DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.016

论著

文章编号:1000-5404(2003)19-1722-03

贫铀对小鼠睾丸生精细胞和精子遗传损伤的初步研究

白 杨,刘晋[illegible],曹 佳,孙华明,刘胜学,杨录军,周燕虹,陈国华,李 岸,王 露 (第三军医大学军事预防医学院卫生毒理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 初步探讨小鼠吸入不同剂量的贫铀(DU)气溶胶对生精细胞和精子的遗传损伤作用。方法 采用小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变试验、小鼠睾丸生殖细胞微核试验和精子染色质结构试验(SCSA),评价DU诱导小鼠生精细胞和精子的遗传损伤程度。结果 吸入DU气溶胶组睾丸生殖细胞微核发生率与对照组相比无显著差异,吸入(731.52±35.99)和(877.83±43.19)ng/g DU组小鼠睾丸初级精母细胞染色体数目畸变率为17.2%和27.2%,与对照组比较显著升高($P<0.01$);精子染色质结构试验中,对照组、吸入(731.52±35.99)和(877.83±43.19)ng/g DU组的精子SCSA各变量平均值:αT分别为253.51±31.76、288.29±68.30、294.56±72.90,%COMP分别为3.73±5.50、9.02±4.43、9.11±5.33,%GREEN分别为0.89±0.44、1.62±1.06、1.80±0.61,DU组各变量值与对照组比较均有显著增高($P<0.05$)。结论 小鼠吸入贫铀气溶胶可诱导生精细胞和精子遗传损伤。

关键词:贫铀;生精细胞;精子;遗传损伤
中图法分类号:R818.73;R321.1 文献标识码:A

The genetic damage to testicular germ cells and sperms of mice after exposure to Depleted Uranium

BAI Yang, LIU Jin-yi, CAO Jia, SUN Hua-ming, LIU Sheng-xue, YANG Lu-jun, ZHOU Yan-hong, CHEN Guo-hua, LI An, WANG Lu (Department of Hygiene Toxicology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the genetic damage to testicular germ cells and sperms of mice induced by inhalation of Depleted Uranium (DU) aerosol. **Methods** Genetic damage due to DU to spermatogenic cells and sperms of mice was assessed by chromosome aberration test, micronucleus test and sperm chromatin structure assay (SCSA) of the primary spermatocytes of mice. **Results** No difference in micronucleus rate of testicular germ cells was found between DU aerosol group and the control group. The chromosome numerical aberration rates of the groups inhaling DU aerosol at the doses of (731.52±35.99) ng/g and (877.83±43.19) ng/g were 17.2% and 27.2%, respectively, increasing significantly as compared with that of the control group ($P<0.01$). SCSA revealed that the average αT values, %COMP values and %GREEN values in DU aerosol groups increased significantly than those in the control groups ($P<0.05$). **Conclusion** Inhalation of DU aerosol may result in genetic damage to testicular germ cells and sperms of mice.

Key words: Depleted Uranium; germ cell; sperm; genetic damage

贫铀(Depleted uranium, DU)是从铀矿物质中富集U235后的副产品。由于其密度大,强度高,韧性好,故在民用和军事领域得到广泛应用。目前,贫铀武器已经在1991年的海湾战争、1999年的科索沃冲突以及2003年的伊拉克战争广泛应用。其既具放射毒性,又有化学毒性,爆炸后主要产生α粒子形成的气溶胶,人员吸入或食入后,会引起内照射,对人体产生严重损害作用[1]。有关贫铀的毒性、毒理国内外已做了大量研究[2,3]。但对于DU诱导雄性生殖细胞突变效应的研究国内外的文献报道极少。我们采用小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变试验、小鼠睾丸生殖细胞微核试验和精子染色质结构试验(Sperm chromatin structure assay, SCSA),对吸入DU气溶胶诱导小鼠生精细胞和精

基金项目:全军"十五"指令性课题(01L061)
作者简介:白 杨(1970-),男,陕西省定边县人,硕士研究生,主要从事生殖毒理学方面的研究。电话:(023)68752200
通信作者:曹 佳,电话:(023)68752271;E-mail:caojia@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-05-13;修回日期:2003-08-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

子遗传损伤进行初步研究, 从而估计其损伤程度, 评价 DU 的生殖毒性效应。

1　材料与方法

1.1　DU 气溶胶的染毒模型和方法

雄性昆明种小鼠, 体质量 20~22 g, 由军事医学科学院实验动物中心提供(实验动物质量合格证书, 军发字第 B98001 号)。随机分为 5 组, 每组 20 只, 其中设 1 个对照组, 4 个吸入组, 均为一次性急性染毒后, 洗消并按常规饲养, 根据不同实验的时间要求取材。染毒在 3 m× 2 m× 5 m 的密闭仓内, 燃烧 DU 材料产生气溶胶, 每种浓度的气溶胶保持 30 min。

1.2　小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变试验

标本制备: 采用"毒理学原理与评价"[4] 所推荐的标准方法, 昆明种小鼠吸入 DU 气溶胶, 14 d 后取双侧睾丸制片、染色。每个睾丸计数 50 个中期分裂相细胞, 分析其染色体结构和数目畸变, 计算畸变细胞率。

1.3　小鼠睾丸生殖细胞微核试验

标本制备: 按辛华等[5] 的方法进行。取适量生殖细胞悬液推片, 自然干燥, 甲醇固定 10 min, 晾干, 室温下 20% Giemsa 染色液(pH 6.8)染色 15 min, 水洗后晾干, 镜检。

结果观察: 高倍镜下, 观察初级精母细胞、次级精母细胞和早期精细胞中的微核, 计算微核细胞率(‰)和微核率(‰)。

1.4　精子染色质结构分析

标本制备: 按 Evenson 等[6] 的方法进行。主要步骤为精子经酸性裂解液裂解后加入吖啶橙(Acricline orange, AO)染色液染色, 然后进行流式细胞仪分析。

测试方法: 精子染色体结构受损伤, DNA 链由双链断裂为单链, 当用氩离子激光(波长 480 nm)激发时, AO 使双链 DNA 呈绿色荧光, 使单链 DNA 激发红色荧光。流式细胞术测量时用每个精子呈红色荧光(变性, 单链 DNA)与红色+绿色荧光(正常 DNA)强度的比值 αT 来表示, %COMP 代表显红色荧光精子的百分比, %GREEN 代表精子显强绿色荧光的百分比, 而 αT 分布的标准差(SDαT)描述了在整群精子中染色质结构异常的程度。

流式细胞术参数: 激发光波长 488 nm, 绿色荧光用(530±30) nm 波长的滤光片, 红色荧光用一个波长 LP620 nm 的滤光片, 两种颜色可被 560 nm 滤光片分开。每个样本测量含 10^5 ~ 10^6 个细胞, 检测速率在 200 个/s。

1.5　统计学分析

数据使用 SPSS11.0 软件进行方差分析。

2　结果

染毒后, 吸入 DU 气溶胶剂量(1 024.13±50.39) ng/g 和(1 170.44±57.59) ng/g 组的动物在染毒后 5 d 内绝大多数死亡, 对吸入(146.30±7.20)、(292.60±14.40)、(731.52±35.99)和(877.83±43.19) ng/g 剂量组进行了如下分析。

2.1　DU 对小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变的影响

本次实验, 未检到睾丸初级精母细胞染色体的结构性畸变, 仅见染色体组畸变, 吸入 DU 气溶胶组与对照组相比, 非整倍体和/或整倍体性畸变的细胞数明显增加, 随吸入剂量的增加, 多倍体畸变的细胞数有增加的趋势, 见表 1; 图 1 所示为油镜下睾丸精母细胞多倍染色体。

表 1　贫铀对小鼠睾丸生殖细胞染色体畸变的影响

Tab 1　Effects of DU on the chromosome aberration of testicular germ cells of mice

Dose (ng/g, $\bar{x}\pm s$)	Scored cells	Abnormalitis					Mean of abnormal cells(%)	CA/ cells
		HOP	HEP	TRP	TEP	PP		
Control	500	4(22%)	12(67%)	2(11%)			3.6	0.036
146.30± 7.20	500	8(44%)	8(44%)	2(11%)			3.4	0.034
292.60±14.40	500	6(25%)	12(50%)	4(17%)	2(8%)		4.4	0.044
731.52±35.99	500	35(41%)	15(17%)	26(30%)	6(7%)	4(5%)	17.2 **	0.172
877.83±43.19	500	39(29%)	28(21%)	29(21%)	29(21%)	11(8%)	27.2 **#	0.272

HOP: Hypodiploid; HEP: Hyperdiploid; TRP: Triploid; TEP: Tetraploid; PP: Poliploid　* *: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$ *vs* (731.52±35.99) group; CA: Chromosome aberration

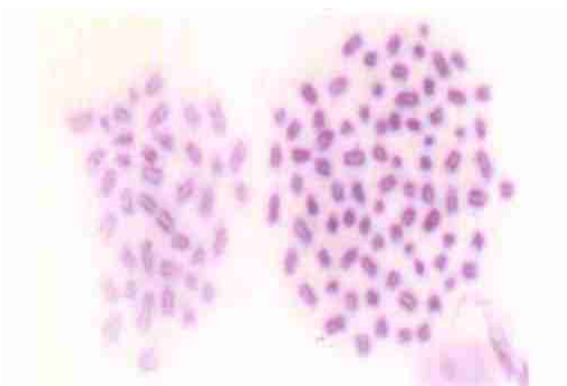


图 1　DU 诱导的多倍体(Giemsa, × 1 000. 左: 正常的初级精母细胞染色体 2N, 右: 异常的初级精母细胞, 染色体数为多倍体)

Fig 1　The polyploid of chromosome induced by DU (Giemsa, × 1 000. Left: Normal chromosome, 2n; Right: Polyploid)

2.2　DU 对小鼠睾丸生殖细胞微核的影响

吸入组与阴性对照组没有显著性差别, 仅早期精细胞微核多见, 见表 2; 图 2 为睾丸生殖细胞微核。

表 2　小鼠睾丸生殖细胞微核分析

Tab 2　Frequency of micronucleus of testicular germ cells of mice in all groups

Dose (ng/g, $\bar{x}\pm s$)	Primary spermmatocyles	Secondary spermatocyles	Spermatids	Micronucleus (‰)	Abnormal germ cell(‰)
Control		2	9	1.1	1.1
146.30± 7.20		1	12	1.3	1.3
292.60±14.40		1	10	1.1	1.1
731.52±35.99		1	9	1.0	1.0
877.83±43.19			6	0.6	0.5
CP(40 mg/kg)		36	301	6.74	6.62

Total germ cell counted: 10 000 (10 mice/group); CP: Cyclophosphamide (10 mice /group)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



图2 睾丸生殖细胞微核(Giemsa,×1 000,箭头所示)

Fig 2 The arrow shows the micronuclei of testicular germ cells (Giemsa,×1 000)

2.3 吸入组SCSA变量平均值测定

吸入DU气溶胶浓度(731.52±35.99)和(877.83±43.19) ng/g,各变量值与对照组相比差异有显著性($P<0.05$),但随吸入DU剂量的增加,SCSA各变量值有所增加,见表3。

表3 对照组和吸入组SCSA变量平均值比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Results by sperm chromatin structure assay in the control group and testing groups($\bar{x}\pm s$)

Group(ng/g)	SCSA Variable		
	αT	%COMP	%GREEN
Control	253.51±31.76	3.73±5.50	0.89±0.44
731.52±35.99	288.29±68.30*	9.02±4.43*	1.62±1.06*
877.83±43.19	294.56±72.90*	9.11±5.33*	1.80±0.61*

*: $P<0.05$ *vs* control

3 讨论

睾丸细胞染色体畸变试验是检测哺乳动物生殖细胞损伤最常用的方法。染色体是遗传物质的载体,若其发生畸变,会使基因在位置上和数量上发生改变,打乱基因间的平衡性。染色体数目改变有非整倍体性(Aneuploidy)和整倍体性(Euploidy)两类改变。本研究所用方法未能发现染色体结构性畸变,在染色体数目畸变中,吸入(731.52±35.99)和(877.83±43.19) ng/g组分别出现了42%和50%的多倍体、40%和30%亚二倍体以及17%和21%的超二倍体,一般认为由于制片中也可能会丢失某条染色体,因此对亚二倍体的分析意义不大,本实验发现DU吸入主要诱导多倍体为主要染色体畸变类型,可能是DU可影响生殖细胞的核内再复制和细胞质分裂,其毒性作用可能在初级精母细胞的有丝分裂期,影响了纺锤体的结构或功能。吸入DU高剂量组小鼠睾丸细胞染色体组畸变率与对照组和低剂量组比较差异显著,而低剂量组和对照组却无显著差异,说明DU致小鼠睾丸生殖细胞染色体组畸变与吸入剂量密切相关。我们认为是由于大剂量吸入DU气溶胶的急性化学毒性所致,这与所有重金属致哺乳动物生殖细胞染色体损伤有相似的结果。

20世纪80年代建立的SCSA方法[7],主要是用来测量精子DNA的完整性以及精子染色质浓缩的程度与成熟精子核蛋白的相关性,其测量亦反映了不同精细胞阶段核染色质结构的异质性,能快速确证和估计精子DNA损伤情况。成熟精子染色质是一个类似结晶蛋白的组成,精子染色质紧束的显著程度可以保护和维持DNA的完整性,因此可以防止环境诱变剂的损伤作用,精子中DNA损伤的增加可能是由于精子染色质没有或不完全浓缩,使DNA易于损伤。文献[8]认为,精子DNA损伤可作为评价动物不孕和精子生成调控改变的一个生物学标志。本研究采用FCM-SCSA检测DU诱导的小鼠精子DNA损伤,结果显示染色质异常精子的百分比较高,随吸入DU气溶胶剂量的增加而增加;DU吸入组各变量值与对照组相比有显著增加,说明吸入DU气溶胶可使精子DNA损伤,%COMP也随吸入剂量的增加呈增大趋势,提示异常精子的比率增加。预示DU作用于小鼠的生殖系统,会引起DNA损伤,破坏精子染色质的完整性,导致实验动物不孕等生殖毒性后果。这为今后进一步评价DU对人类生殖毒性的潜在危险性,提供了科学根据。但其作用于生殖细胞造成精子DNA损伤的机制尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Bleise A, Danesi P R, Burkart W. Properties, use and health effects of depleted uranium(DU): a general overview[J]. J Environ Radioact, 2003, 64(2-3): 93—112.

[2] Miller A C, Brooks K, Stewart M, *et al*. Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation[J]. J Environ Radioact, 2003, 64(2-3): 247—259.

[3] 杨陟华, 范保星, 陆 颖, 等. 贫铀诱发人支气管上皮细胞恶性转化[J]. 癌症, 2002, 21(9): 944—948.

[4] 李寿祺. 毒理学原理与评价[M]. 成都: 四川大学出版社, 2003. 374—375.

[5] 辛 华, 邵红莲, 车大年, 等. 细胞生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 176—177.

[6] Evenson D P, Darzynkiewicz Z, Melamed M R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility[J]. Science, 1980, 210(4474): 1131—1133.

[7] Traina M E, Rescia M, Urbani E, *et al*. Long-lasting effects of lindane on mouse spermatogenesis induced by in utero exposure[J]. Reprod Toxicol, 2003, 17(1): 25—35.

[8] Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, *et al*. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development[J]. Hum Reprod, 1998, 13(Suppl 4): 11—19.

(编辑 张 宁)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net