

# 环磷酰胺对长爪沙鼠精子畸形的影响

杨 信<sup>1</sup>, 陈耿喆<sup>1</sup>, 何秉嘉<sup>1</sup>, 梁 坤<sup>1</sup>, 梁成结<sup>2</sup>, 魏 莲<sup>3</sup>

(1. 广州医学院第二临床学院, 广州 510182; 2. 广州医学院实验动物研究中心, 广州 510182;  
3. 广州医学院公卫学院, 广州 510182)

**【摘要】** 目的 探讨环磷酰胺(CP)对长爪沙鼠精子畸形的影响。方法 取长爪沙鼠随机分成正常对照组, CP组(低、中、高剂量组即剂量分别为20 mg/kg、30 mg/kg、40 mg/kg), 环磷酰胺经腹腔注射, 连续注射5 d, 药后30 d麻醉沙鼠, 剖腹取出两侧附睾制备精子悬液涂片, 用甲醇固定10 min, 用2%的伊红染色30 min, 蒸馏水洗片, 显微镜观察精子形态。结果 低、中、高剂量组分别与正常对照组比较, 长爪沙鼠精子畸形率差异极显著( $P < 0.01$ ); 低、中剂量组分别与高剂量组相比较, 长爪沙鼠精子畸形率差异极显著( $P < 0.01$ ); 低剂量组与中剂量组比较, 精子畸形率差异不显著( $P > 0.05$ )。形态学观察显示: 环磷酰胺对长爪沙鼠精子影响畸形类型主要为尾折叠、尾粗细/长短/扭曲和无钩。结论 环磷酰胺对长爪沙鼠精子有一定的致畸率, 且对长爪沙鼠精子尾部影响最大。在一定剂量范围内, 环磷酰胺对长爪沙鼠的精子致畸率无明显区别; 当高于一定剂量, 随着环磷酰胺用药剂量的增加, 长爪沙鼠的精子致畸率也增加。

**【关键词】** 环磷酰胺; 长爪沙鼠; 精子畸形

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)01-0005-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.001.002

## The Influence of Cyclophosphamide to the Abnormalities of Mongolian Gerbils' Sperms

YANG Xi<sup>1</sup>, CHEN Geng-zhe<sup>1</sup>, HE Bing-jia<sup>1</sup>, LIANG Kun<sup>1</sup>, LIANG Cheng-jie<sup>2</sup>, WEI Lian<sup>3</sup>

(1. The Second Clinical School, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China;

2. The Animal Experiment Center of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China;

3. School of Public Health of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

**【Abstract】 Objective** To study the influence of Cyclophosphamide (CP) to the abnormalities of Mongolian gerbils' sperms. **Methods** 28 male Mongolian gerbils were divided into 4 groups, 7 per group. Set a negative control group, three CP groups (low-dose group, medium-dose group and high-dose group). Cyclophosphamide was given to the CP groups by intraperitoneal injection for 5 days. 30 days after the giving drugs, we anaesthetized the gerbils, opened their abdomen and took out their two testicles. Then we made smears with the sperm suspension, and air dried them, and then fixed them with methanol for 10 minutes, and then air dry them again. After the above steps, we stained them with 2% eosin for 30 minutes, then we rinsed them with distilled water, and dry them for film-reading observations. The observation was about the influence of cyclophosphamide on the Mongolian gerbils' sperm. **Results** Compared with the negative control group, the rate of sperms abnormalities in the three CP groups showed great difference. The rate in the low-dose group and

[基金项目] 广州医学院第二临床学院 2009—2010 年度学生科技活动立项项目。

[作者简介] 杨信(1988-), 女, 研究方向: 药物对动物模型的作用。

[通讯作者] 梁成结(1973-), 男, 高级实验师, 研究方向: 实验动物科学管理及动物模型。

the medium-dose group was obvious different from the rate in the high-dose group ( $P < 0.01$ ). The rate in the low-dose group showed little difference from the rate in the medium-dose group ( $P > 0.05$ ). Morphological observation showed that: the abnormal effect of cyclophosphamide on gerbils' sperms included tail folding, tail weight / length / distortion and no hook. **Conclusions** Cyclophosphamide has a certain teratogenic rate on Mongolian gerbils' sperms. And it influenced their tails most. In a certain dose range, the rate of abnormalities showed little difference, while when the dose was higher than a certain level, the rate of abnormalities rose together with the dose of cyclophosphamide rose.

**【Key words】** Cyclophosphamide; Gerbil; Abnormality of sperm

长爪沙鼠又称蒙古沙鼠,主要分布在我国的内蒙、河北、陕西、宁夏等草原地带<sup>[1]</sup>。具有独特的生物学特性,是国内外正在开发与利用的多能性实验动物,越来越广泛地应用于生命科学的研究。由于对长爪沙鼠的繁殖和使用起步较晚,目前供应长爪沙鼠的单位仅有少数几家。有必要从不同方面对长爪沙鼠进行研究,为该物种的实验动物化,资源开发提供了理论依据。

环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)是人工合成氮芥类烷化剂,是一种毒性较低,是细胞周期非特异性广谱抗肿瘤药,也是导致生殖细胞遗传性损伤的毒作用,对人白细胞及血小板也有一定的破坏作用<sup>[2]</sup>。本实验用 CP 作诱变剂,探讨其对长爪沙鼠精子的影响,未见报道。现我们在实验室进行了该项试验观察,以期探讨出长爪沙鼠在临床用药或毒理研究更多更好相关数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物:雄性长爪沙鼠,体重在 52 ~ 70 g,由广州医学院动物实验中心提供 [SCXK(粤)0007612]。

1.1.2 材料:环磷酰胺(CP)为江苏恒瑞股份有限公司产品,批号为 09090321;伊红染液及染缸;甲醇;生理盐水;注射器;抗凝管;消毒用品 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg);离心管;手术剪刀;镊子等。

1.1.3 仪器:离心机;照相机为 Canon PC1252;显微镜 Olympus BHA;电子天平等。

### 1.2 方法

1.2.1 动物分组:选用体重在  $65 \pm 5$  g 的雄性长爪沙鼠 28 只,随机分为 4 组,每组 7 只,设正常对照组和 CP 组(分低、中、高剂量组其剂量分别为 20 mg/kg、30 mg/kg、40 mg/kg)<sup>[3]</sup>。试验前动物观察一周,记录食量、体重、外观体征和行为活动。饲养环境为广州医学院动物中心,室内温度 21 ~ 24℃,室内湿度 45% ~ 70%,动物自由进食及饮水,饲料由广

东省医学实验中心提供。

1.2.2 动物处理:CP 用生理盐水溶解,给药前配制,CP 组每日按低、中、高三个剂量腹腔注射给药。正常对照组用等量生理盐水注射。连续注射 5 d。给药后,常规饲养。

1.2.3 动物取材:给药 30 d 后,每组取 5 只长爪沙鼠麻醉处理:分别取出两侧附睾,置于盛有 0.8 mL 0.9% 的生理盐水细胞培养液中,用眼科剪剪碎附睾组织或镊子轻轻撕开附睾包膜,徐徐摇动附睾组织,静置 5 ~ 10 min,用镊子将组织碎片取出,装入离心管,3000 转速/min 的离心机离心 5 min,去除上清液,留下约 0.2 mL 液及沉淀物,混匀余液并用加样器吸取 40  $\mu$ L 精子悬液,滴在玻片上推片,自然晾干,每只长爪沙鼠附睾液制片 5 张,甲醇固定 10 min 后再自然晾干,2% 的伊红染色 30 min,蒸馏水冲洗干净,晾干,显微镜下进行阅片观察。

1.2.4 观察指标精子畸形率:在显微镜下计数,每张片计数 200 条完整精子中出现的畸形的精子数,每组共计 1000 条。从而计算出各试验组精子畸形率(%)。同时观察畸形的类型。

1.2.5 统计学处理:统计学分析采用 spss12.0 软件进行处理,所得数据均用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,统计方法使用单因素方差分析 (one-way ANOVA),以  $\alpha = 0.05$  作为检验标准。

## 2 结果

### 2.1 精子畸形率

低、中、高剂量组分别与正常组比较,长爪沙鼠精子畸形率差异极显著 ( $P < 0.01$ );低、中剂量组分别与高剂量组相比较,长爪沙鼠精子畸形率差异极显著 ( $P < 0.01$ );低剂量组与中剂量组比较,精子畸形率差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

从表 2 数据可知,长爪沙鼠精子受环磷酰胺影响而产生的畸形类型主要为尾折叠、尾粗细/长短/扭曲。

表 1 CP 对长爪沙鼠精子畸形的影响

Tab. 1 The influence of CP to the abnormalities of Mongolian gerbils' sperms

组别 Group	剂量 Dose ( mg/kg)	长爪沙鼠数 Number of Mongolian gerbils( n)	观察精子数 Number of observing sperms( n)	畸形精子数 Number of teratospermia( n)	精子畸变率 Aberration rate of sperms( % )
正常对照组 Normal control	0	5	5000	1437	28.74 ± 5.74352
低剂量组 Low dose	20	5	5000	1992	39.84 ± 4.17169*
中剂量组 Medium dose	30	5	5000	2220	44.40 ± 2.77038* *
高剂量组 High dose	40	5	5000	2849	56.98 ± 4.94894* <sup>△</sup>

注:与正常对照组比较: \* P < 0.01; 中剂量与低剂量组比较: \* P > 0.05; 高剂量组与中剂量组、低剂量组相比较: <sup>△</sup> P < 0.01。

Note: Compared with the control group: \* P < 0.01; medium dose group compared with low dose group: \* P > 0.05; high dose group compared with low dose group, medium dose group: <sup>△</sup> P < 0.01.

表 2 环磷酰胺对长爪沙鼠精子畸形类型统计

Tab. 2 Statistics of different influential types of CP on Mongolian gerbils' sperms

组别	观察精子数 Number of observing sperms ( N)	钩变短/直			小头 Microcephaly ( n , %)	尾折叠 Folded tail ( n , %)	尾粗细/长短 /扭曲 Degree of thickness/ length/ length of tail( n , %)	双头/双尾 Double heads/ Double tails ( n , %)	复合畸形 Complex deformity ( n , %)	总计 Total ( n)
		无钩 No hook ( n , %)	Uncurl/ shorten the hook ( n , %)	胖头 Macrocephaly ( n , %)						
正常对照组 Normal control	5000	278( 19.35)	95( 6.61)	37( 2.57)	25( 1.74)	599( 41.68)	260( 18.09)	14( 0.97)	129( 8.98)	1437
低剂量组 Low dose	5000	375( 18.83)	132( 6.63)	62( 3.11)	44( 2.21)	658( 33.03)	556( 27.91)	3( 0.15)	162( 8.13)	1992
中剂量组 Medium dose	5000	354( 15.95)	217( 9.77)	15( 0.68)	33( 1.48)	939( 42.30)	487( 21.94)	16( 0.72)	159( 7.16)	2220
高剂量 High dose	5000	477( 16.74)	98( 3.44)	42( 1.47)	109( 3.83)	826( 28.99)	1053( 36.96)	16( 0.56)	228( 8.00)	2849

## 2.2 精子显微镜下观察

显微镜下观察大量精子尾部畸形,以尾折叠、尾粗细/长短/扭曲为主,尾折叠占比例最多(见彩插 1 图 1~4)。

## 3 讨论

精子的成熟和正常形态发育受多基因控制,人和哺乳动物的基因在正常情况下精液中也有部分精子畸形,但在某些生殖毒物的作用下,精子畸形数量会大大增加。

在试验各组中,低、中、高剂量组长爪沙鼠精子畸形率分别和正常组比较,差异均极显著(P < 0.01),说明环磷酰胺对长爪沙鼠的精子有明显的致畸影响;低、中剂量分别与高剂量组相比较,长爪沙鼠精子畸形率差异极显著(P < 0.01),说明环磷酰胺用药不同剂量对长爪沙鼠精子致畸率有明显差异;低剂量组长爪沙鼠精子畸形率与中剂量组比较,差异不显著(P > 0.05)。

上述提示,环磷酰胺对长爪沙鼠精子有一定的致畸率。在一定剂量内,环磷酰胺对长爪沙鼠的精子致畸率无明显区别。当环磷酰胺高于某个剂量,

随环磷酰胺用药剂量越高,对长爪沙鼠的精子畸形率越高。具体的 CP 剂量范围对沙鼠精子具体致畸率需要进一步实验验证。

尾折叠畸形类型是环磷酰胺对长爪沙鼠精子的畸形最多的类型,最高占畸形数的 42.30%;尾粗细/长短/扭曲类型:是随着环磷酰胺剂量的增加,其在畸形数中所占的比例有所增加,在高剂量组中达到 36.96%,高剂量组有个别模型组的精子尾扭曲率占其全精子的 95% 以上;无钩也是畸形数较多的类型,但其受环磷酰胺剂量影响较小;而其他类型如复合畸形、钩变短/直、小头、胖头等畸形数目也较多,双头这一类型在畸形数中所占比例最少。综合来看,环磷酰胺对长爪沙鼠精子尾部影响最大。

本实验与李凤文“环磷酰胺对小白鼠精子畸形影响的探讨”实验所用的药品及剂量相同,取材方法相同。分组方法相同,但实验用的动物品种不同,给药的方式不同:本实验用长爪沙鼠,通过腹腔注射给药;李凤文实验是用小白鼠通过灌胃给药,所得结果也有差异,异同对比如下:

1. 两实验正常组的精子畸形率相差明显。李凤文小白鼠实验显示:正常组畸形率是 1.34%,而

本实验正常组畸形率是 28.7% ,说明不同品种的动物其正常组精子畸形率是有所不同。长爪沙鼠精子畸形率明显比小白鼠精子畸形率高。这可能与长爪沙鼠的品种遗传有关,也可能与我们在实验操作中引起有关。但本人认为:长爪沙鼠精子畸形率高,是其品种与遗传占主要的。长爪沙鼠精子畸形率高现象与其出生率较低相吻合,也可说明这一点;反之,大小鼠精子畸形率明显低,而其出生率每胎平均十多只,是长爪沙鼠出生率的几倍。当然不同品种的鼠出生率与其排卵数量等因素也有一定的相关性,这些都有待进一步研究。

2. 两实验显示:CP 都能对这两种动物的精子起到明显的致畸作用,但两实验提示 CP 对各自精子主要畸形类型不同:小白鼠的精子畸形是不定形畸形为主占 8.52% ,长爪沙鼠精子主要畸形是尾折叠畸形类型,最高占畸形数的 42.30% 。

3. 由于两实验的给药方式不同,可能吸收的药量有所不同;实验的动物不同,对环磷酰胺的敏感程度也有所不同,这些有待进一步探讨。

本实验研究显示,高剂量组动物模型出现死亡现象。这可能“高剂量”已达到 CP 对长爪沙鼠致

死量附近,这有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 周立志,马勇,李迪强. 大沙鼠在中国的地理分布[J]. 动物学报, 2000, 46(2): 130-137.
- [2] 吴基良,罗健东. 药理学北京:科学出版社[M]. 2007: 291-296.
- [3] 季凤文,刘荣珍,赵鹏,等. 环磷酰胺对小白鼠精子畸形影响的探讨[J]. 广西医学, 2003, 25(3): 328-330.
- [4] 冯波,申吉泓,袁彬彬. 小鼠腹腔注射环磷酰胺建立少精子症模型的稳定性探讨[J]. 中华男科学杂志, 2007, 13(1): 71-73.
- [5] Boekelheide K. Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis [J]. J Natl Cancer Inst Monogr, 2005, (34): 6-8.
- [6] 贾庆军,刘天鹏,冯长龙,等. 环磷酰胺对小鼠生殖细胞和精子的影响[C]. 见(In):贾庆军,刘天鹏,冯长龙,等. 第五届中国肿瘤学术大会论文集.
- [7] 张桥. 卫生毒理学基础[M]. 北京人民卫生出版社: 2001, 249-252.
- [8] 祝寿芬,仇玉兰,王仲霞. 三氧化二砷对小鼠精子形态的影响[J]. 卫生毒理学杂志, 1997, 11(2): 129-130.

(修回日期)2011-09-25

#### (上接第 73 页)

- [36] Wilson MH, Kaminski JM, George AL, Jr. Functional zinc finger/sleeping beauty transposase chimeras exhibit attenuated overproduction inhibition [J]. FEBS Lett, 2005, 579 (27): 6205-6209.
- [37] Ivics Z, Katzer A, Stuve EE, et al. Targeted Sleeping Beauty transposition in human cells [J]. Mol Ther, 2007, 15 (6): 1137-1144.
- [38] Maragathavally KJ, Kaminski JM, Coates CJ. Chimeric Mos1 and piggyBac transposases result in site-directed integration [J]. Faseb J, 2006, 20 (11): 1880-1882.
- [39] Urschitz J, Kawasumi M, Owens J, et al. Helper-independent piggyBac plasmids for gene delivery approaches: strategies for avoiding potential genotoxic effects [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107 (18): 8117-8122.
- [40] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle

cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin [J]. Science, 2007, 318 (5858): 1920-1923.

- [41] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. Cell, 2006, 126 (4): 663-676.
- [42] Desponts C, Ding S. Using small molecules to improve generation of induced pluripotent stem cells from somatic cells [J]. Methods Mol Biol, 2010, 636: 207-218.
- [43] Vanden Driessche T, Ivics Z, Izsvak Z, et al. Emerging potential of transposons for gene therapy and generation of induced pluripotent stem cells [J]. Blood, 2009, 114 (8): 1461-1468.

(修回日期)2011-06-09

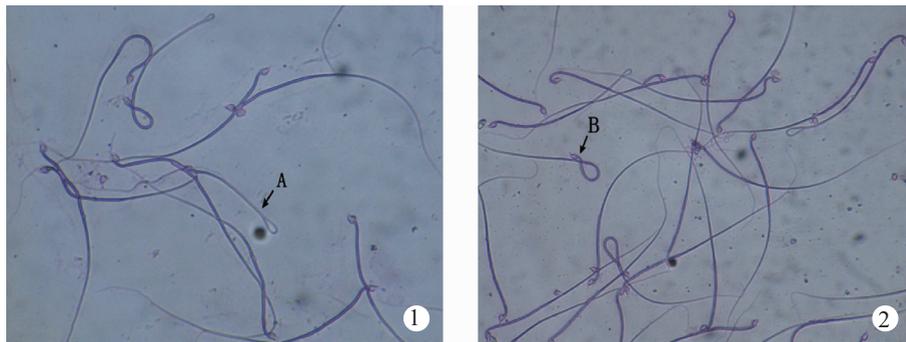


图 1 正常对照组小鼠精子涂片在普通显微镜下观察 图 2 低剂量组小鼠精子涂片在普通显微镜下观察

Fig.1 Normal control group: the sperms under the normal microscope Fig. 2 Low-dose group: sperms under normal microscope  
注:A 示尾折叠类型的畸形精子;B 示钩变短类型的畸形精子 Note: Picture A shows tail folding; Picture B shows hook shortened

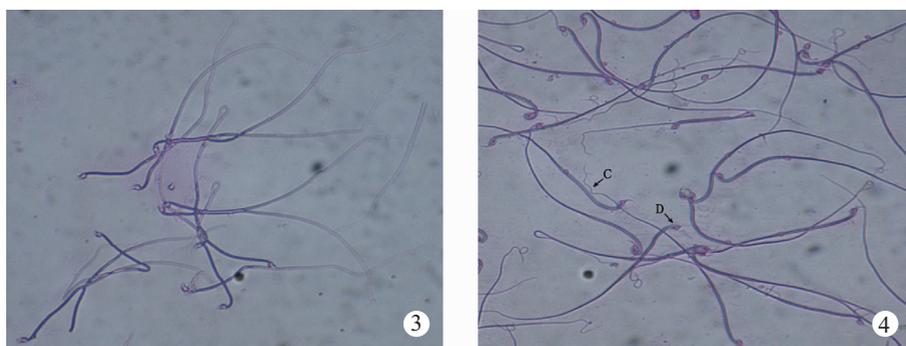


图 3 中剂量组小鼠精子涂片在普通显微镜下观察 图 4 高剂量组小鼠精子涂片在普通显微镜下观察

Fig. 3 Medium-dose group: sperms under normal microscope Fig. 4 High-dose group: sperms under normal microscope  
注:C 示尾扭曲类型的畸形精子; D 示无钩类型的畸形精子 Note: Picture C shows distortion; Picture D shows no hook.

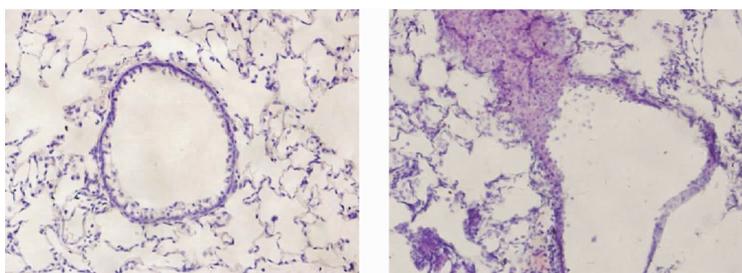


图 1 肺组织病理 HE(x200)

①正常对照组 ②早期戒烟组

Fig. 1 Lung pathology HE(x200)

①Control group ②Early quitting smoke groups

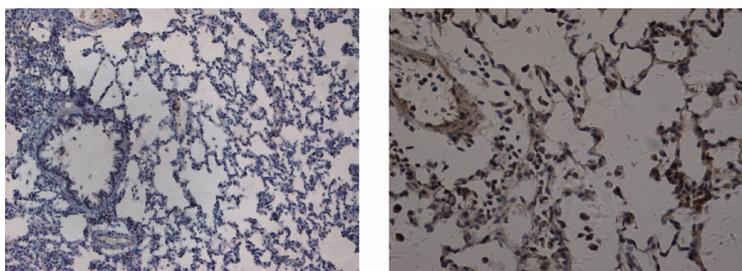


图 2 肺组织 NF-κB 表达 免疫组化(x200)

①正常对照组 ②早期戒烟组

Fig. 2 Expression of NF-κB in lung tissue(x200)

①Control group ②Early quitting smoke groups