

本文引用:高秀霞,陈娟,刘传丽,等.五味子乙素对苯并芘致不育模型小鼠精液质量的影响[J].新乡医学院学报,2015,32(12):1073-1077.

【基础研究】

五味子乙素对苯并芘致不育模型小鼠精液质量的影响

高秀霞, 陈娟, 刘传丽, 侯海燕

(武警后勤学院附属医院妇产科, 天津 300162)

摘要: **目的** 探讨五味子乙素(Sch B)对苯并芘(Bap)所致不育模型小鼠精液质量降低的保护作用及其机制。**方法** 选取性成熟雄性美国癌症研究所小鼠60只,随机分为对照组、Bap组和Sch B+Bap组,每组20只。Bap用橄榄油配成 $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 混悬液,Sch B用 $9\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠注射液配成 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 混悬液。Bap组小鼠给予 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃,Sch B+Bap组小鼠给予Bap($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)及Sch B($200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃,对照组小鼠给予相同剂量的 $9\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠注射液与橄榄油灌胃,30 d后处死小鼠取出睾丸组织,观察各组小鼠的精子密度、活率及动态参数曲线运动速度(VCL)、直线运动速度(VSL)、平均路径速度(VAP)、平均移动角度(MAD)、精子头侧摆幅度(ALH)、鞭打频率(BCF)、直线性(LIN)、摆动性(WOB)、向前性(STR),并测定睾丸组织细胞色素P450(CYP450)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)活性及凋亡相关基因Bax、Bcl-2 mRNA表达水平。**结果** 与对照组小鼠比较,Bap组小鼠的精子密度、活率以及a级精子与b级精子活率均显著降低($P<0.05$);Sch B+Bap组小鼠的精子密度、活率、a级精子与b级精子活率显著高于Bap组($P<0.05$)。Sch B+Bap组小鼠精子密度低于对照组($P<0.05$),但2组小鼠间精子活率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。Bap组小鼠的各项精子动态参数均低于对照组($P<0.05$)。Sch B+Bap组小鼠的各项精子动态参数均高于Bap组($P<0.05$)。Sch B+Bap组小鼠精子的ALH、STR、BCF均显著低于对照组($P<0.05$),VCL、VSL、VAP、LIN、MAD、WOB与对照组小鼠比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组小鼠比较,Bap组、Sch B+Bap组小鼠睾丸组织中CYP450活性显著增高($P<0.05$),GSH-PX、SOD活性显著降低($P<0.05$)。Sch B+Bap组小鼠睾丸组织中CYP450活性显著低于Bap组($P<0.05$),GSH-PX、SOD活性显著高于Bap组($P<0.05$)。与对照组小鼠比较,Bap组、Sch B+Bap组小鼠睾丸组织中Bcl-2 mRNA水平显著降低($P<0.05$),Bax mRNA水平及Bax/Bcl-2显著增高($P<0.05$)。Sch B+Bap组小鼠睾丸组织中Bcl-2 mRNA水平显著高于Bap组($P<0.05$),Bax mRNA水平及Bax/Bcl-2显著低于Bap组($P<0.05$)。**结论** 五味子乙素可以改善苯并芘导致的小鼠精液质量降低,其作用可能是通过提高抗氧化酶活力及调节凋亡相关因子而实现。

关键词: 苯并芘;五味子乙素;不育;小鼠;精液质量;氧化;凋亡

中图分类号: R698 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2015)12-1073-05

Effect of schisandrin B on sperm quality of mice model of infertility induced by benzo-(α)-pyrene and its mechanisms

GAO Xiu-xia, CHEN Juan, LIU Chuan-li, HOU Hai-yan

(Department of Obstetrics and Gynecology, Armed Police Logistics Institute Affiliated Hospital, Tianjin 300162, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of schisandrin B (Sch B) on sperm quality in mice model of infertility induced by benzo-(α)-pyrene (Bap) and its mechanism. **Methods** Sixty viripotent male Institute of Cancer Research mice were randomly divided into control group, Bap group and Sch B + Bap group, each group included 20 mice. Bap suspension was prepared with olive oil (concentration $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), Sch B suspension was prepared with $9\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium chloride injection (concentration $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Male mice were lavaged with $9\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium chloride injection and olive oil in control group. The mice were lavaged with BaP ($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) in Bap group, and the mice were lavaged with Bap ($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) and Sch B ($200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) in Bap + Sch B group. After 30 days, all the mice were executed and the testicle were extracted to detected the sperm density, motility rate, different dynamic parameters [VCL, VSL, VAP, mean angular displacement (MAD), ALH, beat cross frequency (BCF), linearity (LIN), wobble (WOB), straightness (STR)]. The activity of cytochrome 450 (CYP450), glutathione peroxidase (GSH-PX), superoxide dismutase (SOD) and Bax, Bcl-2 mRNA level in the testicle were also examined. **Results** Compared with control group, sperm density, motility rate of mice in Bap group decreased significantly ($P<0.05$), which in Bap + Sch B group increased significantly than those in Bap group ($P<0.05$). The sperm

DOI:10.7683/xyxyxb.2015.12.004

收稿日期:2015-08-31

基金项目:天津市应用基础与前沿技术研究计划(编号:15JCQNJC2300);天津市应用基础计划面上项目(编号:07JCZDJC07400)

作者简介:高秀霞(1974-),女,天津人,硕士,主治医师,研究方向:不孕不育及产前筛查。

count in Sch B + Bap group was significantly decreased compared with control group ($P < 0.05$), and there was no significant difference of motility rate between the two groups ($P > 0.05$). The dynamic parameters of mice in Bap group were significantly lower than those in control group, which in Sch B + Bap group were significantly higher than those in Bap group ($P < 0.05$). ALH, STR, BCF of mice in Bap + Sch B group were significantly lower than those in control group ($P < 0.05$), but VCL, VSL, VAP, LIN, MAD, WOB had no significant difference between control group and Bap + Sch B group ($P > 0.05$). Compared with control group, the activity of cytochrome P450 was increased significantly while the activity of GSH-PX, SOD decreased significantly in Bap group and Bap + Sch B group ($P < 0.05$). Compared with Bap group, the activity of cytochrome P450 was significantly lower while the activity of GSH-PX, SOD were significantly higher in Bap + Sch B group ($P < 0.05$). Compared with control group, the expression of Bcl-2 mRNA level increased significantly while the expression of Bax mRNA level and Bax/Bcl-2 increased significantly in Bap group and Bap + Sch B group ($P < 0.05$). Compared with Bap group, the expression of Bcl-2 mRNA level increased significantly while the expression of Bax mRNA level and Bax/Bcl-2 increased significantly in Bap + Sch B group ($P < 0.05$). **Conclusion** Sch B can improve sperm quality of infertility mice induced by Bap, this effect may be related to antioxidation and inhibition of cell apoptosis.

Key words: benzo-(α)-pyrene; schisandrin B; infertility; mouse; sperm quality; oxidation; apoptosis

苯并芘 [benzo (a) pyrene, Bap] 是多环芳烃类化合物中的主要成员, 可形成于肉类食物及能源物质的不完全燃烧, 随着城市垃圾不当焚烧、烧烤食物食用增多及汽车尾气排放增加, Bap 可通过呼吸、饮食等多种渠道进入人体。Bap 可以在肝脏细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450, CYP450) 作用下代谢产生大量氧化性极强的中间产物和氧自由基, 诱导细胞发生凋亡, 损害人体健康^[1]。本课题组前期研究发现 Bap 与妊娠早期胚胎停止发育相关^[2], 亦有报道 Bap 对精子质量亦有损伤效应^[3]。五味子乙素 (schisandrin B, Sch B) 是中药五味子中含量最高的有效成分, 研究证实, Sch B 能保护脏器免受自由基侵害, 增强细胞线粒体抗氧化损伤的能力^[4]。目前尚不清楚 Sch B 对 Bap 诱导的精子质量损伤是否具有改善作用。本研究观察了 Sch B 对 Bap 致不育模型小鼠精液质量的影响, 并对其作用机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6~8 周龄雄性美国癌症研究所 (Institute of Cancer Research, ICR) 小鼠 60 只, 体重 28~32 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 合格证号: SCXK-(京) 2012-0002。每笼 5 只饲养, 饲养温度控制在 20~26 °C, 12 h 光照, 12 h 黑暗, 颗粒饲料喂养, 自由饮水、饮食。

1.2 主要试剂与仪器 Bap (美国 Sigma 公司); Sch B (中国药品生物制品检定所); 初榨橄榄油 (西班牙品利公司); 9 g · L⁻¹ 氯化钠注射液 (河北天成药业有限公司); 谷胱甘肽过氧化物酶 (lutathione peroxidase, GSH-PX) 及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒 (南京建成生物技术公司); CYP450 活性检测试剂盒 (德国 Promegen 公

司); TRIzol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); 反转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); Bio-Photometer 型生物分光光度计 (德国 Eppendorf 公司); 超速低温离心机 (美国 Beckman 公司); UA-265 双光道紫外分光光度计 (日本岛津公司); RT-PCR 仪 (美国 Sigma 公司); WLJY-9000 型精子质量检测系统 (北京伟力技贸公司)。

1.3 动物模型制备 60 只小鼠采用随机数字法分为对照组、Bap 组和 Sch B + Bap 组, 每组 20 只。Bap 用橄榄油配成 0.2 g · L⁻¹ 混悬液, Sch B 用 9 g · L⁻¹ 氯化钠注射液配成 20 g · L⁻¹ 混悬液 2 种制剂均用现配。每日晨 8:00~9:00 给予小鼠药物灌胃。Bap 组给予 Bap 2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, Sch B + Bap 组给予 Sch B 200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ + Bap 2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 对照组小鼠给予相同剂量的 9 g · L⁻¹ 氯化钠注射液 + 橄榄油。3 组小鼠均连续灌胃 30 d。

1.4 标本采集与处理 最后 1 次灌胃后 5 h 用颈椎脱臼法处死小鼠, 立即放于冰台, 显微镜下无菌状态分离出睾丸组织, 将睾丸周围的脂肪组织剥离, 将附睾与睾丸体分离, 将附睾剪碎后放入 3 mL 的 9 g · L⁻¹ 氯化钠溶液中, 在 37 °C 下孵育 10 min, 使精子充分游离出来, 取 10 μ L 悬浮液置样本槽中, 进行精液质量分析, 其余睾丸组织用于检测 CYP450、GSH-PX、SOD 活性与 Bax、Bcl-2 基因 mRNA 表达水平。

1.5 精液质量检测 参照文献[5]方法, 在 37 °C 环境下进行精液质量检测, 将精子混悬液涂于计数板上, 在计数板上随机选取 10 个视野, 每个视野观察约 10 s, 使用 WLJY-9000 型精子质量检测系统检测精子密度、活率及各项动态参数, 动态参数包括曲线运动速度 (curvilinear velocity, VCL)、直线运动速

度 (straight line velocity, VSL)、平均路径速度 (average path velocity, VAP)、平均移动角度 (mean angular displacement, MAD)、精子头侧摆幅度 (amplitude of lateral head displacement, ALH)、鞭打频率 (beat cross frequency, BCF)、直线性 (linearity, LIN)、摆动性 (wobble, WOB)、向前性 (straightness, STR)。

1.6 睾丸组织中 CYP450 活性检测 参照文献 [6] 方法,将取出的睾丸组织用 0 ℃ 的 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠注射液冲洗直至为清亮液体流下为止,每克睾丸组织加 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) (pH = 7.4) 5.0 mL 在 0 ~ 4 ℃ 下以 $10\,000 \sim 15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液,再用超速低温离心机 $100\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 60 min,抽取上清液,保留沉淀,继续加入 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH = 7.4),每克组织所得微粒体沉淀物加缓冲液 1.0 mL 后混匀。将 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的微粒体蛋白混悬液 0.3 mL 加入 5.7 mL 的 PBS 混悬液 (pH = 7.4) 后充分混匀,分装在 2 只比色杯中,置于 UA-265 双光道双光束紫外分光光度计中并在 400 ~ 500 nm 基线间扫描。将 5 mg 连二亚硫酸钠保险粉加入比色杯中并混匀,一氧化碳轻轻充入样品杯中并扫描 400 ~ 500 nm 的差异光谱,以 450 nm 和 490 nm 处吸光度值为基础计算 CYP450 活性。计算公式为 $\text{CYP450} (\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}) = [(A_{450} - A_{490})/E \cdot L] \times 50\,000$,其中 A 为吸光度, E 为 450 ~ 490 nm 波长的示差光谱消光系数, L 为比色杯厚度,50 000 为本实验制备组织匀浆过程中的稀释倍数。

1.7 睾丸组织中 GSH-PX、SOD 活性测定 将睾丸组织用匀浆机以 $10\,000 \sim 15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 在 4 ℃ 下匀浆 (每次匀浆时间 10 s,间隙 30 s,连续 3 ~ 4 次),按试剂盒说明称取组织后先测定蛋白含量 (双缩脲法),再测定 GSH-PX、SOD 活性,测定时采用生物分光光度计测定并计算活性值。计算公式:酶活性 ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$) = $[(A_{ck} - A_e) \times V]/(A_{ck} \times W \times V_t \times 50\%)$, A_{ck} 为对照管溶液在 560 nm 处的吸光度值, A_e 为样品测定管溶液在 560 nm 处的吸光值, V 为酶液总体积 (mL), W 为提取酶液的组织鲜质量 (g), V_t 为测定时酶液的用量 (mL) [7]。

1.8 RT-PCR 法测定睾丸组织中 Bax 与 Bcl-2 基因 mRNA 水平 称取 10 mg 睾丸组织并按 TRIzol 试剂盒说明书提取出总 RNA。以下步骤按试剂盒说明书要求进行, RNA 纯度与完整性符合要求后按试剂盒说明以 (oligo) dT 为引物反转录合成 cDNA 第 1 链,以 $2 \mu\text{L}$ 的 cDNA 为模板按试剂盒说明进行

PCR 扩增, GAPDH 为内参照。反应条件: 94 ℃ 60 s、解链温度 (melting temperature, T_m) (根据不同的退火温度定) 50 s、72 ℃ 下 90 s, 连续进行 40 个循环。扩增产物在琼脂糖凝胶 ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 电泳槽中迁移 40 min, 取出凝胶并在紫外灯 (260 nm) 下进行照相。用 Quantity one 软件对照片中各个目的基因的条带密度与宽度进行分析, 以管家基因 GAPDH 为内参照计算各个样本的基因条带密度的相对值, 半定量分析结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, Marker 由小到大依次为 100、250、500、750、1 000、2 000 bp, 引物由日本 TaKaRa 公司合成, 聚丙烯酰胺凝胶电泳级纯化, 基因序列如下: Bax 引物 (335 bp, T_m : 59 ℃) 上游: 5'-CCGGCGAATTGGAGATGAACTG-3', 下游: 5'-TGGTCACTGTCTGCCATGTGGG-3'; Bcl-2 引物 (741 bp, T_m : 56 ℃) 上游: 5'-CGGAGGAAGTAGACTGATATTAACAAAG-3', 下游: 5'-CCGAAGCTCAAAG-AAGGCCACA-3'; GAPDH 引物 (239 bp, T_m : 52 ℃) 上游: 5'-ATTGTCAGCAATGCATCCTG-3', 下游: 5'-TTCAGC-TCTGGGATGACCTTGCC-3'。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间数据比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠造模成功例数 对照组小鼠死亡 1 只 (5%), 成功造模 19 只 (95%); Bap 组小鼠死亡 4 只 (20%), 成功造模 16 只 (80%); Sch B + Bap 组小鼠死亡 2 只 (10%), 成功造模 18 只 (90%)。

2.2 3 组小鼠精子密度、活率比较 结果见表 1。与对照组小鼠比较, Bap 组小鼠的精子密度、活率以及 a 级精子与 b 级精子活率均显著降低 ($P < 0.05$); Sch B + Bap 组小鼠的精子密度、活率、a 级精子与 b 级精子活率均显著高于 Bap 组 ($P < 0.05$)。Sch B + Bap 组小鼠精子密度低于对照组 ($P < 0.05$), 但 2 组小鼠间精子活率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 3 组小鼠精子密度及活率比较

Tab.1 Comparison of sperm density and motility rate among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	精子密度/ ($\times 10^9 \text{ L}^{-1}$)	精子活 率/%	a 级精子 活率/%	b 级精子 活率/%
对照组	19	39.12 \pm 3.21	69.34 \pm 8.06	9.06 \pm 1.34	15.84 \pm 2.09
Bap 组	16	12.32 \pm 2.33 ^a	23.94 \pm 3.41 ^a	3.49 \pm 0.39 ^a	3.74 \pm 0.38 ^a
Sch B + Bap 组	18	30.53 \pm 3.61 ^{ab}	66.43 \pm 5.51 ^b	8.73 \pm 1.05 ^b	15.22 \pm 1.99 ^b

注: 与对照组比较^a $P < 0.05$; 与 Bap 组比较^b $P < 0.05$ 。

2.3 3 组小鼠精子动态参数比较 结果见表 2。

Bap 组小鼠的各项精子动态参数均低于对照组 ($P < 0.05$)。Sch B + Bap 组小鼠的各项精子动态参数均高于 Bap 组 ($P < 0.05$)。Sch B + Bap 组小鼠精子动态参数比较

表 2 3 组小鼠精子动态参数比较

Tab. 2 Comparison of sperm dynamic parameters among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VCL/(\(\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}\))	VSL/(\(\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}\))	VAP/(\(\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}\))	ALH/\(\mu\text{m}\)	LIN/%	STR/%	MAD/%	BCF/Hz	WOB/%
对照组	19	60.52 ± 6.43	21.45 ± 4.34	27.34 ± 2.04	1.54 ± 0.22	0.39 ± 0.02	0.87 ± 0.08	89.44 ± 8.31	9.79 ± 1.23	0.62 ± 0.04
Bap 组	16	41.99 ± 4.59 ^a	10.79 ± 1.34 ^a	15.98 ± 1.36 ^a	0.51 ± 0.04 ^a	0.23 ± 0.03 ^a	0.57 ± 0.03 ^a	65.34 ± 5.73 ^a	6.31 ± 0.36 ^a	0.34 ± 0.02 ^a
Sch B + Bap 组	18	60.29 ± 6.32 ^b	20.61 ± 2.22 ^b	26.89 ± 1.82 ^b	1.01 ± 0.16 ^{ab}	0.33 ± 0.05 ^b	0.70 ± 0.04 ^{ab}	87.75 ± 8.34 ^b	8.23 ± 0.48 ^{ab}	0.59 ± 0.04 ^b

注:与对照组比较^a $P < 0.05$;与 Bap 组比较^b $P < 0.05$ 。

2.4 3 组小鼠睾丸组织 CYP450、GSH-PX、SOD 活性比较 结果见表 3。与对照组小鼠比较, Bap 组、Sch B + Bap 组小鼠睾丸组织中 CYP450 活性显著增高 ($P < 0.05$), GSH-PX、SOD 活性显著降低 ($P < 0.05$)。Sch B + Bap 组小鼠睾丸组织中 CYP450 活性显著低于 Bap 组 ($P < 0.05$), GSH-PX、SOD 活性显著高于 Bap 组 ($P < 0.05$)。

表 3 3 组小鼠睾丸组织 CYP450、GSH-PX、SOD 活性比较

Tab. 3 Comparison of the activity of CYP450, GSH-PX and SOD in testicle tissue among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CYP450/ (nmol · g ⁻¹)	GSH-PX/ (×10 ³ U · g ⁻¹)	SOD/ (×10 ³ U · g ⁻¹)
对照组	19	0.38 ± 0.04	23.46 ± 2.98	193.52 ± 20.75
Bap 组	16	0.71 ± 0.07 ^a	12.67 ± 1.23 ^a	151.41 ± 13.32 ^a
Sch B + Bap 组	18	0.59 ± 0.05 ^{ab}	18.47 ± 1.94 ^{ab}	176.44 ± 15.33 ^{ab}

注:与对照组比较^a $P < 0.05$;与 Bap 组比较^b $P < 0.05$ 。

2.5 3 组小鼠睾丸组织 Bax、Bcl-2 基因 mRNA 表达水平比较 结果见图 1、表 4。与对照组小鼠比较, Bap 组、Sch B + Bap 组小鼠睾丸组织中 Bcl-2 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$), Bax mRNA 水平及 Bax/Bcl-2 显著增高 ($P < 0.05$)。Sch B + Bap 组小鼠睾丸组织中 Bcl-2 mRNA 水平显著高于 Bap 组 ($P < 0.05$), Bax mRNA 水平及 Bax/Bcl-2 显著低于 Bap 组 ($P < 0.05$)。

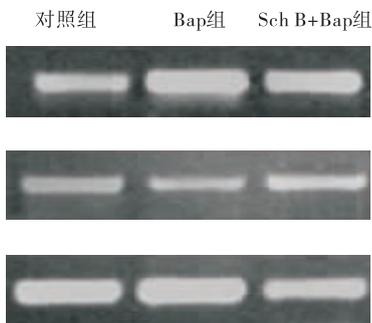


图 1 3 组小鼠睾丸组织中 Bax、Bcl-2 mRNA 的表达

Fig. 1 Expression of Bax and Bcl-2 mRNA in testicle tissue among the three groups

子的 ALH、STR、BCF 显著低于对照组 ($P < 0.05$), VCL、VSL、VAP、LIN、MAD、WOB 与对照组小鼠比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 4 3 组小鼠睾丸组织 Bax、Bcl-2 基因 mRNA 表达比较

Tab. 4 Expression of Bax and Bcl-2 mRNA in testicle tissue among the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2
对照组	19	0.54 ± 0.04	0.74 ± 0.01	0.66 ± 0.02
Bap 组	16	1.09 ± 0.03 ^a	0.38 ± 0.03 ^a	2.81 ± 0.05 ^a
Sch B + Bap 组	18	0.80 ± 0.02 ^{ab}	0.52 ± 0.02 ^{ab}	1.51 ± 0.03 ^{ab}

注:与对照组比较^a $P < 0.05$;与 Bap 组比较^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

Bap 作为典型的环境污染物广泛存在于燃烧烟草的烟雾和内燃机尾气以及熏炸食物中,具有高脂溶性和较强的氧化活性,可导致细胞氧化损伤^[1]。国内外众多学者对其毒性进行了多方面研究,但涉及男性生殖系统毒性的研究还未广泛开展。本研究建立 Bap 诱导雄性 ICR 小鼠不育模型,发现 Bap 诱导组小鼠的精子密度、活率及动态参数指标均显著降低,说明 Bap 可造成小鼠精液质量下降。本研究还发现, Bap 组小鼠睾丸组织中 CYP450 活性显著增高, GSH-PX、SOD 活性显著降低。Bap 是在肝脏中的 CYP450 作用下代谢的,代谢过程中可产生大量活性氧物质造成细胞氧化损伤, CYP450 活性的强弱在染毒早期反映其染毒程度,染毒程度越高活性越强^[8], 本研究中 Bap 染毒小鼠模型睾丸组织 CYP450 活性升高,间接证实了动物模型染毒成功,而 GSH-PX、SOD 检测结果提示, Bap 致不育小鼠睾丸组织中存在抗氧化力降低,说明其代谢过程中产生氧化损伤^[3]。已有研究表明, Bap 能诱导多种细胞发生凋亡^[9]。细胞凋亡过程复杂,凋亡相关蛋白中 Bcl-2 家族是关键性的凋亡调节因子,其中包括抑制凋亡和促进凋亡,二者相互协调共同完成凋亡调节。已有研究证实,当 Bax 同源二聚体形成时诱导细胞凋亡,而 Bcl-2 蛋白表达量升高时, Bax 同源二聚体逐渐分离而与 Bcl-2 蛋白形成 Bax、Bcl-2 异源二聚体,从而发挥抑制凋亡作用^[10]。本研究中

细胞凋亡相关基因表达结果显示,Bap 组小鼠睾丸组织中 Bax mRNA 水平显著增高、Bcl-2 mRNA 水平显著降低,说明 Bap 可能通过改变 Bax、Bcl-2 异源二聚体的调控平衡进而造成睾丸组织及精子细胞凋亡。

五味子是滋补类中药,Sch B 是五味子中含量最高的联苯环辛烯类木脂素,具有较强的抗氧化作用,能有效提高机体免疫能力,具有抗肿瘤、降糖、抗炎等多种药理作用^[11]。本研究发现,应用 Sch B + Bap 组小鼠精子密度、精子活率及各项动态参数均显著优于 Bap 组,且 Sch B + Bap 组小鼠精子的 VSL、VAP、MAD、WOB 等指标与对照组小鼠比较差异无统计学意义,提示 Sch B 能够改善暴露于 Bap 环境中的小鼠精子质量。与精子运动方向相关的 3 大指标 ALH、LIN、STR 中,只有 LIN 在对照组与 Sch B + Bap 组间差异无统计学意义,提示 Sch B 对改善小鼠精子运动方向作用可能较小。本研究结果显示,Sch B + Bap 组 CYP450 活性显著降低,说明 Sch B 可减轻 Bap 毒性作用。既往研究发现,Sch B 可通过提高抗氧化酶活性对氧化应激损伤起保护作用^[12]。本研究中抗氧化酶检测结果发现,Sch B + Bap 组的 GSH-PX、SOD 活性显著增高,提示 Sch B 可能通过提升抗氧化酶活力抑制 Bap 所诱导的精液质量降低。Sch B + Bap 组的 Bax mRNA 水平及 Bax/Bcl-2 显著低于 Bap 组,Bcl-2 mRNA 水平显著高于 Bap 组,提示 Sch B 可能通过调节细胞凋亡因子减轻 Bap 对睾丸组织的损伤效应。

综上所述,Bap 可以造成小鼠精液质量下降,Sch B 能改善 Bap 对精液质量的不良影响,其作用机制可能与 Sch B 调节氧化-抗氧化酶体系及细胞凋亡基因表达有关。对 Sch B 作用机制进一步深入探讨,将有益于今后男性生育力的保护工作。

参考文献:

- [1] Billet S, Abbas I, Goff J L, *et al.* Genotoxic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto airborne particulate matter (PM 2.5) in human lung epithelial A549 cells [J]. *Cancer Lett*, 2008, 270(1):144-155.
- [2] 侯海燕,杨振华,邹晓萍,等. 绒毛组织二氢二醇环氧苯并(a)芘-DNA 加合物与孕早期胚胎停育[J]. *中华围产医学杂志*, 2011, 14(8):459-462.
- [3] 孙小伟,邵贺,刘涛,等. 山奈酚对苯并芘致不育模型小鼠精液质量的影响及其作用机制[J]. *临床误诊误治杂志*, 2015, 28(6):105-108.
- [4] 章艳燕,侯海燕,陈晓,等. 五味子乙素通过 NOS/NO 系统预防 BaP 所致 HTR8-SVneo 细胞氧化损伤[J]. *生殖医学杂志*, 2015, 24(7):572-577.
- [5] Pahune P P, Choudhari A R, Muley P A. The total antioxidant power of semen and its correlation with the fertility potential of human male subjects [J]. *J Clin Diagn Res*, 2013, 7(6):991-995.
- [6] 王双虎,戴大鹏,胡利明,等. 细胞色素 P450 2C9 药物代谢酶体外酶学活性检测新方法的建立[J]. *医学研究杂志*, 2013, 42(2):23-26.
- [7] 朱淑萍,侯海燕. 山奈酚对小鼠胎盘 CYP450 酶、GSH-PX 活性及母鼠血脂的影响[J]. *临床误诊误治杂志*, 2014, 27(4):96-99.
- [8] 周义文,申萍,陈曼,等. 中国成人肝微粒体 P450 酶活性研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2008, 29(5):395-398.
- [9] Kim J Y, Chung J Y, Park J E, *et al.* Benzo[a]pyrene induces apoptosis in RL95-2 human endometrial cancer cells by cytochrome P450 1A1 activation [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(10):5112-5122.
- [10] 赵文峰,高建芝,张金盈. 心肌缺血再灌注损伤时细胞凋亡的信号转导通路[J]. *新乡医学院学报*, 2015, 32(4):374-377.
- [11] 潘瑶,林剑霞,李妍. 五味子乙素的药理作用研究概况[J]. *吉林医药学院学报*, 2014, 36(1):60-62.
- [12] Cao B, Niu C, Lu T, *et al.* Protective effect of Schisandrin B against oxidative damage of UVB irradiated HaCaT cells and its molecular mechanism [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2014, 30(4):523-527.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:王 燕)