

低剂量三聚氰胺对小鼠精子质量影响的研究

田永刚^{1,2}, 张迎梅^{1*}

(1. 兰州大学生命科学学院, 兰州 730000; 2. 兰州大学基础医学院医学实验动物中心, 兰州 730000)

摘要:采用灌胃法,研究了三聚氰胺在 1.0 mg/kg、2.0 mg/kg、4.0 mg/kg 浓度下染毒 35 d 时,小鼠体重、精子运动参数和精子形态的变化。结果显示,4.0 mg/kg 处理组小鼠部分精子运动参数显著性降低($P < 0.05$),1.0 mg/kg 和 2.0 mg/kg 浓度组各项精子运动参数与对照比较变化不显著($P > 0.05$);在染毒一周后,2.0 mg/kg 浓度组小鼠体重增长显著性下降($P < 0.05$),4.0 mg/kg 浓度组小鼠体重极显著降低($P < 0.01$);3 个处理浓度组对小鼠精子形态影响均不显著。总之,食物中低浓度三聚氰胺对小鼠精子活性和形态无明显的影响。

关键词:三聚氰胺; 小鼠; 精子运动参数; 精子畸形

中国分类号:R994.3;Q95-33 文献标识码:A 文章编号:1000-7083(2010)03-0466-03

Effect of Low-dose Melamine on the Quality of Spermatozoa of Mice

TIAN Yong-gang^{1,2}, ZHANG Ying-mei^{1*}

(1. School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Laboratory Animal Center for Medical Science, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: To study the toxicity of low-dosage melamine to the seminal power of male mice, the selected male mice were divided into three groups, and were treated with melamine at 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg for 35 days through intra-gastric administration. The parameters of sperm movement, sperm morphology and body weight of mice were observed and analyzed after 35-day treatment. The results showed that the parameter of sperm movement obviously decreased in the group treated with 4.0 mg/kg melamine ($P < 0.05$), whereas there was no significant change in the groups treated with melamine of both 1.0 mg/kg and 2.0 mg/kg. During the period from 7th to 14th day, the body weight growth of mice treated by 2.0 mg/kg melamine decreased significantly ($P < 0.05$), and the same happened to mice treated by 4.0 mg/kg melamine ($P < 0.01$). Furthermore, there was no significant effects on the sperm morphology among these three groups. In conclusion, the low-dose melamine had no obvious effect on mice spermatozoa activeness and morphology.

Key words: melamine; mice; parameter of sperm movement; sperm deformity

三聚氰胺是一种三嗪类含氮杂环有机化合物,被广泛应用于树脂合成、塑料、涂料、医药等生产行业(Neerman *et al.*, 2004; Friedel & Greulich-Webe, 2006; Lund & Petersen, 2006)。目前它对动物毒性的研究主要有:能使狗和猫产生肾结石,甚至导致尿毒症和急性肾衰(Birgit *et al.*, 2007; Cathy *et al.*, 2007);也发现用它喂养大鼠,能对其生殖、泌尿系统产生不同程度的损害,并可诱发泌尿道肿瘤和膀胱癌(Okumura *et al.*, 1992; Ogasawara *et al.*, 1995)。但有关三聚氰胺对小鼠生殖的影响尤其是对精子运动参数和精子形态的影响尚未见报道。精子的动态和形态是评价精子质量和雄性生育力的主要标准。已有学者报道了芹菜汁(蒲育栋等,2008)、可乐(刘

舒瑜等,2008)、锰(才秀莲等,2007)、乙醇(朱伟勇等,2003)等对小鼠精子运动、数量和形态的影响。为了解备受公众关注的三聚氰胺的生殖毒性,本文选择实验动物小鼠为研究对象,采用灌胃法,通过测定小鼠体重、精子运动参数和精子形态等指标,以期探讨三聚氰胺对雄性小鼠生殖能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物为 SPF (Specific Pathogen Free) 级 BALB/c 雄性小鼠 64 只,体重 24 ~ 27 g,购自兰州大学实验动物中心[生产许可证 SCXK(甘)2009-0004,使用许可证 SYXK(甘)2009-0005];三聚氰胺

收稿日期:2009-08-30 接受日期:2009-09-24

作者简介:田永刚(1973~),男,硕士研究生,研究方向:环境动物学, E-mail: tianyg@lzu.edu.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: ymzhang@lzu.edu.cn

(melamine),分析纯,购于北京百灵威化学技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 染毒浓度 参照中国农业部制定的饲料中三聚氰胺含量标准(NY/T 1372-2007,2007),分别设 0.0 mg/kg、1.0 mg/kg、2.0 mg/kg、4.0 mg/kg 浓度组。

1.2.2 实验分组 64 只雄性小鼠随机分成 4 组,每组 16 只,每天定时灌胃一次,按 0.2 ml/10 g 体重分别给予相应浓度的三聚氰胺,染毒 35 d。自染毒第 1 d(视为第 0 d)起,每天观察动物行为状况,且每 7 d 称体重一次。染毒 35 d 后检测相关指标。

1.2.3 精子运动参数 在 25℃ 左右室温下,脱臼处死小鼠后,立即分离右侧附睾,放入 37℃ 预温的盛有 1 ml 生理盐水(0.86%)的平皿中,用眼科剪将附睾体部纵向剪开 3 个切口,放入 37℃ 水浴箱中 30 min,让精子自由游出,然后用微量移液器吸取 10 μl 精子悬液,采用 WLJY-9000 型伟力彩色精子质量检测系统进行精子运动参数测定。测定参数包括平均路径速度(VAP)、曲线速度(VCL)、直线速度(VSL)、侧摆幅度(ALH)、摆动性(WOB)、平均移动

角度(MAD)和精子密度(ρ)。

1.2.4 精子形态(畸形率) 采用范瑞泉等(2004)改良的方法,在高倍镜下观察精子形态,记录畸形精子数,计算畸形率。

1.3 统计方法

实验结果表示为平均数 ± 标准误差。使用 SPSS15.0 统计软件进行差异性显著分析, P < 0.05 表明差异显著, P < 0.01 表明差异极显著。

2 实验结果

2.1 染毒期间小鼠一般行为状况

染毒第 1 周,各实验组小鼠被毛光滑,活动基本正常;第 2 周,除对照组外,其他各组活动力有所下降,尤其是被毛变得粗糙;第 3~5 周与对照组比较其被毛和行为又逐渐恢复正常。

2.2 对精子运动参数的影响

4.0 mg/kg 浓度组精子曲线速度、侧摆幅度、平均移动角度与对照组比较显著降低(P < 0.05),1.0 mg/kg、2.0 mg/kg 和 4.0 mg/kg 组的其他项与对照组比较差异不显著(表 1)。

表 1 不同浓度对小鼠精子运动参数的影响(̄x ± s)(n = 16)

Table 1 Effect of different melamine concentrations on parameter of sperm movement of mice(̄x ± s)(n = 16)

浓度组 mg/kg	平均路径速度 (VAP) μm/s	曲线速度 (VCL) μm/s	直线速度 (VSL) μm/s	侧摆幅度 (ALH) μm/s	摆动性 (WOB) %	平均移动角度 (MAD) °	精子密度(ρ) 10 ⁶ /ml
0.0	22.01 ± 3.88	54.52 ± 4.33	14.65 ± 4.88	1.82 ± 0.55	42.00 ± 3.46	69.76 ± 0.61	1.17 ± 0.34
1.0	16.38 ± 1.53	51.55 ± 4.77	8.99 ± 0.88	0.82 ± 0.52	36.42 ± 5.87	69.99 ± 8.62	2.91 ± 1.77
2.0	23.05 ± 2.62	52.41 ± 8.20	16.79 ± 2.78	1.73 ± 0.52	47.26 ± 6.65	66.48 ± 9.94	1.00 ± 0.16
4.0	16.96 ± 2.59	44.72 ± 3.62*	9.93 ± 2.79	0.55 ± 0.11*	42.57 ± 0.47	62.73 ± 4.12*	1.18 ± 0.33

注: * 与对照组比较, P < 0.05

2.3 对精子形态的影响

各浓度组精子畸形率均较低,差异不显著;畸形精子指头、体、尾的形态变异,主要类型有:无钩、香蕉形、无定形、胖头、尾折叠、双头及双尾。分类比较

0.0 mg/kg、1.0 mg/kg、2.0 mg/kg 组均以无钩型为主,无定形次之,而 4.0 mg/kg 组以无定形占多数,无钩型次之;各浓度组的胖头、双头及双尾等畸形精子所占比例均很小,差异不显著(表 2)。

表 2 不同浓度对小鼠精子畸形率及分类的影响(̄x ± s)

Table 2 Effect of different melamine concentrations on sperm deformity rates and classification of mice(̄x ± s)

浓度组 (mg/kg)	观察数	畸形数(率) n (%)	无钩数(率) n (%)	无定形数(率) n (%)	胖头数(率) n (%)	双头数(率) n (%)	双尾数(率) n (%)
0.0	5000	118 (2.36)	52 (44.07)	46 (38.98)	2 (1.70)	2 (1.70)	16 (13.53)
1.0	5000	120 (2.40)	56 (46.67)	48 (40.00)	12 (10.00)	2 (1.67)	2 (1.67)
2.0	6000	176 (2.93)	90 (51.14)	54 (30.69)	12 (6.82)	2 (1.14)	18 (10.23)
4.0	4000	150 (3.75)	60 (40.00)	72 (48.00)	12 (8.00)	2 (1.33)	4 (2.67)

2.4 对体重的影响

2.0 mg/kg 浓度在第 14 d 和第 21 d 的体重与第

7 d 的体重比较下降明显(P < 0.05);4.0 mg/kg 浓度在 14 d 的体重与 7 d 的体重比较下降明显(P <

0.01); 在染毒的第 35 d 各浓度组小鼠体重与染毒第 0 d 动物体重比较显著增长($P < 0.01$) (表 3)。

表 3 不同染毒时间各组小鼠体重增长情况比较($\bar{x} \pm s$) ($n = 16$)
Table 3 Compared to the situation in weight growth in different exposure time for each group of mice

浓度 (mg/kg)	染毒时间(d)					
	0	7	14	21	28	35
0.0	26.71 ± 2.16	27.04 ± 2.48	27.28 ± 2.42	27.29 ± 2.33	27.69 ± 2.44	27.73 ± 1.77 ^c
1.0	25.61 ± 1.52	26.16 ± 1.75	26.31 ± 1.37	26.45 ± 1.37	26.41 ± 1.57	26.84 ± 1.53 ^c
2.0	26.19 ± 1.82	27.15 ± 1.31	26.89 ± 1.16 ^a	26.93 ± 1.70 ^a	27.14 ± 1.53	27.31 ± 1.90 ^c
4.0	26.26 ± 1.29	27.18 ± 1.32	26.84 ± 1.36 ^b	26.93 ± 1.53	27.24 ± 1.36	27.21 ± 1.92 ^c

注:^a与第 7 d 比较, $P < 0.05$,^b与第 7 d 比较, $P < 0.01$,^c与 0 d 比较, $P < 0.01$

3 结果分析与讨论

3.1 精子运动参数反映了精子运动能力,同时也客观地反映了精子的运动特点。而精子运动能力是精子结构变化和功能状况的综合体现,也是衡量精子质量的主要指标之一(朱善良等,2002)。精子运动参数 VAP、VCL 和 VSL 反映精子运动速度,ALH、WOB 和 MAD 反映精子运动的方式(蒲育栋等,2008;余玲玲等,2008)。由表 1 可以看出,2.0 mg/kg 及以下浓度组均没有显著影响,而 4.0 mg/kg 浓度组的 VCL、ALH、MAD 显著降低,说明此浓度不仅影响精子的运动速度也影响运动方式,推测可能是三聚氰胺造成生精细胞受损,从而导致精子运动能力和运动方式发生变化,但受损机理有待进一步研究。

3.2 实验显示,随处理浓度的增大,小鼠精子畸形率有升高的趋势,但畸形率均较低,各组间并无显著差异;畸形精子的构成,以无钩和无定形为主,这说明随着染毒浓度的升高对精子的致畸作用在增强。

3.3 从染毒小鼠体重增长情况看,2.0 mg/kg 和 4.0 mg/kg 浓度组在染毒的第 2 周小鼠体重下降明显,以后逐渐恢复正常,这可能是三聚氰胺刺激或损伤了动物消化道影响进食或饮水,暂时性影响其体重增长,而在长期接触的条件下,由于机体自身调节功能的作用使动物体重增长又逐渐恢复正常;染毒 35 d 动物体重与第 0 d 体重差异极显著,即各实验组动物的体重在整个实验过程中均有不同程度的增长,说明三聚氰胺在低浓度条件下对小鼠体重增长的影响具有明显的阶段性。

总之,三聚氰胺在 2.0 mg/kg 及以下浓度时对小鼠精子活力和形态无影响,4.0 mg/kg 浓度时对部分精子运动参数有一定的影响,但对其生育力是否产生影响有待进一步研究。

4 参考文献

- 才秀莲, 李兴升, 李季蓉, 等. 2007. 锰对小鼠精子数量、畸形率和活动度影响[J]. 中国公共卫生, 23(1): 104 ~ 105.
- 范瑞泉, 魏青, 丘钦英, 等. 2004. 小鼠精子畸形试验改良法与传统法效果比较[J]. 华南预防医学, 30(2): 51 ~ 52.
- 刘舒瑜, 李芝兰, 骆晓红, 等. 2008. 可乐对小鼠精子质量影响[J]. 中国公共卫生, 24(1): 77 ~ 78.
- 蒲育栋, 王坤, 党瑜慧, 等. 2008. 芹菜汁对小鼠精液参数及毒性作用的影响[J]. 中国计划生育学杂志, 149(3): 157 ~ 158.
- 余玲玲, 陈小剑, 江明华, 等. 2008. 精子动态参数在精液质量分析中的应用[J]. 医学研究杂志, 37(6): 108 ~ 110.
- 中华人民共和国农业行业标准, NY/T 1372-2007. 2007. 饲料中三聚氰胺的测定[S].
- 朱善良, 陈龙, 高伟, 等. 2002. 大鼠慢性镉染毒后精子生成量和精子运动能力研究[J]. 生殖与避孕, 22(1): 14 ~ 17.
- 朱伟勇, 师宏词, 谢蝶兰, 等. 2003. 饮酒对精液影响的探讨[J]. 宁夏医学杂志, 25(9): 537 ~ 538.
- Birgit P, Robert H, Poppenga, *et al.* 2007. Assessment of melamine and cyanuric acid toxicity in cats[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 19(6): 616 ~ 624.
- Cathy A Brown, Kyu -Shik Jeong, Robert H, *et al.* 2007. Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 19(5): 525 ~ 531.
- Friedel B, Greulich-Weber S. 2006. Preparation of monodisperse, sub-micrometer carbon spheres by pyrolysis of melamine-formaldehyde resin [J]. Small, 2: 859 ~ 863.
- Lund KH, Petersen JH. 2006. Migration of formaldehyde and melamine monomers from kitchen and tableware made of melamine plastic [J]. Food Addit Contam, 23: 948 ~ 955.
- Neerman MF, Chen HT, Parrish AR, *et al.* 2004. Reduction of drug toxicity using dendrimers based on melamine[J]. Mol Pharm, 1: 390 ~ 393.
- Ogasawara H, Imaida K, Ishiwata H, *et al.* 1995. Urinary bladder carcinogenesis induced by melamine in F344 male rats; correlation between carcinogenicity and urolith formation [J]. Carcinogenesis, 16(11): 2773 ~ 2777.
- Okumura M, Hasegawa R, Shirai T, *et al.* 1992. Relationship between calculus formation and arcinogenesis in the urinary bladder of rats administered the non-genotoxic a-gents thymine or melamine[J]. Carcinogenesis, 13(6): 1043 ~ 1045.