

三聚氰胺对雄性小鼠睾丸生精细胞凋亡的影响*

夏凤琼^{1,2**}, 杨国珍^{2***}, 黄健³, 林明春¹, 肖礼红¹

(1. 贵州省骨科医院 检验科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 医学检验学院, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学附院 生化科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨三聚氰胺对雄性小鼠睾丸生精细胞凋亡的影响。方法: 健康雄性昆明种小鼠 50 只随机均分为阴性对照组、实验组(三聚氰胺低、中、高剂量组)及阳性对照组, 阴性对照组按 0.1 mL/10 g 体重灌胃生理盐水, 三聚氰胺低、中、高剂量组分别按 400、800、1 600 mg/kg, 阳性对照组腹腔注射环磷酰胺 40 mg/kg, 各剂量组按照体重每天定时经口给药 1 次, 连续 5 d, 于首次给药后的第 35 天处死各组小鼠; 睾丸病理切片 HE 染色, 观察小鼠睾丸组织的病理学改变, 流式细胞术检测小鼠睾丸生精细胞凋亡率, 免疫组化法检查凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的阳性表达情况。结果: 三聚氰胺各剂量组睾丸形态结构随着染毒剂量的增加出现不同程度的损伤, 睾丸细胞凋亡率呈上升趋势, 其中高剂量组与阴性对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 三聚氰胺低、中、高剂量组 Bcl-2 表达均呈下降趋势, 与阴性对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); Bax 各组表达呈上升趋势, 三聚氰胺中剂量组、高剂量组 Bax 的表达与阴性对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Caspase-3 表达亦呈上升趋势, 三聚氰胺中、高剂量组 Caspase-3 的表达与阴性对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 三聚氰胺促进雄性小鼠睾丸生精细胞凋亡, 其机制可能与下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达和上调促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 的表达有关。

[关键词] 三聚氰胺; 雄性小鼠; 生精细胞; 生殖毒性; 细胞凋亡

[中图分类号] R698.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)07-0781-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.07.008

Effect of Melamine on Apoptosis of Spermatogenic Cells in Testis of Male Mice

XIA Fengqiong^{1,2}, YANG Guozhen², HUANG Jian³, LIN Mingchun¹, XIAO Lihong¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Orthopedic Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. School of Laboratory Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department

of Biochemistry, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of melamine on apoptosis of spermatogenic cells in testis of male mice. **Methods:** Fifty male Kunming mice were randomly divided into 5 groups: saline negative control group (0.01 mL/10 g intragastric treatment), the experimental group of melamine low dosage, medium dosage and high dosage group (400, 800, 1 600 mg/kg treatment), and the positive control group (40 mg/kg CP ip treatment) with equal number. Mice in each experiment group were administered orally for consecutive 5 days in accordance with body mass. 35 days after the first administration, mice were sacrificed. To observe pathologic changes of testis in mice by HE section staining; to detect the apoptosis conditions of spermatogenic cells by the flow cytometry; to detect Bcl-2, Bax and Caspase-3 positive expression with immunohistochemical techniques. **Results:** The testicular morphology of each dosage group showed different degrees of damage. Apoptosis percentage in all groups

*[基金项目] 贵州省科技厅项目基金[黔科合 LH 字(2014)7120 号]

** 贵州医科大学 2011 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: ygzandkj29@sina.com

网络出版时间: 2019-07-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190718.0039.008.html>

increased. The apoptosis percentage in high dosage group was different compared with the negative control group ($P < 0.05$); the expression of Bcl-2 in all dose groups were significantly reduced, the difference was statistically significant compared with negative control group ($P < 0.05$). The expression of Bax and Caspase-3 increased significantly in the medium dose group and the high dose group compared with the negative control group, differences were statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusions: Melamine significantly induced apoptosis of spermatogenic cells in testis of male mice, the mechanism may be related to the down-regulation of anti-apoptotic protein Bcl-2 and up-regulation of apoptotic protein Bax and Caspase-3.

[**Key words**] melamine; male mice; spermatogenic cells; reproductive toxicity; apoptosis

随着全球工业化的迅速发展,人类生殖健康受到的威胁日渐突出,男性精液质量下降十分显著^[1]。三聚氰胺作为一种不可缺少的工业化学品,广泛地用于塑料、涂料、胶水、阻燃剂等行业,由于其含氮量高,再加上现有凯氏定氮法检测蛋白质含量的缺陷,许多不法分子便趁机将三聚氰胺添加于食品中来提高食品的含氮量^[2],从而威胁人类健康^[3]。研究表明,三聚氰对宠物猫、狗及实验兔、鼠、猪具有一定的急性皮肤毒性、吸入毒性、眼睛刺激、肾脏毒性及肝脏毒性^[4-9];也有研究表明三聚氰胺可降低雄性小鼠体液免疫功能^[10],对雌性大鼠具有卵巢毒性^[11]。关于三聚氰胺在生殖毒性方面的研究报道甚少,本研究以健康雄性昆明种小鼠为对象,用不同剂量的三聚氰胺通过灌胃对小鼠进行染毒,检测小鼠睾丸组织的病理变化、睾丸细胞凋亡百分率及凋亡相关蛋白 bcl-2、bax、caspase-3 的表达,初步探讨三聚氰胺对雄性小鼠的生殖毒性。

1 材料与方法

1.1 实验动物主要试剂和仪器

1.1.1 实验动物 选择 6~8 周龄健康雄性昆明种小鼠 50 只,体质量 25~30 g,购自于第三军医大学大坪医院野战外科研究所医学实验动物中心,许可证号 SCXK(渝)2001-0005。

1.1.2 主要试剂和仪器 三聚氰胺(Sigma 公司,美国),环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司),细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物发展有限公司),流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司),Bcl-2、Bax 免疫组化试剂盒(Santa Cruz 公司,美国),Caspase-3 免疫组化试剂盒(Cell Signaling 公司,美国),免疫组化二抗、AB 显色系统(武汉博士德生物工程有限公司),显微照相系统(四川大学 Biomias 图像分析软件)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型 将 50 只雄性小鼠随机均分为阴性对照组、实验组(三聚氰胺低、中、高剂量组)及阳性对照组。阴性对照组按 0.1 mL/10 g 体质量灌胃生理盐水,实验组分别按 400、800、1 600 mg/kg 体质量灌胃三聚氰胺,阳性对照组按 40 mg/kg 体质量腹腔注射环磷酰胺。各剂量组按照体重每天定时给药 1 次,连续 5 d。

1.2.2 标本采集 于第一次染毒结束后的第 35 天,颈椎脱臼处死小鼠,立即剪开腹腔取出两侧睾丸,用生理盐水洗净睾丸上的血液,滤纸擦干,左侧睾丸置于 10% 中性甲醛中固定 3 d 后,常规取材、脱水、石蜡包埋制成切片;右侧睾丸 -20 ℃ 保存,用于检测睾丸细胞凋亡。

1.2.3 HE 染色 左侧睾丸组织切片采用与脱水、透明相反的步骤脱蜡至水,苏木素溶液染色 10 min,自来水冲洗 10 min,1% 盐酸酒精分色数秒,再经伊红染色。切片经乙醇梯度脱水,二甲苯透明后,中性树胶封片。光镜下观察小鼠睾丸组织结构。

1.2.4 凋亡检测 细胞悬液的制备 取小鼠 右侧睾丸组织,剔除表面结缔组织,消去被膜,加入适量的 PBS,用眼科剪将睾丸剪碎,吸管吹打混匀,100 目尼龙网过滤,800 r/min 离心 5 min,弃上清液,组织沉淀用 PBS 洗 2 次,制成细胞悬液(浓度为 $10^5 \sim 10^7$ /ml)。细胞悬液中加入 5 μ L 标记有异硫氰酸荧光素(FITC)的 Annexin V,再加入 10 μ L 碘化丙啶(PI),轻轻混匀、避光 30 min,流式细胞仪检测,计算睾丸细胞凋亡率。

1.2.5 免疫组化 左侧睾丸组织切片采用 SABC 法进行免疫组化染色,二氨基联苯胺(DAB)显色法检验。光镜下,细胞浆或细胞膜呈棕黄色为阳性表达。每张切片随机选取 5 个视野,测得 Bcl-2、Bax、Caspase-3 阳性表达的平均灰度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析,实验结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,统计学显著性分析采用单因素方差分析 (*One-Way ANOVA*),组间差异显著性采用单因素方差分析中的 *LSD* 方法进行多重比较检验,所有测试的统计意义以概率水平 ($\alpha=0.05$) 来判断, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 睾丸组织学

显微镜下结果显示,阴性对照组小鼠睾丸组织

曲细精管完整、排列整齐,可见精原细胞和不同发育阶段的精母细胞、精子细胞及成熟精子,各级细胞排列紧密,层次分明(图 1A)。三聚氰胺各剂量组睾丸形态结构随着染毒剂量的增加出现不同程度的损伤:低剂量染毒组损伤较不明显,各级生精细胞排列较有序,管腔中成熟精子数量减少(图 1B);中剂量染毒组可见生精细胞层数减少,管腔中精子数量减少(图 1C);高剂量染毒组生精细胞排列紊乱、疏松,层数减少,管腔中精子数量减少(图 1D);阳性对照组生精细胞层数减少,管腔中精子数量减少(图 1E)。

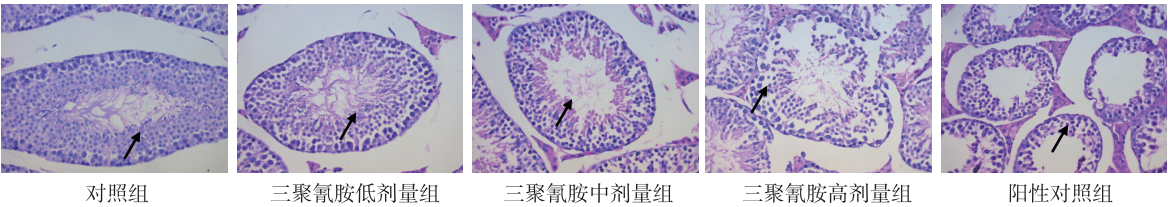


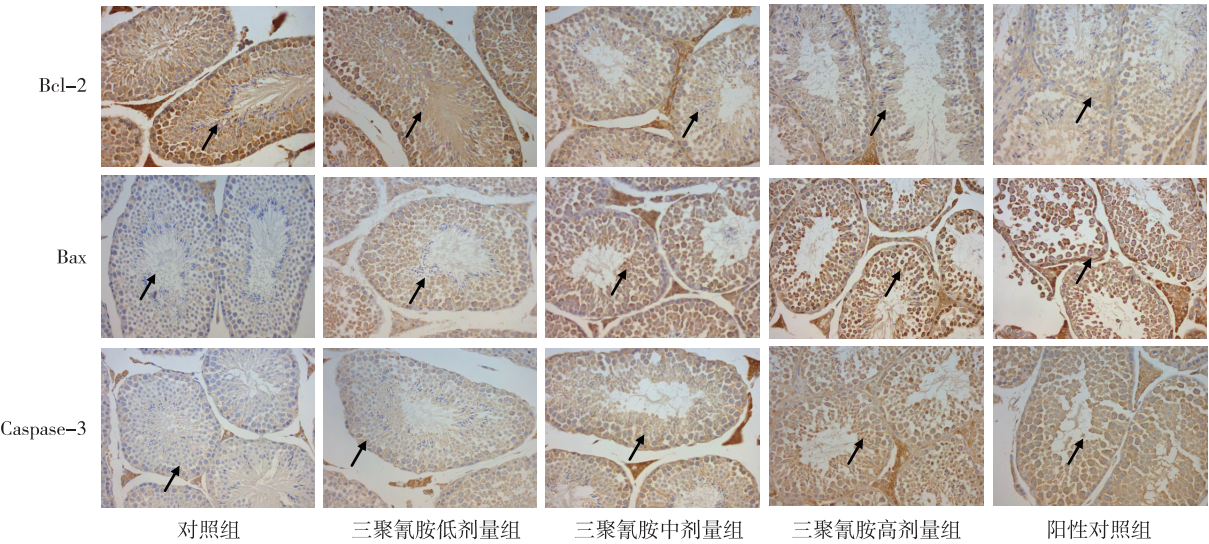
图 1 各组小鼠睾丸组织结构变化情况 (HE, ×400)

Fig. 1 Changes of testicular structure of mice in each group

2.2 蛋白 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 表达

随着染毒剂量的增加,三聚氰胺低、中、高剂量染毒组 Bcl-2 阳性表达较阴性对照组逐渐减少(灰度值升高),差异有统计学意义 ($P<0.05$);三聚氰胺中、高剂量组 Bax、Caspase-3 较阴性对照组其反应随染毒剂量增加而增强(灰度值降低),差异有

统计学意义 ($P<0.05$),与阳性对照组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。应用 BioMias 图像分析系统对各组实验结果进行检测。在 40 倍物镜下,每张切片随机选取 5 个视野(图 2),测得 Bcl-2、Bax、Caspase-3 阳性表达的平均灰度值。见表 1。



注:箭头所示为阳性表达

图 2 各组小鼠睾丸组织中 bcl-2、bax、caspase-3 表达 (SABC, ×200)

Fig. 2 Expression of bcl-2, bax and caspase-3 in each group of mice testis

表 1 各组小鼠凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 阳性表达 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Positive expression of testis in each experimental group of mice

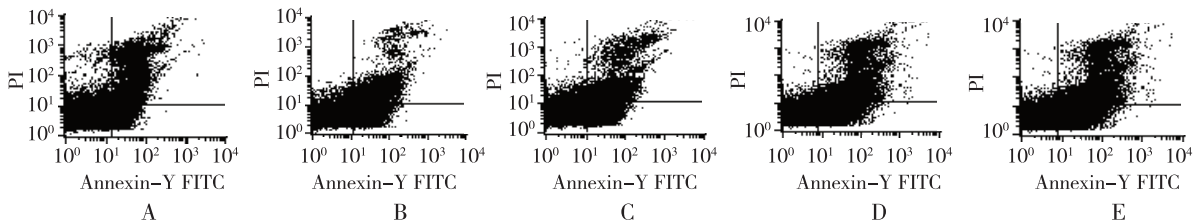
组别	睾丸组织蛋白表达		
	Bcl-2	Bax	Caspase-3
阴性对照组	127.84 ± 12.95	133.06 ± 11.36	149.75 ± 5.33
阳性对照组	150.98 ± 7.86 ⁽¹⁾	109.54 ± 5.65 ⁽¹⁾	129.70 ± 7.22 ⁽¹⁾
三聚氰胺低剂量组	139.03 ± 5.08 ⁽¹⁾⁽²⁾	129.17 ± 9.08 ⁽²⁾	145.65 ± 5.06 ⁽²⁾
三聚氰胺中剂量组	139.90 ± 5.56 ⁽¹⁾⁽²⁾	114.40 ± 8.50 ⁽¹⁾	131.20 ± 14.38 ⁽¹⁾
三聚氰胺高剂量组	141.15 ± 9.23 ⁽¹⁾⁽³⁾	112.14 ± 6.25 ⁽¹⁾	133.45 ± 4.21 ⁽¹⁾

⁽¹⁾与阴性对照组比较, $P < 0.05$; ⁽²⁾⁽³⁾与阳性组比较, $P < 0.05$

2.3 睾丸细胞凋亡率

随着染毒剂量的增加,各实验组睾丸细胞凋亡率呈上升趋势,其中三聚氰胺高剂量组 (23.404 ± 3.488) 与阴性对照组 (16.871 ± 3.610) 比较,差异

有统计学意义 ($P < 0.05$),三聚氰胺低、中剂量组 [(18.441 ± 2.841) 、 (19.486 ± 3.133)] 与阴性对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 3。



注:A 为阴性对照组,B 为三聚氰胺低剂量组,C 为三聚氰胺中剂量组,D 为三聚氰胺高剂量组,E 为阳性对照组

图 3 各实验组睾丸细胞凋亡率

Fig. 3 Testicular cell apoptosis rate of different groups

3 讨论

检测化学品暴露对组织有无影响常采用的方法是病理学检查^[12-13]。本次实验中所采用的化学暴露品是三聚氰胺,结果显示不同剂量的三聚氰胺对各组小鼠的睾丸组织产生了不同程度的病理损伤。其中,生理盐水(空白)对照组小鼠睾丸组织管腔内可见到大量成熟的精子细胞,生精小管及生精细胞排列规则、清晰;三聚氰胺低剂量组睾丸组织无明显的病理学变化;三聚氰胺中剂量组可见到睾丸组织管腔中生精细胞数量减少,层数减少,生精小管排列紊乱;高剂量组小鼠睾丸组织已发生明显萎缩。

细胞凋亡又称细胞程序性死亡(PCD)。正常的细胞凋亡过程对机体并无有害影响。但是外界的有害物质可使机体启动异常的凋亡程序,对机体产生不可逆的损伤。

虽然细胞凋亡是维持机体正常代谢所必须的,

但是生精细胞的凋亡发生明显增加则可能影响精子的正常生成而引起不育^[14],各种理化因素增加睾丸生精细胞凋亡,常常引起睾丸组织发生损伤^[15]。在本次研究中,各组小鼠暴露于不同剂量的三聚氰胺后睾丸生精细胞均发生的不同程度的凋亡,并且随着剂量的增加而增加。因此,本次研究表明,三聚氰胺可能诱导雄性小鼠睾丸生精细胞发生凋亡。

免疫组化结果表明,各剂量组小鼠睾丸组织促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 的表达均增加,中、高剂量组增加显著;而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达却明显降低。因此,本次研究中,雄性小鼠睾丸组织生精细胞的凋亡可能是抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达减少及促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 的表达增加有关。

综上所述,三聚氰胺对雄性小鼠具有一定的生殖毒性作用:睾丸组织结构发生病理损伤,管腔中生精细胞凋亡率增加,抗凋亡蛋白及促凋亡蛋白表达异常,从而可能进一步引起小鼠精液质量的下降和精子数量的减少,对雄性小鼠具有一定的生殖毒性作用。

4 参考文献

[1] SHINE R, PEEK J, BIRDSALL M. Declining sperm quality in new zealand over 20 years [J]. N Z Med J, 2008, 121(1287):50-56.

[2] GUAN N, FAN Q, DING J, et al. Melamine-contaminated powdered formula and urolithiasis in young children [J]. N Engl J Med, 2009, 360(25):1067-1074.

[3] 林涛. 原料乳及乳制品中三聚氰胺/三聚氰酸对动物和人类危害的研究[J]. 山东畜牧兽医, 2017, 38(10):82-83.

[4] QIN, YUCHAN L V, et al. Assessment of melamine contamination in crop, soil and water in China and risks of melamine accumulation in animal tissues and products [J]. Environ Int, 2010, 36(6):446-452.

[5] SCHILLER, E. Inhalation tests with melamine resin powder in rats: light and electron microscopic studies [J]. Verh Dtsch Ges Pathol, 1978, 62(8):391.

[6] CARLI G S, JERRY D T, JOHN D O. Melamine toxicity [J]. J Med Toxicol, 2010, 6(1):50-55.

[7] 王玉燕, 柴玮杰, 高珉之, 等. 三聚氰胺肾毒性研究[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(8):696-700.

[8] 陈杰, 黄绍棠, 章再婷, 等. 三聚氰胺在猪体内的药物残留研究[J]. 饲料与畜牧, 2009(8):53-55.

[9] 高新乐. 三聚氰胺对犬肾损伤的试验研究[D]. 扬州:扬州大学, 2016.

[10] 王欣. 三聚氰胺及其与三聚氰酸联合对雄性小鼠体液免疫影响的研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2015.

[11] 孙嘉瑞. 三聚氰胺及三聚氰胺三聚氰酸混合物对雌性大鼠卵巢毒性及功能的影响[D]. 南京:南京农业大学, 2016.

[12] TRAVLOS G S, MORRIS R W, ELWELL M R, et al. Frequency and relationship of clinical chemistry and liver and kidney histopathology findings in 13-week toxicity studies in rats[J]. Toxicology, 1996, 107(1):17-29.

[13] CRISSMAN J W, GOODMAN D G, HILDEBRANDT P K, et al. Best practice guideline: toxicologic histopathology [J]. Toxicologic Pathology, 2004, 32(2):126-131.

[14] MOLINE J M, GOLDEN A L, BAR-CHAMA N, et al. Exposure to hazardous substances and male reproductive health: a research framework[J]. Environmental Health Perspectives, 2000, 108(10):803-813.

[15] RICHBURG J H. The relevance of spontaneous and chemically-induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology [J]. Toxicology Letters, 2000, 115(1):36-39.

(2019-03-16 收稿, 2019-06-14 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 赵 毅