

三丁基锡对褐菖鲉精巢性激素受体表达的影响^{*}

张纪亮¹, 朱文文¹, 孙 平¹, 熊建利¹, 郭黛健²

(1. 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003; 2. 洛阳师范学院, 河南 洛阳 471022)

摘 要:三丁基锡(Tributyltin, TBT)能够影响鱼类生殖功能,而有关 TBT 对鱼类生殖细胞发育至关重要的雄激素和雌激素受体的影响还未见报道。本实验以海洋经济鱼类褐菖鲉(*Sebastiscus marmoratus*)为对象,研究环境水平 TBT(1, 10 和 100 ng/L)对精巢雄激素和雌激素受体表达的影响。结果表明,TBT 暴露能够抑制褐菖鲉精巢发育和精巢雌激素受体蛋白的水平,并且发现雌激素受体主要定位于精巢精小叶腔间隙。小叶腔间隙的雌激素受体蛋白水平降低可能影响支持细胞和间隙细胞的正常功能,从而影响精巢的正常发育。TBT 暴露对雄激素受体的表达并没有显著的影响。该结果为全面了解 TBT 产生鱼类生殖毒性效应、途径和机制提供了新的重要的资料。

关键词:三丁基锡;褐菖鲉;精巢;雌激素受体

中图分类号:Q958

文献标志码: A

文章编号:1671-6647(2012)02-0252-05

有机锡化合物,特别是三丁基锡(Tributyltin, TBT),被广泛用于海洋船只防污涂料。Jiang 等^[1]对大连、天津、青岛、北海、秦皇岛和烟台等港口采样测定,发现样点无一例外地存在 TBT 污染,污染程度从 0.5 ng/L(低于检测极限)到几百 ng/L。研究表明,有机锡能够影响动物生殖功能,干扰体内激素的分泌,造成生殖和遗传方面的不良后果^[2]。激素核受体在生殖和发育中可能起重要作用,核受体与配体结合活化,进入核内与靶基因中的激素反应元件结合,激活或抑制靶基因的表达,调节机体的生长发育和生殖。与生殖细胞的发育有关的受体主要包括雌激素受体(Estrogen receptor, ER)和雄激素受体(Androgen receptor, AR)。而三丁基锡对鱼类这两种核受体的影响还未见报道。

本实验以海洋经济鱼类褐菖鲉(*Sebastiscus marmoratus*)为对象,研究环境水平 TBT(1, 10 和 100 ng/L)对精巢性激素受体表达的影响。褐菖鲉是一种卵胎生、体内受精的硬骨鱼,容易采集,在实验室容易饲养,适合作为生态毒理学的研究对象。

1 材料与方法

1.1 实验动物

褐菖鲉采于福建厦门海域,体重 25~50 g。雄性有乳白色突起状的生殖器,根据此特征选择雄性实验鱼。实验鱼先在清洁沙滤海水中暂养 7 d,用充气机连续充气。

1.2 污染实验

TBT(纯度≥97%, Fluka 公司,美国)先用无水乙醇配制成一定质量浓度的储备液,避光于 4 °C 保存,实验前用砂滤海水分别配制成 1, 10 和 100 ng/L 三种质量浓度。对照组的每升海水中加入 1 μL 无水乙醇。每组 30 只褐菖鲉分别于 60 L 不同质量浓度的 TBT 的水体中饲养。每日更换一半相同污染质量浓度的海

^{*} 收稿日期:2011-04-08

资助项目:国家自然科学基金——有机锡污染对海洋鱼类性腺分化和发育的影响及其机制(20777061);河南省教育厅科技重点研究项目——有机锡水体污染对鱼类性腺发育的影响及其机制(12B240001)

作者简介:张纪亮(1980-),男,河南新乡人,副教授,博士,主要从事海洋生态毒理方面研究. E-mail: jiliang_zhang@126.com

(王佳实 编辑)

水。取样前 3 d 停止喂食。实验期间水温 14 ± 2 °C, S 为 22~24。暴露 50 d 后取样。精巢放入中性甲醛固定液中固定,用于组织学观察。

1.3 组织化学

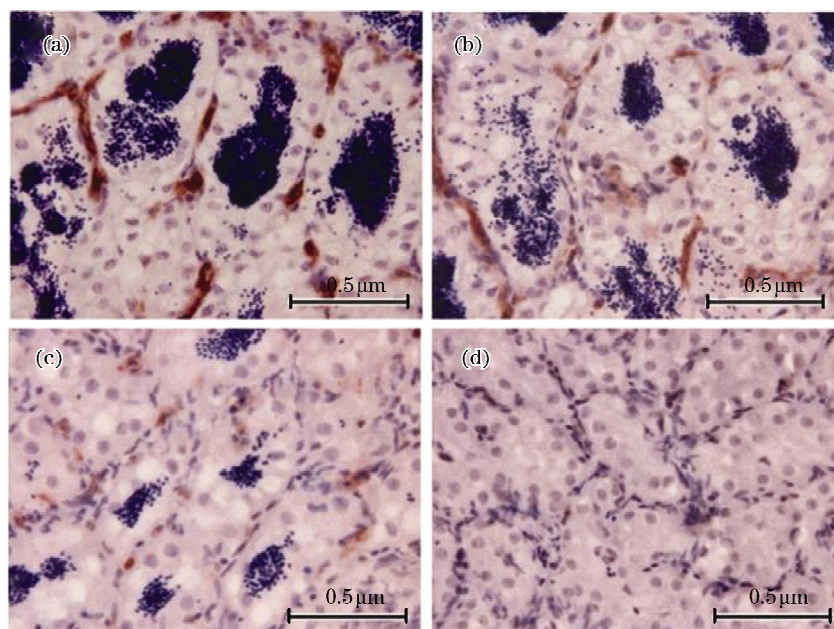
按照免疫组化试剂盒说明书(华美生物,中国洛阳)操作:切片脱蜡至水,3%双氧水甲醇溶液中浸洗 10 min 去除内源性过氧化物酶,接着在柠檬酸盐缓冲液中微波抗原修复 10 min,正常小牛血清 37 °C 封闭 30 min;滴加 1:100 稀释的兔抗人 ER 或兔抗鼠 AR 受体抗体(一抗,NeoMarkers,美国),置 4 °C 过夜,磷酸盐缓冲液(Phosphate buffer saline, PBS)洗 3 次;滴加生物素化羊抗兔 IgG 抗体(二抗),置 37 °C 30 min, PBS 洗 3 次;滴加 SABC-Cy3,置 37 °C 30 min, PBS 洗 4 次, DAB 显色,苏木精复染。阴性对照用正常兔血清 IgG 代替一抗,其余步骤相同。组织切片在 Olympus BX41 型显微镜下观察拍照。

在 6 个不同的视野随机选择 10 个圆形或半圆形的精小叶,利用 OLYSIA BioReport 软件分别计算其周长(c)。精小叶直径(d)根据公式: $d=c/\pi$ 进行换算。采用 SPSS 统计软件进行数据处理,结果用平均值±标准误(Mean±S. E.)表示。单因素方差分析的方法进行统计学分析,组间数据用 Duncan 法进行显著性水平的分析。

2 实验结果

2.1 TBT 对精巢发育的影响

褐菖鲉精巢由许多精小叶构成。在成熟的精巢中精子充满整个精小叶腔。除生殖细胞外,精巢精小叶间还存在另外 2 种非常重要的细胞:支持细胞和间隙细胞。由于这两种细胞较小,在光学显微镜下很难辨别。



(a) 对照组;(b) 1 ng/L TBT 暴露组;(c) 10 ng/L TBT 暴露组;(d) 100 ng/L TBT 暴露组

图 1 免疫组织化学检测 TBT 暴露 50 d 后褐菖鲉精巢内 ER 蛋白表达

注:棕色块状为间隙细胞 ER 蛋白;深紫色块状为精子

Fig. 1 Immunohistochemical detection of ER in the testes of *Sebastiscus marmoratus* exposed to TBT for 50 d

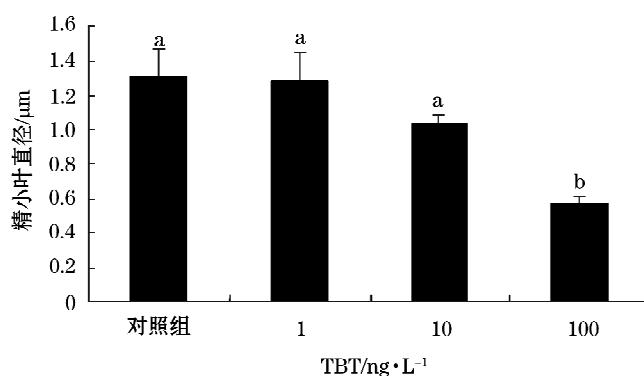


图2 TBT暴露50 d后褐菖鲉精巢精小叶直径

注:上标字母不同的组间具有显著性差异

Fig. 2 Lobules diameter in *Sebastiscus marmoratus* exposed to TBT for 50 days

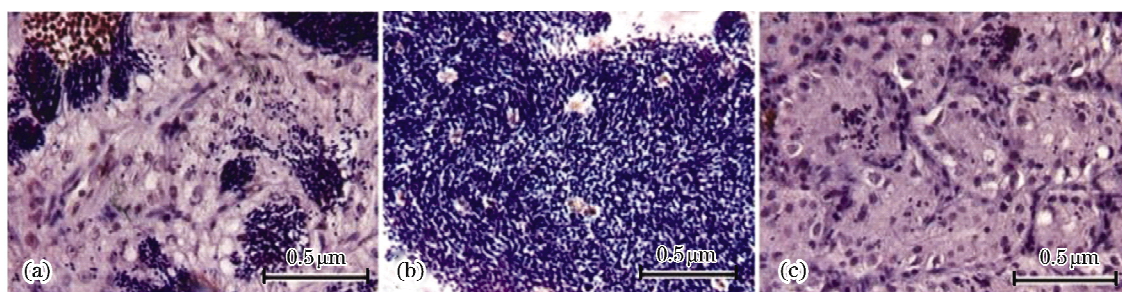
TBT暴露50 d后雄性褐菖鲉精巢发育受到抑制(图1)。在对照组褐菖鲉精巢内精小叶腔内充满了成熟精子(图1a)。1 ng/L TBT暴露组褐菖鲉精巢发育与对照组相比未表现出明显差异。10 ng/L TBT暴露组褐菖鲉精巢精小叶腔内也存在成熟精子,但精子数量和密度明显低于对照组和1 ng/L TBT暴露组(图1c)。在100 ng/L TBT暴露组中成熟精子仅仅存在于少数精小叶腔中,个别精巢中甚至不存在成熟精子(图1d)。另外,与对照组相比,TBT暴露50 d后各暴露组的精小叶直径均有降低,表现出剂量依赖型抑制下降,其中100 ng/L暴露组显著性下降(图2)。

2.2 TBT对精巢ER表达的影响

运用免疫组织化学的方法在精巢内定位ER蛋白,发现ER蛋白主要分布在小叶间隙间(图1)。另外,与对照组相比,各暴露组精巢内ER蛋白均被抑制,而且随着暴露质量浓度的升高,对ER蛋白的抑制程度不断增加,表现出良好的剂量-效应。

2.3 TBT对精巢AR表达的影响

运用免疫组织化学的方法在精巢内定位AR蛋白,发现AR蛋白主要分布在精细胞上(图3)。另外在精母细胞上分布有极少量的AR蛋白(图3)。在小叶间隙、精原细胞以及成熟的精子上都没有发现AR蛋白。与对照组相比,各暴露组精巢内AR蛋白并没有显著的变化。



(a) 对照组精巢AR表达;(b) 图a的局部放大;(c) 100 ng/L TBT暴露组精巢AR表达

图3 免疫组织化学检测TBT暴露50 d后褐菖鲉精巢内AR蛋白变化

注:白色块状体为精细胞;紫色块状体为精母细胞AR蛋白;深紫色块状体为精子

Fig. 3 Immunohistochemical detection of AR in the testes of *Sebastiscus marmoratus* exposed to TBT for 50 d

3 讨 论

在本实验中,TBT 暴露抑制了精巢的发育。和对照组相比,10,100 ng/L TBT 暴露组的精小叶直径显著性降低。Gimeno 等曾报道,精小叶直径和精子发生有关^[3],精小叶直径降低则意味着精子发生受到抑制。在本实验中 10,100 ng/L TBT 暴露组精巢内成熟精子数量降低。Haubruge 等曾经报道,将虹鳉(*Poecilia reticulata*)暴露于 11.2 ng/L TBT 21 d 后精子数量下降 40%~75%^[4]。这和本实验的研究结果是一致的。另外,研究表明类雌激素污染物^[5-7]和抗雄激素污染物^[7-9]通过模仿或抑制内源性雌激素或雄激素与 ER 或 AR 结合来抑制精巢发育。本实验结果表明,TBT 同样能够干扰性激素受体,抑制精巢发育。

研究证明,雌激素的许多作用都是通过 ER 介导的^[10]。目前,关于 ER 在硬骨鱼类性腺定位的研究还很少。Miura 等运用原位杂交的方法在日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)精巢内对 ER 进行定位,发现 ER 主要定位在精原细胞周围的支持细胞和间隙细胞^[11],这和本实验的结果基本一致。另外,Andreassen 等^[12]运用免疫组织化学的方法研究发现 ER 主要定位于对锦(*Zoarcetes viviparus*)精巢的支持细胞和初级精原细胞。尽管和我们的实验结果不一致,但这可能是由于选取的实验鱼类处于不同发育时期所致,因为在本实验中,褐菖鲉精巢中并不存在初级精原细胞。在本实验中,精巢生殖细胞上都没有存在 ER 蛋白,因此雌激素可能通过激活小叶腔间隙细胞上的 ER 间接影响精巢内生殖细胞的发育。ER 对精巢的发育十分重要。Hess 等^[13]指出缺失雌激素受体的转基因雄性小鼠不育,精子发生紊乱,睾丸精子容量和精子活力降低,精巢输出管中流体产物增加。在本实验中,TBT 暴露组褐菖鲉精巢的 ER 蛋白水平降低,这可能是精巢发育受到抑制的原因之一。Andreassen 等^[12]报道,在对锦精巢内,特别是支持细胞上,17 β -雌二醇能够自动调节 ER 的表达。因此,本实验中 ER 表达水平的降低可能和 17 β -雌二醇水平的降低有关。以前的实验已经证实 TBT 能够抑制褐菖鲉精巢 17 β -雌二醇水平^[14]。

TBT 抑制了褐菖鲉精巢小叶腔间隙的 ER 表达水平。在小叶腔间隙分布着支持细胞和间隙细胞。这两种细胞,特别是支持细胞,对精巢的正常发育十分重要^[15]。Rasmussen 等^[16]曾报道,对锦精子发生的紊乱的一个非常重要的原因是支持细胞的衰退。因此,小叶腔间隙的 ER 表达水平降低可能影响支持细胞和间隙细胞的正常功能,从而影响精巢的正常发育。在本实验中 AR 蛋白主要定位在精巢内精细胞上,并且 TBT 暴露对 AR 蛋白表达没有显著影响。因此,在 TBT 抑制精巢发育的过程中,AR 作用并不明显。

本研究结果表明,TBT 对 ER 表达水平的抑制是鱼类精巢发育抑制的一个重要原因。该结果丰富了三丁基锡内分泌干扰机制。尽管 ER 可能介导了 TBT 对褐菖鲉精巢发育的影响过程,但详细的机制还不是很清楚,因此还需要更加深入的研究。

参考文献(References):

- [1] JIANG G B, ZHOU Q F, LIU J Y, et al. Occurrence of butyltin compounds in the waters of selected lakes, rivers and coastal environments from China [J]. Environmental Pollution, 2001, 115(1): 81-87.
- [2] ANTIZAR-LADISLAO B. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. a review. b-antizar@hotmail.com[J]. Environmental International, 2008, 34(2): 292-308.
- [3] GIMENO S, KOMEN H, JOBING S, et al. Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis [J]. Aquatic Toxicology, 1998, 43(2-3): 93-109.
- [4] HAUBRUGE E, PETIT F, GAGE M J. Reduced sperm count in guppies (*Poecilia reticulata*) following exposure to low levels of tributyltin and bisphenol A [J]. Proceedings of Royal Society B: Biological Sciences, 2000, 267(1459): 2333-2337.
- [5] VAN DEN BELT K, WESTER P W, VAN DER VEN L T, et al. Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2002, 21(4): 767-775.
- [6] KINNBERG K, TOFT G. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticu-*

- lata) [J]. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 2003, 54(1): 16-24.
- [7] WEBER I P, HILL R L, JANZ D M. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 63(4): 431-466.
- [8] SINGH M S, JOY K P. Effects of administration of cyproterone acetate on seminal vesicle and testicular activity, and serum testosterone and estradiol-17 β levels in the catfish *Clarias batrachus* [J]. *Acta Biologica Hungarica*, 1998, 49: 143-154.
- [9] KIPARISSIS Y, METCALFE T L, BALCH G C, et al. Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 63(4): 391-403.
- [10] JAUSEN H T, WEST C, LEHMAN M N, et al. Ovarian estrogen receptor- β (ER β) regulation: I. changes in ER β messenger RNA expression prior to ovulation in ewe [J]. *Biology and Reproduction*, 2001, 65(3): 866-872.
- [11] MIURA T, MIURA C, OHTA T, et al. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999, 264(1): 230-234.
- [12] ANDREASSEN T K, SKJOEDT K, ANGLADE I, et al. Molecular cloning, characterisation, and tissue distribution of oestrogen receptor alpha in eelpout (*Zoarces viviparus*) [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2003, 132(3): 356-368.
- [13] HESS R A, BUNICK D, LEE K H, et al. A role for oestrogens in the male reproductive system [J]. *Nature*, 1997, 390(6659): 509-512.
- [14] ZHANG J L, ZUO Z H, HE C Y, et al. Effect of tributyltin on testicular development in *Sebastiscus marmoratus* and the mechanism involved [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28(7): 1528-1535.
- [15] YU W J, LEE B J, NAM S Y, et al. Spermatogenic disorders in adult rats exposed to tributyltin chloride during puberty [J]. *Journal of Veterinary Science*, 2003, 65(12): 1331-1335.
- [16] RASMUSSEN T H, TEH S J, BJERREGAARD P, et al. Anti-estrogen prevents xenoestrogen-induced testicular pathology of eelpout (*Zoarces viviparus*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 72(3): 177-194.

Effect of Tributyltin on the Sex Hormone Receptor in Testis of *Sebastiscus Marmoratus*

ZHANG Ji-liang¹, ZHU Wen-wen¹, SUN Ping¹, XIONG Jian-li¹, GUO Dai-jian²

(1. College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 2. Luoyang Normal University, Luoyang 471022, China)

Abstract: Tributyltin (TBT) can affect the reproductive function in fishes. However, few study reports the effects of TBT on estrogen receptor or androgen receptor which is related to the development of germ cells. Therefore, the present study was conducted to investigate the effects of TBT at environmentally relevant concentrations (1, 10 and 100 ng/L) on testicular estrogen receptor or androgen receptor in male rockfish *Sebastiscus marmoratus*. The results showed that TBT inhibited the testicular development and reduced the levels of estrogen receptor which was located in the interlobular septa. TBT interfered with estrogen receptor might be one of the reasons causing the dysfunction of Sertoli cells, which play a critical role during spermatogenesis. Androgen receptor levels were not shown significant changes after TBT exposure. The results provided new information which is important for fully understanding the reproductive toxic effects, pathway and mechanism of TBT.

Keywords: Tributyltin; *Sebastiscus marmoratus*; testis; estrogen receptor

Received: April 8, 2011