

甲醛对雌性大鼠卵巢组织 Fas 凋亡途径 相关基因表达的影响

彭国庆^{1,2}, 钟才高¹, 张琼², 谢颖¹, 龚凤英²

(中南大学 1. 公共卫生学院卫生毒理学系, 长沙 410078; 2. 湘雅医院妇产科, 长沙 410008)

[摘要] 目的:观察甲醛对雌性大鼠卵巢组织 Fas, caspase-8 和 caspase-3 表达的影响,探讨甲醛对雌性大鼠卵巢毒性的分子机制。方法:将 40 只雌性 SD 大鼠随机分为正常对照组和 3 个不同浓度甲醛处理组,腹腔注射甲醛,剂量分别为 20.0, 2.0 和 0.2 mg/kg,每天 1 次,连续 14 d 后处死所有大鼠后取卵巢组织,用 RT-PCR 检测 Fas 和 caspase-8 mRNA 表达,Western 印迹检测 Fas 蛋白表达,分光光度法检测 caspase-8 和 caspase-3 的活性。结果:甲醛染毒组动物卵巢组织 Fas 与 caspase-8 mRNA 表达以及 caspase-8 和 caspase-3 活性明显高于对照组,且随剂量的增加而增加($P < 0.05$)。结论:Fas 基因表达与 caspase 活性的增强可能是甲醛诱导雌性动物卵巢毒性的重要机制。

[关键词] 甲醛; 大鼠; 卵巢毒性; Fas; caspase

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2010.04.010

Effect of formaldehyde on expressions of Fas apoptosis pathway-related genes of ovary tissues in female rats

PENG Guoqing^{1,2}, ZHONG Caigao¹, ZHANG Qiong², XIE Ying¹, GONG Fengying²

(1. Department of Toxicology, School of Public Health, Central South University, Changsha 410078; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of formaldehyde inducing ovarian toxicity in female rats by observing the effect of formaldehyde on the expression of Fas and caspase-8 mRNA, and the activity of caspase-3 and caspase-8 of ovary tissues in female rats. **Methods** Forty female Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a control group and 3 formaldehyde groups at different concentrations. The rats in the formaldehyde groups were intraperitoneally injected different doses of formaldehyde (20.0, 2.0 and 0.2 mg/kg) continuously for 14 days. After 14 days, all rats were sacrificed and their ovaries were collected for detecting the expression of Fas and caspase-8 mRNA with RT-PCR, the protein expression of Fas with Western blot, and the activities of caspase-8 and caspase-3 with spectrophotometric method. **Results** Compared with the control group, the expression of Fas mRNA and its protein and caspase-8 mRNA and the activity of caspase-8 and

收稿日期 (Date of reception) 2009-07-23

作者简介 (Biography) 彭国庆, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事生殖毒理学研究。

通信作者 (Corresponding author) 钟才高, E-mail: zcg54@hotmail.com

基金项目 (Foundation items) 湖南省自然科学基金 (07JJ5094); 湖南省科技厅科技计划项目 (2007FJ4158, 2007SK3028)。 This work was supported by Natural Science Foundation of Hunan Province (07JJ5094), Technology Plan Project from Science and Technology Committee of Hunan Province (2007FJ4158, 2007SK3028), P. R. China.

caspase-3 of ovary tissues in the rats treated with formaldehyde significantly increased with dose ($P < 0.05$). **Conclusion** The increase of Fas gene expression and the activity of caspase-8 and caspase-3 may be the important mechanism of ovarian toxicity induced by formaldehyde in female rats.

Key words: formaldehyde; rat; ovarian toxicity; Fas; caspase

甲醛是城市生态系统中的重要污染物,对人体健康造成了极大的危害,已被世界卫生组织确认为致癌和致畸物质^[1]。甲醛对人体健康的影响涉及诸多方面,主要有眼和呼吸道的刺激症状、过敏性变态反应性皮炎、肝脏损害、肺脏损害、神经毒作用、遗传毒性等^[2]。近年来,甲醛的生殖毒性已经受到研究者的广泛关注。已有研究^[3,4]发现:甲醛能对雌性小鼠的动情周期及卵巢造成不良影响,使雌性小鼠卵巢生殖细胞发生 DNA-蛋白质交联效应。笔者的前期实验^[5]也发现,甲醛对 SD 雌性大鼠卵巢储备功能有一定损害,本实验是在前期实验的基础上,进一步研究甲醛对雌性大鼠卵巢毒性的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

甲醛购自上海溶剂厂,Fas 多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品,Actin 单克隆抗体及二抗购自美国 Sigma 公司,ECL 显色试剂盒购自美国通用公司,TRIzol 为美国 MRC 公司产品,反转录试剂盒、Taq 酶及 dNTP 为美国 Fermentas 公司产品,Fas,caspase-8 和 GAPDH 引物由上海博亚生物技术公司提供,caspase-8 和 caspase-3 活性检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术公司。

1.1.2 动物

健康清洁级 8 周龄雌性 SD 大鼠 40 只,购自中南大学湘雅医学院动物实验学部提供,动物生产许可证编号:SCXK(湘)2006-0002,体质量(160 ± 10)g,发育良好,自由饮水进食,普通饲料食喂养。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制备

受试雌性大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 4

组,即正常对照组、低剂量甲醛组(0.2 mg/kg)、中剂量甲醛组(2.0 mg/kg)、高剂量甲醛组(20.0 mg/kg),每组各 10 只。各试验组动物,在常规消毒下,均采用腹腔注射甲醛,1 次/d,连续 14 d。

染毒结束第 2 天处死动物,取左侧卵巢组织,迅速放入液氮中保存以提取 RNA;取右侧卵巢组织,于液氮中速冻后转于 -70 °C 冰箱保存用于提取蛋白。

1.2.2 观察指标及检测方法

1.2.2.1 Fas 与 caspase-8 mRNA 表达检测

用 RT-PCR 技术测定,总 RNA 提取及反转录反应按试剂盒说明书步骤进行。引物序列均根据 GenBank 数据库,用 Primer3 软件辅助设计,Fas 上游引物:5'-GACAGTCCCTCCCCACCATCTTG-3',下游引物:5'-CCTGCTGTGCCATCGTCTGCTT-3',扩增产物长度 193 bp;caspase-8 上游引物:5'-GTCTCTCAGTTGCCTTTC-3',下游引物:5'-AGCTGTACCTGTCGCCGAGTCCC-3',扩增产物长度 210 bp;GAPDH 上游引物:5'-CTACCCACGGCAAGTCAAT-3',下游引物:5'-GGATGCAGGGATGATGTTCT-3',扩增产物长度 501 bp。PCR 反应总体积为 25 μ L,包括:10 \times 缓冲液 2.5 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L,10 mmol/L dNTP 2.5 μ L,5 μ mol/L GAPDH 上下游引物各 1 μ L,10 μ mol/L Fas(或 caspase-8)上下游引物各 1 μ L,5 U/ μ L TaqDNA 聚合酶 0.3 μ L,cDNA 1 μ L,ddH₂O 12.7 μ L。反应条件:95 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,循环 35 次;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,SYNGENE 凝胶成像系统对各电泳带的光密度进行分析,计算目的基因与同管内参照 GAPDH 的光密度的比值,即为目的基因 mRNA 表达的半定量结果。

1.2.2.2 Fas 蛋白表达测定

用 Western 印迹技术检测蛋白表达,在液氮低温

下用 2 × SDS 裂解液裂解组织,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液中蛋白以 BCA 法测定蛋白浓度,加上样缓冲液混合煮沸 5 min 后,取 20 μg 蛋白上样加入 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,在恒压 80 V 下电泳分离后,以恒压 120 V 将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,用含 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗(Fas 抗体浓度为 1:500, actin 抗体浓度 1:20 000)4 ℃ 过夜,洗膜后加二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,洗膜后用 ECL 液显色 5 min,移至暗室中 X 线片曝光,显影,定影。将 X 线片扫描后,采用 QUANTITY1 软件分析各条带灰度值,将各目的条带灰度值除以同一标本内参照 actin 条带灰度值,再除以同一胶片上对照组的比值,即为该目的蛋白表达量的半定量结果。

1.2.2.3 Caspase-8 和 caspase-3 酶活性检测

用分光光度法检测酶活性,按试剂盒说明书步骤进行。先用裂解液提取蛋白,Bradford 法测定蛋白浓度;在 100 μL 检测体系中:各样本取相同含量的蛋白,加 10 μL caspase-8 或 caspase-3 检测底物,以检测缓冲液补至 100 μL;37 ℃ 孵育约 120 min,待颜色变化比较明显时,酶标仪上测定 405 nm 波长的吸光度值;根据标准曲线求得各样本酶活性。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计分析软件,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Fas mRNA 及蛋白表达

RT-PCR 结果显示,对照组大鼠卵巢组织 Fas mRNA 低表达,甲醛可使大鼠卵巢组织 Fas mRNA 表达明显增多,且随着浓度的增高,Fas mRNA 表达增强(表 1,图 1);Western 印迹结果显示,对照组大鼠卵巢组织有少量 Fas 蛋白表达,甲醛可使大鼠卵巢组织 Fas 蛋白表达增多,且随着浓度的增高,Fas 蛋白表达增强(表 1,图 2)。

表 1 甲醛对雌性大鼠卵巢组织 Fas 基因及蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Effects of formaldehyde on Fas gene and protein expression of ovary tissues in female rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	Fas/GAPDH	Fas/actin
对照组	0.23 ± 0.06	1.00 ± 0.00
低剂量组	0.47 ± 0.05 *	1.82 ± 0.17 *
中剂量组	0.61 ± 0.09 *△	2.65 ± 0.26 *△
高剂量组	0.79 ± 0.11 *△#	3.80 ± 0.23 *△#

与对照组比较,* $P < 0.05$;与低剂量组比较,△ $P < 0.05$;与中剂量组比较,# $P < 0.05$ 。

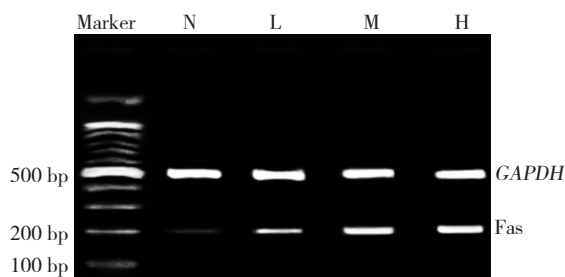


图 1 甲醛对雌性大鼠卵巢组织 Fas mRNA 表达的影响。Marker:DNA 标准物;N:对照组;L:低剂量组;M:中剂量组;H:高剂量组。

Fig.1 Effects of formaldehyde on Fas mRNA of ovary tissues in female rats. Marker:DNA marker; N: Control group; M: Medium dose group; L: Low dose group; H: High dose group.

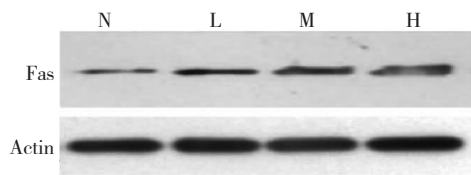


图 2 甲醛对雌性大鼠卵巢组织 Fas 蛋白表达的影响。N:对照组;L:低剂量组;M:中剂量组;H:高剂量组。

Fig.2 Effects of formaldehyde on the expression, of Fas protein of ovary tissues in female rats. N: Control group; M: Medium dose group; L: Low dose group; H: High dose group.

2.2 Caspase-8 mRNA 和 caspase-8, caspase-3 酶活性

对照组大鼠卵巢组织 caspase-8 mRNA 仅有微弱表达,低浓度甲醛即可使大鼠卵巢组织 caspase-8 mRNA 表达增多,随着浓度的增高, caspase-8

mRNA 表达增强(表 2,图 3)。对照组大鼠卵巢组织 caspase-8 和 caspase-3 酶活性均较低,甲醛染毒后, caspase-8 和 caspase-3 酶活性明显增强,且

caspase-8 和 caspase-3 酶活性与甲醛浓度呈明显的剂量依赖性(表 2)。

表 2 甲醛对雌性大鼠卵巢组织 caspase-8 mRNA 表达及 caspase-8, caspase-3 酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 2 Effects of formaldehyde on caspase-8 mRNA expression, caspase-8 and caspase-3 activity of ovary tissues in female rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	caspase-8/GAPDH	caspase-8 酶活性	caspase-3 酶活性
对照组	0.12 ± 0.05	9.018 ± 1.486	15.588 ± 3.561
低剂量组	0.31 ± 0.07 *	26.101 ± 1.370 *	31.180 ± 2.221 *
中剂量组	0.48 ± 0.10 * [△]	37.030 ± 2.806 * [△]	48.190 ± 3.157 * [△]
高剂量组	0.56 ± 0.08 * [△]	51.065 ± 3.103 * ^{△#}	74.380 ± 3.911 * ^{△#}

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中剂量组比较, # $P < 0.05$ 。

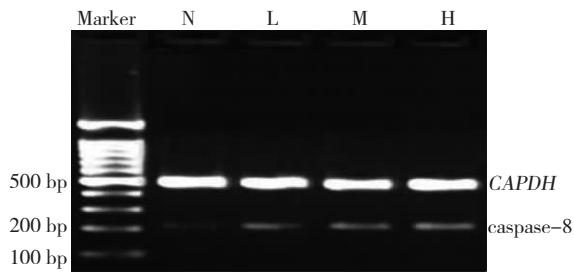


图 3 甲醛对雌性大鼠卵巢组织 caspase-8 mRNA 的影响。Marker: DNA 标准物; N: 对照组; L: 低剂量组; M: 中剂量组; H: 高剂量组。

Fig. 3 Effects of formaldehyde on caspase-8 mRNA of ovary tissues in female rats. Marker: DNA marker; N: Control group; M: Medium dose group; L: Low dose group; H: High dose group.

3 讨 论

甲醛是一种无色、具有强烈刺激性气味的气体,是住宅室内常见的装修型化学性空气污染物。环境中甲醛以其来源广、持续时间长、毒性大等特点受到人们广泛关注。国内外已有关于甲醛对动物生殖毒性危害的报道^[5]。

Fas 途径是介导细胞凋亡的重要信号转导通路。Mor 等^[6]研究发现: Fas 介导的细胞凋亡参与了哺乳动物卵泡的发育及闭锁过程^[7]。Porter 等^[8-9]发现: 在哺乳动物正常的卵巢颗粒细胞及卵

泡上均有 Fas 及其配体的表达,但闭锁的卵泡上 Fas 表达增强。本研究发现在正常大鼠卵巢组织中, Fas mRNA 及蛋白均呈低表达,而经甲醛染毒后,卵巢组织中的 Fas mRNA 及蛋白表达均明显增多,且随甲醛浓度越高, Fas 的表达越强;提示甲醛可能通过上调 Fas 的表达,抑制卵母细胞的增殖及诱导凋亡,从而导致卵泡闭锁。

Caspase 是 Fas 介导的细胞凋亡途径中的蛋白水解酶, Fas 与其配体结合后,可激活 caspase-8,活化的 caspase-8 又可通过信号的级联反应,将具有效应作用的 caspase-3 激活, caspase-3 可直接作用于 DNA 介导细胞凋亡的发生^[10]。在人类卵泡细胞凋亡和卵泡闭锁过程中, caspase-3 的活性比 DNA 碎片出现的时间更早,故认为 caspase 活化后导致的 DNA 碎片可能是卵泡闭锁的重要机制^[11-12]。本实验结果显示: 在正常大鼠卵巢组织中, caspase-8 mRNA 仅有弱表达, caspase-8 和 caspase-3 活性较低,甲醛染毒后, caspase-8 mRNA 的表达明显增多, caspase-8 和 caspase-3 活性增强,其随着甲醛浓度的增高, caspase-8 mRNA 的表达越多, caspase-8 和 caspase-3 的活性越强,呈明显的浓度梯度依赖性。因此, caspase-8 和 caspase-3 可能参与了甲醛诱导的卵巢细胞凋亡及卵泡闭锁。

综上所述,甲醛可能通过诱导 Fas 表达、促进 caspase-8 和 caspase-3 的活性来促进卵巢细胞凋

亡及卵泡闭锁, Fas 介导的细胞凋亡途径可能是甲醛卵巢毒性的重要机制, 因此, 抑制 Fas 介导的细胞凋亡, 是治疗甲醛所致的卵巢毒性的可能措施。

参考文献:

- [1] Kupczewska-Dobacka M. Assessment of carcinogenicity of formaldehyde based on the newest literature data [J]. *Med Pr*, 2007, 58(6): 527-539.
- [2] Tang X, Yang B, Anh D, et al. Formaldehyde in China: production, consumption, exposure levels, and health effects [J]. *Environ Int*, 2009, 35(8): 1210-1224.
- [3] 王伟, 唐明德, 易义珍, 等. 甲醛对雌性小鼠动情周期及卵巢的影响 [J]. *实用预防医学*, 2002, 9(6): 641-643.
WANG Wei, TANG Mingde, YI Yizhen, et al. The effects of formaldehyde on estrous cycle and ovary of female mice [J]. *Practical Preventive Medicine*, 2002, 9(6): 641-643.
- [4] 刘丹丹, 王博. 气态甲醛致雌性小鼠生殖细胞 DNA-蛋白质交联的研究 [J]. *生态毒理学报*, 2006, 1(3): 249-253.
LIU Dandan, WANG Bo. Study on DNA-protein crosslinks of reproductive cell of female mice induced by formaldehyde [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2006, 1(3): 249-253.
- [5] 彭国庆, 钟才高, 张琼, 等. 甲醛对雌性大鼠卵巢储备功能的影响 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2010, 22(1): 32-34.
PENG Guoqi, ZHONG Caigao, ZHANG Qiong, et al. Effects of formaldehyde on ovarian reserve function in female rats [J]. *Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis*, 2010, 22(1): 32-34.
- [6] 谢颖. 甲醛的生殖毒性 [J]. *工业卫生与职业病*, 2002, 28(2): 118-120.
XIE Yin. Reproductive toxicity of formaldehyde [J]. *Industrial Health and Occupational Diseases*, 2002, 28(2): 118-120.
- [7] Mor G, Straszewski S, Kamsteeg M. Role of the Fas/Fas ligand system in female reproductive organs: survival and apoptosis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64(9): 1305-1315.
- [8] Porter D A, Vickers S L, Cowan R G, et al. Expression and function of Fas antigen vary in bovine granulosa and theca cells during ovarian follicular development and atresia [J]. *Biol Reprod*, 2000, 62(1): 62-66.
- [9] Porter D A, Harman R M, Cowan R G, et al. Relationship of Fas ligand expression and atresia during bovine follicle development [J]. *Reproduction*, 2001, 121(4): 561-566.
- [10] Jian X, Cheng G, Tang H F, et al. Ardisiposide I induces apoptosis in human glioblastoma cells through a caspase-8-independent FasL/Fas-signaling pathway [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2009, 27(2): 264-270.
- [11] Glamoclija V, Vilovi ć K, Saraga-Babi ć M, et al. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells [J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(2): 426-431.
- [12] Uchida K, Nishizuka M, Ohmori D, et al. Follicular epithelial cell apoptosis of atretic follicles within developing ovaries of the mosquito *Culex pipiens pallens* [J]. *J Insect Physiol*, 2004, 50(10): 903-912.

(本文编辑 彭敏宁)