

程 勇,任道全,陈根元,等. 苦马豆素对家兔睾丸生精细胞周期的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(9):138-140.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.09.038

苦马豆素对家兔睾丸生精细胞周期的影响

程 勇,任道全,陈根元,矫继峰,王 帅

(塔里木大学动物科学学院/新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室,新疆阿拉尔 843300)

摘要:为研究苦马豆素对家兔睾丸生精细胞周期的影响,进一步探讨疯草的中毒机理,将 24 只雄性家兔随机分为对照组和试验 I、II、III 组,试验组分别按照 I 组 15% (苦马豆素含量 30 mg/kg)、II 组 30% (苦马豆素含量 60 mg/kg)、III 组 45% (苦马豆素含量 90 mg/kg) 的比例添加疯草小花棘豆,对照组仅饲喂苜蓿干草,试验期 70 d。分别于攻毒后第 14、第 35、第 70 天每次每组随机采集 2 只家兔的睾丸,通过流式细胞仪测定生精细胞凋亡率和细胞周期的变化。结果显示,从第 35 天开始,试验组家兔生精细胞凋亡率均极显著升高 ($P < 0.01$),其中单倍体细胞和二倍体细胞凋亡率均极显著升高 ($P < 0.01$),但四倍体细胞数量无显著变化。与对照组相比,中毒家兔睾丸生精细胞数量在 G_0/G_1 期升高,在 S 期降低,而且 G_1 期与 S 期细胞数量呈显著负相关。说明苦马豆素可导致家兔睾丸组织生精细胞凋亡,且呈现出一定的时间-剂量效应。

关键词:苦马豆素;家兔;生精细胞;细胞凋亡;细胞周期;时间-剂量效应

中图分类号:S816.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)09-0138-03

疯草是豆科黄芪属和棘豆属有毒植物的总称,是西北地区草原畜牧业危害最严重的有毒植物^[1],具有根系发达、返青早、抗逆性强、繁殖系数高等特点,极易成为草原中的优势种^[2]。新疆维吾尔自治区每年因采食疯草中毒的放牧家畜约 100 万只(头),其中超过 50% 的中毒家畜死亡^[3]。苦马豆素 (swainsonine, SW) 是一种多羟基吡咯里西啶生物碱,国内外研究表明其是疯草的主要毒性成分^[4],中毒家畜主要表现为繁殖系统和神经系统损伤,其中睾丸、卵巢、脑组织等器官均出现细胞空泡变性、细胞核萎缩等病理变化^[5]。王帅等研究发现,SW 可导致中毒家兔睾丸萎缩、精子数量与活性降低,最终导致雄性动物生精功能障碍^[6]。张樑检测了 SW 对大鼠大脑皮质神经细胞的毒性作用,发现 SW 可导致神经细胞核浓缩, DNA 片段化,最终导致细胞凋亡^[7]。目前有关 SW

对细胞凋亡影响的试验主要集中于其对癌细胞和神经细胞的作用上,对生精细胞的凋亡及其机制未见报道。本试验通过制备亚慢性疯草中毒家兔模型,探讨苦马豆素对家兔生精细胞周期的影响,为家畜疯草中毒的防治提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料、试剂与仪器

1.1.1 材料 疯草样品为采自新疆维吾尔自治区策勒县恰哈乡的小花棘豆 (*Oxytropis glabra* DC) 风干样,由塔里木大学动物科学学院草业科学教研室鉴定。

1.1.2 试剂 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒,美国 BD 公司;DNA-Perp Stain 细胞周期试剂盒,美国 Beckman Coulter 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器 FAC Scam 型流式细胞仪,美国 BD 公司;5810 R 型高速冷冻离心机,德国 Eppendorff 公司。

1.2 试验动物分组与处理

雄性家兔 24 只,体质量 (2.0 ± 0.1) kg/只,平均分为对照组和 3 个试验组,分笼饲养。对照组仅饲喂青苜蓿干草,试验组 I、II、III 分别饲喂掺入小花棘豆 15%、30%、45% (按气相色谱法计算苦马豆素含量分别为 30、60、90 mg/kg^[8]) 的混合干草,试验期 70 d。试验第 14、第 35、第 70 天各组分别剖杀 2 只家兔取睾丸,将家兔睾丸组织剪成 1~2 mm 大小,置

收稿日期:2016-02-02

基金项目:国家自然科学基金(编号:31460678,31260586);国家星火计划(编号:2015GA891015);新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室开放课题(编号:HS201409)。

作者简介:程 勇(1968—),男,新疆阿拉尔人,助理实验师,主要从事动物学研究。E-mail:258773506@qq.com。

通信作者:王 帅,硕士,高级实验师,主要从事动物中毒病及毒理学研究。Tel:(0997)4681616;E-mail:wangshuaidky@126.com。

兽医,2012,37(4):31-32。

[8] 鲁立刚,杨 雪,张忠庆,等. 杜可二元杂交猪与外三元猪育肥性能比较研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2015(2):30-31。

[9] 冯 宇,徐小波,胡东伟,等. 二花脸猪及其杂种猪的肥育性能与胴体肉质[J]. 养猪,2014(5):75-76,77。

[10] 华兆才,邱阳生,蓝锡仁,等. 槐猪不同二元杂交组合的屠宰性能测定初报[J]. 养殖技术顾问,2010(5):202-204。

[11] 蔡木发,高 凤,符小芳,等. 肝脏疾病血清 AFU 与 ALT、AST、GGT 相关性分析[J]. 吉林医学,2015,36(15):3244-3245。

[12] Haug C, Schmid - Kotsas A, Zorn U, et al. Endothelin-1 synthesis and endothelin B receptor expression in human coronary artery smooth muscle cells and monocyte-derived macrophages is up-regulated by low density lipoproteins[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2001, 33(9):1701-1712。

[13] 张 军,郭 亮,梁如意,等. 仔猪血清总蛋白、白蛋白和球蛋白含量测定[J]. 畜牧与饲料科学,2009,30(9):10-11。

[14] 孙天松. 猪免疫球蛋白体外稳定性研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2002。

于 5 mL PBS 液 (pH 值 7.4) 中, 涡旋振荡 3 min 后使用 400 目尼龙滤网过滤, 1 500 r/min 离心 5 min 后弃去上清, 再置于 5 mL PBS 液中混匀。相同条件下重复 3 次即得到单细胞悬液, 用于细胞周期比例和细胞凋亡率的检测。

1.3 苦马豆素对家兔生精细胞周期的影响

使用 PBS 冲洗单细胞悬液 1~2 次, 加入质量浓度为 0.125% 的胰蛋白酶消化 2 min, 含血清培养液终止消化后弃去上清, PBS 漂洗 3 次后收集细胞于离心管中; 4 ℃、2 000 r/min 离心 10 min 后弃去上清, 加入 1 mL 75% 乙醇 4 ℃ 固定过夜; 然后 4 ℃、2 000 r/min 条件下离心 10 min 后弃去上清, PBS 漂洗 3 次后再于 4 ℃、2 000 r/min 条件下离心 10 min, 将细胞重悬于 200 μ L PBS 液中, 加入 5 μ L RnaseA, 37 ℃ 反应 1 h, 再加入 10 μ L Triton-X-100 和 5 μ L PI, 4 ℃ 下避光孵育 30 min, 1 h 内使用流式细胞仪检测。

1.4 苦马豆素致家兔生精细胞凋亡率的测定

使用 PBS 冲洗单细胞悬液 1~2 次, 加入质量浓度为 0.125% 的胰蛋白酶消化 2 min, 含血清培养液终止消化后弃去上清, PBS 漂洗 3 次后收集细胞于离心管中; 4 ℃、2 000 r/min 离心 10 min 后弃去上清, 加入 1 mL PBS 重悬细胞, 使用 250 目尼龙滤网过滤; 然后 4 ℃、2 000 r/min 条件下

离心 10 min 后弃去上清, 将细胞重悬于 200 μ L Binding Buffer 中, 加入 10 μ L AnnexinV-FITC 和 5 μ L PI, 4 ℃ 下避光孵育 30 min, 1 h 内上机检测。

1.5 数据分析

使用 SPSS 16.0 中 One-Way ANOVA 进行单因素方差分析及 Duncan's 多重比较, 检验误差为 5% 和 1%。

2 结果与分析

2.1 苦马豆素对家兔性行为的影响

试验初期攻毒家兔与对照家兔行为均表现正常, 攻毒第 14 天时攻毒家兔出现精神沉郁、被毛竖立、反应迟钝等现象; 与雌兔接触时, 对照家兔的性反应时间短于攻毒家兔, 爬跨次数也多于攻毒家兔。随着攻毒时间的延长, 攻毒家兔均出现喜卧、嗜睡等典型中毒症状^[5], 与雌兔接触时基本无正常的性行为表现。说明苦马豆素可显著影响雄性家兔的性行为。

2.2 苦马豆素对家兔睾丸生精细胞周期的影响

由图 1 可知, 苦马豆素攻毒家兔睾丸生精细胞与对照家兔相比, G_0/G_1 期细胞数量逐渐升高, S 期细胞数量逐渐降低, 而且 G_1 期与 S 期细胞数量呈显著的负相关关系, 其中高剂量攻毒组家兔的变化最为明显。

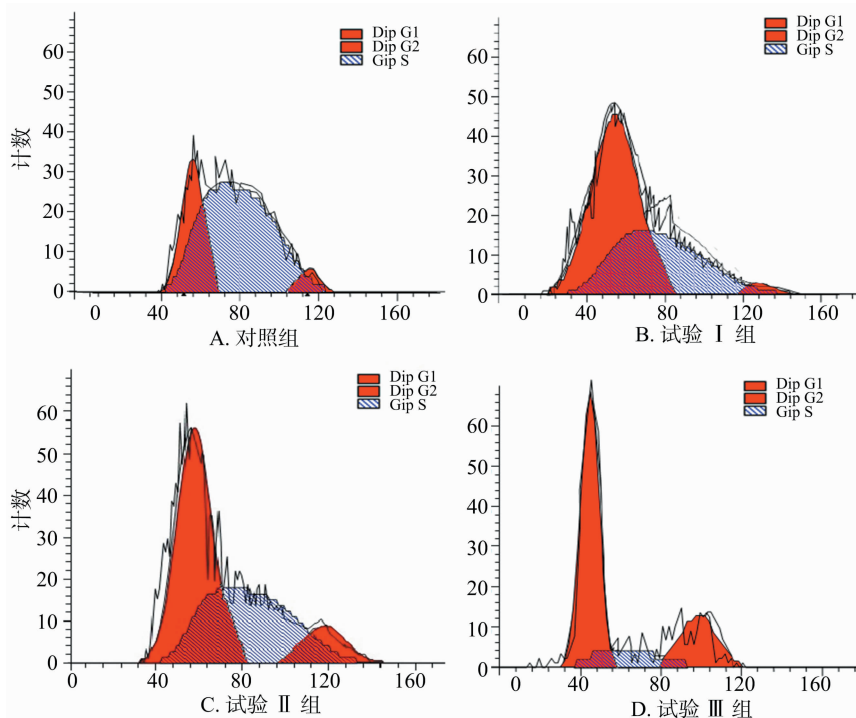


图1 对照家兔(A)与苦马豆素攻毒家兔(B、C、D)生精细胞细胞周期的检测

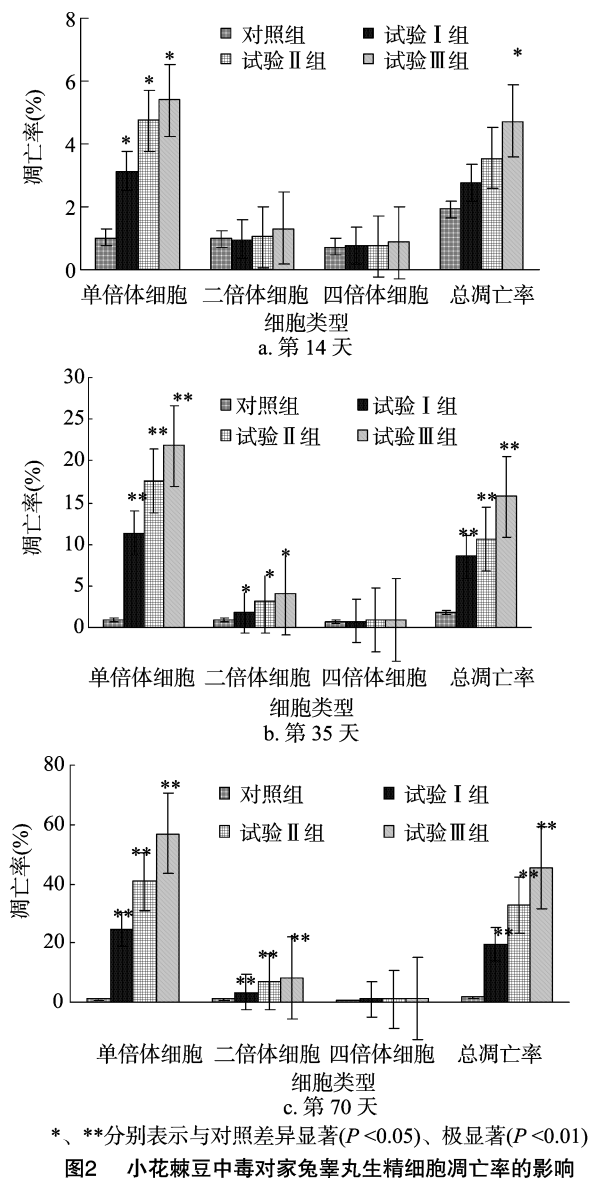
2.3 苦马豆素对家兔睾丸生精细胞凋亡率的影响

家兔睾丸生精细胞主要分为单倍体细胞、二倍体细胞和四倍体细胞。由图 2 可知, 与对照组相比, 第 14 天时试验组家兔单倍体细胞凋亡率均显著高于对照家兔 ($P < 0.05$), 但仅试验 III 组家兔生精细胞凋亡率显著高于对照 ($P < 0.05$)。第 35 天时试验组单倍体细胞凋亡率和生精细胞凋亡率均极显著高于对照 ($P < 0.01$), 但二倍体细胞凋亡率均显著高于对照家兔 ($P < 0.05$)。第 70 天时试验组单倍体细胞凋亡率、二倍体细胞凋亡率和生精细胞凋亡率均极显著高于对照家兔

($P < 0.01$), 但整个试验期内四倍体细胞凋亡率与对照差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 结论与讨论

睾丸细胞主要包括单倍体细胞 (精子细胞和精子)、二倍体细胞 (G_0 期精原细胞、次级精母细胞、支持细胞和间质细胞) 以及四倍体细胞 (粗线期、细线期、双线期的初级精母细胞和 G_2 期的精原细胞等), 另外还有一些较为分散的细胞由进行 DNA 合成的精原细胞和细线前期精母细胞组成。正常



*、**分别表示与对照差异显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)
图2 小花棘豆中毒对家兔睾丸生精细胞凋亡率的影响

情况下,睾丸的精原细胞在促性腺激素和雄性激素作用下,依次经过精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞,最后转变成成为高度分化的精子。其中减数分裂前的精原细胞和精母细胞有较高的自发凋亡现象,但精子细胞很少发生凋亡,这是保证随后的精子正常生长所必需的。其意义在于维持成熟精子的质量和数量,清除染色体异常的生精细胞,保持生精细胞与支持细胞数量上的平衡。其中,四倍体细胞与二倍体细胞的比率反映了精原细胞转化为初级精母细胞的效率,单倍体细胞与四倍体细胞的比率显示了减数分裂的效果,单倍体细胞与二倍体细胞的比率反映了精原细胞转化为精子细胞的效率。笔者所在课题组前期研究发现,小花棘豆中毒主要影响动物的繁殖和神经系统,其中雄性中毒动物表现为性欲低下,无配种能力。Jyothi 等研究表明,睾丸生精细胞凋亡时精原细胞的凋亡比较严重,即多数生殖毒性物质的靶细胞是精原细胞^[9]。本试验通过流式细胞仪检测了家兔睾丸内各种生精细胞的比例,结果发现,与对照组相比,苦马豆素攻毒家兔辜

丸单倍体细胞和二倍体细胞凋亡率均极显著升高,但四倍体细胞凋亡率无明显变化,说明苦马豆素可显著影响家兔减数分裂及精原细胞转化为初级精母细胞的效率,即苦马豆素主要影响精原细胞和次级精母细胞。

通过流式细胞仪检测苦马豆素攻毒对家兔睾丸生精细胞周期的影响发现,与对照相比,中毒家兔睾丸生精细胞 G_0/G_1 期数量增多, S 期细胞数量降低。表明苦马豆素可能抑制了 S 期 DNA 的合成与修复过程,从而使 S 期细胞数量降低,并抑制了 S 期细胞进入 G_2/M 期,另外还对细胞进入 G_1 期有一定的促进作用。凋亡率检测发现,处于分裂增殖阶段的精原细胞、精母细胞对苦马豆素较为敏感。其原因可能为精原细胞和精母细胞分别处于有丝分裂和减数分裂期,在 S 期须打开 DNA 双链以合成新的 DNA,而裸露的 DNA 对苦马豆素的作用较为敏感,容易产生 DNA 损伤^[10]。当 DNA 损伤超过自身的修复能力时,将导致同源染色体配对、交换和分离的紊乱,从而引发细胞凋亡。本试验结果与郭全海等的研究结论^[11]一致,初步阐明了苦马豆素对家兔睾丸生精细胞凋亡的影响机制。

本研究从细胞生物学水平探讨了苦马豆素对家兔睾丸生精细胞凋亡的影响机制,为疯草中毒的防治提供了一定的参考。与对照组相比,中毒家兔睾丸精原细胞和次级精母细胞 G_0/G_1 期数量增多, S 期细胞数量降低,表明苦马豆素可能抑制了精原细胞和次级精母细胞 S 期 DNA 的合成与修复过程。

参考文献:

- [1] 周启武,赵宝玉,路浩,等. 中国西部天然草地疯草生态及动物疯草中毒研究与防控现状[J]. 中国农业科学, 2013, 46(6): 1280-1296.
- [2] 严杜建,周启武,路浩,等. 新疆天然草地毒草灾害分布与防控对策[J]. 中国农业科学, 2015, 48(3): 566-583.
- [3] 王帅,贾琦珍,陈根元,等. 新疆小花棘豆的毒性危害与利用[J]. 新疆畜牧业, 2012(4): 54-55.
- [4] 王帅,吴书奇,胡建军,等. 南疆地区小花棘豆中苦马豆素的分离与鉴定[J]. 草业科学, 2011, 28(6): 1194-1197.
- [5] 王帅,胡建军,陈根元,等. 小花棘豆中毒家兔的病理形态学观察[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(6): 175-178.
- [6] 王帅,陈根元,贾琦珍,等. 小花棘豆中毒对家兔睾丸 α -甘露糖苷酶的影响[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(4): 640-644.
- [7] 张樑. 苦马豆素诱导新生 SD 大鼠大脑皮层神经细胞凋亡机制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2013.
- [8] 王帅,贾琦珍,陈根元,等. 不同生长时期小花棘豆营养成分与苦马豆素含量比较[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(8): 1505-1509.
- [9] Jyothi P, Jagetia G C, Krishnamurthy H. Evaluation of teniposide (VM-26)-induced toxicity on mouse spermatogenesis by flow cytometry[J]. Toxicology, 2001, 163(2/3): 163-174.
- [10] Li Z, Huang Y, Dong F, et al. Swainsonine promotes apoptosis in human oesophageal squamous cell carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* through activation of mitochondrial pathway[J]. Journal of Biosciences, 2012, 37(6): 1005-1016.
- [11] 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.