

林霖,任洪涛,张才,等. 钼对小鼠睾丸 NO 含量及 ATPase 活性的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):195-196.

钼对小鼠睾丸 NO 含量及 ATPase 活性的影响

林霖,任洪涛,张才,李健,王宏伟,杨自军

(河南科技大学动物科技学院,河南洛阳 471003)

摘要:为探讨钼对小鼠睾丸 NO 含量及 ATPase 活性的影响,选用 60 只雄性昆明种小鼠,随机分成对照组、钼 100 组、钼 200 组、钼 400 组共 4 组,即饮水中分别添加 0、100、200、400 mg/L 钼(钼源为钼酸钠),连续染毒 90 d,检测小鼠睾丸组织形态结构,睾丸组织 NO 含量及 ATP 酶活性。结果表明,钼染毒小鼠睾丸生精细胞变性,精子减少,睾丸组织 NO 含量升高,睾丸组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶的活性下降,这可能是钼导致雄性小鼠生殖障碍的毒性机制。

关键词:钼;睾丸;NO;ATP 酶;小鼠

中图分类号:S858.91 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)08-0195-02

钼是动物必需的微量元素,是黄嘌呤氧化酶、醛氧化酶的重要组成部分,参与机体的生长发育及核酸代谢;钼也是一种金属毒物,当过量的钼进入动物机体时,不仅会造成肝、肾等组织脏器损伤^[1-2],还会影响动物生殖系统的结构与功能^[3]。本研究通过检测钼对小鼠睾丸组织 ATP 酶活性和 NO 含量的影响,为探讨钼对雄性小鼠生殖毒作用机制提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 清洁级健康昆明种雄性小白鼠 60 只,体重(16±1) g/只,由河南科技大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 钼酸钠分析纯,天津市化学试剂四厂生产;NO 测试盒、总蛋白测试盒及 ATP 酶试剂盒,均购于南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 健康昆明系雄性小白鼠 60 只,随机分为 4 组,即对照组、钼 100 组、钼 200 组和钼 400 组,每组 15 只,分别饮用由钼酸钠配制、含钼浓度为 0、100、200、400 mg/L 去离子水。小鼠常规饲养,自由取食、饮水,染毒时间 90 d。

1.2.2 睾丸组织切片制作、匀浆的制备及指标检测 染毒 90 d 后,各组取小鼠 5 只,颈椎脱臼处死;打开腹腔,迅速摘取睾丸,去除外膜及血管,用 4℃ 预冷生理盐水洗净血液,滤纸吸干水分。睾丸一侧用中性甲醛固定,常规制作石蜡切片,HE 染色,光镜检测;另一侧精确称重,眼科剪剪碎,加冰浴生理盐水,用玻璃匀浆器制成质量浓度为 10% 的组织匀浆,冷冻离心机 3 000 r/min 离心 10 min,弃去沉淀,取上清液,置 -20℃ 冰箱中保存待测。严格按照试剂盒操作规程,测定睾丸组织液中 NO 含量以及 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} -$

ATP 酶的活力,以 1 h 1 mg 蛋白分解 ATP 酶产生 1 μmol 的 Pi 量为 1 个 ATP 酶活力单位,即 1 μmol/(mg·h)。

1.3 数据处理

数据采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,利用 SPSS 17.0 统计软件,采取单因素方差分析比较组间差异。

2 结果与分析

2.1 钼对小鼠睾丸组织 NO 含量及 ATP 酶活性的影响

由表 1 可见,小鼠睾丸组织 NO 含量随染毒剂量的增加而增加;钼 200 组较对照组差异显著($P < 0.01$),钼 400 组较对照组差异极显著($P < 0.01$);小鼠睾丸组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶的活力随染毒剂量的增加,活性逐渐降低;钼 200 组及钼 400 组 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性降低较对照组差异极显著($P < 0.01$),钼 200 组 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶的活力降低较对照组差异显著($P < 0.05$),钼 400 组 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶的活力降低较对照组差异极显著($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠睾丸组织 NO 含量、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性测定结果

组别	NO (μmol/g)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ [μmol/(mg·h)]	$\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ [μmol/(mg·h)]
对照组	6.61 ± 0.46Bc	6.65 ± 0.55Aa	8.15 ± 0.50Aa
钼 100 组	6.98 ± 0.50Bc	6.18 ± 0.64Aa	7.63 ± 0.54Aa
钼 200 组	7.31 ± 0.64Bb	5.18 ± 0.42Bb	6.91 ± 0.99Ab
钼 400 组	9.46 ± 0.80Aa	5.01 ± 0.61Bb	6.05 ± 0.63Bb

注:同列数据后不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.2 钼对小鼠睾丸组织形态结构的影响

对照组小鼠生精小管内的生精细胞排列规整,管腔内可见大量正常精子(图 1);钼 400 组小鼠生精小管管壁萎缩,部分精原细胞和初级精母细胞变性坏死,生精细胞稀疏,精子数量明显减少(图 2)。钼 100 组、钼 200 组精原细胞和初级精母细胞发生轻度改变,精子数量较对照组减少。

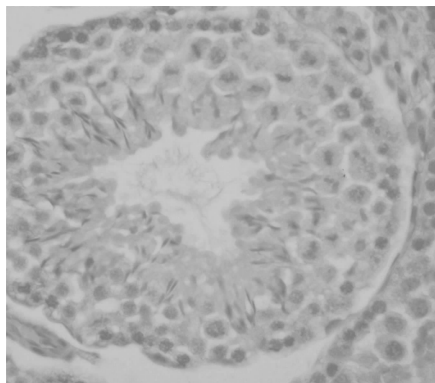
3 结论与讨论

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶普遍存在动物体内。

收稿日期:2013-11-01

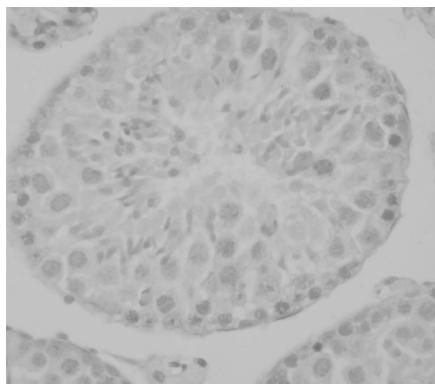
基金项目:河南省教育厅科学基金(编号:2010B230002)。

作者简介:林霖(1972—),男,河南永城人,硕士,实验师,主要从事动物中毒性及营养代谢疾病研究。E-mail:linlin403@163.com。



(H.E 染色, 400×)

图1 对照组小鼠睾丸组织结构



(H.E 染色, 400×)

图2 铅 400 组小鼠睾丸组织结构

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶为细胞膜上跨膜载体蛋白,能将细胞内的 Na^+ 泵出细胞外,同时将细胞外的 K^+ 泵入细胞内, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶不仅能通过水解 ATP 为生命活动提供能量,还对细胞稳态的维持发挥重要作用。 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶通过磷酸化和去磷酸化的变构效应,调控细胞内外的 Ca^{2+} 浓度,维持细胞内 Ca^{2+} 的稳态,对维持细胞内外电位平衡及细胞信使的传递有重要的生物学意义,还可调控细胞内 Mg^{2+} 浓度,影响细胞内 DNA 合成^[4],从而影响组织细胞物质交换及能量代谢。研究发现,多种重金属物质如镉、铅等可以通过抑制 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶的活力来影响动物的生殖功能^[5]。本研究发现,铅染毒小鼠睾丸组织中的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活力下降,铅可抑制雄性小鼠睾丸生精细胞和支持细胞物质交换及能量代谢,引起小鼠睾丸形态结构改变,导致精子生成减少。

NO 是机体内的一种生物信号分子,同时还是一气体类自由基,具有高度的活泼性和极强的氧化反应能力。内源性 NO 由一氧化氮合酶催化 L-精氨酸产生,生理范围内 NO 水

平对机体是有益的;当 NO 生成过多,会产生极强的细胞毒作用,导致睾丸组织细胞脂质过氧化损伤^[6],造成核酸、蛋白、糖类和脂质等细胞成分损伤,从而导致能量代谢受到抑制,三羧酸循环、氧化磷酸化和糖酵解受到干扰,影响精子的正常发生及获能^[7]。Kai 研究发现,过多的自由基攻击可直接破坏 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶结构,导致 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性下降,进一步导致细胞内 Na^+ 增多,从而激活细胞膜上的 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换蛋白,使细胞内 Ca^{2+} 增多, $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性减弱,细胞内钙超载,干扰线粒体氧化磷酸化反应,ATP 生成减少,加重细胞能量耗竭,ATP 酶活性进一步降低^[8]。本研究发现,铅染毒小鼠睾丸中的 NO 生成增多,并且随着铅染毒剂量的增加,睾丸组织 NO 含量也随着增多,睾丸组织细胞损伤程度也越显著,这与文献报道结果^[9]相一致。另外,高浓度的 NO 还可以通过 cGMP 介导作用抑制睾酮分泌^[10],导致生精功能降低,这也可能是高剂量铅影响雄性生殖功能的另一个途径。

综上所述,铅对睾丸的细胞毒作用存在 NO 毒作用机制,并可通过抑制 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶的活性影响生殖功能。

参考文献:

- [1] 肖杰,崔恒敏,杨帆,等. 高铅对雏鸡肾脏的病理损伤和抗氧化功能的影响[J]. 畜牧兽医学报,2010,41(12):1598-1604.
- [2] 周变华,林霖,杨自军,等. 铅对小鼠脂质过氧化损伤及肝 Smac 和 Bax 表达的影响[J]. 中国兽医科学,2012,42(6):617-621.
- [3] 张才,郝贵增,王亚垒,等. 铅对小鼠生殖毒性研究[J]. 河南科技大学学报:自然科学版,2012,33(3):54-57.
- [4] Jørgensen P L. Mechanism of the Na^+, K^+ pump. Protein structure and conformations of the pure ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) - ATPase[J]. Biochimica et Biophysica Acta,1982,694(1):27-68.
- [5] 陈福欣,龚频,金赛,等. 镉损伤睾丸病理变化及蓝莓花青素保护作用[J]. 时珍国医国药,2013,24(3):576-578.
- [6] 康友敏,张健,李健,等. 睾丸内 NO 与 NOS 的研究进展[J]. 军事医学科学院院刊,2002,26(4):301-304.
- [7] 张威,张玮,倪江. 一氧化氮对精子功能的影响[J]. 中华男科学,2000,6(4):255-258.
- [8] Kai Y X. Activation of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ [J]. Biochemical and Biophysical Research Communication,2005,338:1669-1677.
- [9] 郭书周,杨自军,张才. 高铅低铜对小鼠睾丸组织脂质过氧化作用的影响[J]. 河南农业科学,2011,40(11):145-147,151.
- [10] Valenti S, Cuttica C M, Fazzuoli L, et al. Biphasic effect of nitric oxide on testosterone and cyclic GMP production by purified rat leydig cells cultured *in vitro* [J]. International Journal of Andrology,1999,22(5):336-341.

更正:《江苏农业科学》2014 年第 42 卷第 3 期 168-170 页所刊论文《寄生于黄颡鱼鳃上的流行小车轮虫研究》,有两处错误,现予以更正:(1)168 页“摘要”最后一句“……是黄颡鱼的首记录寄主。”改为“……黄颡鱼是流行小车轮虫的首记录寄主。”;169 页“结果和讨论”第一段最后一句“……是黄颡鱼的首记录寄主。”改为“……黄颡鱼是流行小车轮虫的首记录寄主。”特此更正,并向作者和读者致歉。

《江苏农业科学》编辑部