

钙拮抗氟对大鼠睾丸组织的氧化损伤作用

吴秋云, 许爱芹, 杨向东, 王锋

摘要: [目的] 研究氟对大鼠睾丸组织过氧化氢酶(CAT)、乳酸脱氢酶(LDH)和丙二醛(MDA)水平的影响以及钙对其拮抗作用。[方法] 选用健康雄性清洁级SD大鼠80只, 随机分为10组: 对照组、加钙染氟6个剂量组[NaF 2.1、4.2、8.5、17.0、34.0、68.0 mg/(kg·d); CaCO₃ 25、50、50、100、100、150 mg/(kg·d)]和不加钙染氟3个剂量组[NaF 2.1、8.5、34.0 mg/(kg·d)], 灌胃染毒90d。染毒结束次日, 观察大鼠精子数量、睾丸组织结构的改变, 并测定睾丸组织中CAT、LDH和MDA水平。[结果] 氟可使大鼠睾丸精子计数下降并导致睾丸组织病理学改变。各组大鼠睾丸组织CAT、LDH和MDA含量组间比较, 差异有统计学意义(*F*值分别为5.168、2.248、3.168, *P*值分别为<0.001、0.044、0.007)。高剂量染氟组CAT[(27.86±4.04)U/mg prot]较对照组[(44.85±2.81)U/mg prot]降低、LDH[(38 358.49±2 649.23)U/g prot]较对照组[(54 357.66±1 903.90)U/g prot]降低、MDA[(6.82±0.79)nmol/mg prot]较对照组[(3.59±1.11)nmol/mg prot]升高。在相同染氟浓度下, 适量加钙组较不加钙组CAT水平升高、MDA水平降低。[结论] 氟引起睾丸组织的损害可能与氧化应激作用有关, 适量的钙可以拮抗氟诱导的自由基水平增高所造成的氧化损伤作用。

关键词: 氟; 氧化应激; 钙; 拮抗作用; 睾丸

Antagonistic Effect of Calcium against Fluorosis Induced Oxidative Stress in Rat Testis WU Qiu-yun, XU Ai-qin, YANG Xiang-dong, WANG Feng (School of Public Health, Xuzhou Medical College, Jiangsu 221004, China) · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To investigate the effects of fluoride on catalase (CAT), lactate dehydrogenase (LDH), and malonic dialdehyde (MDA) in rat testis and the potential antagonism against these effects by calcium. [Methods] Eighty healthy male SD rats were equally randomized into 10 groups: one control group, six fluorosis groups with calcium [NaF: 2.1, 4.2, 8.5, 17.0, 34.0, 68.0 mg/(kg·d); CaCO₃: 25, 50, 50, 100, 100, 150 mg/(kg·d), respectively], and three fluorosis groups without calcium [NaF: 2.1, 8.5, 34.0 mg/(kg·d)]. The exposure by intragastric administration lasted 90 days. After the last dosing, sperm count, pathological alternations, and levels of CAT, LDH, and MDA in testis samples were determined. [Results] The fluoride exposure reduced the sperm count and damaged the structure of testis in tested rats. The differences in CAT, LDH, and MDA levels among the experiment groups were statistically significant (*F* was 5.168, 2.248, 3.168; *P*<0.001, 0.044, 0.007, respectively). Compared with the control group, in high-dose fluorosis group treated with 34 mg/(kg·d) NaF without CaCO₃, the level of CAT decreased [(27.86±4.04) U/mg prot vs (44.85±2.81) U/mg prot], the level of LDH also decreased [(38 358.49±2 649.23) U/g prot vs (54 357.66±1 903.90) U/g prot], while the level of MDA increased [(6.82±0.79) nmol/mg prot vs (3.59±1.11) nmol/mg prot]. Higher level of CAT and lower level of MDA were observed in the group treated with calcium presented than those in the one with the same dose of fluoride but without calcium. [Conclusion] Fluoride may affect the testis tissue in rats through oxidative stress. The oxidative damage through increasing free radical induced by fluoride may be antagonized by appropriate dose of calcium.

Key Words: fluoride; oxidative stress; calcium; antagonism; testis

有研究者发现, 低钙可以增加氟的吸收和骨氟的蓄积^[1]。因此, 关于补钙能抑制和降低氟对骨骼系统影响的文献日益增多^[2]。同时, 氟中毒所致机体生殖系统的非骨相损害也越来越受到重视, 睾丸组织成为研究的主要器官^[3-4]。氧化应激是一

种致损伤因素, 可损害蛋白质和核苷酸, 导致细胞生长抑制或死亡。在慢性氟中毒发病机制研究中氧化应激一直是大家关注的热点之一。本研究以SD大鼠作为研究对象, 分别给予一定量的氟化钠和碳酸钙, 旨在研究氟致大鼠睾丸组织氧化损伤作用及钙在此损伤中的拮抗作用。

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2014.0017

[基金项目] 2011年徐州医学院科研课题; 2011年徐州医学院公共卫生学院科研课题

[作者简介] 吴秋云(1984—), 女, 讲师, 硕士; 研究方向: 环境与健康; E-mail: xjwqy922@163.com

[作者单位] 徐州医学院公共卫生学院, 江苏 221004

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用初断乳雄性清洁级SD大鼠80只(徐州医学院实验动物中心提供), 适应性喂养1周后, 称重编号, 随机分为10组, 每组8只, 加钙染氟组为6组, 受试物为氟化钠(NaF)和碳酸

钙 (CaCO₃) 按一定比例配成的混合溶液, 现用现配; 不加钙染氟组为 3 组, 受试物为不同浓度的氟化钠 (NaF) 溶液; 阴性对照组给予蒸馏水; 按单位体质量进行灌胃染毒, 1 次/d, 染毒周期 90 d, 每周称重 1 次, 分组情况及染毒剂量见表 1 (高剂量染氟组为氟化钠的 1/3 LD₅₀)。

表 1 实验大鼠分组情况及染毒剂量

组别	氟化钠 [mg/(kg·d)]	碳酸钙 [mg/(kg·d)]
阴性对照组	0.0	0
加钙染氟第 1 组	2.1	25
加钙染氟第 2 组	4.2	50
加钙染氟第 3 组	8.5	50
加钙染氟第 4 组	17.0	100
加钙染氟第 5 组	34.0	100
加钙染氟第 6 组	68.0	150
不加钙染氟第 1 组	2.1	0
不加钙染氟第 2 组	8.5	0
不加钙染氟第 3 组	34.0	0

1.2 主要试剂及仪器

NaF、CaCO₃ (优级纯, 国药集团化学试剂有限公司); TGL-20M 低温高速冷冻离心机 (长沙平凡仪器仪表有限公司); SCIENTZ-II D 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); Epoch 型酶标仪 (美国 Bio-tek 公司); GF-1 型调速式高速分散器 (厦门其林贝尔仪器制造有限公司); 过氧化氢酶 (CAT)、乳酸脱氢酶 (LDH) 和丙二醛 (MDA) 测定试剂盒 (南京建成科技有限公司)。

1.3 精子计数

取 -80℃ 冰冻的睾丸, 将睾丸纵行切开 (实质等分), 用镊子撕去被膜, 将一半睾丸组织精确称重, 剪碎后转移到匀浆管中, 生理盐水定容至 25 mL。应用高速分散器匀浆 2 min, 静置 1 min 以消除泡沫。将匀浆充分混匀, 吸取约 7 μL 到血球计数板的两个样品槽中。为便于计数, 将计数板置于铺有湿布的培养皿中 5 min 以使所有的精子头都固定于计数板的同一焦面上。在 40 倍物镜的显微镜下进行精子头计数。计数板中央 5 个中方格内的精子数记为 R, 然后按公式 $R \times 50000 \times 25 / \text{睾丸质量 (g)} = \text{精子数量 (10}^7/\text{g 睾丸)}$, 计算出每克睾丸组织中精子头的数量。

1.4 睾丸组织病理切片

将睾丸组织切片固定、脱水、染色后于光镜下观察生精上皮细胞的数量与形态改变。

1.5 生化标志酶指标的测定

染毒结束次日, 断头法处死大鼠, 快速摘取双侧睾丸, 用预冷生理盐水清洗血污后滤纸拭干, 称重, 去包膜, 放入表面皿中用眼科剪剪碎, 加入预冷生理盐水, 用超声波细胞粉碎机制成 10% (m/V) 的睾丸组织匀浆, 低温高速冷冻离心机 (3200 × g) 离心 10 min, 取上清液测定睾丸组织中生化标志酶 CAT、LDH 和 MDA 含量。

1.6 统计学分析

数据处理用 SPSS 18.0 软件, 组间比较采用方差分析, 进一步多重比较采用 LSD-t 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 动物一般情况

染毒期间, 对照组大鼠生长正常, 运动状态正常, 被毛有光泽, 牙齿正常。高剂量组 (加钙染氟第 6 组和不加钙染氟第 3 组) 大鼠生长迟缓并出现典型的氟斑牙症状 (色素沉着、缺损、白垩样条纹), 其余各组大鼠有不同程度的氟中毒牙齿改变, 至染毒结束时未发现动物中毒死亡。

2.2 钙拮抗氟对大鼠精子计数的影响

各组大鼠睾丸精子计数组间比较, 差异有统计学意义 ($F=4.129, P=0.002$)。其中, 不加钙染氟第 2、3 组精子计数均较阴性对照组降低; 相同染氟浓度下, 加钙染氟第 5 组精子计数高于不加钙染氟第 3 组, 加钙染氟第 3 组精子计数高于不加钙染氟第 2 组, 见表 2。

表 2 大鼠精子计数比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	精子计数 (10 ⁷ /g 睾丸)
阴性对照组	41.05 ± 2.44
加钙染氟第 1 组	37.24 ± 5.17
加钙染氟第 2 组	36.69 ± 9.17
加钙染氟第 3 组	38.90 ± 5.68 [△]
加钙染氟第 4 组	34.62 ± 7.44
加钙染氟第 5 组	38.05 ± 4.85 [#]
加钙染氟第 6 组	32.17 ± 7.46
不加钙染氟第 1 组	28.02 ± 8.80
不加钙染氟第 2 组	22.19 ± 0.62 [*]
不加钙染氟第 3 组	21.14 ± 3.94 [*]

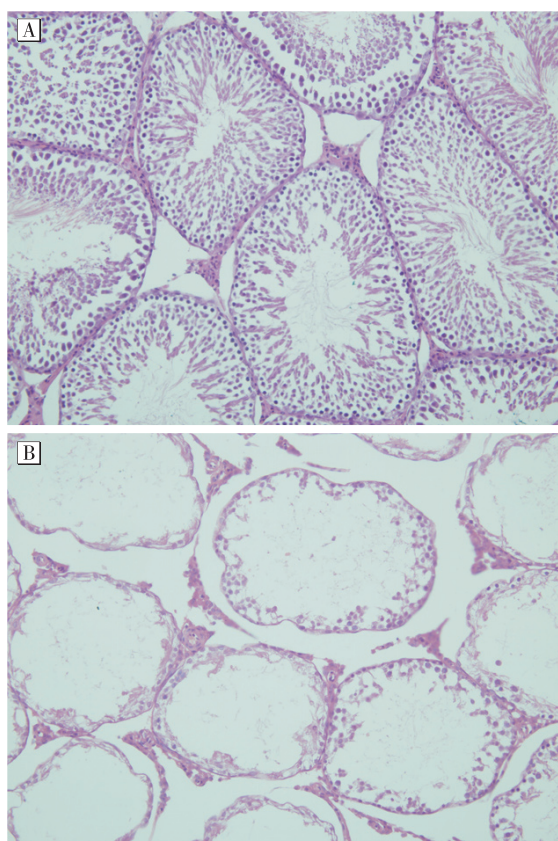
[注] 与阴性对照组比较, * : $P < 0.05$ 。与不加钙染氟第 3 组比较, # : $P < 0.05$ 。与不加钙染氟第 2 组比较, △ : $P < 0.05$ 。

2.3 睾丸组织病理学检查

阴性对照组睾丸曲细精管内各级生精细胞均可见, 成熟精子可见, 部分管腔内精子聚集成簇 (图 1A)。不加钙染氟高剂量组 [NaF 34 mg/(kg·d)] 睾丸曲细精管内各级生精细胞以及支持细胞均显著减少, 部分管腔仅可观察到管壁结构, 成熟精子未见 (图 1B)。

2.4 钙拮抗氟对大鼠睾丸组织生化标志酶水平的影响

各组大鼠睾丸组织 CAT、LDH 和 MDA 含量组间比较, 差异有统计学意义 (F 值分别为 5.168、2.248、3.168, P 值分别为 < 0.001 、0.044、0.007)。其中, 除加钙染氟第 1 组外, 其余各组 CAT 水平均较阴性对照组降低, 加钙染氟第 5 组 CAT 水平高于不加钙染氟第 3 组; 加钙染氟第 3、5 组和不加钙染氟第 3 组 LDH 水平均较阴性对照组降低; 加钙染氟第 4 组和不加钙染氟第 1、3 组 MDA 水平均较阴性对照组升高, 加钙染氟第 5 组 MDA 水平低于不加钙染氟第 3 组, 见表 3。



[注] A: 对照组(HE染色, ×200); B: 染氟组(HE染色, ×200)。

图1 大鼠睾丸组织病理学观察

表3 大鼠睾丸组织生化标志酶水平($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	过氧化氢酶 (U/mg prot)	乳酸脱氢酶 (U/g prot)	丙二醛 (nmol/mg prot)
阴性对照组	44.85 ± 2.81	54357.66 ± 1903.90	3.59 ± 1.11
加钙染氟第1组	40.75 ± 4.71	51116.73 ± 8937.04	4.65 ± 0.80
加钙染氟第2组	38.40 ± 4.96*	47502.90 ± 4776.02	4.58 ± 1.06
加钙染氟第3组	35.71 ± 4.02*	45032.31 ± 6564.76*	4.56 ± 1.36
加钙染氟第4组	36.24 ± 4.05*	49552.16 ± 6698.12	5.30 ± 0.89*
加钙染氟第5组	34.60 ± 3.75**	42721.34 ± 6913.74*	3.98 ± 0.75#
加钙染氟第6组	36.79 ± 3.35*	48889.34 ± 5897.53	4.59 ± 1.07
不加钙染氟第1组	36.24 ± 1.03*	48550.51 ± 8657.51	5.32 ± 1.07*
不加钙染氟第2组	33.51 ± 4.60*	45130.86 ± 5244.46	4.44 ± 0.67
不加钙染氟第3组	27.86 ± 4.04*	38358.49 ± 2649.23*	6.82 ± 0.79*

[注] 与阴性对照组比较, *: $P < 0.05$ 。与不加钙染氟第3组比较, #: $P < 0.05$ 。

3 讨论

关于氟对生殖系统的损害, 相关文献显示, 燃煤型氟中毒病区男性精子数量、精子存活率、精子活力均明显减弱^[5]。本研究发现, 氟可致大鼠精子计数明显降低, 推测可能的机制是氟作用于精子形成的某一过程, 使遗传物质的分子结构发生改变; 或是作用于成熟的精子, 使其物理性状发生改变, 从而导致成熟精子减少^[6]。睾丸的结构与功能是否正常将会影响精子

的质和量, 本研究中, 氟中毒时大鼠睾丸组织超微结构有明显损伤, 这不难解释染氟组精子数量少的原因。大鼠精子数量减少和睾丸组织结构改变提示, 氟可对大鼠睾丸组织造成损伤。由于氟是一种化学性质极为活泼的元素, 文献显示, 氟进入机体后可诱导多种细胞产生氧自由基^[7], 故推测氟对睾丸组织的损伤可能与氧化应激作用有关, 通过对睾丸中氧化还原指标测定发现, 氟可致大鼠睾丸组织CAT、LDH水平降低, MDA水平升高, 提示氟中毒引起睾丸组织的损害可能与机体脂质过氧化作用增强、抗氧化能力降低有关。

钙是拮抗氟中毒的主要营养元素之一, 在本研究中设置了不同的加钙剂量, 主要目的在于摸索钙是否有拮抗氟对睾丸组织损伤的作用。结果显示, 在相同染氟浓度下, 加钙染氟组精子计数高于不加钙染氟组, 加钙染氟第5组较不加钙染氟第3组CAT水平升高、MDA水平降低, 提示适量的钙可以拮抗氟引起的睾丸组织精子数量减少以及氟诱导的自由基水平增高。本研究后续测定了睾丸组织中氟和钙的含量, 发现氟可在大鼠睾丸组织内蓄积, 补钙可增加睾丸组织中钙元素的含量, 加钙组睾丸组织氟含量均低于不加钙组, 结合实验结果推测, 氟在睾丸组织中蓄积后可能通过诱导自由基水平升高造成损害。补钙可降低氟的蓄积量以减缓毒性, 这可能是由于适量的钙使机体内结合态氟增加, 离子态氟降低, 从而减少氟吸收, 促进氟排泄, 降低睾丸氟蓄积量, 减轻睾丸组织损伤作用。

综上所述, 氧化应激反应在氟所致睾丸组织损害过程中可能发挥重要作用, 但要确定氧化应激与氟所致损害之间的因果联系以及钙的拮抗机制, 还有许多问题有待研究。此外, 在本研究中仅发现适量的钙可以拮抗氟诱导的大鼠睾丸组织损伤作用, 但是未摸索出钙对氟的最佳拮抗剂量, 故后续在这方面仍需继续研究, 以期在实际应用中为利用钙来缓解氟的毒性提供剂量参考。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] 李广生, 张文岚, 华坤, 等. 地氟病属于“钙矛盾疾病”[J]. 矿物岩石地球化学通报, 2003, 22(2): 93-95.
- [2] 杨小静, 刘祖阳, 陈敬, 等. 四川省饮茶型氟中毒病区居民钙摄入调查[J]. 预防医学情报杂志, 2012, 29(2): 84-86.
- [3] LONG H, JIN Y, LIN M, et al. Fluoride toxicity in the male reproductive system[J]. Fluoride, 2009, 42(4): 260-276.
- [4] 李崇斌, 孙发, 肖跃海, 等. 燃煤型氟中毒大鼠血清和睾丸酮水平的变化[J]. 贵阳医学院学报, 2011, 36(1): 1-4, 8.
- [5] 唐前华, 孙发. 燃煤型氟中毒对人体精子活力的影响[J]. 医药与保健, 2009, 17(8): 84-85.
- [6] 田凤林. 氟化钠对雄小鼠生殖功能影响的实验研究[J]. 西北民族大学学报: 自然科学版, 2010, 31(2): 64-66.
- [7] 陈杨, 于燕妮. 氧自由基与氟中毒[J]. 中国地方病学杂志, 2009, 28(2): 234-237.

(收稿日期: 2013-02-21)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 郑轻舟; 校对: 王晓宇)