

小鼠睾丸体外培养模型研究邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯对睾酮合成及机制的影响*

徐 华, 黄 洁, 李 敏, 高志斌, 朱彦锋, 李 云[△]

四川大学华西公共卫生学院 营养与食品卫生学教研室(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨睾丸体外培养模型下邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)暴露对小鼠睾丸睾酮合成及基因表达的影响。**方法** 用浸浴式一次性通气旋转装置体外培养小鼠睾丸组织。实验分为二甲基亚砜(DMSO)溶剂对照组和4个DEHP剂量染毒组(终浓度0.1、1.0、10.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$)。分别培养24、48、72 h,每24 h通气一次。放射免疫法测定收集培养基中睾酮水平;Elisa法测定收集培养基中抑制素基因 β_B 基因(*INHB β*)水平;实时荧光定量(QT)-PCR检测睾丸组织相关基因表达水平;HE染色观察睾丸组织病理学变化;免疫组化法检测睾丸组织相关蛋白表达。**结果** 与DMSO溶剂对照组相比,DEHP一定浓度范围内,可使睾酮合成增加,但在DEHP 100.0 $\mu\text{mol/L}$ 染毒48、72 h,睾酮合成开始减少。Elisa测定*INHB β* 在DEHP 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 染毒组合成增加,从DEHP 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 开始合成减少。QT-PCR检测结果显示,与DMSO溶剂对照组相比, 3β 羟类固醇脱氢酶(*3 β -HSD*)、抗细胞色素P450 17 α 羟化酶(*P450c17*)、细胞色素P450侧链裂解酶(*P450Sc*)、波形蛋白(vimentin)mRNA表达下降,尤其是DEHP 100.0 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组($P<0.05$),*INHB β* mRNA表达无显著变化。HE染色,各组睾丸组织未观察到明显病理学改变。免疫组化检测结果显示,与DMSO溶剂对照组相比,蛋白 3β -HSD、*P450c17*、*P450Sc*表达增强,vimentin表达减弱,尤其是DEHP 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 、100.0 $\mu\text{mol/L}$ 两个剂量染毒组。**结论** DEHP暴露对体外培养睾丸的睾酮合成有影响,其机制可能由于其影响了相关功能基因表达,进而对睾酮合成产生正负调控两种作用。

【关键字】 器官培养 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 乳鼠 睾丸 实时荧光定量PCR

The Effects of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) in Testosterone Synthesis and Its Molecular Mechanisms in the Fetal Testis of Male Mouse by Organ Culture *in vitro* XU Hua, HUANG Jie, LI Min, GAO Zhi-bin, ZHU Yan-feng, LI Yun[△]. Department of Nutrition and Food Hygiene, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: liyun_611@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of DEHP in testosterone synthesis and the related genes expression in the fetal testis of male mouse by organ culture *in vitro*. **Methods** The testis tissues were cultured in infiltrating type rotating device for 72 hours. The culture and gas were changed every 24 hours. The testis tissues were divided into the DMSO control group and four DEHP groups (the terminal concentration were 0.1, 1.0, 10.0, 100.0 $\mu\text{mol/L}$). The testosterone levels in the cultured medium were measured by radioimmunoassay, the *INHB β* levels were measured by Elisa, the gene expressions related with testosterone synthesis were detected by real-time PCR, the morphological changes of cultured testis were observed by HE staining under optical microscope, the expressions of related proteins were measured by immunohistochemistry. **Results** Compared to the control group, the levels of testosterone synthesis in 0.1, 1.0, 10.0 $\mu\text{mol/L}$ groups were increased, but decreased in 100.0 $\mu\text{mol/L}$ group which were exposed in DEHP for 48 hours and 72 hours. There was an increase of *INHB β* synthesis in 0.1 and 1.0 $\mu\text{mol/L}$ groups, but a decrease in 10.0 and 100.0 $\mu\text{mol/L}$ groups. The gene expressions of *3 β -HSD*, *P450c17*, *P450Sc*, vimentin were significantly decreased compared to that of control group especially in 1.0 and 10.0 $\mu\text{mol/L}$ groups ($P<0.05$), but the expressions of *INHB β* had no significant changes. There were no apparent morphological changes in testis tissue by HE staining. A significant increase of the three proteins (3β -HSD, *P450c17*, *P450Sc*) and a significant decrease of vimentin were observed in 10.0 and 100.0 $\mu\text{mol/L}$ groups ($P<0.05$). **Conclusion** DEHP exposure can affect the testosterone synthesis in the fetal testis of male mouse. The regulation of gene expression involving in testosterone synthesis might be the mechanism.

【Key words】 Organ culture *in vitro* Di-(2-ethylhexyl) phthalate Fetal mouse Testis Real-time PCR

邻苯二甲酸酯类(PAEs)是一类脂溶性人工合成有机化合物,作为增塑剂和软化剂广泛应用于塑料工业,是公认的环境内分泌干扰物,具有较强的生

* 国家自然科学基金重点项目(No. 81030053)资助

[△] 通讯作者, E-mail: liyun_611@163.com

物富集作用和抗降解能力。在 PAEs 中用量最大、最主要的是邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)。DEHP 以非共价键与聚氯乙烯等结合,在塑料产品使用过程中释放,成为环境污染物^[1],广泛存在于空气、水体、土壤及生物体内,可通过饮水、进食、皮肤接触(化妆品)和呼吸进入人体,国外报道在孕产妇的乳汁中可检测到 DEHP 的存在^[2]。有研究提示长期接触 DEHP 可引起血液、生殖、肝脏、肾脏、肺脏等多系统的损害^[3]。动物研究发现,DEHP 对体外培养的小鼠胚胎有发育毒性和致畸性^[4],DEHP 暴露能够引起睾丸毒性,影响睾酮的合成及相关基因的表达^[5,6]。DEHP 对雄性生殖系统的内分泌干扰作用,尤其是对睾丸的损害作用受到人们广泛关注。以往多是采用动物实验和细胞培养研究,但动物体内实验存在动物个体内分泌差异,影响因素太多,而细胞培养主要研究单一细胞类型,缺少了细胞之间的联系与器官的整体性。最近国外虽有关于 DEHP 对体外培养睾丸组织的影响的研究,但有关其相关的分子机制报道很少,大部分还是 DEHP 有关代谢产物邻苯二甲酸单乙基己基酯(MEHP)的报道。为此,本研究利用通气旋转装置对鼠睾丸组织进行体外培养,研究 DEHP 对睾丸睾酮合成和相关基因、蛋白表达的影响,初步探讨相关分子机制,为将来的深入研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级健康昆明种雄性小鼠,出生 5~7 d,由四川大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(川)2009-09。

1.2 主要试剂

DEHP(Dr. Ehrenstorfer),DMEM 高糖培养基(成都哈里生物),谷氨酰胺(Amresco),二甲基亚砜(DMSO, Amresco),总 RNA 提取试剂盒(Omega),逆转录试剂盒(Thermo),DNase I(Thermo),荧光定量 PCR 检测试剂盒(Bio-Rad),抗细胞色素 P450 侧链裂解酶(P450ScC)抗体(武汉博士德生物有限公司)、抗 β 羟类固醇脱氢酶(β -HSD)抗体、抗细胞色素 P450 17 α 羟化酶(P450c17)抗体、抗波形蛋白(vimentin)抗体(北京博奥森),免疫组化试剂盒、DAB 浓缩试剂盒(北京中杉金桥),抑制素基因 β -B 蛋白(INHB β)Elisa 试剂盒(Ray Bio),引物合成(上海生工)。

1.3 睾丸体外培养方法及实验分组

将出生后 5~7 d 的小鼠颈椎脱臼处死,置于 75%乙醇浸泡 2~3 min,无菌操作取出双侧睾丸。在解剖显微镜下去除睾丸脂肪、结缔组织及被膜并将每个睾丸切分成 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 左右大小,置于预冷的 PBS 中待用。将切好备用的睾丸组织随机分为 5 组,每组平均分成 3 份装入培养瓶,每瓶平均 6~8 块组织,然后将培养瓶置于旋转装置上,34 $^{\circ}$ C 恒温培养 72 h,每 24 h 通混合气体(0.5 L/L O₂, 0.45 L/L N₂, 0.05 L/L CO₂)一次,每次 1 min,每 24 h 收集并更换培养基。DMEM 高糖培养基含 10%小牛血清,100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素、10 μ g/mL 胰岛素、5 μ g/mL 转铁蛋白、2 mmol/L 谷氨酰胺及 15 mmol/L Hepes。

实验分为 DMSO 溶剂对照组(DMSO 终浓度为 1.0 mL/L)和 4 个 DEHP 剂量组(终浓度为 0.1、1.0、10.0、100.0 μ mol/L),每组 3 个培养瓶。

1.4 观察指标及检测方法

1.4.1 睾酮的测定 将收集的培养基分别冻存,放射免疫法测定培养基中睾酮的浓度,结合睾丸质量,计算各组睾酮的合成量。

1.4.2 Elisa 法检测培养基中 INHB β 浓度 收集冻存的培养基为样本,按照 Elisa 试剂盒的操作说明书,检测睾丸组织合成分泌到培养基中 INHB β 的浓度,计算各组睾丸组织 INHB β 合成量。

1.4.3 实时荧光定量 PCR 检测相关基因的表达 睾丸组织总 RNA 的提取采用离心柱法提取,依试剂盒说明操作。总 RNA 经紫外分光光度计检测吸光度在 1.8~2.0 之间,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳无明显降解。所有样品均取 1 μ g 总 RNA 进行 DNase I 处理,逆转录依试剂盒说明操作。PCR 引物序列^[7]、产物长度、解链温度及来源见表 1。实时荧光定量 PCR 反应依试剂盒说明操作两步法:预变性与变性条件各基因均相同,分别为 95 $^{\circ}$ C、30 s,95 $^{\circ}$ C、5 s;退火延伸一步完成,温度为解链温度(表 1),5 s,共 40 次循环。目的基因的表达采用相对定量法,即以 β -actin 作为内参,计算 Δ Ct,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.4.4 HE 染色 将培养结束后的睾丸组织用 Bouin's 液固定过夜、70%乙醇储存后,依次石蜡包埋、常规切片、HE 染色、脱水、透明、树脂封片。光镜下观察睾丸组织细胞的形态、分类、比例,拍照。

1.4.5 免疫组化法检测相关蛋白的表达 免疫组化法采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法(SP法),按操作说明书进行。5 μ m 厚的石蜡组织

表 1 引物设计序列
Table 1 Primer sequence

Gene symbol	Accession No.	Primer sequence (5'-3')		Fragment length (bp)	Melting temperature (°C)
		Forward	Reverse		
3β-HSD	NM_008293	TGGACAAAGTATTCCGACCAGA	GGCACACTTGCTTGAACACAG	250	55.0
P450Scc	NM_019779	ACATGGCCAAGATGGTACAGTTG	ACGAAGCACCAGGTCATTAC	119	55.0
P450c17	NM_007809	TGACCAGTATGTAGGCTTCAGTCG	TCCTTCGGGATGGCAAACCTCTC	171	60.0
Vimentin	NM_011701	CGTCCACACGCACCTACAG	GGGGGATGAGGAATAGAGGCT	74	57.4
INHβ	NM_008381	CTTCGTCTCTAATGAAGGCAACC	CTCCACCACATTCCACCTGTC	166	56.3
PBR	NCBIGeneID 12257	GCCTACTTTGTACGTGGCGAG	ATGGCTGAATACAGTGTTGCC	113	56.3
STAR	NM_011485	CGGGTGGATGGGTCAAGTTC	CCAAGCGAAACACCTTGCC	230	60.0
β-actin	NM_007393	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	154	57.4

切片,二甲苯脱蜡,酒精梯度水化,0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液微波加热修复抗原 20 min,1 mL/L TritonX-100 打孔,30 mL/L H₂O₂/甲醇灭活内源性过氧化物酶,正常羊血清封闭 1 h,稀释一抗(滴度 3β-HSD 1 : 800、P450c17 1 : 200、P450Scc 1 : 200、vimentin 1 : 400)孵育 4 ℃ 过夜,滴加二抗(山羊抗小鼠,即用型) 15 min,链霉素标记 HRP 15 min,DAB 显色,苏木素染色,脱水,透明,封片,镜检。阴性对照用一抗稀释液代替一抗。3β-HSD、P450c17、P450Scc 免疫组化阳性反应为间质细胞胞浆出现棕黄色颗粒,vimentin 免疫组化阳性反应为支持细胞胞浆棕黄色颗粒。

1.5 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),多组间均数的两两比较,方差齐,采用 SNK 法;方差不齐,采用 Games-Howell 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 DEHP 染毒对睾丸睾酮合成的影响

见图 1。相同剂量组、不同染毒时间之间睾酮合成量比较;随着染毒时间的延长,对照组和 4 个 DEHP 染毒剂量组睾酮合成都表现出降低的趋势,但 48 h 后下降幅度逐渐减小。其中,对照组之间,睾酮合成量虽然下降,但差异无统计学意义,0.1 μmol/L DEHP 染毒组,染毒 24 h 与 72 h 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。100.0 μmol/L DEHP 染毒组,染毒 24 h 分别与 48 h、72 h 的睾酮合成量比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

相同染毒时间、不同剂量组之间睾酮合成量比较:染毒 24 h 后,各剂量 DEHP 染毒组均高于对照组,且随着 DEHP 浓度的升高,睾酮合成量呈增加趋势。染毒 48 h 和 72 h 后,睾酮合成量均表现出在一定剂量 DEHP 染毒范围内(10.0 μmol/L

DEHP 内),随着 DEHP 浓度的升高而增加,但在达到 100.0 μmol/L DEHP 时,即呈明显的抑制作用。染毒 48 h 后,DEHP 100.0 μmol/L 与 10.0 μmol/L 剂量组睾酮合成量比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。染毒持续 72 h 后,DEHP 0.1 μmol/L 与 10.0 μmol/L 剂量组睾酮合成量比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

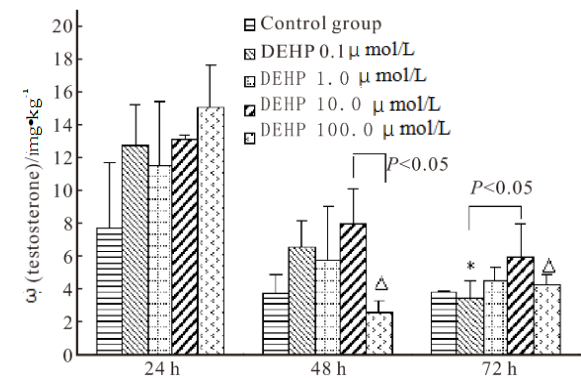


图 1 DEHP 对小鼠睾丸睾酮合成的影响

Fig 1 Effects of DEHP on testosterone synthesis in mouse testis (* $P<0.05$, vs. 24 h in the 0.1 μmol/L DEHP group; Δ $P<0.05$, vs. 24 h in the 100.0 μmol/L DEHP group)

2.2 DEHP 对 INHβ 合成的影响

图 2 结果显示,相同染毒时间,不同剂量组之间比较,随着 DEHP 浓度的升高,INHβ 的合成表现为先增加后减少的总体趋势,0.1 μmol/L 和 1.0 μmol/L 剂量组合成增加,从 10.0 μmol/L 剂量组开始合成减少。染毒 24 h,与对照组比较,1.0 μmol/L DEHP 染毒组 INHβ 合成增加($P<0.05$),各 DEHP 染毒剂量组之间比较,1.0 μmol/L 剂量组与 10.0 μmol/L、100.0 μmol/L 剂量组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。染毒 48 h,0.1 μmol/L DEHP 与 1.0 μmol/L DEHP 组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。染毒 72 h,各组之间比较差异无统计学意义。

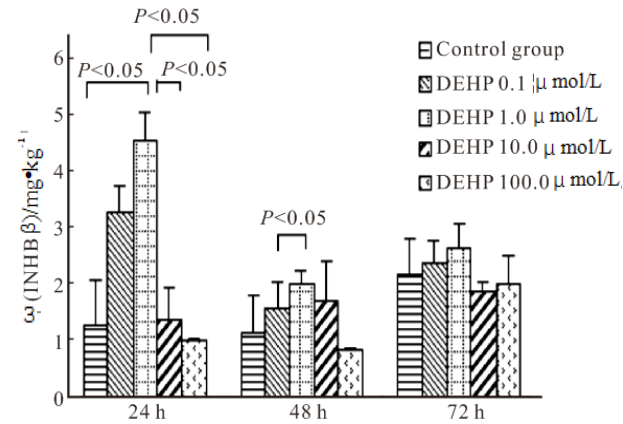


图 2 DEHP 对 INHB β 合成的影响

Fig 2 Effects of DEHP on INHB β synthesis in mouse testis

2.3 DEHP 染毒对睾丸组织相关基因表达的影响

见表 2,随着 DEHP 浓度的升高,*P450Scc*、

P450c17、*3 β HSD* mRNA 表达降低。*P450Scc* mRNA 表达,与对照组比较,1.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组差异有统计学意义($P<0.05$)。*P450c17* mRNA 表达,与对照组比较,100.0 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组差异有统计学意义($P<0.05$)。*3 β HSD* mRNA 表达,与对照组比较,100.0 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组差异有统计学意义($P<0.01$)。类固醇激素合成急性调节蛋白基因(*STAR*)、外周型苯二氮卓类受体蛋白基因(*PBR*)mRNA 表达随 DEHP 浓度的改变,各组之间差异无统计学意义。随着 DEHP 浓度的增高,vimentin mRNA 表达逐渐降低,与对照组比较,100.0 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组差异有统计学意义($P<0.05$)。*INHB β* mRNA 表达,随 DEHP 浓度的改变,各组之间差异无统计学意义。

表 2 DEHP 染毒对睾丸组织相关基因表达的影响(2 ^{-$\Delta\Delta\text{Ct}$} , $n=3$)							
Table 2 Effects of DEHP on the expression of genes in mouse testis(2 ^{-$\Delta\Delta\text{Ct}$} , $n=3$)							
Group	<i>P450Scc</i>	<i>P450c17</i>	<i>3βHSD</i>	Vimentin	<i>INHBβ</i>	<i>STAR</i>	<i>PBR</i>
Control	1.00 $\pm$ 0.112	1.00 $\pm$ 0.069	1.00 $\pm$ 0.119	1.00 $\pm$ 0.082	1.02 $\pm$ 0.259	1.02 $\pm$ 0.225	1.00 $\pm$ 0.038
DEHP 0.1 $\mu\text{mol/L}$	0.86 $\pm$ 0.082	1.03 $\pm$ 0.218	0.81 $\pm$ 0.125	0.91 $\pm$ 0.151	1.05 $\pm$ 0.030	0.80 $\pm$ 0.140	0.89 $\pm$ 0.098
1.0 $\mu\text{mol/L}$	0.72 $\pm$ 0.146 *	0.76 $\pm$ 0.175	0.73 $\pm$ 0.141	0.89 $\pm$ 0.225	1.02 $\pm$ 0.207	0.92 $\pm$ 0.509	0.92 $\pm$ 0.222
10.0 $\mu\text{mol/L}$	1.01 $\pm$ 0.104	1.23 $\pm$ 0.094	0.93 $\pm$ 0.172	0.89 $\pm$ 0.120	1.07 $\pm$ 0.341	0.78 $\pm$ 0.239	0.89 $\pm$ 0.183
100.0 $\mu\text{mol/L}$	0.57 $\pm$ 0.019 **	0.64 $\pm$ 0.170 *	0.48 $\pm$ 0.040 **	0.64 $\pm$ 0.001 *	1.03 $\pm$ 0.076	0.68 $\pm$ 0.136	0.70 $\pm$ 0.074

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. control group

2.4 DEHP 染毒对睾丸形态学结构的影响

见图 3。光镜下见对照组睾丸组织曲细精管排

列规则,结构正常,曲细精管管壁较厚,内由多层生殖母细胞和支持细胞组成,细胞结构清晰,规则致

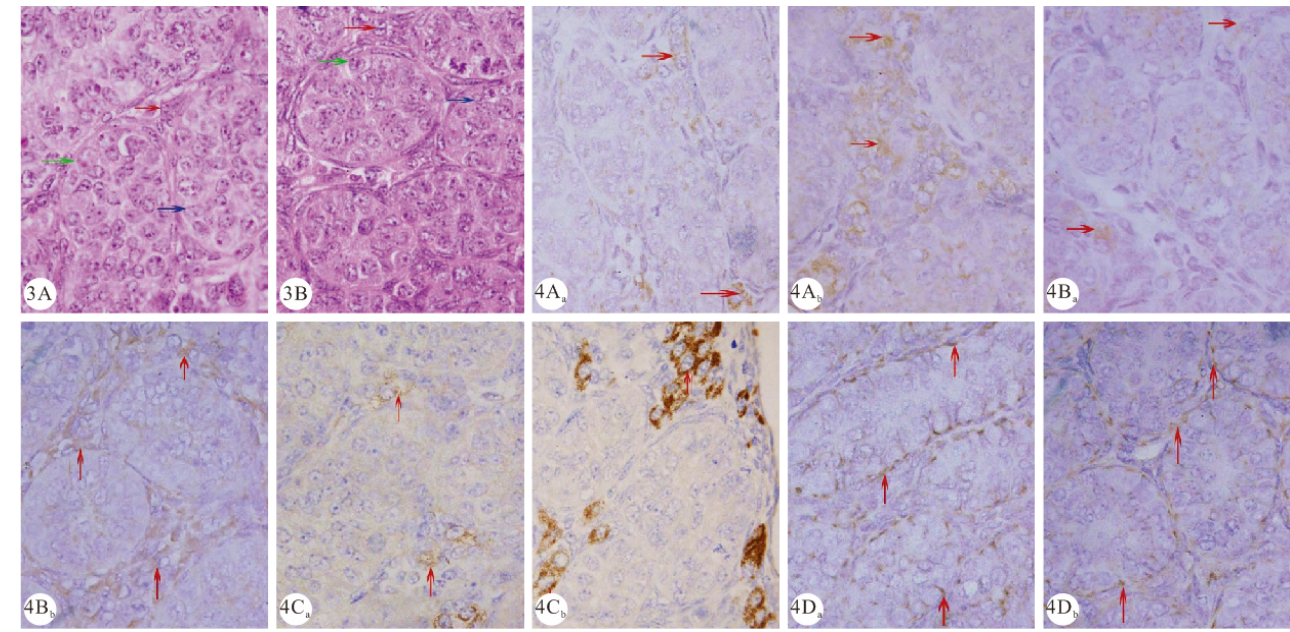


图 3 DEHP 对睾丸形态学的影响。HE $\times 100$

图 4 DEHP 对睾丸蛋白表达的影响。SP $\times 100$

Fig 3 Effects of DEHP to the testis of mouse (red arrow: leydig cells, green arrow: germinal cells, blue arrow: sertoli cells; A: Control group, B: DEHP 100.0 $\mu\text{mol/L}$ group). HE $\times 100$

Fig 4 Effects of DEHP on protein expression in testis (Aa, Ab: 3 β -HSD control group and 100.0 $\mu\text{mol/L}$ group; Ba, Bb: P450c17 control group and 100.0 $\mu\text{mol/L}$ group; Ca, Cb: P450Scc control group and 100.0 $\mu\text{mol/L}$ group; Da, Db: Vimentin control group and 100.0 $\mu\text{mol/L}$ group). SP $\times 100$

密,其中支持细胞分布于外围,多呈三角形等不规则形状,体积较小;生殖母细胞核大而圆,HE 着色较深。睾丸间质细胞分布于曲细精管间隙,呈簇状分布,多为菱形或三角形,细胞大,胞浆丰富,核呈圆形或卵圆形,与正常状态下未培养睾丸组织的形态学结构无差别。DEHP 各染毒剂量组细胞形态与 DMSO 对照组比较无明显病理学变化。

2.5 DEHP 染毒对睾丸蛋白表达的影响

见图 4。DEHP 各染毒剂量组 β -HSD、P450Scc 的表达高于对照组,随着 DEHP 浓度的升高,其表达有逐渐升高的趋势。P450c17 的表达,各剂量组均高于对照组,0.1 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组增加最明显。Vimentin 免疫组化阳性反应着色从基底膜沿支持细胞向管腔延伸,少量间质细胞胞浆也可见,生殖细胞中未见表达。与对照组比较,vimentin 各 DEHP 染毒剂量组表达均下降,向官腔辐射状伸展部分变短,甚至消失。

3 讨论

在 DEHP 染毒对培养睾丸组织尚未造成可见的明显病理学改变之前,探讨睾丸组织早期功能状态的改变及相关基因与蛋白表达改变的情况,可为以后筛选相关内分泌环境干扰物对人体影响的早期指标提供重要依据。本研究中,与对照组比较,DEHP 染毒后的组织 HE 染色切片,睾丸组织结构正常,细胞分类清楚,细胞核正常,未见核固缩及空泡化等病理学改变,各类细胞比例正常,提示在本研究的染毒剂量内,DEHP 对体外培养的睾丸组织并未造成可见的明显的病理学改变。近期 Chauvigné 等^[8]也发现 DEHP 染毒的体外培养睾丸组织形态学没有改变,不同类型的细胞比例无明显变化。

睾酮的合成是一复杂多因素的过程,大部分是由睾丸的间质细胞合成的,涉及到基因和蛋白的表达^[9]。本研究结果显示 DEHP 在一定剂量范围内促进睾酮的合成,超出一定剂量就抑制睾酮的合成,这一转变的剂量范围大致在 10.0~100.0 $\mu\text{mol/L}$ 之间。国外近期研究报道 DEHP 低剂量长期作用对睾丸结构最显著的影响是间质细胞的增生^[10],DEHP 在 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 剂量下,能够促进睾酮的合成^[8];吸入 DEHP,可以引起青春期前大鼠睾酮合成增加^[11]。对照组中,与培养 24 h 后睾酮的合成量比较,培养 48 h、72 h 后睾酮的合成量下降,可能原因一是睾丸组织的培养为连续培养,仅在 48 h、72 h 更换培养基与通气体,随培养时间的延长,睾酮合成

的原料固醇类的量逐渐减少进而影响睾酮的合成;二是对照组为 DMSO 溶剂对照,DMSO 可能对培养睾丸组织也有一定的影响。但是对照组之间的这种差异并不具有统计学意义,说明 DMSO 对睾丸组织造成的影响与 DEHP 染毒造成的影响相比,其仅是轻微的影响,在本研究中可以忽略。

进一步分析相关基因与蛋白的表达,STAR 与 PBR 同时位于线粒体膜上,两者共同调节胆固醇进入线粒体内,STAR 更被认为是控制由胆固醇转化成睾酮的第一限速步骤^[12],本研究中这两者基因的表达虽有下降的趋势,但是尚无统计学意义。 β -HSD 作为第二限速步骤,在睾酮的合成过程中也起到重要的作用。本研究 β -HSD 的 mRNA 表达量明显下降,尤其是 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 、100.0 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组。P450Scc 基因编码的细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶可以催化胆固醇转化为孕烯醇酮,该反应是睾酮生物合成的又一个限速步骤,研究发现小鼠间质细胞中雄激素合成能力与其表达水平高度相关^[13]。本研究发现 P450Scc、P450c17 mRNA 的表达也明显下降,尤其是在 100.0 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组,这可能是高剂量组睾酮合成下降,导致睾丸发育障碍的原因之一。但是利用免疫组化法测定的这 3 个蛋白在间质细胞的表达都增强。

蛋白表达的结果与睾酮合成的结果基本一致,但是 PCR 的结果却与其相反,可能原因一是睾酮合成是复杂的生殖内分泌系统中的一部分,体外器官培养虽然排除了机体内分泌系统的影响,但是间质细胞之外的支持细胞、生殖细胞的影响也是不容忽视的,可能是 DEHP 对另外两种细胞产生影响,进而通过细胞与细胞间的联系影响了翻译后 mRNA 的剪接、整合等过程,最终影响了蛋白的表达。例如,有关支持细胞的指标 vimentin 和 INHB β ,有研究报道,DEHP 能够造成 vimentin 的破坏^[14]。本研究发现 vimentin mRNA 表达有随 DEHP 浓度升高而降低的趋势,各剂量组差异均有统计学意义,INHB β mRNA 的表达未见差异,但是 Elisa 测定结果显示,DEHP 对 INHB β 有先促进后抑制的作用,10.0 $\mu\text{mol/L}$ 开始就出现一定的抑制作用。Vimentin、INHB β 出现抑制作用的剂量均要低于睾酮出现抑制作用的浓度(100.0 $\mu\text{mol/L}$),提示支持细胞对 DEHP 的敏感性可能高于间质细胞,支持细胞受到 DEHP 的影响,进一步影响到支持细胞的功能。另外,从基因的转录到蛋白的表达这一过程本身就很复杂,基因转录后 mRNA 需要经过修饰才能

翻译成蛋白质,而蛋白质的翻译过程也需要核糖体蛋白、有关的酶的参与,同时受到相关基因的调节,而这些调节因素中既有正调控因素,也有负调控因素,任何一个环节发生改变,都会影响最终蛋白的表达量。本研究中出现 的 $3\beta HSD$ 、 $P450c17$ 、 $P450Scc$ mRNA 表达下降,但是蛋白的表达却升高,说明 DEHP 染毒的条件下,这 3 个基因在转录水平和翻译水平都存在调节,但是调节的方向或者路径是不同的。可能是在这 3 种基因翻译通路中的某一正调控基因被 DEHP 激活,而对照组因缺乏 DEHP 无法激活该正调控基因,所以使得 DEHP 染毒组的蛋白表达要高于对照组,具体情况还需要进一步的研究。

综上所述,该研究利用睾丸组织体外培养技术,研究 DEHP 对雄性小鼠睾丸睾酮合成和机制的影响,得出 DEHP 本身有促睾酮分泌的作用,睾酮合成相关的 $3\beta HSD$ 、 $P450c17$ 、 $P450Scc$ 基因表达降低,相对应的蛋白表达升高,vimentin 表达降低,提示 DEHP 对睾酮合成基因的转录水平和翻译水平都有影响,寻找睾酮合成基因转录和翻译通路的正负调节基因对揭示 DEHP 影响睾酮合成的分子机制会有很大的帮助。同时支持细胞在睾酮合成方面也有一定的影响,尤其是通过细胞之间的联系而影响睾酮的合成。

参 考 文 献

- Swan SH. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ Res*,2008;108(2):177-184.
- Main KM,Mortensen GK,Kaleva MM, *et al.* Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect*,2006;114(2):270-276.
- Yen TH,Lin-Tan DT,Lin JL. Food safety involving ingestion of foods and beverages prepared with phthalate-plasticizer-containing clouding agents. *J Formos Med Assoc*,2011;110(11):671-684.
- 高丽芳,李 勇,裴新荣等. 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯对小鼠胚胎发育毒性的体外实验研究. *卫生研究*,2003;32(3):198-200.
- Awal MA, Kurohmaru M, Andriana BB, *et al.* Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) induces testicular alterations in male guinea pigs at prepubertal stage. *Tissue Cell*,2005;37(3):167-175.
- Borch J, Metzдорff SB, Vinggaard AM, *et al.* Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology*,2006;223(1-2):144-155.
- Sarraj MA, Escalona RM, Umbers A, *et al.* Fetal Testis Dysgenesis and Compromised Leydig Cell Function in Tgfr3 (Betaglycan) Knockout Mice. *Biol Reprod*,2010;82(1):153-162.
- Chauvigné F, Menuet A, Lesné L, *et al.* Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis *in vitro*. *Environ Health Perspect*,2009;117(4):515-521.
- Bowman CJ, Tuener KJ,Sar M, *et al.* Altered gene expression during rat wolffian duct development following di(n-butyl) phthalate exposure. *Toxicol Sci*,2005;86(1):161-174.
- Akingbemi BT,Ge R,Klinefelter GR, *et al.* Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2004;101(3):775-780.
- Lovekamp ST, Davis BJ. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect*,2003;111(2):139-145.
- Hallmark N,Walker M. Effects of monobutyl and di(n-butyl) phthalate in vitro steroidogenesis and leydig cell aggregation in fetal testis explants from the rat;comparison with effects in vivo in the fetal rat and neonatal marmoset and in vitro in the human. *Environ Health Perspect*,2007;115(3):390-396.
- Howdeshell KT, Furr J, Lambright CR, *et al.* Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development: altered fetal steroid hormones and genes. *Toxicol Sci*,2007;99(1):190-202.
- Erkekoglu P, Zeybekoglu P, Zeybek ND, *et al.* The effects of di(2-ethylhexyl) phthalate exposure and selenium nutrition on sertoli cell vimentin structure and germ-cell apoptosis in rat testis. *Arch Environ Contam Toxicol*,2012;62(3):539-547.

(2012-11-14 收稿,2013-03-04 修回)

编辑 沈 进