

硫辛酸对全氟辛酸致雄性大鼠生殖毒性的保护作用

杨冬晗^{1a}, 李可欣^{1a}, 张文龙², 张智燕², 高艳荣^{1a}, 范娇^{1b}, 王朝亮^{1b}, 戈娜^{1a}

1. 包头医学院 a. 营养与食品健康研究所 b. 公共卫生学院, 内蒙古 包头 014040

2. 包头医学院第一附属医院, 内蒙古 包头 014010

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.20158

摘要:

[背景] 全氟辛酸 (PFOA) 对生殖健康的损害越来越受到人们的重视, 硫辛酸 (LA) 是否可以缓解 PFOA 所致的生殖损伤尚不明确。

[目的] 探讨 LA 对 PFOA 致雄性大鼠生殖毒性是否具有保护作用。

[方法] 6 周龄雄性 SD 大鼠 40 只, 随机分为 5 组, 每组 8 只。各组处理如下: 正常对照组, 玉米油 (0.2% 体重); LA 对照组, 100 mg·kg⁻¹ LA; PFOA 染毒组, 10 mg·kg⁻¹ PFOA; 低剂量 LA 干预组, 10 mg·kg⁻¹ PFOA+50 mg·kg⁻¹ LA; 高剂量 LA 组, 10 mg·kg⁻¹ PFOA+100 mg·kg⁻¹ LA。灌胃染毒 7 周后, 腹主动脉取血, 留取睾丸、附睾, 计算脏器系数。采用计算机辅助精子分析系统进行精子数量的检测, HE 染色进行睾丸组织的病理学观察, 分光光度法检测睾丸内琥珀酸脱氢酶 (SDH)、乳酸脱氢酶 (LDH) 活性, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测大鼠血清中睾酮和卵泡刺激素 (FSH) 含量, Western blotting 法检测各组大鼠睾丸组织中卵泡刺激素受体 (FSHR) 蛋白表达水平。

[结果] PFOA 染毒组大鼠睾丸脏器系数较正常对照组和 LA 对照组增高分别为 (9.41±0.40) %、(7.50±0.66) %, (8.21±0.94) % ($P<0.05$), 附睾精子数量降低 [(10.63±2.07) ×10⁶, (21.00±3.89) ×10⁶, (17.63±5.01) ×10⁶; $P<0.05$]。睾丸组织病理学结果显示: PFOA 染毒组较正常对照组大鼠生精小管内生精细胞层次减少, 生精细胞排列紊乱, 生精上皮出现较多的空泡化改变, 间质细胞数量减少且排列紊乱; 而各剂量 LA 干预组病变明显减轻。PFOA 染毒组大鼠血浆 SDH、LDH 活性较正常组大鼠下降 [(1.15±0.44)、(1.74±0.58) U·g⁻¹; (1.82±0.64)、(2.58±0.64) U·g⁻¹; $P<0.05$], 而经 100 mg·kg⁻¹ LA 干预后 SDH 活性有明显逆转, 且差异有统计学意义 ($P<0.05$)。此外, PFOA 染毒组大鼠与正常对照组相比, 睾丸内睾酮水平降低, FSH 水平升高, 睾丸组织 FSHR 蛋白表达量降低 ($P<0.05$), 而 LA 干预后可明显看到 FSH 水平下降, 且高剂量 LA 效果更加明显, 同时也减轻了睾丸组织 FSHR 蛋白的下降程度。

[结论] PFOA 对雄性大鼠具有生殖毒性效应, 而适量的 LA 补充可以缓解 PFOA 所致的生殖损伤。

关键词: 全氟辛酸; 硫辛酸; 生殖毒性; 大鼠; 性激素

Protective effect of lipoic acid on reproductive toxicity induced by pentadecafluorooctanoic acid in male rats YANG Dong-han^{1a}, LI Ke-xin^{1a}, ZHANG Wen-long², ZHANG Zhi-yan², GAO Yan-rong^{1a}, FAN Jiao^{1b}, WANG Chao-liang^{1b}, GE Na^{1a} (1.a.Institute of Nutrition and Health b.School of Public Health, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014040, China; 2.The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014010, China)

Abstract:

[Background] The reproductive damage induced by pentadecafluorooctanoic acid (PFOA) has raised increasing concerns, but if lipoic acid (LA) alleviates the damage is unknown.

[Objective] This experiment investigates whether LA could protect against the reproductive toxicity of PFOA in male rats.

[Methods] Forty male SD rats aged six weeks were randomly divided into five groups (eight rats in each group): blank control group (corn oil), LA control group (100 mg·kg⁻¹ LA), PFOA exposure group (10 mg·kg⁻¹ PFOA), low-dose LA intervention group (10 mg·kg⁻¹ PFOA+50 mg·kg⁻¹ LA), and high-dose LA intervention group (10 mg·kg⁻¹ PFOA+100 mg·kg⁻¹ LA). After seven weeks of administration by gavage, blood samples were collected from abdominal aorta, testes and

基金项目

内蒙古自治区大学生创新创业训练计划项目 (201910127005); 包头医学院科学研究基金项目 (BYJJ-YF-2018021); 包头医学院硕士研究生科研创新资助项目 (bycx2019003)

作者简介

杨冬晗 (1996—), 女, 硕士生;
E-mail: 1097179236@qq.com

通信作者

戈娜, E-mail: genayy80@163.com

利益冲突

无申报

收稿日期 2020-04-08

录用日期 2020-07-20

文章编号 2095-9982(2020)09-0891-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

杨冬晗, 李可欣, 张文龙, 等. 硫辛酸对全氟辛酸致雄性大鼠生殖毒性的保护作用 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (9): 891-896, 902.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.20158

Funding

This study was funded.

Correspondence to

GE Na, E-mail: genayy80@163.com

Competing interests

None declared

Received 2020-04-08

Accepted 2020-07-20

To cite

YANG Dong-han, LI Ke-xin, ZHANG Wen-long, et al. Protective effect of lipoic acid on reproductive toxicity induced by pentadecafluorooctanoic acid in male rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(9): 891-896, 902.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.20158

epididymis were harvested, and viscera coefficients were calculated. The sperm count was measured using computer aided sperm analysis system. Pathological observation of testicular tissues was conducted after HE staining. The activities of succinic acid dehydrogenase (SDH) and lactate dehydrogenase (LDH) in testis were detected by spectrophotometry, the contents of testosterone (T) and follicle-stimulating hormone (FSH) in serum by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the protein expression level of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in rat testis by Western blotting.

[Results] The testicular organ coefficient of the PFOA exposure group was higher than those of the blank control group and the LA control group $[(9.41\pm0.40)\%, (7.50\pm0.66)\%, (8.21\pm0.94)\%]$; $P<0.05$, and the epididymal sperm count was lower $[(10.63\pm2.07)\times10^6, (21.00\pm3.89)\times10^6, (17.63\pm5.01)\times10^6]$; $P<0.05$. The results of testicular histopathology showed reduced layers of disordered spermatogenic cells in the rat spermatogenic tubule of the PFOA exposure group compared with the blank control group, along with more vacuolization changes in the spermatogenic epithelium and less and disarranged leydig cells; while these lesions in the LA intervention groups were significantly reduced. The activities of SDH and LDH decreased after the PFOA treatment compared with the blank control group $[(1.15\pm0.44), (1.74\pm0.58) \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}; (1.82\pm0.64), (2.58\pm0.64) \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}]$; $P<0.05$, but the activity of SDH reversed after the $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ LA intervention ($P<0.05$). In addition, compared with the blank control group, the rats in the PFOA exposure group had lower T levels, higher FSH levels, and lower FSHR protein expression levels in the testicular tissues ($P<0.05$), and the rats after LA intervention showed lower FSH levels (far bigger falls for the high-dose LA intervention group) and alleviated reduction of FSHR protein expression levels.

[Conclusion] PFOA has a reproductive toxicity effect on male rats, while appropriate LA supplementation can protect against the reproductive injury caused by PFOA.

Keywords: pentadecafluorooctanoic acid; lipoic acid; reproductive toxicity; rat; sex hormone

全氟辛酸 (pentadecafluorooctanoic acid, PFOA) 是一种人工合成的有机氟化物, 被广泛应用于纺织、食品包装、家具以及各种医疗设备中^[1], 近年来其对男性生殖健康的损害越来越受到人们的重视。PFOA 可通过饮食和空气污染等多种途径进入人体, 可致肝脏、神经等多器官的损害, 美国环境保护署规定的 PFOA 饮用水阈值为 $200 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[2]。即使是非职业暴露人群, 也能在其肝、肾、肺、血液、甲状腺、胰腺、性腺等组织中检出, 其中生殖系统是其最易感的靶器官之一。有研究结果表明 PFOA 暴露能够造成子代雌鼠的低体重现象, 还会导致琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 活性降低^[3-4]。研究发现 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 PFOA 可明显破坏雄性小鼠生精小管, 降低精子数量^[5]。Qiu 等^[6]还发现, 黑头呆鱼暴露于 PFOA 后血清雌二醇水平升高, 睾酮 (testosterone) 浓度明显降低, 而睾酮在曲细精管中的浓度是通过卵泡刺激素受体 (follicle-stimulating hormone receptor, FSHR) 和乳酸脱氢酶 (lactic acid dehydrogenase, LDH) 结合后激活多种途径表达, 三种激素相互作用, 共同调控生精细胞的分裂和分化, 进而影响合成睾酮的各类酶的生物活性, 但具体机制尚不明确。

硫辛酸 (lipoic acid, LA) 的化学名为 1, 2-二硫戊环-3-戊酸, 广泛存在于自然界内, 在动物的肝脏、肾脏以及菠菜、番茄中含量丰富。LA 具有抗氧化、调节糖代谢、调节体内脂质代谢、抗炎、降低内毒素诱导的急性炎症反应, 减轻组织的病理损伤和提高男性生育能力等功能^[7]。LA 在糖尿病等多种疾病的治疗中备

受关注, 目前在临床上也被用于消除疲劳、改善痴呆和美容养颜等^[8-9]。Haghighian 等^[10]一项关于 LA 的临床试验发现, 特发性弱精子症不育患者每天补充 LA 600 mg , 12 周后患者精液的抗氧化指标明显增强, 且精子总数、精子浓度、精子活力均明显上升, 说明 LA 在精子的抗氧化损伤、维持其结构与功能的完整性中均起了一定作用。张国巍等^[11]利用硫辛酸对奥硝唑诱导的少弱精子症雄性大鼠进行干预, 发现 50 、 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 LA 能够较好地改善大鼠生精功能, 提高精子质量。本次研究利用 LA 干预 PFOA 诱导的雄性大鼠, 考察 LA 对雄性大鼠生殖功能是否具有保护作用。

1 对象与方法

1.1 主要试剂及仪器

PFOA、LA (分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 中国), 卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH) 及睾酮酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒 (Cloud-Clone Corp, 美国), LDH 试剂盒、SDH 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 中国), 兔抗鼠多克隆 FSHR 抗体 (BOSTER, 美国), 多克隆 β -actin 抗体、山羊抗兔二抗 (中杉金桥, 中国)。

T6 紫外可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司, 中国), TDZ4-WS 自动平衡台式离心机 (长沙湘仪离心机有限公司, 中国), Synergy HT/SIAFRTI 酶标仪 (BioTek 公司, 美国), NOVE 型光学显微镜 (宁波永新光学有限公司, 中国)。

1.2 实验动物及分组

40只6周龄雄性SD大鼠,体重(160±10)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0002。适应性喂养1周后,根据体重排序后进行完全随机分组,分为5组,每组8只。各组处理如下:正常对照组,食用玉米油;LA对照组,100 mg·kg⁻¹ LA;PFOA染毒组,10 mg·kg⁻¹ PFOA;低剂量LA干预组,10 mg·kg⁻¹ PFOA+50 mg·kg⁻¹ LA;高剂量LA干预组,10 mg·kg⁻¹ PFOA+100 mg·kg⁻¹ LA。LA和PFOA用玉米油(用量为大鼠体重的0.2%)溶解,每日固定时间灌胃给药,实验干预期为7周。大鼠自由摄水摄食,同时控制动物实验室室温在20~25℃,相对湿度为40%~60%,昼夜周期为12h/12h。染毒7周后,实验大鼠禁食不禁水12h,采用0.3%戊巴比妥麻醉,腹主动脉采血法处死大鼠,处死前称重,处死后立即剥离睾丸和附睾组织。动物实验均遵循包头医学院有关动物管理和使用规定和《关于动物伦理与利的作者指南共识》。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 脏器系数 剥离睾丸和附睾组织后,称重并计算脏器系数。脏器系数=(脏器湿重/体重)×1000‰。

1.3.2 精子计数 采用计算机辅助精子分析系统进行精子数量的检测。取附睾3 mm×3 mm大小,称重,放入装有8 mL磷酸盐缓冲液的烧杯中,孵育20 min,备用。取细胞计数板放上盖玻片,滴10 μL精子悬液,再滴10 μL伊红溶液,显微镜下计数,按照“Z”字计算5个大方格的精子总数^[12]。

1.3.3 睾丸组织病理学观察 利用4%的多聚甲醛对睾丸组织固定24 h,常规脱水,石蜡包埋,组织切片,进行苏木精-伊红染色(hematoxylin and eosin staining, HE染色),光学显微镜下观察睾丸的组织病理学变化。

1.3.4 睾丸组织LDH、SDH活性的测定 制备10%睾丸组织匀浆,取上清液,采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定总蛋白含量,分光光度法测定LDH、SDH活性。

1.3.5 血清FSH、睾酮含量的测定 血清FSH、睾酮的测定采用ELISA法,严格按试剂盒操作说明进行。

1.3.6 Western blotting法测定大鼠睾丸组织FSHR蛋白表达量 称取50 mg睾丸样本剪碎后研磨,500 μL裂解液处理30 min,4℃、12 000 r·min⁻¹(离心半径为10 cm)离心10 min,离心后取上清液测定蛋白浓度。根据蛋白定量结果,加入相应体积的4×蛋白上样缓冲液,混匀变性。凝胶内加样后进行电泳及半干法转膜,室温

封闭2 h,加入FSHR(1:500)或β-actin(1:1000)一抗工作液,4℃反应过夜。洗涤,二抗室温孵育90 min,经显影定影液显色,胶片扫描后,用Tanon 1600全自动数码凝胶图像分析系统测定条带灰度值并进行计算。

1.4 统计学分析

数据采用SPSS 16.0软件统计分析,计量资料数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差齐性检验和单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-t检验,检验水准为 $\alpha=0.05$ (双侧检验)。

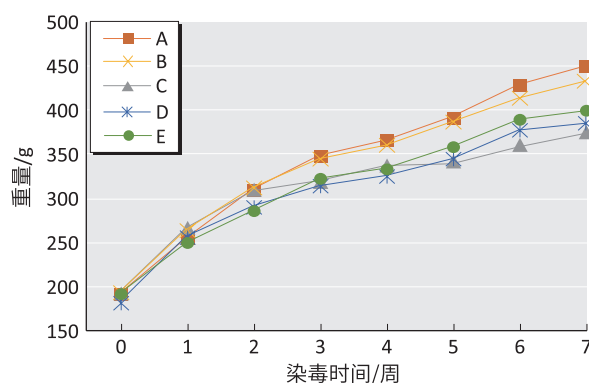
2 结果

2.1 各组大鼠脏器系数

干预7周后,与正常对照组相比,PFOA染毒组和各剂量LA干预组大鼠体重均有不同程度下降($P<0.05$),且不同剂量LA干预组与LA对照组相比也有明显降低($P<0.05$),见图1。各组间大鼠睾丸质量无明显差别。PFOA染毒组附睾质量与正常对照组和LA干预组相比明显下降($P<0.05$)。PFOA染毒组不同剂量LA干预组睾丸脏器系数与正常对照组和LA对照组相比均升高($P<0.05$),但PFOA染毒组升高最为明显。PFOA染毒组和高剂量LA干预组附睾脏器系数与正常对照组相比均升高($P<0.05$),见表1。

2.2 精子计数情况

由图2可知,PFOA染毒组大鼠精子数量明显低于正常对照组和LA对照组($P<0.05$),而进行LA干预后大鼠精子数量较染毒组呈现明显的回升($P<0.05$),但还不能达到正常水平。



[注] A: 正常对照组; B: LA对照组(100 mg·kg⁻¹ LA); C: PFOA染毒组(10 mg·kg⁻¹ PFOA); D: 低剂量LA干预组(10 mg·kg⁻¹ PFOA+50 mg·kg⁻¹ LA); E: 高剂量LA干预组(10 mg·kg⁻¹ PFOA+100 mg·kg⁻¹ LA)。

图1 LA干预PFOA染毒大鼠体重变化(n=8)

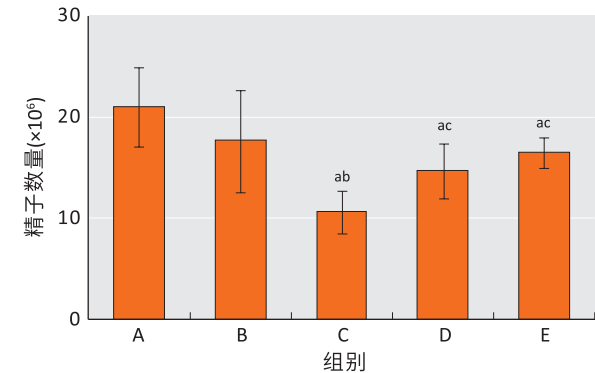
Figure 1 The changes of body weight of PFOA exposed rats after LA intervention (n=8)

表 1 LA 干预 PFOA 染毒大鼠 7 周后的基本情况 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 1 General information of rats with 7-week PFOA exposure after LA intervention ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	体重/g	睾丸质量/g	附睾质量/g	睾丸脏器系数/%	附睾脏器系数/%
正常对照组	491.19±44.61	3.72±0.24	1.67±0.08	7.50±0.66	3.41±0.31
LA 对照组 (100 mg·kg ⁻¹ LA)	472.98±38.25	3.69±0.25	1.72±0.21	8.21±0.94	3.64±0.50
PFOA 染毒组 (10 mg·kg ⁻¹ PFOA)	388.24±51.94 ^{ab}	3.65±0.18	1.48±0.10 ^{ab}	9.41±0.40 ^{ab}	3.85±0.32 ^a
低剂量 LA 干预组 (10 mg·kg ⁻¹ PFOA+50 mg·kg ⁻¹ LA)	414.61±26.98 ^{ab}	3.69±0.13	1.52±0.09 ^{ab}	9.14±0.80 ^{ab}	3.69±0.35
高剂量 LA 干预组 (10 mg·kg ⁻¹ PFOA+100 mg·kg ⁻¹ LA)	425.23±20.78 ^{ab}	3.60±0.22	1.61±0.12	8.97±0.58 ^{ab}	0.38±0.29 ^a

[注] a：与正常对照组比较， $P<0.05$ ；b：与 LA 对照组比较， $P<0.05$ 。



[注] A：正常对照组；B：LA 对照组 (100 mg·kg⁻¹ LA)；C：PFOA 染毒组 (10 mg·kg⁻¹ PFOA)；D：低剂量 LA 干预组 (10 mg·kg⁻¹ PFOA+50 mg·kg⁻¹ LA)；E：高剂量 LA 干预组 (10 mg·kg⁻¹ PFOA+100 mg·kg⁻¹ LA)。a：与正常对照组比较， $P<0.05$ ；b：与 LA 对照组比较， $P<0.05$ ；c：与 PFOA 染毒组比较， $P<0.05$ 。

图 2 LA 干预 PFOA 染毒大鼠精子计数变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

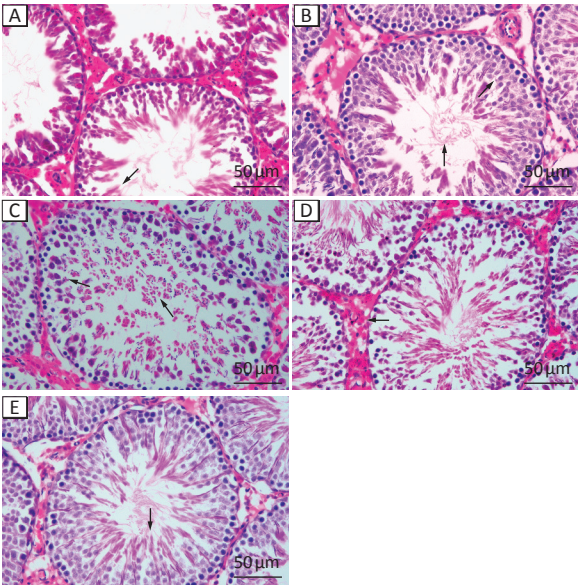
Figure 2 The sperm count changes of PFOA exposed rats after LA intervention ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

2.3 睾丸组织的病理学改变

HE 染色结果显示，正常对照组和 LA 对照组大鼠睾丸内的曲细精管形态完整，曲细精管内各级生精细胞排列整齐，形态规则，层次清楚；支持细胞围绕各级生精细胞排列，各级生精细胞呈紧密有序排列，精子细胞级精子结构完整，排列整齐密集，睾丸间质内散在或群集分布着间质细胞，间质细胞成群分布，发育正常。PFOA 染毒组大鼠睾丸生精小管内细胞层次减少，生精细胞排列紊乱，生精上皮出现较多的空泡化改变，细胞间质受损，紧密连接遭到破坏，间质细胞数量减少，排列紊乱。而 LA 干预组大鼠较 PFOA 染毒组大鼠睾丸组织病理改变明显得到改善，如图 3 所示。

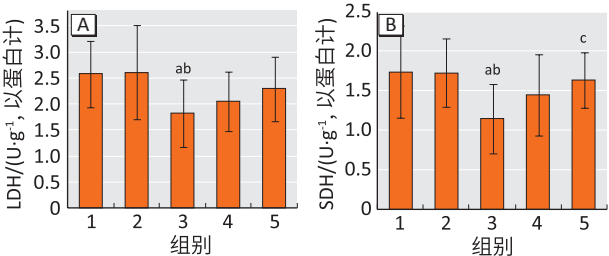
2.4 SDH 和 LDH 活性的变化

与正常对照组 [(1.82±0.64)、(2.58±0.64) U·g⁻¹] 和 LA 对照组相比，PFOA 染毒组大鼠睾丸 SDH 和 LDH 活性均明显降低 [(1.15±0.44)、(1.74±0.58) U·g⁻¹] ($P<0.05$)；LA 各剂量干预组 LDH 活性在数值上虽然均较正常对照组有所下降，但并无统计学差异 ($P>0.05$)。而 SDH 活性在 100 mg·kg⁻¹ LA 干预组与 PFOA 染毒组相比有较大程度升高 ($P<0.05$)，见图 4。



[注] A：正常对照组；B：LA 对照组 (100 mg·kg⁻¹ LA)；C：PFOA 染毒组 (10 mg·kg⁻¹ PFOA)；D：低剂量 LA 干预组 (10 mg·kg⁻¹ PFOA+50 mg·kg⁻¹ LA)；E：高剂量 LA 干预组 (10 mg·kg⁻¹ PFOA+100 mg·kg⁻¹ LA)。箭头所指为曲细精管管腔和支持细胞。正常对照组和 LA 对照组曲细精管和支持细胞结构相对完整；PFOA 染毒组管腔内可见生精细胞脱落，支持细胞排列紊乱；不同剂量的 LA 干预组均得到改善，表现为各级生精细胞排列较为整齐，支持细胞和间质细胞排列相对紧密且有序。

图 3 LA 干预 PFOA 染毒大鼠睾丸组织病理学变化 (×400, HE 染色)
Figure 3 Histopathological changes of testis in PFOA exposed rats after LA intervention (×400, HE staining)



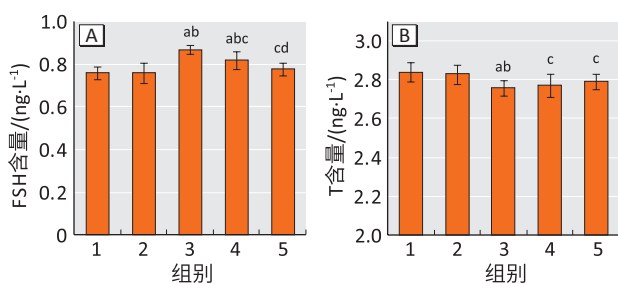
[注] A：LDH；B：SDH。1：正常对照组；2：LA 对照组 (100 mg·kg⁻¹ LA)；3：PFOA 染毒组 (10 mg·kg⁻¹ PFOA)；4：低剂量 LA 干预组 (10 mg·kg⁻¹ PFOA+50 mg·kg⁻¹ LA)；5：高剂量 LA 干预组 (10 mg·kg⁻¹ PFOA+100 mg·kg⁻¹ LA)。a：与正常对照组比较， $P<0.05$ ；b：与 LA 对照组比较， $P<0.05$ ；c：与 PFOA 染毒组比较， $P<0.05$ 。

图 4 LA 干预 PFOA 染毒大鼠睾丸组织 SDH 和 LDH 活性变化 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Figure 4 The changes of SDH and LDH activities in testicular tissues of PFOA exposed rats after LA intervention ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

2.5 血清睾酮和 FSH 含量的变化

与正常对照组和 LA 对照组相比, PFOA 染毒组大鼠血清 FSH 含量升高, 睾酮含量下降 ($P < 0.05$)。不同剂量 LA 干预组与 PFOA 染毒组相比, FSH 含量有不同程度下降 ($P < 0.05$), 且呈现一定的剂量-效应关系, 睾酮含量有不同程度上升, 见图 5。

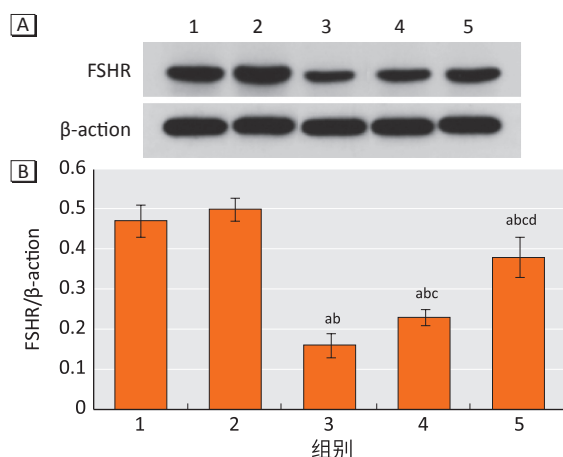


[注] A: FSH 含量; B: 睾酮含量。1: 正常对照组; 2: LA 对照组 ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LA); 3: PFOA 染毒组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PFOA); 4: 低剂量 LA 干预组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PFOA + $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LA); 5: 高剂量 LA 干预组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PFOA + $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LA)。a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 LA 对照组比较, $P < 0.05$; c: 与 PFOA 染毒组比较, $P < 0.05$; d: 与低剂量 LA 干预组比较, $P < 0.05$ 。

图 5 LA 干预 PFOA 染毒大鼠 FSH、睾酮水平变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)
Figure 5 The changes of FSH and testosterone levels in PFOA exposed rats after LA intervention ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

2.6 睾丸组织 FSHR 蛋白变化

Western blotting 结果显示, PFOA 染毒组 FSHR 蛋白含量与其他各组相比均, 有较大程度下降 ($P < 0.05$), 而随着 LA 干预剂量的升高, 明显逆转了这种下降 ($P < 0.05$), 其中 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LA 干预组效果最为明显, 如图 6 所示。



[注] A: 电泳条带图; B: 蛋白相对表达量。1: 正常对照组; 2: LA 对照组 ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LA); 3: PFOA 染毒组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PFOA); 4: 低剂量 LA 干预组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PFOA + $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LA); 5: 高剂量 LA 干预组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PFOA + $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LA)。a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 LA 对照组比较, $P < 0.05$; c: 与 PFOA 染毒组比较, $P < 0.05$; d: 与低剂量 LA 干预组比较, $P < 0.05$ 。

图 6 LA 干预 PFOA 染毒大鼠的 FSHR 蛋白表达变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Figure 6 The changes of FSHR protein expression levels in PFOA exposed rats after LA intervention ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3 讨论

本研究通过对雄性大鼠睾丸和附睾系数计算、睾丸病理学观察、精子计数、睾丸组织 SDH 和 LDH 活性评价, 证实 LA 对 PFOA 致雄性大鼠生殖毒性具有明显的改善作用; 进一步检测发现 LA 可调节 PFOA 所致的大鼠血清睾酮和 FSH 含量异常以及使睾丸组织 FSHR 蛋白表达量升高, 提示这也许是 LA 对雄性大鼠生殖功能保护作用的可能机制。

睾丸组织中支持细胞正常与否决定着精原细胞增殖、各级生精细胞分化和精子成熟。曲细精管由支持细胞和各级生精细胞组成, 其中支持细胞的一侧附着于生精细胞上皮的基底层, 另一侧向外延伸作为精原细胞的附着点, 并为精子的形成提供营养物质^[13]。除此之外, 支持细胞还是外源毒性物质作用的靶点之一, 而 PFOA 的作用正是破坏支持细胞的紧密连接从而造成大鼠生精功能受损, 睾丸结构破坏, 曲细精管闭锁或排列紊乱以及生精细胞脱离曲细精管。同时, 精子数量减少又可反映出化学物质产生的毒性作用影响睾丸组织的结构和各级生精细胞的生长, 导致睾丸组织内的精子在形成期受损^[14]。而位于生精细胞和支持细胞内 LDH 与线粒体标志酶 SDH 是精子和生精细胞糖代谢过程中的重要酶, 其活性大小与精子的成熟密切相关^[15]。本实验中, PFOA 染毒组大鼠支持细胞连接被破坏, 间质受损, 曲细精管排列紊乱, 生精细胞排列紊乱层次减少, 大鼠精子数量明显降低, 睾丸组织 LDH、SDH 活性下降。而 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LA 干预后 SDH 水平显著提高, 同时可见 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LA 干预后睾丸组织结构和精子数量均有大幅改善, 与 Mohasseb 等^[16] 关于 LA 补充可以改善糖尿病所致的生殖系统损伤和生殖细胞凋亡的结果相符, 说明适量的 LA 补充能够保护睾丸组织, 减轻 PFOA 造成的生殖系统损伤。

FSHR 是 FSH 特异表达于睾丸支持细胞表面的受体, 对于精子的发育具有重要作用。在雄性中, FSH 与支持细胞膜上 FSHR 结合, 活化腺苷酸环化酶, 使胞内环磷酸腺苷水平升高, 从而激活多种途径, 通过表达雄激素结合蛋白等蛋白产物, 保持睾酮在曲细精管中的浓度, 控制生精细胞的分裂分化^[17]。而睾酮可通过合成雌二醇反馈性地抑制下丘脑-垂体对 FSH 的分泌, FSH 亦可通过调节抑制素 B 来调节睾酮。本次研究发现, 睾酮水平在 PFOA 染毒组下降, 而 FSH 水平升高, 这与李俊涛等^[18] 对生殖损伤的激素水平研究结果相

一致。该结果提示 PFOA 在大鼠体内可能起到了内源性雌激素的作用,一方面可能是由于 PFOA 直接对睾丸间质细胞造成了损伤,另一方面可能通过下丘脑-垂体-睾丸轴的负反馈调节抑制了睾酮的合成分泌。而 FSH 水平升高可能是由于支持细胞损伤后,原本由支持细胞分泌的一种能够抑制垂体分泌 FSH 的蛋白质——抑制素分泌减少,进而对垂体分泌 FSH 的抑制作用降低而导致的。Prathima 等^[19]研究表明,LA 能消除砷染毒对大鼠睾丸和附睾造成的氧化应激损伤,是由于 LA 的抗氧化作用、砷螯合作用和甾体生成特性,从而恢复了砷暴露大鼠的雄性生殖性能。

由本研究可以看出各 LA 干预组睾酮水平明显上升,FSH 水平明显下降,FSHR 蛋白表达水平明显升高,且随着 LA 剂量的增加,FSH 和 FSHR 水平呈现出的关系说明 LA 可以增加 FSHR 的表达水平,进而与更多的 FSH 结合,恢复损伤的支持细胞的生理功能,促进生精细胞的增殖和分化,促进睾丸发育和精子的成熟,以此来修复大鼠损伤的生殖功能。

综上,PFOA 暴露对大鼠生殖系统会产生毒效应,表现为睾丸组织病理损伤,精子数量减少,睾丸组织中相关酶的活性发生改变,继而诱发血清性激素水平紊乱,血清睾酮浓度下降,FSH 浓度升高。而补充适量的 LA 可通过上调睾丸组织 FSHR 蛋白表达,进而使紊乱的性激素水平及睾丸组织中与精子成熟密切相关的酶活性逐渐趋于正常,最终起到改善 PFOA 所致雄性大鼠生殖损伤的作用,但具体机制还需进一步研究。同时,本研究中的染毒方式、干预时间和剂量是否会对大鼠其他系统造成影响,则还有待更深入的探究。

参考文献

- [1] COPERCHINI F, AWWAD O, ROTONDI M, et al. Thyroid disruption by perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA) [J]. *J Endocrinol Invest*, 2017, 40 (2): 105-121.
- [2] FAGBAYIGBO BO, OPEOLU BO, FATOKI O S, et al. Validation and determination of nine PFCS in surface water and sediment samples using UPLC-QTOF-MS [J]. *Environ Monit Assess*, 2018, 190 (6): 346.
- [3] 高悦,陈思,姚文梅,等.枸杞多糖抗全氟辛酸致子代雌鼠生殖损伤的作用及对生殖激素的影响[J].*黑龙江畜牧兽医*, 2020 (5): 121-124, 151-152.
- [4] 王力,张梦媛,吕卉,等.全氟辛酸致小鼠脾脏氧化损伤的实验研究[J].*蚌埠医学院学报*, 2015, 40 (6): 716-718.
- [5] LIU W, YANG B, WU L, et al. Involvement of NRF2 in perfluorooctanoic acid-induced testicular damage in male mice [J]. *Biol Reprod*, 2015, 93 (2): 41.
- [6] QIU L, ZHANG X, ZHANG X, et al. Sertoli cell is a potential target for perfluorooctane sulfonate-induced reproductive dysfunction in male mice [J]. *Toxicol Sci*, 2013, 135 (1): 229-240.
- [7] SOLMONSON A, DEBERARDINIS R J. Lipoic acid metabolism and mitochondrial redox regulation [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293 (20): 7522-7530.
- [8] 黄自强,庞云渭,郝海生,等.α-硫辛酸抗氧化作用机制及其在动物生殖细胞和早期胚胎中抗氧化作用的研究进展[J].*中国畜牧杂志*, 2019, 55 (3): 6-12.
- [9] MENDOZA-NÚÑEZ VM, GARCÍA-MARTÍNEZ BI, ROSADO-PÉREZ J, et al. The effect of 600 mg Alpha-lipoic acid supplementation on oxidative stress, inflammation, and RAGE in older adults with type 2 diabetes mellitus [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 3276958.
- [10] HAGHIGHIAN HK, HAIDARI F, MOHAMMADI-ASL J, et al. Randomized, triple-blind, placebo-controlled clinical trial examining the effects of alpha-lipoic acid supplement on the spermatogram and seminal oxidative stress in infertile men [J]. *Fertil Steril*, 2015, 104 (2): 318-324.
- [11] 张国巍,万秀霞,万长春,等.硫辛酸对奥硝唑所致少弱精子症大鼠精子发生的保护作用研究[J].*中华男科学杂志*, 2018, 24 (4): 297-303.
- [12] 高艳荣,史雪敏,贾玉巧,等.黄河包头段水源水有机提取物对雄性小鼠生殖细胞凋亡及睾丸组织 3-NT/Caspase-3 表达的影响[J].*环境与职业医学*, 2019, 36 (12): 1137-1142.
- [13] 朱璋佩,石娅萍,闵志强.青黛大鼠给药 90 天胃肠毒性研究[J].*中药与临床*, 2016, 7 (1): 45-47.
- [14] ARRIETA-CORTES R, FARIAS P, HOYO-VADILLO C, et al. Carcinogenic risk of emerging persistent organic pollutant perfluorooctane sulfonate (PFOS): a proposal of classification [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2017, 83: 66-80.
- [15] 席海灵,高艳荣,王素华,等.三种典型纳米颗粒物对雄性大鼠的生殖毒性[J].*环境与健康杂志*, 2018, 35 (1): 39-43.

(下转第 902 页)

- [J]. 现代预防医学, 2019, 46 (7) : 1267-1270.
- [5] WANG Y, MANDAL A K, SON Y O, et al. Roles of ROS, Nrf2, and autophagy in cadmium-carcinogenesis and its prevention by sulforaphane [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 353 : 23-30.
- [6] 张国艳, 郭建勇, 康辉, 等. 镉致 HEK293 细胞氧化损伤及细胞凋亡 [J]. *环境与职业医学*, 2017, 34 (2) : 148-153.
- [7] 陈嘉兴, 陈智健, 吴礼康, 等. Nrf2 信号因子在镉所致 HEK 细胞氧化损伤中的作用 [J]. *华中科技大学学报 (医学版)*, 2017, 46 (2) : 145-149, 154.
- [8] YANG Y, HSU P J, CHEN Y S, et al. Dynamic transcriptomic m⁶A decoration : writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism [J]. *Cell Res*, 2018, 28 (6) : 616-624.
- [9] 谷仕艳, 曹亮, 何作顺. N⁶-甲基腺苷相关蛋白及其对非编码 RNA 调控的研究进展 [J]. *环境与职业医学*, 2019, 36 (1) : 84-89.
- [10] WANG J, ISHFAQ M, XU L, et al. METTL3/m⁶A/miRNA-873-5p attenuated oxidative stress and apoptosis in colistin-induced kidney injury by modulating Keap1/Nrf2 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10 : 517.
- [11] ZHAO T X, WANG J K, SHEN L J, et al. Increased m⁶A RNA modification is related to the inhibition of the Nrf2-mediated antioxidant response in di- (2-ethylhexyl) phthalate-induced prepubertal testicular injury [J]. *Environ Pollut*, 2020, 259 : 113911.
- [12] FU Y, ZHUANG X. m⁶A-binding YTHDF proteins promote stress granule formation [J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16 (9) : 955-963.
- [13] GU S, SUN D, DAI H, et al. N⁶-methyladenosine mediates the cellular proliferation and apoptosis via microRNAs in arsenite-transformed cells [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 292 : 1-11.
- [14] ZHAO T, LI X, SUN D, et al. Oxidative stress : one potential factor for arsenite-induced increase of N⁶-methyladenosine in human keratinocytes [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2019, 69 : 95-103.
- [15] LIU Q, LI M, JIANG L, et al. METTL3 promotes experimental osteoarthritis development by regulating inflammatory response and apoptosis in chondrocyte [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516 (1) : 22-27.
- [16] WANG S, REN X, HU X, et al. Cadmium-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated mitochondrial oxidative stress and the JNK signaling pathway in TM3 cells, a model of mouse Leydig cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 368 : 37-48.

(英文编辑 : 汪源 ; 责任编辑 : 王晓宇)

(上接第 896 页)

- [16] MOHASSEB M, EBIED S, YEHIA M A, et al. Testicular oxidative damage and role of combined antioxidant supplementation in experimental diabetic rats [J]. *J Physiol Biochem*, 2011, 67 (2) : 185-194.
- [17] SCHMIEDCHEN K, PETRI A K, DRIESSEN S, et al. Systematic review of biological effects of exposure to static electric fields. Part II : invertebrates and plants [J]. *Environ Res*, 2018, 160 : 60-76.
- [18] 李俊涛, 曲晓伟, 张蜀武, 等. 益肾生精胶囊对邻苯二甲酸二丁酯致生殖功能损伤大鼠精子质量及生殖激素水平的影响 [J]. *中华男科学杂志*, 2016, 22 (12) : 1110-1115.
- [19] PRATHIMA P, PAVANI R, SUKEERTHI S, et al. α -Lipoic acid inhibits testicular and epididymal oxidative damage and improves fertility efficacy in arsenic-intoxicated rats [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2018, 32 (2) : e22016.

(英文编辑 : 汪源 ; 责任编辑 : 王晓宇)