

亚硝酸盐暴露致雄性小鼠生殖毒性的探讨

高艳^{1 2} 王志新¹ 常成¹ 刘俊² 高晓群^{1*} 邓锦波^{2*}

(1. 郑州大学基础医学院人体解剖学系, 郑州 450001; 2. 河南大学神经生物学研究所, 河南 开封 475004)

[摘要] 目的 探讨亚硝酸盐暴露对雄性小鼠生殖毒性的分子机制。方法 36只2月龄健康雄性小鼠, 随机分为对照组(生理盐水)、低剂量组(60 mg/kg)和高剂量组(120 mg/kg), 每组12只进行亚硝酸盐灌胃3个月, 观察小鼠的生长状况, HE染色法观察睾丸组织病理变化, 免疫荧光和Western blotting方法分析检测睾丸组织细胞增殖与凋亡情况及DNA甲基化、组蛋白去乙酰化相关酶的表达情况。结果 亚硝酸盐暴露组小鼠较对照组小鼠体重增加缓慢, 睾丸指数降低($P < 0.01$), 形态发生病理性改变; 亚硝酸盐暴露组小鼠睾丸组织细胞增殖较对照组明显减少, 细胞凋亡较对照组明显增加($P < 0.01$); 同时DNA甲基化和组蛋白去乙酰化水平高于对照组($P < 0.01$), 且均具有剂量依赖性。结论 亚硝酸盐暴露通过抑制雄性小鼠生长发育及睾丸生精细胞增殖, 诱导睾丸生精细胞凋亡, 造成雄性生殖毒性; DNA甲基化及组蛋白去乙酰化水平升高, 提示表观遗传学可能参与了亚硝酸盐暴露对雄性生殖系统的损伤过程及调控机制。

[关键词] 亚硝酸盐; 生殖毒性; DNA甲基化; 组蛋白去乙酰化; 免疫印迹法; 小鼠

[中图分类号] R711.6 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-4356.2017.05.014

Reproduction toxicity in male mice after nitrite exposure

GAO Yan^{1 2}, WANG Zhi-xin¹, CHANG Cheng¹, LIU Jun², GAO Xiao-qun^{1*}, DENG Jin-bo^{2*}

(1. Department of Human Anatomy, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. Institute of Neurobiology of Henan University, Henan Kaifeng 475004, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the reproduction toxicity and molecular mechanisms in male mice after nitrite exposure. **Methods** Thirty six healthy 2-month-old male mice were divided into control group, low-dose group (60 mg/kg) and high-dose group (120 mg/kg), 12 mice each group. Each mouse was treated with saline or different doses of nitrite by peros once per day for a total of 3 months, and the condition of the mice was monitored every week. The tissue of testis was harvested and the pathological changes of testis were analyzed by HE staining. Immunofluorescence and Western blotting analysis were used to detect the proliferation and apoptosis of testicle cells, DNA methylation and histone deacetylation. **Results** The body weight of the mice in nitrite treated group increased slowly compared with that in the control group. The coefficients of testicular significant decreased ($P < 0.01$) and the morphology of testis also changed after nitrite exposure. In addition, the proliferation of testis cells was elevated dramatically while the apoptosis of testis cells reduced markedly compared with vehicle. The enzyme expressions of both DNA methylation and histone deacetylation were increased in a dose dependent manner after nitrite treatment ($P < 0.01$). **Conclusion** Nitrite exposure can inhibit mouse growth and spermatogenic cell proliferation, and induce spermatogenic cell apoptosis, leading to reproductive toxicity in male. The increased DNA methylation and histone deacetylation level indicate that epigenetics may be involved in the process of male reproductive system damage and regulatory mechanism by nitrite exposure.

[Key words] Nitrite; Reproductive toxicity; DNA methylation; Histone deacetylation; Western blotting; Mouse

亚硝酸盐作为常见的防腐剂和腌制剂, 普遍应用于各种食品, 然而过量的亚硝酸盐却是一种毒物, 急性中毒可导致高铁血红蛋白血症, 慢性中毒则可

致畸、致癌^[1]。目前对亚硝酸盐的研究热点主要集中在癌症及神经毒性方面, 本课题组在探讨亚硝酸盐暴露对小鼠神经毒性时发现其具有不孕效应^[2]。

[收稿日期] 2017-01-09 **[修回日期]** 2017-03-31

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金(20134101110014)

[作者简介] 高艳(1988—), 女(汉族), 河南省固始县人, 在读硕士研究生。

* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

E-mail: gaixiaoqun@zzu.edu.cn Tel: (0371) 66941846

E-mail: jinbo_deng@henu.edu.cn Tel: (0371) 23880292

其不育效应引起了我们的兴趣。哺乳动物精子的发生是一个连续而复杂的过程,表观遗传学贯穿其中,是生命活动的重要调控方式,因此成为近年生殖医学领域的研究热点之一^[3]。越来越多的研究表明,表观遗传学改变在雄性生殖毒性中起着十分重要的作用,与不孕不育及多种疾病有关^[4~7]。环境污染物如重金属汞、苯、砷等可引起机体表观遗传学改变^[8,9],亚硝酸盐作为环境中常见的无机化合物,对雄性生殖的表观遗传毒性机制还不甚明了,本实验通过建立亚硝酸盐暴露模型,观察生精细胞增殖与凋亡情况,初步探讨表观遗传学是否参与了亚硝酸盐暴露对雄性生殖系统的损伤过程,用动物实验的方法阐释男性不育的表观遗传机制,为男性不育的预防及临床治疗提供实验依据。

材料和方法

1. 动物分组及模型建立

2月龄健康雄性昆明小鼠36只,体重26~32g,购自河南省实验动物中心[动物合格证号:SCXK(豫)2010-035]。随机分为对照组(生理盐水)、低剂量组(60 mg/kg)、高剂量组(120 mg/kg),每组12只,每日灌胃1次,连续3个月。小鼠自由摄食饮水、自然昼夜节律采光,饲养房经常通风、定期消毒,室温20~25℃,相对湿度50%~70%。排除实验中小鼠意外死亡,最终每组选5只小鼠,10%水合氯醛3.3ml/kg腹腔麻醉后,取出双侧睾丸放入4%多聚甲醛中固定48h,梯度酒精脱水,二甲苯透明,制作成睾丸石蜡切片,进行HE染色及免疫荧光染色,另外5只进行Western blotting检测。

2. HE染色

睾丸石蜡切片,经二甲苯脱蜡,梯度酒精水合,苏木素染5min,1%盐酸酒精分化5s,伊红染2min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察,摄片。

3. 5-溴脱氧尿嘧啶核苷标记细胞增殖

按照1mg 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)粉末(Sigma公司,B-5002)溶于1ml生理盐水的方法配制BrdU溶液,按50 mg/kg进行腹腔注射^[10],早晚各1次,连续3d,制作成小鼠睾丸石蜡切片,经烤片,脱蜡复水,0.01mol/L枸橼酸缓冲液抗原修复,入2 mol/L盐酸裂解液中,37℃孵育30min, pH8.0硼酸缓冲液漂洗3×10min, PB洗3×10min,加一抗鼠抗BrdU单克隆抗体(1:200,北京中杉金桥生物技术有限公司,ZM-0013),阴性对照组一抗为PB液,4℃过夜, PB洗3×5min,加二抗Alexa Fluor 488驴抗鼠IgG(1:300, Invitrogen公司,A21202),室温避光反应3h, PB洗

3×5min, 65%甘油磷酸缓冲液封片,荧光显微镜下观察,摄片。

4. TUNEL检测细胞凋亡

本实验使用的是TUNEL细胞凋亡检测试剂盒,购于江苏凯基生物科技股份有限公司。具体步骤:小鼠睾丸切片,常规脱蜡水合,0.01mol/L PBS洗3×5min,滴加蛋白酶K工作液,37℃反应20min, PBS洗3×5min,滴加末端氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)反应液,阴性对照组用PBS代替,37℃避光反应60min, PBS洗3×5min,滴加链霉亲和素-TRITC标记液,37℃避光反应30min, PBS洗3×5min, 65%甘油磷酸缓冲液封片,荧光显微镜下观察,摄片。

5. 免疫荧光染色检测

小鼠睾丸石蜡切片,烤蜡,脱蜡复水, PB洗3×5min,抗原修复, PB洗3×5min,加入一抗:鼠抗细胞色素C(cytochrome C, Cyt-C, 1:200, Invitrogen公司,ZM-0013);兔抗Caspase-3(1:50, Abcam公司, AB13847);鼠抗5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5-mC)(1:100, Abcam公司, AB10805);兔抗DNA甲基化转移酶1(DNA methyltransferase 1, DNMT1, 1:100, Abcam, AB19905);兔抗HDAC1(1:200, Abcam公司, AB53091),阴性对照组一抗为PB液,4℃过夜, PB洗3×5min,加入相应的二抗:Alexa Fluor 488驴抗鼠IgG(1:300, Invitrogen公司,A21202);Alexa Fluor 488驴抗兔IgG(1:300, Invitrogen公司,A21206),室温避光孵育3h, PB洗3×5min, 65%甘油磷酸缓冲液封片,荧光显微镜下观察,摄片。

6. Western blotting检测

生理盐水进行心脏灌流后,快速取出双侧睾丸,放入加有RIPA裂解液及PMSF防腐剂的匀浆器中,冰上研磨30min,4℃12000r/min离心30min,取上清液,使用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒测定总蛋白浓度,蛋白经变性、SDS-PAGE电泳转膜至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭,加入一抗:鼠抗Cyt-C(1:2000);兔抗Caspase-3(1:1000);兔抗DNMT1(1:2000);兔抗DNMT3a(1:2000, Abcam, AB4897);兔抗MBD2(1:1500, Abcam公司, AB109260);兔抗HDAC1(1:2000),4℃过夜, TBST漂洗3×10min,分别加入HRP标记的二抗兔抗鼠IgG(1:6000,北京中杉金桥生物技术有限公司,Zb-2306)及山羊抗兔IgG(1:6000,上海碧云天生物技术有限公司,A0208),室温孵育2h, TBST漂洗3×10min,利用ELC显色试剂盒,发光反应2min,暗室曝光,通过显影、定影后,将蛋白印迹到X线片上。利用β-actin(1:3000,上海碧云天生物技术有限公司)

司, AA128) 作为内参, 以目的条带与内参灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达值, 进行分析。

7. 统计学处理

免疫荧光结果是在 Image-Pro Plus V6.0 图像系统内放大相同倍数(即 400 倍)下, 每个剂量组选择 5 张切片, 每张切片随机选择 6 个完整的曲细精管, 计数每个曲细精管的平均阳性细胞数; Western blotting 结果是用 Image J 1.48 和 GraphPad Prism 5 软件测量并统计分析目的蛋白灰度值/ β -actin 灰度值。全部实验数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, SPSS 13.0 统计学软件进行 ANOVA 分析, 对亚硝酸盐暴露组和对照组数据进行差异性检验, $P < 0.05$ 差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 差异具有显著统计学意义。

结 果

1. 亚硝酸盐暴露对小鼠生长状况、体重变化及睾丸指数的影响

灌胃期间, 各组小鼠饮食饮水基本正常, 灌胃 1 周后, 亚硝酸盐暴露组小鼠开始出现背部毛发蓬松, 腹部毛发稀疏现象。与对照组相比, 亚硝酸盐暴露组小鼠体重增加缓慢, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 睾丸脏器指数显著下降, 差异具有统计学意

义 ($P < 0.01$), 呈现剂量依赖性(表 1)。

2. 亚硝酸盐暴露对小鼠睾丸组织结构的影响

对照组小鼠睾丸组织结构正常, 曲细精管排列紧密规则, 管内各级生精细胞排列有序, 管腔中可见游离的成熟精子(图 1A)。低剂量组曲细精管结构基本完整, 但管腔内可见脱落的生精上皮细胞(图 1B)。高剂量组曲细精管结构出现明显病理性变化, 曲细精管萎缩变形, 生精细胞排列紊乱, 层次不清, 部分缺失, 各级生精细胞脱落现象严重, 睾丸间质明显减少(图 1C)。

3. 亚硝酸盐暴露对小鼠睾丸细胞增殖的影响

对照组 BrdU 阳性细胞表达于精原细胞及少部分精母细胞的细胞核, 亚硝酸盐暴露组 BrdU 阳性细胞主要表达于精原细胞的细胞核。与对照组(图 2A)相比, 亚硝酸盐暴露组 BrdU 阳性细胞明显减少(图 2B、2C), 我们对 BrdU 阳性细胞数进行了统计, 结果显示, 亚硝酸盐暴露组单个曲细精管 BrdU 阳性细胞数减少 ($P < 0.01$, 图 3A), 具有剂量依赖性, 结果表明, 亚硝酸盐暴露可抑制生精细胞增殖。

4. TUNEL 法检测细胞凋亡结果

对照组 TUNEL 阳性细胞表达于少数精原细胞(图 2D), 亚硝酸盐暴露组 TUNEL 阳性细胞表达于精原细胞、精子细胞及少数精母细胞(图 2E、2F),

表 1 亚硝酸盐暴露对小鼠体重变化及睾丸指数的影响 ($n = 10 \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of nitrite exposure on body weight and testis index in mice ($n = 10 \bar{x} \pm s$)

分组 groups	亚硝酸盐暴露前 (g) before nitrite exposure (g)	亚硝酸盐暴露后 (g) after nitrite exposure (g)	体重变化 (g) body weight change (g)	睾丸指数 testis index
对照组 control group	27.394 \pm 1.083	45.563 \pm 2.085	18.168 \pm 1.534	0.692 \pm 0.032
低剂量组 low-dose group	27.400 \pm 1.198	41.324 \pm 2.278	13.923 \pm 2.034 **	0.598 \pm 0.053 **
高剂量组 high-dose group	27.419 \pm 0.949	36.592 \pm 1.903	9.173 \pm 1.576 ** &	0.521 \pm 0.061 ** &

亚硝酸盐暴露抑制了小鼠体重增长, 降低了小鼠睾丸脏器指数, 具有剂量依赖性; ** $P < 0.01$, 表示与对照组相比, & $P < 0.05$, 表示高剂量组与低剂量组相比; 脏器指数 = 脏器重量 (g) / 体重 (g) $\times 100\%$

Nitrite exposure can inhibit weight gain in mice and reduce mice testicular viscera coefficient with dose dependence; ** $P < 0.01$, Compared with the control group; & $P < 0.05$ if high dose versus low dose group; Viscera index = viscera heavy weight (g) / body weight (g) $\times 100\%$

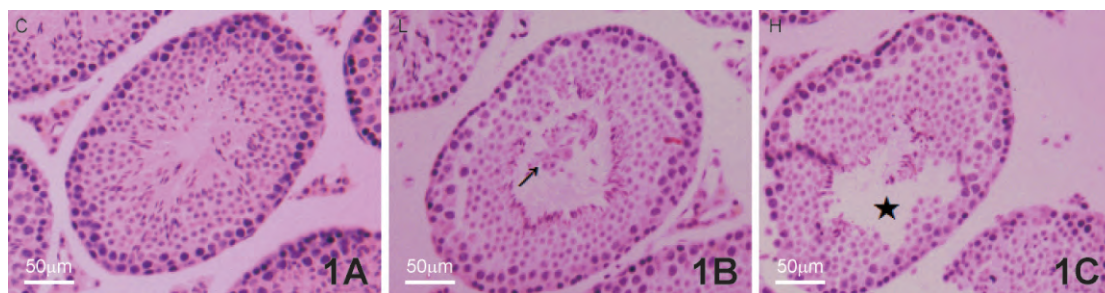


图 1 小鼠睾丸组织结构的 HE 染色 标尺示 50 μ m

A. 对照组; B. 低剂量组可见脱落的生精上皮细胞(↑); C. 高剂量组可见曲细精管变形(★)

Fig. 1 HE staining of mice testicular tissue structure Bar = 50 μ m

A, Control group; B, The exfoliated seminiferous epithelium for the low dose group(↑); C, The deformation seminiferous tubule for the high dose group(★)

通过对 TUNEL 阳性细胞统计,我们发现,硝酸盐暴露组生精细胞凋亡显著增加($P < 0.01$,图 3B),呈现剂量依赖性。结果表明,亚硝酸盐暴露促进了生精细胞凋亡。

5. 亚硝酸盐暴露对小鼠睾丸组织细胞 Cyt-C 和 Caspase-3 的影响

Cyt-C 和 Caspase-3 阳性细胞主要表达于各级生精细胞的细胞质,与对照组相比(图 4A~4D),亚硝酸盐暴露组 Cyt-C(图 4B~4C)和 Caspase-3(图 4E~4F)阳性细胞的表达均增加,我们对单个曲细精管的阳性细胞进行统计,结果显示,亚硝酸盐暴露组 Cyt-C 和 Caspase-3 的阳性细胞数均多于对照组,具有剂量依赖性($P < 0.01$,图 5)。同时我们利用 Western blotting 进行半定量检测,结果显示,亚硝酸盐暴露组 Cyt-C 和 Caspase-3 蛋白的表达量明显多于对照组(图 6A),我们对 Western blotting 的结果进行了统计(图 6B),与免疫荧光结果一致,以上结果说明亚硝酸盐暴露促进了生精细胞凋亡。

6. 亚硝酸盐暴露对小鼠睾丸组织 DNA 甲基化和组蛋白去乙酰化的影响

本实验采用免疫荧光染色法标记 5mC、DNMT1、HDAC1,采用 Western blotting 方法对 DNMT1、DNMT3a、MBD2、HDAC1 进行半定量检测分析。观察结果显示:(1)对照组(图 7A)小鼠睾丸组织 5mC 阳性细胞表达于各级生精细胞的细胞核,而精子细胞未见表达。亚硝酸盐暴露组(图 7B、7C)开始表达于精子细胞且 5mC 阳性细胞数量增多;(2)DNMT1 主要表达于精原细胞及部分精母细胞的细胞核,与对照组(图 7D)相比,亚硝酸盐暴露组 DNMT1 阳性细胞增多(图 7E、7F);(3)HDAC1 表达于各级生精细胞的细胞核,对照组精子细胞极少表达(图 7G),亚硝酸盐暴露组 HDAC1 阳性细胞大量表达(图 7H、7I),图 8 为阴性对照。我们对单

个曲细精管的阳性细胞进行统计,结果显示,亚硝酸盐暴露组 5mC、DNMT1、HDAC1 的阳性细胞数均多于对照组,呈现剂量依赖性($P < 0.01$,图 9)。Western blotting 结果显示,亚硝酸盐暴露组 DNMT1、DNMT3a、MBD2、HDAC1 蛋白的相对表达量均较对照组显著增加($P < 0.01$,图 10)这与免疫荧光结果相一致。以上结果说明,亚硝酸盐暴露诱使了小鼠睾丸生精细胞 DNA 甲基化和组蛋白去乙酰化水平的升高。

讨 论

1. 亚硝酸盐暴露抑制小鼠生长发育

在动物实验中,体重是 1 个非常重要的非特异性观察指标,体重的变化可以反映动物整体的健康状况,而脏器指数的变化则可以客观地反映化学毒物对该脏器毒性作用的综合状况。本实验通过连续进行亚硝酸盐灌胃 3 个月,发现小鼠毛发稀疏、蓬松,体重增加缓慢,呈现剂量依赖性,小鼠睾丸脏器指数显著下降,呈现剂量依赖性,睾丸组织病理切片显示亚硝酸盐暴露组生精细胞排列紊乱,上皮细胞脱落严重。亚硝酸盐作为一种强氧化剂^[11],极易诱使机体发生氧化应激。众所周知,哺乳动物的睾丸组织对外界环境变化极为敏感,易受化学毒物的损害,因此我们猜测亚硝酸盐可能是通过血睾屏障直接对小鼠造成生殖毒性。

2. 亚硝酸盐暴露抑制精原细胞增殖

已有实验表明,过量的亚硝酸盐可抑制大鼠睾丸支持细胞增殖,且具有剂量依赖性^[12]。本实验使用 BrdU 标记法对睾丸生精细胞进行了免疫荧光染色标记,结果显示,BrdU 阳性细胞主要分布于曲细精管近基底膜的精原细胞的细胞核,亚硝酸盐暴露组 BrdU 阳性细胞较对照组明显减少,具有剂量依赖性。本实验中精母细胞、精子细胞及间质细胞中

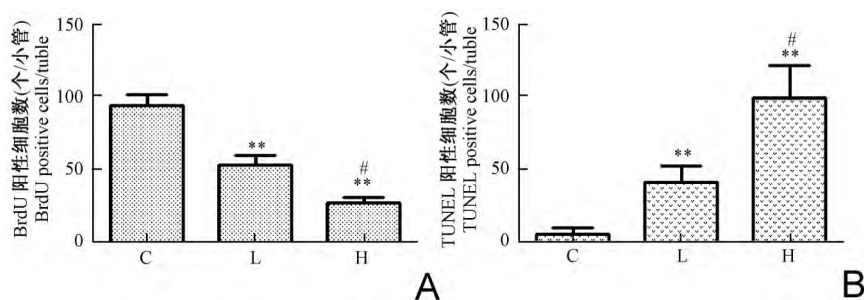


图3 亚硝酸盐暴露后小鼠睾丸细胞增殖、凋亡统计图

A和B分别为单个曲细精管 BrdU 及 TUNEL 阳性细胞的统计结果($\bar{x} \pm s$ $n=30$)。亚硝酸盐暴露剂量依赖性地抑制生精细胞增殖和促进生精细胞凋亡; ** $P < 0.01$ 表示亚硝酸盐暴露组与对照组相比 # $P < 0.05$ 表示高剂量组与低剂量组相比

Fig. 3 The statistical analysis cell proliferation and apoptosis after nitrite exposure

A and B, The histogram of BrdU and TUNEL cells in a single seminiferous tubule ($\bar{x} \pm s$ $n=30$), nitrite exposure can inhibit spermatogenic cell proliferation and induce cell apoptosis with dose dependency; ** $P < 0.05$, if nitrite group versus control; # $P < 0.05$, if high dose versus low dose group

的 BrdU 阳性细胞未被标记到,我们认为可能是因为精原细胞是生精上皮细胞中最幼稚的细胞,具有较强的增殖能力,我们的结果与葛振华^[13]及 Thoolen^[14]的结果一致,我们的实验结果表明,亚硝酸盐暴露可抑制精原细胞增殖,进而影响精子的发生,但其机制不明,可能是因为凋亡细胞增加,打破了细胞增殖与凋亡的平衡;另一种可能是过多的亚硝酸盐产生了过量的 NO,有研究表明,机体内高浓度的 NO 会通过氧化应激和亚硝化应激作用而抑制细胞增殖,同时,大量的 NO 会使细胞周期停滞在 G₁ 期和 S 期,从而使细胞增殖减少^[15,16]。

3. 亚硝酸盐暴露促进生精细胞凋亡

哺乳动物的精子细胞富含不饱和脂肪酸,易受氧化应激攻击,当过量亚硝酸盐摄入机体即是 1 种氧化应激原,可导致线粒体膜通透性的改变,使细胞色素 C 从线粒体膜释放入胞质进而启动 Caspase 级联反应,激活 Caspase-3,从而导致细胞凋亡。本实

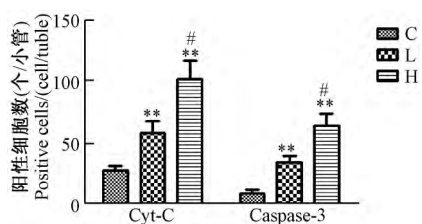


图 5 亚硝酸盐暴露后生精细胞 Cyt-C 及 Caspase-3 阳性细胞的统计结果 ($\bar{x} \pm s$ $n=30$)

C、L、H 分别表示对照组、低剂量组、高剂量组(以下图相同)

亚硝酸盐暴露剂量依赖性地促进生精细胞凋亡; ** $P < 0.01$ 表示亚硝酸盐暴露组与对照组相比 # $P < 0.05$ 表示高剂量组与低剂量组相比

Fig. 5 Statistical analysis for the positive cells of Cyt-C and Caspase-3 after nitrite exposure ($\bar{x} \pm s$ $n=30$)

C, L, H showed control group, low dose group and high dose group (the following figure)

Spermatogenic cell apoptosis increased with dose dependency after nitrite exposure; ** $P < 0.01$, if nitrite group versus control; # $P < 0.05$, if high dose versus low dose group

验使用免疫荧光和 Western blotting 对 Cyt-C 和 Caspase-3 进行了定性及半定量检测,结果显示,亚硝酸盐暴露组 Cyt-C 和 Caspase-3 的表达均增加,且具有剂量依赖性,这说明过量的亚硝酸盐可通过线粒体凋亡途径诱使生精细胞凋亡。同时我们使用 TUNEL 法对生精细胞凋亡做了进一步检测,结果显示,正常对照组 TUNEL 阳性细胞主要表达于部分精原细胞,而亚硝酸盐暴露组 TUNEL 阳性细胞不仅表达于精原细胞还表达于少量的精母细胞及大量的精子细胞,并具有剂量依赖性,TUNEL 结果说明过量亚硝酸盐暴露可诱使生精细胞的 DNA 发生断裂,这与吴赤蓬^[12]及胡桑^[17]等的研究结果相一致,而 DNA 链的断裂会造成细胞周期停滞而直接导致细胞凋亡^[18]。生精细胞增殖与凋亡之间的平衡被打破,从而使精子数量减少,进而引起男性不育的发生^[19]。

4. 亚硝酸盐暴露诱使 DNA 甲基化及组蛋白去乙酰化升高

表观遗传学 (epigenetics) 是由英国科学家 Waddington 于 1942 年提出,指 DNA 序列不发生变化但基因表达却发生了可遗传的改变^[20]。这是真核生物普遍存在的一类基因调控方式,主要从 DNA 甲基化和组蛋白修饰两个层面上调控基因的表达。DNA 甲基化是目前研究最多的,在维持正常细胞功能、遗传印记及胚胎发育起着极其重要的作用,并与细胞增殖分化有关^[21,22]。DNA 甲基化是指真核生物以 S-腺苷蛋氨酸作为甲基供体,在 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferases, DNMTs) 的作用下,将甲基转移到碱基胞嘧啶的第 5 位碳原子上,形成 5-甲基胞嘧啶 (5mC),甲基化通常发生在 CpG 二核苷酸上。哺乳动物细胞中已知有活性的 DNMT 有 3 种,它们分别是 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b。DNMT1 的主要功能是维持 DNA 甲基化,DNMT3a 和 DNMT3b 主要催化从头甲基化。一般来说,DNA 甲基化与基因的表达呈负相关性,甲基化使基因处于转录抑制

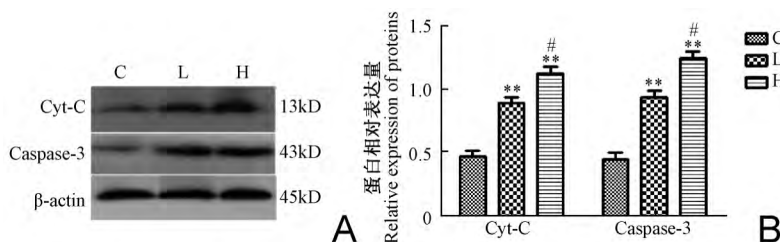


图 6 Western blotting 半定量统计分析

A. Cyt-C、Caspase-3 的 Western blotting 表达; B. Western blotting 半定量分析 ($\bar{x} \pm s$ $n=5$); ** $P < 0.01$, 表示亚硝酸盐暴露组与对照组相比 # $P < 0.05$ 表示高剂量组与低剂量组相比

Fig. 6 Western blotting semi-quantitative analysis

A, Expression of Cyt-C and Caspase-3 (Western blotting); B, Western blotting semi-quantitative analysis ($\bar{x} \pm s$, $n=5$); ** $P < 0.01$, if nitrite group versus control; # $P < 0.05$, if high dose versus low dose group

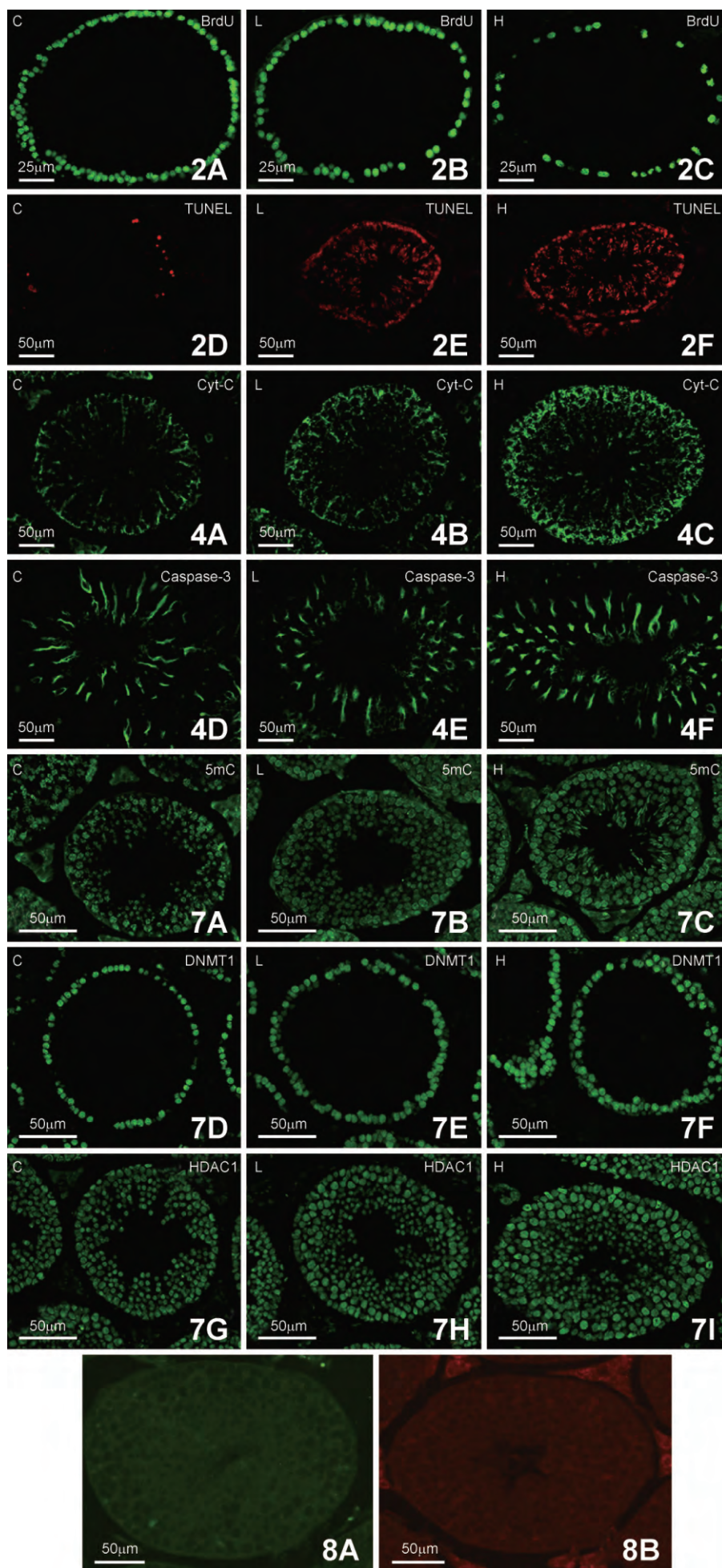


图2 亚硝酸盐暴露小鼠睾丸细胞增殖、凋亡情况 A~C. 标尺示 25 μm , D~F. 标尺示 50 μm

A~C. BrdU 阳性细胞的表达改变情况; D~F. TUNEL 阳性细胞表达改变情况; 亚硝酸盐暴露可剂量依赖性地抑制生精细胞增殖和促进生精细胞凋亡; 对照组、低剂量组、高剂量组分别用 C、L、H 表示,

图4 亚硝酸盐暴露后小鼠睾丸组织 Cyt-C 及 Caspase-3 的表达改变 标尺示 50 μm

A~C. Cyt-C 的阳性细胞表达情况; D~F. Caspase-3 的阳性细胞表达情况; 亚硝酸盐暴露后小鼠生精细胞凋亡呈现剂量依赖性增加

图7 DNA 甲基化和组蛋白去乙酰化水平改变的免疫荧光结果 标尺示 50 μm

A~C. 5mC 的阳性细胞表达; D~F. DNMT1 的阳性细胞表达; G~I. HDAC1 的阳性细胞表达; 亚硝酸盐暴露可诱使小鼠睾丸生精细胞 DNA 甲基化和组蛋白去乙酰化水平升高

图8 A 和 B 为阴性对照 标尺示 50 μm

Fig. 2 The spermatogenic cell proliferation and apoptosis of mice testis after nitrite exposure

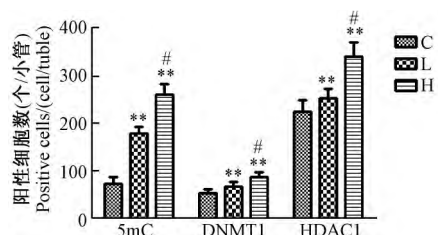
A-C, BrdU positive cells expression; D-F, TUNEL positive cells expression; Nitrite exposure can inhibit spermatogenic cell proliferation and induce cell apoptosis with dose dependence; Cont, low-dose group and high-dose group are marked with C, L and H respectively; The scale for the A-B, Bar = 25 μm ; D-F, Bar = 50 μm

Fig. 4 The alterations of Cyt-C and Caspase-3 expression after nitrite exposure Bar = 50 μm

A-C, Positive cells expression of Cyt-C; D-F, Positive cells expression of Caspase-3; Spermatogenic cell apoptosis increased with dose dependency after nitrite exposure

Fig. 7 DNA methylation and histone acetylation level change of immunofluorescence Bar = 50 μm

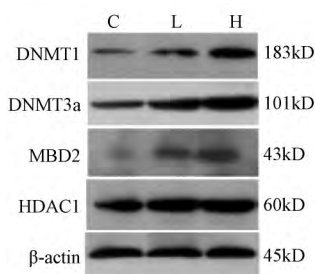
A-C, Positive cells expression of 5mC; D-F, Positive cells expression of DNMT1; G-I, Positive cells expression of HDAC1; Nitrite exposure can induce spermatogenic cells DNA methylation and histone deacetylation level increase

Fig. 8 A and B are negative control groups Bar = 50 μm 图9 5mC、DNMT1、HDAC1 阳性细胞的统计结果($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

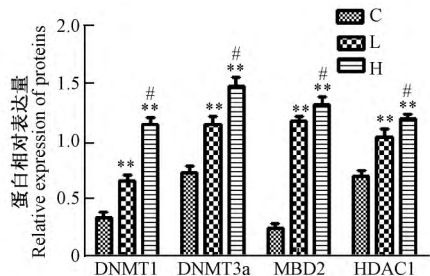
** $P < 0.01$ 表示亚硝酸盐暴露组与对照组相比; # $P < 0.05$, 表示高剂量组与低剂量组相比; 对照组、低剂量组、高剂量组分别用 C、L、H 表示

Fig. 9 Statistical analysis for the positive cells of 5mC, DNMT1 and HDAC1 ($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

** $P < 0.01$, if nitrite group versus control; # $P < 0.05$, if high dose versus low dose group; Low-dose group and high-dose group are marked with C, L and H respectively



A



B

图10 DNA 甲基化及组蛋白去乙酰化改变的 Western blotting 统计分析结果

A. DNMT1、DNMT3a、MBD2、HDAC1 的表达; B. Western blotting 半定量分析($\bar{x} \pm s$, $n = 5$), 亚硝酸盐暴露使 DNMT1、DNMT3a、MBD2、HDAC1 的表达增加; ** $P < 0.01$ 表示亚硝酸盐暴露组与对照组相比; # $P < 0.05$ 表示高剂量组与低剂量组相比; 对照组、低剂量组、高剂量组分别用 C、L、H 表示。

Fig. 10 Statistical analysis DNA methylation and histone acetylation level change of Western blotting

A, Expression of DNMT1, DNMT3a, MBD2, HDAC1; B, Western blotting semi-quantitative analysis($\bar{x} \pm s$, $n = 5$), nitrite exposure can increase DNMT1, DNMT3a, MBD2, HDAC1 protein expression; ** $P < 0.01$, if nitrite group versus control; # $P < 0.05$, if high dose versus low dose group; Low-dose group and high-dose group are marked with C, L and H respectively

状态。本实验结果发现,亚硝酸盐暴露后小鼠睾丸组织 5mC、DNMT1、DNMT3a 的表达量均多于对照组,表明 DNA 总体甲基化水平增高,结果提示,亚硝酸盐暴露可诱使 DNA 甲基化水平升高,进而抑制相关基因表达。除直接抑基因表达,DNA 甲基化还可以通过 CpG 甲基化结合蛋白(methyl-CpG-binding domain proteins, MBDs)招募组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDACs)形成转录抑制复合物^[23],进而表现为协同作用^[24],甲基化 CpG 结合蛋白 MBD2 具有转录抑制子的功能,并且这种抑制作用主要是通过 HDAC 复合体相互作用而实现的^[25],其中 HDAC1 是发现最早的一种,具有较强的去乙酰化作用。HDAC1 通过去掉组蛋白末端的乙酰基从而使组蛋白带正电,与带负电的 DNA 紧密结合,抑制基因转录,本实验结果发现,亚硝酸盐暴露

后小鼠睾丸组织 MBD2、HDAC1 的表达量均多于对照组,表明组蛋白去乙酰化水平增高,结果提示,亚硝酸盐暴露可诱使组蛋白去乙酰化水平升高,进而抑制相关基因表达。此外,HDACs 家族还与染色体易位、基因沉默、细胞分化和增殖以及细胞凋亡有关^[26]。联系前面的实验结果,亚硝酸盐暴露抑制了细胞增殖相关基因的表达而非同样的抑制 Cyt-C 和 Caspase-3 的表达,可见 DNA 高甲基化与组蛋白去乙酰化并没有导致两者基因沉默,已有文献报道,基因、转座子、基因间区的 CpG 二核苷酸都是 DNA 甲基化和组蛋白去乙酰化的靶标^[27]。启动子区甲基化和组蛋白去乙酰化引起稳定的基因沉默,而转录区域的甲基化和组蛋白去乙酰化并不关闭基因的表达,反而有助于某些蛋白的表达^[28]。因此不排除存在这样的机制:亚硝酸盐暴露诱导 Cyt-C 和 Caspase-3 基因的转录区域而非启动子区发生 DNA 高甲基化和组蛋白去乙酰化,这两种修饰促进 Cyt-C 和 Caspase-3 蛋白的表达增加,进而诱导细胞凋亡增加。有研究证明,成熟精子中与早期胚胎发育有关的一些关键基因的启动子是低甲基化的^[29]。在本实验中我们发现,对照组精子细胞 DNA 甲基化产物 5mC 基本不表达,DNMT1 主要表达于精原细胞及部分精母细胞,HDAC1 也未表达于精子细胞中,而亚硝酸盐暴露组精子细胞中 5mC 及 HDAC1 为阳性表达,这说明亚硝酸盐暴露改变了睾丸生精细胞的表现遗传学模式,表现遗传修饰对基因表达具有至关重要的调控作用,尤其是在配子发生和受精以及受精卵的发育等过程中的基因表达调控方面,如果错误的表现遗传修饰发生在配子发生和胚胎植入前阶段,会导致早期胚胎流产及胚胎发育和出生后遗传表型异常等^[30]。因此,生殖细胞发育分化的表现遗传学研究对于遗传疾病的预防和治疗具有重要的指导意义。

综上所述,亚硝酸盐暴露一方面通过减缓小鼠体重增长,降低睾丸脏器指数,抑制精原细胞增殖,促进生精细胞凋亡对雄性生殖系统造成损伤;另一方面通过改变生殖细胞表现遗传学模式对雄性生殖系统产生毒性作用。虽然我们了解了一些关于表现遗传学在生殖毒性中的可能调控作用,但是我们对表现遗传学在生殖毒性中的作用知之甚少,其表现遗传机制尚需要进一步深入探究。

参 考 文 献

- [1] Van Hecke T, Vossen E, Hemeryck LY, et al. Increased oxidative and nitrosative reactions during digestion could contribute to the association between well-done red meat consumption and colorectal cancer[J]. Food Chem, 2015, 187(15): 29-36.
- [2] Hu S, Cui ZhJ, Guo JN, et al. Investigation on mouse infertility after nitrite exposed[J]. Journal of Henan University (Natural Science Edition), 2016, 46(2): 176-181. (in Chinese)
- [3] 胡桑, 崔占军, 郭俊楠, 等. 亚硝酸盐暴露小鼠不孕效应的实验性研究[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2016, 46(2): 176-181.
- [4] Zhenwei J, Shuxin G, Yongchun Z, et al. Mechanisms of TET protein-mediated DNA demethylation and its role in the regulation of mouse development[J]. Yi Chuan, 2015, 37(1): 34-40.
- [5] Bao Y, Cao X. Epigenetic control of B cell development and B-cell-related immune disorders[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2016, 50(3): 301-311.
- [6] Feng Y, Jankovic J, Wu YC. Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease[J]. J Neurol Sci, 2015, 349(1-2): 3-9.
- [7] Millan MJ. The epigenetic dimension of Alzheimer's disease: causal, consequence, or curiosity[J]? Dialogues Clin Neurosci, 2014, (3): 373-393.
- [8] Carrell DT. Epigenetics of the male gamete[J]. Fertil Steril, 2012, 97(2): 267-274.
- [9] Strazzullo M, Matarazzo MR. Epigenetic effects of environmental chemicals on reproductive[J]. Curr Drug Targets, 2017, 18(10): 1116-1124.
- [10] Vecoli C, Montano L, Andreassi MG. Environmental pollutants: genetic damage and epigenetic changes in male germ cells[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2016, 23(23): 23339-23348.
- [11] Wang JT, Zhang W, An L, et al. Nitrite poisoning inhibits the adult neurogenesis in mice[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, 34(4): 641-646. (in Chinese)
- [12] 王久涛, 张伟, 安磊, 等. 亚硝酸盐中毒抑制小鼠成体神经发生[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(4): 641-646.
- [13] Hassan HA, El-Agmy SM, Gaur RL, et al. In vivo evidence of hepato-and reno-protective effect of garlic oil against sodium nitrite-induced oxidative stress[J]. Int J Biol Sci, 2009, 5(3): 249-255.
- [14] Wu ChP, Zhang XR, Han H, et al. The research of nitrite sodium on DNA damage to the sertoli cells of rat testis[J]. Modern preventive Medicine, 2008, 35(9): 1688-1690. (in Chinese)
- [15] 吴赤蓬, 张晓蓉, 韩辉, 等. 亚硝酸钠对大鼠睾丸支持细胞 DNA 损伤的研究[J]. 现代预防医学, 2008, 35(9): 1688-1690.
- [16] Ge ZhH, Wang RY, Wang ChQ, et al. Using bromine deoxyuridine antibody to detection the distribution of the S phase cells in the various organs of mice[J]. Acta Anatomica Sinica, 1994, 25(1): 51-55. (in Chinese)
- [17] 葛振华, 王若愚, 王长青, 等. 用抗溴脱氧尿苷单克隆抗体检测小鼠各种器官内 S 期细胞分布的研究[J]. 解剖学报, 1994, 25(1): 51-55.
- [18] Thoolen B. BrdU labeling of S-phase cells in testis and small intestine of mice, using microwave irradiation for immunogold/silver staining: an immunocytochemical study[J]. J Histochem, 1990, 38(2): 267.
- [19] Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2008, 45(1): 18-31.
- [20] Villalobo A. Nitric oxide and cell proliferation[J]. FEBS J, 2006, 273(11): 2329-2344.
- [21] Hu S, Cui ZhJ, Guo JN, et al. The effects of prenatal nitrite

- exposure on hippocampus of mouse pups [J]. Acta Anatomica Sinica 2015 ,46(3) :289-296. (in Chinese)
- 胡桑 崔占军 郭俊楠 等. 孕期亚硝酸盐暴露对仔鼠海马的影响 [J]. 解剖学报 2015 ,46(3) :289-296.
- [18] Jiang MR. Effects of DNA damage on cell cycle and apoptosis of mamalian cells [D]. Institute of Biochemistry and Cell Biology , Shanghai Institute of Life Sciences , Chinese Academy of Sciences , 2006. (in Chinese)
- 蒋满荣. DNA 损伤对哺乳动物细胞周期和凋亡的影响 [D]. 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 , 2006.
- [19] Kanter M , Aktas C , Erboga M. Heat stress decreases testicular cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study [J]. Toxicol Ind Health ,2013 ,29(2) :99-113.
- [20] Scheen AJ , Junien C. Epigenetics , interface between environment and genes: role in complex diseases [J]. Rev Med Liege ,2012 ,67(5-6) : 250-257.
- [21] Hur K , Niwa T , Toyoda T , et al. Insuffi cient role of cell proliferation in aberrant DNA methylatio induction and involvement of specific types of inflammation [J]. Carcinogenesis ,2011 ,32(1) : 35-41.
- [22] Yang Y , Ye Y , Lin X , et al. Inhibition of pirfenidone on TGF-beta 2 induced proliferation , migration and epithialmesenchymal transition of human lens epithelial cells line SRA01/04 [J]. PLoS One ,2013 ,8(2) : e56837.
- [23] Assam EO , Phillip K , Zalcberg JR , et al. Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation [J]. Mol Cell Biol ,2002 ,22(6) :1844-1857.
- [24] Barros SP , Offenbacher S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease [J]. J Dent Res ,2009 ,88(5) : 400-408.
- [25] Prokhortchouk A , Hendrich B , Jorgensen H , et al. The peatenin partner kaiso is a DNA methylation dependent transcriptional repressor [J]. Genes Dev 2001 ,15(13) : 13-18.
- [26] Grewal SI , Moazed D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression [J]. Science ,2003 ,301 (5634) : 798-802.
- [27] Wang ZhG , Wu JX. DNA methyltransferase classification , functions and research progress [J]. Hereditas ,2009 ,31 (9) : 903-912. (in Chinese)
- 王志刚 吴建新. DNA 甲基转移酶分类、功能及其研究进展 [J]. 遗传 ,2009 ,31 (9) : 903-912.
- [28] Suzuki MM , Adrian B. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics [J]. Nat Rev Genet ,2008 ,(6) : 465-476.
- [29] Molaro A , Hodges E , Fang F , et al. Sperm methylation profiles reveal features of epigenetic inheritance and evolution in primates [J]. Cell ,2011 ,146 (6) :1029-1041.
- [30] Yang B , Xia XY , Huang YF , et al. Epigenetics research progress of sperm [J] , National Journal of Andrology ,2007 ,(12) : 1125-1129. (in Chinese)
- 杨滨 夏欣一 黄宇烽 等. 精子的表观遗传学研究进展 [J]. 中华男科学杂志 2007 ,13(12) :1125-1129.

(编辑 安晓意)

《解剖学报》关于假冒网站的声明

近期发现有假冒网站以《解剖学报》杂志或《解剖学报》杂志社的名义 盗用本刊刊名、国内及国外刊号、杂志封面等 大量复制本刊内容 非法收录稿件并骗取与稿件相关的费用 给作者造成很大的经济损失 给《解剖学报》的声誉造成严重损害。

《解剖学报》郑重声明: 本刊正确网址为 <http://jpxb.bjmu.edu.cn/> ,本刊只通过此网站接收投稿 请切勿登录百度搜索中出现的期刊导航网中的" 解剖学报杂志社-官方网站" 此网站为假冒网站。请作者直接登陆本刊正确网站在线投稿 投稿成功后必须先通过编辑部初审 编辑部直接给作者发送收稿通知 编辑部在收到作者签名的承诺书及审稿费后才能进入审稿程序。本刊从未委托其他任何机构、网站或个人代理征收稿件及收取任何费用!

请广大读者、作者认真辨析 谨防上当受骗!

《解剖学报》编辑部

2017 年 04 月 24 日