

# 杭州湾南岸滩涂沉积物中 POPs 混合物对小鼠的生殖毒性作用

闫鹏<sup>1</sup>, 欧阳昌荣<sup>2</sup>, 施家威<sup>1</sup>

1. 宁波市疾病预防控制中心, 浙江 宁波 315010; 2. 宁波大学生命海洋学院

**摘要:** **目的** 研究杭州湾南岸滩涂沉积物中 POPs 混合物对小鼠的生殖毒性作用。 **方法** 选择健康清洁级性成熟 ICR 小鼠 80 只, 体重 22-26g, 随机分为 30、100、300mg/kg 三个剂量染毒组和一个溶剂对照组, 每组 20 只, 雌雄各半, 进行一代生殖毒性试验。采用灌胃方式进行染毒 (10 ml/kg), 雄鼠染毒 6 周, 进行精子畸形测定。雌鼠染毒 2 周后, 雌雄小鼠按 1:1 同笼交配, 交配时间为 2 周, 观察交配率及受孕率。孕鼠在妊娠 19 天解剖, 观察黄体数、着床数、活胎数、死胎数、吸收胎数、每窝胎仔平均胎长、胎重、胎盘重。 **结果** 当混合物染毒剂量为 100 mg/kg 和 300mg/kg 时, 精子畸形率明显升高 ( $P<0.05$ ), 剂量达到 300mg/kg 时生育率、妊娠率、活胎率、平均胎长和胎仔重降低 ( $P<0.05$ ), 而着床前死亡率、死胎率升高 ( $P<0.05$ )。 **结论** 滩涂沉积物中 POPs 混合物在剂量达到 300mg/kg 时对小鼠产生明显的生殖和发育毒性。

**关键词:** 滩涂沉积物; POPs; 生殖毒性

## Effects of persistent organic pollutants mixtures in tidal-flat sediment of south of Hangzhou Bay on Reproductive toxicity of Mice

YAN Peng, SHI Jia-wei, OUYANG Chang-rong

Ningbo Municipal Centers for Disease Control and Prevention, Ningbo Zhejiang 315010, China

Corresponding author: SHI Jia-wei, E-mail: shijw@nbcdc.org.cn

**Abstract:** **Objective** To study the Reproductive toxicity of typical persistent organic pollutants mixtures in tidal-flat sediment of south of Hangzhou Bay in mice. **Methods** 80 mature ICR mice (clean anima, sexual maturation, weighed 22-26g) were randomly into three experimental groups (30、100 and 300 mg/kg) and the control group, 20 in team, the reproductive toxicity trial in mice. Which all exposed by intragastric administration (10 ml/kg), male mice were gavage administration for 6 consecutive weeks, for the determination of sperm deformity. Female mices were gavage administration for 2 weeks, and then mated with male mices (male: female, 1:1). The time of mating of two weeks, detected Copulation rate and pregnancy rate. Pregnant mice were dissected on 19 day, detected number of corpora lutea resorptions, live and dead fetuses and implantations, detected length of fetus and fetal weight and placental weight. **Results** When the doses of typical persistent organic pollutants were 100 and 300 mg/kg, sperm vitality rate was reduce and rate of sperm deformation was

基金项目: 宁波市社会发展科研项目 (2012C50030)

作者简介: 闫鹏 (1975-), 男, 副主任医师, 硕士, 主要从事环境毒理学研究

通讯作者: 施家威, E-mail:

hoist, there had obvious difference compared with control group ( $P < 0.05$ ). When the doses of typical persistent organic pollutants was 300 mg/kg, fertility rate and pregnancy rate and live fetuses rate and length of fetus and fetal weight were reduce ( $P < 0.05$ ), while rate of pre-implantation death and dead fetuses was hoist ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Effects of persistent organic pollutants mixtures was 300 mg/kg in tidal-flat sediment have a marked reproductive and developmental toxicity for mice.

**Key words:** Tidal-flat sediment; Persistent Organic Pollutants; Reproductive toxicity

持久性有机污染物 (Persistent Organic Pollutants, POPs) 通过各种环境介质 (大气、水、生物体等) 能够长距离迁移并长期存在于环境, 具有长期残留性、生物蓄积性、半挥发性和高毒性, 由于具有干扰人类及野生动物的内分泌系统的作用, 亦被称为环境雌激素<sup>[1]</sup>。近年来, 持久性有机污染物 (POPs) 的污染已对人类健康构成较大的威胁, POPs 曾广泛用于农业 (作为杀虫剂) 和工业, 部分作为副产物在一些工业制造或燃烧过程中产生。国外人群流行病学调查资料表明, 人类某些恶性肿瘤的高发与持久性有机污染物的暴露有关<sup>[2]</sup>。宁波是东部沿海城市, 濒临东海, 滩涂面积广阔, 渔业资源丰富, 随着沿岸城市化和工业化的迅速发展, 大量含有有害物质的生活污水、工业废水和废渣被直接或间接排入附近海域, 造成了滩涂环境 POPs 污染日益严重<sup>[3]</sup>。有研究表明, 一些海洋生物对多氯联苯等 POPs 具有很强的富集能力, 并可通过食物链传递给人, 进而对人类健康造成危害<sup>[4]</sup>。为研究滩涂中多种典型 POPs 的联合毒性, 前期我们应用 GC-MS/MS 联用技术分析测定了杭州湾南岸滩涂沉积物中 16 种典型 POPs 的组成及含量<sup>[5]</sup>, 包括 5 种六氯环己烷

(Hexachlorocyclohexane, HCHs):  $\alpha$ -HCH (30.1%)、 $\beta$ -HCH (4.7%)、 $\gamma$ -HCH (3.1%)、 $\delta$ -HCH (1.1%)、 $\epsilon$ -HCH (0.8%), 4 种双对氯苯基三氯乙烷 (Dichlorodiphenyltrichloroethane, DDTs): o,p'-DDT (0.6%)、p,p'-DDD (1.8%)、p,p'-DDE (39.3%)、p,p'-DDT (2.2%) 和 7 种指示性多氯联苯 (Polychlorinated biphenyls, PCBs): PCB-28 (0.9%)、PCB-52 (1.2%)、PCB-101 (1.7%)、PCB-118 (4.6%)、PCB-138 (1.3%)、PCB-153 (1.9%)、PCB-180 (4.6%)。为真实反映多种典型 POPs 在滩涂环境中共存对哺乳动物生育力可能造成的损害作用, 本研究将 16 种典型 POPs 按组成含量配比混合, 对多种典型 POPs 混合物的生殖毒性作用进行了实验观察, 结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 受试化学物

PCB-28、PCB-52、PCB-101、PCB-118、PCB-138、PCB-153、PCB-180、 $\alpha$ -HCH、 $\beta$ -HCH、 $\gamma$ -HCH、 $\delta$ -HCH、 $\epsilon$ -HCH、o,p'-DDT、p,p'-DDD、p,p'-DDE、p,p'-DDT 购自 accustandard 公司 (美国), 溶剂为二甲基亚砜 (DMSO)。

### 1.2 剂量设计

按 16 种典型 POPs 组成含量配比配制受试混合物, 经霍恩氏法测得混合物雌、雄小鼠急性经口  $LD_{50}$  分别为 880 mg/kg (95%可信限 450~1720 mg/kg)、909 mg/kg (95%可信限 454~1820 mg/kg) 根据混合物  $LD_{50}$  设定剂量组, 低剂量组为 30mg/kg、中剂量组为 100mg/kg、高剂量组为 300mg/kg, 溶剂为二甲基亚砜 (DMSO)。

1.3 实验动物清洁级性成熟、体重 22-26g、ICR 小鼠 80 只, 雌雄各半, 由扬州大学比较医学中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK (苏) 2012-0004, 实验动物使用许可证号: SYXK-(浙) 2013-0191, 整个实验期间小鼠自由饮水和进食, 喂饲全营养饲料, 每日光照 12h, 饲养室温度 20~24℃, 相对湿度 40~60%。

#### 1.4 动物分组及染毒方法

80 只小鼠按体重随机分为 4 组：溶剂对照（DMSO）、低、中、高剂量混合染毒组，每组雌雄小鼠各 10 只。采用灌胃方式进行染毒（10 ml/kg），对照组给等容积的 DMSO。参照毒理学实验方法与技术<sup>[6]</sup>，雄鼠染毒 6 周，每组随机选取 5 只雄鼠进行精子畸形测定。雌鼠染毒 2 周后，雌雄小鼠按 1:1 同笼交配，交配时间为 2 周，每日晨采用阴栓检查法检查雌鼠阴道中有无精子。实验期每天观察受试动物活动、步态、行为及对外界的反应情况等，记录摄食量、观察交配率及受孕率。雄鼠观察精子畸形率；孕鼠在妊娠 19 天解剖，观察黄体数、着床数、活胎数、死胎数、吸收胎数，计算生育率、妊娠率、吸收胎率、活胎率、死胎率，同时观察每窝胎仔平均胎长、胎重、胎盘重。

#### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 软件对数据进行统计分析，计量资料以均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，采用 t 检验；计数资料采用  $\chi^2$  检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 POPs 混合物对小鼠精子畸形的影响

实验结果显示，染毒剂量为 30mg/kg 时，检测精子畸形率与溶剂对照组比较差异无统计学意义（P>0.05）。而染毒剂量达到 100mg/kg 时精子畸形率为 8.2%，剂量达到 300mg/kg 时精子畸形率为 14.6%，比溶剂对照组精子畸形率明显升高，差异有统计学意义（P<0.05），POPs 混合物引起的精子畸形以头部畸形为主，主要为无定形，其次为无钩、香蕉形和折叠尾，还可见胖头等形态，剂量达到 300mg/kg 时，无钩占精子畸形的 30.14%，和溶剂对照组比较，差异有统计学意义，见表 1。

表 1 POPs 混合物对小鼠精子畸形的影响

剂量组别 (mg/kg)	观察精子数	精子畸形数	畸形率 (%)	精子畸形类型 (%)				
				无钩	香蕉型	无定形	胖头	尾折叠
DMSO	5000	19	3.8	15.79	15.79	52.63	5.26	10.53
30	5000	22	4.4	18.18	13.64	54.55	4.55	9.09
100	5000	41	8.2*	19.51	14.63	51.22	4.88	9.76
300	5000	73	14.6*	30.14*	12.33	46.58	4.11	8.22

注：经  $\chi^2$  检验，与溶剂对照组比较 \* P<0.05

#### 2.2 POPs 混合物对小鼠生育力影响的结果

随着 POPs 染毒剂量的升高各染毒组小鼠的交配率下降，但是和溶剂对照组比较差异没有统计学意义（P>0.05）；随着 POPs 染毒剂量的升高各染毒组小鼠的生育率明显下降，剂量达到 300 mg/kg 时生育率为 40%，和溶剂对照组比较差异有统计学意义（P<0.05）；随着 POPs 染毒剂量的升高各染毒组小鼠的妊娠率下降明显，剂量达到 300 mg/kg 时妊娠率为 57.1%，和溶剂对照组比较差异有统计学意义（P<0.05），见表 2。

表 2 POPs 混合物对小鼠生育力的影响

剂量组别 (mg/kg)	合笼雌鼠数	检出阴栓雌鼠数	妊娠雌鼠数	交配率 (%)	生育率 (%)	妊娠率 (%)
DMSO	10	9	8	90.0	80.0	88.9
30	10	8	6	80.0	60.0	75.0
100	10	7	5	70.0	50.0	71.4
300	10	7	4	70.0	40.0*	57.1 *

注：经  $\chi^2$  检验，与溶剂对照组比较 \* P<0.05

2.3 POPs 混合物对小鼠早期胚胎发育的影响

随着 POPs 染毒剂量的升高各染毒组小鼠的着床前死亡率明显升高，剂量达到 300 mg/kg 时为 11.6%，和溶剂对照组比较差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）；随着 POPs 染毒剂量的升高小鼠的活胎率明显下降，剂量达到 300 mg/kg 时活胎率为 76.3%，和溶剂对照组比较差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）；随着染毒剂量的升高小鼠的吸收胎率略有升高，和溶剂对照组比较差异没有统计学意义（ $P>0.05$ ）；随着 POPs 染毒剂量的升高小鼠的死胎率明显升高，剂量达到 300 mg/kg 时死胎率为 13.2%，和溶剂对照组比较差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），见表 3。

表 3 POPs 混合物对小鼠早期胚胎发育的影响

剂量组别 (mg/kg)	妊娠 雌鼠 数	黄 体 数	着 床 数	活 胎 数	吸收 胎数	死胎 数	着床前死 亡率 (%)	活胎率 (%)	吸收胎 率 (%)	死胎率 (%)
DMSO	8	83	80	73	5	2	3.6	91.3	6.3	2.5
30	6	63	60	52	5	3	4.8	86.7	8.3	5.0
100	5	51	47	40	4	3	7.8	85.1	8.5	6.4
300	4	43	38	29	4	5	11.6*	76.3*	10.5	13.2*

注：经  $\chi^2$  检验，与溶剂对照组比较 \*  $P<0.05$

2.4 POPs 混合物对胎仔发育的影响

各 POPs 染毒组平均胎长随着染毒剂量的升高呈下降趋势，剂量达到 300 mg/kg 时为  $12.86\pm0.48\text{mm}$ ，和溶剂对照组比较差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）；各染毒组平均胎仔重随着染毒剂量的升高而下降，剂量达到 300 mg/kg 时为  $0.43\pm0.08\text{g}$ ，和溶剂对照组比较差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）；各染毒组随着剂量的升高平均胎盘重变化不明显，各剂量组与溶剂对照组比较差异没有统计学意义（ $P>0.05$ ），见表 4。

表 4 POPs 混合物对胎仔发育的影响( $\bar{x}\pm s$ )

剂量组别 (mg/kg)	胎仔数	胎长 (mm)	胎仔重 (g)	胎盘重 (g)
0	73	$14.97\pm0.38$	$0.51\pm0.07$	$0.19\pm0.03$
30	52	$14.16\pm0.72$	$0.49\pm0.08$	$0.18\pm0.02$
100	40	$14.02\pm0.71$	$0.48\pm0.09$	$0.18\pm0.02$
300	29	$12.86\pm0.48^*$	$0.43\pm0.08^*$	$0.18\pm0.03$

注：经  $t$  检验，与溶剂对照组比较 \*  $P<0.05$

3 讨论

本研究以杭州湾南岸滩涂沉积物中 HCHs、DDTs 和 PCBs 等 16 种典型 POPs 为受试混合物，对雄性小鼠精子畸形实验观察发现，剂量达到 100mg/kg 时精子畸形率为 8.2%，剂量达到 300mg/kg 时精子畸形率为 14.6%，精子畸形率明显升高，16 种典型 POPs 对小鼠的精子具有明显致畸作用，典型 POPs 混合染毒对雄鼠生殖功能具有损伤作用。有研究显示<sup>[7]</sup>，怀孕期间，母体接触 PCB118 可造成雄性子代在成年期睾丸和附睾减小、精子数量及每日精子生成量减少。说明精子数量的减少和精子畸形是反映 PCBs 等典型 POPs 雄性生殖毒性比较敏感的指标。

实验显示，随着染毒剂量的升高，小鼠的交配率逐渐降低，说明典型 POPs 对小鼠的交配行为有一定影响，提示典型 POPs 对小鼠的内分泌系统有一定干扰作用。当染毒剂量为 300mg/kg 时，小鼠的生育率降低为对照组的一半，显示出典型 POPs 对小鼠的生育力有明显损伤作用。随着染毒剂量的升高雌鼠的妊娠率也逐渐降低，说明典型 POPs 对雌鼠生殖功能有一定损害作用。实验发现，典型 POPs 混合染毒对小鼠早期胚胎发育也有一定影响，随着

剂量升高活胎率降低,而死胎率升高,着床前死亡率、吸收胎率也随着剂量升高而升高。原因可能是由于POPs发挥了类雌激素作用使卵细胞不能正常发育,并对雌鼠排卵功能产生了抑制作用,再者雄鼠的生殖系统也受到了损伤,精子质量下降,部分精子畸形,导致受精卵细胞数目减少,产生的配子质量也下降,配子的缺陷引起相应的妊娠率下降。典型POPs对卵细胞和精子产生生殖毒性导致吸收胎数目增多,不能形成正常的活胎,死胎率也随之升高。典型POPs对胎仔也表现出一定毒性作用,随着染毒剂量升高胎仔重和胎长逐渐降低。徐承敏等<sup>[8]</sup>研究显示,胚胎较成年动物对DL-PCBs的毒性作用敏感,这与幼年和成年动物在药代动力学和新陈代谢上的差异密切相关。妊娠期的持续染毒,类似研究显示<sup>[9]</sup>,对大鼠在怀孕时给予p,p'-DDE,雄性后代可能发生肛门与生殖器之间距离缩短、尿道下裂等先天畸形。

本研究对滩涂沉积物中典型POPs的生殖毒性研究仅是初步的,旨在为以后建立POPs生物毒性数据库提供基础数据。持久性有机污染问题已经广泛引起了我国的关注<sup>[10]</sup>,因此,需要建立统一的沉积物毒性评价方法,这将有助于沉积物污染治理工作的开展。目前,我国对沉积物毒性评价的研究尚处于起步阶段,寻找适合我国水生环境的沉积物毒性试验生物、建立统一的化学分析和毒性试验方法将是今后研究的重点。

## 参考文献

- [1] 宋顺喆,贾丽红.环境雌激素双酚A对男性生殖细胞影响的研究进展[J].实用预防医学,2013,20(10):1279-1281.
- [2] Moysich K,Ambrosone CB,Vena JE,et al.Environmental organochlorine exposure and postmenopausal breast cancer risk[J].Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,1998,7(3):181-188.
- [3] 王益鸣,王晓华,胡颢琰,等.浙江沿岸海产品中有机氯农药的残留水平[J].东海海洋,2005,23(1):54-64.
- [4] 朱云海,尤仲杰,申屠基康,等.宁波滩涂贝类养殖区沉积物中有机氯农药和多氯联苯残留及生态风险评估[J].应用生态学报,2012,23(6):1689-1694.
- [5] 施家威,李继革,王玉飞.气相色谱/串联质谱法测定滩涂沉积物中7种多氯联苯残留[J].中国卫生检验杂志,2013,23(11):2407-2409.
- [6] 王心如.毒理学实验方法与技术[M].北京:人民卫生出版社,(2012,第3版).172-174.
- [7] KURIYAMA SN,CHAHOUD I.In utero exposure to low-dose 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB118) impairs male fertility and alters neurobehavior in rat offspring [J].Toxicology,2004,202(3):185-197.
- [8] 徐承敏,柴剑荣,钱亚玲.宫内和哺乳期接触多氯联苯118和126对雄性仔鼠生殖功能影响[J].卫生研究,2013,42(5):758-763.
- [9] GRAYLE Jr,WOLF C,LAMBRIGHT C,et al.Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone,linuron,iprodione,chlorzoxipate,P,P'DDE,and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate,PCB169,and ethane dimethanesulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat[J].Toxicol Ind Health,1999,15(1-2):94-118.
- [10] 马德毅,王菊英.中国主要河口沉积物污染及潜在生态风险评价[J].中国环境科学,2003,23(5):521-525.