

The Effect of Diethylstilbestrol on Gubernaculum Testis Development in Fetal Mice

己烯雌酚致胚胎期睾丸引带形态结构发育异常的研究

DENG Wang-dong¹, JIANG Xue-wu^{1,*}, LI Jian-hong²

LAI Ya-man¹, CHEN Zhong-xian¹, HUANG Tian-hua^{2,*}

(1. Department of Pediatric Surgery, the Second Hospital of Shantou University Medical College, Shantou Guangdong 515031, China;

2. Research Center of Reproductive Medicine, Shantou University Medical College, Shantou Guangdong 515031, China)

邓汪东¹/蒋学武^{1,*}/李建宏²/

赖亚曼¹/陈中献¹/黄天华^{2,*}

(1. 汕头大学医学院第二附属医院小儿外科, 广东 汕头 515041; 2. 汕头大学医学院生殖医学研究中心, 广东 汕头 515041)

【摘要】背景与目的: 研究环境外源性雌激素己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES)对胚胎小鼠睾丸引带形态发育的影响, 探讨 DES 影响睾丸以及生殖系统发育的机制。材料与方法: 昆明雌性小鼠 60 只, 随机分成 6 组, 于孕 9~17 d 每天分别给予 DES 25、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和等体积的 DMSO、生理盐水作空白和正常对照。孕 19 d 处死母鼠, 取出活胎、取其下腹部, 分别作光镜和电镜固定。观察睾丸引带的组织形态学及细胞超微结构变化。结果: DES 可致睾丸引带发育不良: 体积缩小, 形态异常, 组织结构紊乱, 细胞内肌丝细小, 排列紊乱, 密体不明显, 胞浆中细胞器散在分布。DES 剂量越大, 睾丸引带形态异常及组织细胞结构紊乱现象越明显。结论: DES 可致胎鼠睾丸引带形态异常、组织细胞结构紊乱, 且有剂量效应关系。

【关键词】己烯雌酚; 外源性雌激素; 睾丸引带; 形态学

中图分类号: R726.9

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2005)02-0093-04

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To investigate the effects of prenatal exposure to exoestrogens diethylstilbestrol (DES) on the development of gubernaculum testis in fetal mice. MATERIAL AND METHODS: Sixty pregnant Kunming mice were divided into 6 groups randomly and administered subcutaneously from gestational day(GD) 9 though GD17 with DES at a dose of 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (all dissolved in 0.2 ml dimethyl sulfoxide(DMSO)) and with DMSO only(as control), normal saline alone (as normal control), respectively. Pregnant mice were sacrificed on GD19 and fetuses were quickly removed, the lower part of the male fetuses were fixed according to the need of study with light microscope, scanning and transmission electron microscope. RESULTS: In experimental groups, gubernaculum testis seemed underdeveloped, with smaller volume and abnormal shape, and the bulbs lose clear demarcation between the inner mesenchymal core and muscular outerlayer, gubernaculum cells had some smaller disordered myofibrils, and few fibrils could be seen in myofibrils, there were only some sparse organelles in cytoplasm. All these results closely related to the dosage of DES. CONCLUSION: DES could induce underdevelopment of gubernaculum testis of fetal male mice with obvious dose-effect correlation.

【KEY WORDS】 diethylstilbestrol; exoestrogens; gubernaculum; morphology

近半个世纪来男性精子数减少、生育能力下降、先天性生殖系统畸形以及肿瘤等的发生率明显增加, 而且环境外源性雌激素(exoestrogens, EEs)被认为是其重要原因^[1]。因为它们可影响胚胎期雄性正常的性分化和发

育过程。但其具体的作用机制却很不清楚。由于睾丸在生殖系统发育中的重要作用, 同时又基于胚胎期睾丸的发育(及下降)与睾丸引带关系密切的事实, 我们应用经典的代表性环境外源性雌激素己烯雌酚

收稿日期: 2004-10-15; 修订日期: 2004-11-20

基金项目: 广东省自然科学基金项目(No.010438); 广东省科技攻关项目(No.C31302)

作者简介: 邓汪东(1974-), 男, 广东省梅州市人, 硕士研究生, 研究方向: 生殖系统先天畸形。

* Correspondence to: JIANG Xue-wu E-mail: jiangxw@sina.com; HUANG Tian-hua 86-754-8900845, E-mail: thhuang@stu.edu.cn

(Diethylstilbestrol, DES)专门研究了 EE_s 对睾丸引带发育的影响,以期从睾丸引带这个新的角度探讨 EE_s 对睾丸乃至整个生殖系统发育的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及分组处理

10 周龄雌性昆明小鼠 60 只,随机分为 6 组,每组 10 只。分别为正常组(给予生理盐水)、空白对照组(仅给予溶剂二甲基亚砜, (Dimethyl Sulfoxide, DMSO), AMRESCO 公司,购自上海生工生物工程有限公司)、实验组 1~4: 分别为给予 DES(购自美国 Sigma 公司) 25、50、100 和 200 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (均溶于 0.2 ml DMSO 中)。

1.2 标本准备

雌雄小鼠按常规合笼交配过夜,次晨检查雌鼠有无出现阴道栓并以此作为受孕标志,记妊娠第 0 d(E0)。雌鼠受孕后单独饲养。各组动物均按预先设计的编号在 E9 至 E17 上午 8 h 每 d 皮下注射相应的药物剂量。对照组和正常组仅分别给予等体积 DMSO 和生理盐水。E19 脱颈椎处死孕鼠,迅速取出活胎鼠(也记录死胎情况),切取其下腹部分别固定于 10% 福尔马林、2.5% 戊二醛,24 h 后取材。将雄性胎鼠以 4 μm 厚作冠状位连续切片,HE 染色,光镜观察睾丸引带组织学变化;应用扫描电镜、透射电镜分别观察睾丸引带形态学及细胞超微结构的变化。

1.3 统计学方法 采用 SPSS10.0 统计软件,数据用 χ^2 检验、二项分布和线性回归分析。

2 结果

2.1 DES 剂量与死胎率呈剂量效应关系。从表 1 看,不同剂量组死胎率不同 ($\chi^2 = 52.932, P = 0.000$); 正常、DMSO 与 DES25 三组死胎率相似(二项分布,最小发生概率为 0.2739); DES50 与 DES100 两组死胎率相似 ($\chi^2 = 1.613, P = 0.204$); 但正常、DMSO 与 DES25 三组合并(合并 1 组), DES50 与 DES100 合并(合并 2 组)与 DES200 比较,三组间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 50.068$,

表 1 各组胎鼠数、死胎数、死胎率的情况

Table 1 The number of total embryo, dead foetus and dead rate of embryo

Groups	Total embryo	Dead foetus	Dead rate of embryo ($\times 10^{-2}$)
Normal	93	2	15.00
DMSO	91	3	3.30
DES 25	90	6	6.67
DES 50	86	10	11.63
DES 100	98	18	18.37
DES 200	88	28	31.82

$P = 0.000$); 合并 1 组、合并 2 组、DES200 三组中任意两组比较差异均有统计学意义(最小 $\chi^2 = 10.034, P = 0.002$)。表明随 DES 剂量增大,死胎率增高,而且经统计学处理显示有明显的线性相关关系 ($\hat{y} = 0.03663 + 0.001426X, r = 0.999, P = 0.000$)。

2.2 光镜观察可见正常组及对照组睾丸引带发育良好,引带球较圆和规整,由两部分构成:中心为间叶组织,细胞稀疏,核圆、较大,胞浆少,有突起;外周为肌原细胞,细胞较密,呈束状排列,细胞梭形,核卵圆形;间叶组织和肌原细胞之间有较明显的分界(图 1)。实验组睾丸引带发育较差,随 DES 剂量增加引带球逐渐失去规整,间叶组织与肌原细胞之间的分界也越发不明显,组织结构较为紊乱、模糊。具体地,这些组织形态学的变化在上述合并 1 组、合并 2 组和 DES200 三个组中表现明显(图 1A, 2A), (图 2B, 2C) 和(图 2D)。

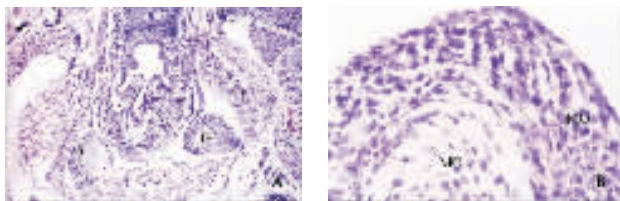


图 1 正常组与对照组小鼠睾丸引带发育情况,显示睾丸引带(G)发育良好,中间稀疏的间叶组织(MC)和外周较密排列的肌原细胞(MO)及其分界清晰可见(A: HE $\times 40$; B: $\times 400$)

Figure 1 Histology of transverse section of fetal mice revealed gubernaculum testes of normal (NS treated) and control (DMSO treated) groups; A: Well-developed gubernaculum (G) appeared about round in the transverse section (HE $\times 40$); B: Inner mesenchymal core (MC) and muscular outlayer(MO) were clearly demarcated. Their cells arranged according to some order (HE $\times 400$)

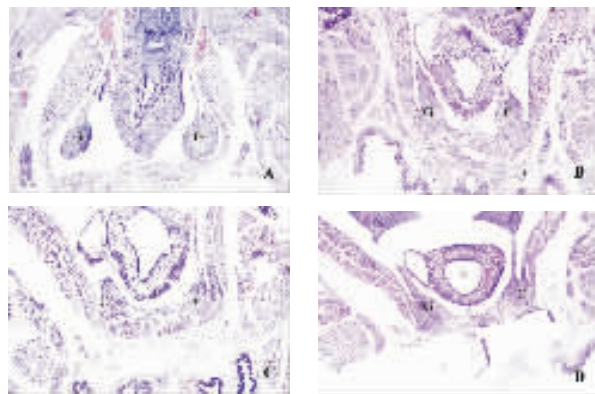


图 2 实验组睾丸引带(G)发育较差,间叶组织与肌原细胞之间分界不明显,形态及组织结构异常(HE $\times 40$)

Figure 2 Histology of transverse section of fetal mice revealed gubernaculum testes (G) of DES-treated groups (HE $\times 40$): Smaller shape with unclear demarcation between the core and outlayer than normal. By the increasing dose of DES, the morphological structure and the shape of gubernaculum seemed more and more abnormal. A-D: 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (HE $\times 40$)

2.3 扫描电镜观察可见睾丸引带包括引带索和引带球。正常组引带球发育良好,较为粗大,呈圆柱状,上连于引带索,下附着于下腹壁。引带索粗短,上附着于

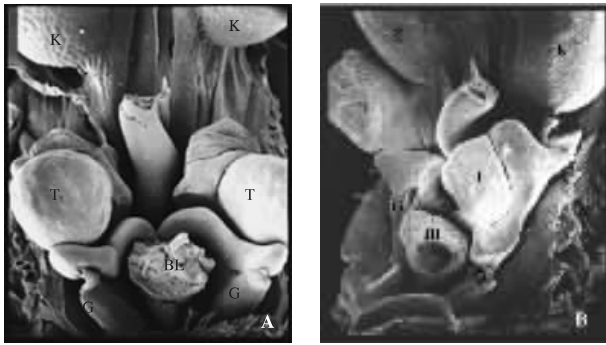


图3 扫描电镜图 正常组A: 辜丸引带(G)发育良好, 较为粗大, 呈圆柱状。辜丸(T)发育良好, 饱满光滑, 位于膀胱颈(BL)偏上, 与肾脏(K)距离较远; 实验组B: 辜丸引带发育较差, 体积较小, 扁平细长。辜丸发育差且形态异常, 位于肾脏下极, 与膀胱距离较远。(肠和部分膀胱已移除)($\times 50$)

Figure 3 SEM of gubernaculum of normal and DES-treated groups($\times 50$). A: Normal group. The gubernaculum (G) developed well and appeared to be a cylinder with stout and short. The testes (T) were fully developed and located next to the bladder (BL) with a long distance between kidneys (K); B: DES ($200 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) treated male fetuses. The poor-developed gubernaculum was slim and long with smaller volume. The testes were poor-developed (no regular round testes could be seen) and located at the lower pole of the kidneys (K). (the intestine and part of the bladder were removed)

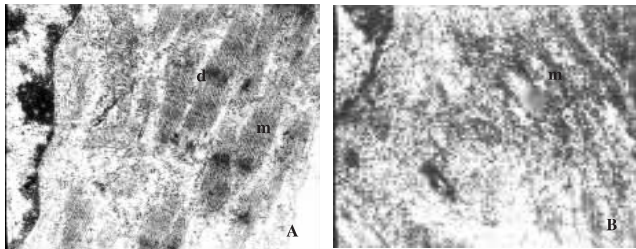


图4 透射电镜图 正常组A: 辜丸引带细胞内存在较为粗大的肌丝(m), 排列整齐, 其中可见明显的密体(d), 胞浆中有丰富的细胞器; 实验组B: 辜丸引带细胞内肌丝细小, 排列较为紊乱, 密体不明显, 胞浆中细胞器散在分布($\times 20\ 000$)

Figure 4 TEM of gubernaculum cells of normal and DES-treated groups($\times 20\ 000$). A: normal group. Well-arranged myofibrils (m) and abundant organelles were observed; B: DES $200 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Smaller disordered myofibrils were revealed

辜丸及附辜尾, 下连于引带球。辜丸发育良好, 饱满, 位于膀胱颈偏上, 与肾脏距离较远。表明辜丸下降正常进行(图3A)。实验组引带球发育较差, 体积较小, 呈圆锥状, 引带索扁平、细长。辜丸发育差且有形态异常, 位于肾脏下极附近, 与膀胱距离较远, 显示辜丸发育不良和下降受到抑制(图3B)。这些变化也与DES剂量相关。

2.4 透射电镜观察发现正常组辜丸引带细胞内存在较为粗大的肌丝, 排列整齐, 其中可见明显的密体, 胞浆中有丰富的细胞器。近核处可见较多的粗面内质网、高尔基体及线粒体等, 表明细胞代谢活跃(图4A)。实验组辜丸引带细胞内肌丝明显细小, 排列较为紊乱, 密体不明显, 胞浆中细胞器散在分布, 仅见少数高尔基体、粗面内质网及线粒体, 表明细胞代谢受到影响, 这种变化在DES剂量较大时特别明显(图4B)。

3 讨论

外源性雌激素(exoestrogens, EEs)又称环境雌激素(environmental estrogens)或异源性雌激素(xenoestrogens)等, 是一类具有雌激素样活性, 能模拟内源性雌激素的生理生化作用或拮抗雄激素效应的化学物质。是环境内分泌破坏物(endocrine disruptors, EDs)的主要成分。它们进入人和动物体内, 干扰机体内分泌系统功能, 影响体内激素代谢过程, 从而对机体的生殖、发育以及肿瘤的发生等产生多方面影响^[2]。许多研究表明, 在过去的半个世纪以来人类精子数和精液量都明显下降, 同时男性生殖系统分化和发育异常如隐辜、辜丸发育不良、尿道下裂、小阴茎以及生殖系统肿瘤等则明显增加^[3,4]。母孕期接触EEs即使是对母体无任何毒性的低剂量也有可能对其后代产生不良影响^[5]。因此EEs目前已被认为是日益增多的先天性生殖系统畸形等发生的重要原因。其具体的作用机理目前还很不清楚。

由于辜丸在男性生殖系统发育中的特殊作用, 目前已有不少直接针对EEs影响辜丸本身发育的研究^[6,7]。辜丸引带(gubernaculum)是连接于辜丸下极到阴囊或耻骨等处的组织结构, 在胚胎发育期其生长发育活跃, 与辜丸的正常发育(下降)关系异常密切。包括引带发育过程中在时间和空间位置上都经历了一系列与辜丸下降发育非常相对应的形态学上的变化, 如开始的逐渐增生(swelling)到过度增生(outgrowth), 再到逐渐退化(regression)、短缩(contraction), 并伴随辜丸入阴囊而仅剩残留。因此辜丸与引带的关系以及影响辜丸引带发育因素的研究近年来也受到更多关注^[8,9], 尽管此方面目前还有很问题远未研究清楚, 但引带组织形态学上的变化却一直被认为是影响辜丸下降发育的重要因素, 而且也有临床观察等方面的研究佐证^[8,10]。EEs对辜丸引带发育影响的研究目前尚未引起广泛关注, 本项目在组织细胞形态学方面对EEs影响辜丸引带发育的情况进行初步观察。从辜丸引带这个新的角度探讨EEs对辜丸以及生殖系统发育的影响。

EEs广泛存在于自然界和人类以及动物的日常生活中, 种类繁多, 其中己烯雌酚(DES)是研究EEs生物学效应的经典雌激素, 也是研究其它EEs和探索EEs影响胚胎发育新研究方法的参考雌激素^[4], 其致畸作用已得到广泛认可。本项目主要参照美国毒理学学会(NTP)(<http://ntp-server.niehs.nih.gov>)界定的范围以及既往研究EEs对辜丸影响的有关实验确定DES及其剂量和给药时间、途径等^[11]。目的是涵盖较广的剂量并使研究结果具有可比性。本实验结果及有关的数据如死胎率等都表明动物模型是成功的。

本研究结果一方面证实胚胎期睾丸引带细胞代谢活跃,且具有丰富的排列整齐的肌源细胞成分包括发育良好的肌丝,提示正常情况下睾丸引带细胞除形态变化与睾丸下降有关外,也可能存在收缩活性(本课题将另行专门研究)。正常情况下引带的发育与睾丸的位置和形态变化一致。另一方面本研究也发现暴露于外源性雌激素 DES 环境中的胎鼠睾丸引带发育较差,包括引带索细长,引带球体积小、形态异常、组织结构紊乱,肌丝细小,细胞代谢不活跃等。同时也观察到睾丸失去光滑饱满的椭圆型外观,且高高位于肾脏下极,显示出 EEs 在影响睾丸引带并使之发育不良时也同时影响着睾丸形态、位置等方面的正常发育。而且这些影响是有剂量效应关系(剂量依赖性)的。表明 DES 对睾丸引带以及睾丸的位置和形态发育都确有明显的抑制作用。提示 EEs 可能通过这一机理影响睾丸的正常下降发育以至影响整个生殖系统的健康发育。

综上,本研究证实胚胎期睾丸引带形态规整,细胞增生活跃,存在丰富的肌源细胞,与睾丸位置、形态发育一致。EEs 可明显影响胚胎期睾丸引带的形态结构包括其细胞和亚细胞成分,同时也影响睾丸的位置和形态。此可能是 EEs 影响睾丸下降发育(甚或引起生殖系统畸形)的机理之一。通过对此机理的深入研究,有望更加明确 EEs 引起生殖系统畸形的机理。并可能为寻找预防/拮抗 EEs 引起睾丸和生殖系统畸形的途径奠定基础。

(本文统计学部分经四川大学华西公共卫生学院陈彬教授审阅,特致谢意)

参考文献:

[1] Norgil Damgaard I, Main KM, Toppari J, *et al.* Impact of exposure to endocrine disrupters in utero and in childhood on adult reproduction[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*,

2002,16(2): 289-309.

- [2] 黄幸舒. 环境内分泌干扰物与人类健康[J]. 癌变·畸变·突变,1999,11(6): 280-281
- [3] Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996[J]. *Environ Health Perspect*, 2000, 108(10): 961-966.
- [4] Sultan C, Balaguer P, Terouanne B, *et al.* Environmental xenoestrogens, antiestrogens and disorders of male sexual differentiation[J]. *Mol Cell Endocrinol*,2001,178: 99-105.
- [5] Tanaka M, Ohtani-Kaneko R, Yokosuka M, *et al.* Low-dose perinatal diethylstilbestrol exposure affected behaviors and hypothalamic estrogen receptor-alpha-positive cells in the mouse [J]. *Neurotoxicol Teratol*,2004,26(2): 261-269.
- [6] Skakkebaek NE. Endocrine disrupters and testicular dysgenesis syndrome[J]. *Horm Res*,2002,57(2): 43.
- [7] Uzumcu M, Suzuki H, Skinner MK. Effect of the anti-androgenic endocrine disruptor vinclozolin on embryonic testis cord formation and postnatal testis development and function[J]. *Reprod Toxicol*, 2004,18(6): 765-774.
- [8] Costa WS, Sampaio FJ, Favorito LA, *et al.* Testicular migration: remodeling of connective tissue and muscle cells in human gubernaculum testis [J]. *J Urol*,2002, 167: 2 171-2 176.
- [9] Kubota Y, Temelcos C, Bathgate RA, *et al.* The role of insulin 3, testosterone, Mullerian inhibiting substance and relaxin in rat gubernaculum growth[J]. *Mol Hum Reprod*,2002, 8(10): 900-905.
- [10] Cendron M, Huff DS, Keating MA, *et al.* Anatomical, morphological and volumetric analysis: a review of 759 cases of testicular maldescent[J]. *J Urol*,1993,149(3): 570-573.
- [11] Emmen JM, McLuskey A, Adham IM, *et al.* Involvement of insulin-like factor 3 (InsI3) in diethylstilbestrol-induced cryptorchidism [J]. *Endocrinology*,2000,141(2): 846-849.

2003 年肿瘤学类期刊影响因子排序表

代 码	期 刊 名 称	影 响 因 子	学 科 内 排 名
G179	中华肿瘤杂志	0.840	1
G251	中华放射肿瘤学杂志	0.452	2
G011	癌症	0.440	3
G549	癌变·畸变·突变	0.379	4
G184	肿瘤	0.301	5
G538	中国癌症杂志	0.280	6
G320	中国肺癌杂志	0.272	7
G133	中国肿瘤临床	0.263	8
G255	中国肿瘤生物治疗杂志	0.257	9
G185	肿瘤防治研究	0.132	10
G636	中国肿瘤临床与康复	0.126	11
	平均值	0.340	

(引自中国科学技术信息研究所《2004 年版中国科技期刊引证报告》)