

镉对小鼠精子和生精细胞超微结构及生精细胞 *bcl-2*、*bax* 基因表达的影响

金龙金* 方周溪¹ 楼哲丰¹ 张 婵¹ 陈锡文²

(温州医学院生命科学院, 浙江省医学遗传学重点实验室;

¹生物学实验中心; ²实验动物中心; 温州市 325035)

摘要 研究镉暴露对小鼠附睾精子和睾丸生精细胞超微结构的变化以及镉对生精细胞凋亡相关基因 *bcl-2*、*bax* 表达水平的影响。采用 24 只雄性 ICR 小鼠随机分为 4 组, 每组 6 只, 分别以 0.183、0.915、1.83 mg/kg 氯化镉腹腔注射, 每天 1 次, 连续 5 次, 设阴性对照生理盐水组。于第 6 天透射电镜观察附睾精子超微结构、睾丸生精细胞核和线粒体超微结构的变化, 免疫组化方法检测生精细胞 Bcl-2、Bax 表达水平。透射电镜观察显示, 0.183 mg/kg 组精子超微结构无显著性变化, 0.915 mg/kg 组精子头部两侧膜与头部胞质间隙轻微扩大, 线粒体嵴间腔扩大且轻度空泡化, 但与对照组相比无统计学意义($P>0.05$)。1.83 mg/kg 组头部两侧膜与胞质间隙扩大, 与对照组相比有显著性差异($P<0.05$), 尾部线粒体嵴间腔扩大且轻度空泡化, 与对照组相比有显著性差异($P<0.05$)。3 种剂量处理组睾丸生精细胞核超微结构异常发生率显著高于对照组($P<0.05$), 且随着处理浓度的升高异常发生率升高; 1.83 mg/kg 组线粒体肿胀空泡化发生率显著高于对照组($P<0.05$)。3 种剂量实验组生精细胞 Bcl-2 表达水平(吸光度)显著低于对照组($P<0.01$), 0.915 mg/kg 组 Bax 表达水平显著高于对照组和 0.183、1.83 mg/kg 组($P<0.01$)。3 种剂量实验组 Bcl-2/Bax 吸光度比值显著低于对照组($P<0.01$); 0.915 mg/kg 组 Bcl-2/Bax 比值显著低于 1.83 mg/kg 组($P<0.01$)。上述结果提示: 高浓度镉诱导附睾精子超微结构改变, 高中低浓度镉致睾丸生精细胞超微结构的改变, 生精细胞超微结构发生凋亡现象。镉对 Bcl-2、Bax 表达水平的改变可能是生精细胞凋亡的分子机制之一。

关键词 镉; 精子; 生精细胞; 超微结构; Bcl-2; Bax

长期以来, 在生殖毒理学的研究中人们总是把化学物质对胚胎或胎儿的潜在毒性效应做为研究的重点。然而近年来的研究发现: 人群中一些生殖功能障碍(如不育症、生育力低下、流产)的发生与化学物质对性腺的直接毒性作用有关。镉是已知的最易在体内蓄积并对生殖系统有较敏感的环境毒物。大量的研究表明少量的镉进入人体即可通过生物放大作用和积累, 对动物器官特别是睾丸及其细胞产生毒性作用, 作者以往研究显示, 氯化镉对小鼠睾丸发育、精子生成数量和质量具有生殖毒性^[1], 但镉对生殖细胞的毒性作用的机制尚不完全清楚。镉引起的 Bcl-2 和 Bax 表达水平变化的研究还不多。

AR 级氯化镉(中国医药上海化学试剂公司); Bcl-2 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物制剂有限公司), Bax 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物制剂有限公司)。戊二醛(中国医药集团上海化学试剂公司), 钨酸(TED FELLA ING 公司), 环氧树脂(Epon812, Serva 公司)。

1.2 动物分组及处理

清洁级健康雄性 ICR 小鼠 24 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)。随机分为 4 组, 每组 6 只, 实验组 1、2、3 分别腹腔注射氯化镉 0.183、0.915、1.83 mg/kg, 每天 1 次, 连续 5 天, 对照组注射等体积生理盐水。

1 材料与方

1.1 试剂

收稿日期: 2006-02-17 接受日期: 2006-03-31

浙江省温州市科技发展计划项目(No.S2002A018)

* 通讯作者。Tel: 0577-86689780, E-mail: jlj@wzmc.net

于第6天处死小鼠,取睾丸和附睾进行各项指标测定。

1.3 精子和生精细胞超微结构观察

取小鼠一侧附睾和睾丸分别用2.5%戊二醛前固定,1%锇酸后固定,环氧树脂包埋,超薄切片,日立H7500型透射电镜观察。观察精子超微结构变化的同时统计精子头部(纵切面)中段膜与胞质间距离(每组随机测量30个精子,每个精子测量精子头中段膜与胞质间距最大的5个部位数值和最小的5个部位数值,取其平均值)和精子尾部线粒体空泡状发生率(每组观察400个线粒体)。对睾丸生精细胞超微结构变化的观察,统计细胞核异常和线粒体空泡的比率。

1.4 Bcl-2、Bax 免疫组化检测

取小鼠另一侧睾丸,10%甲醛固定,石蜡包埋,切片。每组各取12张切片,按试剂盒操作说明书分别进行Bcl-2和Bax免疫组化反应,阴性对照用PBS代替一抗。40倍物镜观察胞浆呈棕色者为阳性反应细胞,应用CMIA彩色医学图像分析系统(华东理工大学研制)测定Bcl-2、Bax吸光度(光密度值)。

1.5 统计学处理

应用SPSS11.0软件分析,均数的两两比较采用单因素方差分析,百分率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 镉暴露小鼠附睾精子超微结构的变化

对照组精子头部纵切面呈杆状,核电子密度极高,顶体明显,头部两侧膜呈锯齿状紧贴头部细胞质,精子尾部膜明显,线粒体结构完整,嵴环状或不规则,尾部横切面9+2结构、致密纤维和纤维鞘明显规则。0.183 mg/kg组精子头和线粒体超微结构与对照组相比无变化,0.915 mg/kg组精子头部两侧膜与头部胞质间隙轻微扩大,但无统计学意义。1.83 mg/kg组头部两侧膜与胞质间隙扩大,与对照组相比有显著性差异($P<0.05$),尾部中段纵切线粒体嵴间腔扩大且轻度空泡化,发生率与对照组相比有显著性差异($P<0.05$)(图1,表1),表明1.83 mg/kg氯化镉对精子膜内侧和线粒体结构有损伤作用。

2.2 镉暴露小鼠睾丸生精细胞超微结构的变化

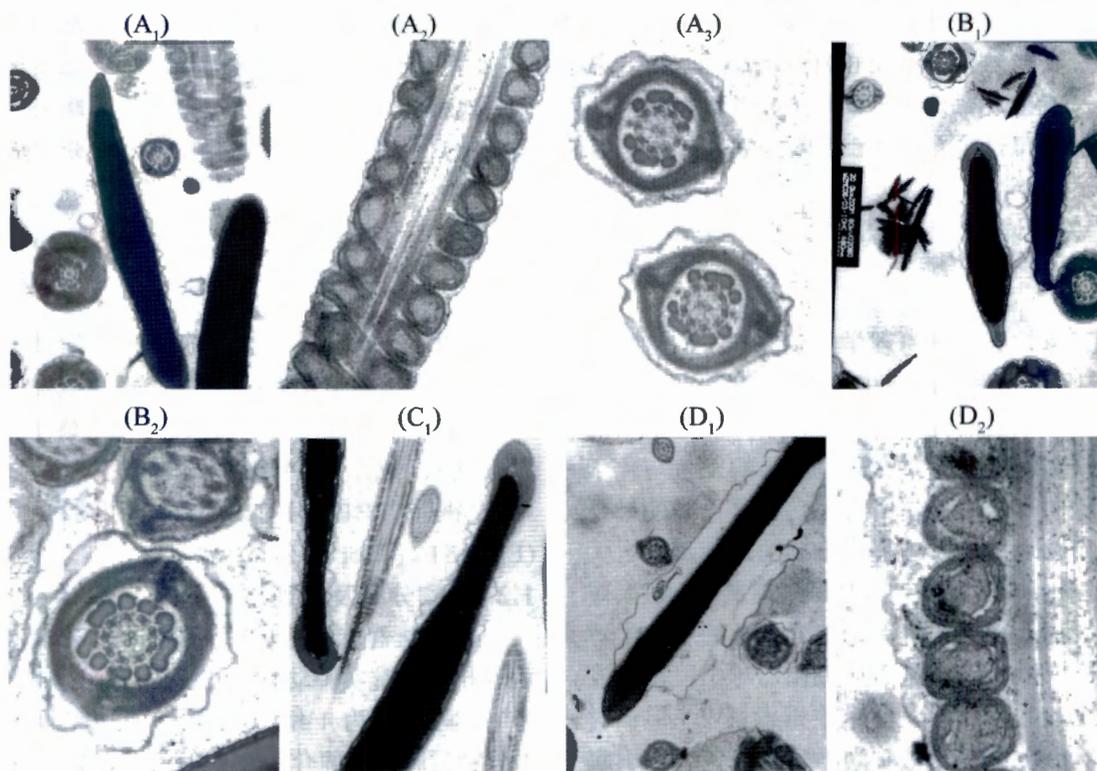


图1 镉暴露小鼠附睾精子超微结构图

A: 对照组精子,其中A₁:精子头部(20 000 \times); A₂: 精子尾部线粒体(40 000 \times); A₃: 精子尾部横切面(70 000 \times)。B: 0.183 mg/kg处理组精子,其中B₁: 精子头部(20 000 \times); B₂: 精子尾部横切面(70 000 \times)。C: 0.915 mg/kg处理组精子头部(示膜与胞质之间间隙轻度扩大,20 000 \times)。D: 1.83 mg/kg处理组精子,其中D₁: 精子头部(示两侧膜与胞质之间间隙扩大,20 000 \times); D₂: 精子尾部线粒体(示嵴间腔扩大,80 000 \times)。

表1 镉对小鼠附睾精子超微结构变化的影响

分组	n	精子头部膜与胞质间隙(nm) ($\bar{x}\pm s$)	线粒体空泡发生率(%)
对照组	6	77.74±24.87	11.25
0.183 mg/kg 组	6	74.97±12.86	13.50
0.915 mg /kg 组	6	82.59±10.36	14.25
1.83 mg/kg 组	6	138.21±36.00*	36.75*

与对照组相比, * $P<0.05$ 。

对照组观察 50 个睾丸生精细胞、400 个线粒体显示超微结构正常; 0.183 mg/kg 组 52% 的睾丸生精细胞核超微结构异常, 与对照组相比差异有显著性($n=50$, $P<0.05$), 线粒体未见异常。0.915 mg/kg 组 72% 的睾丸生精细胞核超微结构异常, 与对照组相比差异有显著性($n=50$, $P<0.05$), 其中部分细胞核异常程度与 0.183 mg/kg 组相近, 部分细胞核异常程度较 0.183 mg/kg 组严重, 少数线粒体中度空泡化(5%, $n=400$)。1.83 mg/kg 组 80% 的睾丸生精细胞核超微结构异常, 与对照组相比差异有显著性($n=50$, $P<0.05$); 42% 的线粒体肿胀空泡化, 与对照组和中低浓度组相比差异有显著性($n=400$, $P<0.05$)。以上超微结构变化的形态描述及图片参见作者以往报道^[2]。

2.3 镉暴露小鼠睾丸生精细胞 Bcl-2、Bax 表达水平的改变

表 2 结果显示, Bcl-2 表达平均光密度值 3 种剂量实验组显著低于对照组($P<0.01$), 表明氯化镉抑制 Bcl-2 表达; Bax 表达平均光密度值 0.915 mg/kg 组显著高于对照组和 0.183 mg/kg、1.83 mg/kg 组($P<0.01$), 表明 0.915 mg/kg 组 Bax 表达量最高, 而 1.83 mg/kg 组平均光密度值与对照组相比显著降低($P<0.05$), 说明 1.83 mg/kg 组 Bax 表达量最低; 3 种剂量实验组 Bcl-2/Bax 光密度比值平均值显著低于对照组($P<0.01$), 其中 0.915 mg/kg 组 Bcl-2/Bax 光密度比值最低, 显著低于 0.183 mg/kg 组和 1.83 mg/kg 组($P<0.01$), 推测通过 Bcl-2/Bax 协同对细胞凋亡作用的效率最为显著。

3 讨论

睾丸是一种具有高度增殖能力的组织, 对镉非常敏感。研究表明镉可引起睾丸生精障碍, 从而引起不育^[3]。镉的体内和体外实验研究发现镉对肾细胞凋亡是镉的肾毒性分子机制之一^[4,5], 也有报道显示镉引起睾丸细胞凋亡的增加^[6], 精子凋亡或坏死

表2 氯化镉对小鼠睾丸生精细胞 Bcl-2、Bax 表达水平及 Bcl-2/Bax 比值的影响

分组	Bcl-2 光密度值 ($\bar{x}\pm s$)	Bax 光密度值 ($\bar{x}\pm s$)	Bcl-2/Bax 光密度比值 ($\bar{x}\pm s$)
对照组	2.14±0.40	0.40±0.12	5.49±0.86
0.183 mg/kg 组	0.57±0.13**	0.42±0.15	1.42±0.21**
0.915 mg /kg 组	0.41±0.03**	1.18±0.14** $\Delta\Delta$	0.35±0.02** $\Delta\Delta$
1.83 mg/kg 组	0.37±0.05**	0.18±0.03*	2.05±0.14**

与对照组比较, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; 与 1.83 mg/kg 组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

数量增多都可导致不育^[7]。Taboga 等^[8]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。我们用电镜观察镉暴露小鼠睾丸生精细胞和附睾精子的超微结构变化, 结果发现, 0.183 mg/kg、0.915 mg/kg 剂量组睾丸生精细胞超微结构上的变化表现为细胞凋亡现象, 如核内染色质轻度浓集、核膜模糊、核轻度固缩, 核膜间隙局部轻微扩张, 且核异常细胞的发生率显著高于对照组组。1.83 mg/kg 组细胞核结构进一步受损, 受损细胞数更多且部分细胞发生坏死现象(如核肿胀、核膜溶解、染色质高度浓集呈块); 1.83 mg/kg 组细胞线粒体结构受损。对附睾精子超微结构的影响未见明显细胞凋亡的染色质变化, 也未见凋亡小体的产生。1.83 mg/kg 组头部两侧膜与胞质间隙扩大, 尾部中段纵切线粒体嵴间腔扩大且轻度空泡化, 说明仅精子膜内侧结构和线粒体结构受损伤; 中低浓度氯化镉组未引起精子超微结构的显著变化, 比相同剂量对睾丸生精细胞的损伤轻。从睾丸生精细胞和附睾精子受镉损伤的程度显示睾丸是镉毒性敏感器官。作者^[1]曾用 2 mg/kg 体重镉慢性腹腔暴露雄性小鼠, 引起雄性小鼠的精子生成、生育能力的下降, 认为镉暴露可能通过增加睾丸生精细胞的凋亡而影响小鼠的生育能力。

细胞凋亡的发生机制十分复杂, 研究认为细胞凋亡与许多基因表达有密切关系, *bcl-2/bax* 基因家族是与细胞凋亡关系密切的一组相关基因, 它通过表达的蛋白发挥抑制或促进细胞凋亡的作用。研究发现 Bcl-2/Bax 家族蛋白在凋亡刺激因素存在的条件下决定细胞凋亡的发生。但有报道 p53 具有介导睾丸生精细胞的凋亡并通过这一机制导致异常精子数量的增加和生育能力的降低^[9,10]。这些蛋白质表达的数量可能决定着细胞凋亡的发生。我们应用免疫组化法测定镉对 Bcl-2、Bax 表达水平的变化, 随着镉

剂量的增加, Bcl-2 表达水平随之下降, 抗凋亡性能降低, 在 0.915 mg/kg 氯化镉急性暴露时, Bax 表达水平增强, 该基因表达水平的增加可能又进一步促进细胞凋亡的发生。但是随着镉剂量的进一步增加达到 1.83 mg/kg 时, Bax 表达反而下降, 推测在高剂量镉暴露时细胞严重受损, 基因被破坏而表达水平下降。从 Bcl-2/Bax 表达比值观察, 0.915 mg/kg 组比值最低, 推测 Bcl-2/Bax 协同作用引起的细胞凋亡最显著。

参考文献 (References)

- [1] 金龙金等。中国男科学杂志, 2004, 18: 15
- [2] 金龙金等。中华劳动卫生职业病杂志, 2005, 23: 271
- [3] Holt WV *et al.* *Reprod Fertil Dev*, 1996, 8: 219
- [4] Stinson LS *et al.* *Am J Nephrol*, 2003, 23: 27
- [5] Gennari A *et al.* *Toxicology*, 2003, 183: 211
- [6] Poliandri AH *et al.* *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, 190: 17
- [7] Larson KL *et al.* *Hum Reprod*, 2000, 15: 1717
- [8] Taboga SR *et al.* *Cytobios*, 1999, 99: 39
- [9] Yin Y *et al.* *Dev Biol*, 1998, 204: 165
- [10] Blanco-Rodriguez J *et al.* *Bio Reprod*, 1999, 61: 1541

Effects of Cadmium on the Ultrastructure of Mice Sperm and Spermatogenic Cell and Gene Expression of *bcl-2*, *bax* in Male Mice

Long-Jin Jin*, Zhou-Xi Fang¹, Zhe-Feng Lou¹, Chan Zhang¹, Xi-Wen Chen²

(College of Life Sciences, Key Research Laboratory for Medical Genetics of Zhejiang; ¹Central Laboratory of Biology; ²Laboratory Animal Center; Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract The aim of the research is to study the effects of cadmium on the ultrastructure of mice sperm and spermatogenic cell and gene expression of *bcl-2*, *bax* in mice spermatogenic cell. Twenty-four male mice were divided into four groups. Three groups were treated with cadmium chloride by peritoneal injection using doses of 0.183 mg/kg, 0.915 mg/kg and 1.83 mg/kg respectively, once per day and five times in total. One normal control group were treated with saline. After exposure of cadmium chloride for five days, the ultrastructure change of mice sperm and the nucleus and mitochondrion of spermatogenic cell was observed by the transmission electron microscope. The expression level of Bcl-2, Bax in spermatogenic cell was assayed by the immunohistochemical method. The electron microscope observation showed that sperm ultrastructure of 0.183 mg/kg group was not seen abnormal plasma membrane and mitochondrion and for 0.915 mg/kg group there was a bit more distant from plasma membrane to cytoplasm with some big vacuolisations in enlarged mitochondrial intracrystal space, but there was no significant differences compared with control group ($P>0.05$). There was significant differences ($P<0.05$) between the 1.83 mg/kg group and control group for the sperm ultrastructure of plasma membrane and mitochondrial intracrystal space. In three treated groups, the abnormal rate for the ultrastructure of spermatogenic cell nucleus is much higher than that of the control ($P<0.05$), more changes with concentrated cadmium. The rate of mitochondrial vacuolization is much higher in 1.83 mg/kg group than that of the control ($P<0.05$). The expression level of Bcl-2 and the ratio of Bcl-2 to Bax in three treated groups (0.183 mg/kg, 0.915 mg/kg, 1.83 mg/kg groups) were lower than that of control group ($P<0.01$) respectively. The expression level of Bax of 0.915 mg/kg group was higher than that of control group and 1.83 mg/kg group ($P<0.01$) respectively. The ratio of Bcl-2 to Bax in 0.915 mg/kg group was significantly lower than that in 1.83 mg/kg group ($P<0.01$). Taken together, we can propose that abnormal ultrastructure in sperm was induced by high dose cadmium. The abnormal ultrastructure and apoptosis in spermatogenic cell could be induced by low, middle or high dose cadmium. The change of expression level of Bcl-2, Bax induced by cadmium would be one of the possible mechanism for apoptosis in spermatogenic cell.

Key words cadmium; sperm; spermatogenic cell; ultrastructure; Bcl-2; Bax

Received: February 17, 2006 Accepted: March 31, 2006

This work was supported by Wenzhou Science & Technology Development Program (No.S2002A018)

*Corresponding author. Tel: 86-577-86689780, E-mail: jlj@wzmc.net