

# 对 - 壬基酚染毒导致小鼠生精细胞损伤机制

章劲夫\* 单圣道 桂亚平 王 磊<sup>1</sup>(同济大学附属同济医院泌尿外科, 上海 200065; <sup>1</sup> 同济大学环境科学与工程学院  
污染控制与资源化国家重点实验室, 上海 200092)

**摘要** 为探讨对 - 壬基酚(*p*-nonylphenol, *p*-NP)摄入导致小鼠生精细胞损伤的机制, 将野生雄性小鼠分别用 10% (V/V) *p*-NP 腹腔注射 7 天和 14 天, 应用苏木精 - 伊红染色、DNA 片段化和 Western 印迹等检测方法观察 *p*-NP 干预后小鼠生精细胞损伤和凋亡的状况及其对 Bcl-2 和 Bax 表达的影响。结果显示, *p*-NP 干预 7 天后, 小鼠睾丸大体形态和睾丸组织细胞学形态均基本正常, 但 DNA 片段化检测证明小鼠生精细胞出现 DNA 片段化的细胞凋亡典型表现; *p*-NP 干预 7 天和 14 天后, C57 小鼠睾丸组织 Bcl-2 表达强度下降, Bax 表达增加, Bcl-2/Bax 比值下降。提示 *p*-NP 对小鼠睾丸的毒性损伤机制之一是诱导生精细胞凋亡, *bcl-2* 和 *bax* 基因参与了其引起小鼠生精细胞凋亡的调控过程。

**关键词** 对 - 壬基酚; Bcl-2; Bax; 睾丸; 细胞凋亡

过去的几十年, 人们为了提高农业生产力和发展现代工业, 合成了数以十万计的新有机化学物。由于长期而广泛地应用这些有机化学物, 使其在环境中大量滞留, 对水体、空气、土壤产生严重持续性的有机污染, 被称为永久性有机污染物(permanent organic pollutants, POPs), 其中包括环境内分泌干扰物质(environmental endocrine disrupters, EEDs)——环境激素。新近研究表明, 水体污染已成为 EEDs 影响人体的重要途径。日本 1998 年进行的全国范围内公共水域及地下水内分泌干扰物调查表明, 水源中检出频率较高的是对 - 壬基酚(*p*-nonylphenol, *p*-NP, 76%)、双酚 A (bisphenol A, BPA, 68%)、4-*t*-辛基酚(4-*tert*-octylphenol, 62%), 这与我国长江流域重庆段 2001 年的调查结果基本类似, 上海地区水环境中亦以 *p*-NP 检出率为最高, 这给饮用水、农产品质量、生态环境和人体健康带来严重影响。本研究采用雄性 C57 小鼠 *p*-NP 染毒模型, 探讨 *p*-NP 摄入导致睾丸组织生精细胞损伤的机制<sup>[1,2]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂** *p*-NP, 分子量为 220.38, Baker 公司产品, 由中国科学院上海分院采购。溶剂花生油为市售鲁花牌花生油, 由山东莱阳鲁花花生油有限公司生产出品。

**1.1.2 动物** 实验中所用的 C57 小鼠均为 3~4 月

龄的雄鼠。所有小鼠用塑料笼饲养(每笼小于 4 只), 并保证其能自由取得食物和水, 房间温度维持在(22±2) °C 伴有 12 h 昼夜节律。实验组腹腔注射 10% *p*-NP 14 次, 每次间隔 24 h, 对照组注射相同体积溶剂花生油。实验时均在 *p*-NP 注射后 3 h, 处死动物并取得睾丸, 每组实验至少有 3 只小鼠作重复。所有实验方法均遵循实验动物管理委员会制定的关于动物饲养和使用的规定并得到当地动物饲养和使用管理委员会的批准。

### 1.2 方法

**1.2.1 睾丸组织学分析** 3~4 个月龄实验 C57 小鼠按实验要求 *p*-NP 干预后麻醉, 用 4% 多聚甲醛灌流, 之后取出睾丸, 酒精脱水, 二甲苯透明, 随后包埋在石蜡中, 用莱卡切片机切出 7 μm 的睾丸切片。切片按照标准操作进行苏木金 - 伊红染色, 并在莱卡显微镜下观察和拍照。

**1.2.2 DNA 片段化检测** 按实验要求 *p*-NP 干预后的 C57 小鼠颈椎脱臼法处死, 解剖获得双侧睾丸, 去除其表面膜后用枪头捣碎睾丸组织, 蛋白酶 K 法 54 °C 消化过夜。用等体积酚抽提二次后, 液相用无水乙醇 -70 °C 沉淀 2 h, 离心, 37 °C TE 溶解过

收稿日期: 2008-12-19 接受日期: 2009-08-10

国家自然科学基金(No.20677043)和上海市自然科学基金(No.05ZR14119)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 021-67116631, Fax: 021-56050502, E-mail: jinfulzhang@yahoo.com.cn

夜。DNA 样品用 RNase 处理后定量, 取 30  $\mu\text{g}$  DNA 上样于 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 紫外检测和拍照。

**1.2.3 Western 印迹分析** 颈椎脱臼法处死动物取得 C57 小鼠睾丸组织, 样品用 20 倍体积蛋白抽提液 (Pierce 公司) 匀浆, 10 000 r/min 离心 5 min 得到蛋白质溶液。BSA 作为标准样品, 用 Pierce 公司试剂盒测定每个样品的蛋白质浓度。取等量蛋白与上样缓冲液混合, 100  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 5 min, 样品经 10% SDS-PAGE 胶分离后, 电转移至硝酸纤维素膜上。膜用 5% 脱脂牛奶 (TBST 稀释) 封闭 1 h 后, 加 1:100 兔抗 Bcl-2/Bax (Santa Cruz 公司) 于 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 作为二抗 (Santa Cruz 公司)。每 2 步间用 TBST 洗涤膜 3 次, 每次 10 min, 最后用 DAB 显色特异蛋白。使用 Axioplan 2 imaging 显微图象分析系统对条带强度进行分析得出半定量数据, 并进行比较。

### 1.3 统计学方法

采用 Prism 统计软件进行分组比较  $t$  检验, 以  $P>0.05$  为差异无统计学意义, 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 组织学观察

p-NP 处理 14 天后, 实验组和对照组相比, 雄鼠睾丸大体形态无太大差异; 7  $\mu\text{m}$  石蜡切片用常规苏木精-伊红染色, 结果显示实验组鼠睾丸组织形态仍较为正常 (图 1)。

### 2.2 p-NP 处理后的小鼠睾丸组织出现 DNA 片段化

分别用 2%、4%、6% 和 10% 的 p-NP 干预 C57 小鼠 14 天后, 小鼠睾丸生精细胞 DNA 片段化检测结果显示, 盐水处理的对照鼠未见有片段化的 “ladder” (图 2 中的白色条带 2), 而 10% NP 处理后出现典型的片段化 “ladder” (图 2 中的白色条带 6), 提示小鼠睾丸生精细胞出现凋亡。

### 2.3 p-NP 处理后睾丸生精细胞 Bcl-2 表达下降而 Bax 表达上升

Western 印迹检测 Bcl-2 和 Bax 的条带表达强度, 结果显示, 腹腔注射 10% p-NP 7 天、14 天和注射溶剂花生油 14 天 (对照) 后小鼠睾丸组织 Bcl-2 的条带强度分别为  $130.79\pm 1.59$ 、 $65.36\pm 2.67$  和  $150.82\pm 1.98$  (图 3); Bax 的条带强度分别为  $186.72\pm 1.66$ 、 $208.56\pm 1.72$  和  $160.34\pm 1.39$  (图 4)。提示随着 p-NP 作用时间的延长, Bcl-2 表达量减少, 而 Bax 细胞表达量增加, Bcl-2/Bax 比值下降, 睾丸生精细胞凋亡增加。对结果进行统计学分析, 差异有统计学意义 ( $P<0.01$ ), 见表 1。

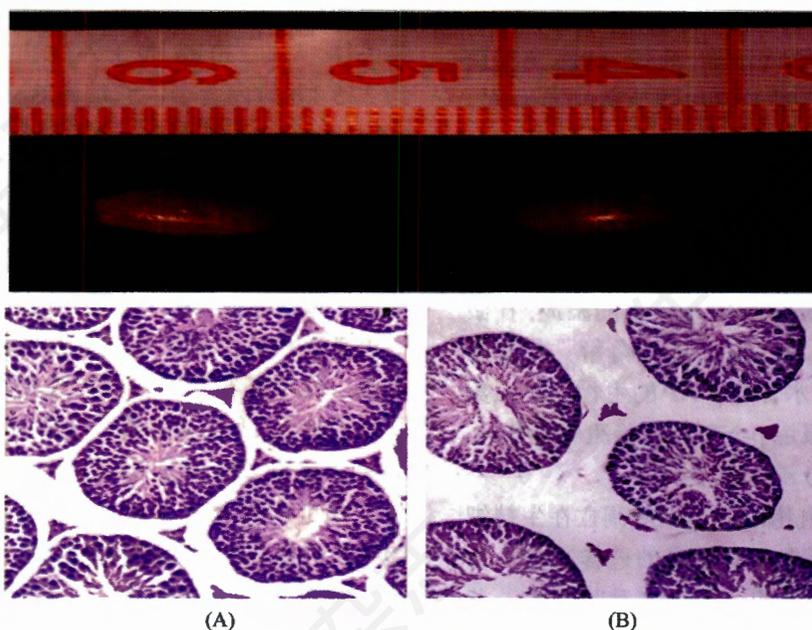
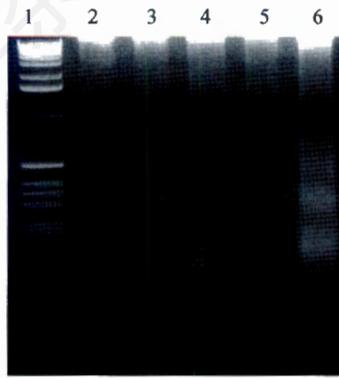


Fig.1 Representative photomicrographs of hematoxylin eosin-stained testis cross sections after p-NP injection for 14 days from control and p-NP-exposed mice

A: oil+saline; B: 10% p-NP+oil.



**Fig.2 Electrophoretic analysis of DNA extracted from testes after p-NP injection for 14 days**

1: marker; 2: control; 3: 2% p-NP; 4: 4% p-NP; 5: 6% p-NP; 6: 10% p-NP.  $n=3$  in each group.

**Table 1 The expression analysis of Bcl-2 and Bax extracted from testes after 10% p-NP injection ( $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ )**

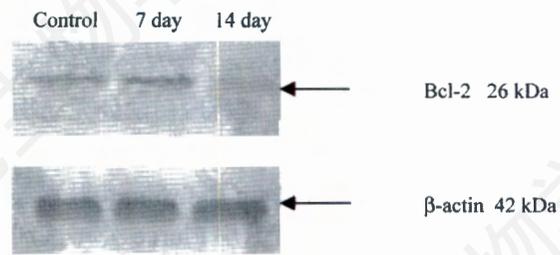
Group	Oil (control)	10% p-NP (7 day)	10% p-NP (14 day)
Bcl-2	150.82±1.98	130.79±1.59*	65.36±2.67*
Bax	160.34±1.39	186.72±1.66*	208.56±1.72*

\* $P<0.01$ , compared with control group.

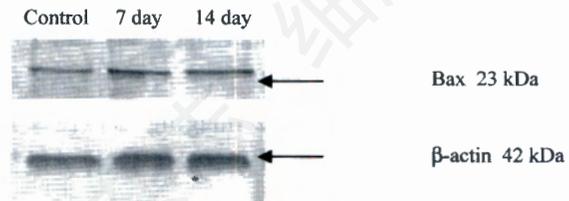
### 3 讨论

烷基酚聚氧乙烯醚(alkylphenols polyoxyethylenes, APEs)是一类非离子表面活性剂,是目前全球商用第二大非离子表面活性剂。在工业生产中, APEs 主要用于塑料及弹性塑料生产、纺织加工、农业化学品、乳化及造纸和纸浆工艺等;在家用市场中, APEs 主要用做洗衣剂及硬表面清洁剂;此外, APEs 还在避孕药膏及凝胶中用作杀精子剂和避孕套的润滑剂。APEs 产品中80%为对-壬基酚聚氧乙烯醚(nonylphenol ethoxylates, NPEs), NPEs 在我国的应用尤其广泛,全世界的年生产量大约为 50 万吨,我国大约为 5 万吨。p-NP 是 NPEs 被环境微生物降解的产物, p-NP 的油水分配系数高,使之极易沉积于水体下的淤泥,在淤泥的厌氧条件下, p-NP 相当稳定,不易降解。生态毒理学家研究发现鳟鱼对水体中 p-NP 的生物富集系数在 40~100 之间,文献报道 p-NP 具有雌激素样作用,是一种典型的环境内分泌干扰物<sup>[3]</sup>。

在哺乳动物中,睾丸组织生精细胞凋亡在生精细胞生长过程中起着重要作用。过多的遗传突变及意外损伤的生精细胞都需要通过凋亡来及时清除。此外,不管是经睾丸毒物处理的实验动物,还是睾丸损伤或某些病理条件下的人类自身,都可以观察到凋亡生精细胞的增多。凋亡是一种对损伤周围组织的快



**Fig.3 The expression of Bcl-2 in the testes after 10% p-NP exposure**



**Fig.4 The expression of Bax in the testes after 10% p-NP exposure**

速清除过程。从形态上看,这种细胞死亡的特性是染色质聚缩并产生片段化,细胞出芽成凋亡小体,因此自发的或毒物介导的睾丸组织生精细胞发生凋亡的机制是当今研究的热点。

*bcl-2* 基因是首先在 t(14;18)染色体易位的滤泡性淋巴瘤细胞系中发现的一种原癌基因,位于 18 号染色体,大约 230 kb,位于外显子 2 和 3 之间,有一个约 225 kb 的内含子。它编码 Bcl-2,分子量 25~26 kDa,含 229 个氨基酸,是位于线粒体内膜、核膜、和滑面内质网上的膜蛋白,能够通过复杂的机制抑制多种因素引起的细胞凋亡。*bcl-2* 基因的表达产物不影响细胞的增殖率,而是作为细胞凋亡的一个潜在抑制因子调节细胞的程序化死亡,被称作抗凋亡基因,它的过高表达可防止或明显降低各种刺激如射线、自由基、化疗药物等引起的细胞凋亡<sup>[4-9]</sup>。*bax* 基因与其作用相反,被称为促凋亡基因<sup>[7-10]</sup>,通过与 Bcl-2 形成杂二聚体等机制发挥促凋亡作用。

最近研究表明,在许多毒物介导的睾丸组织精细胞凋亡的研究中,都发现细胞凋亡是生殖损伤的机制之一<sup>[11,12]</sup>。以前的研究提示 p-NP 具有睾丸毒性作用,并有可能通过细胞凋亡损伤睾丸组织,因此,我们推测细胞凋亡重要调控基因 *bcl-2/bax* 系统可能参与这一过程。p-NP 是烷基酚类的代表化合物,厌氧条件

下很稳定, Wang 等<sup>[13]</sup>在体外实验中发现, p-NP 可引起大鼠睾丸支持细胞(sertoli cell, SC)的凋亡, 流式细胞术细胞周期检测观察到 SC 在给药 72 h 后随作用剂量的增大凋亡细胞比例显著上升, 而这一结果也与 MTT 实验观察到的药物作用 72 h 后 SC 增殖率显著下降相一致。可见, 无论是错误的细胞间信号转导还是细胞水平的凋亡或基因表达的改变, 均具有潜在的诱变性。但到目前为止, p-NP 如何损伤睾丸组织还不十分清楚。

本研究结果提示, 在 p-NP 处理后, 对照组和实验组比较小鼠睾丸大体形态很接近, 无太大差异, 实验组鼠睾丸组织苏木精-伊红染色后, 其细胞形态仍较为正常。但是, p-NP 处理后, 各种剂量组小鼠都出现了 DNA 片段化的表现——“ladder”, 而且剂量高的小鼠片段化“ladder”明显比剂量低的要强, 从而获得作为核酸内切酶作用及 p-NP 介导生精细胞凋亡的直接证据, 说明对-壬基酚染毒直接导致了小鼠睾丸组织生精细胞凋亡。Western 印迹检测发现 Bcl-2 表达条带强度随着 p-NP 作用时间的延长逐渐减弱, 腹腔注射 10% p-NP 7 天和 14 天后 C57 小鼠睾丸组织 Bcl-2 26 kDa 条带强度分别为  $130.79 \pm 1.59$ 、 $65.36 \pm 2.67$ , 而对照组为  $150.82 \pm 1.98$ ; Bax 23 kDa 条带强度分别为  $186.72 \pm 1.66$ 、 $208.56 \pm 1.72$ , 而对照组为  $160.34 \pm 1.39$ ; 提示随着 p-NP 作用时间的延长 Bcl-2 表达量减少, Bax 细胞表达量增加, Bcl-2/Bax 比值下降, 提示随着 p-NP 作用时间的延长, 小鼠睾丸生精细胞凋亡增加。

我们实验结果初步证明, 诱导生精细胞凋亡可能是 p-NP 睾丸毒性损伤的重要机制, bcl-2/bax 基因表达的变化与睾丸组织损伤密切相关, 可能是 p-NP 对睾丸毒性作用机制的重要方面, 对与之相关凋亡基因的进一步深入研究, 有可能发现评估 p-NP 对组织损

伤效应的重要指标, 对今后确定 p-NP 的使用和环境控制标准可能有一定潜在价值。

### 参考文献(References)

- [1] Blake CA, Boockfor FR. Chronic administration of the environmental pollutant 4-tert-octylphenol to adult male rats interferes with the secretion of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin and testosterone, *Biol Reprod*, 1997, 57(2): 255-266
- [2] Dunckley T, Coon KD, Stephan DA. Discovery and development of biomarkers of neurological disease, *Drug Discov Today*, 2005, 10(5): 326-334
- [3] Griffin JL, Bollard ME. Metabonomics: its potential as a tool in toxicology for safety assessment and data integration, *Curr Drug Metab*, 2004, 5(5): 389-398
- [4] Adam JM. The bcl-2 proteins family: arbiters of cell survival, *Science*, 1998, 281(5381): 1317-1323
- [5] Print CG, Loveland KL, Gibson L, et al. Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(21): 12424-12431
- [6] Gross A. BCL-2 proteins: regulators of the mitochondrial apoptotic program, *IUBMB Life*, 2001, 52(3-5): 231-236
- [7] Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(9): 647-656
- [8] Shroff EH, Snyder C, Chandel NS. Role of Bcl-2 family members in anoxia induced cell death, *Cell Cycle*, 2007, 6(7): 807-809
- [9] Er E, Oliver L, Cartron PF, et al. Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax, *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757(9-10): 1301-1311
- [10] Antignani A, Youle RJ. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane?, *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18(6): 685-689
- [11] Bartke A. Apoptosis of male germ cells, a generalized or cell type-specific phenomenon?, *Endocrinology*, 1995, 136(1): 3-4
- [12] Park JD, Habeebu SS, Klaassen CD. Testicular toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate in young Sprague-Dawley rats, *Toxicology*, 2002, 171(2-3): 105-115
- [13] Wang KY, Han XD, Hou YY, et al. Effect of nonylphenol on apoptosis of Sertoli cells *in vitro*, *Bull Environ Contam Toxicol*, 2003, 70(5): 898-904

## Mechanisms of Damage of Testicular Germ Cells Induced by *p*-Nonylphenol

Jin-Fu Zhang\*, Sheng-Dao Shan, Ya-Ping Gui, Lei Wang<sup>1</sup>

(Department of Urology, Tongji Hospital of Tongji University, Shanghai 200065, China; <sup>1</sup>State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China)

**Abstract** To explore the mechanisms of damage of testicular germ cells induced by injection of *p*-nonylphenol (*p*-NP), wild-type C57 mice were injected with *p*-NP (10%, V/V) for 7 or 14 days. The damage and apoptosis of testicular germ cells was evaluated using methods of hematoxylin eosin staining, DNA fragmentation, and Western blot. The results showed that there was no morphological change in the epithelial cells of testicular tubules after 7-day *p*-NP injection, but more apoptotic germ cells were exhibited in these *p*-NP-injected mice than that in the wild-type mice. Furthermore, the mice subjected to a 7-day or 14-day injection of *p*-NP displayed a down-regulation of Bcl-2 and an up-regulation of Bax in the testis. These evidences suggest that the apoptotic regulation may be involved in the damage of testicular germ cells induced by acute *p*-NP injection, and *bcl-2/bax* could contribute to regulating the apoptosis of testicular germ cells.

**Key words** *p*-nonylphenol; Bcl-2; Bax; testis; apoptosis

Received: December 19, 2008

Accepted: August 10, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.20677043) and the Natural Science Foundation of Shanghai City (No.05ZR14119)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-67116631, Fax: 86-21-56050502, E-mail: jinfuzhang@yahoo.com.cn