

论著·基础研究

青春期氰戊菊酯暴露对雄性大鼠睾丸组织氧化应激的影响

张晶晶, 周义军, 户宜, 施蓉, 张妍, 田英, 高宇

上海交通大学医学院 公共卫生学院环境卫生学教研室, 上海 200025

[摘要] **目的**·观察青春期氰戊菊酯暴露对雄性大鼠睾丸组织氧化应激的影响。**方法**·将 50 只 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠随机分为对照 (玉米油) 组、低剂量 (0.02 mg/kg 氰戊菊酯) 组、中剂量 (1 mg/kg 氰戊菊酯) 组、高剂量 (50 mg/kg 氰戊菊酯) 组及干预 (50 mg/kg 氰戊菊酯+100 mg/kg N-乙酰基-L-半胱氨酸) 组, 每组 10 只, 于 4 周龄开始连续染毒 2 个月。测定睾丸组织中丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活力, 并观察大鼠睾丸组织形态结构。**结果**·与对照组相比, 高剂量组大鼠睾丸组织中 MDA 含量升高, 体质量、GSH-Px 和 SOD 活力均下降 (均 $P<0.05$); 而干预组与高剂量组相比, MDA 含量降低, GSH-Px 活力升高 (均 $P<0.05$)。睾丸组织形态学观察发现, 随着染毒剂量的增加, 睾丸生精细胞排列疏松, 细胞层数减少, 曲细精管管腔内径增大。**结论**·青春期氰戊菊酯暴露可能导致雄性大鼠睾丸组织氧化损伤。

[关键词] 氰戊菊酯; 雄性大鼠; 睾丸; 氧化应激

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.02.003 **[中图分类号]** R114 **[文献标志码]** A

Effects of fenvalerate exposure during puberty on oxidative stress in male rat testis

ZHANG Jing-jing, ZHOU Yi-jun, HU Yi, SHI Rong, ZHANG Yan, TIAN Ying, GAO Yu

Department of Environmental Health, School of Public Health, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To study the effects of fenvalerate exposure during puberty on oxidative stress in rat testis. **Methods**·Fifty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into the control group (corn oil), low dose group (0.02 mg/kg fenvalerate), moderate dose group (1 mg/kg fenvalerate), high dose group (50 mg/kg fenvalerate) and intervention group (50 mg/kg fenvalerate+100 mg/kg N-acetyl-L-cysteine), ten rats for each group, for two months by gavage at four weeks of age. Malondialdehyde (MDA) content, activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) in testis and testicular tissue morphology were detected. **Results**·Compared with the control group, the rat body weight and activities of GSH-Px and SOD in testis were significantly decreased in high dose group while MDA content was increased (all $P<0.05$). Compared with the high dose group, MDA content was decreased and GSH-Px activity was increased in the intervention group (both $P<0.05$). The results of testicular histology showed that with the increasing exposure dose, the spermatogenic cells were arranged loosely, the number of layers was decreased and the inner diameter of seminiferous tubules was increased. **Conclusion**·Exposure to fenvalerate during puberty may induce oxidative damage in testis tissue of male rats.

[Key words] fenvalerate; male rat; testis; oxidative stress

农药残留问题一直备受大家关注。拟除虫菊酯类 (pyrethroids, PYRs) 农药是一种新型人工合成农药, 包括不含 α -氰基的 I 型 (以氯菊酯为代表) 和含 α -氰基的 II 型 (以氰戊菊酯为代表), 具有高效、广谱、易降解、哺乳动物低毒等特性, 成为有机磷类和氨基甲酸酯类农药的理想替代品^[1-3]。目前 PYRs 已占据整个杀虫剂市场的 1/4, 在农业害虫和卫生害虫的防治工作中占有重要地位^[4]。在日常生活中, 人们可通过水果、蔬菜和室内环境残留暴露于 PYRs, 并且已有研究^[5]发现 PYRs 代谢物在人群尿液样本中普遍检出。目前研究^[6-8]提示, PYRs 具有一定内分泌干扰毒性、神

经发育毒性和生殖毒性, 但是其雄性生殖毒性作用机制尚不清楚, 氧化应激可能是其中重要的机制之一。氰戊菊酯作为一种高效、低毒的 II 型 PYRs 农药, 较 I 型 PYRs 使用更为广泛。因此, 本研究采用氰戊菊酯对 4 周龄 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠进行染毒, 并设置一个加入抗氧化剂 N-乙酰基-L-半胱氨酸 (N-acetyl-L-cysteine, NAC; 它是细胞内还原性谷胱甘肽的前体, 是一种含有巯基的抗氧化剂, 能够在一定程度上拮抗氧化应激反应) 的干预组, 观察染毒后大鼠睾丸组织氧化应激指标的变化和干预组的干预效果, 进一步探讨其可能的生殖毒性作用机制。

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81602823); 上海市卫生和计划生育委员会面上项目 (201640174); 上海交通大学医学院附属新华医院“千天计划” (15QT08); 上海卫生计生系统重要薄弱学科建设计划 (2016ZB0103) (National Natural Science Foundation of China, 81602823; Scientific Research Program of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning, 201640174; Early Life Plan funded by Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, 15QT08; Developing Plan of Important Weak Disciplines from Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning, 2016ZB0103)。

[作者简介] 张晶晶 (1990—), 女, 硕士生; 电子信箱: zhangjj_826@foxmail.com。

[通信作者] 高宇, 电子信箱: gaoyu_ciel@sjtu.edu.cn。



1 材料与方法

1.1 实验动物

选用3周龄健康SD雄性大鼠50只,体质量(90 ± 20)g,由上海交通大学医学院实验动物科学部提供。动物饲养在室温 $20\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $(50\pm 5)\%$ 以及9h和15h明暗循环(8:00—17:00亮灯)的环境下,自由饮水,标准饲料喂养。动物实验的所有程序均通过上海交通大学医学院动物保护与福利委员会批准,遵循实验动物福利伦理原则。

1.2 主要试剂

氰戊菊酯(纯度 $>97\%$)、玉米油和NAC均购自美国Sigma公司,丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。其他试剂均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 分组及染毒方法

适应性喂养1周后,将50只4周龄青春前期健康SD雄性大鼠随机分为5组,分别为对照(玉米油)组、低剂量 $[0.02\text{ mg/kg}$ 氰戊菊酯,即每日允许摄入量(acceptable daily intake, ADI)]组、中剂量 $(1\text{ mg/kg}$ 氰戊菊酯)组、高剂量 $[50\text{ mg/kg}$ 氰戊菊酯,即 $1/4$ 的半数致死量($1/4\text{ LD}_{50}$)]组及干预 $(50\text{ mg/kg}$ 氰戊菊酯 $+100\text{ mg/kg}$ NAC)组,每组10只。染毒组均用等量玉米油溶解药物。采用灌胃方式,于出生后第28日开始灌胃染毒,每日1次,连续染毒2个月,并于末次染毒24h内处死所有实验动物。

1.4 生长发育指标观察

实验开始后,每日观察大鼠饮食、饮水情况和精神状

态有无异常,每周称量大鼠体质量并记录。

1.5 氧化应激相关指标的测定

处死大鼠后,取出左侧睾丸,按照 $1:9$ (m/V) 加至预冷的生理盐水中制备成组织匀浆, $1\,700\times g$ 离心 10 min ,取上清。然后按照相应试剂盒说明书分别测定MDA含量、GSH-Px和SOD活力。

1.6 睾丸组织病理切片制备

处死大鼠后立即取出右侧睾丸组织,置于 4% 多聚甲醛中固定,然后经脱水、透明、浸蜡、包埋,制备成 $5\text{ }\mu\text{m}$ 石蜡切片,进行苏木精-伊红(H-E)染色。光镜下观察睾丸组织结构变化。

1.7 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计分析。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD法。采用Spearman法进行相关分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体质量的变化

在整个染毒过程中,各组大鼠饮食、饮水和精神状态均无异常。在实验开始之前,大鼠体质量在各剂量染毒组间差异无统计学意义($P=0.930$)。随着染毒时间的增加,发现高剂量组和干预组大鼠体质量增长趋势相对缓慢(图1)。单因素方差分析显示,染毒5周后,各剂量组间大鼠体质量改变呈现明显差异($P=0.000$)。经LSD法进一步两两比较发现,高剂量染毒组大鼠体质量与对照组相比显著下降($P=0.000$)。

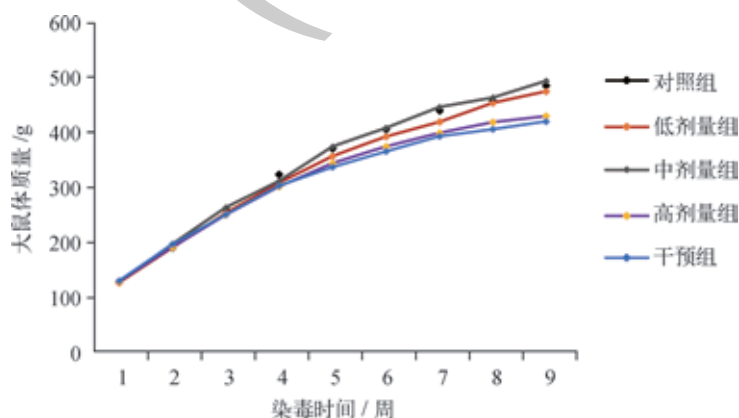


图1 氰戊菊酯染毒对雄性大鼠体质量的影响

Fig 1 Effects of fenvalerate on the body weight in male rats

2.2 大鼠睾丸组织氧化应激指标的检测结果

随着染毒剂量的增加, 睾丸组织中 MDA ($r=0.289$, $P=0.067$) 含量逐渐升高, SOD ($r=-0.495$, $P=0.002$) 和 GSH-Px ($r=-0.802$, $P=0.001$) 活力逐渐降低。与对照组相比, 高剂量组大鼠睾丸组织中 MDA 含量升高

($P=0.009$), SOD 活力下降 ($P=0.001$); 低、中、高剂量组睾丸组织中 GSH-Px 活力均下降 ($P=0.001$)。与高剂量组相比, 干预组睾丸组织中 MDA 含量降低 ($P=0.021$), GSH-Px 活力升高 ($P=0.000$) (表 1)。

表 1 氟戊菊酯染毒对雄性大鼠睾丸组织 MDA 含量、GSH-Px 和 SOD 活力的影响
Tab 1 Effects of fenvalerate on MDA content, GSH-Px and SOD activities in male rat testis

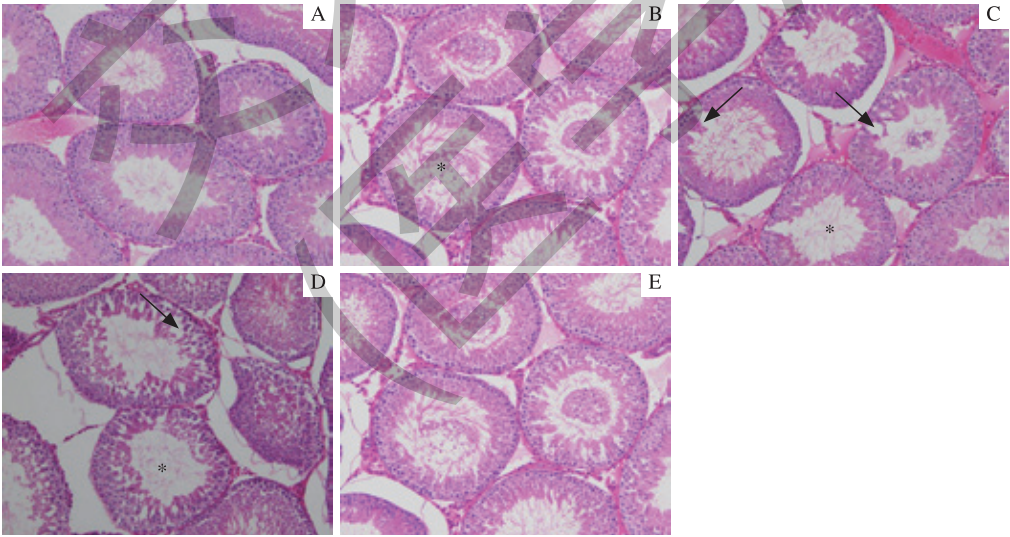
| 组别 | MDA/ (nmol/mg) | GSH-Px/ (U/mg) | SOD/ (U/mg) |
|------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 对照组 | 6.35 ± 1.61 | 166.59 ± 28.24 | 1 188.93 ± 154.80 |
| 低剂量组 | 5.79 ± 1.81 | 124.40 ± 23.61 [ⓐ] | 987.62 ± 330.94 |
| 中剂量组 | 5.97 ± 2.00 | 106.65 ± 20.44 [ⓐ] | 1 108.47 ± 240.02 |
| 高剂量组 | 10.83 ± 7.38 [ⓐ] | 75.79 ± 24.21 [ⓐ] | 834.26 ± 183.83 [ⓐ] |
| 干预组 | 6.88 ± 2.17 [ⓑ] | 187.21 ± 31.79 [ⓐ] | 994.40 ± 117.50 |

注: [ⓐ] $P=0.009$, [ⓑ] $P=0.001$, 与对照组比较; [ⓐ] $P=0.021$, [ⓐ] $P=0.000$, 与高剂量组比较。

2.3 大鼠睾丸组织形态学观察

氟戊菊酯染毒 2 个月后, 大鼠睾丸经 H-E 染色可见 (图 2), 对照组大鼠睾丸组织中曲细精管密集, 管壁清晰完整, 管腔内各级生精细胞数量多且排列规则, 细胞层数 4 ~ 5 层; 低剂量组睾丸组织结构与对照组相似, 曲细精管充实, 管壁整齐, 管腔内各级生精细胞排列较规则、数量较多; 中剂量组睾丸组织中曲细精管密集程度较低, 各

级生精细胞排列较疏松, 可见空泡样改变, 细胞数量相对较少, 细胞层数 3 ~ 4 层; 高剂量组睾丸曲细精管排列稀疏且管腔内出现空泡, 外壁出现褶皱, 各级生精细胞排列紊乱且数量减少, 细胞层数 2 ~ 3 层, 管腔内径明显增大; 与高剂量组相比, 干预组睾丸组织中曲细精管排列较紧密且整齐, 管内各级生精细胞分布较规则, 细胞层数和数量较多。



注: A. 对照组; B. 低剂量组; C. 中剂量组; D. 高剂量组; E. 干预组。H-E 染色, ×20; 箭头所示为空泡样改变, 星号所示为管腔内径增大。

图 2 氟戊菊酯染毒对雄性大鼠睾丸组织结构的影响
Fig 2 Effects of fenvalerate on testicular histology

3 讨论

中国是农药使用大国, 农药残留问题已经引起广泛关注。氟戊菊酯作为一种使用广泛的 II 型 PYRs 农药, 常用

于农业害虫和卫生害虫的防治。饮食和室内环境残留是其 主要暴露途径, 且代谢产物在不同人群中均有检出。Xia 等^[9]研究发现中国某男性人群尿液中 PYRs 农药代谢物 3- 苯氧基苯甲酸 (3-phenoxybenzoic acid, 3-PBA) 检出率高

(100%), 平均浓度为 0.879 $\mu\text{g/g}$ 。氰戊菊酯暴露对雄性生殖系统具有一定的毒性作用, 但其机制尚不十分明确。有学者^[10]提出氧化损伤可能是造成雄性生殖功能下降的一个重要机制。本研究通过检测氰戊菊酯染毒对青春期雄性大鼠睾丸组织氧化应激水平的影响, 为进一步揭示氰戊菊酯的雄性生殖毒性作用机制提供依据。

动物体质量的改变可以作为评价其中毒程度的一个重要指标, 更为直观地反映毒物对动物造成损伤的严重程度。在本研究中, 通过每周检测大鼠体质量, 发现高剂量组和干预组大鼠体质量增长幅度相对较小; 进一步统计分析结果显示, 高剂量组大鼠体质量与对照组相比明显降低 ($P=0.000$)。在整个染毒过程中, 未发现实验动物饮水、饮食及活动量存在明显异常, 提示高剂量的氰戊菊酯暴露可能减缓雄性大鼠体质量增长, 影响其生长发育。

睾丸作为男性最主要的生殖器官, 组织结构完整和功能正常是其发挥作用的前提条件。睾丸的解剖结构主要包括睾丸间质细胞和曲细精管, 其中睾丸间质细胞的主要功能是合成和分泌雄性激素, 曲细精管主要负责精子的生成^[11]。精子数量和质量正常是维持男性生殖功能正常的必要条件。陈庆等^[12]用百草枯对大鼠连续灌胃染毒 8 周, 结果发现在高剂量 (8 mg/kg) 染毒组中, 大鼠精子数量和活性显著下降, 睾丸组织发生退行性改变, 提示睾丸组织损伤可能是精子质量下降的重要原因。在本研究结果中, 氰戊菊酯染毒对大鼠的睾丸组织造成不同程度的破坏; 随着染毒剂量的增加, 曲细精管密集程度逐渐降低, 内径增大, 管内各级生精细胞排列更为疏松且细胞层数和数量都有所减少。这与 Zhang^[13] 和 Zhao^[14] 等研究中氰戊菊酯染毒后睾丸组织形态学改变相似, 表明氰戊菊酯暴露能够对睾丸组织造成一定程度的损伤, 进而可能影响精子发生过程, 降低精子质量。

有研究^[15]表明, 暴露于农药和镉等重金属时, 睾丸组织的结构和功能可产生不同程度的损伤, 这种损伤可能与氧化应激有关。氧化应激是指体内活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 产生过多而抗氧化剂清除能力有限, 导致氧化系统和抗氧化系统失衡, 从而造成组织损伤。有证据^[16]表明, 低水平的 ROS 对维持精子正常

功能 (如获能、顶体反应、精卵结合等) 有重要调控作用; 而过多的 ROS 能够损伤精子膜表面的多聚不饱和脂肪酸, 使膜上的脂质发生过氧化反应, 使精子膜的流动性、完整性、通透性发生改变, 破坏精子膜正常结构, 从而导致精子畸形率增高和活动度降低, 最终影响精子获能和顶体反应。MDA 是自由基对机体损害时生成的脂质过氧化终末代谢产物, 其含量可间接反映睾丸组织自由基的水平和氧化应激的能力, 同时也反映睾丸中生殖细胞的受损程度^[17]。GSH-Px 和 SOD 是机体抗氧化系统中最为重要的抗氧化酶, 在清除体内多余超氧自由基过程中具有核心作用。GSH-Px 是一种重要的含巯基的抗氧化酶, 可以促进还原型谷胱甘肽和过氧化氢反应生成水和氧化型谷胱甘肽, 起到维持细胞膜结构正常和功能完整的作用^[18]。SOD 是一种含有金属辅基的抗氧化歧化酶, 能够把机体内的超氧阴离子转化为过氧化氢, 然后在 GSH-Px 催化作用下, 将过氧化氢还原成水, 从而减缓或阻止活性氧的过氧化反应^[19]。NAC 作为一种常用的抗氧化剂, 可以直接与活性氧发生作用或促进抗氧化酶的合成, 能够在一定程度上拮抗氧化应激作用。在本研究结果中, 氰戊菊酯染毒后大鼠睾丸组织中 MDA 含量增高, SOD 和 GSH-Px 活力降低, 表明氰戊菊酯染毒后睾丸组织氧化应激反应增强, 机体氧化系统和抗氧化系统的平衡遭到破坏。而在加入抗氧化剂的干预组中, 与高剂量组相比, MDA 含量有所下降, GSH-Px 活力恢复正常, 说明 NAC 可以拮抗氰戊菊酯暴露引起的氧化应激作用, 使睾丸组织脂质过氧化过程受到抑制, 抗氧化能力保持正常水平。这进一步验证了氰戊菊酯暴露能够引起睾丸组织氧化损伤, 可能破坏精子发生的微环境, 降低精子质量和数量, 进而影响雄性生殖功能。

本研究结果显示, 氰戊菊酯长期染毒后大鼠体质量下降, 睾丸组织中脂质过氧化产物 MDA 含量增加, 抗氧化酶 GSH-Px 和 SOD 活力下降, 睾丸组织结构遭到不同程度破坏; 而在抗氧化剂保护作用下, 氰戊菊酯所致大鼠睾丸氧化应激水平明显下降。这提示氰戊菊酯能够破坏氧化应激体系的平衡状态, 诱导睾丸组织氧化损伤, 从而产生雄性生殖毒性。但本研究尚有不足, 没有对睾丸组织中生殖细胞凋亡等情况进行检测。我们会将细胞毒性相关研究与后续体外实验相结合, 进行进一步的机制探讨。

参·考·文·献

- [1] 胡春容. 拟除虫菊酯农药的毒性研究进展 [J]. 毒理学杂志, 2005, 19 (3): 239-241.
- [2] 姚克文. 拟除虫菊酯农药的男(雄)性生殖毒性研究进展 [J]. 中华男科学杂志, 2008, 14(3): 268-271.
- [3] 周礼华, 刘春芳, 陈冲, 等. 氯菊酯对雄性小鼠小脑组织氧化应激的影响 [J]. 包头医学院学报, 2014, 30(4): 12-15.
- [4] Casida JE, Quistad GB. Golden age of insecticide research: past, present, or future? [J]. Annu Rev Entomol, 1998, 43: 1-16.
- [5] Saillenfait AM, Ndiaye D, Sabaté JP. Pyrethroids: exposure and health effects-an update [J]. Int J Hyg Environ Health, 2015, 218(3): 281-292.
- [6] Meeker JD, Barr DB, Hauser R. Pyrethroid insecticide metabolites are associated with serum hormone levels in adult men [J]. Reprod Toxicol, 2009, 27(2): 155-160.
- [7] 黄海凤, 周炳, 赵美蓉, 等. 拟除虫菊酯类农药对哺乳动物神经毒理的研究进展 [J]. 农药学报, 2007, 9(3): 209-214.
- [8] Yuan C, Wang C, Gao SQ, et al. Effects of permethrin, cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid on rat sperm motility *in vitro* evaluated with computer-assisted sperm analysis [J]. Toxicol In Vitro, 2010, 24(2): 382-386.
- [9] Xia Y, Han Y, Wu B, et al. The relation between urinary metabolite of pyrethroid insecticides and semen quality in humans [J]. Fertil Steril, 2008, 89(6): 1743-1750.
- [10] 刘冰, 马栋, 毛鹏飞. 氧化应激损伤在男性不育症中的影响 [J]. 中华男科学杂志, 2014, 20(10): 927-931.
- [11] 樊华, 李文. 雄性生殖氧化应激损伤的研究进展 [J]. 中国临床医学, 2016, 23(2): 242-246.
- [12] 陈庆, 赵宗霞, 赵金燕, 等. 百草枯对雄性大鼠精液质量及睾丸组织脂质过氧化的影响 [J]. 环境与职业医学, 2017, 34(4): 337-340.
- [13] Zhang H, Wang H, Wang Q, et al. Pubertal and early adult exposure to fenvalerate disrupts steroidogenesis and spermatogenesis in mice at adulthood [J]. J Appl Toxicol, 2010, 30(4): 369-377.
- [14] Zhao XF, Wang Q, Ji YL, et al. Fenvalerate induces germ cell apoptosis in mouse testes through the Fas/FasL signaling pathway [J]. Arch Toxicol, 2011, 85(9): 1101-1108.
- [15] 李堂林, 翁治委, 周少虎. 生殖系统氧化应激损伤的动物实验方法研究进展 [J]. 医学综述, 2015, 21(6): 991-994.
- [16] 毛鑫, 张丹, 王成芳. 氧化应激性损伤对不育男性精子功能的影响 [J]. 四川大学学报, 2010, 41(4): 723-724.
- [17] 武阳, 常青, 杨旭. 不同浓度甲醛致大鼠肝细胞 DNA 氧化损伤作用 [J]. 环境科学学报, 2009, 9(11): 2415-2419.
- [18] 赵乾龙. 丙烯腈诱导的氧化应激对雄性大鼠睾丸细胞 NF- κ B 信号通路影响的研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2016.
- [19] Wang XZ, Liu SS, Sun Y, et al. β -cypermethrin impairs reproductive function in male mice by inducing oxidative stress [J]. Theriogenology, 2009, 72(5): 599-611.

[收稿日期] 2017-11-08

[本文编辑] 邵碧云

学术快讯

陈竺教授获瑞典 2018 年度舍贝里奖

2018 年 2 月 5 日, 瑞典皇家科学院评选并宣布, 授予中国上海交通大学医学院附属瑞金医院陈竺教授、法国巴黎巴斯德研究院安娜·德让 (Anne Dejean)、法国巴黎法兰西学院格修·德·特 (Hugues de Thé) 2018 年度舍贝里奖, 以表彰 3 位科学家发现白血病的分子机制和急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 的革命性治疗方法。

瑞典皇家科学院表示, 3 位科学家用全反式维甲酸 (all-trans-retinoic acid, ATRA) 和三氧化二砷 (arsenic trioxide, ATO) 对 APL 进行联合靶向治疗, 使得这一疾病的 5 年无病生存率跃升至 90% 以上, 达到基本治愈标准; 同时, 他们还从分子机制上揭示了 ATRA 和砷剂如何诱导白血病细胞的分化和凋亡, 从而达到疾病治疗的目的。

舍贝里奖由瑞典商人班特·舍贝里于 2016 年创立, 用于推动聚焦于癌症、健康和环境的科学研究。

