

壬基酚异构体 NP₄₂ 对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞的损伤作用

刘晓珍^{1,2}, 卢培泉¹, 李福香¹, 祝兆亮¹, 苏梓烁¹, 黄丹菲², 谢明勇^{2*}
(¹东莞理工学院化学工程与能源技术学院 食品营养健康与智能化加工研究中心 广东东莞 523808
²南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室 南昌 330047)

摘要 目的:研究壬基酚异构体 NP₄₂ 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 的损伤作用并探究其分子机制。方法:以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为研究对象,将不同浓度 NP₄₂(0.1~100 μmol/L)作用于细胞 24 h,采用噻唑蓝法检测细胞存活率,酶联免疫分析检测环磷酸鸟苷(cGMP)和环磷酸腺苷(cAMP)含量,RT-PCR 法检测肿瘤坏死因子 α(TNF-α)和诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)mRNA 的表达水平,Western blot 法检测蛋白激酶 C(PKC)的表达情况以及 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38-MAPK)的磷酸化水平。结果:0.1~10 μmol/L NP₄₂ 对细胞存活率无显著影响,100 μmol/L NP₄₂ 能显著降低 RAW264.7 细胞的存活率($P < 0.01$)。与对照组相比,NP₄₂ 处理 24 h 能显著抑制细胞 TNF-α mRNA 和 iNOS mRNA 的表达,抑制细胞 PKC 蛋白的表达和降低细胞内 cAMP 的含量,同时增强细胞内 cGMP 的含量。NP₄₂ 处理能显著下调 p38 的磷酸化水平。结论:壬基酚异构体 NP₄₂ 通过 PKC-cAMP 信号通路以及 p38-MAPK 信号通路对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 产生损伤作用,这可能是壬基酚发挥免疫损伤的主要分子机制。

关键词 壬基酚异构体 NP₄₂; 巨噬细胞 RAW264.7; 环磷酸腺苷; 蛋白激酶 C; p38-MAPK 信号通路
文章编号 1009-7848(2022)10-0058-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.10.007

壬基酚(Nonylphenol, NP)是壬基酚聚氧乙烯醚(Nonylphenol polyoxyethylene ethers, NPEs)的生物降解产物,是带有 1 个苯环和 9 碳侧链化合物的总称,存在多种同分异构体。由于其结构和 β-雌二醇具有一定的相似性,能够模拟 β-雌二醇的功能与活性,从而表现出雌激素效应,因此 NP 被认为是一种环境内分泌干扰素(Environmental endocrine disruptors, EEDs)。研究证实, NP 能够对啮齿类^[1]、鱼类^[2]、蛙类^[3]、水生甲壳类动物^[4]等生物产生内分泌干扰效应,严重干扰生殖系统和神经系统。

大量研究指出壬基酚在各种食品,例如瓜果蔬菜、鸡鸭鱼肉当中有较高浓度的暴露,且人类可能因食用被壬基酚污染的食物,使得壬基酚进入人体并在体内蓄积,影响生殖、神经、免疫等系统,对人类健康产生潜在影响^[5-6]。目前,已经认可高剂量的特定环境内分泌干扰物会导致内分泌、生殖或者神经学的问题,然而关于低剂量 NPs 暴露的

健康问题鲜有报道,对壬基酚进行低剂量暴露下生物毒性研究、风险评估,以及对其建立限制标准显得尤为重要。

研究表明 NP 的生物效应高度依赖于其侧链结构,不同的 NP 异构体由于侧链结构不同,导致其对生物体的毒害效应存在显著差异^[7]。然而目前的研究多以工业壬基酚为研究对象,而工业壬基酚是由多种 NP 异构体组成的混合物,由于不同工业壬基酚各异构体的组成及比例不同,因此导致研究结果不一致^[8]。选用纯度较高的 NP 单体来进行活性研究十分必要。9 碳侧链位于羟基对位的壬基酚,被称为对壬基酚或 4-壬基酚(4-NP),是最常见的壬基酚形式,也是研究报道最多的壬基酚形式。

近年来,关于壬基酚生物毒性的研究报道越来越多,然而,对于壬基酚可产生免疫毒性促进肿瘤发生的相关分子机制尚不清楚,现阶段还未发现利用壬基酚异构体单体进行免疫系统损伤效应的研究。巨噬细胞在宿主免疫应答过程中扮演重要角色,当它们被激活时,能够抑制各种肿瘤细胞的生长^[9]。本研究评估低剂量的 NP₄₂ 暴露对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞的毒性效应。利用高纯度的壬基酚异构体 NP₄₂ 作用于 RAW264.7 巨噬细胞,

收稿日期: 2021-10-19

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81803193);
广东省自然科学基金项目(2018A030310033)

作者简介: 刘晓珍(1990—),女,博士,副教授

通信作者: 谢明勇 E-mail: myxie@ncu.edu.cn

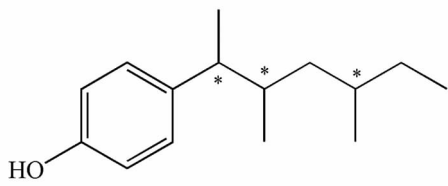
通过检测细胞 TNF- α mRNA 和 iNOS mRNA 的表达、cAMP/cGMP-PKC-p38MAPK 信号通路等免疫相关参数,探讨 NP₄₂ 对小鼠巨噬细胞的免疫毒性作用及相关分子机制,从而深入认识壬基酚异构体 NP₄₂ 的免疫损伤效应。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞系,上海细胞生物研究所。

NP₄₂ 单体(结构见图 1),德国 Guenther 教授实验室(Institute for Chemistry and Dynamics of the Geosphere, Research Centre Juelich, Germany)惠赠;胎牛血清、RPMI 1640 培养基,美国 Hyclone 公司;噻唑蓝(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-Htetrazolium bromide, MTT),美国 Sigma 公司;cAMP Elisa 试剂盒、cGMP Elisa 试剂盒,南京建成生物工程研究所;Western 及 IP 细胞裂解液、BCA 蛋白质量浓度测定试剂盒,碧云天生物技术有限公司;PKC 蛋白抗体,博士德生物技术有限公司;p38、p-p38 蛋白抗体,美国 Cell Signaling Technology 公司。



注:*. 手性碳原子。

图 1 壬基酚异构体 NP₄₂ 的结构式

Fig.1 The structure of NP₄₂

1.2 仪器与设备

Milli-Q50 超纯水净化系统,美国 Millipore 公司;倒置相差显微镜,日本 Olympus 公司;超净工作台,上海一恒科技有限公司;高速冷冻离心机,美国 Sigma 公司;Varioskan Flash E33 全波长多功能酶标仪、细胞培养箱 3110 Series II,美国 Thermo Electron 公司;电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;超低温冰箱,青岛海尔电冰箱股份有限公司;立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂;垂直电泳-转膜装置、ChemDoc XRS+化学

发光成像系统,美国 BIO-RAD 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠 RAW264.7 巨噬细胞的培养 用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中,培养小鼠 RAW264.7 巨噬细胞,选用对数生长期良好的细胞用于后续实验。

1.3.2 细胞存活率测定 采用 MTT 法检测细胞存活率。将 RAW264.7 细胞以 1×10^4 个/孔接种至 96 孔板,置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 6 h。加入不同浓度 NP₄₂(0, 0.1, 1.0, 10, 100 μ mol/L)处理 24 h 后,每孔加入 20 μ L MTT 溶液(5 mg/mL),37 °C 继续孵育 4 h,终止培养。小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷(Diphenylamine, DMSO),振荡 10 min,使结晶物充分溶解,选择 570 nm 波长,在多功能酶标仪上测定各孔光吸收值,根据 $OD_{\text{样品}}/OD_{\text{Control}} \times 100\%$ 计算细胞存活率^[10]。

1.3.3 ELISA 检测 cAMP 和 cGMP 含量 将细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板,经不同浓度 NP₄₂(0, 0.1, 1.0, 10 μ mol/L)处理 24 h 后,收集,PBS 洗 2 次,利用液氮/37 °C 反复冻融 3 次,4 °C,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。用 Elisa 法检测 cAMP 和 cGMP 的活力,操作方法按 Elisa 试剂盒说明进行。

1.3.4 Western blot 检测蛋白表达 将细胞以 2×10^5 个/孔接种至 6 孔培养板中,经不同浓度 NP₄₂(0, 0.1, 1.0, 10 μ mol/L)处理 24 h 后,预冷 PBS 洗涤 3 次,收集细胞,按照 Western 及 IP 细胞裂解液说明书要求提取细胞蛋白,再根据 BCA 蛋白质量浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性后等量蛋白上样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳(50 V 电压,30 min;100 V 电压,55 min),湿法转印至 NC 膜。转印完毕后,NC 膜经 0.1%牛血清白蛋白封闭 2 h,TBST 洗 3 遍后,用稀释后的 PKC、p38、p-p38 一抗 4 °C 孵育过夜。孵育过夜后,小心把 NC 膜转移至装有 TBST 溶液的平皿中,振荡洗膜 3 遍,每遍 10~15 min。再用辣根过氧化物酶(Horse radish peroxidase, HRP)标记二抗(1:5 000)孵育 2 h,TBST 溶液振荡洗膜 3 遍,每遍 10~15 min。采用 ECL 化学发光显色反应,应用全能型凝胶成像分析系统成像、Quantity One 软件分析^[10]。

1.3.5 反转录 PCR 将 RAW264.7 细胞以 2×10^5 个/孔接种至 6 孔培养板中,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养 6 h。NP₄₂ 处理 24 h 后,用预冷 PBS 洗涤 3 次,收集细胞,按照 Trizol 试剂法提取细胞的总 RNA。用反转录试剂盒在 20 μL RNA 反转录反应体系中反转录得到 cDNA,以此为模板进行 PCR 扩增,引物系列见表 1。PCR 反应条件: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 3 min, $94\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 2 min, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 10 min,循环次数均为 30 次,取扩增产物 6 μL 进行电泳^[10]。

1.4 数据统计分析

实验数据均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果与分析

2.1 NP₄₂ 对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞存活率的影响

巨噬细胞是机体重要的免疫细胞,有多种功能,是研究细胞吞噬、细胞免疫和分子免疫学的重要对象。有研究报道 NP 通过减弱小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能,从而抑制小鼠的免疫功能,然而其分子机制还不明确^[11-12]。本研究中探讨了 NP₄₂ 对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞的毒性效应及其相关的分子机制。

不同浓度 NP₄₂ 对 RAW264.7 细胞存活率的影响如图 1 所示,与对照组相比,低浓度 NP₄₂(0.1, 1.0, 10 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 能够降低 RAW264.7 细胞的存活率,然而无显著性影响。当 NP₄₂ 浓度上升到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,能显著引起细胞的死亡($P < 0.01$),并且在显微镜下可以明显观察到细胞损伤状态。该结果与本实验室前期报道的 NP₄₂ 对小鼠 Sertoli TM4 细胞的细胞毒性结果相一致^[13]。因此,在后续相关分子机制研究中选用 NP₄₂ 浓度为 0.1, 1.0, 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

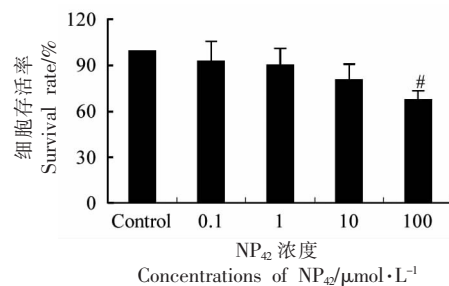
2.2 NP₄₂ 对 RAW264.7 细胞内 TNF- α mRNA 及 iNOS mRNA 表达的影响

TNF- α 主要由活化的巨噬细胞产生,通过细胞膜上的特异性受体向细胞核传递信息,从而促进细胞增殖分化,产生免疫调节、炎症介导、抗肿瘤等复杂的生物学活性^[14]。NO 被证实参与了宿主

表 1 反转录 PCR 引物序列

Table 1 Oligonucleotide primer sequences for quantitative RT-PCR

基因	序列(5'-3')
β -actin	上游引物:TGGCACCACACCTTCTACAATG
	下游引物:CCTGCTTGCTGATCCACAATCTG
TNF- α	上游引物:CTTCAGCCCAGCAGTGT ATTCTTT
	下游引物:GAGAACCTGGGAGTA GACAAGA
iNOS	上游引物:CTCGGAAGTGTAGCACAGCA
	下游引物:TGGAGCACAGCCACATTGAT



注:#. 与对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。

图 2 不同浓度 NP₄₂ 对 RAW264.7 巨噬细胞存活率的影响

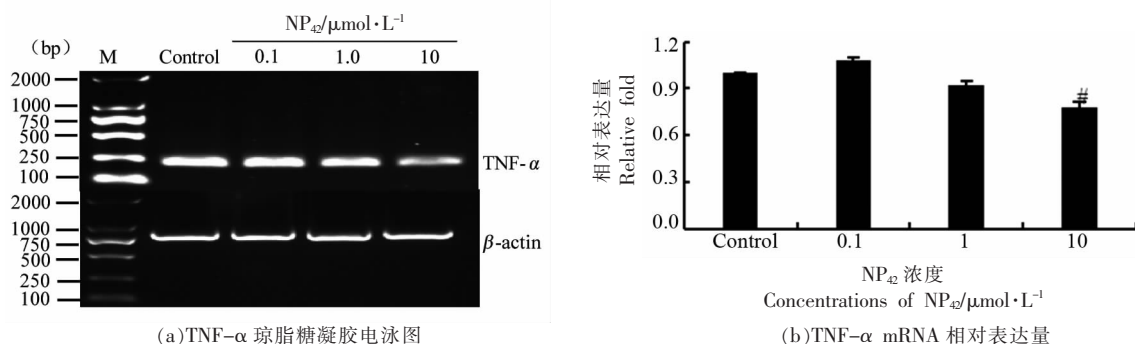
Fig.2 Effect of different concentrations of NP₄₂ on cell survival rate in RAW264.7 cells

的非特异性免疫、巨噬细胞介导的杀伤、抑制肿瘤细胞的增殖等过程^[15-16]。在哺乳动物中,已鉴定有 3 类一氧化氮合酶 (Nitric oxide synthase, NOS), 分别为内皮型一氧化氮合酶 eNOS, 神经元型一氧化氮合酶 nNOS, 诱导型一氧化氮合酶 (iNOS), 其中 iNOS 是 NO 合成的主要酶, iNOS 的表达决定了 NO 的合成。

本实验中,采用 RT-PCR 检测了 NP₄₂ 对 RAW264.7 细胞内 TNF- α mRNA 及 iNOS mRNA 表达的影响,结果如图 3 和图 4 所示。结果显示,10 $\mu\text{mol/L}$ NP₄₂ 显著降低 TNF- α mRNA 的表达($P < 0.01$,图 3)。由图 4 可知,与空白对照组相比, NP₄₂ 处理能够显著抑制细胞内 iNOS mRNA 的表达($P < 0.05$),其中浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,表现为极显著($P < 0.01$)。这表明 NP₄₂ 可对 RAW264.7 细胞造成损伤,导致 TNF- α mRNA 和 iNOS mRNA 表达降低,可能进一步导致 TNF- α 和 NO 合成下降。You 等^[17]研究发现 4-NP 能够在小鼠原代腹膜巨噬细胞和 RAW264.7 细胞内抑制脂多糖

(Lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 TNF- α 和 NO 的生成, 并且能够抑制 TNF- α mRNA 及 iNOS mRNA 的表达, 与本实验研究结果一致。Lee 等^[18]同样发现, NP 能够抑制 B 淋巴细胞和巨噬细胞内 NO 的分泌和 TNF- α mRNA 及 iNOS mRNA 的表达,

影响细胞的免疫应答, 从而抑制了机体抵抗肿瘤发生的能力。综上, 研究推测 NP₄₂ 可能通过抑制 TNF- α 和 NO 的生成以及抑制 TNF- α mRNA 和 iNOS mRNA 的表达从而影响机体的免疫功能。



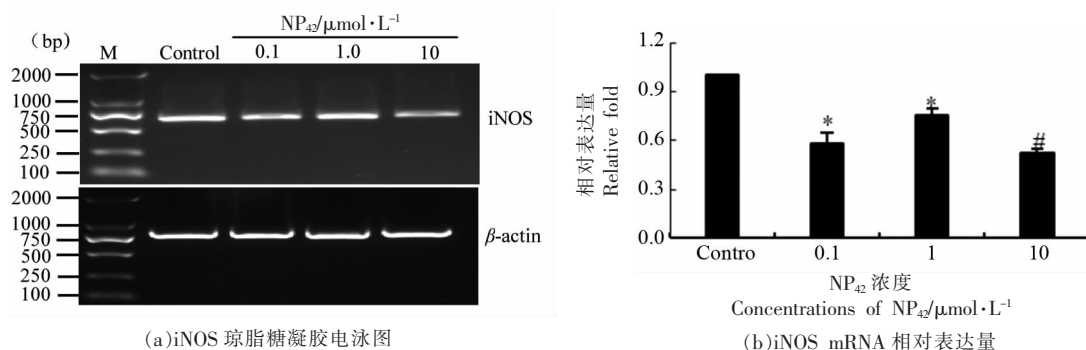
(a) TNF- α 琼脂糖凝胶电泳图

(b) TNF- α mRNA 相对表达量

注: 与对照组相比, *, 差异显著 ($P < 0.05$), #, 差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 3 不同浓度 NP₄₂ 对巨噬细胞 TNF- α mRNA 的表达的影响

Fig.3 Effect of different concentrations of NP₄₂ on the mRNA expression of TNF- α



(a) iNOS 琼脂糖凝胶电泳图

(b) iNOS mRNA 相对表达量

注: 与对照组相比, *, 差异显著 ($P < 0.05$), #, 差异极显著 ($P < 0.01$)。

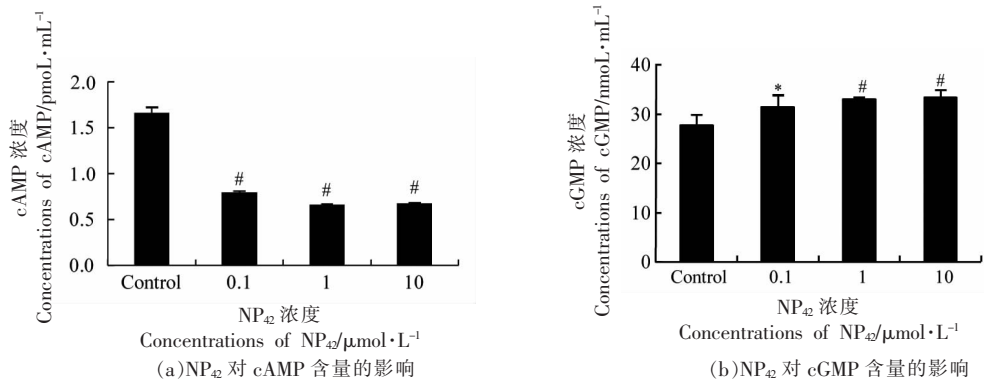
图 4 不同浓度 NP₄₂ 对巨噬细胞 iNOS mRNA 表达的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of NP₄₂ on the mRNA expression of iNOS

2.3 NP₄₂ 对 RAW264.7 细胞内 cAMP、cGMP 含量的影响

环境内分泌干扰物能够影响非甾醇类激素信号通路发挥作用, 例如腺苷酸环化酶 (Cyclic adenosine mono-phos-phase, cAMP)^[19]、磷酸肌醇^[20]以及 Ca²⁺信号通路^[21]。其中, cAMP 和 cGMP 在许多器官调节细胞功能中起着非常重要的作用 (如增殖、分化、细胞凋亡、基因转录)^[22-23]。正常情况下, cAMP 与 cGMP 含量相对稳定并维持一定的比例, 若二者比例发生改变就会引起机体功能失调而导致疾病^[24]。本研究检测了 NP₄₂ 对 RAW264.7 细胞内 cAMP、cGMP 含量的影响。结果如图 5 所

示, 与对照组相比, 在 0.1, 1.0, 10 $\mu\text{mol/L}$ NP₄₂ 处理 24 h 后, RAW264.7 细胞内 cAMP 的含量显著降低 ($P < 0.01$) (图 5a)。巨噬细胞内存在 1 个 cAMP-PKA 途径调节免疫应答, cAMP 活性的降低, 可引起 PKA 等下游信号的激活, 这可能是 NP₄₂ 造成细胞损伤的原因之一。另一方面, NP₄₂ 处理能够显著上调 RAW264.7 细胞内 cGMP 的含量 (浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时, $P < 0.05$; 浓度为 1.0, 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, $P < 0.01$, 图 5b)。这与曹凤华^[25]报道小鼠经不同浓度气态甲醇染毒后, 各器官组织中 cGMP 含量随染毒浓度升高而上升相一致, 表明 NP₄₂ 可能通过调控 cGMP 的表达来发挥损伤



注:与对照组相比,*.差异显著($P < 0.05$),#.差异极显著($P < 0.01$)。

图5 NP₄₂对细胞内cAMP活性和cGMP含量的影响

Fig.5 Effects of NP₄₂ on the content of cAMP and cGMP

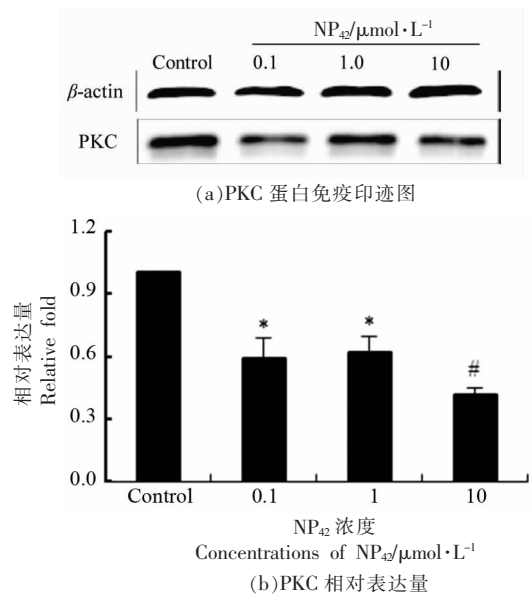
效应。

2.4 NP₄₂对RAW264.7细胞内PKC蛋白表达的影响

蛋白激酶(Protein kinases,PK)能够催化蛋白质的磷酸化过程,主要包括以cAMP依赖的蛋白激酶PKA,cGMP依赖的蛋白激酶PKG及钙和磷脂依赖的蛋白激酶PKC,通过检测效应物(如PKC蛋白)和第二信使(如cAMP、cGMP),可以很好地说明被检测物发挥作用时经由的信号通路^[26]。如图6所示,实验结果发现,细胞经不同浓度NP₄₂处理后,NP₄₂在0.1,1.0 μmol/L时,显著下调了PKC蛋白的表达($P < 0.05$),在浓度为10 μmol/L时,极其显著地下调了PKC蛋白的表达($P < 0.01$),说明NP₄₂会通过干扰钙和PKC信号通路来对巨噬细胞产生免疫毒害作用。

2.5 NP₄₂对p38-MAPK信号通路的影响

目前认为,环境内分泌干扰物等外源性雌激素主要通过两种方式发挥毒性或者内分泌干扰作用^[27],其中之一依赖于雌激素受体的激活,另一种是触发细胞内各种信号级联,主要包括cAMP途径、PKC、钙离子通路(Ca²⁺)、磷脂酰肌醇3激酶(Phosphoinositide 3 kinase,PI3K)信号通路、MAPK信号通路等。其中MAPK信号通路在细胞的增殖、分化、凋亡以及对环境刺激的反应等方面起重要作用。在哺乳动物细胞中鉴定了3个MAPKs家族成员:ERK、JNK、p38激酶。JNK和p38通路被认为起诱导细胞死亡作用,而ERK1/2通路则被认为促进细胞生长繁殖。JNK、p38和



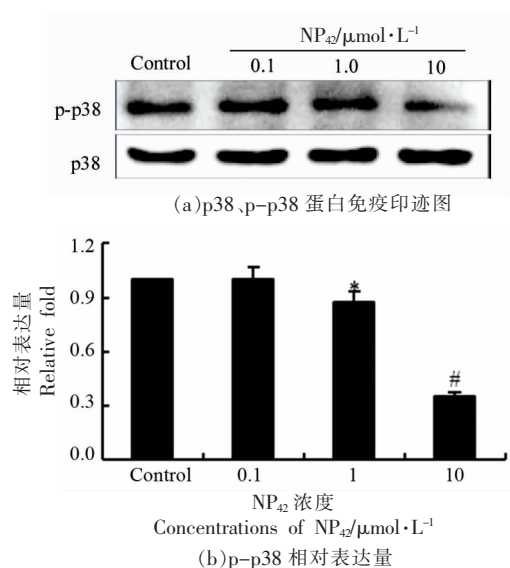
注:与对照组相比,*.差异显著($P < 0.05$),#.差异极显著($P < 0.01$)。

图6 NP₄₂对细胞PKC蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of NP₄₂ on the protein expression of PKC

ERK的动态平衡决定了细胞的存活或凋亡。

采用Western blot法检测不同浓度NP₄₂对细胞内p38-MAPK信号通路的影响。结果如图7所示,与对照组相比,在NP₄₂浓度为0.1 μmol/L时,p38蛋白的磷酸化水平无显著变化,当NP₄₂浓度增加至1.0 μmol/L和10 μmol/L时,p38蛋白的磷酸化水平显著降低,此结果说明NP₄₂抑制RAW264.7巨噬细胞的p38蛋白磷酸化且表现出剂量依赖性。MAPKs主要由PKC和PKA等激酶



注:与对照组相比,*. 差异显著($P < 0.05$),#. 差异极显著($P < 0.01$)。

图 7 NP₄₂ 对 p38-MAPK 信号通路的影响

Fig.7 NP₄₂ inhibited p38-MAPK signaling pathway in RAW264.7 cells

刺激活化, 本研究结果说明 NP₄₂ 可能通过抑制 PKC 的表达, 进而抑制 p38-MAPK 信号的表达, 从而诱导细胞损伤。本课题组之前的研究发现, 正壬基酚可通过激活 p38、ERK1/2、JNK 信号通路对 Sertoli TM4 细胞诱导损伤^[28]。Han 等^[29]研究发现 NP 可能通过激活 PI3-Akt/MAPK/CRE 信号通路诱导 COX-2 表达参与对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫炎症反应调节。壬基酚异构体的生物效应高度依赖于其侧链结构, 这可能是导致不同的壬基酚异构体, 在不同甚至相同的细胞中, 表现出对 MAPK 信号通路不一致的结果, 在未来的研究中将进一步探讨壬基酚异构体的构效关系。

3 结论

利用不同浓度的壬基酚单体 NP₄₂ 处理小鼠 RAW264.7 巨噬细胞, 探究 NP₄₂ 对 RAW264.7 巨噬细胞的损伤作用和对细胞免疫功能的影响。结果发现 NP₄₂ 能够抑制 cAMP 的活性, 下调 TNF- α mRNA 和 iNOS mRNA 的表达, 同时抑制 PKC 蛋白的表达和 p38-MAPK 蛋白的磷酸化。这表明 NP₄₂ 可能通过 PKC-cAMP 信号通路和 p38-MAPK 信号通路对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞产生

损伤效应, 从而影响 RAW264.7 巨噬细胞的功能, 这可能是壬基酚异构体 NP₄₂ 诱导生物体免疫损伤的一个重要分子机制。

参 考 文 献

- [1] CHAPIN R E, DELANEY J, WANG Y, et al. The effects of 4-nonylphenol in rats: A multigeneration reproduction study[J]. *Toxicological Sciences*, 1999, 52: 80-91.
- [2] 刘晓丽, 汪奇, 贾林芝, 等. 壬基酚对斑马鱼精巢组织及性激素合成酶基因表达的影响[J]. *环境科学学报*, 2011, 31(11): 2523-2529.
LIU X L, WANG Q, JIA L Z, et al. Alterations in testicular histology and the mRNAs of enzymes responsible for sex steroid synthesis in the zebrafish *danioerio* exposed to nonylphenol[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(11): 2523-2529.
- [3] 吕玥, 张迎梅, 杨峰, 等. 壬基酚对中华大蟾蜍蝌蚪的毒性效应[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(6): 1086-1090.
LV Y, ZHANG Y M, YANG F, et al. Toxic effects of exposure to nonylphenol on *Bufo bufogargarizans* tadpoles[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(6): 1086-1090.
- [4] GHEKIERE A, VERSLYCKE T, JANSSEN C. Effects of methoprene, nonylphenol, and estrone on the vitellogenesis of the mysid *Neomysis integer*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 147(2): 190-195.
- [5] 谢明勇, 刘晓珍, 陈泱杰. 壬基酚在食品中的污染现状及其生物毒性概述[J]. *食品科学技术学报*, 2014, 32(1): 1-7.
XIE M Y, LIU X Z, CHEN Y J. Review on exposure level of nonylphenol in food and related biological toxicity profile[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, 32(1): 1-7.
- [6] GUENTHER K, HEINKE V, THIELE B, et al. Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food[J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36(8): 1676-1680.
- [7] PREUSS T G, GEHRHARDT J, SCHIRMER K, et al. Nonylphenol isomers differ in estrogenic activity[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(16): 5147-5153.

- [8] 刘晓珍. 正壬基酚及其同分异构体对小鼠 Sertoli TM4 细胞的影响及其分子机制的研究[D]. 南昌大学, 2016.
LIU X Z. Effects of 4-n-NP and its isomers on mouse Sertoli TM4 cells and the underlying molecular mechanism[D]. Nanchang: Nanchang University, 2016.
- [9] SUN M, GADAD S S, KIM D S, et al. Discovery, annotation, and functional analysis of long noncoding RNAs controlling cell-cycle gene expression and proliferation in breast cancer cells[J]. *Molecular Cell*, 2015, 59(4): 698-711.
- [10] 刘晓珍, 聂少平, 余强, 等. *N*-乙酰-半胱氨酸干预壬基酚对小鼠 Sertoli TM4 细胞的损伤作用[J]. *食品科学*, 2019, 40(13): 130-136.
LIU X Z, NIE S P, YU Q, et al. *N*-acetyl-cysteine attenuates nonylphenol-induced damage in mouse Sertoli TM4 cells[J]. *Food Science*, 2019, 40(13): 130-136.
- [11] 马全祥, 范雪晖, 毛泽善. 壬基酚对小鼠免疫功能的影响[J]. *中国公共卫生*, 2004, 2: 201-202.
MA Q X, FAN X H, MAO Z S. Effects of nonylphenol on immunological function of mice [J]. *Chin Journal of Public Health*, 2004, 2: 201-202.
- [12] FUNES S C, RIOS M, ESCOBAR-VERA J, et al. Implications of macrophage polarization in autoimmunity[J]. *Immunology*, 2018, 154(2): 186-195.
- [13] LIU X Z, NIE S P, CHEN Y J, et al. Effects of 4-nonylphenol isomers on cell receptors and mitogen-activated protein kinase pathway in mouse Sertoli TM4 cells[J]. *Toxicology*, 2014, 326: 1-8.
- [14] KUTTY R K, SAMUEL W, BOYCE K, et al. Proinflammatory cytokines decrease the expression of genes critical for RPE function[J]. *Molecular Vision*, 2016, 22: 1156-1168.
- [15] FARIAS-EISNER R, SHERMAN M P, AEBERHARD E, et al. Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity *in vivo*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91(20): 9407-9411.
- [16] NIJKAMP F P, FOLKERTS G. Nitric oxide: Initiator and modulator[J]. *Clinical and Experimental Allergy*, 1997, 27(4): 347-350.
- [17] YOU H J, CHOI C Y, JEON Y J, et al. Suppression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α expression by 4-nonylphenol in macrophages[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2002, 294(4): 753-759.
- [18] LEE J W, HAN H K, PARK S, et al. Nonylphenol increases tumor formation and growth by suppressing gender-independent lymphocyte proliferation and macrophage activation[J]. *Environmental Toxicology*, 2017, 32(6): 1679-1687.
- [19] KATOH K, MATSUDA A, ISHIGAMI A, et al. Suppressing effects of bisphenol A on the secretory function of ovine anterior pituitary cells[J]. *Cell Biology International*, 2004, 28(6): 463-469.
- [20] KHAN S Z, KIRK C J, MICHELANGELO F. Alkylphenol endocrine disrupters inhibit IP3-sensitive Ca^{2+} channels[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 310(2): 261-266.
- [21] WOZNIAK A L, BULAYEVA N N, WATSON C S. Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor- α -mediated Ca^{2+} fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2005, 113(4): 431-439.
- [22] WEHBI V L, TASKÉN K. Molecular mechanisms for cAMP-mediated immunoregulation in T cells - role of anchored protein kinase A signaling units[J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7(222): 1664-3224.
- [23] WANG Z C, SHI F X. Phosphodiesterase 4 and compartmentalization of cyclic AMP signaling[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(1): 34-46.
- [24] 汪德超, 余功, 谢斌. 大承气汤对内毒素血症大鼠血清内毒素及结肠 cAMP、cGMP 的影响[J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(5): 1089-1091.
WANG D C, YU G, XIE B. Effect of Dachengqi Decotion on serum endotoxin and colon cAMP, cGMP in endotoxemia rats [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2014, 25(5): 1089-1091.
- [25] 曹凤华. 甲醛暴露对小鼠脑和骨髓中 NO/cGMP 和 cAMP 信号通路的影响[D]. 武汉: 华中师范大学, 2016.
CAO F H. Adverse effects induced by formaldehyde exposure on NO/cGMP and cAMP signaling pathways of brain and bone marrow in mice [D]. Wuhan: Huazhong Normal University, 2016.
- [26] TANG X Y, ZHANG C Q. Activation of protein kinases A and C promoted proliferation of chicken primordial germ cells[J]. *Animal Reproduction Science*

- ence, 2007, 101(3/4): 295-303.
- [27] YOSHITAKE J, KATO K, YOSHIOKA D, et al. Suppression of NO production and 8-nitroguanosine formation by phenol-containing endocrine-disrupting chemicals in LPS-stimulated macrophages: Involvement of estrogen receptor-dependent or -independent pathways [J]. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, 2008, 18(3): 223-228.
- [28] LIU X Z, NIE S P, HUANG D F, et al. Mitogen-activated protein kinase and Akt pathways are involved in 4-n-nonylphenol induced apoptosis in mouse Sertoli TM4 cells[J]. *Environmental Toxicology & Pharmacology*, 2015, 39(2): 815-824.
- [29] HAN E H, HWANG Y P, KIM H G, et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 by 4-nonylphenol is mediated through the cyclic amp response element activation pathway[J]. *Journal of Toxicology & Environmental Health: Part A*, 2010, 73(21/22): 1451-1464.

The Damage Effect of Nonylphenol Isomer NP₄₂ on Mouse Macrophage RAW264.7 Cells

Liu Xiaozhen^{1,2}, Lu Peiquan¹, Li Fuxiang¹, Zhu Zhaoliang¹, Su Zishuo¹, Huang Danfei², Xie Mingyong^{2*}
(¹Engineering Research Center of Health Food Design & Nutrition Regulation, School of Chemical Engineering and Energy Technology, Dongguan University of Technology, Dongguan 523808, Guangdong
²State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047)

Abstract Objective: The aim of this study was to investigate the damage effect of nonylphenol isomer NP₄₂ on mouse macrophage RAW264.7 cells and the underlying molecular mechanism. Methods: The RAW264.7 cells were with various concentration of NP₄₂ for 24 h, then the cell survival rate was detected by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay, the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) contents were detected by commercial kits, RT-PCR was used to detect the mRNA expression level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and inducible nitric oxides synthase (iNOS), Western blot was used to detect the phosphorylation level of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and the expression of protein kinase C (PKC). Results: Compared with the Control group, 0.1-10 $\mu\text{mol/L}$ NP₄₂ showed no effect on cell survival, while NP₄₂ extremely decreased cell survival at 100 $\mu\text{mol/L}$; Moreover, NP₄₂ treatment significantly inhibited the mRNA expression of TNF- α and iNOS, the expression of PKC protein and the content of cAMP in cells. In contrast, NP₄₂ upregulate the content of cGMP in the cells. In addition, NP₄₂ inhibited the phosphorylation level of p38-MAPK. Conclusion: PKC-cAMP pathway and p38 MAPK signaling pathway were involved in nonylphenol isomer NP₄₂ induced damage in RAW264.7 cells, and this should be one of the major mechanisms by which nonylphenol exerted immunotoxic effects in organism.

Keywords nonylphenol isomer NP₄₂; macrophage RAW264.7; cyclic adenosine monophosphate; protein kinase C; p38-MAPK signaling pathway