文章编号: 1001-0580(2009)02-0209-02　中图分类号: R 114　文献标志码: A　【实验研究】

甲基对硫磷对大鼠生殖毒性损伤作用*

黄斌,祝明清,程丽薇,欧阳雯,邹萍,范勇,毕勇毅,汪春红

摘　要: **目的**　研究甲基对硫磷对雄性大鼠的睾丸毒性作用,探讨其毒理作用机制。**方法**　选择雄性 SD大鼠(220 - 240 g) 20只,连续 6周灌胃染毒,剂量为 1.2, 6, 30 mg/(kg·bw)染毒结束次日处死大鼠。用流式细胞技术分析睾丸细胞周期和细胞凋亡,同时检测睾丸组织超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)含量。**结果**　1.2, 6, 30 mg/(kg·bw)甲基对硫磷染毒后大鼠精子存活率分别为 90.40%, 82.99%, 73.98%;精子畸形率分别为 20.88%, 23.91%, 29.10%,与对照组相比较差异有统计学意义($P < 0.05$或($P < 0.01$)。30 mg/kg染毒组的 SOD活力 185.33U(mg·pro),低于阴性对照组[344.61 U/(mg·pro)];MDA含量 1.90 nmol/(mg·pro)高于其阴性对照组(0.71 nmol/mg·pro)($P < 0.01$)。与对照组比较,中、高剂量染毒组 G0/G1期细胞比例(73.43%, 75.22%)显著降低, S期细胞(12.10%, 9.35%)比例降低;高剂量甲基对硫磷组细胞凋亡率(32.77%)高于对照组(22.17%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论**　甲基对硫磷对大鼠具有明显的生殖毒性,其毒理作用机制可能是氧化应激导致细胞周期的改变和细胞凋亡的增加。

关键词: 甲基对硫磷;生殖毒性;氧化应激;细胞周期;细胞凋亡

Effect of methyl parathion on reproductive cells in rats

HUANG Bin, ZHU Ming-qing, CHENG Li-wei, et al Department of Toxicology, School of Public Health, Wuhan University (Wuhan 430071, China)

Abstract: **Objective**　To investigate the effect and possible mechanisms of methyl parathion on testis cell cycle and cell apoptosis in male rats. **Methods**　Twenty SD male rats (220～240 g) were divided into four groups. The methyl parathion (MPT) was given orally to the rats for six weeks at the dose of 1.2, 6, 30 mg/kg/day, respectively. The testicular viscera coefficient was measured and the activity of superoxide (SOD), the contents of maleic dialdehyde (MDA) were detected. The flow cytometry was used to study the effects of MPT on testicle cells of male rats. **Results**　After the exposure of 1.2, 6, 30 mg/kg MPT, the sperm survival rates were 90.40%, 82.99%, 73.98% and the sperm deformity rates were 20.88%, 23.91%, 29.10%. Compared with the control group there were statistically significant changes ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In 30 mg/kg group, the activity of SOD (185.33 U/mg·pro) was lower that that of negative control group (344.61 U/mg·pro) and MDA content (1.90 nmol/mg·pro) was higher than that of negative control group (0.71 nmol/mg·pro, $P < 0.01$). Compared with the control group, the proportion of cells in G0/G1 phase (73.43%, 75.22%) and S-phase cells (12.10%, 9.35%) were significantly lower in the middle and high dose group. In the high-dose group the apoptosis rate (32.77%) was higher than that of control group (22.17%, $P < 0.05$). **Conclusion**　The toxic effect of MPT on testicles of the rats is obvious, the oxidative stress may lead to changes in cell cycle and increase of apoptosis.

Key words: methyl parathion; reproductive toxicity; oxidant stress; cell cycle; apoptosis

有机磷农药所造成的环境污染已经引起全世界的关注,甲基对硫磷(Methyl, Parathion, MPT)做为一种毒性强、使用广泛且残留时间长的有机磷农药,对人类健康造成的威胁越来越受重视。有关甲基对硫磷生殖毒性的研究国内外均有报道,但其分子毒理机制尚不清楚,有研究认为可能与氧化应激有关[1]。本实验通过研究大鼠睾丸组织内抗氧化体系的变化,以及该变化对睾丸细胞细胞周期和凋亡的影响,探讨其毒理作用机制。

1　材料与方法

1.1　试剂与仪器　甲基对硫磷原油(80%纯度,湖北沙隆达有限公司);溶剂为橄榄油,超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、考马斯亮蓝试剂盒(南京建成生物工程研究所);RNA酶(分析纯,美国 Sigma公司;曲拉通(Triton X - 100)(分析纯,美国 Amresco公司);碘化丙啶(PI)(分析纯,美国 Sigma公司)。电子天平,离心机,光学显微镜(OLYMPUS), UV - 1700紫外可见分光光度计(日本岛津公司); FACSCalibur流式细胞仪(美国 Becton Dicknson公司)等。

1.2　实验动物　采用健康清洁级 SD成年雄性大白鼠 20只,体重 220～240 g。动物及饲料均由武汉大学实验动物中心提供适应性喂养 1周后开始实验。

1.3　动物分组及染毒　将大鼠随机分为 4组,每组 5只。参考 Suresh S等[2]文献方法,MPT低、中、高剂量组分别为 1.2, 6, 30 mg/(kg·bw),连续 6周灌胃染毒。染毒结束次日处死大鼠。对照组为橄榄油。

1.4　检测指标及方法

1.4.1　一般中毒症状和体征　观察大鼠体重、饮食和水、活动情况及一般中毒表现。

1.4.2　脏器系数　准确称量大鼠体重和各脏器重量,按脏器系数 =脏器重(g)/体重(g)计算各脏器的脏器系数。

1.4.3　附睾尾精子数量和质量检测　附睾尾精子计数、精子活动度、精子畸形率参照文献[3]。

1.4.4　睾丸组织 SOD活力、MDA含量的测定　将大鼠睾丸制成组织匀浆液,离心后,取上清液,按试剂盒的方法测定其 SOD活力、MDA含量、蛋白含量。

1.4.5　细胞周期和细胞凋亡的检测　取约 0.3 g睾丸组织,去除包膜,剪碎,加入 4 ℃匀浆液 1 ml并冰浴匀浆, 200目筛网过滤, 1 000 r/min离心 8 min。取其中细胞沉淀重悬于匀浆

*基金项目: 国家自然科学基金(30571556);武汉大学大学生创新基金(2007)
作者单位: 武汉大学公共卫生学院卫生毒理学系,武汉 430071
作者简介: 黄斌(1986 -),男,湖北武汉人,本科在读,研究方向:卫生毒理学。
通讯作者: 汪春红

中国公共卫生 CPH

液中,磷酸盐缓冲液(PBS)调整细胞浓度至 10^6～10^7个/ml,4℃ 70%乙醇固定 24h后,离心去除固定液,PBS洗 2遍,加 RNA酶 20μl于 37℃水浴 30min,加入 800μl碘化丙啶(PI)染液混匀,4℃避光染色 30min,然后上机进行检测。

1.5 统计分析 采用 SPSS软件进行单因素方差分析,并进行染毒组与对照组间的两两比较。

2 结 果

2.1 一般中毒表现及脏器系数 在给药期间,各组动物活动正常,生长发育尚好,未出现明显的中毒症状和不良反应。在给药后期,30mg/kg组的部分动物皮毛失去光泽,精神状态稍差,体重增长有减缓的趋势,但差异无统计学意义。30mg/kg甲基对硫磷组睾丸脏器系数与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),其余脏器未见异常。其脏器系数与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 精子数量与质量(表 1) 由表 1可见,染毒组动物的精子数量与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);与对照组比较,染毒组动物精子的存活率明显下降($P<0.05$),精子畸形率显著升高($P<0.01$);各染毒组间的两两比较,精子存活率差异有统计学意义($P<0.05$),且随着染毒浓度的增加,精子存活率呈下降趋势;精子的畸形率低剂量组和中剂量组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 各组动物的精子数量、精子存活率和精子畸形率($\bar{x}\pm s$)

组 别(mg/kg)	精子数量(10^4/ml)	精子存活率(%)	精子畸形率(%)
对照组	456.25±21.09	95.67±1.10	11.67±1.26
MPT 1.2	441.65±25.19	90.40±1.16[a]	20.88±2.80[a]
6	447.65±26.17	82.99±2.63[b]	23.91+2.05[b]
30	449.30±25.45	73.98±1.47[b]	29.10+3.79[ab]

注:与对照比较,a $P<0.05$,b $P<0.001$。

2.3 睾丸组织 SOD活力、MDA含量(表 2) 由表 2可见,染毒组大鼠睾丸组织中 SOD含量显著低于阴性对照组,且随染毒剂量的升高而下降;MDA含量与对照组比较差异有统计学意义,且随染毒剂量的升高而上升,但中剂量组和高剂量组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 各组动物睾丸组织中 SOD活力、MDA含量

组 别(mg/kg)	SOD活力[(U/mg·pro)]	MDA含量[nmol/(mg·pro)]
对照组	344.61±10.60	0.71±0.00
MPT 1.2	252.54±16.00[b]	1.45±0.19[b]
6	210.90±11.76[b]	1.68±0.15[b]
30	185.33±15.84[b]	1.90±0.20[b]

注:与对照组比较,b $P<0.01$。

2.4 细胞周期及细胞凋亡

2.4.1 对细胞周期的影响(表 3) 由表 3可见,在睾丸细胞 G0/G1期,中剂量和高剂量组细胞百分数显著高于对照组($P<0.05$或 $P<0.01$);在 G2/M期,高剂量组细胞百分比显著低于对照组($P<0.01$);在 S期,中剂量和高剂量组细胞百分数与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$或 $P<0.01$)。

表 3 各组动物睾丸细胞细胞周期和细胞凋亡的情况($\bar{x}\pm s$)

组 别(mg/kg)	G0/G1	G2/M	S	细胞凋亡
对照组	67.70±3.24	16.67±2.39	16.23±1.11	22.17±4.13
MPT 1.2	71.41±0.66	15.37±1.03	14.67±0.86	24.87±1.51
6	73.43±0.63[a]	14.53±1.80	12.1±0.17[a]	27.33±1.07[a]
30	75.22±1.40[b]	12.37±1.47	9.35±0.54[b]	32.77±2.91[b]

注:与对照组比较,a $P<0.05$,b $P<0.01$。

2.4.2 对细胞凋亡的影响 由表 3可见,随着染毒剂量的升高,大鼠睾丸生精细胞的凋亡率有升高的趋势,其中中剂量组和高剂量组大鼠睾丸生精细胞的凋亡率与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$或 $P<0.01$)。

3 讨 论

已有研究表明,甲基对硫磷可导致动物生殖器官重量减轻[2],精子数量减少,畸形率提高[4]。本研究表明,MPT在 30mg/(kg·bw)剂量下对大鼠的睾丸产生损伤作用;MPT染毒后,各剂量组均造成大鼠精子存活率的降低和畸形率的上升,且存在剂量-效应关系。本次实验结果显示,MPT染毒可以引起小鼠丸组织 SOD活力降低,MDA含量增高,与文献[1,5]结果一致,提示 MPT可引起小鼠睾丸组织的脂质过氧化损伤,从而影响睾丸功能。

本次实验结果显示,在细胞周期与细胞凋亡方面,睾丸细胞 G0/G1和 S期,MPT各剂量组细胞百分数显著高于对照组;在 S期,MPT高剂量组细胞百分数显著低于对照组;MPT中剂量和高剂量组细胞凋亡率显著高于对照组,与刘基芳[6]等研究结果相近,表明随着染毒剂量的增加,睾丸细胞的 DNA合成受抑制,使睾丸细胞出现 G2期阻滞,有丝分裂延迟,使进入 M期的细胞百分数减少,Ap峰所占比例增加可说明凋亡细胞发生的百分率增加,表明 MPT可诱导生殖细胞的凋亡,对生殖细胞造成损伤。

综上所述,长期暴露于甲基对硫磷可导致大鼠睾丸组织内抗氧化酶的活性下降,改变体内氧化抗氧化系统的平衡,从而导致生精细胞细胞周期的改变、凋亡的增加,使大鼠表现为生殖器官重量的下降、精子存活率的降低和畸形率的升高。甲基对硫磷诱导的氧化应激可能是其生殖毒性的重要机制。

参考文献

[1] Piña-Guzmán B, Solis-Heredia MJ, Rojas-Garcia AE, et al. Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidative stress[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2006, 5(1): 216-224.

[2] Joshi SC, Mathur R, Gajraj A, et al. Influence of methyl parathion on reproductive parameters in male rats[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2003, 14(3): 91-98.

[3] Uzunhisarcikli M, Kalender Y, Dirican K, et al. Acute, subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2007, 87: 115-122.

[4] Narayana K, Prashanthi N, Nayanatara A, et al. A broad-spectrum organophosphate pesticide 0, 0-dimethyl 0-4-nitrophenyl phosphorothioate (methyl parathion) adversely affects the structure and function of male accessory reproductive organs in the rat[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2006, 22(3): 315-324.

[5] Guney M, Oral B, Demirin H, et al. Evaluation of caspase-dependent apoptosis during methyl parathion-induced endometrial damage in rats: Ameliorating effect of vitamins E and C[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2007, 23(3): 221-227.

[6] 刘基芳,刘乾,倪亚杰,等. 双酚 A对雄性小鼠生殖细胞凋亡作用[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(5): 572-573.

收稿日期: 2008-07-09 (宋艳萍编辑 张亚莲校对)