

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

高艳荣, 史雪敏, 贾玉巧, 王丽, 邵代鹏, 孙瑶, 常翔宇, 张晗, 田江, 刘璐敏, 李东颖

内蒙古科技大学包头医学院公共卫生学院, 内蒙古 包头 014040

摘要:

[背景] 水体有机物污染对生殖健康的危害已成为目前重点关注的问题。我国水环境污染主要是河流有机物污染。

[目的] 探讨黄河包头段水源水有机提取物对小鼠生殖细胞凋亡及睾丸组织 3-硝基酪氨酸 (3-nitrotyrosine, 3-NT) 和天冬氨酸半胱氨酸特异性蛋白 3 (cysteinyI aspartate specific proteinase-3, Caspase-3) 表达的影响, 并初步探讨其生殖毒性作用机制。

[方法] 60 只 SPF 级雄性 ICR 小鼠随机分为 6 组: 对照组、黄河水有机提取物染毒组 (YRW-OE 组)、黄河水有机提取物 +N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 处理组 (YRW-OE+NAC 组)、自来水有机提取物染毒组 (TW-OE 组)、自来水有机提取物 +NAC 处理组 (TW-OE+NAC 组)、NAC 组, 每组 10 只。经口灌胃染毒, 隔日 1 次, 每次染毒前 1 h YRW-OE+NAC 组、TW-OE+NAC 组及 NAC 组小鼠经腹腔以 0.02 mL/g (以体重计) 体积注射浓度为 10 g/L 的 NAC。染毒 4 周后, 取小鼠附睾及睾丸组织, 透射电镜检测生殖细胞凋亡, 采用细胞计数板计数精子数量和观察精子畸形, ELISA 法检测睾丸组织 3-NT 的表达, Western blotting 法检测睾丸组织 Caspase-3 表达。

[结果] 与对照组 $[(4.15 \pm 0.06) \times 10^7/\text{g}, (4.84 \pm 0.65) \%$ 比较, YRW-OE 组小鼠精子数量 $[(2.86 \pm 0.06) \times 10^7/\text{g}]$ 减少, 精子畸形率 $[(19.59 \pm 1.49) \%$ 增加 ($P < 0.05$), TW-OE 组仅精子畸形率 $[(7.89 \pm 1.16) \%$ 增加 ($P < 0.05$); YRW-OE+NAC 组小鼠精子数量 $[(3.55 \pm 0.06) \times 10^7/\text{g}]$ 高于 YRW-OE 组 ($P < 0.05$), 精子畸形率 $[(11.44 \pm 1.22) \%$ 低于 YRW-OE 组 ($P < 0.05$); TW-OE+NAC 组小鼠精子畸形率 $[(5.62 \pm 0.91) \%$ 低于 TW-OE 组 ($P < 0.05$)。透射电镜显示, YRW-OE 组细胞核碎裂, 核糖体和溶酶体等细胞器减少, 细胞器结构不完整, 凋亡细胞多见; YRW-OE+NAC 组偶见核染色质固缩, 核糖体、内质网和溶酶体等细胞器未见减少。与对照组比较, 各染毒组小鼠睾丸组织 3-NT 和 Caspase-3 蛋白表达量明显增加, YRW-OE+NAC 组 3-NT $[(8.46 \pm 0.40) \text{ mg/L}]$ 和 Caspase-3 蛋白 (0.38 ± 0.02) 表达均低于 YRW-OE 组 $[(12.28 \pm 0.78) \text{ mg/L}, 0.48 \pm 0.02]$, 均 $P < 0.05$; TW-OE+NAC 组仅 3-NT 表达低于 TW-OE 组 $[(7.23 \pm 0.47), (9.34 \pm 0.81) \text{ mg/L}, P < 0.05]$ 。

[结论] 黄河水有机提取物能够引起实验小鼠睾丸生殖细胞凋亡增加, 3-NT 和 Caspase-3 蛋白表达量增加; 氧化应激激活 Caspase-3 信号通路介导生殖细胞凋亡可能是其生殖毒性的重要作用机制之一。

关键词: 黄河; 有机提取物; 睾丸; 细胞凋亡; 3-NT; Caspase-3

Effects of organic extracts in source water in Baotou section of the Yellow River on germ cell apoptosis and 3-NT/Caspase-3 expressions in testis of male mice GAO Yan-rong, SHI Xue-min, JIA Yu-qiao, WANG Li, TAI Dai-peng, SUN Yao, CHANG Xiang-yu, ZHANG Han, TIAN Jiang, LIU Lu-min, LI Dong-ying (School of Public Health, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou, Inner Mongolia 014040, China)

Abstract:

[Background] Reproductive health hazards sourced from organic pollutants in river water have become a major concern at present. The pollution of river water in China is mainly caused by organic pollutants.

[Objective] This experiment investigates the effects of organic pollutants in source water in

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19272

基金项目

包头医学院科学研究基金项目 (BYJJ-YF 201712); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (NJZC14262); 2019 年国家级大学生创新创业训练计划项目 (201910127003)

作者简介

高艳荣 (1978—), 女, 硕士, 副教授; E-mail: 39228465@qq.com

通信作者

高艳荣, E-mail: 39228465@qq.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-04-23

录用日期 2019-10-17

文章编号 2095-9982(2019)12-1137-06

中图分类号 R114; R123.7

文献标志码 A

►引用

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.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19272

Funding

This study was funded.

Correspondence to

GAO Yan-rong, E-mail: 39228465@qq.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2019-04-23

Accepted 2019-10-17

►To cite

GAO Yan-rong, SHI Xue-min, JIA Yu-qiao, et al. Effects of organic extracts in source water in Baotou section of the Yellow River on germ cell apoptosis and 3-NT/Caspase-3 expressions in testis of male mice [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(12): 1137-1142.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19272

Baotou section of the Yellow River on the apoptosis of germ cells and the expressions of 3-nitrotyrosine (3-NT) and cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3) in testis of male mice, and preliminarily explores the relevant mechanism of action.

[Methods] Sixty SPF ICR male mice were randomly divided into six groups: control group, Yellow River water organic extracts treatment group (YRE-OE group), Yellow River water organic extracts+N-acetylcysteine (NAC) treatment group (YRE-OE+NAC group), tap water organic extracts treatment group (TW-OE group), tap water organic extracts+NAC treatment group (TW-OE+NAC group), and NAC group, with 10 mice in each group. The YRE-OE were administered to all mice by gavage once every other day, and the mice in the YRE-OE+NAC group, TW-OE+NAC group, and NAC group were intraperitoneally injected with 10 g/L NAC in a volume of 0.02 mL/g (in body weight) 1 h before the YRE-OE administration. After four weeks of the exposure, epididymis and testis tissues were isolated to observe germ cell apoptosis under transmission electron microscope; germ cells were counted and sperm malformation was observed; 3-NT expression in testis was detected by ELISA; and Caspase-3 protein expression was detected by Western blotting.

[Results] Compared with the control group $[(4.15 \pm 0.06) \times 10^7/\text{g}]$, $(4.84 \pm 0.65)\%$, the YRE-OE group showed decreased germ cells $[(2.86 \pm 0.06) \times 10^7/\text{g}]$ and increased sperm malformation rate $[(19.59 \pm 1.49)\%]$ ($P < 0.05$), and the TW-OE group only showed increased sperm malformation rate $[(7.89 \pm 1.16)\%]$ ($P < 0.05$); compared with the YRE-OE group, the YRE-OE+NAC group showed increased germ cells $[(3.55 \pm 0.06) \times 10^7/\text{g}]$ and decreased sperm malformation rate $[(11.44 \pm 1.22)\%]$ ($P < 0.05$); compared with the TW-OE group, the TW-OE+NAC group showed decreased sperm malformation rate $[(5.62 \pm 0.91)\%]$ ($P < 0.05$). Under transmission electron microscope, nuclear fragmentation, reduced cell organelles such as ribosomes and lysosomes, destroyed mitochondrial structure, and abundant apoptosis germ cells were observed in the YRE-OE group; however, such phenomenon was rarely observed in the YRE-OE+NAC group. Compared with the control group, the 3-NT and Caspase-3 expressions were increased in the exposure groups; the YRE-OE+NAC group showed lower 3-NT $[(8.64 \pm 0.40) \text{ mg/L}]$ and Caspase-3 (0.38 ± 0.02) expressions than the YRE-OE group $[(12.28 \pm 0.78) \text{ mg/L}]$, 0.48 ± 0.02 , $P < 0.05$; the TW-OE+NAC group only showed lower 3-NT expression $[(7.23 \pm 0.47) \text{ vs. } (9.34 \pm 0.81) \text{ mg/L}]$, $P < 0.05$ than the TW-OE group.

[Conclusion] The organic matters extracted from the Yellow River could cause germ cell apoptosis and increased expressions of 3-NT and Caspase-3 in testis of mice; the germ cell apoptosis mediated by Caspase-3 signaling pathway activated by oxidative stress may be one of the mechanisms of their reproductive toxicity.

Keywords: the Yellow River; organic extracts; testis; apoptosis; 3-NT; Caspase-3

黄河作为内蒙古内最大的河流之一，流经包头南郊，是包头居民主要饮用水水源。包头是内蒙古西北部一个以钢铁、稀土和铝生产为特色的重工业城市。自国家近年实施支持西部发展的一些政策以来，包头市在冶金、机械制造、能源、电力等方面得到了成倍的增长，由此带来的工业污水排放量明显增加，导致河水有机物污染加重。此外，黄河包头段邻河套平原下游，河套平原是我国粮食生产基地，大面积农作物种植施用的有机肥料和喷洒的农药经雨水进入黄河水流，成为黄河水有机物污染的另一重要来源。同时，由于近年黄河水流量急剧下降，降低了水流输移分散污染物的能力。这些都加重了河水有机物污染和加剧了整个黄河流域生态环境恶化的风险。因此，黄河包头段水源水有机物污染严重及成分复杂，其健康危害已得到社会公众的广泛关注。

水体有机物污染对生殖健康的危害已成为目前重点关注的问题。对水中有机提取物的毒性研究表明，活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 可能是各种有机污染物毒作用的始动因素，ROS 对 DNA 造成的损伤能够致精子形态异常和精子数下降^[1-3]。水源水有机物提取物对机体 DNA 有确定的损伤作用^[4]，国外的同类研究也得到相一致的结果^[5]。

本研究提取黄河包头段水源水 (Yellow River water, YRW) 和自来水 (tap water, TW) 中有机污染物，对雄性小鼠进行有机提取物 (organic extracts, OE) 染毒，同时用抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 预处理部分实验小鼠，以阐明黄河包头段水源水有机物提取物对小鼠生殖细胞凋亡及睾丸组织 3-硝基酪氨酸 (3-nitrotyrosine, 3-NT) 和天冬氨酸半胱氨酸特异性蛋白 3 (cysteinyl aspartate specific proteinase-3, Caspase-3) 表达的影响，揭示其生殖毒性效应，并初步探讨毒作用的分子机制，为制定水体有机物污染的防治措施提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂 正己烷、二甲基亚砜 (天津市凯通化学试剂有限公司，中国)，Amberlite XAD-2 吸附树脂 (郑州合成新材料有限公司，中国)，玉米油、小鼠 3-NT ELISA 试剂盒、Caspase-3 抗体、蛋白浓度测定试剂盒 (Solarbio，美国)。

1.1.2 仪器 超净工作台 (珠海市再鑫仪器有限公司，中国)，NOVE 型光学显微镜 (宁波永新光学有限公司，中国)，台式高速离心机 (上海安亭科学仪器厂，中

国),电热恒温水浴锅(北京三二八科学仪器有限公司,中国),数显电热培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂,中国),全自动酶标分析仪(伯腾仪器有限公司,美国),XAD-2树脂柱(北京朋利驰科技有限公司,中国),旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂,中国),凝胶成像扫描仪(Universal Hood, Bio-Rad, 美国),透射电子显微镜(日立,日本)。

1.2 水样采集及有机物提取

1.2.1 水样采集 于2018年7月3—23日(丰水期)在黄河包头段下游水源断面水面以下0.5 m处采集水样,分6次取水,每次间隔3 d,合计取水1000 L,水样采集入白铁桶。同时以相同的采样时间间隔和采样次数采集自来水末梢水水样。将水样运回实验室,静置过夜沉淀水中杂质。

1.2.2 有机物提取 黄河水及自来水水样经过XAD-2树脂柱富集,正己烷丙酮混合液(1:1)洗脱,然后将洗脱液置于旋转蒸发仪内,在40℃真空负压挥干,用玉米油将有机提取物溶解定容。1 mL有机物玉米油溶解2 500 mL原水样的有机提取物,将提取液置于-4℃冰箱保存,用于动物染毒。

1.3 实验动物分组与染毒

经包头医学院医学伦理审查委员会批准,选择健康SPF级雄性ICR小鼠60只,体重为20~23 g,购于北京方元缘实验动物中心,动物合格证号为SCXK(京)2016-0002。饲养室内温度为(22±2)℃,相对湿度为30%~50%。实验期间,动物饲养室24 h人工控制昼夜,动物可自由饮水、摄食。

适应性饲养1周后,将60只小鼠采用随机分组法分为6组:对照组、50 L/kg黄河水有机提取物染毒组(YRW-OE组)、50 L/kg黄河水有机提取物+100 mg/kg NAC处理组(YRW-OE+NAC组)、50 L/kg自来水有机提取物染毒组(TW-OE组)、50 L/kg自来水有机提取物+100 mg/kg NAC处理组(TW-OE+NAC组)、NAC组,每组10只。经口灌胃染毒,隔日1次,每次染毒前1 h YRW-OE+NAC组、TW-OE+NAC组及NAC组小鼠经腹腔以0.02 mL/g(以体重计)体积注射浓度为10 g/L的NAC,对照组经口灌胃与实验组等体积的玉米油。4周后处死小鼠,取双侧附睾及睾丸,检测附睾精子质量、生殖细胞凋亡、睾丸组织3-NT和Caspase-3表达。

根据文献[6-7],本研究预实验中水中有机提取物染毒剂量为50 L/kg,隔日染毒1次,染毒5次可引起睾丸损伤,表现为精子数量下降和精子畸形率增

加,因此本次研究设计染毒剂量为50 L/kg。

1.4 精子计数、精子畸形及生殖细胞凋亡检测

取附睾置于2 mL、37℃预热生理盐水的离心管中,用眼科剪剪碎,37℃水浴锅保温3 min,待精子游出,制得精子悬液,在37℃水浴中孵育待检测。取10 μL精子悬液滴到细胞计数板上,于显微镜下计数5个方格的精子数,将精子数换算成每克附睾中的精子数量。取1滴精子悬液涂片,甲醇固定5 min,晾干片后镜检。精子畸形主要包括双头、双尾、胖头、无定形、无钩等,每只小鼠观察精子500条,并计算精子畸形率。取睾丸置于5%戊二醛磷酸盐缓冲液中固定,过夜,手术刀剥离睾丸包膜,固定72 h后,组织处理,切片,透射电镜检测睾丸组织超微结构。

1.5 ELISA法测定小鼠睾丸组织3-NT的表达

取小鼠睾丸,除去被膜后剪碎,称取0.2 g加入1.8 mL冷生理盐水,冰浴下用制成10%的睾丸匀浆,以3 500 r/min离心(离心半径为5 cm)10 min,取上清液,采用ELISA试剂盒检测小鼠睾丸组织3-NT的表达,具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.6 Western blotting法检测小鼠睾丸组织Caspase-3蛋白的表达

称取50 mg睾丸组织,加入500 μL裂解液,于4℃充分裂解30 min后,12 000×g、离心10 min,取上清液为蛋白样品。Radford法测定蛋白浓度。蛋白提取液经上样、电泳、转膜、牛奶封闭、一抗4℃孵育过夜、二抗37℃孵育1 h,于凝胶成像扫描仪扫描一抗和荧光二抗结合的目的蛋白荧光信号,以目的蛋白与内参蛋白β-actin的比值作为该蛋白的相对表达量。

1.7 统计学分析

计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,多组比较采用方差齐性检验和单因素方差分析。进一步进行组间两两比较时,采用Bonferroni检验。率间的比较采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 水样中有机提取物对精子数量、精子质量的影响

由表1可知,染毒前各组小鼠体重差异无统计学意义($P>0.05$),染毒4周后,YRW-OE组和TW-OE组小鼠体重低于对照组($P<0.05$);YRW-OE组小鼠睾丸重量低于对照组($P<0.05$);各组小鼠睾丸脏器系数差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较,YRW-OE组精子

数量减少,精子畸形率增加 ($P<0.05$); TW-OE 组仅精子畸形率增加 ($P<0.05$)。YRW-OE+NAC 组小鼠精子数量高于 YRW-OE 组,精子畸形率低于 YRW-OE 组 ($P<0.05$); TW-OE+NAC 组小鼠精子畸形率低于 TW-OE 组 ($P<0.05$)。

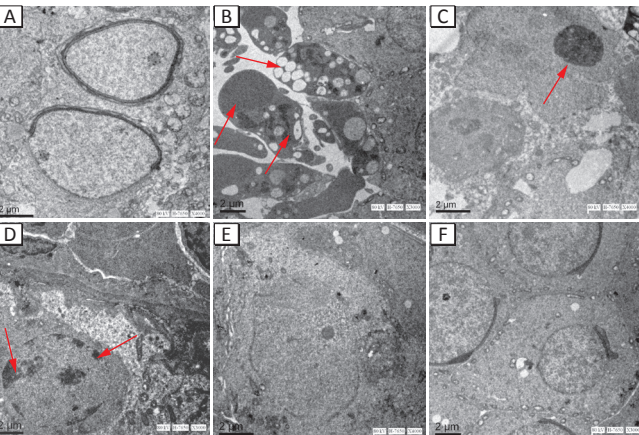
表 1 水样中有机提取物对小鼠体重、睾丸脏器系数、精子数量、精子畸形率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	染毒前体重 (g)	染毒 4 周后体重 (g)	睾丸重量 (g)	睾丸脏器系数 (%)	精子数量 ($\times 10^7/g$)	精子畸形率 (%)
对照组	21.73 $\pm$ 0.90	40.87 $\pm$ 2.41	0.35 $\pm$ 0.02	0.86 $\pm$ 0.04	4.15 $\pm$ 0.06	4.81 $\pm$ 0.65
黄河水有机提取物染毒组 (YRW-OE 组)	22.00 $\pm$ 1.21	32.69 $\pm$ 2.44*	0.30 $\pm$ 0.02*	0.92 $\pm$ 0.03	2.86 $\pm$ 0.06*	19.59 $\pm$ 1.49*
黄河水有机提取物+N-乙酰半胱氨酸处理组 (YRW-OE+NAC 组)	21.19 $\pm$ 1.33	38.40 $\pm$ 3.58	0.33 $\pm$ 0.03	0.86 $\pm$ 0.09	3.55 $\pm$ 0.06#	11.44 $\pm$ 1.22**
自来水有机提取物染毒组 (TW-OE 组)	22.40 $\pm$ 1.17	33.85 $\pm$ 1.29*	0.33 $\pm$ 0.02	0.96 $\pm$ 0.08	4.11 $\pm$ 0.09#	7.89 $\pm$ 1.16**
自来水有机提取物+N-乙酰半胱氨酸处理组 (TW-OE+NAC 组)	21.84 $\pm$ 1.08	38.54 $\pm$ 4.22	0.34 $\pm$ 0.01	0.89 $\pm$ 0.04	4.13 $\pm$ 0.03	5.62 $\pm$ 0.91 $\triangle$ #
N-乙酰半胱氨酸组 (NAC 组)	21.91 $\pm$ 1.28	42.29 $\pm$ 1.56	0.37 $\pm$ 0.03	0.88 $\pm$ 0.04	4.06 $\pm$ 0.05#	5.04 $\pm$ 0.84#
F	0.110	14.734	9.808	2.179	255.500	146.620
P	0.978	0.000	0.000	0.083	0.000	0.000

[注] *: 与对照组比较, $P<0.05$; #: 与 YRW-OE 组比较, $P<0.05$; $\triangle$: 与 TW-OE 组, $P<0.05$ 。

2.2 水样中有机提取物对睾丸生殖细胞凋亡的影响

由图 1 可见,对照组细胞外形规则,染色质均匀细密,胞核清晰,线粒体呈椭圆形或杆状,内嵴结构正常,并含有丰富的内质网、核糖体和溶酶体等细胞器。YRW-OE 染毒组细胞核染色质固缩、聚集成块,核碎裂,细胞器结构多不完整,细胞内出现空泡化,核糖体、内质网、初级溶酶体等细胞器减少,凋亡细胞较多见,可见坏死细胞;YRW-OE+NAC 处理组偶见核染色质固缩,核糖体、内质网和溶酶体等细胞器未见减少。TW-OE 组及 TW-OE+NAC 处理组细胞线粒体空化变性少见,仅有沿核膜内表面核染色质聚集成大小不等的团块状,初级溶酶体较多,凋亡细胞少见。

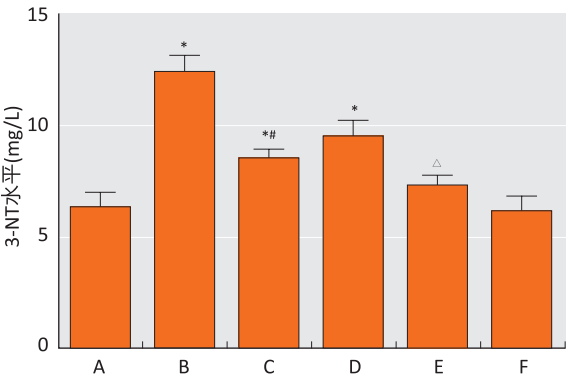


[注] A: 对照组; B: 黄河水有机提取物染毒组 (YRW-OE 组); C: 黄河水有机提取物+N-乙酰半胱氨酸处理组 (YRW-OE+NAC 组); D: 自来水有机提取物染毒组 (TW-OE 组); E: 自来水有机提取物+N-乙酰半胱氨酸处理组 (TW-OE+NAC 组); F: N-乙酰半胱氨酸组 (NAC 组)。透射电镜观察: YRW-OE 组可见细胞内空泡,核染色质固缩,核碎裂; YRW-OE+NAC 组偶见核染色质固缩; TW-OE 组可见核膜内表面核染色质团块。

图 1 透射电镜检测水样中有机提取物处理后小鼠睾丸生殖细胞超微结构

2.3 水样中有机提取物对睾丸组织 3-NT 表达的影响

与对照组比较, YRW-OE 组和 TW-OE 组小鼠睾丸组织 3-NT 表达增加 ($P<0.05$); YRW-OE+NAC 组 3-NT 表达 [(8.46 $\pm$ 0.40) mg/L] 低于 YRW-OE 组 [(12.28 $\pm$ 0.78) mg/L] ($P<0.05$), TW-OE+NAC 组 3-NT 表达 [(7.23 $\pm$ 0.47) mg/L] 低于 TW-OE 组 [(9.34 $\pm$ 0.81) mg/L] ($P<0.05$); NAC 组 3-NT 表达与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 2。



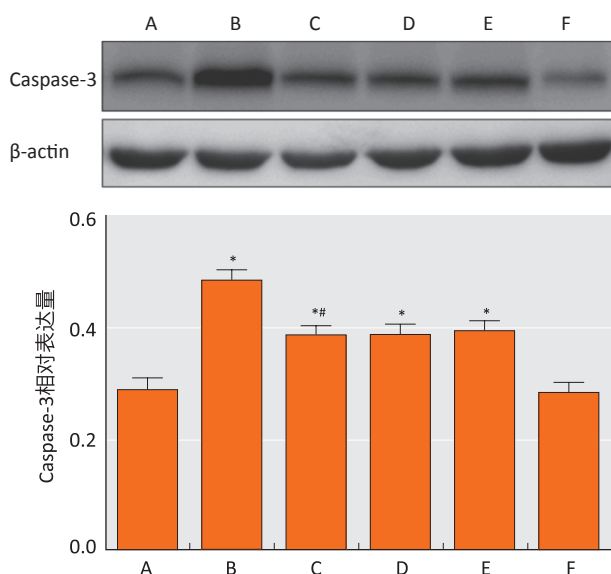
[注] A: 对照组; B: 黄河水有机提取物染毒组 (YRW-OE 组); C: 黄河水有机提取物+N-乙酰半胱氨酸处理组 (YRW-OE+NAC 组); D: 自来水有机提取物染毒组 (TW-OE 组); E: 自来水有机提取物+N-乙酰半胱氨酸处理组 (TW-OE+NAC 组); F: N-乙酰半胱氨酸组 (NAC 组)。*: 与对照组比较, $P<0.05$; #: 与 YRW-OE 组比较, $P<0.05$; $\triangle$: 与 TW-OE 组比较, $P<0.05$ 。

图 2 水样中有机提取物对小鼠睾丸组织 3-NT 表达的影响 ($n=10$)

2.4 水样中有机提取物对睾丸组织 Caspase-3 表达的影响

与对照组比较, 各个染毒组小鼠睾丸组织 Caspase-3 蛋白表达量增加 ($P<0.05$), NAC 组 Caspase-3 蛋白表达量无明显改变 ($P>0.05$); YRW-OE+NAC 处理

组 Caspase-3 蛋白表达量 (0.38 ± 0.02) 低于 YRW-OE 组 (0.48 ± 0.02) ($P < 0.05$) ; TW-OE+NAC 处理组 Caspase-3 蛋白表达量与 TW-OE 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。



[注] A: 对照组; B: 黄河水有机提取物染毒组 (YRW-OE 组); C: 黄河水有机提取物+N-乙酰半胱氨酸处理组 (YRW-OE+NAC 组); D: 自来水有机提取物染毒组 (TW-OE 组); E: 自来水有机提取物+N-乙酰半胱氨酸处理组 (TW-OE+NAC 组); F: N-乙酰半胱氨酸组 (NAC 组)。*: 与对照组比较, $P < 0.05$; #: 与 YRW-OE 组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 水样中有机提取物对小鼠睾丸组织 Caspase-3 表达的影响 ($n=10$)

3 讨论

诱导睾丸生殖细胞凋亡是一些外源有害因素引起生殖毒性的关键靶点, 通过诱导生殖细胞凋亡而破坏睾丸中细胞增殖与凋亡之间的平衡, 导致生殖功能障碍^[8-9]。既往研究^[10-12]指出, 水中有机污染物可引起大鼠睾丸精子细胞凋亡增加, 曹波^[13]对嘉陵江重庆主城区水源水中有机提取物雄性生殖毒性评价的研究结果提示, 水中有机污染物通过诱导睾丸生殖细胞凋亡增加, 可能是其生殖毒性的重要机制。本课题组前期实验结果发现, 黄河包头段有机提取物能够诱导体外培养的生殖细胞凋亡增加, 生殖细胞凋亡可能是水中有机污染物抑制生殖细胞增殖的主要途径^[14]。本研究通过体内实验进一步探明黄河包头段水源水有机提取物的生殖毒性及可能的相关机制。

本研究结果显示, 与对照组比较, YRW-OE 能够引起实验小鼠精子数量减少, 精子畸形率上升, 且 YRW-OE 组小鼠精子数量明显低于 TW-OE 组, 精子畸形率明显高于 TW-OE 组; YRW-OE 组小鼠睾丸生殖细胞胞核染色质固缩、核碎裂和细胞内出现空泡化, 细胞器

结构多不完整, 核糖体、内质网、初级溶酶体等细胞器减少, 凋亡细胞较多。以上结果说明, 黄河包头段水源水有机提取物能够引起小鼠睾丸生殖细胞凋亡增加, 对生殖功能造成损伤。睾丸生殖细胞在分化过程中存在自发性 and 诱发性细胞凋亡, 细胞凋亡是限制生精上皮中生殖细胞数量的主要方式, 约有 3/4 的生殖细胞通过主动的凋亡而丢失。若没有严格的调控机制, 生殖细胞将快速增长并超出支持细胞的承受能力, 或者生殖细胞过度凋亡而使精子数量下降, 这些都将导致生殖功能障碍。因此, 黄河包头段水源水有机提取物引起小鼠生殖细胞过度凋亡可能是其生殖功能损伤的主要机制。

Caspase-3 是细胞凋亡最关键的执行者, 处于凋亡级联反应的下游, 在蛋白级联切割过程中起着重要的作用。正常情况下, Caspase-3 以酶原的形式存在, 几乎没有活性, 直到发生凋亡信号事件由引发者裂解后, 才具有活性^[15-16]。本研究结果显示, YRW-OE 组和 TW-OE 组小鼠睾丸组织 Caspase-3 表达量高于对照组, 但 TW-OE 组 Caspase-3 表达量低于 YRW-OE 组。以上结果说明黄河包头段水源水有机提取物能激活小鼠睾丸组织 Caspase-3 活性, 通过 Caspase-3 途径诱导睾丸组织生殖细胞凋亡增加。用抗氧化剂 NAC 处理实验小鼠后发现, YRW-OE+NAC 组 Caspase-3 表达量低于 YRW-OE 组, 且用透射电镜检测发现, YRW-OE+NAC 组小鼠凋亡的生殖细胞少于 YRW-OE 组, 这说明黄河水有机提取物可能是通过激活氧化应激关联的 Caspase-3 介导细胞凋亡, 引起生殖功能损伤。

3-NT 是氧化应激反应的主要产物, 也是生物体内一种蛋白质损伤的标志性产物。当体内的氧化应激增强时, ROS 会随之增加, 通过自由基反应, 能够硝化游离的酪氨酸或蛋白内的酪氨酸残基, 最终导致 3-NT 含量增加, 且 3-NT 在体内表达稳定^[17]。因此, 通过检测 3-NT 的表达量, 可以评价体内产生的自由基等 ROS 的水平。此外, 3-NT 作为机体内残留的氧化损伤产物之一, 能通过 H_2O_2 介导 DNA 损伤, 影响细胞功能^[18]。本研究结果显示, YRW-OE 组和 TW-OE 组小鼠睾丸组织 3-NT 表达量高于对照组, 但 TW-OE 组小鼠睾丸组织 3-NT 表达量低于 YRW-OE 组, 用抗氧化剂 NAC 处理实验小鼠后发现, YRW-OE+NAC 组 3-NT 表达低于 YRW-OE 组。以上结果说明, 黄河包头段水源水有机提取物能使小鼠体内的氧化应激增强, 睾丸组织自由基等 ROS 产生量增加。

综上所述,黄河包头段水源水有机提取物能使小鼠体内的氧化应激增强,睾丸组织 3-NT 的表达量增加,激活 Caspase-3 信号途径,从而介导生殖细胞凋亡增加。因本研究未对遗传物质损伤的指标进行检测,故关于黄河包头段水源水有机提取物对生殖功能损伤的确切分子机制还不十分清楚,尚需进一步研究。

参考文献

- [1] AGARWAL A, SALEH RA, BEDAIWY MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction [J]. *Fertil Steril*, 2003, 79 (4) : 829-843.
- [2] WANG X, SHARMA RK, SIKKA SC, et al. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility [J]. *Fertil Steril*, 2003, 80 (3) : 531-535.
- [3] WANG D, XU Z, ZHAO Y, et al. Change of genotoxicity for raw and finished water : role of purification processes [J]. *Chemosphere*, 2011, 83 (1) : 14-20.
- [4] 方东,梅卓华,楼宵.南京市主要饮用水源水中有机污染物的遗传毒性研究 [J]. *中国环境监测*, 2001, 17 (1) : 2-7.
- [5] ZIETZ BP, NORDHOLT G, KETSERIDIS G, et al. Mutagenicity of Baltic seawater and the relation to certain chemical and microbiological parameters [J]. *Mar Pollut Bull*, 2001, 42 (10) : 845-851.
- [6] 任谦,曹波,邱志群,等.以嘉陵江(重庆段)为水源的管网末梢水中有机提取物的雄性生殖毒性研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27 (10) : 1012-1015.
- [7] 田怀军.重庆市饮用水有机物污染及其类雌激素活性研究 [D]. 重庆:第三军医大学,2002.
- [8] RICHBURG JH, JOHNSON KJ, SCHOENFELD HA, et al. Defining the cellular and molecular mechanisms of toxicant action in the testis [J]. *Toxicol Lett*, 2002, 135 (3) : 167-183.
- [9] HIKIM AP, LUE Y, DIAZ-ROMERO M, et al. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 85 (2/3/4/5) : 175-182.
- [10] PARK JD, HABEERU SS, KLAASSEN CD. Testicular toxicity of di-(2-ethylhexyl)phthalate in young Sprague-Dawley rats [J]. *Toxicology*, 2002, 171 (2/3) : 105-115.
- [11] D'ALESSIO A, RICCIOLI A, LAURETTI P, et al. Testicular FasL is expressed by sperm cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (6) : 3316-3321.
- [12] RICHBURG JH, NAÑEZ A, WILLIAMS LR, et al. Sensitivity of testicular germ cells to toxicant-induced apoptosis in *gld* mice that express a nonfunctional form of fas ligand [J]. *Endocrinology*, 2000, 141 (2) : 787-793.
- [13] 曹波.嘉陵江重庆主城区水源水中有机污染物雄性生殖毒性的研究 [D]. 重庆:第三军医大学,2006.
- [14] 高艳荣,王素华,高红萍,等.黄河包头段水源水有机提取物对雄性大鼠原代生殖细胞增殖和氧化损伤的影响 [J]. *环境与职业医学*, 2018, 35 (6) : 553-557.
- [15] CHAUHAN V, CHAUHAN A. Oxidative stress in Alzheimer's disease [J]. *Pathophysiology*, 2006, 13 (3) : 195-208.
- [16] GHAVAMI S, HASHEMI M, ANDE SR, et al. Apoptosis and cancer : mutations within caspase genes [J]. *J Med Genet*, 2009, 46 (8) : 497-510.
- [17] 李洁,赵江明,张丽,等.3-硝基酪氨酸对轻微型肝性脑病的诊断价值 [J]. *临床神经病学杂志*, 2019, 32 (1) : 25-28.
- [18] MURATA M, KAWANISHI S. Oxidative DNA damage induced by nitrotyrosine, a biomarker of inflammation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316 (1) : 123-128.

(英文编辑:汪源;编辑:丁瑾瑜;校对:汪源)