论著

文章编号:1000-5404(2006)12-1326-04

# 邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯对原代培养小鼠胚胎睾丸Leydig细胞功能影响研究

宋晓峰,魏光辉,邓永继,陈 璇,刘 星,张德迎 (重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科,重庆 400014)

**提 要:目的** 探讨邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯[Di(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP]对体外培养的小鼠胚胎睾丸间质细胞(Leydig细胞)3β-羟基类固醇脱氢酶(3β-HSD)活性及睾酮合成的影响。**方法** 小鼠胚胎Leydig细胞原代培养。DEHP染毒剂量分别为25、50、100、200 mg/L,通过检测睾酮合成关键酶3β-HSD活性、放免法测定培养液中睾酮浓度,研究DEHP对Leydig细胞功能影响。**结果** 小鼠胚胎Leydig细胞分离培养后,纯度和存活率分别达(81.17±2.32)%、(80.88±2.80)%。DEHP(25 mg/L)处理12 h,或DEHP(50 mg/L)处理6 h后,实验组与对照组比较3β-HSD酶活性明显降低($P<0.05$),随着时间延长和药物浓度增加差异更显著($P<0.01$)。DEHP50、100 mg/L实验组,在12、24 h的睾酮水平明显低于对照组($P<0.05$)或($P<0.01$),存在时间-效应关系;DEHP 200 mg/L实验组在6、12、24 h与对照组比较均有非常显著差异($P<0.01$),并可观察到Leydig细胞明显的形态学改变。**结论** DEHP能影响原代培养小鼠胚胎Leydig细胞3β-羟基类固醇脱氢酶活性,并抑制睾酮合成,存在时间-效应和剂量-效应关系。

**关键词:** 邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯;胚胎;Leydig细胞;睾酮;3β-羟基类固醇脱氢酶
**中图法分类号:** R322.64;R329.25;R994.6 **文献标识码:** A

# Effect of Di(2-ethylhexyl)phthalate on Leydig cells from embryonic mouse testis

SONG Xiao-feng, WEI Guang-hui, DENG Yong-ji, CHEN Xuan, LIU Xing, ZHANG De-ying (Department of Urinary Surgery, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on testosterone secretion and activity of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) in Leydig cells cultured from the embryonic mouse testis. **Methods** The Leydig cells were isolated from fetal mouse testis and were cultured in DMEM/F12 medium. The identification and purity of Leydig cells were assessed by detecting 3β-HSD. After the Leydig cells were treated with 25, 50, 100, 200 mg/L DEHP for 6, 12 or 24 h, the cell viability was measured by using trypan blue, and the 3β-HSD activity and the testosterone level in the medium of the cultured Leydig cells by radioimmunoassay were measured. **Results** The purity and viability of Leydig cells were (81.17±2.32)% and (80.88±2.80)%. Activities of the steroidogenic enzymes 3β-HSD decreased significantly when treated with 25 mg/L or 50 mg/L DEHP for 12 h or 6 h as compared to controls ($P<0.05$), and decreased more significantly when DEHP concentration increased and treatment time prolonged ($P<0.01$). The testosterone level decreased significantly when treated by 50 mg/L and 100 mg/L DEHP for 12 and 24 h as compared with the control group ($P<0.05$ or $P<0.01$) in a time-dependent and dose-dependent effect. The 3β-HSD activity and the testosterone level of the Leydig cells were of significant difference when treated by 200 mg/L DEHP as compared with the controls, with obvious morph changes of Leydig cells. **Conclusion** DEHP affected the activity of 3β-HSD enzyme and Leydig cell proliferation. DEHP suppressed testosterone synthesis of the fetal mouse Leydig cells in primary culture in a dose-dependent and time-dependent effect.

**Key words:** Di(2-ethylhexyl)phthalate; fetus; Leydig cell; testosterone; 3β-HSD

邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯[Di(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP],是邻苯二甲酸酯类化合物(PAE)中的一种,是公认的环境内分泌干扰物(environmental endocrine disruptors, EEDs)。作为塑料工业中应用最广泛的增塑剂,DEHP大量应用于各种塑料产品如纤维素树脂、聚乙烯和聚氯乙烯(PVC)、食品包装材料以

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371475)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371475)
作者简介:宋晓峰(1970-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事环境污染源与小儿先天性疾病相关性方面的研究。电话:(023)66696467
通讯作者:魏光辉,E-mail: ghwei@public.cta.cq.cn,电话:(023)63631928
收稿日期:2005-07-01;修回日期:2005-09-25

及医用材料中。DEHP 极易从塑料制品中释放，可通过多种途径进入人体，DEHP 及其代谢物 MEHP 对机体包括生殖系统在内的多个系统均有毒性作用，可导致机体畸形、癌变等。Leydig 细胞是 DEHP 作用的靶细胞之一。在胚胎期和新生期，动物生殖系统的分化发育依赖于主要来源于 Leydig 细胞的一定浓度的睾酮水平，推测 DEHP 对 Leydig 细胞的作用会引起睾酮分泌能力变化，从而导致泌尿生殖系统先天性畸形等疾病[1-3]。探讨 DEHP 对 Leydig 细胞睾酮合成关键酶活性及对睾酮分泌功能的影响、DEHP 对胚胎期雄性动物的生殖毒性、先天性畸形的发生机制以及 DEHP 的效应机制等成为研究热点。

## 1　材料与方法

### 1.1　实验动物

健康昆明小鼠 6 周龄，体质量 30 g 左右，雌性 20 只，雄性 10 只，由重庆医科大学实验动物中心提供，合格证号为 SCXK(渝)20020001。孕期计算以成年雌雄小鼠合笼后，雌鼠见阴栓为受孕 0 d。取孕 16 d 的母鼠子宫内的雄性胎鼠睾丸为细胞来源。

### 1.2　主要试剂和仪器

DMEM/F12(Hyclone 公司)，胎牛血清(天津 TBD 公司)，脱氢表雄酮(Sigma 公司)，睾酮测定试剂盒(潍坊 3V 生物工程集团有限公司)，细胞离心涂片机(statspin 公司)，DEHP(上海化学试剂有限公司)，解剖显微镜(Nikon 公司)，倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)，显微镜数码照相系统(日本 Olympus 公司)，图像分析系统(北航 CM-2000B 型生物医学图像分析系统)。

### 1.3　实验方法

1.3.1　Leydig 细胞的分离，培养　脱颈椎处死孕 16 d 的母鼠，消毒后打开腹腔，暴露子宫，取出胎鼠；解剖显微镜下，游离雄性胎鼠睾丸，小心剥除睾丸白膜并将精曲小管轻轻拨散，将精曲小管置于含有 0.03% Ⅰ型胶原酶的 DMEM/F12 培养液中，吸管轻轻吹打 10 min，使精曲小管散开成絮网状，然后加入等量冰上预冷的培养液终止消化。消化后的细胞悬液用 100 目不锈钢网过滤，收集过滤液1 000 r/min离心 10 min，弃上清，沉淀物用 DMEM/F12 培养液制成细胞悬液，用血球计数板计数，检测细胞密度。台盼蓝染色计数细胞活率。将细胞悬液接种到放有盖玻片的培养板内。培养条件：5% $CO_2$，95% 空气，37 ℃饱和水蒸气。

1.3.2　Leydig 细胞鉴定及纯度测定　采用 3β-羟基类固醇脱氢酶(HSD)染色法。参照 Machluf[4] 介绍的方法并适当改进。将培养前的睾丸间质细胞悬液和培养 72 h 后的贴壁细胞经 0.25% 胰酶消化后重新制作的细胞悬液，分别用离心涂片机制成均匀的细胞涂片，将细胞涂片和细胞爬片放入染色液中 2 h，pH 7.2、0.1 mol/L PBS 液冲洗 2 次，10% 甲醛固定 5 min，双蒸水冲洗后，细胞涂片用苏木精-伊红(HE)复染，中性树脂封片，显微镜下观察。细胞内出现紫蓝色、大小均匀的颗粒者为阳性细胞，即 Leydig 细胞。计数阳性细胞和阴性细胞数，计算 Leydig 细胞纯度。

1.3.3　DEHP 对胎鼠 Leydig 细胞 3β-羟基类固醇脱氢酶活性及睾酮分泌的影响　在放有爬片的 6 孔培养板每孔内加入 Leydig 细胞 2.5 ml，细胞浓度为 $2\times10^5$/ml(培养液内不含胎牛血清)，培养 48 h 后换液并加入不同浓度的 DEHP 血清溶液 20 μl(DEHP 浓度及作用时间参照文献[5]，并适当调整)，DEHP 在培养液内的终浓度分别为 25、50、100、200 mg/L，溶剂对照组加入20 μl血清。不同浓度 DEHP 为一组，继续培养 6、12、24 h，在不同时间点分别从实验组、溶剂对照组和空白对照组中取出 4 个平行孔中爬片，3β-HSD 染色，同时各孔内培养液离心，取上清液，放射免疫法测定睾酮浓度，操作步骤按试剂盒说明书进行。

光镜下观察 3β-HSD 活性：高度密集、深紫蓝色、大小均匀的颗粒为强阳性反应；中度密集、紫蓝色、大小均匀的颗粒为阳性反应；稀疏的浅紫蓝色、大小均匀的颗粒为弱阳性反应；无颗粒，为阴性反应。

图像分析：选取强阳性和阳性反应的紫蓝色颗粒，每张爬片随机选择 5 个 400 倍视野，统计紫蓝色颗粒平均光密度值反映酶活性高低。

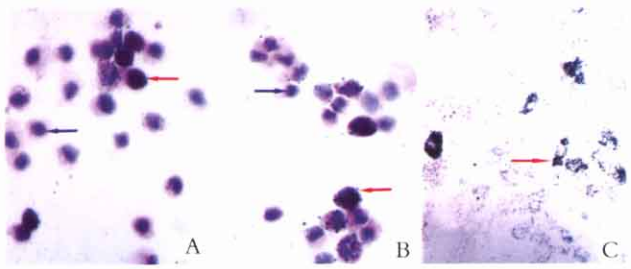
### 1.4　统计学分析

数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示，SPSS 12.0 统计软件 $t$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　Leydig 细胞鉴定、形态学观察

睾丸组织消化后的细胞悬液台盼蓝染色显示细胞存活率为(80.88±2.80)%。培养前的细胞悬液、培养 72 h 后胰酶消化贴壁细胞重新制作的细胞悬液以及培养 72 h 的细胞爬片经 3β-HSD 染色，Leydig 细胞纯度分别为(45.10±1.66)%，(81.17±2.32)% 和(81.54±1.58)%，($n$=10)，见图 1。



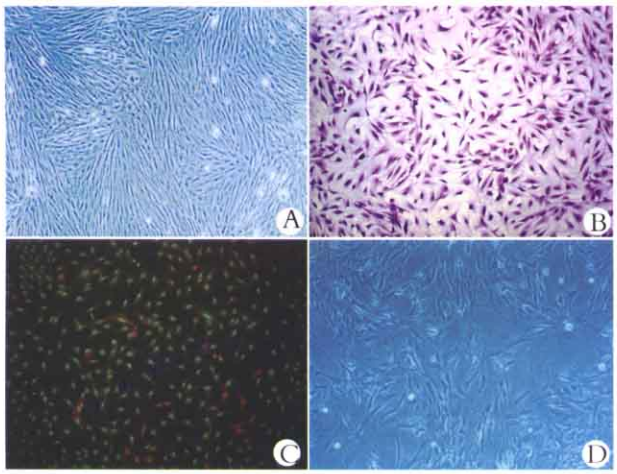

红色箭头：leyding 细胞；蓝色箭头：其他细胞

A：培养前 Leydig 细胞；B：培养 72 h 的 Leydig 细胞；C：培养 72 h 的 Leydig 细胞爬片

**图 1　睾丸 Leydig 细胞形态学观察**　(3β-HSD ×200)

Leydig 细胞接种后 1～2 h 内开始发生极化，细胞质铺开，伸出突起。培养 6 h 左右大部分细胞贴壁生长。光镜下见贴壁细胞透明，基本无颗粒，细胞轮廓清楚，增殖的细胞呈纤维细胞样生长，相互连接成单层膜状，3～4 d 完全汇合(图 2A)。HE 染色及吖啶橙染色荧光显微镜下观察，Leydig 细胞核呈圆形或卵圆形，嗜碱性，大多位于细胞中央；核仁 1～2 个，清晰可见，一般位于核的边缘部；其细胞质轮廓为多角形，一般有 3～4 个突起(图 2B、C)。加入一定浓度 DEHP 并作用相当时间后细胞

增殖速度变慢，细胞轮廓变明显，细胞质粗糙，内有颗粒堆积，并出现空泡。严重者细胞增殖停止，贴壁细胞脱落，浮起，崩溃溶解（图2D）。




A：培养72 h的细胞（倒置相差显微镜×200）；B：培养72 h的细胞（HE×200）；C：培养72 h的细胞（荧光显微镜，吖啶橙染色 ×200）；D：DEHP（200 mg/L）处理24 h的细胞（倒置相差显微镜 ×200）

**图2 显微镜下Leydig细胞形态**

## 2.2 DEHP对Leydig细胞3β-羟基类固醇脱氢酶活性的影响

由表1可见，溶剂对照组与空白对照组在各个时间点均没有显著性差异（$P>0.05$），在较低浓度（25 mg/L）和较短的作用时间内（12 h）实验组与对照组比较，3β-羟基类固醇脱氢酶活性明显降低（$P<0.05$），随着时间延长和药物浓度增加差异更显著（$P<0.01$）。实验组两两比较显示，高剂量组（DEHP 200 mg/L）与低剂量组（DEHP 25 mg/L）差异具有显著（或非常显著）意义（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；高剂量组（DEHP 200 mg/L）与较高剂量组（DEHP 100 mg/L）在6 h以后的时间点无显著差异（$P>0.05$）。

**表1 各实验组Leydig细胞3β-羟基类固醇脱氢酶活性比较（$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | 培养时间（$t$/h） | | |
|---|---|---|---|
| | 6 | 12 | 24 |
| 空白对照组 | 0.200±0.183 | 0.213±0.017 | 0.215±0.013 |
| 溶剂对照组 | 0.205±0.191 | 0.218±0.022 | 0.220±0.018 |
| DEHP 25 mg/L | 0.198±0.015 | 0.188±0.017$^{a}$ | 0.173±0.010$^{a}$ |
| DEHP 50 mg/L | 0.183±0.009 | 0.180±0.008$^{a}$ | 0.168±0.013$^{b}$ |
| DEHP 100 mg/L | 0.165±0.012$^{a}$ | 0.142±0.015$^{bc}$ | 0.140±0.014$^{bc}$ |
| DEHP 200 mg/L | 0.150±0.022$^{acef}$ | 0.135±0.006$^{bce}$ | 0.130±0.008$^{bd}$ |

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与DEHP 25 mg/L组比较；e：$P<0.05$，与DEHP 50 mg/L组比较；f：$P<0.05$，与DEHP 100 mg/L组比较

## 2.3 DEHP对Leydig细胞分泌睾酮水平的影响

Leydig细胞在培养液内不断增殖并分泌睾酮，DEHP对Leydig细胞睾酮分泌能力有影响。如表2可见，DEHP 25 mg/L组、溶剂对照组与空白对照组在6、12、24 h均无显著性差异（$P>0.05$）。DEHP 50、100 mg/L组随着药物作用时间延长，在12、24 h与对照组比较睾酮浓度明显低于对照组（$P<0.05$）或（$P<0.01$）；DEHP 200 mg/L组在6、12、24 h睾酮水平都显著低于对照组（$P<0.01$）。在药物作用的同一时间点，如12、24 h，实验组睾酮水平与对照组相比差异有随药物浓度增加而更显著的趋势。实验组两两比较显示，高剂量组（DEHP 200 mg/L）与低剂量组（DEHP 25 mg/L）在各个时间点差异均有非常显著意义（$P<0.01$）；高剂量组（DEHP 200 mg/L）与较高剂量组（DEHP 100 mg/L）在6 h时有显著差异（$P<0.05$）。

**表2 各实验组Leydig细胞分泌睾酮水平比较（nmol/L，$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | 培养时间（$t$/h） | | |
|---|---|---|---|
| | 6 | 12 | 24 |
| 空白对照组 | 6.07±1.11 | 7.86±0.80 | 8.73±0.38 |
| 溶剂对照组 | 6.27±0.76 | 7.97±0.14 | 8.35±0.80 |
| DEHP 25 mg/L | 6.20±0.38 | 7.45±0.31 | 7.83±0.69 |
| DEHP 50 mg/L | 5.58±0.41 | 5.93±0.21$^{a}$ | 7.56±0.24$^{a}$ |
| DEHP 100 mg/L | 5.16±0.39 | 5.79±0.42$^{ad}$ | 6.72±0.35$^{bce}$ |
| DEHP 200 mg/L | 3.19±0.35$^{bcdf}$ | 3.81±0.96$^{bce}$ | 4.06±0.31$^{bce}$ |

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.01$，与DEHP 25 mg/L组比较；d：$P<0.05$，e：$P<0.01$，与DEHP 50 mg/L组比较；f：$P<0.05$，与DEHP 100 mg/L组比较

## 3 讨论

DEHP是广泛应用的通用型增塑剂，大量存在于化工工业和日常生活中，可通过多种途径进入人和动物体内，危害机体健康，已构成“白色污染”的主要来源。我们前期研究发现环境污染物DEHP在雄性小鼠性分化的关键时期可诱导隐睾发生，其发生率与剂量存在一定的相关性[3]。

雄性生殖系统的分化发育依赖于相关的激素，其中最重要的是雄激素，即睾酮和双氢睾酮。动物体内的雄激素主要由Leydig细胞在黄体生成素（LH）刺激下分泌，睾酮可激发雄性生殖器官和第二性征发育，促进生精细胞分化。因此在胚胎期和新生期，Leydig细胞分泌的睾酮对生殖系统分化发育具有重要意义，如果睾酮水平不足，必然会引起依赖睾酮水平的组织器官发育障碍，导致泌尿生殖系统先天性畸形。

3β-羟基类固醇脱氢酶（3β-HSD）是甾体类激素合成的关键酶之一，在Leydig细胞中表达，是公认的Leydig细胞鉴定指标，同时其活性也可作为衡量Leydig细胞合成睾酮能力大小的一个重要的敏感指标。本实验中3β-HSD染色鉴定结果显示，培养72 h细胞爬片上Leydig细胞纯度在80%以上，同时观察到培养液中加入DEHP后，在低剂量（DEHP 25 mg/L）组3β-HSD活性与对照组相比即有显著差异，随着剂量增加和培养时间延长，其差异更为显著，表明该酶活性极易受到外源物质的影响，并且存在时间-效应关系和

浓度-效应关系。3β-HSD 活性降低，Leydig 细胞合成睾酮能力也下降。

Parks 等[6]研究发现，DEHP 作用于孕期大鼠，可影响其雄性仔鼠生殖系统发育，导致隐睾和尿道下裂，其机制之一就是降低胚胎睾酮合成，降低睾酮浓度的 60% ~85%，接近雌性动物的水平。另有文献报道体内实验中 DEHP 可引起 Leydig 细胞增生，严重者呈腺瘤样。推测是由于 DEHP 导致睾酮水平下降，下丘脑-垂体-睾丸轴负反馈调节，引起 Leydig 细胞反应性增生[7]。本实验中通过放免法检测培养液中睾酮水平，观察到 DEHP 对 Leydig 细胞功能存在影响，而且实验组药物浓度越大、作用时间越长，与对照组的差异越显著，即存在时间-效应关系和浓度-效应关系。同时观察到 DEHP 高剂量组(200 mg/L)对 Leydig 细胞的毒性作用，DEHP 作用后，细胞增殖速度变慢，甚至增殖停止，同时细胞出现明显的形态学改变，细胞质粗糙，出现空泡，细胞膜破裂、细胞核皱缩，贴壁细胞脱落，浮起，细胞崩溃溶解等。

本次实验结果表明：DEHP 以降低 3β-羟基类固醇脱氢酶的活性、抑制 Leydig 细胞增殖、促进细胞死亡，减少细胞数量而影响睾酮分泌，从而降低睾酮水平，作为抗雄激素效应的主要环节。

**参考文献：**


[1] MAHOOD IK, HALLMARK N, MCKINNELL C, *et al*. Abnormal Leydig Cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to Di (n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis[J]. Endocrinology, 2005, 146(2): 613 -623.

[2] BARLOW N J, FOSTER P M. Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following in utero exposure to Di(n-butyl) phthalate[J]. Toxicol Pathol, 2003, 31(4): 397 -410.

[3] 王　炜，魏光辉，邓永继，等. 邻苯二甲酸二-(2-乙基)己酯致小鼠隐睾睾丸和附睾的组织病理学改变[J]. 中华男科学杂志，2004, 10(11): 807 -810, 814.

[4] MACHLUF M, ORSOLA A, BOORJIAN S, *et al*. Microencapsulation of Leydig cells: a system for testosterone supplementation[J]. Endocrinology, 2003, 144(11): 4975 -4979.

[5] 高丽芳，李　勇，裴新荣，等. 邻苯二甲酸二-(2-乙基己基)酯对小鼠胚胎发育毒性的体外实验研究[J]. 卫生研究，2003, 32(3): 198 -200.

[6] PARKS L G, OSTBY J S, LAMBRIGHT C R, *et al*. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat [J]. Toxicol Sci, 2000, 58(2): 339 -349.

[7] AKINGBEMI B T, GE R, KLINEFELTER G R, *et al*. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(3): 775 -780.


(编辑　王　红)

(上接 1319 页)

介入治疗后患者肝区常有钝痛，如疼痛突然加重并腹肌紧张，应提高警惕，前血管破溃入胆管者发病隐匿，多无腹肌紧张及腹痛表现，更应警惕；患者出现心跳加快、皮肤干燥、血压下降，脉压差缩小、尿量减小等症时，应及时判断处理，以免休克发生。

出血沉积于腹腔达一定量时可出现移动性浊音。原有腹水者如短期内腹水量增加，应及时行腹穿检查，抽出不凝血液是诊断本症的重要指标。血管破溃入胆管者出现柏油便，出血量大者可呕血。此表现易被误诊为门脉高压，本组 1 例曾被误诊。

疑为出血患者经降门脉压治疗无效后，应行动脉造影检查，造影剂外渗是诊断该症的重要依据[1]。本组患者行股动脉造影，均见造影剂外渗，1 例外渗入胆管，6 例外渗入腹腔。对诊断明确的肝破裂患者，应立即使用止血药及血管活性药，并及时补充血容量，对失血量大者补充红细胞或全血，以防休克。选择性动脉栓塞是治疗该症的有效方法，同外科手术相比，具有费用低、损伤小等特点[2]。栓塞操作应迅速、准确，选用 Cobra 或单弯导管插管。为不影响再次介入治疗，我们选用短期栓塞剂，并根据血管破裂情况调整其大小。对血管破溃入胆管者栓塞剂选择不宜过小，以免经破裂口进入胆管引起阻塞性黄疸和胰腺炎。

腹腔内积血是细菌良好的培养基，应及时抽吸干净并注入广谱抗生素，必要时静脉用药。短期内对肝动脉行 2 次栓塞，势必加重肝功能损伤，应予保肝治疗，一般 2 周内各项酶学检查能恢复正常。对血管破溃入胆管者可使用清肝利胆药，促进胆管内积血排出。对大出血致贫血者应补充铁剂。恢复较慢者可适量补充红细胞。

通过本组病例成功救治我们体会：正确诊断是治疗的前提，及时抗休克治疗为进一步诊治赢得了时间，准确插管栓塞是治疗的关键，其后抗感染、保肝及抗贫血治疗对病人恢复必不可少。

关键词：肝癌；介入；肝破裂

中图法分类号：R657.32　　文献标识码：B

参考文献：


[1] BUCZKOWSKI A K, KIM P T, HO S G, *et al*. Multidisciplinary Management of Ruptured Hepatocellular Carcinoma [J]. Gastrointest Surg, 2006, 10(3): 379 -386.

[2] 彭　一实，李业波. 中晚期肝癌介入治疗后并发症及分析[J]. 影像诊断与介入放射学，2003, 12(1): 39 -40.

[3] RATHOD K, SHETH R, SHAH P, *et al*. Active contrast extravasation in spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma: a rare CT finding [J]. J Postgrad Med, 2000, 46(1): 35 -36.

[4] KODAMA Y, SHIMIZU T, ENDO H, *et al*. Spontaneous rupture of hepatocellular carcinoma supplied by the right renal capsular artery treated by transcatheter arterial embolization [J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2002, 25(2): 137 -140.


(编辑　龙　亮)