

◇ 预防医学研究 ◇

青春期暴露氰戊菊酯对小鼠海马雄激素受体和雌激素受体的影响

赵莹莹¹, 代波¹, 王华², 张程², 徐德祥², 孟秀红¹

摘要 目的 探讨青春期小鼠暴露氰戊菊酯(Fen)对其大脑海马的雄激素受体(AR)和雌激素受体 α (ER α)、雌激素受体 β (ER β)蛋白表达水平的影响。方法 选取60只3周龄ICR小鼠,随机均分为空白组、溶剂对照组、Fen(0.02、0.2、2 mg/kg)处理组,每组雌雄各半,在出生后28~56 d里,Fen处理组给予相应量的Fen,溶剂对照组给予等容积的玉米油,空白组不予任何处理。灌胃4周后处死小鼠,取其大脑海马组织,采用Western blot法测定海马AR、ER α 和ER β 的表达水平。结果 ①青春期暴露Fen引起雄鼠海马AR表达明显升高,雌鼠海马AR表达未发生显著性改变;②青春期暴露Fen雄鼠海马ER α 和ER β 表达组间差异无统计学意义,雌鼠海马ER α 和ER β 表达亦无显著变化。结论 青春期暴露Fen干扰雄性小鼠海马AR的表达。

关键词 青春期; 海马; 雄激素受体; 雌激素受体

中图分类号 R 977.12; R 179; R 322.811

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)04-0464-04

氰戊菊酯(fenvalerate, Fen)属于II型拟除虫菊酯类杀虫剂,近些年由于其高效、光谱、低残留等特点而广泛用于工农业生产中。有研究^[1]证明,青春期暴露Fen可干扰小鼠大脑皮层睾酮(testosterone, T)和雌二醇(estradiol, E₂)合成。大脑皮层和海马均可合成T和E₂的各种关键酶,这些酶在维持大脑性分化和神经行为发育的过程中起重要的作用^[2]。有研究^[3]显示,成年期大鼠的循环雄激素和雌激素水平至少有一部分是通过雄激素受体(androgen receptor, AR)来调节。该研究通过检测青春期小鼠暴露Fen对海马AR、雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α)和雌激素受体 β (estrogen receptor β , ER β)的影响,旨在阐明Fen对小鼠海马的内分泌干

扰作用及其分子机制,为深入探讨其他环境内分泌干扰物的作用机制提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 60只3周龄SPF级ICR小鼠,雌雄各半,购于安徽省医学实验动物中心,适应性喂养1周。雌雄鼠分笼饲养,饲养环境为昼夜12 h交替,室内温度维持在20~25℃,湿度控制在50%~60%。

1.2 主要试剂 Fen、其他生化试剂均购自美国Sigma公司; AR、ER α 和ER β 一抗抗体购自美国Santa Cruz或美国Upstate公司。

1.3 实验动物处理 60只ICR小鼠随机均分为空白组、溶剂对照组、Fen(0.02、0.2、2 mg/kg)处理组,每组雌雄各半,在出生后28~56 d里,Fen(0.02、0.2、2 mg/kg)处理组按小鼠体重1%通过灌胃给予Fen,溶剂对照组给予等体积的玉米油,空白组不予处理。在56 d时处死小鼠,取其大脑海马组织置于-80℃。采用Western blot法测定海马中AR、ER α 、ER β 蛋白表达水平。

1.4 Western blot法分析 大脑海马用RIPA裂解液提取总蛋白,两次15 000 r/min离心15 min,Lowry法测总蛋白含量,对样本进行蛋白定量后用98℃10 min进行蛋白变性。以蛋白含量100 μ g/孔的样品经过15%聚丙烯酰胺凝胶电泳3.5 h后再以平行电泳方式转移到活化后的PVDF膜上。置于5%脱脂牛奶中4℃封闭过夜。次日用1:1 000的小鼠抗兔的多克隆抗体AR、ER α 、ER β 和兔抗小鼠的 β -actin室温孵育2~3 h,用DPBST溶液洗涤4次,每次10 min,再用DPBS洗涤10 min。洗涤后的PVDF膜用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG抗体(1:40 000~80 000)孵育1~2 h,再用DPBST洗膜。最后用增强化学发光ECL试剂盒进行检测,用X线片显影,以 β -actin作为内参。

1.5 统计学处理 采用SPSS 13.0统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料用方差分析。

2013-10-10 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:11040606M185);国家自然科学基金(编号:81102155、81172711)

作者单位:安徽医科大学公共卫生学院¹ 儿少与妇幼保健学系、² 毒理学系,合肥 230032

作者简介:赵莹莹,女,硕士研究生;

孟秀红,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: mengxi-uhong@163.com

2 结果

2.1 青春期小鼠体重 小鼠生长发育状况良好,毛色正常,平均饮水量和饲料摄入量差异无统计学意义。青春期阶段均无疾病、感染和死亡现象,Fen (0.02、0.2、2 mg/kg) 处理组小鼠体重与溶剂对照组体重相比差异无统计学意义,见表1。

表1 青春期Fen暴露对小鼠体重的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	PND28	PND35	PND42	PND49	PND56
空白(雄性)	23.2±1.1	26.8±2.9	28.9±3.3	30.7±3.9	31.4±3.5
溶剂对照(雄性)	24.1±1.6	28.8±3.0	29.3±1.8	30.8±2.1	31.8±2.0
氟戊菊酯(雄性,mg/kg)					
0.02	23.1±1.1	27.1±1.9	27.9±1.8	29.9±2.0	30.1±1.6
0.2	23.2±2.3	28.2±3.0	29.8±3.0	31.4±3.0	32.0±3.2
2	23.5±2.0	27.8±3.2	29.7±3.1	31.2±3.3	30.1±3.2
空白(雌性)	22.2±2.5	24.8±3.2	25.3±2.0	27.3±2.6	28.9±2.5
溶剂对照(雌性)	22.3±1.3	26.1±2.3	26.1±2.1	28.0±1.7	29.1±1.9
氟戊菊酯(雌性,mg/kg)					
0.02	21.3±1.1	25.1±1.3	25.9±1.3	27.1±1.1	27.7±1.3
0.2	21.7±1.3	26.3±1.5	26.9±1.7	28.5±1.9	29.5±2.7
2	21.1±0.8	24.4±1.1	25.3±1.2	26.8±1.1	27.6±1.6

注: PND 为出生后天数

2.2 小鼠大脑海马 AR 蛋白表达 青春期暴露 Fen (0.02、0.2、2 mg/kg) 4 周,雄性 Fen (0.2、2 mg/kg) 处理组 AR 蛋白表达均出现明显上调,与溶剂对照组相比差异有统计学意义(P<0.01);而雌性 Fen (0.02、0.2、2 mg/kg) 处理组和雄性 Fen (0.02 mg/kg) 处理组与溶剂对照组比较,差异无统计学意义,见图1。

2.3 小鼠大脑海马 ER α 蛋白表达 青春期暴露 Fen (0.02、0.2、2 mg/kg) 4 周,雄性 Fen (0.02、0.2、2 mg/kg) 处理组和雌性 Fen (0.02、0.2、2 mg/kg) 处理组 ER α 蛋白表达与溶剂对照组比较,差异均无统计学意义,见图2。

2.4 小鼠大脑海马 ER β 蛋白表达 青春期暴露 Fen (0.02、0.2、2 mg/kg) 4 周,青春期各处理组雄性小鼠和雌性小鼠 ER β 蛋白表达与溶剂对照组比较,差异均无统计学意义,见图3。

3 讨论

Fen 是一种潜在的环境内分泌干扰物。该研究探讨了青春期接触 Fen 对小鼠海马的内分泌干扰作用。体外实验^[4]表明 Fen 具有微弱的拟雌激素活性。有研究^[5]表明,孕期母鼠暴露于 Fen,其子代雄性小鼠血清和睾丸中的T水平明显下降。另外有

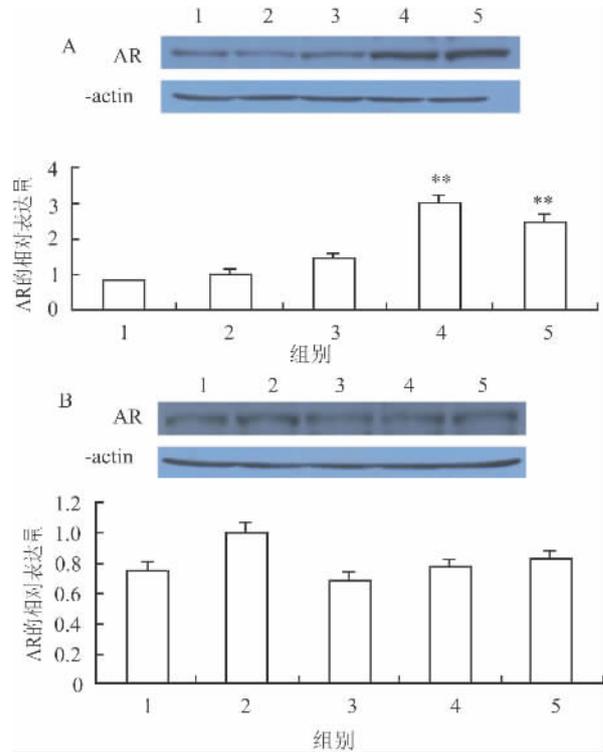


图1 青春期暴露Fen对小鼠大脑海马AR的影响

A: 4周雄鼠; B: 4周雌鼠; 1: 空白组; 2: 溶剂对照组; 3: Fen 0.02 mg/kg 处理组; 4: Fen 0.2 mg/kg 处理组; 5: Fen 2 mg/kg 处理组; 与溶剂对照组比较: ** P<0.01

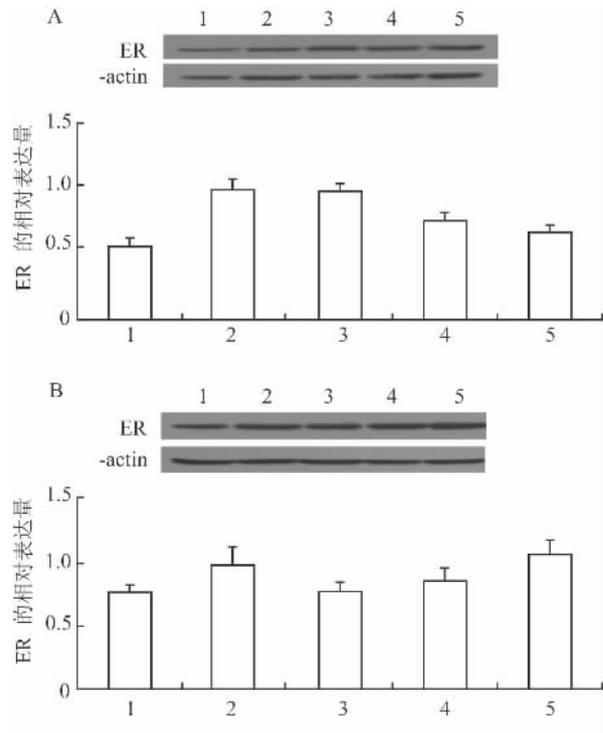


图2 青春期暴露Fen对小鼠大脑海马ER α 的影响

A: 4周雄鼠; B: 4周雌鼠; 1: 空白组; 2: 溶剂对照组; 3: Fen 0.02 mg/kg 处理组; 4: Fen 0.2 mg/kg 处理组; 5: Fen 2 mg/kg 处理组

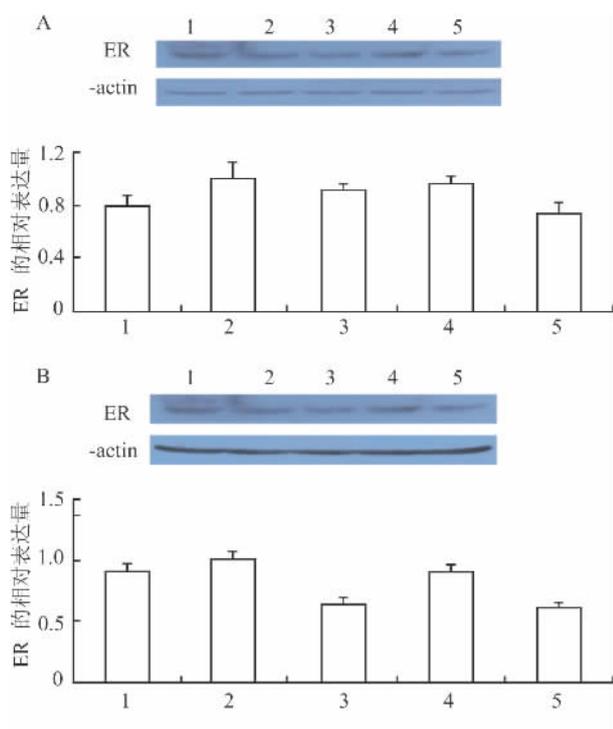


图3 青春期暴露 Fen 对小鼠大脑海马 ERβ 的影响

A: 4 周雄鼠; B: 4 周雌鼠; 1: 空白组; 2: 溶剂对照组; 3: Fen 0.02 mg/kg 处理组; 4: Fen 0.2 mg/kg 处理组; 5: Fen 2 mg/kg 处理组

研究^[6]显示,青春期及成年早期小鼠暴露 Fen 60 mg/kg 明显降低血清和睾丸中 T 含量。另有研究^[7]表明,青春期暴露 Fen 影响小鼠大脑皮层 T 和 E₂ 水平,并上调大脑皮层 AR 的蛋白表达水平。Du et al^[8]利用荧光素酶报告基因的方法得出 Fen 是 AR 的拮抗剂,能抑制 AR 和雄激素结合,并且可以通过 AR、ER 干扰内分泌系统。

该研究探讨了青春期暴露 Fen 对小鼠海马 AR、ERα 和 ERβ 蛋白表达的影响。有研究^[7]显示,青春期暴露高剂量 Fen (7.5、30 mg/kg) 2 周和 4 周显示雌性小鼠大脑皮层 AR 蛋白表达均明显上调,而青春期暴露 Fen 4 周后,雄鼠大脑皮层 AR (7.5、30 mg/kg) 和 ERβ 30 mg/kg 蛋白表达明显上调。该实验青春期低剂量暴露 Fen (0.2、2 mg/kg) 4 周上调雄性小鼠海马的 AR 蛋白表达水平,但雌性小鼠 AR 及雄鼠和雌鼠的 ERα、ERβ 蛋白表达水平变化差异无统计学意义。

有研究^[9-10]显示,大脑皮层和海马合成的 T 通过神经元表达的 AR 和 ERα、ERβ 维持雄(男)性神经行为的正常发育,大脑皮层和海马神经元 AR 的选择性失活则损害雄性小鼠神经行为发育。另有研

究^[11]显示,大脑皮层和海马神经元 CYP19 和 ERα 选择性失活损害攻击性行为,提示雌激素和 ERs 在神经行为发育过程也起重要作用。其他的环境内分泌干扰物,比如双酚 A (bisphenol A, BPA) 在脑发育关键期接触低剂量 BPA 干扰大脑皮层和海马甾体激素合成,并导致探索和情绪行为发育障碍^[12]。

参考文献

- [1] 刘萍,孟秀红,王华等. 青春期氟戊菊酯暴露对小鼠大脑皮层性激素的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(7): 627-30.
- [2] Paus T, Nawaz-Khan I, Leonard G, et al. Sexual dimorphism in the adolescent brain: Role of testosterone and androgen receptor in global and local volumes of grey and white matter [J]. Horm Behav, 2010, 57: 63-75.
- [3] Sandstrom N J, Kim J H, Wasserman M A. Testosterone modulates performance on a spatial working memory task in male rats [J]. Horm Behav, 2006, 50: 18-26.
- [4] Lemaire G, Mnif W, Mauvais P, et al. Activation of α- and β-estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines [J]. Life Sciences, 2006, 79(12): 1160-9.
- [5] Zhang H, Wang H, Ji Y L, et al. Lactational fenvalerate exposure permanently impairs testicular development and spermatogenesis in mice [J]. Toxicol Lett, 2009, 191: 47-56.
- [6] Zhang H, Wang H, Wang Q, et al. Pubertal and early adult exposure to fenvalerate disrupts steroidogenesis and spermatogenesis in mice at adulthood [J]. J Appl Toxicol, 2010, 30(4): 369-77.
- [7] Liu P, Meng X H, Wang H, et al. Effects of pubertal fenvalerate exposure on testosterone and estradiol synthesis and the expression of androgen and estrogen receptors in the developing brain [J]. Toxicol Lett, 2011, 201(2): 181-9.
- [8] Du G, Shen O, Sun H, et al. Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays [J]. Toxicological Sciences, 2010, 116: 58-66.
- [9] Zuloaga D G, Morris J A, Jordan C L, et al. Mice with the testicular feminization mutation demonstrate a role for androgen receptors in the regulation of anxiety-related behaviors and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis [J]. Horm Behav, 2008, 54(5): 758-66.
- [10] Lagunas N, Calmarza-Font I, Grassi D, et al. Estrogen receptor ligands counteract cognitive deficits caused by androgen deprivation in male rats [J]. Horm Behav, 2011, 59(4): 581-4.
- [11] Bakker J, Honda S, Harada N, et al. Sexual partner preference requires a functional aromatase (cyp19) gene in male mice [J]. Horm Behav, 2002, 42(2): 158-71.
- [12] Gioiosa L, Fissore E, Ghirardelli G, et al. Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice [J]. Horm Behav, 2007, 52(3): 307-16.

三氯乙烯对小鼠肝脏 PPAR α 和 PPAR γ 表达的影响

侯菲菲¹ 沈彤¹ 王进¹ 房魏¹ 张澄² 朱启星²

摘要 目的 探讨饮水摄入三氯乙烯(TCE)对小鼠肝脏过氧化物酶体增殖物活化受体(PPAR) α 和PPAR γ 的影响。方法 雌性BALB/c小鼠随机分为空白对照组、溶剂对照组、2.5 g/L TCE组和5.0 g/L TCE组,TCE经饮水暴露。分别在第2、4、8、12周时,取外周血检测肝功能;处死小鼠取肝脏组织,HE染色进行病理观察;分别采用实时荧光定量RT-PCR法和免疫组化法检测PPAR α 和PPAR γ 的mRNA水平和蛋白表达。结果 与空白对照组及溶剂对照组比较,2.5、5.0 g/L TCE组小鼠谷丙转氨酶(ALT)水平在第2、4周明显升高($P < 0.05$);HE染色显示2.5、5.0 g/L TCE组小鼠肝脏组织有明显炎细胞浸润及肝细胞变性,肝损伤在4周时最明显;与空白对照组及溶剂对照组比较,2.5、5.0 g/L TCE组小鼠肝脏中PPAR α 和PPAR γ mRNA表达量在4、8、12周时明显上升($P < 0.05$, $P < 0.01$);2.5、5.0 g/L TCE组小鼠肝脏组织细胞核中均见PPAR α 和PPAR γ 的阳性表达,与空白对

照组及溶剂对照组比较,各时期肝脏细胞核PPAR α 和PPAR γ 的阳性表达率显著上升($P < 0.05$)。结论 饮水摄入TCE能上调小鼠肝脏PPAR α 和PPAR γ 表达。

关键词 三氯乙烯; PPAR α ; PPAR γ ; 肝毒性

中图分类号 R 114

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)04-0467-05

三氯乙烯(trichloroethylene, TCE)是工业上广泛应用的氯代类有机溶剂,除职业暴露外,由于大量应用加之处置不当,其已大量进入大气、土壤和地下水系统,成为一种重要的环境污染物^[1]。职业环境中TCE暴露主要通过呼吸道和皮肤,而普通人群中TCE暴露主要是通过饮水摄入。TCE可引起机体多脏器损害,在TCE职业暴露人群中发生的TCE药疹样皮炎,患者在出现严重皮肤损害的同时还表现出明显的肝脏损害^[2]。研究^[3]显示长期TCE摄入主要引起肝脏毒性,目前TCE长期暴露引起肝脏毒性的具体机制还不清楚。研究^[4]表明许多环境毒物所致肝脏毒性与其诱导核受体超家族转录因子过氧化物酶体增殖物活化受体(peroxisome proliferator activated receptors, PPARs)表达相关。该研究通过检测经饮水摄入TCE小鼠肝脏损伤和肝脏中PPAR α

2013-11-25 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:11040606M213);教育部科学技术研究重点项目(编号:210100)

作者单位:安徽医科大学公共卫生学院¹卫生毒理学系、²劳动卫生与环境卫生系,合肥 230032

作者简介:侯菲菲,女,硕士研究生;

沈彤,男,博士,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: ahmusht@163.com

Effects of pubertal fenvalerate exposure on androgen receptor and estrogen receptors in hippocampus of mice

Zhao Yingying¹, Dai Bo¹, Wang Hua², et al

(¹Dept of Maternal, Child & Adolescent Health, ²Dept of Toxicology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effects of pubertal fenvalerate exposure on the expression of androgen receptor (AR) and estrogen receptors (ERs) in hippocampus. **Methods** 60 male and female mice in postnatal day (PND) 28 were randomly divided into five groups: the blank group, the control group and fenvalerate (0.02, 0.2, 2 mg/kg) group. Pubertal male and female mice in treatment groups were treated with fenvalerate (0.02, 0.2, 2 mg/kg) by gavage daily from PND28 to PND56, while the blank gave nothing and controls received corn oil. After four weeks, the mice were sacrificed, then hippocampus was excised. Protein expression of AR, two estrogen receptors (ER α and ER β) in hippocampus were analyzed by Western blot. **Results** In males, the protein expression of AR in hippocampus was markedly upregulated in pubertal fenvalerate exposure. In females, the protein expression of AR in hippocampus was of no statistically significant differences between groups. There was no statistically significant difference of the ER α and ER β protein expression among all the sexual groups. **Conclusion** Pubertal fenvalerate exposure disrupts AR expression in hippocampus of mice.

Key words puberty; hippocampus; androgen receptor; estrogen receptors