

# 丙烯腈对雄性小鼠生殖细胞作用的研究

李芝兰, 张 煦\*, 党瑜慧, 李大盛, 刘 景

(兰州医学院公共卫生学系, 甘肃 兰州 730000)

**摘要:** 目的 探讨丙烯腈对雄性小鼠生殖细胞的毒性作用。方法 将 40 只昆明种雄性小鼠随机分成 5 组, 阴性对照组 (生理盐水 0.1 ml/10g)、低剂量组 (丙烯腈 2 mg/kg)、中剂量组 (丙烯腈 4 mg/kg)、高剂量组 (丙烯腈 8 mg/kg) 和阳性对照组 (环磷酰胺 20 mg/kg)。每天皮下注射 1 次, 连续 5 天。实验结束后处死动物, 取材, 做初级精母细胞染色体畸变分析及精子畸形试验。结果 皮下注射丙烯腈 2 mg/kg, 4 mg/kg 和 8 mg/kg 组小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变率、细胞畸变率及精子畸形率均显著高于阴性对照组。结论 丙烯腈对雄性小鼠的生殖细胞有致突变效应, 并对精子的生成有毒害作用。

**关键词:** 丙烯腈 (AN); 生殖细胞损伤; 初级精母细胞; 染色体畸变; 精子畸形; 小鼠

中图分类号: O623.761 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2002)04-0193-03

## Studies on the effects of acrylonitrile on germ cells in male mice

LI Zhi-lan, ZHANG Xun, DANG Yu-hui, LI Da-sheng, LIU Jing

(Department of Public Health, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** **Objective** To study the effects of acrylonitrile (AN) on germ cells in male mice. **Methods** Forty male mice of Kunming strain were divided randomly into five groups i. e., negative control group treated with normal saline 0.1 ml/10g of body weight, low-dose group with 2 mg/kg of AN, medium-dose group with 4 mg/kg of AN, high-dose group with 8 mg/kg of AN and positive control group with 20 mg/kg of cytoxan by subcutaneous injection once daily for five days. Then, the animals were killed and their bio-specimens were collected and the chromosome aberration of primary spermatocyte and sperm deformity test were performed for them. **Results** The rates of chromosome aberration of primary spermatocyte, cell deformity and sperm deformity were significantly higher in the animals treated with 2 mg/kg, 4 mg/kg and 8 mg/kg of AN by subcutaneous injection than those with negative controls. **Conclusions** Acrylonitrile could have mutagenic effects in male mice, which was hazardous and toxic to their spermatogenesis.

**Key words:** Acrylonitrile; Impairment of germ cells; Primary spermatocyte; Chromosome aberration; Sperm deformity; Mice

据职业流行病学调查, 丙烯腈 (AN) 作业男工妻子的自然流产和子代先天缺陷发生率都显著高于对照组<sup>[1,2]</sup>, 这提示 AN 对男工生殖细胞具有一定的损伤作用。为探讨其致生殖细胞损伤作用, 我们进行了本实验。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及毒物

实验动物为兰州医学院实验动物中心提供的成年健康昆明种雄性小鼠 40 只, 平均体质量为 (36.06 ± 4.40) g。染毒用丙烯腈系兰州化学工业公司生产, 纯度在 99.5% 以上。

### 1.2 方法及步骤

依体质量随机分为阴性对照组 (生理盐水 0.1 ml/10g), 低剂量组 (AN 2 mg/kg), 中剂量组 (AN 4 mg/kg), 高剂量组 (AN 8 mg/kg) 和阳性对照组 (环磷酰胺 20 mg/kg) 5 组, 每组 8 只动物。皮下注射, 每天 1 次, 连续 5 天。第 13 天处死动物, 取材, 作指标观察。

**1.2.1 AN 对初级精母细胞染色体影响** 按文献介绍的初级精母细胞染色体制备法制片<sup>[3]</sup>。取一侧睾丸, 2.2% 柠檬酸三钠中等渗分离出曲细精管, 0.4% KCl 低渗 20 min, 固定液 (乙醇冰醋酸 3:1) 固定 20 min, 60% 醋酸溶解, 60 °C 载玻片上滴片, 干燥, 10% Giemsa 染色 40 min, 油镜下观察。盲法读片, 每只动物观察初级精母细胞中期分裂相 100 个, 分别统计常染色体的缺失、断裂 (片)、分离、单价体、三价体、四价体及性染色体的分离、缺失, 计算细胞畸变率和染色体畸变率 [细胞畸变率 (%) = (有染色

\* 兰医病理解剖教研室

收稿日期: 2001-11-14; 修回日期: 2002-02-05

作者简介: 李芝兰 (1962-), 女, 甘肃陇西人, 学士, 副教授, 从事劳动卫生与职业病教学与科研工作, 研究方向: 工业毒物的生殖毒性研究。

体畸变的细胞数/分析染色体的细胞总数)  $\times 100\%$ , 染色体畸变率(%) = (染色体畸变总数/分析染色体的总数)  $\times 100\%$ 。

1. 2. 2 AN 对精子形态的影响 取小鼠双侧附睾, 置于 2 ml 生理盐水中剪碎, 4 层拭镜纸过滤, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 加少许生理盐水混匀后涂片, 自然干燥, 甲醇固定, 2% 的伊红染色 1 h, 盲法读片。在高倍镜下, 每只动物计数轮廓清楚、分散良好的精子 1 000 条, 分别记录和统计。畸形精子形态判定参照文献中的精子分类计数标准<sup>[3]</sup>。

1. 2. 3 睾丸指数, 组织形态的观察 小鼠先称体质量, 处死后迅速取出双侧睾丸称质量 [睾丸指数 = 睾丸质量 (mg) / 小鼠体质量 (g)  $\times 10$ ]。留取一侧睾丸, 固定于 10% 甲醛溶液中, 常规脱水, 石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜下观察。

## 2 实验结果

### 2. 1 睾丸初级精母细胞染色体畸变和细胞畸变

由表 1 可见, 不同剂量 AN 染毒组和环磷酰胺组小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变率分别达 0.83%、1.26%、1.54%、1.71%, 均较阴性对照组初级精母细胞染色体畸变率 0.34% 高, 经统计学检验, 其差异均具有高度显著性 ( $P < 0.01$ )。进一步分析染色

表 1 皮下注射 AN 小鼠初级精母细胞染色体畸变率及细胞畸变率的比较

| 组别   | 剂量<br>(mg/kg) | 细胞数<br>(个) | 染色体畸变 |        | 细胞畸变 |         |
|------|---------------|------------|-------|--------|------|---------|
|      |               |            | 数     | %      | 数    | %       |
| 生理盐水 | —             | 700        | 47    | 0.34   | 47   | 6.71    |
| AN   | 2             | 700        | 116   | 0.83 * | 114  | 16.29 * |
| AN   | 4             | 800        | 202   | 1.26 * | 198  | 24.75 * |
| AN   | 8             | 700        | 216   | 1.54 * | 207  | 29.57 * |
| 环磷酰胺 | —             | 800        | 274   | 1.71 * | 259  | 32.38 * |

\* 与生理盐水组比较,  $P < 0.01$ , 下表同。

体畸变的类型, AN 染毒组及环磷酰胺组均突出地表现为常染色体的缺失, 其所占的比例明显增高。常染色体缺失的构成比分别为: 生理盐水组 21.28%, 2 mg/kg AN 组 54.31%, 4 mg/kg AN 组 44.55%, 8 mg/kg AN 组 51.85%, 环磷酰胺组 58.03%。各实验组细胞的畸变率均明显高于生理盐水组 6.71%, 经统计学检验, 有高度显著性差异 ( $P < 0.01$ )。AN 剂量与染色体畸变率及细胞畸变率间的相关分析可见, 随着 AN 剂量的增大, 初级精母细胞染色体畸变率升高 ( $r = 0.9543$ ), 细胞畸变率也升高 ( $r = 0.9474$ ), 均呈现一定的正相关。

### 2. 2 精子畸变

表 2 皮下注射 AN 小鼠精子畸形率的比较

| 组别   | 剂量<br>(mg/kg) | 观察细胞数<br>(个) | 精子畸形分类数 (个) |     |     |     |    | 畸形精子<br>总数 (个) | 畸形率<br>% |
|------|---------------|--------------|-------------|-----|-----|-----|----|----------------|----------|
|      |               |              | 无定形         | 无钩  | 香蕉型 | 尾折迭 | 双尾 |                |          |
| 生理盐水 | —             | 7 000        | 63          | 22  | 23  | 6   | 0  | 114            | 1.63     |
| AN   | 2             | 7 000        | 194         | 26  | 22  | 0   | 0  | 242            | 3.46 *   |
| AN   | 4             | 8 000        | 194         | 137 | 49  | 45  | 2  | 427            | 5.34 *   |
| AN   | 8             | 7 000        | 241         | 126 | 112 | 47  | 2  | 528            | 7.54 *   |
| 环磷酰胺 | —             | 8 000        | 215         | 148 | 35  | 15  | 0  | 413            | 5.16 *   |

由表 2 可见, 不同剂量 AN 染毒组和环磷酰胺组小鼠精子畸形率分别为 3.46%、5.34%、7.54% 和 5.16%, 均高于生理盐水组精子畸形率 1.63%, 经统计学检验, 差异高度显著 ( $P < 0.01$ ), 并随着 AN 剂量的增加, 精子畸形率也增高, 呈一定的正相关 ( $r = 0.9868$ ,  $P < 0.05$ )。

### 2. 3 睾丸指数及组织形态学改变

由表 3 可见, 睾丸指数随着 AN 剂量的增加, 有上升趋势, 但差异无显著性。各实验组睾丸组织在光镜下观察未见有意义的病理改变, 各组间无差异。

表 3 皮下注射 AN 小鼠睾丸指数变化

| 组别   | 剂量 (mg/kg) | 动物数 (只) | 睾丸指数 ( $\bar{x} \pm s$ ) |
|------|------------|---------|--------------------------|
| 生理盐水 | —          | 7       | 55.77 $\pm$ 3.25         |
| AN   | 2          | 7       | 56.87 $\pm$ 7.13         |
| AN   | 4          | 8       | 58.05 $\pm$ 5.44         |
| AN   | 8          | 7       | 59.25 $\pm$ 5.93         |
| 环磷酰胺 | —          | 8       | 61.86 $\pm$ 9.09         |

## 3 讨论

AN 对雄性动物精子形态影响和对男工的生殖流行病学调查已有报道, 但 AN 对动物睾丸生殖细胞染色体有无损伤, 尚未见报告。本次实验发现, 小鼠皮下注射一定剂量 AN 后睾丸初级精母细胞染色体畸变

率和细胞畸变率均增高。AN 对初级精母细胞染色体的影响, 主要引起以常染色体缺失为主的畸变, 其畸变率高达 0.83%~1.54%, 显著高于阴性对照组, 且细胞畸变率也显著高于阴性对照组。提示 AN 可通过损伤染色体引起致突变效应。

精子形态的观察可客观地判断物质的生殖毒性。本次实验结果, 精子畸形率显著高于阴性对照组, 这与以往的研究结果基本一致<sup>[4]</sup>, 支持 AN 对小鼠精子的生成有毒害作用的观点。

一般认为某些化学因子引起生殖细胞突变后可引起不育、半不育、流产、死胎、先天性畸形和肿瘤<sup>[3]</sup>。如果在生殖细胞成熟的减数分裂过程中发生染色体异常, 形成异常的精子或卵细胞, 受精后能发育成不正常的个体(畸形儿), 甚至导致流产或死胎<sup>[5]</sup>。男子精子数减少或畸形精子数增多与妻子流产有关<sup>[3]</sup>。因此 AN 作业男工妻子的死胎、死产、新生儿出生缺陷和自然流产的相对危险度增高<sup>[2]</sup>, 很可能与 AN 对男性生殖细胞有致突变效应和 AN 对精子生成有毒害作用有关。

本次实验中观察到 AN 对小鼠的体质量影响不明

显。尽管 AN 染毒后, 随着染毒剂量的增大, 睾丸指数呈上升趋势, 但其变化与对照组的差异尚无统计学意义。结合睾丸组织形态学观察未见有意义的病理改变的事实, 我们考虑可能与染毒时间较短等有关。

1991 年, 世界卫生组织召开的国际环境对生殖健康影响研讨会上, 曾提出生殖系统对环境有害因素特别敏感<sup>[6]</sup>, 毒物在不引起机体其他系统损害时, 就可引起生殖损伤。本次实验研究结果, 为进一步加强作业人员劳动保护提供了科学依据。

#### 参考文献:

- [1] 董定龙. 接触丙烯腈作业工人生殖机能的流行病学调查 [A]. 第六次全国劳动卫生与职业病学术会议论文汇编 [C]. 大连: 中华预防医学会, 1998, 266-297.
- [2] 吴惟德, 苏江, 黄美媛, 等. 接触丙烯腈男工的生殖流行病学调查 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1994, 2 (5): 261-263.
- [3] 黄幸珍, 陈星若. 环境化学致突变、致畸、致癌试验方法 [M]. 杭州: 浙江科技出版社, 1985, 249-271.
- [4] 王振全, 李芝兰, 肖卫. 丙烯腈对小鼠精子致畸的研究 [J]. 兰州医学院学报, 1995, 21 (3): 130-131.
- [5] 严仁英. 实用优生学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986, 35.
- [6] 王蓀兰. 劳动卫生学 (第 3 版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993, 198.

## ·病例报告·

### 苯致白血病 1 例报道

冯玉妹<sup>1</sup>, 张顺荣<sup>1</sup>, 罗子燕<sup>1</sup>, 何 芳<sup>2</sup>, 李光浩<sup>3</sup>

(1. 上海市杨浦区中心医院职业病科, 200090; 2. 云南省职业病防治所; 3. 吉林市职业病医院)

#### 1 病史摘要

患者, 男, 49 岁, 1999 年 2 月因牙痛、发热、乏力到医院就诊。发现白细胞高达  $41.2 \times 10^9/L$ , 给予头孢噻肟治疗 2 天, 体温恢复正常, 牙痛消失, 复查白细胞  $40.0 \times 10^9/L$ 。1 周后作骨髓检查, 提示慢性粒细胞白血病, 同时予羟基脲 1 g tid po。2 个月后病情缓解, 白细胞数达正常范围。为明确慢性粒细胞白血病与职业是否有关, 由内科转入职业病科。

既往史: 身体健康, 历年体检白细胞在正常范围。最近一次白细胞检查时间是 1995 年, 白细胞为  $5.8 \times 10^9/L$ 。体检: T 36.8℃, P 80 次/分, R 20 次/分, BP 130/90 mmHg (17.3/12.0 kPa)。意识清, 步入病房, 发育营养中等, 无贫血貌, 全身皮肤无出血, 左颌下淋巴结  $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ , 质中, 光滑, 无压痛, 可活动, 其余浅表淋巴结无肿大。瞳孔等大, 对光反射存在。咽不充血, 扁桃体不肿大, 甲状腺不肿大, 呼吸音清。心律齐, 心率 80 次/分, 未闻及病理性杂音。腹软, 无压痛, 肝脾肋下未及。肾区无叩痛。膝反射存在, 病理反射未引出。

#### 2 劳动条件

患者自 1968 年从事喷漆工作, 工龄 31 年, 接触硝基漆, 溶剂为香蕉水、二甲苯。每天工作 6~8 小时, 无防护设备, 同工种无苯中毒发生, 空测浓度不详。据查 70 年代前香蕉水含苯约 40%。70~90 年代油漆稀释剂以甲苯、二甲苯为主, 含有少量苯。

#### 3 讨论

苯致白血病国外早有报道, 国内近年来也时有报道, RAIC 已明确苯为致癌物, 我国颁布的职业病名单中也将苯致白血病列为职业病。但在个案诊断时以往有二种不同的观点, 临床工作者一般认为苯致白血病常见有白细胞减少, 随后发展为再生障碍性贫血和/或骨髓增生异常综合征, 最后导致白血病, 而职业流行病学工作者认为, 只要接触苯, 经过一定的潜伏期后发生白血病者即可认定为苯致白血病, 其间不一定有慢性苯中毒的发展过程。经过多年的临床实践及大量的流行病学调查结果, 作者认为上述二种观点都是可取的。结合本例患者长达 31 年的苯接触工龄, 我们认为患者的白血病与苯有关。