文章编号:1000-5404(2007)01-0005-04

论著

嘉陵江C市段水中有机污染物睾丸毒性分子机制初步研究

曹 波[1],舒为群[1],曹 佳[2] (第三军医大学军事预防医学院:[1]环境卫生学教研室,[2]军事毒理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨水中有机污染物对大鼠睾丸损伤的分子机制。**方法** 采用XAD-2树脂浓缩水中有机污染物;大鼠经灌胃暴露于水中有机提取物,用TUNEL法检测细胞凋亡;免疫组化与免疫印迹方法检测水中有机提取物对fas, fasL, scf ,c-kit蛋白表达的影响。**结果** 高剂量组水中有机污染物可增加精子细胞凋亡率($P<0.05$),精原细胞也观察到凋亡,但实验组与对照组之间没有统计学差异。高剂量组水中有机污染物可明显增加精原细胞fas,fasL和c-kit蛋白表达($P<0.05$)。**结论** 水中有机污染物对精原细胞的发育分化有影响,并可诱导精子细胞凋亡,有可能破坏精原细胞的生精过程,但详细机制还需进一步研究。

关键词:水源水;有机提取物;雄性生殖毒性;细胞凋亡
中图法分类号:R123.1;R321.1;R994.6 **文献标识码**:A

Mechanism of rat testis toxicity induced by organic extract from Jialing river water

CAO Bo[1], SHU Wei-qun[1], CAO Jia[2]([1]Department of Environmental Hygiene,[2]Department of Military Toxicology, College of Preventive Medicine,Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the toxicity of organic extract from river water on the male reproductive system in rats. **Methods** Organic pollutants were extracted from river water with XAD-2 resin and the extract from 2, 16 and 80 L river water was administered daily into 30 male SD rats by gavage for consecutive 28 days. Corn oil served as the solvent control in another ten rats. After the last intake of water extract, all rats were killed, and the sections of testis were prepared according to routine procedure. The TUNEL assay for *in situ* detection of apoptosis and quantitation of apoptotic germ were performed on testicular sections. Immunohistochemistry and Western blotting were used to examine the changes of scf, fas, fasL and c-kit expressions in rat testis. **Results** The percentage of apoptotic spermatid cells significantly increased in rats receiving organic extract from 80 L water daily, as compared with the control rats. The spermatocytes in rats receiving organic extract from 80 L water daily overexpressed fas, fasL and c-kit. **Conclusion** The organic pollutants from river water result in spermatid apoptosis and spermatogenesis arrest.

Key words: river water; organic pollutant; spermatogenesis arrest; apoptosis

大量研究表明环境中有机污染物与生殖损伤有密切联系[1]。农药、除草剂、塑料增塑剂等有机污染物在实验室条件下均可对睾丸造成损伤。但实际暴露过程中机体接触的是多种化学物,而评价环境混合污染物对生殖的影响还少见报道。外来化学物的睾丸毒性往往表现为对生精过程的破坏,生精过程受许多因素影响,其中细胞凋亡是外来化学物质睾丸损伤的主要分子机制,其中fas与受体结合启动生精细胞凋亡,而干细胞生长因子(stem cell factor, scf)促进生精细胞分化发育成为成熟精子,同时具有抑制生精细胞凋亡的作用[2]。我们前期研究结果显示水中有机提取物可对大小鼠的睾丸产生病理损伤,精子数下降[3]。为了研究水环境中混合有机污染物的毒作用机制,我们采用固相萃取技术提取水源水中有机污染物染毒动物,观察其对睾丸损伤的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

XAD-2树脂(Amberlite公司),正己烷、丙酮、甲醇(农残

基金项目:国家科技部攻关项目(2003DA903B03-02),国家科技部西部引导项目(2003BA869C),国家自然科学基金重点项目(30630056)
Supported by the Key Program of State Ministry of Science and Technology (2003DA903B03-02), the "Guidance Project" for West China of State Ministry of Science and Technology (2003BA869C) and the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30630056)

作者简介:曹 波(1970-),男,贵州省贵阳市人,博士研究生,讲师,主要从事环境毒理学方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68752715,E-mail:caobo@mail.tmmu.com.cn
通讯作者:曹 佳,电话:(023)68752271

收稿日期:2006-07-31;修回日期:2006-09-08

级,tedia 公司);兔抗大鼠 fas、fasL、scf 和 c-kit 抗体、小鼠 β-actin单抗(武汉博士德公司);SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司);BCA 蛋白检测试剂盒、RIPA 蛋白裂解、聚丙烯酰胺凝胶试剂盒(碧云天公司)。

1.2 有机提取物制备

于2004年7月至8月采集嘉陵江C市段某自来水厂取水点水样20 000 L,参照文献[4]的方法进行,应用固相萃取技术富集水中有机物,萃取剂为 XAD-2 树脂,过柱流速为4~6倍柱体积/min;以正己烷:丙酮(1:1)为洗脱液;洗脱液经旋转蒸发仪45 ℃减压蒸馏挥干。用玉米油定容至200 L/ml,备用。

1.3 动物实验

清洁级 SD 雄性大鼠40只,体质量(162±17)g,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心[许可证号 SCXK-(军)2002008]。动物按随机区组方法分为3个试验组(每公斤体质量灌胃相当于2、16、80 L 水样中的有机提取物)和对照组,每组10只[5]。灌胃体积为每公斤体质量5 ml,每周连续灌胃7 d,染毒4周。首次染毒后第28天处死动物,取单侧睾丸、附睾于 bousin 液中固定,作石蜡切片用于免疫组化与光镜病理观察;另一侧睾丸于液氮中保存,提取总蛋白用于 Western blot 分析;另一侧附睾称重,作附睾尾精子计数。

1.4 TUNEL 法检测细胞凋亡

1.4.1 TUNEL 检测细胞凋亡 参考罗氏公司细胞凋亡检测试剂盒,简述如下:睾丸切片二甲苯脱蜡至水,切片滴加蛋白酶 K(20 μg/ml)孵育(37 ℃,30 min),漂洗,5% 牛血清白蛋白封闭(37 ℃,30 min)。滴加反应液1(37 ℃,60 min),阴性对照不加 TDT,阳性对照提前加1 mg/L DNA 酶(37 ℃,20 min),漂洗,滴加反应液2(37 ℃,30 min);DAB 染色,镜下观察细胞核呈深棕色即用自来水流水冲洗终止反应;苏木精复染,盐酸乙醇分色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树胶封片观察。

1.4.2 结果判定 镜下观察,以出现棕黄色细胞核细胞为阳性细胞,计数出现阳性细胞的曲细精管数。阳性曲精管数/观察的曲细精管数×100% 计为凋亡率。

1.5 免疫组化方法

1.5.1 按博士德公司 SABC 试剂盒进行免疫组化检测 简述如下:石蜡切片二甲苯脱蜡至水,3% 过氧化氢孵育(室温,20 min),漂洗;0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH=6)抗原修复20 min,漂洗;封闭(37 ℃,20 min)封闭;加一抗4℃过夜,一抗浓度分别为 fas(1:100),fasL(1:100),c-kit(1:100),漂洗;加二抗孵育(37 ℃,20 min),漂洗;加 SABC 试剂孵育(37 ℃,20 min),漂洗;DAB 染色,镜下观察细胞核呈深棕色即用自来水流水冲洗终止反应,苏木精复染,盐酸乙醇分色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树胶封片观察。

1.5.2 结果判定[6] 光镜下观察,以出现棕黄色细胞为阳性细胞,计数出现阳性细胞的曲细精管数。阳性曲精管数/观察的曲细精管数×100% 计为阳性表达率。

1.6 Western blot 检测

1.6.1 总蛋白提取 液氮中取出睾丸,置于预冷研钵中研磨成粉,加入裂解液(碧云天,p0013B),混匀,冰上裂解30 min,加入 PMSF 混匀,4 ℃,12 000 r/min 离心10 min,吸取上清,BCA 试剂盒(碧云天,p0012)检测蛋白浓度,上清置于-70℃冰箱保存待用。

1.6.2 Western blot 分析 常规聚丙烯酰胺凝胶电泳(fas,fasL 和 scf 采用12% 的胶,c-kit 采用8% 的胶),上样蛋白浓度为20μg/孔(上样前煮沸变性),电泳完毕经半干转印将蛋白转移至 PVDF 膜,蛋白粉封闭后加入一抗(1:75~1:100),二抗(1:5 000~1:7 500),DAB 显色照相。蛋白样本为3只大鼠已知浓度蛋白混合,实验重复3次。

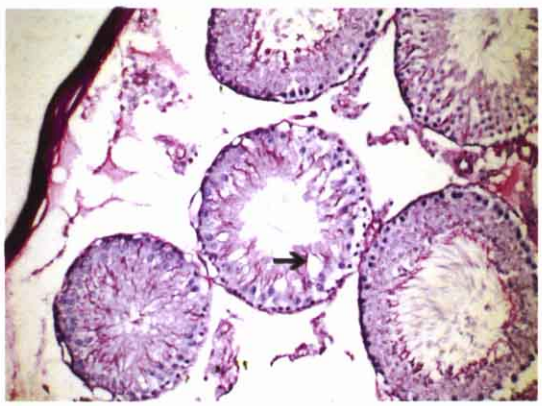
1.7 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SSPS 11.5 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 睾丸曲细精管病理观察

睾丸病理 PAS 染色观察,正常曲细精管分布规则,管腔圆形,基底膜与生精细胞结合紧密不脱落,腔内生精细胞排列紧密,5~6层,精子较丰富,但各个曲细精管并不均匀。间质细胞在曲细精管间均匀散在分布。实验结果显示,水中有机污染物可引起大鼠睾丸支持细胞空泡变性,生精细胞排列疏松(图1)。附睾尾精子计数与附睾重量比值随剂量增加而减少,高剂量组为$(2.5 \pm 1.3) \times 10^7$个/g,对照组为$(4.2 \pm 1.4) \times 10^7$个/g,高剂量组明显低于对照组($P<0.05$)。



→:支持细胞空泡变性

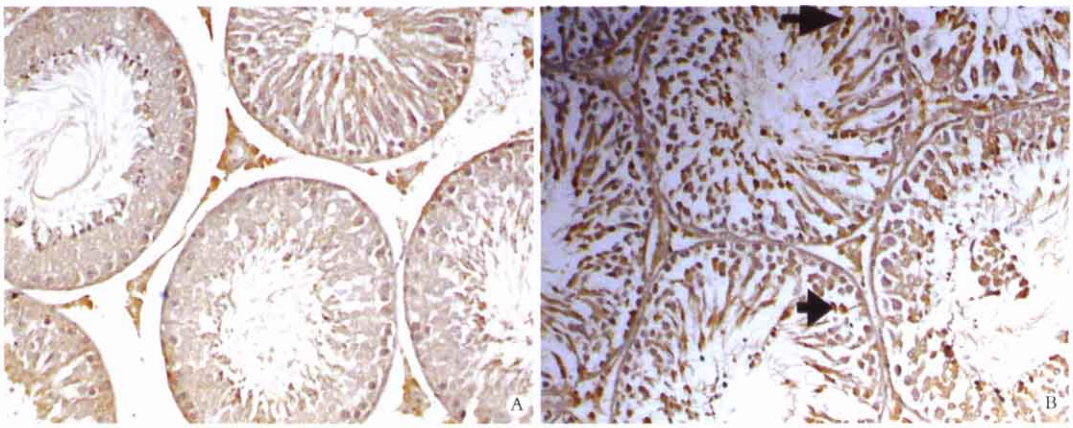
图1 曲细精管生精上皮空泡变性 (PAS×200)

2.2 细胞凋亡

对照组能观察到生精细胞凋亡,主要是分裂前的生精细胞与精原细胞,与实验组比较相差不显著($P>0.05$);对照组少见精子细胞凋亡,实验组可见精子细胞凋亡发生,高剂量组凋亡率为(41±14)%,对照组凋亡率为(10±4)%,高剂量组明显高于对照组($P<0.05$)。见图2。

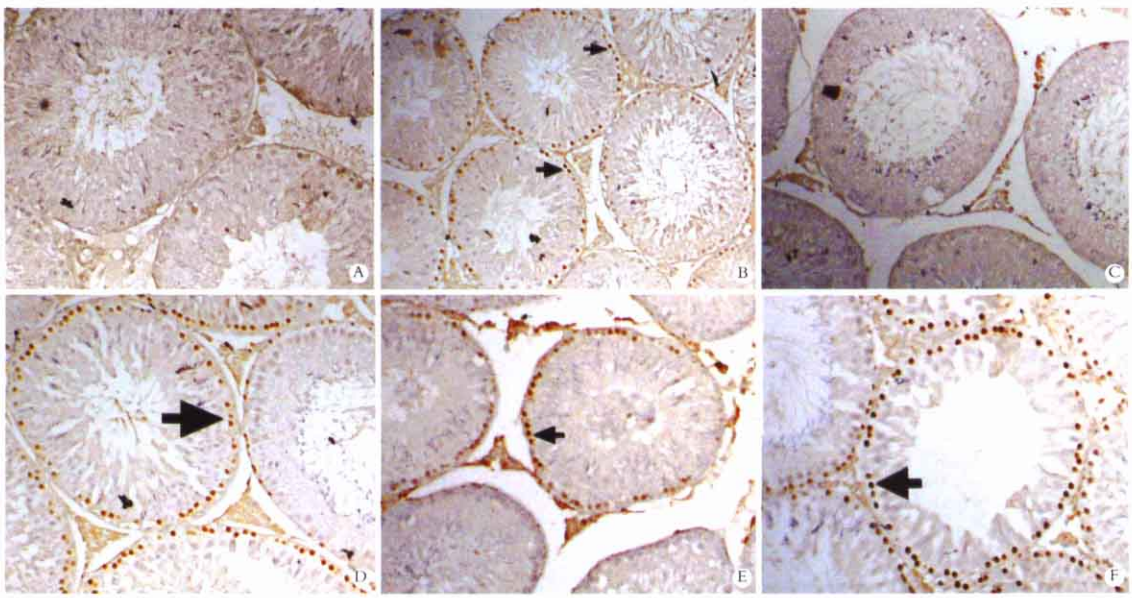
2.3 免疫组化结果

对照组与实验组均有 Fas、fasL 和 c-kit 蛋白表达,高剂量组明显高于对照组($P<0.05$,表1)。表达阳性细胞主要是分裂前的生精细胞,包括初级精母细胞和精原细胞,fas,fasL 蛋白表达位于细胞质或细胞膜,c-kit 表达位于细胞核。见图3。



A：对照组；B：高剂量组(80 L/kg)；➡：凋亡的精子细胞

图 2　水中有机物诱发大鼠精子细胞凋亡　(TUNEL×200)



A、B：fas 蛋白表达(A：对照组，B：高剂量组)；C、D：fasL 蛋白表达(C：对照组，D：高剂量组)；E、F：c-kit 蛋白表达(E：对照组，F：高剂量组)；➡：表达阳性细胞

图 3　免疫组化检测水中有机污染物对大鼠睾丸相关基因的表达　(SABC×200)

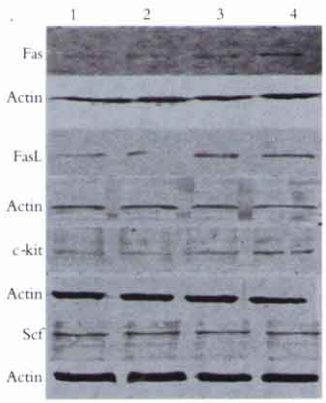
表 1　大鼠睾丸生精过程相关基因表达阳性曲细精管数($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数量	Fas	FasL	c-kit
对照组	5	26 ± 4	16 ± 19	19 ± 19
低剂量组	5	22 ± 4	10 ± 6	9 ± 8
中剂量组	5	35 ± 16	32 ± 15	41 ± 18
高剂量组	5	49 ± 12[a]	49 ± 25[a]	58 ± 31[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.4　Western blot 结果

Western blot 结果显示，fas、fasL 和 c-kit 蛋白表达明显增高，高剂量组高于对照组($P<0.05$)，而 Scf 因子的蛋白表达对照组与实验组之间无明显差异($P>0.05$)(图 4)。



1：对照组；2：低剂量组；3：中剂量组；4：高剂量组

图 4　水中有机污染物对大鼠睾丸相关基因蛋白表达的影响

3 讨论

环境中有机污染物引起的生殖损伤,大多集中于对睾丸的损伤,细胞凋亡是主要的损伤机制,fas/fasL引起凋亡酶的启动使生精细胞发生凋亡[6]。睾丸生精过程受睾丸支持细胞的调控,支持细胞通过分泌干细胞生长因子影响生精细胞分化成为成熟精子。Scf因子能与其受体c-kit发挥作用,有抑制生精细胞凋亡的作用,睾丸生精过程的平衡主要通过这两条途径来保持均衡的[2]。在我们的前期研究结果显示水中有机提取物可引起生精细胞损伤,精子数目下降[3],本研究也得到同样结果,即实验大鼠高剂量组相对精子数明显下降($P<0.05$)。我们认为水中有机污染物对睾丸生精过程的影响也有可能涉及到这两条途径。因此采用免疫组化与Western blot检测细胞凋亡与相关的基因表达。

大量文献证实环境污染物可以诱导睾丸生精细胞凋亡增加,生精过程各期生精细胞均可见细胞凋亡。我们研究发现,凋亡主要发生于精子细胞,精原细胞也能观察到凋亡发生,但实验组与对照组相比无明显差异($P>0.05$)。fas及fas配体介导细胞凋亡是环境污染物睾丸毒性的主要发生机制,个别的化学物也可不依赖于fas途径而引起生精细胞凋亡增加。我们发现水中有机污染物可引起高剂量组分裂前生精细胞fas与fasL蛋白明显增加,但是有丝分裂前的生精细胞凋亡并未增加。本实验结果显示精子细胞凋亡明显增加,但是并未观察到精子细胞有fas与fasL蛋白表达,与文献报道结果一致。以上结果说明,在本研究条件下,fas与fasL表达增加并不引起细胞凋亡增加,精子细胞凋亡的机制可能有其他的原因,有待进一步研究。

生精过程阻滞是外来化学物睾丸毒性的表现之一,表现为生精细胞大量停留在精原细胞阶段,而不进一步发育分化形成成熟精子细胞,有可能是相关基因功能受影响所致[7]。c-kit蛋白是生精过程中生精细胞发育分化的重要指标,主要在精原细胞上表达[8,9]。我们的结果显示,高剂量组c-kit表达阳性细胞增加,提示精原细胞明显增加,生精过程受到阻滞(arrest)。c-kit蛋白为膜蛋白,但结果显示表达位于细胞核,有可能是生精细胞细胞核占细胞比例较大,以及固定液引起细胞质收缩等因素,使得阳性细胞染色细胞质与细胞核不易区分,也有报道由于抗体的不同,c-kit蛋白有可能在细胞核表达[11]。

本实验结果显示水有机污染物可以引起精子数量下降,精子细胞凋亡。考虑到水中有机污染物是多种化学物构成,我们前期采用GC/MS分析水中有机提取物,发现其中以多环芳烃和邻苯二甲酸酯类为主。邻苯二甲酸酯是典型的睾丸毒剂,fas介导的细胞凋亡机制是其重要的损伤机制,而多环芳烃类的污染物可以诱导其他种类细胞凋亡发生[10]。我们的结果显示fas, fasL主要表达于有丝分裂前的生精细胞,实验组表达率均高于对照组,但TUNEL法检测细胞凋亡,并没有观察到实验组生精细胞凋亡增加的现象。因此实验结果提示两类主要污染物联合作用于不同的生精过程,呈现相加作用,最后导致生精过程受到影响。

本研究观察水中有机污染物对睾丸生精细胞凋亡,fas、fasL以及scf及其受体c-kit表达的影响。结果显示水中有机提取物可能干扰了大鼠睾丸正常生精过程,引起精子细胞凋亡和生精细胞发育分化阻滞。初步揭示了水中有机污染物睾丸损伤的机制,详细机制有待进一步体外实验证实。本研究中采用的动物实验程序是参考经济合作与发展组织生殖与发育毒性筛选试验程序(OECD,421),实验周期较短,染毒时间为28 d[5],染毒时间并未覆盖整个生精周期,因此应采用染毒时间更长的动物实验以及体外生精细胞培养进一步验证。

参考文献:

[1] Skakkebaek N E, Rajpert-De-Meyts E, Main K M. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects[J]. Hum Reprod, 2001, 16(5): 972-978.

[2] Boekelheide K, Fleming S L, Johnson K J, *et al*. Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 2000, 225(2): 105-115.

[3] 任 谦, 曹 波, 邱志群, 等. 以嘉陵江(重庆段)为水源的管网末梢水中有机提取物的雄性生殖毒性研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(10): 1012-1015.

[4] Daignault S A, Noot D K, Williams D T. A review of the use of XAD resins to concentrate organic compounds in water[J]. Water Res, 1988, 22(7): 803-813.

[5] Reproduction/developmental toxicity screening test. OECD Guideline for Testing of Chemicals 421[M]. Paris: OECD, 1995.

[6] Lee J, Richburg J H, Younkin S C, *et al*. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis[J]. Endocrinology, 1997, 138(5): 2081-2088.

[7] Schrans-Stassen B H, Saunders P T, Cooke H J, *et al*. Nature of the spermatogenic arrest in Dazl -/- mice[J]. Biol Reprod, 2001, 65(3): 771-776.

[8] Mauduit C, Hamamah S, Benahmed M. Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis[J]. Human Reprod Update, 1999, 5(5): 535-545.

[9] Yan W, Suominen J, Toppari J. Stem cell factor protects germ cells from apoptosis *in vitro*[J]. J Cell Sci, 2000, 113(Pt 1): 161-168.

[10] Raychoudhury S S, Kubinski D. Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced cytotoxicity in cultured rat Sertoli cells involves differential apoptotic response[J]. Environ Health Perspect, 2003, 111(1): 33-38.

[11] Matsuda R, Takahashi T, Nakamura S, *et al*. Expression of the c-kit protein in human solid tumors in corresponding fetal and adult normal tissues[J]. Am J Pathol, 1993, 142(1): 339-346.

(编辑 张大春)