· 实验研究 ·

妊娠期正己烷暴露对雄性仔代大鼠生殖发育影响*

李宏[1]，潘雪丰[1]，卢晓丽[2]，肖世华[2]，张文昌[2]

摘　要：目的　探讨妊娠期正己烷暴露对雄性仔代大鼠生殖发育的影响。**方法**　24 只 Wistar 孕鼠随机分为 4 组，于孕期第 1 ~ 20 d 静式吸入 0（对照组）、360、1 800、9 000 mg/m^3 正己烷；雄性仔鼠从出生后第 9 d（PND9）开始称重，PND69 处死，计算睾丸及附睾脏器系数；组织切片观察睾丸病理学改变；计算精子活率、活力、密度及畸形率；测定血清睾酮水平和睾丸丙二醛含量。**结果**　正己烷 9 000 mg/m^3 组雄性仔鼠体重增长明显低于对照组，睾丸脏器系数[（1.05 ± 0.07）mg/g]低于对照组[（1.12 ± 0.05）mg/g]（$P < 0.05$），精子活率和活力低于对照组；雄性仔鼠血清睾酮含量[（1.22 ± 0.45）ng/mL]低于对照组[（2.53 ± 0.99）ng/mL]（$P < 0.05$）；正己烷 9 000 mg/m^3 组雄性仔鼠睾丸组织出现曲精小管排列疏松、精原细胞萎缩、曲精小管管壁变薄等病理改变；各组雄性仔鼠睾丸丙二醛含量无明显差异。**结论**　妊娠期高剂量正己烷暴露可通过非脂质过氧化途径介导明显抑制雄性仔代生殖发育。

关键词：正己烷；妊娠期暴露；雄性生殖毒性；仔代大鼠

中图分类号：R 994.6　**文献标志码：**A　**文章编号：**1001-0580(2015)07-0886-04　DOI：10.11847/zgggws2015-31-07-08

Reproductive toxicity of n-hexane gestational exposure in male offspring rats

LI Hong*, PAN Xue-feng, LU Xiao-li, et al (*Department of Pharmacy, Fujian Health Professional Institute, Fuzhou, Fujian Province 350101, China)

Abstract: Objective　To study reproductive toxicity of n-hexane gestational exposure in F1 Wista male rats. **Methods**　Twenty-four pregnant Wistar rats were exposed to n-hexane at the concentrations of 0, 360, 1 800, and 9 000 mg/m^3 via respiration for 4 hours a day from 1 to 20 gestation day. The male offspring (F1) rats were weighted every 3 days from postnatal day (PND) 9 and sacrificed at PND 69. Testis and epididymis organ coefficient, sperm survival ratio, sperm motility, sperm abnormality rate, and sperm density of the male F1 rats were observed. The testis tissues of the F1 male were consecutively sectioned and stained with hemotoxylin and eosin (HE) for microscopic observation of histopathological changes. Serum testosterone and malonaldehyde (MDA) in testis of the offspring rats were also measured. **Results**　Compared with the control, body weight, testis organ coefficient, sperm survival ratio and motility, and serum testosterone were significantly declined and obvious dysplasia in testis was observed in the male rats with 9 000 mg/m^3 n-hexane gestational exposure. No significant differences in MDA content of testicular tissue were observed among the rats with different concentrations of n-hexane gestational exposure. **Conclusion**　Gestational exposure to high concentration of n-hexane could lead to obvious dysplasia of reproductive organ in male F1 rats and the dysplasia is not related to lipid peroxidation pathway.

Key words: n-hexane; gestation exposure; male reproductive toxicity; offspring rat

正己烷（n-hexane）是工业上广泛使用的一种有机溶剂，职业暴露主要通过呼吸道途径，其体内主要代谢产物 2,5 - 已二酮可通过胎盘屏障。近年来正己烷职业暴露已引起广泛关注[1]，而从事正己烷相关工作的大部分人群为育龄女性[2]。研究表明妊娠期正己烷暴露能导致仔代发育的明显异常[3-4]，正己烷及其体内代谢产物对雄性生殖系统具有明显的毒性[5]。但妊娠期正己烷暴露对仔代成年后雄性生殖系统影响如何研究较少。本研究应用孕鼠静式吸入正己烷染毒，探讨妊娠期正己烷暴露对雄性仔代大鼠的生殖发育毒性，结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　正己烷（n-hexane）分析纯（上海国药集团）；丙二醛测定试剂盒（南京建成生物工程研究所）；睾酮电化学发光测定试剂盒（北京大成生物制品有限公司）。L-RDJ/1000 静式染毒柜（广州九方电子有限公司）；电化学全自动免疫分析仪（德国 Beckman 公司）；OLYSIA-BioReport 图像 - 拍摄分析系统（日本 Olympus 公司）。

1.2　实验动物　清洁级成年 Wistar 大鼠，雌、雄体重分别为 210 ~ 230 g 与 300 ~ 320 g，上海斯莱克实

* **基金项目：**国家自然科学基金（30972514）；福建省医学创新项目（2014 - CXB - 9）
作者单位：1. 福建卫生职业技术学院，福建 福州 350101；2. 福建医科大学公共卫生学院
作者简介：李宏（1978 - ），男，福建福州人，讲师，主管医师，博士，研究方向：毒理学和药理学。
通讯作者：张文昌，E-mail：wenchang2008@126.com
数字出版日期：2015 - 6 - 5 14:00
数字出版网址：http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150605.1400.001.html

验动物中心提供，许可证号：SCXK（沪）2012 - 0002，动物饲养于悬吊式不锈钢饲养笼内，饲养环境为（22 ± 2）℃，湿度为（50 ± 10）%，14∶10 h 明暗交替，自由饮水进食。

1.3　分组及处理　雌雄大鼠适应饲养 1 周后，观察雌鼠动情周期，按雌雄 2∶1 合笼，次日晨检阴栓和阴道涂片，同时检测到阴栓和阴道涂片精子阳性确认为妊娠第 0 d（gestation day 0，GD0）。妊娠母鼠按照体重随机分成 4 组，每组 6 只，从 GD1 至 GD20 静式吸入 0（对照组）、360、1 800、9 000 mg/m^3 正己烷，4 h/d。母鼠自然分娩，哺乳期至生后（postnatal day，PND）21 d，各组选择体重和出生日期最为接近的 8 只雄鼠（每窝至少 1 只），F1 代雄鼠按前述饲养条件于 PVC 大鼠笼中饲养。

1.4　指标与方法

1.4.1　体重增长和脏器系数　F1 代雄鼠出生后第 9 d（PND9）开始称体重，每 3 d 称重 1 次；PND69 颈椎脱臼法处死仔鼠，剥离双侧附睾及睾丸称重，计算其脏器系数。

1.4.2　精子活率和活力检测　剥离左侧附睾（n = 8），在 37 ℃达尔伯克必需基本培养基中制成精子悬液，37 ℃载物台盲法镜检，目测活动精子数占视野内精子总数百分率。分级标准：0 级表示精子不能活动；1 级精子只在原地蠕动；2 级精子只向前曲线运动；3 级精子直线向前运动；4 级精子呈快速直线前向运动。

1.4.3　精子计数和精子畸形率检测　剥离右侧附睾（n = 8）以 1 mL 0.3% NaCl 溶液冲洗，制成精子悬液，光学显微镜下采用血细胞计数板计算每克附睾所含精子数，同时计数畸形精子占总精子数的比例。

1.4.4　血清睾酮含量测定　F1 代雄鼠（PND69）眼内眦静脉取血（n = 8），4 ℃静置 12 h，3 000 r/min 离心 15 min 分离血清，按睾酮试剂盒操作步骤，采用竞争性电化学发光法测定血清睾酮含量。

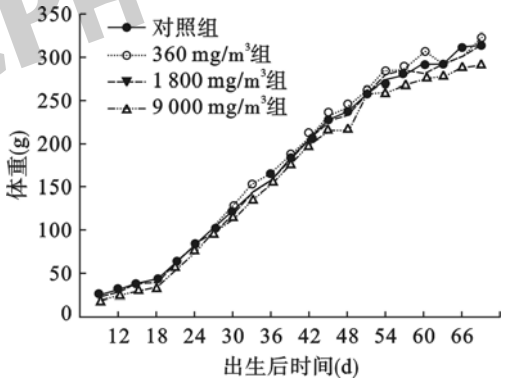
1.4.5　睾丸丙二醛含量测定　右侧睾丸（n = 8）在冰浴下研磨制备 10% 睾丸组织匀浆，按丙二醛测定试剂盒操作步骤测定睾丸组织中丙二醛含量。

1.4.6　睾丸病理学检查　左侧睾丸 4% 多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋后 5 μm 连续切片，图像拍摄系统下观察曲精小管、管腔、睾丸支持细胞和精原细胞等病理变化。

1.5　统计分析　计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析，组间比较采用单因素方差分析，两两比较方差齐采用最小显著差法（least significant difference，LSD）检验；方差不齐采用 Dunnett's t3 检验；率的比较采用 Kruskal-Wallis 检验，总体有差异采用 Mann-Whitney 检验进行两两比较；精子畸形率采用 Pearson χ^2 检验进行统计，检验水准为 $\alpha = 0.05$。

2　结　果

2.1　正己烷对仔鼠一般状况影响（图 1）　试验期间各组仔鼠毛色光泽、反应能力、进食饮水、粪便和尿液均未见异常；与对照组比较，各剂量正己烷染毒组子代雄鼠睾丸、附睾等器官未见明显异常或病变。与对照组比较，正己烷 360 和 1 800 mg/m^3 组仔鼠体重增长无明显差异，9 000 mg/m^3 组雄性仔鼠体重增长明显降低（$P < 0.05$）。



注：与对照组比较，a $P < 0.05$。

图 1　妊娠期正己烷暴露对雄性仔鼠体重增长影响

2.2　正己烷对雄性仔鼠睾丸和附睾系数影响（表 1）　与对照组比较，正己烷 9 000 mg/m^3 组雄性仔鼠睾丸重量和睾丸脏器系数均降低（$P < 0.05$）；与对照组比较，各剂量正己烷组雄性仔鼠附睾重量和附睾系数无明显变化（$P > 0.05$）。

表 1　妊娠期正己烷暴露对雄性仔鼠睾丸与附睾系数影响（$\bar{x} \pm s$，n = 8）

组别（mg/m^3）	睾丸重量（g）	睾丸系数（mg/g）	附睾重量（g）	附睾系数（mg/g）
对照组	3.52 ± 0.17	1.12 ± 0.05	0.21 ± 0.03	0.07 ± 0.01
正己烷组　360	3.66 ± 0.16	1.14 ± 0.08	0.24 ± 0.02	0.08 ± 0.01
1 800	3.64 ± 0.21	1.16 ± 0.08	0.22 ± 0.01	0.07 ± 0.01
9 000	3.06 ± 0.14[a]	1.05 ± 0.07[a]	0.21 ± 0.03	0.07 ± 0.01

注：与对照组比较，a $P < 0.05$。

2.3　正己烷对雄性仔鼠精子活率与活力影响（表 2）　与对照组比较，正己烷 9 000 mg/m^3 组雄性仔鼠睾丸精子活率降低（$P < 0.05$），且呈明显的剂量 - 效应关系；与对照组比较，正己烷 9 000 mg/m^3 组雄性仔鼠

睾丸精子活动力强的精子构成比下降($P<0.05$)。

2.4　正己烷对雄性仔鼠精子密度与精子畸形率影响　对照组及正己烷 360、1 800、9 000 mg/m^3 组雄性仔鼠精子密度分别为$(4.86\pm2.16)\times10^7$、$(6.36\pm1.67)\times10^7$、$(6.67\pm1.42)\times10^7$、$(7.86\pm2.19)\times10^7$ 个/mL;与对照组比较,正己烷 1 800、9 000 mg/m^3 组雄性仔鼠精子密度升高($P<0.05$)。对照组及正己烷 360、1 800、9 000 mg/m^3 组雄性仔鼠精子畸形率分别为 1.73%、1.82%、2.07% 和 1.78%;与对照组比较,各剂量正己烷组雄性仔鼠精子畸形率无明显变化($P>0.05$)。

表 2　妊娠期正己烷暴露对雄性仔鼠精子活率和活力构成比影响($n=8$)

组别(mg/m^3)	精子活率(%)	活力构成比(%)				
		0 级	1 级	2 级	3 级	4 级
对照组	83.33±7.07	4.88	6.50	9.76	54.47	24.39
正己烷组 360	80.00±7.07	8.21	2.99	5.97	75.37	7.46
1 800	78.89±9.28	9.32	6.21	9.32	60.87	14.29
9 000	66.67±10.00[a]	14.71[a]	26.47[a]	37.50[a]	16.91[a]	4.41[a]

注:与对照组比较,a $P<0.05$。

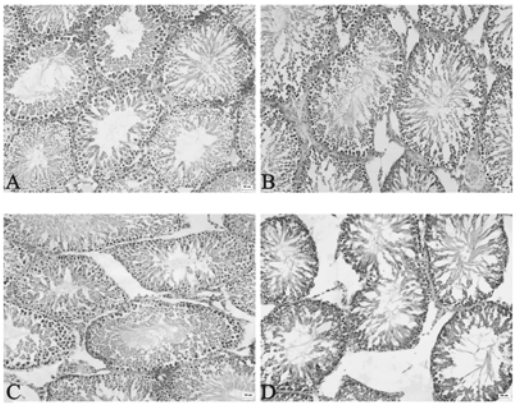
2.5　正己烷对雄性仔鼠血清睾酮与睾丸丙二醛水平影响(表 3)　与对照组比较,正己烷 9 000 mg/m^3 组雄性仔鼠的血清睾酮水平降低($P<0.05$);与对照组比较,各剂量正己烷暴露组雄性仔鼠睾丸组织中丙二醛含量无明显变化。

表 3　妊娠期正己烷暴露对雄性仔鼠血清睾酮与睾丸丙二醛含量影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别(mg/m^3)	睾酮(ng/mL)	丙二醛(nmol/mL)
对照组	2.53±0.99	2.09±0.69
正己烷组 360	2.37±0.76	2.06±0.41
1 800	1.51±0.42	1.76±0.20
9 000	1.22±0.45[a]	1.93±0.45

注:与对照组比较,a $P<0.05$。

2.6　正己烷对雄性仔鼠睾丸组织病理结构影响(图2)　对照组及正己烷360、1 800mg/m^{3}组雄性仔鼠睾丸曲精小管及细胞结构完整、曲精小管排列整齐、管腔正常、管壁正常(图 2A、2B、2C);正己烷 9 000 mg/m^3 组雄性仔鼠睾丸曲精小管及细胞结构完整、曲精小管排列疏松、间质变宽、管腔增大、管腔内精原细胞萎缩、曲精小管管壁变薄(图 2D)。



注:A:对照组;B、C、D:正己烷 360、1 800、9 000 mg/m^3 组。

图 2　正己烷对雄性仔鼠睾丸病理结构影响(HE, ×200)

3　讨　论

环境毒物宫内暴露对仔代生长发育意义重大。研究表明双酚 A、二噁英等环境毒物妊娠期暴露等均能引起雄性仔代生殖系统发育异常[6-7],妊娠期正己烷暴露能引起雌性子代生殖系统异常[4],而高浓度正己烷对雄性成年动物的生殖损伤已得到证实[8-9]。睾丸、附睾系数、精子活力、血清睾酮和睾丸病理切片是雄性生殖损伤的重要指标,而脂质过氧化是其常见机制[10-11]。本研究结果表明正己烷中、高剂量组雄性仔鼠体重明显低于对照组。提示高浓度正己烷暴露后仔代整体发育迟缓,与既往的报道一致,如 Marks 等报道妊娠 CD-1 小鼠给予 0.26 ~ 9.9 g/kg 正己烷,子代体重明显下降,雌性 Wistar 大鼠在孕期和哺乳期吸入1 800 ~5 400 mg/m^{3}正己烷,子代体重也明显下降[12]。脏器系数可反映靶器官的综合毒性。本研究结果表明正己烷中、高剂量组雄性仔鼠睾丸系数明显下降,高剂量组仔鼠睾丸组织出现间质变宽、曲精小管疏松和精原细胞萎缩等发育不良现象,进一步证实正己烷宫内暴露可抑制仔代雄鼠睾丸发育,与成年动物暴露模型相符[8-9]。

雄性生殖功能取决于正常精子数量与活动能力。本研究结果显示,正己烷高剂量组雄性仔鼠睾丸精子活率和活力均低于对照组。提示妊娠期正己烷暴露可致雄性仔鼠生殖系统损伤;正己烷暴露组仔鼠睾丸的精子密度明显升高,可能与机体对精子活性下降的一种代偿机制有关。睾酮是维持精子发生和成熟的关键因素。Boekelheide 等[8]研究表明正己烷的体内代谢产物 2,5 – 已二酮可以引起睾酮水平的下调。本研究结果也显示,正己烷高剂量组

雄性仔鼠血清睾酮水平下降,提示宫内正己烷暴露在雄性仔鼠出生之后仍能干扰生殖内分泌系统。脂质过氧化损伤是正己烷致雄性生殖损伤的重要机制之一[8-9,13]。丙二醛是脂质过氧化的标志物,对生殖细胞和精子毒性明确,其含量可直接反映组织细胞的脂质过氧化程度[14]。本研究结果表明,与对照组比较,各剂量正己烷暴露组雄性仔鼠睾丸组织中丙二醛含量无明显变化。提示妊娠期正己烷暴露所致雄性仔鼠生殖系统损伤与成年动物生殖系统损伤机制不同,并非通过脂质过氧化途径介导,可能与基因表达层面的改变有关[4],值得进一步研究。

参考文献

[1] 余新天,邱星元,边寰锋,等. 职业性慢性正己烷中毒的经济负担[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2014,32(7):523-524.

[2] Sallmen M, Neto M, Mayan ON. Reduced fertility among shoe manufacturing workers[J]. Occup Environ Med, 2008, 65(8): 518-524.

[3] Pascual R, Aedo L, Meneses JC, et al. Solvent inhalation (toluene and n-hexane) during the brain growth spurt impairs the maturation of frontal, parietal and occipital cerebrocortical neurons in rats[J]. Int J Dev Neurosci, 2010, 28(6): 491-495.

[4] Li H, Liu J, Sun Y, et al. N-hexane inhalation during pregnancy alters DNA promoter methylation in the ovarian granulosa cells of rat offspring[J]. J Appl Toxicol, 2014, 34(8): 841-856.

[5] Horimoto M, Isobe Y, Isogai Y, et al. Rat epididymal sperm motion changes induced by ethylene glycol monoethyl ether, sulfasalazine, and 2,5-hexandione[J]. Reprod Toxicol, 2000, 14(1): 55-63.

[6] Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, et al. Dioxin (TCDD) induces epigenetic transgenerational inheritance of adult onset disease and sperm epimutations[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e46249.

[7] Manikkam M, Haque MM, Guerrero-Bosagna C, et al. Pesticide methoxychlor promotes the epigenetic transgenerational inheritance of adult-onset disease through the female germline[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e102091.

[8] Boekelheide K, Schoenfeld HA. Spermatogenesis by Sisyphus: proliferating stem germ cells fail to repopulate the testis after 'irreversible' injury[J]. Adv Exp Med Biol, 2001, 500: 421-428.

[9] 曹静婷,黄中新,程欣,等. 正己烷静式染毒致 SD 大鼠生殖腺损伤[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2007,25(5):275-278.

[10] 刘基芳,刘乾,倪亚杰,等. 双酚 A 对雄性小鼠生殖细胞凋亡作用[J]. 中国公共卫生,2006,22(5):572-573.

[11] 王文祥,廖惠珍,曹建平,等. 亚慢性镉暴露对雄性大鼠生殖毒性的研究[J]. 中国公共卫生,2004,20(5):54-55.

[12] Daughtrey WC, Neeper-Bradley T, Duffy J, et al. Two-generation reproduction study on commercial hexane solvent[J]. J Appl Toxicol, 1994, 14(5): 387-393.

[13] 沈齐英,刘录. 正己烷致大鼠脂质过氧化损伤的研究[J]. 环境与健康杂志,2001,18(2):86-88.

[14] 罗琼,闫俊,崔晓燕,等. 枸杞多糖对辐照大鼠生殖系统损伤拮抗作用[J]. 中国公共卫生,2011,27(10):1358-1359.

收稿日期: 2015-05-06　（解学魁编辑　郭薇校对）

· 实验研究 ·

HRS 调控凋亡相关蛋白 Bcl-xL、Bad、Bcl-2、Bax 对大鼠心肌缺血再灌注损伤影响

李波,杨萌,刘景伟,胡春阳

摘　要:目的　探讨氢气饱和生理盐水(HRS)调控凋亡相关蛋白 Bcl-xL、Bad、Bcl-2、Bax 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响。**方法**　36 只健康雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、缺血再灌注损伤组和 HRS 处理组,每组 12 只;采用经典造模法建立心肌缺血再灌注损伤模型,3 组制模成功后再灌注 2 h,评价造模效果及 Bcl-xL、Bad、Bcl-2、Bax 等相关凋亡蛋白的表达。**结果**　大鼠心脏缺血再灌注损伤 2 h 后,假手术组、缺血再灌注损伤组、HRS 处理组 Bcl-xL mRNA和蛋白表达分别为(2.41±0.13)和(2.71±0.11)、(0.82±0.08)和(0.72±0.03)、(1.96±0.12)和(2.07±0.12),Bcl-2 mRNA 和蛋白表达分别为(2.12±0.07)和(2.51±0.08)、(0.50±0.04)和(0.83±0.07)、(1.62±0.03)和(1.92±0.05),Bad mRNA 和蛋白表达分别为(0.27±0.06)和(0.53±0.04)、(1.03±0.05)和(1.24±0.03)、(0.48±0.02)和(0.72±0.05),Bax mRNA 和蛋白表达分别为(0.51±0.03)和(0.47±0.05)、(1.53±0.05)和(1.25±0.03)、(0.52±0.03)和(0.93±0.03);3 组 Bcl-xL、Bad、Bcl-2、Bax mRNA 和蛋白表达分别比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论**　HRS 可通过调控 Bcl-xL、Bad、Bcl-2、Bax 凋亡相关蛋白的表达较为有效地减轻大鼠心肌缺血再损伤,进而保护心肌细胞。

关键词:氢气饱和生理盐水(HRS);Bcl-xL;Bad;Bcl-2;Bax;心肌缺血再灌注损伤

中图分类号:R 542.2; R 392.11　**文献标志码**:A　**文章编号**:1001-0580(2015)07-0889-04　DOI:10.11847/zgggws2015-31-07-09

Effects of HRS on apoptosis-related protein Bcl-xL, Bad, Bcl-2, and Bax and on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats

作者单位: 新乡医学院第三附属医院心内科,河南 新乡 453000

作者简介: 李波(1980-),男,河南新乡人,主治医师,硕士,研究方向:心血管内科疾病的研究与治疗。

数字出版日期:2015-6-8 8:04

数字出版网址:http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150608.0804.009.html