

小鼠子宫增重法检测国产三氯杀螨醇的雌激素生物活性

赵炳顺¹, 邹继超¹, 储少岗², 徐晓白², 杜克久² (1. 中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080; 2. 中国科学院生态环境研究中心环境分析化学与生态毒理开放实验室, 北京 100085)

摘要:为了解我国商品农药三氯杀螨醇是否具有明显的雌激素活性,利用整体给药方式检测了不同剂量三氯杀螨醇对未成熟小鼠子宫的作用。结果表明,较低剂量的三氯杀螨醇未使小鼠子宫明显增重,当剂量增加到 4 mg 和 8 mg 时,子宫重量明显增加,与对照组结果相比,有显著差异。将以上结果与雌二醇、*o,p'*-DDT 的作用进行了比较。本实验的结果说明三氯杀螨醇具有明显的雌激素活性。同时还表明小鼠子宫增重法对评价某些环境雌激素的雌激素生物活性来说是一种较为简便可靠的检测方法。

关键词:环境雌激素;三氯杀螨醇;小鼠;子宫重量

Bioassay of estrogenic effect of dicofol using uterine weight method in mice

ZHAO Bingshun¹, ZOU Jichao¹, CHU Shaogang², XU Xiaobai², DU Kejiu² (1. State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080; 2. Laboratory of Environmental Analytical Chemistry & Ecological Toxicology, Center of Ecological Environment, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085)

Abstract: The estrogenic activity of dicofol locally produced was investigated using the uterine proliferation in mice as an endpoint after subcutaneous administration. The results showed that there was no marked effect on the increase of uterine weight after treatment with lower doses of dicofol, but as the dose increased up to 4 mg and 8 mg the uterine weight increased significantly. Comparing with those of estradiol and *o,p'*-DDT, of which the uterotrophic actions were well documented, the estrogenic effect of dicofol is weaker than the two compounds. These results demonstrated that the locally produced dicofol possesses estrogenic activity, and the *in vivo* bioassay used in this study provides a simple and effective approach to screen the estrogenic action of environmental chemicals.

Key words: environmental estrogen; dicofol; mice; uterus

近年来,环境污染物对于人类和动物健康的有害作用已日益引起重视,有报道表明,某些含氯有机物(如多氯联苯以及杀虫剂 DDT 等)不仅影响并干扰人和动物的生殖功能而且还可能诱发某些肿瘤的产生^[1,2]。对于许多环境污染物的研究结果证明它们往往具有雌激素的生物活性,因而对这类化合物统称为“环境雌激素”^[3]。由于雌激素对机体的作用是比较复杂的,牵涉的环节也较多,因此,在分析环境污染物时,首要的问题是建立准确可靠的检测指标,以便在此基础上,进一步分析它们对人类或野生动物可能带来的危害。在分析被测物的雌激素生物活性时,既可以用体内给药法观察小鼠子宫的增长情况^[4],也可以用体外法观察乳腺癌细胞增

收稿日期:1999-04-14;修订日期:1999-10-14

基金项目:国家自然科学基金项目(29677026)

作者简介:赵炳顺(1950—),男,助理研究员

殖受到的影响^[5]。如果要进一步了解被测物的作用途径,则需要分析药物在体外实验中是否具有结合雌激素受体的特性。利用分子生物学技术还可以分析其在基因水平的作用以及与 DNA 的激素反应元件的相互作用等。研究者常在分析药物时根据研究目的从上述方法中选择一种或多种进行检测。

已有不少报道表明在杀虫剂中, DDT 具有雌激素活性, 能使小鼠子宫增长^[4]。对于另一种与 DDT 结构类似的杀虫剂-三氯杀螨醇的雌激素活性, 曾有过体外雌激素受体结合试验的报道^[6]。还有报道提出, 在佛罗里达湖中的鳄鱼雌性化现象可能与湖水受到三氯杀螨醇的污染有关^[7]。在我国三氯杀螨醇是防治棉花和果树等螨害的常用杀虫剂, 了解它对环境污染的作用及其确切的雌激素生物活性是很有必要的。为了通过这方面的研究建立简便、可靠的检测方法, 同时又结合药物剂型的特点, 本项工作选择体内给药方式, 并以药物的最终生理效应-小鼠子宫增重作为检测指标, 分析了国产商品杀虫剂三氯杀螨醇的雌激素生物活性。

1 材料和方法

1.1 试剂

国产三氯杀螨醇为 22% 乳液, 河北省张家口长城化工厂 1997 年 7 月 25 日生产(产品标准号 Q\ CHO2. 1392); 雌二醇为德国 E. Merck 厂出品; o, p -¹DDT, 纯度 92%, 中国标准物质检测中心赠送。

1.2 动物实验

利用昆明种雌性小白鼠, 于出生后 15—20 天, 体重在 8—12 g 时随机分为以下各组: 对照组 每只小鼠颈部皮下注射不加任何药物的大豆油 0.1 mL, 连续注射 3 天, 于第 4 天称体重后将小鼠用断颈法处死, 剪取子宫, 迅速在电子天平上称量湿重。雌二醇组 每只小鼠每天颈部皮下注射 1 μ g 溶于 0.1 mL 大豆油的雌二醇, 以下处理与 相同。 o, p -¹DDT 组 每只小鼠每天颈部皮下注射 200 μ g 溶于 0.1 mL 大豆油的 o, p -¹DDT, 以下处理与 相同。、 、 组 每只小鼠每天颈部皮下分别注射 1 mg、2 mg、4 mg、8 mg 溶于 0.1 mL 大豆油的三氯杀螨醇, 以下处理与 相同。各组子宫于称重完毕即先后经 Bouin's 液及 70% 乙醇固定, 并进行拍照, 以比较其外观大小等情况。

1.3 结果计算

考虑到小鼠子宫重量通常随体重的变化而有所增减, 为了使所得数据更为合理, 在计算结果时, 将测得的子宫湿重绝对值均换算为每 10 g 体重时子宫 mg 数值, 并表示为: mg/10 g (体重)。各组数据用平均值比较法及 t 检验计算对照组与给药各组之间差异的显著性^[10]。

2 结果

2.1 三氯杀螨醇对小鼠子宫重量的影响

给予相同剂量三氯杀螨醇后, 小鼠子宫重量变化的结果可从表 1 看出, 对照组 15 例小鼠的子宫重量平均值为 8.12 ± 2.39 mg/10g (体重), 三氯杀螨醇 1 mg 和 2 mg 组的子宫重量与对照组之间无明显差异; 4 mg 和 8 mg 组与对照组之间均有显著差异 ($P < 0.001$)。另外, 各组子宫的外观和大小还可从图 1 中看出。

另外, 各组子宫的增长情况还可从图 1 中看出。1A, 1B, 和 1C 为对照组子宫, 而 2A, 2B, 和 2C 为注射雌二醇组子宫, 从外观上可看出这组子宫明显增大, 三氯杀螨醇各不同剂量组的子

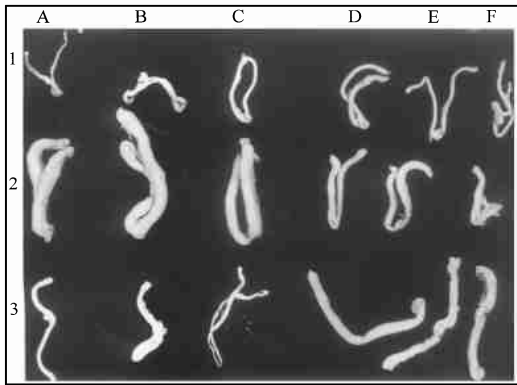


图 1 不同剂量三氯杀螨醇对小鼠子宫增长的作用
 对照组:1A,1B,1C;三氯杀螨醇(2 mg)组:1D,1E,1F;
 雌二醇(1 μg)组:2A,2B,2C;三氯杀螨醇(4 mg)组:2D,
 2E,2F;三氯杀螨醇(1 mg)组:3A,3B,3C;三氯杀螨醇(8
 mg)组:3D,3E,3F.

Fig.1 The effect of dicofol with different dosage on the
 uterine proliferation in mice

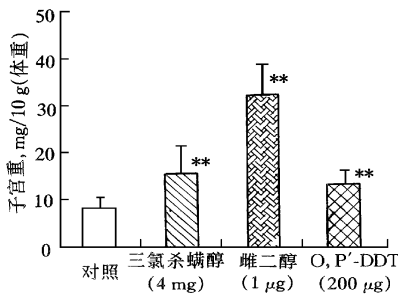


图 2 三氯杀螨醇、雌二醇、o,p'-DDT 作用比较
 (* *:与对照组比较, $P < 0.001$)

Fig.2 The comparison of the effects of dicofol,
 estradiol and o,p'-DDT on uterine
 weight; the dosage are 4 mg, 1 μg and
 200 μg respectively; * *: compared with
 control group, $P < 0.001$

宫也可从图 1 中观察到它们之间的区别。

表 1 三氯杀螨醇对小鼠子宫增重的作用

Table 1 The effect of dicofol on uterine weight gain in mice

组 别	剂 量, mg	溶 剂 (大豆油)	动 物 数	子 宫 重,mg/10g(体 重) (平均值 ±SD)
对 照	~	0.1 mL	15	8.12 ±2.39
三 氯 杀 螨 醇	1	0.1 mL	17	8.23 ±1.69
	2	0.1 mL	16	7.85 ±1.59 *
	4	0.1 mL	17	15.66 ±6.09 **
	8	0.1 mL	17	16.79 ±5.75 **

注:每天每只动物注射 1 次,连续 3 天,第 4 天处死,取子宫称重;
 * :与对照组比较, $P > 0.5$; * *:与对照组比较, $P < 0.001$.

2.2 三氯杀螨醇与雌二醇、o,p'-DDT 作用的比较

参照 Shelby^[4]报道中所用有效剂量,进行了雌二醇和 o,p'-DDT 的实验并以这二种药物所得结果作为三氯杀螨醇组的阳性对照,以便分析三氯杀螨醇是否的确具有雌激素生物活性.将有效剂量的三氯杀螨醇 4 mg 组的数据与雌二醇、o,p'-DDT 结果比较,可以看出,4 mg 三氯杀螨醇与后二者同样具有使小鼠子宫增重的作用,而且这三个实验组的数据与对照组比较,均有显著差异 ($P < 0.001$),说明三氯杀螨醇的确具有雌激素活性.同时,还可看出,在本实验条件下,其所需的有效剂量较高,而子宫增重的程度却较低.以上结果可从图 2 看出.

3 讨 论

从表 1 所示结果可看出,三氯杀螨醇 1 mg 和 2 mg 组的子宫重量与对照组的的结果相近似,这说明在这两种剂量范围内,三氯杀螨醇并未显示出雌激素活性,而当剂量增加到 4 mg 和 8 mg 时,小鼠子宫增重明显.在实验中还观察到 8 mg 组的小鼠发生中毒现象,如有 1/3 小鼠在给药二天后死亡,未死者有倒卧不起及尿潴留现象.

还观察到这些小鼠在中毒情况下,子宫增重明显,并无水肿等其它不正常现象发生(见图 1).上述结果一方面说明三氯杀螨醇在一定剂量下即显示出雌激素生物活性,一方面还说明其有效剂量与半致死剂量是接近的.将有效剂量的结果与雌二醇以及 o,p'-DDT 的作用进行比较时(如图 2 所示),可以看出,1 μg 雌二醇使子宫由对照组的 8.12 增至 32.33,即增加了 3.98 倍,而比 1 μg 高 4000 倍的 4 mg 三氯杀螨醇,使子宫重量达到 15.66,比对照组增加 1.93 倍;与 200 μg 的 o,p'-DDT 相比,三氯杀螨醇的有效剂量高 20 倍,二者使子宫增重的程度相近.另

外,本实验所用雌二醇和 DDT 的剂量以及使子宫增重的程度与 Shelby (1996)^[4]的报道结果较为一致;Vonier (1996)^[6]报导的三氯杀螨醇竞争结合雌二醇受体所需浓度比雌二醇本身所需浓度高约 6000 倍,在这方面,本实验所得结果也有类似情况,即三氯杀螨醇促使子宫明显增重所需剂量(4 mg)比雌二醇所用剂量(1 μ g)高 4000 倍.以上均说明三氯杀螨醇确实具有雌激素活性,同时,也还说明需要相当高的剂量才能表现出它的雌激素作用.

从以上这些结果看来,利用体内实验方法,观察所测药物的最终生理效应对于检测环境雌激素来说是比较适合的,这种方法并不需要复杂的设备或技术.在体外方法中,受体结合实验可以了解药物的作用是否经过受体所介导,但尚不能区分被测物是雌激素的激动剂或是拮抗剂.利用分子生物学技术深入分析药物在基因转录和基因表达水平的作用对于环境污染物的研究具有很重要的意义,尽管这方面的研究需要更多的仪器设备.为了全面而深入的研究环境污染物并评价其对人类和动物界的危害,在检测时选择多种方法以便综合分析是很有必要的^[4],例如,有报道表明利用特定孵化温度对海龟性别决定的影响作为某些环境污染物雌激素活性的检测指标^[8].另外,还通过观察三氯杀螨醇使蛋壳变薄的作用,从而分析野生动物可能受到的危害等^[9].

参考文献:

- [1] Albory U G. Organochlorine Compound in relation to breast cancer, endometrial cancer and endometriosis: an assesment to the biological and epidemiological evidence[J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 1995, 25(6): 463—531
- [2] Birnbaum L S. Endocrine effects of prenatal exposure to PCBs, dioxins and other xenobiotics: implication for policy and future [J]. *Environ Health Perspect*, 1994, 102(8): 676—679
- [3] Rudel R. Predicting Health effects of exposure to compounds with estrogenic activity: methodological issues[J]. *Environ Health Perspect*, 1997, 105(Suppl 3): 655—663
- [4] Shelby M D, Newbold R R, Tully D B, *et al.* Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assay[J]. *Environ Halth Perspect*, 1996, 104: 1296—1300
- [5] Zacharewski T. In vitro bioassay for assessing estrogenic substances[J]. *Environ Sci & Tech*, 1997, 3(3): 613—620
- [6] Vonier F M, Crain D A, McLachlan J A, *et al.* Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator[J]. *Environ Health Perspect*, 1996, 104: 1318—1322
- [7] Margie P. A testing deadline for endocrine disrupters[J]. *Environ Sci & Tech*, 1996, 30(12): 540A—544A
- [8] Bergeron J M, Crews D, McLachlan. PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomaker of enviromental contamination[J]. *Environ Health Perspect*, 1994, 102: 780—781
- [9] Clark D R. Dicolfol Induced eggshell thinning in captive american kestrels[J]. *Environ Toxicol Chem*, 1990, 9(8): 1063—1069
- [10] 杨纪珂. 数理统计方法在医学科学中的应用[M]. 上海: 上海科学技术出版社. 1964. 87—94