

四氯化碳联合二乙基亚硝胺对小鼠精巢的毒性作用

李亚琳 惠亮亮

渭南师范学院化学与生命科学学院 渭南 714009

摘要: 为了研究四氯化碳 (CCl_4) 联合二乙基亚硝胺 (DEN) 对小鼠 (*Mus musculus domesticus*) 精巢的毒性作用。将昆明小鼠随机分为对照组与实验组, 各 12 只个体。实验组每周 2 次腹腔注射含有 15% CCl_4 的花生油溶液, 同时自由饮用 0.07% 的 DEN 溶液, 连续诱导 8 周。对照组每周 2 次注射花生油, 饮用蒸馏水。分别于第 3、6、8 周处死实验组及对照组小鼠各 4 只, 对其精巢组织进行常规固定、包埋、切片、H.E 染色, 观察精巢的形态及精子数量的变化。与实验组比较, 对照组小鼠体重明显增加, 且实验组与对照组差异显著; 与对照组相比, 实验组睾丸系数以及精子存活率均显著减少。对照组小鼠精巢都具有正常的生精小管结构, 管腔中存在大量精子; 第 3 周, 实验组小鼠的精巢与对照组类似, 生精小管较为完整, 生精细胞稍有散乱; 第 6 周, 实验组生精小管变形, 生精细胞排列疏松, 精子数目减少且畸形; 第 8 周, 实验组生精小管残缺不全, 生精细胞和精子散乱排列, 精子数量大大减少且变形更为严重。实验说明, CCl_4 联合 DEN 能够造成小鼠精巢组织的损害以及精子数目的减少和畸变。

关键词: 四氯化碳; 二乙基亚硝胺; 精巢

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2015) 02-294-06

Damage of Testis by Carbon Tetrachloride Combining with Diethylnitrosamine in Mice

LI Ya-Lin HUI Liang-Liang

College of Chemistry and Life Science, Weinan Normal University, Weinan 714009, China

Abstract: To study the toxic effect of carbon tetrachloride (CCl_4) combining with diethylnitrosamine (DEN) on testis, Kunming mice (*Mus musculus domesticus*) were randomly divided into two groups. The experimental group was injected with 15% CCl_4 /peanut oil solution intraperitoneally twice a week for eight weeks, with 0.07% DEN water solution free drinking during the treatment. The control group was injected with peanut oil, with purified water drinking. In both experimental group and control group, four mice were killed at 3, 6, 8 weeks respectively. The testicular tissue was fixed, embedded and sectioned conventionally,

基金项目 陕西省军民融合研究基金项目 (No. 15JMR18), 渭南师范学院特色学科建设项目 (No. 14TSXK04);

第一作者介绍 李亚琳, 女, 医学博士; 研究方向: 肿瘤生物学; E-mail: lyal1222@126.com。

收稿日期: 2014-05-28, 修回日期: 2014-10-13 DOI: 10.13859/j.cjz.201502018

then was stained by H.E method. The changes of testicular structure and the number and shape of spermatozoa were observed. Values were presented as Mean \pm SD of three independent samples. The results were analyzed by two-sample equal variance Student's *t*-test (one-tailed), and statistical significance was set at $P < 0.05$. The average testis weight was significantly higher in control group than in the experimental group (Table 1). Testicular organ coefficient and sperm survival rate were significantly decreased in experimental group compared to the control group (Table 2). The control mice showed normal seminiferous tubules and a large number of spermatozoa. The testis of mice in the experimental group killed in 3 weeks was similar to that of the control group, with complete seminiferous tubules and a small amount of the spermatogenic cells. After 6 weeks, the testis in experimental group changed evidently, with disordering spermatogenic cells, decreasing and abnormal sperm. After 8 weeks, the testis of experimental group showed a dramatic change, with all the spermatogenic cells and spermatozoa arranged disorderly, decreased sperm number, and increased deformity of sperm (Fig. 1). Conclusion: CCl_4 combining with DEN can damage testis structure, decrease the number of sperm, and induce sperm abnormality.

Key words: Carbon tetrachloride (CCl_4); Diethylnitrosamine (DEN); Testis

四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl_4) 是一种无色透明的挥发性液体, 对人呼吸道、神经中枢、肝、肾有严重的危害, 通常以 CCl_4 来建立肝纤维化的模型。二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN), 是一种微发黄的液体, 具有极强的刺激气味, 接触后对肝等器官亦有极大的损害。王立芹等 (2009) 研究发现 CCl_4 对大鼠 (*Rattus norvegicus*) 精巢结构及精子数量有严重的影响, 匡志鹏 (2006) 采用二乙基亚硝胺、 CCl_4 、乙醇联合诱导了小鼠 (*Mus musculus domesticus*) 肝癌, 中间经历肝炎、肝硬化阶段, 建立了较为理想的动物肝癌模型。本实验用 CCl_4 溶液通过腹腔注射作用于小鼠, 并辅助饮用含微量 DEN 的纯净水, 模拟自然中毒方式, 采用低剂量长时间诱导, 探讨这两种化学毒剂对小鼠精巢的损伤作用以及对生殖系统的影响, 进而估计环境中这两种有毒化学物质对生殖系统的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物为雄性昆明鼠, 购于第四军医大学实验动物中心, 体重为 (25 ± 5) g ($n = 24$), 实验期间自由饮水、进食。实验使用的主要试

剂四氯化碳和二乙基亚硝胺购于 Sigma 公司。采用光学显微镜 (OLYMPUS BX50) 和照相机 (Canon PowerShot A650 IS) 观察记录精巢组织结构的变化情况。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组及模型建立 雄性昆明鼠 24 只, 实验前先观察一周, 后随机分为对照组和实验组 2 组, 每组 12 只, 将这两组同条件分笼饲养。在无菌操作台上, 于每周一、四下午给实验组小鼠腹腔注射 15% 的 CCl_4 花生油溶液, 每次剂量按照体重为 8 $\mu\text{l/g}$, 同时每天用 0.07% DEN 溶液 (纯净水配制而成) 喂养实验组小鼠。对照组每周同期两次注射花生油溶液, 剂量与实验组相同, 自由饮用蒸馏水。

1.2.2 睾丸脏器系数的测定 观察小鼠的食量及饮水情况, 每周称量小鼠的体重并观察记录其行为。每组小鼠脱颈椎处死后称其体重, 并迅速取出睾丸, 用电子天平准确称重并记录。计算脏器系数, 睾丸系数 = 睾丸质量 (mg) / 小鼠体重 (g)。

1.2.3 精子的存活率及形态观察 颈椎脱臼处死小鼠后, 立即取出附睾, 用预温的 37 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水冲洗 2 次, 用眼科剪纵向剪开附睾, 置于加有 3 ml 37 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水的试管中, 在恒温箱中

孵育 20 min, 使精子充分游离。取出一定量的精子悬液, 与等体积的伊红迅速充分混匀, 使其染色后, 取出 10 μ l 加入红细胞记数板中, 400 倍光学显微镜下观察精子存活情况, 活细胞被染成红色, 而死细胞为无色(镜下观察为透明)。精子存活率 = [活精子数 / (活精子数 + 死精子数)] \times 100%。统计精子数量并观察不同时间处理组小鼠精子的形态变化。

1.2.4 解剖形态观察与组织切片染色 在用处理第 3、6、8 周分别脱颈椎处死两组小鼠各 4 只并解剖, 之后观察小鼠的精巢形态。用生理盐水反复洗涤组织以除去残留的血液, 迅速剪开并用 10%福尔马林溶液固定 1~2 d。然后进行梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋, 切成 6 μ m 厚的切片。切片进一步经过脱蜡、复水、H.E 染色、脱水、二甲苯透明等, 树脂封片后于显微镜下观察。

1.2.5 统计学分析 数据用 3 个独立样本的平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 来表示, 结果用双样本等方差学生 *t* 检验来分析不同组之间的差异显著性(单尾), 显著水平定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 活体观察

实验组给药第 3 周后, 小鼠食量明显减少, 饮水也相应减少, 体重增加程度明显小于对照

组, 于第 6 周表现出显著差异, 第 8 周表现为极显著差异(表 1)。伴随这些现象, 实验组小鼠出现毛色发黄, 粪便颜色变淡发绿。偶见小鼠睾丸膨胀且局部变大的情况。

2.2 睾丸系数

随着处理时间的延长, 对照组小鼠睾丸系数逐渐增加, 实验组小鼠睾丸系数呈降低趋势, 并且分别在第 6 周和第 8 周, 实验组小鼠的睾丸系数与对照组相比具有显著性和极显著性差异(表 1)。

2.3 精子总数、存活率

处理不同时间后小鼠精子数以及精子存活率见表 2。随着处理时间的延长, 实验组小鼠的精子总数逐渐减少, 精子存活率逐渐降低。与对照组比较, 处理第 6 周和第 8 周精子总数以及存活的精子数均有极显著性差异; 而精子存活率在处理第 3 周差异显著, 第 6 周和第 8 周后差异极显著。

2.4 精子畸形的观察

显微镜下观察, 实验组小鼠精子的头部、体部和尾部均有一定程度的形态变化, 精子出现了双头状、香蕉状、无定形状、肥胖以及双尾、无尾、尾折叠等现象, 这些精子均为畸形的精子, 并随处理时间的延长, 精子畸变程度越显著, 畸形精子的数量也逐渐增加。

表 1 CCl₄ 联合 DEN 处理对小鼠体重和睾丸系数的影响 ($n = 4$)

Table 1 Effect of CCl₄ and DEN on body weight and testicle organ coefficient in mouse

组别 Group	体重 (g) Body weight		睾丸重 (mg) Testis weight		睾丸系数 (mg/g) Testicular coefficient		
	平均值 \pm 标准差	<i>P</i>	平均值 \pm 标准差	<i>P</i>	平均值 \pm 标准差	<i>P</i>	
	Mean \pm SD		Mean \pm SD		Mean \pm SD		
第 3 周 3 rd week	对照组 Control 实验组 Experimental	31.7 \pm 1.77 30.1 \pm 2.21	> 0.05	165.3 \pm 5.55 152.1 \pm 7.91	< 0.05	5.22 \pm 0.15 5.08 \pm 0.12	> 0.05
第 6 周 6 th week	对照组 Control 实验组 Experimental	36.5 \pm 1.21 31.3 \pm 2.89	< 0.05	212.3 \pm 5.96 157.5 \pm 7.92	< 0.01	5.65 \pm 0.19 5.01 \pm 0.22	< 0.05
第 8 周 8 th week	对照组 Control 实验组 Experimental	39.7 \pm 1.20 32.4 \pm 3.12	< 0.01	219.1 \pm 4.88 161.2 \pm 8.88	< 0.01	5.52 \pm 0.05 4.89 \pm 0.24	< 0.01

P 表示 *t* 检验结果的可信度, 显著性与极显著性水平定位 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 。

P indicated credibility of *t* test. Significant and very significant differences are determined by $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

表 2 CCl₄ 联合 DEN 处理对精子存活率的影响Table 2 Effect of CCl₄ and DEN on survival rates of the spermatozoa

组别 Group	精子总数 Total sperm number		存活精子数 Survival sperm number		精子存活率 (%) Sperm viability		
	平均值 ± 标准差 Mean ± SD	<i>P</i>	平均值 ± 标准差 Mean ± SD	<i>P</i>	平均值 ± 标准差 Mean ± SD	<i>P</i>	
	第 3 周 3 rd week	对照组 Control 实验组 Experimental	63.00 ± 6.56 56.00 ± 8.89	> 0.05	58.00 ± 5.57 49.00 ± 9.16	> 0.05	92.0 ± 0.8 87.0 ± 3.1
第 6 周 6 th week	对照组 Control 实验组 Experimental	69.00 ± 8.19 38.00 ± 6.24	< 0.01	62.00 ± 8.00 15.00 ± 9.64	< 0.01	90.0 ± 2.7 38.0 ± 17.8	< 0.01
第 8 周 8 th week	对照组 Control 实验组 Experimental	64.00 ± 8.00 26.00 ± 4.58	< 0.01	60.00 ± 8.02 4.00 ± 4.67	< 0.01	93.0 ± 1.2 17.0 ± 12.7	< 0.01

P 表示 *t* 检验结果的可信度, 显著性与极显著性水平定位 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 。

P indicated credibility of *t* test. Significant and very significant differences are determined by $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

2.5 精巢组织切片染色观察

显微观察发现, 对照组的精巢基膜完整, 生精小管近似圆形, 排列整齐有序。每个生精小管中的生精细胞如精原细胞、初级精母细胞等有层次并紧密整齐排列, 靠近管腔中央, 有许多已成熟的精子 (图 1)。第 3 周实验组小鼠的精巢与对照组基本类似, 基膜较为完整, 生精小管周边有少许破损, 每个生精小管及其内的生精细胞排列都较为紧密。处理 6 周, 实验组小鼠的精巢中生精小管变形, 生精细胞排列疏松, 层次混乱, 有的移入管腔中, 精子数目减少, 且出现畸形精子。处理 8 周, 实验组小鼠的精巢与对照组有很明显的差别, 生精小管严重残缺变形, 管腔为不规则状态, 很难区分相邻的两个生精小管的界限。生精细胞与精子排列散乱, 精子数量减少, 大量变形的精子存在于不成形的管腔中 (图 1)。

3 讨论

生殖系统对有毒物质十分敏感, 经常在其他系统还没有出现反应时, 就已有明显的变化。对小鼠精巢病变的诱导通常使用化学试剂和重金属两种。重金属常有镉 (李新红等 2010)、铅 (李晋等 2011)。化学试剂常有甲醛、苯 (李玲等 2006) 及苯的衍生物, 如甲苯二异氰酸酯 (季宇彬等 2004)、邻苯二甲酸二丁酯等 (白晨等 2011)。文献中罕有用 CCl₄ 诱导精

巢病变的情况。因此本实验用 CCl₄ 辅助 DEN 联合作用, 研究这两种有毒化学药物对小鼠精巢的毒性作用, 发现小鼠精巢有明显的损伤和病理形态改变。对照组小鼠精巢生精小管明晰可见, 生精细胞排列整齐有序, 有大量精子; 而实验组小鼠的精巢中生精小管变形, 生精细胞排列疏松, 层次混乱, 有的移入管腔中, 精子数目减少并出现畸变现象。随着处理时间的延长, 这些病理形态改变也越来越明显, 给药第 8 周小鼠生精小管之间分界不明显, 生精细胞散乱排列, 精子数量已大幅度减少。

给药期间小鼠出现的毛色发黄, 推测是长期注射 CCl₄ 所引起。给小鼠注射药剂 CCl₄ 时, 偶见小鼠睾丸部分膨大, 注射结束之后又恢复原状, 这可能是小鼠的一种应激反应。实验组第 6 周与第 8 周解剖时, 个别小鼠腹腔有少量积液, 推测可能是注射入腹腔没有被吸收的 CCl₄ 溶液或者由肝病变引起的腹水。

CCl₄ 和 DEN 对雄性小鼠的生殖器官均有毒害作用, 处理后其合并作用于睾丸组织, 对睾丸的生长发育及生理活动产生影响, 从而造成睾丸组织的病理性变化。本实验研究表明, 随着 CCl₄ 联合 DEN 处理时间的延长, 这两种有毒化学物质对小鼠生殖器官的毒性也增大, 睾丸系数也变小, 说明小鼠睾丸发生了不同程度的萎缩。

足够的精子数量是维持正常生育力的重要

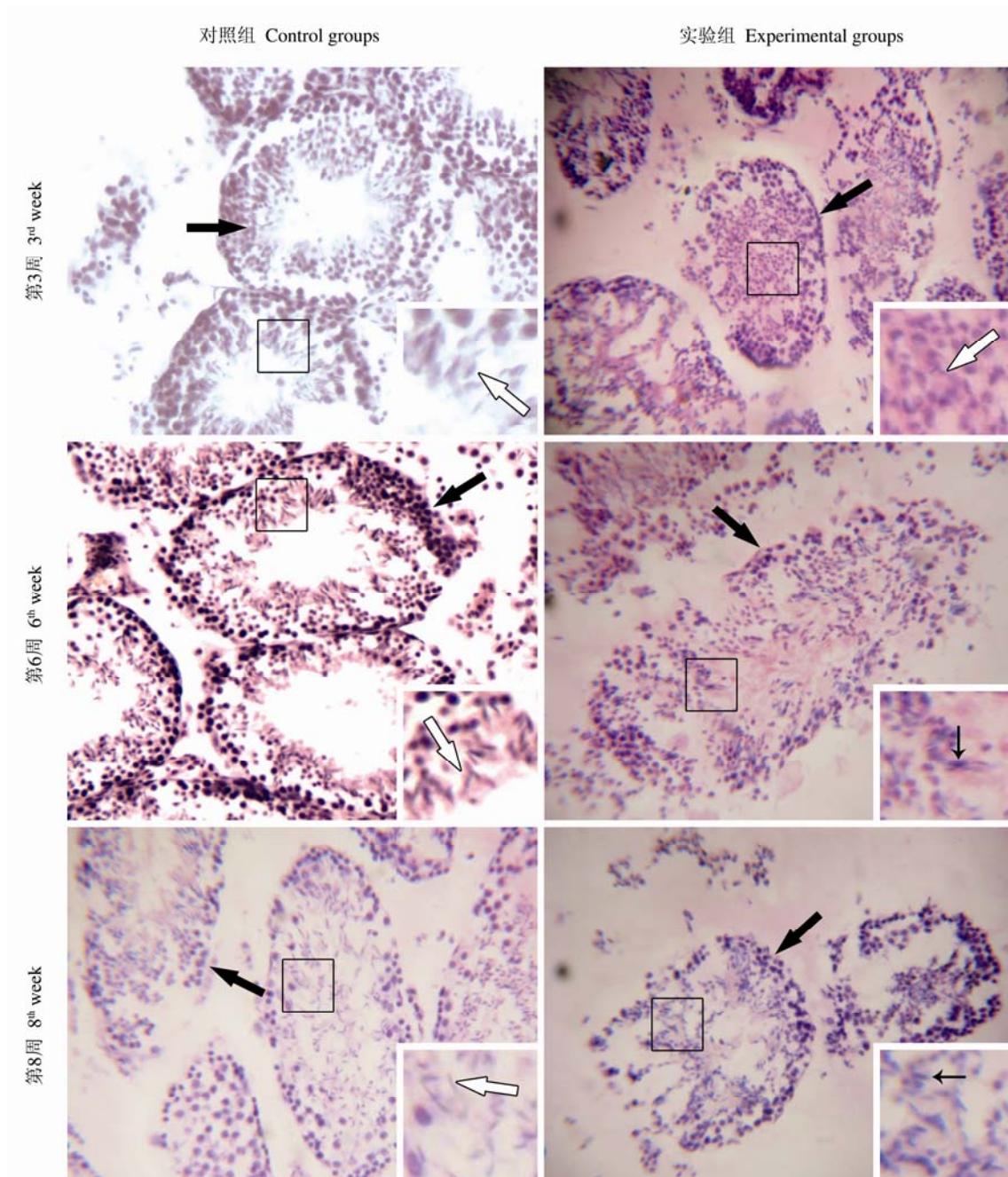


图1 CCl₄联合DEN对小鼠精巢组织的毒性效应(放大倍数:200×)

Fig. 1 The toxicity of CCl₄ and DEN on testis in mice (magnification: 200×)

⇨ 精子细胞; ⇨ 生精细胞; ⇨ 畸形精子。⇨ Spermatid; ⇨ Spermatogenic cell; ⇨ Abnormal sperm.

右下角为生精小管中央所示区域的放大图(放大倍数:600×),以显示正常精子和畸形精子。

The central area identified by foursquare in seminiferous tubule was amplified and put at the bottom right corner of each picture (magnification: 600×), to show the normal sperm and metamorphic sperm.

前提,在评价有害因素对雄性生殖健康的影响时,精子数量的改变比其他指标更为敏感。精子计数是评价生殖毒性效应的重要指标,可反映生精细胞的功能(Chung et al. 2001)。本实验研究发现,经 CCl₄ 辅助 DEN 处理后,随着处理时间的延长,小鼠的精子数量、精子存活率均明显降低,与对照组比较有极显著性差异,表明 CCl₄ 辅助 DEN 能抑制精子的发生,干扰精子的形成和生长过程。

CCl₄ 和 DEN 对小鼠精巢的毒性作用还表现在能够引起精子畸变,表现为精子出现了双头状、香蕉状、无定形状、肥胖以及双尾、无尾、尾折叠等现象。随着处理时间的延长,精子畸变程度越显著,畸形的精子数量也逐渐增加。

生精小管是精子的发源地,性成熟后,生精小管中的生精细胞不断发育成精子,其发育顺序是:精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞、精子,它们是从管壁的基膜向管腔依次排列的。关于小鼠精巢的损伤机理,一般有两种观点。第一种观点是药物诱导小鼠机体产生过量超氧化物自由基而产生的过氧化损伤,破坏生精细胞膜结构,造成线粒体损伤,进而使得精巢细胞间紧密连接解体,破坏血睾屏障(Wang et al. 2012)。另一种观点认为药物影响小鼠体内正常酶代谢平衡,使得 ATP 供应不足,导致能量代谢障碍(季宇彬等 2004)。

本实验通过对小鼠腹腔注射 15% CCl₄ 并辅助饮用 0.07% DEN 溶液使小鼠染毒,证明 CCl₄ 和 DEN 对小鼠有生殖毒性,在损伤其精巢结构的同时减少精子生成量并诱发精子畸变,说明这两种药物可以渗透到小鼠生殖器官中,对精

巢产生毒害。而本实验 CCl₄ 对精巢损伤的机理还不明确,需要进一步的探索研究。

参 考 文 献

- Chung N P, Chung C Y. 2001. Is cadmium chloride-induced inter-Sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable *in vitro* model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? *Endocrinology*, 142(5): 1878-1888.
- Wang H X, Zhou D X, Zheng L R, et al. 2012. Effects of paternal occupation exposure to formaldehyde on reproductive outcomes. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 54(5): 518-524.
- 白晨, 张茨, 杜贤进, 等. 2011. 增塑剂邻苯二甲酸二丁酯致小鼠睾丸组织的病理学改变. *中国组织工程研究与临床康复*, 15(42): 7809-7812.
- 季宇彬, 蒋晖, 郎朗, 等. 2004. TDI 对小鼠睾丸组织能量代谢的影响. *哈尔滨商业大学学报: 自然科学版*, 20(5): 546-548.
- 匡志鹏. 2006. AFP 基因修饰树突状细胞疫苗的构建及对原发性肝癌发生发展阻断的研究. 南宁: 广西医科大学博士学位论文.
- 李晋, 曹枫. 2011. 铅对小鼠睾丸生精细胞凋亡及 Caspase-3, Bcl-2 和 Bax 基因表达的影响. *安徽师范大学学报: 自然科学版*, 34(6): 559-564.
- 李玲, 权铁刚, 于光艳, 等. 2006. 苯和甲醛对雄性小鼠睾丸生殖细胞的联合毒性. *吉林大学学报: 医学版*, 32(4): 609-611.
- 李新红, 翁芝莹, 黎琴, 等. 2010. 镉对小鼠精母细胞凋亡及附睾内精子质量的影响. *应用生态学报*, 21(4): 987-992.
- 王立芹, 季丽莉, 唐源远, 等. 2009. 四氯化碳对成年大鼠睾丸的影响. *新乡医学院学报*, 26(5): 433-437.