

Aroclor 1254 对小鼠早期胚胎体外发育的影响

杨培先, 胡林勇, 赵晓娥, 王 妍, 苏利红, 马保华

(西北农林科技大学 动物医学院 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】【目的】探讨了 Aroclor 1254 对小鼠 2-细胞和 8-细胞胚胎体外发育的影响。【方法】在体外培养的小鼠 2-细胞和 8-细胞胚胎培养液中, 分别添加质量浓度为 0.05, 0.25, 1.25 和 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 的 Aroclor 1254, 并设 Aroclor 1254 溶剂(乙醇)对照组和空白对照组, 比较不同质量浓度的 Aroclor 1254 对小鼠 2-细胞和 8-细胞胚胎体外发育的影响。【结果】0.05 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 影响 2-细胞胚胎的孵化(57.7%), 与溶剂对照组(66.7%)差异显著($P < 0.05$); 0.25 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 组, 2-细胞胚胎的囊胚发育率(72.5%)及囊胚孵化率(23.2%)与溶剂对照组(84.2%, 66.7%)差异极显著($P < 0.01$); 1.25 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 组, 2-细胞胚胎发育到 8-细胞阶段的比率(32.1%)极显著低于溶剂对照组($P < 0.01$); 6.25 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 组, 2-细胞胚胎发育到 4-细胞和 8-细胞阶段的比率(58.1%和 29.6%)极显著低于溶剂对照组($P < 0.01$)。0.05 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 对 8-细胞胚胎发育无明显影响; 但当质量浓度提高到 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 时, Aroclor 1254 显著影响 8-细胞胚胎的孵化(64.7%, $P < 0.05$); 1.25 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 组, 8-细胞胚胎囊胚发育率(68.6%)及孵化率(25.5%)极显著低于溶剂对照组(92.4%, 75.7%)($P < 0.01$); 6.25 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 组 8-细胞胚胎不能继续发育。【结论】Aroclor 1254 对小鼠胚胎体外发育存在明显的剂量-毒性关系, 随着培养液中 Aroclor 1254 质量浓度的增加, 对小鼠早期胚胎的发育毒性表现越早; 胚胎越小, 毒性敏感性越强。

【关键词】 Aroclor 1254; 毒性; 胚胎; 体外发育; 小鼠

【中图分类号】 S814.8

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)04-0032-05

Effect of Aroclor 1254 on early mouse embryo development *in vitro*

YANG Pei-xian, HU Lin-yong, ZHAO Xiao-e, WANG Yan, SU Li-hong, MA Bao-hua

(College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Engineering of Agricultural Ministry of China, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The aim of this study was to investigate the effect of Aroclor 1254 on mouse embryo(2-cell and 8-cell stage) development *in vitro*. 【Method】Aroclor 1254 of 0.05, 0.25, 1.25 and 6.25 $\mu\text{g/mL}$ were added to the mouse embryo(2-cell and 8-cell stage) culture media respectively, solvent(ethanol) control group and blank control group were set and then the effects of Aroclor 1254 with different concentration to the mouse embryo developmental competence cultured *in vitro* were compared. 【Result】The results indicated that Aroclor 1254 with 0.05 $\mu\text{g/mL}$ could significantly depress the hatching rate (57.7%) of the 2-cell stage embryos compared with the solvent control group(66.7%)($P < 0.05$); The blastular ratio(72.5%) and hatching rate(23.2%) were degraded significantly at 0.25 $\mu\text{g/mL}$ of Aroclor 1254 compared with that of corresponding solvent control group(84.2%, 66.7%, respectively)($P < 0.01$);

* [收稿日期] 2007-05-08

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(99SM66)

[作者简介] 杨培先(1981—), 男, 河南周口人, 在读硕士, 主要从事动物胚胎生物技术研究。

[通讯作者] 马保华(1966—), 男, 陕西城固人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物胚胎生物技术研究。

E-mail: mabaohuaxn@tom.com

When the concentration of Aroclor 1254 elevated to 1.25 $\mu\text{g/mL}$, the embryo developmental proportion from 2-cell to 8-cell stage (32.1%) was notably cut down compared with that of the dissolvent control group. And the ratio of 2-cell stage embryos development to the 4-cell and 8-cell stage (58.1% and 29.6% respectively) were significantly lower than that of dissolvent control group ($P < 0.01$), after the 2-cell stage embryos were exposed to Aroclor 1254 of 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Aroclor 1254 at 0.05 $\mu\text{g/mL}$ had no significant impact on the developmental competence of 8-cell embryos, but when the concentration was elevated to 0.25 $\mu\text{g/mL}$, the hatching rate (64.7%) of the 8-cell embryos was significantly decreased, compared with that of the solvent control group ($P < 0.05$). The blastocyst developmental rate (68.6%) and hatching rate (25.5%) of the 8-cell embryos with 0.25 $\mu\text{g/mL}$ of Aroclor 1254 were obviously lower than that of the corresponding solvent control group (92.4%, 75.7%, respectively) ($P < 0.01$). No embryo can develop continuously when the concentration of Aroclor 1254 was evaluated to 6.25 $\mu\text{g/mL}$. **【Conclusion】** The conclusion was that Aroclor 1254 depressed the mouse embryo development according to the dose-toxicity *in vitro*; as the dose of Aroclor 1254 increased, the toxic effect on mouse embryo development would appear earlier and act more fiercely. The younger the embryo was, the more sensitive it was to Aroclor 1254.

Key words: Aroclor 1254; toxicity; embryo; *in vitro*; mouse

环境激素是由于人类从事生产活动而释放到环境中的一些外源性化学物质, 这些物质进入动物体内后可以产生一些类似激素的生理作用, 干扰和破坏正常的激素作用, 从而影响人和动物的生长发育及生殖, 引起代谢紊乱、生殖器官异常、卵巢癌、子宫肌瘤、前列腺癌及精巢癌等生殖系统疾病^[1-3]。Aroclor 1254 是环境激素类二噁英多氯联苯 (PCBs) 的典型代表物质之一^[4-6]。研究 Aroclor 1254 对体外培养小鼠胚胎生长发育和形态分化的影响, 对进一步探讨多氯联苯对胚胎的发育毒性特点和毒性机理具有重要意义。很多学者通过体内及体外试验对多氯联苯的毒性进行了多方面的研究, 如降低受精率、损害胚胎的生长, 增加胚胎的丢失及降低幼小动物的存活率等^[5-7]。研究较多的是多氯联苯的生殖毒性及其对附植后胚胎的影响。如: 研究表明^[8], 哺乳期接触 Aroclor 1254 的母鼠体成熟后, 其卵巢湿重显著低于对照组 ($P < 0.05$); 子宫湿重极显著或显著低于对照组; 胎儿期接触 Aroclor 1254 的母鼠体成熟后, 1/10 LD_{50} 染毒组卵巢及子宫湿重显著低于对照组 ($P < 0.05$); 在性成熟期和断奶期染毒鼠排卵前卵巢切片观察发现, 最高染毒剂量卵巢皮质部除有成熟或接近成熟卵泡外, 有多个发育中闭锁的卵泡。而专门对体外胚胎的毒性毒理研究较少。体内胚胎毒性试验易受母体因素的影响; 而体外试验具有经济、简便、实验周期短、可以控制实验条件和试验结果可重复等优点。本研究在小鼠 2-细胞胚胎和 8-细胞胚胎的体外培养液中加入不同质量浓度剂量的 Aroclor 1254, 探讨 Aroclor 1254 对小鼠早期

胚胎体外发育的影响, 并找出 Aroclor 1254 对昆白系小鼠胚胎所产生毒性的有效质量浓度, 以期评价此类物质对动物生殖健康造成的影响提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 昆白系小鼠, 购自第四军医大学实验动物中心。母鼠, 25~30 g; 公鼠, 35 g 左右。

1.1.2 试验试剂及仪器 主要试剂: Aroclor 1254 (Crescent Chemical Co Inc, USA); 孕马血清促性腺激素 (PMSG) 和人绒毛膜促性腺激素 (hCG) (宁波第二激素厂); 新生牛血清 (NBS) (GBICO); 石蜡油 (SIGMA); 培养液: 胚胎回收操作液 (含体积分数 5% NBS 的 mDPBS); CZB 胚胎培养液, 基础液为 CZB 液, 按 Chatot 等^[9] 的配方配制, 调节 pH 为 7.2~7.4, 使用前加体积分数 10% NBS, CZB 中所用试剂均为美国 SIGMA 公司产品。

主要仪器设备: 体视显微镜, 数码倒置荧光相差显微镜, CO_2 培养箱, 超净工作台。

1.2 小鼠超数排卵及配种

选择阴门微开张、阴道黏膜淡粉红色到粉红色的母鼠, 于下午 4:00 腹腔注射 PMSG 8~10 U/只, 50 h 后腹腔注射 hCG 8~10 U/只, 随后放入单独饲养的公鼠笼内同笼过夜, 次日上午 7:00~8:00 观察记录配种母鼠阴门栓形成情况, 见阴门栓者假定为受孕, 专笼饲养, 备用。

1.3 小鼠胚胎培养液的配制

试验组: 将无水乙醇溶解的不同质量浓度的

Aroclor 1254 母液,按比例添加到 CZB 胚胎培养液中,组成 4 个试验组培养液(无水乙醇体积比相同),定为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ组,剂量分别对应为 0.05,0.25,1.25 和 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 。溶剂对照组:在培养液中添加与试验组相同体积的无水乙醇。空白对照组:常规的 CZB 胚胎培养液。

1.4 Aroclor 1254 对小鼠胚胎体外发育的影响

1.4.1 2-细胞和 8-细胞胚胎的采集 分别在注射 hCG 后 45~48 h 和 67~77 h 将假定受孕的小鼠脱颈椎处死,按 Nary 等^[10]的方法输卵管回收 2-细胞及 8-细胞胚胎。检出形态规则,发育良好的胚胎,用 mDPBS 洗 3 次,再用提前平衡好的培养液洗 3 次,备用。

1.4.2 胚胎体外培养和试验结果判定 将上述胚胎分别移入 24 孔细胞培养板的 6 组培养液中,每孔 50~60 枚,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 、饱和湿度的 CO_2 培养箱中培养。每 12 h 在倒置显微镜下观察,并记录小鼠胚胎发育情况。

1.5 数据处理

试验数据用 Spss11.0 软件进行 χ^2 检验分析。

表 1 小鼠 2-细胞胚胎在含不同质量浓度 Aroclor 1254 培养液中的体外发育结果

组别 Group	培养胚胎数 Number of embryo	胚胎发育率/% Development rate				
		4-细胞胚 4-cell embryo	8-细胞胚 8-cell embryo	桑椹胚 Morula	囊胚 Blastocyst	孵化胚 Hatching embryo
溶剂对照组 Solvent control	171	95.9 A	92.3 A	86.5 A	84.2 aA	66.7 aA
空白对照组 Control	192	99.5 A	97.4 A	90.1 A	86.4 aA	69.3 aA
Ⅰ组 Group I	208	96.1 A	95.2 A	91.8 A	85.6 aA	57.7 bA
Ⅱ组 Group II	207	98.5 A	95.6 A	88.4 A	72.5 bB	23.2 B
Ⅲ组 Group III	196	93.9 A	32.1 B	10.7 B	7.6 cC	1.0 C
Ⅳ组 Group IV	186	58.1 B	29.6 B	0	0	0

注:同列数据后标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下表同。
Note: Values within columns with different uppercase and superscripts differ significantly ($P<0.01$),different lower superscripts differ significantly ($P<0.05$). The same as follows.

2.2 小鼠 8-细胞胚胎体外发育结果

将 8-细胞胚胎培养在含 Aroclor 1254 分别为

0.05,0.25,1.25 和 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 的培养液中,桑椹胚、囊胚发育率及孵化率结果见表 2。

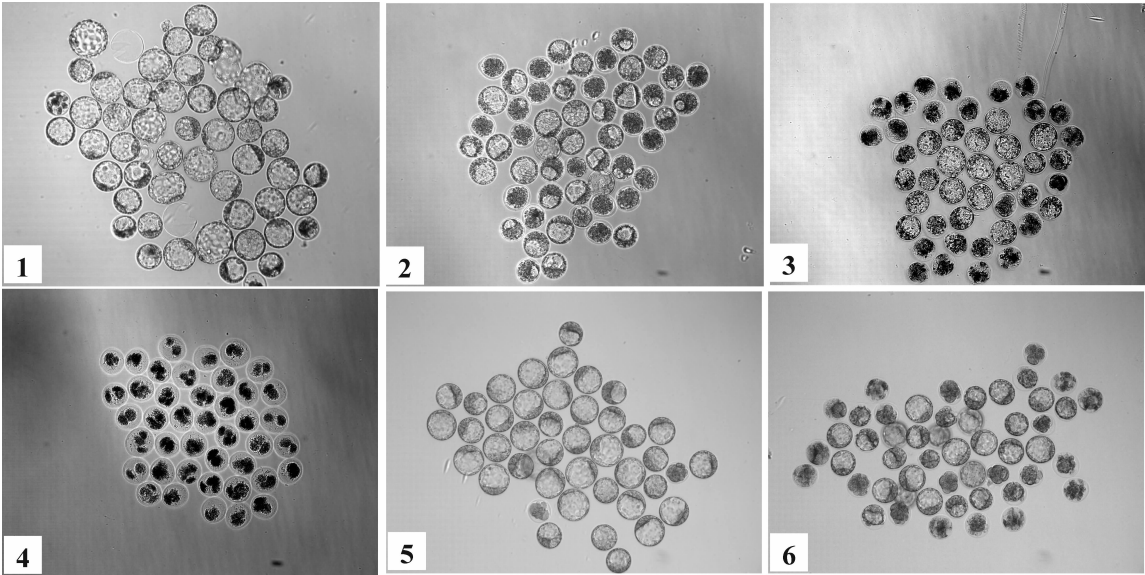
表 2 小鼠 8-细胞胚胎在含不同质量浓度 Aroclor 1254 培养液中的体外发育结果

组别 Group	培养胚胎数 Number of embryo	胚胎发育率/% Development rate		
		桑椹胚 Morula	囊胚 Blastocyst	孵化胚 Hatching embryo
溶剂对照组 Solvent control	185	97 a	92.4 A	75.7 aA
空白对照组 Control	196	100 a	96.4 A	79.6 aA
Ⅰ组 Group I	189	96.8 a	87.3 A	78.8 aA
Ⅱ组 Group II	215	97.7 a	96.7 A	64.7 bA
Ⅲ组 Group III	204	94.1 a	68.6 B	25.5 B
Ⅳ组 Group IV	198	90.9 b	0	0

由表 2 可知,0.05 和 0.25 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 对昆白系小鼠 8-细胞胚胎发育到囊胚阶段均无明显

影响;但后者影响 8-细胞胚胎的孵化(64.7%),囊胚孵化率与溶剂对照组差异显著($P<0.05$);1.25 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 组,囊胚率及囊胚孵化率极显著低于溶剂对照组($P<0.01$),部分胚胎已经退化

(图版 6);6.25 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 组,桑椹胚发育率显著低于对照组($P<0.05$),胚胎不能继续发育。



图版 1~6 小鼠 2-细胞和 8-细胞胚胎在不同质量浓度 Aroclor 1254 中的发育观察结果(100 $\times$)

1. 空白对照组 2-细胞胚胎体外培养 60 h 的发育情况;2,3. 分别为 2-细胞胚在 0.25,1.25 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 培养液中培养 60 h 的发育情况;4. 2-细胞胚在 6.25 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 培养液中培养 18 h 的胚胎;5,6. 分别为 8-细胞胚在 0.25, 1.25 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 培养液中培养 36 h 的发育情况
- Fig. 1—6 Observation results of the *in vitro* development of 2-cell and 8-cell mouse embryos that exposed to different concentration of Aroclor 1254(100 $\times$)
1. 2-cell embryos cultured for 60 h in control medium;2,3. 2-cell embryos exposed to 0.25,1.25 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 respectively for 60 h; 4. 2-cell embryos exposed to 6.25 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 for 18 h;5,6. 8-cell embryos exposed to 0.25 and 1.25 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 respectively for 36 h

3 结论与讨论

3.1 Aroclor 1254 对小鼠 2-细胞胚胎体外发育的影响

Aroclor 1254 是环境激素类二噁英多氯联苯(PCBs)的典型代表物质之一,较低剂量的 PCBs 干扰小鼠早期胚胎的体外发育。Kholkute 等^[11]认为,PCBs 可能是通过改变雌性配子膜的稳定性而影响胚胎的体外发育。本研究结果表明,0.05 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 不影响小鼠 2-细胞胚胎发育到囊胚,但显著降低囊胚的孵化率,这可能是由于 Aroclor 1254 影响胚胎孵化相关基因的表达而影响小鼠囊胚的孵化率。这与 Kietz 等^[12]在兔上的研究结果相类似。Kietz 等^[12]认为,PCBs 影响兔胚胎植入相关基因的表达而降低了兔胚胎的植入率。当培养液中

Aroclor 1254 剂量增加到 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 时,能极显著降低体外培养的 2-细胞胚胎发育到囊胚,这可能是由于胚胎持续的接触毒物干扰了 2-细胞期胚胎基因组的激活,降低了 4-细胞期以后胚胎中与胚胎发育相关因子的表达。当培养液中 Aroclor 1254 剂量增加到 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 时,极显著降低 2-细胞胚胎发育到 8-细胞阶段的比例,8-细胞胚胎发育延迟,且很快退化,说明 1.25 $\mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 对小鼠胚胎的致密化影响较大。有研究证明^[13],受 Aroclor 1254 毒性作用的精子在体内受精后形成的受精卵,即使完成了第一次卵裂,在进一步的发育中,仍会出现发育延迟及发育中退化的现象。当培养液中 Aroclor 1254 剂量增加到 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 时,体外培养的 2-细胞胚胎不能继续发育。以上结果表明,Aroclor 1254 对小鼠早期胚胎有毒性作用,且随着

剂量的增加毒性作用增强。

3.2 Aroclor 1254 对小鼠 8-细胞胚胎体外发育的影响

在体外培养的 8-细胞胚胎培养液中加入不同剂量的 Aroclor 1254,旨在探讨该物质对胚胎致密化及进一步分化的影响。本试验结果表明,当培养液中 Aroclor 1254 剂量由 $0.05\ \mu\text{g/mL}$ 增加到 $6.25\ \mu\text{g/mL}$ 时,并不影响 8-细胞胚胎发生致密化而发育成桑椹胚,其原因可能是小鼠胚胎发育到 8-细胞胚胎阶段后很快就会致密化而发育成桑椹胚,毒物对其作用时间不长;但是随着作用时间的延长,会影响胚胎的进一步发育。PCBs 不仅影响小鼠胚胎的发育潜能,在 Aroclor 1254 对牛卵母细胞发育潜能及体外受精研究中,该物质能够影响牛卵母细胞受精后 7~8 d 桑椹胚或囊胚的数量^[14]。本研究中 $0.25\ \mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 显著降低 8-细胞胚胎在体外发育的孵化率; $1.25\ \mu\text{g/mL}$ Aroclor 1254 极显著降低 8-细胞胚胎在体外发育到囊胚阶段的发育率及其进一步的孵化。由以上结果可知,Aroclor 1254 对体外培养小鼠 8-细胞胚胎的毒性主要表现在桑椹胚以后的发育中,这可能是 Aroclor 1254 影响了桑椹胚阶段的细胞间由缝隙连接所介导的细胞间通讯,使胚胎不能继续发育;也可能是在致密化阶段就对胚胎内的细胞连接及分化造成了干扰,只不过在形态上未表现出来。

本研究证明了 Aroclor 1254 对小鼠胚胎体外发育存在明显的剂量-毒性关系,随着其质量浓度的增加对小鼠胚胎的发育毒性增强;胚龄越小,毒性敏感性越强。

[参考文献]

- [1] 龙鼎新. 环境雌激素的生殖和发育毒性研究进展 [J]. 中国优生优育, 2001, 12(1): 46-48.
Long D X. Advance in the reproduction and development toxicity of the environmental estrogens [J]. Chinese Journal of Reproductive Health, 2001, 12(1): 46-48. (in Chinese)
- [2] Battershill J M. Review of the safety assessment of polychlorinated biphenyls (PCBs) with particular reference to reproductive toxicity [J]. Hum Exp Toxic, 1994, 13: 581-597.
- [3] Seiler P, Fischer B, Lindenau A, et al. Effects of persistent chlorinated hydrocarbons on fertility and embryonic develop-

ment in the rabbit [J]. Hum Reprod, 1994, 9: 1920-1926.

- [4] 李 霜. 多氯联苯与人体健康 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2005, 23(4): 316-318.
Li X. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and human health [J]. Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, 2005, 23(4): 316-318. (in Chinese)
- [5] 王心如. 毒理学基础 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003.
Wang X R. Toxicology substructure [M]. 4th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003. (in Chinese)
- [6] 胡恭华, 李舒梅. 内分泌干扰物的毒理学研究进展 [J]. 赣南医学院学报, 2000, 24(4): 456-460.
Hu G H, Li S M. Advance in the toxicology of the endocrine disruptors (EDCs) [J]. Journal of Gannan Medical College, 2000, 24(4): 456-460. (in Chinese)
- [7] Safe S H. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment [J]. Crit Rev Toxicol, 1994, 24: 87-149.
- [8] 马保华. Aroclor 1254 对雌性小鼠生殖毒理研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2003.
Ma B H. Studies on the reproductive toxicology of Aroclor 1254 in the female mouse [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A & F University, 2003. (in Chinese)
- [9] Chatot C L, Ziomek C A, Bavister B D, et al. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro* [J]. J Reprod Fert, 1989, 86: 679-688.
- [10] Nary A, Gertsentein M, Vintersten K, et al. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003.
- [11] Kholkute S D, Dukelow W R. Effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) mixtures on *in vitro* fertilization in the mouse [J]. Bull Environ Contam Toxic, 1997, 59: 531-536.
- [12] Kietz S, Fischer B. Polychlorinated biphenyls affect gene expression in the rabbit preimplantation embryo [J]. Mol Reprod Dev, 2003, 64(3): 251-260.
- [13] 马保华, 王建华, 史志诚, 等. Aroclor 1254 对小鼠精子受精能力与受精卵发育的毒性研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(5): 1-4.
Ma B H, Wang J H, Shi Z C, et al. Toxicity of the Aroclor 1254 on the fertilization ability of sperm and the development of early embryo in mice [J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2005, 33(5): 1-4. (in Chinese)
- [14] Paola P, Federrica P, Alberto M, et al. *In vitro* reproductive toxicity of polychlorinated biphenyls: effects on oocyte maturation and developmental competence in cattle [J]. Mol Reprod Dev, 2001, 58: 411-416.