维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0570-04

镉对雄性大鼠颌下腺的影响及丙酸睾酮的保护作用

李新枝,廖晓岗

(重庆医科大学电子显微镜室生殖医学超微结构实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨氯化镉对雄性大鼠颌下腺的影响及丙酸睾酮的保护作用。方法:35 只雄性 Wistar 大鼠分为 3 组:对照(C)组、镉(Cd)组和镉加丙酸睾酮(Cd+T)组。利用原子吸收火焰法、免疫组化法、透射电镜等作颌下腺组织镉含量测定,雄激素受体(AR)表达和定量分析以及颗粒曲管(GCT)细胞的超微结构观察。结果:镉注射后 24h,GCT 细胞内出现不同程度的线粒体肿胀和(或)空泡化,胞质和线粒体内可见髓样结构,GCT 周围毛细血管内皮细胞线粒体肿胀。7~15 天后上述改变明显加重,部分 GCT 细胞见胞质广泛肿胀和轻度核溶解,30 天后细胞形态仍未恢复正常。Cd +T 组的超微结构损伤较相应 Cd 组轻。Cd 组和 Cd +T 组的镉含量均明显高于 C 组,Cd+T 组的镉含量虽低于相应 Cd 组,但差异无显著性。各实验组 AR 表达均少于 C 组,但 Cd+T 组的 AR 表达高于相应 Cd 组,且在 3、7、15 天组两者比较差异有显著性。结论:镉对 GCT 细胞的超微结构有早期直接损伤作用,后期雄激素及其受体减少加重此损伤,补充雄激素对上述损伤有一定的保护效果。

【关键词】颌下腺;镉;丙酸睾酮;雄激素受体;超微结构

【中国图书分类法分类号】R361.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-02-20

Effects of cadmium on submandibular gland and the protective effects of testosterone in male rats

LI Xinzhi, et al

(Laboratory of Electron Microscopy, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of cadmium and the protection of testosterone propionate on submandibular gland of male rats. *Methods*: Thirty-five male adult Wistar rats were randomly divided into three groups: control, Cd and Cd + T group. The cadmium concentrations in submandibular gland were measured by flame mode of atomic absorption spectrophotometry. The morphologic changes of GCT cells were observeded by transmission electron microscopy. The expression of AR was determined by immunohistochemical SABC method and was semi-quantitatively analysed by image analysis. *Results*: The main ultrastructural changes after Cd treatment included swelling or vacuolation of mitochondria, increase of myelin figures in GCT cells, and swelling of mitochondria in the endothelial cells of peritubular capillaries. The changes above were most prominent at 7~15d, and swelling of the cytoplasm and slight karyolysis were also found. The morphology of GCT cells didn't recovery to normal yet after 30d. On the other hand, the ultrastructural lesions of GCT cells in Cd+T group were gentle. Compared with the control group, the cadmium concentrations in both Cd and Cd+T groups were significantly increased. Although they were lower in Cd+T group than that in Cd group, there was no significant difference between the two groups. The immunoreactivity level of AR in Cd and Cd+T groups decreased after Cd treatment, but it was higher in Cd+T group than that in corresponding Cd group, and had significant difference between them at 3, 7, 15d. *Conclusions:* The present results indicate that the earlier ultrastructural damage of GCT is related to the direct action of cadmium. The decrease of androgen and androgen receptor might aggravate the damage at later stages. To some extent, testosterone pretreatment could prevent toxicity of cadmium on submandibular gland.

【Key words】 Submandibular gland; Cadmium; Testosterone propionate; Androgen receptor; Ultrastructure

颌下腺是具有明显性别差异性的器官,雄性动物颌下腺与生殖系统相互依赖,为雄激素依赖器官[1-3],鉴于此已有学者提出颌下腺-睾丸轴的概念。目前从啮齿类动物的颌下腺中已发现近 30 种主要定位于颗粒曲管(granular convoluted tubule,GCT)细胞的多肽类活性物质,它们对生殖系统的发育和生理功能具有重要调节作用。镉是一种半衰期很长的有毒重金属。随着我国半导体及电子等工业的迅猛发展,镉污染日趋严重,极大地危害人们的健康。

作者介绍:李新枝(1978-),女,硕士,主要研究方向:生殖生物学。

维普资讯 http://www.cqvip.com

文献报道镉对肾、肝、骨骼、血液系统等均有毒性作用，而生殖系统对镉损伤尤其敏感[4,5]，关于镉对颌下腺影响的研究，目前仅见镉对雌性动物颌下腺影响的少量报道[6]。而有关镉对雄性动物颌下腺的毒性作用研究，国内外尚未见报道。此外，雄激素对镉毒性的保护作用机制亦不十分清楚。故该实验在我们以往镉对雄性生殖系统影响的系列研究基础上，通过组织镉含量测定，雄激素受体免疫组化定位和半定量分析以及超微结构观察等，探讨镉对雄性大鼠颌下腺 GCT 细胞的损伤以及丙酸睾酮的保护效果，为预防和治疗镉对男（雄）性生殖功能的损伤提供研究资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组和处理

健康成年雄性 Wistar 大鼠 35 只，体重 200~300g，随机分为 3 组：C 组、Cd 组和 Cd+T 组，实验组每个时间点所用动物均为 3 只，共计 30 只。对照组每个时间点设 1 只，共 5 只。Cd 组用 0.1%氯化镉（4mg/kg 体重）腹腔内 1 次注射；Cd+T 组连续注射 1%丙酸睾酮（5mg/kg）[7]3 次，每隔 24h1 次，并于最后 1 次注射丙酸睾酮的同时注射 0.1%氯化镉（剂量同上）。不同实验组均于镉注射后 24h、3、7、15、30 天取材。对照组给予腹腔内注射等体积的生理盐水，并与各实验组相应时间点同时取材。动物均在戊巴比妥钠(50mg/kg 体重)腹腔内注射麻醉下，取右侧颌下腺下极部分用作透射电镜样品制备，剩余颌下腺组织用于免疫组化，左侧颌下腺完整取出，用去离子水反复冲洗，滤纸吸干，称重，-20℃保存，用于镉含量测定。

1.2 透射电镜样品制备

按照常规透射电镜样品制备方法进行。用超薄切片机作 0.5μm 厚半薄切片，经 1%甲苯胺蓝 - 天青Ⅱ染色后在光镜下定位颌下腺的 GCT 细胞，然后制备超薄切片，用醋酸双氧铀及枸橼酸铅染色，H-600 型透射电镜观察。

1.3 免疫组织化学及其结果的定量分析

用 SABC 法进行免疫组织化学染色，具体方法按照试剂盒说明书进行。图像分析在光镜下（10×40）每组随机拍摄 10 个视野，共 110 张照片。用北航 BM2000 生物医学图像分析系统对所摄照片 AR 免疫反应产物总面积与背景面积之比（TA/BA）进行测量。

1.4 镉含量测定

配 $HClO_4$:HNO_3 体积比 1:4 混合酸。每例颌下腺标本加上述混合酸 1ml 湿式消化为澄清溶液，稀释，定容于 6ml，用原子吸收火焰法测定。

1.5 统计分析

计量数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。采用 SAS8.2 统计软件进行两组间样本均数比较的 t 检验。$P<0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结 果

2.1 颌下腺组织中的镉含量

结果见附表 1。镉注射后各时间点 Cd 组和 Cd+T组的颌下腺组织镉含量均显著高于对照组（$P<0.05$），镉注射后 24h 镉含量已明显升高，3~7 天达最高值，15 天镉含量开始下降，30 天仍高于对照组。Cd+T 组的镉含量虽然在各时间点均低于 Cd 组，但两组间差异没有显著性（$P>0.05$），提示丙酸睾酮对镉在颌下腺组织内的蓄积没有太大影响。

2.2 超微结构观察

表 1 颌下腺组织中镉含量的变化（$\bar{x} \pm s$，μg /g）

	time of treatment				
Group	24h	3d	7d	15d	30d
Cd	1.347 ± 0.232*	1.643 ± 0.232*	1.779 ± 0.066*	1.413 ± 0.295*	1.022 ± 0.038*
Cd+T	1.130 ± 0.115*	1.433 ± 0.335*	1.613 ± 0.162*	1.237 ± 0.194*	0.983 ± 0.010*
C			0.032 ± 0.011		

* vs C group, $P<0.05$

对照组 GCT 细胞形态正常，并可分为多颗粒细胞、少颗粒细胞和无颗粒细胞。多颗粒细胞分泌颗粒占据了胞质的大部分，细胞器较少。少颗粒细胞分泌颗粒较少，胞质中细胞器丰富。无颗粒细胞胞质内有少量或没有分泌颗粒，细胞器不发达。镉注射后 24h，GCT 细胞内部分线粒体轻度内室肿胀，胞质有少量髓样结构（图 1），管周毛细血管内皮细胞线粒体轻度肿胀；3 天后，上述改变加重；7~15 天，GCT 细胞退变最严重，表现为胞质电子密度降低，广泛线粒体内室肿胀，嵴减少或消失呈空泡状，甚至线粒体外膜破裂，并可见较多髓样结构形成，高尔基复合体扁平囊泡扩大，排列错乱，少数细胞可见核轻度肿胀(图 2~4)。管周毛细血管内皮细胞线粒体和局部胞质肿胀(图 5)。镉注射后 30 天，上述改变

维普资讯 http://www.cqvip.com

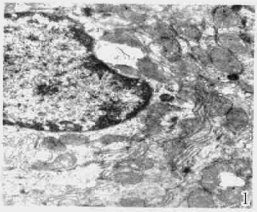


图 1 镉 24h 组 GCT 细胞的超微结构(8000×)

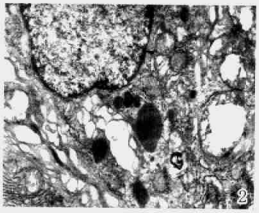


图 2 镉 7d 组 GCT 细胞的超微结构(10 000×)

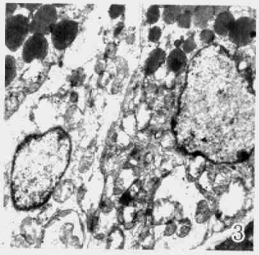


图 3 镉 7d 组 GCT 细胞的超微结构(5 000×)

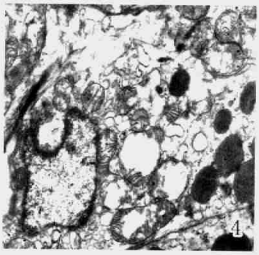


图 4 镉 15d 组 GCT 细胞的超微结构(8000×)



图 5 镉 7d 组 GCT 周毛细血管内皮细胞超微结构(6000×)

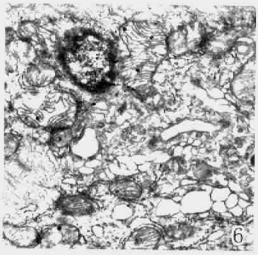


图 6 镉 30d 组 GCT 细胞的超微结构(12 000×)

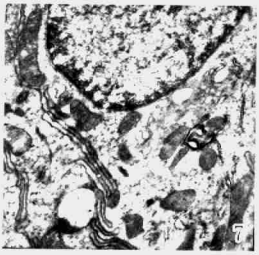


图 7 镉加丙酸睾酮 7d 组 GCT 细胞的超微结构(10 000×)

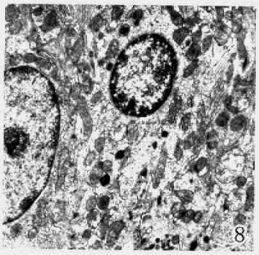


图 8 镉加丙酸睾酮 15d GCT 细胞的超微结构(6000×)

有减轻趋势,GCT 细胞大多形态正常,但仍可见少数线粒体肿胀和高尔基体扁平囊泡扩张(图 6)。Cd+T 组的 GCT 细胞超微结构损伤均较相应的 Cd 组轻。Cd+T 注射后 24h,GCT 细胞超微结构没有明显改变。3~15 天,可见 GCT 细胞内部分线粒体肿胀,但其数量及肿胀程度均不及相应 Cd 组,未见核异常改变,胞质内髓样结构也较相应 Cd 组少(图 7,8)。30 天组,GCT 细胞超微结构基本恢复。

2.3 AR 免疫反应产物在颌下腺的分布及图像分析

大鼠颌下腺腺泡细胞(AC)、GCT 细胞、纹状管(SD)和排泄管细胞内均有 AR 免疫阳性物质存在,阳性物质分布于胞浆和胞核,以胞浆为主。其中 GCT 细胞积聚的阳性物质最多,SD 和排泄管次之,AC 最少(图 9)。图像分析的结果见附表 2:Cd 组的 AR 免疫阳性物质在镉注射后 24h 已见下降,7 天时达最低水平(图 10),此后有所增加,但到 30 天为止仍低于对照组。Cd+T 组的 AR 免疫阳性物质均高于相应时间点的 Cd 组(图 11),但仍低于对照组($P<0.05$)。

3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com

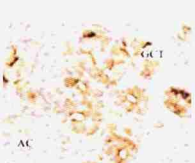


图 9 对照组的 AR 表达

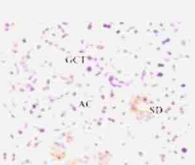


图 10 镉 7d 组 AR 表达明显减弱

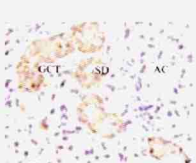


图 11 镉加丙酸睾酮 7d 组 AR 表达强于相应镉组（Bar:20μm）

表 2 雄激素受体（AR）免疫组化定量分析 TA/BA(x± s)

Group	time of treatment			
	24h	3d	7d	15d	30d
Cd	0.089 ± 0.021	0.044 ± 0.012*△	0.026 ± 0.013*△	0.060 ± 0.017*△	0.078 ± 0.021*
Cd+T	0.093 ± 0.016	0.071 ± 0.017*△	0.056 ± 0.008*△	0.073 ± 0.019*△	0.080 ± 0.019*
C			0.109 ± 0.017		

*vs C group, $P<0.05$; △Cd group vs Cd + T group, $P<0.05$

本研究结果显示镉注射后 24h，GCT 细胞已出现超微结构改变，主要为线粒体肿胀，髓样结构形成等细胞肿胀溶解性变化，且超微结构损伤的动态改变与颌下腺组织镉含量呈平行关系。据文献报道雄鼠阉割后 30min 血清睾酮水平下降到最低点，但 GCT 细胞形态改变在阉割后 1 月才出现，表现为 GCT 细胞体积变小、数量减少，分泌颗粒变小，粗面内质网减少等萎缩性变化[9]。而我们以往研究证实镉（2mg/kg）注射后雄性大鼠血清睾酮 7 天才降至基线水平[5]。故揭示本实验中 GCT 细胞超微结构的早期改变为镉的直接损伤作用所致。我室过去的研究还表明镉对睾丸间质细胞有毒性作用，镉引起间质细胞内 G-6-Pase 活性下降从而影响睾酮合成[4]。由此推测后期雄激素水平的下降必然加重 GCT 细胞的超微形态损伤。

本研究中 GCT 细胞的主要超微病理改变是线粒体肿胀及线粒体和胞质内髓样结构形成等细胞膜性成分退变，这与镉对膜性成分的氧化损伤机制有关。镉可抑制膜磷脂合成酶系的活性，导致膜结构破坏和细胞肿胀崩解。镉抑制超氧化物歧化酶（SOD），过氧化氢酶（CAT）等抗过氧化酶的活性，造成脂质过氧化物的堆积，细胞膜脂的流动性下降，影响膜的结构和功能。也有研究报道线粒体是镉毒性作用的靶细胞器，镉染毒后可引起线粒体内镉含量增高，线粒体功能破坏，扰乱组织细胞的氧化－抗氧化平衡[9,10]。此外线粒体破坏将致能量代谢障碍，ATP 生成减少，进而影响膜 Na^+-K^+ 泵的功能，使钠、水在细胞内潴留。我们所观察到镉致 GCT 细胞肿胀溶解性改变符合上述细胞损伤机制。

研究报道氯化镉腹腔内注射后 1h 睾酮水平开始下降，7 天时下降至最低值，30 天后睾酮水平回升，但仍未达正常水平[5]。本研究镉注射后 AR 免疫阳性物质的变化与上述血清睾酮水平的变化基本平行。Cd+T 组 AR 免疫阳性物质均高于相应时间点的 Cd 组，提示雄激素对颌下腺的 AR 表达具有上调作用。有关雄激素对 AR 表达的上调作用在卵巢、肝脏、肌肉和骨组织等亦得到了证实[11,12]，但也有研究报道雄激素对前列腺中叶、附睾、精囊腺、阴茎、肾脏等组织的 AR 表达具有下调作用[13]，上述矛盾结果是否由于组织差异性抑或实验方法不同所造成，有待进一步的研究证实。本研究中 Cd+T 组 AR 蛋白表达虽高于相应 Cd 组，但与对照组相比，仍明显减少，说明镉对 AR 蛋白表达可能具有直接抑制作用。体外实验已证实，镉可引起 AR 蛋白及 ARmRNA 减少[14]。综合上述结果表明镉注射后 AR 蛋白的减少既与雄激素对 AR 的自我调节有关，同时也可能与镉对 AR 的毒性作用有关。至于其作用机制，目前尚不十分清楚。

本实验还显示丙酸睾酮对镉所致 GCT 细胞超微结构的损伤有一定的保护效果。研究表明雄激素

维普资讯 http://www.cqvip.com

能通过多种途径对抗镉毒性，其保护机制可能与下列因素有关：（1）雄激素提高金属硫蛋白（MT）的合成[7]，MT 可缓解镉的毒性作用[15]；（2）雄激素干扰镉在组织细胞的积聚，使组织细胞的镉含量降低。本研究中 Cd+T 组的镉含量虽然在镉注射后的各时间点均低于相应的 Cd 组，但经统计学分析差异无显著性，说明丙酸睾酮对镉所致颌下腺损伤的保护效果尚不能完全用雄激素减少镉在颌下腺的积聚机制来解释。此外，研究报道镉能与 AR 结合，且其结合位点就是雄激素和 AR 的结合位点[14]，故提示本研究中丙酸睾酮的保护作用可能是通过雄激素受体介导的，即丙酸睾酮通过竞争机制减少镉与 AR 的结合而发挥对颌下腺的保护作用。至于其保护机制是否与 MT 或其他因素有关，还有待进一步的研究证实。

（通讯作者：廖晓岗，Tel:023-68485838; E-mail: liaoxg@126.com）

参 考 文 献

[1] Tsutsumi O, Kurachi H, Oka T. A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function [J]. Science, 1986; 233(3): 975-977.

[2] Cupp AS, Kim GH, Skinner MK. Expression and action of neurotropin -3 and nerve growth factor in embryonic and early postnatal rat testis development [J]. Biol Reprod, 2000; 63(6):1617-1628.

[3] 李新枝，廖晓岗. 雄激素及其受体对雄性动物颌下腺影响的研究进展[J]. 生殖医学杂志，2004;13(6):381-384.

[4] 廖晓岗，李维信. 镉对大鼠睾丸间质细胞损伤及锌对其保护的形态学研究[J]. 生殖与避孕，1999;19(5):290-295.

[5] 徐 晨，李维信. 镉对大鼠精囊腺超微结构及 TPPase 细胞化学和血清睾酮含量的影响[J]. 解剖学报，1997;28(3):209-214.

[6] Czykier E, Dziecіol J, Galazyn-Sidorczuk M, et al. A preliminary study of the submandibular gland of the rat after one-year cadmium intoxication [J]. Rocz Akad Med Bialymst, 2004; 49(1):178-179.

[7] Shimada H, Bare RM, Hochadel JF, et al. Testosterone pretreatment mitigates cadmium toxicity in male C57 mice but not in C3H mice [J]. Toxicology, 1997; 116(1-3): 183-191.

[8] Tanaka S, Hosoi K, Tanaka I, et al. Immunocytochemical study of protein F in the mouse submandihular gland [J]. J Histochem Cytochem, 1984;32(6):585-592.

[9] Tang W, Shaikh ZA. Renal cortical mitochondrial dysfunction upon cadmium metallothionein administration to Sprague-Dawley rats [J]. J Toxicol Environ Health A, 2001; 63(3): 221-235.

[10] Casalino E, Calzaretti G, Shlano C, et al.. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium [J]. Toxicology, 2002; 179(1): 37-50.

[11] Wiren K, Keenan E, Zhang XW, et al. Homologous androgen receptor up-regulation in osteoblastic cells may be associated with enhanced functional androgen responsiveness [J].Endocrinology,1999;140 (7): 3114-3124.

[12] Sinha HI, Taylor WE, Gonzalez CNF. Androgen Receptor in Human Skeletal Muscle and Cultured Muscle Satellite Cells: Up-Regulation by Androgen Treatment [J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2004; 89(10):5245-5255.

[13] Quarmby VE, Yarbrough WG, Lubahn DB, et al. Autologous down-regulation of androgenreceptor messenger ribonucleic acid [J]. Mol-Endocrinol, 1990; 4(1): 22-28.

[14] Martin MB, Voeller HJ, Gelmann EP, et al. Role of Cadmium in the Regulation of AR Gene Expression and Activity [J]. Endocrinology, 2002; 143(1):263-275.

[15] Cyr DG, Dufresne J, Pillet S, et al. Expression and regulation of metallothioneins in the rat epididymis [J]. J Androl, 2001; 22(1): 124-135.