

## 氯化镉对小鼠脏器系数及睾丸生殖细胞线粒体 *D-Loop* 基因突变的影响

曹琼洁, 陈忠义, 阮冬芬, 王欣珍, 楼哲丰, 邵薇薇, 金龙金\*

**摘要:** [目的] 研究氯化镉对发育中的小鼠睾丸、肾、肝等脏器系数及对睾丸生殖细胞线粒体 DNA 控制区 (*D-Loop*) 基因突变的影响, 探索氯化镉对睾丸影响的机制。 [方法] 取 7 周龄雄性 ICR 小鼠 40 只 [体重 (19.5 ± 2.5) g], 随机分为低 (1 μmol/kg)、中 (5 μmol/kg)、高 (10 μmol/kg) 剂量氯化镉腹腔注射染毒组和阴性对照组共 4 组, 每组 10 只, 隔天染毒, 共 10 次, 对照组腹腔注射等体积的生理盐水。第 21 天取小鼠双侧睾丸、肾和肝, 测定脏器系数; 提取睾丸生殖细胞基因组 DNA, 聚合酶链反应 (PCR) 扩增线粒体 *D-Loop* 基因, 纯化后测序分析基因突变。 [结果] 高剂量组睾丸脏器系数明显低于对照组 ( $P < 0.001$ ), 但肝脏脏器系数明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 低剂量组肾脏脏器系数明显高于对照组 ( $P < 0.001$ )。测序结果显示各组小鼠睾丸生殖细胞线粒体 *D-Loop* 基因未检测到突变。 [结论] 高剂量的氯化镉对小鼠睾丸和肝脏脏器系数产生影响, 低剂量的氯化镉对小鼠肾脏脏器系数产生影响。氯化镉处理小鼠 21 d, 未检测到睾丸生殖细胞线粒体 *D-Loop* 基因突变。

**关键词:** 氯化镉; 线粒体 DNA 控制区; 基因突变; 肝肾睾丸脏器系数

**Effects of Cadmium Chloride on Organ Weight Coefficient and Mitochondrial *D-Loop* Point Mutation of Mouse Testicle** CAO Qiong-jie, CHEN Zhong-yi, RUAN Dong-fen, WANG Xin-zhen, LOU Zhe-feng, SHAO Wei-wei, JIN Long-jin\* (College of Life Sciences, Wenzhou Medical College, Key Research Laboratory for Medical Genetics of Zhejiang, Wenzhou, Zhejiang 325035, China). \*Address correspondence to JIN Long-jin; E-mail: jlj@wzmc.edu.cn

**Abstract:** [Objective] To study organ weight coefficient and testicle mitochondrial (mt) *D-Loop* point mutation in mice after exposure to cadmium. [Methods] Forty male mice were divided into 4 groups with 10 animals each group (average body weight: 19.5 ± 2.5 g; age: 7 week). Three groups treated with intraperitoneal cadmium chloride of 1.0, 5.0, 10.0 μmol/kg, once per 2 days, 10 times in total, and normal saline for control group. Necropsy were conducted 20 days after exposure of cadmium chloride, weight coefficients of testis, kidneys, liver were determined. The mt *D-Loop* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the genomic DNA of mice testicle tissue, and their mutant sites by DNA sequencing was analyzed. [Results] The testis weight coefficient of 10.0 μmol/kg cadmium chloride group was lower than that of the control group ( $P < 0.001$ ), but the liver weight coefficient of 10.0 μmol/kg cadmium chloride group was higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). The kidney weight coefficient of 1.0 μmol/kg cadmium chloride group was higher than that of the control group ( $P < 0.001$ ). No mt *D-Loop* mutation was found in the mice testicle spermatogenic cell. [Conclusion] High dose cadmium chloride affected the mice testicle and liver weight coefficient, low dose cadmium chloride affected that of kidney, but 21 day exposure did not induced mt *D-Loop* mutation.

**Key Words:** cadmium chloride; *D-Loop*; gene mutation; liver kidney testis weight coefficient

重金属镉是当今世界共同关注的重要环境污染源, 世界卫生组织 (WHO) 将其作为优先研究的食品污染物<sup>[1]</sup>。镉对哺乳动物具有较强的致癌、致畸和致突变作用<sup>[2]</sup>。已有报道显示镉可以诱导动物睾丸、附睾等组织器官发生结构功能上的退化性变化<sup>[3]</sup>, 本课题组以往的研究也表明氯化镉对小鼠生殖细胞 DNA 具有损伤作用<sup>[4,5]</sup>, 可引起小鼠生殖细胞 *Bcl-2*、*Bax* 表

达水平异常<sup>[6]</sup>。睾丸生殖细胞较其他细胞分裂指数高, 基因突变率高, 易于检测。以往镉对细胞的损伤研究表明, 镉可致细胞氧化损伤作用<sup>[7]</sup>。但镉致动物器官和细胞的损伤作用机制尤其是对线粒体损伤机制还不清楚, 而线粒体 DNA 易受到氧化过程中产生的活性氧 (ROS) 的攻击, 线粒体 DNA 受损后极易产生突变<sup>[8]</sup>。为进一步在分子水平上研究睾丸生殖细胞的损伤机制, 本项目拟检测镉对小鼠睾丸脏器系数的影响及对线粒体 DNA 控制区 (*D-Loop*) 基因突变的影响。

[基金项目] 温州医学院 2008 年本专科学历生科研申请立项自然科学类课题 (编号: 200801010)

[作者简介] 曹琼洁 (1988-), 女, 本科生; 研究方向: 生殖遗传; E-mail: vicky.cqj@163.com

[\*通信作者] 金龙金教授; E-mail: jjl@wzmc.edu.cn

[作者单位] 温州医学院生命科学学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 浙江 温州 325035

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂和实验动物

AR 级氯化镉采用中国医药上海化学试剂公司产品; 聚合酶链反应 (PCR) 扩增引物以小鼠基因组 (NCBI 登录号为 41386985)

为参照模板,采用Primer3软件设计获得,D-Loop基因引物序列为:上游引物5'-AAGGAGCTACTCCCCACCAC-3'、下游引物5'-ATAAGGCCAGGACCAAACCT-3',引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;PCR聚合酶试剂、DNA片段纯化试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司产品;琼脂糖、Tris试剂购自Promega公司;蛋白酶K、DNA酶为Merk公司产品。清洁级健康雄性ICR小鼠40只,7周龄,体重(19.5±2.5)g,由温州医学院实验动物中心提供[许可证号:SYXK(浙)2005-0061]。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与染毒 取40只小鼠随机分为低、中、高剂量氯化镉腹腔注射染毒组和阴性对照组,每组10只。低、中、高剂量氯化镉处理组分别以1.0、5.0、10.0 μmol/kg氯化镉腹腔注射,隔天注射1次,共10次,阴性对照组每次腹腔注射等体积的生理盐水。于暴露第21天处死小鼠,取睾丸、肾脏和肝备用。

1.2.2 小鼠脏器系数测定 小鼠处死后分别称量体重和双侧睾丸、肾及肝脏的重量,按文献[9]计算睾丸、肾和肝的脏器系数。

1.2.3 小鼠睾丸生殖细胞基因组DNA提取 参考李世林等[10]机械分离法获取小鼠睾丸生殖细胞,参考基因组DNA标准提取法并加以改进提取细胞全基因组DNA。将睾丸用磷酸盐缓冲液制成生殖细胞悬液,加入细胞裂解缓冲液[1 mol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA), 0.069 mol/L 十二烷基磺酸钠(SDS)],再加20 μg/mL RNA酶,37℃水浴30 min后加入80 μg/mL蛋白酶K,65℃过夜,用酚、异丙醇抽提,70%乙

醇洗涤,最后用TE溶液溶解即可得小鼠睾丸生殖细胞全基因组DNA。

1.2.4 PCR反应和产物鉴定 DNA模板1 μL,上游引物和下游引物(10 μmol/L)各0.3 μL,dNTP混合物(2.5 mmol/L)2.5 μL,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL,10×PCR缓冲液2.5 μL,Taq酶0.1 μL,补充ddH<sub>2</sub>O至25 μL。反应体系在94℃预变性5 min,按94℃变性20 s,61℃退火20 s,72℃延伸1 min程序共循环30次,最后72℃终末延伸5 min。扩增产物用1.5%琼脂糖电泳鉴定。

1.2.5 PCR产物纯化和测序 按宝生物工程(大连)有限公司DNA片段纯化试剂盒说明书操作纯化PCR产物,纯化后由上海基康生物技术有限公司进行测序,将结果与小鼠标准序列进行比对,并观察测序峰图是否出现突变。

1.3 统计学方法

运用SPSS 11.0软件,采用单因素方差分析方法,检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 氯化镉对小鼠脏器系数的影响

高剂量氯化镉组睾丸的脏器系数明显低于对照组和低剂量氯化镉组(P<0.001),但肝脏的脏器系数则明显高于对照组(P<0.05);低剂量氯化镉组肾脏的脏器系数明显高于对照组(P<0.001)和高剂量组(P<0.05)(表1)。

表1 氯化镉对小鼠肝、肾和睾丸脏器系数的影响(n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

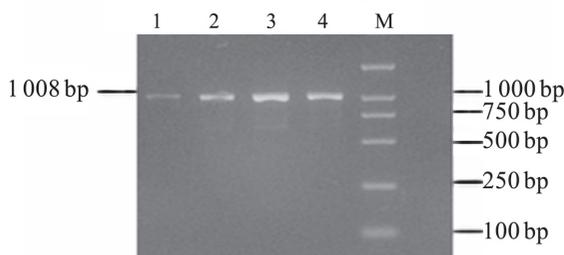
Table 1 Effects of cadmium chloride on testis, liver, kidneys weight coefficient in mice

组别(Group)	体重(Weight, g)	肝脏的脏器系数(Liver weight coefficient)	肾脏的脏器系数(Kidney weight coefficient)	睾丸的脏器系数(Testis weight coefficient)
对照(Control)	33.40 ± 1.28	0.0619 ± 0.0031	0.0084 ± 0.0009	0.0035 ± 0.0006
低剂量(Low dose)	34.07 ± 2.22	0.0610 ± 0.0038	0.0096 ± 0.0007***	0.0035 ± 0.0005
中剂量(Mid dose)	32.76 ± 1.89	0.0625 ± 0.0033	0.0090 ± 0.0008	0.0036 ± 0.0005
高剂量(High dose)	32.24 ± 2.32	0.0655 ± 0.0041*	0.0086 ± 0.0005	0.0017 ± 0.0010***

[注]与对照组比(Compared with the control),\*: P<0.05; \*\*\*: P<0.001;与低剂量氯化镉组比(Compared with the low dose group), #: P<0.05; #: P<0.01。

2.2 小鼠睾丸生殖细胞线粒体D-Loop基因PCR扩增结果

对照组和氯化镉处理各组均可以扩增出1008 bp的D-Loop基因片段(图1),与预期DNA片段一致。



[注]1: 阴性对照组(Control); 2: 高剂量氯化镉组(High dose); 3: 中剂量氯化镉组(Mid dose); 4: 低剂量氯化镉组(Low dose); M: DNA Mark。

图1 小鼠睾丸生殖细胞线粒体D-Loop基因PCR扩增产物电泳图  
Figure 1 The PCR result of testis mitochondrial D-Loop in mice

2.3 小鼠睾丸生殖细胞线粒体D-Loop基因PCR产物测序结果

将测序结果与小鼠标准序列比对,氯化镉处理各组和对

照组均未检测出D-Loop基因的突变(图2),提示各氯化镉组染毒21 d未检测到染毒小鼠生殖细胞线粒体D-Loop基因突变。



图2 小鼠睾丸生殖细胞线粒体D-Loop基因测序部分峰图

Figure 2 The DNA sequencing of testis mitochondrial D-Loop in mice

3 讨论

脏器系数在一定程度上是反映药物或毒物对脏器的影响或损伤的重要指标。本项目用不同剂量氯化镉经小鼠腹腔注射染毒后,测定小鼠脏器系数。结果显示,高剂量氯化镉(10.0 μmol/kg)处理组小鼠睾丸脏器系数明显低于对照组(P<0.001),提示镉可能对小鼠睾丸有影响,但中、低剂量组睾丸脏器系数与对照组相比无差异,而低剂量氯化镉引起小鼠肾脏脏器系数明显变化,提示睾丸相对于肾脏不是对氯化镉反应敏感的器官。同时,高剂量氯化镉组小鼠肝脏脏器系数表现为增

高,这是由于肝是机体中的解毒器官,任何药物或毒物进入体内后都要在其中进行代谢。其毒物及其代谢产物对肝脏都有一定的毒性,而肝脏脏系数升高可能是器官损伤的一种代谢补偿效应。肾是机体排泄毒物的重要器官,当氯化镉经肾排泄时,也会对其造成不同程度的损害<sup>[11]</sup>,低剂量氯化镉组小鼠肾脏脏系数明显升高,说明肾对镉毒反应敏感,这与以往文献报道一致<sup>[12]</sup>。另有研究称<sup>[13]</sup>,肾脏脏系数的升高可能是器官肿大充血效应;中、高剂量组肾脏脏系数下降,推测镉对肾发育产生抑制作用并与镉引起的器官肿大充血效应相互抵消。

但近几年(2009年前)鲜有报道对分子水平重金属毒性机制的研究,尤其是对线粒体基因突变研究更少。线粒体在生命活动中发挥着重要功能,是动物细胞核外唯一含有DNA结构的细胞器。*D-Loop*包含了H-链(重链)启动子、线粒体转录因子结合区以及保守序列块等,涉及到线粒体(mt)DNA的复制和转录。此外,mtDNA包含2个核蛋白亚基(12S rRNA和16S rRNA)和13个蛋白亚基编码序列。研究认为,mtDNA是致癌物作用的重要靶点,其损伤程度和突变率显著高于核DNA<sup>[14]</sup>,是核基因的10~20倍<sup>[15]</sup>,这是由于mtDNA位于线粒体内膜附近,裸露于内膜氧化呼吸链产生的大量自由基环境中,易遭受氧化损伤<sup>[14]</sup>,且没有DNA损伤修复系统。

本项目以PCR测序分析了*D-Loop*基因突变,测序结果显示对照组和各剂量氯化镉处理组小鼠睾丸线粒体*D-Loop*基因未检测到突变,推测可能有两种情况:(1)本研究中氯化镉处理剂量引起*D-Loop*基因突变的概率很低,未能检测到;(2)即使本研究中氯化镉处理剂量对线粒体*D-Loop*基因突变有影响(假设),但基因突变的拷贝数不多,未达到测序能检测出来的水平。因此,延长氯化镉的处理时间,使基因突变的拷贝数积累到一定数量,采用更灵敏的突变检测技术是我们进一步研究的重点。

#### 参考文献:

- [1] WHO. Evaluation of certain additives and contaminants [M]. Geneva: WHO, 1989.
- [2] 崔玉静,黄益宗,朱永官. 镉对人类健康的危害及其影响因子的研究进展[J]. 卫生研究, 2006, 35(5): 656-659.
- [3] HOLT WV, PALOMO MJ. Optimization of a continuous real-time computerized semen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation [J]. *Reprod Fertil Dev*, 1996, 8(2): 219-230.
- [4] 金龙金,方周溪,张婵,等. 镉暴露小鼠生精细胞DNA损伤与Bcl-2和Bax表达率及超微结构改变[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2005, 23(4): 271-273.
- [5] 金龙金,楼哲丰,董杰影,等. 汞、镉对小鼠离体骨髓细胞和睾丸生殖细胞的DNA损伤作用[J]. 癌变·畸变·突变, 2004, 16(2): 94-97.
- [6] 金龙金,方周溪,楼哲丰,等. 镉对小鼠精子和生精细胞超微结构及生精细胞bcl-2、bax基因表达的影响[J]. 细胞生物学杂志, 2006, 28(3): 477-480.
- [7] OH SH, CHOI JE, LIM SC. Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells [J]. *Toxicology*, 2006, 220(1): 1-12.
- [8] WEI YH, LU CY, LEE HC, et al. Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 854: 155-170.
- [9] 金龙金,张军明,董杰影. 醋酸铅对雄性小鼠生殖功能的毒性作用[J]. 生殖医学杂志, 2003, 12(5): 288-291.
- [10] 李世林,王行环,杨中华,等. 比较机械分离法和组合酶消化法分离大鼠生精细胞的差异[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(50): 10105-10108.
- [11] 李江肃,李引乾,赵富奎,等. 磺胺喹噁啉对小鼠的急性毒性试验[J]. 西北农业学报, 2008, 17(2): 29-32.
- [12] FUKUMOTO M, KUJIRAOKA T, HARA M, et al. Effect of cadmium on gap junctional intercellular communication in primary cultures of rat renal proximal tubular cells [J]. *Life Sci*, 2001, 69(3): 247-254.
- [13] 许庭良,姜俸蓉,罗明秀,等. 慢性镉中毒对小白鼠肾脏的损害[J]. 贵阳医学院学报, 1996, 21(4): 267-270.
- [14] 韩琤波,王小松,马洁韬,等. 线粒体DNA损伤与胃癌发生关系的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(21): 1608-1612.
- [15] 王正引,张小如,兰风华. 补肾健脾养血活血方对老年小鼠肾线粒体DNA缺失突变的影响[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(11): 652-654.

(收稿日期: 2009-11-16)

(英文编审: 薛寿征; 编辑: 郭薇薇; 校对: 徐新春)

#### 【告知栏】

## 《中华临床医师杂志(电子版)》2011年度征稿征订

《中华临床医师杂志(电子版)》是中国科技核心期刊,半月刊,全年24期,定价672元,国内刊号CN 11-9147/R,邮发代号80-728,被万方数据库、中国期刊网、维普数据库、美国化学文摘、乌利希期刊指南、波兰哥白尼索引等国内外知名数据库收录。

2011年度重点栏目征稿及2011年优惠征订详情请见中华临床医师杂志官方网站www.clinicmed.net的期刊动态。欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志!欢迎各位专家组织、推荐、撰写重点栏目论文!

投稿信箱:北京市100035-50信箱编辑部;邮编:100035。投稿电子邮箱:Lcdoctor@163.com。电话:010-62219211;传真:010-62222508。网址:www.clinicmed.net。