azoospermia[J]. Systems Biol Reprod Med, 2015, 61(5): 300 – 306

19 Du T, Wang Y, Fan Y, *et al*. Fertility and neonatal outcomes of embryos achieving blastulation on Day 7: are they of clinical value?[J]. Human Reprod, 2018, 33(6): 1038 – 1051

20 Rosenbaum PR, Rubin DB. The central role of the propensity score inobservational studies for causal effects[J]. Biometrika, 1983, 70(1): 41 – 55

21 F Thoemmes. Propensity score matching in SPSS[J]. Statistics, 2012, arXiv: 1201. 6385

22 Dong J, Wang Y, Chai WR, *et al*. The pregnancy outcome of progestin – primed ovarian stimulation using 4 versus 10mg of medroxyprogesterone acetate per day in infertile women undergoing invitro fertilisation: a randomised controlled trial[J]. Bjog An Int J Obstetr Gynaecol, 2017, 124(7): 1048 – 1055

23 Wang N, Wang Y, Chen Q, *et al*. Luteal – phase ovarian stimulation vs conventional ovarian stimulation in patients with normal ovarian reserve treated for IVF: a large retrospective cohort study[J]. Clin Endocrinol, 2016, 84: 720 – 728

24 Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, *et al*. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality[J]. J Vitro Fertil Embryo Transfer, 1986, 3(5): 284 – 295

25 Cobo A, de los Santos MJ, Castello D, *et al*. Outcomes of vitrified early cleavage – stage and blastocyst – stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3, 150 warming cycles[J]. Fertil Steril, 2012, 98(5): 1138 – 1146

26 Silber SJ, Nagy Z, Devroey P, *et al*. Distribution of spermatogenesis in the testicles of azoospermic men: the presence or absence of spermatids in the testes of men with germinal failure[J]. Human Reprod, 1997, 12(11): 2422 – 2428

27 Mulhall JP, Burgess CM, Cunningham D, *et al*. Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with nonobstructive azoospermia: prevalence and predictive factors[J]. Urology, 1997, 49(1): 91 – 95, discussion 5 – 6

28 Devroey P. Clinical application of new micromanipulative technologies to treat the male[J]. Human Reprod, 1998, 13(Suppl 3): 112 – 122

(收稿日期: 2021 – 03 – 17)
(修回日期: 2021 – 04 – 12)

饮水砷暴露对 SD 大鼠肝脏损伤的形态学研究

丁关鑫 黄 佳 夏荣香 林 勤 马 艳 吴顺华 张 玲

摘 要 目的 研究不同浓度亚砷酸钠染毒对大鼠肝脏超微结构变化的影响。**方法** 将 56 只健康成年 SD 大鼠随机分为对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组。记录尿砷含量以及观察肝脏病理形态学改变的情况。**结果** 低、中、高剂量组的尿砷含量均大于对照组,经检验差异有统计学意义($Z=48.50$,$P<0.01$),且随着亚砷酸钠剂量的增大,尿砷的含量也随着升高。与对照组比较,中、高剂量组的肝脏重量下降明显,经检验,差异有统计学意义($F=3.246$,$P<0.05$)。电镜下观察,低剂量组肝细胞细胞核异形,中、高剂量组出现细胞核畸形,肝细胞灶性坏死。**结论** 亚慢性饮水砷暴露会造成肝脏超微结构变化,且随着亚砷酸钠剂量的增加,肝脏的病理变化也随之加重。同时,SD 大鼠尿砷含量增高,肝脏重量下降。

关键词 饮水砷暴露 肝脏 病理形态学

中图分类号 R595.2 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.10.010

Morphological Study of Liver Injury in SD Rats Induced by Arsenic Exposure in Drinking Water. *Ding Guanxin, Huang Jia, Xia Rongxiang, et al. School of Public Health, Xinjiang Medical University, Xinjiang 830011, China*

Abstract Objective To study the effects of different doses of sodium arsenite on the ultrastructure of rat liver. **Methods** Fifty – six healthy adult SD rats were randomly divided into 4 groups: control group, low – dose group, medium – dose group, high – dose group. Urine arsenic content was recorded and liver pathomorphology was observed. **Results** The urinary arsenic content of the low – dose group, medium – dose goup, high – dose group were higher than that of the control group, the difference was statistically significant ($Z=48.50$, $P<0.01$), and the urinary arsenic content increased with the increase of the exposure dose. Compared with control group, liver weight of the medium – dose group and high – dose group decreased significantly, and the difference was statistically significant ($F=$

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81560520)

作者单位:830011 乌鲁木齐,新疆医科大学公共卫生学院(丁关鑫、马艳、吴顺华);830002 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心(黄佳、夏荣香、林勤、张玲)

通讯作者:张玲,主任医师,电子信箱: 549307703@qq.com

3.246, $P<0.05$). Under electron microscope, the liver nucleus was abnormal in the low - dose group, and nuclear abnormality and focal necrosis of liver cells were observed in the medium - dose group and high - dose group. **Conclusion** Subchronic arsenic exposure in drinking water can cause ultrastructural changes in the liver, and with the increase of sodium arsenite dose, the pathological changes in the liver are also aggravated. Meanwhile, arsenic content in the liver of SD rats increases, and the weight of the liver decreases.

Key words Arsenic exposure in drinking water; Liver; Pathomorphology

砷是一种化学元素,通常有无机砷和有机砷两种形式,普遍存在于自然界中,其中无机砷(inorganic arsenic, iAs)被国际癌研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)和美国环境保护署(Environmental Protection Agency, EPA)确认为Ⅰ类致癌物[1,2]。通过饮用水摄入砷是大多数人群摄入砷的主要途径,饮水砷暴露引起的机体慢性砷中毒受到全球范围内的普遍关注[3]。在机体中,肝脏是无机砷进行生物转化的主要场所,部分生物转化在肾脏和肺中进行[4]。据2016年的调查结果显示,世界上大约有1.5亿人长期摄入砷含量超出标准的饮用水,这些人群分布在全球约70多个地区,长期饮用高砷水可造成人体器官和系统多方面损伤,其中肝脏为砷的主要靶器官之一[5,6]。本研究通过给实验动物饮用不同剂量亚砷酸钠水溶液12周的体内实验,记录大鼠肝脏重量,测定尿砷含量,观察肝脏组织病理学变化,为探讨砷中毒的发病机制提供实验基础。

材料与方法

1. 主要仪器与试剂:亚砷酸钠($NaAsO_2$,分析纯,美国Fluka公司),砷的标准液,原子荧光分光光度计(北京吉天仪器有限公司,AFS-933),高速冷冻离心机(美国Thermo公司,ST40),-80℃超低温冰箱(美国Thermo公司,705型),恒温水浴箱(德国IKA公司,DSHZ-300A),超薄切片机(瑞典LKB公司,LKB-V型),透射电镜(日本日立公司,H-7650型),电子天平(郑州南北仪器设备有限公司,JD200-3)。

2. 动物的分组与染毒:选择健康成年SD大鼠56只,体质量为200g±20g,雌雄对半,从新疆医科大学动物实验中心购入。饲养条件:12h昼夜光照,饲养温度调控在20~24℃,相对湿度调控为40%~65%。将56只SD大鼠随机分为4组,即对照组(未染毒)、染毒低剂量组、染毒中剂量组和染毒高剂量组。采用的染毒方式为经口自由饮水,其中对照组染毒剂量:0mg/L,大鼠饮用去离子水;低剂量组染毒剂量2mg/L;中剂量组染毒剂量10mg/L;高剂量组染毒剂量50mg/L[7]。在实验期间,大鼠进行自由饮水、进食,连续染毒12周。

3. SD大鼠一般情况:在实验期间,每天密切查看并记录大鼠的进食情况、饮水情况、毛发柔顺度、精神状态、活动情况,并及时对受伤的大鼠进行处理。

4. 尿砷含量的测定:采用原子荧光分光光度法对尿砷含量进行测定。

5. 大鼠肝脏称重及其肝脏系数的计算:在消毒无菌的操作台上快速取下大鼠肝脏,去除结缔组织,后在4℃ 0.9%氯化钠溶液下进行冲洗,用滤纸将水分吸干,然后对肝脏重量进行称量,计算其系数。公式:肝脏系数(%)=肝脏重量(g)/体质量(g)×100%。

6. 肝组织的电镜观察:将肝脏组织切成1mm×1mm×1mm的超小组织块后,放入浓度为2.5%的戊二醛溶液中,在4℃条件下固定,然后用1%锇酸再固定,丙酮梯度脱水,EPON812包埋,进行切片(50nm厚度),然后醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,烤干后在电镜下观察肝脏组织超微结构改变。

结　　果

1. 一般情况:对照组大鼠摄食与饮水正常、毛发柔顺有光泽、有活力,无不良情况。其他不同浓度染毒组,大鼠摄食饮水量减少,毛发光洁度低,动作缓慢,易激惹,其症状随着染毒剂量的增加而加重。

2. 尿砷的检测:染毒结束后,对大鼠尿砷含量进行检测,测得对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组大鼠尿砷含量[M(Q1, Q3)]分别为:18.96(10.90, 43.00)μg/L、135.31(103.03, 145.24)μg/L, 790.86(640.92, 1119.50)μg/L和3036.60(1252.70, 4922.90)μg/L,发现随染毒剂量的增大,尿砷的水平也随之升高,差异有统计学意义($Z=48.50$, $P<0.01$)。

3. 各组小鼠肝脏系数的变化:染毒结束后,通过对肝组织的称重以及其系数的计算,发现与对照组比较,中、高剂量组肝脏重量下降,差异有统计学意义($F=3.246$, $P<0.05$),低剂量组肝重量略微升高,但整体大致呈下降趋势。各实验组之间肝系数发现肝脏系数的变化比较,差异无统计学意义($F=0.188$, $P>0.05$,表1)。

表 1　各组大鼠肝脏重量及其肝脏系数结果($n=56,\bar{x}\pm s$)

组别	肝脏重量(g)	肝脏系数(%)
对照组	14.89 ± 1.51	4 ± 1
低剂量组	14.98 ± 1.73	4 ± 1
中剂量组	14.42 ± 2.11	3 ± 2
高剂量组	14.25 ± 1.21	4 ± 1

4. 电镜观察肝组织(病理检测结果):通过电镜观察发现对照组大鼠肝细胞水肿。低剂量组出现肝细胞水肿,细胞核异形,狄氏间隙胶原纤维增生。中剂量组肝细胞明显肿胀,肝血窦充血,异染色质和毛细胆管明显增生,细胞核畸形,发现肝细胞灶性坏死。高剂量组发现肝细胞水肿、局部出现肝细胞灶性坏死,详见图 1。

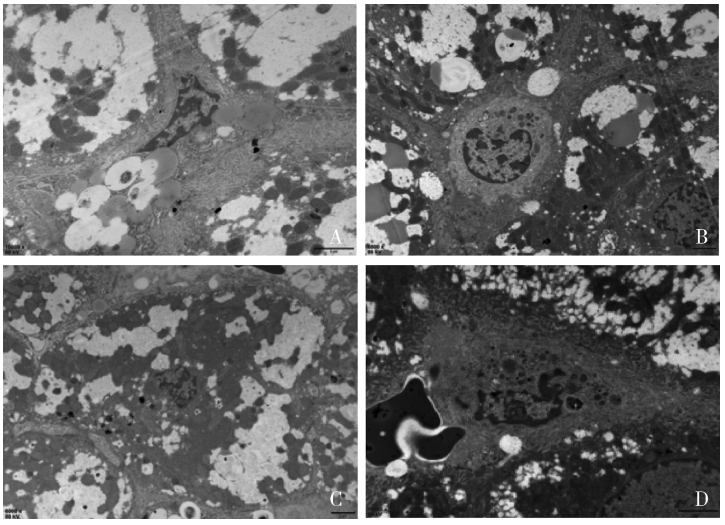

图 1　电镜下肝细胞超微结构(醋酸铀和柠檬酸铅双重染色)

A. 对照组(×10000);B. 低剂量组(×6000);C. 中剂量组(×6000);D. 高剂量组(×10000)

讨　　论

砷是大自然中常见的一种对人体健康具有损害作用的重要类金属元素、环境毒物和已确认的人类致癌物[8]。世界卫生组织(WHO)建议人类日常饮用水中砷的最大允许限量(maximum permissible limit, MPL)为 10μg/L(WHO,1996 年),这与中国生活饮用水卫生标准(GB5749 – 2006)中规定的砷的最大允许浓度指标相同[9]。肝脏是砷累积和代谢的主要场所,是砷中毒的一个主要靶器官[10]。砷对肝脏的损害作用早在部分研究中已经得到了证实,砷中毒可以导致肝组织发生病变,但发病机制尚不清楚,这成为制约其防治的瓶颈问题[11]。

毒物进入人体后不能完全从体内排出,未排出的部分在体内进行蓄积,从而引起慢性毒物中毒。常用的砷中毒的生物学标志物主要包括尿砷、血砷、发砷或指甲砷[12]。在砷暴露的评估中,砷在人体内的生物转化及排出都非常迟缓,虽然砷暴露人群在离开砷暴露环境后,人体中尿砷会随着时间的延长逐步减少,甚至可能恢复至正常水平,但是尿砷水平不会在短时间内急速减少,因此尿砷能够反映人体近期砷暴露水平,但尿砷具有一定的局限性,其不能反映长期的砷暴露水平[13]。本研究中随着染毒剂量的增大,尿砷水平也逐步升高,经统计学检验,各剂量组尿砷含量比较,差异有统计学意义($Z=48.50,P<0.01$),提示人群长时间暴露在砷环境中会导致砷在机体内进行蓄积。这与高怡等[14,15]宋秋楠等[16]报道的尿砷与砷暴露浓度呈正相关结果一致。

本研究中染毒结束后,通过对肝组织的称重及肝脏系数的计算发现,与对照组比较,中、高剂量组肝脏重量减少,差异有统计学意义($F=3.246,P<0.05$)。肝脏系数可以反映肝组织的损伤情况,是一个常用的经济、有效的指标,可以为深入探寻外源化学物作用的靶器官和病理组织学检测等提供线索。肝脏系数在排除大鼠体质量对其干扰的条件下,可以旁证肝组织是否发生病变。本研究经检验,各组大鼠肝脏系数的变化比较,差异无统计学意义($F=0.188,P>0.05$),分析原因可能与实验中亚砷酸钠染毒剂量的设计有关,有待于深入对其进行设计研究。但这并不能否定砷暴露对肝脏病理改变以及肝功能影响的可能性。

通常情况下,毒物进入人体后,首先对体内敏感

的细胞器产生伤害。因此,电镜观察有助于发现毒物对人体的早期损害作用。在本实验中,电镜下观察到对照组肝细胞水肿,分析原因可能是在固定过程中发生挤压。低剂量组肝细胞水肿、细胞核异形。中、高剂量组发现肝细胞灶性坏死,随着亚砷酸钠染毒剂量的增大,肝脏损伤情况随之明显。这与徐梦伟等[17]和张露露等[18]报道结果一致。在电镜观察下,低剂量组肝组织病变不明显,随着亚砷酸钠染毒剂量的增加,肝细胞水肿更加明显,中、高剂量组出现肝血窦充血,细胞核畸形,异染色质和毛细胆管明显增生,狄氏间隙胶原纤维增生。这与谢瑶芸等[19]研究的随着亚砷酸钠染毒剂量的增大,肝脏的病理变化也随之加重的结论一致。

本实验通过观察 SD 大鼠肝脏病理形态学变化发现,亚慢性饮水砷暴露会造成肝脏超微结构变化,且随着亚砷酸钠剂量的增加,肝脏的病理变化也随之加重。同时,SD 大鼠尿砷含量增高,肝脏重量下降。由于砷中毒严重威胁人体健康,因此,深入研究砷暴露致肝损伤机制对于预防肝损伤至关重要。

参考文献

1 Mo TT, Dai H, Du H, *et al*. Gas chromatography - mass spectrometry based metabolomics profile of hippocampus and cerebellum in mice after chronic arsenic exposure[J]. Environ Toxicol, 2019, 34(2): 103 - 111

2 Loomis D, Guha N, Hall AL, *et al*. Identifying occupational carcinogens: anupdate from the IARC Monographs[J]. Occupati Environ Med, 2018, 75(8): 593 - 603

3 姚芹, 吴顺华, 汤红英, 等. 亚砷酸钠亚慢性染毒对小鼠肝脏肾脏的损伤作用[J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(12): 1388 - 1390

4 于慧敏, 王茜, 夏荣香, 等. 不同价态砷染毒大鼠肾脏砷代谢产物与相关代谢酶的关联性[J]. 中华地方病学杂志, 2014, 33(2): 150 - 154

5 Minatel BC, Sage AP, Anderson C, *et al*. Environmental arsenic exposure: from genetic susceptibility to pathogenesis[J]. Environ Int, 2018, 112: 183 - 197

6 朱凯, 张爱华, 董令, 等. 辅助性 T 细胞 - 17 与调节性 T 细胞浸润在砷致大鼠肝脏损伤中的作用[J]. 中华地方病学杂志, 2018, 37(7): 536 - 540

7 戴研平, 高晓勤. 慢性砷染毒对大鼠睾丸肝细胞生长因子及其受体 c - Met 表达的影响[J]. 环境与健康杂志, 2017, 34(8): 670 - 673

8 周晴, 陈伟, 席淑华. 砷致癌机制研究进展[J]. 中华地方病学杂志, 2017, 36(12): 933 - 936

9 Jha SK, Mishra VK, Damodaran T, *et al*. Arsenic in the groundwater: occurrence, toxicological activities, and remedies[J]. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2017, 35(2): 84 - 103

10 刘振宇, 王克维, 郦芒, 等. 砷致肝细胞凋亡的研究进展[J]. 中华地方病学杂志, 2019, 5: 418 - 421

11 王甜, 赵哲仪, 穆银贵, 等. 亚砷酸钠所致 L - 02 人肝细胞损伤与 p14ARF 表达下调及 MDM2、p53 表达增加有关[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2020, 36(6): 507 - 512

12 孔畅, 杨林生, 李海蓉, 等. 内蒙古某饮水型砷中毒病区人群体内砷蓄积与砷代谢的年内变化特征[J]. 环境化学, 2018, 37(11): 2335 - 2341

13 李静, 韩俊洋, 张露, 等. 新疆奎屯地区砷暴露致肝损伤现况调查[J]. 新疆医科大学学报, 2015, 38(2): 231 - 234

14 高怡, 仇玉兰, 田凤洁, 等. 低浓度饮水砷暴露大鼠体内各脏器组织中砷的分布[J]. 环境与健康杂志, 2011, 2: 125 - 127

15 高怡, 仇玉兰, 田凤洁, 等. 饮水砷暴露大鼠血砷、尿砷和组织砷含量测定分析[J]. 山西医科大学学报, 2011, 1: 33 - 36

16 宋秋楠, 郑玉建, 马艳, 等. 亚慢性砷暴露对大鼠血液和尿液砷含量及运动功能发育的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2020, 43(5): 562 - 566

17 徐梦伟, 任冬燕, 孙高峰, 等. 亚砷酸钠对 SD 大鼠脏器损伤的实验研究[J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(2): 193 - 198

18 张露露, 吴顺华, 李静. 亚砷酸钠致大鼠肝纤维化的实验观察[J]. 环境与健康杂志, 2015, 32(11): 953 - 957, 1035

19 谢瑶芸, 胡汉华, 汤建安, 等. 氟砷对大鼠子代各器官组织超微结构的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2002, 1: 1 - 3

(收稿日期: 2021 - 05 - 17)
(修回日期: 2021 - 05 - 30)

(上接第 34 页)

24 田涛,傅强,朱健奎,等. 二至丸治疗斑马鱼骨质疏松模型效益观察及破骨细胞自噬机制[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(3): 352 - 357

25 孙勤国,徐鸿婕,罗蒙,等. 滋阴补肾方对糖尿病合并去卵巢骨质疏松大鼠的作用及对 Wnt/β - catenin 信号的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(3): 419 - 424

26 孙菁,李佳洋,沈沐瑶,等. 培本固疏方对去势大鼠骨代谢及骨生物力学的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(8): 1109 - 1113

27 李生强,陈赛楠,谢冰颖,等. 续苓健骨方对骨质疏松模型大鼠 miRNA 表达谱的作用研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(11): 1561 - 1566

28 于岩松,柳椰,那俊夫,等. 补正续骨丸对去卵巢大鼠骨量及其相关骨折的作用机制研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(7): 889 - 894

29 谭登,张玉,张农山,等. 补肾通络方对骨质疏松斑马鱼效应评价及破骨细胞自噬机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7): 79 - 85

30 朱伟,李智斌,杨利学,等. 抗疏强骨合剂对去势骨质疏松模型大鼠骨组织中自噬相关蛋白表达的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(25): 2752 - 2756

(收稿日期:2021 - 03 - 21)
(修回日期:2021 - 04 - 18)