

氟戊菊酯宫内暴露对雄性仔鼠雄性特征的影响

杨旸, 李晓凤, 周义军

摘要: [目的] 了解氟戊菊酯宫内暴露对雄性仔鼠雄性特征的影响。[方法] 选用 SD 妊娠大鼠 20 只, 随机分为 4 组, 分别给予 0、2、10、50 mg/kg 氟戊菊酯, 于妊娠第 12~18 天进行灌胃染毒, 仔鼠出生后第 13 天每组随机抽取 35 只雄性仔鼠观察乳头保留情况。仔鼠断乳后进行窝标准化, 每组随机保留 25 只雄性仔鼠, 并于出生第 35 天处死取材, 制备睾丸匀浆, 应用比色法测定睾丸组织一氧化氮(nitric oxide, NO)及一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)水平。[结果] 雄性仔鼠出生第 13 天, 2 mg/kg 和 10 mg/kg 染毒组与空白对照组比较, 乳头保留数差异无统计学意义($P>0.05$), 而 50 mg/kg 染毒组乳头保留数明显高于空白对照组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。与空白对照组相比, 2 mg/kg 染毒组 NOS 活性无明显改变($P>0.05$), 10 mg/kg 和 50 mg/kg 染毒组 NOS 活性明显升高, 差异有统计学意义($P<0.05$)。各染毒组 NO 含量与空白对照组相比, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。[结论] 氟戊菊酯宫内暴露对雄性仔鼠雄性特征有明显的类雌激素效应。

关键词: 氟戊菊酯; 大鼠; 妊娠; 乳头保留; 一氧化氮合酶

Effects of Intrauterine Fenvalerate Exposure on the Male Characteristics of Offspring Rats YANG Yang¹, LI Xiao-feng¹, ZHOU Yi-jun² (School of Public Health, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China). Address correspondence to ZHOU Yi-jun, E-mail: zhouyj@shsmu.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To investigate the effect of intrauterine fenvalerate exposure on the male characteristics of offspring rats. [Methods] Twenty pregnant SD rats were randomly divided into 4 groups, and intragastrically administrated with 0, 2, 10 and 50 mg/kg of fenvalerate respectively from gestation day 12 to 18. The number of nipple retention was observed of 35 male offspring rats randomly selected from each group on postnatal day 13. And 25 male offspring rats were randomly kept after ablactation in each group and killed on postnatal day 35 to prepare testicular homogenate. The level of nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) in testicles were measured. [Results] Compared with the control group, the number of retained nipples was significantly increased in 50 mg/kg group ($P<0.05$), but not in 2 and 10 mg/kg groups ($P>0.05$); the activity of NOS was significantly increased in 10 and 50 mg/kg groups ($P<0.05$), but not in 2 mg/kg group ($P>0.05$). There was no significant difference in the level of NO between the exposed groups and the control group ($P>0.05$). [Conclusion] The intrauterine fenvalerate exposure exhibited obvious estrogenic effects on the male characteristics of offspring rats.

Key Words: fenvalerate; rat; gestation; nipple retention; nitric oxide synthase

氟戊菊酯(fenvalerate, Fen)为Ⅱ型拟除虫菊酯类农药, 同时也被认为是一类扰乱内分泌系统的环境雌激素^[1]。近年来人们越来越关注其对人类的生殖危害, 研究 Fen 对雄性生殖的影响则成为热点。目前国内研究以 Fen 对雄性生殖内分泌、精子运动能力影响等为主^[2-3], 有关 Fen 宫内暴露对雄性仔鼠雄性特征影响的报告很少。本研究旨在通过对妊娠期大鼠进行染毒, 观察 Fen 对其雄性仔代乳头保留数、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)及一氧化氮(nitric oxide, NO)水平的变化, 探索 Fen 宫内暴露对仔代雄性特征的影响, 为人类生殖健

康安全提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养条件

1.1.1 动物 清洁级纯种健康成年妊娠 SD 大鼠 20 只, 源自中科院上海生命科学研究院动物研究中心。动物生产许可证号 SCXK(沪)2007-0005, 动物使用许可证号 SYXK(沪)2008-0050。20 只孕鼠由上海交通大学医学院动物实验中心提供。

1.1.2 饲养条件 室温(23 ± 2)℃, 湿度(60 ± 10)%, 采用 8:00—17:00 亮灯的明暗循环法。

1.2 实验方法

20 只受孕 SD 大鼠, 按体重单随机分为 4 组, 每组 5 只, 其中 1 组为空白对照组, 其余 3 组为染毒组。染毒组于妊娠第 12~18 天分别给予 2、10、50 mg/kg Fen 进行灌胃染毒, 以玉米油作为溶剂, 1 次/d, 空白对照组予玉米油灌胃。仔鼠出生后

[基金项目] 国家大学生创新性实验计划(编号: 091024858); 上海交通大学医学院基金(编号: 2008XJ006)

[作者简介] 杨旸(1989—), 女, 本科生, 研究方向: 预防医学; E-mail: yangyang198921@sina.com

[通信作者] 周义军讲师, E-mail: zhouyj@shsmu.edu.cn

[作者单位] 上海交通大学医学院公共卫生学院, 上海 200025

3 周断奶分笼, 喂繁育饲料饲养至出生后 35 d (PND35) 处死。

1.3 仪器与试剂

1.3.1 仪器 T6 S 型紫外分光光度计 (北京普析通用分析仪器有限公司), Pro 200 匀浆机、低温高速离心机、恒温水浴锅及微量取样器 (美国 Oxford 公司)。

1.3.2 试剂 99.0% 氰戊菊酯、99.6% 玉米油、考马斯亮蓝总蛋白 (Sigma-Aldrich 公司); NO、NOS 测定试剂盒 (南京建成科技有限公司)。

1.4 检测指标

1.4.1 母鼠及仔鼠基本情况 观察母鼠活动度、精神状况、饮食饮水状况; 观察仔鼠出生情况: 出生时数量、体重、有无畸形或死胎。

1.4.2 乳头保留数 仔鼠出生后第 13 天, 每组按体重随机抽取 35 只雄性仔鼠, 观察雄性仔鼠乳头保留数。

1.4.3 NO 及 NOS 水平 仔鼠断乳后 (PND21) 进行窝标准化, 每窝按体重单纯随机抽样保留 5 只雄性仔鼠, 并于出生后 35 d 处死制备睾丸匀浆: 取左侧睾丸与 0.01 mol/L Tris-缓冲溶液 (pH7.4) 按 1:9 进行匀浆后离心, 取上清液保存待用; 按照 NO 及 NOS 试剂盒说明书测定及计算。

1.5 统计学分析

结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 11.5 统计软件对数据进行方差分析, 染毒组与空白对照组用 Dunnett *t* 法进行比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 母鼠及仔鼠基本情况

各组母鼠活动度、精神状况、饮食饮水状况均正常, 染毒组未观察到明显毒性反应。各组仔鼠出生数量、体质量均无异常, 无畸形或死胎。

2.2 氰戊菊酯暴露对雄性仔鼠乳头保留数的影响

由表 1 可见, 各组仔鼠乳头保留数差异有统计学意义 ($P=0.012$)。与空白对照组比较, 2 mg/kg 和 10 mg/kg 氰戊菊酯染毒组雄性仔鼠在出生后第 13 天乳头保留数差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但 50 mg/kg 染毒组雄性仔鼠的乳头保留数较空白对照组明显增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 1 氰戊菊酯暴露对雄性仔鼠乳头保留数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=35$)

Table 2 Effects of fenvalerate on the nipple retention of male offspring rats

剂量 Dose (mg/kg)	乳头保留数 Nipple numbers	<i>F</i>	<i>P</i>
0	3.94 $\pm$ 1.96	3.812	0.012
2	4.06 $\pm$ 2.35		
10	4.34 $\pm$ 2.02		
50	5.49 $\pm$ 2.19*		

[注]*: 与空白对照组比较 (Compared with the blank control group), $P<0.05$ 。

2.3 氰戊菊酯暴露对雄性仔鼠睾丸组织 NOS 及 NO 水平的影响

由表 2 可见, 各组睾丸 NOS 活性差异有统计学意义 ($P=0.017$)。2 mg/kg 氰戊菊酯染毒组睾丸 NOS 活性与空白对照组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但 10、50 mg/kg 染毒组

NOS 活性与空白对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。各剂量染毒组雄性仔鼠睾丸 NO 含量与空白对照组相比, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 氰戊菊酯暴露对雄性仔鼠睾丸组织 NOS 及 NO 水平的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=25$)

Table 3 Effects of fenvalerate on the testicular NOS and NO of male offspring rats

剂量 Dose (mg/kg)	一氧化氮合酶 NOS (U/mg pro)	<i>F</i>	<i>P</i>	一氧化氮 NO (μ mol/g pro)	<i>F</i>	<i>P</i>
0	10.48 $\pm$ 1.28	3.546	0.017	15.55 $\pm$ 3.54	1.615	0.191
2	11.05 $\pm$ 1.69			17.29 $\pm$ 3.70		
10	12.00 $\pm$ 1.67*			17.38 $\pm$ 3.23		
50	11.49 $\pm$ 2.12*			17.47 $\pm$ 3.94		

[注]*: 与空白对照组比较 (Compared with the blank control group), $P<0.05$ 。

3 讨论

许多研究显示, Fen 具有明显的雌激素样活性作用, 主要在精子生成以及成熟精子运动和速度方面影响雄性动物生殖功能, 导致大鼠生殖能力丧失或下降^[2-4]; Fen 能够通过胎盘转运, 诱发雄性仔代生殖发育异常, 对其第二性征表型产生影响, 如雄性肛殖距离缩短^[5], 但尚无有关 Fen 诱发雄性仔代乳头保留数的报告。

乳头/乳晕保留是评价雄性动物雌性化的指标之一, 睾酮是雄性动物保持雄性特征所依赖的重要雄性激素^[6], 不仅在生殖系统发育中发挥重要作用, 在胎儿的性分化中也扮演了重要角色。双氢睾酮 (dihydrotestosterone, DHT) 是控制和调节雄性动物乳头/乳晕退化过程的雄性激素, 是由睾酮与 5 α 转化酶反应后生成, DHT 水平改变会造成乳头/乳晕残留。因此有研究将此作为内分泌干扰物的毒效应观察指标, 称其为“DHT 作用效应的终点”, 是评价雄性动物生殖系统异常的敏感指标^[7-8]。

本实验结果显示, 2、10 mg/kg 染毒组雄性仔鼠乳头数在出生后第 13 天与对照组差异无统计学意义, 但 50 mg/kg 染毒组与对照组的差异有统计学意义, 提示在 50 mg/kg 剂量下, Fen 对雄性仔代生殖系统具有明显的拟雌激素活性效应。研究发现, 抗雄性激素可使得出生 13 d 的雄性仔鼠的乳头/乳晕保留数增加, 研究者还观察到在睾酮依赖组织畸形的动物中有 10~12 个乳头几乎完全雌性化表型^[9]。因此推测, Fen 对雄性仔鼠产生的拟雌激素活性的内分泌毒性可能与抗雄性激素内分泌毒性有同工异曲之用, 也许与两者都通过影响支持细胞功能来干扰下丘脑-垂体-性腺环路调节途径而实现扰乱内分泌功能有关, 从而达到抗雄性激素样作用^[2-4, 9]。

本实验没有发现雄性仔鼠生殖器官的结构畸形, 可能与选择 Fen 宫内暴露时间有关。因为在睾酮生成的 14~17 d^[10] 孕体器官已基本形成, Fen 对胎体的毒性主要是免疫、中枢神经系统、生殖器官的功能影响, 而在仔鼠出生 2 周后, 高剂量组雄性仔鼠显现出雌性化表型, 即乳头数量明显增加, 显然与发育毒性的母体剂量作用有关, 影响了睾酮与雄激素受体结合, 使雄性生物学功能受到干扰^[5, 11], 但雄性仔鼠乳头数并没有达到完全雌性化表现, 可能是通过母体胎盘转运机制的过滤降低了

Fen 浓度, 对胎鼠的性发育不足以造成严重威胁。

研究显示^[12-13], NO 和 NOS 在雄性生殖系统中起着十分重要的调节作用, 并参与下丘脑-垂体-性腺轴及睾酮分泌的调节。NO 是一种生物信息分子, 广泛参与体内病理、生理过程, 参与调节睾丸微循环, 阴茎勃起、前列腺等功能。NOS 以 3 种形式分布于睾丸间质细胞、支持细胞和生精细胞, 对生殖的调节作用具有双重性, 通过还原型辅酶 II 催化精氨酸分解成 NO 及瓜氨酸, NOS 的活性直接影响 NO 的生成^[14]。

NO 与睾酮的分泌密切相关, 表现在睾丸间质细胞内 NOS 的阳性表达, NOS 抑制剂能明显升高血清睾酮水平, NO 类药物则能抑制睾酮分泌, 睾丸 NOS 的活性增强与生精细胞凋亡增加有关^[12]。本实验结果显示, 35 d 仔鼠睾丸 NOS 活性明显增强, 与前期实验睾丸称重降低相一致, 提示睾丸是 Fen 对雄性仔鼠性特征作用的重要靶器官^[15-16]。本实验结果显示, NO 活性与空白对照组差异无统计学意义, 可能与前期实验染毒组血清睾酮和睾丸匀浆睾酮含量没有明显差异有关^[15-16]。近年来对胎儿睾丸发育影响的研究也发现^[17], Fen 宫内暴露的孕鼠, 其雄性仔代睾丸及附睾明显缩小, 成年后, 其睾丸细精管成熟度降低, 精子数量亦明显减少。Fen 宫内暴露对雄性仔鼠的生殖系统造成损害, 高浓度 Fen 对 2 周龄雄性仔鼠乳头保留数的雌性化毒性效应明显, NOS 活性的增强对睾丸损害具有较久远的影响。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] 胡春荣. 拟除虫菊酯农药的毒性研究进展[J]. 毒理学杂志, 2005, 19(3): 239-241.
- [2] 宋玲, 王玉邦, 孙宏, 等. 氰戊菊酯体外对大鼠精子运动能力的影响[J]. 中华男性科学杂志, 2007, 13(7): 588-591.
- [3] 龚伟, 张习春, 高蓉, 等. 氰戊菊酯对小鼠体外获能的影响及机制探讨[J]. 环境与职业医学, 2004, 21(2): 84-87.
- [4] 姚克文, 王介东. 氰戊菊酯对大鼠精子及生殖激素的影响[J]. 生殖医学杂志, 2008, 17(1): 58-61.
- [5] MONIZ AC, CRUZ-CASALLAS PE, OLIVEIRA CA, et al. Perinatal fenvalerate exposure: behavioral and endocrinology changes in male rats[J]. Neurotoxicol Teratol, 1999, 21(5): 611-618.
- [6] HESS RA, BUNICK D, LEE KH, et al. A role for oestrogens in the male reproductive system[J]. Nature, 1997, 390(6659): 509-512.
- [7] 常兵. 内分泌干扰物生殖发育毒性评价[J]. 中华预防医学杂志, 2005, 39(5): 364-367.
- [8] MCINTYRE BS, BARLOW NJ, FOSTER PM. Male rats exposed to linuron in utero exhibit permanent changes in anogenital distance, nipple retention, and epididymal malformations that result in subsequent testicular atrophy[J]. Toxicol Sci, 2002, 65(1): 62-70.
- [9] GRAY LE JR, OSTBY J, FURR J, et al. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat[J]. Toxicol Sci, 2000, 58(2): 350-365.
- [10] 克莱艾森·卡萨瑞特·道尔. 毒理学: 毒物的基础科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [11] 朱威, 朱心强. 农药的抗雄激素作用及其机制[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2005, 32(1): 14-19.
- [12] 贺鹏, 杨彦玲. 一氧化氮和一氧化氮合酶对雄性生殖系统的影响[J]. 延安大学学报, 2008, 6(2): 13-15.
- [13] 陈礼强, 郑凯迪. 一氧化氮合酶与动物生殖[J]. 饲料工业, 2006, 27(10): 22-24.
- [14] 汪涛, 刘宇, 黄群山, 等. 一氧化氮对动物生殖机能的影响[J]. 动物医学进展, 2006, 27(2): 27-30.
- [15] 李晓凤, 杨咏, 周义军. 妊娠期氰戊菊酯暴露对雄性仔鼠睾丸标志酶的影响[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2011, 31(8): 1117-1120.
- [16] 周义军, 李晓凤, 梁辰, 等. 氰戊菊酯宫内暴露对雄性仔鼠性分化的影响[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2010, 30(8): 879-882.
- [17] ZHANG H, WANG H, JI YL, et al. Maternal fenvalerate exposure during pregnancy persistently impairs testicular development and spermatogenesis in male offspring[J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(5): 1160-1169.

(收稿日期: 2012-01-01)

(英文编审: 薛寿征; 编辑: 张晶; 校对: 葛宏妍)

【精彩预告】

上海市 15 岁以上居民高血压流行现状

程旻娜, 徐继英, 姚海宏, 等

为了解上海市 15 岁以上居民高血压流行现状。研究人员于 2010 年 8—9 月采用多阶段分层概率随机抽样的方法, 对 15 808 名常住居民进行问卷调查和血压测量, 最终获得有效问卷 15 732 份。结果显示, 通过人口加权, 调查人群平均收缩压和平均舒张压分别为 129.05 mmHg (95%CI: 128.47~129.63 mmHg)、79.71 mmHg (95%CI: 79.44~79.99 mmHg)。高血压患病率为 30.15% (95%CI: 29.79%~32.54%), 疾病知晓率为 74.19% (95%CI: 71.93%~76.33%), 治疗率为 59.95% (95%CI: 57.58%~62.28%), 控制率为 30.59% (95%CI: 28.32%~32.96%)。知晓率、治疗率和控制率在中心城区高于非中心城区, 女性高于男性, 差别均有统计学意义 ($P < 0.01$)。由此可见, 上海市居民平均血压偏高, 患病情况严重。知晓率水平较高, 治疗率、控制率水平需进一步提升。

此文将于近期刊出, 敬请关注!