

砷染毒对大鼠雌激素及其受体的影响

郑冲, 张人华

摘要: [目的] 探讨砷染毒对大鼠雌激素及其受体的影响和雌激素受体(ER)信号通路指标间的关系。[方法] 以雌性SD大鼠为实验动物, 随机分成4组, 每组6只。用亚砷酸钠灌胃染毒。分别为: 对照组、低砷组(0.625 mg/kg)、中砷组(2.500 mg/kg)、高砷组(10.000 mg/kg)。每天1次灌胃染毒, 连续3个月。染毒结束用酶联免疫吸附法测定大鼠血清中卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E2)及ER的水平。[结果] 对照组、低砷组、中砷组、高砷组FSH表达水平分别为: (26.05±2.10)、(18.23±1.58)、(10.22±1.58)、(2.07±0.79) IU/L; LH表达水平分别为: (39.43±1.65)、(10.33±2.08)、(1.95±0.29)、(0.60±0.23) IU/L; E2表达水平分别为: (54.92±5.14)、(40.68±3.01)、(9.20±1.92)、(9.03±1.02) ng/L; ER表达水平分别为: (41.06±2.14)、(24.32±2.21)、(22.16±3.16)、(9.06±2.06) ng/L。随着砷染毒剂量的增高, FSH、LH表达逐渐降低($P<0.01$); 除E2在砷中、高染毒剂量(2.500、10.000 mg/kg), ER在砷低、中染毒剂量(0.625、2.500 mg/kg)的表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)外, 其余剂量间表达差异均有统计学意义($P<0.01$)。尿砷与FSH、LH、E2、ER间存在剂量-效应关系, 砷、尿砷与FSH、LH、E2、ER均为负相关关系($P<0.05$); ER信号通路指标间FSH、LH与E2, E2与ER间均为正相关关系($P<0.05$)。[结论] 雌激素及其受体参与了砷暴露致大鼠生殖系统的损伤, 砷抑制ER通路各指标的表达, 砷很可能是内分泌干扰物。

关键词: 砷; ER信号通路; 雌激素; 受体; 内分泌干扰物

Effects of Arsenic on Estrogen and Its Receptor in Rats ZHENG Chong, ZHANG Ren-hua (Department of Public Health Monitoring, Guizhou Center for Disease Control and Prevention, Guiyang, Guizhou 550004, China). Address correspondence to ZHANG Ren-hua, E-mail: zhangrenhua0085@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To examine the effects of arsenic on estrogen and its receptor as well as the relationships among the indicators of estrogen receptor (ER) signaling pathway in rats. [Methods] Female SD rats were divided into four groups with six rats each and were exposed to NaAsO₂ (0, 0.625, 2.500, and 10.000 mg/kg) by oral perfusion, once a day, for three consecutive months respectively. The concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E2), and ER in serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. [Results] The levels of FSH in the control, low arsenic, middle arsenic, and high arsenic groups were (26.05±2.10), (18.23±1.58), (10.22±1.58), and (2.07±0.79) IU/L, respectively; the levels of LH were (39.43±1.65), (10.33±2.08), (1.95±0.29), and (0.60±0.23) IU/L, respectively; the levels of E2 were (54.92±5.14), (40.68±3.01), (9.20±1.92), and (9.03±1.02) ng/L, respectively; the levels of ER were (41.06±2.14), (24.32±2.21), (22.16±3.16), and (9.06±2.06) ng/L, respectively. With the increasing of arsenic, the expression levels of FSH and LH gradually decreased ($P<0.01$). The expression levels of E2 and ER were of significant differences between groups treated with different doses of arsenic ($P<0.01$) except the E2 in the middle and high arsenic groups (2.500, 10.000 mg/kg) and the ER in the low and middle arsenic groups (0.625, 2.500 mg/kg). There were dose-effect relationships of arsenic exposure with FSH, LH, E2, and ER. Arsenic and urinary arsenic were negatively associated with FSH, LH, E2, and ER ($P<0.05$). E2 was positively associated with FSH, LH, and ER ($P<0.05$). [Conclusion] Estrogen and its receptor participate in the process of reproductive system damage caused by arsenic. The expression levels of the ER pathway indicators are inhibited by arsenic. Therefore, arsenic is probably an endocrine disrupting chemical.

Key Words: arsenic; estrogen receptor signaling pathway; estrogen; receptor; endocrine disruptor

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.15305

[基金项目] 贵州省疾病预防控制中心青年技术基金(编号: 2014-E1-5青)

[作者简介] 郑冲(1986—), 男, 硕士生, 主管医师; 研究方向: 砷中毒; E-mail: 602429453@qq.com

[通信作者] 张人华, E-mail: zhangrenhua0085@163.com

[作者单位] 贵州省疾病预防控制中心卫生监测检验所, 贵州 贵阳 550004

雌激素受体(estrogen receptor, ER)是配体依赖的转录调节因子,当与雌激素结合而活化时,能影响多种有关调控细胞周期与细胞分裂及分化的基因表达,是调节雌激素对靶器官发挥效应的唯一调节因子,对雌性动物的生殖起着至关重要的作用^[1]。Kaltreider^[2]发现慢性砷暴露能够引起血清中雌激素、孕酮的改变,国内研究者通过观察慢性砷中毒大鼠动情周期的变化,初步证实砷具有内分泌干扰作用,能够引起雌激素、孕酮的改变^[3]。同时夏雅娟等^[4]也观察到砷能够通过作用于ER mRNA的表达而对生殖系统产生损伤。而砷与ER、各类雌激素之间关系如何,砷的具体作用模式如何,目前尚无此类研究报道。因此本研究通过动物染毒试验初步探讨砷染毒对大鼠雌激素及其受体的影响,以及ER信号通路指标间的关系,为地方性砷中毒预防提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组及染毒

清洁级SD(Sprague Dawley)雌性大鼠24只,8周龄,体重(108.35 ± 9.42)g[许可证号:SCXK(黔)2012-0001],随机分成4组,每组6只。用亚砷酸钠(NaAsO_2)灌胃染毒。实验所用 NaAsO_2 半数致死量(LD_{50})为30 mg/kg,通过预实验确定以 $1/3 LD_{50}$ 作为高剂量,以4倍间距往下类推。分别为:对照组、低砷组(0.625 mg/kg)、中砷组(2.500 mg/kg)、高砷组(10.000 mg/kg)按上述分组,每天1次灌胃染毒。大鼠自由摄取饲料,自由饮水,自动控制昼夜循环(12h/12h),室温(22 ± 1)℃,每周调换笼位1次。每周称重1次,调节并维持给药量,连续灌胃染毒3个月。

1.2 指标分析

1.2.1 暴露指标 大鼠处死前收集24 h尿液。每份尿样随即分成2部分:第1部分以1 mL尿样加10 μL 浓盐酸,使其pH值小于2,用于测定尿砷;第2部分不处理,用于测定尿肌酐(urinary creatinine, UCr)。尿砷测定采用氢化物发生-电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICAPQ, Thermo公司,美国),UCr测定采用碱性苦味酸法。尿砷用UCr校正。

1.2.2 效应指标 大鼠处死前腹腔注射0.9%戊巴比妥钠麻醉后心脏采集血样。非抗凝血离心分离血清,采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E2)和ER含量。

1.3 统计学分析

SPSS 18.0统计软件进行方差分析、相关、偏相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。尿砷量呈偏态分布,故用几何均数GM表示。用S-PLUS2000软件进行剂量-效应关系分析。

2 结果

2.1 尿砷浓度变化

各剂量组尿砷水平变化见表1。可见以每g肌酐(Cr)计的尿砷量随砷染毒剂量的增加而升高,4组间比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。砷染毒剂量与尿砷量之间为正相关关系($P<0.01$)

表1 各剂量组大鼠尿砷的变化

Table 1 Results of UAs in every dose group

组别 Group	砷染毒 剂量 (mg/kg)	例数 (n)	尿砷(UAs, mg/kg)		相关系数r Correlation coefficient	P
			中位数 GM	最小值~最大值 Min~Max		
对照组(Control)	0.000	6	22.31	19.60~36.40	0.936	0.000
低砷组(As_{low})	0.625	6	47.19*	72.23~103.71		
中砷组($\text{As}_{\text{middle}}$)	2.500	6	155.22**	118.88~222.92		
高砷组(As_{high})	10.000	6	229.10***	375.71~528.36		

[注]*: 与对照组相比, $P<0.01$ 。*: 与低砷组相比, $P<0.01$ 。▲: 与中砷组相比, $P<0.01$ 。

[Note]*: Compared with the control group, $P<0.01$. *: Compared with the low As group, $P<0.01$. ▲: Compared with the middle As group, $P<0.01$.

2.2 砷对FSH、LH、E2、ER表达水平的影响

表2可见,随着砷剂量的增高,FSH、LH表达逐渐降低($P<0.01$)。随着砷剂量的增高,除E2在中、高砷剂量(2.500、10.000 mg/kg)间,ER在低、中砷剂量(0.625、2.500 mg/kg)间降低不明显($P>0.05$);其余均随着砷剂量升高表达明显降低($P<0.01$)。

表2 各剂量组大鼠FSH、LH、E2、ER含量变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Results of FSH, LH, E2, and ER in every dose group

组别(Group)	例数(n)	FSH(IU/L)	LH(IU/L)	E2(ng/L)	ER(ng/L)
对照组(Control)	6	26.05 ± 2.10	39.43 ± 1.65	54.92 ± 5.14	41.06 ± 2.14
低砷组(As_{low})	6	$18.23 \pm 1.58^*$	$10.33 \pm 2.08^*$	$40.68 \pm 3.01^*$	$24.32 \pm 2.21^*$
中砷组($\text{As}_{\text{middle}}$)	6	$10.22 \pm 1.58^{**}$	$1.95 \pm 0.29^{**}$	$9.20 \pm 1.92^{**}$	$22.16 \pm 3.16^*$
高砷组(As_{high})	6	$2.07 \pm 0.79^{***}$	$0.60 \pm 0.23^{***}$	$9.03 \pm 1.02^{**}$	$9.06 \pm 2.06^{***}$

[注]*: 与对照组相比, $P<0.01$ 。*: 与低砷组相比, $P<0.01$ 。▲: 与中砷组相比, $P<0.01$ 。

[Note]*: Compared with the control group, $P<0.01$. *: Compared with the low As group, $P<0.01$. ▲: Compared with the middle As group, $P<0.01$.

2.3 尿砷与 FSH、LH、E2、ER 的剂量-效应关系分析

从图 1 可见, FSH 的二维效应指标呈明显的单一直线下降趋势, 剂量效应类型为直线型。LH、E2 效应类型相似: 当尿砷在 0~150 mg/g 范围, 随着尿砷量增加, 其效应迅速下降; 而尿砷大于 150 mg/g, 随着尿砷量增加, 其效应下降不明显, 出现平台剂量效应。ER 效应类型类似于 S 型剂量效应: 尿砷在 0~50 mg/g 范围, 其效应迅速下降; 尿砷在 50~150 mg/g 范围, 其效应下降不明显, 出现平台效应; 尿砷大于 150 mg/g, 其效应迅速下降。尿砷与 FSH、LH、E2、ER 间存在剂量-效应关系。

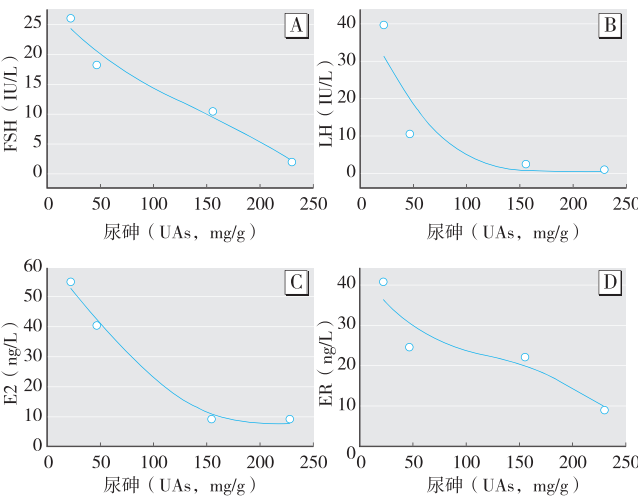


图 1 大鼠尿砷剂量与 FSH、LH、E2、ER 的剂量-效应关系
Figure 1 The dose-effect relationship of UAs with FSH, LH, E2, and ER in serum of rats

2.4 砷、尿砷与 FSH、LH、E2、ER 的偏相关分析

从表 3 可见, 砷、尿砷剂量与 FSH、LH、E2、ER 水平均为负相关关系 ($P<0.05$)。

表 3 各变量间的偏相关关系				
Table 3 Partial correlation analysis between variables				
变量 1 Variable 1	变量 2 Variable 2	偏相关系数 Partial correlation coefficient	P	
砷 (As)	FSH	-0.466	0.017	
	LH	-0.357	0.037	
	E2	-0.417	0.035	
	ER	-0.504	0.041	
尿砷 (UAs)	FSH	-0.426	0.043	
	LH	-0.389	0.041	
	E2	-0.434	0.039	
	ER	-0.534	0.042	

2.5 ER 信号通路指标间的偏相关分析

从表 4 可以看出, FSH、LH 与 E2, E2 与 ER 间,

各物质水平均为正相关关系 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

表 4 信号通路指标间的偏相关分析
Table 4 Partial correlation analysis between indicators of signaling pathways

变量 (1) Variable 1	变量 (2) Variable 2	偏相关系数 Partial correlation coefficient	P
LH	E2	0.617	0.000
FSH	E2	0.439	0.039
E2	ER	0.590	0.009

3 讨论

ER 是配体依赖的转录调节因子, 是调节雌激素对靶器官发挥效应的唯一调节因子, 介导大部分的雌激素反应, 对生殖系统的生长、发育及损伤具有重要的调控作用^[5]。ER 广泛分布于雌性生殖器官(卵巢、子宫、乳腺等)的组织细胞中。ER 的表达受下丘脑-垂体前叶和卵巢分泌的激素进行调节(即下丘脑-垂体-卵巢轴)^[6-7]。FSH、LH 是由垂体前叶碱性细胞分泌的单链多肽糖蛋白, 是调节卵巢发育, 雌、孕激素分泌, 排卵等一系列雌性生理过程的肽类激素。FSH、LH 作用于卵巢颗粒细胞, 激活芳香化酶, 使胆固醇转化为雄烯二酮和睾酮, 再转化为 E2。E2 与靶细胞核内的 ER 结合后, ER 发生构象变化在靶基因雌激素反应元件(ERE)处形成二聚体^[8], 然后与靶基因启动子内的 ERE 结合, 激活其下游基因转录, 对雌性动物的生殖发挥调控作用。

本研究结果可知, FSH、LH、E2、ER 表达量随着砷、尿砷剂量的增加逐渐降低, 以高砷水平时最为明显, 存在明显的剂量-效应关系。砷对 FSH、LH、E2、ER 的效应均为负向作用。从砷、尿砷与 FSH、LH-E2-ER 通路各指标间的相关分析可知, 砷、尿砷与 FSH、LH、E2、ER 均为负相关关系, FSH、LH 与 E2, E2 与 ER 间均为正相关关系, 提示 FSH、LH-E2-ER 通路参与了砷暴露致大鼠生殖系统损伤的过程, 砷通过抑制 ER 通路各指标的表达导致生殖系统损伤。近年来实验研究发现, 砷很可能是环境雌激素类物质, 通过改变雌激素介导途径, 干扰基因表达而产生损伤效应^[9-13]。本研究以剂量-反应关系评价为基础, 探讨了 ER 信号通路与砷的生殖毒性间的关系, 初步揭示了 ER 在砷生殖毒性雌激素信号通路中的调控机制, 可为砷中毒所致生殖系统损伤的防治提供一定的理论依据。但本研究未从分子基因层面上探讨砷与 ER 基因及其 ER 通路中各细胞生殖因子间的关系, 尚有待于进一

步研究。

综上, FSH、LH-E2-ER通路参与了砷暴露致大鼠生殖系统的损伤, 砷抑制ER通路各指标的表达, 砷很可能是环境雌激素类物质。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] Lee HR, Kim TH, Choi KC. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER α and ER β , identified by estrogen receptor knockout mouse[J]. Lab Anim Res, 2012, 28(2): 71-76.
- [2] Kaltreider RC, Davis AM, Lariviere JP, et al. Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor[J]. Environ Health Perspect, 2001, 109(3): 245-251.
- [3] 郭宏宇, 郝光, 夏雅娟. 慢性砷暴露对雌鼠血清雌二醇、孕酮水平的影响[J]. 卫生研究, 2011, 40(1): 120-121.
- [4] 夏雅娟, 张峰. 慢性砷暴露对小鼠生殖器官ER α 、PRmRNA表达的影响[J]. 中国地方病学杂志, 2009, 20(28): 129-130.
- [5] 丁利军, 刘燕杰, 丁家桐. 小梅山猪发情周期生殖器官雌激素受体mRNA定位与相对定量研究[J]. 畜牧兽医学报, 2007, 38(8): 776-780.
- [6] 连艳, 杨鹰, 张琨琨, 等. 卵巢切除对大鼠子宫阴道雌激素受体亚型表达的影响[J]. 四川动物, 2008, 27(3): 378-381.
- [7] Weihua Z, Saji S, Mäkinen S. Estrogen receptor(ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(11): 5936-5941.
- [8] 金玲, 张晓红, 王建六, 等. 阴道前壁膨出患者阴道组织中雌激素受体 α 和 β 亚型的表达[J]. 中华妇产科杂志, 2007, 12(14): 18-20.
- [9] 饶婷, 张孝斌, 吴飞, 等. 雌激素对老年雌鼠阴道NOS及雌激素受体的影响[J]. 中国老年学杂志, 2009, 11(29): 2909-2911.
- [10] 夏雅娟, 旭日干, 刘东军. 砷的生殖发育毒性及雌激素效应研究进展[J]. 中国地方病杂志, 2010, 29(1): 112-115.
- [11] 夏雅娟, 郝光, 刘东军, 等. 慢性砷暴露对小鼠动情周期的影响[J]. 中国地方病防治杂志, 2009, 24(1): 16-17.
- [12] Davey JC, Bodwell JE, Gosse JA, et al. Arsenic as an endocrine disruptor: effects of arsenic on estrogen receptor-mediated gene expression in vivo and in cell culture[J]. Toxicol Sci, 2007, 98(1): 75-86.
- [13] 夏雅娟, 孟萌, 张峰, 等. 砷雌激素样效应及对HeLa细胞生长的影响[J]. 中国地方病学杂志, 2009, 28(1): 24-27.

(收稿日期: 2015-04-27)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 张晶, 丁瑾瑜; 校对: 王晓宇)

【告知栏】

沉痛悼念姚志麒教授

本刊资深学术顾问姚志麒教授于2016年1月30日逝世, 享年89岁。姚志麒教授生于1926年, 上海市人, 教授、研究生导师。姚志麒教授于1949年毕业于交通大学工学院, 1950年起在原上海医学院公共卫生科任教, 1991年底退休。曾兼任卫生部医药卫生重大科研成果评审委员会委员, 高等院校预防医学专业教材评审委员会(第1、2届)副主任委员、委员, 医院污水消毒处理咨询委员会副主任委员, 原中央爱卫会“国际饮水十年: 农村改水贷款项目”技术顾问, 上海市建委科技委员会环境专业委员会委员、美国麻萨诸塞大学访问学者。我们失去了一位著名的预防医学专家, 但他的业绩不朽, 精神永存!

沉痛悼念姚志麒教授!