

壬基酚对成年雄性 SD 大鼠生殖功能的影响^{*}

张 浩^{1#} 曾祥贵¹ 程微波² 吴德生¹

1. 四川大学华西公共卫生学院 环境卫生学教研室 (成都 610041); 2. 四川大学华西公共卫生学院 毒理学教研室

【摘要】 目的 研究壬基酚对 SD 雄性大鼠生殖功能的影响。方法 将成年雄性 SD 大鼠经口染毒壬基酚 (50、100、200 mg/kg) 28 d 后, 处死, 测定生殖功能相关指标, 并作睾丸组织病理学检查。取成年雄性大鼠睾丸细胞进行体外培养, 壬基酚染毒, 测定睾丸酮分泌量的变化, 并对其间质细胞、支持细胞和生精细胞的超微结构进行电镜观察。结果 经口染毒壬基酚剂量 ≥ 100 mg/kg 可引起大鼠精子计数和活力的显著降低, 睾丸组织病理学切片显示曲细精管萎缩, 生精能力下降。睾丸细胞体外培养研究显示, 壬基酚能抑制睾丸酮的分泌, 且电镜观察可见间质细胞内质网肿胀, 表明合成功能减弱。结论 壬基酚在高浓度时能明显损伤雄性大鼠的生殖功能。

【关键词】 壬基酚 生殖功能 睾丸酮 组织病理学

【中图分类号】 R698

Adverse Effects of Nonylphenol on the Reproductive Function of Adult Male SD Rats Zhang Hao^{*}, Zeng Xianggui, Cheng Weibo, Wu Dengsheng. ^{*} Department of Environmental Health, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

【Abstract】 Objective To assess the adverse effects of both *in vivo* and *in vitro* exposure to nonylphenol on the reproductive function of adult male SD rats. Methods Adult male SD rats were sacrificed after they had received orall nonylphenol at 50, 100, 200 mg/kg for 28 days. Both indications related to their reproductive function and histopathological section of testis were analyzed. *In vitro* study of testicular cells from adult male rats by use of culture solution with different nonylphenol concentrations was conducted. Testosterone production in cell culture medium was examined and the ultrastructure of Leydig cell, Sertoli cell and spermatogenesis cell were observed under electron microscope. Results *In vivo* study of the experiment animals in comparison with the controls revealed that sperm count and motility in testis of adult rats exposed to nonylphenol at doses of 100 mg/kg and above were significantly decreased, and the histopathological sections of testis showed atrophied seminiferous tubules and decreased spermatogenesis. *In vitro* study of testicular cell culture showed that testosterone secretion was inhibited. And electron microscopy disclosed that the endoplasmic reticulum of Leydig cell swelled, which might indicate the reduction of testosterone biosynthesis. Conclusion Nonylphenol at higher dose directly impairs the reproductive function of adult male SD rats.

【Key words】 Nonylphenol Reproductive function Testosterone Histopathology

烷基酚被广泛用作塑料增塑剂, 农药乳化剂, 纺织行业的整理剂等, 其环境降解产物壬基酚的化学性质稳定, 环境分布广泛。许多环境内分泌干扰的实验研究结果证实壬基酚具有雌激素样作用^[1,2], 但有关其生殖发育毒性的研究, 在近年才逐渐引起人们的高度关注。本研究旨在探索壬基酚对哺乳动物雄性 SD 大鼠生殖功能的影响以及睾丸组织的病理学改变。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 280~320 g, 共 30 只, 由本校实验动物中心提供。

1.2 试剂

壬基酚, 化学纯, 由中国医药公司北京采购站提供。DMEM 高糖培养基, 小牛血清、胰蛋白酶、 NAD^+ 、NBT 显色浓缩液、二甲基亚砷、MTT、异雄酮、睾丸酮测定试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 体内实验 设 50、100、200 mg/kg 三个壬基酚染毒组(每组 6 只大鼠)及空白对照组。不同浓度的壬基酚分组灌胃染毒 4 周, 剖杀动物, 取附睾进行精子密度、活度和死精子数等指标测定, 同时取睾丸组织固定, 石蜡包埋, 制片, 进行组织病理学观察。

1.3.2 体外实验 大鼠睾丸细胞体外培养, 将 2

^{*} 国家自然科学基金(批准号 30030120)资助

[#] 华西公共卫生学院 2000 级博士研究生

只成年雄性 SD 大鼠颈椎脱臼处死, 在无菌条件下, 取出双侧睾丸清洗, 分离被膜、胰酶消化 15 min, 培养液清洗, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入含 15% 小牛血清的培养液 10 ml, 混悬, 细胞计数, 同时采用苔盼蓝染色观察细胞存活率, 并将细胞混悬液分装于 24 孔培养板上, 置于 37℃, 5%CO₂ 卵箱中预培养 48 h, 弃去各孔原培养液, 再加入配制好的含不同浓度壬基酚(10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰、10⁻¹¹、10⁻¹² mol/L) 培养液 1 ml, 同时设空白对照, 继续培养 24 h, 取各孔上清液 0.5 ml, 采用放射免疫法测定睾丸酮分泌量, 实验重复一次。生殖细胞电镜观察: 取壬基酚 10⁻⁸ mol/L 染毒组和对照组细胞培养液, 离心, 弃上清液, 用 3% 戊二醛固定, 制片, 用电

镜观察睾丸间质细胞、支持细胞和精原细胞。

2 结果

2.1 体内实验结果

2.1.1 壬基酚对雄性大鼠生精能力的影响 表 1 显示, 壬基酚 100 mg/kg 组的精子活力显著低于对照组, 死精子数显著高于对照组, 壬基酚 200 mg/kg 组, 体重、精子密度、精子活度显著低于对照组, 死精子数显著高于对照组。

2.1.2 壬基酚对大鼠睾丸的损伤 200 mg/kg 组与对照组比较(图 1、2), 壬基酚睾丸部分曲细精管萎缩, 精原细胞无异常改变, 但部分精母细胞死亡, 致使精子数明显减少; 此外, 可见核碎裂现象, 其它

表 1 壬基酚对 SD 雄性大鼠生精能力的影响 (x±s)
Table 1 Adverse effects of nonylphenol on the spermatogenous ability of male SD rats (x±s)

Group	n	Body weight (g)	Sperm count (Million/ml)	Sperm motility (Percent)	Death sperm number (Percent)
Control	6	347.0±27.7	166.7±36.9	61.6±8.8	4.25±1.33
Nonylphenol 50 mg/kg	5	355.4±32.1	172.2±34.1	62.2±9.6	4.00±0.79
Nonylphenol 100 mg/kg	6	333.8±46.2	172.3±52.5	51.7±8.4 *	6.17±1.47 *
Nonylphenol 200 mg/kg	6	295.5±32.0 *	142.8±27.4 *	48.2±12.3 *	18.70±13.40 *

* P<0.05, compared with the control

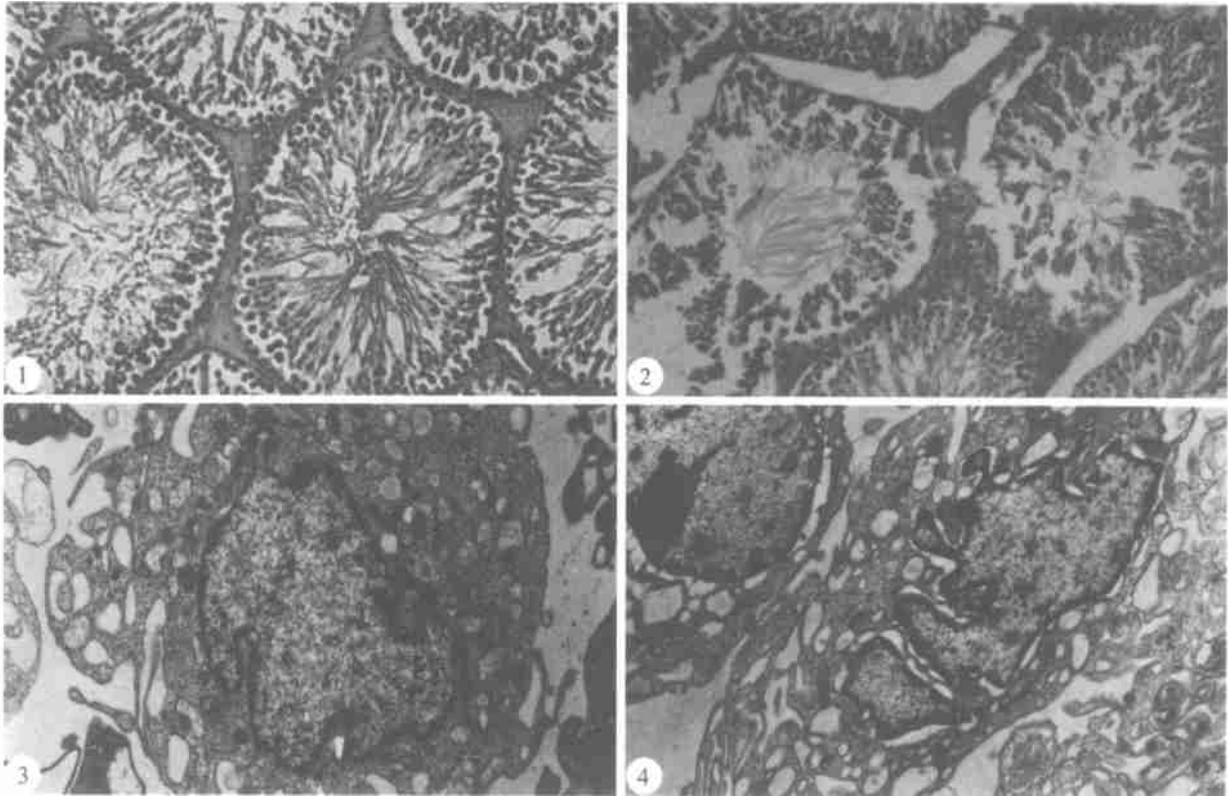


图 1 对照组睾丸。 ×200 图 2 壬基酚染毒组睾丸。 ×200 图 3 对照组间质细胞。 ×6 000 图 4 壬基酚染毒组间质细胞。 ×6 000
Fig 1 Testis of control. ×200 Fig 2 Testis treated with nonylphenol. ×200 Fig 3 Leydig cell of control. ×6 000
Fig 4 Leydig cell treated with nonylphenol. ×6 000

浓度组未见异常。

2.2 体外实验结果

2.2.1 大鼠睾丸细胞体外培养 倒置显微镜下可观察到培养液中有胞膜内侧出现明显光环的睾丸间质细胞,细胞悬液经苔盼蓝染色,显示细胞存活率>95%,培养 24、48 h,观察其贴壁良好,细胞数量明显增加。在培养 6、24、48、72 h 后,培养液中睾丸酮含量分别为 2.8、4.2、1.7、2.5 ng/ml,表明经体外连续培养后,新增殖的细胞仍具有分泌睾丸酮的功能,体外睾丸细胞培养条件符合实验设计要求。

2.2.2 壬基酚对睾丸酮分泌量的影响 加入不同浓度壬基酚继续培养,各组 OD 值无明显差异,表明在受试浓度范围内壬基酚对培养细胞不产生细胞毒作用,但壬基酚各浓度组睾丸酮含量与对照组比较,具有显著差异,表明壬基酚对睾丸间质细胞分泌睾丸酮有抑制作用,并且存在剂量反应关系。两次重复试验结果一致,见表 2。

表 2 壬基酚对睾丸细胞生长情况及睾丸酮分泌功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Effects of nonylphenol on both growth status of testicular cell and testosterone secretion production ($\bar{x} \pm s$)

Group	OD value	Testosterone (ng/ml)
Nonylphenol (mol/L)		
10 ⁻⁸	0.257±0.0078	0.97±0.1155 *
10 ⁻⁹	0.288±0.0051	0.90±0.1732 *
10 ⁻¹⁰	0.300±0.0185	1.30±0.1000 *
10 ⁻¹¹	0.281±0.0170	1.20±0.3464 *
10 ⁻¹²	0.282±0.0215	1.60±0.2646 *
Control	0.247±0.0325	1.73±0.3055

* $P<0.05$, compared with the control

2.2.3 生殖细胞电镜观察结果 由图 3、4 可见,睾丸间质细胞内质网肿胀,但精原细胞和支持细胞超微结构未见异常。

3 讨论

精子数量和活力的变化是反映雄性生殖功能异常的早期指标,本研究结果显示,100 mg/kg 壬基酚染毒组与对照组比较,虽然精子密度未见异常,但精子活力已有所降低,且死亡精子数增加,表明此浓度对雄性大鼠的生精功能已产生了有害作用,200 mg/kg 壬基酚染毒组,其组织病理学观察也证实睾丸曲细精管发生明显的病理学改变,以损伤精母细胞为特征,精母细胞发育生成精子的数量显著减少,提示高浓度时影响睾丸生精功能,并且该组小鼠体重降低($P<0.05$),提示对小鼠产生了毒性作用。这

与范奇元等^[3,4]的实验结果基本相同。据 Chitra 等近期报道^[5],对雄性大鼠壬基酚(100 mg/kg)染毒 45 d,睾丸生精上皮显著减少,其机制可能是通过影响生精上皮抗氧化防御系统的功能,干扰生精。

体内睾丸酮总量的 95% 由睾丸间质细胞分泌,本次大鼠睾丸细胞体外培养实验结果显示,壬基酚对间质细胞合成睾丸酮有明显的抑制作用,Lanrenzama 等^[6]在壬基酚动物多代生殖毒性实验研究中发现,F1 代大鼠血清睾丸酮水平在壬基酚各剂量组均明显降低,且睾丸内合成睾丸酮的微粒体酶 P450_{c17} 活性明显下降。此外,我们对体外细胞培养实验中的 10⁻⁸ mol/L 壬基酚浓度组的睾丸生精细胞、支持细胞、间质细胞的超微结构进行了电镜观察表明,精原细胞和支持细胞与对照组比较未见异常,但染毒组睾丸间质细胞的内质网出现明显的肿胀,证明了间质细胞睾丸酮的合成受到影响,其机制尚不清楚。

目前,对于壬基酚是否对人类的生殖及发育具有危害尚有争议,特别是在环境低浓度的情况下是否会干扰哺乳动物的生殖功能没有达成统一的认识,还需大量有效的人群流行病学调查和动物实验证据。因此本次实验的研究结果支持高浓度壬基酚对大鼠的生殖功能产生了有害作用,为今后壬基酚生殖毒性机制进一步深入的研究提供了有价值的参考依据。

参 考 文 献

- 1 邓茂先,陈祥贵.环境内分泌干扰物研究进展.国外医学卫生学分册,2000;27(2):65
- 2 郑刚.环境雌激素对机体的影响.国外医学卫生学分册,2001;28(4):197
- 3 范奇元,李卫华,申立军等.壬基酚对 SD 雄性大鼠生殖功能的影响.卫生毒理学杂志,2001;15(4):225
- 4 de Jager C, Bornman MS, van der Horst G. The effect of P-nonylphenol on the fertility potential of male rats after gestational, lactational and direct exposure. Andrologia, 1999; 31(2):107
- 5 Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP. Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats. Arch Toxicol, 2002; 76(9):545
- 6 Laurenzama EM, Balasubramanian G, Weis C, et al. Effect of nonylphenol on serum testosterone levels and steroidogenic enzyme activity in neonatal, pubertal, and adult rats. Chem Biol interact, 2002; 139(1):23

(2002-09-15 收稿,2002-10-14 修回)

编辑 沈进