

枸杞多糖对 2,4-二氯苯氧乙酸所致雌性大鼠生殖系统损伤的保护作用

王恒泉¹, 柴茹², 周健¹, 杨惠芳¹

1. 宁夏医科大学公共卫生与管理学院,宁夏环境因素与慢性病控制重点实验室,宁夏银川 750004
2. 西安市未央区疾病预防控制中心,陕西 西安 710016

摘要:

[背景] 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)作为阔叶杂草除草剂和植物生长调节剂而被广泛应用,相关研究显示2,4-D具有神经毒性、内分泌干扰性、遗传毒性与致癌性以及生殖毒性等。

[目的] 了解2,4-D暴露对雌性大鼠生殖系统的影响,初步探讨枸杞多糖(LBP)的保护作用及可能机制。

[方法] SPF级雌性SD大鼠24只,每组6只,随机分为空白对照组(去离子水1mL·d⁻¹)、染毒组($75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 2,4-D)、枸杞多糖对照组($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ LBP)、枸杞多糖干预组($75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 2,4-D + $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ LBP)。每天经口灌胃1次,连续染毒28d。每隔2d测量体重1次,染毒结束后取卵巢及子宫组织称重并计算脏器系数;采用苏木精-伊红染色法(HE)检测卵巢及子宫组织病理改变;采用ELISA法检测血清中雌二醇(E2)水平;使用相关试剂盒测定血清中氧化损伤[超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)及丙二醛(MDA)]水平;TUNEL荧光染色法检测卵巢及子宫组织细胞凋亡情况;Western blotting法检测卵巢组织中死亡受体通路相关蛋白Fas、FasL、FADD、Pro-Caspase-8、Cleaved-Caspase-8、Pro-Caspase-3、Cleaved-Caspase-3表达量。

[结果] 与空白对照组相比,染毒组大鼠卵巢组织结构异常,处于不同发育阶段的卵泡数量减少,形态出现改变,且闭锁卵泡数量增多;子宫内膜不完整,可见内膜缺失,出现不同程度的胞核假复层现象,固有层腺体数减少。与染毒组相比,枸杞多糖干预组大鼠卵巢组织结构相对较完整,处于不同发育阶段的卵泡数量增加,结构相对完整,排列紧密;子宫组织结构相对较完整,内膜缺失现象及胞核假复层现象减少。各组间SOD、GSH-Px、E2水平,MDA浓度差异均有统计学意义($F=86.1$ 、 26.2 、 43.3 、 22.3 ,均 $P<0.01$)。与空白对照组相比,染毒组血清SOD、GSH-Px、E2水平降低($P>0.01$),MDA浓度增加($P>0.01$);与染毒组相比,枸杞多糖干预组血清SOD、GSH-Px、E2水平升高($P>0.01$),MDA浓度降低($P>0.01$)。各组间卵巢及子宫组织细胞凋亡率差异均有统计学意义($F=64.8$ 、 55.5 ,均 $P<0.01$)。与空白对照组相比,染毒组大鼠卵巢及子宫组织细胞凋亡率升高($P>0.01$);与染毒组相比,枸杞多糖干预组大鼠卵巢及子宫组织细胞凋亡率降低($P>0.01$)。各组间卵巢组织内死亡受体通路相关蛋白表达差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。与空白对照组相比,染毒组大鼠卵巢组织内Fas、FasL、FADD、Pro-Caspase-8、Cleaved-Caspase-8、Pro-Caspase-3、Cleaved-Caspase-3表达升高($P<0.05$ 或 0.01);与染毒组相比,枸杞多糖干预组大鼠卵巢组织内Fas、FasL、FADD、Pro-Caspase-8、Cleaved-Caspase-8、Pro-Caspase-3、Cleaved-Caspase-3表达降低($P<0.05$ 或 0.01)。

[结论] 2,4-D能够引起雌性大鼠发生氧化应激进一步介导Fas-FasL通路引发细胞凋亡而造成雌性大鼠生殖系统损伤。枸杞多糖能降低雌性大鼠氧化应激水平,下调Fas-FasL通路相关蛋白表达,减少生殖细胞凋亡,以达到生殖保护的目的。

关键词: 2,4-二氯苯氧乙酸;生殖毒性;氧化损伤;细胞凋亡;死亡受体途径;枸杞多糖

Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on reproductive system injury of female rats induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid WANG Hengquan¹, CHAI Ru², ZHOU Jian¹,

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21083

基金项目

大学生创新创业训练计划项目(S202110752032);国家自然科学基金(81960584)

作者简介

王恒泉(1995—),男,硕士生;
E-mail: w17782952279@163.com

通信作者

杨惠芳, E-mail: joyceyh@163.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-03-07

录用日期 2021-10-19

文章编号 2095-9982(2021)11-1270-08

中图分类号 R135

文献标志码 A

▶引用

王恒泉,柴茹,周健,等.枸杞多糖对2,4-二氯苯氧乙酸所致雌性大鼠生殖系统损伤的保护作用[J].环境与职业医学,2021,38(11):1270-1277.

▶本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21083

Funding

This study was funded.

Correspondence to

YANG Huifang, E-mail: joyceyh@163.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-03-07

Accepted 2021-10-19

▶To cite

WANG Hengquan, CHAI Ru, ZHOU Jian, et al. Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on reproductive system injury of female rats induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(11): 1270-1277.

▶Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21083

YANG Huifang¹ (1. School of Public Health and Management Ningxia Key Laboratory of Environmental Factors and Chronic Disease Control, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. Weiyang District Center for Disease Control and Prevention, Xi'an, Shaanxi 710016, China)

Abstract:

[Background] 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is widely used as a broad-leaved herbicide and plant growth regulator. Related studies have shown that 2,4-D has neurotoxicity, ability to disrupt endocrine function, genotoxicity, carcinogenicity, and reproductive toxicity.

[Objective] This experiment is conducted to investigate the effect of 2,4-D exposure on reproductive system of female rats, and to preliminarily explore the potential ameliorative effect of *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP) and its possible mechanism.

[Methods] Twenty-four SPF female SD rats with six rats in each group were randomly divided into a blank control group (deionized water 1 mL·d⁻¹), an exposure group (75 mg·kg⁻¹ 2,4-D), an LBP control group (50 mg·kg⁻¹ LBP), and an LBP intervention group (75 mg·kg⁻¹ 2,4-D + 50 mg·kg⁻¹ LBP). The rats were given intragastric administration once a day for 28 consecutive days. Body weight was measured every two days. After exposure, ovary and uterus were weighed and organ coefficients were calculated; the pathological changes of ovary and uterus were detected by hematoxylin-eosin staining (HE); the level of estradiol (E2) in serum was detected by ELISA; the levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), and malondialdehyde (MDA) in serum were measured by corresponding kits; the apoptosis of ovarian and uterine cells was detected by TUNEL fluorescence staining; and the protein expression levels of Fas, FasL, FADD, Pro-Caspase-8, Cleaved-Caspase-8, Pro-Caspase-3, and Cleaved-Caspase-3 in ovarian tissues were detected by Western blotting.

[Results] Compared with the blank control group, the ovarian structure of the exposure group was abnormal, the number of follicles at different developmental stages decreased, morphological changes were observed, and the number of atretic follicles increased; the endometrium was incomplete, with different degrees of nuclear pseudostratification and decreased number of glands in lamina propria. Compared with the exposure group, the ovarian structure of the LBP intervention group was complete, and the follicles at different developmental stages increased in amount, remained intact, and were arranged closely; the uterine structure was relatively intact, showing decreased endometrial loss and nuclear pseudostratification. There were significant differences in the levels of SOD, GSH-Px, E2, and MDA among the four groups ($F=86.1, 26.2, 43.3$, and 22.3 , all $P < 0.01$). Compared with the blank control group, the levels of serum SOD, GSH-Px, and E2 decreased in the exposure group ($P < 0.01$), while the concentration of MDA increased ($P < 0.01$). Compared with the exposure group, the levels of serum SOD, GSH-Px, and E2 in the LBP intervention group increased ($P < 0.01$), and the concentration of MDA decreased ($P < 0.01$). There were significant differences in the apoptosis rates of ovarian and uterine cells among the four groups ($F=64.8, 55.5$, both $P < 0.01$). Compared with the blank control group, the apoptosis rates of ovarian and uterine cells increased in the exposure group ($P < 0.01$). Compared with the exposure group, the apoptosis rates of ovarian and uterine cells decreased in the LBP intervention group ($P < 0.01$). There were significant differences in the expression levels of death receptor pathway-related proteins in ovarian tissues among the four groups (all $P < 0.05$). Compared with the blank control group, the expression levels of Fas, FasL, FADD, Pro-Caspase-8, Cleaved-Caspase-8, Pro-caspase-3, and Cleaved-Caspase-3 were increased in the exposure group ($P < 0.05$ or 0.01). Compared with the exposure group, the expression levels of above proteins were decreased in the LBP intervention group ($P < 0.05$ or 0.01).

[Conclusion] The study findings reveal that 2,4-D can induce oxidative stress and further mediate Fas-FasL pathway to induce apoptosis, resulting in reproductive system damage in female rats. LBP can reduce the oxidative stress level, down-regulate the expression of Fas-FasL pathway-related proteins, and reduce the apoptosis of germ cells, therefore protecting reproductive system of female rats.

Keywords: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; reproductive toxicity; oxidative damage; apoptosis; death receptor pathway; *Lycium barbarum* polysaccharide

2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)是一种合成植物激素,它在1941年首次被合成,主要用作除草剂^[1]。据统计,大约有1500种农药产品中含有2,4-D活性成分^[2]。在我国每年约5000~8000 t 2,4-D丁酯用于小麦、大豆、玉米和其他作物以控制杂草^[3]。2,4-D具有较强生殖毒性,目前相关研究主要集中于2,4-D对雄性生殖系统的影响,研究表明2,4-D可

以干扰睾丸支持细胞的正常功能从而造成精子发生与形态异常^[4-5],这也与早期人群流行病学研究结果相一致^[6]。虽然人群流行病学研究表明2,4-D与不良妊娠结局之间没有明确的相关性^[7],但体外研究表明2,4-D及衍生物2,4-D二甲铵盐可引发中国仓鼠卵巢细胞姐妹染色单体交换和DNA损伤^[8],体内实验表明2,4-D可造成雌性大鼠卵巢及子宫组织及性激素水平

异常^[9]。死亡受体途径是细胞凋亡的主要途径之一^[10], 其中 Fas-FasL 信号通路最为经典, 以往的研究发现氧化应激可以介导细胞发生凋亡^[11]。枸杞多糖(*Lycium barbarum* polysaccharide, LBP)是从枸杞中提取的一种天然的植物多糖, 具有丰富的生物活性, 研究发现枸杞多糖具有生殖保护作用^[12]。本研究拟建立雌性 SD 大鼠体内 2,4-D 染毒模型, 同时使用枸杞多糖进行干预, 通过检测抗氧化酶 [超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)] 水平, 脂质过氧化[丙二醛(malondialdehyde, MDA)]水平, 组织病理学改变及血清雌二醇(estriadiol, E2)水平, 死亡受体通路相关蛋白[Fas 细胞表面死亡受体(Fas cell surface death receptor, Fas)、Fas 配体(Fas ligand, FasL)、Fas 死亡结构域相关蛋白(Fas-associated with death domain protein, FADD)、半胱天冬蛋白酶 8 前体(pro-cysteinyl aspartate specific proteinase 8, Pro-Caspase-8)、活化型半胱天冬蛋白酶 8(Cleaved-Caspase-8)、半胱天冬蛋白酶 3 前体(pro-cysteinyl aspartate specific proteinase 3, Pro-Caspase-3)、活化型半胱天冬蛋白酶 3(Cleaved-Caspase-3)] 的表达情况, 初步探讨 2,4-D 染毒及枸杞多糖干预对雌性大鼠生殖系统的影响及可能机制, 为进一步研究 2,4-D 的生殖毒性及枸杞多糖的保护作用提供依据。

1 对象与方法

1.1 主要试剂与仪器

2,4-D 标准品(纯度为 99%, Sigma, 美国), LBP(纯度 > 60%, 上海源叶生物科技有限公司, 中国), SOD 测定试剂盒、MDA 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, 中国), GSH-Px 测定试剂盒、全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白测定试剂盒(凯基生物技术股份有限公司, 中国), 雌二醇 ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 中国), TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(万类生物, 中国), 兔抗多克隆 Fas、FasL 抗体(Affinity, 美国), 兔抗多克隆 FADD、β-actin 抗体(Proteintech, 美国), 兔抗单克隆 Caspase-8 抗体(Cell Signaling Technology, 美国), 兔抗单克隆 Caspase-3 抗体(Abcam, 英国), 垂直式蛋白电泳仪(Bio-Rad, 美国), 全波长酶标仪(Thermo, 美国), Azure C300 凝胶成像系统(Azure Biosystems, 美国), 图像采集系统显微镜(Leica, 德国)。

1.2 实验动物及分组

SPF 雌性 SD 大鼠 24 只, 体重为 50~90 g[由宁夏医科大学实验动物中心提供, 实验动物质量合格证编码 10752309201900022, 实验动物质量许可证 SCXK(宁)2015-0001]。适应性饲养 1 周后, 随机分为 4 组(每组 6 只, 分笼饲养, 每笼 3 只)。在预实验中根据相关文献及 2,4-D 的 LD₅₀ 设置了相应的浓度梯度, 并根据血清 E2 和氧化损伤指标变化确定最终染毒剂量。枸杞多糖剂量的选择根据相关文献及预实验, 选择在干预后能够提高 E2 水平和降低血清中氧化损伤指标的剂量为最终的干预剂量。分别设为空白对照组(去离子水 1 mL·d⁻¹)、染毒组(75 mg·kg⁻¹ 2,4-D)、枸杞多糖对照组(50 mg·kg⁻¹ LBP)、枸杞多糖干预组(75 mg·kg⁻¹ 2,4-D, 50 mg·kg⁻¹ LBP)。实验期间大鼠自由饮水、摄食, 饲养环境温度 18~22°C, 湿度 40%~70%, 自然昼夜节律光照。每天经口灌胃一次, 连续染毒 28 d。

1.3 一般行为学观察

观察各组大鼠的行为, 包括形态学变化(精神状态, 皮毛、黏膜及耳廓色泽, 休息时的姿势等), 异常行为表现(如动物的反抗触摸、叫声、惊跳、逃跑、洗脸、直立、挠抓等情绪性行为发生情况), 隔天记录 1 次。

1.4 动物体重及卵巢、子宫脏器系数测定

每隔 2 d 称重一次并记录, 直至染毒结束。脏器系数=脏器重量(g)/体重(g)×100%。

1.5 卵巢及子宫组织结构观察

动物麻醉后经心尖穿刺采血处死后, 立即分离出大鼠卵巢及子宫组织, 去除周围脂肪和结缔组织, 生理盐水漂洗, 滤纸吸干, 准确称量双侧卵巢及子宫重量, 计算脏器系数。随机选取 3 只大鼠的脏器进行组织切片, 剩余 3 只大鼠的脏器使用 Western blotting 法检测相关蛋白表达量。将脏器置入装有 40 mL 体积分数为 10% 甲醛的细口瓶中固定。固定好的标本用梯度浓度的乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片厚 4 μm, 苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)制片染色。镜下观察其组织形态。

1.6 血清 SOD、GSH-Px、E2 水平及 MDA 浓度测定

动物麻醉后, 迅速剪开胸腹部, 暴露心脏, 经心脏穿刺采血。收集血液于 10 mL 离心管中, 低温离心(3000 r·min⁻¹, 10 min, 离心半径 10 cm), 取其上清液, 按照试剂盒说明书, 测定大鼠血清中 SOD、GSH-Px、E2 水平及 MDA 浓度。

1.7 TUNEL 荧光法观察大鼠卵巢及子宫组织细胞凋亡情况

每只大鼠取 2 张组织切片, 将切片浸入磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS), 洗 5 min, 3 次; 切片用柠檬酸修复液微波修复 5 min, 自然冷却, PBS 洗 5 min, 3 次; 每个样本滴加 50 μ L 现配 TUNEL 反应液, 37 °C 避光孵育 90 min; PBS 洗 5 min, 3 次, DAPI 染核 10 min; 抗荧光衰减封片剂封片。在荧光显微镜下观察并计算 3 个视野下的阳性细胞数, 取平均值, 细胞凋亡率=凋亡细胞/(凋亡细胞计数+非凋亡细胞计数)×100%。

1.8 Western blotting 法检测卵巢组织中死亡受体通路相关蛋白表达量

按照说明书步骤提取卵巢组织蛋白及蛋白定量, 蛋白上样量为 50 μ g。经质量分数为 10%~15% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 转移蛋白至聚偏二氟乙烯膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。用含体积分数 0.1% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液漂洗 3 次, 每次 10 min; 一抗 4 °C 孵育过夜, 磷酸盐吐温缓冲液漂洗 3 次, 每次 10 min; 二抗室温孵育 1 h, 磷酸盐吐温缓冲液

漂洗 3 次, 每次 10 min, 使用凝胶成像系统成像, 使用 Image J 1.52 软件计算其灰度值并进行统计学分析。

1.9 统计学分析

实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。多组间比较采用单因素方差分析, 进一步组间两两比较, 采用 LSD 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

染毒组大鼠随着染毒时间延长, 表现出神态倦怠, 烦躁、愤怒、相互攻击, 鼠毛粗糙、枯黄等异常表现, 其余各组大鼠未见明显异常, 各组大鼠均未见死亡。

2.2 大鼠体重增长情况及卵巢、子宫湿重及脏器系数

各组大鼠体重稳定增长, 各组大鼠体重变化差异无统计学意义($P>0.05$), 结果见表 1。各组大鼠卵巢、子宫脏器系数间比较差异无统计学意义($P>0.05$), 结果见表 2。

表 1 各组大鼠体重变化量($n=6, \bar{x} \pm s, g$)
Table 1 Changes in body weight of rats in each group ($n=6, \bar{x} \pm s, g$)

组别	染毒前	染毒后				体重增长量
		第7天	第13天	第19天	第28天	
空白对照组	82.0±15.9	125.9±9.7	154.7±9.4	176.3±14.8	205.4±17.9	123.6±25.2
染毒组	96.7±8.4	133.8±8.0	160.0±8.0	180.2±8.1	204.3±10.0	108.0±5.3
枸杞多糖对照组	96.3±13.8	135.7±10.5	165.4±8.9	190.3±10.7	218.3±15.1	122.1±19.3
枸杞多糖干预组	98.3±7.1	135.2±9.0	167.1±9.6	190.2±11.5	213.2±17.9	114.9±19.0
F						0.89
P						0.47

表 2 各组大鼠卵巢、子宫组织湿重及脏器系数($n=6, \bar{x} \pm s$)
Table 2 Wet weights and organ coefficients of ovary and uterus of rats in each group ($n=6, \bar{x} \pm s$)

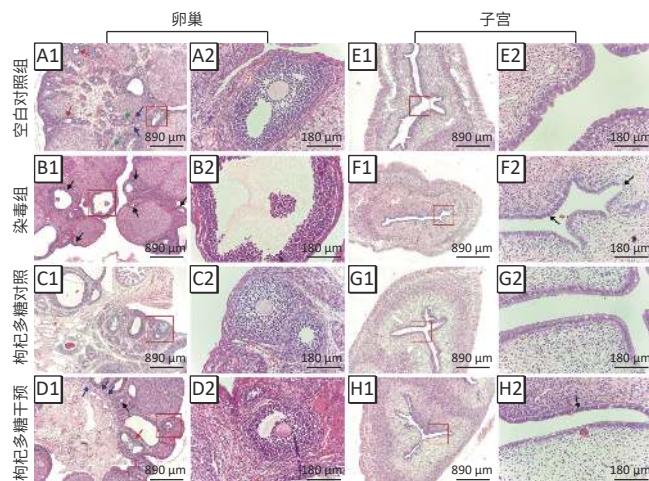
组别	卵巢湿重/g	卵巢脏器系数/%	子宫湿重/g	子宫脏器系数/%
空白对照组	0.061±0.011	0.030±0.003	0.476±0.189	0.232±0.089
染毒组	0.058±0.005	0.028±0.002	0.402±0.067	0.197±0.031
枸杞多糖对照组	0.060±0.004	0.028±0.002	0.396±0.162	0.182±0.074
枸杞多糖干预组	0.058±0.003	0.027±0.002	0.433±0.209	0.206±0.102
F	0.66		0.42	
P	0.59		0.74	

2.3 大鼠卵巢及子宫组织形态学的变化

空白对照组大鼠卵巢组织结构完整, 处于不同发

育阶段的卵泡数量和形态未见异常, 黄体、白体及卵巢间质组织结构未见异常, 各级卵泡颗粒细胞结构完整, 排列紧密成层, 呈椭圆形, 细胞核大小均一, 胞膜和核膜完整。与空白对照组相比, 染毒组大鼠卵巢组织结构异常, 处于不同发育阶段的卵泡数量减少, 卵泡形态出现明显改变, 且闭锁卵泡数量增多; 各级卵泡颗粒细胞结构完整但分布不规则, 排列不紧密。与染毒组相比, 枸杞多糖干预组大鼠卵巢组织结构相对较完整, 处于不同发育阶段的卵泡数量增加, 各级卵泡颗粒细胞结构相对完整, 排列紧密。与空白对照组相比枸杞多糖对照组大鼠卵巢组织结构未见异常, 结果见图 1。

空白对照组大鼠子宫组织形态正常, 子宫壁内膜、肌层和外膜组织轮廓清楚。与空白对照组相比, 染毒组大鼠子宫内膜不完整, 可见内膜出现缺失, 内膜薄厚不均, 出现不同程度的胞核假复层现象, 固有层腺体数减少。与染毒组相比, 枸杞多糖干预组大鼠子宫组织结构相对较完整, 内膜缺失现象及胞核假复层现象减少。与空白对照组相比枸杞多糖对照组大鼠子宫组织结构未见异常, 结果见图1。



[注] A1-D1 及 E1-H1 放大倍数为 40 倍, A2-D2 及 E2-H2 放大倍数为 200 倍; 红框: 200 倍放大区域。A1: 蓝色箭头为原始卵泡, 绿色箭头为初级卵泡, 红色箭头为次级卵泡; B1: 箭头为闭锁卵泡; D1: 蓝色箭头为原始卵泡, 红色箭头为次级卵泡, 黑色箭头为闭锁卵泡; F2: 左侧箭头为胞核假复层, 右侧箭头为内膜缺失; H2: 黑色箭头为胞核假复层。

图1 各组大鼠卵巢及子宫组织病理学变化

Figure 1 Histopathological changes of ovary and uterus of rats in each group

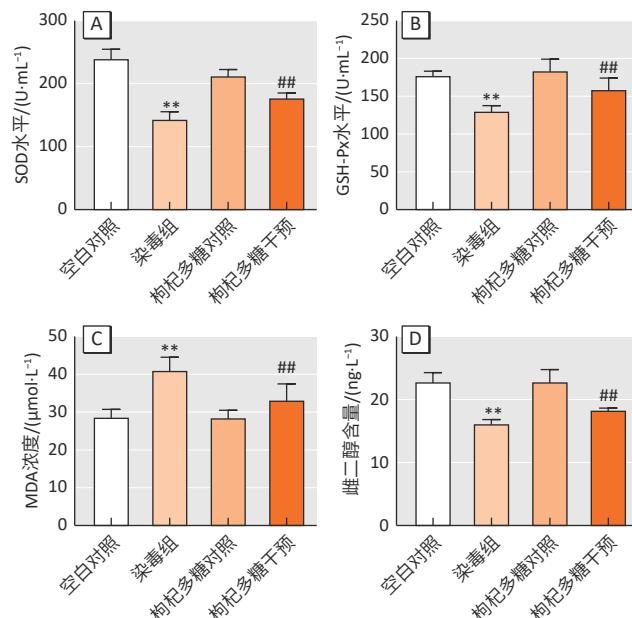
2.4 大鼠血清 SOD、GSH-Px、E2 水平及 MDA 浓度的变化

各组间大鼠血清 SOD、GSH-Px、E2 水平及 MDA 浓度差异均有统计学意义($F=86.1$ 、 26.2 、 43.3 、 22.3 , 均 $P < 0.01$)。与空白对照组相比, 染毒组大鼠血清 SOD、GSH-Px、E2 水平降低($P > 0.01$), MDA 浓度升高($P > 0.01$); 枸杞多糖对照组大鼠血清 SOD、GSH-Px、E2 水平及 MDA 浓度变化无统计学意义($P > 0.05$)。与染毒组相比, 枸杞多糖干预组大鼠血清 SOD、GSH-Px、E2 水平升高($P > 0.01$), MDA 浓度降低($P > 0.01$)。结果见图2。

2.5 大鼠卵巢及子宫组织细胞凋亡率的变化

各组间卵巢及子宫组织细胞凋亡率差异均有

统计学意义($F=64.8$ 、 55.5 , 均 $P < 0.01$)。染毒组大鼠卵巢及子宫组织细胞凋亡率高于空白对照组大鼠($P < 0.01$)。与空白对照组相比, 枸杞多糖对照组大鼠卵巢及子宫组织细胞凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$)。枸杞多糖干预组大鼠卵巢及子宫组织细胞凋亡率低于染毒组($P < 0.01$)。结果见图3、图4。



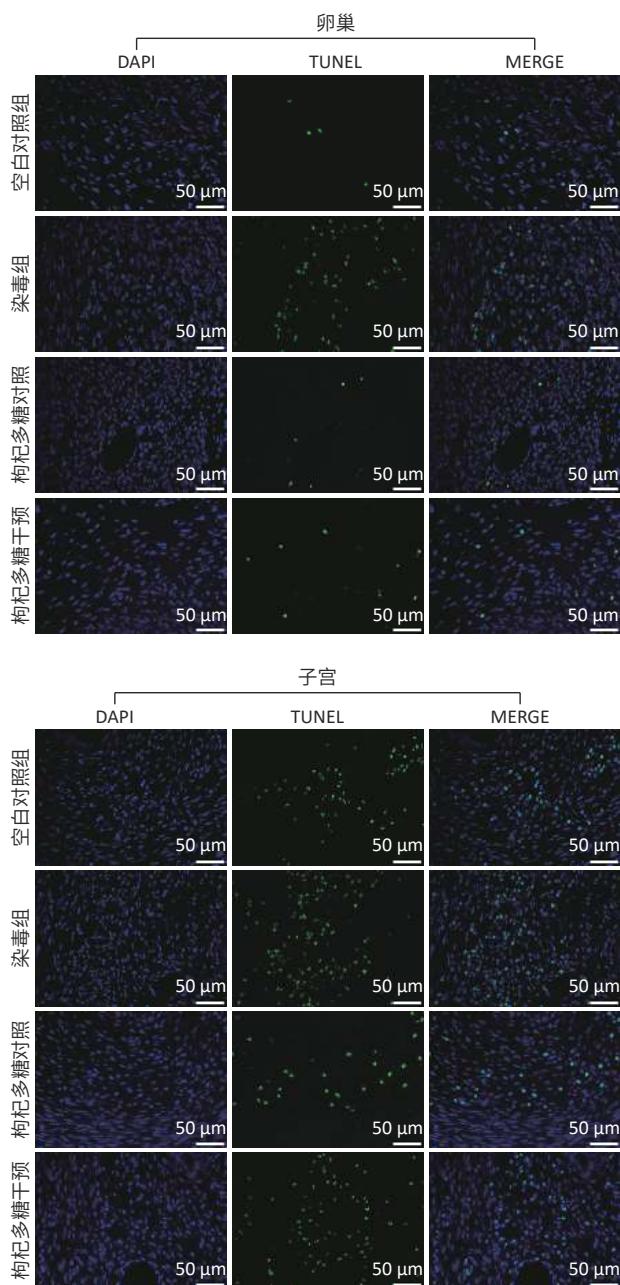
[注] A: $F=64.8$, $P < 0.01$; B: $F=26.2$, $P < 0.01$; C: $F=22.3$, $P < 0.01$; D: $F=43.3$, $P < 0.01$. **: 与空白对照组比较, $P < 0.01$; #: 与染毒组比较, $P < 0.01$ 。

图2 各组大鼠血清 SOD、GSH-Px、E2 水平及 MDA 浓度比较($n=6$)

Figure 2 SOD, GSH-Px, and E2 levels and MDA concentration in serum of rats in each group ($n=6$)

2.6 大鼠卵巢组织死亡受体通路相关蛋白表达的变化

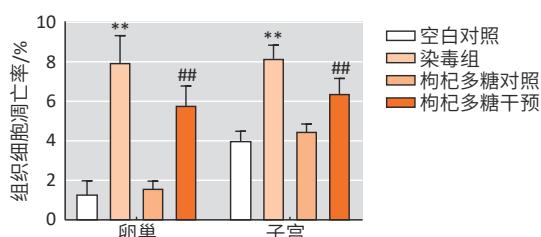
各组间卵巢组织内死亡受体通路相关蛋白表达差异均有统计学意义($F=12.6$ 、 20.1 、 8.3 、 11.1 、 12.8 、 14.3 , 均 $P < 0.01$; $F=5.7$, $P < 0.05$)。与空白对照组相比, 染毒组大鼠卵巢组织 Fas、FasL、FADD、Pro-Caspase-8、Cleaved-Caspase-8、Pro-Caspase-3、Cleaved-Caspase-3 表达升高($P < 0.05$ 或 0.01); 枸杞多糖对照组卵巢组织内死亡受体通路蛋白表达水平差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。与染毒组相比, 枸杞多糖干预组大鼠卵巢组织内 Fas、FasL、FADD、Pro-Caspase-8、Cleaved-Caspase-8、Pro-Caspase-3、Cleaved-Caspase-3 表达降低($P < 0.05$ 或 0.01), 结果见图5。



[注] 图中蓝色荧光为细胞核定位, 绿色荧光为凋亡细胞染色。

图3 各组大鼠卵巢及子宫组织细胞凋亡比较($\times 400$)

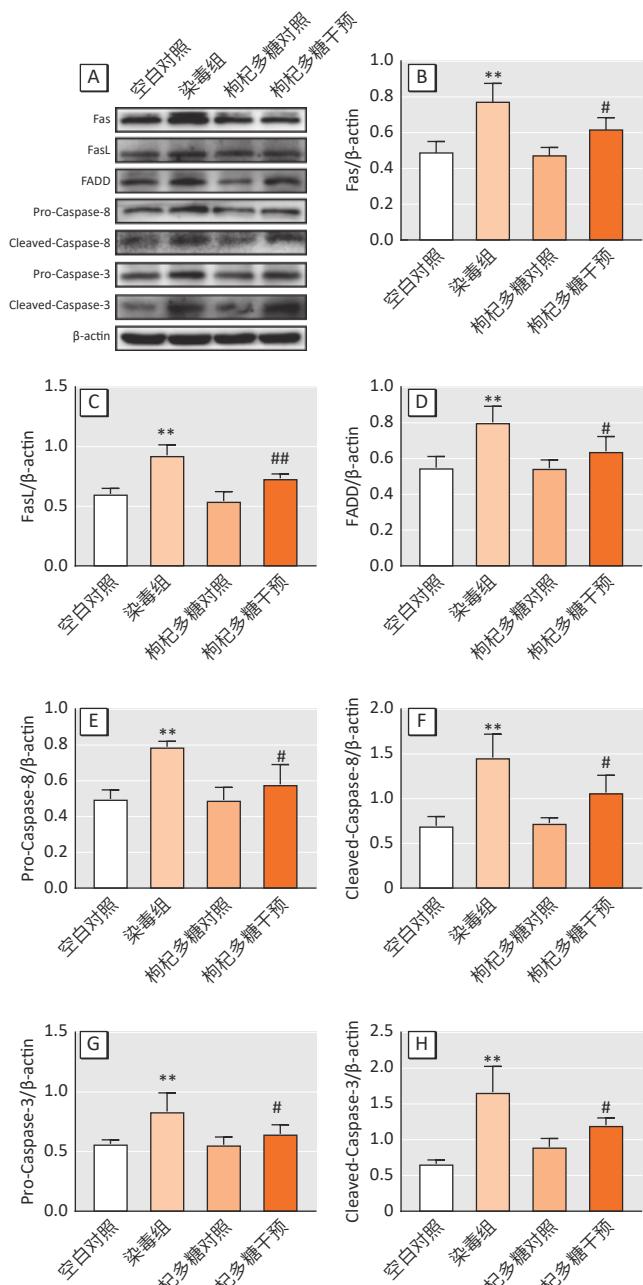
Figure 3 Apoptosis of ovarian and uterine cells of rats in each group ($\times 400$)



[注] 卵巢: $F=64.8, P < 0.01$; 子宫: $F=55.5, P < 0.01$ 。**: 与空白对照组比较, $P < 0.01$; ##: 与染毒组比较, $P < 0.01$ 。

图4 各组大鼠卵巢及子宫组织细胞凋亡率比较($n=6$)

Figure 4 Apoptosis rates of ovarian and uterine cells of rats in each group ($n=6$)



[注] A: 蛋白电泳图; B: $F=12.6, P < 0.01$; C: $F=20.1, P < 0.01$; D: $F=8.3, P < 0.01$; E: $F=11.1, P < 0.01$; F: $F=12.8, P < 0.01$; G: $F=5.7, P < 0.05$; H: $F=14.3, P < 0.01$ 。*: 与空白对照组比较, $P < 0.05$; **: 与空白对照组比较, $P < 0.01$; #: 与染毒组比较, $P < 0.05$; ##: 与染毒组比较, $P < 0.01$ 。

图5 各组大鼠卵巢组织死亡受体通路蛋白表达情况($n=6$)

Figure 5 Expressions of death receptor pathway-related proteins in ovary of rats in each group ($n=6$)

3 讨论

据估计,全世界应用于农作物的杀虫除草剂中,只有不到0.1%到达了特定的目标,而留下了大量有毒残留物可以自由进入环境^[13]。2,4-D作为一种应急系统除草剂,广泛用于控制牧场、草坪、高尔夫球场、森林、道路和公园的阔叶杂草和其他植被^[2]。2,4-D可通

过多种途径进入体内,体内实验结果显示 2,4-D 染毒后可经血液分布至全身各组织器官,其中卵巢和子宫组织中都可检测到 2,4-D 的残留^[14]。本次研究结果显示各组大鼠体重增长量、卵巢及子宫脏器系数间均无统计学差异,这可能与染毒剂量及时间等因素有关,脏器重量改变程度与生殖系统损伤之间并不完全一致,因此,尚不能说明 2,4-D 对卵巢及子宫组织功能没有影响。同时本次研究显示染毒组大鼠血清 E2 水平以及 HE 结果提示 2,4-D 染毒后大鼠卵巢及子宫组织存在损伤,表明 2,4-D 可以造成雌性大鼠生殖系统损伤。

正常情况下机体处于氧化与抗氧化平衡状态,但当氧化水平增高或抗氧化水平降低时,机体则会产生过多的活性氧(reactive oxygen species, ROS)^[15]。MDA 作为脂质氧化的终产物,反映机体过氧化损伤情况,SOD、GSH-Px 是衡量机体抗氧化能力大小的重要标志^[15-16]。研究表明氧化应激可以影响雌性小鼠卵母细胞的成熟及受精率从而降低其生育力^[17]。本次研究结果显示染毒组大鼠血清 SOD、GSH-Px 水平降低,MDA 浓度升高,提示染毒后大鼠抗氧化能力减弱,过氧化反应力增强,导致 ROS 水平升高,可能影响大鼠生殖系统正常功能。同时过量的 ROS 会对机体细胞中的脂质、蛋白质、DNA 等大分子造成损伤从而引起细胞凋亡^[18]。

细胞凋亡指由一系列基因激活、表达以及调控等主导的,为维持内环境稳态的细胞自主有序的死亡,细胞凋亡途径主要有 3 种分别为死亡受体途径、线粒体途径和内质网途径^[19]。研究表明 2,4-D 可以引发人牙髓干细胞凋亡、小鼠睾丸细胞凋亡等^[20-21]。本次研究结果显示染毒组大鼠卵巢及子宫组织内细胞凋亡率增高,提示 2,4-D 可以造成雌性生殖细胞凋亡。同时染毒组大鼠血清 E2 水平降低,可能与 2,4-D 引发卵巢颗粒细胞凋亡而造成血清雌激素水平下降有关。尽管染毒后卵巢及子宫组织细胞凋亡率升高,并且脏器系数出现下降但并未见统计学差异,这可能是由于染毒剂量与时间不足而组织内细胞凋亡率未达到影响其实质改变水平。目前关于 2,4-D 引起细胞凋亡的研究主要集中于线粒体途径和内质网途径,且以 Fas 系统为代表的死亡受体信号转导通路是卵巢细胞凋亡的重要通路之一^[22],因此本实验旨在探究 2,4-D 是否介导死亡受体途径引发的细胞凋亡。死亡受体途径是指细胞膜表面的某些蛋白质与携带凋亡信号的配体结合,并将凋亡信号转移至细胞内从而诱导细胞发生凋亡,Fas 抗原与 FasL 组成的 Fas 系统是细胞内主要的

信号转导途径之一^[10]。当 Fas 单体与 FasL 结合后,形成 Fas 三聚体复合物,同时募集连接 FADD, FADD 有着特殊的结构域,一方面 FADD 的死亡结构域与 Fas 结合,另一方面含有的死亡效应结构域能够与 Pro-Caspase-8 结合,从而形成由 Fas-FADD-Pro-Caspase-8 构成的死亡诱导复合物,这种死亡诱导复合物是凋亡中所必需的,它作为下游信号蛋白的中心点,可以激活下游 Caspase 家族成员如 Caspase-3/6/9 使其水解并激活 DNA 降解酶,从而使细胞发生凋亡^[23]。本次研究结果显示染毒组大鼠卵巢组织内的 Fas、FasL、FADD、Pro-Caspase-8、Cleaved-Caspase-8、Pro-Caspase-3、Cleaved-Caspase-3 表达量升高,提示 2,4-D 可通过 Fas-FasL 信号通路引发卵巢细胞凋亡。

枸杞子作为中国传统的中药材,其主要活性成分为枸杞多糖,具有多种生物活性,尤其在生殖保护方面具有重要作用^[24]。研究表明枸杞多糖可以提升生殖细胞抗氧化能力、抑制细胞凋亡^[25]。因 2,4-D 可以引起大鼠发生氧化应激,而枸杞多糖具有抗氧化活性和生殖保护作用,因此本实验加入枸杞多糖进行染毒干预。实验结果显示与染毒组相比,枸杞多糖干预组血清 SOD、GSH-Px 水平升高,MDA 浓度降低,表明枸杞多糖具有抗氧化功能。与染毒组相比枸杞多糖干预组大鼠血清 E2 水平升高,同时卵巢及子宫组织损伤相对减轻,提示枸杞多糖具有雌性生殖保护功能。与染毒组相比,枸杞多糖干预组大鼠卵巢及子宫组织细胞凋亡率降低,同时卵巢组织内 Fas、FasL、FADD、Pro-Caspase-8、Cleaved-Caspase-8、Pro-Caspase-3、Cleaved-Caspase-3 表达降低,提示枸杞多糖具有抑制细胞凋亡功能,下调 Fas-FasL 通路蛋白表达量以抑制卵巢细胞凋亡。上述功能可能机制与枸杞多糖具有调节激素平衡、清除氧自由基、抑制生殖细胞凋亡有关^[24]。

综上所述,2,4-D 可以引起雌性大鼠发生氧化应激,激活 Fas-FasL 信号通路导致细胞凋亡。而枸杞多糖可能通过降低氧化应激水平、调节 Fas-FasL 信号通路抑制细胞凋亡的发生,从而减少 2,4-D 对雌性大鼠生殖系统的损伤。但其损伤的具体机制及枸杞多糖的保护机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] SONG Y. Insight into the mode of action of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) as an herbicide[J]. *J Integr Plant Biol*, 2014, 56(2): 106-113.
- [2] ISLAM F, WANG J, FAROOQ M A, et al. Potential impact of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on human and

- ecosystems[J]. *Environ Int*, 2018, 111: 332-351.
- [3] ZHANG C, LIU X, DONG F, et al. Soil microbial communities response to herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid butyl ester[J]. *Eur J Soil Biol*, 2010, 46(2): 175-180.
- [4] ALVES M G, RATO L, CARVALHO RA, et al. Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(5): 777-793.
- [5] HARADA Y, TANAKA N, ICHIKAWA M, et al. PPAR α -dependent cholesterol/testosterone disruption in Leydig cells mediates 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-induced testicular toxicity in mice[J]. *Arch Toxicol*, 2016, 90(12): 3061-3071.
- [6] LERDA D, RIZZI R. Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)[J]. *Mutat Res Lett*, 1991, 262(1): 47-50.
- [7] BURNS CJ, SWAEN GM. Review of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) biomonitoring and epidemiology[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2012, 42(9): 768-786.
- [8] GONZÁLEZ M, SOLONESKI S, REIGOSA MA, et al. Genotoxicity of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and a commercial formulation, 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt. I. Evaluation of DNA damage and cytogenetic endpoints in Chinese Hamster ovary (CHO) cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2005, 19(2): 289-297.
- [9] 苟练习, 张梦云, 刘科亮, 等. 2, 4-二氯苯氧乙酸对初断乳SD大鼠生殖器官发育的影响及相关机制[J]. 癌变·畸变·突变, 2018, 30(5): 389-394.
- GOU L, ZHANG MY, LIU KL, et al. Reproductive toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in immature SD rats[J]. *Carcinog, Teratog Mutagen*, 2018, 30(5): 389-394.
- [10] GREEN DR, LLAMBI F. Cell death signaling[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7(12): a006080.
- [11] WANG M, WU X, YU L, et al. LCT-3d induces oxidative stress-mediated apoptosis by upregulating death receptor 5 in gastric cancer cells[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 658608.
- [12] YANG FL, WEI YX, LIAO BY, et al. Effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in obese mice[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 742.
- [13] SOLONESKI S, NIKOLOFF N, LARRAMENDY ML. Analysis of possible genotoxicity of the herbicide flurochloridone and its commercial formulations: Endo III and Fpg alkaline comet assays in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells[J]. *Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2016, 797: 46-52.
- [14] 陈晓. 2, 4-二氯苯氧乙酸在大鼠体内的毒物代谢动力学研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2017.
- CHEN X. Toxicokinetics of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in rats[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2017.
- [15] AHANGARPOUR A, NAJIMI SA, FARBOOD Y. Effects of Vitex agnus-castus fruit on sex hormones and antioxidant indices in a d-galactose-induced aging female mouse model[J]. *J Chin Med Assoc*, 2016, 79(11): 589-596.
- [16] UTOMO A, JIANG X, FURUTA S, et al. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(42): 43522-43529.
- [17] QIAO P, ZHANG Y, YANG Y, et al. Oral isoniazid causes oxidative stress, oocyte deterioration and infertility in mice[J]. *Toxicology*, 2021, 455: 152749.
- [18] LU J, WANG Z, CAO J, et al. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018, 16(1): 80.
- [19] 毛伟平, 许锋. 细胞凋亡过程中的信号转导[J]. 环境与职业医学, 2004, 21(1): 62-65.
- MAO WP, XU F. Signal transduction in the process of cell apoptosis[J]. *J Environ Occup Med*, 2004, 21(1): 62-65.
- [20] MAHMOUDINIA S, NIAPOUR A, HAMIDABADI HG, et al. 2, 4-D causes oxidative stress induction and apoptosis in human dental pulp stem cells (hDPSCs)[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2019, 26(25): 26170-26183.
- [21] ZHANG D, WU Y, YUAN Y, et al. Exposure to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid induces oxidative stress and apoptosis in mouse testis[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2017, 141: 18-22.
- [22] CATALDO NA, DUMESIC DA, GOLDSMITH PC, et al. Immunolocalization of Fas and Fas ligand in the ovaries of women with polycystic ovary syndrome: relationship to apoptosis[J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(9): 1889-1897.
- [23] TUMMERS B, GREEN DR. Caspase-8: regulating life and death[J]. *Immunol Rev*, 2017, 277(1): 76-89.
- [24] 田元春. 枸杞多糖生殖保护作用研究进展[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(12): 1421-1424.
- TIAN YC. Research progress in reproductive protection effects of lycium barbarum polysaccharides[J]. *Chin J New Drugs*, 2013, 22(12): 1421-1424.
- [25] QIAN L, YU S. Protective effect of polysaccharides from *Lycium barbarum* on spermatogenesis of mice with impaired reproduction system induced by cyclophosphamide[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2016, 76(5): 383-385.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 陈姣)