



低浓度 84 消毒液对小鼠生殖生理的影响

胡玉,田韵,周丽,周军,丁志刚

(中南大学湘雅三医院医学实验中心,长沙 410013)

【摘要】 目的 观察低浓度 84 消毒液对小鼠生殖生理的影响。**方法** 将 72 只 KM 小鼠随机分为 3 组,即: 0.5% 84 消毒液组(A组)、2.0% 84 消毒液组(B组)和生理盐水组(C组),每组 24 只,雌雄各半,各组每天 1 次灌胃给予相应药物,连续 9 周。阴道涂片镜检观察雌性小鼠的动情周期。9 周后,观察雄性小鼠的精子畸形率;并用 ELISA 法测定小鼠血清中性激素的水平;并取睾丸(或卵巢)、心、肝、肺、肾进行组织学观察。**结果** 与 C 组比较,A 和 B 组小鼠体重差异无显著性($P > 0.05$);血清性激素水平差异无显著性($P > 0.05$);雌性小鼠动情周期差异无显著性($P > 0.05$);组织学观察未见异常;与 C 组比较,A 组小鼠精子畸形率差异无显著性($P > 0.05$),B 组小鼠精子畸形率显著增高($P = 0.041 < 0.05$)。**结论** 0.5% 84 消毒液对小鼠的生殖生理无明显影响,在实际使用中要严格控制消毒液浓度。

【关键词】 84 消毒液;小鼠;生殖生理

【中图分类号】 Q95-33 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 07-0041-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.007.008

Effect of low-level 84 disinfection solution on reproductive physiology of mice

HU Yu, TIAN Yun, ZHOU Li, ZHOU Jun, DING Zhi-gang

(The Center of Experimental Medical Research in the Third Xiangya Hospital, Centre South University, Changsha 410013, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of low-level 84 disinfection solution on reproductive physiology of mice. **Methods** 72 KM mice were randomly divided into three groups: 0.5% 84 disinfection solution group (group A), 2.0% 84 disinfection solution group (group B) and saline solution group (group C). 12 males and 12 females in each group. Corresponding medicine was given once a day by intragastric gavage for 9 weeks. The estrous cycle of female mice was observed by exfoliative cytology of vagina. After 9 weeks, The sperm abnormality test was performed, Serum samples were taken for sex hormone test by ELISA, and the histological change of testis (or ovary), heart, liver, lung and kidney were observed. **Results** Compared with group C, No significant difference was observed in the weight variation and serum sex hormone level in group A and B ($P > 0.05$). The difference of the estrous cycle of female mice was not significant ($P > 0.05$). No histopathological abnormality was observed. Compared with group C, There was no significant difference in the rate of sperm abnormality in group A ($P > 0.05$), but the rate in group B was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** 0.5% 84 disinfection solution has no significant effect on reproductive physiology of mice, The concentration of disinfection solution must be strictly controlled when used.

【Key words】 84 Disinfection solution; Mice; Reproductive physiology

[基金项目] 湖南省科技厅项目(2011TT2012)。

[作者简介] 胡玉(1984-),女,助理研究员,硕士,研究方向:生物医学工程。

[通讯作者] 丁志刚(1973-),男,主管技师,硕士。研究方向:动物饲养与管理 E-mail: dzg410007@163.com。

84 消毒液是含氯的次氯酸钠溶液,具有广谱、高效、快速的杀菌作用。目前动物实验室多采用独立通气笼盒(individually ventilated cages, IVC)系统,而 84 消毒液是浸泡 IVC 笼具的常用消毒液之一。84 消毒液用于 IVC 笼具的消毒效果已有报道^[1],但对于 84 消毒液对实验动物生殖生理的影响未见报道,因此,本实验使用 84 消毒液对 KM 小鼠生殖生理的影响进行研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠 72 只,雌雄各半,4 周龄,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2011-0003】。饲养在中南大学湘雅三医院动物实验中心【SYXK(湘)2010-0001】,整个实验过程严格遵守医院实验动物中心标准操作规程,并且善待实验动物。

1.2 实验试剂与仪器

84 消毒液(湖南湘雅集团有限公司,有效氯含量:4.0%~7.0%);小鼠睾酮(T)酶联免疫分析(ELISA)试剂盒、小鼠雌二醇(E2)酶联免疫分析(ELISA)试剂盒,购自上海江莱生物科技有限公司;丙氨酸转氨酶(ALT)、白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)、血糖(Glu)、甘油三酯(TG)、胆固醇(CHO)试剂盒,购自广州瑞宇生物科技有限公司;日立 LABOSPECT 003 全自动生化分析仪,日本日立公司;电子天平(湖南湘仪,TP-620A)等。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组及处理 72 只 KM 小鼠,经 1 周适应性饲养后,随机分为 3 组:2 个剂量组(A 组、B 组)和生理盐水组(C 组),每组 24 只,雌雄各半。A 组以 0.5% 84 消毒液(常用消毒浓度)灌胃 0.5 mL, B 组以 2.0% 84 消毒液灌胃 0.5 mL, C 组以生理盐水灌胃 0.5 mL,每天灌胃 1 次,连续灌胃 9 周。

1.3.2 一般状态观察 实验期间,每日观察各组动物的摄食、饮水量、活动及毛色等状况,每周称量体重 1 次,连续称量 9 周。

1.3.3 动情周期观察:从第 2 周开始,连续 8 周, A、B 和 C 组各随机选取 10 只雌性小鼠,每天清晨采用阴道冲洗法做阴道脱落细胞涂片,光学显微镜下观察脱落细胞形态,以了解动情周期变化情况。

判断标准参见教材^[2]。

1.3.4 精子畸形率观察:第 9 周结束时, A、B 和 C 组各随机选取 6 只雄性小鼠,取双侧附睾,置于生理盐水中,分离包膜,剪碎附睾,过滤后将滤液以 1000 r/min 离心 2 min,弃上清液后制成悬液涂片,甲醇固定 15 min,0.5% 伊红染色 1 min,置于玻片架上晾干,高倍镜下观察精子形态,每只动物观察精子 1000 个,计算精子畸形率^[3]。

1.3.5 性激素和生化指标测定:第 9 周结束时, A、B 和 C 组各随机选取 12 只,雌雄各半,眼球取血,分离血清,-20℃冰箱保存,严格按照试剂盒说明书进行操作,分别测定雄性小鼠的睾酮水平和雌性小鼠雌二醇水平。剩余血清采用全自动生化分析仪对血清进行生化分析。

1.3.6 组织切片:眼球取血后即刻颈椎脱臼法处死动物,解剖切取心、肝、肺、肾、睾丸(或卵巢),4% 多聚甲醛固定。固定好的标本用梯度浓度的乙醇脱水,正丁醇透明,石蜡包埋,切片厚 5 μm,HE 染色。

1.4 统计学分析

用软件 SPSS18.0 进行分析,所有数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 一般情况

经观察,各组小鼠外观、活动、饮水和摄食量均未见异常,与生理盐水组(C 组)比较,0.5% 84 消毒液组(A 组)和 2.0% 84 消毒液组(B 组)小鼠体重无显著性差异($P > 0.05$)(表 1)。

2.2 动情周期

小鼠动情周期一般为 4~5 d,与 C 组比较, A 组和 B 组小鼠雌性小鼠动情周期均较为规律,无显著性差异($P > 0.05$)(表 2)。

2.3 精子畸形率

观察到的精子畸形率包括香蕉形、无钩、胖头、无定形、双头等。与 C 组比较, A 组小鼠精子畸形率差异无显著性($P > 0.05$), B 组小鼠精子畸形率显著增高($P = 0.041 < 0.05$)(表 3)。

2.4 性激素测定

与 C 组比较, A 组和 B 组小鼠雄性小鼠的睾酮水平和雌性小鼠的雌二醇水平差异无显著性($P > 0.05$)(表 4 和表 5)。

表 1 雌性和雄性小鼠体重变化(g)
Tab.1 Weight variation of female mice and male mice(g)

时间(d) Time(Day)	A 组 Group A		B 组 Group B		C 组 Group C	
	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male
	0	27.69 ± 1.28 *	34.19 ± 0.75 *	27.81 ± 1.07 *	33.94 ± 0.78 *	27.94 ± 1.27
7	31.13 ± 1.23 *	38.19 ± 0.84 *	31.44 ± 1.12 *	37.94 ± 0.90 *	31.50 ± 1.20	38.50 ± 0.60
14	33.81 ± 1.00 *	40.38 ± 0.92 *	34.13 ± 0.83 *	40.19 ± 1.30 *	34.56 ± 0.42	40.69 ± 0.92
21	35.06 ± 0.68 *	42.44 ± 1.12 *	35.38 ± 0.58 *	42.19 ± 1.39 *	35.94 ± 0.98	42.63 ± 1.27
28	36.38 ± 0.44 *	44.75 ± 1.28 *	36.75 ± 0.60 *	44.63 ± 1.30 *	36.88 ± 0.44	45.13 ± 0.99
35	38.13 ± 0.52 *	46.81 ± 0.96 *	38.38 ± 0.64 *	46.69 ± 0.75 *	38.50 ± 0.71	47.13 ± 0.52
42	39.90 ± 0.71 *	47.94 ± 0.32 *	39.69 ± 0.59 *	47.81 ± 0.53 *	39.81 ± 0.53	48.19 ± 0.53
49	41.06 ± 0.50 *	49.06 ± 0.90 *	41.06 ± 0.62 *	48.94 ± 0.82 *	41.19 ± 0.84	49.31 ± 0.53
56	42.25 ± 0.71 *	50.13 ± 0.74 *	42.31 ± 0.46 *	50.13 ± 0.74 *	42.50 ± 0.38	50.31 ± 0.65
63	43.31 ± 0.65 *	50.88 ± 0.69 *	43.56 ± 0.56 *	50.63 ± 0.88 *	43.69 ± 0.59	51.25 ± 0.71

注: * $P > 0.05$, 与生理盐水组(C组)比较。

Note: * $P > 0.05$, compared with group C.

表 2 雌性小鼠动情周期
Tab.2 The estrous cycle of female mice

组别 Group	动情期(d) Estruation(d)	非动情期(d) Non-estruation(d)	动情周期(d) Estrous cycle
A 组(10 只) Group A	1.20 ± 0.42	3.70 ± 0.48	4.90 ± 0.32 *
B 组(10 只) Group B	1.10 ± 0.32	3.80 ± 0.42	4.90 ± 0.32 *
C 组(10 只) Group C	1.20 ± 0.42	3.80 ± 0.42	5.00 ± 0.00

注: * $P > 0.05$, 与 C 组比较。

Note: * $P > 0.05$, compared with group C.

表 3 雄性小鼠精子畸形率
Tab.3 The sperm abnormality of male mice

组别 Group	观察精子数(个) No. of spermatids observed	精子畸形数(个) No. of spermatids malformed	畸形率(%) Sperm abnormality
A 组(6 只) Group A	6000	360	6.00 ± 0.51 *
B 组(6 只) Group B	6000	378	6.30 ± 0.33 **
C 组(6 只) Group C	6000	345	5.75 ± 0.42

注: * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, 与 C 组比较。

Note: * $P > 0.05$, ** $P = 0.041 < 0.05$, compared with group C.

表 4 雄性小鼠血清睾酮水平
Tab.4 Level of serum testosterone in male mice

组别 Group	体重(g) Weight	睾酮(pg/mL) Testosterone
A 组(6 只) Group A	50.83 ± 0.82	60.57 ± 1.40 *
B 组(6 只) Group B	50.42 ± 0.92	59.97 ± 1.75 *
C 组(6 只) Group C	51.25 ± 0.82	59.22 ± 1.08

注: * $P > 0.05$, 与 C 组比较。

Note: * $P > 0.05$, compared with group C.

2.5 生化指标

与 C 组比较, A 组和 B 组小鼠丙氨酸转氨酶、白蛋白、总蛋白、血尿素氮、肌酐、血糖、甘油三酯、胆固醇差异无显著性($P > 0.05$) (表 6)。

2.6 组织切片

A、B 组与 C 组心、脑、肝、脾、肺、肾、睾丸(或卵

巢)组织切片均未发现异常。彩插 6 图 1、2 分别为三组卵巢、睾丸组织切片图。

表 5 雌性小鼠血清雌二醇水平
Tab.5 Level of serum estradiol in female mice

组别 Group	体重(g) Weight	雌二醇(ng/L) Estradiol
A 组(6 只) Group A	43.33 ± 0.75	26.33 ± 1.00 *
B 组(6 只) Group B	43.75 ± 0.52	26.38 ± 1.11 *
C 组(6 只) Group C	43.58 ± 0.58	25.99 ± 1.99

注: * $P > 0.05$, 与 C 组比较。

Note: * $P > 0.05$, compared with group C.

3 讨论

IVC 系统已被广泛应用, 而浸泡消毒是最常用的 IVC 笼具消毒方式, 浸泡消毒后的笼盒自然会有

表 6 血清生化指标
Tab. 6 Serum biochemical indexes

血清生化指标 Serum biochemical index	A 组(6 只) Experiment group A	B 组(6 只) Experiment group B	C 组(6) Control group
丙氨酸转氨酶(U/L) ALT	42.50 ± 6.25*	41.33 ± 6.56*	42.83 ± 5.41
白蛋白(g/L) ALB	37.50 ± 1.34*	37.87 ± 1.47*	36.99 ± 2.17
总蛋白(g/L) TP	62.17 ± 3.30*	62.92 ± 4.01*	61.08 ± 4.12
血尿素氮(mmol/L) BUN	9.85 ± 1.12*	9.00 ± 0.90*	9.46 ± 1.17
肌酐(μmol/L) CRE	9.43 ± 0.89*	9.79 ± 1.27*	10.03 ± 1.07
血糖(mmol/L) Glu	3.23 ± 0.44*	3.51 ± 0.41*	3.30 ± 0.54
甘油三酯(mmol/L) TG	1.34 ± 0.41*	1.43 ± 0.42*	1.29 ± 0.39
胆固醇(mmol/L) CHO	3.49 ± 0.46*	3.82 ± 0.41*	3.51 ± 0.39

注: * $P > 0.05$, 与生理盐水组比较。

Note: * $P > 0.05$, compared with group C.

消毒液残留,实验动物饲养在笼盒内,其残留量是否对实验动物产生影响早就引起实验动物学界的关注^[1,4]。同时,为了维护和保障实验动物伦理福利,充分体现“不伤害原则”^[5],我们也应了解消毒液残留量是否对实验动物产生影响。

84 消毒液具有广谱、高效、快速的消毒杀菌作用,是浸泡 IVC 笼具的常用消毒液之一。李启富等^[1]研究表明,0.5% 84 消毒液浸泡 10 min,效果很好,一年多未见污染,裸小鼠质量检测可达 SPF 级。本研究采用 0.5% (常用消毒浓度)、2.0% 84 消毒液分别对 KM 小鼠进行灌胃,对照组采用生理盐水进行灌胃,对实验小鼠的部分生殖生理相关指标进行了观察:与生理盐水组比较,0.5% 84 消毒液组和 2.0% 84 消毒液组小鼠体重变化无显著性差异,雌性小鼠的动情周期差异无显著性,雄性小鼠血清睾酮和雌性小鼠雌二醇水平差异无显著性,部分生化指标检测无显著性差异。三组小鼠的心、肝、肺、肾和睾丸(或卵巢)组织切片均未发现异常。与生理盐水组比较,0.5% 84 消毒液组小鼠精子畸形率差异无显著性,但是 2.0% 84 消毒液组小鼠精子畸形率差异有显著性($P = 0.041 < 0.05$),提示此浓度的消毒液可能对小鼠的精子形成有影响,对于是否因

此对小鼠繁殖性能有影响以及是否对仔鼠生长发育是否有影响还有待于进一步研究。

以上研究结果表明,0.5% 84 消毒液对小鼠的生殖生理无明显影响,2.0% 84 消毒液组小鼠精子畸形率显著增高,在实际使用中一定要严格控制消毒液浓度。下一步我们将对于低浓度消毒液对小鼠繁殖性能是否有影响以及是否对仔鼠生长发育有影响做进一步研究。

参考文献:

- [1] 李启富,田泽敏,龚廷,等. IVC 笼盒消毒灭菌效果的观察[J]. 中国比较医学杂志,2006,16(12):757-759.
- [2] 吴端生,张健. 现代实验动物学技术[M]. 北京:化学工业出版社,2007年:46.
- [3] 汤百争,周正适,周智君. 低浓度臭氧对小鼠生殖生理的影响[J]. 中国比较医学杂志,2005,15(1):32-34.
- [4] 顾锋,王国强,沈志明,等. 独立通气笼盒过氧乙酸灭菌效果初探[J]. 上海实验动物科学,2003,23(2):111-113.
- [5] 贺争鸣,李根平,李冠民,等. 实验动物福利与动物实验科学[M]. 北京:科学出版社,2011年:47-49.

[修回日期]2014-05-06