

# 咪鲜胺对雄性小鼠生殖毒理作用的研究

唐涛<sup>1</sup> 董锦熠<sup>1</sup> 李想<sup>1</sup> 谭显胜<sup>1,2</sup> 吴娟<sup>1,2</sup> 金晨钟<sup>1,2</sup> 胡军和<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup> 湖南人文科技学院农业与生物技术学院, 湖南娄底 417000;

<sup>2</sup> 湖南人文科技学院, 湖南省农药无害化应用重点实验室, 湖南娄底 417000)

**摘要** 为了探讨咪鲜胺对雄性小鼠的生殖毒理作用, 利用腹腔注射法, 研究咪鲜胺对雄性小鼠生长发育、生殖器官系数和精子浓度及活率的影响。结果表明, 咪鲜胺对雄性小鼠生长发育影响较小, 但是其对雄鼠生殖器官生长发育具有一定毒理作用, 继而对雄鼠生殖力产生影响, 表现为精子浓度和活率降低。该结果可为今后进一步探讨咪鲜胺对雄性动物的生殖毒性提供一定的理论支持。

**关键词** 内分泌干扰物; 咪鲜胺; 雄性小鼠; 生殖毒性

中图分类号 S482.2 文献标识码 A

文章编号 1007-5739(2021)02-0182-03

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5739.2021.02.073

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Research on Reproductive Toxicity of Prochloraz on Male Mice

TANG Tao<sup>1</sup> DONG Jinyi<sup>1</sup> LI Xiang<sup>1</sup> TAN Xiansheng<sup>1,2</sup> WU Juan<sup>1,2</sup> JIN Chenzhong<sup>1,2</sup> HU Junhe<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Agriculture and Biotechnology, Hunan University of Humanities and Technology, Loudi Hunan 417000; <sup>2</sup> Hunan University of Humanities and Technology, Hunan Key Laboratory of Pesticide Harmless Application, Loudi Hunan 417000)

**Abstract** In order to investigate the reproductive toxicity of prochloraz on male mice, the effects of prochloraz on the growth and development, reproductive organ coefficient, sperm concentration and viability of male mice were studied by intraperitoneal injection. The results showed that prochloraz had little effect on the growth and development of male mice, but it had a certain toxic effect on the growth and development of male reproductive organs, and then had an impact on the fecundity of male mice, with the decrease of sperm concentration and motility. The results can provide theoretical support for further study of prochloraz's reproductive toxicity in male animals.

**Keywords** endocrine disruptor; prochloraz; male mouse; reproductive toxicity

随着人们对环境毒理学研究的日益深入, 环境内分泌干扰物对人体健康的影响也备受关注。近年的研究表明, 内分泌干扰物会对动物的生长发育和内分泌功能造成影响<sup>[1-3]</sup>, 会造成雄性动物生殖内分泌紊乱, 导致雄性大鼠血清睾酮、促黄体生成素和睾丸环腺苷酸含量在一定时间内显著变化, 影响胆固醇合成中关键酶的基因表达<sup>[4]</sup>, 具有诱发生殖障碍的风险。农药类内分泌干扰物一直与人类及其他野生动物息息相关, 累积效应下会对动物生殖系统造成直接影响, 还会进一步影响动物生殖相关基因, 包括调控促性腺激素相关基因、细胞增殖分化相关基因、性激素受体相关基因等<sup>[5]</sup>。常用杀菌剂咪鲜胺也是环境内分泌干扰物

之一。研究表明, 咪鲜胺是一种环境抗雄激素物, 直接暴露具有干扰动物体内激素分泌作用, 孕期暴露会影响后代性别分化, 还会对雄性后代的生殖系统造成影响<sup>[6-7]</sup>。

人类日常生活中不可避免地会通过不同途径接触大量可能的化合物。研究显示, 农药在观察到的环境内分泌干扰物影响中占主导地位<sup>[8]</sup>。国内关于咪鲜胺对雄性动物生殖毒理作用的研究较少, 鉴于咪鲜胺作为广谱杀菌剂的大量使用, 其对人类和野生动物生殖系统具有潜在影响。本研究通过腹腔注射咪鲜胺暴露, 分析其对小鼠生长发育、睾丸指数和精子浓度的影响, 以期为进一步评估咪鲜胺对雄性哺乳动物的毒性作用和机理提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验动物: 健康雄性昆明小鼠 32 只, 8~10 周龄, 体质量 35~40 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物许可证号 SCXK(湘)2009-0004。主要仪器:

**基金项目** 湖南省研究生科研创新项目(CX20190953); 娄底市科技局科技创新项目“2018 应用技术研究与应用项目”。

**作者简介** 唐涛(1996—), 男, 湖南怀化人, 在读硕士研究生。研究方向: 资源利用与植物保护。

\* 通信作者

**收稿日期** 2020-08-24

EVOS X1 大屏数码显微镜,由美国 AMG 生产;二氧化碳培养箱,由美国 Thermo Fisher Scientific 生产;AIRT EH 超净工作台,由安泰科技有限公司生产;精子计数板,一次性塑料培养皿,由浙江柏美特医用塑料有限公司生产。主要试剂:咪鲜胺,由上海泰坦科技股份有限公司生产;组织洗液(HEPES 缓冲液, Serum Protein Substitute, SPS),由美国 SAGE 生产。

## 1.2 试验方法

小鼠分笼饲养在普通动物饲养房,温度 23~25℃,相对湿度为 60%~80%,明暗 12 h 周期交替,小鼠自然饮水采食。喂养 3 d 后,将 32 只雄性小鼠随机分为 4 组,即对照组(玉米油)、低剂量组、中剂量组、高剂量组,其中低剂量组、中剂量组、高剂量组的用药量分别为 53.33、80.00、160.00 mg/(kg·体质量·d)。每组 8 只,采用腹腔注射方式进行染毒,每天 1 次,时间为 15:00,连续 15 d 注射。试验组注射由咪鲜胺溶于溶剂玉米油之中制成的均匀混悬液,每 3 d 配制 1 次,对照组注射溶剂玉米油,每日注射量均依照当日称取小鼠的体质量来确定。

## 1.3 脏器系数测定

染毒结束采用脱臼法处死小鼠后,立即取出双侧睾丸及附睾,剥离粘连的脂肪组织,迅速称取质量并记录湿质量,计算睾丸指数。计算公式如下:

$$\text{睾丸指数} = \text{睾丸质量} / \text{体质量}$$

## 1.4 精子密度与活率测定

剪下一侧附睾尾用组织洗液冲洗后迅速置于盛有 5 mL 培养液的培养皿中,用眼科剪将附睾尾剪成小段,放置于二氧化碳培养箱让精子游离 15 min 后过滤,制成精子悬液。吸取 10  $\mu\text{L}$  精子悬液,显微镜下采用红细胞计数法计算精子数,精子活率为观测到的活动精子数(总精子数与不活动精子数之差)与总精子数的比值。

## 1.5 数据分析

试验数据采用 SPSS 23.0 统计软件进行显著性差异分析,多重比较选用 Duncan 法, $P \leq 0.05$  即表示差异具有统计学意义,计量资料均以均数 $\pm$ 标准差表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 咪鲜胺对雄性小鼠体质量的影响

体质量变化是检测化合物对生物体毒性作用的指标之一,染毒后 10 d 各组小鼠体质量变化如图 1 所示,可以看出,中、高剂量组小鼠体质量在第 1 天均有下降,且咪鲜胺暴露组小鼠体质量一直低于 CK,但是各组数据间无显著性差异( $P > 0.05$ ),这一结果与 Blystone C R 等<sup>[9]</sup>的研究结论相似。

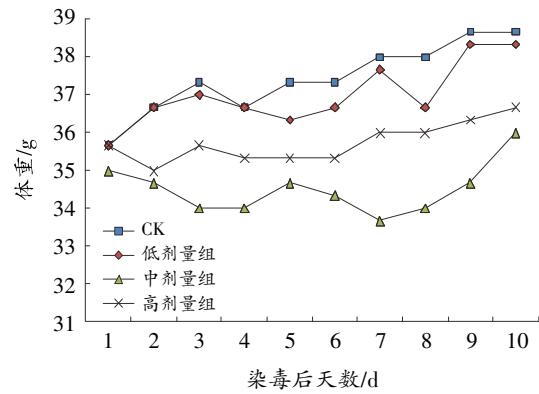


图 1 各组小鼠注射后每日平均体质量变化趋势

### 2.2 咪鲜胺对雄性小鼠睾丸质量及睾丸系数的影响

在抗雄激素物的作用下,雄性小鼠的生殖器官受到的影响较大。对雄性小鼠睾丸质量和睾丸系数进行分析,结果如表 1 所示。可以看出,低剂量组小鼠的睾丸质量与 CK 存在显著性差异( $P < 0.05$ ),但中、高剂量组与 CK 的睾丸质量无显著性差异( $P > 0.05$ ),低、中、高剂量组的睾丸质量之间也无显著性差异( $P > 0.05$ )。低、中、高剂量组小鼠睾丸系数均小于 CK,但差异不显著( $P > 0.05$ ),各组小鼠睾丸系数之间均无显著性差异( $P > 0.05$ )。

表 1 咪鲜胺对雄性小鼠睾丸质量及睾丸系数的影响

| 处理   | 睾丸质量/g               | 睾丸系数                     |
|------|----------------------|--------------------------|
| 低剂量组 | 0.310 $\pm$ 0.023 b  | 0.008 1 $\pm$ 0.001 00 a |
| 中剂量组 | 0.317 $\pm$ 0.038 ab | 0.008 5 $\pm$ 0.000 88 a |
| 高剂量组 | 0.324 $\pm$ 0.005 ab | 0.008 3 $\pm$ 0.000 40 a |
| CK   | 0.352 $\pm$ 0.023 a  | 0.009 1 $\pm$ 0.000 84 a |

注:同列不同字母表示在  $P < 0.05$  水平上的差异显著性。

### 2.3 咪鲜胺对雄性小鼠精子活率的影响

精子活率和精子浓度一直被作为雌性哺乳动物生殖力的重要指标,各组小鼠精子活率如图 2 所示。可以看出,咪鲜胺暴露组小鼠精子活率均低于 CK,且与 CK 存在显著性差异( $P < 0.05$ ),3 个处理组间的精子活率无显著性差异( $P > 0.05$ ),由此表明咪鲜胺对雄性小

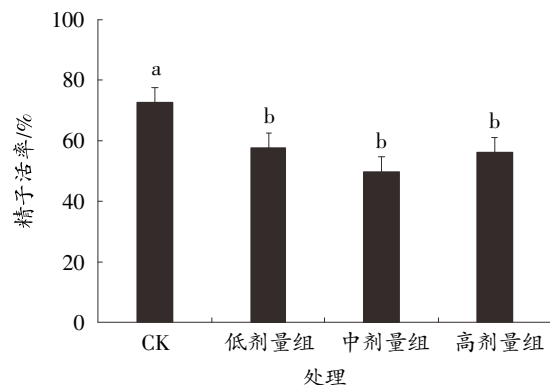


图 2 各组小鼠平均精子活率

鼠的精子活率具有抑制作用。

各组小鼠精子浓度如图3所示,可以看出,其中咪鲜胺暴露组精子浓度均小于CK,且具有显著性差异( $P<0.05$ ),这一结果与 Conley J M 等<sup>[10]</sup>的研究相似。

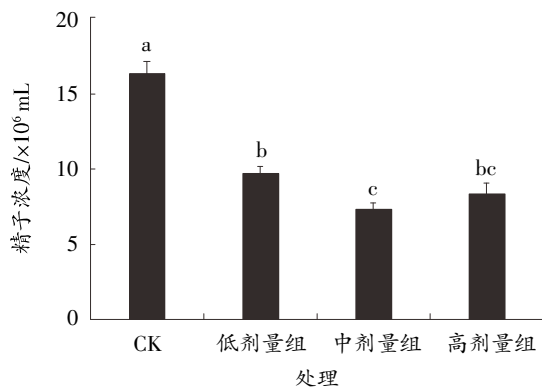


图3 各组小鼠平均精子浓度

### 3 结论与讨论

试验结果表明,通过腹腔注射咪鲜胺暴露,对雄性小鼠生长发育、睾丸质量和系数影响较小,咪鲜胺暴露对雄性小鼠精子浓度和活率有一定影响,继而可能会降低雄鼠生育能力。

内分泌干扰物尤其是具有抗雄激素性质类已被证实具有影响雄性动物生育能力的潜在风险,表现为精液量和精子数量减少,精子运动能力低下、形态异常,严重的会导致睾丸癌。在人早期发育过程中,长期接触内分泌干扰物,可致使成年后机体对激素的反应性发生改变。成年后长期大剂量接触,可以导致生殖功能下降,主要包括精子质量下降和数量减少、先天性隐睾和尿道下裂发生率上升、不育症发生率上升等<sup>[11]</sup>。通过成年雄性小鼠腹腔暴露咪鲜胺试验发现,在试验给定的剂量下,咪鲜胺未对雄性小鼠造成明显的毒性作用,在给药结束后继续跟踪记录小鼠体质量,3个试验组体质量低于对照组,但无显著性差异,表明咪鲜胺对雄性小鼠体质量变化影响较小,这与 Schmidt F 等<sup>[12]</sup>的研究结论有稍许差异。

虽然 Laier P 等<sup>[13]</sup>研究表明,怀孕母鼠咪鲜胺暴露,会导致雄性子代雄激素受体信号受干扰,继而抑制雄性后代内源性激素的产生,导致生殖器官质量降低,但是本试验对象为成年公鼠,咪鲜胺未能在其生殖器官发育重要阶段发挥作用,故而对雄性小鼠睾丸质量和睾丸系数未产生明显影响,这一结果也表明咪鲜胺对雄性哺乳动物生殖器官的生殖毒理作用主要发生在性器官发育阶段,而对发育成熟的雄性动物影响不明显。

本试验结果表明,咪鲜胺对成年雄性小鼠睾丸质量及系数影响也较小,但值得注意的是,与对照组相

比,咪鲜胺显著降低了试验组雄性小鼠的精子活率,这一结果可能是由咪鲜胺直接作用于雄鼠生殖器官,导致附睾和精囊腺、尿道球腺和复侧前列腺等副性腺重量的降低所引起的<sup>[14-15]</sup>。同时咪鲜胺暴露组精子浓度也低于对照组,出现这一结果的原因可能是由于抗雄激素暴露,睾酮合成关键酶合成受阻,睾酮间质细胞发育障碍导致的。Wilson 等<sup>[16]</sup>研究表明,抗雄激素通过破坏雄激素受体信号通路导致生殖组织的改变,其作用机制包括与激素受体结合、改变内源性激素的产生或代谢或者修饰激素受体的数量,最终结果也会导致雄鼠生育能力下降。以上结论进一步表明了咪鲜胺能对雄性动物生育能力产生影响,但是其具体作用机制还需要进一步探究。

在日常生活中,人类和其他野生动物不可避免会与环境内分泌干扰物接触,其毒理作用是长效和累积的。研究显示,20世纪以来,人类的生殖能力和生殖健康水平呈明显下降趋势,其中由男方生殖健康原因引起的不育约占30%,其主要原因来自环境有害因素对男性生殖系统的干扰作用<sup>[17]</sup>。研究表明,环境内分泌干扰物不仅能直接影响父母体的生育能力,对其子代的正常生长发育也具有影响<sup>[18]</sup>。因此,探究内分泌干扰物对雄性动物的影响,还需要进一步结合其对子代的毒理作用机制进行分析。

### 4 参考文献

- [1] 张婉莹,吴昊宇,董新文,等.邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯长期暴露对成年雄鼠甲状腺激素水平的影响[J].癌变·畸变·突变,2020,32(1):47-51.
- [2] 张立颖,高娜,许肖肖,等.出生前邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯暴露对青春期雄性大鼠甲状腺激素合成的影响[J].环境与健康杂志,2019,36(10):902-905.
- [3] 韩玉,侯振中.亚硒酸钠对雌鼠生殖系统毒性作用的研究[J].中国兽医杂志,2012,48(7):8-10.
- [4] 王新,于浩,房恒通,等.玉米赤霉烯酮通过干扰内分泌系统造成性成熟雄性大鼠生殖损伤[J].中国兽医学报,2019,39(7):1394-1398.
- [5] 杨娜,吴航利,王佳,等.农药类内分泌干扰物对动物生殖系统干扰机制的研究进展[J].延安大学学报(自然科学版),2020,39(2):87-91.
- [6] JACOBSEN P R, CHRISTIANSEN S, BOBERG J, et al. Combined exposure to endocrine disrupting pesticides impairs parturition, causes pup mortality and affects sexual differentiation in rats[J]. International Journal of Andrology, 2010, 33(2):434-442.
- [7] ALPERTUNGA B, KARA M, ABUDAYYAK M, et al. Effects of prochloraz on DNA damage, lipid peroxidation and antioxidant system *in vitro*[J]. Toxicol Mech Methods, 2014, 24(4):

(下转第187页)

值。食用价值主要表现在可使用部分占体质量的比例以及食用时的口感(肌肉的嫩度和鲜味)方面,而营养价值主要取决于为合成人体内含氮化合物必需氨基酸的含量与组成比例。

**3.1.1 大鲵的食用价值。**研究表明,大鲵去内脏质量占体质量的 90.11%,大鲵可食用部分比例较高。另外,大鲵肌肉鲜味氨基酸含量占总氨基酸含量的 38.69%,远高于鳊鱼(33.6%)、丁鱼(31.05%)、大口胭脂鱼(27.63%)等常见名贵鱼类,表明大鲵肌肉肉味鲜美。综合以上 2 项指标,大鲵肌肉有很高的食用价值。

**3.1.2 大鲵的营养价值。**大鲵肌肉的蛋白质含量很高,粗蛋白含量为 16.79%,而且肌肉中的钙、磷、锌等对人体重要的矿质元素含量丰富。此外,大鲵肌肉中必需氨基酸含量占总氨基酸含量的 43.20%,与大口胭脂鱼(43.35%)相似,明显高于黄颡鱼(41.37%)和鳊(39.91%)等经济鱼类,且均显著高于 FAO/WHO 的氨基酸标准模式(35.38%)。由此可见,大鲵肌肉也具有较高的营养价值。

### 3.2 结论

本研究结果表明,大鲵去内脏质量占总体质量的 90.11%,鲜味氨基酸占总氨基酸的 38.69%,粗蛋白质含量为 16.79%,且必需氨基酸占总氨基酸的 43.20%。

说明大鲵是一种食用价值和营养价值都很高的水产动物,有很高的人工养殖价值。

### 4 参考文献

- [1] MORESCALCHI A, ODIEMA G, OLMO E. Karyological relationships between the *Cryptobranchid salamanders* [J]. *Experientia*, 1977, 33: 1579-1581.
- [2] 王海文. 我国大鲵 *Megalobatrachus davidianus* (Blan-chard) 研究现状与发展前景的探讨 [J]. *现代渔业信息*, 2002, 17(7): 5-8.
- [3] 陈曦, 王杨科, 陈德经. 大鲵皮肤药膏和大鲵黏液药膏烫伤药理试验研究 [J]. *湖北农业科学*, 2012, 51(13): 2797-2800.
- [4] 杨玉凤. 大鲵的药用价值及人工养殖 [J]. *北京农业*, 2004(1): 28.
- [5] 王立新, 郑尧, 艾闽, 等. 中国大鲵皮肤营养成分分析 [J]. *淡水渔业*, 2011, 41(1): 92-95.
- [6] 张神虎. 大鲵药用价值 [J]. *广西农业生物科学*, 2001(4): 309-310.
- [7] 周兴华, 郑曙明, 吴青, 等. 齐口裂腹鱼肌肉营养成分的分析 [J]. *大连水产学院学报*, 2005(1): 20-24.
- [8] 艾为明, 陈少波, 曾国权, 等. 人工模拟生态养殖子二代大鲵肌肉营养成分分析 [J]. *水生态学杂志*, 2008, 29(6): 120-123.
- [9] 董宏伟, 韩志忠, 康志平, 等. 匙吻鲟含肉率及肌肉营养成分分析 [J]. *淡水渔业*, 2007(4): 49-51.
- [10] CONLEY J M, LAMBRIGHT C S, NICOLA E, et al. Mixed "antiandrogenic" chemicals at low individual doses produce reproductive tract malformations in the male rat [J]. *Toxicological Sciences; an Official Journal of the Society of Toxicology*, 2018, 164: 166.
- [11] 周万灏, 贾孟春. 环境内分泌干扰物对男性生殖的影响 [J]. *国外医学(计划生育/生殖健康分册)*, 2006(3): 174-177.
- [12] SCHMIDT F, MARX-STOELTING P, HAIDER W, et al. Combination effects of azole fungicides in male rats in a broad dose range [J]. *Toxicology*, 2016, 355: 54-63.
- [13] LAIER P, METZDORFF S B, BORCH J, et al. Mechanisms of action underlying the antiandrogenic effects of the fungicide prochloraz [J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 2006, 213(2): 160-171.
- [14] WILSON V S, BLYSTONE C R, HOTCHKISS A K, et al. Diverse mechanisms of anti-androgen action: impact on male rat reproductive tract development [J]. *International Journal of Andrology*, 2008, 31(2): 178-187.
- [15] SCHNEIDER S, FUSSELL K C, MELCHING-KOLLMUSS S, et al. Investigations on the dose-response relationship of combined exposure to low doses of three anti-androgens in Wistar rats [J]. *Archives of Toxicology*, 2017.
- [16] WILSON V S, BLYSTONE C R, HOTCHKISS A K, et al. Diverse mechanisms of anti-androgen action: impact on male rat reproductive tract development [J]. *International Journal of Andrology*, 2008, 31(2): 178-187.
- [17] 曹佳. 环境有害因素对男性生殖健康的影响及其机制 [J]. *中华预防医学杂志*, 2018, 52(7): 681-684.
- [18] 孔元原, 蔡德培. 环境内分泌干扰物与儿童性发育异常 [J]. *国外医学(卫生学分册)*, 2007(6): 333-338.

(上接第 184 页)

268-275.

- [8] HEISE T, SCHMIDT F, KNEBEL C, et al. Hepatotoxic combination effects of three azole fungicides in a broad dose range [J]. *Archives of Toxicology*, 2018, 92(2): 859-872.
- [9] BLYSTONE C R, JOHNATHAN F, LAMBRIGHT C S, et al. Prochloraz inhibits testosterone production at dosages below those that affect androgen-dependent organ weights or the onset of puberty in the male Sprague Dawley rat [J]. *Toxicological Sciences; an Official Journal of the Society of Toxicology*, 2007, 97(1): 65.
- [10] CONLEY J M, LAMBRIGHT C S, NICOLA E, et al. Mixed "antiandrogenic" chemicals at low individual doses produce reproductive tract malformations in the male rat [J]. *Toxicological Sciences; an Official Journal of the Society of Toxicology*, 2018, 164: 166.
- [11] 周万灏, 贾孟春. 环境内分泌干扰物对男性生殖的影响 [J]. *国外医学(计划生育/生殖健康分册)*, 2006(3): 174-177.
- [12] SCHMIDT F, MARX-STOELTING P, HAIDER W, et al. Combination effects of azole fungicides in male rats in a