短篇论著

文章编号:1000-5404(2014)16-1758-03

全氟辛酸对雄性小鼠精子质量及睾丸相关酶活力的影响

王 力[1],刘 辉[2] (233030 安徽 蚌埠,蚌埠医学院:预防医学系营养与食品卫生学教研室[1];生物科学系遗传学教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨全氟辛酸(perfluorooctanoic acid,PFOA)对雄性小鼠精子质量及睾丸相关酶活力的影响,分析PFOA对雄性小鼠生殖毒性的可能机制。**方法** 40只SPF级成年ICR种小鼠采用随机数字表法分为对照组、低(1 mg/kg)剂量组、中(5 mg/kg)剂量组、高(25 mg/kg)剂量组,每组10只。采用灌胃方式进行染毒,每周3次,连续35 d,染毒结束后计算睾丸、附睾脏器系数,进行形态学观察,并统计精子数、活动度和畸形率。制备组织匀浆,测定超氧化物歧化酶(super oxidase dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)、山梨醇脱氢酶(sorbitol dehydrogenase,SDH)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)及一氧化氮(nitric oxide,NO)几种指标的水平。**结果** 高剂量PFOA能增高睾丸组织中MDA的含量,降低SOD、SDH、LDH及GSH-Px活性($P<0.05$, 0.01),中、高剂量组的精子数量明显下降,活动度差。**结论** PFOA能造成小鼠睾丸一定的脂质过氧化损伤,中、高剂量PFOA抑制了精子数量,降低了精子质量及活动能力。

[关键词] 全氟辛酸;精子质量;氧化损伤

[中图法分类号] R321.1;R322.64;R994.6 [文献标志码] A

全氟辛酸(perfluorooctanoic acid, PFOA)是全氟化合物(perfluorinated compounds,PFCs)的一种,被广泛应用于各个领域。因其结构特性很难被分解,在自然界中可以持久性存在,通过食物链的富集作用,高浓度地蓄积在动物和人的体内[1]。研究表明,PFOA具有肝脏毒性、免疫毒性、生殖毒性等[2]。最近,在一个以夫妻为基础的前瞻性队列研究中,观察到持久性环境化学物与生殖能力降低相关联[3]。本实验以成年雄性ICR小鼠为对象,研究在不同剂量PFOA作用下小鼠精子质量及睾丸相关的酶活力的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂全氟辛酸(perfluorooctanoic acid,PFOA)(sigma公司,美国);超氧化物歧化酶(super oxidase dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)、山梨醇脱氢酶(sorbitol dehydrogenase,SDH)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、一氧化氮(nitric oxide,NO)及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);722 s仪器型分光光度计(上海分析仪器厂)。

1.2 实验动物

ICR种小鼠40只,SPF级,体质量20~23 g,购自安徽省实验动物中心,合格证号码为scxk(皖)2011-002,于蚌埠医学院实验动物中心屏障系统饲养,光照周期为12 h∶12 h(昼∶夜),温度控制为20~26 ℃,相对湿度为40%~60%,并具有独立通风循环系统,自由进食饮水。参考郎朗等[4]的染毒剂量,参考其低浓度组的1/16 LD50染毒剂量确定高剂量组浓度,设置正常对照组(生理盐水)、低剂量染毒组(1 mg/kg PFOA)、中剂量染毒组(5 mg/kg PFOA)和高剂量染毒组(25 mg/kg PFOA),每组10只。采用灌胃方式进行染毒,每周3次,连续35 d。

1.3 实验方法

1.3.1 脏器系数测定 染毒结束后称量体质量,颈椎脱臼法处死,立即取出睾丸和附睾,称量质量,计算脏器指数(mg/g)=脏器质量(mg)/体质量(g)。

1.3.2 精子计数、精子活动度和精子畸形率测定 取左侧附睾尾,制备精子悬液。参照范轶欧等[5]的人工方法进行精子计数和畸形率测定,取单侧附睾尾制备精子悬液,将悬液置于37 ℃恒温水浴孵育20 min,用高倍镜观察精子活动度,将精子活动度分为4级:Ⅰ级为精子活动良好,呈直线泳动;Ⅱ级为精子活动比较活泼,呈曲线泳动;Ⅲ级为精子活动迟缓,原地打转;Ⅳ为精子不活动。活动率=(Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ)/(Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ+Ⅳ)×100%。最后60 ℃水浴处死剩余精子,按红细胞计数法计数精子浓度,染色后镜检计数计算精子畸形率。

1.3.3 睾丸酶活测定 取部分睾丸,称量,加4 ℃生理盐水制成10%的匀浆,于3 000 r/min离心10 min,取上清液,按试剂盒要求,检测各种酶活力指标。

1.4 统计学分析

用SPSS 19.0软件进行数据处理。数据经正态性检验,结果用$\bar{x}\pm s$表示,进行单因素方差分析和q检验。

[基金项目] 安徽省高校优秀青年人才基金(2012SQRL091);蚌埠医学院自然科学研究课题(Byky1203)

[通信作者] 刘 辉,E-mail:shooterlau1220@aliyun.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140224.1724.009.html(2014-02-24)

2 结果

2.1 PFOA对小鼠睾丸及附睾指数、精子数量、畸形率的影响

从表1中可以看出,各处理组和对照组之间睾丸指数、附睾指数都没有明显的差异。中高剂量组的精子数量明显减少,畸形率明显上升($P<0.01$)。

表1 PFOA对雄性小鼠睾丸附睾指数、精子数量、畸形率的影响 ($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	睾丸指数 (mg/g)	附睾指数 (mg/g)	精子数量 ($\times10^7$/g附睾)	畸形率 (%)
正常对照组	5.65±0.22	1.83±0.11	4.31±0.10	0.44±0.03
低剂量染毒组	5.97±0.16	1.98±0.08	3.95±0.11	0.47±0.04
中剂量染毒组	6.40±0.30	2.20±0.15	3.43±0.12[a]	1.97±0.08[ab]
高剂量染毒组	5.87±0.46	2.43±0.23	3.20±0.09[a]	2.48±0.11[ab]
F	1.960	1.917	22.346	34.086
P	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01

a: $P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与低剂量染毒组比较

2.2 PFOA对小鼠精子活动度的影响

从各级精子活动度的构成比来看,中高剂量组与对照组相比都有明显变化,总的精子活动率,中高剂量组出现了明显的下降($P<0.01$)。见表2。

表2 PFOA对雄性小鼠精子活动率的影响 ($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	活动度分级				活动率(%)
	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	
正常对照组	20.8±0.98	40.3±1.00	10.9±0.79	4.1±0.31	94.58±0.45
低剂量染毒组	19.7±0.58	37.2±1.09	11.7±0.49	4.4±0.37	93.97±0.49
中剂量染毒组	9.5±0.70[a]	19.8±0.68[a]	15.6±0.63[a]	15.7±0.55[a]	74.04±0.99[a]
高剂量染毒组	4.8±0.42[a]	13.7±0.77[a]	12.3±0.42	23.1±1.6[a]	57.41±2.06[a]
F	123.68	207.53	11.67	110.00	223.89
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

a: $P<0.01$,与正常对照组比较

2.3 PFOA对小鼠睾丸组织抗氧化能力的影响

与对照组相比,中高剂量染毒组中,小鼠睾丸组织中GSH-PX和T-SOD的活性都出现了明显下降($P<0.01$)。见表3。SDH与LDH的活性在高剂量染毒组中也明显低于对照组(表3、4)。而高剂量染毒组中MDA的含量显著高于对照组,NO的含量没有明显变化(表4)。

表3 PFOA对小鼠睾丸组织中GSH-PX、T-SOD、SDH活性的影响 ($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	GSH-PX (U/mg)	T-SOD (U/mg)	SDH (U/mg)
正常对照组	22.38±0.47	148.69±27.22	9.84±0.42
低剂量染毒组	7.94±2.17[a]	109.47±14.97	7.40±0.28
中剂量染毒组	7.24±0.91[a]	50.45±4.74[a]	5.48±0.66[b]
高剂量染毒组	6.36±1.58[a]	28.11±4.38[a]	3.81±0.84[a]
F	2.747	5.244	7.734
P	<0.05	<0.01	<0.01

a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与正常对照组比较

表4 PFOA对小鼠睾丸组织中MDA含量、NO含量、LDH活性的影响 ($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	MDA (nmol/mg)	NO (μmol/g)	LDH (U/g)
正常对照组	0.37±0.25	2.81±0.38	831.38±15.76
低剂量染毒组	0.75±0.18	3.63±1.46	890.17±61.36
中剂量染毒组	1.25±0.12	4.28±1.83	602.28±113.38
高剂量染毒组	4.64±0.56[a]	7.76±2.16	396.67±53.11[a]
F	19.777	1.544	10.195
P	<0.01	>0.05	<0.01

a: $P<0.01$,与正常对照组比较

3 讨论

酶系统的稳定与正常是维持精子发生的必不可少的[6]。持久性环境化学物与生殖能力降低相关联[3]的研究已引起重视,PFOA作为一种在生活中广泛运用的化合物,其生殖毒性也值得进一步的探讨。范轶欧等[5]研究了全氟辛烷磺酸对雄性大鼠生精功能的影响,表明全氟辛烷磺酸能造成雄性大鼠生精功能的下降。全氟辛磺烷酸和全氟十碳羧酸暴露可致大鼠睾丸重量显著降低,睾丸功能出现退行性变化[7],这点与本实验结果不同,本实验结果显示,一定剂量的PFOA可以对雄性小鼠的生殖指标造成影响,主要体现在精子数量、质量及活动能力的下降,且具有一定的剂量效应,但是从脏器系数上来看,并没有显著性差别,高剂量PFOA能增高睾丸组织中MDA的含量,降低SOD、SDH、LDH及GSH-Px活性。这可能是由于睾丸有被膜包被,不像肝脏等器官那样有明显的肿大充血[4],所以PFOA可能并未对睾丸本身产生了剧烈的实质性的损伤,但是影响了相关酶的活性从而引起精子数量、质量及活动能力的下降。

SOD、GSH-Px是细胞内主要的抗氧化酶,其活性的高低反映了机体清除自由基的能力[7],自由基在正常新陈代谢中不断地产生,产生和清除处在一个动态平衡状态时,不会对组织和细胞产生大的伤害。一旦由于某些原因导致自由基过量无法正常清除,就会介导脂质过氧化作用造成机体各种损伤,MDA则是公认的自由基攻击引起氧化损伤的标志性产物[8],其含量的多少可以直接反映出细胞遭受氧化损伤的程度。本实验条件下,中高剂量组SOD、GSH-Px活性的显著性下降及高剂量MDA含量的显著性上升,表示PFOA可能影响了正常的脂代谢,从而介导大量的自由基产生,进而引起氧化损伤。而SDH与LDH是参与精子发生及供能的两个关键酶[8],其活性可作为评价三羧酸循环运行程度的指标,也可以作为精子成熟和功能完善

的标志酶,在本实验中,这两种酶的活力与对照组相比有下降的趋势,并且在高剂量组中有显著性的下降,PFOA可能是通过干扰线粒体的三羧酸循环,降低能量代谢,从而影响精子成熟和供能。NO是一种双重作用的物质,低浓度时可以保护细胞,高浓度时会对细胞膜进行攻击导致氧化损伤[9],在本实验条件下,NO的含量并没有发生明显的变化,可能并不是PFOA氧化损伤的主要原因。

综上,一定浓度的PFOA能对睾丸造成一定的氧化损伤,影响精子发生过程参与供能的标志酶SDH及LDH的活力,从而对小鼠的精子数量、质量、活动造成一定的影响。

参考文献:

[1] Abbott B D, Wood C R, Watkins A M, *et al*. Effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) on expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) and nuclear receptor-regulated genes in fetal and postnatal CD-1 mouse tissues[J]. Reprod Toxicol, 2012, 33(4): 491 - 505.

[2] Butenhoff J L, Bjork J A, Chang S C, *et al*. Toxicological evaluation of ammonium perfluorobutyrate in rats: twenty-eight-day and ninety-day oral gavage studies[J]. Reprod Toxicol, 2012, 33(4): 513 - 530.

[3] Buck-Louis G M, Sundaram R, Schisterman E F, *et al*. Persistent environmental pollutants and couple fecundity: the LIFE study[J]. Environ Health Perspect, 2013, 121(2): 231 - 236.

[4] 郎朗, 宋维平, 季宇彬. 全氟辛酸在小鼠肝脂质过氧化损伤中的作用[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版, 2012, 28(3):257 - 259, 266.

[5] 范轶欧, 金一和, 麻懿馨, 等. 全氟辛烷磺酸对雄性大鼠生精功能的影响[J]. 卫生研究, 2005, 34(1): 37 - 39.

[6] 刘高峰, 胡小梅, 王春景, 等. 氯化镧对雄性小鼠精子质量及睾丸酶活力的影响[J]. 四川动物, 2012, 31(3): 471 - 473.

[7] Shi Z, Zhang H, Ding L, *et al*. The effect of perfluorododecanonic acid on endocrine status, sex hormones and expression of steroidogenic genes in pubertal female rats[J]. Reprod Toxicol, 2009, 27(3/4): 352 - 359.

[8] 汪洪波, 汪斌, 向小勇. 厄多司坦预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤及心肌细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(1): 61 - 64.

[9] Mehmetcik G, Ozdemirler G, Kocak-Toker N, *et al*. Effect of pretreatment with artichoke extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress[J]. Exp Toxicol Pathol, 2008, 60(6): 475 - 480.

(**收稿**:2013-12-05;**修回**:2014-01-17)

(编辑 吴培红)

(上接1757页)

2 讨论

头痛是神经内科常见的症状之一,头痛性质的判定需要结合患者的病史、病程、发病形式、伴随症状、查体、实验室及影像学检查等,往往是一个很复杂的过程,需要排除急重症的疾病,如颅内占位、感染、SAH等。SAH是指脑底部、脑表面及脊髓血管破裂后,血液流入蛛网膜下腔引起相应临床症状的一种急性脑血管性疾病,是神经内科常见的急重症之一。引起SAH的常见病因为颅内动脉瘤、脑血管畸形、脑底异常血管网病等。

结合上述3例病案总结经验教训如下:(1)部分以头痛为主诉收治入院的患者在入院当天完善头颅CT检查对了解疾病是非常必要的,而不论入院前或者近日是否行头颅CT或MRI检查,以免对头痛性质的变化造成漏诊及误诊。(2)20% ~ 30%的SAH患者出现脑血管痉挛,一般于出血后3 ~ 5 d开始,5 ~ 14 d为高峰期,造影时机一般在出血3 d内或3 ~ 4周后,避免脑血管痉挛导致全脑DSA阴性。而在临床实际工作中往往难以实现。另外,引起DSA阴性结果的原因有[1]:①动脉瘤本身的因素,如瘤颈狭窄、动脉瘤内血栓形成;②血管间的重叠、造影角度的影响;③隐匿性血管畸形,由于畸形内少量出血形成血栓,供血动脉过细;④脊髓动静脉畸形;⑤静脉畸形。(3)文献报道有4% ~27%的SAH患者首次全脑DSA无法明确病因[2]。临床症状、脑脊液检查高度提示SAH,但头颅CT及DSA检查阴性的患者,应重复DSA检查,必要时结合CTA、MRI检查等。但是,经过多学科团队的考查,重复DSA检查适用于那些高度怀疑隐匿性血管损害的病例[3]。(4)对于那些有肯定的SAH的病史,继腰穿后脑脊液发现红细胞、有脊髓的症状,或者下肢症状,但头颅DSA阴性的患者,应完善详细的脊髓成像[4],以明确是否存在脊髓动脉瘤。

参考文献:

[1] 李锦平, 赵继宗. 全脑血管造影阴性的蛛网膜下腔出血的病因探讨[J]. 中国临床神经外科杂志, 2000, 5(2): 83 - 85.

[2] 刘之一, 徐宏, 周增俊, 等. 蛛网膜下腔出血首次全脑血管造影阴性的原因分析及处理[J]. 中华神经医学杂志, 2006, 5(10):1017 - 1018, 1025.

[3] Khan A A, Smith J D, Kirkman M A, *et al*. Angiogram negative subarachnoid haemorrhage: outcomes and the role of repeat angiography [J]. Clin Neurol Neurosurg, 2013,115(8): 1470 - 1475.

[4] Nageshwaran S, Mullin S, Cowley P, *et al*. Subarachnoid haemorrhage as the presenting feature of lumbar spinal arteriovenous malformation [J]. Pract Neurol, 2013, 13(5): 319 - 321.

(**收稿**:2014-05-31;**修回**:2014-06-20)

(编辑 王小寒)