

甲醛对小鼠睾丸生殖细胞的 DNA 损伤及 bcl-2、bax 蛋白表达的影响

董杰影¹, 楼哲丰¹, 赵惠玲²

(1. 温州医学院生物学实验教学中心; 2. 温州医学院实验动物中心, 浙江 温州 325035)

摘要: 为探讨甲醛对小鼠睾丸生殖细胞的 DNA 损伤及凋亡相关基因 bcl-2、bax 蛋白在染毒小鼠睾丸细胞中的表达, 分别用 0.2、2、20 mg/kg 的甲醛小鼠腹腔注射, 利用单细胞凝胶电泳检测睾丸生殖细胞的 DNA 损伤, 同时对睾丸生殖细胞采用免疫组化法进行 bax 及 bcl-2 蛋白染色, 并结合图像分析推测 bax 及 bcl-2 的蛋白表达变化。结果显示在甲醛 0.2 mg/kg 的浓度时小鼠生殖细胞有最明显的 DNA 损伤, 3 种浓度甲醛处理组 bax 蛋白表达均明显增多, 而 bcl-2 阳性蛋白表达明显低于阴性对照组, 差异有统计学意义。说明甲醛可造成机体内生殖细胞的 DNA 损伤, 还可通过抑制 bcl-2、增加 bax 的表达而诱导细胞凋亡, 从而影响生殖细胞。

关键词: 甲醛; 凋亡相关基因; bcl-2; bax; 生殖细胞

中图分类号: 994.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2007)02-0108-02

Effect of formaldehyde on germ cell DNA and bcl-2, bax genes expression in testicles of mice

DONG Jie-ying¹, LOU Zhe-feng¹, ZHAO Hui-ling²

(1. Department of Biology, Wenzhou Medical College; 2. Laboratory Animal Center, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract: To investigate the effect of formaldehyde on DNA of mouse germ cell and on the expression of apoptosis-related genes bcl-2 and bax, 0.2mg/kg, 2mg/kg and 20 mg/kg of formaldehyde were intraperitoneally injected to mice; the single cell gel electrophoresis was used to detect the DNA damage of germ cell, SABC immuno-histochemical method was used to conduct bax and bcl-2 protein staining while using image analyzing technique to predict the expression changes of bax and bcl-2 genes. The results showed that 0.2mg/kg of formaldehyde showed the largest damaging effect on DNA of mice germ cell; bax gene expression showed increased in all three formaldehyde treated groups while the expression of bcl-2 was obviously lower than that of controls. It is suggested that formaldehyde can damage DNA of germ cell and may induce apoptosis through advancing expression of bax and inhibiting expression of bcl-2.

Key words: Formaldehyde; Apoptosis-related gene; Bcl-2; Bax; Germ cell

甲醛是一种常见的环境污染物, 且多为装修型化学性室内空气污染物, 对人体健康造成了很大的危害。在很低的浓度下 ($0.5\text{mg}/\text{m}^3$) 甲醛就可以引起眼部和呼吸道的刺激作用^[1]。在低剂量时甲醛以 DNA 断裂损伤为主, 而在高剂量时引起 DNA 发生交联^[2]。动物实验中还发现甲醛具有生殖毒性和致细胞突变及致癌性^[3]。为了进一步研究甲醛对睾丸细胞毒性和生殖细胞的凋亡机制, 我们用单细胞凝胶电泳检测染毒小鼠睾丸细胞的 DNA 损伤, 免疫组化分析 bcl-2、bax 蛋白表达。

1 材料

1.1 主要试剂

AR 甲醛 (上海溶剂厂), 低熔点琼脂糖 (LMA) 和正常熔点琼脂糖 (NMA) (华美生物工程公司), 二甲基亚砜 (Sigma 公司), 十二烷基肌氨酸钠 (华美生物公司)。TritonX-100

(FARCO 公司), 溴乙锭 (Sigma 公司), bcl-2、bax 免疫组化试剂盒 (武汉博士德生物试剂有限公司)。

1.2 动物及分组

清洁级健康雄性 ICR 小鼠 32 只, 体重 (25 ± 2) g, 由温州医学院实验动物中心提供 (医动字 22030002 号)。

将小鼠随机分成 4 组, 每组 8 只, 设 3 个染毒剂量组 (0.2, 2, 20 mg/kg) 和 1 个对照组 (仅注射生理盐水)。每天注射 1 次, 连续 5 d, 于第 6 天处死小鼠, 取睾丸进行各项指标测定。

2 实验方法

2.1 单细胞凝胶电泳

每组取 6 只小鼠的睾丸, PBS 制成细胞悬液, 调细胞密度为 $(0.3\sim 0.6)\times 10^{-10}/\text{L}$ 。按照 Singh 方法^[4]稍作改进: 先在磨砂的载玻片铺 3 层胶 (第一层为 NMA, 第二层为 5 ml 睾丸细胞悬液与 75 ml 的 LMA 混合液, 第三层为 LMA)。混合于 LMA 中的睾丸细胞经 90 min 裂解, 30 min 解旋后, 在 25V、电流 80 mA 的电场下电泳 30 min, 然后用 Tris-HCl 溶液中和 3 次 (5 min/次), 溴乙锭染色观察每个样本计数 100 个细胞, 每组

收稿日期: 2006-08-28; 修回日期: 2007-02-01

基金项目: 浙江省温州市科技发展计划项目 (Y2003A017)

作者简介: 董杰影 (1966-), 女, 高级实验师, 研究方向: 细胞与分子毒理学。

共计 400 个细胞。根据彗星尾部 DNA 含量占细胞 DNA 总量的比例, 将 DNA 损伤程度分为 5 级, 0 级: < 5% 无损伤, 细胞核完整; 1 级: 5%~20% 中度损伤, 可见彗尾, 细胞核缩小; 2 级: 20%~40% 中度损伤, 可见明显彗尾, 细胞核缩小; 3 级: 40%~95% 重度损伤, 彗尾荧光信号强而密, 并见明显缩小的细胞核; 4 级> 95%, 完全损伤。

2.2 bcl-2、bax 蛋白免疫组化检测

每组各取 15 张睾丸石蜡切片按试剂盒操作说明书分别进行 bcl-2 和蛋白免疫组化反应。阴性对照用 PBS 代替一抗。

2.3 图像分析及定量方法

在 bcl-2 和 bax 免疫细胞化学染色涂片上, 每组 10 个视野, 在光镜 10×40 倍的视野下, 采用 Image-Pro Plus 5.0 测量睾丸细胞表达 bcl-2 和 bax 蛋白的光密度、阳性表达率 (视野中 bcl-2 和 bax 蛋白表达呈阳性的细胞占视野所有细胞的百分率)。

2.4 统计学方法

DNA 损伤分级指标比较采用秩和检验 (SPSS11.0 软件进行统计分析), bcl-2、bax 蛋白表达密度、阳性率、差异比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 甲醛对体内染毒的睾丸细胞 DNA 损伤的影响

甲醛组细胞损伤高于对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 且以 0.2mg/kg 组变化最显著, 见表 1。

表 1 甲醛对体内染毒的睾丸细胞 DNA 损伤的影响

甲醛剂量 (mg/kg)	计数细胞 (个)	各级 DNA 损伤的细胞数					总损伤率 (%)
		0 级	I 级	II 级	III 级	IV 级	
0 (阴性对照)	400	360	32	8	0	0	10.0
0.2	400	177	23	69	92	39	55.8**
2	400	210	22	52	109	7	47.5**
20	400	275	54	45	26	0	31.3**

与对照组比, ** $P<0.01$

3.2 甲醛对睾丸细胞 bcl-2、bax 蛋白表达的影响

3 种剂量组睾丸细胞 bcl-2 蛋白表达阳性明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 而 bax 表达则明显增强, bax 的睾丸细胞增多, 见表 2。

表 2 甲醛对睾丸细胞 bcl-2、bax 蛋白表达的影响

甲醛剂量 (mg/kg)	bax		bcl-2	
	阳性表达率	光密度	阳性表达率	光密度
0	5.6±0.4	130.8±4.6	39.1±2.7	164.3±4.9
0.2	6.7±0.5**	134.0±2.3**	31.1±2.8**	156.7±6.6*
2	6.6±0.4**	136.1±2.9*	22.4±2.8**	150.9±4.6**
20	7.5±0.8**	138.1±1.3*	18.2±2.0**	144.6±4.3**

与对照组比, * $P<0.05$ ** $P<0.01$

4 讨论

甲醛是一种已知致癌、致突变物质, 有一定的遗传毒性。易建华等^[5]发现甲醛能使小鼠精子畸形率增高, 且精子的活动度及生存能力均减弱, 精子计数也明显减少。Majumdar 等^[6]

研究证实, 甲醛不仅能降低大鼠睾丸和前列腺中的 DNA 含量, 还能减少附睾和前列腺中的组蛋白含量; 并且可引起巨噬细胞 DNA 蛋白质交联和 DNA 单链断裂^[7]。本实验可见, 甲醛 0.2mg/kg 浓度组织细胞损伤率为 55.8%, 损伤最明显, 而 20mg/kg 浓度损伤率为 31.3%, 这种差异推测是因为过量甲醛诱导细胞 DNA 发生交联, 使核 DNA 漏出受阻, 从而在核内积聚, 不出现彗星现象, 这与周建华等人的研究结果相一致^[8]。DNA 蛋白质交联是 DNA 与蛋白质形成稳定的分子遗传损伤, 一旦形成难以修复, 是一种严重的分子遗传损伤, 可影响基因的表达式, 破坏染色体结构^[9]。

细胞凋亡是基因控制下的细胞自杀活动, 在此过程中, 有新的 RNA 转录和蛋白质合成, 其中 bcl-2 可与 bax 形成异源二聚体发挥抑制凋亡作用, 而 bax 自身可形成同源二聚体促进凋亡^[10]。目前对生殖细胞凋亡的分子机制尚不十分清楚。Suzuki^[11]等以切除性腺的雄性小鼠生殖管道为凋亡模型, 发现随着凋亡的产生出现 bcl-2 下调。本实验采用免疫组化方法配合图像分析技术, 研究甲醛致小鼠生殖细胞的 bax、bcl-2 蛋白表达。结果表明, 甲醛处理组生殖细胞的 bax 蛋白表达明显高于阴性对照组, 而 bcl-2 蛋白表达则明显低于阴性对照组, 提示小鼠腹腔注射一定浓度甲醛, 可导致 bax 和 bcl-2 蛋白表达异常, 两者通过各自作用途径, 相互协同, 共同诱导生殖细胞的凋亡。

参考文献:

- [1] WHO. Concise International Chemical Assessment Document 40: Formaldehyde [R]. World Health Organization, 2002: 12-16.
- [2] 杨丹凤, 裴著革, 张华山, 等. 典型醛类污染物单独及联合作用对小鼠脾淋巴细胞 DNA 损伤的离体实验研究 [J]. 卫生研究, 2002, 29 (1): 30-33.
- [3] 李玲, 许红霞, 刘桂珠, 等. 甲醛对小鼠致突变作用的研究 [J]. 宁夏医学院学报, 2004, 26 (5): 320-321.
- [4] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. Exp Cell Res, 1988, 175: 184-191.
- [5] 易建华, 张敬华, 高宇香. 甲醛对小鼠精子毒作用实验 [J]. 工业卫生与职业病, 2000, 26 (5): 18-20.
- [6] Majumdar P K, Kumar V L. Inhibitory effects of formaldehyde on the reproductive system of male rats [J]. Indian J Physiol Pharmacol, 1995, 39 (1): 80-82.
- [7] 董红燕, 刘军卓, 陈冠英. 甲醛对豚鼠肺巨噬细胞 DNA 的损伤作用 [J]. 环境与健康杂志, 1998, 15 (6): 253-255.
- [8] 周建华, 胡晓磐, 徐瑛, 等. 甲醛致淋巴细胞 DNA 交联作用的体内实验研究 [J]. 工业卫生与职业病, 2004, 30 (6): 360-363.
- [9] 张爱华, 杨光红. 燃煤碑污染对人体细胞 DNA 合成损伤及修复的影响 [J]. 癌变·畸变·突变, 2000, 12 (2): 78-80.
- [10] 林汝仙, 孙志贤. Bcl-2 基因家族与细胞程序性死亡 [J]. 国外医学遗传学分册, 1997, 20 (5): 242.
- [11] Suzuki A, Matsuzawa A, Iguchi T. Down regulation of bcl-2 is the first step on fas mediated apoptosis of male reproductive tract [J]. Oncogene, 1996, 13 (1): 31.