

TCDD 宫内暴露致雄性子代大鼠生殖毒性研究

谭雪梅¹, 张秀丽², 余凯伦¹, 刘蔓蔓¹, 陶宇昌¹, 陈瑶¹, 余增丽¹

(1. 郑州大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室, 郑州 450001; 2. 郑州大学第一附属医院营养科, 郑州 450000)

【摘要】目的:探讨 2-3-7-8 四氯二苯并二噁英(2-3-7-8 Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin, TCDD)宫内暴露对雄性子代生殖毒性的影响及机制。**方法:**成功交配后,将母鼠随机分组。高剂量组(0.5 $\mu\text{g/kg}$)、低剂量组(0.1 $\mu\text{g/kg}$)和溶剂对照组,每组各 6 只,TCDD 组及对照组于孕 8~14 d(gestation day 8-14, GD8-14)采用灌胃方式分别给予 TCDD 及玉米油处理。孕鼠自然分娩,测量雄性仔鼠肛门至生殖器的距离(anal to genital distance, AGD);计算睾丸的脏器系数;利用精子质量分析仪对仔鼠精子的质量及数量进行分析测定;酶联免疫吸附法对雄性子代血清睾酮(testosterone, T)水平进行测定;测定凋亡相关蛋白 Bax、Bcl2、Caspase-3 的表达水平。**结果:**0.1 $\mu\text{g/kg}$ 组、0.5 $\mu\text{g/kg}$ 组仔鼠与对照组仔鼠相比,AGD[(1.49 $\pm$ 0.04) cm、(1.32 $\pm$ 0.01) cm 和 (1.21 $\pm$ 0.02) cm]有所缩短($P=0.000$),精子数目[(72.33 $\pm$ 4.46) $\times 10^6$ 个/mL、(63.67 $\pm$ 3.44) $\times 10^6$ 个/mL、(45.33 $\pm$ 5.47) $\times 10^6$ 个/mL]与精子活率[(78.53 $\pm$ 1.26)%、(64.40 $\pm$ 3.14)%、(53.87 $\pm$ 3.65)%]明显降低,精子畸形率[(2.17 $\pm$ 0.75)%、(4.83 $\pm$ 0.75)%、(8.00 $\pm$ 1.10)%]升高($P=0.000$),血清中 T 水平[(2.68 $\pm$ 0.06) ng/mL、(2.38 $\pm$ 0.08) ng/mL 和 (2.10 $\pm$ 0.09) ng/mL]明显下降($P=0.000$),差异均有统计学意义,0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠的睾丸质量($P=0.001$)和睾丸脏器系数($P=0.004$)降低的差异有统计学意义;睾丸组织细胞 Bax 蛋白相对表达量(0.836 $\pm$ 0.004、1.185 $\pm$ 0.004、1.414 $\pm$ 0.001)随染毒剂量的递增而上升($P=0.000$),Bcl-2(1.368 $\pm$ 0.053、1.108 $\pm$ 0.040、0.751 $\pm$ 0.022)则相反($P=0.001$),同时,0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 染毒组 Pro-Caspase-3 蛋白表达明显降低,但 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达明显增加($P=0.000$)。**结论:**宫内暴露 TCDD 可使雄性仔鼠出现雌性化特征,影响雄性仔鼠生育能力,对雄性子代具有生殖毒性,其机制可能与仔鼠睾丸组织细胞增殖-凋亡失衡和细胞凋亡的线粒体通路被激活有关。

【关键词】2-3-7-8 四氯二苯并二噁英;雄性子代;生殖毒性;子宫内;暴露**【中图分类号】**R114**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-12-18

Reproductive toxicity of intrauterine exposure to

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male offspring rats

Tan Xuemei¹, Zhang Xiuli², Yu Kailun¹, Liu Manman¹, Tao Yuchang¹, Chen Yao¹, Yu Zengli¹

(1. Teaching and Research Section of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Zhengzhou University; 2. Nutrition Department, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect and mechanism of action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) intrauterine exposure on the reproductive function of male offspring rats. **Methods:** After mating, pregnant rats were randomly divided into high-dose TCDD group (0.5 $\mu\text{g/kg}$), low-dose TCDD group (0.1 $\mu\text{g/kg}$), and solvent control group, with 6 rats in each group. The TCDD groups and the control group were treated with TCDD and corn oil, respectively, by intragastric administration on gestation days 8-14 (GD8-14). After being delivered naturally, male offspring were measured for anogenital distance (AGD), and testicular organ coefficient was also calculated. Then the quality and quantity of sperm were analyzed by a sperm quality analyzer. In addition, the level of testosterone (T) in the serum of male offspring was determined by enzyme-linked immunosorbent assay, and the expression levels of the apoptosis-related proteins Bax, Bcl2, and caspase-3 were also measured. **Results:** Compared with the control group, both the low-dose group and high-dose group had a significantly shortened AGD[(1.32 $\pm$ 0.01) cm and (1.21 $\pm$ 0.02) cm vs. (1.49 $\pm$ 0.04) cm, $P=0.000$], and these two groups showed significant reductions in sperm count[(63.67 $\pm$ 3.44) $\times 10^6$ /mL and (45.33 $\pm$ 5.47) $\times 10^6$ /mL vs. (72.33 $\pm$ 4.46) $\times 10^6$ /mL] and sperm motility rate[(64.40 $\pm$ 3.14)% and (53.87 $\pm$ 3.65)% vs. (78.53 $\pm$ 1.26)%]. Furthermore, a significantly increased rate of sperm deformity[(4.83 $\pm$ 0.75)% and (8.00 $\pm$ 1.10)% vs. (2.17 $\pm$ 0.75)%], $P=0.000$] and a significantly decreased level of testosterone in serum[(2.38 $\pm$ 0.08) ng/mL and (2.10 $\pm$ 0.09) ng/mL vs. (2.68 $\pm$ 0.06) ng/mL, $P=0.000$] were also observed in these two groups. The testicular weight

作者介绍: 谭雪梅, Email: 1570880280@qq.com,

研究方向: 营养与相关疾病。

通信作者: 余增丽, Email: zly@zzu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 21577119)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190505.1702.004.html>

(2019-05-06)

and testicular organ coefficient in the high-dose group decreased significantly compared with those in the low-dose group ($P=0.001$ and 0.004 , respectively). With an increase in TCDD dose, the relative expression level of Bax protein increased significantly in testicular tissue cells (0.836 ± 0.004 vs. 1.185 ± 0.004 vs. 1.414 ± 0.001 , $P=0.000$), whereas the expression level of Bcl-2 demonstrated an opposite trend (1.368 ± 0.053 vs. 1.108 ± 0.040 vs. 0.751 ± 0.022 , $P=0.001$). Meanwhile, the high-dose group had a significant reduction in the expression level of pro-caspase-3 and a significant increase in the expression level of cleaved-caspase-3 ($P=0.000$).

Conclusion: Intrauterine exposure to TCDD can induce feminization of male offspring, affect their fertility, and cause reproductive toxicity. The mechanism may be related to cell proliferation-apoptosis imbalance and activation of the mitochondrial pathway of apoptosis in the testicular tissue cells of these offsprings.

[Key words] 2-3-7-8 Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin; male offspring rat; reproductive toxicity; intrauterine; exposure

雄性个体从胎儿生殖腺发生至性成熟的整个过程都受到多种因素的调控,包括性激素、下丘脑-垂体-性腺轴等。2-3-7-8 四氯二苯并二噁英(2-3-7-8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD)作为环境内分泌干扰物,其复杂多样的雌激素样作用可通过干扰正常的生理调控而损害性腺的分化发育^[1]。目前对 TCDD 的雄性生殖毒性研究多集中于 F0 代,研究表明,TCDD 可导致雄鼠睾丸萎缩,日精子产量下降,睾丸间质细胞数量减少,体积降低,影响生殖功能^[2-3],但宫内暴露 TCDD 对雄性子代性成熟期的生殖影响及机制尚不十分清楚,故本研究旨在探讨宫内暴露 TCDD 致 F1 代雄鼠的生殖影响。

细胞凋亡是指细胞在一定病理及生理条件下的一种自主的程序性死亡,正常的细胞凋亡可保证机体内细胞质量以及数量的稳定,但某些化学物质的暴露则会干扰细胞的正常凋亡。与细胞凋亡相关的因子有很多,Bax 是机体内的最主要的凋亡蛋白,可以促进凋亡,而 Bcl-2 的作用与其正好相反,两者相互作用共同调控线粒体凋亡通路。Caspase-3 作为细胞凋亡过程关键效应因子,其活化说明凋亡已不可逆^[4]。在前期的体外实验中^[5],作者观察到 TCDD 可使大鼠睾丸间质细胞凋亡增加,Bax、Caspase-3 蛋白相对表达量增加,Bcl-2 蛋白相对表达量降低,诱导睾丸间质细胞凋亡。

在此背景下,在 SD 孕鼠孕 8~14 d (gestation day 8-14, GD8-14) (性腺性别决定期)给予 TCDD 处理,观察雄性仔鼠肛门至生殖器的距离(anal to genital distance, AGD),睾丸的脏器系数,精子质量各相关指标,血清睾酮(testosterone, T)水平,凋亡相关蛋白 Bax、Bcl2、Caspase-3 的表达水平的影响,并进一步探究 TCDD 对生殖系统的发生及发育影响

的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准,SPF 级 sprague-dawley (SD) 大鼠,体质量 220 g 以上,8~10 周龄,性成熟 SD 雌性大鼠 18 只,雄鼠 18 只,均从河南实验动物中心购买[合格证号:SCXK(豫)2015-0004],饲养于屏障系统中,饲养标准:SPF 级环境下,温度 20℃~24℃、湿度 50%~60%,12 h 昼夜循环,自由饮水和摄食。

将雄鼠与雌鼠每晚 20:30 雌雄比 2:1 合笼,次日清晨查阴栓,查出者视为交配成功,记作 GD0。成功交配后,将母鼠随机分为低剂量 TCDD 组(0.1 μg/kg)、高剂量 TCDD 组(0.5 μg/kg)和溶剂对照组,每组 6 只。TCDD 组及对照组于 GD8-14 灌胃分别给予 TCDD 及玉米油处理。足月孕鼠自由分娩,保留所有仔鼠,饲养至性成熟。

1.2 实验指标及方法

1.2.1 观察雄性仔鼠雌性化的诱导效应 将出生后 21 d (postnatal day 21, PND 21) 雄性仔鼠仰卧位固定,测量其 AGD。

1.2.2 计算睾丸的脏器系数 称重,在 100 mg/L 水合氯醛 3 mL/kg 麻醉下采血后处死出生后 90 d (postnatal day 90, PND 90) 雄性仔鼠,快速取睾丸,称重并求得其脏器系数。脏器系数=(脏器质量/体质量)×100。测量完将每只动物一侧的睾丸保存在-80℃冰箱用于 western blot,并将睾丸的另一侧固定在 Bouin 液中用于后续的组织病理学观察。

1.2.3 血清 T 水平的测定 采用 ELISA 检测血清中 T 的水平。按照试剂盒说明书测定。

1.2.4 检测精子质量及数量 取左侧附睾,放在预热 37℃的 M199 培养基中,剪碎后于 37℃恒温培养箱里扩散 10 min。待精子充分扩散后,用双层滤纸过滤,进行精子计数、活率计算和畸形率计算。

1.2.5 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白的检测 将保存于 -80°C 冰箱的睾丸取出,提取睾丸组织总蛋白,蛋白浓度使用 BCA 法测定。蛋白充分变性后,取蛋白 $30\text{ }\mu\text{g}$ /组电泳分离后,转膜 (220 V , 90 min),封闭 (0.5 g/mL 脱脂牛奶, 37°C , 1 h),洗膜 (TBST, 4 次, 10 min /次),孵一抗 (4°C , 过夜),洗膜 (TBST, 4 次, 10 min /次),孵二抗 (37°C , 2 h) (抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司),洗膜 (TBST, 4 次, 10 min /次),滴加 ECL 发光液,在超灵敏凝胶成像仪上曝光后,利用 Image J 软件对结果进行相对定量分析。

1.3 统计学分析

利用 SPSS 17.0 对数据进行分析,所有实验指标均以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较,若方差齐性,采用 LSD- t 检验,若方差不齐,采用 Dunnett- t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 宫内 TCDD 暴露对雄性仔鼠 AGD 的影响

溶剂对照组、 $0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组及 $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠 AGD 分别为: (1.49 ± 0.04) cm、(1.32 ± 0.01) cm 和 (1.21 ± 0.02) cm。方差分析 3 组宫内 TCDD 暴露对雄性仔鼠 AGD 的差异,差别有统计学意义 ($F=108.24$, $P=0.000$),两两比较结果表明: $0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组及 $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠 AGD 与溶剂对照组雄性仔鼠 AGD 相比均明显降低 ($P=0.000$),且 $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠 AGD 较 $0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠 AGD 明显降低 ($P=0.000$),结果提示宫内 TCDD 暴露可降低雄性仔鼠 AGD,诱导雄性仔鼠雌性化。见表 1。

表 1 宫内 TCDD 暴露对仔鼠肛殖距的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	肛殖距 (cm)
溶剂对照组	1.49 ± 0.04
$0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组	1.32 ± 0.01^a
$0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组	1.21 ± 0.02^{ab}
F 值	108.240
P 值	0.000

注: a, 与溶剂对照组比较, $P=0.000$; b: 与 $0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组比较, $P=0.000$

2.2 宫内 TCDD 暴露对雄性仔鼠睾丸质量及其脏器系数的影响

宫内 TCDD 暴露,溶剂对照组、 $0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组及 $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组仔鼠睾丸质量分别为 (1.75 ± 0.15) g、(1.61 ± 0.04) g 和 (1.39 ± 0.18) g,方差分析 3 组宫内 TCDD 暴露对仔鼠睾丸质量的差异,差别有统计学意义 ($F=10.780$, $P=0.001$)。两两比较结果表明, $0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组仔鼠睾丸质量与溶剂对照组仔鼠睾丸质量相比无明显差异 ($P=0.099$), $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组仔鼠睾丸质量与溶剂对照组仔鼠睾丸质量相比明显

降低 ($P=0.000$), $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组仔鼠睾丸质量与 $0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组仔鼠睾丸质量相比明显降低 ($P=0.012$); 宫内 TCDD 暴露,仔鼠睾丸脏器系数分别为 (0.39 ± 0.04)%、(0.34 ± 0.04)% 和 (0.29 ± 0.03)%,方差分析 3 组宫内 TCDD 暴露对仔鼠睾丸脏器系数的差异,差异有统计学意义 ($F=8.190$, $P=0.004$)。两两比较结果表明, $0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组仔鼠睾丸脏器系数与溶剂对照组仔鼠睾丸脏器系数相比无明显差异 ($P=0.075$), $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组仔鼠睾丸脏器系数与溶剂对照组仔鼠睾丸脏器系数相比明显降低 ($P=0.001$), $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组仔鼠睾丸脏器系数与 $0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组仔鼠睾丸脏器系数相比无明显差异 ($P=0.050$)。见表 2。

表 2 宫内 TCDD 暴露对仔鼠睾丸重量及睾丸脏器质量系数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	睾丸质量 (g)	睾丸脏器系数 (%)
溶剂对照组	1.75 ± 0.15	0.39 ± 0.04
$0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组	1.61 ± 0.04^a	0.34 ± 0.04^d
$0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组	1.39 ± 0.18^{bc}	0.29 ± 0.03^{cd}
F 值	10.780	8.190
P 值	0.001	0.004

注: a, 与溶剂对照组比较, $P=0.099$; b: 与溶剂对照组比较, $P=0.000$; c: 与 $0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组比较, $P=0.012$; d: 与溶剂对照组比较, $P=0.075$; e: 与溶剂对照组比较, $P=0.001$; f: 与 $0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组比较, $P=0.050$

2.3 宫内 TCDD 暴露对雄性仔鼠血清 T 水平的影响

宫内暴露 TCDD,溶剂对照组、 $0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组及 $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠血清睾酮分别为 (2.68 ± 0.06) ng/mL、(2.38 ± 0.08) ng/mL 和 (2.10 ± 0.09) ng/mL。方差分析 3 组宫内 TCDD 暴露对雄性仔鼠血清睾酮的差异,差别有统计学意义 ($F=84.810$, $P=0.000$)。两两比较结果表明, $0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组及 $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠血清睾酮与溶剂对照组雄性仔鼠血清睾酮相比均明显降低 ($P=0.000$),且 $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠血清睾酮较 $0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠血清睾酮明显降低 ($P=0.000$)。见表 3。

表 3 宫内 TCDD 暴露对仔鼠血清中睾酮含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	睾酮 (ng/mL)
溶剂对照组	2.68 ± 0.06
$0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组	2.38 ± 0.08^a
$0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组	2.10 ± 0.09^{ab}
F 值	84.810
P 值	0.000

注: a, 与溶剂对照组比较, $P=0.000$; b: 与溶剂对照组比较, $P=0.000$

2.4 宫内 TCDD 暴露对雄性仔鼠精子质量和数量的影响

宫内暴露 TCDD,溶剂对照组、 $0.1\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组及 $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠精子计数、精子活率、精子畸形率分别为 (72.33 ± 4.46) $\times 10^6$ 个/mL、(63.67 ± 3.44) $\times 10^6$ 个/mL、

(45.33 ± 5.47) $\times 10^6$ 个/mL; (78.53 ± 1.26)%、(64.40 ± 3.14)%、(53.87 ± 3.65)% ; (2.17 ± 0.75)%、(4.83 ± 0.75)%、(8.00 ± 1.10)%。方差分析 3 组宫内 TCDD 暴露对雄性仔鼠精子计数的差异, 差别有统计学意义 ($F=55.530, P=0.000$)。两两比较结果表明, 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组与溶剂对照组雄性仔鼠精子计数相比明显降低 ($P=0.005$), 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠精子计数与溶剂对照组雄性仔鼠精子计数相比明显降低 ($P=0.000$), 且 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠精子计数较 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠精子计数明显降低 ($P=0.000$)。方差分析 3 组宫内 TCDD 暴露对雄性仔鼠精子活率的差异, 差别有统计学意义 ($F=111.130, P=0.000$)。两两比较结果表明, 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组及 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组与溶剂对照组雄性仔鼠精子活率相比均明显降低 ($P=0.000$), 且 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠精子活率较 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠精子活率明显降低 ($P=0.000$)。方差分析 3 组宫内 TCDD 暴露对雄性仔鼠精子畸形率的差异, 差别有统计学意义 ($F=65.790, P=0.000$)。两两比较结果表明, 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组及 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组与溶剂对照组雄性仔鼠精子畸形率相比均明显增高 ($P=0.000$), 且 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠精子畸形率较 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠精子畸形率明显增高 ($P=0.000$)。见表 4。宫内 TCDD 暴露致雄性仔鼠精子畸形如图 1 所示, 且畸形以缺尾畸形与卷尾畸形多见。结果提示, 宫内 TCDD 暴露可使精子数目与活率降低, 畸形率增高, 影响雄性仔鼠生育能力。

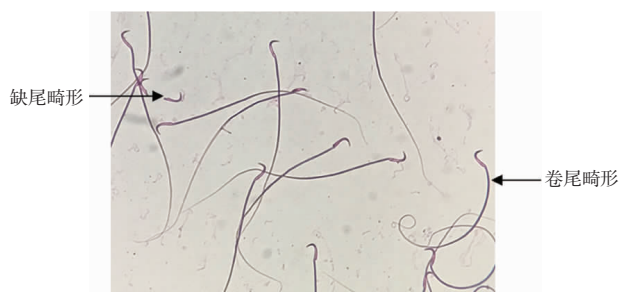


图 1 宫内 TCDD 暴露致仔鼠精子畸形形态图

表 4 宫内 TCDD 暴露对仔鼠精子计数、活率、畸形率的影响
($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	精子计数 ($\times 10^6$ 个/mL)	精子活率 (%)	精子畸形率 (%)
溶剂对照组	72.33 ± 4.46	78.53 ± 1.26	2.17 ± 0.75
0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组	63.67 ± 3.44^a	64.40 ± 3.14^d	4.83 ± 0.75^f
0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组	45.33 ± 5.47^{bc}	53.87 ± 3.65^{de}	8.00 ± 1.10^g
<i>F</i> 值	55.530	111.130	65.790
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注: a, 与溶剂对照组比较, $P=0.005$; b, 与溶剂对照组比较, $P=0.000$; c, 与 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组比较, $P=0.000$; d, 与溶剂对照组比较, $P=0.000$; e, 与 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组比较, $P=0.000$; f, 与溶剂对照组比较, $P=0.000$; g, 与 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组比较, $P=0.000$

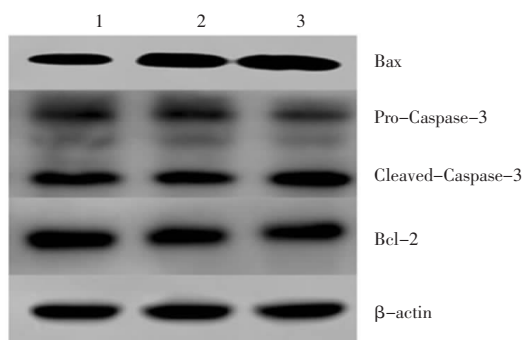
2.5 宫内 TCDD 暴露对仔鼠睾丸细胞凋亡相关蛋白表达的影响

图 2 为 Western blot 显影结果条带图, 表 5 为使用 Image J 软件对结果条带进行相对定量分析的结果。由表 5 可见, 宫内暴露 TCDD, 溶剂对照组、0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组及 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组仔鼠睾丸组织细胞 Bcl-2、Bax、Pro-Caspase-3、Cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量及 Bcl-2/Bax 比值分别为: Bcl-2 (1.368 ± 0.053 、 1.108 ± 0.040 、 0.751 ± 0.022)、Bax (0.836 ± 0.004 、 1.185 ± 0.004 、 1.414 ± 0.001)、Pro-Caspase-3 (0.540 ± 0.024 、 0.511 ± 0.029 、 0.323 ± 0.013)、Cleaved-Caspase-3 (0.978 ± 0.009 、 1.085 ± 0.041 、 1.739 ± 0.095)、Bcl-2/Bax 比值 (1.637 ± 0.069 、 0.936 ± 0.036 、 0.531 ± 0.016)。方差分析 3 组宫内 TCDD 暴露对仔鼠睾丸组织细胞 Bcl-2、Bax、Pro-Caspase-3、Cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量及 Bcl-2/Bax 比值的差异, 差别均有统计学意义, 分别为: Bcl-2 ($F=175.320, P=0.000$)、Bax ($F=313.710, P=0.000$)、Pro-Caspase-3 ($F=78.43, P=0.000$)、Cleaved-Caspase-3 ($F=141.650, P=0.000$)、Bcl-2/Bax 比值 ($F=447.780, P=0.000$)。两两比较结果表明: 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组及 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组与溶剂对照组雄性仔鼠睾丸组织细胞 Bcl-2 蛋白相对表达量相比均明显降低 ($P=0.000$), 且 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组较 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠睾丸组织细胞 Bcl-2 蛋白相对表达量明显降低 ($P=0.000$); 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组及 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组与溶剂对照组雄性仔鼠睾丸组织细胞 Bax 蛋白相对表达量相比均明显增高 ($P=0.000$), 且 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组较 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠睾丸组织细胞 Bax 蛋白相对表达量明显增高 ($P=0.000$); 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组及 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组与溶剂对照组雄性仔鼠睾丸组织细胞 Bcl-2/Bax 比值相比均明显降低 ($P=0.000$), 且 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组较 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠睾丸组织细胞 Bcl-2/Bax 比值明显降低 ($P=0.000$); 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组与溶剂对照组雄性仔鼠睾丸组织细胞 Pro-Caspase-3 蛋白相对表达量相比无明显差异 ($P=0.170$), 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组与溶剂对照组雄性仔鼠睾丸组织细胞 Pro-Caspase-3 蛋白相对表达量相比明显降低 ($P=0.000$), 且 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组较 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠睾丸组织细胞 Pro-Caspase-3 蛋白相对表达量明显降低 ($P=0.000$); 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组与溶剂对照组雄性仔鼠睾丸组织细胞 Cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量相比无明显差异 ($P=0.720$), 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组与溶剂对照组雄性仔鼠睾丸组织细胞 Cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量相比明显降低 ($P=0.000$), 且 0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组较 0.1 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 组雄性仔鼠睾丸组织细胞 Cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达量明显降低 ($P=0.000$)。结果提示, 宫内 TCDD 暴露可使睾丸细胞增殖能力降低, 增高睾丸细胞凋亡能力, 造成睾丸细胞增殖-凋亡失衡, 且与线粒体通路被激活相关。

表 5 宫内 TCDD 暴露对仔鼠睾丸凋亡相关蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Bcl-2	Bax	Bcl-2/ Bax	Pro-Caspase3	Cleaved-Caspase3
溶剂对照组	1.368 ± 0.053	0.836 ± 0.004	1.637 ± 0.069	0.540 ± 0.024	0.978 ± 0.009
0.1 μg/kg TCDD 组	1.108 ± 0.040 ^a	1.185 ± 0.004 ^c	0.936 ± 0.036 ^e	0.511 ± 0.029 ^g	1.085 ± 0.041 ⁱ
0.5 μg/kg TCDD 组	0.751 ± 0.022 ^{ab}	1.414 ± 0.001 ^{cd}	0.531 ± 0.016 ^{ef}	0.323 ± 0.013 ^{hi}	1.739 ± 0.095 ^{kl}
F 值	175.320	313.710	447.780	78.430	141.650
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与溶剂对照组比较, $P=0.000$;b:与 0.1 μg/kg TCDD 组比较, $P=0.000$;c:与溶剂对照组比较, $P=0.000$;d:与 0.1 μg/kg TCDD 组比较, $P=0.000$;e:与溶剂对照组比较, $P=0.000$;f:与 0.1 μg/kg TCDD 组比较, $P=0.000$;g:与溶剂对照组比较, $P=0.170$;h:与溶剂对照组比较, $P=0.000$;i:与 0.1 μg/kg TCDD 组比较, $P=0.000$;j:与溶剂对照组比较, $P=0.720$;k:与溶剂对照组比较, $P=0.000$;l:与 0.1 μg/kg TCDD 组比较, $P=0.000$



1:溶剂对照组;2:0.1 μg/kg TCDD 组;3:0.5 μg/kg TCDD 组

图 2 宫内 TCDD 暴露对仔鼠睾丸凋亡相关蛋白表达的影响

3 讨 论

TCDD作为环境内分泌干扰物的一种,对于男性具有明显生殖毒性。在个体的发育过程中,个体对TCDD具有极高的敏感性,即使摄入极少量的TCDD都可能对其生殖器官造成损害。本研究结果显示,宫内暴露TCDD可诱导雄性仔鼠出现雌性化特征,睾丸质量降低、发育迟缓;使精子数目和活率降低、畸形率增高,影响雄性仔鼠生育能力,导致雄性子代生殖毒性;Bcl2、Pro-Caspase-3 蛋白表达降低、Bax、Cleaved-Caspase-3 蛋白表达增高,说明宫内TCDD暴露能使睾丸细胞的增殖能力降低,凋亡能力增强,引起睾丸组织细胞增殖-凋亡失衡,与激活细胞凋亡的线粒体通路有关。

在睾丸形态发生期间,需要不同的睾丸细胞类型进行迁移^[6-8]。一些间质细胞(如前扁桃体和内皮细胞)来源于中肾细胞向睾丸的迁移以促进生精细胞的形成,而一些 Sertoli 细胞从体腔上皮细胞迁移^[9]。这些迁移发生于母鼠 GD8-14,即性腺发育性别决定期,这个时期对环境化学物异常敏感,接触

极少量的环境化学物即可对生殖系统产生极大损害。因而本实验选择在母鼠 GD8-14 给予 TCDD 灌胃给药。

肛殖距目前被用于作为评价雄性化指标的检测标准。在动物实验中,肛殖距常作为胎鼠的雄激素高低的标志。在本实验中,宫内暴露TCDD后,各剂量组的雄性仔鼠 AGD 较对照均有所缩短,该现象可作为改变雄激素作用的敏感性指标。这与 Loeffler 和 Peterson^[9]研究结果相一致,但与 Theobald 和 Peterson^[10]实验结果相反。

有研究表明,精子的受精能力与其数量、活率及形态有直接联系^[11]。本实验结果显示,宫内TCDD暴露能降低精子数目及活率。el-Sabeawy 和 Simanainen^[2,12]分别探讨了 21 日龄雄鼠及成年雄鼠暴露TCDD的生殖毒性,研究发现精子数目均有所降低,其结果与本实验相同。王沐沂等^[13]对 21 日龄幼鼠暴露TCDD进行研究,研究发现不仅精子数目有所降低,活率也明显下降。张建军等^[14]研究发现低剂量长期TCDD暴露可使雄性SD大鼠精子畸形率增高。Arima 等^[15]发现,产前暴露TCDD可使射精精子数量减少,精子活率及活力减低。以上研究均与本研究结果相一致。由表 3 可见,各TCDD组相较于对照组,精子畸形率均增高。结果提示宫内暴露TCDD可能因损伤精子而对雄性仔鼠生育能力造成影响,导致生殖毒性。

睾酮是一种主要通过睾丸分泌的类固醇激素,与第二性征的发育与维持及正常的性功能有关,且参与精子发生的调控。在此前提下,本研究测定了血清 T 水平,结果表明,宫内暴露TCDD可使仔鼠血清 T 水平下降。结果提示TCDD致使T水平下降是精子质量降低及雄性生殖损伤的重要原因之一。

有报道称,大鼠在宫内、哺乳期暴露于TCDD,结果发现实验组的睾丸质量均较对照组明显降

低^[2,10]。而 Simanainen 等^[12]研究发现青春期后暴露于 TCDD,因高剂量 TCDD 染毒时,动物体质量明显下降,睾丸质量不受影响,甚至睾丸的相对质量有所增高,故认为 TCDD 对睾丸质量影响的关键时期是在青春期之前。本研究与以上研究结果相一致,研究发现宫内暴露 TCDD 使仔鼠睾丸相对质量明显下降。

Bax 是机体内的最主要的凋亡蛋白,可以促进凋亡,而 Bcl-2 的作用与其正好相反,两者相互作用共同调控线粒体凋亡通路。Caspase-3 作为细胞凋亡过程关键效应因子,其活化说明凋亡已不可逆。Caspase-3 具有前体和活化体两种形式,而前体只有被切割为活化体后才具有活性,Cleaved-Caspase-3 为 Caspase-3 活性程度的标志,而 Caspase-3 蛋白前体可作为其蛋白表达水平的标志。本实验所用抗体能特异性识别 Caspase-3 前体和活化体,Caspase-3 蛋白表达量为检测出的 Pro-Caspase-3 蛋白表达量与 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达量之和。结果显示,睾丸组织细胞 Bax 蛋白相对表达量随染毒剂量的递增而上升,Bcl-2 则相反,同时,0.5 $\mu\text{g/kg}$ TCDD 染毒组 Pro-Caspase-3 蛋白表达明显降低,但 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达明显增加。结果提示,宫内 TCDD 暴露可使睾丸细胞的增殖能力下降,凋亡能力增加,从而引起睾丸细胞增值-凋亡失衡,与激活细胞凋亡的线粒体通路有关。

综上所述,TCDD 作为二噁英类中毒性最强的一种,宫内暴露可诱导雄性仔鼠出现雌性化特征,睾丸重量下降、发育迟缓;使精子活率和数目降低、畸形率增高,影响雄性仔鼠生育能力,导致雄性子代生殖毒性;其机制可能与仔鼠睾丸组织细胞增值-凋亡失衡和细胞凋亡的线粒体通路被激活有关,涉及的蛋白有 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3。

参 考 文 献

- [1] 夏革清,韩平,邹丽. 110 二噁英的拟雌激素作用和雌激素拮抗作用[J]. 国外医学(卫生学分册),2003,30(6):325-328.
- [2] el-Sabeawy F, Wang S, Overstreet J, et al. Treatment of rats during pubertal 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]. Toxicology & Applied Pharmacology, 1998, 150(2):427-442.
- [3] Johnson L, Wilker CE, Safe SH, et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin reduces the number, size, and organelle content of Leydig cells in adult rat testes[J]. Toxicology, 1994, 89(1):49-65.
- [4] Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch[J]. Nature Reviews Cancer, 2002, 2(9):647-656.
- [5] 殷俊,谭雪梅,张秀丽,等. TCDD 对大鼠睾丸间质细胞凋亡相关蛋白表达及 ROS 含量的影响[J]. 郑州大学学报(医学版),2017,52(5):558-562.
- [6] Karl J, Capel B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium[J]. Developmental Biology, 1998, 203(2):323-333.
- [7] Levine E, Cupp AS, Miyashiro L, et al. Role of transforming growth factor- α and the epidermal growth factor receptor in embryonic rat testis development[J]. Biology of Reproduction, 2000, 62(3):477-490.
- [8] Magre S, Jost A. Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus[J]. Journal of Electron Microscopy Technique, 1991, 19(2):172-188.
- [9] Loeffler IK, Peterson RE. Interactive effects of TCDD and p,p'-DDE on male reproductive tract development in in utero and lactationally exposed rats[J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 1999, 154(1):28-39.
- [10] 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]. Toxicology & Applied Pharmacology, 1997, 145(1):124-135.
- [11] 汪瑶瑶,曾向阳,孙建明. 精子 DNA 损伤与精液质量关系的研究进展[J]. 现代医药卫生,2014,30(11):1657-1660.
- [12] 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]. Toxicological Sciences, 2004, 81(2):401-407.
- [13] 王沐沂, Essam E, Overstreet JW, 等. 用计算机辅助精子分析系统测定 TCDD 对大鼠精子运动能力的影响[J]. 中国公共卫生, 1999, 15(5):6-8.
- [14] 张建军, 吴景欢, 闫克栋. 长期低剂量接触 2,3,7,8-四氯二苯并-p-二噁英对大鼠骨髓细胞微核和精子形态的影响[J]. 环境与健康杂志, 2010, 27(9):788-791.
- [15] Arima A, Kato H, Ooshima Y, et al. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces a reduction in epididymal and ejaculated sperm number in rhesus monkeys[J]. Reproductive Toxicology, 2009, 28(4):495-502.

(责任编辑:张辉洁)