

二月桂酸二丁基锡对大鼠睾酮及合成关键酶的影响

司纪亮¹,李杰^{2*},许晓群³,曹延河⁴,潘寻¹ (1.山东大学环境科学与工程学院,山东 济南 250061; 2.山东大学公共卫生学院,山东 济南 250012; 3.山东省医学科学院基础医学研究所,山东 济南 250062; 4.山东省淄博市第七人民医院病理科,山东 淄博 255000)

摘要: 用玉米油或二月桂酸二丁基锡[DBTD 0.01,0.1,1mg/(kg·d)体重]对新生雄性 Wistar 大鼠连续 5d 注射染毒.至大鼠出生后第 49d,检测其血清睾酮,细胞色素胆固醇侧链裂解酶(P450scc)、3 β -羟基类固醇脱氢酶(3 β -HSD)和细胞色素 P450 17- α 脱羟基酶(Cyp17)这 3 种睾酮合成关键酶 mRNA 表达及脏器系数.结果表明,大鼠血清睾酮随 DBTD 剂量升高呈上升趋势,1mg/(kg·d)组与对照组比较有显著性差异;P450scc 和 3 β -HSD mRNA 相对表达无显著性变化,Cyp17 在 0.1mg/(kg·d)组的相对表达有显著性升高;1mg/(kg·d)组大鼠睾丸脏器系数有显著性升高,而各 DBTD 处理组附睾和肝脏脏器系数与对照组比较无显著性变化.

关键词: 二月桂酸二丁基锡(DBTD); 大鼠; 睾酮; 关键酶; mRNA 表达

中图分类号: X503.22 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2007)02-0264-05

Influence of di-butyltin dilaurate on rats testosterone and synthetic key enzymes. SI Ji-liang¹, LI Jie^{2*}, XU Xiao-qun³, CAO Yan-he⁴, PAN Xun¹ (1.School of Environmental Science and Engineering, Shandong University, Jinan 250061, China; 2.School of Public Health, Shandong University, Jinan 250012, China; 3.Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science, Jinan 250062, China; 4.Department of Pathology, No. 7 People's Hospital of Zibo City, Shandong Province, Zibo 255000, China). *China Environmental Science*, 2007,27(2): 264~268

Abstract: Newborn male Wistar rats were injected contamination continuously for 5d using di-butyltin dilaurate (DBTD) 0.01,0.1, 1mg/(kg·d) body weight or solvent corn oil. 49d after the birth of rat, its serum testosterone was detected. The mRNAs expressions of three key steroidogenic synthesized enzymes; cytochrome cholesterol side-chain-cleavage enzyme (P450scc), and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD), and cytochrome P450 17 α -hydroxylase (Cyp17) mRNA, and organ index in rats were detected. The rat serum testosterone tended to rise with the rise of DBTD dosage. 1mg/(kg·d) group compared with the control group rose markedly. The relative expression of P450scc and 3 β -HSD mRNA did not change markedly. The relative expression of Cyp17 in 0.1mg/(kg·d) group rose markedly; the 0.1mg/(kg·d) group rat testis organ index rose markedly; while each DBTD treating group epididymis and liver organ index compared with the control group had no significant change.

Key words: di-butyltin dilaurate(DBTD); rat; testosterone; key enzymes; expression of mRNA

有机锡化合物广泛应用于船舶、塑料、农药、木材加工等行业,其对人类及其他动物的危害越来越受到广泛关注^[1-5].研究表明,二月桂酸二丁基锡(DBTD)对成年雄性 Wistar 大鼠染毒可干扰其睾丸酶活性,影响大鼠的生殖功能^[6],提示其可能具有环境类激素功能,但关于 DBTD 对哺乳动物性激素影响的研究未见报道.研究证实啮齿类动物在出生早期对类激素物质最为敏感^[7].本研究以不同浓度的 DBTD 染毒新生雄性 Wistar 大鼠,饲养至青春时期,通过测定大鼠脏器系数、血

清睾酮浓度,观察其青春期睾丸间质细胞病理切片,检测睾酮合成过程中 3 种关键酶基因 P450scc、3 β -HSD 及 Cyp17 mRNA 转录水平的变化,探讨 DBTD 对雄性生殖功能可能产生的内分泌干扰作用及其机理,为环境保护和人类健康保护提供参考依据.

收稿日期: 2006-08-17

基金项目: 国家“973”项目(2002CB512908)

* 责任作者, 教授, hjwsli@sdu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

DBTD,分析纯,购自上海实验试剂有限公司,使用时以玉米油溶解;焦碳酸二乙酯(DEPC)购自上海生工生物工程公司;DNA Marker(DL2000)购自大连宝生物制品有限公司;Trizol 试剂、M-MLV 逆转录酶、dNTPs、Rnasin、Taq 酶购自 GIBCOL 公司;P450scc、Cyp17、3 β -HSD 和 β -actin 的引物以及逆转录引物 Oligo d(T)18 由上海生工生物工程公司合成;氯仿、异丙醇、乙醇等均为国产分析纯试剂.睾酮 ELISA 试剂盒(Rat Testo)购自 Market INC USA 公司(批号 0427902).

1.2 试验动物处理

妊娠 12d Wistar 孕鼠(SPF 级)12 只,体重(330 $\pm$ 20)g,由山东大学实验动物中心提供(许可证号 SCXK(鲁)20030004).动物饲养温度(20 $\pm$ 3) $^{\circ}$ C,湿度(60 $\pm$ 10)%,光暗时间比 12h:12h,保持环境条件恒定.乳鼠出生 10h 后,按母鼠体重随机分成 4 组:玉米油阴性对照组;低剂量组[0.01mg/(kg $\cdot$ d)];中剂量组[0.10mg/(kg $\cdot$ d)];高剂量组[1.00mg/(kg $\cdot$ d)].按染毒剂量用玉米油配制成不同浓度的 DBTD 溶液对乳鼠皮下注射染毒.对照组注射玉米油,注射量均为 0.01mL/g 体重,每天 1 次,连续 5d.幼鼠出生 21d 后断乳,雌雄分笼普通饲料喂养.饲养至出生后第 49d,每组随机选取 10 只雄性大鼠称重,经腹腔注射 2%戊巴比妥麻醉,然后暴露大鼠股静脉,并从该处取血 2mL,分离血清,-20 $^{\circ}$ C 保存备用.断头处死大鼠,用 RNase-free 器械解剖大鼠,取其肝脏、睾丸和附睾组织称重、编号,计算相应的脏器系数.脏器系数计算公式:脏器系数=脏器质量(g)/大鼠体重(g) $\times$ 100%.每组选择 3 只大鼠的一侧睾丸用 10%的中性福尔马林固定,常规脱水包埋,5 μ m 切片,HE 染色,观察靶器官受损情况;其余睾丸用 RNase-free 生理盐水清洗,立即置入液氮罐中保存待检.

1.3 ELISA 法测定各组大鼠血清中 T 浓度

依据试剂盒说明书测定 T 浓度,每个处理组

随机选择 6 个血清,每个样品做 2 个平行样.

1.4 RT-PCR 扩增

每组随机选取 3 只大鼠的一侧睾丸,按照 TRIzol 说明书操作步骤提取总 RNA,用紫外分光光度仪测定 RNA 含量,根据 RNA 在 260nm 和 280nm 吸光度比较鉴定其纯度^[8].每组吸取 5 μ g RNA 加热变性,然后进行逆转录,方法参照 M-MLV 逆转录酶说明书.PCR 反应引物如下, P450scc 引物 P450-F: 5'GTCTTTGCCTGCGCTC AGT3', P450-R: 5'TGCTGCTTGATGCGTCTG3', 目的产物 547bp,用 β -actin1 作内参,引物序列为 actin1-F:5'CACACTGTGCCCCATCTATGA3',actin 1-R:5'GATGCCACAGGATTCCATAC3', 目的产物 342bp.Cyp17 引物 Cyp-F:5'ATATGATGCTGG CACACGAC3',Cyp-R:5'CGAACTTTGGCATAA CCCTT3',扩增片段 252bp; 3 β -HSD 引物 HSD-F: 5'TCCAGTGTATGTAGGCAATGT3',HSD-R:5'T CCACTAGTGTCCCGATCC3',扩增片段 420bp; 二者用 β -actin2 作内参,引物序列为 actin2-F: 5'ATTGTCACCAACTGGGACGAT3',actin2-R:5' ATGCCACAGGATTCCATACC3', 目的产物 599bp.引物设计软件为 Oligo 6.3.每个样本重复 2 次 RT-PCR 扩增.

1.5 目的基因的电泳、测序与图像分析

取目的 DNA 10 μ L,加 2 μ L 上样缓冲液,用 1.5%琼脂糖凝胶 60V 电压下电泳,溴化乙锭(EB)染色.采用 Labworks 4.0 凝胶成像系统分别对 3 种目的基因及内参 β -actin 扩增条带进行半定量分析,得出其光密度值.关键酶 mRNA 的相对表达值=(目的基因扩增条带的光密度值/相对应的内参扩增条带光密度值).所得关键酶基因 PCR 产物,纯化后送上海生工生物工程公司测序.

1.6 统计分析

应用 SPSS10.0 统计软件处理数据,应用单因素方差程序进行分析.单因素方差分析有显著性差异的,各组间均数的两两比较,方差齐的采用 LSD,方差不齐的选择 Dunnett's T3 方法进行分析,定义 $P<0.05$ 为有统计学差异.

2 结果与讨论

2.1 DBTD 染毒对大鼠体重、脏器系数的影响

由表 1 可见,出生后 49d 时,DBTD 处理组大鼠体重与对照组比较有显著性的降低,提示 DBTD 处理对大鼠的生长发育有不利影响.仅在低剂量组睾丸质量与对照组比较有显著性的降低,其他脏器质量与对照组无显著性差异.高剂量组大鼠睾丸脏器系数显著高于对照组,而低剂量、中剂量组与对照组无显著性差异.DBTD 处理组大鼠肝脏脏器系数和附睾脏器系数与对照

组无显著性差异.

周群芳等^[9]研究表明,肝脏脏器系数(肝肉指数)可作为评估污染物对实验动物慢性毒性效应的灵敏指标,睾丸脏器系数(性肉指数)可作为环境类激素对实验动物慢性暴露的一个灵敏指标.本研究结果显示各 DBTD 处理组大鼠肝脏脏器系数无显著性改变,而高剂量组睾丸脏器系数显著升高,提示在较低浓度($\leq 1\text{mg/kg}$ 体重)暴露时,DBTD 对乳鼠的环境类激素效应可能较毒性效应明显.

表 1 DBTD 染毒对大鼠体重,脏器质量和脏器系数的影响
Table 1 Effects of DBTD on weight of rats, organs and organ index

DBTD 剂量 [mg/(kg·d)]	例数	体重 (g)	脏器质量(g)			脏器系数(%)		
			睾丸	附睾	肝脏	睾丸	附睾	肝脏
0	10	251.3±15.0	2.28±0.13	0.72±0.18	10.04±1.23	0.91±0.06	0.29±0.08	4.02±0.60
0.01	10	222.3±18.5**	1.99±0.24**	0.75±0.11	9.14±0.84	0.90±0.08	0.34±0.07	4.12±0.34
0.10	10	233.7±19.5*	2.21±0.17	0.74±0.10	9.01±0.55	0.95±0.08	0.32±0.05	3.87±0.37
1.00	10	217.1±8.4**	2.19±0.13	0.65±0.12	8.89±1.29	1.01±0.04**	0.30±0.05	4.10±0.64

注:* $P<0.05$, ** $P<0.01$,结果以 mean±SD 显示

2.2 DBTD 对大鼠血清 T 浓度及睾丸组织的影响

由图 1 可见,各剂量组血清 T 浓度都有不同程度升高,且随 DBTD 剂量升高呈上升趋势,高剂量组与阴性对照组比较有显著性统计学差异.睾丸组织切片发现 DBTD 对大鼠睾丸生精细胞、支持细胞和间质细胞与玉米油阴性对照比较无明显病理改变.这说明与睾酮代谢相关酶的改变比组织病理学的改变出现得早.出生早期暴露于 DBTD 可对大鼠的睾丸系统产生一些长期的影响.

2.3 目的基因 RT-PCR 扩增产物电泳结果

4 组大鼠睾丸内参照 β -actin1、 β -actin2 和目的基因 P450scc、Cyp17、 3β -HSD RT-PCR 扩增产物电泳结果,如图 2 所示.目的基因与内参扩增产物长度与引物设计结果相符.目的基因测序后输入 GenBank,经 BLAST 比对分析后,所得基因片段与 GenBank 中已有相应的基因序列同源性非常好,证明所得 PCR 产物为目标片段. P450Scc、Cyp17 及 3β -HSD 目的基因产物序列

提交 GenBank,注册登记号分别为:DQ515795, DQ515796, DQ515797.

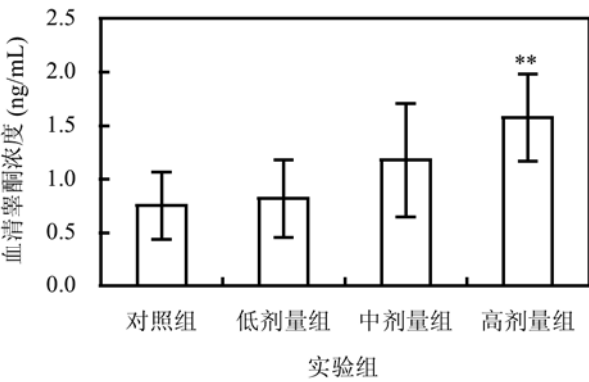


图 1 大鼠血清 T 浓度均值

Fig.1 Mean concentration of serum T in male rats
** 表示与对照组比较 $P<0.01$,结果以 mean±S.E.M. (n=6)显示

雄激素的生物合成是胆固醇转化为睾酮的过程.P450scc、 3β -HSD 及 Cyp17 在睾酮的生物合成过程起关键性的作用^[10-11].有研究表明,在睾

酮生成过程中,P450_{scc} 首先催化胆固醇生成孕酮;Cyp17 进一步将孕烯醇酮、孕酮转变为脱氢异雄甾酮、雄烯二酮^[12]。

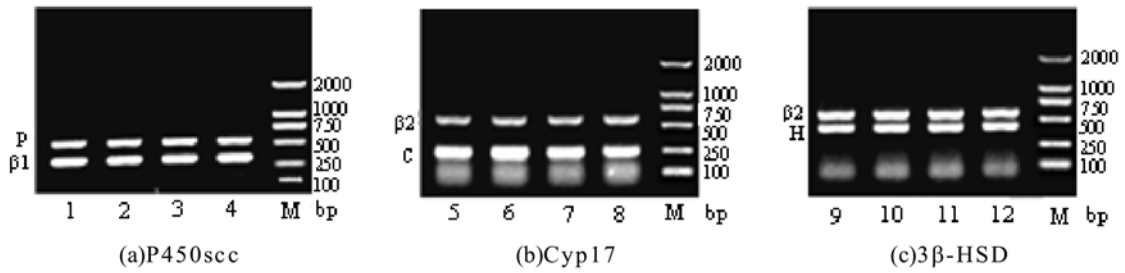


图 2 大鼠睾丸 P450_{scc},Cyp17,3β-HSD 基因 RT-PCR 电泳图

Fig.2 Electrophoresis gel image of P450_{scc}, Cyp17, 3β-HSD gene RT-PCR products from the testes of rats
β1 为内参β-actin1, β2 为内参β-actin2,P 为 P450_{scc},C 为 Cyp17,H 为 3β-HSD,M 为 DNA marker. 1,2,3,4 分别为高剂量,中剂量,低剂量,对照组内参及 P450_{scc} 基因 RT-PCR 扩增产物目的带;5,6,7,8 分别为相应试验组内参及 Cyp17 基因扩增产物目的带;9,10,11,12 分别为相应试验组内参及 3β-HSD 基因扩增产物目的带

2.4 3 种关键酶 mRNA 表达与统计学分析

由表 2 可见,各 DBTD 处理组大鼠睾丸组织中 P450_{scc} mRNA,3β-HSD mRNA 的相对表达量与对照组比较无显著性统计学差异;各实验组大鼠的 Cyp17 mRNA 相对表达量均比对照组有所升高,中剂量组与对照组比较有显著性统计学差异.这表明 Cyp17 可能是大鼠 DBTD 暴露的相对敏感指标.DBTD 处理干扰了大鼠雄性系统使 Cyp17 mRNA 表达量增加,促进了孕烯醇酮、孕酮转变为脱氢异雄甾酮、雄烯二酮的过程,从而使睾酮水平升高。

浓度不呈剂量反应关系,可能是由于体内暴露于类激素物质影响下丘脑-垂体-性腺内的多个位点^[13],从而出现复杂的情况。

3 结论

- 3.1 新出生 Wistar 大鼠暴露于 DBTD,可导致其青春期时血清睾酮浓度增加,但实验大鼠睾丸组织无显著性病理改变。
- 3.2 DBTD 处理对实验终点时各实验组大鼠睾丸 P450_{scc}、3β-HSD mRNA 的表达并没有显著性影响,但可影响 Cyp17 mRNA 相对表达。
- 3.3 新出生 Wistar 大鼠短期暴露于 DBTD,可将危害延续至青春期。

参考文献:

[1] Birchenough A C, Barnes N, Evans S M, *et al.* A review and assessment of tributyltin contamination in the North Sea, based on surveys of butyltin tissue burdens and imposex/intersex in four species of neogastropods [J]. *Mar. Pollut. Bull.*, 2002, 44(6):534-543.

[2] Kajiwara N, Niimi S, Watanabe M, *et al.* Organochlorine and organotin compounds in Caspian seals (*Phoca caspica*) collected during an unusual mortality event in the Caspian Sea in 2000 [J]. *Environ. Pollut.*, 2002,117(3):391-402.

[3] Adeeko A, Li D, Forsyth D S, *et al.* Effects of in utero tributyltin chloride exposure in the rat on pregnancy outcome [J]. *Toxicol. Sci.*, 2003,74(2):407-415.

表 2 大鼠睾酮合成酶关键酶 mRNA 的相对表达
Table 2 The relative mRNA expression of key steroidogenic enzymes in the testes of rats

DBTD 剂量 [mg/(kg·d)]	例数	P450 _{scc}	Cyp17	3β-HSD
0	3	0.74±0.09	1.06±0.14	0.75±0.09
0.01	3	0.73±0.10	1.28±0.16	0.81±0.08
0.1	3	0.85±0.06	1.40±0.09*	0.89±0.15
1	3	0.86±0.04	1.32±0.08	0.76±0.10

注:* P<0.05,结果以 mean±S.E.M.显示

中剂量 DBTD 组 Cyp17 mRNA 相对表达量与对照组比较有显著性统计学差异,而低、高剂量组与对照组无显著性差异.其 mRNA 与 DBTD

- [4] Alam M S, Husain R, Seth P K, *et al.* Age and sex related behavioral changes induced by dibutyltin-dilaurate in rats [J]. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1993,50(2):286-292.
- [5] Ema M, Amano H, Itami T, *et al.* Teratogenic evaluation of di-n-butyl phthalate in rats [J]. Toxicol. Lett., 1993,69(2):197-203.
- [6] 宋祥福,李铁骥,于光艳.二月桂酸二丁基锡对雄性大鼠睾丸组织中酶活性的影响 [J]. 中国比较医学杂志,2005,15(5):285-287.
- [7] Iguchi T, Watanabe H, Katsu Y. Developmental effects of estrogenic agents on mice, fish, and frogs: a mini-review [J]. Horm. Behav., 2001,40(2):248-451.
- [8] Chang W T, Lauzon R J. Isolation of biologically functional RNA during programmed death of a colonial ascidian [J]. Biol. Bull., 1995,188(1):23-31.
- [9] 周群芳,江桂斌,刘稷燕.三丁基锡化合物对稀有鮰鲫的急慢性毒理影响 [J]. 中国科学(B 辑), 2003,33(2):150-155.
- [10] Payne A H, Youngblood G L. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells [J]. Biol. Reprod., 1995, 52(2):217-225.
- [11] Greco T L, Payne A H. Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads [J]. Endocrinology, 1994,135(1):262-268.
- [12] Payne A H, Hales D B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones [J]. Endocr. Rev., 2004,25(6):947-970.
- [13] Akingbemi B T, Ge R, Klinefelter G R, *et al.* Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2004,101(3): 775-780.

作者简介: 司纪亮(1973-),男,山东淄博人,山东大学环境科学与工程学院博士研究生,主要从事环境毒理研究.发表论文 6 篇。