

# 砷对大鼠生精细胞 DNA 损伤及 XRCC1 表达影响

李宏彬<sup>1</sup> 徐光翠<sup>1</sup> 高黎黎<sup>1</sup> 陆祥<sup>2</sup> 张东<sup>1</sup> 张合喜<sup>1</sup>

**摘要:**目的 观察不同剂量三氧化二砷( $As_2O_3$ )对成年大鼠生精细胞 DNA 损伤及其 X 射线修复交叉互补基因 1(XRCC1) 基因表达影响。方法 40 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 4 组,对照组、低、中、高剂量  $As_2O_3$  组(0.375、0.75、1.5 mg/kg) 灌胃法连续给药 16 周处死大鼠,应用单细胞凝胶电泳试验检测大鼠生精细胞 DNA 损伤,免疫组化法检测大鼠生精细胞 XRCC1 蛋白表达。结果 对照组生精细胞平均尾长( $1.04 \pm 0.61$ )  $\mu m$ ,中、高剂量  $As_2O_3$  组可见部分细胞拖尾,平均尾长分别为( $3.11 \pm 1.16$ )、( $3.62 \pm 2.46$ )  $\mu m$ ,明显长于对照组( $P < 0.01$ ),细胞尾部 DNA 含量比及尾矩也明显增加( $P < 0.01$ );中、高剂量  $As_2O_3$  组 XRCC1 阳性细胞百分比分别为( $11.13 \pm 7.06$ )%和( $9.63 \pm 6.32$ )%,均较对照组的( $15.49 \pm 8.23$ )%明显降低( $P < 0.05$ ),XRCC1 表达量随着染毒剂量增高而降低;DNA 损伤与 XRCC1 表达呈负相关( $r = -0.778, P < 0.01$ )。结论 一定剂量  $As_2O_3$  可通过抑制生精细胞 XRCC1 表达,诱导大鼠生精细胞 DNA 损伤,产生雄性生殖毒性。

**关键词:** 三氧化二砷( $As_2O_3$ ); 生精细胞; X 射线修复交叉互补基因 1(XRCC1); DNA 损伤

中图分类号: R 994.6

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)11-1470-03

## Effects of arsenic on DNA damage and XRCC1 gene expression in rat spermatogenic cells

LI Hong-bin\*, XU Guang-cui, GAO Li-li et al(\* Department of Epidemiology and Statistics, Xinxiang Medical University, Xinxiang Henan Province 453003, China)

**Abstract:** **Objective** To examine the effects of arsenic on DNA damage and its X-ray repair cross complementary protein 1(XRCC1) in the spermatogenic cells of rats. **Methods** Forty health male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a control group and low, moderate and high dose group. The rats in the four groups were gavaged with different concentrations of  $As_2O_3$  solution(0, 0.375, 0.75 and 1.5 mg/kg) everyday, respectively. After 16 weeks of treatment, the rats were sacrificed by cervical dislocation and the testis tissue were sampled. XRCC1 protein expression was analyzed with immunohistochemistry and DNA damage was observed with single cell gel electrophoresis test (SCGE). **Results** The tail length of the cells averaged  $1.04 \pm 0.61$   $\mu m$  in the control group. The exposure to 0.75 and 1.5 mg/kg  $As_2O_3$  resulted in a significant lengthening of the cell tails( $3.11 \pm 1.16$   $\mu m$  and  $3.62 \pm 2.46$   $\mu m$ , respectively,  $P < 0.01$ ) as well as an increased tail DNA% and tail moment of the cells( $P < 0.01$ ). There was no significant difference between low dose group( $16.08 \pm 9.87\%$ ) and control group( $15.49 \pm 8.23\%$ ) in XRCC1 protein expression ( $P > 0.05$ ). XRCC1 expression in the moderate and high dose group( $11.13 \pm 7.06\%$  and  $9.63 \pm 6.32\%$ ) was significantly greater than that in the control group( $P < 0.05$ ). The XRCC1 protein expression of spermatogenic cells showed a dose-response relationship. The negative correlation between the DNA damage and XRCC1 expression of spermatogenic cells was significant( $r = -0.778, P < 0.001$ ). **Conclusion** One of the mechanisms of male reproduction toxicity of  $As_2O_3$  might be the inhibition of XRCC1 expression which induces DNA damage.

**Key words:**  $As_2O_3$ ; spermatogenic cell; X-ray repair cross complementary gene 1; DNA damage

砷是一种广泛存在的环境污染物。砷及其化合物具有致癌、致畸、致突变作用,对人类健康产生多方面损伤。人群流行病学调查和动物实验研究均提示雄性生殖系统可能是砷毒性作用靶位之一<sup>[1-2]</sup>。然而,砷生殖毒性作用的分子机制尚不十分清楚。本研究通过采用单细胞凝胶电泳法观察砷暴露大鼠生精细胞 DNA 损伤及免疫组化法检测生精细胞 X 射线修复交叉互补基因 1(X-ray repair cross complementing gene1, XRCC1) 蛋白表达情况,进一步探讨砷致雄性生殖毒性分子机制。

### 1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 三氧化二砷( $As_2O_3$ ) 纯度 >99.0% (美国 Sigma 公司), 低熔点琼脂糖(上海生工生物工程有限公司), XRCC1 单克隆抗体(美国 Neo Markers 公司), SP 免疫组化试剂盒(美国 ZyMed 公司), Leica-CM 1850 型切片机(德国 Leica 公司), Nikon E80i 荧光显微镜(日本 Nikon 公司)。

1.2 动物分组及染毒 健康雄性 SD 大鼠(河南省实验动物中心), 清洁级 40 只, 体重( $200 \pm 10$ ) g, 许可证号: SCKK(豫) 2005-0001。将大鼠随机分为 4 组, 对照组和  $As_2O_3$  0.375、0.75、1.5 mg/kg 3 个染毒组, 每组 10 只, 连续灌胃 16 周, 每日 1 次, 灌胃容量 0.01 mL/g, 对照组给予等量双蒸水。

1.3 细胞 DNA 损伤检测 单细胞凝胶电泳(彗星

作者单位: 1. 新乡医学院流行病与卫生统计学教研室, 河南 新乡 453003; 2. 遵义医学院组织胚胎学教研室

作者简介: 李宏彬(1970-) 男, 河南驻马店人, 讲师, 硕士, 研究方向: 遗传与分子毒理学。

通讯作者: 张合喜, E-mail: hexich@xxmu.edu.cn

实验) 依照 Singh 方法<sup>[3]</sup> 溴化乙啶(EB) 染色后, 荧光显微镜下观察细胞, 每组随机拍摄 100 个细胞, 记录损伤情况。用 CASP 彗星图像分析软件分析尾长、尾部 DNA 百分比含量和尾矩。尾长 = 尾部左边界 - 尾部右边界; 尾部 DNA 含量(%) = 尾光密度 / (头光密度 + 尾光密度) × 100%; 尾矩 = 尾长 × 尾 DNA 百分含量。

1.4 XRCC1 蛋白表达检测 免疫组化法检测生精细胞 XRCC1 蛋白表达 操作步骤按试剂盒说明书进行, 以磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS) 代替一抗作为阴性对照, 光学显微镜下, XRCC1 阳性细胞为细胞核被染成棕黄色或褐色, 随机选取 5 个横切生精小管, 观察计数阳性细胞数, 求阳性细胞数百分比。

1.5 统计分析 各组数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 13.0 进行单因素方差分析, 组间比较选用最小显著差(*t* 检验) 法; 描述两变量之间关系用直线相关分析。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

2.1 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对生精细胞 DNA 损伤(表 1) 对照组细胞核清晰, 大部分细胞呈圆形, 边缘清楚, 密度均匀;

染毒组部分细胞头部中间致密, 周边松散有拖尾, 呈彗星状。中、高剂量 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组尾部 DNA 百分含量及尾矩均高于对照组 ( $t = 2.811, 3.218, P < 0.01$ ), 低剂量组与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。随着染毒剂量增加, DNA 损伤程度愈严重。

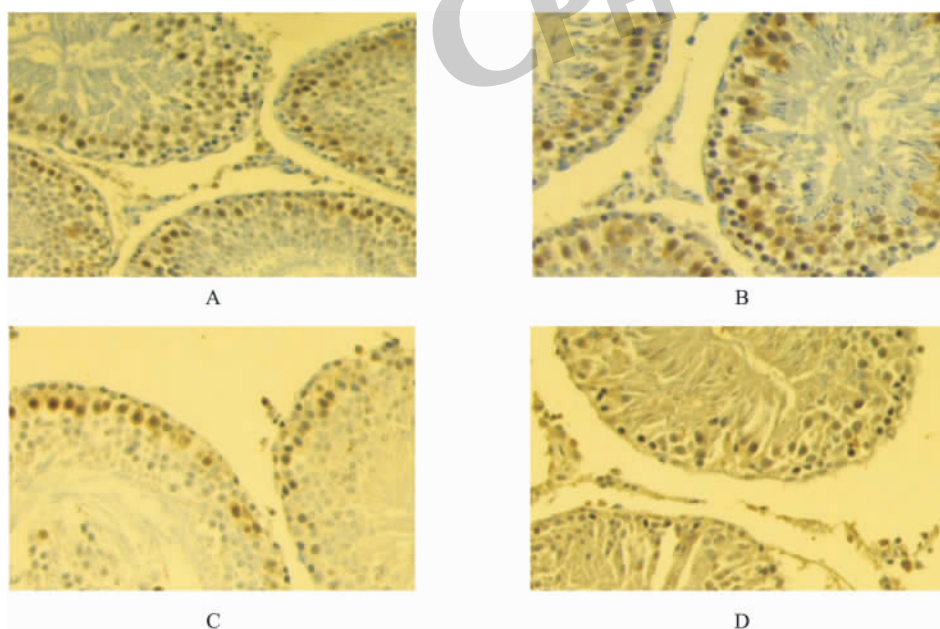
表 1 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对大鼠生精细胞 DNA 损伤影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别(mg/kg)	尾长(μm)	DNA(%)	尾矩
对照组	1.04 ± 0.61	2.38 ± 0.97	2.47 ± 1.08
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0.375	1.82 ± 1.04	3.01 ± 3.61	5.49 ± 2.86
0.75	3.11 ± 1.16 <sup>a</sup>	10.15 ± 8.94 <sup>a</sup>	31.23 ± 11.31 <sup>a</sup>
1.5	3.62 ± 2.46 <sup>a</sup>	12.70 ± 9.07 <sup>a</sup>	45.98 ± 14.26 <sup>a</sup>

注: 与对照组比较 <sup>a</sup>  $P < 0.01$ 。

2.2 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对生精细胞 XRCC1 表达影响(图 1)

各剂量组 SD 大鼠睾丸组织内均可检测到 XRCC1 蛋白表达, 主要表达在精原细胞和精母细胞中。对照组与低、中、高剂量 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组大鼠生精细胞 XRCC1 蛋白阳性细胞百分比分别为 (15.49 ± 8.23)%、(16.08 ± 9.87)%、(11.13 ± 7.06)%、(9.63 ± 6.32)%。中、高剂量 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组大鼠生精细胞 XRCC1 蛋白表达明显低于对照组 ( $t = 2.208, 2.412, P < 0.05$ ), 随着染毒剂量增高生精细胞 XRCC1 蛋白表达量降低。



注: A: 对照组; B ~ D: 分别为 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.375、0.75、1.5 mg/kg 组。

图 1 大鼠睾丸组织 XRCC1 蛋白表达结果(组织化学染色, ×400)

2.3 XRCC1 与 DNA 损伤的关联性 采用直线相关分析, 慢性染砷大鼠生精细胞 DNA 损伤与 XRCC1 蛋白表达呈负相关 ( $r = -0.778, P < 0.01$ )。

## 3 讨论

砷可蓄积于睾丸组织, 致睾丸组织萎缩和生精

细胞损害, 产生生殖毒性<sup>[4]</sup>。睾丸生精细胞凋亡指数随着染砷剂量增加而升高, 且生精细胞凋亡指数与端粒酶活性呈负相关<sup>[5]</sup>。本研究结果显示, 各剂量组大鼠生精细胞 DNA 均出现拖尾现象, 剂量为 0.75、1.5 mg/kg 时其尾长、DNA 百分含量及尾矩与对照组比较差异有统计学意义, 提示一定剂量 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 能够引起生精细胞 DNA 链断裂, 导致 DNA

碎片形成。这是因为砷在代谢过程中能够产生大量活性氧自由基(ROS)<sup>[6]</sup>,一些含巯基酶如丙酮酸脱氢酶、磷酸酯酶等与 ROS 结合后活性受到抑制,直接影响细胞代谢、氧化过程以及 DNA 合成与修复,从而对 DNA 造成损伤。

DNA 断裂可以通过 DNA 修复酶得以修复。研究表明,XRCC1 基因在 DNA 单链损伤修复中起着重要作用<sup>[7]</sup>。本研究结果显示,随着染毒剂量增加,XRCC1 蛋白表达明显降低,低剂量组较对照组表达有增高趋势,原因可能与低剂量砷引起生精细胞兴奋效应有关。大鼠 XRCC1 蛋白表达与 DNA 损伤之间呈负相关,提示 XRCC1 基因低表达可抑制 DNA 重新连接,丧失由砷所引起 DNA 损伤修复功能。进一步表明 XRCC1 可能在维持遗传稳定性方面起着重要作用,从而预防肿瘤的发生。但砷是如何诱导 XRCC1 表达降低的分子生物学机制仍需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Hsieh FI, Hwang TS, Hsieh YC, et al. Risk of erectile dysfunction induced by arsenic exposure through well water consumption in Taiwan [J]. *Environ Health Perspect* 2008, 116(4): 532-536.
- [2] Chiou TJ, Chu ST, Tzeng WF, et al. Arsenic trioxide impairs spermatogenesis via reducing gene expression levels in testosterone synthesis pathway [J]. *Chem Res Toxicol* 2008, 21(8): 1562-1569.
- [3] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. *Exp Cell Res* 1998, 175(1): 184-191.
- [4] Pant N, Murthy RC, Srivastava SP. Male reproductive toxicity of sodium arsenite in mice [J]. *Human and Experimental Toxicology*, 2004, 23(8): 399-403.
- [5] 陈伟, 陆祥, 舒小林, 等. 砷对大鼠生精细胞及端粒酶逆转录酶表达影响 [J]. *中国公共卫生* 2008, 24(11): 1382-1384.
- [6] 李冰, 张新玉, 李昕, 等. 无机砷的肝细胞毒性和氧化应激 [J]. *中国工业医学杂志* 2009, 22(3): 209-210.
- [7] 方道奎, 张建清, 胡大林, 等. XRCC1 在 MMS 致人细胞 DNA 单链断裂修复中的作用 [J]. *中山大学学报: 医学科学版* 2009, 30(8): 47-51.

收稿日期: 2011-09-19

(解学魁编辑 郑新校对)

#### • 实验研究 •

## 毒死蜱对大鼠脑组织 RAGE 介导 Gq-PKC 信号转导途径影响

张峰, 付志华, 白宇, 李素平

**摘要:**目的 探讨 48% 毒死蜱(CPF)对大鼠胆碱酯酶活力及晚期糖基化终末产物受体(RAGE)介导的 Gq-蛋白激酶 C(PKC)信号转导途径影响。方法 将大鼠随机分为 CPF 低(1/40LD<sub>50</sub>)、中(1/20LD<sub>50</sub>)、高(1/10LD<sub>50</sub>) 3 个剂量组和生理盐水对照组,经口染毒 28 d 后,用三氯化铁比色法检测大鼠全血胆碱酯酶活力;荧光免疫组化法检测脑组织 RAGE、PKC 的表达;蛋白质印迹法(western blot)检测脑组织中 Gq 蛋白的表达。结果 全血胆碱酯酶活力随染毒剂量的增加而降低,对照组和 CPF 低、中、高剂量组三氯化铁比色法测定值分别为(33.75 ± 5.03)、(29.70 ± 4.01)、(10.40 ± 1.95)、(5.25 ± 0.05);RAGE、Gq 蛋白、PKC 的表达均随染毒剂量的增加而增高,对照组和 CPF 低、中、高剂量组 RAGE 免疫反应平均光密度值分别为(0.32 ± 0.01)、(2.01 ± 0.09)、(5.03 ± 0.05)、(8.02 ± 0.04),Gq 蛋白的相对含量分别为(0.84 ± 0.01)、(0.90 ± 0.01)、(1.10 ± 0.02)、(1.59 ± 0.01),PKC 免疫反应平均光密度值分别为(0.12 ± 0.01)、(2.01 ± 0.03)、(3.52 ± 0.02)、(5.01 ± 0.08)。结论 CPF 主要通过抑制胆碱酯酶的活力对机体造成损伤,RAGE、Gq 蛋白、PKC 的高表达可能参与了 CPF 中毒神经系统病理性信号转导。

**关键词:** 48% 毒死蜱(CPF);胆碱酯酶;晚期糖基化终末产物受体(RAGE);信号转导

中图分类号: R 139

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)11-1472-03

## Effect of chlorpyrifos on RAGE-Gq-PKC signal transduction of brain tissue in rats

ZHANG Feng, FU Zhi-hua, BAI Yu, et al (School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi Province 030001, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of 48% chlorpyrifos on cholinesterase activity and signal transduction pathway in rats. **Methods** Thirty-two rats were randomly divided into low-dose (1/40 median lathal dose [LD<sub>50</sub>]), moderate-dose (1/20 LD<sub>50</sub>), high-dose (1/10 LD<sub>50</sub>) groups and saline control group. The rats were treated by oral gavage for 28 days. The activity of whole blood cholinesterase was detected with ferric chloride colorimetric method; the expression of the receptor of advanced glycation end-products (RAGE) and protein kinase C (PKC) in brain tissue were detected with the immunohistochemistry; the expression of Gq protein in brain tissue were detected with western

作者单位: 山西医科大学公共卫生学院,山西太原 030001

作者简介: 张峰(1985-),男,山西汾阳人,硕士在读,研究方向:农药毒理。

通讯作者: 李素平, E-mail: LISUPING56@126.com