

## 论著

文章编号:1000-5404(2007)19-1838-03

## PCB<sub>153</sub>诱导小鼠胚胎细胞凋亡对胚胎生长发育的影响

常青<sup>1</sup>,赵泽文<sup>1</sup>,李泽桂<sup>2</sup>,梁志清<sup>1</sup> (第三军医大学:<sup>1</sup>西南医院妇产科,<sup>2</sup>基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

**提要:**目的 探讨环境雌激素多氯联苯同系物 PCB<sub>153</sub>对发育过程中小鼠胚胎细胞凋亡的影响。方法 于体外施予孕 8.5 d 小鼠胚胎不同浓度 PCB<sub>153</sub>,应用植入后全胚胎培养技术培养胚胎;采用原位 TUNEL 技术观察胚胎细胞凋亡。结果 PCB<sub>153</sub>对胚胎发育具有明显影响且呈剂量-效应关系,且随 PCB<sub>153</sub>浓度增加,凋亡细胞比值上升。结论 PCB<sub>153</sub>能诱导胚胎细胞凋亡,这与其致胚胎发育异常有关,可能是 PCB<sub>153</sub>的致畸作用机制之一。

**关键词:**植入后全胚胎培养;PCB<sub>153</sub>;胚胎发育;细胞凋亡;致畸机制

**中图法分类号:**R321; R329.28; X503.1

**文献标识码:**A

## Effect of PCB<sub>153</sub> induced-apoptosis on mouse embryonic development

CHANG Qing<sup>1</sup>, ZHAO Ze-wen<sup>1</sup>, LI Ze-gui<sup>2</sup>, LIANG Zhi-qing<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, <sup>2</sup>Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** Objective To explore the effects of polychlorinated biphenyl congener (PCB<sub>153</sub>) an environmental estrogen, on embryonic development and its mechanism. Methods Mouse embryos of gestational day 8.5 were exposed to different doses of PCB<sub>153</sub> *ex vitro*. Post-implantation whole embryo culture (WEC) technique was used to investigate the effects of PCB<sub>153</sub> on growth and development. The terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL) technique was used to detect apoptosis in embryonic tissue sections. Results PCB<sub>153</sub> had obvious effects on the development and growth of embryos in a dose-dependent manner; The ratio of apoptotic cells was increased with increased doses of PCB<sub>153</sub>. Conclusion PCB<sub>153</sub>-induced apoptosis is involved in mouse embryo anomalies.

**Key words:** post-implantation whole embryo culture; PCB<sub>153</sub>; embryonic development; apoptosis; teratogenic mechanism

多氯联苯 (polychlorinated biphenyl, PCB) 属环境雌激素,广泛存在于人类生存的环境中,对生物体可产生严重的毒害作用<sup>[1]</sup>。它共有 209 种同系物,PCB<sub>153</sub> 是机体含量最多的同系物之一<sup>[2]</sup>,其与人类关系密切。我们前期已经研究证明 PCB<sub>153</sub> 可以导致小鼠胚胎异常发育,而凋亡在胚胎的正常发育过程中起着重要作用<sup>[3]</sup>,因此,本研究旨在观察 PCB<sub>153</sub> 对发育过程中小鼠胚胎细胞凋亡的影响,以探讨凋亡在胚胎异常发育中的作用。

基金项目:重庆市科技计划项目(2002-10-77)

Supported by the Sci & Tech Project of Chongqing(2002-10-77)

作者简介:常青(1963-),女,湖南省长沙市人,博士,主任医师,教授,主要从事出生缺陷方面的研究,发表论文 16 篇。电话:(023)68765399, E-mail: cqli99@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-01-09;修回日期:2007-05-08

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂和主要设备

多氯联苯同系物 PCB<sub>153</sub>(货号 35602, Riedel-deHaen 公司),将其溶于二甲基亚砜(DMSO)制成浓度为 2、0.2、0.02 ng/μl 的溶液,保存于 4 ℃。D-PBS(Gibco),参考文献[4]自制的大鼠血清,凋亡试剂盒(KeyGen),旋转培养箱(WEC2000 型,第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室自制),解剖显微镜(NIKON),光学显微镜(OLYMPUS),不同比例混合标准气体(重庆朝阳气体工业有限公司)。

#### 1.2 获取小鼠胚胎

选取体质量(25±2)g 的昆明种小白鼠(购于第三军医大学实验动物中心),每日 18:00 按雌:雄=2:1 合笼,次日 8:00 查见阴栓者定为妊娠第 0 天,妊娠第 8 天 14:00~16:00 定为妊娠第 8.5 天。此时脱颈处死孕鼠取胚胎<sup>[4]</sup>。选取体节数为 3~5 对的胚胎随机分配到各组进行培养(包括体内组、空白组、

溶剂组和实验组。体内组是指胚胎在体内发育至 9.75 d;空白组是指培养基为纯大鼠血清;溶剂组是指培养基中 DMSO 浓度为 0.5%;实验组共 3 组,培养基中 PCB<sub>153</sub>浓度分别为 0.10、1.00、10.00 ng/ml)。每 50 毫升培养瓶中有 4~5 枚胚胎和 4~5 ml 大鼠血清。瓶中充以一定比例混合气体,于旋转培养箱中(37.5±0.5)℃旋转培养,30~40 r/min。分别在培养开始时、培养 16 h 和 24 h 充入标准混合气体,混合气体的比例依次为 5% CO<sub>2</sub>:5% O<sub>2</sub>:90% N<sub>2</sub>;5% CO<sub>2</sub>:20% O<sub>2</sub>:75% N<sub>2</sub>;5% CO<sub>2</sub>:40% O<sub>2</sub>:55% N<sub>2</sub>。培养 28 h(相当于体外发育至 9.75 d)收获胚胎。在解剖显微镜下观察胚胎各系统器官的发育情况。

### 1.3 TUNEL 检测

各组胚胎经 10% 中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,连续切片(5 μm)。切片经二甲苯脱蜡 2×5 min、酒精逐级脱水。用 1×PBS 漂洗 3×5 min。加入蛋白酶 K 工作液,21~37℃反应 15~30 min。用 1×PBS 漂洗 3×5 min。浸入封闭液中,室温封闭 10 min。用 1×PBS 漂洗 3×5 min。滴加 TdT 酶反应液,37℃避光湿润反应 60 min。用 1×PBS 漂洗 3×5 min。滴加 streptavidin-HRP 工作液,37℃避光,湿润反应 30 min。用 1×PBS 漂洗 3×5 min。DAB 显色,苏木精复染,常规封片。光学显微镜下观察、拍照。阴性对照中,不加 TdT 酶,其余步骤相同。

### 1.4 凋亡细胞计数方法

正常细胞的核被苏木精染为蓝色,TUNEL 阳性细胞核为棕黄色。根据下列标准确定着色阳性细胞为凋亡细胞<sup>[5]</sup>:①单个散在分布;②具有凋亡的核形态(核固缩或染色质浓聚附边或核碎裂);③周围无炎症反应。对缺乏凋亡核形态的阳性细胞,除非染色强度与背景有鲜明对比,且呈单个分布,否则不认为是凋亡细胞<sup>[6]</sup>。每组取 4 只胚胎,每只胚胎选取 4 张切片阅片,每张切片取 5 个高倍视野(×400),计数阳性细胞核在视野中占总细胞核的百分比。

### 1.5 统计学分析

应用 SPSS 10.0 统计软件,率的比较采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

### 2.1 PCB<sub>153</sub> 对小鼠胚胎发育的影响

体外培养 28 h,PCB<sub>153</sub> 对胚胎发育的影响呈剂量-效应关系,详见我们的前期研究<sup>[3]</sup>。PCB<sub>153</sub> 可致胚胎发育迟缓、头部形态异常、颅神经管未闭、翻转异常、心脏空泡等各种畸形(图 1,2),甚至出现死亡。



从左到右依次为 1.00 ng/ml 组、10.00 ng/ml 组和溶剂组  
图 1 胚龄 9.75 d 胚胎发育情况 (×30)



图 2 实验组胚龄 9.75 d 胚胎发育情况 (×25)

### 2.2 TUNEL 检测结果

光镜下,体内组、空白组和溶剂组中 TUNEL 阳性率差异不显著( $P > 0.05$ )。实验组中,随 PCB<sub>153</sub>浓度增加,TUNEL 阳性率呈上升趋势。PCB<sub>153</sub> 为 1.00 ng/ml 时,与溶剂组比较 TUNEL 阳性率已有显著性差异( $P < 0.05$ )。TUNEL 阳性区域可见细胞核内的棕黄色颗粒(图 3),主要在头、体节、神经管、肢芽、腮弓等部位,其他部位亦可观察到阳性颗粒,但反应深浅不一。见表 1。

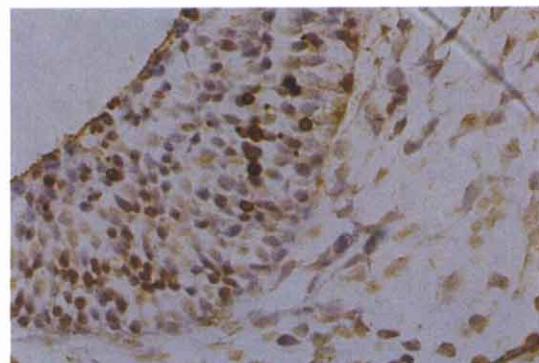


图 3 胚龄 9.75 d 胚胎切片 (TUNEL ×400)

表 1 PCB<sub>153</sub> 诱导小鼠胚胎凋亡 TUNEL 检测结果

组别	胚胎数(只)	切片数(张)	TUNEL 阳性率(%, $\bar{x} \pm s$ )
体内组	4	16	5.33 ± 0.14
空白组	4	16	5.97 ± 0.31
溶剂组	4	16	6.26 ± 0.23
实验组(ng/ml)			
0.10	4	16	19.51 ± 1.02
1.00	4	16	41.30 ± 0.83 <sup>a</sup>
10.00	4	16	57.45 ± 0.67 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与溶剂组比较

## 3 讨论

前期研究表明,在小鼠胚胎体外发育的 28 h 内,PCB<sub>153</sub>能够抑制鼠胚的生长发育和形态分化,存在明显的剂量-效应关系,表现出 PCB<sub>153</sub>能引起胚胎发育迟缓,对小鼠胚胎有致畸作用和发育毒性<sup>[3]</sup>。当 PCB<sub>153</sub> 为 1.00 ng/ml 时,卵黄囊(visceral yolk sac, VYS)循环、头长、颅臀长、中脑和腮弓等指标明显降低,提示这些部位是 PCB<sub>153</sub>作用的敏感部位。因为

凋亡在胚胎发育、分化和成熟过程中具有重要作用，能够通过自稳机制有序地调节细胞的生死<sup>[7]</sup>。因此，我们在本研究中，观察了发育中的鼠胚在接触PCB<sub>153</sub>后的凋亡变化情况。研究表明，在体内组、空白组和溶剂组中均观察到凋亡细胞，说明在胚胎发育过程中，完成阶段使命的某些细胞必须死亡，才可能启动或激发下一阶段的发育，这是一种正常的生理功能。然而，一旦由各种有害因素诱发细胞自稳机制失衡，就会干扰和破坏胚胎的正常生长发育，结果导致畸胎形成。实验组中，当PCB<sub>153</sub>≥1.00 ng/ml时，胚胎细胞凋亡过度，TUNEL检测表明胚胎多部位发生凋亡，如头、体节、神经管、肢芽、腮弓和其他部位。大量的凋亡细胞出现表明在PCB<sub>153</sub>的作用下，使胚胎受损处于不可逆阶段，在胚胎组织器官进行快速增殖和分化时，异常凋亡是PCB<sub>153</sub>诱发畸形的重要因素之一。可见，致畸物可以通过改变胚胎细胞凋亡发生的数量和部位而起作用<sup>[8]</sup>，这是器官形成期胚胎发生畸变的重要机制之一。目前，凋亡的诱导机制及作用仍不是很清楚，尤其是细胞凋亡在畸形发生中的作用还知之甚少，需要深入研究。

小鼠胚龄8.5~9.75 d相当于人类孕期的22~28 d，属于神经胚时期<sup>[9]</sup>，是胚胎发育早期阶段，此期胚胎发育易受环境因素影响。本实验结果提示，应警惕PCB<sub>153</sub>等环境雌激素类污染物对早期胚胎发育的危害。随着工业化的进程，环境雌激素的污染有进一步扩大的趋势，成为人类健康很大的潜在威胁因素。环境雌激素种类繁多，生活中人们可能同时接触多种这类物质，每种物质对生物体的危害是怎样的，相互间的

联合作用如何，以及它们的作用机制等都不是很清楚，还有待深入研究。

### 参考文献：

- [1] Canzoniero L M, Adornetto A, Secco A, et al. Involvement of the nitric oxide/protein kinase G pathway in polychlorinated biphenyl-induced cell death in SH-SY 5Y neuroblastoma cells [J]. J Neurosci Res, 2006, 84(3): 692~697.
- [2] Turci R, Marinaccio A, Balducci C, et al. Polychlorinated biphenyl serum levels in two Italian population groups; sex pattern and correlation with age [J]. Epidemiol Prev, 2006, 30(2): 100~107.
- [3] 赵泽文, 常青, 梁志清, 等. 应用小鼠体外全胚胎培养方法研究多氯联苯同系物PCB<sub>153</sub>对胚胎发育的影响[J]. 重庆医学, 2004, 33(5): 662~665.
- [4] 蔡文琴, 李海标. 发育神经生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 386.
- [5] Migheli A, Cavalla P, Marino S, et al. A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after *in situ* end-labeling of DNA strand breaks [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1994, 53(6): 606~616.
- [6] Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, et al. *In situ* apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations [J]. J Histochem Cytochem, 1996, 44(9): 959~968.
- [7] Mirkes P E. 2001 Warkany lecture: to die or not to die, the role of apoptosis in normal and abnormal mammalian development [J]. Teratology, 2002, 65(5): 228~239.
- [8] Torchinsky A, Fein A, Toder V. Teratogen-induced apoptotic cell death: does the apoptotic machinery act as a protector of embryos exposed to teratogens? [J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2005, 75(4): 353~361.
- [9] 孙昭. 胚胎发育的分期及发育表[J]. 四川解剖学杂志, 1999, 7(1): 61~64.

(编辑 王红)

## 关于医学符号的使用

医学符号学的里哪种字母，或者是大写或小写一律都用斜体，要注意区分拉丁字母和希腊字母。例如均数的符号是字母“ $\bar{x}$ ”，半数的符号是希腊字母“ $\chi$ ”，自由度的符号是希腊文“ $\nu$ ”，不足拉丁文“V”。样本的相关系数是“ $r$ ”，不能误为希腊文“ $\gamma$ ”。

化学元素及碱素在医学写前时一般多采用符号，都是拉丁字母正体大写。离子态是在右上角用数字加“+”或“-”表示，例如Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, P<sup>3-</sup>等，分子用Ca<sup>2+</sup>, P<sup>3-</sup>, Al<sup>3+</sup>, O<sup>2-</sup>表示。核素的核子数(质量数)应写在右上角，带符号的左上角，例如<sup>23</sup>I, <sup>32</sup>P。表示激发状态的m写在右上角，例如：<sup>133</sup>Te<sup>m</sup>, <sup>133</sup>In<sup>m</sup>。在科学论文和教科书中不属核素的中文名称，即不能写成其碘，例如<sup>133</sup>I, <sup>32</sup>P<sup>m</sup>, <sup>133</sup>In<sup>m</sup>。

近几年分子生物学发展很快，对医学资料许多学科，大多数分子生物学名词本语的符号尚有统一的确定形式，要对符号的来源及意义有深刻的理解，使相同的名称避免错误，例如：RNA有tRNA(ribosomal RNA), rRNA (transfer RNA), mRNA(messenger RNA)3种，拉丁m是表示类型的符号而小写，RNA是大写。