

本文引用: 赵英政, 吴辉, 徐光翠, 等. 氯化镉抗雄激素样作用的 Hershberger 实验研究[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31 (4): 269-271.

【基础研究】

氯化镉抗雄激素样作用的 Hershberger 实验研究

赵英政, 吴辉, 徐光翠, 韩光亮, 张合喜

(新乡医学院公共卫生学院, 河南 新乡 453003)

摘要: 目的 研究氯化镉的抗雄激素样作用。方法 将 40 只成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠去势, 随机分为阴性对照组, 0.080、0.200、2.000 mg · kg⁻¹ 氯化镉 + 丙酸睾酮 (TP) 组, 氟他胺 + TP 组, 每组 8 只。各组大鼠均皮下注射 TP, 剂量为 0.4 mg · kg⁻¹, 连续染毒 10 d。在此基础上阴性对照组经腹腔注射花生油, 剂量为 10 mL · kg⁻¹; 不同剂量氯化镉 + TP 组分别经腹腔注射 0.080、0.200、2.000 mg · kg⁻¹ 氯化镉 (10 mL · kg⁻¹); 氟他胺 + TP 组给予 50 mg · kg⁻¹ 的氟他胺灌胃。最后一次给药 24 h 后经股动脉采血, 处死动物, 测雄性激素依赖器官的质量并计算脏器系数, 采用放射免疫法检测血清睾酮水平。结果 2.000 mg · kg⁻¹ 氯化镉 + TP 组大鼠体质量增长幅度明显低于阴性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与阴性对照组相比, 氟他胺 + TP 组各雄性激素依赖器官的脏器系数及血清睾酮浓度降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 氯化镉在实验剂量下可能不具有抗雄激素样作用。

关键词: 氯化镉; 丙酸睾酮; 抗雄激素样作用; Hershberger 实验

中图分类号: R135.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239 (2014)04-0269-03

Anti-androgenic activity of cadmium chloride in hershberger assays

ZHAO Ying-zheng, WU Hui, XU Guang-cui, HAN Guang-liang, ZHANG He-xi

(Department of Public Health, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To study the anti-androgen effect of cadmium chloride. **Methods** Forty adult male castrated Sprague-Dawley rats were randomly divided into negative control group, 0.080, 0.200, 2.000 mg · kg⁻¹ cadmium chloride + testosterone propionate (TP) group and flutamide + TP group, with eight rats in each group. All rats were administrated with TP (0.4 mg · kg⁻¹) once daily for 10 days. Based on this, negative control group was administrated peanut oil with a dose of 10 mL · kg⁻¹ by intraperitoneal injection. The different doses of cadmium chloride + TP group were administrated 0.080, 0.200, 2.000 mg · kg⁻¹ cadmium chloride by intraperitoneal injection respectively. The injection volume was 10 mL · kg⁻¹. Flutamide + TP group was administrated flutamide by intragastric administration with the dose of 50 mg · kg⁻¹. The blood was collected via the femoral artery at 24 hours after the last administration and then the animals were sacrificed. The weight of androgen dependent organs was measured and the organ coefficient was calculated. The levels of serum testosterone were detected by radioimmunoassay. **Results** Compared with the negative control group, the growth of body weight of 2.000 mg · kg⁻¹ cadmium chloride + TP group was significantly lower ($P < 0.05$), and the organ coefficients of androgen dependent organs and levels of serum testosterone were decreased significantly in flutamide + TP group ($P < 0.05$). **Conclusion** Cadmium may have not the anti-androgen activity in this assay protocol.

Key words: cadmium chloride; testosterone propionate; anti-androgen effect; Hershberger assays

镉污染是众多环境污染问题之一, 镉生物降解缓慢, 易在体内蓄积, 引起慢性毒性。近年来研究显示, 低剂量镉有干扰内分泌作用, 能够产生拟雌激素样作用^[1-2]。目前尚未见有文献对镉是否具有抗雄激素样作用进行研究。本研究利用 Hershberger 体内实验的方法检测氯化镉是否具有体内抗雄激素样

作用, 并探讨对雄性动物血清激素水平的影响, 为进一步探讨氯化镉的内分泌干扰作用及环境危险度评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 40 只, 体质量 190 ~ 210 g, 由新乡医学院实验动物中心提供。饲养条件: 室温 18 ~ 20 °C, 相对湿度 30% ~ 60%, 按自然昼夜节律采光, 饲养在多聚碳酸酯塑料笼内, 自由进食和饮水。

1.2 实验试剂及仪器 氯化镉、分析纯 (含量

DOI: 10.7683/xyxyxb.2014.04.008

收稿日期: 2013-07-08

基金项目: 新乡医学院高学历人才科研启动项目 (编号: 2007025)

作者简介: 赵英政 (1979-), 男, 河南兰考人, 硕士, 讲师, 研究方向: 环境毒理学。

通信作者: 韩光亮 (1963-), 男, 河南新乡人, 博士, 教授, 研究方向: 环境毒理学。

99.0%)购自天津市开通化学试剂有限公司;氟他胺购自上海复旦复华药业有限公司;丙酸睾酮(tosterone propionate, TP)为中国药品生物制品检定所标准品;市售金龙鱼花生油;睾酮放射免疫试剂盒购于南京建成生物技术有限公司;中佳 GC-400 型 γ 计数器购自安徽科大创新有限公司中佳分公司;H-1650R 低温离心机购自湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司;FA2004A 电子天平购自上海精天电子仪器有限公司。

1.3 动物处理及分组 参照张国军等^[3]的方法, 检疫观察 1 周后, 无异常, 腹腔注射质量分数为 25% 的乌拉坦 ($4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉大鼠。待大鼠呈麻醉状态后 (约 20 min), 将大鼠仰卧固定, 用手指轻轻按压腹部使睾丸进入阴囊内, 备皮后乙醇常规消毒。切开阴囊皮肤, 剪开双侧睾丸鞘膜, 分离睾丸及附睾, 在附睾头尾之间结扎睾丸动脉后摘出睾丸并保留附睾。青霉素冲洗切口, 逐层缝合各层及皮肤。术后腹腔注射青霉素 2 万单位, 术后恢复 1 周。

将去势后 1 周的健康大鼠随机分为 5 组, 阴性对照组, 0.080 、 0.200 、 $2.000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化镉 + TP 组及氟他胺 + TP 组, 每组 8 只。各组大鼠均皮下注射 TP, 剂量为 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 连续染毒 10 d。阴性对照组皮下注射 TP 后 2 h, 腹腔注射花生油, 剂量为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$; 不同剂量氯化镉 + TP 组皮下注射 TP 后 2 h, 分别经腹腔注射氯化镉, 染毒剂量为 0.080 、 0.200 、 $2.000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$); 氟他胺 + TP 组: 皮下注射 TP 后 2 h, 经灌胃给予 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氟他胺。

1.4 检测指标

1.4.1 雄激素依赖组织器官脏器系数 最后一次给药 24 h 后测大鼠体质量, 用质量分数 25% 乌拉坦麻醉, 经股动脉采血后处死动物, 取阴茎、前列腺、精囊腺、肛提肌等雄性激素依赖组织器官, 用眼科剪除去结缔组织后测质量 (精确到 0.1 mg) 并记录结果, 计算脏器系数 (脏器系数 = 脏器质量/大鼠终体质量)。

表 2 各处理组大鼠雄激素依赖组织脏器系数比较

组别	n	阴茎/($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	精索/($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	精囊腺和前列腺/($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)	肛提肌/($\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)
阴性对照组	8	89.7 ± 12.3	56.5 ± 11.9	363.0 ± 64.9	343.0 ± 69.3
$0.080 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化镉 + TP 组	8	76.2 ± 5.8	51.3 ± 7.9	264.0 ± 104.0	234.0 ± 34.9
$0.200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化镉 + TP 组	8	97.3 ± 26.9	55.0 ± 25.6	437.0 ± 245.0	336.0 ± 95.9
$2.000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化镉 + TP 组	8	97.4 ± 14.9	75.2 ± 15.2	330.0 ± 125.0	256.0 ± 84.9
氟他胺 + TP 组	8	12.2 ± 5.2^a	27.5 ± 5.7^a	62.9 ± 18.7^a	161.0 ± 69.4^a

注: 与阴性对照组比较^a $P < 0.05$ 。

2.3 氯化镉对去势大鼠血清睾酮的影响 阴性对照组、 $0.080 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化镉 + TP 组、 $0.200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

1.4.2 血清睾酮水平 大鼠经股动脉采血, 血样室温放置 4 h, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 分离血清。按试剂盒说明书采用放射免疫法检测血清睾酮水平。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件包进行分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各组数据的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 氯化镉对去势 SD 大鼠体质量变化的影响

结果见表 1。动物去势后恢复 7 d, 观察发现生命体征平稳、手术切口愈合情况良好、腹部无膨隆、饮食正常、大小便正常, 各组动物术后恢复良好。 $2.000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化镉 + TP 组大鼠体质量增长幅度明显低于阴性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与阴性对照组比较, $0.080 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化镉 + TP 组、 $0.200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化镉 + TP 组及氟他胺 + TP 组体质量变化差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠体质量变化比较

组别	n	体质量/g	
		染毒前	染毒后
阴性对照组	8	223.2 ± 15.4	288.2 ± 16.2
$0.080 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化镉 + TP 组	8	227.5 ± 14.8	298.2 ± 15.4
$0.200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化镉 + TP 组	8	225.2 ± 16.4	298.2 ± 14.3
$2.000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化镉 + TP 组	8	217.0 ± 15.6	236.0 ± 18.6^a
氟他胺 + TP 组	8	225.0 ± 18.9	287.3 ± 19.6

注: 与阴性对照组比较^a $P < 0.05$ 。

2.2 氯化镉对大鼠雄性激素依赖组织脏器系数的影响 结果见表 2。与阴性对照组比较, 氟他胺 + TP 组大鼠的阴茎、精索、肛提肌、精囊腺及前列腺脏器系数差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与阴性对照组比较, 3 个氯化镉干预组各项指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

氯化镉 + TP 组、 $2.000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化镉 + TP 组及氟他胺 + TP 组的血清睾酮浓度分别为 ($85.2 \pm$

31.7)、 (92.7 ± 37.3) 、 (73.4 ± 23.2) 、 (82.0 ± 26.3) 、 (19.2 ± 15.2) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与阴性对照组相比,氟他胺+TP组大鼠血清睾酮水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。3个氯化镉干预组与阴性对照组比较,大鼠血清睾酮水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

目前,关于镉的生殖毒性已进行了大量动物实验,以往的研究显示镉具有内分泌干扰作用。徐孝娜等^[4]在体外研究发现,长时间低剂量镉对 MCF-7 乳腺癌细胞生长有促进作用。张淑静等^[5]体内试验也证实了氯化镉的环境雌激素样作用,氯化镉能改变未成年雌性小鼠子宫脏器系数,可引起子宫上皮细胞高度增生,同时使雌激素受体的表达增强。目前,对氯化镉是否具有抗雄激素样作用还未见报道,本研究利用 Hershberger 体内实验的方法检测氯化镉是否具有体内抗雄激素样活性。

Hershberger 实验可以检测雄激素和抗雄激素的直接作用,具有简单、短期、相对特异的优点。张国军^[6]研究中的采用去势大鼠实验模型与未去势整体成年雄性大鼠及 20 d 青春期大鼠相比较,对于抗雄激素化合物检测更加灵敏,特异性也高,同时检测的相关激素指标睾酮有助于揭示其作用机制^[6]。本实验给药时间为 10 d,延长给药时间可能增加敏感性,特别对于弱的抗雄激素作用物,至少需要 7 d,否则可能导致假阴性结果^[7]。

本研究的阳性对照氟他胺为一种强效抗雄激素物质,在抗雄激素筛选实验中运用最广泛。氟他胺发挥抗雄激素作用主要是通过抑制靶组织对雄激素的摄取及雄激素与细胞核受体的结合^[8-9]。氟他胺能明显降低去势后用 TP 处理的雄性大鼠的前列腺、精囊腺及雄激素同化作用来表达组织肛提肌的质量。Ashby 等^[10]证实 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的氟他胺能对 TP 产生的雄激素效应产生拮抗作用。该实验氟他胺+TP 组各雄激素依赖器官脏器系数明显低于阴性对照组,差异有统计学意义,说明氟他胺在该实验中表现出抗雄激素样作用。

本次实验中各剂量组阴茎、精索、精囊腺和前列

腺、肛提肌等脏器系数与阴性对照组相比,差异无统计学意义,说明镉在本实验条件下并不能抑制 TP 产生的雄激素效应,镉不具备氟他胺类似的抗雄激素样作用。本实验方法去除了经典的内分泌反馈通路,提示镉很可能不是通过拮抗雄激素受体效应来影响体内雄激素水平的。镉对睾丸间质细胞有明显的毒性作用,间质细胞是睾酮合成和分泌的场所,因此,染镉后体内睾酮水平的变化可能是出于睾丸组织受损伤、间质细胞被破坏、数量减少后的继发反应。

综上所述,镉未显示出明显的抗雄激素样作用。对于镉抗雄激素样作用及其作用机制还需进一步研究证实。

参考文献:

- [1] 付远辉,王思华,汤晓阳,等. 不同剂量 HgCl_2 与 CdCl_2 联合对去卵巢大鼠的雌激素样作用[J]. 郑州大学学报:医学版, 2008,43(5):927-929.
- [2] 王思华,陈小玉. 汞或镉及其联合应用对去卵巢大鼠的雌激素样作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2010,24(6):500-504.
- [3] 张国军,朱心强,郑一凡,等. 动物勃起模型研究抗雄激素对勃起功能的影响[J]. 卫生毒理学杂志,2002,16(4):213-215.
- [4] 徐孝娜,李娅,季爱玲,等. 镉对 MCF-7 细胞生长和雌激素受体表达影响[J]. 中国公共卫生,2013,29(5):710-713.
- [5] 张淑静,于燕波,臧鹏,等. 镉、铅、乐果和对硫磷雌激素样联合作用初步研究[J]. 卫生研究,2012,41(3):493-497.
- [6] 张国军. 环境抗雄激素检测法[J]. 国外医学:卫生学分册, 2003,30(2):84-86.
- [7] Lambright C, Ostby J, Bolseine K, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: an antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats[J]. *Toxicol Sci*, 2000,56(2):389-399.
- [8] Kolle S N, Melching-Kollmuss S, Krennrich G, et al. Assessment of combinations of antiandrogenic compounds vinclozolin and flutamide in a yeast based reporter assay[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2011,60(3):373-380.
- [9] 袁耀美,张茨,白晨. 不同剂量氟他胺诱导小鼠建立尿道下裂及隐睾模型研究[J]. 新乡医学院学报,2012,29(4):241-242.
- [10] Ashby J, Lefevre P A, Tinwell H, et al. Testosterone-stimulated weanlings as an alternative to castrated male rats in the Hershberger anti-androgen assay[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2004, 39(2):229-238.

(本文编辑:孟月 英文编辑:孟月)