

·基础研究·

本文引用:王磊,石中玉,王安,王艳,李盼飞,卢曦,张淑静,高誉珊,胡素敏.4 Gy⁶⁰Co γ 射线对 Balb/c 小鼠睾丸辐射损伤效应的研究[J].湖南中医药大学学报,2019,39(4):470-474.

4 Gy⁶⁰Co γ 射线对 Balb/c 小鼠睾丸辐射损伤效应的研究

王磊,石中玉,王安,王艳,李盼飞,卢曦,张淑静,高誉珊,胡素敏*
(北京中医药大学中医学院,北京 100029)

[摘要] 目的 探讨4 Gy⁶⁰Co γ 射线对 Balb/c 小鼠睾丸的辐射损伤效应。方法 将60只 Balb/c 小鼠根据体质量按随机数表法分为正常组和辐射组,每组30只。对辐射组小鼠给予4 Gy⁶⁰Co γ 射线一次性全身照射,并分别在照后14、21、35 d取材,检测小鼠睾丸指数,睾丸病理变化,精子浓度、活率、活力、正常形态率、血清激素等指标。结果 与正常组比较,辐射组小鼠睾丸指数在照后14、21、35 d时均显著降低($P<0.001$);辐射后14 d时,辐射组小鼠精子浓度、精子活率、活力以及正常精子形态率均无显著性差异,而小鼠血清睾酮显著升高($P<0.05$);辐射后21 d时,辐射组小鼠精子浓度、精子活率和精子活力以及正常精子形态百分比均显著降低($P<0.01$);照后35 d时,辐射组小鼠精子浓度、精子活率、精子活力以及正常精子形态百分比均显著降低($P<0.001$);4 Gy⁶⁰Co γ 射线对小鼠血清黄体激素和促卵泡素的影响不显著($P>0.05$)。结论 4 Gy⁶⁰Co γ 射线对 Balb/c 小鼠睾丸损伤严重。

[关键词] ⁶⁰Co γ 射线;辐射损伤;电离辐射;睾丸;精子

[中图分类号]R818.74 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.04.008

Study on Radiation Injury of 4 Gy⁶⁰Co γ Ray to Testis of Balb/c Mice

WANG Lei, SHI Zhongyu, WANG An, WANG Yan, LI Panfei, LU Xi, ZHANG Shujing, GAO Yushan, HU Sumin*
(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective** To study the radiation injury of 4 Gy⁶⁰Co γ ray on testis of Balb/c mice. **Methods** A total of 60 Balb/c mice were randomly divided into the normal group and the radiation group according body weight through random number table, with 30 mice in each group. The radiation group was given whole-body exposure to 4 Gy⁶⁰Co γ ray. On the 14th, 21st, 35th day of exposure, the materials were taken to detect the testicular index, pathological changes of testis, sperm concentration, sperm motility, sperm activity, normal sperm forms, serum hormone and other indicators. **Results** Compared with the normal group, the testicular index of irradiated-mice decreased significantly on 14th day, 21th day and 35th day ($P<0.001$); There was no significant difference in sperm concentration, sperm viability, sperm motility of mice and percentage of normal sperm morphology in the radiation group on 14th day and the normal group, while the level of serum testosterone in mice increased significantly ($P<0.05$). After 21 days of radiation, the sperm concentration, sperm viability, sperm motility of mice and percentage of normal sperm morphology of the mice in the radiation group decreased significantly ($P<0.01$). The effect of 4 Gy⁶⁰Co γ ray on serum LH and FSH was not significant ($P>0.05$). **Conclusion** 4 Gy⁶⁰Co γ ray can cause severe damage to the testis of Balb/c mice.

[Keywords] ⁶⁰Co γ ray; radiation damage; ionizing radiation; testicle; semen

[收稿日期]2018-07-15

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(11475035,11675027);北京中医药大学协同创新建设计划项目(522/0100604299);北京中医药大学新奥奖励基金资助课题(2016XAJLJJ-001)。

[作者简介]王磊,男,在读硕士研究生,研究方向:中药基础理论与临床应用研究,辐射损伤的中医药防护研究。

[通讯作者]* 胡素敏,女,教授,博士研究生导师,E-mail:husm@bucm.edu.cn。

睾丸是产生精子和分泌雄性激素的器官。其中精子产生于生精小管内,而雄激素主要由间质细胞合成和分泌^[1],雄激素能促进精子发生和男性生殖器官的正常发育,并维持男性的第二性征和性功能。同时睾丸是一个辐射敏感器官,极易遭受电离辐射的损伤,以致生精功能障碍,更有甚者可致永久不育。本文主要探讨电离辐射对小鼠睾丸的损伤效应,为揭示急性电离辐射致小鼠睾丸损伤的机制提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 实验动物及分组

雄性 Balb/c 小鼠 60 只,SPF 级,体质量(20±2) g,由北京维通利华实验动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK(京)2016-0011。所有 Balb/c 小鼠饲养于北京中医药大学 SPF 级实验动物房,饲养温度(23±2) °C,湿度 40%~60%,12 h 交替光照模拟昼夜时间,自由饮食。将小鼠根据体质量按随机数表法分为正常(NC)组和辐射(IR)组,每组 30 只。每组将 30 只小鼠根据取材时间点的不同,分成 3 批,每批 10 只。

1.2 仪器与试剂

Olympus BX51 显微镜,日本 Olympus;WLYI-90000 计算机生殖辅助系统,北京伟力新世纪公司。促卵泡素(follicle stimulating hormone, FSH)检测试剂盒:北京兰博利德商贸有限公司,批号:CEA830Mu。黄体激素(luteinizing hormone, LH)检测试剂盒:北京兰博利德商贸有限公司,批号:CEA441Mu。睾酮(testosterone, T)检测试剂盒:北京兰博利德商贸有限公司,批号:CEA458Ge。

2 方法

2.1 动物造模

适应性喂养 3 d 后,对辐射组小鼠进行一次性全身⁶⁰Co γ射线照射,剂量为 4.0 Gy,剂量率为 0.55 Gy/min,照射地点为北京大学化学与分子工程学院钴源实验室;正常组小鼠不接受辐射。

2.2 动物取材

各组小鼠分别于辐射后第 14、21、35 天分 3 批,每批 10 只,眼眶取血后断颈处死,检测以下各项指标。

2.3 检测指标

2.3.1 睾丸指数 小鼠断颈处死后,取双侧睾丸,称其质量,计算睾丸指数。

睾丸指数=睾丸质量(g)/体质量(g)×100%。

2.3.2 精子质量检测 (1)小鼠脱颈椎处死后,将双侧附睾组织分离,并移入盛有 1 mL Medium199 培养液的小培养皿中,将附睾用眼科剪剪碎,并用移液器吹打均匀,使附睾中的精子充分游离,制成精子悬液。室温下,用移液枪吸取 10 μL 精子悬液滴于血球计数板上计数,并换算成精子相对浓度进行比较。(2)室温下,取 10 μL 精子悬液滴于血球计数板上,光镜下检测精子活率和活力,检测时间控制在 10 min 以内,精子活动分为四级:a 级精子指快速前向运动的精子,b 级精子指缓慢或呆滞的前向运动的精子,c 级精子指非前向运动的精子,d 级精子指不动的精子。精子活力:样品中(a 级+b 级)精子占精子总数的百分率。精子活率:样品中(a 级+b 级+c 级)精子占精子总数的百分率。(3)将(1)中剩余的精子悬液加入适量的 1%伊红溶液,染色 20 min 后,取 1 滴于洁净玻片,均匀推片,空气中自然干燥,用中性树脂封片,制成精液样本片。在 400、800 倍显微镜下观察精子形态,记录畸形精子的数量,计算畸形率。精子畸形大致可分为卷曲、大头、双头、双尾、无钩、香蕉形等。有头无尾、轮廓不清、重叠和明显被剪碎的精子不计^[2]。

精子畸形率=畸形精子数/检查的精子数×100%。

2.3.3 小鼠睾丸组织 HE 染色 取小鼠一侧的睾丸,以改良的 Davidson's 固定液(37%~40%甲醛溶液:无水乙醇:冰醋酸:去离子水按 6:3:1:10 的比例配制)固定 24 h 后转移至 10%中性甲醛溶液中保存。酒精梯度脱水后用石蜡包埋,4 μm 连续切片,常规 HE 染色,显微镜下观察睾丸组织形态结构。

2.3.4 ELISA 法测定小鼠血清中激素 小鼠眼眶取血,静置 2 h,然后在 3 000 r/min、4 °C 条件下离心 15 min,分离上层血清,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测小鼠血清中的 LH、FSH 和 T。

2.4 统计方法

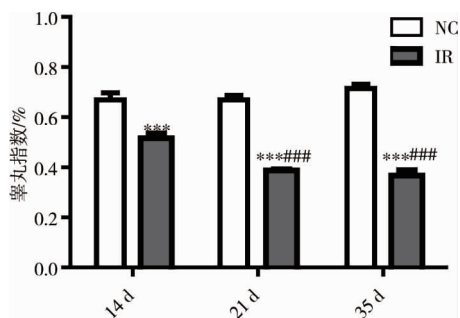
实验结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”进行统计描述,采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。组间比较用独立样本的 *t* 检验,所有的统计检验均采用双侧检验,*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 4 Gy⁶⁰Co γ射线对小鼠睾丸指数的影响

与正常组比较,辐射组小鼠在照后 7 d、21 d 和 35 d 的睾丸指数均显著降低(*P*<0.001)。与照后 14 d

辐射组小鼠比较,照后 21 d 和 35 d 辐射组小鼠睾丸指数均显著降低 ($P<0.001$); 而照后 35 d 和 21 d 的辐射组间比较,两组小鼠睾丸指数差异无统计学意义 ($P>0.05$),见图 1。



注:与 NC 组比较,*** $P<0.001$;与照后 14 d IR 组比较,#### $P<0.001$

图 1 不同取材时间小鼠睾丸指数变化柱状图

3.2 4 Gy⁶⁰Co γ 射线对小鼠精子浓度和质量的影响

3.2.1 精子浓度 与正常组相比,照后 14 d 辐射组小鼠精子浓度差异无统计学意义 ($P>0.05$);照后 21 d 和 35 d 时,辐射组小鼠精子浓度显著降低 ($P<0.01$, $P<0.001$); 照后 35 d 与照后 21 d 的辐射组比较,其精子浓度也显著降低 ($P<0.001$),见图 2A。

3.2.2 精子活率 与正常组相比,照后 14 d 时,辐射组小鼠精子活率差异无统计学意义 ($P>0.05$);照后

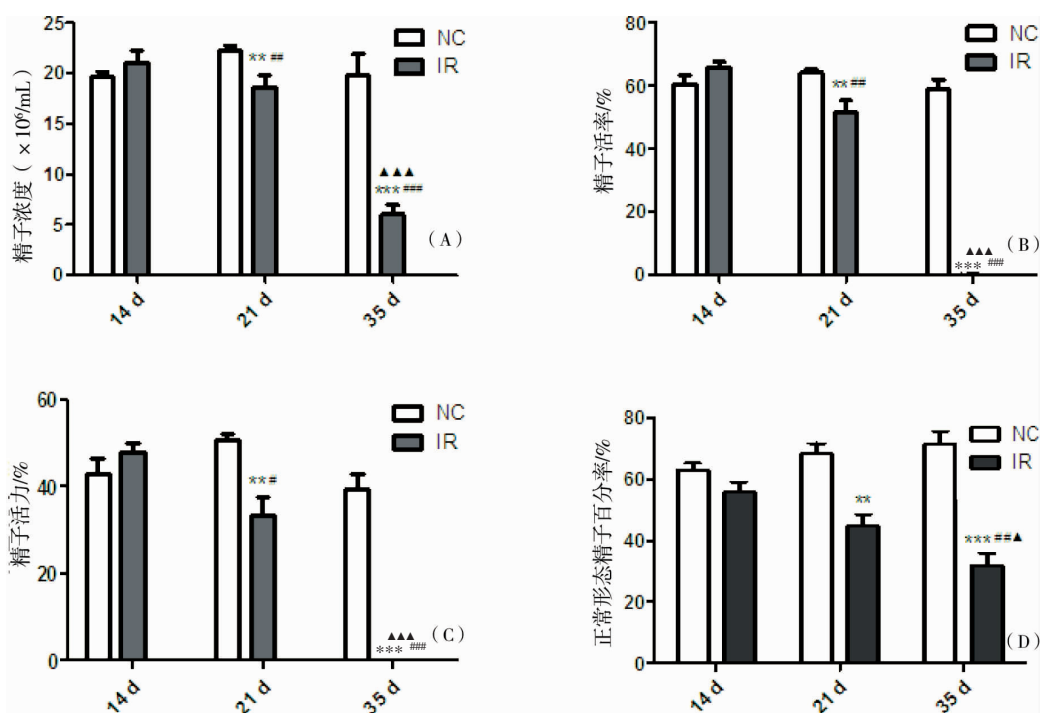
21 d 时,辐射组小鼠精子活率显著降低 ($P<0.01$),较照后 14 d 辐射组小鼠精子活率也显著降低 ($P<0.01$); 照后 35 d 时,辐射组小鼠精子活率趋近于 0,与正常组、照后 14 d 和照后 35 d 的辐射组比较,差异均具有显著统计学意义 ($P<0.001$)。见图 2B。

3.2.3 精子活力 与正常组相比,照后 14 d 时,辐射组小鼠精子活力差异无统计学意义 ($P>0.05$);照后 21 d 时,辐射组小鼠精子活力显著下降 ($P<0.01$)。与照后 14 d 辐射组小鼠相比,照后 21 d 辐射组小鼠精子活力显著降低 ($P<0.05$)。照后 35 d 时,辐射组小鼠无精子活力,与正常组、照后 14 d 和照后 35 d 的辐射组比较,差异均具有显著统计学意义 ($P<0.001$)。见图 2C。

3.2.4 精子形态 与正常组相比,照后 14 d 时,辐射组小鼠正常形态精子百分比差异无统计学意义 ($P>0.05$);照后 21 d 时,辐射组小鼠正常形态精子百分比显著降低 ($P<0.01$);照后 35 d,辐射组小鼠正常形态精子百分比显著下降 ($P<0.001$),与照后 14 d、21 d 辐射组比较,正常形态精子百分率也显著降低 ($P<0.01$, $P<0.05$),见图 2D。

3.3 4 Gy⁶⁰Co γ 射线对小鼠睾丸组织形态结构的影响

显微镜下观察,在正常组小鼠睾丸中,生精小管



注:A.精子浓度;B.精子活率;C.精子活力;D.正常形态精子百分率。与 NC 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与照后 14 d IR 组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与照后 21 d IR 组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.001$

图 2 不同取材时间小鼠精子质量变化柱形图

结构完好,排列紧密且规则。在生精小管中,支持细胞以及各级生精细胞排列整齐,生精上皮的基底膜结构完整;各生精小管之间的排列正常,睾丸间质完整;生精小管腔内充满长形精子。

随着时间的推移,辐射组小鼠睾丸受到不同程度的损伤。照射后 14 d,辐射组小鼠生精小管结构比较完整,管腔内生精细胞排列较为紊乱,层数减少,其中大部分精原细胞已观察不到,但是精母细胞、精子细胞和长形精子胞等仍可见,生精小管明显萎缩,生精小管之间的间隙增大;照后 21 d,辐射组小鼠睾丸生精小管结构混乱,精原细胞几近消失,精母细胞、精子细胞脱落情况严重,生精上皮分层减少,生精小管高度退化、萎缩,管腔明显缩小;照后 35 d,辐射组小鼠生精小管基底膜出现破损,生精上皮呈现大量空泡样结构,支持细胞和间质细胞萎缩退化,生精细胞严重脱落,生精小管腔严重萎缩,各生精小管之间的间隙增大,见图 3。

3.4 4 Gy⁶⁰Co γ 射线照射对小鼠血清激素水平的影响

与正常组比较,照后 14 d,辐射组小鼠血清睾酮含量显著升高($P<0.01$),照后 21 d 和 35 d,辐射组间睾酮水平差异无统计学意义($P>0.05$),见图 4A;照后辐射组血清促卵泡素水平差异无统计学意义($P>0.05$),见图 4B;照后 21 d 辐射组小鼠血清促黄体素水平显著降低($P<0.05$),照后 14 d 和 35 d 时,正常组和辐射组小鼠血清 LH 水平差异无统计学意

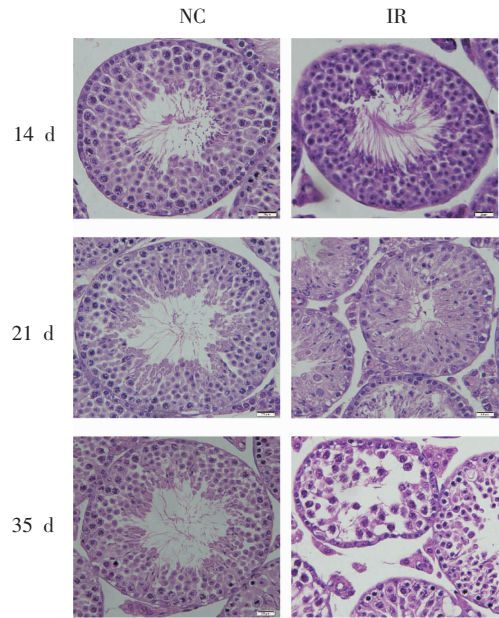
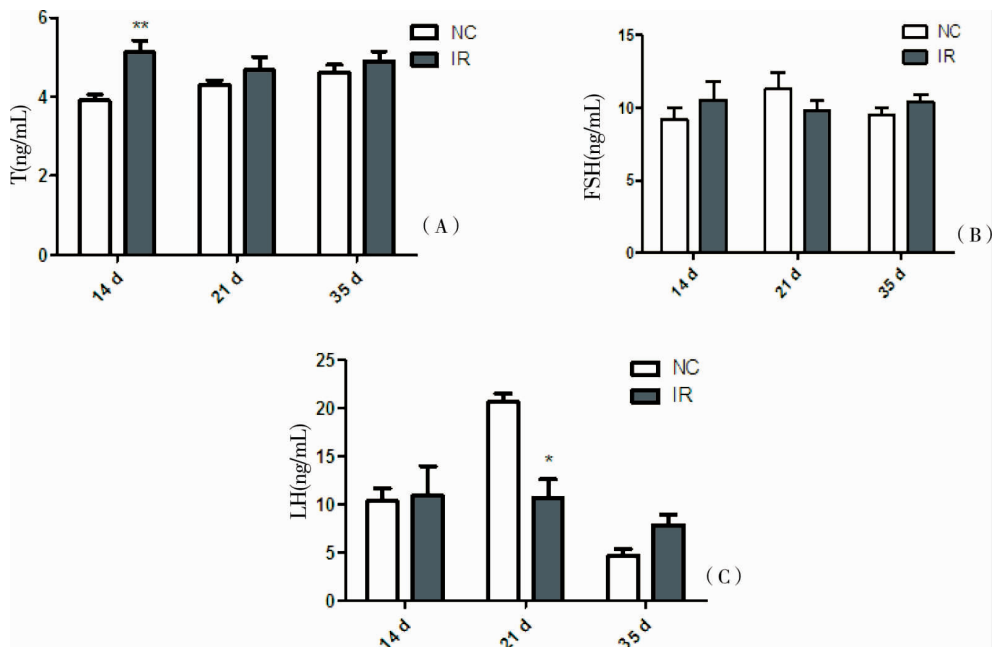


图 3 不同取材时间小鼠睾丸组织病理变化
光镜图(HE,×400)

义($P>0.05$),见图 4C。

4 讨论

睾丸对电离辐射非常敏感,较小剂量的电离辐射即可导致睾丸生精小管上皮、附睾上皮等出现超微结构的改变,以致睾丸的生精过程被破坏。有研究发现 1 Gy 剂量的 X 射线全身照射小鼠,照后 16 h 即可观察到小鼠生精细胞出现损伤^[3];照射后 4 周,小鼠睾丸损伤较照后 16 h 加重,小鼠生精小管上皮变薄,生精细胞层数减少,管腔内的成熟精子减少,生



注:A.小鼠血清 T;B.小鼠血清 FSH;C.小鼠血清 LH。与 NC 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

图 4 照后不同取材时间点小鼠血清激素水平变化柱形图

精小管的形状发生不规则变化,管腔之间的间隙增大。可以观察到,随着照后时间的推移,电离辐射造成的小鼠睾丸的损伤也随之加重。因为睾丸体积98%由生精小管等生发组织构成^[4],所以睾丸体积减小及质量降低的直接原因之一是生精小管等组织的萎缩退化。实验发现,4 Gy⁶⁰Co γ 射线照射后,小鼠睾丸指数显著降低,提示辐射导致小鼠睾丸的质量减轻;在照后第14天时辐射组小鼠精原细胞大部分消失,精母细胞和精子细胞的损伤也较为严重,辐射组小鼠出现了生精细胞脱落坏死,生精上皮退化、变性、结构破损,生精小管萎缩退化等一系列严重损伤,并且辐射组小鼠睾丸在辐射后21 d比14 d损伤严重,而辐射后35 d又比21 d损伤严重,提示随着时间推移,电离辐射造成的小鼠睾丸的损伤也在持续性加重。

各辐射组小鼠的精子浓度在辐射后14 d时与正常组小鼠比较均无显著性差异。可能是因为精子的辐射抗性较强,辐射后14 d时精子浓度没有出现明显的下降。但是在照后21 d时,辐射组小鼠的精子浓度显著下降,并且在35 d时继续下降。这是因为4 Gy剂量的电离辐射导致精原细胞大量死亡,且在1个生精周期(约35 d)内无法恢复,小鼠精子发生过程被破坏,因此小鼠精子浓度持续降低。有研究发现小鼠接受0.5 Gy以上剂量照射即可导致精子的活率和活力降低^[5],实验结果显示,与正常组比较,辐射组小鼠精子活率和精子活力在辐射后14 d时无明显变化,在照后21 d时显著降低,照后35 d时几乎丧失精子活率、活力。同时,也有研究发现长期暴露于低剂量电离辐射后,会出现精子活力下降,但精子浓度未出现显著变化的情况^[6],照后35 d的结果显示,辐射组小鼠丧失精子活力和活率时,小鼠精子浓度还未降至0。

精子常见的畸形包括大头、小头、双头、无头等,但正常男性的精液中也含有一定比例的畸形精子^[7],但电离辐射可导致正常精子形态发生改变。高剂量的电离辐射可以破坏精子的正常结构,增加精子的畸形率^[8]。实验结果表明4 Gy射线对小鼠精子形态造成了严重损伤,提示小鼠的生育力可能受到影响。

精子的发生受众多激素的调控,其中,电离辐射可导致激素水平发生变化,进而可能引起生精过程的异常。T是由Leydig细胞分泌的。与生精细胞相比,Leydig细胞具有较强的抗辐射能力,有研究发现,在受到辐射剂量 ≤ 5 Gy时,Leydig分泌T的功能受到一定的

影响,但其细胞形态结构未见明显变化^[9],还有研究发现2 Gy的X射线照射能够使小鼠T水平升高^[10],本实验观察到辐射组小鼠T在照后14 d时较正常组升高,与文献报道一致。FSH和LH由垂体分泌,垂体同样具有较强的抗辐射能力,实验发现FSH的分泌水平未受电离辐射显著影响;促性腺激素释放素(GnRH)的脉冲式分泌可引起LH不连续释放^[1],因此照后21 d时,正常组小鼠LH水平异常升高可能与之有关。

综上,4 Gy⁶⁰Co γ 射线可以严重损伤睾丸结构和功能,造成小鼠睾丸指数降低,生精小管萎缩退化、生精上皮结构破坏严重,引起精子浓度降低,精子活率和活动力下降以及精子畸形率的升高。同时电离辐射上调了照后14 d小鼠T水平,但对FSH和LH的影响较小。急性辐射致小鼠睾丸损伤的机制仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] 尼施拉格,贝 雷,尼施拉格.男科学—男性生殖健康与功能障碍[M]. 3版.北京:北京大学医学出版社,2013:24.
- [2] 艾尔肯·塔西铁木尔,黄蕊芳,刘晓峰,等.昆仑雪菊遗传毒性研究[J]. 中国食品卫生杂志,2018,30(1):18-21.
- [3] 王艳梅,杨加周,艾庆燕,等.X线辐射损伤对小鼠睾丸生精上皮结构的改变[J].延安大学学报(医学科学版),2008,6(3):1-2.
- [4] 杨德安.睾丸体积与睾丸功能的相关性[J].国外医学.泌尿系统分册,1987(6):42-43.
- [5] LI H Y, ZHANG H. Proteome analysis for profiling infertility markers in male mouse sperm after carbon ion radiation [J]. Toxicology, 2013, 306:85-92.
- [6] KUMAR D, SALIAN S R, KALTHUR G, et al. Semen abnormalities, sperm DNA damage and global hypermethylation in health workers occupationally exposed to Ionizing radiation[J]. Plos One, 2013,8(7):1-8.
- [7] HAMILTON J A M, CISEN M, BRANDES M, et al. Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system[J]. Human Reproduction, 2015,30(5): 1110-1121.
- [8] SHIN S C, KANG Y M, JINYW, et al. Relative morphological abnormalities of sperm in the caudal epididymis of high- and low dose-rate gamma-irradiated ICR mice[J]. Journal of Radiation Research, 2009,50(3):261-266.
- [9] 赵亚兵.枸杞多糖对大鼠睾丸支持细胞辐射损伤的恢复作用[D]. 郑州:郑州大学,2012.
- [10] DING J, WANG H, WU Z B, et al. Protection of murine spermatogenesis against Ionizing radiation-Induced testicular Injury by a green tea polyphenol[J]. Biology of Reproduction, 2015,92(1): 1-13.

(本文编辑 杨 瑛)