

# Effects of Acephate on Oxidative Damage and Ovarian Function in Female Rats

## 乙酰甲胺磷对雌性大鼠氧化损伤及卵巢功能的影响

LIU Xiu-fang, NING Yan-hua, GUO Feng-ying,  
GUAN Su-zhen, XUE Ya-bin, LIU Gui-zhu

(Department of Environmental hygiene and Toxicology, Ningxia Medical College, Yinchuan 750004, China)

刘秀芳/宁艳花/郭凤英/

关素珍/薛亚斌/刘桂珠

(宁夏医学院公共卫生学院环境卫生学与毒理学教研室, 银川 750004)

**【摘要】**背景与目的: 研究乙酰甲胺磷对雌性大鼠氧化损伤及卵巢功能的影响。材料与方法: 30只健康成年SD雌性大鼠, 随机分为5组, 每组6只。实验组设高(47.25 mg/kg)、中(23.63 mg/kg)、低(11.81 mg/kg)3个不同剂量乙酰甲胺磷染毒组、阴性对照组(蒸馏水)和阳性对照组(雌二醇 0.1 mg/kg)。染毒组和阴性对照组采用经口灌胃, 阳性对照组采用腹腔注射染毒。检测大鼠动情周期、血清和卵巢组织中SOD和GST活性、GSH和MDA含量及卵巢组织形态等的改变。结果: 与阴性对照组比较, 乙酰甲胺磷高剂量染毒组大鼠动情周期延长, 血清SOD活力升高, GSH含量降低, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。中、高剂量染毒组大鼠血清MDA含量均高于阴性对照组, 高剂量染毒组GST活力显著低于阴性对照组, 差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。各染毒组卵巢组织匀浆中SOD活力均低于阴性对照组, 各染毒组GST活力均高于阴性对照组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。低剂量染毒组卵巢组织GSH含量低于阴性对照组, 高剂量染毒组MDA含量显著高于阴性对照组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。高剂量染毒组大鼠卵巢组织的病理改变主要表现为始基卵泡和初级卵泡增多, 而次级卵泡和成熟卵泡较少见, 且闭锁卵泡增多。结论: 乙酰甲胺磷对雌性大鼠具有一定的生殖毒性, 在高剂量(47.25 mg/kg)染毒下, 可引起动情周期的紊乱、卵巢组织的病理学改变, 抑制卵巢的抗氧化酶活性, 诱导脂质过氧化。

**【关键词】**乙酰甲胺磷; 雌性大鼠; 卵巢; 生殖毒性

中图分类号: R994.6 R318.16

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2008)06-0463-04

**【ABSTRACT】** BACKGROUND AND AIM: To study the effects of acephate on oxidative damage and ovarian function in female rats. MATERIALS AND METHODS: Female Sprague-Dawley rats received oral acephate at 0, 11.81, 23.63, 47.25 mg/kg once daily for 30 days. The positive control group was treated with estradiol (0.1mg/kg) by peritoneal injection. The estrous cycle, SOD, MDA, GSH, GST and the histomorphology changes of ovaries were evaluated. RESULTS: In high dosage group the estrous cycle was significantly prolonged compared to negative control group ( $P < 0.05$ ). In the serum, SOD activities of acephate-treated rats were significantly increased compared with that of negative group, but the contents of GSH and GST activities were reduced ( $P < 0.05$ ). The levels of MDA in serum were significantly increased in middle and high dosage groups compared to negative group ( $P < 0.05$ ). In the ovaries, SOD activities of acephate-treated rats were significantly reduced, but GST activities significantly increased compared with those of negative group ( $P < 0.05$ ). In addition, the content of MDA in high dosage group was significantly higher than that of negative group, and the level of GSH in low dosage group was lower than that of negative group ( $P < 0.05$ ). Pathology slices showed increased counts of primordial follicles and primary follicles, while the counts of secondary follicle and mature follicle was decreased in high dosage group. In addition, there were more atretic follicles. CONCLUSION: Acephate had obvious reproductive toxicity on female rats. At the dosage of 47.25mg/kg, it could induce estrous cycle disorders,

收稿日期: 2008-03-27; 修订日期: 2008-05-07

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目(Z0662)

作者简介: 刘秀芳(1953-)女,宁夏银川市人,教授,研究方向:环境与健

康。E-mail: liuxf@nxmc.edu.cn

some pathologic changes in the ovaries, and inhibit the activities of antioxidase and resulting in lipid peroxidation.

【KEY WORDS】acephate female rat ovaries

乙酰甲胺磷 (acephate), 化学名称 *O*, *S*-二甲苯-*N*-乙酰基硫代磷酸酯, 是高毒农药甲胺磷的乙酰基衍生物, 以高效、低毒、低残留而优于众多有机磷杀虫剂, 是我国替代甲胺磷在生产和生活中大力推广应用的农药品种之一<sup>[1]</sup>。国内外关于乙酰甲胺磷的雌性生殖毒性作用研究报道很少。本文旨在探讨不同剂量乙酰甲胺磷暴露对雌性大鼠氧化损伤及对卵巢功能的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

选用健康成年 SD 雌性大鼠 (清洁级, 由宁夏医学院实验动物中心提供) 30 只, 体重 180~220 g。动物合格证号 SCXK(宁)2005~0001。

### 1.2 受试物

市售农药乙酰甲胺磷, 浓度 30%, 湖北沙隆达股份有限公司生产。

### 1.3 实验动物分组与染毒

30 只健康成年 SD 雌性大鼠, 随机分为 5 组, 每组 6 只。实验组按生殖毒性研究染毒剂量设计的原则, 以乙酰甲胺磷致大鼠半数致死量 ( $LD_{50} = 945 \text{ mg/kg}$ ) 为依据, 设高 (47.25 mg/kg)、中 (23.63 mg/kg)、低 (11.81 mg/kg) 3 个乙酰甲胺磷剂量染毒组、阴性对照组和阳性对照组。染毒组用蒸馏水配制的乙酰甲胺磷灌胃, 阴性对照组用等量的蒸馏水灌胃。染毒组每天染毒 1 次, 连续染毒 30 d; 阳性对照组大鼠给予雌二醇 (0.1 mg/kg), 采用腹腔注射染毒方式, 每 7 d 染毒 1 次, 连续染毒 4 次。实验期间, 大鼠自由饮水, 进食。于末次染毒 24 h 后心脏采血处死大鼠取出双侧卵巢组织进行检测。

### 1.4 观察指标及测定方法

**1.4.1 大鼠动情周期的检测** 采用阴道脱落细胞涂片法<sup>[2]</sup>。动情周期的判定依据: 根据阴道涂片的细胞学变化来判断大鼠所处的动情周期。动情前期 (卵泡加速生长): 全部是有核上皮细胞, 偶有少量角化细胞; 动情期 (卵泡成熟、排卵): 全部是无核角化细胞或间有少量上皮细胞; 动情后期 (黄体生成): 白细胞、角化细胞、有核上皮细胞均有; 动情间期 (黄体退化): 大量白细胞及少量上皮细胞和粘液。

**1.4.2 卵巢脏器系数的测定** 处死大鼠后, 立即取出双侧卵巢, 剥离周围脂肪组织和结缔组织, 准确称量卵巢的重量, 计算卵巢脏器系数。

### 1.4.3 超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽 S 转移

酶 (GST) 的活力及还原型谷胱甘肽 (GSH) 和丙二醛 (MDA) 含量的测定 采用分光光度法检测血清和卵巢组织匀浆中 SOD 和 GST 的活力, GSH 和 MDA 的含量。

**1.4.4 卵巢组织形态病理改变的检测** 取大鼠一侧卵巢组织, 经 10% 中性甲醛固定。固定好的标本常规用梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片厚 5~8  $\mu\text{m}$ , HE 染色。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件包处理, 计量资料的组间比较采用方差分析, 剂量反应关系采用秩相关检验。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

染毒初期, 高剂量染毒组大鼠出现震颤、二便失禁等轻微的中毒症状, 在染毒后 2 h 内逐渐消失。

### 2.2 乙酰甲胺磷对雌性大鼠体重增长、卵巢脏器系数及动情周期的影响

见表 1。乙酰甲胺磷各染毒组大鼠体重增长与阴性对照组相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。卵巢脏器系数乙酰甲胺磷各染毒组与阴性对照组相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。乙酰甲胺磷各染毒组雌性大鼠的动情周期明显延长, 主要是动情间期的延长, 高剂量染毒组与阴性对照相比, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 并且随着染毒剂量的升高, 大鼠的动情周期逐渐延长 ( $r = 0.542, P < 0.01$ )。

表1 乙酰甲胺磷对雌性大鼠体重增长、卵巢脏器系数和动情周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effects of acephate on body weight gains, ovaries index and estrous cycle of female rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Groups	Weight gains (g)	Ovaries index	Estrous cycle(d)
Negative control	50.80 ± 7.50	0.05612 ± 0.0025	4.33 ± 0.52
Low dosage group	54.30 ± 8.90	0.06067 ± 0.0036	4.50 ± 0.55
Middle dosage group	49.20 ± 9.60	0.05764 ± 0.0069	5.00 ± 1.09
High dosage group	49.15 ± 7.34	0.04830 ± 0.0072	6.71 ± 1.80*
Positive control	51.38 ± 6.92	0.05149 ± 0.0089	6.83 ± 1.83*

ANOVA compared with negative control, \* $P < 0.05$

### 2.3 乙酰甲胺磷对雌性大鼠抗氧化酶活性和脂质过氧化水平的影响

#### 2.3.1 乙酰甲胺磷对 SOD 活力和 MDA 的影响

见表 2。血清 SOD 活力各染毒组均高于阴性对照组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。卵巢组织匀浆中 SOD 活力各染毒组均低于阴性对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且随着染毒剂量的增加, 卵巢组织匀浆中 SOD 活力降

低( $r = -0.794, P < 0.01$ )。中、高剂量染毒组血清 MDA 含量均高于阴性对照组, 差异具有统计学意义

( $P < 0.05$ )。卵巢组织匀浆中高剂量染毒组 MDA 含量高于阴性对照组, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 2 血清和卵巢组织匀浆中SOD活力和MDA含量的比较( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Comparison of the levels of SOD and MDA in serum and ovaries ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Groups	SOD		MDA	
	Serum(U/ml)	Ovaries (U/mg prot)	Serum(nmol/ml)	Ovaries (nmol/mgprot)
Negative control	374.58 ± 19.74	127.86 ± 18.48	4.14 ± 0.88	0.5980 ± 0.0859
Low dosage group	429.71 ± 24.71*	64.90 ± 23.83**	3.87 ± 0.54	0.5155 ± 0.1007
Middle dosage group	443.41 ± 28.56*	57.14 ± 21.41**	6.23 ± 1.32*	0.5126 ± 0.1663
High dosage group	422.94 ± 19.24*	41.95 ± 8.72**	6.61 ± 1.31*	0.9954 ± 0.1288*
Positive control	411.64 ± 28.99	69.36 ± 20.71**	3.20 ± 1.17*	0.8693 ± 0.3222

ANOVA compared with negative control, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$

**2.3.2 乙酰甲胺磷对 GSH 含量和 GST 活性的影响** 见表 3。血清 GSH 含量各染毒组均低于阴性对照组( $P < 0.01$ ), 且随着染毒剂量的增加, GSH 含量降低( $r = -0.801, P < 0.01$ )。低剂量染毒组卵巢组织匀浆中 GSH 含量低于阴性对照组, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而中、高剂量染毒组与阴性对照组相比, 差

异无统计学意义( $P > 0.05$ )。各染毒组血清 GST 活性均低于阴性对照组, 高剂量染毒组与阴性对照组相比, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且随着染毒剂量的增加, GST 活性降低( $r = -0.594, P < 0.01$ )。各染毒组卵巢 GST 活性均高于阴性对照组, ( $P$  均  $< 0.01$ ), 且随着染毒剂量的增加, GST 活性增高( $r = 0.631, P < 0.01$ )。

表 3 血清和卵巢组织匀浆中GSH含量和GST活性的测定结果( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Comparison of the levels of GSH and GST in serum and ovaries ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Groups	GSH		GST	
	Serum(mg/L)	Ovaries (mg/g prot)	Serum(mg/L)	Ovaries (mg/g prot)
Negative control	368.97 ± 21.29	45.16 ± 4.72	39.31 ± 12.16	12.77 ± 2.12
Low dosage group	306.32 ± 40.10**	32.19 ± 4.61*	38.81 ± 9.96	31.72 ± 7.40**
Middle dosage group	302.91 ± 35.40**	37.78 ± 6.27	35.03 ± 10.53	32.20 ± 3.80**
High dosage group	242.19 ± 26.86**	41.30 ± 3.17	16.76 ± 9.64*	36.54 ± 3.63**
Positive control	252.42 ± 29.34**	31.35 ± 6.77*	17.83 ± 7.48*	30.54 ± 2.69**

ANOVA compared with negative control, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$

**2.4 乙酰甲胺磷对大鼠卵巢组织形态的影响**

见图 1~5。光学显微镜下观察, 各组卵巢外表光

滑, 附有致密的结缔组织被膜, 可分清被膜、皮质和髓质 3 部分。阴性对照组大鼠卵巢组织未见异常, 上皮可

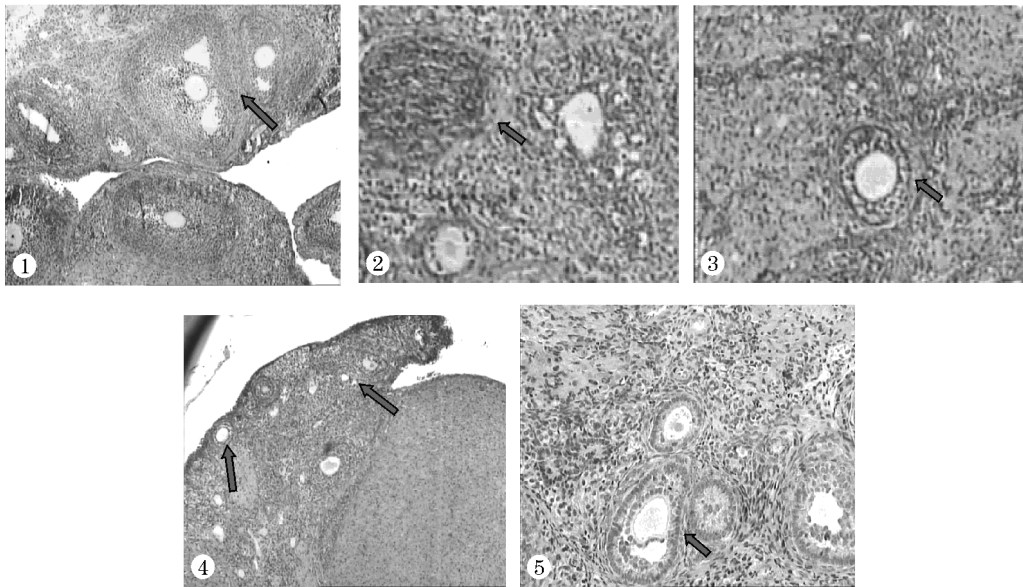


图 1 阴性对照组大鼠卵巢组织可见各级卵泡, 次级卵泡和成熟卵泡较多(HE × 40) 图 2、3 低、中剂量染毒组大鼠卵巢可见各级卵泡及黄体(HE × 200) 图 4 高剂量染毒组大鼠卵巢组织可见许多初级卵泡, 次级卵泡和成熟卵泡少见(HE × 40) 图 5 高剂量染毒组大鼠卵巢可见闭锁卵泡数量增多(HE × 100)

Figure 1 Many secondary follicles and mature follicles were showed in the rat ovaries of negative group(HE × 40) Figure 2-3 Many follicles and corpus lutea were showed in the rat ovaries of low and middle dosage groups(HE × 200) Figure 4 Many primary follicles, less secondary follicle and mature follicle were showed in the rat ovaries of low and middle dosage groups(HE × 40) Figure 5 Many atretic follicles were showed in the rat ovaries of high dosage groups(HE × 100)



见不同发育阶段的卵泡(图 1)。乙酰甲胺磷低、中剂量染毒组大鼠卵巢可见各级卵泡及黄体(图 2、3),高剂量染毒组大鼠卵巢可见大量的始基卵泡和初级卵泡,次级卵泡和成熟卵泡较少见,且闭锁卵泡增多(图 4、5)。

### 3 讨论

卵巢的主要功能表现为周期性的排卵及其分泌相应性激素,同时伴随有阴道上皮细胞学的周期性变化。环境中有害因素影响卵巢机能时,可导致动情周期出现变化<sup>[3]</sup>。本研究结果表明,乙酰甲胺磷染毒组可引起雌性大鼠动情周期延长,以动情间期延长为主,其中高剂量染毒组与阴性对照组相比,差异具有统计学意义,说明乙酰甲胺磷具有明显的雌性性腺生殖毒性。

大量研究表明许多病理生理现象均与自由基引起的脂质过氧化密切相关。氧化应激可以损伤颗粒细胞 DNA 而引起细胞凋亡,从而导致黄体退化和卵泡闭锁<sup>[4]</sup>。动物实验证实,抗氧化酶活性的下降以及氧自由基含量的增多可以导致黄体细胞和卵泡颗粒细胞的凋亡,从而导致黄体退化和卵巢闭锁<sup>[5]</sup>。

SOD 是机体自由基酶防御系统中的重要酶, SOD 具有清除超氧自由基,间接抑制脂质过氧化和膜损害的作用。故常用 SOD 的活性来间接反映氧自由基的水平,以及细胞抗脂质过氧化和清除氧自由基的能力。MDA 是脂质过氧化的一种最终产物,其含量的多少可反映组织中脂质过氧化的速率和强度,间接反映了自由基的水平 and 细胞氧化损伤的程度<sup>[6]</sup>。本实验结果显示,乙酰甲胺磷染毒组血清 SOD 活力高于阴性对照组 ( $P < 0.05$ ),而卵巢 SOD 活力低于阴性对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); MDA 含量在血清和卵巢中均呈现升高的趋势 ( $P < 0.05$ )。提示卵巢脂质过氧化增强,从而使机体产生大量的氧自由基;而血清中 SOD 活力先升高后降低,可能由于过氧化产物的堆积,刺激机体调节,在诱导了脂质过氧化反应的同时也启动了抗氧化系统。

GSH 能与活性氧族(ROS)反应,保护细胞免受氧化应激,也可以抵抗诱导氧化应激的化学物质引起的细胞毒作用。GSH 的耗竭必然会破坏机体的氧化平衡状态,导致氧化应激<sup>[7]</sup>。谷胱甘肽硫转移酶(GST)具有消除体内过氧化物及解毒双重功能,在谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力低下的条件下,只有清除体内脂质过氧化物(LPO)的功能<sup>[8]</sup>。本研究结果发现,乙酰甲胺磷各染毒组血清 GST 活性和 GSH 含量较阴性对照组均明显降低

( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),提示体内自由基的产生增加, GSH 消耗量随之增加,因此从总体上来说,机体抗氧化能力已有所下降。乙酰甲胺磷各染毒组卵巢中 GSH 含量较阴性对照组明显降低 ( $P < 0.05$ ),而 GST 活性升高 ( $P < 0.01$ ),可能是卵巢发生了代偿性反应。但是 GST 以 GSH 为底物发挥抗氧化作用,而 GSH 含量显著降低,因此卵巢总的抗氧化能力仍然下降。

化学物质的卵巢毒性大体上可包括引起性腺的组织病理学改变,影响卵泡的发育、生长、成熟;使卵母细胞突变,造成遗传学损伤;干扰卵巢产生类固醇激素。本研究观察到,乙酰甲胺磷低、中剂量染毒组大鼠卵巢可见各级卵泡及黄体。高剂量染毒组大鼠卵巢可见大量的始基卵泡和初级卵泡,次级卵泡和成熟卵泡较少见,且闭锁卵泡增多。

综上所述,乙酰甲胺磷对雌性大鼠具有一定的生殖毒性作用,可引起动情周期的紊乱和卵巢组织的病理改变。乙酰甲胺磷可抑制抗氧化酶的活性,导致脂质过氧化和产生大量的氧自由基,损伤颗粒细胞 DNA 而引起黄体细胞和卵泡颗粒细胞的凋亡,黄体退化和卵巢闭锁,从而影响卵巢的功能,导致大鼠动情周期紊乱。

### 参考文献:

- [1] 俞苏霞, 蒋世熙, 孙 华. 空气中乙酰甲胺磷的采集与分析方法的研究[J]. 卫生研究, 2000, 29(4): 205 - 206.
- [2] Rao RP, Kaliwal BB. Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice[J]. Ind Health, 2002, 40(3): 237 - 244.
- [3] 保毓书. 妇女劳动卫生[M]. 北京:中国劳动出版社, 1995, 222.
- [4] Murdoch WJ. Inhibition by oestradiol of oxidative stress-induced apoptosis in pig ovarian tissues[J]. J Reprod Fertil, 1998, 114(1): 127 - 130.
- [5] Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, et al. Oxidative stress and the ovary [J]. J Soc Gynecol Investig, 2001, 8(Suppl 1): S40 - 42.
- [6] 赵克然. 氧自由基与临床[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2000: 44 - 51.
- [7] Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation[J]. Chem Biol Interact, 1998, 24(111/112): 1 - 14.
- [8] Zaidi SM, Banu N. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain[J]. Clin Chim Acta, 2004, 340(1/2): 229 - 233.