

类雌激素农药咪鲜胺对哺乳动物的生殖毒理研究进展

唐涛¹ 周威¹ 晏姣¹ 戴清香^{1,2} 谭显胜^{1,2} 金晨钟^{1,2} 胡军和^{1,2*}

(¹ 湖南人文科技学院农业与生物技术学院,湖南娄底 417000; ² 湖南人文科技学院湖南省农药无害化应用重点实验室)

摘要 目前,类雌激素农药对生态系统和人口健康造成的危害日益受到人们的关注。类雌激素农药会影响雌性哺乳动物的内分泌系统,导致生殖和发育方面的畸形。本文就类雌激素农药的概念及其对雌性哺乳动物的毒性作用,并着重从咪鲜胺的类雌激素作用机制、检测方法和今后研究趋势3个方面进行阐述,以期对于同行研究类雌激素农药对哺乳动物生殖毒理方面的研究有一定借鉴意义。

关键词 类雌激素农药;咪鲜胺;哺乳动物;生殖毒理

中图分类号 S481.1 文献标识码 A 文章编号 1007-5739(2019)08-0223-03

Progress on Reproductive Toxicity in Mammals of Xenoestrogenic Pesticides Prochloraz

TANG Tao¹ ZHOU Wei¹ YAN Jiao¹ DAI Qing-xiang^{1,2} TAN Xian-sheng^{1,2} JIN Chen-zhong^{1,2} HU Jun-he^{1,2*}

(¹ Agriculture and Biotechnology Institute, Hunan University of Humanities, Science and Technology, Loudi Hunan 417000; ² Hunan Provincial Key Laboratory of Pesticide Harmless Application, Hunan University of Humanities, Science and Technology)

Abstract The harm of xenoestrogenic pesticides to ecosystem and population health has attracted more and more attention. The xenoestrogenic pesticides can affect the endocrine system of female mammals, causing malformations in reproduction and development. In this paper, the concept of xenoestrogenic pesticides and their toxic effects on female mammals were discussed, and the effect of xenoestrogenic pesticides prochloraz on the reproductive physiology of female mammals and the mechanism of their differentiation were expounded from three aspects, such as the mechanism of xenoestrogenic pesticides, detection methods and future research trend, which would have reference to other researchers in this field.

Key words xenoestrogens; prochloraz; mammal; reproductive toxicity

农药是广泛应用于害虫和病害控制的主要化学品,仅就农业用途而言,欧盟每年使用杀虫剂超过14万t,大量应用杀虫剂会引起人们对农药危害人类健康的担忧,如生殖安全的担心,包括目前人类不孕发病率的逐年上升也与之相关。为了提高农业生产效率,农药被人们长期和大量使用^[1],对环境造成十分严重的污染,特别是有些农药中含有类似雌激素的成分,可能影响动物甚至人的内分泌功能。

咪鲜胺是一种新型咪唑类高效广谱杀菌剂^[2],通用名为 Prochloraz,又叫扑菌唑、扑霉唑,具有触杀性和内吸性,通过抑制麦角甾醇的生物合成,从而破坏菌体细胞膜功能而起作用^[3]。研究表明,咪鲜胺在体外引发多种作用机制,因为它拮抗雄激素和雌激素受体,并抑制芳香酶活性^[4]。总之,咪鲜胺是一种类雌激素农药,其有关的干扰内分泌作用机制、检测技术和今后研究方向方面的论述还不是很系统。因此,本文就咪鲜胺对于哺乳动物生殖毒理方面的研究予以综述,期望对该领域今后的研究有一定的意义。

1 咪鲜胺的类雌激素作用机制的研究

类雌激素农药咪鲜胺也是一种内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs),能够干扰正常内分泌激素生物合成^[5]。许多EDCs具有类似雌激素活性并干扰由雌激素受体(estrogen receptors, ER)介导的正常雌激素信号传导作用^[6]。EDCs可以通过与ER直接作用,间接通过芳香烃受体等转录因子或通过调节对正常雌激素合成和代谢至关重要的代谢酶,来调节和修饰基因组和非基因组ER的活性,从而影响雌激素的功能。虽然受体结合内源性雌激素17 β -雌二醇

(Estrogen 2, E2),具有相似的亲和力,但许多外源性配体已显示出对ER的选择性^[6]。通常,EDCs通过多种机制起作用,包括通过激活其他转录因子,最显著的是芳香烃受体的间接作用,或通过雌激素代谢的修饰。具有上述类似雌激素功能,并且干扰正常内分泌功能的农药称之为类雌激素农药,目前使用比较广泛^[6-7]。

某些类雌激素农药与激素有类似的化学构象,可以和激素受体直接结合,形成配体受体复合物,复合物再结合到细胞核DNA结合域的雌激素反应元件上,诱导或抑制有关调节细胞生长和发育的靶基因的转录^[8]。而某些物质可竞争性结合雄激素受体,虽然二者结合后无生理活性,但由于该类物质占据了正常激素的结合位点,使之无法与受体结合从而减弱了正常的激素效应^[9]。咪鲜胺是羊毛甾醇14 α -脱甲基酶(lanosterol 14 α -demethylase 或 CYP51A1)的抑制剂,它是从羊毛甾醇中生产麦角甾醇(真菌细胞膜的必需成分)所必需的,而羊毛甾醇14 α -脱甲基酶是一种细胞色素P450酶,参与羊毛甾醇转化为4,4-二甲基胆甾醇-8(9),14,24-三烯-3 β -醇^[10]。

咪鲜胺有较弱的抗雄激素活性,能够拮抗外周雄激素受体,减缓雄激素依赖性组织的生长发育;还能够拮抗中枢雄激素受体,阻断睾酮负反馈调节机制,引起脑垂体促黄体生成素分泌增多^[11]。类雌激素农药对男性的影响尤为突出,表现为性腺发育不良、生殖道肿瘤和先天畸形增多。

因此,咪鲜胺也是一种新型内分泌干扰物,主要拮抗相关生殖激素受体发挥作用,因为它引发双重作用机制并且通过阻断雄激素受体和抑制胎儿类固醇生成起到抗雄激素的作用^[3]。体内咪鲜胺通过降低生殖器官的重量,影响前列腺中雄激素调节的基因表达和增加促黄体激素水平素。

2 农药咪鲜胺类雌激素作用的检测方法

2.1 整体动物试验

一般整体动物试验是通过动物试验研究相关农药受试

基金项目 湖南省教育厅创新平台开放基金项目(17K050);娄底市科技局科技创新项目“2018应用技术研究及开发项目”;湖南省研究生科研创新项目(CX2016B676)。

作者简介 唐涛(1996-),男,湖南怀化人,在读硕士研究生。研究方向:农药残留检测方法的研究。

* 通信作者

收稿日期 2018-12-30

物对哺乳动物生殖功能和发育过程的影响,预测其可能产生的对生殖细胞、受孕等的不良影响。对于雌性动物的测试,较经典的方法有子宫增重试验^[7]和阴道细胞角化试验;此外,还有过氧化物酶活力测定^[8]及子宫血管渗透性试验^[9]。体内试验的关键在于选择合适的试验动物和易于检测的生理指标。如鱼类卵黄蛋白原诱导试验,就是根据正常雄性体内不会含有卵黄蛋白原,在大剂量人工雌激素作用下以及在低剂量类雌激素长期作用下,都能诱导体内卵黄蛋白原的生成,从而检测经类雌激素农药作用后的雄鱼体内的卵黄蛋白原的含量来评价其毒性。有研究者提出一套将日本青鳉胚胎和幼鱼暴露于排放污水中,通过对暴露后的胚胎损坏死亡情况、孵化率、孵化时间、幼鱼畸形、平游失败率、生长(体重、体长)、性别比率和死亡率等指标进行观察和统计,从而评价排放污水的毒性和内分泌干扰效应的方法^[10]。

总之,虽然体内试验法的结果可靠,但是要求大量的动物毒理学试验,需要以牺牲大量的试验动物为代价,并且花费大量的人力物力,而且持续周期较长。同时,不同种类的试验动物,不同生长阶段的同一种试验动物对同一类雌激素农药均可能表现出不同的试验结果。因此,经体内试验法得出的结论也有一定的局限性。

2.2 离体细胞试验方法

乳腺癌细胞7细胞(breast cancer cells, MCF-7)来源于人乳腺癌细胞,其雌激素受体表达阳性,具有雌激素依赖性,并在暴露于雌激素化学物质后迅速增殖,广泛应用于类雌激素农药活性的评价^[11]。因此,通过雌激素受体(ER)依赖性MCF-7细胞增殖试验可以检测农药的雌激素活性^[12]。具体的操作方法如下:将MCF-7细胞接种在含有细胞基础培养液的6孔培养板中,在生长培养基中孵育24h后,用试验培养基(含有待检测物质的基础培养液)代替原有的基础培养基继续培养6d,然后统计细胞数,从而研究其添加物对于MCF-7细胞生长的影响。另外,还可以检测其对照组和不同试验组培养液中雌激素水平的变化,最终决定其检测物质的抗雌激素作用强度。

另外,还有E-SCREEN方法,就是试验以利用雌激素对其靶细胞的增殖作用作为终点来评估环境化学物质的雌激素性,该定量测定法比较了在没有雌激素(阴性对照)和存在17 β -雌二醇(阳性对照)和一系列怀疑是雌激素的化学物质的情况下通过相似的MCF-7细胞接种物获得的细胞数^[13]。目前,研究发现E-SCREEN测定法可以用来测量类雌激素农药对于生殖方面的影响^[14-15]。具体方法是,用一系列浓度的化学品或目的样品处理后,使用E2作为阳性对照,研究MCF7细胞的增殖情况。使用该测定法,发现多种化合物是雌激素的类似物,如烷基酚、邻苯二甲酸酯、咪鲜胺等。进一步研究显示,这些化合物可以结合ER并激活MCF7细胞中pS2(一种雌激素应答基因)的转录^[13]。E-SCREEN这样的增殖试验可能是高度敏感的,并且结果可能具有相关性,因为该系统利用表达可能介导雌激素效能的内源共激活因子的人源细胞。最近有研究报道,利用该技术进行了玉米赤霉烯酮及其衍生物的雌激素活性研究,测量暴露于这些霉菌毒素的ER阳性人乳腺癌细胞(MCF-7)的增殖,进一步发现,

在6.25~25.00 μ M水平暴露后,通过使用E-Screen生物测定评估细胞增殖,其结果显示了玉米赤霉烯酮及其衍生物在MCF-7细胞中的雌激素活性^[16]。

2.3 分子生物学方法

荧光素酶报告基因系统是以荧光素为底物检测萤火虫荧光素酶活性的一种报告系统,荧光素酶可以催化荧光素氧化成氧化荧光素,其间会发出生物荧光,然后通过荧光测定仪测定荧光素氧化过程中释放的生物荧光^[17-18]。可见,荧光素和荧光素酶这一生物发光体系,可以灵敏、高效地检测基因的表达,是检测转录因子与目的基因启动子区DNA相互作用的一种检测方法^[18]。目前,按照整个方法技术体系,构建了雌激素受体亚型介导的荧光素酶报告系统,开发了使用荧光素酶报告基因系统的人类雌激素受体(hERalpha)和hERbeta介导的报告基因测定,结果hERalpha报告基因系统对E2的最低检测限为 1.9×10^{-11} mol/L,在 1.9×10^{-8} mol/L处获得最高诱导倍数,是对照组的30.7倍^[19]。

分子生物学方法快速、灵敏、特异性高,使类雌激素农药体外检测试验更易实现,可操作性强。用其他激素类受体(如雄激素受体、孕激素受体)替代该体系中的雌激素受体,就可以构建检测环境雄激素和环境孕激素的试验体系。因此,该方法的推广性好。

3 今后研究方向

农药残留引发的问题涉及医疗、饮食、建筑、造船、水产养殖等各行各业^[20-21],目前,对雌激素作用机制尚不清楚,对环境污染雌激素生物活性的研究还处于探索性研究阶段,仅可以根据有限的试验数据推测哪些环境污染物可能具有雌激素活性,尚无足够的在人体中负面效应的证据。因此,类雌激素农药作用机制的深入研究对了解和确定一种环境污染物的雌激素性质十分必要。另一个研究方向即研究更多的化学品和其他压力因素及其潜在累积影响。多年来,毒理学家倾向于避免研究累积效应,因为它被认为是一个棘手的问题。对于激素活性剂来说尤其如此,因为有大量的配体和多种来源,其中不仅包括人造化学物质,还包括植物中的化合物、内源性激素,甚至非化学应激物。最后,这方面的未来研究需要不断拓展,这意味着关于内分泌系统特定组分的信息(例如特定的细胞培养反应)需要在全身生理学的背景下进行解释^[22]。

随着分子生物学试验方法的渗透、人类基因组计划中人类基因图谱的绘制完善,生物芯片中毒理芯片的研究很快将成为毒理学研究的前沿^[23-24],建立科学准确的环境污染物雌激素活性筛选方法、充分利用人类基因组计划研究结果进行毒理芯片的研究是最理想的切入点。

4 参考文献

- [1] PIMENTEL D. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States [J]. *Environment, Development and Sustainability*, 2005, 7(2): 229-252.
- [2] PILLING E D, BROMLEYCHALLENGER K A C, WALKER C H, et al. Mechanism of synergism between the pyrethroid insecticide λ -cyhalothrin and the imidazole fungicide prochloraz in the honeybee (*Apis mellifera* L.) [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1995, 51(1): 1-11.
- [3] VINGGAARD A M, HASS U, DALGAARD M, et al. Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action [J]. *International Jour-*

- nal of Andrology, 2006, 29(1): 186–192.
- [4] DIAMANTI-KANDARAKIS E, BOURGUIGNON J P, GIUDICE L C, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement[J]. *Endocrine Reviews*, 2009, 30(4): 293–342.
- [5] Lemaire G, Mnif W, Mauvais P, et al. Activation of alpha- and beta-estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines[J]. *Life Sciences*, 2006, 79(12): 1160–1169.
- [6] VANDENBERG L N, COLBORN T, HAYES T B, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses[J]. *Endocrine Reviews*, 2013, 33(3): 378–455.
- [7] BAUMANN L, KNÖRR S, KEITER S, et al. Prochloraz causes irreversible masculinization of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(21): 16417–16422.
- [8] SEEGER B, KLAWONN K, BEKALE B N, et al. Mixture effects of estrogenic pesticides at the human estrogen receptor α and β [J]. *Plos One*, 2016, 11(1): e0147490.
- [9] HOFMEISTER M V, BONEFELD-JERGENSEN E C. Effects of the pesticides prochloraz and methiocarb on human estrogen receptor and mRNA levels analyzed by on-line RT-PCR[J]. *Toxicology in Vitro*, 2004, 18(4): 427–433.
- [10] LEPESHEVA G I, WATERMAN M R. Sterol 14-demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2007, 1770(3): 467–477.
- [11] VINGGAARD A M, NELLEMANN C, DALGAARD M, et al. Antiandrogenic effects in vitro and in vivo of the fungicide prochloraz[J]. *Toxicological Sciences*, 2002, 69(2): 344–353.
- [12] OKUBO T, SUZUKI T, YOKOYAMA Y, et al. Estimation of estrogenic and antiestrogenic activities of selected pesticides by MCF-7 cell proliferation assay[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2004, 46(4): 445–453.
- [13] SOTO A M, SONNENSCHNEIN C, CHUNG K L, et al. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants[J]. *Environmental Health Perspectives*, 1995, 103(Suppl 7): 113.
- [14] BITSCH N, DUDAS C, KÖRNER W, et al. Estrogenic activity of musk fragrances detected by the E-screen assay using mcf-7 cells[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002, 43(3): 257–264.
- [15] LANGE C, KUCH B, METZGER J W. Estrogenic activity of constituents of underarm deodorants determined by E-Screen assay[J]. *Chemosphere*, 2014, 108: 101–106.
- [16] TATAY E, ESPIN S, GARCÍA-FERNÁNDEZ A J, et al. Estrogenic activity of zearalenone, α -zearalenol and β -zearalenol assessed using the E-screen assay in MCF-7 cells[J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2018, 28(4): 239–242.
- [17] RAMANATHAN C, LIU A C. Developing mammalian cellular clock models using firefly luciferase reporter, in reporter gene assays[J]. *Reporter Gene Assays*, 2018, 1755: 49–64.
- [18] VAN VUGT-LUSSENBURG B M A, VAN DER LEEA R B, MAN H Y, et al. Incorporation of metabolic enzymes to improve predictivity of reporter gene assay results for estrogenic and anti-androgenic activity[J]. *Reproductive Toxicology*, 2018, 75: 40–48.
- [19] LIU Y, HUANG X M, QU S J, et al. Estrogen receptor subtype-mediated luciferase reporter gene assays for determining (anti)estrogen effect of chemicals[J]. *Journal of Sichuan University (Medical Science Edition)*, 2015, 46(6): 811–815.
- [20] WANG W L, TADA M, NAKAJIMA D, et al. Multi-parameter phenotypic profiling in MCF-7 cells for assessing the toxicity and estrogenic activity of whole environmental water[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(16): 9277–9284.
- [21] DOMINGUES I, OLIVEIRA R, MUSSO C, et al. Prochloraz effects on biomarkers activity in zebrafish early life stages and adults[J]. *Environmental Toxicology*, 2013, 28(3): 155–163.
- [22] MA L, YATES S R. Dissolved organic matter and estrogen interactions regulate estrogen removal in the aqueous environment: a review[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 640: 529–542.
- [23] MA Dongfang, HUANG Shi, ZHANG Peng, et al. Sensitivity of fusarium graminearum to carbendazim and prochloraz[J]. *Plant Diseases & Pests*, 2017, 8(1): 21–23.
- [24] XU Chengxiang, MA Yanping, LIU Haobin. Preservation effect of prochloraz-manganese chloride complex on postharvest 'Shatangju' (*Citrus reticulata*) fruits[J]. *Plant Diseases and Pests*, 2016, 7(5/6): 32.

(上接第 222 页)

为: 6 头荷斯坦牛为 BLAD 携带者, 携带率为 0.8%; 15 头荷斯坦牛为 CVM 携带者, 携带率为 2.0%; 4 头牛为 DUMPS 携带者, 携带率为 0.5%, 说明进口奶牛和国内牛隐性遗传疾病虽然携带率低于报道, 但还有一定比例。对进口 32 份牛精液的检测结果为均无携带率, 说明国外畜牧业大国对种公牛遗传疾病检测还是做到了有意义的筛查。

本研究同时用测序的方法对 2017 年新报道的遗传疾病牛面部综合症 (FDS) 进行筛选, 对以上标本均为检测出阳性。说明 FDS 的携带率比较低, 可不必要对牛进行大规模检测, 但对种公牛的筛选还是有长远意义。

优秀种公牛在荷斯坦牛育种过程中被高强度使用, 当优秀种公牛携带隐性遗传疾病时, 隐性遗传疾病很易被迅速传播。目前, 我国有种公牛超过 2 000 头, 但对遗传疾病的携带率情况不清楚。因此, 应对我国荷斯坦种公牛尽快进行遗传疾病的检测。由于试验抽取样本有限只能对我国荷斯坦牛隐性遗传疾病携带情况进行初步调查, 还应对我国荷斯坦牛隐性遗传疾病携带情况进行大规模的抽查。隐性遗传疾病的剔除是一项长期任务, 各职能部门应共同努力, 加强对进口奶牛、精液及胚胎的检验, 同时逐步淘汰现已检测出的携带隐性遗传疾病的荷斯坦奶牛。

6 参考文献

- [1] 孙艺, 孙东晓, 张沅. 中国荷斯坦牛白细胞粘附缺陷病遗传分析[J]. *中国奶牛*, 2007(11): 7–10.
- [2] 王洪梅, 李建斌, 侯明海, 等. 牛脊柱畸形综合征检测方法的建立与应用[J]. *遗传*, 2008(9): 1223–1227.
- [3] 朱凯, 刘光磊, 张长斌, 等. 荷斯坦牛遗传缺陷病研究进展[J]. *中国奶牛*, 2014(5): 17–20.
- [4] JORGEN S A, MCEVOY F J, HEEGAARD S, et al. A de novo missense mutation of FGFR2 causes facial dysplasia syndrome in Holstein cattle[J]. *BMC Genetics*, 2017, 18: 74.
- [5] 马金柱, 崔玉东, 朱战波, 等. 牛白细胞粘附缺陷病 (BLAD) 的调查[J]. *遗传*, 2006(10): 1233–1236.
- [6] 李艳华, 张胜利, 刘振君, 等. 中国荷斯坦牛脊椎畸形综合征的研究现状与展望[J]. *中国奶牛*, 2008(6): 27–29.
- [7] 范学华, 张毅, 孙东晓, 等. 中国荷斯坦种公牛 BLAD 遗传缺陷的分子检测及系谱分析[J]. *中国奶牛*, 2011(8): 1–4.
- [8] 施红. 新型的 DNA 序列测定策略: PCR 产物直接测序[J]. *生物技术通讯*, 2005, 11(2): 10.
- [9] 徐祖元, 包其郁, 牛宇欣. PCR 产物直接测序技术中影响因素研究[J]. *遗传*, 2007, 24(5): 548–550.
- [10] 王洪梅, 李建斌, 许尚忠, 等. 中国荷斯坦牛白细胞粘附缺陷病 PCR-RFLP 检测方法的研究[J]. *生物技术通报*, 2007(3): 155–158.
- [11] 张开展. 中国奶牛进口情况与趋势[J]. *中国畜牧业通讯*, 2005(11): 14–15.
- [12] 苏光华, 张元跃. 奶牛血液保存条件和 DNA 提取方法的优化[J]. *中国奶牛*, 2007(5): 7–9.
- [13] 马春生. 一种新的荷斯坦牛遗传缺陷短脊椎综合症 (Brachyspina) [C]// 中国奶业协会繁殖专业委员会、国家肉牛产业技术体系疾病控制研究室、国家奶牛产业技术体系疾病控制研究室. 中国奶业协会第 24 次繁殖学术年会暨国家奶牛/肉牛产业技术体系第一届全国牛病防治学术研讨会论文集. 北京: 中国奶业协会繁殖专业委员会, 国家肉牛产业技术体系疾病控制研究室, 国家奶牛产业技术体系疾病控制研究室, 全国牛病大会组委会, 2009: 4.
- [14] 李建斌, 王洪梅, 高运东, 等. 利用 PCR-RFLP 检测中国荷斯坦牛遗传缺陷: 瓜氨酸血症[J]. *生物技术通报*, 2006(6): 97–99.