# 邻苯二甲酸二异壬酯胚胎期和哺乳期染毒对子代雄性大鼠生殖系统的影响

李佳琳[1]，王永[2]，金宇婷[3]，罗燃燃[1]，王彭彭[1]，张蕴晖[1]，蒋小红[4]

1. 复旦大学公共卫生学院环境卫生学教研室，上海 200032
2. 上海市计划生育科学研究所毒理室，上海 200030
3. 温州医科大学附属育英儿童医院新生儿科，浙江 温州 325027
4. 上海市同仁医院内分泌科，上海 200336

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18727

**摘要：**

[目的] 作为环境内分泌干扰物邻苯二甲酸二乙基己脂（DEHP）的替代物，邻苯二甲酸二异壬酯（DINP）已逐渐成为用量最大的增塑剂之一。本研究旨在探索DINP胚胎期及哺乳期染毒对雄性子代生殖系统的影响及其可能机制。

[方法] 采用两代繁殖实验设计，在Wistar雌性受孕大鼠的GD7（受孕第8天）至PND21（产后第21天），每天经口灌胃DINP，染毒剂量为5、50、500、1 000 mg/kg（体重），玉米油为溶剂对照组，每组由5~6只孕鼠组成。PND2时，测量子代仔鼠的肛殖距（AGD），并计算其AGD指数。在PND4时通过窝标准化操作保持每窝8只仔鼠（4只雌鼠，4只雄鼠）。分别于PND21和PND49，从各剂量组随机抽取10只雄性仔鼠，用ELISA法测定其血清睾酮水平，并解剖观察其睾丸病理变化；计算PND21时睾丸和附睾系数，并用实时定量PCR方法测定睾酮合成途径关键基因的mRNA表达情况。

[结果] 与溶剂对照组相比较，DINP染毒组新生仔鼠的围生期损失数和雌雄性别比差异无统计学意义（$P>0.05$），但雄性仔鼠的AGD缩短，分别为（5.15±0.37）、（5.17±0.33）、（4.57±0.38）、（5.16±0.32）mm，500、1 000 mg/kg染毒组雄性仔鼠的AGD指数（2.48±0.19、2.51±0.13）降低。与对照组相比：PND21时，50 mg/kg及以上的DINP处理组中*Star*基因mRNA表达量增高，500及1 000 mg/kg处理组中*Scarb1*的mRNA表达量降低，*Lhcgr*基因mRNA表达量也在1 000 mg/kg剂量组降低（均$P<0.05$）。PND49 DINP染毒组大鼠生精细胞和精子减少，间质细胞出现聚集现象，但PND21和PND49雄性仔鼠血清睾酮浓度未发现降低（$P>0.05$）。

[结论] 胚胎期及哺乳期DINP暴露对雄性$F_1$代大鼠的生殖系统存在影响，睾酮合成过程中关键基因*Scarb1*、*Star*和*Lhcgr*可能在其作用机制中发挥一定作用。

**关键词：**邻苯二甲酸二异壬酯；生殖发育毒性；肛殖距；血清睾酮

**Effects of embryonic and lactational diisodecyl phthalate exposure on reproductive system of male offspring rats**

*LI Jia-lin[1], WANG Yong[2], JIN Yu-ting[3], LUO Ran-ran[1], WANG Peng-peng[1], ZHANG Yun-hui[1], JIANG Xiao-hong[4]* (1.*Department of Environmental Hygiene, School of Public Health, Fudan University, Shanghai* 200032, *China;* 2.*Laboratory of Toxicology, Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai* 200030, *China;* 3.*Neonatology Department, Yuying Children's Hospital Affiliated to Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang* 325027, *China;* 4.*Department of Endocrinology, Shanghai Tongren Hospital, Shanghai* 200336, *China*)

**Abstract:**

**[Objective]** As an alternative to environmental endocrine disruptor diethylhexyl phthalate (DEHP), diisodecyl phthalate (DINP) has gradually become one of the most widely used plasticizers. This study aims to explore the effects of embryonic and lactational DINP exposure on the reproductive system of male offspring and its possible mechanisms.

**[Methods]** In a two-generation reproduction toxicity study, pregnant Wistar rats were treated with 5, 50, 500, and 1 000 mg/kg (body weight) DINP or corn oil (solvent control) by gavage once a day from gestational day 7 (GD7) to postnatal day 21 (PND21), with 5-6 pregnant rats in each group. On PND2, the anogenital distance (AGD) of the pups was measured and the AGD

**组稿专家**
张蕴晖（复旦大学公共卫生学院），
E-mail：yhzhang@shmu.edu.cn
厉曙光（复旦大学公共卫生学院），
E-mail：leeshuguang@fudan.edu.cn

**基金项目**
国家自然科学基金（21577026，81872581）；国家重点研发计划青年项目（2016YFC0206800）

**作者简介**
李佳琳（1995—），女，硕士生；
E-mail：18211020019@fudan.edu.cn

**通信作者**
蒋小红，E-mail：18121226538@163.com

**利益冲突** 无申报
**收稿日期** 2018-11-05
**录用日期** 2019-02-13

**文章编号** 2095-9982(2019)04-0320-07
**中图分类号** R114
**文献标志码** A

**▸引用**
李佳琳，王永，金宇婷，等. 邻苯二甲酸二异壬酯胚胎期和哺乳期染毒对子代雄性大鼠生殖系统的影响[J]. 环境与职业医学，2019，36（4）：320-326.

**▸本文链接**
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18727

**Funding**
This study was funded.

**Correspondence to**
JIANG Xiao-hong, E-mail: 18121226538@163.com

**Competing interests** None declared
**Received** 2018-11-05
**Accepted** 2019-02-13

**▸To cite**
LI Jia-lin, WANG Yong, JIN Yu-ting, et al. Effects of embryonic and lactational diisodecyl phthalate exposure on reproductive system of male offspring rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(4): 320-326.

**▸Link to this article**
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18727

Index was calculated. On PND4, the litters were culled to 8 pups per litter (4 females and 4 males). On PND21 and PND49, 10 male pups randomly selected from each dose group were measured for serum testosterone levels by ELISA and observed for testicular pathological changes. The testis and epididymis coefficients were calculated on PND21, and the mRNA expressions of key genes in testosterone synthesis pathway were determined by real-time quantitative PCR.

**[Results]** Compared with the solvent control group, the perinatal loss and male-female sex ratio of the newborn rats in the designed DINP groups were not statistically different ($P>0.05$), but the AGDs of male pups were significantly shortened to (5.15±0.37), (5.17±0.33), (4.57±0.38), and (5.16±0.32) mm in the order of low to high DINP exposure level, respectively, and the AGD indices of the 500 and 1 000 mg/kg dose groups were significantly reduced to (2.48±0.19) and (2.51±0.13), respectively. Compared with the control group, on PND21, the mRNA expression levels of *Star* were significantly increased in the DINP-treated groups at 50 mg/kg and above, the levels of *Scarb1* were significantly decreased in the DINP-treated groups at 500 and 1 000 mg/kg, and the levels of *Lhcgr* was significantly reduced in the 1 000 mg/kg DINP-treated group ($P<0.05$). The spermatogenic cells and spermatozoa decreased and aggregation appeared in the interstitial cells after the DINP treatment on PND49; but there was no significant decrease in serum testosterone concentrations in the male rats on PND21 and PND49 ($P>0.05$).

**[Conclusion]** Embryonic and lactational DINP exposure affects the reproductive system of male $F_1$ rats. *Scarb1*, *Star* and *Lhcgr*, key genes of testosterone synthesis, may play a role in the male reproductive toxicity of DINP.

**Keywords:** diisononyl phthalate; reproductive and developmental toxicity; anogenital distance; serum testosterone

邻苯二甲酸二异壬酯（diisononyl phthalate，DINP）是一种广泛应用的增塑剂，主要用于各类的软质聚氯乙烯产品，如电线电缆、薄膜、聚氯乙烯皮革、聚氯乙烯地板革、玩具、鞋材、封边条、护套、假发、桌布等，在某些橡胶产品和涂料中也有少量的应用。由于欧盟对邻苯二甲酸二（2-乙基）己脂（di-2-ethylhexyl phthalate，DEHP）、邻苯二甲酸丁酯苯甲酯（butyl benzyl phthalate，BBP）、邻苯二甲酸二丁酯（dibutyl phthalate，DBP）等6种常用增塑剂的限用，DINP已逐渐成为用量最大的增塑剂之一。由于担心潜在的毒性，欧盟已禁止DINP用于生产可被3岁以下儿童放入口中的玩具，并设定了食品接触材料的总DINP最大特定迁移限量为9 mg/kg[1-2]。

邻苯二甲酸酯类增塑剂，如DEHP和BBP，具有生殖发育毒性，是一类环境内分泌干扰物，从胎儿时期即可影响内分泌，通过抑制睾丸生成睾酮，最终对雄性生殖系统产生影响。有研究发现DINP可能也同样具有生殖发育毒性：Gray等[3]发现，750 mg/kg DINP围生期染毒可以引起SD雄性大鼠乳头保留，但其生殖毒性明显低于同剂量的DEHP和BBP；Boberg等[4]发现围生期DINP染毒能造成Wistar雄性仔鼠从胎儿时期至其成年后生殖系统的改变；Lee等[5]发现，在不同暴露剂量下，DINP可导致大鼠的肛殖距（anogenital distance，AGD）和AGD指数降低。这些研究都提示，DINP可能具有雄性生殖毒性，但仅有少数研究关注了DINP宫内暴露和哺乳期染毒对仔鼠生殖系统发育的影响。Boberg[4]继续研究发现Wistar大鼠孕期及哺乳期DINP染毒可致其雄性后代中乳头保留增加、AGD减少、精子活力降低和精子数量增加。Clewell等[6]也对围生期SD大鼠进行了不同浓度的染毒，发现DINP可诱导雄性仔鼠在出生后第2天（postnatal day 2，PND2）出现多核生殖细胞和睾丸间质细胞集聚，并且在PND14发现了AGD的缩小。

睾酮对促进精子生成和成熟、附属性腺发育和维持功能以及下丘脑-垂体-性腺轴的调控等具有重要作用[7]。胆固醇是睾酮合成途径中的前体物，依次经孕烯醇酮、17α-羟孕烯醇酮、脱氢异雄酮、雄烯二酮最终转换为睾酮。睾酮的合成过程离不开B类清道夫受体1（scavenger receptor class B member 1，Scarb1）对胆固醇的转运，类固醇急性调节蛋白（steroidogenic acute regulatory protein，Star）对胆固醇转运的促进作用，黄体化激素/绒毛膜促性腺激素受体（luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor，Lhcgr）对相关酶的激活，此外限速酶胆固醇侧链裂解酶（cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1，Cyp11a1）在睾酮合成转运过程中也发挥着重要的调节作用[8-9]。睾丸间质细胞源胰岛素样因子3（insulin like 3，Insl3）主要在睾丸间质细胞特异性表达，随个体性成熟的增高而增高，除了对睾丸下降过程中的引带发育起到关键作用外，也可以促进生殖细胞增殖和减少生殖细胞凋亡，是评价雄性生殖功能减退和成熟度的重要标志物[10-12]。

因此，本研究运用两代繁殖实验，探索DINP胚胎期及哺乳期染毒对大鼠雄性子代生殖系统的影响，通过测定仔鼠AGD和比较PND21和PND49时仔鼠血清睾酮水平，观察睾丸病理变化，并分析睾酮合成过程

中关键基因表达的改变，来探索DINP对仔鼠不同生长阶段生殖系统发育的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

成年Wistar雌性大鼠，购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司，实验动物生产许可证SCXK（沪）2013-0016。经检疫和适应性观察后，选择健康并能较好适应饲养环境的大鼠。

### 1.2 饲养条件

大鼠在上海市计划生育科学研究所（中国生育调节药物毒理检测中心）SPF级动物房内饲养，实验动物使用许可证号SYXK（沪）2013-0027。动物室的温度为（22±3）℃，相对湿度为50%~60%，采用人工照明，12 h光照，12 h黑暗。动物采用标准颗粒饲料饲养并自由饮水。

### 1.3 试剂

主要试剂：DINP（上海永盛化工进出口公司，中国），大鼠睾酮ELISA试剂盒（上海林瑞生物科技有限公司，中国），异丙醇（上海生工生物，中国），三氯甲烷（国药集团化学试剂有限公司，中国），DEPC水（上海生工生物，中国），Primescript RT Reagent Kit（宝日医生物技术，中国），TRIzol（英杰生命技术有限公司，美国）。

### 1.4 剂量设置

由于DINP为DEHP等增塑剂的替代物，毒性较低，参考欧洲经济合作与发展组织（OECD）指南414中对发育毒性[13]染毒剂量最大不超过1 000 mg/（kg·d）的要求，本研究共设五个剂量组，DINP染毒剂量依次为1 000、500、50、5 mg/kg和溶剂对照组。分别准确称取0.1、1.0、10、20 g DINP，加入玉米油，混合定容于200 mL容量瓶中，配置成0.5、5、50、100 mg/mL的DINP贮存液，于4℃冰箱保存待用。最低染毒剂量5 mg/kg是模拟人类接触DINP的最小环境暴露水平。

### 1.5 实验设计

经过1周的适应性饲养，将雄性和雌性Wistar成年大鼠按照每笼1∶2的比例混合饲养，在每天清晨的固定时间给雌鼠做阴道涂片检查，通过在显微镜下检查涂片上是否有精子来确定受孕与否。查到精子后，取出受孕大鼠并根据体重随机分配到对照组和各染毒组，并将检查到精子的那天确定为受孕第1天（GD0）。孕鼠从受孕的第8天（GD7）开始，灌胃染毒至哺乳期结束（PND21），每天1次，体积为0.005 mL/g，同时每天称重1次，并根据体重调节染毒体积。仔鼠饲养至PND49。对照组经灌胃给予同体积/同频次的玉米油。

本研究设计和指标测量参考OECD指南414（发育毒性研究）[13]和421（生殖发育毒性筛选实验）[14]要求。大鼠交配后，弃去雄性大鼠和非妊娠的雌性大鼠，每个实验组由5~6只怀孕的雌性大鼠组成。

计数各组新生仔鼠围生期损失数、子代数、子代性别比。PND2时使用卡尺测量不同染毒组雄性仔鼠的AGD，并计算AGD指数，AGD指数=AGD/$\sqrt[3]{体重}$。PND4时进行窝标准化操作，做到每窝8只幼仔（4只雌鼠，4只雄鼠）。PND21和PND49时采取随机抽样的方法分别从各组选出10只雄性仔鼠，用ELISA法测定PND21和PND49时仔鼠血清睾酮水平，并解剖仔鼠，经HE染色后在光学显微镜下观察其睾丸的病理改变。同时PND21时对解剖的10只仔鼠进行称重，并计算睾丸系数和附睾系数，睾丸（附睾）系数=［睾丸（附睾）重量/小鼠体重］×100%。

用TRIzol试剂一步法提取睾丸组织总RNA。*Scarb1*、*Lhcgr*、*Star*、*Cyp11a1*和*Insl3*引物序列如表1所示。使用Mastercycler ep realplex荧光定量仪按两步法程序进行PCR反应，预变性循环1次，95℃ 30 s；PCR反应循环40次，95℃变性5 s，60℃复性31 s；溶解阶段循环1次，95℃ 15 s，60℃ 15 s和95℃ 15 s。以*RPS16*作为内参基因，用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各组目的基因mRNA表达的差别。

**表1 睾酮合成相关基因引物序列**

Table 1 Primer sequences of genes related to testosterone synthesis

| 基因 Gene | 正向引物 Forward primer | 反向引物 Reverse primer |
|---|---|---|
| *Insl3* | 5′-GTGGCTGGAGCAACGACA-3′ | 5′-AGAAGCCTGGTGAGGAAGC-3′ |
| *Lhcgr* | 5′-CTGCGCTGTCCTGGCC-3′ | 5′-CGACCTCATTAAGTCCCCTGAA-3′ |
| *Scarb1* | 5′-ATGGTACTGCCGGGCAGAT-3′ | 5′-CGAACACCCTTGATTCCTGGTA-3′ |
| *Star* | 5′-CCCAAATGTCAAGGAAATCA-3′ | 5′-AGGCATCTCCCCAAAGTG-3′ |
| *Cyp11a1* | 5′-AAGTATCCGTGATGTGGG-3′ | 5′-TCATACAGTGTCGCCTTTTCT-3′ |
| *RPS16* | 5′-AAGTCTTCGGACGCAAGAAA-3′ | 5′-TGCCCAGAAGCAGAACAG-3′ |

### 1.6 统计学分析

运用SPSS 16.0软件对所有数据进行统计分析，包括正态性检验，方差齐性检验，各染毒组与对照组进行Dunnett-*t*检验的方差分析或卡方检验。检验水准$\alpha$=0.05。

## 2 结果

### 2.1 仔鼠基本情况

DINP 染毒对仔鼠体重增长无明显影响（数据未显示）。DINP 各染毒组新生仔鼠的围生期存活率和子代性别比详见表 2。与溶剂对照组相比，DINP 暴露组仔鼠的围生期损失数和性别比例均未见明显差异（$P>0.05$）。

表 2 DINP 围生期暴露对新生仔鼠的影响

Table 2 Effects of perinatal DINP exposure on basic indices of offspring rats

| 剂量组（mg/kg）Dose group | 围生期存活率（%）Perinatal survival rate | *P* | 雌 / 雄比 Female/male ratio | *P* |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 100.00 | — | 26/24 | — |
| 5 | 96.43 | 0.497 | 23/33 | 0.260 |
| 50 | 98.25 | 1.000 | 23/34 | 0.228 |
| 500 | 95.52 | 0.260 | 33/34 | 0.769 |
| 1 000 | 93.10 | 0.122 | 32/26 | 0.742 |

### 2.2 AGD 指数和睾丸及附睾系数

与溶剂对照组相比，各 DINP 组雄性仔鼠 AGD 缩短（$P<0.05$）；高剂量的 DINP（500 mg/kg 和 1 000 mg/kg）导致雄性仔鼠的 AGD 指数明显降低（表 3）。

表 3 DINP 胚胎期和哺乳期染毒对 PND2 雄性仔鼠 AGD 的影响（$\bar{x}\pm s$）

Table 3 Effects of intrauterine and lactational DINP exposure on AGD of male offspring rats on PND21

| 剂量组（mg/kg）Dose group | 仔鼠数（只）Number of pups | AGD（mm） | AGD 指数 AGD index |
|---|---|---|---|
| 0 | 24 | 5.55±0.35 | 2.68±0.15 |
| 5 | 33 | 5.15±0.37* | 2.60±0.17 |
| 50 | 31 | 5.17±0.33* | 2.60±0.17 |
| 500 | 32 | 4.57±0.38* | 2.48±0.19* |
| 1 000 | 23 | 5.16±0.32* | 2.51±0.13* |

[注] 与溶剂对照组（0 mg/kg）比较，*：$P<0.05$；**：$P<0.01$。

[Note] Compared with the solvent control group(0 mg/kg), *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

表 4 为 PND21 时雄性仔鼠的睾丸、附睾系数的统计结果。500、1 000 mg/kg DINP 组雄性仔鼠的睾丸和附睾系数明显低于对照组（$P<0.05$），而 5、50 mg/kg DINP 染毒组则无差异（$P>0.05$）。

### 2.3 血清睾酮浓度和睾丸病理改变

结果显示，PND21 和 PND49 时雄性仔鼠的血清睾酮浓度与溶剂对照组相比均没有明显差异（$P>0.05$），见表 5。

表 4 DINP 胚胎期和哺乳期染毒对 PND21 雄性仔鼠睾丸和附睾系数的影响（$\bar{x}\pm s$，$n$=10，%）

Table 4 Effects of intrauterine and lactational DINP exposure on testis and epididymis coefficients of male offspring rats on PND21

| 剂量组（mg/kg）Dose group | 睾丸系数 Testicular coefficient | 附睾系数 Epididymis coefficient |
|---|---|---|
| 0 | 0.19±0.03 | 0.07±0.01 |
| 5 | 0.19±0.02 | 0.07±0.01 |
| 50 | 0.18±0.01 | 0.06±0.01 |
| 500 | 0.16±0.01* | 0.05±0.01* |
| 1 000 | 0.09±0.03** | 0.04±0.01** |

[注] 与溶剂对照组（0 mg/kg）比较，*：$P<0.05$；**：$P<0.01$。

[Note] Compared with the solvent control group(0 mg/kg), *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

表 5 DINP 胚胎期和哺乳期染毒对雄性仔鼠血清睾酮浓度的影响（$\bar{x}\pm s$，μg/L）

Table 5 Effects of intrauterine and lactational DINP exposure on serum testosterone concentration in male offspring rats

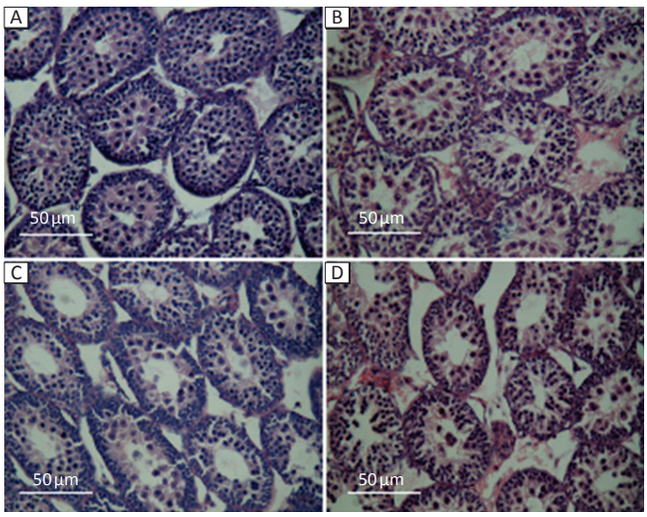
| 剂量组（mg/kg）Dose group | PND21（$n$=10）* | PND49（$n$=10）* |
|---|---|---|
| 0 | 2.99±1.14 | 3.40±1.46 |
| 5 | 3.11±0.90 | 3.08±0.82 |
| 50 | 3.28±1.03 | 2.01±0.48 |
| 500 | 2.33±0.50 | 3.36±0.84 |
| 1 000 | 2.05±0.62 | 2.61±1.01 |

[注（Note）] *：$P>0.05$。

PND21 和 PND49 雄性仔鼠睾丸病理结果显示，对照组仔鼠睾丸曲细精管排列整齐，层次清楚。随着 DINP 染毒剂量的增高，曲细精管内生精细胞数量减少，有的脱落入管腔，呈片状，在腔内可见多核细胞。与 PND21 大鼠相比，成熟大鼠（PND49）睾丸曲细精管内生精上皮和间质细胞更为明显。溶剂对照组雄性仔鼠睾丸中的生精细胞排列整齐，在管腔内可见精子，间质细胞在曲细精管之间可以观察到被胞浆染成红色。DINP 染毒组生精细胞和精子减少，间质细胞出现聚集现象，其中 500 mg/kg 组间质细胞聚集最为明显。见图 1、图 2。

### 2.4 睾酮合成关键基因的 mRNA 表达

表 6 可见，与溶剂对照组比较，50 mg/kg 及以上浓度 DINP 染毒组 *Star* 基因表达均升高，500、1 000 mg/kg DINP 染毒组 *Scarb1* 基因 mRNA 表达量明显降低，1 000 mg/kg DINP 染毒组 *Lhcgr* 基因 mRNA 表达量也降低（$P<0.05$）。然而，各 DINP 染毒组中 *Insl3* 和 *Cyp11a1* 基因 mRNA 表达水平与溶剂对照组相比均无统计学差异（$P>0.05$）。

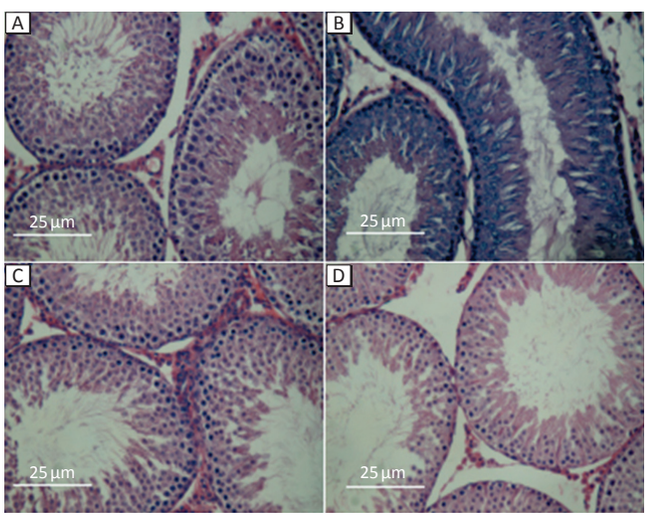



[注] A：溶剂对照组，睾丸曲细精管排列整齐；B：50 mg/kg DINP，部分生精细胞脱落入曲细精管管腔，曲细精管轻度萎缩；C：500 mg/kg DINP，间质细胞聚集；D：1 000 mg/kg DINP，生精细胞减少。

[Note] A: Seminiferous tubules are neatly arranged in the solvent control group; B: Some spermatogenic cells fall into seminiferous tubule lumens and seminiferous tubules show mild atrophy in the 50 mg/kg DINP group; C: Leydig cells accumulate in the 500 mg/kg DINP group ; D: The number of spermatogenic cells is reduced in the 1 000 mg/kg DINP group.

**图1 DINP胚胎期和哺乳期染毒后PND21时雄性仔鼠睾丸病理变化**

Figure 1 Pathological changes of testis in male offspring rats after intrauterine and lactational DINP exposure on PND21




[注] A：溶剂对照组，睾丸曲细精管排列整齐，精子细胞更成熟；B：50 mg/kg DINP，少量生精细胞脱落入曲细精管管腔；C：500 mg/kg DINP，间质细胞聚集；D：1 000 mg/kg DINP，生精细胞减少。

[Note] A: Seminiferous tubules are neatly arranged and sperm cells are more mature in the solvent control group; B: A small amount of spermatogenic cells fall into seminiferous tubule lumens in the 50 mg/kg DINP group; C: Leydig cells accumulate in the 500 mg/kg DINP group; D: The number of spermatogenic cells is reduced in the 1 000 mg/kg DINP group.

**图2 DINP胚胎期和哺乳期染毒后PND49时雄性仔鼠睾丸病理变化**

Figure 2 Pathological changes of testis in male offspring rats after intrauterine and lactational DINP exposure on PND49

**表6 DINP胚胎期和哺乳期染毒对PND21雄性仔鼠睾酮合成关键基因mRNA相对表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n$=10）**

Table 6 Relative mRNA expression changes of genes key to testosterone synthesis in male offspring rats after intrauterine and lactational exposure to DINP on PND21

| 剂量组（mg/kg）Dose group | *Insl3* | *Scarb1* | *Star* | *Lhcgr* | *Cyp11a1* |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 1.03±0.15 | 1.00±0.04 | 1.10±0.09 | 1.00±0.10 | 1.00±0.16 |
| 5 | 1.06±0.14 | 0.90±0.06 | 1.33±0.22 | 0.90±0.12 | 0.85±0.02 |
| 50 | 1.07±0.15 | 0.85±0.13 | 1.36±0.18* | 1.02±0.06 | 0.88±0.08 |
| 500 | 1.10±0.18 | 0.79±0.10* | 1.42±0.35** | 0.93±0.15 | 0.90±0.05 |
| 1 000 | 1.30±0.16 | 0.51±0.12** | 1.68±0.33** | 0.70±0.11** | 0.91±0.15 |

[注] 与溶剂对照组（0 mg/kg）比较，*：$P$<0.05；**：$P$<0.01。

[Note] Compared with the solvent control group(0 mg/kg), *: $P$<0.05; **: $P$<0.01.

## 3 讨论

作为一种消耗量迅速增加的增塑剂，DINP对生物体健康的影响越来越受到关注。与其他邻苯二甲酸酯一样，DINP被认为可能具有抗雄激素样作用。例如，Borch等[15]发现，DINP单独或DINP联合DEHP染毒，能抑制雄性胎鼠睾酮的合成，它还能导致雄性胎鼠血浆促黄体生成素水平的增加。Masutomi等[16]的研究表明，20 000 mg/L DINP围生期暴露会致SD染毒仔鼠精母细胞和睾丸支持细胞变性。但Gray等[3]发现，DINP的生殖毒性明显低于同剂量的DEHP和BBP。除了动物实验的证据，最近的一项人群研究报告也发现DINP代谢物与血清睾酮的减少有关，表明其抗雄激素的作用[2]。

孕期和哺乳期是环境内分泌干扰物最为敏感的暴露窗口期。因此，本研究运用两代繁殖实验设计，研究DINP胚胎期和哺乳期染毒对不同发育阶段雄性大鼠生殖系统的影响。

研究结果显示，DINP对怀孕雌鼠和$F_1$代仔鼠的体重增加没有明显影响，染毒组新生仔鼠的围生期损失数和雌雄性别比与溶剂对照组相比也无统计学差异；然而DINP各染毒组雄性仔鼠的AGD较溶剂对照组均明显降低，这一结论与Boberg等[4]在其关于围生期DINP暴露对大鼠生殖及行为的影响中所阐述的结果相符。在其研究中，600、750、900 mg/kg DINP染毒能引起雄性仔鼠的AGD明显降低。本研究还发现，500、1 000 mg/kg DINP染毒组雄性仔鼠的AGD指数较溶剂对照组降低。Boberg等[4]的研究发现，在300、600、750、900 mg/kg DINP四个染毒组中，仅有900 mg/kg染毒组雄性仔鼠的AGD指数降低，同样表现为高暴露量对其雄性子代的AGD指数有影响。

为进一步探讨DINP可能的雄性生殖发育毒性作用，本研究还检测了PND21和PND49仔鼠的血清睾酮浓度，结果未发现暴露组PND21和PND49雄性仔鼠的血清睾酮浓度与溶剂对照组有明显差别。但本研究中样本量较小，因此DINP围生期暴露对青春期前雄性仔鼠睾酮分泌的影响有待进一步研究。

本研究发现，DINP围生期暴露对雄性子代的生殖系统发育存在一定影响，具体表现为雄性仔鼠AGD和AGD指数减少，以及PND21和PND49时雄性仔鼠睾丸发生病理特异性的改变。与溶剂对照组相比较，DINP染毒组大鼠睾丸的生精细胞和精子减少，500 mg/kg组间质细胞聚集最为明显，与DEHP所致的睾丸间质细胞瘤样改变相似[17]。这与逯晓波等[18]的研究结果一致，他们研究DEHP对大鼠睾丸发育及*Star*、*Cyp19a1*、*Cyp11a1*基因表达的影响时，也发现了间质细胞汇聚成团的变化相似，同时也与Li等[2]发现的子宫内暴露于DINP会影响一些仔鼠睾丸间质细胞类固醇基因，淋巴细胞多核和睾丸间质细胞聚集的表达水平的结果一致。因此可以推测睾丸间质细胞可能是DINP毒作用的靶细胞之一。

为探索可能机制，本研究检测了PND21时*Scarb1*、*Lhcgr*、*Star*、*Cyp11a1*和*Insl3*基因的mRNA表达量。结果显示，DINP染毒组*Scarb1*和*Lhcgr*基因mRNA表达量降低，*Star*基因mRNA表达量增高，表明该剂量DINP胚胎期和哺乳期染毒，可以导致雄鼠睾酮合成路径中脂蛋白转运层面和游离胆固醇由线粒体外膜转移进内膜层面相关基因表达异常，这些异常可能是DINP宫内和哺乳期染毒致$F_1$代雄鼠生殖损害的可能机制。Adamsson等[19]发现，在围生期暴露于250 mg/kg DINP时，大鼠睾丸*Star*表达水平有增加的趋势，而本实验在50 mg/kg即出现升高，而Hannas[20]则发现1 000、1 500 mg/kg DINP染毒会降低大鼠睾丸*Star*和*Cyp11a1*基因的表达水平，结果的不一致性可能是因为Hannas染毒时间短，为GD14—GD18，且测量的是仔鼠GD18时的基因表达水平，与本研究中的仔鼠发育阶段不同。睾丸Star是一类胆固醇转运蛋白，可促进类固醇激素合成细胞中胆固醇自线粒体外膜转运至内膜，进而转化合成类固醇激素，是该类激素合成的限速步骤，推测DINP可能会通过影响睾酮合成过程来发挥其抗雄激素样作用，这导致了本研究中观察到的雄性生殖发育毒性的表征。

遗憾的是，由于本研究缺少PND49时的mRNA测量结果，未能与PND21时的测量结果进行时序比较。此外，本研究只关注了DINP对雄性仔鼠产生的生殖发育毒性，有动物实验表明，DEHP妊娠期和哺乳期暴露可对青春期前的雌性仔鼠的促性腺激素发挥特有的刺激作用[7]，人群研究也发现高相对分子质量邻苯二甲酸酯（如DINP）宫内暴露能够使女孩青春发动时相提前[21]，因此需要更多证据来证实围生期DINP暴露对雌性后代产生的生殖发育毒性。

综上，本研究运用两代繁殖实验，通过测定仔鼠AGD和比较PND21与PND49仔鼠血清睾酮水平及睾丸病理变化，发现胚胎期及哺乳期DINP暴露对雄性$F_1$代大鼠的生殖系统存在影响，发现*Scarb1*和*Lhcgr*可能在DINP暴露对子代雄性生殖系统的作用机制中发挥一定作用。

## 参考文献


[1] Directive 2005/84/EC of the European Parliament and of the Council of 14 December 2005［A/OL］.［2018-11-01］. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX：32005L0084&rid=1.

[2] LI L，BU T，SU H，et al. *In utero* exposure to diisononyl phthalate caused testicular dysgenesis of rat fetal testis［J］. Toxicol Lett，2015，232（2）：466-474.

[3] GRAY L J J R，OSTBY J，FURR J，et al. Perinatal exposure to the phthalates DEHP，BBP，and DINP，but not DEP，DMP，or DOTP，alters sexual differentiation of the male rat［J］. Toxicol Sci，2000，58（2）：350-365.

[4] BOBERG J，CHRISTIANSEN S，AXELSTAD M，et al. Reproductive and behavioral effects of diisononyl phthalate（DINP）in perinatally exposed rats［J］. Reprod Toxicol，2011，31（2）：200-209.

[5] LEE H C，YAMANOUCHI K，NISHIHARA M. Effects of perinatal exposure to phthalate/adipate esters on hypothalamic gene expression and sexual behavior in rats［J］. J Reprod Dev，2006，52（3）：343-352.

[6] CLEWELL R A，THOMAS A，WILLSON G，et al. A dose response study to assess effects after dietary administration of diisononyl phthalate（DINP）in gestation and lactation on male rat sexual development［J］. Reprod Toxicol，2013，35：70-80.

[7] CARBONE S，SAMANIEGO Y A，CUTRERA R，et al. Different effects by sex on hypothalamic-pituitary axis of prepubertal offspring rats produced by *in utero* and lactational

exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) [J]. NeuroToxicology, 2012, 33 (1): 78-84.

[8] BORCH J, METZDORFF S B, VINGGAARD A M, et al. Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis [J]. Toxicology, 2006, 223 (1/2): 144-155.

[9] VALERI C, SCHTEINGART H, REY R. The prepubertal testis: biomarkers and functions [J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2013, 20 (3): 224-233.

[10] SHONO T, SHIMA Y, KONDO T, et al. In utero exposure to mono-N-butyl phthalate impairs insulin-like factor 3 gene expression and the transabdominal phase of testicular descent in fetal rats [J]. J Pediatr Surg, 2005, 40 (12): 1861-1864.

[11] IVELL R, HENG K, NICHOLSON H, et al. Brief maternal exposure of rats to the xenobiotics dibutyl phthalate or diethylstilbestrol alters adult-type Leydig cell development in male offspring [J]. Asian J Androl, 2013, 15 (2): 261-268.

[12] HANNAS B R, LAMBRIGHT C S, FURR J, et al. Genomic biomarkers of phthalate-induced male reproductive developmental toxicity: a targeted RT-PCR array approach for defining relative potency [J]. Toxicol Sci, 2012, 125 (2): 544-557.

[13] OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Environment, Health and Safety Publications, Test No.414: Prenatal Developmental Toxicity Study [EB/OL]. [2018-11-01]. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-414-prenatal-development-toxicity-study_9789264070820-en.

[14] OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Environment, Health and Safety Publications, Test No.421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test [EB/OL]. [2018-11-01]. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-414-prenatal-development-toxicity-study_9789264070820-en.

[15] BORCH J, LADEFOGED O, HASS U, et al. Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats [J]. Reprod Toxicol, 2004, 18 (1): 53-61.

[16] MASUTOMI N, SHIBUTANI M, TAKAGI H, et al. Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein, or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/reproductive systems in later life [J]. Toxicology, 2003, 192 (2/3): 149-170.

[17] SUN Y, SHEN J, ZENG L, et al. Role of autophagy in di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)-induced apoptosis in mouse Leydig cells [J]. Environ Pollut, 2018, 243: 563-572.

[18] 逯晓波，于涛，马明月，等. 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯对大鼠睾丸发育及*StAR*、*CYP19a1*、*CYP11a1*基因表达的影响[J]. 卫生研究，2010，39(3)：263-267.

[19] ADAMSSON A, SALONEN V, PARANKO J, et al. Effects of maternal exposure to di-isononylphthalate (DINP) and 1, 1-dichloro-2, 2-bis (p-chlorophenyl) ethylene (p, p'-DDE) on steroidogenesis in the fetal rat testis and adrenal gland [J]. Reprod Toxicol, 2009, 28 (1): 66-74.

[20] HANNAS B R, LAMBRIGHT C S, FURR J, et al. Dose-response assessment of fetal testosterone production and gene expression levels in rat testes following in utero exposure to diethylhexyl phthalate, diisobutyl phthalate, diisoheptyl phthalate, and diisononyl phthalate [J]. Toxicol Sci, 2011, 123 (1): 206-216.

[21] BERGER K, ESKENAZI B, KATHERINE K, et al. Association of prenatal urinary concentrations of phthalates and bisphenol a and pubertal timing in boys and girls [J]. Environ Health Perspect, 2018, 126 (9): 97004.

（英文编辑：汪源；编辑：王晓宇；校对：汪源）