

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.20.001
文章编号: 1005-8982 (2018) 20-0001-05

基础研究 · 论著

VEGF、VEGFR2 在慢性砷中毒大鼠 生精小管中的表达及其意义*

戴研平¹, 王平², 高晓勤²

(1. 贵州医科大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550004; 2. 遵义医药高等专科学校,
贵州 遵义 563006)

摘要: 目的 研究血管内皮生长因子 (VEGF) 及其受体 2 (VEGFR2) 在慢性砷中毒大鼠生精小管中的表达, 探讨其与男性不育的关系及致男性不育的机制。**方法** 健康清洁雄性 SD 大鼠 40 只, 体重 160 ~ 200 g, 随机分为高 (60.0 mg/L)、中 (12.0 mg/L)、低 (2.4 mg/L) 剂量染毒组和对照组 (蒸馏水), 采用经口自由饮水方式染毒, 连续染毒 6 个月。染毒结束后, 采用免疫组织化学法测定 VEGF、VEGFR2 的表达, 末端标记法 (TUNEL) 测定大鼠睾丸生精上皮凋亡细胞灰度值, 并观察精子形态, 测定精子活力。**结果** 免疫组织化学法结果显示, 与对照组比较, 各染毒组 VEGF、VEGFR2 表达水平较低 ($P < 0.05$)。TUNEL 法结果显示, 各染毒组大鼠生精上皮凋亡细胞灰度值较对照组低 ($P < 0.05$); 随着砷染毒剂量的增加, 大鼠睾丸生精上皮凋亡细胞灰度值呈降低趋势。与对照组比较, 各染毒组正常精子数量减少, 畸形精子比例逐渐升高, 精子活力下降 ($P < 0.05$)。**结论** 慢性砷中毒可影响大鼠睾丸中 VEGF、VEGFR2 的表达, 引起生精上皮细胞凋亡, 导致男性不育。

关键词: 血管内皮生长因子; 血管内皮细胞生长因子受体 2; 砷中毒; 生精小管

中图分类号: R595

文献标识码: A

Expressions of VEGF and VEGFR2 proteins in seminiferous tubules of rats with chronic arsenic poisoning*

Yan-ping Dai¹, Ping Wang², Xiao-qin Gao²

(1. School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China;
2. Zunyi Medical and Pharmaceutical College, Zunyi, Guizhou 563006, China)

Abstract: Objective To study the expressions of VEGF and its receptor 2 (VEGFR2) in the seminiferous tubules of chronic arsenic poisoning rats, to explore their relationships with the male infertility and the mechanism of male sterility. **Methods** Forty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups, i.e. high-dose arsenic exposure group (60.0 mg/L), medium-dose arsenic exposure group (12.0 mg/L), low-dose arsenic exposure group (2.4 mg/L), and control group (distilled water). The rats were treated with arsenic through drinking water for 6 consecutive months. In the end of the experiment, expressions of VEGF and VEGFR2 were detected by immunohistochemistry, the grey values of apoptosis cells in the seminiferous tubular epithelia of the rats were determined by TUNEL method, the sperm morphology and sperm motility were observed. **Results** Immunohistochemical results showed that the expression levels of VEGF and VEGFR2 in the arsenic exposure groups were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). TUNEL method results

收稿日期: 2017-12-08

* 基金项目: 贵州省科学技术基金 [No: 黔科合人才团队 (2014) 4005 号]; 贵州省遵义市科技计划 [No: 遵市科合设字 (2014) 01 号]
[通信作者] 王平, E-mail: 87261253@qq.com

showed that compared with the control group, the grey values of apoptosis cells in the seminiferous tubular epithelia of the rats obviously decreased in the arsenic exposure groups ($P < 0.05$); with the increase of arsenic exposure dose, the grey values of apoptosis cells in the seminiferous tubules showed a trend of decrease. Compared with the control group, the number of normal sperms decreased, the sperm deformity rate increased and the sperm motility dropped in the arsenic exposure groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Chronic arsenic poisoning affects expressions of VEGF and VEGFR2 in seminiferous tubules of rat testis and can cause apoptosis of seminiferous epithelial cells, resulting in male infertility.

Keywords: VEGF; VEGFR2; arsenic poisoning; seminiferous tubule

砷是一种广泛存在于自然界的类金属元素和人类致癌物^[1]。研究表明,慢性砷暴露可影响人类的生殖和发育,但目前关于砷致癌及生殖毒性的具体机制尚不明确^[2-4]。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)与精子的发生和成熟有关。目前尚未见砷中毒及 VEGF、VEGFR2 与男性不育相关性的报道。本实验通过研究 VEGF、VEGFR2 在慢性砷中毒大鼠睾丸中的表达变化,检测生精上皮细胞凋亡情况,探讨慢性砷中毒对大鼠睾丸损伤的机制,为慢性砷中毒不育的防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择体重 160 ~ 200 g 健康清洁级雄性 SD 大鼠 40 只,由贵州医科大学实验动物中心提供,许可证号: SCK(黔)2002 ~ 0001。动物饲养环境温度 23 ~ 25℃,相对湿度 60% ~ 65%。实验期间,大鼠可自由摄食、饮水。

适应性饲养 1 周后,将大鼠随机分为 4 组:对照组(蒸馏水),以及低(2.4 mg/L)、中(12.0 mg/L)、高(60.0 mg/L)剂量染毒组,每组 10 只。采用自由饮水方式连续染毒 6 个月。每天测定并记录大鼠体重,观察大鼠外观行为变化。

1.2 主要试剂

VEGF、VEGFR2 兔抗鼠多克隆抗体(英国 Abcam 公司),细胞凋亡检测试剂盒(武汉博士德生物工程公司),亚砷酸钠(分析纯,北京化工厂)。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学法 睾丸石蜡切片,用二甲苯化蜡至水,0.01 mmol/L 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)微波修复 15 min,冷却至室温,30 ml/L 过氧化氢封闭内源

性过氧化物酶 15 min,10 ml/L Triton-100 浸泡 30 min 增加细胞通透性,山羊血清 37℃ 封闭 30 min 后加一抗(1 : 50),4℃ 孵育过夜,恢复室温 40 min 后滴加山羊抗兔 IgG,37℃ 孵育 1 h, DAB 显色 5 min,苏木精复染 2 min,常规脱水、透明、封片。以上步骤间均用 0.01 mmol/L PBS(pH 7.0 ~ 7.4)洗 3 次,5 min/次。采用 Olympus BX51 显微镜拍照,IPP 6.0 图像分析软件计算阳性细胞平均灰度值。

1.3.2 末端标记法(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL) 取大鼠左侧睾丸石蜡组织切片,按照细胞凋亡试剂盒说明书采用末端脱氧核苷酸介导的 dUTP 原位 TUNEL 检测睾丸生精小管细胞凋亡情况。细胞核中出现棕黄色颗粒为凋亡细胞。每组随机取 3 张连续切片,每张观察 5 个视野,采用 Mias 图像分析软件测定凋亡细胞核的平均灰度值。

1.3.3 精子形态观察 采用加样枪每组吸取 40 μl 精子悬液滴在载玻片上,用玻片将悬液轻轻推开,让其自然晾干,甲醇固定 10 min,晾干,1% 伊红染色 10 min,流水冲洗、晾干。采用盲法在光学显微镜下观察精子形态。

1.3.4 精子活力测定 取一侧附睾,用 37℃ 生理盐水冲洗,眼科剪剪碎,37℃ 生理盐水 5 ml,吸管抽吸 5 次,37℃ 恒温箱 10 min,待精子充分分离后,采用伟力精子分析系统记录精子浓度、精子活动率及各个活动精子浓度。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF、VEGFR2 在睾丸中的表达

2.1.1 VEGF 免疫组织化学法结果显示,VEGF 阳

性产物主要位于睾丸精原细胞和支持细胞的胞质及胞核、初级精母细胞及精子细胞的顶体、精子残余体。各染毒组与对照组的 VEGF 灰度值比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 对照组较染毒组下降。见表 1 和图 1。

2.1.2 VEGFR2 VEGFR2 阳性产物主要位于睾丸精子细胞的顶体及精子头部、精原细胞及支持细胞的胞质及胞核。各染毒组与对照组的 VEGFR2 灰度值比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 对照组较染毒组下降。见表 1 和图 2。

表 1 各组大鼠睾丸 VEGF、VEGFR2 灰度值比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	VEGF	VEGFR2
对照组	109.60 ± 0.41	90.12 ± 0.37
低剂量染毒组	127.80 ± 0.62 [†]	117.60 ± 0.71 [†]
中剂量染毒组	136.70 ± 0.95 [†]	130.20 ± 0.50 [†]
高剂量染毒组	145.00 ± 0.60 [†]	151.20 ± 0.32 [†]
F 值	36.941	5.981
P 值	0.000	0.020

注: † 与对照组比较, $P < 0.05$

2.2 睾丸生精小管的细胞凋亡情况

TUNEL 染色结果显示, 凋亡细胞呈棕黄色, 对

照组睾丸生精小管偶见凋亡细胞, 各染毒组上皮凋亡细胞核染色深, 核固缩, 体积比正常细胞小, 染色质浓缩聚集于核膜下。对照组, 以及低、中、高剂量染毒组大鼠睾丸生精小管上皮细胞核灰度值分别为 (92.42 ± 0.36)、(133.0 ± 0.72)、(150.32 ± 0.23) 和 (164.20 ± 0.85), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 56.692, P = 0.000$), 各染毒组凋亡细胞数较对照组增多。见图 3。

2.3 精子形态

对照组精子形态正常, 低剂量染毒组精子形态基本正常, 偶见异常精子结构不完整和尾部折叠; 中剂量染毒组异常精子明显增多, 可见精子头部与尾部分离畸形; 高剂量染毒组正常数量明显减少, 畸形精子比例明显升高, 可见精子头尾分离和尾部折叠现象。见图 4。

2.4 精子活力

各组大鼠精子浓度、精子活动率、活动精子浓度比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 各染毒组大鼠精子活动率、活动精子浓度较对照组低 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 低剂量染毒组大鼠精子浓度较高, 而中、高剂量染毒组大鼠精子浓度较低 ($P < 0.05$)。见表 2。

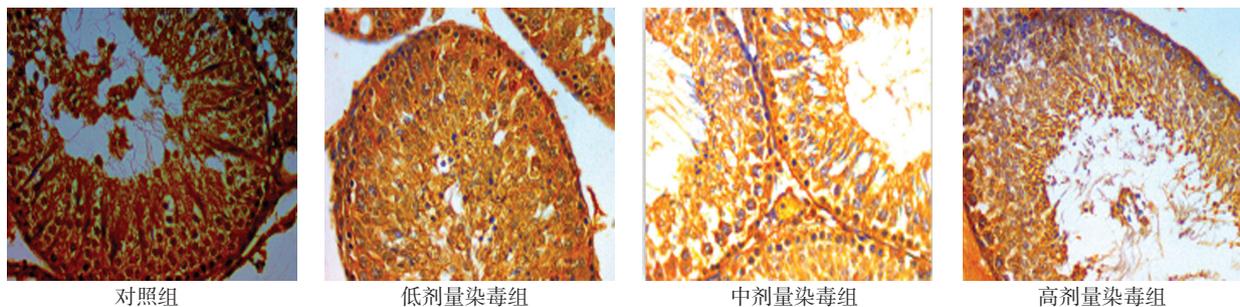


图 1 VEGF 在大鼠睾丸生精小管中的表达 (免疫组织化学法 × 400)

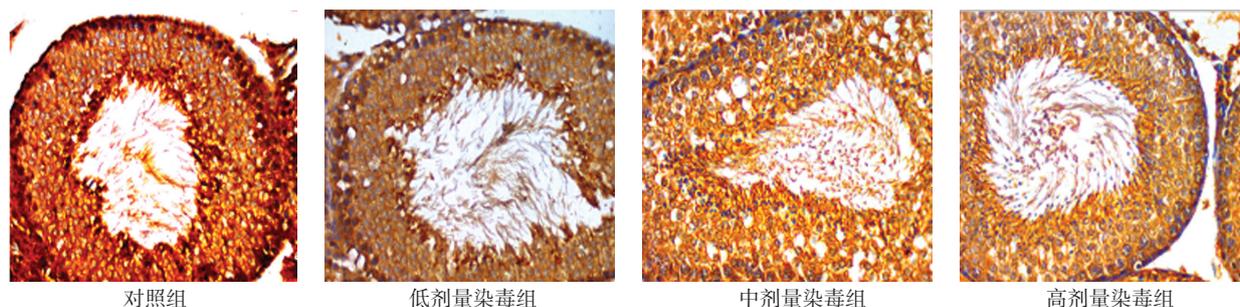
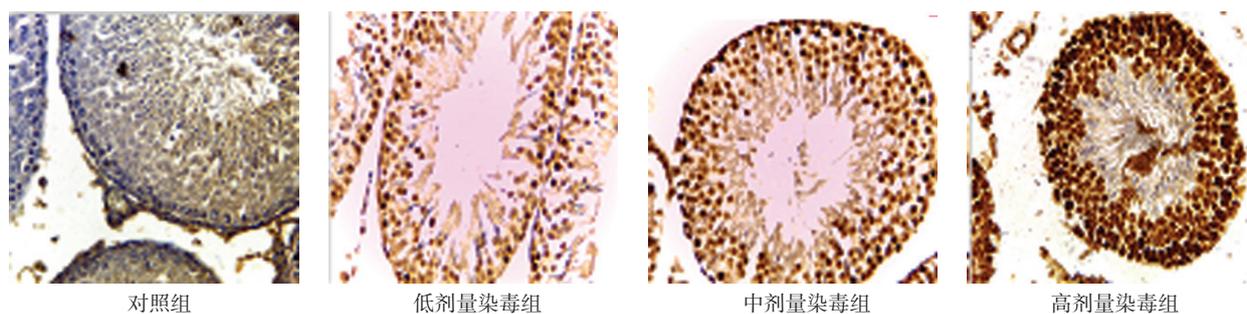
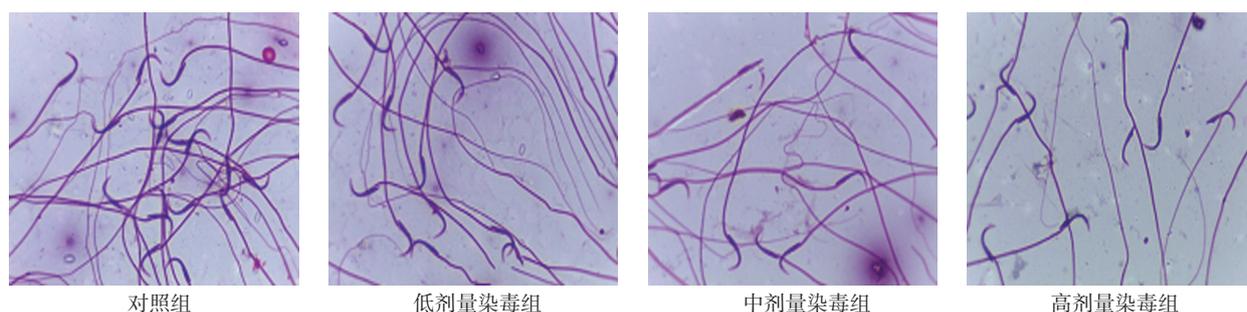


图 2 VEGFR2 在大鼠睾丸生精小管中的表达 (免疫组织化学法 × 400)

图 3 大鼠睾丸生精小管细胞核凋亡情况 (TUNEL 染色 $\times 400$)图 4 各组大鼠附睾精子涂片 (伊红染色 $\times 100$)表 2 各组大鼠精子活力比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	精子浓度 / ($\times 10^6$ 个/ml)	精子活动率 / %	活动精子浓度 / %
对照组	46.51 \pm 17.20	54.72 \pm 9.70	26.30 \pm 12.20
低剂量染毒组	65.70 \pm 21.20 [†]	43.20 \pm 12.80 [†]	23.05 \pm 11.04 [†]
中剂量染毒组	23.20 \pm 5.10 [†]	40.43 \pm 10.80 [†]	12.05 \pm 5.01 [†]
高剂量染毒组	19.80 \pm 9.08 [†]	37.53 \pm 9.86 [†]	10.02 \pm 4.80 [†]
F 值	6.486	5.031	8.872
P 值	0.016	0.018	0.003

注: †与对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

砷是一种广泛存在于自然环境中的化学污染物和 A 类致癌物。VEGF 及其受体是体内与生殖相关的重要生长因子之一。VEGF 能够促进血管生成, 在已发现的 3 种 VEGF 受体中, VEGFR2 即 KDR 是血管发生和构建的主要调节者。VEGFA 与 VEGFR2 结合后能介导 VEGF 促进内皮细胞增殖、促内皮细胞存活作用与抗凋亡、促进内皮细胞迁移、提高血管通透性^[5-7]。

研究证明, VEGF 与男性生殖及细胞凋亡有关。VEGF 在睾丸中发挥重要作用, 与生精功能的调节有关^[8]。VEGF 在附睾中起重要作用, 参与附睾血管功能调节和微环境的形成^[9]。VEGF 与精索静脉曲张有

关^[10]。VEGF 与精囊、前列腺疾病有关^[11]。睾丸生精功能受神经-内分泌调节, 多种生长因子和性激素在生精细胞的分裂、增殖、分化等过程中发挥重要作用^[12-13]。睾酮可正向调节 VEGF 的表达, 对男性生育能力起关键作用^[14]。本课题组前期研究发现, 慢性砷中毒对大鼠睾丸中促黄体生成素 (luteotropic hormone, LH) 有影响, 且随着亚砷酸钠暴露剂量的增加, 大鼠血清 LH 浓度呈下降趋势^[15]。砷中毒还导致雄性大鼠血清抑制素 -B 和睾酮分泌减少^[16]。慢性砷中毒能导致精子受精能力降低^[17]。本研究免疫组织化学法结果显示, 与对照组相比, 各染毒组 VEGF、VEGFR2 表达水平呈下降趋势, 原因可能是随着砷中毒剂量的增加和时间的延长, 影响睾丸性激素尤其是睾酮的分泌水平下降, 进而引起 VEGF、KDR 蛋白表达下调。

细胞凋亡是一种由基因调控的细胞主动死亡的过程。病理状态下可导致疾病肿瘤的发生。本研究中 TUNEL 法结果表明, 与对照组比较, 各染毒组大鼠睾丸生精小管上皮凋亡细胞灰度值较低, 表明砷中毒可引起睾丸生精上皮细胞凋亡, 且随着染毒剂量的增加, 生精小管上皮细胞凋亡水平逐渐升高。

附睾是精子成熟的场所, 精子活力能够反映雌性生殖毒性, 也是决定生育能力的重要因素, 而评价精子活力的指标主要有附睾内精子浓度、活动率和活动精子浓度。研究表明, 生精细胞的活动可受外源性化

学物质的影响, 导致精子活力下降^[18]。生精细胞的数量和成熟程度是精子生成的最初决定因素。本研究结果显示, 与对照组比较, 低剂量染毒组大鼠精子浓度较高, 而中、高剂量染毒组精子浓度较低。各染毒组大鼠精子活动率、活动精子浓度较低, 可能与睾丸支持细胞的功能改变有关。

综上所述, 随着砷中毒染毒剂量的增加和时间的延长, VEGF、VEGFR2 表达水平逐渐下降, 而生精上皮的凋亡水平逐渐升高。慢性砷中毒时可影响 VEGF、VEGFR2 的表达和睾丸内微环境的形成, 间接改变精子发生、发育, 进而导致男性不育, 但其具体机制有待进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] MOHAMMED A K S, JAYASINGHE S S, CHANDANA E P, et al. Arsenic and human health effects: a review[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2015, 40(8): 828-846.
- [2] LU T H, TSENG T J, SU C C, et al. Arsenic induces reactive oxygen species caused neuronal cell apoptosis through JNK/ERK mediated mitochondria dependent and GRP 78/CHOP regulated pathways[J]. *Toxicology Letters*, 2014, 224(1): 130-140.
- [3] SEOW W J, KILE M L, BACCARELLI A A, et al. Epigenome wide DNA methylation changes with development of arsenic induced skin lesions in Bangladesh: a case control follow up study[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2014, 55(6): 449-456.
- [4] WADHWA S K, KAZI T G, KOLACHI N F, et al. Case-control study of male cancer patients exposed to arsenic-contaminated drinking water and tobacco smoke with relation to non-exposed cancer patients[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2011, 30(20): 2013-2022.
- [5] ZHAO R, LIU X Q, WU X P, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) enhances gastric carcinoma invasiveness via integrin alpha (v) beta6[J]. *Cancer Lett*, 2010, 287(15): 150-156.
- [6] CHUNG A S, FERRARA N. Developmental and pathological angiogenesis[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 2(27): 563-584.
- [7] BECK B, DRIESSENS G, GOOSSENS S, et al. A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours[J]. *Nature*, 2011, 478(7369): 399-403.
- [8] 艾庆燕, 田宏, 马莉, 等. 实验性精索静脉曲张对大鼠睾丸和附睾中血管内皮生长因子及其受体 1 表达的影响 [J]. *中华男科学杂志*, 2009, 15(6): 488-492.
- [9] 刘孝东, 杨宇如. 血管内皮生长因子与男性生殖系统的血管生成 [J]. *中华男科学*, 2004, 10(1): 49-51.
- [10] 艾庆燕, 赵豫凤, 马莉, 等. VEGF 和 Flt-1 在精索静脉曲张大鼠附睾中的表达变化 [J]. *四川动物*, 2012, 4(31): 626-629.
- [11] 曹敬毅, 戚景光, 杨宁, 等. 经尿道前列腺电切术中出血与前列腺增生组织 MVD、VEGF 的关系 [J]. *现代泌尿外科杂志*, 2009, 14(1): 29-31.
- [12] 艾庆燕, 赵豫凤, 杨加周, 等. 人胎睾丸发生过程中 VEGF 的表达研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(9): 979-981.
- [13] 李环, 高久春, 郭航, 等. 血清生殖激素水平与精子密度关系 [J]. *吉林大学学报 (医学版)*, 2009, 35(3): 530-533.
- [14] SHAFQAT K, PAL S K, KUMARI S, et al. Time-frequency analysis of HRV data from locally anesthetized patients[J]. *Engineering in Medicine and Biology Society*, 2009, 2(18): 1824-1827.
- [15] 秦海霞, 高晓勤, 刘智, 等. 砷对大鼠生精细胞半胱氨酸天冬氨酸酶-3 表达及血清中黄体生成素浓度的影响 [J]. *环境与健康杂志*, 2014, 31(8): 676-678.
- [16] 杨喆, 高晓勤, 谷江, 等. 慢性砷中毒对雄性大鼠血清抑制素-B(INH-B) 和睾酮的影响 [J]. *中华地方病学杂志*, 2014, 33(1): 24-26.
- [17] 杨燕平, 高晓勤, 丁贤胜, 等. 亚慢性砷中毒对大鼠精子透明质酸酶的影响 [J]. *中华地方病学杂志*, 2014, 1(33): 27-28.
- [18] DOYLE T J, BOWMAN J L, WINDELL V L, et al. Transgenerational effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on testicular germ cell associations and spermatogonial stem cells in mice[J]. *Biol Report*, 2013, 88(11): 112.

(童颖丹 编辑)