

张明,肖旭峰,邹静,等. 2010. 镉致仔猪辜丸支持细胞抗氧化酶活性降低及 DNA 损伤研究[J]. 环境科学学报, 30(10): 2065–2069

Zhang M, Xiao X F, Wu J, et al. 2010. DNA damage and decrease of cellular antioxidase activity in piglet sertoli cells exposed to cadmium[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 30(10): 2065–2069

# 镉致仔猪辜丸支持细胞抗氧化酶活性降低及 DNA 损伤研究

张明<sup>1,3</sup>, 肖旭峰<sup>2</sup>, 邹静<sup>1</sup>, 邓思君<sup>1</sup>, 袁莉芸<sup>1</sup>, 郭诚志<sup>1</sup>, 朱丽<sup>1</sup>, 袁慧<sup>1,\*</sup>

1. 湖南农业大学动物医学院, 长沙 410128

2. 江西农业大学农学院, 南昌 330045

3. 江西生物科技职业学院, 南昌 330200

收稿日期: 2010-01-17

修回日期: 2010-04-25

录用日期: 2010-06-13

**摘要:** 为了研究镉对仔猪辜丸支持细胞毒性影响, 以仔猪辜丸支持细胞为实验模型, 采用二步酶消化法分离支持细胞进行培养, 并通过油红 O 和免疫细胞化学方法进行鉴定, 探讨了 0、10、20、40、80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氯化镉对支持细胞的毒性作用. 结果表明, 二步酶消化法能分离出纯度较高的支持细胞, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  以上的氯化镉对支持细胞的生长具有抑制作用, 并能使支持细胞的丙二醛含量升高, 超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性下降, 造成支持细胞 DNA 损伤, 并随着氯化镉浓度的增大存在明显的剂量-效应关系.

**关键词:** 氯化镉; 支持细胞; 抗氧化酶; DNA 损伤

文章编号: 0253-2468(2010)10-2065-05

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

## DNA damage and decrease of cellular antioxidase activity in piglet sertoli cells exposed to cadmium

ZHANG Ming<sup>1,3</sup>, XIAO Xufeng<sup>2</sup>, WU Jing<sup>1</sup>, DENG Sijun<sup>1</sup>, YUAN Liyun<sup>1</sup>, GUO Chengzhi<sup>1</sup>, ZHU Li<sup>1</sup>, YUAN Hui<sup>1,\*</sup>

1. College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128

2. College of Agriculture, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045

3. Jiangxi Biotech Vocational College, Nanchang 330200

Received 17 January 2010;

received in revised form 25 April 2010;

accepted 13 June 2010

**Abstract:** This study was designed to explore the toxic effects of cadmium on piglet sertoli cells. Sertoli cells were isolated from piglet testes using a two-step enzyme digestion, followed by differential plating and were identified by oil red O staining and immunocytochemical methods. Piglet sertoli cells were cultured and classified into five groups, i. e., control group without cadmium chloride; and 4 separate groups exposed to 10, 20, 40 and 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  cadmium chloride. We found that highly purified sertoli cells were isolated by the two-step enzyme digestion and the sertoli cells' growth was inhibited by cadmium chloride at 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , compared with the control group. The MDA content was increased but the SOD and GSH Px activity of the sertoli cells were decreased by exposure to cadmium chloride at 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Moreover, DNA damage of sertoli cells was observed by cadmium chloride at 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and the damage showed a significant dose-effect relation with the increasing CdCl<sub>2</sub> concentration.

**Keywords:** cadmium chloride; sertoli cells; antioxidase; DNA damage

### 1 引言(Introduction)

镉是一种对动物和人体具有致畸和致癌作用

的重金属,特别是对肾、辜丸、肝等组织具有毒害作用,已被美国毒理委员会(ATSDR)列为危及人体健康的有毒物质之一(吴训伟,2000).随着工农业生

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目(No. GJJ09404); 湖南农业大学青年基金(No. 07QN06)

Supported by the Science and Technology Research Project of Jiangxi Provincial Department of Education (No. GJJ09404) and the Youth Foundation of Hunan Agricultural University (No. 07QN06)

作者简介: 张明(1969—),男,教授(博士), E-mail: zhming1970@yahoo.com.cn; \* 通讯作者(责任作者), E-mail: yuanhui7269@yahoo.com.cn

Biography: ZHANG Ming(1969—), male, professor(Ph. D.), E-mail: zhming1970@yahoo.com.cn; \* Corresponding author, E-mail: yuanhui7269@yahoo.com.cn

产的发展,镉的生产和使用量不断增加.研究表明,镉可通过采矿、冶炼精炼和电镀等行业排放的废水和废气等途径进入环境从而造成污染,或伴随饲料添加剂进入动物体内(农英相,2002),并通过食物链进入人体.由于镉是半衰期很长(通常在20年以上)的多器官、多系统有毒物质,且在动物体内容易蓄积,不易分解,因此,镉对动物、人体和食品安全等已构成了渐进性威胁,并因为其残留问题会进一步造成对环境的污染(魏筱红等,2007).

研究表明,睾丸是镉的靶器官,镉能够损伤睾丸组织并减少精子的生成(Fowler *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2003; Bennoff *et al.*, 2004; Goyer *et al.*, 2004; 苏念军等,2004).但目前关于镉对睾丸组织内细胞毒性的研究大都是针对生精细胞,有关镉对睾丸支持细胞,特别是猪睾丸支持细胞毒性研究的报道还较为罕见.因此,本试验以体外培养的仔猪睾丸支持细胞为试验对象,采用二步酶消化法分离和培养仔猪睾丸支持细胞,通过油红O和免疫细胞化学方法进行鉴定,并测定氯化镉对支持细胞抗氧化酶活性的影响.同时,通过彗星试验测定氯化镉对支持细胞DNA损伤的影响,以期为镉对雄性生殖毒性研究提供参考.

## 2 材料和方法 (Materials and methods)

### 2.1 材料和试剂

仔猪睾丸采自湖南长沙本地3~4周龄大长白仔猪,并置于冰浴磷酸缓冲液(PBS,含双抗 $600\text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ )中,2h内送至实验室;免疫细胞化学检测试剂盒购置于武汉博士德公司;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒购置于南京建成生物公司.

### 2.2 支持细胞的分离、培养和鉴定

支持细胞的分离、培养和鉴定是在Mauro等(2003)方法的基础上并加以改进.首先,将仔猪睾丸在无菌条件下剪除附睾等其他组织,剥离被膜和曲细精管,再将睾丸组织剪成 $1\sim 2\text{ mm}^3$ 的小块;采用 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胶原酶和 $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰酶进行消化,并收集细胞重新混悬于培养液中,采用自然沉降和低速离心法去除血细胞和间质细胞;用0.4%苔酚蓝染色鉴定细胞活率.然后调整细胞密度至 $2\times 10^6\text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$ 进行培养,培养液为含10%胎牛血清的DMEM/F12,培养条件为:温度 $34^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5%,湿度100%;24h后吸去培养液,用 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Tris-

HCl处理5min以去除精原细胞;换新培养基培养.最后,等细胞铺满培养板底部80%~90%后用油红O和免疫细胞化学方法进行鉴定.

### 2.3 细胞抑制试验

试验分为5组,对照组为不含氯化镉的DMEM/F12培养基,其他处理组分别为含10、20、40、 $80\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉的DMEM/F12培养基.24h后收集细胞进行试验,重复4次.用四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定氯化镉对细胞抑制情况,具体方法参照文献(Mosmann,1983;He *et al.*, 1998).

### 2.4 SOD、MDA、GSH-Px 检测

SOD、MDA、GSH-Px的检测参照南京建成生物公司试剂盒说明书进行.

### 2.5 支持细胞DNA损伤的检测

支持细胞DNA损伤的检测参照Singh等(1988)的方法并稍加改进,裂解时间延长为2h,解旋时间1h,电泳时间为40min.玻片置荧光显微镜下观察,每组共计数400个细胞(每组做4个平行片,每片计数100个细胞).图像分析采用彗星图像分析软件CASP(comet assay software project)对随机选取的每个细胞DNA彗星图像进行分析.采用尾部DNA含量(tail DNA)、尾长、尾矩、Olive尾矩(olive tailmoment)作为衡量DNA损伤程度的指标,其中,tail DNA为彗星尾部DNA量占总DNA量的百分比,用于表征迁移的DNA量;尾长为彗星头部中心到尾部末尾的距离,用于表征DNA迁移的距离;尾矩为彗星头部的右边界到彗星尾部末端的距离与尾部DNA含量的乘积,是表征DNA损伤的综合指标之一;Olive尾矩为头光密度重心到尾光密度重心的距离与尾部DNA含量的乘积,也是表征DNA损伤的综合指标之一.

### 2.6 数据处理

利用SPSS 13.0软件进行统计分析,数据结果以平均值 $\pm$ 标准差( $\text{Mean}\pm\text{SE}$ )表示,以 $p<0.05$ 为差异显著标准, $p<0.01$ 为差异极显著标准.

## 3 结果 (Results)

### 3.1 支持细胞

采用二步酶解法分离得到的支持细胞大约占活细胞总数的90%以上.培养24h后,支持细胞呈宽大的柱状或不规则形状,胞体大且被拉长,细胞贴壁铺展,相临细胞交织连接,呈镶嵌状排列,细胞间隙不规则,两侧有多个突起,折光性较强,在胞质

中可见吞噬物和大小不等的空泡,细胞胞核也可以见到.油红 O 染色显示,在支持细胞胞质的两极或细胞核的四周出现红色圆形脂肪滴(图 1a).免疫细胞化学染色表明,培养 72h 的细胞中高度表达 FasL,胞浆染为黄棕色(图 1b),说明培养的细胞为睾丸支持细胞.

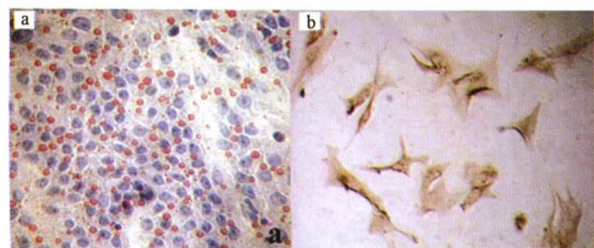


图 1 支持细胞的形态(a.油红 O 染色睾丸支持细胞,400 ×;b.支持细胞 FasL 表达免疫细胞化学染色,400 ×)  
Fig.1 Sertoli cell morphology(a. Identification of sertoli cells by oil red O staining, 400 ×; b. Identification of sertoli cells by immunocytochemistry, 400 ×)

3.2 镉对仔猪睾丸支持细胞抑制率的影响

用 MTT 法观察不同浓度氯化镉处理 24h 后对睾丸支持细胞增殖的影响,结果见表 1.从表 1 可知,随着氯化镉浓度的加大,睾丸支持细胞生长所受到的抑制也越来越强.与对照组相比,10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理组能使支持细胞的生长受到显著抑制;其余各组也均能使支持细胞生长受到抑制,且与对照组相比差异极显著.同时,从表 1 还可知,氯化镉对支持细胞生长的毒性抑制作用在试验浓度范围内存在剂量-效应关系.

表 1 氯化镉的对睾丸支持细胞抑制率的影响

| CdCl <sub>2</sub> 浓度/<br>( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | OD <sub>490</sub> | 抑制率     |
|----------------------------------------------------------------|-------------------|---------|
| 0                                                              | 0.757 ± 0.036     | 0       |
| 10                                                             | 0.695 ± 0.053 *   | 8.190%  |
| 20                                                             | 0.561 ± 0.041 **  | 25.892% |
| 40                                                             | 0.384 ± 0.045 **  | 49.273% |
| 80                                                             | 0.127 ± 0.028 **  | 82.223% |

注:同列间与阴性对比较, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; OD<sub>490</sub> 为 490nm 处的吸光度,用于表征支持细胞的生长情况.

3.3 镉对睾丸支持细胞抗氧化酶活性的影响

本实验检测了不同浓度氯化镉处理后睾丸支持细胞中的 MDA 含量、SOD 活性和 GSH-Px 活性(表 2).由表 2 可知,在 MDA 检测中,10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理组与对照组相比 MDA 含量升高,且差异显著,其

余各处理组同对照组相比差异极显著,并且随着氯化镉剂量的增大 MDA 含量也在升高,呈现一定的剂量-效应关系.但 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理组与 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理组相比,MDA 含量有所降低.在 SOD 检测中,各处理组与对照组相比 SOD 活性降低,10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理组与对照组相比差异显著,其余各组与对照组相比差异极显著,并且随着镉剂量的增加 SOD 活性也随之降低,呈现一定的剂量-效应关系. GSH-Px 活性检测中,各处理组与对照组相比活性降低,10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理组与对照组相比差异显著,其余各组与对照组相比差异极显著,并且随着镉剂量的增加 GSH-Px 活性也随之降低,呈现一定的剂量-效应关系.

表 2 MDA 含量、SOD 活性和 GSH-Px 活性的变化

| CdCl <sub>2</sub> 浓度/<br>( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | MDA 含量/<br>( $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) | SOD 活性/<br>( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) | GSH-Px 活性/<br>( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 0                                                              | 3.239 ± 0.278                                   | 253.316 ± 28.694                             | 21.327 ± 5.483                                  |
| 10                                                             | 3.985 ± 0.542 *                                 | 240.379 ± 23.867 *                           | 18.625 ± 3.226 *                                |
| 20                                                             | 4.755 ± 1.034 **                                | 200.392 ± 25.831 **                          | 16.437 ± 4.238 **                               |
| 40                                                             | 8.157 ± 0.857 **                                | 137.372 ± 22.614 **                          | 12.082 ± 3.731 **                               |
| 80                                                             | 6.236 ± 1.341 **                                | 94.134 ± 19.458 **                           | 10.269 ± 3.235 **                               |

注:同列间与阴性对比较, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; U 定义为在正常生理条件下,1min 内转化 1  $\mu\text{mol}$  底物,或者底物中 1  $\mu\text{mol}$  有关基团所需的酶量.

3.4 镉对睾丸支持细胞 DNA 损伤的影响

从荧光显微图像(图 2)上可以看出,对照组细胞核 DNA 基本完整,呈紧密球状,荧光强度较大,拖尾细胞很少;而氯化镉处理组大多数细胞核 DNA 有明显拖尾,呈现典型的彗星状.从表 3 可以看出,对照组和 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理组在尾部 DNA 百分含量、尾长、尾矩、Olive 尾矩 4 个彗星参数均上均没有显著差异( $p > 0.05$ );20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  处理组的 4 个彗星参数值均显著高于对照组( $p < 0.05$ ),分别是对照组的 269%、183%、415% 和 442%. 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和

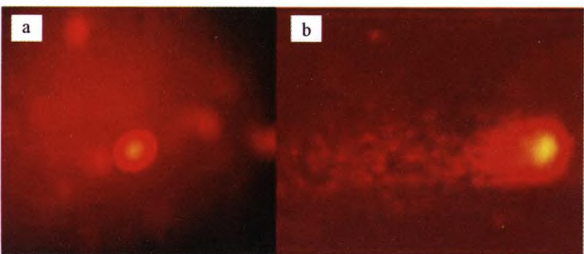


图 2 彗星试验照片(a.阴性对照组,400 ×;b.氯化镉组,400 ×)  
Fig.2 The photo of comet assay(a. DNA image of control group, 400 ×; b. DNA image of treated group,400 ×)

80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组同对照组相比,4个彗星参数具有极显著差异( $p < 0.01$ ).在试验浓度范围内,支持细胞损伤情况随着氯化镉浓度的增加,损伤程度

逐渐加重,损伤严重的细胞比率也随之增加,DNA的总体损伤水平逐渐加重,表现出明显的剂量-效应关系.

表 3 不同浓度氯化镉对支持细胞 DNA 损伤结果  
Table 3 Effect of different concentrations of cadmium on DNA damage in sertoli cells

| CdCl <sub>2</sub> 浓度<br>/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | 细胞数 | tail DNA              | 尾长/ $\mu\text{m}$   | 尾矩                  | Olive 尾矩            |
|----------------------------------------------------------------|-----|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 0                                                              | 400 | 5.16% $\pm$ 0.62%     | 9.10 $\pm$ 1.84     | 1.14 $\pm$ 0.32     | 0.86 $\pm$ 0.34     |
| 10                                                             | 400 | 6.23% $\pm$ 0.51%     | 11.06 $\pm$ 1.97    | 1.39 $\pm$ 0.43     | 1.02 $\pm$ 0.37     |
| 20                                                             | 400 | 13.89% $\pm$ 3.39% *  | 16.61 $\pm$ 4.96 *  | 4.73 $\pm$ 0.85 *   | 3.87 $\pm$ 0.51 *   |
| 40                                                             | 400 | 24.26% $\pm$ 6.72% ** | 29.33 $\pm$ 5.92 ** | 16.02 $\pm$ 3.79 ** | 13.25 $\pm$ 3.48 ** |
| 80                                                             | 400 | 60.24% $\pm$ 9.75% ** | 44.65 $\pm$ 8.75 ** | 69.37 $\pm$ 8.79 ** | 51.03 $\pm$ 8.21 ** |

注:同列间与阴性对照比较; \* 表示  $p < 0.05$ , \*\* 表示  $p < 0.01$ .

4 讨论 (Discussion)

镉作为重金属毒素可伴随氧化锌或者作为环境毒素进入动物体内,并可通过食物链进入人体.镉在动物机体、人体及生态环境中的蓄积和破坏作用已引起人们的高度重视.目前,针对镉毒性的研究较多,但有关镉对睾丸支持细胞毒性的研究报道较少,任绪义等(2003)研究发现,镉能诱导大鼠睾丸支持细胞 MT 的表达进而造成睾丸组织损伤.本实验进一步揭示了镉对睾丸支持细胞的生长具有抑制作用并呈现剂量-效应关系,这为临床上镉对雄性生殖细胞的毒性作用机理作出了部分解释.

氧化应激是指因氧化剂和抗氧化剂的平衡被破坏而对机体造成的潜在伤害,即当氧自由基的产生超过机体抗氧化防御体系清除能力或机体防御体系受损而不能发挥正常功能时导致的细胞毒性效应.机体抗氧化酶防御系统主要包括 SOD 和 GSH-Px 等,SOD 是一种广泛存在于生物体内与细胞氧化代谢密切相关的蛋白质,是活性氧自由基的天然消除剂,也是抗氧化酶系中最先与活性氧自由基结合的酶类.SOD 能特异性结合体内超氧阴离子,且可与 GSH-Px 协同作用防止脂质过氧化及其代谢产物对机体的损害(Zhang *et al.*, 2005),还可直接捕捉和清除超氧阴离子等自由基(Alul *et al.*, 2003),其主要作用机理是通过氢原子供体的作用阻断或终止自由基连锁反应链,从而阻止和抑制氧自由基反应和脂质过氧化反应的病理性加剧,起到抗氧化作用.GSH-Px 能催化过氧化氢的还原反应,对由活性氧和羟自由基诱发的脂质过氧化物及过氧化氢有极强的清除能力,从而保护生物大分子和生物膜结构免受过氧化物损伤(Sairam *et al.*,

2003).本研究通过检测氯化镉对支持细胞 SOD、GSH-Px 的活性以及氧化代谢产物 MDA 的含量发现,氯化镉对细胞抗氧化酶类的活性具有抑制作用,能引起 SOD 和 GSH-Px 活性的降低,使 MDA 含量增高.抗氧化应激的各种酶活性的降低,势必引起细胞抵抗氧化损伤能力的下降,降低细胞自身对活性氧、过氧化脂质等有害因素所致损伤的保护能力,当这种损伤超过细胞自身的修复能力时必将引起细胞凋亡或坏死.本研究发现,80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉组的 MDA 含量较 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组有所降低,这可能是由于镉的浓度较大,部分细胞坏死脱落造成细胞数量下降所致.MDA 被广泛用于反映机体内脂质过氧化损伤的程度,可引起细胞 DNA 损伤、细胞功能改变、基因毒性以及癌症启动等多种细胞损伤(Korchazhkina *et al.*, 2003; Ozguner *et al.*, 2005).细胞 DNA 损伤是 MDA 最主要的作用结果之一.

本研究通过改良优化的彗星试验检测氯化镉对支持细胞 DNA 的损伤,克服了传统方法效率低、易脱胶、污染大、程序复杂、不能保存等缺点,而且适合批量操作、成本低廉.试验结果显示,对照组支持细胞彗星实验 DNA 荧光图像大多数呈现紧密球状,很少有细胞拖尾,尾部 DNA 百分含量、尾长、尾矩、Olive 尾矩 4 项主要彗星指标数值都比较低,说明细胞核 DNA 非常完整.随着镉浓度的增加,支持细胞的 DNA 发生电泳迁移,其彗星试验 4 个参数逐渐增加,呈现明显剂量-效应关系(表 3).说明镉处理可导致睾丸细胞的 DNA 损伤.而 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镉组的 Olive 尾矩值明显增加,表明大剂量镉可引起支持细胞凋亡.这一结果与姜声扬等(2003)的研究一致,说明镉能造成支持细胞 DNA 损伤.

## 5 结论(Conclusions)

氯化镉能抑制仔猪睾丸支持细胞的生长,抑制率随氯化镉浓度的增加而增加。 $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  以上的氯化镉能使支持细胞的 MDA 含量升高, SOD, GSH-Px 活性下降,造成支持细胞 DNA 损伤,并随着氯化镉浓度的增大存在明显的剂量-效应关系,从而造成睾丸组织的损伤,最终导致猪繁殖能力的下降。

**责任作者简介:**袁慧(1947—),教授、博士生导师,主要从事动物中毒和毒理学研究。

## 参考文献(References):

- Alul R H, Wood M, Lonjo J, *et al.* 2003. Vitamin C protects low density lipoprotein from homocysteine mediated oxidation [J]. *Free Radic Biol Med*, 34 (7):881—889
- Benhoff S H, Millan C, Hurley I R, *et al.* 2004. Bilateral increased apoptosis and bilateral accumulation of cadmium in infertile men with left varicocele[J]. *Hum Reprod*, 19(3): 616—627
- Fowler P A, Murray T, Abramovich D R, *et al.* 2002. Environmental chemical effects on testicular function[J]. *Reproductive Medicine Review*, 10(2):77—100
- Goyer R A, Liu J, Waalkes M P. 2004. Cadmium and cancer of prostate and testis[J]. *Biometals*, 17(5):555—558
- He Q, Jiang D Z. 1998. A novel aminosteroid is active for proliferation inhibition and differentiation induction of human myeloid leukemia HL-60 cell line[J]. *J Exp Hematol*, 6(4):287—292
- 姜声扬,庄勋,朱晓蓉,等. 2003. 镉对小鼠睾丸细胞 DNA 损伤及锌保护作用研究[J]. *中国公共卫生*, 19(12):1450—1452
- Jiang S Y, Zhuang X, Zhu X R, *et al.* 2003. Effect of subchronic cadmium exposure on DNA damage of testicle cells in mice and protective effect of zinc sulfate[J]. *China Public Health*, 19(12): 1450—1452(in Chinese)
- Korchazhkina O, Hristopher E C, Spencer S A. 2003. Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatisation with 2,4-dinitrophenylhydrazine[J]. *J Chromatogr B*, 794:353—362
- Maccarrone M, Ceconi S, Rossi G, *et al.* 2003. Anandamide activity and degradation are regulated by early postnatal aging and follicle-stimulating hormone in mouse sertoli cells[J]. *Endocrinology*, 144 (1):20—28
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 65(1-2):55—63
- 农英相. 2002. 饲料级硫酸锌卫生指标中的镉检测报告[J]. *广西农业科学*, 5:260
- Nong Y X. 2002. Determination of cadmium in the hygiene index of feed grade sulfate[J]. *Guangxi Agricultural Science*, 5:260(in Chinese)
- Ozguner F, Koyu A, Cesur G. 2005. Active smoking causes oxidative stress and decreases blood melatonin levels[J]. *Toxicol Ind Health*, 21(1-2):21—26
- 任绪义,周雍,张建鹏,等. 2003. 镉暴露大鼠睾丸支持细胞金属硫蛋白表达的时相研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 30(6): 965—968
- Ren X Y, Zhou Y, Zhang J P, *et al.* 2003. Expression of metallothionein gene at different time in testicular interstitial cells and liver of rats treated with cadmium [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 30(6):965—968(in Chinese)
- Sairam R K, Singh D V, Srivaatava G C. 2003. Changes in activities of antioxidant enzymes in sunflower leaves of different age[J]. *Biol Plant*, 47(1):61—66
- Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al.* 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell[J]. *Exp Cell Res*, 175 (2):184—191
- 苏念军,朱伟杰,李菁. 2004. 镉对雄(男)性生殖系统的毒性影响[J]. *生殖与避孕*, 24(2):103—107
- Su N J, Zhu W J, Li J. 2004. Toxic effects of cadmium chloride on male reproduction system [J]. *Reproduction and Contraception*, 24(2): 103—107(in Chinese)
- 魏筱红,魏择义. 2007. 镉的毒性及其危害[J]. *公共卫生与预防医学*, 18(4): 44—46
- Wei X H, Wei Z Y. 2007. Toxicity and hazard of cadmium [J]. *Journal of Public and Preventive Medicine*, 18(4): 44—46(in Chinese)
- 吴训伟. 2000. 镉与细胞凋亡[J]. *卫生毒理学杂志*, 14(4): 247—249
- Wu X W. 2000. Cadmium and apoptosis [J]. *Journal of Health Toxicology*, 14(4):247—249 (in Chinese)
- Zhang Y M, Ji L L. 2005. Soy isoflavones lowers blood lipid of atherosclerotic rat[J]. *Chin Prev Med*, 6(1):124