

醋酸铅对小鼠胚胎体内发育毒性的研究^{*}

马保华, 王建华, 史志诚, 刘金龙^{*}, 王 强^{*}

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 采用饮水染毒法研究碱式醋酸铅对小鼠早期胚胎体内发育的毒性。将体重 (15 ± 2) g的母鼠随机分为高剂量、中剂量、低剂量染毒组和对照组。从试验的第1天起, 染毒组小鼠分别于下午17:00至次日上午8:00自由饮用5.0, 1.0和0.2 g/L醋酸铅溶液, 次日上午8:00至下午17:00更换为自来水, 如此循环, 持续21 d; 对照组小鼠一直自由饮用自来水。染毒结束后, 进行正常饲喂, 饮水至试验结束。从第26天开始对小鼠进行超排, 超排小鼠分别在注射hCG后的48, 72和96 h回收输卵管及/或子宫胚胎。结果显示, 在注射hCG后48 h回收胚胎时, 染毒各组超排小鼠正常2~4-C胚胎占回收总数的比率与对照组无显著差异($P > 0.05$); 72 h回收胚胎时, 高、低剂量组的桑葚胚比率极显著低于对照组($P < 0.01$), 中剂量组则显著低于对照组($P < 0.05$); 96 h回收胚胎时, 高剂量组囊胚比率极显著低于对照组($P < 0.01$), 中、低剂量组的囊胚比率与对照组差异不显著($P > 0.05$), 且此时各染毒组的退化胚比率均极显著高于对照组($P < 0.01$)。结论认为, 铅能显著影响体内胚胎从2-C期进一步发育为桑葚胚和囊胚, 并使胚胎发育延迟、停滞和退化。

[关键词] 胚胎; 醋酸铅; 发育毒性; 小鼠

[中图分类号] S859.83; X503.22

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)03-0015-04

铅是一种古老而广泛分布的环境污染物。由于铅及铅的化合物种类繁多, 用途广泛, 所以铅是造成环境污染的主要金属元素之一。早在罗马帝国时代, 人们就观察到因铅中毒而引起的流产、死胎、不育等现象^[1]。随着现代工业的发展, 铅以矿尘、烟尘、污水及废渣形式进入工作区和生活环境, 使得许多矿工、冶炼工, 以及铅污染区的居民接触过量的铅而发生中毒。大量试验表明, 铅对机体的神经、造血、泌尿、免疫等系统均有不同程度的损害^[2]。由于铅在机体内有蓄积作用, 所以长期低剂量接触会影响到动物和人类的繁殖与生殖功能。人群流行病学调查显示, 铅污染地区妇女自然流产、早产及畸胎和婴幼儿行为异常增多, 并指出高流产率是铅造成的胚胎毒性的一个重要特征^[3]。随着人们环境意识的增强, 研究铅对胎盘^[4]、附植前胚胎发育^[5]、器官发生^[6]及个体发育^[7,8]等生殖序列的毒性成为现代生殖毒理学、生殖流行病学的重要内容。本研究对不同剂量下铅对小鼠早期胚胎体内发育的影响进行了初步试验, 探讨铅对小鼠早期胚胎发育的毒性作用, 为从形态学

上探讨铅的毒性机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材 料 1.1.1 试验动物 昆白系小鼠, 购自第

1.1.2 主要试剂及药品 碱式醋酸铅(PbOHA c); 马绒毛膜促性腺激素(eCG); 人绒毛膜促性腺激素(hCG); 新生牛犊血清(NCS); 磷酸盐缓冲液(PBS)。

1.1.3 主要仪器及设备 体视显微镜; 相差荧光显微镜; 电子分析天平; 恒温水浴锅。

1.2 方 法

1.2.1 染毒 13~15 g的青年母鼠, 经适应期饲养后, 于试验前(0天)将体重 (15 ± 2) g的母鼠72只随机分为4组, 每组18只, 即高剂量染毒组、中剂量染毒组、低剂量染毒组和对照组。从试验的第1天起, 染毒组小鼠分别于下午17:00至次日上午8:00自由饮用5.0, 1.0和0.2 g/L醋酸铅溶液, 次日上午8:00至下午17:00更换为自来水, 如此循环, 持续21 d; 对照组小鼠一直自由饮用自来水。染毒结束后, 进行正常饲喂, 饮水至试验结束, 并从第26天开始对小鼠进行超排。

^{*} [收稿日期] 2002-06-29

[基金项目] 西北农林科技大学青年教师专项科研基金

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

^{*} 刘金龙, 王强为西北农林科技大学动物科技学院2001届毕业生。

1.2.2 小鼠超排及胚胎回收 在注射 eCG 的当天(超排第 0 天),选择阴门微开张、黏膜淡粉红色的母鼠,于下午 16:00 腹腔注射 eCG 5~10 大鼠单位;第 2 天下午 16:00 腹腔注射 hCG 5~10 大鼠单位,雌雄小鼠同笼过夜,雌雄比为 1:1;第 3 天上午 7:00~8:00,观察记录配种后雌鼠阴栓形成情况。配种后,分别在注射 hCG 后的 48、72 和 96 h 用离体生殖道回收法回收输卵管及/或子宫胚胎,记录回收卵总数、胚胎数量及发育阶段、退化胚数量和未受精

卵数量。
1.2.3 数据统计 试验数据用 χ^2 检验进行分析。

2 结果

高剂量染毒组、中剂量染毒组、低剂量染毒组和对照组的卵回收总数分别为 264、250、254 和 273 枚,其正常发育胚胎、发育延迟胚、退化胚和未受精卵情况见表 1。

表 1 醋酸铅对小鼠胚胎体内发育毒性试验结果

Table 1 Experiment results of toxicity of lead acetate on mouse embryo development *in vivo*

分组 Group	HCG 注射后 间隔时间/h Time after hCG were injected	回收卵 总数/枚 Total number of eggs collected	1-C 胚/% 1-cell embryo	2~4-C 胚/% 2-cell embryo	桑胚/% Morulae	囊胚/% Blastocyst	退化胚/% Degeneration embryo	未受精卵/% Oocyte
高剂量组 High dose	48	129	22.5(29)	48.1 a(62)	0	0	29.5(38)	0
	72	96	12.5(12)	11.5(11)	25.0 e(24)	0	42.7(41)	8.3(8)
	96	39	0	7.7(3)	0	25.6 i(10)	43.6 m(17)	23.1(9)
中剂量组 Moderate dose	48	123	8.9(11)	53.7 b(66)	0	0	26.8(33)	10.1(13)
	72	92	9.8(9)	13.0(12)	33.7 f(31)	0	41.3(38)	2.2(2)
	96	35	0	14.3(5)	2.9(1)	37.1 j(3)	40.0 n(14)	5.7(2)
低剂量组 Low dose	48	123	14.6(18)	52.0 c(64)	0	0	22.0(27)	11.4(14)
	72	87	9.2(8)	15.0(13)	27.6 g(24)	0	27.6(24)	20.7(18)
	96	44	6.8(3)	2.3(1)	0	45.5 k(20)	34.1 o(15)	11.4(5)
对照组 Control	48	130	20.8(27)	60.0 d(78)	0	0	16.2(21)	3.1(4)
	72	107	6.5(7)	27.1(29)	52.3 h(56)	0	6.5(7)	7.5(8)
	96	36	2.7(1)	5.6(2)	11.1(4)	58.3 l(21)	8.3 p(3)	13.8(5)

注: 各个胚胎回收时间各组之间统计结果为, ① a:d, b:d, c:d, $P>0.05$; ② e:h, g:h, $P<0.01$; f:h, $P<0.05$; ③ i:l, $P<0.01$; j:l, k:l, $P>0.05$; ④ m:p, n:p, o:p, $P<0.01$ 。
Note: The statistic results of each group during embryo collection period are: ① a:d, b:d, c:d, $P>0.05$; ② e:h, g:h, $P<0.01$; f:h, $P<0.05$; ③ i:l, $P<0.01$; j:l, k:l, $P>0.05$; ④ m:p, n:p, o:p, $P<0.01$ 。

3 讨论

3.1 铅对小鼠早期胚胎体内发育的影响

铅随饮水或饲料进入消化道以后, 主要在小肠吸收, 吸收率约为 5%~15%。铅进入血液后, 形成可溶性磷酸氢铅、甘油磷酸铅及蛋白结合物, 大约有 1% 的铅游离于血清中, 游离铅与结合铅处于动态平衡之中。而铅的毒性作用可能是游离铅引起的^[2]。据报道^[9], 给予交配后的小鼠以含铅饲料, 观察受精后 48 h 胚胎的细胞数, 结果表明, 处于 4 个细胞期的胚胎数比 8 个细胞期的胚胎数明显增多, 提示铅抑制了胚胎细胞的分裂, 并推测铅还可能影响胚胎的首次卵裂过程。

对小鼠而言, 一般约在凌晨排卵受精, 受精卵的第 1 次卵裂在受精后 18~24 h, 以后约每 12 h 分裂 1 次, 分裂到 8 细胞时为一团细胞, 无腔体出现时为桑葚胚, 到 16 细胞时即进入囊胚阶段。依此推算, 自

然繁殖配种的小鼠, 在检栓后的次日下午 16:00(相当于超排小鼠注射 hCG 后 48 h), 受精卵基本上已经完成了第 1 次卵裂, 即到达 2-C 胚阶段, 稍晚能见到小部分胚胎已完成或正在完成第 2 次卵裂(即 3~4 细胞)。而对于超排小鼠, 由于卵巢上卵泡较多, 在此时仍能见到部分 1-C 胚胎。在超排小鼠注射 hCG 后 72 h, 正常发育的受精卵应发育到桑葚胚; 注射 hCG 后 96 h, 正常发育的受精卵应发育到囊胚。本研究以注射 hCG 后 48 h 受精卵发育到 2~4-C 胚胎、72 h 发育到桑葚胚、96 h 发育到囊胚的比率以及发育退化胚数作为小鼠早期胚胎发育的重要指标。

由表 1 看出, 在注射 hCG 后 48 h 回收胚胎时, 染毒组小鼠回收的卵中, 正常 2~4-C 胚胎比率与对照组无显著差异($P>0.05$), 但均低于对照组, 而且高剂量组与对照组相差近 12 个百分点($\chi^2_{0.05}=3.37$, $\chi^2_{0.05}=3.84$)。差异不显著可能是染毒剂量尚未达到

影响卵母细胞发育成熟和受精过程的程度。同时表明,只要卵母细胞发育成熟,其卵源性基因表达活动能够维持受精及受精卵的第1次卵裂。

注射 hCG 后 72 h 回收胚胎时,高剂量组和低剂量组的桑胚率极显著低于对照组($P < 0.01$),中剂量组则显著低于对照组($P < 0.05$)。说明虽然卵母细胞能够受精并完成第1次卵裂,但由于铅的毒性作用,而使卵裂胚在其后的发育过程中,难以完成 2-C 阶段由卵源性基因控制向胚源性基因控制的转换,同时由于铅的蓄积作用以及铅的游离,使早期胚胎发育过程中一直受到铅的毒性作用,即使已经发育到 2-C 期的胚胎,在进一步发育为桑葚胚的过程中仍会受到影响而发育迟缓甚至停止发育并退化^[10]。

注射 hCG 后 96 h 回收胚胎时,高剂量染毒组与对照组囊胚率差异极显著($P < 0.01$),中、低剂量染毒组的囊胚比率与对照组差异不显著($P > 0.05$),此时各染毒组的退化胚比率均极显著高于对照组($P < 0.01$)。证明高剂量组由于铅的毒性作用,同样影响到桑葚胚进一步发育到囊胚的过程,即使已经发育的胚胎,也会在发育过程中发生退化。中、低剂量组的囊胚发育率与对照组差异不显著($P > 0.05$),其原因可能在于 96 h 时回收的胚胎数较少,影响到差异显著性的统计检验;另一方面则仍可能是由于染毒剂量较低,而未达到差异显著性标准,

但仍能看出囊胚率有下降的趋势。

3.2 铅影响早期胚胎发育的可能机理

关于铅影响早期胚胎发育的机理,目前仍不十分清楚。但相关研究和报道的日益增多,为探讨其机理提供了各种研究思路。本试验进行了铅对小鼠早期胚胎发育毒性的初步研究,尚未涉及铅对早期胚胎发育毒性的机理,试验结果为以后的毒理研究奠定了基础。试验结果证明,铅能够导致早期胚胎发育迟缓,并加速胚胎的退化。鉴于本试验中各个指标控制阶段胚胎的平均细胞数减少,故推测其与受影响胚胎的细胞周期延长、微管或纺锤体功能损伤有关。即铅对胚胎发育的抑制作用,一方面可能是由于其对重要代谢酶(如含巯基酶和磷脂酶)的毒性作用致使酶失活,从而影响胚胎细胞的正常代谢和染色体复制,使细胞分裂缺少物质基础;另一方面,可能是其抑制了胚胎细胞中骨架蛋白的合成^[11],从而使纺锤体等有丝分裂器不能正常形成和移动,使细胞分裂无法正常进行;同时,也可能是由于其对微丝、微管等细胞骨架的影响,导致胞质分裂无法正常进行。胚胎细胞对铅盐的吞噬,可使氧消耗增加,磷酸戊糖途径代谢加速和氧自由基增加,自由基则可能是铅损伤胚胎细胞遗传物质的重要媒介。另外,铅还可能通过影响胚胎的分泌因子而对胚胎发育产生不利影响。

[参考文献]

- [1] 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
- [2] 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
- [3] 杨霄霖. 环境铅污染对妇女生殖功能危害的调查[J]. 环境与健康杂志,1998,15(4): 154- 156
- [4] Gupta G S, Singh J, Anita Gupta, et al. Trace metals and metalloenzymes in placenta after oral administration of lead acetate[J]. Biological Trace Element Research, 1998, 60(1- 2): 145- 152
- [5] Kurosky L, Lyster P, Martin J E, et al. Prenatal toxicity of lead monitored via preimplantation rodent embryo culture[J]. Toxicologist, 1989, 9(1): 94
- [6] Vaccaro T M, Brown Woodman P D, Webster W S. Investigating the possible teratogenicity of inorganic lead on rat embryos *in vitro*[J]. Teratology, 1992, 45(3): 328- 329
- [7] Martin J J, Ronis, Thomas M, Badger, Sarah J, Shema, et al. Reproductive toxicity and growth effects in rats exposed to lead at different periods during development[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1996, 136(2): 361- 371
- [8] Pinon-Lataillade G, Thoreux-Manlay A, Coffegnay H, et al. Reproductive toxicity of chronic lead exposure in male and female mice[J]. Hum Exp Toxicol, 1995, 14(11): 872- 878
- [9] 张国禾. 铅对胚胎毒性作用[J]. 国外医学——卫生学分册, 1984, 3: 133- 136
- [10] 邱佳菁, 李逸平. “生存还是毁灭”;发育还是阻滞——小鼠早期胚胎体外发育 2-细胞阻滞产生机制初析[J]. 生命科学, 2000, 12(5): 193- 198
- [11] 沈维干, 李朝军, 季全兰. 砷对小鼠卵母细胞成熟和体外受精的影响[J]. 中国工业医学杂志, 1999, 12(6): 327- 329

Developmental toxicity of lead acetate on mouse embryo *in vivo*

MA Bao-hua, WANG Jian-hua, SHI Zhi-cheng, LIU Jin-long, WANG Qiang

(College of Animal Sciences and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The toxicity of lead acetate on embryo development *in vivo* was investigated on mice by adding lead acetate into drinking water. Female mice of body weight (15 ± 2) g were divided into a high dose, a moderate dose, a low dose and control group randomly. Mice in test groups drank 5.0, 1.0 and 0.2 g/L lead acetate solution separately from 17:00 pm of the first day to 8:00 am of next day, then the three kinds of solutions were replaced by water from 8:00 am to 17:00 pm of the next day, so was done repeatedly for 21 days; mice in control group always drank water. Then all the mice were raised normally until the end of the test. From day 26, mice were conducted to superovulation, and the embryos in oviduct and uterus were collected at 48 h, 72 h and 96 h after hCG were injected. Results showed that the ratio of normal 2-4C embryo collected from the test groups has no statistical difference ($P > 0.05$) with control group after 48 h injected with hCG. Morulae ratio of high dose and low dose groups were lower very significantly than that of control group ($P < 0.01$) after 72 h injected with hCG, and the morulae ratio of moderate dose group was significantly lower than that of control group ($P < 0.05$). The blastocysts ratio of high dose group was very significantly lower than that of control group ($P < 0.01$) after 96 h injected with hCG, and the ratio of moderate dose and low dose groups has no significant difference with that of control group ($P > 0.05$), and the degeneration embryo ratio of test groups had very significant difference than that of control group ($P < 0.01$). These results suggested that lead acetate could remarkably affect the development of embryos *in vivo* from 2-4C into morulae and blastocysts, and made embryo retardance, stagnancy and degeneration during development.

Key words: embryo; lead acetate; developmental toxicity; mouse