DOI:10.16016/j.1000-5404.201501144

论著

1,2,3,4-二环氧丁烷对雄性小鼠生殖细胞损伤的研究

董建云[1,2],王 治[2],董小梅[2],刘晋祎[2],叶冬青[1],曹 佳[2],敖 琳[2] (230032 合肥,安徽医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系[1];400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院毒理学研究所[2])

[摘要] **目的** 研究1,3-丁二烯的活性中间代谢产物1,2,3,4-二环氧丁烷(1,2,3,4-diepoxybutane, DEB)对小鼠睾丸生殖细胞的损伤。**方法** 成年雄性昆明小鼠分为溶剂对照组(PBS)、低剂量(17 mg/kg)DEB染毒组和高剂量(42.5 mg/kg)DEB染毒组。采用腹腔注射染毒,于第1、3、5天间隔注射3 d,初次染毒后的第21天采样。比较睾丸系数、精子密度、精子活动度以及睾丸组织的病理学改变。采用流式细胞仪进行睾丸细胞周期及DNA倍型分析。采用化学比色法检测小鼠肝组织氧化和抗氧化能力的改变。**结果** 与溶剂对照组相比,各染毒组小鼠的睾丸系数及精子密度均有下降,且高剂量DEB染毒组明显降低($P<0.05$)。与溶剂对照组相比,DEB染毒小鼠的极慢或不动的精子比例显著升高($P<0.05$,$P<0.01$)。细胞周期分析结果显示,高剂量DEB染毒组的单倍体和二倍体细胞比例降低,而四倍体细胞比例升高,同时G_2/M期细胞比例升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。随着染毒剂量增加,睾丸结构受损,肝组织的MDA水平增加,而SOD和GSH-Px水平降低,其中高剂量DEB染毒组的变化具有统计学差异($P<0.05$)。**结论** DEB染毒可以造成小鼠睾丸细胞损伤,干扰生精细胞的周期进程,氧化应激可能是DEB诱导生殖细胞损伤的原因之一。

[关键词] 1,3-丁二烯;1,2,3,4-二环氧丁烷;精子损伤;细胞周期阻滞
[中图法分类号] R321.2; R329.26; R996 [文献标志码] A

DEB, 1,2,3,4-diepoxybutane, induces germ cell damage in male mice

Dong Jianyun[1,2], Wang Zhi[2], Dong Xiaomei[2], Liu Jinyi[2], Ye Dongqing[1], Cao Jia[2], Ao Lin[2] ([1]Department of Epidemiology and Statistics, College of Public Health, Anhui Medical University, Hefei, Anhui Province, 230032; [2]Institute of Toxicology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the toxic effects of 1,2,3,4-diepoxybutane (DEB), a metabolic intermediates of 1,3-butadiene, on germ cells of male mice. **Methods** Male Kunming mice were randomly divided into 3 groups, including solvent control group (PBS), DEB low dose (17 mg/kg) exposure group and high dose (42.5 mg/kg) exposure group. Each mouse was intraperitoneally treated for 3 times at an interval of 48 h. The mice were sacrificed on day 21 after the first injection. The testis coefficient, sperm density, sperm motility and pathological changes of the testis tissue were examined. The cell cycle distribution and DNA content of testicular cells were analyzed by flow cytometry. The quantity of malodialdehyde (MDA) and the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) in liver were detected by chemical colorimetry. **Results** Compared with control group, the testis coefficient and sperm density were decreased in DEB-treated groups, with 42.5 mg/kg DEB group reduced more significantly ($P<0.05$). And the sperm percentage of the extremely slow or motionless was obviously increased ($P<0.05$ or $P<0.01$) in

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81273105);重庆市自然科学基金一般项目(CSTC2012jjA0276)
[通信作者] 敖 琳,E-mail:aolin117@163.com
曹 佳,E-mail:caojia1962@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150327.1430.028.html(2015-03-27)

groups treated with low or high dose of DEB. Flow cytometry showed that the percentages of haploid and diploid cells were significantly lower in 42.5 mg/kg group than control group ($P<0.05$), whereas the percentages of tetraploid cells and G_2/M cells were significantly higher than control ($P<0.05$). Furthermore, with the increase of DEB treatment, the impaired testicular structure was observed. When compared with control group, the level of MDA was higher ($P<0.05$), but the activities of GSH-Px and SOD were lower ($P<0.05$) in the liver tissue of mice treated with 42.5 mg/kg DEB ($P<0.05$). **Conclusion** DEB exerts reproductive toxic effects on sperm cells, induces disturbance of cell cycle progression of spermatogenic cells, and leads to the oxidative stress in mice.

[**Key words**] 1,3-butadiene; 1,2,3,4-diepoxybutane; sperm damage; cell cycle arrest

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81273105) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA0276). Corresponding author: Ao Lin, E-mail: aolin117@163.com; Cao Jia, E-mail: caojia1962@126.com

1,3-丁二烯(1,3-Butadiene, BD)是一种重要的化工原料,可导致职业人群的健康损害[1-2]。由于BD也在汽车尾气、香烟烟雾及食用油烟中普遍存在,因而被认定为居民住宅环境区的主要污染物之一[3]。国际癌症研究组织(IARC)于2008年将BD确认为人类致癌物(1类)。1,2,3,4-二环氧丁烷(1,2,3,4-diepoxybutane, DEB)是BD最重要的活性中间代谢产物,具有较强的遗传毒性,可诱导基因突变和染色体损伤[4-5]。此外,既往研究发现DEB也能造成雄性生殖细胞的遗传损伤,如染色体畸变和微核形成[6]。职业流行病学研究也提示BD长期接触的工人存在生殖健康危害[7]。但目前DEB对雄性生殖系统损伤的实验研究资料还并不全面。本研究通过DEB腹腔注射染毒导致小鼠生精过程的改变、睾丸组织结构的改变及精子的异常来探讨DEB对雄性小鼠睾丸细胞的损伤作用及其可能的损伤机制,旨在为进一步进行人群生殖健康的防护提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

DEB购自美国Chem Service公司,细胞周期检测试剂盒(北京碧云天生物技术研究所),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成),FC-500流式细胞仪(美国Beckman公司),计算机辅助精液分析(CASA)系统(美国Hamilton Thorne公司)。

1.2 实验动物与分组

健康成年雄性昆明小鼠21只,体质量(30±1)g,由第三军医大学实验动物中心提供[合格证号:SCXK(军)2007-016]。分为溶剂对照组(PBS)、低剂量(17 mg/kg)和高剂量(42.5 mg/kg)DEB染毒组,每组7只。小鼠适应性喂养1周后,于第1、3、5天腹腔注射,注射容量为0.01 mL/g。于初次染毒后的第21天处死小鼠进行采样。分离双侧睾丸,称量并计算脏器系数。一侧睾丸用于细胞周期的分析,另一侧睾丸4%多聚甲醛固定,石蜡包埋用于病理组织切片观察。

1.3 精子运动力及精子密度分析

取双侧附睾,置于盛有200 μL HTF培养基的小皿中,用眼科剪将附睾剪开,使精子游离出。用吸管轻轻吹打悬液,即制成精子悬液。取5 μL精子悬液于载玻片,采用CASA系统分析精子运动力和精子密度。

1.4 睾丸细胞周期测定

将一侧睾丸用眼科剪剪成1~2 mm大小的碎片,加入1 mL PBS轻柔吹打,200目尼龙网过滤,1 000 r/min离心5 min。弃上清,沉淀再用PBS漂洗两次,加入预冷的70%乙醇进行固定,4 ℃冰箱过夜备用。按照细胞周期检测试剂盒的说明,离心去除细胞固定液,预冷的PBS漂洗1次,加入500 μL碘化丙啶染色液,37 ℃避光温浴30 min。样品测试前用200目尼龙网过滤除去细胞团。采用流式细胞仪进行检测,采用CXP Cytometer软件采集细胞,采用FCS Express软件进行分析。

1.5 肝组织氧化和抗氧化水平检测

取0.2~1 g肝脏,加入0.86%生理盐水进行匀浆,制成10%组织匀浆。按照试剂盒操作说明分别进行MDA、SOD及GSH-Px的活性检测。

1.6 统计学分析

计量指标以$\bar{x}\pm s$表示。采用SPSS 17.0进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 DEB对小鼠一般状况和睾丸系数的影响

染毒期间,溶剂对照组和低剂量DEB染毒组小鼠

活动、食欲良好，被毛光亮。高剂量 DEB 染毒组表现出不同程度的食欲差，活动减少，被毛色泽变暗等毒性症状。与溶剂对照组相比，低剂量和高剂量染毒组的睾丸湿质量及睾丸系数均降低，且高剂量 DEB 染毒组的睾丸系数明显降低（$P<0.05$，表 1）。

表 1　DEB 对小鼠睾丸湿质量及睾丸系数的影响

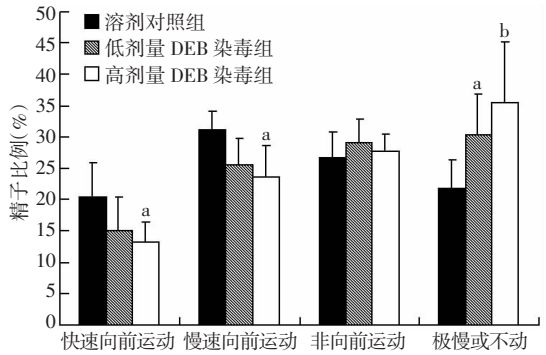
（$n=7, \bar{x}\pm s$）

组别	睾丸湿质量(g)	睾丸系数(‰)
溶剂对照组	0.26 ± 0.04	5.90 ± 0.72
低剂量 DEB 染毒组	0.22 ± 0.02	5.67 ± 0.46
高剂量 DEB 染毒组	0.19 ± 0.02	5.10 ± 0.73[a]

a：$P<0.05$，与溶剂对照组比较

2.2　DEB 对小鼠精子的损伤作用

不同浓度的 DEB 腹腔注射小鼠后，与溶剂对照组［(80.23 ± 16.02) × 10^6/mL］相比，各染毒组精液密度都有所下降［低剂量 DEB 染毒组(61.53 ± 23.29) × 10^6/mL，高剂量 DEB 染毒组(52.70 ± 12.22) × 10^6/mL］，但只有高剂量 DEB 染毒组明显下降（$P<0.05$，图 1A）。精子活动力分析结果显示，极慢或不动的精子比例在 DEB 染毒后均明显升高（$P<0.05$，$P<0.01$）。同时，高剂量 DEB 染毒组快速向前运动和慢速向前运动精子比例与溶剂对照组相比明显降低（$P<0.05$，图 1）。



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与溶剂对照组比较

图 1　CASA 系统对小鼠精子活力的分析

2.3　DEB 对小鼠睾丸细胞周期的影响

采用流式细胞仪分析小鼠睾丸细胞的 DNA 含量。由表 2 可知，与溶剂对照组相比，低剂量 DEB 染毒组的睾丸细胞比例未出现明显改变，高剂量 DEB 染毒组的睾丸细胞中单倍体及二倍体细胞比例明显降低（$P<0.05$），而四倍体细胞比例明显增加（$P<0.05$）。此外，细胞周期各时相细胞的比例见表 3，与溶剂对照组相比，低剂量 DEB 染毒组细胞周期各时相比例无显著改变，高剂量 DEB 染毒组中 G_0/G_1 期及 S 期细胞比例明显降低（$P<0.05$），而 G_2/M 期细胞比例明显增加（$P<0.05$）。

表 2　小鼠睾丸组织各倍体细胞所占百分数（$n=7, \bar{x}\pm s$）

组别	单倍体(1C)	二倍体(2C)	四倍体(4C)
溶剂对照组	25.61 ± 4.23	25.15 ± 2.42	38.97 ± 6.13
低剂量 DEB 染毒组	27.73 ± 6.34	27.73 ± 3.07	36.01 ± 6.56
高剂量 DEB 染毒组	19.41 ± 4.72[a]	19.88 ± 4.60[a]	51.39 ± 8.67[a]

a：$P<0.05$，与溶剂对照组比较

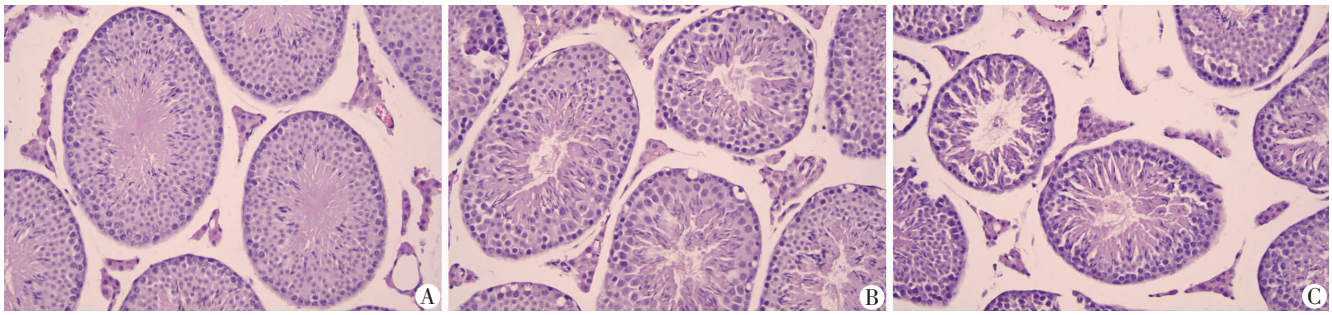
表 3　DEB 对小鼠睾丸细胞周期各时相生精上皮细胞的影响［$n=7$，$(\bar{x}\pm s)$%］

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
溶剂对照组	31.95 ± 4.03	12.25 ± 2.21	56.96 ± 5.44
低剂量 DEB 染毒组	34.34 ± 2.50	11.20 ± 1.83	55.93 ± 3.36
高剂量 DEB 染毒组	23.20 ± 4.06[b]	9.68 ± 0.53[a]	68.25 ± 4.31[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与溶剂对照组比较

2.4　DEB 对小鼠睾丸组织结构的影响

显微镜观察可见，对照组小鼠睾丸的生精小管管腔呈椭圆形，生精细胞排列整齐且紧密。低剂量 DEB 染毒组的睾丸组织结构基本正常，仅生精细胞间排列较疏松，个别生精细胞可见空泡和固缩的细胞核。高剂量 DEB 染毒组的睾丸生精小管形态不规则，可见生精细胞层次减少，结构排列紊乱，精子生成明显减少（图 2）。



A：溶剂对照组；B：低剂量 DEB 染毒组；C：高剂量 DEB 染毒组

图 2　HE 染色观察小鼠睾丸组织病理学改变　（LM　×200）

2.5 DEB对小鼠肝组织MDA、SOD、GSH-Px的影响

由表4可见,DEB染毒处理后,MDA水平呈升高趋势,而抗氧化酶SOD和GSH-Px的活力呈现下降趋势,其中高剂量DEB染毒组与溶剂对照相比,MDA、SOD和GSH-Px的改变有统计学差异($P<0.01$)。

表4 DEB对小鼠肝脏组织MDA、SOD、GSH-Px水平的影响($n=7, \bar{x}\pm s$)

组别	MDA(nmol/mg)	SOD (U/mg)	GSH-Px (U/mg)
溶剂对照组	0.43±0.12	142.59±12.03	578.60±74.64
低剂量DEB染毒组	0.59±0.18	122.41±31.74	532.60±81.92
高剂量DEB染毒组	0.74±0.14[a]	104.16±17.41[a]	433.80±84.91[a]

a: $P<0.01$,与对照组比较

3 讨论

自2008年国际癌症研究所(IARC)将BD的致癌性由可能人类致癌物(2A类)提升为确定人类致癌物(1类)以来,BD对人类健康的影响及其靶器官效应引起了更多关注。BD的致突变和致癌性来自于在机体内转化形成的3种主要环氧化活性代谢物,其中DEB的毒性效应最强,被认为是导致职业暴露人群造血系统肿瘤危险性升高的直接原因[8]。此外,流行病学和实验研究已证实BD的生殖损伤作用,其中卵巢是BD毒性作用的敏感器官之一[9]。在雄性生殖系统,研究证实BD及其代谢物可以导致睾丸萎缩和生殖细胞的遗传损伤[10],但目前对DEB睾丸系统的研究资料还不全面,其相应的机制也并不明确。本研究从睾丸细胞生精过程改变的角度探讨DEB对雄性生殖细胞的毒性作用,并探讨诱导睾丸细胞损伤的可能机制。

DEB为双功能烷化剂,易造成DNA链内、链间或DNA与蛋白分子之间的交联,导致DNA损伤[11]。DNA损伤后可诱发一系列的损伤反应,包括对细胞不同类型周期进展阻滞的发生及凋亡的诱导等。既往研究报道显示,DEB在人淋巴细胞和肺细胞中分别观察到有凋亡和周期改变的发生[12-13],但在生殖系统中尚少见报道。本研究采用流式细胞术检测结果显示,高剂量DEB染毒组小鼠睾丸细胞的单倍体和二倍体细胞比例与溶剂对照组小鼠相比显著降低,而四倍体细胞比例则显著增加。进一步分析细胞周期各时相细胞的比例,发现高剂量DEB染毒组的睾丸细胞G_0/G_1期和S期细胞比例显著降低,而G_2/M期细胞比例显著增加,提示DEB对小鼠睾丸的生精过程产生了显著影响,且显示有细胞进展的阻滞。

此外,各染毒组小鼠的睾丸湿质量和睾丸系数均有下降,且高剂量DEB染毒组出现显著降低,提示作为生殖细胞分化发育场所的睾丸组织受到了影响。DEB对睾丸组织结构的损伤也比较明显,包括生精细胞层次减少和管腔内精子生成减少。这些结果证实了DEB可引起睾丸系统的损伤。

既往的遗传毒性研究发现,BD及其代谢物不仅可以导致体细胞的突变,也可在生精细胞的分化发育过程中诱导染色体断裂和微核形成[10]。本实验运用精液密度及精子活动力指标揭示DEB是否有生殖毒性。研究发现,高剂量DEB染毒组与溶剂对照组相比,精液密度显著下降,精子活动力中极慢或不动的精子比率显著增加,提示DEB可引起精子损伤,造成雄性生殖能力的下降。

以往研究发现,活性氧族的过多产生或抗氧化系统的功能受损后引起的氧化应激,将造成DNA的氧化损伤,同时也在男性不育中起到了关键的作用[14-16]。既往有研究显示,DEB可诱导机体的氧化应激[17],并且介导了线粒体通路的凋亡发生[13]。因此,本研究通过检测肝组织氧化和抗氧化指标来反映DEB染毒对机体氧化应激状态的影响,其中MDA是脂质过氧化产物,GSH-Px和SOD是衡量机体抗氧化能力的指标。结果表明DEB可造成脂质过氧化物水平的升高和抗氧化酶活力的下降。这一结果初步提示,氧化应激可能是DEB诱导生殖细胞损伤的原因之一。

综上所述,本研究结果显示DEB可改变睾丸细胞的生精过程,破坏睾丸组织结构最终导致精子异常,其发生可能与活性氧过多引起的氧化应激有关,也为进一步研究DEB的生殖毒性机制提供了线索。

参考文献:

[1] Ammenheuser M M, Bechtold W E, Abdel-Rahman S Z, *et al*. Assessment of 1, 3-butadiene exposure in polymer production workers using HPRT mutations in lymphocytes as a biomarker[J]. Environ Health Perspect, 2001, 109(12): 1249-1255.

[2] Xiang M, Ao L, Yang H, *et al*. Chromosomal damage and polymorphisms of metabolic genes among 1, 3-butadiene-exposed workers in a matched study in China[J]. Mutagenesis, 2012, 27(4): 415-421.

[3] Logue J M, McKone T E, Sherman M H, *et al*. Hazard assessment of chemical air contaminants measured in residences [J]. Indoor Air, 2011, 21(2): 92-109.

[4] Cochrane J E, Skopek T R. Mutagenicity of butadiene and its

epoxide metabolites: I. Mutagenic potential of 1, 2-epoxybutene, 1, 2, 3, 4-diepoxybutane and 3, 4-epoxy-1, 2-butanediol in cultured human lymphoblasts[J]. Carcinogenesis, 1994, 15(4): 713 - 717.

[5] Liu X J, Zeng F M, An J, *et al*. Cytotoxicity, genotoxicity, and mutagenicity of 1-chloro-2-hydroxy-3-butene and 1-chloro-3-buten-2-one, two alternative metabolites of 1, 3-butadiene [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 271(1): 13 - 19.

[6] Adler I D. Spermatogenesis and mutagenicity of environmental hazards: extrapolation of genetic risk from mouse to man[J]. Andrologia, 2000, 32(4/5): 233 - 237.

[7] 董定龙, 王德启, 赵国华, 等. 从事丁二烯抽提装置作业工人生殖危害的调查[J]. 工业卫生与职业病, 1999, 25(2): 101 - 103.

[8] Kirman C R, Albertini R A, Gargas M L. 1, 3-Butadiene: Ⅲ. Assessing carcinogenic modes of action[J]. Crit Rev Toxicol, 2010, 40 Suppl 1: 74 - 92.

[9] Kirman C R, Grant R L. Quantitative human health risk assessment for 1, 3-butadiene based upon ovarian effects in rodents[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2012, 62(2): 371 - 384.

[10] Albertini R J, Carson M L, Kirman C R, *et al*. 1, 3-Butadiene: Ⅱ. Genotoxicity profile[J]. Crit Rev Toxicol, 2010, 40 Suppl 1: 12 - 73.

[11] Zhang P P, Wen Y, An J, *et al*. DNA damage induced by three major metabolites of 1, 3-butadiene in human hepatocyte L02 cells[J]. Mutat Res, 2012, 747(2): 240 - 245.

[12] Schmiederer M, Knutson E, Muganda P, *et al*. Acute exposure of human lung cells to 1, 3-butadiene diepoxide results in G_1 and G_2 cell cycle arrest[J]. Environ Mol Mutagen, 2005, 45(4): 354 - 364.

[13] Yadavilli S, Martinez-Ceballos E, Snowden-Aikens J, *et al*. Diepoxybutane activates the mitochondrial apoptotic pathway and mediates apoptosis in human lymphoblasts through oxidative stress[J]. Toxicol *In Vitro*, 2007, 21(8): 1429 - 1441.

[14] Aitken R J, Whiting S, De-Iuliis G N, *et al*. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase[J]. J Biol Chem, 2012, 287(39): 33048 - 33060.

[15] Saalu L C. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: an evidence based evaluation [J]. Pak J Biol Sci, 2010, 13(9): 413 - 422.

[16] Guo J, Wu G, Bao J, *et al*. Cucurbitacin B induced ATM-mediated DNA damage causes G_2/M cell cycle arrest in a ROS-dependent manner[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88140.

[17] Korkina L G, Deeva I B, De-Biase A, *et al*. Redox-dependent toxicity of diepoxybutane and mitomycin C in sea urchin embryogenesis[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(2): 213 - 220.

(收稿:2015-01-20;修回:2015-02-04)

(编辑 吴培红)