

喹乙醇对小鼠生精细胞 *Bax* 基因表达的影响

姜 卓, 罗光彬*, 尹荣焕, 冷义福

(沈阳农业大学 动物胚胎工程实验室, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 喹乙醇具有一定的蓄积毒性、遗传毒性和诱变性等毒理作用。试验用 2%吐温-80 将喹乙醇配成悬浊液, 对小鼠进行灌喂, 分别于 4d, 8d, 12d 颈椎脱臼处死小鼠取其睾丸组织; 采用免疫组织化学方法, 检测喹乙醇对小鼠睾丸生精细胞凋亡调控基因 *Bax* 蛋白表达的影响, 进而研究喹乙醇对小鼠睾丸生精细胞凋亡的影响。结果表明, *Bax* 蛋白的表达随着药物浓度的升高而呈显著变化, 即呈现一定的剂量-效应关系。

关键词: 喹乙醇; *Bax*; 细胞凋亡

中图分类号: S816.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)03-0112-03

细胞凋亡是受基因控制的一种主动性细胞自杀过程, 是细胞自主的有序死亡, 也是机体进行正常新陈代谢和生理活动的保障。目前已发现某些物理因素(辐射、高温等)、细胞因子、病毒感染和化学药物等都可诱导细胞凋亡^[1]。喹乙醇为一种化学合成抗菌促生长剂, 具有一定的蓄积毒性、遗传毒性和诱变性^[2~4]等毒理作用, 可引起多个内脏器官的变性、坏

死^[5]、血细胞减少、SOD 酶活性降低等^[6]。在精子发生过程中, 生殖细胞经历了一系列的减数分裂、有丝分裂、细胞分化形成精子细胞, 其中有很多生殖细胞发生凋亡。若凋亡过度, 则引起少精子症; 若凋亡不足, 则导致多精子症^[7]。而 *Bax* 具有促进睾丸生殖细胞凋亡, 对维持正常的精子发生起重要作用。试验通过检测 *Bax*, 讨论喹乙醇对小鼠睾丸生精细

收稿日期: 2007-09-03

基金项目: 辽宁省教育厅青年基金资助项目(05L404)

作者简介: 姜 卓(1980-), 女, 辽宁大连人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物繁殖与生物技术。

通讯作者: 罗光彬(1959-), 男, 吉林磐石人, 教授, 博士, 主要从事动物胚胎工程研究。

自我复制的功能相符, 在细胞分裂时, R-质粒也同时进行复制, 而使子细胞也带有耐药质粒^[8], 进而出现耐药现象, 且不会在短时间内消失。

3) 为了控制耐药现象的发生, 临床上应做到合理使用抗菌药物, 如采取联合用药、交叉用药、轮换用药的方式^[9]。这样既可以充分发挥抗菌药物之间的协同作用, 增加疗效; 又可避免细菌长期接触某一种药物, 增加耐药性产生的机率。临床用药时, 最好结合药敏试验, 做到有针对性地用药。另外, 还可以考虑使用中兽药以及其他的小肽类产品, 替代目前常用的抗菌药, 达到少用抗菌药的目的。

参考文献:

[1] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2001: 215—223.

[2] 姜中其, 陈晓红. 规模化猪场仔猪断奶腹泻大肠杆菌耐药性监测 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2004, 30(5): 567—571.

[3] 高云英, 李浩波, 李琳, 等. 陕西仔猪致病性大肠杆菌的分离鉴定和耐药性测定 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(9): 12—15.

[4] 赵斌, 何绍红. 微生物学实验 [M]. 北京: 科学技术出版社, 2002.

[5] 倪芳, 童明庆. 2006 年版 CLSI/NCCLS 有关抗生素敏感试验操作标准的更新要点 [J]. 临床检验杂志, 2006, 24(3): 235—239.

[6] 谭炳乾, 陈哲, 林申. 猪源大肠杆菌的分离鉴定及耐药性分析 [J]. 畜禽业, 2006(13): 22—23.

[7] 俞道进, 黄一帆, 邓文华, 等. 猪场大肠杆菌耐药性的流行病学调查 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2005, 34(3): 357—360.

[8] 韩伟, 张铁, 钟秀会. 大肠杆菌的耐药机制及中药对大肠杆菌 R 质粒消除作用的研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2006, 25(3): 25—27.

[9] 张铁, 王春光, 王谦, 等. 猪源大肠杆菌的分离、鉴定及耐药性监测 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(12): 23—25.

胞凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理

将 7~12 周龄 36 只雄性昆明小鼠, 随机分成 6 组。喹乙醇分为 80 mg/kg (1/30LD₅₀)、120 mg/kg (1/20LD₅₀)、240 mg/kg (1/10LD₅₀)、480 mg/kg (1/5LD₅₀) 4 个剂量组, 用 2% 吐温-80 配成混悬液灌胃。阴性对照组(即溶剂组)用 2% 吐温-80 灌胃; 同时设 1 个正常对照组。小鼠饲养 1 周后开始灌胃给药, 每天 1 次, 分别于 4 d, 8 d, 12 d 颈椎脱臼处死小鼠, 取其睾丸组织, 进行免疫组化试验。

1.2 样品处理

载玻片预先用多聚赖氨酸进行处理; 小鼠睾丸组织用 10% 中性缓冲福尔马林固定 24 h 以上, 石蜡包埋。切片常规脱蜡入水。

1.3 操作步骤

采用武汉博士德生物工程有限公司的试剂盒。主要步骤为: 10% 的中性福尔马林溶液中固定 24 h。石蜡切片常规脱蜡入水。30% H₂O₂ 1 份+蒸馏水 10 份混合, 室温孵育 5~10 min, 以灭活内源性过氧化物酶的活性; 蒸馏水洗 3 次。滴加 0.1% 的胰蛋白酶作消化液, 消化 5~10 min 后蒸馏水洗 3 次。滴加 5% BSA 封闭液, 室温 20 min。甩去多余液体, 不洗。滴加适当稀释的特异性第 1 抗体(Bax), 37℃, 1 h。PBS(pH 7.2~7.6)洗 3 次, 每次 2 min, 再滴加特异性生物素化第 2 抗体, 37℃湿盒孵育 30 min; PBS(pH 7.2~7.6)洗 3 次, 每次 2 min。滴加试剂 SA BC, 37℃湿盒孵育 30 min; PBS(pH 7.2~7.6)洗 4 次, 每次 5 min。

DAB 显色使用 DAB 显色试剂盒, 取 1 mL 蒸馏水, 加试剂盒中 A, B, C 试剂各 1 滴, 混匀后加盖切片。室温显色, 镜下控制反应时间 10~30 min。再滴加苏木素轻度复染, 脱水、透明、封片。显微镜下观察结果, 拍照并纪录结果。采用 JD-801 形态学显微图像分析系统进行分析。

2 结果与分析

喹乙醇对小鼠生精细胞 Bax 基因表达的观察结果见图 1~4; 对小鼠生精细胞 Bax 蛋白表达的影响见表 1。

从图 1~4、表 1 可以看出, 生精细胞凋亡诱导基因 Bax 表达时, 正常组、阴性组和 80 mg/kg 喹乙醇组的 Bax, 主要定位于曲精小管的精原细胞和初

级精母细胞。喹乙醇超过 120 mg/kg 的高剂量组, 在各级生精细胞均有表达; 而且在曲精小管的间质, 有时也可见到 Bax 大量表达。Bax 凋亡诱导蛋白主要存在于细胞浆和细胞膜中, 阳性细胞在细胞浆

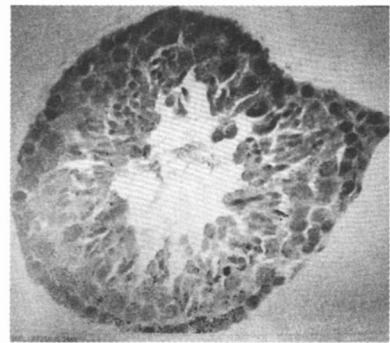


图 1 4d 正常组 Bax 表达(×400)

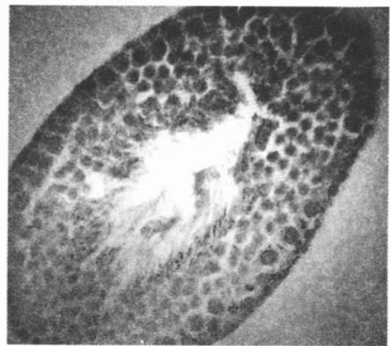


图 2 4d 阴性组 Bax 表达(×400)

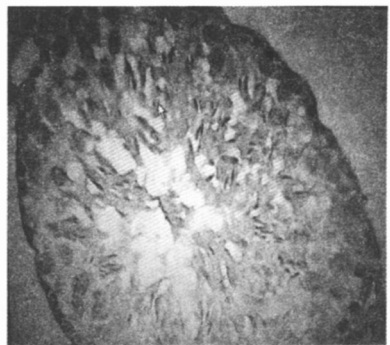


图 3 8d 1/30LD₅₀ 组 Bax 表达(×400)

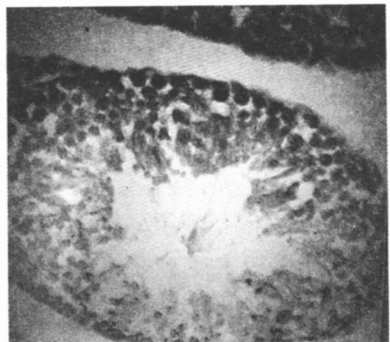


图 4 8d 1/10LD₅₀ 组 Bax 表达(×400)

表 1 喹乙醇对生精细胞 Bax 蛋白表达的影响

组别	指标	时间(d)		
		4	8	12
正常组	阳性面积比	1.06±0.24	0.98±0.28	0.87±0.21
	灰度值	157.51±10.23	152.31±9.89	145.65±9.23
阴性组	阳性面积比	0.98±0.19	1.04±0.27	0.73±0.09
	灰度值	157.78±8.76	155.88±11.56	150.45±8.26
1/30 LD ₅₀	阳性面积比	0.82±0.18	1.83±0.42 ^a	0.91±0.23
	灰度值	135.67±17.97	151.47±23.53	154.07±19.07
1/20 LD ₅₀	阳性面积比	1.96±0.54 ^{ab}	1.47±0.31	1.24±0.32
	灰度值	169.64±26.74	150.75±19.37	144.06±20.03
1/10 LD ₅₀	阳性面积比	2.68±0.34 ^{ab}	2.23±0.41 ^{ab}	2.33±0.25 ^{ab}
	灰度值	163.24±12.89	146.19±15.86	143.02±14.73
1/5 LD ₅₀	阳性面积比	1.79±0.65 ^{ab}	2.74±0.46 ^{ab}	3.36±0.54 ^{AB}
	灰度值	159.24±15.56	131.27±10.85 ^{ab}	132.27±15.31 ^b

注: a 表示与正常组比较差异显著, P< 0.05; b 表示与阴性组比较差异显著; A 表示与正常组比较差异极显著, P< 0.01; B 表示与阴性组比较差异极显著

和细胞膜中出现棕色和棕黄色的颗粒。
从灰度值来看, 同对照组比较, 各试验组随着浓度的升高灰度值在逐渐下降, 但多数差异不显著(P> 0.05); 8 d 和 12 d 的 480 mg/kg 喹乙醇组灰度值下降显著(P< 0.05), 说明 Bax 蛋白表达浓度增加。

3 讨论

细胞凋亡是细胞受到某种信号刺激后产生的一种缓慢的程序化死亡, 受细胞内外多因素调控。生精细胞的生理性凋亡对于去除受损的细胞、控制细胞数量和保证精子的质量有其重要意义。细胞凋亡过程是受基因精确调控的, 目前发现与细胞凋亡相关的基因有两类, Bax 基因是近年来新发现的一种凋亡促进基因, 属 Bcl-2 同一家族基因。Bax 不但有拮抗 Bcl-2 的抑制凋亡的作用, 而且同时具有直接促进细胞凋亡的功能。Bax 作为促进细胞凋亡的基因代表, Bcl-2 作为抑制细胞凋亡的基因代表, 两者在细胞内的表达水平决定了细胞的生存与死亡^[8]。喹乙醇是一种低毒、高效、用量少的抗菌促生长剂。作为一种饲料添加剂广泛地应用于畜禽生产中, 能有效地预防疾病, 提高饲料利用率, 影响代谢, 提高氮的沉积, 从而促进蛋白质、组织细胞的形成。
试验通过测定 Bax 基因, 讨论喹乙醇对睾丸生殖细胞凋亡的影响, 从整体来看, 正常组和阴性对照组曲精小管中 Bax 蛋白表达较少; 4d 时, 喹乙醇剂量超过 120 mg/kg 的各试验组阳性表达面积均显著高于正常组和阴性对照组, 但未呈现规律性; 8 d 时,

喹乙醇各试验组阳性表达面积较 4d 时有所升高, 而且 240 mg/kg 和 480 mg/kg 组与正常组和阴性组比较, 升高显著。同时, 随着药物浓度的升高, 阳性表达面积增大, 呈现一定的剂量一效应关系; 12d 时这种剂量一效应关系依然存在。除 240 mg/kg 组阳性表达面积增加显著外, 剂量达到 480 mg/kg 时增加极显著(达 3.36)。可以看出, 一定量的喹乙醇对睾丸生殖细胞凋亡有促进作用。

参考文献:

[1] 李晓军, 武建国. 细胞凋亡检测的研究进展及其与疾病的关系[J]. 临床检验杂志, 1999, 17(1): 1—7.
[2] 徐士新. 喹乙醇蓄积毒性试验[J]. 中国兽药杂志, 1992, 26(2): 22—24.
[3] 王树槐. 喹乙醇诱发 CHL 细胞染色体畸形试验[J]. 中国兽药杂志, 1993, 27(4): 27—29.
[4] 曾子健. 喹乙醇在鲤鱼体内的药代动力学研究[J]. 四川农业大学学报, 1993, 11(1): 109—112.
[5] 汪开毓, 耿毅. 鲤鱼急性喹乙醇中毒的病理学研究[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(6): 565—569.
[6] 汪开毓, 耿毅. 鲤亚急性喹乙醇中毒的血液生化指标研究[J]. 水生生物学报, 2003, 27(1): 23—26.
[7] 余荣娇, 徐斯凡. Bcl-2 基因家族在睾丸生殖细胞凋亡中的作用[J]. 生殖医学杂志, 2005, 14(6): 382—384.
[8] Korsmeyer S J, Yin X M, Oltvai Z N, et al. Reactive oxygen species and the regulation of cell death by Bcl-2 gene family[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1271(1): 63—66.