实验研究
Experiment

林丹对大鼠生精细胞活化型半胱天冬酶-3表达及血清黄体生成素、睾酮浓度的影响

曹红亭[1a]，孙祖越[2]，周莉[2]，罗玉珍[1a]，周健[1a]，汪岭[1a]，陈健茂[1b]，李晓玉[1a]，宋琦如[1a]

1. 宁夏医科大学 a. 公共卫生与管理学院 b. 实验动物中心，宁夏 银川 750004
2. 上海市计划生育科学研究所药理毒理学研究室，上海 200032

摘要：

[背景] 林丹是有机氯农药六六六的γ异构体，对雄性生殖系统有损害作用。

[目的] 研究林丹亚慢性染毒对雄性大鼠睾丸组织活化型半胱天冬酶-3（cleaved caspase-3）表达及血清黄体生成素、睾酮浓度的影响，探讨林丹致雄性生殖系统损伤的机制。

[方法] 40只雄性SD大鼠被随机分为5组，分别为低、中、高剂量（3、6、13 mg·kg^{-1}）林丹染毒组，溶剂对照组（10 mg·kg^{-1}玉米油），阳性对照组（100 μg·kg^{-1}雌二醇）。每天灌胃1次，连续8周，染毒末24 h称重，禁食一晚经腹腔注射10%水合氯醛溶液麻醉后解剖取材，测定大鼠睾丸生精细胞cleaved caspase-3蛋白表达情况及血清黄体生成素、睾酮浓度。

[结果] 与溶剂对照组相比：各染毒组大鼠体重差异均无统计学意义（$P>0.05$）；13 mg·kg^{-1}组大鼠精子密度降低（$P<0.05$）；6、13 mg·kg^{-1}组大鼠精子存活率下降（$P<0.05$），睾丸生精细胞cleaved caspase-3蛋白表达升高（$P<0.05$）；13 mg·kg^{-1}组大鼠血清黄体生成素浓度升高（$P<0.05$），睾酮浓度降低（$P<0.05$）。与阳性对照组相比：各染毒组大鼠体重及精子密度差异均无统计学意义（$P>0.05$）；3、6 mg·kg^{-1}组大鼠精子存活率升高（$P<0.05$），睾丸生精细胞cleaved caspase-3蛋白表达降低（$P<0.05$），血清黄体生成素浓度降低（$P<0.05$）；各染毒组大鼠血清睾酮浓度升高（$P<0.05$）。病理结果显示：各林丹染毒组大鼠睾丸出现不同程度的损害状态，表现为曲细精管管腔间隙增大，生精细胞排列紊乱，精子数量减少。阳性对照组亦表现为管腔增大，精子数量减少，并可在管腔内发现脱落的生精细胞。

[结论] 林丹可能通过上调睾丸组织cleaved caspase-3蛋白表达来调控生精细胞凋亡，引发血清睾酮水平下降，继而导致大鼠精子生成减少，且在此实验条件下，林丹引起大鼠内分泌干扰作用较雌二醇弱。

关键词：林丹；凋亡；黄体生成素；睾酮；活化型半胱天冬酶-3

Effects of lindane on cleaved caspase-3 expression in spermatogenic cells and serum luteinizing hormone and testosterone concentrations in rats

CAO Hong-ting[1a], SUN Zu-yue[2], ZHOU Li[2], LUO Yu-zhen[1a], ZHOU Jian[1a], WANG Ling[1a], CHEN Jian-mao[1b], LI Xiao-yu[1a], SONG Qi-ru[1a] (1.a.School of Public Health and Management b.School of Animal Experimental Center, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2.Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Shanghai Institute of Planned Parenthood, Shanghai 200032, China)

Abstract:

[Background] Lindane is the gamma isomer of organochlorine pesticide hexachlorocyclohexane and can damage male reproductive system.

[Objective] This experiment investigates the effects of sub-chronic exposure to lindane on cleaved caspase-3 expression in testicular tissues and serum luteinizing hormone and testosterone concentrations in male rats, aiming to explore the mechanism of lindane-induced male reproductive damage.

[Methods] Forty male SD rats were randomly divided into five groups: solvent control group (10 mg·kg^{-1} corn oil), positive control group (100 μg·kg^{-1} estradiol), and 3, 6, and 13 mg·kg^{-1} lindane groups. The rats were treated with the designed dosages by gavage once a day for continuously eight weeks. After 24 h of last exposure, the rats were weighed, and after an overnight fasting, the rats were anesthetized with 10% chloral hydrate and dissected to determine the cleaved

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19869

基金项目
宁夏卫生计生委重点科研课题（2018-NW-004）

作者简介
曹红亭（1995—），女，硕士生；
E-mail：1322459152@qq.com

通信作者
宋琦如，E-mail：sqr20@163.com

利益冲突 无申报
收稿日期 2019-12-13
录用日期 2020-03-02

文章编号 2095-9982(2020)05-0508-06
中图分类号 R114
文献标志码 A

▸引用
曹红亭，孙祖越，周莉，等. 林丹对大鼠生精细胞活化型半胱天冬酶-3表达及血清黄体生成素、睾酮浓度的影响 [J]. 环境与职业医学，2020，37（5）：508-513.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19869

Funding
This study was funded.

Correspondence to
SONG Qi-ru, E-mail: sqr20@163.com

Competing interests None declared
Received 2019-12-13
Accepted 2020-03-02

▸To cite
CAO Hong-ting, SUN Zu-yue, ZHOU Li, et al. Effects of lindane on cleaved caspase-3 expression in spermatogenic cells and serum luteinizing hormone and testosterone concentrations in rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(5): 508-513.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19869

caspase-3 protein expression in spermatogenic cells and serum luteinizing hormone and testosterone concentrations.

[Results] Compared with the solvent control group, there was no significant difference in body weight of rats in the exposure groups ($P>0.05$); the sperm density of rats in the 13 mg·kg^{-1} group decreased ($P<0.05$); the sperm survival rate decreased and the cleaved caspase-3 protein expression level in spermatogenic cells were upregulated in the 6 mg·kg^{-1} and 13 mg·kg^{-1} groups ($P<0.05$); the serum luteinizing hormone concentration increased and the serum testosterone concentration decreased in the 13 mg·kg^{-1} group ($P<0.05$). Compared with the positive control group, there were no significant differences in body weight and sperm density in the exposure groups ($P>0.05$); the sperm survival rate increased, the protein expression level of cleaved caspase-3 in spermatogenic cells decreased, and the serum luteinizing hormone concentration decreased in the 3 mg·kg^{-1} and 6 mg·kg^{-1} groups ($P<0.05$); the serum testosterone concentration in each exposure group increased ($P<0.05$). The testicular pathological observations showed that the rats in each lindane-treated group presented varying degrees of testicular damage, including increased seminiferous tubule space, disarranged spermatogenic cells, and decreased sperm counts; the rats in the positive control group also showed enlarged seminiferous tubule space, reduced sperm counts, and spermatogenic cells in the lumen.

[Conclusion] Lindane may regulate spermatogenic cell apoptosis by upregulating the cleaved caspase-3 protein expression in testicular tissues, leading to decreased serum testosterone level and spermatogenesis in rats. Under these experimental conditions, lindane may cause less endocrine disruption in rats than estradiol.

Keywords: lindane; apoptosis; luteinizing hormone; testosterone; cleaved caspase-3

林丹是有机氯农药六六六的γ异构体，由于其药效稳定、防治面广，曾被大量用作除草剂、杀虫剂，是国际上公认的环境内分泌干扰物[1]。尽管已经禁止了林丹的生产和使用，但由于其脂溶性、难降解、易残留等特点，目前在土壤、水体环境及人体血清等组织中仍可检测到林丹的大量残留[2-4]。有研究表明低剂量林丹暴露可对雄性生殖功能产生严重损伤。Sharma等[5]发现林丹可降低大鼠睾丸和附睾质量，使得精子畸形率增加，精子数量及活性降低。Fausto等[6]对妊娠期雌兔进行口服林丹试验，发现子一代雄兔精子超微结构受损。吴迪等[7]发现低剂量林丹可明显抑制斑马鱼产卵量和受精率。但林丹导致雄性生殖系统的损害机制尚不清楚。半胱天冬酶-3（caspase-3）是调节细胞凋亡的关键蛋白酶，有“死亡蛋白酶”之称。caspase-3被激活为活化型caspase-3（cleaved caspase-3）意味着细胞凋亡进入不可逆转阶段[8]。本实验通过建立林丹亚慢性染毒SD大鼠模型，检测低剂量林丹暴露对雄性SD大鼠睾丸生精细胞cleaved caspase-3蛋白表达及血清黄体生成素及睾酮浓度的影响，探讨林丹致雄性生殖系统损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

林丹（德国Dr. Ehrenstorfer GmbH公司，产品编号：C14073000）、玉米油（北京Solarbio公司）、雌二醇（北京biotopped公司）、黄体生成素、睾酮酶联免疫吸附试剂盒（上海信裕生物科技有限公司）、兔抗大鼠多克隆cleaved caspase-3（北京博奥森生物技术有限公司）、二甲基联苯胺（DAB）显色试剂盒（北京中杉金桥技术公司）、多聚甲醛固定液（上海尚宝生物科技有限公司）、兔二步法试剂盒（北京中杉金桥技术公司）、0.4%台盼蓝染液（北京索莱宝科技有限公司）、血球计数板（上海求精生化试剂仪器有限公司）。

图像采集系统显微镜（德国Leica公司）、全波长酶标仪（美国Thermo公司）、载玻片和盖玻片（江苏世泰实验器材有限公司）、离心机（上海Heal force公司）。

1.2 实验动物分组及染毒

毒物剂量确定：亚慢性毒作用的最高剂量通常为毒物半数致死剂量（LD_{50}）的1/20~1/5，且各剂量组之间组距不得少于2倍。大鼠林丹的LD_{50}为126 mg·kg^{-1}[9]，结合课题组前期预实验结果及相关文献，将林丹染毒最高剂量组浓度设置为13 mg·kg^{-1}，即1/10 LD_{50}，以2倍组距设置的低剂量组、中剂量组浓度分别为3 mg·kg^{-1}（1/40 LD_{50}）、6 mg·kg^{-1}（1/20 LD_{50}）。依据文献及课题组前期研究[10]，设置阳性对照组为100 μg·kg^{-1}雌二醇组。

选择健康清洁级SD雄性大鼠40只，体重为160~180 g，购于宁夏医科大学实验动物中心，动物许可证号：SCXY（宁）2015-0001。将大鼠饲养在温度为21~24 °C，相对湿度60%~80%的环境中。适应性饲养一周后，按照随机化原则将大鼠分为5组，分别为溶剂对照组（10 mg·kg^{-1}玉米油），阳性对照组（100 μg·kg^{-1}雌二醇），3、6、13 mg·kg^{-1}林丹染毒组。将林丹及雌二醇融于玉米油，配置成所需浓度的林丹及雌二醇溶液，每天称量大鼠体重并记录，依据大鼠体重求得毒

物相应灌胃剂量，每天灌胃1次，连续染毒8周，实验期间大鼠进食饮水自由。染毒末24 h称量大鼠体重并记录，禁食（不禁水）一晚后进行解剖取材。

1.3 精子密度、存活率的测定

于干净的培养皿中倒入2 mL DMEM培养液置于37℃水浴中预热，取出右侧附睾组织洗净快速置于培养皿中，用眼科剪将其剪成小段后置于37℃水浴中，使精子充分游离10 min，过滤制成精子悬液。采用血球计数板法对精子密度进行测定，吸取10 μL精子悬液滴于计数板进行镜下观察。精子密度 $=N\times5\times10^4$ mL^{-1}（N：5个中方格总数，5：方格系数，10^4：计数板系数）。采用台盼蓝染色法测定精子存活率，光镜下随机观察100个精子，记录被染色精子数量，计算精子存活率。精子存活率 =（100- 被染色精子数）/100×100%。

1.4 组织病理学检查

取大鼠左侧睾丸，用PBS冲洗干净后，用干净的针头在两端扎孔后置于4%多聚甲醛固定液中固定72 h。经梯度酒精脱水、石蜡包埋后，于最大剖面6 μm连续切片，HE染色后在光学显微镜下观察其组织形态学改变并拍照。

1.5 免疫组化法检测cleaved caspase-3

石蜡切片经脱蜡至水化，高压锅抗原修复6 min，用3%H_2O_2孵育10 min去除内源性过氧化物酶，正常山羊血清封闭液孵育20 min，滴加稀释后一抗（多克隆兔抗cleaved caspase-3，以PBS进行200倍稀释），室温放置30 min后置4℃冰箱过夜；第2天取出，复温30 min后滴加二抗，37℃孵育30 min，滴加DAB显色，待细胞着色且背景较淡时立即终止反应。用苏木精复染，脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，显微镜下观察。根据平均光密度法进行结果判定：每组随机抽3张切片，每张切片镜下随机采取10个曲细精管，采用Image pro plus 6.0软件量化阳性结果表达量。利用软件自定义选择工具选取照片中曲细精管区域，得出该区域的积分光密度值及该区域的总面积。积分光密度值与区域总面积的比值，即平均光密度值。

1.6 大鼠血清黄体生成素、睾酮浓度的检测

以染毒末24 h大鼠体重为准，每1 kg大鼠体重腹腔注射浓度为质量分数10%的水合氯醛3 mL，待大鼠麻醉后开胸暴露心脏，用采血针和采血管于大鼠心尖处快速采血，经离心机3 500 r·min^{-1}离心10 min（离心半径13.5 cm），吸取上清液于1.5 mL离心管中，-80℃保存待用。用相关酶联免疫吸附试剂盒检测血清样品中黄体生成素、睾酮水平，具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.7 统计学分析

采用SPSS 23.0统计软件进行分析，实验结果均以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。对各组实验结果进行正态性检验和方差齐性检验，多组比较采用单因素方差分析，组间多重比较用LSD-t检验。检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 一般情况

随着林丹染毒时间的延长，阳性对照组以及高剂量组大鼠被毛凌乱、不光滑，并逐渐出现烦躁不安、易激惹症状，在灌胃过程中尤为明显。低、中剂量组与溶剂对照组相比则无明显差别。

2.2 林丹染毒大鼠体重的变化

各染毒组大鼠的体重增长量与溶剂对照组、阳性对照组相比，差异均无统计学意义（P>0.05）。见图1。

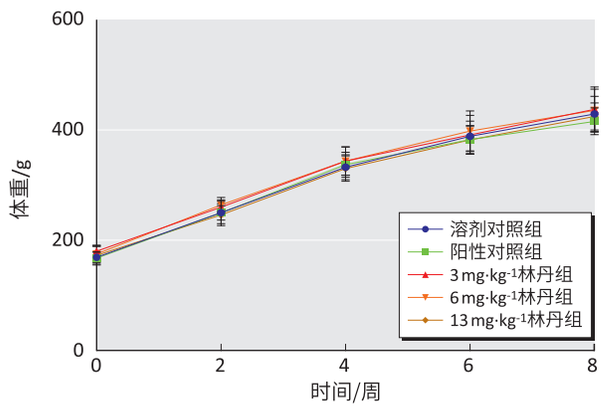


图1 林丹染毒对大鼠体重增长的影响（n=8）

2.3 大鼠精子密度、存活率

与溶剂对照组相比，13 mg·kg^{-1}组大鼠精子密度降低（P<0.05），6、13 mg·kg^{-1}组大鼠精子存活率下降（P<0.05）；与阳性对照组相比，3、6 mg·kg^{-1}组大鼠精子存活率上升（P<0.05），各染毒组精子密度差异无统计学意义（P>0.05）。见表1。

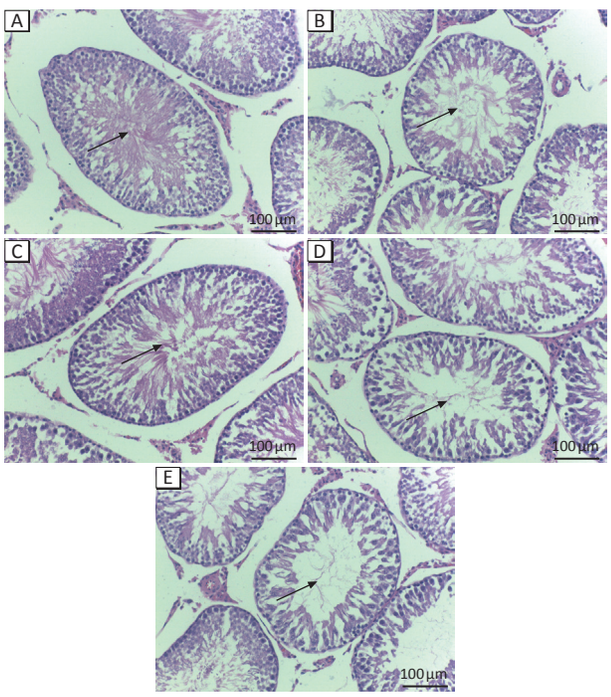
表1 林丹染毒对大鼠精子密度及存活率的影响（$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	精子密度/×10^6 mL^{-1}	精子存活率/%
溶剂对照组	11.84±7.28	91.63±3.34
阳性对照组	4.51±2.64*	68.88±6.58*
3 mg·kg^{-1}林丹组	7.86±2.41	86.00±8.62△
6 mg·kg^{-1}林丹组	8.30±4.14	78.63±5.78*△
13 mg·kg^{-1}林丹组	6.41±1.99*	70.13±5.89*

[注] *：与溶剂对照组比较，P<0.05；△：与阳性对照组比较，P<0.05。

2.4 大鼠睾丸组织形态学变化

HE染色结果显示，溶剂对照组睾丸组织结构清晰，生精细胞排列整齐，层次清楚，管腔内可见大量成熟精子。阳性对照组睾丸曲细精管管腔间隙变大，生精细胞层数减少，生精细胞排列紊乱，管腔内无絮状精子生成。3 mg·kg^{-1}组与溶剂对照组睾丸组织结构变化相当。随着林丹染毒剂量的增加，6、13 mg·kg^{-1}组管腔间隙逐渐变大，生精细胞数量减少更加明显。高剂量组睾丸损伤程度与阳性对照组相当。见图2。



[注] A：溶剂对照组；B：阳性对照组；C：3 mg·kg^{-1}林丹组；D：6 mg·kg^{-1}林丹组；E：13 mg·kg^{-1}林丹组。箭头所指为曲细精管管腔。溶剂对照组曲细精管结构相对完整；阳性对照组管腔增大，精子数量减少，管腔内可见脱落的生精细胞。各林丹染毒组大鼠睾丸出现不同程度的损害，表现为曲细精管管腔间隙增大，生精细胞排列紊乱，精子数量减少。

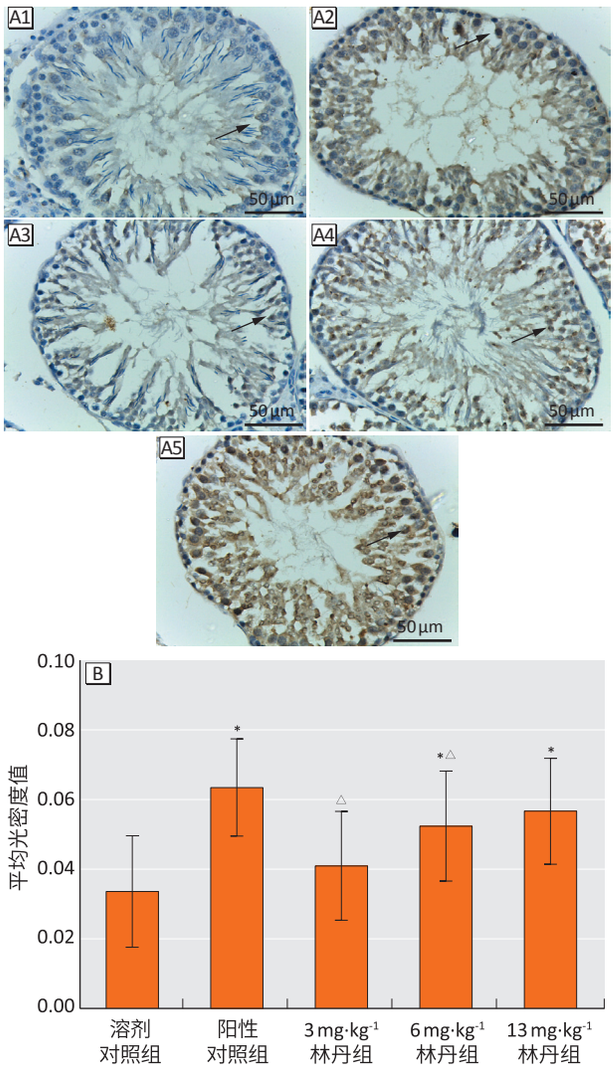
图2 林丹染毒大鼠睾丸组织形态学变化（HE染色，×200）

2.5 大鼠生精细胞 cleaved caspase-3 表达水平

与溶剂对照组相比，6、13 mg·kg^{-1}组cleaved caspase-3蛋白表达增加（$P<0.05$）；3、6 mg·kg^{-1}组cleaved caspase-3蛋白的表达低于阳性对照组（$P<0.05$）。见图3。

2.6 大鼠血清黄体生成素、睾酮浓度的变化

与溶剂对照组相比，13 mg·kg^{-1}组血清黄体生成素浓度升高、睾酮浓度降低（$P<0.05$）；与阳性对照组相比，3、6 mg·kg^{-1}组血清黄体生成素浓度降低、各染毒组睾酮浓度均升高（$P<0.05$）。见表2。



[注] 1：溶剂对照组；2：阳性对照组；3：3 mg·kg^{-1}林丹组；4：6 mg·kg^{-1}林丹组；5：13 mg·kg^{-1}林丹组。箭头所指为cleaved caspase-3表达部位。*：与溶剂对照组比较，$P<0.05$；△：与阳性对照组比较，$P<0.05$。

图3 林丹染毒大鼠生精细胞免疫组化结果（A）及cleaved caspase-3表达水平（B）（n=8）

表2 林丹染毒对大鼠血清黄体生成素、睾酮浓度的影响
（$\bar{x}\pm s$，μg·L^{-1}，n=8）

组别	黄体生成素	睾酮
溶剂对照组	2.1480±0.1452	3.5532±0.2847
阳性对照组	2.4111±0.1586*	2.9634±0.2150*
3 mg·kg^{-1}林丹组	2.2023±0.1233△	3.4271±0.2957△
6 mg·kg^{-1}林丹组	2.2145±0.9200△	3.4061±0.3414△
13 mg·kg^{-1}林丹组	2.3050±0.1310*	3.2559±0.2800*△

[注] *：与溶剂对照组比较，$P<0.05$；△：与阳性对照组比较，$P<0.05$。

3 讨论

精子在形成过程中伴随有正常的凋亡以保证精子质量、数量和遗传稳定性，但若凋亡过度，则精子数量跟质量难以得到保证，易引发男性不育。细胞凋亡是由多基因调控的细胞自主有序的死亡，各种细

胞凋亡途径均由相同的凋亡执行信号通路（caspase家族激活）来完成[11]。caspase家族是一组特异性切割天冬氨酸的半胱氨酸蛋白酶，其家族核心成员为caspase-3[12]。caspase-3在活化前是以前半胱天冬酶-3（procaspase-3）的形式存在的，当细胞受到死亡信号诱导或刺激时，可转化为有活性的caspase-3，即cleaved caspase-3[13]，继而发挥蛋白水解酶作用，引发DNA损伤和凋亡[8]。本研究结果表明，cleaved caspase-3在各级生精细胞内均有表达。林丹染毒后大鼠睾丸生精细胞cleaved caspase-3阳性表达高于溶剂对照组，且主要表达于精原细胞和精母细胞核、浆内，而溶剂对照组几乎不见cleaved caspase-3阳性表达，提示林丹染毒可以上调睾丸cleaved caspase-3蛋白表达，诱导生精细胞凋亡。Vaithinathan等[14]发现口服50 mg·kg^{-1}（以体重计）有机氯农药甲氧氯后，大鼠睾丸组织内procaspse-3和cleaved caspase-3水平随甲氧氯暴露时间延长而升高，说明有机氯农药甲氧氯亦诱导成年大鼠睾丸细胞凋亡，这可对本研究结果起到支持作用。

在精子发生过程中，性激素作为生精细胞的支持因子对其凋亡的调控起着非常重要的作用。下丘脑促进腺垂体释放黄体生成素，使其与睾丸间质细胞上的黄体生成素受体结合，促进睾丸间质细胞分泌睾酮[15]。睾酮是雄性动物体内主要的雄激素，具有维持生精的作用[16]。有文献报道，睾丸功能受损导致血清卵泡刺激素（follicle-stimulating hormone，FSH）升高[15]，表明生精功能障碍，累及间质细胞后可使黄体生成素升高，当黄体生成素显著升高时睾丸发生不可逆转性损伤，并可能影响血清睾酮水平。本研究结果显示，长期低剂量林丹染毒后，大鼠血清黄体生成素、睾酮含量分别随着林丹染毒剂量的上升而上升、下降。由此推测，林丹染毒后大鼠血清黄体生成素水平升高可能是由于林丹在大鼠体内蓄积导致睾丸发生病变，继而引起睾丸间质细胞分泌的睾酮水平下降，经下丘脑-垂体-性腺轴的负反馈调节使血清黄体生成素水平升高。宫剑等[17]发现无精子症和性染色体异常患者的血清FSH、黄体生成素水平高于正常对照组男性，而睾酮水平降低，这与本次研究结果是一致的。刘霞等[18]发现职业性接触有机氯农药氯丹及灭蚁类药物含砷化合物的作业人员，其血清FSH、黄体生成素及睾酮水平呈明显的抑制状态，并与工龄有关，表明氯丹及含砷化合物可干扰雄性体内性激素分泌，与本研究结果一致。此外，Pant等[19]对非职业接触男性体内林丹浓度进行检测后发现，林丹浓度与精子质量之间存在负相关，表现为精子活力下降等，而本研究结果亦表明林丹可使得大鼠精子密度及存活率下降。目前的研究已证实睾酮分泌减少是生精细胞凋亡的主要原因之一[20]。因此长期低剂量林丹染毒可能引起大鼠血清睾酮水平的降低，并影响精子生成降低精子质量。

雌二醇是天然雌激素中雌激素作用最强的激素之一，其代谢异常可导致雄性精子生成异常、雄性生殖器官畸形，干扰机体内分泌调节并影响免疫系统功能[21]。以雌二醇作为阳性对照组，可在一定程度上判断林丹雌激素作用的强弱。本研究结果表明，林丹可与雌二醇发挥相似的雌激素样作用，二者均可降低大鼠精子质量，紊乱血清性激素水平并上调睾丸凋亡蛋白的表达。本研究发现，各林丹染毒组大鼠血清睾酮水平均高于阳性对照组，而睾酮是影响精子生成的关键所在，初步证实在此实验条件下林丹的内分泌干扰作用较雌二醇轻，与宋琦如等[22]的研究结论一致。但结果中所出现的13 mg·kg^{-1}组大鼠精子密度、精子存活率及生精细胞cleaved caspase-3的表达均与阳性对照组无差异，可能因为林丹是通过对睾丸的直接毒作用导致大鼠精子生成障碍。病理结果亦显示林丹染毒后大鼠睾丸组织出现了不同程度的损伤，生精细胞层数及管腔内精子数量明显减少，13 mg·kg^{-1}组大鼠睾丸损伤程度与阳性对照组相当。因此推测在此染毒剂量及染毒时间内，大鼠精子数量、精子存活率及生精细胞凋亡受林丹的影响较血清睾酮更为敏感。本实验仅从表观、组织形态学及内分泌水平对林丹致大鼠生殖毒性进行初步研究，有关林丹的致凋亡作用还需在基因水平上做进一步论证。

综上，低剂量林丹暴露可能通过上调生精细胞cleaved caspase-3蛋白表达诱发生精细胞凋亡，继而使得血清性激素水平紊乱，血清睾酮浓度下降，并引发大鼠精子密度和存活率下降。林丹可发挥与雌二醇相似的雌激素样作用，且在此实验条件下，林丹的内分泌干扰作用较雌二醇弱。具体机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] PADMA VV，SOWMYA P，FELIX TA，et al. Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats [J]. Food Chem Toxicol，2011，49（4）：991-998.

[2] 牛丽丽. 我国农田土壤和周边树皮中持久性有毒物质的残留特征及健康风险 [D]. 杭州：浙江大学，2015.

[3] 陈静. 瘦素基因G2548A位点多态性、环境雌激素（DDTs和HCHs）暴露与胆囊胆固醇结石患病风险研究 [D]. 厦门：厦门大学，2017.

[4] LI J，WANG P，SHI S，et al. Background biomonitoring of residue levels of 137 pesticides in the blood plasma of the general population in Beijing [J]. Environ Monit Assess，2018，190（5）：315.

[5] SHARMA P，SINGH R. Protective role of curcumin on lindane induced reproductive toxicity in male Wistar rats [J]. Bull Environ ContamToxicol，2010，84（4）：378-384

[6] FAUSTO A M，MORERA P，MARGARIT R，et al. Sperm quality and reproductive traits in male offspring of female rabbits exposed to lindane（γ-HCH）during pregnancy and lactation [J]. ReprodNutr Dev，2001，41（3）：217-225.

[7] 吴迪，单正军，韩志华，等. 林丹短期暴露对斑马鱼生长发育和繁殖的影响 [J]. 生态与农村环境学报，2011，27（1）：49-53.

[8] KARNA K K，CHOI B R，You J H，et al. The ameliorative effect of monotropein，astragalin，and spiraeoside on oxidative stress，endoplasmic reticulum stress，and mitochondrial signaling pathway in varicocelized rats [J]. BMC Complement Altern Med，2019，19（1）：333.

[9] 张莹，赵丹宇. 林丹的安全性毒理学评价 [J]. 农药科学与管理，1996，17（4）：11-13.

[10] 刘传志，张莉，刘振瑶，等. 雌二醇激素对大鼠生理功能的影响 [J]. 长春理工大学学报（自然科学版），2017，40（5）：125-127，131.

[11] 李帅，张炳东. 细胞凋亡途径的研究进展 [J]. 山东医药，2017，57（37）：103-106.

[12] 李永宁，肖晶晶，赵建勇. Caspase-3及Cleaved-Caspase-3在氟中毒大鼠肝脏中表达 [J]. 贵州医药，2016，40（3）：239-240.

[13] 朱金萍，王丽华，王啸. 血管内皮生长因子和cleaved caspase-3在宫颈鳞癌组织中的表达及临床意义 [J]. 中国肿瘤临床与康复，2015，22（11）：1306-1310.

[14] VAITHINATHAN S，SARADHA B，MATHUR P P. Methoxychlor induces apoptosis *via* mitochondria- and FasL-mediated pathways in adult rat testis [J]. Chem Biol Interact，2010，185（2）：110-118.

[15] 周芩. 双酚A对男性生殖功能的影响及机制探讨 [D]. 太原：山西医科大学，2013.

[16] 姜会真. “秩边透水道”针法对少弱精症大鼠精液质量的影响 [D]. 太原：山西中医药大学，2019.

[17] 宫剑，楼文文，邢超，等. 男性不育症的染色体畸变与生殖激素水平 [J]. 中国优生与遗传杂志，2015，23（5）：52-54，100.

[18] 刘霞，朱宝立，班永宏，等. 接触灭蚁药物对男工体内性激素水平的影响 [J]. 中国工业医学杂志，2004，17（6）：378-380.

[19] PANT N，SHUKLA M，UPADHYAY A D，et al. Association between environmental exposure to *p*，*p′*-DDE and lindane and semen quality [J]. Environ Sci Pollut Res Int，2014，21（18）：11009-11016.

[20] 张明. 环境激素双酚A对SD大鼠睾丸生精细胞凋亡作用的实验研究 [D]. 石家庄：河北医科大学，2013.

[21] 寇胜男，朗朗，季宇彬. 雌二醇对生物体内分泌系统毒性作用机制的研究 [J]. 安全与环境工程，2012，19（1）：15-18.

[22] 宋琦如，孙祖越，童琳，等. 林丹对大鼠精子生成的影响 [J]. 宁夏医科大学学报，2018，40（11）：1250-1252.

（**英文编辑**：汪源；**责任编辑**：王晓宇）