

黄莉,刘寒英,丘剑峰,等. 2011. 城市河涌水对 C57BL/6J 小鼠生殖和发育的影响[J]. 环境科学学报, 31(11): 2530-2537

Huang L, Liu H Y, Qiu J F, et al. 2011. Effect of city canal river water on reproduction and development of C57BL/6J female mice[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 31(11): 2530-2537

城市河涌水对 C57BL/6J 小鼠生殖和发育的影响

黄莉¹, 刘寒英¹, 丘剑峰¹, 张钰³, 黄韧³, 李冰^{2,*}

1. 广州医学院实验动物中心, 广州 510182

2. 广州医学院实验医学中心, 广州 510182

3. 广东省实验动物监测所, 广州 510260

收稿日期: 2011-01-19

修回日期: 2011-02-28

录用日期: 2011-03-16

摘要: 前期研究发现广州市周边小型企业集中点和生活区下游河涌水样中存在较高浓度的 AhR 激活物污染。为考察河涌水中是否存在对生殖和发育产生影响的 TCDD 类似物, 本研究以检出河涌水样激活物平均值标准品 TCDD 做阳性对照, C57BL/6J 雌性小鼠为模型进行了三代生殖毒性实验, 了解长期暴露对动物生殖和发育产生的毒性影响。成年雌性小鼠 40 只, 随机分 4 组, 每组 10 只, 分别饮用自来水(正常对照 I 组), $2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TCDD 标准水样(阳性对照 II 组), 石井河涌水(III 组), 芳村河涌水(IV 组), 连续三代繁殖, 观察水样对小鼠生殖和发育的影响。生殖指标结果显示, 处理组与正常对照 I 组比较, II、III 和 IV 组亲代(P0, P1 和 P2 代)小鼠的交配和妊娠时间均显著延长($p < 0.05$); 交配率、受孕率、妊娠率和生育率逐代下降, 分别为交配率以 II 和 III 组的 P2 代显著($p < 0.05$); 受孕率和生育率以 II 组 P2 代显著($p < 0.05$), III 和 IV 组连续 3 代均显著降低($p < 0.05$); 妊娠率以 II 组、III 组 P2 代下降明显($p < 0.05$), IV 组连续 3 代均下降明显($p < 0.05$)。发育指标结果显示, 处理组 II、III 和 IV 组子代小鼠出生 D4 和 D21 的存活率明显低于正常 I 组, 以 II、III 组 F2 和 F3 代, IV 组 F3 代($p < 0.05$)的下降明显; 子鼠出生数量下降, 以 IV 组 F3 代明显($p < 0.05$); II 组、III 组和 IV 组 F3 代的 D7、D14 和 D21 的生长体重低于正常组($p < 0.05$)。血清类固醇激素检测结果显示, 亲代经产鼠 II、III 和 IV 组与正常 I 组比较, 血清雌二醇(E2) P0 代降低显著($p < 0.001$); 血清孕酮(PNG) II 组 P0 代, III 组 P0、P1 代和 IV 组亲 3 代显著高于正常 I 组($p < 0.05$)。子代处女鼠 II、III 和 IV 组 F2 和 F3 代促黄体激素(LH)下降显著($p < 0.001$)。实验结果显示代表污染水的 III 和 IV 组与 TCDD 阳性对照 II 组水样所引起的重要母体生殖指标、子代发育指标以及雌性生殖激素水平的变化相似, 强烈提示河涌水样中存在持久性有机污染物并具有与 TCDD 类似的生殖毒性, 长期低剂量的接触将影响雌性小鼠的生殖和发育功能, 值得引起注意。

关键词: 河涌; 持久性有机污染物; 三代生殖毒性; C57BL/6J 小鼠

文章编号: 0253-2468(2011)11-2530-08

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Effect of city canal river water on reproduction and development of C57BL/6J female mice

HUANG Li¹, LIU Hanying¹, QIU Jianfeng¹, ZHANG Yu³, HUANG Ren³, LI Bing^{2,*}

1. Laboratory Animal Research Center, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182

2. Laboratory Medicine Research Center, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182

3. Laboratory Animal Monitoring Institute, Guangdong Province, Guangzhou 510260

Received 19 January 2011;

received in revised form 28 February 2011;

accepted 16 March 2011

Abstract: Our previous studies found that drainage canal water in Guangzhou contained amounts of AhR-activating ligands, as determined from a yeast AhR reporter system. In this study, a three-generation experiment was conducted to assess the reproductive and developmental risks associated with these waters in C57BL/6J female mice. 40 female mice were randomly divided into 4 groups. Animals in the groups were allowed to continuously freely drink tap water (group I), $2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TCDD which had equivalent TEQ of the water samples (group II), sample water from Shijing River (group III) and sample water from Fangcun River (group IV). P and F generation mice were observed for general reproductive and developmental toxicity. The results showed that the major reproductive indices that were affected include Mean Day of Mating and Gestation, both were delayed significantly ($p < 0.05$) in treated groups comparing with the group I in maternity over three generation. Other indices also altered in treated groups included significantly decreased

基金项目: 广东省实验动物重点实验室开放课题基金(No. 2007A060101002); 广州医学院课题基金(No. 2006ZR003)

Supported by the Key Laboratory of Experimental Animal of Guangdong Province(No. 2007A060101002) and the Research Foundation of Guangzhou Medical College(No. 2006ZR003)

作者简介: 黄莉(1962—), 女, 副研究员(博士), E-mail: huanglifree@yahoo.com.cn; * 通讯作者(责任作者), E-mail: libing@gzhmc.edu.cn

Biography: HUANG Li(1962—), female, associate researcher(Ph. D.), E-mail: huanglifree@yahoo.com.cn; * Corresponding author, E-mail: libing@gzhmc.edu.cn

Mating Index of group II in maternity third (P2) ($p < 0.05$), decreased Fertility and Fecundity Index of group III and IV ($p < 0.05$) over three maternity generation, and decreased Gestation Index ($p < 0.05$) in group II and III of maternity third and group IV over three generations. With regard to the effected development index of filial generation, the Survivor Rate on day 4 and day 21 decreased significantly ($p < 0.05$) in group II and III of generation F2 and F3 in group IV of generation F3. The pup Body Weight of treated group on day 7, day 14 and day 21 were lower ($p < 0.05$) than control in generation F3. Drinking of sample waters and TCDD water significantly decreased estradiol in maternity generation P0 ($p < 0.001$) comparing with control. Also decreased were pregesterone in group II, III and IV ($p < 0.05$) in filial generation F2 and F3, and the LH level ($p < 0.001$). The most effected reproductive indices, development indices and reproduction hormones between water samples and $2\text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TCDD water were very similar, implying that the city canal river water contained dioxin-like substances and may exert chronic toxic effect.

Keywords: river; persistent organic pollutants; three generation reproductive toxicity; C57BL/6J mouse

1 引言 (Introduction)

持久性有机污染物 (persistent organic pollutants, POPs) 是环境中普遍存在的污染性物质, 是杀虫剂、工业化学品(多氯联苯 PCBs) 和生产中的副产品(DIOXINS, DXNs), 具有高残留性、高生物浓缩性和高生物毒性的特点。水体环境中持久性污染物的污染不仅可以影响野生鱼类繁殖和渔业生产, 同时可通过食物链和水循环直接危害人类健康 (Abalos 2008)。由于现有饮用水处理方案尚没有针对该类物质提出有效方法, 因而水体污染对人类健康的危害需要有客观的认识。珠江三角洲地区是我国经济发展最快的地区之一, 随着工业和乡镇企业的迅猛发展, 水体环境质量恶化, 珠江三角洲地区表层沉积物中多环芳烃含量高达 $408 \sim 10810 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (康跃惠等 2000)。因此有必要对该水域的持久性有机污染物含量和其健康危害进行多方面的研究。城市以及近郊生活污水由于污染源种类繁多, 难以具体分析污染源的化学组成, 但这类污染物对动物和人类的危害具有同样的机制, 一般认为是通过激活芳香碳氢化合物受体 (Aryl hydrocarbon receptor, AhR) 所介导的, 因此可以通过受体激活水平评价以及所激活的基因表达改变判断样本中的毒性 (黄莉等 2010), 并能够以 2,3,7,8-四氯二苯并-p-二噁英 (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD) 毒性当量 (Toxic Equivalency, TEQ) 的形式量化 (黄莉等 2004)。我们利用一套 AhR 驱动的酵母报道基因系统, 对广州几个典型的城市河涌水进行了探索性检测, 发现一些具有较高激活 AhR 的污染样本。这些近珠江主流区域的河涌, 激活物典型含量介于 $1.19 \sim 3.24 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (TEQ), 平均约在 $2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此剂量 TCDD 样本在 NIH 小鼠早期急性生殖毒性实验研究中, 未发现对妊娠鼠的生殖和胚胎发育产生明显损害 (黄莉等 2005), 但长期慢性毒性对生殖和发育的影响仍需探究。另外, 虽

然检测样本的受体激活水平相当于 $2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TCDD, 但由于污染物成分复杂, 是否具有相当的终点毒性效应也是我们关心的问题, 因此, 本研究利用 C57BL/6J 小鼠为模型动物进行了三代生殖毒性研究, 以期了解珠江三角洲地区工业和生活废水中的有机污染物可能对动物生殖和发育产生的毒性影响; 同时了解以受体激活为基础的检测污水中 TCDD 类污染物定量方法的有效性。

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 实验材料

2.1.1 实验动物 C57BL/6J 小鼠, 由广州医学院实验动物中心提供的健康清洁级小鼠 (健康合格证号: 粤检证字 2003A042 号; 环境合格证号: 2003C050) 21 d 断奶雌性小鼠, 体重 $8 \sim 10 \text{ g}$, 饲养环境温度为 $18 \sim 25^\circ\text{C}$, 随意采食及饮水。

2.1.2 试剂 TCDD 标准品购自美国 AccuStandard 公司 (批号: 970401R-AC), 浓度为 1 mg , 用 1 mL 二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 配成浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 待用。促卵泡激素 (FSH)、促黄体激素 (LH)、雌二醇 (E2) 和孕酮 (PG) 放射免疫试剂盒, 购自天津德普生物技术和医学产品有限公司 (批号: TK1210078)。

2.1.3 实验仪器 台式高速冷冻离心机 (UNIVERSAL 32R)、电子天平 (JJ1000Y)、手术器械 (眼科剪、眼科镊)、德国 leica DM4000B 显微镜。

2.2 实验方法

2.2.1 样品的采集和处理 实验水样取饮用自来水作为阴性对照组。取广州市芳村区沙涌河水和白云区石井河涌水, 水样无气味, 不完全透明, 沉淀过滤后取上清液供小鼠自由饮用; 取浓度 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TCDD 用 DMSO 稀释, 再用饮用水配成 $2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液作为阳性对照组, 给小鼠自由饮用; 卵巢组织按常规方法进行固定、包埋, 每个卵巢切 5 张片, 选最大切面和两面对应部位切面, HE 染色后,

德国 leica DM4000B 显微摄像系统提取图像,观察各阶段卵泡数变化。

2.2.2 三代繁殖实验设计 选 C57BL/6J 小鼠为模型动物,分亲代(P0,P1,P2)和子代(F1,F2,F3),亲代每代繁殖2窝(Fa和Fb),Fa窝用作繁殖,Fb窝用于血样和组织样品的采集。具体设计为亲一代(P0)雌鼠饮用水样7周,与健康正常雄鼠同笼2~3周,雌雄比(2:1),每天早上检查雌性小鼠阴道栓,取出见栓小鼠,待子一代(F1a)出生和哺乳期结束

后,选出10只雌性小鼠作为亲二代(P1)。P0代再次与正常雄鼠同笼,生产子一代(F1b),待哺乳结束后的第35天,乙醚麻醉P0和F1b代雌鼠,眼球摘除采集血液,分离血清用于性激素的测定。颈椎脱臼处死,采集组织样品,10%的甲醛固定,用于组织病理学观察和免疫组织化学的检测。P1代连续饮水7周后,与正常雄鼠同笼生产子二代(F2a和F2b),在F2a中选出10只雌性小鼠作为亲三代(P2),用于繁殖子三代(F3a和F3b) 实验设计见图1。

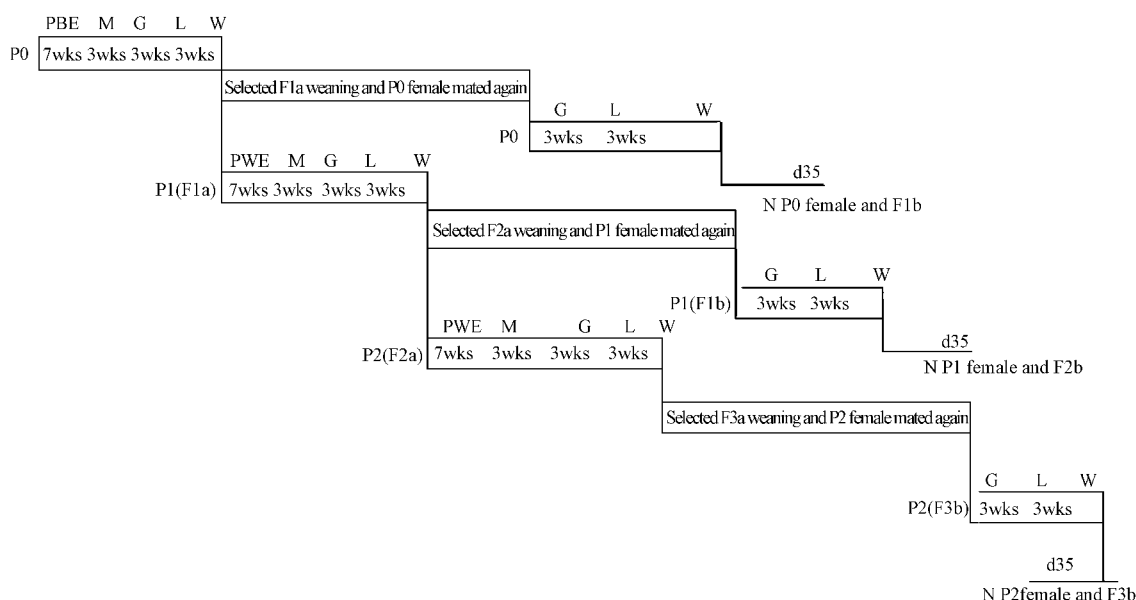


图1 水样三代繁殖实验设计(每代小鼠交配前暴露7周(PEB),交配3周(M),妊娠3周(G),哺乳3周(L),断奶后暴露7周(PWE),断乳后第35天(PND)处死取样。亲代(P),子代(F))

Fig. 1 3-generation study design for Contaminative water(PBE,prebreed exposure (7weeks); PWE,postwean exposure (7weeks); M,mating (3 weeks); G,gestation (3 weeks); L,lactation (3 weeks); W,weaning; PND,post-natal day; P(Parental generation); F(Filial generation))

2.2.3 C57BL/6J 小鼠的分组及处理 21 d 断奶雌性小鼠40只,体重8~10 g,随机分为4组,每组10只,健康对照组饮用自来水(I组),阳性对照组饮用 $2\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度TCDD水(II组),石井水样(III组),芳村水样(IV组),连续繁殖3代。实验过程中观察和记录亲代P0,P1和P2的繁殖指标,包括平均交配时间、交配指数、妊娠指数、妊娠时间、活产指数;子代F1(F1a,F1b),F2(F2a,F2b)和F3(F3a,F3b)的发育指标,包括平均每窝出生的数量、窝重,第1天、第7天、第14天和第21天的体重,第1天(d1)、第14天和第21天的存活数量,断奶时的性别比例变化。

2.2.4 激素放免测定 亲代雌二醇(Estrogen,E2)和孕酮(Progesterone,PG),子代促卵泡成熟激素(FSH)和促黄体生成激素(LH)检测按照试剂盒说明书操作方法,使用SN-695 gamma counter RIA program

进行测定。FSH和LH的单位($\text{IU}\cdot\text{L}^{-1}$),PG单位($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$),E2单位($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

2.2.5 结果统计分析 数据用SPSS16.0分析软件进行分析。亲代繁殖指标,类固醇激素和卵泡数量用两个独立样本检验(Two-independent samples test)结果用序和检验(Wilcoxon test)比较处理组与正常对照组间的差异显著性;新生仔鼠哺乳期质量用单因素方差分析(One way ANOVA test)中的最小显著极差法(LSD)比较差异显著性,断奶仔鼠每窝性别比用公式:雄性数量/(雄性数量+雌性数量) $\times 100\%$ 计算,用单因素方差分析(One way ANOVA test)中的Dunnnett test法比较差异显著性。数据用平均值 $\pm$ 标准差表示,显著性差异为 $p < 0.05$,Excel软件做图;亲代E2与生殖和发育指标的相关性,用皮尔逊相关系数(Pearson Correlation Coefficients)检验得出相关度。

3 结果 (Results)

3.1 亲代生殖和子代发育变化

3.1.1 水样对亲代和子代小鼠的体征影响 实验期间每天对饮水处理小鼠进行观察,亲代小鼠没有腹泻,被毛凌乱,明显消瘦的体征表现,对4周后水样组亲代小鼠实验期间的体重变化与对照组相比,差异无统计学意义;实验终期处死解剖除发现Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ组肝脏稍有发黄,其他脏器无发现如充血、出血等变化;病理检测发现肝脏的脂肪空泡变性,肾盂和肾小管稍有水肿;免疫组织化学检测 AhR, Cyp1a2,发现Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ组脑、肝、肾、子宫、输卵管和卵巢阳性面积数量增加(另文报道)。哺乳期子代小鼠Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ组 F3 代表现有胸背部位被毛生长缓慢或裸体,Ⅱ组2只、Ⅳ组1只 F3 代子鼠颅脑呈圆形,4周后死亡,解剖脑室内有大量积水,脑组织萎缩。

3.1.2 水样对亲代雌鼠生殖的影响(如表1) 与正常对照Ⅰ组比较,处理组(Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ)亲代雌鼠交配和妊娠时间延长,分别为 P0 代($p < 0.01$, or $p < 0.001$), P1 代($p < 0.05$, or $p < 0.01$, or $p < 0.001$), P2 代($p < 0.05$, or $p < 0.01$, or $p < 0.001$); 交配率下降,以Ⅱ和Ⅲ组的 P2 代具统计学意义

($p < 0.05$); 受孕率和生育率以Ⅱ组 P2 代($p < 0.05$),Ⅲ和Ⅳ组的连续3代均显著降低($p < 0.05$, $p < 0.01$); 妊娠率下降,以Ⅱ组、Ⅲ组 P2 代下降明显($p < 0.05$, or $p < 0.01$),Ⅳ组连续3代均明显下降($p < 0.05$, or $p < 0.01$)。

3.1.3 水样对子代 d1、d4 和 d21 的出生存活率影响 与正常对照Ⅰ比较,处理组新生鼠 d4 和 d21 的存活率明显低于正常组,其死亡多数在4天前,Ⅱ组、Ⅲ组的 F2 和 F3 代($p < 0.05$, or $p < 0.01$, or $p < 0.001$),Ⅳ组 F3 代($p < 0.05$, or $p < 0.01$)的存活率明显下降。

3.1.4 水样对子鼠出生数量窝重和体重的影响 与正常对照Ⅰ组比较,处理组子鼠出生数量和平均窝重逐代下降,以Ⅳ组水样 F3 代减少具统计学意义($p < 0.05$; $p < 0.01$); 子鼠出生平均体重 F1 代增加,以Ⅱ、Ⅲ组有统计学意义($p < 0.05$), F3 代下降,以Ⅱ和Ⅳ组显著($p < 0.001$; $p < 0.05$); F3 代出生后 d7、d14 和 d21 体重增加慢,以Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ组 d7($p < 0.01$; $p < 0.001$; $p < 0.001$), d14($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.05$) 和 d21($p < 0.05$; $p < 0.05$; $p < 0.05$) 差异显著。

3.1.5 对断奶子鼠性别的影响 统计发现处理组雄性数量增多,但无统计差异。

表1 水样对三代繁殖小鼠生殖和发育指标的影响

Table 1 The effect of contaminated water sample on reproduction and development across over 3-generation experiment

检测指标 (Tyl et al., 2002)	繁殖代数	样品分组和数量			
		对照组(Ⅰ) 30	2ng·L ⁻¹ TCDD(Ⅱ) 30	石井河涌水(Ⅲ) 30	芳村河涌水(Ⅳ) 30
平均交配时间/d	P0(F1a-F1b)	4.10 ± 2.74	13.77 ± 3.71 ***	12.40 ± 2.99 ***	11.00 ± 6.38 **
	P1(F2a-F2b)	3.89 ± 3.66	13.55 ± 3.88 ***	12.27 ± 2.49 ***	10.14 ± 2.48 **
	P2(F3a-F3b)	4.22 ± 2.55	11.38 ± 2.56 **	12.22 ± 3.02 ***	8.28 ± 3.90 *
交配率	P0(F1)	100%	100%	96.43% ± 27.74%	92.00% ± 21.13%
	P1(F2)	100%	90.00% ± 30.00%	89.01% ± 32.02%	92.31% ± 26.65%
	P2(F3)	100%	84.62% ± 36.08% *	87.50% ± 30.09% *	90.32% ± 29.99%
受孕率	P0(F1)	100%	91.67% ± 28.23%	84.62% ± 36.79% *	76.00% ± 43.59% *
	P1(F2)	100%	86.67% ± 34.58%	81.48% ± 39.58% *	80.76% ± 40.19% *
	P2(F3)	100%	76.93% ± 46.14% *	70.97% ± 46.14% **	73.08% ± 45.23% **
生育率	P0(F1)	100%	91.67% ± 28.23%	84.62% ± 36.79% *	76.00% ± 43.59% *
	P1(F2)	100%	86.67% ± 34.58%	78.57% ± 41.79% *	80.76% ± 40.19% *
	P2(F3)	100%	76.93% ± 46.14% *	70.00% ± 46.61% **	73.08% ± 45.23% **
妊娠率	P0(F1)	92.00% ± 21.13%	79.12% ± 40.61%	73.08% ± 44.36%	56.00% ± 49.63% *
	P1(F2)	95.00% ± 21.79%	80.00% ± 40.00%	75.00% ± 43.30%	62.96% ± 48.29% *
	P2(F3)	95.83% ± 19.98%	72.00% ± 44.89% *	46.42% ± 49.87% **	55.17% ± 49.73% **
妊娠时间/d	P0(F1)	19.17 ± 0.52	20.13 ± 0.34 ***	19.95 ± 0.52 ***	20.13 ± 0.35 ***
	P1(F2)	19.17 ± 0.38	20.10 ± 0.44 ***	20.00 ± 0.33 ***	19.63 ± 0.51 *
	P2(F3)	19.18 ± 0.53	19.79 ± 0.42 **	19.67 ± 0.49 *	20.00 ± 3.01 ***
出生第1天成活率	P0(F1)	98.39% ± 4.46%	95.57% ± 15.38%	96.44% ± 7.83%	96.11% ± 7.77%
	P1(F2)	100%	93.79% ± 19.80%	89.68% ± 27.95%	89.14% ± 22.46%
	P2(F3)	100%	92.03% ± 22.99%	90.83% ± 23.26%	87.40% ± 31.18%
出生第4天成活率	P0(F1)	93.75% ± 24.21%	83.24% ± 33.88%	85.22% ± 33.99%	77.25% ± 35.64% *

续表 1

检测指标 (Tyl <i>et al.</i> ,2002)	繁殖代数	样品分组和数量			
		对照组(I) 30	2ng·L ⁻¹ TCDD(II) 30	石井河涌水(III) 30	芳村河涌水(IV) 30
出生第 21 天成活率	P1(F2)	95.43% ± 8.89%	51.76% ± 48.14% **	60.99% ± 45.12% *	66.64% ± 44.81% *
	P2(F3)	96.43% ± 6.69%	47.07% ± 44.87% **	57.75% ± 47.60% *	68.42% ± 42.88% *
	P0(F1)	92.14% ± 24.20%	77.26% ± 34.46%	81.65% ± 33.34%	70.20% ± 32.51% **
雄性比(♂)	P1(F2)	95.43% ± 8.89%	49.07% ± 46.74% **	59.01% ± 43.95% *	56.72% ± 43.11% *
	P2(F3)	96.43% ± 6.69%	41.34% ± 40.66% ***	57.75% ± 47.60% *	67.67% ± 42.45% *
	P0(F1)	46.60%	49.62%	45.23%	46.88%
平均出生数量/只	P1(F2)	47.01%	55.95%	53.35%	54.73%
	P2(F3)	50.11%	56.17%	55.00%	57.23%
	P0(F1)	6.33 ± 2.5	5.22 ± 1.56	4.50 ± 1.84	5.00 ± 1.94
平均窝重 /g	P1(F2)	5.40 ± 2.32	5.00 ± 1.82	5.13 ± 2.16	4.9 ± 1.92
	P2(F3)	5.10 ± 1.48	5.00 ± 1.56	3.75 ± 1.28	3.29 ± 1.70*
	P0(F1)	7.92 ± 2.99	7.23 ± 1.93	6.26 ± 2.46	6.65 ± 2.70
平均出生质量/g	P1(F2)	6.98 ± 2.93	6.52 ± 2.30	6.61 ± 2.60	6.45 ± 2.36
	P2(F3)	6.66 ± 1.89	5.71 ± 1.76	5.02 ± 1.72	4.08 ± 2.35**
	P0(F1)	1.2982 ± 0.0687	1.3974 ± 0.1032*	1.3991 ± 0.0702*	1.3217 ± 0.0494
出生第 7 天质量/g	P1(F2)	1.3034 ± 0.1007	1.3140 ± 0.1069	1.3209 ± 0.1284	1.3344 ± 0.1269
	P2(F3)	1.3148 ± 0.0991	1.1531 ± 0.0949*** **	1.3387 ± 0.026	1.2320 ± 0.1262* *
	P0(F1)	4.1095 ± 0.7767	4.0900 ± 0.3746	3.8721 ± 0.3617	4.0215 ± 0.3549
出生第 14 天质量/g	P1(F2)	4.0251 ± 0.7885	3.8858 ± 0.4375	3.7768 ± 0.1647	3.7649 ± 0.6099
	P2(F3)	4.7234 ± 0.9970	3.9961 ± 0.1297**	3.5010 ± 0.2387***	3.7354 ± 0.2558***
	P0(F1)	6.3179 ± 0.6691	6.1091 ± 0.4915	6.2445 ± 0.4326	6.2584 ± 0.8235
出生第 21 天质量/g	P1(F2)	6.5191 ± 0.7202	6.3112 ± 0.9594	5.9173 ± 1.2296	6.3166 ± 1.1783
	P2(F3)	7.0014 ± 0.5225	6.4546 ± 0.5074*	6.1641 ± 0.5221**	6.4670 ± 0.5245*
	P0(F1)	8.5557 ± 0.9769	8.5054 ± 1.2213	8.5229 ± 1.6783	8.6490 ± 0.9368
	P1(F2)	8.3720 ± 1.0792	8.7051 ± 1.5214	8.4387 ± 1.1537	8.4559 ± 1.1537
	P2(F3)	9.4681 ± 0.4964	7.7237 ± 1.0161**	8.533 ± 0.5072**	8.3043 ± 0.7016**

注: * , ** , *** 表示与 I 组比较差异显著($p < 0.05$, or $p < 0.01$ or $p < 0.001$); * , ** 表示与 F1 代比较差异显著($p < 0.05$ $p < 0.01$)

3.2 亲代和子代类固醇激素变化和卵泡发育

3.2.1 水样对产后 35 d 经产雌鼠的血清 E2 和孕酮 PG 的影响 正常组三代血清 E2 和 PNG 保持稳定;与正常 I 组比较,Ⅱ组三代的血清 E2 水平均低于正常组,以 P0 代差异显著($p < 0.01$),Ⅲ组和Ⅳ组水样的 P0 下降($p < 0.01$,或 $p < 0.001$),P1 和 P2 代高于正常组;血清 PNG 含量升高,Ⅱ组 P0 代差异显著($p < 0.05$),Ⅲ组 P0 和 P1 代差异显著($p < 0.05$) (图 2) .

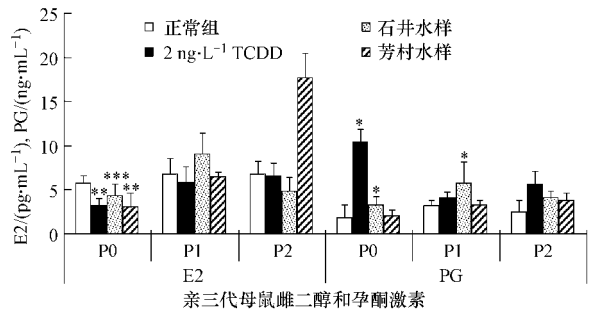


图 2 水样处理对亲代血清 E2 和 PG 的影响 (平均值 ± 标准误)

Fig.2 The effect of contaminated water on serum E2 and PG of maternal generation (Mean ± SE)

3.2.2 水样对断奶后第 35 天雌性子鼠血清 FSH、LH 和 E2 的影响 与正常组比较,Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ组 F2 和 F3 代血清 FSH 水平显著降低($p < 0.05$); F2 和 F3 代血清 LH 下降($p < 0.01$ $p < 0.001$); F2 和 F3 代的 E2 水平稍有增加,但无统计意义(图 3) .

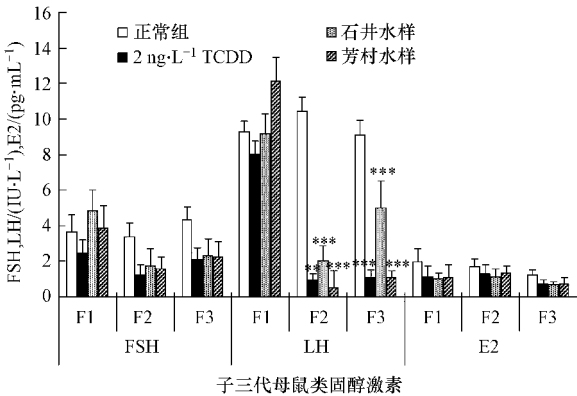


图 3 水样处理对子代血清 FSH , LH 和 E2 水平的影响(平均值 ± 标准误) (* , ** , ***) 表示与 I 组间差异显著或极显著($p < 0.05$ or $p < 0.01$ or $p < 0.001$)

Fig. 3 The effect of contaminated water on serum FSH , LH and E2 of maternal generation(Mean ± SE) (* , ** , ***) The mean difference is significant compared with group I at the 0.05 , 0.01 and 0.001level

3.2.3 水样对子代小鼠卵泡发育的影响 对处理

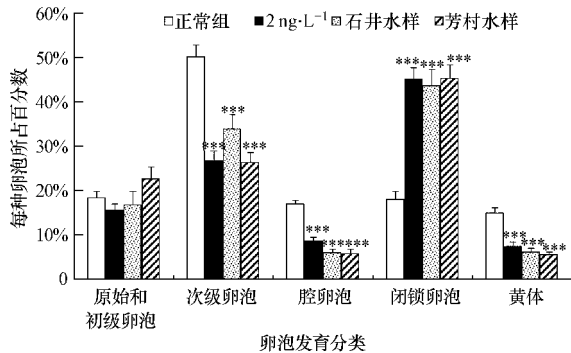


图4 水样处理对仔代卵巢卵泡发育的影响(平均值 ± 标准误)(原始/初级卵泡(P/SF),次级卵泡(MF),腔卵泡(Antral/pre-ovulation PO),闭锁卵泡(AT),黄体(CL))

Fig. 4 Follicular development in the virgin female mice across 3 generation (Mean ± SE) (Primary/Small follicular (SF), Medium follicular (MF), Antral (pre-ovulation PO), Atresia (AT), Corpus luteum (C L). The significant comparative between groups; (***) The mean difference is significant compared with negative control group at 0.001 level)

表2 亲代E2与生殖和发育指标的相关度

Table 2 The correlation between maternal serum E2 and reproduction index

样品组	E2与生殖发育指标相关系数r							性别
	交配时间	交配指数	妊娠指数	妊娠时间	d1存活指数	d4存活指数	d21存活指数	
I组	0.35	0.00	0.98	0.51	0.96	0.96	0.98	0.99
II组	-0.46	-0.89	-0.29	-0.45	-0.80	-0.97	-0.97	0.98
III组	-0.99	-0.996	-0.68	-0.59	-0.91	-0.98	-0.99	0.99
IV组	-0.87	-0.62	-0.02	-0.94	-0.99	-0.89	-0.89	0.99

注: 完全相关 $|r| = 1$; 强相关 $0.7 \leq |r| < 1$; 相关 $0.4 \leq |r| < 0.7$; 弱相关 $|r| < 0.4$; 零相关 $r = 0$

4 讨论 (Discussion)

4.1 污染水影响了小鼠亲代生殖和子代发育

本研究的第一个目标是分析该剂量水平的污染是否对生殖产生危害。前期研究我们利用人类芳香碳氢化合物受体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 结合元件驱动的酵母报道基因系统对广州芳村、石井等河涌水样检测发现存在 AhR 激活物 (黄莉等, 2004), 其污染总毒性当量 (TEQ) 达到一定的危害水平 ($1.19 \sim 3.24 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$)。一般认为芳香碳氢化合物本底水平以总 PCBs 浓度计在 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平, 典型如中欧生物圈保护区为 $2.8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (Koci et al., 2007); 国内报道环境水域中该类污染物在主要江河中含量较低, 如大连海湾和松花江淤泥中为 $58.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $36.8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 一些局部区域含量较高, 如闽江口和太湖水污染高达 $985.2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $631 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (Xing et al., 2005), 珠江三角洲地区表层沉

组 F3 代小鼠卵巢切片 HE 染色, 显微镜下观察, 与 I 比较, II 组、III 组和 IV 组水样使原始卵泡、次级卵泡、腔卵泡、黄体数量减少, II 组和 IV 组以次级卵泡、腔卵泡、黄体数量减少差异显著 ($p < 0.001$); III 组腔卵泡和黄体数量减少显著 ($p < 0.001$), II 组、III 组和 IV 组闭锁卵泡数量增加 ($p < 0.001$) (图 4)。

3.3 雌激素与生殖和发育的关系

3.3.1 亲代血清 E2 与生殖指标的相关性 分析显示正常组 E2 与交配时间、妊娠指数、妊娠时间成正相关, 与交配指数零相关; 处理组血清 E2 与交配时间、交配率、妊娠指数、妊娠时间呈负相关 (表 2)。

3.3.2 亲代血清 E2 与出生第 1 天、第 4 天和第 21 天成活率的相关性 正常组血清 E2 浓度与子鼠出生成活率和雄性比例成正相关; 处理组血清 E2 浓度与子鼠出生成活率呈负相关, 与雄性比例呈正相关 (表 2)。

积物中多环芳烃含量高达 $408 \sim 10810 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (康跃惠等, 2000)。这些污染物对于生殖和发育毒性的研究多数集中在 PCBs, 如水体 PCBs 污染导致鱼鹰和栖息鸟类繁殖失败 (Clark et al., 1998; Harris et al., 2005); 密歇根湖 (Michigan lake) PCBs 污染造成水貂不能正常繁殖 (Heaton et al., 1995); 有关水体二噁英类污染对生殖和发育影响仅见对鱼类的研究多数来自对特定的污染事件调查, 包括: 安大略湖 (Lake Ontario) TCDD 及相关化合物的污染造成虹鳟鱼不能繁殖 (Philip et al., 2003); 英属哥伦比亚 (British Columbia) 海岸 PCDDs 和 PCDFs 的污染引起雏鸕形态异常 (Henshel et al., 1995), 早期发育和性腺分化时期 TCDD 的暴露, 致使斑马鱼的生殖健康受到损害 (Tisha et al., 2009)。值得注意的是与我们检测剂量相当的污染水平有报道认为可造成哺乳类的生殖危害, $2.4 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1}$ TCDD 毒性当量 (TEQs) 浓度 PCBs 饲料影响了水貂的繁殖

(Brunström *et al.*, 2001). 用 1.8 ng TCDD 长期饲养雌性虹鳟造成成鱼的繁殖率、幼鱼的存活率和生长下降(Giesy *et al.*, 2002), 而针对城市河涌水样的生殖毒性实验尚未见到类似报道.

实验中, 我们给 C57BL/6 小鼠暴露于河涌水可以引起显著的生殖毒害. 饮用河涌水(Ⅲ组、Ⅳ组)显著延长了小鼠的交配时间, 降低了受孕率、生育率和妊娠率, 出生后子鼠存活率逐代下降(表 1). 说明水样对母体生殖有直接毒性作用, 是造成妊娠中后期流产、妊娠率显著降低的直接原因. 其中涉及的机制可能与改变动物性激素水平有关. 类似的环境污染物导致的生殖毒性屡见不鲜, 典型的如莠去津(一种除草剂)降低大鼠血清中 FSH 和 LH 水平是导致动物不发情的原因(Cooper *et al.*, 1996; Fraites *et al.*, 2009); 杀虫脒和硫四甲秋兰姆(杀真菌药)可影响大鼠血浆 LH 浓度而使排卵推迟, 进而影响动物生殖和发育指标(Stoker, 2001). 本研究对出生后 35 日龄子代血清性激素检测, 发现青春期雌性小鼠 F2 和 F3 代的血清 LH 明显降低(图 2), 血清 LH 的减少可引起卵巢卵泡发育受阻, 雌激素分泌不足, 是次级卵泡(生长卵泡)和腔卵泡减少, 黄体减少和闭锁卵泡增加的原因(图 4); 亲代小鼠 P0 代血清雌二醇含量降低, 其余 P1 和 P2 代激素水平变异极大, 说明河涌水引起激素分泌的紊乱与小鼠个体发育不整齐造成的发情周期紊乱有关. 由此可以推论河涌水引起母鼠生殖扰乱的原因在于水中含有生殖激素的干扰物. 结果与 TCDD 大鼠模型研究相符(Gao *et al.*, 2001; Patnode *et al.*, 1994).

4.2 河涌水与 $2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TCDD 暴露的毒性性质和造成的危害程度相似

由于酵母系统的分析结果所代表的是 AhR 激活的效应, 虽然一般认为是其毒性的机制研究, 但河涌水中含有众多的化合物, 可能的毒性机制有别于 TCDD 的典型效应, 我们期望通过与典型污染物 TCDD 的比较, 分析其毒性效应的机制是否存在差异. 实验中设置含有 $2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TCDD 水样, 根据成年小鼠饮水量 $4 \sim 7 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$ 计算, 小鼠每天进入体内的 AhR 激活物约在 $0.008 \sim 0.014 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (TEQ). 河涌水引起的指标变化与阳性对照(Ⅱ组)相似, 其中交配时间、受孕率、生育率和妊娠率, 出生后子鼠存活率, 青春期雌性小鼠 F2 和 F3 代的血清 LH 水平, P0 代血清雌二醇含量, F3 闭锁卵泡和黄体这些在污水观察到的指标变化, 在 TCDD 标准

对照中同样发生了改变, 说明河涌水中极有可能存在二噁英类似物. 河涌水的生殖毒性特点也符合环境内分泌干扰物特征. 实验中我们还发现 AhR 激活所引起的体内分子标记 CYP1A2 表达行为在两者之间完全相同(黄莉等, 2010), 也支持污水中的生殖毒性成分与 TCDDs 相关的推断. 但 TCDD 标准水样与河涌水样之间, 某些指标具有差异的, 尤其是河涌水对活产率的影响大于 TCDD 阳性对照结果. 这一现象可能与河涌水中多种污染物的协同有关, 研究中曾对 TCDD, 苯并芘和 β -萘黄酮的单一和混合标准品对 LacZ 活性诱导表达进行过检测(黄莉等, 2004), 发现混合后对酶活性诱导大于 TCDD 单独诱导. 说明污染水样中可能含有其他种类的生殖和发育毒性物质, 导致实验结果并不能完全以 TCDD 的典型毒害方式表现出来.

5 结论 (Conclusions)

1) 工业和生活污水中存在二噁英类似物污染. 长期接触可造成 C57BL/6 雌性小鼠生殖激素紊乱. 对雌性小鼠生殖和发育有实质性影响, 且对青春小鼠的生殖影响大于对发育的影响.

2) 由于现有饮用水处理方法未包含对卤代芳烃类物质的去除措施, 这类物质对人类健康的影响应该受到关注.

责任作者简介: 李冰(1963—), 男, 广州医学院实验医学研究中心教授, 硕士生导师, 主要从事分子生物学和分子毒理学研究.

参考文献 (References):

- Abalos M, Abad E, Estévez A, *et al.* 2008. Effects on growth and biochemical responses in juvenile gilthead seabream 'Sparus aurata' after long-term dietary exposure to low levels of dioxins [J]. *Chemosphere* 73(1): 303–310
- Brunström B, Lund B O, Bergman A *et al.* 2001. Reproductive toxicity in mink (*Mustela vison*) chronically exposed to environmentally relevant polychlorinated biphenyl concentrations [J]. *Environ Toxicol Chem* 20(10): 2318–2327
- Clark K E, Niles L J, Stansley W. 1998. Environmental contaminants associated with reproductive failure in bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) eggs in New Jersey [J]. *Bull Environ Contam Toxicol* 61: 247–254
- Cooper R L, Stoker T E, Goldman J M *et al.* 1996. Effect of atrazine on ovarian function in the rat [J]. *Reprod Toxicol*, 10(4): 257–264.
- Fraites M J, Cooper R L, Buckalew A *et al.* 2009. Characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to atrazine and

- metabolites in the female rat[J]. *Toxicol Sci* ,112(1) : 88-99
- Giesy J P , Jones P D , Kannan K *et al.* 2002. Effects of chronic dietary exposure to environmentally relevant concentrations to 2 , 3 , 7 , 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on survival , growth , reproduction and biochemical responses of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquat Toxicol* ,59: 35-53
- Gao X , Mizuyachi K , Terranova P F , *et al.* 2001. 2 , 3 , 7 , 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin decreases responsiveness of the hypothalamus to estradiol as a feedback inducer of preovulatory gonadotropin secretion in the immature gonadotropin-primed rat[J]. *Toxicol Appl Pharmacol* ,170(3) : 181-190
- Harris M L , Wilson L K , Elliott J E. 2005. An assessment of PCBs and OC pesticides in eggs of double-crested (*Phalacrocorax auritus*) and Pelagic (*P. pelagicus*) cormorants from the west coast of Canada , 1970 to 2002 [J]. *Ecotoxicology* ,14(6) : 607-625
- Heaton S N , Bursian S J , Giesy J P , *et al.* 1995. Dietary exposure of mink to carp from Saginaw Bay , Michigan. 1. Effects on reproduction and survival , and the potential risks to wild mink populations [J]. *Arch Environ Contam Toxicol* ,28(3) : 334-343
- Henshel D S , Martin J W , Norstrom R , *et al.* 1995. Morphometric abnormalities in brains of great blue heron hatchlings exposed in the wild to PCDDs [J]. *Environ Health Perspect* ,103(4) : 61-66
- 黄莉 , 黄韧 , 刘寒英 , 等. 2010. 二噁英染毒模型小鼠子宫中相关受体及代谢酶的分布 [J]. *中华生物医学工程杂志* ,16(5) : 469-475
- Huang L , Huang R , Liu H Y *et al.* 2010. Distribution of dioxin receptors and metabolizing enzymes of 2 , 3 , 7 , 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure mice models [J]. *Chin J Biomed Eng* ,16(5) : 469-475 (in Chinese)
- 黄莉 , 黄韧 , 冯媛瑜 , 等. 2010. 2 , 3 , 7 , 8-四氯苯并二噁英短期染毒可造成着床前胚胎丢失并伴随雌性生殖器官中毒物相关蛋白的诱导表达 [J]. *生态毒理学报* ,5(3) : 334-342
- Huang L , Huang R , Feng Y Y *et al.* 2010. Short time exposure of tcdd causing loss of implantation failure of embryos and its associated with induced expression of relevant proteins [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology* ,5(3) : 334-342(in Chinese)
- 黄莉 , 王建华 , 戴丽军 , 等. 2004. 酵母基因报道系统检测环境二恶英类似物的污染 [J]. *应用与环境生物学报* ,10(4) : 493-496
- Huang L , Wang J H , Dai L J *et al.* 2004. Utilization of yeast gene report system to detect environmental Dioxins-like substances [J]. *China J Appl Environ Biol* ,10(4) : 493-496(in Chinese)
- 黄莉 , 王建华 , 戴丽军 , 等. 2005. 2 , 3 , 7 , 8-四氯苯二恶英对 NIH 小鼠早期妊娠和生殖激素的影响 [J]. *环境科学学报* ,25(1) : 94-98
- Huang L , Wang J H , Dai L J , *et al.* 2005. Effects of 2 , 3 , 7 , 8-tetrachlorodibenzodioxin on the Early Pregnancy and Cycling Reproductive Hormone Levels of NIH Mouse [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae* ,25(1) : 94-98(in Chinese)
- 黄莉 , 吕嘉春 , 戴丽军 , 等. 2005. 妊娠早期不同时间的 2 , 3 , 7 , 8-四氯苯二恶英染毒对小鼠胚胎转移率和成活率的影响 [J]. *卫生毒理学杂志* ,19(2) : 89-91
- Huang L , Lü J C , Dai L J *et al.* 2005. Effects of TCDD dose at different stage on the embryo lost at early pregnancy and survive rate at born [J]. *Journal of Health Toxicology* ,19(2) : 89-91(in Chinese)
- 康跃惠 , 麦碧娴 , 黄秀娥 , 等. 2000. 珠江三角洲地区水体表层沉积物中有机污染状况初步研究 [J]. *环境科学学报* ,20(增刊) : 167-170
- Kang Y H , Mai B X , Huang X E *et al.* 2000. Primary study on status of organic pollution in surface sediments of the Pearl River Delta [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae* ,20(Suppl) : 167-170(in Chinese)
- Koci V , Ocelka T , Dragoun D , *et al.* 2007. Concentration of organochlorine pollutants in surface waters of the central European biosphere reserve Krivoklatsko [J]. *Environ Sci Pollut Res Int* ,14(2) : 94-101
- Patnode K A , Curtis L R. 1994. 2 , 4 , 4' , 5' - and 3 , 4 , 4' , 5' - hexachlorobiphenyl alteration of uterine progesterone and estrogen receptors coincides with embryotoxicity in mink [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* ,127(1) : 9-18
- Philip M C , John A R , Douglas D E , *et al.* 2003. Effects of Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Early Life Stage Toxicity on Lake Trout Populations in Lake Ontario during the 20th Century [J]. *Environ Sci Technol* ,37(17) : 3864-3877
- Stoker T E , Goldman J M , Cooper R L. 2001. Delayed ovulation and pregnancy outcome: effect of environmental toxicants on the neuroendocrine control of the ovary (1) [J]. *Environ Toxicol Pharmacol* ,9(3) : 117-129
- Tisha C , King H , Jan S *et al.* 2009. Persistent adverse effects on health and reproduction caused by exposure of zebrafish to 2 , 3 , 7 , 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during early development and gonad differentiation [J]. *Toxicology sciences* ,109(1) : 75-87
- Xing Y , Lu Y , Dawson R W *et al.* 2005. A spatial temporal assessment of pollution from PCBs in China [J]. *Chemosphere* ,60(6) : 731-739