

# 复合不育剂 EP-1 对雄性长爪沙鼠的抗生育作用

张锦伟<sup>1</sup> 海淑珍<sup>1</sup> 郭永旺<sup>2</sup> 吴新平<sup>3</sup> 施大钊<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193; 2. 全国农业技术推广服务中心, 北京 100026; 3. 农业部农药检定所, 北京 100026)

**摘要:** 在室内条件下采用食毒法研究了浓度为 1/20 000 的复合不育剂 EP-1 饵料对雄性长爪沙鼠性激素、生殖器官及繁殖行为的作用。结果显示: 给药 1 周后, 血清内促卵泡素 (FSH)、促黄体素 (LH) 和雌二醇 (E2) 水平与对照组相比差异不显著, 但睾酮 (T) 浓度显著下降; 试鼠精囊腺重量显著降低; 睾丸和附睾重量虽略有降低, 但差异均不显著; 给药组精子平均畸形率为 (55.00 ± 2.79)%, 显著高于对照组的 (32.00 ± 2.36)%; 给药组睾丸曲精小管平均异常率为 (22.99 ± 5.00)%, 显著高于对照组的 (4.21 ± 1.18)%; 试鼠配对后主要表现为相互嗅闻, 给药组雄鼠主动嗅闻雌鼠频次显著低于对照组, 打斗和攻击频次也降低; 实验室条件下, 40 天内对照组繁殖率为 55.6%, 而给药组均未繁殖。说明 EP-1 对雄性长爪沙鼠具有明显的抗生育作用。

**关键词:** EP-1 不育剂; 生育; 长爪沙鼠

## Anti-fertility effect of EP-1 contraceptive compound on male Mongolia gerbils *Meriones unguiculatus*

Zhang Jinwei<sup>1</sup> Hai Shuzhen<sup>1</sup> Guo Yongwang<sup>2</sup> Wu Xinping<sup>3</sup> Shi Dazhao<sup>1\*</sup>

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. National Agro-Technology Extension Center, Beijing 100026, China; 3. Institute for the Control of Agrochemicals, the Ministry of Agriculture, Beijing 100026, China)

**Abstract** The effects of anti-fertility EP-1 at the concentration of 1/20 000 on sex hormones, reproductive organs and reproductive behavior of male Mongolia gerbils were studied under the laboratory condition. One week treatment results had no significant differences in the concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), and exogenous estradiol-17-β (E2) in serum by radioimmunoassay compared with the control. While the concentration of testosterone (T) was significantly lower than that of the control. The weight of seminal vesicle was obviously lower comparing with the control, but no distinct differences had been found in the weight of testis and epididymis. The mean deformity rate of sperms was (55.00 ± 2.79)%, which was two-fold higher than that of the control at (32.00 ± 2.36)%. The mean abnormal rate of the seminiferous tubules in the testis was (22.99 ± 5.00)%, which is higher than that of the control at (4.21 ± 1.18)%. The test mice in paired didn't mate but only smelled mutually, and the frequency of smelling was lower than that of the control, and the frequency of fighting and attacking also decreased. The reproductive rate of the control was 55.6% while the experimental group was zero.

**Key words** EP-1 contraceptive compound; anti-fertility; Mongolia gerbils

基金项目: 国家“973”计划 (2007CB109105), “十一五”国家科技支撑计划 (2006BAD16B04-1), 农业部农作物病虫害鼠害疫情监测与防治项目

作者简介: 张锦伟, 男, 1983 年生, 硕士研究生, 研究方向为鼠害不育控制, email: zhangjinweibeyond@yahoo.cn

\* 通讯作者 (Author for correspondence), email: shidazhao@cau.edu.cn 收稿日期: 2010-04-09

长期以来,控制农业鼠害大多采用杀鼠剂灭鼠的方式。这类方法虽然能够在短时间内大幅降低鼠类的数量,但也存在局限性,如残留的个体通过繁殖可使害鼠数量较快地恢复、易引起非靶标动物中毒以及造成环境安全隐患等难以克服的问题。而采用不育控制则可通过降低鼠类繁殖减少对杀鼠剂的依赖达到持续控制的效果<sup>[1]</sup>。Knippling & McGuire<sup>[2]</sup>提出害鼠不育控制理论,即连续施行3代杀灭70%的鼠,只有短期效果;而若连续3代70%的鼠不育,将使种群灭绝。当前,不育技术已成为替代化学灭鼠的方法之一。

EP-1是张知彬等<sup>[3]</sup>首先提出用于鼠类不育控制的激素类复合不育剂,由炔雌醚和左炔诺孕酮按照1:2的比例配制。Ep-1对鼠类的作用已有一些相关报道,其中张知彬等<sup>[4]</sup>、宛新荣等<sup>[5]</sup>、霍秀芳等<sup>[6-7]</sup>和张堰铭(2009,学术交流)分别报道了对布氏田鼠 *Lasiopodomys brandtii* 子午沙鼠 *Meriones meridianus* 灰仓鼠 *Cricetulus migratorius* 雌性黑线毛足鼠 *Phodopus sungorus* 雄性大仓鼠 *Tscherskia triton* 高原鼠兔 *Ochotona curzoniae* 的不育作用,均发现其效果显著。但Zhao等<sup>[8]</sup>则报道了EP-1对雄性布氏田鼠的抗生育作用不明显。

本试验在实验室条件下采用食毒法测定了EP-1对雄性长爪沙鼠的不育效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 试鼠选择

试验前随机选取健康、无外伤、睾丸已下降至阴囊的雄性成年(体重为50~70g)长爪沙鼠,观察2周。观察期间,淘汰日食量不足试鼠平均食量1/10的个体,共选择试鼠20只,随机分为2组,独立样本T测验(Independent-Sample T test)显示2组体重分别为57.35±1.11g和59.6±1.83g,组间差异不显著(df=18, P=0.307>0.05)。

所有试鼠均单笼饲养,饲养笼28.5cm×17.2cm×15.8cm,光照14L:10D,温度25±1℃,自由取食饮水。对试验组试鼠连续单独喂药饵1周,除第1次喂12g以外,以后10g/天,对照组常规玉米饲喂,除第1次喂12g以外,以后10g/天。药饵是由99%炔雌醚(quinestrol 化学名称:17α-乙炔基,3-环戊醚)和99%左炔诺孕酮(levonorgestrel 化学名称:18-甲基炔诺酮)原药(购自北京紫竹天工科技有限公司)按照1:2的比例混合后溶于花生油后

混以玉米粉、干草粉配成浓度为1/20000的药粉后轧制成长8~15mm,直径约3mm的柱状颗粒,自然风干备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 试鼠性激素与生殖组织的测定

给药组和对照组分别单笼连续喂药饵和玉米1周后,从眼球静脉丛取血。血样常温静置约2h后,以3500r/min离心机离心15min,取上层血清,保存于-20℃,2个月内作放射免疫检测<sup>[9]</sup>。测定促卵泡素(follicle-stimulating hormone,简称FSH)、促黄体素(luteinizing hormone,简称LH)、雌二醇(estradiol,简称E2)、睾酮(testosterone,简称T)等4项指标在血清中的含量<sup>[10]</sup>,由北京康源瑞得生物技术有限公司完成。取血后将所有试鼠断颈处死,称重,解剖观察睾丸、附睾、精囊腺形态并称量。解剖后迅速取试鼠单侧附睾尾置于1mL 36~37℃ 0.9%生理盐水中,用解剖剪将附睾尾剪破,约反复剪30次,使其成为精子悬液,静置约10min,用移液器吸取少量悬液滴于载玻片上,推片,待自然风干后用胶头滴管吸取95%酒精固定。待酒精风干后用1%伊红染液染色1.5~2h后清水冲洗3min,自然风干,光学显微镜镜检,计数400个以上精子,计算精子畸形率<sup>[11]</sup>。精子畸形率(%)=(畸形精子数/计数精子数)×100。试鼠解剖后取单侧睾丸置于Bouin固定液固定后,制作石蜡切片,HE染色,观察睾丸组织变化。光镜下计数200个以上完整曲精小管截面,计算管腔异常率。管腔异常率(%)=(异常管腔数/计数管腔数)×100。

#### 1.2.2 试鼠繁殖行为观察

给药组喂药饵、对照组喂玉米,1周后与正常发育性成熟雌性长爪沙鼠配对,配对雌雄个体间体重差异均小于10g。行为观察箱体积为40cm×32cm×32cm,以透明隔板分为2个体积相同区域,将待配对鼠分别放于2个区域中适应10min之后打开隔板,观察30min。参照房继明<sup>[11]</sup>、张健旭等<sup>[12]</sup>对鼠类社会行为的定义,记录长爪沙鼠的交配、嗅闻和攻击行为。试鼠配对后正常饲养,饲养笼28.5cm×17.2cm×15.8cm,光照14L:10D,温度25±1℃,自由取食饮水。计算40天内的繁殖率。繁殖率(%)=(繁殖对数/配对总数)×100。

### 1.3 数据统计分析

数据记录用平均数±标准误表示。采用SPSS 11.5软件进行统计分析,独立样本T测验检验两组

独立样本平均值差异显著性, Mann-Whitney U 检验  
两组间繁殖率差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 EP-1对雄鼠生殖激素的影响

独立显著性 T 测验显示, 试验组长爪沙鼠血清

内促卵泡素、促黄体素和雌二醇水平与对照组差异不显著,  $df_1 = 16, P_1 = 0.565 > 0.05$ ;  $df_2 = 16, P_2 = 0.328 > 0.05$ ;  $df_3 = 6.30, P_3 = 0.921 > 0.05$ ; 试验组睾酮水平则明显下降, 差异达显著水平,  $df = 16, P = 0.028 < 0.05$ (表 1)。说明 EP-1 抑制了雄鼠睾酮的分泌, 而对促卵泡素、促黄体素和雌二醇作用不大。

表 1 EP-1对长爪沙鼠主要生殖激素的影响

Table 1 Effect of EP-1 on *Mongolia gerbil's* key reproductive hormones

组别 Group	样本量 Number	促卵泡素 FSH (mIU/mL)	促黄体素 LH (mIU/mL)	雌二醇 E2 (pg/mL)	睾酮 T (ng/mL)
对照 Control	9	10.42 ± 0.41	12.01 ± 1.22	330.80 ± 90.38	1.72 ± 0.45
处理 Treatment	9	10.05 ± 0.46	13.92 ± 1.46	320.88 ± 32.34	0.50 ± 0.11*

注: \* 表示独立显著性 T 测定差异显著 ( $P < 0.05$ )。Note \* means significant difference at  $P < 0.05$  level by independent T test

### 2.2 EP-1对长爪沙鼠主要生殖器官的作用

#### 2.2.1 生殖器官重量

喂药 1 周后, 试鼠主要生殖器官与对照组相比发生了不同程度的变化。给药组试鼠睾丸和附睾平均重量分别为  $0.79 \pm 0.05$ g 和  $0.26 \pm 0.02$ g 低于对照组的  $0.86 \pm 0.03$ g 和  $0.29 \pm 0.02$ g 但差异均不显著; 而给药组精囊腺平均重量为  $0.18 \pm 0.03$ g 显著低于对照组的  $0.33 \pm 0.06$ g ( $df = 18, P = 0.033 < 0.05$ (图 1)。试鼠精囊腺显著萎缩, 作为分泌精液的重要腺体, 对精子的正常发育和成熟均产生不利影响。

#### 2.2.2 精子形态的变化

正常精子的头部有钩、精子尾舒展(图 2-A)。喂药后, 畸形精子比例明显升高, 表现为头部和尾部折叠以及头部无钩(图 2-B)。与对照组相比, 给药

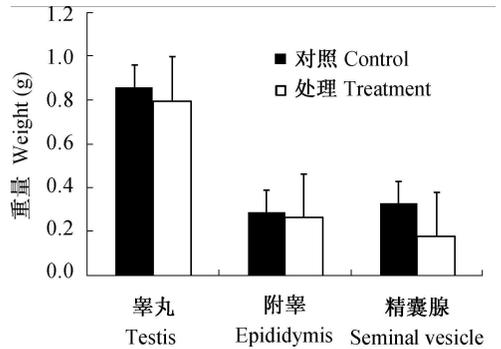


图 1 雄性长爪沙鼠生殖器官重量比较

Fig 1 The effect of EP-1 on *Mongolia gerbil's* reproductive organs

组精子的平均畸形率为  $(55.00 \pm 2.79)\%$ , 显著高于对照组的  $(32.00 \pm 2.36)\%$  ( $df = 16, P = 0.00 < 0.05$ )。可见, EP-1 可导致附睾内成熟精子的畸形。

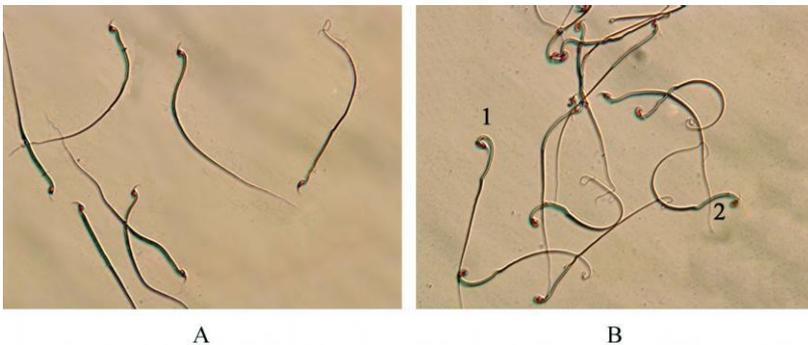


图 2 EP-1不育剂对雄性长爪沙鼠精子的作用 ( $\times 400$ )

Fig 2 The effect of EP-1 for the sperm of *Mongolia gerbil's* ( $\times 400$ )

注: A 对照组; B 处理组。1 精子头尾折叠; 2 精子头无钩。Note: A: Control group; B: treatment group; 1: Head folding with the tail; 2: head lacking in hook

### 2.2.3 睾丸组织形态变化

处理组的睾丸组织曲精小管管腔内,生精细胞排列紊乱且稀疏、圆形精子细胞或精母细胞异常脱落入管腔中央,导致管腔内精母细胞减少而出现空腔的现象(图3)。与对照组相比,处理组睾丸组织

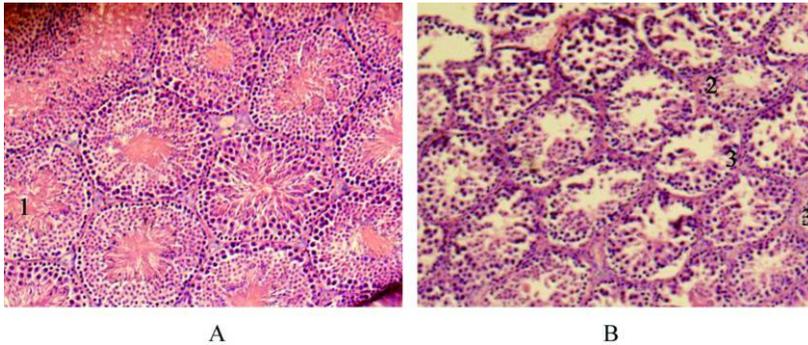


图3 EP-1不育剂对雄性长爪沙鼠睾丸组织形态的影响( $\times 200$ )

Fig 3 The morphology change of the testis tissue of male Mongolian gerbils using EP-1

注: A 对照组; B 处理组。1: 正常曲精小管管腔截面; 2: 曲精小管管腔直径变小, 各级生精细胞排列紊乱; 3: 曲精小管空腔严重。

Notes: A: Control group; B: treatment group. 1: Normal seminiferous tubules in the testis tissue; 2: the diameter of tubule becomes smaller and sperm atogenic cells at various levels distribute disorderly; 3: seminiferous tubules are badly hollow.

### 2.3 EP-1对长爪沙鼠行为的影响

饲喂1周后配对雌雄个体间仅表现为不同程度的嗅闻或打斗行为。经过频次记录和统计, 30 min内处理组雄鼠主动嗅闻雌鼠频次为  $7.6 \pm 1.88$  次, 显著低于对照组  $14.2 \pm 1.93$  次 ( $F = 0.156$ ,  $df = 18$ ,  $P = 0.025 < 0.05$ ); 而雌鼠主动嗅雄鼠频次对照组  $18.9 \pm 2.57$  次, 略高于处理组的  $14.8 \pm 3.18$  次, 二者差异不显著 ( $F = 0.003$ ,  $df = 18$ ,  $P = 0.329 > 0.05$ )。此外, 对照组打斗频次也略高于处理组, 二者差异不显著。这说明 EP-1 可导致试鼠交配欲望明显降低, 不同个体间打斗和攻击行为也减少。

### 2.4 EP-1对长爪沙鼠繁殖率的影响

配对繁殖试验中, 9只对照组中成功配对繁殖5只, 繁殖率为55.6%, 而8只处理组的成功繁殖对数为0, 繁殖率为0。Mann-Whitney U 检验表明:  $u = 0.015 < 0.05$ , 二者差异达到显著水平, 可见喂药1周后雌性长爪沙鼠40天内失去繁殖能力。

## 3 讨论

动物的繁殖活动与血清中促卵泡素(FSH)、促黄体素(LH)、促乳素(PRL)、雌二醇(E2)等激素含量密切相关。本试验结果表明, 试验组的鼠睾酮水平显著低于对照组, 而其它3项激素水平差异均不显著。睾酮是协同诱导雄鼠精子发育和成熟的重要

激素, 对雄鼠性腺的发育以及第2性征的维持有重要作用。它的异常分泌会导致精子发育异常, 也使雄鼠第2性征的维持和交配行为受到影响。雄性长爪沙鼠在摄入 EP-1 药饵1周后睾酮的分泌受到显著影响, 这与 FSH、LH、E2 等的分泌均有重要联系, 但三者变化均不明显, 因此, 该药物对雄性长爪沙鼠体内生殖激素分泌的影响还有待进一步验证。

本试验结果显示, EP-1 能够导致雌性长爪沙鼠生殖器官萎缩, 尤其对精囊腺的影响最为显著, 这与张知彬等<sup>[13]</sup>对雄性大仓鼠的研究结果基本一致。杨增明等<sup>[14]</sup>报道, 促乳素(PRL)能够促进成熟小鼠的精囊腺和前列腺的发育。因此, 研究药物导致精囊腺萎缩的激素调控机制时应该进一步关注雄鼠体内 PRL 的变化情况。精囊腺是分泌精液的重要器官, 对精子的成熟具有重要作用。精囊腺的萎缩可能与附睾内精子发育异常有关。

精子涂片和睾丸组织的切片显示 EP-1 导致了精子的发育异常, 这与 Sakamoto & Hashimoto<sup>[15]</sup>所报道的药物导致精子畸形基本相同; EP-1 对睾丸组织的破坏状况与杨筱珍等<sup>[16]</sup>报道己烯雌酚对成年仓鼠睾丸组织影响的结果也一致。

不育控制的优点一方面使不育个体在种群中继续占有领域、消耗资源、保持社群压力和降低种群恢复的速度; 另一方面由于竞争性繁殖干扰的作用,

激素, 对雄鼠性腺的发育以及第2性征的维持有重要作用。它的异常分泌会导致精子发育异常, 也使雄鼠第2性征的维持和交配行为受到影响。雄性长爪沙鼠在摄入 EP-1 药饵1周后睾酮的分泌受到显著影响, 这与 FSH、LH、E2 等的分泌均有重要联系, 但三者变化均不明显, 因此, 该药物对雄性长爪沙鼠体内生殖激素分泌的影响还有待进一步验证。

使正常个体不能参与繁殖<sup>[17]</sup>。摄药动物的繁殖行为和繁殖率可以直接反映出药效。本试验中饲喂 EP-1 药饵 1 周后, 给药组配对的雌雄个体间仅表现嗅闻或打斗行为, 雄鼠主动嗅闻雌鼠频次显著低于对照, 显然药物影响了雄鼠的繁殖行为。本试验在室内进行, 试鼠的生存环境与自然条件不同, 因此, 该药对行为表达的影响尚不能定论。此外, 本试验在喂药期间 (7 天) 和配对过程中 (40 天) 除了 2 对配对鼠因打斗意外死亡外无死亡现象, 说明药物在该浓度下无致死效果, 而且起到了控制繁殖的作用。

### 参 考 文 献 (References)

- [ 1 ] 张知彬. 鼠类不育控制的生态学基础. 兽类学报, 1995 15 (3): 229- 234
- [ 2 ] Knippling E F, McGuire J U. Potential role of sterilisation for suppressing rat populations: A theoretical appraisal. Technical Bulletin, Agriculture Research Service, US Department of Agriculture, 1972, 1455: 1- 27
- [ 3 ] 张知彬, 廖力夫, 王淑卿, 等. 一种复方避孕药物对三种野鼠的不育效果. 动物学报, 2004, 50(3): 341- 347
- [ 4 ] 张知彬, 赵美蓉, 曹小平, 等. 复方避孕药物 (EP- 1) 对雄性大仓鼠繁殖器官的影响. 兽类学报, 2006, 26(3): 300- 302
- [ 5 ] 宛新荣, 石岩生, 宝祥, 等. EP-1 不育剂对黑线毛足鼠种群繁殖的影响. 兽类学报, 2006, 26(4): 392- 397
- [ 6 ] 霍秀芳, 王登, 梁红春, 等. 两种不育剂对长爪沙鼠的作用. 草地学报, 2006 14(2): 184- 187
- [ 7 ] 霍秀芳, 施大钊, 王登. 左炔诺孕酮- 炔雌醚对长爪沙鼠的不育效果. 植物保护学报, 2007 34(3): 321- 325
- [ 8 ] Zhao M R, Liu M, Li D, et al. Anti-fertility effect of levonorgestrel and quinestrol in Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*). Integrative Zoology, 2007, 2: 260- 268
- [ 9 ] 尹伯元. 放射免疫测定基础. 天津: 天津科学技术出版社, 1985
- [ 10 ] L X H, Shi D Z. Variations of serum estradiol and progesterone levels during consecutive reproductive states in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). Experimental Animals, 2010 59(2): 231- 237
- [ 11 ] 房继明. 观察箱内成年雄性布氏田鼠间的行为和行为序. 北京师范大学学报 (自然科学版), 1994 30(3): 420- 426
- [ 12 ] 张健旭, 张知彬, 王祖望. 大仓鼠在繁殖期的行为关系及交配行为. 兽类学报, 1999 19(2): 132- 142
- [ 13 ] 张知彬, 张健旭, 王福生, 等. 不育和“灭杀”对围栏内大仓鼠种群繁殖力和数量的影响. 动物学报, 2001, 47(3): 241- 248
- [ 14 ] 杨增明, 孙青原, 夏国良. 生殖生物学. 北京: 科学出版社, 2005: 130- 131
- [ 15 ] Sakamoto J, Hashimoto K. Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice- effects on fertility and sperm morphology. Archives of Toxicology, 1986 59: 201- 205
- [ 16 ] 杨筱珍, 陈耀星, 王子旭. 己烯雌酚对成年仓鼠睾丸生精的影响. 中国农业科学, 2005, 38(11): 2339- 2343
- [ 17 ] Shi D Z, Wan X R, Davis S A, et al. Simulation of lethal control and fertility control in a demographic model for Brandt's vole *Microtus brandtii*. Journal of Applied Ecology, 2002, 39 (2): 337- 348