论著

文章编号:1000-5404(2005)10-1012-04

以嘉陵江(重庆段)为水源的管网末梢水中有机提取物的雄性生殖毒性研究

任 谦,曹 波,邱志群,赵 清,舒为群 (第三军医大学军事预防医学院环境卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察以嘉陵江(重庆段)为水源的管网末梢水中有机提取物对雄性生殖系统的影响。**方法** 用固相萃取技术(吸附剂:GDX-102树脂)富集水中有机物(OE)。昆明种雄性小鼠随机分为5组,分别用DMSO(溶剂对照,0.005 L/kg)、OE 12.5 L/kg、OE 25 L/kg、OE 50 L/kg、CP(阳性对照,40 mg/kg)连续腹腔注射5 d,第15天处死动物取材。应用放射免疫法(RIA)检测血清中的睾酮(T),硫代巴比妥酸法(TBA)检测睾丸组织液中丙二醛(MDA)。光镜下计数畸形精子。光镜和电镜观察睾丸病理组织学改变。**结果** 与DMSO相比,OE组睾酮水平显著性降低;MDA的含量未见显著差异($P>0.05$);同时畸形精子数显著增加。光镜下发现生精细胞疏松脱落,数量减少。电镜下可见间质细胞、支持细胞、生精细胞超微结构的改变。**结论** 以嘉陵江(重庆段)为水源的管网末梢水中的有机提取物对小鼠具有一定的雄性生殖毒性。

关键词: 管网末梢水;有机提取物;雄性生殖毒性
中图法分类号: R123.1; R321.1; R697.2 **文献标识码:** A

Study of toxicity of organic extract of tap water on male reproductive system in mice

REN Qian, CAO Bo, QIU Zhi-qun, ZHAO Qing, SHU Wei-qun (Department of Environmental Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the toxicity of the organic extract of tap water on the male reproductive system in mice. **Methods** Organic pollutants were extracted from tap water with GDX-102 resin and the extract was injected into the peritoneal cavity of male mice in the dosages of 12.5, 25 and 50 L/kg daily for consecutive 5 days. DMSO served as the solvent control and cyclophosphamide as the positive control. At day 10 after the last injection, the mice were killed and serum level of testosterone was determined with radioimmunoassay (RIA). The MDA content of the testis homogenate was measured with thiobarbituric acid method (TBA). The number and deformity of the sperms were observed with optic microscopy. The sections of the testis were prepared with the routine procedure and the histopathological changes were studied with optic and eletronic microscopies. **Results** When the data of the mice of the organic extract group were compared with those of the DMSO control group, it was found that the organic extract of tap water resulted in a significant decrease of serum testosterone and a significant increase of deformed sperms. No significant difference between the MDA content of the mice of 2 groups was shown. Optic microscopy revealed the detachment of the spermatogenic cells and decrease of the number of spermatid cells. The changes of ultramicrostructure of the leydig cells, sertoli cells and spermatogenic cells were found with electron microscopy. **Conclusion** The findings of our study suggest that the organic pollutants of tap water result in damages of the reproductive system of male mice.

Key words: tap water; organic pollutant; male reproductive system

水污染是当今世界重大的环境问题之一。饮水卫生和安全一直受到各国政府和公众重视。流行病学调查显示,人类精子密度由1940年的1.13×10^8/ml下降到1990年的0.66×10^8/ml;每次射精量也由3.4 ml下降到2.75 ml,水污染被认为是主要原因之一[1]。国内外学者研究发现,不少地区饮用水中含有已公认的雄性生殖毒物邻苯二甲酸酯、苯系物等。嘉陵江是长江的重要支流,三峡库区的主要组成部分之一,也是重庆市主城区主要的饮用水源,其水质状况与人群健康关系密切。为观察以嘉陵江为水源的管网末梢水有机提

基金项目:国家科技部攻关项目(2003DA903B03-02),国家科技部西部引导项目(2003BA869C)
Supported by the Key Sci &Tech Research Foundation of State Ministry of Science and Technology (2003DA903B03-02), "West of China Guided Project" of State Ministry of Science and Technology (2003BA869C)
作者简介:任 谦(1974-),男,云南省昆明市人,硕士研究生,实习研究员,主要从事环境毒理学方面的研究。电话:(023)68775175
通讯作者:舒为群,电话:(023)68752294
收稿日期:2005-04-01;修回日期:2005-04-15

取物对雄性生殖系统的影响,我们进行了本次研究。

1　材料与方法

1.1　主要试剂和仪器

二氯甲烷、甲醇、丙酮由天津大茂公司提供,均为色谱纯。萃取剂为 GDX-102 树脂,颗粒度为 60 ~ 80 目,天津试剂二厂生产。二甲基亚砜(DMSO)为 ACS 级,Sigma 公司提供。注射用环磷酰胺(CP)由上海华联制药有限公司提供。睾酮放免试剂盒由北京北方生物技术研究所提供。丙二醛检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。GC-911γ 放射免疫计数器中佳光电仪器公司。菲利普公司 TECNAI-10 透射电镜。

1.2　水中有机提取物(organic extract, OE)的制备

于 2003 年 12 月在本室采集管网末梢水样 2 000 L。应用固相萃取技术富集水中有机物。GDX 树脂的处理、装柱、过柱、吸附物洗脱参照黄志丹等[2]报道的方法。过柱流速为 3 倍柱体积/min,以二氯甲烷和甲醇为洗脱液。洗脱液经 K-D 浓缩器浓缩,通氮气(99.999%)挥干。用 DMSO 定容至 100 L/ml 备用。

1.3　动物分组及处理

清洁级雄性 4 ~ 5 周龄昆明种小鼠 25 只,体质量 22.4 ~ 27.9 g,重庆中药研究院提供,合格证号为 SCXK(渝)2000 × 0004。随机分为 5 个组(每组 5 只),分别暴露于 DMSO(作为溶剂对照)0.005 L/kg、OE 12.5 L/kg、OE 25 L/kg、OE 50 L/kg、CP(作为阳性对照)40 mg/kg,按 0.1 ml/20 g 染毒体积腹腔注射染毒,下腹交替进针连续 5 d。小鼠按 12 h 白昼的节律调节光照,保持适宜的温度与相对湿度,自由饮水摄食。染毒结束后观察 10 d,眼眶采血,断颈处死,分离双侧睾丸秤重,计算脏器系数。

1.4　各项指标观察

1.4.1　血清睾酮的检测　　小鼠摘除眼球取血,3 500 × *g* 10 min 离心,血清放入 4 ℃冰箱待测。采用 RIA 测定睾酮含量。

1.4.2　睾丸组织液中丙二醛含量的检测　　取单侧睾丸在冰面上剥离被膜。组织匀浆,按质量体积比 1∶9 滴加生理盐水配制成 10%的匀浆,4 ℃下高速离心(10 000 × *g* 30 min)。取匀浆上清液,采用南京建成生物工程研究所试剂盒检测丙二醛含量。

1.4.3　精子畸形　　单侧附睾剪碎,加入生理盐水,用吸管吹打 5 ~ 6 次,静置 3 ~ 5 min。用四层擦镜纸滤去组织碎片,吸取精子悬液,均匀推片,甲醇固定 30 min,2%伊红染色 1 h,高倍镜下每只小鼠计数1 000条完整的精子,记录畸形精子数。每组计数 5 只共计5 000条精子。精子畸形的判定标准参考文献[3]。畸形的种类分为头、颈、体、尾畸形,头部畸形又分为不定形、胖头、香蕉、无钩 4 种畸形。

1.4.4　病理学观察　　取单侧睾丸,在冰面上迅速沿横轴剖开致 1/2 处、固定于 2.5%的戊二醛,15 min 后取出,分出大面固定于 10%的甲醛内,做石蜡切片,HE 染色。光镜观察;剩余部分分解为 1 mm^3 小块固定于戊二醛,做超薄切片,透射电镜观察。

1.5　统计学方法

应用 SPSS 10.0 统计软件,进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　一般指标观察

溶剂对照组、阳性对照组及各 OE 组小鼠生长发育良好,无全身中毒症状。各组间体质量、睾丸脏体比差异无显著性($P > 0.05$),见表 1。

表 1　水中 OE 对小鼠体质量、睾丸脏器系数、血清 T、睾丸组织液中 MDA 的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Effect of tap water OE on body weight, ratio of testis/body weight, the serum testosterone (T) level and testis homogenate MDA in mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	*n*	BW(g)	Testis/BW ($g \times 10^{-3}$)	Abnormality rates (%)	Serum T (ng/ml)
DMSO(0.005 L/kg)	5	39.15 ± 3.39	6.06 ± 0.92	6.73 ± 0.73	5.78 ± 2.05
OE (12.5 L/kg)	5	38.62 ± 3.22	5.93 ± 0.91	13.67 ± 4.81**	0.47 ± 0.25**
OE (25.0 L/kg)	5	39.74 ± 2.15	5.16 ± 0.55	15.68 ± 3.83**	0.96 ± 0.78**
OE (50.0 L/kg)	5	39.16 ± 4.32	5.51 ± 0.11	18.06 ± 3.11**	1.51 ± 1.89*
CP (40 mg/kg)	5	41.38 ± 2.30	5.12 ± 0.57	18.34 ± 5.59**	1.61 ± 1.45*

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, *vs* DMSO

2.2　血清睾酮的变化

各 OE 组及 CP 组小鼠血清中的睾酮与溶剂对照组相比显著降低($P < 0.01$)。结果见表 1。

2.3　睾丸组织中的 MDA 含量比较

各 OE 组及 CP 组相比睾丸组织中 MDA 含量无显著性差异($P > 0.05$)。结果略。

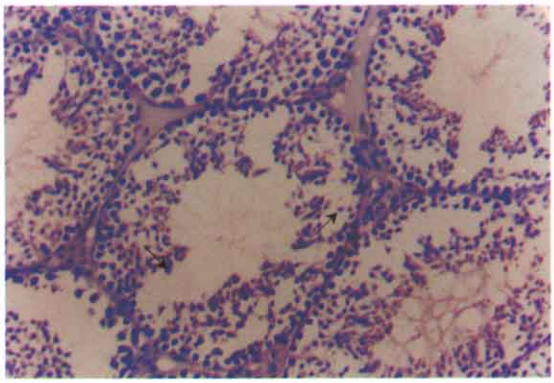
2.4　精子畸形率比较

由表 1 可见,各 OE 组精子畸形数与对照组比较呈显著增加($P < 0.01$),并呈剂量-效应关系。精子畸形以头部畸形为主,主要是不定形和无钩,其次是香蕉和胖头,在高剂量组发现卷尾、折体的畸形精子数增加,CP 组以无钩为主。

2.5　病理改变

2.5.1　光镜观察　　溶剂对照组曲细精管腔内,各级生精细胞排列规则,管腔中精子大量生成。各试验组睾丸间质细胞数量、形态未见异常变化。OE 12.5 L/kg 组可见生精细胞排列轻度紊乱,OE 25.0 L /kg 组出现部分生精细胞轻度疏松脱落,精子细胞轻度减少。OE 50.0 L/kg 组光镜下曲细精管管腔不规则,生精细胞数量中度减少,排列疏松明显(图 1)。

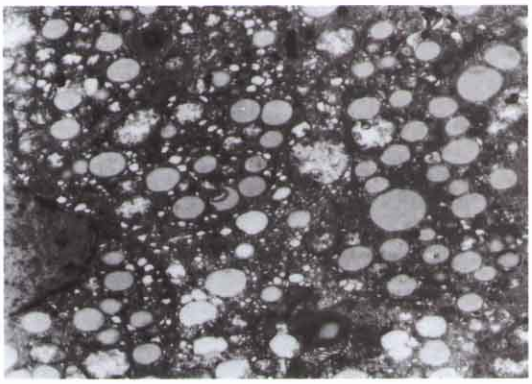
2.5.2　电镜观察　　溶剂对照组可见间质细胞胞质内滑面内质网丰富,线粒体呈多形性、嵴清晰;支持细胞核膜完整,核仁清晰;精原细胞胞质丰富,空淡,核呈卵圆形,染色质电子密度低。OE 25.0 L/kg 组间质细胞受损后表现为胞质髓样变性,线粒体轻度肿胀,滑面内质网扩展,脂滴增多变大(图 2)。电镜下可见支持细胞线粒体肿胀,退变明显,滑面内质网扩张。生精细胞线粒体肿胀。OE 50.0 L/kg 组间质细胞线粒体肿胀明显,线粒体嵴消失,滑面内质网扩张,质膜溶解,染色质边聚。支持细胞病理改变表现为胞浆肿胀明显,基质疏松,形成空泡。顶体期的精子细胞脱落到基底部(图 3)。生精细胞可见排列紊乱,数量减少;精原细胞胞浆固缩,凝固性坏死。



↑: Spermatogenic cell detached spermatid cells decreased in quantity

图1 OE 50.0 L/kg组光镜观察 (HE×200)

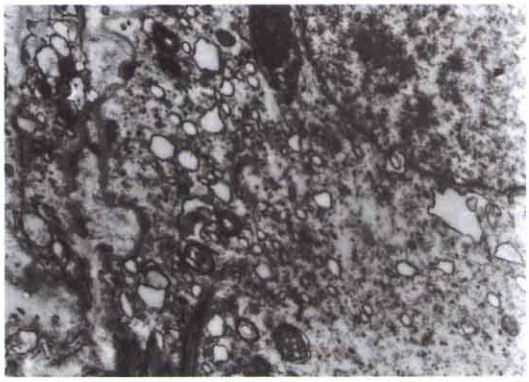
Fig 1 Pathological changes in OE 50 L/kg group under light microscope (HE×200)



Cristae mitochondria swellen, SER dilated; ↑: Lipid droplets of leydig cells increased in quantity in OE 25.0 L/kg group

图2 OE 25.0 L/kg组间质细胞电镜观察 (TEM×4 200)

Fig 2 Pathological changes of leydig cells in OE 25.0 L/kg group under electron microscope (TEM×4 200)



Endochylema swellen, SER dilated; ↑: Spermidcell moved to basal membrane in sertoli cells

图3 OE 50.0 L/kg组支持细胞电镜观察 (TEM×7 000)

Fig 3 Pathological changes of sertoli cells in OE 50.0 L/kg group under electron microscope (TEM×7 000)

3 讨论

我们曾对长江、嘉陵江(重庆段)源水的研究发现,雄性生殖毒性物质邻苯二甲酸二丁酯(DBP)检出率最高,所有受检水样90%均可检出,检出浓度高达9.48 μg/L[4]。相对于源水来说,管网末梢水的污染有其自身特点。管网末梢水中含有氯化消毒副产物(DBPs),其生殖毒性已被证实[5]。Brocca等[6]的研究发现以PE、PVC为材质的水管中的有机物如烷基酚,会释放到水中。因此探讨管网末梢水中有机提取物对生殖系统的影响亦成当务之急。

本次研究表明,在受试剂量范围内,管网末梢水中有机提起物对小鼠的体质量、睾丸脏器系数无显著影响,但引起了小鼠睾丸组织曲细精管萎缩、生精细胞坏死脱落、管腔内精子生成数量减少等病理学改变;光镜改变与田怀军等[7]报道结果相一致。同时血清睾酮的含量下降、精子畸形率升高。OE组在染毒剂量范围内与溶剂对照组相比,小鼠精子畸形数明显升高($P<0.01$),OE组的畸形精子数均在溶剂对照的2倍以上,参照李寿祺[8]制定的标准,本研究中所用的管网末梢水中的有机提取物已达到小鼠精子畸形诱变剂的判定标准。

睾丸的间质细胞是合成和分泌睾酮的主要场所,间质细胞形态和功能正常,是维持体内睾酮水平正常的必要条件。电镜观察发现,25.0 L/kg组间质细胞线粒体肿胀、滑面内质网扩张,脂滴数量增加、体积变大,睾酮含量显著性低于溶剂对照组,原因可能是间质细胞受损后,脂滴利用减低,在细胞内蓄积,导致睾酮合成分泌下降。以上结果与Dees等[9]的结论一致。本次实验中间质细胞受损,可能是小鼠血清睾酮的降低的主要原因。小鼠睾丸中MDA的含量变化与OE剂量无相关性这一结果,提示该物质对睾丸的损伤可能不是通过脂质过氧化途径来完成的。

同时电镜观察可见随着染毒剂量的增高支持细胞受损严重,在50 L/kg组支持细胞胞浆肿胀明显,基质疏松,顶体期的精子细胞尾部移行致基底部,被支持细胞吞噬。光镜观察也发现多个剂量组出现生精细胞排列疏松脱落、空泡变性。Linder等[10]的研究显示饮用水中的DBPs可以通过损伤支持细胞而导致生精细胞的脱落,精子生成障碍,因此我们推测OE对支持细胞的损伤可能干扰了生精细胞的发育分化、使得精子生成的数量和质量下降。

上述多项结果表明饮用水中的有机提取物能引起睾丸局部的毒作用,出现生精功能障碍。生精过程的调控是极其复杂的,除睾丸的自身调节外,还受下丘脑、垂体的调控,因此本研究中OE对生精功能损伤的

机制还有待进一步研究。

本研究表明以嘉陵江(重庆段)为水源的管网末梢水中有机提取物可导致睾丸组织的损伤,对雄性生殖系统具有潜在危害。

参考文献:

[1] Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, *et al*. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years[J]. B M J, 1992, 305(6854): 609 - 613.

[2] 黄志丹, 田世忠, 邓南圣, 等. 东湖水及其自来水中有机污染物的 GC/MS 鉴定[J]. 环境科学与技术, 1992, 56(1): 19 - 26, 33.

[3] Wyrobek A J, Bruce W R. Chemical induction of sperm abnormalities in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975, 72(11): 4425 - 4429.

[4] 田怀军, 舒为群, 张学奎, 等. 长江、嘉陵江(重庆段)源水有机污染物的研究[J]. 长江流域资源与环境, 2003, 12(2): 118 - 123.

[5] Tully D B, Luft J C, Rockett J C, *et al*. Reproductive and genomic effects in testes from mice exposed to the water disinfectant byproduct bromochloroacetic acid[J]. Reprod Toxicol, 2005, 19(3): 353 - 366.

[6] Brocca D, Arvin E, Mosbeak H. Identification of organic compounds migrating from polyethylene pipelines into drinking water[J]. Water Research, 2002, 36(15): 3675 - 3680.

[7] 田怀军, 吴德生, 陶 锐. 饮用水中有机污染物的雄性生殖毒性病理学研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(9): 1076 - 1078.

[8] 李寿祺. 毒理学原理与方法[M]. 成都: 四川大学出版社, 2003. 383 - 385

[9] Dees J H, Gazouli M, Papadopoulos V. Effect of mono-ethylhexyl phthalate on MA-10 Leydig tumor cells[J]. Reprod Toxicol, 2001, 15(2): 171 - 187.

[10] Linder R E, Klinefelter G R, Strader L F, *et al*. Histopathologic changes in the testes of rats exposed to dibromoacetic acid[J]. Reprod Toxicol, 1997, 11(1): 47 - 56.

(编辑 张大春)

文章编号:1000-5404(2005)10-1015-01

个案与短篇

两侧桡动脉手部行程和分支变异 1 例

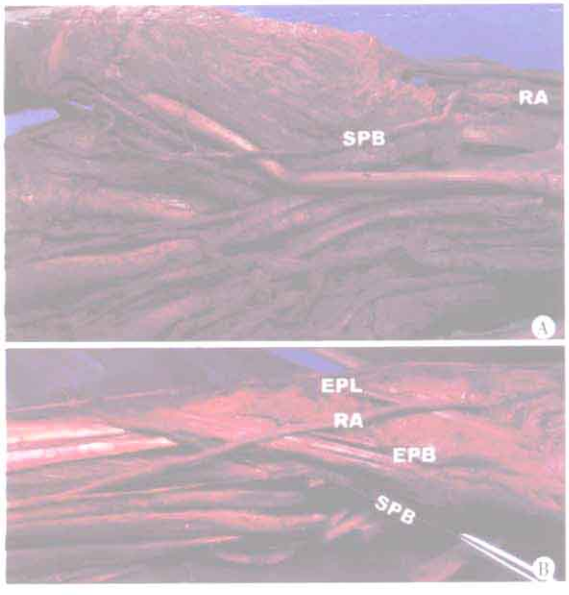
A case report of variant course and branches of bilateral radial arteries in hands

包 庞, 刘 芳, 刘明曦, 刘 昕, 许建华, 闫庆凯, 田志远, 陈卫军, 孙建森 (第三军医大学基础医学部解剖学教研室, 重庆市生物力学实验室, 重庆 400038)

桡动脉在手部的正常行程为,在桡骨下端斜过拇长展肌和拇短伸肌腱深面转至腕背背侧,沿舟骨和大多角骨背面下行,斜过拇长伸肌腱深面至手背,穿第一掌骨间隙入手掌深部,与尺动脉掌深支吻合构成掌深弓;桡动脉在转向手背时发出 1 支较细的掌浅支,穿拇短屈肌深方或浅面与尺动脉终支吻合构成掌浅弓。曾有文献[1,2]报道单侧桡动脉变异。我们在解剖一老年男尸时发现其两侧桡动脉在手部的行程及分支均发生变异,这种变异少见文献报道,现将观测结果报告如下。

右侧桡动脉至桡骨茎突发出 1 支变异的掌浅支,主干支外径 2.1 mm,经拇指的 3 个长肌腱深方至手背,在手背部和手掌深部的行程和分支无异常;变异的掌浅支较粗大,起始处外径达 1.7 mm,穿拇短屈肌浅层行向拇、食指,在距起点 7.7 cm 处发出分支(外径为 0.9 mm)分布于拇指桡侧,继续行程 1.75 cm 后,在拇、食指间近掌指关节处分为 2 支,外径均为 1.1 mm,分别分布于拇指尺侧和食指桡侧。上述变异的掌浅支的 3 个分支替代了正常由桡动脉在掌深部发出的拇主要动脉和食指桡侧副动脉,且掌浅支未参与形成掌浅弓(图 1A)。

左侧桡动脉在前臂下行至桡骨茎突上方 5.5 cm 处分为 2 支,较细的 1 支(外径为 1.3 mm),与正常桡动脉行程一致,在转向手背处发出 1 支掌浅支,至手掌部与尺动脉终支吻合形成掌浅弓,行程等无异常。较粗大的 1 支为变异支,外径为 2.1 mm,位置较表浅,斜行依次跨越拇长展、拇短伸、拇长伸肌肌腱浅面,行程中与头静脉紧密伴行,继而穿过第一掌骨间隙至手掌深部,发出拇主要动脉和食指桡侧动脉,终支与上述细支汇合后,与尺动脉掌深支吻合形成掌深弓(图 1B)。



RA: 变异的桡动脉; SPB: 掌浅支; EPB: 拇短伸肌; EPL: 拇长伸肌; A: 右手变异的桡动脉掌浅支; B: 左手变异的桡动脉

图 1 两侧桡动脉手部行程和分支变异

(下转 1019 页)

作者简介:包 庞(1985 -),男,云南省宣威市人,学员,学员旅四队。电话:(023)68752412

通讯作者:陈卫军,电话:(023)68752225,E-mail: cwj52225@hotmail.com

收稿日期:2004-04-30;修回日期:2004-06-30