

Effects of Di-n-butyl Phthalate on Testicular Ins13 mRNA Expression in Pubertal Male Rats

邻苯二甲酸二丁酯亚慢性染毒对大鼠睾丸 Ins13 mRNA 表达的影响

ZHAO Qing¹, SHU Wei-qun^{1,*}, CAO Jia^{2,*}, ZHANG Liang¹, FU Wen-juan¹
(1. Department of Environmental Hygiene; 2. Department of Toxicology, School of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

赵 清¹/舒为群^{1,*}/曹 佳^{2,*}/
张 亮¹/付文娟¹
(1. 第三军医大学军事预防医学院环境卫生学教研室; 2. 第三军医大学军事预防医学院军事毒理学教研室, 重庆 400038)

【摘要】背景与目的: 观察邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 亚慢性染毒对青春期大鼠睾丸间质细胞功能标志物胰岛素样因子 3 (Ins13) mRNA 表达水平的影响。材料与方法: 青春期健康雄性 SD 大鼠 72 只, 随机分为 3 组: 溶剂对照组 (玉米油), DBP 50 mg/kg 和 250 mg/kg 剂量的染毒组, 每组 24 只。隔日染毒, 等体积灌胃, 连续染毒 90 d。分别于染毒后 30、60 和 90 d 各组随机选取 8 只大鼠处死。取睾丸、附睾、心、肝、脾、肾称重并计算脏器系数, 放免法检测血清睾酮含量, 实时荧光定量 PCR 法检测睾丸 Ins13 mRNA 表达。结果: DBP 250 mg/kg 组染毒 90 d 肝脏系数显著大于对照组 ($P < 0.05$); 50 mg/kg 组染毒 60 d 大鼠血清睾酮水平较对照组显著升高 ($P < 0.05$), 而 250 mg/kg 组比 50 mg/kg 组显著下降 ($P < 0.01$); 各染毒组大鼠睾丸 Ins13 mRNA 表达水平较对照组显著下调 ($P < 0.01$)。染毒 30 d、60 d 时 DBP 250 mg/kg 剂量组较 DBP 50 mg/kg 组显著下调 ($P < 0.05$), 各染毒组睾丸 Ins13 mRNA 表达水平均随处理时间延长先下调而后上调, 60 d 较 30 d 显著降低 ($P < 0.05$), 90 d 较 60 d 显著升高 ($P < 0.01$)。结论: 青春期大鼠 DBP 亚慢性暴露可干扰血清睾酮及睾丸 Ins13 mRNA 表达水平, 对肝脏可能有潜在毒性。

【关键词】 邻苯二甲酸二丁酯; 间质细胞; 胰岛素样因子 3; 睾酮

中图分类号: X592 文献标识码: A 文章编号: 1004-616X(2009)03-0161-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND AND AIM: To explore the effects of subchronic exposure to di-n-butyl phthalate (DBP) on testicular insulin-like factor 3 (Ins13) mRNA expression in pubertal male rats. MATERIALS AND METHODS: A total of 72 male Sprague-Dawley rats at the age of 4-5 weeks were equally randomized into 3 groups, to receive by gavage 0, 50 or 250 mg/kg of DBP on alternate day for 90 days. Body, testis, epididymis and main organs were weighed. Serum testosterone, and mRNA expression of Ins13 in the testis were measured. RESULTS: There was an increase of the liver/body ratio in 250 mg/kg group after 90 days treatment ($P < 0.05$). Compared with the control, an increase in serum testosterone was found in the 50 mg/kg group ($P < 0.05$), but there was a reduction in 250 mg/kg group compared with the 50 mg/kg group ($P < 0.01$) after 60 days exposure. The mRNA expressions of Ins13 were significantly down regulated in all dosage groups ($P < 0.01$), more significantly in 250 mg/kg group than in 50 mg/kg group ($P < 0.05$). CONCLUSION: Pubertal male rats subchronically exposed to DBP could induce changes in serum testosterone and testicular Ins13 mRNA expression, and could have potential adverse effect on the liver.

【KEY WORDS】 Di-n-butyl phthalate; Leydig cell; Ins13; testosterone

邻苯二甲酸二丁酯 (Di-n-butyl phthalate, DBP) 广泛的一种,也是公认的环境内分泌干扰物。国内外研究报用作塑料增塑剂,是邻苯二甲酸酯类化合物 (PAEs) 中道显示, DBP 主要表现为对雄性动物的生殖和发育毒

收稿日期: 2009-01-14; 修订日期: 2009-03-03
基金项目: 国家科技部西部引导项目 (2003BA869C), 国家自然科学基金重点
项目 (30630056), 重庆市重大科技专项 (CSTC2006AA7003)
作者简介: 赵 清 (1972-), 女, 云南省昆明市人, 博士, 研究方向: 环境毒
理学。E-mail: zhaoqing007cn@yahoo.com.cn
* Correspondence to: SHU Wei-qun, E-mail: xm0630@sina.com; CAO Jia,
E-mail: caojia@mail.tmmu.com.cn

性^[1-3]。以往的实验主要研究 DBP 对宫内暴露、围产期和成年后小鼠或大鼠生殖发育的影响。胰岛素样因子 3 (InsI3) 是由睾丸间质细胞在整个生命周期内稳定分泌产生的一种激素,被认为可能是比睾丸激素水平更敏感的,能显示间质细胞功能状况的指标^[4]。本研究通过检测青春期雄性大鼠亚慢性暴露于 DBP 后血清睾酮及睾丸 InsI3 mRNA 表达的变化,以探讨 DBP 暴露是否可干扰睾酮合成及 InsI3 的转录水平。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂和仪器 玉米油、DBP(美国 Sigma 公司) RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司) 逆转录试剂盒(美国 Promega 公司) Realtime PCR Master Mix-SYBR GREEN(日本 TOYOBO 公司), 琼脂糖(西班牙 Biowest 公司), 电泳缓冲液(北京鼎国生物技术有限公司), 引物合成(Invitrogen 公司), 睾酮放射免疫分析试剂盒(北京原子高科股份有限公司)。8 连排 PCR 管(美国 Axygen 公司), 低温冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司), iQTM5 多重实时荧光定量 PCR 仪、Power PAC-200 电泳仪、Gel Doc2000 凝胶图像成像系统(美国 BIO-RAD 公司), GC-911 γ 放射免疫计数器(中国科学技术大学科技实业总公司), 紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司), MP 2000D 型电子天平(上海精密科学天平有限公司), BS110 S 型电子天平(北京塞多利斯天平有限公司)。

1.1.2 动物及分组 4~5 周龄 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 72 只, 体重(89 \pm 17)g, 由第三军医大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(军)-2002-007。染毒前适应性饲养一周, 其温度控制在 22 \pm 3 $^{\circ}$ C 相对湿度控制在 30%~70%, 人工控制照明为 12 h 昼/12 h 夜, 动物自由进食、饮水。实验时将大鼠按随机数字法随机分为 3 组, 即溶剂对照组(玉米油)、DBP 低剂量染毒组(50 mg/kg) 和高剂量染毒组(250 mg/kg), 每组各 24 只。

1.2 方 法

1.2.1 染毒方式及取材 大鼠隔日染毒, 各组按 2 ml/kg 等体积灌胃, 连续染毒 90 d。每天观察动物一般状况, 每周称量体重 1 次, 分别于染毒后 30 d、60 d 和 90 d, 各组随机选取大鼠 8 只处死。处死前夜, 动物禁食, 自由饮水。选取的大鼠称体重后, 10% 乌来坦腹腔麻醉, 采集股动脉血后处死, 立即剖取睾丸、附睾、心、肝、脾、肾, 称重后将睾丸于冰上迅速切分为 50 mg 左右小块, 分装于冻存管中液氮保存, 用于实时荧光定量

PCR。血液离心后取血清于 -70 $^{\circ}$ C 保存, 用于测定睾酮。

1.2.2 脏器系数测定 除去睾丸、附睾、心、肝、脾、肾周围的脂肪结缔组织, 吸尽脏器表面血液后用电子天平称质量用于计算脏器系数。脏器系数以脏器质量(g)与体质量(g)之比表示。

1.2.3 血清睾酮测定 采用放射免疫分析试剂盒, 按照说明书测定。样品及标准品均在同一条件下进行复管测定, 变异系数均 < 15%。

1.2.4 荧光定量 PCR 检测睾丸 InsI3 mRNA 表达

1.2.4.1 总 RNA 提取 每组随机抽取 3 个样本, 按 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒说明书中的操作步骤抽提睾丸组织总 RNA。琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测抽提 RNA 的质量和浓度。

1.2.4.2 逆转录 提取的 RNA 按以下方法进行逆转录, cDNA 合成总体积为 20 μ l: ①目的 RNA 和反转录引物的混合及变性: 取总 RNA 1 μ g, Oligo(dT)₁₅ 1 μ l, DEPC 处理水补足体积至 5 μ l, 70 $^{\circ}$ C 保温 5 min 后立即置于冰水浴冷却至少 5 min。②反转录 5 \times RT Buffer 4 μ l, dNTP Mix 1 μ l, RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor 0.5 μ l, M-MLV Rtase H 1 μ l, DEPC 处理水 8.5 μ l, 37 $^{\circ}$ C 5 min 退火, 42 $^{\circ}$ C 60 min cDNA 链合成, 70 $^{\circ}$ C 15 min 反转录酶灭活, 合成的 cDNA 置 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.4.3 引物设计合成 根据 GenBank 检索的大鼠 InsI3 mRNA 和内参照 β -actin mRNA 序列设计引物。InsI3 引物为: caagacctttgggtctgtgtc(上游), tccttggttctgggatctatg(下游), 预期扩增片段为 151 bp。 β -actin 引物为: tccagcacacttaacttaacttagc(上游), agccacaagaacactcagg(下游), 预期扩增片段为 98 bp。

1.2.4.4 荧光定量 PCR 应用 iQTM 5 多重实时荧光定量 PCR 仪和日本 TOYOBO 公司的 Realtime PCR Master Mix(SYBR GREEN)试剂进行 Real-time PCR。反应体系 25 μ l: cDNA 1 μ l, 2 \times master mix 12.5 μ l, 上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ l, ddH₂O 9.5 μ l。反应在专用的 8 连排 PCR 管中进行, 设置 PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s 预变性, 94 $^{\circ}$ C 15 s 变性, 58 $^{\circ}$ C 20 s 退火, 重复 40 个循环。在 72 $^{\circ}$ C 1.5 min 收集荧光信号, 循环结束后执行融解曲线程序: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s。实时定量 PCR 反应结束后, 根据 PCR 获得的融解曲线和扩增曲线分析结果的可靠性并设定阈值, 输出 Ct 值, iQ5 软件保存结果并分析。

1.3 统计学方法

体重、脏器系数、血清睾酮等数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS13.0 进行单因素方差分析, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水

准。实时 PCR 的结果采用比较 Ct 值定量方法 根据公式 $Fold = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算处理组和对照组之间目的基因的相对表达差异, ΔCt 值表示处理组和对照组间的 Ct 值差异, 计算结果以两组间目的基因拷贝数的比值, 即 Fold 值表示。其中 $\Delta\Delta Ct = (\text{实验组 Ct}_{\text{目的基因}} - \text{实验组 Ct}_{\text{参照基因}}) - (\text{对照组 Ct}_{\text{目的基因}} - \text{对照组 Ct}_{\text{参照基因}})$

2 结果

2.1 DBP 染毒对大鼠体重增长的影响

表 1 DBP 染毒对大鼠脏器系数的影响 (% , $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 The effects of DBP on the organ relative weights of rats (% , $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Group	Time(d)	Relative weight					
		Testis	Epididymis	Liver	Kidney	Heart	Spleen
Control	30	1.31 ± 0.19	0.29 ± 0.04	3.57 ± 0.34	0.73 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.24 ± 0.03
DBP 50 mg/kg	30	1.24 ± 0.14	0.27 ± 0.04	3.47 ± 0.48	0.71 ± 0.06	0.33 ± 0.02	0.23 ± 0.04
DBP 250 mg/kg	30	1.35 ± 0.20	0.27 ± 0.02	3.67 ± 0.23	0.72 ± 0.05	0.32 ± 0.03	0.24 ± 0.05
Control	60	1.01 ± 0.17	0.32 ± 0.03	3.28 ± 0.26	0.63 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.19 ± 0.02
DBP 50 mg/kg	60	1.03 ± 0.15	0.30 ± 0.03	3.13 ± 0.18	0.64 ± 0.04	0.30 ± 0.03	0.18 ± 0.02
DBP 250 mg/kg	60	1.06 ± 0.13	0.30 ± 0.02	3.29 ± 0.16	0.65 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.21 ± 0.03
Control	90	0.90 ± 0.08	0.29 ± 0.02	2.98 ± 0.23	0.60 ± 0.04	0.29 ± 0.03	0.18 ± 0.02
DBP 50 mg/kg	90	0.89 ± 0.23	0.27 ± 0.05	2.95 ± 0.24	0.62 ± 0.06	0.28 ± 0.03	0.17 ± 0.02
DBP 250 mg/kg	90	0.90 ± 0.06	0.28 ± 0.02	3.26 ± 0.14*	0.60 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.17 ± 0.02

Relative weight = Organ weight / Body weight. Compared with control, * $P < 0.05$.

平较对照组显著升高 ($P < 0.05$), 高剂量组 (250 mg/kg) 较低剂量组显著下降 ($P < 0.01$); 染毒时间对血清睾酮影响的结果表明, DBP 250 mg/kg 组血清睾酮水平随处理时间延长先下降而后上升, 染毒 60 d 比 30 d 显著下降 ($P < 0.01$), 90 d 比 60 d 显著升高 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 DBP 染毒对大鼠血清睾酮水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 The effects of DBP on serum testosterone in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Time(d)	Serum testosterone (ng/ml)		
	Control	DBP 50 mg/kg	DBP 250 mg/kg
30	2.68 ± 0.38	2.70 ± 0.18	2.80 ± 0.19
60	2.41 ± 0.27	2.77 ± 0.42 ^a	2.26 ± 0.23 ^{bc}
90	2.96 ± 0.29	2.82 ± 0.24	3.06 ± 0.30 ^d

Compared with control, ^a $P < 0.05$; Compared with DBP 50 mg/kg group, ^b $P < 0.01$; Compared with 30 d of DBP 250 mg/kg group, ^c $P < 0.01$; Compared with 60 d of DBP 250 mg/kg group, ^d $P < 0.01$.

2.4 DBP 染毒对大鼠睾丸 Insl3 mRNA 表达水平的影响

低剂量组 (DBP 50 mg/kg 组) 染毒 60 d 以及高剂量组 (DBP 250 mg/kg 组) 染毒 30、60、90 d, 睾丸 Insl3 mRNA 表达水平比对照组显著下调 ($P < 0.01$)。染毒 30、60 d DBP 250 mg/kg 组比 DBP 50 mg/kg 组显著下调 ($P < 0.05$); DBP 高、低剂量组 Insl3 mRNA 表达水平均随处理时间延长先下调而后上调, 染毒 60 d 比 30 d 显著下调 ($P < 0.01$; $P < 0.05$), 染毒 90 d 比 60 d 显著上调 ($P < 0.01$), 染毒 60 d 对 Insl3 mRNA 表达下调影响

DBP 各剂量组大鼠染毒期间饮食活动正常, 未见明显的毒作用表现。在实验期间其体重的增长与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 DBP 染毒对大鼠脏器系数的影响

大鼠脏器系数仅 DBP 250 mg/kg 染毒 90 d 组肝脏系数显著大于对照组 ($P < 0.05$), 其它脏器的脏器系数与对照组比较差异均无统计学意义。见表 1。

2.3 DBP 染毒对大鼠血清睾酮水平的影响

DBP 染毒 60 d, 低剂量 (50 mg/kg) 组血清睾酮水

最显著。见表 3。

表 3 DBP 染毒对大鼠睾丸 Insl3 mRNA 表达水平的影响 ($2^{-\Delta\Delta Ct}, n = 3$)

Table 3 The effects of DBP on testicular Insl3 mRNA expression in rats

Time (day)	Fold ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		
	Control	DBP 50 mg/kg	DBP 250 mg/kg
30	1.00	0.96 ± 0.20	0.42 ± 0.14 ^{ab}
60	1.00	0.42 ± 0.11 ^{ac}	0.17 ± 0.08 ^{abd}
90	1.00	0.80 ± 0.18 ^c	0.63 ± 0.14 ^{ac}

Compared with control, ^a $P < 0.01$; Compared with DBP 50 mg/kg group, ^b $P < 0.05$; Compared with 30 d, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$; Compared with 60 d, ^e $P < 0.01$.

3 讨论

本研究结果显示, 青春期 SD 大鼠给予 DBP 50 mg/kg 和 250 mg/kg 剂量经口亚慢性染毒, 大鼠体重与对照组比较差异无统计学意义; 而生殖器官睾丸和附睾以及主要脏器心、脾、肾的脏器系数与对照组比较差异亦无统计学意义。提示青春期大鼠亚慢性暴露于 250 mg/kg 及以下剂量的 DBP, 对其生长发育及生殖器官睾丸和附睾以及主要脏器无明显毒性。肝脏系数在 250 mg/kg 剂量组染毒 90 d 显著大于对照组 ($P < 0.05$), 提示青春期大鼠亚慢性暴露于 250 mg/kg DBP 对肝脏可能有潜在毒性, 但还需要生化及组织病理学等实验数据的进一步验证。

本研究中大鼠暴露于 DBP 60 d, 血清睾酮水平 50 mg/kg 剂量组比对照组显著升高 ($P < 0.05$),



250 mg/kg 剂量组比 50 mg/kg 剂量组显著降低 ($P < 0.01$)。睾酮主要由睾丸间质细胞合成和分泌。报道显示,出生后暴露于 PAEs 对间质细胞的影响主要与暴露剂量有关。高浓度(每天 > 500 mg/kg,经口)的 PAEs 可以抑制成年间质细胞的功能,降低雄激素的合成,延迟青春期^[5]。低剂量(每天 < 100 mg/kg,经口)则增加成年间质细胞的数量和雄激素水平,使得青春期提前^[6]。本研究中 50 mg/kg 低剂量组睾酮水平显著升高,推测 DBP 染毒对睾酮的影响可能存在低剂量兴奋效应。常兵等^[7]研究 DBP 对青春期雄性大鼠生殖毒性结果显示,250 mg/kg 剂量组染毒 8 周血清睾酮比对照组下降,但未达到显著水平,与本研究的结果一致。提示 250 mg/kg 剂量的 DBP 暴露 60 d 可一定程度抑制成年大鼠间质细胞的功能,降低雄激素的合成,但此剂量尚不足以显著降低雄激素水平。本研究显示染毒时间对血清睾酮水平也有影响,250 mg/kg 剂量组血清睾酮水平随暴露时间延长先下降而后上升,60 d 比 30 d 下降显著 ($P < 0.01$),90 d 比 60 d 显著升高 ($P < 0.01$)。提示 250 mg/kg 剂量 DBP 暴露 60 d 对雄激素的抑制最显著,延长染毒时间并不增强该剂量 DBP 对激素合成的抑制作用。

Insl3 由睾丸间质细胞分泌产生,在血浆中浓度较高,是人类睾丸内成熟间质细胞的标志物,在雄性分化的过程中发挥关键作用^[8]。近年来研究表明睾丸间质细胞 Insl3 受外源性雌激素的调节,17 α 雌二醇、17 β 雌二醇和己烯雌酚等对其表达均有下调作用^[9-10]。本研究发现青春期大鼠亚慢性暴露于 DBP 50 mg/kg 和 250 mg/kg 剂量均可显著下调睾丸 Insl3 mRNA 表达水平。Insl3 mRNA 表达水平随处理时间延长先下调而后上调,染毒 60 d 对基因下调影响最显著。提示环境内分泌干扰物 DBP 在低剂量水平暴露 60 d,亦可对睾丸间质细胞 Insl3 转录水平的表达产生下调作用。推测 Insl3 基因表达下调可能是 DBP 生殖毒性的作用机制之一。

由于本实验结果显示 DBP 250 mg/kg 染毒 60 d 对睾酮及 Insl3 基因表达水平的影响最显著,推测青春期 SD 大鼠暴露于 250 mg/kg DBP 60 d 对睾丸间质细胞的功能有不利的影响,会干扰其睾酮的合成和分泌以及

Insl3 的表达,可能影响其正常生殖功能。其机制还有待进一步深入探讨。

(致谢:本研究得到本教研室各位老师、研究生、工作人员的大力支持与帮助,在此表示诚挚的谢意!)

参考文献:

- [1] Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, et al. NTP center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-butyl phthalate[J]. *Reprod Toxicol*, 2002, 16(5): 489 - 527.
- [2] Zhang Y, Jiang X, Chen B. Reproductive and developmental toxicity in F1 Sprague-Dawley male rats exposed to di-n-butyl phthalate in utero and during lactation and determination of its NOAEL[J]. *Reprod Toxicol*, 2004, 18(5): 669 - 676.
- [3] Mahood IK, Scott HM, Brown R, et al. In utero exposure to di(n-butyl) phthalate and testicular dysgenesis: comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity[J]. *Environ Health Perspect*, 2007, 115(Suppl 1): 55 - 61.
- [4] Ivell R, Balvers M, Domagalski R, et al. Relaxin2like factor: a highly specific and constitutive new marker for Leydig cells in the human testis[J]. *Mol Hum Reprod*, 1997, 3(6): 459 - 466.
- [5] Sjoberg P, Lindqvist NG, Plöen L. Age-dependent response of the rat testes to di(2-ethylhexyl) phthalate[J]. *Environ Health Perspect*, 1986, 65: 237 - 242.
- [6] Akingbemi BT, Ge R, Klinefelter GR, et al. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(3): 775 - 780.
- [7] 常兵,刘德瑜,梁玉香,等. 邻苯二甲酸二丁酯对青春期雄性大鼠的生殖毒性研究[J]. *中国自然医学杂志*, 2007, 9(3): 461 - 465.
- [8] 张宝红,杜军保. 胰岛素样激素 3 的研究进展[J]. *国外医学:生理、病理科学与临床分册*, 2004, 24(2): 114 - 115.
- [9] Jiang XW, Li JH, Huang TH, et al. Effect of prenatal exposure to diethylstilbestrol on gubernacular development in fetal male mice[J]. *Asian J Androl*, 2004, 6(4): 325 - 329.
- [10] Nef S, Shipman T, Parada LF. A molecular basis for estrogen induced cryptorchidism[J]. *Dev Biol*, 2000, 224(2): 354 - 361.