

牛磺酸对尼古丁致大鼠睾丸氧化损伤的保护作用

关怀^{1a}, 左中^{1b}, 常晓慧^{1c}, 张晶鑫², 唐冬梅², 尚丽新³

摘要: [目的] 探讨牛磺酸对尼古丁所致雄性大鼠睾丸氧化损伤的保护作用。[方法] 32只SD雄性大鼠, 随机分为阴性对照组、牛磺酸对照组、尼古丁染毒组及牛磺酸干预组。阴性对照组大鼠生理盐水1 mL皮下注射, 双蒸水1 mL灌胃; 牛磺酸对照组大鼠皮下注射生理盐水1 mL, 灌胃牛磺酸双蒸水溶液1 mL(牛磺酸量为100 mg/kg); 尼古丁染毒组大鼠皮下注射尼古丁生理盐水溶液1 mL(尼古丁量为2 mg/kg), 灌胃双蒸水1 mL; 牛磺酸干预组大鼠如上注射尼古丁生理盐水溶液和灌胃牛磺酸双蒸水溶液。皮下注射和灌胃每日1次, 连续4周。测定大鼠睾丸系数、附睾系数、精子密度和活率; 检测睾丸组织丙二醛(MDA)含量; 检测睾丸组织超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。[结果] 睾丸系数、附睾系数、精子密度和活率: 尼古丁染毒组大鼠显著低于另3组($P<0.05$), 牛磺酸干预组显著低于阴性对照组和牛磺酸对照组($P<0.05$); 睾丸组织MDA含量: 尼古丁染毒组大鼠显著高于另3组($P<0.05$), 牛磺酸干预组显著高于阴性对照组和牛磺酸对照组($P<0.05$); 睾丸组织SOD、CAT、GSH-Px活性: 尼古丁染毒组大鼠显著低于另3组($P<0.05$), 牛磺酸干预组显著低于阴性对照组和牛磺酸对照组($P<0.05$)。[结论] 尼古丁可致大鼠睾丸组织氧化损伤, 牛磺酸对此具有抗氧化保护作用。

关键词: 牛磺酸; 尼古丁; 睾丸; 氧化损伤; 抗氧化

Protective Effect of Taurine on Nicotine-Induced Oxidative Damage in Testis of Rats GUAN Huai^{1a}, ZUO Zhong^{1b}, CHANG Xiao-hui^{1c}, ZHANG Jing-xin², TANG Dong-mei², SHANG Li-xin³ (1.a.Department of Obstetrics and Gynecology b.Pathology Department c.Department of Medical Affairs, No.210 Hospital of PLA, Liaoning 116021, China; 2.Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Liaoning 116001, China; 3.Department of Obstetrics and Gynecology, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100700, China). Address correspondence to SHANG Li-xin, E-mail: guanhuaai_submit@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To assess the protective effect of taurine on nicotine-induced oxidative damage in testis of rats. [Methods] Thirty-two male SD rats were randomly divided into negative control, taurine control, nicotine exposed, and taurine intervention groups. The negative control group was treated with 1 mL physiological saline subcutaneously and 1 mL double distilled water by gavage. The taurine control group was treated with 1 mL physiological saline subcutaneously and 1 mL double distilled water containing 100 mg/kg taurine by gavage. The nicotine exposed group was treated with 1 mL physiological saline solution containing 2 mg/kg nicotine subcutaneously and 1 mL double distilled water by gavage. The taurine intervention group was treated with 1 mL physiological saline solution containing 2 mg/kg nicotine subcutaneously and 1 mL double distilled water containing 100 mg/kg taurine by gavage. All the treatments were conducted once a day and lasted four weeks. The organ coefficients of testis and epididymis, sperm count and motility rate, the content of malondialdehyde (MDA) in rat testis, and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in rat testis were examined. [Results] The organ coefficients of testis and epididymis as well as sperm count and motility rate were lower in the nicotine exposed group than in the other three groups ($P<0.05$), and were lower in the taurine intervention group than in the negative control group and taurine control group ($P<0.05$). The content of MDA in rat testis of the nicotine exposed group was significantly higher than those of the other three groups ($P<0.05$), and that of the taurine intervention group was also significantly higher than those of the negative control group and the taurine control group ($P<0.05$). The activities of SOD, CAT, and GSH-Px in rat testis were all significantly lower in the rats treated with nicotine than in the other three groups ($P<0.05$), and the taurine intervention group also presented

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.15273

[作者简介] 关怀(1976—), 女, 博士, 主治医师; 研究方向: 生殖和发育毒理学; E-mail: greeneve@163.com

[通信作者] 尚丽新, E-mail: guanhuaai_submit@163.com

[作者单位] 1.解放军第210医院 a.妇产科 b.病理科 c.医务处, 辽宁 116021; 2.大连大学附属中山医院妇产科, 辽宁 116001; 3.北京军区总医院妇产科, 北京 100700

lower levels than the negative control group and the taurine control group ($P < 0.05$). [Conclusion] Nicotine could induce oxidative damage in rat testis tissues. Taurine may antagonize the above toxic effects through antioxidant mechanism.

Key Words: taurine; nicotine; testis; oxidative damage; antioxidant

长期吸烟导致男性精子数量下降, 受精能力降低^[1]。此毒性作用主要由其中的尼古丁(nicotine)成分引起^[2]。尼古丁又称烟碱, 是烟草中的主要有机毒物。经吸烟摄入的尼古丁可进入血循环, 并穿过血睾屏障, 在睾丸组织沉积^[2]。研究表明, 氧化应激可能是尼古丁引起精子质量下降的主要原因之一^[2-3]。但针对该机制, 寻找保护雄性生殖器官免受尼古丁损伤的研究较少。牛磺酸(taurine), 是人体必需的非蛋白质氨基酸, 也是一种抗氧化剂, 除具有维持细胞内外渗透压平衡的生理功能外, 还能使损伤部位的抗氧化酶水平升高, 促进局部氧自由基的清除^[4]。已证实, 牛磺酸对多种毒物引起的氧化损伤具有保护作用, 但对尼古丁引起的睾丸组织氧化损伤的保护作用鲜见报道。本研究通过对雄性大鼠皮下注射尼古丁, 建立尼古丁染毒大鼠模型; 通过检测睾丸组织丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量了解局部脂质过氧化程度; 通过检测睾丸组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性了解局部抗氧化水平, 进而探讨牛磺酸对尼古丁致大鼠睾丸组织氧化损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

无特定病原体级(SPF)7周龄SD雄性大鼠32只, 由大连医科大学动物中心提供[许可证号: SCXK(辽)2008-0002, 20130715], 体重为190~210 g。饲养环境温度20~25℃, 湿度为50%~60%, 自然节律采光, 动物自由进食进水。

1.2 主要试剂与仪器

尼古丁(纯度>99%, 中国, 北京伊普瑞斯科技有限公司); 牛磺酸(美国, Sigma)。MDA、SOD、CAT和GSH-Px和检测试剂盒(中国, 南京建成生物工程研究所); JJ2000型电子秤(精确度0.1 g, 中国, 常熟双杰); CELL-VU RDRM-600精子计数板(美国, Millennium Sciences); HC-2518R高速冷冻离心机(中国, 科大创新股份有限公司中佳分公司); 恒温水浴振荡器(中国, 常州国华仪器厂)。

1.3 分组与处理

适应性饲养1周后, 将32只大鼠随机分为4组, 每组8只, 分别为阴性对照组、牛磺酸对照组、尼古丁染毒组和牛磺酸干预组。阴性对照组大鼠皮下注射生理盐水1 mL, 灌胃双蒸水1 mL; 牛磺酸对照组大鼠皮下注射生理盐水1 mL, 灌胃牛磺酸双蒸水溶液1 mL(牛磺酸量为100 mg/kg); 尼古丁染毒组大鼠皮下注射尼古丁生理盐水溶液1 mL(尼古丁量为2 mg/kg), 灌胃双蒸水1 mL; 牛磺酸干预组大鼠如上注射尼古丁生理盐水溶液和灌胃牛磺酸双蒸水溶液。皮下注射和灌胃每日1次, 连续4周。各组动物均自由饮用双蒸水。

1.4 实验方法

染毒结束次日晨, 称重后拉颈处死大鼠。迅速分离双侧睾丸及附睾组织, 生理盐水冲洗, 滤纸拭干, 天平称重, 计算脏器系数[脏器系数=(脏器质量/体重)×100]。分离附睾尾, 放入含1 mL精子洗涤液的离心管中, 眼科剪将其剪碎, 置37℃培养箱孵育1 h, 用精子计数板计数精子, 计算精子活率及密度。取睾丸组织200 mg, 于表面皿中剪碎, 再移至玻璃匀浆器, 加入匀浆介质(0.01 mol/L Tris-HCl, pH=7.4), 研磨10 min, 制成睾丸匀浆组织, 3600 r/min离心10 min(离心半径4 cm), 取上清液, 按照试剂盒说明书方法测定SOD、CAT和GSH-Px活性以及MDA水平。

1.5 统计学分析

数据分析采用SPSS 17.0软件。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述分布, 多组间均值比较采用one-way ANOVA分析, 两组间均值比较采用LSD检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 牛磺酸对尼古丁染毒大鼠脏器系数的影响

4组大鼠睾丸质量、睾丸系数、附睾质量和附睾系数比较, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。其中, 尼古丁染毒组大鼠上述4项指标低于阴性对照组和牛磺酸对照组($P < 0.05$); 牛磺酸干预组的4项指标也低于阴性对照组和牛磺酸对照组($P < 0.05$), 但高于尼古丁染毒组($P < 0.05$)。阴性对照组和牛磺酸对照组4项指标比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 牛磺酸对尼古丁染毒大鼠脏器系数的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	体重(g)	睾丸质量(g)	睾丸系数	附睾质量(g)	附睾系数
阴性对照组	232.35 ± 14.46	1.56 ± 0.09	0.67 ± 0.04	0.56 ± 0.04	0.24 ± 0.01
牛磺酸对照组	230.23 ± 12.54	1.52 ± 0.07	0.66 ± 0.03	0.57 ± 0.03	0.25 ± 0.02
尼古丁染毒组	229.92 ± 11.87	1.30 ± 0.10 ^{abd}	0.56 ± 0.05 ^{abd}	0.38 ± 0.04 ^{abd}	0.16 ± 0.02 ^{abd}
牛磺酸干预组	231.43 ± 13.66	1.42 ± 0.09 ^{abc}	0.61 ± 0.04 ^{abc}	0.46 ± 0.05 ^{abc}	0.20 ± 0.01 ^{abc}
<i>F</i>	2.33	8.45	3.26	6.78	7.52
<i>P</i>	0.37	0.00	0.04	0.02	0.01

[注]a: 与阴性对照组比较, $P<0.05$; b: 与牛磺酸对照组比较, $P<0.05$; c: 与尼古丁染毒组比较, $P<0.05$; d: 与牛磺酸干预组比较, $P<0.05$ 。

2.2 牛磺酸对尼古丁染毒大鼠精子密度及活率的影响

4组大鼠精子密度和活率比较, 差异均具有统计学意义($P<0.05$)。其中, 尼古丁染毒组大鼠上述2项指标低于阴性对照组和牛磺酸对照组($P<0.05$); 牛磺酸干预组2项指标低于阴性对照组和牛磺酸对照组($P<0.05$), 但高于尼古丁染毒组($P<0.05$)。阴性对照组和牛磺酸对照组2项指标比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

表2 牛磺酸对尼古丁染毒大鼠精子活率和密度的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	精子密度($10^6/\text{ml}$)	精子活率(%)
阴性对照组	5.35 ± 0.76	85.55 ± 6.27
牛磺酸对照组	5.29 ± 0.68	86.21 ± 7.59
尼古丁染毒组	2.89 ± 0.84 ^{abd}	64.37 ± 8.58 ^{abd}
牛磺酸干预组	4.45 ± 0.62 ^{abc}	73.43 ± 7.28 ^{abc}
<i>F</i>	34.58	15.46
<i>P</i>	0.00	0.00

[注]a: 与阴性对照组比较, $P<0.05$; b: 与牛磺酸对照组比较, $P<0.05$; c: 与尼古丁染毒组比较, $P<0.05$; d: 与牛磺酸干预组比较, $P<0.05$ 。

2.3 牛磺酸对尼古丁染毒大鼠睾丸组织MDA含量影响

4组大鼠睾丸组织MDA含量比较, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。其中, 尼古丁染毒组大鼠睾丸组织MDA含量高于另3组($P<0.05$), 牛磺酸干预组MDA含量高于阴性对照组和牛磺酸对照组($P<0.05$)。阴性对照组和牛磺酸对照组MDA水平比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

2.4 牛磺酸对尼古丁染毒大鼠睾丸组织SOD、CAT和GSH-Px活性影响

4组大鼠睾丸组织SOD、CAT和GSH-Px活性比较, 差异均具有统计学意义($P<0.05$)。其中, 尼古丁染毒组大鼠睾丸组织SOD、CAT和GSH-Px活性低于另3组($P<0.05$), 牛磺酸干预组上述3项指标低于阴性对照组和牛磺酸对照组($P<0.05$)。阴性对照组和牛磺酸对照组3项指标比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。

见表3。

表3 牛磺酸对尼古丁染毒大鼠睾丸组织MDA、CAT、SOD和GSH-Px水平影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	MDA (nmol/mg)	SOD (NU/mgt)	CAT (U/mg)	GSH-Px (U/mg)
阴性对照组	1.41 ± 0.16	141.55 ± 13.42	3.11 ± 0.17	42.51 ± 0.11
牛磺酸对照组	1.40 ± 0.09	139.89 ± 11.88	3.01 ± 0.21	41.77 ± 0.17
尼古丁染毒组	1.88 ± 0.14 ^{abd}	101.22 ± 14.65 ^{abd}	1.86 ± 0.13 ^{abd}	26.86 ± 0.16 ^{abd}
牛磺酸干预组	1.62 ± 0.14 ^{abc}	127.24 ± 11.49 ^{abc}	2.74 ± 0.12 ^{abc}	39.95 ± 0.14 ^{abc}
<i>F</i>	16.26	17.43	22.74	24.52
<i>P</i>	0.00	0.00	0.00	0.00

[注]a: 与阴性对照组比较, $P<0.05$; b: 与牛磺酸对照组比较, $P<0.05$; c: 与尼古丁染毒组比较, $P<0.05$; d: 与牛磺酸干预组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

长期吸烟和被动吸烟具有多种健康危害, 是全球的公共卫生问题之一^[5]。我国成年男性吸烟率高达52.9%, 总吸烟人群超过3亿, 被动吸烟人群高达7.4亿^[6]。吸烟或被动吸烟破坏雄性生殖功能, 其毒作用主要由其中的尼古丁成分引起^[2]。因此, 寻找对抗尼古丁毒性作用的物质并对相关机制进行研究具有现实意义。本研究中, 每只大鼠体重约为200g, 体表面积约0.0311m², 尼古丁给药剂量为2.0mg/kg, 按体表面积换算为成年男性(体重60kg, 体表面积1.6246m²)约0.33mg/kg, 相当于每天吸烟10支左右的尼古丁摄入量。实验期间, 全部动物均未出现中毒反应, 但尼古丁染毒大鼠精子质量下降, 提示染毒剂量合理。

本研究中, 尼古丁暴露导致大鼠睾丸和附睾组织重量及系数下降, 精子质量降低, 其原因可能与尼古丁对睾丸组织的直接损伤和导致生殖内分泌紊乱有关^[2]。精子细胞膜含有大量不饱和脂肪酸, 对脂质过氧化以及活性氧自由基诱导的损伤高度敏感^[7]。MDA是氧自由基攻击生物膜中多不饱和脂肪酸引起的脂质过氧化反应产生的主要终末代谢产物, 是反映机体细胞氧化应激程度的常用指标^[8]。SOD、CAT和GSH-Px

是机体最重要的抗氧化酶^[8]。其中, SOD是歧化超氧阴离子(O_2^-)的专一性酶, 而 O_2^- 是活性氧生成过程中的初始产物; CAT和GSH-Px将 H_2O_2 转化为 H_2O , 此步骤也受SOD催化。因此, SOD被称为活性氧防御的第一线, CAT和GSH-Px起支持作用。联合检测SOD、CAT和GSH-Px活性能反映机体抗氧化水平。本研究中, 尼古丁染毒导致大鼠睾丸、附睾质量和脏器系数下降, 精子密度和活力降低, 经检测睾丸组织MDA含量显著升高, 而SOD、CAT和GSH-Px活性显著降低, 证明尼古丁可致大鼠睾丸组织氧化-抗氧化系统失衡。有报道^[9]称, 尼古丁可抑制抗氧化酶活性, 考虑可能是其导致氧化应激的机制之一。牛磺酸可部分改善精子质量, 提高精子密度和精子活率, 经检测也显著降低MDA含量和升高SOD、CAT及GSH-Px活性, 表明牛磺酸可显著减轻尼古丁对大鼠睾丸组织的氧化损伤, 具有抗氧化保护作用。当然, 因其对人体的必需性, 牛磺酸对尼古丁生殖毒性的防护作用还可能涉及修复损伤等方面。

尽管国外个别报道^[2]称, 绿茶对尼古丁的雄性生殖毒性具有保护作用; 但作为机体必需的营养物质, 以牛磺酸对抗尼古丁毒性可能具有更好的开发前景。另外, 本研究中, 牛磺酸对尼古丁致大鼠睾丸组织氧化损伤只起到部分保护作用, 提示在牛磺酸使用剂量和尼古丁其他损伤机制方面, 尚需深入研究。

• 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

[1] Lotti F, Corona G, Vitale P, et al. Current smoking is

associated with lower seminal vesicles and ejaculate volume, despite higher testosterone levels, in male subjects of infertile couples[J]. Hum Reprod, 2015, 30(3): 590-602.

[2] Mosbah R, Yousef MI, Mantovani A, et al. Nicotine-induced reproductive toxicity, oxidative damage, histological changes and haematotoxicity in male rats: The protective effects of green tea extract[J]. Exp Toxicol Pathol, 2015, 67(3): 253-259.

[3] Jalili C, Salahshoor MR, Naseri A, et al. Protective effect of *Urtica dioica* L against nicotine-induced damage on sperm parameters, testosterone and testis tissue in mice[J]. Iran J Reprod Med, 2014, 12(6): 401-408.

[4] 于俊海. 牛磺酸的生物学效应与运动能力的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2014, 36(3): 25-28.

[5] 李建华, 刘江凤. 吸烟对人类健康主要危害的研究进展[J]. 国际内科学杂志, 2008, 35(5): 284-287.

[6] 中国卫生部. 中国吸烟危害健康报告[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 19-20.

[7] 刘苗苗, 张长城, 贾亮亮, 等. 五子衍宗方对环磷酸胺致小鼠睾丸氧化损伤的保护作用[J]. 中成药, 2013, 35(12): 2591-2597.

[8] 郭锡春, 高华, 刘坤, 等. 海参精囊两种提取物对环磷酸胺诱导的小鼠睾丸氧化损伤的保护作用[J]. 中国药房, 2015, 26(4): 497-499.

[9] Oyeyipo IP, Raji Y, Bolarinwa AF. Antioxidant profile changes in reproductive tissues of rats treated with nicotine[J]. J Hum Reprod Sci, 2014, 7(1): 41-46.

(收稿日期: 2015-04-10)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 汪源)

【告知栏】

《环境与职业医学》杂志声明

近来, 本刊陆续收到作者反映, 有多家网站冒用本刊名义收稿并收取高额审稿费。对此, 本刊郑重声明如下: 我们从未委托任何机构或个人征文, 本刊唯一投稿方式是通过登录《环境与职业医学》主页 <http://jeom.scdc.sh.cn:8081>, 望广大作者特别小心, 谨防受骗。

《环境与职业医学》杂志编辑部

2015年12月12日