

多氯联苯对鸡胚卵巢发育和配子分化的影响

方昌阁 张才乔 夏国良 乔惠理

(中国农业大学生物学院)

陈耀星

(中国农业大学动物医学院)

摘要 禽类的肉和蛋产品含有大量的脂肪,可蓄积高浓度的多氯联苯(PCB)和其他环境污染物从而影响动物和人类健康。试验选用鸡作为实验动物研究了PCB对胚胎期卵巢发育和生殖细胞分化的影响,在入孵前将Aroclor 1254注入海兰种蛋的卵黄内,剂量分别为0, 1, 10和100 μg /枚。取出新出壳雏鸡的卵巢进行组织学研究。结果表明:PCB处理后,鸡胚的孵化率与对照组相比明显下降,而且死胚都发生了不同程度的水肿;雌性雏鸡左侧卵巢横截面积、皮质厚度和皮质内的卵母细胞数均比对照组明显增加;只有个别的卵母细胞发生了核固缩和胞质空泡化。本研究表明PCB干扰鸡胚卵巢的发育,首次揭示了PCB促进卵原细胞分化的作用。

关键词 鸡; 多氯联苯; 卵巢; 胚胎发育

中图分类号 Q 492.5

Effects of Polychlorinated Biphenyls on Ovarian Development and Gamete Differentiation in Embryonic Chickens

Fang Changge Zhang Caiqiao Xia Guoliang Qiao Huili

(College of Biological Science, CAU)

Chen Yaoxing

(College of Veterinary Medicine, CAU)

Abstract The disrupting effects of polychlorinated biphenyls (PCB) on ovarian development and gamete differentiation in chicken embryos were studied. PCB (Aroclor 1254) was injected into the yolk of fertilized Hyline eggs, with doses of 0, 1, 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{egg}$, respectively. Ovaries of the newly hatched chickens were removed for the examination of histological structures. The results showed that hatching rates decreased sharply after PCB treatment. Different extent of edema occurred in the dead chickens after PCB administration. In the PCB-treated groups, the ovaries of left side had larger transverse areas, thicker cortex and more oocytes compared with the control group. Vacuolated and pyknosis was observed in only a few oocytes of the treated groups. This study proved that PCBs disturbed chicken ovarian development and promoted oocyte differentiation.

Key words chicken; polychlorinated biphenyls; ovary; embryonic development

由于环境污染物日益增多其影响也日趋严重,各国的研究者对此都非常关注。环境中持久存在的污染物如多氯联苯(polychlorinated biphenyl, PCB)、二恶英(dioxin)、二氯二苯三氯乙烷(DDT)等化合物给动物和人带来极大的危害。1999年2月比利时等4国发生的二恶英污染鸡事件在世界上引起极大的震动^[1]。这些环境中持久存在的污染物在动物和人体内蓄积并与激素受体结合起激素样作用,引起内分泌紊乱,使生殖机能失常,被称为环境激素。环境激素对

收稿日期: 2001-01-03

北京市自然科学基金(6992019)和国家自然科学基金(39970535)资助项目

张才乔,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

动物和人的危害是多方面的,有证据表明人类流产率上升、儿童智力下降、子宫癌和乳腺癌等生殖系统肿瘤的增加以及动物的生殖机能损害都与环境污染物有关。二恶英是世界上目前已知的最毒的物质,早在1987年世界卫生组织国际癌症研究中心就认定二恶英是一级致癌物^[2]。PCB是一类亲脂性、持久性的二恶英类环境污染物,可以通过生物放大作用在人和动物体内蓄积并产生类二恶英效应,引起内分泌激素如类固醇激素^[3]和甲状腺激素^[4]的代谢紊乱,影响生殖系统如发生性反转、生殖器官异常、卵巢囊肿、子宫肌瘤等^[5-7],导致免疫缺陷等,从而使神经-内分泌-免疫网络被破坏。PCB在环境中的大量累积所造成的危害是不可估量的,给野生动物造成的生殖损害对动物种群的延续有灾难性后果^[2]。目前,关于PCB对动物胚胎性腺影响的研究刚刚开始。由于PCB是胎盘透过物质^[8],母体摄入的PCB可透过胎盘传递给胎儿,因此本研究采用鸡作为实验动物来避免母体因素的影响,目的是从实验室提供直接的证据以证实PCB具有影响动物性腺发育和配子分化的作用。

1 材料和方法

1.1 药物

本实验中使用的PCB是Aroclor 1254,购自美国Accustandard试剂公司,将其溶于花生油中备用。

1.2 实验动物

鸡海兰种蛋购自中国农业大学动物科技学院实验牧场。种蛋从贮藏室取出后,在室温下平衡4~12 h。注射PCB前,首先用75%的酒精擦拭蛋壳,在靠近钝端1.5 cm处的蛋壳上开一小孔。然后,将不同浓度的PCB油制剂注入蛋黄内,用石蜡封口。注射的PCB剂量为1, 10, 100 μg /枚,这是依据我们反复的毒理实验和其他学者的研究确定的实验剂量^[4,9],注射体积为100 μL 。对照组注射等体积的纯花生油。注射后的种蛋放入孵化器内孵化,孵化条件为38 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度60%。孵化期间每隔1 d照蛋1次,将死胚拣出肉眼观察病理变化。出壳后1日龄宰杀。取出性腺,以4%中性多聚甲醛固定,按常规石蜡包埋并制作切片,苏木精-伊红染色。组织结构用数码相机摄影后,采用德国的Leica database软件测量卵巢横截面积、卵巢皮质的厚度及其内部的卵母细胞数。每个处理重复3次,所得数据使用单因子方差分析进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 死亡率和孵化率

注射PCB使种蛋的死亡率明显提高。在孵化第1周,1, 10和100 μg /枚组的死亡率分别为40%, 13%和13%,对照组仅为4%。在孵化的第2周,对照组和1 μg /枚组的死亡率分别提高到13%和47%,而10和100 μg /枚组死亡率无变化。在孵化第3周实验组死亡率又有增加,可以观察到有一些鸡胚虽然可以啄破蛋壳但无力出壳而最终死亡。21—22 d的孵化率对照组为87%,而实验组1, 10和100 μg /枚组分别为40%, 47%和53%(表1),两者差异极显著。

2.2 肉眼可见病理变化

注射PCB诱发了鸡胚的死亡和不同程度的水肿。水肿发生的部位包括颈部皮下、头部、心脏和腹腔。可以看到试验组的活鸡胚也有水肿发生。

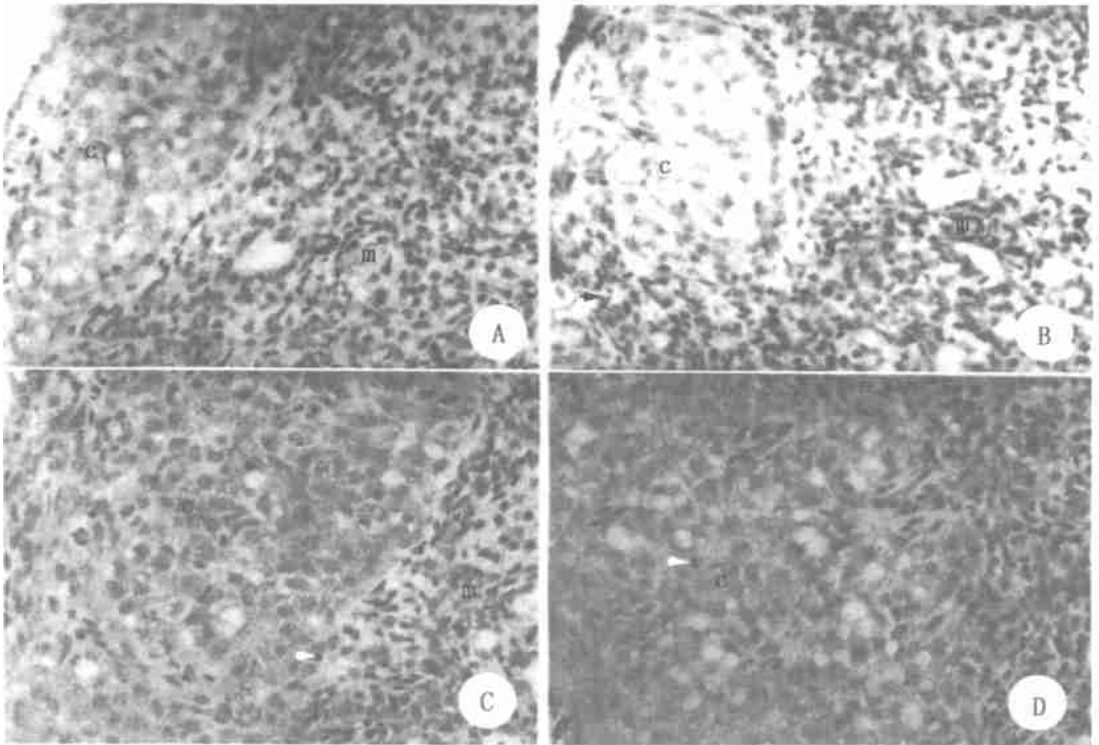
表 1 注射 PCB 对鸡胚死亡率和孵化率的影响

项 目	PCB 剂量 $\mu\text{g}/\text{枚}$			
	0	1	10	100
样本数	30	30	28	30
1—11 d 死亡率/%	4 ± 1.7	$40 \pm 7.5^{**}$	$13 \pm 2.6^*$	$13 \pm 3.6^*$
12—19 d 死亡率/%	13 ± 4.0	$47 \pm 5.2^{***}$	13 ± 2.6	13 ± 3.6
孵化率/%	87 ± 1.0	$40 \pm 2.4^{***}$	$47 \pm 2.1^{***}$	$53 \pm 2.6^{***}$

注: *, ** 和 *** 分别表示处理组的孵化率与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$, $P < 0.001$ 和 $P < 0.0001$)。

2.3 卵巢组织病理变化

从 1 日龄对照组雏鸡的卵巢横截面观察, 卵巢皮质发育较好, 组织中分布着紧密的皮质索, 外侧与生殖上皮相连, 内侧与髓质相连。皮质内包含了大量的卵母细胞(图 1)。注射 PCB 后, 试验组雏鸡的卵巢皮质都发生了不同程度的增厚, 但内部的生殖细胞密度没有变化(图 1)。即注射 PCB 使得雏鸡卵巢横截面积显著增大(1, 10 和 100 $\mu\text{g}/\text{枚}$, $P < 0.001$), 卵巢皮质厚度明显增加(1, 10 和 100) $\mu\text{g}/\text{枚}$, $P < 0.001$), 卵巢皮质内的卵母细胞数也显著增加(1, 10 和 100 $\mu\text{g}/\text{枚}$, $P < 0.001$, 图 2)。注射 PCB 对卵巢的毒性作用表现为卵母细胞发生胞质空泡化和核固缩(图 1)。

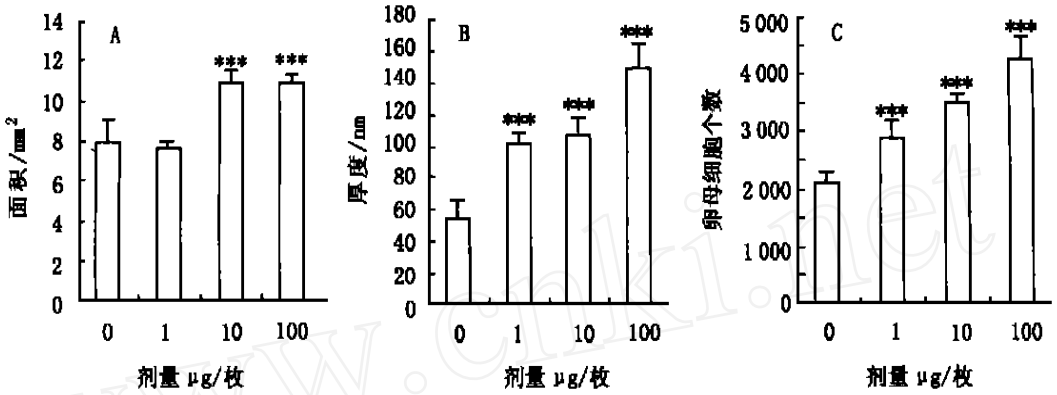


A, B, C, D 分别代表对照和 PCB 处理剂量 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{枚}$ 。

图示雏鸡的卵巢横截面结构。

白箭头表示发生核固缩的卵母细胞; c 表示卵巢皮质, m 表示卵巢髓质。

图 1 注射 PCB 对雏鸡卵巢的影响



*** ($P < 0.001$) 表示该数值与对照组数值相比差异显著

图2 PCB对雏鸡卵巢横截面积、卵巢皮质和卵母细胞数的影响

3 讨论

众所周知, PCB 和二恶英等环境污染物对鸡的毒性作用很多^[1]。蛋鸡感染的早期, 产蛋量明显下降。几周后, 伴随着体重的下降和大批的死亡, 其种蛋的蛋壳变薄和孵化率明显降低。同时母鸡并发有多种症状: 消瘦综合症、颈部的皮下水肿、共济失调和紫质症等, 剖检可见心肌、胸腺的严重萎缩^[1, 9, 10]。暴露 PCB 和二恶英后, 鸡患有的这种综合症被称为“鸡水肿症”, 曾在 20 世纪 50 年代、70 年代的美国及比利时等 4 国 1999 年 2 月爆发的 PCB 和二恶英污染鸡场事件中报道过^[1]。本试验从实验室直接证明了 PCB 的致水肿和死亡以及降低孵化率的作用, 该结果与其他学者的观察结果类似^[1, 4, 9, 10]。在本试验中, 有趣的是实验组鸡胚死亡率不是依照 PCB 剂量的增加而升高的, 相反却随剂量的增加而降低, 这与其他研究类同^[9], 其原因目前还不清楚。但 PCB 处理后的孵化率明显下降, 而且雏鸡和胚胎发生皮下水肿的比率随注射 PCB 浓度的升高而增加, 该结果与 Hoffman 和 Brunstrom 等人的试验结果类似^[9, 10]。对实验组鸡卵巢的组织学观察发现, 高剂量 PCB 处理雏鸡卵巢的受影响程度比低剂量组的大。

PCB 对雌性雏鸡卵巢的影响结果直接证实了 PCB 的类雌激素作用: 促进雌性雏鸡卵巢皮质的发育和其内部卵母细胞的分化。通常条件下, 雌性禽类只有左侧的性腺发育成卵巢而右侧的退化。PCB 处理鸡胚后, 雏鸡的卵巢横截面积显著增大, 并且卵巢皮质厚度和皮质内分布的卵母细胞也随 Aroclor 1254 注射剂量的增加而显著增加, 但这些卵母细胞是否具有正常的功能还不得而知。已有研究证明 PCB 具有类雌激素作用^[11-13], 因此本试验中卵巢参数的改变表明 PCB 对卵巢发育产生的影响可能是通过雌二醇受体介导的。PCB 的毒性作用表现为个别卵母细胞的核固缩和胞质空泡化。有关 PCB 和 DDT 对鸡和野生鸟类的产蛋量、孵化率以及甲状腺素的分泌量产生的负影响已被一些研究证实^[2]。本研究结果进一步从实验室有力地证实了 PCB 的生殖毒性和可能造成鸟类的不育, 但对于 PCB 影响雏鸡卵巢发育和卵母细胞分化的机理有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Bernard A, Hemmans C, Broeckaer F, et al. Food contamination by PCBs and dioxins. *Nature*, 1999, 401: 231, 232
- 2 出云渝明, 著[日]. 胡经之主编. 威胁人类存亡的定时炸弹——环境荷尔蒙. 深圳: 海天出版社, 1999
- 3 Kendall R J, Dickerson R L. Principles and processes for evaluating endocrine disruption in wildlife. *Environ Toxicol Chem*, 1996, 15: 1253, 1254
- 4 Gould J C, Cooper K R, Scanes C G. Effects of polychlorinated biphenyls on thyroid hormones and liver type I monodeiodinase in the chick embryo. *Ecotoxicol Environ Safety*, 1999, 43: 195~ 203
- 5 Willingham E, Crews D. Sex reverse effects of environmental relevant xenobiotic concentrations on the red-eared turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *Gen Comp Endocrinol*, 1999, 113: 429~ 435
- 6 Fry D M, Toone C K. DDT-induced feminization of gull embryos. *Science*, 1981, 213: 922~ 924
- 7 Munson L, Calzada N, Kennedy S, et al. Luteinized ovarian cysts in Mediterranean striped dolphins. *J Wildl Dis*, 1998, 34: 656~ 660
- 8 Krauthacker B, Reiner E, Votava-Raic A, et al. Organochlorine pesticides and PCBs in human milk collected from mothers nursing hospitalized children. *Chemosphere*, 1998, 37: 27~ 32
- 9 Brunstrom B. Sensitivity of embryos from duck, goose, herring gull, and various chicken breeds to 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyls. *Poultry Science*, 1988, 67: 52~ 57
- 10 Hoffman D J, Melancon M J, Klein P N, et al. Comparative developmental toxicity of planar polychlorinated biphenyl congeners in chickens, American kestrels, and common terns. *Environ Toxicol Chem*, 1998, 17(4): 747~ 757
- 11 Andersson P L, Blom A, Johannisson A, et al. Assessment of PCBs and hydroxylated PCBs as potential xenoestrogens: *In vitro* studies based on MCF-7 cell proliferation and induction of vitellogenin in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1999, 37: 145~ 150
- 12 Ahlborg U G, Lipworth L, Titus-Ernstoff L, et al. Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: an assessment of the biological and epidemiological evidence. *Crit Rev Toxicol*, 1995, 25 (6): 463~ 531
- 13 方昌阁, 张才乔, 乔惠理, 等. 多氯联苯对鸡胚性腺发育的影响. *科学通报*, 2001, 46(13): 1094~ 1097