

# 硫酸铜对小鼠睾丸损伤的组织学研究

李广录 熊建利 董瑞丽 顾瑞瑞 李 猛

(河南科技大学 动物科技学院 河南 洛阳 471003)

**摘要:** 研究不同剂量的硫酸铜对小鼠睾丸组织的损伤,为研究动物生殖毒性和繁衍提供参考依据。首先采用上下法测定硫酸铜对小白鼠的半数致死量 LD<sub>50</sub> 为 55 mg/kg 95% 可信限区间为 35.02 ~ 155。将 40 只小白鼠随机分为 4 组,即对照组(生理盐水)、低剂量组、中剂量组、高剂量组,采用灌胃法染毒。期间记录小鼠体质量,染毒结束后采集睾丸组织称质量并制作石蜡切片,观察其病理组织学变化。结果显示,与对照组相比,不同剂量的试验组体质量的增长率均下降,高剂量组在第 1 周和第 2 周甚至出现了负增长,分别为: -3.86% , -0.62%。光学显微镜观察睾丸的病理切片,与对照组相比,试验组小鼠睾丸曲精细管呈现不同程度的变性,管内各级生精细胞数目减少或缺失,精子形成极少或无,且随剂量的升高,睾丸组织病理损伤越严重。以上结果表明,硫酸铜可诱导生精细胞凋亡,且可显著抑制精原细胞的增殖,随着剂量的增加对睾丸组织的生殖毒性效应越强。

**关键词:** 硫酸铜; 小鼠; 脏器系数; 睾丸; 病理学变化

中图分类号: S852.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)03-0088-04

## The Histology Study of Testis Injury in Male Mice Caused by Copper

LI Guang-lu<sup>1</sup>, XIONG Jian-li<sup>1</sup>, DONG Rui-li<sup>1</sup>, GU Rui-rui<sup>1</sup>, LI Meng<sup>1</sup>

(College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**Abstract:** According to the study on histological damage induced by the different doses of copper sulfate, this paper can provide reference for the study of animal reproductive toxicity and reproduction. Firstly, LD<sub>50</sub> was 55 mg/kg (95% CI 35.02 to 155) which was determined by Up-and-Down Procedure (UDP). 40 rats were randomly separated into control group (normal saline), low-dose copper sulfate group, middle-dose copper sulfate group, high-dose copper sulfate group. The rats were exposed to copper sulfate by gavage every day and the treatment was lasted for 28 days. Body weight of rats were recorded during experiment, organ coefficient of tissues and pathology changes of testis were observed after poisoning. The results showed that, in comparison with control group, body weight increasing rate was differently decreased on body weight in each poisoning group. The high-dose group experienced negative growth in the first and second weeks and were -3.86% , -0.62% respectively. Obvious pathological changes through light microscope were observed in testis tissues, seminiferous tubules showed degeneration in varying degrees in poisoning groups. The number of all the spermatogenic cells in each grade in seminiferous tubules and spermatozoa were decreased or absent obviously. Testicular pathologic injury was more serious with the increase of concentration. To sum up, copper sulfate can induce the apoptosis of spermatogenic cells and can significantly inhibit the proliferation of spermatogonia. The effect of reproductive toxic on testicular tissue are stronger as doses increased.

**Key words:** Copper sulfate; Rat; Organ coefficient; Testis; Pathological changes

铜是人类和动物体内重要的微量元素之一,它不仅参与机体内蛋白质、核酸、脂肪、碳水化合物、维生素等营养物质的代谢,而且还在骨骼发育、生殖、凝血等生理机能中起着重要作用。铜广泛存在于自

然界中,但由于人类对铜的开采、冶炼、加工及商业制造活动的日益增加,造成铜污染日益严重。因其不能被降解,故具有很大的潜在危害。因此,在当今社会中,铜作为一种主要的污染物对人体或动物的

收稿日期: 2013-05-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(30900138); 河南科技大学“SRTP”项目(2011193)

作者简介: 李广录(1979-),男,陕西宝鸡人,讲师,硕士,主要从事动物分子遗传学研究。

毒害作用,倍受人们的关注。

随着组织学研究的发展和成熟,人类迫切需要通过组织学实验的方法来研究铜对人体造成的危害。但目前的研究主要集中于对小鼠的外周血淋巴细胞、肝脏细胞的研究<sup>[1]</sup>,而对动物生殖系统的影响报道很少。因此,采用组织学石蜡切片研究铜对小鼠生殖系统—睾丸的损伤,通过测定不同剂量对小鼠体质量、睾丸质量、睾丸细胞损伤的影响,揭示铜在不同剂量下对小鼠的毒害作用,为研究动物生殖毒性和繁衍提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

试验所用动物为健康成年昆明系雄性小鼠(18~22 g),购买于河南科技大学医学院动物中心。

### 1.2 主要试剂及仪器

无水硫酸铜(提供  $\text{Cu}^{2+}$ )、蒸馏水、苏木精染料、伊红染料、石蜡; BL6100 电子天平( Sartorius 公司)、切片机(德国 Leica 公司)。

### 1.3 小鼠铜中毒模型的建立

选用健康昆明系雄性小白鼠 40 只,适应性饲养 7 d 后,随机分为 4 组,分别为:对照组(生理盐水)、低剂量组( $\text{CuSO}_4$  0.055 mg/kg)、中剂量组( $\text{CuSO}_4$  0.55 mg/kg)、高剂量组( $\text{CuSO}_4$  5.5 mg/kg)。采用灌胃法每天灌胃 4 mL 染毒,染毒时间为 28 d。

### 1.4 病料采集与处理

染毒结束后,将各试验组小白鼠称质量后拉颈处死,剖开腹腔,取睾丸组织称质量后置于 10% 中性福尔马林固定溶液中固定 24 h 后,分别经 75%、85%、95%、100% 的酒精脱水,二甲苯置换至石蜡包埋,石蜡切片,厚度 4  $\mu\text{m}$ ,常规 HE 染色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光镜观察并拍照记录。

### 1.5 数据处理

数据处理采用 Excel 和 SPSS 17.0 软件进行。数据以平均值  $\pm$  标准误(Mean  $\pm$  SE)表示。睾丸系数用试验小鼠睾丸的质量与其体质量的比值来计算。在分析图表中 CG 表示对照组; LG 表示低剂量组; MG 表示中剂量组; HG 表示高剂量组; Sig 表示相伴概率。

## 2 结果与分析

### 2.1 染毒后体质量增长率的变化规律

经不同剂量的铜染毒后,每周对小鼠的体质量进行称质量和记录。并绘制了硫酸铜对小白鼠体质量

量增长率的影响图,如图 1。从图 1 中可以看出,与对照组相比,第 1 周时试验组的小鼠体质量增长率都低于对照组,尤其是高剂量组出现明显的负增长,且体质量增长率在 3 周时都低于对照组,说明铜对小鼠的体质量增长率具有一定的抑制作用,但随着时间的延长铜对体质量增长率的变化作用不大,没有明显的时间效应。

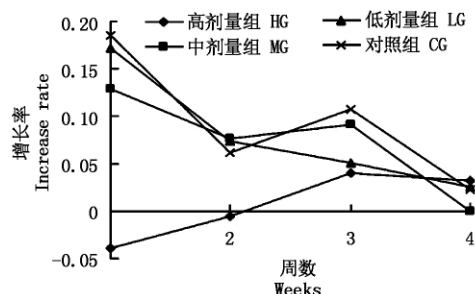


图 1 不同剂量、不同染毒时间硫酸铜对小白鼠体质量增长率的影响

Fig. 1 The effect of copper sulphate on body weight growth rate under different dose and duration in rats

### 2.2 染毒后小鼠睾丸系数的变化规律

为了直观地观察染毒后小鼠睾丸系数的变化规律,根据试验数据绘制柱状图,如图 2。以对照组作为比较基数来研究不同染毒剂量下睾丸系数的变化规律。

脏器系数是毒理实验中常用的指标。正常时各脏器质量与体质量的比值较恒定。动物染毒后,受损脏器质量发生改变,致使脏器系数也随之而改变。从图 2 中可以看出,同一抽样时间、不同剂量染毒后小鼠睾丸系数都出现了总趋势高于对照组,说明染毒后小鼠睾丸出现了充血、水肿或增生肥大等病理变化,这说明铜对小鼠睾丸产生了病理性的损伤。

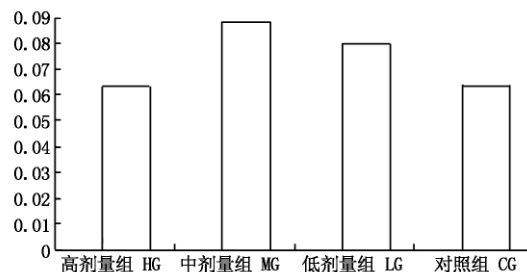


图 2 不同剂量染毒后睾丸系数的变化

Fig. 2 The changes of testicular coefficient under different dose

从表 1 可以看出,当抽样时间一定时,染毒剂量在 0.055、0.55 mg/kg 时,与对照组睾丸系数均表现极显著( $P < 0.01$ );染毒剂量在 0.055 mg/kg 时,与 0.55 mg/kg 组睾丸系数表现显著,这可能是铜对小鼠的体质量具有抑制作用而对睾丸的影响不大所造成的;而染毒剂量在 5.5 mg/kg 时,与对照组睾丸系

数表现不显著 ( $P > 0.05$ ) ,这可能是小鼠体内锰代谢的影响使其体内的几种微量元素的分布发生异常 ,而且还导致睾丸组织的锌、铜含量明显下降 ,而锌缺乏导致睾丸质量减轻所致<sup>[2]</sup> ;也可能是高剂量铜对小鼠体质量的抑制作用更大所致。

### 2.3 染毒后睾丸病理组织学变化

由图 3 可知 ,对照组小鼠睾丸的曲细精管管腔的大小基本一致 ,管腔内各级生精细胞排列整齐 ,管腔内有精子。间质正常 ,无充血、出血及炎症细胞浸润等现象。与对照组相比 ,低剂量组小鼠睾丸细胞没有太大的变化 ,只是曲细精管管腔略微变大 ,管腔内各级生精细胞有少量的缺如;中剂量组管腔内各级生精细胞缺如的更加明显 ,管腔变大 ,管腔内精子减

少;高剂量组曲细精管管腔的变化更加明显 ,各级生精细胞数目减少的更加明显 ,精子的形成极少或无。充分说明铜对雄性小鼠具有明显的生殖毒性效应。

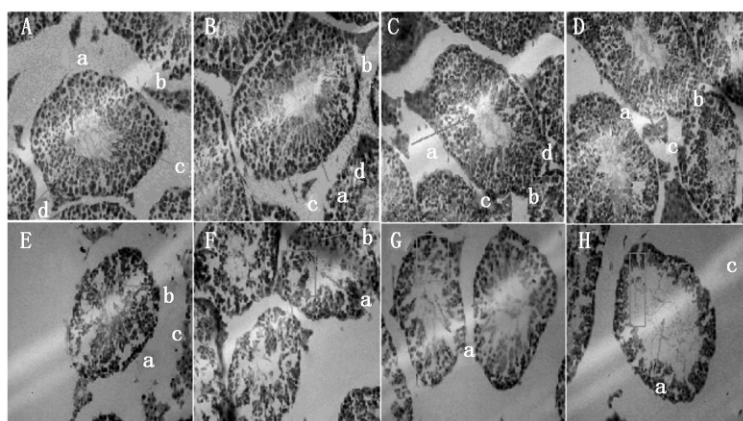
表 1 不同染毒剂量睾丸系数的显著性比较

Tab. 1 The significant differences of testicular coefficient under different dose

组别 Group	相伴概率 Significance			
	对照组 CG	低剂量组 LG	中剂量组 MG	高剂量组 HG
对照组 CG		0.000 **	0.000 **	0.816
低剂量组 LG	0.000 **		0.017 *	0.000 **
中剂量组 MG	0.000 **	0.017 *		0.000 **
高剂量组 HG	0.816	0.000 **	0.000 **	

注: \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ 。

Note: \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ 。



A ,B. 对照组; C ,D. 低剂量组; E ,F. 中剂量组; G ,H. 高剂量组; a. 管腔; b. 精子; c. 精原细胞; d. 精子细胞。  
A ,B. Indicate CG; C ,D. Indicate LG; E ,F. Indicate MG; G ,H. Indicate HG; a. Lumen; b. Sperm; c. Spermatogonia; d. Spermatid.

图 3 不同剂量染毒后睾丸的组织学变化( HE  $\times 400$  )

Fig. 3 The histological changes of testis under different dose( HE  $\times 400$  )

## 3 讨论

铜不仅是生物体必需的微量元素 ,也是重金属污染的重要因素之一<sup>[2]</sup> 。它能影响生物膜的膜质过氧化、产生氧化损伤。研究发现 ,铜能减弱质膜  $H^+ -ATPase$  的活性和参与氧自由基的产生 ,过量的铜可使动物中毒 ,铜可与体内的其他生物分子包括酶、蛋白质、核酸相互作用<sup>[3]</sup> 。本试验根据半致死量设定硫酸铜的染毒剂量 ,通过灌胃法建立硫酸铜中毒动物模型。试验中发现 ,硫酸铜对小鼠体质量增长率具有一定的抑制作用。在第 2 周体质量增长率出现正增长 ,原因可能是第 1 周试验小白鼠在染毒情况下出现体质量下降甚至负增长 ,随着染毒时间的延长 ,小白鼠对铜产生了一定的适应 ,且处于生长发育期 ,体质量正处于增长阶段 ,因此 ,在第 2 周出现体质量增长率的比第 1 周有所增加。而在第 3 周到第 4 周时 ,持续的染毒使小白鼠的机体产生了病理性变化 ,而出现了体质量的增长率的下降 ,抑制

作用明显。

对于动物来说 ,易受铜离子的污染 ,且毒害作用明显<sup>[4]</sup> 。前人通过 DNA 标记 ,用检测试剂检测并研究了小鼠肾脏中的铜代谢 ,结果发现 ,铜吸收进入肾脏后在肾皮质细胞中大量积累 ,从而为 Menkes 病的研究提供了线索<sup>[5]</sup> 。陈通克等<sup>[6]</sup> 研究表明 ,大鼠口服高剂量硫酸铜 ,大鼠的肝脏出现病理损害 ,功能降低。王利等<sup>[7]</sup> 研究表明 ,过量的铜会导致动物肝脏、肾脏等器官产生病理变化。许多研究显示 ,过量的铜都对生物具有一定毒性效应<sup>[8-15]</sup> 。在本研究中随着染毒剂量的增加小鼠睾丸细胞呈现不同程度的变性 ,管内各级生精细胞数目减少或缺失 ,精子形成极少或无 ,尤其是高剂量组。说明硫酸铜对睾丸具有明显的生殖毒性效应 ,并表现出明显的剂量效应。虽然与前人所研究的脏器不同 ,但研究结果同样表明铜离子污染对于小白鼠的脏器具有显著的毒害作用 ,因此 ,要加强对环境中铜离子污染的预防 ,保护人体和动物健康。

## 参考文献:

- [1] 徐琳. 小鼠肝脏特异性表达载体 ALB-ATP7B 的构建 [M]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(1): 123 - 134.
- [2] 杨自军, 孙鲜明, 陈钟鸣, 等. 鸡肝脏中铁铜锰锌镍铬的含量分析 [J]. 河南农业科学, 1996(12): 29 - 30.
- [3] 张迎梅, 王叶菁, 虞闰六, 等. 重金属  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  对泥鳅 DNA 损伤的研究 [J]. 水生生物学报, 2006, 30(4): 399 - 403.
- [4] 殷海成. 高剂量铜、锌、铁日粮对断奶仔猪生产性能及血红蛋白的影响 [J]. 河南农业科学, 2002(9): 39 - 40.
- [5] Hung I H, Suzuki M, Yamaguchi Y, *et al.* Biochemical characterization of the wilson disease protein and functional expression in the yeast *saccharomyces cerevisiae* [J]. *Bio Chem*, 1997, 272(34): 21461 - 21466.
- [6] 陈通克, 管敏强, 李翔. 铜中毒对 SD 大鼠肝的影响研究 [J]. 广东微量元素科学杂志, 2010(9): 24 - 26.
- [7] 王利. 动物铜中毒及防治 [J]. 四川畜牧兽医杂志, 2002(4): 21 - 22.
- [8] Yoo H Y, Chang M S, Rho H M. Heavy metal-mediated activation of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene via a metal-responsive element [J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 262: 310.
- [9] 钱晓薇, 罗蔚华. 乙酸铜对雄性小白鼠生殖毒性的影响 [J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(3): 435 - 443.
- [10] 张波. 二氯苯胺对小鼠睾丸毒作用酶学研究 [J]. 中国工业医学杂志, 2006, 19(6): 365 - 366.
- [11] Alessandra S, Fausta M, Francesca B, *et al.* Stress proteins and oxidative damage in a renal derived cell line exposed to inorganic mercury and lead [J]. *Tox Colology*, 2009, 264(3): 215 - 224.
- [12] 郭树周, 杨自军, 张才. 高铝低铜对小鼠睾丸组织脂质过氧化作用的影响 [J]. 河南农业科学, 2011, 40(11): 145 - 147.
- [13] 刘蕊. Cu 胁迫对香豌豆生长及生理特性影响 [J]. 华北农学报, 2012, 27(增刊): 193 - 197.
- [14] 范宝莉. 铜锈导下小麦生理生化及叶绿体蛋白质组成变化 [J]. 华北农学报, 2009, 24(5): 140 - 143.
- [15] 梁全忠, 贺宁荣, 侯福安, 等. 高铜日粮对家兔生产性能的影响 [J]. 山西农业科学, 1988(9): 11 - 13.