

Aroclor1254 对雄性大鼠的生殖毒性效应

陈潞萍 邢晖 江岩 赵建文 邹鹏 贾晓宇

作者单位: 110034 辽宁沈阳, 沈阳医学院基础部生物化学与分子生物学教研室

通信作者: 贾晓宇, Email: JiaXY0126@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2021.03.007

【摘要】 目的 探讨 Aroclor1254 对成年雄性大鼠的生殖毒性效应。方法 将 90 d 的成年雄性 SD 大鼠(体质量 250 ~ 300 g)随机分为溶剂对照组和 Aroclor1254 低、中、高剂量(1、3、5 mg/kg)组,每组 8 只。采用腹腔注射法连续给药,制备 SD 大鼠生精障碍模型,溶剂对照组给予等体积玉米油,给药 30 d 后麻醉处死大鼠,记录各组大鼠体质量、睾丸和附睾质量,计算睾丸和附睾器官系数并检测各组大鼠给药后精子数。采用苏木素-伊红(HE)染色观察睾丸组织病理学变化。结果 与溶剂对照组比较, Aroclor1254 低、中、高剂量组大鼠的体质量、睾丸和附睾质量、睾丸和附睾器官系数、精子计数均随剂量升高而降低,以高剂量组降低最多[体质量(g): 278.32 ± 5.60 比 301.05 ± 4.35 , 睾丸质量(g): 1.39 ± 0.08 比 1.66 ± 0.04 , 附睾质量(g): 0.35 ± 0.07 比 0.54 ± 0.05 , 睾丸器官系数: $(5.00 \pm 0.25)\%$ 比 $(5.51 \pm 0.10)\%$, 附睾器官系数: $(1.20 \pm 0.24)\%$ 比 $(1.80 \pm 0.22)\%$, 精子计数($\times 10^6$ 个): 11.50 ± 1.06 比 19.50 ± 2.92 , 均 $P < 0.05$]。Aroclor1254 处理组大鼠生精小管结构破坏、排列紊乱、两生精小管间质细胞减少,且随剂量升高症状加重。结论 Aroclor1254 暴露可能通过破坏血睾屏障的完整性损伤大鼠生殖功能。

【关键词】 Aroclor1254; 血睾屏障; 生精障碍; 生殖毒性

Reproductive toxicity of Aroclor1254 in male rats

Chen Luping, Xing Hui, Gang Yan, Zhao Jianwen, Zou Peng, Jia Xiaoyu. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, Liaoning, China

Corresponding author: Jia Xiaoyu, Email: JiaXY0126@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the reproductive toxicity of Aroclor1254 in adult male rats. **Methods** The 90-day adult male SD rats (weighing 250–300 g) were randomly divided into solvent control group, Aroclor1254 low-, mid- and high-dose (1, 3, 5 mg/kg) groups, with 8 rats in each group. SD rat model with spermatogenic disorder was prepared by intraperitoneal injection. The solvent control group was given corn oil. The rats were anesthetized and sacrificed 30 days after administration. The body mass, testicular and epididymal mass of rats in each group were recorded, the testicular and epididymal organ indexes were calculated, and the sperm count of rats in each group was detected. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histopathological changes of testis. **Results** Compared with the solvent control group, the body mass, testicular and epididymal mass, testicular and epididymal organ indexes and rat sperm count of Aroclor1254 low-dose, mid-dose and high-dose groups decreased with the increase of dose, and the decrease was the most significant in high-dose group [body mass (g): 278.32 ± 5.60 vs. 301.05 ± 4.35 , testicular mass (g): 1.39 ± 0.08 vs. 1.66 ± 0.04 , epididymal mass (g): 0.35 ± 0.07 vs. 0.54 ± 0.05 , testicular organ index: $(5.00 \pm 0.25)\%$ vs. $(5.51 \pm 0.10)\%$, epididymal organ index: $(1.20 \pm 0.24)\%$ vs. $(1.80 \pm 0.22)\%$, sperm count of rats ($\times 10^6$): 11.50 ± 1.06 vs. 19.50 ± 2.92 , all $P < 0.05$]. **Conclusion** Exposure to Aroclor1254 may damage rat reproductive function by destroying the integrity of the blood testis barrier.

【Key words】 Aroclor1254; Blood testicular barrier; Spermatogenesis disturbance; Reproductive toxicity

多氯联苯是一类被广泛应用于生活及工业生产的雌激素环类环境污染物,能通过皮肤、呼吸道等多种途径进入人或动物体内^[1],对免疫系统^[2]、内分泌系统^[3]、神经系统^[4]、生殖系统^[5]等造成危害。本研究选择对动物具有生殖毒性的典型多氯联苯类化合物 Aroclor1254 为研究对象,探讨不同剂量 Aroclor1254 对大鼠的生殖毒性效应,为 Aroclor1254

的生殖毒理研究提供依据,现报告如下。

1 实验动物和材料

1.1 实验动物 40 只健康 SPF 级成年雄性 SD 大鼠(体质量 250 ~ 300 g,日龄 90 d)购自沈阳医学院实验动物中心[动物许可证号 SCXK(辽)2020-0001,实验单位使用许可证号 SYXK(辽)2019-0005]。购回后适应性饲养 7 d,大鼠自由摄食和饮水,昼夜交

替周期为 12 h/12 h, 控制环境温度为 20~25 ℃。本研究符合动物福利与伦理学标准, 并经本校实验动物伦理委员会审批(审批号: SYYXY2021022101)。

1.2 试剂 Aroclor1254 购自美国 Supleco 公司, 包埋剂 OCT 购自日本 SAKURA 公司, 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒购自上海碧云天生物技术公司。

2 实验方法

2.1 动物分组及给药 将大鼠随机分为溶剂对照组、Aroclor1254 低、中、高剂量(1、3、5 mg/kg)组, 每组 8 只。将 Aroclor1254 溶于 1 mL 玉米油, 采用腹腔注射给药方式, Aroclor1254 处理组大鼠连续给药 30 d, 溶剂对照组给予等体积玉米油。

2.2 检测指标及方法

2.2.1 体质量、睾丸和附睾质量 给药 30 d 后麻醉处死所有大鼠, 记录大鼠体质量, 提取睾丸和附睾组织, 使用分析天平分别称质量。

2.2.2 睾丸及附睾器官系数 根据测定的大鼠体质量、睾丸和附睾质量计算睾丸及附睾器官系数, 器官系数=(器官湿质量/体质量)×100%。

2.2.3 精子计数 剥离大鼠双侧附睾 4 mm×4 mm 组织, 置于 2 mL 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)内摇床孵育 30 min, 70 μL 滤膜过滤, 加入 1 mL PBS 冲洗, 混匀备用。取上述精液 10 μL 滴至细胞计数板, 再滴 10 μL 伊红溶液, 加盖玻片于显微镜下观察计数, 每份样品计数 3 次, 取平均值。

2.2.4 睾丸组织病理学观察 剥离睾丸组织并迅速放入提前准备好的液氮中冷冻 3 min, 用冰盒迅速转移至 -80 ℃冰箱保存备用。打开冰冻切片机, 预先制冷 -20 ℃, 取出冷冻的睾丸组织行 OCT 包埋, 固定于样品装载区, 设置切片机切片厚度为 10 μm, 切片, 并将组织吸附于专用的组织切片载玻片上。行 HE 染色, 并在显微镜下观察。

2.3 统计学分析 所有实验均重复 3~4 次, 使用不同批次的 SD 大鼠。采用 SPSS 16.0 统计学软件处理数据, 符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 进行单因素方差分析、*t* 检验或 Dunnett's 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Aroclor1254 对大鼠体质量、睾丸和附睾质量的影响 与溶剂对照组比较, 给药后 Aroclor1254 低剂量组大鼠体质量、睾丸和附睾质量均无显著变化(均 *P*>0.05)。Aroclor1254 中、高剂量组大鼠体质量、

睾丸和附睾质量均较溶剂对照组明显降低(均 *P*<0.05)。见表 1。

表 1 Aroclor1254 各剂量组和溶剂对照组大鼠给药后体质量、睾丸和附睾质量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	体质量(g)	睾丸质量(g)	附睾质量(g)
溶剂对照组	8	301.05±4.35	1.66±0.04	0.54±0.05
Aroclor1254 低剂量组	8	296.78±3.32	1.62±0.03	0.49±0.22
Aroclor1254 中剂量组	8	286.48±3.99 ^{ab}	1.57±0.04 ^a	0.46±0.01 ^a
Aroclor1254 高剂量组	8	278.32±5.60 ^{abc}	1.39±0.08 ^{abc}	0.35±0.07 ^{abc}

注: 溶剂对照组给予玉米油, Aroclor1254 低、中、高剂量分别为 1、3、5 mg/kg; 与溶剂对照组比较, ^a*P*<0.05; 与 Aroclor1254 低剂量组比较, ^b*P*<0.05; 与 Aroclor1254 中剂量组比较, ^c*P*<0.05

3.2 Aroclor1254 对大鼠睾丸和附睾器官系数的影响 与溶剂对照组比较, 给药后 Aroclor1254 低剂量组睾丸和附睾器官系数均无显著变化(均 *P*>0.05), Aroclor1254 高剂量组睾丸和附睾器官系数均明显低于另外 3 组(均 *P*<0.05), 说明 Aroclor1254 对大鼠生殖系统造成损伤。见表 2。

表 2 Aroclor1254 各剂量组和溶剂对照组大鼠给药后睾丸和附睾器官系数以及精子计数比较($\bar{x}\pm s$)

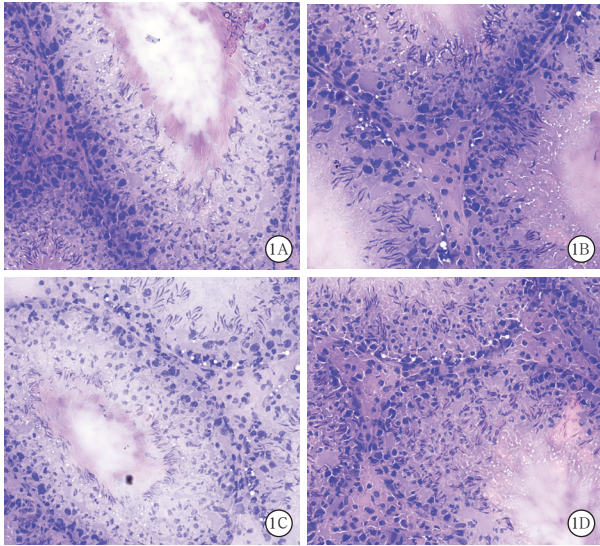
组别	动物数(只)	睾丸器官系数(%)	附睾器官系数(%)	精子计数(×10 ⁶ 个)
溶剂对照组	8	5.51±0.10	1.80±0.22	19.50±2.92
Aroclor1254 低剂量组	8	5.40±0.13	1.60±0.10	18.12±1.35
Aroclor1254 中剂量组	8	5.50±0.18	1.60±0.19 ^a	14.62±0.74 ^{ab}
Aroclor1254 高剂量组	8	5.00±0.25 ^{abc}	1.20±0.24 ^{abc}	11.50±1.06 ^{abc}

注: 溶剂对照组给予玉米油, Aroclor1254 低、中、高剂量分别为 1、3、5 mg/kg; 与溶剂对照组比较, ^a*P*<0.05; 与 Aroclor1254 低剂量组比较, ^b*P*<0.05; 与 Aroclor1254 中剂量组比较, ^c*P*<0.05

3.3 Aroclor1254 对大鼠精子计数的影响 与溶剂对照组比较, 给药后 Aroclor1254 低剂量组大鼠精子计数无显著变化(*P*>0.05); Aroclor1254 中、高剂量组较溶剂对照组和 Aroclor1254 低剂量组精子计数均明显降低, 且 Aroclor1254 高剂量组较中剂量组明显降低(均 *P*<0.05), 可见大鼠接受 Aroclor1254 染毒剂量越大, 精子计数越低。见表 2。

3.4 Aroclor1254 对大鼠睾丸组织病理学的影响 Aroclor1254 处理后, 大鼠睾丸组织出现不同程度损伤。溶剂对照组大鼠睾丸生精小管结构完整, 管腔充满各级生精细胞, 且生精细胞发育正常。见图 1A。Aroclor1254 低剂量组较溶剂对照组无明显改变。见

图 1B)。Aroclor1254 中、高剂量组大鼠睾丸生精小管结构破坏,形态不完整,各级生精细胞排列紊乱。见图 1C、1D。且上述症状随着 Aroclor1254 剂量增大而加重,表明 Aroclor1254 能破坏大鼠睾丸组织。



注: 1A 为溶剂对照组,可见相邻生精小管连接紧密,管腔完整; 1B 为 Aroclor1254 低剂量组,可见生精小管结构完整,管腔内各级生精细胞分布均匀; 1C 为 Aroclor1254 中剂量组,可见相邻生精小管间连接细胞减少; 1D 为 Aroclor1254 高剂量组,可见生精小管管壁不完整,管腔生精细胞减少

图 1 Aroclor1254 各剂量组和溶剂对照组大鼠给药后睾丸组织病理学变化(苏木素-伊红染色 低倍放大)

4 讨论

迄今为止,有文献报道我国育龄期男性不孕不育者占 30%~40%^[6],已引起医疗界高度重视。现已知多种环境毒物可对生殖系统造成损伤^[7],但是有关多氯联苯混合物 Aroclor1254 对雄性动物生殖系统影响的研究还鲜有报道。本研究选用成年雄性 SD 大鼠作为实验动物,根据预实验选用最佳给药剂量对大鼠进行染毒处理。体质量是衡量机体是否处于健康状态的指标之一,可以灵敏地反映机体各系统功能是否正常^[8],从而证实动物是否染毒成功。本研究采用不同剂量(分别为 1、3、5 mg/kg) Aroclor1254 对大鼠进行染毒处理。在染毒结束后分析大鼠体质量、睾丸和附睾质量以及睾丸和附睾器官系数,结果显示 Aroclor1254 各剂量组上述指标均有所下降,尤以高剂量组下降明显,表明染毒成功,这一结果与其他报道一致^[9]。由此初步验证了 Aroclor1254 可能对大鼠生殖系统造成损伤的猜想。

本研究计数并分析了染毒后大鼠的精子数量,发现 Aroclor1254 各剂量组大鼠精子计数均减少,且呈现剂量-效应关系,高剂量组减少最明显。精子

发生这一生理过程的主要场所是睾丸生精小管。生精小管是哺乳动物睾丸的基本功能单位^[10],也是生殖毒物作用的主要靶点^[11],因此本研究对大鼠睾丸组织进行 HE 染色,观察其病理组织学变化。结果显示当 Aroclor1254 给药剂量达到 3 mg/kg 后,随着给药剂量的增加,该药物对睾丸生精小管的破坏程度加重,生精小管内各级生精细胞排列紊乱且溶解,该病理学结果对我们的猜想进行了又一补充。

综上所述,本研究证实了 Aroclor1254 对大鼠具有生殖毒性,且 Aroclor1254 在 3 mg/kg 的剂量暴露下就能对大鼠产生生殖毒性效应。后续可借鉴生物信息学方法对其致病机制进行研究^[12]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- BURNS J S, WILLIAMS P L, SERGEYEV O, et al. Predictors of serum dioxins and PCBs among peripubertal Russian boys [J]. Environ Health Perspect, 2009, 117 (10): 1593-1599. DOI: 10.1289/ehp.0800223.
- PILLAI M R, KEYLOCK K T, CROMWELL H C, et al. Exercise influences the impact of polychlorinated biphenyl exposure on immune function [J]. PLoS One, 2020, 15 (8): e0237705. DOI: 10.1371/journal.pone.0237705.
- ALARCÓN S, ESTEBAN J, ROOS R, et al. Endocrine, metabolic and apical effects of in utero and lactational exposure to non-dioxin-like 2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl (PCB 180): a postnatal follow-up study in rats [J]. Reprod Toxicol, 2021, 102: 109-127. DOI: 10.1016/j.reprotox.2021.04.004.
- 董菊子, 赵红斌, 马慧, 等. 多氯联苯对雄性大鼠海马神经元棘密度及 bcl-2 表达的影响 [J]. 环境与健康杂志, 2010, 27 (2): 151-152, 封 3. DOI: 10.1360/972010-1292.
- CHENG Z Y, ZHANG X C, BASSIG B, et al. Dataset of testicular germ cell tumors (TGCT) risk associated with serum polychlorinated biphenyl (PCB) by age at diagnosis and histologic types [J]. Data Brief, 2021, 36: 107014. DOI: 10.1016/j.dib.2021.107014.
- 李维娟, 朱娜. 直接上法与梯度离心结合上法法优选精子的比较研究 [J]. 实用检验医师杂志, 2017, 9 (3): 186-188. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2017.03.018.
- CHENG C Y, MRUK D D. The blood-testis barrier and its implications for male contraception [J]. Pharmacol Rev, 2012, 64 (1): 16-64. DOI: 10.1124/pr.110.002790.
- WATANABE M, RISI R, MASI D, et al. Current evidence to propose different food supplements for weight loss: a comprehensive review [J]. Nutrients, 2020, 12 (9): 2873. DOI: 10.3390/nu12092873.
- VAN ESTERIK J C, VERHAREN H W, HODEMAEKERS H M, et al. Compound- and sex-specific effects on programming of energy and immune homeostasis in adult C57BL/6JxFVB mice after perinatal TCDD and PCB 153 [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2015, 289 (2): 262-275. DOI: 10.1016/j.taap.2015.09.017.
- STAUB C, JOHNSON L. Review: spermatogenesis in the bull [J]. Animal, 2018, 12 (s1): s27-s35. DOI: 10.1017/S1751731118000435.
- MAO B P, LI L X, YAN M, et al. Environmental toxicants and cell polarity in the testis [J]. Reprod Toxicol, 2018, 81: 253-258. DOI: 10.1016/j.reprotox.2018.08.015.
- 莫均荣, 张振辉, 陈美婷, 等. 基于 GEO 芯片和生物信息学分析构建肝癌相关 ceRNA 网络 [J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (4): 427-432. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210205-00211.

(收稿日期: 2021-07-16)

(本文编辑: 邵文)