

# 环境雌激素硫丹对根田鼠(*Microtus oeconomus*)生殖毒性效应

孙平<sup>1,2\*</sup> 熊建利<sup>1</sup> 朱文文<sup>1</sup>

(1 河南科技大学动物科技学院 河南洛阳 471003 2 中国科学院动物研究所 北京 101001)

**摘要** 为探讨硫丹的生殖毒性,实验选择健康雄性根田鼠 20 只,随机分成对照组和实验组,分别注射等剂量生理盐水(6 mL/kg)和硫丹溶液(7.0 mg/kg)。在染毒的第 7 天和第 14 天,实验组和对照组各处死 5 只根田鼠。通过实验,第 1 阶段实验组与对照组根田鼠的体重变化不大,睾丸系数差异不明显,精子数、精子活动率下降不明显,精子畸形率明显增加( $P<0.05$ )。第 2 阶段实验组与对照组根田鼠的体重变化不大,睾丸系数差异不明显,精子数、精子活动率下降明显,精子畸形率增加,与第 1 阶段相比,体重没变化,睾丸系数也无明显变化,精子活动率下降明显( $P<0.05$ ),精子畸形率增加极显著( $P<0.01$ )。因此,环境雌激素硫丹可以引起根田鼠睾丸的精子数下降、精子活动率下降、精子畸形率明显增加。

**关键词** 硫丹 精子数 精子活动率 精子畸形率 睾丸系数

中国图书分类号:Q492.4 文献标识码:B

环境雌激素 (Environmental Estrogens, EEs) 广泛存在于各类环境中,进入人和动物体内后能干扰体内自然激素的合成、分泌、转运、结合作用和消除等过程。近几年,EEs 对生殖健康潜在影响的问题在国内外倍受关注。许多有机氯农药先后被发现具有雌激素活性且已被各国禁用。作为有机氯农药之一的硫丹却仍在世界各地广泛使用,估计目前全世界硫丹的年产量在  $1\times 10^4$  t 以上,Simonich 等的调查结果显示硫丹已经广泛存在于全球环境中,而且是所检测的 11 种有机氯化合物中残留浓度最高的品种之一<sup>[1]</sup>。硫丹对哺乳动物毒作用的靶器官较多,Singh 等报道,雄性大鼠急性或亚慢性接触硫丹都可出现生殖毒性<sup>[2]</sup>。张晓

丹等(2006)通过给小鼠注射硫丹,结果发现硫丹可以引起睾丸生精细胞凋亡<sup>[3]</sup>。

青藏高原地区生态环境非常脆弱,人类活动的干扰不断加剧。在青藏高原上,根田鼠(*Microtus oeconomus*)是一种分布广泛的小型哺乳动物,主要分布于植被覆盖较好的草甸和灌丛中,有关其自然以及实验状态下种群数量动态<sup>[4]</sup>以及行为学<sup>[5]</sup>的研究相对较多,但有关 EEs 对根田鼠生殖毒性方面尚不了解。本实验目的是通过注射一定剂量的硫丹,探讨其对根田鼠生殖器官的发育、生精能力、精子活力的影响,为环境保护工作提供科学依据,为人类健康提供指导性科学意见。

## 1 材料与方法

程或研读它的文本可以逐步理解它的用心和立意。尤其是实验学科,它重视学生探究式的自我学习和自主设计实验要求学生通盘考虑实验的目的性,关联性,可行性又要注意细节问题,最后还能自我反省改进不足。这些都联系到了当下教育的热点:基于探究的自我教育(inquire based education)。根据我们的具体情况改造后部分移植它的做法会对我们的生物学科教育有所帮助。最后还

要强调的是实验本身实有很多的不可监督性,这也为教育学生真正内化学术道德 (academic honesty) 提供了平台,也许这是教育另一更为重要的着眼点吧。

## 主要参考文献

- 1 International Baccalaureate Organization Diploma Programme Biology guide Published March 2007.  
(E-mail:zhouyi\_joy@hotmail.com)

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30500073,30570370);河南科技大学人才科研基金项目(05-129);河南科技大学校研究基金资助项目(2006ZY054)

1.1 实验动物 野生根田鼠为捕自中国科学院海北高寒草甸生态系统定位站(37°29'~37°45'N, 101°12'~101°23'E)附近的高寒草甸和高寒灌丛,在中国科学院西北高原生物研究所的动物饲养房内配对繁殖,以F<sub>2</sub>代的健康成年雄性根田鼠为实验动物,40只,体重为30~40g。动物饲养在40cm×28cm×15cm的塑料箱内,以清洁干燥的锯末作垫料,以棉花为巢材,水供应充足,自由取食鼠颗粒饲料(北京科澳协力饲料有限公司)并配以适量新鲜胡萝卜,全自动控制实验室内温度及通风度,室温控制在(22±2)℃。参照自然界的日照时间,光周期14L:10D。

1.2 试剂和仪器 92%的硫丹(江苏安邦生物有限公司)、有机溶剂苯(西宁新科化学仪器销售有限公司),DK-8D型电子恒温水浴箱(上海精宏实验设备有限公司),BH-2型高倍偏振光显微镜(Olympus)。

1.3 方法和分组 把硫丹用苯配成0.1%浓度的溶液,每次注射0.05mL。随机把根田鼠分成2阶段每组20只(对照组和实验组)。对照组连续腹腔注射6mL/kg的生理盐水,实验组连续腹腔注射等剂量的硫丹,浓度为7.0mg/kg。第1阶段在染毒后第7天和第14天脱臼处死10只,同时处死对照组根田鼠10只,称体重、辜丸重,并计算辜丸系数;分别测辜丸的精子数、精子活动率、精子畸形率。

#### 1.4 检测指标和方法

1.4.1 辜丸系数 在最后一次注射完的翌日,脱臼处死根田鼠,电子天平(精确到0.01g)称取体重,迅速剥去周围脂肪组织和结缔组织,称量辜丸重量,并计算辜丸系数。

1.4.2 精子计数 辜丸称重后,迅速置于含有5mL 0.9%生理盐水的平皿中,用手术剪剪碎,36℃水浴槽中水浴20min,用胶头吸管吸取少量上清液制成载玻片,在400倍显微镜下观察。观察不同的视野,记录精子个数,最后求平均数,就得到一个视野的精子数。

1.4.3 精子活动率 此方法按照黄勤<sup>[6]</sup>描述的方法进行指标检测,观察不同视野的精子数,记录100个精子,在显微镜下观察这些视野中活动和不活动的精子。精子活动率=观察到的活动精子/观察的精子总数。

1.4.4 精子畸形率 观察不同视野的精子数,记

录100个精子,在显微镜下观察这些视野中是否有弯曲、肥胖的、无头、头部无钩的、尾巴不规则的、无尾等,这些都记录为畸形精子数。

1.4.5 数据分析 采用SPSS统计软件,对原始实验数据进行方差分析。

## 2 结果

2.1 染毒硫丹对根田鼠辜丸系数的影响 从表1可以看出,染毒硫丹对根田鼠辜丸系数影响非常显著,随着注射天数的增加辜丸系数也增加,第1、2阶段实验组体重基本不变,而对照组体重略有降低,但两者间差异显著(P>0.05);第2阶段对照组与第1阶段对照组体重差异不显著(P>0.05),第2阶段实验组与第1阶段实验组体重差异不显著(P>0.05)。比较辜丸系数发现,第1阶段实验组的辜丸系数低于对照组,差异不显著(P>0.05),第2阶段实验组的辜丸系数显著大于对照组(P<0.05),第2阶段实验组与第1阶段实验组比较,辜丸系数增加,并且差异显著(P<0.05)。

表1 硫丹对根田鼠辜丸系数的影响

	N	初始体重(g)	解剖体重(g)	辜丸重量(g)	辜丸系数%
第1阶段					
对照组	10	36.55±0.25	35.50±0.62	0.45±0.05	1.27±0.15
实验组	10	35.40±0.90	35.82±0.18	0.44±0.09	1.23±0.05
第2阶段					
对照组	10	34.45±2.05	33.25±2.35	0.40±0.05	1.20±0.16
实验组	10	33.48±3.32	33.45±2.14	0.50±0.06	1.49±0.08

#### 2.2 染毒硫丹对根田鼠辜丸精子活动率的影响

从表2可以看出,与对照组相比,平均每个视野的辜丸精子数,随着注射硫丹的时间增加而降低。第1阶段实验组与对照组比较,平均每个视野的辜丸精子数降低,差异不明显(P>0.05),第2阶段实验组与对照组比较,平均每个视野的辜丸精子数降低,差异显著(P<0.05)。第2阶段实验组和对照组与第1阶段实验组和对照组分别比较,平均每个视野的辜丸精子数降低但差异不显著(P>0.05)。精子活动率,第1阶段实验组与对照组比较,精子活动率降低,差异不明显(P>0.05);第2阶段实验组与对照组比较,精子活动率降低,差异明显(P<0.05);第2阶段对照组与第1阶段对照组比较,精子活动率降低,差异不明显(P>0.05),第2阶段实验组与第1阶段实验组比较,精子活动率降低,差异显著(P<0.01)。

表2 硫丹对根田鼠睾丸精子活动率的影响

	N	观察精子数(个)	活精率(%)	平均每个视野的精子数(个)
第1阶段				
对照组	10	100	74.5±1.50	9.40±3.60
实验组	10	100	71.0±1.40	8.50±1.50
第2阶段				
对照组	10	100	73.5±1.50	10.50±2.00
实验组	10	100	70.8±1.20	7.80±1.25

### 2.3 染毒硫丹对根田鼠睾丸精子畸形率的影响

从表3数据可以得出,第1阶段实验组与对照组比较,睾丸精子畸形率增加,差异明显( $P<0.05$ ),第2阶段实验组与对照组比较,睾丸精子畸形率增加,差异极显著( $P<0.01$ );第2阶段实验组与第1阶段实验组比较,睾丸精子畸形率增加,差异显著( $P<0.05$ )。

表3 硫丹对根田鼠睾丸精子畸形率的影响

	N	观察精子数(个)	畸形率(%)
第1阶段			
对照组	10	100	11.50±0.55
实验组	10	100	13.20±0.80
第2阶段			
对照组	10	100	12.50±0.50
实验组	10	100	14.20±0.80

### 3 讨论

环境雌激素对生精功能的影响是目前深受重视的问题,硫丹是其中的一种<sup>[7]</sup>。朱心强<sup>[8]</sup>等(2002)通过实验发现,成年大鼠长期大剂量接触硫丹可以引起精子数目减少,精子形态异常,说明硫丹可以影响哺乳动物的生精过程;他们还发现,成年雄性大鼠亚慢性经口接触硫丹可以引起精子数目减少和形态异常<sup>[9]</sup>,国外也有类似的报道,说明硫丹确实具有一定的雄性生殖毒性。本实验研究结果发现,染毒硫丹可使根田鼠精子计数明显减少,精子活动率明显降低,精子畸形率升高,并有一定的反应关系,这与国外的报道相一致。

化合物可以通过多种机理干扰精子发育和成熟过程。朱心强<sup>[8]</sup>等(2002)通过硫丹实验研究睾丸组织的脂质过氧化和DNA氧化损伤,提示氧化损伤可能是硫丹引起大鼠生精功能障碍的原因之一。另外,硫丹也可通过其他途径影响大鼠的生精过程,如大剂量急性接触硫丹可以影响大鼠睾丸内多种酶的活性,大剂量亚慢性接触硫丹可以降低大鼠血浆促性腺激素和睾酮以及内睾酮的水平<sup>[10]</sup>,硫丹对体外培养的大鼠睾丸支持细胞有直接毒性<sup>[11]</sup>,此外硫丹本身还有致突变作用<sup>[12]</sup>,这些都可能是影响

生精过程的原因。

此外,我们对Wistar大鼠的研究也发现,染毒硫丹可以引起大鼠睾丸系数有明显差异,睾丸生精数随着注射硫丹时间的增加而降低,精子活动率随着硫丹注射时间增加而降低,精子畸形率随着硫丹注射时间的增加而增大<sup>[13]</sup>。这与本实验的研究结果一致。

### 主要参考文献

- Simonich S.L., Hites R. A..Global distribution of persistent organ ochlorine compounds. Science, 1995, 269(5232):1851—1854.
- Singh S.K., Narayan R., Shanker R., Saxena D.K..Endosulfan induced biochemical changes in the testis of rats. Vet Hum Toxicol, 1995, 37(6):547—549.
- 张晓丹,周广红,陈少军.硫丹对小鼠睾丸生精细胞毒作用及其机制研究.环境与职业医学, 2006, 2(23):34—37.
- Sun P., Zhu W.Y., Zhao X.Q..Opposite sex sibling recognition in adult root vole, *Microtus oeconomus* Pallas: Phenotype matching or association. Polish journal of Ecology, 2008, 56(4):701—708.
- Sun P., Zhao X.Q., Klein J.A., Wei W.H..Local warming about 1.3°C in alpine meadow has no effect on root vole (*Microtus oeconomus*) population during winter. Polish Journal of Ecology, 2005, 53(1): 123—127.
- 黄勤,黄幸纾.工业品六六六对小鼠精子影响的研究.浙江医科大学学报, 1987, 16(1):7—12.
- Bulger W.H., Kupfer D..Estrogenic action of DDT analogs. Am J Ind Med, 1983, 4(1-2):163—173.
- 朱心强.硫丹对成年大鼠生精功能的影响和氧化损伤.中国药理学与毒理学杂志, 2002, 16(5): 391—395.
- 朱心强,郑一凡,黄幸纾.大鼠孕期和哺乳期接触硫丹对仔代雄性生殖系统发育的影响.中国药理学与毒理学杂志, 2000, 14(10):352—356.
- Singh S. K., Pandey R. S.. Effect of subchronic endosulfan exposures on plasma gonadotrophins, testosterone, testicular testosterone and enzymes of androgen biosynthesis in rat. Indian J Exp Biol, 1990, 28(9):953—956.
- 应贵双,黄幸纾.大鼠支持细胞培养方法在检测硫丹,己烯雌酚和氯化镉雄性生殖毒性中的应用.癌变.畸变.突变, 1997, 9(1):31—35.
- Chaudhuri K., Selvaraj S., Pal A.K..Studies on the genotoxicity of endosulfan in bacterial system. Mutat Res, 1997, 439(1): 63—67.
- 周坤,孙平,邓雯.环境雌激素硫丹对Wistar大鼠生精能力的影响.黑龙江畜牧兽医, 2008, 7: 96—98.

(E-mail: pingsunny@msn.com)