

郭全海,赵耀光.慢性氟中毒对公鸡睾丸组织细胞周期的影响[J].江苏农业科学,2015,43(7):234-235.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.080

慢性氟中毒对公鸡睾丸组织细胞周期的影响

郭全海, 赵耀光

(商丘职业技术学院动物工程系,河南商丘 476000)

摘要:通过研究慢性氟中毒对公鸡生精细胞细胞周期的影响,探讨慢性氟中毒对公鸡睾丸组织造成损害的机制。试验将 36 羽 160 日龄的三黄鸡随机均分为染氟组、对照组,并进行常规饲养,对照组饮用自来水,染氟组饮用含量为 3.25 g/L 的 NaF 水。饲喂 80 d 后,采用流式细胞仪检测各组公鸡睾丸生精细胞的细胞周期变化。与对照组相比,染氟组公鸡睾丸生精细胞于 S 期数量减少,并于 G₀/G₁ 期数量增多,且 G₁ 期与 S 期的细胞数量呈显著负相关关系。试验结果表明,染氟组公鸡睾丸生精细胞的细胞周期发生了显著改变。

关键词:氟中毒;公鸡;睾丸组织;细胞周期

中图分类号: S858.317.29 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)07-0234-02

氟是动物机体必需的微量元素,但其化学性质活泼,安全范围窄,过量摄入可引起氟中毒^[1]。长期以来,人们对氟的研究主要集中于其对骨骼、牙齿等骨相组织的损害,而非骨相方面的研究却很少。近年来有学者指出,慢性氟中毒可对机体非骨相组织造成很大损伤,已引起人们重视^[2]。细胞从一次分裂结束到下一次分裂结束的时间称为细胞周期,大量研究表明,氟化物可引起细胞周期的改变。采用细胞培养的方法观察氟对二倍体成纤维细胞周期的影响,发现氟对不同细胞非同步化培养的敏感性不同^[3]。Hayashi 等研究发现,细胞对氟的敏感性与细胞所处周期的不同时期有关^[4]。氟可诱导啮齿类动物细胞染色体丝裂和断裂,表明氟对啮齿类动物细胞周期中的 G₂ 期敏感。氟可使大鼠卵巢、小鼠卵巢及子宫的 DNA、RNA 含量减少。体外细胞培养氟可抑制 DNA 的合成,表明氟可影响核酸、蛋白质的代谢^[5]。国内外关于氟对机体影响的研究多集中于体外培养细胞、小鼠、大鼠等,而氟对公鸡睾丸组织细胞周期的影响尚未见报道。本研究在细胞生物学水平上探讨氟对睾丸组织细胞周期的影响,为相关疾病的治疗及研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物

36 羽 160 日龄雄性三黄鸡购于商丘市梁园区某养鸡场,该鸡群曾对新城疫、传染性法氏囊炎、传染性支气管炎进行防疫,并对鸡球虫进行过防治。

1.2 主要试剂及仪器

氟化钠、75% 乙醇、PI 染液等购于南京凯基生物科技发展有限公司,自配 PBS 溶液。电子天平(上海天普分析仪器有限公司)、(江苏国胜实验仪器厂)、Epics - prolie 型流式细

胞仪(Coulter 公司)、恒温水箱、低速离心机、涡旋振荡混合器、200 目尼龙滤网、手术剪刀、镊子等。

1.3 试验动物模型建立

试验用公鸡经饲养观察无病后,随机分为试验组、对照组,每组 18 羽。2 组均自由采食全价饲料(购于正大集团公司,含氟量符合国家标准)饲养。试验组自由饮用 NaF 含量为 3.25 g/L 的水;对照组自由饮用自来水(含氟量符合国家标准)。所有试验鸡均采用单笼饲养,试验期为 80 d。

1.4 取样及单细胞悬液的制备

饲养第 80 天将试验鸡剖杀,于 4 ℃ 环境下取出睾丸,剔除周围结缔组织,取每羽公鸡右侧睾丸采样,制备单细胞悬液,用于不同周期细胞比例的检测。剪取大小约为 0.5 cm³ 的睾丸组织块,用眼科组织剪剪为 1~2 mm 大小的碎片,置于含 3 mL PBS 溶液(pH 值为 7.4)的试管内,于涡旋振荡混合器混合 3 min 后,用 200 目尼龙滤网过滤至另一试管内。将睾丸组织单细胞悬液以 1 500 r/min 离心 5 min 后弃上清,加入 3 mL PBS 溶液并混匀 1 min,于同样条件重复洗涤离心 2 次即制成单细胞悬液,保存备用。

1.5 睾丸组织细胞周期的测定

采用流式细胞仪 PI 染色法测定睾丸组织细胞周期。用 PBS 溶液冲洗单细胞悬液 2 次,将细胞浓度调整为 10⁶ 个/mL,加入 75% 乙醇于 4 ℃ 固定 1 h,使用 PBS 溶液冲洗 2 次后,每管依次加入 PBS 溶液 100 μL、PI 染液 300 μL,置于 4 ℃ 避光环境中反应 30 min。采用 Epics - prolie 型流式细胞仪检测细胞周期,计算不同倍体细胞亚二倍体峰所占的比例。

2 结果与分析

2.1 鉴定慢性氟中毒试验模型

试验第 28 天,试验组公鸡开始出现鸡冠变紫、头下耷、精神委顿、食欲不振、羽毛粗糙等症状;试验第 73 天左右,试验组大量公鸡卧地不起,表明鸡慢性氟中毒模型建立成功。

2.2 睾丸组织不同周期细胞的比例

分别将试验组、对照组的公鸡随机均分为 6 个小组,每组 3 羽,计算各组平均值并比较不同周期细胞的比例(表 1、图 1)。

收稿日期:2014-10-29

基金项目:河南省商丘市科技计划(编号:20122023)。

作者简介:郭全海(1980—),男,河南淮阳人,硕士,讲师,主要从事分子生物学、免疫学、动物疫病防治等方面的研究。E-mail: guohan611@163.com。

表 1 睾丸组织不同周期细胞的比例($\bar{x} \pm s$)

动物序号	G ₁ 期(%)		S 期(%)		G ₂ 期(%)	
	试验组	对照组	试验组	对照组	试验组	对照组
1	79.2	62.3	16.3	29.2	4.9	6.8
2	78.7	62.7	16.7	29.7	5.0	6.4
3	78.5	62.6	16.8	30.6	5.1	6.2
4	77.9	63.2	16.9	31.1	5.2	6.9
5	77.4	63.4	17.1	30.8	5.3	6.3
6	77.3	63.2	17.1	31.1	5.2	7.0
平均值 ± 标准差	78.17 ± 0.77 **	62.90 ± 0.43	16.82 ± 0.26 **	30.42 ± 0.76	5.12 ± 0.06 **	6.64 ± 0.34

注: ** 表示与对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。

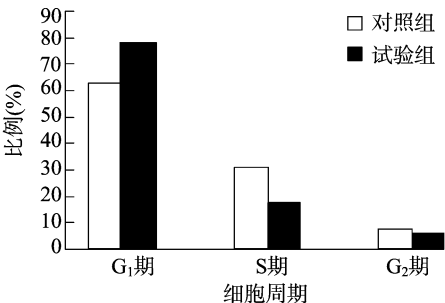


图 1 睾丸组织不同周期细胞的比例对比

经 t 检验,对于 G_1 期、S 期、 G_2 期,试验组与对照组的差异均极显著($P < 0.01$)。

由图 1 可知,试验组 G_1 期细胞比例高于对照组,而 G_2 期、S 期细胞比例均低于对照组。由表 1 可知,试验组 G_1 期与 S 期细胞比例呈显著负相关关系,而对照组则未表现出此关系。

3 讨论与结论

关于氟对细胞周期的影响已有很多报道。Sato 等采用细胞培养的方法观察氟对二倍体成纤维细胞周期的影响,发现氟同步化培养 S 期细胞 8 h 后,DNA 合成被抑制^[3]。Hayashi 等发现,人二倍体成纤维细胞各氟染毒组 S 期细胞数明显高于对照组^[4]。余日安等研究发现,投氟组 S 期肾组织细胞数明显增加, G_0/G_1 期、 G_2/M 期细胞数无明显变化^[6]。一些学者则持相反意见。张桂珍等研究小鼠脑、肝、肾等组织并指出,氟对脑神经细胞的影响主要作用于 S 期(DNA 合成期),它可减少进入 S 期的细胞数,从而使 S 期、 G_2/M 期细胞数均减少;氟对肝细胞周期的影响主要作用于 G_1 期和 G_2 期,它可使 G_1 期、 G_2 期细胞数量显著增加;过量氟对肾细胞周期的作用主要是抑制细胞凋亡,而当氟浓度达到 100 mg/L 时,可引发睾丸细胞凋亡^[7]。有研究表明,长期饮用氟污染的水将使睾丸间质细胞受到严重损坏,且血浆睾丸酮会明显降低^[8-10]。本试验结论为试验组 G_1 期细胞比例显著高于对照组, G_2 期、S 期细胞比例显著低于对照组,且 G_1 期与 S 期细胞比例呈显著负相关关系,这与张桂珍等对脑组织的研究结论一致。而本试验结论与其他学者的结论仍存在差异,主要是由试验动物及所研究细胞种类的不同而造成的。以往大多数试验均在大鼠、小鼠等动物机体中进行,或将氟化钠作用于人工培养的细胞,而本研究的试验动物则为公鸡;其他学者主要以肝、肾、骨等组织细胞进行试验,而本试验选用的是睾丸

组织的生精细胞,由于睾丸存在血睾屏障,对氟化钠的进入有一定影响,可能导致试验结果有差异。张桂珍等的试验部位是小鼠脑部神经组织,而存在于脑部的血脑屏障也可对氟化钠的进入产生影响,这可能是本试验结论与张桂珍等的结论一致而不同于其他学者的主要原因。

氟对睾丸组织生精细胞的细胞周期产生影响,主要通过抑制 S 期 DNA 的合成及修复过程,以影响细胞从 S 期到 G_2/M 期过渡的准备工作,从而使 S 期细胞减少,同时对 S 期细胞进入 G_2 期的过程产生抑制作用,并对细胞进入 G_1 期产生较强的促进作用。本研究在细胞生物学水平上探讨了氟对睾丸组织生精细胞产生影响的机制,为家禽氟病的防治提供理论参考。氟对动物细胞周期的影响与试验动物、组织器官的种类均有关,氟对同一动物不同组织,或不同动物相同、不同组织的影响均可能相同或有差异。

参考文献:

[1]李广生,井 玲. 关注氟化物的剂量-效应问题[J]. 中国地方病学杂志,2004,23(2):100-101.

[2]徐海峰,牛广明,陈克敏,等. 过量摄入氟化物对多器官损伤的研究[J]. 内蒙古医学杂志,2009,41(4):385-388.

[3]Sato K, Hayashi F, Natarajan A T, et al. Toxic effects of fluoride on cultured fibroblast [J]. Pharmacy World&Science, 1998, 20(5): 214-218.

[4]Hayashi N, Tsutsui T. Cell cycle dependence of cytotoxicity and clastogenicity induced by treatment of synchronized human diploid fibroblasts with sodium fluoride[J]. Mutation Research, 1993, 290(2):293-302.

[5]贺凌飞,黄 闽,王阅春,等. 高氟对大鼠口腔黏膜细胞增殖周期和 DNA 合成的影响[J]. 中国地方病防治杂志,2004,19(3): 129-131.

[6]余日安,夏 涛,王爱国,等. 硒和锌对氟致大鼠肾脏细胞凋亡及增殖周期变化的影响[J]. 中华预防医学杂志,2002,36(4): 219-221.

[7]张桂珍,高 申,郑德明,等. 过量氟对大鼠脑肝肾细胞周期与细胞凋亡的影响[J]. 中国地方病学杂志,2001,20(5):344-346.

[8]吴培福,曲伟杰,郭爱伟. 氟对雄性小鼠生殖毒性的试验[J]. 中国兽医杂志,2011,47(6):32-35.

[9]黎晓敏,秦 港,王 健. 试验性氟中毒鸡睾丸组织的病理学研究[J]. 畜牧兽医学报,2006,37(7):717-721.

[10]孙子龙,牛瑞燕,王俊东. 氟对雄性小鼠生长发育及性腺中氟含量的影响[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(3):227-229.