

小鼠邻苯二甲酸二丁酯染毒模型建立及莱菔硫烷保护作用的探索

汤井源¹, 蒋旭平², 秦志强³, 韩鹏³, 秦超³, 沈百欣⁴, 王巍³, 唐敏³, 张炜^{3*}

¹南京中医药大学附属医院, 江苏省中医院泌尿外科, 江苏 南京 210029; ²宜兴市人民医院泌尿外科, 江苏 宜兴 214200; ³南京医科大学第一附属医院泌尿外科, 江苏 南京 210029; ⁴南京医科大学第二附属医院泌尿外科, 江苏 南京 210011

[摘要] 目的:用邻苯二甲酸二丁酯(DBP)建立小鼠染毒模型并探讨莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)的保护作用。方法:将30只6周龄小鼠随机分为溶剂对照组(大豆油组)、SFN组[0.75 mg/(kg·d)]、DBP组[500 mg/(kg·d)]、DBP+SFN低剂量组[0.5 mg/(kg·d)]、DBP+SFN中剂量组[0.75mg/(kg·d)]、DBP+SFN高剂量组[1.00 mg/(kg·d)], 每组5只, 连续喂药2周后处死, 测量睾丸重量、肛殖距(AGD)、AGD/体重、睾丸脏器系数等指标, 并观察小鼠睾丸的组织病理学改变。另取一侧附睾中精子进行精子计数、精子活力以及精子畸形率分析。结果:相比于对照组, DBP组AGD/体重、精子计数、活力等指标均明显降低, 精子畸形率显著升高($P < 0.05$), 睾丸出现明显病理改变。而DBP+SFN低剂量组各检测指标均优于DBP组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), SFN能够明显改善DBP导致的小鼠睾丸组织病变。结论:SFN可显著缓解DBP导致的生殖毒性, 为进一步探讨DBP毒性作用和SFN的保护机制提供了合适的动物实验模型。

[关键词] 邻苯二甲酸二丁酯; 莱菔硫烷; 生殖毒性; 动物模型

[中图分类号] R691

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)05-595-05

doi:10.7655/NYDXBNS20180505

Establishment of dibutyl phthalate poisoning mouse model and the protective response of sulforaphane

Tang Jingyuan¹, Jiang Xuping², Qin Zhiqiang³, Han Peng³, Qin Chao³, Shen Baixin⁴, Wang Wei³, Tang Min³, Zhang Wei^{3*}

¹Department of Urology, Affiliated Hospital of Nanjing Medical University of TCM, Jiangsu Province Hospital of TCM, Nanjing 210029; ²Department of Urology, Yixing People's Hospital, Yixing 214200; ³Department of Urology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029; ⁴Department of Urology, the Second Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210011, China

[Abstract] **Objective:** To establish the dibutyl phthalate (DBP) poisoning mouse model and discuss the protective response of sulforaphane (SFN). **Methods:** A total of 30 male mice with age of 6 weeks old were randomly divided into the solvent control group (soybean oil group), the SFN group[0.75 mg/(kg·d)], the DBP group[500 mg/(kg·d)], the DBP with SFN low dose group[0.5 mg/(kg·d)], the DBP with SFN middle dose group[0.75 mg/(kg·d)] and the DBP with SFN high dose group[1 mg/(kg·d)] with 5 mice in each. After continuous feeding drugs for 2 weeks, all mice were sacrificed and anatomized, the testis weight, anogenital distance (AGD), AGD/weight and the organ coefficients of testis were measured. In addition, the testicular histopathological changes of mice were observed and one side of epididymis was used to analysis the sperm counts, viability and deformity rate. **Results:** The DBP group presented with obvious lower AGD/weight, sperm counts, viability and higher deformity rate, significant testicular histopathological changes compared to the soybean oil group ($P < 0.05$). However, all the test results in the DBP with SFN low dose group were superior to that of the DBP group ($P < 0.05$) and the testicular histopathological changes were improved significantly. **Conclusion:** SFN could alleviate the reproductive toxicity induced by DBP significantly and this provides an experimental animal model for further studying the

[基金项目] 国家自然科学基金(81670608, 81600514)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhangwei@medmail.com.cn

toxicity of DBP and the protective mechanism of SFN.

[Key words] dibutyl phthalate; sulforaphane; reproductive toxicity; animal model

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(05):595-599]

邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)是工业生产中的一种重要原料,被广泛用于生产增塑剂、胶黏剂、橡胶、香料以及作为农药载体等,与人类生活密切相关。由于其不易牢固地结合在有机物载体上,极易造成空气、水体、土壤及生物体污染,对人类健康尤其是生殖系统造成严重危害^[1]。已有研究表明, DBP可作用于雄性生殖系统,导致尿道下裂、隐睾、睾丸萎缩、精子生成障碍等生殖系统损害^[2]。莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)是一种异硫氰酸盐,具有抗氧化、抗肿瘤等生物学特性^[3]。研究表明, SFN可抵抗DBP对机体造成的氧化应激损害^[4]。

随着对DBP毒性作用研究的不断深入,动物模型逐渐成为不可或缺的工具,如本课题组已经成功构建DBP诱导大鼠尿道下裂、隐睾模型^[5]。但目前的动物模型主要用于研究DBP对胚胎期动物的影响,而对成年动物生殖系统的影响以及DBP毒性抵抗方法的研究仍缺乏合适的动物模型。本研究利用DBP及SFN构建小鼠染毒及抗毒模型,以探讨DBP的生殖毒性SFN的保护作用,有利于进一步分析DBP生殖毒性及SFN抗毒的具体机制,从而为预防尿道下裂、隐睾、睾丸萎缩等生殖系统损害的发生及相应的治疗提供指导。现将模型初步构建方法报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF级雄性C57BL/6J小鼠30只,5周龄,体重17~20 g,购自南京医科大学动物实验中心。室温23~25℃,相对湿度50%~60%,每日光照12 h,自由摄食、饮水。

DBP(分析纯,浓度1.04 g/mL)和SFN(Sigma公司,美国);市售精制大豆油;生理盐水;游标卡尺;精密电子天平;荧光电子显微镜(蔡司Axioskop 2 plus,德国);精子质量分析仪(北京清华同方mk105523)。

1.2 方法

1.2.1 实验设计

30只小鼠,随机分为溶剂对照组(大豆油)、SFN

组[0.75 mg/(kg·d)]、DBP组[500 mg/(kg·d)]、DBP+SFN低剂量组[0.5 mg/(kg·d)]、DBP+SFN中剂量组[0.75 mg/(kg·d)]、DBP+SFN高剂量组[1.00 mg/(kg·d)],每组5只,动物适应环境1周后从6周龄(青春期)开始用于实验。溶剂对照组给予大豆油灌胃, SFN不同剂量[0.50、0.75、1.00 mg/(kg·d)]溶于生理盐水皮下注射, DBP[500 mg/(kg·d), 1/16半数致死量]溶于大豆油灌胃,此外各组补充相应的大豆油和生理盐水。每天喂药1次,连续2周,2周后处死。

1.2.2 观察指标

一般情况及解剖学指标:每天观察动物外观、行动及死亡状况,每周称量体重。2周后股动脉放血处死,利用游标卡尺测量肛殖距(AGD),测量方法见图1。解剖观察生殖系统,分离睾丸和附睾,用预冷的0.9%生理盐水清洗,滤纸吸干,快速拍照、称重,并计算AGD/体重、睾丸脏器系数。

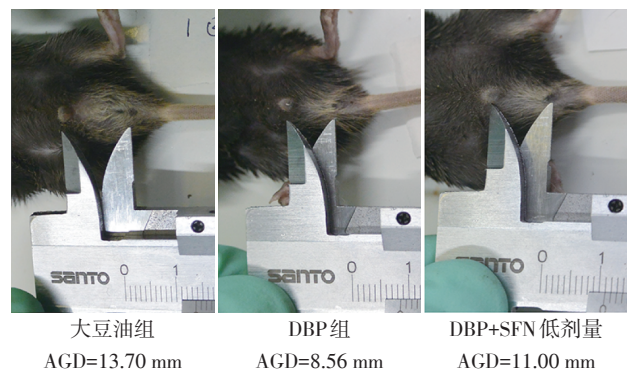


图1 AGD测量方法

Figure 1 The measurement method of AGD

睾丸组织学研究:取小鼠一侧睾丸,用10%的福尔马林溶液固定。将固定好的睾丸组织修块、脱水、透明、浸蜡、包埋和切片处理,常规HE染色,显微拍照。

精子计数、活力:取一侧附睾,剪碎,在预热的生理盐水中37℃温育5 min,使附睾中精子充分游离出来,然后1 000 r/min离心3 min,制备精子悬液。利用精子质量分析仪检测各组小鼠的精子计数、活力。

精子形态:取一滴精子悬液制成涂片,干燥后甲醇固定。HE染色后在高倍显微镜下观察200个精子,计数其中畸形的精子。

1.3 统计学方法

采用SPSS 20.0统计软件处理数据,实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析以及SNK法两两比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

DBP组出现1只小鼠死亡,且该组小鼠行动迟缓,精神不振。其余各组小鼠实验期间饮食活动正常,无明显的毒性反应。实验结束时各组小鼠体重无明显差异($P > 0.05$)。

2.2 小鼠解剖学检查指标

DBP+SFN低剂量组的AGD大于DBP组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图2A),其余各组差异不明显($P > 0.05$)。排除体重影响后,溶剂对照组、SFN组和DBP+SFN低剂量组的AGD/体重相比于DBP组,差异明显($P < 0.05$,图2B)。同样的,在睾丸重量方面,仅DBP+SFN低剂量组与DBP组差异显著($P < 0.05$,图2C)。此外,DBP组的睾丸脏器指数明显低于SFN组和DBP+SFN低剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图2D)。

2.3 睾丸组织学研究结果

显微图片观察显示(图3),大豆油组与SFN组小鼠睾丸生精上皮较厚,曲细精管直径较大,各级生精细胞排列规则,数量较多,间质细胞发育良好,曲细精管之间排列紧密。而DBP组小鼠睾丸生精上皮较薄,曲细精管直径变小,细胞层次少且排列紊乱甚至缺失,数量显著减少。间质细胞减少或缺失,曲细精管间排列不紧密。DBP+SFN组图片显示

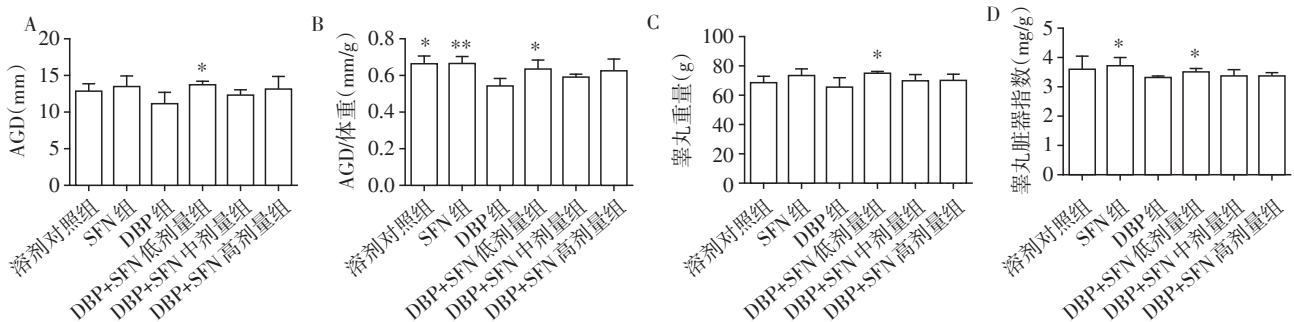
结果与大豆油组结果基本相同,但与DBP组相比,很大程度上改善了睾丸的病理损伤,可见各级生精细胞排列变规则,数量增加,间质细胞数量变多。

2.4 精子计数、活力、畸形率

精子畸形分为头畸形、颈畸形和尾畸形(图4)。DBP组精子数量、活力均明显低于其余5组,而畸形率显著高于其他各组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图5)。SFN各剂量组间以及与溶剂对照组、SFN组之间精子计数、活力和畸形率差异不明显,无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

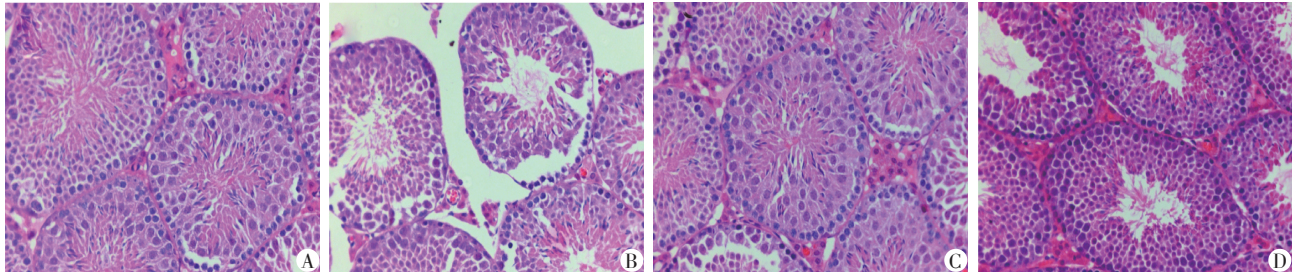
近年来,环境污染问题越来越受到重视。DBP作为最常用的增塑剂,广泛存在于人类生活中,对人类健康产生重大影响。作为环境内分泌干扰物的一种,DBP具有抗雄激素作用和雌激素样效应^[6],通过干扰正常的内分泌系统,产生明显的胚胎毒性、睾丸毒性及致生殖畸形,表现为睾丸萎缩、曲细精管萎缩、隐睾、尿道下裂、精子生成减少等生殖系统毒损害^[7-8]。同时DBP可导致机体氧化应激损伤,造成多脏器尤其是睾丸的氧化应激损害^[8]。转录因子NF-E2相关因子(Nrf2)是机体抗氧化应激的重要转录因子,可参与保护机体的氧化应激损伤^[9]。当机体发生氧化应激或受到其他化学物质刺激时,Nrf2可由细胞浆进入细胞核,与相关基因的抗氧化应激元件结合,进而诱导下游抗氧化蛋白如血红素加氧酶1(HO-1)、NAD(P)H醌氧化还原酶1(NQO-1)、谷胱甘肽S转移酶(GST)等的表达,从而保护机体免受活性物质(如氧自由基)及一些毒性物质(如致癌物、药物代谢活性产物等)的侵害^[10]。而SFN是Nrf2重要的诱导剂,能够通过激活Nrf2抵抗DBP引起的氧化应激损伤^[11]。



与DBP组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图2 各组小鼠解剖学指标比较

Figure 2 Comparison of anatomical parameters of mice in each group



A:溶剂对照组;B:DBP组;C:SFN组;D:DBP+SFN低剂量组。

图3 各组睾丸病理组织学观察(HE,×400)

Figure 3 HE staining of testis tissues from the four groups(×400)

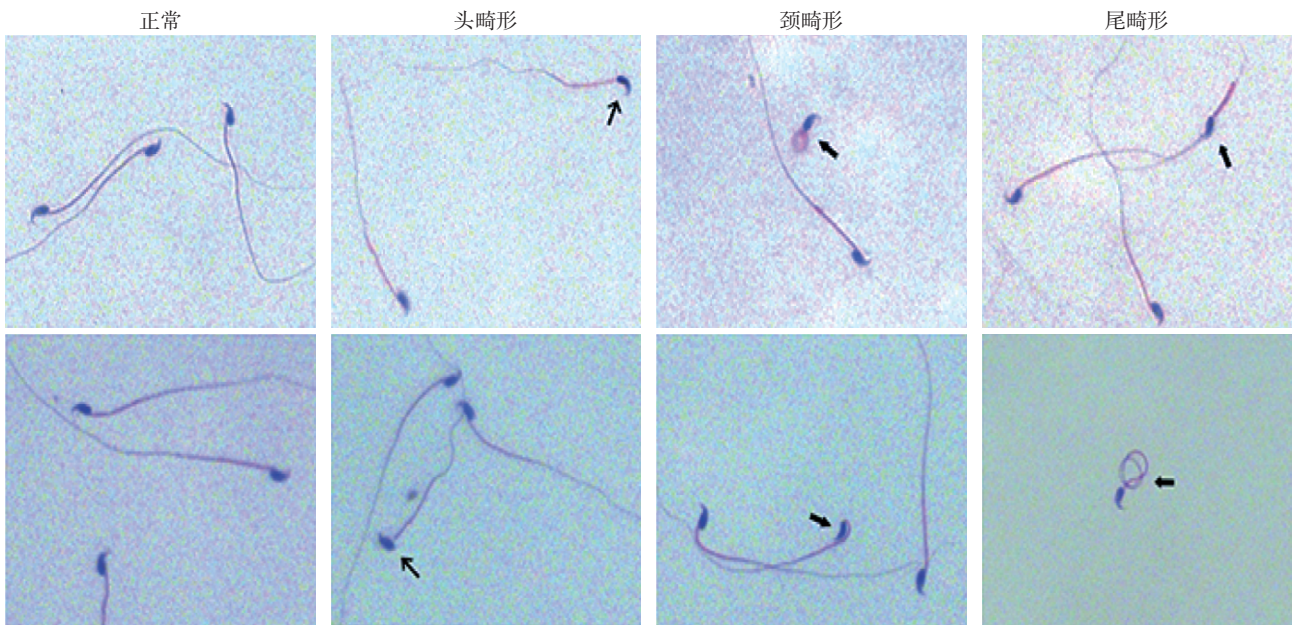
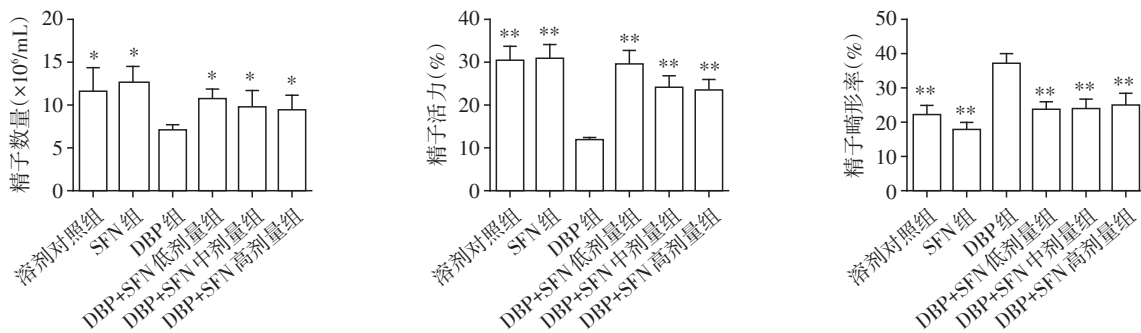


图4 精子畸形示意图(HE,×400)

Figure 4 Images of normal and deformed spermatozoa (HE, ×400)



与DBP组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图5 DBP及SFN对各组精子数量、活力、畸形率的影响

Figure 5 Effects of DBP and SFN supplementation on total sperm count, total motility and percentage of abnormal sperm

建立实验动物模型是研究人类各种疾病发生、发展规律,探索新的治疗途径不可缺少的工具及重要的手段。因此本研究选择雄性小鼠生长发育的敏感时期,以DBP和SFN成功构建了小鼠的染毒和

抗毒模型,为揭示DBP生殖毒性及SFN保护作用的具体机制提供了基础。AGD、AGD/体重、睾丸重量和睾丸脏器指数等指标可反映生殖器的发育情况以及评估DBP的毒性作用。本研究中DBP组的

AGD/体重这一指标明显低于溶剂对照组,差异有统计学意义。其他几项指标虽然差异不显著,但仍显示出降低的趋势。睾丸切片结果提示与溶剂对照组相比,DBP可明显减少曲细精管中精子发生细胞数量,降低曲细精管直径,损伤支持细胞,曲细精管之间联系不紧密。DBP+SFN低剂量组则能够明显改善因DBP导致小鼠睾丸组织的病变。此外,DBP组的精子计数、活力均低于其余各组,畸形率最高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。这些结果提示,小鼠生殖系统已受到毒性损害作用。而DBP+SFN低剂量组不管是在AGD、AGD/体重、睾丸重量和睾丸脏器指数这些指标方面,还是在精子计数、活力及畸形率方面均优于DBP组,差异有统计学意义。这表明SFN能够抵抗DBP的毒性作用。DBP+SFN不同剂量组之间比较发现,各指标差异并无显著意义,说明SFN的剂量可能与其发挥保护效力之间无明显联系,但DBP+SFN低剂量组显示出更优的保护作用趋势,提示SFN可能具有一个最适作用剂量。

总的来说,本研究成功构建小鼠DBP染毒及SFN抗毒模型,为进一步探讨DBP毒性作用和SFN保护作用提供了合适的动物实验模型,也为环境污染可造成生殖系统损害提供了科学依据。同时SFN是否通过抗氧化应激途径抵抗DBP毒性作用还需分子水平研究进一步证实。

[参考文献]

[1] Fang CR, Long YY, Shen DS. Sorption behavior of dibutyl phthalate and dioctyl phthalate by aged refuse [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2014, 21(12): 7641-7649

[2] Chatonnet P, Boutou S, Plana A. Contamination of wines and spirits by phthalates: types of contaminants present, contamination sources and means of prevention [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2014, 31(9): 1605-1615

[3] Houghton CA, Fassett RG, Coombes JS. Sulforaphane: translational research from laboratory bench to clinic [J]. *Nutr Rev*, 2013, 71(11): 709-726

[4] Shen B, Wang W, Ma L, et al. Sulforaphane restores oxidative stress induced by di-N-butylphthalate in testicular Leydig cells with low basal reactive oxygen species levels [J]. *Urology*, 2014, 84(4): 850-856

[5] 张炜,袁琳,吴婷,等.邻苯二甲酸二丁酯诱导尿道下裂大鼠模型的建立及其作用机制[J].*中华实验外科杂志*, 2005, 22(2): 246-248

[6] Noriega NC, Howdeshell KL, Furr J, et al. Pubertal administration of DEHP delays puberty, suppresses testosterone production, and inhibits reproductive tract development in male Sprague-Dawley and Long-Evans rats [J]. *Toxicol Sci*, 2009, 111(1): 163-178

[7] Nordkap L, Joensen UN, Blomberg JM, et al. Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 355(2): 221-230

[8] Aly HA, Hassan MH, El-Beshbishy HA, et al. Dibutyl phthalate induces oxidative stress and impairs spermatogenesis in adult rat [J]. *Toxicol Ind Health*, 2016, 32(8): 1467-1477

[9] Shen B, Wang W, Ding L, et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 rescues the oxidative stress induced by di-N-butylphthalate in testicular Leydig cells [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2015, 34(2): 145-152

[10] Piao MS, Park JJ, Choi JY, et al. Nrf2-dependent and Nrf2-independent induction of phase 2 detoxifying and antioxidant enzymes during keratinocyte differentiation [J]. *Arch Dermatol Res*, 2012, 304(5): 387-395

[11] Boddupalli S, Mein JR, Lakkanna S, et al. Induction of phase 2 antioxidant enzymes by broccoli sulforaphane: perspectives in maintaining the antioxidant activity of vitamins A, C, and E [J]. *Front Genet*, 2012, 3: 7

[收稿日期] 2017-11-03