

PAG 活性随染毒剂量的增加而逐渐升高。统计结果表明, 40、80 mg/kg 剂量组小鼠脑组织 GS 活性明显低于对照组, 80 mg/kg 剂量组小鼠脑组织 PAG 活性明显高于对照组。详见表 1。

表 1 小鼠脑组织 PAG 及 GS 活性测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

剂量 (mg/kg)	n	PAG	GS
0	10	14.8 ± 3.6	250.6 ± 28.6
20	10	16.1 ± 4.3	240.9 ± 23.7
40	10	18.2 ± 4.8	215.9 ± 17.4**
80	10	21.3 ± 7.0**	177.9 ± 33.5***

与对照组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

拟除虫菊酯类杀虫剂具有兴奋性神经毒性。中毒时主要表现为中枢神经系统的强烈兴奋症状。普遍认为这是由于突触间隙 Glu 递质含量过高, 进而与突触后膜上的受体结合所致。

脑内 Glu 主要由 Glu-Gln 循环通路合成和清除。突触前膜释放的 Glu 进入突触间隙, 正常情况下只有 1/4 与突触后膜上的受体结合发挥生理作用, 而大部分被星形胶质细胞通过载体 GLT-1 摄取, 在胶质细胞内的 GS 催化下 Glu 转变生成 Gln, Gln 再从星形胶质细胞释放作为 Glu 的前体在神经元中积累, 经 PAG 水解成 Glu, 其中一部分 Glu 经谷氨酸脱羧酶催化生成 γ -氨基丁酸。未分解的 Glu 被转运到突触囊泡中, 参与新一轮的兴奋反应。

文献报道^[4,5], 拟除虫菊酯可抑制大鼠神经胶质细胞对 Glu 的摄取功能和 GS 活性而使突触间隙 Glu 清除减少。本研究发现, 80 mg/kg 剂量组小鼠脑组织 PAG 活性明显升高, 因此, 该类药物也可能直接作用于 PAG, 使其活性升高, 水解产生过多的 Glu, 导致突触间隙内 Glu 过多。即拟除虫菊酯类杀虫剂致哺乳动物神经突触间隙内 Glu 递质含量增多可能是

由于其清除减少和合成增多共同作用的结果。本研究还发现, 40 mg/kg 剂量组小鼠脑组织 GS 活性受到明显抑制, 而 PAG 活性未见明显升高, 因此, 该类药物也可能是首先抑制了 GS 活性, 阻止 Glu 合成 Gln, 使酶反应的产物——Gln 含量减少 (另有文献报道), 胶质细胞内的 Glu 堆积, 负反馈作用于载体, 使之对 Glu 的重摄取减少, 进而使突触间隙 Glu 不能被及时清除; 而 PAG 活性的升高可能是由于 Gln 含量的减少, 神经元中 PAG 堆积所致, 详细的毒作用机制有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Casida J E, Gammon D W, Glickman A H, et al. Mechanism of selective action of pyrethroid insecticides [J]. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1983, 23: 413.
- [2] 夏世钧, 吴中亮. 分子毒理学基础 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2001: 260-261.
- [3] 杨晓运, 李智, 秦绿叶, 等. 星形胶质细胞和神经元之间谷氨酸-谷氨酰胺的代谢偶联 [J]. 生命科学进展, 2003, 34 (4): 350-352.
- [4] 吴建平, 夏若寒, 石年, 等. 拟除虫菊酯对大鼠突触体谷氨酸摄取功能的影响 [J]. 卫生研究, 1999, 28 (5): 261-262.
- [5] 安丽, 赵越, 杨军, 等. 乙体氟氰菊酯对大鼠海马谷氨酰胺合成酶活性的影响 [J]. 毒理学杂志, 2006, 20 (2): 105-106.
- [6] Renis M, Cardile V, Russo A, et al. Glutamine synthetase activity and HSP70 levels in cultured rat astrocytes: effect of 1-octadecyl-2-methylac-glycerol-3-phosphocholine [J]. Brain Res, 1998, 783 (1): 143-150.
- [7] Carthoys N P, Weiss R F. Regulation of renal ammoniogenesis—subcellular localization of rat kidney glutaminase isoenzymes [J]. J Biol Chem, 1974, 249 (10): 3261-3266.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72 (7): 248-254.

二噁英对大鼠卵巢颗粒细胞分泌功能的影响

Effect of 2, 3, 7, 8-tetrachloro-p-dibenzodioxin on the secretion of ovarian granulose cell in rats

赵力军¹, 王静², 刘英华², 王晓军², 汤乃军¹

ZHAO Li-jun¹, WANG Jing², LIU Ying-hua², WANG Xiao-jun², TANG Nai-jun¹

(1. 天津医科大学, 天津 300070; 2. 天津市卫生防病中心, 天津 300011)

摘要: 分别以 4.00、0.40、0.04 ng/ml 浓度的 2, 3, 7, 8-四氯苯二噁英 (TCDD) 对体外培养的大鼠卵巢颗粒细胞进行 24 h 染毒, 测定细胞活性和细胞分泌产物 (雌二醇和孕酮) 含量。结果显示, 各染毒组与对照组比较, 雌二醇和孕酮水平均有所降低, 差别有统计学意义 ($P < 0.01$), 且有剂量-反应关系。提示 TCDD 抑制大鼠卵巢颗粒细胞分泌功能。

关键词: 大鼠; 颗粒细胞; 雌二醇; 孕酮; 二噁英

中图分类号: R994.6 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2007)01-0045-02

二噁英是一类有机氯化化合物的总称, 其中 2, 3, 7, 8-四氯苯二噁英 (TCDD) 毒性最大, 危害最严重。人类慢性低剂量接触二噁英后, 其后代 (雄性个体生殖器官萎缩、畸形、结构异常, 雄激素水平下降、精液减少、质量变性、性欲下降, 甚至出现雌性化行为) 雌性个体卵巢功能下降甚至消失, 子宫内膜异位, 生育能力下降, 流产、死胎或畸形; 婴儿发育迟缓、智力和行为功能缺陷及性别发育异常等^[1-3]。为进一步了解二噁英对卵巢的直接毒性作用, 探讨二噁英的毒作用机制, 我们采用体外培养大鼠卵巢颗粒细胞的方法, 观察二噁英对卵巢颗粒细胞分泌功能的影响。

1 材料与与方法

1.1 材料

实验动物: 二级 Wistar 大鼠, 由军事医学科学院实验动

收稿日期: 2006-04-29; 修回日期: 2006-08-16

作者简介: 赵力军 (1955-), 男, 副教授, 从事劳动卫生与职业病学教学工作。

物中心提供。试剂: DMEM 培养基, invitrogen corporation; 青、链霉素, 天津灏洋生物制品科技有限公司; 孕马血清 PMSG, 天津实验动物中心; 二噁英 (TCDD), Cambridge Isotope laboratories Inc. (纯度 99%); 酶联免疫 (大鼠雌二醇、大鼠孕酮) 试剂盒, 美国 MARKET INC.

1.2 方法

采用未成年雌性大鼠, 皮下注射 PMSG, 隔日颈椎脱臼处死动物, 无菌条件取出双侧卵巢, 去除脂肪和被膜, 用 PBS 清洗后置于 EMDM 培养液中, 20 ml 注射器针头刺破卵泡, 冲洗出颗粒细胞, 收集、清洗、离心、分散, 调整细胞密度, 按 1×10^6 /ml 密度接种于 96 孔板 (200 μ V 孔), 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养。培养 4 d 后更换去激素血清的培养液, 加入不同浓度的受试物, 继续培养 24 h。培养液中青霉素为 60 单位/ml, 链霉素为 60 μ g/ml。分别测定细胞活性和细胞分泌产物雌二醇、孕酮含量。

细胞活性测定: 四氮唑盐比色法。加入 5 mg/ml 的 MTT 液 (10 μ V 孔) 继续培养 4 h; 吸出孔内培养液后, 加入 DMSO 液 (150 μ V 孔), 将培养板置于微孔振荡器上振荡 10 min, 使结晶物溶解; 酶标仪检测各孔 OD 值 (检测波长 570 nm)。记录结果, 绘制曲线图。

细胞分泌产物测定: 酶联免疫法 (ELISA)。分别取标准品、待测培养液 25 μ V 孔加于相应反应孔中, 按试剂盒说明书操作方法, 于 450 nm 处读取光 OD 值。以 OD 值为纵坐标, 以标准品浓度为横坐标, 数据处理后可获得标准曲线^[3], 从标准曲线上查出被测样品的雌二醇、孕酮含量^[4-6]。

实验设高、中、低 3 个剂量组, 终浓度为 4.00、0.40、0.04 ng/ml; 另设一个阴性对照组、一个空白对照组。阴性对照组除不加受试物外, 其他处理条件同染毒组; 空白对照组不含颗粒细胞。每组设 6 个平行孔。

1.3 数据处理

用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果和讨论

TCDD 对卵巢颗粒细胞分泌产物的影响见表 1。由表 1 可见, 各染毒剂量组、阴性对照组的细胞活性与空白对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 各染毒剂量组与阴性对照组的细胞活性比较差异无统计学意义, 说明实验对卵巢颗粒细胞活性无明显抑制; 3 个染毒组的雌二醇和孕酮均较对照组为低, 其差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。进一步两两比较显示, 3 个染毒组间的雌二醇含量除低剂量组与中剂量组、中剂量组与高剂量组外, 其他组之间的差别均有统计学意义 ($P < 0.05$); 而孕酮含量除中剂量组与高剂量组外, 其他组之间的差别均有统计学意义 ($P < 0.05$)。相关分析结果显示, 雌二醇含量与 TCDD 剂量的相关系数为 -0.847, 且有统计学意义 ($P < 0.01$), 二者间存在负向变化趋势联系; 孕酮含量与 TCDD 剂量的相关系数为 -0.909, 且有统计学意义 ($P < 0.01$), 二者间存在负向变化趋势联系。

二噁英对哺乳动物生殖功能的影响, 国内仅限于整体动物实验。黄莉^[7]等人用 TCDD 对 NIH 小鼠染毒, 观察到以 50、100

表 1 TCDD 对大鼠卵巢颗粒细胞分泌功能的影响

组别	剂量 (ng/ml)	细胞活性	雌二醇 (ng/ml)	孕酮 (ng/ml)
高剂量组	4.00	0.21 ± 0.04*	21.76 ± 4.96**	12.04 ± 0.56**
中剂量组	0.40	0.19 ± 0.02*	26.71 ± 2.27**	12.12 ± 1.08**
低剂量组	0.04	0.19 ± 0.01*	30.77 ± 2.07**	18.43 ± 2.01**
阴性对照组	0	0.22 ± 0.02*	60.49 ± 9.07	24.36 ± 2.30
空白对照组	0	0.01 ± 0.00	—	—

与空白对照组比较, * $P < 0.01$; 与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$ ng/kg 剂量早期染毒使子宫内胚胎丢失, 着床后胚胎发育异常出现阻滞和死亡; 不同时期染毒均可降低胚胎和胎儿成活率, 血清雌二醇升高、孕酮降低。郭玉梅^[8]等人的研究表明低剂量 TCDD 1、2、4 μ g/kg 就可导致妊娠猕猴出现中毒症状, 并影响早期胚胎丢失。同类实验国外亦有报道, 结论一致^[9]。

有文献报道了用体外培养卵巢颗粒细胞的方法检测 TCDD 的生殖毒性, 在人卵巢颗粒细胞 17 β -雌二醇 E₂ 和孕酮分泌时, TCDD 对卵巢颗粒细胞雌二醇的分泌产生影响, 且是在不改变 P450 芳香化酶活力的情况下降低体外培养的人黄体颗粒细胞雌二醇生成^[10, 11]。

本次实验结果表明, TCDD 可以引起大鼠卵巢颗粒细胞的分泌物雌二醇和孕酮水平下降, 在实验条件下有剂量-反应关系, 提示二噁英对卵巢有直接毒性作用, 可以抑制大鼠卵巢颗粒细胞的分泌。

参考文献:

- [1] 张弘, 林其德. 二噁英与生殖健康 [J]. 国外医学计划生育分册, 2003, 22 (3): 130-133.
- [2] 王江敏, 臧桐华. 二噁英污染及其对生殖和内分泌系统的影响 [J]. 疾病控制杂志, 2003, 7 (5): 454-456.
- [3] 罗琼, 朱依敏, 黄荷凤. 二噁英内分泌干扰物对胚胎的影响及其机制 [J]. 国外医学妇幼保健分册, 2005, 16 (1): 45-47.
- [4] 郑月慧, 徐斯凡, 张保平. 内皮素-1 对大鼠排卵前卵泡颗粒细胞产生孕酮的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 1997, 13: 171-173.
- [5] 金章, 方廉, 郑月慧. cemb₂ 对大鼠黄体细胞 hCG 诱导的孕酮分泌的影响 [J]. 生理学报, 2000, 52 (1): 17-22.
- [6] 魏美娟, 王静, 俞瑾. 药物对大鼠卵巢颗粒细胞的影响 [J]. 上海医科大学学报, 2000, 27 (6): 511-513.
- [7] 黄莉, 戴丽军, 叶炳飞, 等. 2,3,7,8-四氯苯二噁英对 NIH 小鼠胚胎发育的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15 (3): 150-153.
- [8] 郭玉梅, 王沐沂, 王心如. TCDD 对猕猴妊娠期及其妊娠结局的毒性影响 [J]. 中国公共卫生, 2000, 16 (11): 1001-1002.
- [9] Guo Y, Hendriks A G, Overstreet J W, et al. Endocrine biomarkers of early fetal loss in cynomolgus macaques (Macaca fascicularis) following exposure to dioxin [J]. Biol Reprod, 1999, 60 (3): 707-713.
- [10] Heimler I, Rawlins R, Owen H, et al. Dioxin perturbs in a dose and time-dependent fashion, steroid secretion and induces apoptosis of human luteinized granulosa cells [J]. Endocrinology, 1998, 139 (10): 4373-4379.
- [11] Moran F M, Conley A J, Onbun C J, et al. 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-p-dioxin decrease estradiol production without altering the enzyme activity of cytochrome P450 aromatase of human luteinized granulosa cells in vitro [J]. Biol Reprod, 2000, 62 (4): 1102-1108.