

## 用多终点体内试验法研究硫丹的雌激素活性

裘炯良\*\* 常 艳 朱心强

浙江大学湖滨校区毒理学研究室 杭州 310006

**摘要** 为研究硫丹是否具有雌激素活性,以摘除卵巢的 NIH 雌性小鼠为对象,用多终点体内试验法,观察子宫体重比、子宫积液、动情周期转换、子宫上皮细胞高度及子宫基质细胞层厚度五项指标。结果显示:硫丹组(0.5mg/kg/d,1.5mg/kg/d 和 3.0mg/kg/d)的五项指标值与阴性对照组相比无显著性差异,且三个组之间无明显的剂量-反应关系。以上结果提示在本实验条件下,硫丹不具有雌激素活性。

**关键词** 硫丹;雌激素活性;多终点测定

## USE IN VIVO MULTIPLE ENDPOINTS ASSAY FOR STUDYING ESTROGENICITY OF ENDOSULFAN

Qiu Jiongliang, Chang Yan, Zhu Xinqiang

Department of Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310006

**Abstract** We combined five endpoints into a single 5-day in vivo screening assay to identify estrogenicity of endosulfan. The endpoints evaluated as markers of estrogenicity included the ratio of uterine weight/body weight, uterine fluid imbibition, vaginal cornification incidence, uterine stroma cell proliferation and uterine epithelial cell height. The endosulfan were administered daily p. o. for 5 days to sexually mature ovariectomized female NIH mice. Compared with the five endpoints of the three dosage groups of endosulfan (0.5mg/kg/d, 1.5mg/kg/d and 3.0 mg/kg/d) showed no significant difference and no significant dose-response. Thus, endosulfan has no estrogenicity under the experimental condition.

**Key words** Endosulfan; Estrogenicity; Multiple endpoints

外源性雌激素(Xenoestrogen)是一类具有雌激素活性的内分泌干扰因子,它们可以模拟或调节体内雌激素的作用,并且可以干扰体内正常雌激素的产生、分泌、代谢及其作用的发挥。外源性雌激素对人体健康的影响在九十年代初就已引起公众和医学界的重视,其可能导致男性生殖异常这一点更是公众关注的焦点<sup>(1-3)</sup>。外源性雌激素种类繁多,在环境中存在广泛,如植物性、人工合成的药用雌激素有其它许多化学品,包括部分有机氯农药都含有这类物质<sup>(3)</sup>。硫丹(Endosulfan)属有机氯农药中的环二烯类杀虫剂,分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>C<sub>16</sub>O<sub>3</sub>S。国外有实验报道硫丹具

有雌激素活性<sup>(4)</sup>,但由于它在杀灭某些农业害虫方面具有其它农药所不可替代的作用<sup>(5)</sup>,因而仍在美国等发达国家及部分发展中国家中大面积使用<sup>(6)</sup>。近年来对于硫丹的雌激素活性研究不少,但结论很不一致<sup>(7-9)</sup>。为此我们采用了多终点体内试验法对硫丹的雌激素作用加以研究,以期获得更有说服力的证据。

### 材料与方法

#### 1 主要试剂

硫丹由如东农药厂提供,纯度为 92.0%;雌二醇

国家自然科学基金资助项目

\*\* 浙江大学湖滨校区预防 94 级毕业生 杭州 310006

( $\beta$ -estradiol) 购自美国 Sigma 公司; 溶剂为市售的食物调和油。其余试剂均为分析纯或实验室纯。

## 2 实验动物及饲养环境

选用 NIH 雌性性成熟小鼠 (16.0 - 20.0g), 由浙江大学湖滨校区动物中心提供。饲养环境温度  $20 \pm 2$ , 湿度  $50\% \pm 10\%$ , 昼夜周期为 12/12 小时, 自由饮水进食, 一周后切除卵巢<sup>(10)</sup>, 每日观察活动情况及动情周期, 剔除死鼠和去势不全的小鼠。

## 3 实验方法

### 3.1 称重、编号。

3.2 随机分组与染毒: 将卵巢摘除的雌鼠随机分成 5 组, 每组 10 只, 分别为阴性对照组 (食油)、低、中、高剂量硫丹组 (0.5mg/kg/d, 1.5mg/kg/d, 3.0mg/kg/d, 以食油为溶剂), 阳性对照组 (雌二醇, 200 $\mu$ g/kg/d)。灌胃 1 次/天, 染毒 5 天后用颈椎脱臼法处死。

### 3.3 检测指标和方法

3.3.1 动情周期、子宫积液、子宫体重比按常规方法进行。

3.3.2 子宫形态学检测: 将子宫置于 Bouin's 液中固定 2 小时, 用石蜡包埋, 从子宫角输卵管端开始, 垂直于子宫角长轴朝子宫体方向连续切片, 每片厚 5 $\mu$ m, 共切 15 片/侧子宫角, 取第 2, 6, 10, 14 片固定于玻片上, 用 H. E. 染色后, 置于显微镜下用测微尺测量子宫上皮细胞的增生高度及基质细胞层的厚度。

3.3.2.1 子宫上皮细胞高度测量: 每只子宫的两侧子宫角上各测量 40 个位点, 所得的平均值作为该子宫上皮细胞的平均高度。

3.3.2.2 子宫基质细胞层最大厚度的测量: 每只子宫测量 8 个位点 (所选位点均为基质细胞层厚度最大处), 以其平均值为该子宫基质细胞层的最大厚度<sup>(12)</sup>。

## 4 数据统计

正态分布数据, 采用单因素方差分析; 非正态分布数据, 采用非参数统计 K-W 分析法, 用 SPSS for Windows 统计软件包分析。

## 结果

### 1 染毒后小鼠中毒情况及体重变化

5 组染毒小鼠均未出现死亡。由表 1 可见硫丹组尤其是中、高剂量组小鼠出现较明显的中毒症状; 表 2 显示的小鼠在六天内体重的变化情况为: 中、高剂量组体重增量为负值, 与阴性对照组比较有显著性

差异 ( $P$  值分别小于 0.05 和 0.01)。因此说明硫丹小鼠已出现了较明显的毒性反应, 染毒剂量足够。

表 1 不同浓度硫丹染毒后的小鼠中毒情况

药物	剂量 (mg/kg/d)	动物数 (只)	有效鼠数 (只)	中毒程度 <sup>b</sup>	中毒发生数 (百分率)
硫丹	0	10	9 <sup>a</sup>	-	0/9(0)
	0.5	10	10	+	1/10(10)
	1.5	10	10	+	3/10(30)
	3.0	10	10	++	8/10(80)
雌二醇	0.2	10	9 <sup>a</sup>	-	0/9(0)

注: a. 实验过程中患肺炎的小鼠已被剔除。

b. 中毒程度分为: 未出现任何异常表现的定为阴性, 用“-”表示; 出现反应迟钝和/或畏寒、竖毛的定为轻度中毒, 用“+”表示; 包括轻度中毒的所有症状, 另又出现震颤、走路不稳、甚至抽搐的定为重度中毒, 用“++”表示<sup>(11)</sup>。

表 2 不同浓度硫丹染毒后小鼠的体重变化

药物	剂量 (mg/kg/d)	组名	最后体重 (g) ( $\bar{x} \pm s$ )	六天内体重增量 <sup>a</sup> (g)
硫丹	0	阴性对照组	17.01 $\pm$ 1.71	0.12
	0.5	低剂量组	16.22 $\pm$ 1.94	-0.58
	1.5	中剂量组	16.66 $\pm$ 1.85	-1.13 <sup>*</sup>
	3.0	高剂量组	16.16 $\pm$ 1.88	-2.06 <sup>*</sup>

注: a. 中位数

与对照比较 \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$ .

## 2 子宫积液和动情周期的转换

阴性对照组及低、中、高剂量组的小鼠在 5 天中均未再次呈现动情期, 解剖子宫时均未见到明显的子宫水肿和积液; 阳性对照组 (E2) 在试验第 3 天即有小鼠从动情间期转入动情期, 至第 5 天该组所有小鼠均呈现或呈现过动情期, 在解剖其子宫时见明显的子宫水肿和积液。结果见表 3。

表 3 子宫液和动情周期的转换

药物	剂量 (mg/kg/d)	出现子宫积液 (百分率)	动情周期转换 <sup>a</sup> (百分率)
硫丹	0	0/9(0)	0/9(0)
	0.5	0/10(0)	0/10(0)
	1.5	0/10(0)	0/10(0)
	3.0	0/10(0)	0/10(0)
雌二醇	0.2	9/9(100)	9/9(100)

注: a. 维持于动情间期的定为阴性, 动情周期发生转换的, 即呈现动情期的定为阳性, 占一只动物数。

## 3 硫丹对小鼠子宫重量和子宫体重比的影响

为了消除小鼠体重这一干扰因素, 本实验不直接

采用子宫重量指标,而是对子宫体重比作了方差分析,结果为:3个硫丹组的比值分别为6.2,7.3,5.8  $\times 10^{-4}$ ,阴性对照组比值为5.9  $\times 10^{-4}$ ,阳性对照组为34.6  $\times 10^{-4}$ ,各硫丹组与阴性对照相比无显著性差异( $P > 0.05$ )。结果见表4。

表4 硫丹对小鼠子宫体重比的影响

药物	剂量 (mg/kg/d)	子宫湿重(g) ( $\bar{x} \pm s$ )	子宫体重比( $\times 10^{-4}$ ) ( $\bar{x} \pm s$ )
硫丹	0	9.98 $\pm$ 2.92	5.9 $\pm$ 1.9
	0.5	9.96 $\pm$ 2.11	6.2 $\pm$ 1.4
	1.5	12.28 $\pm$ 3.77	7.3 $\pm$ 2.5
	3.0	9.93 $\pm$ 2.14	5.8 $\pm$ 0.9
雌二醇	0.2	55.28 $\pm$ 9.34*	34.6 $\pm$ 8.6*

注: \*示阳性对照与硫丹组比较  $P < 0.05$

#### 4 不同浓度硫丹染毒后小鼠子宫上皮细胞高度及基质细胞层厚度的变化

小鼠子宫基质细胞层厚度及上皮细胞高度分别见图1、图2。阳性对照组在雌二醇的作用下明显增生(见图中的箭头所指:上皮细胞高度明显增大,基质细胞层厚度明显增宽)。而硫丹组小鼠子宫上皮细胞高度及基质细胞层厚度变化不明显,与阴性对照组相比无显著性差异( $P > 0.05$ ),且3个组间亦无明显的剂量-效应关系( $P > 0.05$ )。数据结果见表5。

表5 子宫上皮细胞高度及基质细胞层厚度( $\bar{x} \pm s$ )的变化情况

药物	剂量 (mg/kg/d)	子宫数 (只)	子宫上皮细胞高度 ( $\mu\text{m}$ )	子宫基质细胞层 最大厚度( $\mu\text{m}$ )
硫丹	0	9	10.3 $\pm$ 1.6	128.8 $\pm$ 16.4
	0.5	10	10.8 $\pm$ 1.7	142.2 $\pm$ 13.9
	1.5	10	11.7 $\pm$ 2.1	128.0 $\pm$ 14.7
	3.0	10	10.7 $\pm$ 1.2	171.4 $\pm$ 31.8
雌二醇	0.2	9	36.3 $\pm$ 4.0*	412.5 $\pm$ 87.6**

注: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

试验结果表明:硫丹达到小鼠明显中毒的剂量时,也未检测出雌激素活性,可以认为经过体内代谢的硫丹不具有雌激素活性。

#### 讨论

自1994年Soto用体外试验方法首先提出硫丹具有雌激素活性以来,先后有不少学者应用类似的方法也证明了硫丹的雌激素样作用<sup>(7-9)</sup>。但硫丹本身是否具有雌激素活性并不重要,重要的是其进入体内

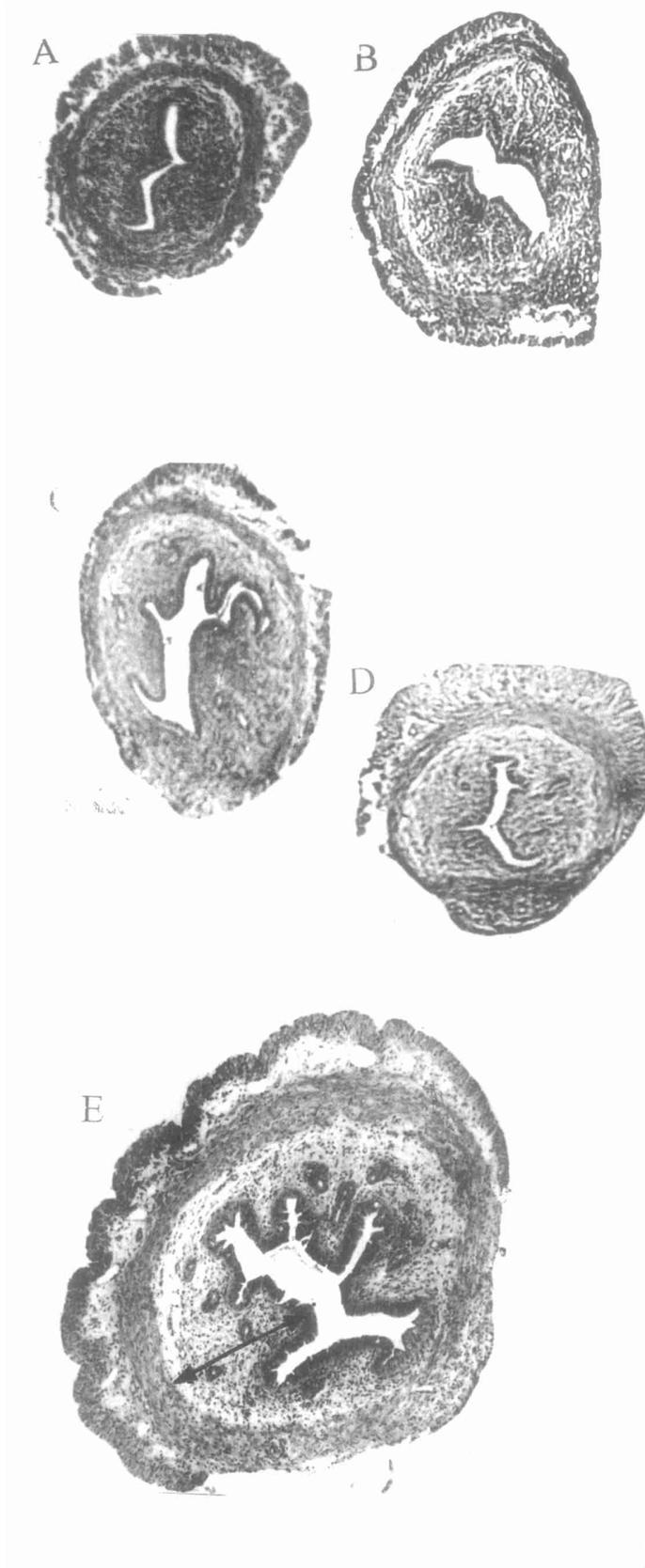
后是否仍具有该活性。如果经过体内代谢后,不再具有活性,就对下丘脑或垂体没有作用,也不会改变机体性腺激素的分泌和性腺功能,不会引起生殖异常。因此评价硫丹的雌激素活性,最终应根据体内试验的结果。本实验的特点是采用可靠性较高的多终点体内试验法(检测了子宫体重比、子宫液、动情周期转换及子宫上皮细胞高度、基质细胞层厚度等五项指标),结果均为阴性,这表明经过体内代谢的硫丹不再具有雌激素活性。其原因,作者认为可能有以下几点解释:首先,硫丹在体内可代谢成为硫酸盐、二醇羟基醚、酮和一种未经鉴定的代谢物,这些代谢物中只有20%是亲脂性的,其余的硫丹水溶性代谢物很快就排出体外<sup>(13)</sup>。因而留于体内的硫丹及其代谢物较少,无法引起机体的雌激素样改变。其次,与体外试验不同,硫丹进入机体后一般需经过复杂的肝酶代谢过程,然后作用于靶细胞。本次体内试验(由于是多终点检测,比采用单一终点可靠)的结果为阴性,很可能与肝脏内的苯巴比妥和其它酶诱导剂使硫丹在体内的贮存进一步减少<sup>(13)</sup>和/或肝脏复杂的酶系使硫丹的雌激素活性基因代谢灭活有关。其具体机理有待进一步的研究。

采用多终点体内实验法检测硫丹的雌激素活性的优点有:(1)硫丹已经过体内代谢,因而实验结果比体外试验更合理可靠;(2)与经典的子宫增重法相比,本法较经济、方便、省时;(3)同时测定多个终点得出的实验结果可靠性强。同时本实验也存在着体内方法不可避免的影响因素,如由于动物身体状况、年龄、品系、生物鉴定方法等的影响,动物对硫丹的反应性之间存在着一定的个体差异;实验受操作技巧的影响;动物的饮食对实验结果也有一定的影响等。

(致谢:浙大生物医学工程研究所,医学图像研究室的徐庐生教授、应磊老师及法医学教研室的黄宝林老师给予技术帮助)。

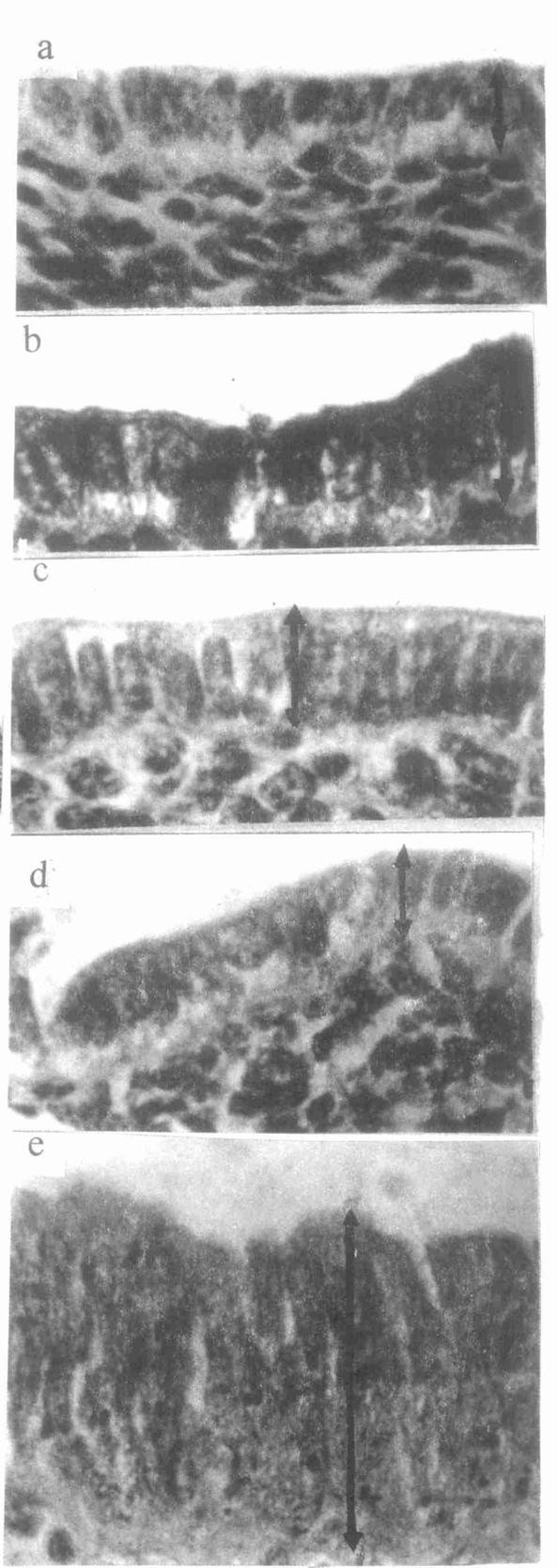
#### 参考文献

- Jensen TK, Toppari J, Keiding N, et al. Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health. *Clin Chem*, 1995;41(12):1896
- Stone R. Environmental estrogens stir debate. *Science*, 1994;265:308
- Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *The Lancet*, 1993;341(8857):1392
- Soto AM, Chmg KL, Sounenschein C. The pesticides endosulfa, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen sensitive cells. *Environ Health Perspect*, 1994;102(4):380



A:阴性对照组 B:硫丹低剂量 C:硫丹中剂量 D:硫丹高剂量  
E:阳性对照组 (放大倍数  $\times 40$ )

图1 子宫基质细胞增生情况



a:阴性对照组 b:硫丹低剂量 c:硫丹中剂量 d:硫丹高剂量 e:  
阳性对照组 (放大倍数  $\times 1000$ )

图2 子宫上皮细胞高度

## 发光细菌暗变种对化合物的致突变效应的检测

韩桂春<sup>1</sup> 谢 维<sup>2</sup> 张秀君<sup>3</sup>

辽宁省环境监测中心站 沈阳 110031 <sup>2</sup>抚顺环境监测中心站 抚顺 113006 <sup>3</sup>沈阳大学师范学院 沈阳 110015

**摘要** 从明亮发光杆菌 T<sub>3</sub> 小种(Photobacterium Phosphoreum T<sub>3</sub> Sp)分离到的自发暗变种(k 变种) T<sub>9171</sub> 菌株检测十种化合物,其中六种化合物呈致突变阳性反应,二种化合物呈可疑阳性,二种化合物呈阴性反应,该方法比较传统的 Ames 试验检测化合物致突变效应灵敏度高,可望成为一种简易灵敏的测试环境致突变物的短期生物学试验方法。

**关键词** 发光细菌;暗变种

## THE DETECTION OF PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM DARK MUTANT TO CHEMICALS ' MUTAGENIC EFFECT

Han Guichun<sup>1</sup>, Xie Wei<sup>2</sup>, Zhang Xiujun<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Liao Ning Environmental Monitoring Center Station, Shenyang 110031, <sup>2</sup>Fu Shun Environmental Monitoring Center Station, Fushun 113006, <sup>3</sup>Shen Yang University Normal College, Shenyang 110015

**Abstract** The positive mutagenic response to six chemicals and doubtful positive mutagenic response to two chemicals and negative mutagenic response to two chemicals were demonstrated by a spontaneous dark mutant (k mutant), Strain T<sub>9171</sub>, isolated from photobacterium phosphoreum T<sub>3</sub> Spp. Mutagenic mutant has higher sensitivity to genotoxic chemicals as compared with conventional Ames test. It is possible to become a simple sensitive short-term biological test method for the detection to mutagenic compounds in environment.

**Key words** Photo bacteria; Dark mutant

### 材料与方法

供试自发暗变种系南京土自行分离的明亮发光杆菌 T<sub>3</sub> 小种的 T<sub>9171</sub> 菌株。该菌的菌落与野生型菌

落不同,扁平透明,其发光量很弱,仅为野生型的 10<sup>-2</sup> ~ 10<sup>-5</sup>。受试化合物是:阿糖胞苷 1000μg/ml,二甲基亚砷原液,重铬酸钾 10μg/ml,丝裂霉素 - C5 μg/ml,

- 5 Brun LO, Stuart J, Gaudichon V, et al. Functional haplodiploidy: a mechanism for the spread of insecticide resistance in an important international insect pest. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995;92(21): 9861
- 6 Kick Start Kernel Guard Specimen Label. C & P Press, 1998 (<http://greenbook.net/~das/haztab/>)
- 7 Milligan SR, Balasubramanian AV, Kalita JC. Relative potency of xenobiotic estrogens in an acute in vivo mammalian assay. *Environ Health Perspect*, 1998;106:23
- 8 Kavita R, Wang F, Chen IC, et al. Estrogenic activity of a dieldrin/toxaphene mixture in the mouse uterus, MCF-7 human breast cancer cells, and yeast-based. estrogen receptor assays: no apparent synergism. *Endocrinology*, 1997;138(4):1520
- 9 Barry MJ. Effects of an organochlorine pesticide on different levels of biological organization in Daphnia. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1996;34(3):239
- 10 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学. 第二版. 人民卫生出版社,1991:1293 - 1297
- 11 施新猷,等. 医学动物实验方法. 人民卫生出版社,1979:141 - 143
- 12 Counor JC, Cook JC, Craven SC, et al. An in vivo battery for identifying endocrine modulators that are estrogenic or dopamine regulators. *Fundamental and Applied Toxicology*, 1996;33:182
- 13 韦兰·丁·小海斯(美). 农药毒理学各论. 化学工业出版社, 1998:174 - 251

(1999 - 03 - 29 收稿;1999 - 08 - 15 接受)