

分类号：

密级：

UDC：

学号： 406500210026

南昌大学硕士研究生

学位论文

聚苯乙烯纳米塑料和三氯生联合暴露对卵巢的毒性 效应及其作用机制

Toxic Effects and Mechanisms of Combined Exposure to Polystyrene
Nanoplastics and Triclosan on Ovarian Function

王文灿

培养单位（院、系）：公共卫生学院

指导教师姓名、职称：郑莉萍 教授

申请学位的学科门类：医学

学科专业名称：公共卫生与预防医学

论文答辩日期： 2024 年 5 月 24 日

答辩委员会主席： 郑月慧

评阅人： 叶耀辉

罗韬

2024 年 5 月 24 日

摘要

背景与目的:

近年来,塑料颗粒已经成为全球公认的最具威胁的新型污染物。相较于微塑料(Microplastics, MPs, 直径 $< 5\text{ mm}$), 纳米塑料(Nanoplastics, NPs, 直径 $< 100\text{ nm}$) 由于具有更小的尺寸和更大的比表面积, 表现出更强的生物毒性和吸附其他环境污染物的能力而尤为值得关注。有关纳米塑料和其他污染物联合暴露的毒性效应多在水生生物中研究, 而在哺乳动物特别是生殖系统的毒性研究仍然较少。三氯生(Triclosan, TCS) 是一种常见的药品和个人护理产品(PPCPs), 在人们的日常生活中得到广泛应用。先前的研究表明, 聚苯乙烯纳米塑料(PS-NPs) 可以稳定吸附三氯生, PS-NPs 和 TCS 的单独暴露都可能导致雌性小鼠卵巢损伤, 干扰雌激素的分泌, 产生生殖毒性。然而, 有关纳米塑料和三氯生联合暴露对卵巢的毒性及其机制的影响尚未阐明。本研究采用成年雌性昆明小鼠和人卵巢颗粒细胞(KGN) 作为研究对象, 系统性地从组织形态学和分子生物学角度探究 PS-NPs 和 TCS 联合暴露诱导卵巢毒性损伤及其作用机制, 为明确 PS-NPs 和 TCS 联合暴露对人类生殖系统的危害提供科学依据。

实验方法:

1. 实验中使用了 8 周龄健康的雌性昆明小鼠, 随机分为对照组、NPs 单独暴露组、TCS 单独暴露组、NPs 和 TCS 联合暴露组; 小鼠每只每天分别灌胃玉米油、1 mg PS-NPs、50 mg/kg TCS、1 mg PS-NPs+50 mg/kg TCS。
2. 灌胃期间收集小鼠体重, 动情周期数据, 30 天后收集血清和卵巢组织样本, 进行 HE 染色观察卵巢形态及卵泡数量, 通过 ELISA 方法检测血清促卵泡激素(FSH)、雌二醇(E_2)、孕酮(P) 激素。
3. 透射电镜检测小鼠卵巢组织自噬小体形成, 并通过 Western blot 检测自噬相关蛋白 ATG5、P62、LC3b-I 和 LC3b-II 的表达水平, 以探究自噬是否参与卵巢损伤过程。
4. 通过 TUNEL 染色试剂盒检测小鼠卵巢组织凋亡情况, Western blot 检测凋亡相关蛋白 BAX、BCL-2、CASPASE-3 的表达水平。
5. 建立体外培养 KGN 细胞系, 通过 CCK-8 法检测 NPs 和 TCS 暴露细胞

24 h 后的活力, 分为对照组 (0.03% DMSO)、PS-NPs 组 (150 $\mu\text{g/mL}$)、TCS 组 (15 μM , 0.03% DMSO) 和 PS-NPs+TCS 组 (150 $\mu\text{g/mL}$ +15 μM , 0.03% DMSO)。显微镜观察细胞形态, 采用氧化应激检测试剂盒检测细胞活性氧 (ROS)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、过氧化氢酶 (CAT) 的水平; 通过 TMRE 试剂盒检测细胞线粒体膜电位情况; 采用 Cyto-ID 检测试剂盒检测细胞内自噬小体和自噬流的变化。

6. 为了进一步探究细胞毒性机制, 通过 Western blot 检测抗氧化应激通路蛋白 NRF2、KEAP1、HO-1、SESTRIN2 的表达情况。使用 AnnexinV& PI 双染检测试剂盒检测细胞凋亡情况, Western blot 检测细胞凋亡蛋白 BAX、BCL-2、CASPASE-3 和细胞自噬蛋白 LC3B-I、LC3B-II、P62 和 ATG5 的表达情况。

研究结果:

1. 小鼠灌胃 30 天后, 对照组和 NPs 组小鼠体重均有所增长, 然而 TCS 单独暴露组和 NPs、TCS 联合暴露组的小鼠体重下降, 共同暴露的卵巢指数显著小于对照组和单独暴露组 ($P < 0.05$)。

2. 与对照组和单独暴露组相比, NPs 和 TCS 联合暴露组的动情周期显著延长 ($P < 0.05$), 卵巢组织中卵泡数量显著下降 ($P < 0.05$), 小鼠血清激素 FSH、E₂、P 显著下降 ($P < 0.05$)。

3. CCK-8 法显示与对照组和单独暴露组相比, NPs 和 TCS 的联合暴露显著降低了 KGN 细胞活力 ($P < 0.05$); 氧化应激检测试剂盒表明相比对照和单独暴露, NPs 和 TCS 联合暴露组的 ROS 水平和 MDA 活性显著上升 ($P < 0.05$), SOD 酶活性和 CAT 酶活性显著下降 ($P < 0.05$)。

4. TMRE 探针显示, NPs 和 TCS 单独暴露均会引起 KGN 细胞线粒体膜电位下降, CYTO-ID 自噬检测表明 NPs 和 TCS 的暴露可以引起 KGN 细胞的自噬流增加和自噬小体生成增多。

5. TUNEL 染色试剂盒表明 NPs 和 TCS 的暴露诱导小鼠卵巢凋亡细胞增多, AnnexinV& PI 双染检测试剂盒显示 NPs 和 TCS 的联合暴露诱导 KGN 细胞凋亡率显著高于对照组和单独暴露组 ($P < 0.05$)。

6. Western blot 结果表明, 与对照组和单独暴露组相比, 灌胃小鼠 30 天后的卵巢和处理 24 h 的人 KGN 细胞均在 NPs 和 TCS 的共同暴露后, 表现出自噬相关蛋白 LC3B-II/LC3B-I 比值和 ATG5 蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$), 而 P62 蛋白表达显著减少 ($P < 0.05$)。纳米塑料 NPs 和 TCS 共同暴露后细胞凋亡相关

蛋白 BCL-2/BAX 比值显著低于对照和单独暴露组，Cleaved CASPASE-3 则显著高于对照和单独暴露组 ($P < 0.05$)。

7. NPs 和 TCS 暴露 KGN 细胞 24 h 后,两者协同激活了 KEAP1-NRF2-HO-1 抗氧化应激通路,并且抗氧化蛋白 SESTRIN2 蛋白表达在联合暴露组中显著降低 ($P < 0.05$)。

研究结论:

1. NPs 和 TCS 的联合暴露显著诱导了雌性小鼠卵巢和 KGN 细胞的毒性损伤。
2. NPs 和 TCS 的联合暴露协同激活了抗氧化应激 KEAP1-NRF2-HO-1 信号通路,并且 SESTRIN2 表达的下调影响了氧化-抗氧化平衡稳态。

关键词: 纳米塑料; 三氯生; 氧化应激; 协同毒性; 颗粒细胞

ABSTRACT

Background and objective:

In recent years, plastic particles have become globally recognized as one of the most threatening emerging pollutants. Nanoplastics (NPs), with a diameter smaller than 100 nm, are particularly concerning compared to microplastics (MPs, with a diameter less than 5 mm) due to their smaller size and larger surface area-to-volume ratio, which enhance their biological toxicity and their ability to adsorb other environmental pollutants. Research on the toxicity of combined exposure to nanoplastics and other pollutants has predominantly focused on aquatic organisms, with relatively fewer studies conducted on mammals, especially regarding their reproductive systems. Triclosan (TCS) is a common pharmaceutical and personal care product (PPCP) widely used in people's daily lives. Previous studies have indicated that polystyrene nanoplastics (PS-NPs) can stably adsorb triclosan, and separate exposure to PS-NPs and TCS may result in ovarian damage in female mice, disrupting estrogen secretion and causing reproductive toxicity. However, the effects of combined exposure to nanoplastics and triclosan on ovarian toxicity and its underlying mechanisms remain unclear. This study employed adult female Kunming mice and human ovarian granulosa cells (KGN) as research subjects to systematically investigate the ovarian toxicity induced by combined exposure to PS-NPs and TCS from both histological and molecular biology perspectives. The aim is to elucidate the mechanisms underlying ovarian toxicity and provide scientific evidence for the potential harm of combined exposure to PS-NPs and TCS on the human reproductive system.

Experimental methods:

1. The experiment used 8-week-old healthy female Kunming mice, which were randomly divided into four groups: control group, NPs alone exposure group, TCS alone exposure group, and NPs and TCS combined exposure group. Each mouse was administered corn oil, 1 mg PS-NPs, 50 mg/kg TCS, or 1 mg PS-NPs + 50 mg/kg

TCS daily by gavage.

2. Compared to the control group and the single exposure groups, the combined exposure group of NPs and TCS exhibited a significantly prolonged estrous cycle ($P < 0.05$), a significant decrease in the number of follicles in ovarian tissue ($P < 0.05$), and a significant reduction in serum levels of hormones FSH, E2, and P ($P < 0.05$).

3. CCK-8 assay results showed that, compared to the control group and the single exposure groups, combined exposure to NPs and TCS significantly reduced the viability of KGN cells ($P < 0.05$). Oxidative stress detection kits indicated that the levels of ROS and MDA activity in the combined exposure group were significantly higher ($P < 0.05$), while SOD and CAT enzyme activities were significantly lower ($P < 0.05$) compared to the control and single exposure groups.

4. TMRE probe analysis showed that exposure to NPs and TCS alone caused a decrease in mitochondrial membrane potential in KGN cells. CYTO-ID autophagy detection indicated that exposure to NPs and TCS increased autophagic flux and the formation of autophagosomes in KGN cells.

5. TUNEL staining indicated that exposure to NPs and TCS increased the number of apoptotic cells in mouse ovaries. Annexin V & PI double staining showed that the apoptosis rate of KGN cells induced by combined exposure to NPs and TCS was significantly higher than that of the control group and the single exposure groups ($P < 0.05$).

6. Western blot results indicated that, compared to the control group and the single exposure groups, both the ovaries of mice after 30 days of gavage and human KGN cells after 24 hours of treatment showed a significant increase in the ratio of autophagy-related proteins LC3B-II/LC3B-I and ATG5 protein expression following combined exposure to NPs and TCS ($P < 0.05$). In contrast, P62 protein expression was significantly decreased ($P < 0.05$). The ratio of the apoptosis-related proteins BCL-2/BAX was significantly lower, while Cleaved CASPASE-3 levels were significantly higher in the combined exposure group compared to the control and single exposure groups ($P < 0.05$).

7. After 24 hours of exposure to NPs and TCS, KGN cells showed co-activation of the KEAP1-NRF2-HO-1 antioxidant stress pathway. Additionally, the

expression of the antioxidant protein SESTRIN2 was significantly decreased in the combined exposure group ($P < 0.05$).

Research results:

1. After 30 days of gavage, both the control group and the NPs group showed an increase in mouse body weight. However, the body weight of mice in the TCS single exposure group and the combined exposure group of NPs and TCS decreased. Additionally, the ovarian index of mice with combined exposure was significantly lower than that of the control group and the single exposure groups.

2. Compared to the control group and the single exposure groups, the combined exposure group of NPs and TCS exhibited a significantly prolonged estrous cycle. The number of follicles in ovarian tissue significantly decreased, and the levels of serum hormones FSH, E_2 , and P in mice significantly decreased.

3. The CCK-8 assay revealed that compared to the control group and the single exposure groups, the combined exposure of NPs and TCS significantly reduced the viability of KGN cells. The oxidative stress assay kit demonstrated that compared to the control group and the single exposure groups, the combined exposure of NPs and TCS resulted in a significant increase in ROS levels and MDA activity, while the activities of SOD enzyme and CAT enzyme were significantly decreased.

4. TMRE (tetramethylrhodamine, ethyl ester) staining revealed that both NPs and TCS single exposures caused a decrease in mitochondrial membrane potential in KGN cells. CYTO-ID autophagy detection demonstrated that exposure to NPs and TCS could induce an increase in autophagic flux and an increase in the formation of autophagosomes in KGN cells.

5. The TUNEL staining assay kit indicated that exposure to NPs and TCS induced an increase in apoptotic cells in mouse ovarian tissues. The Annexin V & PI dual staining assay kit showed that the combined exposure to NPs and TCS significantly increased the apoptosis rate of KGN cells compared to the control group and the single exposure groups.

6. Western blot results showed that in both mouse ovaries after 30 days of gavage and human KGN cells treated for 24 hours, following combined exposure to NPs and TCS, there was a significant increase in the expression of autophagy-related

proteins LC3B-II/LC3B-I ratio and ATG5, while the expression of P62 protein was significantly decreased compared to the control group and the single exposure groups. Additionally, the BCL-2/BAX ratio, indicative of apoptosis, was significantly lower, and Cleaved CASPASE-3 expression was significantly higher in the combined exposure group of NPs and TCS compared to the control and single exposure groups.

7. After 24 hours of exposure to NPs and TCS, a synergistic activation of the NRF2-KEAP1-HO-1 antioxidant stress pathway was observed in KGN cells. Moreover, the expression of the antioxidant protein SESTRIN2 was significantly reduced in the combined exposure group.

Research conclusions:

1. Combined exposure to NPs and TCS significantly induced toxic damage in the ovaries of female mice and KGN cells.

2. The combined exposure to NPs and TCS synergistically activated the antioxidant stress KEAP1-NRF2-HO-1 signaling pathway, and the downregulation of SESTRIN2 expression affected the balance of oxidative stress and antioxidant defense.

Keywords: Nanoplastics; Triclosan; Oxidative stress; Synergistic toxicity; Granulosa

目 录

第 1 章 引言.....	1
第 2 章 材料与方法	4
2.1 实验材料.....	4
2.1.1 实验所用细胞株和动物.....	4
2.1.2 主要试剂信息.....	4
2.1.3 主要仪器设备信息.....	5
2.2 PS-NPs 特征分析	6
2.2.1 透射电镜(TEM)形态分析	6
2.2.2 PS-NPs 的粒径分布和单独或联合三氯生的 Zeta 电位测定.....	6
2.3 PS-NPs 和 TCS 暴露小鼠模型的建立.....	6
2.3.1 实验分组及处理.....	6
2.3.2 小鼠体重和动情周期观察.....	7
2.3.3 小鼠卵巢组织石蜡切片.....	7
2.3.4 组织 HE 染色	8
2.3.5 生殖激素水平测定.....	8
2.3.6 卵巢组织 TUNEL 染色.....	8
2.3.7 透射电镜检测卵巢组织自噬小体.....	9
2.4 PS-NPs 和 TCS 暴露 KGN 细胞模型的建立.....	9
2.4.1 KGN 细胞系培养	9
2.4.2 细胞活力检测(CCK-8 法)与实验分组	10
2.4.3 细胞氧化应激检测.....	10
2.4.4 线粒体膜电位检测.....	12
2.4.5 Cyto-ID 检测细胞自噬小体	12
2.4.6 Annexin V &PI 双染检测细胞凋亡	12
2.5 Western blot	12
2.5.1 总蛋白提取.....	12
2.5.2 细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提.....	13
2.5.3 蛋白质印迹法.....	13
2.6 数据处理与分析.....	14
第 3 章 结果.....	15
3.1 PS-NPs 单独和联合 TCS 后的表面特征鉴定.....	15
3.2 PS-NPs 和 TCS 暴露对雌性小鼠生殖系统的影响	15
3.2.1 PS-NPs 和 TCS 暴露对雌性小鼠体重和卵巢指数的影响.....	15
3.2.2 PS-NPs 和 TCS 暴露影响雌性小鼠动情周期变化.....	17

3.2.3 PS-NPs 和 TCS 暴露损伤雌性小鼠卵巢组织.....	17
3.2.4 PS-NPs 和 TCS 暴露紊乱雌性小鼠生殖激素水平.....	18
3.2.5 PS-NPs 和 TCS 暴露导致雌性小鼠卵巢自噬.....	19
3.2.6 PS-NPs 和 TCS 暴露诱导雌性小鼠卵巢凋亡.....	21
3.3 PS-NPs 和 TCS 暴露对 KGN 细胞的影响.....	23
3.3.1 PS-NPs 和 TCS 的暴露诱导 KGN 细胞毒性效应.....	23
3.3.2 PS-NPs 和 TCS 的暴露导致 KGN 细胞氧化应激.....	23
3.3.3 PS-NPs 和 TCS 的暴露导致 KGN 细胞线粒体损伤.....	25
3.3.4 PS-NPs 和 TCS 的暴露激活了 KEAP1-NRF2-HO-1 通路.....	25
3.3.5 PS-NPs 和 TCS 的暴露引起 KGN 细胞过度自噬.....	26
3.3.6 PS-NPs 和 TCS 的暴露诱导 KGN 细胞凋亡.....	27
第 4 章 讨论.....	29
第 5 章 结论与展望.....	32
5.1 结论.....	32
5.2 创新点.....	33
5.3 不足和展望.....	33
参考文献.....	34
综述 微纳米塑料与其他污染物联合暴露的生殖毒性作用及其机制研究进展.....	40
参考文献.....	46

中英文缩略词表

缩写	英文全称	中文对照
KGN	Human ovarian granulosa cell line	人卵巢颗粒细胞系
NPs	Nanoplastics	纳米塑料
PS-NPs	Polystyrene-Nanoplastics	聚苯乙烯纳米塑料
MPs	Microplastics	微塑料
PS-MPs	Polystyrene-Microplastics	聚苯乙烯微塑料
MPTP	mitochondrial permeability transition pore	线粒体膜通透性转换孔
MXR	multixenobiotic resistance mechanism	多型异源物质抗性机制
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
RIPA	Radio Immunoprecipitation Assay	蛋白裂解液
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
ROS	Reactive Oxygen Species	活性氧
MDA	Malonaldehyde	丙二醛
SOD	Superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
CAT	Catalase	过氧化氢酶

第 1 章 引言

塑料在 20 世纪 50 年代生产以来，产量日益增加，根据联合国环境规划署（UNEP）报道塑料年产量达到 4.3 亿吨，预计到 2050 年全球塑料总产量可达到 340 亿吨，随着塑料制品消费的增加和塑料废弃物在环境中的积累，塑料污染已成为全球关注的问题^[1]。近年来，环境中的塑料污染根据颗粒大小已被分类为微塑料（MPs，直径 < 5 mm）和纳米塑料（NPs，直径 < 100 nm）。MPs 和 NPs 作为公认的新兴污染物，对环境污染和公共健康的影响而引起人们越来越多的关注^[2]。根据来源的不同可以将微纳米塑料分为两类：初级微纳米塑料和次级微纳米塑料，初级微纳米塑料用于专业生产，如化妆品、药物和合成织物，而次级微纳米塑料则源自环境中废弃塑料制品的物理、化学和生物作用的分解^[3]。目前微纳米塑料对水生和陆生生物的负面影响已经得到广泛研究，同时，基于“特洛伊木马效应”，MPs 和 NPs 与其他持久性污染物（如重金属、多环芳烃、药物和个人护理产品）的相互作用也受到关注^[4]。例如，共同暴露于聚苯乙烯微塑料和铁会通过诱导铁缺乏加剧老龄小鼠认知衰退^[5]。MPs 加剧了四溴双酚 A 引起的人类肠道微生物群稳定性破坏^[6]。MPs 和邻苯二甲酸值共同暴露引起精子数量减少和质量下降^[7]。共同暴露于聚苯乙烯微塑料和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯（DEHP）可通过促进活性氧（ROS）产生导致小鼠卵巢颗粒细胞 DNA 损伤、细胞周期停滞和坏死^[8]。

与微塑料相比，纳米塑料在尺寸上更小，具有更大的比表面积、更强的细胞亲和力、更广泛的分布以及更多的功能基团，使其对生物体的毒性效应更强，并且对其他环境污染物的吸附能力更高^[9]。NPs 和其他环境污染物共同暴露对雌性生殖毒性的影响也是研究的焦点之一。例如，暴露于 NPs 的斑马鱼胚胎表现出孵化率和存活率降低，其卵母细胞发生凋亡^[10]。NPs 在体外暴露卵巢颗粒细胞后，可以激活 HIPPO 信号通路，抑制颗粒细胞增殖，同时激活 NRF2 信号通路调节 ROS 水平。在体内暴露条件下，NPs 导致小鼠发情周期紊乱，正常卵泡减少，卵巢组织凋亡增加，从而导致卵巢储备减弱，最终影响小鼠的生殖能力^[11, 12]。NPs 也可以穿透胎盘屏障，导致人类卵巢和胎盘细胞活力降低，引发炎症、DNA 损伤和细胞周期停滞^[13]。PS-NPs 和己酚醇联合暴露于斑马鱼后表

现出显著的增强毒性效应，导致斑马鱼性激素分泌下降，受精率和孵化率显著降低^[14]。二氧化钛纳米颗粒和 NPs 的共同暴露会加剧小鼠肠道屏障的破坏，从而导致雌性小鼠卵巢结构和功能异常^[15]。但是这些研究主要集中在水生生物和哺乳动物上，而有关 NPs 与其他污染物共同暴露对人类生殖细胞毒性和潜在机制的信息仍然相对匮乏。

三氯生（TCS，5-氯-2-(2', 4'-二氯苯氧基)苯酚）是一种属于药物和个人护理产品（PPCPs）的化合物。它是一种合成的、多功能的、广谱抗菌剂，广泛用于消费品，如漱口水、牙膏、肥皂、化妆品和消毒剂^[16]。TCS 能够通过诱导氧化应激、引起线粒体损伤、干扰脂质代谢和触发凋亡，最终导致卵巢功能受损，从而破坏卵巢功能和储备^[17, 18]。先前的研究表明，TCS 通常存在于废水中，并且还可以在各种体液和组织中检测到，如尿液、血清、血浆和乳液^[19]。在覆盖 10 个国家的一项多国调查中，检测内陆水样品中的 TCS 含量，最大浓度达到了 96.7 nM^[20]。在美国未经处理的废水中，TCS 的最高浓度达到了 297.7 nM^[21]。中国南方城市的河底淤泥样品中 TCS 的平均浓度为 24.2 nmol/kg^[22]。美国国家健康和营养调查(NHANES)的数据显示，美国一般人口尿液中的 TCS 几何平均浓度范围从 13.0 µg/L 到 18.5 µg/L 不等^[23]。中国南方城市的一项人口调查显示，母乳中 TCS 含量为 0.18 ng/mL^[24]。暴露于 TCS 导致斑马鱼卵巢中抗氧化相关基因（SOD、GPx1a、CAT、sMT-B）的下调，随后导致 ROS 依赖性卵巢凋亡^[25]。TCS 的暴露导致人卵巢颗粒细胞的线粒体功能障碍和细胞毒性。并且它可以通过糖酵解增强能量的生成，导致人卵巢颗粒细胞中雌二醇和孕激素水平的提高^[26]。最近的证据表明，纳米塑料广泛分布在大气以及水域和陆地环境中。地表水中微塑料浓度逐渐增加，在湿季黄河下游的地表水中，微塑料浓度逐渐上升，达到 930 个/L（相当于 4.65 mg/L）^[27, 28]。由于面临技术限制，检测纳米塑料仍然面临一些挑战。然而，有理由推测，纳米尺寸的颗粒释放可能更多。纳米塑料的浓度可能高达当前测量的微塑料浓度的 10^{14} 倍^[29]。接下来，研究人员可以利用表面增强拉曼光谱（SERS）技术实现对环境中的纳米塑料含量的快速检测^[30]。人们在日常生活中不断接触塑料制品，微纳米塑料也可能通过食物链被人们摄入。事实上，在人类的粪便、肺部、大脑、血液、胎盘等部位已经检测到塑料颗粒^[31]。因此，基于以上事实，NPs 和 TCS 的共同暴露已经成为不可避免的现象。

作为广泛使用的塑料，聚苯乙烯（PS）废弃物也是最常见的环境污染形式

之一^[32]。近期的研究表明, PS-NPs 由于具有更大的比表面积表现出强大的物理吸附能力, 主要是因为范德华力、静电或氢键、 $\pi-\pi$ 堆叠等相互作用^[33]。此外, PS-NPs 比较容易吸附药物和个人护理产品(PPCPs), 特别是对于三氯生(TCS), 表现出更强的吸附稳定性和亲和力^[34]。2019 年底新冠病毒疫情的爆发导致一次性塑料制品和消毒需求的增加, 因此, NPs 和 TCS 的生产排放显著增加^[35], 对 PS-NPs 和 TCS 的联合毒性效应进行研究具有重要的理论和实际意义。

环境污染物的暴露作为影响女性生殖健康的一项重要危险因素, 了解这些污染物的毒理特点有着重要意义。卵巢是雌性生殖系统的主要组成部分, 可以作为 NPs 和 TCS 联合作用的共同靶器官, 其中颗粒细胞在哺乳动物卵泡发育中发挥着核心作用, 颗粒细胞的死亡会导致卵泡发育的停止^[36]。KGN 细胞是一种人卵巢颗粒细胞系, 保留了颗粒细胞的关键功能, 包括类固醇生成、细胞生长、凋亡控制和卵母细胞的生长支持。因此, KGN 细胞可以作为代表了雌性生殖能力的有效体外模型^[37]。我们先前的研究表明, 纳米塑料能在小鼠卵巢中蓄积, 并在体外实验中进入细胞内。故本研究中, 拟以成年雌性昆明小鼠和 KGN 细胞为实验对象, 单独和共同暴露于 PS-NPs 和 TCS, 探讨这些污染物对雌性小鼠和 KGN 细胞的毒性效应和可能的机制, 为人们生殖健康风险评估提供理论依据。

第2章 材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验所用细胞株和动物

本研究所用的7周龄健康的昆明小鼠购自江西科瑞斯（Crisbio）& 阿普斯戴尔（UP-Style）生物科技有限公司，许可证号为SYXK（赣）2021-0001，合格证号为110324231107275943，并在标准的动物培养环境（环境温度 $22\pm2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，湿度50-60%）下适应1周后进行实验，动物实验研究已通过南昌大学实验动物福利伦理委员会审查。本实验所用的人卵巢颗粒细胞系（KGN）购自上海弘顺生物科技有限公司。

2.1.2 主要试剂信息

试剂	公司
聚苯乙烯纳米塑料（PS-NPs, 25 nm，密度1.05 g/cm ³ ）	中科雷鸣(北京)科技
三氯生（TCS, 纯度97%）	上海易恩化学
DMSO	北京索莱宝
RIPA 裂解液	北京普利莱基因技术
通用型组织固定液	北京索莱宝
ROS 检测试剂盒	南京建成生物工程研究所
SOD 测定试剂盒	南京建成生物工程研究所
CCK-8 细胞活性检测试剂盒	碧云天生物技术
MDA 测定试剂盒	南京建成生物工程研究所
CAT 测定试剂盒	南京建成生物工程研究所
Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒	武汉 Elabscience
Super ECL Plus（超敏发光检测试剂盒）	苏州优逸兰迪

试剂	公司
Tris-Glycine SDS Buffer	康维世纪
SDS-PAGE Stacking Gel Buffer	康维世纪
SDS-PAGE Separating Gel Buffer	康维世纪
TBST	北京索莱宝
DMEM/Ham's F-12	Gibco
蛋白预染 Marker	赛默飞
蛋白酶抑制剂	武汉塞维尔
Protein loading buffer	武汉塞维尔
聚偏二氟乙烯膜	默克
CASPASE3 抗体	三鹰生物技术
BAX 抗体	三鹰生物技术
BCL2 抗体	三鹰生物技术
二抗（抗鼠）	三鹰生物技术
二抗（抗兔）	三鹰生物技术
NRF2 抗体	三鹰生物技术
KEAP1 抗体	三鹰生物技术
HO-1 抗体	三鹰生物技术
LC3B 抗体	Sigma-Aldrich
P62 抗体	三鹰生物技术
ATG5 抗体	三鹰生物技术
线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 检测试剂盒	碧云天生物科技
CYTO-ID 自噬检测试剂盒	Enzo Life Sciences
小鼠雌二醇 (E ₂) -Elisa 试剂盒	武汉赛培生物科技
小鼠促卵泡素 (FSH) -Elisa 试剂盒	武汉赛培生物科技
小鼠孕酮 (PROG) -Elisa 试剂盒	武汉赛培生物科技

2.1.3 主要仪器设备信息

仪器	生产厂家
高压灭菌锅	博讯实业
多功能微孔板检测仪	PerkinElmer
荧光倒置显微镜	Olympus
高速冷冻离心机	赛默飞
超声波清洗机	深圳冠博科技
凝胶电泳仪	Bio-Rad
纯水制备仪	厦门精艺业科技
凝胶成像分析系统	Bio-Rad
生物安全柜	鑫贝西生物
制冰机	Panasonic
超声波细胞破碎仪	般诺生物
细胞培养箱	赛默飞
体式显微镜	Olympus
-80℃超低温冰箱	SANYO, Japan
恒温水浴锅	上海浦东物理光学仪器厂

2.2 PS-NPs 特征分析

2.2.1 透射电镜（TEM）形态分析

将超声充分混匀分散后的 PS-NPs (25nm) 用乙醇稀释，滴至铜网上待干后使用透射电镜观察其形态。

2.2.2 PS-NPs 的粒径分布和单独或联合三氯生的 Zeta 电位测定

将 PS-NPs 超声充分混匀分散用适量双蒸水稀释，后通过马尔文动态光散射（DLS）分别检测 NPs 单独和联合三氯生后的 zeta 电位，并对 NPs 的粒径分布进行分析。

2.3 PS-NPs 和 TCS 暴露小鼠模型的建立

2.3.1 实验分组及处理

我们通过给小鼠灌胃的方式给药,其中小鼠暴露 PS-NPs (25nm) 的剂量参考本实验室之前的研究结果^[38],小鼠暴露三氯生剂量参考相关文献的研究^[39]。选择 7 周龄雌性昆明小鼠,自由饲料进食,在温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,湿度 $55\pm 5\%$,12/12 h 的光照/黑暗循环下饲养。经过一周的适应后将 28 只雌性昆明小鼠随机分成 4 组,每组 7 只,分别为对照组,PS-NPs 暴露组,TCS 暴露组,PS-NPs 和 TCS 联合暴露组。首先,TCS 溶于 DMSO 中,再将其溶于玉米油中,在最终的溶液中 DMSO 的浓度为 0.1%,在此实验中每组溶液灌胃前在摇床上混合 24 h,以完全混合 NPs 和 TCS 溶液。最终 NPs 单独暴露组小鼠每只每天灌胃 1 mg PS-NPs, TCS 暴露组小鼠每只每天灌胃 50 mg/kg, NPs 和 TCS 联合暴露组小鼠则每只每天灌胃 1 mg PS-NPs+50 mg/kg TCS,对照组给予同体积的玉米油。经口服灌胃 30 天后,所有小鼠被麻醉,进行样本采集。每组小鼠进行眼眶取血离心后获取血清,卵巢称重后并于 -80°C 保存以便后续实验。

2.3.2 小鼠体重和动情周期观察

每日固定中午 12 点称取各组小鼠体重并记录。小鼠阴道开口后观察动情周期,每天下午 3 点进行小鼠阴道涂片:取生理盐水浸泡的棉签插入小鼠阴道约 0.5-1cm 处,轻微转动后均匀涂抹在载玻片,风干后进行巴氏染色,立即在显微镜下观察。判断标准如下:

动情周期	细胞形态特征	时间 (h)
动情前期 (proestrus)	大量有核上皮细胞,少量角化细胞	12
动情期 (estrus)	大量无核角化鳞状角化上皮细胞(形状似落叶状)堆积,少量有核上皮细胞	9~15
动情后期 (metestrus)	少量角化上皮细胞,有核上皮细胞和白细胞	14~18
动情间期 (diestrus)	大量白细胞、圆上皮细胞及少量粘液	60~70

2.3.3 小鼠卵巢组织石蜡切片

- (1) 将新鲜卵巢组织称重后放入通用型组织固定液中固定 24 h;
- (2) 进行超纯水冲洗 5 min,依次在 70%、80%、95% I、95% II、100% I、

100% II 乙醇中进行梯度脱水 1 h;

(3) 接着在二甲苯 I、II 浸泡 0.5 h;

(4) 使用石蜡模块保持 60 °C 恒温水浴锅进行包埋, 冷却后的蜡块取出备用;

(5) 在切片机进行 4~6 μm 切片, 并在 37°C 温水中进行展片。

2.3.4 组织 HE 染色

(1) 将贴有组织的载玻片放到 58 °C 烘箱进行烤片;

(2) 在二甲苯中脱蜡, 依次在 100% I、100% II、95% I、95% II、80%、70%、50% 乙醇浸泡 5 min 进行水化;

(3) 进行苏木素染色细胞核 2 min, 进行流水冲洗返蓝 30 min;

(4) 用伊红染细胞质 2 min, 水洗数秒;

(5) 进行梯度脱水并在二甲苯中进行透明, 最后取适量中性树脂封片保存。

2.3.5 生殖激素水平测定

(1) 加样: 在酶标板上分别设立待测样品孔、标准孔和空白孔, 每个孔加样品 50 μL , 并设立复孔轻轻晃动混匀;

(2) 温育: 用封板膜封板后于 37°C 温育 30 min;

(3) 洗涤: 小心揭掉封板膜, 弃去液体, 甩干, 每孔加满洗涤液, 静置 30 秒后弃去, 如此重复 5 次, 在吸水纸上拍干;

(4) 加酶: 每孔加入酶标试剂 50 μL , 空白孔除外;

(5) 温育: 操作同 2;

(6) 洗涤: 操作同 3;

(7) 显色: 每孔先加入显色剂 A 50 μL , 再加入显色剂 B 50 μL , 轻轻震荡混匀, 37°C 避光显色 10 min;

(8) 终止: 每孔加终止液 50 μL , 终止反应;

(9) 测定: 立即在 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD 值)。

2.3.6 卵巢组织 TUNEL 染色

- (1) 将石蜡切片在常规二甲苯中脱蜡，并在乙醇中进行梯度脱水；
- (2) PBS 冲洗后滴加 20 $\mu\text{g/mL}$ 不含 DNase 的蛋白酶 K, 25°C 孵育 30 min；
- (3) PBS 清洗 3 遍，每个样本加入 10 μL TdT 酶和 90 μL 荧光标记液，避光湿盒 37°C 孵育 1 h；
- (4) PBS 洗涤 3 次，进行细胞核染色，滴加 DAPI 染色液，避光室温孵育 10 min；
- (5) 用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察。

2.3.7 透射电镜检测卵巢组织自噬小体

- (1) 取新鲜小鼠卵巢组织放入 2.5% 戊二醛中固定 2 h；
- (2) PBS 清洗后用 2% 锇酸固定 2 h；
- (3) 用 50%、70%、80%、90%、100% 乙醇进行梯度脱水各 15 min；
- (4) 用丙酮置换 2 次，每次 15 min；
- (5) 使用丙酮和环氧树脂进行梯度渗透浸渍；
- (6) 用环氧树脂进行样本包埋，冷却后修块和切片；
- (7) 3% 醋酸铀-枸橼铅双染色后，在透射电镜下进行观察。

2.4 PS-NPs 和 TCS 暴露 KGN 细胞模型的建立

2.4.1 KGN 细胞系培养

- (1) 完全细胞培养液配置：在基础 DMEM/F-12 培养基中添加 10% 胎牛血清（FBS）和青霉素-链霉素双抗添加剂，在 4°C 保存。
- (2) KGN 细胞复苏：从液氮罐中取出冻存管迅速放到 37°C 恒温水浴箱中，3 min 后待冻存液融化后在 1000 rpm 离心 4 min。取出冻存管后用吸管弃去上层液体，用复温后的培养液轻微吹打混匀，进行细胞板接种。
- (3) KGN 细胞传代：在细胞生长到 80% 左右时进行传代操作，吸弃原细胞培养液，用 PBS 清洗一遍，加入适量 0.25% 胰酶完全覆盖细胞，在显微镜下观察，待细胞变圆后加入完全培养液终止消化，用吸管轻微吹打脱落细胞，收集细胞，在 500 rpm 离心 5 min，离心后弃去上清，加入完全培养液进行铺板接

种。

(4) KGN 细胞冻存：待 0.25%胰酶消化终止离心后，吸弃上清，加入合适的细胞冻存液重悬细胞，分装到冻存盒管中，放入冻存盒中到-80℃冰箱进行梯度降温，第二天转移到液氮中。

2.4.2 细胞活力检测（CCK-8 法）与实验分组

我们使用 CCK-8 试剂盒测量细胞活力。首先，我们向 96 孔板中加入 100μL 的细胞悬浮液（每孔 8×10^3 个细胞）。细胞附着后，我们弃掉培养基，其中包含不同浓度的 PS-NPs（0、50、100、150、200 和 250 μg/mL）^[40]和 TCS（0、5、15、25、35 和 45 μM）^[26]新鲜培养基刺激细胞 24 h。然后，我们每孔加入 10μL 的 CCK-8 溶液，并继续培养细胞 2 h。我们使用酶联免疫吸附法读板仪在 450 nm 处测量吸光度。最后，我们对 PS-NPs 和 TCS 的不同组合进行了联合细胞毒性测试。最终实验分为四组：对照组（0.03% DMSO）、PS-NPs 组（150 μg/mL）、TCS 组（15 μM，0.03% DMSO）和 PS-NPs+TCS 组（150 μg/mL+15 μM，0.03% DMSO）。

2.4.3 细胞氧化应激检测

1、KGN 细胞内 ROS 水平的检测

细胞接种在 6 孔板并按照我们的实验分组药物处理 KGN 细胞 24 h，我们用 PBS 洗涤细胞 2 遍，然后用 0.1%的 DCFH-DA 在 37℃避光孵育 30 min。接下来，我们用无血清培养基洗涤细胞三次，并用 DAPI 染色细胞核 10 min。最后，我们将细胞洗涤三次，然后立即在荧光显微镜下观察它们（固定参数）并拍照，激发/发射波长为 485/525 nm。

2、KGN 细胞 SOD 检测

(1) 底物应用液的配制：底物贮备液与缓冲液按照 1：200 的比例，现配现用。酶工作液的配制：酶贮备液和酶稀释液按照 1：10 的比例，现配现用。按照下表在 96 孔板中进行细胞样本操作，每组样本重复三次且设置复孔：

	对照孔	对照空白孔	测定孔	测定空白孔
待测样本（μL）	-	-	20	20
蒸馏水（μL）	20	20	-	-

第 2 章 材料与方法

	对照孔	对照空白孔	测定孔	测定空白孔
酶工作液 (μL)	20	-	20	-
酶稀释液 (μL)	-	20	-	20
底物应用液 (μL)	200	200	200	200
混匀, 37°C 孵育 20 min, 450nm 处酶标仪读数				

(2) 按照说明书中的公式计算样本中的 SOD 值。

3、KGN 细胞 MDA 检测:

(1) 将试剂室温解冻, 提前备好 5mL EP 管按照下面表格进行细胞样本操作:

	空白	标准	测定	对照
10 nmol/mL 标准品 (mL)	-	0.2	-	-
无水乙醇 (mL)	0.2	-	-	-
测试样品 (mL)	-	-	0.2	0.2
试剂一 (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2
混匀 (摇动管架)				
试剂二 (mL)	3	3	3	3
试剂三 (mL)	1	1	1	-
50%冰醋酸 (mL)	-	-	-	1

(2) 将离心管用封口膜封口, 并用针头扎上一个小孔, 混匀后将其放入 95°C 水浴锅中 40 min, 取出后流水冷却, 4000rpm, 离心 10 min;

(3) 取上清到 96 孔板中, 每组三个重复且设置复孔, 532nm 测定吸光值;

(4) 根据说明书公式计算 MDA 数值。

4、KGN 细胞 CAT 检测:

(1) 提前将试剂一和试剂二 37°C 预温, 准备 5mL EP 管, 将细胞样本按照下表操作:

	对照管	测定管
待测样本 (mL)	-	0.05
试剂一 (mL)	1.0	1.0
立即混匀, 计时, 37°C 准确反应 1 min		
试剂三 (mL)	1.0	1.0
试剂四 (mL)	0.1	0.1
待测样本	0.05	-

(2) 混匀后到 96 孔板中，每组三个重复且设置复孔，在 405nm 测定吸光值；

(3) 根据说明书公式计算 CAT 数值。

2.4.4 线粒体膜电位检测

将细胞接种于 12 孔板按照实验分组处理培养细胞 24 h 后，我们用 PBS 洗涤细胞三次。然后，我们用 10 μ M TMRE 染液避光孵育细胞 30 min。我们使用 Hoechst 33342 标记细胞核。在用 PBS 洗涤三次后，我们在荧光显微镜下观察了细胞并拍摄了图片（固定参数），激发/发射波长为 550/575 纳米。

2.4.5 Cyto-ID 检测细胞自噬小体

我们使用 CYTO-ID 自噬检测试剂盒 2.0 评估自噬液泡和活跃的自噬通量。阳离子两性示踪染料可以特异性地染色自噬液泡而不标记溶酶体。细胞接种 6 孔板经药物处理 24 h 后，我们用 Cyto-ID 绿色荧光染料和 Hoechst 33342 避光孵育细胞 30 min。用 1 \times Assay Buffer 洗涤三次后，我们立即在荧光显微镜下观察细胞（固定参数）并拍摄图片。

2.4.6 AnnexinV& PI 双染检测细胞凋亡

将细胞接种 6 孔板经过药物处理 24h 后吸弃原培养液，并用 PBS 清洗后，用含有 Annexin V-APC 染色溶液和 PI 染色溶液的 Annexin V Binding Buffer 避光孵育细胞 30 min。之后在室温下用 DAPI 染色细胞核避光孵育 15 min，立即在倒置荧光显微镜下观察细胞并拍照（固定参数）。

2.5 Western blot

2.5.1 总蛋白提取

将按照实验分组的卵巢组织和 KGN 细胞用 PBS 清洗 2 遍，加入含有蛋白酶抑制剂的适量的 RIPA 裂解液，在冰上充分研磨 30 min。用移液枪收集液体

到 2 mL EP 管中进行离心（12000rpm， 4℃）15 min。取上清进行 BCA 蛋白浓度测定，保存于-20℃冰箱。

2.5.2 细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提：

（1）将药物处理好的细胞用 PBS 清洗 2 遍，用细胞刮子刮取细胞，5000 rpm 离心 5 min 收集细胞；

（2）弃上清，每 20 μ L 细胞沉淀加入 200 μ L 含有 PMSF 细胞浆蛋白提取试剂 A。高速涡旋振荡 5 min，冰浴 15 min，加入细胞浆蛋白抽提试剂 B 10 μ L，涡旋振荡 5 秒，冰浴 1 min。涡旋振荡 5 秒，在 4℃，12000 g 离心 5 min。立即吸取上清到预冷 EP 管中，即为细胞浆蛋白，立即放在-80℃保存；

（3）沉淀部分加入 50 μ L 含有 PMSF 细胞核蛋白提取试剂 A，剧烈涡旋振荡 30 秒，冰浴每隔 2 min 振荡一次，共计 30 min。于 4℃，12000 g 离心 10 min，吸取上清保存在预冷的 EP 管中，即为抽取的细胞核蛋白，立即放在-80℃保存。

2.5.3 蛋白质印迹法

（1）样本准备：将提取好的蛋白根据定量浓度调整一致，加入 1x Loading Buffer 煮沸 10 min，降至室温，分装保存-20℃冰箱；

（2）制胶：配置 5%PAGE 浓缩胶和 12% PAGE 分离胶，按照下列表格依次添加：

5%PAGE 浓缩胶						
体积（mL）	双蒸水	30%丙烯酰胺	Tris-HCL（浓缩胶 PH6.8，分离胶 PH8.8）	10% SDS	10% APS	TMED
6	4.10	1.0	0.75	0.06	0.06	0.006
12%分离胶						
15	3.0	6.0	5.7	0.15	0.15	0.006
10%分离胶						
15	4.0	5.0	5.7	0.15	0.15	0.006

（3）上样：在电泳槽中倒入现配的电泳液，轻拔梳子，依次上样预染 Marker 和分组样本各 10 μ L，80V 电泳 30 min 后转为 110V 电泳至胶底；

(4) 转膜: 提前将 PVDF 膜在甲醇中激活, 放入倒入转膜液的托盘中, 将多余的浓缩胶切除, 依次按照负极、滤网、滤纸、凝胶、PVDF 膜、滤纸、滤网、正极。100V 恒压冰浴条件下转膜 90 min;

(5) 封闭: 用 5% 脱脂牛奶室温摇床封闭 1 h;

(6) 孵育抗体: 封闭结束后用 TBST 在摇床上清洗膜三次, 每次 5 min, 而后孵育一抗 4°C 过夜。第二天回收一抗用 TBST 在摇床上清洗膜三次, 每次 5 min, 室温孵育二抗 1 h。

(7) 显影: 孵育二抗后用 TBST 在摇床上清洗三次, 每次 5 min, 将 PVDF 膜浸入灵敏发光显影液数秒, 立即在显影仪上曝光。

2.6 数据处理与分析

所有的实验数据均来自至少三次独立实验。所有的结果都以平均值 \pm 标准偏差的形式呈现。我们使用 GraphPad Prism 软件 (版本 8.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) 进行统计分析。我们采用一元方差分析 (ANOVA) 后采用 Tukey 的多重比较检验。不同的字母表示两组之间存在显著差异 ($P < 0.05$), 而相同的字母表示两组之间没有差异。

第3章 结果

3.1 PS-NPs 单独和联合 TCS 后的表面特征鉴定

本研究利用扫描电子显微镜探索了聚苯乙烯纳米颗粒（PS-NPs）的形态（图 3.1 A）。PS-NPs 呈球形，大小在 15 纳米到 25 纳米之间（图 3.1 B）。此外，我们测量了 NPs 和 TCS/NPs 溶液的相对 Zeta 电位值。TCS/NPs 的 Zeta 电位显示出较低的绝对值，表明在吸附后分散性显著降低（图 3.1 C）。

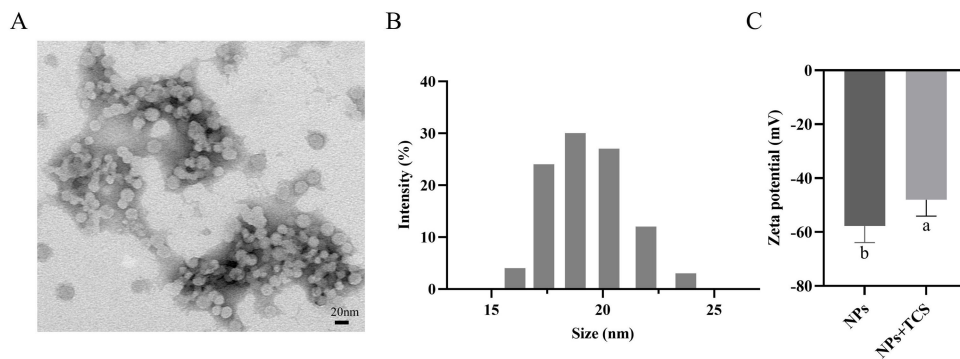


图 3.1 聚苯乙烯纳米颗粒（PS-NPs）的具体特性

（A）聚苯乙烯纳米颗粒的扫描电子显微镜（SEM）图像。（B）PS-NPs 的尺寸分布。（C）单独 PS-NPs 和与 TCS 孵育后的 zeta 电位。不同字母表示存在显著差异（ $P < 0.05$ ）。

3.2 PS-NPs 和 TCS 暴露对雌性小鼠生殖系统的影响

3.2.1 PS-NPs 和 TCS 暴露对雌性小鼠体重和卵巢指数的影响

暴露于 NPs 和 TCS 可以引起小鼠体重和卵巢的一些变化。随着暴露时间延

长, 对照组和 NPs 组小鼠体重均有所增长, 然而 TCS 组和 NPs+TCS 组的小鼠体重随着时间延长有所降低 (图 3.2.1 A)。在灌胃 30 天后, 与对照组相比 TCS 组和 NPs+TCS 组体重显著下降, 而 NPs 组和对照组的体重相比差异没有统计学意义, NPs+TCS 联合暴露组相比于 NPs 单独暴露显著下降, 相比于 TCS 单独暴露没有显著差异 (图 3.2.1 B)。和对照组相比, 小鼠的卵巢大小和卵巢指数并无明显变化, TCS 组和 NPs+TCS 组显著下降。NPs+TCS 联合暴露组和 NPs 单独暴露组相比显著下降, 而和 TCS 单独暴露组相比无明显变化 (图 3.2.1 C-D)。

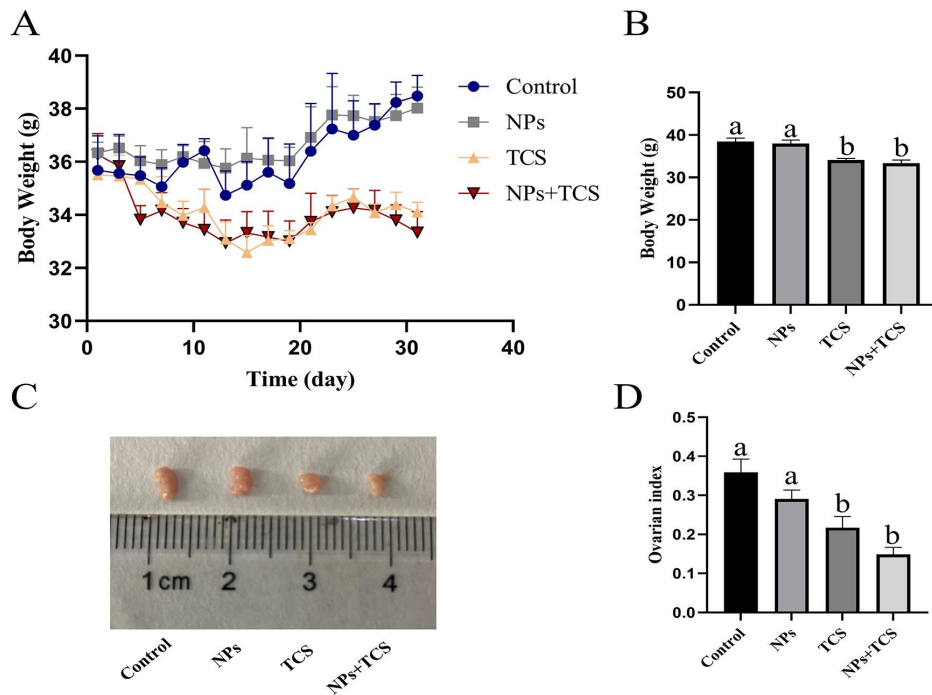


图 3.2.1 NPs 和 TCS 暴露导致小鼠体重和卵巢指数变化

(A) 不同处理组随着时间的延长的小鼠体重变化 (B) 暴露 30 天后小鼠体重变化。(C) 暴露 30 天后, 不同处理组小鼠卵巢器官大小。(D) 小鼠卵巢指数的变化情况。n=7, 不同字母表示存在显著差异 ($P < 0.05$)。

3.2.2 PS-NPs 和 TCS 暴露影响雌性小鼠动情周期变化

根据小鼠阴道脱落的细胞形态变化记录小鼠发情时期（图 3.2.2 A and B），相比于对照组，NPs 和 TCS 单独暴露组的发情间期明显延长，而联合暴露组更为显著（图 3.2.2 C， $P < 0.05$ ）。

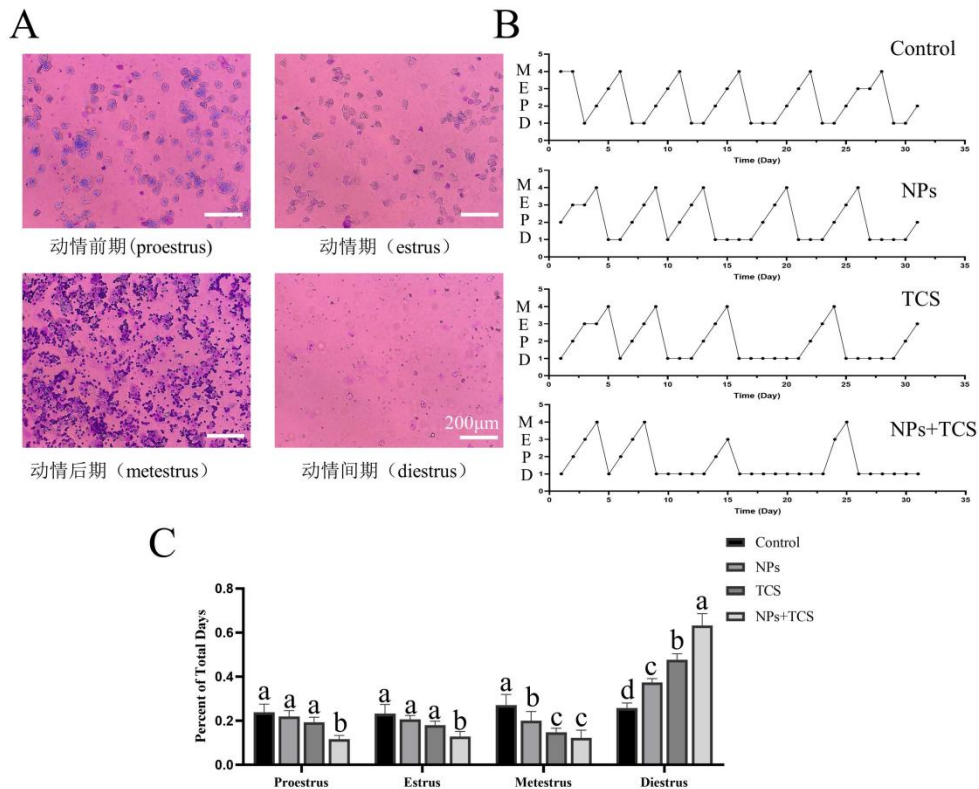


图 3.2.2 NPs 和 TCS 暴露引起小鼠动情周期紊乱

(A) 阴道涂片巴氏染色，Bar: 200μm。（B）动情周期记录（动情前期（P），动情期（E），动情后期（M），动情间期（D））。（C）小鼠动情周期统计。n=7，不同字母表示存在显著差异（ $P < 0.05$ ）。

3.2.3 PS-NPs 和 TCS 暴露损伤雌性小鼠卵巢组织

卵巢的生卵作用是成熟雌性最基本的生殖功能，卵泡作为卵巢的基本功能单位，它的数量影响雌性生殖储备能力。NPs 和 TCS 暴露会对小鼠卵巢造成损

伤，与对照组相比，NPs 和 TCS 单独暴露均会导致卵泡数量下降，黄体增多，在联合暴露组差异更为显著（图 3.2.3 A and B, $P < 0.05$ ）。

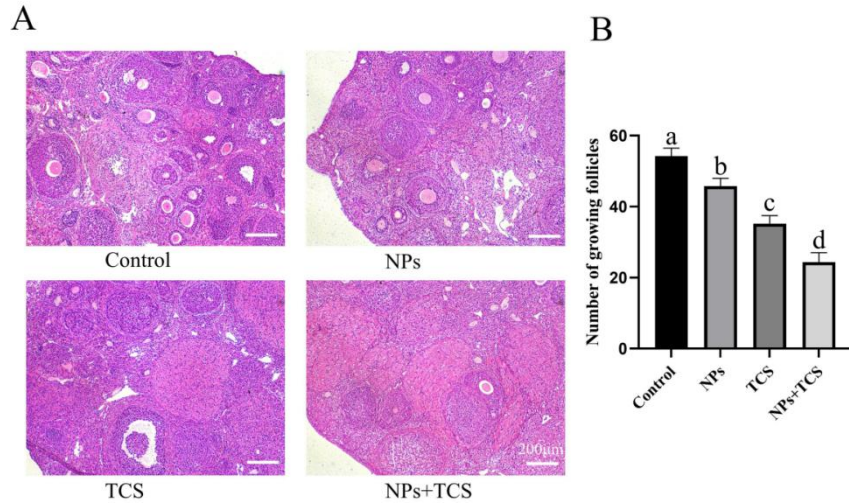


图 3.2.3 NPs 和 TCS 暴露引起小鼠卵巢组织损伤

(A) 小鼠卵巢组织 HE 染色，Bar: 200 μm。B 小鼠卵泡数量统计。n=7，不同字母表示存在显著差异 ($P < 0.05$)

3.2.4 PS-NPs 和 TCS 暴露紊乱雌性小鼠生殖激素水平

卵巢同时还有内分泌的功能，正常的激素分泌对促进生殖器官生长发育和成熟起到至关重要的作用。对小鼠血清促卵泡激素 (FSH)、雌二醇 (E_2)、孕酮 (P) 激素分泌水平检测，结果如下：NPs 和 TCS 的联合暴露引起小鼠血清 FSH, E_2 , P 激素水平均显著低于对照组和单独暴露组 (图 3.2.4 A-C, $P < 0.05$)，而 FSH 和 P 激素水平中 NPs 单独暴露组和对照组没有显著差异性。

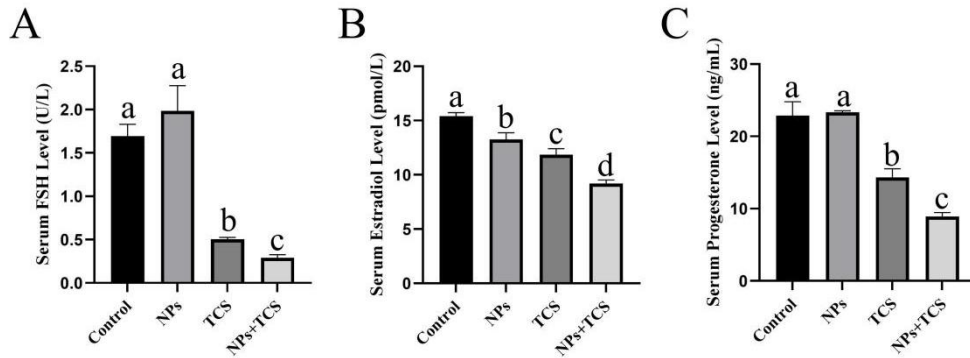


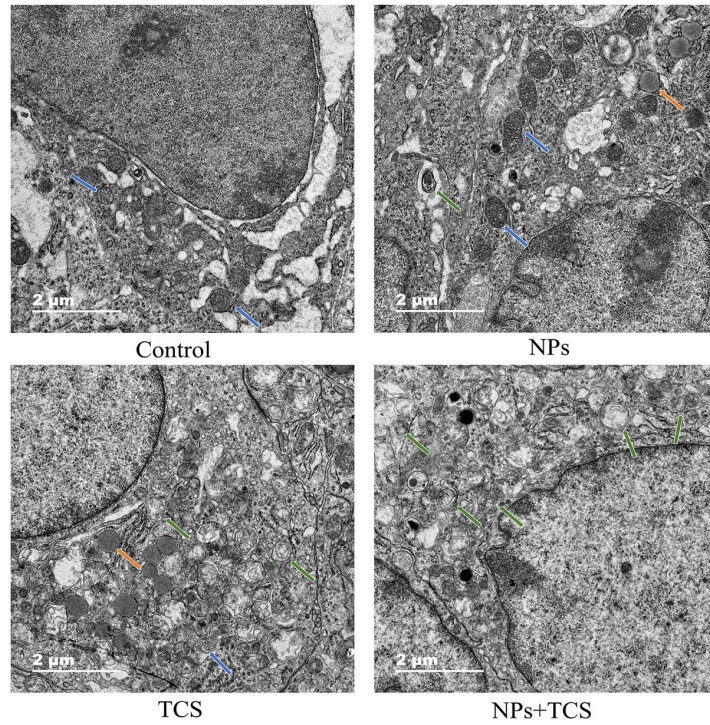
图 3.2.4 NPs 和 TCS 暴露引起激素分泌紊乱

(A) 小鼠血清促卵泡激素 (FSH) 激素水平变化。(B) 小鼠血清雌二醇 (E_2) 激素水平变化。(C) 小鼠血清孕酮 (P) 激素水平变化。 $n=7$, 不同字母表示存在显著差异 ($P < 0.05$)。

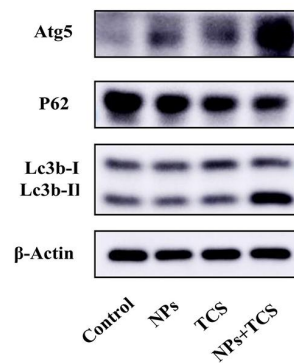
3.2.5 PS-NPs 和 TCS 暴露导致雌性小鼠卵巢自噬

为了探究 NPs 和 TCS 的暴露是否引起小鼠自噬的发生, 我们进行了自噬小体和自噬蛋白表达检测。透射电镜结果显示, 与对照组相比, NPs 和 TCS 联合暴露组中发现大量尚没有降解的自噬小体, 在 NPs 和 TCS 单独暴露组中则较少 (图 3.2.5 A)。Western blot 结果表明 ATG5 蛋白表达和 LC3B-II/LC3B-I 比值在联合暴露组中均显著高于对照组和单独暴露组, 而单独暴露组和对照组无显著性差异。与对照组相比, NPs 单独暴露组无明显变化, TCS 单独暴露组显著下降, NPs 和 TCS 联合暴露组中 P62 蛋白的表达下降更为显著 (图 3.2.5 B-E, $P < 0.05$)。

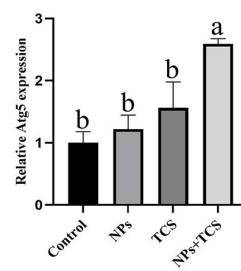
A



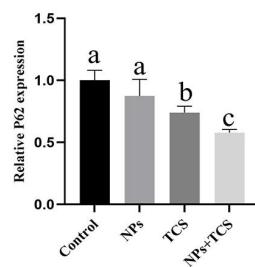
B



C



D



E

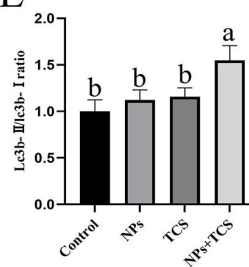


图 3.2.5 NPs 和 TCS 暴露激活小鼠自噬发生

(A) 透射电镜下卵巢组织(蓝色箭头: 线粒体; 橙色箭头: 自噬小体; 绿色箭头: 脂滴), Bar: 2 μ m。(B) Western blot 显示自噬相关蛋白 LC3B-I, LC3B-II, P62, ATG5 蛋白表达情况。(C) ATG5 蛋白表达水平的量化。(D) P62 蛋白表达水平的量化。(E) LC3B-II/LC3B-I蛋白表达比率的量化。n=7, 不同字母表示存在显著差异($P < 0.05$)。

3.2.6 PS-NPs 和 TCS 暴露诱导雌性小鼠卵巢凋亡

我们使用 TUNEL 染色对小鼠卵巢中完整的单个细胞凋亡状况进行探究并检测主要凋亡相关蛋白 BAX, BCL-2 和 Cleaved CASPASE-3 的表达情况。TUNEL 染色结果显示 NPs 和 TCS 单独或联合暴露中阳性细胞均多于对照组(图 3.2.6 A)。Western blot 结果表明: 与对照组相比, BAX 在 NPs 暴露组无明显变化, 在 TCS 暴露组中显著升高, 在两者联合暴露组升高更为显著。与对照组相比, BCL-2 和 Cleaved CASPASE-3 在单独暴露时无显著变化, 但在联合暴露时分别显著下降和升高。与对照组相比, BCL-2/BAX 比值在 NPs 单独暴露时无显著变化, 在 TCS 和联合暴露时显著下降(图 3.2.6 B-F, $P < 0.05$)。

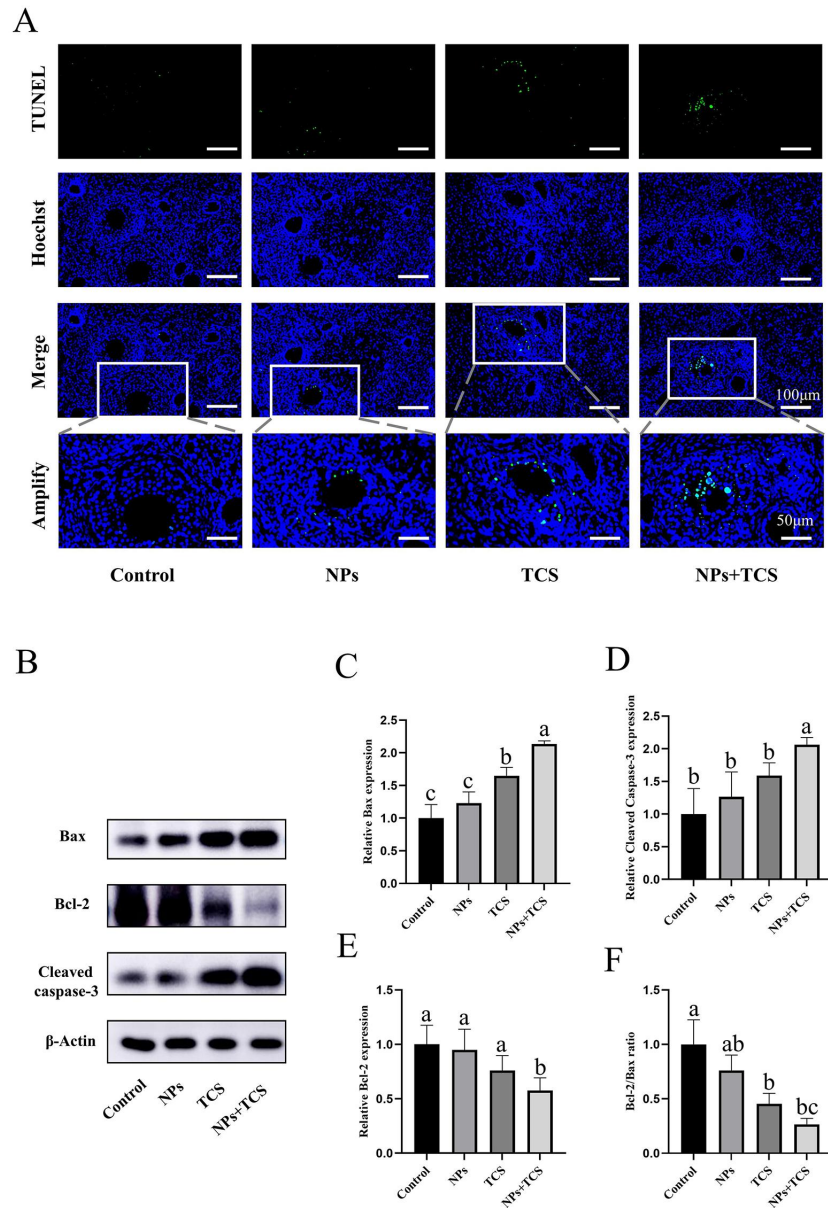


图 3.2.6 NPs 和 TCS 的暴露导致小鼠卵巢凋亡

(A) 卵巢组织 TUNEL 染色, Bar: 100 μ m。(B) 蛋白免疫印迹分析凋亡相关蛋白表达水平。(C) BAX 蛋白表达水平定量分析。(D) Cleaved CASPASE-3 蛋白表达水平定量分析。(E) BCL-2 蛋白表达水平定量分析。(F) BCL-2/BAX 比值定量分析。n=7, 不同字母表示存在显著差异 ($P < 0.05$)。

3.3 PS-NPs 和 TCS 暴露对 KGN 细胞的影响

3.3.1 PS-NPs 和 TCS 的暴露诱导 KGN 细胞毒性效应

我们首先对暴露于 PS-NPs 或 TCS 的 KGN 细胞进行了 CCK8 实验。随着浓度的增加，PS-NPs 和 TCS 都降低了 KGN 的存活率（图 3.3.1 A 和 B）。暴露于 150 $\mu\text{g/mL}$ PS-NPs 和 15 μM TCS 的联合作用显著降低了细胞存活率至约 50%（图 3.3.1 C, $P < 0.05$ ），伴随着细胞数量的显著减少和细胞肿胀（图 3.3.1 D）。

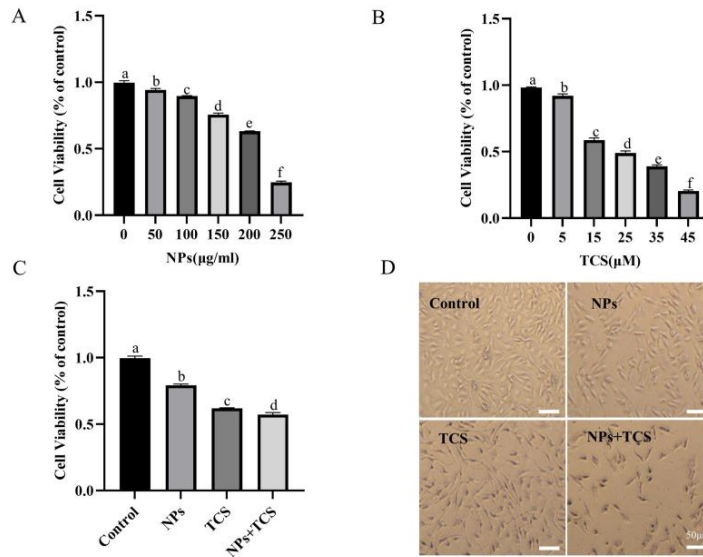


图 3.3.1 PS-NPs 和 TCS 的暴露对 KGN 细胞活力和细胞形态的影响

KGN 细胞在梯度浓度下暴露于 (A) PS-NPs 和 (B) TCS 24 h 后的细胞存活率。

(C) KGN 细胞在联合暴露 (150 $\mu\text{g/mL}$ PS-NPs 和 15 μM TCS) 后的细胞存活率。(D) 在不同处理下 PS-NPs 暴露 24 h 后的 KGN 细胞形态, Bar: 50 μm 。n=3, 不同字母表示存在显著差异 ($P < 0.05$)。

3.3.2 PS-NPs 和 TCS 的暴露导致 KGN 细胞氧化应激

为了探讨 PS-NPs 和 TCS 在 KGN 细胞中引起的氧化损伤,我们在处理后的细胞中测量了 ROS 和 MDA 的积累以及 SOD 和 CAT 的活性。与对照组相比,暴露于 PS-NPs 或 TCS 单独时,ROS 水平显著增加;而在 PS-NPs 和 TCS 的共同作用下,这种增加更显著(图 3.3.2 A 和 B, $P < 0.05$)。与对照组相比,暴露于 PS-NPs 或 TCS 单独时,SOD 和 CAT 的活性显著降低。与单独暴露组相比,共同作用组的 SOD 活性差异显著,但 CAT 活性没有显著变化(图 3.3.2 C 和 D, $P < 0.05$)。作为细胞膜过氧化损伤的生物标志物,MDA 在 NPs 和 TCS 共同作用后显著增加。但是在单独暴露于 NPs 和 TCS 后没有显著变化(图 3.3.2 E, $P < 0.05$)。

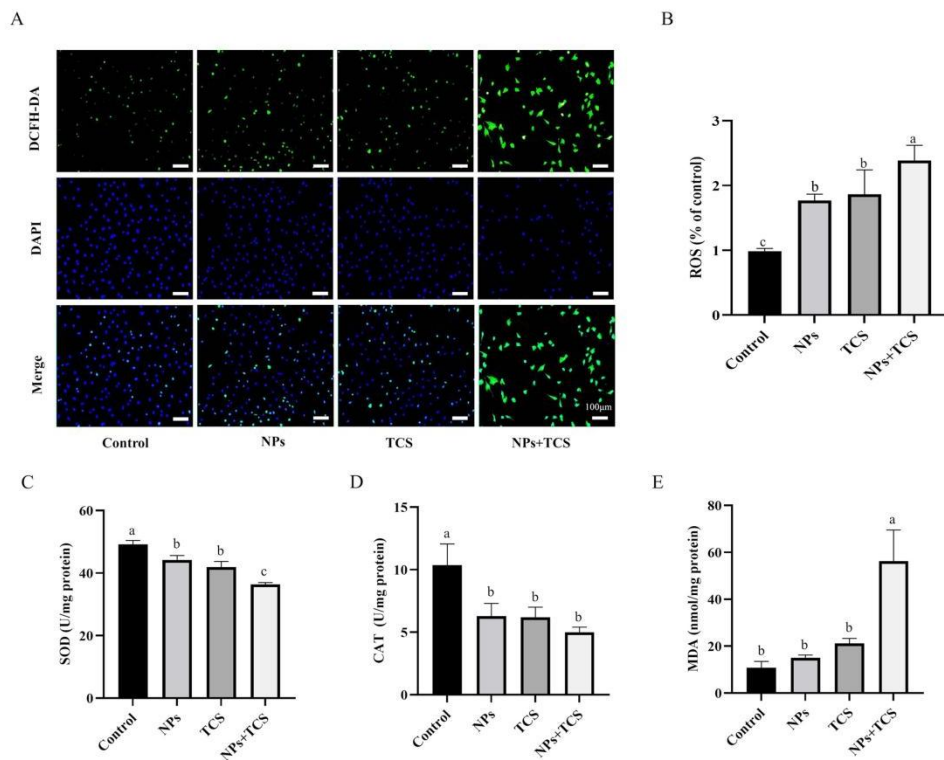


图 3.3.2 PS-NPs 和 TCS 的暴露诱导 KGN 细胞氧化应激

(A) 细胞内 ROS 水平的荧光图像 (Bar: 100 μm) 和 (B) 多功能微孔板阅读器测量的 ROS 水平的定量分析。KGN 细胞中的 (C) SOD 活性, (D) CAT 活性和 (E) MDA 水平。n=3, 不同字母表示存在显著差异 ($P < 0.05$)。

3.3.3 PS-NPs 和 TCS 的暴露导致 KGN 细胞线粒体损伤

我们使用线粒体膜电位测定试剂盒评估了线粒体跨膜电位的变化。当线粒体膜电位丧失时，线粒体通透性转换孔（MPTP）保持开放状态，导致荧光探针 TMRE 释放到细胞质中，荧光强度显著降低。与对照组相比，PS-NPs 或 TCS 单独暴露或 PS-NPs 和 TCS 的共同作用显著降低了荧光强度（图 3.3.3 A）。我们使用 ImageJ 对荧光信号进行了定量分析（图 3.3.3 B, $P < 0.05$ ）。与对照组相比，各处理组的膜电位显著降低。

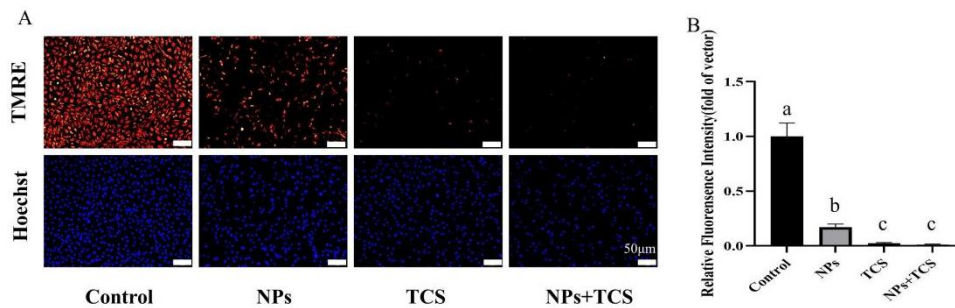


图 3.3.3 PS-NPs 和 TCS 的暴露引起 KGN 细胞线粒体功能障碍

(A) 线粒体膜电位的荧光图像，Bar: 50 μm 和 (B) 荧光定量分析。n=3，不同字母表示存在显著差异 ($P < 0.05$)。

3.3.4 PS-NPs 和 TCS 的暴露激活了 KEAP1-NRF2-HO-1 通路

我们评估了蛋白质表达以调查 PS-NPs 和 TCS 诱导的氧化应激是否与 SESTRIN2 和 KEAP1-NRF2-HO-1 途径的变化相关（图 3.3.4 A）。与对照组相比，核 NRF2 蛋白表达显著增加，同时细胞质 NRF2 减少（图 3.3.4 B），KEAP1 蛋白表达显著降低（图 3.3.4 C, $P < 0.05$ ），HO-1 蛋白表达显著增加（图 3.3.4 D, $P < 0.05$ ），在 PS-NPs 和 TCS 的共同作用后。对于这些蛋白质，与单独暴露其中任何一个成分引起的变化相比，共同暴露 PS-NPs 和 TCS 引起的变化更加显著。与对照组相比，NPs 暴露的细胞中 SESTRIN2 蛋白表达轻微增加，而

共同暴露于 PS-NPs 和 TCS 的细胞中显著减少（图 3.3.4 E, $P < 0.05$ ）。

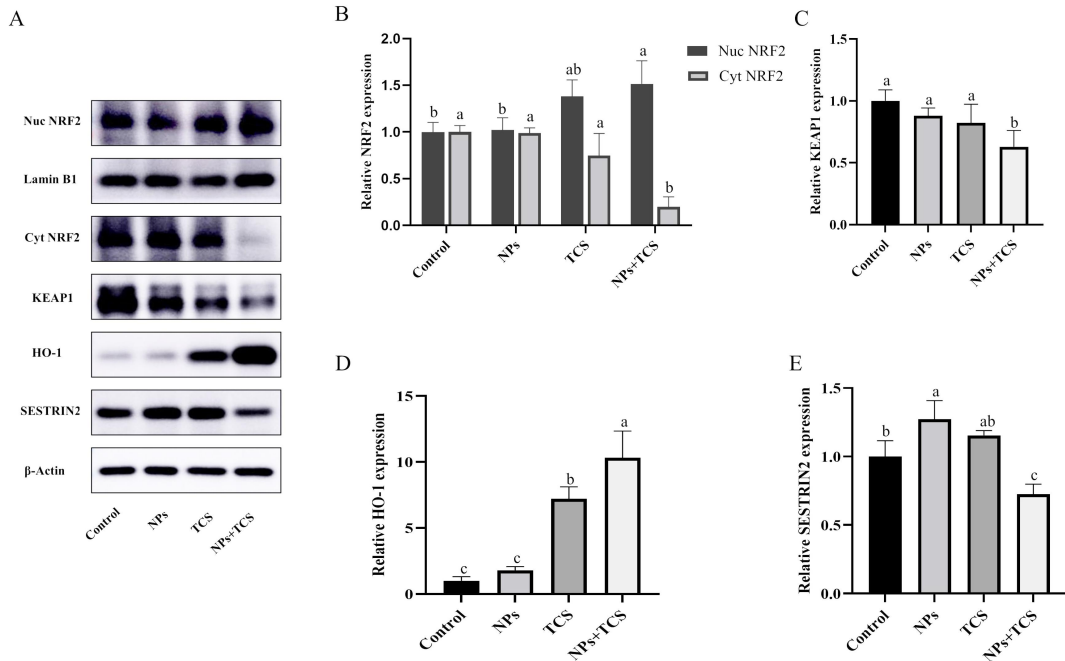


图 3.3.4 PS-NPs 和 TCS 的暴露激活了 KGN 细胞中的抗氧化应激通路

(A)图显示 KGN 细胞核(Nuc)和细胞质(Cyt)NRF2、KEAP1、HO-1 和 SESTRIN2 蛋白表达。(B) Nuc 和 Cyt-NRF2, (C) KEAP1, (D) HO-1 和 (E) SESTRIN2 的蛋白表达的定量分析。n=3, 不同字母表示存在显著差异 ($P < 0.05$)。

3.3.5 PS-NPs 和 TCS 的暴露引起 KGN 细胞过度自噬

为进一步探讨 PS-NPs 和 TCS 引起的细胞毒性是否与自噬有关, 我们测量了 KGN 细胞中的自噬泡和自噬流, 并确定了与自噬相关的蛋白 LC3B-I、LC3B-II、P62 和 ATG5 的表达。绿色荧光信号表示自噬泡。在暴露 PS-NPs 和/或 TCS 后, 与对照组相比, 自噬泡的数量增加（图 3.3.5 A）。此外, 与仅暴露 PS-NPs 或 TCS 相比, 与 PS-NPs 和 TCS 的共同作用后, LC3B-II/LC3B-I 比值和 ATG5 蛋白表达显著增加, 而 P62 蛋白表达显著减少（图 3.3.5 B-E, $P < 0.05$ ）。

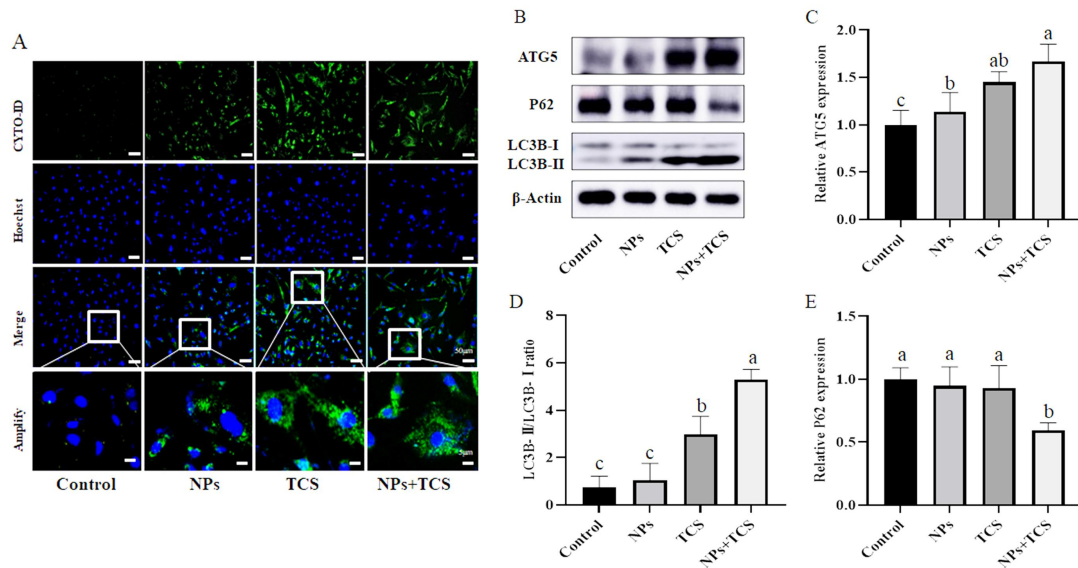


图 3.3.5 PS-NPs 和 TCS 的暴露激活了 KGN 细胞的自噬

(A) 使用 Cyto-ID 绿色染色检测自噬泡和自噬通量, Bar: 50μm。(B) 蛋白印迹显示 KGN 细胞中 LC3B-I、LC3B-II、P62 和 ATG5 蛋白表达。(C) ATG5 蛋白表达的定量分析, (D) LC3B-II / LC3B-I 比值, 以及 (E) P62 蛋白表达。n=3, 不同字母表示存在显著差异 ($P < 0.05$)。

3.3.6 PS-NPs 和 TCS 的暴露诱导 KGN 细胞凋亡

为了调查在暴露 NPs 和 TCS 后是否触发了凋亡, 我们进行了一项 Annexin V-PI 染色实验, 并测量了与凋亡相关的蛋白 BCL-2 和 BAX 的表达。与对照组和仅暴露 PS-NPs 或 TCS 相比, 与 PS-NPs 和 TCS 的共同作用显著增加了绿色荧光强度 (图 3.3.6 A 和 B, $P < 0.05$), 显著增加了 Cleaved CASPASE-3 蛋白表达, 并显著降低了 BCL-2/BAX 比值 (图 3.3.6 C-G, $P < 0.05$)。

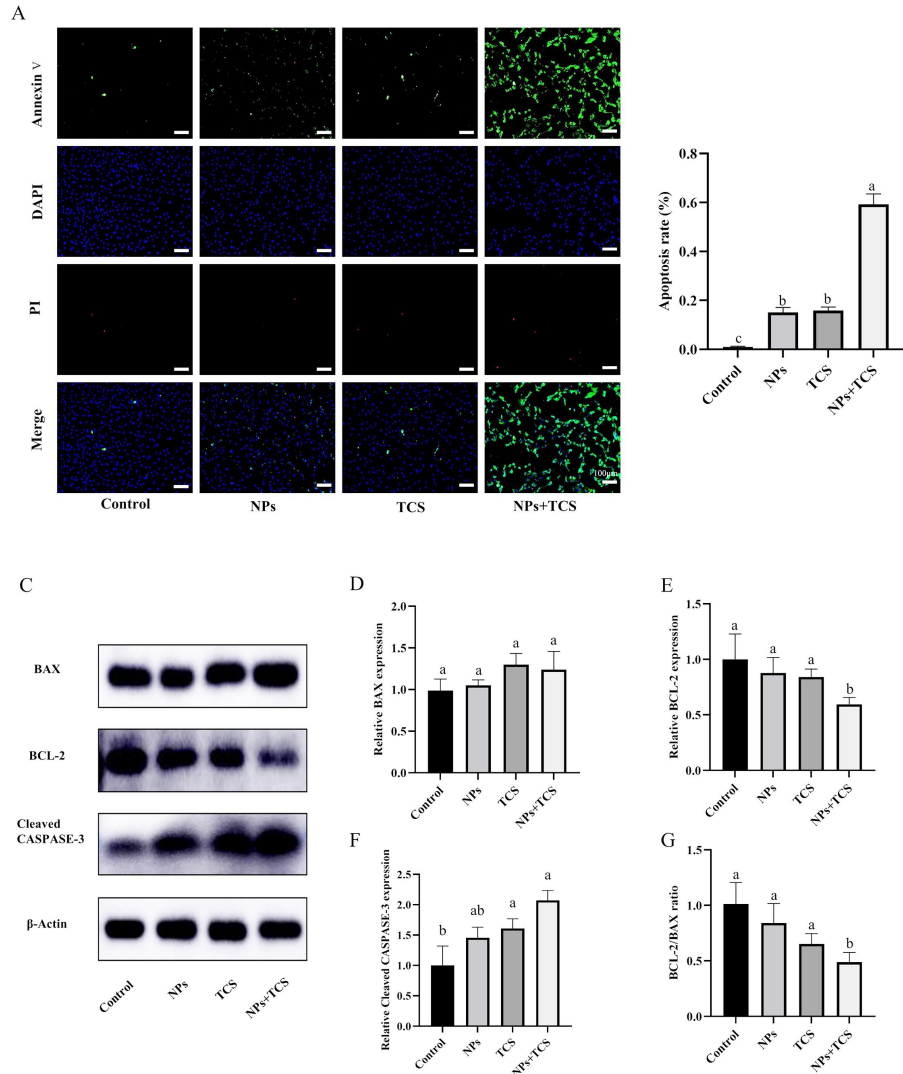


图 3.3.6 PS-NPs 和 TCS 的暴露诱导了 KGN 细胞的凋亡

(A)用 Annexin V(绿色)和 PI(红色)染色的 KGN 细胞的荧光图像,Bar: 100μm。
 (B)凋亡率的定量分析。(C)代表性的蛋白印迹显示 KGN 细胞中 BAX、BCL-2、Cleaved CASPASE-3 蛋白的表达。(D)BAX, (E)BCL-2, (F)Cleaved CASPASE-3 蛋白表达的定量分析以及 (G) BCL-2 / BAX 比值。n=3, 不同字母表示存在显著差异 ($P < 0.05$)。

第4章 讨论

污染物通常在自然环境中以混合物的形式共存。由微塑料和 TCS 引起的污染问题变的越来越严重，人们尤其关注它们的生殖毒性作用。例如，微塑料通过影响精子与卵子碰撞的概率和减少配子融合的效率，增强了对 TCS 对泥蚶的生殖毒性^[41]。与微塑料相比，纳米塑料和 TCS 的共同暴露在跳蚤上产生了更显著的协同毒性效应^[42]。最近的研究揭示了环境中的纳米塑料可能成为各种水生生物群体意外摄入的食物来源，它们通过食物链富集在人体的各个器官中。被肠道消化后，这些纳米塑料的表面似乎具有增强吸附疏水离子污染物如 TCS 的功能基团^[43]。在成年雌性小鼠中，暴露于 TCS 导致发情周期延长，减少卵泡和黄体。尽管雌性的正常生殖功能受到正常卵巢活动的影响，但下丘脑分泌促性腺激素释放激素（GnRH）以及随后垂体释放促性腺激素（LH 和 FSH）也是主要的调节因素。因此，下丘脑-垂体-卵巢轴在雌性生殖中扮演着关键的角色^[44]。暴露于 TCS 的小鼠表现出较低的血清黄体生成激素（LH）、促卵泡生成激素（FSH）和孕激素水平，以及促性腺激素释放激素（GnRH）mRNA 水平的降低^[45]。人群研究表明，TCS 与不孕症、新生儿先天缺陷以及婴儿出生体重存在一定关联。三氯生可以潜在地破坏卵泡的形成和发育，导致卵泡储备的减少，从而损害生殖健康^[46, 47]。因此，NPs 和 TCS 的共同暴露可能对包括人类在内的许多生物的生殖健康和安全性构成严重威胁。例如 NPs 和 TCS 的联合暴露破坏了跳蚤和韩国臂尾轮虫的多型异源物质抗性机制（MXR），引起氧化应激和脂质膜损伤^[48]。基于这些先前的发现，我们评估了 PS-NPs 和 TCS 在雌性小鼠和人类卵巢颗粒细胞系 KGN 细胞中的联合毒性和作用机制。与仅暴露于 PS-NPs 或 TCS 相比，联合暴露组小鼠卵巢指数，卵泡计数，血清激素下降更为明显，并且联合暴露组的自噬和凋亡率显著升高，共同暴露于 PS-NPs 和 TCS 导致小鼠卵巢损伤，具有明显的协同毒性效应。PS-NPs 和 TCS 的共同暴露导致了卵巢损伤和卵泡数量的下降或许是生殖激素减少的主要原因，但其与下丘脑-垂体-卵巢轴的联系值得进一步研究。

为了进一步探究 NPs 和 TCS 联合毒性的具体机制，我们使用 KGN 细胞系进行进一步探究。纳米塑料和三氯生均可以诱导氧化应激发生。纳米塑料可以

在各种细胞、组织和器官中积累,导致 ROS 依赖性的功能障碍^[49]。此外,三氯生增加了黑色素瘤细胞中有丝分裂诱导 ROS 产生,导致 ROS 依赖性的细胞死亡和自噬^[50]。尽管 ROS 是线粒体代谢的自然副产品,但过度积累可能引起氧化应激,导致线粒体功能障碍和细胞损伤^[51]。在本研究中,KGN 细胞暴露于 PS-NPs 和 TCS 24 h,与对照组和单独暴露组相比,联合暴露组显著增加了 ROS,并降低了线粒体膜电位。此外,SOD 和 CAT 活性显著减少,而 MDA 积累显著增加。PS-NPs 和 TCS 的共同暴露加剧了细胞中 ROS 的积累,呈现出协同效应。氧化应激诱导的卵巢颗粒细胞损伤可能导致卵巢功能障碍,这可能是雌性卵巢滋养层受限、排卵障碍和生殖功能障碍的潜在原因之一^[52, 53]。

NRF2-KEAP1-HO-1 通路对于调节细胞氧化应激至关重要。通常情况下,NRF2 在细胞质中与 KEAP1 结合,防止其释放。然而,氧化压力的变化导致 KEAP1 发生结构变化,释放 NRF2,使其能够转位到细胞核^[54]。一旦在细胞核中,NRF2 与抗氧化应激元件(AREs)结合,并在氧化应激损伤的情况下激活基因的转录,如 HO-1^[55]。通过人卵巢组织的免疫组织化学实验,成功确定了 Nrf2 和 Keap1 的定位。此外,在人卵巢颗粒细胞中检测到了 Nrf2 和 Keap1 的表达^[56]。在 NRF2 蛋白质水平下调后,卵巢颗粒细胞中催化酶、超氧化物歧化酶 1(SOD1)和 8-羟基鸟嘌呤 DNA 糖苷酶(OGG1)的 mRNA 水平显著下降。NRF2 的激活可能有助于缓解人卵巢颗粒细胞中的氧化应激^[57]。SESTRIN2 是一种抵抗各种应激因素的应激蛋白,包括 DNA 损伤、缺氧和氧化应激^[58]。SESTRIN2 的敲除进一步增强了氧化应激诱导的颗粒细胞活力和增殖能力下降。相反,SESTRIN2 的过表达降低了细胞内活性氧化物质(ROS)和丙二醛(MDA)水平,增加超氧化物歧化酶(SOD)酶活性,缓解了线粒体功能障碍,降低了 BAX 和 CASPASE-3 的表达,增加了 BCL-2 的表达,抑制了细胞凋亡^[59]。研究表明,SESTRIN2 干扰了 NRF2 与 KEAP1 的结合,使 NRF2 能够转位到细胞核并激活其靶基因的表达(例如 HO-1)^[60]。SESTRIN2 和 NRF2 之间存在积极的相互作用,促进抗氧化活性,减少线粒体损伤^[61]。SESTRIN2 蛋白的低表达会影响 NRF2 蛋白的表达,并减弱了细胞的抗氧化防御能力^[62, 63]。在外界应激因素来临时,机体通过激活 KEAP1-NRF2-HO-1 抗氧化途径,抵抗外部压力引起的损伤。然而,对于压力的长时间暴露或高剂量的压力可能会超过机体的抗氧化能力,导致严重的损伤^[11]。我们发现单独暴露于 PS-NPs 或 TCS 初期轻微上调了 SESTRIN2 的表达,但在联合暴露组中 SESTRIN2 的表达下降,而 HO-1

的表达仍然较高。或许,这可能是一种毒物兴奋效应的表现,进一步表明与单独暴露的组相比,联合暴露组表现出更高的毒性^[64]。这些发现表明 SESTRIN2 在应对氧化应激中具有更敏感的作用,并对 NRF2 产生负面的反馈调控效应。

联合暴露于 NPs 和 TCS 可能会降低细胞的抗氧化能力,导致氧化应激并进一步损害大分子和细胞器。因此,细胞可能通过上调自身的保护机制并通过激活自噬来恢复稳定性。自噬的激活与线粒体膜通透性有关^[65]。线粒体膜通透性转换孔(MPTP)的短暂开放调节线粒体 ROS。然而,MPTP 的长时间开放可能导致线粒体能量功能障碍、细胞器肿胀和凋亡^[66]。LC3B-I、LC3B-II、P62 和 ATG5 蛋白是自噬的关键组成部分^[67]。选择性的自噬受体 P62 招募泛素化的蛋白质,最终由自噬酶降解^[68]。LC3B-II/LC3B-I 比率和 P62 蛋白表达通常用于评估细胞中自噬活性^[69]。在本研究中,PS-NPs 和 TCS 的联合暴露显著诱导了小鼠卵巢和 KGN 细胞中的自噬,促进了自噬体的形成,增加了 ATG5 蛋白的表达以及 LC3B-II/LC3B-I 比率。P62 蛋白表达的降低证实了顺畅的自噬通路。然而,过度或不适当的自噬可能导致自噬依赖性的细胞死亡^[70]。ROS 的过度积累也可能诱导凋亡^[71],我们的结果显示,PS-NPs 和 TCS 的联合暴露显著增加了小鼠卵巢和 KGN 细胞的凋亡率,联合暴露主要在凋亡的早期阶段增加了 Cleaved CASPASE-3 水平,并减少了 BCL-2/BAX 比率。

低剂量的 NPs 和 TCS 的联合暴露增强了毒性。这表明在日常生活中,两种或更多有毒物质共同作用的风险可能比单独暴露于这些成分时更为严重。然而,我们的实验只能作为风险评估的一部分。为了充分了解 NPs 和 TCS 的联合毒性,还需要进行人群和生态学研究。这是我们研究的主要局限性。尽管一般人群对 NPs 和 TCS 的暴露浓度较低,但是随着暴露时间和接触的增加,它们在体内的生物积累也会增加,因此对人体健康的潜在风险增加^[72]。TCS 通常在化妆品和肥皂中发现,对女性的生殖健康影响较大,而对男性的生殖健康影响较小^[73]。先前的研究表明日常食物和饮料在使用后可能会释放 NPs,人们则可能更容易摄入。因此,减少使用塑料制品并避免使用含有 TCS 的肥皂或化妆品是降低潜在风险的有意义的措施。

5.1 结论

5.2 创新点

本研究通过 NPs 和 TCS 单独或联合暴露时对雌性小鼠和人卵巢颗粒细胞的毒性作用，系统的阐明两者联合的协同雌性生殖毒性作用，相比单一的暴露更有现实意义。本研究重点讨论了 SESTRIN2 在 KEAP1-NRF2-HO-1 抗氧化应激通路中的作用，为氧化应激的稳态失衡导致细胞自噬和凋亡提供了新的视角。

5.3 不足和展望

本文研究了 PS-NPs 和 TCS 对雌性小鼠卵巢的亚急性暴露和 KGN 细胞的急性暴露，系统阐明了两种污染物联合暴露的毒理学作用和机制，但是缺少慢性低剂量暴露研究，存在一定局限性。本研究应用了体内小鼠模型和体外细胞模型，但是缺乏人群暴露的研究，这也是后续我们所要关注的重点。探究 NPs 和 TCS 在人群中的暴露水平，开展风险评估，探究它们与其他疾病的相关性，进而为人群健康做出指导和帮助。

参考文献

- [1] MacLeod M, Arp H, Tekman M B, et al. The global threat from plastic pollution[J]. *Science*, 2021,373(6550):61-65.
- [2] Shah S, Ilyas M, Li R, et al. Microplastics and Nanoplastics Effects on Plant-Pollinator Interaction and Pollination Biology[J]. *Environ Sci Technol*, 2023,57(16):6415-6424.
- [3] Goncalves J M, Bebianno M J. Nanoplastics impact on marine biota: A review[J]. *Environ Pollut*, 2021,273:116426.
- [4] Sun N, Shi H, Li X, et al. Combined toxicity of micro/nanoplastics loaded with environmental pollutants to organisms and cells: Role, effects, and mechanism[J]. *Environ Int*, 2023,171:107711.
- [5] Liu X, Yang H, Yan X, et al. Co-exposure of polystyrene microplastics and iron aggravates cognitive decline in aging mice via ferroptosis induction[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022,233:113342.
- [6] Huang W, Yin H, Yang Y, et al. Influence of the co-exposure of microplastics and tetrabromobisphenol A on human gut: Simulation in vitro with human cell Caco-2 and gut microbiota[J]. *Sci Total Environ*, 2021,778:146264.
- [7] Deng Y, Yan Z, Shen R, et al. Enhanced reproductive toxicities induced by phthalates contaminated microplastics in male mice (*Mus musculus*)[J]. *J Hazard Mater*, 2021,406:124644.
- [8] Wu H, Liu Q, Yang N, et al. Polystyrene-microplastics and DEHP co-exposure induced DNA damage, cell cycle arrest and necroptosis of ovarian granulosa cells in mice by promoting ROS production[J]. *Sci Total Environ*, 2023,871:161962.
- [9] Xiong Y, Zhao J, Li L, et al. Interfacial interaction between micro/nanoplastics and typical PPCPs and nanoplastics removal via electrosorption from an aqueous solution[J]. *Water Res*, 2020,184:116100.
- [10] Feng M, Luo J, Wan Y, et al. Polystyrene Nanoplastic Exposure Induces Developmental Toxicity by Activating the Oxidative Stress Response and Base Excision Repair Pathway in Zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *ACS Omega*, 2022,7(36):32153-32163.
- [11] Huang J, Zou L, Bao M, et al. Toxicity of polystyrene nanoparticles for mouse ovary and cultured human granulosa cells[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023,249:114371.
- [12] Zeng L, Zhou C, Xu W, et al. The ovarian-related effects of polystyrene nanoplastics on human ovarian granulosa cells and female mice[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023,257:114941.
- [13] Shen F, Li D, Guo J, et al. Mechanistic toxicity assessment of differently sized and charged polystyrene nanoparticles based on human placental cells[J]. *Water Res*,

- 2022,223:118960.
- [14] Lin X, Wang Y, Yang X, et al. Endocrine disrupting effect and reproductive toxicity of the separate exposure and co-exposure of nano-polystyrene and diethylstilbestrol to zebrafish[J]. *Sci Total Environ*, 2023,865:161100.
- [15] Zhang J, Zou Y, Hu L, et al. TiO₂ nanoparticles combined with polystyrene nanoplastics aggravated reproductive toxicity in female mice via exacerbating intestinal barrier disruption[J]. *J Sci Food Agric*, 2023.
- [16] Montagnini B G, Forcato S, Pernoncine K V, et al. Developmental and Reproductive Outcomes in Male Rats Exposed to Triclosan: Two-Generation Study[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021,12:738980.
- [17] Maksymowicz M, Reka G, Machowiec P, et al. Impact of Triclosan on Female and Male Reproductive System and Its Consequences on Fertility: A Literature Review[J]. *J Family Reprod Health*, 2022,16(1):33-42.
- [18] Du Y, Wang B, Cai Z, et al. The triclosan-induced shift from aerobic to anaerobic metabolism link to increased steroidogenesis in human ovarian granulosa cells[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021,220:112389.
- [19] De Marchi L, Freitas R, Oliva M, et al. Does salinity variation increase synergistic effects of triclosan and carbon nanotubes on *Mytilus galloprovincialis*? Responses on adult tissues and sperms[J]. *Sci Total Environ*, 2020,734:138837.
- [20] Milanovic M, Duric L, Milosevic N, et al. Comprehensive insight into triclosan-from widespread occurrence to health outcomes[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2023,30(10):25119-25140.
- [21] Kumar K S, Priya S M, Peck A M, et al. Mass loadings of triclosan and triclocarbon from four wastewater treatment plants to three rivers and landfill in Savannah, Georgia, USA[J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2010,58(2):275-285.
- [22] Chen Z F, Wen H B, Dai X, et al. Contamination and risk profiles of triclosan and triclocarban in sediments from a less urbanized region in China[J]. *J Hazard Mater*, 2018,357:376-383.
- [23] Wang C F, Tian Y. Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population exposure, present evidence and potential mechanisms[J]. *Environ Pollut*, 2015,206:195-201.
- [24] Zhang D, Xiao J, Xiao Q, et al. Infant exposure to parabens, triclosan, and triclocarban via breastfeeding and formula supplementing in southern China[J]. *Sci Total Environ*, 2023,858(Pt 1):159820.
- [25] Wang F, Zheng F, Liu F. Effects of triclosan on antioxidant- and apoptosis-related genes expression in the gill and ovary of zebrafish[J]. *Exp Anim*, 2020,69(2):199-206.
- [26] Du Y, Wang B, Cai Z, et al. The triclosan-induced shift from aerobic to anaerobic metabolism link to increased steroidogenesis in human ovarian granulosa cells[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021,220:112389.

- [27] Han M, Niu X, Tang M, et al. Distribution of microplastics in surface water of the lower Yellow River near estuary[J]. *Sci Total Environ*, 2020,707:135601.
- [28] Allen D, Allen S, Abbasi S, et al. Microplastics and nanoplastics in the marine-atmosphere environment[J]. *NATURE REVIEWS EARTH & ENVIRONMENT*, 2022,3(6):393-405.
- [29] Besseling E, Redondo-Hasselerharm P, Foekema E M, et al. Quantifying ecological risks of aquatic micro- and nanoplastic[J]. *Critical reviews in environmental science and technology*, 2019,49(1/6):32-80.
- [30] Ruan X, Xie L, Liu J, et al. Rapid detection of nanoplastics down to 20 nm in water by surface-enhanced raman spectroscopy[J]. *J Hazard Mater*, 2024,462:132702.
- [31] Yao Y, Glamoclija M, Murphy A, et al. Characterization of microplastics in indoor and ambient air in northern New Jersey[J]. *Environ Res*, 2022,207:112142.
- [32] Jones J I, Vdovchenko A, Cooling D, et al. Systematic Analysis of the Relative Abundance of Polymers Occurring as Microplastics in Freshwaters and Estuaries[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020,17(24).
- [33] Li J, Huang X, Hou Z, et al. Sorption of diclofenac by polystyrene microplastics: Kinetics, isotherms and particle size effects[J]. *Chemosphere*, 2022,290:133311.
- [34] Cortes-Arriagada D, Miranda-Rojas S, Camarada M B, et al. The interaction mechanism of polystyrene microplastics with pharmaceuticals and personal care products[J]. *Sci Total Environ*, 2023,861:160632.
- [35] Mohamed B A, Fattah I, Yousaf B, et al. Effects of the COVID-19 pandemic on the environment, waste management, and energy sectors: a deeper look into the long-term impacts[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022,29(31):46438-46457.
- [36] Das M, Djahanbakhch O, Hacıhanefioglu B, et al. Granulosa cell survival and proliferation are altered in polycystic ovary syndrome[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008,93(3):881-887.
- [37] Nishi Y, Yanase T, Mu Y, et al. Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor[J]. *Endocrinology*, 2001,142(1):437-445.
- [38] Zeng L, Zhou C, Xu W, et al. The ovarian-related effects of polystyrene nanoplastics on human ovarian granulosa cells and female mice[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023,257:114941.
- [39] Cao Y, Xi J, You X, et al. Dose-response genotoxicity of triclosan in mice: an estimate of acceptable daily intake based on organ toxicity[J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2021,10(6):1153-1161.
- [40] Banerjee A, Shelver W L. Micro- and nanoplastic induced cellular toxicity in mammals: A review[J]. *Sci Total Environ*, 2021,755(Pt 2):142518.
- [41] Lu L, Huang W, Han Y, et al. Toxicity of microplastics and triclosan, alone and in combination, to the fertilisation success of a broadcast spawning bivalve *Tegillarca granosa*[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2023,101:104208.

- [42] Pashaei R, Dzingeleviciene R, Putna-Nimane I, et al. Acute toxicity of triclosan, caffeine, nanoplastics, microplastics, and their mixtures on *Daphnia magna*[J]. *Mar Pollut Bull*, 2023,192:115113.
- [43] Krasucka P, Bogusz A, Baranowska-Wojcik E, et al. Digestion of plastics using in vitro human gastrointestinal tract and their potential to adsorb emerging organic pollutants[J]. *Sci Total Environ*, 2022,843:157108.
- [44] Shoorei H, Seify M, Talebi S F, et al. Different types of bisphenols alter ovarian steroidogenesis: Special attention to BPA[J]. *Heliyon*, 2023,9(6):e16848.
- [45] Cao X Y, Hua X, Xiong J W, et al. Impact of Triclosan on Female Reproduction through Reducing Thyroid Hormones to Suppress Hypothalamic Kisspeptin Neurons in Mice[J]. *Front Mol Neurosci*, 2018,11:6.
- [46] Chen X, Mou L, Qu J, et al. Adverse effects of triclosan exposure on health and potential molecular mechanisms[J]. *Sci Total Environ*, 2023,879:163068.
- [47] Minguez-Alarcon L, Christou G, Messerlian C, et al. Urinary triclosan concentrations and diminished ovarian reserve among women undergoing treatment in a fertility clinic[J]. *Fertil Steril*, 2017,108(2):312-319.
- [48] Jeong C B, Kang H M, Lee Y H, et al. Nanoplastic Ingestion Enhances Toxicity of Persistent Organic Pollutants (POPs) in the Monogonont Rotifer *Brachionus koreanus* via Multixenobiotic Resistance (MXR) Disruption[J]. *Environ Sci Technol*, 2018,52(19):11411-11418.
- [49] Sun Z, Wen Y, Zhang F, et al. Exposure to nanoplastics induces mitochondrial impairment and cytomembrane destruction in Leydig cells[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023,255:114796.
- [50] Jin J, Chen N, Pan H, et al. Triclosan induces ROS-dependent cell death and autophagy in A375 melanoma cells[J]. *Oncol Lett*, 2020,20(4):73.
- [51] Zhang B, Pan C, Feng C, et al. Role of mitochondrial reactive oxygen species in homeostasis regulation[J]. *Redox Rep*, 2022,27(1):45-52.
- [52] Ji R, Jia F, Chen X, et al. Carnosol inhibits KGN cells oxidative stress and apoptosis and attenuates polycystic ovary syndrome phenotypes in mice through Keap1-mediated Nrf2/HO-1 activation[J]. *Phytother Res*, 2023,37(4):1405-1421.
- [53] Sun P, Zhang Y, Sun L, et al. Kisspeptin regulates the proliferation and apoptosis of ovary granulosa cells in polycystic ovary syndrome by modulating the PI3K/AKT/ERK signalling pathway[J]. *BMC Womens Health*, 2023,23(1):15.
- [54] Yu C, Xiao J H. The Keap1-Nrf2 System: A Mediator between Oxidative Stress and Aging[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021,2021:6635460.
- [55] Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, et al. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018,1865(5):721-733.
- [56] Xu B, He T, Yang H, et al. Activation of the p62-Keap1-Nrf2 pathway protects against oxidative stress and excessive autophagy in ovarian granulosa cells to attenuate

- DEHP-induced ovarian impairment in mice[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023,265:115534.
- [57] Akino N, Wada-Hiraike O, Terao H, et al. Activation of Nrf2 might reduce oxidative stress in human granulosa cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018,470:96-104.
- [58] Ala M, Eftekhari S P. Target Sestrin2 to Rescue the Damaged Organ: Mechanistic Insight into Its Function[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021,2021:8790369.
- [59] Wang X, Yang J, Li H, et al. miR-484 mediates oxidative stress-induced ovarian dysfunction and promotes granulosa cell apoptosis via SESN2 downregulation[J]. *Redox Biol*, 2023,62:102684.
- [60] Zhang L L, Ding K, Liao S S, et al. Sestrin2 reduces ferroptosis via the Keap1/Nrf2 signaling pathway after intestinal ischemia-reperfusion[J]. *Free Radic Biol Med*, 2024,214:115-128.
- [61] Zhou X R, Ru X C, Xiao C, et al. Sestrin2 is involved in the Nrf2-regulated antioxidative signaling pathway in luteolin-induced prevention of the diabetic rat heart from ischemia/reperfusion injury[J]. *Food Funct*, 2021,12(8):3562-3571.
- [62] Pasha M, Eid A H, Eid A A, et al. Sestrin2 as a Novel Biomarker and Therapeutic Target for Various Diseases[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017,2017:3296294.
- [63] Wang P, Zhao Y, Li Y, et al. Sestrin2 overexpression attenuates focal cerebral ischemic injury in rat by increasing Nrf2/HO-1 pathway-mediated angiogenesis[J]. *Neuroscience*, 2019,410:140-149.
- [64] Bondy S C. The Hormesis Concept: Strengths and Shortcomings[J]. *Biomolecules*, 2023,13(10).
- [65] Li A, Gao M, Liu B, et al. Mitochondrial autophagy: molecular mechanisms and implications for cardiovascular disease[J]. *Cell Death Dis*, 2022,13(5):444.
- [66] Kwong J Q, Molckentin J D. Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart[J]. *Cell Metab*, 2015,21(2):206-214.
- [67] Satyavarapu E M, Das R, Mandal C, et al. Autophagy-independent induction of LC3B through oxidative stress reveals its non-canonical role in anoikis of ovarian cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2018,9(10):934.
- [68] Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm[J]. *Essays Biochem*, 2017,61(6):609-624.
- [69] Orrenius S, Kaminsky V O, Zhivotovsky B. Autophagy in toxicology: cause or consequence?[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013,53:275-297.
- [70] Zhou B, Kreuzer J, Kumsta C, et al. Mitochondrial Permeability Uncouples Elevated Autophagy and Lifespan Extension[J]. *Cell*, 2019,177(2):299-314.
- [71] Wang B, Wang Y, Zhang J, et al. ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis[J]. *Arch Toxicol*, 2023,97(6):1439-1451.
- [72] Masseroni A, Rizzi C, Urani C, et al. Nanoplastics: Status and Knowledge Gaps in the Finalization of Environmental Risk Assessments[J]. *Toxics*, 2022,10(5).

参考文献

- [73] Alfahli M A, Lee M H. Triclosan: An Update on Biochemical and Molecular Mechanisms[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019,2019:1607304.

综 述

微纳米塑料与其他污染物联合暴露的生殖毒性作用及其机制研究进展

摘要：微塑料（MPs）和纳米塑料（NPs）作为一种公认的新兴污染物，它们对环境污染和公共卫生的影响日益受到人们的关注。在日常生活中微纳米塑料也可以通过摄入、吸入和皮肤等方式进入人体。因此，人们普遍担心，微纳米塑料除了引起环境问题外，还可能对人类健康产生不良影响。MPs/NPs 对肝脏、胃肠系统和炎症水平的威胁，已经在之前的研究中得到了充分的探索。随着 MPs/NPs 可以穿透血睾屏障的研究证实和在胎盘中检测到 MPs/NPs，越来越多的研究将重点放在生殖毒性上。此外，由于环境中的污染物不是单一存在的，MPs/NPs 有可能与其他污染物尤其是持久性内分泌干扰物相互作用，从而增强生殖功能障碍等综合毒性。本综述重点讨论微纳米塑料和其他环境污染物联合暴露对生殖毒性的作用和机制，为微纳米塑料和其他污染物对人类健康影响的危险度评价提供理论基础，从而为人们预防危险暴露，保护生殖健康提供参考。

关键词：联合暴露；微塑料；纳米塑料；生殖毒性

Abstract: Microplastics (MPs) and Nanoplastics (NPs) are recognized as emerging pollutants, and their impacts on environmental pollution and public health are receiving increasing attention. In daily life, micro- and nanoplastics can also enter the human body through ingestion, inhalation, and skin contact. Therefore, there is widespread concern that besides causing environmental issues, micro- and nanoplastics may also have adverse effects on human health. As research confirms the ability of MPs/NPs to penetrate the blood-testis barrier and the detection of MPs/NPs in the placenta, an increasing number of studies are focusing on reproductive toxicity. Additionally, due to the coexistence of multiple pollutants in

the environment, MPs/NPs may interact with other pollutants, especially persistent endocrine disruptors, thereby enhancing comprehensive toxicity such as reproductive dysfunction. This review focuses on discussing the effects and mechanisms of combined exposure to micro- and nanoplastics with other environmental pollutants on reproductive toxicity. It aims to provide research insights into the impact of micro- and nanoplastics along with other pollutants on human health.

Keywords: Combined Exposure; Microplastics; Nanoplastics; Reproductive Toxicity

1 前言

随着全球工业化的推进,塑料已经成为这个时代的主导。主要的塑料种类,如聚乙烯(PE)、聚丙烯、聚氯乙烯、聚苯乙烯(PS)、聚氨酯和聚对苯二甲酸乙二醇酯,已经占据了80%的塑料市场份额^[1]。尽管塑料的广泛应用带来了便利,但也导致大量塑料垃圾被排放到环境中,引发了塑料在生态系统中的积累。这些塑料垃圾在各种环境中广泛存在,包括内河、土壤、空气,甚至是极地地区^[2]。随着塑料制品的消费增加和塑料废品在环境中的积累,塑料污染已经演变为全球性问题。一旦大块的塑料材料进入环境,就会通过热熔解、光化学反应、氧化等过程逐渐分解成微塑料颗粒,这些颗粒可能在环境中存在很长时间^[3]。除了自然来源的塑料微粒,工业生产也会将微塑料被添加到个人护理产品中,如乳液、保湿霜、清洁剂和牙膏,以满足市场需求^[4]。目前人们根据粒径大小将塑料颗粒主要分为直径小于5 mm的微塑料(MPs)和小于100 nm之间的纳米塑料(NPs)^[5]。

微纳米塑料在环境中无处不在, Gyrewere 收集的北大西洋水样显示,其中包含了9%聚苯乙烯(PS)、18%PET和73%聚氯乙烯(PVC)等纳米聚合物成分^[6]。意大利奥凡托河的水样受到PE、PP(聚丙烯)、PS、PVC和PUR(聚氨酯)聚合物的污染,中国青藏高原河流被PET、PE、PP、PS和聚酰胺(PA)聚合物污染^[7-8];中国渭河受到PE、PVC和PS的污染^[9]。除了由水携带外,微纳米塑料还可以从家庭和工业灰尘和烟尘中传播到大气中。这种广泛的分布有利于不同物种受到微纳米塑料的污染,尤其是皮肤暴露、吸入和摄入^[10]。

微纳米塑料的毒性主要体现在三个方面：一是微纳米塑料本身固有的伤害作用，较小的颗粒尺寸（如 $10\mu\text{m}$ 和 $2.5\mu\text{m}$ ）可以穿透器官（如肺和肠）和细胞（如肠细胞和巨噬细胞），被认为是刺激免疫反应和氧化应激的外来元素^[11]。由于难以生物清除，这些颗粒的在生物体内累积可引发慢性炎症，将会促进癌症和死亡等恶性肿瘤的发展^[12]。二是因为微纳米塑料是由有害添加剂（如增塑剂、阻燃剂、稳定剂、着色剂、抗静电剂、润滑剂、滑脱剂、固化剂、发泡剂和杀生物剂）的混合物制成的聚合物^[13]。在自然环境下，随着经受日晒，风吹，磨损等物理和化学因素导致老化，从而浸出有害单体。已知这些化学物质具有细胞毒性，可作为内分泌干扰物损害目标器官的结构、全身代谢以及水生和陆生动物物种的繁殖能力^[14]。三是最新的研究证明了微塑料可以通过范德华力、静电或氢键、 π - π 堆积等对污染物具有很强的物理吸附能力。并且相较于微塑料，纳米塑料的尺寸更小、比表面积更大、细胞亲和力更高、官能团更丰富，这使得它们对生物体的毒性作用更强，且对其他污染物的吸附能力也更强^[15, 16]。

微纳米塑料与其他持久性污染物例如药品和个人护理产品（PPCPs）、多溴二苯醚（PBDEs）、多环芳烃（PAHs）以及重金属如镉和汞之间的毒理学相互作用引起了极大关注，因为它们通过颗粒物和食物网的长距离传输，将其他环境污染物转移到直接或间接暴露的生物体和环境，可能引发“特洛伊木马”效应^[17]。微纳米塑料可能改变这些化学物质的生物利用度、环境行为和在环境中的毒性。例如，它们可以将这些化学物质的浓度提高到沉积物中的 100 倍，比周围海水中的背景浓度高出 6 个数量级^[18]。微纳米塑料对淡水生物群、海洋生物和哺乳动物毒性作用包括氧化应激、肠道炎症、组织损伤、代谢变化、免疫功能障碍和肠道微生物群破坏已经得到充分研究^[19]。但对微纳米塑料与外界环境中其他污染物质的联合作用的研究仍然有限。最新的研究报道在人体胎盘中检测到微纳米塑料，甚至出现跨代遗传，引起后代的生殖损伤^[20]。因此，本综述重点阐述微纳米塑料和其他污染物联合对生殖系统的影响及其分子机制。

2 微纳米塑料与其他污染物的联合生殖毒性效应

2.1 生殖器官损伤

雌性小鼠暴露于 100 mg/L 聚苯乙烯微塑料 (PS-MPs) 和 200 mg/kg 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 (DEHP) 35 天后破坏了卵巢颗粒细胞层, 导致卵泡断裂和闭锁, PS-MPs 和 DEHP 的共同暴露对卵巢颗粒细胞层的完整性产生了不利影响, 导致小鼠卵巢颗粒细胞损伤、细胞周期停滞和坏死的增加^[21]。与单独 PS-MPs 和铅 (Pb) 暴露相比, PS-MPs 和 Pb 的共同暴露显著增加了卵巢中 Pb 的积累, 导致卵巢和子宫组织的组织病理损伤。这些结果表明, 共同暴露对小鼠卵巢和子宫产生了更严重的毒性^[22]。微囊藻毒素-LR (MC-LR) 在 PS-MPs 联合作用时, PS-MPs 的存在增加了 MC-LR 在斑马鱼生殖腺中的积累。在 MC-LR 单独暴露组中, 发现斑马鱼卵巢基底膜的解体和卵黄膜的内陷, 而 PS-MPs 的存在加剧了这些损伤^[23]。PS-MPs 和 17 α -甲基睾酮 (MT) 的共暴露导致斑马鱼成熟卵子比例减少^[24]。Phe 和 MPs 的联合作用破坏了下丘脑-垂体-性腺轴的调节, 降低了雌性鱼的卵黄蛋白水平和繁殖能力, 增加了卵泡萎缩的比例, 抑制了卵巢的成熟, 并加重了繁殖毒性^[25]。TiO₂ 和 PS-NPs 的共同暴露导致卵巢结构和功能的显著损伤, 但单独的暴露没有毒性效应^[26]。PS-MPs 和镉 (Cd) 或邻苯二甲酸酯 (PAE) 的共同暴露损害小鼠睾丸组织结构, 降低精子质量, 加剧了雄性小鼠的生殖损伤^[27, 28]。单独暴露于 PS-MPs 或 MC-LR 可破坏小鼠睾丸结构, 增加组织凋亡水平并降低精子质量, 而共同暴露会增强毒性作用^[29]。小鼠共同暴露于聚苯乙烯纳米塑料 (PS-NPs) 和邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 导致精子质量显著下降、精子发生显著受损以及血睾屏障 (BTB) 破坏增加^[30]。

2.2 激素影响

性激素水平的结果表明, PS-MPs 增强了 MC-LR 诱导的生殖毒性, 这与 17 β -雌二醇 (E₂) 和睾酮 (T) 水平的异常增加密切相关^[23]。在环境现实浓度下, MPs 和 BPA 联合暴露显著抑制了白对虾的生殖发育, 体内性发育相关激素 (GIH 和 MIH) 的含量以及编码调节激素的基因 (GIH、MIH 和 CHH) 的表达均上调,

MPs 增强了 BPA 对白对虾的新陈代谢干扰和破坏内分泌调控作用^[31]。PS-MPs 和 MT 联合暴露于斑马鱼的酶联免疫吸附试验结果显示,在暴露 14 天后,雌性鱼卵巢中的 E₂、LH 和 FSH 水平在所有三个处理组中显著降低^[24]。

2.3 跨代影响

微塑料可以显著增加菲 (Phe) 在海洋青鳉鱼卵巢中的蓄积并且可以转移到后代,胚胎的积累量随 MPs 的浓度增加而增加。MPs 和 Phe 联合暴露破坏了青鳉鱼母体的下丘脑-垂体-性腺轴,此外,MPs 增加了胚胎中 Phe 引起的心动过缓,Phe 在母体 F0 代卵巢和胚胎生物累积增加,未直接暴露的后代 (F1 代) 中的 Phe 浓度增加,表明 MPs 加剧了 Phe 的代际毒性^[25]。一项对斑马鱼的研究发现,将 F0 代暴露于 PS-NPs 和三-1, 3-二氯异丙基磷酸 (TDCIPP) 都会导致这些污染物在各种组织中积累,包括肠道、肝脏、鳃和头部,并且 PS-NP 促进了 TDCIPP 从母代转移到后代,增强了对 F1 代斑马鱼的跨代甲状腺功能紊乱,PS-NPs 的存在改变了 TDCIPP 的生物利用度,并加剧了斑马鱼的跨代甲状腺破坏,具有跨代遗传毒性^[32]。同样,另一项针对斑马鱼的研究证明了 PS-NPs 和水杨酸乙基己酯 (EHS) 联合暴露 28 天后导致 EHS 在亲代 (F0) 和后代 (F1) 中的生物累积,并从亲代转移到后代^[33]。

3 微纳米塑料与其他污染物的联合生殖毒性机制

3.1 氧化应激

研究发现 PS-MPs 和 DEHP 具有协同作用,它们都促使 ROS 的过度产生,并通过触发 CNR1/CRBN/YY1/CYP2E1 信号通路引起氧化应激,进而导致 DNA 氧化损伤。这表明氧化应激介导的 Hippo 信号通路在 PS-MPs 和 DEHP 引起的卵巢损伤中起关键作用。使用氧化应激抑制剂 AM251 或 DAS 可以显著逆转这些变化,并有效缓解由 PS-MPs 和 DEHP 引起的生殖毒性^[21]。PS-MPs 和 Pb 的联合暴露通过诱导氧化应激,血清丙二醛水平显著增加,同时降低了小鼠血清超氧化物歧化酶加剧了小鼠卵巢毒性^[22]。

3.2 基因损伤

在微藻毒素和微塑料对斑马鱼的联合暴露研究中, HPG 轴中 *gnrh2*、*gnrh3*、*cyp19a1b*、*cyp11a* 和 *lhr* mRNA 水平的变化进一步证明了 MC-LR 与 PS-MPs 联合加重了生殖功能障碍。在给予 ER 应激抑制剂 (Salubrinol, Sal) 后, 与 PERK/eIF2 α 信号通路相关的基因的 mRNA 水平下调至对照组水平^[23]。另一项微塑料和 17 α -甲基睾酮联合暴露于斑马鱼的研究中在雌性鱼中, MT、PS-MPs 和 MT + PS-MPs 处理 7 天后, *cyp11a* mRNA 的表达在所有三个处理组 (MT、PS-MPs 和 MT + PS-MPs) 中都显著减少, 而在 MT + PS-MPs 处理 14 天后, *cyp19a1a* 和 *StAR* mRNA 的表达显著增加, 定量实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 的结果表明两者的联合可以共同对生物体的基因表达产生影响^[24]。PS-MPs 可以携带 MC-LR 进入睾丸间质细胞, 降低睾酮水平和参与睾酮合成的关键分子 (*StAR*、*P450scc*、*P450c17*、*3 β -HSD* 和 *17 β -HSD*) 的 mRNA 表达水平^[29]。微塑料和镉诱导的睾丸损伤与干扰 miR-199a-5p/HIF-1 α /铁死亡通路有关, 并且 MPs 和 Cd 协同抑制 Keap1-Nrf2 通路及其下游基因, 诱导雄性小鼠睾丸脂质过氧化和铁死亡^[27, 34]。

4 结论与展望

微纳米塑料的毒性与它们本身的类型, 形状, 浓度, 以及和其他环境污染物的结合密切相关, 到目前为止, 大多数实验室研究都是用商业化的单一颗粒类型进行的。然而, 如果对颗粒进行详尽的表征, 这些研究可能会提供有关微纳米塑料特性风险的关键信息。此外, 次生或风化的微纳米塑料预计会对生物体造成更大的威胁, 因为它们会增加摄入、浸出有毒添加剂、表明生物膜形成、增加颗粒粗糙度和更大的表面积来吸附环境中更多的有毒物质。目前的研究中关于微纳米塑料的浓度远远高于环境中的实际浓度, 并且急性暴露偏多, 长时间的慢性暴露和环境浓度的研究仍然较少。尽管大量研究已经证实了微纳米塑料在环境中的广泛存在, 但对于微纳米塑料的监测和生态风险评估还没有统一的国际技术方法。需要进一步研究有效的生物标志物筛选和生态风险评估技术, 以表明微纳米塑料单独或联合其他环境污染物的毒理学效应。为了更好的对人

群健康的保护提供指导和依据,关于纳米塑料和其他环境污染物联合的作用在人群中的暴露定量研究和风险评估是接下来研究的重点。

参考文献

- [1] Gao R, Liu R, Sun C. A marine fungus *Alternaria alternata* FB1 efficiently degrades polyethylene[J]. *J Hazard Mater*, 2022, 431:128617.
- [2] Le LT, Nguyen K N, Nguyen P T, Duong H C, Bui X T, Hoang N B, Nghiem L D. Microfibers in laundry wastewater: Problem and solution[J]. *Sci Total Environ*, 2022, 852:158412.
- [3] Zhang K, Hamidian A H, Tubic A, Zhang Y, Fang J, Wu C, Lam P. Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review[J]. *Environ Pollut*, 2021, 274:116554.
- [4] Osman A I, Hosny M, Eltaweil A S, Omar S, Elgarahy A M, Farghali M, Yap P S, Wu Y S, Nagandran S, Batumalaie K, Gopinath S, John O D, Sekar M, Saikia T, Karunanithi P, Hatta M, Akinyede K A. Microplastic sources, formation, toxicity and remediation: a review[J]. *Environ Chem Lett*, 2023:1-41.
- [5] Jiang B, Kauffman A E, Li L, McFee W, Cai B, Weinstein J, Lead J R, Chatterjee S, Scott G I, Xiao S. Health impacts of environmental contamination of micro- and nanoplastics: a review[J]. *Environ Health Prev Med*, 2020, 25(1):29.
- [6] Moon S, Martin L, Kim S, Zhang Q, Zhang R, Xu W, Luo T. Direct observation and identification of nanoplastics in ocean water[J]. *Sci Adv*, 2024, 10(4):eadh1675.
- [7] Campanale C, Stock F, Massarelli C, Kochleus C, Bagnuolo G, Reifferscheid G, Uricchio V F. Microplastics and their possible sources: The example of Ofanto river in southeast Italy[J]. *Environ Pollut*, 2020, 258:113284.
- [8] Zhang K, Su J, Xiong X, Wu X, Wu C, Liu J. Microplastic pollution of lakeshore sediments from remote lakes in Tibet plateau, China[J]. *Environ Pollut*, 2016, 219:450-455.
- [9] Zhang L, Li X, Li Q, Xia X, Zhang H. The effects of land use types on microplastics in river water: A case study on the mainstream of the Wei River, China[J]. *Environ Monit Assess*, 2024, 196(4):349.
- [10] Marcelino R C, Cardoso R M, Domingues E, Goncalves R V, Lima G, Novaes R D. The emerging risk of microplastics and nanoplastics on the microstructure and function of reproductive organs in mammals: A systematic review of preclinical evidence[J]. *Life Sci*, 2022, 295:120404.
- [11] Feng Y, Tu C, Li R, Wu D, Yang J, Xia Y, Peijnenburg W, Luo Y. A systematic review of the impacts of exposure to micro- and nano-plastics on human tissue

- accumulation and health[J]. *Eco Environ Health*, 2023, 2(4):195-207.
- [12] Yee M S, Hii L W, Looi C K, Lim W M, Wong S F, Kok Y Y, Tan B K, Wong C Y, Leong C O. Impact of Microplastics and Nanoplastics on Human Health[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2021, 11(2).
- [13] Yong C, Valiyaveetil S, Tang B L. Toxicity of Microplastics and Nanoplastics in Mammalian Systems[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(5).
- [14] Urli S, Corte P F, Crociati M, Baufeld A, Monaci M, Stradaoli G. Impact of Microplastics and Nanoplastics on Livestock Health: An Emerging Risk for Reproductive Efficiency[J]. *Animals (Basel)*, 2023, 13(7).
- [15] Rafa N, Ahmed B, Zohora F, Bakya J, Ahmed S, Ahmed S F, Mofijur M, Chowdhury A A, Almomani F. Microplastics as carriers of toxic pollutants: Source, transport, and toxicological effects[J]. *Environ Pollut*, 2024, 343:123190.
- [16] Yu Y, Mo W Y, Luukkonen T. Adsorption behaviour and interaction of organic micropollutants with nano and microplastics - A review[J]. *Sci Total Environ*, 2021, 797:149140.
- [17] Karbalaee S, Hanachi P, Walker T R, Cole M. Occurrence, sources, human health impacts and mitigation of microplastic pollution[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2018, 25(36):36046-36063.
- [18] Amobonye A, Bhagwat P, Raveendran S, Singh S, Pillai S. Environmental Impacts of Microplastics and Nanoplastics: A Current Overview[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12:768297.
- [19] Wang W, Yuan W, Xu E G, Li L, Zhang H, Yang Y. Uptake, translocation, and biological impacts of micro(nano)plastics in terrestrial plants: Progress and prospects[J]. *Environ Res*, 2022, 203:111867.
- [20] Ragusa A, Svelato A, Santacroce C, Catalano P, Notarstefano V, Carnevali O, Papa F, Rongioletti M, Baiocco F, Draghi S, D'Amore E, Rinaldo D, Matta M, Giorgini E. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta[J]. *Environ Int*, 2021, 146:106274.
- [21] Wu H, Liu Q, Yang N, Xu S. Polystyrene-microplastics and DEHP co-exposure induced DNA damage, cell cycle arrest and necroptosis of ovarian granulosa cells in mice by promoting ROS production[J]. *Sci Total Environ*, 2023, 871:161962.
- [22] Feng Y, Yuan H, Wang W, Xu Y, Zhang J, Xu H, Fu F. Co-exposure to polystyrene microplastics and lead aggravated ovarian toxicity in female mice via the PERK/eIF2 α signaling pathway[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 243:113966.
- [23] Lin W, Luo H, Wu J, Liu X, Cao B, Liu Y, Yang P, Yang J. Polystyrene microplastics enhance the microcystin-LR-induced gonadal damage and reproductive endocrine disruption in zebrafish[J]. *Sci Total Environ*, 2023, 876:162664.
- [24] Rong W, Chen Y, Xiong Z, Zhao H, Li T, Liu Q, Song J, Wang X, Liu Y, Liu S. Effects of combined exposure to polystyrene microplastics and

- 17alpha-Methyltestosterone on the reproductive system of zebrafish[J]. Theriogenology , 2024, 215:158-169.
- [25] Li Y, Yang G, Wang J, Lu L, Li X, Zheng Y, Zhang Z, Ru S. Microplastics increase the accumulation of phenanthrene in the ovaries of marine medaka (*Oryzias melastigma*) and its transgenerational toxicity[J]. J Hazard Mater, 2022, 424(Pt D):127754.
- [26] Zhang J, Zou Y, Hu L, Zhao Y, Fen Y, Xu H. TiO₂ nanoparticles combined with polystyrene nanoplastics aggravated reproductive toxicity in female mice via exacerbating intestinal barrier disruption[J]. J Sci Food Agric, 2023, 103(13):6452-6462.
- [27] Zhang Q, Xia W, Zhou X, Yang C, Lu Z, Wu S, Lu X, Yang J, Jin C. PS-MPs or their co-exposure with cadmium impair male reproductive function through the miR-199a-5p/HIF-1alpha-mediated ferroptosis pathway[J]. Environ Pollut , 2023 , 339:122723.
- [28] Deng Y, Yan Z, Shen R, Huang Y, Ren H, Zhang Y. Enhanced reproductive toxicities induced by phthalates contaminated microplastics in male mice (*Mus musculus*)[J]. J Hazard Mater, 2021, 406:124644.
- [29] Liu H, Jin H, Pan C, Chen Y, Li D, Ding J, Han X. Co-exposure to polystyrene microplastics and microcystin-LR aggravated male reproductive toxicity in mice[J]. Food Chem Toxicol, 2023, 181:114104.
- [30] Ma T, Liu X, Xiong T, Li H, Zhou Y, Liang J. Polystyrene nanoplastics aggravated dibutyl phthalate-induced blood-testis barrier dysfunction via suppressing autophagy in male mice[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 264:115403.
- [31] Han Y, Shi W, Tang Y, Zhou W, Sun H, Zhang J, Yan M, Hu L, Liu G. Microplastics and bisphenol A hamper gonadal development of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by interfering with metabolism and disrupting hormone regulation[J]. Sci Total Environ, 2022, 810:152354.
- [32] Zhao X, Liu Z, Ren X, Duan X. Parental transfer of nanopolystyrene-enhanced tris(1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate induces transgenerational thyroid disruption in zebrafish[J]. Aquat Toxicol, 2021, 236:105871.
- [33] Zhou R, Zhou D, Ding Z, Bao X, Jin Q. Effects of polystyrene nanoplastics on melanin interference toxicity and transgenerational toxicity of ethylhexyl salicylate based on DNA methylation sequencing[J]. Aquat Toxicol, 2023, 256:106402.
- [34] Lan Y, Hu L, Feng X, Wang M, Yuan H, Xu H. Synergistic effect of PS-MPs and Cd on male reproductive toxicity: Ferroptosis via Keap1-Nrf2 pathway[J]. J Hazard Mater, 2024, 461:132584.