

砷中毒大鼠生精细胞凋亡的变化*

陆祥¹, 陈伟^{1*}, 舒小林¹, 陈俊希²

(遵义医学院 1. 组织学与胚胎学教研室; 2. 2006级护理学专业学生, 贵州 遵义 563003)

摘要:【目的】观察不同剂量的三氧化二砷(As_2O_3)对成年大鼠生精细胞凋亡的影响。【方法】40只健康雄性SD大鼠随机分成对照组、低剂量组(0.0375 g/L)、中剂量组(0.075 g/L)、高剂量组(0.15 g/L)4组,灌胃法连续给药16周后对各组大鼠睾丸取材进行精子头计数,并计算睾丸脏器系数、每日精子生成量(DSP)。采用甲基绿-派诺宁染色法和TUNEL法检测大鼠生精细胞凋亡情况。【结果】①中、高剂量组睾丸精子头计数和DSP均低于对照组($P < 0.05$);②与对照组相比,中、高剂量组生精细胞凋亡指数(AI)均显著升高($P < 0.01$);③生精细胞AI与DSP呈负相关($r = -0.563$, $P < 0.01$)。【结论】一定剂量 As_2O_3 可通过促进生精细胞凋亡而导致精子生成量的减少,从而产生雄性生殖毒性。

关键词: As_2O_3 ; 凋亡; 生精细胞; 大鼠

中图分类号: R994.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2009)02-0179-04

Effects of Arseniasis on Apoptosis of Spermatogenic Cells of Rat Testis

LU Xiang¹, CHEN Wei^{1*}, SHU Xiao-lin¹, CHEN Jun-xi²

(1. Department of Histology and Embryology;

2. Student of 2006 Grade in Nursing Specialty, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract:【Objective】To investigate the occurrence of spermatogenic cell apoptosis after aniso dose arsenic trioxide (As_2O_3) administration in the testis of adult male rats.【Methods】Forty healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups and they were administered respectively with 0 (control group), 0.0375 g/L (low dose group), 0.075 g/L (medium dose group), 0.15 g/L (high dose group) of As_2O_3 aqueous solution by intragastric administration consecutively for 16 weeks. The numbers of testicular sperm head were counted. The coefficient of testicular viscera and daily sperm production (DSP) were calculated in each group. The apoptosis of spermatogenic cells were assessed by in situ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dTUP nick end labeling (TUNEL) technique and methyl green-pyronin staining method.【Results】① In the testis of As_2O_3 -treated rats, the coefficients of testicular viscera, the numbers of testicular sperm head, and DSP in medium and high dose groups were lower than that of control group ($P < 0.05$); ② The apoptosis index (AI) of spermatogenic cells in medium and high dose groups significantly increased compared with that in control group ($P < 0.01$); ③ There were negative correlation between the DSP and AI of spermatogenic cells in arsenic treated rats ($r = -0.563$, $P < 0.01$).【Conclusions】By increasing the apoptosis of spermatogenic cells and decreasing sperm production in male rats, a certain dose of As_2O_3 may give rise to male reproduction toxicity. The increasing apoptosis numbers of spermatogenic cells may play an important role in leading to subfertility.

Key words: As_2O_3 ; apoptosis; spermatogenic cell; rat

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(2):179-182]

砷是已肯定的生殖毒物,并具有较强的生殖毒性^[1]。研究显示,当达到一定浓度时,砷可损伤生精细胞,引起精子数量、质量的下降^[2],但关于砷对雄(男)性生殖系统毒性作用的分子机制尚不

清楚。本实验通过检测慢性砷中毒大鼠睾丸脏器系数、精子头数、每日精子生成量及生精细胞凋亡情况,探讨砷对精子发生的影响,为进一步探讨砷致雄(男)性生殖毒性机制提供基础资料。

收稿日期: 2008-04-10

基金项目: 贵州省科技厅国际合作重点项目(黔科合J字[2006]2078号)

作者简介: 陆祥, 硕士, 讲师; * 通讯作者: 陈伟, 副教授, 硕士生导师, E-mail: jcbzupei@163.com

1 材料与方 法

1.1 动物模型的建立

健康雄性清洁级 SD 大鼠 40 只, 体质量 (150 ± 10) g, 由重庆第三军医大学实验动物中心提供。随机分为 4 组, 每组 10 只, 标准饲料喂养, 以灌胃方式分别给予对照组、低、中、高剂量组大鼠双蒸水、0.0375 g/L、0.075 g/L As_2O_3 、0.15 g/L As_2O_3 水溶液进行染毒, 每日 1 次, 连续 16 周, 灌胃量按每 100 g 体质量灌 1 mL 给予, 每周日早上空腹称质量, 以调整灌胃量。

1.2 实验药物及试剂

受试物为 As_2O_3 (美国 Sigma 公司产品), 由遵义医学院附属医院皮肤与性病科惠赠; 辜丸匀浆液: 即曲通-硫柳汞盐液 (saline-Triton-Merthiolate, STM); TUNEL 试剂盒 (德国 Roche 公司); 甲基绿 (美国 Fluka 公司); 派诺宁 (中国医药集团上海分公司)。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 辜丸组织病理学检查 连续给药 16 周后, 称质量后用颈椎脱臼处死大鼠, 分离辜丸在生理盐水中漂洗, 滤纸吸干、称质量, 计算辜丸脏器系数。辜丸组织常规固定、包埋、切片、HE 染色后于光镜下观察病理变化。

1.3.2 每日精子生成量 每日精子生成量 (daily sperm production, DSP) 的测定参考 Blazak 等^[3]方法进行。每克辜丸中精子头数用以下公式计算: [每方格精子头计数 $\times$ 方格系数 $\times$ 血细胞计数板系数 $\times$ STM 稀释系数 $\div$ 组织质量]。每克辜丸 DSP 以精子头计数值除以产生抗匀浆的细胞所需时间 (大鼠为 6.1 d) 计算。

1.3.3 生精细胞凋亡的检测 甲基绿-派诺宁染色法和原位末端标记法 (in situ terminal deoxynucleotidyl

transferase mediated dTUP nick end labeling, TUNEL) 观察生精细胞凋亡。TUNEL 法操作步骤按试剂盒说明书进行。以存在凋亡生精细胞的生精小管为阳性生精小管, 400 倍光镜下随机选择 10 个阳性生精小管, 计数凋亡生精细胞数和总生精细胞数, 计算出凋亡细胞百分率即生精细胞凋亡指数 (apoptosis index, AI)。

1.3.4 统计学处理 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 首先用 SPSS 12.0 软件行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间比较选用 LSD 法; 描述两变量之间的关系采用直线相关分析。

2 结 果

2.1 辜丸组织病理学观察

对照组辜丸组织生精小管密集, 基膜完整, 细胞层次清楚, 各级生精细胞正常, 管腔中有密集的精子。较对照组比, 低剂量组无明显变化; 中剂量组辜丸生精上皮结构较疏松, 管腔中精子数量减少, 小管间隙增宽, 细胞体积缩小; 高剂量组部分生精小管出现基膜溶解, 生精上皮细胞层次紊乱, 细胞间隙增大、体积缩小, 管腔中有脱落的精子细胞, 成熟精子数量明显减少, 间质出现水肿、渗出 (图 1)。

2.2 各剂量组辜丸脏器系数、辜丸精子头数及每日精子生成量 (DSP) 的变化

辜丸脏器系数、精子头计数及 DSP 低剂量组与对照组比较, 稍有减少, 但差异不明显, 无统计学意义 ($P > 0.05$), 中、高剂量组明显减少, 有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 生精细胞凋亡检测结果

甲基绿-派诺宁染色法光镜下观察到, 凋亡生精细胞核固缩, 呈绿色或蓝绿色, 胞质呈紫红色 (图 2, 箭头所示)。TUNEL 法光镜下观察到, 凋亡

表 1 染砷大鼠辜丸脏器系数、精子头计数及 DSP

Table 1 Coefficient of testicular viscera, sperm head count, and daily sperm production (DSP) of arsenic treated rat testis ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Group	Coefficient of Testicular Viscera (%)	Sperm Head Count ($\times 10^6/g$)	DSP ($\times 10^6/g/d$)
Control Group	1.15 ± 0.09	81.47 ± 18.35	13.36 ± 3.01
0.0375 g/L Group	1.05 ± 0.09	73.30 ± 17.68	12.02 ± 2.90
0.075 g/L Group	$0.99 \pm 0.15^{(2)}$	$64.37 \pm 13.64^{(1)}$	$10.55 \pm 2.24^{(1)}$
0.15 g/L Group	$0.87 \pm 0.15^{(2)}$	$54.50 \pm 6.06^{(2)}$	$8.93 \pm 0.99^{(2)}$
F	9.819	12.135	12.135
P	0.000	0.000	0.000

Compared with control group, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$

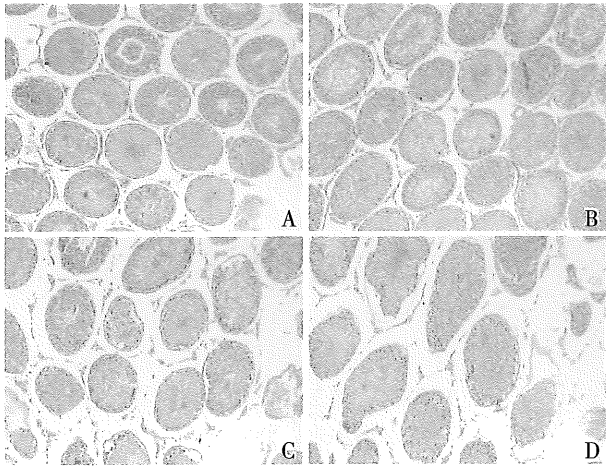


图 1 各组大鼠生精小管的组织病理学变化

Fig.1 Histopathological changes of seminiferous tubule of rats in each group by HE staining

A: control group; B: As_2O_3 0.0375 g/L group; C: As_2O_3 0.075 g/L group; D: As_2O_3 0.15 g/L group; $\times 100$

表 2 染砷大鼠生精细胞凋亡指数(AI)

Table 2 Apoptosis index of spermatogenic cells of arsenic treated rats ($n=10, \bar{x} \pm s, \%$)

Group	Apoptosis index(AI, %)	
	Ethyl green-pyronin staining	TUNEL
Control	0.58 ± 0.04	0.58 ± 0.06
0.0375 g/L	0.60 ± 0.04	0.61 ± 0.03
0.075 g/L	$0.82 \pm 0.31^{1)}$	$0.84 \pm 0.05^{1)}$
0.15 g/L	$1.14 \pm 0.06^{1)}$	$1.24 \pm 0.07^{1)}$
F	306.577	307.209
P	0.000	0.000

1): Compared with control group $P < 0.01$

生精细胞核固缩, 被特异性染成棕黄色或棕褐色(图 3)。两种方法均可观察到各组均有生精细胞凋亡, 对照组和低剂量组生精细胞凋亡以精原细胞为主; 中、高剂量组以精原细胞和精母细胞为主; 低剂量组生精细胞 AI 稍高于对照组, 但无统计学意义($P > 0.05$); 中、高剂量组生精细胞 AI 明显升高, 与对照组比较有统计学意义($P < 0.01$, 图 4)。

2.4 各染砷组睾丸 DSP 与生精细胞 AI 的相关关系
运用直线相关分析, 大鼠睾丸 DSP 与生精细胞 AI 之间呈直线负相关($r = -0.563, P < 0.01$, 图 5)。

3 讨 论

睾丸生精上皮具有高度增殖能力, 但在精子

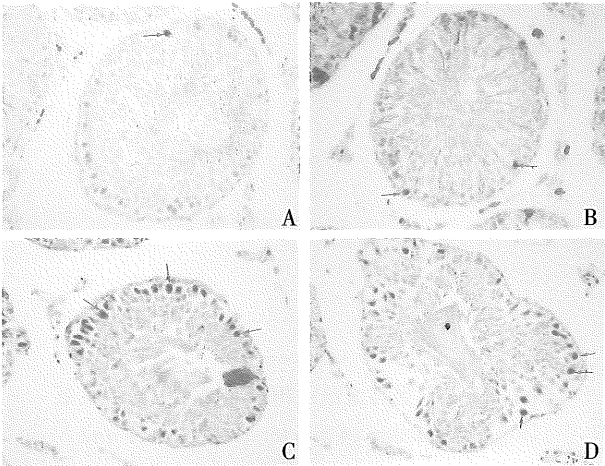


图 2 各组大鼠生精细胞凋亡变化

Fig.2 Apoptosis of spermatogenic cells of rats in each group by methyl green-pyronin staining

A: control group; B: As_2O_3 0.0375 g/L group; C: As_2O_3 0.075 g/L group; D: As_2O_3 0.15 g/L group; $\times 200$

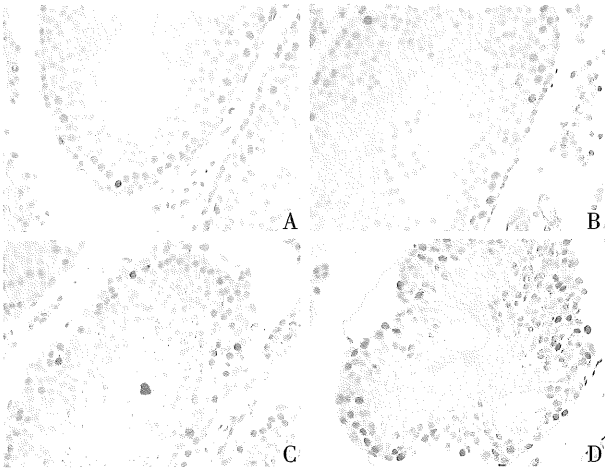


图 3 各组大鼠生精细胞凋亡变化

Fig.3 Apoptosis changes of spermatogenic cells of rats in each group by TUNEL

A: control group; B: As_2O_3 0.0375 g/L group; C: As_2O_3 0.075 g/L group; D: As_2O_3 0.15 g/L group; $\times 400$

发生各个阶段都存在自发性的生精细胞凋亡, 生精过程中细胞增殖与凋亡保持着动态平衡, 故生精细胞的凋亡对于维持精子的生成数量和质量具有重要作用^[4]。而环境有害因素可促进生精细胞凋亡, 从而导致生精障碍和睾丸萎缩^[5], 因此生精细胞凋亡增加是引起男性生殖能力下降的重要原因之一。

砷的生殖毒性研究显示^[6,7], 砷可蓄积于睾丸组织, 致睾丸组织萎缩和生精细胞损害, 提示砷可通过血-睾屏障, 从而发挥其生殖毒性; 进一步研

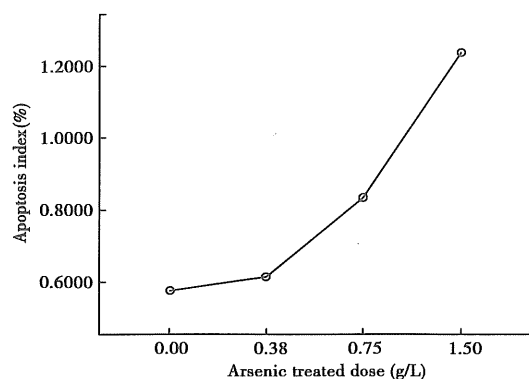


图4 染砷剂量与大鼠生精细胞凋亡指数的关系

Fig.4 Relation of arsenic treated dose and spermatogenic cell apoptosis index

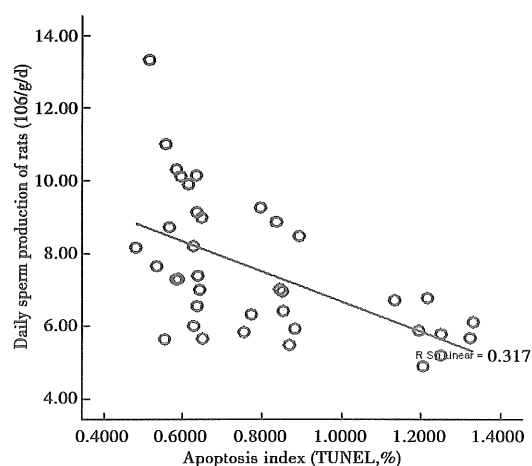


图5 染砷大鼠DSP与生精细胞凋亡的相关性分析

Fig.5 Correlation between daily sperm production and spermatogenic cell apoptosis of arsenic treated rats

究显示^[8,9],砷可影响下丘脑—垂体—睾丸性腺轴活动,引起促性腺激素和性激素分泌紊乱,干扰精子发生,导致精子数量明显下降。das Neves等^[10]发现橙皮苷和硫辛酸两种抗氧化剂对染砷小鼠的肝脏和肾脏有保护作用,而对睾丸没有保护作用,导致生殖细胞的退化,提示砷对生精细胞的毒性作用是不可逆的,但以上研究对砷致生殖细胞退化的表现没有进行进一步的探讨。本研究病理结果,睾丸精子头计数及DSP结果与上述研究结果一致。在进一步追踪研究中发现,随染砷剂量的增加,生精细胞凋亡也随之增加,凋亡生精细胞以精原细胞、精母细胞为主,并存在剂量-效应关系。通过DSP与生精细胞AI的直线相关性分析显示,二者之间呈直线负相关,提示染砷大鼠DSP的降低与生精细胞的凋亡增加有关,推测As₂O₃可能通过血-睾屏障后,作用于位于基底室的精原细胞、初

级精母细胞,即精子发生的最初阶段,诱导大鼠生精细胞凋亡增加,使精子生成减少,导致成熟精子数量下降,从而产生雄性生殖毒性。本研究初步证实砷可诱导大鼠生精细胞凋亡增加,这可能是砷的雄(男)性生殖毒性的作用途径之一,但关于砷致生精细胞凋亡及其途径的分子生物学机制仍需要进一步探讨。

参考文献:

- [1] 张晨,王国葵,肖碧玉,等. 砷的生殖毒性研究进展[J]. 中华预防医学杂志, 2000, 34(1): 56-58.
- [2] Pant N, Kumar R, Murthy RC, et al. Male reproductive effect of arsenic in mice [J]. Biometals, 2001, 14(2): 113-117.
- [3] Blazak WF, Treinen KA, Juniewicz PE. Application of testicular sperm head counts in the assessment of male reproductive toxicity [J]. Methods Toxicol, 1993, 3A: 86-94.
- [4] Hikim AP, Wang C, Lue Y, et al. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83(1): 152-156.
- [5] Hsu PC, Pan MH, Li LA, et al. Exposure in utero to 2, 2', 3, 3', 4, 6'-hexachlorobiphenyl (PCB 132) impairs sperm function and alters testicular apoptosis-related gene expression in rat offspring [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 221(1): 68-75.
- [6] 张育,梁虹,盛树清,等. 药理浓度三氧化二砷对大鼠睾丸组织形态及精子生成的影响[J]. 实用临床医药杂志, 2003, 7(1): 53-56.
- [7] Pant N, Murthy RC, Srivastava SP. Male reproductive toxicity of arsenic in mice [J]. Hum Exp Toxicol, 2004, 23(8): 399-403.
- [8] Sarkar M, Chaudhuri GR, Chattopadhyay A, et al. Effect of sodium arsenite on spermatogenesis, plasma gonadotrophins and testosterone in rats [J]. Asian J Androl, 2003, 5(1): 27-31.
- [9] Jana K, Jana S, Samanta PK. Effects of chronic exposure to sodium arsenite on hypothalamo-pituitary-testicular activities in adult rats possible an estrogenic mode of action [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2006, 4: 9.
- [10] das Neves RN, Carvalho F, Carvalho M, et al. Protective activity of hesperidin and lipoic acid against sodium arsenite acute toxicity in mice [J]. Toxicol Pathol, 2004, 32(5): 527-535.

(编辑 孙慧兰)