

喹乙醇诱导小鼠睾丸生精细胞凋亡作用研究

尹荣焕¹, 白文林¹, 方和春², 王健民¹, 潘树德¹, 刘宝山¹, 刘金玲¹, 姜卓¹

(1. 沈阳农业大学 畜牧兽医学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 辽宁省辽中县疾病预防控制中心, 辽宁 辽中 110200)

摘要: 按毒理学方法给小鼠灌喂不同剂量喹乙醇, 采用原位末端标记法检测该药物饲料添加剂对生精细胞凋亡作用的影响。结果表明: 各试验组小鼠生精细胞凋亡指数较正常组和阴性对照组均有所增加, 在不同时间, 高剂量组均表现差异显著($p < 0.05$)或极显著($p < 0.01$), 且连续给药 8 d 和 12 d 时, 喹乙醇各试验组呈现出明显的剂量-效应关系, 说明喹乙醇可以诱导小鼠睾丸生精细胞发生凋亡。

关键词: 喹乙醇; 生精细胞; 凋亡

中图分类号: S816.7; S859.83 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)01-0141-04

Effect of Olaquinox on Inducing Apoptosis of Testicle Spermatogenic Cell in Mouse

YIN Rong-huan¹, BAI Wen-lin¹, FANG He-chun², WANG Jian-min¹, PAN Shu-de¹,
LIU Bao-shan¹, LIU Jin-ling¹, JIANG Zhuo¹

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;
2. Disease Center for Prevention and Control in Liaozhong County of Liaoning Province, Liaozhong 110200, China)

Abstract: Based on the mice fed different dosages olaquinox according to method of toxicology, effect of this medicated premix on apoptosis of spermatogenic cell was detected using method of end mark in situ. The results showed that there was a rising in index of spermatogenic cell apoptosis from all experimental groups compared with normal group and negative control group, and a significant difference from high dosages($p < 0.05$ or $p < 0.01$) in different time, at the same time, there was an obvious correlation between dosage and effect of olaquinox at 8 d and 12 d. These results indicated that olaquinox could induce apoptosis of testicle spermatogenic cell in mouse.

Key words: Olaquinox; Spermatogenic cell; Apoptosis

细胞凋亡, 亦称为细胞程序性死亡, 它是细胞衰老、死亡的一种主动过程, 以 DNA 降解为特征, 细胞周围无炎症反应。现已证实, 细胞凋亡是生殖调节的重要机制之一, 一方面可能是遗传稳定祛除异常生精细胞的一种方式^[1]; 另一方面, 或许是生精细胞分化所必需的。许多学者认为, 睾丸生精能力的丧失也与细胞凋亡有关^[2]。

喹乙醇在畜牧业生产中一直作为药物饲料添加剂在广泛使用, 它的多种毒性报道较多。但关于喹乙醇对细胞凋亡作用的影响, 在国内外文献中报道较少, 从生殖细胞凋亡的手段检测药物添加剂对生殖细胞的影响, 属于毒理学中一个较新的领域, 本研究主要是采用原位末端标记法探讨喹乙醇对雄性小

鼠生殖细胞凋亡作用的影响。

1 材料和方法

1.1 试验动物

选取 7~12 周龄雄性健康昆明小鼠 36 只, 体重 25~30 g。购自辽宁中医药大学。动物状态良好, 皮毛光泽, 进食与活动正常。

1.2 药品及试剂

喹乙醇(纯度 98.5%, 批号 040217, 购自上海嘉辰化工有限公司); 2% 吐温-80, 甲醛, 乙醇, 二甲苯, 石蜡等均为实验室常规试剂。

1.3 动物分组及给药方法

将 36 只雄性昆明小鼠随机分成 6 组, 喹乙醇分

收稿日期: 2007-10-24

基金项目: 辽宁省教育厅青年基金资助项目(05L404)

作者简介: 尹荣焕(1976-), 女, 河北安国人, 博士, 讲师, 主要从事动物性食品安全与中药免疫研究工作。

为 80 mg/kg (1/30 LD₅₀), 120 mg/kg (1/20 LD₅₀), 240 mg/kg (1/10 LD₅₀), 480 mg/kg (1/5 LD₅₀) 4 个剂量组, 用 2% 吐温-80 配成混悬液灌胃; 阴性对照组 (即溶剂组) 用 2% 吐温-80 灌胃; 同时设一个正常对照组。小鼠饲养 7 d 后开始灌胃给药, 每日 1 次, 分别于给药 4, 8, 12 d 采取颈椎脱臼处死小鼠取睾丸组织。

1.4 TUNEL 法检测生精细胞凋亡

采用武汉博士德生物工程有限公司细胞凋亡检测试剂盒。

1.4.1 样品处理 载玻片预先用多聚赖氨酸进行处理, 小鼠睾丸组织用 10% 中性缓冲福尔马林固定 4 h 以上, 石蜡包埋。切片常规脱蜡入水 (脱蜡务必干净)。

1.4.2 操作步骤 切片置于用蒸馏水新鲜配置的 3% H₂O₂ 中, 室温下 10 min 灭活内源性酶后, 用蒸馏水洗 2 min × 3 次; 滴加 0.01 mol/L TBS 1:200 新鲜稀释 Proteinase K 37℃ 消化 15 min, 0.01 mol/L TBS 洗 2 min × 3 次; 滴加标记缓冲液 (Labeling Buffer) 20 μL/片, 以保持切片湿润。按每张切片取 TdT 和 DIG-dUTP 各 1 μL, 加入 18 μL 标记缓冲液中, 混匀。甩去切片多余液体后加标记液 20 μL/片。置样品于湿盒中, 37℃ 标记 2 h; 0.01 mol/L TBS 洗 2 min × 3 次; 加封闭液 50 μL/片, 室温下封闭 30 min, 甩掉封闭液, 不洗; 用抗体稀释液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体 (取 1 mL 抗体稀释液加生物素化抗地高辛抗体 10 μL), 混匀后 50 μL/片加至标本片上, 置样品于湿盒中, 37℃ 反应 30 min, 0.01 mol/L TBS 洗 2 min × 3 次; 用抗体稀释液 1:100 稀释 SABC (取 1 mL 抗体稀释液加 SABC 10 μL), 混匀后按 50 μL/片加至切片上。湿盒中 37℃ 反应 30 min, 0.01 mol/L TBS 洗 5

min × 4 次; DAB 显色, 取 1 mL 蒸馏水, 分别加入 DAB 试剂盒中 A, B, C 试剂各一滴, 混匀后加至标本片上, 室温下显色 10~30 min。蒸馏水洗涤终止显色; 苏木素轻度复染。0.01 mol/L TBS 洗, 蒸馏水洗。脱水, 透明, 封片。

1.4.3 光镜下观察结果 细胞核着色呈棕黄色为阳性。每张切片任取 20 个视野, 计数总生精细胞中凋亡细胞数, 计算出阳性细胞率, 作为生精细胞凋亡指数 (Apoptotic index, AI)。

1.5 数据统计分析

本试验的数据采用 SPSS12.0 统计软件中单因子方差分析进行统计分析, 用 LSD 进行多重比较, 文中所有试验数据均用平均值 ± 标准误表示。

2 结果与分析

镜下曲精小管中阳性细胞核被染成棕黄色, 典型的凋亡细胞表现为染色质凝集, 边集化, 呈新月状聚集于核膜下方。正常饲养组的小鼠睾丸生精细胞中就可以找到 DBA 显色阳性细胞, 即凋亡细胞, 只是数量较少; 阴性对照组小鼠在数量上与正常组差异不显著 (p > 0.05)。各用药组小鼠生精细胞凋亡指数均有所增加, 其中饲养 4 d 时, 喹乙醇达到或超过 1/20 LD₅₀, 各组升高显著 (p < 0.05) 饲养 8 d 时测得喹乙醇 1/30 LD₅₀ 组和 1/20 LD₅₀ 组升高显著 (p < 0.05), 而 1/10 LD₅₀ 组和 1/5 LD₅₀ 组升高极显著 (p < 0.01); 饲养 12 d 时测得喹乙醇 1/5 LD₅₀ 组较正常组和阴性组生精细胞凋亡指数升高显著 (p < 0.05), 而 1/10 LD₅₀ 组较正常组显著 (p < 0.05), 见表 1。表明喹乙醇可以诱导小鼠睾丸生精细胞发生凋亡。

表 1 睾丸生精细胞凋亡指数

Tab. 1 The index of apoptosis of testicle spermatogenic cell

组别 Groups	%		
	4 d	8 d	12 d
正常组 Normal group	0.08 ± 0.044	0.12 ± 0.04	0.07 ± 0.17
阴性组 Negative group	0.10 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.11 ± 0.05
1/30 LD ₅₀	0.18 ± 0.03	0.28 ± 0.08ab	0.15 ± 0.03
1/20 LD ₅₀	0.33 ± 0.1ab	0.31 ± 0.2ab	0.20 ± 0.07
1/10 LD ₅₀	0.26 ± 0.05ab	0.39 ± 0.09A	0.28 ± 0.08a
1/5 LD ₅₀	0.28 ± 0.07ab	0.40 ± 0.08A	0.30 ± 0.07ab

注: a 表示与正常组比较差异显著, p < 0.05; b 表示与阴性组比较差异显著, p < 0.05; A 表示与正常组和阴性组比较差异极显著, p < 0.01。

Note: a stands for significant difference compared with normal group, p < 0.05; b standing for significant difference compared with negative group, p < 0.05; A standing for highly significant difference compared with normal group and negative group, p < 0.01.

各级生精细胞在各试验组阳性定位表现不同, 见图 1 至图 6。正常组和阴性组主要以精原细胞为主, 其次是初级精母细胞, 而在间质细胞中未见阳性细胞。1/30 LD₅₀ 组凋亡阳性细胞主要定位于精原细胞和初级精母细胞, 以精原细胞最多。1/20 LD₅₀ 组

凋亡阳性主要定位于精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞, 同样以精原细胞最多。1/10 LD₅₀ 组凋亡阳性细胞主要定位于精原细胞、初级精母细胞, 以初级精母细胞为最多, 精子细胞核外围有较多淡棕色着色环。而 1/5 LD₅₀ 组凋亡阳性细胞定位于各级

生精细胞, 许多精子细胞核外围也有较多淡棕色着色环。

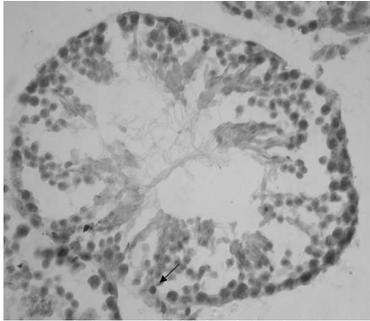


图 1 正常组 8 d 生精细胞凋亡图(× 400)

Fig. 1 Apoptosis picture of 8 d spermatogenic cell from normal group(× 400)

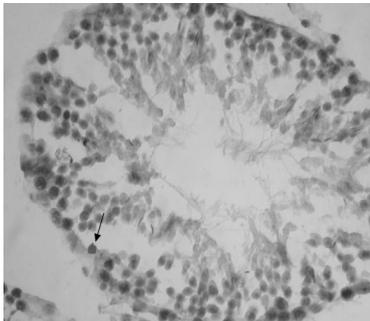


图 2 阴性组 8 d 生精细胞凋亡图(× 400)

Fig. 2 Apoptosis picture of 8 d spermatogenic cell from negative group(× 400)

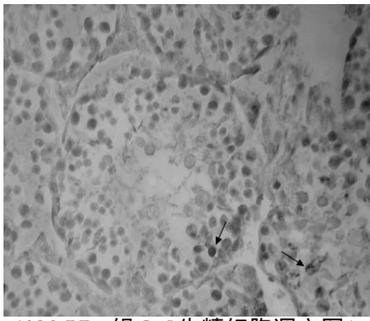


图 3 1/30 LD₅₀组 8 d 生精细胞凋亡图(× 400)

Fig. 3 Apoptosis picture of 8 d spermatogenic cell from 1/30 LD₅₀ group(× 400)

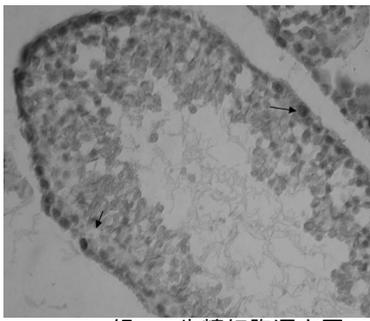


图 4 1/20 LD₅₀组 8 d 生精细胞凋亡图(× 400)

Fig. 4 Apoptosis picture of 8 d spermatogenic cell from 1/20 LD₅₀ group(× 400)

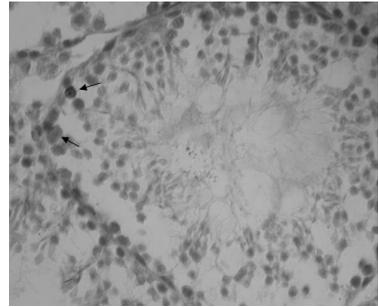


图 5 1/10 LD₅₀组 8 d 生精细胞凋亡图(× 400)

Fig. 5 Apoptosis picture of 8 d spermatogenic cell from 1/10 LD₅₀ group(× 400)

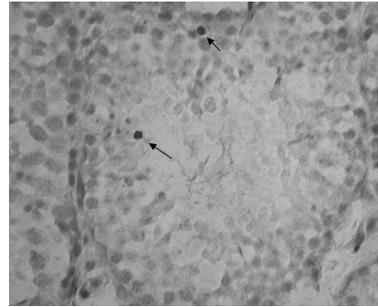


图 6 1/5 LD₅₀组 8 d 生精细胞凋亡图(× 400)

Fig. 6 Apoptosis picture of 8 d spermatogenic cell from 1/5 LD₅₀ group(× 400)

3 讨论

睾丸生殖细胞(Germ cells, GC) 的增殖分化, 即精子的形成可分为三个阶段: 首先是精原细胞增殖阶段, 通过精原细胞的分裂和分化产生初级精母细胞; 其次是精母细胞成熟分裂时期, 初级精母细胞和次级精母细胞的两次成熟分裂, 即初级精母细胞经一次 DNA 复制而进行了 2 次细胞分裂, 染色体减少一半; 最后是精子形成阶段, 圆形精子细胞变形成为蝌蚪状精子。在此期间, 由于生殖细胞的退化或凋亡而丢失的精子数占精子生成总量的 20%~ 75%^[3,4], 睾丸就是通过精原细胞不断地分裂、分化, 同时过量的生精细胞又不断地凋亡, 调节精子发生。据报道^[5,6], 精原细胞和精母细胞是睾丸中发生凋亡的主要细胞, 这与本试验的结果相一致。但当生精细胞凋亡过量时也会引起睾丸生精能力的丧失。

生精细胞凋亡除了由自身因素自发产生外, 也可以由外部因素产生, 如环境中的有害因素亦可诱发细胞凋亡, 目前已发现某些物理因素(辐射、高温等)、激素及生长因子、病毒感染、毒素、免疫细胞、射线、高温和化学药物等都可诱导细胞凋亡^[7]。喹乙醇是以邻硝基苯胺为原料合成的饲料药物添加剂, 属于一种化学合成物质, 具有中等程度的毒性和诱变毒性^[8-12]。汪开毓等^[13-15]用喹乙醇对鲤鱼进行染毒, 采用电子显微镜观察法、原位末端标记法

(TUNEL 法) 和流式细胞术对鲤经喹乙醇染毒后的肝细胞进行了细胞凋亡的检测, 结果显示, 肝细胞呈现细胞凋亡的形态学特征; 而原位末端标记法检测出现阳性细胞和流式细胞仪检测出现细胞凋亡峰, 表明喹乙醇可诱导鲤肝细胞凋亡, 且其凋亡率随染毒时间的延长而升高。

细胞凋亡可以采用电泳法、流式细胞仪等检测方法^[16], 本试验采用 TUNEL 法定量检测生精细胞凋亡。本试验结果表明, 随着喹乙醇剂量的增加, 凋亡指数有上升的趋势。各试验组小鼠生精细胞凋亡指数较正常组和阴性对照组均有所增加, 饲养 8 d 和 12 d 时, 喹乙醇各试验组生精细胞凋亡指数有明显的剂量-效应关系。但试验在不同时间测得的生精细胞凋亡指数并没有随着灌胃时间的延长而相应增加, 即未呈现明显的时间-效应关系。分析其原因可能有 3 种: 其一是喹乙醇对生精细胞凋亡的促进作用不会随着时间的延长而增强; 其二由于睾丸组织损伤严重, 随着损伤的加重, 生精细胞大量死亡, 细胞数量明显减少而导致凋亡率下降; 其三就是由于溶剂的影响, 或在本试验条件下喹乙醇没有显示出时间-效应, 其时间-效应关系还有待于进一步核实。

喹乙醇在体内残留后可能会通过诱导睾丸生精细胞凋亡, 使精子生成数量减少, 而影响动物、甚至人的生殖功能。

参考文献:

- [1] Hsueh A J. Gonadal cell apoptosis [J]. *Recent Prog Hom Res*, 1996, 51(1): 433.
- [2] 张军强, 丁家桐. 细胞凋亡与生殖[J]. *畜牧与兽医*, 2002, 34(7): 41- 43.
- [3] Furuta I, Poikka H T, Sccarbough K, *et al.* Photoperiod regulates testis cell apoptosis in djungarian hamsters [J]. *Biol Reprod*, 1994, 51(6): 1315- 1321.
- [4] 彭黎明, 王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 48.
- [5] Billig H, Furuta I, Rivier C, *et al.* Apoptosis in testis germ cells: Developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages [J]. *Endocrinology*, 1995, 136(1): 5- 12.
- [6] Cai L, Hales B F, Robaire B. Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide [J]. *Biol Reprod*, 1997, 56(6): 1490- 1497.
- [7] 李晓军, 武建国. 细胞凋亡检测的研究进展及其与疾病的关系[J]. *临床检验杂志*, 1999, 17(1): 1- 7.
- [8] 王德成, 高洪, 范泉水, 等. 喹乙醇致线粒体 DNA 基因损伤的 SSCP 分析[J]. *吉林农业大学学报*, 2007, 29(1): 95- 101.
- [9] 尹荣焕, 白文林, 张文亮, 等. 喹乙醇对小鼠血细胞及骨髓微核率的影响[J]. *湖北农业科学*, 2007, 46(1): 107- 108.
- [10] 耿毅, 汪开毓. 动物喹乙醇中毒研究进展[J]. *畜禽业*, 2000(5): 31- 32.
- [11] 曹随忠, 张力, 梁剑平, 等. 喹噁啉-1, 4- 二氧化物类抗菌促生长剂特殊毒理学研究进展[J]. *动物医学进展*, 2001, 22(2): 17- 20.
- [12] 王树槐. 喹乙醇诱发 CHL 细胞染色体畸变试验[J]. *中国兽药杂志*, 1993, 27(4): 27- 29.
- [13] 汪开毓, 赵德明, 耿毅, 等. 喹乙醇诱导鲤肝细胞凋亡的研究[J]. *水产学报*, 2004, 28(6): 733- 736.
- [14] 汪开毓, 耿毅, 黄小丽. 喹乙醇诱导鲤肝细胞凋亡的电子显微镜观察[J]. *中国水产科学*, 2005, 23(2): 228- 231.
- [15] 汪开毓, 耿毅, 黄小丽. 用流式细胞术检测喹乙醇诱导的鲤肝细胞凋亡[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(5): 648- 651.
- [16] 程瑜, 张华屏, 乔中东. 雄激素通过 Fas 途径诱导小鼠骨髓巨噬细胞凋亡[J]. *华北农学报*, 2005, 20(4): 8- 11.