分析[J]. 中国公共卫生,2010,26(5):555 – 556.
[4] Mummery CL, Zhang J, Ng ES, et al. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview[J]. Circ Res, 2012, 111(3): 344 – 358.
[5] Cho J, Zhai P, Maejima Y, et al. Myocardial injection with GSK-3 beta-overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuates cardiac dysfunction after myocardial infarction[J]. Circ Res, 2011, 108(4): 478 – 489.
[6] 陆东风,吴昊,黄璟,等. 新生 SD 大鼠心肌干细胞的体外分离培养与鉴定[J]. 南方医科大学学报,2006,26(11):1629 – 1632.
[7] Surder D, Schwitter J, Moccetti T, et al. Cell-based therapy for myocardial repair in patients with acute myocardial infarction: rationale and study design of the Swiss Multicenter Intracoronary Stem Cells Study in Acute Myocardial Infarction (SWISS-AMI) [J]. Am Heart J, 2010, 160(1): 58 – 64.
[8] Kawaguchi N. Adult cardiac-derived stem cells: differentiation and survival regulators[J]. Vitam Horm, 2011, 87: 111 – 125.
[9] Frati C, Savi M, Graiani G, et al. Resident cardiac stem cells [J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(30): 3252 – 3257.
[10] Dawn B, Stein AB, Urbanek K, et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(10): 3766 – 3771.
[11] 王彤,郑韶欣,周长青,等. 心肌干细胞移植可改进心力衰竭大鼠室颤阈值和电生理的稳定性[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(36):6753 – 6756.
[12] Flaherty MP, Kamerzell TJ, Dawn B. Wnt signaling and cardiac differentiation[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012, 111: 153 – 174.
[13] Blankesteijn WM, van de Schans VA, ter Horst P, et al. The Wnt/frizzled/GSK-3 beta pathway: a novel therapeutic target for cardiac hypertrophy[J]. Trends Pharmacol Sci, 2008, 29(4): 175 – 180.

收稿日期:2013 – 03 – 28　　(韩仰欢编辑　郑新校对)

· 实验研究 ·

壬基酚对大鼠前列腺细胞凋亡影响及机制*

朱建林,陈昱,刘瑾,杨华,吴传城,李昱辰,陈锦,任南

摘　要:目的　探讨壬基酚对大鼠前列腺组织细胞凋亡及 caspase – 3、caspase – 8 和 caspase – 9 mRNA 表达影响。**方法**　健康清洁级 Wistar 雄性大鼠 50 只,按体重随机分为 5 组,分别为 12.5、25、50、100 mg/kg 壬基酚染毒组和对照组(橄榄油),每组 10 只;皮下注射染毒(1 mL/kg),每天 1 次,连续染毒 30 d;Tunel 法观察前列腺前叶组织细胞凋亡,实时荧光定量聚合酶链式反应(RT – PCR)法观察组织中 caspase – 3、caspase – 8、caspase – 9 mRNA 表达。**结果**　12.5、25、50、100 mg/kg 壬基酚染毒组大鼠前列腺细胞凋亡率分别为(3.07 ± 1.31)%、(5.21 ± 1.47)%、(6.31 ± 1.29)%、(8.90 ± 0.18)%,均低于对照组的(12.73 ± 2.19)%($P < 0.05$);与对照组比较,12.5、25、50、100 mg/kg 壬基酚染毒组大鼠前列腺组织细胞 caspase – 3、caspase – 8、caspase – 9 mRNA 表达均降低($P < 0.05$)。**结论**　壬基酚可致雄性大鼠前列腺细胞凋亡率下降,其机制可能与前列腺细胞 caspase – 3、caspase – 8 和 caspase – 9 mRNA 表达降低有关。

关键词:环境内分泌干扰物;壬基酚;大鼠;凋亡基因;前列腺增生
中图分类号:R 994.6　**文献标志码**:A　**文章编号**:1001-0580(2013)08-1187-03　DOI:10.11847/zgggws2013-29-08-29

Effects of nonylphenol on prostate cell apoptosis and expressions of caspase-3, caspase-8, and caspase-9 mRNA in male Wistar rats

ZHU Jian-lin, CHEN Yu, LIU Jin, et al (*Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian Province* 350004, China)

Abstract: Objective　To evaluate effects of nonylphenol (NP) on rat prostate tissue apoptosis and expressions of caspase-3, caspase-8, and caspase-9 mRNA. **Methods**　Fifty healthy Wistar rats were randomly divided into five groups (one olive control group and 4 groups exposed to NP at the doses of 12.5, 25, 50, and 100 mg/kg) based on body weight. The exposure groups were admimistered 1 mg/kg of NP hypodermic injection once a day for 30 days. The prostate tissue apoptosis was observed with teminal transferase-mediated biotin dUTP nick end labeling (TUNEL) and expressions of caspase-3, caspase-8, and caspase-9mRNA in prostate tissue were detected with real-time reverse transcription PCR (RT-PCR). **Results**　The prostate apoptosis rate in 12.5, 25, 50, and 100 mg/kg NP group were 3.07 ± 1.31%, 5.21 ± 1.47%, 6.31 ± 1.29%, and 8.90 ± 0.18%, all lower than that in the control group (12.73 ± 2.19%) ($P < 0.05$ for all). The expressions of caspase-3 mRNA, caspase-8 mRNA, and caspase-9 mRNA in all NP exposed groups were lower than those in the control group ($P < 0.05$ for all). **Conclusion**　NP decreases the apoptosis of prostate tissue in male Wistar rats, which may be one of the mechanisms for prostate hyperplasia in rats caused by NP.

Key words: environmental endocrine disruptor; nonylphenol; rat; apoptotic gene; prostate hyperplasia

* **基金项目**:福建省自然科学基金(2009J01150)
作者单位:福建医科大学公共卫生学院职业与环境卫生学系,福建 福州 350004
作者简介:朱建林(1976 –),女,湖南醴陵人,博士,讲师,研究方向:生殖毒理学。

壬基酚是一种环境激素,能破坏干扰机体内分泌系统,因此又名内分泌干扰素[1]。作为一种表面活性剂,壬基酚被广泛应用于化学洗涤剂中,随着洗涤剂在日常生活中的大量使用,壬基酚的安全性也越来越受到人们的关注[2]。研究发现,较低剂量的壬基酚对雄性大鼠前列腺有增生作用[3]。良性前列腺增生(benign prostatic hyperplasia, BPH)是男性老年人的常见病、多发病,但其病因和发病机制尚不十分明确,近年来,许多学者从细胞凋亡的角度去研究 BPH 的发病机制,并发现细胞凋亡的减少可导致 BPH 的发生[4]。本研究旨在探讨不同剂量的壬基酚对大鼠前列腺组织细胞凋亡影响,并从凋亡基因(caspase-3、caspase-8、caspase-9)mRNA 的表达角度进行机制探讨。结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　壬基酚(纯度 99.9%,美国 Sigma 公司);橄榄油(上海国药集团化学试剂有限公司)。焦磷酸二乙酯(上海晶美生物工程有限公司),引物序列及目标片段,β-actin:上游:5′-CGTTGACATCCGTAAAGA-3′, 下游: 5′-AGCCACCAATCCACACAG-3′, 173 bp; Caspase-3: 上游: 5′-GAGACAGACAGTGGAACTGACGATG-3′,下游:5′-GGCGCAAAGTGACTGGATGA-3′, 147 bp; caspase-8:上游:5′-TCAGCAACATGCGGGACAG-3′,下游:5′-TGAAGCAGTCTTTGCCCTTGTG-3′, 171 bp; Caspase-9:上游:5′-CTGAGCCAGATGCTGTCCCATA-3′,下游:5′-CCAAGGTCTCGATGTACCAGGAA-3′, 168 bp; 引物设计与合成、PrimeScriptTM RT Reagent、SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(大连宝生物工程有限公司);Tunel 试剂盒(南京建成生物有限公司)。OLYMPUS - BioReporter 图像拍摄系统和 Image - Pro Plus 5.0 图像分析软件(日本 Olympus 公司);Hu - 12A 型透射电子显微镜(日本日立公司);7500 型 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2　实验动物　健康清洁级 Wistar 雄性大鼠(上海实验动物研究中心)50 只,体重 135 ~ 154 g,许可证号:SCXK(沪)2007 - 0005。大鼠经过 1 周适应性喂养,随机分为 5 组,每组 10 只,即对照组(橄榄油)及 12.5、25、50、100 mg/kg 壬基酚染毒组,采用皮下注射途径染毒,注射体积为 1 mL/kg,连续染毒 30 d。染毒期间,观察大鼠一般情况,包括外观,反应,食欲,活动等情况,并每天称重记录。染毒结束后,采集大鼠前列腺前叶组织待测。

1.3　指标与方法

1.3.1　Tunel 法检测细胞凋亡　大鼠前列腺前叶组织常规固定包埋后,按试剂盒说明进行操作,用图像拍摄系统与图像分析软件计算前列腺组织细胞凋亡数,苏木素伊红(hematoxylin eosin, HE)染色计算前列腺中同一视野的细胞总数目,两者比值为凋亡率。

1.3.2　Caspase-3、caspase-8、caspase-9 基因表达检测　采用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time reverse polymerase chain reaction, RT-PCR)法,常规方法提取前列腺前叶组织 RNA 后,按试剂盒说明进行操作。扩增条件:采用两步法 PCR 反应程序。第 1 步 94 ℃预变性 10 s;第 2 步 PCR 反应,94 ℃ 15 s, 60 ℃ 34 s,共 40 个循环。反应结束后,所有反应信息资料备 ABI 7500 扩增仪收集并储存,结合融解曲线进行分析。

1.4　统计分析　数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 SNK(Student - Newman - Keuls)检验。检验水准为 $\alpha = 0.05$。

2　结　果

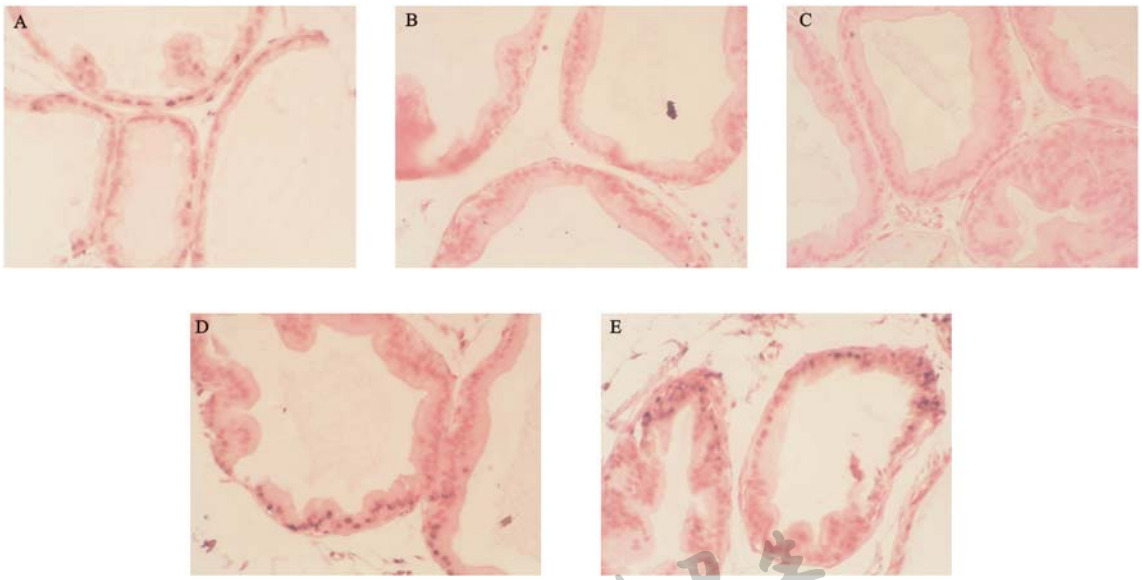
2.1　一般毒性　在整个实验过程中,除 100 mg/kg 壬基酚染毒组大鼠实验后期活动明显减少、反应较迟钝、进食饮水略减、皮毛质地较差外,其余各组大鼠食欲、活动正常、皮毛光滑。

2.2　壬基酚对大鼠前列腺前叶组织细胞凋亡率影响　对照组及 12.5、25、50、100 mg/kg 壬基酚染毒组大鼠前列腺前叶组织细胞凋亡率分别为(12.73 ± 2.19)%、(3.07 ± 1.31)%、(5.21 ± 1.47)%、(6.31 ± 1.29)%、(8.90 ± 0.18)%,与对照组比较,各壬基酚染毒组大鼠前列腺前叶细胞凋亡率均下降($P < 0.05$);但随着染毒剂量增加,前列腺上皮细胞凋亡率有增加趋势。

2.3　壬基酚对大鼠前列腺前叶组织细胞凋亡病理影响(图 1)　对照组大鼠前列腺上皮腺腔规则,细胞呈单层立方上皮,凋亡阳性细胞数目最多(细胞核蓝黑色为阳性);而各壬基酚染毒组大鼠前列腺上皮细胞肥大,有些表现为复层,腺腔欠规则,阳性细胞数目较少;但随着染毒剂量增加,阳性细胞数有增加趋势。

2.4　壬基酚对大鼠凋亡相关基因 mRNA 表达影响(表 1)　与对照组比较,各壬基酚染毒组 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 mRNA 表达均下降,但随着染毒剂量增加,caspase 基因家族 mRNA 表达呈增加趋势。

中国公共卫生 CPH



注：A：对照组；B ~ E：12.5、25、50、100 mg/kg 壬基酚染毒组。

图 1　壬基酚对大鼠前列腺组织细胞凋亡影响（HE 染色，×400）

表 1　壬基酚对大鼠前列腺组织凋亡相关基因 mRNA 表达影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

组别（mg/kg）		caspase－3	caspase－8	caspase－9
对照组		0.925 ± 0.206	0.507 ± 0.255	0.814 ± 0.282
壬基酚	12.5	0.405 ± 0.091[b]	0.215 ± 0.106[b]	0.417 ± 0.069[b]
	25	0.430 ± 0.115[b]	0.213 ± 0.162[b]	0.588 ± 0.266[b]
	50	0.693 ± 0.120[a]	0.341 ± 0.138[a]	0.641 ± 0.259[a]
	100	0.721 ± 0.127[a]	0.418 ± 0.230[a]	0.717 ± 0.903[a]

注：与对照组比较，a $P < 0.05$，b $P < 0.01$。

3　讨　论

BPH 是影响老年男性健康的常见疾病，发病率占老年男性疾病首位。研究表明，50 岁男性的发病率 > 50%，> 80 岁的男性中 > 80% 会出现组织学 BPH[5]，但其发病原因至今尚未阐明。细胞凋亡在前列腺增生的发生发展过程中作用已为人们初步认识，并发现了很多相关基因[6]，caspase-8 与 caspase-3 在 caspase 级联反应中分别在起始者与执行者上处于核心地位，是细胞凋亡发生的关键步骤及一切凋亡信号传导的共同通路。作为效应分子的 caspase-3 的活化主要依靠 caspase-9 的激活[7]。本研究结果显示，各壬基酚染毒组大鼠前列腺上皮细胞凋亡率下降，caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 mRNA 表达皆低于对照组（$P < 0.05$），提示在较低剂量作用下，壬基酚可引起大鼠前列腺组织细胞凋亡减少，其机制可能与壬基酚减少 caspase-8 和 caspase-9 基因表达，而致效应分子 caspase-3 基因表达下降，最终导致大鼠前列腺细胞凋亡减少有关；本研究结果还显示，随着染毒剂量增加，各壬基酚染毒组大鼠前列腺上皮细胞凋亡率及 caspase 基因表达皆有增加趋势，这可能与毒物的兴奋效应有关，即低剂量时表现为适当的刺激反应，而高剂量则表现为抑制作用[8]，但壬基酚致大鼠前列腺组织细胞凋亡的具体机制尚有待进一步研究。

参考文献

[1]　邓茂生，吴德生. 壬基酚对雌性 SD 大鼠早期性发育的影响[J]. 中国公共卫生，2002，18（2）：17－18.
[2]　马全祥，范雪晖，毛泽善. 壬基酚对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国公共卫生，2004，20（2）：201－202.
[3]　朱建林，汪家梨，张文昌. 壬基酚诱发大鼠前列腺增生及对血清中性激素水平的影响[J]. 环境与健康杂志，2009，26（2）：119－121，F3.
[4]　Shariat SF，Ashfaq R，Roehrborn CG，et al. Expression of survivin and apoptotic biomarkers in benign prostatic hyperplasia[J]. J Urol，2005，174（5）：2046－2050.
[5]　叶章群. 良性前列腺增生的诊断和治疗[J]. 中华老年医学杂志，2006，25（5）：390.
[6]　刘庆猛，路名芝. 良性前列腺增生细胞增殖和凋亡发病机制研究进展[J]. 江西医学检验，2005，23（2）：141－145.
[7]　Wong RS. Apoptosis in cancer：from pathogenesis to treatment[J]. J Exp Clin Cancer Res，2011，30（1）：87.
[8]　王心如. 毒理学基础[M]. 6 版. 北京：人民卫生出版社，2012：24.

收稿日期：2013－02－17　　（解学魁编辑　郑新校对）