

# 亚硝酸盐所致生殖毒性机制的研究

段海龙 李晨 曾嘉怡 刘冠兰\*

(长沙医学院 湖南 长沙 410219)

**摘要:**目的 探讨亚硝酸盐所致生殖毒性机制的研究。方法 挑选 SPF 级, 雄性昆明小鼠, 40 只, 随机分为亚硝酸钠溶液低[3 mg / (kg · d)]、中[9mg / (kg · d)]、高[18 mg / (kg · d)] 3 组为实验组, 登记量生理盐水为对照组。每组 10 只, 按照相应剂量每天灌胃给药, 连续 5 d, 饲养期限为 2 个月。检测小鼠各脏器系数和精子数的测定。结果 不同剂量亚硝酸钠的脾脏系数分别为 (8.98 ± 0.94mg/g、8.69 ± 0.48mg/g、7.53 ± 0.33mg/g), 激素水平随着亚硝酸钠染毒剂量的增加而降低, 差异具有统计学意义 (P < 0.05); 脾脏系数分别为 (13.89 ± 2.79mg/g、13.85 ± 2.64mg/g、14.42 ± 0.75mg/g) 激素水平随着亚硝酸钠染毒剂量的增加而升高趋势, 且差异具有统计学意义 (P < 0.05); 与对照相比实验组小鼠计数精子分别为 [(14.279 ± 3.20) × 10<sup>6</sup>/ml、(15.121 ± 3.68) × 10<sup>6</sup>/ml、(16.327 ± 2.93) × 10<sup>6</sup>/ml], 随着亚硝酸钠暴露剂量的增加精子的计数下降, 且精子存活率明显降低, 具有明显的统计学差异 (P < 0.05)。结论 亚硝酸钠的暴露可以损伤雄性小鼠的生殖功能。

**关键词:** 亚硝酸盐; 生殖毒性; 雄性小鼠; 精子存活率

亚硝酸钠作为添加剂与防腐剂, 在工业生产和食品加工中被广泛应用。在我国北方地区, 人们多喜欢对蔬菜进行腌制后食用, 在腌制过程中会产生亚硝酸盐等有害物质[1-2]。此外, 亚硝酸钠在纺织, 摄影, 医药等领域也多有应用。很长一段时间, 科学家们对亚硝酸盐单独或者与其他一些化学试剂相结合造成的毒性进行了深入研究。摄入过量的亚硝酸盐会导致生物体中毒乃至死亡[3]。因此, 亚硝酸盐的毒性已经引起人们的广泛关注。相关毒理学实验表明, 亚硝酸盐摄入会导致生殖力降低和发育力低下, 从而影响出生率、胎儿的健康甚至新生儿死亡[4]。本实验通过建立亚硝酸盐暴露模型, 探讨亚硝酸钠对雄性小鼠生殖功能的影响, 从而阐释亚硝酸盐与男性生殖力的关联性, 为男性不育的预防及临床治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及试剂

SPF 级, 雄性昆明小鼠, 40 只, 购自长沙天勤生物科技有限公司。饲养于长沙医学院动物实验中心 SPF 级动物房, 室温 25 ± 3℃, 湿度 50% ± 5%, 8: 00-20:00 保持光照, 并自由进水、进食。实验动物符合国家相关实验动物管理政策与法规, 实验获长沙医学院动物伦理委员会审议通过。动物适应性饲养 3d 后, 开始实验。

### 1.2 主要试剂及仪器

亚硝酸钠, 天平秤, DMEM 培养液, 显微镜, 培养皿, 眼科剪, 注射器等。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 溶液配制

以国家规定肉制品中亚硝酸盐的残留量 ≤ 30 ~ 50mg / kg, 按此换算小鼠的等效剂量做为本底对照组小鼠给药剂量。分别配制 0.01、0.2、0.4、0.8 mg / ml 亚硝酸钠溶液。每日灌胃给药 100μl, 达到 0.2mg / (kg · d)。

表 1 亚硝酸钠对雄性小鼠主要脏器的影响

组别	n	剂量 mg / (kg · d)	心脏 (mg/g)	肝脏 (mg/g)	脾脏 (mg/g)	肺脏 (mg/g)	肾脏 (mg/g)
对照组	10	0	5.82 ± 0.17	55.38 ± 8.52	9.72 ± 0.68	10.77 ± 2.41	13.71 ± 3.38
低剂量组	10	3	5.42 ± 0.27	54.37 ± 9.29	8.98 ± 0.94	9.79 ± 2.62	13.89 ± 2.79
中剂量组	10	9	6.27 ± 0.62	59.28 ± 5.21	8.69 ± 0.48	20.11 ± 9.81	13.85 ± 2.64
高剂量组	10	18	5.64 ± 0.74	57.44 ± 9.32	7.53 ± 0.33	14.83 ± 2.05	14.42 ± 0.75

### 1.3.2 实验分组及给药

将灌胃后小鼠随机分为亚硝酸钠溶液低[3 mg / (kg · d)]、中[9mg / (kg · d)]、高[18 mg / (kg · d)] 3 组为实验组, 登记量生理盐水为对照组。每组 10 只, 按照相应剂量每天灌胃给药, 连续 5 d, 饲养 2 月。2 个月终止灌胃后, 使用 12 周龄具有正常生殖能力的雄性小鼠进行下一步实验。

### 1.4 观察指标

#### 1.4.1 各脏器系数的测定

末次灌胃后 3 天, 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 将其心、肝、脾、肺、肾逐一游离并称量。并换算脏器系数, 进行分析。脏器系数计算公式为脏器系数 (mg/g) = 脏器重量 (mg) / 小鼠体重 (g)。

#### 1.4.2 精子数的测定

取出附睾计数精子, 观察其活动度。精子分析方法为双侧附睾称重后, 置于 2 ml DMEM 培养液 (37℃ 预温) 的小平皿中, 用眼科剪剪碎, 吸管吹打, 于显微镜下观察计数。

### 1.5 统计分析

采用 SPSS 24.0 统计学软件进行统计分析, 数据用均数 ± 标准差 (x ± s) 表示。分析方法独立样本 t 检验、有序变量的两独立样本比较的秩和检验和 Spearman 等级等相关分析方法, P < 0.05 有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 亚硝酸钠对雄性小鼠主要脏器的影响

不同剂量亚硝酸钠的脾脏系数分别为 (8.98 ± 0.94mg/g、8.69 ± 0.48mg/g、7.53 ± 0.33mg/g), 激素水平随着亚硝酸钠染毒剂量的增加而降低, 差异具有统计学意义 (P < 0.05); 脾脏系数分别为 (13.89 ± 2.79mg/g、13.85 ± 2.64mg/g、14.42 ± 0.75mg/g) 激素水平随着亚硝酸钠染毒剂量的增加而升高趋势, 且差异具有统计学意义 (P < 0.05)。其余指标差异无统计学意义。见表 1。

### 2.1 亚硝酸钠对小鼠计数精子和精子功能指标的影响

末次灌胃后,与对照相比实验组小鼠计数精子分别为[(14.279 ± 3.20) × 10<sup>6</sup>/ml、(15.121 ± 3.68) × 10<sup>6</sup>/ml、(16.327 ± 2.93) × 10<sup>6</sup>/ml],随着亚硝酸钠暴露剂量的增加精子的计数下降,且精子存活率明显降低,具有明显的统计学差异(P < 0.05)。

表2 亚硝酸钠对小鼠计数精子和精子功能指标

组别	n	剂量 mg / (kg 精子计数 (x10 <sup>6</sup> /ml) 精子存活率 (%)	•d)	
对照组	10	0	21.228 ± 3.26	56.203 ± 5.42
低剂量组	10	3	14.279 ± 3.20	52.281 ± 3.24
中剂量组	10	9	15.121 ± 3.68	51.383 ± 5.12
高剂量组	10	18	16.327 ± 2.93	48.931 ± 6.04

### 3 讨论

亚硝酸盐广泛作为食品添加剂,用于防腐与增加色泽。同时,多地区地下水中亚硝酸盐水平远远超过国家规定。过量摄入亚硝酸钠的所带来的损伤引起人们的广泛关注,但其对生殖系统影响的研究尚未系统开展过[5]。我们使用 SPF 级,雄性昆明小鼠,针对于不同浓度的亚硝酸钠进行连续 2 个月的灌胃处理,检测小鼠主要脏器、精子计数和精子功能。本文结果表明与对照相比实验组小鼠计数精子分别为[(14.279 ± 3.20) × 10<sup>6</sup>/ml、(15.121 ± 3.68) × 10<sup>6</sup>/ml、(16.327 ± 2.93) × 10<sup>6</sup>/ml],随着亚硝酸钠暴露剂量的增加精子的计数下降,且精子存活率明显降低,具有明显的统计学差异(P < 0.05)。连续 2 个月对小鼠进行亚硝酸钠灌胃,将会对小鼠产生生殖毒性的影响。既往研究表明,过量亚硝酸钠的摄入对小鼠的神经系统造成影响,可以降低小鼠的学习和记忆能力。亚硝酸钠灌胃后的雄性小鼠体重显著降低,精子活力与生殖能力显著下降,与我们研究结论基本一致。

目前不孕不育现象和新生儿畸形日趋严重,相关流行病学研究结果表明,产前摄入饮用水中高浓度的亚硝酸盐,导致新生儿神经管缺陷会显著增减[6-7]。饮食中的亚硝酸盐可以在酸性环境中与胺和酰胺反应,进而对身体进行伤害。高水平亚硝酸盐摄入可能会对生殖造成不良影响。同时亚硝酸盐等污染的饮用水会导致不良妊娠的风险增加,而各种 N-亚硝基化合物也可能是导致胎儿畸形的重要因素。既往结果表明,在孕期前三个月,24%的孕妇服用过一种或多种亚硝化药物,在研究人群中,母体摄入亚硝化药物与新生儿神经管缺陷、肢体缺陷和某些类型的心脏缺陷相关,尤其是可能导致心脏缺陷、室间隔缺损和单心室等疾病[8]。在一些国家,对出生缺陷人群进行研究表明,患畸形、腭裂和心脏缺陷病新生儿的母亲中,亚硝酸盐总摄入量显著高于正常新生儿的母亲。

同时,前人研究表明摄入过量亚硝酸钠可能引发早产。早产儿

患胃肠道、呼吸道并发症和神经发育障碍的风险均高于正常婴儿。早产的原因和机制受许多因素的影响,例如感染,炎症,子宫过度膨胀和压力等。绒毛膜损伤是导致早产的一种因素,特别是过早破裂。一氧化氮对植入、胚胎发育和胎盘中血管的发育是必需的,但是高水平的亚硝酸盐可以导致细胞周期停滞,细胞凋亡和衰老,并且可能导致绒毛膜炎。怀孕 2 至 3 个月的妇女服用亚硝化药物可能引起早产,可能与亚硝酸盐形成 N-亚硝基化合物相关。因此,内源性 N-亚硝基化合物的形成取决于胃中亚硝酸盐的浓度。亚硝酸盐与亚硝化类化合物一同摄入导致早产的几率显著增加。

### 参考文献

- [1]葛磊.亚硝酸钠对雌性小鼠配子质量及生殖力影响的研究[D].内蒙古大学,2017.
  - [2]Vodovar Dominique and Megarbane Bruno. Are sodium nitrite exposures increasing in the United States?[J]. Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.), 2021, 60(3): 1-2.
  - [3]罗小军,黄张建,张奕华.亚硝酸钠治疗缺血性疾病研究进展[J].中国药物化学杂志,2017,27(05):408-414.
  - [4]Zerfaß Christian and Christie Oleza Joseph A. and Soyer Orkun S.. Manganese Oxide Biomineralization Provides Protection against Nitrite Toxicity in a Cell-Density-Dependent Manner[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 85(2): e02129-18.
  - [5]高艳,王志新,常成,刘俊,高晓群,邓锦波.亚硝酸盐暴露致雄性小鼠生殖毒性的探讨[J].解剖学报,2017,48(05):576-584.
  - [6]胡桑,崔占军,郭俊楠,邓锦波,邓洁心.亚硝酸盐暴露小鼠不孕效应的实验性研究[J].河南大学学报(自然科学版),2016,46(02): 176-181.
  - [7]Wu Shanshan et al. Nitrite exposure may induce infertility in mice.[J]. Journal of toxicologic pathology, 2022, 35(1): 75-82.
  - [8]Truong H. N. et al. NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF NITRITE AGAINST HYPOXIC ISCHEMIC BRAIN INJURY IN NEWBORN RAT PUPS[J]. JOURNAL OF INVESTIGATIVE MEDICINE, 2013, 61(1): 168-168.
- 项目基金: 国家级大学生创新创业训练计划项目: 教高司函【2020】13号-S202010823024; 湖南省大学生创新创业训练计划项目: 湘教通【2020】191号-3907; 长沙医学院大学生创新创业训练计划项目: 长医教【2020】26号-079;
- 第一作者: 段海龙, (2000.01-), 男, 本科在读, 临床医学专业
- \*通讯作者: 刘冠兰, (1983.01-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 组织胚胎学