



# 己烯雌酚诱导的氧化应激对青春期 大鼠睾丸类固醇合成的影响

李军延, 乔佩环, 张林媛, 刘 帅, 于 淼, 常 兵

(中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100050)

**【摘要】 目的** 己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)可以导致睾丸氧化损伤,而氧化损伤则可能是导致类固醇合成障碍的作用机制之一。本文探讨 DES 导致睾丸氧化损伤与睾酮合成途径的关系及可能的机制。**方法** 24 只健康 4 周龄雄性 Wistar 大鼠,随机分为 4 组,即对照组(玉米油)和 DES 染毒组(0.1、1.0、10.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ),每组 6 只,皮下注射每日 1 次,连续染毒 8 周。染毒结束后称量动物体重及雄性生殖器官和附属生殖器官(睾丸、附睾、前列腺)的重量,用生化方法检测睾丸匀浆中丙二醛(MDA)和活性氧自由基(ROS)的含量,抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)的活性变化以及类固醇合成酶 3 $\beta$ -羟类固醇脱氢酶 1(3 $\beta$ -HSD1)、17 $\beta$ -羟类固醇脱氢酶 3(17 $\beta$ -HSD3)的活性,用放射免疫法测定外周血中睾酮、促黄体生成素(LH)的水平,用 RT-PCR 检测固醇激素急性调节蛋白(StAR)、P<sub>450</sub>胆固醇侧链裂解酶(P<sub>450</sub>scc)、3 $\beta$ -羟类固醇脱氢酶 1(3 $\beta$ -HSD1)、17 $\beta$ -羟类固醇脱氢酶 3(17 $\beta$ -HSD3) mRNA 水平的表达变化。**结果** 10.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组睾丸、前列腺重量以及脏器系数明显减少,MDA 和 ROS 的氧化程度明显升高,SOD、CAT、GPx 的活性降低,3 $\beta$ -HSD1、17 $\beta$ -HSD3 的活性分别降低;血清睾酮降低,1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组 LH 降低,整个染毒区间呈现剂量效应关系;10.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组 StAR、P<sub>450</sub>scc、3 $\beta$ -HSD1、17 $\beta$ -HSD3 mRNA 表达减少,1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组 StAR、3 $\beta$ -HSD1 依然减少。**结论** DES 暴露干扰了大鼠睾丸氧化/抗氧化平衡,同时导致包括睾酮水平降低在内的雄性生殖危害。DES 导致 GPx、CAT 酶活力降低,抑制睾丸类固醇合成途径中 P<sub>450</sub>scc、3 $\beta$ -HSD1 mRNA 的表达水平,以及 3 $\beta$ -HSD1 活性降低导致睾酮减少。推测该途径可能是 DES 干扰类固醇合成的毒性作用机制之一。

**【关键词】** 己烯雌酚;间质细胞;氧化损伤;睾酮合成

**【中图分类号】** R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 06-0001-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.006.001

## Effects of diethylstilbestrol on testicular oxidative stress and steroidogenesis in male rats

LI Jun-yan, QIAO Pei-huan, ZHANG Lin-yuan, LIU Shuai, YU Miao, CHANG Bing

(National Institute for Occupational Health and Poison Control, China CDC, Beijing 100050, China)

**【Abstract】 Objective** It is well known that diethylstilbestrol (DES) can result in testicular oxidative injury, and one of its mechanisms of action is leading to dysfunction of steroidogenesis. The aim of this study was to investigate the relationship between testicular oxidative injury caused by DES and the key synthetase activities for the synthesis pathway of steroidogenesis and the possible mechanism. **Methods** Twenty-four 4-wk-old male Wistar albino rats were randomly divided into 4 groups, 6 rats each. Three doses of DES (0.1, 1.0 and 10  $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{d}$ ) groups and a vehicle (corn oil) control group, were respectively administered by subcutaneous injection once a day for eight weeks. The rats were sacrificed after 8 weeks treatment and the body weight, testis, epididymis, prostate were weighed, respectively. The testicular tissues

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30972448);环保公益性行业科研专项(201109038)。

[作者简介] 李军延(1963-),女,本科,副研究员,主要从事实验动物及管理研究 E-mail: lijy1@chinacdc.cn。

[通讯作者] 常兵(1961-),男,博士,研究员,主要从事生殖内分泌毒理学研究, E-mail: bjchangbing@sohu.com。

were homogenized and the oxidation of MDA and ROS, the activity changes of antioxidases SOD, CAT and GPx, as well as the activities of steroid synthetases 3 $\beta$ -HSD1 and 17 $\beta$ -HSD3 were determined by biochemical measurement. The levels of testosterone and LH in peripheral blood were measured by radioimmunoassay. The intensities of expression of StAR, P450scc, 3 $\beta$ -HSD1, 17 $\beta$ -HSD3-mRNA were detected by PCR. **Results** In the 10.0  $\mu$ g/kg dose group, the weights and organ coefficients of testis and prostate were decreased significantly, the oxidation of MDA and ROS was increased distinctly and the activities of SOD, CAT, GPx, 3 $\beta$ -HSD1 and 17 $\beta$ -HSD3 were reduced. The concentration of serum testosterone was decreased in the 10.0  $\mu$ g/kg dose group. In the 10.0  $\mu$ g/kg and 1.0  $\mu$ g/kg dose groups, the decline of LH level presented a dose-dependent manner, and the intensities of immunochemical positive staining for StAR, P450scc, 3 $\beta$ -HSD1 and 17 $\beta$ -HSD3 mRNA were decreased. **Conclusions** DES exposure results in disturbance of the oxidant/antioxidant balance and decline of testosterone level that induces reproductive impairment in male rats. DES induces reductions of both GPx and 3 $\beta$ -HSD activities which cause the decrease of testosterone synthesis. The expression of P450scc and 3 $\beta$ -HSD-mRNA, which are the key synthetases in biosynthetic pathway of steroidogenesis, are inhibited by DES, and it is speculated that the disturbance of steroidogenic synthesis enzymes may be one of the mechanisms of toxic effects of DES.

**【Key words】** Diethylstilbestrol; Testis; Rats; Leydig cells; Testosterone; Oxidative damage; Steroidogenesis

己烯雌酚 (diethylstilbestrol, DES) 是 1938 年合成的非甾体类雌激素, 据报道其药效约为 17 $\beta$ -雌二醇的 10 倍<sup>[1]</sup>, 曾作为预防流产或早孕的药物而被临床广泛使用<sup>[2]</sup>, 也作为动物促生长剂应用于畜禽生产中<sup>[3]</sup>, 虽然在全球多个国家和地区已被禁止, 但是养殖业等非法使用依然存在<sup>[4,5]</sup>, 其危害依然不可忽视。

DES 具有生殖毒性在人类以及实验动物中已经广泛证实<sup>[6,7]</sup>, 外源性雌激素可直接通过影响睾丸基因表达或间接通过下丘脑-垂体-睾丸轴反馈作用, 抑制睾酮合成, 打破雌/雄激素平衡, 干扰信号转导, 影响支持细胞增殖、分化及与生殖细胞的相互作用, 最终导致雄性生殖器官发育雄性化缺失, 支持细胞数量减少、功能受损, 以及精子发生异常<sup>[8,9]</sup>。DES 对雄性生殖系统危害包括氧化应激损伤<sup>[10,11]</sup>和类固醇合成异常导致的睾丸睾酮减少<sup>[12-14]</sup>, 但是两者间的关系尚不清楚, 我们研究 DES 对睾丸氧化应激损伤与抑制类固醇合成的关系, 并探讨 DES 对雄性生殖系统损伤的可能的新机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及饲养条件

健康 SPF 级 Wistar 大鼠, 21 日龄, 雄性 24 只, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 生产许可证号 SCXK(京)2007-0001。动物饲养于中国疾病预防控制中心动物室, 使用许可证号 SYXK(京)2009-0032。全价营养颗粒饲料和经反渗透过滤的纯净水由动物自由摄取。

### 1.2 材料与试剂

己烯雌酚 (diethylstilbestrol, DES) Sigma 公司生

产, 黄体生成素 (LH) 和睾酮 (T) 检测试剂由北京北方生物技术研究提供; SOD、CAT、GPx、MDA、ROS、3 $\beta$ -HSD1 和 17 $\beta$ -HSD3 试剂购自南京建成生物工程研究所。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司; Real-time PCR 试剂盒购自 KAPA Biosystem 公司; 723 型分光光度计 (天津普瑞斯公司); 荧光定量 PCR 仪 Roche LightCycler480 (美国罗氏)。

### 1.3 动物分组及染毒方法

动物经适应性饲养 7 d, 确认正常后, 大鼠按体重随机分为高 10.0  $\mu$ g/kg (6 只)、中 1.0  $\mu$ g/kg (6 只)、低 0.1  $\mu$ g/kg (6 只) 组和对照 (6 只) 共 4 组。DES 用无水乙醇溶解后震荡混悬于玉米油中, 根据大鼠体重确定实际染毒量, 对照组仅为玉米油, 每日 1 次连续 8 周皮下注射染毒。

### 1.4 体重与脏器重量 (系数) 检测

实验结束后, 称取动物体重, 然后麻醉处死动物, 全身及内脏观察, 取睾丸、附睾、前列腺称重, 计算脏器系数: 脏器系数 = 脏器湿重/动物体质量  $\times$  100%。

### 1.5 血清及睾丸内激素水平测定

股动脉取血 5 mL, 经过低温离心得到血清; 取 0.5 g 睾丸, 加生理盐水制成质量浓度为 10% 的组织匀浆, 离心后得到睾丸匀浆; 激素测定使用放射免疫方法, 分别测定血清黄体生成素 (LH)、睾酮 (T) 和睾丸匀浆中睾酮 (T), 按说明书操作。

### 1.6 睾丸组织抗氧化酶及类固醇合成酶活性测定

睾丸匀浆用于测定超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)、丙二醛 (MDA)、活性氧自由基 (ROS)、3 $\beta$  羟类固醇脱氢

酶 1 (3β-HSD1) 和 17β 羟类固醇脱氢酶 3 (17β-HSD3), 按说明书操作。

1.7 RT-qPCR 检测睾丸组织中类固醇合成酶 mRNA 表达水平

试验方法参照丁思进等进行<sup>[15]</sup>, 引物设计参照 Genbank 中固醇激素急性调节蛋白 (StAR)、P<sub>450</sub> 胆固醇侧链裂解酶 (P<sub>450</sub> scc)、3β 羟类固醇脱氢酶 1 (3β-HSD1)、17β 羟类固醇脱氢酶 3 (17β-HSD3) 的 mRNA 序列, 见表 1。

1.8 统计学方法

结果以均数加减标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用 SAS 8.2 统计软件进行统计学分析。计量资料用 Bartlett 法进行方差齐性检验, 若方差齐则进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 差异有统计学意义时用 Dunnett's *t* 法进行多重比较检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DES 暴露后体重、睾丸、附睾、前列腺重量及系数

低剂量组 1 只动物意外死亡。低剂量组体重与对照组比较未见改变, 中和高剂量组体重显著减少 (P < 0.01), 中剂量组体重与对照组比较减少 15.0%、高剂量组减少 17.0%; 中和高剂量组单侧睾丸和前列腺重量显著减少, 睾丸重量最大减少

40.6%, 前列腺最大减少 24.9%, 低剂量组未见变化; 单侧附睾的重量与脏器系数未见变化; 见表 2。

2.2 DES 暴露后 SOD、CAT、GPx 活性和 MDA, ROS 的水平

高剂量组抗氧化酶 SOD、CAT 和 GPx 活性显著降低, 其中 SOD 和 GPx 的活性在中剂量组也显著降低, SOD、CAT 和 GPx 活性降低最大分别为 36.5%、28.3%、29.2%, 同时 SOD 和 GPx 活性呈现剂量效应关系, 其他组未见变化; 高和中剂量组 MDA 和 ROS 水平显著升高, MDA 和 ROS 水平升高最大分别为 23.5% 和 31.0%, 其中 ROS 水平的变化呈现剂量效应关系, 其他组未见变化; 见表 3。

2.3 DES 暴露后类固醇合成酶及循环和睾丸内激素水平

高剂量组 3β-HSD1 活性显著降低 (P < 0.01), 最大下降 44.1%, 17β-HSD3 活性同样显著下降 (P < 0.05), 最大下降 27.3%; 促黄体生成素 (LH) 随染毒剂量的增加而降低, 中高剂量组显著降低, 最大下降 30.2%, 并且各组间变化呈现剂量效应关系; 循环以及睾丸内睾酮随剂量的增加呈现减少, 高剂量组循环睾酮显著减少 (P < 0.01), 中和高剂量组睾丸睾酮显著减少 (P < 0.01); 循环睾酮最大减少 16.5%, 睾丸睾酮最大减少 48.6%, DES 对睾丸内睾酮减少的作用更明显; 低剂量组上述指标均未见变化; 见表 4。

表 1 引物序列  
Tab.1 Sequences of premiers for the PCR

| 基因<br>Genes | 引物序列<br>Primer sequences                                                                 | 产物长度<br>Product length |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| StAR        | Forward primer: TTG GGC ATA CTC AAC AAC CA<br>Reverse primer: ATG ACA CCG CTT TGC TCA G  | 389 bp                 |
| P450scc     | Forward primer: AGG TGT AGC TCA GGA CTT<br>Reverse primer: AGG AGG CTA TAA AGG ACA CC    | 399 bp                 |
| 3β-HSD1     | Forward primer: TTG GTG CAG GAG GAAAGAAC<br>Reverse primer: CCG CAA GTA TCA TGA CAG A    | 547 bp                 |
| 17β-HSD3    | Forward primer: TTC TGC AAG GCT TTA CCA GG<br>Reverse primer: ACA AAC TCA TCG GCG GCT TT | 653 bp                 |
| β-actin     | Forward primer: CCCATCTATGAGGTTACGC<br>Reverse primer: TTTAATGTCACGCACGATTTTC            | 150 bp                 |

表 2 DES 暴露后雄性生殖系统的参数 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab.2 Male reproductive parameters in the male rats after exposure to DES

| 剂量<br>(μg/kg)    | 数量<br>(只)     | 体重<br>(g)        | 睾丸(右侧)<br>(g)         | 睾丸系数                      | 附睾(右侧)<br>(g)             | 附睾系数                      | 前列腺<br>(g)            | 前列腺系数                          |
|------------------|---------------|------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Doses<br>(μg/kg) | Number<br>(n) | Weight<br>(g)    | Testis (right)<br>(g) | Testicular<br>coefficient | Epididymis<br>(right) (g) | Epididymis<br>coefficient | Prostate gland<br>(g) | Coefficient of<br>the prostate |
| 0                | 6             | 440.20 ± 14.05   | 1.52 ± 0.12           | 0.35 ± 0.02               | 0.46 ± 0.02               | 0.10 ± 0.01               | 0.80 ± 0.08           | 0.18 ± 0.01                    |
| 0.10             | 5             | 441.23 ± 15.55   | 1.53 ± 0.11           | 0.35 ± 0.01               | 0.44 ± 0.05               | 0.10 ± 0.01               | 0.82 ± 0.04           | 0.19 ± 0.01                    |
| 1.00             | 6             | 376.09 ± 15.60** | 1.11 ± 0.14**         | 0.29 ± 0.03**             | 0.42 ± 0.05               | 0.11 ± 0.01               | 0.68 ± 0.05*          | 0.18 ± 0.01                    |
| 10.0             | 6             | 366.24 ± 16.75** | 0.91 ± 0.07**         | 0.25 ± 0.02**             | 0.42 ± 0.05               | 0.12 ± 0.01               | 0.60 ± 0.06**         | 0.16 ± 0.01*                   |

\* P < 0.05; \*\* P < 0.01

表 3 DES 暴露后 SOD、CAT、GPx 活性和 MDA、ROS 的水平( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab.3 The activities of SOD, CAT, GPx and levels of MDA, ROS of the male rats after exposure to DES

| 剂量<br>( $\mu\text{g/kg}$ )<br>Doses<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | 数量<br>(只)<br>Number<br>(n) | 超氧化物歧化酶<br>(nU/mg prot) SOD<br>(nU/mg prot) | 过氧化氢酶<br>(U/mg prot) CAT<br>(U/mg prot) | 谷胱甘肽过氧化物酶<br>(U/mg prot)<br>GPx<br>(U/mg prot) | 丙二醛<br>(U/mg prot)<br>MDA<br>(nmol/mg prot) | 活性氧自由基<br>(U/mg prot) ROS<br>(U/mg prot) |
|-------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------|
| 0                                                           | 6                          | 26.15 $\pm$ 1.33                            | 6.87 $\pm$ 0.73                         | 12.66 $\pm$ 1.16                               | 0.89 $\pm$ 0.14                             | 55.25 $\pm$ 4.23                         |
| 0.10                                                        | 5                          | 25.94 $\pm$ 0.84                            | 6.39 $\pm$ 0.68                         | 12.21 $\pm$ 1.11                               | 0.87 $\pm$ 0.16                             | 56.48 $\pm$ 3.91                         |
| 1.00                                                        | 6                          | 23.91 $\pm$ 1.22 *                          | 5.95 $\pm$ 0.74                         | 10.28 $\pm$ 1.22 *                             | 1.13 $\pm$ 0.19 *                           | 60.42 $\pm$ 3.39 *                       |
| 10.0                                                        | 6                          | 16.61 $\pm$ 1.24 **                         | 4.92 $\pm$ 0.79 **                      | 8.96 $\pm$ 1.09 **                             | 1.16 $\pm$ 0.18 *                           | 80.02 $\pm$ 3.76 **                      |

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

表 4 DES 暴露后类固醇合成酶及循环和睾丸内激素水平( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab.4 The activities of 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD3 and the levels of testosterone and LH of the male rats after exposure to DES

| 剂 量<br>( $\mu\text{g/kg}$ )<br>Doses<br>( $\mu\text{g/kg}$ ) | 数 量<br>(只)<br>Number<br>(n) | 3 $\beta$ 羟类固醇<br>脱氢酶 1<br>(U/mg prot)<br>3 $\beta$ -HSD1<br>(U/mg prot) | 17 $\beta$ 羟类固醇<br>脱氢酶 3<br>(U/mg prot)<br>17 $\beta$ -HSD3<br>(U/mg prot) | 黄体生成素<br>(mIU/mL)<br>LH<br>(mIU/mL) | 循环睾酮<br>(ng/mL)<br>Circulating testosterone<br>(ng/mL) | 睾丸内睾酮<br>(ng/mL)<br>Testicular testosterone<br>(ng/mL) |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 0                                                            | 6                           | 26.02 $\pm$ 3.02                                                         | 18.29 $\pm$ 2.84                                                           | 3.86 $\pm$ 0.49                     | 0.45 $\pm$ 0.04                                        | 12.26 $\pm$ 3.24                                       |
| 0.10                                                         | 5                           | 23.89 $\pm$ 3.21                                                         | 17.03 $\pm$ 3.16                                                           | 3.31 $\pm$ 0.37                     | 0.45 $\pm$ 0.03                                        | 12.33 $\pm$ 2.98                                       |
| 1.00                                                         | 6                           | 20.35 $\pm$ 2.24                                                         | 14.48 $\pm$ 2.74                                                           | 2.85 $\pm$ 0.70 *                   | 0.41 $\pm$ 0.04                                        | 8.23 $\pm$ 0.81 **                                     |
| 10.0                                                         | 6                           | 13.35 $\pm$ 2.35 **                                                      | 12.59 $\pm$ 3.02 *                                                         | 2.69 $\pm$ 0.66 **                  | 0.37 $\pm$ 0.04 **                                     | 6.30 $\pm$ 1.95 **                                     |

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

表 5 DES 暴露后睾丸内 StAR, P450<sub>scc</sub>, 3 $\beta$ -HSD1 和 17 $\beta$ -HSD3 mRNA 的表达水平( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab.5 The relative expression of StAR, P450<sub>scc</sub>, 3 $\beta$ -HSD1 and 17 $\beta$ -HSD3 mRNA in the male rats after exposure to DES

| 剂量( $\mu\text{g/kg}$ )<br>Doses ( $\mu\text{g/kg}$ ) | 固醇激素急性调节<br>蛋白/ $\beta$ 肌动蛋白<br>StAR/ $\beta$ -actin | P450 胆固醇侧链<br>裂解酶/ $\beta$ 肌动蛋白<br>P450 <sub>scc</sub> / $\beta$ -actin | 3 $\beta$ 羟类固醇<br>脱氢酶 1/ $\beta$ 肌动蛋白<br>3 $\beta$ -HSD1/ $\beta$ -actin | 17 $\beta$ 羟类固醇<br>脱氢酶 3/ $\beta$ 肌动蛋白<br>17 $\beta$ -HSD3/ $\beta$ -actin |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| 0                                                    | 1.02 $\pm$ 0.05                                      | 1.00 $\pm$ 0.01                                                         | 0.99 $\pm$ 0.06                                                          | 1.00 $\pm$ 0.02                                                            |
| 0.1                                                  | 0.90 $\pm$ 0.07                                      | 0.87 $\pm$ 0.09                                                         | 0.91 $\pm$ 0.08                                                          | 0.98 $\pm$ 0.03                                                            |
| 1.0                                                  | 0.87 $\pm$ 0.08                                      | 0.77 $\pm$ 0.10 *                                                       | 0.63 $\pm$ 0.12 *                                                        | 0.78 $\pm$ 0.11 *                                                          |
| 10.0                                                 | 0.76 $\pm$ 0.09 *                                    | 0.44 $\pm$ 0.05 **                                                      | 0.53 $\pm$ 0.03 **                                                       | 0.81 $\pm$ 0.13                                                            |

\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

2.4 DES 暴露后睾丸内 StAR, P450<sub>scc</sub>、3 $\beta$ -HSD1 和 17 $\beta$ -HSD3 mRNA 的相对表达水平

StAR、P450<sub>scc</sub>、3 $\beta$ -HSD1 和 17 $\beta$ -HSD3 mRNA 水平分别降低,StAR 在高剂量组与对照组比较显著减少( $P < 0.05$ ),最大减少了 25.8%,P450<sub>scc</sub> 在中和高剂量组中分别显著性减少( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ),最大减少 56.1%。3 $\beta$ -HSD1 在中和高剂量组中分别显著减少( $P < 0.01$ ),最大减少了 46.6%。17 $\beta$ -HSD3 在高剂量组未出现有统计学意义的改变,仅中剂量组显著减少( $P < 0.05$ ),最大减少 29.5%;见表 5。

3 讨论

通过对 28 日龄大鼠进行 8 周(包括青春前期,青春期直到性成熟期)不同剂量 DES 皮下注射染毒,结果显示中和高剂量组体重、睾丸重量、睾丸脏器系数、前列腺脏器系数均减少;除附睾之外,包括

睾丸和前列腺的性腺受到影响,出现重量减轻的现象。促性腺激素中促黄体生成素(LH)随染毒剂量的增加而降低,中高剂量组显著降低,并且各组间变化呈现剂量效应关系;循环以及睾丸内睾酮随剂量的增加呈现减少,其中高剂量组循环睾酮显著减少,中和高剂量组睾丸睾酮显著减少;DES 可以对睾丸中性腺以及附属性腺直接产生作用,同时对下丘脑-垂体-睾丸轴激素调控产生影响,符合既往 DES 对雄性生殖毒性的作用特征<sup>[12-14]</sup>。

研究显示一些化学物质可以扰乱睾丸内部环境,并通过破坏睾丸细胞的氧化/抗氧化平衡机制损伤睾丸功能<sup>[16,17]</sup>。睾酮的生物合成在睾丸间质细胞,产生睾酮的类固醇合成级联反应本身会产生活性氧 ROS<sup>[18]</sup>。由于过度的 ROS 水平可以造成睾丸功能的损伤,所以睾丸具备一个有效的抗氧化剂体系,对 ROS 的损伤进行保护<sup>[19]</sup>。但是过度的环境毒物暴露已经显示出干扰睾丸的氧化与抗氧化

作用的平衡,损伤睾丸功能的作用<sup>[16]</sup>。DES 对雄性生殖系统具有抑制抗氧化酶活性,提高活性氧水平,导致氧化/抗氧化失衡毒性的作用。成熟仓鼠皮下注射 1.0 mg/kg 连续染毒 1 周,发现睾丸 SOD、GPx 和 T-AOC 显著降低,MDA 水平明显增加<sup>[10]</sup>。成年雄性大鼠经口染毒 2 周,睾丸形态出现毒性改变,具有中和 ROS 作用的硫氧还原蛋白-1 受到抑制,导致细胞的氧化还原失常,造成睾丸的毒性损伤<sup>[11]</sup>。我们的结果显示,染毒 8 周后高剂量组抗氧化酶 SOD、CAT 和 GPx 活性显著降低、其中 SOD 和 GPx 的活性在中剂量组也显著降低、同时 SOD 和 GPx 活性呈现剂量效应关系;高和中剂量组 MDA 和 ROS 水平显著升高,其中 ROS 水平的变化呈现剂量效应关系。提示 DES 的生殖毒性与 ROS 密切相关,DES 通过降低抗氧化酶水平,增加 ROS 含量,干扰间质细胞正常功能,导致睾酮生成减少。

间质细胞合成睾酮通过 StAR 蛋白把胆固醇转运至线粒体内, P450<sub>scc</sub> 将胆固醇侧链裂解转化为孕烯醇酮, 3 $\beta$ -HSD 催化孕烯醇酮转化生成孕酮, 17 $\beta$ -HSD3 使得雄烯二酮最终催化形成具有生物活性的睾酮(T)<sup>[20]</sup>。在睾丸雄激素生物合成的过程中 StAR、P450<sub>scc</sub> 为限速酶, 3 $\beta$ -HSD 和 17 $\beta$ -HSD3 是参与固醇类激素生成以及激素活性和非活性之间互相转化的关键酶,对于维持哺乳动物体内激素之间的平衡、调节激素生成和代谢发挥着重要的作用。我们的结果显示循环以及睾丸内睾酮随剂量的增加呈现减少,其中循环睾酮最大减少 16.5%, 睾丸睾酮最大减少 48.6%。结果表明 DES 可以减少循环血液和睾丸内睾酮水平,同时对睾丸内睾酮减少的作用更明显。DES 在胎儿期、新生儿期以及成熟期啮齿动物暴露中虽然睾酮减少作为毒性作用共同特征之一,但是对类固醇合成酶作用显示差异,导致睾酮减少的机制的不同。胎儿期小鼠暴露 DES 在妊娠 18.5 d,类固醇合成酶系列中 StAR 的抑制最明显<sup>[21]</sup>;在新生儿期出生 4 日大鼠 DES 染毒 14 天, 3 $\beta$ -HSD 等表达未发生变化,但是 StAR 表达显著减少<sup>[22]</sup>。成熟大鼠 DES 染毒 2 周, P450<sub>scc</sub> 表达明显受到抑制, StAR 表达未见改变,提示在成年大鼠类固醇合成途径中细胞色素 P450<sub>scc</sub> 是 DES 引起生殖毒性作用的首要靶基因<sup>[23]</sup>。我们的结果显示 StAR、P450<sub>scc</sub>、3 $\beta$ -HSD1 和 17 $\beta$ -HSD3 的 mRNA 表达均受到抑制,但是其中 P450<sub>scc</sub> 和 3 $\beta$ -HSD1 最敏感,受抑制程度高,最大降低分别为 56% 和

47%。类固醇合成酶中 3 $\beta$ -HSD1 的酶活性同样显示最敏感,最大减少约 48.7%,根据我们的结果可以推断,DES 暴露在包括青春前期、青春期在内的整个性成熟前,主要通过抑制 P450<sub>scc</sub> 和 3 $\beta$ -HSD1 干扰类固醇激素合成。另外,有研究显示对 4 周龄大鼠暴露 DES 通过 3 $\beta$ -HSD 介导的类固醇合成抑制,导致睾酮减少<sup>[24]</sup>,该研究结果支持我们现有性成熟前期 DES 暴露的数据。我们认为在生命周期中 DES 对类固醇合成途径的作用不同,可以分为胎儿和新生儿期,性成熟前期以及成熟期,当然主要原因与间质细胞分型有关(大鼠约在 56 d 前后未成熟型分化形成成熟型间质细胞),同时染毒剂量和方式在分期中的意义尚需考量。

我们的结果显示 DES 对睾丸具有干扰氧化应激/抗氧化平衡作用,同时影响间质细胞正常功能,导致睾酮生成减少。典型内分泌干扰物质显示出增加睾丸活性氧的生产水平并扰乱类固醇合成毒性作用特征。在类固醇激素生物合成途径中各种酶系统被认为是内分泌干扰物重要靶基因<sup>[25]</sup>。如多氯联苯(Aroclor 1254)在大鼠睾丸间质细胞体外培养中,显示抑制抗氧化酶(SOD、CAT、GPx 等)的活性,增加 LPO 和 ROS 水平,同时减少 P450<sub>scc</sub>、3 $\beta$ -HSD 和 17 $\beta$ -HSD mRNA 转录水平<sup>[26]</sup>。对杀虫剂-林丹(lindane)的体内研究显示,5 mg/kg 的林丹染毒 30 d,随着氧化应激反应的增强,睾丸类固醇合成酶 3 $\beta$ -HSD 和 17 $\beta$ -HSD 活性降低<sup>[27]</sup>。林丹单次染毒后 StAR 蛋白, 3 $\beta$ -HSD 和 17 $\beta$ -HSD 活性均出现降低<sup>[28]</sup>。在 15 ~ 30 d 染毒,林丹可以显著抑制睾丸雄激素的合成,显著减少外周血液中 FSH、LH、睾酮的水平和睾丸内睾酮的水平,同时抑制 3 $\beta$ -HSD 和 17 $\beta$ -HSD 活性<sup>[29]</sup>。上述研究结果(从体外培养细胞到整体动物实验)与我们的研究结果同样可以推论内分泌干扰物质(雌激素活性物质)可以通过对睾丸氧化应激的直接作用,干扰睾丸氧化/抗氧化平衡,损伤睾丸间质细胞功能,抑制类固醇合成关键酶系,导致睾酮水平降低。我们的研究首次证实 DES 对睾丸氧化/抗氧化平衡的作用和睾酮减少为主要特征的雄性生殖毒性两者的联系。

#### 参考文献:

- [1] Daston GP, Gooch JW, Breslin WJ, et al. Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data [J]. Reprod Toxicol, 1997, 11 (4): 465 - 481.

- [2] Newbold RR, McLachlan JA. Transplacental hormonal carcinogenesis: diethylstilbestrol as an example [J]. *Prog Clin Biol Res*, 1996, 394:131–147.
- [3] Lange IG, Daxenberger A, Schiffer B, et al. Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment [J]. *Analyt Chim Acta*, 2002, 473(1):27–37.
- [4] 袁超, 李杰, 耿微, 等. 哈尔滨市售动物性食品中兽药残留量检测 [J]. *中国公共卫生*, 2009, 25(6):747–748.
- [5] 晓华, 李迎月, 何洁仪, 等. 广州市部分动物源性食品激素及抗生素残留状况分析 [J]. *中国热带医学*, 2009, 9(10):2081–2082.
- [6] Klip H, Verloop J, van Gool JD, et al. OMEGA Project Group. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study [J]. *Lancet*, 2002, 359(9312):1102–1107.
- [7] Newbold RR. Prenatal exposure to diethylstilbestrol (DES) [J]. *Fertil Steril*, 2008, (2 Suppl):e55–e56.
- [8] Rivas A, Fisher JS, McKinnell C, et al. Induction of reproductive tract developmental abnormalities in the male rat by lowering androgen production or action in combination with a low dose of diethylstilbestrol: evidence for importance of the androgen-estrogen balance [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(12):4797–4808.
- [9] Fielden MR, Halgren RG, Fong CJ, et al. Gestational and lactational exposure of male mice to diethylstilbestrol causes long-term effects on the testis, sperm fertilizing ability in vitro, and testicular gene expression [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(8):3044–3059.
- [10] Ma A, Yang X, Wang Z, et al. Adult exposure to diethylstilbestrol induces spermatogenic cell apoptosis in vivo through increased oxidative stress in male hamster [J]. *Reprod Toxicol*, 2008, 25(3):367–373.
- [11] Li Y, Okumura K, Nomura S, et al. Oxidatively damaged proteins in the early stage of testicular toxicities in male rats by orally administered with a synthetic oestrogen, diethylstilbestrol [J]. *Reprod Toxicol*, 2011, 31(1):26–34.
- [12] Haavisto T, Nurmela K, Pohjanvirta R, et al. Prenatal testosterone and luteinizing hormone levels in male rats exposed during pregnancy to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and diethylstilbestrol [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, 178(1–2):169–179.
- [13] Sharpe RM. The ‘oestrogen hypothesis’- where do we stand now? [J]. *Int J Androl*, 2003, 26(1):2–15.
- [14] van den Driesche S, Walker M, McKinnell C, et al. Proposed role for COUP-TFII in regulating fetal Leydig cell steroidogenesis, perturbation of which leads to masculinization disorders in rodents [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5):e37064.
- [15] 丁思进, 乔佩环, 张林媛, 等.  $17\beta$ -雌二醇通过 HPGA 和 ER $\alpha$  干扰睾酮合成调控精子发生 [J]. *卫生研究*, 2013, 42(3):410–414.
- [16] Saradha B, Mathur PP. Effect of environmental contaminants on male reproduction [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2006, 21:34–41.
- [17] Mathur PP, Saradha B, Vaithinathan S. Impact of environmental toxicants on testicular function [J]. *Immun Endoc Metab Agents Med Chem*, 2008, 8:79–90.
- [18] Hanukoglu I. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells [J]. *Drug Metab Rev*, 2006, 38:171–196.
- [19] Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2008, 1:15–24.
- [20] Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones [J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(6):947–970.
- [21] Guyot R, Odet F, Leduque P, et al. Diethylstilbestrol inhibits the expression of the steroidogenic acute regulatory protein in mouse fetal testis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 220(1–2):67–75.
- [22] Mikkilä TF, Toppari J, Paranko J. Effects of neonatal exposure to 4-tert-octylphenol, diethylstilbestrol, and flutamide on steroidogenesis in infantile rat testis [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 91(2):456–466.
- [23] Maeda N, Okumura K, Tanaka E, et al. Downregulation of cytochrome P450<sub>scc</sub> as an initial adverse effect of adult exposure to diethylstilbestrol on testicular steroidogenesis [J]. *Environ Toxicol*, 2013, 6:20.
- [24] Kim HH, Kwak DH, Yon JM, et al. Differential expression of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase mRNA in rat testes exposed to endocrine disruptors [J]. *J Reprod Dev*, 2007, 53(3):465–471.
- [25] Mathur PP, DCruz SC. The effect of environmental contaminants on testicular function [J]. *Asian J Androl*, 2011, 13(4):585–591.
- [26] Murugesan P, Muthusamy T, Balasubramanian K, et al. Polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) inhibits testosterone biosynthesis and antioxidant enzymes in cultured rat Leydig cells [J]. *Reprod Toxicol*, 2008, 25:447–454.
- [27] Sujatha R, Chitra KC, Latchoumycandane C, et al. Effect of lindane on testicular antioxidant system and steroidogenic enzymes in adult rats [J]. *Asian J Androl*, 2001, 3:135–138.
- [28] Saradha B, Vaithinathan S, Mathur PP. Single exposure to low dose of lindane causes transient decrease in testicular steroidogenesis in adult male Wistar rats [J]. *Toxicology*, 2008, 244:190–197.
- [29] Singh SK, Pandey RS. Effect of sub-chronic endosulfan exposures on plasma gonadotrophins, testosterone, testicular testosterone and enzymes of androgen biosynthesis in rat [J]. *Indian J Exp Biol*, 1990, 28:953–956.

[修回日期]2014-04-20