

甲醛对雄性 Wistar 大鼠生殖毒性的影响研究

唐宝定, 王 勋, 唐 灿, 张 鼎, 吴守伟, 李蕾娜

[摘要] **目的:** 探索不同剂量的甲醛对雄性大鼠精子畸形率、骨髓微核率、血清睾酮水平以及睾丸组织的影响。 **方法:** 选择性成熟 Wistar 大鼠 40 只随机分成 5 组: 0.9% 氯化钠注射液组 (阴性对照组) 和高、中、低剂量甲醛染毒组 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 及 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 环磷酰胺组 (阳性对照组)。通过腹腔注射染毒 1 周, 测定血清睾酮水平, 染毒结束后 2 d 摘眼球采血, 颈椎脱臼法处死大鼠, 统计精子畸形率和骨髓微核率, 对大鼠睾丸做石蜡组织切片, 观察睾丸组织损伤情况。 **结果:** 精子畸形率: 与阴性对照组比较, 中、低剂量染毒组精子畸形率上升 ($P < 0.05$), 高剂量染毒组和阳性对照组精子畸形率上升更明显 ($P < 0.01$); 骨髓微核率: 与阴性对照组比较, 中、低剂量染毒组骨髓微核率上升不明显 ($P > 0.05$), 高剂量染毒组和阳性对照组上升明显 ($P < 0.01$); 血清睾酮水平: 与阴性对照组比较, 高、中、低剂量染毒组和阳性对照组血清睾酮水平均明显降低 ($P < 0.01$)。睾丸石蜡切片显示高剂量染毒组组织损伤严重。 **结论:** 甲醛可以引起雄性大鼠精子畸形, 增加骨髓微核率, 降低血清睾酮水平, 对雄性大鼠具有一定的生殖及遗传毒性。

[关键词] 生殖; 精子畸形率; 微核率; 血清睾酮; 甲醛

[中图法分类号] R 339.2

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.02.003

Effect of formaldehyde on the reproductive toxicity in male Wistar rats

TANG Bao-ding, WANG Xun, TANG Can, ZHANG Ding, WU Shou-wei, LI Lei-na

(Department of Bioscience, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of different doses of formaldehyde on the teratosperm rate, bone marrow micronucleus rate, level of serum testosterone and testicular tissue in male Wistar rats. **Methods:** Forty sexual maturity male Wistar rats were randomly divided into the negative control group (treated with normal saline), low-dose formaldehyde poisoning group (treated with $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), mid-dose formaldehyde poisoning group (treated with $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), high-dose formaldehyde poisoning group (treated with $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and positive control group (treated with $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ cyclophosphamide). The levels of serum testosterone in rats were measured after 1 week of intraperitoneal injection. After 2 days of poisoning, the eyeball was removed, the blood sample was collected, and all rats were sacrificed by cervical dislocation method. The teratosperm rate and micronucleus rate in all rats were analyzed. The testicle morphology and histopathology were analyzed by paraffin embedded section. **Results:** Compared with the negative control group, the teratosperm rate in low- and mid-dose formaldehyde poisoning groups increased ($P < 0.05$), and the increasing degree of which in high-dose formaldehyde poisoning group and positive control group was more obvious ($P < 0.01$). Compared with the negative control group, the increasing degree of micronucleus rate in low- and mid-dose formaldehyde poisoning groups was not obvious ($P > 0.05$), and the increasing degree of which in high-dose formaldehyde poisoning group and positive control group was more obvious ($P < 0.01$). Compared with the negative control group, the levels of serum testosterone in low- and mid-dose formaldehyde poisoning groups decreased ($P < 0.01$), and the decreasing degree of which in high-dose formaldehyde poisoning group and positive control group was more obvious ($P < 0.01$). The paraffin embedded testicle section showed the tissue injury in high-dose formaldehyde poisoning group was severe. **Conclusions:** The formaldehyde can lead to the sperm malformation, increase the bone marrow micronucleus rate, and decrease the levels of serum testosterone in male Wistar rats. The formaldehyde has certain reproductive and genetic toxicity of in male Wistar rats.

[Key words] reproduction; teratosperm rate; micronucleus rate; serum testosterone; formaldehyde

[收稿日期] 2016-07-30 [修回日期] 2017-08-16

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究重点项目 (KJ2017A237)

[作者单位] 蚌埠医学院 生物科学系, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 唐宝定 (1973-), 女, 硕士, 副教授。

甲醛是一种重要的化工原料和有机溶剂, 广泛用于制造树脂、塑料、橡胶、染料和油漆等。由于甲醛挥发度低, 易从家具与装饰材料中缓慢释放而污

[7] MORISCO C, CONDORELLI G, TRIMARCO V, et al. Akt mediates the cross-talk between β -adrenergic and insulin receptors in neonatal cardiomyocytes[J]. Circ Res, 2005, 96(2): 180.

insulin resistance is associated with enhanced insulin signalling [J]. Hypertension, 2002, 40(6): 8

[8] OGIHARA T, ASANO T, ANDO K, et al. Angiotensin II-induced

(本文编辑 刘畅)

染室内空气,经呼吸道进入人体,并对机体的健康产生各种危害。已有研究^[1-5]表明甲醛可降低机体的呼吸功能、神经系统的信息整合功能,影响机体的免疫应答,并具有一定的遗传毒性,但有关其生殖毒性和遗传毒性的研究较少,机制尚不清楚。本研究通过检测甲醛染毒后雄性大鼠精子畸形率、骨髓细胞微核率、血清睾酮水平变化以及睾丸组织学改变来探讨甲醛对生殖健康的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及染毒 甲醛购自国药集团化学试剂有限公司,分析纯;实验动物为我院实验动物中心提供的9周龄健康Wistar雄性大鼠40只,体质量(230±20)g;参照文献资料^[2,6]并参考国内外动物试验的剂量,随机将大鼠分为0.9%氯化钠注射液阴性对照组、低剂量甲醛染毒组(0.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、中剂量甲醛染毒组(2.0 mg·kg⁻¹·d⁻¹)和高剂量甲醛染毒组(20.0 mg·kg⁻¹·d⁻¹)和50 mg·kg⁻¹·d⁻¹环磷酸胺组(阳性对照组),每组各8只,均采用腹腔注射,1次/天,连续7 d。实验结束后2 d,各组小鼠摘取眼球取血,颈椎脱臼法处死大鼠取睾丸组织。

1.2 血清睾酮含量的测定 将取出的血液低温离心分离血清,用酶联免疫法测定样品睾酮含量,具体实验方法按照试剂盒说明进行,试剂盒由上海酶联生物科技有限公司提供。

1.3 大鼠精子畸变实验 染毒后,用颈椎脱臼法处死大鼠,取出睾丸,分离两侧附睾,用眼科剪剖开附睾组织,将附睾尾放入盛有0.9%氯化钠注射液的小平皿中。剪碎组织,用滤网滤除组织碎片后1 000 r/min离心5 min,去上清,沉淀用0.9%氯化钠注射液重悬后涂片,待玻片干燥后用甲醇固定5 min,干燥后用2%伊红水溶液染色1 h。在高倍镜下检查精子形态,每只小鼠检查完整精子1 000条,计数其中畸形的精子,计算精子畸形率。

1.4 骨髓微核计数 处死大鼠后用剪刀剪开大腿皮肤和肌肉,取出股骨,剪掉股骨两端膨大的关节头,然后用注射器吸取5 mL 0.9%氯化钠注射液,插入股骨一端,将骨髓细胞冲洗至10 mL的离心管中。将所获得的细胞悬浮液以1 000 r/min离心10 min,吸去上清液,在沉淀物中加入2滴灭活的小牛血清,制成细胞悬液后涂片,干燥后放入甲醇固定液中固定10 min,取出晾干,用Giemsa染液染色15 min,在显微镜下,每只小鼠骨髓涂片标本计数800个嗜多

染红细胞,包括其中出现微核的细胞数,计算骨髓微核率。

1.5 睾丸石蜡切片 处死小鼠后,剖开腹腔,暴露睾丸,用眼科剪分离睾丸附近的结缔组织,取出完整的睾丸。迅速放入10%的甲醛溶液中固定后常规方法制作睾丸组织石蜡切片,常规HE染色,于400倍光学显微镜下观察观察睾丸组织病理学变化。

1.6 统计学方法 采用单因素方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 甲醛对Wistar大鼠精子畸形率、骨髓微核率以及血清睾酮的影响 精子畸形率:与阴性对照组比较,中、低剂量染毒组精子畸形率上升($P < 0.05$),高剂量染毒组和阳性对照组精子畸形率上升更明显($P < 0.01$);骨髓微核率:与阴性对照组比较,中、低剂量染毒组骨髓微核率上升不明显($P > 0.05$),高剂量染毒组和阳性对照组上升明显($P < 0.01$);血清睾酮水平:与阴性对照组比较,高、中、低剂量染毒组和阳性对照组血清睾酮水平均明显降低($P < 0.01$)(见表1)。

表1 甲醛对Wistar大鼠精子畸形率、骨髓微核率和血清睾酮水平的影响($\bar{x} \pm s; n_i = 8$)

| 分组 | 精子畸形率/% | 骨髓微核率/% | 血清睾酮水平/(ng/mL) |
|-----------|------------------|-------------------|----------------|
| 阴性对照组 | 5.53 ± 1.91 | 0.53 ± 0.36 | 4.56 ± 0.21 |
| 低剂量染毒组 | 8.02 ± 3.04 * | 1.77 ± 0.79 | 3.78 ± 0.46 ** |
| 中剂量染毒组 | 10.35 ± 4.39 * | 2.27 ± 1.73 | 2.83 ± 0.35 ** |
| 高剂量染毒组 | 12.40 ± 5.82 ** | 3.45 ± 1.63 ** | 1.78 ± 0.62 ** |
| 阳性对照组 | 14.13 ± 10.45 ** | 6.37 ± 4.52 ** ΔΔ | 1.56 ± 0.43 ** |
| F | 2.67 | 7.32 | 69.50 |
| P | <0.05 | <0.01 | <0.01 |
| $MS_{组内}$ | 35.047 | 5.367 | 0.189 |

q 检验:与阴性对照组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与低剂量染毒组比较Δ $P < 0.01$

2.2 睾丸石蜡组织切片镜下表现 由光镜照片可见,阴性对照组生精小管界膜完整,基膜内可见排列整齐的各级生精细胞和支持细胞,生精小管内各级生精细胞多在6~8层,管腔内可见精子。各染毒组大鼠生精小管形态结构随染毒浓度发生明显变化:生精小管逐步萎缩,生精上皮逐渐变薄,生精细胞排列疏松及脱落,各个发育分阶段的生精细胞数量明显减少,管腔内生精细胞层数逐步减少,中、高剂量染毒组可见生精细胞之间间隙扩大,管腔内成熟的精子数量逐步减少,偶见分解脱落的生精细胞,局部残留较大的空隙,高剂量染毒组可见生精小管有严

重破坏,生精细胞层数明显减少。阳性对照组生精小管界膜完整,生精细胞层数略有减少,组织间隙可

见大量血细胞,可能为炎性渗出(见图 1)。

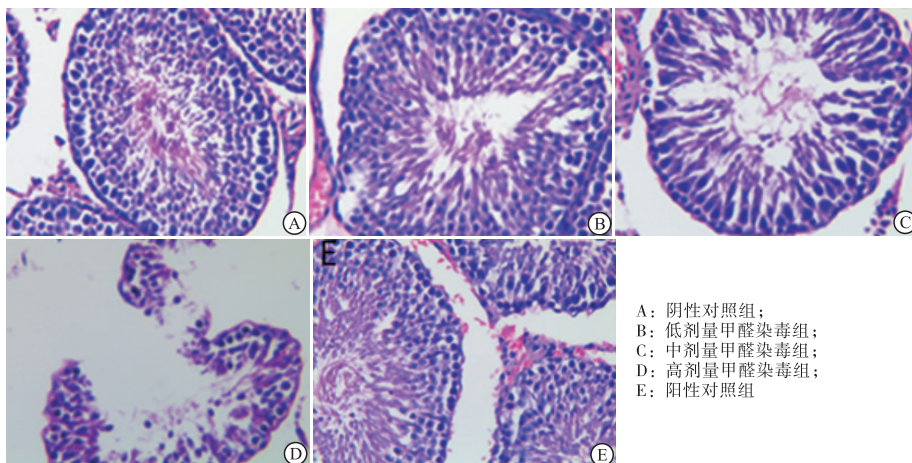


图1 不同染毒浓度睾丸组织切片图(HE染色)

3 讨论

精子畸形试验是通过检测化学物质所致哺乳动物精子形态的改变和畸形数量的增加,以评价其对雄性动物生殖细胞的生殖毒性和潜在诱变性的快速简便的方法^[4]。本研究结果显示,各剂量染毒组雄性大鼠精子畸形率均高于阴性对照组,高剂量染毒组上升更明显,表明甲醛与精子畸形存在着明显的剂量-效应关系。研究^[4,6-8]显示,0.2~20.0 mg·kg⁻¹·d⁻¹甲醛导致睾丸细胞凋亡促进因子 bax 阳性表达率明显增多,而凋亡抑制因子 Bcl-2 的阳性表达率明显低于对照组,提示甲醛染毒后可导致 bax 和 Bcl-2 蛋白表达异常,两者通过各自作用途径,相互协同,共同诱导生殖细胞的凋亡。

微核试验是反映染色体损伤的一种简易、快速方法^[1,9-10]。在本研究中,经高剂量甲醛染毒的大鼠的微核率与阴性对照组相比升高明显。说明甲醛能够引起染色体损伤,从而对生殖细胞产生影响。

睾酮是睾丸间质细胞分泌的类固醇激素,可促进精母细胞转化为精子细胞,从而促进精子发生;HENKEL 等^[11]发现,附睾精子成熟和精子活动力的诱导均需要有生物活性的睾酮的作用。因此,血清睾酮水平能很好的反应睾丸的功能。本研究表明,不同剂量的甲醛染毒后大鼠血清睾酮水平均明显降低;从大鼠睾丸组织切片可知,高剂量染毒组睾丸组织损伤严重,提示甲醛可能通过影响睾丸间质细胞从而影响血清睾酮的水平。

综上所述,甲醛可以损害大鼠睾丸正常的结构和功能,具有一定的生殖毒性,其作用机制还需进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 张娟,朱方艳,尹立红,等.苯和甲醛对 BALB/c 小鼠的联合遗传毒性[J].癌变·畸变·突变,2010,22(4):308.
- [2] 彭国庆,田焱,金鸥.甲醛对雌性大鼠卵巢结构及卵母细胞超微结构和凋亡的影响[J].细胞与分子免疫学杂志,2010,26(9):865.
- [3] PILIDIS GA, KARAKITSIOS SP, KASSOMENOS PA, *et al.* Measurements of benzene and formaldehyde in a medium sized urban environment. In-door/outdoor health risk implications on special population groups[J]. Environ Monit Assess, 2009, 150(1/4):285.
- [4] 邢沈阳,叶琳,王南南.甲醛对雄性小鼠的生殖遗传毒性[J].吉林大学学报(医学版),2007,33(4):716.
- [5] 黄云飞,张静,张晨,等.甲醛对大鼠子代学习记忆及海马 C-fos 蛋白表达影响的研究[J].毒理学杂志,2011,25(3):197.
- [6] 彭国庆,钟才高,张琼,等.甲醛对雌性大鼠卵巢组织 Fas 凋亡途径相关基因表达的影响[J].中南大学学报(医学版),2010,35(4):341.
- [7] OZEN OA, KUS MA, KUS I, *et al.* Protective effects of melatonin against formaldehyde-induced oxidative damage and apoptosis in rat testes: an immunohistochemical and biochemical study[J]. Syst Biol Reprod Med, 2008, 54(4/5):169.
- [8] 翟玲玲,徐兆发,赵剑.甲醛引起淋巴细胞凋亡的试验研究[J].中国误诊学杂志,2011,11(4):813.
- [10] YU G, CHEN Q, LIU X, *et al.* Formaldehyde induces bone marrow toxicity in mice by inhibiting peroxiredoxin 2 expression[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(4):1915.
- [9] SHE Y, LI Y, LIU Y, *et al.* Formaldehyde induces toxic effects and regulates the expression of damage response genes in BM-MSCs[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2013, 45(12):1011.
- [11] HENKEL R, MAASS G, SCHUPPE HC, *et al.* Molecular aspects of declining sperm motility in older men[J]. Fertil Steril, 2005, 84(5):1430.