

混合染毒双酚 A、壬基酚对小鼠生育力的影响

王薛君, 李海山, 张玉敏, 崔金山

(沈阳医学院毒理教研室, 辽宁 沈阳 110034)

摘要: 目的 研究经口混合染毒双酚 A (BPA) 和壬基酚 (NP) 对小鼠的生殖和发育毒性。方法 选择性成熟、清洁级、体重在 22~26 g 的昆明种小鼠 128 只, 随机区组分为 (1) BPA 24 mg/kg+NP 12 mg/kg, (2) BPA 60mg/kg+NP 30 mg/kg, (3) BPA 120 mg/kg+NP 60 mg/kg 染毒组和阴性对照组, 每组每性别 16 只小鼠, 按 10 ml/kg 灌胃染毒, 1 次/d, 雄鼠连续染毒 6 周, 雌鼠从交配前 15 d 染毒至妊娠第 6 天结束。按 EPA 推荐的小鼠生育力测试方法进行实验研究。结果 从 BPA 24 mg/kg+NP 12mg/kg 组始生育指数、妊娠率、活胎率随染毒剂量增加而下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而着床前死亡率、吸收胎率、死胎率随剂量增加而升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 从 BPA 60 mg/kg+NP 30 mg/kg 组始精子计数、活精率随染毒剂量增加而下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 精子畸形率随剂量增加而升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而交配指数、平均胎长、平均胎重仅在 BPA 120 mg/kg+NP 60 mg/kg 组显著低于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 经口较长时间混合染毒 BPA 和 NP 会对小鼠产生明显的生殖毒作用和胚胎发育毒性。

关键词: 双酚 A; 壬基酚; 小鼠; 生殖毒性; 胚胎发育毒性

中图分类号: R394.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)03-0147-03

Combined effects of mixture of bisphenol A and nonylphenol on fertility in mice

WANG Xue-jun, LI Hai-shan, ZHANG Yu-min, CUI Jin-shan

(Department of Toxicology, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China)

Abstract Objective To study the effects of oral exposure to mixture of bisphenol A (BPA) and nonylphenol (NP) on reproductive and developmental toxicities in mice. **Method** One hundred and twenty-eight sexual mature KM mice weighed 22~26 grams were randomly divided into a negative control group and three groups exposed to varied doses of BPA and NP (BPA 24 mg/kg plus NP 12 mg/kg, BPA 60 mg/kg plus NP 30 mg/kg, and BPA 120 mg/kg plus NP 60 mg/kg, respectively), with 16 male and 16 female mice in each group. BPA and NP were administered by gavage with 10 ml/kg daily for six weeks in male mice and from 15 days before mating to sixth day after conception in female mice. Fertility test was performed in accordance with the procedure recommended by the Environmental Protection Agency (EPA) in the United States. **Result** Fertility index, conception rate and rate of live fetus decreased with the increase in dose of exposure to BPA and NP ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and death rate before implantation, rate of fetal resorption and rate of fetal death increased with the increase in exposure dose ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Count of sperm and sperm vitality decreased with the increase of exposure dose ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and rate of sperm deformity increased with the increase in exposure dose ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). However, mating index, length of fetus and fetal weight significantly decreased in mice exposed to BPA 120 mg/kg plus NP 60 mg/kg ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), as compared with those in control mice. **Conclusion** Oral exposure to mixture of BPA and NP for a long time could cause markedly reproductive and embryodevelopmental toxicity in mice.

Key words: Bisphenol A; Nonylphenol; Mice; Reproductive toxicity; Embryodevelopmental toxicity

双酚 A (Bisphenol A, BPA) 和壬基酚 (Nonylphenol, NP) 均为环境雌激素类化学物, 具有一定的生殖和发育毒性^[1-9]。BPA 主要用于塑料工业的原料。NP 作为离子表面活性剂, 广泛用于塑料、橡胶、纺织、印刷、造纸及洗涤剂等行业, 通过工业废水污染生态环境。关于二者生殖和发育毒性资料均为单一染毒的资料。为真实反映二者在环境中共存对人类生育力可能造成的损害作用, 本研究在同一时期, 应用同批动物在相同条件下同时进行了单一染

毒双酚 A、壬基酚, 混合染毒双酚 A、壬基酚, 并应用联合系数法对其是否产生联合毒作用及其类型进行了系统研究, 限于文章篇幅, 对上述研究结果分别进行单独报道。本文将混合染毒双酚 A、壬基酚对小鼠生育力的影响报道如下。

1 材料与方法

1.1 受试化学物

BPA 为上海市试剂一厂提供的分析纯试剂, NP 由大庆石油公司生产, 纯度为 98.39%, 相对密度 0.948 8, 为淡黄色油状液体。溶剂为青岛嘉里植物油公司生产的金龙鱼牌试剂用花生油。

收稿日期: 2004-09-27; 修回日期: 2004-11-24

作者简介: 王薛君 (1959-), 女, 研究方向: 生殖毒理学。

1.2 实验动物及分组

选择健康、清洁级性成熟、体重 22~26 g 昆明种小鼠 128 只,雌雄各半,由沈阳医学院实验动物中心提供。随机区组分为溶剂对照、BPA 24 mg/kg+NP 12 mg/kg (低)、BPA 60mg/kg+NP 30 mg/kg (中)和 BPA 120mg/kg+NP 60 mg/kg (高)染毒组。每组雌雄小鼠各 16 只。

1.3 实验动物处置与测定指标

参照 FDA 方法^[7],雄性小鼠于交配前 4 周开始染毒至交配 2 周末染毒结束。雌性小鼠于交配前 15 d 开始染毒至妊娠第 6 天结束。按 10 ml/kg 容积灌胃染毒,对照组给等容积花生油 1 次/d。实验期间每天观察小鼠中毒症状,每周称体重 1 次。雄雌鼠按 1:1 合笼,交配 2 周,于每晨 8:00 检查阴栓,查到阴栓日定为妊娠 0 天。母鼠从妊娠 0 天开始每 3 天称体重 1 次,观察体重变化,并于妊娠第 15 天脱颈椎处死。剖腹检查:黄体数、着床数(用 10% 硫化胺溶液染色 20 min 观察着床腺数)、活胎数、死胎数、吸收胎数并测定胎重、胎盘重及胎长;计算交配指数(检出阴栓的雌鼠数/合笼的雄鼠数×100%)、生育指数(妊娠雌鼠数/合笼的雌鼠数×100%)、妊娠率(妊娠雌鼠数/检出阴栓雌鼠数×100%)、着床前死亡率[(黄体数-着床数)/黄体数×100%]、吸收胎率、死胎率、活胎率、平均每窝活胎数、平均胎长、胎重、胎盘重。交配后于末次染毒当天脱颈椎随机处死 8 只雄鼠,按黄勤和李龙方法^[8,9],计数附睾精子数、活精率和精子畸形率。整个实验期间小鼠自由饮水和进食,喂饲全营养饲料,饲养室温度 20~23℃,相对湿度 45%~55%。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 10.0 版软件进行统计分析,计数资料进行 χ^2 检验,计量资料进行 *F* 检验和 *q* 检验,并进

行直线相关分析。

2 结果

2.1 一般症状及体重变化

染毒期间高剂量组部分小鼠灌胃后数分钟出现管状尾、跳跃、奔跑等兴奋症状,继之汗液分泌增加,背毛变湿,染毒 20~30 min 后,上述症状逐渐消失,中、低剂量组未发现上述症状。在染毒期间雌雄小鼠均生长发育良好,体重持续增长,各染毒组体重与溶剂对照相比差异均无显著性 ($P>0.05$)。

2.2 混合染毒 BPA、NP 对小鼠生精功能的影响

从表 1 可见精子计数随染毒剂量增加而下降,呈明确的剂量-反应关系 ($r=-0.584, P<0.05$)。

表 1 混合染毒 BPA、NP 对小鼠生精功能影响结果 (n=8)

组别	精子计数 (10 ⁸ /g 附睾)	活精率测定			精子畸形率测定		
		观察	活精	活精	计数	畸形	畸形
		精子数	子数	率(%)	精子数	精子数	率(%)
对照组	6.246±1.821	1 600	1 413	88.3	8 000	121	1.51
低剂量组	6.344±1.101	1 600	1 350	84.4	8 000	130	1.62
中剂量组	5.369±1.476	1 600	1 139	71.2 *	8 000	166	2.08 *
高剂量组	4.169±1.247	1 600	1 035	64.7 **	8 000	224	2.77 **

与对照组比较 * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 下表同。

2.3 混合染毒 BPA、NP 对小鼠生育力影响的结果 (见表 2)

表 2 混合染毒 BPA、NP 对小鼠生育力影响的结果

组别	合笼雄鼠	合笼雌鼠	检出阴栓雌鼠	妊娠雌鼠数	交配指数 (%)	生育指数 (%)	妊娠率 (%)
对照组	16	16	15	15	93.8 (15/16)	93.8 (15/16)	100.0 (15/15)
低剂量组	16	16	14	12	87.5 (14/16)	75.0 (12/16) *	85.7 (12/14)
中剂量组	16	16	14	10	87.5 (14/16)	62.5 (10/16) **	71.4(10/14) **
高剂量组	16	16	12	6	75.0 (12/16) *	37.5 (6/16) **	50.0 (6/12) **

2.4 混合染毒 BPA、NP 对小鼠早期胚胎发育的影响 (见表 3)

表 3 混合染毒 BPA、NP 对小鼠早期胚胎发育的影响测定结果

组别	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 (%)
对照组	162	157	136	16	3	3.1(5/162)	86.6(136/157)	10.2(16/157)	1.9(3/157)
低剂量组	125	114	84	21	9	8.8(11/125) *	73.7(84/114) *	18.4(21/114) *	7.9(9/114) *
中剂量组	105	89	45	30	14	15.2(16/105) **	50.6(45/89) **	33.7(30/89) **	15.7(14/89) **
高剂量组	77	62	35	18	9	19.5(15/77) **	56.5(35/62) **	29.0(18/62) **	14.5(9/62) **

2.5 混合染毒 BPA、NP 对胎仔发育的影响 (见表 4)

从表 4 可见平均每窝活胎数从低剂量组始就明显低于对照组 ($P<0.05$),随剂量升高降低更明显。中、高剂量组与对照组比较差异均有非常显著性 (P

<0.01),并存在明显的剂量-效应关系 ($r=-0.643, P<0.01$)。高剂量组平均每窝胎仔重、胎长均低于对照组,差异均有显著性 ($P<0.05$),并均存在明确的剂量-效应关系, *r* 依次为一 0.574, -0.598, 均

$P < 0.05$ 。

表 4 混合染毒 BPA、NP 对胎仔发育的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	每窝活胎数	每窝胎仔重 (g)	每窝胎盘重 (g)	每窝胎长 (mm)
对照组	9.1 ± 3.7	0.51 ± 0.10	0.18 ± 0.02	15.18 ± 1.07
低剂量组	7.5 ± 3.2 *	0.49 ± 0.07	0.18 ± 0.01	14.93 ± 0.94
中剂量组	5.5 ± 3.3 **	0.48 ± 0.10	0.18 ± 0.04	14.32 ± 1.24
高剂量组	5.6 ± 2.8 **	0.38 ± 0.09 *	0.19 ± 0.02	13.14 ± 1.16 *

3 讨论

本研究对连续染毒 6 周并于交配后与末次染毒当天处死的雄鼠生精功能的检测发现, 精子计数和活精率从中剂量组随染毒剂量升高而下降, 而精子畸形率随染毒剂量增加而升高, 说明长期较低剂量混合染毒 BPA 和 NP 对小鼠的生精功能产生了明显损害作用, 这与崔金山等报道的短期高剂量染毒结果相一致^[10], 说明长期较低剂量接触 BPA 和 NP 仍可致生精功能的损害。其损伤的机制是 BPA 和 NP 均能透过血睾屏障并在睾丸内蓄积损伤生精上皮, 造成间质细胞和支持细胞的退行性变性^[2,4,11], 因而导致生精功能受损。

本研究发现, 长期混合染毒 BPA 和 NP 在 BPA 120mg/kg + NP 60 mg/kg 时可导致小鼠性功能受损, 雄鼠交配指数明显下降, 其原因是 BPA 和 NP 可损伤睾丸间质细胞, 使 T 分泌减少^[2,4], 使小鼠性行为受损。本研究从低剂量组始, 雌鼠的生育指数和妊娠率均明显下降, 且随染毒剂量增加下降愈明显。一方面是由 BPA 和 NP 损伤了雄鼠的生殖功能, 使精子数量减少, 活精率和精子畸形率的升高使受精率下降; 另一方面二者均可损伤雌鼠卵细胞的发育和排卵功能, 使形成的配子减少, 表现为黄体数减少; 第三, 即使形成配子, 由于其结构缺陷, 形成的配子在 BPA 和 NP 的继续作用下部分损伤严重者在未着床前就死亡, 损伤较轻者在着床初期可因毒物的作用而死亡, 形成吸收胎, 再加之交配指数下降, 三者共同原因导致生育指数和妊娠率下降。

BPA 和 NP 所产生的早期胚胎毒性, 部分是由于卵细胞和精子受损产生的生殖毒性所致, 亦可是在妊娠 0 天至第 6 天继续染毒 BPA 和 NP 的直接胚胎毒性所致, 或二者兼有之。本研究中, 由于着床前死亡率、吸收胎率和死胎率增加, 导致活胎率下降。存活的胎仔在高剂量组平均胎仔重、平均胎长均低于对照组, 证明虽然停止继续染毒 BPA 和 NP, 但存留在体内的 BPA 和 NP 其后续作用仍存在, 可能因二者的蓄积作用对晚期胚胎和胎仔仍产生毒效应。

参考文献:

- [1] Stapher CA, Dorn PB, Kleka GM, et al. A review of the environmental fate, effect and exposures of bisphenol A [J]. *Chemosphere*, 1998, 36 (10): 2149-2173.
- [2] 邓茂克, 吴德生, 詹丽. 环境雌激素双酚 A 的生殖毒性研究 [J]. *环境与健康杂志*, 2001, 16 (3): 134-136.
- [3] Bennie DT, Sullivan CA, Lee HD, et al. Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and upper St. Lawrence River [J]. *The Science of the Total Environment*, 1997, 193 (3): 263-275.
- [4] Jager CD, Bomarn MS, Costhuizen MC. The effect of P-nonylphenol on the fertility potential of male rats after gestational, lactational and direct exposure [J]. *Andrologia* 1999, 31 (2): 107-113.
- [5] 逢兵, 周袁芳, 周天喜, 等. 双酚 A 对大鼠胚胎毒性的初步研究 [J]. *劳动医学*, 2000, 17 (2): 70-72.
- [6] 邓茂克, 吴德生, 张立实, 等. 壬基酚对雌性 SD 大鼠早期发育的影响 [J]. *中国公共卫生*, 2002, 18 (2): 147-148.
- [7] 王心如. *毒理学试验方法与技术* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 81-86.
- [8] 黄勤, 黄幸纾. 工业品六六六对小鼠精子影响研究 [J]. *浙江医科大学学报*, 1987, 16 (1): 7.
- [9] 张桥. *卫生毒理学基础* [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 249-251.
- [10] 崔金山, 张玉敏, 段志文, 等. 双酚 A 与壬基酚混合染毒对小鼠生精功能的影响 [J]. *工业卫生与职业病*, 2004, 30 (4): 289-292.
- [11] 逢兵, 呈向东, 任道风, 等. 双酚 A 对大鼠睾丸 Leydiny 细胞的毒作用 [J]. *卫生毒理学杂志*, 2000, 14 (3): 173-174.

(上接第 146 页)

- [5] 许海燕, 孔桦. 纳米材料的研究进展及其在生物医学中的应用 [J]. *基础医学与临床*, 2002, 22 (2): 97-102.
- [6] 毕肖林, 狄留庆. 纳米技术及其在医药学中的应用研究 [J]. *中医药学刊*, 2004, 22 (86): 1064-1067.
- [7] Mirkin CA, Letsinger RL, Mneic RG, et al. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials [J]. *Nature*, 1996, 382 (6592): 607-609.
- [8] 张诚, 张晓玲. 纳米毒性可能冲击人体健康 [J]. *畜牧兽医学报*, 2004, 33 (1): 14-17.
- [9] 贾元宏, 张淑青, 张学庆, 等. 一种纳米材料抑菌效果及毒性试验观察 [J]. *预防医学文献信息*, 2002, 8 (6): 737.
- [10] 叶玲, 苏勤, 周学东, 等. 新型纳米根管充填材料体外基因毒性的初步研究 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2004, 22 (2): 93-95.
- [11] 刘岚, 唐萌, 何整, 等. Fe₃O₄ 及 Fe₃O₄-Glu 纳米颗粒的毒性和致突变性研究 [J]. *环境与职业医学*, 2004, 21 (1): 14-17.