

# 枸杞多糖对双酚 A 暴露小鼠生精细胞 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

李晓彩, 孙小娜, 钟秀会, 马爱团\*

(河北农业大学 中兽医学院, 定州 073000)

**摘要:** 研究枸杞多糖(LBP)对双酚 A(BPA)暴露小鼠睾丸生精细胞中 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 凋亡蛋白表达的影响。将 50 只成年雄性昆明小鼠随机分为 A、B、C、D、E 共 5 组, 每组 10 只。除正常对照组(A 组)注射等量橄榄油外, 其余 4 组小鼠分别腹腔注射  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 BPA, 连续 7 d, 建立生精损伤模型。同时 C、D、E 组小鼠分别灌服 7 d 不同剂量的 LBP( $50$ 、 $100$ 、 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 正常对照组(A 组)和模型组(B 组)小鼠灌服等量生理盐水。制备组织切片观察睾丸组织病理学变化, 免疫组化法测定睾丸组织 Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 凋亡蛋白的表达。结果显示, BPA 可极显著增加睾丸生精细胞 Caspase-3 和 Bax 的阳性细胞数量( $P < 0.01$ ), 降低 Bcl-2 的表达( $P < 0.05$ )。补充不同剂量 LBP 后, Caspase-3 的阳性表达均极显著低于模型组( $P < 0.01$ )。200  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  LBP 组生精细胞 Bax 的阳性细胞数量极显著低于模型组( $P < 0.01$ ); Bcl-2 的表达随 LBP 剂量的增加而提高, 其中 200  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  LBP 组阳性表达极显著高于模型组( $P < 0.01$ ), Bcl-2/Bax 比值也随着 LBP 剂量的增加而上升。结果表明, 枸杞多糖通过调节凋亡相关基因的表达, 抑制生精细胞凋亡, 从而缓解双酚 A 引起的雄性生殖损伤。

**关键词:** 枸杞多糖; 双酚 A; Caspase-3; Bcl-2; Bax

中图分类号: S853.74

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)02-0314-05

## Effects of LBP on the Expression of Caspase-3, Bcl-2 and Bax Proteins in Spermatogenic Cells of Mice Pretreated with Bisphenol A

LI Xiao-cai, SUN Xiao-na, ZHONG Xiu-hui, MA Ai-tuan\*

(College of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Agricultural University of Hebei, Dingzhou 073000, China)

**Abstract:** The aim of this experiment was to study the effects of LBP on the expression of Caspase-3, Bcl-2 and Bax proteins in spermatogenic cells of mice. Fifty adult male Kunming mice were randomly divided into five groups, which were A, B, C, D and E, with 10 mice in each group. Except the mice in group A which were injected with olive oil as control group, the mice in other four groups were intraperitoneally injected with  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  BPA for 7 days. Meanwhile, the mice in groups C, D, E were given different doses of LBP ( $50$ ,  $100$  and  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) by intragastric administration consecutively for one week, the mice in control (A) group and model (B) group were treated with physiological saline. Histopathological changes of the testicular tissue were observed, immunohistochemical technique was applied to detect the expression of Caspase-3, Bcl-2 and Bax proteins. Results showed that BPA can enhance the expression of Caspase-3 and Bax proteins ( $P < 0.01$ ), diminish the expression of Bcl-2 ( $P < 0.05$ ). After supplement with different doses of LBP, the expression of Caspase-3 were all significantly decreased in C, D and E groups than that in the model group ( $P < 0.01$ ). With the dose of LBP increasing, the expression

收稿日期: 2011-07-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31072164); 河北省自然科学基金项目(C2010000662)

作者简介: 李晓彩(1985-), 女, 河北邯郸人, 硕士生, 主要从事中药药理与生殖免疫研究, E-mail: up2u0312@163.com

\* 通讯作者: 马爱团, 教授, Tel: 0312-2381601, E-mail: maaituan@126.com

of Bax was significantly decreased and the expression of Bcl-2 gradually increased than that in the model group especially in the  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  LBP group ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, Bcl-2/Bax ratio also increased obviously in groups B, C and D. Results suggest that LBP can restrain spermatogenic cell apoptosis through regulating the expression of apoptosis-related genes, thus alleviate the reproductive damage induced by BPA on adult male mice.

**Key words:** LBP; bisphenol A; Caspase-3; Bcl-2; Bax

在已发现的环境内分泌干扰物中,双酚 A(Bisphenol A, BPA)对雄性动物的不良影响备受关注,BPA 通过模拟雌激素与体内雌激素受体结合,干扰动物机体正常内分泌功能,引起雄性性腺发育不良,降低精液质量及精子数目,影响人类及动物的正常繁衍<sup>[1]</sup>。已有研究证实,枸杞多糖(Lycium barbarum polysaccharides, LBP)具有抗氧化、促生殖等多种药理活性,具有良好的保护雄性生殖的作用<sup>[2]</sup>。但 LBP 能否缓解环境内分泌干扰物引起的雄性生殖损伤,报道相对较少。本试验利用 BPA 建立雄性小鼠生殖损伤模型,通过给予不同剂量 LBP,研究其对小鼠雄性生殖系统的保护作用,明确 LBP 对生精细胞凋亡的影响,探讨 LBP 缓解雄性生殖损伤的途径及机理,为双酚 A 毒性的预防和治疗提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

成年昆明雄性小鼠,体质量( $25 \pm 2$ ) g,由河北医科大学实验动物中心提供。

### 1.2 主要试剂

双酚 A、橄榄油、枸杞多糖均购于美国 Sigma 公司;兔抗鼠 Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 多克隆抗体、即用型 SABC 试剂盒均购自北京博奥森生物技术公司;DAB 显色试剂盒,购自北京中杉金桥生物技术公司。

### 1.3 试验分组和处理

将 50 只成年雄性小鼠,正常饲养 7 d 后随机分为对照组(A)、BPA 模型组(B)、LBP 低剂量(C)、中剂量(D)和高剂量(E)处理组,每组 10 只。除对照组外,其余 4 组小鼠分别腹腔注射  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 BPA,1 次  $\cdot \text{d}^{-1}$ ,连续 7 d,建立生精损伤模型,对照组注射等量橄榄油<sup>[3]</sup>。同时 C、D、E 组小鼠分别灌服 50、100、200  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 LBP,A 组和 B 组小鼠灌服等量生理盐水,于末次处理 24 h 后脱颈处死小鼠,取双侧睾丸固定,制作石蜡切片。

### 1.4 检测指标

睾丸进行常规石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察睾丸组织病理学变化。切片按常规方法,二甲苯脱蜡后经各级酒精下行至水,用免疫组化 SABC 法检测小鼠睾丸生精细胞中凋亡蛋白的表达。一抗分别为兔抗鼠 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 多克隆抗体,二抗为生物素化羊抗兔 IgG,DAB 显色。按试剂盒说明书操作,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。高倍显微镜下分别观察 Caspase-3、Bcl-2、Bax 的阳性表达情况。每张切片分别选取 10 个圆形的曲细精管,每个处理组分别选取 100 个,在  $400 \times$  倍视野下计数每个曲细精管的阳性细胞数,求其平均值。

### 1.5 统计学分析

检测结果以“平均数和标准差( $\bar{x} \pm s$ )”表示,应用 SPSS16.0 统计软件进行分析。各组间两两比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$  为差异显著, $P < 0.01$  为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 小鼠睾丸组织的病理学变化

从组织切片(图 1)可以看出,正常小鼠睾丸曲细精管排列规则,结构清晰,层次分明,各级生精细胞排列紧密有序,管腔中有密集的精子。间质细胞紧密聚集于曲细精管之间的疏松组织内,细胞多呈棱形或三角形,胞质丰富。BPA 处理后,睾丸内各曲细精管排列疏松,间质细胞数量减少,呈弥散状分布于曲细精管之间。光镜下曲细精管内生精上皮排列紊乱,生精细胞大量脱落到管腔中,成熟精子数量减少甚至消失。补充 LBP 的小鼠,曲细精管结构与模型组比较明显改善,以 100 和  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 LBP 组最为显著,小管内各级生殖细胞排列有序,仅少量小管出现轻微损伤; $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  LBP 组小鼠睾丸组织也有改善,但效果不太明显。

### 2.2 睾丸生精细胞 Caspase-3 蛋白的表达

免疫组化结果,对照组 Caspase-3 的阳性反应物呈棕色,细胞主要分布于精原细胞和精母细胞,为

胞质表达;BPA 组阳性反应多集中于精原细胞,定位于胞核,间质细胞也有表达;各 LBP 组阳性表达主要在精原细胞,偶见部分间质细胞有阳性表达。从细胞凋亡的统计结果来看,BPA 组 Caspase-3 阳性表达细胞数量为 58.36,明显高于对照组的 41.85 ( $P<0.01$ );添加 LBP 后 Caspase-3 阳性细胞数量随其剂量增加逐渐下降,与 BPA 组相比均有显著性差异( $P<0.01$ )。

### 2.3 睾丸生精细胞 Bcl-2 和 Bax 的表达

高倍显微镜下 Bcl-2 阳性产物呈棕色,细胞质与细胞核均有阳性着色。对照组阳性表达集中于精原细胞;BPA 组在间质及支持细胞均有阳性表达,着色较浅,呈弥散状、条索状分布,精原细胞表达较少,与对照组比较,有显著差异( $P<0.05$ )。LBP 组

阳性反应主要在精原细胞及初级精母细胞表达,各级生精细胞有弱阳性表达,并随 LBP 剂量增加 Bcl-2 表达增加,其中 100 和 200  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  LBP 组凋亡表达显著高于模型组( $P<0.05$ )。

Bax 主要表达于精原细胞,阳性反应物为棕黄色,在胞质着色明显。Bax 在各组中均有凋亡信号表达,以 BPA 组阳性细胞数最多为 62.52 个·小管<sup>-1</sup>,显著高于对照组 47.23 个·小管<sup>-1</sup> ( $P<0.01$ );补充 LBP 后,随着 LBP 剂量增加,Bax 凋亡表达下降,200  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  LBP 组与 BPA 组相比有显著差异( $P<0.01$ );阴性对照未见免疫反应阳性着色。

Bcl-2 和 Bax 比值结果表明,添加 BPA 后 Bcl-2/Bax 为 0.920 0,明显低于对照组,而 LBP 组随着剂量增加 Bcl-2/Bax 比值逐渐上升(表 1)。

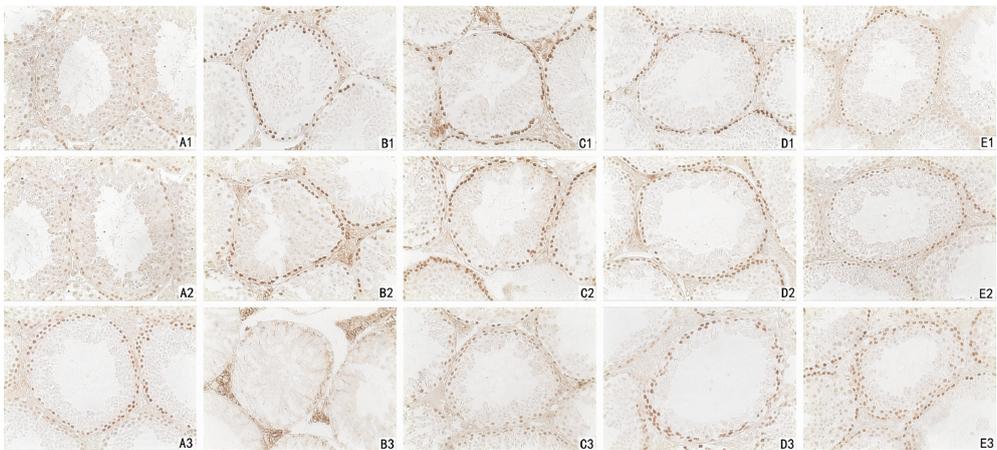
表 1 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的阳性细胞数量及 Bcl-2/Bax 的变化 ( $n=100$ )

Table 1 The expression of Caspase-3, Bcl-2, Bax and the ratio of Bcl-2/Bax in different groups

组别 Group	Caspase-3/(个·小管 <sup>-1</sup> )	Bcl-2/(个·小管 <sup>-1</sup> )	Bax/(个·小管 <sup>-1</sup> )	Bcl-2/Bax
A	41.854 5+1.227 3 <sup>A</sup>	64.527 8+2.364 9 <sup>ABa</sup>	47.229 9+1.098 9 <sup>Aa</sup>	1.384 1
B	58.362 6+1.451 6 <sup>B</sup>	56.691 3+1.817 5 <sup>Ab</sup>	62.521 3+1.423 6 <sup>Bb</sup>	0.920 0
C	48.480 2+2.154 9 <sup>Ca</sup>	57.213 6+1.398 0 <sup>Ab</sup>	56.638 1+3.568 8 <sup>ABb</sup>	0.973 5
D	43.200 0+1.574 7 <sup>ACb</sup>	64.284 7+2.642 5 <sup>ABa</sup>	55.945 8+2.858 9 <sup>ABb</sup>	1.138 1
E	43.184 4+1.666 0 <sup>ACb</sup>	67.205 0+2.505 4 <sup>B</sup>	53.003 9+1.861 3 <sup>Ab</sup>	1.270 6

A. 对照组;B. 20  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  双酚 A 组;C. 双酚 A+50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  枸杞多糖组;D. 双酚 A+100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  枸杞多糖组;E. 双酚 A+200  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  枸杞多糖组,以下图表同。同一列数字不同大写上标字母表示差异极显著( $P<0.01$ ),不同小写上标字母表示差异显著( $P<0.05$ )

A. Control; B. 20  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  BPA group; C. BPA+50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  LBP group; D. BPA+100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  LBP group; BPA+E. 200  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  LBP group, the same as below. The different lowercase and capital letters followed the data in the same column showed significant difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively



A1~E1. Caspase-3 蛋白;A2~E2. Bax 蛋白;A3~E3. Bcl-2 蛋白

A1-E1. Expression of Caspase-3 protein; A2-E2. Expression of Bax protein; A3-E3. Expression of Bcl-2 protein

图 1 小鼠睾丸生精细胞 Caspase-3、Bcl-2 与 Bax 蛋白的表达 (200×)

Fig. 1 The expression of Caspase-3, Bcl-2 and Bax proteins in spermatogenic cells in mice (200×)

### 3 讨论

人和动物在正常生理性精子发生过程中,各阶段都存在自发性生精细胞凋亡。在环境理化因素如激素、化学药物、射线、温度等影响下,可发生病理性生精细胞凋亡,导致凋亡增加,以致精子生成量减少或不育<sup>[4]</sup>。凋亡是一系列高度调控的半胱氨酸蛋白酶 Caspase 级联反应事件的结果,Caspase-3 被证实处于该级联反应的下游,是 Caspase 家族中最重要的凋亡执行者之一<sup>[5-6]</sup>。Bcl-2 蛋白家族是细胞凋亡蛋白家族中重要的调控蛋白,包括 Bcl-2、Bax、Bad、Bak 等成员。Bax 自身可形成同源二聚体促进凋亡,Bcl-2 和 Bax 形成异源二聚体发挥抑制凋亡作用,因此两者的比值决定了细胞的命运<sup>[7-8]</sup>。

#### 3.1 双酚 A 与生精细胞凋亡

前期试验证实,成年小鼠连续 7 d 注射 20 mg · kg<sup>-1</sup> BPA,可导致小鼠睾丸质量显著下降,组织形态结构明显破坏,血清中生殖激素睾酮和黄体生成素含量显著下降,抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活性均明显降低<sup>[3]</sup>。本试验结果显示,20 mg · kg<sup>-1</sup> BPA 诱导小鼠生精细胞的 Caspase-3 和 Bax 高表达,下调凋亡抑制因子 Bcl-2 的表达,使 Bcl-2/Bax 比例失衡,引起生精细胞凋亡。表明 BPA 诱发生精细胞凋亡,是导致精子数量减少的主要原因。

研究表明,在睾丸发育及精子发生过程中,自发性生精细胞凋亡主要为精原细胞,极少数次级精母细胞和精子细胞出现凋亡<sup>[9]</sup>。研究也证实,正常小鼠曲细精管中有少量阳性细胞,且集中表达于靠近基底膜的精原细胞。而添加 BPA 后,阳性反应多集中于间质细胞(Leyding)和支持细胞(Sertoli)。睾丸 Leyding 细胞是合成和分泌睾酮的细胞,睾酮是维持精子发生和成熟的关键因素。前期试验证实,应用 BPA 后小鼠体内睾酮含量显著减低<sup>[3]</sup>,推测睾酮的缺乏与 Leyding 细胞凋亡直接相关。Sertoli 为各级生精细胞提供结构支持,与各级生精细胞紧密连接形成血睾屏障。研究表明,BPA 可对小鼠睾丸 Sertoli 细胞造成损害,引起睾丸 Sertoli 细胞的退化,降低生精能力<sup>[10-11]</sup>。本试验结果中,BPA 导致睾丸 Sertoli 细胞出现不同程度的损伤,使大量生精细胞脱落。说明 BPA 通过损伤 Leydig 细胞和 Sertoli 细胞的结构和功能,诱导成年小鼠生殖损伤。

#### 3.2 枸杞多糖与生殖凋亡相关基因的表达

枸杞多糖作为我国传统中药枸杞子的主要活性成分,具有增强免疫力、抗氧化和抑制肿瘤生长等作用。试验结果显示,补充 LBP 组生精细胞 Caspase-3 凋亡蛋白的表达显著下降,并呈现一定的剂量依赖关系,以 200 mg · kg<sup>-1</sup> LBP 剂量组效果最为显著,凋亡细胞数趋于正常组。说明 LBP 可减轻双酚 A 所致的生精细胞凋亡,缓解睾丸生精损伤。

有研究表明,LBP 可通过调控凋亡相关基因 Bax 和 Bcl-2 的表达来抑制氧化损伤所致大鼠晶状体上皮细胞凋亡<sup>[2]</sup>。在本试验中发现,添加 LBP 后 Bcl-2 在初级精母细胞及以后各级生精细胞表达显著,促进 Bcl-2 蛋白的表达,同时 LBP 降低了 Bax 的阳性细胞数量,增加 Bcl-2/Bax 比值,抑制 BPA 所致的生精细胞凋亡。

本试验显示,凋亡蛋白 Caspase-3 阳性信号的表达存在易位现象,在正常细胞中 Caspase-3 主要在细胞质中表达,凋亡的生精细胞中出现了 Caspase-3 由胞质向胞核的移位,作为细胞凋亡过程中的重要执行蛋白,Caspase-3 必须进入细胞核执行其功能,提示 Caspase-3 的移位可能与其发挥促凋亡作用有关,具体的移位机制有待进一步研究。

### 4 结论

BPA 作为一种环境内分泌干扰物,对生殖系统的损害已越来越受到人们的重视。大量动物试验研究都有力地证明了 BPA 对雄性生殖产生有害影响。LBP 是中药枸杞的主要有效成分,现代药理学研究也表明 LBP 具有抗氧化,保护生殖系统的功能,但对其保护生殖系统详细机制的报道很少。本试验通过检测 LBP 对 BPA 染毒后小鼠睾丸生精细胞 Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 凋亡蛋白的表达变化,表明 LBP 可增加 Bcl-2/Bax 比值,阻断凋亡途径,抑制 Caspase-3 活化,最终阻断生精细胞发生凋亡。

#### 参考文献:

- [1] ERLER C, NOVAK J. Bisphenol A Exposure: Human Risk and Health Policy[J]. *J Pediatr Nurs*, 2010, 25(5): 400-407.
- [2] 黄晓兰,杨明亮,吴晓旻,等. 枸杞多糖对大鼠生殖系统保护作用的机制探讨[J]. *武汉大学学报*, 2004, 25(1): 30-31.
- [3] 孙小娜,李晓彩,马爱团,等. 双酚 A 对雄性小鼠睾丸

- 发育和生殖激素分泌水平的影响[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(9): 949-952.
- [4] 王志成, 赵红光, 龚守良. 生精细胞凋亡的线粒体调控[J]. 吉林大学学报, 2007, 33(1): 176-179.
- [5] 张晓田, 宋天保. Caspase-3 与细胞凋亡的研究[J]. 医学综述, 2002, 8(11): 621-623.
- [6] COMMUNAL C, SUMANDEA M, DE TOMBE P, et al. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes[J]. *PNAS*, 2002, 99(9): 6252-6256.
- [7] ADAMS J M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis[J]. *Genes & Dev*, 2003, 17(20): 2481-2495.
- [8] 陈伟, 付小兵, 王海滨, 等. 增生性瘢痕中凋亡相关基因转录的变化[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(2): 235-237.
- [9] 罗兰, 张彦, 张闻, 等. 小鼠睾丸发育全过程中生精细胞的自发性凋亡[J]. 云南大学学报, 2011, 33(1): 113-117.
- [10] AWA M A, KUROHIMARU M, MIZUKAM T, et al. Effect of bisphenol-A on the Sertoli cell culture from prepubertal male Wistar rats[J]. *J Med Sci*, 2002, 2(1): 19-23.
- [11] 孙延霞, 刘基芳, 杨慧, 等. 双酚 A 对雄性小鼠血清中 NO、NOS 及睾丸组织形态学的影响[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(2): 196-198.
- [12] 汪朝阳, 黄秀榕, 祁明信, 等. 枸杞多糖对氧化损伤大鼠晶状体上皮细胞凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 表达的调控[J]. 眼视光学杂志, 2003, 5(3): 147-149.

(编辑 白永平)