

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.09.009

长期低浓度七氟醚吸入对雄性小鼠生殖功能的影响*

邓友良¹ 马玉龙¹ 张增利¹ 侯玉书¹ 赵洁² 李伟² 曹国庆³ 侯武刚^{1Δ}

(1 第四军医大学西京医院麻醉科 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学基础部组织学与胚胎学教研室 陕西 西安 710032;

3 第四军医大学 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨长期低浓度七氟醚吸入对雄性小鼠生殖功能的影响。**方法:**雄性 C57 小鼠 20 只随机分为吸醚组和对照组,吸醚组给予连续 45 d,每天 4 h 吸入 0.2%七氟醚。吸醚第 36 d 起每只雄性小鼠与 4 只雌性小鼠合笼交配。合笼结束后,雄性小鼠称重,计算睾丸指数,观察睾丸形态学变化,检测附睾精子活力和血清激素水平,统计子代小鼠数量和性别比例。**结果:**长期低浓度七氟醚吸入后雄性小鼠体重增长明显减少,精子活力显著降低,血清卵泡刺激素(FSH),促黄体生成素(LH),瘦素(LEP)显著升高,雄激素(T)水平无显著差异。雌性小鼠受孕率、子代数量及性别比例无显著差异。**结论:**长期低浓度七氟醚吸入对雄性小鼠具有一定的生殖毒性,影响其血清激素水平和精子活力,但受孕率和子代性别比无显著差异。

关键词:七氟醚;精子活力;性激素;生殖毒性

中图分类号: R-332; R322.61; Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)09-1635-04

Effects of Long-Term Low-Dose Sevoflurane Exposure on Reproduction of Male Mice*

DENG You-liang¹, MA Yu-long¹, ZHANG Zeng-li¹, HOU Yu-shu¹, ZHAO Jie², LI Wei², CAO guo-qing³, HOU Wu-gang^{1Δ}

(1 Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

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

3 The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of long-term low-dose sevoflurane inhalation on reproductive function of male mice. **Methods:** Twenty male C57 mice were randomly divided into two groups (n=10): control group and Sevo group. The mice in Sevo group exposed to 0.2% sevoflurane for 45 d, 4 h/day. Thirty five days later, each male mouse mated with 4 female mice. Ten days later, these male mice were weighed and testis index was calculated. The morphological changes of the testes, the sperm motility and serum hormone levels were detected. The number of offspring mice and sex ratio were calculated. **Results:** After Long-term low-dose sevoflurane inhalation, the weight increasement of male mice and sperm motility significantly decreased, and the serum levels of FSH, LH, LEP significantly increased, whereas the serum levels of Testosterone did not change compared with mice in Con group. And there were no significant difference in pregnancy rate, offspring number and sex ratio between Con group and Sevo group. **Conclusions:** Long-term low-dose sevoflurane exposure affected serum hormone level and significantly decreased sperm motility of the male mice, but had no influence on pregnancy rate and the number and sex ratio of offsprings. These findings indicate that long-term low-dose sevoflurane inhalation exerts toxicity on reproduction of male mice.

Key words: Sevoflurane; Sperm motility; Sex hormone; Reproductive toxicity

Chinese Library Classification(CLC): R-332; R322.61; Q492 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)09-1635-04

前言

七氟醚是临床上最常用吸入麻醉剂,有研究发现:长期或短期吸入临床浓度的七氟醚显著降低精子密度和精子活力,损伤精细胞 DNA,破坏性激素稳态^[1-4]。

闭合式麻醉回路的广泛应用使得手术室内麻醉气体浓度显著下降,但国内大部分麻醉机由于缺乏废气回收装置,手术

室工作人员特别是麻醉医生仍长期暴露在低浓度的麻醉气体中。那么,长期低浓度麻醉气体暴露是否具有生殖毒性?其对男性生殖功能的影响目前尚不清楚。本实验应用雄性小鼠长期吸入低浓度七氟醚,检测其血清激素水平、睾丸形态结构和精子活力变化,并与雌性小鼠交配后分析其子代数量与性别比例,探讨长期低浓度七氟醚吸入对生殖功能的影响。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81371446)

作者介绍:邓友良(1990-),男,硕士研究生,主要研究方向:脑保护, E-mail: 15289359658@163.com

Δ 通讯作者:侯武刚(1979-),男,硕士研究生导师,副教授,主要研究方向:脑保护,电话:029-84771262, E-mail: gangwuhou@163.com

(收稿日期:2016-10-30 接受日期:2016-11-21)

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

8 周龄 C57 小鼠, 雄性 20 只, 雌性 80 只, 体重 20 ± 1 g, 购自第四军医大学实验动物中心, 饲养于 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 环境中, 12 h 明暗交替照明。将 20 只雄性 C57 小鼠按照数字表随机化原则随机分为吸醚组和对照组各 10 只。吸醚组雄性小鼠置于含有钠石灰的密闭的吸醚盒中, 连续 45 d, 每天 4 h, 吸入 0.2% 七氟醚 + 2 L/min 氧气混合气体, 并用麻醉气体分析仪监测吸醚盒七氟醚浓度, 使其维持在 0.2%。对照组雄性小鼠不给予七氟醚吸入, 其余处理与吸醚组一致。将 80 只雌性 C57 小鼠同样随机分为吸醚组和对照组各 40 只, 待雄性小鼠吸醚第 36 d, 每只雄性小鼠与 4 只雌性小鼠合笼交配 10 d, 雌性小鼠不作特殊处理。

1.2 实验动物处理与 HE 染色

雄性小鼠于吸醚前和合笼结束后均称重, 计算体重变化。合笼结束后, 雄性小鼠在深麻醉下取双侧睾丸称重, 并计算睾丸指数 = 睾丸重量 / 体重 (mg/g)^[9]。用饱和苦味酸固定睾丸后石蜡包埋切片, 常规 HE 染色进行睾丸形态学观察并摄片^[9]。

1.3 精子活力检测

取雄性小鼠附睾尾部, 剪碎后置于 37° 预热的含 1% 胎牛血清的 DMEM (1 ml) 中。 37°C 孵育 15 min, 25°C 低速 (300 rpm) 离心 2 min 后取上层精子悬液, 以适当比例稀释后取 10 μL 精子悬液于血细胞计数板上计数, 所得精子数量即为精子活力。

1.4 放射免疫法检测

合笼结束后, 所有雄性小鼠在深麻醉下摘眼球取血, 4°C 静置 2 h 后 (3000 rpm) 离心分离血清。用放射免疫法检测血清中雄激素 (Testosterone, T), 促黄体生成素 (Luteotropic hormone, LH), 卵泡刺激素 (Follicle-stimulating hormone, FSH), 瘦素 (Leptin, LEP) 浓度。

1.5 子代数量、性别比和雌性小鼠受孕率

在每窝小鼠出生后第一天记录子鼠数量及雄雌只数。分别统计两组小鼠受孕率 = 每窝受孕雌性小鼠数量 / 4, 平均每只受孕雌性小鼠子代数量和性别比例。

1.6 统计学方法

所有的数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Prism graphPad5.0 进行单因素方差分析及 T 检验。 $P < 0.05$ 时视为有统计学差异。

2 结果

2.1 长期低浓度七氟醚吸入对雄性小鼠体重和睾丸指数的影响

七氟醚吸入前, 吸醚组和对照组雄性小鼠体重无明显差异 ($P > 0.05$)。长期低浓度七氟醚吸入后, 吸醚组雄性小鼠体重显著低于对照组小鼠 ($P < 0.05$)。进一步分析两组雄性小鼠体重增加值发现: 吸醚组雄性小鼠体重增加值显著低于对照组小鼠 ($P < 0.01$)。见表 1。

长期低浓度七氟醚吸入后, 两组雄性小鼠睾丸重量与睾丸体重指数均无统计学差异 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 长期低浓度七氟醚吸入对雄性小鼠体重、睾丸重量及睾丸指数的影响

Table 1 Effect of long-term low-dose inhalation of sevoflurane on body weight, testis weight and testicular index in male mice

		Weight (g)		Testis weight (g)	Testis index
Con	22.76 ± 0.34	27.43 ± 0.49	5.02 ± 0.23	201.0 ± 4.33	7.33 ± 0.14
Sevo	22.09 ± 0.30	25.89 ± 0.29^a	3.81 ± 0.23^b	190.8 ± 2.80	7.38 ± 0.17

Note: Compared with the mice in Con group, sevoflurane exposure dramatically inhibit the increasement of body weight. ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$.

2.2 长期低浓度七氟醚吸入对雄性小鼠睾丸形态结构与精子活力的影响

HE 染色结果发现吸醚组与对照组小鼠相比, 睾丸组织形态结构无显著变化, 睾丸组织内睾丸间质与生精小管排列整

齐, 生精周期和各型生精细胞形态结构清晰完整。见图 1。

附睾精子活力计数发现, 与对照组相比, 长期低浓度七氟醚吸入后雄性小鼠精子活力显著下降 ($P < 0.001$)。见图 1。

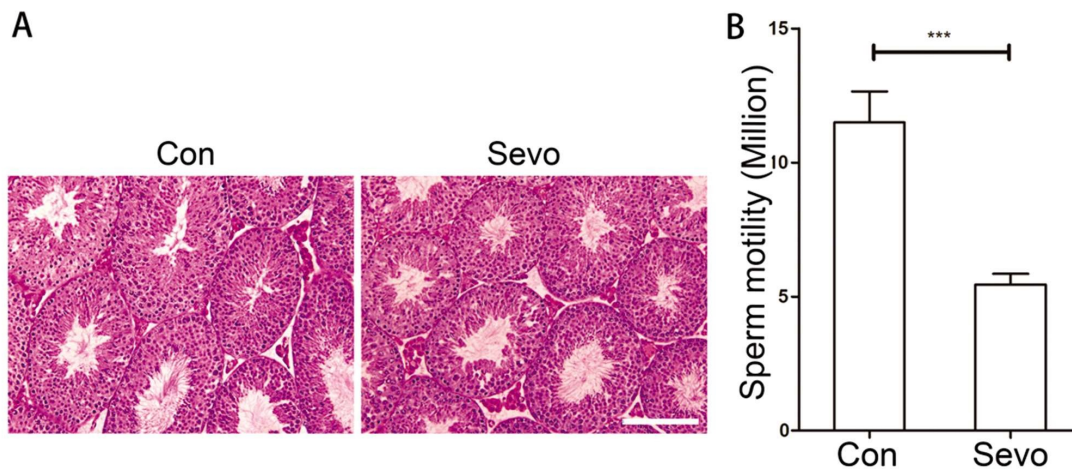


图 1 长期低浓度七氟醚吸入对睾丸组织和精子活力的影响

Fig.1 Effect of long-term low-dose sevoflurane inhalation on testicular tissue and sperm motility

Note: A: The morphologic change of testis. B: Effect of long-term low-dose sevoflurane exposure on sperm motility. Compare to the mice in Con group, sevoflurane exposure significantly decrease the sperm motility. ***, $P < 0.001$.

2.3 长期低浓度七氟醚吸入对雄性小鼠血清激素的影响

放射免疫检测结果发现吸醚组雄性小鼠血清中 FSH 和 LH 水平显著高于对照组($P<0.05$),而 T 水平与对照组相比略有

升高,但无统计学差异($P>0.05$);此外,吸醚组雄性小鼠血清中 LEP 水平与对照组相比显著升高($P<0.001$)。见表 2。

表 2 长期低浓度七氟醚吸入对雄性小鼠血清性激素水平的影响

Table 2 Effects of long-term low-dose inhaled sevoflurane on serum sex hormone levels in male mice

	T(ng/mL)	FSH(mIU/mL)	LH(mIU/mL)	LEP(ng/mL)
Con	0.27± 0.06	7.20± 0.41	8.90± 0.73	4.88± 0.18
Sevo	0.36± 0.06	8.31± 0.27 ^a	10.75± 0.47 ^b	5.69± 0.14 ^c

Note: Compared with the mice in Con group, sevoflurane exposure significantly increase the serum levels of FSH, LH and LEP. ^a $P<0.05$; ^b $P<0.01$; ^c $P<0.001$.

2.4 长期低浓度七氟醚吸入对受孕率、子代数量及性别比的影响

合笼交配结束后统计每笼雌性小鼠受孕率发现,吸醚组与对照组间雌性小鼠受孕率无显著差异。见表 3。

子代数量在吸醚组和对照组间无明显差异($P>0.05$)。平均每窝子代数量两组间也无显著差异($P>0.05$)。进一步分析两子代性别比例发现吸醚组与对照组间子代雌雄比例无显著差异($P>0.05$)。见表 3。

表 3 长期低浓度七氟醚吸入对雌性小鼠受孕率、子代数量和性别比例的影响

Table 3 Effects of long-term low-dose sevoflurane inhalation on conception rates, offspring numbers and sex ratios in female mice

	Pregnancy rate	litter size at birth	Gender ratio(Female/male)
Con	0.58± 0.09	6.52± 0.31	1.34± 0.19
Sevo	0.50± 0.07	7.10± 0.46	1.67± 0.23

3 讨论

七氟烷是一种高度氟化的麻醉剂,因其化学性质稳定,血/气分配系数低(0.63),对呼吸道刺激小,血流动力学稳定性而广泛应用于临床。大量研究发现七氟烷具有潜在的神经毒性^[67],肾脏毒性^[8]、生殖毒性及明显的遗传毒性^[14]。

目前由于缺乏废气回收装置,手术室内仍有低浓度的七氟醚残留,但是残余麻醉气体浓度尚不清楚。为研究长期低浓度七氟醚暴露对男性生殖功能的影响,本实验选用麻醉机所能达到的最低浓度 0.2%七氟醚进行实验,暴露时间为 45 d,大于小鼠一个生精周期(35 d)。

本实验结果表明长期低浓度七氟醚吸入不影响子代数量及第一胎子鼠的雌雄比例。早在 1972 年,人们就已经开始关注吸入性麻醉剂的生殖毒性作用。有学者发现手术室女性麻醉工作者自然流产,胎儿先天畸形,不孕概率明显增加^[9],参与全麻诱导者第一胎生女孩的概率增加^[10]。与本实验结果不一致,可能原因如下:①吸入麻醉剂种类不同,本实验中使用的麻醉剂为七氟醚,其毒性作用远低于其他含氟麻醉剂;②麻醉气体暴露时间不一致,本实验中七氟醚暴露时间为 45 d,远小于手术室工作人员的麻醉气体暴露时间,尚不足以引起子代表型变化。

本实验研究结果发现长期低浓度七氟醚吸入后雄性小鼠精子活力显著降低。有研究发现七氟醚剂量依赖性抑制离体人精子运动功能和体外获能^[11],破坏人精子 DNA 结构^[2]。上述在 / 离体实验结果提示七氟醚暴露对精子功能具有一定损伤作用。而 Wang LJ 等研究结果与本实验结论不一致,认为高浓度七氟醚暴露不影响体外人精子的运动能力、活力^[12]及精子活率^[13]。这种差异的原因可能是在 / 离体和七氟醚暴露时间不一致:本实验采用在体长期吸入七氟醚,而 Wang LJ 等实验中使人精子直接短时间内暴露于七氟醚中。有研究表明七氟醚通过

抑制海马神经元内自噬流水平而促进神经元凋亡,诱发术后认知功能障碍^[14],而自噬可能与精活力和存活有关^[15]。那么,长期低浓度七氟醚吸入是否通过影响精细胞内自噬流而降低精子活力,仍需进一步实验证明。

FSH、LH 和 T 在精子的生成、成熟及性欲维持中发挥着至关重要的作用。本实验研究发现长期低浓度七氟醚吸入后血清中 FSH、LH 水平显著升高,而血清 T 水平未见明显变化。邓智标等研究发现在无精子、少精子及生精障碍患者血清中 LH、FSH 水平显著升高^[16],与本实验研究结果一致。

形态学结果表明长期低浓度七氟醚暴露不影响睾丸组织结构。Ziya Kaya 等研究表明反复吸入七氟醚后睾丸组织明显受损^[3],而这种七氟醚暴露后睾丸组织损伤可能与性激素紊乱有关^[17]。与本实验结论不一致,可能是由于低浓度七氟醚引起的血清激素改变不足以引起睾丸结构破坏。

同时,我们还观察到:在长期低浓度七氟醚吸入后体重增长减缓,腹部脂肪明显减少。瘦素(LEP)是一种由脂肪细胞分泌的蛋白质类激素,作用于下丘脑的代谢调节中枢,发挥抑制食欲,调节能量代谢作用^[18,19]。因此,我们对血清中 LEP 浓度进行检测,结果发现 LEP 浓度明显升高。有研究发现特异性敲除垂体瘦素受体(LEPR)后血清中 LH、FSH 水平明显降低^[20]。那么,长期低浓度七氟醚暴露引起的血清性激素的改变是否与 LEP 升高有关目前尚不明确。

综上所述,本研究发现长期低浓度七氟醚吸入后雄性小鼠精子活力显著下降,血清生殖激素水平明显升高,但雌性小鼠受孕率、子代数量及其性别比例未见显著差异,提示长期低浓度七氟醚吸入具有一定生殖毒性。但雄性小鼠更长时间七氟醚暴露是否会影响雌性小鼠受孕率、子代数量和性别比例仍需深入探讨。

参考文献(References)

- [1] Ceyhan A, Cincik M, Bedir S, et al. Effects of exposure to new inhalational anesthetics on spermatogenesis and sperm morphology in rabbits [J]. Arch Androl, 2005, 51(4): 305-315
- [2] Kaymak C, Kadioglu E, Coskun E, et al. Determination of DNA damage after exposure to inhalation anesthetics in human peripheral lymphocytes and sperm cells in vitro by comet assay [J]. Hum Exp Toxicol, 2012, 31(12): 1207-1213
- [3] Ziya Kaya, Erkan Sogut, Sevil Cayli, et al. Evaluation of effects of repeated sevoflurane exposure on rat testicular tissue and reproductive hormones [J]. Inhal Toxicol, 2013, 25(4): 192-198
- [4] Land PC, Owen EL, Linde HW. Morphologic Changes in Mouse Spermatozoa after Exposure to Inhalational Anesthetics during Early Spermatogenesis [J]. Anesthesiology, 1981, Vol.54: 53-56
- [5] 楼哲丰, 管敏强, 陈忠义, 等. 氯化镉对小鼠睾丸指数及其线粒体 ATPase6、D-Loop 基因突变的影响 [J]. 癌变·畸变·突变, 2009, 21(6): 452-454, 459
- Lou Zhe-feng, Guan Min-qiang, Chen Zhong-yi, et al. Effects of Cadmium Chloride on Index and mtATPase6 and D. Loop Mutations of Mice Testicle [J]. Carcinogenesis, Teratogenesis Mutagenesis, 2009, 21(6): 452-454, 459
- [6] 张莹, 李士通. 七氟烷对神经系统的双重作用: 神经毒性抑或神经保护 [J]. 上海医学, 2011, 34(12): 966-970
- Zhang Ying, Li Shi-tong. Dual effects of sevoflurane on the nervous system: neurotoxicity or neuroprotection [J]. Shanghai Medical Journal, 2011, 34(12): 966-970
- [7] Bittner E A, Yue Y, Xie Z. Brief review: anesthetic neurotoxicity in the elderly, cognitive dysfunction and Alzheimers disease [J]. Can J Anaesth, 2011, 58 (2): 216-223
- [8] 俞卫锋. 卤代类吸入麻醉药肝肾毒性的再认识 [J]. 中国继续医学教育, 2010, (4): 24-29
- Yu Wei-feng. A review about hepatotoxicity and nephrotoxicity of halogenated inhalational anesthetics [J]. Chin Cont Med Edu, 2010, (4): 24-29
- [9] Knill-Jones RP, Rodrigues LV, Moir DD, et al. Anaesthetic practice and pregnancy. Controlled survey of women anaesthetists in the United Kingdom [J]. Lancet, 1972, 1(7764): 1326-1328
- [10] Gupta D, Kaminski E, McKelvey G, et al. Firstborn offspring sex ratio is skewed towards female offspring in anesthesia care providers: A questionnaire-based nationwide study from United States [J]. J Anaesthesiol Clin Pharmacol, 2013, 29(2): 221-227
- [11] 王兰兰, 郭晶晶, 林函, 等. 不同吸入麻醉药对人精子运动功能和体外获能的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2010, (9): 1065-1068
- Wang Lan-lan, Guo Jing-jing, Lin Han, et al. Effects of inhalation anesthetics on human sperm motility and capacitation in vitro. Chinese Journal of Anesthesiology, 2010, (9): 1065-1068
- [12] Wang LJ, Wang XH, Sun HJ, et al. Effects of inhalation anaesthetics on human sperm motility and vitality in vitro [J]. Br J Anaesth, 2008, 101(6): 883-884
- [13] 王丽君, 汪小海, 顾连兵. 吸入麻醉剂浓度及作用时间对人离体精子活率的影响 [J]. 数理医药学杂志, 2009, 22(4): 418-420
- Wang Li-jun, Wang Xiao-hai, Gu Lian-bing. Effects of Inhalation Anesthetics Concentration and Exposure Time on Human Sperm Motility in Vitro [J]. Journal of Mathematical Medicine, 2009, 22(4): 418-420
- [14] Zhang X, Zhou Y, Xu M, et al. Autophagy Is Involved in the Sevoflurane Anesthesia-Induced Cognitive Dysfunction of Aged Rats [J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153505
- [15] Aparicio IM, Espino J, Bejarano I, et al. Autophagy-related proteins are functionally active in human spermatozoa and may be involved in the regulation of cell survival and motility [J]. Sci Rep, 2016, 6: 33647
- [16] 邓智标. 血清睾酮 / 促黄体生成素、促卵泡激素及促黄体生成素水平检测在诊断睾丸生精作用中的价值 [J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(11): 1508-1509, 1512
- Deng Zhi-biao. Value of serum T/LH, FSH and LH levels in the diagnosis of testicular spermatogenesis [J]. Int J Lab Med, 2016, 37(11): 1508-1509, 1512(In Chinese)
- [17] Xu XL, Pan C, Hu JX, et al. Effects of isoflurane inhalation on the male reproductive system in rats [J]. Environ Toxicol Pharmacol. 2012, 34(3): 688-693
- [18] Mela V, Jimenez S, Freire-Regatillo A, et al. Blockage of neonatal leptin signaling induces changes in the hypothalamus associated with delayed pubertal onset and modifications in neuropeptide expression during adulthood in male rats [J]. Peptides, 2016, 86: 63-71
- [19] Ohga H, Hirata D, Matsumori K, et al. Possible role of the leptin system in controlling puberty in the male chub mackerel, *Scomber japonicus* [J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2016, 203: 159-166
- [20] Akhter N, Carl Lee T, Syed MM, et al. Selective deletion of leptin receptors in gonadotropes reveals activin and GnRH-binding sites as leptin targets in support of fertility [J]. Endocrinology, 2014, 155(10): 4027-4042

· 重要信息 ·

公 示

根据国家新闻出版广电总局和省市新闻主管部门关于开展新闻采编人员换发记者证相关文件的精神。现代生物医学进展杂志社共有 1 人符合换发新版记者证的条件, 予以公示。

刘同奎

此公示期自即日起 20 个工作日。凡对此公示有异议者, 请在公示期内到纪检监察等相关部门反映情况。