

壬基酚对雄性小鼠生精能力及睾酮的影响

孟沅^a, 徐文博^b, 李清钊^a, 曹燕花^a, 钱庆增^a, 王茜^a

摘要: [目的] 研究壬基酚对雄性小鼠生精能力及血清性激素睾酮的影响。[方法] 雄性昆明种小鼠40只, 随机分为4组, 每组10只, 分别为壬基酚25、50、100 mg/kg 剂量染毒组和溶剂对照组(玉米油)。各组隔日灌胃给予相应剂量的壬基酚溶液, 连续35 d后处死小鼠取血, 用酶联免疫法测定小鼠血清睾酮的水平。取左侧睾丸做组织病理切片, 取双侧附睾制备精子悬液, 并在光学显微镜下进行精子计数, 计算活精子率和精子畸形率。[结果] 35 d后, 与对照组相比, 100 mg/kg 剂量染毒组小鼠睾丸组织病理学切片显示曲细精管萎缩, 体重减轻幅度升高, 睾丸重量下降, 精子数量、精子活动度均降低, 精子畸形率增高(均 $P<0.05$)。染毒组小鼠血清睾酮含量、精子数量与壬基酚浓度存在明显剂量-反应关系($r=-0.98$, $r=-0.96$; $P<0.05$)。[结论] 壬基酚对雄性小鼠生殖系统有一定损害作用, 高剂量的壬基酚能损伤小鼠的生精功能。

关键词: 壬基酚; 雄性小鼠; 生精功能; 睾酮; 精子畸形

Effects of Nonylphenol on Spermatogenesis Function and Testosterone of Male Mice MENG Yuan^a, XU Wen-bo^b, LI Qing-zhao^a, CAO Yan-hua^a, QIAN Qing-zeng^a, WANG Qian^a (a.School of Public Health b.Jitang College, North China University of Science and Technology, Hebei 063000, China). Address correspondence to WANG Qian, E-mail: wwqq517@aliyun.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To assess the effects of nonylphenol on spermatogenesis function and serum sex hormone testosterone of male mice. [Methods] Forty Kunming adult male mice were randomly divided into control group (corn oil), low-dose nonylphenol group (25 mg/kg), middle-dose nonylphenol group (50 mg/kg), and high-dose nonylphenol group (100 mg/kg), ten mice for each group. Corresponding administrations were given by gavage every other day for 35 days. Then the mice were neutralized and serum samples were collected to assess serum testosterone level by enzyme linked immunosorbent assay. Left testis was used for biopsy, sperm suspension was prepared by both cauda epididymidis for sperm count under optical microscopy to calculate sperm viability and sperm malformation rate. [Results] After 35 d, compared with the control group, the pathological sections of the 100 mg/kg nonylphenol group presented seminiferous tubule atrophy, combined with increased weight loss, declined testicular weight, sperm quantity, sperm activity, and increased sperm malformation rate (all $P<0.05$). The serum testosterone levels and sperm counts had obvious dose-response relationships with the concentration of nonylphenol in the exposed mice ($r=-0.98$, $r=-0.96$; $P<0.05$). [Conclusion] Nonylphenol could damage the reproductive system of male mice to a certain extent, and high doses of nonylphenol could damage the spermatogenesis function of mice.

Key Words: nonylphenol; male mouse; spermatogenesis function; testosterone; sperm malformation

壬基酚(nonylphenol)由壬基酚聚氧乙烯醚转化而来,是一种重要的精细化工原料和中间体,主要用于生产表面活性剂,也用于抗氧化剂、纺织印染助剂、润滑油添加剂、农药乳化剂、树脂改性剂、树脂及橡胶稳定剂等领域。我国每年都有大量的壬基酚通过工

业“三废”及生活污水进入环境介质,并在环境中蓄积,通过水、空气及食物链进入人体,环境污染极为广泛。

由于壬基酚分子结构与人体内雌二醇的分子结构相似,可竞争与体内雌激素受体结合,干扰机体的内分泌代谢,是一类环境内分泌干扰物,可危害生物体的内分泌、生殖、免疫、神经等多个系统机能。体外实验证明壬基酚具有拟雌激素活性,影响哺乳动物生殖系统^[1]。国内关于壬基酚对雄性昆明种小鼠生殖系统的影响报道尚不完善,固进行本研究以进一步了解这种损害的作用机制。

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.15219

[基金项目] 华北理工大学大学生创新创业训练计划项目(编号: X2014116)

[作者简介] 孟沅(1992—),女,本科生;研究方向:环境有害因素与健康;E-mail: 819742861@qq.com

[通信作者] 王茜, E-mail: wwqq517@aliyun.com

[作者单位] 华北理工大学 a.公共卫生学院 b.冀唐学院,河北 063000

1 材料与方法

1.1 实验主要仪器及试剂

电子天平(上海精密化学仪器厂)、光学显微镜(日本奥林巴斯公司)、LeicaRM2016切片机(上海莱卡仪器有限公司)、LeicaASP300全自动组织脱水机(上海莱卡仪器公司)、YD-6D生物组织石蜡包埋机(金华市益迪医疗设备厂)、MQX200R型酶标仪(美国BIO-TEX公司)、超低温冰箱。

壬基酚(纯度99%,江苏常州染料化工厂)、小鼠睾酮酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所)、植物油(金龙鱼葵花籽油)、10%中性福尔马林溶液。

1.2 实验动物及分组

选择健康成年雄性昆明种小鼠40只,体重30~40g(清洁级,华北理工大学动物实验中心提供)。实验动物设施许可证:SYXY(冀)2010-0038。将40只小鼠按体重均衡的原则随机分为4组,每组10只,分别为溶剂对照组(植物油)和低(25mg/kg)、中(50mg/kg)、高(100mg/kg)剂量壬基酚染毒组。壬基酚经口 LD_{50} 为970~2300mg/kg,染毒剂量根据参考文献[1-4]确定。各组小鼠均自由摄食、饮水,适应性饲养1周后供试。采用经口灌胃染毒方法,连续3d。

1.3 标本采集

于末次染毒后24h称重,小鼠经水合氯醛麻醉后,摘眼球取血,以2000r/min离心10min(离心半径10cm),分离血浆后备用。小鼠脱颈椎处死,迅速摘取双侧睾丸,分离附睾和附睾尾,称重并计算单侧睾丸脏器系数。

1.4 观察指标

1.4.1 一般情况 每日观察小鼠皮毛光泽度,饮食、饮水、呼吸及活动情况。隔天测量体重,记录给药前后体重变化。

1.4.2 睾丸组织病理学观察 取左侧睾丸,以10%中性福尔马林固定后,切取部分组织,经石蜡包埋、乙醇梯度脱水、苏木精-伊红染色,制成5 μ m厚的切片。应用光学显微镜照相系统观察小鼠睾丸组织病理学改变并拍照。

1.4.3 睾酮变化分析 小鼠经氯醛麻醉后,摘左眼球取血。以2000r/min离心10min(离心半径10cm),分离血浆,按睾酮ELISA试剂盒的要求测定睾酮。

1.4.4 精子计数、活动率及畸形率分析 取双侧附睾尾,置于0.5mL氯化钠溶液(0.9%,37℃)中剪碎,滤

除组织碎片后,加3.5mL氯化钠溶液制备精子悬液,用血细胞计数板在100倍光学显微镜下采用文献[5]的方法进行精子计算并观察精子活动度。取新鲜精子滤液2滴,滴于载玻片上,室温下自然干燥后经甲醇固定,以体积分数为2%伊红染色30min后,在400倍光学显微镜下观察精子形态并拍照,计数畸形率。精子畸形以无钩、大头、香蕉形、双头、双尾等为指标。

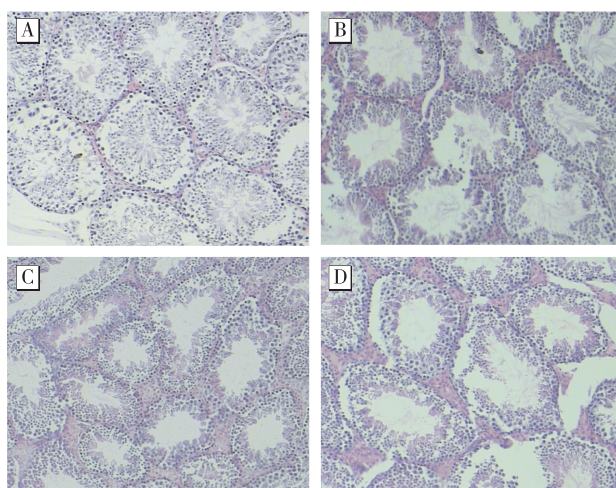
1.5 统计学分析

本实验采用成组实验设计。实验数据采用Excel 2003软件建立数据库并录入。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 17.0软件包进行数据的统计分析。数据分析采用单因素方差分析,组间比较采用LSD检验,剂量-反应关系分析采用Spearman相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 睾丸组织病理学改变

壬基酚染毒35d后,对照组小鼠睾丸病理切片显示曲细精管排列紧密,管径正常,生精上皮中生精细胞层次清晰层数较多,精子发生良好(图1A);25mg/kg组小鼠生精小管排列欠紧密,生精细胞层基本完整(图1B);50mg/kg组小鼠部分睾丸曲细精管萎缩,生精细胞层变薄(图1C);100mg/kg组小鼠睾丸切片内大部分组织曲细精管萎缩,管间隙明显增大,精元细胞结构改变,部分精母细胞破裂,管内精子数量减少(图1D)。



[注]A: 对照组; B: 25mg/kg; C: 50mg/kg; D: 100mg/kg。

图1 壬基酚染毒35d后小鼠睾丸组织改变($\times 100$)

2.2 一般情况

染毒期间,对照组小鼠活动正常,被毛光亮;

100 mg/kg 组小鼠染毒后活动减少, 精神萎靡, 偶有稀便; 染毒组小鼠皮毛灰暗, 但组间差异不明显, 灌胃后汗液分泌增加, 实验后期 100 mg/kg 组小鼠反抗强烈。染毒 35 d 后小鼠体重减轻, 其中壬基酚 100 mg/kg 组体重差值(染毒前-染毒后)变化明显高于对照组 ($P<0.05$), 其余两组与对照组相比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

表 1 壬基酚染毒 35 d 对小鼠体重的影响 (g)				
剂量 (mg/kg)	n	染毒前	染毒后	体重差值
0	10	32.09 ± 4.02	26.71 ± 3.40	5.38 ± 5.28
25	10	35.23 ± 4.06	30.33 ± 2.75	4.90 ± 3.12
50	10	36.90 ± 2.80	30.40 ± 3.50	5.50 ± 3.31
100	10	35.10 ± 4.31	25.36 ± 5.54	9.74 ± 3.06*

[注]*: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.3 脏器系数及血清睾酮

染毒 35 d 后, 与对照组相比, 壬基酚 100 mg/kg 染毒组小鼠睾丸质量降低 ($P<0.05$); 50 mg/kg 组与 25 mg/kg 组的脏器系数均降低 ($P=0.006$, $P=0.012$)。随着染毒剂量的增加, 染毒组小鼠血清睾酮浓度下降, 呈剂量-反应关系 ($r=-0.98$, $P<0.05$)。见表 2。

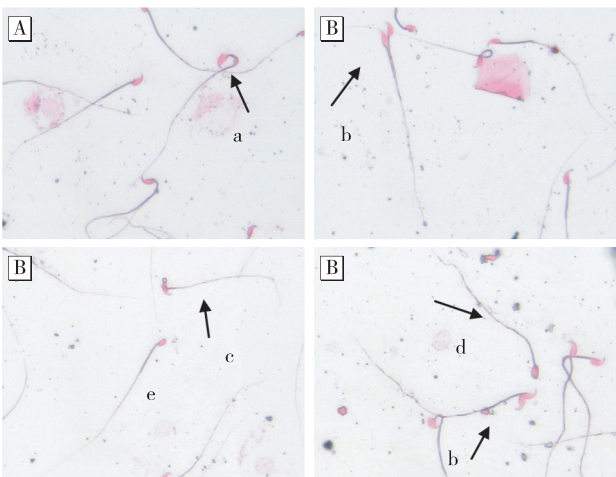
表 2 壬基酚染毒 35 d 对小鼠性腺的影响				
剂量 (mg/kg)	n	睾丸重量 (mg)	脏器系数 (%)	睾酮 (ng/L)
0	10	158.62 ± 16.57	5.96 ± 0.19	28.92 ± 27.30
25	10	142.20 ± 11.82	4.70 ± 0.64*	9.99 ± 5.16*
50	10	137.57 ± 20.63	4.57 ± 0.84*	9.23 ± 7.32**
100	10	129.40 ± 38.23*	5.34 ± 1.83	8.08 ± 4.61**
F		2.636	3.628	4.093
P		0.065	0.022	0.015

[注]与对照组相比, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

2.4 生精能力

壬基酚染毒后, 小鼠附睾尾精子畸形形态如图 2。由实验观察得, 精子畸形主要以无勾和颈部畸形为主, 其次为尾部异常折叠畸形。50 mg/kg 组可见头尾部异常折叠的精子(图 2A)。100 mg/kg 组可见双头畸形, 颈部异常突出的精子数量增多(图 2B)。25 mg/kg 组畸形数量少于 100 mg/kg 组, 但偶见无头畸形和断尾畸形。

随着染毒剂量的增加, 小鼠附睾尾产生的精子数量明显减少, 呈剂量-反应关系 ($r=-0.96$, $P<0.05$)。对照组相比, 100 mg/kg 组精子数、活精子率明显降低 ($P<0.01$), 精子畸形率升高 ($P=0.000$)。见表 3。



[注]A: 50 mg/kg 组; B: 100 mg/kg 组。a: 颈部异常突起畸形; b: 双头畸形; c: 颈部异常折叠畸形; d: 无勾畸形; e: 小头畸。

图 2 小鼠附睾尾部精子畸形图 (×400)

表 3 壬基酚染毒 35 d 对小鼠生精功能的影响				
剂量 (mg/kg)	n	精子数量 (×10 ⁶ /mL)	活精子率 (%)	精子畸形率 (个/5000)
0	10	152.78 ± 84.40	78.75 ± 10.71	55 ± 9
25	10	113.90 ± 15.13	72.15 ± 8.23	60 ± 10
50	10	100.67 ± 21.83*	72.73 ± 8.72	64 ± 6
100	10	78.22 ± 54.40**	66.28 ± 6.08**	82 ± 15**
F		3.909	3.502	14.513
P		0.017	0.025	0.000

[注]与对照组相比, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

3 讨论

本研究显示 100 mg/kg 壬基酚染毒 35 d 后, 可致雄性昆明种小鼠出现体重减轻; 睾丸重量降低, 病理改变明显; 精子数、精子活动率降低, 精子畸形率升高, 同时血清睾酮水平降低。

体重是反映受试物对实验动物基本状况影响的综合指标。本研究结果表明, 壬基酚染毒剂量达 100 mg/kg 时, 连续染毒 35 d 可使小鼠染毒前后体重差值增大, 25 mg/kg 和 50 mg/kg 剂量组并无明显差异。朱建林等^[6]以 Wistar 大鼠为研究对象, 发现壬基酚 100 mg/kg 剂量组连续染毒 30 d 可使 Wistar 大鼠体重减低; 而 25 mg/kg 组 Wistar 大鼠体重无明显变化。精子数量和质量是反映生殖系统功能异常的直接指标。本实验结果显示, 100 mg/kg 壬基酚染毒可降低小鼠精子数量, 增加精子畸形率。精子产生量与睾丸重量有密切关系, 壬基酚可通过小鼠血睾屏障在睾丸内蓄积, 损伤小鼠生精能力。100 mg/kg 染毒组与对照组相比, 睾丸重量降低。

组织病理学切片显示,随着壬基酚染毒剂量增加,小鼠睾丸内曲细精管萎缩,管间隙增大,精母细胞结构改变,精子数量减少,说明小鼠生精功能已受到损害。50 mg/kg 壬基酚染毒可降低雄性小鼠精子数量,但未改变其睾丸重量,壬基酚可致大鼠睾丸日产精子数及附睾精子数呈现剂量依赖性减少^[10]。Aly 等^[7]在壬基酚染毒成年雄性大鼠的实验中发现,100 mg/kg 组精曲小管组织学参数变化;250 mg/kg 组附睾重量减轻,并出现相应的毒性征象;400 mg/kg 组睾丸受损精子数降低。刘艳等^[8]研究结果证明 200 mg/kg 壬基酚经口染毒可损伤小鼠生精细胞和初级精母细胞染色体,致使小鼠精子数量减少,精子畸形率升高,损伤小鼠生精功能。精子头部畸形与睾丸组织结构异常密切相关,精子畸形率升高可直接影响雄性生殖功能。本实验染毒剂量达 100 mg/kg 时,小鼠精子形态发生明显改变,出现无勾双头等畸形精子数量增多;其他染毒剂量精子畸形以头部畸形为主,其次为颈部异常折叠。

95% 的体内性激素睾酮由睾丸间质细胞分泌。本实验结果显示小鼠体内睾酮含量与染毒剂量呈负相关($r=-0.98$, $P<0.05$),但间质细胞睾酮合成机制受何影响尚不清楚。冯凯琳等^[9]研究发现 200 mg/kg 壬基酚染毒可降低雄性大鼠血清睾酮水平。本实验结果表明,与对照组相比,各染毒组小鼠血清睾酮含量均降低,其结果可能与睾丸组织病变有关,不同染毒剂量对各级精细胞的影响存在差异,导致间质细胞分泌睾酮水平发生变化。睾酮的异常分泌可影响下丘脑-垂体-睾丸轴的正常功能,使激素分泌系统紊乱,影响生殖系统功能。

本实验结果表明,高剂量(100 mg/kg)壬基酚对雄性小鼠的生殖系统有损害作用,通过降低精子质量影响生殖功能。本次实验无法明确壬基酚损伤小鼠睾丸组织导致生精异常的具体机制,需进一步实

验探讨。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] Małgorzata M. Dobrzyńska. DNA damage in organs of female and male mice exposed to nonylphenol, as a single agent or in combination with ionizing irradiation: A comet assay study. *Mutation Research* [J]. *Mutat Res*, 2014, 772: 14-19.
- [2] Han X D, Tu Z G, Gong Y, et al. The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats [J]. *Reprod Toxicol*, 2004, 19(2): 215-221.
- [3] 许洁, 范奇元, 周远忠, 等. 壬基酚对雄性仔鼠生殖毒性的研究 [J]. *毒理学杂志*, 2008, 22(1): 23-25.
- [4] 闫鹏, 郑剑, 徐景野, 等. 壬基酚和辛基酚对小鼠生殖毒性联合毒性的作用 [J]. *中国预防医学杂志*, 2009, 10(4): 303-205.
- [5] 黄勤, 黄幸纤. 工业品六六六对小鼠精子影响的研究 [J]. *浙江医科大学学报*, 1987, 16(1): 9-22.
- [6] 朱建林, 汪家梨, 张文昌. 壬基酚诱发大鼠前列腺增生及对血清中性激素水平的影响 [J]. *环境与健康杂志*, 2009, 26(2): 119-120.
- [7] Aly H A, Domenech O, Banjar Z M. Effect of nonylphenol on male reproduction: analysis of rat epididymal biochemical markers and antioxidant defense enzymes [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 261(2): 134-141.
- [8] 刘艳, 崔金山, 张玉敏, 等. 环境雌激素壬基酚对小鼠生精功能的影响 [J]. *工业卫生与职业病*, 2004, 30(5): 293-295.
- [9] 冯凯琳, 张鹏洲, 申去非, 等. 壬基酚对雄性大鼠生精功能及相关激素和酶的影响 [J]. *解放军药学报*, 2012, 28(3): 189-192.

(收稿日期: 2015-03-11)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 葛宏妍)