

· 基础研究 ·

益肾填精中药对环境内分泌干扰物染毒大鼠睾酮合成关键酶及雄激素受体表达的影响

李祥婷^{1,2} 蔡德培¹

摘要 **目的** 观察益肾填精中药对邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(di-2-ethylhexylphthalate, DEHP)及氯氰菊酯(cypermethrin, CYP)染毒大鼠睾酮合成关键酶和雄激素受体(androgen receptor, AR)基因及蛋白表达水平的影响,探讨所用中药拮抗环境内分泌干扰物(environmental endocrine disruptors, EEDs)抗雄激素活性的可能作用机制。**方法** 70 只 21 日龄雄性 SD 大鼠随机分为 7 组,每组 10 只。对照组(喂饲玉米油)、染毒 A 组(DEHP 500 mg/kg)、染毒 B 组(CYP 80 mg/kg)、染毒 C 组(DEHP 500 mg/kg + CYP 80 mg/kg)及治疗 A 组、治疗 B 组、治疗 C 组,治疗 A、B、C 组同时喂饲益肾填精中药合剂(40 mL/kg)。每日空腹灌胃给药,疗程为 30 天。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(real time polymerase chain reaction, real time-PCR)及免疫印迹方法(Western blot),分别检测 StAR、CYP11A1、CYP17A1、3 β -HSD、17 β -HSD、AR mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较,染毒 A、B、C 组 StAR、CYP11A1、CYP17A1、3 β -HSD、17 β -HSD、AR mRNA 表达水平显著下调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。中药治疗干预可使上述基因表达水平明显上调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。DEHP、CYP 单独及联合染毒可导致 CYP11A1、CYP17A1、AR 蛋白表达水平显著下调($P < 0.05$, $P < 0.01$),而中药治疗干预可使上述蛋白表达水平显著上调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 益肾填精中药可通过使睾丸的 AR 以及睾酮合成关键酶的表达上调,促进染毒大鼠自身睾酮的生物合成,多水平、多靶点地发挥其对 EEDs 抗雄激素活性及生殖毒性的拮抗作用。

关键词 环境内分泌干扰物;益肾填精;中药;合成关键酶;雄激素受体

Effect of Chinese Herbs for Shen Invigorating Essence Replenishing on Expression of Restrict Enzymes of Testosterone Biosynthesis and Androgen Receptor of Rats Contaminated with Environmental Endocrine Disruptors LI Xiang-ting^{1,2} and CAI De-pei¹ 1 Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Children's Hospital of Fudan University, Shanghai (200032); 2 Department of Integrative Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai (200032)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Chinese herbs for Shen invigorating essence replenishing (CHSIER) on restrict enzymes of testosterone biosynthesis and androgen receptor (AR) expression in testes of rats exposed to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and cypermethrin (CYP), and to study its possible mechanism for antagonizing antiandrogen activity of environmental endocrine disruptors (EEDs). **Methods** Seventy male Sprague-Dawley rats (21 days old) were randomly divided into seven groups (10 in each group), i.e., the control group (fed with corn oil), exposed group A (DEHP 500 mg/kg), exposed group B (CYP 80 mg/kg), exposed group C (DEHP 500 mg/kg + CYP 80 mg/kg), and treatment group A, B, C (CHSIER 40 mL/kg), respectively. All medication was administered by gastrogavage, once per day, 30 days as one therapeutic course. mRNA and protein expressions of acute regulatory protein (StAR), CYP11A1, CYP17A1, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD), 17 β -

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30371820)

作者单位:1. 复旦大学附属儿科医院中西医结合科(上海 200032); 2. 复旦大学附属中山医院中西医结合科(上海 200032)

通讯作者:蔡德培, 021-64038640, E-mail: dp_cai@aliyun.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20170426.111

HSD, androgen receptor (AR) in rat testes were detected by real time polymerase chain reaction (real time RT-PCR) and Western blot respectively. Results Compared with the control group, mRNA expression levels of StAR, CYP11A1, CYP17A1, 3 β -HSD, 17 β -HSD, and AR in rat testes were down-regulated in exposed group A, B, and C ($P < 0.05$, $P < 0.01$). They could be up-regulated by CHSIER ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Protein expressions of CYP11A1, CYP17A1, and AR could be significantly down-regulated by DEHP, CYP, or their combination ($P < 0.05$, $P < 0.01$), which could be significantly up-regulated by CHSIER ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusions CHSIER could promote testosterone biosynthesis of exposure rats by up-regulating the expression of restrict enzymes of testosterone biosynthesis and AR, and significantly antagonize reproductive toxicity of EEDs at multiple levels and targets.

KEYWORDS environmental endocrine disruptor; Shen invigorating essence replenishing; Chinese herbs; key enzymes for synthesis; androgen receptor

环境内分泌干扰物 (environmental endocrine disruptors, EEDs) 是一类外源性化学物质, 广泛存在于自然界中, 土壤、水、空气以及食物中均可检出^[1]。它干扰生物体内正常激素的合成、释放、转运、与受体结合、代谢和清除, 因而会干扰正常激素维持体内平衡和调节发育过程的作用^[2]。越来越多的证据显示, 男性生殖系统发育异常及疾病发生与 EEDs 密切相关^[3]。流行病学研究发现, 男性精子质量降低和生育能力下降与多种 EEDs 相关, 包括邻苯二甲酸酯类, 双酚 A 以及多氟化合物等^[4]。胚胎期、新生儿及青春发育期是男性睾丸发育的关键时期, 这个时期对 EEDs 的敏感性很高^[5]。动物实验证实, 青春期 Wistar 雄性大鼠暴露于 EEDs 6 周后, 出现睾丸重量减轻, 睾酮合成障碍, 曲细精管萎缩, 空泡变性、精子生成受到抑制^[6]。有研究发现, EEDs 诱导的血清睾酮水平降低是化合物直接作用于睾丸的间质细胞和支持细胞, 产生生殖毒性, 而并非通过下丘脑—垂体轴抑制促黄体生成激素 (LH) 的分泌。由此可以推测, 睾丸是 EEDs 的主要靶器官之一^[7]。

本研究在前期实验基础^[8,9]上, 采用 SD 大鼠, 建立了 EEDs 引致性腺发育不良的疾病模型, 并在此基础上采用益肾填精中药治疗干预, 证实所用中药能有效地拮抗 EEDs 的生殖毒性, 显著地改善睾丸的形态结构及睾酮的分泌功能, 进一步阐述益肾填精中药有效地拮抗 EEDs 的抗雄激素活性及生殖毒性的作用机制, 为临床运用中药治疗性腺发育不良提供实验依据。

材料与方法

1 动物 21 日龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 70 只, 体重 (60 $\pm$ 5)g, 购自上海西普尔必凯实验动物有限公司 [许可证号: SCXK (沪) 2008-0016]。SPF 级动物房, 温度

(22 $\pm$ 3) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 50% ~ 60%, 12/12 h 明暗周期。动物食用标准颗粒饲料, 自由饮水和摄食。

2 染毒物质 邻苯二甲酸二 (2-乙基己基) 酯 (di-2-ethylhexylphthalate, DEHP): 分析纯, 纯度 $\geq$ 99%, 上海劲马实验设备有限公司, 生产批号: 5549; 氯氰菊酯 (cypermethrin, CYP): 有效成分 $> 95\%$, 南京荣诚化工有限公司, 生产批号: 0697。

3 药物 益肾填精中药由熟地黄、制首乌、龟板胶、仙灵脾、巴戟天、菟丝子、肉苁蓉、鹿角胶中药组成。由本院中药制剂室煎制成浓缩合剂, 每毫升约含生药 3 g。

4 主要试剂及仪器 玉米油: 市售, 金龙鱼牌; RNA 提取试剂 Trizol: Invitrogen 公司; Random Primer、dNTP Mixture、DL1 000 DNA Ladder Marker、Takara ExTaq DNA 聚合酶、PrimeScript RT Master Mix、SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus): 宝生物工程 (大连) 有限公司; 目的基因引物: 上海生工生物工程公司; Western 及 IP 细胞裂解液、BCA 法蛋白定量试剂盒、蛋白 Marker: 碧云天生物技术研究; HRP-conjugated Monoclonal Mouse Anti-beta actin (KC-5A08): Kang Chen 公司; CYP 17A1 Rabbit Monoclonal Antibody (P05093): Epitomics 公司; AR Rabbit Monoclonal Antibody (P10275): Epitomics 公司; CYP 11A1 Rabbit Monoclonal Antibody (13363-1-AP): Proteintech 公司; HRP 标记山羊抗兔 IgG (H+L): 妙通 (上海) 生物科技有限公司; T.G.L-16gR 型高速台式冷冻离心机; Olympus BH2 型显微镜; Panasonic MV-C P410 型摄像机; 紫外凝胶一次成像及分析仪 (GDS 8000): 英国 UVP 公司; DYY-III 型电泳仪: 北京六一仪器厂; H5-琼脂糖电泳槽: 浙江海宁仪器厂; 实时荧光定量聚合酶链式反应 (real time-PCR)

扩增仪(Mastercycler ep realplex): Eppendorf 公司;PCR 扩增仪(PTC-150): 美国 MJ 公司;Hoefer mini VE 垂直蛋白电泳系统: Amersham Biosciences;硝酸纤维素(PVDF)膜: Milipore Corporation;Hoefer TE-70 半干转膜仪:Amersham Biosciences。

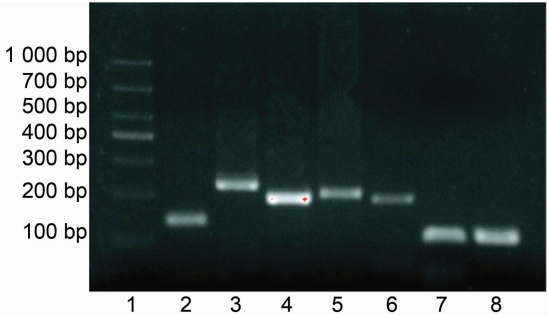
5 方法

5.1 分组及模型建立 参照参考文献[9,10]的方法建立动物模型,70 只 SD 雄性大鼠随机分成 7 组,每组 10 只。对照组(喂饲玉米油)、染毒 A 组(DEHP 500 mg/kg)、治疗 A 组(DEHP500 mg/kg + 中药合剂 40 mL/kg)、染毒 B 组(CYP80 mg/kg)、治疗 B 组(CYP80 mg/kg + 中药合剂 40 mL/kg)、染毒 C 组(DEHP500 mg/kg + CYP80 m/kg)及治疗 C 组(DEHP500 mg/kg + CYP80 mg/kg + 中药合剂 40 mL/kg)。对照组、染毒组每天清晨灌胃 1 次(5 mL/kg)。治疗组中药分清晨及下午 2 次灌胃(40 mL/kg)。给药期间,每天称重,根据体重调整灌胃剂量。疗程 30 天。

5.2 观察指标及检测方法

5.2.1 睾丸组织睾酮合成关键酶及 AR 的基因表达水平 采用 real time-PCR 法检测睾丸组织睾酮合成关键酶及 AR 的基因表达水平。首先采用 Trizol 试剂提取睾丸组织总 RNA,并测其浓度及 OD(A₂₆₀/A₂₈₀)值。根据反转录试剂盒说明书操作,取模板 RNA 1 μg 加入反转录试剂盒,配置 20 μL 反应体系,轻柔混匀后进行反转录反应,条件如下: 37 ℃ ,

15 min;85 ℃ ,5 s;4 ℃ 。逆转录后的 cDNA 保存于 -20 ℃ 。根据试剂盒说明书行 real time-PCR,采用计算机辅助设计引物序列,大鼠相应指标 StAR、CYP11A1、CYP17A1、3β-HSD、17β-HSD 及 AR 上下游引物序列及产物长度,见表 1。各 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析,鉴定是否为特意性目的片段(结果见图 1)。采用 SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus)试剂盒检测睾丸组织中的待测基因的 mRNA 水平,配置 25 μL 荧光定量反应体系,加入 2.5μL 的 cDNA,以三步法行 real time-PCR,40 个循环。以大鼠 GAPDH 作为内参照。目的基因的相对 mRNA 表达水平用以下公式计算: 相对 mRNA 表达量 = 2^{-ΔΔCt}。其中,ΔCt 值 = 目的基因 Ct 值 - 管家基因(GAPDH) Ct 值的差值,ΔΔCt = 各实验组 ΔCt 值 - 空白对照组 ΔCt 值。



注:1 为 Marker;2 为 GAPDH;3 为 GYP11A;4 为 CYP17A;5 为 3β-HSD;6 为 17β-HSD;7 为 AR;8 为 StAR

图 1 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳条带

表 1 各基因上下游引物序列、PCR 条件及产物长度

检测基因	上下游引物(5'→3')	PCR 条件	产物长度(bp)
StAR	F: TCCCTCAAAGACCAAACCTCAC R: AGTGGCTGGCGAACTCTATCT	95 ℃ 2 min,40 cycles (95 ℃ 30 s,61.5 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s),72 ℃ 10 min,4 ℃ forver	113
CYP11A1	F: GTGGACACGACCTCCATGAC R: AGCACCAGGTCGTTCACAAT	95 ℃ 2 min,40 cycles (95 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s),72 ℃ 10 min,4 ℃ forver	230
CYP17A1	F: ACTCAAAGCCTCTTGYCGGA R: GGTCTATGGACTCCTTGTCGTG	95 ℃ 2 min,40 cycles (95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s),72 ℃ 10 min,4 ℃ forver	196
3β-HSD	F: GTGATCTGTTTCCTGGGTTGA R: ATCTCCTTCTAACATTGTCACCTT	95 ℃ 2 min,40 cycles (95 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s),72 ℃ 10 min,4 ℃ forver	209
17β-HSD	F: TGACACAGCTTGTCTCAAACAC R: GGTCAGCACCTGGATAATGAT	95 ℃ 2 min,40 cycles (95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s),72 ℃ 10 min,4 ℃ forver	191
AR	F: GCCTCTTCTTCTGGCATACT R: CTGGGATAGGGGACTCTGTTC	95 ℃ 2 min,40 cycles (95 ℃ 30 s,58.5 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s),72 ℃ 10 min,4 ℃ forver	115
GAPDH	F: ACAGCAACAGGGTGGTGGAC R: TTTGAGGGTGCGAGCAACTT	95 ℃ 2 min,40 cycles (95 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s),72 ℃ 10 min,4 ℃ forver	152

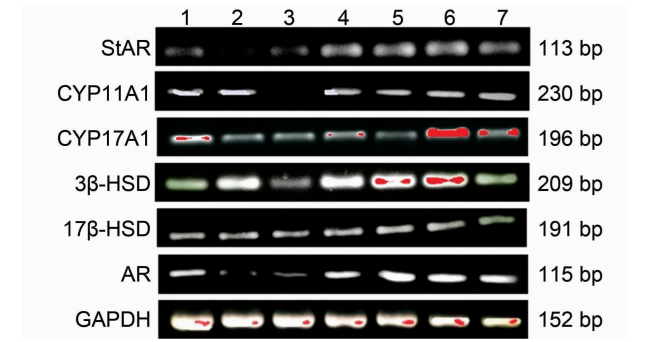
5.2.2 睾丸组织睾酮合成关键酶及 AR 的蛋白表达水平 蛋白裂解液提取各组睾丸组织蛋白,利用 BCA 蛋白定量测定试剂盒对蛋白进行定量。以 100 μg 蛋白泳道上样,经 SDS-PAGE 电泳后,电转移至 PVDF 膜,加入一抗,4 ℃ 封闭过夜,用事先配好的洗液 TBST 在摇床上清洗,10 min × 6 次。羊抗兔二抗用 Western 二抗稀释液配好,浓度为 1:2 000。加入 HRP 标记的二抗,室温下孵育 1 h, TBST 清洗,10 min × 6 次。取等量的 ECL 发光剂 A、B,将 PVDF 膜正面向上放在保鲜膜上,将 A、B 液取出混匀滴在膜上,避光 4 min 后将膜上的发光剂去掉并转移到黑色胶片上。将膜放置 LAS-4000 mini (Fujifilm) 中显影成像。采用 Muti Gauge V3.2 (Fujifilm) 系统进行蛋白定量分析,将每组 CYP11A1、CYP17A1、AR 蛋白条带光密度值与对应 β-actin 蛋白光密度值的比值进行统计学分析。β-actin、CYP11A1、CYP17A1、AR 的蛋白分子量分别为:43、60、55、110 kD。

5.3 统计学方法 应用 SPSS19.0 统计软件包,对实验数据进行分析。real time-PCR 实验数据作对数转换后进行分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,方差不齐时用 Tamhane 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠睾丸 CYP11A1、CYP17A1、3β-HSD、StAR、17β-HSD、AR mRNA 表达比较(表 2,图 2) 与对照组比较,染毒 A 组睾丸 StAR、CYP11A1、CYP17A1、3β-HSD、17β-HSD、ARmRNA 的表达水平显著降低($P < 0.05, P < 0.01$);染毒 B 组 CYP17A1、17β-HSD、StAR、AR mRNA 表达降低($P < 0.01$);染毒 C 组 CYP11A1、CYP17A1、3β-HSD、

StAR、AR mRNA 均下降($P < 0.05, P < 0.01$)。与染毒 A 组比较,治疗 A 组睾丸 StAR、CYP11A1、CYP17A1、3β-HSD、17β-HSD mRNA 表达水平上调($P < 0.05, P < 0.01$)。与染毒 B 组比较,治疗 B 组睾丸 CYP11A1 和 AR、StAR、CYP17A1、17β-HSDmRNA 表达水平均上调($P < 0.05, P < 0.01$);与染毒 C 组比较,治疗 C 组睾丸 CYP11A1、3β-HSD、AR mRNA 表达水平均上调($P < 0.05$)。



注:1 为对照组;2 为染毒 A 组;3 为染毒 B 组;4 为染毒 C 组;5 为治疗 A 组;6 为治疗 B 组;7 为治疗 C 组;图 3 同

图 2 各组大鼠睾丸指标 mRNA 表达电泳图

2 各组大鼠睾丸 CYP11A1、CYP17A1、AR 蛋白表达比较(表 3,图 3) 与对照组比较,染毒 A 组睾丸 CYP11A1、AR 的蛋白表达水平显著降低($P < 0.05, P < 0.01$);染毒 B 组睾丸 CYP17A1、AR 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$);染毒 C 组睾丸 CYP11A1 的蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。与染毒 A 组比较,治疗 A 组睾丸 CYP11A1 及 AR 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。与染毒 B 组比较,治疗 B 组睾丸 CYP17A1、AR 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05, P < 0.01$)。与染毒 C 组比较,治疗 C 组睾丸 CYP11A1、CYP17A1 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠 CYP11A1、CYP17A1、3β-HSD、17β-HSD、StAR、AR mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CYP11A1	CYP17A1	3β-HSD	17β-HSD	StAR	AR
对照	10	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
染毒 A	10	0.11 ± 0.04 **	0.01 ± 0.01 **	0.07 ± 0.04 **	0.27 ± 0.16 **	0.35 ± 0.25 **	0.46 ± 0.37 *
治疗 A	10	0.94 ± 0.43 $\Delta\Delta$	0.61 ± 0.36 Δ	1.68 ± 0.29 Δ	1.91 ± 0.55 Δ	0.67 ± 0.32 $\Delta\Delta$	1.08 ± 0.42
染毒 B	10	0.51 ± 0.61	0.19 ± 0.06 **	0.67 ± 0.28	0.40 ± 0.19 **	0.66 ± 0.13 **	0.25 ± 0.11 **
治疗 B	10	1.31 ± 0.53 $\Delta\Delta$	0.77 ± 0.65 Δ	1.20 ± 0.31	1.65 ± 0.69 Δ	0.97 ± 0.42 Δ	1.84 ± 0.6 $\Delta\Delta$
染毒 C	10	0.36 ± 0.25 *	0.41 ± 0.16 *	0.18 ± 0.07 **	0.65 ± 0.43	0.59 ± 0.24 **	0.32 ± 0.51 **
治疗 C	10	0.97 ± 0.30 $\circ$	0.49 ± 0.41	1.11 ± 0.56	0.90 ± 0.33	0.75 ± 0.28	1.59 ± 0.81

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与染毒 A 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与染毒 B 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与染毒 C 组比较, $\circ P < 0.05$, $\circ\circ P < 0.01$

表 3 各组大鼠睾丸 CYP11A1、CYP17A1 及 AR 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	CYP11A1	CYP17A1	AR
对照	10	1.37 ± 0.06	1.21 ± 0.08	1.22 ± 0.33
染毒 A	10	0.95 ± 0.17 *	1.10 ± 0.14	0.89 ± 0.20 **
治疗 A	10	1.40 ± 0.09 Δ	1.05 ± 0.13	1.23 ± 0.22 Δ
染毒 B	10	1.17 ± 0.20	1.06 ± 0.10 *	0.93 ± 0.14 *
治疗 B	10	0.85 ± 0.51	1.20 ± 0.11 Δ	1.26 ± 0.17 $\Delta\Delta$
染毒 C	10	0.60 ± 0.51 **	1.08 ± 0.11	1.04 ± 0.20
治疗 C	10	1.09 ± 0.21 $\circ$	1.28 ± 0.05 $\circ$	1.14 ± 0.22

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与染毒 A 组比较, $\Delta P < 0.01$;与染毒 B 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与染毒 C 组比较, $\circ P < 0.01$

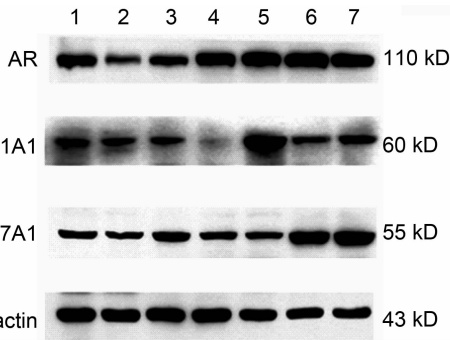


图 3 各组大鼠 CYP11A1、CYP17A1 及 AR 蛋白表达电泳图

讨 论

胆固醇在 StAR 的作用下从线粒体外膜转运到内膜后,经 CYP11A1 催化为孕烯醇酮,再由 3 β -HSD 催化为孕酮,孕酮在 17 α -羟化酶的催化下进一步转化成 17-羟孕酮,接着在 CYP17A1 的催化下,生成雄烯二酮,再经 17 β -HSD 催化,生成睾酮。其中起关键作用的酶主要有 StAR、CYP11A1、CYP17A1、3 β -HSD 和 17 β -HSD。EEDs 对胆固醇转运及睾酮合成的系列关键酶的基因表达均可产生影响,主要表现为上述基因表达水平下调^[11]。

已有文献报道,EEDs 还可通过雄激素受体介导途径干扰雄激素信号转导通路,影响雄激素促进生殖发育和维持生殖功能作用的发挥^[12,13]。EEDs 通过 AR 介导的抗雄激素作用机制如下:(1)通过改变 AR 水平,影响靶器官对雄激素的反应性。暴露于氯苯基三氯乙烷(DDT)的小鼠睾丸 AR 表达及其调节基因 PEM 和 ODC 水平下调^[14]。(2)直接与 AR 结合降低其与雄激素的亲合力,抑制其诱导的转录活化和基因表达。有机氯农药在环境中存在持久且易于生物富集,他们能直接结合到 AR 配体结合域^[15]。(3)诱导

AR 突变。双酚 A 能诱导前列腺癌细胞 AR 发生点突变,改变了受体配体结合域的三维结构,降低 AR 与配体结合的特异性,同时,AR 突变也致 AR 稳定性下降,影响 AR 的活性^[16]。(4)抑制 AR 与靶基因结合。EEDs 大多为 AR 的竞争性拮抗剂,能抑制雄激素与 AR 结合,阻遏 AR 与 DNA 上的雄激素反应元件结合,从而抑制依赖雄激素的基因转录活化和表达。杀菌利和烯菌酮都是 AR 拮抗剂,竞争性地结合 AR,通过抑制 AR-DNA 结合而抑制雄激素依赖的基因表达^[17]。(5)与 AR 结合,同时促进 AR-DNA 结合,却不能启动转录。考虑可能是 EEDs 影响了与 AR 相互作用的辅助因子的调节功能,改变 AR 的转录活性,但具体机制尚不清楚。研究证实,EEDs 能改变 AR 的亚细胞动力学,抑制 AR 转录活性^[14]。

本研究结果显示,DEHP 及 CYP 单独及联合染毒可引起青春前期雄性 SD 大鼠 StAR、CYP11A1、CYP17A1、3 β -HSD 及 17 β -HSD mRNA 表达水平显著下调,CYP11A1、CYP17A1 蛋白表达水平也显著下调,说明 EEDs 染毒后通过影响胆固醇转运及睾酮合成关键酶相关基因的转录水平,最终抑制睾酮的合成。研究结果还显示,CYP 染毒后睾丸 AR 的基因及蛋白的表达水平显著降低,说明 EEDs 也可通过受体介导途径发挥其抗雄激素活性。而中药治疗干预可使睾酮合成的系列关键酶及 AR mRNA 和蛋白表达水平均显著上调,说明中药可通过睾酮合成途径及受体介导途径,拮抗 EEDs 的抗雄激素活性。

中医学认为,肾为先天之本,肾藏精主生殖。性腺发育不良按照中医辨证为肾精不足之证,当以益肾填精之法为治疗原则。采用熟地黄、制首乌滋肾阴、益精血,仙灵脾、巴戟天壮肾阳、益精气,菟丝子补肝肾、益精髓,肉苁蓉补肾壮阳、滋阴益髓,龟板胶、鹿角胶滋肾阴壮肾阳、峻补精血。诸药合用,起到滋阴壮阳、补肾填精益髓的功效。临床上采用益肾填精中药治疗性腺发育不良及青春期延迟的患儿,可使患儿的促性腺激素及睾酮水平显著回升,睾丸及外生殖器的发育异常得到改善,从而进入比较正常的性发育及青春期的进程^[18]。

本课题组前期研究表明,益肾填精中药可明显抑制下丘脑 GnRH 紧张性分泌中心神经肽 Y 的合成和释放,对下丘脑 GnRH 的周期性及紧张性分泌中心均产生显著的促进作用,使下丘脑 GnRH 神经元功能显著活跃,GnRH 基因表达水平显著上调,GnRH 及垂体 FSH、LH 的合成及分泌明显增加,从而明显促进下丘脑—垂体的促性腺机能^[19]。

总之,益肾填精中药对生殖系统及生殖器官形态

结构、功能及发育的改善作用是通过机体神经内分泌调节系统、性腺及生殖器官多层次、多水平、多靶点的综合作用而实现。

参 考 文 献

- [1] Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans [J]. *Environ Health Perspect*, 1993, 101(5): 378-384.
- [2] Sharpe RM, Irvine DS. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? [J]. *BMJ*, 2004, 328(7437): 447-451.
- [3] Hauser R, Skakkebaek NE, Hass U, et al. Male reproductive disorders, diseases, and costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(4): 1267-1277.
- [4] Juul A, Almstrup K, Andersson AM, et al. Possible fetal determinants of male infertility [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(9): 553-562.
- [5] Rouiller-Fabre V, Habert R, Livera G. Effects of endocrine disruptors on the human fetal testis [J]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2014, 75(2): 54-57.
- [6] Helal MA. Celery oil modulates DEHP-induced reproductive toxicity in male rats [J]. *Reprod Biol*, 2014, 14(3): 182-189.
- [7] Noriega NC, Howdeshell KL, Furr J, et al. Pubertal administration of DEHP delays puberty, suppresses testosterone production, and inhibits reproductive tract development in male Sprague-Dawley and Long-Evans rats [J]. *Toxicol Sci*, 2009, 111(1): 163-178.
- [8] 李祥婷, 蔡德培. 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯、氯氟菊酯单独及联合染毒对青春前期雄性大鼠生殖发育的不良影响 [J]. *卫生研究*, 2012, 41(5): 710-716.
- [9] 李祥婷, 蔡德培. 环境内分泌干扰物对青春前期雄性大鼠性腺发育的不良影响及其中药拮抗治疗的研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(12): 1690-1695.
- [10] 孔元原, 蒋明玉, 蔡德培. 滋肾阴泻相火中药对环境内分泌干扰物染毒大鼠生殖器官雌激素受体表达的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 20(3): 312-316.
- [11] Liu D, Shen L, Tao Y, et al. Alterations in gene expression during sexual differentiation in androgen receptor knockout mice induced by environmental endocrine disruptors [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(2): 399-404.
- [12] Grimaldi M, Boulahtouf A, Delfosse V, et al. Reporter cell lines for the characterization of the interactions between human nuclear receptors and endocrine disruptors [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015, 6: 62.
- [13] Rouiller-Fabre V, Guerquin MJ, N'Tumba-Byn T, et al. Nuclear receptors and endocrine disruptors in fetal and neonatal testes: a gapped landscape [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015, 6: 58.
- [14] Chaturvedi NK, Kumar S, Negi S, et al. Endocrine disruptors provoke differential modulatory responses on androgen receptor and pregnane and xenobiotic receptor: potential implications in metabolic disorders [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 45(1-2): 291-308.
- [15] Lemaire G, Terouanne B, Mauvais P, et al. Effect of organochlorine pesticides on human androgen receptor activation *in vitro* [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 96(2): 235-246.
- [16] Hess-Wilson JK, Webb SL, Daly HK, et al. Unique bisphenol a transcriptome in prostate cancer: Novel effects on ERbeta expression that correspond to androgen receptor mutation status [J]. *Environ Health Perspect*, 2007, 115(11): 1646-1653.
- [17] Ostby J, Kelce WR, Lambright C, et al. The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist *in vivo* and *in vitro* [J]. *Toxicol Ind Health*, 1999, 15(1-2): 80-93.
- [18] 蔡德培主编. 性早熟与青春期延迟 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2005: 33-40, 163-171.
- [19] 沈皓, 蔡德培, 陈伯英. 补肾中药对下丘脑-垂体促性腺机能的影响 [J]. *中西医结合学报*, 2004, 2(1): 53-56.

(收稿: 2015-11-09 修回: 2017-02-25)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶