

人卵泡液中重金属铅对女性生殖毒性的研究

冯 婷¹, 千日成¹, 马 龙¹, 刘嘉茵^{1*}, 郁建桥²

(¹南京医科大学第一附属医院临床生殖中心, 江苏 南京 210029; ²江苏省环境监测中心, 江苏 南京 210036)

[摘要] 目的:研究重金属铅对女性生殖系统的影响,分析铅含量与获卵率、卵子成熟率、正常受精率、正常卵裂率、可移植胚胎率、优质胚胎率、妊娠率的相关性。方法:测定36例行体外受精(IVF)治疗的患者卵泡液中铅的浓度,并观察这些患者的卵泡数、获卵率、卵子成熟率、正常受精率及发育情况。结果:获卵率、卵子成熟率、正常受精率、正常卵裂率、可移植胚胎率、优质胚胎率和卵泡液中铅的检出均无显著差异,但随着铅含量浓度的逐渐增高,卵子成熟率、正常卵裂率、优质胚胎率均有下降趋势。结论:重金属铅对女性生殖系统是有毒性损害的,但由于本研究的样本量较少,两者之间无显著性关联,应再加大样本量继续研究。

[关键词] 卵泡液;铅;胚胎发育

[中图分类号] R172

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2013)11-1550-03

doi:10.7655/NYDXBNS20131114

由于职业和环境的因素,人可能会长期接触到铅的金属悬浮物,流行病学研究就已经发现铅对激素水平有影响^[1]。此外有研究报道,铅既有生殖毒性,还有妊娠毒性,它能通过胎盘屏障,对胚胎产生毒性作用,使自然流产和早产率增高^[2-3]。铅能抑制胚胎的着床,国内外报道的研究中,给大鼠饮用含铅的水均可以使妊娠率、着床率明显降低。铅还能经胎盘和乳汁转移,直接对胎儿和婴儿造成危害,导致自然流产、早产、畸胎和婴幼儿行为异常增多^[4-5]。一旦被人体吸收,铅的自然代谢非常缓慢,会长期蓄积在人体内。

本研究中,针对36例行体外受精(IVF)治疗患者的卵泡液进行铅含量的检测,并密切观察患者卵母细胞及胚胎发育的情况,以期研究铅对女性生殖的毒性机制,及对卵子成熟及胚胎发育的影响。

1 对象和方法

1.1 对象

2012年6月~8月,由于输卵管盆腔原因、子宫内膜异位症、多囊卵巢综合征、不明原因不孕等在本中心进行体外受精-胚胎移植(IVF-ET)的患者36例,年龄25~40岁,平均年龄为(31.0±3.4)岁;夫妇文化程度高中及以上者占80%;职业接触油漆1

例,甲醛1例,卤代物1例。均无重金属接触史;1例吸烟(<15支/d)。以10 μg/L浓度为卵泡液中铅的检出限,将患者分为两组:检出组21例,未检出组15例。

1.2 方法

1.2.1 卵母细胞的采集与处理

应用常规促排卵方案、B超监测卵泡生长发育,待卵泡充分生长发育后经阴道穿刺取卵,带卵丘放射冠的卵母细胞经含10%人血清替代品(SAGE公司,美国)的Hepes-HTF培养液(SAGE公司,美国)充分洗涤后,移入含10%人血清替代品的HTF培养液(SAGE公司,美国)中,置CO₂培养箱(37℃、5%CO₂、饱和湿度)中备用。

1.2.2 精子的处理与受精

取卵当日按常规,用PureCeption(SAGE公司,美国)处理新鲜精液。按IVF的常规操作方案加精。于受精后16~18h在倒置显微镜400倍下观察受精情况,培养液为含10%人血清替代品的GM培养液(SAGE公司,美国)。

1.2.3 胚胎发育与评价

每隔24h观察胚胎的发育情况,根据胚胎发育速度,卵裂球的数目、均一度,细胞质的形态以及碎片的多少对胚胎进行综合整体的评价。移植当日可移植胚胎的标准是胚胎发育速度基本正常,卵裂球不均一或均一、数目不均等或均等,细胞质中允许有少量空泡,碎片程度不超过15%;优质胚胎的标准是胚胎发育速度正常,卵裂球均一、数目不均等或均

[基金项目] 江苏省卫生厅项目(FXK201221);江苏省科技厅项目(BM2013058)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jyliu@njmu.edu.cn

等,细胞质均一、无空泡,碎片程度不超过 10%。

1.2.4 妊娠结局

从取卵后肌注安宫黄体酮以健黄体,在种植后第 14 天取静脉血测 hCG 值,以检验是否妊娠,第 40 天 B 超检查胎数及胎心。

1.2.5 铅测定

患者行常规 IVF 取卵,检出卵子后收集卵泡液,超低温保存,集中测试。用石墨炉原子吸收法测定铅的含量^[6]。

1.3 统计学方法

数据经整理后,计算各组的相关指标的发生率,具体计算方法如下:获卵率(%)=(取卵数/卵泡数)×100%;体外成熟率(%)=(成熟卵数/取卵总数)×100%;正常受精率(%)=(双原核受精卵数/成熟卵数)×100%;卵裂率(%)=(正常卵裂胚胎数/双原核受精卵数)×100%;可移植胚胎率(%)=(可移植胚胎数/双原核受精卵数)×100%;优质胚胎率(%)=(优质胚胎数/双原核受精卵数)×100%;临床妊娠率(%)=(临床妊娠周期数/移植周期数)×100%。

分析铅含量与获卵率、卵子成熟率、正常受精率、正常卵裂率、可移植胚胎率、优质胚胎率、妊娠率的相关性。采用 SASS17.0 系统,应用卡方检验比较不同组间卵母细胞体外成熟、受精、胚胎发育及临床

妊娠结局等, $P < 0.05$ 具有统计显著性。

2 结果

2.1 卵泡液中铅对获卵、卵子成熟及胚胎发育影响

以 10 $\mu\text{g/L}$ 浓度为卵泡液中铅的检出限,将卵泡分为未检出、检出两组。两组间的获卵率、卵子成熟率、正常受精率、卵裂率、可移植胚胎率、优质胚胎率、临床妊娠率之间均无显著相关性 (P 值均 > 0.05),但值得注意的是,检出铅的卵泡液组中,卵子成熟率、卵裂率及优质胚胎率均有下降的趋势(表 1)。

2.2 卵泡液中铅的含量分布

以 10 $\mu\text{g/L}$ 浓度为卵泡液中铅的检出限,检出铅的 310 个卵泡中,即使是最小值也达到了检出限的数倍(58 $\mu\text{g/L}$),最大值高达 2 857 $\mu\text{g/L}$,43.0% (310/721) 的卵泡液标本中可以检出铅,平均值为 160.50 $\mu\text{g/L}$,可见铅的分布和污染是比较普遍的。

2.3 铅的浓度对卵子质量及胚胎发育的影响

将卵泡液中铅浓度差异最大的 2 例患者的各项实验室指标进行比较,成熟率、正常受精率、可移植胚胎率及优质胚胎率均有统计学差异,尤其是正常受精率的结果。随着铅浓度的增加,胚胎的发育潜能均有明显下降的趋势(表 2)。

表 1 卵泡液中铅未检出、检出组卵子成熟度与胚胎发育的比较 (%)

组别	卵泡数	获卵率	成熟率	正常受精率	卵裂率	可移植胚胎率	优质胚胎率	临床妊娠率
未检出	411	63.7(262/411)	68.3(179/262)	87.2(156/179)	94.9(148/156)	61.5(96/156)	31.4(49/156)	45.0(9/20)
检出	310	69.6(216/310)	68.1(147/216)	92.5(136/147)	94.1(128/136)	63.2(86/136)	30.9(42/136)	46.7(7/15)
P 值		0.10	0.95	0.11	0.78	0.49	0.89	0.20

表 2 铅浓度最小及最大值之间胚胎发育情况的比较 (%)

患者铅浓度($\mu\text{g/L}$)	卵泡数	获卵率	成熟率	正常受精率	卵裂率	可移植胚胎率	优质胚胎率
58.0	31	41.9(13/31)	76.9(10/13)	100(10/10)	100(10/10)	100(10/10)	100(10/10)
2 875.0	30	66.7(20/30)	35.0(7/20)	42.9(3/7)	100(3/3)	33.3(1/3)	33.3(1/3)
P 值		0.05	0.03*	0.01*	/	0.04*	0.04*

3 讨论

铅是一种常见的工业毒物,其所造成的环境污染以及对人体的伤害已经引起越来越多的重视,长期接触低浓度的铅可导致免疫、生殖和神经等系统的损伤。铅不是人体必需的微量元素,是一种具有神经毒性的重金属,可经过呼吸道、消化道及皮肤渗透作用进入人体,蓄积在各组织中^[7-9],而一旦进入人体,因其为重金属元素,自然排泄十分缓慢,会引起免疫、生殖、神经等多器官多系统的损害^[10-11]。对女性的危害除了对自身造成生殖损害外,甚至还会

影响到子代,即通过胎盘和母乳对胚胎和婴儿造成更为严重的危害^[3,5,8,12]。

本研究中铅检出与未检出组的平均年龄相近(31.0 vs 30.9 岁),表明年龄因素没有对卵子的质量及胚胎发育产生影响,两组具有可比性。哺乳动物的卵母细胞在减数分裂的过程中,生发泡破裂是第一次减数分裂的起始标志,第一极体释放后就停滞于第二次减数分裂的中期,待受精后启动并完成减数分裂。重金属铅对卵母细胞的生发泡破裂并没有影响,而是明显地降低了小鼠超排卵的卵母细胞数,并抑制第一极体的释放^[13]。本研究的数据表明,随着铅

浓度的检出量增加,虽然两组间的成熟率比较接近,但仍有下降的趋势,可能是由于其对卵母细胞染色体的损伤,使其不能正常排出第一极体。由于铅对细胞内 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的竞争拮抗作用,而干扰微管的正常合成,使得纺锤体的正常形成和有序的细胞分裂受到抑制^[14],本研究中体现胚胎发育潜能的相关数据,包括卵裂率和优质胚胎率,随着铅浓度的增加出现了下降的趋势,可加大样本量进一步研究分析。

普通人群的铅暴露主要来自汽车尾气、染料、化妆品、蓄电池、垃圾焚烧等空气污染,本研究资料显示出,所有患者均为非职业暴露人群,但数据表明仍有 43.0%(310/721)的卵泡液标本中可以检出铅,平均值为 $160.50 \mu\text{g/L}$,可见环境中铅的分布和污染是比较普遍的。而卵泡液中铅含量的个体差异很大,波动在 $58.00\sim 2\ 875.00 \mu\text{g/L}$,可能与个人日常生活环境及生活习惯的差异有关。铅检出量最小和最大值之间反映胚胎发育潜能的数据,即成熟率、受精率、可移植胚胎率及优质胚胎率,均有明显的统计学差异,说明铅在较高浓度时可抑制卵母细胞的成熟和受精能力,降低卵母细胞的质量及影响胚胎的发育潜能。虽然有研究显示铅能抑制胚胎的着床^[15],但在本研究中没有统计学差异,可能由于样本量较少。本研究资料目前尚无法显示出铅含量与卵子质量、胚胎发育、妊娠结局等生殖指数有显著相关性,可能是由于样本量较少的原因,如加大样本量,可以更好地解释铅对女性生殖功能损害的机制。

[参考文献]

- [1] Zenzes MT, Zhang HM, et al. Cadmium accumulation follicular fluid and women in vitro fertilization embryo transfer is higher in smokers [J]. *Fertil Steril*, 1995, 64(3): 599-603
- [2] 万伯健,李北利,姜厚波,等. 接触铅女工后期血铅动态及对新生儿体格发育的影响 [J]. *中国预防医学杂志*, 1995, 4(2): 151-154
- [3] Bloom MS, Parsons PJ, Steuerwald AJ, et al. Toxic trace metals and human oocytes during in vitro fertilization (IVF)[J]. *Reprod Toxicol*, 2010, 29(3): 298-305
- [4] Gulson BL, Mizon KJ, Palmer JM, et al. Blood lead changes during pregnancy and postpartum with calcium supplementation [J]. *Environ Health Perspect*, 2004, 112(15): 1499-1507
- [5] AL-Saleh I, Shinwari N, Mashhour A, et al. Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women [J]. *Int J Hyq Environ Health*, 2011, 214(2): 79-101
- [6] 郁建桥,史啸勇,刘宇全. 石墨炉原子吸收法测定生殖液中铅和镉含量的方法研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2005, 25(10): 1711-1713
- [7] 韩磊,张恒东. 铅、镉的毒性及其危害[J]. *职业卫生与病伤*, 2009, 24(3): 173-177
- [8] 苗红,程蔚蔚. 孕期铅暴露对胎儿及婴幼儿的影响 [J]. *上海交通大学学报:医学版*, 2011, 31(5): 667-671
- [9] Quillet L, Besaury L, Popova M, et al. Abundance, diversity and activity of sulfate-reducing prokaryotes in heavy metal-contaminated sediment from a salt marsh in the Medway Estuary (UK) [J]. *Mar Biotechnol*, 2012, 14(3): 363-381
- [10] Kitana N, Callard IP. Effect of cadmium on gonadal development in freshwater turtle (*Trachemys scripta*, *Chrysemys picta*) embryos [J]. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2008, 43(3): 262-271
- [11] Benitez MA, Mendez-Armenta M, Montes S, et al. Mother-fetus transference of lead and cadmium in rats: involvement of metallothionein [J]. *Histol Histopathol*, 2009, 24(12): 1523-1530
- [12] Gaber MZE, Salman AM, Dokhan KZ, et al. Experimental studies on the influence of case in activated charcoal on lead toxicity upon fertility [J]. *Asiut Veterinary Medical*, 2009, 55: 443-465
- [13] 贺秀媛,朱翠娟,袁慧,等. 醋酸铅对小鼠卵巢组织结构和卵巢颗粒细胞凋亡的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2010, 2(30): 254-256
- [14] Kalia K, Zheng W, Jiang W. Importance of mitochondria in manganese-induced cellular toxicity [J]. *Neurotoxicology*, 2009, 30(4): 727-733
- [15] 沈维干,陈彦,李朝军,等. 6种金属元素对小鼠卵母细胞成熟和体外受精的影响 [J]. *卫生研究*, 2000, 29(4): 202-204

[收稿日期] 2013-05-07