

基于转录组测序探究BaP暴露对孕早期卵巢黄体衰老的影响

王明霞¹, 徐翰婷², 陈雪梅^{1*}

¹重庆医科大学公共卫生学院生殖与发育教育部国际合作联合实验室, 重庆

²重庆医科大学基础医学院生殖与发育教育部国际合作联合实验室, 重庆

收稿日期: 2024年3月11日; 录用日期: 2024年4月5日; 发布日期: 2024年4月16日

摘要

目的: 通过转录组测序技术分析孕早期BaP暴露对卵巢黄体的影响。方法: 利用雌性SD大鼠构建BaP染毒孕鼠模型, BaP组孕鼠自怀孕第一天(d1)每日晨灌胃给予0.2 mg/(kg/d) BaP, 对照组则给予等体积的玉米油, 收集d7大鼠卵巢组织。同时利用0.5 $\mu\text{mol/L}$ BaP处理人卵巢颗粒细胞KGN构建细胞模型。利用转录组测序(RNA-seq)技术检测对照组与BaP组卵巢黄体组织中的差异表达基因(DEGs), 并进一步对筛选的DEGs进行生物信息学分析和分子功能验证。结果: RNA-seq共筛选出300个差异表达基因, 其中上调基因86个, 下调基因214个。对DEGs进行GO功能注释和KEGG富集分析, 结果显示BaP暴露可能通过细胞衰老信号通路损伤孕早期卵巢功能。 β -半乳糖苷酶染色结果显示, 与对照组相比, BaP处理组 β -半乳糖苷酶活性显著增加; Western blot、免疫组化和免疫荧光结果显示, BaP暴露下调CDK4、CyclinD1的表达, 同时上调p53、p21和p16的蛋白水平。结论: BaP暴露诱导卵巢颗粒细胞衰老, 进而损伤孕早期大鼠卵巢黄体功能。

关键词

苯并芘, 卵巢, 转录组, 差异表达基因, 细胞衰老

RNA-Seq-Based Technique to Study the Effects of Exposure to Benzo(a)pyrene on Ovarian Corpus Luteum Senescence during Early Pregnancy

Mingxia Wang¹, Hangting Xu², Xuemei Chen^{1*}

¹Joint Laboratory for International Cooperation, Ministry of Education of Reproduction and Development, School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing

*通讯作者 Email: chenxuemei@cqmu.edu.cn

²Joint Laboratory for International Cooperation, Ministry of Education of Reproduction and Development, School of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing

Received: Mar. 11th, 2024; accepted: Apr. 5th, 2024; published: Apr. 16th, 2024

Abstract

Objective: The effect of early pregnancy exposure to BaP on the ovarian corpus luteum was analysed by RNA-Seq. **Methods:** A BaP-contaminated pregnant mice model was constructed using female SD rats. The pregnant rats in the BaP group were given 0.2 mg/(kg/d) BaP by daily morning gavage up from the first day of pregnancy (d1), while the control group was given an equal volume of maize oil, and ovary tissues were collected from d7 rats. Treating human ovarian granulosa cells KGN with 0.5 μ mol/L BaP to establish the cell models. The transcriptome sequencing (RNA-seq) technology was used to detect differentially expressed genes (DEGs) in ovarian corpus luteum tissues of the control and BaP groups, and the screened DEGs were further subjected to bioinformatics analyses and molecular functional validation. **Results:** A total of 300 DEGs were screened by RNA-seq, including 86 up-regulated genes and 214 down-regulated genes. Gene Ontology (GO) functional annotation and KEGG enrichment analyses of DEGs showed that BaP exposure may impair ovarian function in early pregnancy through cellular senescence signalling pathways. The results of β -galactosidase staining showed a significant increase in β -galactosidase activity in the BaP-treated group compared to the control group. Western blot, IHC and IF results revealed that BaP exposure down-regulated the expression of CDK4 and CyclinD1, while up-regulating the protein levels of p53, p21 and p16. **Conclusion:** BaP exposure might induce ovarian granulosa cell senescence, which leads to impair ovarian luteal function in early pregnancy rats.

Keywords

Benzoapyrene, Ovary, Transcriptome, DEGs, Cell Senescence

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是有机物不完全燃烧过程中所产生的有毒环境污染物,广泛存在于汽车尾气、香烟烟雾、工业排放物以及碳烤烟熏食品等中[1]。其中苯并芘(Benzoapyrene, BaP)是 PHAs 中最具代表性的一种,具有致癌和致突变性[2] [3],以及明显的发育、神经和生殖毒性等[4] [5]。人们在日常生活中主要通过吸入、皮肤接触和食入等方式暴露于 BaP [6]。BaP 属于内分泌干扰物,具有明显的卵巢毒性。课题组前期研究发现[7],孕早期暴露于 BaP 会影响卵巢合成与分泌的雌孕激素,进而影响胚胎植入及子宫内膜蜕膜化过程,干扰妊娠的维持。其中,黄体是卵巢内短暂存在的内分泌腺,具有分泌孕酮以维持妊娠的功能[8]。此外,课题组前期研究还证实[9],孕早期暴露 BaP 会诱导小鼠卵巢组织内活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的产生。生理水平的 ROS 对于正常卵巢功能的调控至关重要,比如参与调节卵泡生长、血管生成和黄体类固醇激素合成等[10]。然而,当卵巢暴露于高浓度的氧分子或接触到具有氧化性的化学衍生物时,这些暴露物可损伤卵巢正常生理功能,影响排卵和卵泡质量,或干扰类固醇激素的合成与分泌,甚至引起黄体功能不全(Luteal phase deficiency, LPD)、卵巢早衰(Premature

ovarian failure, POF)等疾病的发生[11][12]。研究发现[13], BaP 可与小鼠精母细胞 DNA 反应形成 BaP-DNA 加合物, 通过 p53/p21 依赖性途径诱导精母细胞衰老。同时, Saha 等人也发现[14], BaP 暴露能通过诱导 ROS 的生成从而促进人星形胶质细胞衰老。女性的生育能力主要取决于卵巢寿命, 卵巢衰老将会破坏排卵、黄体形成等过程, 同时干扰受精、着床和早期胚胎发育这一系列妊娠关键事件, 从而损伤女性生育能力或引起不孕症、流产等不良妊娠结局的发生[15][16]。目前 BaP 暴露所导致的大鼠卵巢黄体功能异常与卵巢细胞衰老之间的关系尚不清楚。因此, 本研究旨在从细胞衰老的角度探讨 BaP 对大鼠卵巢黄体细胞功能的影响, 研究结果将为深入探讨 BaP 影响卵巢功能的机制及更加全面地了解 BaP 的雌性生殖毒性提供新的思路和见解。

2. 材料和方法

2.1. 实验材料

2.1.1. 实验动物

本实验所用 SPF 级雌雄 SD 大鼠(6~8 周龄, 200~260 g), 购于重庆医科大学实验动物中心[实验动物许可号: SCXK(渝)2007-0002, 实验动物使用许可号: SCXK(渝)2007-0001]。小鼠饲养于温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $55 \pm 10\%$ 的环境中, 能够自由饮水摄食。本研究符合所在单位实验动物伦理委员会制定的伦理学标准。

2.1.2. 主要试剂

本实验所用到的 BaP、玉米油、 β -actin 抗体、DMEM 高糖培养基、两性霉素 B 均购自美国 Sigma 公司; 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒、DEPC 水、BCA 蛋白测定试剂盒、RIPA 蛋白裂解液、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、青霉素-链霉素双抗、抗荧光淬灭封片液(含 DIPA)均购自上海碧云天生物技术有限公司; SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液购自新赛美生物科技有限公司; 人绒毛膜促性腺激素(hCG)购自美国 Millipore 公司; 胎牛血清购自深圳中科百抗生物技术有限公司; CyclinD1 抗体、p16 抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司; p21 抗体购自武汉华美生物科技有限公司; p53 抗体购自 CST 公司; HRP 标记二抗、PBS 缓冲液粉末、脱脂奶粉、二步法试剂盒(小鼠/兔增强聚合物法检测系统)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

2.1.3 主要仪器

本研究所使用的仪器主要有: 正置显微镜、倒置显微镜(日本 Olympus 公司), 红外荧光化学发光系统(美国 Bio-Rad 公司), 冷冻型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司), 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司), 激光共聚焦扫描显微镜(日本 Nikon 公司), 移液枪(德国 Eppendorf 公司)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 动物实验与材料收集

将 SD 大鼠于饲养环境中进行一周的适应性喂养后, 于每晚 17:00~18:00 点按雌雄 3:1 的比例进行合笼交配。次日晨 8 时分笼, 用棉拭子取阴道分泌物涂片, 并将显微镜下观察到精子的雌性 SD 大鼠进行标记, 记录此天为怀孕第一天(孕“d1”天)。将标记后的雌鼠随机分为对照组和 BaP 组(20 只/组)。BaP 组孕鼠从孕 d1 至孕 d7 天于每日晨体重测量后灌胃给予 0.2 mg/kg/d 浓度 BaP (溶于玉米油内)。而对照组则称重后按 0.1 mL/10g 动物体重灌胃给予相应体积玉米油。在孕 d7 天腹腔注射麻醉处死孕鼠后, 于冰上迅速分离并收集卵巢组织, 并在显微镜下进一步分离黄体组织, 用于后续实验。

2.2.2. 细胞培养

本研究所用的人卵巢颗粒细胞系 KGN 细胞购自美国 ATCC 公司。KGN 细胞在含有 100 U/ml 青霉素

- 链霉素、10 U/ml 两性霉素 B 和 20%胎牛血清的 DMEM-F12 的培养基(培养环境: 37°C 温度、5% CO₂ 浓度)中贴壁生长。将 KGN 细胞分为对照组、hCG 组和 BaP 组。对照组加入 DMSO (终浓度不超过 0.1%) 作为对照。hCG 组: 使用 hCG (1.0 IU/mL, 溶于 Hank's 平衡盐溶液中)诱导 KGN 细胞发生黄体化, 处理 KGN 细胞 24 h。BaP 组: 利用 0.5 μmol/L BaP (溶于 DMSO 中)联合 1.0 IU/mL hCG 处理 KGN 细胞 24 h, 以进行后续实验。

2.2.3. 转录组测序(RNA Sequencing, RNA-seq)

使用 TRIzol 试剂从收集到的对照组和 BaP 组大鼠卵巢黄体组织(3 个样本/组)中提取总 RNA, 按送检要求稀释后交由深圳华大基因科技有限公司进行 RNA-seq。应用 R 语言软件分析 RNA-seq 所获得的数据, 筛选对照组与 BaP 组的差异表达基因(Differential expression gene, DEGs), 筛选标准设定为调整 P 值 (Adjusted P value, P adj.) < 0.05, 差异倍数(fold change, FC)对数绝对值|logFC| > 2。根据 DEGs 绘制火山图和聚类热图, 分析其分布情况、差异大小及差异显著性等信息; 利用数据库基因本体(Gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书 KEGG 注释进行功能富集分析。

2.2.4. β-半乳糖苷酶染色法

使用 β-半乳糖苷酶染色法检测卵巢组织及 KGN 细胞内细胞衰老情况。针对于黄体组织, 将大鼠卵巢的冰冻切片复温后, 使用 PBS 浸泡洗涤切片, 加入 100 μl β-半乳糖苷酶染色固定液室温固定 20 min; 对于 KGN 细胞, 使用 HBSS 洗涤处理后的 KGN 细胞, 随后加入 500 μl β-半乳糖苷酶染色固定液室温固定 20 min。最终在固定后的切片及细胞中加入适量配制好的染色工作液, 37°C 孵育过夜。次日, 于显微镜下观察, 采集图片。

2.2.5. 蛋白免疫印迹法(Western Blot)

使用 RIPA 蛋白裂解液提取大鼠卵巢及 KGN 细胞内的蛋白, 利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白含量, 根据酶标仪检测样品的吸光度值计算样品浓度。在提取的蛋白内加入 SDS-PAGE 上样缓冲液, 并放入 100°C 金属浴内变性 10 min, 后置于-80°C 保存。配置 12%分离胶、5%浓缩胶进行上样电泳, 将电泳完毕凝胶上的蛋白转印至 PVDF 膜上。后取出条带, 使用 5%脱脂奶粉(溶于 PBST)于 37°C 摇床封闭 2 h, 并于 4°C 孵育一抗过夜。抗体信息如下: 抗 p21 抗体(1:200)、抗 p53 抗体(1:1000)、抗 p16 抗体(1:200)、抗 CDK4 抗体(1:500)、抗 CyclinD1 抗体(1:1000)和抗 β-actin 抗体(1:3000)。次日, 用 PBST 浸洗条带后, 加入二抗(1:3000)于 37°C 孵育 1 h, 随后使用红外荧光化学发光系统显色。以 β-actin 为内参, 使用 Quantity One 软件分析显色条带灰度值。

2.2.6. 免疫组化(Immunohistochemistry, IHC)

取大鼠卵巢组织进行石蜡包埋, 使用石蜡切片机对包埋组织进行切片, 将获得的切片烘干后进行免疫组化实验。将烘干的切片置于二甲苯中脱蜡后, 于梯度酒精内脱水, 并用枸橼酸盐溶液进行抗原热修复。加入适量的内源性过氧化物酶阻断剂消除切片中的内源性干扰后, 孵育一抗(CDK4, 1:100)于 4°C 过夜。次日, 使用 PBS 洗去切片上过量的抗体后, 滴加适量的山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物 37°C 孵育 20 min, 利用 DAB 进行显色反应。使用中性树胶对切片进行封片, 于显微镜下观察, 采集图片信息。

2.2.7. 免疫荧光(Immunofluorescence, IF)

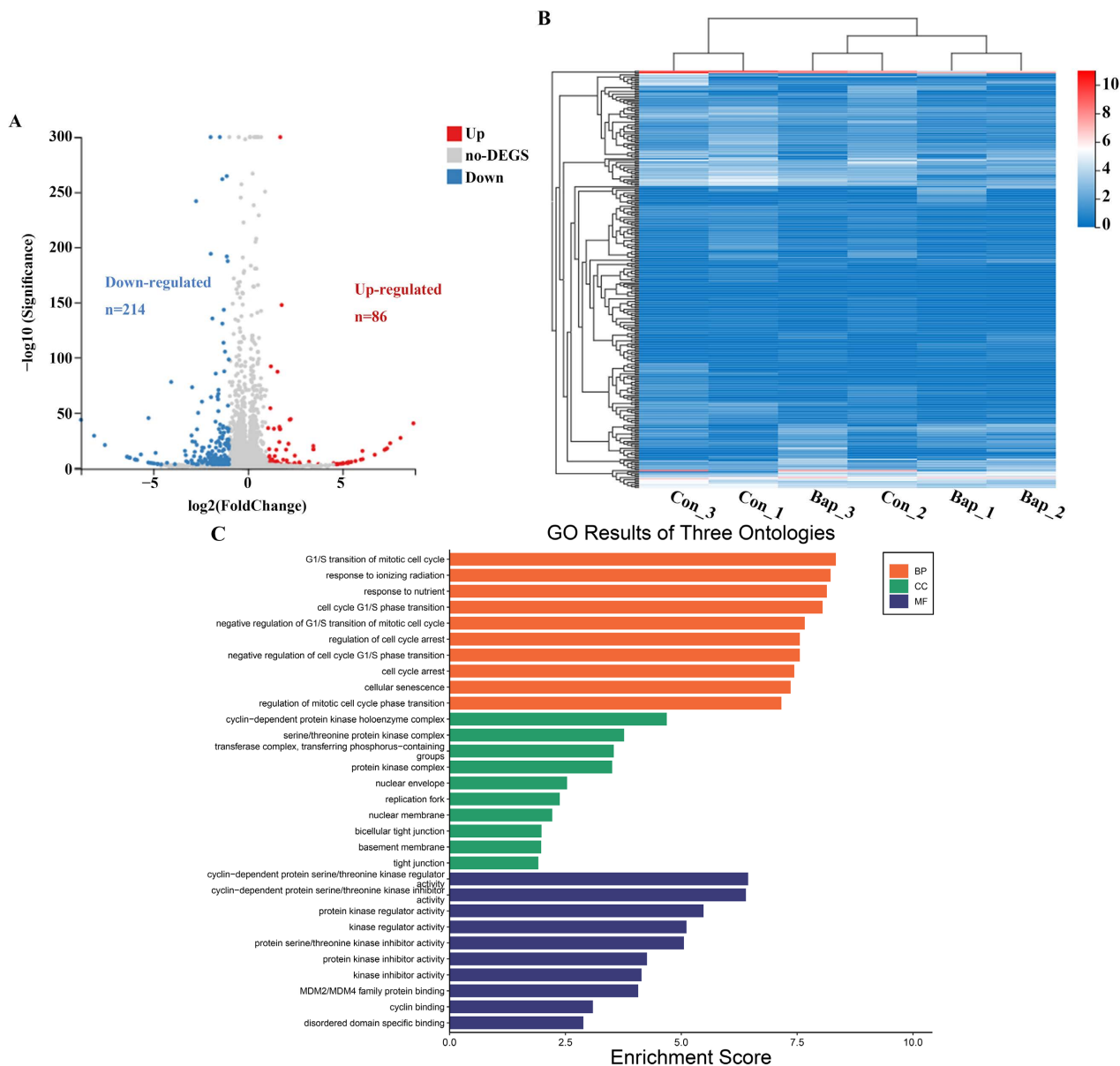
将 KGN 细胞接种于 24 孔板爬片中, 加药处理 24 h 后弃去培养基。使用 PBS 浸洗爬片后, 利用 4% 多聚甲醛室温固定爬片上的 KGN 细胞, 后用 5%山羊血清封闭液封闭, 加入一抗(CDK4, 1:100)于 4°C 孵育过夜。次日复温后, 使用荧光二抗稀释液(1:200)避光孵育 1 h, 后用含 DIPA 的抗荧光淬灭剂封片, 并于共聚焦显微镜下观察。

2.2.8. 统计学分析

运用 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据统计并绘制统计图, 每个实验至少重复 3 次。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{X} \pm S$)表示, 分别使用 t 检验和单因素方差分析对两组和多组数据进行统计分析。 $p < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3. 结果

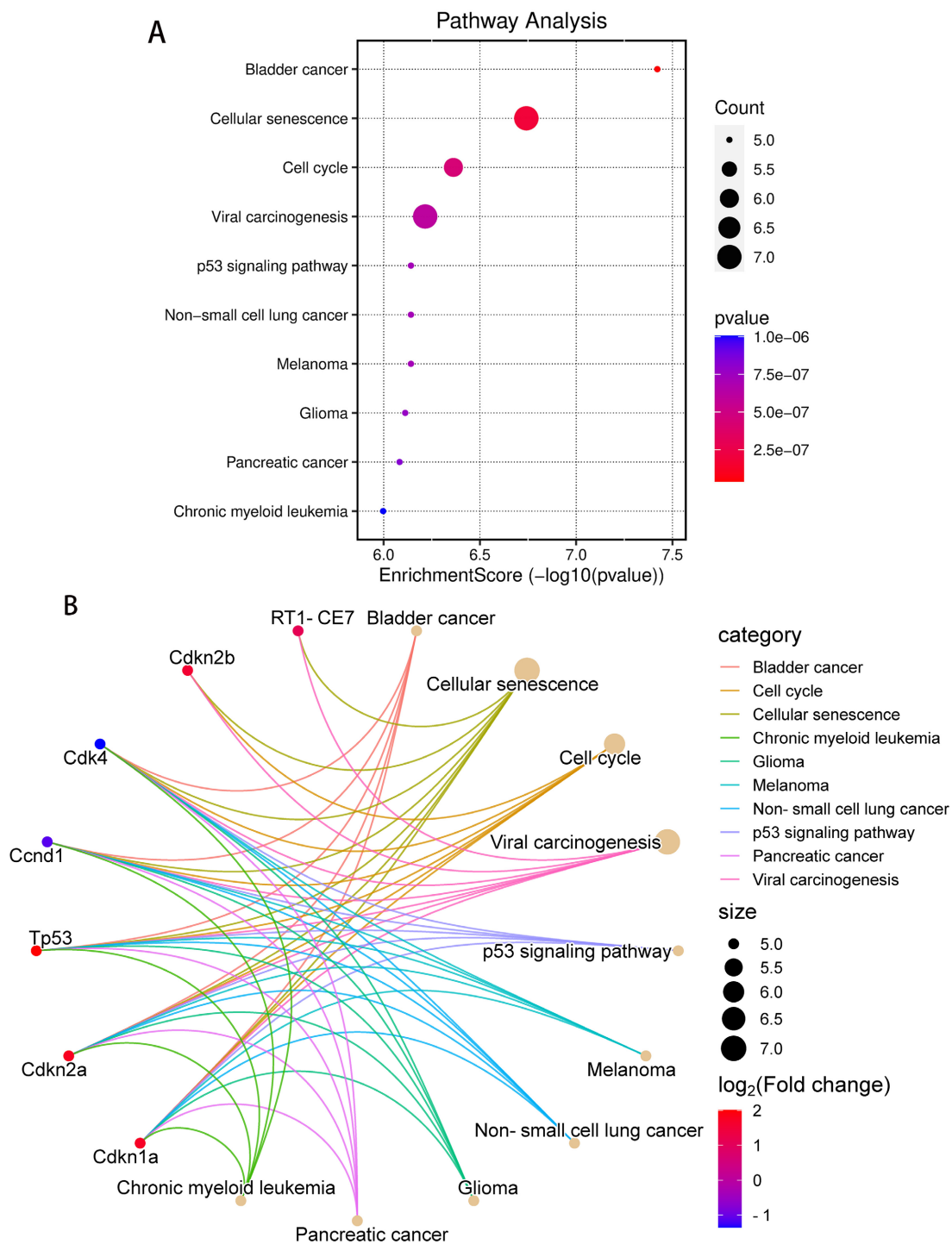
3.1. BaP 暴露干扰了孕早期卵巢细胞衰老过程



注: (A) 差异表达基因的火山图。 $\log_2(\text{foldchange}) > 2$ 和 $p < 0.05$ 的基因分别以蓝色(下调基因)和红色(上调基因)表示。(B) 差异表达基因表达变化的热图。(C) 显著差异表达基因的 GO 功能富集分析图。橙黄色表示生物学过程(Biological process, BP), 深青色表示细胞成分(Cellular component, CC), 深蓝色表示分子功能(Molecular function, MF)。

Figure 1. Differentially expressed genes and related pathways in luteal tissue of BaP-treated rat ovaries

图 1. BaP 处理的大鼠卵巢黄体组织的差异表达基因及相关通路。



注：(A) 差异基因表达气泡图，显示富集的信号通路；(B) 差异基因表达 cnetplot 图，显示与这些信号通路相关的特定基因。

Figure 2. KEGG functional enrichment analysis of significantly differentially expressed genes

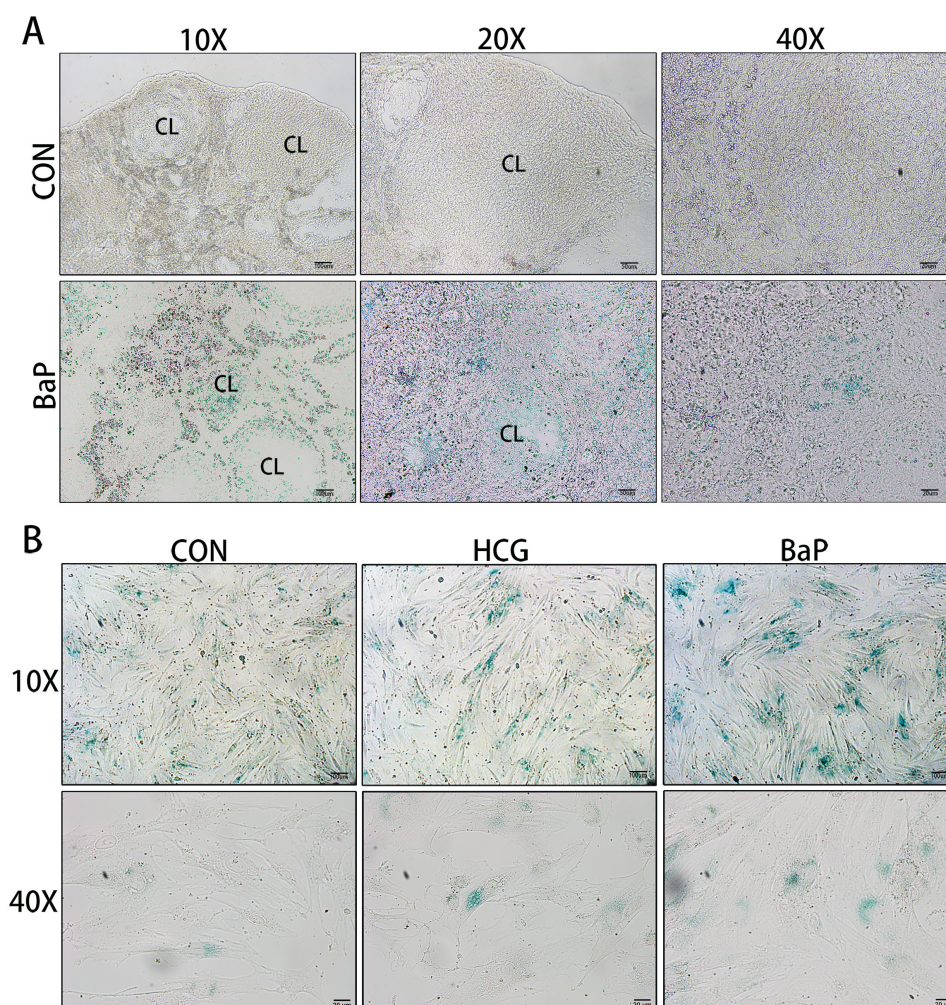
图 2. 显著差异表达基因的 KEGG 功能富集分析

RNA-seq 数据集的 DEGs 分析显示，本次测序共存在有 300 个基因在对照组和 BaP 组间存在着差异表达(86 个基因上调，214 个基因下调)，其中 p21、p53、Bcl6、Slc34a2、Cdkn2a、Prss35、Cdkn2b 等基

因表达显著上调, 而 *Akr1c3*、*Cyp17a1*、*Ccnd1*、*Cdk4*、*Nemp1*、*Rcan1* 等基因表达显著下调(图 1(A)和图 1(B))。随后对 BaP 组中显著 DEGs 进行 GO 功能分析, 结果显示 DEGs 主要聚集在 10 个显著的 GO 中, 包括调控细胞周期 G1/S 期的转换、电离辐射反应、细胞衰老和细胞周期阻滞等生物过程(图 1(C))。此后, 我们进一步对这些 DEGs 进行了 KEGG 富集分析, 气泡图结果显示这些 DEGs 主要在细胞衰老、病毒致癌和细胞周期通路中富集, 而 cnetplot 图则显示在这些 DEGs 中表达上调的 p21、p53、*Cdkn2a* 和 *Cdkn2b*, 与表达下调的 *Ccnd1*、*Cdk4* 参与了细胞衰老过程的调控(图 2)。以上这些结果提示, BaP 暴露可能通过干扰细胞衰老相关调控因子表达, 损伤孕早期卵巢功能。

3.2. BaP 暴露促进孕早期卵巢颗粒细胞衰老

为了明确 BaP 暴露对孕早卵巢细胞衰老的影响, 我们使用 β -半乳糖苷酶染色法检测了卵巢组织和体外黄体化 KGN 细胞内细胞衰老的情况。结果显示, 与对照组相比, BaP 处理组中 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞的数量显著增加, 且 KGN 细胞中衰老阳性细胞在 BaP 处理组中的数量变化趋势与体内趋势相一致(图 3)。

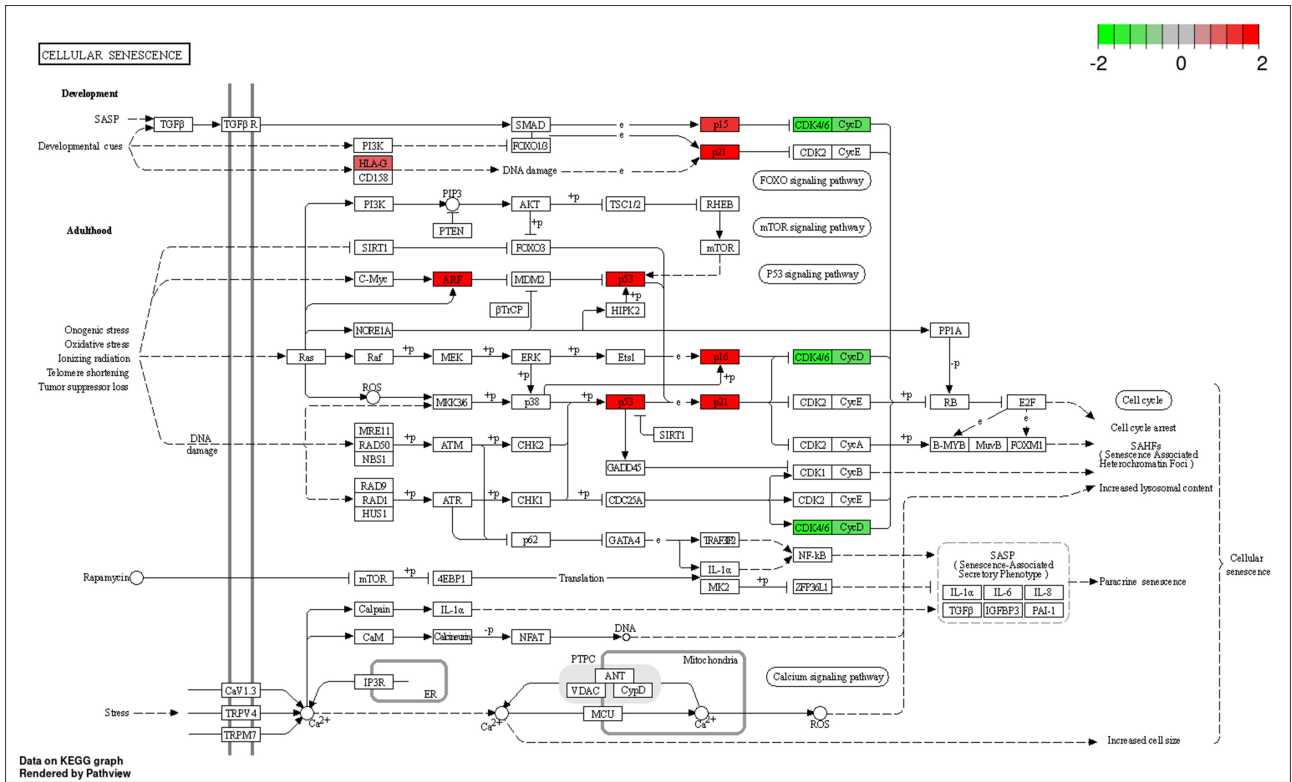


注: β -半乳糖苷酶染色检测, (A) 大鼠卵巢组织; (B) KGN 细胞内细胞衰老情况。CL: 黄体; 蓝色标记 β -半乳糖苷酶阳性细胞。

Figure 3. Detection of cellular senescence

图 3. 细胞衰老情况的检测

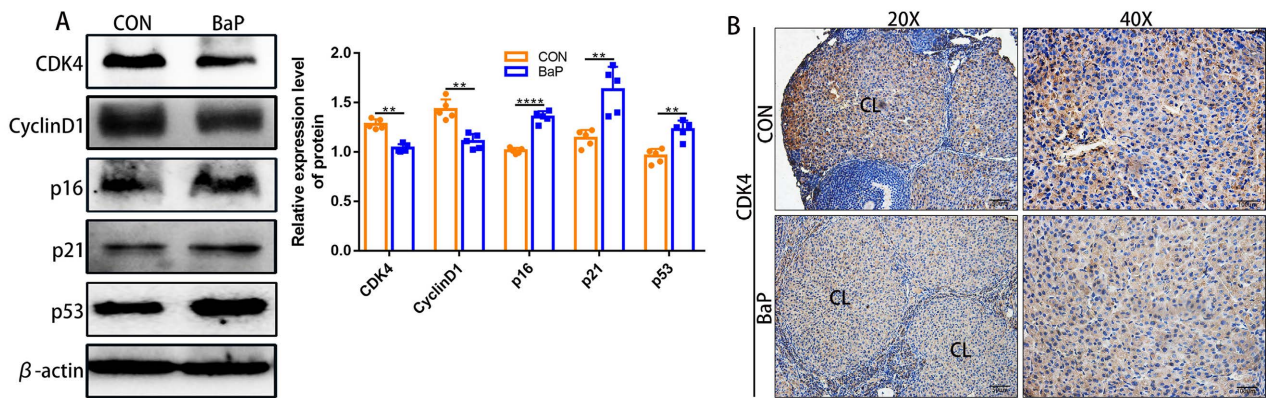
3.3. BaP 暴露诱导细胞周期阻滞，促进细胞衰老因子的表达



注：用 Pathview 绘制细胞衰老通路的基因表达图。红色代表上调基因，绿色代表下调基因。

Figure 4. Diagram of cellular senescence signalling pathways

图 4. 细胞衰老信号通路图



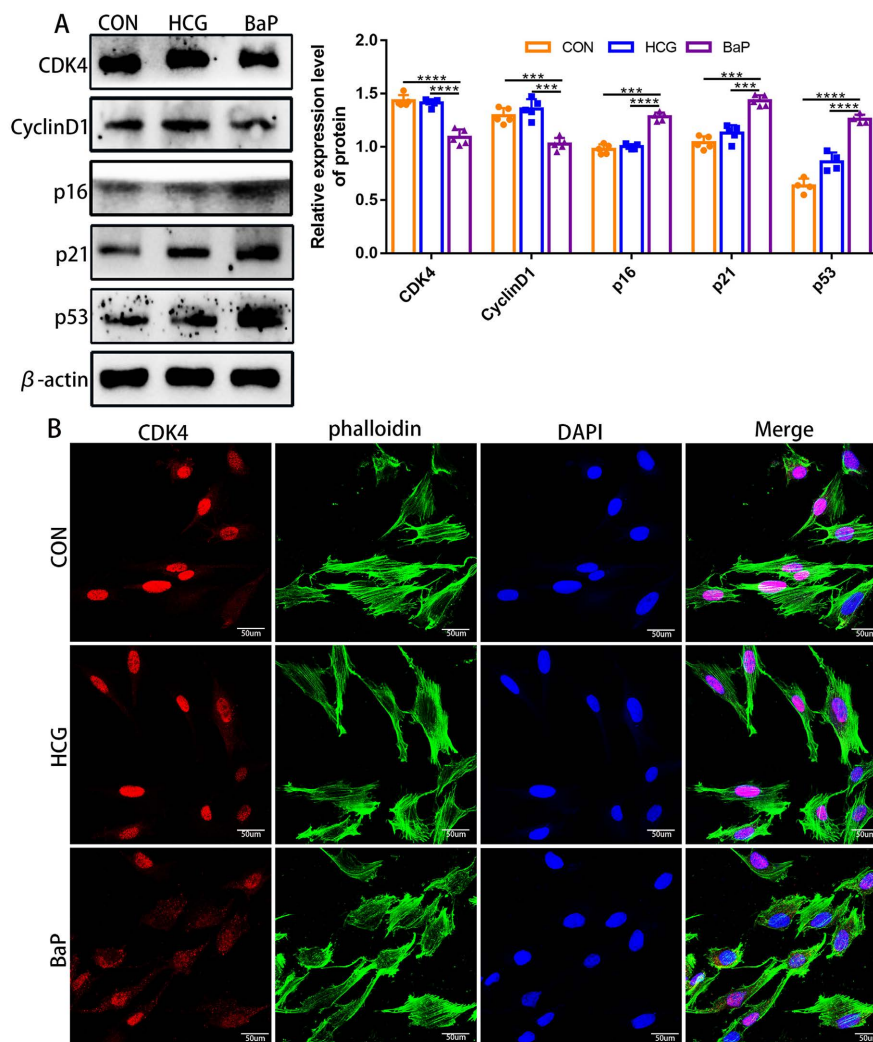
注：(A) Western blot 检测卵巢组织 CDK4、CyclinD1、p16、p21 和 p53 的蛋白水平及其灰度分析结果。(B) IHC 检测卵巢黄体中 CDK4 的表达。CL：黄体。* $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ ，**** $p < 0.0001$ 。

Figure 5. BaP exposure induces cell cycle arrest and cellular senescence in ovarian tissue

图 5. BaP 暴露诱导卵巢组织细胞周期阻滞和细胞衰老

基于 RNA-seq 的分析结果，我们绘制了细胞衰老的信号通路图，并根据图 1 和图 2 中 RNA-seq 结果在图中标记了衰老相关 DEGs 的变化情况(图 4)。随后，我们进一步验证了 BaP 处理对这些细胞衰老关键因子的影响。Western blot 和 IHC 结果显示，BaP 暴露会下调孕早期大鼠卵巢组织内细胞衰老相关因子

CDK4、CyclinD1 的表达,同时上调 p53、p21 和 p16 的水平(图 5)。体外 Western blot 和 IF 结果与体内趋势一致,差异有统计学意义($p < 0.05$) (图 6)。上述实验共同提示, BaP 暴露会诱导细胞周期阻滞,促进孕早期卵巢黄体细胞衰老。



注: (A) Western blot 检测 KGN 细胞 CDK4、CyclinD1、p16、p21 和 p53 的蛋白水平及其灰度分析结果。(B) IF 检测 KGN 中 CDK4 的表达。红色表示 CDK4 阳性细胞,绿色表示标记鬼笔环酰胺染色的细胞骨架,蓝色表示 DAPI 染色的细胞核。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.001$ 。

Figure 6. BaP exposure induces cell cycle arrest and cellular senescence in KGN cells
图 6. BaP 暴露诱导 KGN 细胞周期阻滞和细胞衰老

4. 讨论

BaP 是一种环境内分泌干扰物,可通过多种途径被人体吸收[17]。我们的前期研究发现[7],孕早期暴露 BaP 减少了维持妊娠所必须的雌、孕激素的合成与分泌。卵巢作为女性体内重要的生殖器官之一,其内短暂性存在的内分泌器官黄体是妊娠期分泌雌孕激素的主要场所,对胎儿的发育起着不可或缺的调控作用[8]。但目前关于孕早期 BaP 暴露影响卵巢黄体功能的机制研究并不深入,仍需进一步探索。因此,

本研究中我们结合了生物信息学分析以及体内外实验,进一步探索了 BaP 暴露对孕早期卵巢黄体的影响。我们分别对对照组及 BaP 组的大鼠卵巢黄体组织进行了 RNA-seq,以探索 BaP 影响孕早期卵巢黄体功能的潜在机制。RNA-seq 分析显示, BaP 暴露引起了大鼠卵巢组织内 300 个基因出现差异表达,其中检测到 86 个上调基因,214 个下调基因。为了揭示这些 DEGs 的潜在生物学功能,我们选择了表达较为显著的 DEGs 进行了 GO 和 KEGG 富集分析。在 GO 和 KEGG 富集分析中,我们发现这些较为显著的 DEGs 主要参与了细胞衰老信号通路的调控,提示 BaP 可能通过干扰细胞衰老过程损伤孕早期卵巢黄体功能。

细胞衰老作为信号转导过程中的一种,可受到电离辐射、代谢功能障碍、化疗药物、癌基因的激活或氧化损伤等多因素诱导[18],其主要特征是永久性的细胞周期停滞,并可导致发育过程中及损伤后组织重塑能力下降,促进炎症反应,或诱导衰老生物体的肿瘤发生[18][19][20]。衰老表型主要包括 DNA 损伤反应的激活或细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(如 p16、p21 等)表达上调,进而导致细胞周期阻滞、产生衰老相关分泌表型(SASP)、衰老相关 β -半乳糖苷酶活性增加等[18][21]。同时,衰老信号通路的激活往往会降低细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)的活性[22][23]。而衰老细胞中,p21 和 p16 会与细胞周期蛋白 Cyclin-CDK 发生抑制性结合,参与细胞周期进展的阻滞,从而进一步促进细胞衰老的发生[24][25]。研究发现[26],在肺癌细胞 A549 中,BaP 通过增加 p21 的表达抑制了 A549 的细胞增殖,延迟了细胞周期进程。Yu Feng 等人也发现[27],长期暴露于 BaP 可增加小鼠肺成纤维细胞 mLFC 中 p53 和 p21 蛋白表达水平,诱导 mLFC 发生衰老。前期关于 BaP 致卵巢衰老的研究主要集中在产前 BaP 暴露对卵巢功能的影响[28][29]。如, Lim 等人研究指出[29],产前 BaP 暴露会减少小鼠卵巢中卵泡数量,降低卵巢储备能力,导致卵巢在产后出现提前衰老的现象。由于妊娠期间卵巢对 BaP 的敏感性更高,因此探究 BaP 暴露对于妊娠期卵巢黄体的影响是非常有必要的。

在本研究中,我们使用 β -半乳糖苷酶染色检测发现,BaP 暴露会增强大鼠卵巢黄体细胞和黄体化 KGN 细胞中 β -半乳糖苷酶活性。同时,我们还通过 Western blot、IHC 和 IF 实验结果验证得出, BaP 暴露上调了衰老相关表型如衰老指标 p21 和 p16 的表达水平,抑制了细胞周期调控蛋白 CDK4 和 CyclinD1 的表达,导致细胞周期阻滞,诱导细胞衰老。综上,我们推测: BaP 暴露诱导孕早期卵巢黄体衰老可能是通过促进 BaP-DNA 加合物形成,导致 DNA 损伤和激活 p53 信号通路,进而上调 p53 下游靶基因 p21 的表达,造成颗粒细胞细胞周期停滞和细胞衰老的发生。然而本研究依然存在着局限性,未能深入探索 BaP 激活 p53 信号通路诱导黄体颗粒细胞衰老确切分子机制,这也是课题组下一步计划研究和完善的重点。综上所述,本研究从卵巢黄体颗粒细胞衰老的角度探讨 BaP 暴露导致孕早期卵巢黄体功能异常的机制,研究结果为更加全面深入了解 BaP 影响卵巢黄体功能提供新的方向和线索。

参考文献

- [1] Chen, Y., Zhao, R., Xue, J. and Li, J. (2013) Generation and Distribution of PAHs in the Process of Medical Waste Incineration. *Waste Management*, **33**, 1165-1173. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.01.011>
- [2] Shi, Q., Godschalk, R.W.L. and Van Schooten, F.J. (2017) Inflammation and the Chemical Carcinogen Benzo[A]Pyrene: Partners in Crime. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, **774**, 12-24. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.08.003>
- [3] Zou, H., Zhang, M., Chen, J., Anigu, S., Jiang, Y. and Chen, T. (2024) AHR-Mediated DNA Damage Contributes to BaP-Induced Cardiac Malformations in Zebrafish. *Science of the Total Environment*, **906**, Article ID: 167636. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167636>
- [4] Idowu, O., Semple, K.T., Ramadass, K., O'Connor, W., Hansbro, P. and Thavamani, P. (2019) Beyond the Obvious: Environmental Health Implications of Polar Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environment International*, **123**, 543-557. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.051>
- [5] Zhang, M., Miao, Y., Chen, Q., Cai, M., Dong, W., Dai, X., Lu, Y., Zhou, C., Cui, Z. and Xiong, B. (2018) BaP Exposure Causes Oocyte Meiotic Arrest and Fertilization Failure to Weaken Female Fertility. *The FASEB Journal*, **32**, 342-352. <https://doi.org/10.1096/fj.201700514r>

- [6] Gao, P., Da Silva, E., Hou, L., Denslow, N.D., Xiang, P. and Ma, L.Q. (2018) Human Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Metabolomics Perspective. *Environment International*, **119**, 466-477. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.017>
- [7] Xu, H., Mu, X., Ding, Y., Tan, Q., Liu, X., He, J., Gao, R., Li, N., Geng, Y., Wang, Y. and Chen, X. (2021) Melatonin Alleviates Benzo(A)Pyrene-Induced Ovarian Corpus Luteum Dysfunction by Suppressing Excessive Oxidative Stress and Apoptosis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **207**, Article ID: 111561. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111561>
- [8] Przygodzka, E., Plewes, M.R. and Davis, J.S. (2021) Luteinizing Hormone Regulation of Inter-Organelle Communication and Fate of the Corpus Luteum. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, Article No. 9972. <https://doi.org/10.3390/ijms22189972>
- [9] 徐翰婷. B(A)P 通过 TRAF2-NF κ B-Caspase1 轴诱导妊娠早期卵巢颗粒细胞凋亡[D]: [博士学位论文]. 重庆: 重庆医科大学, 2022. <https://doi.org/10.27674/d.cnki.gcyku.2021.000116>
- [10] Shi, Y.Q., Zhu, X.T., Zhang, S.N., Ma, Y.F., Han, Y.H., Jiang, Y. and Zhang, Y.H. (2023) Premature Ovarian Insufficiency: A Review on the Role of Oxidative Stress and the Application of Antioxidants. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, **14**, Article ID: 1172481. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1172481>
- [11] Xie, T., Ye, W., Liu, J., Zhou, L. and Song, Y. (2021) The Emerging Key Role of Klotho in the Hypothalamus-Pituitary-Ovarian Axis. *Reproductive Sciences*, **28**, 322-331. <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00277-5>
- [12] Cai, M., Wang, J., Sun, H., Guo, Q., Zhang, C., Yao, H., Zhao, C., Jia, Y. and Zhu, H. (2023) Resveratrol Attenuates Hydrogen Peroxide-Induced Injury of Rat Ovarian Granulosa-Lutein Cells by Resisting Oxidative Stress via the SIRT1/Nrf2/ARE Signaling Pathway. *Current Pharmaceutical Design*, **29**, 947-956. <https://doi.org/10.2174/1381612829666230403133322>
- [13] Ling, X., Yang, W., Zou, P., Zhang, G., Wang, Z., Zhang, X., Chen, H., Peng, K., Han, F., Liu, J., Cao, J. and Ao, L. (2018) TERT Regulates Telomere-Related Senescence and Apoptosis through DNA Damage Response in Male Germ Cells Exposed to BPDE *in Vitro* and to B[A]P *in Vivo*. *Environmental Pollution*, **235**, 836-849. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.099>
- [14] Saha, S., Mahapatra, K.K., Mishra, S.R., Mallick, S., Negi, V.D., Sarangi, I., Patil, S., Patra, S.K. and Bhutia, S.K. (2020) *Bacopa monnieri* Inhibits Apoptosis and Senescence through Mitophagy in Human Astrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, **141**, Article ID: 111367. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111367>
- [15] Cui, J. and Wang, Y. (2024) Premature Ovarian Insufficiency: A Review on the Role of Tobacco Smoke, Its Clinical Harm, and Treatment. *Journal of Ovarian Research*, **17**, Article No. 8. <https://doi.org/10.1186/s13048-023-01330-y>
- [16] Puy, V., Barroca, V., Messiaen, S., Ménard, V., Torres, C., Devanand, C., Moison, D., Lewandowski, D., Guerquin, M.J., Martini, E., Frydman, N. and Livera, G. (2021) Mouse Model of Radiation-Induced Premature Ovarian Insufficiency Reveals Compromised Oocyte Quality: Implications for Fertility Preservation. *Reproductive BioMedicine Online*, **43**, 799-809. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.06.027>
- [17] Bukowska, B. and Sicińska, P. (2021) Influence of Benzo(A)Pyrene on Different Epigenetic Processes. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, Article No. 13453. <https://doi.org/10.3390/ijms222413453>
- [18] Hernandez-Segura, A., Nehme, J. and Demaria, M. (2018) Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*, **28**, 436-453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>
- [19] Meyer, K., Hodwin, B., Ramanujam, D., Engelhardt, S. and Sarikas, A. (2016) Essential Role for Premature Senescence of Myofibroblasts in Myocardial Fibrosis. *Journal of the American College of Cardiology*, **67**, 2018-2028. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.02.047>
- [20] D'Adda Di Fagagna, F. (2008) Living on a Break: Cellular Senescence as a DNA-Damage Response. *Nature Reviews Cancer*, **8**, 512-522. <https://doi.org/10.1038/nrc2440>
- [21] Gorgoulis, V., Adams, P.D., Alimonti, A., Bennett, D.C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovskiy, V., Jurk, D., Maier, A.B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J.F., Robbins, P.D., Schmitt, C.A., Sedivy, J., Vougas, K., Von Zglinicki, T., Zhou, D., Serrano, M. and Demaria, M. (2019) Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, **179**, 813-827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>
- [22] McConnell, B.B., Starborg, M., Brookes, S. and Peters, G. (1998) Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases Induce Features of Replicative Senescence in Early Passage Human Diploid Fibroblasts. *Current Biology*, **8**, 351-354. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70137-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70137-X)
- [23] Coppé, J.P., Rodier, F., Patil, C.K., Freund, A., Desprez, P.Y. and Campisi, J. (2011) Tumor Suppressor and Aging Biomarker P16(INK4a) Induces Cellular Senescence without the Associated Inflammatory Secretory Phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 36396-36403. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257071>
- [24] Roger, L., Tomas, F. and Gire, V. (2021) Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, Article No. 13173. <https://doi.org/10.3390/ijms222313173>

- [25] Engeland, K. (2022) Cell Cycle Regulation: P53-P21-RB Signaling. *Cell Death & Differentiation*, **29**, 946-960. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>
- [26] Yu, F., Ye, K., Hu, Y., Li, J., An, Y. and Qu, D. (2019) Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Derived from Vehicle Exhaust Gas Induces Premature Senescence in Mouse Lung Fibroblast Cells. *Molecular Medicine Reports*, **19**, 4326-4334. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10086>
- [27] Hýžd'alová, M., Procházková, J., Strapáčová, S., Svržková, L., Vacek, O., Fedr, R., Andryšik, Z., Hrubá, E., Líbalová, H., Kléma, J., Topinka, J., Mašek, J., Souček, K., Vondráček, J. and Machala, M. (2021) A Prolonged Exposure of Human Lung Carcinoma Epithelial Cells to Benzo[A]Pyrene Induces P21-Dependent Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT)-Like Phenotype. *Chemosphere*, **263**, Article ID: 128126. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128126>
- [28] Kummer, V., Mašková, J., Zralý, Z. and Faldyna, M. (2013) Ovarian Disorders in Immature Rats after Postnatal Exposure to Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Applied Toxicology*, **33**, 90-99. <https://doi.org/10.1002/jat.1714>
- [29] Lim, J., Lawson, G.W., Nakamura, B.N., Ortiz, L., Hur, J.A., Kavanagh, T.J. and Luderer, U. (2013) Glutathione-Deficient Mice Have Increased Sensitivity to Transplacental Benzo[A]Pyrene-Induced Premature Ovarian Failure and Ovarian Tumorigenesis. *Cancer Research*, **73**, 908-917. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3636>