技术方法

文章编号:1000-5404(2012)20-2124-03

塑化剂邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯诱导大鼠尿道下裂的研究

李明勇,陈柏林,邱 林,华 燚,何 昀,温 晟,龙春兰,魏光辉 [400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科,儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市(儿童发育重大疾病诊治与预防)国际科技合作基地]

[摘要] **目的** 采用塑化剂邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)宫内暴露诱导建立大鼠尿道下裂模型,观察DEHP的外生殖器毒性作用。**方法** 孕鼠40只,完全随机分成4组:正常对照组和DEHP低中高3个剂量组[分别为500、750、1 000 mg/(kg·d)]。在怀孕天数(GD)第12~19天连续灌胃,出生后(PND)第1天即对新生鼠进行计数,称体质量和测量肛门至生殖器之间的距离(AGD);PND30测量阴茎长度,观察每组雄性仔鼠的尿道开口位置,判断有无尿道下裂及其严重程度并切取整个阴茎进行病理组织HE染色。**结果** 与对照组相比,随着DEHP暴露剂量增大,每窝产活仔数及雄性活仔数均较对照组有显著减少;同时仔鼠的体质量减轻、AGD和阴茎长度缩短明显($P<0.05$,$P<0.01$)。DEHP低、中、高剂量组诱导出雄性仔鼠尿道下裂发生率分别为10.7%、30.6%和37.0%,与正常对照组比较,差异显著($P<0.05$,$P<0.01$);重型尿道下裂发生率分别为0、8.3%和22.2%;阴茎组织横截面石蜡切片HE染色予以验证。**结论** DEHP大鼠宫内暴露成功建立尿道下裂模型,且对子代具有一定的发育和外生殖器毒性效应。

[关键词] 尿道下裂;邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯;塑化剂;SD大鼠;动物模型
[中图法分类号] R726.95;R994.6 [文献标志码] B

尿道下裂(hypospadias)是小儿泌尿生殖系统最常见的畸形之一,约占新生儿1/250,根据最新国内外流行病学统计,其发生率逐年上升且在近30年翻了一番[1],但其病因仍然不明。研究认为环境中天然和人工合成的环境内分泌干扰物(environmental endocrine disruptors,EEDs)暴露可能是尿道下裂发生和不断增多的主要原因[2]。邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯[Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate,DEHP]属于邻苯二甲酸酯类化合物(AEs),是最常被使用的塑化剂,2011年5月起在台湾爆发的"塑化剂风波"[3],也正是由于检测出含DEHP食品多达961项。有研究发现台湾5岁以下男性婴幼儿平均阴茎长度显著短于世界其他地区的儿童,怀疑可能与塑化剂相关[4]。为了验证DEHP的外生殖器毒性效应,故我们设计了本研究,观察DEHP诱导尿道下裂发生。

1 材料与方法

1.1 试剂和主要仪器设备

DEHP(分析纯,浓度>99%,上海化学试剂有限公司生产)、市售精制大豆油(金龙鱼,上海生产)、游标卡尺(0~150 mm,上海恒胜生产)、TP电子天平(最少量程0.01 g)、JQ-1型通风柜、病理组织石蜡包埋机(BMJ-B型,常州中威电子仪器厂)、自动固定脱水机(VIP-E300F-4897,日本政府赠送)。

1.2 实验动物选择和饲养

SPF级Sprague-Dawley(SD)大鼠40只,约10周龄,雌性,体质量(260±10)g,雄性10只,体质量(320±10)g,购自重庆医科大学实验动物中心[许可证号:SCXK(渝)2007-0001]。饲养于重庆医科大学附属儿童医院SPF实验动物中心[SYXK(渝)2007-0016],空调房维持12 h昼-夜间断性照明,保持室温(24±1)℃,相对湿度(45±5)℃,噪音85 dB以下,自动采食饮水。本研究遵从国际实验动物护理和使用指南。

1.3 染毒方式

经口灌胃染毒,DEHP溶于大豆油(溶剂)中,实验组包括低中高3个剂量组(分别为DEHP 500、750、1 000 mg/kg),对照组为同期等量的大豆油,于孕12~19 d连续灌胃,每天1次,定时给药1.5 ml。

1.4 实验设计

1.4.1 交配实验和实验分组 按1∶1比例将雄、雌性大鼠合笼,合笼后每天上午固定时间检查笼底有无精液栓,发现精液栓的当天确定为孕0 d(gestation day,GD0)。查到精液栓后,将受孕大鼠取出,完全随机分配至4个组,每组10只,予以DEHP剂量分别为0(正常对照组)、500、750、1 000 mg/(kg·d)。

1.4.2 称量和拍照 SD孕鼠以发现分娩当天确定为出生后0 d(postnatal day, PND0)。于PND1对新生仔鼠计数,并测量雄性新生仔鼠肛门至生殖器之间的距离(anogenital distance, AGD)和称体质量,于PND30时,逐个检查雄鼠阴茎的弯曲度、尿道开口部位,判断有无尿道下裂[5],并用COOLPIX S220相机微距镜头拍摄。

1.4.3 阴茎长度测量和组织病理学观察 10%水合氯醛液腹腔注射麻醉(用量4 ml/kg)PND30新生仔鼠,将新生大鼠仰卧位固定四肢于通风柜内,剪去阴茎皮肤周围毛发,用游标卡尺测量阴茎根部到阴茎顶端的垂直距离为阴茎长度。然后平阴茎根部切下整个阴茎,用4%多聚甲醛固定24 h,脱水,石蜡包埋,5 μm横向切片得到标本,60 ℃烤片过夜,予以苏木精-伊红(HE)染色。取过标本的老鼠予以CO_2安乐死。

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81102093);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5414)
[通信作者] 魏光辉,电话:(023)63631928, E-mail: ghwei@cqmu.edu.cn

表 1 SD 孕鼠不同剂量 DEHP 暴露后雄性仔鼠的生殖参数和尿道下裂发生情况

DEHP 剂量	孕鼠数(只)	产期(d)	每窝产活仔数(只)	每窝产雄性活仔数(只)	PND1 雄鼠体质量(g)	PND1 雄鼠 AGD(mm)	PND1 雄鼠 AGD/体质量(g/mm)	PND30 阴茎长度(mm)	雄性仔鼠尿道下裂发生数(只)	雄性仔鼠尿道下裂发生率(%)
0 mg/(kg·d)	10	21	12.0±1.6	6.5±1.8	6.54±0.47	4.08±0.59	0.63±0.12	6.73±0.53	0	0
500 mg/(kg·d)	10	21	10.6±1.6	5.6±1.2	6.23±0.28[a]	3.80±0.37[a]	0.61±0.07	6.59±0.70	6	10.7[a]
750 mg/(kg·d)	10	21.5±0.5[ac]	7.5±1.8[bc]	3.6±0.8[bc]	5.92±0.55[bc]	3.26±0.33[bc]	0.55±0.06[ac]	6.15±0.37[bc]	11	30.6[bc]
1 000 mg/(kg·d)	10[e]	22.6±0.6[ac]	4.7±2.9[bcd]	2.7±1.8[bc]	5.14±0.62[bcd]	2.86±0.29[bcd]	0.56±0.03[bcd]	5.12±0.79[bcd]	10	37.0[bc]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与 0 mg/(kg·d)比较; c: $P<0.05$, 与 500 mg/(kg·d)比较; d: $P<0.05$, 与 750 mg/(kg·d)比较; e: 含 2 窝死胎

1.5 统计学方法

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 16.0 统计软件,完全随机设计的样本均数组间或组内两两比较采用 t 检验,两样本率的比较采用 χ^2 检验,各组产期之间的比较采用随机设计的秩和检验。

2 结果

2.1 SD 孕鼠孕 12~19 d DEHP 暴露后雄性仔鼠尿道下裂模型结果及发生率的比较

由表 1 可见,随着 DEHP 灌胃剂量增加,孕鼠产期显著延迟($P<0.05$),当剂量增大至 1 000 mg/(kg·d)时,出现 2 只孕鼠因难产致死;同时,平均每窝产活仔数及产雄性活仔数在中高剂量组亦显著减少($P<0.05$, $P<0.01$)。相对于正常对照组,DEHP 灌胃组雄性仔鼠 PND1 时体质量和 AGD 以剂量相关的方式呈显著下降或缩短($P<0.05$, $P<0.01$),以及 AGD/体质量的比值和 PND30 时阴茎长度在中、高剂量组也是如此。DEHP 低、中、高剂量组诱导出雄性仔鼠尿道下裂畸形发生率相对于正常对照组差异显著($P<0.05$, $P<0.01$);且中、高剂量组相对于低剂量组亦有显著差异($P<0.05$, $P<0.01$),但在中、高剂量组之间发生率未见显著差异($P=0.59$)。

2.2 大鼠尿道下裂判断标准

正常雄性 SD 大鼠尿道如图 1 A、C;尿道下裂雄性大鼠尿道如图 1 B、D,判断标准参照张炜等[5]报道。除此之外,本实验中由不同剂量 DEHP 诱导的尿道下裂 SD 大鼠畸形严重程度不一,可肉眼分型为:轻型,腹侧包皮分裂,尿道开口于阴茎头腹侧;中型,尿道开口于阴茎体中部;重型,尿道开口于阴茎与会阴交接处(没有会阴型和阴囊型);中型及重型尿道下裂 PND50 后可以观察到白色的尿道软骨外露。各型的具体发生情况见表 2。

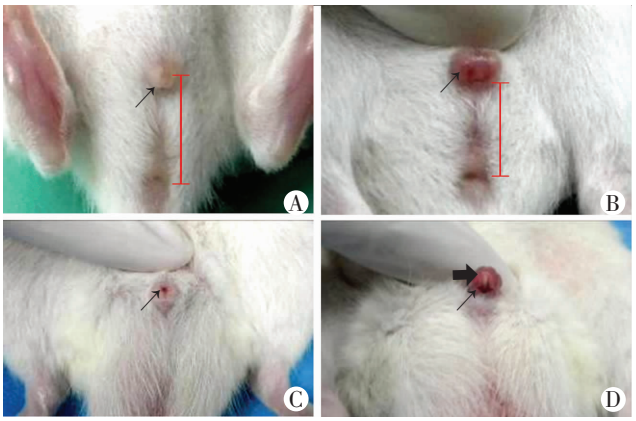
表 2 不同剂量 DEHP 诱导尿道下裂严重程度分布情况

DEHP 剂量	总雄性仔鼠数(只)	尿道下裂发生数(只)	轻型	中型	重型	重型尿道下裂发生率(%)
500 mg/(kg·d)	56	6	4	2	0	0
750 mg/(kg·d)	36	11	3	5	3	8.3
1 000 mg/(kg·d)	27	10	1	3	6	22.2[a]

a: $P<0.05$, 与 750 mg/(kg·d)比较

2.3 DEHP 宫内暴露后仔鼠阴茎与对照组正常阴茎横切面 HE 染色观察

PND30 SD 仔鼠整个阴茎组织不同层面 HE 染色如图 2 所示,镜下见尿道下裂尿道口距离腹侧包皮较正常对照组明显缩短,且腹侧包皮发育障碍,未能在中线处融合而形成裂隙,同时可见尿道远端有明显的软骨细胞染色。



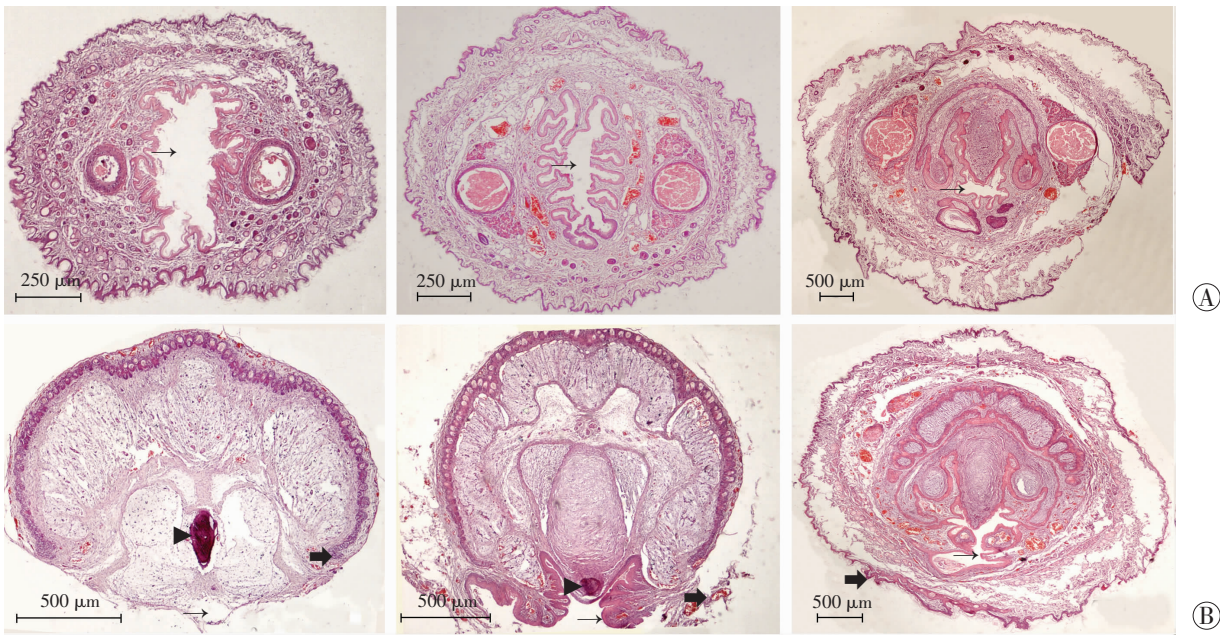
↑:尿道口;⊢⊣:AGD;⬆:软骨
A、B:PND15;C、D:PND50;A、C:正常对照组;B、D: DEHP 750 mg/(kg·d)

图 1 SD 子代新生鼠尿道下裂大体观察

3 讨论

本研究中我们选择 SD 大鼠作为毒理学研究的模型动物,与以往报道的 KM[6-7]和 C57BL/6 等[8]小鼠研究比较,SD 大鼠主要有以下优点:①体型大,观察体表畸形更加直观;②遗传学较为一致,对实验条件反应也较为近似,被誉为精密的生物工具;③更重要的是,SD 大鼠对性激素敏感性高,已有在药理学、毒理学[5,9-10]、内分泌学和营养学等方面的广泛研究应用。大鼠孕后期(孕 12~19 d)是胚胎外生殖器分化发育的关键时期[9],此期干预能较大程度地诱导单纯性尿道下裂同时尽量避免对其他系统的损害。

有动物研究发现,DEHP 孕后期持续灌胃 140 mg/(kg·d)是可观察到生育能力减弱的最低有害剂量[11];Andrade 等[10]研究发现,450 mg/(kg·d)及其以下剂量的 DEHP 宫内暴露均未见尿道下裂畸形发生。故本实验我们从 DEHP 500 mg/(kg·d)的剂量开始,设立低、中、高 3 个剂量组,发现均能诱导出 SD 大鼠尿道下裂,但鉴于低剂量 500 mg/(kg·d)诱导率太低,高剂量组 1 000 mg/(kg·d)毒性太大导致母鼠难产死亡或死胎等,我们认为以 DEHP 750 mg/(kg·d)最能作为诱导尿道下裂模型的适宜剂量,达到最大可能的诱导尿道下裂畸形发生和最少的难产、胎死率。



↑:尿道腔;⬆:包皮;▲:软骨 A:正常对照组;B:DEHP 750 mg/(kg·d)

图2 PND30新生SD大鼠阴茎由远端向近端横切面HE染色观察(从左向右)

本研究发现孕鼠DEHP暴露后,其雄性仔鼠体质量、阴茎长度和具有鼠类性别分化标志的AGD相比较于正常对照组或低剂量组有显著地减轻或缩短($P<0.05$),与文献[6-8, 10]报道一致。进一步证实DEHP具有很强的生物体蓄积性,可影响到下一代,造成严重的机体生殖功能障碍及生殖器官发育异常。

我们进一步观察到随着DEHP剂量增大,SD孕鼠每窝总产活仔数及产雄性活仔数呈明显下降趋势,其中中、高剂量组与正常对照组比较差异显著($P<0.01$),以及孕鼠产期明显延迟($P<0.05$),间接地说明DEHP剂量过大导致宫内难产和死胎仔鼠数量明显增加以及DEHP影响胚胎的正常发育。此外,本实验中我们用不同剂量DEHP诱导出类似于人类的不同严重程度的尿道下裂SD大鼠模型,且随着DEHP剂量增大,重型尿道下裂的发生率随之显著增高($P<0.05$);表明一定范围内,孕期DEHP的暴露程度与仔鼠尿道下裂的严重程度呈正相关;也再次证明SD大鼠是研究尿道下裂发病机制的良好模型动物。对于实验中观察到的尿道软骨现象,文献[12]报道,不同于人类,雄性鼠尿道软骨和骨是生殖结节在雄激素和上皮间充质的干预下分化而来。

本研究一定程度上,提示了塑化剂DEHP宫内暴露对子代的发育以及外生殖器毒性。本研究构建的尿道下裂动物模型逼真、直观,类似于人类的尿道下裂的发生,为进一步尿道下裂发生机制的研究做好了铺垫。

参考文献:

[1] Dolk H, Vrijheid M, Scott J E, *et al*. Toward the effective surveillance of hypospadias[J]. Environ Health Perspect, 2004, 112(3): 398-402.

[2] Wang M H, Baskin L S. Endocrine disruptors, genital development, and hypospadias [J]. J Androl, 2008, 29(5): 499-505.

[3] Yen T H, Lin-Tan D T, Lin J L. Food safety involving ingestion of foods and beverages prepared with phthalate-plasticizer-containing clouding agents [J]. J Formos Med Assoc, 2011, 110(11): 671-684.

[4] Wang C H, Lin W D, Bau D T, *et al*. Penile length of normal boys in Taiwan [J]. Acta Paediatr Taiwan, 2006, 47(6): 293-266.

[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] 宋晓峰, 魏光辉, 邓永继, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(12): 1326-1329.

[7] Wu S, Zhu J, Li Y, *et al*. Dynamic effect of di-2-(ethylhexyl) phthalate on testicular toxicity: epigenetic changes and their impact on gene expression [J]. Int J Toxicol, 2010, 29(2): 193-200.

[8] Liu X, He D W, Zhang D Y, *et al*. Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) increases transforming growth factor-beta1 expression in fetal mouse genital tubercles [J]. J Toxicol Environ Health A, 2008, 71(19): 1289-1294.

[9] 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.

[10] Andrade A J, Grande S W, Talsness C E, *et al*. A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats [J]. Toxicology, 2006, 228(1): 85-97.

[11] Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J. Phthalates: toxicology and exposure[J]. Int J Hyg Environ Health, 2007, 210(5): 623-634.

[12] Baskin L S, Liu W, Bastacky J, *et al*. Anatomical studies of the mouse genital tubercle [J]. Adv Exp Med Biol, 2004, 545: 103-121.

(**收稿**:2012-05-14;**修回**:2012-06-26)

(编辑 王 红)