

汪美贞, 贾秀英. 2012. 低剂量长期铅暴露对雄性黑斑蛙精巢组织关键酶活性的影响[J]. 环境科学学报, 32(3): 751-756

Wang M Z, Jia X Y. 2012. Effects of low-dose and long-term lead (Pb) exposure on testicular enzymes in male *Rana nigromaculata* [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 32(3): 751-756

# 低剂量长期铅暴露对雄性黑斑蛙精巢组织关键酶活性的影响

汪美贞<sup>1</sup>, 贾秀英<sup>2,\*</sup>

1. 浙江工商大学环境科学与工程学院, 杭州 310035

2. 杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036

收稿日期: 2011-05-25

修回日期: 2011-06-11

录用日期: 2011-06-22

**摘要:** 在实验条件下, 将健康的性成熟雄性黑斑蛙暴露于 0.1、0.2、0.4、0.8 和 1.6 mg·L<sup>-1</sup> 的 Pb<sup>2+</sup> 溶液中 30 d, 以 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶、Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶、 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶( $\beta$ -DG)、乳酸脱氢酶(LDH)和酸性磷酸酶(ACP)活性为指标, 进行了长期铅暴露对雄性黑斑蛙生殖毒性的研究。结果表明: 随着铅染毒剂量的增加, Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶和 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性被诱导, Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性被抑制, 当 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶的抑制程度超过 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶和 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶的代偿机制时, 会抑制精子的发生, 进而导致雄性生殖毒性; 在 1.6 mg·L<sup>-1</sup> Pb<sup>2+</sup> 处理下, ACP 酶被显著抑制, 提示支持细胞受损, 精子总数受到影响; 在 0.4 mg·L<sup>-1</sup> Pb<sup>2+</sup> 处理下, LDH 酶被显著抑制, 提示生精细胞受损, 精子质量受到影响。

**关键词:** 铅; 精巢; 生殖毒性; 黑斑蛙

文章编号: 0253-2468(2012)03-751-06

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

## Effects of low-dose and long-term lead (Pb) exposure on testicular enzymes in male *Rana nigromaculata*

WANG Meizhen<sup>1</sup>, JIA Xiuying<sup>2,\*</sup>

1. College of Environmental Science and Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035

2. College of Life and Environmental Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036

Received 25 May 2011;

received in revised form 11 June 2011;

accepted 22 June 2011

**Abstract:** To evaluate the reproductive toxicity of low-dose and long-term lead (Pb) exposure in male *Rana nigromaculata*, healthy adult male frogs were exposed to 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 mg·L<sup>-1</sup> of lead solution for 30 d under experimental conditions. The activities of Ca<sup>2+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase,  $\beta$ -DG, LDH and ACP were tested. The results showed that the activities of Ca<sup>2+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase were induced with the increasing lead level, while Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase being inhibited. When the decrease of Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase exceeded the increase of Ca<sup>2+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, the quantity of sperm decreased and the male reproductive toxicity of the frog was induced by lead. In addition, the activities of ACP were inhibited under 1.6 mg·L<sup>-1</sup> Pb<sup>2+</sup>, implying decrease of the quantity of sperm because of damage of sertoli cell. Also, the activities of LDH were significantly inhibited under 0.4 mg·L<sup>-1</sup> Pb<sup>2+</sup>, implying decrease of the quality of sperm because of the damage of spermatogenic cells.

**Keywords:** lead; testes; reproductive toxicity; *Rana nigromaculata*

### 1 引言 (Introduction)

铅是环境中普遍存在的重金属元素之一, 并且广泛地应用于日常生活和工业生产中。在这些应用中, 只有 1/4 的铅被重新回收利用, 其余的铅则以各种形式排放到环境中。由于铅具有不可降解性, 所以

很容易造成环境污染, 在环境中以微量、痕量甚至超痕量的形式持续存在, 通过食物链对各营养级产生影响和危害, 甚至威胁着种群的生存和繁衍 (García-García *et al.*, 2006)。虽然铅污染早已引起人们的注意 (Hong *et al.*, 2008), 但低剂量铅 (简称“低铅”) 的长期污染尚未得到充分重视, 值得深入研究。

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (No. 302056, Y5110144, Y5110019)

Supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. 302056, Y5110144, Y5110019)

作者简介: 汪美贞 (1982—), 女, 博士, E-mail: wmezzy@163.com; \* 通讯作者 (责任作者), E-mail: XY\_Jia@163.com

Biography: WANG Meizhen (1982—), female, Ph. D., E-mail: wmezzy@163.com; \* Corresponding author, E-mail: XY\_Jia@163.com

两栖类动物是生态系统的重要组成部分。近年来,由于环境污染加剧,两栖类动物在全球范围内出现了严重的衰退,甚至一些种群发生了灭绝(Alford *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2010; Kiesecker *et al.*, 2001; Rovito *et al.*, 2009)。作为生态系统的重要组成部分,全球两栖类种群数量下降,将对其他生物有机体产生重要影响(Allentoft *et al.*, 2010; Becker *et al.*, 2008)。多数学者认为两栖动物由于皮肤具有高渗透性、水陆两栖等特点,使得污染物极易在其体内富集和放大,即两栖类特别是蛙类可作为环境毒理学实验理想的模式动物(Blaustein *et al.*, 2010; 施蔡雷等, 2010)。因此,无论是从两栖动物种群衰退的角度考虑,还是从蛙类是理想的毒理学模式动物的角度考虑,均有必要对低铅长期暴露对两栖动物的毒性进行研究。

综上,本文拟在前期对低铅长期暴露致黑斑蛙精子毒性和性激素水平干扰研究的基础上,进一步研究低剂量铅长期暴露对黑斑蛙精巢组织中  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶、 $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶、 $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶、 $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶( $\beta$ -DG)、乳酸脱氢酶(LDH)和酸性磷酸酶(ACP)等精巢标志酶活性的影响,以期明确低剂量铅长期暴露对黑斑蛙生殖损伤的影响,深入探讨两栖动物种群衰退的毒理学机制。

## 2 材料和方法 (Materials and methods)

### 2.1 实验试剂

$\text{Pb}^{2+}$  溶液采用  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  配制,分析纯(上海华东医药股份有限公司),用双蒸水配制成  $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  母液,实验时稀释成所需各浓度。

### 2.2 供试动物

健康成年雄性黑斑蛙(*Rana nigromaculata*)捕自杭州市郊,体长为  $(7.19 \pm 0.33) \text{ cm}$ ,体重为  $(36.29 \pm 6.60) \text{ g}$ 。在室内盛有 2~3 cm 深曝气自来水(曝气 3 d 以上)的玻璃水族缸(实验前用 10% 的  $\text{HNO}_3$  浸泡)中暂养 7 d 后,挑选健壮、规格整齐的黑斑蛙进行实验。

### 2.3 实验方法

2.3.1 实验处理 实验用黑斑蛙随机分成 6 组,每组 20 只。根据 96 h 急性毒性实验,参考铅的国家污水综合排放标准,将染毒组黑斑蛙分别暴露于 3 cm 深的  $\text{Pb}^{2+}$  溶液中,浓度依次为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (按  $\text{Pb}^{2+}$  计,用  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  配制),对照组黑斑蛙暴露于 3 cm 深的清洁水溶液中,设 3

个平行组。实验容器为  $60 \text{ cm} \times 40 \text{ cm} \times 35 \text{ cm}$  (长×宽×高)的玻璃水族箱,实验用水为曝气自来水,实验时水温 18~22  $^{\circ}\text{C}$ ,pH 值为 6.5~7.0,溶氧为 6~8  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。实验采用静态置换法,每天更换试验溶液,每天喂食 2 次,暴露实验持续 30 d。驯养期间及实验过程中黑斑蛙基本没有出现死亡情况。驯养结束黑斑蛙的体重变化不大,为  $(35.88 \pm 6.94) \text{ g}$ 。

2.3.2 样品处理 染毒结束后,用双毁髓法处死黑斑蛙,取出精巢,去除粘连物,清洗,滤纸吸干,称重。4  $^{\circ}\text{C}$  下按 1 g 精巢加 9 mL 预冷生理盐水的比例加入生理盐水,在冰盘上用玻璃匀浆器进行匀浆。于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、4000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  下离心 10 min,取上清液保存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中,备用。

### 2.4 酶活性测定

蛋白质含量的测定采用考马司亮兰比色法, $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶、 $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶和  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶采用无机磷法进行测定,酸性磷酸酶(Acid phosphatases, ACP)采用 4-氨基安替吡啉法测定,乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)采用 2,4-二硝基苯肼法测定, $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶( $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -DG)采用游离酚酞法测定。试剂盒均购自南京建成生物工程有限公司,详细操作参照文献(贾秀英等,2007)。各酶活单位以  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  (以 prot 计)表示。

### 2.5 数据处理

实验所得数据以平均值  $\pm$  标准误来表示,数据分析采用 SPSS 11.5 统计软件包中的方差分析(ANOVA)及 Pearson 相关分析。 $p < 0.05$  表示差异显著, $p < 0.01$  表示差异极显著。

## 3 结果 (Results)

### 3.1 铅对精巢 ATP 酶活性的影响

图 1 显示的是不同浓度铅对黑斑蛙精巢组织 ATP 酶活性的影响。由图 1a 和 1b 可知,随着铅染毒剂量的增加, $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶活性均呈先上升后下降的趋势,且在 0.2~0.8  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Pb}^{2+}$  处理下, $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶活性均极显著高于对照组( $p < 0.01$ );但在 1.6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Pb}^{2+}$  处理下, $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性回落至对照组水平( $p > 0.05$ )。由图 1c 可知,随着染毒剂量的增加, $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性呈直线下降趋势,且在 0.1~1.6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Pb}^{2+}$  处理下  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性极显著低于对照组( $p < 0.01$ )。此外,由图 1c 还

可知,铅染毒剂量与精巢  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性之间

具有显著的剂量-效应关系( $r = -0.901, p < 0.01$ ).

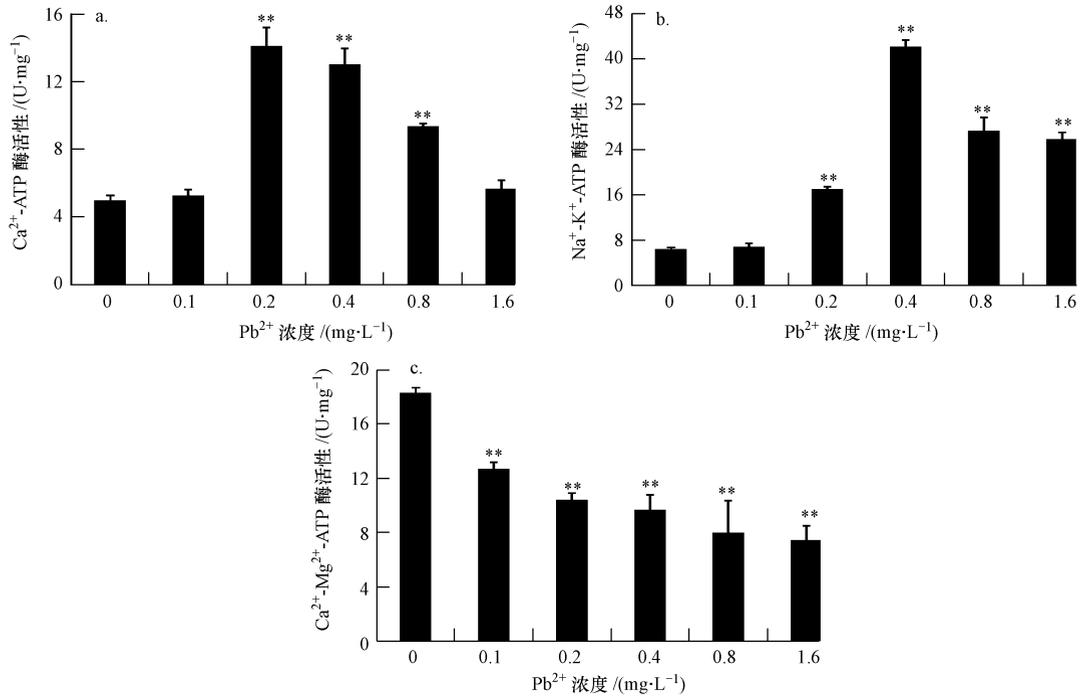


图 1 铅对黑斑蛙精巢 ATP 酶活性的影响(a.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶, b.  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶, c.  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶;  $n = 10$ ; 与对照组比较 \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , 下同)

Fig. 1 The effects of lead on ATPase activities in testes of male *Rana nigromaculata* (a.  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, b.  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATPase, c.  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase;  $n = 10$ ; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , compared to the control group, the same below)

### 3.2 铅对精巢标志酶活性的影响

图 2 为不同浓度铅对黑斑蛙精巢其他标志酶活

性的影响. 由图 2 可见,  $\beta$ -DG 酶活性在  $0.2 \sim 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  染毒组时,极显著低于对照组( $p < 0.01$ ),

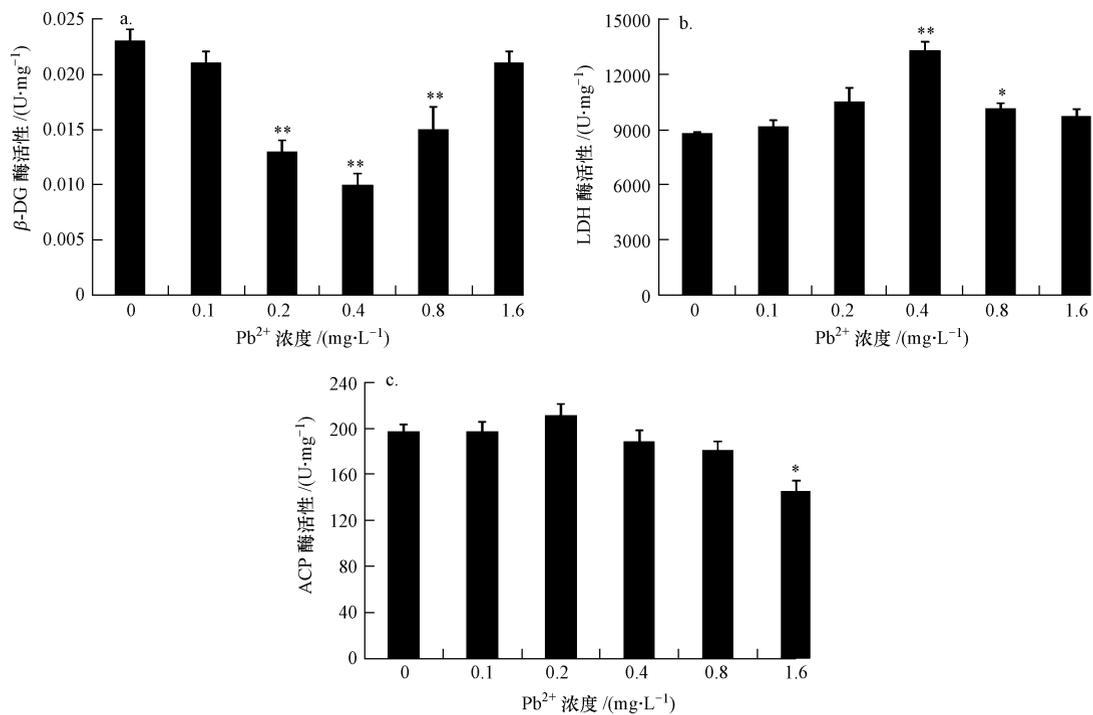


图 2 铅对黑斑蛙精巢中标记酶活性的影响(a.  $\beta$ -DG 酶, b. LDH 酶, c. ACP 酶)

Fig. 2 The effects of lead on marked enzymes in testes of male *Rana nigromaculata*(a.  $\beta$ -DG, b. LDH, c. ACP)

在  $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组回升至对照组水平 ( $p > 0.05$ )。LDH 酶活性在  $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组极显著高于对照组 ( $p < 0.01$ )；随着铅浓度的增加，LDH 酶活性开始回落，亦在  $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组回落至对照组水平 ( $p > 0.05$ )。ACP 酶活性只在  $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组显著低于对照组 ( $p < 0.05$ )，其余各染毒组与对照组比较差异不明显 ( $p > 0.05$ )。对比各标志酶活性的变化，引起  $\beta$ -DG 酶活性变化的铅浓度小于引起 LDH 酶活性变化的铅浓度，而后者小于引起 ACP 酶活性变化的铅浓度。

#### 4 讨论 (Discussion)

铅到达精巢组织后，必须跨越细胞膜进入细胞内，细胞膜是铅在精巢组织内产生毒性效应的第一道屏障。ATP 酶是细胞膜上一些微小的蛋白质孔道，它能让特定的离子通过，对维持渗透压、调节 pH、产生膜电位、细胞内外信号转导等具有重要意义。研究发现，在精巢组织中，ATP 酶还对精子发生、精子活力具有重要影响 (Acevedo *et al.*, 2006)。 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶可将胞浆内  $\text{Ca}^{2+}$  泵出细胞外或泵入内质网，是胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  流出的主要通道。 $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶能将细胞内的  $\text{Na}^{+}$  泵出细胞外，同时将细胞外的  $\text{K}^{+}$  泵入细胞内，维持细胞稳态。Yücebilgiç (2003) 报道人血液中的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶活性均可被铅所抑制；Satyavathi 等 (2000) 研究也发现，铅可抑制印度对虾后期幼体内  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶活性；MacDonald 等 (1986) 研究则表明，在低铅暴露中， $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性无显著变化。本研究结果发现，在铅染毒下精巢  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶活性均随着铅浓度的升高呈现先上升后下降的趋势，但  $\text{Pb}^{2+}$  大于  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  处理组中的酶活性均显著高于对照组，即铅对黑斑蛙精巢  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶活性具有诱导作用，可以将细胞内过量的  $\text{Ca}^{2+}$  泵出细胞，以维持细胞内的钙稳态。但本研究同时发现， $\text{Pb}^{2+}$  能抑制黑斑蛙精巢中  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性，这与 Abam 等 (2008) 和 Quintanar-Escorza 等 (2007) 研究结果基本一致。 $\text{Pb}^{2+}$  抑制  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性，使胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高， $\text{Mg}^{2+}$  浓度降低。据 Alavi 和 Cosson (2006) 报道， $\text{Ca}^{2+}$  过高可以拮抗  $\text{K}^{+}$  在精子发生中的积极作用；Masui 等 (2005) 则指出  $\text{Mg}^{2+}$  是生精过程中很多酶所必需的金属离子。说明  $\text{Pb}^{2+}$  主要通过抑制  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性，破坏细胞内外各离子平

衡，影响生精过程中其他酶活性。此外，贾秀英等 (2009) 报道当  $\text{Pb}^{2+}$  为  $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时，精子总数显著低于对照组；而当  $\text{Pb}^{2+}$  为  $0.1 \sim 0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时，精子总数与对照组无显著性差异。说明  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶对铅污染较为敏感， $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶具有一定抵抗铅污染的能力，当  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶的代偿作用弱于铅对  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶的抑制时，则抑制精子的发生，导致雄性生殖毒性。

精子发生是一个多时相的复杂过程，与精巢中多种酶的活性存在着重要关系。 $\beta$ -DG 酶参与各种葡萄糖苷酸的水解，还可与其他酶共同参与细胞器的降解与更新 (Varnagy *et al.*, 2002)；LDH 酶是生精细胞糖代谢产生能量的主要酶 (Boussouar *et al.*, 2004；Butts *et al.*, 2010)；ACP 酶则主要分布于精巢支持细胞内，可作为衡量是否出现生精障碍的指标 (徐莉春等, 2000；Pesch *et al.*, 2006)。本研究结果显示，在  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Pb}^{2+}$  处理下， $\beta$ -DG 酶即极显著高于对照组，说明仅  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  铅长期暴露即可对精巢组织内的细胞结构产生影响。在本实验染毒剂量条件下，黑斑蛙精巢中 LDH 酶，随着铅染毒剂量的增加，其活性被显著诱导，这可能是因为有氧氧化提供的能量减少，导致糖酵解代偿性能量供应提高引起的，说明大于  $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  铅长期暴露可干扰生精细胞的能量代谢，进而影响生精细胞的发育。同时，在  $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Pb}^{2+}$  处理下，ACP 酶活性显著被抑制，表明随着染毒剂量的增加，铅长期暴露亦可对支持细胞产生损伤。对比各标志酶活性的变化，引起  $\beta$ -DG 酶活性变化的铅浓度 ( $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) < 引起 LDH 酶活性变化的铅浓度 ( $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) < 引起 ACP 酶活性变化的铅浓度 ( $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )，提示精巢组织其他细胞对铅的敏感性强于生精细胞强于支持细胞。此外，贾秀英等 (2009) 报道当  $\text{Pb}^{2+}$  为  $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时，精子总数显著低于对照组；而当  $\text{Pb}^{2+}$  大于  $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时，精子畸形率显著高于对照组。说明 ACP 酶活性下降是由于支持细胞活性衰弱引起的，可作为精子总数下降的重要指征；LDH 酶活性升高是生精细胞能量代谢衰弱、精子畸形的重要表征。

综上所述，重金属铅可对精巢组织中其他细胞、生精细胞和支持细胞产生影响，同时可以干扰细胞膜结构上的主要离子通道活性，破坏细胞内外的离子平衡，进而抑制精子的发生，导致雄性生殖

毒性. 由此说明, 铅对细胞结构的影响, 特别是对细胞膜上离子通道的影响是铅致两栖动物雄性生殖毒性的途径之一.

## 5 结论 (Conclusions)

1) 黑斑蛙在低剂量铅溶液( $0.1 \sim 1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )中染毒 30 d,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶活性被诱导,  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性被抑制, 当  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶的抑制程度超过  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶的代偿机制时, 细胞膜内外离子平衡被打破, 精子发生被抑制, 致使显现雄性生殖毒性.

2) 黑斑蛙在低剂量铅溶液( $0.1 \sim 1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )中染毒 30 d, 引起  $\beta$ -DG 酶活性变化的铅浓度 ( $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) < 引起 LDH 酶活性变化的铅浓度 ( $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) < 引起 ACP 酶活性变化的铅浓度 ( $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 提示精巢组织其他细胞对铅的敏感性强于生精细胞强于支持细胞, 即精子畸形率的提高早于精子总数下降的发生.

责任作者简介: 贾秀英(1966—), 教授, 硕士生导师, 研究方向为生态毒理学. E-mail: XY\_Jia@163.com.

## 参考文献 (References):

- Abam E, Okediran B S, Odukoya O O, *et al.* 2008. Reversal of ionoregulatory disruptions in occupational lead exposure by vitamin C [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 26(3): 297-304
- Acevedo J J, Mendoza-Lujambio I, Vega-Beltran J L, *et al.* 2006.  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels in mouse spermatogenic cells and sperm, and their role in capacitation [J]. *Dev Biol*, 289(2): 395-405
- Alavi S M H, Cosson J. 2006. Sperm motility in fishes: (II) Effects of ions and osmolality: A review [J]. *Cell Biol Int*, 30: 1-14
- Alford R A, Dixon P M, Pechmann J H. 2001. Ecology: Global amphibian population declines [J]. *Nature*, 412 (6848): 499-500
- Allentoft M E, O'Brien J. 2010. Global amphibian declines, loss of genetic diversity and fitness: a review [J]. *Diversity*, 2(1): 47-71
- Becker C G, Loyola R D. 2008. Extinction risk assessments at the population and species level: implications for amphibian conservation [J]. *Biodivers Conserv*, 17(9): 2297-2304
- Blaustein A R, Walls S C, Bancroft B A, *et al.* 2010. Direct and indirect effects of climate change on amphibian populations [J]. *Diversity*, 2(2): 281-313
- Boussouar F, Benahmed M. 2004. Lactate and energy metabolism in male germ cells [J]. *Trends Endocrin Met*, 15(7): 345-350
- Butts I A E, Rideout R M, Burt K, *et al.* 2010. Quantitative semen parameters of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and their physiological relationships with sperm activity and morphology [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5): 756-762
- García-García G, Nandini S, Sarma S S S. 2006. Turbidity mitigates lead toxicity to cladocerans (Cladocera) [J]. *Ecotoxicology*, 15(5): 425-436
- Hayes T B, Falso P, Gallepeau S, *et al.* 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 213: 921-933
- Hong C L, Jia Y B, Yang X E, *et al.* 2008. Assessing lead thresholds for phytotoxicity and potential dietary toxicity in selected vegetable crops [J]. *Bulletin of Environmental Science*, 80(4): 356-361
- 贾秀英, 汪美贞. 2007. 亚急性镉暴露对雄性黑斑蛙生殖毒性的研究 [J]. *环境科学学报*, 27(9): 1512-1516
- Jia X Y, Wang M Z. 2007. Study on the reproductive toxicity of subacute cadmium exposure in male *Rana nigronmaculata* [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 27(9): 1512-1516 (in Chinese)
- 贾秀英, 汪美贞, 施蔡雷, 等. 2009. 铅暴露对雄性黑斑蛙精子毒性和血清性激素水平的影响 [J]. *环境科学学报*, 29(5): 1072-1076
- Jia X Y, Wang M Z, Shi C L, *et al.* 2009. Effects of lead exposure on sperm toxicity and levels of sexual hormone in sera of male *Rana nigronmaculata* [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 29(5): 1072-1076 (in Chinese)
- Kiesecker J M, Blaustein A R, Belden L K. 2001. Complex caused of amphibian population declines [J]. *Nature*, 410 (6829): 681-684
- MacDonald E, Hellevuo K, Komulainen H. 1986. Lead does not affect calmodulin-induced activation of calcium dependent adenosine triphosphatase in human red blood cell membranes [J]. *Arch Toxicol Suppl*, 9: 397-400
- Masui D C, Furriel R P M, Silva E C C, *et al.* 2005. Gill microsomal ( $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ )-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: interactions at cationic sites [J]. *Int J Biochem Cell*, 37(12): 2521-2535
- Pesch S, Bergmann M, Bostedt H. 2006. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality [J]. *Theriogenology*, 66(2): 307-313
- Quintanar-Escorza M A, González-Martínez M T, Navarro L, *et al.* 2007. Intracellular free calcium concentration and calcium transport in human erythrocytes of lead-exposed workers [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 220(1): 1-8
- Rovito S M, Parra-Olea G, Vásquez-Almazán C R, *et al.* 2009. Dramatic declines in neotropical salamander populations are an

- important part of the global amphibian crisis [J]. PNAS, 106 (9): 3231-3236
- Satyavathi C, Rao Y P. 2000. Inhibition of  $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase in *Penaeus indicus* postlarvae by lead [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 127: 11-22
- 施蔡雷, 张杭君, 贾秀英. 2010. 黑斑蛙精巢 MDA 和抗氧化酶对铅、镉暴露的生态毒性响应 [J]. 生态学报, 30 (13): 3569-3574
- Shi C L, Zhang H J, Jia X Y. 2010. Ecotoxic responses of MDA and antioxidant enzymes in testes of the frog *Rana nigronmaculata* due to exposures to lead and cadmium [J]. Acta Ecologica Sinica, 30 (13): 3569-3574 (in Chinese)
- Varnagy L, Budai P, Molnar E, *et al.* 2002. One-generation reproduction toxicity of Dithane M245 (mancozeb) and lead acetate [J]. Acta Wet Hung, 50(3): 365-371
- 徐莉春, 王沐沂, 王心如. 2000. 镉对大鼠睾丸毒作用的酶学研究 [J]. 中国公共卫生, 16(2): 119-220
- Xu L C, Wang S Y, Wang X R. 2000. Enzymology study of toxicity effects of cadmium on rat testis [J]. China Public Health, 16 (2): 119-220 (in Chinese)
- Yücebilgiç G. 2003. Effects of lead on  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  ATPase and  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase activities and lipid peroxidation in blood of workers [J]. Int J Toxicol, 22(2): 95-97