

高温对睾丸细胞内活性氧水平的影响 及川芎嗪保护作用的研究

郑晶¹, 孙鹤², 王纯慧¹, 郭京晓¹, 刘芳¹

(1. 黑龙江省疾病预防控制中心公共卫生监测所, 黑龙江 哈尔滨 150030 2. 哈尔滨二四二医院预防保健科, 黑龙江 哈尔滨 150066)

摘要: 目的 探讨高温对雄性生殖细胞的氧化损伤作用及川芎嗪对细胞的保护作用。方法 以猪睾丸细胞为研究对象, 分为高温 (43℃ 1 h、43℃ 2 h) 组、高温+37℃ 6 h组、高温+川芎嗪 (80、160和 320 μg/ml) 组和阴性对照组, MTT比色法检测细胞损伤作用, 采用激光共聚焦显微镜和流式细胞仪结合细胞活性氧检测试剂盒观察细胞内活性氧水平变化。结果 在本实验条件下, 高温对睾丸细胞没有明显的细胞损伤作用; 43℃作用细胞 1 h 细胞内活性氧未见明显升高 ($P>0.05$), 43℃作用细胞 2 h 细胞内活性氧显著升高 ($P<0.05$), 即使脱离高温环境, 短时间内活性氧水平亦未见降低; 160 μg/ml和 320 μg/ml川芎嗪能明显降低高温所致细胞内活性氧水平。结论 高温能使睾丸细胞内活性氧生成增加, 诱发氧化损伤, 川芎嗪能抑制高温所致细胞内活性氧的升高, 对细胞具有保护作用。

关键词: 高温; 川芎嗪; 活性氧; 氧化损伤

中图分类号: R135 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2010)06-0403-03

Effect of high temperature on reactive oxygen species in testicular cells and
protective effect of tetramethylpyrazine

ZHENG Jing, SUN He, WANG Chunhui, GUO Jingxiao, LIU Fang

(1. Department of Public Health Surveillance, Heilongjiang Provincial Center for Disease Control, Harbin 150030, China;
2. Department of Prevention and Health, Harbin Two Four Two Hospital, Harbin 150066, China)

Abstract: Objective To explore the oxidative damage effect of high temperature on male sex cells and the protective effect of tetramethylpyrazine (TMP) on it. Methods Swine testicular cells were divided into high temperature groups (43℃ 1 h and 43℃ 2 h), high temperature + 37℃ 6 h group, high temperature + TMP group and control group. MTT colorimetric assay was used to determine cell injury. The changes of reactive oxygen species (ROS) were measured by ROS test kit, laser confocal microscopy and flow cytometry. Results The results showed that there was no cell injury at high temperature, and there was no obvious increase in ROS after 1 h exposure to 43℃ ($P>0.05$), but ROS significantly increased after 2 h exposure to 43℃ ($P<0.05$) even moved away from high temperature. 160 μg/ml and 320 μg/ml TMP could inhibit the increase of ROS induced by high temperature. Conclusion It was suggested that high temperature could increase ROS levels in swine testicular cells and induce oxidative damage, while TMP might inhibit the rise of ROS in swine testicular cells caused by high temperature and showed protective effect on cells.

Key words: high temperature; tetramethylpyrazine (TMP); reactive oxygen species (ROS); oxidative damage

温度作为一种外在因素对男性生殖功能的影响愈来愈被重视, 尤其是作业场所高温对职业工人的影响已成为当前研究的热点。长期高温作业能影响人体健康, 如影响人体的热平衡、水盐代谢、神经系统、循环系统、消化系统等。常见的高温作业工种较多, 如铸造工、冶炼工、锅炉工及厨师等, 这些工种的作业人员 90% 为男性, 又多处于性生活和生育旺盛期, 如果长期在该环境中工作, 可能影响生殖功能而引起

不育, 因此, 高温对男性生殖功能的不良影响不容忽视。正常生理情况下, 体内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生和清除处于动态平衡, 当机体处于应激状态时, 会使 ROS 产生增加, 而 ROS 清除体系能力不足, 造成体内 ROS 蓄积, 导致机体的氧化损伤^[1]。因此, 本研究以猪睾丸细胞为研究对象, 以活性氧为着眼点, 探讨高温对睾丸细胞的氧化损伤作用, 并探寻缓解睾丸细胞氧化损伤的预防措施, 为揭示高温对男性生殖功能不良影响的作用机制提供新思路。

收稿日期: 2010-05-26 修回日期: 2010-07-13

作者简介: 郑晶 (1976-), 女, 主管医师, 硕士, 主要从事职业卫生工作。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

川芎嗪 (tetraethylpyrazine TMP) 购自南京泽朗医药科技有限公司, 纯度 98%, 白色针状结晶, 溶于 60℃热水中; MEM培养基购自美国 Invitrogen 公司; 小牛血清购自上海纬群生物技术有限公司; EDTA胰酶和 MTT 购自美国 Sigma 公司; 活性氧检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; 流式细胞仪 (Beckman 美国); 电热鼓风干燥箱 (泰斯特, 中国)。

1.2 细胞培养

猪睾丸精原 (ST) 细胞由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所王永博士惠赠。细胞在 37℃、5% CO₂ 条件下培养于含 10% 小牛血清的 MEM 培养基中, EDTA 胰酶消化、传代, 取对数生长期细胞用于实验。

1.3 细胞分组与处理

实验设高温 (43℃ 1 h、43℃ 2 h) 组、高温 + 37℃ 6 h 组、高温 + TMP (80、160、320 μg/ml) 组和阴性对照组。

高温组细胞置于电热干燥箱中 43℃ 恒温烘烤不同时间; 高温 + TMP 组细胞先加入不同浓度 TMP 预培养 12 h 后, 再 43℃ 恒温烘烤; 阴性对照组细胞不做任何处理。

1.4 细胞毒性 (MTT 比色法)

细胞接种于 96 孔培养板 (1×10⁴ 孔), 培养 24 h 后按上述方法处理细胞, 每组设 6 个重复孔, 然后 37℃ 继续培养 24 h 培养结束前 4 h 每孔加入 20 μl MTT (5 mg/ml), 培养结束后弃去液体, 每孔加入 150 μl DMSO 震荡混匀后酶标仪 490 nm 波长测定吸光度 (OD) 值, 按下列公式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - \frac{\text{实验组吸光度}}{\text{阴性对照组吸光度}} \times 100\%$$

1.5 细胞活性氧检测

2×10⁴ 个细胞接种于细胞培养瓶中, 经上述方法处理细胞后, 按试剂盒说明书操作。采用原位装载探针的方法, 加入 DCFH-DA (终浓度 3.3 μmol/L) 37℃ 孵育 20 min 用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次, 收集细胞悬浮于 PBS 溶液中流式细胞仪检测。阳性对照组采用试剂盒提供的阳性对照试剂。

2×10⁴ 细胞爬片接种于 6 孔培养板中, 以上述方法处理后, 按试剂盒说明书操作, 采用原位装载探针的方法于激光共聚焦显微镜下观察细胞内荧光强度并拍照。

1.6 数据分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS3.0 软件采用 ANOVA 方差分析进行统计学分析, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高温及 TMP 联合作用对细胞损伤的作用

高温组和高温 + TMP 组细胞生长抑制率为 10% 左右, 各组间差异无统计学意义, 未见明显的生长抑制作用, 结果见表 1。因此, 在本实验条件下, 可认为高温对睾丸细胞无明显的细胞损伤作用。

表 1 高温对睾丸细胞的损伤作用

组别	抑制率 (%)
43℃ 1 h	9.130±1.194
43℃ 2 h	10.510±0.656
80 μg/ml TMP+43℃ 1 h	10.420±1.126
160 μg/ml TMP+43℃ 1 h	9.320±0.989
320 μg/ml TMP+43℃ 1 h	8.950±1.232
80 μg/ml TMP+43℃ 2 h	9.870±1.363
160 μg/ml TMP+43℃ 2 h	10.420±1.323
320 μg/ml TMP+43℃ 2 h	9.870±0.989

2.2 高温对睾丸细胞内活性氧水平的影响

本研究所使用的活性氧检测试剂盒是利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测。细胞内的活性氧可以将 DCFH (无荧光) 氧化生成 DCF (有荧光), 观察 DCF 荧光强度就可以知道细胞内活性氧水平。

激光共聚焦显微镜下可见阴性对照组细胞内无荧光或发出微弱荧光, 流式细胞仪检测荧光强度为 0.730±0.208 表明细胞内活性氧水平较低, 而阳性对照组可见细胞内发出较强的荧光, 分布于细胞周边。实验组中, 43℃ 1 h 组细胞内可观察到较弱的荧光强度, 但 37℃ 继续孵育 6 h 后细胞内荧光强度明显增强, 平均荧光强度为 2.100±0.265 与对照组和 43℃ 1 h 组比较差异均有统计学意义 (P<0.05); 43℃ 处理细胞 2 h 细胞内荧光强度明显强于 43℃ 1 h 组 (P<0.05), 37℃ 孵育 6 h 后细胞内荧光强度继续增强, 平均荧光强度达到 3.830±0.451, 表明细胞内活性氧水平显著升高, 结果见图 1 (封三) 和表 2。

表 2 高温所致睾丸细胞内活性氧荧光强度变化

组别	荧光强度
阴性对照组	0.730±0.208
43℃ 1 h 组	1.070±0.115
43℃ 1 h 组 + 37℃ 6 h 组	2.100±0.265 ^{ab}
43℃ 2 h 组	3.070±0.153 ^{abc}
43℃ 2 h 组 + 37℃ 6 h 组	3.830±0.451 ^{abcd}
试剂盒阳性对照	9.270±0.929 ^a

注: a 与阴性对照组比较, P<0.05; b 与 43℃ 1 h 组比较, P<0.05; c 与 43℃ 1 h + 37℃ 6 h 组比较, P<0.05; d 与 43℃ 2 h 组比较, P<0.05。

2.3 TMP对高温所致睾丸细胞内活性氧水平升高的抑制作用

如图 2 (封三) 和表 3 所示, 43℃ 1 h+ TMP 组细胞内荧光强度比阴性对照组略有所增强, 而低于 43℃ 1 h 组, 但与对照组和 43℃ 1 h 组差异无统计学意义; 43℃ 2 h+80μg/ml TMP 组细胞内荧光强度比 43℃ 2 h 组减弱, 但差异无统计学意义, 而与阴性对照组差异有统计学意义 (P<0.05); 43℃ 2 h+ TMP (160 μg/ml、320 μg/ml) 组细胞内荧光强度显著减弱, 平均荧光强度为 1.500±0.361, 与 43℃ 2 h 组和 43℃ 2 h+80 μg/ml TMP 组差异均有统计学意义 (P<0.05), 表明 TMP 能抑制高温诱导的细胞内活性氧水平的升高。

表 3 高温与 TMP 联合作用对睾丸细胞内活性氧荧光强度变化影响

组 别	荧光强度
阴性对照组	0.730±0.208
80 μg/ml TMP+43℃ 1 h	0.900±0.265
160 μg/ml TMP+43℃ 1 h	1.000±0.100
320 μg/ml TMP+43℃ 1 h	0.870±0.115
80 μg/ml TMP+43℃ 2 h	2.900±0.173 ^a
160 μg/ml TMP+43℃ 2 h	2.130±0.208 ^a
320 μg/ml TMP+43℃ 2 h	1.500±0.361 ^{ab}
试剂盒阳性对照	9.270±0.929 ^a

注: a 与阴性对照组比较, P<0.05 b 与 80μg/ml TMP+43℃ 2 h 组比较, P<0.05

3 讨论

ROS 是指含氧的自由基, 是细胞氧化磷酸化过程氧的代谢副产物, 是一类有高度化学反应活性的含氧基团, 包括羟自由基 (·OH)、超氧阴离子自由基 (O₂⁻)、单线态氧 (O₂) 及过氧化氢 (H₂O₂) 等^[2]。ROS 容易与生物大分子发生反应, 导致细胞结构的破坏, 影响机体正常细胞和组织的功能, 从而引起机体呈现病理状态及多种疾病。研究结果表明, 在本实验条件下, 虽然高温对睾丸细胞没有明显的损伤作用, 但高温 (43℃) 作用睾丸细胞 2 h 即能显著增加细胞内 ROS 水平, 即使随后脱离高温环境 6 h 细胞内 ROS 水平仍继续增加, 表明高温能显著诱导细胞内 ROS 的产生, 进而可能会影响睾丸细胞的生理功能。过量 ROS 生成时会对生殖细胞产生损伤作用, 攻击细胞膜及脂蛋白中的多元不饱和脂肪酸, 导致细胞膜流动性下降和脂质过氧化、蛋白质和 DNA 破坏或参与诱导生殖细胞发生凋亡, 从而直接和间接影响机体的生殖功能^[3,4]。有研究发现, ROS 与精子畸形率有极密切的关系, ROS 产生过多时, 形态异常以及活动性差的精子数量则会增多^[5]。但需要注意的

是, 以往观察高温对睾丸生殖细胞损害作用的研究, 多采用的是高温对睾丸的局部作用, 而哺乳动物能借助于阴囊主动调节睾丸的温度, 因此, 如果高温对动物全身作用, 睾丸生殖细胞的氧化损伤程度如何, 需要通过动物实验来进一步揭示。

川芎嗪 (TMP) 是从川芎的干燥根茎中提取的一种生物碱单体, 其化学结构为 4 甲基吡嗪。研究表明 TMP 具有抗血小板聚集、扩张血管、保护血管内皮、改善微循环等多种药理作用, 用于部分心脑血管等疾病的治疗并取得良好疗效^[6]; TMP 同时还具有抗氧化、抑制和消除自由基产生、提高内源性超氧化物歧化酶活性等生物作用, 但其作用机制尚未阐明^[7]。在本研究中, 我们还观察了 TMP 对高温所致睾丸细胞内活性氧变化的影响, 结果表明 TMP 能显著抑制高温所致的细胞内 ROS 的产生, 即对细胞具有保护作用, 具有剂量-效应关系, 这也进一步证明了 TMP 具有抗氧化、抑制自由基的作用, 同时也为探寻缓解高温对机体的氧化损伤作用提供了研究方向。但本实验的研究发现是通过体外实验所得, 由于 TMP 在体内代谢较快, 在体内试验中 TMP 能否通过血睾屏障到达睾丸组织以及作用如何, 也有待于今后通过动物实验来解释。

综上所述, 在本实验条件下, 高温能显著增加睾丸细胞内活性氧水平, 进而影响睾丸细胞的正常生理功能, 川芎嗪能抑制高温所致的睾丸细胞内活性氧的生成, 对细胞具有保护作用。

参考文献:

[1] Sahin K, Onderci M, Sahin N, et al. Effects of dietary combination of chromium and biotin on egg production, serum metabolites and egg yolk mineral and cholesterol concentrations in heat-distressed laying quails [J]. *Biological Trace Element Research* 2004; 101(2): 181-192.

[2] Nong Q, Komatsu M, Izumo K, et al. Involvement of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced cytogenotoxicity [J]. *Free Radic Res* 2007; 41 (12): 1326-1337.

[3] Sanocka D, Kułpiński M. Reactive oxygen species and sperm cells [J]. *Reprod Biol Endoc* 2004; 23 (2): 12-16.

[4] Jung CK, Bezek S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species—cause or consequence of tissue injury [J]. *Gene Phys Bioph* 2005; 24 (3): 263-278.

[5] Zakaria AA, Ahmed AH, Allamaneni SS, et al. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress [J]. *Asian J of Andro* 2004; 6 (4): 313-318.

[6] 何维来, 陈如坤, 周汝元. 川芎嗪对结扎犬 IAD 损伤冠脉内皮及心肌的保护作用 [J]. *第四军医大学学报*, 2005; 26 (23): 2152-2155.

[7] Feng L, Xiong Y, Cheng F, et al. Effect of ligustrazine on ischemia-reperfusion injury in murine kidney [J]. *Trans Proc* 2004; 36 (7): 1949-1951.

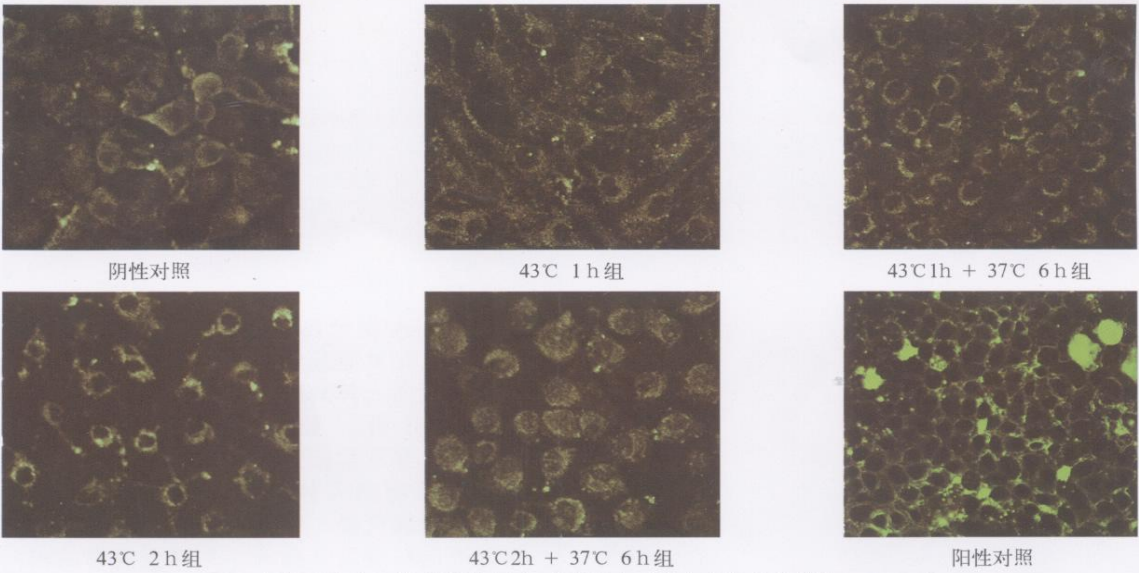


图 1 高温对睾丸细胞内活性氧水平的影响 (激光共聚焦显微镜, 600 ×)

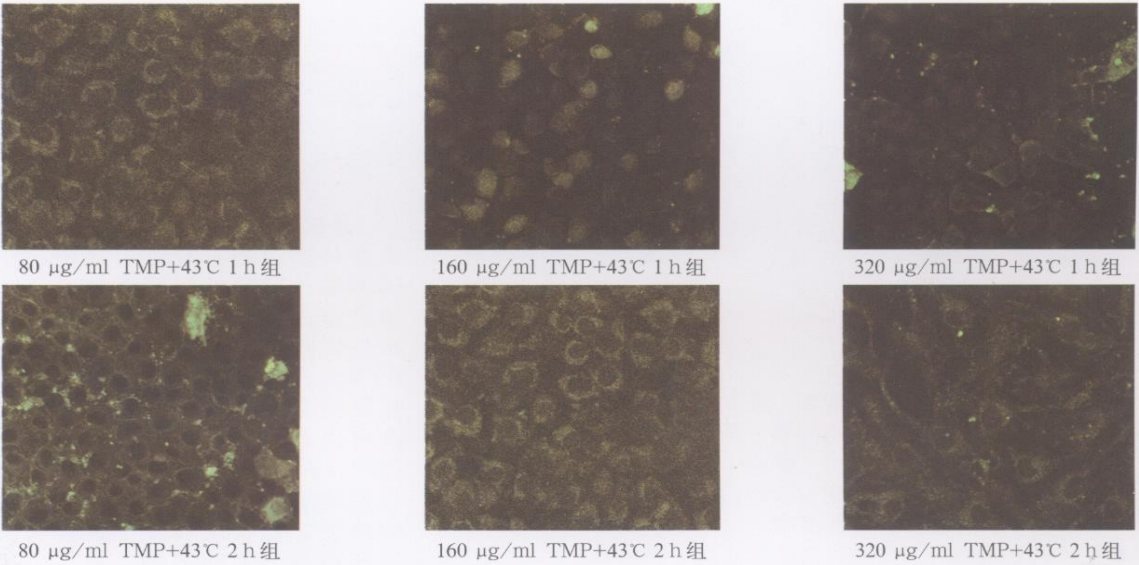


图 2 高温+TMP 对睾丸细胞内活性氧水平的影响 (激光共聚焦显微镜, 600 ×)

三氯乙烯致敏豚鼠肝脏 MDA 含量和 SOD 活力的测定(正文见 406~408 页)

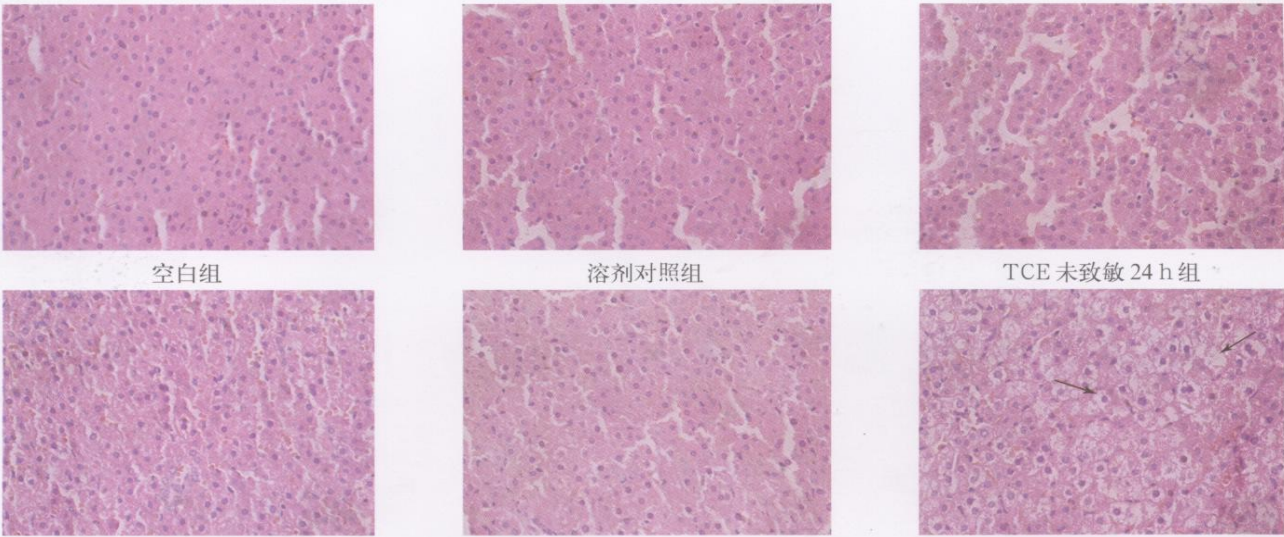


图 3 各组肝脏组织病理学改变 (HE, 200 ×)