DOI:10.16016/j.2097-0927.202212008

聚苯乙烯纳米塑料致雄性小鼠生殖毒性效应及初步机制

成 娅[1,2,3],韩 飞[2],梁月辉[2,4],卢春升[5],刘晋祎[2],杨惠芳[1,3],曹 佳[2] 750021 银川,宁夏医科大学公共卫生与管理学院劳动卫生与环境卫生教研室[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系毒理学研究所[2];750021 银川,宁夏环境因素与慢性病控制重点实验室[3];430071 武汉,武汉大学公共卫生学院营养与食品卫生学系[4];550025 贵阳,贵州医科大学公共卫生与健康学院卫生毒理学教研室[5]

[摘要] **目的** 分析聚苯乙烯纳米塑料(polystyrene nanoparticles, PS-NPs)亚慢性暴露对成年雄性小鼠生殖功能的影响,并探讨其影响睾酮(testosterone,T)合成的可能分子机制。**方法** 60 只 8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠完全随机分成对照组(去离子水组)、PS-NPs 低暴露组(10 mg/kg,10 PS 组)和高暴露组(40 mg/kg,40 PS 组),每组 20 只。每日灌胃 1 次,连续 60 d。末次染毒 24 h 后,称量并计算各组小鼠睾丸、附睾、脑、肝、脾、肺、肾的质量和脏器系数;运用 HE 染色分析睾丸组织病理形态差异;透射电子显微镜观察睾丸细胞的超微结构改变;采用计算机辅助精液分析系统分析精液参数;采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测血清 T、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)和卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)含量;结合转录组测序数据分析结果,采用荧光定量 PCR(qPCR)法检测各组小鼠睾丸组织中 T 合成关键基因的表达水平。**结果** 与对照组相比,40 PS 组小鼠附睾质量显著增加($P<0.05$);10 PS 组小鼠睾丸脏器系数和 40 PS 组小鼠附睾脏器系数均显著增加($P<0.05$);10 PS 和 40 PS 组小鼠肝和脾的质量以及脏器系数均显著下降($P<0.05$)。病理学结果显示,与对照组相比,10 PS 和 40 PS 组小鼠睾丸生精小管管腔增大,生精细胞松散,空泡化增多;透射电镜下可见 10 PS 和 40 PS 组睾丸间质细胞胞浆中线粒体肿胀和内质网扩张。10 PS 组小鼠精子活力较对照组显著下降($P<0.05$);10 PS 和 40 PS 组小鼠血清 T 水平均降低,其中 40 PS 组下降显著($P<0.05$);10 PS 和 40 PS 组小鼠血清 LH 和 FSH 水平较对照组均显著上升($P<0.05$)。10 PS 和 40 PS 组小鼠睾丸中 CYP11A1 的 mRNA 表达较对照组均显著下调($P<0.05$)。**结论** PS-NPs 会导致小鼠睾丸病理和功能损伤,并可能通过影响睾丸间质细胞结构下调 T 生成关键基因 CYP11A1 的表达,降低 T 的合成。

[关键词] 纳米微塑料;睾丸损伤;精液参数;超微结构;睾酮
[中图法分类号] R321.1; R363.21; R994.6 [文献标志码] A

Reproductive toxicity and preliminary mechanism of polystyrene nanoplastics in male mice

CHENG Ya[1,2,3], HAN Fei[2], LIANG Yuehui[2,4], LU Chunsheng[5], LIU Jinyi[2], YANG Huifang[1,3], CAO Jia[2]
[1]Department of Occupational Health and Environmental Hygiene, School of Public Health and Management, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia Hui Autonomous Region, 750021; [2]Institute of Toxicology, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [3]Key Laboratory of Environmental Factors and Chronic Disease Control, Yinchuan, Ningxia Hui Autonomous Region, 750021; [4]Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Wuhan University, Wuhan, Hubei Province, 430071; [5]Department of Toxicology, School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province, 550025, China

[**Abstract**] **Objective** To analyze the effect of subchronic exposure of polystyrene nanoplastics (PS-NPs) on reproductive function in adult male mice, and to explore the preliminary molecular mechanism of its

[基金项目] 国家重点研发计划(2022YFC2702902);国家自然科学基金重点项目(82130097);重庆市自然科学基金(cstc2020jcyj-msxmX0419)
[通信作者] 曹 佳,E-mail:caojia1962@126.com
杨惠芳,E-mail:joyceyhf@163.com

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

impact on testosterone synthesis. **Methods** Sixty 8-week-old C57BL/6 male mice were fully randomly divided into control group (deionized water) and PS-NPs low (10 mg/kg, 10 PS) and high exposure group (40 mg/kg, 40 PS), with 20 mice in each group. The mice were treated once per day for 60 d by gavage. The weights and organ coefficient of the testes, epididymis, brain, liver, spleen, lung and kidney of each group of mice were weighed and calculated at 24 h after the last exposure. HE staining was used to analyze the histopathological differences of testicular tissue, and transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructural changes of testicular cells. The computer assisted sperm assay system was used to analyze semen parameters, the contents of serum testosterone (T), luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the expression levels of key genes for T synthesis, which had been screened by transcriptome sequencing, were determined in testicular tissues by real-time PCR. **Results** Compared with the control group, the weight of the epididymis in the 40 PS group was increased significantly ($P<0.05$), the testicular organ coefficients of mice in the 10 PS group and the epididymis organs coefficients of mice in the 40 PS group were increased obviously ($P<0.05$), and the weight and organ coefficients of the liver and spleen of the mice in the 10 PS and 40 PS groups were decreased remarkably ($P<0.05$). The pathological results showed that compared with the testis of the control group, the lumen of the semininogenic tubule in the 10 PS and 40 PS groups were enlarged, the semimatogenic cells were loose, and the vacuoleization was increased. Transmission electron microscopy displayed that mitochondrial swelling and endoplasmic reticulum expansion were observed in the cytoplasm of Leydig cells in 10 PS and 40 PS groups. The sperm motility of mice in the 10 PS group was decreased significantly compared with the control group ($P<0.05$). The serum T level of mice in the 10 PS and 40 PS groups was decreased, with that of the 40 PS group more significant ($P<0.05$). The serum LH and FSH levels of mice in the 10 PS and 40 PS groups were increased notably. Compared with the control group, the mRNA levels of CYP11A1 in the testes of mice were significantly down-regulated in both 10 PS and 40 PS groups ($P<0.05$). **Conclusion** PS-NPs can cause damage to the testes pathologically and functionally in mice, and may reduce T synthesis by inducing structural abnormalities of Leydig cells and down-regulating CYP11A1 expression.

[**Key words**] nano-microplastics; testicular injury; semen parameters; ultrastructure; testosterone

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2702902), the Key Program of National Natural Science Foundation of China (82130097), and the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2020jcyj-msxmX0419). Corresponding author: CAO Jia, E-mail: caojia1962@126.com; YANG Huifang, E-mail: joyceyhf@163.com

塑料污染对地球生态和人群健康构成了严重威胁。目前塑料的年产量已从150万吨增加至3.68亿吨[1]。不断增长的产量和广泛的应用导致环境塑料总量急剧增加[2]。塑料制品可在自然环境中通过光降解、机械作用以及生物过程逐渐降解为小颗粒塑料[3]。其中,粒径小于5 mm的塑料颗粒被称为微塑料(microplastics, MPs)[4]。除了较大塑料垃圾的降解,MPs也来源于个人护理品、化妆品、洗涤剂、牙膏及一些大型塑料产品在制造、使用过程中的磨损[5]。根据MPs成分分类,MPs主要包括聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯(polystyrene, PS)、聚对苯二甲酸乙二醇酯和聚氯乙烯[6]。PS是全球产量最大的通用塑料之一,已成为研究MPs生物效应的代表性颗粒[7]。聚苯乙烯微塑料(polystyrene microplastics,PS-MPs)可以通过各种途径进入生物体内,对人类健康构成潜在威胁[8]。已有研究证明,PS-MPs能够积聚于生物肝、肾、肠道和血液等器官和组织中,引起机体氧化应激、免疫损伤、能量平衡和新陈代谢紊乱[9]。随着对PS-MPs研究的深入,研究者发现聚苯乙烯纳米塑料(polystyrene nanoparticles, PS-NPs)能够影响小鼠精子质量,破坏精子顶体完整性,造成生殖损伤[10]。但PS-NPs对生殖系统的具体毒性效应和机制仍不清楚。

目前关于PS-MPs对小鼠雄性生殖功能影响的研究主要侧重于急性染毒、精液质量及睾丸屏障等方面,其对雄性生殖慢性和亚慢性染毒损伤的具体效应和机制有待进一步发掘,尤其关于PS-NPs的研究目前较少。本研究采用PS-NPs对雄性小鼠进行亚慢性染毒,探讨PS-NPs对雄性小鼠睾丸的损伤效应,分析其对睾丸细胞结构和激素尤其是睾酮(testosterone,T)的影响及可能原因,以期为今后PS-NPs的危害研究和防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

直径为80 nm的PS-NPs [2.5%(质量体积分数),10 mL]从天津市倍思乐色谱技术开发中心获得。HE染液套装(重庆赛洛合志生物科技有限公司)、酶联免疫试剂盒(ELISA,江苏博深生物科技有限公司,

中国南京)、TRIzol 总 RNA 提取试剂盒(武汉爱博泰克生物技术有限公司)、逆转录和荧光定量 PCR(qPCR)专用试剂(武汉爱博泰克生物技术有限公司)。计算机辅助精液分析系统(computer-aided semen analysis system,CASA,北京穗加软件有限公司)、正置光学显微镜(日本尼康)、透射电子显微镜[日立科学仪器(北京)有限公司]。

1.2 实验动物与分组

60 只购自成都药康生物科技有限公司的 8 周龄清洁级 C57BL/6 雄性小鼠适应 1 周后,按完全随机分为 3 组:对照组(去离子水组)、PS-NPs 低暴露组(10 mg/kg,10 PS 组)和 PS-NPs 高暴露组(40 mg/kg,40 PS 组),每组 20 只。经口灌胃,每日 1 次,每周称量体质量(除第 60 天体质量间隔 3 d 外)并记录,60 d 后收集组织和血液。

1.3 小鼠器官收集和脏器系数的测定

最后一次染毒 24 h 后,称量各组小鼠体质量。眼球取血后脱颈处死,迅速分离小鼠睾丸、附睾、脑、肝、脾、肺、肾,称量并记录。

脏器系数=(脏器湿质量/体质量)×100%

1.4 精子数量和活力评估

处死小鼠后收集附睾,称重后将其迅速放于含有 800 μL F12 培养基的培养皿中,用眼科剪将附睾尾剪开,并挤压附睾让精子游出。37 ℃孵育 2 min 后,用枪头吹打 3 次,吸取 7 μL 精子悬浮液,采用 CASA 对精子数量和活力进行分析评估。

1.5 组织病理学和超微结构分析

将石蜡包埋的睾丸组织切成 5 μm 厚的切片,将切片依次放入二甲苯、无水乙醇、75%酒精中脱蜡,HE 染色,二甲苯中透明化,中性树胶封片。显微镜观察睾丸组织的结构变化。

睾丸样品经 3%戊二醛预固定,1%四氧化锇再固定,丙酮逐级脱水后 Ep812 包埋。采用超薄切片机制备 60~90 nm 超薄切片,固定在铜网格上,并用醋酸铀和柠檬酸铅染色,于透射电子显微镜下观察。

1.6 血清 T 水平检测

收集血液后,3 000 r/min 离心 10 min,取血清于 1.5 mL 无酶 EP 管中,按照 ELISA 试剂盒说明书检测各组小鼠血清中睾酮(testosterone,T)、黄体生成素(luteinizing hormone,LH)和卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone,FSH)水平。

1.7 细胞处理、转录组测序和分析

GC2 细胞用 10% FBS 的高糖培养基培养。细胞接种 24 h 后分为 3 组:对照组、10 PS 组和 40 PS 组,分别用 0、10、40 μg/mL 浓度 PS-NPs 染毒,48 h 后提取细胞总 RNA。采用 Nanodrop ND-2000(Thermo Scientific,美国)检测 RNA 质量和浓度。按照 mRNA 建库试剂盒说明书(武汉爱博泰克生物技术有限公司)制备 PE 文库。使用 oligo (dT)磁珠从 1 μg 总 RNA 中纯化 mRNA、合成 cDNA、连接接头序列和进行 PCR 扩增。采用 Agilent Bioanalyzer 4150(AgilentTechnologies, 美国)评估文库质量,于 NovaSeq 6000 平台进行测序。测序数据用于生物信息学分析,Feature Counts 用于计算比对到每个基因的 read 数,根据基因的长度计算每个基因的 FPKM 值。

1.8 RNA 提取、逆转录及表达定量检测

利用 Primer Premier 5.0 软件,根据所需目的基因 mRNA 设计引物序列并合成,引物序列见表 1。取正常对照组、10 PS 和 40 PS 组睾丸组织进行实验。根据总 RNA 提取试剂盒的制造商说明,从 100 mg 的睾丸组织中提取总 RNA。提取 RNA 后检测总 RNA 的浓度、纯度和完整性。随后将 mRNA 逆转录成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qPCR 检测分析。以 β-actin 作为内参照基因,用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

基因	引物序列
StAR	正向:5′-ATGCAGGAAAGCCAGGTA-3′
	反向:5′-GCCAGCTTGTAGAATGAGC-3′
CYP11A1	正向:5′-GTGATGTGGGGACCAAGT-3′
	反向:5′-AGGCTGGAAGTTGAAGAGG-3′
3β-HSD	正向:5′-CTGATCTGAGGGCTGAGG-3′
	反向:5′-GACAGTGGGAGCTGGTATG-3′
CYP17A1	正向:5′-ATCCCGAAGGACACACAT-3′
	反向:5′-TAAACCGATCTGGCTGGT-3′
17β-HSD	正向:5′-ACCCAGGAGAATGCCAAG-3′
	反向:5′-GATGCAGACCACCCCAA-3′
β-actin	正向:5′-CTACCTCATGAAGATCCTGACC-3′
	反向:5′-CACAGCTTCTCTTTGATGTCAC-3′

1.9 统计学分析

计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。使用 GraphPad Prism 9.0 软件生成统计图。采用单因素方差分析(ANOVA)和 Dunnett 检验进行统计分析。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

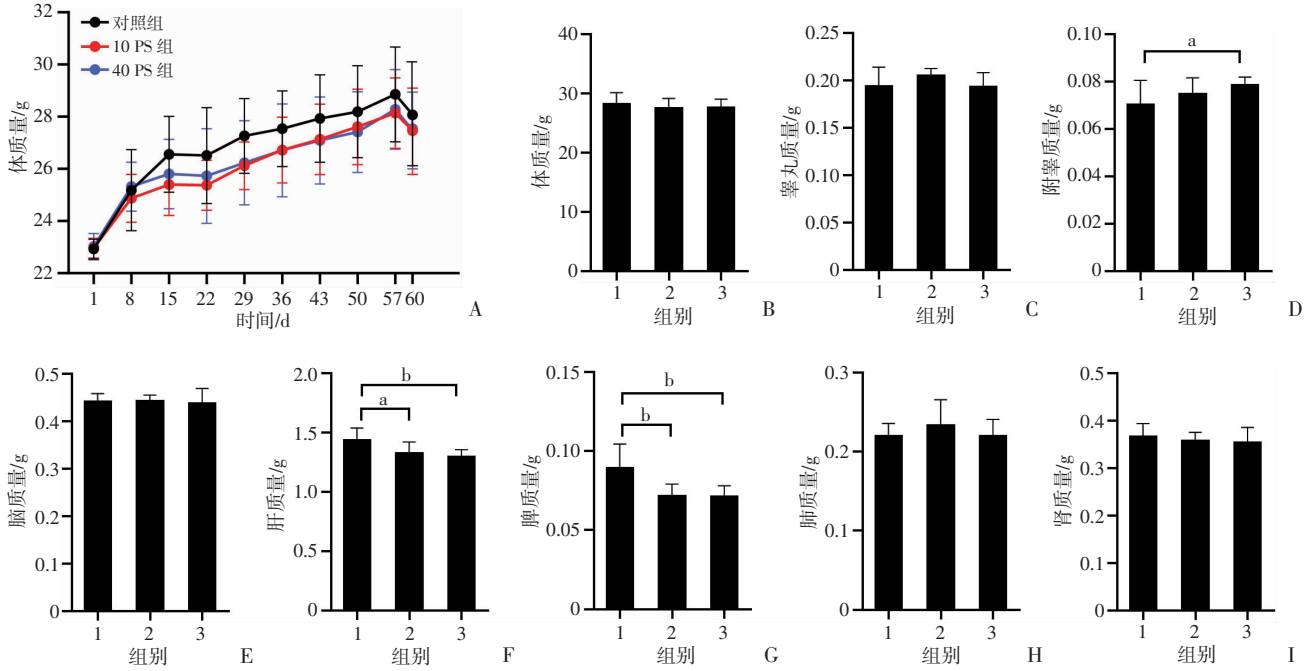
2.1 PS-NPs 对小鼠体质量和各脏器质量的影响

PS-NPs 开始暴露后每周记录各组小鼠体质量。统计分析发现,10 PS 和 40 PS 组的小鼠体质量有低于对照组趋势,但差异无统计学意义。至暴露结束时,与对照组相比,10 PS 和 40 PS 组小鼠的终体质量,睾丸(双侧)、脑、肺和肾(双侧)质量差异无统计学意义;10 PS 和 40 PS 组小鼠附睾(双侧)质量均出现增高趋势,其中 40 PS 组小鼠附睾质量明显增加($P<0.05$)。10 PS 和 40 PS 组小鼠的肝质量和脾质量均显著低于

对照组($P<0.05$)。见图1。

2.2　PS-NPs对小鼠各组织脏器系数的影响

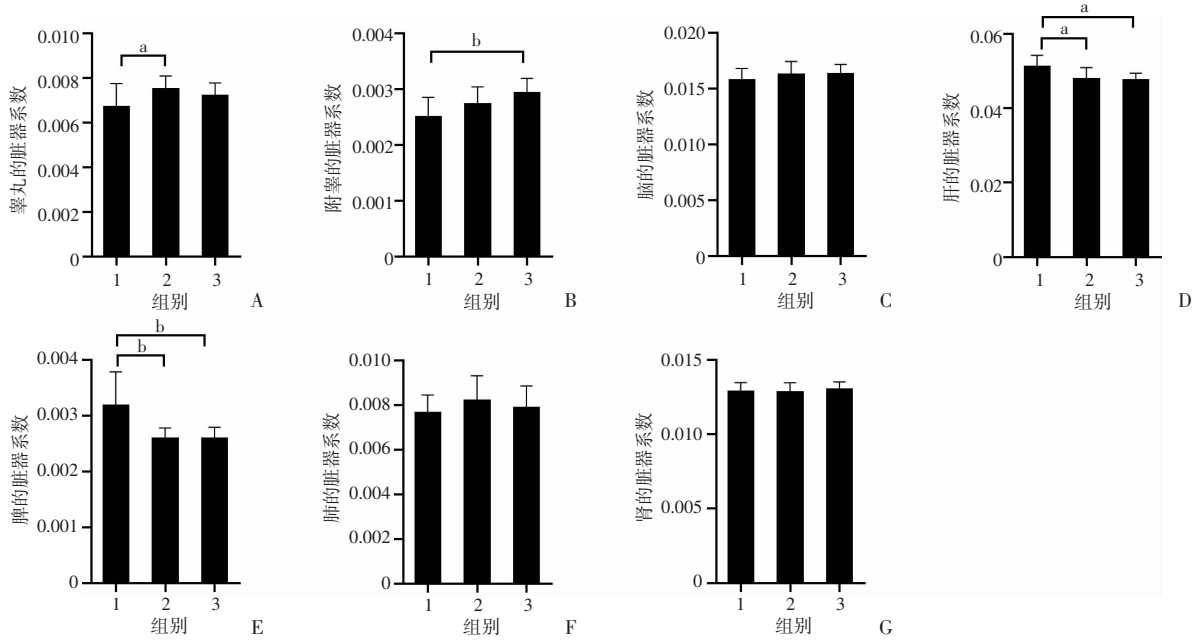
计算各组小鼠睾丸(双侧)、附睾(双侧)、脑、肝、脾、肺、肾(双侧)的脏器系数提示,与对照组相比,10 PS和40 PS组小鼠睾丸和附睾脏器系数均呈现增加趋势,且10 PS组睾丸脏器系数和40 PS组附睾脏器系数明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。脑、肺和肾脏器系数与对照组相比没有明显差异。与对照组相比,10 PS和40 PS组小鼠肝脏和脾脏的脏器系数显著下降,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图2。



1:对照组;2:10 PS组;3:40 PS组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:小鼠体质量变化;B:对照组与10 PS和40 PS组小鼠第60天体质量比较;C~I:不同浓度PS-NPs暴露后小鼠睾丸(C)、附睾(D)、脑(E)、肝(F)、脾(G)、肺(H)、肾(I)的质量比较

图1　PS-NPs暴露后小鼠体质量和各器官质量的比较



1:对照组;2:10 PS组;3:40 PS组;a:$P<0.05$, b:$P<0.01$

A~G:不同浓度PS-NPs暴露后小鼠睾丸(A)、附睾(B)、脑(C)、肝(D)、脾(E)、肺(F)、肾(G)的脏器系数比较

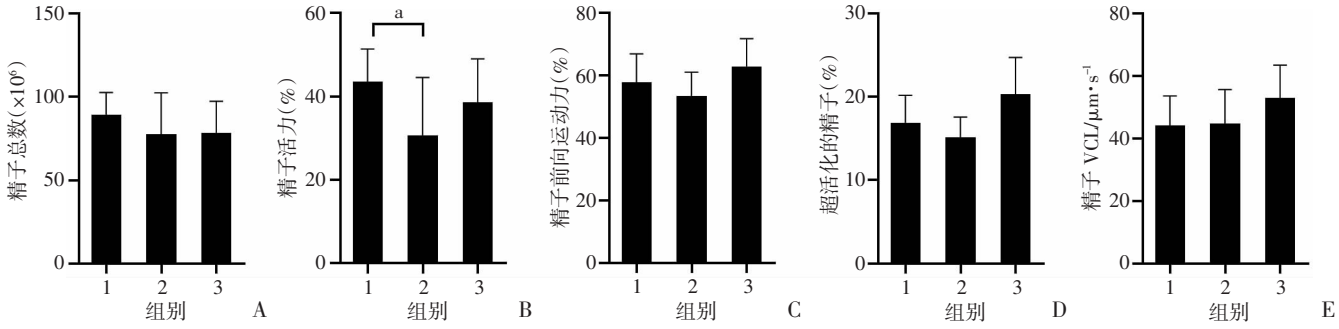
图2　PS-NPs暴露后小鼠各器官脏器系数的比较分析

2.3　PS-NPs 对小鼠精子数量和活力的影响

与对照组相比,10 PS 和 40 PS 组小鼠精子总数有下降趋势,但差异无统计学意义。10 PS 和 40 PS 组小鼠的精子活力均有低于对照组的趋势,但只有 10 PS 组小鼠的精子活力下降具有统计学意义($P<0.05$)。10 PS 和 40 PS 组的精子前向运动力、超活化的精子和精子头部沿其实际行走曲线的运动速度(VCL)与对照组相比差异均无统计学意义。见图 3。

2.4　PS-NPs 对睾丸组织病理结构的影响

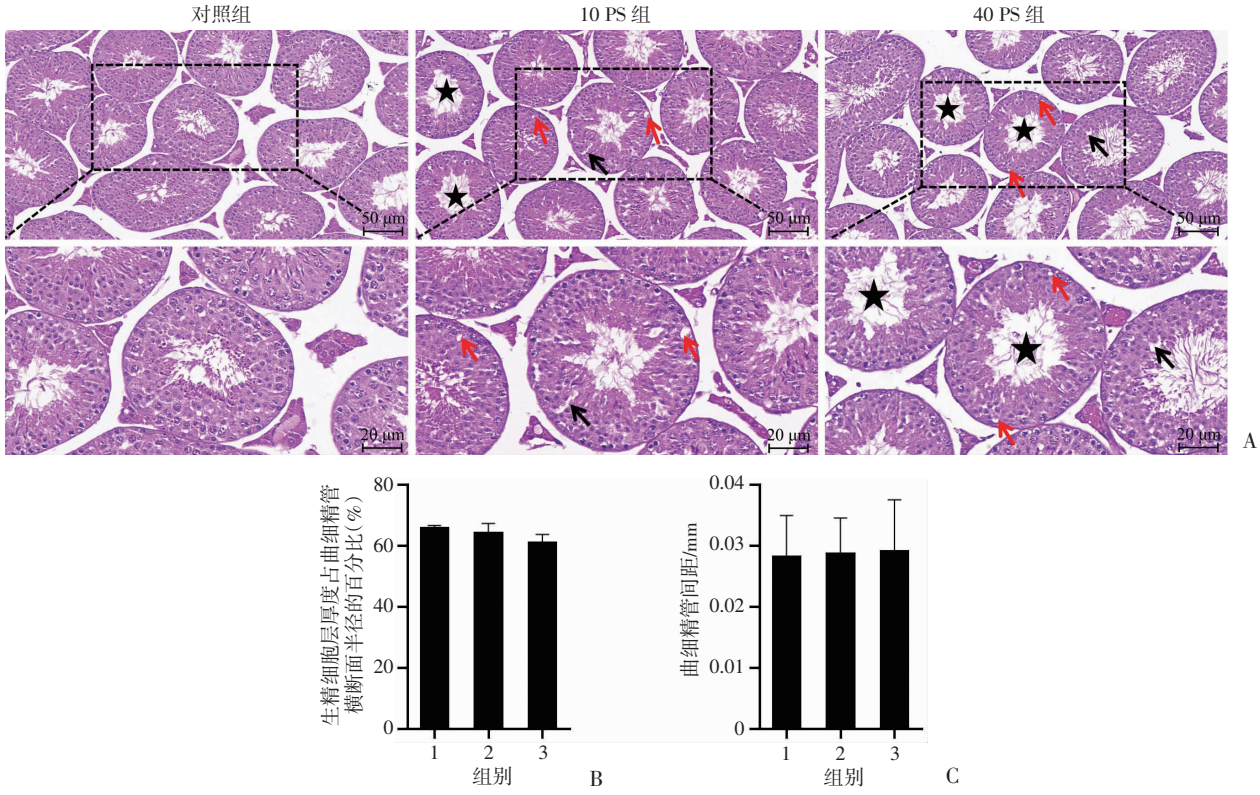
睾丸组织病理学结果显示,对照组小鼠的睾丸组织各级生精细胞层次清楚,排列有序,曲细精管结构完整,生精上皮基膜完整。10 PS 和 40 PS 组小鼠与对照组小鼠睾丸相比生精小管管腔增大,生精细胞松散,空泡化增多。与对照组相比,10 PS 和 40 PS 组小鼠睾丸生精细胞层厚度占曲细精管横断面半径的百分比有下降趋势,但差异无统计学意义。10 PS 和 40 PS 组小鼠睾丸曲细精管之间距离与对照组相比没有明显差异。见图 4。



1:对照组;2:10 PS 组;3:40 PS 组;a:$P<0.05$

A:精子总数;B:精子活力;C:精子前向运动力;D:超活化的精子;E:精子头部沿其实际行走曲线的运动速度(VCL)

图 3　PS-NPs 暴露对小鼠精子数量和活力的影响



1:对照组;2:10 PS 组;3:40 PS 组

A:HE 染色观察睾丸的病理形态学改变　★:与对照组相比生精小管管腔增大;黑色箭头示生精细胞松散;红色箭头示空泡化;B:睾丸生精细胞层厚度占曲细精管横断面半径的百分比;C:睾丸曲细精管间距

图 4　PS-NPs 暴露对小鼠睾丸病理结构的影响

2.5　PS-NPs 对小鼠睾丸间质细胞超微结构的影响

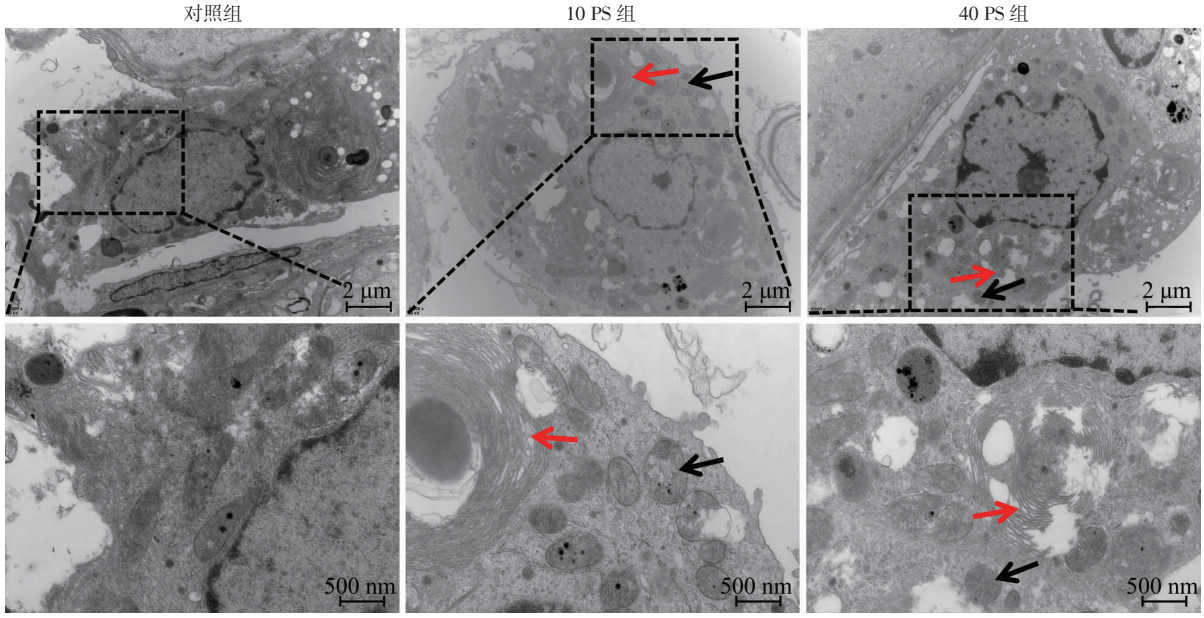
电镜下观察睾丸细胞超微结构发现,对照组睾丸间质细胞胞浆中细胞器丰富,线粒体较多,线粒体嵴清晰,可见少量脂滴。10 PS 和 40 PS 组小鼠睾丸间质细胞胞浆中少量线粒体肿胀,部分内质网扩张。见图 5。

2.6　PS-NPs 对小鼠血清激素的影响

10 PS 和 40 PS 组小鼠血清 T 水平均低于对照组,且 40 PS 组血清 T 下降具有统计学意义($P<0.05$)。血清 LH 和 FSH 水平与对照组相比均显著上升,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。见图 6。

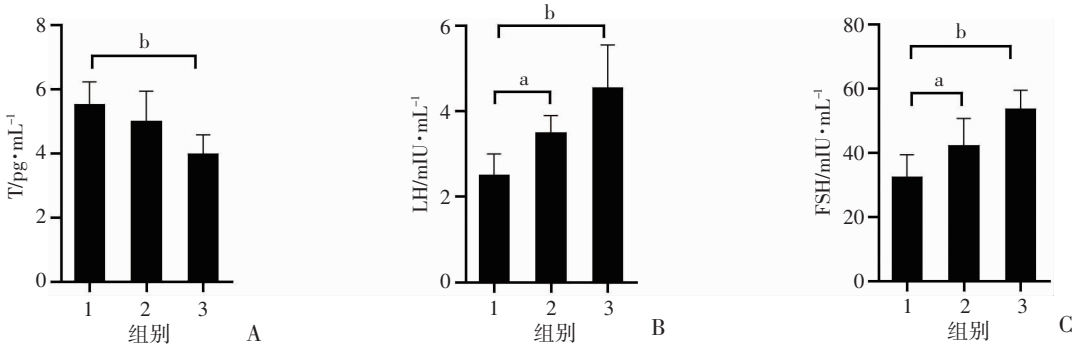
2.7　PS-NPs 暴露对 T 合成相关基因表达的影响

根据小鼠精母细胞细胞株(GC2)暴露 PS-NPs 后进行转录组测序,通过对测序数据进行分析发现,与对照组相比,10 PS(10 μg/mL)组有 75 个基因上调,177 个基因下调;40 PS(40 μg/mL)组有 94 个基因上调,300 个基因下调[Log fold change (FC) > 1.5, $P<0.05$]。进一步分析发现,暴露于 PS-NPs 后睾丸间质细胞激素合成相关基因类固醇合成调节蛋白(StAR)、细胞色素 P450 家族成员 11A1(CYP11A1)、细胞色素 P450 单加氧酶(CYP17A1)和 17β-羟基类固醇脱氢酶(17β-HSD)表达与对照组相比存在明显差异,且 CYP11A1 基因表达降低在 10 PS 和 40 PS 组呈现明显的剂量依赖效应。为了确定 PS-NPs 暴露是否影响了这些激素合成相关基因,进一步通过 qPCR 检测 StAR、CYP11A1、3β-HSD、CYP17A1 和 17β-HSD 在睾丸组织中的表达。与对照组小鼠睾丸相比,10 PS 和 40 PS 组小鼠睾丸中 CYP11A1 的表达水平显著下降,差异具有统计学意义($P<0.05$);而 StAR、3β-HSD、CYP17A1 和 17β-HSD 在 10 PS 和 40 PS 组小鼠睾丸中没有发现明显变化。见图 7。



黑色箭头示线粒体的改变;红色箭头示内质网的改变

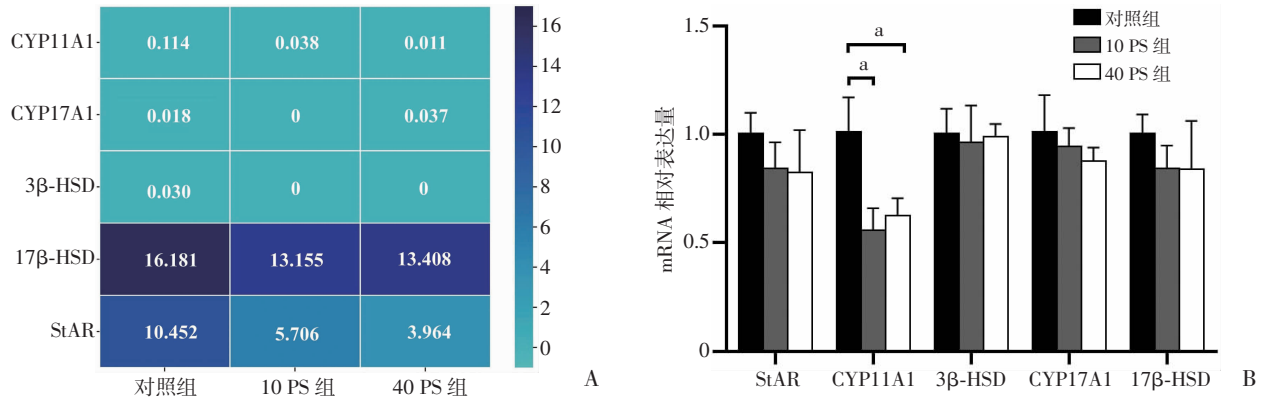
图 5　PS-NPs 暴露对小鼠睾丸间质细胞超微结构的影响



1:对照组;2:10 PS 组;3:40 PS 组;a:$P<0.05$, b:$P<0.01$

A~C:分别为 ELISA 检测小鼠血清 T(A)、LH(B)、FSH(C)浓度

图 6　PS-NPs 暴露对小鼠血清激素水平的影响



A:小鼠精母细胞细胞株(GC2)暴露 PS-NPs 后 StAR、CYP11A1、3β-HSD、CYP17A1 和 17β-HSD 的基因表达;B:StAR、CYP11A1、3β-HSD、CYP17A1、17β-HSD 的 mRNA 表达 a:$P<0.01$

图 7 PS-NPs 暴露对睾丸组织中 T 合成相关基因表达的影响

3 讨论

PS-MPs 对人类生殖健康的潜在不利影响已经引起了研究者广泛的关注。目前虽然有不少 PS-MPs 对哺乳动物雄性生殖系统损伤的研究,但主要集中于微米级 PS-MPs,纳米级 PS-MPs 生殖毒性作用研究仍然较少;由于纳米级 PS-MPs 结构微小,更易进入生殖系统,提示纳米级 PS-MPs 可能造成的生殖毒性作用会更加严重,有必要进行充分研究;且已有的研究主要集中于 MPs 急性和亚急性染毒,但 MPs 的危害作用很可能是一个长期和慢性的过程。因此,亟需对 MPs 的慢性和亚慢性暴露进行深入研究[11]。本研究采用纳米级(80 nm)PS-MPs 进行亚慢性染毒研究其对雄性小鼠生殖系统的影响,对比 T 变化及其合成相关基因表达改变。结果发现 PS-NPs 导致睾丸病理和细胞结构损伤,可能通过降低 T 水平影响精子形成,且这种 T 下降可能与睾丸间质细胞超微结构损伤以及 T 生成基因 CYP11A1 表达异常相关。

最近的研究显示,PS-MPs 可在雌性小鼠脑、心、肝、脾、肺、肾、小肠、大肠和血液中蓄积,且在卵巢和子宫中的积累诱导卵巢炎症,导致卵母细胞质量下降[12]。人胎盘灌注模型结果也显示,粒径 240 nm 的 PS-MPs 可以穿过胎盘屏障[13]。睾丸对外源化学物的作用十分敏感,容易引起组织结构异常,精子发生受阻,从而导致生殖功能损伤。已有研究证明,PS-MPs 对雄性生殖系统具有毒性作用[14]。PS-MPs 可以通过下调精子 ATP 水平削弱其运动能力,降低精卵结合的概率,进而导致泥蚶受精率显著下降[15]。而且,PS-MPs 还能够通过氧化应激激活 MAPK-Nrf2 通路,导致小鼠血睾屏障(blood-testis barrier, BTB)相关蛋白表达减少,诱导小鼠 BTB 的破坏[16]。此外,有研究发现 PS-NPs 可影响小鼠子代睾丸发育,破坏生精上皮并减少精子数量[17]。精子发生是一个复杂的分化过程,BTB 的保护、T 的分泌、支持细胞的营养作用等形成的特殊微环境对精子发生至关重要[18]。本研究发现,PS-NPs 能够引起小鼠睾丸病理和睾丸间质细胞超显微结构损伤,这可能是导致精子发生异常的原因之一,而且低剂量组小鼠精子活力明显下降,各染毒组精子总数也呈下降趋势。T 作为睾丸间质细胞分泌的最重要的雄激素,是维持雄性动物第二特征和调控繁殖能力的重要因素[19]。T 可参与 BTB、减数分裂、支持细胞精细胞黏附和精子释放等过程的维持,一旦 T 减少往往会导致精子发生失败[20]。T 和所有甾体激素一样,都是胆固醇的衍生物[21]。胆固醇首先由 StAR 从线粒体外膜转移至线粒体内膜,并通过 CYP11A1 催化侧链裂解反应代谢成孕烯醇酮,在光面内质网内被 3β-HSD 转化为孕酮,孕酮由 CYP17A1 催化转化为雄烯二酮,最后在 17β-HSD 的作用下代谢为 T[19, 22]。CYP11A1 受到抑制,会影响胆固醇在线粒体内形成孕烯醇酮的过程,导致孕烯醇酮含量减少。即使 StAR 将胆固醇大量地转运到线粒体内,但 CYP11A1 水平下降,也会导致 T 合成降低[23]。本研究发现,暴露于 PS-NPs 后 10 PS 和 40 PS 组小鼠睾丸间质细胞线粒体和内质网损伤,且 T 合成关键基因 CYP11A1 在睾丸中的表达明显受到抑制,提示 PS-NPs 可能通过诱导睾丸间质细胞超微结构异常以及降低 CYP11A1 基因的表达,抑制 T 的合成和分泌。

雄性激素的合成还会受到下丘脑-垂体-睾丸

(hypothalamus-pituitary-testis,HPT)轴的调控。下丘脑分泌促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone,GnRH)刺激垂体分泌促性腺激素(LH 和 FSH),在 LH 与 FSH 的刺激下,睾丸间质细胞和支持细胞合成 T[24]。此外,T、FSH 及 LH 也可作为主要的反馈信号影响下丘脑-垂体轴的功能,并且 T 能够通过影响下丘脑分泌 GnRH,抑制 LH 和 FSH 的产生[25]。本研究结果显示,PS-NPs 暴露后 LH 与 FSH 的水平增高,可能是由于低水平 T 将信号反馈给下丘脑和垂体,从而直接或间接地使垂体释放 FSH 和 LH 增加。FSH 与支持细胞上的受体结合能够激活精子发生,被认为是精子发生和支持细胞功能的生物标志物[26]。FSH 异常升高也能够引起血清中 LH 水平代偿性升高,最终影响精子质量[27]。因此,PS-NPs 暴露后 FSH 和 LH 异常升高也可能是导致精子质量发生异常的原因之一,不过具体机制还需要进一步的深入研究。

PS-NPs 亚慢性暴露能够导致小鼠睾丸病理改变、细胞结构损伤、精子活力下降及性激素水平异常。PS-NPs 可能通过诱导睾丸间质细胞超微结构异常,下调 T 生成关键基因 CYP11A1 的表达导致 T 合成下降,进而造成雄性小鼠生殖功能损伤。本研究将为后期 PS-NPs 的危害研究和防治提供重要理论参考依据。

参考文献:

[1] ALI M U, LIN S Y, YOUSAF B, *et al*. Environmental emission, fate and transformation of microplastics in biotic and abiotic compartments: global status, recent advances and future perspectives[J]. Sci Total Environ, 2021, 791: 148422. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.148422.

[2] GEYER R, JAMBECK J R, LAW K L. Production, use, and fate of all plastics ever made[J]. Sci Adv, 2017, 3(7): e1700782. DOI: 10.1126/sciadv.1700782.

[3] RIOS-MENDOZA L M, ONTIVEROS-CUADRAS J F, LEON-VARGAS D, *et al*. Microplastic contamination and fluxes in a touristic area at the SE Gulf of California[J]. Mar Pollut Bull, 2021, 170: 112638. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2021.112638.

[4] ZHANG D D, FRASER M A, HUANG W, *et al*. Microplastic pollution in water, sediment, and specific tissues of crayfish (*Procambarus clarkii*) within two different breeding modes in Jianli, Hubei Province, China[J]. Environ Pollut, 2021, 272: 115939. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115939.

[5] LEI K, QIAO F, LIU Q, *et al*. Microplastics releasing from personal care and cosmetic products in China[J]. Mar Pollut Bull, 2017, 123(1/2): 122-126. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2017.09.016.

[6] ANDRADY A L, NEAL M A. Applications and societal benefits of plastics[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009, 364(1526): 1977-1984. DOI: 10.1098/rstb.2008.0304.

[7] ILECHUKWU I, EHIGIATOR B E, BEN I O, *et al*. Chronic toxic effects of polystyrene microplastics on reproductive parameters of male rats[J]. Environ Anal Health Toxicol, 2022, 37(2): e2022015-e2022010. DOI: 10.5620/eaht.2022015.

[8] LI S W, MA Y, YE S Z, *et al*. Endogenous hydrogen sulfide counteracts polystyrene nanoplastics-induced mitochondrial apoptosis and excessive autophagy *via* regulating Nrf2 and PGC-1α signaling pathway in mouse spermatocyte-derived GC-2spd(ts) cells[J]. Food Chem Toxicol, 2022, 164: 113071. DOI: 10.1016/j.fct.2022.113071.

[9] DENG Y F, ZHANG Y, LEMOS B, *et al*. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure[J]. Sci Rep, 2017, 7: 46687. DOI: 10.1038/srep46687.

[10] ZHOU L X, YU Z Y, XIA Y Y, *et al*. Repression of autophagy leads to acrosome biogenesis disruption caused by a sub-chronic oral administration of polystyrene nanoparticles[J]. Environ Int, 2022, 163: 107220. DOI: 10.1016/j.envint.2022.107220.

[11] AU S Y, BRUCE T F, BRIDGES W C, *et al*. Responses of *Hyalella azteca* to acute and chronic microplastic exposures[J]. Environ Toxicol Chem, 2015, 34(11): 2564-2572. DOI: 10.1002/etc.3093.

[12] LIU Z Q, ZHUAN Q R, ZHANG L Y, *et al*. Polystyrene microplastics induced female reproductive toxicity in mice[J]. J Hazard Mater, 2022, 424: 127629. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.127629.

[13] WICK P, MALEK A, MANSER P, *et al*. Barrier capacity of human placenta for nanosized materials[J]. Environ Health Perspect, 2010, 118(3): 432-436. DOI: 10.1289/ehp.0901200.

[14] JIN H B, YAN M H, PAN C, *et al*. Chronic exposure to polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity and decreased testosterone levels *via* the LH-mediated LHR/cAMP/PKA/StAR pathway[J]. Part Fibre Toxicol, 2022, 19(1): 13. DOI: 10.1186/s12989-022-00453-2.

[15] SHI W, SUN S G, HAN Y, *et al*. Microplastics hamper the fertilization success of a broadcast spawning bivalve through reducing gamete collision and gamete fusion efficiency[J]. Aquat Toxicol, 2022, 242: 106049. DOI: 10.1016/j.aquatox.2021.106049.

[16] LI S D, WANG Q M, YU H, *et al*. Polystyrene microplastics induce blood-testis barrier disruption regulated

by the MAPK-Nrf2 signaling pathway in rats[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2021, 28(35): 47921-47931. DOI: 10.1007/s11356-021-13911-9.

[17] HUANG T, ZHANG W J, LIN T T, *et al*. Maternal exposure to polystyrene nanoplastics during gestation and lactation induces hepatic and testicular toxicity in male mouse offspring[J]. Food Chem Toxicol, 2022, 160: 112803. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112803.

[18] JIN H B, MA T, SHA X X, *et al*. Polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity in mice[J]. J Hazard Mater, 2021, 401: 123430. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.123430.

[19] YANG L D, MA T T, ZHAO L J, *et al*. Circadian regulation of apolipoprotein gene expression affects testosterone production in mouse testis[J]. Theriogenology, 2021, 174: 9-19. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2021.06.023.

[20] XING H Z, CHEN S B, WANG X L, *et al*. 3-Monochloropropane-1, 2-diol causes spermatogenesis failure in male rats *via* Sertoli cell dysfunction but not testosterone reduction[J]. Toxicol Lett, 2022, 360: 1-10. DOI: 10.1016/j.toxlet.2022.01.006.

[21] 黄婉月. AFB_1 致小鼠睾酮合成障碍的分子机制及 ROS/AMPK 信号通路的调控作用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021.
HUANG W Y. Molecular mechanism of AFB_1-induced testosterone synthesis disorder in mice and the regulation of ROS/AMPK signaling pathway[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2021.

[22] CHOI Y, LEE E G, LEE G, *et al*. Amodiaquine promotes testosterone production and *de novo* synthesis of cholesterol and triglycerides in Leydig cells[J]. J Lipid Res, 2021, 62: 100152. DOI: 10.1016/j.jlr.2021.100152.

[23] 赵焕焕, 庚天琦, 张燕, 等. 草甘膦对雄性大鼠睾酮合成的影响[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(5): 242-247. DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20180508004.
ZHAO H H, GENG T Q, ZHANG Y, *et al*. Effects of glyphosate on testosterone synthesis in male rats[J]. Asian J Ecotoxicol, 2018, 13(5): 242-247. DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20180508004.

[24] AJAYI A F, AKHIGBE R E. The physiology of male reproduction: impact of drugs and their abuse on male fertility[J]. Andrologia, 2020, 52(9): e13672. DOI: 10.1111/and.13672.

[25] CORRADI P F, CORRADI R B, GREENE L W. Physiology of the hypothalamic pituitary gonadal axis in the male[J]. Urol Clin North Am, 2016, 43(2): 151-162. DOI: 10.1016/j.ucl.2016.01.001.

[26] SALEEM T H, OKASHA M, IBRAHIM H M, *et al*. Biochemical assessments of seminal plasma zinc, testis-expressed sequence 101 and free amino acids and their correlations with reproductive hormones in male infertility[J]. Biol Trace Elem Res, 2021, 199(5): 1729-1742. DOI: 10.1007/s12011-020-02310-9.

[27] PETERSEN K U, HÆRVIG K K, FLACHS E M, *et al*. Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and male reproductive function in young adulthood; a cross-sectional study[J]. Environ Res, 2022, 212: 113157. DOI: 10.1016/j.envres.2022.113157.

(**收稿**:2022-12-01;**修回**:2023-02-27)

(编辑 张 维)