

王兴庄, 徐世文, 张春红. 2009 硝基苯对小鼠睾丸生殖细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. 环境科学学报, 29(1): 186-190

Wang X Z, Xu S W, Zhang C H. 2009 Effects of nitrobenzene on apoptosis and the mRNA levels of Bcl-2 and Bax in mouse reproductive cells [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 29(1): 186-190

硝基苯对小鼠睾丸生殖细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 表达的影响

王兴庄¹, 徐世文^{1*}, 张春红²

¹ 东北农业大学动物医学院, 哈尔滨 150030

² 国家农业标准化监测与研究 中心, 哈尔滨 150036

收稿日期: 2008-03-20 修回日期: 2008-05-21 录用日期: 2008-11-24

摘要: 为了探讨硝基苯对小鼠睾丸生殖细胞凋亡及 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达的影响. 将 10 周龄雄性昆明小鼠随机分为染毒组 (26 mg kg⁻¹、52 mg kg⁻¹、105 mg kg⁻¹)、溶剂对照组 (花生油)、对照组 (生理盐水), 并对其灌胃染毒, 试验期为 30 d RT-PCR 法检测小鼠生殖细胞 Bcl-2、Bax mRNA 表达, 透射电镜观察小鼠生殖细胞超微结构的变化, TUNEL 法检测生殖细胞的凋亡. 结果表明, 小鼠生殖细胞的 Bcl-2 mRNA 表达明显低于对照组, Bax mRNA 表达明显高于对照组, Bcl-2/Bax 比值也明显低于对照组. 并具有统计学意义 ($p < 0.01$, $p < 0.05$); 电镜观察结果显示, 硝基苯能使生殖细胞的细胞核、染色质、线粒体等超微结构发生不同程度的病理改变.

关键词: 硝基苯; 生殖细胞; Bcl-2; Bax; 小鼠

文章编号: 0253-2468 (2009) 01-186-05 中图分类号: R994.6 文献标识码: A

Effects of nitrobenzene on apoptosis and the mRNA levels of Bcl-2 and Bax in mouse reproductive cells

WANG Xingzhuang¹, XU Shiwen^{1*}, ZHANG Chunhong²

¹ College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030

² Chinese Agriculture Standardize Monitor and Research Center, Harbin 150036

Received 20 March 2008 received in revised form 21 May 2008 accepted 24 November 2008

Abstract In order to investigate the effect of nitrobenzene on apoptosis and the mRNA levels of Bcl-2 and Bax in the reproductive cells of mice, forty 10-week-old male Kunming mice were randomly allocated to nitrobenzene treatment groups (26 mg kg⁻¹, 52 mg kg⁻¹, and 105 mg kg⁻¹), solvent control group (arachis oil), and control group (physiological saline). The mice were treated through intragastric administration for 30 days. The mRNA levels of Bcl-2 and Bax in the reproductive cells were determined by RT-PCR. The ultrastructure of the reproductive cells was observed with a Transmission Electron Microscope (TEM). Apoptosis of the reproductive cells was determined by TUNEL. The results indicated that the mRNA levels of Bcl-2 in the nitrobenzene treatment groups were significantly lower than that in the control group ($p < 0.01$, $p < 0.05$). The mRNA levels of Bax in the nitrobenzene treatment groups were significantly higher than that in the control group ($p < 0.01$, $p < 0.05$). The relative values of Bcl-2/Bax in the nitrobenzene treatment groups were significantly lower than in the control group ($p < 0.01$, $p < 0.05$). The TEM results indicated that nitrobenzene caused different degrees of pathological change to the ultrastructure of the cell nuclei, chromatin, and mitochondria of the reproductive cells.

Keywords nitrobenzene; reproductive cell; Bcl-2; Bax; mice

1 引言 (Introduction)

硝基苯 (Nitrobenzene, NB) 是人工合成的化合物, 被广泛地用于医药、农药、染料、橡胶等行业, 也是常见的有毒污染物. 由于其毒性强、分布广, 美国

环保局及我国环保总局均将其列入优先监测物 (沈德中, 2002). 长期接触对人体及动植物危害极大 (Hankenson *et al.*, 1991). 随着中国精细化学工业的发展, 每年进入环境的硝基苯数量持续增加, 通常会通过生产、运输和事故进入水体中. 目前, 国内

基金项目: 黑龙江省教育厅研究生创新基金项目 (No. YJSCX2007-0043HLJ)

Supported by the Postgraduate's Innovation Fund of Education Department of Heilongjiang Province of China (No. YJSCX2007-0043HLJ)

作者简介: 王兴庄 (1981-), 男; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: xushiwen101@sohu.com

Biography: WANG Xingzhuang (1981-), male; * Corresponding author, E-mail: xushiwen101@sohu.com

外对硝基苯类化合物的研究相当活跃, 主要集中在研究了它们的环境行为、生态学特性和在水生生物体内的富集作用及其引起的毒性毒理机制。Rajagopal C 等 (2001) 用颗粒状活性炭 GAC 做吸附剂处理硝基苯废水, 并建立了一个预测吸收的动力学模型, 处理量较大。殷培杰等 (2007) 研究了 4℃ 和 20℃ 两种温度条件下硝基苯的自然衰减和生物强化降解情况。结果表明, 2种浓度的硝基苯在 4℃ 时有氧、缺氧条件下均无降解, 20℃ 时有氧和缺氧条件下均有明显的降解, 添加筛选出的混合降解菌可快速降解处于泥浆状的硝基苯。薛良义等 (2005) 研究了硝基苯和氯苯对鲫鱼血细胞 DNA 的损伤作用。试验结果表明, 不同浓度的硝基苯和氯苯都可以引起血细胞 DNA 的单链断裂, 出现拖尾的彗星细胞。但硝基苯对动物生殖毒性方面的研究报道较少, 本试验以小鼠为研究对象, 从分子水平探讨硝基苯对生殖细胞毒性及其凋亡的机制, 为丰富毒理学资料, 更好地评价硝基苯对人类的潜在危害提供理论依据。

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 主要试剂与仪器

硝基苯 (上海凌峰化学试剂有限公司, AR, 产品批号: 04041); M-MLV 反转录酶 (Invitrogen 公司)、

flaq 酶 (Takara (大连) 宝生物公司); 琼脂糖 (上海 Yitong 公司); 其它试剂均为国产分析纯。总 RNA 试剂盒 (上海飞捷生物技术有限公司)、细胞凋亡试剂盒 (德国罗氏公司); DYY-6C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); Champ GelTM 3000 凝胶成像系统 (北京赛智创业科技有限公司); JEM-100CX II 型透射电子显微镜 (日本电子公司)。

2.2 动物分组与处理

雄性昆明小鼠由哈尔滨医科大学附属二院实验动物中心提供。40 只 (10 周龄) 雄性昆明小鼠随机分为 5 组, 每组 8 只, 剂量选择参考邢厚娟 (2007), 对对照组 I、溶剂对照组 II、低剂量组 III (26 mg·kg⁻¹)、中剂量组 IV (52 mg·kg⁻¹)、高剂量组 V (105 mg·kg⁻¹) 进行灌胃染毒。在第 30 d 将各组小鼠剖杀采集睾丸, 用于各项指标的检测。

2.3 RT-PCR 检测

根据 GeneBank 发表的鼠的基因序列, 应用 Oligo6.0 软件设计引物, 由上海英俊生物公司合成, 序列如表 1。

取睾丸组织, 用总 RNA 试剂盒提取组织 RNA, 依次进行 RNA 检测、逆转录反应、PCR 扩增, 扩增条件: 94℃ 5min, 94℃ 1min, 58℃ 45s (Bcl-2)、65℃ 45s (Bax)、51℃ 45s (Cyc), 72℃ 1min, 35 个循环后 72℃ 延伸 7min, 4℃ 终止反应。电泳及成像分析。

表 1 扩增基因引物序列及目的片段长度
Table 1 Primer sequence and length of gene

基因	序列号	引物序列	PCR 产物长度
Bcl-2	NM 177410	上游: 5' AGC CGG GAG AAC AGG GTA 3' 下游: 5' TGT TGA CGC TCT CCA CAC A 3'	473bp
Bax	NM 007527	上游: 5' TGGCTGGG GAGACACCTGAG C 3' 下游: 5' TCA GCCCATCTTCTTCCAGATG 3'	467bp
Cyc	NM 008907	上游: 5' AAGGATTGGCTATAAGGG 3' 下游: 5' GGAATGGTTTGATGGGTA 3'	406bp

2.4 超微结构的观察

常规方法采集小鼠睾丸组织, 戊二醛固定, 制作超薄切片, JEM-100CX II 型透射电子显微镜观察照相。

2.5 细胞凋亡的检测

采用 TdT 介导的原位末端标记法 (TUNEL 法), 按试剂盒使用说明进行测定。

观察计数: 显微镜下观察, 细胞核中有棕色颗粒为阳性细胞即凋亡细胞, 非凋亡细胞用苏木素复染为蓝紫色核, 阴性对照切片不出现棕色颗粒。每

组选择 5 张相同断面的切片, 光镜下在每张切片上随机计数 100 个细胞, 计算凋亡细胞数。

2.6 数据处理

统计学处理采用 SPSS 统计学软件包 (Statistical Package for the Social Science; SPSS 11.0 for windows), 取均数及标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行单因素方差分析, * 与对照组相比差异显著 ($p < 0.05$), ** 与对照组相比差异显著 ($p < 0.01$), 与对照组之间相比差异不显著, 不标注。

3 结果 (Results)

3.1 RT-PCR 检测的结果

由表 2 图 1 和图 2 可知, 空白组 Bcl-2, Bax mRNA 表达和 Bcl-2/Bax 比值与油对照组相比差异不显著 ($p \geq 0.05$), 表明可以选择花生油作为溶剂. 随着染毒剂量的增加生殖细胞内 Bcl-2 mRNA 表达先升高逐渐降低, 低剂量组 Bcl-2 mRNA 表达与油

对照组相比差异显著升高 ($p < 0.05$), 中剂量组 Bcl-2 mRNA 表达与油对照组相比显著降低 ($p < 0.05$), 高剂量组 Bcl-2 mRNA 表达与油对照极显著降低 ($p < 0.01$), 低、中剂量组 Bax mRNA 表达与油对照组相比显著升高 ($p < 0.05$), 高剂量组 Bax mRNA 表达与油对照组相比极显著升高 ($p < 0.01$). 各染毒组 Bcl-2/Bax 比值与油对照组相比显著或极显著降低 ($p < 0.05$, $p < 0.01$), 呈明显的剂量-效应关系.

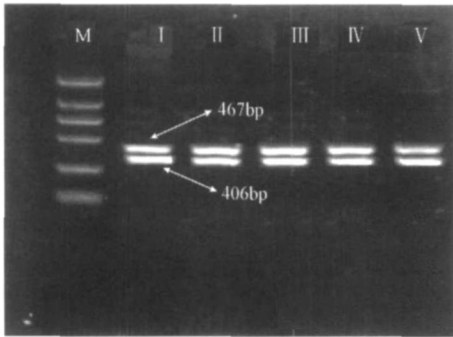


图 1 生殖细胞 Bax mRNA 表达 (M 表示 DNA Marker DL 2000)

Fig 1 Bax mRNA expression in reproductive cell

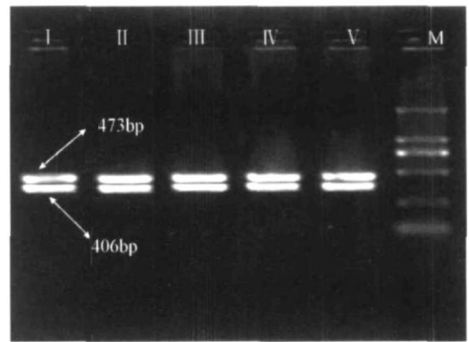


图 2 生殖细胞 Bcl-2 mRNA 表达

Fig 2 Bcl-2 mRNA expression in reproductive cell

表 2 生殖细胞 Bcl-2, Bax mRNA 表达及 Bcl-2/Bax 比值的结果

Table 2 The results of Bcl-2 mRNA, Bax mRNA, and their relative values in reproductive cells

组别	样本数	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
空白组 I	5	0.767 ± 0.0266	0.554 ± 0.009	1.385 ± 0.061
油对照组 II	5	0.764 ± 0.0257	0.538 ± 0.018	1.420 ± 0.054
低剂量组 III	5	0.917 ± 0.0401*	0.865 ± 0.069	1.097 ± 0.023*
中剂量组 IV	5	0.707 ± 0.0403*	1.071 ± 0.017	0.613 ± 0.081**
高剂量组 V	5	0.569 ± 0.0082**	1.218 ± 0.344*	0.467 ± 0.017**

3.2 透射电镜的观察结果

由图 3 可见, 对照组生殖细胞间隙明显, 核质均匀, 高尔基体、线粒体丰富 (图 3-a). 高剂量组精母细胞胞质内细胞器减少, 异染色质边聚, 细胞核皱

缩 (图 3-b). 间质细胞线粒体肿胀, 异染色质边聚并呈现环形 (图 3-c). 支持细胞受损, 支持细胞与精母细胞的联系受到严重破坏 (图 3-d).

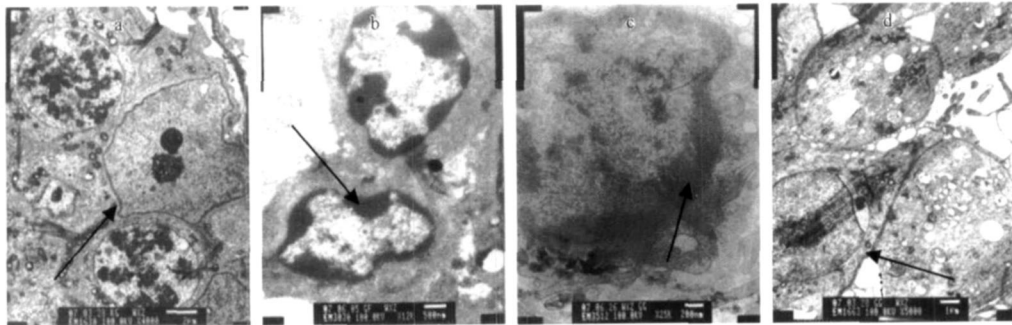


图 3 生殖细胞超微结构观察结果 (a 油对照组 (4000×), b 油对照组 (12 k×), c 高剂量组 (25 k×), d 高剂量组 (5000×))

Fig 3 Ultrastructures of reproductive cells (a arachis oil control groups (4000×), b arachis oil control groups (12 k×), c high dose groups (25 k×), d high dose groups (5000×))

3.3 细胞凋亡的检测结果

由表 3 和图 4 可知, 油对照组 (图 4-a) 生殖细胞凋亡极少, 高剂量组 (图 4-b) 生殖细胞凋亡明显, 并且高剂量组睾丸中细胞凋亡指数与油对照组比较差异极显著 ($p < 0.01$).

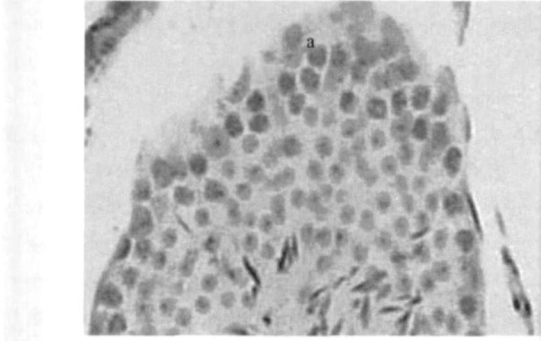


表 3 生殖细胞凋亡指数的检测结果 (个/100个)

Table 3 Apoptosis indexes in reproductive cells (number/100)

组别	样本数	睾丸细胞凋亡指数
油对照组 II	5	0.213 ± 0.033
高剂量组 V	5	3.630 ± 0.047*

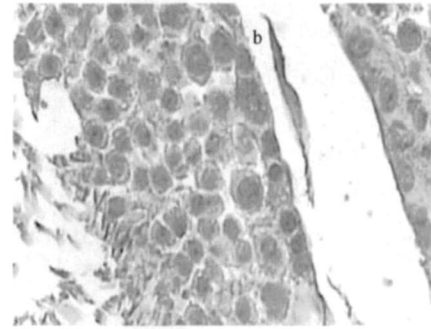


图 4 生殖细胞凋亡观察结果 (a 油对照组 (TUNEL 法, 400×), b 高剂量组 (TUNEL 法, 400×))

Fig 4 The apoptosis results of the reproductive cells (a oil control groups (TUNEL 法, 400×), b high dose groups (TUNEL 法, 400×))

4 讨论 (Discussion)

细胞凋亡 (apoptosis) 是细胞接受某种信号后或受到某些因素刺激后一种主动的, 由一些凋亡相关基因相互作用引起的细胞消亡的过程, 亦称细胞程序性死亡. 细胞凋亡的发生与凋亡相关基因的基因组群有关, 这些基因根据功能可分为凋亡基因和凋亡抑制基因, 前者诱导细胞凋亡, 主要有 Bax, ced3, ced4, c-fos, c-jun, c-myc, p53, Bcl-2 等, 后者抑制细胞凋亡, 主要有 Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 等, 其中 Bcl-2 和 Bax 是细胞凋亡过程中起关键性作用的一对功能基因, Bcl-2 主要生物学功能为延长细胞寿命并增加细胞对凋亡刺激因素的抗性 (赵永同等, 1996), 而 Bax 的过量表达可抑制 Bcl-2 的功能而使细胞凋亡 (Olivai *et al.*, 1993), 相关研究证实 Bcl-2 和 Bax 在细胞内以同源二聚体或异源二聚体形式存在. 当 Bax 过表达时, 形成同源二聚体 Bax/Bax, 促进细胞凋亡; 当 Bcl-2 过表达时, 就形成异源二聚体 Bcl-2/Bax, 抑制细胞凋亡 (郑航等, 2000). 因此, Bax 和 Bcl-2 的表达水平及 Bcl-2/Bax 比值决定细胞生存方向 (沈志祥等, 2007).

贾娜等 (2005) 研究了二乙氧基乙醇诱导的大鼠生殖细胞凋亡及其分子调控机制, 二乙氧基乙醇诱导的生殖细胞凋亡明显, 染毒后 Bax mRNA 表达水平每天均升高, 并且 Bax/Bcl-2 的比值也在染毒后上升, 凋亡相关基因 Bax、Bcl-2 mRNA 参与二乙氧基乙醇诱导的大鼠生殖细胞凋亡的调控. 刘光伟

等 (2003) 研究低剂量电离辐射诱导小鼠睾丸生殖细胞凋亡的作用及凋亡基因 Bcl-2 和 Bax 表达的影响, 结果表明, 当 Bcl-2/Bax 比值大于 1 时, 生殖细胞凋亡无明显增加; 比值小于 1 时, 生殖细胞凋亡明显增加. 本试验结果表明, 高剂量组细胞凋亡指数与对照组相比显著升高, 生殖细胞凋亡增加, RT-PCR 检测的低剂量组生殖细胞 Bcl-2 mRNA 表达稍有增加, 这可能是细胞的保护机制, 但 Bcl-2/Bax 的比值仍明显降低, 中、高剂量组 Bax mRNA 表达逐渐增加, Bcl-2 mRNA 逐渐显著减少, 导致了 Bax mRNA 的过表达, 从而形成了 Bax/Bax 同源二聚体, 促进细胞凋亡. 此结果与上述文献报道一致. Bcl-2 基因表达的蛋白主要分布在线粒体上, 可阻止细胞内 Ca^{2+} 的流动而阻断细胞凋亡并干扰过氧化物的产生和脂膜的过氧化, 从而抑制氧化物应激诱导的细胞凋亡 (杨筱珍等, 2004). Bcl-2 表达的减少必将削弱其干扰过氧化物的产生和脂质过氧化的能力及对 Ca^{2+} 的流动的控制, 进一步促进细胞凋亡.

Taboga 等 (1999) 研究表明, 生精细胞发生凋亡最常见的形态变化是细胞核染色质浓缩, 我们用电镜观察结果显示: 对照组核质均匀, 线粒体丰富, 高剂量组胞质内细胞器减少, 异染色质边聚, 肿胀的线粒体可见糖原包涵物, 细胞核皱缩. 这说明硝基苯对生殖细胞的损伤表现为核染色质的浓缩、边聚和线粒体的肿胀.

5 结论 (Conclusions)

1) 硝基苯能够诱导小鼠生殖细胞凋亡, Bcl-2 mRNA 表达减少, Bax mRNA 表达增加, Bcl-2/Bax 比值下降, 并且在 26~105 mg·kg⁻¹ 染毒剂量内呈现剂量-效应关系。

2) 硝基苯诱导的 Bcl-2/Bax mRNA 表达的变化可能是生殖细胞凋亡的重要机制之一。

责任作者简介: 徐世文 (1966—), 男, 东北农业大学动物医学院教授。从事环境毒理学和营养代谢病研究工作。E-mail xushiwen101@sohu.com, Tel 13351780669/0451-55190407。

参考文献 (References)

Hankenson K, Schaeffer D J. 1991 Microtox assay of trinitrotoluene dinitrotoluene and dinitroethylaniline mixtures [J]. Bull Environ Contam Toxicol 46(4): 550-553

贾娜, 高星, 王瑞生. 2005 二乙氧基乙醇诱导大鼠生精细胞凋亡及其分子机制研究 [J]. 毒理学杂志, 19(1): 26-28

Jia N, Gao X, Wang R S. 2005. The study on the germ cell apoptosis and its molecular mechanism in rat testis induced by 2-ethoxyethanol [J]. Journal of Health Toxicology, 19(1): 26-28 (in Chinese)

刘光伟, 王春燕, 吕哲, 等. 2003 Bcl-2/Bax 基因表达对低剂量电离辐射诱导小鼠睾丸生精细胞凋亡的影响 [J]. 辐射防护, 23(6): 345-348

Liu G W, Wang C Y, Lu Z, et al. 2003 Effect of Bcl-2/Bax gene expression on apoptosis of spermatogenic cells of mouse testes induced by low dose radiation [J]. Radiation Protection, 23(6): 345-348 (in Chinese)

Olivai Z N, Millan C L, Korsmeyer S J. 1993 Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog Bax that accelerates programmed cell death [J]. Cell 74(8): 609

Rajgopal C, Kapoor J C. 2001 Development of adsorptive removal process for treatment of explosives contaminated wastewater using activated carbon [J]. Journal of Hazardous Materials 87(1-3): 73-98

沈德中. 2002 污染环境的生物修复 [M]. 北京: 化学工业出版社, 6-7

Shen D Z. 2002 Bioremediation of polluted environment [M]. Beijing Chemical Industry Press 6-7 (in Chinese)

沈志祥, 刘翠鲜. 2007 运动对老年小鼠心肌 Bcl-2, Bax 基因 mRNA 表达的影响 [J]. 体育与科学, 28(2): 66-68

Shen Z X, Liu C X. 2007 The effects of exercise on myocardial Bcl-2 and Bax mRNA expression in the aged mice [J]. Journal of Sports and Science 28(2): 66-68 (in Chinese)

Taboga S R, de Souza R S, dos Santos D C, et al. 1999. Spontaneous germ cell death by apoptosis in epididymis of the adult bat artibeus lituratus [J]. Cytobios 99(390): 39-45

邢厚娟, 王海波, 王敏, 等. 2007. 硝基苯灌胃致小鼠蛋白质氧化损伤作用的研究 [J]. 环境科学学报, 27(9): 1509-1511

Xing H J, Wang H B, Wang M. 2007. Study on protein oxidative damage in mice by intragastric administration of nitrobenzene [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 27(9): 1509-1511 (in Chinese)

薛良义, 李卢, 周济胜. 2005 硝基苯和氯苯对鲫鱼血细胞 DNA 损伤的研究 [J]. 水利渔业, 25(3): 8-9

Xue L Y, Li L, Zhou J S. 2005 Investigation on DNA damage induced by nitrobenzene and chlorobenzene in crucian red cells [J]. Reservoir Fisheries 25(3): 8-9 (in Chinese)

杨筱珍, 陈耀星, 王子旭, 等. 2004. 基因对雄性生殖细胞凋亡调控的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 31(1): 24-26 27

Yang X Z, Chen Y X, Wang Z X, et al. 2004. The research progress in gene regulate to male sex-cell of apoptosis [J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 31(1): 24-26 27 (in Chinese)

殷培杰, 陈威, 孙红文. 2007. 温度对底泥中硝基苯的自然衰减及强化降解的影响 [J]. 环境科学学报, 27(8): 1288-1291

Yin P J, Chen W, Sun H W. 2007 The effect of temperature on natural attenuation and bio-augmented degradation of nitrobenzene-contaminated sediments [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 27(8): 1288-1291 (in Chinese)

赵永同, 朱峰. 1996 凋亡的分子机理 [J]. 生命科学, 8(2): 19

Zhao Y T, Zhu F. 1996 Molecular mechanism of apoptosis [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences 8(2): 19 (in Chinese)

郑航, 胡礼泉, 郑新民, 等. 2000. Bcl-2/Bax 基因表达对隐睾生殖细胞凋亡的影响 [J]. 中华男科学杂志, 14(2): 81-82 85

Zheng H, Hu L Q, Zheng X M, et al. 2000 Bcl-2/Bax expression and testicular germ cell apoptosis in experimental cryptorchidism [J]. Chinese Journal of Andrology 14(2): 81-82 85 (in Chinese)