

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.11.004

中国大鲵肌肉蛋白肽对 BPA 诱导小鼠精子发生障碍的治疗作用 及其机制研究 *

陈桢桢^{1,2,3} 耿瑶^{2,4} 赵洁² 马斌芳² 李伟^{2,3,Δ}

(1 西北工业大学医学研究院 陕西 西安 710072; 2 空军军医大学基础医学院人体解剖与组织胚胎学教研室 陕西 西安 710032;
3 陕西远光高科技公司 陕西 西安 710304; 4 西北大学生命科学学院 陕西 西安 710127)

摘要 目的: 研究中国大鲵肌肉蛋白肽 (The protein and peptide extracts from muscles of Chinese giant salamanders, SP) 对双酚 A (bisphenol A, BPA) 诱导的小鼠生精障碍的保护作用, 并初步探讨其作用机制。**方法:** 40 只 C57BL/6 雄性小鼠分为四组, 分别为 Control 组、BPA 组、BPA+CS (Compound Substance) 组、BPA+SP 组。BPA 组使用 50 mg/kg/d 的 BPA 腹腔注射, BPA 溶解于玉米油; Control 组只腹腔注射玉米油。BPA+CS 组灌胃其他有利于生精壮阳的复合物用作对照, 复合物溶解于生理盐水中; BPA+SP 组灌胃上述复合物联合大鲵肌肉蛋白肽, 以上灌胃剂量均 4 g/kg/d。连续造模 28 天, 期间每周测定小鼠体重, 造模结束后测定睾丸体积、睾酮比, 取附睾精子使用 CASA 计算机辅助分析系统测定精子数目、精子活力, ELISA 法测定血清睾酮含量, HE 染色、TUNEL 染色分析睾丸组织病理学, 最后采用免疫荧光染色及 Western blotting 分析转移相关基因 2 (MTA2) 的表达情况、油红 O 染色观察支持细胞体内、体外吞噬作用。**结果:** 与对照组比较, BPA 组睾丸体积 ($P<0.05$)、睾丸重量 ($P<0.05$)、睾酮比 ($P<0.05$)、精子数目 ($P<0.05$)、精子活力 ($P<0.05$)、睾酮含量 ($P<0.01$) 均显著降低, 睾丸组织形态受损 ($P<0.05$)、生精细胞凋亡增多 ($P<0.01$)、MTA2 表达量降低 ($P<0.01$)、支持细胞吞噬功能减弱 ($P<0.01$); BPA+CS 组较 BPA 组无明显变化, BPA+SP 组以上变化显著改善 ($P<0.05$)。**结论:** 大鲵肌肉蛋白肽对 BPA 诱导的小鼠生精功能障碍有明显的保护作用, 作用机制可能与干预 MTA2 表达进而增强支持细胞的吞噬作用相关。

关键词: 双酚 A; 大鲵肌肉蛋白肽; 凋亡; 支持细胞; 吞噬

中图分类号: R-33; Q492; Q132.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2022)11-2018-10

The Role and Mechanism of the Protein and Peptide Extracts from Muscles of Chinese Giant Salamanders Protects Mouse Testis from Deleterious Effects of Bisphenol A *

CHEN Zhen-zhen^{1,2,3}, GENG Yao^{2,4}, ZHAO Jie², MA Bin-fang², LI Wei^{2,3,Δ}

(1 Institute of Medical Research, Northwestern Polytechnical University, Xi'an, Shaanxi, 710072, China;

2 Department of Histology and Embryology, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 Shaanxi Far Light High-Tech Ltd, Xi'an, Shaanxi, 710304, China;

4 College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an, Shaanxi, 710127, China)

ABSTRACT Objective: To explore the protective effect and its mechanism of the protein and peptide extracts from the muscle of Chinese giant salamanders (SP) on the protection of bisphenol A (BPA)-induced sperm disorder in mice. **Methods:** Forty male C57BL/6 mice were divided into four groups, Control group, BPA group, BPA+CS group and BPA+SP group. BPA group was injected with 50 mg/kg/d of BPA, which dissolved in corn oil. Control group was injected with corn oil only. The BPA+CS group was given compound substances, which have been proved to be beneficial for spermatogenesis, and were used as controls. The BPA+SP group was given the above mentioned compounds plus SP dissolved in physiological saline. Mice received the compounds plus SP by gavage. The doses were 4 g/kg/d for both groups. The model was established continuously for 28 days, during which the body weight of mice was measured weekly. Testicular volume and testosterone-body ratio were measured after establishment of animal model. Epididymal sperms were collected to measure sperm number and sperm motility by using the computer aided analysis system (CASA). The amount of testosterone in the serum was determined by ELISA. HE staining and TUNEL staining were used to analyze testicular histopathology. Finally, immunofluorescence staining and Western blotting were used to analyze the expression of metastasis associated protein 2 (MTA2), and Oil Red O staining was used to observe the phagocytosis of Sertoli cells in vitro and in vivo. **Results:** Compared with the control group, the testicular volume ($P<0.05$), testicular weight ($P<0.05$), testosterone-body ratio ($P<0.05$), sperm number ($P<0.05$), sperm motility

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31971070; 31671198)

作者简介: 陈桢桢 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生殖生物学, E-mail: ohguaiho@163.com

Δ 通讯作者: 李伟 (1977-), 男, 博士, 硕士生导师, 副教授, 研究方向: 生殖生物学, E-mail: liweipepeyato@163.com, 电话: 029-84774511

(收稿日期: 2021-11-21 接受日期: 2021-12-17)

($P<0.05$), and the amount of testosterone in the serum of mice ($P<0.01$) in BPA group were significantly decreased. Testicular morphology was damaged and the number of apoptotic spermatogenic cells in BPA group was increased compared with control group($P<0.01$). At the same time, the expression of MTA2 and the phagocytosis of Sertoli cells in BPA group were decreased compared with control group ($P<0.01$). There was no difference between BPA + CS group and BPA group. Surprisingly, the above changes in BPA group were significant difference by using SP($P<0.05$). **Conclusion:** SP has obvious protective effect on BPA-induced sperm disorder in mice, and the mechanism of action may be related to enhanced phagocytosis of Sertoli cells by improving the expression of MTA2.

Key words: Bisphenol A; The protein and peptide extracts from muscles of Chinese giant salamanders; Apoptosis; Sertoli cells; Phagocytosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q492; Q132.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)11-2018-10

前言

最近的报告表明,人类的精液质量明显下降^[1]。引起精液质量下降的因素常常是复杂的,而有许多患者发病原因不明确。随着生活水平的发展,人们渐渐注意到环境问题与不育症之间的联系^[2]。很多临床、流行病学和基础实验工作都证实了环境内分泌干扰物可降低男性生育能力^[3]。双酚 A(Bisphenol A, BPA) 广泛用于聚碳酸酯及环氧树脂的生产,因其结构与雌激素类似,具有弱雌激素与抗雄激素的作用,是一种重要的环境内分泌干扰物。越来越多的研究表明^[4-6],BPA 能造成不同形式、不同程度的生殖系统损害。现代医学对男性不育症的发病机制暂未完全了解,临床上没有特异性的治疗药物^[7]。两栖类生物由于其独特的生活环境,具有较高的食用价值和药用价值^[8,9]。中国大鲵是世界上最大的两栖生物,因肉质鲜美,风味独特,营养滋补,被誉“水中活人参”。其肌肉中共检出 14 种脂肪酸,这些脂肪酸具有极强的抗氧化应激活性^[10,11]。目前研究表明,BPA 引起雄性生殖毒性与氧化应激有关^[12]。大鲵肌肉活性成分是否可改善 BPA 所致精子发生作用目前尚未见报道。本文将通过分离大鲵肌肉蛋白肽并将其灌胃小鼠的同时染毒 BPA,以探讨大鲵肌肉蛋白肽对 BPA 染毒雄性小鼠生殖毒性的缓解作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

BPA、玉米油、DMSO(Sigma,美国);大鲵肌肉蛋白肽复合物(陕西远光高科技,中国);BWV 培养基储存液、柠檬酸钠抗原修复液(Solarbio,中国);苏木素-伊红染液(Beyotime,中国);TUNEL 染色试剂盒(Roche Applied Science,瑞士);睾酮 ELISA 试剂盒(Cloud-Clone,中国);人抗兔多克隆抗体 GAPDH(Abcclon,中国);人抗兔多克隆抗体 MTA2(Abcam,美国);羊抗兔免疫荧光二抗试剂盒(Beyotime,中国);抗荧光淬灭含 DAPI 封片剂(大连美伦,中国);羊抗兔 HRP 标记二抗(St John's Laboratory,美国);油红 O 染色试剂盒(Leagene,中国);BCA 蛋白定量试剂盒、PVDF 膜、化学发光试剂盒、青霉素与链霉素(米鼠,中国);小鼠睾丸 TM4 细胞系(ATCC,美国);DMEM/F12 培养液、胎牛血清(Gibco,美国);胶原酶、透明质酸酶(Sigma,美国);手动轮转式切片机、冷冻切片机(Leica,德国);显微成像系统(Carl Zeiss,德国);全自动精子分析仪(上海圣荷西医疗用品有限公司,中国);酶标仪(Tecan,澳大利亚);倒置荧光显微镜(Olympus,日本);低温高速离心机(Beckman,德国);化学发光成像系统(Clinx,中国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及实验方法 雄性 C57BL/6 小鼠 40 只,8 周龄,体重约 23-25 g,购买于空军军医大学实验动物中心。饲养于空军军医大学组织教研室 SPF 动物房,恒定室温 26℃,每隔 12 小时明暗交替,食用商业化鼠粮、玻璃瓶饮水。实验开始前适应性喂养一周后随机分为四组,每组 10 只,分别为 Control 组、BPA 组、BPA+CS 组、BPA+SP 组。BPA 组使用 50 mg/kg/d 的 BPA 处理动物,BPA 溶解于玉米油,给药方式为腹腔注射;Control 组只腹腔注射玉米油。BPA+CS 组灌胃其他已被证明有利生精壮阳作用的复合物,复合物溶解于生理盐水中;BPA+SP 组灌胃上述复合物和大鲵肌肉蛋白肽(均由陕西远光高科技提供,大鲵肌肉蛋白肽制备过程参考徐阳等^[13]方法并作改进),用于灌胃复合物配方见表 1,混合物灌胃剂量均为 4 g/kg/d。连续造模 28 天,期间每周测定小鼠体重,造模结束后测定睾丸质量,取附睾精子使用 CASA 计算机辅助分析系统测定精子数目、精子活力,ELISA 法测定血清睾酮含量,HE 染色、TUNEL 染色分析睾丸组织病理学,最后采用免疫荧光染色及 Western blotting 法分析 MTA2 的表达情况、油红 O 染色观察支持细胞体内吞作用。

1.2.2 睾丸组织系数(辜体比)的计算 睾丸组织系数(辜体比)=双侧睾丸平均重量(mg)/体重(g)×100%

1.2.3 CASA 精子分析系统测定精子数目及质量 使用戊巴比妥钠麻醉小鼠后,迅速分离两侧附睾在 PBS 中冲洗干净,将其置于 1 mL 精子 BWV 培养基储存液中,用眼科剪将附睾尾部剪开,37 度恒温摇床中放置 5 min 获得精子悬液用于精子活力及精子数目测定(全程注意无菌操作,避免污染)。吸取 20 μ L 精子悬液使用计算机辅助精子分析系统(CASA,SAIS-PLUS version 10.1;Medical Supply,XI,AN,CHINA)测定不同组处理的精子运动能力和精子数目。

1.2.4 ELISA 法检测血清睾酮含量 使用眼球取血法收集血液样本,静置 3 h 后 3000 rpm 离心,配制不同浓度标准品。在 96 孔板中加入标准品及样品 50 μ L、加入 50 μ L 检测液 A,37℃ 孵育 60 min,洗板 3 次后加入 100 μ L 检测液 B,37℃ 孵育 30 min,加 TMB 底物 90 μ L,37℃ 孵育 10-20 min 后加终止液 50 μ L,酶标仪 450 nm 读取 OD 值。

1.2.5 HE 染色检测睾丸病理学改变 末次给药后一天从动物体内取出睾丸,将其置 Bouin's 固定液中 24 h,梯度酒精脱水后包埋于石蜡中。使用手动轮转式切片机切片,厚度 5 μ m。切片脱蜡复水后苏木精、伊红各染色一分钟后脱水封片,光镜下检查睾丸内生精小管的改变。

表 1 一种具有生精壮阳作用的大鲵肌肉蛋白肽复合物配方

Table 1 A compound substance of a strong and fertile effect with the protein and peptide extracts from muscles of Chinese giant salamanders

Ordinal	The formula name	The amount of formula
1	Zinc glucose	0.2 g
2	Vitamin B12	0.45 mg
3	Vitamin E	0.3 g
4	Icariin	0.5 g
5	Schisandra chinensis	20 g
6	Dogwood	20 g
7	SP(BPA+CS group was not added)	20 g
8	Compound sweeteners, seasoning powders, etc.	Appropriate amount

1.2.6 TUNEL 染色法检测生精细胞凋亡情况 使用原位细胞凋亡检测试剂盒对睾丸组织进行染色。根据说明书要求,使用前现配反应液(TdT 酶和荧光标记液按照 1:9 的比例混合),阴性对照只加荧光标记液。睾丸组织石蜡切片脱蜡复水后,将配好的反应液以每个组织块 20 μ L 的量滴加在组织上,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 2 h。使用抗荧光淬灭封片剂(含 DAPI)封片,荧光显微镜下检查睾丸内生精细胞的凋亡情况。

1.2.7 免疫荧光化学从形态学水平检测睾丸中 MTA2 表达 将石蜡切片二甲苯脱蜡、梯度酒精复水,柠檬酸钠抗原修复液(pH6.0)微波修复 20 min。滴加免抗 MTA2 抗体(稀释浓度 1:200),4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。避光滴加羊抗兔荧光二抗(稀释浓度 1:400),室温孵育 2 h,抗荧光淬灭(含 DAPI)封片剂封片,荧光显微镜下拍照。

1.2.8 Western blotting 法从分子水平测定睾丸中 MTA2 蛋白表达 各组睾丸组织解冻后加入 RIPA 裂解液提取蛋白,蛋白浓度使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定。聚丙烯酰胺凝胶电泳及转膜后加入免抗 GAPDH 抗体(稀释浓度 1:1000)、MTA2 抗体(稀释浓度 1:1000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 清洗后加 HRP 标记羊抗兔二抗(稀释浓度 1:2000)室温孵育 2 h。在膜的正表面加入超敏发光液,使用 Cline 化学发光成像分析系统显影,Image J 软件分析条带结果。

1.2.9 油红 O 染色观察支持细胞吞噬功能 取新鲜睾丸组织使用冰冻切片机切片,厚度为 10 μ m。将贴好的片子置于 10%的福尔马林中固定 10 min,蒸馏水冲洗后异丙醇稍洗。改良油红 O 染色试剂密闭染色 10 min,苏木精复染核,50%甘油封片。光镜下检查睾丸内油红 O 染色情况的改变,Image J 软件量化染色结果。

1.2.10 小鼠睾丸支持细胞体外培养及吞噬作用检测 小鼠睾丸 TM4 细胞系购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)。使用 DMEM/F12 培养液(配方:89%无血清培养基,1%青霉素与链霉素,5%胎牛血清)、15 cm 细胞培养皿培养,细胞培养箱设定 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂。按照王慧珍等^[4]人的方法提取各级生精细胞、构建支持细胞体外吞噬模型并进行油红 O 染色。正常小鼠用戊巴比妥钠麻醉后颈椎脱臼处死。摘取睾丸在室温下与 0.5 mg/mL 胶原酶孵育 15 分钟,然后通过 80 μ m 铜网过滤以消除间质细胞。生精小管在室温下重悬在胶原酶中 20 分钟以去除肌样细胞,然后与 1 mg/mL 透明质酸酶

一起温育 25 分钟。收集悬浮在培养基中的生精细胞并再培养 2 天,以诱导自发性细胞凋亡。BPA 染毒组使用二甲基亚砜(DMSO)将 BPA 溶解后加入培养基配成 10 μ g/mL 的实验组培养液,对照组培养液只加入同等体积 DMSO;BPA+CS 组和 BPA+SP 组培养液加入 10 μ g/mL 的 BPA,CS 和 SP 剂量均为 1000 nM。待 TM4 细胞密度生长至 80%时,每组加入相同体积的凋亡细胞残体悬液,共培养 24 h 后检查吞噬效果。

1.2.11 支持细胞油红 O 染色 各个实验组培养至 24 h 后弃去培养液,PBS 清洗后使用 10%福尔马林固定 10 min。蒸馏水冲洗后异丙醇稍洗,油红 O 染色试剂盒密闭染色 10 min,苏木精复染核。使用倒置显微镜观察并拍照染色结果,用 Image J 软件量化染色结果。

1.3 统计学分析

所有结果采用 SPSS(Version 21.0,IBM,USA)软件进行统计分析。组间检验采用 one-way ANOVA 检验,其中, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。使用 Image J(version 2.0,NIH)对实验结果进行数据采集,Prism (version 8.0,Graphpad,CA,USA)绘制数据图表。

2 结果

2.1 BPA 刺激和大鲵肌肉蛋白肽治疗后对睾丸大体形态的影响

实验未处死小鼠,取出睾丸称取湿重。BPA 染毒组睾丸重量由 105.5 $\pm$ 9.2 mg 降低为 90.4 $\pm$ 10.7 mg,较 Control 组显著降低($P < 0.05$);BPA+SP 组睾丸重量为 95.9 $\pm$ 5.1 mg,与 BPA 组相比得到显著改善($P < 0.05$),见图 1(A)和图 1(B);BPA 染毒组体重较对照组略有减少,BPA+SP 组得到改善,但差异不具有统计学意义($P > 0.05$),见图 1(C);BPA 组睾丸组织相对重量较 Control 组显著降低,BPA+SP 组相对于 BPA+CS 组显著增加($P < 0.05$),见图 1(D)。

2.2 BPA 刺激和大鲵肌肉蛋白肽治疗后对小鼠精子数目及精子活力的影响

在相同的精子悬液体积下,就精子活力而言,BPA 组小鼠各类精子数目均显著低于 Control 组($P < 0.01$),特别是快速前向运动精子数目由 34 $\pm$ 5 降为 4 $\pm$ 2。BPA+CS 组较 BPA 组无明显改变($P > 0.05$),BPA+SP 组较 BPA+CS 组改善明显,其中快速向前运动精子数目由 5 $\pm$ 2 增加为 10 $\pm$ 5($P < 0.01$),见图 2(A、B);对于运动精子的运动速度而言,BPA 组小鼠直线速度、

曲线速度、路径速度都显著低于 Control 组,其中前向运动速度由 $35.2 \pm 9.5 \mu\text{m/s}$ 几乎降为 0, BPA+SP 组前向运动速度提高至 $16.2 \pm 3.1 \mu\text{m/s}$; 与 BPA 组相比, BPA+SP 组精子曲线速度、路径速度都有显著提高 ($P < 0.01$), 见图 2(C)。

2.3 BPA 刺激和大鲵肌肉蛋白肽治疗后对小鼠睾酮合成的影响

从睾酮含量测定结果来看, BPA 染毒后血清睾酮含量由 $31524 \pm 12015 \text{ pg/mL}$ 降低至 $12548 \pm 5124 \text{ pg/mL}$ ($P < 0.01$), BPA+CS 组较 BPA 组无明显改变 ($P > 0.05$), BPA+SP 组睾酮含量较 BPA+CS 组由 $15398 \pm 4389 \text{ pg/mL}$ 提高至 $29895 \pm 5898 \text{ pg/mL}$ ($P < 0.01$), 见图 3。

2.4 BPA 刺激和大鲵肌肉蛋白肽治疗后睾丸组织病理学改变

从 HE 染色结果来看, Control 组小鼠睾丸发育正常, 输精管结构完整, 生精细胞排列规则, 间质细胞分布均匀; BPA 组的小鼠睾丸结构均出现不同程度的损伤, 如生精小管空泡增多, 睾丸内空腔明显, 生精小管基底膜不连续, 精子数量减少, 生精细胞排列紊乱等; BPA+CS 组较 BPA 组组织形态未见明显改善; BPA+SP 组改善明显, 各级生精细胞排列规则, 管腔内可见正常精子, 见图 4(A)。对组织形态学评分, BPA 组评分为 60 ± 5 , 较 Control 组明显降低; BPA+SP 组评分为 80 ± 5 , 较 BPA+CS 组 (58 ± 5) 显著升高 ($P < 0.05$), 见图 4(C)。TUNEL 染

色结果显示, BPA 组小鼠睾丸 TUNEL 阳性信号(绿色荧光)明显, 对其进行计数, 平均每个生精小管内凋亡细胞数目为 45 ± 10 , 凋亡信号在各级生精细胞均有出现; BPA+SP 组平均每个生精小管内凋亡细胞数目为 5 ± 5 , 凋亡状况较 BPA 组显著改善 ($P < 0.01$), 见图 4(B), 4(C)。

2.5 BPA 刺激和大鲵肌肉蛋白肽治疗后对支持细胞吞噬蛋白 MTA2 表达的影响

MTA2 是显示支持细胞吞噬活性的关键蛋白, 通过睾丸组织进行免疫荧光染色分析, BPA 组 MTA2 阳性细胞(红色荧光)数目较正常对照组显著减少, BPA+CS 组较 BPA 组 MTA2 阳性细胞数目无明显改变, BPA+SP 组 MTA2 阳性细胞数目回升, 见图 5(A)。通过对各个生精小管内阳性细胞数目进行计数并做统计学分析, Control 组每个生精小管 MTA2 阳性数目为 53 ± 5 ; BPA 组为 18 ± 5 ; BPA+CS 组为 21 ± 5 ; BPA+SP 组为 46 ± 8 。因此, BPA 可致 MTA2 阳性显著减少, SP 可显著增强 MTA2 的表达 ($P < 0.01$), 见图 5(C)。提取各组睾丸蛋白质做免疫印迹, 结果显示 MTA2 在 Control 组呈高表达, BPA 染毒组、BPA+CS 组 MTA2 表达量降低, BPA+SP 组 MTA2 的表达量回升, 见图 5(B)。采用 Image J 软件进行灰度比值半定量分析, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 5(C)。

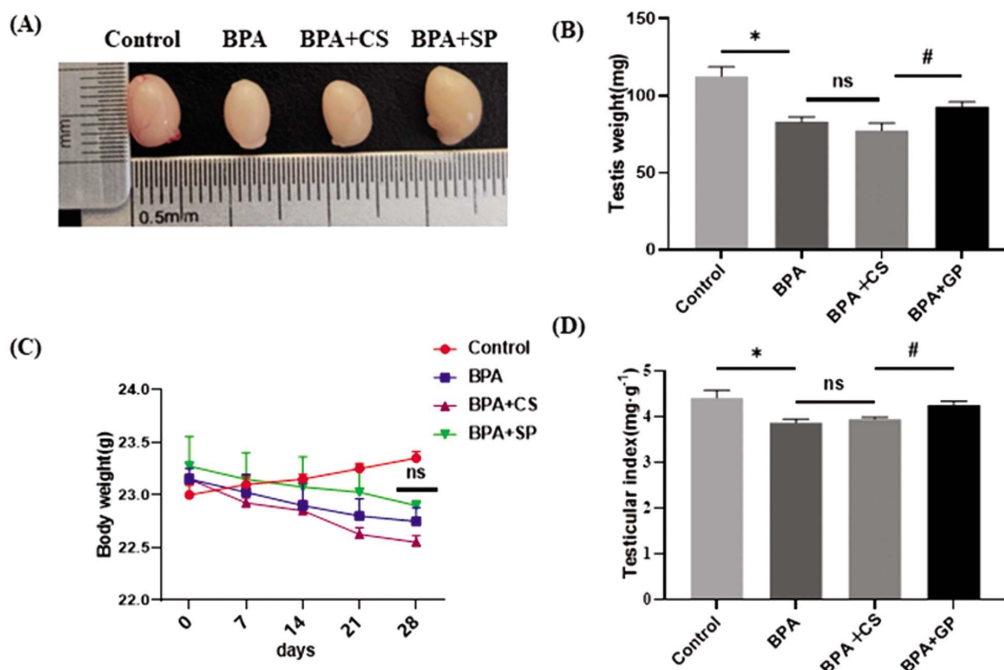


图1 BPA刺激和大鲵肌肉蛋白肽治疗后对小鼠睾丸大体形态的影响

Fig.1 Effects of stimulation with BPA and treatment with SP on the morphology of testis in mice

Note: (A): Comparison of testicular volume in each group; (B): Testicular weight of mice in each group; (C): Body weight changes of mice in each group during modeling; (D): Relative weight of testicular tissue in each group.

* Compared with Control group, $P < 0.05$; ns Compared with BPA group, $P > 0.05$; # compared with BPA+CS group, $P < 0.05$, $n = 5$.

2.6 BPA 刺激和大鲵肌肉蛋白肽治疗后对支持细胞功能的影响

油红 O 染色强度反映了支持细胞的吞噬功能。通过对睾丸组织油红 O 染色, BPA、BPA+CS 组油红 O 阳性面积较正常对照组显著增大; BPA+SP 组油红 O 染色面积较 BPA+CS 组显著降低。支持细胞体外培养测定吞噬功能实验结果显示, Control 组支持细胞细胞质中油红 O 染色明显, 脂滴分布较多;

BPA、BPA+CS 组细胞质中几乎看不到脂滴, 表明吞噬作用受阻; BPA+SP 组支持细胞细胞质脂滴增多, 表明吞噬作用增强。通过对体内外油红 O 染色结果使用 Image J 分析, BPA 染毒可显著降低支持细胞的吞噬功能 ($P < 0.01$), 体内、体外 SP 治疗均可增强支持细胞吞噬功能 ($P < 0.01$)、($P < 0.05$), 见图 6(B)。

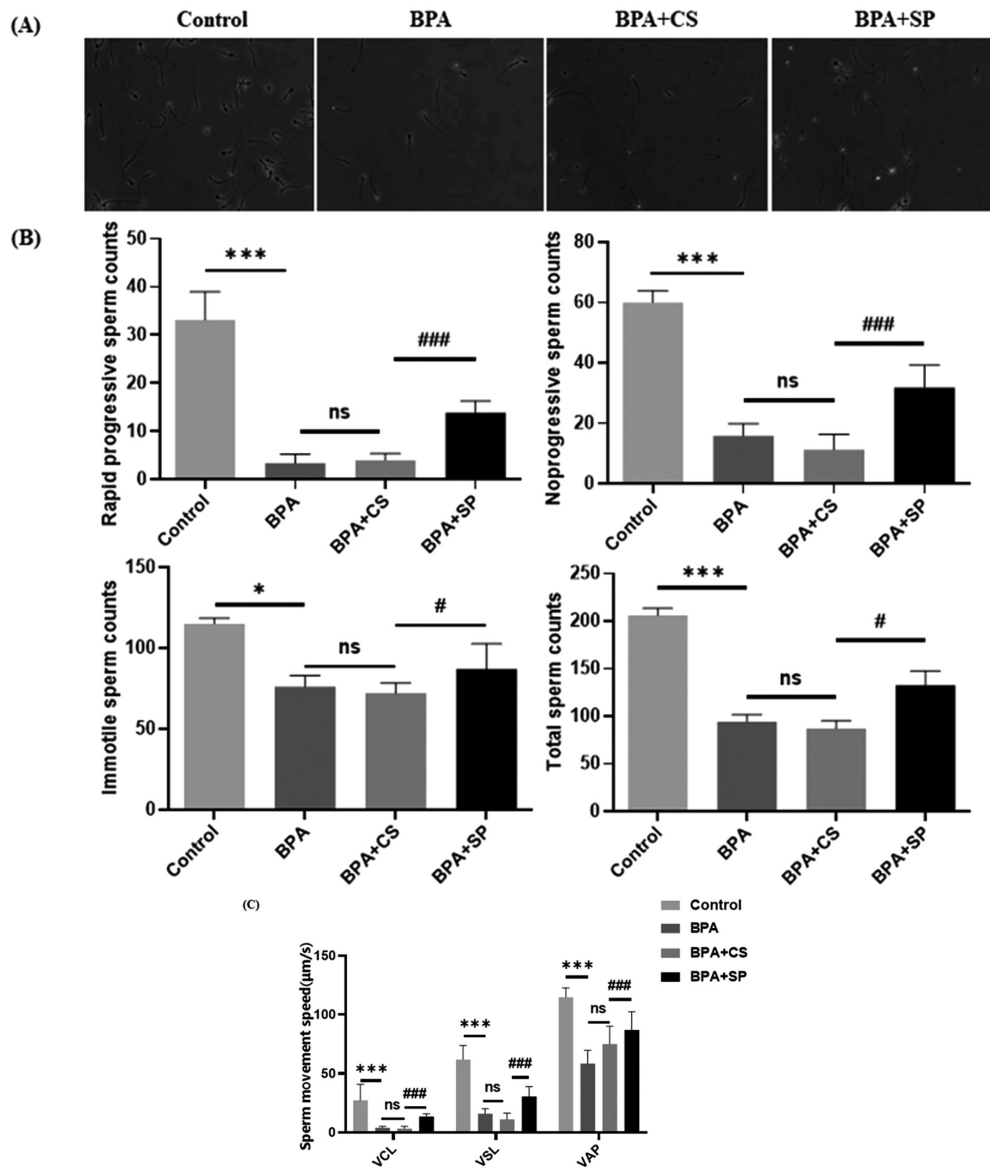


图 2 不同处理对小鼠精子数目及精子活力的影响

Fig.2 Effects of different treatments on sperm number and sperm motility in mice

Note: (A): Representative diagram of mouse sperm motility using CASA; (B): The effect of the number of various types of sperm, Rapid progressive (PR); No progressive (NP); Immobile (IM); (C): Effects of sperm motility velocity, Straight line velocity (VSL); Curvilinear velocity (VCL); Path velocity (VAP).

*Compared with Control group, $P < 0.05$; ns Compared with BPA group, $P > 0.05$; # compared with BPA+CS group, $P < 0.05$, $n = 5$;

*** Compared to the Control group, $P < 0.01$; ns Compared with BPA group, $P > 0.05$; ### compared with BPA+CS group, $P < 0.01$, $n = 5$;

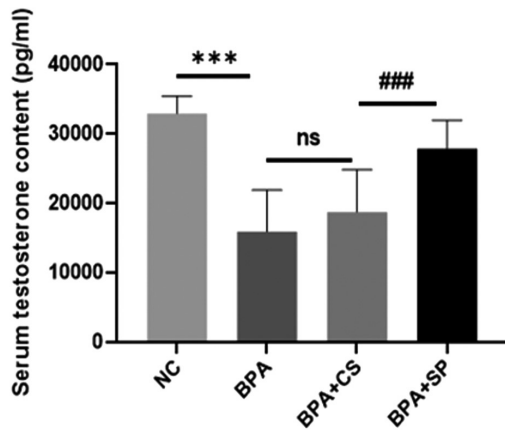


图 3 各组小鼠血清睾酮含量

Fig.3 The content of testosterone in serum of mice in each group

Note: *** Compared to the Control group, $P < 0.01$; ns Compared with BPA group, $P > 0.05$; ### compared with BPA+CS group, $P < 0.01$, $n = 5$.

3 讨论

本研究采用已被大家公认的有利于生精壮阳的物质与大鲵肌肉蛋白肽混合用于 BPA 染毒小鼠,添加大鲵肌肉蛋白肽组与普通复合物组相比,可通过改善支持细胞吞噬功能而对雄性小鼠生殖功能产生保护。使用常规的精子发生保护作用的复合物作为对照,一方面证明了在 BPA 致生殖损伤的特殊条件下,使用常规生精壮阳物质已经不能够挽救生精过程损伤,这也进一步体现了大鲵肌肉蛋白肽的特殊作用;另一方面也解决了大鲵肌肉蛋白肽单独使用溶解困难的问题。我们使用酶解法分离中国大鲵肌肉蛋白肽,并首次将之应用于 BPA 对睾丸损伤作用的治疗研究,以睾丸生精细胞凋亡为切入点,以影响支持细胞吞噬作用的 MTA2 分子为抓手,首次从支持细胞功能方面研究 BPA 损伤精子发生过程的分子机理,具有明显的理

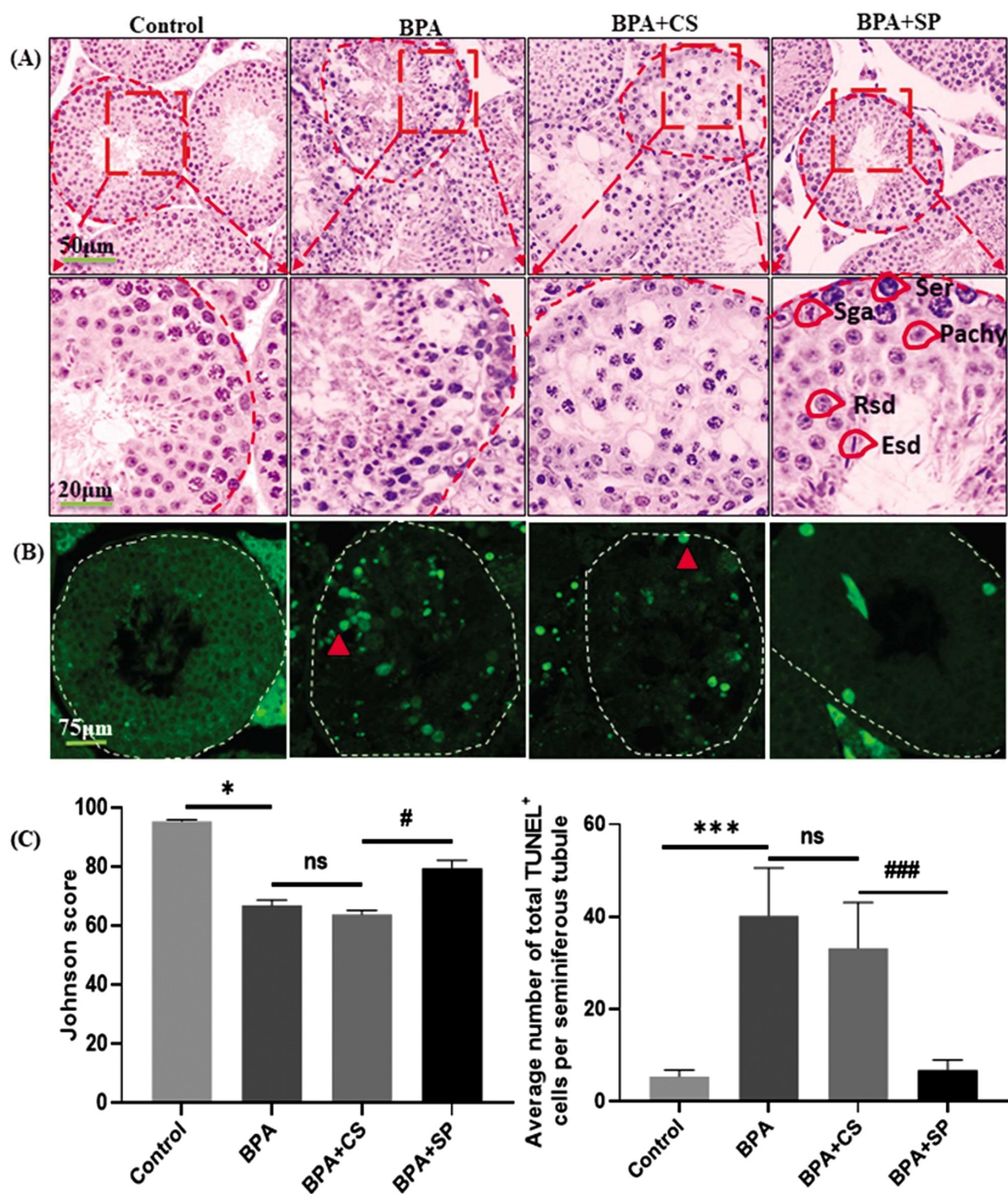


图4 各组小鼠睾丸病理学差异

Fig.4 Pathological differences of testis in each group

Note:(A): HE staining of testis in each group, Sertoli cells (Ser); Spermatogonium (Sga); Pachytene spermatocyte (Pachy); Round spermatid (Rsd); Elongated spermatid (Esd); (B): TUNEL staining of testis in each group, the green fluorescence is TUNEL positive, as shown with red triangle; (C): Johnson score of HE staining and statistical analysis of TUNEL staining.

*Compared with the Control group, $P<0.05$; ns Compared with BPA group, $P>0.05$; # compared with BPA+CS group, $P<0.05$, $n=5$;

*** Compared to the Control group, $P<0.01$; ns Compared with BPA group, $P>0.05$; ### compared with BPA+CS group, $P<0.01$, $n=5$;

论应用创新性。

已有研究表明,较高的尿液或血液 BPA 浓度与较高的 BMI 或体重显著相关^[15]。但我们的研究结果却与此不同,接触 BPA 小鼠体重没有显著变化,这种不同结果可能是由于 BPA 接触方式与时间的差异。使用 50 mg/kg/day 的 BPA 连续 28 天腹腔注射染毒小鼠,小鼠生殖系统损伤,这与以前的研究结果相一致^[16,17]。已有研究表明^[18],BPA 诱导的毒性可导致上皮高度和生精小管直径降低,这是由于生殖上皮细胞连接缺陷导致睾丸间质空间增加和细胞脱落。在我们的研究中,在 BPA 诱导的

小鼠睾丸毒性中也观察到了空泡的形成和生精细胞的缺失,这也提示生精功能障碍模型建立成功。想要了解 BPA 对生殖系统的损伤特点,必须系统地测定与生殖相关参数,我们的研究更加全面地测定了从激素水平、精子数目、精子活力到睾丸组织学损伤,并将睾丸生精细胞凋亡作为落脚点,进一步探讨生精细胞凋亡后睾丸的稳态变化。

支持细胞是睾丸中一种重要的细胞类型,环境雌激素引起的精子数目下降,可能与睾丸支持细胞受损有关^[19]。目前,BPA 对支持细胞的研究多集中于细胞形态以及细胞间连接的变化。

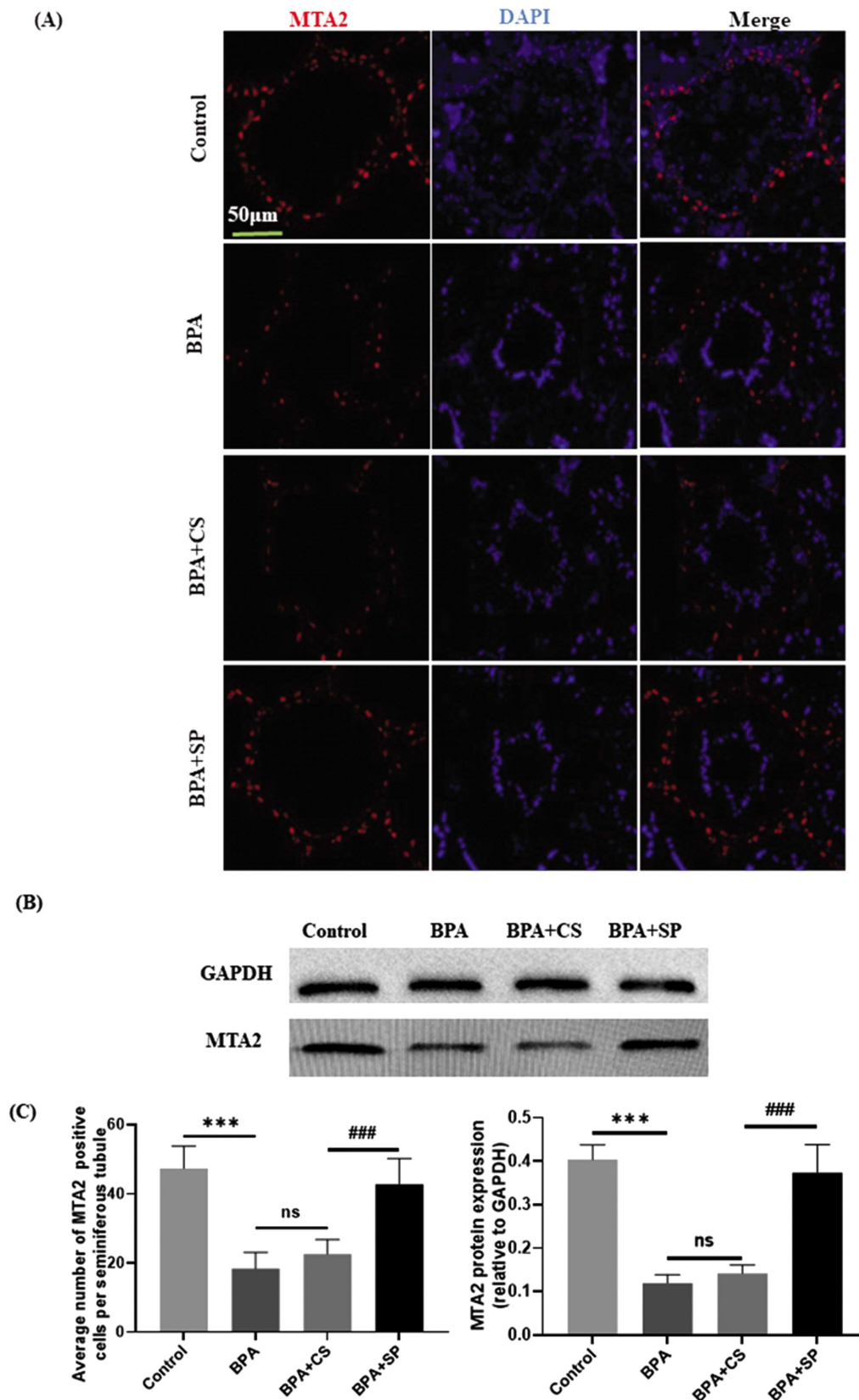


图5 各组小鼠睾丸组织 MTA2 蛋白表达差异

Fig.5 Difference of MTA2 protein expression in testicular tissues in each group.

Note: (A): Immunofluorescence staining of MTA2, the red fluorescence is MTA2 positive, and the blue fluorescence is nuclear localization with DAPI;

(B): The expression of MTA2 protein by Western blotting. (C): Statistical analysis of Immunofluorescence staining and Western blotting.

*** Compared to the Control group, $P < 0.01$; ns Compared with BPA group, $P > 0.05$; ### compared with BPA+CS group, $P < 0.01$, $n = 5$.

其中, 10^{-7} mol/L 的 BPA 可引起支持细胞形态由近柱形变成狭长的条状;另外, BPA 可导致支持细胞核染色质凝聚成絮状,生

精细胞与支持细胞分离并排列紊乱,从而由基底膜脱落入管腔;还有, BPA 可使支持细胞的增殖能力下降,从而导致生精细

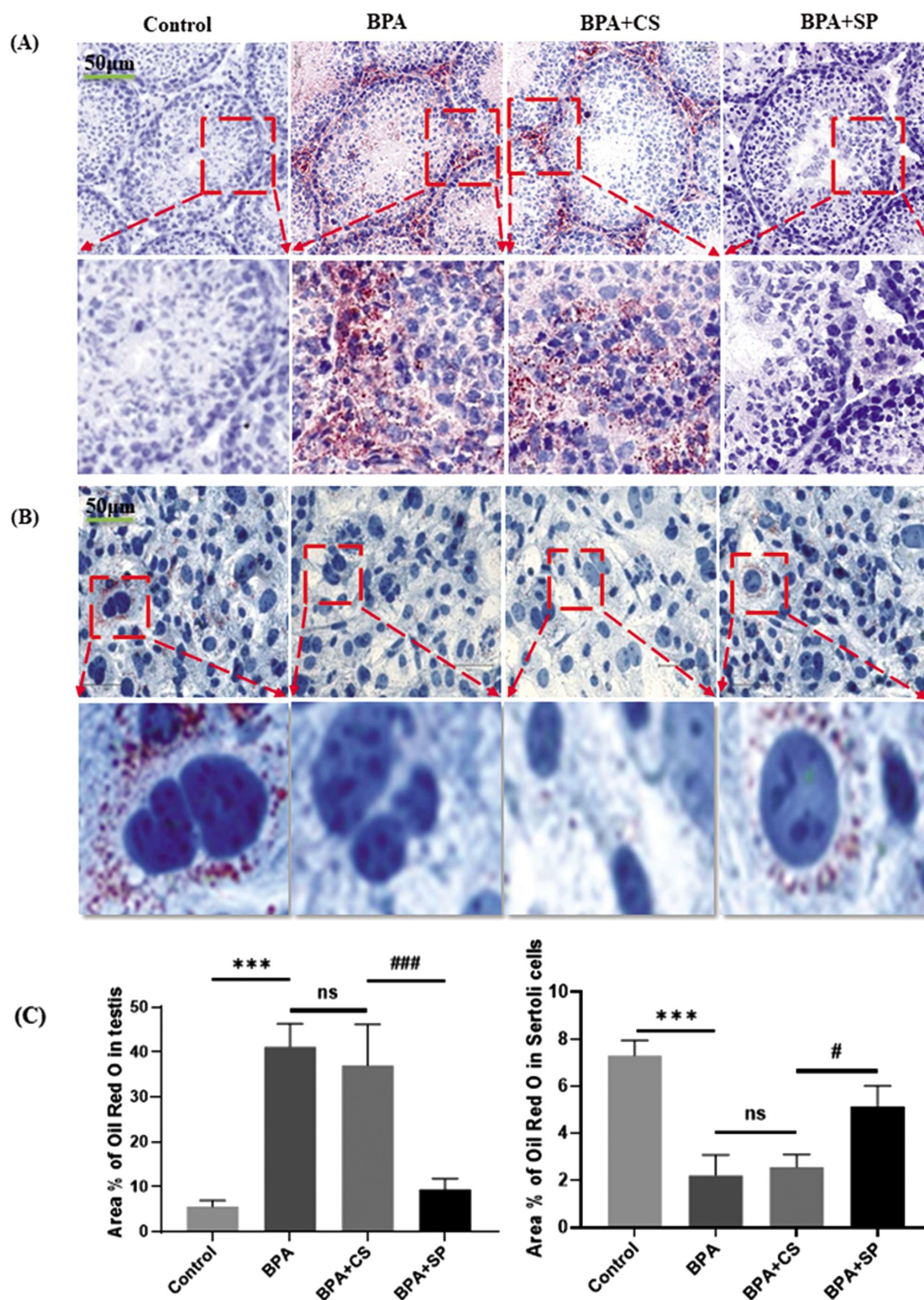


图 6 各组小鼠睾丸组织及支持细胞体外培养油红 O 染色

Fig.6 Oil Red O staining of testicular tissue and Sertoli cells cultured in vitro in each group.

Note: (A) Oil Red O staining of testicular tissue, the red lipid droplets are positive for Oil Red O staining; (B): Oil Red O staining of Sertoli cells in vitro, the red lipid droplets are positive for Oil Red O staining;

(C): Statistical analysis of Oil Red O staining with Image J.

*** Compared to the Control group, $P < 0.01$; ns Compared with BPA group, $P > 0.05$; ### compared with BPA+CS group, $P < 0.01$;

compared with BPA+CS group, $P < 0.05$, $n = 5$.

胞大量凋亡^[20-24]。但是,支持细胞的一个重要作用是吞噬、清除凋亡细胞残体,以维持正常的生精细胞比例及生精小管腔内环境稳定^[25,26]。研究表明,在缺乏与脂质代谢或转移相关基因(如核受体、类视黄醇 X 受体- β (RXR β))的小鼠中,支持细胞中过

量脂滴的积累导致精子发生受损^[27]。因此,支持细胞中脂质代谢的平衡对于维持正常的精子发生至关重要。MTA2 是组蛋白脱乙酰酶复合物的组成部分,在肿瘤进展中发挥重要作用^[28]。已有研究表明,MTA2 在睾丸中特异性表达于支持细胞,其表达

量与支持细胞的吞噬活性成正比^[29]。我们的研究通过测定MTA2表达量变化联合油红O染色结果证明了BPA染毒小鼠睾丸支持细胞吞噬活力减弱,在灌胃大鲵肌肉蛋白肽后,支持细胞吞噬作用恢复。体外支持细胞吞噬凋亡残体时,碎片被支持细胞包裹在细胞质^[30](未被吞噬的凋亡残体在染色前洗去),通过油红O染色可以观察到支持细胞细胞质中存在大量脂滴,这一体外实验也证明了使用大鲵肌肉蛋白肽刺激可以提升支持细胞吞噬功能这一事实。

我们的研究发现,大鲵肌肉蛋白肽可通过提高睾丸支持细胞吞噬作用而促进生精过程,成为抵抗BPA损害精子发生的保护剂。目前关于大鲵肉的研究已表明,大鲵肉酶解肽具有自由基清除活性^[31],大鲵肉酶解可获得血管紧张素酶抑制肽^[32];另外,大鲵肉活性肽已被用来研制运动功能饮料^[33]。这些结果都暗示大鲵作为最大的两栖动物有着特殊的生物功能。目前,在抵抗BPA致生精功能障碍的研究中,其作用机制多集中于抗氧化应激。例如,褪黑激素是一种源自色氨酸的神经激素,具有抗氧化作用,褪黑激素对BPA诱导的生殖毒性具有显著的改善作用^[34]。我们推测大鲵肌肉蛋白肽对于生精过程的保护可能与其抗氧化应激活性有关。但是其具体作用机制目前还不清楚,下步工作我们将进一步深入探索其作用的分子机理。

综上,本研究表明,大鲵肌肉蛋白肽可通过改善支持细胞吞噬作用抵抗BPA致精子发生障碍,本文为进一步研究大鲵肌肉中天然成分的活性以及开发具有特定功能的新型药物或保健食品提供重要理论依据。

参考文献(References)

- [1] Maffini M V, Rubin B S, Sonnenschein C, et al. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 254-255: 179-186
- [2] Jafari H, Mirzaianajmabadi K, Roudsari R L, et al. The factors affecting male infertility: A systematic review [J]. *Int J Reprod Biomed*, 2021, 19(8): 681-688
- [3] Anway M D, Cupp A S, Uzumcu M, et al. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility [J]. *Science*, 2005, 308(5727): 1466-1469
- [4] Wei Y, Li S, Han C, et al. *Cuscuta chinensis* flavonoids alleviate bisphenol A-induced apoptosis of testicular cells in male mice offspring[J]. *Andrologia*, 2019, 51(11): e13427
- [5] Olukole S G, Lanipekun D O, Ola-Davies E O, et al. Maternal exposure to environmentally relevant doses of bisphenol A causes reproductive dysfunction in F1 adult male rats: protective role of melatonin[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2019, 26(28): 28940-28950
- [6] Abdel-Maksoud F M, Ali F, Akingbemi B T. Prenatal exposures to bisphenol A and di (2-ethylhexyl) phthalate disrupted seminiferous tubular development in growing male rats [J]. *Reprod Toxicol*, 2019, 88: 85-90
- [7] Velasquez M, Tanrikut C. Surgical management of male infertility: an update[J]. *Transl Androl Urol*, 2014, 3(1): 64-76
- [8] Li H, Huang H, Hou L, et al. Discovery of Antimycin-Type Depsipeptides from a wbl Gene Mutant Strain of Deepsea-Derived *Streptomyces somaliensis* S CSIO ZH66 and Their Effects on Pro-inflammatory Cytokine Production [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 678
- [9] Graham E B, Knelman J E, Schindlbacher A, et al. Microbes as Engines of Ecosystem Function: When Does Community Structure Enhance Predictions of Ecosystem Processes? [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 214
- [10] Pei J, Chen D, Jin W, et al. Structure and mode of action of a novel antibacterial peptide from the blood of *Andrias davidianus* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2019, 69(5): 312-317
- [11] Pei J, Feng Z, Ren T, et al. Purification, characterization and application of a novel antimicrobial peptide from *Andrias davidianus* blood[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2018, 66(1): 38-43
- [12] Yin L, Dai Y, Cui Z, et al. The regulation of cellular apoptosis by the ROS-triggered PERK/EIF2 α /chop pathway plays a vital role in bisphenol A-induced male reproductive toxicity [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 314: 98-108
- [13] 徐阳, 孙强, 青维, 等. 复合酶法制备大鲵多肽的研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(24): 180-185
- [14] Wang H, Wang H, Xiong W, et al. Evaluation on the phagocytosis of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells in vitro through detecting lipid droplet formation by Oil Red O staining [J]. *Reproduction*, 2006, 132(3): 485-492
- [15] Rochester J R. Bisphenol A and human health: a review of the literature[J]. *Reprod Toxicol*, 2013, 42: 132-155
- [16] Wang C, Zhang J, Li Q, et al. Low concentration of BPA induces mice spermatocytes apoptosis via GPR30[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 49005-49015
- [17] Tian J, Ding Y, She R, et al. Histologic study of testis injury after bisphenol A exposure in mice [J]. *Toxicol Ind Health*, 2017, 33(1): 36-45
- [18] Morgan A M, El-Ballal S S, El-Bialy B E, et al. Studies on the potential protective effect of cinnamon against bisphenol A- and octylphenol-induced oxidative stress in male albino rats [J]. *Toxicol Rep*, 2014, 1: 92-101
- [19] Adegoke E O, Rahman M S, Pang M G. Bisphenols Threaten Male Reproductive Health via Testicular Cells [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 624
- [20] Wang L, Yan M, Wu S, et al. Microtubule Cytoskeleton and Spermatogenesis-Lesson From Studies of Toxicant Models [J]. *Toxicol Sci*, 2020, 177(2): 305-315
- [21] Wu D, Huang C J, Jiao X F, et al. Bisphenol AF compromises blood-testis barrier integrity and sperm quality in mice [J]. *Chemosphere*, 2019, 237: 124410
- [22] Lv Y, Li L, Fang Y, et al. In utero exposure to bisphenol A disrupts fetal testis development in rats[J]. *Environ Pollut*, 2019, 246: 217-224
- [23] Sèdes L, Desdoits-Lethimonier C, Rouaisnel B, et al. Crosstalk between BPA and FXR α Signaling Pathways Lead to Alterations of Undifferentiated Germ Cell Homeostasis and Male Fertility Disorders [J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 11(4): 944-958
- [24] Chen W, Duan P, Tang S, et al. [Effects of bisphenol A on the expression of N-cadherin, Vimentin and FSHR in rat Sertoli cells][J]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, 2017, 35(2): 101-105
- [25] Wakayama T, Iseki S. Role of the spermatogenic-Sertoli cell interaction through cell adhesion molecule-1 (CADM1) in

- spermatogenesis[J]. *Anat Sci Int*, 2009, 84(3): 112-121
- [26] Johnson L, Thompson D J, Varner D D. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis [J]. *Anim Reprod Sci*, 2008, 105(1-2): 23-51
- [27] Mascres B, Ghyselinck N B, Watanabe M, et al. Ligand-dependent contribution of RXRbeta to cholesterol homeostasis in Sertoli cells [J]. *EMBO Rep*, 2004, 5(3): 285-290
- [28] Covington K R, Fuqua S A. Role of MTA2 in human cancer [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2014, 33(4): 921-928
- [29] Zhu C J, Zhang S, Liang Y, et al. Elicitation of metastasis associated protein 2 expression in the phagocytosis by murine testicular Sertoli cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 445(3): 667-672
- [30] Medubi L J, Akinola O B, Oyewopo A O. Low testicular zinc level, p53 expression and impairment of Sertoli cell phagocytosis of residual bodies in rat subjected to psychological stress[J]. *Andrologia*, 2021, 53(3): e13958
- [31] 贺屹潮, 全文刚, 陈德经, 等. 大鲵肉酶解肽抗氧化及免疫活性研究[J]. *陕西理工大学学报(自然科学版)*, 2020, 36(02): 81-86
- [32] 王泽奇, 杨双盼, 冉旭. 大鲵肌肉 ACE 抑制肽的制备及其稳定性 [J]. *食品工业*, 2020, 41(04): 123-127
- [33] 鲍九枝, 余可锋. 响应面优化大鲵肉活性肽制备及运动饮料开发 [J]. *食品工业*, 2014, 35(11): 175-178
- [34] Olukole S G, Lanipekun D O, Ola-Davies E O, et al. Maternal exposure to environmentally relevant doses of bisphenol A causes reproductive dysfunction in F1 adult male rats: protective role of melatonin[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2019, 26(28): 28940-28950

(上接第 2090 页)

- [22] Zhang H, Gao Y, Wu D, et al. The relationship of lipoprotein-associated phospholipase A2 activity with the seriousness of coronary artery disease[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2020, 20(1): 295
- [23] Yin YJ, Chen YC, Xu L, et al. Relationship of lipoprotein-associated phospholipase A2(Lp-PLA2) and periprocedural myocardial injury in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention [J]. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 2020, 28(15): 100541
- [24] Sofogianni A, Alkagiet S, Tziomalos K. Lipoprotein-associated Phospholipase A2 and Coronary Heart Disease [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(3): 291-296
- [25] 郭彩花, 窦红勇, 李彩兰, 等. LP-PLA2, Hcy, D-D 水平在急性缺血性脑卒中患者中的临床应用价值 [J]. *检验医学与临床*, 2021, 18(14): 2104-2106
- [26] Xia YR, Li QR, Wang JP, et al. Diagnostic value of urinary monocyte chemoattractant protein-1 in evaluating the activity of lupus nephritis: a meta-analysis[J]. *Lupus*, 2020, 29(6): 599-606
- [27] 葛冰磊, 俞善春, 金纪伟. 急性缺血性脑卒中患者血清 Hcy、GAL3、MCP-1 表达及其临床意义 [J]. *中国医师杂志*, 2019, 21(6): 893-897
- [28] 葛纪, 薛忠元, 崔莉, 等. 尤瑞克林联合阿司匹林对老年缺血性脑卒中病人血清 NSE 和 MCP-1 的影响 [J]. *实用老年医学*, 2018, 32(6): 531-534
- [29] 许云鹤, 刘永刚, 赵小妹, 等. 血清 SAA, RBP4, MCP-1 与缺血性脑卒中脑损伤及梗死程度的关系研究 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(3): 255-258
- [30] Georgakis MK, Gill D, Rannikmäe K, et al. Genetically Determined Levels of Circulating Cytokines and Risk of Stroke [J]. *Circulation*, 2019, 139(2): 256-268