

亚慢性染毒 2, 3, 7, 8-四氯二苯并二噁英 对雄性大鼠生殖系统的影响

刘静, 汤乃军*, 赵力军, 曹树义, 高鹤芬, 王辉

(天津医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 天津 300070)

摘要: 目的 了解 2, 3, 7, 8-四氯二苯并二噁英 (TCDD) 对雄性大鼠生殖系统的影响。方法 清洁级 Wistar 雄性大鼠 32 只, 体重 (100±10) g, 随机分成 4 组, 每组 8 只, 连续经口灌胃染毒 90 d, 剂量分别为 2.5, 25, 250 ng/kg, 对照组给予二甲亚砜 (DMSO), 测定血清中睾酮 (T)、促黄体生成素 (LH)、促卵泡生成素 (FSH) 的激素水平以及睾丸、前列腺、精囊腺的脏器质量系数, 附睾尾精子畸形率。结果 与对照组比较, 各染毒组 T 水平下降, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 各染毒组 FSH 和 LH 水平上升, 但差异无显著性 ($P > 0.05$); 中、高剂量组的睾丸、精囊腺及所有染毒组的前列腺脏器质量系数均低于对照组 ($P < 0.05$); 各染毒组精子畸形率随剂量的增加而上升, 中、高剂量组与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$)。结论 TCDD 亚慢性染毒, 可影响精子和生殖系统的正常发育, 并在一定程度上对生殖激素的稳态造成了干扰。

关键词: 2, 3, 7, 8-四氯二苯并二噁英; 睾酮; 黄体生成素; 卵泡刺激素

中图分类号: R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)04-0196-04

Effect of subchronic exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on reproductive system of male rats

LIU Jing, TANG Nai-jun*, ZHAO Li-jun, CAO Shu-yi, GAO He-fen, WANG Hui

(Department of Occupational Health, School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective To study the effect of TCDD on reproductive system of male rat. **Method** Thirty two healthy male Wistar rats were randomly divided into four groups according to body weight (100±10) g: control group (rats were orally given 250 ng/kg dimethyl sulfoxide, DMSO), and three exposed groups (orally received different doses of TCDD—2.5, 25 and 250 ng/kg per day, respectively for 90 days). At the end of experimental period the animals were fasted overnight, then weighed and sacrificed. Testicle, epididymis, prostate and seminal vesicle were removed for measuring their relative weights to body weight. Meanwhile, the serum levels of testosterone (T), luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH) and the sperm abnormality rate in epididymis tail were also measured. **Result** The results showed that the serum testosterone levels and weight coefficients of prostate in rats of all the TCDD exposed groups were significantly lower than that of controls ($P < 0.05$), the serum levels of FSH and LH also seemed to show some increase but without any significant difference compared with controls ($P > 0.05$). Additionally, the weight coefficients of testicle, epididymis and seminal vesicle in middle or high TCDD exposed groups and the percentages of sperm abnormalities in epididymis tail of rats in middle or high TCDD exposed groups were significantly increased compared with controls ($P < 0.05$). **Conclusion** It is showed that subchronic exposure to TCDD could damage the normal development of sperm and reproductive system, and disturb the homeostasis of reproductive hormones suggesting that dioxins might affect the function of reproductive-endocrine system in male rats to a certain extent.

Key words: 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD); Testosterone (T); Luteinizing hormone (LH); Follicle stimulating hormone (FSH)

2, 3, 7, 8-四氯二苯并二噁英 (2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, TCDD) 是二噁英类化合物中毒性最强的一种, 是最严重的持续性环境有机污染物之一, 具有很强的肝脏、皮肤和生殖毒性^[1, 2]。TCDD 也是典型的环境内分泌干扰物, 其对生殖内分泌的干扰效应

成为近年来研究的热点。本研究以 Wistar 雄性大鼠为研究对象, 探讨 TCDD 对雄性动物的抗雄激素作用及其对生殖系统正常发育的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组与染毒

清洁级 Wistar 雄性大鼠 32 只 (由北京大学医学中心实验动物中心提供), 体重 (100±10) g, 随机分成 4 组, 每组 8 只; 经口灌胃染毒 TCDD, 剂量分别为 0, 2.5, 25, 250 ng/kg, 溶剂对照组给予 250

收稿日期: 2006-03-27; 修回日期: 2006-06-15

作者简介: 刘静 (1980—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 工业毒理学。

*: 通讯作者, 教授, E-mail: tangnaijun@vip.sina.com

ng/kg 二甲基亚砷 (DMSO), 连续灌胃 90 d.

1.2 主要试剂与仪器设备

TCDD (购于 Cambridge Isotope Laboratories, Inc. 纯度 99%); 二甲基亚砷 (DMSO) 为国产分析纯; 睾酮 (T)、促黄体生成激素 (LH)、促卵泡生成素 (FSH) 的放免试剂盒均购自北方生物技术研究所以; 甲醇液; 2%伊红染液; γ 放射免疫计数器 (GC-911); 日本 OLYMPUS 倒置荧光显微镜; 万分之一电子天平.

1.3 实验指标和方法

1.3.1 睾酮、促卵泡生成素、促黄体生成素激素水平的测定 大鼠处死前夜禁食, 准确称量体重后, 股动脉取血, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上层血清采用竞争放射免疫分析法, 按照试剂盒操作规程测定激素含量.

1.3.2 睾丸、前列腺、精囊腺脏器质量系数的测定 颈椎脱臼法处死动物后, 迅速准确摘取睾丸、前列腺、精囊腺器官称重, 按脏器质量系数=脏器湿重(g)/体重(g)×100(g/100 g)计算.

1.3.3 精子畸形率的测定 分离附睾尾, 剪开, 加 2 ml 新配制的 0.86%生理盐水缓冲溶液, 甲醇固定, 伊红染色观察精子畸形形态并计数, 每只大鼠共观察

500 个完整精子.

1.4 统计方法

采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析处理, 结果以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学方法采用单因素方差分析, 进一步与对照组的两两比较时采用 Dunnett 分析.

2 结果与讨论

2.1 一般健康状况的变化情况

在实验观察期间内, 高、中、低剂量组各有 1 只动物分别于实验开始后第 51、45 和 67 天死于化脓性中耳炎, 症状为病鼠头偏一侧, 提起尾巴后, 病鼠朝头偏转的一侧旋转. 其余大鼠活动及生长发育正常, 未出现明显中毒症状和不良反应, 各剂量组大鼠的体重变化、进食量与对照组相比没有明显的改变, 这表明实验动物的一般代谢情况仍在正常的范围.

2.2 性器官及其附属腺脏器质量系数

由表 1 可见, TCDD 染毒 90 d 后, 各染毒组睾丸、前列腺和精囊腺的脏器质量系数下降, 与对照组比较差异有显著性; 两两比较显示, 25、250 ng/kg 组睾丸和精囊腺及各染毒组前列腺与对照组比较, 差别有显著性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

表 1 TCDD 对大鼠体重、性器官脏器质量系数及精子畸形率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

剂量 (ng/kg)	动物 只数	体重 (g)	脏器质量系数 (g/100g 体重)			精子畸形率 (%)
			睾丸	前列腺	精囊腺	
0	8	362.50±33.73	1.15±0.23	0.15±0.03	0.47±0.11	2.02±0.82
2.5	7	354.17±50.64	1.06±0.12	0.13±0.02*	0.41±0.08	2.78±0.83
25	7	335.63±69.92	0.95±0.15*	0.11±0.02**	0.37±0.10*	5.12±1.08**
250	7	330.00±42.54	0.91±0.06**	0.13±0.02*	0.32±0.08**	6.56±1.70**
F 值	—	0.522	3.712	4.862	3.556	16.353
P 值	—	0.672	0.024	0.008	0.029	0.000

与 0 剂量组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 表 2 同.

过去有研究报道, 大鼠于出生前或哺乳期暴露于 TCDD, 睾丸质量有显著降低; 于青春期暴露于 TCDD, 也有此情况发生^[3,4]. 在我们的研究也发现, TCDD 使睾丸相对质量显著下降. 相比之下, 对青春后期暴露于 TCDD 的研究显示, 睾丸质量不受影响, 甚至睾丸的相对质量有所增高^[5], 系因高剂量 TCDD 染毒时, 动物体重明显下降所致. 故认为 TCDD 对睾丸质量影响的关键时期是在青春期之前.

前列腺和精囊腺是依赖于雄性激素的生殖器官, 主要是 5α-二氢睾酮 (DHT), 由 5α-还原酶作用于睾酮形成的^[5]. 本研究中, 各染毒剂量组血清中睾酮浓度的降低, 很可能是导致精囊腺和前列腺等依赖于雄性激素的生殖器官质量降低的主要原因. 但也有研究显示, 经 TCDD 染毒前列腺质量下降时, 精囊腺质量

未受明显影响. 因此, 可以推测对生殖腺发育的影响除雄激素外还可能有其他因素^[6].

2.3 精子畸形分析

以往研究显示, 即便在引起血清雄性激素下降和附属性器官质量下降的更小剂量时, 精子的发生仍会受影响^[7]. 由表 1 可见, 各染毒剂量组精子畸形率均有所上升, 其中高、中剂量染毒组与对照组比较, 差别有显著意义 ($P < 0.01$). 这提示 90 d 亚慢性 TCDD 的暴露可能会损伤动物精子而导致生殖毒性, 同时观察到的精子畸形形态以头部畸形为主, 主要为无钩头; 尾部畸形主要以尾折叠多见. El-Tawil 等通过对 SD 大鼠 60 d 亚慢性灌胃染毒 TCDD (剂量分别为 200、100、50 ng/kg) 也观察到相似的结果^[8]. TCDD 诱导的氧化应激反应是其发挥毒性效应的一个重要机

制。Latchoumycandane 等以 TCDD 染毒 Wistar 雄性大鼠,发现 TCDD 诱导大鼠睾丸、附睾和附睾中的精子发生氧化应激反应,产生过量的活性氧^[9],而精子细胞胞浆膜上的多不饱和脂肪酸是极易受到活性氧的攻击,我们认为 TCDD 诱导大鼠精子发生氧化应激反应很可能是其引起精子畸形的一个主要原因。

2.4 睾酮、促卵泡生成素、促黄体生成素激素水平

由表 2 可见,染毒 TCDD 90 d 后,与对照组比较各染毒组血清中 T 水平均显著下降 ($P < 0.05$),各染毒剂量组血清中 FSH、LH 水平均有所升高,但差别无统计学意义。

表 2 TCDD 对大鼠血清中 T、FSH 和 LH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

剂量 (ng/kg)	动物 只数	T (ng/ml)	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)
0	8	1.93 ± 0.97	1.72 ± 0.45	0.84 ± 0.65
2.5	7	1.13 ± 0.61 *	1.78 ± 0.45	0.95 ± 0.58
25	7	1.03 ± 0.74 *	2.21 ± 0.64	1.06 ± 0.54
250	7	0.93 ± 0.38 *	2.14 ± 0.46	1.39 ± 0.52
F 值	—	3.123	1.781	1.264
P 值	—	0.044	0.175	0.308

睾酮对于维持雄性生殖系统的正常功能、促进附属性器官正常形态学发育有重要作用,因此认为 TCDD 使睾酮水平下降是导致雄性生殖系统毒性作用的重要原因之一。生理情况下大鼠睾丸 LH 与 Leydig 间质细胞上的 LH 受体结合后,通过 cAMP-蛋白激酶 A 系统,促进胆固醇运至线粒体,并被细胞色素 P450 侧链分裂酶 (P450_{sc}) 转变成孕烯醇酮,继而被滑面内质网的酶类转变成睾酮。

本实验 TCDD 染毒使雄性大鼠血清中睾酮水平明显下降,考虑可能的原因有:TCDD 暴露损伤了睾丸 Leydig 间质细胞质内一些与雄激素合成有关的酶和受体的基因表达。Lai 等实验结果显示^[10],TCDD 抑制了大鼠 Leydig 间质细胞中细胞色素 P450 侧链分裂酶基因表达,并且通过调控 Leydig 细胞中 cAMP 信号转导以影响胆固醇生成的过程。Fukuzawa 等实验观察到,TCDD 抑制了小鼠睾丸中 P450_{sc} 和 LH 受体的基因表达^[11]。其次由于睾酮的合成主要在睾丸 Leydig 间质细胞内质网和线粒体上进行,因此内质网和线粒体体积减小或是受损必然损伤其与雄激素合成有关的酶,如 P450-17 α 羟化酶、P450-17,20 裂解酶、5 α -还原酶等,使睾酮合成量下降^[9]。实验表明,TCDD 染毒可诱导 Wistar 雄性大鼠睾丸细胞线粒体发生氧化应激反应,产生过量的活性氧和脂质过氧化产物损伤细胞线粒体结构的完整性^[12]。此外,有学者通过小鼠的皮下 TCDD 染毒,观察到睾丸组织细胞内滑面内质网肿胀,线粒体肿胀、坏死和吞噬溶

酶体形成等异常的超微病理结构^[13]。

我们在研究 TCDD 对生殖腺毒性作用的同时也注意到下丘脑和垂体内分泌的变化。下丘脑分泌促性腺激素释放激素 (GnRH) 能促进腺垂体释放 FSH 和 LH,释放的 FSH 和 LH 分别作用于睾丸的支持细胞和 Leydig 间质细胞,促进睾丸的生精和间质细胞分泌睾酮的功能。而下丘脑 GnRH 释放和腺垂体 FSH 和 LH 的分泌则都受睾丸分泌激素的反馈调控,这种反馈关系使血浆中睾酮等雄激素水平维持在正常的生理范围^[14]。当血浆雄激素浓度下降时,正常的生理反应是通过下丘脑—垂体—性腺轴的负反馈作用使血浆中 LH 浓度升高。然而多数学者的实验表明,当 TCDD 使血浆中性腺激素水平下降时,LH 浓度并未受影响,这与本实验结论相一致。在 TCDD 染毒组,血清中 T 水平明显下降时,FSH 和 LH 均未代偿性明显升高,考虑的可能原因有 TCDD 作为环境内分泌干扰物使下丘脑—垂体—性腺轴反馈调节异常,或是 TCDD 改变了细胞和器官对调控它们功能的激素或生长因子的反应能力^[15]。Bookstaele 等实验结果表明,TCDD 能影响睾丸对 LH 的反应能力,还可能改变了 LH、FSH 的分泌调节机制,使负反馈因子反应能力异常^[16]。

综上所述,TCDD 作为环境内分泌干扰物中二噁英类的代表物质,可对雄性大鼠生殖系统产生多种毒性作用,并引起下丘脑—腺垂体—性腺轴的反馈调节机制异常。虽然目前关于 TCDD 毒性作用机制的研究取得了一定进展,但仍不十分清楚。因此尚需更多的实验研究进行深入探讨。

参考文献:

- [1] 刘云儒,汤乃军.二噁英的毒理学研究进展[J].中华劳动卫生职业病杂志,2003,21:138-141.
- [2] 董丽,汤乃军.四氯并二噁英的肝脏毒性[J].中华劳动卫生职业病杂志,2005,23:60-62.
- [3] Theobald HM, Peterson RE. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: effects on development of the male and female reproductive system of the mouse [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1997, 145 (1): 124-135.
- [4] El-Sabeawy F, Wang S, Overstreet J, et al. Treatment of rats during perinatal development with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters both signaling kinase activities and epidermal growth factor receptor binding in the testis and the motility and acrosomal reaction of sperm [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1998, 150 (2): 427-442.
- [5] Simanainen U, Adamsson A, Tuomisto JT, et al. Adult 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) exposure and effects on male reproductive organs in three differentially TCDD-susceptible rat lines [J]. Toxicol Sci, 2004, 81 (2): 401-407.
- [6] 韩笑宇,关晓伟,何威. TCDD 的生殖毒性作用对生殖系统的影响 [J]. 解剖科学进展, 2001, 7: 241-244. (下转第 204 页)

的 ET 至少有 4 种异构形式, 即 ET-1、ET-2、ET-3 和 ET-B^[6], 其中 ET-1 活性最强。ET 的受体有 3 种, 包括 ET_AR、ET_BR 和 ET_CR^[7]。静脉注射 ET 时, 可引起短暂的降压及心跳加快作用, 随后为显著而持久的升压效应^{1,8}。ET 作用的机制是通过作用于血管平滑肌细胞膜上的 ET 受体, 激活 Ca²⁺ 通道和磷脂酶 C (PLC), 产生三磷酸肌醇 (IP₃), 促使细胞内钙池释放 Ca²⁺, 同时引起细胞膜受体操纵性 Ca²⁺ 通道开放, 细胞外 Ca²⁺ 内流增加, 胞浆内 Ca²⁺ 浓度升高, 使动、静脉强烈收缩, 外周阻力增加, 回心血量增加, 血压升高。这一缩血管作用比血管紧张素 II 和去甲肾上腺素强许多倍。其次, ET 作用于心肌细胞膜 ET 受体, 激活细胞膜上的 Ca²⁺ 通道, Ca²⁺ 内流增加, 兴奋-收缩耦联增强, 使心肌收缩张力加强, 具有正性肌力作用^[9]。此外, 高浓度的 ET 可抑制压力感受器反射, 从而使其降压作用减弱, 血压相应升高^[10]。

有资料显示, 高血压发病率与肥胖有密切联系, 50% 以上的高血压病人是超体重者^[11]。本研究结果表明, 地面作业的矿工中, HP 组血浆 ET 水平明显高于 NHP 组, 而且主要是超体重的高血压矿工, ET 水平与 BMI 呈正相关。说明超体重与 ET 水平有某种联系, 两者在矿工高血压的发病中相互作用。而在井下作业的矿工中, HP 组血浆 ET 水平反而低于 NHP 组, 并明显低于地面作业 HP 组, ET 水平与 BMI 呈负相关。提示井下作业可能降低了高血压矿工血浆 ET 水平。矿工在井下作业, 由于受到多种因素的影响, 如地球引力、大气压不同, 可能抑制了 ET 的释放, 或者由于劳动强度大, 机体代谢率高, ET 降解速度较快, 从而降低了血浆 ET 水平。年龄、吸烟、饮酒、

高血压家族史、糖尿病史等因素对井下、地面作业的 HP 组与 NHP 组矿工血浆 ET 水平均无显著影响。

参考文献:

- [1] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells [J]. *Nature*, 1988, 332: 411-415.
- [2] Cemacek P, Stewart DJ. Immunoreactive endothelin in human plasma: marked elevations in patients in cardiogenic shock [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 161: 562-567.
- [3] 陈灏珠, 李宗明. 内科学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 754.
- [4] 王勇, 张亚光. 高血压病患者血浆内皮素与降钙素基因相关肽变化的意义 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15 (8): 94.
- [5] 谢建洪, 黄慧芳. 高血压患者动态血压参数、NO、ET 测定及其临床意义 [J]. *浙江医学*, 2001, 23 (8): 464-465.
- [6] Haynes WG, Webb DJ. The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease [J]. *Clin Sci*, 1993, 84: 485-500.
- [7] Kame S, Jayawickreme CK, Lemer MR, et al. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET_C receptor) from xenopus laevis dermal melanophores [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 19126-19133.
- [8] Knuepfer MM, Han SP, Trajani AJ, et al. Regional hemodynamic and baroreflex effects of endothelin in rats [J]. *Am J Physiol*, 1989, 257: H918-926.
- [9] 张朝, 李玉龙, 何瑞荣. 内皮素对豚鼠乳头肌电生理和收缩活动的影响 [J]. *生理学报*, 1997, 49 (2): 146-152.
- [10] 李德培, 范振中, 何瑞荣. 内皮素对麻醉大鼠动脉压力感受器反射的调制作用 [J]. *生理学报*, 1998, 50 (2): 169-175.
- [11] Macmahon SW, Blacket RB, Macdonald GJ, et al. Obesity, alcohol consumption and blood pressure in Australian men and women: the national heart foundation of Australia risk factor prevalence study [J]. *J Hypertens*, 1984, 2: 85.
- [12] Latchoumycandane C, Chitra KC, Mathur PP, et al. The effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the antioxidant system in mitochondrial and microsomal fractions of rat testis [J]. *Toxicology*, 2002, 171 (2-3): 127-135.
- [13] Kwon YI, Yeon JD, Oh SM, et al. Protective effects of ursodeoxycholic acid against 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced testicular damage in mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 194(3): 239-247.
- [14] 姚泰. 生理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005. 602-603.
- [15] Bookstaff RC, Kamei F, Moore RW, et al. Altered regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor number and pituitary responsiveness to GnRH in 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-treated male rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1990, 105(1): 78-92.
- [16] Bookstaff Moore RW, Poterson RE, et al. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin increases the potency of androgens and estrogens as feedback inhibitors of luteinizing hormone secretion in male rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1990, 104 (2): 212-224.
- [7] Rune GM, Souza P, Krowke R, et al. Morphological and histochemical pattern of response in rat testes after administration of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) [J]. *Histol Histopathol*, 1991, 6 (4): 459-467.
- [8] El-Tawil OS, Elsaieed EM. Induction of oxidative stress in the reproductive system of rats after subchronic exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin [J]. *Environ Contam Toxicol*, 2005, 75(1): 15-22.
- [9] Latchoumycandane C, Chitra KC, Mathur PP. Induction of oxidative stress in rat epididymal sperm after exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin [J]. *Arch Toxicol*, 2002, 76(2): 113-118.
- [10] Lai KP, Wong MH, Wong CK. Inhibition of CYP450_{sec} expression in dioxin-exposed rat Leydig cells [J]. *J Endocrinol*, 2005, 185(3): 519-527.
- [11] Fukuzawa NH, Ohsako S, Wu Q, et al. Testicular cytochrome P450_{sec} and IHR as possible targets of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the mouse [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 221(1-2): 87-96.

(上接第 198 页)