

## 农药百克敏对小鼠精母细胞GC-2铁死亡的诱导作用

汤子怡, 阳诗盈, 杨天珍, 刘闻强, 钟江雪, 尹俐  
(重庆理工大学药学与生物工程学院生物制药系, 重庆 400054)

**[摘要]** **目的:** 探讨百克敏对小鼠精母细胞GC-2铁死亡的影响, 阐明百克敏是否能引起雄性生殖毒性。**方法:** 小鼠精母细胞GC-2分为对照组(普通培养基)、低剂量百克敏组( $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 百克敏)、中剂量百克敏组( $1.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 百克敏)和高剂量百克敏组( $2.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 百克敏)。给予百克敏处理24 h后, 采用噻唑蓝(MTT)法检测不同剂量百克敏作用下GC-2细胞活性, JC-1线粒体膜电位检测试剂盒检测各组GC-2细胞中线粒体膜电位, 超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒检测各组GC-2细胞中SOD活性, 丙二醛(MDA)检测试剂盒检测各组GC-2细胞中MDA水平, 还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型GSH(GSSG)检测试剂盒检测各组GC-2细胞中GSH和GSSG水平, 并计算GSH/GSSG比值; Western blotting法检测各组GC-2细胞中血红素氧合酶1(HO-1)、铁蛋白重链1(FTH1)和GSH过氧化物酶4(GPX4)蛋白表达水平。**结果:** 与对照组比较, 百克敏剂量 $\geq 1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 各组GC-2细胞活性均降低( $P < 0.01$ ), 设置其低、中和高剂量分别为 $0.8$ 、 $1.6$ 和 $2.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 百克敏。JC-1法, 与对照组比较, 中和高剂量百克敏组GC-2细胞线粒体膜电位均降低。与对照组比较, 低、中和高剂量百克敏组GC-2细胞中SOD活性均降低( $P < 0.01$ ), MDA水平升高( $P < 0.01$ )。与对照组比较, 低、中和高剂量百克敏组GC-2细胞中GSH水平均降低( $P < 0.01$ )、GSSG水平均升高( $P < 0.01$ ), 且GSH/GSSG比值均降低( $P < 0.01$ )。与对照组比较, 低、中和高剂量百克敏组GC-2细胞中HO-1蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), FTH1和GPX4蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。**结论:** 百克敏能够诱导小鼠精母细胞GC-2铁死亡。

**[关键词]** 百克敏; 小鼠精母细胞; 铁死亡; 谷胱甘肽过氧化物酶4; 氧化应激

**[中图分类号]** R966 **[文献标志码]** A

## Induction effect of pesticide pyraclostrobin on ferroptosis of spermatocytes GC-2 of mice

TANG Ziyi, YANG Shiyi, YANG Tianzhen, LIU Wenqiang, ZHONG Jiangxue, YIN Li  
(Department of Biopharmaceutical Sciences, School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China)

**ABSTRACT** **Objective:** To discuss the effect of pyraclostrobin on ferroptosis in the spermatocytes GC-2 of the mice, and to clarify whether pyraclostrobin can cause male reproductive toxicity. **Methods:** The mouse spermatocytes GC-2 were divided into control group, low dose of pyraclostrobin group ( $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

[收稿日期] 2025-01-20 [录用日期] 2025-03-10

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81402655); 重庆市科技局自然科学基金面上项目(cstc2019jcyj-msxmX0427)

[作者简介] 汤子怡(2000—), 女, 重庆市人, 在读硕士研究生, 主要从事分子药理学方面的研究。

[通信作者] 尹俐, 副教授, 硕士研究生导师(E-mail: yinli@cqut.edu.cn)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

pyraclostrobin), medium dose of pyraclostrobin group ( $1.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pyraclostrobin) and high dose of pyraclostrobin group ( $2.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pyraclostrobin). After being treated with pyraclostrobin for 24 h, methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) method was used to detect the proliferation activities of the GC-2 cells after treated with different doses of pyraclostrobin; mitochondrial membrane potential detection kit JC-1 was used to detect the mitochondrial membrane potential in the GC-2 cells in various groups; superoxide dismutase (SOD) activity detection kit was used to detect the activities of SOD in the GC-2 cells in various groups; malondialdehyde (MDA) assay kit was used to determine the levels of MDA in the GC-2 cells in various groups; reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) detection kits were used to detect the levels of GSH and GSSG in the GC-2 cells, and the ratios of GSH/GSSG in various groups were calculated; Western blotting method was used to detect the expression levels of heme oxygenase-1 (HO-1), ferritin heavy chain 1 (FTH1) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in the GC-2 cells in various groups. **Results:** Compared with control group, the proliferation activities of the GC-2 cells in various pyraclostrobin dose  $\geq 1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  groups were decreased ( $P < 0.01$ ). The low, medium, and high doses of pyraclostrobin were 0.8, 1.6, and  $2.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . The results of JC-1 method showed that compared with control group, the mitochondrial membrane potential of the GC-2 cells in medium, and high doses of pyraclostrobin groups were decreased. Compared with control group, the SOD activity in the GC-2 the cells in low, medium, and high doses of pyraclostrobin groups were decreased ( $P < 0.01$ ), and the MDA levels in the GC-2 cells were increased ( $P < 0.01$ ). Compared with control group, the GSH levels in the GC-2 cells in low, medium, and high doses of pyraclostrobin groups were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), the GSSG levels were increased ( $P < 0.01$ ), and the GSH/GSSG ratios were decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with control group, the expression levels of HO-1 protein in the GC-2 cells in low, medium, and high doses of pyraclostrobin groups were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), while the expression levels of FTH1 and GPX4 proteins were significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Pyraclostrobin can induce the ferroptosis of the spermatocytes GC-2.

**KEYWORDS** Pyraclostrobin; Mouse spermatocytes; Ferroptosis; Glutathione peroxidase 4; Oxidative stress

百克敏又称吡唑醚菌酯, 是一种农业用的广谱杀菌剂, 广泛应用于小麦、大豆、花生和水稻等多种作物的真菌病害防治<sup>[1-3]</sup>。然而, 其环境残留问题日益引起关注。在美国加利福尼亚采集的鱼类和沙蟹样本中, 百克敏的检出率高达 100%<sup>[4]</sup>。同时, 在中国不同地区的稻田水体中, 施用百克敏 3 d 后检测到的最大残留浓度可达  $17.24 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[5]</sup>。随着百克敏在自然水体和食物链中被频繁检出, 其对生态系统和人类健康的潜在风险逐渐显现。研究<sup>[6-9]</sup>显示: 百克敏对罗非鱼和斑马鱼等水生生物具有显著的毒性效应, 可诱导胚胎发育毒性、心脏毒性、神经毒性和肝毒性。同时, 其对土壤线蚓的繁殖功能也产生不利影响<sup>[10]</sup>。在人类健康方面, 百克敏暴露可导致接触性皮炎等不良反应<sup>[11]</sup>。然而, 关于百克敏对人类生殖系统, 特别是雄性生殖功能的潜在影响尚未得到充分研究。铁死亡是一种铁依赖性的程序性细胞死亡形式, 其特征是谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 耗竭和 GSH 过氧化物酶 4

(GSH peroxidase 4, GPX4) 活性降低, 导致脂质过氧化物代谢障碍并大量积累<sup>[12-13]</sup>。上述过氧化物在二价铁离子 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 的催化下发生芬顿反应, 产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 最终引发铁死亡<sup>[14]</sup>。近年研究<sup>[15-17]</sup>表明: 多种环境污染物可通过诱导铁死亡途径对机体造成损伤。然而, 百克敏是否通过铁死亡影响雄性生殖功能目前尚未阐明。基于此, 本研究旨在探讨百克敏暴露能否通过诱导精母细胞铁死亡而导致小鼠雄性生殖毒性, 以期为评估百克敏的生殖健康风险提供新的科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、主要试剂和仪器

小鼠精母细胞 GC-2 购自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC) 细胞库。高糖培养基改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) 和胎牛血清购自上海道鹏生物

科技有限公司, 双抗(1%青-链霉素)购自苏州新赛美生物科技有限公司, 百克敏购自上海叶源生物科技有限公司, 噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyltetrazolium bromide, MTT)购自北京酷来搏科技有限公司, JC-1线粒体膜电位检测试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒、GSH和氧化型GSH(oxidized glutathione, GSSG)检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 辣根酶标记山羊抗兔IgG和辣根酶标记山羊抗小鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 血红素氧合酶1(heme oxygenase-1, HO-1)和GPX4购自中国Proteintech公司, 铁蛋白重链1(ferritin heavy chain 1, FTH1)购自成都正能生物技术有限责任公司。Centrifuge 5804R型高速冷冻离心机购自德国Eppendorf公司, Fluor Chem HD2型化学发光凝胶成像系统购自美国Protein Simple公司, Synergy H1型多功能荧光酶标仪购自美国BioTek公司, NIS-Elements型激光共聚焦显微镜购自日本Nikon公司。

**1.2 小鼠精母细胞GC-2的培养和分组** 采用含有10%胎牛血清和1%青-链霉素的DMEM高糖培养基, 于37℃、5% CO<sub>2</sub>的恒温孵箱中培养小鼠精母细胞GC-2。取处于对数生长期的GC-2细胞均匀接种在6孔细胞培养板中, 24 h后观察细胞状态。将GC-2细胞分为对照组、低剂量百克敏组、中剂量百克敏组和高剂量百克敏组。对照组细胞采用普通培养基处理24 h, 低、中和高剂量百克敏组细胞分别给予0.8、1.6和2.4 μmol·L<sup>-1</sup>百克敏处理, 24 h后收集细胞进行下一步实验操作。

**1.3 MTT法检测不同剂量百克敏作用下GC-2细胞活性** 取处于对数生长期的GC-2细胞, 均匀接种于24孔细胞培养板中, 放置于37℃、5% CO<sub>2</sub>恒温孵箱中培养。重新配置培养基并加入百克敏, 使其终浓度为0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0和4.5 μmol·L<sup>-1</sup>。吸弃24孔细胞培养板中的培养基, 向对照组中加入不含百克敏的完全培养基, 实验组加入上述含有不同浓度百克敏的培养基, 于恒温孵箱中培养24 h后每孔加入50 μL浓度为5 g·L<sup>-1</sup>的MTT溶液, 置于恒温孵箱中继续培养4 h。吸弃24孔细胞培养板中的培养基并向其中加入550 μL的二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液, 将其放在低速摇床上避光振荡10 min, 用酶标仪在

波长570 nm处(参比波长630 nm)测定其吸光度(A)值, 并计算细胞活性。细胞活性=(实验组A值-空白组A值)/(对照组A值-空白组A值)×100%。

#### 1.4 采用试剂盒检测GC-2细胞中线粒体膜电位

取处于对数生长期的GC-2细胞均匀接种于6孔细胞培养板中, 置于37℃、5% CO<sub>2</sub>恒温孵箱中培养。将细胞分为对照组和实验组, 对照组加入普通培养基, 实验组依次加入低、中和高剂量的百克敏处理24 h。收取样品时吸弃培养基, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)清洗1次, 将完全培养基与JC-1染色工作液按1:1的比例充分混匀后, 每孔加入2 mL混合溶液, 于恒温孵箱中孵育20 min, 弃去上清, 用JC-1染色缓冲液(1×)清洗2次, 重新加入2 mL完全培养基后用激光共聚焦显微镜进行观察。绿色荧光表示细胞中线粒体膜电位降低, 红色荧光表示细胞中线粒体膜电位正常。

#### 1.5 采用试剂盒检测各组GC-2细胞中SOD活性

按照“1.4”中的细胞接板和分组方式对细胞进行处理。吸弃培养基后用预冷的PBS缓冲液清洗1次, 加入SOD样品制备液, 吹打裂解细胞, 于4℃预冷离心机中12 000 g离心3 min, 取上清液作为待测样品。在96孔细胞培养板中分别加入20 μL的空白对照、样品和标准品, 每孔加入160 μL的WST-8/酶工作液混匀, 再加入20 μL的反应启动工作液, 于37℃条件下孵育30 min, 用酶标仪检测其在波长450 nm处的A值。抑制百分率=(空白对照1 A值-样品A值)/(空白对照1 A值-空白对照2 A值)×100%, SOD酶活性(U·μg<sup>-1</sup>)=抑制百分率/(1-抑制百分率)×(C<sub>prot</sub>×V)。C<sub>prot</sub>为样本蛋白浓度, V为样品体积。

#### 1.6 采用试剂盒检测各组GC-2细胞中MDA水平

按照“1.4”中的细胞接板和分组方式对细胞进行处理。用裂解液收取样品, 二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白浓度, 在1.5 mL离心管中加入100 μL裂解液作为空白对照, 加入100 μL不同浓度的标准品用于制作标准曲线, 加入100 μL样品用于测定, 每个管中加入200 μL MDA检测工作液混匀后于100℃的沸水中加热15 min, 水浴冷却至室温后1 000 g离心10 min取上清, 在96孔细胞培养板中加入200 μL上清, 用酶标仪测定其在波长532 nm处的A值, 根据标准

曲线计算样品的MDA水平, 再根据蛋白浓度来计算总样品中的MDA水平。

**1.7 采用试剂盒检测各组 GC-2 细胞中 GSH 和 GSSG 水平** 按照“1.4”中的细胞接板和分组方式对细胞进行处理。用 PBS 缓冲液洗涤细胞 1 次, 离心后取一部分细胞用于蛋白浓度检测, 另一部分细胞加入细胞沉淀体积的 3 倍量的蛋白去除剂 M 溶液后振匀, 利用液氮和 37 °C 水浴对样品进行 2 次快速冻融, 4 °C 放置 5 min 后放于 4 °C 预冷的离心机中 10 000 g 离心 10 min, 收集上清用于后续总 GSH 和 GSSG 的测定。总 GSH 检测: 在 96 孔细胞培养板中加入标准品和样品, 加入 150 μL 总 GSH 检测工作液混匀并室温孵育 5 min, 加入 50 μL 的 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 溶液混匀, 测定其在 412 nm 波长处 A 值; GSSG 测定: 按照 100 μL 样品加入 20 μL GSH 清除辅助液振匀, 再加入 4 μL GSH 清除工作液混匀, 室温静置 60 min 后, 按照上述测定总 GSH 的方法测定 A 值。样品对照标准曲线计算样品中总 GSH 和 GSSG 的水平, 利用测定得到的蛋白浓度计算出每毫克蛋白中的总 GSH 和 GSSG 的水平, 后通过公式计算出 GSH 的水平。GSH=总 GSH-GSSG×2。GSH/GSSG=GSH/GSSH×100%。

**1.8 Western blotting 法检测各组 GC-2 细胞中 HO-1、FTH-1 和 GPX4 蛋白表达水平** 按“1.4”的方法接板和分组。每孔加入 200 μL 细胞裂解液, 放置在冰上裂解 30 min 后收集细胞裂解液, 于 4 °C 预冷的离心机中以 12 000 g 离心 20 min, 取上清液用 BCA 法测定样品的蛋白浓度。用测得的蛋白浓度进行样品的配制, 加入相应的裂解液和 5× 缓冲液将样品的蛋白浓度调成一致并进行变性, 用 12.5% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 对蛋白进行分离, 之后放置在冰水中湿转, 将蛋白转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 用 5% 脱脂奶粉在室温下封闭 1 h, 分别用 HO-1、FTH-1、GPX2 和 β-tubulin 的抗体在室温下孵育 2 h, 用含吐温 Tris 缓冲盐溶液 (Tris buffered saline with Tween-20, TBST) 冲洗 3 次, 加入相应的二抗在室温下孵育 1 h, TBST 溶液冲洗 3 次, 结束后显影。采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白

表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/β-tubulin 蛋白条带灰度值。

**1.9 统计学分析** 采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析。各组 GC-2 细胞活性, 各组 GC-2 细胞中 SOD 活性、MDA 水平、GSH 水平、GSSG 水平和 GSH/GSSG 比值, 各组 GC-2 细胞中 HO-1、GPX4 和 FTH1 蛋白表达水平均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同剂量百克敏作用下各组 GC-2 细胞活性

与对照组比较, 百克敏剂量  $\geq 1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  各组 GC-2 细胞活性均降低 ( $P < 0.01$ )。见表 1。后续实验以半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) 作为百克敏的最高剂量, 设置其低、中和高剂量分别为 0.8、1.6 和 2.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 1 不同剂量百克敏作用下各组 GC-2 细胞活性

Tab. 1 Activites of GC-2 cells after treated with different doses of pyraclostrobin in various groups ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	Cell activity
Control	1.00±0.02
Concentration of pyraclostrobin ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
0.5	0.99±0.00
1.0	0.85±0.01*
1.5	0.80±0.04*
2.0	0.72±0.00*
2.5	0.62±0.04*
3.0	0.60±0.03*
3.5	0.56±0.01*
4.0	0.57±0.01*
4.5	0.54±0.01*

\* $P < 0.01$  vs control group.

**2.2 各组 GC-2 细胞的线粒体膜电位** 与对照组比较, 低、中和高剂量百克敏组中 GC-2 细胞绿色荧光强度均明显增强, 表明百克敏处理后 GC-2 细胞中的线粒体膜电位明显降低。见图 1。

### 2.3 各组 GC-2 细胞中 SOD 活性和 MDA 水平

与对照组比较, 低、中和高剂量百克敏组 GC-2 细胞中 SOD 活性降低 ( $P < 0.01$ ), MDA 水平升高 ( $P < 0.01$ )。见表 2。与对照组比较, 高剂量百克敏组 GC-2 细胞中 SOD 水平下降 78.63%, MDA 水

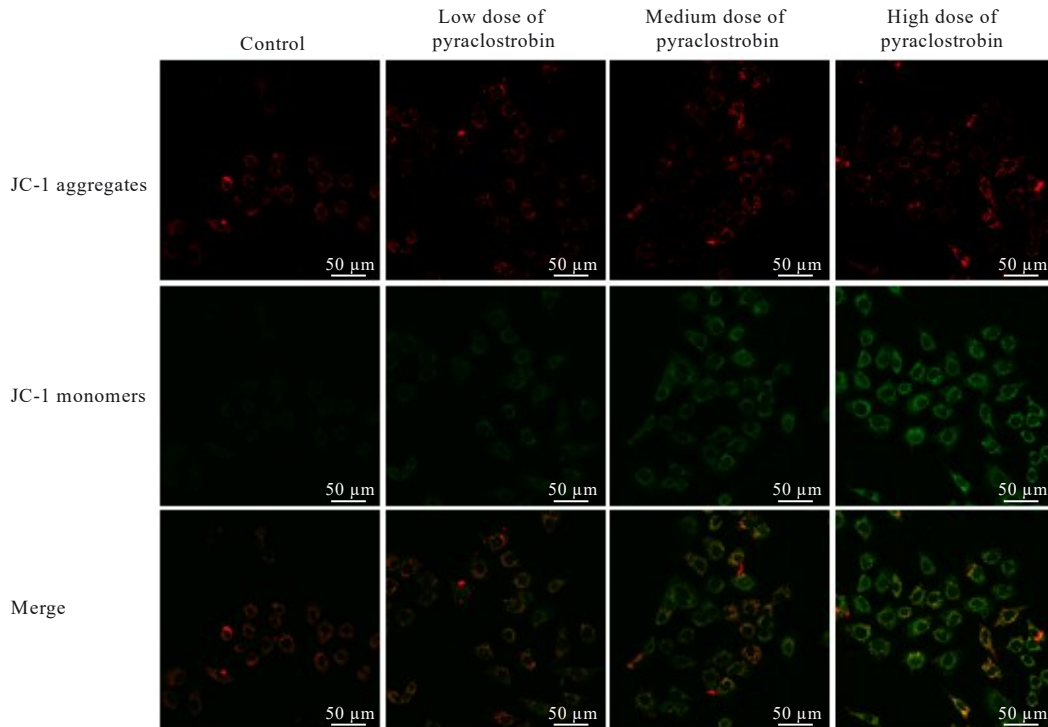


图1 各组GC-2细胞中线粒体膜电位情况

Fig. 1 Mitochondrial membrane potential in GC-2 cells in various groups

平升高 167.00%。

#### 2.4 各组GC-2细胞中GSH和GSSG水平及GSH/GSSG比值 与对照组比较, 中和高剂量百克敏组

表2 各组GC-2细胞中SOD活性和MDA水平

Tab. 2 SOD activities and MDA levels in GC-2 cells in various groups ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	SOD [ $\lambda_b/(U \cdot mg^{-1})$ ]	MDA [ $w_b/(\mu mol \cdot g^{-1})$ ]
Control	70.13 ± 5.11	1.00 ± 0.07
Pyraclorobin		
Low dose	35.69 ± 6.08*	1.56 ± 0.11*
Medium dose	18.36 ± 0.58*	1.66 ± 0.02*
High dose	14.98 ± 1.69*	2.67 ± 0.91*

\* $P < 0.01$  vs control group.

GC-2细胞中GSH水平降低 ( $P < 0.01$ ), GSSG水平升高 ( $P < 0.01$ ), GSH/GSSG比值降低 ( $P < 0.01$ )。见表3。与对照组比较, 高剂量百克敏组GC-2细胞中GSH水平下降62.88%, GSSG水平升高47.02%, GSH/GSSG比值降低74.95%。

#### 2.5 各组GC-2细胞中HO-1、FTH1和GPX4蛋白表达水平

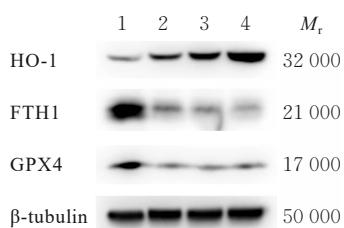
与对照组比较, 低、中和高剂量百克敏组GC-2细胞中HO-1蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), FTH1和GPX4蛋白表达水平降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见图2和表4。与对照组比较, 高剂量百克敏组GC-2细胞中HO-1蛋白表达水平增加281.00%, FTH1蛋白表达水平降低83.00%, GPX4蛋白表达水平降低54.00%。

表3 各组GC-2细胞中GSH和GSSG水平及GSH/GSSG比值

Tab. 3 Levels of GSH and GSSG and GSH/GSSG ratios in GC-2 cells in various groups ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	Level of GSH [ $w_b/(\mu mol \cdot g^{-1})$ ]	Level of GSSG [ $w_b/(\mu mol \cdot g^{-1})$ ]	Ratio of GSH/GSSG
Control	23.49 ± 2.12	4.70 ± 0.05	4.99 ± 0.41
Pyraclorobin			
Low dose	14.72 ± 0.76*	5.33 ± 0.18	2.76 ± 0.05*
Medium dose	9.00 ± 1.14*	7.36 ± 0.39*	1.22 ± 0.17*
High dose	8.72 ± 2.64*	6.91 ± 0.32*	1.25 ± 0.32*

\* $P < 0.01$  vs control group.



Lane 1: Control group; Lane 2: Low dose of pyraclostrobin group; Lane 3: Medium dose of pyraclostrobin group; Lane 4: High dose of pyraclostrobin group.

图2 各组 GC-2 细胞中 HO-1、FTH1 和 GPX4 蛋白表达电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of expressions of HO-1, FTH1, and GPX4 proteins in GC-2 cells in various groups

### 3 讨论

百克敏作为 QoI 类杀菌剂的典型代表, 因其具有广谱高效的杀菌活性而在农业生产中得到了广泛

应用<sup>[1]</sup>。然而, 百克敏在环境介质(土壤、水体和大气)中的持续积累, 其生态毒理学效应日益引起研究者关注<sup>[18]</sup>。研究<sup>[5, 10]</sup>表明: 百克敏对多种非靶标生物(水生生物和土壤无脊椎动物)具有显著的急性毒性和慢性毒性效应, 然而, 其对哺乳动物生殖系统, 特别是雄性生殖功能的潜在毒性作用及其分子机制仍缺乏系统性研究。为了探讨百克敏是否具有生殖毒性, 本研究以小鼠精母细胞 GC-2 为体外模型, 采用不同剂量 (0.5~4.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的百克敏处理 24 h。细胞活性检测结果显示: 当百克敏暴露剂量  $\geq 1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, GC-2 细胞的活性显著降低。进一步分析发现: 百克敏暴露导致 GC-2 细胞中 SOD 活性和 GSH 水平降低, MDA 水平和 GSSG 水平升高, 并且 GSH/GSSG 比值显著降低。上述结果表明: 百克敏可通过破坏 GC-2 细胞的氧化还原稳态, 诱导氧化应激反应, 从而可能对雄性生殖系统造成潜在损伤。基于上述发现, 本研究进一步探讨了百克敏能否诱导 GC-2 细胞发生铁死亡。

表4 各组 GC-2 细胞中 HO-1、FTH1 和 GPX4 蛋白表达水平

Tab. 4 Expression levels of HO-1, FTH1, and GPX4 proteins in GC-2 cells in various groups ( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

Group	HO-1	FTH1	GPX4
Control	1.00±0.21	1.00±0.15	1.00±0.15
Pyraclostrobin			
Low dose	1.86±0.33*	0.31±0.07**	0.45±0.17*
Medium dose	2.76±0.21**	0.28±0.07**	0.45±0.19*
High dose	3.81±0.41**	0.17±0.02**	0.46±0.08*

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group.

铁死亡是一种铁依赖性的程序性细胞死亡方式, 其特征包括脂质过氧化物的过度积累和抗氧化防御系统的崩溃, 其能够通过调控生殖细胞的数量和质量、参与精子形态塑造、影响精子运动能力和受精能力, 在精子发生过程中发挥关键作用<sup>[19]</sup>。然而, 铁死亡过程的异常可导致精子发生障碍, 进而引发男性不育<sup>[20-21]</sup>。GPX4 是铁死亡的标志分子, 具有抑制脂质过氧化物的功能, 能够降解小分子过氧化物和脂质过氧化物, 在铁死亡调控中发挥关键作用<sup>[22]</sup>。研究<sup>[23]</sup>显示: 约 30% 的少弱精子症患者精液中 GPX4 蛋白表达水平显著降低, 并且在小鼠精母细胞中特异性敲除 GPX4 会导致精子数量显著减少、精子活力显著降低和精子结构异常等现象。本研究结果显示: 小鼠精母细胞 GC-2 暴露于百克敏后, GPX4 蛋白表达水平显著下调, 可能导

致其抑制脂质过氧化物的功能受损, 从而诱导 GC-2 细胞发生铁死亡。FTH1 作为铁储存蛋白, 其主要功能是通过结合游离铁, 维持细胞内铁稳态<sup>[24]</sup>。在双酚 F 诱导小鼠暴露模型导致的生殖损伤中, FTH1 能够介导生精细胞中的铁死亡, 并且影响双酚 F 诱导的生殖损伤<sup>[25]</sup>。在本研究中, GC-2 细胞暴露于百克敏后, FTH1 蛋白表达水平显著下调, 可能导致细胞中游离铁水平升高, 促进铁催化的 Fenton 反应和脂质过氧化, 进一步促进铁死亡的发生<sup>[26]</sup>。另一方面, HO-1 能够通过分解血红素释放游离铁, 增加细胞内铁离子的含量, 促进铁死亡的发展<sup>[27]</sup>。而 HO-1 的过度激活会增加 ROS 和脂质过氧化, 对精子质量、睾丸功能和激素水平等产生负面影响<sup>[21]</sup>。在本研究中, GC-2 细胞中的 HO-1 蛋白表达水平上调可能进一步加剧铁死亡过程。基

于上述实验结果, 本研究发现百克敏能够诱导小鼠精母细胞GC-2发生铁死亡, 进而对生殖系统产生毒性作用。

百克敏杀菌机制主要依赖于抑制真菌细胞色素b与c1之间的电子传递, 阻断线粒体呼吸链复合体Ⅲ的功能, 从而抑制三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)的生成, 干扰真菌的能量代谢循环, 最终发挥抑菌作用<sup>[1, 28]</sup>。线粒体不仅是细胞能量代谢的核心细胞器, 在铁死亡调控中发挥关键作用。作为铁代谢和ROS生成的主要场所, 线粒体通过维持细胞内氧化还原稳态来参与铁死亡的调控过程<sup>[29-30]</sup>。本研究结果显示: 百克敏暴露可导致GC-2细胞线粒体膜电位显著降低, 表明百克敏可能通过干扰线粒体功能影响细胞的能量代谢过程。这一发现为进一步阐明百克敏诱导铁死亡的分子机制提供了重要线索, 同时也提示线粒体功能障碍可能是百克敏生殖毒性的关键环节之一。

综上所述, 百克敏暴露可显著降低精母细胞的抗氧化能力, 导致细胞内脂质过氧化物积累, 并且诱导精母细胞发生铁死亡。本研究揭示了百克敏能够通过诱导精母细胞铁死亡, 进一步引发生殖毒性作用, 为阐明环境污染物诱导男性生殖相关疾病的潜在诱因和发病机制提供了新的理论依据和研究思路。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

汤子怡参与研究选题、实验操作、数据收集、数据整理、统计学分析和论文撰写, 阳诗盈、杨天珍、刘闻强和钟江雪参与实验操作及统计学分析, 尹俐参与研究选题、数据收集、数据整理和论文审校。

#### [参考文献]

- [1] 张明浩, 康珊珊, 王 曦, 等. 基于多作物中吡唑醚菌酯的环境行为评估长期膳食风险[J]. 农业工程学报, 2023, 39(11): 286-294.
- [2] JOSHI J, SHARMA S, GURUPRASAD K N. Foliar application of pyraclostrobin fungicide enhances the growth, rhizobial-nodule formation and nitrogenase activity in soybean (var. JS-335) [J]. Pestic Biochem Physiol, 2014, 114: 61-66.
- [3] 刘冰卿, 陈 霞, 凌金锋, 等. 氯氟醚菌唑·吡唑醚菌酯对柑橘炭疽病的田间防治效果[J]. 热带农业科学, 2023, 43(7): 53-56.
- [4] 罗 跃, 吴小毛, 胡贤锋, 等. 吡唑醚菌酯的降解代谢及毒理研究进展[J]. 农业资源与环境学报, 2022, 39(4): 651-663.
- [5] 李焯青, 张昌朋, 赵学平, 等. 吡唑醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段的亚致死效应研究[J]. 生态毒理学报, 2024, 19(4): 338-349.
- [6] LI H, ZHAO F, CAO F J, et al. Mitochondrial dysfunction-based cardiotoxicity and neurotoxicity induced by pyraclostrobin in zebrafish larvae[J]. Environ Pollut, 2019, 251: 203-211.
- [7] WU Y Z, WANG Y J, TONG Z, et al. Pyraclostrobin induces developmental toxicity and cardiotoxicity through oxidative stress and inflammation in zebrafish embryos[J]. Environ Pollut, 2024, 358: 124490.
- [8] WU M Q, BIAN J H, HAN S, et al. Characterization of hepatotoxic effects induced by pyraclostrobin in human HepG2 cells and zebrafish larvae [J]. Chemosphere, 2023, 340: 139732.
- [9] MAO L G, JIA W, ZHANG L, et al. Embryonic development and oxidative stress effects in the larvae and adult fish livers of zebrafish (Danio rerio) exposed to the strobilurin fungicides, kresoxim-methyl and pyraclostrobin [J]. Sci Total Environ, 2020, 729: 139031.
- [10] KOVAČEVIĆ M, HACKENBERGER D K, HACKENBERGER B K. Effects of strobilurin fungicides (azoxystrobin, pyraclostrobin, and trifloxystrobin) on survival, reproduction and hatching success of *Enchytraeus crypticus* [J]. Sci Total Environ, 2021, 790: 148143.
- [11] WANG Q Y, LUO N N, LEI M, et al. Facial irritant contact dermatitis caused by pyraclostrobin [J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2022, 15: 1643-1647.
- [12] TANG D L, KANG R, VANDEN BERGHE T, et al. The molecular machinery of regulated cell death [J]. Cell Res, 2019, 29(5): 347-364.
- [13] STOCKWELL B R, FRIEDMANN ANGELI J P, BAYIR H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. Cell, 2017, 171(2): 273-285.
- [14] ZHANG S P, XIN W, ANDERSON G J, et al. Double-edge sword roles of iron in driving energy production versus instigating ferroptosis [J]. Cell Death Dis, 2022, 13(1): 40.
- [15] WU S F, GA Y, MA D Y, et al. The role of ferroptosis in environmental pollution-induced male reproductive system toxicity [J]. Environ Pollut, 2024, 363(Pt 1): 125118.

- [16] NAKAMURA T, NAGURO I, ICHIJO H. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2019, 1863(9): 1398-1409.
- [17] YANG L L, CAI X M, LI R B. Ferroptosis induced by pollutants: an emerging mechanism in environmental toxicology[J]. *Environ Sci Technol*, 2024, 58(5): 2166-2184.
- [18] HAN L X, WANG Y R, WANG Y J, et al. Pyraclostrobin repeated treatment altered the degradation behavior in soil and negatively affected soil bacterial communities and functions [J]. *J Hazard Mater*, 2025, 485: 136876.
- [19] YUAN W Z, SUN Z B, JI G J, et al. Emerging roles of ferroptosis in male reproductive diseases [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 358.
- [20] 焦丹丽, 马秉哲, 赵琛, 等. 铁死亡在睾丸生精功能障碍中的机制研究进展 [J]. *中华男科学杂志*, 2022, 28(11): 1044-1048.
- [21] LIU Y, CAO X H, HE C, et al. Effects of ferroptosis on male reproduction [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(13): 7139.
- [22] ZHANG W, LIU Y, LIAO Y, et al. GPX4, ferroptosis, and diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 174: 116512.
- [23] IMAI H, HAKKAKU N, IWAMOTO R, et al. Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(47): 32522-32532.
- [24] CHEN Y, MA Q, ZHANG J, et al. Endogenous iron (II) self-enriched fenton nanocatalyst via FTH1 activity inhibition and iron (III) reduction for amplified cancer ferroptosis therapy [J]. *Mol Pharm*, 2025, 22(3): 1568-1583.
- [25] ZHOU S M, SHI Y, LI J Y, et al. Bisphenol F induces spermatogenic cell ferroptosis via FTO-mediated m6A regulation of FTH1 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2025, 229: 364-373.
- [26] TIAN Y, LU J, HAO X Q, et al. FTH1 inhibits ferroptosis through ferritinophagy in the 6-OHDA model of parkinson's disease [J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(4): 1796-1812.
- [27] TANG Z M, JU Y H, DAI X C, et al. HO-1-mediated ferroptosis as a target for protection against retinal pigment epithelium degeneration [J]. *Redox Biol*, 2021, 43: 101971.
- [28] CARBONE M, MATHIEU B, VANDENSANDE Y, et al. Impact of exposure to pyraclostrobin and to a pyraclostrobin/boscalid mixture on the mitochondrial function of human hepatocytes [J]. *Molecules*, 2023, 28(20): 7013.
- [29] CHANG H C, WU R X, SHANG M, et al. Reduction in mitochondrial iron alleviates cardiac damage during injury [J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(3): 247-267.
- [30] AHOLA S, LANGER T. Ferroptosis in mitochondrial cardiomyopathy [J]. *Trends Cell Biol*, 2024, 34(2): 150-160.