

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20161031001

魏明, 甘露, 龙卫红, 等. 苏丹红 I 对小鼠卵巢的损伤作用及对 Caspase-3 和 Ki-67 表达的影响[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(2): 88-93

Wei M, Gan L, Long W H, et al. Injury and expression of Caspase-3 and Ki-67 in ovary of mice exposed to Sudan I [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(2): 88-93 (in Chinese)

苏丹红 I 对小鼠卵巢的损伤作用及对 Caspase-3 和 Ki-67 表达的影响

魏明^{1,*}, 甘露², 龙卫红², 侯进¹, 邓雅婷¹, 陈玉龙³, 陈丽宏²

1. 西安医学院药理学教研室, 西安 710021

2. 陕西省人民医院妇科, 西安 710068

3. 西安医学院基础与转化医学研究所, 西安 710021

收稿日期: 2016-10-31 录用日期: 2016-12-20

摘要: 苏丹红是一种人工合成偶氮染料, 可引起肝脏及泌尿系统等多个脏器的肿瘤, 但苏丹红对生殖系统的毒性研究较少。本研究以昆明小鼠为受试对象, 探讨苏丹红 I 对小鼠卵巢组织 Caspase-3 和 Ki-67 表达的影响。将 24 只昆明小鼠随机分为: 对照组、低剂量(60 mg·kg⁻¹)、中剂量(120 mg·kg⁻¹)、高剂量(240 mg·kg⁻¹) 4 组, 6 只/组。胃灌 4 周, 4 周末处死。HE 染色观察各组卵巢组织病理变化, 免疫组化法检测卵巢组织 Caspase-3 和 Ki-67 表达, Real time PCR 检测卵巢组织 Caspase-3 和 Ki-67 mRNA 表达, Western blotting 检测卵巢组织中 Ki-67 及 Caspase-3 蛋白表达。与对照组比较, 实验组卵巢中 Caspase-3 阳性细胞率显著升高($P < 0.05$), 而 Ki-67 阳性细胞率显著降低($P < 0.05$), Real time PCR 及 Western blotting 结果与免疫组化法结果一致。本实验发现苏丹红染毒后颗粒细胞的 Caspase-3 表达增加, 且 Caspase-3 表达呈剂量依赖性, 但 Ki-67 表达受到抑制。

关键词: 苏丹红 I; 卵巢; Caspase-3; Ki-67

文章编号: 1673-5897(2017)2-088-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Injury and Expression of Caspase-3 and Ki-67 in Ovary of Mice Exposed to Sudan I

Wei Ming^{1,*}, Gan Lu², Long Weihong², Hou Jin¹, Deng Yating¹, Chen Yulong³, Chen Lihong²

1. Department of Pharmacology and Toxicology of Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China

2. Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China

3. Institute of Basic and Translational Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China

Received 31 October 2016 accepted 20 December 2016

Abstract: Sudan is a synthetic azo dye and can cause tumors in multiple organs including liver and urinary system, but the research in reproductive system toxicity is rare. The effect of Sudan I on the expression of Caspase-3 and Ki-67 in the ovarian tissue of mice was studied by gastric gavage. The 24 Kunming mice were randomly divided into 4 groups: control group, low dose (60 mg·kg⁻¹), medium dose (120 mg·kg⁻¹) and high dose (240 mg·kg⁻¹)

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究项目(2016JM8046, 2014JQ2-8055); 西安医学院校级重点建设学科资助项目(2015097); 陕西省卫计委重点项目(2014A); 陕西省教育厅重点科研攻关计划项目(16JS096); 西安医学院 2016 博士科研启动基金项目(2016DOC22)

作者简介: 魏明(1978-), 男, 博士, 研究方向为毒理学, E-mail: weiming@xiyi.edu.cn

group. Each group contained 6 mice. After gastric gavage for 4 weeks, the pathological changes were observed by HE staining. The expression of Caspase-3 and Ki-67 in ovary was detected by immunohistochemistry and the mRNA expression and protein expression of Ki-67 and Caspase-3 in mouse ovarian tissues were detected by real time PCR and western blotting. Compared with the control group, the rate of Ki-67 positive cells was significantly lower in high concentration group ($P < 0.05$). The rate of Caspase-3 positive cells was significantly increased ($P < 0.05$) in high concentration group and the results of PCR and western blotting were consistent with the immunohistochemical results. The Caspase-3 expression of ovarian granulosa cell was increased after SDI exposure, but the Ki-67 expression was inhibited.

Keywords: Sudan I; ovary; Caspase-3; Ki-67

苏丹红(Sudan)是一种人工合成偶氮染料,广泛用于化妆品、蜡类、溶剂、纺织品等^[1]。当前,苏丹红不允许用于食物,但在过去的 10 年中,苏丹红仍然在欧洲进口的食物中被发现^[2]。许多国家立法要求在进口食物中检测苏丹红的水平(Sudan I, II, III 和 IV)^[2]。在国内,一些不法商贩仍违规使用苏丹红,如将苏丹红 IV 添加到辣椒粉中,借以刺激人们的感官并增进食欲,严重威胁食用者的身体健康。文献报道,苏丹红 I 可以引起肝脏以及泌尿系统等多个脏器的肿瘤,此外,Sudan 进入体内后激活相关酶体系,在酶的催化作用下形成多种代谢产物,这些代谢产物可诱导细胞内核物质的损伤,或与 DNA、RNA 形成加合物,体内外实验均证实了 Sudan 的致突变作用^[3-5]。研究报道,Caspase-3 是凋亡信号转导通路中主要执行分子之一,其激活后导致细胞的不可逆性凋亡^[6]。而 Ki-67 是一种能识别存在于增殖细胞核基质内与细胞增殖相关的核蛋白,能反映组织细胞的增殖活性^[7]。本研究以昆明小鼠为实验动物,通过免疫组化、实时定量 RCR 及 Western blotting 技术,检测卵巢组织 Caspase-3 及 Ki-67 表达,探讨苏丹红 I 对小鼠卵巢组织的影响,确定其对小鼠生殖的毒性,以期研究苏丹红 I 的毒性和毒理作用提供参考,为全面评价苏丹红的毒性和毒理作用提供依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 材料

苏丹红 I(SDI)购自第四军医大学试剂中心;10 周龄体重 21~22 g 健康昆明小鼠,购自西安交通大学动物实验中心,实验动物许可证号:SCXK(陕)2012-003。小鼠饲养于 SPF 级动物实验室,保持恒温($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$),恒湿($55\% \pm 5\%$),照明情况为 12 h : 12 h(光照:黑暗)。每笼 6 只,实验期间自由饮水摄食。Caspase-3 大鼠抗小鼠多克隆抗体与 Ki-67 兔抗鼠多克隆抗体购自 CST 公司,即用型 SABC 免

疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组与处理

实验分为对照组,低、中、高 3 个剂量 SDI 实验组,每组随机分 6 只雌性昆明小鼠。实验组每日分别给小鼠胃灌 0.2 mL 浓度分别为 60、120 和 240 mg·kg⁻¹的 SDI 植物油,对照组小鼠胃灌 0.2 mL 植物油溶液,连续胃灌 28 d^[8]。

1.2.2 标本收集及 HE 染色

小鼠给药 4 周后处死。卵巢组织迅速置于 10% (体积分数)多聚甲醛溶液固定,常规脱水,二甲苯透明,60 °C 埋蜡。莱卡切片机切片,HE 染色,显微镜观察并拍照。

1.2.3 免疫组化

按照免疫组化常规步骤操作。切片脱蜡至水,6% (体积分数)H₂O₂-甲醇溶液浸泡去除内源性过氧化物酶,滴加正常羊血清(体积比为 1 : 10),置湿盒 37 °C 孵育 20 min,弃血清,用 1 : 100 (体积比)稀释的一抗 4 °C 孵育过夜,滴加生物素标记的二抗工作液,37 °C 孵育 1 h,滴加 HRP 标记的链酶卵白素工作液,37 °C 孵育 30 min,DAB 反应液中中止显色,上述各步骤之间均用 0.01 mol·L⁻¹、pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 3 次,每次 5 min。苏木素复染,透明封片。以 PBS 替代一抗作为阴性对照。细胞核呈棕黄色细颗粒状物质沉积,则为细胞核阳性反应,细胞核免疫阳性产物为清晰点状。若细胞核周围见棕黄色颗粒状物质沉积,则可判断为细胞浆阳性反应。通过免疫组化检测卵巢颗粒细胞 Caspase-3 及 Ki-67 表达情况。

1.2.4 图像分析及处理

Caspase-3 以细胞质或细胞核内出现棕黄色或棕褐色为凋亡阳性细胞,而 Ki-67 检测以细胞质或细胞核内出现棕黄色或棕褐色即为增殖细胞,每张

切片从左至右连续观察 10 个视野,分别计数 Caspase-3 及 Ki-67 表达阳性细胞数占总细胞数的比例,即分别为 Caspase-3 阳性细胞率和 Ki-67 阳性细胞率。

1.2.5 实时定量 PCR 检测各组卵巢组织 Caspase-3 和 Ki-67 mRNA 水平

收集各组卵巢组织,用 Trizol 法提取 RNA,反转录后定量备用,取 10 μ L 体系进行荧光定量 PCR,反应体系为:上下游引物各 0.4 μ L, cDNA 1 μ L, PCR Mix 5 μ L, ddH₂O 3.2 μ L。Primer5.0 设计引物。

β -actin 上游引物为 5'-ACAGCAACAGGGTGTGGAC-3', 下游引物为 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAATT-3'; Caspase-3 上游引物为 5'-TG-GTTGCCCTCTTACTTTGC-3', 下游引物为 5'-CCAGTGTCCAGCCATGATG-3'。

Ki-67 上游引物为 5'-AGCGTCAACAGG-GAGATG-3', 下游引物为 5'-CTTCAGAGACAGC-CAGGAG-3'。

1.2.6 Western blotting 检测各组卵巢组织中 Ki-67 及 Caspase-3 蛋白水平

取小鼠新鲜卵巢组织,提取蛋白后蛋白定量,SDS-PAGE 凝胶电泳,湿转法将蛋白质转移至 PVDF 膜,8% (体积分数)牛奶封闭 2 h, Ki-67、Caspase-3、 β -actin 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min, HRP 标记的二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 发光,曝光后扫描,以目的条带和内参照条带 β -actin 灰度比值表示 Ki-67 Caspase-3 蛋白水平。

1.2.7 统计学方法

结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析。多组均数间的比较采用单因素方差分析(Oneway ANOVA),检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果 (Results)

2.1 SDI 对小鼠卵巢损伤的病理结果

SDI 低剂量组 HE 染色与对照组比较,形态无明显差异,卵巢体积以及皮质各级卵泡基本正常,颗粒细胞无明显变化;中剂量组小鼠的卵巢体积缩小,皮质萎缩,各级卵泡均可见;高剂量组部分区域可见纤维组织增生,有间质小血管扩张充血,严重者卵巢皮质明显变薄,结构混乱,间质纤维化,卵泡数量明显减少,闭锁卵泡增多,成熟卵泡几乎不可见,黄体细胞明显增大变空,部分颗粒细胞水变性更明显。

2.2 SDI 对小鼠卵巢 Caspase-3 及 Ki-67 表达的影响

Caspase-3 蛋白阳性信号主要位于细胞质,少数核阳性,如图 2 所示。高剂量及中剂量 Caspase-3 的阳性率分别为 $55.39\% \pm 3.66\%$ 及 $31.25\% \pm 5.41\%$,与对照组比较, Caspase-3 在中高剂量卵巢组织中表达明显增加 ($P < 0.05$)。Ki-67 蛋白的阳性信号主要位于细胞质,高剂量及中剂量的 Ki-67 蛋白阳性率分别为 $14.81\% \pm 2.17\%$ 及 $19.95\% \pm 3.22\%$ 。与对照组比较, Ki-67 在 SDI 高剂量组卵巢组织中表达明显降低 ($P < 0.05$) 见图 2, 表 1。

表 1 各组卵巢中 Ki-67 及 Caspase-3 阳性细胞率 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 The rate of Ki-67 and Caspase-3 positive cell in ovary of each group ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别 Group	Ki-67	Caspase-3
对照组 Control	$45.32\% \pm 5.29\%$	$20.20\% \pm 4.21\%$
低浓度组($60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) Low concentration	$30.37\% \pm 4.73\%$	$26.46\% \pm 3.69\%$
中浓度组($120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) Median concentration	$19.95\% \pm 3.22\%^{* \#}$	$31.25\% \pm 5.41\%^{* \#}$
高浓度组($240 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) High concentration	$14.81\% \pm 2.17\%^{* \#}$	$55.39\% \pm 3.66\%^{* \#}$

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; 与低浓度组比较, # $P < 0.05$ 。

Note: * compared with the control group, $P < 0.05$; # compared with low concentration group, $P < 0.05$.

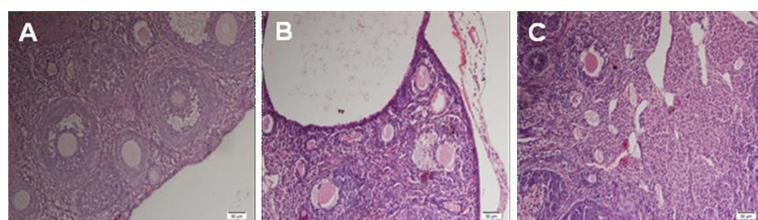


图 1 小鼠卵巢 HE 染色图 ($\times 200$) ($n=6$)

注: A-对照组, B-苏丹 I (SDI) 中浓度组 ($120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), C-SDI 高浓度组 ($240 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。

Fig. 1 Mouse ovarian HE staining ($\times 200$) ($n=6$)

Note: A-Control, B-Sudan I (SDI) median concentration group ($120 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), C-SDI high concentration group ($240 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

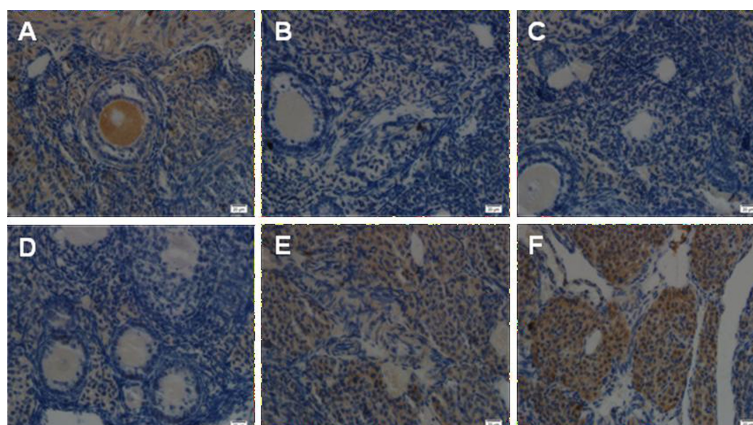


图 2 小鼠卵巢 Ki-67 及 Caspase-3 表达 (×400) (n=6)

注: A, Ki-67 在对照组中的表达; B, Ki-67 在 SDI 中浓度组中的表达; C, Ki-67 在 SDI 高浓度组中的表达; D, Caspase-3 在对照组中的表达; E, Caspase-3 在 SDI 中浓度组中的表达; F, Caspase-3 在 SDI 高浓度组中的表达。

Fig. 2 Mouse ovary Ki-67 and Caspase-3 expression (×400)(n=6)

Note: A, Ki-67 expression in the control group; B, expression of Ki-67 in SDI medium concentration group; C, expression of Ki-67 in SDI high concentration group; D, expression of Caspase-3 in the control group; E, expression of Caspase-3 in SDI medium concentration group; F, expression of Caspase-3 in SDI high concentration group.

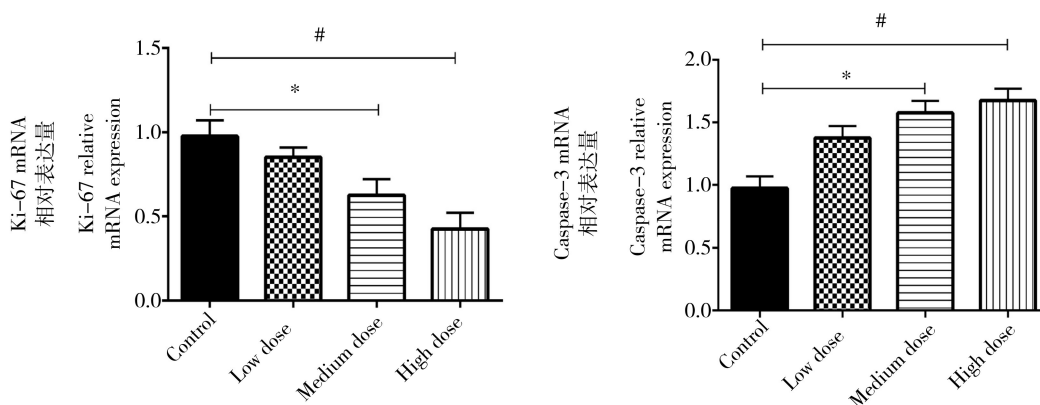


图 3 实时定量 PCR 检测小鼠卵巢组织 Ki-67 及 Caspase-3 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与对照组比较, # $P < 0.01$ 。

Fig. 3 The mRNA expression of Ki-67 and Caspase-3 in mouse ovarian tissues were detected by Real time PCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Note: * compared with the control group, $P < 0.05$; # compared with the control group, $P < 0.01$.

2.3 实时定量 PCR 检测小鼠卵巢组织 Ki-67 及 Caspase-3 mRNA 表达

如图 3 所示, 与对照组相比, 随着 SDI 剂量的增加, 小鼠卵巢组织 Ki67 表达逐渐减少, * $P < 0.05$ (与对照组比较), # $P < 0.01$ (与低剂量组比较)。然而, 随着 SDI 剂量的增加, 小鼠卵巢组织 Caspase-3 的表达逐渐增加, 与对照组比较有统计学差异, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ 。

2.4 Western Blotting 检测小鼠卵巢组织 Ki-67 及 Caspase-3 蛋白表达

如图 4 所示, 与对照组比较, 中剂量及高剂量

SDI 作用后, Ki-67 蛋白水平显著降低, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ 。然而, 中剂量及高剂量 SDI 作用后, Caspase-3 蛋白表达较对照组显著升高, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ 。

3 讨论 (Discussion)

卵巢颗粒细胞是体内产生合成雌激素的重要细胞。雌性动物体内的雌激素主要由卵巢颗粒细胞将卵泡膜细胞合成的睾酮和雄烯二酮转化为雌二醇及雌酮^[6]。SDI 是否对卵巢颗粒细胞产生了不良影响目前未见相关报道。本研究在 SDI 染毒后, 光镜下观察卵巢组织颗粒细胞结构的变化。与对照组相比,

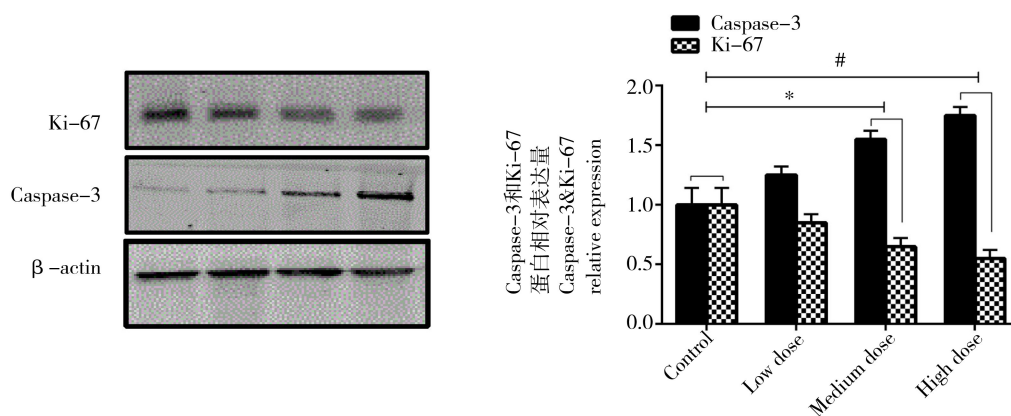


图4 Western Blotting 检测小鼠卵巢组织 Ki-67 及 Caspase-3 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与对照组比较,# $P<0.01$ 。

Fig. 4 The protein expression of Ki-67 and Caspase-3 in mouse ovarian tissues were detected by Western Blotting ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Note: compared with the control group, * $P<0.05$, # $P<0.01$.

SDI 低剂量组卵巢体积正常,卵巢皮质各级卵泡基本正常,颗粒细胞无明显变化。中剂量组小鼠的卵巢体缩小,皮质萎缩,各级卵泡均可见,但高剂量组部分区域可见纤维组织增生,有间质小血管扩张充血,严重者卵巢皮质明显变薄,结构紊乱,间质纤维化,卵泡数量明显减少,闭锁卵泡增多,成熟卵泡几乎不可见,黄体细胞明显增大变空,部分颗粒细胞水变性更明显。由此可见,卵巢的病理变化的程度与 SDI 有一定的剂量相关性。

Ki-67 是一种能识别存在于增殖细胞核基质内与细胞增殖相关的核蛋白,能反映组织细胞的增殖活性。作为增殖相关的核抗原,Ki-67 在细胞活动期(G1, S, G2 和 M)表达,但在细胞静息期(G0)缺失^[7]。Ki-67 水平在 G1 期和 S 期水平较低,但在有丝分裂的早期,Ki-67 水平迅速升高^[8],在有丝分裂的晚期表达迅速下降,Ki-67 的合成和降解在细胞周期的任何时候都被精确调控。因此它是重要的细胞增殖标志^[8-9]。本实验结果表明,实验组 Ki-67 总阳性细胞率明显降低。

目前研究发现,细胞凋亡是卵泡闭锁的根本机制,卵巢细胞凋亡的过程由多种基因参与完成,包括 Bcl-2/Bax、Caspase-3、Fas/FasL、C-myc 等^[10-11]。在参与凋亡调控的众多因子中,天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspases)起重要作用,其中 Caspase-3 是推动细胞凋亡的主要因素之一^[10-11]。文献报道也表明,卵巢闭锁及黄体萎缩退化时发生细胞凋亡,特别是颗粒细胞^[11]。因此,观察小鼠卵巢颗粒细胞 Caspase-3 表达变化,推测苏丹红 I 可能对性腺细胞

凋亡发挥作用。Caspase-3 通常以非活化的酶原形式存在于细胞质中,其活化通常有 2 条途径^[11-12]:一是经细胞膜表面受体如 Fas、TNFR1 等死亡受体介导的活化,外在通路的激活依赖于跨膜死亡受体的配体,属于肿瘤坏死因子超家族,配体涉及到炎症和细胞死亡程序,如 TNF- α 、CD95L 以及 TRAIL(TNF 相关的凋亡诱导配体);另一条途径是内在的线粒体通路,即死亡刺激因子如缺氧、活性氧(ROS)以及生长因子缺乏等作用下,线粒体释放细胞色素 C 及活化的 Caspase-3,通过裂解一系列底物而引起细胞凋亡^[13]。卵巢颗粒细胞与卵巢周期卵泡发育成熟关系密切,它的凋亡是诱导卵泡闭锁的重要因素^[14-15]。

本实验检测 SDI 染毒后卵巢组织颗粒细胞 Caspase-3 表达,发现 SDI 染毒后颗粒细胞的 Caspase-3 表达增加,且 Caspase-3 表达呈剂量依赖性,但 Ki-67 表达受到抑制。

通讯作者简介:魏明(1978-),男,博士,研究方向为毒理学。

参考文献 (References):

- [1] Rebane R, Leito I, Yurchenko S, et al. A review of analytical techniques for determination of Sudan I-IV dyes in food matrixes [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217: 2747-2757
- [2] Fonovich T M. Sudan dyes: Are they dangerous for human health [J]. Drug and Chemical Toxicology, 2013, 36: 343-352
- [3] Zhang X, Jiang L, Geng C, et al. Inhibition of Sudan I genotoxicity in human liver-derived HepG2 cells by the

- antioxidant hydroxytyrosol [J]. *Free Radical Research*, 2008, 42: 189-195
- [4] Stiborova M, Schmeiser H H, Frei E, et al. Enzymes oxidizing the azo dye 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) and their contribution to its genotoxicity and carcinogenicity [J]. *Current Drug Metabolism*, 2014, 15: 829-840
- [5] Zandoni T B, Lizier T M, Assis M, et al. CYP-450 isoenzymes catalyze the generation of hazardous aromatic amines after reaction with the azo dye Sudan III [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 57: 217-226
- [6] Laven J S, Fauser B C. What role of estrogens in ovarian stimulation [J]. *Maturitas*, 2006, 54: 356-362
- [7] Gerlach C, Sakkab D Y, Scholzen T, et al. Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy [J]. *Hepatology*, 1997, 26: 573-578
- [8] Pan H M, Feng J H, He G X, et al. Evaluation of impact of exposure of Sudan azo dyes and their metabolites on human intestinal bacteria [J]. *Anaerobe*, 2012, 18: 445-453
- [9] Li L T, Jiang G, Chen Q, et al. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review) [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 11: 1566-1572
- [10] Yerushalmi R, Woods R, Ravdin P M, et al. Ki67 in breast cancer: Prognostic and predictive potential [J]. *The Lancet Oncology*, 2010, 11: 174-183
- [11] Juraver-Geslin H A, Durand B C. Early development of the neural plate: New roles for apoptosis and for one of its main effectors caspase-3 [J]. *Genesis*, 2015, 53: 203-224
- [12] Boland K, Flanagan L, Prehn J H. Paracrine control of tissue regeneration and cell proliferation by Caspase-3 [J]. *Cell Death & Disease*, 2013, 4: 720-725
- [13] Poreba M, Strozyk A, Salvesen G S, et al. Caspase substrates and inhibitors [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2013, 5: 8673-8680
- [14] Lockshin R A, Zakeri Z. Caspase-independent cell death [J]. *Oncogene*, 2004, 23: 2766-2773
- [15] Choi J Y, Jo M W, Lee E Y, et al. The role of autophagy in follicular development and atresia in rat granulosa cells [J]. *Fertility and Sterility*, 2010, 93: 2532-2537 ◆