

[文章编号] 1674-8115(2011)08-1117-04

· 论著 ·

## 妊娠期氟戊菊酯暴露对雄性仔鼠睾丸标志酶的影响

李晓凤, 杨旸, 周义军

(上海交通大学公共卫生学院, 上海 200025)

[摘要] 目的 探讨妊娠期氟戊菊酯暴露对雄性仔鼠生殖系统的影响。方法 将 20 只妊娠雌鼠随机分为对照组和不同剂量染毒组, 其中对照组给予纯玉米油, 染毒组分别给予 2、10 和 50 mg/kg 氟戊菊酯, 于妊娠后第 12~18 天进行灌胃染毒。雄性仔鼠于出生后第 35 天处死, 采用比色法测定睾丸标志酶酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、乳酸脱氢酶(LDH)和  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -GT)的活性, 放射免疫法检测血清和睾丸匀浆中睾酮含量。结果 50 mg/kg 染毒组雄性仔鼠的 LDH 活性明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ); 2 mg/kg 和 10 mg/kg 染毒组的  $\gamma$ -GT 活性明显低于对照组 ( $P < 0.01$ ); 不同剂量染毒组的 ACP 和 AKP 活性与对照组比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。雄性仔鼠的血清和睾丸匀浆中睾酮含量随染毒剂量的增加而升高, 但不同剂量染毒组与对照组比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 妊娠期氟戊菊酯暴露对雄性仔鼠的生殖系统有一定的影响, 可明显影响睾丸标志酶的活性。

[关键词] 氟戊菊酯; 妊娠; 乳酸脱氢酶;  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶; 睾酮

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.08.016

[中图分类号] R595.4; R-332

[文献标志码] A

## Effects of fenvalerate on enzymes in testis of male offspring rats after maternal exposure in gestation

LI Xiao-feng, YANG Yang, ZHOU Yi-jun

(School of Public Health, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

**[Abstract]** Objective To investigate the effects of fenvalerate on reproductive system of male offspring rats after maternal exposure in gestation. Methods Twenty pregnant SD rats were randomly divided into three treated groups (treated with 2, 10, and 50 mg/kg fenvalerate respectively on day 12 to 18 of gestation by means of intragastric injection) and control group (treated with corn oil). Male offspring rats were sacrificed on postnatal day 35, and the levels of serum testosterone (T) and testis homogenate T were determined by radioimmunoassay (RIA). Meanwhile, the activities of enzymes in testis such as acid phosphatases (ACP), alkaline phosphatase (AKP), lactate dehydrogenase (LDH) and gamma-glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT) were examined by colorimetry. Results Compared with control group, the activity of LDH was restrained in 50 mg/kg group ( $P < 0.05$ ), and those of  $\gamma$ -GT were increased in 2 mg/kg group and 10 mg/kg group ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference in the activities of ACP and AKP between control group and treated groups ( $P > 0.05$ ). The levels of serum T and testis homogenate T were increased with different doses dependently, while there was no significant difference between control group and treated groups ( $P > 0.05$ ). Conclusion Exposure of fenvalerate in gestation has some influence on the reproductive system of male offspring rats, and can significantly affect the activities of enzymes in testis.

[Key words] fenvalerate; gestation; lactate dehydrogenase; gamma-glutamyl transpeptidase; testosterone

氟戊菊酯是一种新型Ⅱ型拟除虫菊酯类农药, 因其广谱高效的毒性而被广泛应用于农林害虫及家畜疾病传播媒介的防治, 但其对人类的危害也越来越引起国内外学者的普遍关注。以往的研究主要集中在其神经毒性, 近年的研究<sup>[1~4]</sup>表明: 氟戊菊酯具

有类雌激素样作用, 是一种扰乱内分泌系统的环境雌激素, 可以通过影响支持细胞的功能来干扰下丘脑-垂体-性腺轴的调节作用, 使精子发生过程受损, 导致少精或无精。目前, 国内研究氟戊菊酯对雄性生殖系统的影响主要通过对雄性 SD 大鼠的直接

[基金项目] 国家大学生创新性实验计划(091024858); 上海交通大学医学院基金(2008XJ006) (National Innovation Program for Undergraduates, 091024858; Foundation of Shanghai Jiaotong University School of Medicine, 2008XJ006)。

[作者简介] 李晓凤(1990—), 女, 本科生; 电子信箱: shanghaixf\_3589@126.com。

[通信作者] 周义军, 电子信箱: zhouyj@shsmu.edu.cn。

暴露,而通过宫内暴露研究氯戊菊酯对子代生殖系统影响的报道则很少。Moniz 等<sup>[2]</sup>的研究表明,氯戊菊酯能通过胎盘屏障转运,对胚胎发育产生有害影响。本研究旨在通过妊娠期暴露氯戊菊酯,观察氯戊菊酯对雄性仔鼠睾酮水平和睾丸标志酶活性的影响,为氯戊菊酯暴露的健康危险度评价提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

清洁级纯种健康成年雌性 SD 大鼠 20 只,8 周龄,由中国科学院上海生命科学研究院动物研究中心提供,经上海交通大学医学院实验动物中心交配,获得孕 5 d 的妊娠雌鼠。动物生产许可证号:SCXK(沪)2007-0005;使用许可证号:SYXK(沪)2008-0050。动物饲养于室温( $23 \pm 2$ )℃、湿度( $60 \pm 10$ )%、9 h 和 15 h 明暗循环的条件下(8:00~17:00 亮灯)。

### 1.2 主要试剂和仪器

**1.2.1 试剂** 氯戊菊酯(99.0%)、玉米油(99.6%)购自 Sigma-Aldrich 公司;考马斯亮蓝总蛋白测定试剂盒,酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)、 $\gamma$ -谷氨酰转移酶( $\gamma$ -glutamyl transferase,  $\gamma$ -GT)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;<sup>125</sup>I 睾酮放射免疫分析药盒由深圳拉尔文生物工程技术有限公司提供;其他试剂为国产分析纯。

**1.2.2 仪器** T6 S 型紫外分光光度计(北京普协通用分析仪器有限责任公司);Pro 200 匀浆机(Oxford,美国);低温高速离心机、SN-695 型  $\gamma$ -计数仪(上海核所日环光电仪器有限公司);分析天平、恒温水浴锅,微量取样器。

### 1.3 分组

将 20 只妊娠雌鼠随机分为对照组和低、中、高 3 个剂量染毒组,其中对照组给予纯玉米油,染毒组分别给予 2、10 和 50 mg/kg 氯戊菊酯(溶剂为玉米油),均采用灌胃方式,每天一次,于妊娠后第 12~18 天进行染毒,连续染毒 7 d。

### 1.4 观察指标

**1.4.1 观察染毒后母鼠和仔鼠的生活状况** 主要包括母鼠的活动度、精神状况、饮水和食物消耗量、体质量增长情况。妊娠第 21 天左右,注意观察仔鼠是否出生并详细记录仔鼠出生时间、数量、体质量、性别比、有无畸形及死胎。至仔鼠断乳后,每窝随机保留 5 只雄性仔鼠继续饲养。

**1.4.2 计算雄性仔鼠的脏器系数** 雄性仔鼠于出生后第 35 天处死,分离其睾丸、肝脏、肾脏、心脏、肺、脾脏、脑,称取质量,并计算其脏器系数(脏器质量/体质量,g/100 g)。

**1.4.3 血清和睾丸匀浆的制备** 处死雄性仔鼠时断头取血,低温离心,分离上清液于 -20 ℃ 保存。取左侧睾丸于预冷的生理盐水中漂洗,称取质量,用预冷的匀浆介质(pH 7.4,0.01 mol/L Tris-HCl),按 1:9 的比例进行匀浆,低温离心,取上清液于 -20 ℃ 保存。

**1.4.4 睾丸标志酶活性和睾酮含量检测** 睾丸标志酶 ACP、 $\gamma$ -GT、AKP 和 LDH 活性采用比色法试剂盒检测;血清和睾丸匀浆中的睾酮含量采用放射免疫法试剂盒检测。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 11.5 软件进行统计学处理,计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析并用 Dunnett 进行两两比较。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 生长发育和中毒症状

妊娠期氯戊菊酯染毒后,对照组及各染毒组母鼠生长发育和精神状况良好,各染毒组进食、饮水量也均无异常。各窝仔鼠数量及雌雄比见表 1。

表 1 各窝仔鼠数量及雌雄比

Tab 1 Number of offspring rats and ratio of female to male in each litter

组别	窝 1	窝 2	窝 3	窝 4	窝 5
对照组	14(5:9)	17(8:9)	15(8:7)	18(9:9)	14(4:10)
2 mg/kg 染毒组	13(4:9)	11(5:6)	17(4:13)	13(6:7)	12(6:6)
10 mg/kg 染毒组	13(7:6)	17(9:8)	16(9:7)	13(6:7)	15(6:9)
50 mg/kg 染毒组	14(9:5)	13(9:5)	14(6:8)	15(8:7)	14(8:6)

### 2.2 氯戊菊酯对雄性仔鼠各脏器系数的影响

2 mg/kg 染毒组的雄性仔鼠体质量显著高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );而其他剂量染毒组与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。2 mg/kg 染毒组仔鼠的肝脏脏器系数显著大于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );不同剂量染毒组仔鼠的心脏脏器系数均显著大于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );不同剂量染毒组仔鼠的睾丸脏器系数均较对照组下降,其中 10 mg/kg 和 50 mg/kg 染毒组与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ );但各染毒组仔鼠的肾脏、肺、脾脏、脑的脏器系数与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ) (表 2)。

表 2 氟戊菊酯对雄性仔鼠各脏器系数的影响( $\bar{x} \pm s, n = 25$ )Tab 2 Effects of fenvalerate on relative organ weight (g/100 g) of male offspring rats ( $\bar{x} \pm s, n = 25$ )

组别	仔鼠质量/g	脏器系数/(g/100 g)						
		肝脏	肾脏	心脏	肺	脾脏	睾丸	脑
对照组	149.86 ± 15.65	4.86 ± 0.37	1.06 ± 0.07	0.41 ± 0.04	0.62 ± 0.07	0.40 ± 0.09	0.82 ± 0.07	1.17 ± 0.10
2 mg/kg 染毒组	158.37 ± 9.25 <sup>①</sup>	5.06 ± 0.30 <sup>①</sup>	1.04 ± 0.07	0.43 ± 0.03 <sup>②</sup>	0.63 ± 0.08	0.40 ± 0.05	0.79 ± 0.06	1.12 ± 0.07
10 mg/kg 染毒组	149.24 ± 12.21	4.78 ± 0.34	1.04 ± 0.05	0.44 ± 0.04 <sup>②</sup>	0.63 ± 0.09	0.40 ± 0.05	0.78 ± 0.06 <sup>①</sup>	1.14 ± 0.09
50 mg/kg 染毒组	144.28 ± 8.74	4.97 ± 0.31	1.05 ± 0.01	0.44 ± 0.03 <sup>②</sup>	0.66 ± 0.09	0.41 ± 0.05	0.75 ± 0.05 <sup>②</sup>	1.15 ± 0.06

<sup>①</sup>  $P < 0.05$ , <sup>②</sup>  $P < 0.01$  与对照组比较。

### 2.3 氟戊菊酯对雄性仔鼠睾丸标志酶活性的影响

不同剂量染毒组雄性仔鼠的睾丸匀浆中 ACP 和 AKP 活性与对照组比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。2 mg/kg 和 10 mg/kg 染毒组的 LDH 活性与对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )；但 50 mg/kg 染毒组的 LDH 活性显著低于对照组，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。2 mg/kg 和 10 mg/kg 染毒组的  $\gamma$ -GT 活性显著低于对照组，差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )；但 50 mg/kg 染毒组的  $\gamma$ -GT 活性与对

照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (表 3)。

### 2.4 氟戊菊酯对雄性仔鼠血清和睾丸匀浆中睾酮含量的影响

随着染毒剂量的增加，血清睾酮含量有逐渐升高的趋势，但各剂量染毒组与对照组比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。睾丸匀浆中睾酮含量随着染毒剂量的增加先降低后升高，但各剂量染毒组与对照组比较差异也无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (表 4)。

表 3 氟戊菊酯对雄性仔鼠睾丸标志酶活性的影响( $\bar{x} \pm s, n = 25$ , U/g 蛋白)Tab 3 Effects of fenvalerate on activities of enzymes in testis of male offspring rats ( $\bar{x} \pm s, n = 25$ , U/g protein)

组别	ACP	AKP	LDH	$\gamma$ -GT
对照组	119.76 ± 16.43	135.94 ± 21.18	5.77 ± 0.84	2.85 ± 1.23
2 mg/kg 染毒组	125.64 ± 7.94	131.76 ± 15.75	5.34 ± 0.75	2.00 ± 1.24 <sup>②</sup>
10 mg/kg 染毒组	128.58 ± 20.11	132.18 ± 18.04	5.87 ± 0.75	2.03 ± 0.58 <sup>②</sup>
50 mg/kg 染毒组	130.10 ± 28.66	133.91 ± 24.57	5.28 ± 1.00 <sup>①</sup>	2.34 ± 0.68

<sup>①</sup>  $P < 0.05$ , <sup>②</sup>  $P < 0.01$  与对照组比较。

### 表 4 氟戊菊酯对雄性仔鼠血清和睾丸匀浆中睾酮含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 25$ , U/g 蛋白)

Tab 4 Effects of fenvalerate on serum T levels and testis homogenate T levels of male offspring rats ( $\bar{x} \pm s, n = 25$ , U/g protein)

组别	血清睾酮	睾丸匀浆中的睾酮
对照组	33.33 ± 40.65	83.72 ± 45.16
2 mg/kg 染毒组	34.82 ± 46.64	80.08 ± 56.06
10 mg/kg 染毒组	35.37 ± 42.32	80.81 ± 50.38
50 mg/kg 染毒组	44.57 ± 68.27	113.81 ± 101.76

### 3 讨 论

氟戊菊酯具有生殖内分泌毒性和拟雌激素活性，不仅可以直接作用于大鼠成熟精子，引起运动速度和运动方式的改变，导致生殖能力下降或不育，还可能通过使生精上皮细胞变性和支持细胞受损，干扰下丘脑-垂体-性腺轴的调节作用，使精子发生受损，对动物生殖功能产生影响<sup>[5-7]</sup>。 $\gamma$ -GT 是睾丸支持细胞的特异性标志酶，它的活性变化与支持细胞的功能息息相关；ACP 的活性变化则直接与生精

上皮的变性有关。胡静熠等<sup>[1]</sup>将 SD 大鼠经灌胃染毒氟戊菊酯，观察到在高剂量时 ACP 和  $\gamma$ -GT 活性均下降，其中  $\gamma$ -GT 活性明显下降，其毒性机制可能是通过干扰细胞膜表面离子通道，降低膜脂质流动性，抑制  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶，干扰细胞内钙稳态<sup>[5, 8]</sup>，或者氟戊菊酯竞争性地与雄激素受体和性激素结合蛋白结合，影响睾酮合成的相关酶<sup>[9]</sup>。

本研究结果表明，染毒组雄性仔鼠睾丸匀浆中 ACP 活性与对照组相比差异均无统计学意义，与胡静熠等的研究结果不同。推测出现这种结果可能是因为本实验通过妊娠期染毒来研究子代出生后第 35 天睾丸匀浆中 ACP 活性的变化。研究<sup>[2]</sup>表明氟戊菊酯能通过胎盘屏障转运到达子代，其浓度可能会损耗或代谢到不足以对子代生精上皮细胞直接造成严重损害的程度，这时机体的代偿修复机制占主要作用。 $\gamma$ -GT 在 50 mg/kg 染毒组时明显下降，提示氟戊菊酯可能对支持细胞造成了损伤。支持细胞损伤将影响雌激素和抑制素的分泌，抑制素减少可以降低对垂体分泌卵泡刺激激素的抑制，从而使垂体分

泌卵泡刺激素增加,进而影响睾酮的合成。

有研究<sup>[10]</sup>表明,大鼠氯戊菊酯染毒3个月后,其睾丸中合成睾酮的酶( $17\beta$ -羟基类固醇脱氢酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)表达量下降,导致血清睾酮浓度显著下降,提示氯戊菊酯可抑制睾酮的生成,具有抗雄性激素样作用。而本实验研究结果显示:血清和睾丸匀浆中的睾酮含量与对照组相比差异均无统计学意义,推测可能是因为所测睾酮含量是在仔鼠出生后的第35天,随着仔鼠的生长发育,机体的代偿修复作用逐渐发挥作用,使得睾酮的合成趋于正常。大鼠睾酮生成通常分三个阶段<sup>[10]</sup>,第一阶段在大鼠妊娠的第14~17天,与本研究的氯戊菊酯暴露时间相吻合;第二阶段发生在大鼠妊娠的第17天至出生后第14天。在本实验染毒剂量下,血清和睾丸匀浆中的睾酮含量与对照组比较差异均无统计学意义,而本实验前期研究<sup>[11]</sup>肛殖距的结果提示仔鼠出生后第4、8、12天不同剂量染毒组雄性仔鼠肛殖距较对照组明显短小( $P < 0.05$ ),但出生后第24天的各组雄性仔鼠肛殖距无明显差异( $P > 0.05$ )。所以,在本实验的剂量设计下,氯戊菊酯可能只影响到第一阶段睾酮的合成,而随着第二阶段睾酮的正常合成,其对雄性性分化的胜利作用逐步表现出来,从而使性分化异常的表型特征被机体逐步代偿修复。

LDH催化丙酮酸和乳酸的转化反应,通过糖酵解生能,为生精细胞的生长发育成熟提供能量,对雄性生精功能及精子活动起着重要作用<sup>[12]</sup>。本实验结果显示,雄性仔鼠睾丸中LDH活性在高剂量染毒组(50 mg/kg)时显著低于对照组,推测氯戊菊酯可能会影响到雄性子代生精上皮细胞生长发育的能量供给,进而通过影响生精上皮细胞的发育而影响精子的生成。

Zhang等<sup>[13]</sup>研究发现:通过灌胃染毒的孕鼠,其雄性仔鼠睾丸和附睾明显缩小,成年后代的睾丸细精管成熟度及其精子数量也明显减少。本实验结果显示,染毒组睾丸脏器系数与对照组相比差异有统计学意义,且随着染毒剂量的增加,睾丸脏器系数下降,说明氯戊菊酯可影响雄性后代的性发育水平。这可能与氯戊菊酯具有雌激素样作用和抑制雄激素发挥生物学作用有关<sup>[1,2]</sup>。

本实验研究结果显示:氯戊菊酯对雄性仔鼠睾酮水平和睾丸标志酶活性有一定影响,并可使睾丸脏器系数明显下降,主要通过损伤子代的睾丸间质细胞和支持细胞,干扰下丘脑-垂体-性腺轴的调节作用,使子代的生殖内分泌功能紊乱,从而影响性发育水平。本研究在一定程度上探讨了妊娠期氯戊菊酯暴露对雄性仔鼠生殖系统的影响机制,为深入研究提供了基础。

### [参考文献]

- [1] 胡静熠,王守林,赵人铮,等.氯戊菊酯对雄性大鼠生殖内分泌系统的影响[J].中华男科学,2002,8(1):18~21.
- [2] Moniz AC, Cruz-Casallas PE, Oliverira CA, et al. Perinatal fenvaleate exposure: behavioral and endocrinology changes in male rats[J]. Neurotoxicol Teratol, 1999, 21(5): 611~618.
- [3] Moniz AC, Cruz-Casallas PE, Salzgeber SA, et al. Behavioral and endocrine changes induced by perinatal fenvaleate exposure in female rats[J]. Neurotoxicol Teratol, 2005, 27(4): 609~614.
- [4] 胡春荣.拟除虫菊酯农药的毒性研究进展[J].毒理学杂志,2005,19(3):239~241.
- [5] 龚伟,张习春,高蓉,等.氯戊菊酯对小鼠精子体外获能的影响及机制探讨[J].环境与职业医学,2004,21(2):84~87.
- [6] 宋玲,王玉邦,孙宏,等.氯戊菊酯体外对大鼠精子运动能力的影响[J].中华男性科学杂志,2007,13(7):588~590.
- [7] 姚克文,王介东.氯戊菊酯对大鼠精子及生殖激素的影响[J].生殖医学杂志,2008,17(1):58~61.
- [8] He J, Chen JF, Liu R, et al. Fenvaleate-induced alterations in calcium homeostasis in rat ovary[J]. Biomed Environ Sci, 2006, 19(1): 15~20.
- [9] 克莱艾森·卡萨瑞特·道尔毒理学[M].6版.黄吉武,周宗灿,译.北京:人民卫生出版社,2005:589.
- [10] 朱威,朱心强.农药的抗雄激素作用及其机制[J].国外医学:卫生学分册,2005,32(1):14~19.
- [11] 周义军,李晓凤,梁辰,等.氯戊菊酯宫内暴露对雄性仔鼠性分化的影响[J].上海交通大学学报:医学版,2010,30(8):879~882.
- [12] 才秀莲,郭海,伍冬梅,等.染锰大鼠血清和睾丸LDH活性的变化[J].遵义医学院学报,2010,33(2):101~103.
- [13] Zhang H, Wang H, Ji YL, et al. Maternal fenvaleate exposure during pregnancy persistently impairs testicular development and spermatogenesis in male offspring[J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(5): 1160~1169.

[收稿日期] 2011-04-07

[本文编辑] 周珠凤