

热应激对猪睾丸细胞活性氧水平影响

张晓峰^{1,2}, 刘迪², 王淼², 李垚¹

(¹东北农业大学动物科学技术学院, 哈尔滨 150030; ²哈尔滨医科大学公共卫生学院, 哈尔滨 150081)

摘要: 【目的】探讨热应激对猪睾丸细胞的氧化损伤。【方法】将猪睾丸细胞分为 43℃ 1 h 组、43℃ 2 h 组、43℃ 1 h+37℃ 6 h 组、43℃ 2 h+37℃ 6 h 组、正常对照组及阳性对照组, 采用光镜和电镜观察细胞及线粒体形态学变化, 采用细胞活性氧检测试剂盒, 通过激光共聚焦显微镜和流式细胞仪观察细胞内活性氧水平的变化。

【结果】43℃ 处理 1 h 后, 细胞变圆, 线粒体发生部分或广泛变性, 43℃ 2 h 组和 43℃ 2 h+37℃ 6 h 组更为明显; 43℃ 1 h 组细胞内活性氧水平未见明显升高 ($P>0.05$), 但 43℃ 2 h 组细胞内活性氧水平显著高于 43℃ 1 h 组 ($P<0.05$)。上述 2 组细胞经 43℃ 处理后 37℃ 继续孵育 6 h, 细胞内活性氧水平均明显增强 ($P<0.05$)。【结论】热应激使睾丸细胞线粒体形态学发生改变, 诱发细胞氧化损伤, 进而可能影响睾丸的生殖功能。

关键词: 热应激; 睾丸细胞; 活性氧; 线粒体

Effects of Heat Stress on Reactive Oxygen Species in Swine Testicular Cells

ZHANG Xiao-feng^{1,2}, LIU Di², WANG Miao², LI Yao¹

(¹College of Animal Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; ²College of Public Health, Harbin Medical University, Harbin 150081)

Abstract: 【Objective】 To study the effect of heat stress on oxidative injuries in swine testicular cells. 【Method】 Swine testicular cells were divided into 6 groups, 43℃ 1 h, 43℃ 2 h, 43℃ 1 h+37℃ 6 h, 43℃ 2 h+37℃ 6 h, negative and positive groups. Cellular and mitochondrial morphology were observed by using light microscope and transmission electron microscope. Laser confocal microscopy and flow cytometry were used to determine the level of reactive oxygen species (ROS) in testicular cells with ROS test Kit. 【Result】 After 1 h with 43℃ treatment, cells became circular and mitochondria showed partial or extensive denaturation, especially obvious in 43℃ 2 h and 43℃ 2 h+37℃ 6 h groups. There were no significant increase of ROS in testicular cells in 43℃ 1 h group ($P>0.05$), but the level of ROS obviously increased in 43℃ 2 h group, compared to the former ($P<0.05$), and the level of ROS in 43℃ 1 h and 43℃ 2 h groups also continued to increase after additional 6 h in 37℃, compared to negative group ($P<0.05$). 【Conclusion】 Heat stress could result in the morphological changes of mitochondria of testicular cells and induce oxidative injuries, thus could affect the reproductive function of testis.

Key words: heat stress; testicular cells; reactive oxygen species; mitochondria

0 引言

【研究意义】随着畜牧业规模化、集约化的迅速发展及饲养密度的进一步提高, 许多养殖企业对夏季高温重视不足及设备改造投入不够, 环境高温直接或

间接影响了雄性家畜精子成熟和精液质量, 影响了繁殖率^[1], 造成较大的经济损失。因此, 揭示热应激对睾丸细胞的影响及其可能的作用机制, 为预防热应激、寻找缓解或抗热应激的措施具有重要意义。【前人研究进展】热应激 (heat stress) 主要表现产热增加、排

收稿日期: 2009-04-30; 接受日期: 2009-07-25

基金项目: 中国博士后科学基金 (20080440834)、哈尔滨市科技局青年科技创新人才基金 (2008RFQXS083)

作者简介: 张晓峰 (1976—), 男, 黑龙江肇东人, 副教授, 研究方向为生殖毒理与代谢调控。Tel: 0451-87502830, 13836057789; E-mail: zhanghyd@163.com。通信作者李垚 (1966—), 女, 黑龙江密山人, 教授, 博士, 研究方向为分子营养与代谢调控。E-mail: liyao1966@sina.com

汗增多、心血管系统紧张性增加、消化液分泌减少、中枢神经系统兴奋性降低等^[2-3]。热应激使公牛体温升高,引起阴囊皮温和睾丸温度升高,进而使精子成熟和储存受到影响^[4],热应激使奶牛早期胚胎死亡,而且发生在发情期或发情后1~7 d的热应激对胚胎生存极为有害^[5],研究发现体外受精猪胚胎细胞热应激(42℃)作用9 h,45.6%的细胞发生凋亡^[6]。此外,热应激情况下动物的发情状况不易察觉,发情特征不明显或暗发情、空怀^[7]。热应激使机体激素分泌水平发生改变,可直接和(或)间接影响生殖激素分泌和调控^[8-9]。目前为止,热应激对家畜繁殖性能影响的机理尚不清楚,热应激对雄性动物繁殖性能影响的研究报道较少。【本研究的切入点】生物机体在生理、病理情况下可产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),过量 ROS 对生殖细胞产生损伤作用,诱导生殖细胞发生凋亡,直接和间接参与生殖疾病的致病过程^[10-11]。目前 ROS 所致的生殖细胞氧化损伤研究报道较少。【拟解决的关键问题】ROS 在热应激中的作用逐渐引起关注,本试验从氧化应激损伤角度,以猪睾丸细胞为研究对象,探讨热应激对睾丸细胞内 ROS 水平的变化,为揭示热应激对雄性畜禽生殖功能损害的作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

MEM 培养基(美国 Invitrogen 公司),小牛血清(上海纬群生物技术有限公司),EDTA/胰酶(美国 Sigma 公司),活性氧检测试剂盒(碧云天生物技术研究),激光共聚焦显微镜(C1Si,日本 Nikon);流式细胞仪(Cell Lab Quanta SC,美国 Beckman);电热鼓风干燥箱(101 型,中国泰斯特)。

1.2 细胞培养与处理

猪睾丸(swine testicular, ST)生精细胞系由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所王永博士惠赠。细胞在37℃、5% CO₂条件下培养于含10%小牛血清的 MEM 培养液中,EDTA/胰酶消化、传代,取对数生长期细胞用于试验。

试验设6组,即43℃ 1 h 组、43℃ 2 h 组、43℃ 1 h+37℃ 6 h 组、43℃ 2 h+37℃ 6 h 组、正常对照组(37℃ 6 h)及阳性对照组(试剂盒阳性对照)。细胞置于电热干燥箱中43℃恒温烘烤。

1.3 细胞形态学观察

细胞接种于培养瓶中,按上述方法处理细胞后,

光镜下观察细胞形态学变化,收集细胞后戊二醛固定,Epon812 树脂包埋,超薄切片机切片,醋酸铀-柠檬酸铅双重染色,透射电镜观察细胞线粒体形态学变化。

1.4 细胞活性氧检测

按试剂盒说明书操作。2×10⁴细胞接种于细胞培养瓶或爬片接种于6孔培养板中,24 h 更换2% MEM 培养液,按上述方法处理细胞后,弃培养液,采用原位装载探针的方法,加入终浓度为3.3 μmol·L⁻¹ DCFH-DA(无血清细胞培养液稀释)37℃孵育20 min,用无血清细胞培养液洗涤3次,激光共聚焦显微镜观察摄像(激发波长488 nm,发射波长520 nm)或收集细胞悬浮于 PBS 溶液中流式细胞仪检测。阳性对照组加入试剂盒阳性对照试剂37℃刺激30 min 后按上述方法操作,试验重复3次。

1.5 数据分析

数据以 X±SD 表示,SPSS 13.0 软件 ANOVA 方差分析进行统计学分析,显著水平为 P<0.05。

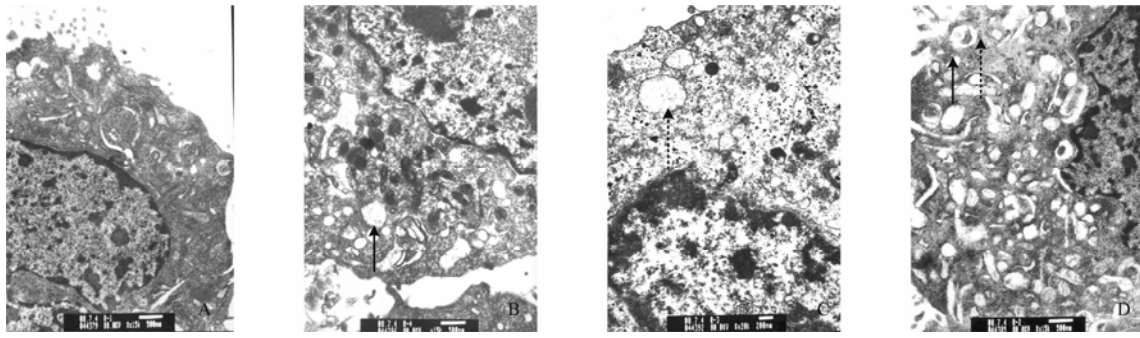
2 结果与分析

2.1 细胞形态学变化

光镜下可见正常睾丸细胞呈梭形,依附生长。高温处理1 h 后可观察到细胞变圆,随着时间延长,变圆的细胞数量增多,并有部分细胞脱落。电镜下可见高温处理后部分细胞水肿,线粒体发生部分或广泛变性、线粒体嵴肿胀或消失,细胞表面突起减少,尤以43℃ 2 h 组和43℃ 2 h+37℃ 6 h 组为明显(图1)。

2.2 细胞内活性氧水平变化

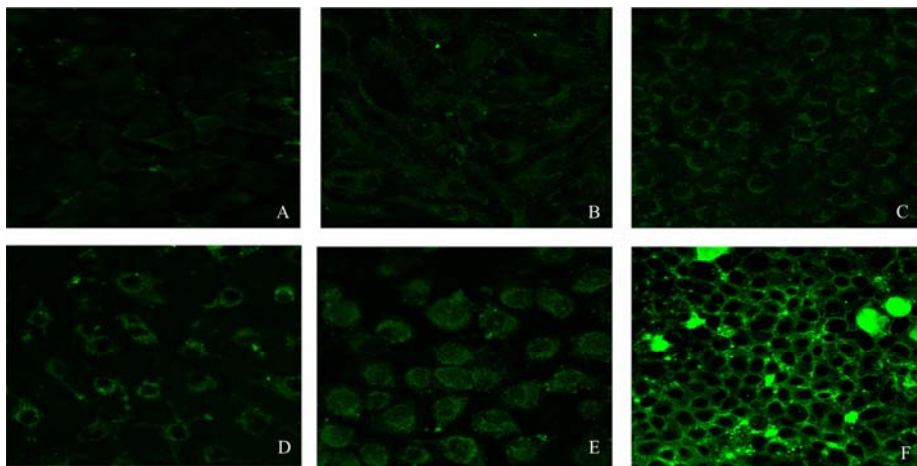
活性氧检测试剂盒是利用荧光探针 DCFH-DA 进行检测。细胞内的活性氧可以将 DCFH(无荧光)氧化生成 DCF(有荧光),观察 DCF 荧光强度就可以知道细胞内活性氧水平。激光共聚焦显微镜下可见阴性对照组细胞内无荧光或发出微弱荧光,流式细胞仪检测荧光强度为0.73±0.208,表明细胞内活性氧水平较低,而阳性对照组可见细胞内发出较强的荧光,分布于细胞周边。高温处理组中,43℃ 1 h 组细胞内可见微弱的荧光强度,但37℃继续孵育6 h 后细胞内荧光强度明显增强,为2.10±0.265,与对照组和43℃ 1 h 组相比有显著差异(P<0.05);43℃ 处理细胞2 h,细胞内荧光强度明显强于43℃ 1 h 组(P<0.05),37℃ 孵育6 h 后细胞内荧光强度继续增强,达到3.83±0.451(图2、图3)。



A: 阴性对照; B: 43°C 1 h + 37°C 6 h, 线粒体部分变性 (↑); C: 43°C 2 h, 线粒体部分变性, 线粒体嵴消失 (↓); D: 43°C 2 h + 37°C 6 h, 线粒体广泛变性
 A: Negative control; B: 43°C 1 h + 37°C 6 h, partial denaturation of mitochondria (↑); C: 43°C 2 h, partial denaturation of mitochondria and disappearance of mitochondrial cristae (↓); D: 43°C 2 h + 37°C 6 h, extensive denaturation of mitochondria

图 1 热应激所致睾丸细胞线粒体形态学变化 (15 000×)

Fig. 1 Morphological changes of mitochondria induced by heat stress in testicular cells (15 000×)



A: 阴性对照; B: 43°C 1 h; C: 43°C 1 h + 37°C 6 h; D: 43°C 2 h; E: 43°C 2 h + 37°C 6 h; F: 阳性对照
 A: Negative control; B: 43°C 1 h; C: 43°C 1 h + 37°C 6 h; D: 43°C 2 h; E: 43°C 2 h + 37°C 6 h; F: Positive control

图 2 激光共聚焦显微镜下所见睾丸细胞内荧光强度变化 (600×)

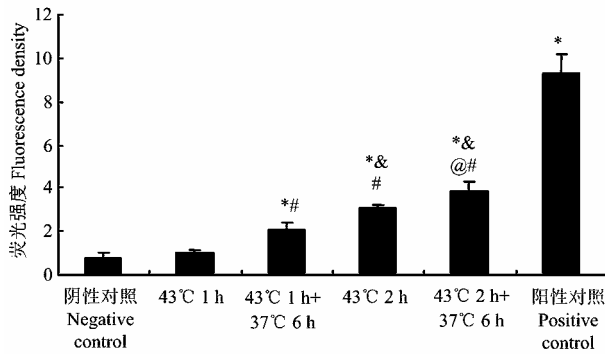
Fig. 2 Changes of fluorescence intensity in testicular cells observed by using laser confocal microscopy (600×)

3 讨论

活性氧是含氧的自由基, 是细胞氧化磷酸化过程的氧的代谢副产物, 是一类有高度化学反应活性的含氧基团, 包括羟自由基 ($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、单线态氧 (O^2) 及过氧化氢 (H_2O_2)、脂质过氧化自由基 ($\text{ROO}\cdot$) 等。生物机体摄入的氧中, 有 2% 可转化为活性氧^[12-14]。在正常情况下, 机体内 ROS 的产生和清除处于动态平衡状态, 当机体受到氧化损伤会使 ROS 的产生急剧增加, 当 ROS 清除体系的能力

不足时, 造成体内 ROS 蓄积, 导致机体组织的氧化受损^[15]。

机体内的 ROS 具有双重性。一方面, ROS 不仅参与机体免疫和信号的传导, 同时为雄性生殖过程所必需^[16-17]。Sharma 等^[18]发现, ROS 通过增强精子磷脂酶的活性进而促进顶体反应。ROS 可活化酪氨酸磷酸化, 在精子对卵细胞的粘附过程中发挥生理调节作用, 这是 ROS 对雄性生殖功能的有利作用。另一方面, ROS 很容易与生物大分子发生反应, 可直接损害或通过一系列过氧化链式反应引起细胞结构的破坏, 影响



* 与阴性对照组比较, $P < 0.05$; #与 43°C 1 h 组比较, $P < 0.05$; & 与 43°C 1 h + 37°C 6 h 组比较, $P < 0.05$; @ 与 43°C 2 h 组比较, $P < 0.05$; * Compare to negative control, $P < 0.05$; # Compare to 43°C 1 h, $P < 0.05$; & Compare to 43°C 1 h + 37°C 6 h, $P < 0.05$; @ Compare to 43°C 2 h, $P < 0.05$

图 3 热应激对睾丸细胞内活性氧水平影响

Fig. 3 Effect of heat stress on ROS levels in testicular cells

机体正常细胞和组织, 从而引发多种疾病^[19]。过量 ROS 生成时对生殖细胞产生损伤作用, 攻击细胞膜及脂蛋白中的多不饱和脂肪酸, 细胞膜流动性下降和脂质过氧化, 蛋白质和 DNA 破坏或参与诱导生殖细胞发生凋亡, 从而直接或间接影响雄性繁殖功能^[20-22]。有研究表明, ROS 与精子畸形率有极密切的关系, ROS 产生过量时, 形态异常以及活动性差的精子数量则会增多^[23]。

哺乳动物睾丸对温度十分敏感, 温度升高可影响睾丸生殖功能。本试验结果表明, 高温处理睾丸细胞 1 h, 细胞内 ROS 水平未见明显增加, 但高温处理细胞 2 h, 细胞内 ROS 水平显著增加, 即使随后脱离高温环境, 在正常温度中培养 6 h, 细胞内 ROS 水平未见降低, 反而出现持续增高, 表明高温使睾丸细胞产生大量活性氧自由基。有研究发现, 急性热应激使肉鸡肌肉线粒体内超氧阴离子自由基生成增加, 但对蛋鸡肌肉线粒体内超氧阴离子自由基的生成无影响, 分析认为这与热应激导致鸡体内直肠和肌肉温度升高有关^[24]。本试验结果表明, 如果反复多次高温处理细胞, 细胞内 ROS 水平会保持较高水平。

生理状态下线粒体是 ROS 产生的主要部位, 一方面线粒体利用氧产生 ATP, 供机体能量需求, 同时也生成 ROS 自由基损伤线粒体本身^[25]。本试验观察细胞线粒体形态学变化, 发现热应激使细胞线粒体变性, 线粒体肿胀或消失, 提示高温可能使线粒体结构受损导致呼吸链功能降低或失常, 电子传递发生障碍,

引起细胞内 ROS 水平升高, 而 ROS 的增加又进一步损伤线粒体。

4 结论

热应激使睾丸细胞发生氧化损伤, 生成较多的活性氧, 远离应激源后短时间内机体仍处于氧化与抗氧化的失衡状态, 可能损害睾丸细胞功能, 导致畜禽生产能力下降或丧失。

References

- [1] 范石军, 韩友文, 李荣文, 尹清强. 家禽热应激机理及其研究进展. 饲料博览, 1996, 8(5): 14-16.
Fan S J, Han Y W, Li R W, Yin Q Q. Mechanisms and progression of heat stress on poultry. *Feed Panorama*, 1996, 8(5): 14-16. (in Chinese)
- [2] Rozenboim I, Tako E, Gal-Garber O, Proudman J A, Uni Z. The effect of heat stress on ovarian function of laying hens. *Poultry Science*, 2007, 86: 1760-1765.
- [3] 刘东武, 陈志伟. 热应激对奶牛生理性能的影响. 安徽农业科学, 2008, 36: 4104-4106.
Liu D W, Chen Z W. Effect of heat stress on physiological characters of dairy cows. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36: 4104-4106. (in Chinese)
- [4] 桑润滋, 田树军, 李俊杰, 倪俊卿, 韩建永, 赵春霞, 吴培, 马亚宾, 张军辉, 胡月超, 吴云海. 热应激对荷斯坦公牛精液品质的影响及机理. 中国兽医学报, 2002, 22: 407-410.
Sang R Z, Tian S J, Li J J, Ni J Q, Han J Y, Zhao C X, Wu P, Ma Y B, Zhang J H, Hu Y C, Wu Y H. Influence of heat stress on semen quality of holstein bull and approach to its mechanism. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2002, 22: 407-410. (in Chinese)
- [5] Jousan F D, de Castro e Paula L A, Block J, Hansen P J. Fertility of lactating dairy cows administered recombinant bovine somatotropin during heat stress. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90: 341-351.
- [6] Isom S C, Prather R S, Rucker E B. Heat stress-induced apoptosis in porcine in vitro fertilized and parthenogenetic preimplantation-stage embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 2007, 74: 574-581.
- [7] 孙桂芬. 热应激对奶牛生产性能的影响及预防措施. 广东奶业, 2006, (3): 5-8.
Sun G F. Effect of heat stress on reproductive function of dairy cow and its protective measure. *Guangdong Dairy Production*, 2006, (3): 5-8. (in Chinese)
- [8] Meendering J R, Torgrimson B N, Houghton B L, Halliwill J R,

- Minson C T. Menstrual cycle and sex affect hemodynamic responses to combined orthostatic and heat stress. *American Journal of Physiology, Heart Circulatory Physiology*, 2005, 289(2): 631-642.
- [9] Ren L, Medan M S, Ozu M, Li C, Watanabe G, Taya K. Effects of experimental cryptorchidism on sperm motility and testicular endocrinology in adult male rats. *Journal of Reproduction Development*, 2006, 52: 219-228.
- [10] Liu Z, Lin H, Ye S, Liu Q Y, Meng Z, Zhang C M, Xia Y, Margoliash E, Rao Z, Liu X J. Remarkably high activities of testicular cytochrome c in destroying reactive oxygen species and in triggering apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103: 8965-8970.
- [11] 朱德淳, 刘睿智, 刘 媛, 孙 妍, 许宗革. 活性氧、白细胞和精子凋亡关系的探讨. *中国现代医学杂志*, 2007, 17: 926-928.
- Zhu D C, Liu R Z, Liu Y, Sun Y, Xu Z G. Relations of reactive oxygen species leucocyte and sperm apoptosis. *China Journal of Modern Medicine*, 2007, 17: 926-928. (in Chinese)
- [12] 余祖胤, 毛秉智, 从玉文. 活性氧与细胞周期调控. *军事医学科学院院刊*, 2007, 31: 576-578.
- Yu Z Y, Mao B Z, Cong Y W. Reactive oxygen species and cell cycle regulation. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 2007, 31: 576-578. (in Chinese)
- [13] Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*, 2002, 80: 780-787.
- [14] Nong Q, Komatsu M, Izumo K, Indo H P, Xu B, Aoyama K, Majima H J, Horiuchi M, Morimoto K, Takeuchi T. Involvement of reactive oxygen species in Microcystin-LR-induced cytogenotoxicity. *Free Radical Research*, 2007, 41: 1326-1337.
- [15] Sahin K, Onderci M, Sahin N, Gursu M F, Vijaya J, Kucuk O. Effects of dietary combination of chromium and biotin on egg production, serum metabolites, and egg yolk mineral and cholesterol concentrations in heat-distressed laying quails. *Biological Trace Element Research*, 2004, 101(2): 181-192.
- [16] Williams M S, Kwon J. T cell receptor stimulation, reactive oxygen species, and cell signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, 2004, 37: 1144-1151.
- [17] Agarwal A, Saleh R A, Bedaiwy M A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility Sterility*, 2003, 79: 829-843.
- [18] Shanna R K, Aganal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 1996, 48: 835-850.
- [19] Kemal D N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 2000, 74: 1200-1207.
- [20] Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biological Endocrinology*, 2004, 23(2): 12-16.
- [21] Ochsendorf F R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reproductive Update*, 1999, 5: 399-420.
- [22] Juránek I, Bezek S. Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species-cause or consequence of tissue injury? *General Physiology and Biophysics*, 2005, 24: 263-278.
- [23] Zalata A A, Ahmed A H, Allamaneni S S, Comhaire F H, Agarwal A. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian Journal of Andrology*, 2004, 6: 313-318.
- [24] Murphy M P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemistry Journal*, 2009, 417(1): 1-13.
- [25] Mujahid A, Yoshiki Y, Akiba Y, Toyomizu M. Superoxide radical production in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. *Poultry Science*, 2005, 84: 307-314.

(责任编辑 林鉴非)