

3,4-二氯苯胺对雄性大鼠精子顶体酶活性和顶体反应的影响

芦冉¹, 张波^{2*}, 张鑫², 王东威²

(1 首都师范大学生命科学院, 北京 100037; 2 北京联合大学应用文理学院生物学系, 北京 100083)

摘要: 为观察 3,4-二氯苯胺 (DCA) 对雄性大鼠精子顶体酶活性和顶体反应的影响, 探讨 DCA 生殖毒性的可能机制, 选取健康性成熟 Wistar 雄性大鼠 48 只, 随机分为 6 组, 即正常对照组、溶剂对照组和 3,4-二氯苯胺 39、81、170、357 mg/kg 4 个剂量组。经口灌胃染毒, 1 次/d 连续 35 d 分别采集精液, 采用改良 Kennedy 法测定不同剂量组精子顶体酶活性, 考马斯亮蓝染色法体外检测不同浓度二氯苯胺 (5、10、20、40 μ g/ml) 对精子顶体反应率的影响。结果显示, 与对照组比较, 81~357 mg/kg 剂量组大鼠精子顶体酶活性明显降低 ($P < 0.05$ $P < 0.01$), 精子顶体反应率显著下降 ($P < 0.01$), 且降低幅度与 3,4-二氯苯胺的作用浓度有关。提示 3,4-二氯苯胺对大鼠精子顶体酶活性具有明显的抑制作用, 并可能由此影响精子发生顶体反应。

关键词: 3,4-二氯苯胺 (DCA); 精子顶体酶; 顶体反应

中图分类号: R99 O623.732 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2008)02-0099-03

Effect of 3,4-dichloroaniline on acrosomal enzyme activity and acrosomal reaction of spermatozoa in male rats

LU Ran¹, ZHANG Bo^{2*}, ZHANG Xin², WANG Dongwei²

(1. Department of Biology, Capital Normal University, Beijing 100037, China; 2. Department of Biology, Beijing Union University, Beijing 100083, China)

Abstract: To explore the effects of 3,4-dichloroaniline exposure on acrosomal enzyme activity and acrosomal reaction of spermatozoa of male rats, 48 male Wistar rats, adult and healthy, were randomly divided into 6 groups, including control group, solvent control group and different dosage of 3,4-dichloroaniline exposure groups (39, 81, 170, 357 mg/kg of DCA). DCA were orally taken once a day for 35 days. After exposure, the sperm were taken for the detection of acrosomal enzyme activity with improved Kennedy method and acrosomal reaction by detecting acrosomal proteins with Coomassie brilliant blue staining method. The results showed that the acrosomal enzyme activities were significantly decreased in 81~357 mg/kg of DCA exposed groups ($P < 0.05$ $P < 0.01$), meanwhile the acrosomal reaction rates were obviously lower than the control ($P < 0.01$), and they all were dose dependent. It suggested that 3,4-dichloroaniline might inhibit the activity of acrosomal enzymes of sperms, thereby result in lowering the capability of acrosomal reaction of rat sperms.

Key words: 3,4-Dichloroaniline (DCA); Acrosomal enzyme activity; Acrosomal reaction

二氯苯胺是除草剂、杀虫剂、偶氮染料和药物等合成的中间体, 在农业生产中, 又是除草剂、杀虫剂的降解产物, 其中的卤代苯胺还可以在以苯胺为原料的杀虫剂的降解过程中形成^[1]。这些化合物多属有毒有害物质^[2], 随工业废水、农业径流水、生活污水流入水体, 对水生生物的生长、发育和繁殖构成危害, 破坏生态系统, 对人体健康有潜在危害^[3]。大量研究表明卤代苯胺具有明显的形成高铁血红蛋白的作用, 而且对肝脏具有不同程度的毒性^[4]。但是到目前为止, 国内外的学者们对这种化合物的研究多数集中在水生生物和鱼类范围, 而以哺乳动物作为研究对象的资料很少, 本研究旨在探讨二氯苯胺对哺乳动物的生殖毒性问题。

1 材料与方

1.1 动物

健康性成熟 Wistar 雄性大鼠 48 只, 体重 260~270 g 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

1.2 试剂及仪器

3,4-二氯苯胺 (FLUKA 公司), Na-benzoyl-DL-精氨酸-p-硝酰基苯胺 (Na-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide, BAPNA), 苯甲咪 (benzamidine), 400 型聚蔗糖 (Ficoll 400), N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HePES), 考马斯亮蓝 R250 (Brilliant Blue R250), 孕酮 (Progesterone $\geq 99\%$), 以上均为 Sigma 公司产品。二甲基亚砜 (DMSO) (AMRESCO 公司产品), UNICQ-WFZ UV2000 型紫外可见分光光度计 [H0410043 尤尼柯 (上海) 仪器有限公司], Memmert NE-500 培养箱 (德国 Memmert 公司, E505 0190)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组 健康 Wistar 雄性大鼠 48 只, 随机分为 6 组, 正常对照组、溶剂对照组及 3,4-二氯苯胺 39、81、170

收稿日期: 2007-11-02 修回日期: 2008-03-04

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (项目编号: 7063071)。

作者简介: 芦冉 (1981-), 女, 细胞毒理学硕士研究生。

* 通讯作者, 博士, 教授, 主要研究方向: 环境毒理。

357 mg/kg 4 个组, 每组 8 只, 等容积经口灌胃染毒 (1 ml/200 g), 1 次/d 连续 35 d 自由摄食饮水。

1.3.2 精子顶体酶活性检测 采用改良 Kennedy 法, 根据文献 [5] 的方法, 以在 24℃, 水解 1.0 μmol BAPNA/ml 的底物量定为 1 U 顶体酶活性。

顶体酶活性 (μ U/10⁶ 精子) = (T 管 OD 值 - C 管 OD 值) × 10⁶ / 247.5 × 7.5。计算各组精子顶体酶活性值。

1.3.3 精子顶体反应检测 采用考马斯亮蓝染色法, 6 组精子悬液 (3 × 10⁶ ~ 6 × 10⁶ 个/ml 存活率 > 90%) 分装于 1 ml 容量的 Eppendorf 管, 每管 0.2 ml 为空白组 (检测精子自发顶体反应率), 染毒剂量组 (加入 DMSO 溶解的 3,4-二氯苯胺, 终浓度分别为 5、10、20、40 μg/ml) 和对照组 (等体积 DMSO), 反映体系 DMSO 的浓度不超过 1%。所有精子悬液先置于 37℃ 恒温培养箱中 2 h 使精子获能, 对照组和各染毒组均加入孕酮 (终浓度为 150 μmol/L) 诱发顶体反应, 15 min 后, 各组悬液取 50 μl 于载玻片制成涂片, 晾干, 2% 考马斯亮蓝染液浸染 2~3 min, 蒸馏水冲洗, 晾干, 显微镜下

观察。每张涂片随机观察 200 个精子, 顶体未被染成蓝色的为发生顶体反应的精子, 记录精子顶体反应率。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 11.5 软件, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行单因素方差分析, 并进行染毒组与对照组组间两两比较。

2 结果

2.1 3,4-二氯苯胺对大鼠体重和脏器系数的影响

染毒初期, 高剂量组大鼠食欲减退, 行动有些迟缓, 此情况在一周后逐渐消失。表 1 结果表明, 经过 5 周喂养后, 81 mg/kg 组大鼠体重增量明显低于溶剂对照组体重增量 (P < 0.05); 357 mg/kg 组大鼠体重增量和对照组比较有极显著性降低 (P < 0.01)。由表 1 可以看出 39、170 mg/kg 两个剂量组大鼠的睾丸系数均大于溶剂对照组, 但差异不明显, 而 357 mg/kg 剂量组大鼠睾丸系数有极显著的增加 (P < 0.01)。170、357 mg/kg 剂量的二氯苯胺对大鼠的肝脏系数有极显著性影响 (P < 0.01)。81、170 和 357 mg/kg 剂量的二氯苯胺可导致大鼠的脾脏系数极显著的增加 (P < 0.01)。

表 1 3,4-二氯苯胺对大鼠体重和脏器系数的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	体重增量 (%)	附睾系数	睾丸系数	肾脏系数	心脏系数	肝脏系数	脾脏系数	肺脏系数
空白对照组	154.37 ± 45.90	0.22 ± 0.06	0.82 ± 0.07	0.69 ± 0.04	0.29 ± 0.02	3.56 ± 0.44	0.19 ± 0.02	0.36 ± 0.06
溶剂对照组	125.59 ± 19.02	0.25 ± 0.06	0.84 ± 0.10	0.62 ± 0.08	0.29 ± 0.03	3.53 ± 0.37	0.18 ± 0.04	0.37 ± 0.06
染毒 39 mg/kg 组	149.42 ± 31.58	0.22 ± 0.03	0.85 ± 0.11	0.68 ± 0.11	0.28 ± 0.03	3.77 ± 0.29	0.23 ± 0.04	0.31 ± 0.02
染毒 81 mg/kg 组	109.52 ± 22.02*	0.23 ± 0.03	0.84 ± 0.07	0.67 ± 0.04	0.28 ± 0.04	3.63 ± 0.22	0.30 ± 0.06**	0.32 ± 0.02
染毒 170 mg/kg 组	118.26 ± 15.29	0.24 ± 0.02	0.86 ± 0.05	0.73 ± 0.07	0.31 ± 0.03	4.20 ± 0.43**	0.50 ± 0.08**	0.34 ± 0.02
染毒 357 mg/kg 组	68.38 ± 10.74**	0.26 ± 0.06	0.90 ± 0.12**	0.72 ± 0.08	0.29 ± 0.04	4.50 ± 0.48**	0.70 ± 0.19**	0.38 ± 0.04

与空白对照组比较 * P < 0.05 ** P < 0.01, 表 2-3 同。

2.2 3,4-二氯苯胺对大鼠精子顶体酶活性的影响

表 2 可见, 39 mg/kg 组精子顶体酶活性与空白对照组及溶剂对照组相比差异无统计学意义 (P > 0.05), 81 mg/kg 组酶活性比对照组明显降低 (P < 0.05), 170、357 mg/kg 组酶活性极明显低于对照组 (P < 0.01)。

表 2 3,4-二氯苯胺对大鼠精子顶体酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n (只)	顶体酶活性 (μ U/10 ⁶ 精子)
空白对照组	8	96.90 ± 5.19
溶剂对照组	8	96.23 ± 5.88
染毒 39 mg/kg 组	8	92.12 ± 4.67
染毒 81 mg/kg 组	8	87.00 ± 9.51*
染毒 170 mg/kg 组	8	74.43 ± 10.67**
染毒 357 mg/kg 组	8	65.93 ± 8.90**

2.3 3,4-二氯苯胺对大鼠精子顶体反应的影响

随着染毒剂量的增加, 大鼠精子顶体反应率呈现明显下降趋势, 与 3,4-二氯苯胺浓度有剂量效应关系, 见表 3。

表 3 3,4-二氯苯胺对大鼠精子顶体反应率的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

染毒剂量 (μ g/ml)	精子数 (个)	顶体反应率 (%)
自发顶体反应率	400	16.50 ± 3.79
0 (对照组)	400	89.50 ± 2.89
5	400	78.75 ± 2.06**
10	400	80.75 ± 1.26**
20	400	74.25 ± 1.71**
40	400	55.50 ± 1.73**

3 讨论

不同剂量 3,4-二氯苯胺 (39、81、170、357 mg/kg) 染毒大鼠后, 大鼠体重显著降低, 说明 3,4-二氯苯胺对大鼠的生长发育有明显的影 响。研究结果还显示, 3,4-二氯苯胺导致大鼠肝脏系数、脾脏系数、睾丸系数显著增高。

精子顶体酶作为受精过程中的关键酶, 在精子穿透卵细胞透明带时起溶解透明带作用, 因而其活性高低可直接影响受孕过程。顶体酶活性检测是近年逐步开展起来的精子功能检测方法, 是反映活精子质量的重要指标 [6]。顶体酶的活性可通过检测存在于精子顶体的精氨酸酰胺酶来确定。其原理是精氨酸酰胺酶以 BAPNA 为底物, 分解产生有色产物——硝酰基苯胺, 通过测定硝酰基苯胺的产量可推算出精氨酸酰胺酶的活性, 从而反映顶体酶的活性。本实验结果表明, 二氯苯胺对精子顶体酶有显著的损伤作用, 说明二氯苯胺可能影响大鼠精子的受精作用。

研究表明活精子的顶体反应百分率与精子的卵透明带穿透率呈强正相关, 透明带诱发精子顶体反应率已成为评价精子功能的一个可靠的指标 [7]。目前已建立了较成熟的顶体反应检测方法, 其中, 考马斯亮蓝法较为稳定 [8]。本实验表明, 随着染毒剂量的增加, 精子顶体反应率呈现明显的下降趋势, 具有 3,4-二氯苯胺剂量依赖关系。

由于精子顶体酶活性受到了抑制, 精子发生顶体反应催化剂的量及能够发生顶体反应的精子的数量亦会减少, 从而

造成一定数量的精子中顶体反应率降低。本研究中精子顶体反应率的降低亦呈现浓度依赖性,而且在高浓度二氯苯胺作用下降低得非常明显,5 μg/ml与 10 μg/ml组间差异不明显,我们推测在精子发生顶体反应的过程中,有可能还有其他化学因素起到代偿作用,以降低外来化学物质的影响,保证精子顶体反应正常进行。但当外来化学物质超过一定浓度时,这种作用即会消失,顶体反应率则显著下降。

到目前为止,关于二氯苯胺导致精子顶体酶活性降低的机制和顶体反应率下降的根本原因还不清楚,这其中具体有哪些因素起了重要作用还需要进行更加深入的研究。

参考文献:

[1] Fishbein L. The handbook of environmental chemistry Vol 3 Part C. Anthropogenic compounds [M]. Berlin: Springer, 1984: 311
 [2] 周光召. 面向 21 世纪科技进步与社会经济发展 [M]. 北京:

中国科学技术出版社, 1999: 24-26
 [3] 中国环境科学研究院. 环境背景值和环境容量研究 [M]. 北京: 科学出版社, 1990: 129-133
 [4] 惠秀娟. 环境毒理学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 科学与工程出版中心, 2003: 34-36
 [5] 肖春花, 王忠山, 左文静, 等. 精子顶体酶活性检测新方法与应用 [J]. 男性学杂志, 1994, 8 (4): 198-200
 [6] 许宗革, 刘睿智, 王忠山, 等. 精子顶体酶活性检测对诊断男性不孕症的价值 [J]. 吉林医学, 2004, 25 (6): 35-36
 [7] Lin De Y, Garrett C, Baker H W. Clinical application of sperm-oocyte interaction tests in vitro fertilization embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs [J]. Fertil Steril 2004, 82 (5): 1251-1263
 [8] 张韞, 谢琪璇, 潘善培, 等. 人精子顶体反应 3 种检测方法的比较与评价 [J]. 中国男科学杂志, 2005, 11 (6): 419-425.

矽肺患者血液中转化生长因子 β₁ 表达水平的研究

马庆坤¹, 吴成秋²

(1. 唐山钢铁集团有限责任公司医院, 河北 唐山 063000 2 南华大学公共卫生研究所, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 为探讨转化生长因子 β₁ (TGFβ₁) 与矽肺的关系, 采集 16 例矽肺患者和 15 例正常人的静脉血 8 ml 应用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血液中 TGFβ₁ 的含量。提取外周血淋巴细胞中的总 RNA 以及血清中的总蛋白质, 分别用 RT-PCR 和 Western-blot 检测方法检验 TGFβ₁ 的 mRNA 和蛋白质表达水平。结果显示, 矽肺患者血清 TGFβ₁ 为 (203.14 ± 32.38) μg/ml 正常人血清 TGFβ₁ 为 (42.66 ± 15.50) μg/ml 两者差异有统计学意义 (t = 19.51, P < 0.01); 矽肺患者血液中 TGFβ₁ 水平明显高于正常人。TGFβ₁ 可作为矽肺患者的血清学检测指标。

关键词: 矽肺; 转化生长因子 β₁ (TGFβ₁); 表达水平

中图分类号: R135.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2008)02-0101-03

Research on the expression level of transforming growth factor β₁ in blood of silicosis patients

MA Qingkui, WU Chengqiu

(1. Affiliated Hospital of Tangshan Steel and Iron Company, Tangshan 063000, China; 2. Institute for Public Health, Nanhua University Hengyang 421001, China)

Abstract: To explore the relationship between TGFβ₁ and silicosis especially the possibility that TGFβ₁ expression level in blood to be a available clinical index for silicosis diagnosis 16 silicosis patients and 15 controls were selected as the objects of this study. 8 ml blood were taken from those people for experimental detecting. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used for the detection of serum TGFβ₁ level. the expression level of TGFβ₁ mRNA and TGFβ₁ protein in peripheral lymphocytes were detected by RT-PCR and Western blotting methods respectively. SPSS14.1 was applied for statistical analysis. The result showed that the serum expression level of TGFβ₁ of silicosis patients was (203.14 ± 32.38) μg/ml significantly higher than that of controls (42.66 ± 15.50) μg/ml (P < 0.01). The RT-PCR and Western blotting detecting results also showed that the lymphocytes TGFβ₁ mRNA expression level in silicosis patients was also obviously decreased compared with the controls. It indicated that serum TGFβ₁ level is closely related to silicosis suggests that it could be taken as a clinical index for the diagnosis of silicosis.

Key words: Silicosis; Transforming growth factor β₁ (TGFβ₁); Expression level

矽肺病是由于在职业场所长期吸入游离二氧化硅粉尘而导致的肺部弥漫性纤维化。矽肺的发生是否与遗传因素有关目前还不清楚。近年来,在职业病病因研究方面,研究者们

试图寻找其遗传易感因素^[1,2]。为此,本文以转化生长因子-β₁ (transforming growth factor β₁, TGFβ₁) 为靶基因,探讨矽肺患者与正常对照人群血液中 TGFβ₁ 的表达差异。

1 材料与方法

1.1 对象

16 例确诊的慢性矽肺患者 (无其他疾患) 中 II 期矽肺 11

收稿日期: 2007-12-28

作者简介: 马庆坤 (1964-), 女, 副主任医师。