

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.09.003

文章编号: 1005-8982(2018)09-0013-09

母鼠长期低剂量锰染毒对子代大鼠睾丸氧化应激状态及生精细胞凋亡的影响*

王乾兴¹, 于明明¹, 张先平²

(1. 遵义医学院 细胞生物学教研室, 贵州 遵义 563003; 2. 湖南省娄底市中心医院 生殖医学中心, 湖南 娄底 422907)

摘要: **目的** 探讨氯化锰长期低剂量染毒对子代大鼠睾丸中氧化应激状态及生精细胞凋亡的影响。**方法** 健康雌性SD大鼠32只随机分为对照组, 低、中、高剂量组, 每组8只。锰染毒组分别腹腔注射2、4和8 mg/kg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 对照组腹腔注射等容生理盐水, 1次/d, 5d/周, 共8周。与正常雄性SD大鼠交配受孕后, 雌鼠在妊娠期和哺乳期继续染毒。每组随机取8只12周龄子代雄性大鼠断头处死后取材, HE染色观察睾丸生精小管结构; qRT-PCR、免疫组织化学、Western blot分别检测叉头蛋白转录因子O3a (FoxO3a)、与Bcl-2相互作用的细胞死亡调节子(Bim)、半胱天冬酶9 (Caspase-9) mRNA和蛋白的表达; TUNEL技术检测生精细胞凋亡。**结果** ① HE染色可见各锰染毒组睾丸生精小管呈现不同程度的形态学改变。随着锰染毒剂量的增加, 生精细胞层数逐渐减少, 各级生精细胞排列紊乱、数量减少或缺如, 管腔内成熟的精子数目减少; ②中、高剂量组精子密度、精子活动率降低, 而精子畸形率上升 ($P < 0.05$); ③各锰染毒组大鼠睾丸组织内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性随锰染毒剂量的增加而降低 ($P < 0.05$); 而睾丸组织内丙二醛(MDA)含量和活性氧(ROS)水平随锰染毒剂量的增加逐渐升高 ($P < 0.05$); ④在mRNA和蛋白水平, FoxO3a的表达随锰染毒剂量的增加逐渐上升 ($P < 0.05$); 低剂量组Bim mRNA表达量未见变化, 但在中、高剂量组则降低, 而细胞死亡调节因子表达量则随锰染毒剂量的增加逐渐增加 ($P < 0.05$); ⑤Caspase-9 mRNA和蛋白表达量在各锰染毒组均升高, 且随锰染毒剂量的增加逐渐增加 ($P < 0.05$); ⑥各锰染毒组大鼠均可见生精细胞凋亡, 其凋亡指数高于对照组, 且随锰染毒剂量的增加而上升 ($P < 0.05$)。**结论** 长期低剂量锰染毒可抑制子代大鼠睾丸内抗氧化酶活性或(和)增加MDA含量, 提高睾丸组织ROS水平, 促进FoxO3a和Bim表达, 启动Caspase-9信号通路, 最终导致子代大鼠生精细胞的凋亡。

关键词: 锰; 抗氧化酶; 叉头蛋白转录因子O3a; 细胞死亡调节子; 凋亡

中图分类号: R595

文献标识码: A

Effect of maternal chronic exposure of low-dose manganese on spermatogenic cells of offspring rats*

Qian-xing Wang¹, Ming-ming Yu¹, Xian-ping Zhang²

(1. Department of Cell Biology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China; 2. Reproductive Medicine Center, Loudi Central Hospital, Loudi, Hunan 422907, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of chronic exposure of low-dose manganese chloride on spermatogenic cells of offspring rats. **Methods** Totally 32 healthy female SD rats were randomly divided into control group, low dose group, middle dose group and high dose group ($n = 8$). Rats in manganese exposure group received different doses of manganese chloride (2, 4, and 8 mg/kg in low dose group, middle dose group and high

收稿日期: 2017-03-24

* 基金项目: 贵州省自然科学基金 (No.: 黔科合J字[2011]2282)

dose group, respectively) once a day, 5 days a week in a total of 8 weeks. Rats in control group were treated with saline for 8 weeks. After mating with normal male SD rats, female rats were continuously exposed to manganese during pregnancy and lactation as mentioned above. Testes of 12 week old offspring were harvested. HE staining was performed to observe the structure of seminiferous tubules. The expression levels of FoxO3a, Bim, Caspase-9 mRNA, and protein in testis were identified by real-time PCR, immunohistochemistry, and Western blotting. Apoptosis rate of spermatogenic cells was detected by TUNEL. **Results** Morphological changes of seminiferous tubules in manganese exposure groups were observed including decrease of spermatogenic cell, disorder of spermatogenic cell structure and reduction of mature sperms. Abnormality was more severe along with increase of manganese exposure. Density and activity of sperms decreased while deformity ratio increased significantly in middle and high dose groups when compared with control group ($P < 0.05$). Activity of SOD, CAT and GSH-Px in the testis of rats exposed to manganese decreased dramatically while levels of MDA and ROS increased in dose dependent manner when compared with control group ($P < 0.05$). The expression levels of FoxO3a, Bim and Caspase-9 increased in dose dependent manner when compared with control group ($P < 0.05$). Apoptosis of spermatogenic cells in manganese exposed groups were significantly enhanced in dose dependent manner compared with control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Chronic maternal exposure of manganese leads to apoptosis of spermatogenic cells in offspring rats through activating oxidation mediated Caspase-9 signaling pathway.

Keywords: manganese; FOXO3a; Bim; apoptosis

男性不育是临床上常见疾病之一。由于环境污染、不良生活习惯等的影响,男性精子数、精子活动率或正常精子率等均呈下降趋势^[1-3],已经引起学界的广泛关注。

环境锰暴露是引发男性生殖障碍的一个重要因素。作为环境中广泛存在的重金属,锰在采矿、干电池生产、无铅汽油以及杀虫剂等方面的广泛使用加大了锰污染的程度,提高人类的锰暴露水平。而过量锰的蓄积则可产生生殖毒理作用。研究表明,锰可通过血睾屏障而蓄积于睾丸,引起男性精液浓度、精子活力、精子活率及精子总数降低,鸡、大鼠生精细胞凋亡等一系列生殖毒性^[4-7]。但上述关于动物实验的研究大多为急性或亚急性锰染毒,对于慢性染毒后对雄性子代的生殖毒理效应尚未见报道。

锰的毒性机制之一是增加体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平,发生氧化应激损伤,导致细胞凋亡^[8-11]。叉头蛋白转录因子 O 3a (forkhead-like protein O 3a, FoxO3a)属于叉头框转录因子家族(forkhead box, FOX) O 亚族成员,是氧化应激中多个信号通路的交汇点,在细胞增殖、细胞周期阻滞、ROS清除和细胞凋亡诱导中发挥重要作用,已成为氧化应激损伤研究的一个热点^[12-15]。锰对子代雄性大鼠的生殖毒性是否也通过该基因起作用,目前也未见报道。

因此本文对母代大鼠进行长期低剂量锰染毒,探索其对子代大鼠睾丸氧化应激状态、FOXO3a 表达及生精细胞凋亡的影响,明确长期低剂量锰染毒对子代大鼠生精细胞是否具有损伤作用及其分子机制,为锰

中毒的预防和治疗、环境锰暴露的安全限量的确定提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 满月无特定病原体(SPF)级雌性 SD 大鼠(90~120 g),购于第三军医大学医学实验动物中心(许可证号:SCXK(渝)2012-0005),随机分为 4 个组,即对照组,低、中、高剂量组,每组 8 只。每天 12 h 光照,12 h 黑暗,温度(21 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,自由进食和饮水。所做实验获得遵义医学院伦理学委员会批准。

1.1.2 主要试剂 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (分析纯)(购于中国医药集团上海化学试剂公司),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性、丙二醛(malonaldehyde, MDA)含量及 ROS 水平测定试剂盒(购自南京建成生物工程研究所),原位细胞凋亡检测试剂盒(购于美国 Roche 公司),RNAiso Plus(购于日本 TaKaRa 公司),TransStart Tip Green qPCR Super Mix(购于北京全式金生物技术有限公司),FoxO3a 和半胱天冬酶 9(cysteinylaspartatespecific protease 9, Caspase-9)兔单抗(购于英国 Abcam 公司),与 Bcl-2 相互作用的细胞死亡调节子(Bcl-2 interacting mediator of cell death, Bim)兔单抗(购于美国 Cell Signal 公司),GAPDH 鼠单抗(购于美国 Proteintech 公司),实时荧光定量

聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 扩增引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成 (见表 1)。

表 1 qRT-PCR 扩增引物序列

基因名称	引物序列	片段长度 /bp
FoxO3a	正向: 5'-ACCTGTCTACGCTGACCTG-3'	132
	反向: 5'-CTGTTGCTGTCGCCCTTATC-3'	
Bim	正向: 5'-TTACACGAGGAGGGCGTTT-3'	171
	反向: 5'-CCATACCAGACGGAAGATGAA-3'	
GAPDH	正向: 5'-GACATGCCGCTGGAGAAAC-3'	151
	反向: 5'-AGCCCAGGATGCCCTTACT-3'	

1.2 方法

1.2.1 动物模型复制 参照文献 [16-17], 雌性 SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 分别注射生理盐水和 2、4 和 8 mg/kg 氯化锰, 共计 8 周, 与性成熟期雄性 SD 大鼠按 1 : 3 合笼交配, 于次日 8 : 00 见阴栓者视为妊娠第 1 天, 妊娠后分开单独饲养。雌鼠在妊娠期 (3 周) 和哺乳期 (3 周) 继续染毒, 总染毒时间共计 14 周。各组动物给药途径均采用腹腔注射, 1 次 /d, 5 d/ 周。每 3 天测大鼠体重以监测妊娠情况和调整 MnCl₂ 用量。

1.2.2 标本采集 每组随机取 8 只 12 周龄子代雄性大鼠断头处死, 分离双侧睾丸和附睾。左侧睾丸收集于无 RNA 酶的 EP 管中用于 qRT-PCR 和 Western blot 实验; 右侧睾丸用 4% 多聚甲醛溶液固定用于 HE 染色、TUNEL 和免疫组织化学 (免疫组化) 实验。附睾用于精液质量检测。

1.2.3 精液质量检测 切除附睾尾部, 纵向切 3 个切口, 放入盛有 2 ml 预热 PBS 的离心管中, 37℃ 水浴 20 min。取 50 μl 精子悬液光镜下检测精子密度、活动率和畸形率。

1.2.4 睾丸组织 SOD、CAT 和 GSH-Px 活力、MDA 含量和 ROS 水平检测 准确称取少量睾丸组织, 剪碎, 加入生理盐水, 超声粉碎制备 10% 组织匀浆, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液按试剂盒说明书分别测定 SOD (WST-1 法)、CAT (可见光法)、GSH-Px (二硫代二硝基苯甲酸法) 活力、MDA 含量 (硫代巴比妥酸法) 及 ROS 水平 (化学荧光法)。考马斯亮蓝法测定相应组织蛋白含量。

1.2.5 qRT-PCR 检测大鼠睾丸组织 FoxO3a、Bim mRNA 表达 RNAiso Plus 提取子代大鼠睾丸总

RNA, 分光光度计测定 OD260/OD230、OD260/OD280 进行 RNA 纯度鉴定和浓度测定。取 2 μg 总 RNA 进行两步法逆转录反应合成 cDNA, 反应条件为 42℃ 孵育 30 min、85℃ 灭活 5 s、4℃ 冷却 10 min。按试剂盒说明书进行 qRT-PCR, 反应体系为 20 μl, 反应程序为: 94℃ 预变性 30 s, 然后再 94℃ 变性 5 s, 60℃ 退火和延伸 30 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 为内参, 以 2^{-ΔΔCt} 值作为目的基因的相对表达量。每个样品设置 3 管重复, 取 3 次的平均值计算各基因 mRNA 的相对表达量。

1.2.6 免疫组化法检测大鼠生精细胞 FoxO3a 和 Bim 蛋白表达 大鼠睾丸经 4% 多甲醛固定 24 h 后冠状切面制备石蜡切片 (4 μm)。石蜡切片常规脱蜡、水化, 入 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶, PBS 冲洗后高压修复 2 min (FoxO3a) 或微波中高火修复抗原 20 min (Bim), PBS 冲洗 3 次 × 5 min, 正常山羊血清封闭。分别滴加 FoxO3a (1 : 50) 和 Bim (1 : 100) 兔单抗, 4℃ 过夜。PBS 冲洗 3 次 × 5 min, 加生物素标记羊抗兔 IgG 在 37℃ 反应 30 min, PBS 冲洗 3 次 × 5 min。DAB 显色, 苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 中性树胶封片, 光学显微镜观察。以 PBS 代替一抗作为阴性对照组。

1.2.7 Western blot 检测大鼠生精细胞 FoxO3a 和 Bim 蛋白表达 取睾丸组织 100 mg 加入 500 μl RIPA 裂解液, 同时加入 PMSF 和蛋白磷酸酶抑制剂 (与裂解液的比例为 1 : 100), 4℃ 下电动匀浆 6 次 × 5 s, 间隔 5 s。2 500 r/min, 4℃ 离心 15 min, 小心吸取上清液, BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μg 蛋白变性后上样, 10% 分离胶 120 V 恒压电泳后, 100 mA 恒流转印至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 洗膜后分别加入一抗 (FoxO3a 为 1 : 5 000, Bim 为 1 : 1 000, GAPDH 为 1 : 4 000), 4℃ 过夜。洗膜后加入 HRP 标记的二抗, 37℃ 孵育 1 h, 再次洗膜后, 加入 ECL 发光液发光、显影、定影。将胶片扫描, 用 Image Pro Plus 软件分析目的条带的光密度值, 以目的条带 /GAPDH 的积分光密度值之比作为目的蛋白相对表达量。

1.2.8 TUNEL 检测生精细胞凋亡 大鼠睾丸冠状面石蜡切片 (4 μm) 常规脱蜡, 梯度乙醇水化至蒸馏水。微波 350 W 加热 3 min 进行抗原修复, 自然放置冷却到室温。0.3% 的 H₂O₂- 甲醇溶液中封闭 10 min, PBS 冲洗。滴加 50 μl TUNEL 反应液 (包括 5 μl 末端转移酶溶液和 45 μl 标记反应液), 37℃ 湿盒避光温育 1 h。PBS 冲洗 3 次 × 5 min。加转化剂 POD, 37℃ 反

应 30 min, PBS 冲洗, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 苏木素复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光学显微镜观察。同时设阴性对照 (只加标记反应液) 和阳性对照 (10 $\mu\text{g/ml}$ 的 DNAase I 预处理)。每张切片随机选择 10 个生精小管, 计数凋亡信号阳性的生精细胞数占总生精细胞数的比例, 即为凋亡指数 (apoptosis index, AI)。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较行单因素方差分析, 两两比较用 Tamhane 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 睾丸组织的形态学变化

对照组睾丸曲细精管管腔大小基本一致、各级生

精细胞有序排列于管壁上, 着色均匀, 管腔内可见大量精子细胞和成熟精子。各锰染毒组睾丸生精小管呈现不同程度的形态学改变。随着锰染毒剂量的增加, 生精细胞层数逐渐减少, 各级生精细胞排列紊乱、数量减少或缺如, 管腔内成熟的精子数目明显减少。见图 1。

2.2 长期低剂量锰染毒对子代大鼠精液的影响

各组大鼠精子密度、精子活动率及畸形率比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组与低剂量组精子密度、精子活动率和畸形率差异无统计学意义, 但中、高剂量组精子密度、精子活动率下降, 精子畸形率上升, 且随锰染毒剂量的增加逐步递进变化 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 睾丸组织抗氧化酶活性、MDA 含量和 ROS 水平的变化

各组大鼠睾丸 SOD、CAT 及 GSH-Px 活性, MDA

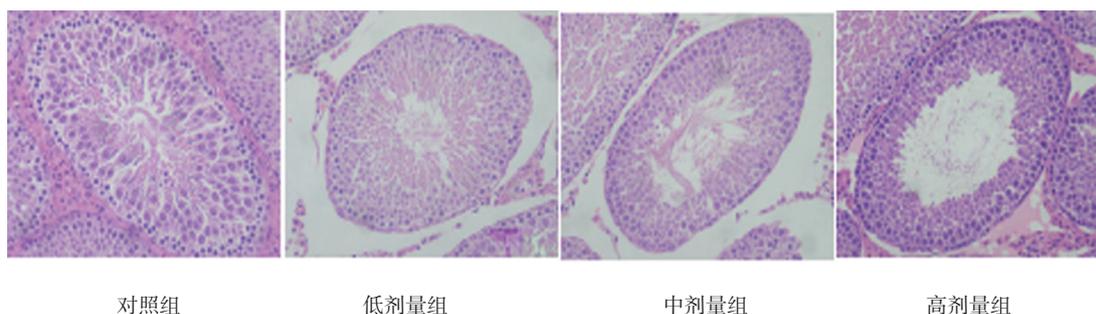


图 1 子代大鼠睾丸组织 (HE \times 400)

表 2 各组大鼠精液质量分析结果 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	精子密度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	精子活动率 /%	畸形率 /%
对照组	115.164 \pm 25.421	89.422 \pm 4.530	15.874 \pm 5.141
低剂量组	107.320 \pm 10.144	81.651 \pm 5.868	20.654 \pm 4.350
中剂量组	84.227 \pm 14.008 ¹⁾²⁾	54.163 \pm 7.122 ¹⁾²⁾	41.076 \pm 6.775 ¹⁾²⁾
高剂量组	53.157 \pm 5.437 ¹⁾²⁾³⁾	31.467 \pm 9.025 ¹⁾²⁾³⁾	58.465 \pm 5.137 ¹⁾²⁾³⁾
F 值	78.492	46.268	66.427
P 值	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.01$; 2) 与低剂量组比较, $P < 0.01$; 3) 与中剂量组比较, $P < 0.05$

含量及 ROS 水平比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 低剂量组睾丸组织 CAT 含量降低 ($P < 0.01$), 中、高剂量组则 3 种抗氧化酶活性均降低 ($P < 0.05$); 各锰染毒组比较, SOD、CAT 及 GSH-Px 活性均随锰染毒剂量的增加而逐渐降低 ($P < 0.05$)。

与对照组比较, 各锰染毒组 MDA 含量和 ROS 水

平均升高 ($P < 0.05$); 各锰染毒组比较, 随锰染毒剂量的增加, MDA 含量和 ROS 水平逐渐升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 长期低剂量锰染毒对子代大鼠生精细胞 FoxO3a 和 Bim mRNA 及蛋白表达的影响

各组子代大鼠睾丸组织 FoxO3a 和 Bim mRNA 表

表 3 各组大鼠睾丸 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性, MDA 含量及 ROS 水平比较 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	SOD/ (u/mg protein)	CAT/ (u/mg protein)	GSH-Px/ (u/mg protein)	MDA/ (nmol/mg protein)	ROS/ (荧光强度)
对照组	142.325 ± 5.624	9.678 ± 1.143	30.254 ± 5.718	0.647 ± 0.119	210.316 ± 37.578
低剂量组	127.653 ± 6.757	7.317 ± 1.846 ¹⁾	28.779 ± 4.617	0.857 ± 0.251 ¹⁾	335.674 ± 41.121 ¹⁾
中剂量组	90.208 ± 4.317 ¹⁾²⁾	4.332 ± 0.767 ¹⁾²⁾	21.320 ± 5.008 ¹⁾²⁾	1.726 ± 0.507 ¹⁾²⁾	452.746 ± 37.547 ¹⁾²⁾
高剂量组	71.424 ± 7.678 ¹⁾²⁾³⁾	1.269 ± 0.317 ¹⁾²⁾³⁾	17.447 ± 3.266 ¹⁾²⁾³⁾	2.523 ± 0.448 ¹⁾²⁾³⁾	547.249 ± 41.107 ¹⁾²⁾³⁾
F 值	94.613	16.487	24.669	36.567	197.347
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, P < 0.01; 2) 与低剂量组比较, P < 0.01; 3) 与中剂量组比较, P < 0.05

达比较, 差异均有统计学意义 (P < 0.05)。与对照组比较, 除低剂量组 Bim mRNA 外, 各锰染毒组 FoxO3a 和 Bim mRNA 表达量均增加, 且随锰染毒剂量的增加而增加 (P < 0.05)。见表 4。

免疫组化结果显示, FoxO3A、Bim 被染成棕黄色或棕褐色, 主要表达于各级生精细胞的细胞质, 其染

色强度随锰染毒剂量的增加而增加。见图 2。

各组子代大鼠睾丸组织 FoxO3a 和 Bim 蛋白表达比较, 差异均有统计学意义 (P < 0.05)。与对照组比较, 各锰染毒组 FoxO3A 和 Bim 蛋白表达量均增加 (P < 0.05), 且均随锰染毒剂量的增加而增加 (P < 0.05)。见图 3。

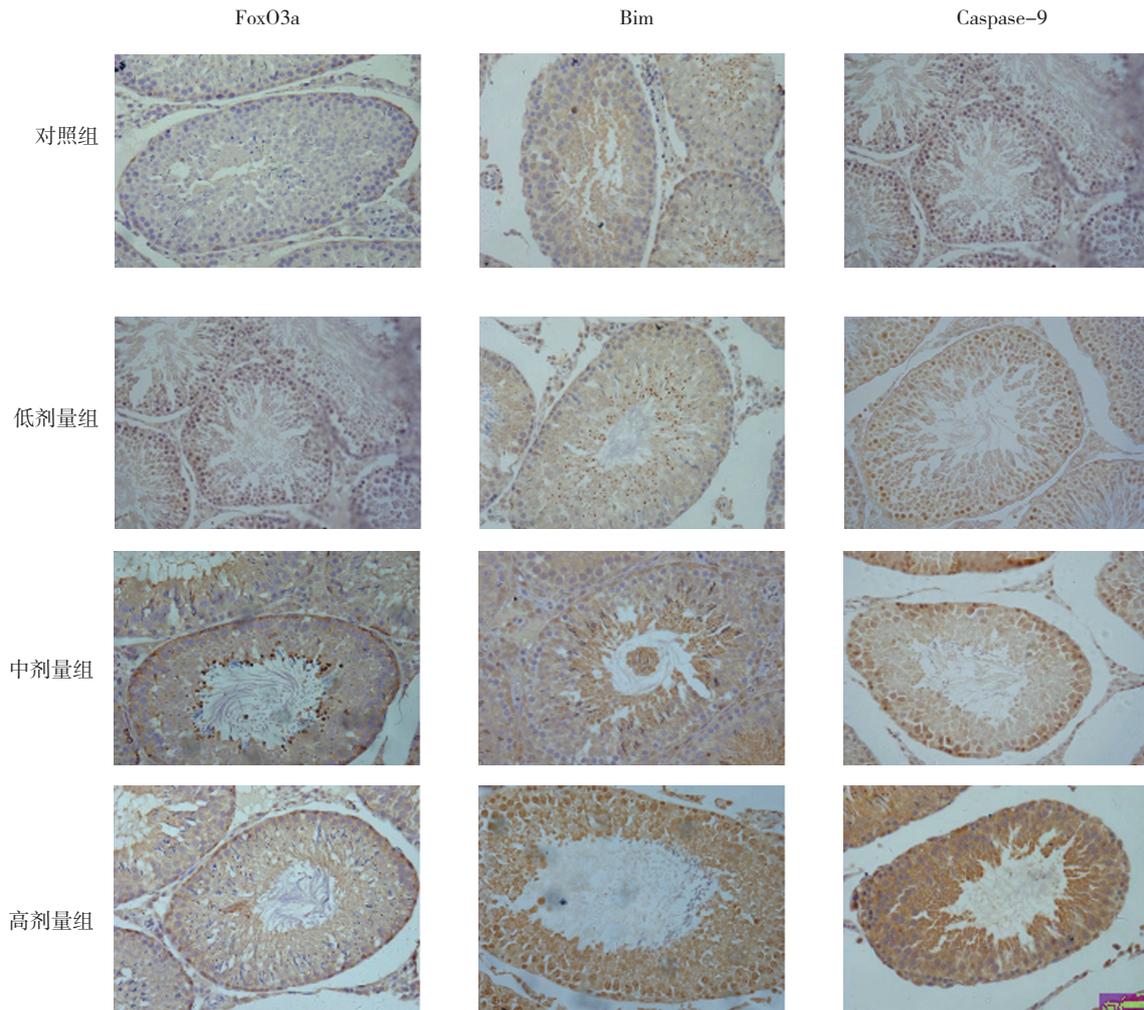


图 2 子代大鼠生精细胞 FOXO3a、Bim 和 Caspase-9 蛋白表达 (SP × 400)

表 4 子代大鼠睾丸组织 FoxO3a、Bim 和 Caspase-9 mRNA 表达的定量和凋亡指数分析 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

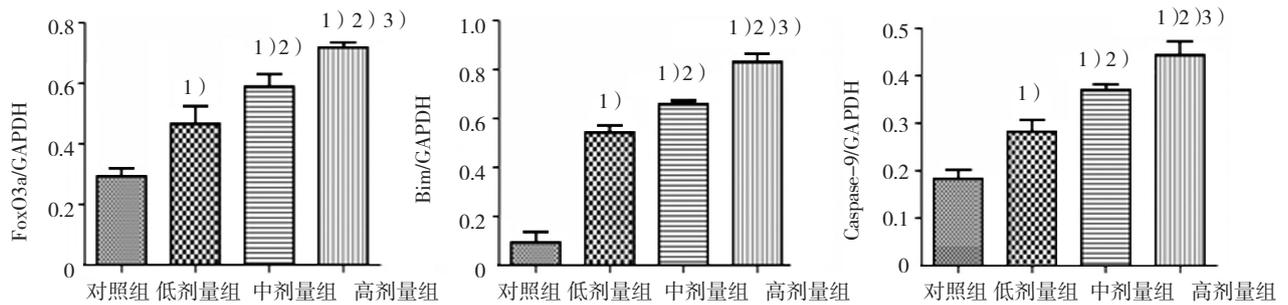
组别	FoxO3a	Bim	Caspase-9	AI/%
对照组	1.0	1.0	1.0	5.72 ± 0.53
低剂量组	1.4170 ± 0.227 ¹⁾	1.250 ± 0.081	1.747 ± 0.097 ¹⁾	9.052 ± 1.021 ¹⁾
中剂量组	2.253 ± 0.102 ¹⁾²⁾	1.997 ± 0.236 ¹⁾²⁾	2.497 ± 0.064 ¹⁾²⁾	15.870 ± 1.311 ¹⁾²⁾
高剂量组	3.033 ± 0.178 ¹⁾²⁾³⁾	2.581 ± 0.170 ¹⁾²⁾³⁾	3.297 ± 0.366 ¹⁾²⁾³⁾	19.594 ± 1.120 ¹⁾²⁾³⁾
F 值	21.363	14.168	24.245	66.467
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, P<0.05; 2) 与低剂量组比较, P<0.05; 3) 与中剂量组比较, P<0.05

2.5 长期低剂量锰染毒对子代大鼠睾丸 Caspase-9 表达和生精细胞凋亡的影响

各组子代大鼠睾丸组织 Caspase-9 mRNA 及蛋白表达比较, 差异均有统计学意义 (P<0.05)。与对照组比较, 各锰染毒组睾丸细胞 Caspase-9 mRNA 和蛋白表达量均升高, 且随锰染毒剂量的增加逐渐增加

(P<0.05)。见表 4 和图 3。



1) 与对照组比较, P<0.05; 2) 与低剂量组比较, P<0.05; 3) 与中剂量组比较, P<0.05

图 3 子代大鼠生精细胞 FOXO3a、Bim 和 Caspase-9 的蛋白表达

TUNEL 结果显示, 各组大鼠均可见生精细胞凋亡, 凋亡细胞的细胞核呈棕黄色, 主要见于精原细胞、精母细胞和精子细胞。各组子代大鼠生精细胞 AI 比

较, 差异有统计学意义 (P<0.05)。各锰染毒组生精细胞 AI 均高于对照组 (P<0.05), 且随锰染毒剂量的增加而增加 (P<0.05)。见图 4 和表 4。

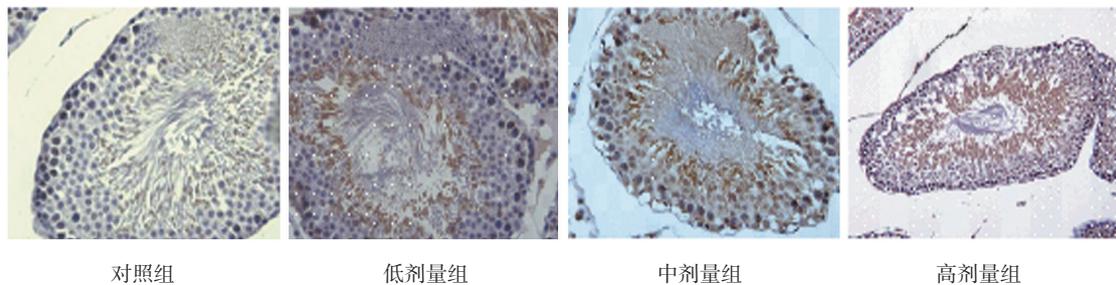


图 4 子代大鼠生精细胞的凋亡 (TUNEL × 400)

3 讨论

毒理学实验所采用的锰染毒途径主要有 3 条: 经

呼吸道的雾化剂染毒^[18-19]、经消化道的食物或饮水染毒^[20-21]、经循环系统的皮下或腹腔注射染毒^[22-23]。呼

吸道染毒可以较为真实地反映锰尘导致的毒性,但该方法需要专门的吸入装置,操作比较繁琐;消化道染毒或循环系统染毒则由于染毒后动物的活动度下降而导致其进水进食的减少,可能影响到最终的锰摄入量;以往采用皮下或腹腔注射法进行锰染毒的剂量体重大多在 7.5 mg/kg 以上,远远大于环境或特定场所的锰暴露水平。因此对锰毒性的职业防护指导意义有限。由于皮下注射容易发生渗漏而导致剂量不准,本实验参照文献^[16-17]的方法,采取较低剂量(2、4、8 mg/kg 体重)氯化锰进行腹腔注射,以评价低剂量长期锰染毒对子代雄性大鼠的生精细胞的影响。

ROS 是需氧细胞进行正常生化反应的产物,包括 O_2^- 、 H_2O_2 及 $HO_2 \cdot OH$ 等,可参与细胞内多种信号转导过程。由于 ROS 具有高氧化性,因此在正常情况下,机体主要由 SOD、CAT 和 GSH-Px 等抗氧化酶来清除 ROS,从而维持细胞内低 ROS 状态,起保护细胞的作用。当机体内 ROS 产生过多或抗氧化酶活性下降,造成机体氧化还原水平失衡时,ROS 可启动脂质过氧化而损伤膜功能和完整性,从而造成氧化应激损伤,启动细胞凋亡程序^[24],而这也正是锰的毒性机制之一^[8-11]。此外,MDA 是脂质过氧化反应的主要代谢产物,其含量的高低代表脂质过氧化的强度和速率,是评价机体氧化应激状态的一个常用指标^[25-26]。本实验发现,长期低剂量锰染毒后,子代大鼠睾丸组织内 SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性均随锰染毒剂量的增加而逐渐降低,而 MDA 含量和 ROS 水平逐渐升高。提示母代大鼠长期低剂量锰染毒后,锰可通过胎盘屏障和血睾屏障进入子代大鼠睾丸内,降低睾丸生精细胞 ROS 清除能力(和)促进生精细胞线粒体产生 ROS,从而增加生精细胞 ROS 水平,引起其脂质过氧化反应,导致氧化损伤^[27]。

作为一种多功能转录因子,FOXO3a 在细胞周期阻滞、细胞凋亡及细胞自噬等过程中起到关键作用^[28]。当机体发生氧化应激时,ROS 可将 FOXO3a 磷酸化、乙酰化修饰来调控其功能。目前,关于 ROS 究竟是促进还是抑制 FOXO3a 活性目前还存在争议^[29-30],但至少可以肯定的是当 ROS 过量产生时,FOXO3a 高表达可以促进前凋亡蛋白 Bim 的表达^[31-32],诱发线粒体外膜通透性增加,引起细胞色素 C 释放^[33],进一步激活 Caspase-9,引起细胞凋亡^[34]。本实验发现,不同剂量氯化锰染毒后,在 mRNA 和蛋白质水平 FoxO3a 的表达均增加,且随着锰染毒剂量的增加而上升。在 mRNA 水平上,对照组与低剂量组 Bim 表达量无差异,但中、高剂量组则升高;

而在蛋白水平上,各锰染毒组 BIM 蛋白表达量均增加,且随锰染毒剂量的增加而递增。低剂量组 Bim mRNA 和蛋白水平表达的不一致性,可能与转录和翻译存在时空间隔有关,也可能是 2 mg/kg 氯化锰染毒剂量相对较小,对 Bim 基因表达的诱导作用不足造成。无论如何,上述结果至少可以说明母鼠长期低剂量锰染毒可以增加子代大鼠睾丸生精细胞的氧化应激状态,诱导 FOXO3a,后者进一步诱导 BIM 的表达,启动生精细胞凋亡程序。

本研究结果显示,Caspase-9 在 mRNA 和蛋白水平的表达量在各锰染毒组均升高,且随锰染毒剂量的增加逐渐增加。同时 TUNEL 结果和精液质量分析结果也显示各锰染毒组大鼠 AI 随锰染毒剂量的增加而上升,精子密度和活动率下降而畸形率上升。结合 HE 染色结果显示的生精小管内生精细胞层数逐渐减少,生精细胞排列紊乱、数量减少的结果。提示长期低剂量锰染毒可以诱导子代大鼠睾丸生精细胞 Caspase-9 的表达,启动 Caspase 级联信号,最终引起生精细胞的凋亡^[34-36]。

综上所述,长期低剂量锰染毒可导致子代大鼠生精细胞凋亡、睾丸功能障碍,其可能机制是通过抑制抗氧化酶活性和促进 ROS 产生,诱导 FOXO3a 和 BIM 表达,从而导致线粒体内细胞色素 c 的释放,启动 Caspase-9 信号通路,最终导致生精细胞的凋亡。

参 考 文 献:

- [1] HUANG C, LI B, XU K, et al. Decline in semen quality among 30,636 young Chinese men from 2001 to 2015[J]. *Fertil Steril*, 2017, 107(1): 83-88.
- [2] JR B E, SETTI A S, BRAGA D P, et al. Decline in semen quality among infertile men in Brazil during the past 10 years[J]. *Int Braz J Urol*, 2015, 41(4): 757-763.
- [3] BURTON A. Study suggests long-term decline in French sperm quality[J]. *Environ Health Perspect*, 2013, 121(2): a46.
- [4] WANG Y X, YANG S, ZHEN H, et al. Associations of urinary metal levels with serum hormones, spermatozoa apoptosis and sperm DNA damage in a Chinese population[J]. *Environ Int*, 2016(94): 177-188.
- [5] WIRTH J J, ROSSANO M G, DALY D C, et al. Ambient manganese exposure is negatively associated with human sperm motility and concentration[J]. *Epidemiology*, 2007, 18(2): 270-273.
- [6] LIU X F, ZHANG L M, GUAN H N, et al. Effects of oxidative stress on apoptosis in manganese-induced testicular toxicity in cocks[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013(60): 168-176.
- [7] 王乾兴,金华,张先平.谷胱甘肽拮抗锰致雄性大鼠生殖损伤的

- 研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2011, 19(9): 537-539.
- [8] CHTOUROU Y, TRABELSI K, FETOUI H, et al. Manganese induces oxidative stress, redox state unbalance and disrupts membrane bound ATPases on murine neuroblastoma cells in vitro: protective role of silymarin[J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(8): 1546-1557.
- [9] CORDOVA F M, AGUIAR A S J R, PERES T V, et al. Manganese-exposed developing rats display motor deficits and striatal oxidative stress that are reversed by Trolox[J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87(7): 1231-1244.
- [10] MADDIRALA Y, TOBWALA S, ERCAL N. N-acetylcysteineamide protects against manganese-induced toxicity in SHSY5Y cell line[J]. *Brain Res*, 2015(1608): 157-166.
- [11] WANG T, LI X, YANG D, et al. ER stress and ER stress-mediated apoptosis are involved in manganese-induced neurotoxicity in the rat striatum in vivo[J]. *Neurotoxicology*, 2015(48): 109-119.
- [12] FERBER E C, PECK B, DELPUECH O, et al. FOXO3a regulates reactive oxygen metabolism by inhibiting mitochondrial gene expression[J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(6): 968-979.
- [13] SENGUPTA A, MOLKENTIN J D, PAIK J H, et al. FoxO transcription factors promote cardiomyocyte survival upon induction of oxidative stress[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(9): 7468-7478.
- [14] WANG R, ISLAM B N, BRIDGES A, et al. cGMP signaling increases antioxidant gene expression by activating forkhead box O3A in the colon epithelium[J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(2): 377-389.
- [15] DANSEN T B. Forkhead box O transcription factors: key players in redox signaling[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(4): 559-561.
- [16] KIM S I, JANG Y S, HAN S H, et al. Effect of manganese exposure on the reproductive organs in immature female rats[J]. *Dev Reprod*, 2012, 16(4): 295-300.
- [17] TORRENTE M, COLOMINA M T, DOMINGO J L. Effects of prenatal exposure to manganese on postnatal development and behavior in mice: Influence of maternal restraint[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2002, 24(2): 219-225.
- [18] PETTIGLIO M A, HERRERA C, FOSTER M L, et al. Liver metal levels and expression of genes related to iron homeostasis in rhesus monkeys after inhalational manganese exposure[J]. *Data Brief*, 2016(6): 989-997.
- [19] SAPUTRA D, CHANG J, LEE B J, et al. Short-term manganese inhalation decreases brain dopamine transporter levels without disrupting motor skills in rats[J]. *J Toxicol Sci*, 2016, 41(3): 391-402.
- [20] ELBETIEHA A, BATAINEH H, DARMANI H, et al. Effects of long-term exposure to manganese chloride on fertility of male and female mice[J]. *Toxicol Lett*, 2001, 119(3): 193-201.
- [21] WANG L, SHIRAKI A, ITAHASHI M, et al. Aberration in epigenetic gene regulation in hippocampal neurogenesis by developmental exposure to manganese chloride in mice[J]. *Toxicol Sci*, 2013, 136(1): 154-165.
- [22] MILATOVIC D, GUPTA R C, YU Y, et al. Protective effects of antioxidants and anti-inflammatory agents against manganese-induced oxidative damage and neuronal injury[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 256(3): 219-226.
- [23] SANTOS D, BATORÉU M C, TAVARES de ALMEIDA I, et al. Evaluation of neurobehavioral and neuroinflammatory endpoints in the post-exposure period in rats sub-acutely exposed to manganese[J]. *Toxicology*, 2013, 314(1): 95-99.
- [24] POLJSKAK B, ŠUPUT D, MILISAV I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013(2013): 956792.
- [25] DING X, WANG D, LI L, et al. Dehydroepiandrosterone ameliorates H₂O₂-induced Leydig cells oxidation damage and apoptosis through inhibition of ROS production and activation of PI3K/Akt pathways[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016(70): 126-139.
- [26] BEGENIK H 1, SOYORAL Y U, ERKOC R, et al. Serum malondialdehyde levels, myeloperoxidase and catalase activities in patients with nephrotic syndrome[J]. *Redox Rep*, 2013, 18(3): 107-112.
- [27] YOON H, KIM D S, LEE G H, et al. Apoptosis induced by manganese on neuronal SK-N-MC cell line: Endoplasmic reticulum (ER) stress and mitochondria dysfunction[J]. *Environ Health Toxicol*, 2011(26): e2011017.
- [28] NHO R S, HERGERT P. FoxO3a and disease progression[J]. *World J Biol Chem*, 2014, 5(3): 346-354.
- [29] COSKUN D, OBAKAN P, ARISAN E D, et al. Epibrassinolide alters PI3K/MAPK signaling axis via activating Foxo3a-induced mitochondria-mediated apoptosis in colon cancer cells[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 338(1): 10-21.
- [30] PENG C, MA J, GAO X, et al. High glucose induced oxidative stress and apoptosis in cardiac microvascular endothelial cells are regulated by FOXO3a[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79739.
- [31] SHI C, VICCARO K, LEE H G, et al. Cdk5-FOXO3a axis: initially neuroprotective, eventually neurodegenerative in Alzheimer's disease models[J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(9): 1815-1830.
- [32] MARZI L, COMBES E, VIÉ N, et al. FOXO3a and the MAPK p38 are activated by cetuximab to induce cell death and inhibit cell proliferation and their expression predicts cetuximab efficacy in colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2016, 115(10): 1223-1233.
- [33] HAGENBUCHNER J, KUZNETSOV A, HERMANN M, et al. FOXO3-induced reactive oxygen species are regulated by BCL2L1 (Bim) and SESN3[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 5): 1191-1203.
- [34] ZHANG L, SANG H, LIU Y, et al. Manganese activates caspase-9-dependent apoptosis in human bronchial epithelial cells[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2013, 32(11): 1155-1163.

[35] VAUX D L. Apoptogenic factors released from mitochondria[J].

Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(4): 546-550.

[36] WANG Y H, YANG X L, HAN X, et al. Mimic of manganese

superoxide dismutase to induce apoptosis of human non-Hodgkin lymphoma Raji cells through mitochondrial pathways[J]. Int

Immunopharmacol, 2012, 14(4): 620-628.

(王荣兵 编辑)

《中国现代医学杂志》投稿须知

《中国现代医学杂志》创刊于1991年, 期刊号ISSN1005-8982/CN43-1225/R, 旬刊, 系中国科技论文统计源期刊、北大中文核心期刊、中国核心学术期刊(RCCSE)(A-)及湖南省十佳期刊, 被中国知网、万方数据库、超星域出版、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等国内外多个检索系统收录, 公开发行。本刊是中华人民共和国教育部主管的综合性医学学术期刊, 以服务于广大医药卫生科技人员, 促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨。由中南大学、中南大学湘雅医院主办, 湖南省湘雅医学期刊社有限公司出版。

本刊刊登的论文内容涉及基础医学、临床医学、预防医学及医学相关学科的新理论、新技术、新成果以及医学信息、动态等。文稿须具有科学性、创新性、实用性。文字要求准确、通顺、精练。本刊设基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。学术报告类论文字数控制在3000字以内; 病例报告类论文字数控制在800字以内。稿件格式为题名、作者姓名、作者单位、邮编、摘要(具体要求见投稿细则)、关键词、正文、参考文献。

本刊对国家级的科研成果或阶段性成果及部级以上课题项目的进展报道实行速审快发。一般稿件2个月内有评审结果, 录用后等待发表。请作者自行登录本刊网站(www.zgxdyx.com)查询稿件处理结果, 恕不另行通知。稿件发表后, 赠当期杂志2本。

投稿细则

1. 文稿力求文字精练、准确、通顺; 文题简明、醒目, 能反映出文章的主题; 勿用不规范字。请作者仔细校对全文, 并认真复核数据。摘要应与正文内药物剂量、病例数、百分比等数据一致。如有错误, 将降低审稿人和编辑对该文真实性的信任度, 导致退稿。	6. 所有栏目需附关键词3~5个, 其中临床报道、学术报告和病例报告只需中文关键词, 其余栏目需中英文关键词齐全。
2. 文题中不使用英文缩略语。摘要中一般也不使用英文缩略语, 如因为该词出现多次而需要使用时, 应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文缩略语(此处不需写出英文全称)。正文中首次使用英文缩略语时, 也应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文全称及英文缩略语。此规则对已公知、公用的缩略语除外。	7. 照片、图片(黑白原始照片必须清晰, 大小5cm×7cm), 须在文章内标明其位置, 并附标题, 显微镜下照片应标明放大倍数, 图背面标明作者姓名、文章编号、图序及照片方向(上、下)。
3. 单位介绍信原件, 注明稿件非一稿多投。采用网上投稿方式时, 请将该介绍信照片插入提交的论文Word文稿第一页。	8. 所有栏目参考文献须引用10条以上, 以近5年文献为主。引用期刊的格式为: 作者·文题·刊名, 年, 卷(期): 起止页码.; 引用书籍的格式为: 著者·书名·版次·出版地: 出版社, 年份: 起止页码.; 每条参考文献应列出作者姓名, 如超过3名者, 则在3名作者后写等。中文格式: 解勤之, 陈方平, 蹇在伏, 等. 红细胞收缩: 血小板无力症的可能代偿机制[J]. 中国医学工程, 1998, 8(11): 3-5. 英文格式: SZEMAN B, NAGY G. Changes in cognitive function in patient with diabetes mellitus[J]. Orv Hetil, 2012, 153(9): 323-329.
4. 所有栏目投稿的中英文论文题目、作者姓名及作者单位需齐全(每位作者只标注一个主要单位, 其余的可以作者简介方式在首页左下角注明, 标注通信作者的必须留下通信作者本人的电话或电子邮箱, 以便核实)。	9. 综述第一作者须有副高以上职称证明(参考文献35条以上)。
5. 栏目对中英文摘要的要求: 论著、临床论著、新进展研究需中英文摘要齐全, 并按目的、方法、结果、结论四要素书写, 200~500个字。综述需中英文摘要齐全, 不需按四要素书写。临床报道和学术报告只需中文摘要, 病例报告无需中英文摘要。	10. 凡国家、省部级自然科学基金、博士基金、863计划及国家重点实验室项目的论文, 请注明基金名称及编号并附相关项目批准文件或任务书复印件, 可优先发表。项目主要负责人为通信作者。采用网上投稿方式时, 请将相关证明材料的照片插入提交的论文Word文稿最后一页。