

醋酸铅对小鼠精子发生毒性研究^{*}

马保华, 宋小飞, 艾小云, 王有柱, 郝 捷

(西北农林科技大学 动物科技学院 农业部家畜生殖内分泌与胚胎工程重点开放实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用腹腔注射染毒法, 将体重 (16 ± 1) g 的性成熟期小鼠随机分为高剂量 $(1/10 LD_{50})$ 、中剂量 $(1/50 LD_{50})$ 、低剂量 $(1/250 LD_{50})$ 染毒组和溶剂对照组, 每组10只, 高、中、低剂量染毒组于试验的第0, 3, 6, 9和12天以 0.01 mL/g 注射量, 分别腹腔注射 $1.20, 0.24, 0.048 \text{ g/L}$ 的醋酸铅 $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ 溶液, 对照组注射灭菌蒸馏水。30 d后, 处死小鼠, 采集输精管精子, 研究醋酸铅对小鼠精子的发生毒性。结果表明: (1)各试验组小鼠的睾丸、附睾湿重及其与体重的比值均无明显差异 $(P > 0.05)$; (2)采用输精管精子进行精子发生毒性检验是可行的; (3)各试验组小鼠精子相对密度及精子活力无统计学差异 $(P > 0.05)$; (4)各染毒组小鼠畸形精子比率显著高于对照组 $(P < 0.01)$; (5)高剂量和中剂量试验小鼠输精管顶体异常精子比率与对照组之间差异显著 $(P < 0.05)$ 。说明本试验所用醋酸铅剂量未明显影响性成熟期小鼠的性腺发育及精子密度和活力, 各剂量醋酸铅染毒显著影响了精子的形态发生和顶体形成。

[关键词] 醋酸铅; 精子发生; 毒性; 小鼠

[中图分类号] S859.83; X503.22

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)06-0049-04

铅是主要的环境污染金属之一, 随着现代工业的发展, 铅以各种形式影响动物及人类健康, 对机体的神经、造血、泌尿、免疫系统均有不同程度的损害^[1~3], 长期低剂量接触会影响到动物和人类的繁殖与生殖功能。铅对雄性生殖功能, 尤其是对雄性动物生长发育、性腺发育及精子发生的毒性作用是现代生殖毒理学、生殖流行病学研究的重要内容之一。本研究以具有代表性的模型动物小鼠为研究对象, 探讨醋酸铅对性成熟期雄性小鼠生长发育及其性腺发育和精子发生能力的影响, 以期为人类和动物生殖毒理研究提供参考性和基础性资料。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物 试验动物为第四军医大学实验动物中心昆明系小鼠。购回断奶鼠后经适应饲养, 选用体重达到16 g左右的40只性成熟雄性小鼠用于试验。适应期及试验期常规饲养管理, 白天光照12 h, 夜间黑暗12 h, 饲养室控温 $20 \sim 22^\circ\text{C}$, 排风扇定时通风换气^[4]。

1.1.2 主要试剂与设备器械 主要试剂有醋酸铅、精液稀释液、福尔马林磷酸盐缓冲液、 5 g/L 龙胆紫

酒精液、姬姆萨原液及工作液。设备有体视显微镜、生物显微镜、恒温水浴锅、改良纽巴(Neubauer)氏血球计数板。

1.2 方 法

1.2.1 染毒剂量的设计及各浓度醋酸铅溶液的配制 本研究所用醋酸铅的分子式为 $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 对小鼠腹腔注射的 LD_{50} 为 120 mg/kg ^[5]。试验设计以 $1/10 LD_{50}$ 、 $1/50 LD_{50}$ 、 $1/250 LD_{50}$ 剂量作为高、中、低染毒剂量。用双蒸水配制 $1.2, 0.24$ 和 0.048 g/L 的醋酸铅溶液, 正压过滤除菌, 分装备用。

1.2.2 染毒及试验程序 将试验小鼠随机分为高、中、低剂量染毒组和溶剂对照组(对照组), 每组10只。高、中、低剂量组于试验的第0, 3, 6, 9和12天分别腹腔注射 $1.2, 0.24, 0.048 \text{ g/L}$ 的醋酸铅溶液, 注射量 0.01 mL/g , 溶剂对照组注射相应体积的灭菌蒸馏水。试验开始后每3 d称重1次, 直到第11次称重(试验30 d)后, 处死受试小鼠, 离体采集输精管精子, 进行精子发生毒性检验。

1.2.3 试验小鼠精子采集 颈部脱臼法处死试验鼠, 仰卧, 用酒精棉球消毒腹部开口部位被毛及皮肤。剪开腹壁, 暴露生殖系统, 分离输精管。在含精

* [收稿日期] 2004-07-20

[基金项目] 西北农林科技大学青年教师专项科研基金项目

[作者简介] 马保华(1965-), 男, 陕西城固人, 副教授, 博士, 主要从事动物胚胎工程和动物生殖毒理研究。

液稀释液的表面皿中,用眼科剪除去附着于输精管上的韧带及脂肪,并冲洗干净。将冲洗干净的输精管放入另一含有 1.0 mL 新鲜精液稀释液的平皿内,在立体显微镜下,用 2 支眼科用异物针纵向撕开整个输精管,精子会浮游到稀释液中。用吸管连同精子吸出液体部分,装于具塞试管中暂存。在采集输精管的同时,采集左右两侧睾丸、附睾,测量其湿重。

1.2.4 精子密度及活力检查 在实际研究中,难以准确测量小鼠的原精液量。本试验采集输精管精子,直接使整个输精管的精子浮游到等体积的精液稀释液中,以估算精子的相对密度。估算时,将每只小鼠的精液均按 0.05 mL 计算,每只均使用 1.0 mL 精液稀释液则为稀释 20 倍,计数前再将保存的精液二次稀释 10 倍,既总稀释倍数为 200 倍。精子的计数采用改良纽巴氏血球计数板,用吸管吸取二次稀释的精液,放于计数室与盖玻片接触处,使精液自然流入计数室中。计数中间 5 个中方格(对角 5 个)内 80 个小方格的精子数,计数值为 X ,按照简化公式 $X \times 10^7$ 即可计算出每毫升输精管精液中精子的密度。计算时,先计算死精子的 X_1 值,将计数板置于 50

水浴锅中的搪瓷盘中 5~10 min,杀死精子,计数总精子数 X_2 值,则 $(X_2 - X_1)/X_2$ 为精子活力, $X_2 \times 10^7$ 为精子相对密度。

1.2.5 畸形精子检查 精液中形态不正常的精子为畸形精子,精子畸形率是指精液中畸形精子数占总精子数的百分比。检查畸形精子时,取 1 小滴精液在载玻片上制成抹片,用龙胆紫酒精液染色 3 min,自然干燥、水洗后镜检。检查不同视野的 500 个精子,统计出其中所含的畸形精子数。当数到最后 1 个视野时,即使已数够 500 个精子,也须完成视野内所有精子的计数。畸形精子计数时按照头部畸形、颈部畸形、尾部中段畸形、尾部主段畸形分类计数。尾部发育未完成的未成熟精子,计入畸形精子。

1.2.6 精子顶体异常的检查 精液抹片自然干燥 10~20 min,福尔马林磷酸盐缓冲液固定 15 min,水洗后自然干燥。用姬姆萨工作液染色 90 min,水洗,风干。用中性树脂封片后,置于 1 000 倍显微镜下用油镜观察、计数顶体异常精子。每张抹片须观察不同视野的 300 个精子,统计出顶体异常精子数。当数到最后 1 个视野时,即使已数够 300 个精子,也应将视野内所有精子计数完毕。精子顶体异常主要表现为肿胀、缺损、部分或完全脱落。

1.2.7 数据统计 试验数据用 Microsoft Excel 统

计,差异显著性检验用 t 检验进行分析。

2 结果与分析

2.1 试验期小鼠体重的变化规律

由图 1 可以看出,试验开始时,高、中、低剂量染毒组和对照组小鼠体重分别为 (15.5 ± 0.50) , (15.12 ± 0.12) , (16 ± 0.05) 和 (16 ± 1.21) g,试验末(30 d)体重分别为 (29.8 ± 3.59) , (30.8 ± 3.10) , (29 ± 2.39) 和 (31 ± 2.50) g。高、中剂量组小鼠在染毒 3 次后,出现了一定程度的生长迟缓。但各组之间呈现类似的生长变化规律,即停止染毒后,体重增长逐渐得到恢复。

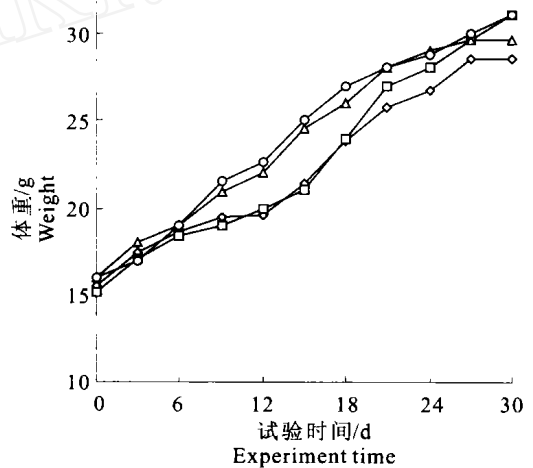


图 1 试验小鼠体重变化曲线

- - - 高剂量; - □ - 中剂量; - . . 低剂量; - ◇ - 对照

Fig 1 Curve of body weight change of the experiment male mice

- - - High dose; - □ - Moderate dose;
- . . Low dose; - ◇ - CK

2.2 试验小鼠睾丸、附睾湿重及其与体重的比值

试验鼠睾丸、附睾湿重及其与体重的比值见表 1。表 1 结果表明,各试验组与对照组之间上述指标均无统计学差异 ($P > 0.05$)。

2.3 精子质量检验结果

试验小鼠输精管精子相对密度及活力,以及试验鼠畸形精子及顶体异常精子检验结果见表 2。表 2 结果表明,各试验组小鼠精子的相对密度及精子活力无统计学差异 ($P > 0.05$);各染毒组小鼠畸形精子比率极显著地高于对照组 ($P < 0.01$);高剂量和中剂量试验小鼠输精管顶体异常精子比率与对照组之间差异显著 ($P < 0.05$)。

表 1 试验公鼠睾丸、附睾湿重及其与体重的比值

Table 1 Wet weight of testicle and epididymis of the male mice and the weight ratio to the body weight				
分组 Group	数量 Number	体重($\bar{X} \pm SD$)/g Body weight	睾丸、附睾湿重 ($\bar{X} \pm SD$)/mg The wet weight of testicle and epididymis	睾丸、附睾与体重比值 The weight ratio of testicle and epididymis to the body weight
高剂量组 High dose	10	29.8 ± 3.59	210.11 ± 33.59	7.32 × 10 ⁻³
中剂量组 Moderate dose	10	30.8 ± 3.10	209.44 ± 25.24	7.76 × 10 ⁻³
低剂量组 Low dose	10	29.0 ± 2.39	236.95 ± 20.89	7.72 × 10 ⁻³
对照组 Control	10	31.0 ± 2.50	231.99 ± 13.29	7.91 × 10 ⁻³

表 2 试验鼠输精管精子质量检验结果

Table 2 Checkout result of the sperm quality in spermaduct of the male mice					
分组 Group	数量 Number	精子相对密度 ($\bar{X} \pm SD$)/ (10 ⁷ · mL ⁻¹) The relative sperm consistency	精子活力/ ($\bar{X} \pm SD$) The sperm activity	畸形精子百分率 ($\bar{X} \pm SD$)/% The percent of the malformation sperm	顶体异常比率/% The percent of the abnormal acrosome sperm
高剂量组 High dose	10	51.30 ± 7.60	0.35 ± 0.15	25.81 ± 3.33 a	13.48 ± 2.37 b
中剂量组 Moderate dose	10	53.60 ± 10.18	0.40 ± 0.13	27.12 ± 6.48 a	12.33 ± 2.16 b
低剂量组 Low dose	10	53.90 ± 10.44	0.44 ± 0.20	23.71 ± 6.22 a	9.94 ± 1.86
对照组 Control	10	51.70 ± 19.57	0.41 ± 0.15	13.46 ± 2.39	6.48 ± 2.36

注: 各列试验组与对照组比较, a 为 $P < 0.01$, b 为 $P < 0.05$ 。
Note: Comparing test with control group in a list of data, the letter 'a' denote $P < 0.01$ and 'b' denote $P < 0.05$.

3 讨论与小结

3.1 选择性成熟期青年公鼠进行精子发生毒性研究的依据

本研究所选择的染毒时期为雄性小鼠性成熟期前后的一段生长发育时期。在这一时期, 公鼠性腺的精原细胞增殖已经完成, 并分化为初级精母细胞, 此后, 公鼠性腺就具有了产生精子的功能。本研究的目的在于研究醋酸铅对雄性小鼠体成熟后精子细胞形成、精子细胞变态形成精子以及精子在附睾内进一步成熟的毒性。研究结果证明, 醋酸铅进入体内后, 对精子细胞形成、精子形成及其附睾内成熟过程具有毒性作用。

3.2 试验期公鼠体重的变化规律

本研究的分组方法, 使试验开始时各组小鼠平均体重及组内变异相似。研究结果表明, 试验期间高剂量染毒组和中剂量染毒组公鼠在染毒到第 3 次后, 出现了一定程度的生长迟缓。在染毒程序结束后, 经过一段时间, 高剂量和中剂量染毒组的体重增长得到了一定程度的恢复。从最终的生长趋势看, 各组之间最终的生长变化规律类似。说明本试验根据生殖毒理试验设计的染毒剂量, 对染毒小鼠的生长发育并未产生不可恢复的显著影响, 符合生殖毒理试验设计原则^[6]。

3.3 醋酸铅与精子形态学质量的关系

各试验组公鼠的睾丸、附睾湿重及其与体重的比值均无明显差异($P > 0.05$)。说明本试验染毒剂量并未明显影响性成熟期公鼠的性腺发育。

试验鼠输精管精子密度及活力检验结果表明, 本试验首次采用的输精管精子采集方法及以精子相对密度作为检验试验鼠精子密度的检验依据是可行的, 可以保证每只试验鼠都能够在同等条件下进行检验比较。各试验组公鼠精子相对密度无统计学差异则说明, 已经完成精原细胞增殖及初级精母细胞分化的性成熟期青年公鼠, 能够最终形成精子的精原细胞及初级精母细胞的数量已经确定^[7,8]。用本研究所使用的醋酸铅剂量进行染毒, 未影响性腺产生精子的数量, 即不会改变精子密度。虽然高剂量染毒组精子活力较低, 但与对照组之间无统计学差异($P > 0.05$), 其他染毒组精子活力与对照组也无统计学差异, 说明本试验所使用的醋酸铅剂量对精子活力无显著影响。

在睾丸曲细精管中, 球形精子细胞形成精子及其在附睾内进一步成熟的过程中, 精子形态发生了复杂的变化, 成熟后最终由附睾尾到达输精管。从形态上反映精子毒性的 2 个重要指标为输精管精子的畸形比率和顶体形态异常比率^[9]。精子畸形的出现可能是精子生成过程中精子细胞核、细胞器和细胞

膜受到破坏,或输精管和副性腺发生了病理变化。从表 2 可以看出,高剂量、中剂量和低剂量染毒组小鼠输精管精子的畸形比率极显著地高于对照组小鼠 ($P < 0.01$),说明各剂量醋酸铅染毒均可显著地影响精子的生成过程;另外,高剂量、中剂量试验鼠精

子顶体形态异常比率显著高于对照组 ($P < 0.05$),低剂量试验鼠与对照组无统计学差异 ($P > 0.05$),说明高剂量和中剂量醋酸铅染毒时,对小鼠精子顶体形成有显著影响。

[参考文献]

- [1] 李权武,王建华. 动物繁殖毒理学[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1999
- [2] 李光辉,贺普宵. 畜禽微量元素疾病[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1990
- [3] 梁翠玲. 重金属与精液质量[J]. 中国公共卫生, 2004, (4): 495- 497.
- [4] 军事医学科学院实验动物场. 实验动物饲养与繁殖[M]. 北京: 科学出版社, 1985
- [5] 醋酸铅[EB/OL]. <http://www.scdc.sh.cn/abc/spcc/hazards/csq.htm>, 2003-08-06
- [6] 湖南医学院卫生学教研组. 卫生毒理实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979
- [7] 冯伯森,王秋雨,胡玉兴. 动物细胞工程原理与实践[M]. 北京: 科学出版社, 2000
- [8] 钱菊汾,刘 灵,马保华,等. 家畜胚胎学[M]. 北京: 中国科学文化出版社, 2003
- [9] 李青旺,武 浩. 动物繁殖学[M]. 西安: 西安地图出版社, 2000

Studies of the toxicity of the lead acetic on spermatogenesis of the male mice

MA Bao-hua, SONG Xiao-fei, AI Xiao-yun, WANG Youo-zhu, HAO Jie

(Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryotechnology, Ministry of Agriculture, College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The toxicity of the lead acetic on spermatogenesis of the male mice was studied. The puberty male mice with the body weight of (16 ± 1) g were divided into high dose ($1/10 LD_{50}$), moderate dose ($1/50 LD_{50}$), low dose ($1/250 LD_{50}$), and solvent control group randomly. The mice in high, moderate, low dose and in control group, every three day, were injected into abdominal cavity (0.01 mL/g) with 1.20 mg/mL , 0.24 mg/mL , 0.048 mg/mL lead acetate $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ solution and distilled water respectively, totally 5 times. After 30 days, the mice were put to death, the vas were separated, and the sperm in the vas were collected. The results are as follows: (1) the testicle and epididymis wet weight, and the weight ratio to the body weight had no difference ($P > 0.05$); (2) it was practicable by using the sperm in the vas to carry out test of the spermatogenesis toxicity; (3) the sperm relative consistency and activity had no statistics difference ($P > 0.05$); (4) the ratio of the malformation sperm were significantly different between experiment groups and control group ($P < 0.01$); (5) the ratio of the abnormal acrosome sperm in high and moderate dose groups were significantly higher than that of control group ($P < 0.05$). It proved that the lead acetic dose in this study had no effect on the sexual gland development, the sperm density and activity, evidently, and the morphogenesis and acrosomagenesis of sperm were affected significantly by exposure to lead acetic in puberty period.

Key words: lead acetic; spermatogenesis; toxicity; mouse