

# 湿地内外滇池水体中微囊藻毒素对小鼠生殖毒性的研究

沈放, 路斌, 石自博, 杨黎江  
(昆明学院 生命科学与技术系, 云南 昆明 650214)

**摘要:**通过提取湿地内外滇池水体水样中的微囊藻毒素,检测湿地内外水体中微囊藻毒素对小鼠的生殖毒性,以及对其体外和体内精子活性的影响.结果表明:湿地外周滇池水体中的微囊藻毒素对小鼠具有生殖毒性,特别在精子的生成和精子活性方面表现出较强的毒性作用;湿地内水体的生殖毒性明显低于湿地外水体,对小鼠的睾丸和附睾不会形成器质性变化,也不会影响精子的数量和精子活性(与对照组比较  $P > 0.05$ ).结果证实湿地能有效抑制滇池水体中微囊藻毒素的形成,对滇池水质可起到有效的净化作用.

**关键词:**滇池;湿地;微囊藻毒素;生殖毒性;精子;精子活性

**中图分类号:**X52;R994.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1674-5639(2012)03-0033-04

## Study on Reproductive Toxicity of Microcystin in Peripheral and Internal Wetland of Dianchi Lake

SHEN Fang, LU Bin, SHI Zi-bo, YANG Li-jiang

(Department of Life Science and Technology, Kunming University, Yunnan Kunming 650214, China)

**Abstract:** Microcystins was extracted in water of peripheral and internal wetland of Dianchi Lake. Reproductive toxicity of microcystins in mice and the influence of microcystins on sperm motility *in vitro* and *in vivo* were examined. The microcystins from peripheral wetland in Dianchi Lake has reproductive toxicity in mice and especially shows stronger toxic effects in the production and activity of sperm. Reproductive toxicity of the water sample from internal wetland is significantly lower than that of peripheral wetland causing none pathological changes in mouse testis and epididymis, and no impact on sperm numbers and sperm activity (compared with the control group,  $P > 0.05$ ). The results demonstrate that wetland can effectively inhibit the production of microcystin and effectively purify the water quality in Dianchi Lake.

**Key words:** Dianchi Lake; wetland; microcystins; reproductive toxicity; sperm; sperm activity

由于工农业和城市化的发展,工业和生活污水通过各种渠道进入滇池水环境中,导致作为昆明地区供水水源之一的滇池水体严重污染,水域内藻类大量繁殖,形成成片蓝藻水华<sup>[1-2]</sup>.蓝藻产生的微囊藻毒素(microcystin, MC)为细胞内毒素,其性状稳定,分解缓慢.当滇池水华大量暴发时,不仅影响了饮用水质量和水体的自然景观,所产生的微囊藻毒素也将严重污染水体和水生生物<sup>[3-4]</sup>.已有研究表明,微囊藻毒素生物毒性作用的靶器官为肝脏,通过对鼠、鱼腹腔注射或口服给药,MC能迅速引起实验动物急性中毒<sup>[5-6]</sup>.目前,关于MC的生殖毒性方面的研究较少,且多集中于对鱼类的研究.现已了解到微囊藻毒素对哺乳动物生殖器官具有损伤作用,但研究工作尚不系统全面<sup>[7-8]</sup>.

近年来,滇池治理通过建立人工湿地和恢复原有湿地,已取得一定成效.已有研究表明,湿地

对滇池水体中微囊藻毒素的动物急性毒性和长期毒性能起到有效降解的作用<sup>[9]</sup>,同时湿地也能有效改变微囊藻的繁殖速率和水体中藻类的优势种群,并明显抑制水体中的蓝藻数量,可显著净化水质<sup>[10]</sup>.但滇池水华中的微囊藻毒素是否对哺乳动物具有生殖毒性,且滇池水体经湿地净化后是否能对微囊藻毒素的生殖毒性起到有效控制的作用目前尚未见相关报道.本研究拟通过对比较经湿地内外滇池水体中的微囊藻毒素对小鼠的生殖系统的影响,明确湿地对滇池水华中的微囊藻毒素是否具有抑制或降解作用,为滇池保护和治理提供科学依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 水样采集

#### 1.1.1 湿地外周水样

采集滇池草海湿地外水体中上层水样,水样较

收稿日期:2012-04-14

基金项目:云南省教育厅科研基金资助项目(09C0133);昆明学院科研课题资助项目(2009L017)

作者简介:沈放(1973—),女(满族),辽宁凤城人,副教授,硕士,从事生物化学和药理学研究.

透明、呈绿色,可见明显的藻团颗粒,pH6.0~6.4.

### 1.1.2 湿地内水样

采集滇池草海湿地内水体中上层水样,所采集的水样透明、浅绿色,水中藻团颗粒较少,pH6.4~6.7.

### 1.2 采集水样中的藻类鉴定

对2种水体样品中生存的藻类情况进行镜检,2种水样中的优势藻类均为数量不等的惠氏微囊藻、绿色微囊藻和铜绿微囊藻.

### 1.3 仪器及试剂

仪器:恒温水浴箱(土耳其NÜVE);低温离心机(Eppendorf 5804R);微量分析天平(瑞士梅特勒XS205DU);小型高速离心机(美国Backman Microfuge 22R);滤布(120目及200目);生物显微镜(Olympus);血球计数板.

试剂:阳性对照为醋酸棉酚(质量分数>95%,批号:081026,上海融禾医药科技发展有限公司),其余试剂均为国产分析纯.

### 1.4 微囊藻毒素提取液的制备<sup>[9]</sup>

取一定量的水样过滤,先用120目滤布过滤3次,再用200目滤布过滤2次,收集过滤所得的藻浆,-20℃冻存,于次日室温解冻,如此反复冻融3次,可得水样的微囊藻藻浆.将各水样的藻浆与10%醋酸溶液以V(醋酸溶液):V(藻浆)=1:1的比例混合溶解,搅拌提取2h,4℃,3000r/min离心15min,收集上清液,所得沉淀再用10%醋酸溶液按上法搅拌提取1次.合并上清液,45℃旋转蒸发浓缩,得各样品的微囊藻毒素提取液(V(水样):V(提取液)=1000:1),-20℃冻存待用.

### 1.5 实验动物

昆明种小鼠,♂,健康,性成熟,体质量为31~35g(由昆明医学院动物科提供,合格证号:2005017;发证单位:云南省动物管理委员会).实验动物自由饮水进食,饲养于室温、自然光照条件下,适应饲养环境1周.

### 1.6 小鼠精子培养液的制备<sup>[11]</sup>

取小鼠睾丸加入少量Hank's平衡液,用组织匀浆器研磨破碎细胞,13000r/min,4℃下离心10min,将所得上清液加入Hank's平衡液制成质量浓度为0.1g/mL的睾丸匀浆液,取睾丸匀浆液和Hank's平衡液配制成V(睾丸匀浆液):V(Hank's平衡液)=1:8.3的培养液,分装,置-20℃保存备用.

### 1.7 小鼠体外精子活性的毒性<sup>[11]</sup>

将各水样微囊藻毒素提取液用Hank's平衡液稀释至1μL/mL,得水样毒素稀释液.取雄性小鼠10只,用作对照组、湿地外周水样组和湿地内水样组的体外精子活性实验.雄性小鼠脱椎处死后取一侧附睾于1mL培养液中,剪碎,加入培养液7mL稀释,36℃水浴10min后镜检并计数精子成活率,精子成活率达60%以上为合格精子溶液.取精子溶液各200μL至96孔板,分为空白对照组、湿

地外周水样组和湿地内水样组,分别加入生理盐水、湿地外周水样微囊藻毒素稀释液和湿地内水样微囊藻毒素稀释液各50μL,36℃水浴10min,选取血球计数板中的5个中方格,读取每个方格中A、B、C和D级的精子数目,计算精子成活率.每个样品做3组平行.

各级精子比率计算方法如下:

各级精子比率 =

$$\frac{A \text{ 级(或 B 级、C 级、D 级)的精子数} \times 10^9}{\text{总精子数} \times 10^9} \times 100\%$$

精子成活率计算方法如下:

精子成活率 =

$$\frac{(A \text{ 级} + B \text{ 级} + C \text{ 级的精子总数}) \times 10^9}{\text{总精子数} \times 10^9} \times 100\%$$

### 1.8 小鼠生殖器官的影响

各实验组分别取雄性小鼠10只,每天灌胃样品液0.1mL,连续灌胃2周,对照组喂食自来水.2周后,用3%的戊巴比妥钠溶液麻醉小鼠,称体质量,取睾丸、附睾称质量,用当日体质量计算睾丸系数(睾丸质量/体质量×100%)及附睾系数(附睾质量/体质量×100%).附睾剪碎、培养和稀释方法同前,显微镜下观察精子成活情况并计算精子活率.

### 1.9 统计学分析

数据分析采用SPSS 16.0软件系统,数据表示为:平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ ),采用Student-t检验进行组间数据差异比较,采用Duncan's检验进行多组间数据差异比较,当P<0.05时,差异有统计学意义.

## 2 结果与分析

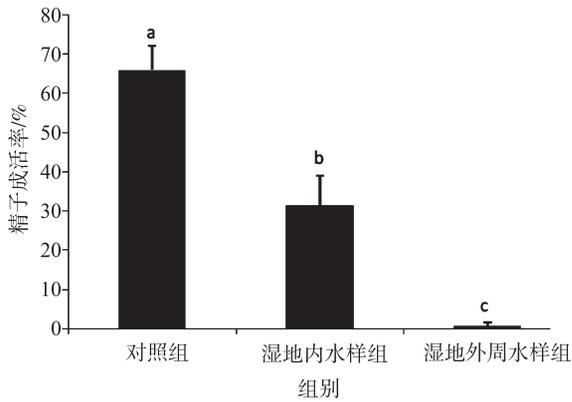
### 2.1 对小鼠体外精子活性的影响

在体外培养的小鼠精子溶液中加入湿地外周水样和湿地内水样的微囊藻毒素提取液后,小鼠精子活力受到了影响,各级精子比率均有不同程度的下降,结果见表1和图1.

表1 湿地内外滇池水体中的微囊藻毒素对小鼠精子体外活性的影响

项目	对照组	湿地内水样组	湿地外周水样组
样本数/n	10	10	10
A级精子数/×10 <sup>9</sup> 个	9.2±2.4	0.2±0.7**	0.0±0.0**
A级精子比率/%	28.9	0.7	0.0
B级精子数/×10 <sup>9</sup> 个	6.5±1.8	3.7±1.4*	0.0±0.0**
B级精子比率/%	20.4	12.4	0.0
C级精子数/×10 <sup>9</sup> 个	5.3±1.1	5.5±2.0	0.2±1.2**
C级精子比率/%	16.7	18.5	0.7
D级精子数/×10 <sup>9</sup> 个	10.8±2.5	20.4±3.7**	29.4±2.1**
D级精子比率/%	33.9	68.5	99.3
总精子数/×10 <sup>9</sup> 个	31.8±4.7	29.8±5.4	29.6±3.2

注:与对照组比较,\*为P<0.05;\*\*为P<0.01.



各比较组中,柱上字母不同表示相互间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )

图1 湿地内外滇池水体中的微囊藻毒素对小鼠精子体外成活率的影响

实验结果表明,湿地外周水样和湿地内水样的

表2 湿地内外滇池水体中的微囊藻毒素对小鼠睾丸和附睾的影响

组别	体质量/g	睾丸质量/g	睾丸系数	附睾质量/g	附睾系数
对照组	45.7 ± 5.8	0.147 ± 0.015	0.322 ± 0.024	0.0441 ± 0.0159	0.097 ± 0.009
湿地外周水样组	30.5 ± 4.9	0.173 ± 0.037	0.567 ± 0.055*	0.0955 ± 0.0587	0.313 ± 0.019**
湿地内水样组	43.7 ± 2.6	0.131 ± 0.022	0.300 ± 0.038	0.0533 ± 0.0094	0.122 ± 0.006

注:与对照组比较,\*为 $P < 0.05$ ;\*\*为 $P < 0.01$ .

2.3 对小鼠体内精子活性的影响

通过对小鼠进行2周的湿地外周水样和湿地内水样的微囊藻毒素提取液灌胃,检测水样中毒素对小鼠各级精子数量和精子活性的影响,结果见表3和图2.

表3 湿地内外滇池水体中的微囊藻毒素对小鼠体内精子活性的影响

项目	对照组	湿地外周水样组	湿地内水样组
样本数/n	10	10	10
A级精子数/ $\times 10^9$ 个	26.2 ± 7.8	0.9 ± 1.2**	12.9 ± 8.6*
A级精子比率/%	38.1	6.9	21.1
B级精子数/ $\times 10^9$ 个	13.5 ± 4.9	1.2 ± 2.0**	11.5 ± 6.7
B级精子比率/%	19.6	9.2	18.8
C级精子数/ $\times 10^9$ 个	14.6 ± 3.4	2.6 ± 1.7**	8.4 ± 4.5
C级精子比率/%	21.2	19.8	13.7
D级精子数/ $\times 10^9$ 个	14.5 ± 4.5	8.4 ± 3.1	28.3 ± 11.2**
D级精子比率/%	21.1	64.1	46.3
总精子数/ $\times 10^9$ 个	68.8 ± 14.7	13.1 ± 9.8**	61.1 ± 18.7

注:1)与对照组比较,\*为 $P < 0.05$ ,\*\*为 $P < 0.01$ ;2)湿地外周水样组中有2个样本的精子畸形率 $> 20\%$ .

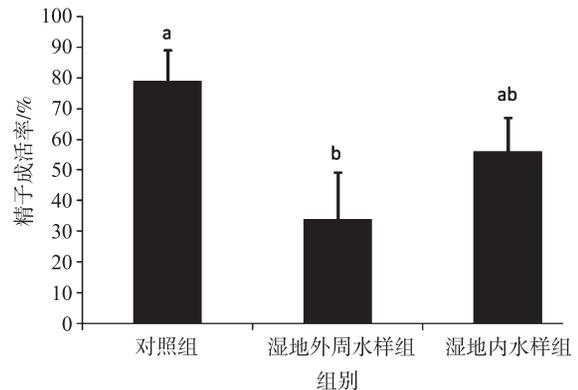
实验结果显示,湿地外周水样组的A,B,C级精子数量和精子总数均较对照组有明显的下降,且差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),且畸形精子数量异于正常水平;湿地内水样组中A级较对照组有明显的下降( $P < 0.05$ ),D级精子数量较对照组有显著

微囊藻毒素提取液均能显著降低雄性小鼠的精子活力.加入湿地外周水样微囊藻毒素提取液可使小鼠精子基本全部死亡,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ );而湿地内水样的微囊藻毒素提取液在同样体积分数时还有部分精子存活,但等级较低为B级和C级精子.

2.2 对小鼠生殖器官的影响

通过对小鼠进行2周的湿地外周水样和湿地内水样的微囊藻毒素提取液灌胃,检测水样中的毒素对小鼠体质量、睾丸及附睾的影响,结果见表2.

实验结果表明,湿地外周水样组小鼠体质量明显低于对照组,睾丸及附睾质量均较对照组有所上升但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),睾丸系数及附睾系数则显著高于对照组( $P < 0.05$ );湿地内水样组小鼠体质量、睾丸质量、附睾质量、睾丸系数及附睾系数与对照组差异均无统计学差异( $P > 0.05$ ).



各比较组中,柱上的不同字母表示相互间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )

图2 湿地内外滇池水体中的微囊藻毒素对小鼠体内精子成活率的影响

上升( $P < 0.01$ ),但B,C级精子数量和精子总数与对照组差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ).说明微囊藻毒素对小鼠精子具有一定的毒性作用.从精子活率来看,湿地外周水样组与对照组差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),但湿地内水样组的精子活率虽有所下降,但与湿地外周水样组无明显差异,同时与对照组间的差异也无统计学意义( $P > 0.05$ ).

3 讨论

从全世界范围来看,饮水是微囊藻毒素进入人体的最主要途径<sup>[12-13]</sup>.如果饮用水源是发生蓝藻水

华的水库、湖泊或河流,即使水通过自来水公司处理,仍有一定量的微囊藻毒素残留在饮用水中,而普通的加热煮沸等方法是无法有效去除或降解该毒素的<sup>[14]</sup>.作为昆明供水源之一的滇池,由于水体富营养化导致蓝藻水华的大量爆发,而这些水华藻类均能产生微囊藻毒素<sup>[2]</sup>.微囊藻毒素不但具有较强的肝、肾毒性,还具有动物胚胎致畸、免疫功能抑制、DNA和染色体损伤等多种毒害作用.关于MC的生殖毒性方面的研究较少且多集中于对鱼类的研究.目前仅有的少量报道证实,长时间暴露于微囊藻毒素可导致雄性大鼠生殖系统的损伤,并导致睾丸功能严重受损,进而造成严重的生殖毒性<sup>[8]</sup>.

通过从体内和体外两方面进行湿地内外的滇池水体中微囊藻毒素对哺乳动物生殖毒性的研究,结果证实,湿地外周水样和湿地内水样的微囊藻毒素提取液均能显著降低体外培养的雄性小鼠的精子活力,湿地外周水样中的微囊藻毒素可使小鼠精子基本全部死亡,而湿地内水样组中还有部分精子存活,但活力等级较低;两种水样中均含有一定量的微囊藻毒素,但湿地外周水样中的微囊藻毒素含量明显高于湿地内水样.灌胃微囊藻毒素提取液后,湿地外周水样组的小鼠体质量出现下降,可能与水样中毒素含量高,染毒后引起食欲下降及消化功能紊乱有关;该组小鼠睾丸及附睾质量虽没有出现明显增大现象,但睾丸系数及附睾系数则显著高于对照组,这也可能与其体质量变化有直接关系.湿地内水样组小鼠体质量、睾丸质量、附睾质量、睾丸系数及附睾系数均与对照组无明显差异,可认为该组水样中的微囊藻毒素含量较低,对小鼠的生殖器官尚不能造成器质性变化.从附睾中的精子数量和精子活性来看,湿地外周水样组不但A、B、C级精子数量明显减少,还出现精子总数显著性下降(与对照组比较,  $P < 0.01$ )和畸形精子数量异常的现象;湿地内水样组中A级精子数量减少,D级精子数量增多,B、C级精子数量和精子总数与对照组比较无明显变化;从精子活率来看,湿地外周水样组的精子活率显著低于对照组,湿地内水样组虽有所下降但与对照组间的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ).这些都进一步说明湿地外周水域的微囊藻毒素高于湿地内水域.

综上所述,湿地外周滇池水体中的微囊藻毒素对小鼠具有生殖毒性,特别在精子的生成和精子活性方面表现出较强的毒性作用.同时,湿地内的滇池

水体中因微囊藻数量与湿地外周水体不同,两种水体中微囊藻毒素含量出现了明显的差异,导致湿地内水体的毒性明显低于湿地外水体,其对小鼠的睾丸和附睾不会形成器质性变化,也不会影响精子的数量和精子的活性(与对照组比较  $P > 0.05$ ).证实湿地能有效抑制滇池水体中微囊藻毒素的形成,对作为昆明市水源之一的滇池水质可起到有效的净化作用,同时也可对滇池水生生物及周边动物和人类健康起到保护作用.

#### [参考文献]

- [1] 赵以军,王旭,谢青,等.滇池蓝藻“水华”微囊藻毒素的分离和鉴定[J].华中师范大学学报:自然科学版,1999,33(2):250-254.
- [2] 潘晓洁,常锋毅,沈银武,等.滇池水体中微囊藻毒素含量变化与环境因子相关性研究[J].湖泊科学,2006,18(6):572-578.
- [3] SICINSKA P, BUKOWSKA B, MICHA L J, et al. Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with Microcystin-LR *in vitro*[J]. Toxicol, 2006, 27(4):387-397.
- [4] 邓义敏.滇池水体中微囊藻毒素的研究[J].云南环境科学, 2000, 19(8):117-119.
- [5] HEINZE R. Toxicity of the cyanobacterial toxin microcystin-LR to rats after 28 days intake with the drinking water[J]. Environ Toxicol, 1999, 14:57-60.
- [6] FAWELL J K, HART J, JAMES H A, et al. Blue-green algae and their toxins-analysis, toxicity, treatment and environmental control[J]. Wat Supply, 1993, 11(3):109-121.
- [7] 丁笑生,段红英.微囊藻毒素及其生殖毒性的研究进展[J].水产科学, 2007, 26(1):61-62.
- [8] 李燕,沈洁,韩晓冬.微囊藻毒素对雄性大鼠生殖系统的影响[J].实用老年科学, 2008, 22(1):30-32.
- [9] 沈放,路斌,全向荣,等.经湿地净化后滇池水体中微囊藻毒素的毒性变化[J].昆明学院学报, 2011, 33(3):92-94.
- [10] 沈放,路斌,全向荣,等.微囊藻经滇池湿地处理前后在水体中的生长状况研究[J].昆明学院学报, 2011, 33(6):77-80.
- [11] 沈放,杨黎江,彭永芳,等.重楼皂苷类化合物体外抗生育功效研究[J].中国现代应用药学, 2010, 27(11):961-964.
- [12] FALCONER I R. Toxic cyanobacterial bloom problems in Australian waters: Risks and impacts on human health[J]. Phycologia, 2001, 40:228-233.
- [13] 陈艳,俞顺章,杨坚波,等.太湖地区城市饮用水微囊藻毒素与恶性肿瘤死亡率的关系[J].中国肿瘤杂志, 2002, 12(6):485-488.
- [14] 周松涛,李翠云,郑光耀,等.微囊藻毒素降解方法的研究进展[J].现代生物医学进展, 2009, 9(19):3764-3767.