

活性氧在 p,p'-DDE 诱导大鼠睾丸支持细胞凋亡中的作用

宋杨, 石玉琴, 程晋, 关霞, 王玉萍, 杨克敌*

摘要: [目的] 研究活性氧在 2,2-双-(对氯苯基)-1,1-二氯乙烯(p,p'-DDE)诱导大鼠睾丸支持细胞凋亡中的作用。[方法] 从大鼠睾丸组织中分离支持细胞进行离体原代培养 3 d, 用 0、10、30、50 μmol/L 的 p,p'-DDE 及加有 300 μmol/L 的抗氧化剂 N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)的 p,p'-DDE (50 μmol/L)继续培养 24 h, 应用流式细胞仪测定细胞内活性氧(ROS)水平、线粒体膜势能($\Delta\psi_m$)、凋亡发生率。[结果] 50 μmol/L 的 p,p'-DDE 可以诱导支持细胞 ROS 显著升高, 10、30、50 μmol/L p,p'-DDE 处理组的线粒体膜势能下降, 30、50 μmol/L 的 p,p'-DDE 可以诱导支持细胞凋亡, 与对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$); NAC 有效抑制了 ROS 升高, 削弱线粒体膜势能下降, 减少了凋亡发生率, 与 50 μmol/L 的 p,p'-DDE 处理组相比, 差异有显著意义($P < 0.05$)。[结论] p,p'-DDE 可以诱导大鼠睾丸支持细胞凋亡, ROS 产生可能是其重要原因之一。

关键词: 2,2-双-对氯苯基-1,1-二氯乙烯; 活性氧; 睾丸支持细胞; 凋亡

The Role of Reactive Oxygen Species in p,p'-DDE-induced Apoptosis of Sertoli Cells in Rats SONG Yang, SHI Yu-qin, CHENG Jin, GUAN Xia, WANG Yu-ping, YANG Ke-di*(The MOE Key Lab of Environment and Health, Department of Occupational and Environmental Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China). *Address correspondence to YANG Ke-di; E-mail: yangkd@mail.tjmu.edu.cn

Abstract: [Objective] To investigate the mechanism of p,p'-DDE-induced apoptosis of Sertoli cells and the role of reactive oxygen species. [Methods] Sertoli cells from testes of rats were treated with 0, 10, 30, and 50 μmol/L p,p'-DDE, or with 50 μmol/L p,p'-DDE pretreated by 300 μmol/L NAC (N-acetyl-L-cysteine). Then the fluorescence intensity of reactive oxygen species (ROS), mitochondria membrane potential ($\Delta\psi_m$) and apoptosis percentage was detected by a FACS Calibur flow cytometer. [Results] 50 μmol/L p,p'-DDE increased the ROS level. The mitochondria membrane potential was decreased after all p,p'-DDE's treatments. The percentage of apoptosis was increased after treatment with 30 or 50 μmol/L p,p'-DDE. Compared with the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The antioxidant NAC inhibited the increased ROS generation, decreased the mitochondria membrane potential and apoptosis percentage ($P < 0.05$). [Conclusion] p,p'-DDE could induce apoptosis in Sertoli cells. The generation of ROS may be an important reason in the apoptosis.

Key Words: p,p'-DDE; ROS; Sertoli cells; apoptosis

二氯二苯三氯乙烷 (DDT) 作为一种有机氯杀虫剂在许多国家已被禁止生产和使用多年, 但其在环境中半衰期很长, 其主要代谢终产物 2,2-双-(对氯苯基)-1,1-二氯乙烯 (p,p'-DDE) 可长期存在于环境中。有文献报道 DDT 可以在人体中存在 10~20 年, 但是它的代谢产物 p,p'-DDE 可能终身存在^[1]。因此, 在持久性有机污染物 (POPs) 斯德哥尔摩公约 (2001 年 5 月 21~23 日于瑞典) 中, DDT 被列为 12 种持续性污染物之一。p,p'-DDE 作为 DDT 的最主要代谢产物, 也是一种 POPs 和环境内分泌干扰物, 它可以与雄激素竞争性结合雄激素受体, 而且可以与其他环境雌激素发挥协同作用, 导致生殖内分泌紊乱和生殖过程障碍^[2]。

细胞凋亡 (apoptosis) 是由于细胞内外环境变化或死亡信号触发以及在基因调控下所引起细胞主动死亡的过程, 是为维持内环境稳定, 由基因控制的细胞自主有序性的死亡。它是细胞正常生长的一种生理调节方式, 这一过程对于消除机体内老化细胞或具有潜在异常生长的细胞, 以至于保持机体处于稳定状态 (homeostasis) 起着重要的作用^[3]。

支持细胞是曲细精管上皮中唯一的体细胞, 为细胞骨架提供支持并且保证生精细胞成长的微环境, 具有为生精细胞提供营养, 激素转化, 屏障隔离和吞噬的作用等^[4]。在男性生殖毒理学的研究中, 体外培养支持细胞的方法已为很多学者采用。支持细胞虽然是非生殖细胞, 但其对生精细胞趋化、成熟、凋亡的影响密切相关。有关 p,p'-DDE 对雄性生殖系统的影响较少报道, 尤其是在细胞水平。

本研究拟通过 p,p'-DDE 处理大鼠睾丸支持细胞, 观察 ROS 含量、线粒体膜势能以及凋亡水平。鉴于抗氧化剂 NAC 是谷胱甘肽 (GSH) 合成前体, 其在细胞内去乙酰化后生成含有

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30671734)

[作者简介] 宋杨 (1982-), 女, 博士生, 研究方向: 环境毒理学研究

[*通信作者] 杨克敌教授, E-mail: yangkd@mail.tjmu.edu.cn

[作者单位] 华中科技大学同济医学院劳动卫生与环境卫生学系 教育部环境与健康重点实验室, 湖北 武汉 430030

还原型巯基的半胱氨酸,也是一种抗氧化物质。为了研究氧化应激在细胞凋亡中的作用,我们还使用了NAC预处理。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

清洁级 18~20 日龄雄性 SD 大鼠 3 只(由同济医学院动物房提供); p,p'-DDE(德国 DR 公司); DMEM 培养基(改良的 Eagle 培养基, Hyclone 公司); 胎牛血清(GIBCO 公司); 胶原酶(Sigma 公司); 胰蛋白酶(Difco 公司); HEPES(N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙磺, Promega 公司); 谷氨酰胺(Roche 公司)。活性氧检测探针 DCFH-DA(2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐)、二甲亚砜(DMSO)、多聚赖氨酸及抗氧化剂 NAC(N-乙酰-L-半胱氨酸)均购自 Sigma 公司。PI-Annexin V 试剂盒、线粒体膜电位检测探针(JC-1)均购自 Molecular Probes 公司; 荧光显微镜(Olympus 产品); 流式细胞仪(BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 支持细胞分离与培养 细胞培养: 大鼠用脱颈法处死, 75%乙醇消毒阴囊皮肤, 放于消毒过的托盘中, 置于超净台上, 切开皮肤及皮下组织取出双侧睾丸, 从附睾尾部剪断精索, 放入预先注入了冰冷的 D-Hanks 液培养皿中, 剥除睾丸被膜, 冲洗睾丸实质, 将其剪碎成约 1 mm³, 加入 D-Hanks 液静置 3 min, 用 D-Hanks 液冲洗 2 遍后转入三角烧瓶中。加入 0.25% 胰酶 3 mL, 37 °C 恒温水浴快速振荡消化 30 min, 至组织碎块变成线索状。加入少许血清终止消化, 转入 50 mL 离心管中, 1200 r/min(离心半径为 15 cm)离心 5 min 共 2 次, 用 D-Hanks 液洗涤沉淀后, 加入 0.1% 胶原酶转入三角烧瓶中于 37 °C 恒温低速振荡消化 30 min, 至酶液呈粘液状, 经 100 目网筛过滤, 将滤液 1000 r/min(离心半径为 15 cm)离心 5 min 共 2 次, 用 DMEM 培养液洗涤, 加入一定量培养液重悬沉淀物, 吹打混匀。用 0.4% 台盼蓝染色计数活细胞含量, 加入适量 pH7.2 DMEM 培养液调整细胞密度至 2 × 10⁵ 个/mL, 补加胎牛血清使其浓度约为 20%。用富尔根染色鉴定支持细胞。

1.2.2 细胞染毒 以 DMSO 为溶剂溶解色谱纯 p,p'-DDE, 以 DMSO 为对照, 对离体培养 2 d 的支持细胞进行染毒, 设定 p,p'-DDE 终浓度分别为 10、30、50 μmol/L, 培养基中 DMSO 的含量不高于 0.5%, 置于 5% CO₂、35 °C 培养箱中继续培养 24 h。为了测定氧化应激在活性氧、线粒体膜势能及凋亡中的作用, 本实验还用了 300 μmol/L 抗氧化剂 NAC 进行预处理 1 h, 再用 50 μmol/L p,p'-DDE 染毒 24 h。

1.3 ROS 水平测定

DCFH-DA 本身不发荧光, 但进入细胞后水解生成无荧光的 DCFH, 在 ROS 存在的条件下 DCFH 被氧化成发荧光的 DCF。因此, DCF 的荧光强度就代表了 ROS 的生成水平。收集细胞后, 加入 DCFH-DA, 使其终浓度为 10 μmol/L, 避光 37 °C 水浴 15 min, 用流式细胞仪(激发波长 488 nm)检测各管的荧光强度, 每个样检测 1 × 10⁴ 个细胞, 重复 3 次。

1.4 线粒体膜势能的测定

JC-1 是一种脂溶性的染料, 它可以特异性的富集在线粒体上, 在正常的线粒体上, 它可以发出红色荧光, 当线粒体膜势

能下降时, 红色荧光减少, 绿色荧光增强。因此, 红、绿色荧光的比值就代表线粒体膜势能的下降程度, 即膜的损伤程度。收集细胞后, 用 1.0 μg/mL JC-1 避光 37 °C 水浴 15 min, 用流式细胞仪(激发波长 590 nm)检测各管的荧光强度, 每个样检测 1 × 10⁴ 个细胞, 重复 3 次。

1.5 细胞凋亡率的测定

细胞凋亡发生早期改变之一是磷脂酰丝氨酸(PS)从细胞膜内转移到细胞膜外, 使 PS 暴露在细胞膜外表面。Annexin V 对 PS 有高度的亲和性。因此, 用荧光标记该蛋白可充当一敏感的探针检测暴露在细胞膜表面的 PS, 荧光强度即反映了细胞的凋亡发生率。细胞收集后, 用含有 1 μg/mL PI 和 5 μL Annexin V 的 buffer 缓冲液避光室温孵育 5 min, 用流式细胞仪检测各管的荧光强度, 每个样检测 1 × 10⁴ 个细胞, 重复 3 次。

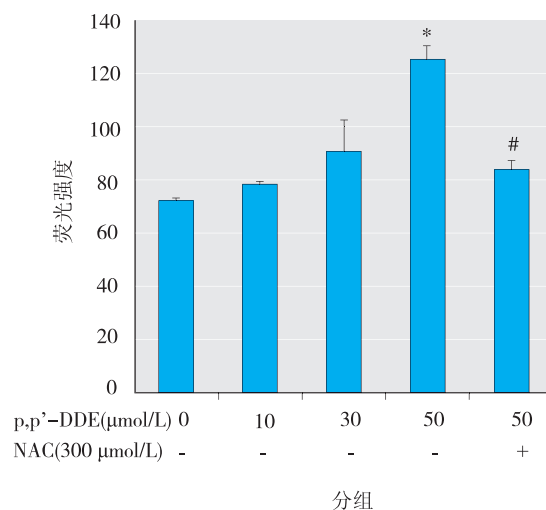
1.6 统计分析

应用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 p,p'-DDE 对支持细胞生成 ROS 的影响及 NAC 的作用

本研究发现支持细胞 ROS 生成水平随着 p,p'-DDE 染毒的升高而增高。50 μmol/L 的 p,p'-DDE 处理组与对照组相比, 差异有统计学意义。NAC 预处理细胞 1 h 后, 再加入 50 μmol/L 的 p,p'-DDE 作用 24 h 后, 产生 ROS 的量明显少于 50 μmol/L 的 p,p'-DDE 单独作用组, 差异有统计学意义($P < 0.05$) (见图 1)。



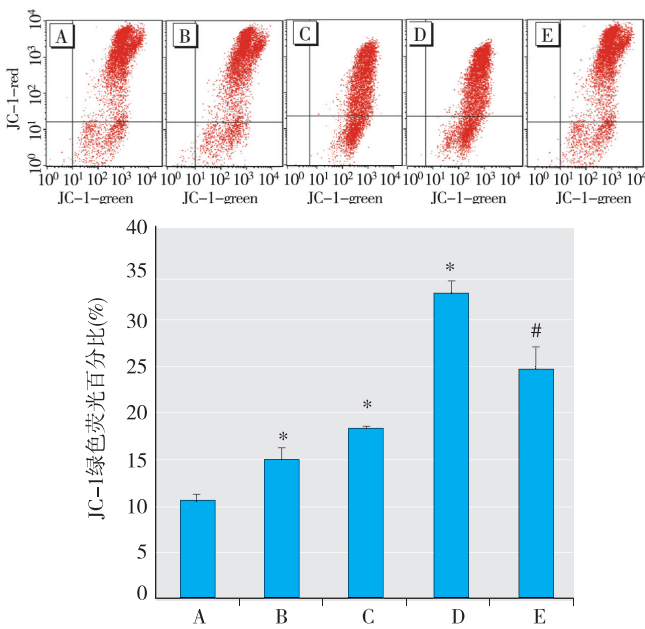
[注]*: 与对照组比较, $P < 0.05$; #: 与 50 μmol/L 的 p,p'-DDE 处理组相比, $P < 0.05$ 。

图 1 p,p'-DDE 对支持细胞 ROS 的影响及 NAC 的作用

Figure 1 The effect of p,p'-DDE on ROS generation attenuated by NAC

2.2 p,p'-DDE 对支持细胞线粒体膜势能的影响及 NAC 的作用

各浓度 p,p'-DDE 处理组, 红、绿色荧光的比值升高, 线粒体膜势能显著下降, 呈现剂量依赖关系, 与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$)。而 NAC 预处理组, 线粒体膜势能下降明显减弱, 和 50 μmol/L p,p'-DDE 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$) (见图 2)。



A: 对照组; B: 10 μmol/L 组; C: 30 μmol/L 组;
D: 50 μmol/L 组; E: NAC+50 μmol/L p,p'-DDE 组

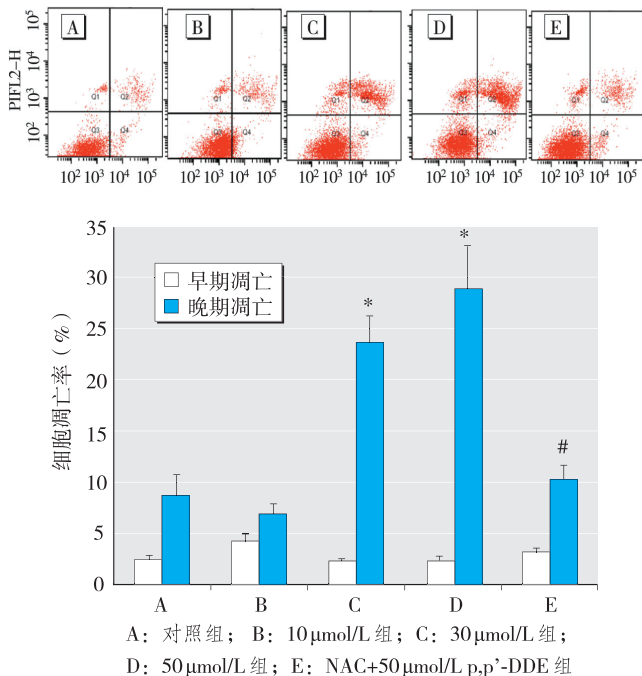
[注]*: 与对照组比较, $P < 0.05$; #: 与 50 μmol/L 的 p,p'-DDE 处理组相比, $P < 0.05$ 。

图 2 p,p'-DDE 对支持细胞线粒体膜势能的影响及 NAC 的作用

Figure 2 p,p'-DDE's effect on mitochondrial membrane potential antagonized by NAC

2.3 p,p'-DDE 染毒后支持细胞凋亡发生率及 NAC 的作用

30、50 μmol/L 的 p,p'-DDE 染毒支持细胞 24 h 后, 晚期细胞凋亡发生率显著高于对照组 ($P < 0.05$), NAC 预处理组, 凋亡发生率减少, 和 50 μmol/L p,p'-DDE 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 3)。



A: 对照组; B: 10 μmol/L 组; C: 30 μmol/L 组;
D: 50 μmol/L 组; E: NAC+50 μmol/L p,p'-DDE 组

[注]*: 与对照组比较, $P < 0.05$; #: 与 50 μmol/L p,p'-DDE 组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 p,p'-DDE 染毒后支持细胞凋亡发生率及 NAC 的作用

Figure 3 p,p'-DDE's effect on apoptosis percentage neutralized by NAC

3 讨论

DDT 及其代谢产物 p,p'-DDE 已被证实为环境内分泌干扰物, 可与雄激素受体竞争性结合, 抑制雄激素活性, 干扰雄性生物体内正常内分泌物质的合成、释放、代谢和结合等过程, 从而破坏其维持机体稳定和调控的作用。近些年来, 很多研究表明 DDT 及其主要代谢产物 p,p'-DDE 可以诱导细胞凋亡, 这可能是其作用机制之一。TEBOURI 发现 7 μg/mL DDT 可以诱导大鼠胸腺细胞凋亡^[5]。而在 PEREZ-MALDONADO 的报道中, 20 μg/mL p,p'-DDE 可以诱导外周血单核细胞凋亡, 并且与氧化应激有关^[6]。也有动物实验证明 DDT 和它的产物可以诱导 DNA 单链断裂和脂质过氧化^[7]。本研究发现 30 μmol/L 以上的 p,p'-DDE 可以引起支持细胞凋亡, 而 ROS 在凋亡中起着重要的作用。

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 如超氧阴离子、羟自由基、过氧化氢、一氧化氮等, 是多种细胞发生氧化应激所产生氧的部分还原代谢产物^[8-10]。正常条件下, 体内活性氧与体内抗氧化系统间保持着平衡状态。适量的 ROS 可作为类似于第二信使的信号分子, 激活许多氧化还原敏感性信号通路, 在细胞的生长和发育中起着重要的作用。如果机体受到环境有害因素的影响, 活性氧产生过多, 超出了机体的清除能力, 体内氧化-抗氧化的平衡机制被打破, 可能会导致很多疾病的发生。不少证据还支持 ROS 参与了细胞凋亡诱导早期线粒体的变化。线粒体是 ROS 的主要来源和促凋亡作用靶点, ROS 可诱导线粒体膜通透性转换孔开放, 导致线粒体肿胀, 线粒体膜势能降低, 诱导凋亡发生^[11]。本研究通过不同浓度 (0、10、30、50 μmol/L) 的 p,p'-DDE 对大鼠睾丸支持细胞 ROS 诱导、线粒体膜势能以及凋亡的检测发现: p,p'-DDE 可以诱导支持细胞 ROS 显著升高、线粒体膜势能下降、支持细胞凋亡发生。为了阐明氧化应激和细胞凋亡的关系, 实验使用了抗氧化剂 NAC。NAC 是一种谷胱甘肽的诱导剂, 它可以拮抗活性氧的不良作用。抗氧化剂 NAC 有效抑制了 ROS 升高, 削弱线粒体膜势能下降, 减少了细胞凋亡的发生。KANAN 等报道, 有机氯农药硫丹 (endosulfan) 引发的 T 细胞凋亡是由于 ROS 生成过多而导致线粒体膜电位紊乱引起凋亡发生^[12]。ROS 怎样引起线粒体膜势能下降目前仍不清楚, FEMEIRA 报道 DDE 可以作用于线粒体电子传递链的琥珀酸脱氢酶 II, 引起线粒体膜势能下降^[13], 但这种机制是否作用于支持细胞有待于进一步研究。

由此可见, ROS 在 p,p'-DDE 致大鼠睾丸支持细胞凋亡中发挥了重要作用。至于 p,p'-DDE 是否激活一些信号转导通路, 引起凋亡, 或者直接通过 ROS 的信使作用使一些信号转导通路激活而引起凋亡, 我们将在以后作陆续报道。

参考文献:

- [1] MORGAN DP, ROAN C.C. The metabolism of DDT in man. In Essays in toxicology (W. Jr. Hayes. Ed.), 5th ed, Academic Press, New York, 1974: 39-97.
- [2] KELCE WR, STONE CR, LAWS SC, et al. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist [J]. Nature, 1995, 375(6532): 581-585.
- [3] CHANG F, STEELMAN LS, SHELTON JG, et al. Regulation of cell

- cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review)[J]. *Int J Oncol*, 2003, 22(3): 469-480.
- [4] GRAY TJ, BEAMAND JA. Effect of some phthalate esters and other testicular toxins on primary cultures of testicular cells[J]. *Food Chem Toxicol*.1984, 22(2): 123-131.
- [5] TEBOURBI O, RHOUMA KB, SAKLY M. DDT induces apoptosis in rat thymocytes[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1998, 61(2): 216-223.
- [6] PÉREZ-MALDONADO IN, HERRERA C, BATRES LE, et al. DDT-induced oxidative damage in human blood mononuclear cells[J]. *Environ Res*, 2005, 98(2): 177-184.
- [7] BARROS SB, PIMENTE R, SIMIZU K, et al. Dose-dependent study of liver lipid peroxidation related parameters in rats treated with p,p'-DDT[J]. *Toxicol Lett*, 1994, 70(1): 33-38.
- [8] HANCOCK JT, DESIKAN R, NEILL SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways.[J]. *Biochem Soc Trans*, 2001, 29(Pt 2): 345-350.
- [9] 李培峰, 方允中. 活性氧对蛋白质的损伤作用[J]. *生命的化学*, 1994, 14(6): 1-3.
- [10] GABBITA SP, SUBRAMANIAM R, ALLOUCH F, et al. Effects of mitochondrial respiratory stimulation on membrane lipids and proteins: an electron paramagnetic resonance investigation. [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1372(2): 163-173.
- [11] GORES GJ, MIYOSHI H, BOLTA R, et al. Induction of the mitochondrial permeability transition as a mechanism of liver injury during cholestasis: a potential role for mitochondrial protease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 66(1-2): 167-175.
- [12] KANNAN K, HOLCOMBE RF, JAIN SK, et al. Evidence for the induction of apoptosis by endosulfan in a human T-cell leukemic line. [J]. *Mol Cell Biochem*, 2000, 205(1-2): 53-66.
- [13] FERREIRA FM, MADEIRA VM, MORENO AJ. Interactions of 2,2-bis(p-chlorophenyl)-1,1-dichloroethylene with mitochondrial oxidative phosphorylation[J]. *Biochem Pharmacol*, 1997, 53(3): 299-308.

(收稿日期: 2008-12-29)

(编辑: 洪琪; 校对: 徐新春)

文章编号: 1006-3617(2010)01-0027-04 中图分类号: R15 文献标志码: A

【论著】

Serum Dioxin and Furan Levels among Trichlorophenol and Pentachlorophenol Workers with Chloracne

BURNS Carol J, COLLINS James J*, BODNER Kenneth, BUDINSKY Robert A, WILKEN Michael, LAMPARSKI Les L, CARSON Michael L

Abstract: [Objective] To determine if serum dioxin levels are higher among trichlorophenol (TCP) or pentachlorophenol (PCP) workers with and without chloracne and to examine characteristics of workers with chloracne. [Methods] We collected blood from 26 PCP workers, 12 TCP workers, and 36 workers with no PCP or TCP exposure and measured dioxin levels. Chloracne was determined by examining plant medical records. [Results] We observed higher serum levels of the toxic equivalency (according to the World Health Organization) based on 2378-TCDD for 12378-PeCDD, 123678-H₆CDD, 123789-H₆CDD, and 123678-H₆CDF among the PCP workers with chloracne compared to the PCP workers with no chloracne. There were no significant differences in serum levels for the TCP workers by chloracne status, although the 2378-TCDD levels were higher among the participants who previously had chloracne (43.6 ppt vs. 16.4 ppt). The putative risk factors for chloracne of younger age at first exposure and more years since first exposure were observed in the TCP workers but not the PCP workers. Chloracne in the PCP workers was associated with longer duration of exposure prior to the diagnosis. [Conclusion] Chloracne is a good indicator for high dioxin exposures, and TCP and PCP workers have distinctively different serum profiles of dioxin congeners.

Key Words: chloracne; pentachlorophenol; trichlorophenol; dioxin; serum

High exposure to chlorinated dibenzo-p-dioxins has been associated with the acute skin condition, chloracne^[1]. Several studies have determined that while trichlorophenol (TCP) workers with chloracne have high serum levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(2378-TCDD), some trichlorophenol workers without chloracne also have high 2378-TCDD levels^[2,3]. Similar findings have

been observed among pentachlorophenol(PCP)workers with chloracne but with higher chlorinated dioxins predominating^[4]. A report on subjects from Seveso, Italy, the contaminated site from a 1976 trichlorophenol industrial accident, compared serum 2378-TCDD levels between chloracne subjects and control subjects^[5]. The chloracne subjects who currently had higher 2378-TCDD levels were younger at the time of the accident and were more likely to have light color hair than subjects without chloracne.

The incidence of chloracne among the more than 2000 chlorophenol workers in Midland, Michigan has been described^[6,7]. Unlike other study groups, dioxins exposure in this cohort was not the result of an accident or explosion. Investigators concluded that

Brief introduction of author: Carol J BURNS (1963-), female, PhD, Senior Research Epidemiologist, Occupational Epidemiology

*Address correspondence to COLLINS James J; E-mail jjcollins@dow.com

Work unit: The Dow Chemical Company, Epidemiology Department, 1803 Building, Midland, MI 48674 USA