

砷致雌性大鼠生殖系统损害的研究

郑冲, 张人华

摘要: [目的] 探讨砷致雌性大鼠生殖系统的损害作用。[方法] 以雌性SD大鼠为实验动物, 随机分成4组, 每组6只, 亚砷酸钠(NaAsO_2)染毒剂量: 对照组(0 mg/kg)、低砷组(0.36 mg/kg)、中砷组(1.44 mg/kg)、高砷组(5.77 mg/kg), 连续灌胃染毒3个月, 实验结束后检测大鼠尿砷(U_{As})、卵巢砷(O_{As})及大鼠血清中雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、血管内皮生长因子(VEGF)、细胞周期素D1(CYC-D₁)蛋白表达水平, 并观察卵巢病理学改变。[结果] (1)各砷染毒组ER、PR、VEGF、CYC-D₁均明显低于对照组($P < 0.01$), 且随着砷染毒剂量的增高, 表达水平逐渐降低。(2) U_{As} 、 O_{As} 与ER、PR、VEGF、CYC-D₁均呈负相关($P < 0.05$), ER与PR、VEGF、CYC-D₁间均呈正相关($P < 0.05$)。(3)光镜下, 中砷、高砷组大鼠卵巢HE染色可见卵泡闭锁或塌陷, 间质细胞大量增生呈铺石板状或梭状排列。[结论] ER-PR/VEGF/CYC-D₁信号通路可能参与砷暴露致雌性大鼠的生殖损害, 卵泡的减少、闭锁及间质细胞过度增生可能是砷中毒对大鼠卵巢损害的主要病理类型。

关键词: 砷; 生殖系统损害; 尿砷; 卵巢砷; 雌激素受体; 孕激素受体; 血管内皮生长因子; 细胞周期素D1

Reproductive Damage in Female Rats Exposed to Arsenic 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 reproductive damage induced by arsenic in female rats. [Methods] Female SD rats were randomly assigned into four groups with six rats each and exposed to sodium arsenite (NaAsO_2) (0, 0.36, 1.44, and 5.77 mg/kg for control and low, middle, and high dose arsenic groups) by oral perfusion for three months. Urinary arsenic (U_{As}), ovary arsenic (O_{As}), and serum estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), vascular endothelial growth factor (VEGF), and cyclin D1 (CYC-D₁) protein expression levels were determined. The pathological changes of ovary were also observed. [Results] (1) ER, PR, VEGF, and CYC-D₁ were lower in the exposed groups than those in the control group ($P < 0.01$) and decreased with higher doses of arsenic. (2) U_{As} and O_{As} were negatively associated with ER, PR, VEGF, and CYC-D₁ ($P < 0.05$); ER was positively associated with PR, VEGF, and CYC-D₁ ($P < 0.05$). (3) Under HE staining and light microscope, follicular atresia and collapse were observed in the ovary of rats treated with middle or high dose arsenic, and large amounts of stromal cells were arranged in a stone-like or spindle-like form. [Conclusion] ER-PR/VEGF/CYC-D₁ pathways may participate in the reproductive damage caused by arsenic exposure. Follicular atresia and collapse and stromal cell hyperplasia are major pathological changes.

Key Words: arsenic; reproductive damage; urinary arsenic; ovary arsenic; estrogen receptor; progesterone receptor; vascular endothelial growth factor; cyclin D1

地方性砷中毒是严重危害人类健康的疾病之一。我国贵州砷中毒病区人群自然流产率、低体重儿出生率及胎儿先天畸形率均较高^[1-3]。本课题组前期动物实验发现^[4], 砷作为环境雌激素类物质, 可能通过卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素-雌二醇-雌激素

受体(LH-E2-ER)通路参与雌性大鼠生殖系统的损伤作用。雌激素受体(estrogen receptor, ER)是调节雌激素对靶器官发挥效应的唯一调节因子。孕激素受体(progesterone receptor, PR), 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、细胞周期素D1(cyclin D1, CYC-D₁)均是受ER所调控的细胞因子, 它们与子宫内膜基质细胞及卵巢的一系列生殖生理活动密切相关^[5-7]。而砷与上述细胞因子的关系如何, 具体作用模式如何, 目前尚罕见相关报道。因此, 本研究以尿砷(U_{As})、卵巢砷(O_{As})为暴露指标, ER、PR、VEGF、CYC-D₁为效应指标, 初步探讨砷中毒对

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.15532

[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, 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

大鼠ER下游信号通路的影响,为研究砷中毒致病机制,尤其是生殖系统病变机制及其防治提供理论依据。

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。染毒浓度分别为:对照组(0 mg/kg)、低砷组(0.36 mg/kg)、中砷组(1.44 mg/kg)、高砷组(5.77 mg/kg),每天一次,连续灌胃染毒3个月。动物自由摄取饲料、自由饮水,自动控制昼夜循环(12/12 h),室温(22 ± 1)℃。每周称重一次,按动物体重调节染毒剂量,每周调换笼位一次。

1.2 U_{As} 含量及 O_{As} 含量的测定

大鼠处死前收集24 h尿液。每份尿样随即分成两份:第1份以1 mL尿样加10 μL 浓盐酸,使其pH<2,用于测定 U_{As} ;第2份不处理,用于测定尿肌酐(U_{Cr})。 U_{As} 及 O_{As} 均采用氢化物发生器-电感耦合等离子体原子发射光谱法测定, U_{Cr} 采用碱性苦味酸法测定。 U_{As} 用 U_{Cr} 校正,单位为mg/gCr(以下表示为“mg/g”)。准确称取左侧卵巢组织0.1 g,生理盐水制成匀浆,加8.0 mL浓硝酸和2.0 mL过氧化氢进行微波消解。冷却后,去离子水定容至25 mL待测 O_{As} 。

1.3 ER、PR、VEGF和CYC-D₁蛋白表达水平的测定

大鼠处死前腹腔注射质量分数为0.9%的戊巴比妥钠(每kg体重10 mL)麻醉后,采集心脏血样。非抗凝血离心分离血清,采用Elisa法检测ER、PR、VEGF和CYC-D₁蛋白表达水平。

1.4 卵巢组织病理形态观察

取右侧卵巢组织于体积分数为4%的甲醛溶液固定48 h,常规脱水、石蜡包埋、切片,HE染色后于光学显微镜下观察卵巢组织的病理形态改变。

1.5 统计学分析

采用SPSS 18.0软件进行方差分析,多组间比较采用LSD检验(方差齐)及Tamhane's检验(方差不齐),相关分析采用Pearson直线相关,趋势卡方检验分析各指标异常率的剂量反应关系。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 U_{As} 、 O_{As} 水平的变化

表1显示, U_{As} 、 O_{As} 随砷染毒剂量的增加而升高

($r_{U_{As}}=0.875$, $P<0.001$; $r_{O_{As}}=0.843$, $P<0.001$)。各组间 U_{As} 及 O_{As} 水平不全相等($F_{U_{As}}=335.17$, $F_{O_{As}}=298.24$, 均 $P<0.01$)。低砷、中砷、高砷各组与对照组比较,差异均有统计学意义。

表1 各组 U_{As} 、 O_{As} 水平的变化(Geometric Mean, Gm)

Table 1 Changes of U_{As} and O_{As} levels in each dose group

As(mg/kg)	例数(N)	U_{As} (mg/g)		O_{As} ($\mu\text{g/g}$)	
		$\bar{x}$	95%CI	$\bar{x}$	95%CI
0	6	22.31	19.60~36.40	1.625	0.317~2.999
0.36	6	47.19*	72.23~103.71	3.476*	1.458~5.237
1.44	6	155.22**	118.88~222.92	7.258**	4.549~9.364
5.77	6	229.1***	375.71~528.36	8.547***	5.899~10.216

[注]*:与对照组相比, $P<0.01$ 。*:与低砷组(0.36 mg/kg)相比, $P<0.01$ 。▲:与中砷组(1.44 mg/kg)相比, $P<0.01$ 。

[Note]*: Compared with the control group, $P<0.01$. *: Compared with the low As group(0.36 mg/kg), $P<0.01$. ▲: Compared with the middle As group(1.44 mg/kg), $P<0.01$.

2.2 砷对ER、PR、VEGF、CYC-D₁蛋白表达水平的影响

表2显示,各砷染毒组ER、PR、VEGF、CYC-D₁均不全相等($F_{ER}=316.14$, $F_{PR}=298.36$, $F_{VEGF}=356.98$, $F_{CYC-D_1}=331.14$, 均 $P<0.01$),4项指标各染毒组均低于对照组($P<0.01$),且随着砷染毒剂量的增高,表达逐渐降低。

表2 各组ER、PR、VEGF、CYC-D₁表达水平变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Changes of ER, PR, VEGF, and CYC-D₁ levels in each dose group

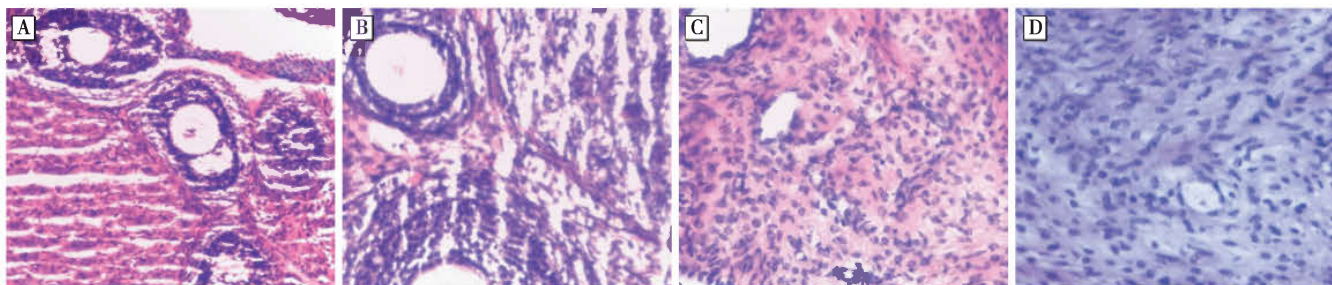
As(mg/kg)	例数(N)	ER(ng/L)	PR(ng/L)	VEGF(IU/L)	CYC-D ₁ (IU/L)
0	6	41.06 $\pm$ 8.14	115.90 $\pm$ 10.41	81.58 $\pm$ 9.85	40.06 $\pm$ 8.41
0.36	6	24.32 $\pm$ 9.21*	73.62 $\pm$ 9.25*	68.35 $\pm$ 15.8*	30.26 $\pm$ 5.80*
1.44	6	22.16 $\pm$ 9.16*	38.60 $\pm$ 7.26**	59.95 $\pm$ 13.26**	25.45 $\pm$ 9.29*
5.77	6	9.06 $\pm$ 2.06***	22.50 $\pm$ 11.80***	14.87 $\pm$ 4.08***	2.60 $\pm$ 0.23***

[注]*:与对照组相比, $P<0.01$ 。*:与低砷组(0.36 mg/kg)相比, $P<0.01$ 。▲:与中砷组(1.44 mg/kg)相比, $P<0.01$ 。

[Note]*: Compared with the control group, $P<0.01$. *: Compared with the low As group(0.36 mg/kg), $P<0.01$. ▲: Compared with the middle As group(1.44 mg/kg), $P<0.01$.

2.3 大鼠卵巢组织的病理改变

图1A显示,正常对照组的大鼠卵泡、黄体清晰可见,形态正常,间质细胞均匀分布。图1B显示,低砷组大鼠卵巢组织结构同正常对照组;图1C显示,中砷组大鼠卵泡闭锁或塌陷,间质细胞增生且为弱嗜酸性颗粒状;图1D显示,高砷组大鼠卵泡闭锁或塌陷,间质细胞大量增生呈铺石板状或梭状排列。



[注]A: 对照组; B: 低砷组(0.36mg/kg); C: 中砷组(1.44mg/kg); D: 高砷组(5.77mg/kg)。

[Note]A: Control group; B, C, and D: Low(0.36mg/kg), middle(1.44mg/kg), and high(5.77mg/kg)dose arenic groups, respectively.

图1 各组大鼠卵巢病理改变(×400)

Figure 1 Pathological changes of ovary in female rats exposed to varied doses of arsenic

2.4 U_{As} 、 O_{As} 与 ER、PR、VEGF、CYC-D₁ 的相关分析

表3显示, U_{As} 、 O_{As} 与 ER、PR、VEGF、CYC-D₁ 均为负相关关系($P < 0.05$), ER 与 PR、VEGF、CYC-D₁ 间均为正相关关系($P < 0.05$)。

2.5 染砷剂量与各效应指标异常检出率间关系

以对照组各效应指标5%下限作为正常参考值下限, 当各效应指标小于该值时则为异常。表4显示, 染毒剂量与各效应指标异常检出率间存在明显剂量-

反应关系($P < 0.01$)。

表3 各变量间的相关关系

Table 3 Correlation between selected variables

变量 Variable	U_{As}		O_{As}		ER	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
ER	-0.515	0.037	-0.421	0.040	1.000	0.000
PR	-0.397	0.046	-0.423	0.040	0.636	0.017
VEGF	-0.675	0.027	-0.547	0.028	0.618	0.014
CYC-D ₁	-0.456	0.045	-0.357	0.047	0.705	0.016

表4 染砷剂量与各效应指标异常检出率间的关系($n=6$)

Table 4 Correlation between the abnormal rates of effect biomarkers and arsenic doses

As (mg/kg)	ER		PR		VEGF		CYC-D ₁	
	异常数	异常率(%)	异常数	异常率(%)	异常数	异常率(%)	异常数	异常率(%)
	Abnormal count	Abnormal rate	Abnormal count	Abnormal rate	Abnormal count	Abnormal rate	Abnormal count	Abnormal rate
0	0	0.0	1	16.7	0	0.0	1	16.7
0.36	2	33.3	2	33.3	3	50.0	3	50.0
1.44	3	50.0	6	100.0	4	66.7	5	83.3
5.77	6	100.0	6	100.0	6	100.0	6	100.0
趋势 χ^2 (Trend chi-square test)	12.73		18.90		13.50		13.50	
<i>P</i>	0.005		0.000		0.004		0.004	

3 讨论

本研究发现, 随着砷染毒剂量的增加, 大鼠 U_{As} 、 O_{As} 含量逐渐增高, ER、PR、VEGF、CYC-D₁ 表达水平逐渐降低, 且存在剂量效应关系。 U_{As} 、 O_{As} 与 ER、PR、VEGF、CYC-D₁ 呈负相关, ER 与 PR、VEGF、CYC-D₁ 呈正相关, 说明砷可抑制 ER-VEGF/CYC-D₁/PR 信号通路相关指标的表达水平。近年来研究发现, 砷引起的生殖损害效应的机制可能以环境内分泌干扰物的途径进行, 砷通过与靶细胞核内的 ER 结合, 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, 然后与靶基因启动子内的 ERE 结合, 抑制其下游基因转录^[8-11]。本实验结果也显示砷抑制 ER 的表达,

而 ER 下游生殖细胞因子 PR、VEGF、CYC-D₁ 的表达也相应受到了抑制。这说明 ER-PR/VEGF/CYC-D₁ 信号通路参与了砷暴露致大鼠生殖损害。

VEGF 在雌激素作用于间质细胞的过程中起着促进细胞间质降解的作用^[5]。CYC-D₁ 是细胞周期调节因子, CYC-D₁ 的表达量降低会引起卵泡闭锁及其相应生殖功能障碍^[6]。HE 染色结果显示, 砷染毒大鼠卵巢发生了不同程度的病理学改变, 主要表现为间质细胞过度增生及卵泡的闭锁或塌陷。卵巢病理改变与 VEGF、CYC-D₁ 表达水平下降相印证。结果提示砷染毒可引起雌性大鼠生殖系统损害, VEGF、CYC-D₁ 表达水平的下降是卵巢发生病理改变的基础。

综上, ER-PR/VEGF/CYC-D₁ 信号通路参与了砷暴露致大鼠生殖损害, 间质细胞过度增生及卵泡的减少、闭锁可能是砷中毒对大鼠卵巢损害的主要病理改变。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] 沈雁峰, 孙殿军, 赵新华, 等. 中国饮水型地方性砷中毒病区和高砷区水砷筛查报告[J]. 中国地方病学杂志, 2005, 24(2): 172-175.
- [2] 孙殿军. 我国地氟病、地砷病防治策略探讨[C]. 全国第八届地方性氟(砷)中毒学术会议论文集, 2009: 23-24.
- [3] 钱茂春, 黄月珍, 王国荃, 等. 地方性慢性砷中毒合并氟中毒56例初步报告[J]. 新疆医学院学报, 1985, 8(2): 163-165.
- [4] 郑冲, 张人华. 砷中毒对大鼠雌激素及其受体的影响[J]. 环境与职业医学, 2016, 33(2): 119-122.
- [5] Hicks D, Dell'Orto P, Falzon M, et al. Immunohistochemical performance of estrogen and progesterone receptor antibodies on the Dako Omnis Staining Platform: Evaluation in Multicenter Studies[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2015, 9(12): 1567-1569.
- [6] Chen N, Ma C N, Zhao M, et al. Role of VEGF gene polymorphisms in the clinical outcome of non-small cell lung cancer[J]. Genet Mol Res, 2015, 7(4): 16006-16011.
- [7] Irving J A, Lee C H, Yip S. A Distinctive ovarian sex cord-stromal neoplasm characterized by FOXL2, SF-1, WT-1, Cyclin D1, and β -catenin nuclear expression and CTNNB1 mutations[J]. Am J Surg Pathol, 2015, 39(10): 1420-1426.
- [8] 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]. 中国地方病学杂志, 2010, 29(1): 112-115.
- [9] Davey J C, Bodwell J E, Gosse J A, 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.
- [10] Dávila-Esqueda M E, Jiménez-Capdeville M E, Delgado J M, et al. Effects of arsenic exposure during the pre-and postnatal development on the puberty of female offspring[J]. Exp Toxicol Pathol, 2012, 64(1/2): 25-30.
- [11] 张育, 张建东. 三氧化二砷对K562细胞VEGF/R及MMP-2, 9表达的影响[J]. 中华血液学杂志, 2005, 10(3): 165-168.

(收稿日期: 2015-09-10)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 陶黎纳, 陈姣)

【告知栏】

《环境与职业医学》杂志微信公众号即将上线

《环境与职业医学》杂志微信公众号将于近期正式上线, 该平台包括“读者”“作者”和“我们”三个主菜单, 主要提供稿件状态查询、当期最新内容及稿件撰写要求等内容, 同时也发布国内外最新研究动态及发展前沿等资讯, 满足读者网络时代碎片化阅读的需求。本平台旨在编者、作者、读者之间搭建一个分享、学习、互动的平台, 以此推动《环境与职业医学》杂志的健康发展。

请直接扫描二维码或在公众号中搜索“环境与职业医学”(微信号: JEOM), 即可关注本刊微信公众号。



《环境与职业医学》编辑部