

苯并 (a) 芘对雄性小鼠生殖细胞毒性作用*

金明华¹, 刘晓梅¹, 郝民¹, 王华¹, 王雯¹, 徐艳玲¹, 孙志伟^{1,2}

摘要: 目的 研究不同剂量苯并 (a) 芘对小鼠睾丸细胞酶活性、精子畸变率及生殖细胞 DNA 损伤影响。方法 采用分光光度法测定小鼠睾丸细胞乳酸脱氢酶 (LDH)、葡萄糖 - 6- 磷酸脱氢酶 (G-6-PD) 和山梨醇脱氢酶 (SDH) 活性; 利用单细胞凝胶电泳检测苯并 (a) 芘对生殖细胞 DNA 作用; 采用精子畸变和微核试验方法检测精子畸变率和精细胞微核率。结果 随着染毒剂量增加, LDH 活性逐渐降低, 20 mg/kg 苯并 (a) 芘组与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 不同剂量苯并 (a) 芘均可造成小鼠生殖细胞 DNA 损伤, 5、10、20 mg/kg 的损伤率分别为 4.4%、7.9% 和 8.8%, 与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 精子畸变率和精细胞微核率分别为 1.10%、2.24%、3.64% 和 11.00%、14.40%、17.40%; 与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 一定剂量条件下, 苯并 (a) 芘能够影响小鼠睾丸细胞酶活性, 导致小鼠生殖细胞 DNA 损伤, 并在一定剂量范围内对雄性小鼠的生殖细胞产生毒作用。

关键词: 苯并 (a) 芘; 生殖细胞 DNA 损伤; 乳酸脱氢酶; 山梨醇脱氢酶; 葡萄糖 - 6- 磷酸脱氢酶

中图分类号: R 996

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2011)02-0212-02

Effect of B(a)P on germ cells of male mice JIN Minghua, LIU Xiaomei, HAOMIN, et al. School of Public Health, Jilin University (Changchun 130021, China)

Abstract Objective To study different concentrations of B(a)P on enzyme activity, sperm abnormality rate and DNA damage rate of mouse germ cells. **Methods** Lactate dehydrogenase (LDH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD), sorbitol dehydrogenase (SDH) were measured with spectrophotometry. DNA damage was detected with single cell gel electrophoresis (SCGE), and sperm abnormality rate and sperm cell micronucleus rate were determined with sperm aberration test and micronucleus test respectively. **Results** B(a)P affected activities of LDH, SDH, G-6-PD in mouse testicular cells. The activities of LDH in testicular cells decreased with the increasing of B(a)P exposure dose, and significant difference was observed between 20 mg/kg group and the negative control group ($P < 0.05$). DNA damage was observed in every exposure group with the damage rate of 4.4%, 7.9%, and 8.8%, respectively, and all of the rate were significantly different from that of negative control group ($P < 0.05$). Sperm abnormality rate and sperm cell micronucleus rate in each exposure group were 1.10%, 2.24%, 3.64%, and 11.00%, 14.40%, 17.40%, respectively, and were significantly different from that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** B(a)P could influence enzyme activities of mouse sperm cell, cause DNA damage and have cytotoxicity to male mouse sperm cell within a certain dose range.

Key words benzo(a)pyrene (B(a)P); germ cell DNA damage; LDH; SDH; G-6-PD

苯并 (a) 芘 [benzo(a)pyrene, B(a)p] 是一种广泛存在于环境中的具有致癌作用的多环芳烃类化合物^[1]。人群流行病学调查显示, B(a)P 与人类癌症关系密切, 其毒性作用与其化学结构以及代谢产物有关^[2]。国内外许多学者对其毒性进行了研究, 但对于生殖系统毒性研究较少。研究证实, 苯并 (a) 芘对小鼠精子的形成有损害作用, 是生殖细胞潜在诱变剂^[3], 生殖毒性和遗传毒性的研究已成为苯并 (a) 芘毒性研究的重要内容之一。本研究通过体内给予小鼠不同剂量苯并 (a) 芘, 观察其对睾丸相关酶类及其生殖细胞 DNA 损伤影响。

1 材料与与方法

1.1 实验动物与分组 健康昆明种小白鼠 (吉林大学实验动物中心) 30 只, 雄性, 体重 (28 ± 2) g。随机分为阴性对照组 (玉米油)、5、10、20 mg/kg 苯并 (a) 芘染毒组和阳性对照组即环磷酰胺 100 mg/kg 每组 6 只。

1.2 试剂与仪器 苯并 (a) 芘 (德国 Merck 公司); 山梨醇 (上海化学试剂采购供应站); 葡萄糖 - 6- 磷酸二钾盐 (中国

科学院生物化学研究所); 磷酸氢二钠、磷酸二氢钾 (沈阳市试剂三厂); 肌氨酸钠 (美国 Sigma 公司); 曲拉通 - X 100 (上海化学试剂厂); 721 型分光光度计 (上海第二分析仪器厂); 台式离心机 (北京医疗仪器厂)。

1.3 染毒方式 小鼠在灌胃前后禁食 3 h。阴性对照组 (玉米油), 5、10、20 mg/kg 苯并 (a) 芘染毒组口腔灌胃给药, 连续 3 d。阳性对照组腹腔注射 1 次给药。于染毒结束后 24 h 脱颈椎处死, 取睾丸, 称重, 剥去被膜, 在冰浴下匀浆, 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清待测。

1.4 指标检测

1.4.1 睾丸细胞酶活性测定 乳酸脱氢酶 (LDH)、葡萄糖 - 6- 磷酸脱氢酶 (G-6-PD) 和山梨醇脱氢酶 (SDH) 采用分光光度法测定^[4]。乳酸脱氢酶转换数定义: 在 25 °C 每分钟每 135 000 g 酶蛋白 (1 mol/L LDH) 所形成的还原型辅酶 I (NADH) 的摩尔数。考马斯亮兰法测定蛋白质含量^[5]。

1.4.2 睾丸细胞 DNA 损伤检测 采用 Singh 方法^[6], 溴化乙啶 (EB) 染色后, 荧光显微镜下观察细胞, 每组随机拍摄 200 个细胞记录损伤情况。根据 DNA 损伤程度分为 5 级。

DNA 损伤率 = (各级细胞数 / 计数细胞总数) × 100%。

1.4.3 小鼠精子畸变试验^[7] 染毒后 24 h 将小鼠脱颈椎处死, 剖开腹腔, 取出睾丸, 分离两侧附睾, 用生理盐水冲洗精子涂片。用甲醇固定 5 min, 2% 伊红溶液染色 1 h, 在高倍镜

* 基金项目: 教育部骨干教师振兴计划项目

作者单位: 1 吉林大学公共卫生学院, 吉林 长春 130021; 2 首都医科大学公共卫生学院

作者简介: 金明华 (1966-), 女, 朝鲜族, 副教授, 博士, 主要从事环境有害因子生物效应及其作用机制研究。

通讯作者: 孙志伟, E-mail: zwsun@hotmail.com

下检查精子形态。每只小鼠检查完整精子 500 条,每一剂量组检查 2 500 条精子。

1.4.4 生精细胞微核实验 取一侧睾丸,放于载玻片上,剥除睾丸被膜,用剪刀将曲细精管剪碎,2.2% 柠檬酸钠溶液制备细胞悬液,涂片。将玻片于甲醇固定 10 min,自然干燥,用 Giemsa 染液 (pH 6.8) 染色 30 min,自来水冲洗,干燥后在油镜下计数早期精细胞微核率。

1.5 统计分析 采用 SAS 软件的 χ^2 和 *t* 检验方法进行统计分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 苯并 (a) 芘对小鼠睾丸细胞酶活性影响 (表 1) 染毒各剂量组 LDH、G-6-PD、SDH 活性随着染毒剂量增加而逐渐降低,其中苯并 (a) 芘 20 mg/kg 剂量组、阳性对照组的 LDH 活性与阴性对照组比较差异有统计学意义;G-6-PD、SDH 活性各剂量组与对照组比较差异无统计学意义。

表 1 苯并 (a) 芘对雄性小鼠睾丸细胞酶活性影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 (mg/kg)	LDH (U/gprot)	SDH (U/gprot)	G-6-PD (U/gprot)	
阴性对照组	180.52 ± 35.47	15.71 ± 3.18	33.42 ± 10.87	
苯并 (a) 芘				
5	167.93 ± 16.55	16.97 ± 1.32	39.66 ± 2.93	
10	144.72 ± 8.53	16.19 ± 1.43	30.57 ± 2.58	
20	124.97 ± 11.63 ^a	16.11 ± 2.13	36.22 ± 3.83	
环磷酰胺	100	128.29 ± 17.03 ^a	16.43 ± 1.74	38.15 ± 5.49

注:与阴性对照组比较, $aP < 0.05$ 。

2.2 苯并 (a) 芘对小鼠精原细胞 DNA 影响 (表 2) 体内给予小鼠不同剂量苯并 (a) 芘均可以导致小鼠精原细胞 DNA 损伤。随着苯并 (a) 芘染毒剂量增加,各剂量染毒组与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),细胞 DNA 损伤程度与染毒剂量存在剂量-效应关系。

表 2 B(a)P 对小鼠睾丸细胞 DNA 损伤影响 ($n = 6$)

组别 (mg/kg)	DNA 损伤程度 (个)					损伤率 (%)
	0	I	II	III	IV	
阴性对照组	164	25	9	2	0	18
苯并 (a) 芘						
5	112	46	28	11	3	44 ^a
10	42	57	50	23	28	79 ^a
20	34	50	43	32	41	88 ^a
环磷酰胺	100	2	72	55	20	99 ^a

注:与阴性对照组比较, $aP < 0.05$ 。

2.3 苯并 (a) 芘对小鼠精子畸变率影响 精子畸形试验结果表明,苯并 (a) 芘可致精子畸变率升高,阴性对照组,5、10、20 mg/kg 苯并 (a) 芘组和环磷酰胺组的畸形率分别为 0.82%、1.10%、2.24%、3.64% 和 4.0%。随着染毒剂量增加,精子畸变率逐渐升高,10、20 mg/kg 苯并 (a) 芘组与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 苯并 (a) 芘对小鼠精细胞微核影响 早期精细胞微核试验结果表明,苯并 (a) 芘可致早期精细胞微核率升高。阴

性对照组,5、10、20 mg/kg 苯并 (a) 芘组和环磷酰胺组的微核率分别为 6.2%、11.0%、14.4%、17.4% 和 25.8%,随着染毒剂量增加,精细胞微核率逐渐升高,各剂量染毒组与阴性对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

生殖系统对化学毒物的作用非常敏感,较早出现功能甚至结构改变。LDH 催化丙酮酸脱氢而转变成乳酸,参与能量代谢,LDH 的活性受到抑制,将阻碍能量的供给^[8]。因此,能量供给阻碍可能引起 DNA 合成受到抑制。LDH、SDH、G-6-PD 参与能量代谢和类固醇激素合成^[4]。实验结果表明,苯并 (a) 芘可使 LDH 活性受到明显抑制,阻碍能量供给,苯并 (a) 芘对 SDH、G-6-PD 活性作用并不明显。苯并 (a) 芘还可以引起雄性小鼠睾丸细胞 DNA 损伤,导致精子畸形率和微核率增加。苯并 (a) 芘可以影响小鼠睾丸细胞周期进程,使睾丸细胞 DNA 合成受到明显抑制,睾丸生殖细胞阻滞于 G₂ 期,使细胞有丝分裂延迟^[9],提示苯并 (a) 芘可引起睾丸细胞 DNA 损伤和精细胞微核,也能够通过血-睾屏障直接作用于精子,使精子发生畸变,影响雄性小鼠生精过程。

本研究显示,不同剂量苯并 (a) 芘均可导致细胞 DNA 损伤,可能是由于苯并 (a) 芘可透过血-睾屏障,与核酸分子共价结合,导致 DNA 损伤。提示一定剂量的苯并 (a) 芘可以影响睾丸细胞酶活性,导致 DNA 损伤,可能是引起生殖毒性重要途径之一。

参考文献

- [1] Smith TL, Merry SE, Harris DL, et al. Species-specific testicular and hepatic microsomal metabolism of benzo(a)pyrene, an ubiquitous toxicant and endocrine disruptor [J]. *Toxicol In Vitro* 2007; 21(4): 753-758.
- [2] Hengster JG, Van der Burg B, Steinberg P, et al. Interspecies differences in cancer susceptibility and toxicity [J]. *Drug Metab Rev* 1999; 31(4): 917-970.
- [3] Verhofstad N, van Oostrum CT, van Bennekom J, et al. DNA adduct kinetics in reproductive tissues of DNA repair proficient and deficient male mice after oral exposure to benzo(a)pyrene [J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2010; 51(2): 123-129.
- [4] 江泉观. 雄性生殖毒理学 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版, 1994: 225.
- [5] Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies [J]. *Anal Biochem* 1996; 236(2): 302-308.
- [6] 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.
- [7] 丁训诚. 男性生殖毒理学 [M]. 北京: 中国人口出版社, 1997: 204-205.
- [8] 李湘鸣, 居中华, 孙蓉, 等. 镉对大鼠睾丸中某些酶活性及组织形态的影响 [J]. *卫生毒理学杂志*, 1999; 13(1): 31-33.
- [9] 金明华, 石龙, 刘晓梅, 等. 苯并 (a) 芘对雄性小鼠睾丸细胞周期的影响 [J]. *中国公共卫生*, 2004; 20(2): 153-154.

收稿日期: 2010-06-02

(解学魁编辑 宋东校对)