

# 氟化钠对小鼠睾丸组织的损伤及细胞凋亡的影响

赵燕凌<sup>1</sup>, 张斌<sup>2</sup>, 宋国华<sup>2</sup>, 刘茂林<sup>2</sup>, 高继平<sup>2</sup>

(1. 山西医科大学医学影像系, 太原 030001; 2. 山西医科大学实验动物中心, 太原 030001)

**【摘要】** 目的 研究氟中毒对小鼠睾丸组织的影响。方法 给小鼠饮用含 0 mg/L、10 mg/L、25 mg/L、50 mg/L 氟化钠水, HE 染色观察睾丸组织形态病理学变化, 用 TUNEL 法检测小鼠睾丸组织细胞凋亡。结果 氟中毒能诱导小鼠睾丸 TUNEL 阳性细胞, 且凋亡细胞率较对照组明显增高。结论 氟中毒可诱导小鼠睾丸组织细胞凋亡明显, 凋亡发生部位与病理改变明显的部位相吻合, 氟中毒小鼠睾丸组织细胞凋亡机制参与睾丸损害过程。

**【关键词】** 氟中毒; 凋亡; TdT 缺口末端标记; 小鼠

**【中图分类号】** Q953; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)01-0039-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.001.002

## Injury and Apoptosis in Testis Cells of in Mice Exposed to Sodium Fluoride

ZHAO Yan-lin<sup>1</sup>, ZHANG Bin<sup>2</sup>, SONG Guo-hua<sup>2</sup>, LIU Mao-lin<sup>2</sup>, GAO Ji-ping<sup>2</sup>

(1. Medical Image Department, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. Laboratory Animal Center, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

**【Abstract】 Objective** To study the influence of fluoride on the testis apoptosis in mouse. **Methods** Experimental mouse were exposed to sodium fluoride (NaF) added to drinking water, The histopathological changes of testis tissue were observed by HE staining. The apoptosis were detected by TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling) apoptosis Detection Kit. **Results** TUNEL-positive cells could be detected in fluoride-treated rat testis. The apoptotic rates of fluoride-treated testis cells were higher than that of control significantly. **Conclusion** There is tendency of apoptosis in testis of fluorosis in mouse. It is most similitude with change spot of pathology. There may exist apoptosis mechanism in testis lesion of fluorosis.

**【Key words】** Fluorosis; Apoptosis; TUNEL; Mouse

氟作为机体生命活动所必需的微量元素之一, 它广泛存在于饮水、土壤、大气和动植物体内, 但机体长期过量摄入可导致慢性氟中毒。氟对雄性生殖系统有毒性作用, 可直接作用于睾丸、附睾、前列腺等, 破坏其结构, 导致生育能力的下降<sup>[1]</sup>。研究表明间质细胞受损, 线粒体和滑面内质网的变化显著, 可能通过增强脂质过氧化作用, 抑制物质和能量代谢过程, 损伤 DNA 等途径对雄性生殖系统结构

和功能造成直接损害<sup>[2]</sup>。氟对雄性生殖系统的损害是多途径、十分复杂的过程, 关于氟致睾丸间质细胞凋亡作用和机制仍不十分清楚<sup>[3]</sup>。因此, 氟对雄性生殖系统的影响日益受到重视。

本研究选用小鼠建立氟染毒模型, 对氟染毒小鼠睾丸组织的结构和组织凋亡进行分析, 观察氟对小鼠睾丸组织病理学变化, 用 TUNEL 技术检测睾丸组织细胞凋亡, 探讨氟引起睾丸组织损伤和凋亡的

[作者简介] 赵燕凌 (1973 -), 女, 硕士, 讲师。E-mail: zhaoyl@spring@163.com。

[通讯作者] 宋国华, 女, 副教授, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: ghsong@yahoo.com.cn。

机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

动物:健康雄性昆明小鼠 40 只,由山西医科大学实验动物中心提供(SCXK[晋]2009-001)。

试剂:氟化钠(NaF,分析纯,购自天津化学试剂厂);TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒(北京中昊生物公司);4%多聚甲醛。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物模型的建立

雄性昆明小鼠 40 只常规饲养 1 周后,随机分为四组:对照组、低氟组、中氟组和高氟组,每组 10 只。根据已发表文献<sup>[4,5]</sup>对实验组给药剂量和用药时间稍作修改,对照组饲喂普通饲料,饮去离子水;低氟组、中氟组和高氟组饲喂普通饲料,分别饮用含 10、25、50 mg/L 氟化钠去离子水。定时饲喂饲料,自由采食、饮水。环境温度 20 ~ 25℃。实验期间每天观察动物活动、饮食、排泄、反应及氟斑牙情况,同时每周称重 1 次,观察体重变化。

#### 1.2.2 标本采集

饲喂 120 d 后,麻醉后解剖,迅速取其睾丸组织,生理盐水冲洗,置于 4%多聚甲醛固定液中固定 24 h。

#### 1.2.3 切片制作

睾丸组织在 4%多聚甲醛中固定 24 h 后,自来水冲洗,去离子水冲洗,将睾丸组织用锋利刀片沿纵向对半切割成两块,梯度酒精脱水,置二甲苯透明,较低温度(低于 60℃)下浸蜡,包埋。将包埋好的蜡块置于石蜡切片机上切片,厚度为 5 μm。将切片漂浮于 45℃温水中,然后用 0.01%多聚赖氨酸处理过的载玻片捞起,并放在烘片机上烤干。

#### 1.2.4 HE 染色

按常规方法对组织切片作 HE 染色,光学显微镜观察组织病理学变化。

二甲苯、酒精脱蜡至水→苏木精染色 10 min,镜下控制盐酸酒精分化,水洗返蓝→脱水到 90%酒精→伊红 5 min→梯度乙醇脱水(浓度:75% - 80% - 90% - 100%)→二甲苯透明→中性树脂封片→光镜下观察睾丸组织形态。

#### 1.2.5 原位细胞凋亡检测

采用 TdT 介导的末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labelin, TUNEL 法)进行细胞凋亡的

原位检测,按照试剂盒说明书进行。TUNEL 结果计算:400 倍高倍镜下观察,阳性细胞的细胞核呈棕黄色,细胞核出现黄至棕褐色颗粒均为阳性细胞,凋亡细胞的形态学特征为染色质浓集、核裂解以及核周新月体样浓集染色质,细胞内可见深色凋亡小体者为凋亡细胞。随机选择 5 个高倍视野(400 倍)并计数 500 个细胞,记录凋亡细胞数,计算凋亡指数(AI): $AI = \text{凋亡细胞数} / 500 \times 100\%$ 。

#### 1.2.6 统计分析

用 SPSS11.5 软件进行统计分析,各组数据以均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm S$ )表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 临床检查

染毒期间,对照组小鼠营养活动状况良好,皮肤有弹性,被毛浓密有光泽,反应活跃机敏,活动敏捷,对照组小鼠的体重随染毒时间延长呈正增长。牙齿完整有光泽,釉质棕黄色半透明。氟中毒组小鼠营养状况较差,身体瘦弱,被毛蓬乱无光泽,反应迟钝。下切齿失去光泽,牙釉质出现白垩样不透明性改变,表面粗糙,变脆易磨损,长度为正常时的 1/2,有的仅剩残根。

### 2.2 病理剖检

正常饲料对照组小鼠剖开腹腔后,可见皮下脂肪充盈,肌肉丰满,内脏器官检查未见异常。

染氟组小鼠剖开腹腔后,可见皮下脂肪贫瘠,肌肉紧紧附着于骨,不易剥离,内脏器官检查见异常。

### 2.3 睾丸组织形态学的变化

实验观察到正常组睾丸间质细胞,周围有明显较长突起,胞体扁椭圆形,细胞核正常,核染色质分布均匀,胞质中细胞器分布正常。用光镜观察染氟组睾丸细胞,小鼠曲精小管退化坏死,可见细胞排列紊乱,细胞皱缩、体积缩小;胞浆结构疏松内有水肿空泡,细胞内器稀少,胞体核固缩,核染色质凝集呈块状分布,染色质边集,核周出现空泡样变化;内质网肿胀模糊不清(彩插 3 见图 1)。

### 2.4 睾丸组织凋亡检测

显微镜镜下观察,凋亡细胞核特异性染色呈棕色,胞浆为浅棕色,非凋亡细胞为浅紫色(彩插 3 见图 2)。镜下表现为细胞收缩变圆失去微绒毛,与邻近细胞连接消失,核内染色质浓缩边集,出现细胞

膜内陷分割,并有膜包裹的凋亡小体形,TUNEL 阳性细胞有的胞核略小,有的胞核呈碎片状。氟中毒组引起大量 TUNEL 阳性细胞(彩插 3 见图 2)。与对照组比较,染氟组睾丸细胞凋亡率显著增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 小鼠睾丸细胞凋亡率的比较  
Tab. 1 Comparison of testis apoptosis in mouse

组别 Group	染氟时间(d) Time (d)	动物只数 Number	个/500 个细胞 Number/500 cells
0 mg/L	120	10	5.04 ± 0.72
10 mg/L	120	10	16.25 ± 2.13
25 mg/L	120	10	31.51 ± 2.21*
50 mg/L	120	10	48.80 ± 4.02*

注:与对照组比较,\* $P < 0.01$

Note: Compared with the control group,\* $P < 0.01$

### 3 讨论

#### 3.1 高氟对动物组织的损伤

近年来氟化物对内分泌系统、神经系统、生殖系统功能的影响引起广泛的重视,研究表明氟化物可引起小鼠和大鼠睾丸、肾近曲小管、肝脏、大脑皮质细胞的组织学改变以及激素水平的变化。有报道氟中毒对大鼠肾近曲小管上皮细胞有明显的浑浊肿胀和空泡变性,并伴有少量炎细胞浸润,多数肾近曲小管管腔狭窄变形,局部出现坏死崩解。发现氟中毒能明显诱导大鼠肾脏细胞凋亡,并存在坏死<sup>[6]</sup>。崔留欣等<sup>[7]</sup>关于氟致雄性大鼠生殖功能损害的实验研究表明,染氟组的各级生精细胞数量减少,结构疏松,成熟精子的数量下降。郭晓英<sup>[8]</sup>关于氟对大鼠肝脏功能和形态的影响及与氧化应激关系的实验研究表明,染氟组大鼠肝细胞细胞界限不清,细胞内染色质浓缩、边集,呈半月形聚集于核膜下;线粒体可见明显肿胀,嵴断裂或消失;内质网扩张;可见较多的白色脂滴;毛细胆管扩张,腔面微绒毛减少。不同日龄氟中毒三代大鼠大脑皮质细胞凋亡程度增高,氟中毒可以引起世代蓄积,接触氟环境时间越长,其动物子代大脑损伤越严重<sup>[9]</sup>。Schalz 等<sup>[10]</sup>研究结果认为氟可抑制小鼠血清睾酮水平,使其比对照组下降 40%,氟化物毒性与动物生殖力下降呈正相关。染毒组精子计数、活动率下降,畸形率升高,血清睾酮、促黄体生成激素下降。

本研究结果及以往报道都表明,高氟会导致小鼠曲精小管退化坏死,细胞排列紊乱,细胞皱缩、体积缩小;胞浆结构疏松内有水肿空泡,细胞内器稀少,胞体核固缩,核染色质凝集呈块状分布,染色质

边集,核周出现空泡样变化;内质网肿胀模糊不清。关于高氟对生殖系统毒作用机制的分子和基因水平的研究还有待于进一步探讨。

#### 3.2 染氟小鼠睾丸间质细胞凋亡

氟是一种原生质毒物,可以诱导机体不同组织发生细胞凋亡。当前,细胞凋亡已成为分子生物学、胚胎学、放射生物学、肿瘤学、免疫学和血液学的研究热点。许多外界不良因素可以诱导机体组织的细胞凋亡。细胞凋亡是指在基因调控下的细胞自主死亡,细胞以这种主动死亡来维持组织的自身稳定。它在生物体的生长发育、衰老、组织损伤与修复以及病毒感染中都发挥重要的作用。

氟为细胞毒性物质,近年来细胞凋亡在氟中毒发病机制中的作用引起了人们的广泛关注,人们已从多方面探讨了氟化物诱导细胞凋亡的作用机制。已有研究表明,高氟对多种组织细胞的损伤不伴有炎症反应,而以核内染色质边集、细胞萎缩的改变为特征,此与众多学者对细胞凋亡的描述相吻合<sup>[11]</sup>,提示细胞凋亡可能是氟致机体组织细胞损伤的重要参与因素。结构改变是不可逆的,其损害的程度与体内氟负荷密切相关。但氟究竟是如何引起睾丸病理改变、导致生殖功能损害目前不清楚。

TUNEL 实际上是分子生物学与形态学相结合的研究方法,对完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行原位染色,能准确地反应细胞凋亡典型的生物化学和形态特征。细胞凋亡的生化特征之一,是  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  离子依赖的内源性核酸酶的激活将核染色体从核小体间断裂,形成由大约为 180 ~ 200 bp 或其多聚体组成的寡核苷酸片段,从而产生有游离粘性 3'-OH 的 DNA 断链,因此可进行凋亡细胞的检测,即脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)。TUNEL 法是目前唯一具有普遍意义且已发展成熟的检测方法,可实现末端定量,并可在形态学改变之前检测到凋亡,且敏感、标记强度大<sup>[12]</sup>。根据实验原理,TUNEL 法较免疫组化法更加精确、敏感,在时序性上早于免疫组化法表达出细胞凋亡的特性,故本实验考虑以 TUNEL 法的结果为准,推测氟中毒后对睾丸组织功能有明显影响。

在氟中毒与细胞凋亡关系的研究中,国外学者主要采用体外细胞培养的方法进行实验,观察到培养肺细胞经氟化物处理后 DNA 的损害和凋亡改

变<sup>[13]</sup>。Lowth<sup>[14]</sup>给体外培养的胰岛 β 细胞染氟以后,电镜下观察到染色质边集及 DNA 降解成寡聚核苷酸,呈现出凋亡特征。Lonroy<sup>[15]</sup>用氯化铝处理胸腺小叶时,亦激起大范围胸腺细胞亚型的凋亡。Hirano<sup>[16]</sup>培养骨肉瘤细胞 UMR106 株,用 5 mmol/L 氟处理 8 h 以后,用 TUNEL 法证明了细胞凋亡的存在。国内学者以大体动物实验发现过量氟可诱导组织细胞凋亡。吕晓红<sup>[17]</sup>在慢性氟中毒大鼠观察到脑细胞中 DAB 着染阳性的凋亡细胞,并且表达具有选择性,流式细胞术显示慢性氟中毒脑组织中的凋亡峰明显高于正常对照组。应用流式细胞术同样检测到氟中毒大鼠和家兔肝细胞凋亡率较对照组明显增加<sup>[18,19]</sup>。实验中 TUNEL 检测结果显示:显微镜下观察,对照组细胞核呈现出淡紫色,染毒组细胞核呈现出棕黄色,TUNEL 阳性细胞有的胞核略小,有的胞核呈碎片状。氟中毒组引起大量 TUNEL 阳性细胞,而对照组大鼠罕见 TUNEL 阳性细胞。氟可促进睾丸组织细胞的过度凋亡及引起细胞坏死,且细胞凋亡率比同剂量同时间组细胞坏死率高。这提示细胞过度凋亡可能是氟诱发的睾丸组织细胞损伤的主要形式,细胞坏死则是细胞凋亡晚期的表现。氟诱发睾丸组织细胞损伤,可解释氟可能对睾丸毒作用的机制,即氟通过诱发睾丸组织细胞过度凋亡而对睾丸造成功能性或器质性损害。这也印证了氟对睾丸早期功能性损害的可逆性及晚期结构性改变的不可恢复性。

本研究用病理学观察、TUNEL 的凋亡检测,证明了氟染毒可导致小鼠睾丸组织细胞凋亡,提示过量氟在体内的毒性和细胞凋亡有关,本结果为深入研究氟的雄性生殖毒性提供了资料。高氟对睾丸组织的损害存在细胞凋亡,其损害过程是一个复杂的过程,细胞凋亡还受到其他多种细胞凋亡基因的调控,如 Caspase 家族、一氧化氮、兴奋性氨基酸、自由基等,各种因素在睾丸间质细胞凋亡的过程发挥怎样的相互作用,还需开展深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 崔留欣,姜春霞,王锡林,等. 氟致雄性大鼠生殖功能损害的实验研究[J]. 中国地方病学杂志 2003, 22(3): 195-197.  
[2] 袁双虎. 睾丸间质细胞凋亡及调控[J]. 中华男科学, 2003, 9

(3): 218-225.

- [3] 杨建英,张勇法,乔晓岚. 睾丸间质细胞的研究进展[J]. 医学综述 2009, 15(14): 2093-2097.  
[4] Ahmed Elbetieha, Homa Darmani, Ahmad S Al-Hiyasat, et al. Fertility effects of sodium fluoride in male mice [J]. Fluoride, 2000(3): 128-134.  
[5] Homa Darmani, Ahmad S Al-Hiyasat, Ahmed M Elbetieha, et al. Effects of sodium fluoride in drinking water on fertility in female mice. Fluoride 2001(4): 242-249.  
[6] 高勤,王守立,于燕妮,等. 慢性氟中毒大鼠肾脏自由基含量与形态学变化[J]. 贵州医药 2005, 29(3): 213-215.  
[7] 崔留欣,姜春霞,王锡林,等. 氟致雄性大鼠生殖功能损害的实验研究[J]. 中国地方病学杂志 2003, 22(3): 195-197.  
[8] 郭晓英. 氟对大鼠肝脏功能和形态的影响及与氧化应激关系的实验研究[D]. 中国医科大学博士学位论文 2003: 20  
[9] 葛亚明,宁红梅,刘俊伟,等. 氟对不同世代大鼠大脑皮质细胞凋亡的影响[J]. 中国畜牧兽医 2010, 37(7): 44-46.  
[10] 姜春霞,王锡林,程学敏,等. 氟对雄性大鼠生殖系统的内分泌干扰作用研究[J]. 河南预防医学杂志, 2003, 14(1): 8-13.  
[11] 徐辉,张桂珍,李广生. 慢性氟中毒非骨相损伤与细胞凋亡[J]. 地方病通报 2000, (3): 79-80.  
[12] 雷静,章平,钱呈,等. 几种细胞凋亡检测方法的比较[J]. 生物技术通讯 2005, 16(6): 681-682.  
[13] Schwarze PE, Johanson NM, Samuel Sen JT, et al. The use of isolated lung cell in vitro pulmonary toxicity studies of DNA damage apoptosis and alternation of gene expression[J]. Cent Eur Public Health, 1996, 4: 6-10.  
[14] Lowth AC, Williams GT, Scarpell JH, et al. Heterotrimeric G-protein implicated in the regulation of apoptosis in pancreatic beta-cel[J]. Exp Cell Res 1996, 229(1): 69-76.  
[15] Lonroy LA, Jenkinson EJ, Dwen JT, et al. Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate hydrolysis accompanies T-cell receptor induced apoptosis of murine thymocytes within thymus [J]. Eur J Immunol, 1995, 25(7): 1828-1835.  
[16] Hirano S, Ando M. Fluoride mediates apoptosis in osteosarcoma UMR 106 and its cytotoxicity depends on the PH [J]. Arch Toxicol, 1997, 72(1): 52-58.  
[17] 吕晓红,李广生,孙波. 慢性氟中毒大鼠神经细胞凋亡的研究[J]. 中国地方病学杂志 2000, 19(2): 96-98.  
[18] 井玲,邵宗俊,任立群,等. 氟中毒大鼠肝细胞凋亡的研究[J]. 中国地方病学杂志, 1999, 18(2): 84-85.  
[19] 孙景春,徐辉,张桂珍,等. 氟中毒家兔肝细胞凋亡与肝功能损害[J]. 中国地方病防治杂志 2001, 16(3): 129-131.

(修回日期)2011-10-22

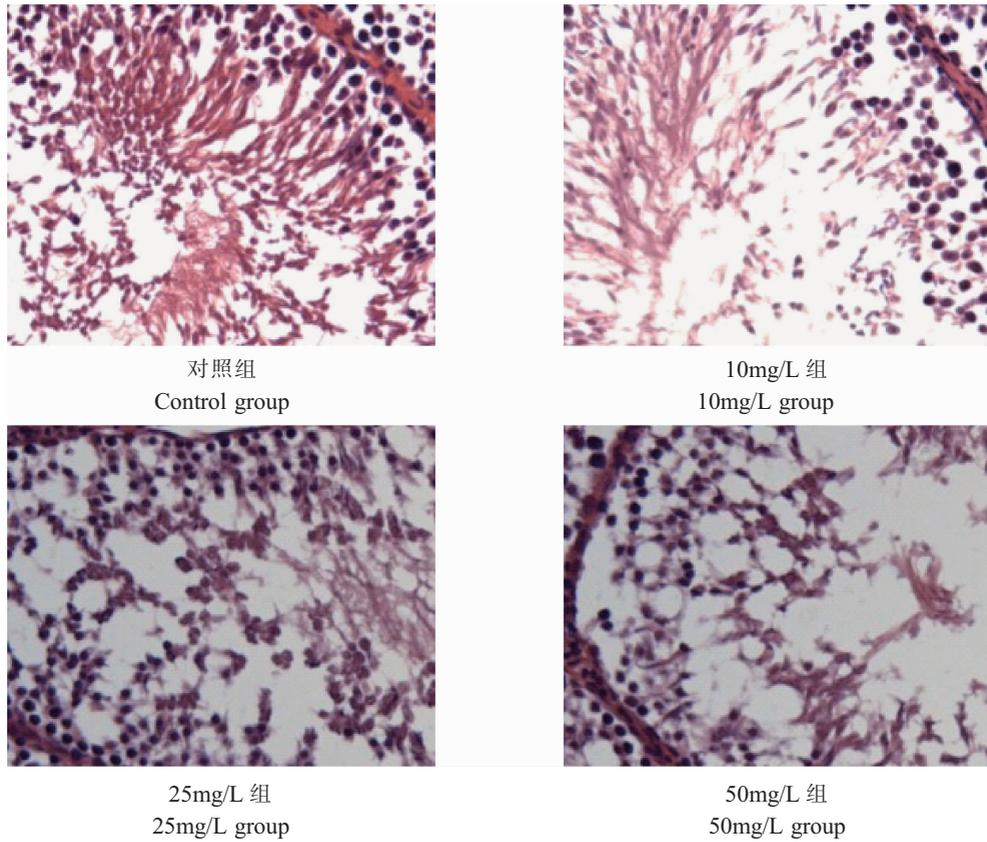


图 1 小鼠睾丸形态学改变(HE,×200)

Fig. 1 Morphology changes of mouse testis(HE,×200)

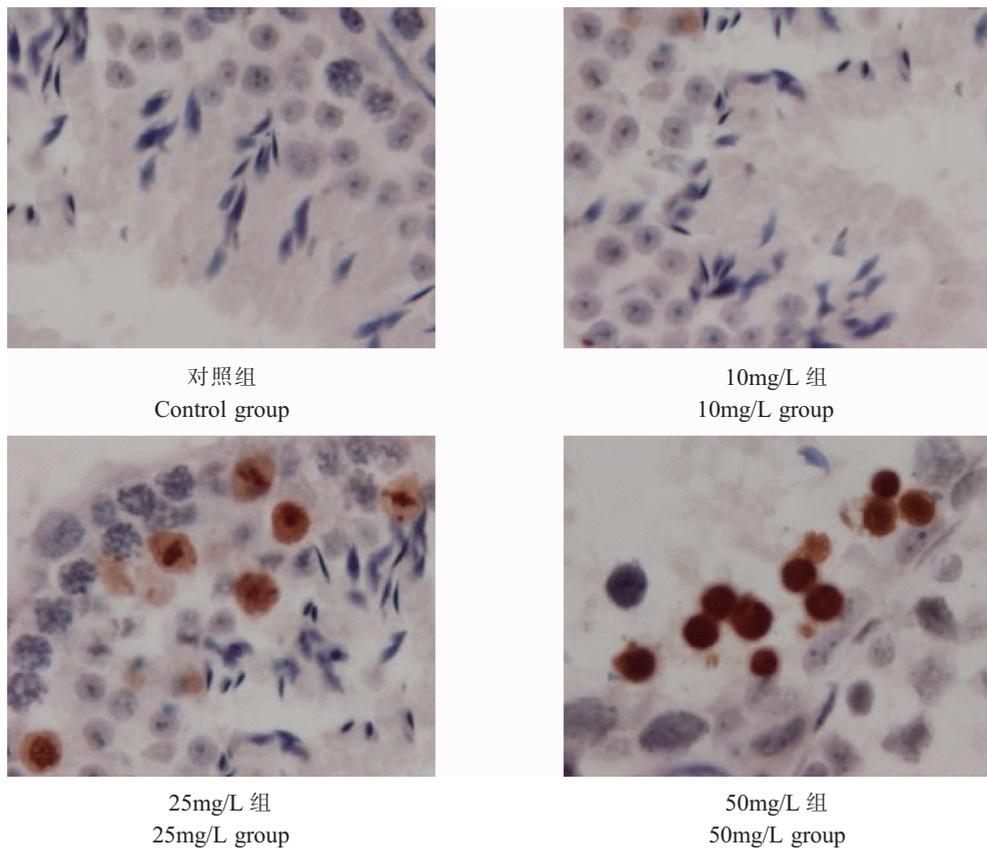


图 2 小鼠睾丸组织 TUNEL 表达(×400)