

S 型氯代甘油醇对雄性 ICR 小鼠生育力的影响

张 皓 钱国庆 凌 霄 赵建伟 郑唯 陈 丽 蒋颂辉 屈卫东¹
复旦大学公共卫生学院环境卫生学教研室 公共卫生安全教育部重点实验室, 上海 200032

摘要:目的 研究 S 型氯代甘油醇对雄性 ICR 小鼠生育能力及睾丸附睾的组织病理学影响。方法 雄性性成熟 ICR 小鼠 64 只, 随机分为 4 组, 每组 16 只。实验组分别给予 1/40、1/20、1/10LD₅₀ (小鼠经口 LD₅₀ 117.54mg/kg) S 型氯代甘油醇, 对照组给予等体积双蒸水。连续灌胃染毒 5 天后, 每组取 4 只雄鼠按雌/雄 1:1 交配, 此后每隔 2 天交配一次, 持续 2 个月, 观察 S 型氯代甘油醇对雄性小鼠交配指数和雄性生育力指数的影响。实验结束后, 每组保留 6 只动物继续染毒至 8 个月后进行附睾精子计数和睾丸附睾的组织病理学检查。结果 ①与对照组相比, 染毒 S 型氯代甘油醇 2 个月未引起雄性 ICR 小鼠交配指数和雄性生育力指数显著降低 ($P > 0.05$); ②染毒 8 个月未导致附睾精子数量显著降低 ($P > 0.05$), 睾丸和附睾的组织病理学检查未见明显异常。结论 低剂量长期染毒 S 型氯代甘油醇对雄性小鼠不具有抗生育作用。

关键词: S 型氯代甘油醇 雄性 ICR 小鼠 雄性 生育力 组织病理学改变
中图分类号: R994.4 Q343.34 **文献标识码:** A

Effects of S- α -chlorohydrin on male ICR mice fertility

ZHANG Hao, QIAN Guoqing, LING Xiao, ZHAO Jianwei, et al.

Key laboratory of Public Health Safety, Ministry of Education, Department of Environmental Health,
School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: **Objective** To study the effects of S- α -chlorohydrin on male ICR mice mating index, fertility index and the histopathologic changes of testis and epididymis. **Methods** 64 sexually mature male ICR mice were randomly divided into four groups, each group contained 16 mice. At the doses of 1/40, 1/20 and 1/10LD₅₀ (mice oral, LD₅₀ 117.54mg/kg) S- α -chlorohydrin (ACH) were administrated consecutively by oral gavage to male ICR mice, while equal volume redistilled water was given to the controls. At the 5th day mating tests were started, and four male mice from each group were mated with females at a ratio of 1:1. The mating test was carried out every other day until 2 months, and the mating index and the male fertility index induced by S- α -chlorohydrin were observed. 6 male mice from each group were exposed with S- α -chlorohydrin for another 6 months, and then epididymal cauda sperm counts and histopathological changes in the testes and epididymides were evaluated. **Results** ①In Comparison with control groups, the mating index and male fertility index in male mice exposed to S- α -chlorohydrin for two months at any dose level were not changed; ②There were no significant changes in cauda sperm count between treated and control groups, and no obvious histopathological injuries were observed in testes and epididymides of treated mice. **Conclusion** Long term exposure to S- α -chlorohydrin less than 1/40LD₅₀ did not induce antifertility effects in male ICR mice.

Key words: S- α -chlorohydrin, male ICR mice, male fertility, histopathological change

氯代甘油醇 (α -chlorohydrin), 化学名 3-氯-1,2-丙二醇 (3-chloro-1,2-propanediol, 3-MCPD), 是较早发现的雄性抗生育物, 能引起雄性大鼠、仓鼠、豚鼠等多种动物不育^[1]。近年来有关调查表明在酱油等调味品中存在该物质污染^[2,3], 引

起科学界和公众的广泛关注。氯代甘油醇分子具有 R 型和 S 型两种异构体, 已知生殖毒作用由 S 型异构体引起。以往研究认为大、小鼠间可能存在差异, 关于氯代甘油醇对雄性小鼠的抗生育的前期研究结论并不一致。而早期报道混合型氯代甘油醇并不导致雄性小鼠不育^[4], 但也有体内研究显示混合型氯代甘油醇能够抑制雄性小鼠受精能力^[5], 且体外实验显示 S 型氯代甘油醇染毒小鼠附睾尾部精子后呈现与大鼠精子类似的运动功能障碍^[6], 提示在小鼠可能存在类似的抗生育效应。由于抗生育效应可能与精子发生的时间阶段有关, 完整的小鼠精子发生周期 (spermatogenic cycle) 约为 8.6d^[7], 精子形成 (spermatogenesis) 需经历数个精子发生周期, 在小鼠约需

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30571539); 上海市科委“启明星”部分资助 (No. 03QD14011); NIH 5-D43-TW000627-10 sub5-38006 部分资助

作者简介: 张皓, 男, 硕士研究生, 研究方向: 生殖毒理学, mikehoozzz@yahoo.com.cn

¹ 通讯作者: 屈卫东, E-mail: wdqu@fudan.edu.cn

35d^[8]。本研究通过长时间染毒进一步确认 S 型氯代甘油醇对雄性 ICR 小鼠生殖功能的影响及可能原因。此外,由于小鼠常被作为雄性生殖毒性评价的实验动物,种属间差异将影响评价的结论,因而本实验可为完整的雄性生殖毒性评价提供进一步依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料与试剂 S 型氯代甘油醇,纯度 ≥97%、M16 培养液、EDTA、Tris-HCl 均购自 Sigma 公司,ATP 检测试剂盒购自 Roche 公司。CO₂ 培养箱(Heraeus,德国)。

1.1.2 实验动物 健康雄性 ICR 小鼠 64 只,体重 25~ 30g,ICR 雌鼠 90 只,体重 20~ 23g,实验动物由中国科学院上海实验动物中心提供,饲养于 SPF 级动物房,温度(22±2)℃,相对湿度 60%±5%。人工照明(14h/10h),自由饮水、摄食。

1.2 方法

1.2.1 动物染毒与交配试验 研究设对照组及不同剂量的染毒组,对照组施以等体积双蒸水,实验组分别施予 1/40 LD₅₀、1/20 LD₅₀ 和 1/10 LD₅₀ 3 个剂量(LD₅₀ 117.54mg/kg,经口^[9])。雄鼠染毒前隔夜禁食 12h,次日 8 时经口灌胃染毒。染毒第 5 天傍晚每组取 4 只雄鼠,按雌:雄=1:1 交配,次日晨 8 时检查阴栓,见阴栓者为交配成功,记为 G0 天,交配试验持续 2 个月,交配期间雄鼠持续染毒。根据交配情况和受孕情况计算交配率和雄性生育力指数,计算方法见下:

交配指数= $\frac{\text{交配雄鼠数}}{\text{合笼雄鼠数}} \times 100\%$;

雄性生育力指数= $\frac{\text{使雌鼠妊娠的雄鼠数}}{\text{与雌鼠交配的雄鼠数}} \times 100\%$ ^[10]

部分动物继续染毒 8 个月,观察对精子计数和睾丸和附睾组织病理的影响。

1.2.2 精子计数 染毒 8 个月后,每剂量组取 3 只雄鼠进行附睾精子计数。颈椎脱臼处死雄鼠;取双侧附睾尾,置经 37℃ 预温的 300μl M16 培养液中,以 16 号针头刺破附睾管,置 5%CO₂ 培养箱孵育 5min,使精子游出。将精子悬液转移到含 800μl M16 培养液的 1.5ml 离心管中,混匀,以血细胞计数板进行精子计数(个/ml)。

1.2.3 组织病理学检查 染毒 8 个月后,每组取 3 只雄鼠进行睾丸和附睾常规病理学检查。将睾丸和附睾,置于 Bouin's 液种固定 24h,以流水冲洗,酒精梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋固定,切片,HE 染色后观察组织病理学变化。

1.2.4 数据处理 采用 Excel 2003 整理和建立数据库,利用 SPSS12.0 统计软件进行统计分析。雄性大鼠体重和精子数采用完全随机设计的单因素方差分析,各剂量组与对照组多重比较采用 Dunnett-t 检验;交配率和生育力指数分析采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 S 型氯代甘油醇对小鼠体重的影响

染毒 2 个月期间对照组和各剂量组小鼠的体重均随时间呈递增趋势,不同剂量组动物体重与对照组比均无显著统计

学差异($P>0.05$),表明持续染毒 S 型氯代甘油醇并未影响受试动物的正常生长状态。

2.2 S 型氯代甘油醇染毒对雄性 ICR 小鼠交配指数和雄性生育力指数的影响

S 型氯代甘油醇染毒对雄性 ICR 小鼠交配指数和雄性生育力指数的影响如表 1 所示,连续染毒 2 个月后,各剂量组交配指数和雄性生育力指数与对照组均无显著统计学差异($P>0.05$),表明低于 1/10 LD₅₀ 剂量下长时间染毒 S 型氯代甘油醇未对雄性 ICR 小鼠的交配能力和生育力产生影响。

表 1 S 型氯代甘油醇染毒 2 个月对雄性 ICR 小鼠交配指数和雄性生育力指数的影响

Table 1 The observation of mating index and male fertility index of ICR male mice induced by S-alpha-chlorohydrin (oral, 2 months)

剂量组	合笼雄鼠数 (只)	交配雄鼠数 (只)	使雌鼠受孕的雄鼠数 (只)	交配指数 (%)	雄性生育力指数 (%)
0	16	11	9	68.75	81.82
1/40 LD ₅₀	16	15	13	93.75	86.67
1/20 LD ₅₀	16	13	10	81.25	76.93
1/10 LD ₅₀	16	14	11	87.50	78.57

2.3 S 型氯代甘油醇染毒对小鼠附睾精子数量的影响

染毒 8 个月后 S 型氯代甘油醇染毒对小鼠附睾精子数量的影响如表 2 所示,各剂量组小鼠精子数量与对照组相比均无显著统计学差异($P>0.05$),提示 S 型氯代甘油醇并不影响生精细胞的功能。

表 2 经口染毒 S 型氯代甘油醇 8 个月对雄性 ICR 小鼠附睾精子数量的影响

Table 2 Effects of S-alpha-chlorohydrin (oral, 8 months) on epididymal sperm number in ICR male mice ($\bar{x} \pm s$)

剂量	动物数	精子数量($\times 10^6$)
0	6	21.17±5.38
1/40 LD ₅₀	4	21.03±7.30
1/20 LD ₅₀	6	19.21±9.47
1/10 LD ₅₀	6	18.19±9.19

2.4 组织病理学检查

2.4.1 S 型氯代甘油醇染毒对小鼠睾丸的组织形态学影响

如图 1 所示,对照组睾丸精曲小管上皮各层细胞排列整齐,无脱落,管腔内可见精子。不同剂量组睾丸与对照组相比无明显异常,上皮组织结构完整,不同阶段的生精细胞排列整齐无脱落,管腔内可见精子。

2.4.2 S 型氯代甘油醇染毒对小鼠附睾的组织形态学影响

如图 2 所示,对照组附睾管上皮组织结构完整,假复层上皮细胞排列规则,管腔内充满精子,间质无异常。在不同剂量染毒组,S 型氯代甘油醇均未造成附睾管结构的明显改变,上皮细胞排列整齐,管腔内精子丰富,间质无增生。

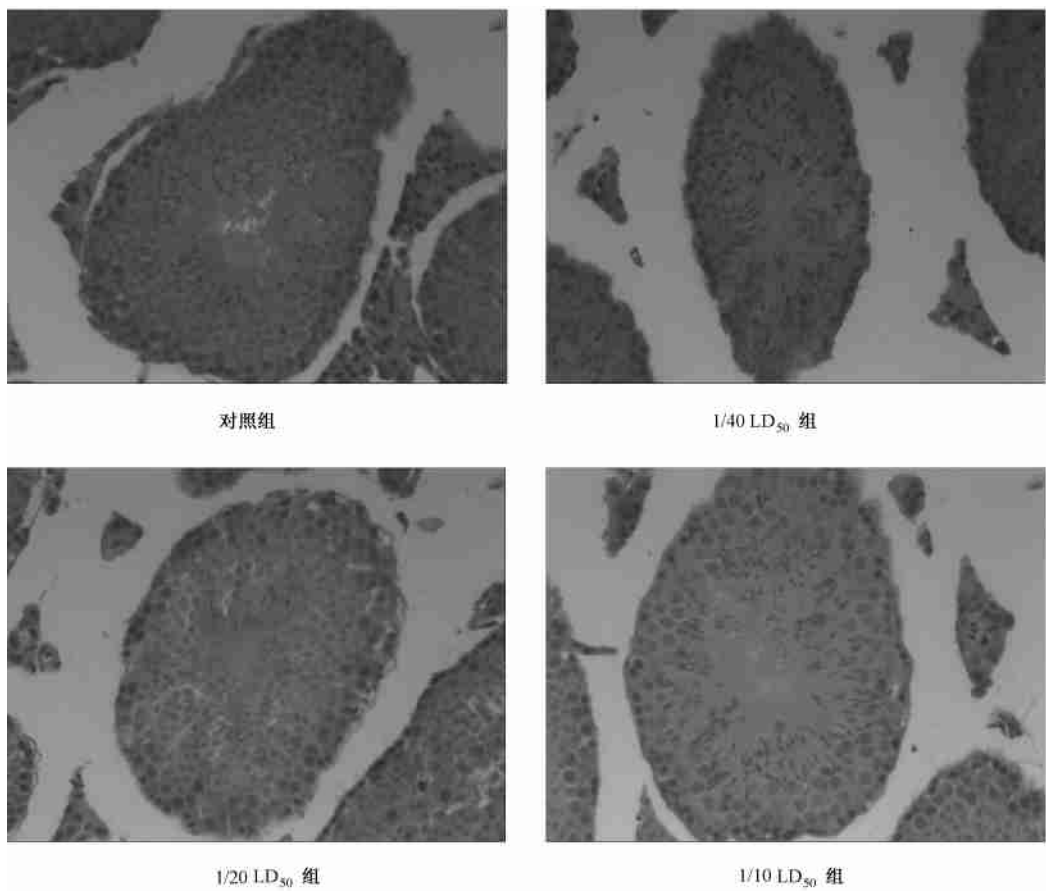


图1 S 染毒型氯代甘油醇对 ICR 小鼠睾丸的组织形态学影响(HE, × 400)

Figure 1 Histopathological effects of S-alpha-chlorohydrin (oral, 8 months) on the testes of ICR mice (HE, × 400)

3 讨论

HOYT 报道 CD 大鼠经口染毒混合型氯代甘油醇 14 天在 25mg/kg 剂量水平出现大鼠摄食减少和体重下降^[11]。本研究各剂量实验组小鼠体重均呈增长趋势,不同剂量组和对照组体重未出现明显差异,表明在低于 11.75mg/kg 水平 S 型氯代甘油醇并不影响小鼠正常生长发育。

小鼠精子形成需约 35 天,因此,连续 2 个月的交配试验理论上能够检出影响附睾精子功能及损伤睾丸生精功能而造成动物不育的生殖毒物。交配试验结果显示,连续交配 2 月后,各剂量组小鼠的交配指数和雄性生育力与对照组相比均无显著统计学差异($P > 0.05$),表明在本次设计剂量和染毒时间下雄鼠生育力未受影响。JACKSON 指出一次经口染毒 12.5mg/kg S 型氯代甘油醇可致雄性大鼠短暂不育^[12]。短期染毒混合型氯代甘油醇在 5~20mg/kg 剂量水平也可导致雄性大鼠可逆的生育力抑制,因 R 型无抗生育作用,以混合型试剂中 R 型和 S 型各占 50% 计算,则 10mg/kg 水平 S 型氯代甘油醇足以对大鼠产生生殖毒作用。本次连续染毒雄性小鼠 2 月在最高剂量组 11.75mg/kg 未发现生育力降低,表明氯代甘油的生殖毒作用存在种属差异,因而将小鼠作为评价雄性

抗生育药物和毒物时必须加以重视,以避免漏检。

生育力综合反映了所有影响动物生殖能力的因素,但并不是灵敏的检测指标,精子数量和组织病理学检查则可为敏感地指示化学物对雄性生殖毒作用的性质和作用靶点。精子数量反映外来化学物质对睾丸生精功能损伤,许多影响雄性生育力的生殖毒物最终会干扰睾丸的精子发生,导致附睾精子数量下降。本实验采用游出法所得精子浓度不等于附睾内精子总量,但在操作条件一致基础上可以比较附睾内精子相对数量。染毒 8 个月,精子数量随剂量改变无显著变化($P > 0.05$),表明该化学物未对睾丸生精能力造成明显影响。病理学检查显示,染毒 8 个月 S 型氯代甘油醇未对睾丸和附睾造成明显病理损伤,提示长时间染毒 1/10 LD₅₀ (11.75mg/kg) S 型氯代甘油醇未对小鼠有睾丸和附睾产生器质性损伤。这可能与文献报道该物质在小鼠体内排泄较快有关^[13]。

本次实验显示以 1/10 LD₅₀ (11.75mg/kg) S 型氯代甘油醇连续染毒 2 个月未导致雄性小鼠交配能力降低,也未损伤雄性小鼠生育力,表明在此剂量水平 S 型氯代甘油醇对雄性小鼠不具有抗生育作用。长期染毒条件下 S 型氯代甘油醇不具有损伤小鼠睾丸生精功能的作用,也不影响睾丸和附睾的病理结构,因而 S 型氯代甘油醇对小鼠不具有抗生育作用。

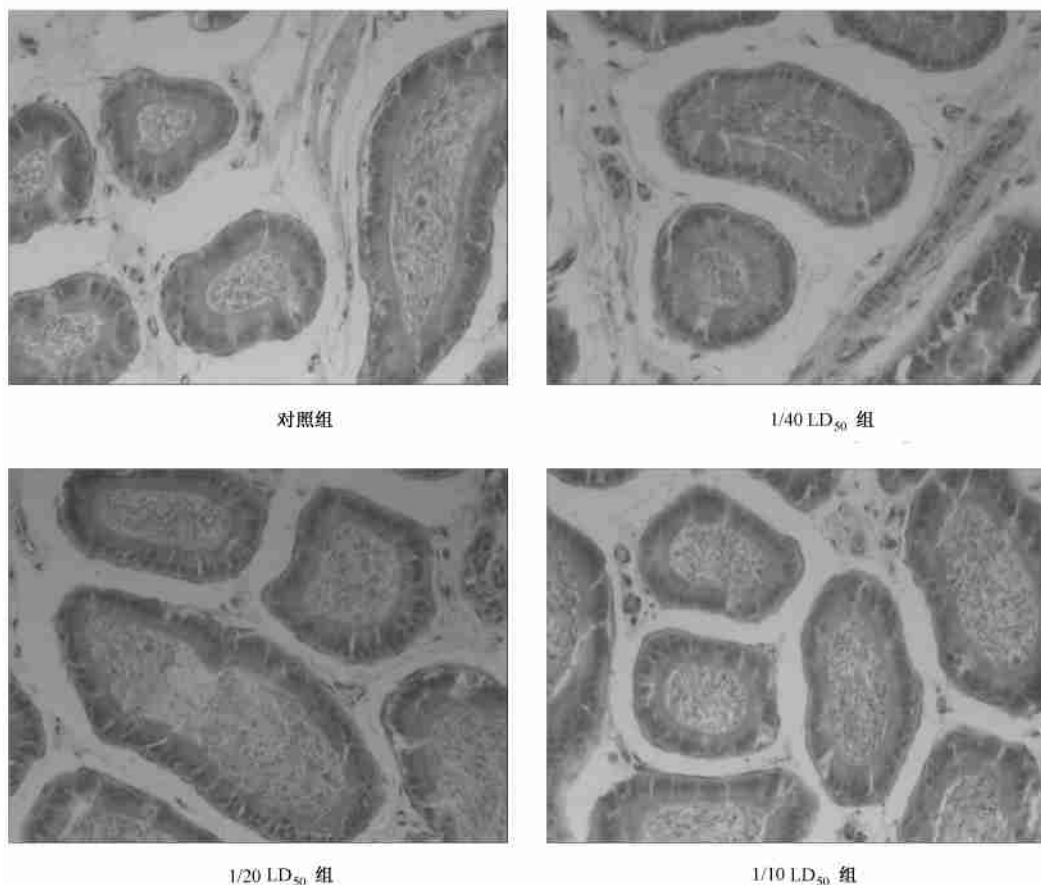


图 2 经口染毒 S 型氯代甘油醇 8 个月对 ICR 小鼠附睾的组织形态学影响(HE, $\times 400$)

Figure 2 Histopathological effects of S- α -chlorohydrin(oral, 8months) on the epididymide of ICR mice(HE, $\times 400$)

参考文献

- LOBLT J. α -chlorohydrin: a review of a model posttesticular antifertility agent[M] // CUNNINGHAM G R, SDHILL W B, HAFEZ E S E. Regulation of male fertility. The Hague: Martinus Nijhoff, 1980: 109-122.
- 金庆中, 张正, 罗仁才, 等. 北京市场液体调味品中 3-氯-1,2-丙二醇污染状况研究[J]. 卫生研究, 2001, 30(1): 60-61.
- CREWS C, HOUGH P, BRERETON P, et al. Survey of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in selected food groups 1999-2000[J]. Food Addit Contam, 2002, 19: 22-27.
- FORD W C, WAITES G M. Activities of various 6-chloro-6-deoxysugars and (S) α -chlorohydrin in producing spermatocoeles in rats and paralysis in mice and in inhibiting glucose metabolism in bull spermatozoa in vitro[J]. J Reprod Fertil, 1982, 65(1): 177-183.
- TSUNODA Y, CHANG M C. Fertilizing ability in vivo and in vitro of spermatozoa of rats and mice treated with α -chlorohydrin[J]. J Reprod Fertil, 1976, 46(2): 401-406.
- BONE W, JONES A R, MORIN C, et al. Susceptibility of glycolytic enzyme activity and motility. of spermatozoa from rat, mouse, and human to inhibition by proven and putative chlorinated antifertility compounds in vitro[J]. J Andro, 2001, 22: 464-470.
- CLERMONT Y, TROTT M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of ^3H -thymidine and radioautography[J]. J Fertil Steril, 1969, 20(5): 805-817.
- OAKBERG E F. Duration of spermatogenetics in the mouse and timing of stages of the cycles of the seminiferous epithelium[J]. Am J Anat, 1956, 99(3): 507-516.
- 钱国庆, 张皓, 张国州, 等. R,S 及 R,S 型 3-氯-1,2-丙二醇的急性毒性研究[J]. 卫生研究, 2007, 36(2): 137-140.
- THORNTON S R, SCHROEDER R E, ROBISON R L, et al. Embryo-fetal developmental and reproductive toxicology of vinyl chloride in rats. Toxicol Sci, 2002, 68: 207-219.
- HOYT J A, FISHER L F, HOFFMAN W P, et al. Utilization of a short-term male reproductive toxicity study design to examine effects of α -chlorohydrin (3-chloro-1,2-propanediol)[J]. Reprod Toxicol, 1994, 8: 237-250.
- JACKSON H, ROONEY F R, FITZPATRICK R W, et al. Characterization and antifertility activity in rats of S(+)- α -chlorohydrin[J]. Chem Biol Interact, 1977, 17: 117-120.
- BONE W, JONES A R, COOPER T G. The effect of (R,S)-ornidazole on the fertility of male mice and the excretion and metabolism of 36Cl-(R,S)- α -chlorohydrin in male mice and rats[J]. Int J Androl, 2002, 25(2): 94-99.

收稿日期: 2007-08-28