

• 实验研究 •

氯化镧对小鼠生殖功能及抗氧化应激酶的影响

Effect of lanthanum chloride on reproductive function and antioxidative kinase in mice

刘秋芳¹, 杨敬华¹, 巫生文¹, 翟玲玲², 蔡原¹LIU Qiu-fang¹, YANG Jing-hua¹, WU Sheng-wen¹, ZHAI Ling-ling², CAI Yuan¹

(1. 中国医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室, 辽宁 沈阳 110001; 2. 中国医科大学公共卫生学院儿童少年卫生学教研室)

摘要: 50 只小鼠随机分为 5 个组, 3 个染毒组分别给予不同浓度的氯化镧 (100、200、400 mg/kg), 阳性对照组给予环磷酰胺 30 mg/kg, 阴性对照组给予 0.2 ml/只生理盐水, 每天注射 1 次, 连续注射 5 d。分离附睾, 检测精子活动度和精子数量, 采用生化方法检测睾丸氧化抗氧化指标。随着氯化镧染毒剂量的增加, 精子总数和精子活动度呈下降趋势, 氯化镧染毒组的精子总数显著低于对照组小鼠 ($P < 0.01$)。200 mg/kg 和 400 mg/kg 染毒组的精子活动度显著低于阴性对照组小鼠 ($P < 0.01$)。染毒组和阳性对照组小鼠的 MDA 水平显著高于阴性对照组 ($P < 0.05$), GSH、SOD 水平显著低于阴性对照组小鼠 ($P < 0.01$)。提示氯化镧染毒可能影响小鼠生殖器官的发育, 并抑制体内某些抗氧化酶活性。

关键词: 氯化镧; 生殖; 氧化应激

中图分类号: R994.6 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2012)04-0277-02

随着稀土的广泛开发和利用, 其对生态环境及人类健康的影响已成为人们普遍关注的毒理学问题^[1-3]。镧为轻稀土元素, 是自然界中含量较多的稀土元素, 但目前镧对生殖系统影响的研究并不多见, 本次实验通过观察氯化镧对雄性小鼠生殖功能的影响, 检测精子活动度及睾丸氧化应激指标的变化, 探讨氧化应激与氯化镧对小鼠生殖功能影响的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物和染毒方法

选择 50 只健康的清洁级雄性昆明小鼠 (由中国医科大学提供), 体重 22~24 g, 10 只动物一组, 随机分成 5 个组, 3 个染毒组小鼠分别予 100、200、400 mg/kg 浓度的氯化镧染毒, 阳性对照组给予环磷酰胺 30 mg/kg, 阴性对照组给予 0.2 ml/只生理盐水, 每天注射 1 次, 连续注射 5 d。

1.2 观察指标与方法

参考文献[4]进行精子活力分级和活动度的计算。精子计数: 将精子悬液分别加热到 60℃ 杀死精子, 用细胞计数板按 RBC 计数法计数精子数, 换算成 1 ml 精子悬液中精子数目作为精子总数。

睾丸组织中 MDA、SOD 和 GSH 指标的测定按照南京建成试剂盒说明进行。

1.3 数据处理

采用 SPSS16.0 统计软件进行统计学分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较 5 组测定指标是否有差异, 用单因素方差分析, 随后采用 LSD 法进行两两比较。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 氯化镧对小鼠精子数和精子活动度的影响

随着氯化镧染毒剂量的增加, 精子总数和精子活动度呈下降趋势, 氯化镧染毒各组的精子总数分别为 (10.28 ± 1.61) $\times 10^6$ /ml, (9.5 ± 0.98) $\times 10^6$ /ml, (8.26 ± 2.08) $\times 10^6$ /ml, 显著低于对照组小鼠 [$(13.40 \pm 1.94) \times 10^6$ /ml] ($P < 0.01$)。染毒 200 mg/kg 组和 400 mg/kg 组的精子活动度分别为 (67.60 ± 5.59)%, (64.20 ± 4.76)%, 显著低于阴性对照组小鼠 [$(75.60 \pm 2.40)\%$] ($P < 0.01$)。

2.2 睾丸 MDA、SOD、GSH 检测结果比较

染毒组和阳性对照组小鼠的 MDA 水平显著高于阴性对照组小鼠 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), GSH、SOD 水平显著低于阴性对照组小鼠 ($P < 0.01$), 而且染毒 200 mg/kg 组 GSH、SOD 水平显著低于 100 mg/kg 组 ($P < 0.01$)。详见表 1。

表 1 各组小鼠睾丸 MDA、SOD、GSH 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	MDA (nmol/mg prot)	GSH (mg/g prot)	SOD (U/mg prot)
阴性对照组	10	0.20 $\pm$ 0.02	14.77 $\pm$ 1.68	251.99 $\pm$ 20.87
染毒 100 mg/kg 组	10	0.29 $\pm$ 0.11*	10.90 $\pm$ 0.40**	209.01 $\pm$ 15.71**
染毒 200 mg/kg 组	10	0.28 $\pm$ 0.03*	8.52 $\pm$ 0.42***	166.76 $\pm$ 6.08***
染毒 400 mg/kg 组	10	0.30 $\pm$ 0.06*	7.77 $\pm$ 0.66**	158.47 $\pm$ 7.23**
阳性对照组	10	0.36 $\pm$ 0.09**	6.44 $\pm$ 0.44**	132.60 $\pm$ 12.79**

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与染毒 100 mg/kg 组比, # $P < 0.01$ 。

3 讨论

丙二醛 (MDA), 产生的氧自由基是一类具有高度化学反应活性的含氧基团, 对机体产生毒性作用, 甚至导致睾丸生精功能障碍^[5]。GSH 构成细胞防御氧化损伤机制中的第一道防线, 作为一种抗氧化机制来对抗活性氧。GSH 通过对活性氧的清除提高精子细胞抗氧化应激能力^[6]。SOD 是体内最主要的抗氧化酶之一, 是氧自由基的清除剂, 可保护细胞免受损伤, 对维持自由基代谢平衡起重要作用。SOD 活力水平反映了机体对抗自由基损伤的能力。

本实验发现氯化镧染毒组的精子数和精子活动度显著低

收稿日期: 2011-12-12; 修回日期: 2012-03-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30800925)

作者简介: 刘秋芳 (1959—), 女, 主管技师, 主要从事毒理学研究。

通讯作者: 蔡原, E-mail: cmuycai@163.com。

于阴性对照组,且有一定的剂量-反应关系。染毒组小鼠睾丸组织 MDA 含量显著升高,而 GSH 活性和 SOD 含量显著下降,且有一定的剂量-反应关系,可见染毒后睾丸组织的自由基与不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应增强,而机体抗氧化损伤的能力下降,机体精子细胞受到自由基严重攻击,导致精子膜损伤,损害生殖细胞的功能,这可能也是氯化镉染毒小鼠精子数和精子活动度下降的原因之一。

参考文献:

- [1] Xu H E. The progress of resource, environment and health in China [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2004: 43-64.
- [2] 陈祖义. 稀土元素的脑部蓄积性及其毒性效应 [J]. 世界元素医学, 2005, 12 (2): 5-9.
- [3] He X, Zhang Z Y, Zhang H F, et al. Neurotoxicological evaluation of long-term lanthanum chloride exposure in rats [J]. Toxicol Sci, 2008, 103: 354-361.
- [4] 张军, 潘发明. 甲胺磷对小鼠精子质量的影响 [J]. 中国工业医学杂志, 2002, 15 (4): 208-210.
- [5] Rees M D, Kennett E C, Whitelock J M, et al. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies [J]. Free Radic Biol Med, 2008, 44 (12): 1973-2001.
- [6] Matough F A, Budin S B, Hamid Z A, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications [J]. Sultan Qaboos Univ Med J, 2012, 12 (1): 5-18.

邻苯二甲酸二辛酯对大鼠卵巢颗粒细胞分泌功能的影响

Effect of dioctyl phthalate (DOP) on secretion of ovarian granulose cells in rats

赵力军¹, 沈晟¹, 王静², 陈曦¹, 孙增荣¹, 汤乃军¹

ZHAO Li-jun¹, SHEN Sheng¹, WANG Jing², CHEN Xi¹, SUN Zeng-rong¹, TANG Nai-jun¹

(1. 天津医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 天津 300070; 2. 天津市疾病预防控制中心, 天津 300011)

摘要: 以邻苯二甲酸二辛酯 (DOP) 对大鼠卵巢颗粒细胞进行体外染毒、培养来研究 DOP 对卵巢颗粒细胞分泌功能的影响。提取未成年大鼠卵巢颗粒细胞进行体外培养, DOP 染毒后测定细胞分泌产物 (雌二醇和孕酮) 含量。染毒组与对照组比较, 雌二醇和孕酮水平均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。雌二醇含量与 DOP 剂量的相关系数为 -0.68 ($P < 0.01$); 孕酮含量与 DOP 剂量的相关系数为 -0.79 ($P < 0.01$), 提示在实验剂量下产生剂量-反应关系。DOP 对大鼠卵巢颗粒细胞分泌功能有抑制作用。

关键词: 邻苯二甲酸二辛酯; 大鼠; 卵巢颗粒细胞; 雌二醇; 孕酮

中图分类号: R994.6 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2012)04-0278-03

邻苯二甲酸酯类 (phthalic acid esters, PAEs) 化合物是一类可干扰内分泌功能的环境污染物, 包括邻苯二甲酸二乙己基酯 (DEHP) 等 30 多种化合物^[1]。PAEs 化合物作为增塑剂, 遇到水或有机溶剂时极易释放出来, 从而对环境造成污染^[2]。PAEs 化合物是目前地球上最为广泛的污染物之一^[3], 具有生殖毒性^[4,5]、致癌性、致畸致突变作用^[6-8], 并可引起哮喘^[9]。邻苯二甲酸二辛酯 (DOP) 是一种应用非常广泛的增塑剂, 除用于塑料、橡胶、油漆及乳化剂等工业外, 还用于生产食品包装材料、医疗卫生制品等。本研究拟通过体外培养方法, 观察 DOP 对大鼠卵巢颗粒细胞分泌功能

的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物: 二级 Wistar 大鼠, 由中科院实验动物中心提供。

试剂: DMEM 培养基 (天津百若克医药生物技术有限责任公司), 青霉素、链霉素、标准胎牛血清 (天津灏洋生物制品科技有限公司), 孕马血清 (PMSG, 沈阳光大制药有限公司), DOP (分析纯)、二甲基亚砷 (天津化学试剂厂), 大鼠雌二醇、大鼠孕酮试剂盒 (美国 R&D)。

1.2 方法

取 DMEM 培养液, 无菌加入 10% 的标准胎牛血清, 再分别按照 60 U/ml、60 μ g/ml 加入青霉素和链霉素, 振荡摇匀, 4℃ 中保存。

采用未成年雌性大鼠, 皮下注射 PMSG, 100 IU/100 g, 48 h 后颈椎脱臼处死, 取出双侧卵巢, 在平皿中用磷酸缓冲液 (PBS) 清洗, 于 DMEM 培养基中用无菌的 20 ml 注射器针头刺破卵泡, 冲洗出颗粒细胞, 移入刻度离心管, 1 000 r/min 离心, 沉淀, 弃去上清液, 重复 3 次后用 DMEM 培养液定容细胞混悬液至 4 ml。

用培养液调整细胞密度, 按 1×10^6 个/L 浓度 200 μ l/孔于培养板中, 37℃、5% CO₂ 的培养箱培养。培养至细胞充分贴壁后更换不加血清的培养基, 并加入受试物, 再培养 24 h, 测定细胞分泌产物雌二醇、孕酮含量^[10]。

细胞分泌产物测定: 分别取标准品、待测培养液 25 μ l/孔加于相应反应孔中, 于 450 nm 处读取吸光度值。数据处理后获得标准曲线, 从标准曲线上查出被测样品的雌二醇、孕酮含量。

实验设高、中、低 3 个剂量组, 终浓度为 40、8、1.6 μ g/ml; 设等体积阴性对照与空白对照组。阴性对照不加受试

收稿日期: 2011-11-18; 修回日期: 2012-03-20

基金项目: 天津市科技支撑计划重点项目 (09ZCaYSF01700), 天津医科大学科研基金 (2010ky13)。

作者简介: 赵力军 (1955—), 男, 副教授, 研究方向: 工业毒理。