

氯化锰对雄性大鼠亚急性生殖毒性机制研究

武 英¹, 崔金山², 张玉敏², 王薛君², 马明月²

(1. 沈阳市第九人民医院 辽宁 沈阳 110024; 2. 沈阳医学院毒理学教研室, 辽宁 沈阳 110034)

摘要: 选取健康性成熟雄性 Wistar 大鼠灌胃 染毒 10 mg/kg、20 mg/kg 和 40 mg/kg 氯化锰, 每日 1 次, 连续染毒 30 d 应用分光光度法测定血清和睾丸匀浆中 MDA、ROS、NO、SOD、GSH-Px、LDH、LDHx、G-6-PD、 β -G 和 NOS 的水平和活力。结果显示, 染毒氯化锰 20 mg/kg 组仅睾丸匀浆中 ROS、SOD、LDHx 和 G-6-PD 活力与阴性对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。在 40 mg/kg 组, 血清中 LDHx 和 G-6-PD 下降, 睾丸匀浆中的 MDA、ROS 升高, SOD、GSH-Px、LDHx 和 β -G 活力下降, 与对照组比较差异有显著性或高度显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并且 SOD、ROS、LDHx 和 G-6-PD 有明确剂量-效应关系, r 值为 0.578 2、-0.534 7、-0.581 4 和 -0.497 2 (均 $P < 0.05$)。各染毒剂量组睾丸匀浆中 NOS 活力均明显高于对照组, 差异有显著性 (均 $P < 0.05$)。说明亚急性染毒氯化锰可使大鼠睾丸组织产生脂质过氧化作用, 使睾丸标志酶活力降低, 睾丸匀浆中 NOS 活力升高, 使间质细胞、支持细胞和生精细胞受损, 并形成一损伤链, 这些可能是锰致雄性生殖功能受损的部分机制。

关键词: 氯化锰; 雄性大鼠; 睾丸标志酶; NO; NOS

中图分类号: R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2004)03-0183-03

Study on mechanisms of subacute reproductive toxicity in male rats exposed to manganous chloride

WU Ying¹, CUI Jin-shan², ZHANG Yu-min², WANG Xue-jun², MA Ming-yue²

(1. Shenyang Ninth People's Hospital, Shenyang 110024, China; 2. Department of Toxicology, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China)

Abstract: Health and mature Wistar male rats exposed to 10mg/kg, 20mg/kg and 40mg/kg of manganous chloride by lavage once a day for 30 days. MDA, ROS, SOD, GSH-Px, LDH, LDHx, G-6-PD, β -G, NO and NOS in serum and testis homogenate of male rats were determined with spectrophotometry. Results showed that in the 20mg/kg of manganous chloride group, values of ROS, SOD, LDHx and G-6-PD were significantly different only in the testis homogenate of rats compared with negative control group ($P < 0.05$). In the 40mg/kg group in the testis homogenate of rats, MDA and ROS were increased, while activities of SOD, GSH-Px, LDHx, β -G decreased and activities of LDHx and G-6-PD in the serum were decreased and significantly different compared with negative control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). SOD, ROS, LDHx and G-6-PD showed clear and definite dose-effect relationship, $r = 0.578\ 2$, $-0.534\ 7$, $-0.581\ 4$, $-0.497\ 2$ ($P < 0.05$). While in all exposure groups, activities of NOS in the testis homogenate of rats were increased compared with negative control group ($P < 0.05$). It is suggested that testis tissue of rats by subacute exposure manganous chloride produced lipid peroxidation and activities of testis marker enzymes were decreased and NOS of testis homogenate of rats was increased and resulted in damage of Leydig cells, Sertoli's cells and spermatids and formed a damage chain. These may be section mechanisms of damaged reproductive function of male rats.

Key words: Manganous chloride; Male rat; Activities of testis marker enzymes; NO; NOS

锰是一种较常见的职业毒物, 对其毒作用已有较广泛深入的研究^[1,2]。近年来对锰的生殖毒作用研究已引起人们极大关注, 实验证明锰可引起雄鼠性功能下降、曲细精管受损、生精功能下降和生殖内分泌功能变化^[1,3-9]及作业工人性功能下降等一系列生殖毒性^[1,9]。为进一步探讨锰对雄性生殖功能损伤的机制, 本研究拟从脂质过氧化损伤、睾丸标志酶活力及 NO 和 NOS 的变化等方面进行研究, 为进一步探讨锰中毒的可能机制提供毒理学依据。

1 材料与方法

1.1 受试物

氯化锰 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 购自天津化学试剂三厂生产的分析纯试剂, 纯度 99.9% 以上。

1.2 实验动物分组及处理

选择由沈阳医学院实验动物中心提供的健康性成熟的雄性 Wistar 大鼠 40 只, 体重 180~220 g, 随机分为阴性对照组和 10 mg/kg、20 mg/kg 和 40 mg/kg 氯化锰组 4 组, 每组 10 只。按 0.5 ml/100 g 等容积不同浓度灌胃染毒, 阴性对照组给予等容积的蒸馏水, 每天 1 次, 连续染毒 30 d。于末次染毒 24 h 腹主动脉采血后处死大鼠, 称量睾丸和附睾的质量并取单侧睾丸用生理盐水制成 0.2 g/ml 的睾丸匀浆备检。取部分睾丸组织作常规光镜组织病理学检查。

1.3 检测指标及方法

脂质过氧化指标包括 MDA、ROS、SOD、GSH-Px、睾丸组

收稿日期: 2003-09-11; 修回日期: 2003-11-17

作者简介: 武英 (1950-), 女, 副主任医师。

织标志酶包括β-葡萄糖醛酸苷酶 (β-G)、LDH、LDHx、G-6-PD 和一氧化氮 (NO)、一氧化氮合酶 (NOS)。上述各指标的检测均按南京建成生物制品公司提供试剂盒说明书进行。G-6-PD 应用 2, 6-二酚酞酚连续比色法进行测定^[7]。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 软件进行数据处理, 进行方差分析和 *q* 检验。

2 结果

表 1 染毒组大鼠血清中脂质过氧化指标测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	MDA (nmol/ml)	ROS (U/ml)	SOD (NU/ml)	GSH-Px (U/ml)
阴性对照组	10	17.84±3.26	989.43±82.37	510.66±59.34	182.46±13.46
染毒 10 mg/kg 组	10	17.01±2.98	998.16±84.20	500.43±56.71	184.32±15.10
染毒 20 mg/kg 组	10	16.84±3.04	948.23±93.40	514.36±48.79	174.54±13.28
染毒 40 mg/kg 组	10	16.76±2.79	962.41±96.32	512.58±51.33	176.32±14.25

表 2 染毒组大鼠睾丸匀浆中脂质过氧化指标测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	MDA (nmol/mg prot)	ROS (U/mg prot)	SOD (NU/mg prot)	GSH-Px (U/mg prot)
阴性对照组	10	0.57±0.03	2.00±0.25	25.76±3.42	1.81±0.27
染毒 10 mg/kg 组	10	0.55±0.04	2.07±0.40	24.42±2.84	1.78±0.31
染毒 20 mg/kg 组	10	0.59±0.06	2.98±0.24*	17.10±2.31*	1.73±0.29
染毒 40 mg/kg 组	10	0.71±0.07*	3.78±0.31**	15.34±2.43**	1.19±0.30*

与阴性对照组比较, **P*<0.05 ***P*<0.01, 下表同。

2.2 染毒大鼠血清和睾丸匀浆中 NO 和 NOS 活力测定结果

表 3 可见, NOS 活力虽各染毒组均升高, 但剂量-效应关系不显著, *r*=0.1938 (*P*>0.05)。

2.3 染毒大鼠血清和睾丸匀浆中睾丸标志酶活力测定结果

从表 4 可见, 血清中 LDHx 和 G-6-PD 在 40 mg/kg 组与阴

2.1 染毒大鼠血清和睾丸匀浆中脂质过氧化指标测定结果

从表 1 可见, 染毒 30 d 氯化锰组各指标与阴性对照组比较差异均无显著性 (*P*>0.05)。从表 2 可见, 在 20 mg/kg 组大鼠睾丸匀浆中 SOD 和 ROS 与阴性对照组比较差异有显著性 (*P*<0.05), 随染毒剂量增加, 改变更加显著, 存在着明确的剂量-效应关系, *r* 值依次为 0.5782 和 -0.5347 (均 *P*<0.05)。

性对照组比较差异有显著性 (*P*<0.05)。由表 5 可见在 20 mg/kg 组 LDHx 和 G-6-PD 活力就开始低于阴性对照组, 在 40 mg/kg 组降低更明显且存在剂量-效应关系, *r* 值为 -0.5814 和 -0.4972 (均 *P*<0.05)。β-G 活力仅在 40 mg/kg 组低于阴性对照组, 差异有高度显著性 (*P*<0.01)。

表 3 染毒组大鼠血清和睾丸匀浆中 NO 和 NOS 测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	血 清		睾 丸 匀 浆	
		NO (μmol/L)	NOS (U/ml)	NO (μmol/g prot)	NOS (U/g prot)
阴性对照组	10	31.34±17.48	42.66±7.63	0.34±0.08	0.44±0.07
染毒 10 mg/kg 组	10	33.56±18.24	40.48±8.11	0.34±0.06	0.56±0.06**
染毒 20 mg/kg 组	10	30.70±18.74	42.37±6.86	0.37±0.08	0.53±0.08**
染毒 40 mg/kg 组	10	35.42±16.49	40.85±7.17	0.33±0.07	0.57±0.10**

表 4 染毒组大鼠血清中各标志酶活性测定结果 ($\bar{x} \pm s$) U/L

组 别	<i>n</i>	LDH	LDHx	β-G	G-6-PD
阴性对照组	10	2436.71±878.24	206.97±74.22	45.32±7.81	44.33±17.56
染毒 10 mg/kg 组	10	2448.43±927.43	240.43±58.44	43.74±8.43	46.38±18.34
染毒 20 mg/kg 组	10	2518.84±918.50	188.37±42.73	46.31±7.59	40.52±16.74
染毒 40 mg/kg 组	10	2532.81±103.25	143.35±43.43**	40.58±8.72	29.89±17.84**

表 5 染毒组大鼠睾丸匀浆中各标志酶活性测定结果 ($\bar{x} \pm s$) U/g prot

组 别	<i>n</i>	LDH	LDHx	β-G	G-6-PD
阴性对照组	10	2943.91±234.38	356.84±68.12	2.43±0.26	1.96±1.24
染毒 10 mg/kg 组	10	2874.26±310.84	361.45±54.38	2.38±0.31	1.83±1.16
染毒 20 mg/kg 组	10	2831.63±246.83	230.31±48.42*	2.40±0.24	1.03±0.65*
染毒 40 mg/kg 组	10	2588.44±314.25	184.82±50.63**	1.74±0.21**	1.06±0.76*

2.4 染毒大鼠睾丸、附睾器官组织病理学检测结果

大体剖检仅见 40 mg/kg 染毒组大鼠睾丸充血略有肿胀, 其他各染毒组睾丸、附睾、精囊腺和前列腺大体剖检均未见异常发现。睾丸、附睾的质量和脏器系数测定结果见表 6。光镜下可见 40 mg/kg 染毒组大鼠曲细精管生精上皮变薄, 层次

排列紊乱并减少。管腔中精细胞和精子数较对照组明显减少, 精细胞、支持细胞和间质细胞均有空泡样变性, 附睾管上皮变薄, 管腔内精子较对照组明显稀疏减少, 其他各剂量组睾丸、附睾、精囊腺及前列腺未发现有意义的组织病理学改变。

表 6 染毒大鼠睾丸和附睾质量及脏器系数测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重 (g)	睾丸质量 (g)	脏器系数	附睾质量 (g)	脏器系数
阴性对照组	10	351±28	2.62±0.19	7.46±0.84	0.83±0.07	2.36±0.32
染毒 10 mg/kg 组	10	350±31	2.71±0.26	7.74±0.69	0.84±0.10	2.40±0.22
染毒 20 mg/kg 组	10	347±25	2.64±0.18	7.09±0.71	0.77±0.14	2.22±0.31
染毒 40 mg/kg 组	10	298±28	3.25±0.34*	10.91±0.58*	0.58±0.11*	1.95±0.24*

3 讨论

本研究发现染毒氯化锰 30 d 剂量达 20 mg/kg 时便可使睾丸匀浆中的 ROS 升高和 SOD 活力下降。染毒剂量升至 40 mg/kg 时组织匀浆中 MDA 开始升高, ROS 升高更明显, 而 SOD 和 GSH-Px 活力下降, 且 ROS 和 SOD 的变化均存在明确的剂量-效应关系, 说明氯化锰可通过血睾屏障, 在睾丸组织内产生活性氧自由基, 使睾丸组织发生脂质过氧化作用, 使 MDA 升高, 抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活力下降, 由此导致生精上皮细胞膜、支持细胞和间质细胞受损。病理学可见, 曲细精管变薄, 层次减少, 排列紊乱, 管腔精细胞减少, 生精细胞、间质细胞和支持细胞空泡变性等改变。因而出现生精细胞功能和睾酮分泌下降, 支持细胞分泌的生长因子减少, 使生殖功能受到损害。而在同样染毒条件下, 血清中各指标变化不明显, 说明睾丸组织对锰的损害作用较其他组织敏感, 氯化锰对睾丸和附睾的脂质过氧化作用是使雄性生殖功能受损的重要机制之一。

G-6-PD、 β -G、LDH 和 LDHx 可分别作为睾丸间质细胞、支持细胞、生精上皮和精子的标志酶, 它们活力的改变影响各细胞的生理、生化功能, 导致睾酮分泌下降, 精细胞生长因子减少, 精子发生和发育受阻, 生精功能受损^[8]。本研究结果显示, 染毒氯化锰 20 mg/kg 时大鼠睾丸匀浆中的 G-6-PD 和 LDHx 活力就开始下降, 剂量达 40 mg/kg 时, 血清和睾丸匀浆中 LDHx、G-6-PD 和睾丸匀浆中 β -G 活力均明显低于阴性对照组, 说明睾丸间质细胞、支持细胞和生精细胞及精子的功能均受到了损害, 由于上述酶活性下降, 进一步加重了这些细胞的生化、生理功能的损伤。睾丸标志酶活性下降, 影响各细胞的功能是致雄性生殖功能受到损害的又一机制。

NOS 有两种类型, 即原型一氧化氮合酶 (CNOS) 和诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)。Zini 等研究认为睾丸间质细胞和支持细胞中都存在有 iNOS, 它参与精子生成和成熟过程的调解,

当睾丸缺血再灌注后, 脱落的生精上皮细胞中 iNOS 升高^[9]。本研究发现, 仅睾丸匀浆中各染毒组 NOS 活性明显高于对照组, 但各染毒组间活性升高差异不显著, 与 Zini 的研究结果相近^[9], 说明氯化锰影响 NOS 活力, 亦可能使生精功能调解受损而影响雄性生殖功能。

综上所述, 亚急性染毒氯化锰 30 d 可使大鼠睾丸组织产生活性氧自由基, 对睾丸组织有脂质过氧化作用, 损伤各种细胞的生物膜及膜上酶的活性, 使睾丸标志酶活力下降和 NOS 活力增加, 进一步损伤生精上皮、支持细胞、间质细胞的功能, 并加重了组织病理学损伤, 对雄性生殖系统的结构和功能形成一个损伤链, 这可能是锰产生雄性生殖毒性的部分机制。

参考文献:

- [1] 夏元洵. 化学物毒性全书 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1991. 77-83.
- [2] 梁友信. 劳动卫生与职业病学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 70-71.
- [3] Shupe RM. Hormones and testis development and possible adverse effects of environmental chemicals [J]. Toxicol Lett, 2001, 31: 221-232.
- [4] 罗圣庆, 董定龙. 锰对雄性生殖功能影响 [J]. 职业医学, 1991, 18: 108-110.
- [5] 王子元, 李宝贵, 林磊光, 等. 氯化锰对雄性小鼠生殖细胞诱变性研究 [J]. 中国工业医学杂志, 2002, 15 (1): 8-12.
- [6] 姜岳明, 陆继培, 谢佩意, 等. 锰对男工性功能及生殖节育影响 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1996, 14 (5): 271-273.
- [7] 王坤, 翟韬, 左砚琴. 实用诊断酶学 [M]. 重庆: 科学技术文献出版社重庆分社, 1989. 514-543.
- [8] 江泉观, 于永强. 雄 (男) 性生殖毒理学 [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1994. 225-245.
- [9] Zini A, Schulsinger D. Localization of inducible nitric oxide synthase in the normal postischemic rat testis [J]. Fertil Steril, 1996, 66: 205-209.

(上接第 165 页)

工作能力是职业卫生面临的重要任务之一。

参考文献:

- [1] 詹承烈. 劳动心理学研究及其名词概念统一规范问题 [J]. 劳动医学, 1999, 16 (1): 37-38.
- [2] 王治明, 兰亚佳. 紧张和职业紧张 [J]. 劳动医学, 2001, 18 (3): 186-188.
- [3] Ross RR, Altmier EM. Intervention in occupational stress [M]. First Published. London: Sage publication. 1994. 12-14.
- [4] Osipow, SH. Occupational stress inventory revised edition (OSI-R). 5th ed. [M]. Odessa: Psychological Assessment Resources, Inc.

1998. 1-10.

- [5] 李健, 兰亚佳, 王治明, 等. 职业紧张量表 (OSI-R) 信度、效度验证 [J]. 工业卫生与职业病杂志, 2001, 27 (2): 137-139.
- [6] 马来记, 周彤, 金泰康, 等. 工作能力指数表中文版的信度和效度 [J]. 劳动医学, 2000, 17 (2): 70-72.
- [7] 余善法. 国外职业紧张测试工具简介. 工业卫生与职业病, 1997, 23 (2): 126-128.
- [8] Pithers RT, Socen R. Scottish and Australian teacher stress and strain: a comparative study [J]. Br J Educational Psychology, 1998, 68: 269-279.
- [9] Niles SG, Anderson WP. Career development and adjustment: The relation between concerns and stress [J]. Journal of Employment Counseling, 1993, 30 (1): 79.