

雌激素及其受体 ER β 在氰戊菊酯所致 雄性大鼠生殖毒性中的作用

郭 茂, 陈 琰, 李兴元, 孔德营

遵义医科大学 基础医学院生理学教研室, 贵州 遵义 563000

摘要: 为探讨雌激素及其受体 ER β 在氰戊菊酯(Fen)致雄性 SD 大鼠生殖毒性中的作用, 采用 SD 大鼠将其随机分为对照组(Fen 0 mg/kg)、低剂量 Fen 染毒组(20 mg/kg)、高剂量 Fen 染毒组(40 mg/kg), 每组 8 只, 染毒组以玉米油溶解配制制成不同浓度的 Fen 溶液等体积灌胃, 对照组给予等量玉米油, 每日灌胃 1 次, 连续染毒 30 d 后, 采用常规方法检测精子数量、精子活力及畸形率, ELISA 测定雄鼠血清和睾丸中雌二醇(E2)的水平, Real-time PCR 和 Western Bolt 检测芳香化酶(CYP19A1), ER β , Bax, Bcl-2, Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 和蛋白表达水平, TUNEL 法检测大鼠睾丸生殖细胞凋亡情况, HE 染色法观察睾丸病理结构。结果显示: Fen 染毒 30 d 后, 与对照组相比, 在 40 mg/kg 组精子数量、a 级精子活力及精子活动率均显著降低, 精子畸形率显著增加($p < 0.05$); 血清和睾丸 E2 水平均显著升高($p < 0.05$, $p < 0.01$); CYP19A1 mRNA 和蛋白表达水平在 20 mg/kg 和 40 mg/kg 组显著增加($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$), ER β mRNA 和蛋白表达水平在 40 mg/kg 组均显著增加($p < 0.01$); 大鼠睾丸 Bax, Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 和蛋白表达水平在 40 mg/kg 组均显著增加($p < 0.01$), Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平在 40 mg/kg 组均显著降低($p < 0.01$); TUNEL 结果显示: 大鼠睾丸生殖细胞凋亡增加且在 40 mg/kg 组差异有统计学意义($p < 0.01$); 睾丸病理结构发现, 染毒组大鼠睾丸曲细精管生精细胞数量减少或缺失, 管腔内精子减少, 部分曲细精管生精细胞排列紊乱。以上结果表明, Fen 可能通过上调雄性 SD 大鼠睾丸 CYP19A1 的表达, 增加雄鼠睾丸 E2 的水平, 同时, 上调雄鼠睾丸 ER β 的表达, 过度增强雌激素-ER β 信号作用, 促进生精细胞的凋亡, 引起精子发生异常。

关键词: 氰戊菊酯; 雌激素; 雌激素受体; 生殖毒性

中图分类号: Q492.4

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2021)10-0066-11

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effects of Estrogen and ER β on Reproductive Toxicity Induced by Fenvalerate in Male Rats

GUO Mao, CHEN Yan, LI Xingyuan, KONG Deying

Department of Physiology, Basic Medical College, Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou 563000, China

收稿日期: 2020-07-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31760339); 贵州省科技厅联合基金项目(CK-1044); 贵州省教育厅青年人才成长项目(CJ-910)。

作者简介: 郭 茂, 硕士研究生, 主要从事生殖生理学的研究。

通信作者: 孔德营, 副教授, 硕士研究生导师。

Abstract: To explore the roles of estrogen and its receptor ERβ (estrogen receptor β) in reproductive toxicity of fenvalerate in male SD rats, in this study, twenty-four male SD rats were randomly divided into three groups with eight rats in each, one control group and two treatmentgroups administered with fenvalerate at 20 and 40 mg/kg, respectively, by gavage for 30 consecutive days. Semen quality parameters were measured with conventional optical microscopy; the level of E2 in the serum and the testes was tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the mRNA and protein expression of CYP19A1, ERβ, Bax, Bcl-2, Caspase3 and Caspase9 were detected by real-time PCR and Western blotting; histological changes in the testes were observed by hematoxylineosin (HE) staining, and germ cell apoptosis was measured by TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL). The results showed that compared with the control group, the 40 mg/kg fenvalerate group had significantly reduced sperm count and sperm motility($p<0.05$), and had significantly higher levels of sperm malformation($p<0.05$) and E2 levels in the serum ($p<0.05$) and the testicular ($p<0.01$). TUNEL-positive germ cells significantly increased in the 40 mg/kg fenvalerate exposure group, and the mRNA and protein expression of proapoptotic gene Bax, Caspase 3 and Caspase 9 in rat testes were also significantly up-regulated, the expression levels of anti-apoptotic gene Bcl-2 was significantly reduced. Meanwhile, the number of spermatogenic cells and spermatozoa in the seminiferous tubules decreased in the fenvalerate exposure groups. These results indicate that fenvalerate can increase the level of E2 in male SD rats by up-regulating the expression of CYP19A1 and, in addition, it can also up-regulate the expression of ERβ in the testis, so as to increase the combination of E2 and ERβ, promote the apoptosis of spermatogeniccells, and cause spermatogenesis disorder.

Key words: fenvalerate; estrogen; ER(estrogen receptor); reproductive toxicity

氰戊菊酯(Fenvalerate, Fen)是一种Ⅱ型拟除虫菊酯类农药,因其具有高效、低毒、低残留等特点,而被广泛应用于农业生产和家庭生活中,但其对人类的生殖健康具有明显的危害性.研究表明,氰戊菊酯是一种环境内分泌干扰物^[1],具有明显的雄性生殖毒性,可通过影响睾酮合成相关酶和蛋白的表达而影响雄性体内睾酮的含量,以及影响支持细胞和间质细胞的功能来干扰下丘脑-垂体-性腺轴的调节作用^[2-5],使雄性生精过程受损,导致精子数量减少及活力降低.此外,研究表明,雄性体内的雌激素对雄性生殖功能也具有重要调节作用^[6],氰戊菊酯在干扰睾酮分泌的同时,是否也干扰了雄性体内的雌激素分泌以及其受体的表达从而产生生殖毒性?为了验证我们的猜想,本研究拟通过分析雌激素及其受体 ERβ 在 Fen 染毒后的表达情况,探讨 Fen 等拟除虫菊酯类农药杀虫剂所致雄性生殖毒性的相关机制.

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂

Fen 原药(纯度 98.80%),北京坛墨质检科技有限公司产品;HE 染色试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;雌二醇(E2) ELISA 试剂盒,上海江莱生物科技有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;CYP19A1,Caspase 3,Caspase 9 抗体,英国 Abcam 公司;ERβ,Bax,Bcl-2 抗体,武汉三鹰生物技术有限公司;RNA 逆转试剂盒和 SYBR Premix Ex Taq,日本 Takara 公司;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(增强型绿光),武汉伊莱瑞特生物科技公司.

1.1.2 仪 器

低温高速离心机,美国 Thermo 公司;分光光度计(ND2000C 型),美国 Thermo 公司;酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;显影仪,美国 Syngene 公司;PCR 仪,美国 Life Technogies 公司;荧光显微镜,日本 Olympus 公司.

1.2 方 法

1.2.1 实验动物与处理

体质量 220~250 g 健康性成熟的雄性 SD 大鼠 24 只, 购自重庆腾鑫生物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK(辽)2015-0001. 大鼠适应性喂养 1 周后采用随机数表法将大鼠分为对照组(Fen 0 mg/kg)、低剂量 Fen 染毒组(20 mg/kg)、高剂量 Fen 染毒组(40 mg/kg), 每组 8 只. 染毒组以玉米油溶解配制不同浓度的 Fen 溶液等体积灌胃, 灌胃量为每 100 g 体质量 0.5 mL, 每日 1 次, 灌胃前后大鼠自由摄食、饮水, 连续染毒 30 d(大鼠的一个生精上皮周期为 12~15 d), 对照组给予等量玉米油. 大鼠按 12 h 白昼的节律调节光照, 保持适宜温度(22 ± 2 °C)和相对湿度($60\% \pm 5\%$). 连续染毒 30 d 后, 将大鼠称质量后麻醉, 心脏采集血样, 然后迅速分离双侧附睾和睾丸. 采集的血液待其凝固后离心(常温, 1 100 r/min, 20 min), 吸取上清液分装后于 -80 °C 保存, 用于检测血清雌激素水平; 分离的附睾和睾丸迅速称其质量, 然后用生理盐水冲洗表面的血污, 附睾立即用于精子计数及活力检测, 右侧睾丸经液氮速冻, -80 °C 冻存, 用于测定睾丸雌激素水平, 检测 CYP19A1, ER β , Bax, Bcl-2, Caspase 3 及 Caspase 9 mRNA 和蛋白的表达情况, 左侧睾丸用 4% 甲醛固定后用于病理结构观察和生殖细胞凋亡检测.

1.2.2 精子计数、活力及畸形检测

参照 Kong 等^[7]的方法并稍作调整检测雄鼠附睾精子数量及活力情况. 取单侧附睾尾制备精子悬液, 将悬液放入含 0.1% 牛血清白蛋白的 Ham's F-12 培养基中, 放入 37 °C, 5% CO₂ 恒温培养箱中孵育 20 min, 光学显微镜下(400 $\times$)计数 400 个精子中各级活力(a 级: 快速直线运动; b 级: 慢速直线运动; c 级: 原地打转或运动迟缓; d 级: 无活动)的精子数, 计算各级精子活力和活动率. 于 60 °C 水浴中处死精子, 用血细胞计数法计数每克附睾中的精子总数. 吸取 10 μ L 精子悬液于载玻片上涂片, 凉干, 甲醇固定 30 min, 伊红染液染色 10 min, 自来水冲洗玻片, 凉干后镜检, 每个样本计数 1 000 个精子, 统计正常与畸形精子数, 计算精子畸形率.

1.2.3 睾丸组织病理形态学检查

取固定于 4% 甲醛的睾丸组织, 经梯度乙醇脱水、浸蜡、石蜡包埋、切片(厚 4 μ m), 每只动物随机选择 4 张切片, 经 HE 染色, 中性树胶封片, 然后于光镜下观察其形态学变化, 如曲细精管的完整性、生殖细胞的数量等.

1.2.4 血清及睾丸雌二醇(E2)检测

睾丸组织匀浆制备: 用预冷的磷酸盐缓冲液 PBS(0.01 mol/L, pH 值为 7.4)冲洗睾丸组织, 去除残留血液, 称质量后将组织剪碎. 将剪碎的组织按每克的组织样品加入 5 mL 的 PBS, 于冰上充分研磨. 最后将匀浆液离心(4 °C, 1 100 r/min, 10 min), 取上清分装后于 -80 °C 保存用于检测. 操作步骤严格按照 E2 ELISA 试剂盒说明书进行, 取 E2 标准品、血清或睾丸组织匀浆加入反应孔, 加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体, 37 °C 恒温箱温育 60 min, 洗板, 加入反应底物, 37 °C 恒温箱避光孵育 15 min, 加入终止液, 测定吸光度(OD 值), 绘制标准曲线计算浓度.

1.2.5 Real-time PCR 法检测大鼠睾丸 CYP19A1, ER β , Bax, Bcl-2, Caspase 3 及 Caspase 9 的 mRNA 表达情况

取 -80 °C 冻存的睾丸组织 100 mg 研磨成粉末状, 然后采用 RNAiso-Plus 提取试剂提取样本总 RNA, 按产品说明书进行实验. 采用分光光度计测定总的 RNA 浓度, 根据光度计 260 nm 和 280 nm 处的吸光度比值测定其纯度. 按照 RNA 反转录试剂盒要求, 将所有样本总 RNA 浓度调整为 100 ng/ μ L, 取 10 μ L 进行逆转录, 反应条件: 37 °C 15 min; 85 °C 5 s; 4 °C 保存. 按照 Real-time PCR 试剂盒说明书要求, 取 cDNA 2 μ L, 然后依次加入 ddH₂O, SYBR Premix Ex Taq(2 $\times$), 上下游引物(各引物序列见表 1), PCR 反应条件: 95 °C 30 s; 40 个 PCR 循环(95 °C 5 s; 60 °C 30 s). 所有反应均设立 2 个复孔. 记录每个反应管中标本的 C_t 值, 以 Gapdh 为内参基因, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各染毒组与对照组的 CYP19A1, ER β , Bax, Bcl-2, Caspase 3 及 Caspase 9 mRNA 的相对表达量.

表 1 引物序列

基 因	引 物 序 列
Gapdh	正向引物 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3' 反向引物 3'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-5'
ER β	正向引物 5'-ACGTCAGGCACATCAGTAACAAGG-3' 反向引物 3'-CATCTCCAGCAGCAGGTCATACAC-5'
CYP19A1	正向引物 5'-AGCCTGCGGTATCAGCCTGTC-3' 反向引物 3'-AGCCTGTGCATTCTTCCGATGTTC-5'
Bax	正向引物 5'-AGGACGCATCCACCAAGAAG-3' 反向引物 3'-CAGTTGAAGTTGCCGTCTGC-5'
Bcl-2	正向引物 5'-AGCATGCGACCTCTGTTTGA-3' 反向引物 3'-TCACTTGTGGCCAGGTATG-5'
Caspase 3	正向引物 5'-CTTGGAACGGTACGCGAAGA-3' 反向引物 3'-AGTCCATCGACTTGCTTCCA-5'
Caspase 9	正向引物 5'-TCAGAACTGTCCCGTGAAGC-3' 反向引物 3'-CTCCTCCAACCTGGAAGCTG-5'

1. 2. 6 Western Bolt 法检测大鼠睾丸 CYP19A1,ER β ,Bax,Bcl-2,Caspase 3 及 Caspase 9 的蛋白表达情况

取-80℃冻存的睾丸组织 60 mg,剪碎后加入裂解液,冰上匀浆并充分裂解 30 min,然后离心(4℃,13 000 r/min,5 min),取上清.以 BCA 法测定总蛋白浓度,每孔以 50 μ g 总蛋白量上样.12%聚丙烯酰胺凝胶电泳(120 V,1.5 h),恒压转膜(20 V,40~70 min),室温封闭 2.5 h,4℃过夜孵育一抗,室温孵育二抗 1 h,在暗室中用 ECL 法显影.目标蛋白相对表达量用目标蛋白的灰度值与内参 β -actin 的灰度值比值表示.

1. 2. 7 TUNEL 法检测睾丸生殖细胞凋亡

本研究采用末端脱氧核酸转移酶(TdT)介导 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)检测大鼠睾丸生殖细胞凋亡情况.该技术的原理是细胞在发生凋亡时,会激活一些 DNA 内切酶,剪切核小体间的基因组 DNA,暴露出 3'-OH,然后暴露的 3'-OH 可在 TdT 的催化下加上荧光素-12-脱氧三磷酸腺苷(FITC-12-dUTP),而后即可通过荧光显微镜观察生殖细胞的凋亡情况.检测按试剂盒说明书进行,取睾丸石蜡切片(切片制作同睾丸组织病理形态学检查)经脱蜡水合,滴加蛋白 K 酶工作液 37℃作用 25 min,滴加平衡液室温平衡 20 min,滴加 TdT 酶工作液 37℃湿盒避光孵育 60 min,滴加 DAPI 室温避光孵育 8 min 进行染核,甘油封片,在荧光显微镜下观察拍照,凋亡细胞呈强绿荧光.TUNEL 反应阳性细胞计数是在荧光显微镜下(200 $\times$)每张切片随机选取 4 个不同视野进行计数.

1. 2. 8 统计学处理

所有计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用 SPSS 17.0 统计软件,采用单因素方差分析和 Duncan 法进行多重比较, $p<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结 果

2. 1 Fen 对大鼠睾丸、附睾质量及体质量的影响

如表 2 所示,与对照组相比,20 mg/kg 和 40 mg/kg 组大鼠睾丸、附睾质量及体质量均有所降低,但差异无统计学意义, $p>0.05$.

表 2 Fen 对大鼠睾丸、附睾质量及体质量的影响

Fen 剂量/ (mg · kg ⁻¹)	<i>n</i>	体质量/ g	睾丸质量/ g	附睾质量/ g	睾丸系数/ ‰	附睾系数/ ‰
0	8	365.00±30.71	3.66±0.20	1.30±0.08	10.11±1.15	3.59±0.34
20	8	358.75±26.42	3.59±0.19	1.27±0.14	10.04±0.90	3.56±0.51
40	8	355.00±29.76	3.42±0.35	1.23±0.05	9.72±1.47	3.47±0.33

注：睾丸系数=(睾丸质量/体质量)×1 000‰；附睾系数=(附睾质量/体质量)×1 000‰。

2.2 Fen 对雄性 SD 大鼠附睾精子质量的影响

如表 3 所示，与对照组相比，20 mg/kg 组精子总数、各级精子活力及畸形率差异无统计学意义($p>0.05$)；40 mg/kg 组附睾精子总数、a 级活力精子、精子活动率及畸形率(精子畸形情况见图 1)差异有统计学意义($p<0.05$ 或 $p<0.01$)。

表 3 Fen 对附睾精子数量、活力及畸形率的影响

Fen 剂量/ (mg · kg ⁻¹)	<i>n</i>	精子总数/ (×10 ⁶ 个 · g ⁻¹)	a 级活力/ %	a 级与 b 级活力/ %	活动率/ %	畸形率/ ‰
0	8	44.98±14.70	8.65±1.67	23.08±3.89	68.55±4.68	15.88±3.48
20	8	39.57±6.94	7.36±1.04	20.11±3.65	62.92±6.82	20.75±3.01
40	8	30.25±4.52 [*]	6.64±1.53 [*]	19.46±3.24	45.28±8.52 ^{**}	36.38±9.47 [*]

注：与对照组相比，* 表示 $p<0.05$ ，** 表示 $p<0.01$ ，差异有统计学意义。

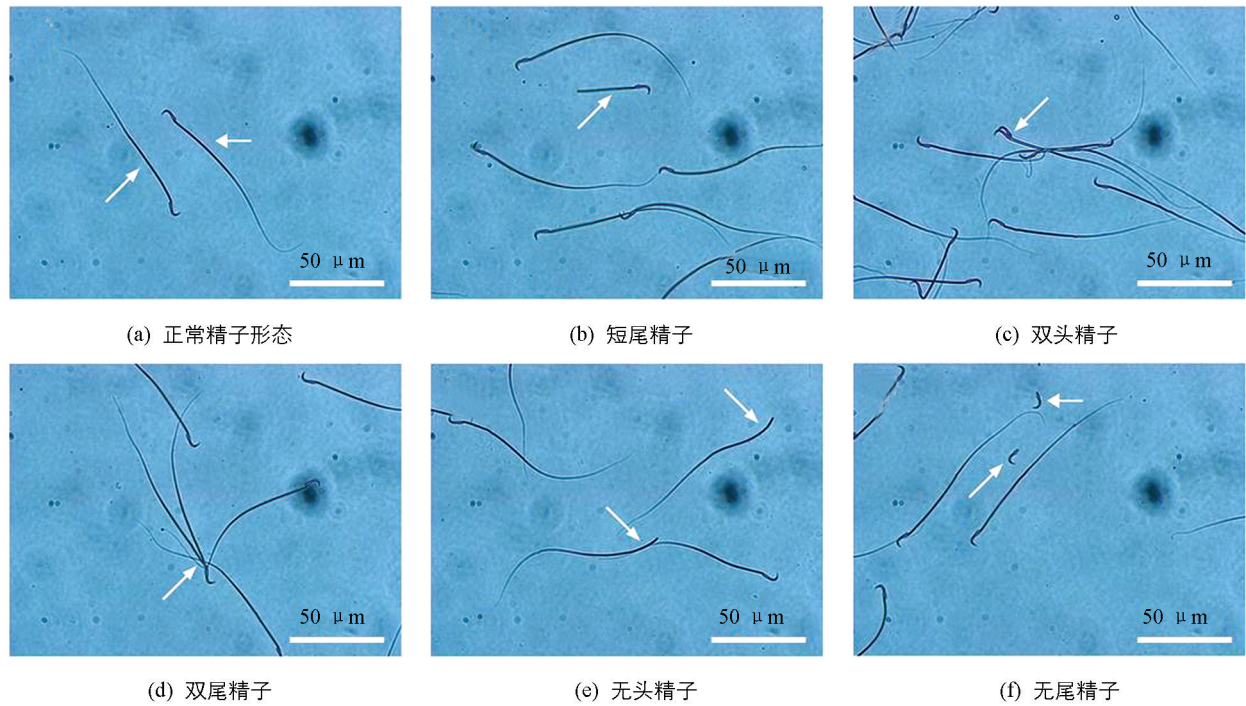


图 1 Fen 染毒后导致的精子畸形情况

2.3 Fen 对雄性 SD 大鼠血清及睾丸 E2 水平的影响

如图 2 所示，与对照组相比，20 mg/kg 组血清和睾丸中 E2 水平均未显著增加($p>0.05$)；40 mg/kg 组血清和睾丸中 E2 水平均显著升高($p<0.05$, $p<0.01$)。提示 Fen 具有提升雄性体内 E2 水平的作用，且这种作用随 Fen 染毒剂量的增加而加强。

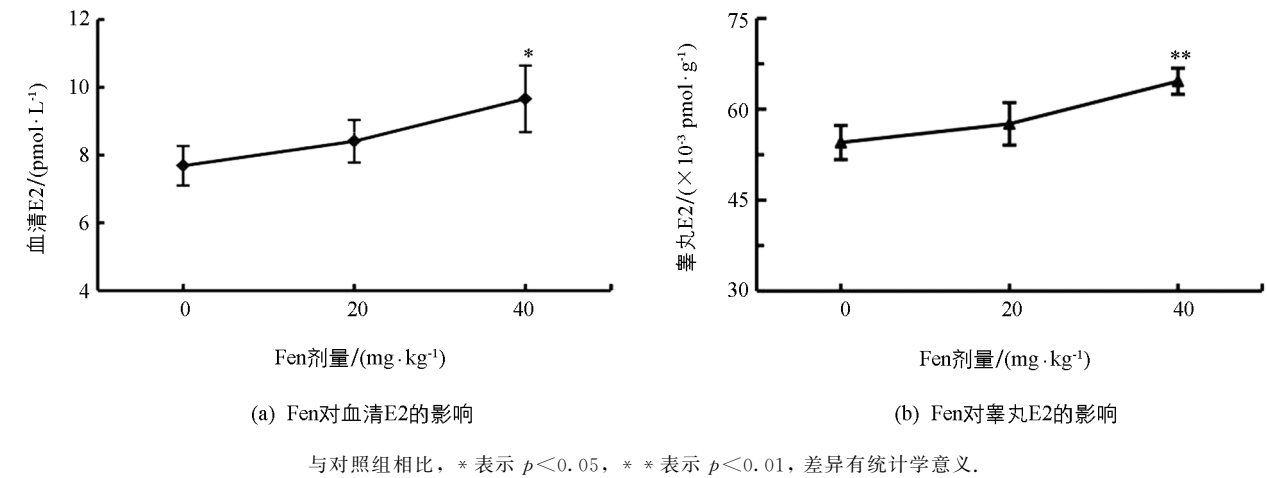
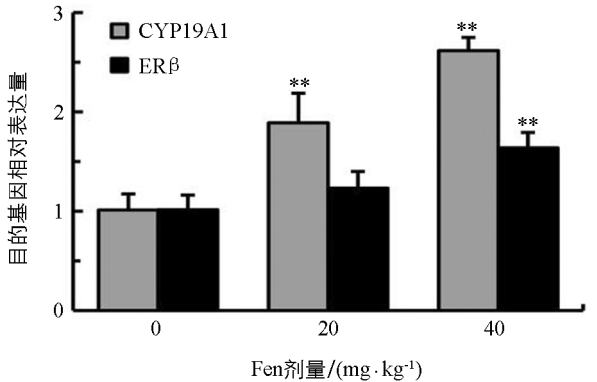


图 2 Fen 对血清及睾丸 E2 水平的影响

2.4 Fen 对雄性 SD 大鼠睾丸 CYP19A1 和 ERβ mRNA 表达的影响

如图 3 所示,与对照组相比,雄鼠睾丸 CYP19A1 和 ERβ mRNA 表达水平均随染毒剂量增加而上调, CYP19A1 mRNA 表达水平在 20 mg/kg 和 40 mg/kg 组均极显著上调 ($p < 0.01$); ERβ mRNA 表达水平在 20 mg/kg 组差异无统计学意义 ($p > 0.05$), 在 40 mg/kg 组差异有统计学意义 ($p < 0.01$), 提示 Fen 具有上调雄鼠睾丸 CYP19A1 和 ERβ 基因表达的作用.



与对照组相比, ** 表示 $p < 0.01$, 差异有统计学意义.

图 3 Fen 对雄性 SD 大鼠睾丸 CYP19A1 和 ERβ mRNA 表达的影响

2.5 Fen 对雄性 SD 大鼠睾丸 CYP19A1 和 ERβ 蛋白表达的影响

如图 4 所示,与对照组相比,雄鼠睾丸 CYP19A1 和 ERβ 蛋白表达水平均随染毒剂量增加而增加, CYP19A1 在 20 mg/kg 组和 40 mg/kg 组差异均有统计学意义 ($p < 0.05$, $p < 0.01$); ERβ 在 20 mg/kg 差异无统计学意义 ($p > 0.05$), 在 40 mg/kg 组差异有统计学意义 ($p < 0.01$), 提示 Fen 具有上调雄鼠睾丸 CYP19A1 和 ERβ 蛋白表达的作用.

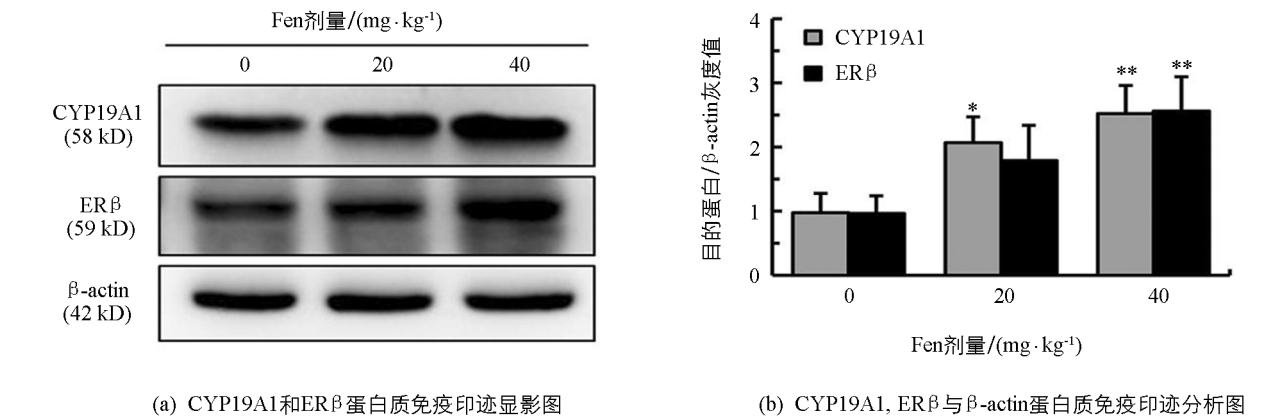


图 4 Fen 对雄性 SD 大鼠睾丸 CYP19A1 和 ERβ 蛋白表达的影响

2.6 Fen 对雄性 SD 大鼠睾丸 Bax, Caspase 3, Caspase 9 及 Bcl-2 mRNA 表达情况的影响

如图 5 所示,与对照组相比,雄鼠睾丸 Bax, Caspase 3 及 Caspase 9 mRNA 表达水平均随染毒剂量增加而上调, Bcl-2 mRNA 表达水平随染毒剂量增加而下调, Bax, Caspase 3 及 Caspase 9 mRNA 表达水平在 40 mg/kg 组均极显著上调($p<0.01$), Bcl-2 mRNA 表达水平在 20 mg/kg 组显著下调($p<0.05$), 在 40 mg/kg 组极显著下调($p<0.01$).

2.7 Fen 对雄性 SD 大鼠睾丸 Bax, Caspase 3, Caspase 9 及 Bcl-2 蛋白表达的影响

如图 6 所示,与对照组相比,雄鼠睾丸 Bax, Caspase 3, Caspase 9 蛋白表达水平均随染毒剂量增加而上调, Bcl-2 蛋白表达水平随染毒剂量增加而下调, Caspase 3, Caspase 9 及 Bcl-2 蛋白表达水平在 40 mg/kg 组差异有统计学意义($p<0.01$); Bax 蛋白表达水平在 20 mg/kg 和 40 mg/kg 组差异均有统计学意义($p<0.05$, $p<0.01$).

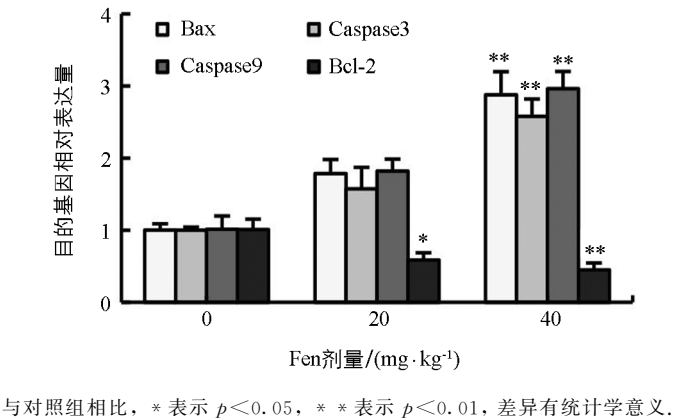
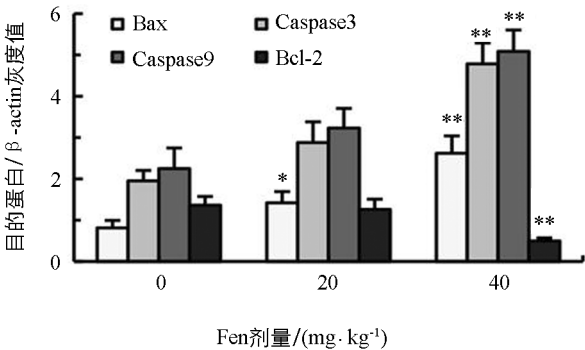
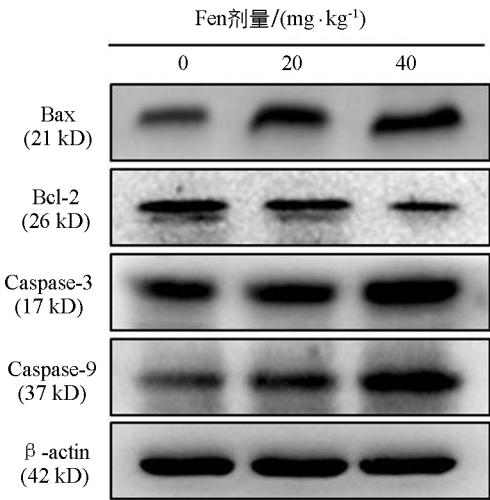


图 5 Fen 对雄性 SD 大鼠睾丸 Bax, Caspase 3, Caspase 9 及 Bcl-2 mRNA 表达情况的影响



(a) Bax, Caspase 3, Caspase 9及Bcl-2蛋白质免疫印迹显影图 (b) Bax, Caspase 3, Caspase 9, Bcl-2与β-actin蛋白质免疫印迹显影图
与对照组相比, * 表示 $p<0.05$, * * 表示 $p<0.01$, 差异有统计学意义.

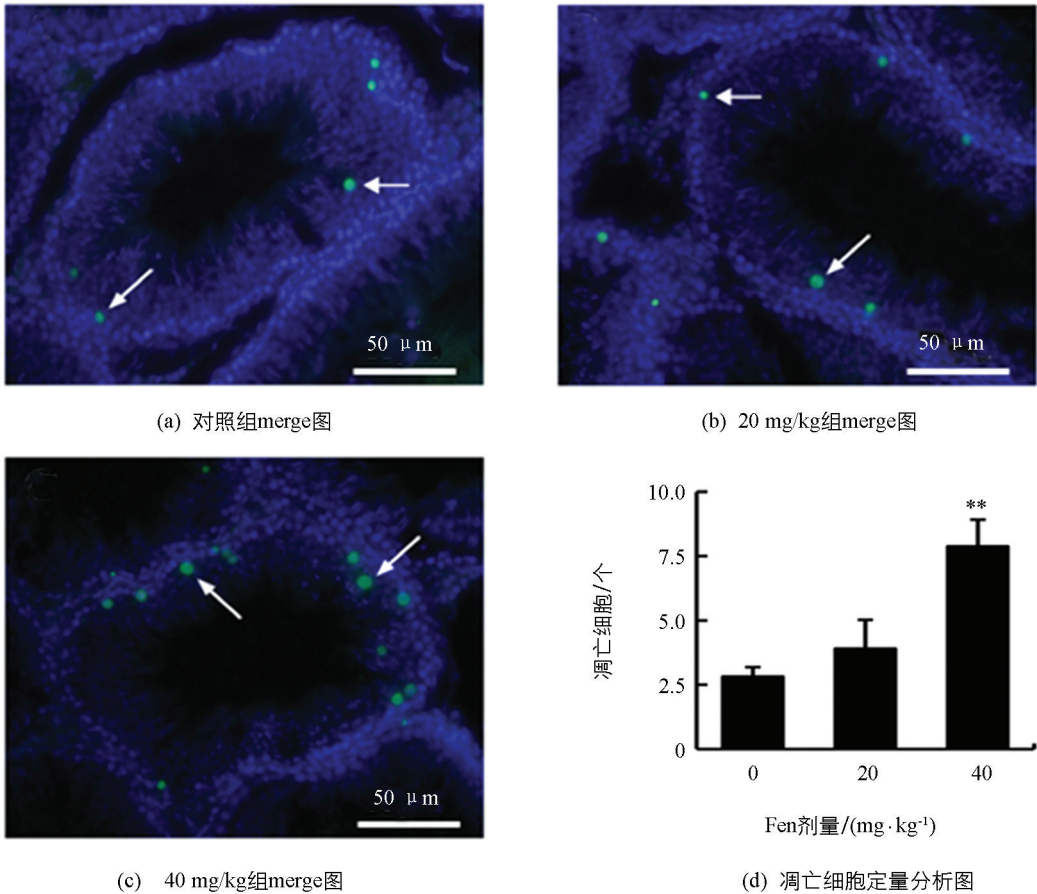
图 6 Fen 对雄性 SD 大鼠睾丸 Bax, Caspase 3, Caspase 9 及 Bcl-2 蛋白表达的影响

2.8 Fen 对雄性 SD 大鼠睾丸曲细精管中生精细胞凋亡的影响

如图 7 显示,与对照组相比, Fen 染毒组雄鼠睾丸生殖细胞凋亡数量(1 个视野中)增加, 在 40 mg/kg 组差异有统计学意义($p<0.01$), 提示随着 Fen 染毒剂量的增加, 雄鼠睾丸生殖细胞凋亡逐渐增多.

2.9 Fen 对雄性 SD 大鼠睾丸病理结构的影响

如图 8 所示, 对照组大鼠曲细精管结构完整, 生精细胞数量多, 排列紧密; 20 mg/kg 组大鼠睾丸曲细精管生精细胞数量减少, 部分曲细精管出现了较为严重的生精细胞缺失(箭头所示); 40 mg/kg 组大鼠睾丸曲细精管生精细胞数量进一步减少, 可见部分曲细精管生精细胞排列紊乱, 生精细胞缺失严重, 管腔内精子较少.



蓝色荧光为细胞核(DAPI 染色), 绿色荧光为凋亡细胞(箭头所示). 与对照组相比, * * 表示 $p<0.01$, 差异有统计学意义.

图 7 Fen 对雄性 SD 大鼠睾丸生殖细胞凋亡情况的影响

3 讨 论

正常雄性生育能力的维持依赖于精子发生的有效进行. 正常有效的精子发生既有赖于睾丸中的生精细胞、支持细胞和间质细胞之间的密切协调, 又受到下丘脑-垂体-性腺轴的生殖内分泌调控, 同时这两个方面之间还相互协调、相互依存, 彼此密不可分. 在生殖内分泌调控中, 雄性精子发生主要受黄体生成素介导的睾酮分泌的调控, 但雌激素在雄性精子发生过程中也同样起着不可或缺的作用. 研究显示, 适量的雌激素在雄性生殖中具有促进精子发生、抑制生殖细胞凋亡、提高精子受精能力等作用^[8-10], 而雄性体内雌激素的含量过低或过高均会引起雄性精子发生异常以及生殖能力下降^[11-12].

在药理学和毒理学中, 体质量及脏器系数是一个关键的毒性观察指标. 结果显示, 青春期雄性 SD 大鼠暴露于 Fen 后, 大鼠的体质量及附睾和睾丸的脏器系数均出现减小的趋势, 但差异均无统计学意义, 这表明本研究中 Fen 的剂量对雄鼠整体的生长情况并未产生太大的影响.

精子质量是衡量雄性生殖能力的重要指标^[13]. 在精子发生的过程中, 各级生精细胞对有毒化学物质的作用十分敏感, 易受到有毒化学物质的干扰而导致精子的数量减少和活力降低. 本研究的结果表明, Fen 染毒后, 各染毒组精子数量、精子活力和精子活动率均较对照组降低, 精子畸形率较对照组增加, 且在 40 mg/kg 组差异有统计学意义, 这与 Zhang 等^[14]的研究结果一致. 这说明 Fen 对雄性的生殖能力具有损害作用.

雌二醇(E2)是雄性体内最主要的雌激素. 本研究的结果表明, 在 Fen 连续染毒 30 d(两个生精上皮周期)后, 雄性大鼠血清和睾丸中 E2 含量均较对照组增高, 并且在 40 mg/kg 组, 二者差异均有统计学意义, 这表明 Fen 可促进雄性体内 E2 的生成, 提高雄鼠体内雌激素的水平. Carreau 等^[11]研究发现, 雄性睾丸中雌激素水平过高会引起雄性精子发生异常, 使精子质量降低, 导致雄性生殖能力下降. 这提示我们 Fen 可通过增加雄性睾丸中雌激素的水平而损害雄性生殖功能.

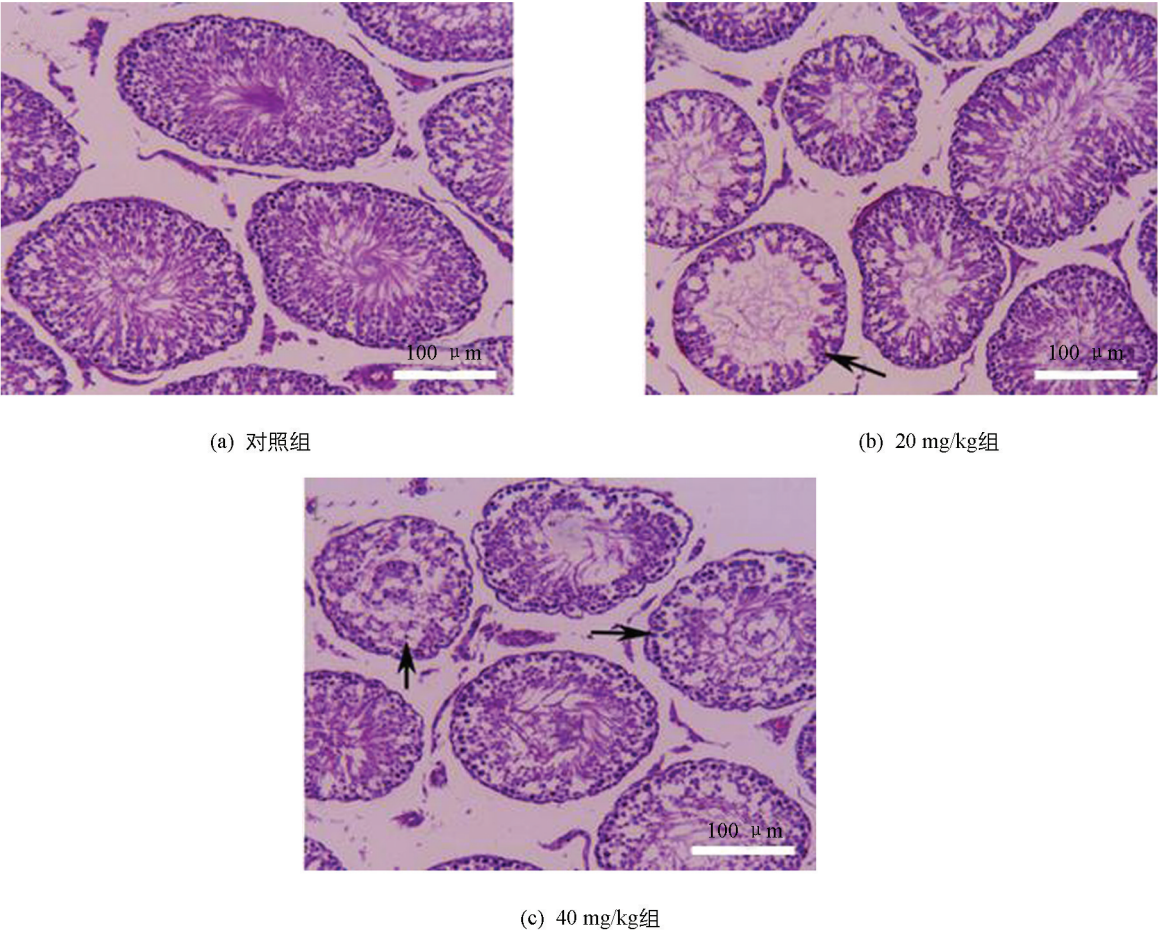


图 8 Fen 对睾丸曲细精管结构的影响

雄性体内的 E2 由雄激素在睾丸中转化而来, 芳香化酶(CYP19A1)是这一转化过程中的关键酶. CYP19A1 在雄性睾丸间质细胞、生精细胞及精子中均有表达^[15]. 以往的研究发现, CYP19A1 在雄性体内低表达或过度表达均会引起雄性精子发生异常, 使精子数量减少和活力降低, 导致雄性生殖损伤甚至不育^[6,12,16-18], 这主要与 CYP19A1 表达异常致使雄性睾丸内 E2 合成不足或过量有关^[11-12]. 本研究中各染毒组睾丸 CYP19A1 的 mRNA 和蛋白表达水平较对照组均显著增加, 这与 Fen 染毒后引起血清和睾丸中 E2 含量增加的研究结果相一致. 这表明 Fen 是通过诱导睾丸中 CYP19A1 的表达, 促进雄激素转化为雌激素, 从而升高雄性睾丸中雌激素水平的.

雌激素发挥其生理作用需通过其特异性受体(雌激素受体, ERs)的介导. ERs 属于激素核受体超家族的成员, 其主要包括 ER α 和 ER β 两种亚型, 其中 ER β 主要分布于成熟雄性大鼠的支持细胞和生精细胞^[19,20], 对维持正常雄性生殖能力发挥着十分重要的作用. Delbes 等^[21]研究发现, 敲除小鼠 ER β 可促进小鼠生殖母细胞的增殖同时抑制其凋亡; Gould 等^[22]和 Dumas 等^[23]发现, ER β 受体激动剂可促进生精细胞的凋亡. 我们的研究结果显示, Fen 可诱导大鼠睾丸中 ER β 的 mRNA 和蛋白高表达, 并且 40 mg/kg 组与对照组相比差异有统计学意义($p < 0.01$). 同时, 我们还发现, 随着 ER β 的表达量升高, 雄性大鼠曲细精管发生凋亡的生精细胞比例也逐渐增加, 这与 Xie 等^[24]以及 Qu 等^[25]用双酚 a、全氟辛烷磺酸等其他环境内分泌干扰物研究的结果相一致. 这些结果提示我们, Fen 可能通过诱导雄鼠睾丸中 ER β 的表达, 过度增强 ER β 信号作用, 而促进生精细胞的凋亡, 使曲细精管中生精细胞数量和管腔内精子数量减少, 但 ER β 引起生精细胞凋亡的机制尚不清楚.

线粒体凋亡途径是细胞最重要的凋亡途径之一, 在各种外源性病理刺激条件下, Bcl-2 家族中的促凋亡蛋白(如 Bax, Bad 等)发生去磷酸化, 与线粒体膜上的抗凋亡蛋白(如 Bcl-2, Bcl-XL 等)结合, 而开启线粒体

膜通透性转换孔, 导致凋亡相关因子, 如细胞色素 C、凋亡诱导因子等从线粒体内释放进入胞浆, 激活 Caspase 家族的凋亡启动者 Caspase 9, Caspase 9 激活后能引起 Caspase 级联反应, 最终激活凋亡执行者 Caspase 3, 而引起细胞凋亡^[26-28]。我们的研究结果显示, Fen 染毒上调了大鼠睾丸中促凋亡基因 Bax, Caspase 3 及 Caspase 9 mRNA 和蛋白的表达水平, 同时抑制了抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达。这些结果似乎提示我们, Fen 诱导的雄鼠睾丸 ER β 过度升高可能与线粒体凋亡途径的激活之间存在着某种联系, 但具体机制还有待进一步研究。

综上所述, 我们猜测 Fen 通过上调雄性大鼠睾丸中 CYP19A1 和 ER β 的表达, 致使睾丸 E2 水平升高的同时, 又过度增强 E2-ER β 信号作用, 后者通过某种机制激活线粒体凋亡途径, 从而引起生殖细胞的过度凋亡, 精子发生异常, 精子数量和活力降低, 畸形精子增多, 最终导致雄性大鼠的生殖损伤。然而 Fen 是通过何种机制上调雄性大鼠睾丸中 CYP19A1 和 ER β 的表达水平以及 ER β 的高表达是否与生殖细胞线粒体凋亡途径的激活有关, 这些问题都还有待今后进一步明确。

参考文献:

- [1] WU S G, HU G J, ZHAO X P, et al. Synergistic Potential of Fenvalerate and Triadimefon on Endocrine Disruption and Oxidative Stress during Rare Minnow Embryo Development [J]. *Environmental Toxicology*, 2018, 33(7): 759-769.
- [2] GUO Y C, SHEN O X, HAN J J, et al. Circadian Rhythm Genes Mediate Fenvalerate-Induced Inhibition of Testosterone Synthesis in Mouse Leydig Cells [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2017, 80(23-24): 1314-1320.
- [3] HONG T, LI R, SUN L L, et al. Role of the Gene Phlda1 in Fenvalerate-Induced Apoptosis and Testicular Damage in Sprague-Dawley Rats [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2019, 82(15): 870-878.
- [4] 严 锐, 何梦婷, 王 伟, 等. 氰戊菊酯对雄性大鼠激素昼夜节律性的影响 [J]. *毒理学杂志*, 2019, 33(2): 92-95.
- [5] RAVULA A R, YENUGU S. Long Term Oral Administration of a Mixture of Pyrethroids Affects Reproductive Function in Rats [J]. *Reproductive Toxicology*, 2019, 89: 1-12.
- [6] HESS R A, COOKE P S. Estrogen in the Male: a Historical Perspective [J]. *Biology of Reproduction*, 2018, 99(1): 27-44.
- [7] KONG D Y, ZHANG J D, HOU X H, et al. Acetamiprid Inhibits Testosterone Synthesis by Affecting the Mitochondrial Function and Cytoplasmic Adenosine Triphosphate Production in Rat Leydig Cells [J]. *Biology of Reproduction*, 2017, 96(1): 254-265.
- [8] ADEOYA-OSIGUWA S A, MARKOULAKI S, POCKOCK V, et al. 17 β -Estradiol and Environmental Estrogens Significantly Affect Mammalian Sperm Function [J]. *Human Reproduction*, 2003, 18(1): 100-107.
- [9] ROYER C, LUCAS T F G, LAZARI M F M, et al. 17Beta-Estradiol Signaling and Regulation of Proliferation and Apoptosis of Rat Sertoli Cells [J]. *Biology of Reproduction*, 2012, 86(4): 108-122.
- [10] CHIMENTO A, SIRIANNI R, CASABURI I, et al. Role of Estrogen Receptors and G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Regulation of Hypothalamus-Pituitary-Testis Axis and Spermatogenesis [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2014, 5: 1-8.
- [11] CARREAU S, DELALANDE C, SILANDRE D, et al. Aromatase and Estrogen Receptors in Male Reproduction [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006, 246(1-2): 65-68.
- [12] ROBERTSON K M, O'DONNELL L, SIMPSON E R, et al. The Phenotype of the Aromatase Knockout Mouse Reveals Dietary Phytoestrogens Impact Significantly on Testis Function [J]. *Endocrinology*, 2002, 143(8): 2913-2921.
- [13] ZHANG Y, ZHOU Y, TANG Q, et al. The Protective Effects of Selenium-Enriched Spirulina on the Reproductive System of Male Zebrafish (Danio Rerio) Exposed to Beta-Cypermethrin [J]. *Food & Function*, 2018, 9(11): 5791-5804.
- [14] ZHANG J J, HU Y, GUO J Y, et al. Fenvalerate Decreases Semen Quality in Puberty Rat through Germ Cell Apoptosis [J]. *Andrologia*, 2018, 50(9): e13079.

- [15] COOKE P S, NANJAPPA M K, KO C, et al. Estrogens in Male Physiology [J]. *Physiological Reviews*, 2017, 97(3): 995-1043.
- [16] 于万鹏. 芳香化酶超表达引起雄鼠不育分子机理研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [17] LAMBETH L S, MORRIS K R, WISE T G, et al. Transgenic Chickens Over Expressing Aromatase Have High Estrogen Levels but Maintain a Predominantly Male Phenotype [J]. *Endocrinology*, 2016, 157(1): 83-90.
- [18] LARDONE M C, ARGANDOÑA F, FLÓREZ M, et al. Over Expression of CYP19A1 Aromatase in Leydig Cells is Associated with Steroidogenic Dysfunction in Subjects with Sertoli Cell-only Syndrome [J]. *Andrology*, 2017, 5(1): 41-48.
- [19] SAUNDERS P T, FISHER J S, SHARPE R M, et al. Expression of Oestrogen Receptor Beta (ER Beta) Occurs in Multiple Cell Types, Including some Germ Cells, in the Rat Testis [J]. *The Journal of Endocrinology*, 1998, 156(3): 13-17.
- [20] VAN PELT A M, DE ROOIJ D G, VAN DER BURG B, et al. Ontogeny of Estrogen Receptor-Beta Expression in Rat Testis [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(1): 478-483.
- [21] DELBES G, LEVACHER C, PAIRAULT C, et al. Estrogen Receptor B-Mediated Inhibition of Male Germ Cell Line Development in Mice by Endogenous Estrogens during Perinatal Life [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(7): 3395-3403.
- [22] GOULD M L, HURST P R, NICHOLSON H D. The Effects of Oestrogen Receptors α and β on Testicular Cell Number and Steroidogenesis in Mice [J]. *Reproduction*, 2007, 134(2): 271-279.
- [23] DUMASIS K, KUMAR A, DESHPANDE S, et al. Differential Roles of Estrogen Receptors, ESR1 and ESR2, in Adult Rat Spermatogenesis [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2016, 428: 89-100.
- [24] XIE M N, BU P L, LI F J, et al. Neonatal Bisphenol a Exposure Induces Meiotic Arrest and Apoptosis of Spermatogenic Cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(9): 10606-10615.
- [25] QU J H, LU C C, XU C, et al. Perfluorooctane Sulfonate-Induced Testicular Toxicity and Differential Testicular Expression of Estrogen Receptor in Male Mice [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2016, 45: 150-157.
- [26] ZAMARAEVA V, KOPEINA G S, PROKHOROVA E A, et al. Post-Translational Modification of Caspases: The other Side of Apoptosis Regulation [J]. *Trends in Cell Biology*, 2017, 27(5): 322-339.
- [27] ONGS B, SAMANGOUEI P, KALKHORAN S B, et al. The Mitochondrial Permeability Transition Pore and Its Role in Myocardial Ischemia Reperfusion Injury [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2015, 78: 23-34.
- [28] JANE E P, PREMKUMAR D R, MORALES A, et al. Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Signaling by NVP-BKM120 Promotes ABT-737-Induced Toxicity in a Caspase-Dependent Manner through Mitochondrial Dysfunction and DNA Damage Response in Established and Primary Cultured Glioblastoma Cells [J]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2014, 350(1): 22-35.

责任编辑 周仁惠