

论著 • 临床研究

广西某企业铝暴露工人精子线粒体 PARL 蛋白水平与精子活力、存活率及畸形率的相关性^{*}

兰贵斌, 李 皇[△], 黄承乐, 谢德纯, 韦尚兵, 周晓旋, 潘 敏

(百色市人民医院检验科, 广西百色 533000)

摘要:目的 探讨铝暴露工人精子线粒体早老素相关菱形蛋白(PARL)水平与精子活力、存活率及畸形率的相关性。方法 从广西某大型铝企业选取 162 名男性铝作业工人作为铝暴露组,同时选取年龄、工龄构成匹配的 162 名企业服务公司员工为对照组;分别采用石墨炉原子吸收光谱法、高效液相色谱法测定作业环境铝浓度,工人血液和尿液铝浓度;利用酶联免疫吸附试验测定精子线粒体 PARL 蛋白水平,并对精子功能指标进行分析。结果 铝暴露组配料、电解和铸造 3 个车间空间平均铝浓度分别为 (6.72 ± 1.45) 、 (7.23 ± 1.50) 、 (7.35 ± 1.72) mg/m³,明显高于对照组环境中铝浓度($F=8.314, P<0.001$)。铝暴露组血液和尿液铝浓度均明显高于对照组($P<0.05$),而精子线粒体 PARL 蛋白水平则明显低于对照组($P<0.05$)。铝暴露组精子存活率和精子活力均明显低于对照组,精子畸形率显著高于对照组($P<0.05$)。精子活力、精子存活率与精子线粒体 PARL 蛋白水平呈正相关($r_{\text{精子活力}}=0.713, P=0.012; r_{\text{精子存活率}}=0.628, P=0.008$);精子畸形率与精子线粒体 PARL 蛋白水平呈负相关($r_{\text{精子畸形率}}=-0.953, P=0.002$)。结论 铝暴露作业工人精子功能显著受损,且精子活力、存活率及畸形率与 PARL 蛋白水平密切相关。

关键词:铝; PARL 蛋白; 精子活力; 精子存活率; 精子畸形率

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.05.025

中图法分类号:R135

文章编号:1673-4130(2018)05-0606-04

文献标识码:A

Correlation between the level of presenilin-associated rhomboid-like protein and the sperm motility, survival rate and deformity rate of sperm in workers exposed to aluminum in Guangxi^{*}

LAN Guibin, LI Huang[△], HUANG Chengle, XIE Dechun, WEI Shangbing, ZHOU Xiaoxuan, PAN Min
(Department of Clinical Laboratory, Baise People's Hospital, Baise, Guangxi 533000, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between the level of presenilin-associated rhomboid-like protein (PARL) and the sperm motility, survival rate and deformity rate of sperm in workers exposed to aluminum. **Methods** A total of 162 male workers exposed to aluminum in a large aluminum enterprise in Guangxi were selected as the exposure group, and the 162 staff members of the service company were selected as the control group by matching the age and length of service. The concentration of aluminum in the working environment and the aluminum content in the blood and urine were determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry and high performance liquid chromatography. Enzyme linked immunosorbent assay was used to measure the level of PARL protein in sperm and sperm function was evaluated. **Results** The average concentrations of aluminum in the batching, electrolysis and casting of aluminum exposure group were (6.72 ± 1.45) , (7.23 ± 1.50) and (7.35 ± 1.72) mg/m³, which were significantly higher than those of the control group ($F=8.314, P<0.001$). The content of aluminum in blood and urine of exposed group were significantly higher than those of control group ($P<0.05$), while the levels of PARL of exposed group were significantly lower than those of control group ($P<0.05$). Moreover, the sperm survival rate and sperm motility of exposed group were significantly lower than those of the control group, and the sperm deformity rates of exposed group were significantly higher than those of the control group ($P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that there was a positive correlation of sperm motility, sperm survival rate and protein level of PARL ($r_{\text{sperm motility}} =$

^{*} 基金项目:百色市科学研究与技术开发计划资助项目(百科计 20161507)。

作者简介:兰贵斌,男,主管技师,主要从事铝暴露地区不育患者精子线粒体蛋白的研究。 [△] 通信作者, E-mail: huanglibs@126.com。

本文引用格式:兰贵斌,李皇,黄承乐,等.广西某企业铝暴露工人精子线粒体 PARL 蛋白水平与精子活力、存活率及畸形率的相关性[J].

0.713, $P=0.012$; $r_{\text{sperm survival rate}}=0.628, P=0.008$); while the sperm deformity rate and protein level of PARL showed a significant negative correlation ($r_{\text{sperm deformity rate}}=0.953, P=0.002$). **Conclusion** The sperm function was significantly impaired in aluminum exposed workers, and the changes of sperm motility, survival rate and malformation rate were closely related to the protein level of PARL.

Key words: aluminum; PARL protein; sperm motility; sperm viability; sperm deformity rate

铝及其化合物是自然界中普遍存在的金属化合物,被广泛应用于人类生产生活的各个领域,然而由于铝的生殖毒性常受到其化合物类型、剂量、接触方式、时间、环境 pH 值等多种因素的影响,因此铝及其化合物能否诱发生殖功能损害仍存有争议^[1]。广西是我国主要铝产地之一,如何防治职业铝暴露,早期识别和评估铝及其化合物的毒性也是本地区公共卫生领域亟待解决的关键课题^[2]。早老素相关菱形蛋白(PARL)是线粒体膜菱形蛋白家族成员,具有调控线粒体功能和能量代谢的作用^[3]。有研究发现, PARL 蛋白在精子形成和获能中扮演重要角色^[4]。据此,本研究拟以广西某大型铝企业的男性铝暴露工人为受试对象,探讨铝暴露工人精子线粒体 PARL 蛋白水平与精子功能的相关性,以期防治铝生殖毒性提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 从广西某大型铝企业选取 162 名男

性铝作业工人作为铝暴露组,年龄 27~58 岁,平均年龄(45.61±8.94)岁,工龄 3~21 年,平均工龄(12.53±3.22)年,其中从事电解工种 56 名、熔炼 64 名、焊接 42 名。纳入标准:(1)铝暴露作业工龄连续 3 年及以上;(2)未接触高温、多环芳烃、锰、铅、汞等其他可能导致生殖功能损伤的职业有害因素;(3)未罹患冠心病、糖尿病、高血压或恶性肿瘤等慢性疾病,无甲状腺病史、生殖器官创伤史等其他会影响精子功能的疾病史;(4)年龄不超过 60 岁,且均无酗酒、吸烟等不良生活嗜好;(5)调查前 2 周内未服用任何影响生殖系统功能或精子活力的药物;(6)愿意参与本项目研究,依从性良好,签署知情同意书。同时,从该企业下属服务公司中,以铝暴露组年龄、工龄构成匹配选取 162 名工人为对照组,作业工种分别为钳工(45 名)、电工(66 名)和锅炉工(51 名)。2 组研究对象在年龄、工龄、文化程度、饮酒、吸烟等方面差异均无统计学意义($P>0.05$),资料具有可比性,见表 1。

表 1 2 组研究对象一般资料比较

组别	n	年龄(岁)	工龄(年)	饮酒[% (n/n)]	吸烟[% (n/n)]	文化程度(n)		
						小学及以下	初中	高中及以上
铝暴露组	162	45.61±8.94	12.53±3.22	27.04(39/162)	31.48(51/162)	46	76	40
对照组	162	45.62±9.64	11.58±3.59	22.22(36/162)	33.95(55/162)	49	80	33
t/χ^2		0.410	1.224	0.156	0.224		1.320	
P		0.672	0.208	0.693	0.636		0.517	

1.2 方法

1.2.1 作业环境铝浓度检测 分别选择作业环境中铝配料、电解铝和铝铸造 3 个车间,布置 12 个采样点,使用醋酸纤维滤膜定点连续采集空气中铝尘样本,严格按照《工作场所空气中有害物质监测的采样规范(GBZ159-2004)》的要求,每个采样点采集 3 个样本。采集结束后,利用硝酸加热至 140℃消化醋酸纤维滤膜,参照美国 NIOSH(National Institute for Occupational Safety and Health)推荐的石墨炉原子吸收光谱法测定铝浓度。

1.2.2 问卷调查 应用自行设计的问卷分别对所有受试对象的人口学情况、社会经济、营养情况、吸烟与饮酒情况、既往疾病史等进行调查,结合每年企业的体检资料,获取职业性铝暴露史及既往疾病史或服药状况等。

1.2.3 血清和尿液中铝浓度测定 取所有受试对象下班后的血清和尿液样本,其中血清经分离后移入 EP 管,尿液加入 6 mol/L 适量盐酸预贮存。样本送至检测实验室后,立即置于-80℃低温冰箱中保存,1 周内检测分析。实验器材均采用 10%纯硝酸浸泡,蒸馏-去离子水反复冲洗、烘干备用。采用高效液相色谱法测定血清和尿液中铝浓度,实验详细操作参考文献[5],检测操作均由专业实验技术人员完成。

1.2.4 精子线粒体 PARL 蛋白水平检测 2 组受试对象均禁欲 3~7 d,分别采用手淫法采集精液样本,置于无菌容器中,参照 WHO 人类精液检查与实验室手册(第 5 版)标准处理和保存^[6]。采用酶联免疫吸附试验测定精子线粒体 PARL 蛋白的水平,检测试剂盒购于台湾 Abnova 公司,货号 H00055486-P01,检测由专业检验技术人员操作完成。

1.2.5 精子功能分析 精子常规检测指标包括:外观、精液量、pH 值、液化时间、黏稠度、精子存活率、凝集、精子密度和圆细胞;精子活力依据 WHO 的标准分为 a 级和 b 级, (a+b)% 即前向运动精子百分率^[7];精子形态异常包括:头部、中部、主末段和原生质滴,并计数 100 个精子中的异常精子数量,计算精子畸形率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件分析和整理数据,其中计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,组间均数比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;计数资料的 2 组间比较采用卡方检验,采用 Pearson 分析法分析 2 项指标的相关性,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 作业环境铝浓度检测结果 铝暴露组受试对象的配料、电解和铸造 3 个车间空气中铝浓度范围分别为 3.08~9.88、3.78~13.52、3.70~13.68 mg/m³;3 个车间空间平均铝浓度分别为 (6.72±1.45)、(7.23±1.50)、(7.35±1.72)mg/m³;对照组受试对象空气中铝浓度范围为 0.08~0.86 mg/m³,平均浓度为(0.31±0.11)mg/m³,明显低于铝暴露组作业环境中铝浓度,差异具有统计学意义($F=8.314, P<0.001$)。

2.2 2 组受试对象血清和尿液铝浓度测定结果比较 铝暴露组受试对象的血清和尿铝浓度均明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$);Pearson 分析结果显示,尿铝与血清铝浓度存在明显正相关($r=0.841, P=0.018$),且尿铝、血清铝浓度与作业工龄亦存在明显正相关($r_{\text{尿铝}}=0.525, P=0.021; r_{\text{血清铝}}=0.621, P=0.016$),见表 2。

表 2 2 组受试对象血清和尿液铝含量测定结果比较(μg/L)					
组别	<i>n</i>	血清铝		尿铝	
		浓度范围	浓度	浓度范围	浓度
铝暴露组	162	0.92~4.93	2.82±0.77	7.86~28.60	13.55±3.81
对照组	162	0.51~1.70	1.06±0.41	2.16~9.36	5.11±1.28
<i>t</i>		4.255		6.315	
<i>P</i>		0.038		0.001	

2.3 2 组受试对象精子线粒体 PARL 蛋白水平检测结果比较 对照组和铝暴露组受试对象的精子线粒体 PARL 蛋白水平分别为(16.54±4.12)、(4.59±1.06)ng/mL,差异有统计学意义($t=6.132, P=0.001$)。

2.4 2 组受试对象精子功能测试结果比较 铝暴露组受试对象精子存活率和精子活力均明显低于对照

组,而精子畸形率显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$),而其余指标两组间差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

2.5 精子功能与精子线粒体 PARL 蛋白水平相关性分析 Pearson 相关分析显示,精子活力、精子存活率与精子线粒体 PARL 蛋白水平呈正相关($r_{\text{精子活力}}=0.713, P=0.012; r_{\text{精子存活率}}=0.628, P=0.008$);而精子畸形率与精子线粒体 PARL 蛋白水平呈负相关($r_{\text{精子畸形率}}=-0.953, P=0.002$)。

表 3 2 组受试对象精子功能测试结果比较				
指标	铝暴露组 (<i>n</i> =162)	对照组 (<i>n</i> =162)	<i>t</i>	<i>P</i>
精液量(mL)	3.21±1.73	3.74±1.66	0.642	0.418
pH 值	7.21±0.25	7.32±0.32	0.831	0.296
液化时间(min)	24.82±8.93	19.74±7.27	1.823	0.136
精子存活率(%)	48.28±11.93	68.83±14.84	5.203	0.011
凝集(%)	8.82±1.23	6.93±1.76	1.932	0.098
精子密度(×10 ⁶ /mL)	22.23±9.63	26.82±10.41	0.932	0.199
圆细胞(×10 ⁶ /mL)	4.02±0.88	3.81±0.83	0.404	0.617
精子活力(%)	21.31±8.33	52.91±12.74	8.820	<0.001
精子畸形率(%)	30.75±8.92	16.92±6.16	7.623	<0.001

3 讨 论

既往研究显示,血液和尿液铝浓度均是反映作业工人铝暴露水平的有效生物监测指标。然而有趣的是,有研究发现作业工人尿铝浓度较对照人群明显增高,而血铝浓度则无显著改变,提示血铝浓度并不是指示铝暴露剂量的敏感标志^[8-9]。本研究结果发现,铝暴露组工人血铝和尿铝浓度均显著高于对照组,而且 Pearson 相关分析显示,血铝、尿铝浓度呈正相关,且两者均与铝作业工龄呈正相关,该结果一方面表明铝暴露不仅可以导致作业工人血铝和尿铝的水平增加,而且随着作业工人铝暴露时间的延长,铝可在体内蓄积,表现为随着暴露时间的增加,血铝和尿铝浓度升高;另一方面,这一结果也提示从事铝暴露作业工作应适当调整、控制接触的时间或限制工作的年限,以减轻铝暴露对作业工人生殖功能的损害。

本研究结果显示,精子功能损害是铝致生殖毒性的典型表现之一,其中主要包括精子活力降低,精子存活率下降和畸形率显著增高,而对精液量、pH 值、液化时间、黏稠度、凝集、精子密度和圆细胞等并无明显影响。但尽管如此,铝致生殖毒性由于受到环境铝浓度、暴露途径、时间和频率、个体差异等诸多因素的影响,各项研究结论仍存在明显差异^[10]。KLEIN 等^[11]通过对 62 例精液样本的检测分析发现,高浓度铝可能是影响精子生成和数量的高危环境因素;ZHU

等^[12]以 Wistar 大鼠为受试对象,予以 120 d 铝暴露后也发现,亚慢性铝暴露可导致动物精子数量明显降低,精子畸形率升高,并影响睾丸 LDH、SDH 和 ACP 等关键氧化还原相关酶活性的水平;而 HADI 等^[13]以 18 mg/kg 剂量氧化铝处理雄性大鼠 30 d,发现大鼠精子浓度、精子异常率和精子活力明显改变,但这些精子功能损伤并不严重。本研究纳入的受试对象是广西地区大型铝厂的作业工人,铝接触的方式主要通过空气途径吸入人体,从血铝和尿铝浓度结果同样发现,空气中高浓度铝暴露对人体可产生较大的生殖毒性。

尽管诸多研究结果均提示,铝暴露能够诱发精子功能损害,但其具体的毒性作用机制仍不清楚。而且目前对于铝致生殖毒性机制的研究国内外仅有少量的报道。为进一步探讨铝暴露致作业工人精子功能损伤的潜在机制,本研究同时测定了精子线粒体 PARL 蛋白水平。结果发现,铝暴露可以导致精子线粒体 PARL 蛋白水平显著降低。已有研究显示,精子线粒体 PARL 蛋白不仅是调控精子生成的关键蛋白,也是精子线粒体获能和能量补给的主要调控因子^[14]。PARL 蛋白水平的降低可直接导致精子能量供应系统失衡,启动精子细胞凋亡,继而诱发精子活力下降、存活率降低等不良结局^[15]。本研究通过相关性分析结果同样显示,PARL 蛋白水平与精子活力和存活率呈正相关,而与精子畸形率呈负相关,充分印证了这一推论。

综上所述,本研究通过对铝暴露作业工人精子功能和精子线粒体 PARL 蛋白水平的相关性研究发现,铝暴露能够导致作业工人精子活力和存活率降低,增加精子畸形率,而且这些改变与 PARL 蛋白水平密切相关。然而铝致生殖毒性作用的机制,以及精子线粒体 PARL 蛋白的具体作用机制仍未明确,亟待后续深入研究加以论证。

参考文献

- [1] MOHAMMAD N S, ARAFA M H, ATTEIA H H. Co-enzyme Q10 and fish oil synergistically alleviate Aluminum chloride-induced suppression of testicular steroidogenesis and antioxidant defense[J]. Free Radic Res, 2015, 49(11):1319-1334.
- [2] HE H, HE L, GU M. Signal transduction during aluminum-induced secretion of organic acids in plants[J]. Biologia Plantarum, 2015, 59(4):601-608.
- [3] WÜST R, MAURER B, HAUSER K, et al. Mutation analyses and association studies to assess the role of the presenilin-associated rhomboid-like gene in Parkinson's disease[J]. Neurobiol Aging, 2016, 39(217):13-15.

- [4] BORENGASSER S J, FASKE J, KANG P, et al. In utero exposure to prepregnancy maternal obesity and postweaning high-fat diet impair regulators of mitochondrial dynamics in rat placenta and offspring[J]. Physiol Genomics, 2014, 46(23):841-850.
- [5] BURTON C, SHI H, MA Y. Development of a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry urinary pterinomics workflow[J]. Anal Chim Acta, 2016, 927:72-81.
- [6] SHARMA R, HARLEV A, AGARWAL A, et al. Cigarette smoking and semen quality: a new meta-analysis examining the effect of the 2010 World Health Organization laboratory methods for the examination of human semen [J]. Eur Urol, 2016, 70(4):635-645.
- [7] HAMILTON J, CISEN M, BRANDES M, et al. Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system[J]. Human Reproduction, 2015, 30(5):1110-1121.
- [8] GUPTA A. Ferric citrate hydrate as a phosphate binder and risk of Aluminum toxicity[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2014, 7(10):990-998.
- [9] ADAMS J, HOWSMON D P, KRUGER U, et al. Significant association of urinary toxic metals and Autism-Related Symptoms-A nonlinear statistical analysis with cross validation[J]. PLoS One, 2017, 12(1):e0169526.
- [10] PANDEY G, JAIN G C. A review on toxic effects of aluminium exposure on male reproductive system and probable mechanisms of toxicity[J]. Int J Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 3(3):48-57.
- [11] KLEIN J P, MOLD M, MERY L, et al. Aluminum content of human semen: implications for semen quality[J]. Reprod Toxicol, 2014, 50:43-48.
- [12] ZHU Y Z, SUN H, FU Y, et al. Effects of sub-chronic Aluminum chloride on spermatogenesis and testicular enzymatic activity in male rats[J]. Life Sci, 2014, 102(1):36-40.
- [13] HADI A A, JAFFAT H S. Effect of Aluminum-containing antacid on sperm parameters and testicular structure in male rats[J]. Int J Pharm Tech Res, 2016, 9(3):267-271.
- [14] WU H, CHEN Q. Hypoxia activation of mitophagy and its role in disease pathogenesis[J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(12):1032-1046.
- [15] ASHRAFI G, SCHWARZ T L. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria[J]. Cell Death Differ, 2013, 20(1):31-42.