

· 论 著 ·

## 甲氧滴滴涕对雌性大鼠性腺毒性作用及其机制研究

常 飞<sup>1</sup>, 汪惠文<sup>2</sup>, 陈必良<sup>3</sup>, 马向东<sup>3</sup>

(兰州军区总医院:1. 妇产科;2. 麻醉科 730050;

3. 第四军医大学附属西京医院妇产科, 西安 710033)

**摘要:**目的 探讨甲氧滴滴涕(MXC)对雌性大鼠性腺毒性的作用机制。方法 成年雌性清洁级 SD 大鼠 40 只,按体质量随机分成 4 组,染毒剂量分别为 0、16、32、64 mg/kg。每天以 1 mL/100 g 体质量腹腔注射染毒,连续 20 d。结果 高、中剂量染毒组大鼠动情周期延长,与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。各染毒组大鼠子宫脏器系数、卵巢脏器系数以及子宫、卵巢间质雌激素受体(ER)的表达阳性率与对照组比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 在本实验剂量条件下,MXC 可能不是通过影响 ER 表达而产生性腺毒性。

**关键词:**甲氧氯;受体,雌激素;性腺毒性

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.01.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)01-0009-03

Research of relation between female gonad toxicity of methoxychlor on rats and the expression of estrogen receptor in uterus and ovary

Chang Fei<sup>1</sup>, Wang Huiwen<sup>2</sup>, Chen Biliang<sup>3</sup>, Ma Xiangdong<sup>3</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology; 2. Department of Anesthesiology, the General Hospital of Lanzhou Military Command, Gansu 730050, China; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Shanxi 710033, China)

**Abstract:** **Objective** To study the relation between female gonad toxicity of methoxychlor on rats and the expression of estrogen receptor(ER) in uterus and ovary. **Methods** 40 SD female rats were randomly divided into 4 groups base on body weight and were injected subcutaneously by the 4 dose levels(0, 16, 32, 64 mg/kg body weight) for 20 days. Vaginal smears of rats were taken to determine estrous cycle. The rats were sacrificed on the day of estrus stage. Body weights, estrus stage, organ weights and organ coefficients of ovary were observed. Serum follicle stimulating hormone(FSH), luteinizing hormone(LH), estradiol(E2) and progesterone(P) were detected with the radio immunoassays. **Results** The period of estrus cycle of intermediate and high concentration groups were longer than normal group( $P < 0.05$ ). The organ coefficients of uterus, ovary and the positive arte of ER of experiment groups was similar to normal group( $P > 0.05$ ). **Conclusion** MXC in experimental dose may induce the disorder of hypothalamic-pituitary-ovarian axis and decrease the expression level of FSH, however, this dose can not change the expression level of ER secreted from ovarian and uterus, and increase the toxicities of female gonad.

**Key words:** methoxychlor; receptors, estrogen; gonad toxicity

甲氧滴滴涕(methoxychlor, MXC)是一种替代滴滴涕的有机氯杀虫剂,其杀虫效果明显,生物毒性相对较低,因而在许多国家得到广泛应用。体内外研究表明, MXC 可以引起大鼠动情周期延长<sup>[1]</sup>,增加窦状卵泡的闭锁<sup>[2-3]</sup>,影响卵巢功能,但是 MXC 对雌性大鼠性腺毒性机制仍不清楚。本文通过亚慢性染毒,观察 MXC 对大鼠子宫和卵巢雌激素受体(estrogen receptor, ER)表达的影响,以探讨 MXC 对雌性大鼠性腺毒性作用机制。

**1 材料与方**

**1.1 实验动物** 雌性 3 个月龄 SD 大鼠 40 只购于第四军医大学实验动物中心,体质量 180~200 g。饲养温度为 22 ℃, 12 h 光照, 12 h 黑暗,允许自由饮水和摄食。

**1.2 试剂与仪器** MXC(美国 Sigma 公司生产,纯度 99%,批号:49054),芝麻油为市售的纯正芝麻油,卵泡刺激素(FSH)、促黄体生成素(LH)、雌二醇(E2)、孕激素(P)放射免疫试剂盒(北京北免东雅生物技术研究所),台式低温高速离心机(德国 Kendro 公司 D37520),紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂 752C 型),系统显微镜(日本 Olympus BX51), $\gamma$  计数仪(西安 262 厂,型号 2003ps), ER 抗体(美国 Santa Cruz 公司), ABC 试剂盒(武汉博士德公司)等。采用 SABC 法进行免疫组织化

学染色,同时用 PBS 代替一抗做阴性对照。

**1.3 实验方法**

**1.3.1 动物分组染毒** 大鼠经适应性饲养 1 周后随机分为对照组(MXC 0 mg/kg 组)和低、中、高剂量组(MXC 16、32、64 mg/kg 组)。对照组腹腔注射芝麻油,注射量为每 100 g 体质量 1 mL,每天 1 次,连续 3 周。低、中、高剂量组大鼠每日 8:00~10:00 MXC 灌胃染毒,连续染毒 20 d,给药剂量和时间参照文献[1-2]的方法,灌胃量为每 100 g 体质量 1 mL。大鼠每周称体质量 1 次,以调整灌胃量。

**1.3.2 子宫、卵巢指数及血清激素水平测定** 末次灌药 24 h 后眼眶静脉取血 5 mL,颈椎脱臼处死大鼠,迅速剖腹取出卵巢、子宫,用电子天平称其质量后,计算子宫、卵巢脏器指数[脏器指数 = 脏器湿质量(mg)/体质量(g)]。血标本置 4 ℃ 冰箱内冷藏静置 24 h 后,4 000 r/min 离心 20 min,取上清液, -20 ℃ 保存,用放射免疫法测血清 FSH、LH、P 及 E2 浓度,按照试剂盒操作说明书进行测定。所有样品同批次测定,以避免批间误差。

**1.3.3 观察动情周期变化** 每日 8:00~10:00 对大鼠进行阴道脱落细胞涂片,显微镜下观察阴道涂片的组织学变化,以判别动情前期、动情期、动情后期和动情间期<sup>[4]</sup>。为避免处死

表 1 各组大鼠动情周期变化( $\bar{x}\pm s, d$ )

组别	动情前期	动情期	动情后期	动情间期	周期数
对照组	3.79±0.96	4.17±0.98	3.50±0.88	3.16±0.90	4.80±0.41
低剂量组	3.90±0.82	4.39±1.00	3.10±0.70	2.23±1.00	4.51±0.59
中剂量组	4.39±0.87	5.10±0.90 <sup>a</sup>	2.98±0.46	3.02±1.13	3.63±0.55 <sup>a</sup>
高剂量组	4.20±0.80	5.70±0.91 <sup>a</sup>	3.40±0.55	2.96±1.20	3.24±0.61 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

表 2 各组大鼠子宫、卵巢质量及指数变化( $\bar{x}\pm s$ )

组别	子宫质量(g)	子宫脏器指数(‰)	卵巢质量(mg)	卵巢脏器指数(‰)
对照组	0.5368±0.2116	2.1265±0.7963	44.60±8.12	0.175±0.04
低剂量组	0.5410±0.1205	2.1702±0.4392	43.71±9.34	0.171±0.03
中剂量组	0.5571±0.1634	2.2451±0.6169	41.32±7.63 <sup>a</sup>	0.163±0.05 <sup>a</sup>
高剂量组	0.5743±0.1703	2.3234±0.6359	39.87±6.86 <sup>a</sup>	0.159±0.06 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

表 3 各组 E2、P、FSH、LH 水平变化( $\bar{x}\pm s$ )

组别	E2(pg/mL)	P(ng/mL)	FSH(mIU/mL)	LH(mIU/mL)
对照组	34.41±1.09	3.48±0.36	5.34±0.35	2.84±0.48
低剂量组	33.24±2.31	3.37±0.45	4.95±0.61	2.75±0.31
中剂量组	31.15±1.56 <sup>a</sup>	3.10±0.75	3.68±0.26 <sup>a</sup>	3.16±0.30
高剂量组	30.04±2.45 <sup>a</sup>	3.26±0.83	3.11±0.38 <sup>a</sup>	3.29±0.21

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

动物时受刺激或因时间拖延等原因可能导致动情周期改变, 最后一次(第 21 日)的阴道涂片在动物被处死的同时进行, 并在之后 1 周内完成涂片的观察。

**1.3.4 子宫、卵巢 ER 表达量测定** 将子宫和卵巢固定、包埋后切片, 采用 SABC 法进行免疫组织化学染色, 同时用 PBS 代替一抗做阴性对照。严格按照检测试剂盒操作规程操作, 用 Olympus 数码显微图像系统采集图像, 然后用图像分析软件 Image-pro Plus5.0 进行雌激素受体测定, 并计算 ER 表达阳性率。

**1.4 统计学处理** 数据用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理, 计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示, 用 LSD 法进行组间比较, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 一般影响** 染毒期间各组大鼠皮毛没有改变, 有光泽, 色白, 未见脱毛; 无食欲减退、体质量减低等异常表现。

**2.2 MXC 对大鼠动情周期变化的影响** 低剂量组动情周期与对照组比较无明显差异, 而中、高剂量组动情期延长, 周期数减少, 与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 1。

**2.3 MXC 对大鼠卵巢、子宫质量及脏器指数的影响** 各剂量组子宫质量及子宫脏器指数与对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 各剂量组卵巢质量及卵巢脏器指数比对照组降低, 低剂量组与对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 而中、高剂量组与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表 2。

**2.4 MXC 对大鼠血清中类固醇激素水平变化的影响** 各剂量组大鼠血清 E2、FSH 水平呈下降趋势, 低剂量组与对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 中、高剂量组与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 各剂量组血清 P、LH 水平与

对照组相比差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ), 见表 3。

**2.5 MXC 对大鼠子宫、卵巢间质 ER 表达的影响** 各剂量组大鼠子宫内膜、卵巢间质 ER 表达阳性率与对照组类似( $P > 0.05$ ), 见表 4。

表 4 各组大鼠子宫内膜、卵巢间质 ER 阳性率比较( $\bar{x}\pm s, \%$ )

组别	子宫内膜 ER 阳性率	卵巢间质 ER 阳性率
对照组	53.19±18.30	35.50±14.38
低剂量组	55.81±16.18	36.98±16.19
中剂量组	56.92±13.26	34.85±17.48
高剂量组	57.90±12.82	37.16±15.08

## 3 讨论

MXC 是环境雌激素<sup>[5]</sup>的一种, 广泛应用于杀虫, 其仍是强有力的环境化学毒物<sup>[6]</sup>。但是, 关于 MXC 对雌性大鼠性腺毒性作用机制仍不清楚, 本实验结果显示, 中、高剂量染毒组大鼠卵巢系数降低, 动情周期延长, 周期数减少, 血清中 E2 和 FSH 水平降低, 表明在该剂量条件下, 染毒 MXC 能够引起明显的性腺毒性。

在生理状况下, 垂体分泌促性腺激素作用于卵巢, 调节卵巢分泌性激素(E2 和 P4), 维持卵泡的正常发育并调节排卵, 性激素进入细胞后, 与受体结合形成配体-受体复合物, 控制子宫内膜和动情周期变化。ER 在子宫主要分布于内膜层、基层, 在动情周期中, ER 的变化与体内雌、孕激素水平变化密切相关, 呈周期性变化<sup>[7]</sup>。ER 在卵巢主要分布在间质, 其作用是促进卵泡发育和卵泡腔形成, 使颗粒细胞中的孕激素受体

(PR)和卵泡刺激素受体(FSH-R)增加,以便 FSH-R 能发挥促卵泡发育、成熟和促进性激素合成、分泌的作用。卵泡发育按组织学检查分为始基卵泡、窦前卵泡、生长卵泡、成熟卵泡和黄体阶段<sup>[8]</sup>,如果 ER 在卵泡内不足,卵泡的生长、发育、成熟、激素产生和排卵一系列生理活动将会受限<sup>[9]</sup>。

本实验中观察到中、高剂量组的血清 E2 与对照组相比显著下降,而子宫内膜及卵巢 ER 表达阳性率与对照组相比差异无统计学意义( $P>0.05$ )。国外研究显示 MXC 能够与 ER 结合<sup>[10]</sup>,导致成年去卵巢大鼠子宫重量增加<sup>[11]</sup>,与 ER $\alpha$  结合促进富含 ER 的人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖<sup>[12]</sup>。所以,对 ER 的影响在 MXC 雌性性腺毒性作用机制中起了重要作用。导致本研究结果的原因考虑有以下几个方面:一方面 MXC 并非单纯地通过影响血中雌激素的水平来影响 ER 表达,因为环境内分泌干扰物本身也可与 ERs 相互作用触发几个基因的转录,从而诱导或抑制下丘脑、垂体、子宫、前列腺等器官中雌激素调节基因 ER mRNA 的表达;另一方面,血清 E2 水平下降,ER 呈代偿性增加从而维持受体表达量不变;再有本实验所采用的免疫组织化学半定量测定方法不够敏感,还不能检测出各剂量组之间已存在的差异。因此,MXC 对 ER 表达的影响还有待于从更微观的角度或者应用更敏感的检测方法来检测。由本实验推测,在该实验剂量下 MXC 可以导致动情周期紊乱、雌激素水平降低等雌性性腺毒性,且干扰垂体分泌 FSH,但是该毒性作用不是通过影响子宫和卵巢 ER 蛋白表达所致。

#### 参考文献:

- [1] You L, Casanova M, Bartolucci EJ, et al. Combined effects of dietary phytoestrogen and synthetic endocrine active compound on reproductive development in Sprague-Dawley rats: genistein and methoxychlor [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 66(1):91-104.
- [2] Borgeest C, Symonds D, Mayer LP, et al. Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of
- [3] Borgeest C, Miller KP, Gupta R, et al. Methoxychlor induced atresia in the mouse involves Bcl-2 family members, but not gonadotropins or estradiol [J]. *Biol Reprod*, 2004, 70(6):1828-1835.
- [4] 施新猷. 医学动物实验方法 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1981:141-143.
- [5] Davis DL, Axelrod D, Bailey L, et al. Rethinking breast cancer risk and the environment: the case for the precautionary principle [J]. *Environ Health Perspect*, 1998, 106(9):523-529.
- [6] Cummings AM. Methoxychlor as a model for environmental estrogens [J]. *Crit Rev Toxicol*, 1997, 27:367-379.
- [7] 曹泽毅. 激素受体及其临床应用 [M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993:191.
- [8] 马红梅, 刘嘉茵. HSP 在人卵巢周期中的表达 [J]. *安徽医药*, 2008, 12(12):1196-1197.
- [9] 史小林. 人类生殖学 [M]. 北京:科学出版社, 2002:164.
- [10] Rao RP, Kaliwal BB. Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice [J]. *Ind Health*, 2002, 40(3):237-244.
- [11] Chapin RE, Harris MW, Davis BJ, et al. The effects of perinatal/juvenile methoxychlor exposure on adult rat nervous, immune, and reproductive system functions [J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1997, 40(1):138-157.
- [12] Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, et al. Estimation of estrogenic and antiestrogenic activities of selected pesticides by MCF-7 cell proliferation assay [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2004, 46(4):445-453.

(收稿日期:2010-01-10 修回日期:2010-05-10)

(上接第 8 页)

- [5] odology, recommendations and future developments [J]. *Eur Respir J*, 2003, 22:1026-1041.
- [6] Tomalak W, Radlinski J, Pawlik J, et al. Impulse oscillometry VS body plethysmography in assessing respiratory resistance in children [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2006, 41(1):50-54.
- [7] 许梅, 杨洁, 刁晓源, 等. 肺通气功能与呼吸阻抗的临床研究 [J]. *重庆医学*, 2008, 37(16):1793-1794.
- [8] Mansur AH, Manney S, Ayres JG. Methacholine induced asthma symptoms correlate with impulse oscillometry but not spirometry [J]. *Respir Med*, 2008, 102(1):42-49.
- [9] 刘传合, 李硕, 宋欣, 等. 脉冲振荡系统对哮喘儿童肺功能的测试及其意义初探 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2005, 7(6):556-557.

- [10] the ovarian epithelium in the mouse [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 68(2):473-478.
- [11] Borgeest C, Miller KP, Gupta R, et al. Methoxychlor induced atresia in the mouse involves Bcl-2 family members, but not gonadotropins or estradiol [J]. *Biol Reprod*, 2004, 70(6):1828-1835.
- [12] 施新猷. 医学动物实验方法 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1981:141-143.
- [13] Davis DL, Axelrod D, Bailey L, et al. Rethinking breast cancer risk and the environment: the case for the precautionary principle [J]. *Environ Health Perspect*, 1998, 106(9):523-529.
- [14] Cummings AM. Methoxychlor as a model for environmental estrogens [J]. *Crit Rev Toxicol*, 1997, 27:367-379.
- [15] 曹泽毅. 激素受体及其临床应用 [M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993:191.
- [16] 马红梅, 刘嘉茵. HSP 在人卵巢周期中的表达 [J]. *安徽医药*, 2008, 12(12):1196-1197.
- [17] 史小林. 人类生殖学 [M]. 北京:科学出版社, 2002:164.
- [18] Rao RP, Kaliwal BB. Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice [J]. *Ind Health*, 2002, 40(3):237-244.
- [19] Chapin RE, Harris MW, Davis BJ, et al. The effects of perinatal/juvenile methoxychlor exposure on adult rat nervous, immune, and reproductive system functions [J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1997, 40(1):138-157.
- [20] Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, et al. Estimation of estrogenic and antiestrogenic activities of selected pesticides by MCF-7 cell proliferation assay [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2004, 46(4):445-453.

(收稿日期:2010-01-10 修回日期:2010-05-10)

- [21] Al-Mutairi SS, Sharma PN, Al-Alawi A, et al. Impulse oscillometry: an alternative modality to the conventional pulmonary function test to categorise obstructive pulmonary disorders [J]. *Clin Exp Med*, 2007, 7(2):56-64.
- [22] 胡先纬. 脉冲振荡肺功能测试研究支气管哮喘患者的呼吸阻抗 [J]. *安徽医药*, 2009, 13(7):795-796.
- [23] 金炬. 脉冲振荡法结合舒张试验在支气管哮喘与慢性阻塞性肺疾病鉴别诊断中的应用 [J]. *安徽医药*, 2008, 12(8):716-717.
- [24] 张路, 梁永杰, 雷撼, 等. 应用脉冲振荡仪测定呼吸阻抗评估哮喘患者运动反应 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(31):6311-6314.

(收稿日期:2010-01-11 修回日期:2010-05-18)