



2,4-滴丁酯对雄性小鼠的生殖毒性作用

刘艳冬¹, 宋飞玉², 马晓明¹, 王琳¹, 毛磊¹, 洪迪¹, 宋祥福¹

(1. 吉林大学公共卫生学院, 长春 130021; 2. 吉林康乃尔药业有限公司, 吉林 132013)

【摘要】 目的 研究2,4-滴丁酯对雄性小鼠的生殖毒性作用。**方法** 将48只雄性ICR小鼠随机分为4组, 即对照组(玉米油)和低(10 mg/kg)、中(20 mg/kg)和高剂量(40 mg/kg)2,4-滴丁酯染毒组, 每组12只。采用灌胃方式进行染毒, 每天1次, 每周连续染毒6 d, 实验周期为5周。染毒结束后采用分光光度法对睾丸组织中总抗氧化能力(T-AOC)、乳酸脱氢酶(LDH)、琥珀酸脱氢酶(SDH)、 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase及 $\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATPase的活性进行测定。**结果** T-AOC活力随着2,4-滴丁酯染毒剂量的升高逐渐下降, 高剂量组与其他组比较差异显著; 与对照组和低剂量2,4-滴丁酯染毒组相比较, 高、中剂量组睾丸组织中LDH活力值较低, 差异显著, 且高剂量组与中剂量组比较差异显著; SDH活力随着2,4-滴丁酯染毒浓度的升高逐渐降低, 高、中剂量组与对照组相比较差异显著, 且高剂量组与中、低剂量组比较差异显著; 与对照组和低剂量2,4-滴丁酯染毒组相比较, 高、中剂量组睾丸组织中 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase活力值较低, 且差异显著; 实验组 $\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATPase活力与对照组比较差异显著。**结论** 2,4-滴丁酯染毒对雄性小鼠睾丸组织具有一定的毒性作用。

【关键词】 2,4-滴丁酯; 睾丸; SDH; LDH; ATPase; T-AOC; 生殖毒性

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 08-0016-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.008.004

Reproductive toxicity of 2,4-D butylate to male mice

LIU Yan-dong¹, SONG Fei-yu², MA Xiao-ming¹, WANG Lin¹, MAO Lei¹, HONG Di¹, SONG Xiang-fu¹

(1. School of Public Health of Jilin University, Changchun 130021, China;

2. Jilin Connell Pharmaceutical. Co., Ltd, Jilin 132013, China)

【Abstract】 Objective To explore the reproductive toxicity of 2,4-D butylate to the testis in male mice. **Methods** Forty-eight ICR male mice were randomly divided into four groups: the control group, and three 2,4-D butylate experimental groups (10, 20, 40 mg/kg), 12 mice in each group. 2,4-D butylate was intragastrically administered once a day and six days per week for five weeks. At the end of the exposure, the activities of total antioxidant capacity (T-AOC), $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase, $\text{Ca}^{++} \text{Mg}^{++}$ -ATPase, lactate dehydrogenase (LDH) and succinate dehydrogenase (SDH) in testis homogenate were measured by spectrophotometry. **Results** The activity of T-AOC was gradually decreased with the increase of doses, with a significant difference between the high dose group and other groups. The activities of LDH in the moderate and high dose groups were significantly lower than those of the low dose group and control group, and there was a significant difference between the high dose group and moderate dose group. The activities of SDH in the testis was gradually decreased with the increase of the 2,4-D butylate dose, showing significant differences between the high dose group and the moderate dose and control groups, and between the high and moderate dose groups and the low dose group. The activities of $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase in the moderate and high dose groups were significantly lower than that of the control and

[作者简介] 刘艳冬(1986-), 男, 在读硕士; 研究方向: 农药对机体的影响。E-mail: liu502yandongzly@126.com。

[通讯作者] 宋飞玉(1975-), 女, 研究方向: 药物毒理。E-mail: songfeiyu2008@163.com。

low dose group. The activities of $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATPase was significantly lower in the experimental groups than that in the control group. **Conclusion** Exposure to 2,4-D butylate has certain toxic effect on the testicular tissue in male mice.

【Key words】 2,4-D butylate; Testis; SDH; LDH; ATPase; T-AOC; Reproductive toxicity; Male mice

2,4-D 丁酯为苯氧乙酸类激素型选择性除草剂,其性质为无色油状液体,难溶于水,易溶于多种有机溶剂,是世界上使用最广泛的除草剂之一。2,4-滴丁酯属于低毒性除草剂,急性中毒少见^[1]。但是 2,4-滴丁酯挥发性强、分布范围广,常因使用不恰当而对环境造成污染,并可通过食物链进入人体,对生态环境和人类健康造成严重的危害^[2,3],因而其毒性和残留问题日益受到人们的重视。国内外曾报道过 2,4-滴丁酯中毒的病例,临床症状早期主要表现为:头晕、无力、恶心、呕吐、烦躁等,随着病情的发展可出现多脏器的损害^[4]。目前关于 2,4-滴丁酯的生殖毒性及其作用机制研究较少。本研究旨在从能量代谢及抗氧化能力的角度出发,探讨 2,4-滴丁酯对雄性小鼠的生殖毒性作用及机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性清洁级 ICR 小鼠 48 只,体质量(25 ± 2)g,由吉林大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证编号为【SCXK(吉)2007-0003】。

1.2 主要试剂与仪器

2,4-滴丁酯(上海至鑫化工有限公司);总抗氧化能力(T-AOC)测试盒、乳酸脱氢酶(LDH)测试盒、琥珀酸脱氢酶(SDH)测试盒、三磷酸腺苷(ATP)酶测试盒、总蛋白定量测试盒(南京建成生物工程研究所)。

恒温水浴箱(北京西城区医疗器械厂);低速自动平衡离心机(北京医用离心机厂);722 型分光光度计(北京医疗设备二厂)。

1.3 动物分组及染毒方法

将 48 只雄性清洁级 ICR 小鼠适应性喂养 1 周后,随机分为 4 组,即对照组(玉米油)和低(10 mg/kg)、中(20 mg/kg)和高剂量(40 mg/kg)2,4-滴丁酯染毒组。采用灌胃方式进行染毒,实验组均给予 0.27 mL 2,4-滴丁酯染毒溶液,对照组给予等量的玉米油,每天 1 次,每周连续染毒 6 d,共 5 周。每周末称量并记录小鼠体重,根据体重确定下周的染毒剂量。

1.4 样本的采集与制备

于末次染毒结束后 24 h,处死小鼠,取出双侧辜

丸,再称取适量辜丸组织,在冰水浴条件下,加生理盐水研磨后,制备成 10% 的组织匀浆,2 500 r/min 离心 15 min,取上清液待测。

1.5 样本的测定

将制备好的待测上清液严格按照 T-AOC、LDH、SDH、 Na^+K^+ -ATPase、 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATPase 测试盒说明书检测样品的吸光度,根据相应的公式计算出相应酶的活力。组织中的蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定。

1.6 统计学方法

全部测定数据采用统计软件 SPSS 13.0 进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 辜丸组织中 T-AOC 活力的测定结果

T-AOC 活力随着 2,4-滴丁酯染毒剂量的升高逐渐下降,高剂量组与其他组比较差异显著,见表 1。

表 1 2,4-滴丁酯染毒对小鼠辜丸组织 T-AOC 活力的影响
Tab.1 Effects of 2,4-D butylate on the T-AOC activity in the testis tissue of mice

组别 Groups	总抗氧化能力 T-AOC (U/mgprot)
对照组 Control	7.60 ± 1.35
低剂量组 Low dose	7.22 ± 0.80
中剂量组 Moderate dose	6.67 ± 1.15
高剂量组 High dose	5.23 ± 1.04 ^{abc}

注:^a与对照组进行比较 $P < 0.05$; ^b与低剂量组进行比较 $P < 0.05$; ^c与中剂量组进行比较 $P < 0.05$ 。

Note. ^aCompared with the control group, $P < 0.05$; ^bCompared with the low dose group, $P < 0.05$; ^cCompared with the moderate dose group, $P < 0.05$.

2.2 辜丸组织中 LDH 和 SDH 的活力

LDH 和 SDH 活力均随着 2,4-滴丁酯染毒浓度的升高逐渐降低,与对照组和低剂量组相比较,高、中剂量组辜丸组织中 LDH 活力值较低,差异显著,且高剂量组与中剂量组比较差异显著;高、中剂量组辜丸组织中 SDH 活力与对照组相比较差异显著,且高剂量组与中、低剂量组比较差异显著,见表 2。

2.3 辜丸组织中 Na^+K^+ -ATPase 及 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATPase 的活力

与对照组和低剂量组相比较,高、中剂量组辜丸组织中 Na^+K^+ -ATPase 活力值较低,且差异显著;实验组 $\text{Ca}^{++}\text{Mg}^{++}$ -ATPase 活力与对照组比较差异

显著,见表 3。

表 2 2,4-滴丁酯对小鼠睾丸组织中 LDH 和 SDH 活力的影响

Tab.2 Effects of 2,4-D butylate on the activities of LDH and SDH in the testis tissue of mice

组别 Groups	乳酸脱氢酶 LDH (U/mgprot)	琥珀酸脱氢酶 SDH (U/mgprot)
对照组 Control	2.29 ± 0.28	37.58 ± 1.86
低剂量组 Low dose	2.13 ± 0.27	34.33 ± 3.18
中剂量组 Moderate dose	1.83 ± 0.09 ^{ab}	30.39 ± 6.47 ^a
高剂量组 High dose	1.57 ± 0.14 ^{abc}	24.95 ± 4.61 ^{abc}

注:^a与对照组进行比较 $P < 0.05$; ^b与低剂量组进行比较 $P < 0.05$; ^c与中剂量组进行比较 $P < 0.05$ 。

Note. ^aCompared with the control group, $P < 0.05$; ^bCompared with the low dose group, $P < 0.05$; ^cCompared with the moderate dose group, $P < 0.05$.

表 3 2,4-滴丁酯对小鼠睾丸组织中 ATPase 活力的影响

Tab.3 Effects of 2,4-D butylate on the activity of ATPase in the testis tissue of mice

组别 Groups	Na ⁺ K ⁺ - ATPase 活力 μmol Pi/mgprot/h	Ca ⁺⁺ Mg ⁺⁺ - ATPase 活力 μmol Pi/mgprot/h
对照组 Control	6.66 ± 0.57	6.45 ± 0.69
低剂量组 Low dose	6.11 ± 0.54	5.53 ± 0.41 ^a
中剂量组 Moderate dose	5.54 ± 0.74 ^{ab}	5.70 ± 0.85 ^a
高剂量组 High dose	5.02 ± 0.48 ^{ab}	5.50 ± 0.39 ^a

注:^a与对照组进行比较 $P < 0.05$; ^b与低剂量组进行比较 $P < 0.05$ 。

Note. ^aCompared with the control group, $P < 0.05$; ^bCompared with the low dose group, $P < 0.05$.

3 讨论

总抗氧化能力 (T-AOC) 代表体内酶类和非酶类抗氧化物质的总体水平,是反映机体抗氧化能力的综合指标,主要通过清除自由基及分解过氧化物等,维持体内助氧化与抗氧化系统的动态平衡,使机体处于氧化还原相对稳定的状态,且可以克服某种特定抗氧化指标难以全面反映组织抗氧化能力的局限性,更能准确、全面地反映机体的抗氧化能力^[5]。有研究表明 2,4-二氯苯氧乙酸类物质能够通过诱导机体产生过多的自由基,破坏细胞膜的完整性,损伤细胞内的抗氧化防御体系,减少抗氧化酶的含量^[6,7]。本次实验小鼠睾丸组织中 T-AOC 活力有随着 2,4-滴丁酯染毒浓度的升高逐渐下降的趋势,与高剂量 2,4-滴丁酯染毒组相比较,中、低剂量组和对照组睾丸组织中 T-AOC 活力值较高,且差异显著。结果表明中、低剂量的 2,4-滴丁酯染毒对小鼠睾丸组织的抗氧化能力影响不大;高剂量 2,4-滴丁酯染毒可使 T-AOC 活力明显降低说明小鼠体内抗氧化防御系统的动态平衡被打破,体内过多的自由基不能有效的被清除,而对睾丸组织产生了氧

化损伤作用。

LDH 属于糖酵解酶系,由生精细胞产生,存在于曲细精管胞浆中,其作用是在糖酵解过程中催化丙酮酸转化为乳酸,其活性与生精过程中的能量代谢及生精上皮的成熟密切相关,是生精细胞成熟的标志酶之一^[8]。SDH 属于线粒体的标志酶,存在于生精小管的支持细胞和生精细胞的线粒体内,其作用是最终将果糖转化为葡萄糖而进行能量代谢,在精子的能量代谢过程中起到重要作用,可作为睾丸成熟、精子功能成熟和形态完善的标志酶^[9]。因此,LDH 和 SDH 活性变化是反映生殖毒性作用的敏感指标之一。本次实验小鼠睾丸组织中 LDH 和 SDH 活力均随着 2,4-滴丁酯染毒浓度的升高逐渐降低,且与对照组相比,高、中剂量组 LDH 和 SDH 活性显著性降低,结果表明高、中剂量的 2,4-滴丁酯染毒可通过干扰生殖细胞的糖酵解和有氧呼吸过程,导致能量的供应不足,影响精子的生成与成熟。

ATPase 是广泛分布在体内的生物膜酶系统,是细胞进行能量转换的重要系统,而 Na⁺ K⁺ -ATPase 和 Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ -ATPase 是其主要成员。ATPase 是睾丸内能量代谢的关键酶,也是质膜上重要的离子泵,不仅可以影响能量的产生、转移和利用,还可以维持细胞膜正常的膜电位变化和内环境的稳定,因此其活性高低是反映机体能量代谢水平和细胞膜损伤的重要指标^[10]。本次实验结果表明 Na⁺ K⁺ -ATPase 和 Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ -ATPase 活力均随着 2,4-滴丁酯染毒剂量的升高呈下降的趋势,提示:2,4-滴丁酯染毒可通过抑制睾丸生殖细胞的能量转换,影响细胞膜结构的完整性和内环境的稳定,对生殖细胞造成损伤。

综上所述,2,4-滴丁酯染毒可引起小鼠睾丸组织内 T-AOC、LDH、SDH、Na⁺ K⁺ -ATPase 和 Ca⁺⁺ Mg⁺⁺ -ATPase 活性降低,说明 2,4-滴丁酯可能通过影响生殖细胞的抗氧化能力、干扰生殖细胞糖酵解和有氧呼吸过程影响产能及抑制生殖细胞对能量的利用,对雄性小鼠睾丸组织发挥毒性作用。

参考文献:

- [1] 孙秀梅,李宪,唐维. 重度 2,4-滴丁酯中毒抢救 [J]. 中国实用医药, 2010, 5(26):190.
- [2] Skinner JA, Lewis KA, Bardon KS, et al. An overview of the environmental impact of agriculture in the UK [J]. J Environ Manag, 1997, 50(2):111-128. (下转第 23 页)

- 型研究概况 [J]. 心脏杂志, 2014, 26(4): 491-493.
- [6] 张军平, 许颖智, 李良军, 等. 实验性动脉粥样硬化模型复合建模的方法及评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(10): 41-45.
- [7] 黄成磊, 李天奇, 乔伟伟, 等. 兔股动脉粥样硬化症改良模型的建立及评价 [J]. 实验动物与比较医学, 2007, 27(1): 6-10.
- [8] 李秋梅, 王硕仁, 赵明镜, 等. 家兔实验性血管成形术后在狭窄模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(4): 203-209.
- [9] 刘佳春, 王大明, 李志国, 等. 小型猪颈动脉粥样硬化型狭窄模型的初步建立 [J]. 中华神经外科杂志, 2006, 22(12): 756-758.
- [10] 管耘园, 叶炳华, 卢辉和, 等. 球囊损伤加高脂喂养建立兔颈动脉粥样硬化模型 [J]. 实验动物科学, 2007, 24(1): 6-9.
- [11] 杨康敏, 杨柳, 朱海波. 超声影像分析在高脂血症金黄地鼠模型构建中的动态监测 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(4): 5-9.
- [12] 高树彪, 王硕仁, 赵明镜, 等. 体表高频超声测定兔颈动脉的二维图像表现和血流特点 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(4): 225-227.
- [13] 佟怀宇, 周定标, 李俊来, 等. 高分辨超声动态观察家兔颈动脉粥样硬化模型颈动脉内膜剥脱术前后血管内膜的变化 [J]. 中国临床康复, 2005, 9(25): 120-122.
- [14] 李晓娟, 张大鹏, 隋丽华, 等. 超声在评价大鼠酒精性脂肪肝模型中的应用 [J]. 中国比较医学杂志, 23(4): 19-22.
- [15] 周琛云, 廖会, 蒋璐蔓. 高频超声显示及测量正常臂部尺神经及正中神经 [J]. 中国医学影像技术, 2009, 25(9): 1677-1679.
- [16] 赵淑芝, 辛朝晖, 吕永锋. 下肢血管疾病的高频超声检查 [J]. 医学影像学杂志, 2005, 15(1): 43-45.
- [17] 秦博, 张芳, 曲红培. 高频超声在下肢血管疾病中的应用 [J]. 上海医学影像, 2008, 17(3): 251-253.
- [18] 陈志奎, 张秀娟, 黄静, 等. 高频超声诊断腮腺肿瘤 [J]. 中国医学影像技术, 2011, 27(9): 1775-1778.
- [19] Koelmay MJ, den Hartog D, Prins MH, et al. Diagnosis of arterial disease of the lower extremities with duplex ultrasonography [J]. Br J Surg, 1996, 83: 404-409.
- [20] 黄道中, 陆永萍, 张青萍, 等. 20MHz 超高频探头超声检查阴茎硬结病变的临床应用价值 [J]. 中国男科学杂志, 2003, 17(2): 122-123.
- [21] Rjosk - Dendorfer D, Gürtler VM, Sommer W, et al. Value of high resolution compression elastography and color Doppler sonography in characterization of breast lesions: comparison of different high-frequency transducers [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2014, 2(28): 1386-0291.
- [22] 黄道中, 黎春雷, 张青萍. 高频超声在浅表器官病变中的应用价值 [J]. 中华超声影像学杂志, 2004, 13(6): 442-445.
- [23] Latham GJ, Veneracion ML, Joffe DC, et al. High-frequency micro-ultrasound for vascular access in young children—a feasibility study by the high-frequency ultrasound in kids study (HUSKY) group [J]. Paediatr Anaesth. 2013, 23(6): 529-35.
- [修回日期]2014-06-20

(上接第 15 页)

- [10] 王婷, 郑长青. 细胞因子在炎症性肠病发病机制中的作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(1): 72-75.
- [11] Arai S, Tsuji M, Kim SJ, et al. Babesia canis infection in canine-red blood cell-substituted CID mice [J]. Int J Parasitol, 1998, 28(9): 1429-1435.
- [12] 张光玉, 王云甫, 黄朝芬, 等. IL-2 对小鼠旋毛虫感染的影响 [J]. 热带医学杂志, 2006, 6(5): 542-543.
- [修回日期]2014-05-22

(上接第 18 页)

- [3] Huber A, Bach M, Frede HG. Pollution of surface waters with pesticides in Germany: modeling non-point source inputs [J]. Agric Ecosyst Environ, 2000, 80(3): 191-204.
- [4] 姚洪波, 陈玉姬, 孙秀玖, 等. 口服 2, 4-滴丁酯 3 例临床观察 [J]. 中国工业医学杂志, 2004, 17(1): 35-35.
- [5] 黄风华, 郑新民, 张元珍, 等. 诊断超声波照射对大鼠睾丸总抗氧化能力、丙二醛及脂质过氧化物酶水平和生殖细胞凋亡的影响 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2007, 28(1): 85-88.
- [6] Nakbi A, Tayeb W, Dabbou S, et al. Hypolipidimic and antioxidant activities of virgin olive oil and its fractions in 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid - treated rats [J]. Nutrition, 2012, 28(1): 81-91.
- [7] Troudi A, Sefi M, Ben Amara I, et al. Oxidative damage in bone and erythrocytes of suckling rats exposed to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid [J]. Pesticide Biochem Physiol, 2012, 104(1): 19-27.
- [8] 徐宏伟, 马爱国. 维生素 A 缺乏对大鼠生精能力及睾丸标志酶活性的影响 [J]. 中国公共卫生, 2002, 18(11): 1298-1299.
- [9] 李丽萍, 刘秀芳, 宁艳花, 等. DEHP 对大鼠睾丸能量代谢酶的影响及其氧化损伤作用 [J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 1: 027.
- [10] Gorini A, Canosi U, Devecchi E, et al. ATPases enzyme activities during ageing in different types of somatic and synaptic plasma membranes from rat frontal cerebral cortex [J]. Progr Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat, 2002, 26(1): 81-90.
- [修回日期]2014-05-21