

Bcl-2 and Bax Expressions in Spermatogenic Cells and Ultrastructural Changes in Spermatogenic Cells and Sperms of Mice Exposed to Mercury

汞对小鼠生精细胞 Bcl-2、Bax 表达和生精细胞、精子超微结构的影响

楼哲丰/方周溪/董杰影/金龙金*
(温州医学院生物学实验教学中心, 浙江温州 325027)

LOU Zhe-feng, FANG Zhou-xi, DONG Jie-ying, JIN Long-jin*
(Central Laboratory of Biology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China.)

【摘要】背景与目的: 研究氯化汞暴露对小鼠睾丸生精细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的影响, 观察氯化汞引起生精细胞和精子超微结构的变化。材料与方法: 取 32 只雄性 ICR 小鼠, 随机分为 3 个不同氯化汞剂量处理组和阴性对照组, 共 4 组, 各处理组分别以 0.5、1.0、5.0 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 氯化汞腹腔注射, 每天 1 次, 连续 5 d, 阴性对照组注射等体积生理盐水。用免疫组化法测定小鼠睾丸生精细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达的阳性细胞率、平均光密度值; 透射电镜观察生精细胞和附睾精子超微结构改变。结果: 3 种不同剂量氯化汞组 Bcl-2 蛋白表达的阳性细胞率和平均光密度值均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 1.0、5.0 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 氯化汞组 Bax 蛋白表达的阳性细胞率和平均光密度值均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。透射电镜观察显示, 各氯化汞处理组生精细胞核膜、染色质、线粒体、附睾精子线粒体等超微结构均发生不同程度的病理变化, 且随氯化汞浓度的增加, 超微结构病理变化越明显。结论: 小鼠汞暴露可导致睾丸生精细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达阳性细胞率和平均光密度值显著性改变, 生精细胞和精子超微结构发生明显的变化。

【关键词】氯化汞; Bcl-2; Bax; 生精细胞; 精子; 超微结构

中图分类号: R135.11; R994 文献标识码: A 文章编号: 1004-616X(2007)02-0139-04

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To study Bcl-2 and Bax expressions in spermatogenic cells, ultrastructural changes in spermatogenic cells and sperms of mice after exposure to mercury. MATERIALS AND METHODS: 32 male mice were divided into 4 groups, 3 groups treated with intraperitoneal mercuric chloride of 0.5, 1.0, 5.0 $\mu\text{mol}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ for 5 days, and one normal saline control group. The positive expression rates of Bcl-2 and Bax protein and average optical density in spermatogenic cells by the immunohistochemical method were assayed, and the ultrastructural changes of spermatogenic cells and sperms were assessed by the transmission electron microscope. RESULTS: Bcl-2 protein expression positive rates and average optical density were lower than of normal group ($P < 0.05$). Bax protein expression positive rates and average optical density in 1.0, 5.0 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ groups were higher than those in normal group ($P < 0.05$). The ultrastructure of nuclear membrane, chromatin, mitochondria and sperm mitochondria in three treated groups showed different degrees of injury and the degree of ultrastructural change was more severe with increasing concentration of mercury. CONCLUSION: Mercury exposure caused abnormal Bcl-2 and Bax protein expression, average optical density change and ultrastructural changes in spermatogenic cells and sperms.

【KEY WORDS】mercuric chloride; Bcl-2; Bax; spermatogenic cell; sperm ultrastructure

汞是现代工业生产中普遍应用的一种重金属, 可对动物和人体多种组织细胞造成损害, 近年来, 国内外大量研究表明汞对免疫系统、神经细胞等有明显损害作用^[1-2]; 对体内细胞的凋亡具有诱导作用^[3], 具有致癌、

收稿日期: 2006-10-13; 修订日期: 2007-01-04

基金项目: 浙江省温州市科技发展计划项目 (No. S2002A018)

作者简介: 楼哲丰 (1979-), 男, 浙江省诸暨人, 助理实验师, 本科, 研究方向: 遗传学。

* Correspondence to: JIN Long-jin, Tel: 0577-86689780, E-mail: jlj@wzmc.net

致畸、致基因突变等危害^[4];汞对生殖功能的毒性作用以及对睾丸生殖细胞的损伤作用也曾有报道^[5-6];但其毒性机制有待于进一步深入研究。汞对生精细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平以及对生精细胞和精子超微结构的研究尚缺乏证据。为此我们进行了本试验。

1 材料与方法

1.1 材料

AR 级氯化汞(上海试剂四赫维化工有限公司,批号:0112101),Bcl-2、Bax 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物制剂有限公司)。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 220030002 号)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 取 32 只 ICR 雄性小鼠随机分为 3 个不同浓度氯化汞实验组和阴性对照组,共 4 组,每组 8 只,实验组分别腹腔注射氯化汞 0.5、1.0、5.0 μmol/kg,每天 1 次,连续 5 d,对照组注射等体积生理盐水。于暴露第 6 d 处死小鼠,取睾丸和附睾进行各项指标检测。

1.2.2 睾丸生精细胞 Bcl-2、Bax 蛋白阳性细胞率、平均光密度值检测 取小鼠一侧睾丸固定,石蜡包埋,切片,每只睾丸各取 2 张切片,按免疫组化试剂盒操

作说明书分别进行 Bcl-2、Bax 免疫组化反应,其中阴性对照用 PBS 缓冲液代替一抗。高倍镜下观察 Bcl-2、Bax 蛋白表达阳性细胞,并用 Imge-Proplus 5.1 图象处理系统处理观察结果、计算蛋白表达阳性细胞百分率和平均光密度值。

1.2.3 睾丸生精细胞和附睾精子超微结构观察

取小鼠另一侧睾丸和附睾用戊二醛固定,环氧树脂包埋,超薄切片,用日立 H7500 型透射电镜观察。

1.3 统计学方法

运用 SPSS11.0 软件,采用 ANOVA 分析数据,α=0.05 为检验标准。

2 结果

2.1 氯化汞对小鼠睾丸生精细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达阳性细胞率、平均光密度值的影响

结果见表 1。氯化汞各组小鼠睾丸生精细胞 Bcl-2 蛋白表达阳性细胞率显著低于对照组($P < 0.05$),平均光密度值也显著低于对照组($P < 0.05$),且 Bcl-2 蛋白表达阳性细胞率和平均光密度值降低与氯化汞剂量增加存在一定的剂量效应关系,相关系数分别为 $r = -0.952(P < 0.05)$ 、 $r = -0.937(P < 0.05)$;Bax 蛋白表达的阳性细胞率和平均光密度值除 0.5 μmol/kg 氯化汞处理组与对照组比较无显著性差异外,其余氯化汞处

表 1 氯化汞致小鼠睾丸生精细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达阳性细胞率、平均光密度值的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Bcl-2, Bax protein and average optical density in spermatogenic cells of mice by mercuric chloride($\bar{x} \pm s$)

Groups	Positive cell rates (%)		Average optical density (D)	
	Bcl-2	Bax	Bcl-2	Bax
Negative control	40.93 ± 2.92	5.56 ± 0.42	163.94 ± 4.97	127.52 ± 6.05
Mercuric chloride				
0.5 μmol/kg	34.38 ± 3.58*	5.99 ± 0.49	153.75 ± 6.46*	128.29 ± 2.71
1.0 μmol/kg	26.96 ± 4.84**	7.68 ± 1.02*	146.80 ± 4.60**	130.43 ± 2.29*
5.0 μmol/kg	20.74 ± 2.53**	12.80 ± 2.30**	140.95 ± 4.82**	140.27 ± 4.16**

Compared with control * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

理组均显著高于对照组($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。

2.2 氯化汞对小鼠睾丸生精细胞超微结构的影响

正常对照组小鼠精原细胞、各级精母细胞结构完整,形态规则,细胞界限清楚,核膜结构正常,核质分布均匀,无固缩,核仁明显,内质网均匀散布,结构完整,线粒体嵴清晰,无肿胀、空泡等现象(图 1a)。0.5 μmol/kg 氯化汞处理组精原细胞和精母细胞结构完整,形态较规则,核内染色质轻度浓缩,核基质轻度淡化,线粒体未见异常改变(图 1b)。1.0 μmol/kg 氯化汞组部分精原细胞和精母细胞核内染色质进一步浓集成块,呈疏松网状,核基质局灶性染色淡化,核轻度固缩,核膜皱折不平滑,核膜间隙局部轻微扩张;部分线粒体中度肿胀,出现空泡化改变(图 1c)。5.0 μmol/kg 氯化汞组有较多的精原细

胞和精母细胞胞质模糊不清,胞质出现溶解现象,核肿胀,核膜破裂,染色质进一步浓集成团,染色深,核基质淡化,线粒体肿胀、空泡化明显,出现嵴溶解现象(图 1d)。

2.3 氯化汞对小鼠附睾精子线粒体超微结构的影响

正常对照组精子线粒体排列整齐,嵴清晰,无肿胀、空泡等现象(图 2a);0.5 μmol/kg 氯化汞处理组精子线粒体排列整齐,嵴清晰,少数线粒体有轻微肿胀、空泡现象(图 2b);1.0 μmol/kg 氯化汞组精子线粒体排列整齐,部分精子线粒体嵴内腔较正常精子线粒体大,可见肿胀、空泡化(图 2c);5.0 μmol/kg 氯化汞组精子线粒体排列略紊乱,少数线粒体边缘模糊,嵴溶解现象明显,线粒体明显肿胀、空泡化(图 2d)。

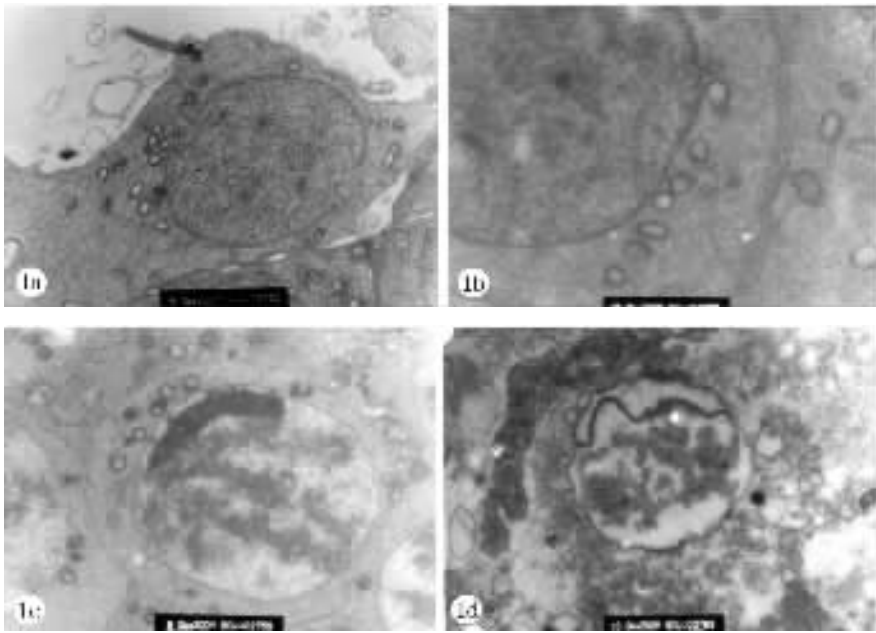


图 1a 对照组生精细胞超微结构(×8000) 图 1b 0.5 μmol/kg 氯化汞组生精细胞超微结构(×15000) 图 1c 1.0 μmol/kg 氯化汞组生精细胞超微结构(×8000) 图 1d 5.0 μmol/kg 氯化汞组生精细胞超微结构(×10000)
 Figure 1a Spermatogenic cell ultrastructure of control (×8000) Figure 1b Spermatogenic cell ultrastructure of 0.5 μmol/kg mercuric chloride group(×15000) Figure 1c Spermatogenic cell ultrastructure of 1.0 μmol/kg mercuric chloride group(×8000) Figure 1d Spermatogenic cell ultrastructure of 5.0 μmol/kg mercuric chloride group (×10000)

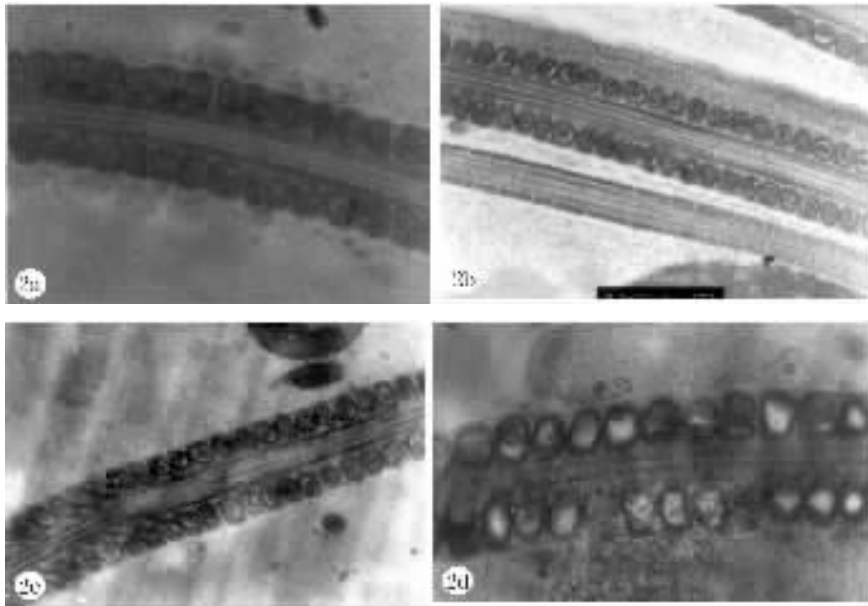


图 2a 对照组精子线粒体超微结构(×30000) 图 2b 0.5 μmol/kg 氯化汞组精子线粒体超微结构(×25000)
 图 2c 1.0 μmol/kg 氯化汞组精子线粒体超微结构(×25000) 图 2d 5.0 μmol/kg 氯化汞组精子线粒体超微结构(×40000)
 Figure 2a sperm mitochondrion ultrastructure of control (×30000) Figure 2b sperm mitochondrion ultrastructure of 0.5 μmol/kg mercuric chloride group (×25000) Figure 2c sperm mitochondrion ultrastructure of 1.0 μmol/kg mercuric chloride group (×25000) Figure 2d sperm mitochondrion ultrastructure of 5.0 μmol/kg mercuric chloride group (×40000)
 Figure 2c sperm mitochondrion ultrastructure of 1.0 μmol/kg mercuric chloride group (×25000) Figure 2d sperm mitochondrion ultrastructure of 5.0 μmol/kg mercuric chloride group (×40000)

3 讨 论

汞是公认的环境有害物,可以通过不同的方式进入

动物或者人类体内,可对多个器官和组织造成伤害,并具有生物累积和生物放大效应,汞对生殖系统造成的损害是不容忽视的一个问题。近年来对汞的生殖毒性已相



当重视,分别从睾丸和附睾脏器系数、曲细精管面积变化^[3,5],睾丸生殖细胞的DNA损伤^[6],睾丸细胞酶活性的变化^[7],神经递质变化^[8],卵母细胞成熟和受精能力^[9],妊娠和胚胎的情况^[5]等方面做了系统的研究,而氯化汞引起的小鼠睾丸生精细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达阳性细胞率和阳性光密度及生精细胞和精子超微结构变化方面的研究很少涉及,为此我们进行了本实验。Bcl-2 是最早在人类细胞中发现的凋亡控制基因,在生命旺盛的组织 and 细胞中表达明显^[10],属于抗凋亡基因;Bax 是 Bcl-2 家族成员之一,是能与 Bcl-2 蛋白结合的同源分子,属于凋亡基因,两者在细胞中的表达水平共同决定了细胞是否凋亡^[11]。本研究结果表明,小鼠睾丸生精细胞 Bcl-2 蛋白表达阳性细胞率、平均光密度值与氯化汞染毒剂量呈负相关;1.0、5.0 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 氯化汞处理组 Bax 蛋白表达阳性细胞率和平均光密度值均显著高于对照组。说明氯化汞抑制了小鼠睾丸生精细胞 Bcl-2 基因表达,且氯化汞浓度越高,其抑制的程度就越深,当氯化汞浓度较低时凋亡基因 Bax 表达水平与正常比无明显升高,当氯化汞浓度升高时,Bax 表达活性就进一步增强,通过 Bcl-2 和 Bax 两者表达水平的改变,导致最后细胞凋亡。其机制可能与我们之前研究的氯化汞致小鼠睾丸生殖细胞的DNA损伤作用^[6]有关。

对小鼠睾丸生精细胞和附睾精子超微结构进行的观察发现,氯化汞可致小鼠睾丸生精细胞和精子超微结构发生明显的病理变化,低剂量组氯化汞对生精细胞和精子超微结构基本无明显改变,只有少数有轻微表现;中剂量组氯化汞处理对生精细胞和精子超微结构改变趋于明显,核开始固缩,生精细胞和精子部分线粒体出现空泡化改变;高剂量组氯化汞对生精细胞超微结构影响更加明显,核碎裂,少数细胞坏死,生精细胞和精子线粒体空泡明显,精子线粒体排列略紊乱,边缘模糊。这说明低剂量组氯化汞对小鼠睾丸生精细胞超微结构的改变并不明显,但随着氯化汞剂量的进一步增加,其病理

变化也更加明显,到高浓度时甚至出现细胞坏死等情况。

综上所述,氯化汞可引起小鼠生精细胞 Bcl-2 蛋白表达减少和 Bax 蛋白表达增加,导致细胞凋亡;并且氯化汞可致小鼠生精细胞和精子超微结构发生病理性改变,高剂量氯化汞还可导致细胞坏死。

参考文献:

- [1] Shenker BJ, Guo TL, Shapiro IM. Induction of apoptosis in human T-cells by methyl mercury: temporal relationship between mitochondrial dysfunction and loss of reductive reserve[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999, 15(1): 23-35.
- [2] 许传杰,李志超,毕晓影,等. MMC 对大鼠脑神经细胞凋亡及 p53 基因表达的影响 [J]. *中国公共卫生*, 1999, 15(4): 285-286.
- [3] 陈小玉,赵一波,张巧. 氯化汞对雄性大鼠生殖毒性的研究[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2001, 19(6): 427-429.
- [4] 周建华,薛莲,杜鹃,等. 镉和氯化汞致体细胞 hprt 基因位点突变的作用和突变频率的研究 [J]. *工业卫生与职业病*, 2002, 28(3): 129-132.
- [5] 金龙金,董杰影,张军明. 小剂量氯化汞对小鼠的生殖毒性 [J]. *环境与健康杂志*, 2004, 21(2): 75-77.
- [6] 金龙金,董杰影,楼哲丰,等. 氯化汞对小鼠睾丸生殖细胞的DNA损伤作用[J]. *环境污染与防治*, 2004, 26(6): 412-414.
- [7] 金明华,孙志伟,石龙,等. 甲基汞对小鼠睾丸细胞酶活性的影响[J]. *中国公共卫生*, 2001, 17(9): 789.
- [8] 李健,刘苹,纳冬荃,等. 妊娠期甲基汞暴露对大鼠的母体毒性[J]. *环境与健康杂志*, 2001, 18(2): 70-72.
- [9] 沈雏干,陈彦,李朝军,等. 汞对雌性小鼠生殖功能及脏器的影响[J]. *卫生研究*, 2000, 29(2): 75-77.
- [10] John C, Reed JC. Mechanisms of Apoptosis[J]. *Am J Pathol*, 2000, 157: 1415-1430.
- [11] 朱国萍,娄阳,徐冲. Bcl-2 蛋白家族与细胞凋亡 [J]. *细胞生物学杂志*, 2001, 23(1): 20-23.

(上接 128 页)

最近, MNT 的标本观察分析过程也逐渐自动化。流式细胞仪以及图像分析系统的应用使得 MNT 的自动化检测成为可能。

1990 年,美国 EPA 遗传毒理计划的 MNT 专家委员会,发表了对 1983 年制订的 MNT 指导规范的修订版,指出 MNT 用于化合物染色体诱变与致癌性的评价和预测,应在标准的规范试验条件下进行并且结合其他检测指标综合评价结果。

1995 年,欧洲经合组织也颁布了有关哺乳动物红细胞 MNT 的新指南。

1997 年,由 Fenech 牵头的国际协作小组成立,旨在搞清不同国家(地区)、不同种族人群的 MN 本底值及影响因素,以确定 MN 是否可以作为肿瘤及其他疾病的生物标志物。

(摘自《微核试验:原理、方法及其在人群监测和毒性评价中的应用》)