

叶酸对炔雌醚致雄性大鼠生殖损伤的保护作用研究

李健¹, 陈福宁², 陈耀星³, 王子旭³, 董玉兰³, 曹静³, 司丽芳¹, 刘志军¹, 赵战勤^{1*}

(1. 河南科技大学动物科技学院, 洛阳 471023; 2. 北京昌平区中西医结合医院, 北京 102208;

3. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

摘要: 旨在探讨叶酸对炔雌醚致雄性大鼠生殖损伤的保护作用。将 20 只 8 周龄成年雄性 SD 大鼠适应饲养 1 周后, 随机分为 4 组。对照组: 橄榄油 + 生理盐水; 炔雌醚组: 1.0 mg · kg⁻¹ 炔雌醚; 炔雌醚 + 叶酸组: 1.0 mg · kg⁻¹ 炔雌醚 + 1.1 mg · kg⁻¹ 叶酸; 叶酸组: 1.1 mg · kg⁻¹ 叶酸。灌胃处理, 每天一次, 连续 2 周。处理结束后, 取生殖器官称重, 检测精子质量, 测定睾丸抗氧化功能, 制作睾丸组织切片, 观察睾丸组织结构, 通过免疫组织化学染色检测 Caspase-3 与 eNOS 表达。结果显示, 炔雌醚单独处理组造成大鼠生殖器官萎缩, 重量下降, 精子发生异常, 精子质量下降, 抗氧化酶活性下降, 睾丸发生氧化应激; 与之相反, 凋亡效应酶 Caspase-3 与 eNOS 表达增加。炔雌醚 + 叶酸处理组通过减少 eNOS 表达降低氧化应激, 抑制 Caspase-3 表达, 降低精子畸形率、生精小管损伤, 最终改善雄性大鼠生殖功能。与对照组相比, 单独叶酸处理组睾丸抗氧化酶活性、组织结构和精子质量均有一定程度提高, 无显著差异。本研究首次证实叶酸有效地抑制了炔雌醚对雄性大鼠生殖功能的破坏作用。

关键词: 叶酸; 炔雌醚; 凋亡; 氧化应激; 生殖

中图分类号: S85; S814

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)02-0351-08

The Study of Protection of Folic Acid against Quinestrol Induced Reproductive Toxicity in Male Rat

LI Jian¹, CHEN Fu-ning², CHEN Yao-xing³, WANG Zi-xu³, DONG Yu-lan³,
CAO Jing³, SI Li-fang¹, LIU Zhi-jun¹, ZHAO Zhan-qin^{1*}

1. College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China; 2. Changping Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Beijing 102208, China 3. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: The study was conducted to investigate the effects of folic acid on quinestrol induced aberrant reproduction in adult male rat. Twenty 8-week-old adult male SD rats were randomly divided into 4 groups after 1-week of adaptive feeding. Control group: olive oil + physiological saline; Quinestrol group: 1.0 mg · kg⁻¹ quinestrol; Quinestrol + folic acid group: 1.0 mg · kg⁻¹ quinestrol + 1.1 mg · kg⁻¹ folic acid (dissolved in saline); Folic acid group: 1.1 mg · kg⁻¹ folic acid. Quinestrol and folic acid were given intragastric administration to male rats daily for 2 weeks. After the treatments, the sexual organs were weighed, semen quality were tested, antioxidant status of

收稿日期: 2016-08-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(U1404325; 31302106); 河南省教育厅高等学校重点科研项目基础研究计划(16A230004); 河南科技大学青年科学基金项目(2015QN032); 河南科技大学高级别科研项目培育基金(序号 4); 河南省自然科学基金项目(162300410081)

作者简介: 李健(1980-), 男, 安徽亳州人, 博士, 副教授, 主要从事生殖毒理学、动物解剖学与组织胚胎学教学与研究, E-mail: lijian800702@126.com

* 通信作者: 赵战勤, 博士, 副教授, Tel: 0379-64282341, E-mail: zhaozhanqin@126.com

testes were investigated, testis tissue section were made, histopathology of testes were observed, the expressions of Caspase-3 and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) were detected by immunohistochemical staining. The results showed that atrophy of sexual organs were induced, the weights of sexual organs were decreased, abnormal spermatogenesis were aberrant, sperm quality were reduced, antioxidant enzyme activity were decreased, oxidative stress were happend in testes after the treatment of quinestrol alone. By contrast, the expressions of Caspase-3 and eNOS in the testes were increased. In the group of quinestrol and folacin treatment, oxidative stress were reduced by decreasing eNOS expression, the expression of Caspase-3 were inhibited, the sperm deformity rate and the damage of the tubule were reduced, the reproductive function of male rats were improved significantly. Compared with the control group, the testicular antioxidant enzyme activities, tissue structure and sperm quality were ameliorated to some extent in the folacin treatment group, there was no significant difference. The results clearly demonstrate for the first time that folacin effectively inhibited the damaging effects of quinestrol on reproductive function in adult male rats.

Key words: folacin; quinestrol; apoptosis; oxidative stress; reproduction

外源性雌激素是一类外源性天然或化学合成的物质,通过干预内分泌系统的激素合成、分泌及代谢等过程,对雄性生殖系统健康造成广泛的破坏作用。炔雌醚是一种化学合成的啮齿类不育剂,被用于蒙古草原和青藏高原布氏田鼠与高原鼠兔的种群数量控制。炔雌醚目前多用于激素替代治疗、乳腺癌与前列腺癌治疗及避孕药,它通过污水排放和动物排泄物进入环境,成为目前最重要的环境雌激素之一,在探索雌激素类内分泌干扰物对生殖系统的发育与功能影响风险及机制方面引起学者的广泛关注^[1]。已有文献表明,炔雌醚通过干扰下丘脑-垂体-睾丸轴^[2],下调 FSH β 和 LH β mRNA 表达^[3],诱导氧化应激^[4],造成生精细胞凋亡、睾丸萎缩、精子质量下降等途径干扰生殖器官的发育,抑制生殖激素分泌,破坏生殖功能^[5]。细胞膜过多的不饱和脂肪酸使生精细胞对活性氧及其产物非常敏感,因此,活性氧严重影响雄性生殖功能^[6-7]。体内的酶类抗氧化系统(吡啶胺双加氧酶、GSH-Px 及 CAT 等)和非酶类抗氧化系统(维生素 C、维生素 E 及 GSH 等)能够清除活性氧,维持正常细胞的生理平衡^[8]。而当活性氧抑制抗氧化酶系统时,机体的氧化-抗氧化系统平衡被破坏,氧化应激将会发生^[9]。氧化应激被证实是破坏人与动物雄性生殖功能的分子机制之一^[10-11]。叶酸是一种具有抗氧化功能的 B 族维生素,是生物合成嘌呤、胸苷酸和蛋氨酸的必需成分。而且,叶酸对于细胞分裂和生长是必需的,对精子发生和雄性生殖功能都很重要^[12-13]。然而,关于叶酸

对环境雌激素诱导的生殖损伤的改善作用还知之甚少。因此,研究叶酸对睾丸抗氧化功能、生精细胞凋亡、精子质量和生精小管组织结构的影响有助于理解叶酸对生殖系统的保护作用途径与机制。

1 材料与方法

1.1 试验动物处理

20 只 8 周龄成年雄性封闭群 SD 大鼠,平均体重(260±20)g,购自河南省实验动物中心。在每天 12 h 光照和 12 h 黑暗的通风良好的房间进行饲养,自由采食、饮水,温度保持(25±2)°C,湿度保持(40±10)%。适应饲养 1 周后,将大鼠随机分为 4 组,进行药物灌胃处理,每天 1 次,连续 2 周。第 1 组(对照组):橄榄油 50 μ L,0.2 mL 生理盐水;第 2 组:含 1.0 mg·kg⁻¹炔雌醚(溶解于橄榄油)的橄榄油 50 μ L;第 3 组:50 μ L 含 1.0 mg·kg⁻¹炔雌醚的橄榄油+0.2 mL 含 1.0 mg·kg⁻¹叶酸(溶解于生理盐水)^[14]的生理盐水;第 4 组:0.2 mL 含 1.0 mg·kg⁻¹叶酸的生理盐水。

1.2 试剂

炔雌醚(H20103563)购自北京紫竹药业有限公司;橄榄油购自国药集团;Caspase-3(PR2285)与 eNOS(GA1013)检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。GSH-Px(E90150)、SOD(E30-267R)、T-AOC(E91629R)、MDA(E30266R)和 NO(E90339R)酶联免疫检测试剂盒购自上海安迪生物科技有限公司。甲基绿、派若宁购自上海如吉生物

科技发展有限公司。

1.3 组织样品采集与处理

在最后一次药物处理 24 h 后,采用戊巴比妥钠 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ BW}$) 麻醉,颈椎脱臼处死,分离睾丸、附睾、精囊腺和前列腺并对其进行称重。睾丸用 4% 多聚甲醛固定液固定,莱卡(RM2235)石蜡切片机 $5 \mu\text{m}$ 切片,苏木精-伊红(HE)染色和免疫组织化学染色。从每组鼠睾丸 10 张切片选 100 个圆形的生精小管,采用 Scion Image 软件测量面积。

取左侧一只附睾尾用于检测精子质量。将附睾尾放入含 37°C 的生理盐水的离心管,用眼科剪剪碎, 37°C 孵育使精子游离附睾尾,取一滴混悬液放入细胞计数板,在 400 倍显微镜下统计精子数量 ($10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$)^[15]。精子数量:悬浮于每毫升生理盐水内的附睾尾内的精子数量;精子活力:向前游动精子数量/精子总数 $\times 100\%$;取一滴混悬液放在玻片上,在 400 倍显微镜下,观察直线活动的精子^[16]。精子涂片采用吉姆萨染色检测精子形态和顶体完整率^[17],精子畸形包括头部畸形、中段畸形及尾畸形等。畸形率:畸形精子数/精子总数 $\times 100\%$;顶体完整率:顶体完整精子数量/精子总数 $\times 100\%$ 。

1.4 抗氧化状态和脂质过氧化物的检测

THERMO FISHER Multiskan FC 酶标仪检测 GSH-Px、SOD 和 T-AOC 活性,MDA 与 NO 含量,检测敏感度分别为 $0.1 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.1 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.0 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。批内、间变异系数 $<15\%$ 。数据单位分别为 $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ (GSH-Px)、 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ (SOD)、 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ (T-AOC)、 $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ (MDA) 和 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (NO)。

1.5 甲基绿-派若宁染色

甲基绿-派若宁染色用于定位动物组织^[18]和昆虫幼虫唾液腺的 RNA 和 DNA^[19]。室温下组织切片常规脱蜡和水化后在甲基绿-派若宁染色液中染色 10~20 min,丙酮和乙醇(1:1)脱水 30 s,二甲苯和丙酮(1:1)透明 10~40 s。在光学显微镜下观察,凋亡细胞的胞浆呈深红色染色。

1.6 免疫组织化学染色

采用免疫组织化学染色检测 Caspase-3 与 eNOS 表达。二步法染色步骤:组织切片经常规二甲苯脱蜡、梯度酒精水化至蒸馏水、 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 漂洗,3% H_2O_2 封闭,微波抗原修复,5% 正常山羊血清封闭、一抗兔抗 Caspase-3(1:100)孵育 2

h,生物素标记的山羊抗兔 IgG(1:200)孵育 2 h、DAB 孵育 2~5 min,苏木精复染、脱水、透明、封片。免疫组织化学染色结果棕黄色判定为阳性,统计 1 000 个生精细胞中阳性细胞数。

1.7 数据分析

数据采用 SPSS18 软件包进行单因素方差分析(One Way ANOVA),多重比较(LSD),数据以“均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)”表示, $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 为差异显著或极显著。

2 结 果

2.1 生殖器官和睾丸生精小管组织结构

表 1 表明,与对照组相比,炔雌醚处理组睾丸、附睾、精囊腺和前列腺重量分别下降 32.91%、40.1%、48.87% 和 45.12%,差异极显著($P<0.01$)。炔雌醚+叶酸组与炔雌醚组相比,睾丸、附睾、精囊腺和前列腺重量分别升高 24.53%、28.13%、54.41% 和 62.22%,差异极显著($P<0.01$)。炔雌醚+叶酸组生殖器官重量仍低于对照组,差异不显著。与对照组和叶酸组相比,炔雌醚组生精小管显著萎缩,面积分别下降 29.43% 和 31.21% ($P<0.01$)。炔雌醚+叶酸组与单独炔雌醚组相比,生精小管的面积增加达 26.53% ($P<0.01$),但仍低于对照组和叶酸组。叶酸组生殖器官重量和生精小管面积与对照组接近,无明显区别。

炔雌醚明显改变了睾丸生精小管生殖上皮的组织结构。生精小管面积显著下降,大量精原细胞、精母细胞和精子细胞皱缩(图 1C)。生精小管外的间质组织减少,间隙增大。随着生精细胞数量的显著减少,精原细胞、精母细胞和精子细胞的分布发生紊乱。在炔雌醚组生精小管内少见成熟的长形精子。相反,叶酸+炔雌醚组睾丸的组织结构损伤相对轻微,与炔雌醚组相比有明显改善;圆形或椭圆形的生精小管稍微萎缩,生殖上皮嵌有大量的生精细胞,管腔内有长形精子,构成完整的精子发生过程(图 1D)。与对照组相比,叶酸组睾丸组织结构无明显变化(图 1B)。

2.2 精子质量

连续 2 周处理,炔雌醚造成精子数量和活力显著下降,精子畸形率显著升高(表 2)。精子涂片染色显示精子畸形包括大头、头尾分离、卷曲、双头及双尾等。相反,叶酸改善了炔雌醚对精子质量造成

的损伤。与炔雌醚组相比,叶酸+炔雌醚组精子数量和活力分别提高 106.1%和 31.03%,差异极显著

($P < 0.01$);畸形率下降 26.84%,顶体完整率提高 17.61%,差异显著($P < 0.05$)(表 2)。

表 1 炔雌醚与叶酸对生殖器官重量与生精小管面积的影响

Table 1 Effects of quinestrol and/or folacin on weights of reproductive organs and seminiferous tubular area

| 组别 Group | 睾丸/g Testis | 附睾/g Epididymis | 精囊腺/g Seminal vesicle | 前列腺/g Prostate | 生精小管面积/ μm^2 Seminiferous tubular area |
|------------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|--|
| 炔雌醚+叶酸 Quinestrol+folacin | 2.64±0.36 ^A | 0.82±0.12 ^B | 1.05±0.16 ^B | 0.73±0.12 ^A | 51.42±5.64 ^A |
| 炔雌醚 Quinestrol | 2.12±0.27 ^B | 0.64±0.13 ^B | 0.68±0.13 ^B | 0.45±0.08 ^B | 40.64±6.83 ^B |
| 叶酸 Folacin | 3.15±0.33 ^A | 1.14±0.17 ^A | 1.37±0.24 ^A | 0.85±0.09 ^A | 59.08±6.44 ^A |
| 对照 Control | 3.16±0.25 ^A | 1.07±0.14 ^A | 1.33±0.17 ^A | 0.82±0.11 ^A | 57.59±5.35 ^A |

肩标大写字母不同表示差异极显著($P < 0.01$)。下同

The values with different capital letters within the same column mean very significantly different($P < 0.01$). The same as below

表 2 炔雌醚与叶酸对精子质量的影响

Table 2 Effects of quinestrol and/or folacin on semen quality

| 组别 Group | 精子数量/ $(10^6 \cdot \text{mL}^{-1})$ Sperm counts | 精子活力/% Sperm motility percent | 畸形率/% Abnormal morphology | 顶体完整率/% Integrity of acrosome |
|------------------------------|---|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| 炔雌醚+叶酸 Quinestrol+folacin | 64.5±8.33 ^B | 66.3±9.27 ^B | 25.9±5.78 ^a | 82.8±5.95 ^a |
| 炔雌醚 Quinestrol | 31.3±4.29 ^C | 50.6±5.49 ^C | 35.4±7.38 ^a | 70.4±8.24 ^b |
| 叶酸 Folacin | 81.6±9.37 ^A | 80.7±7.25 ^A | 21.5±4.04 ^b | 80.8±7.62 ^a |
| 对照 Control | 79.8±823 ^A | 78.7±5.88 ^A | 22.6±4.39 ^b | 80.3±6.84 ^a |

小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),下同

The values with different small letters within the same column mean significant difference ($P < 0.05$). The same as below

2.3 抗氧化酶活性变化

对照组和叶酸组睾丸 SOD 活性分别为 158.55 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 163.27 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,炔雌醚组下降至 92.24 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P < 0.01$)。同时,炔雌醚显著降低睾丸 GSH-Px 和 T-AOC 的水平(表 3)。与抗氧化功能下降相一致,炔雌醚组 MDA 含量升高至 7.65 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,而对照组和叶酸组的 MDA 含量分别为 4.67 和 4.34 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。对照组睾丸 NO 含量为 13.82 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,炔雌醚组 NO 含量升高至 31.66 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与炔雌醚组相比,叶酸+炔雌醚组 SOD、GSH-Px 和 T-AOC 活性显著升高,

NO 和 MDA 含量显著下降($P < 0.01$)。叶酸组与对照组相比,各指标无明显变化(表 3)。

2.4 Caspase-3 与 eNOS 表达

通过免疫组织化学染色方法检测 Caspase-3(阳性细胞)表达和甲基绿-派若宁染色检测细胞凋亡。凋亡细胞包括精原细胞、精母细胞和精子细胞。炔雌醚组凋亡细胞数量最多,达到 240.4 个;炔雌醚+叶酸组凋亡细胞数量达到 196.7 个;叶酸组和对照组凋亡细胞数量分别为 146.6 个和 161.2 个(图 2A~2D;表 4)。与对照组相比,炔雌醚组 Caspase-3 阳性细胞数显著升高($P < 0.01$)。与炔雌

表 3 炔雌醚与叶酸对睾丸抗氧化功能的影响

Table 3 Effects of quinestrol and/or folacin on antioxidant status of testes

| 组别 Group | 超氧化物歧化酶/ (U · mL ⁻¹) SOD | 谷胱甘肽过氧化 物酶/(U · L ⁻¹) GSH-Px | 总抗氧化能力/ (U · mL ⁻¹) T-AOC | 丙二醛/ (μmol · L ⁻¹) MDA | 一氧化氮/ (μmol · L ⁻¹) NO |
|------------------------------|---|--|--|--|--|
| 炔雌醚+叶酸 Quinestrol+folacin | 138.24 ± 25.64 ^A | 44.62 ± 7.15 ^A | 8.68 ± 2.74 ^B | 4.53 ± 1.22 ^B | 19.53 ± 3.28 ^B |
| 炔雌醚 Quinestrol | 92.24 ± 15.37 ^B | 25.48 ± 6.54 ^B | 4.47 ± 1.28 ^C | 7.65 ± 1.38 ^A | 31.66 ± 5.05 ^A |
| 叶酸 Folacin | 163.27 ± 24.75 ^A | 46.44 ± 8.84 ^A | 13.41 ± 2.58 ^A | 4.34 ± 0.75 ^B | 14.29 ± 3.34 ^C |
| 对照 Control | 158.55 ± 24.35 ^A | 44.81 ± 5.96 ^A | 11.53 ± 2.61 ^A | 4.67 ± 0.59 ^B | 13.82 ± 2.94 ^B |

醚组相比,炔雌醚+叶酸组凋亡细胞数量显著下降 ($P < 0.01$)。叶酸组 Caspase-3 阳性细胞数量比对照组略有降低,但差异不显著(图 2)。eNOS 在睾丸组织细胞的表达见表 4 和图 2E~H。精原细胞、精母细胞和精子细胞的胞质中都有 eNOS 表达。与 Caspase-3 的升高趋势相似,炔雌醚组 eNOS 阳性细胞数量升高至 227.1 个,而对照组和叶酸组的分别是 124.3 和 118.4。叶酸+炔雌醚组的 eNOS 阳性细胞数量比单独炔雌醚组显著下降 ($P < 0.01$),但仍显著高于对照组。单独叶酸组 eNOS 阳性细胞数量比对照组略有降低。

表 4 炔雌醚与叶酸对睾丸生精细胞 Caspase-3 和 eNOS 表达的影响

Table 4 Effects of quinestrol and/or folacin on protein expression of Caspase-3 and eNOS

| 组别 Group | Caspase-3 | eNOS |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 炔雌醚+叶酸 Quinestrol+Folacin | 196.7 ± 40.82 ^B | 161.7 ± 33.68 ^B |
| 炔雌醚 Quinestrol | 240.4 ± 44.75 ^A | 227.1 ± 52.35 ^A |
| 叶酸 Folacin | 146.6 ± 33.27 ^C | 118.4 ± 25.42 ^C |
| 对照 Control | 161.2 ± 27.34 ^C | 124.3 ± 27.36 ^C |

Caspase-3 和 eNOS 阳性生精细胞包括精原细胞、精母细胞和精子细胞。在免疫组化染色切片生精小管内统计 1 000 个生精细胞内的阳性生精细胞数

The number of Caspase-3 and eNOS-positive spermatogonia, spermatocytes, spermatids and Leydig cells in both the control and quinestrol treated groups, was determined by counting a total of 1 000 spermatogenic cells from STs cross sections with immunohistochemical staining each animal

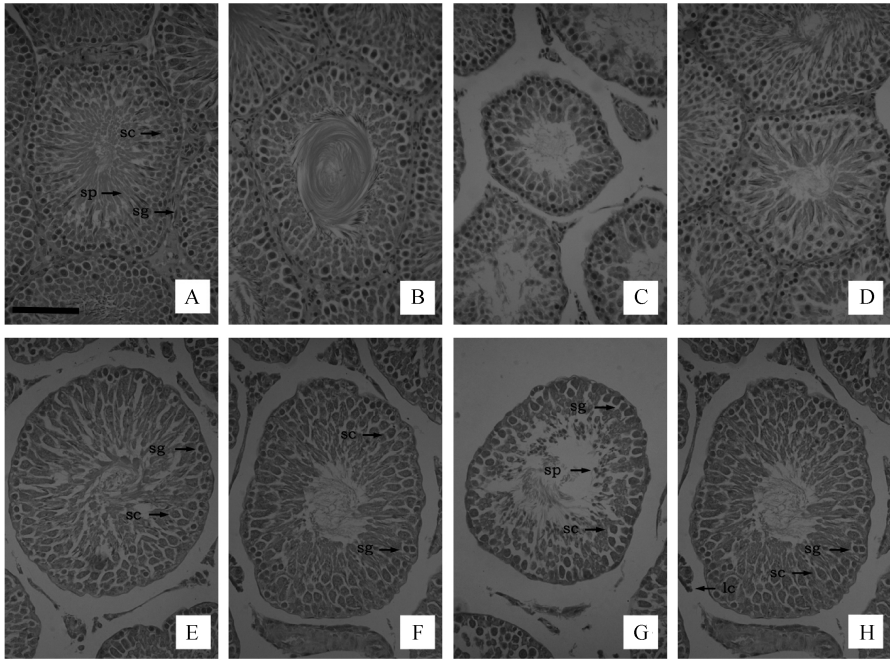
3 讨论

3.1 叶酸对雄性大鼠生殖功能的保护作用

睾丸、附睾、精囊腺、前列腺重量、精子数量及质量等的下降证实炔雌醚对雄性生殖系统有明显的毒性作用。前期研究发现炔雌醚通过激活 JNK 和 P38 MAPK 途径抑制细胞增殖、促进生精细胞凋亡^[20]。这一结果与沈伟等用炔雌醚慢性暴露蒙古沙鼠试验造成睾丸损伤的结论相一致^[4]。生精细胞数量减少和生精小管萎缩是精子发生异常的形态学指标^[21-22]。精子数量、活力、畸形率及顶体异常是用于检测各种因素破坏精子发生质量^[23]。本研究结果表明,炔雌醚对大鼠生殖功能有破坏作用。叶酸是一种广泛存在于多种食物中的水溶性 B 组维生素,对维持基因组完整性有重要作用,并参与多种生化过程^[24]。有研究证实,叶酸抑制小鼠睾丸氧化应激和生精细胞凋亡、改善睾丸组织结构、增加睾丸重量,减少精子畸形率、提高精子活力^[25-26]。B. G. Swayne 等研究发现叶酸抑制小鼠精子染色质损伤、染色质突变、DNA 断裂,从而增加精子数量和品质^[27]。因此,叶酸对雄性生殖功能具有重要的保护作用。叶酸显著抑制了炔雌醚的生殖破坏作用,明显增加生殖器官重量,增加生精细胞数量和精子质量。研究发现大鼠饲料缺少叶酸导致精子数量和活力显著下降^[28],补充叶酸改善了精子发生和精子指标^[14,29]。叶酸抑制炔雌醚对生殖的破坏作用可能归功于其抗氧化功能,而抗氧化功能对正常的精子发生起决定作用。

3.2 叶酸对雄性大鼠睾丸抗氧化酶活性的调节作用

氧化应激诱发发生精细胞凋亡,并通过抑制精子

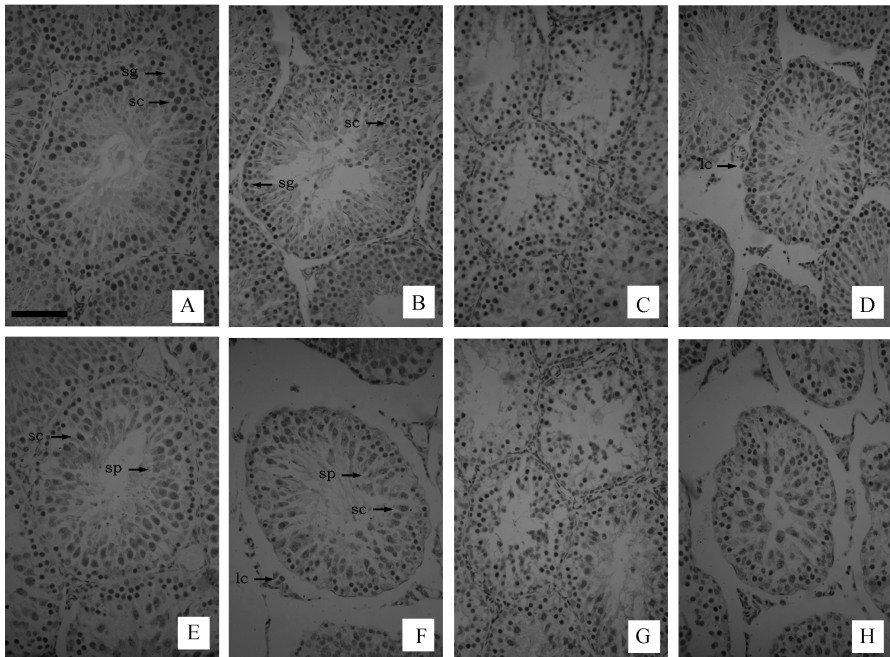


A,E. 对照组;B,F. $1.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 叶酸;C,G. $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 炔雌醚;D,H. $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 炔雌醚 + $1.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 叶酸. A~H. 标尺 = $100 \mu\text{m}$. Sg. 精原细胞;sc. 精母细胞;sp. 精子细胞。下同。A~D. 苏木精-伊红(HE)染色;E~H. 甲基绿-派若宁染色

A,E. Control; B, F. $1.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ folacin; C, G. $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ quineestrol; D, H. $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ quineestrol + $1.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ folacin. A-H. Scale bar = $100 \mu\text{m}$. Sg, Spermatogonium; sc, Spermatocyte; sp, Spermatid. The same as below. A-D. Hematoxylin-eosin(HE)staining; E-H. Methyl-ruoning staining

图 1 大鼠睾丸生精小管组织结构变化

Fig. 1 Morphological changes in the STs of testes in adult rats



A~D. Caspase-3;E~H. eNOS 表达

A-D. Caspase-3; E-H. eNOS

图 2 大鼠睾丸生精细胞凋亡相关蛋白表达变化

Fig. 2 Apoptosis-related proteins expression in germ cells of the testes of adult rats

功能造成雄性动物不育^[30]。内源性抗氧化剂,如维生素、抗氧化酶、三肽及还原剂等可清除活性氧和脂质过氧化物。炔雌醚暴露抑制了大鼠睾丸 SOD、GSH-Px 和 T-AOC 活性,增加了 NO 和 MDA 含量,MDA 含量的升高可能由活性氧 NO 的含量升高造成或加剧,炔雌醚诱导大鼠睾丸氧化应激发生。氧化应激可能是炔雌醚造成大鼠睾丸损伤的途径之一。叶酸是一种能够清除活性氧的抗氧化剂,本试验结果显示叶酸逆转了高浓度活性氧对精子质量的破坏作用,叶酸+炔雌醚显著提高了 SOD、GSH-Px 和 T-AOC 活性,降低了 NO 和 MDA 含量,增强了大鼠睾丸抗氧化能力,并缓解炔雌醚诱导的氧化应激。抗氧化制剂的抗氧化作用、一氧化氮合酶的交互作用和叶酸对 NO 的生物活性作用可能参与氧化应激状态的变化^[31]。Caspase-3,是一种半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶,广泛用于检测细胞凋亡^[32]。内皮型一氧化氮合酶(eNOS),能够合成 NO,广泛分布于精母细胞和精子细胞。结果显示与 NO 含量显著升高相一致,炔雌醚显著增加了 Caspase-3 和 eNOS 的表达。叶酸+炔雌醚处理抑制 Caspase-3 和 eNOS 表达,从而减少氧化应激和生精细胞凋亡,发挥抑制炔雌醚对生殖功能的破坏作用。S. Zabihi 等^[33]研究发现叶酸提高 ROS 清除酶活性,上调 VEGF-A 表达、调节铜锌超氧化物歧化酶蛋白分布,降低 Bax/Bcl-2 比值,从而减少糖尿病大鼠胚胎卵黄囊细胞凋亡。李运书等^[34]研究发现叶酸降低 Bax 的表达,提高 Bcl-2 的表达,抑制胎鼠心肌细胞凋亡。结果表明,调节 Caspase-3 和 eNOS 表达可能是叶酸保护雄性生殖功能的重要途径之一。

4 结 论

本研究首次证实叶酸对炔雌醚造成的生殖损伤具有保护作用。炔雌醚通过诱导睾丸氧化应激、Caspase-3 和 eNOS 表达紊乱造成生殖器官萎缩、精子发生异常、精子质量下降及睾丸损伤。叶酸缓解了炔雌醚的生殖毒性作用,这一结果有助于理解叶酸对雄性生殖功能的保护作用,有利于揭示环境雌激素造成生殖损伤的作用机制,从而为其防治寻找新调控途径。

参考文献 (References):

[1] TANG T, QIAN K, SHI T, et al. Photodegradation of quinestrol in waters and the transformation prod-

ucts by UV irradiation[J]. *Chemosphere*, 2012, 89: 1419-1425.

- [2] ZHAO M, LIU M, LI D, et al. Anti-fertility effect of levonorgestrel and quinestrol in Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*) [J]. *Integr Zool*, 2007, 2 (4):260-268.
- [3] LÜ X, GUO Y, SHI D. Effects of quinestrol on reproductive hormone expression, secretion, and receptor levels in female Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) [J]. *Theriogenology*, 2012, 77(6):1223-1231.
- [4] SHEN W, SHI D, WANG D, et al. Inhibitive effects of quinestrol on male testes in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) [J]. *Res Vet Sci*, 2012, 93(2): 907-913.
- [5] LI J, CHEN F, LI C, et al. Quinestrol induces spermatogenic apoptosis *in vivo* via increasing pro-apoptotic proteins in adult male mice[J]. *Tissue Cell*, 46 (5): 318-325.
- [6] HEMACHAND T, SHAHA C. Functional role of sperm surface glutathione S-transferases and extra cellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative stress[J]. *FEBS Lett*, 2003, 538(1):14-18.
- [7] AGARWAL A, SALEH R A, BEDAIWY M A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction[J]. *Fertil Steril*, 2003, 79 (4):829-843.
- [8] SUBUDHI U, DASA K, PAITAL B, et al. Alleviation of enhanced oxidative stress and oxygen consumption of L-thyroxine induced hyperthyroid rat liver mitochondria by vitamin E and curcumin[J]. *Chem Biol Interact*, 2008, 173(2):105-114.
- [9] BURTON G J, JAUNIAUX E. Oxidative stress[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2011, 25(3): 287-299.
- [10] VAANHOLT L M, MILNE A, ZHENG Y, et al. Oxidative costs of reproduction: Oxidative stress in mice fed standard and low antioxidant diets [J]. *Physiol Behav*, 2016, 154:1-7.
- [11] PLANTAMP C, SALORT K, GIBERT P, et al. All or nothing: Survival, reproduction and oxidative balance in Spotted Wing Drosophila (*Drosophila suzukii*) in response to cold [J]. *J Insect Physiol*, 2016, 8:28-36.
- [12] 刘艳利, 申 静, 支丽慧, 等. 叶酸调控鸡脾和胸腺 IGF-2 表达的表现遗传机制探究[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(2):296-304.
- LIU Y L, SHEN J, ZHI L H, et al. The study on

- epigenetic mechanism of *IGF2* expression in spleen and thymus regulated by folic acid in broilers[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(2): 296-304. (in Chinese)
- [13] KAMEN B. A review on folate and antifolate pharmacology[J]. *Semin Oncol*, 1997, 24(5):18-39.
- [14] SHALABY M A, EL ZORBA H Y, ZIADA R M. Reproductive toxicity of methomyl insecticide in male rats and protective effect of folic acid[J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(11):3221-3226.
- [15] CAILLE N, RODINA M, KOCOUR M, et al. Quantity, motility and fertility of tench *Tinca tinca* (L.) sperm in relation to LHRH analogue and carp pituitary treatments[J]. *Aqua Int*, 2006, 14(1):75-87.
- [16] SÖNMEZ M, TÜRK G, YÜCE A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats[J]. *Theriogenology*, 2005, 63(7): 2063-2072.
- [17] WATSON P F. Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa[J]. *Vet Rec*, 1975, 97(1):12-15.
- [18] MA A, YANG X, WANG Z, et al. Adult exposure to diethylstilbestrol induces spermatogenic cell apoptosis *in vivo* through increased oxidative stress in male hamster [J]. *Reprod Toxicol*, 2008, 25:367-373.
- [19] JURAND A, GOEL S C. The use of methyl green-pyronin staining after glutaraldehyde fixation and paraffin or araldite embedding [J]. *Tissue Cell*, 1976, 8(2):389-394.
- [20] 李 健, 陈耀星, 陈福宁, 等. MAPK 信号通路在炔雌醚诱导大鼠生精细胞凋亡中的作用研究[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(2): 381-387.
- LI J, CHEN Y X, CHEN F N, et al. The role of MAPK signaling pathway in quinnestrol-induced apoptosis of spermatogenic cells in rat [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(2): 381-387. (in Chinese)
- [21] CAI L, CHEN S, EVANS T, et al. Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism[J]. *Urol Res*, 2000, 28(5):342-347.
- [22] CAMERON D F, MURRAY F T, DRYLIE D D. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men[J]. *Anat Rec*, 1985, 213(1):53-62.
- [23] BAN Y, KOMATSU T, KEMI M, et al. Testicular spermatid and epididymal sperm head counts as an indicator for reproductive toxicity in rats [J]. *Exp Anim*, 1995, 44(4):315-322.
- [24] FENECH M. Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs) [J]. *Food Chem Toxicol*, 2002, 40(8): 1113-1117.
- [25] PADMANABHAN S, TRIPATHI D N, VIKRAM A, et al. Methotrexate-induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice; Intervention of folic and folinic acid [J]. *Mutat Res*, 2009, 673(1):43-52.
- [26] IBRAHIM W, TOUSSON E, MM ALI E, et al. Folic acid alleviates oxidative stress and hyperhomocysteinemia involved in testicular dysfunction of hypothyroid rats[J]. *Gen Comp Endocr*, 2011, 174(2):143-149.
- [27] SWAYNE B G, KAWATA A, BEHAN N A, et al. Investigating the effects of dietary folic acid on sperm count, DNA damage and mutation in Balb/c mice[J]. *Mutat Res*, 2012, 737(1): 1-7.
- [28] MYAR C A, INGERSOLL R, WALLOCK L M. Folate levels and the effects of folate deficiency on the reproductive organs of male rats [J]. *FASEB J*, 1999, 13:229-232.
- [29] FORGES T, MONNIER-BARBARINO P, ALBERTO J M, et al. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health[J]. *Hum Reprod Update*, 2007, 13(3):225-238.
- [30] LI J, WANG H, ZHANG J, et al. Abnormal secretion of reproductive hormones and antioxidant status involved in quinnestrol induced reproductive toxicity in adult male rat[J]. *Tissue Cell*, 2014, 46(1): 27-32.
- [31] STANGER O. Physiology of folic acid in health and disease[J]. *Curr Drug Metab*, 2002, 3(2):211-223.
- [32] DEGTEREV A, BOYCE M, YUAN J. A decade of caspases[J]. *Oncogene*, 2003, 22(53):8543-8567.
- [33] ZABIHI S, ERIKSSON U J, Wentzel P. Folic acid supplementation affects ROS scavenging enzymes, enhances Vegf-A, and diminishes apoptotic state in yolk sacs of embryos of diabetic rats [J]. *Reprod Toxicol*, 2007, 23(4):486-498
- [34] 李运书, 孟祥硕, 崔 策, 等. 叶酸对胚胎大鼠心肌细胞凋亡及 Bax、Bcl-2 表达的影响 [J]. 承德医学院学报, 2015, 3(14):259-261.
- LI Y S, MENG X S, CUI C, et al. Effect of folic acid on cardiomyocyte apoptosis and the expressions of Bcl-2 and Bax in Embryonic rat [J]. *Journal of Chengde Medical College*, 2015, 3(14):259-261. (in Chinese)