

三氧化二砷(As_2O_3)对雄性小鼠的遗传毒性的研究

钱 晓 薇

(温州师范学院生命与环境科学学院 温州 325003)

摘 要 本文以清洁级 ICR 雄性小鼠为实验动物,研究 As_2O_3 对小鼠的遗传毒性。采用小鼠精子畸形实验法以及小鼠骨髓 PCE 微核实验法,对成年的小鼠腹腔注射 0.25–6.00mg/kg/d As_2O_3 ,染毒 7d。结果表明, As_2O_3 对小鼠的体重增长及睾丸的重量存在抑制作用,其中 1.00mg/kg/d 剂量 As_2O_3 对小鼠体重增长及睾丸重量的抑制是最显著的($P<0.001$); As_2O_3 使小鼠精子的畸形率明显增加($P<0.001$),且呈明显的剂量-效应关系;此外 As_2O_3 还使小鼠 PCE 微核率增加,且 As_2O_3 与 PCE 微核率之间也具有明显的剂量效应。结论是 As_2O_3 对雄性小鼠具有明显的遗传毒性。

关键词: As_2O_3 睾丸 精子畸形率 微核率

三氧化二砷俗称“砒霜”,作为药物使用已经有悠久的历史,但由于其毒性较大而使用谨慎。临床发现三氧化二砷在治疗白血病、胃癌、食管癌等方面,以其疗效佳、副作用少而日益受到医学界的重视^[1,2]。研究表明砷对哺乳动物和人体具有致突、致畸和致癌作用^[3,4]。三氧化二砷对蚕豆根尖细胞具有明显的细胞遗传学毒性,并具有积累有丝分裂中期细胞的效应^[5]。Wyrobek 等通过精子畸形实验认为,哺乳动物生殖细胞对诱变剂高度敏感,并观察到人类与鼠类精子试验反应相似^[6]。为此本实验研究三氧化二砷对雄性小鼠的生殖细胞及骨髓嗜多染红细胞(PCE)的影响,以便为三氧化二砷用于临床治疗提供参考资料。

材料和方法

1. 材料

实验材料选用体格健康的雄性清洁级 ICR 小鼠,共 80 只,由温州医学院实验动物中心提供。三氧化二砷由哈尔滨伊达药业有限公司生产,其浓度为 1mg/ml。

2. 方法

实验小鼠随机分 8 组,每组 10 只小鼠,每天称重,按体重腹腔注射 0.25、0.50、0.75、1.00、2.00、4.00、6.00mg/kg 三氧化二砷;另设 1 个对照组,注射 0.9% 的生理盐水。每天同一时间注射 1 次,持续 7d。停药 24h 后,颈椎脱臼法处死小鼠。剪开阴囊,取出睾丸,称重。然后分离出两只附睾,用生理盐水冲洗,放入盛有 4ml 生理盐水的小烧杯中,以眼科剪剪碎组织,混匀。通过四层擦镜纸滤除组织碎片。滤液以 1000r/min 离心 5min,弃上清液,将剩余少量液体与沉淀摇匀、制片。干燥后,甲醇固定 5–10min,干后用改良石炭酸品红染色 1h。制片标本在高倍镜下检查精子形态,每只小鼠检查完整的精子 1000 只。凡出现双头或者头部无钩、

香蕉状、无定形、肥胖以及双尾、尾巴折叠等现象即定为畸形^[7]。每组观察 10000 个精子,以求出畸形率(‰)。小鼠处死后并取股骨置于 2ml 生理盐水中夹碎,将上层细胞悬浮液倒入离心管中,1000rpm 离心 5–8min,弃上清液,加 2–3 滴小牛血清(已灭活),涂片 4 张,自然干燥,甲醇固定 5–8min,用 10% 吉氏染色液染色 10min,磷酸缓冲液冲洗。油镜下观察每鼠 1000 个 PCE 细胞,计算其微核千分率^[8]。

3. 统计方法

—均采用 SPSS10.0 数据处理系统进行统计处理。

结 果

1. 三氧化二砷对小鼠体重和睾丸的影响

经不同剂量 As_2O_3 处理的小鼠,在实验期间没有表现出异常的行为和明显的中毒症状。由表 1 可见,在 0–1.00mg/kg 剂量范围内 As_2O_3 对小鼠体重增长的影响随着剂量的增加而呈现出明显的抑制作用,1.00mg/kg 剂量组的抑制最强,即 3 个低剂量组(0.25、0.50、0.75mg/kg)实验期间小鼠体重增加均达极显著水平($P<0.01$ 或 $P<0.001$),而高剂量组(1.00mg/kg 剂量组)实验期间小鼠体重增加达显著水平($P<0.05$)。但随着剂量的进一步增加,即在 1.0–6.0mg/kg 剂量范围内 As_2O_3 对小鼠体重增长的影响随着剂量的增加而使抑制减弱,即低剂量组(1.00mg/kg 剂量组)实验期间小鼠体重增加达显著水平($P<0.05$),而高剂量组(2.00、4.00、6.00mg/kg)实验期间小鼠体重增加达极显著水平

本文 2002 年 11 月 11 日收到,2003 年 3 月 8 日接受。

基金项目:温州市科技局科研基金资助(S2002A015);温州市“551”人才基金资助。

E-mail:qxw@mail.wzptt.zj.cn

($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。对小鼠睾丸重量的影响只有 1.00mg/kg 剂量组达极显著水平($P < 0.001$)、4.00mg/kg 剂量组达显著水平($P < 0.05$),其余实验组均不明显。

表 1 三氧化二砷对雄性小鼠体重和睾丸重量的影响

组别	As ₂ O ₃ 的剂量 (mg/kg)	每组小鼠数 (只)	实验前体重 (g)	实验后体重 (g)	睾丸重量 (g) ^a
I (对照)	0.00	10	25.45±0.29	29.31±0.31***	0.142±0.0024
II	0.25	10	25.42±0.37	27.87±0.37***	0.141±0.0020
III	0.50	10	26.21±0.50	28.69±0.54**	0.144±0.0024
IV	0.75	10	25.30±0.48	26.96±0.47**	0.135±0.0013
V	1.00	10	25.69±0.47	26.90±0.59*	0.120±0.0032***
VI	2.00	10	25.97±0.47	27.68±0.48***	0.137±0.0028
VII	4.00	10	26.17±0.35	28.98±0.50***	0.133±0.0024*
VIII	6.00	10	26.28±0.51	28.73±0.49***	0.136±0.0011

注:表中指标值均为平均值±标准误差;a代表两个睾丸的重量和。体重:每组实验前与实验后比较;睾丸重量:实验组与对照组比较。* $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2. 三氧化二砷对小鼠精子形态的影响

图片 1 显示经 As₂O₃ 作用的雄性小鼠精子畸形主要表现在头部,有头部无钩、无定形。图片 2 是未经 As₂O₃ 作用的阴性对照组的正常形态精子及畸形精子,常见的为无钩。

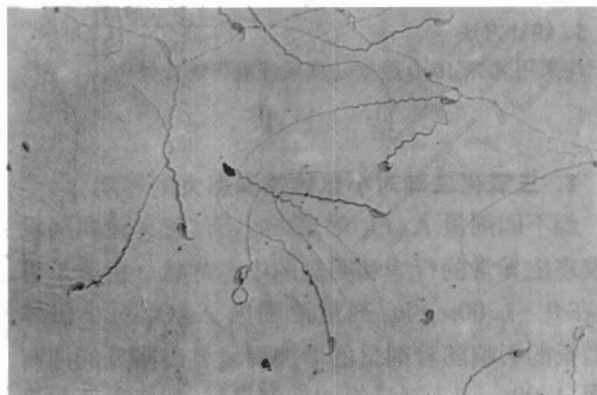


图 1 组 V (即 1mg/kg 剂量 As₂O₃) 的精子形态学图片,其中有头部无钩、无定形等畸形精子

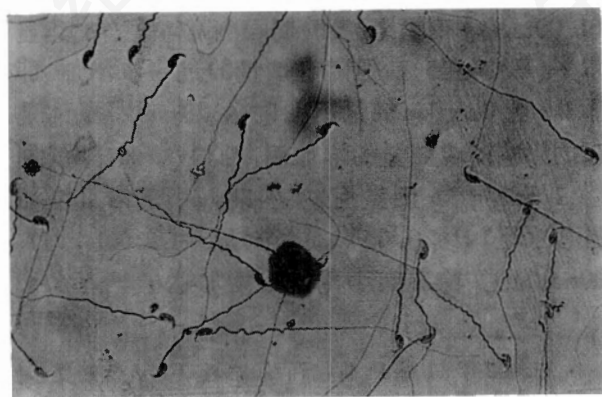


图 2 组 I (即未经 As₂O₃ 处理的对照组) 的正常精子及无钩精子

实验结果表明,各实验组精子畸形率与对照组的差异均极为显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),精子的畸形率随 As₂O₃ 剂量的增大而增加。组 II 与组 III、组 V 与组 VI、组 VI 与组 VII、组 VIII 与组 VIII 间比较,精子的畸形率均差异极为显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$,表中未标出),它们之间存在着明显的剂量-效应关系(见表 2)。

表 2 三氧化二砷对雄性小鼠精子形态的影响

组别	实验鼠数(只)	观察精子总数	畸形精子总数	畸形精子率(%)
I (对照)	10	10 000	653	65.3±1.2
II	10	10 000	792	79.2±1.8**
III	10	10 000	918	91.8±1.8***
IV	10	10 000	998	99.8±1.7***
V	10	10 000	1 062	106.2±4.9***
VI	10	10 000	1 678	167.8±4.4***
VII	10	10 000	2 332	233.2±4.6***
VIII	10	10 000	2 418	241.8±3.3***

注:实验组均与对照组比较,** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

3. 三氧化二砷对小鼠骨髓 PCE 微核率的影响

由表 3 可见,在本实验剂量范围内 As₂O₃ 对雄性小鼠诱发的骨髓 PCE 微核率,随着剂量的增加而上升,且每一实验组与对照组比较均具有极显著的差异($P < 0.001$)。经方差分析发现:组 II 与组 III、组 VI 与组 VII 比较差异均极显著($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$);组 III 与组 IV、组 V 与组 VI 比较差异显著($P < 0.05$);组 IV 与组 V、组 VII 与组 VIII 比较差异均不显著($P > 0.05$)。说明 As₂O₃ 对小鼠骨髓 PCE 微核率的诱发具有明显的剂量-效应关系。

表 3 三氧化二砷对雄性小鼠骨髓 PCE 微核率的影响

组别	实验小鼠数	观察 PCE 细胞数	1 000PCE 微核数										微核率% ($\bar{x} \pm s$)
I (对照)	10	10 000	2	2	3	3	2	2	3	3	2	2	2.40±0.16
II	10	10 000	5	6	5	5	3	4	5	4	3	3	4.30±0.34***
III	10	10 000	5	6	7	6	5	6	6	7	6	6	6.00±0.21***
IV	10	10 000	7	8	9	6	6	7	8	7	8	9	7.50±0.34***
V	10	10 000	8	9	8	9	8	8	8	9	8	7	8.20±0.20***
VI	10	10 000	8	9	10	9	11	9	10	10	9	10	9.50±0.27***
VII	10	10 000	11	11	10	13	10	12	12	14	12	13	11.80±0.42***
VIII	10	10 000	14	12	13	11	13	12	12	11	11	12	12.10±0.31***

注:*** $P < 0.001$ 。

讨 论

本研究发现 As₂O₃ 能抑制雄性小鼠体重的增长和睾丸的重量,且 1.00mg/kg 剂量组的抑制作用为最强。As₂O₃ 抑制了小鼠体重增长以及睾丸重量的下降,可能是由于该化合物使呼吸链上的酶合成

受到了抑制,特别是ATP酶的合成速率下降,减少其对三羧酸循环的抑制作用,使体内的三羧酸循环速度加快导致小鼠体内的脂肪、蛋白质等物质的分解^[9]。我们认为其中1.00mg/kg剂量As₂O₃对呼吸酶合成的抑制作用可能是最强的。As₂O₃引发精子畸形主要在头部,以无钩、无定形为主。据国内报道,不同种系小鼠对As₂O₃毒性反应差别很大,这可能是纯系小鼠耐毒能力小的缘故^[10]。本实验显示清洁级ICR小鼠对As₂O₃的生殖毒性相当敏感,精子畸形率要高于国内报道的其他种系小鼠以及大鼠的精子畸形率^[4,11]。大量的资料证实精子形态是由多基因控制,涉及多条染色体,而且小鼠精子头部的形态遗传率相当高,故精子形态发生改变^[11]。As₂O₃对小鼠精子的畸形率的影响与对小鼠的睾丸重量的影响,并不存在相关性。As₂O₃诱发精子畸形的机理还需进一步的探讨,可能该化合物使精子形成的有关基因发生突变,从而导致精子畸形率的增高。本研究发现As₂O₃对小鼠骨髓PCE微核率的诱发具有明显的剂量效应,说明清洁

级ICR小鼠对As₂O₃的毒性较为敏感,其PCE微核率要高于KM小鼠^[12]。综上所述,本研究表明As₂O₃对雄性小鼠的体重、睾丸、精子形态以及PCE微核率均有明显的影响,其详细机理有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 工树叶等,1997,哈尔滨医科大学学报,31(5):428-429.
- [2] 顾琴龙等,1997,肿瘤,17(6):461-462.
- [3] 李勇等,1998,中华预防医学杂志,32(1):37-39.
- [4] 张晨等,1996,新疆医学院学报,19(4):257-260.
- [5] 钱晓薇等,2002,遗传,24(3):305-309.
- [6] Wyrobek Aj., et al., 1983, *Mut Res*, 115:73.
- [7] D. Annanie, et al., 2000, 动物学报, 46(4):392-398.
- [8] 钱晓薇等,2001,浙江大学学报(农业与生命科学版), 27(4):411-414.
- [9] Wessnell. B. and A. Lugham, 1982, *Biochem Biophys Act.*, 68(9):475-485.
- [10] 邓友平等,1999,中国中药杂志,24(3):174-175.
- [11] 祝寿芬等,1997,卫生毒理学杂志,11(2):122-130.
- [12] 蔡原等,1995,中国公共卫生学报,14(2):120-122.

STUDIES OF GENETIC TOXICITY EFFECTS OF ARSENIC TRIOXIDE ON THE MALE MICE

QIAN Xiao Wei

(Department of Life and Environmental Science, Wenzhou Normal College, Wenzhou 325003 China)

ABSTRACT To study the effect of arsenic trioxide on genetic toxicity of male mice, by sperm deformity test and PCE micronucleus test. The mice were investigated by intraperitoneal injection of 0.25-6.0mg/kg/d for 7 days. The results demonstrated that the mice body weight growing existed obvious restrain function, while the weight of testis has no obvious difference among groups. The inhibition of 1.0mg/kg/d dose on body and testis weight is the most marked among groups ($P < 0.001$). But the rate of sperm abnormality increased significantly ($P < 0.001$). The results revealed a remarkable dose-response relationship between As₂O₃ and the rate of sperm abnormality. Besides, arsenic trioxide has PCE micronucleus rate of male mice increase significantly, there is a remarkable dose-response relationship between As₂O₃ and PCE micronucleus rate.

Key words: Arsenic trioxide Testis The Rate of sperm abnormality Micronucleus rate