论著

文章编号:1000-5404(2008)11-1002-04

# 邻苯二甲酸二丁酯和苯并[a]芘联合染毒对大鼠睾丸支持细胞的影响

邱志群[1,2],舒为群[2],付文娟[2],曹 佳[1] (第三军医大学军事预防医学院:[1]军事毒理学教研室,[2]环境卫生学教研室,重庆 400038)

**摘 要:目的** 探讨邻苯二甲酸二丁酯和苯并[a]芘单独或联合染毒对大鼠睾丸支持细胞增殖及乳酸分泌的影响。**方法** 分离纯化大鼠睾丸支持细胞,油红 O 染色鉴定纯度大于 90% 后,以 0.1、1、10、100、500 μg/ml 邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate,DBP)和 0.01、0.1、1、10、100 μg/ml 苯并[a]芘[benzo(a)pyrene,BaP]单独或依次联合染毒,用 MTT 法检测对支持细胞增殖的影响,并测定培养液中的乳酸含量。**结果** DBP 染毒后 100 μg/ml 吸光度值[*D*(490)]显著高于对照组($P<0.01$)。BaP 染毒各组的 *D*(490)值与对照组比较,无统计学差异。DBP 100 μg/ml + BaP 10 μg/ml 联合染毒组 *D*(490)值显著上升($P<0.01$),而在 500 μg/ml DBP + 50 μg/ml BaP 联合染毒组 *D*(490)值下降($P<0.05$)。DBP 100 μg/ml 组、100 μg/ml DBP + 10 μg/ml BaP 组和 500 μg/ml DBP + 50 μg/ml DBP 组培养液中的乳酸显著增加($P<0.01$),DBP 500 μg/ml 组和 BaP 50 μg/ml 组培养液中的乳酸含量也增高($P<0.05$)。**结论** 一定剂量 DBP 可刺激支持细胞增殖并增加乳酸分泌,BaP 虽不抑制支持细胞的增殖,但可使乳酸分泌增加。二者联合作用,在一定剂量下以 DBP 的效应为主,但在高剂量可抑制细胞增殖,呈现一定的协同作用。

**关键词:**邻苯二甲酸二丁酯;苯并[a]芘;睾丸支持细胞;乳酸
**中图法分类号:**R322.64;R329.25;R992 **文献标识码:**A

# Combined effect of dibutyl phthalate and benzo(a)pyrene in rat sertoli cells *in vitro*

QIU Zhi-qun[1,2], SHU Wei-qun[2], FU Wen-juan[2], CAO Jia[1] ([1]Department of Hygiene Toxicology, [2]Department of Environmental Hygiene, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** Objective To investigate the combined effect of dibutyl phthalate (DBP) and benzo(a)pyrene (BaP) on the proliferation and lactate secretion in rat sertoli cells. Methods Rat testicular sertoli cells were isolated, purified, cultured, and identified with oil red O. The purity of rat sertoli cells was >90%. Then the purified sertoli cells were treated with the toxicants at different dose, i.e. DBP (0.1, 1, 10, 100, 500 μg/ml), BaP (0.01, 0.1, 1, 10, 50 μg/ml) and their combination DBP + BaP (0.1 + 0.01, 1 + 0.1, 10 + 1, 100 + 10, 500 + 50 μg/ml). The viability of sertoli cells was determined by MTT method and the lactate concentration in the cultured medium was detected. Results As compared with DMSO control, the absorbance values in 100 μg/ml DBP and DBP + BaP (100 + 10 μg/ml) groups were significantly increased ($P<0.01$), but that in 500 μg/ml DBP group was decreased ($P<0.01$) and those of BaP groups were of no statistical difference ($P>0.05$). Lactate concentration in 100, 500 μg/ml DBP groups, 50 μg/ml BaP group and DBP + BaP (100 + 10, 500 + 50 μg/ml) groups were increased ($P<0.05$). Conclusion DBP at low dose can promote the proliferation and lactate secretion in sertoli cells, but BaP can only enhance the lactate secretion. The combination of DBP and BaP, if both at low doses, promotes the proliferation of sertoli cells; if both at high doses, inhibits the proliferation of sertoli cells with high dose. The combined effect of DBP and DaP is synergistic.

**Key words:** dibutyl phthalate; benzo(a)pyrene; sertoli cell; lactate

**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)
Supported by the Guided Project for "West of China" of State Ministry of Science and Technology (2003BA869C) and the National Natural Science Foundation of China (30630056) and the Key Program of Sci & Tech of Chongqing (CSTC2006AA7003)

**作者简介:**邱志群,女,四川省自贡市人,博士研究生,实验师,主要从事环境毒理学方面的研究,发表论文 20 余篇。电话:(023)68752293,E-mail:qiuzhiqun@mail.tmmu.com.cn
**通信作者:**曹 佳,电话:(023)68752271,E-mail:caojia@mail.tmmu.com.cn

**收稿日期:**2008-02-26 **修回日期:**2008-03-12

水中持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs)对人体健康的危害是目前国内外关注的问题。由于污染物种类繁多,特性各异,加上人类处于长期低剂量暴露状态,目前尚无较好的方法监测其对人体的危害,寻找体外检测评价方法是目前的研究热点。众多污染物中以邻苯二甲酸酯类和多环芳烃类污染最为严重,其中的代表物分别为邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)和苯并[a]芘[benzo(a)pyrene, BaP][1]。已有研究显示 DBP 已经广泛的存在于自然界及人体内,美国 NTP 的研究确认其具有显著的雄性生殖毒性[2,3],BaP 有确定的致癌性,文献报道其也具有雄性生殖毒性[4],二者的毒作用靶细胞可能均为睾丸支持细胞,但目前尚少见二者联合作用的相关报道。本研究采用 DBP 与 BaP 单独或联合作用于原代培养的大鼠睾丸支持细胞,观察其影响,为在细胞水平检测有机污染物的联合作用提供实验依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　实验动物与主要试剂

18~21 日龄雄性 SD 大鼠(睾丸未下降至阴囊),由第三军医大学实验动物中心提供。DMEM/F12 培养基(Gibico BRL,爱尔兰),V 型胶原酶、胰蛋白酶、四甲基偶氮唑盐(MTT)(Sigma 公司,美国),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),油红 O、乳酸测试盒(南京建成生物工程研究所)。

### 1.2　支持细胞的分离、纯化与培养

根据 Wu 的方法[5]改进并按以下步骤进行。颈椎脱臼法处死大鼠,消毒腹部皮肤后无菌取睾丸,剥开睾丸被膜,挤出睾丸实质,小心剔除血管,用眼科剪将组织剪成 1~2 $mm^3$ 碎块。加入 0.25% 胰蛋白酶,于 37 ℃,5% $CO_2$ 培养箱中消化 20~60 min,加入含有小牛血清的培养液终止消化,离心 2 次去除胰酶;再用 0.05% V 型胶原酶于 37 ℃,5% $CO_2$ 培养箱中消化 30~60 min,终止消化后 100 目细胞筛过滤,离心洗涤去除胶原酶。加入培养液(DEME/F12、L-谷胺酰胺 3 mg/ml、20% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml)制成单细胞悬液,苔盼兰染色,计数。将细胞稀释成(3~3.5)×$10^5$ 个/ml 的细胞悬液,接种于培养瓶中,35 ℃、5% $CO_2$ 培养箱培养,48 h 后加入少量 20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)处理生精细胞,继续培养备用,隔日换液 1 次。

### 1.3　油红 O 特异性染色确定细胞纯度

Tris-HCl 处理了生精细胞后 2 d,胰酶消化细胞接种到置有盖玻片的 6 孔培养板内,放入 35 ℃,5% $CO_2$ 培养箱培养 48 h 后,夹出爬片,PBS 洗 3 次,每次 5 min,50% 异丙醇固定 1 min,油红 O 染色液染色 10 min,蒸馏水冲洗 3 次,每次 1 min,苏木精染色 5 min,1% 盐酸酒精分色及返蓝后,镜下观察计数。

### 1.4　对支持细胞增殖的影响

按 1×$10^5$ 个/孔的密度接种于 96 孔培养板,5% $CO_2$、35℃ 培养 24 h 后,弃去全部培养液,按如下实验分组进行染毒:以 DMSO 为溶剂的 0.1、1、10、100、500 μg/ml DBP 各组和 0.01、0.1、1、10、50 μg/ml BaP 各组以及 DBP + BaP 联合染毒(按剂量从低到高依次对应联合,参见表 1),另设溶剂对照组(1 μl/ml DMSO)和空白对照组。每个组 8 个平行孔,置 35℃、5% 饱和湿度孵箱内培养 24 h。然后吸出培养液储备于 -70℃ 备另测乳酸,每孔加入 180 μl 培养液(不含血清)和 20 μl MTT(5 mg/ml),继续孵育 4 h,小心吸弃孔内培养液,每孔加入 150 μl DMSO,振荡 10 min,待颗粒充分溶解后,在自动酶联免疫检测仪以 490 nm 波长测定各孔光吸收值 $D$(490)。该实验重复进行 3 次。

表 1　DBP 和 BaP 染毒 24 h 后支持细胞的活性($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

| | 组别 | $D$(490)值 |
|---|---|---|
| | 空白对照组 | 0.872±0.033 |
| | DMSO 对照组 | 0.847±0.020 |
| DBP | 0.1 μg/ml 组 | 0.823±0.001 |
| | 1 μg/ml 组 | 0.877±0.012 |
| | 10 μg/ml 组 | 0.984±0.170 |
| | 100 μg/ml 组 | 1.464±0.132[a] |
| | 500 μg/ml 组 | 0.793±0.149 |
| BaP | 0.01 μg/ml 组 | 0.820±0.034 |
| | 0.1 μg/ml 组 | 0.851±0.010 |
| | 1 μg/ml 组 | 0.821±0.004 |
| | 10 μg/ml 组 | 0.902±0.025 |
| | 50 μg/ml 组 | 0.815±0.004 |
| 联合染毒 | 0.1 μg/ml DBP + 0.01 μg/ml BaP 组 | 0.953±0.001 |
| | 1 μg/ml DBP + 0.1 μg/ml BaP 组 | 1.028±0.021 |
| | 10 μg/ml DBP + 1 μg/ml BaP 组 | 1.01±0.021 |
| | 100 μg/ml DBP + 10 μg/ml BaP 组 | 1.742±0.008[a] |
| | 500 μg/ml DBP + 50 μg/ml BaP 组 | 0.608±0.084[b] |

a:$P<0.01$, b:$P<0.05$, 与 DMSO 组相比

### 1.5　培养液中乳酸的测定

为生精细胞提供乳酸是支持细胞的功能之一,培养液中的乳酸含量可以反映支持细胞的状况。取出冻存的培养液(不超过 1 个月),按照乳酸测定试剂盒(批号 20070705)方法和步骤测定乳酸。

### 1.6　统计学分析

采用 SPSS 12.0 for windows 统计软件包进行统计学分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,细胞增殖活性和乳酸含量均采用单因素方差分析和 $t$ 检验进行组间比较。

## 2　结果

### 2.1　支持细胞纯度鉴定

镜下可见,支持细胞胞体呈宽大的柱状或不规则状,有粗大的突起,细胞质内可见小吞噬物或小空泡,核大呈蓝色,卵圆形或不规则形,核质均匀。细胞质中有大小不等的红色脂滴,此为支持细胞的特异性标志之一,生精细胞与间质细胞均不着红色(图 1)。经过二步酶消化法分离纯化的支持细胞纯度达 90% 以上。

### 2.2　对支持细胞增殖的影响

采用 MTT 法检测不同浓度的 DBP 和 BaP 作用 24h 后支持细胞的活性,结果显示溶剂对照组与空白对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。DBP 染毒后 1 μg/ml 组、10 μg/ml 组和 100 μg/ml 有刺激细胞增殖的趋势,其中 100 μg/ml 显著高

于对照组($P<0.01$),而500 μg/ml DBP组的$D$(490)值略微下降。BaP染毒各组的$D$(490)值与对照组比较,无统计学差异。100 μg/ml DBP+10 μg/ml BaP联合染毒组$D$(490)值显著上升($P<0.01$),而在500 μg/ml DBP+50 μg/ml BaP组$D$(490)值下降($P<0.05$)。

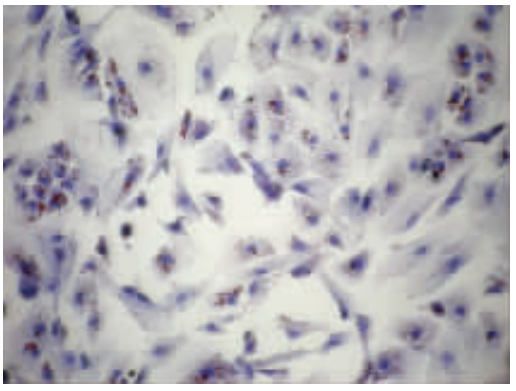
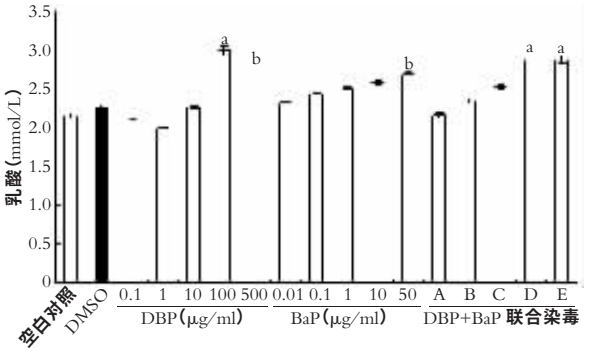


图1 支持细胞油红O染色观察 (×200)

### 2.3 培养液中乳酸的测定

DBP和BaP染毒支持细胞24 h后,DBP 100 μg/ml组、100 μg/ml DBP+10 μg/ml BaP联合染毒组培养液中的乳酸显著增加($P<0.01$),而DBP 500 μg/ml组和500 μg/ml DBP+50 μg/ml BaP联合染毒组培养液中的乳酸显著增加($P<0.01$),BaP 50 μg/ml组中培养液与对照比也有增加($P<0.05$)(图2)。




A:0.1 μg/ml DBP+0.01 μg/ml BaP组;B:1 μg/ml DBP+0.1 μg/ml BaP组;C:10 μg/ml DBP+1 μg/ml BaP组;D:100 μg/ml DBP+10 μg/ml BaP组;E:500 μg/ml DBP+50 μg/ml BaP组
a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与DMSO组相比

图2 DBP和BaP染毒24 h后培养液中乳酸的含量

## 3 讨论

邻苯二甲酸二丁酯(DBP)是一种广泛应用于工业生产中的增塑剂。由于DBP是添加剂而不是以化学键的形式与塑料等终产品结合,因此在使用的过程中不断的向周围环境释放,造成环境污染。饮用水是人体摄入DBP的主要途径之一。我国水体中DBP含量从每升水中几微克到几百微克不等[6]。研究表明DBP可致雄性啮齿类动物睾丸萎缩、质量减轻、睾丸标志酶活性下降、精母细胞和精子细胞丧失、曲细精管变性萎缩、生殖道畸形等[7,8]。

苯并[a]芘(BaP)主要通过大气沉降、城市污水和工业废水的排放、石油的溢漏污染地表水和地下水,从而导致饮用水水源受到污染。虽然地表水中的BaP含量一般介于纳克到微克级,但是由于其毒性强而被列为生活饮用水卫生标准的控制项目。BaP的生殖发育毒性研究相对较少。目前已有的研究证实BaP可引起睾丸的改变,这些改变包括曲细精管形态学的变化,生精细胞和精子的减少以及间质细胞肿瘤等[9]。

睾丸支持细胞对生精细胞具有营养、支持与保护等多种作用。由于精细胞缺乏糖酵解的酶体系,需要支持细胞将葡萄糖转化为乳酸和丙酮酸供精细胞利用,并可阻止血液中某些有害物质进入曲细精管以保护发育中的生精细胞不受外来毒物的侵袭[10]。鉴于支持细胞体内外毒性试验具有良好的一致性,并且具有省时、简便、毒性检测明确、重复性好等优点,有学者提出它可以作为生殖毒物的初筛替代系统[11]。而且已有在体研究证实DBP和BaP均可引起生精细胞和精子的减少[7,9],这可能与支持细胞受损相关。

本研究证实DBP染毒后在一定的剂量范围内(1~100 μg/ml)有刺激细胞增殖的趋势,在100 μg/ml达到峰值,显著高于对照组($P<0.01$)。而高剂量时(500 μg/ml)抑制支持细胞生长,具有一定的毒作用。当DBP与BaP联合作用时呈现出DBP的作用趋势,也是在100 μg/ml DBP+10 μg/ml BaP组刺激支持细胞增殖,而在500 μg/ml DBP+50 μg/ml BaP组对细胞有毒作用。该结果提示DBP可能具有毒物兴奋效应(hormesis),即在低剂量呈现刺激效应而在高浓度时呈现抑制效应[12]。BaP各染毒组均不影响支持细胞的增殖,可能与BaP需通过体内的混合功能氧化酶和环氧化物环化酶的代谢活化方产生较强的毒作用相关。

细胞培养液中的乳酸升高有两种原因:一是由于细胞总数量的增加;二是表明细胞糖酵解增加和/或细胞毒性。本实验中两种情况都存在,在DBP 100 μg/ml组和100 μg/ml DBP+10 μg/ml BaP联合染毒组乳酸显著增加,与细胞数量的增加相一致。而在500 μg/ml DBP组和500 μg/ml DBP+50 μg/ml BaP联合染毒组乳酸增加则属于第2种情况即细胞毒性。值得注意的是在BaP 50 μg/ml组乳酸增加,显示该剂量下的BaP对支持细胞有毒性,但是在MTT实验中并没有检测出来,可能是因为代谢相关生化反应比细胞活性的改变更快。该结果与Raychoudhury等[13]的研究一致。

综上所述,低剂量DBP可刺激支持细胞增殖,乳酸变化与此一致。BaP虽不抑制支持细胞的增殖,但可使乳酸分泌增加。二者联合作用在一定剂量下以DBP的效应为主,但在高剂量可抑制细胞增殖,呈现一定的协同作用,其机制还有待于进一步研究。

## 参考文献：


[1] 田怀军，舒为群，张学奎，等. 长江、嘉陵江(重庆段)源水有机污染物的研究[J]. 长江流域资源与环境，2003，12(2)：118－123.

[2] Carruthers C M，Foster P M. Critical window of male reproductive tract development in rats following gestational exposure to di-n-butyl phthalate[J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol，2005，74(3)：277－285.

[3] 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.

[4] Inyang F，Ramesh A，Kopsombut P，*et al*. Disruption of testicular steroidogenesis and epididymal function by inhaled benzo(a) pyrene[J]. Reprod Toxicol，2003，17(5)：527－537.

[5] Wu Z，Templeman，Templeman J L，Smith RA，*et al*. Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on isolated developing mouse Sertoli cells *in vitro*[J]. J Anat，2005，206(2)：175－184.

[6] 邱志群，舒为群，曹　佳. 我国水中有机物及部分持久性有机物污染现状[J]. 癌变·畸变·突变，2007，19(3)：189－193.

[7] Howdeshell K L，Furr J，Lambright C R，*et al*. Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development：altered fetal steroid hormones and genes[J]. Toxicol Sci，2007，99(1)：190－202.

[8] Jiang J，Ma L，Yuan L，*et al*. Study on developmental abnormalities in hypospadiac male rats induced by maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP)[J]. Toxicology，2007，232(3)：286－293.

[9] Smith T L，Merry S T，Harris D L，*et al*. Species-specific testicular and hepatic microsomal metabolism of benzo(a) pyrene，an ubiquitous toxicant and endocrine disruptor[J]. Toxicol In Vitro，2007，21(4)：753－758.

[10] 吕伟宏，田怀军. 低氧对大鼠睾丸支持细胞形态结构与存活率的影响[J]. 第三军医大学学报，2007，29(1)：65－67.

[11] Pineau C，Dupaix A，Jeagou B. The co-culture of sertoli cells and germ cells：applications in toxicology[J]. Toxicol In Vitro，1999，13(4)：513－520.

[12] Cook R，Calabrese E J. The importance of hormesis to public health[J]. Cien Saude Colet，2007，12(4)：955－963.

[13] Raychoudhury S S，Kubinski D. Polycyclic aromatic hydrocarbon－induced cytotoxicity in cultured rat Sertoli cells involves differential apoptotic response[J]. Environ Health Perspect，2003，111(1)：33－38.


（编辑　龙　亮）

（上接 997 页）

## 3　讨论

ALCL 是非霍奇金淋巴瘤的一个特殊亚型，有特别的染色体异位 t(2；5)(p23；q35)。ALCL 病理形态学表现多样，CD30 强阳性是诊断的关键。由于其病理形态学的特点，易误诊为其他疾病。本组中侵犯下肢软组织的 1 例曾在外院误诊为“横纹肌瘤”，侵犯腰椎、腰大肌的 1 例误诊为“脊椎炎”。故应尽早行病理活检检查。

ALCL 分为原发型和继发型，原发型 ALCL 分为原发系统型 ALK＋ALCL、原发系统型 ALK-ALCL 和原发皮肤型 ALCL。本文大部分病例为中青年男性，多合并结外侵犯，ALK＋ALCL 占多数，男女比例稍低于国外报道。

ALCL 临床进展较快，起病早期即易经血循环及淋巴管扩散，治疗原则以全身化疗为基础，同时辅以放疗，手术一般仅限于诊断性活检。但 ALCL 的最佳治疗方案目前仍无定论. 对于低危的 ALK 阳性 ALCL 患者(IPI 为 0－1)可予常规化疗，多采用含有阿霉素的方案，也有报道称长春新碱在药物治疗中是有效的[1]，成人 ALCL 多采用中高度恶性 NHL 的治疗方案(如 MACOP-B、F-MACHOP)；对于中、高危的 ALK 阳性 ALCL(IPI≥2)及 ALK 阴性 ALCL 患者，一些报道认为大剂量化疗后可采用干细胞支持治疗[2]，但尚需积累更多经验进一步确定。

不管应用的是何种治疗策略，从综合结果来看，都取得了较其他类型侵袭性淋巴瘤较好的疗效。但 ALK 阴性 ALCL 的治疗效果不理想，无论是常规放化疗，还是大剂量化疗联合干细胞移植，都没有使患者获得更加满意的长期生存。

ALCL 的预后影响因素有：ALK 阳性者优于 ALK 阴性者[3]；IPI 指数越高，预后越差[4]；Ki-67 阴性者优于 Ki-67 阳性者。与本组结果基本相符。文献报道 CD56 也是一个重要的预后因素，CD56 阴性者总生存率优于 CD56 阳性者[5]，但本组病例的病理报告中均未体现，可能与病例少有关。此外，本组结果表明近期疗效越好，生存期越长；伴有全身症状的预后差。

至目前为止，随访期仅 3 年，尚需进一步追踪观察。总体来说本组的疗效和生存率低于文献报道，考虑可能与下列因素有关：①本组 6 例初治病例中有 4 例获得缓解和生存；②大部分病例为复治患者，在外院接受过不同剂量的放化疗治疗，疗效均不理想，且增大耐药性发生的可能性；③病例数较少。尚需继续积累病例，寻求治疗间变性大细胞淋巴瘤更为有效的治疗方案和策略。

关键词：淋巴瘤；间变性大细胞；临床特征；治疗
中图法分类号：733.41　　文献标识码：B

## 参考文献：


[1] Muto A，Nakagawa A，Shimomura Y，*et al*. Antineoplastic agents for pediatric anaplastic large cell lymphoma：Vinblastine is the most effective in vitro[J]. Leuk Lymphoma，2005，46(10)：1489－1496.

[2] Falini B，Pileri S，Zinzani P L，*et al*. ALK＋lymphoma：clinico-pathological findings and outcome[J]. Blood，1999，93(8)：2697－2706.

[3] ten-Berge R L，Meijer C J，Dukers D F，*et al*. Expression levels of apoptosis-related proteins predict clinical outcome in anaplastic large cell lymphoma[J]. Blood，2002，99(12)：4540－4546.

[4] Tilly H，Graulard P，Lepage E，*et al*. Primary anaplastic large-cell lymphoma in adults：clinical presentation，immunophenotype，and outcome[J]. Blood，1997，90(9)：3727－3734.

[5] Suzuki R，Kagami Y，Takeuchi K，*et al*. Prognostic significance of CD56 expression for ALK-positive and ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma of T/null cell phenotype[J]. Blood，2000，96(9)：2993－3000.


（编辑　王小寒）