

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)21-1967-02

次声对雄性小鼠睾丸细胞 DNA CpG 甲基化水平的影响

高柳村¹, 陈彩云¹, 周 鹏², 陈景藻³, 舒 青²(第四军医大学:¹ 口腔医学系十六队,² 基础部医学遗传学与发育生物学教研室,³ 西京医院次声实验室 陕西 西安 710033)

Effects of infrasound on DNA CpG methylation of testicular cells in male mice

GAO Liu-Cun¹, CHEN Cai-Yun¹, ZHOU Peng², CHEN Jing-Zao³, SHU Qing²

¹Team 16, Department of Stomatology, ²Department of Medical Genetics and Developmental Biology, School of Basic Medicine, ³Infrasound Lab, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To investigate the changes of genome DNA methylation of testicular cells in mice with high performance liquid chromatography (HPLC) after infrasound exposure, and to explore the relations between infrasound and epigenetics. **METHODS:** The BALB/c mice were exposed to infrasound (8 Hz/130 dB) for 1, 7 and 14 d, respectively, 2 h daily, and the control groups were unexposed. Then the changes of genome DNA methylation of testicular cells in the mice were analyzed with HPLC. **RESULTS:** The levels of the genome DNA methylation of testicular cell in exposed groups were all significantly lower than those in control groups as time went on (1 d, 0.0150 ± 0.0127 vs 0.0235 ± 0.0062 ; 7 d, 0.0140 ± 0.0030 vs 0.0273 ± 0.0040 ; 14 d, 0.0150 ± 0.0096 vs 0.0250 ± 0.0049 , $P = 0.000$). **CONCLUSION:** The infrasound markedly affects the genome DNA methylation of testicular cells. These changes are positively associated with the infrasound exposure time.

【Keywords】 infrasound; mice; testis cell; methylation

【摘要】目的:应用高效液相色谱分析技术对次声作用后小鼠睾丸细胞基因组 DNA CpG 甲基化的变化进行分析,以研究次声作用与表遗传学改变的关系。方法:采用 8 Hz, 130 dB 的次声分别作用于 1, 7 和 14 d 组 3 个实验组,各雄性 Balb/c 小鼠 20 只,每日次声暴露 2 h。同时设对照组,并利用高效液相色谱分析技术对实验组与对照组的小鼠睾丸细胞基因组 DNA CpG 甲基化水平进行检测。结果:次声暴露 1, 7

和 14 d 组的小鼠睾丸细胞基因组 DNA CpG 甲基化程度均低于对照组,并随次声作用时间的变化而改变,分别为 0.0150 ± 0.0127 vs 0.0235 ± 0.0062 , 0.0140 ± 0.0030 vs 0.0273 ± 0.0040 , 0.0150 ± 0.0096 vs 0.0250 ± 0.0049 ($P = 0.000$)。结论:次声作用可致睾丸细胞基因组 DNA CpG 甲基化的改变,与次声暴露时间有关。

【关键词】 次声; 小鼠; 睾丸细胞; 甲基化

【中图分类号】 R394.1 **【文献标识码】** A

0 引言

高强度次声可致生物体组织和器官的损伤,可使日常生活和战斗能力受到影响。表遗传学是研究没有 DNA 序列变化、可遗传的、稳定的基因表达(修饰)的改变。次声是否可致生殖细胞表遗传学变化尚未见报道。本实验我们采用第四军医大学研制的次声压力舱系统,观察在一定声压级水平的次声作用下小鼠睾丸细胞基因组 DNA CpG 甲基化的变化情况,以研究次声的损伤与表遗传学改变的关系,为探讨次声对人体的危害及制定预防措施提供一定的依据。

1 材料和方法

1.1 仪器设备 次声声源及检测系统采用第四军医大学在中国科学院声学研究所和航天工业总公司第 41 所的指导和协作下建成的、声源为电动扬声器式次声压力舱系统及检测系统。次声压力舱系统由低频信号发生器、功率放大器和电动扬声器组成。检测系统主要包括次声传声器和次声信号数据采集分析系统。

1.2 实验动物及分组 健康雄性 Balb/c 小鼠 90 只(体质量 18~20 g),我校实验动物中心提供。分笼饲养于安静舒适的环境下(基础噪音不高于 40 dB),标准饲料喂养,自由饮水。小鼠随机分为 1, 7 和 14 d 共 3 组,每组 20 只,每天暴露于次声压力舱产生的 8 Hz, 130 dB 声压场中 2 h;对照组每组 10 只,按上述 3 个时间点每天在次声舱内无作用放置 2 h。

1.3 睾丸组织 DNA 提取与鉴定 各组于次声作用完毕后当日用脊椎脱臼法处死小鼠。摘取睾丸组织,将 1.0 g 组织放入研钵中磨碎,加 DNA 提取液 10 mL

收稿日期 2006-04-24; 接受日期 2006-09-08

基金项目 军队“十五”指令性课题(01L071)

通讯作者 舒 青. Tel: (029) 84774490 Email: tqingshu@fmmu.edu.cn

作者简介 高柳村. 第四军医大学在读七年制临床医学专业学员. Tel:

(029) 84774490 Email: camelboat@sohu.com

(含 10 mL/L Tris Cl pH 8.0, 0.1 mol/L EDTA, pH 8.0, 0.5 g/L SDS) 蛋白酶 K 消化 55°C 水浴过夜, 饱和酚/氯仿法抽取 DNA, 冰乙醇沉淀 DNA, 常温晾干, 加水溶解 紫外分光光度计检测 DNA 浓度及纯度。

1.4 HPLC 基因组甲基化检测 将 100 μ g 基因组 DNA 和 100 μ L 400 mL/L 的氢氟酸(HF, 优级纯, 上海致冷剂厂)混匀 80°C 温育 12 h 后开盖置 40°C 烘箱至液相完全蒸发 随之加新鲜配制的 0.02 mol/L pH 为 2.3 的 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 100 μ L。碱基水解后, 采用包括自动紫外监测及积分仪的 Waters 510 型 HPLC, 按要求进行检测。积分面积 5 mC/(5 mC + C) 的百分数检测总基因组 DNA 中 ^5mC 的含量即 DNA 甲基化的水平^[1]。检测开始前分别用 A, T, G, C 与 ^5mC 的标准品过柱^[2] 确定 5 mC 与 C 峰值出现的时间。

统计学处理: 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS12.0 统计软件分析。1, 7 和 14 d 暴露组与对照组间用方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

次声作用 1, 7 和 14 d 后各暴露组与相应对照组比较 DNA 甲基化均有不同程度的降低, 并随次声作用时间的增加而改变。次声作用使暴露组与对照组之间 DNA 甲基化的程度差异有统计学意义(P = 0.000) 而各组间 DNA 甲基化的程度差异不明显(P = 0.269 表 1)。

表 1 8 Hz/130 dB 次声暴露后小鼠睾丸细胞 DNA CpG 甲基化水平的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	1 d	7 d	14 d
对照	10	0.0235 \pm 0.0062	0.0273 \pm 0.0040	0.0250 \pm 0.0049
暴露 ^a	20	0.0150 \pm 0.0127	0.0140 \pm 0.0030	0.0150 \pm 0.0096

^aP < 0.05 vs 对照组。

3 讨论

次声超过一定声压级水平的次声暴露可造成生物体器官或细胞功能及形态的损伤^[3], 当声压频率为 16 Hz 声强为 100 dB 次声作用能引起淋巴管的收缩反应^[4]。声压频率为 16 Hz 声强为 130 dB 的次声暴露可诱使 L929 细胞细胞膜上突起缩短凹陷变浅^[5], 引起内皮细胞损伤^[6]和心肌细胞凋亡^[7]。声压频率为 8 Hz 声强为 130 dB 次声暴露可使大鼠海马 5-HT, 5-HTR, RyR 表达减少^[8], 造成神经细胞损伤和功能紊乱, 进而引起动物学习记忆功能障碍。同等声压级水平的次声暴露还可导致小鼠生育能力降低^[9], 次声暴露强度 \geq 130 dB 可引起豚鼠 Corti 器超

微结构不同程度的损伤和听阈永久性丧失^[10]。

魏亚宁等^[11]报道次声暴露对小鼠睾丸组织细胞及其超微结构的影响, 损伤以次声参数为 8 Hz/130 dB 最为严重, 在 7 和 14 d 组中出现了大量的畸形精子。我们实验选取能使小鼠睾丸支持细胞、间质细胞及生精细胞损伤现象最为严重的 8 Hz/130 dB 次声作用小鼠, 并观察在该声压级水平的次声条件下, 暴露不同时间后小鼠睾丸细胞基因组 DNA 甲基化的变化情况。结果表明小鼠睾丸细胞基因组 DNA 甲基化的水平与次声的暴露与否密切相关, 并随暴露时间的增加而改变。这种甲基化的调节过程出现在机体应激损伤修复的早期阶段, 低甲基化可能易于发生各种修复基因的转录翻译, 进而增强表达功能性蛋白, 通过此种方式以加强睾丸细胞对抗外界次声损伤的能力, 随后小鼠睾丸组织对次声作用产生适应性。结果提示次声作用与基因组 DNA 甲基化的水平具有正态的量效关系。由本实验推测低甲基化可作为次声导致睾丸组织细胞损伤的早期检测指标之一, 对次声损伤及其严重程度的评价具有较重要的诊断提示价值, 但次声共振反应后的睾丸细胞甲基化水平的普遍降低值得进一步研究。

【参考文献】

- [1] 房静远, 萧树东, 李蓉蓉, 等. HPLC 检测胃癌 DNA 甲基化的初步研究[J]. 中国肿瘤临床, 1997 24(7): 538-540.
- [2] Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A. The human Dnmt2 has residual DNA(cytosine-C5) methyltransferase activity[J]. J Biol Chem, 2003 278(34): 31717-31721.
- [3] 陈景藻. 次声产生及生物学效应[J]. 国外医学·物理医学与康复学分册, 1999 19(1): 9214.
- [4] Krivolesova SA, Svidovyi VI, Lobov GI, et al. Effects of infrasound and noise on contractility of lymphatic vessels[J]. Med Tr Prom Ekol, 2001 2: 16-20.
- [5] 王冰水, 陈景藻, 刘斌, 等. 次声暴露对 L929 细胞膜影响的原子力显微镜观察[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2005 23(6): 428-430.
- [6] Chow K, Cheung F, Lao TT. Effect of homocystein on the production of nitric oxide in endothelial cells[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999 26(10): 817-818.
- [7] 么晓轶, 裴兆辉, 朱妙章, 等. 8 Hz/90 dB 次声暴露后心肌细胞凋亡及其相关机制研究[J]. 第四军医大学学报, 2006 27(6): 490-492.
- [8] 谭永霞, 李玲, 陈景藻, 等. 次声对大鼠海马 5-HT, 5-HTR, RyR 表达及恢复的研究[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2005 4(4): 324-327.
- [9] 刘秀敏, 甄荣, 陈惠芳, 等. 次声对小鼠生育能力与免疫功能的影响[J]. 中华物理医学与康复, 2000 22(2): 100-103.
- [10] 冯勃, 姜泗长, 杨伟炎, 等. 强次声波对豚鼠 Corti 器超微结构的损伤[J]. 中华耳科学杂志, 2006 4(1): 65-68.
- [11] 魏亚宁, 刘静, 舒青, 等. 次声暴露对小鼠睾丸细胞超微结构的影响[J]. 中华男科学, 2002 8(5): 323-328.

编辑 王小仲