

Effect on Two-generation Multiplication of SD Rats Treated with Di-n-butyl Phthalate in Utero

邻苯二甲酸二丁酯宫内暴露对 SD 大鼠两代繁殖的影响

张勇燕¹/舒为群^{1,*}/曹佳²/
罗教华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, 重庆 400038; 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)

ZHANG Yong-yan¹, SHU Wei-qun^{1,*}, CAO Jia², LUO Jiao-hua¹, FU wen-juan¹
(1. Department of Environmental Hygiene, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; 2. Department of Environmental Hygiene, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

【摘要】背景与目的：探讨邻苯二甲酸二丁酯 (di-n-butyl phthalate, DBP) 宫内暴露对亲代和 F1 代孕鼠繁殖能力以及 F1 和 F2 代雄性仔鼠生长发育及生殖系统的影响。材料与方法：选择妊娠 SD 大鼠 60 只, 随机分为溶剂对照组 (玉米油)、DBP 50 mg/(kg·d) 染毒组和 DBP 250 mg/(kg·d) 染毒组, 于 GD8 至 GD21 每日经口灌胃染毒, 连续繁殖两代, 观察 F0 及 F1 代孕鼠体重、产仔数、产仔性别比等的改变, 以及 F1 和 F2 代雄性仔鼠体重、肛殖距、精子数目及形态、睾丸及附睾组织病理学改变。结果：与对照组相比, DBP 50 mg/(kg·d) 组 F1 代母鼠哺乳期体重的增重增加 ($P < 0.05$) ; F2 代雌性仔鼠肛殖距缩短 ($P < 0.05$) , 但经自身体重校正后差异无统计意义 ($P > 0.05$) 。DBP 250 mg/(kg·d) 组 F0 代母鼠哺乳期体重增重减少 ($P < 0.05$) ; F1 代雄性仔鼠肛殖距缩短, 用自身体重校正后差异显著 ($P < 0.05$) ; F1 代雄鼠精子数目明显减少 ($P < 0.01$) ; F1 和 F2 代雄性仔鼠精子头部畸形率增加 ($P < 0.05$) 。结论：亲代宫内暴露 DBP 可影响 F0 乃至 F1 代孕鼠的繁殖功能, 引起 F1 代雄性仔鼠生殖系统损伤, 可能会延续至 F2 代。

【关键词】邻苯二甲酸二丁酯; 繁殖; 发育; 肛殖距; 精子畸形

中图分类号: X592 文献标识码: A 文章编号: 1004-616X(2009)03-0169-04

【ABSTRACT】BACKGROUND AND AIM: To investigate the effects of Di-n-butyl phthalate on the multiplication function of F0 and F1 pregnancy rats and on the development and reproductive system of F1 and F2 male pups. MATERIALS AND METHODS: Pregnant SD rats were randomly divided into three groups with two experimental groups and one control group. Animals were gavaged with either corn oil only (vehicle control) or DBP [50 mg/(kg·d), 250 mg/(kg·d)] during GD8 and GD21. For breeding in two generations, we assessed the body weight, sex ratio of F0 and F1 pregnant rats. The body weight, anogenital distance, number and morphous of sperm, the histology of testis or epididymis of F1 and F2 male pups were also observed. RESULTS: Compared with control, the body weight gain during lactation of F1 pregnant rats were significantly increased at the dose of DBP 50 mg/(kg·d), but the anogenital distance were shorten in F2 female pups. After corrected by anogenital index (AGI), there are no significant differences. At the dose of DBP 250 mg/(kg·d), the body weight gain during lactation of F0 pregnant rats were significantly reduced. The anogenital index and the number of sperm of F1 male pups were also significantly reduced at this dose ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Moreover, the headed deformity rate of F1 and F2 male pups were also reduced significantly ($P < 0.05$). CONCLUSION: Treating with DBP in utero could interfere with the multiplication function of F0 and F1 pregnant rats, and give rise to the reproductive toxicities of F1 male rats, with potential influence on F2 male rats.

【KEY WORDS】Di-n-butyl phthalate; multiplication; development; anogenital distance; semina deformity

收稿日期: 2009-02-11; 修订日期: 2009-04-03
基金项目: 重庆市重大科技专项 (CSTC2006AA7003)
作者简介: 张勇燕 (1980-), 女, 河北蔚县人, 硕士研究生, 研究方向: 环境卫生学。

* Correspondence to: SHU Wei-qun, Tel: 023-68752294

邻苯二甲酸二丁酯(Di-n-butyl phthalate, DBP)是一种具有内分泌干扰性质的有机化学物。DBP 主要作为增塑剂长期使用,由于其在生产过程中非持久地(如化学键)与塑料结合而易于从塑料产品中释放到环境里,造成广泛污染。美国国家毒理学计划(NTP)的研究已确认 DBP 有显著的雄性生殖毒性及发育毒性^[1]。大量动物资料显示大鼠宫内暴露于DBP 可观察到雄性子代睾丸、附睾、附属性腺和外生殖器官损伤,以及生精小管退化、睾丸萎缩、隐睾症和附睾畸形等病变^[2-5]。目前,宫内暴露 DBP 的生殖和发育毒性研究多持续至 F1 代,而 DBP 的多代繁殖及发育毒性还未见报道。因此,本研究选择在仔鼠性别决定敏感期^[6](GD8~GD21)对 SD 大鼠进行母体宫内暴露,观察 F0 和 F1 代母鼠的繁殖情况以及 F1 和 F2 子代以雄性生殖系统为主的发育指标,为 DBP 暴露的危险评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 DBP(液体,密度 1.043 g/ml)和玉米油购于 Sigma 公司。工作液配制方法:将 DBP 原液分别用玉米油稀释成浓度 25 mg/ml 和 125 mg/ml 工作液待用。

1.1.2 实验动物 SPF 级 Sprague-Dawley 孕鼠 60 只,由重庆市第三军医大学大坪医院动物实验中心提供,合格证号 SCXK(军)2007-17。

1.2 剂量设置与暴露处理

60 只孕鼠随机分为 2 个不同 DBP 剂量的染毒组和 1 个对照组,每组 20 只。染毒组分别以 DBP 50 mg/(kg·d)和 DBP 250 mg/(kg·d)剂量,自 GD8 至 GD21,按 2 ml/kg 每日对亲代孕鼠经口灌胃染毒,溶剂对照组则给予同等量的玉米油。

1.3 动物模型

1.3.1 F0 代孕鼠 直接购买 F0 代妊娠 0 d 的孕鼠,自 GD0 开始至哺乳期结束,每周称取孕鼠体重。

1.3.2 F1 代仔鼠 F1 代仔鼠出生当天(PND0)记录每窝产仔数、每窝活仔数、活仔体重、性别比等,出生后第 4 d(PND4)测量仔鼠肛殖距,记录每窝 4 d 活仔数、活仔窝重等,并按照 OECD 实验指南(No. 414, No. 421)要求,进行窝标准化,每窝余 8 只仔鼠,不足 8

只的窝剔掉。一部分雄性仔鼠出生后第 60 d(PND60)称重后取双侧睾丸、附睾等脏器称重,左侧睾丸和附睾固定于 Bouin's 液中常规石蜡切片做组织形态学观察,右侧附睾尾用做精子评价。另一部分雄性仔鼠与雌性仔鼠于出生 90 d 后交配产生 F2 代。

1.3.3 F1 代孕鼠 随机选取同剂量组不同窝别的雌雄鼠,每日 18:00 按 1:1 合笼,次日晨 9:00 检查阴栓,查见阴栓后将雌鼠取出,单笼饲养,自 GD0 至 PND21,每周称取孕鼠体重。

1.3.4 F2 代仔鼠 F2 代仔鼠 PND0 记录每窝产仔数、每窝活仔数、活仔体重、性别比等,PND4 测量仔鼠肛殖距,记录每窝 4 d 活仔数、活仔窝重等。雌性仔鼠于 PND21 处死,雄性仔鼠于 PND60 称重后处死取材。

1.4 观察指标

1.4.1 组织形态学观察 按石蜡切片苏木精-伊红(HE)常规染色程序处理切片(此过程由第三军医大学西南医院病理科协助完成),光镜下进行组织形态学观察,计数切片上所有圆形曲细精管数,并记录出现变性曲细精管数。

1.4.2 附睾尾精子评价^[7] 精子计数:附睾称重后剪下附睾尾部,于 5 ml 生理盐水中剪碎,放置 5 min 待精子释出,用两层镜头纸过滤,记录过滤后体积;用生理盐水稀释,白细胞计数板计数,根据计数所得精子密度,计算出滤液中的精子总数,再用精子总数除以右侧附睾重量即为每克附睾精子数。精子畸形率:取精子稀释液 1 滴涂片,待涂片干后甲醇固定,0.5%伊红染色。每组随机选 10 只大鼠,每只大鼠镜下计数 500 个完整的精子,记录畸形精子数。

1.5 统计学方法

用 SPSS11.5 统计软件对数据进行统计分析,计数资料用卡方检验,计量资料用方差分析。

2 结果

2.1 DBP 对母鼠体重增重的影响

与对照组相比,DBP 50 mg/(kg·d)剂量组 F1 代母鼠哺乳期体重的增重显著增加($P < 0.05$),DBP 250 mg/(kg·d)剂量组 F0 代母鼠哺乳期体重的增重显著降低($P < 0.05$),见表 1。

表 1 DBP 对 F0 及 F1 代母鼠体重的影响(g)
Table 1 Effect of DBP on the body weight of F0 and F1 pregnant rats(g)

Groups	F0 generation		F1 generation	
	During gestation	During lactation	During gestation	During lactation
Control (Corn oil)	119.8 ± 35.7	17.0 ± 17.5	105.7 ± 20.9	12.1 ± 20.7
DBP 50 mg/(kg·d)	102.1 ± 29.4	12.4 ± 21.4	105.4 ± 33.3	34.0 ± 17.1*
DBP 250 mg/(kg·d)	105.2 ± 39.8	-6.7 ± 28.9*	88.0 ± 34.1	-1.3 ± 10.7

Compared with control, * $P < 0.05$

2.2 DBP 对仔鼠出生及发育的影响

各剂量间仔鼠出生体重、产仔数、活仔数、性别比的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。F1 代雄性仔鼠的肛殖距 (AGD) 有缩短趋势, 但与对照组比较差异无统计学意义; F2 代仔鼠肛殖距与对照组比较差异亦无统计学意义。

在排除仔鼠体重影响的基础上, 用肛殖距与仔鼠体重作比较 (AGI) 后发现, DBP 250 mg/(kg · d) 组雄性仔鼠肛殖距明显缩短 ($P < 0.05$); F1 和 F2 代雌雄仔鼠肛殖距比较差异无统计学意义 (见表 2 表 3)。

表 2 DBP 对 F1 代仔鼠出生及发育的影响
Table 2 The effect of DBP on the born and development of F1 pups

	F1 generation ^a								
	Live pups per litter	Sex ratio (male/female)	AGD(mm)		AGI(mm/g)		Body weight gain(g)		
			Male	Female	Male	Female	PND0	PND21	PND56
Control (Corn oil)	10.88 ± 4.69	0.75(79/106)	4.68 ± 0.45	2.11 ± 0.25	0.51 ± 0.07	0.23 ± 0.03	6.6 ± 0.5	34.8 ± 4.8	141.3 ± 18.3
DBP 50 mg/(kg · d)	9.38 ± 4.24	0.99(72/73)	4.42 ± 0.32	2.09 ± 0.19	0.48 ± 0.05	0.24 ± 0.02	6.2 ± 0.5	29.8 ± 8.5	132.6 ± 25.9
DBP 250 mg/(kg · d)	10.78 ± 2.63	1.07(72/67)	4.36 ± 0.32	2.05 ± 0.14	0.45 ± 0.05 [*]	0.21 ± 0.02	6.5 ± 0.7	28.1 ± 10.3	133.7 ± 34.1

Compared with control, ^{*} $P < 0.05$. a: $n = (15, 12, 11)$ respectively, litter were serve as unit; AGI = AGD/weight(mm/g).

表 3 DBP 对 F2 代仔鼠出生及发育的影响
Table 3 The effect of DBP on the birth and development of F2 pups

	F2 generation ^b								
	Live pups per litter	Sex ratio (male/female)	AGD(mm)		AGI(mm/g)		Body weight gain(g)		
			Male	Female	Male	Female	PND0	PND21	PND56
Control (Corn oil)	8.71 ± 2.51	1.07(95/88)	4.69 ± 0.54	2.05 ± 0.13	0.45 ± 0.12	0.21 ± 0.06	7.0 ± 0.8	38.9 ± 7.2	173.6 ± 21.1
DBP 50 mg/(kg · d)	9.42 ± 2.07	1.26(63/50)	4.41 ± 0.34	1.93 ± 0.08	0.45 ± 0.05	0.23 ± 0.04	6.7 ± 0.8	37.8 ± 5.4	162.8 ± 23.7
DBP 250 mg/(kg · d)	5.92 ± 4.9	1.29(40/31)	4.70 ± 0.29	2.07 ± 0.21	0.44 ± 0.06	0.21 ± 0.03	7.3 ± 1.1	36.5 ± 8.2	164 ± 28.7

b: $n = (15, 10, 6)$ respectively, litter were serve as unit; AGI = AGD/weight(mm/g)

2.3 雄性仔鼠睾丸及附睾组织病理学观察

DBP 50 mg/(kg · d) 组与对照组各代雄性仔鼠睾丸曲细精管发育正常, 无明显异常, 基底膜与生精细胞结合紧密不易脱落, 腔内可见各级生精细胞排列紧密, 说明有正常的生精过程, 间质细胞均匀散在分布于曲细精管间。DBP 250 mg/(kg · d) 组生精细胞疏松脱落, 生

精上皮可见空泡变性 (图 1A), 部分曲细精管可见生精细胞核固缩 (图 1B)。F1 雄性子代变性曲细精管明显增加 ($P < 0.05$), F2 雄性子代变性曲细精管数与对照组比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

对照组和各染毒组附睾切片未见明显损伤, 附睾头体尾部切片均见大量附睾管, 管腔内可见大量精子。

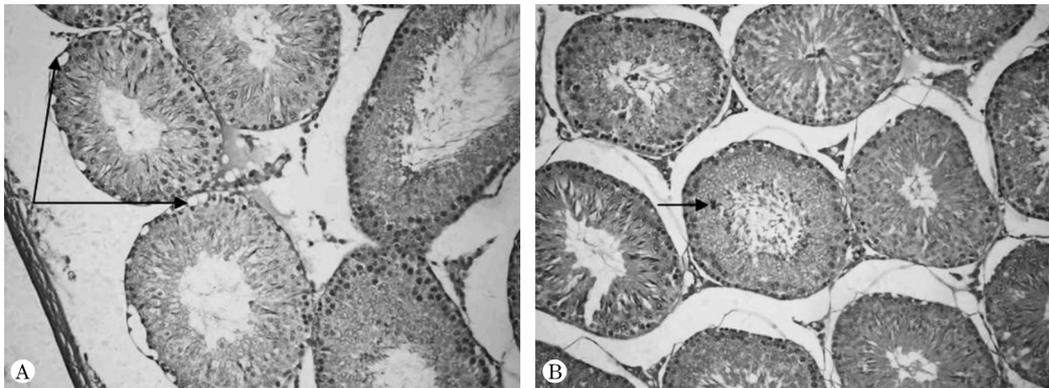


图 1 变性曲细精管 (×200)。A: 箭头所指为空洞变性; B: 箭头所指核固缩

Figure 1 Degenerative seminiferous tubules (×200) A: Arrow indicate the degeneration of vacuolar; B: Arrow indicate karyopycnosis

2.4 雄性仔鼠精子评价

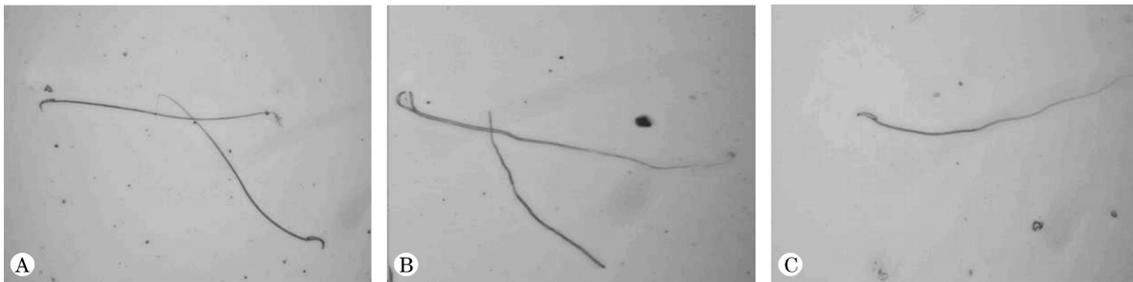
附睾尾精子计数有下降趋势, DBP 250 mg/(kg · d) 剂量组 F1 代精子数目显著降低 ($P < 0.01$)。F2 代各剂量组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 4)。

精子畸形率明显上升, 以头部畸形为主。头部畸形主要有双头、不定形、无钩头 (见图 2)。其中 DBP 250 mg/(kg · d) 组 F1 子代和 F2 子代精子头部畸形率均明显高于对照组 ($P < 0.05$) (见表 4)。



表 4 DBP对雄性仔鼠精子数目及形态的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)Table 4 Effect of DBP on the number and the morphology of sperm in male pups($n = 10, \bar{x} \pm s$)

	F1 generation			F2 generation		
	Sperm number ($\times 10^6$)	Sperm number/epididymis weight($\times 10^7/g$)	Abnormal head sperm	Sperm number ($\times 10^6$)	Sperm number/epididymis weight($\times 10^7/g$)	Abnormal head sperm
Control	3.60 \pm 0.62	1.40 \pm 0.22	1.24 \pm 0.51	5.00 \pm 0.98	2.00 \pm 0.38	0.68 \pm 0.33
DBP 50 mg/(kg.d)	3.40 \pm 0.51	1.50 \pm 0.21	1.26 \pm 0.67	3.60 \pm 0.86	1.70 \pm 0.43	1.00 \pm 0.69
DBP 250 mg/(kg.d)	1.50 \pm 0.26 ^{**}	0.66 \pm 0.09 ^{**}	2.08 \pm 1.01 [*]	4.30 \pm 0.88	1.80 \pm 0.35	1.51 \pm 0.93 [*]

Compare with control: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 图 2 精子形态($\times 400$) A: 正常精子; B: 双头精子; C: 无钩头精子Figure 2 Sperm morphology($\times 400$) A: normal sperm; B: double headed sperm; C: hookless sperm

3 讨论

目前,内分泌干扰物对子代的多代生殖发育毒性受到国内外学者的关注。Skinner 等^[6]研究表明环境内分泌干扰物乙烯菌核利和甲氧氯宫内暴露可引起 F1 代乃至 F4 代雄性仔鼠的损伤,主要表现在生精细胞凋亡增加、精子数目减少以及精子活力降低。但是 DBP 作为主要的内分泌干扰物是否也可引起多代生殖及发育毒性还未见报道。

肛殖距(anogenital distance, AGD)目前已广泛用于评价男性化/男性体征消失指标的检测标准。我们发现 F1 代雄性仔鼠的肛殖距有缩短趋势,但差异无统计学意义。在排除体重影响的基础上,我们用仔鼠自身体重对 AGD 做了校正(AGI),发现各组间仍然存在剂量反应趋势,且 DBP 250 mg/(kg·d) 组雄性仔鼠 AGI 显著降低,这与 Zhang Y^[3]等研究结果一致,说明了 DBP 对 F1 代仔鼠雄性生殖系统的损伤。

本实验观察到 DBP 50 mg/(kg·d) 组 F1 代母鼠哺乳期体重增加,这种现象可能是 DBP 低剂量的 hormesis 效应^[8],DBP 低剂量对 F1 代雌鼠有兴奋刺激作用,促使其在哺乳期体重增长。DBP 低剂量为何引起这种现象,还有待于进一步研究。

本实验研究发现 DBP 250 mg/(kg·d) 抑制了 F0 代孕鼠妊娠期体重增长;F1 代精子数减少且畸形率增加,F2 代精子畸形率显著增加。这说明 DBP 对 F1 代生殖系统有明显的损伤作用,但对 F2 代生殖系统影响不明显。但精子畸形率在 F1 和 F2 雄性子代均出现异常,

这为宫内暴露 DBP 可影响雄性仔鼠子 1 代及子 2 代精子的功能损伤提供了有意义的线索。

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] Mylchreest E, Cattley RC, Foster PMD, et al. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to Di(n-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism?[J]. *Toxicol Sci*, 1998, 43(1): 47-60.
- [3] 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.
- [4] Latini G, Del VA, Massaro M, et al. Phthalate exposure and male infertility[J]. *Toxicology*, 2006, 226(2/3): 90-98.
- [5] 龙延,田二坡,秦达念,等. 青春前期邻苯二甲酸二丁酯持续暴露对大鼠睾丸发育的影响[J]. *中华男科学杂志*, 2008, 14(9): 779-785.
- [6] Anway MD, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(S6): 43-49.
- [7] 黄文涛,陈慧. 大鼠精子畸形形态学观察分析[J]. *重庆中草药研究*, 2006, 12(2): 22-24.
- [8] 顾祖维. 现代毒理学概论[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 15-20.