

枸杞多糖对新生鼠氯化甲基汞慢暴露染毒致成年期生育能力下降的干预作用

曹池¹ 刘香¹ 陈海斌¹ 罗迈¹ 崔静¹ 张华² 王米佳¹ 王丹¹ 田建英¹

(1 宁夏医科大学基础学院,银川,750004; 2 宁夏回族自治区人民医院神经内科,银川,750004)

摘要 目的:探讨早期低剂量接触氯化甲基汞(Methyl Mercury Chloride, MMC)对大鼠生殖功能和生长发育的影响以及枸杞多糖(Lycium Barbarum Polysaccharides, LBP)的早期干预。方法:将 60 只健康 7 日龄大鼠随机分为对照组(CON)、MMC 组、MMC + LBP 组、LBP 组,MMC 组和 MMC + LBP 组均颈部皮下注射 MMC,CON 组颈部注射相同剂量的生理盐水,MMC + LBP 组同时喂养 LBP,雌雄合笼,自然观察各组体重发育以及生殖繁育能力以及子代仔鼠早期生长发育和存活状况。再将已孕母鼠哺乳期仔鼠染毒,观察母鼠产仔情况。结果:1)MMC 组毛色萎缩,精神状态倦怠、动作不活泼、食欲不振。2)MMC 组生长较缓慢且随染毒时间的延长而明显。3)MMC 组染毒大鼠未产仔,MMC + LBP 组有产仔,但产死率高、出生后存活率低于 CON;LBP 组产死率较 CON 低。4)MMC + LBP 组有畸胎,且仔鼠出生体重与正常 CON 和 LBP 组仔鼠出生体重有统计学意义($P < 0.01$)。5)染毒仔鼠影响其已孕母鼠再次生育。结论:MMC 对大鼠有生殖发育毒性,LBP 可抑制 MMC 引起的生殖毒性。

关键词 氯化甲基汞;枸杞多糖;生殖毒性

The Intervention Effect of Lycium Barbarum Polysaccharide on Adulthood Lower Fertility Reproduction Induced by Neonatal Exposed to Methylmercury Chloride in Rats

Cao Chi¹, Liu Xiang¹, Chen Haibin¹, Luo Mai¹, Cui Jing¹, Zhang Hua², Wang Mijia¹, Wang Dan¹, Tian Jianying¹

(1 Basic School of Medicine, Ningxia Medical University, Yingchuan 750004, China; 2 Department of Neurology, Ningxia Autonomous People's Hospital, Yingchuan 750004, China)

Abstract Objective: To detect the toxicity of neonatal exposed to methylmercury chloride on the adulthood reproduction, as well as early growth and development in rats and the intervention of Lycium barbarum polysaccharide. **Methods:** Sixty SD of 7 d rats were randomly divided into saline Control, MMC, MMC + LBP, LBP. The natural development, weight growth and fertilities were observed. Healthy pregnant female rats and MMC exposed neonatal rats and were also observed. **Results:** 1) Compared with the control group, the rats in MMC group was dropping, inactivity, loss of appetite; 2) The weights of rats in MMC group grew slower than in control rats with the exposure time dependently; 3) MMC group were infertility after exposure to the methyl mercury. There remained offspring in MMC + LBP group and their after-born death rates were higher than that of the control group, with low birth weights and low survival rates; 4) The weights in MMC + LBP rats were significant lower ($P < 0.01$) than that in control and LBP group; 5) The MMC exposed pups influenced the next reproduction of the female rats. **Conclusion:** Methylmercury chloride has development and reproductive toxicity effects on rats. Lycium barbarum polysaccharides have potential protection against the toxicity roles.

Key Words Methylmercury chloride; Lycium barbarum polysaccharide; Reproductive toxicity

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.12.029

环境污染对生育力的影响引起越来越多的人关注。氯化甲基汞(MMC)是严重危害人类健康的蓄积性环境污染物质,在食物链中有生物放大作用。存在于环境中的 MMC 对健康造成的影响主要表现为低剂量、长期暴露引起的非典型性、多系统的损伤。研究发现 MMC 对雄鼠的生殖能力可通过父系传播影响后代的生长发育和神经行为发育的变化^[1]。枸杞多糖(LBP)是枸杞子的主要功能成分之一,具有多种药理作用和

生物活性功能,其对生殖系统的保护作用亦有报道^[2-4],但是否能对 MMC 引起的生殖毒性有抑制作用尚未见报道。本实验通过 LBP 对新生鼠长期接触低剂量 MMC 导致其成年生殖毒性的干预作用观察,旨在为寻求抑制 MMC 的生殖毒性,减少对新生儿、青少年生长发育的危害新的早期干预途径。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂 MMC(德国 Merck 公司);LBP(上海

康舟真菌多糖有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组 5~7 d 健康二级清洁 SD 大鼠新生鼠 60 只(宁夏医科大学实验动物中心提供),体重 9~12 g,动物房内清洁,噪音小于 70 db,日光辅助照明,12 h/d,饲养温度为(22±2)℃。饲料为宁夏医科大学动物实验中心提供。适应性饲养 3 d,随机分为 4 组,每组 15 只。MMC 组(15 只):颈部皮下注射 MMC 造模;MMC + LBP 组(15 只),哺乳式喂养 LBP(25 mg/mL),同时颈部皮下注射 MMC;LBP 组(15 只):只哺乳式喂养 LBP;CON 组(15 只):颈部皮下注射生理盐水。

1.2.2 体重增长量测定 各组体重增长量的计算方法为,给药 10 d、20 d、30 d、40 d 和 50 d 大鼠的体重增长,计算公式为:体重增长量=(各时期体重-给药前体重)。

1.2.3 各组雌鼠分娩率和产仔情况的观察 观察交配雌鼠分娩和产仔情况,记录各组雌鼠的分娩率,产仔数、畸胎数、成活率等,如果该组雌鼠不产仔这些指标都按 0 计算。

1.2.4 仔鼠出生体重和早期生长发育观察 记录各组仔鼠出生体重,分别记录各组仔鼠出生后耳廓分离时间、毛发长出时间、开眼的时间和自主采食时间,并进行各组之间的比较。如果该组雌鼠未产仔,各项指标都按 0 计算。

1.2.5 仔鼠染毒对正常雌鼠产仔数的影响 选产仔的正常雌鼠若干只,其产仔后,再次受孕,哺乳期间,仔鼠与孕鼠不分笼,仔鼠随机分别标记,并给注射上述剂量的生理盐水、MMC、MMC + LBP,28 d,各组换垫料、给食、给水时间一致,观察记录受孕雌鼠二胎产仔情况。

1.2.6 统计学方法 各组数据用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 一般状况 与生理盐水 CON 相比,MMC 组进食量较少、体重减轻,粪便较稀,垫料潮湿,毛色发黄,运动迟缓,精神萎靡、有个别个体显得较为暴躁;MMC + LBP 组体重、粪便、毛色、运动、精神等情况较 MMC 组减轻,较 CON 加重。

2.2 体重变化量 与 CON 相比 MMC 组和 MMC + LBP 组发育过程中体重增长缓慢,且随着时间的延长而明显,在给药 20~40 d 期间,生长速度减慢最明显,MMC + LBP 组大鼠随 LBP 给药时间延长体重增加,较 MMC 组差异有统计学意义($P < 0.05$),由表 1、表 2 可见。

2.3 MMC 和 LBP 对大鼠生育能力的影响 MMC 组分

娩率零,MMC + LBP 组雌鼠有分娩率,但产死率高,出现畸胎;CON 组和 LBP 组雌鼠分娩率没有明显差别、存活率高且无畸胎,由表 3 可见。

表 1 MMC 和 LBP 对雄鼠体重增长的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	CON	MMC	MMC + LBP	LBP
10 d	40.1 ± 0.8	37.5 ± 1.1**	38.8 ± 1.3	39.9 ± 1.5
20 d	103.2 ± 5.4	67.1 ± 8.0**	75.4 ± 12.0** [△]	102.1 ± 3.9 ^{△△}
30 d	175.6 ± 5.6	143.0 ± 4.1**	148.6 ± 4.1** [△]	179.1 ± 3.6 ^{△△}
40 d	196.3 ± 2.5	177.9 ± 5.9**	186.5 ± 8.2** [△]	199.4 ± 7.7 ^{△△}
50 d	299.0 ± 5.1	230.3 ± 7.4**	238.3 ± 6.0** [△]	297.1 ± 7.0 ^{△△}

注:与 CON 相比,** $P < 0.01$;与 MMC 组相比,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$ 。

表 2 MMC 和 LBP 对雌鼠体重增长的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	CON	MMC	MMC + LBP	LBP
10 d	27.3 ± 2.8	26.0 ± 2.1	26.0 ± 1.6	26.5 ± 2.5
20 d	71.5 ± 1.5	61.4 ± 1.5**	63.8 ± 0.9**	70.4 ± 1.1 ^{△△}
30 d	101.9 ± 9.7	72.0 ± 5.1**	75.5 ± 7.1**	97.5 ± 12.9 ^{△△}
40 d	143.8 ± 5.1	129.8 ± 6.0**	136.3 ± 4.9 [△]	147.1 ± 7.1 ^{△△}
50 d	163.5 ± 5.2	145.9 ± 5.2**	155.1 ± 4.1 [△]	166.9 ± 3.7 ^{△△}

注:与 CON 相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 MMC 组相比,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$ 。

表 3 MMC 和 LBP 对雌鼠分娩、产仔情况的影响

组别	CON	MMC	MMC + LBP
交配数	6	5	5
分娩数	5	0	2
分娩率(%)	83.3	0.0	40.0
总产仔数	59	0	18
死产数	3	0	8
畸胎数	0	0	2
出生后死亡	0	0	8
存活率(%)	94.4	0.0	44.4

2.4 LBP 对 MMC 染毒亲代产仔早期发育的影响 与 CON 比较,MMC + LBP 组仔鼠出生体重与 CON 仔鼠出生体重都有统计学意义($P < 0.01$);耳廓分离时间没有统计学意义($P > 0.05$),毛发长出时间、开眼时间和自主采食时间明显延长($P < 0.05$)。LBP 组仔鼠各项指标与 CON 没有统计学意义($P > 0.05$),见表 4。

表 4 仔鼠早期发育情况($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	CON	MMC + LBP	LBP
出生体重(g)	6.26 ± 0.36	4.93 ± 0.22**	6.09 ± 0.21
耳廓分离时间(d)	4.9 ± 0.8	5.2 ± 0.8	5.1 ± 0.6
毛发长出时间(d)	5.3 ± 0.5	5.9 ± 0.7*	5.4 ± 0.5
开眼时间(d)	12.6 ± 0.7	13.9 ± 1.1*	13.3 ± 1.0
自主采食时间(d)	15.9 ± 0.8	16.6 ± 0.7*	16.2 ± 0.8

注:与 CON 比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

CON 和 LBP 组仔鼠体长较长,体型较大,肤色红润有光泽,仔鼠肤色红润有光泽,MMC + LBP 组仔鼠皮

肤失去光泽,颜色呈暗紫色,并且有畸胎,其死胎呈黑色。

2.5 哺乳期仔鼠染毒对已孕母鼠生育能力的影响
健康母鼠产仔后再次受孕,观察仔鼠染毒对母鼠的再次生育的影响,结果未染毒组母鼠产仔数均数为 12 只,MMC + LBP 组产仔数为 6 只,MMC 染毒组雌鼠未产仔。

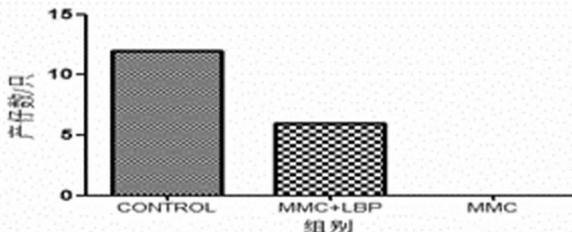


图 1 仔鼠染毒对已孕母鼠生育能力的影响

3 讨论

汞广泛存在于自然界中,在水和土壤中微生物甲基化作用下生成剧毒 MMC,对环境及人体健康都具有极大的危害,被各国政府及 UNEP、WHO 等国际组织列为“优先控制的环境污染物”^[5]。由于其环境中最稳定,具有生物体内高蓄积性^[6],脂溶性高,易于通过胎盘屏障和血脑屏障,极易造成对发育期的器官的损害,特别是对发育期的脑更敏感。MMC 可影响神经细胞凋亡、引起生物膜和神经递质的改变。对儿童可有视觉、听觉,神经行为改变^[7-8]。孕期汞暴露、可损害子鼠长期记忆,延迟神经系统发育相关基因的表达,引起结构功能变化^[9-11]。

MMC 是生活中常见的不易分解的蓄积性环境污染物,可通过食物链进入体内。其可以通过胎盘直接造成对胎儿的损伤,也可对卵细胞造成遗传损伤从而危害子代。吴美琴^[12]等人研究发现汞可蓄积在人胎盘移出物中,具有明显的剂量-反应关系,这种蓄积作用可能会影响到胎盘的组织结构,甚至干扰胎盘的正常生物转化作用;也能透过血睾屏障,作用于雄性生殖系统,影响雄性动物的交配能力,作用于雄性生殖细胞 dNA,造成遗传损伤从而影响子代生长发育^[13];Sitarek 等研究发现,低剂量接触 MMC 对体重、耳廓分离、开眼时间等有显著影响^[14]。

LBP 是传统名贵中药枸杞子的重要有效成分,是从枸杞子中提取而得的一种水溶性多糖。已明确该多糖系蛋白多糖,由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖、鼠李糖 6 种单糖成分组成,具有多种药理作用和生物活性功能,主要药理作用有:调节机体免疫功能、增强记忆力、抗氧化、耐缺氧、防辐射等^[15-17]。现代科学研究表明,其具有免疫调节、抗氧化^[18-19],抑制 A β

诱导对原代神经元的毒性作用,尽管国内外尚少见关于 LBP 对抗环境污染,发挥保护作用的研究。有研究表明 LBP 能抑制微量 MMC 诱导的海马神经干细胞的损伤^[20],明显减轻温水浴导致的大鼠睾丸组织细胞的损伤程度。可显著改善大鼠交配能力,调节血清性激素水平的分泌。

本研究分别发现雌、雄鼠早期染毒,对其生长(体重增长量)、生育能力、和其仔鼠早期发育均有不良影响,结果显示 MMC 染毒鼠生长较 CON 缓慢、精神状态较差,长期染毒可致不孕不育,而 MMC + LBP 干预组雌鼠受孕分娩率明显有所改善。对亲代染毒后代仔鼠早期发育状况进行观察发现 MMC + LBP 组仔鼠出生体重明显低于正常 CON 仔鼠出生体重($P < 0.01$),其毛发出时间、开眼时间和自主采食时间与 CON 和 LBP 组有显著差异,但耳廓分离时间未见显著差异。CON 和 LBP 组生育能力及其仔鼠早期发育未见显著差异性,表明 LBP 在一定剂量范围内,未见不良作用,并能全面改善 MMC 染毒鼠的生殖发育健康状况,另,发现已受孕的正常母鼠哺乳染毒仔鼠,可使其终止妊娠,不生育。有研究表明体内摄入的汞可以随代谢产物随尿液、粪便排出体外,母鼠可能接触到仔鼠毛,尿液以及粪便中的汞而染毒,可致其终止妊娠;MMC + LBP 组,母鼠有生育,且仔鼠能存活,表明 LBP 有保护染毒鼠的生育能力。通过筛选天然药效成分,研究其对环境因素慢性暴露引起的发育和生殖的损伤后干预作用,将为预防环境污染提供了新的途径,也为枸杞对抗环境污染,提供了理论依据。

参考文献

- [1]任锐,范春,刘延丽. 氯化甲基汞染毒对大鼠后代发育的影响[J]. 环境与健康杂志,2005,22(5):348-50.
- [2]Heinz gH, Hoffman dJ, Klimstra JD, et al. Reproduction in mallards exposed to dietary concentrations of methylmercury [J]. Ecotoxicology, 2011,19(5):977-982.
- [3]李春英,邱炳源. 甲基汞的毒性作用[J]. 中华预防杂志,2011,35(6):365-366.
- [4]Hu g, Jin M, Lin X, et al. Mercury distribution in neonatal rat brain after intrauterine methylmercury exposure [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2010,29(1):7-11.
- [5]JECFA. Methylmercury. In: WHO Technical Report Series922. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Report of the 61st Joint FAO/WHO Expert Committee on FoodAdditives [J]. Geneva: JECFA, 2004:132-139.
- [6]Clarkson TW, Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds[J]. Crit Rev Toxicol,2006,36(8):609-62.

- ated fetuin - A forms a mineral complex in the serum of rats with adenine - induced renal failure[J]. *Kidney International*, 2009, 75(9): 915 - 928.
- [4] 刘洪彦, 杨爱华, 刘雪梅, 等. 腺嘌呤致大鼠慢性肾功能衰竭模型研究[J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15(12): 2014 - 2017.
- [5] 肖炜. 慢性肾衰动物模型方法学研究现状[J]. *中国试验动物杂志*, 2006, 12(3): 176 - 179.
- [6] 屈超超, 陈爽白. 慢性肾功能衰竭的中医现代研究[J]. *长春中医药大学学报*, 2010, 26(2): 198 - 199.
- [7] 朱凌波, 薛莉, 李靖. 倍生冲剂联合中药灌肠治疗早中期慢性肾衰竭的临床观察[J]. *南京中医药大学学报*, 2012, 28(4): 324 - 326.
- [8] 郭立芳, 王凤丽, 王月华, 等. 益气通络解毒降浊方结合西医基础疗法治疗早、中期慢性肾功能衰竭疗效观察[J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(8): 1042 - 1045.
- [9] 倪青. 中医治疗慢性肾功能衰竭的思路与方法——时振声临床经验运用[J]. *辽宁中医杂志*, 2001, 28(12): 712 - 713.
- [10] 傅文录. 时振声治疗肾病方剂学应用的特色[J]. *辽宁中医杂志*, 2004, 3(8): 624 - 625.
- [11] 刘宏伟, 王国栋, 张国强. 医坛巨匠时振声教授学术贡献撷萃[J]. *中医药学刊*, 2001, 19(6): 534 - 535.
- [12] 郭教礼, 王国柱. 著名中医学家时振声学术经验摘要[J]. *山西中*
- 医, 2005, 21(4): 8 - 9.
- [13] 孙升云, 杨钦河, 肖达民, 等. 慢性肾功能衰竭中医证候学的临床研究[J]. *新中医*, 2005, 37(5): 30 - 31.
- [14] 张勤, 刘晓敏. 180 例慢性肾功能衰竭患者虚证证候分布规律调查[J]. *世界中西医结合杂志*, 2008, 3(7): 417 - 418.
- [15] 徐鲁谦. 中西医结合治疗气阴两虚型慢性肾功能衰竭 38 例[J]. *国医论坛*, 2009, 24(4): 33 - 34.
- [16] 邹川, 吴禹池, 林启展, 等. 中药结肠洗液联合基础疗法对慢性肾功能衰竭患者 BUN、SCr、UA 及 IS 的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(9): 1192 - 1195.
- [17] 郭兆安, 张爱真, 徐炳侠, 等. 祛毒颗粒治疗慢性肾衰竭的多中心临床研究[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2011, 18(4): 197 - 200.
- [18] 龚德华, 徐斌, 朱冬冬, 等. 复方 α 酮酸片联合低蛋白饮食延缓慢性肾功能衰竭进展的临床随机对照研究[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2012, 21(5): 421 - 428.
- [19] 孙脊峰, 赵柏山, 焦凯, 等. 前列腺素 E1 对糖尿病肾病患者肾动脉血流动力学的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27(6): 342 - 644.

(2013 - 05 - 21 收稿)

(上接第 1473 页)

- [7] Castoldi AF, Onishchenko N, Johansson C, et al. Neurodevelopmental toxicity of methylmercury: Laboratory animal data and their contribution to human risk assessment[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2008 Jul, 51(2): 215 - 29.
- [8] White RF, Palumbo CL, Yurgelun - Todd dA, et al. Functional MRI approach to developmental methylmercury and polychlorinated biphenyl neurotoxicity[J]. *Neurotoxicology*, 2011, 32(6): 975 - 980.
- [9] Maia Cdo S, Ferreira VM, Diniz JS, et al. Inhibitory avoidance acquisition in adult rats exposed to a combination of ethanol and methylmercury during central nervous system development[J]. *Behav Brain Res*, 2010, 211(2): 7 - 191.
- [10] Ferraro L, Tomasini MC, Tanganelli S, et al. Developmental exposure to methylmercury elicits early cell death in the cerebral cortex and long - term memory deficits in the rat[J]. *Int J dev Neurosci*, 2009, 27(2): 74 - 165.
- [11]. Radonjic M, Cappaert NL, de Vries EF, et al. Delay and impairment in brain development and function in rat offspring after maternal exposure to methylmercury[J]. *Toxicol Sci*, 2013, 133(1): 112 - 24.
- [12] 吴美琴, 颜崇淮. 胎儿期汞暴露研究进展[J]. *中国儿童保健杂志*, 2010, 18(3): 231 - 233.
- [13] Albers PH, Koterba MT, Rossmann R, et al. Effects of methylmercury on reproduction in American kestrels[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2007, 26(9): 1856 - 1866.
- [14] Auharek SA, do Carmo Vieira M, Cardoso CA, et al. Reproductive toxicity of campomanesia xanthocarpa (Berg.) in female wistar rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, S0378 - 8741(13): 00262 - 00266.
- [15] Luo Q, Cui X, Yan J, et al. Antagonistic effects of Lycium barbarum polysaccharides on the impaired reproductive system of male rats induced by local subchronic exposure to $^{60}\text{Co} - \gamma$ irradiation[J]. *Phyther Res*, 2011, 25(5): 694 - 701.
- [16] Xin YF, You ZQ, Gao hY, et al. Protective effect of Lycium barbarum polysaccharides against doxorubicin - induced testicular toxicity in rats[J]. *Phyther Res*, 2012, 26(5): 716 - 721.
- [17] Zhu J, Zhao L - H, Zhao X - P, et al. Lycium barbarum polysaccharides regulate phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells[J]. *Cell Biol Int*, 2007, 31: 615 - 619.
- [18] Li XM. Protective effect of Lycium barbarum polysaccharides on streptozotocin - induced oxidative stress in rats[J]. *Int J Biol Macromol*, 2007, 40: 461 - 465.
- [19] 刘慧莲. 枸杞多糖对小鼠精原干细胞增殖作用的影响[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(3): 1490 - 1492.
- [20] 陈维维, 金国华, 张新华, 等. 枸杞多糖对氯化甲基汞诱导海马神经干细胞损伤的保护作用[J]. *解剖学报*, 2012, 43(4): 460 - 466.

(2013 - 05 - 12 收稿)