

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.18.017

硫辛酸对全氟辛酸所致大鼠生殖毒性效应的保护作用*

李海燕¹, 张智燕^{1△}, 贾晓宇², 戈娜³1. 包头医学院第一附属医院医学检验科, 内蒙古包头 014010; 2. 沈阳医学院基础学院, 辽宁沈阳 110034;
3. 包头医学院营养与食品健康研究所, 内蒙古包头 014010

摘要:目的 探讨成年雄性大鼠经全氟辛酸(PFOS)染毒后, 硫辛酸(LA)对大鼠生殖毒性效应的保护作用。方法 选取 40 只成年雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、LA 对照组、PFOS 染毒组、低剂量 LA 组、高剂量 LA 组。各分组处理如下: 正常对照组给予玉米油, LA 对照组给予 100 mg/kg LA, PFOS 染毒组给予 10 mg/kg PFOS, 低剂量 LA 组给予 10 mg/kg PFOS+50 mg/kg LA, 高剂量 LA 组给予 10 mg/kg PFOS+100 mg/kg LA。采用灌胃法连续给药 28 d, 成模后精确测定大鼠体质量并麻醉处死大鼠。检测大鼠体质量、睾丸质量、附睾质量、睾丸及附睾脏器系数、精子计数。采用苏木精-伊红染色观察大鼠睾丸组织结构的病理学变化。结果 PFOS 染毒组、低剂量 LA 组、高剂量 LA 组大鼠体质量低于正常对照组和 LA 对照组, 差异均有统计学意义($P<0.05$); PFOS 染毒组、低剂量 LA 组大鼠附睾质量低于正常对照组和 LA 对照组, 差异均有统计学意义($P<0.05$); PFOS 染毒组、低剂量 LA 组、高剂量 LA 组大鼠睾丸脏器系数高于正常对照组和 LA 对照组, 差异均有统计学意义($P<0.05$); PFOS 染毒组、高剂量 LA 组大鼠附睾脏器系数高于正常对照组, 差异均有统计学意义($P<0.05$); LA 对照组大鼠附睾质量、睾丸脏器系数高于正常对照组, 大鼠体质量低于正常对照组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。苏木精-伊红染色结果显示, PFOS 染毒处理后, 大鼠睾丸生精小管形态结构不完整, 间质细胞数量减少, 紧密连接结构破坏, 各级生精细胞排列紊乱, 生精上皮空泡化改变。结论 PFOS 可导致大鼠生殖系统损伤, LA 干预对 PFOS 所致的生殖毒性效应具有保护作用。

关键词:全氟辛酸; 硫辛酸; 生殖毒性; 保护作用

中图法分类号: R453.9; R979.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2024)18-2703-04

Protective effect of lipoic acid on reproductive toxicity induced by perfluorooctanoic acid in rats*

LI Haiyan¹, ZHANG Zhiyan^{1△}, JIA Xiaoyu², GE Na³

1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014010, China; 2. School of Basic Science, Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning 110034, China; 3. Institute of Nutrition and Food Health, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014010, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of lipoic acid (LA) on reproductive toxicity in adult male rats exposed to perfluorooctanoic acid (PFOS). **Methods** A total of 40 adult male SD rats were randomly divided into normal control group, LA control group, PFOS infected group, low dose LA group and high dose LA group. Each group is processed as follows. The normal control group was given corn oil, the LA control group was given 100 mg/kg LA, the PFOS infected group was given 10 mg/kg PFOS, and the low dose LA group was given 10 mg/kg PFOS + 50 mg/kg LA. The high dose LA group was given 10 mg/kg PFOS + 100 mg/kg LA. After 28 days of continuous administration by intragastric administration, the weight of the rats was accurately determined and the rats were killed by anesthesia. Body mass, testicular mass, epididymal mass, testicular and epididymal organ coefficient and sperm count were measured. The pathological changes of testicular tissue structure were observed by hematoxylin-eosin staining. **Results** The body mass of rats in PFOS infected, low dose LA and high dose LA groups were lower than those in normal control group and LA control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The epididymal mass of rats in PFOS infected and low dose LA groups were lower than those in normal control group and LA control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The testicular organ coefficient in PFOS infected,

* 基金项目: 内蒙古自治区大学生创新创业训练计划项目(201910127005); 包头医学院科学研究基金项目(BYJJ-YF-2018021); 包头医学院硕士研究生科研创新资助项目(bycx2019003)。

作者简介: 李海燕, 女, 副主任医师, 主要从事基因多态性与疾病的关系方向的研究。△ 通信作者, E-mail: 3290226606@qq.com。

low dose LA and high dose LA groups were higher than those in normal control group and LA control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The epididymal organ coefficients in PFOS infected and high dose LA groups were higher than those in normal control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The epididymal mass and testicular organ coefficient of rats in LA control group were higher than those in normal control group, and the body mass of rats were lower than those in normal control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The results of hematoxylin-eosin staining showed that the morphological structure of seminiferous tubules was incomplete, the number of interstitial cells was reduced, the tight junction structure was damaged, the spermatogenic cells at all levels were arranged in disorder, and the spermatogenic epithelium was vacuolated. **Conclusion** PFOS can cause damage to the reproductive system in rats, and LA intervention can protect the reproductive toxicity induced by PFOS.

Key words: perfluorooctanoic acid; lipoic acid; reproductive toxicity; protective effect

全氟辛酸(PFOS)是一种表面活性剂,因其稳定性好,被广泛用于工业生产中^[1],但其很难被生物或化学方法降解,造成该物质在环境中大量残留^[2],对生态环境和人类健康产生严重危害^[3]。有研究显示,PFOS导致的生殖毒性和氧化应激有关^[4],近期相关报道指出抗氧化应激的物质对PFOS造成的损伤具有改善作用^[5]。故本研究选取常用抗氧化剂硫辛酸(LA)作为干预药物^[6],通过腹腔注射法对成年雄性SD大鼠进行染毒造模,造模成功后观察LA干预后大鼠精子数、体质量、生殖器官质量及大鼠睾丸结构,探讨了LA对PFOS所致生殖毒性效应的保护作用,旨在为LA治疗生殖毒性损伤提供理论依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 选取北京斯贝福生物技术有限公司培育的40只健康SPF级6周龄雄性SD大鼠,随机分为正常对照组、LA对照组、PFOS染毒组、低剂量LA组、高剂量LA组,各8只。许可证号为SCXK(京)2016-0002。动物实验及处理均按照包头医学院第一附属医院实验动物管理及伦理委员会指导原则操作(IACUC号:BYLL2018021),并按3R原则给予人道关怀。

1.2 方法 购回大鼠适应环境1周后进行实验,实验期间大鼠自由摄取饲料和水,白天黑夜交替周期为12 h,保持环境温度为20~25℃,环境湿度为40%~50%。各分组处理如下:正常对照组给予玉米油,LA对照组给予100 mg/kg LA,PFOS染毒组给予10 mg/kg PFOS,低剂量LA组给予10 mg/kg PFOS+50 mg/kg LA,高剂量LA组给予10 mg/kg PFOS+100 mg/kg LA。其中PFOS染毒组及高剂量LA组和低剂量LA组同时给予PFOS(购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司),10 h后对高剂量LA组和低剂量LA组分别给予高剂量和低剂量的LA(购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司),正常对照组和LA对照组正常灌胃。培育28 d后,麻醉处死大鼠,采用分析天平准确称量大鼠体质量;摘取大鼠睾丸及附

睾,采用分析天平准确称量并记录脏器湿重,计算睾丸及附睾脏器系数,睾丸/附睾脏器系数=(对应脏器湿重/体质量)×100%;剥离大鼠双侧附睾4 mm×4 mm于提前预温的磷酸盐缓冲液(PBS)内,摇床孵育30 min,用70 μL滤膜过滤,加入2 mL PBS混匀备用。取上述精液10 μL至细胞计数板,再滴10 μL伊红溶液,盖上盖玻片,严格按细胞计数板使用方法进行操作并在显微镜下观察计数,每份标本计数3次,最后取平均值;提前准备好15 mL液氮置于容器中,将剥离的睾丸组织迅速放入备好的液氮中,组织在液氮中浸泡3 min后,迅速转移至-80℃冰箱保存备用。冰冻切片机预先制冷至-20℃,取出冷冻的睾丸组织并用OCT包埋,将睾丸组织固定于标本装置架上,使用切片机进行切片,切片厚度为10 μm,将切下来的组织吸附于有组织粘贴剂的盖玻片上。进行苏木精-伊红(HE)染色(染色试剂盒均购自上海碧云天生物技术公司),并在显微镜下观察并拍照保存。本研究所有实验均重复3~4次,且采用不同批次的SD大鼠进行实验。

1.3 统计学处理 采用SPSS16.0统计软件分析数据。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 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-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5组大鼠体质量、睾丸质量、睾丸及附睾脏器系数比较 PFOS染毒组、低剂量LA组、高剂量LA组大鼠体质量低于正常对照组和LA对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);PFOS染毒组、低剂量LA组大鼠附睾质量低于正常对照组和LA对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);PFOS染毒组、低剂量LA组、高剂量LA组大鼠睾丸脏器系数高于正常对照组和LA对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);PFOS染毒组、高剂量LA组大鼠附睾脏器系数高于正常对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);LA对照组大鼠附睾质量、睾丸脏器系数高于正常对照组,大鼠体质量低于正常对照组,差异均有统计学意义

($P<0.05$)。见表 1。

表 1 5 组大鼠体质量、睾丸质量、睾丸及附睾脏器系数比较($\bar{x}\pm s,n=8$)

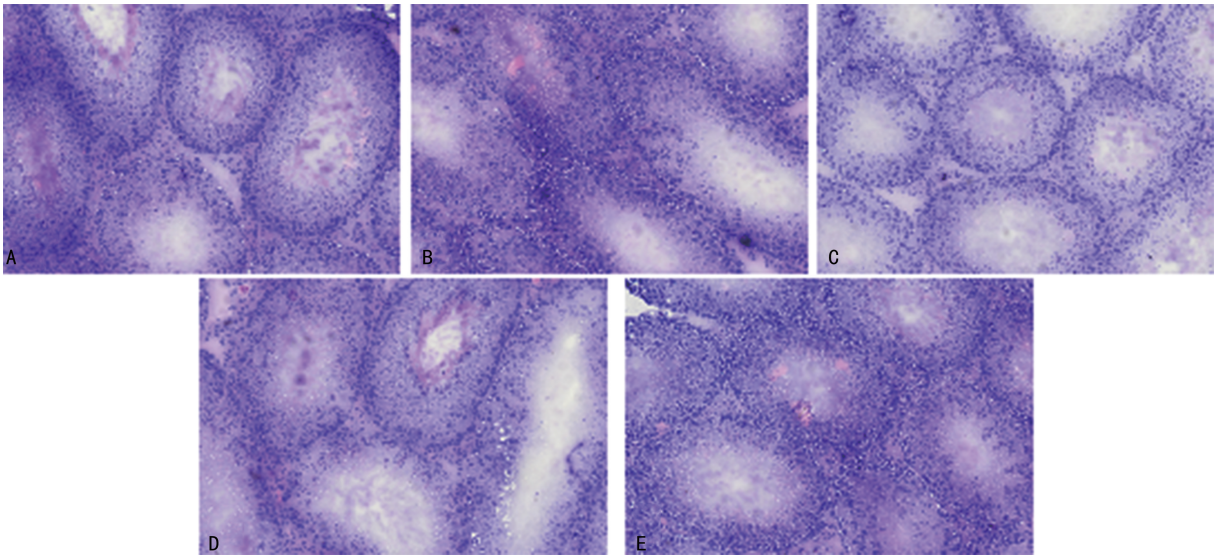
组别	体质量(g)	睾丸质量(g)	附睾质量(g)	睾丸脏器系数($\times 1\ 000$)	附睾脏器系数($\times 1\ 000$)
正常对照组	485.45 $\pm$ 42.96	3.65 $\pm$ 0.23	0.82 $\pm$ 0.04	7.60 $\pm$ 0.56	1.70 $\pm$ 0.15
LA 对照组	467.50 $\pm$ 37.26 ^a	3.63 $\pm$ 0.25	0.85 $\pm$ 0.11 ^a	7.80 $\pm$ 0.87 ^a	1.80 $\pm$ 0.24
PFOS 染毒组	383.87 $\pm$ 52.12 ^{ab}	3.59 $\pm$ 0.18	0.73 $\pm$ 0.05 ^{ab}	9.50 $\pm$ 1.22 ^{ab}	1.90 $\pm$ 0.16 ^a
低剂量 LA 组	409.79 $\pm$ 25.88 ^{ab}	3.63 $\pm$ 0.13	0.75 $\pm$ 0.04 ^{ab}	8.90 $\pm$ 0.62 ^{ab}	1.80 $\pm$ 0.17
高剂量 LA 组	420.33 $\pm$ 20.33 ^{ab}	3.60 $\pm$ 0.22	0.80 $\pm$ 0.06	8.40 $\pm$ 0.71 ^{ab}	1.90 $\pm$ 0.14 ^a
F	6.12	6.34	10.53	2.43	2.45
P	0.02	0.68	<0.05	0.03	0.03

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与 LA 对照组比较,^b $P<0.05$;—表示无数据。

2.2 5 组大鼠精子计数比较 正常对照组、PFOS 染毒组、LA 对照组、低剂量 LA 组、高剂量 LA 组的大鼠精子计数分别为 $(20.38\pm 4.21)\times 10^6$ 、 $(10.50\pm 1.93)\times 10^6$ 、 $(18.25\pm 5.26)\times 10^6$ 、 $(14.50\pm 2.56)\times 10^6$ 、 $(16.25\pm 1.49)\times 10^6$,5 组大鼠精子计数比较,差异均有统计学意义($F=6.20,P=0.03$),PFOS 染毒组、低剂量 LA 组、高剂量 LA 组大鼠精子计数低于正

常对照组,LA 对照组、低剂量 LA 组、高剂量 LA 组大鼠精子计数高于 PFOS 染毒组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 睾丸 HE 染色 HE 染色结果显示,PFOS 染毒处理后,大鼠睾丸生精小管形态结构不完整,间质细胞数量减少,紧密连接结构破坏,各级生精细胞排列紊乱,生精上皮空泡化改变。见图 1。



注:A 为正常对照组;B 为 LA 对照组;C 为 PFOS 染毒组;D 为低剂量 LA 组;E 为高剂量 LA 组。

图 1 睾丸 HE 染色结果($\times 400$)

3 讨 论

近年来,随着工业的不断发展,各种环境污染物给自然界的生物及人类健康带来严重危害。全氟化合物是近些年新发现的环境污染物^[7],可对人体免疫^[8]、神经^[9]、生殖^[10]等多个系统造成毒性损伤。美国国家环境保护局于 2022 年 9 月将该物质列为危险物质^[11],现以全氟化合物中主要的 PFOS 备受关注,虽然有关该化合物的研究较多,但主要集中在其代谢及化学结构上。目前有研究报道该物质会损伤女性卵巢颗粒细胞^[12-13],但是对男性生殖毒性研究的报道还较少。全氟化合物的急性毒性不高,但因其稳定的

理化性质使其产生的慢性毒性较强,因此需对该类化合物的慢性及急性毒性进行比较并深入研究。本课题选取急性染毒的方式对大鼠进行处理,观察该物质对大鼠的毒性效应,对比染毒前后大鼠精子计数、睾丸结构的变化,这一染毒方式可在短时间观察到 PFOS 所致的大鼠生殖毒性效应。已有实验表明活性氧(ROS)是导致男性不育的重要因素之一^[14],因此本研究从氧化应激方面探讨抗氧化作用对 PFOS 所致生殖毒性的保护作用。

LA 被称为“万能抗氧化剂”^[15],在消化系统^[16]、神经系统^[17]及内分泌系统^[18]中均有应用,现已成为

抗氧化研究的热点。目前有关 LA 在生殖系统方面的研究主要是维持机体正常内分泌,保护精子不受氧化应激损伤^[19],但 LA 改善各种毒物对生殖系统的损伤作用的研究尚少。因此,本研究对染毒大鼠进行干预,观察其治疗效果。

随机将 40 只成年雄性 SD 大鼠分为 5 组,并采用灌胃法连续处理 28 d。大鼠体重质量变化在一定程度上可以反映整体损伤情况,结果显示与正常对照组相比,PFOS 染毒组大鼠体质量下降($P<0.05$),这可能是因为 PFOS 对大鼠造成毒性效应,导致大鼠多个系统出现损伤,从而食欲下降,这一现象也说明本研究造模成功^[19]。经 PFOS 干预后,高剂量 LA 组和低剂量 LA 组大鼠体质量较 LA 对照组低,差异有统计学意义($P<0.05$),说明 LA 对 PFOS 的毒性作用可能起到了改善作用。脏器系数这一指标可以很好地反映体质量变化是否对动物脏器产生了影响^[20]。为了检测大鼠性器官是否受到 PFOS 的毒性影响,本研究又计算了大鼠的脏器系数,结果显示附睾在 PFOS 的毒性作用下质量减轻,而经 LA 干预后,大鼠睾丸、附睾脏器系数升高,说明 LA 起到了改善作用。生精情况是否良好是检测雄性生殖健康的灵敏指标,为了检测 LA 对染毒大鼠的干预作用,本研究统计了大鼠睾丸精子计数,结果发现经 PFOS 染毒后,大鼠精子计数降低,LA 联合 PFOS 处理后精子计数表现为不同程度回升,说明 LA 干预确实有改善作用。睾丸是产生精子的场所,HE 染色可准确观察睾丸的损伤程度及 LA 对其改善作用。因此,本研究对大鼠睾丸组织结构进行了观察,与正常对照组及 LA 对照组相比,PFOS 染毒组大鼠睾丸生精小管管壁变薄,两生精小管间结构破坏,官腔内生精细胞有不同程度破坏,经 LA 干预后,上述现象得到改善,但不能恢复到正常水平,精子发生这一过程在生精小管中进行,因此,精子计数的变化和睾丸组织结构的改变有紧密的联系。睾丸组织结构变化与精子计数变化趋势相一致。

综上所述,本研究分析证实了 LA 可改善 PFOS 所致大鼠生殖毒性效应,为 PAOS 所致的雄性生殖毒性效应提供了新证据,也为临床上治疗相关疾病提供参考,同时也提醒人们远离该类环境污染物。

参考文献

[1] WAN H T, LAI K P, WONG C K C. Comparative analysis of PFOS and PFOA toxicity on sertoli cells[J]. Environ Sci Technol, 2020, 54(6): 3465-3475.
[2] 赵雪松,任新,段小月,等. 全氟辛烷磺酸盐暴露对斑马鱼胚胎发育毒性与氧化应激的影响[J]. 唐山学院学报,

2016, 29(6): 12-16.
[3] 尹洁晨,简子海,刘冉. 全氟辛烷磺酸对秀丽隐杆线虫的雄性生殖毒性[C]//2018 中国环境科学学会科学技术年会论文集(第一卷),安徽:中国环境科学学会,2018:142-148.
[4] 潘小元. ROS 蓄积介导 PFOS 诱导人胚胎肝细胞自噬和凋亡的研究[D]. 衡阳:南华大学,2017.
[5] 裴梦月,谢雷,杨媛,等. 抗氧化剂在男性不育症治疗中的研究进展[J]. 中国性科学, 2022, 31(6): 15-19.
[6] 张顺棠,刘继东. 茶多酚和硫辛酸对谷氨酸发酵的影响[J]. 发酵科技通讯, 2022, 51(2): 63-68.
[7] 许罗,林秋风,李聪,等. 典型全氟化合物污染现状及其处理技术研究进展[J]. 中国给水排水, 2022, 38(10): 56-62.
[8] 梁小流. 维生素 C 对全氟辛酸致小鼠脾脏免疫毒性的保护作用的研究[D]. 南宁:广西医科大学, 2020.
[9] 师利采. 全氟辛酸暴露对小鼠认知功能的影响及机制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2021.
[10] 宋鹏琰. 妊娠期全氟辛酸染毒致子代雄鼠生殖毒性及枸杞多糖缓解作用的研究[D]. 保定:河北农业大学, 2018.
[11] EPA. 美国 EPA 指定全氟辛酸(PFOA)和全氟辛烷磺酸(PFOS)为危险物质[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(10): 112.
[12] 周圆圆. 全氟辛酸(PFOA)对人卵巢颗粒细胞间隙连接通讯的影响及其与细胞凋亡的关系[D]. 杭州:浙江大学, 2019.
[13] 杨柳,苏萌,王晓丹,等. 全氟辛酸对妊娠小鼠的肝脏毒性和生殖毒性作用[C]//中国畜牧兽医学会 2014 年学术年会,广州:中国畜牧兽医学会, 2014: 500-500.
[14] ARTINI P G, CASAROSA E, CARLETTI E, et al. In vitro effect of myo-inositol on sperm motility in normal and oligoasthenospermia patients undergoing in vitro fertilization[J]. Gynecol Endocrinol, 2017, 33(2): 109-112.
[15] 黄涛,黄开勋. α -硫辛酸的生物医学功能[J]. 生命的化学, 2004, 24(1): 58-60.
[16] 符振强,董扬帆,汤上上,等. 低盐胁迫下饲料中添加 α -硫辛酸对凡纳滨对虾生长、抗氧化能力及肠道健康的影响[J]. 动物营养学报, 2021, 33(9): 5203-5218.
[17] 赵超群. 甲钴胺联合 α -硫辛酸治疗糖尿病周围神经病变对神经电生理的影响与相关机制研究[J]. 中国现代药物应用, 2023, 17(9): 131-134.
[18] 周帆,劳丹华,李廷尉,等. 890nm 红外激光联合 α -硫辛酸、依帕司他在 2 型糖尿病周围神经病变中的应用[J]. 中国医药科学, 2020, 10(17): 16-19.
[19] 朱璋佩,石娅萍,闵志强. 青黛大鼠给药 90 天胃肠毒性研究[J]. 中药与临床, 2016, 7(1): 45-47.
[20] 袁本利. 药物安全评价中脏器系数的意义及不足[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(11): 960-963.