

孕期乙酸铅暴露对子代睾丸组织能量代谢酶的影响研究

周金鹏, 张方方, 吴子俊

(作者单位均为深圳市职业病防治院, 深圳, 518001)

摘要: **目的** 评价孕期乙酸铅暴露对性成熟雄性子代小鼠睾丸组织能量代谢酶活力的影响, 并探讨其对生殖系统损伤的作用机制。 **方法** 将清洁级健康昆明种孕小鼠32只按体重随机分为高剂量组(2000 mg/kg)、中剂量组(1000 mg/kg)、低剂量组(500 mg/kg)和对照组(蒸馏水), 每组8只。于妊娠第14天开始, 每日灌胃染毒, 灌胃剂量为10 ml/kg, 持续至母鼠自然分娩。记录孕鼠染毒期间体重增量和分娩时间。待雄性仔鼠8周龄(性成熟)时, 称重并处死, 分离双侧睾丸和附睾, 测定睾丸、附睾的重量及脏器系数、附睾精子数。检测睾丸组织中的碱性磷酸酶(AKP)、乳酸脱氢酶(LDH)、琥珀酸脱氢酶(SDH)、Ca-Mg-ATP酶、Na-K-ATP酶、总ATP酶活力。 **结果** 各组孕鼠分娩时间和体重增量间比较, 差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。中、高剂量组仔鼠体重、睾丸重量、睾丸脏器系数、附睾重量、附睾脏器系数均明显低于对照组($P<0.05$); 各染毒组仔鼠附睾精子数、睾丸组织SDH酶、Na-K-ATP酶、Ca-Mg-ATP酶、总ATP酶活力均明显低于对照组(均 $P<0.01$); 高剂量组仔鼠睾丸组织LDH酶、AKP酶活力均明显低于对照组($P<0.01$); 且随着乙酸铅染毒剂量的增高, 睾丸组织SDH酶、Na-K-ATP酶、Ca-Mg-ATP酶以及总ATP酶活力均呈下降趋势。 **结论** 在本研究的染毒时间和剂量范围内, 孕期乙酸铅暴露可干扰雄性子代小鼠睾丸的能量代谢, 继而使得精子生成减少。

关键词: 孕期; 乙酸铅; 睾丸; 能量代谢; 酶

铅(Pb)是一种常见的重金属, 也是地壳的组分, 遍布于土壤、水体与空气中, 被广泛应用于蓄电池、文具、射线防护材料等产品的制造。铅及其化合物产生的雄性生殖毒性正在逐步被揭示^[1]。铅暴露可导致雄性动物精液量减少、畸形率升高、精子活动力下降^[2]。低浓度铅接触可以影响精子质量及精子染色体的凝聚^[3]。铅可导致精子生成铅暴露可以改变睾丸及附睾组织中神经生长因子(NGF)的基因表达^[4]。已有研究表明, 乙酸铅与雄性小鼠睾丸生精上皮的损伤程度及附睾管内的精子数量呈明显的剂量-反应关系, 提示乙酸铅可抑制雄性小鼠的生育能力^[5]。然而, 关于乙酸铅对雄性子代小鼠生殖系统损害的研究较少。为此, 本研究主要评价了孕期乙酸铅暴露对性成熟雄性子代小鼠的性器官脏器系数、精子数及睾丸组织能量代谢酶活力的影响, 并初步探讨其产生雄性生殖毒性作用的机制, 为进一步研究乙酸铅对男性的生殖健康损害提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

2-16P高速冷冻离心机（德国Sigma），UV2000型紫外可见分光光度计（日本Unico），WT6002型电子天平（杭州万特衡器有限公司），F8型超细匀浆器（德国Fluko），酶标仪（英国Labstems Multiska Ascent公司），Eclipse E600 型光学显微镜（日本Nikon公司）。

乙酸铅（化学纯，天津化学试剂有限公司），考马斯亮兰蛋白测定试剂盒、超微量ATP酶测试盒、碱性磷酸酶（AKP）、乳酸脱氢酶（LDH）、琥珀酸脱氢酶（SDH）酶、Ca-Mg-ATP酶、Na-K-ATP酶检测试剂盒（购于南京建成生物制品公司）。

1.2 实验动物及饲养环境

选用清洁级健康昆明种孕小鼠（由山东大学实验动物中心代为授孕）32只，体重为45.2~60.8 g。实验动物生产许可证号SCXK（鲁）2013-0001，实验动物使用许可证号为SYXK（鲁）2013-0007。动物饲养温度为（23±2）℃，相对湿度（50±10）%，自然光照，普通饲料分笼喂养。

1.3 动物分组与染毒方法 将实验动物按体重随机分为高剂量染毒组（2000 mg/kg）、中剂量染毒组（1000 mg/kg）、低剂量染毒组（500 mg/kg）和对照组（蒸馏水），每组8只。于妊娠第14天开始，在无菌条件下，采用灌胃方式，每日染毒，灌胃量为10 ml/kg，持续至母鼠自然分娩。仔鼠母乳喂养至3周龄，雌、雄分笼后继续饲养，于8周龄时处死。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 孕鼠染毒期间体重增量和分娩时间

观察并记录孕鼠染毒期间体重增量（分娩时体重与首次染毒时体重之差）和分娩时间（以日计）。

1.4.2 睾丸、附睾脏器系数

待仔鼠8周龄（性成熟）时，从每组雄性仔鼠中按体重随机抽取20只，以颈椎脱臼方式处死，分离双侧睾丸、附睾，称重，并计算睾丸、附睾的脏器系数。

$$\text{睾丸脏器系数} = \frac{\text{睾丸重量}(\text{g})}{\text{大鼠体重}(\text{g})} \times 100\%$$

$$\text{附睾脏器系数} = \frac{\text{附睾重量}(\text{g})}{\text{大鼠体重}(\text{g})} \times 100\%$$

1.4.3 附睾精子计数

取一侧附睾，剪下附睾尾，在1 ml 生理盐水中剪碎，加4 ml 生理盐水，吸管吹打30次制成精子悬液，用100目的网格过滤，于400倍光学显微镜下按红细胞计数法计算精子数，并计算每克附睾所含精子数。

1.4.4 睾丸酶活力检测

取适量睾丸组织标本，以 1:9（m：V）的比例加入冰生理盐水，用玻璃匀浆器在冰水浴条件下研磨 3 min 制成 10%的睾丸匀浆，然后在低温（4℃）离心机中以 2 000 r/min（离心半径为 7.6 cm）离心 10 min，静置片刻，取上清液，检测 AKP 酶、LDH 酶、SDH 酶、Na-K-ATP 酶、Ca-Mg-ATP 酶以及总 ATP 酶的活力。同时，用考马斯亮兰法检测匀浆蛋白的含量。具体操作步骤按相应试剂盒检测说明进行。

1.5 统计学分析

本研究实验数据均为计量资料。采用 SPSS19.0 统计软件分析，服从正态分布的资料多组间比较在方差齐性检验后采用单因素方差分析；不服从正态分布的资料采用秩和检验。进一步进行组间两两比较时，若方差齐，选择 SNK 检验；若方差不齐，选择 Games-Howell 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乙酸铅孕期染毒对孕鼠分娩时间及染毒期间体重增量的影响

乙酸铅孕期染毒对孕鼠分娩时间及染毒期间体重增量的影响见表 1。各剂量组孕鼠分娩时间经秩和检验，其差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。随着染毒剂量的增大，各组孕鼠染毒期间的体重增量经单因素方差分析检验，其差异也无统计学意义（ $P>0.05$ ）。

表 1 乙酸铅孕期染毒对孕鼠分娩时间及染毒期间体重增量的影响 (n=8)

组别	分娩时间 (d)			体重增量($\bar{x}\pm s$, g)
	M	P_{25}	P_{75}	
对照组	20.00	19.50	21.50	15.52±5.27
低剂量组	19.00	18.25	20.50	14.97±5.78
中剂量组	20.00	18.75	20.75	14.36±6.53
高剂量组	19.50	19.25	20.00	14.07±6.36

2.2 乙酸铅孕期染毒对雄性仔鼠性成熟后体重、性器官、精子数的影响

表2可见，中、高剂量组仔鼠体重、睾丸重量、睾丸脏器系数、附睾重量、附睾脏器系数均明显低于对照组（ $P<0.05$ ）；各染毒组仔鼠附睾精子数均明显低于对照组（ $P<0.01$ ）；且随着染毒剂量的增高，各组精子数有减少的趋势。

表 2 乙酸铅孕期染毒对雄性仔鼠性成熟后体重、性器官、精子数的影响 (n=20, $\bar{x}\pm s$)

组别	体重(g)	睾丸重量(g)	脏器系数(%)	附睾重量(g)	脏器系数(%)	精子计数($10^7/g$)
对照组	40.58±3.77	0.293±0.057	0.722±0.083	0.125±0.016	0.311±0.034	7.48±0.56
低剂量组	39.23±4.95	0.276±0.048	0.703±0.921	0.119±0.023	0.304±0.051	5.61±0.72**
中剂量组	35.18±3.71*	0.207±0.043*	0.587±0.074*	0.086±0.019*	0.243±0.042*	5.32±0.54**
高剂量组	35.03±4.12*	0.204±0.037*	0.582±0.081*	0.087±0.021*	0.246±0.025*	4.34±0.65**

注：对照组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

2.3 乙酸铅孕期染毒对雄性仔鼠性成熟后睾丸酶活力的影响

2.3.1 乙酸铅孕期染毒对雄性仔鼠性成熟后睾丸 AKP 酶、LDH 酶、SDH 酶活力的影响

表 3 可见，高剂量组仔鼠睾丸组织 LDH 酶、AKP 酶活力均明显低于对照组（均 $P<0.01$ ）；各染毒组仔鼠睾丸组织 SDH 酶均明显低于对照组（均 $P<0.01$ ）；随着染毒剂量的升高，染毒组小鼠睾丸 SDH 酶活力呈现明显下降趋势。

表 3 乙酸铅孕期染毒对雄性仔鼠性成熟后睾丸 AKP 酶、LDH 酶、SDH 酶活力的影响($n=20$, $\bar{x} \pm s$)

组别	AKP 酶(U/g Pro)	LDH 酶(U/g Pro)	SDH 酶(U/mg Pro)
对照组	67.92±5.65	1877.96±382.44	18.25±4.58
低剂量组	68.55±6.13	1953.14±360.29	13.28±3.17**
中剂量组	62.78±7.24	1735.36±420.87	12.90±3.68**
高剂量组	43.20±6.78**	1373.54±433.83**	10.44±2.74**

注：对照组相比，** $P<0.01$ 。

2.3.2 乙酸铅孕期染毒对雄性仔鼠性成熟后睾丸 Ca-Mg-ATP 酶、Na-K-ATP 酶、总 ATP 酶活力的影响

表 4 可见，各染毒组仔鼠睾丸组织 Na-K-ATP 酶、Ca-Mg-ATP 酶、总 ATP 酶活力均明显低于对照组（均 $P<0.01$ ）；且随着乙酸铅染毒剂量的增高，Na-K-ATP 酶、Ca-Mg-ATP 酶以及总 ATP 酶活力均呈下降趋势。

表 4 乙酸铅孕期染毒对雄性仔鼠性成熟后睾丸 Ca-Mg-ATP 酶、Na-K-ATP 酶、总 ATP 酶活力的影响
[$n=20$, $\bar{x} \pm s$]

组别	Ca-Mg-ATP 酶	Na-K-ATP 酶	总 ATP 酶
	[$\mu\text{mol Pi}/(\text{mg Pro} \cdot \text{h})$]	[$\mu\text{mol Pi}/(\text{mg Pro} \cdot \text{h})$]	[$\mu\text{mol Pi}/(\text{mg Pro} \cdot \text{h})$]
对照组	9.76±1.21	9.98±1.65	27.92±3.15
低剂量组	5.07±0.90**	5.36±0.95**	15.39±2.54**
中剂量组	3.61±0.73**	4.59±0.43**	14.43±4.45**
高剂量组	1.24±0.67**	2.68±0.32**	10.26±3.37**

注：对照组相比，** $P<0.01$ 。

3 讨论

睾丸内的 SDH 酶主要分布在精曲小管的支持细胞和生精细胞的线粒体内膜，是有氧代谢三羧酸循环的限速酶，影响精子能量代谢，它的活力大小可用以判断线粒体功能的变化^[6]。LDH 主要位于睾丸曲细精管胞浆线粒体内，是生精细胞糖酵解的关键酶，其活力与生

精过程及精子活动、获取能量及受精有关^[7]。本研究发现,各染毒组仔鼠睾丸组织SDH酶活力均明显低于对照组(均 $P<0.01$);随着染毒剂量的升高,染毒组仔鼠睾丸SDH酶活力呈现明显下降趋势;高剂量组仔鼠睾丸组织LDH酶活力明显低于对照组($P<0.01$)。提示乙酸铅孕期染毒可导致雄性仔鼠睾丸生精细胞能量生成障碍,影响了精子的发育和成熟,甚至导致精子活力减低和个体生育力下降。

AKP酶的主要存在于精原细胞、胚胎期初级精母细胞及各级生精细胞与支持细胞的交界面上,与睾丸生精细胞的分裂活动及葡萄糖等营养物质向各级生精细胞的转运有关^[8]。本研究发现,高剂量组仔鼠睾丸AKP酶活力明显低于对照组($P<0.01$),提示乙酸铅可能通过影响AKP酶的活力影响营养物质向各级生精细胞的运输,从而对其造成损伤,导致生精障碍。

ATP酶是精子通过有氧代谢获取能量的关键酶,ATP的分解可为精子纤维收缩提供能量,在生精细胞、支持细胞及间质细胞(Leydig细胞)的细胞质膜和线粒体内膜上均有分布。Na-K-ATP酶又称为钠泵,是一种存在于细胞膜上的跨膜蛋白,可调节细胞内 Na^+ 、 K^+ 离子浓度,维持细胞内的渗透压和正常膜电位,也可以通过与不同蛋白的交联作用发挥细胞信号传导功能。Ca-Mg-ATP酶又称为钙泵,可迅速将细胞外信号传入细胞内,同时在一定信号作用下将 Ca^{2+} 从细胞内释放到细胞质,对调节细胞肌肉收缩、运动、生长、分化等许多生理功能的都起到重要作用^[9-10]。本研究结果显示,随着乙酸铅染毒剂量的升高,各染毒组仔鼠睾丸总ATP酶、Na-K-ATP酶和Ca-Mg-ATP酶活力均呈现明显下降趋势,可能会影响睾丸组织内多种细胞的能量代谢,抑制了精子的发生、成熟和活动力。同时,细胞内 Na^+ 、 Ca^{2+} 的浓度调节失常,可能会造成细胞水肿而导致凋亡。

性器官重量和脏器系数是较好反映化学毒物对该器官综合毒性作用的有效指标,也是判断毒物作用靶器官的重要线索,其变化多为毒物造成的器质性损伤所致^[11]。本研究结果发现,中、高剂量组仔鼠睾丸重量、睾丸脏器系数、附睾重量、附睾脏器系数均明显低于对照组,说明乙酸铅染毒除了通过影响多种酶的活力而干扰睾丸组织的能量代谢,亦可影响其发育,或可导致不可逆的器质性损伤。

胎盘血流丰富,胎盘绒毛组织与子宫血窦间形成天然的胎盘屏障。研究表明^[12],铅对胎盘的强亲和力可导致其通过胎盘屏障对仔鼠产生毒性作用,铅对胎盘滋养细胞的损伤可阻碍胎盘的血液供应及母代与子代间营养物质及 O_2 的交换,使得仔鼠重量减轻。本研究发现,中、高剂量组仔鼠体重低于对照组,印证了前人的研究结果。

综上所述,在本研究的染毒时间和剂量范围内,孕期乙酸铅暴露可干扰雄性子代小鼠

睾丸的能量代谢, 导致其性成熟后睾丸能量的产生和利用发生障碍, 继而使得精子生成减少, 表明能量代谢障碍可能是乙酸铅造成雄性生殖系统损伤的机制之一。

参考文献

- [1] 汪美贞, 贾秀英. 铅对雄性生殖毒性的研究进展[J]. 动物学杂志, 2006, 41(1): 123-127.
- [2] 韦佩珠. 铅的生殖毒性研究进展[J]. 广西预防医学, 2001, 7: 127-129.
- [3] Hernandez-Ochoa I, Garcia-Vargas G, Lopez-Carrillo L, et al. Low lead environmental exposure alters semen quality and sperm chromatin condensation in northern Mexico [J]. Reprod Toxicol, 2005, 20(2):221-228.
- [4] 丁斐, 顾晓松, 王晓冬, 等. 实验性铅中毒对睾丸神经生长因子基因表达的影响[J]. 解剖学报, 2000, 31(4): 313-317.
- [5] 李建秀, 王晓梅, 高丽珍, 等. 乙酸铅染毒雄性小鼠生殖器官的形态改变 (J). 邯郸医学高等专科学校学报, 2002, 15(2): 109-110.
- [6] 范轶欧, 金一和, 麻懿馨, 等. 全氟辛烷磺酸对雄性大鼠生精功能的影响[J]. 卫生研究, 2005, 34(1): 37-39.
- [7] 陈永益, 许晓路, 申秀英, 等. 钆染毒对小鼠脏器系数和睾丸酶活性的影响[J]. 中国环境科学, 2005, 25(3): 279-282.
- [8] 周金鹏, 李杰, 林大枫, 等. 二苯基甲烷二异氰酸酯对雄性小鼠的生殖毒性及其机制研究[J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(2): 120-123.
- [9] Vivenes CY, Peralta-Arias RD, Camejo MI, et al. Biochemical identification of dynein-ATPase activity in human sperm[J]. Z Naturforsch C, 2009, 64(9-10):747-753.
- [10] 洪燕, 陈锋, 王晓梅, 等. 双酚 A 对小鼠心脏损伤及其机制初步探讨[J]. 实用预防医学, 2013, 20(3): 273-276.
- [11] 邹丽君, 张娟, 高艳芳, 等. 低剂量苯 45d 染毒致小鼠的生殖毒性[J]. 实用预防医学, 2013, 20(8): 918-920.
- [12] 王娟, 尹洁, 孟焕平, 等. 硒对铅暴露孕鼠胎盘损伤拮抗作用. 中国公共卫生, 2007, 23(10): 1229-1231.