

Combined Effect of Di-n-butyl Phthalate and Benzo(a) pyrene on Vimentin and α -tubulin in Rat Sertoli Cells

邻苯二甲酸二丁酯和苯并[a]芘对大鼠睾丸支持细胞波形蛋白和微管蛋白表达的影响

QIU Zhi-qun^{1,2}, SHU Wei-qun², CHEN Ji-an²,
LUO Jiao-hua², YANG Lan², ZHENG You-ke¹, CAO Jia^{1,*}
(1. Department of Hygienic Toxicology; 2. Department of Environmental Hygiene, School of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

邱志群^{1,2}/舒为群²/陈济安²/罗教华²/
杨澜²/郑有科¹/曹佳^{1,*}
(第三军医大学军事预防医学院:1. 军事毒理学教研室 2. 环境卫生学教研室 重庆 400038)

【摘要】背景与目的：探讨邻苯二甲酸二丁酯 (di-n-butyl phthalate, DBP) 和苯并[a]芘 [benzo(a) pyrene, BaP] 单独或联合染毒对大鼠睾丸支持细胞波形蛋白和 α -微管蛋白表达的影响。 材料与方法：分离纯化大鼠睾丸支持细胞，以 1、10、100 $\mu\text{g/ml}$ DBP 和 0.1、1、10 $\mu\text{g/ml}$ BaP 单独或依次联合染毒 12、24、48 h 后，用免疫荧光方法检测细胞中波形蛋白和 α -微管蛋白的表达。 结果：与 DMSO 组比较，染毒 24 h 后，10 $\mu\text{g/ml}$ DBP 与 1 $\mu\text{g/ml}$ BaP 均可诱导波形蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$)，100 $\mu\text{g/ml}$ DBP 组和 10 $\mu\text{g/ml}$ BaP 组的波形蛋白下降更为显著 ($P < 0.01$)，100 $\mu\text{g/ml}$ DBP + 10 $\mu\text{g/ml}$ BaP 联合染毒组波形蛋白的表达显著降低 ($P < 0.01$)。染毒 48 h 后，DBP 和 BaP 单独染毒中、高剂量组波形蛋白的表达显著降低 (分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)，联合染毒各组的波形蛋白表达与 DMSO 组相比均显著减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，但与 DBP 和 BaP 各对应剂量单独作用组并无显著差异 ($P > 0.05$)。染毒 24 h 后，10 $\mu\text{g/ml}$ BaP 组 α -微管蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$)；48 h 后，100 $\mu\text{g/ml}$ DBP 组 α -微管蛋白表达显著上升 ($P < 0.05$)，BaP 各组 α -微管蛋白表达均显著增加。 结论：一定剂量的 DBP 和/或 BaP 可诱导大鼠支持细胞内波形蛋白表达降低，微管蛋白表达增加，二者联合作用呈现拮抗效应。

【关键词】邻苯二甲酸二丁酯；苯并[a]芘；睾丸支持细胞；波形蛋白； α -微管蛋白

中图分类号：R730.45 文献标识码：A 文章编号：1004-616X(2009)03-0165-04

【ABSTRACT】BACKGROUND AND AIM: To investigate the combined effects of di-n-butyl phthalate (DBP) and benzo(a) pyrene (BaP) on vimentin and α -tubulin in rat sertoli cells. MATERIALS AND METHODS: Rat testicular sertoli cells were isolated, purified and cultured, then treated with the toxins at different doses, DBP(1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$), BaP (0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$) and DBP + BaP (1 + 0.1, 10 + 1, 100 + 10 $\mu\text{g/ml}$), for 12 h, 24 h and 48 h. The vimentin and α -tubulin were measured with immunofluorescence technique. RESULTS: At 24 h, the expressions of vimentin protein in 10 $\mu\text{g/ml}$ DBP group and 1 $\mu\text{g/ml}$ BaP group were decreased significantly ($P < 0.05$), and lower in 100 $\mu\text{g/ml}$ DBP group ($P < 0.01$), 10 $\mu\text{g/ml}$ BaP group ($P < 0.01$) and 100 $\mu\text{g/ml}$ DBP + 10 $\mu\text{g/ml}$ BaP group ($P < 0.01$). At 48 h, the expressions of vimentin protein in middle and high dose of DBP group and BaP group and all three combined groups were obviously decreased, but there was no difference between each combined group and their matched dose group. The expression of α -tubulin protein was increased significantly in 10 $\mu\text{g/ml}$ BaP group ($P < 0.05$) at 24 h and in 100 $\mu\text{g/ml}$ DBP group and each BaP groups at 48 h. CONCLUSION: DBP and BaP could decrease vimentin protein expression and increase α -tubulin protein expression at certain dosages, and their combined effect on these two proteins in rat sertoli cells were antagonistic.

【KEY WORDS】dibutyl phthalate; benzo(a)pyrene; sertoli cell; vimentin; α -tubulin

收稿日期：2008-12-16；修订日期：2009-02-20
基金项目：国家科技部西部引导项目(2003BA869C)；国家自然科学基金重点项目(30630056)；重庆市重大科技专项(CSTC2006AA7003)
作者简介：邱志群，女，四川省自贡市人，博士，高级实验师，主要从事环境毒理学方面的研究。Tel：023-68752293；E-mail：qiuzhiqun@gmail.com
* Correspondence to: Cao Jia, E-mail: caojia@mail.tmmu.com.cn

邻苯二甲酸酯类和多环芳烃类是目前水环境污染最为广泛的两类有机污染物,它们的代表物分别为邻苯二甲酸二丁酯(di-n-butyl phthalate, DBP)和苯并[a]芘[benzo(a)pyrene, BaP]^[1]。由于水中有机物以混合的形式进入人体,研究其联合作用显得尤为重要。DBP具有明显的雄性生殖毒性,可致雄性啮齿类动物睾丸萎缩、重量减轻、睾丸标志酶活性下降、精母细胞和精子细胞丧失、曲细精管变性萎缩等^[2-3];BaP可改变曲细精管形态,减少生精细胞和精子数量以及诱发间质细胞肿瘤^[4-5];但是目前二者联合作用的生殖毒性尚未见报道。我们采用DBP和BaP单独和联合染毒原代大鼠睾丸支持细胞,观察二者对支持细胞中波形蛋白和 α -微管蛋白表达的影响,为在细胞水平探讨二者的联合作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂

18~21日龄雄性SD大鼠(睾丸未下降至阴囊),由第三军医大学实验动物中心提供。DMEM/F12培养基(Gibco BRL,爱尔兰),V型胶原酶、胰蛋白酶(Sigma试剂公司,美国),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),山羊抗vimentin和大鼠抗 α -tubulin(Santa Cruz生物技术公司,美国),FITC标记抗山羊IgG和TRITC标记抗鼠IgG(北京中杉金桥生物有限公司)。

1.2 支持细胞的分离、纯化与培养

根据Wu^[7]的方法改进并按以下步骤进行。颈椎脱臼处死大鼠,消毒腹部皮肤后无菌取睾丸,剥开睾丸被膜,挤出睾丸实质,小心剔除血管,用眼科剪将组织剪成1~2 mm³碎块。加入0.25%胰蛋白酶,于37℃,5% CO₂培养箱中消化20~60 min,加入含有小牛血清的培养液终止消化,离心(800 r/min × 3 min)2次去除胰酶;再用0.05%V型胶原酶于37℃,5% CO₂培养箱中消化30~60 min,终止消化后100目细胞筛过滤,离心(800 r/min × 3 min)洗涤去除胶原酶。加入培养液(DEME/F12、L-谷氨酰胺3 mg/ml、20%胎牛血清、青霉素100 U/ml、链霉素100 U/ml)制成单细胞悬液,苔盼兰染色,计数。将细胞稀释成3 × 10⁵~3.5 × 10⁵个/ml的细胞悬液,接种于培养瓶中,35℃、5% CO₂培养箱中培养,48 h后加入少量20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)处理生精细胞,继续培养备用,隔日换液1次。第4 d用0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA溶液消化后制成1 × 10⁵/ml的细胞悬液,种植于已预置好小盖玻片的24孔培养板中。将培养板移入细胞培养箱,置于5% CO₂、35℃及完全饱和湿度条件下培养,待细胞融合至50%

时染毒,染毒剂量及分组见表1。

1.3 波形蛋白和 α -微管蛋白的免疫荧光检测

按不同分组的各时间点染毒完毕后,取出玻片,用预冷(4℃)的0.01 mol/L的PBS漂洗2次,用冷丙酮固定20 min后自然干燥。加入羊抗vimentin(稀释度为1:100)或鼠抗 α -tubulin(稀释度为1:50),4℃孵育过夜后在37℃下继续孵育20 min,PBS清洗5 min × 3次;加入FITC标记抗山羊IgG(稀释度为1:50)或TRITC标记抗大鼠IgG(稀释度为1:50)37℃孵育60 min,PBS清洗5 min × 3次,DAPI染色5 min后PBS清洗5 min × 3次(vimentin检测时),5%缓冲甘油封片,荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察,照相记录。

1.4 荧光显微镜观察与图像分析

在显微镜下以随机选取5个视野拍照,各组采用相同曝光时间,用图像处理系统测量荧光强度,以灰度级表示,灰度级分为256个灰度层次,细胞的积分灰度级代数和除以分析区域面积,得到平均灰度级。

1.5 统计学分析

采用SPSS12.0 for windows统计软件包进行统计学分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用F检验和q检验。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 支持细胞波形蛋白的表达

结果见表1。染毒12 h后各组细胞内波形蛋白的表达无显著变化。与DMSO组比较,染毒24 h后,10 μ g/ml DBP与1 μ g/ml BaP可诱导波形蛋白表达下降($P < 0.05$),100 μ g/ml DBP组和10 μ g/ml BaP组的波形蛋白下降更为显著($P < 0.01$),而1 μ g/ml DBP组与0.1 μ g/ml BaP组的表达与对照组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。联合染毒24 h后,仅在100 μ g/ml DBP + 10 μ g/ml BaP组波形蛋白的表达显著降低。染毒48 h后,DBP和BaP单独染毒组的变化趋势与24 h相同,其中、高剂量组显著低于对照组(分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$);联合染毒各组的波形蛋白表达与DMSO组相比均显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但与DBP和BaP各对应剂量单独作用组间的差异无统计学意义。

从形态学上观察,波形蛋白表达在细胞质,由核周的细胞质呈辐射状向四周胞膜伸展,直到细胞膜。DMSO组细胞中波形蛋白多而长,而且分布均匀,整个细胞的胞质内分布着辐射状或网状的波形蛋白。而染毒后出现波形蛋白形状变化,细胞从多边形收缩,有的成索状,有的成圆形,细胞间的空隙明显增大(图1)。

表 1 DBP和BaP单独及联合染毒大鼠睾丸支持细胞波形蛋白的表达 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)
Table 1 The effects of DBP, BaP and DBP + BaP on vimentin in rat sertoli cells ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Group	Average gray level		
	12 h	24 h	48 h
Control	65.242 ± 5.025	65.525 ± 6.157	73.658 ± 3.597
DMSO	67.319 ± 4.357	68.839 ± 7.841	76.260 ± 5.779
DBP	1 μg/ml	58.229 ± 7.625	50.600 ± 3.549
	10 μg/ml	57.691 ± 10.568	48.829 ± 6.509*
	100 μg/ml	54.562 ± 4.625	42.897 ± 7.236**
BaP	0.1 μg/ml	62.774 ± 8.315	53.957 ± 6.600
	1 μg/ml	56.537 ± 6.584	49.055 ± 10.677*
	10 μg/ml	56.414 ± 8.255	44.007 ± 10.241**
DBP + BaP	1 μg/ml DBP + 0.1 μg/ml BaP	70.670 ± 5.234	61.612 ± 5.629
	10 μg/ml DBP + 1 μg/ml BaP	65.929 ± 8.215	52.146 ± 12.940
	100 μg/ml DBP + 10 μg/ml BaP	60.250 ± 4.235	45.132 ± 4.288**

Compared with DMSO group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

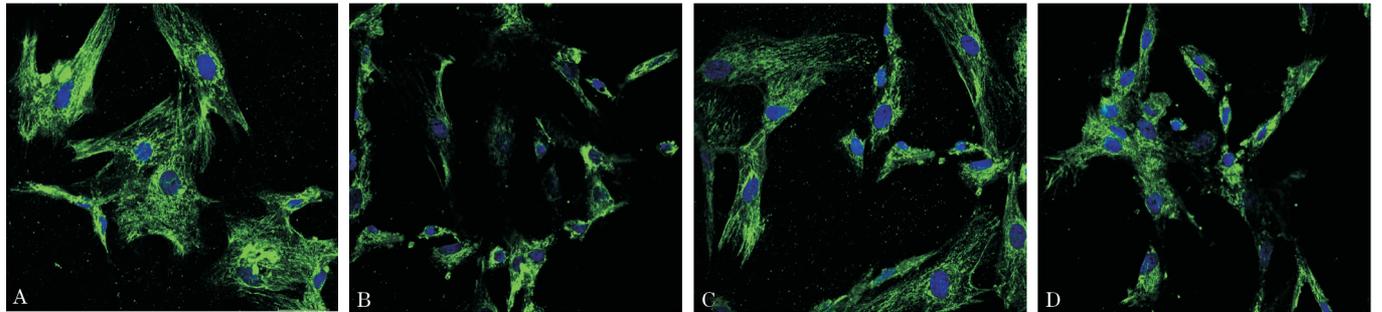


图 1 DBP 和 BaP 染毒大鼠睾丸支持细胞 48 h 后波形蛋白的表达(激光共聚焦观察)。A: DMSO 组 B: 10 μg/ml BaP 组 ; C: 100 μg/ml DBP 组 D: 100 μg/ml DBP + 10 μg/ml BaP 组
Figure 1 The expression of vimentin in Sertoli cell of rat after exposure to DBP, BaP and DBP + BaP treatment for 48 h (Laser Scanning Confocal Microscope). A: DMSO group B: 10 μg/ml BaP group ; C: 100 μg/ml DBP group D: 100 μg/ml DBP + 10 μg/ml BaP group

2.2 支持细胞 α-微管蛋白的表达

见表 2。染毒 12 h 后各组细胞内的 α-微管蛋白的表达与 DMSO 组相比均无显著改变;染毒 24 h 后, BaP 10 μg/ml 剂量组 α-微管蛋白表达开始明显增加 ($P < 0.05$), 其余各组与对照组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。随着染毒时间延长到 48 h, DBP 100 μg/ml

剂量组的 α-微管蛋白表达显著上升 ($P < 0.05$), 10 μg/ml 和 1 μg/ml 剂量组与对照组间差异仍无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 BaP 0.1 μg/ml 和 1 μg/ml 剂量组的表达较 DMSO 组增加 ($P < 0.05$), 其 10 μg/ml 组的增加更显著 ($P < 0.01$)。联合染毒各组的 α-微管蛋白水平与对照组间差异无统计学意义。

表 2 DBP和BaP单独及联合染毒大鼠睾丸支持细胞α-微管蛋白的表达 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)
Table 2 The effects of DBP, BaP and DBP + BaP on vimentin in rat sertoli cells ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Group	Average gray level		
	12 h	24 h	48 h
Control	32.218 ± 2.742	33.215 ± 3.242	22.091 ± 2.111
DMSO	27.719 ± 3.561	29.150 ± 4.3612	18.690 ± 4.082
DBP	1 μg/ml	31.010 ± 1.546	27.011 ± 2.146
	10 μg/ml	30.897 ± 6.368	29.897 ± 5.068
	100 μg/ml	32.253 ± 4.765	32.254 ± 4.965
BaP	0.1 μg/ml	34.803 ± 3.198	32.603 ± 2.298
	1 μg/ml	32.732 ± 2.169	33.732 ± 1.969
	10 μg/ml	22.818 ± 3.967	38.818 ± 2.867*
DBP + BaP	1 μg/ml DBP + 0.1 μg/ml BaP	27.388 ± 3.343	28.398 ± 4.343
	10 μg/ml DBP + 1 μg/ml BaP	26.995 ± 5.598	30.965 ± 3.698
	100 μg/ml DBP + 10 μg/ml BaP	31.571 ± 5.171	31.571 ± 5.011

Compared with DMSO group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

3 讨论

支持细胞与生精细胞间具有特殊的胞间联系, 波形蛋白和微管蛋白在维持支持细胞的细胞骨架、支持细胞

与生精细胞的黏附以及二者间的信号传递等方面起着重要作用, 因此, 任何影响波形蛋白和微管蛋白的表达、结构及降解的因素都必将影响支持细胞的功能, 进而干扰精子的发生和成熟^[8-9]。支持细胞是某些环境睾丸毒



物作用的原始和直接靶点,在一些化学毒物及物理因素对雄性生殖产生毒性作用时,支持细胞由于结构的破坏而致使生精细胞脱落^[10-11]。

本研究结果显示 DBP 和 BaP 均可使支持细胞波形蛋白表达减少,而且呈剂量依赖性。Kleyменова 等^[12]发现孕鼠在妊娠期间染毒 500 mg/(kg·d) DBP 后可导致子代雄性大鼠睾丸支持细胞内波形蛋白减少或消失,从而导致生精细胞凋亡增加。另一种邻苯二甲酸酯的代谢产物——2-乙基己基邻苯二甲酸单酯 (MEHP) 也具有同样的毒作用^[8],我们的实验结果与此相一致。目前尚未见到 BaP 对波形蛋白影响的报道。DBP 和 BaP 联合作用后波形蛋白表达减少的趋势与单独染毒一致,与对照组间差异具有统计学意义,但是联合组与 DBP 和 BaP 各对应剂量单独作用组并无显著差异。波形蛋白不仅在表达量上有变化,而且形态也有变化。DBP、BaP 和联合染毒各高剂量组染毒 24 h 与 48 h 后细胞内波形蛋白明显缩短,变成索状或者小圆形,支持细胞形态的改变可能使支持细胞与生精细胞的连接出现中断,嵌在支持细胞周边的生精细胞将受到影响,从而干扰生精过程。

BaP 染毒 24 h 和 48 h 后可使支持细胞中 α -微管蛋白的表达增加,而且呈剂量依赖性。DBP 在染毒 48 h 后高剂量组 (100 μ g/ml) 可显著增加 α -微管蛋白的表达 ($P < 0.05$)。但是联合染毒各组各时点与 DMSO 组相比均无显著变化。以上结果说明 DBP 和 BaP 均可以干扰支持细胞的微管蛋白的表达,BaP 的干扰强度大于 DBP,但是联合染毒后该干扰作用消失,提示二者具有拮抗效应。睾丸中的微管蛋白主要在支持细胞胞浆中表达,在保持生精细胞的稳定以及生精细胞与支持细胞的连接中发挥重要作用,同时在精子发生与精子成熟释放中也有一定的作用。Boekelheide^[9]证实实用环境毒物 2,5-己二酮可以通过干扰支持细胞的微管蛋白而诱导睾丸损伤,造成生精上皮的模糊和生精细胞死亡。Samir^[5]报道多环芳烃中的荧蒽使支持细胞 α -微管蛋白变长,从而引起支持细胞凋亡。虽然 DBP 染毒整体动物后未见到睾丸微管蛋白的显著改变,但是在体外培养的 V79 细胞中有不同程度的改变^[13],我们的结果与此相一致。

由于有机污染物以混合的形式进入人体,研究有机物混合后的生物效应更能反映其对生物体的实际作用,我们的研究发现作为污染最为广泛的邻苯二甲酸酯类和多环芳烃类代表的 DBP 和 BaP 联合染毒支持细胞后对波形蛋白和 α -微管蛋白表达的影响均呈现拮抗效应,这为评价水中有机污染物的危害提供了新的思路。但是本室前期研究表明,二者联合作用在高剂量下可协同抑制睾丸支持细胞的增殖^[11],这提示 DBP 和 BaP 联合

染毒后的毒性作用是一个综合复杂的过程,其机制尚待深入研究。

参考文献:

- [1] 邱志群,舒为群,付文娟,等.邻苯二甲酸二丁酯和苯并[a]芘联合染毒对大鼠睾丸支持细胞的影响[J].第三军医大学学报,2008,30(11):1002-1005.
- [2] Mahood IK, Scott HM, Brown R, et al. In utero exposure to di(n-butyl) phthalate and testicular dysgenesis: comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity[J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(Suppl 1): 55-61.
- [3] Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Ema M. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2008, 50(1): 37-49.
- [4] Knox EG. Childhood cancers and atmospheric carcinogens[J]. J Epidemiol Community Health, 2005, 59(2): 101-105.
- [5] Raychoudhury SS, Dana K. Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced cytotoxicity in cultured rat Sertoli cells involves differential apoptotic response[J]. Environmental Health Perspectives, 2003, 111(1): 33-38.
- [6] Kopecky M, Semecky V, Nachtigal P. Vimentin expression during altered spermatogenesis in rats[J]. Acta Histochem, 2005, 107(4): 279-289.
- [7] Wu Z, Templeman JL, Smith RA, et al. Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on isolated developing mouse Sertoli cells in vitro[J]. J Anat, 2005, 206(2): 175-184.
- [8] Tay TW, Andriana BB, Ishii M, et al. Disappearance of vimentin in Sertoli cells: a mono (2-ethylhexyl) phthalate effect[J]. Int J Toxicol, 2007, 26(4): 289-295.
- [9] Boekelheide K, Fleming SL, Allio T, et al. 2,5-Hexanedione-induced testicular injury[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003, 43: 125-147.
- [10] Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, et al. The morphological changes of adult mouse testes after (60) Co gamma-radiation [J]. Iran Biomed J, 2008, 12(1): 35-42.
- [11] Bhattacharya N, Dufour JM, Vo MN, et al. Differential effects of phthalates on the testis and the liver [J]. Biol Reprod, 2005, 72(3): 745-754.
- [12] Kleyменова E, Swanson C, Boekelheide K, et al. Exposure in utero to di(n-butyl) phthalate alters the vimentin cytoskeleton of fetal rat Sertoli cells and disrupts Sertoli cell-gonocyte contact[J]. Biol Reprod, 2005, 73(3): 482-490.
- [13] Nakagomi M, Suzuki E, Usami K, et al. Effects of endocrine disrupting chemicals on the microtubule network in Chinese hamster V79 cells in culture and in Sertoli cells in rats[J]. Teratog Carcinog Mutagen, 2001, 21(6): 453-462.