

砷对小鼠卵母细胞成熟和体外受精的影响

沈维干¹, 李朝军², 季全兰¹, 贡昌春¹, 荀爱华¹, 陈 兰¹

(1. 扬州大学医学院 江苏 扬州 225001; 2. 南京师范大学 江苏 南京 210097)

摘要: 目的 探讨三氧化二砷(As_2O_3)对小鼠生殖作用的影响。方法 采用小鼠卵母细胞体外培养、体外受精的方法研究 As_2O_3 对卵母细胞成熟和体外受精的影响。结果 As_2O_3 对小鼠卵母细胞生发泡破裂、超排卵的卵母细胞数目没有影响,但可以抑制卵母细胞第一极体的释放,降低体外受精率和卵母细胞的存活率。结论 As_2O_3 可以破坏卵母细胞的成熟、降低卵母细胞的受精能力,对生殖细胞和生育能力有一定的毒性作用。

关键词: 三氧化二砷; 卵母细胞; 生发泡破裂; 第一极体; 体外受精

中图分类号: O612.5; Q492.5 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(1999)06-0327-03

The effect of Arsenic on oocyte maturation and in vitro fertilization in mice oocyte

SHEN Wei-gan¹, LI Chao-jun², JI Quan-lan¹, GONG Chang-chun¹, XUN Ai-hua¹, CHEN Lan¹

(1. Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China; 2. Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: **Objective** To examine whether the arsenic affects the reproduction of mouse. **Method** By using the methods of mouse oocyte culture and in vitro fertilization the effect of arsenic on oocyte maturation and in vitro fertilization (IVF) was studied. **Results** Arsenic could inhibit the extruding of the first polar body, reduce the quality and the viability of oocyte and lower the rate of IVF, but only little impact on the germinal vesicle breakdown (GVBD) and the number of oocytes after induction of ovulation. **Conclusion** The results suggest that arsenic may obstruct oocyte maturation in mice that reduces the fertile ability of oocyte, therefore it is toxic to oocyte and fertility ability in mice.

Key words: Arsenic; Oocyte; Germinal vesicle breakdown; First polar body; In vitro fertilization

砷的化合物广泛分布于自然界,在工业生产过程中,砷以矿尘、烟尘及污水形式进入工作区和生活环境,使得许多矿工、冶炼工、砷污染区内的居民接触过量的砷。接触过量的砷可发生急、慢性砷中毒,皮肤癌,肺癌以及其他内脏肿瘤^[1]。大量实验证明,砷对人的心肌、呼吸、神经、生殖、造血、免疫系统等均有不同程度的损伤^[1,2]。为了全面评价砷的毒性作用,我们采用小鼠在体给药后取出卵母细胞进行体外培养、体外受精以及直接取出卵母细胞进行体外培养的方法^[3,4],研究砷对雌性小鼠的卵母细胞的成熟、减数分裂以及受精能力的影响,探讨砷对小鼠生殖细胞的危害,并研究危害的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养液 培养液为 DMEM (低糖) + BSA (为 Sigma 产品)。体外受精是在 TYH 液中进行。胚胎

细胞培养是在 CZB+谷氨酰胺(为 Sigma 产品)中进行。操作液为 M_2 和 M_2 +次黄嘌呤(用以抑制卵母细胞的自发成熟)。

1.1.2 As_2O_3 , 透明质酸酶, 矿物油 (均为 Sigma 产品), 孕马血清促性腺激素 (PMSG, 天津激素厂), 人绒毛膜促性腺激素 (hCG, 南大制药厂)。

1.1.3 实验动物 为 22 天龄左右的 ICR 小鼠 (购于南京铁道医学院动物中心)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠在体实验和体外受精实验 设立空白对照组和 As_2O_3 不同剂量给药组,连续腹腔注射给药 3 天,每只雌小鼠处死前 (62~65h) 腹腔注射 5IU 的 PMSG 促使卵泡发育,48h 后腹腔注射 hCG 进行超排卵, hCG 作用后 14~17h,一部分按李朝军等^[3]的方法获取卵母细胞进行体外受精,24h 后观察 IVF 的情况,受精率以 2-细胞胚胎数占成熟卵母细胞(排出第一极体)的比例;另一部分用吸卵管将带有大量颗粒细胞的卵母细胞移入含透明质酸酶 (150IU/ml) 的培养液中,室温放置 15min,待颗粒细胞从卵母细胞上脱落下来,用吸卵管反复吹打后将卵母细胞移入 DMEM+BSA 的培养液中立即在倒置显微镜下观察并

收稿日期: 1999-05-22; 修回日期: 1999-06-21

基金项目: 扬州大学医学院青年科研基金资助

作者简介: 沈维干 (1965—), 男, 江苏兴化人, 硕士, 主要研究环境因子等对卵母细胞的减数分裂和受精能力的影响。

记录比较各组卵母细胞的发育情况，接着继续培养，按不同间隔时间观察结果。

1.2.2 卵母细胞的获取和培养 正常小鼠经 PMSG 腹腔注射 48h 后，按李朝军等^[4]的方法取出生发泡完整饱满的卵母细胞置于覆盖有矿物油的 50ml 不同剂量 As₂O₃ 培养液微滴中培养，分别与培养 8h 时观察各组的卵母细胞生发泡破裂（GVBD）率，24h 时观察各组第一极体释放率和卵母细胞存活率。以 GVBD 作为减数分裂启动的标志，第一极体释放为第 1 次减数分裂完成的标志。

以上所有的细胞培养均是在 37℃，5%CO₂，湿度饱和的 CO₂ 培养箱中进行。

2 结果

表 1 腹腔注射 As₂O₃ 对卵母细胞的影响

Table1 The effect of administration of As₂O₃ into abdomen on mouse oocyte

剂 量 (mg/kg)	间隔时间 (h)	超排卵母细胞数 ($\bar{x} \pm s$)	总卵母细胞数 (个)	GVBD 率 (%)	第一极体释放率 (%)	卵母细胞存活率 (%)
0 0	0	39.17±2.64	122	100 (122/122)	45.1 (55/122)	95.9 (117/122)
	24	39.17±2.64	127	100 (127/127)	73.6 (93/127)	85.8 (109/127)
	48	39.17±2.64	113	100 (113/113)	76.1 (86/113)	67.3 (76/113)
	72	39.17±2.64	113	100 (113/113)	76.1 (86/113)	56.6 (64/113)
1 0	0	37.50±1.91 ^①	113	99.1 (112/113)	19.5 (22/113) ^③	71.7 (81/113) ^③
	24	37.50±1.91 ^①	111	100 (111/111) ^②	18.9 (21/111) ^③	52.3 (58/111) ^③
	48	37.50±1.91 ^①	116	100 (116/116) ^②	21.6 (25/116) ^③	47.4 (55/116) ^④
	72	37.50±1.91 ^①	116	100 (116/116) ^②	29.3 (34/116) ^③	29.3 (34/116) ^③
3 0	0	38.83±1.94 ^①	133	100 (133/133)	18.8 (25/133) ^③	63.9 (85/133) ^③
	24	38.83±1.94 ^①	134	100 (134/134) ^②	19.4 (26/134) ^③	53.7 (72/134) ^③
	48	38.83±1.94 ^①	125	100 (125/125) ^②	19.2 (24/125) ^③	48.8 (61/125) ^④
	72	38.83±1.94 ^①	127	100 (127/127) ^②	29.1 (37/127) ^③	28.3 (36/127) ^③

注：GVBD 率是 GVBD 的卵母细胞数占总卵母细胞数的比例；第一极体释放率是释放第一极体的卵母细胞数占总卵母细胞数的比例。

①与对照组相比经 *t* 检验差异无显著意义 ($P>0.05$)。②经 χ^2 检验与对照组相比差异无显著意义 ($P>0.05$)。③与对照组相比经 χ^2 检验差异有极显著意义 ($P<0.01$)。④与对照组相比经 χ^2 检验差异有显著意义 ($P<0.05$)。

2.2 砷对卵母细胞体外受精（IVF）的影响

有极显著性意义的下降 ($P<0.01$)。

实验结果见表 2。实验组的 IVF 率与对照组相比

表 2 As₂O₃ 对小鼠卵母细胞 IVF 的影响

Table 2 The effect of As₂O₃ on in vitro fertilization of mouse oocyte

剂 量 (mg/kg)	受精时间 (h)	2-细胞胚胎率 (%)	3-细胞以上胚胎率 (%)	总受精率 (%)
0 0	24	74.1 (40/54)	0	74.1
	48	20.4 (11/54)	53.7 (29/54)	74.1
	72	9.3 (5/54)	64.8 (35/54)	74.1
1 0	24	16.2 (12/74)	0	16.2 ^①
	48	10.8 (8/74)	17.6 (13/74)	28.4 ^①
	72	6.8 (5/74)	31.1 (23/74)	37.8 ^①
3 0	24	7.1 (7/99)	0	7.1 ^①
	48	2.0 (2/99)	26.3 (26/99)	28.3 ^①
	72	3.0 (3/99)	26.3 (26/99)	29.3 ^①

①与对照组相比经 χ^2 检验差异有极显著意义 ($P<0.01$)。

2.3 砷对体外培养卵母细胞的影响

实验结果见表 3。实验组与对照组相比 GVBD 率

没有显著影响 ($P>0.05$), 但第一极体释放率和卵母细胞的存活率均有极显著性下降 ($P<0.01$), 与上述

结果完全吻合。

表3 As_2O_3 对体外培养卵母细胞的影响

Table 3 The effect of As_2O_3 on in vitro cultured of mouse oocyte

剂量 ($\mu\text{g/L}$)	总卵母细胞数 (个)	GVBD		第一极体释放		卵母细胞存活	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
0	70	69	98.57	49	70.00	60	85.71
30.0	77	74	96.10 ^①	23	29.87 ^②	39	50.64 ^②
60.0	71	68	95.77 ^①	17	23.94 ^②	30	42.25 ^①

①与同一时间的对照组相比经 χ^2 检验差异无显著意义 ($P>0.05$)。

②与对照组相比经 χ^2 检验差异有极显著性意义 ($P<0.01$)。

3 讨论

近年来, 有关砷化合物对生物大分子合成和代谢、对基因扩增和表达以及对DNA损伤和修复等影响效应的研究不断深入, 结果显示, 砷化合物在极低浓度下可促进DNA的合成和损伤的修复, 在高浓度下可以抑制DNA的合成和损伤的修复; 砷化合物可以抑制RNA的合成, 抑制细胞骨架蛋白的合成和促进金属硫蛋白的合成, 还可以诱发基因扩增(可能与体内癌基因扩增有关); 无机砷化合物是有效的热休克蛋白诱导物。因此, 有人提出砷可能是一种必需微量元素^[1,2]。一些实验还证实, As_2O_3 对大鼠肢芽细胞的增殖和分化有明显的抑制作用, 并提出砷属于强致畸物^[5,6]。我们通过给小鼠卵母细胞体外培养、体外受精的方法, 研究了其对小鼠卵母细胞的危害。结果证明, As_2O_3 对卵母细胞的GVBD、超排卵的卵母细胞数目无影响, 但可以抑制第一极体的释放, 并可降低IVF率, 同时在使用组中的所有卵母细胞的细胞质中颗粒增多且分布不均匀。 As_2O_3 对卵母细胞的第一极体释放的抑制作用一方面可能是由于其对体内重要代谢的含巯基的酶和磷酸脂酶作用, 使酶失活, 影响细胞的正常代谢和细胞的染色体, 使细胞分裂发生障碍^[1]; 另一方面可能是由于其抑制了细胞中骨架蛋白的合成^[2], 导致纺锤体、有丝分裂器不能正常形成和移动, 细胞分裂无法正常进行; 同时, 也可能由于其对微丝等细胞骨架的影响, 导致胞质分裂无法正常进行, 第一极体不能形成, 不能进入第二次

减数分裂, 精子和卵细胞不能正常受精, 从而导致IVF率下降。正常超排的卵母细胞在含有 As_2O_3 的培养液中培养时, 也能明显地抑制第一极体的释放, 这进一步证实了上述推论。此外, As_2O_3 可以显著地引起卵母细胞的存活率下降。说明 As_2O_3 对卵母细胞的细胞毒性作用明显且作用机制复杂。本研究显示, 砷可以破坏或抑制卵母细胞的成熟和减数分裂过程, 降低卵母细胞的受精能力和存活率, 提示育龄妇女接触砷及其化合物会导致生育能力降低甚至造成不育或不孕。

随着工业的不断发展, 人们从污染源、工厂排出的废气、香烟烟雾中接触砷污染的机会越来越多, 研究砷对生殖细胞的影响, 可以为优生及临床上一些不明原因的流产及不孕症的病因研究提供理论和实验依据。

参考文献:

- [1] 王夔. 生命科学中的微量元素(下卷)[M]. 北京: 中国计量出版社, 1992. 147~173.
- [2] 孟紫强. 砷的分子毒理学研究进展[J]. 中国公共卫生, 1998, 14(9): 570~573.
- [3] 李朝军, 王斌, 范必勤, 等. 小鼠腔前卵泡卵母细胞的体外培养、体外成熟和体外受精研究[J]. 南京大学学报(自然科学版), 1997, 33(2): 265~272.
- [4] 李朝军, 王斌, 范必勤. 腺嘌呤对体外小鼠卵母细胞减数分裂的抑制[J]. 实验生物学报, 1994, 27(4): 457~462.
- [5] 李勇, 朱惠刚, 孔佩艳. 砷对大鼠肢芽细胞增殖和分化的影响[J]. 卫生研究, 1998, 27(3): 161~163.
- [6] 李勇, 姚华, 孙桦龄, 等. 三氧化二砷对体外培养胚胎的发育毒性实验研究[J]. 中国地方病学杂志, 1996, 15(2): 93.