

炔雌醇对大鼠睾丸的毒性与氧化损伤作用

杨翠军¹, 崔文典², 刘芳¹, 马媛媛¹, 高翠¹, 葛剑¹

(1. 河北北方学院, 河北 张家口 075000; 2. 张家口市草原监理站, 河北 张家口 075000)

摘要: 为了研究环境雌激素炔雌醇的生殖毒性与活性氧的关系, 按 0.1、0.5、1.0、5.0 mg/kg 的药物剂量对雄性大鼠给药, 测定大鼠的睾丸质量、睾丸及血浆中超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量。结果表明: 随着给药剂量增加, 睾丸质量显著下降, 睾丸萎缩; 睾丸组织和血浆中 SOD 和 GSH-Px 水平显著下降。说明炔雌醇的生殖毒性与细胞活性氧(ROS)有关, 炔雌醇可能通过降低抗氧化酶的含量, 增加 ROS 的含量, 导致生殖损伤。

关键词: 炔雌醇; 大鼠; 睾丸; 活性氧; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶

中图分类号: S859.83 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)11-0150-03

The Relationship between Reproductive Toxicity and Oxidative Damage Induced by Ethinylestradiol in Rats

YANG Cui-jun¹, CUI Wen-dian², LIU Fang¹, MA Yuan-yuan¹, GAO Cui¹, GE Jian¹

(1. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

2. Zhangjiakou Grassland Management Station, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: To explore the relationship between reproductive toxicity and oxidative damage induced by ethinylestradiol, the rats were treated with different dosages of ethinylestradiol, which were 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mg/kg, respectively. The testicular weight and the contents of SOD and GSH-Px in plasma and testicular were measured. The results showed that testicular weight decreased significantly with increasing dosages of ethinylestradiol. The antioxidant enzymes including SOD and GSH-Px in testicular tissue and plasma all decreased significantly. In a conclusion, there is a close relationship between reproductive toxicity of ethinylestradiol and ROS.

Key words: ethinylestradiol; rat; testicular; ROS; SOD; GSH-Px

随着现代工农业的飞速发展, 大量的内分泌干扰物释放到环境中, 对世界范围内的动物造成明显影响, 导致动物出生缺陷增加、繁殖力下降等。环境内分泌干扰物(environmental endocrine disruptors chemicals, EDCs)是一类通过干扰人类和其他生物内分泌系统功能而影响生殖健康的化学物质。环境雌激素(environmental estrogens, EEs)是 EDCs 中最为重要的一类, 能够引起各种类型的雄性生殖障碍, 如性腺发育不良、睾丸萎缩、精子活力降低、睾丸肿瘤等, 导致许多野生动物的繁殖能力显著下降, 而且对人类的生殖健康也产生了潜在威胁^[1]。

炔雌醇(ethinylestradiol, EE2)是合成避孕药的一种常用成分, 它可以通过污水处理系统进入自然环境。在污水处理系统排出的水中, EE2 的质量浓度可达 7.2~42 ng/L^[2]。由于 EE2 的半衰期长且可生物富集, 能够对动物机体造成生殖损伤。研究证实, EE2 能够导致鱼类不育甚至影响鱼类的种群繁殖^[2]; 新生期雄性大鼠暴露于 EE2 中可引起雄性生殖损伤, 如抑制睾丸、附睾的发育, 导致隐睾、睾丸积液和附睾肿物等, 引起附睾内精子数量减少, 降低大鼠的生育能力^[3]。目前, 环境雌激素的雄性生殖毒性已经得到确认, 但其作用机制尚不清晰。研究

收稿日期: 2012-05-26

基金项目: 河北北方学院自然科学基金项目(Q201134)

作者简介: 杨翠军(1979-), 女, 河北石家庄人, 讲师, 硕士, 主要从事病理学研究。E-mail: yangcuijun45@126.com

表明,环境雌激素引起的生精损伤可能与细胞活性氧(ROS)有密切关系^[4]。本研究以炔雌醇作为研究环境雌激素效应的药物模型,探讨炔雌醇对大鼠生殖系统的氧化损伤,旨在了解环境雌激素对雄性动物毒性的具体作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 供试大鼠购自河北北方学院实验动物中心,从中选取 50 只雄性青年大鼠,清洁级,体质量在 200~220 g。

1.1.2 试剂 己烯雌酚购自 Sigma 公司;超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 试验分组 大鼠饲养环境:室温为 $(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$,白天和黑夜时间均为 12 h,湿度在 $(50\pm 5)\%$,自由取食和饮水。大鼠自购买之日起,适应环境 1 周。然后将大鼠随机分为 5 组,每组 10 只,分别为对照组、1 组、2 组、3 组、4 组。1 组、2 组、3 组、4 组分别按 0.1、0.5、1.0、5.0 mg/kg 腹腔注射 100 μL 的己烯雌酚,对照组注射生理盐水 100 μL ,每组给药间隔 3 d 并称质量,各组连续注射 5 次后,再继续饲养 1 周,进行取材。

1.2.2 试验取材 每组大鼠约每隔 1 周采血 1 次,然后 5 000 r/min 离心 10 min,取血浆保存于 -80°C 冰箱中备用。试验最后一天,处死动物,称取睾丸质量。将睾丸组织匀浆,液氮冷冻后,保存于 -80°C 冰箱中备用。

1.2.3 抗氧化能力测定 睾丸组织和血浆中抗氧化酶,如 SOD 和 GSH-Px 的检测使用相应试剂盒,方法及步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.4 数据统计 所有试验数据均采用 SPSS 11.0 进行统计分析,均以(平均值 \pm 标准差)表示,组间进行 t 检验。

2 结果与分析

2.1 大鼠体质量及睾丸质量

由图 1 可见,相同时期各组间大鼠平均体质量无显著差异($P>0.05$)。由图 2 可见,对照组、1 组、2 组、3 组、4 组睾丸质量分别为 (0.52 ± 0.01) g、 (0.50 ± 0.02) g、 (0.32 ± 0.02) g、 (0.25 ± 0.02) g、 (0.20 ± 0.02) g,对各组进行 t 检验,除对照组与 1 组差异不显著($P>0.05$)外,其余组间差异显著($P<0.05$)。

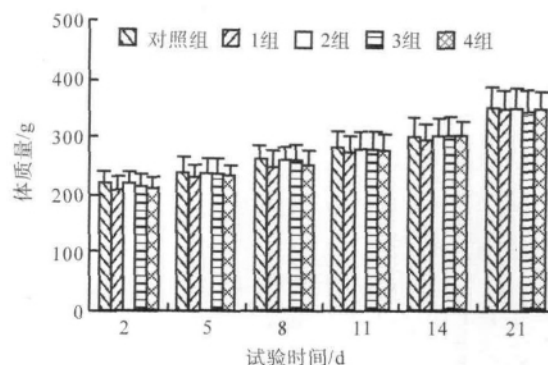
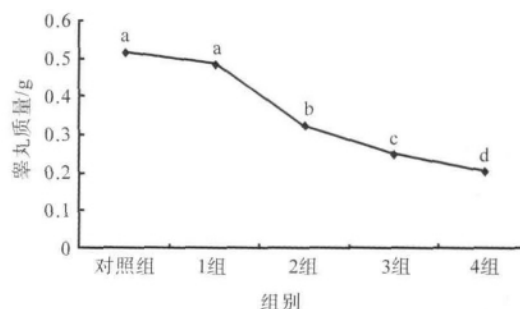


图 1 炔雌醇对大鼠体质量的影响



不同组间相同字母代表差异不显著($P>0.05$),
不同字母代表差异显著($P<0.05$)

图 2 炔雌醇对大鼠睾丸质量的影响

2.2 抗氧化能力测定结果

2.2.1 睾丸组织中 SOD 和 GSH-Px 水平测定结果 连续 5 次对各组大鼠注射不同剂量炔雌醇药剂后,导致大鼠睾丸组织中 SOD 和 GSH-Px 活性显著降低,具体见表 1。由表 1 可见,注射炔雌醇后,大鼠 SOD 活性和 GSH-Px 活性均显著低于对照组($P<0.05$),并且随着注射剂量的增大,SOD 活性和 GSH-Px 活性呈显著降低趋势。

表 1 各组大鼠睾丸组织中 SOD 和 GSH-Px 水平的比较

组别	大鼠数量/只	注射药物剂量/(mg/kg)	SOD/(U/mg)	GSH-Px/(U/mg)
对照组	10	0	135.4 \pm 9.53a	40.4 \pm 2.70a
1 组	10	0.1	116.0 \pm 7.78b	36.8 \pm 1.92b
2 组	10	0.5	92.6 \pm 3.85c	33.2 \pm 2.39bc
3 组	10	1.0	83.4 \pm 4.77d	29.8 \pm 1.92c
4 组	10	5.0	60.6 \pm 5.13e	21.8 \pm 2.59d

注:同列相同字母表示差异不显著($P>0.05$),字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

2.2.2 不同处理时期血浆中 SOD 水平测定结果

由图 3 可见,对照组的大鼠在各个处理时期血浆中 SOD 水平没有显著变化($P>0.05$);随着时间的延长,试验 1、2、3、4 组的大鼠血浆中 SOD 水平逐渐降低,除试验 1 组的第 15 天与第 21 天血浆 SOD 水平差异不显著外($P=0.071$),其余各组的各个时期(第 1、8、15、21 天)差异均显著($P<$

0.05)。与对照组相比,在试验第 1 天,各处理组大鼠的血浆 SOD 水平差异不显著($P>0.05$),其余各处理时期对照组与试验组相比差异显著($P<0.05$),且血浆中 SOD 水平随着药物剂量增加呈下降趋势。

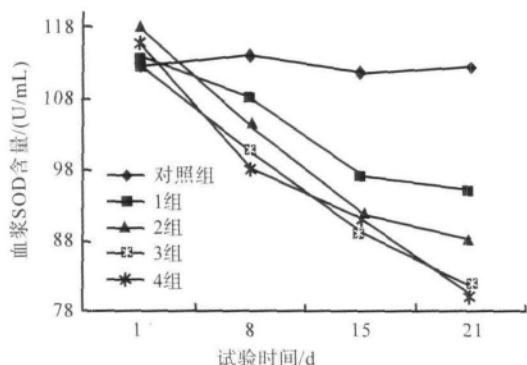


图 3 不同处理时期和不同给药剂量对大鼠血浆 SOD 水平的影响

2.2.3 不同处理时期血浆中 GSH-Px 水平测定结果 各组大鼠不同时期血浆中 GSH-Px 水平测定结果如图 4 所示。对照组在整个试验期 GSH-Px 水平无显著性差异;除对照组外,1、2、3、4 组在整个处理时期 GSH-Px 水平呈下降趋势,除 1 组和 3 组在试验的第 1 天和第 8 天,以及 4 组在试验的第 8 天和第 15 天血浆中 GSH-Px 水平差异不显著外($P>0.05$),其余各组在试验的第 1、8、15、21 天血浆中 GSH-Px 水平差异显著($P<0.05$)。通过对同一时期不同组别的大鼠血浆中 GSH-Px 水平的统计分析得出,在总体趋势上,随着用药剂量的增加,同一时期血浆中 GSH-Px 水平呈下降趋势;测定第 1 天,各组大鼠血浆中 GSH-Px 水平差异不显著($P>0.05$);在第 8 天,除 1、2 组与对照组血浆中 GSH-Px 水平差异不显著($P>0.05$)外,其余各组与对照组差异均达到了显著水平($P<0.05$);第 15、21 天,各组与对照组大鼠血浆中 GSH-Px 水平相比,差异均达显著水平($P<0.05$)。

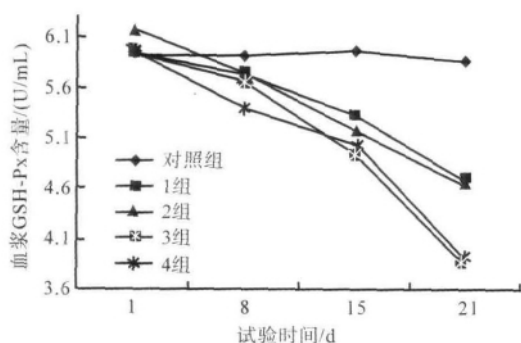


图 4 不同处理时期和不同给药剂量对大鼠血浆中 GSH-Px 水平的影响

3 讨论

随着生产技术的发展和社会的进步,大量人工合成的化学物质不断排放到环境中,而其降解产物很多具有类雌激素活性,使水源、空气和土壤都受到了污染,引起雄性动物生殖障碍^[5-6],对当今畜牧业的发展产生了很大的影响。有报道认为,环境雌激素对雄性动物的生殖损伤与 ROS 密切相关^[7-9],可能是其对相关酶类的 DNA 产生影响,从而降低了相关抗氧化酶的含量。本研究以炔雌醇为研究对象,以大鼠作为试验模型,观察睾丸组织和血浆中 GSH-Px 和 SOD 水平的变化,结果表明,炔雌醇能够降低睾丸组织和血浆中 GSH-Px 和 SOD 水平,可能造成睾丸组织和血浆中超氧阴离子和过氧化氢等过氧化物无法清除,ROS 含量升高,造成对于过氧化物比较敏感组织(如睾丸组织)的损伤,从而对雄性动物造成生殖障碍,例如精子活力降低、数量锐减等^[5]。以上结果说明,炔雌醇的生殖毒性与 ROS 含量有很大关系,炔雌醇通过降低睾丸组织抗氧化酶水平,提高机体 ROS 含量,使生精细胞处于氧化状态,干扰生精细胞的正常功能,导致生精障碍,从而对雄性动物的生殖器官造成障碍。因此,炔雌醇对大鼠生殖系统的氧化损伤是引起其生殖毒性的重要原因之一,同时氧化损伤也可能是环境雌激素生殖毒性的作用机制之一。

参考文献:

- [1] Mishra D P, Shaha C. Estrogen-induced spermatogenic cell apoptosis occurs via the mitochondrial pathway: role of superoxide and nitric oxide[J]. J Biol Chem, 2005, 280(7): 6181-6196.
- [2] 徐绘. 17 α -炔雌醇对斑马鱼生殖系统的影响及其机理的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [3] 周庆辉. 新生期暴露于炔雌醇对雄性大鼠生殖系统的生长发育及功能的影响[D]. 武汉: 武汉大学, 2005.
- [4] 邓茂先, 陈祥贵. 环境内分泌物研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2000, 27(2): 65-68.
- [5] 马爱团, 陈耀星, 王子旭. 己烯雌酚对成年雄性金色中仓鼠的生殖毒性与氧化损伤的关系[J]. 动物学报, 2007, 53(6): 1076-1082.
- [6] 杨筱珍, 陈耀星, 王子旭. 己烯雌酚对成年仓鼠睾丸生精的影响[J]. 中国农业科学, 2005, 38(11): 2339-2343.
- [7] Takahashi O, Oishi S. Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mice[J]. Food Chem Toxicol, 2003, 41: 1035-1044.
- [8] 李桂玲, 孙小娜, 马爱团, 等. 槲皮素对己烯雌酚诱导的仓鼠生精细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(3): 288-292.
- [9] 刘宝敏. 卵黄蛋白原的纯化与检测及其在己烯雌酚和炔雌醇联合毒性研究中的应用[D]. 厦门: 厦门大学, 2008.