

# 妊娠期染毒 PFOS 对子代成年雄鼠生殖毒性作用及机制探讨

马英<sup>1</sup>, 杨春壮<sup>2△</sup>, 刘星<sup>2</sup>, 赵冰海<sup>3</sup>, 初彦辉<sup>3</sup>, 李洪志<sup>3</sup>

1. 牡丹江医学院图书馆(牡丹江 157011); 2. 牡丹江医学院解剖教研室(牡丹江 157011);

3. 牡丹江医学院黑龙江省抗纤维化重点实验室(牡丹江 157011)

**【摘要】** 目的 探讨妊娠期染毒全氟辛烷磺酸盐(perfluorooctane sulfonate, PFOS)对子代成年雄鼠 Leydig 细胞(adult Leydig cell, ALC)合成睾酮的影响。方法 对妊娠第 12 d 的 SD 大鼠采用灌胃方式染毒 PFOS(5 mg/kg), 1 次/d, 连续 8 d。仔鼠出生后第 70 d (PND70), 观测子代雄鼠体质量、睾丸系数、精子数量、血清睾酮浓度, 并采用实时荧光聚合酶链式反应检测睾酮合成途径中相关因子 mRNA 的相对表达量。结果 与对照组相比, 染毒组子代雄鼠体质量降低( $P < 0.001$ ); 睾丸系数增高( $P < 0.001$ ); 精子数量及血清睾酮浓度降低( $P < 0.05$ ); ALC 中睾酮合成相关基因类固醇能急性调控因子(*Star* 基因)、清除因子受体类 B 成员 1(*Scarb1* 基因)、P450<sub>sc</sub> 编码基因(*Cyp11a1*)、17 $\beta$  羟基类固醇脱氢酶(17 $\beta$ -HSD3)编码基因(*Hsd17b3*)的 mRNA 表达均下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 而胰岛素样生长因子-1 基因(*Igf1*)和胰岛素样因子-3 基因(*Ins13*)的 mRNA 表达差异无统计学意义。结论 妊娠期染毒 PFOS 可抑制子代雄鼠睾酮合成途径中相关基因的表达, 降低子代雄鼠睾丸 ALC 合成睾酮的功能。

**【关键词】** 全氟辛烷磺酸盐 成年 Leydig 细胞 子代 睾酮

**Study of Pregnancy Exposure to PFOS on Reproductive Toxicities and Mechanism in Male Offspring Rats** MA Ying<sup>1</sup>, YANG Chun-zhuang<sup>2△</sup>, LIU Xing<sup>2</sup>, ZHAO Bing-hai<sup>3</sup>, CHU Yan-hui<sup>3</sup>, LI Hong-zhi<sup>3</sup>. 1. Library of Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, China; 2. Department of Anatomy, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, China; 3. Key Laboratory of Anti-fibrosis Biotherapy of Heilongjiang, Mudanjiang 157011, China

△ Corresponding author, E-mail: chunzhuangyang412@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the effects of testosterone synthesis in adult leydig cell (ALC) of male rats exposed by perfluorooctane sulfonate (PFOS) during pregnancy. **Methods** At gestations 12 day, the pregnant rats were exposed to PFOS (5 mg/kg, PFOS group) or 0.5% Tween (control group) by gavage, once a day for 8 consecutive days. On postnatal day (PND) 70, several indexes of male offspring rats were measured including body mass, testicular coefficient, sperm count, serum testosterone concentration. The mRNA levels of ALC associated with testosterone synthesis were detected by real-time quantitative RT-PCR. **Results** The result showed that sperm count and serum testosterone concentration decreased in male offspring rats of PFOS group ( $P < 0.05$ ), and body mass was significantly lower ( $P < 0.001$ ). The expression of steroidogenic acute regulatory factor (*Star*), scavenger receptor class B type 1 (*Scarb1*), *Cyp11a1* (coding gene of cytochrome P450 side chain cleavage) and *Hsd17b3* (coding gene of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase) were down regulated ( $P < 0.05$ ), no significant statistical difference was observed on the mRNA level of insulin-like growth factor-1 (*Igf1*) and insulin-like factor 3 (*Ins13*). **Conclusion** Gestational exposure to PFOS can inhibit the mRNA levels associated with testosterone synthesis, and decrease the ability of testosterone synthesis in ALC of male offspring rats.

**【Key words】** Perfluorooctane sulfonate Adult Leydig cells Offspring Testosterone

全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS)是由 17 个 F 原子、8 个 C 原子及烃链末端 1 个  $\text{SO}_3^-$  组成的全氟有机化合物<sup>[1]</sup>。由于具有疏水、疏脂和高热稳定性, PFOS 常作为表面活性剂和保护剂广泛应用于工业生产中, 如: 皮革、纸张、包装袋和纺织品等<sup>[2]</sup>。流行病学调查显示, 在各种环境介质(大气、水体、污泥)、动物组织以及人类乳汁和

血液中均能检测到 PFOS<sup>[3]</sup>, 生物体内的 PFOS 很难被降解, 生物半衰期最高可达 21.3 年<sup>[4]</sup>。PFOS 可引起神经、肝脏、生殖及免疫等系统的损害, 被认为具有全身多脏器毒性的持久性有机污染物<sup>[5,6]</sup>。近年来, PFOS 对雄性生殖系统的内分泌干扰作用, 尤其是对睾丸的损害作用受到人们广泛关注。研究发现, 胚胎期染毒 PFOS 可导致子代高死亡率<sup>[7]</sup>, 使血清睾酮浓度、睾丸间质细胞(Leydig cell, LC)合成睾酮的酶类活性显著下降<sup>[8]</sup>。以往

关于 PFOS 对亲代及胎鼠的生殖毒性研究较多, 而其对子代成年期的远期生殖毒性鲜有报道。本研究利用亲代 Sprague Dawley (SD) 大鼠妊娠期染毒 PFOS 模型, 通过观察子代成年雄鼠血清睾酮浓度及其合成通路中相关基因表达水平的变化, 研究 PFOS 对成年 Leydig 细胞 (adult Leydig cell, ALC) 睾酮合成功能的影响, 初步探讨 PFOS 对子代成年雄鼠生殖毒性作用的分子机制, 为全面评价 PFOS 的毒理学作用及预防其对人类生殖的损害提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

FA1004N 电子分析天平 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂), Step Qne 荧光定量 PCR 仪 (ABI, America), IX71 型倒置显微镜 (Olympus, Japan), PFOS (纯度 > 98%, Fluka, Switzerland), RNA 提取试剂盒 (Omega, America), 血清睾酮放射免疫分析试剂盒 (三维生物工程有限公司), Real Time PCR-SYBR Green 检测试剂 (大连宝生物工程有限公司)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 实验动物模型制备** 10 只 SPF 级妊娠 SD 大鼠 (体质量 220~280 g, 由黑龙江中医药大学实验动物中心提供) 饲养于独立通风隔离笼中, 温度 20~25 °C, 相对湿度 40%~60%。普通日光灯照明, 12 h 光亮, 12 h 黑暗, 循环交替。大鼠随机分成 2 组, 每组 5 只: 对照组 (0.5% Tween20), 染毒组 (5 mg/kg PFOS)。妊娠第 12 d 采用灌胃方式进行染毒, 1 次/d, 持续 8 d 后正常饲养。雄性仔鼠出生后第 21 d (PND21) 断乳, 每周称量体质量 1 次。

**1.2.2 子代雄鼠体质量和睾丸系数的检测** 至 PND70 乙醚麻醉雄性仔鼠 (染毒组 30 只, 对照组 18 只), 称重后迅速取出睾丸和附睾, 去除血管和筋膜等结缔组织。生理盐水漂洗后再用滤纸吸干, 准确称取睾丸质量并计算睾丸系数 (睾丸质量/体质量)。

**1.2.3 子代雄鼠附睾精子计数、血清睾酮水平的测**

定 每组取 10 只雄性仔鼠 (PND70) 断头取血 3 mL, 以 4 °C、1 500 r/min 离心 30 min, 吸取上清液, 参照放射免疫分析试剂盒说明检测血清睾酮含量。同时, 取一侧新鲜附睾, 按解剖结构定位切取附睾尾, 放入盛有 2 mL PBS 缓冲液 (已预热至 35 °C) 的试管中, 剪碎, 待精子充分释放后, 用移液枪轻轻吹打 3~4 次, 35 °C 孵育 15 min, 制成精子悬液。取 0.5 mL 精子悬液加到装有 2 mL PBS 的新试管中, 充分混匀, 60 °C 水浴 1 min, 取 10 μL 加入血球计数板, 计算附睾精子数。

**1.2.4 子代雄鼠 ALC 睾酮合成相关基因 mRNA 的检测** 每组取 10 只雄性仔鼠 (PND70), 用 Trizol 法提取睾丸组织总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 实时荧光定量 PCR 法进行类固醇能急性调控因子 (Star 基因)、清除因子受体类 B 成员 1 (Scarb1 基因)、P450scc 编码基因 (Cyp11a1)、17β-羟基类固醇脱氢酶 (17β-HSD<sub>3</sub>) 编码基因 (Hsd17b3)、胰岛素样生长因子-1 基因 (Igf1) 和胰岛素样因子-3 基因 (Insl3) 检测。引物设计参照 GenBank 中序列, 由上海生工合成, 见附表。反应体系: SYBR Green Mix (9 μL), cDNA (2 μL), Forward primer (0.8 μL), Reverse primer (0.8 μL), RNase-free H<sub>2</sub>O (7.4 μL)。扩增反应程序 (各基因预变性与变性条件基本相同): 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 45 个循环, 72 °C 延伸 5 min。以 Rps16 为内参, 以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 表示各目的基因的相对表达量。

### 1.3 统计学方法

计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 妊娠期母体染毒 PFOS 对子代雄鼠体质量、睾丸系数的影响

见图 1、图 2。与对照组比较, 染毒组 PND70 子代雄性大鼠体质量降低, 睾丸系数高于对照组, 差异均有统计学意义 (P < 0.001)。

附表 基因序列和引物

Table Gene sequence and primers

Gene	Primer sequence (5' to 3')		Size of product (bp)
Rps16	F: AAGTCTTCGGACGCAAGAAA	R: TGCCAGAAAGCAGAACAG	147
Star	F: CCCAAATGT CAAGGAAATCA	R: AGGCATCTCCCAAAGTG	187
Scarb1	F: ATGGTACTGCCGGCAGAT	R: CGAACACCCTTGATTCTGGTA	117
Cyp11a1	F: AAGTATCCGTGATGTGGG	R: CATAACAGTGTGCGCTTTTCT	124
Hsd17b3	F: TTTCTTCGGGAGTAGGGGTTTC	R: TCATCGCGGTCTTGGTGC	181
Igf1	F: ACTCTGCTTGCTCACCTTTACC	R: TCATCCACAATGCCCGTC	174
Insl3	F: GTGGCTGGAGCAACGACA	R: AGAAGCCTGGTGAGGAAGC	102

## 2.2 妊娠期染毒 PFOS 对子代成年雄鼠附睾精子数量、血清睾酮的影响

见图 3、图 4。与对照组相比,染毒组精子数下降,血清睾酮含量降低,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ )。说明 PFOS 可通过胎盘屏障导致 Leydig 细胞类固醇合成功能障碍,从而对精子发生与成熟产生持久性损害作用。

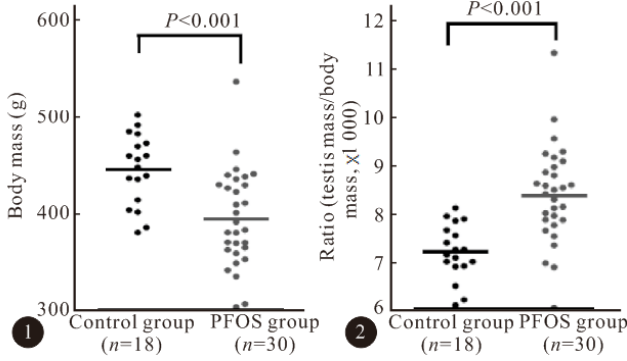


图 1 PFOS 对子代成年雄鼠体质量的影响

图 2 PFOS 对子代成年雄鼠睾丸系数的影响

图 3 PFOS 对子代成年雄鼠精子数量的影响( $n=10$ )

图 4 PFOS 对子代成年雄鼠血清睾酮的影响( $n=10$ )

Fig 1 Effect of PFOS on body mass of adult male offspring rats Fig 2 Effect of PFOS on testicular coefficient of adult male offspring rats  
Fig 3 Effect of PFOS on sperm counts of adult male offspring rats ( $n=10$ ) Fig 4 Effect of PFOS on serum testosterone concentration of adult male offspring rats ( $n=10$ )

## 2.3 妊娠期染毒 PFOS 对子代雄鼠 ALC 合成睾酮相关基因 mRNA 表达的影响

染毒组 *Star* 基因、*Scarb1* 基因、*Cyp11a1* 基因、*Hsd17b3* 基因表达水平降低( $P < 0.05$ ),而 *Igf1* 和 *Ins13* 基因表达尽管有降低的趋势,但差异无统计学意义(图 5)。上述结果表明 PFOS 可通过胎盘屏障干扰子代雄鼠 ALC 类固醇合成功能。

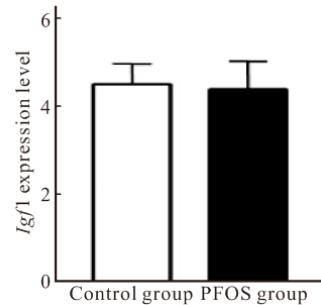
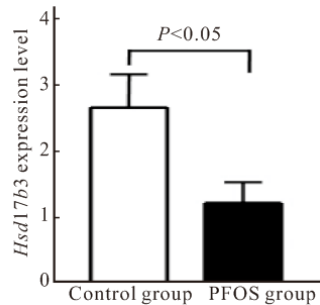
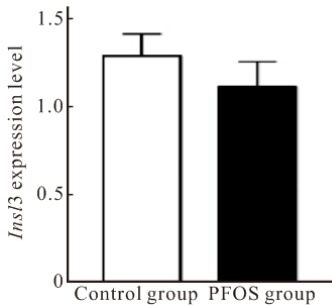
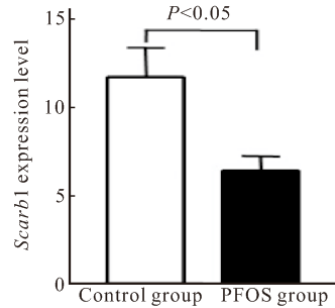
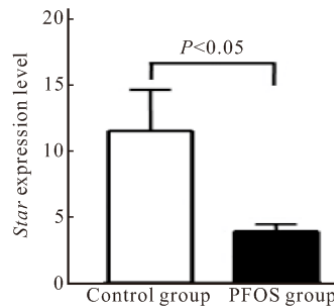
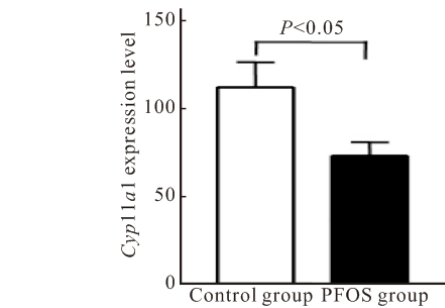
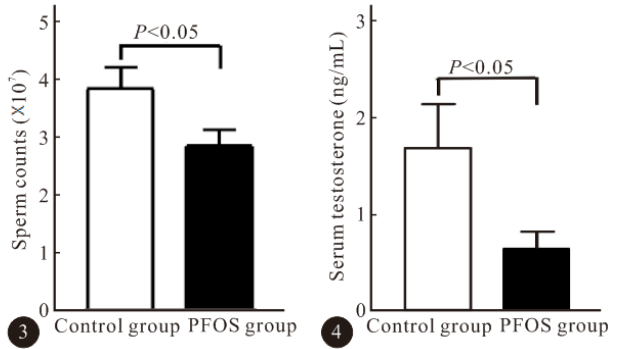


图 5 子代雄鼠 ALC 合成睾酮相关基因 mRNA 的表达( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=10$ )

Fig 5 The expression of mRNA levels of genes related testosterone biosynthesis in adult male offspring ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $n=10$ )

## 3 讨论

哺乳动物体内 95% 的睾酮由 LC 分泌<sup>[9]</sup>, LC 可分为胚胎期、婴幼儿期、青春期、成年期(ALC)及老年期<sup>[10]</sup>。其中 ALC 产生的睾酮主要作用是刺激雄

性内、外生殖器官的发育成熟,并与 Leydig、Sertoli 细胞上的受体结合,调控精原细胞存活与分化、成熟与凋亡,从而维持生精过程,提高精子数量和质量<sup>[11]</sup>。而精子计数是直接反映生育能力的重要指标,它的变化能够提示生精过程的异常。范轶欧和

高连连等<sup>[12,13]</sup>研究表明,PFOS 可使大鼠体质量和睾丸质量降低,睾丸系数下降、精子数减少及精子畸形率显著升高。本研究发现,PFOS 5 mg/(kg·d) 剂量染毒的妊娠期 SD 大鼠,其子代雄鼠(PND70) 体质量、精子数均低于对照组,与上述研究结果一致。而实验中子代雄鼠睾丸系数高于对照组,分析可能为 PFOS 对子代雄鼠发育的毒性影响更严重,导致雄鼠体质量下降得更加明显的缘故。精子数量的降低可间接地反映睾酮水平的下降,本实验子代雄鼠血清睾酮检测结果也给予了证实,提示妊娠期母体染毒 PFOS 可通过胎盘屏障干扰睾酮的合成,对子代雄鼠睾丸的发育和精子发生与成熟产生持久性损害。

睾酮是 LC 以胆固醇为原材料、由多种因子及类固醇生成酶共同参与合成、并受黄体生成激素(luteotropic hormone, LH)调控的一种激素。首先,胆固醇通过胆固醇脂蛋白结合受体(基因 *Scarb1* 的产物)进入 Leydig 细胞内,随后 LH 激活腺苷酸环化酶催化合成蛋白激酶(protein kinase A, PKA),在 PKA 作用下胆固醇从细胞质转移到线粒体上。然后,在类固醇生成快速调节蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, StAR)的快速调节下,胆固醇由线粒体外膜向线粒体内膜转运(StAR 是类固醇激素合成的限速酶),由线粒体内膜上的胆固醇侧链裂解酶(编码基因 *Cyp11a1*) 转化为孕烯醇酮。最终,在内质网中通过  $\Delta 5$  与  $\Delta 4$  两种途径由 17 $\beta$ -羟基类固醇脱氢酶(编码基因 *Hsd17b3*) 合成为睾酮<sup>[14]</sup>。本研究对此反应过程中参与睾酮合成的相关因子的 mRNA 的表达水平进行检测,结果发现,染毒组 *Scarb1*、*Star*、*Cyp11a1* 及 *Hsd17b3* 基因表达下调,提示妊娠期染毒 PFOS 可干扰子代雄鼠胆固醇由胞外向胞内、由胞质向线粒体内膜上的转运,并影响胆固醇在内质网内的进一步催化。*Igf1* 是由支持细胞和 Leydig 细胞共同产生的一种重要的局部调节因子,可通过增强 Leydig 细胞中葡萄糖,转运蛋白 8 基因的表达,促进 Leydig 细胞摄取更多的葡萄糖增强自身合成睾酮的能力。而 *Insl3* 是胰岛素样激素超家族中的一员,是 LC 成熟的标志物,对雄性分化发挥关键作用,但在本实验中并未发现 *Igf1* 和 *Insl3* 基因表达差异有统计学意义。

综上所述,本研究初步证实妊娠期染毒 PFOS 可通过下调睾酮合成通路中相关基因的表达水平,

降低 ALC 睾酮合成功能,既而损伤子代成年后雄鼠睾丸发育和精子的发生,对子代成年雄鼠产生远期生殖毒性作用。

## 参 考 文 献

- 1 Yeung LWY, So MK, Jiang GB, *et al.* Perfluorooctane sulfonate and related fluorochemicals in human blood samples from China. *Envir Sci Technol*, 2006; 40(3): 715-720.
- 2 Jensen AA, Leffers H. Emerging endocrine disruptors: perfluoroalkylated substances. *Int J Androl*, 2008; 31(2): 161-169.
- 3 Wilhelm M, Bergmann S, Dieter HH. Occurrence of perfluorinated compounds (PFCs) in drinking water of Rhine-Westphalia, Germany and new approach to assess drinking water contamination by shorter-chained C4-C7 PFCs. *Int J Hyg Environ Health*, 2010; 213(3): 224-232.
- 4 崔 歆, 杨 琳, 刘 爽等. 持久性环境污染物全氟辛烷磺酸和全氟辛酸的污染现状研究进展. *环境与职业医学*, 2010; 27(8): 505-508.
- 5 Rosen MB, Schmid JE, Das KP, *et al.* Gene expression profiling in the liver and lung of perfluorooctane sulfonate exposed mouse fetuses: comparison to changes induced by exposure to perfluorooctanoic acid. *Reprod Toxicol*, 2009; 27(3-4): 278-288.
- 6 Shi Z, Zhang H, Liu Y, *et al.* Alterations in gene expression and testosterone synthesis in the testes of male rats exposed to perfluorododecanoic acid. *Toxicol Sci*, 2007; 98(1): 206-215.
- 7 So MK, Yamashita N, Taniyasu S, *et al.* Health risk in infants associated with exposure to perfluorinated compound in human breast milk from zhoushan, China. *Envir Sci Technol*, 2006; 40(9): 2924-2929.
- 8 韦荣国, 苏红巧, 秦占芬. 全氟辛烷磺酸盐(PFOS)、全氟己烷磺酸盐(PFHS)和全氟丁烷磺酸盐(PFBS)对非洲爪哇胚胎的发育毒性. *生态毒理学报*, 2012; 7(5): 542-548.
- 9 Anita HP, Matthew PH. *The Leydig cell in health and disease.* USA Totowa: Humana Press Inc, 2007; 41-51.
- 10 游海燕. Leydig 细胞睾酮合成的调节. *中国男科学杂志*, 2003; 17(2): 138-141.
- 11 Slott VL, Suarez JD, Poss PM, *et al.* Optimization of the system for use with rat spermatozoa in toxicological studies. *Fundam Appl Toxicol*, 1993; 21(3): 298-307.
- 12 范轶欧, 金一和, 麻懿馨等. 全氟辛烷磺酸对雄性大鼠生精功能的影响. *卫生研究*, 2005; 34(1): 37-39.
- 13 高连连, 李祥婷, 谢长明等. 益肾填精中药拮抗环境内分泌干扰物致青春前期大鼠性腺发育不良的作用机制. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014; 30(8): 787-196.
- 14 Manna PR, Dyson MT, Stocco DM. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspective. *Mol Hum Reprod*, 2009; 15(6): 321-333.

(2014 - 12 - 15 收稿, 2015 - 04 - 27 修回)

编辑 沈 进