

乙酸铜对雄性小白鼠生殖毒性的影响

钱晓薇* 罗蔚华

(温州大学生命与环境科学学院, 温州 325003)

摘要 以清洁级ICR雄性小白鼠为实验动物, 研究不同剂量乙酸铜对小白鼠的生殖毒性。采用小白鼠精子畸形实验及小白鼠骨髓嗜多染红细胞(以下简称PCE)微核实验等方法。分别对成年小白鼠腹腔每天注射 0.25~16.00 mg/kg 8个剂量的乙酸铜, 染毒7天。结果表明: 乙酸铜对小白鼠的体重增长及睾丸重量具有一定的抑制作用, 其中组VI、组VII的最明显。不同剂量的乙酸铜均使雄性小白鼠精子密度($P<0.001$)、精子活力明显降低, 具有明显的剂量效应。各实验组精子畸形率、PCE微核率均明显高于对照组($P<0.001$)($P<0.05$ 或 $P<0.001$), 且均随乙酸铜剂量的增加而明显升高。结果表明实验剂量的乙酸铜对ICR雄性小白鼠具有明显的生殖毒性效应。

关键词 乙酸铜; 生殖毒性; 精子活力; 精子畸形率; 微核率

重金属铜对动植物营养的必要性早在1925年就由McHargue报道, 此后铜在动植物内的代谢过程逐渐得到了深入广泛的研究。铜是人类和动物体内重要的微量元素之一, 它不仅参与机体内蛋白质、核酸、脂肪、碳水化合物、维生素等营养物质的代谢, 而且还在骨骼发育、生殖、凝血等生理机能中起着重要作用。铜是细胞色素c氧化酶的成分之一, 也是Cu/Zn超氧化物歧化酶的辅助因子^[1]。铜能激活金属硫蛋白(MT)基因的启动子^[2]。铜又是重金属污染的重要因素之一, 能够影响生物膜的膜质过氧化、产生氧化损伤。研究发现铜能减弱质膜H⁺-ATPase的活性^[3]。过量的铜可使动物中毒, 铜可与体内的其他生物分子包括酶、蛋白质、核酸相互作用^[4]。铜在肝脏中的大量积累可能是引起ATP7B突变的原因之一^[5]。许多研究显示铜对生物具有一定毒性效应^[6,7]。我们的研究工作也表明铜对黄鳝、蚕豆根尖具有明显的损伤作用^[8-10]。本文我们选择雄性小白鼠为实验动物, 探讨乙酸铜对小白鼠的生殖毒性效应。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物为清洁级体格健康的ICR雄性小白鼠, 均由温州医学院实验动物中心提供, 鼠龄6~8周, 体重24~28 g。乙酸铜, 批号: 20040101, 中国上海振欣试剂厂生产。

1.2 方法

1.2.1 染毒与分组 实验小白鼠随机分9组, 每组

10只。每天称重, 按体重分别腹腔注射0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、12.00、16.00 mg/kg的乙酸铜, 分别编为组II、组III、组IV、组V、组VI、组VII、组VIII、组IX。另设一阴性对照组(组I), 腹腔注射0.9%的生理盐水。每天同一时间注射1次, 持续7天。停药24 h后, 颈椎脱臼法处死小白鼠。实验分组详见表1。

1.2.2 精子密度、活力及精子畸形率的测定 采用文献^[11,12]方法。

1.2.3 骨髓嗜多染红细胞(PCE)微核率的测定 采用文献^[13]方法。

1.3 统计方法

均采用SPSS 12.0数据处理系统进行方差分析。

2 结果

2.1 乙酸铜对小白鼠体重和睾丸重量的影响

经不同剂量的乙酸铜处理的小白鼠体重和睾丸重量的影响见表1。8个实验组在实验期间小白鼠体重增加均有一定的抑制作用。其中组VI、组VII的最明显, 实验前与实验后的体重无显著差异($P>0.05$)。不同剂量的乙酸铜对小白鼠睾丸的重量也有明显的抑制作用, 除组II外其余7个实验组的睾丸重量均明显低于与组I($P<0.05$, 或 $P<0.01$, 或 $P<0.001$)。

2.2 乙酸铜对小白鼠精子密度及活性的影响

收稿日期: 2006-12-14 接受日期: 2007-02-07

温州市科技局科研基金(No.S2002A015)、温州师范学院科研基金(No.2003Z20)资助项目

*通讯作者。Tel: 0577-88371046, E-mail: qianxiaowei@126.com

由表2可见,不同剂量的乙酸铜均使雄性小白鼠精子密度明显降低。8个剂量组的精子密度与对照组的比较均有显著差异($P<0.001$),具有明显的剂量效应。8个实验组的I级精子的百分率均明显低于对照组($P<0.001$),呈现一定的剂量效应。

2.3 乙酸铜对小白鼠精子形态的影响

表3显示:各实验组精子畸形率均明显高于对照组($P<0.001$)。精子畸形率随乙酸铜剂量的增加而明显升高。统计分析发现:组IX明显高于组VIII、组VIII明显高于组VII、组VII明显高于组VI、组VI明显高于组V、组V明显高于组IV、组IV明显高于组III、组III明显高于组II,且均为 $P<0.001$ 。具有明显的剂量效应(图1)。

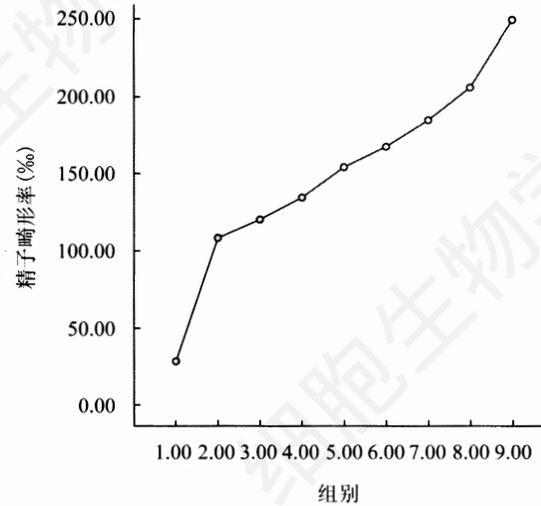


图1 乙酸铜对小白鼠精子畸形率的影响

表1 乙酸铜对小白鼠体重及睾丸重量的影响

组别	乙酸铜剂量(mg/kg)	每组小鼠数(只)	实验前体重(g)	实验后体重(g)	睾丸重量(g) ^a
I(对照组)	0.00	10	25.45±0.92	29.31±0.99***	0.174±0.014
II	0.25	10	25.22±0.96	28.42±2.05***	0.171±0.012
III	0.50	10	25.17±1.19	27.65±2.42***	0.161±0.011*
IV	1.00	10	25.46±0.63	27.33±0.98**	0.161±0.013*
V	2.00	10	25.22±0.89	26.51±1.23*	0.156±0.014**
VI	4.00	10	25.45±1.19	26.36±2.08	0.144±0.011***
VII	8.00	10	25.49±1.02	26.48±0.92	0.152±0.013***
VIII	12.00	10	25.34±1.25	27.19±1.20**	0.160±0.010*
IX	16.00	10	25.50±1.02	27.26±1.09**	0.161±0.011*

体重为每组实验前与实验后比较;睾丸:a代表两个睾丸的重量和。与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

表2 乙酸铜对小白鼠精子活性影响

组别	精子密度($\times 10^4$ 个/ml)	精子活力(%)			
		I级	II级	III级	IV级
I(对照组)	125.44±6.56	28.90±1.97	22.60±1.51	35.80±1.03	12.70±1.42
II	71.08±1.72***	19.90±1.37***	29.60±1.71***	36.40±1.51	14.10±1.91
III	69.08±2.64***	18.90±1.20***	30.80±1.81***	37.10±1.60	13.20±1.40
IV	65.12±1.01***	17.60±1.26***	31.10±1.73***	37.90±1.97*	13.40±1.58
V	37.30±2.23***	10.10±1.10***	34.00±2.91***	42.10±1.85***	13.80±1.75
VI	34.56±2.70***	8.50±1.08***	35.70±2.54***	42.40±1.96***	12.60±1.51
VII	31.46±1.70***	8.30±1.25***	34.70±2.41***	43.30±2.31***	13.70±1.64
VIII	30.50±1.70***	7.20±1.03***	35.20±2.20***	43.70±2.26***	13.90±1.79
IX	11.88±1.10***	6.60±1.07***	35.50±2.76***	43.90±3.11***	14.00±1.83

与对照组比较,* $P<0.05$,*** $P<0.001$ 。

表3 乙酸铜对小白鼠精子形态的影响

组别	实验小鼠数	畸形精子数/1 000个精子										畸形精子率‰($\bar{x}\pm s$)
		25	26	25	24	28	33	31	33	28	32	
I	10	25	26	25	24	28	33	31	33	28	32	28.5±3.50
II	10	117	106	107	110	109	106	102	109	103	114	108.30±4.62***
III	10	125	119	121	120	115	127	128	116	115	117	120.30±4.88***
IV	10	131	140	128	126	133	131	150	141	139	127	134.60±7.68***
V	10	157	151	159	163	157	159	149	153	149	145	154.20±5.67***
VI	10	169	177	163	159	157	179	178	165	158	170	167.50±8.44***
VII	10	178	189	197	191	183	183	176	182	178	191	184.80±6.89***
VIII	10	204	225	205	203	199	197	203	210	199	217	206.20±8.82***
IX	10	259	241	236	243	246	268	249	251	241	258	249.20±9.93***

与其余组比较,*** $P<0.001$ 。

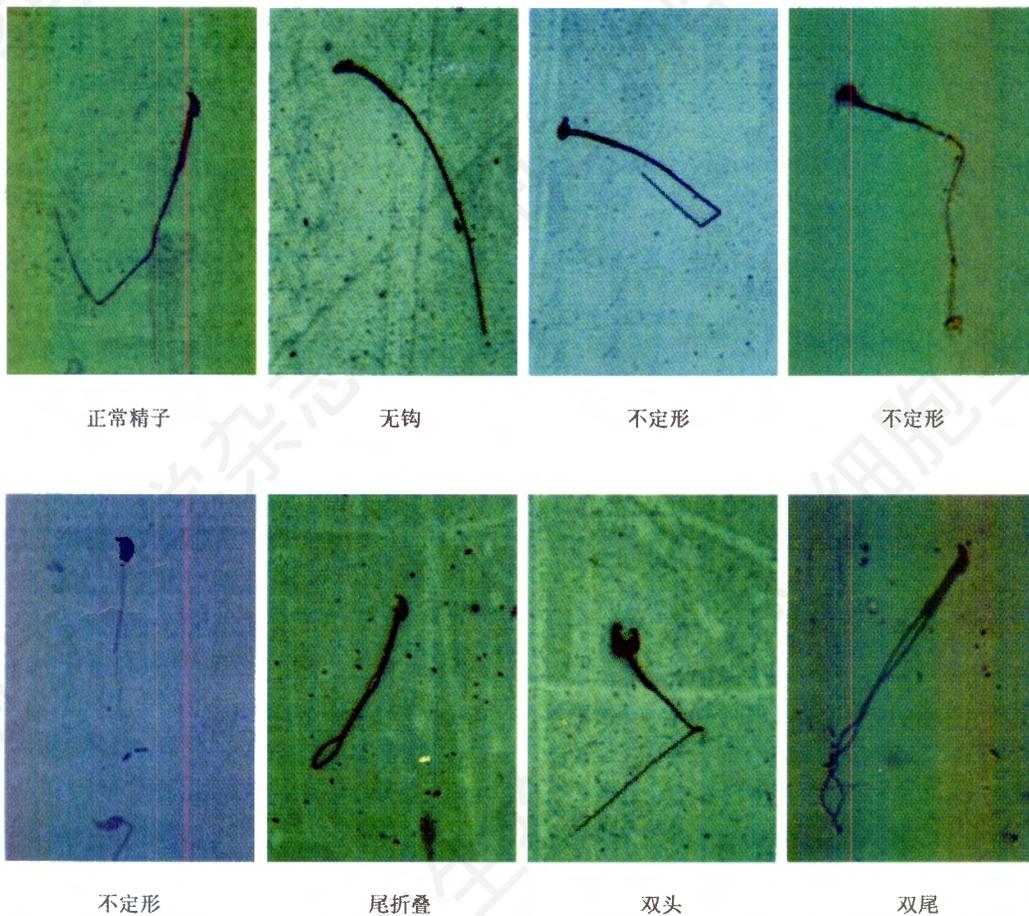


图2 乙酸铜对小白鼠精子形态的影响

表4 乙酸铜对小白鼠精子畸变类型的影响

组别	实验小鼠数	精子畸形总数	精子畸形类型(%)				
			无钩	不定形	尾折叠	双头	双尾
I	10	285	35.4	54.7	7.4	1.4	1.1
II	10	1 083	36.8	53.7	6.9	1.3	1.3
III	10	1 203	33.5	57.0	7.2	1.1	1.2
IV	10	1 346	34.4	56.3	7.0	1.2	1.1
V	10	1 542	31.6	59.1	6.8	1.2	1.3
VI	10	1 675	31.0	58.8	7.6	1.5	1.1
VII	10	1 848	32.9	58.3	6.7	1.2	0.9
VIII	10	2 062	33.4	57.4	7.1	1.0	1.1
IX	10	2 492	33.7	56.9	7.3	1.0	1.1

由表4可见, 本实验中精子出现的畸变类型有无钩、不定形、尾折叠、双头及双尾等类型(图2), 其中不定形为最多, 无钩次之, 尾折叠第二, 另两种比较少。可见精子的畸变主要在头部。8个实验组的精子畸形类型与对照组比较无明显差异。

2.4 乙酸铜对小白鼠PCE微核率的影响

表5显示: 8个实验组的PCE微核率均明显高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.001$)。组间比较发现: 组III

的明显高于组II($P<0.05$), 组V的明显高于组IV($P<0.05$), 组VI的明显高于组V($P<0.05$), 而组IX则明显高于组VIII($P<0.001$)。即随着乙酸铜剂量的增加PCE微核率逐渐升高, 具有剂量效应。

3 讨论

哺乳动物细胞摄取铜主要有两条途径, 一是以血浆铜蓝蛋白为递质途径, 细胞从血浆铜蛋白-铜蓝蛋

表5 乙酸铜对小白鼠 PCE 微核率的影响

组别	实验小鼠数	观察PCE细胞数	1 000PCE 微核数										微核率‰(x±s)		
I	10	10 000	1	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2.10±0.57
II	10	10 000	3	3	2	3	3	3	3	2	2	4	3	2	2.80±0.63*
III	10	10 000	4	3	3	4	3	4	5	4	3	3	3	3	3.60±0.70***
IV	10	10 000	3	5	4	4	4	3	4	3	3	4	3	4	3.70±0.67***
V	10	10 000	5	4	5	4	5	4	4	5	6	4	4	4	4.60±0.70***
VI	10	10 000	5	4	5	6	6	5	6	6	5	6	5	6	5.40±0.70***
VII	10	10 000	6	6	6	5	5	6	6	7	7	5	5	5	5.90±0.74***
VIII	10	10 000	6	6	5	7	7	7	6	6	5	6	6	6	6.10±0.74***
IX	10	10 000	7	9	8	7	7	6	7	10	9	8	8	8	7.80±1.23***

与对照组比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

自摄取铜。二是游离途径, 血浆中与白蛋白或组氨酸结合的铜以及游离铜通过自由通道进入细胞。细胞内的铜与铜蛋白结合^[14]。

本实验发现乙酸铜能抑制小白鼠体重的增加和睾丸的重量。这可能是由于该化合物使呼吸链上的酶合成受到抑制, 特别是ATP酶的合成速率下降减少其对三羧酸循环的抑制作用, 使体内的三羧酸循环速度加快而导致小鼠体内的脂肪、蛋白质等物质的分解^[15]。8个实验组中, 组VI、组VII这2个剂量的作用是最明显。这可能是这2个剂量的乙酸铜对呼吸链上酶合成的抑制是最严重。

本实验通过对精子的活性、精子的密度和精子畸形来评价精子的状态。实验的结果显示: 8个剂量的乙酸铜均能使小白鼠的精子密度和活性明显下降, 呈现出一定的剂量效应。提示小白鼠精子的能量代谢, 发育状况受到一定程度影响。这可能是当小白鼠体内铜浓度升高直接影响精子的生理功能, 也可干扰垂体内分泌腺的分泌功能, 同时精液中的铜离子通过离子跨膜运动以改变精子膜的功能。精子活动降低同时影响精子存活率, 使得精子数量减少^[15]。说明乙酸铜进入小白鼠体内影响精子的生长发育, 对精子的发生可能有一定的抑制作用。研究表明铜有抑制精子的氧化酵解过程致精子活动下降或直接杀精作用, 男性不育患者中铜的含量明显高于健康已育男性, 同样在不育症体内随精子数的减少, 铜含量明显增高^[16]。Jockenhovel等^[17]认为精液铜含量与精子密度、直线运动和正常形态显著相关。一些含铜宫内节育环是通过释放入宫腔内的铜离子, 干扰与胚胎着床有关的酶促反应, 并干扰精子在子宫腔内的运动, 破坏精子的结构, 而达到避孕作用。实验证明含铜宫内节育环避孕率高达98%^[18]。

本实验结果还显示随着乙酸铜剂量的增加精子

的畸形率呈现明显上升。乙酸铜引起小白鼠精子畸变的可能原因是通过铜对DNA损伤引起, 或是乙酸铜作用于精子生成过程中某些代谢环节而引起的精子形态畸形^[19]。实验发现在各精子畸变类型中以头部畸形为主, 而精子受精能力取决于精子头部, 精子头部畸形率高时, 受精能力差, 直接影响受精能力, 精子尾部是精子运动的器官, 尾部功能的好坏影响到精子的运动能力和活动率, 进而影响到精子和卵子的顺利结合^[20]。

微核形成的机制一般认为是具有遗传毒性的物质作用于染色体, 导致染色体断裂, 或作用于纺锤体, 导致纺锤体功能不全。在细胞分裂时, 染色体的移动滞后, 不能排列到赤道板上, 从而形成大小不等的小核, 其形态多样, 但与主核相分离, 也可以丝或带与主核相连; 大小为主核的三分之一以下^[21]。本研究表明不同剂量的乙酸铜均能诱发小白鼠骨髓PCE产生较高频率的微核(与对照组比较, $P<0.05$ 或 $P<0.001$), 说明乙酸铜对动物骨髓细胞具有明显遗传毒理作用。其微核率随着乙酸铜剂量的增加而升高, 具有明显的剂量效应。提示随着乙酸铜剂量的增加对PCE遗传物质的损伤加剧。

综上所述, 乙酸铜能抑制雄性小白鼠的体重和睾丸的重量, 降低精子的活性和精子的密度, 增加精子的畸变率和PCE微核率。说明本实验剂量的乙酸铜对ICR雄性小白鼠具有明显的生殖毒性效应。

参考文献(References)

- [1] Yoo HY et al. *Mol Gen Genet*, 1999, **262**: 310
- [2] 向晓辉. *国外医学医学地理分册*, 2003, **24**: 45
- [3] 杨颖丽等. *西北师范大学学报(自然科学版)*, 2005, **41**: 50
- [4] 易秀. *农业环境保护*, 1997, **16**: 187
- [5] Gerbasi V et al. *Neurochem Res*, 2003, **28**: 867
- [6] 杨再福. *环境保护科学*, 2000, **26**: 37

- [7] Baatrup E. *Comp Biochem Physiol*, 1991, **100**: 253
- [8] 钱晓薇. *江西科学*, 2004, **22**: 331
- [9] 钱晓薇. *中国公共卫生*, 2005, **21**: 123
- [10] 钱晓薇. *细胞生物学杂志*, 2005, **27**: 351
- [11] 陈振文等译. *人类精液及精子-宫颈黏液相互作用实验室检验手册*, 北京: 科学出版社, 1994, 4
- [12] 钱晓薇等. *浙江大学学报(理学版)*, 2004, **31**: 326
- [13] 钱晓薇. *细胞生物学杂志*, 2003, **25**: 179
- [14] Mas A *et al. Biochem Biophys Acta*, 1992, **1135**: 123
- [15] 于素芳等. *中国男科学杂志*, 2000, **16**: 137
- [16] 陈黎等. *泸州医学院学报*, 2002, **19**: 13
- [17] Jockenhovel F *et al. Andrologia*, 1990, **22**: 503
- [18] 乌毓明. *中国实用妇科与产科杂志*, 1995, **11**: 239
- [19] 刘璐等. *国外医学医学地理分册*, 2004, **25**: 29
- [20] 阎勇. *遵义医学院学报*, 2001, **24**: 494
- [21] 梁子安等. *湖北民族学报(自然科学)*, 2002, **20**: 4

The Effects of Copper Acetic Acid on Reproductive Toxicity of the Male Mice

Xiao-Wei Qian*, Wei-Hua Luo

(School of Life and Environment Science, Wenzhou University, Wenzhou 325003, China)

Abstract The sperm deformity test and PCE micronucleus test were used to study the different doses of copper acetic acid on reproduction toxicity of male mice. The copper acetic acid of 0.25–16.00 mg/kg/d were respectively investigated by intraperitoneal injection to male mouse for 7 days. The results show that the copper acetic acid in each experimental group can inhibit the increases of body weight and testis, of which group VI and VII are the most remarkable. They can also reduce significantly the vitality and concentration of sperm. There is an apparent dose-effect. Besides, the frequencies of sperm deformity and micronucleus in each experimental group are significantly higher than the control group's. Moreover, they rise with increasing dose of copper acetic acid. The results show that experimental doses of copper acetic acid have obvious effects of reproduction toxicity on ICR male mice.

Key words copper acetic acid; reproductive toxicity; the vitality of sperm; the frequency of sperm deformity; the frequency of micronucleus

Received: December 14, 2006 Accepted: February 7, 2007

This work was supported by the Foundation of Wenzhou Technology Bureau (No.S2002A015) and the Wenzhou Normal College (No. 2003Z20)

*Corresponding author. Tel: 86-577-88371046, E-mail: qianxiaowei@126.com