农药学学报 2019, 21(2): 196-203
Chinese Journal of Pesticide Science http://nyxxb.alljournal.cn

·研究论文·
DOI: 10.16801/j.issn.1008-7303.2019.0027

高效氯氰菊酯对小鼠卵巢生殖功能的影响及维生素 E 的干预作用

吴亚琳， 王欧婷， 徐玉薇， 张莎莎， 安秀秀， 魏学良*

(西南大学 动物科技学院，重庆 400715)

摘 要：为探究高效氯氰菊酯 (*beta*-cypermethrin, *β*-CP) 对雌性小鼠卵巢生殖功能的影响及维生素 E (vitamin E, VE) 的干预作用，将雌性昆白小鼠随机分为 6 组：空白对照组 (花生油处理)、*β*-CP 不同剂量 (10、20、40 mg/kg) 处理组、VE 保护组 (20 mg/kg *β*-CP+20 mg/kg VE) 和 VE 组 (20 mg/kg VE)，连续灌胃 10 d。灌胃结束后取小鼠卵巢组织，观察组织结构的病理变化，采用免疫组化法、蛋白免疫印迹试验及 RT-PCR 方法检测卵巢中 StAR 蛋白含量及 *casp*-3、*casp*-8、*INHα* 和 *INHβB* 基因 mRNA 表达的变化。结果显示：与对照相比，10、20 和 40 mg/kg 的 *β*-CP 处理均使小鼠卵巢组织结构发生了损伤，使组织中 StAR 蛋白的浓度分别降低了 18.8%、36.3% 和 40.3%，*casp*-3 基因的表达分别升高了 16.0%、26.7% 和 52.9%，*INHα* 基因的表达分别升高了 34.5%、83.6% 和 228.7%，*INHβB* 基因的表达分别升高了 7.5%、39.2% 和 52.7%；20 和 40 mg/kg 的 *β*-CP 处理使得 *casp*-8 基因的表达分别升高了 27.1% 和 36.7%。上述处理组与对照组的差异均达显著水平 ($P < 0.05$)。与 20 mg/kg *β*-CP 处理组相比，VE 保护组的 StAR 蛋白含量也显著增多 ($P < 0.05$)。研究表明，*β*-CP 对小鼠卵巢具有毒性作用，这与 *β*-CP 抑制 StAR 蛋白的合成，上调 *casp*-3、*casp*-8、*INHα* 及 *INHβB* 基因的表达有关；添加 VE 对小鼠卵巢有一定的保护作用，这与 VE 可减弱 *β*-CP 对 StAR 蛋白合成的抑制作用有关。

关键词: 高效氯氰菊酯；小鼠；卵巢；生殖损伤；维生素 E；StAR 蛋白；细胞凋亡基因；抑制素

中图分类号： S481.1; S482.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1008-7303(2019)02-0196-08

Influence of *beta*-cypermethrin and intervention effects of vitamin E on reproductive function of mice ovary

WU Yalin, WANG Outing, XU Yuwei, ZHANG Shasha, AN Xiuxiu, WEI Xueliang*

(*College of Animal Science and Technology*, *Southwest University*, *Chongqing* 400715, *China*)

Abstract: The study was conducted to investigate the influence of *beta*-cypermethrin (*β*-CP) on ovary reproductive function and the intervention of vitamin E (VE) in mice. Blank control (peanut oil treatment), three different doses of *β*-CP (10, 20 and 40 mg/kg), protection (20 mg/kg *β*-CP+20 mg/kg vitamin E) and vitamin E (20 mg/kg) were applied to 6 groups of mice for 10 d continuously. After the treatment, the ovarian tissue was obsoleted to observe the pathological changes of ovarian tissue structure. The changes of StAR protein content, *casp*-3, *casp*-8, *INHα* and *INHβB* gene expression were

收稿日期：2018-09-01；**录用日期：**2019-01-02.

作者简介：吴亚琳，女，硕士研究生，**E-mail：**linpu@foxmail.com；*魏学良，通信作者 (Author for correspondence)，男，硕士，副研究员，研究方向为生殖调控与环境公害，**E-mail：**weixueliang2006@163.com

determined by immunocytochemistry, Western blotting and RT-PCR. The results showed that, compared with the control group, the treatment of *β*-CP at 10, 20 and 40 mg/kg damaged the ovarian tissue in mice, the concentration of StAR protein was reduced by 18.8%, 36.3% and 40.3%, the expression of *casp*-3 was increased by 16.0%, 26.7% and 52.9%, the expression of *INHα* was increased by 34.5%, 83.6% and 228.7%, the expression of *INHβB* was increased by 7.5%, 39.2% and 52.7%; the treatment of *β*-CP at 20 and 40 mg/kg increased the expression of *casp*-8 by 27.1% and 36.7%. There are significant differences between the above treatment groups and control groups ($P < 0.05$). The concentrarion of StAR protein increased in the protection group compared with the 20 mg/kg *β*-CP treatment group ($P < 0.05$). Those results demonstrated that *β*-CP had a toxic effect on the ovarian tissue of mice, which was caused by the inhibition of StAR protein synthesis by *β*-CP and the increase in the expression of *casp*-3, *casp*-8, *INHα* and *INHβB*. Vitamin E had a protection effect on mice ovarian tissue after, which resulted from the decrease of the inhibit effect of *β*-CP on StAR protein by vitamin E.

Keywords: *beta*-cypermethrin; mice; ovary; reproductive damage; vitamin E; StAR protein; cell apoptosis; inhibin

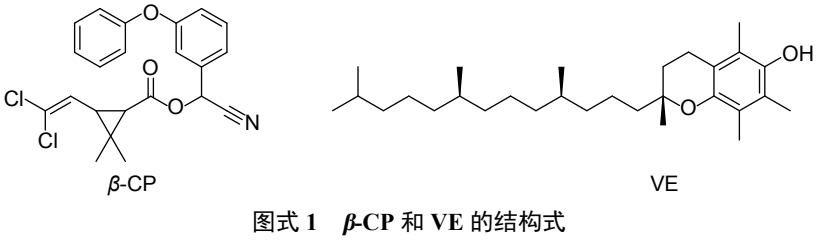
高效氯氰菊酯 (*beta*-cypermethrin，*β*-CP，图式 1) 是人工合成的第二代拟除虫菊酯类杀虫剂，其活性比氯氰菊酯高 1 倍，具有作用迅速、杀虫谱广、持效期长、光热稳定以及对眼睛和皮肤无刺激等优点[1]，已被广泛用于农林业棉铃虫、菜蚜等害虫的控制[2-4]，也常作为卫生杀虫剂应用于人类生活环境中[5-6]。

已有研究表明，氯氰菊酯等拟除虫菊酯类杀虫剂可导致哺乳动物大脑、肝脏、肾脏和睾丸等组织和细胞的脂质过氧化，抑制组织和细胞抗氧化酶的活性[7-8]，影响神经、免疫及生殖等系统的发育，促使认知障碍的发生等[9-11]，即其同时具有神经毒性、肝脏毒性、免疫毒性、生殖毒性和基因毒性[12-14]。*β*-CP 可在动物的脂肪、皮肤、肝脏、肾脏、肾上腺、卵巢和脑等组织中蓄积[15]。Hughes 等研究证明其具有类雌激素作用，广泛使用及其残留会对动物及人类健康造成危害[8, 16-17]。目前对于 *β*-CP 毒性的研究多集中在肝肾组织、免疫系统和雄性生殖系统方面。研究表明，*β*-CP 可导致多种水生无脊椎动物和爬行类动物发生氧化应激，引发肝脏损伤[18-20]。Wang 等[7] 及 Huang 等[21] 发现，*β*-CP 能够引起小鼠巨噬细胞的氧化应激，降低其生存和吞噬能力，促进细胞的凋亡。Wang 等发现，灌胃 20 mg/kg 的 *β*-CP 可明显影响雄性大鼠睾丸、精囊及副性腺的发育，以及影响生精细胞和精子的生成[22]。Hocine 等发现，氯氰菊酯也可引起妊娠期母鼠及新生仔鼠发生氧化应激[23]。维生素 E (vitamin E, VE，图式 1) 是一种常见的抗氧化剂，已明确其可有效缓解氯氰菊酯对大鼠大脑和肝脏造成的损伤[24]。本研究拟通过探讨 *β*-CP 对小鼠卵巢的影响，进而探明 *β*-CP 对雌性动物生殖系统的毒性作用，并以 VE 为保护剂，探究 VE 能否干预 *β*-CP 对小鼠卵巢的影响。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 小鼠分组及处理 共用 80 只 40 日龄的雌性昆白小鼠，平均体重约 30 g，由重庆中药研究所提供。小鼠经适应性饲养 7 d 后随机分为 6 组：空白对照组 (花生油处理，Control)，3 个 *β*-CP 处理组 (剂量分别为 10、20 及 40 mg/kg)，VE 保护组 (20 mg/kg *β*-CP + 20 mg/kg VE) 以及 VE 组



图式 1 *β*-CP 和 VE 的结构式

Scheme 1 The structural formula of *β*-CP and VE

(20 mg/kg VE)。每组 10～15 只小鼠，VE 保护组用 VE 灌胃后 1.0 h 再用 β-CP 灌胃，其他组用生理盐水灌胃后 1.0 h 再用 β-CP 灌胃。连续灌胃处理 10 d 后，采用颈椎脱臼法处死各组小鼠，无菌条件下采集卵巢。

1.1.2 主要试剂和仪器 高效氯氰菊酯 (*beta*-cypermethrin, β-CP) 原药 (南京盼丰生化有限公司，纯度 > 99%)；维生素 E (VE)、多聚甲醛及染色剂伊红 (成都市科龙化工试剂厂，分析纯)；市售金龙鱼牌花生油 (用于溶解 β-CP)；冰乙酸 (成都市科龙化工试剂厂，分析纯)；苏木精染液 (南昌雨露实验器材有限公司)；磷酸盐缓冲液 (PBS) (中国鼎国生物公司，BF-0011)；二氨基联苯胺 (DAB，纯度 > 97%) (梯希爱上海化成工业发展有限公司)；RIPA 裂解液 (P0013C)、苯甲磺酰氟 (PMSF，纯度 > 99%)、5 × SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (P0015)、cDNA 第一链合成试剂盒 (D7166) (碧云天生物技术有限公司)；Lowry 法蛋白浓度测定试剂盒 (PC0030)、乙二胺四乙酸 (EDTA，纯度 > 99.5%) (北京索莱宝科技有限公司)；TRNzol 总 RNA 提取试剂 (天根生化科技有限公司，DP405)；0.45 μm 聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) (Immobilon-P，美国密理博公司)。

MDF-382ECN 超低温冰箱 (日本 SANYO 公司)；CT15RE 冷冻离心机 (日本日立公司)；Direct-Q™ 5 超纯水制作系统 (美国密理博公司)；LDZX-40BI 立式自动电热压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂)；1/1 000 RS-232II 精密电子天平 (上海精天电子仪器厂，JT201N)；XSZ-4GR 电子光学生物显微镜 (重庆光电仪器有限公司)；RM2235B 轮转组织切片机 (德国莱卡公司)；PowerPac™电泳及转移设备 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 小鼠卵巢组织结构观察 将小鼠卵巢组织放入体积分数为 10% 的中性福尔马林中固定，冲洗后在 70%、80% 和 90% 的乙醇中分别脱水 1.0 h，再经无水乙醇脱水 2.0 h；置于二甲苯中进行透明化处理，最后将组织块浸蜡、包埋、切片后进行 HE 染色。用显微镜 (200 倍) 观察卵巢组织结构的变化。

1.2.2 免疫组化法 石蜡切片经常规脱蜡及抗原热修复 (1 mmoL/L 的 EDTA，pH = 8.0，95 ℃，15 min) 后，用冷水迅速冷却至室温，正常山羊血清封闭；加入抗 StAR 蛋白抗体 (按体积比 1 : 500 加入 PBS 稀释后使用)，于 4 ℃ 孵育过夜；加入生物素二抗工作液，于 37 ℃ 孵育 30 min；用 DAB 显色，经苏木精复染后脱水、透明化和封片，进行显微镜观察。

1.2.3 蛋白免疫印迹试验 取约 1 g 卵巢组织，加入 3 mL RIPA 裂解液及 30 μL PMSF 并充分匀浆，提取组织总蛋白，用 Lowry 法[25] 测定蛋白浓度并定量。取约 100 μg 总蛋白样品，加入 SDS-PAGE 凝胶中电泳，分别用 5% 的 SDS-PAGE 浓缩胶及 12% 的 SDS-PAGE 分离胶进行蛋白的分离；切取所需部分凝胶，将凝胶上的蛋白恒流转至 PVDF 膜，用 5% 脱脂牛奶封闭后经 PBST 洗膜；抗孵育 (抗 StAR 抗体按体积比 1 : 1 000 稀释) 4 ℃ 过夜，37 ℃ 孵育二抗 (按体积比 1 : 1 000 稀释) 1 h；常规 PBST 洗膜后用 10 mL 0.5% 的 DAB 溶液染色，拍照记录结果。

1.2.4 RT-PCR 扩增 按照 TRNzol 总 RNA 提取试剂 (TIANGEN) 说明书提取卵巢的总 RNA，测定其浓度及 A260 nm/A280 nm 值，保存于 –80 ℃。按照反转录试剂盒步骤合成 cDNA，使用 Taq 酶对内参基因和目的基因进行比对分析。反应体系为：10 × Taq Buffer 5 μL，DNA 模板 1 μL，dNTPs (10 mmol/L) 1 μL，上下游引物各 0.5 μL，Taq 酶 1 μL，以 ddH_2O 补齐至 50 μL。扩增条件为：95 ℃ 3 min；95 ℃ 30 s，65～67 ℃ 45 s，72 ℃ 10 s，30 个循环；72 ℃ 5 min。所得产物直接用于聚丙烯酰胺凝胶电泳分辨 RT-PCR 扩增片段。引物由上海生工生物技术服务公司合成，序列见表 1。

1.3 统计方法

采用 SPSS 22.0 软件分析数据间差异的显著性 ($P < 0.05$)；并采用 Global one-way ANOVAS 分析各组处理间的相关性，经由 LSD法分析不同组间的差异。试验数据均为 X (平均数) ± SE (标准误) ($n = 10$)。

2 结果与分析

2.1 小鼠 β-CP 中毒临床症状

灌胃 1 d 后，3 个剂量 β-CP 处理组小鼠均出现精神沉郁，采食量、活动量下降，少数出现神经症状；3 d 后症状有所减轻；7 d 后症状再次出现，小鼠表现出精神萎靡、活动减少、共济失调、震颤、嗜睡及消瘦等症状，尤以 40 mg/kg 处理组最为明显。

表 1　RT-PCR 引物

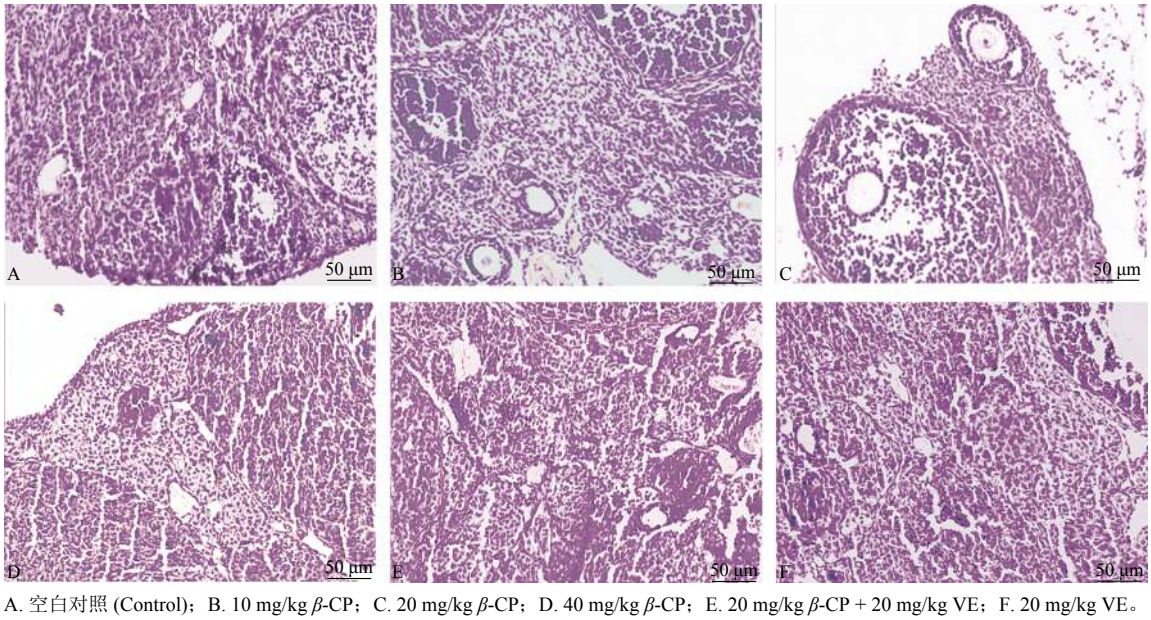
Table 1　RT-PCR primers

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	产物大小 Product sizes/bp	参考序列号 Refer number
casp-3	F: 5′-AATCTGACGGTCCTCCTG-3′ R: 5′-TCGCCAAATCTTGCTAAT-3′	198	NM_009810.3
casp-8	F: 5′-TGCTTGGACTACATCCCACAC-3′ R: 5′-TGCAGTCTAGGAAGTTGACCA-3′	169	NM_009812.2
INHα	F: 5′-GGTGGGGATCCTGGAATAAG-3′ R: 5′-GCACCTGTAGCTGGGAAAAG-3′	122	NM_010564.5
INHβB	F: 5′-TACGTGTGTCCAGAAGTGGC-3′ R: 5′-TTCGCCTAGTGTGGGTCAAC-3′	110	NM_002193.3
β-actin	F: 5′-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3′ R: 5′-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3′	154	NM_007393.5

40 mg/kg *β*-CP 处理组小鼠在灌胃 1 h 后出现明显中毒症状，主要表现为对外界刺激反应过敏、流涎、竖毛、乱窜乱抓，进一步出现侧卧扭曲翻滚、呼吸困难及四肢抽搐等症状，中毒严重者出现死亡，死亡一般发生在灌胃 24 h 内。随处理剂量的降低，中毒症状出现时间延长，程度减轻。

2.2　不同浓度 *β*-CP 对小鼠卵巢结构的影响

取小鼠卵巢制作石蜡切片后进行 HE 染色，显微镜观察结果见图 1。与对照组相比，不同剂量 *β*-CP 处理组卵巢细胞胞浆嗜酸性均增强，卵巢空泡状结构明显，其中尤以 40 mg/kg 处理组最为明显。



A. 空白对照 (Control)；B. 10 mg/kg *β*-CP；C. 20 mg/kg *β*-CP；D. 40 mg/kg *β*-CP；E. 20 mg/kg *β*-CP + 20 mg/kg VE；F. 20 mg/kg VE。

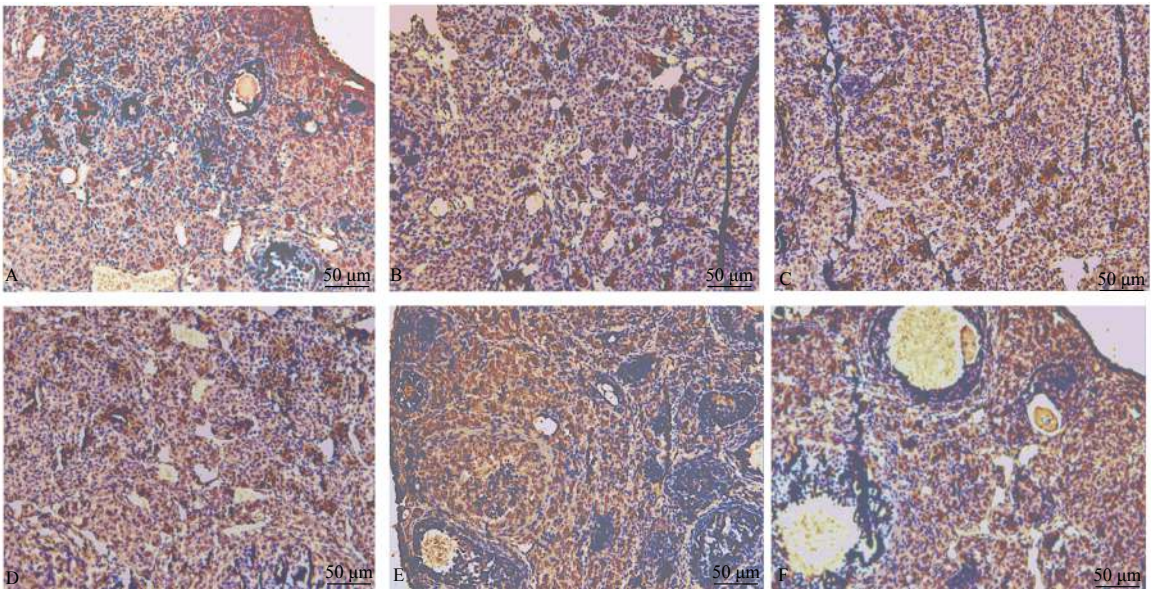
图 1　高效氯氰菊酯处理后小鼠卵巢组织结构的变化

Fig. 1　Changes of the ovaries histologic structure in mice after *β*-CP treatment

2.3　不同浓度 *β*-CP 对 StAR 蛋白合成的影响

2.3.1　StAR 蛋白免疫组化　StAR 蛋白免疫组化切片的显微观察结果见图 2。在空白对照及各处理组的卵泡和黄体细胞中都可看到染色颗粒的存在，且与对照组相比，40 mg/kg *β*-CP 处理组中含有染色颗粒的细胞较少，并且颗粒较小，颜色较浅。

2.3.2　StAR 蛋白浓度　采用蛋白免疫印迹法测定。以 *β*-actin 蛋白为内参，使用 Image J 软件分析蛋白的灰度值，以灰度值的大小代表蛋白的相对表达水平。测得空白对照组，10、20 和 40 mg/kg *β*-CP 处理组，VE 保护组和 VE 组的 StAR 蛋白灰度值分别为 0.650 7 ± 0.025 7、0.528 2 ± 0.012 3、0.414 8 ± 0.019 8、0.388 5 ± 0.011 8、0.535 3 ±

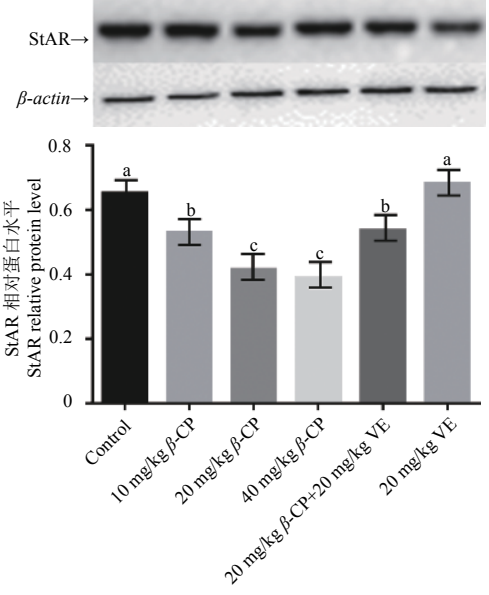


A. 空白对照 (Control)；B. 10 mg/kg *β*-CP；C. 20 mg/kg *β*-CP；D. 40 mg/kg *β*-CP；E. 20 mg/kg *β*-CP + 20 mg/kg VE；F. 20 mg/kg VE。

图 2　高效氯氰菊酯处理后小鼠卵巢中 StAR 蛋白含量的变化

Fig. 2　Changes of StAR protein content in mice ovaries after *β*-CP treatment

0.024 9 和 0.681 1 ± 0.024 6。如图 3 所示：10、20 和 40 mg/kg *β*-CP 处理组的 StAR 蛋白浓度均显著低于空白对照组 ($P < 0.05$)，分别降低了 18.8%、36.3% 和 40.3%；VE 组和对照组差异不显著 ($P > 0.05$)，VE 保护组则显著高于 20 mg/kg *β*-CP 处理组 ($P < 0.05$)。



注：柱上字母不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note：The different labels indicate that the differences are significant ($P < 0.05$).

图 3　高效氯氰菊酯处理后小鼠卵巢中 StAR 蛋白表达量的变化

Fig. 3　Changes of StAR protein expression in mice ovaries after *β*-CP treatment

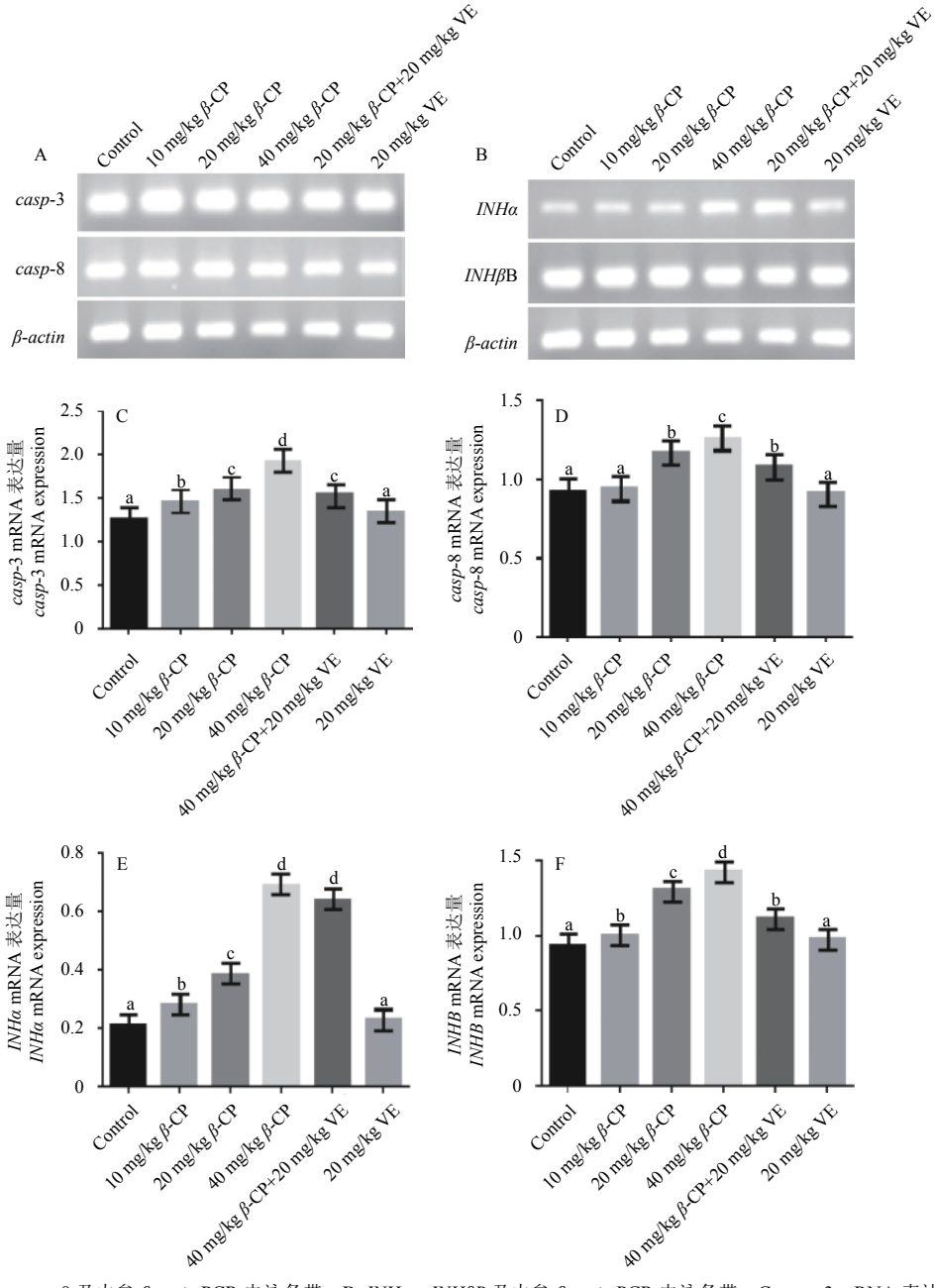
2.4　*β*-CP 对小鼠细胞凋亡基因转录的影响

2.4.1　对 *casp*-3 转录的影响　空白对照组、3 个剂量 *β*-CP 处理组、VE 保护组和 VE 组的 *casp*-3 PCR 电泳条带见图 4A， mRNA 表达量灰度值分别是 1.259 0 ± 0.107 0、1.460 0 ± 0.224 0、1.595 1 ± 0.154 7、1.924 4 ± 0.178 4、1.553 3 ± 0.232 4 和 1.339 3 ± 0.107 4。如图 4C 所示：随 *β*-CP 剂量增加，*casp*-3 mRNA 的表达显著升高 ($P < 0.05$)，10、20 和 40 mg/kg 处理组分别升高了 16.0%、26.7% 和 52.9%；VE 组和对照组差异不显著 ($P > 0.05$)，VE 保护组和 20 mg/kg *β*-CP 处理组差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.4.2　对 *casp*-8 转录的影响　空白对照组、3 个剂量 *β*-CP 处理组、VE 保护组及 VE 组的 *casp*-8 PCR 电泳条带见图 4A，mRNA 表达量灰度值分别为 0.919 1 ± 0.003 1、0.947 1 ± 0.001 3、1.168 5 ± 0.001 9、1.256 8 ± 0.002 3、1.084 0 ± 0.000 9 和 0.912 3 ± 0.003 7。如图 4D 所示：随 *β*-CP 剂量升高，*casp*-8 mRNA 的表达升高，除 10 mg/kg 组与对照组差异不显著外 ($P > 0.05$)，其余 2 组均显著高于对照 ($P < 0.05$)，分别升高了 27.1% 和 36.7%；VE 组和对照组差异不显著 ($P > 0.05$)，VE 保护组和 20 mg/kg *β*-CP 处理组差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.5　*β*-CP 对小鼠抑制素基因转录的影响

2.5.1　对小鼠 *INHα* mRNA 转录的影响　空白对



A. *casp-3*、*casp*-8 及内参 *β-actin* PCR 电泳条带；B. *INHα*、*INHβB* 及内参 *β-actin* PCR 电泳条带；C. *casp*-3 mRNA 表达量变化；D. *casp*-8 mRNA 表达量变化；E. *INHα* mRNA 表达量变化；F. *INHβB* mRNA 表达量变化。

A. PCR electrophoretic strips of *casp*-3, *casp*-8 and *β-actin* (reference gene); B. PCR electrophoretic strips of *INHα*, *INHβB* and *β-actin* (reference gene); C. Changes of *casp*-3 mRNA expression; D. Changes of *casp*-8 mRNA expression; E. Changes of *INHα* mRNA expression; F. Changes of *INHβB* mRNA expression.

注：柱上字母不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note：The different labels indicate that the differences are significant ($P < 0.05$).

图 4　高效氯氰菊酯处理后小鼠卵巢组织中 *casp*-3、*casp*-8、*INHα* 及 *INHβB* mRNA 表达的变化

Fig. 4　Changes of the expression of *casp*-3, *casp*-8, *INHα* and *INHβB* mRNA in mice ovaries after *β*-CP treatment

照组、3 个剂量 *β*-CP 处理组、VE 保护组及 VE 组的 *INHα* PCR 电泳条带见图 4B， mRNA 表达量灰度值分别为 0.209 0 ± 0.001 9、0.281 1 ± 0.002 3、0.383 8 ± 0.004 1、0.687 0 ± 0.000 4、0.636 4 ± 0.003 3 和 0.228 4 ± 0.003 8。如图 4E 所示：随 *β*-CP 剂量增加，*INHα* mRNA 的表达显著升高 ($P < 0.05$)，10、20 和 40 mg/kg 处理组分别升高了 34.5%、83.6% 和 228.7%；VE 组和对照组差异不显著 ($P > 0.05$)，VE 保护组显著高于 20 mg/kg *β*-CP 处理组 ($P < 0.05$)。

2.5.2　对小鼠 *INHβB* mRNA 转录的影响　空白对照组、3 个剂量 *β*-CP 处理组、VE 保护组及 VE 组

的 *INHβB* PCR 电泳条带见图 4B， mRNA 表达量灰度值分别为 0.934 3 ± 0.006 3、1.004 2 ± 0.003 4、1.300 2 ± 0.001 8、1.426 6 ± 0.004 2、1.117 8 ± 0.006 0 和 0.976 6 ± 0.003 3。如图 4F 所示：随 *β*-CP 剂量升高，*INHBB* mRNA 的表达显著升高 ($P < 0.05$)，10、20 和 40 mg/kg 处理组分别升高了 7.5%、39.2% 和 52.7%；VE 组和对照组差异不显著 ($P > 0.05$)，VE 保护组显著低于 20 mg/kg *β*-CP 处理组 ($P < 0.05$)。

3 讨论与结论

由于 *β*-CP 微溶于水而易溶于油，因此本研究以花生油作为其溶剂对小鼠进行灌胃处理。结果表明，经不同剂量的 *β*-CP 处理后小鼠均表现出了一定的中毒症状，其中 20 mg/kg 的 *β*-CP 即可使小鼠产生明显的毒性反应，而 40 mg/kg 组甚至能够引起小鼠的死亡，因此本研究所设 VE 保护组为 20 mg/kg *β*-CP + 20 mg/kg VE，以期通过对可造成小鼠明显毒性损伤的中等剂量 *β*-CP 的干预，探究 VE 对 *β*-CP 造成的机体损伤是否具有预防保护作用。

Zhou 等的研究表明，*β*-CP 可影响小鼠卵巢的质量[26]，但本研究发现，各剂量 *β*-CP 处理组小鼠卵巢质量与对照组并无显著差异，这可能与本研究采用的急性毒性试验方法处理周期短有关。通过制作石蜡切片和 HE 染色，在显微镜下观察小鼠卵巢组织结构的变化，发现不同剂量处理组与对照相比，卵巢细胞胞浆嗜酸性均增强，卵巢空泡状结构明显，其中 40 mg/kg *β*-CP 处理组尤为明显，说明 *β*-CP 对小鼠卵巢组织结构造成了损伤，即 *β*-CP 对雌性小鼠生殖系统具有毒性作用。

为探究 *β*-CP 对雌性生殖系统的影响机制及 VE 的干预作用，本研究进一步从分子水平检测了 *β*-CP 对与生殖相关的 StAR 蛋白、细胞凋亡相关基因和抑制素基因表达的影响。有研究表明，*β*-CP 能够干扰雌性小鼠雌激素与孕激素的平衡，干扰妊娠周期、胚胎着床率以及子代的发育[26-27]。甾体类前体物转移至线粒体是性激素等类固醇激素合成过程中的限速步骤，而 StAR 蛋白是这一步骤中的关键调节因子[28]，对类固醇激素的生成速率具有重要影响[29]。通过免疫组化和蛋白免疫印迹试验发现，*β*-CP 可抑制卵巢组织中 StAR 蛋白的合成，而 VE 可减弱此抑制作用，表明 *β*-CP 可能通过抑制 StAR 蛋白的合成，进而影响类固醇激素的合成，最终影响卵巢的生殖功能，而 VE 可通过减弱 *β*-CP 对 StAR 蛋白的影响，从而对卵巢的生殖功能起到一定的保护作用。卵巢颗粒细胞的凋亡是卵泡闭锁的基本机制，Marettove 的研究表明，拟除虫菊酯类农药可影响雌性小鼠的正常排卵，导致卵泡闭锁，减少卵泡细胞、卵母细胞和黄体的数量[30]。通过对小鼠卵巢中细胞凋亡基因 *casp*-3 和 *casp*-8 表达的检测，发现 *β*-CP 可促进 *casp*-3 和 *casp*-8 的表达，表明 *β*-CP 可能通过对细胞凋亡相关基因的上调，影响卵巢卵泡的正常发育，促进卵泡发生闭锁，从而对卵巢的生殖功能造成影响；而添加 VE 对 *casp*-3 和 *casp*-8 的表达无明显影响。抑制素由卵巢颗粒细胞合成并分泌，直接影响优势卵泡的发育和数量，与卵泡发育和继续成熟密切相关[31]。通过对抑制素相关基因 *INHα* 和 *INHβB* 表达的检测，发现 *β*-CP 可促进 *INHα* 和 *INHβB* 的表达，表明 *β*-CP 可能还会通过对抑制素基因的上调，限制优势卵泡的发育和数量，进而影响卵巢的生殖功能。

综上可见，*β*-CP 对雌性小鼠的生殖系统具有毒性作用，可对小鼠卵巢组织结构造成损伤，这与经 *β*-CP 处理后小鼠卵巢组织中 StAR 蛋白的合成减少，以及 *casp*-3、*casp*-8、*INHα* 和 *INHβB* 基因表达的上调有关；而 VE 可通过减弱 *β*-CP 对 StAR 蛋白的影响，从而对卵巢起到一定的保护作用。

参考文献 (Reference):

[1] YAN Y L, FAN J, LAI Y C, et al. Efficient preparative separation of *β*-cypermethrin stereoisomers by supercritical fluid chromatography with a two-step combined strategy[J]. J Sep Sci, 2018, 41(6): 1442-1449.

[2] JIN T, LIN Y Y, JIN Q A, et al. Population susceptibility to insecticides and the development of resistance in *Bactrocera cucurbitae* (Diptera:Tephritidae) [J]. J Econ Entomol, 2016, 109(2): 837-846.

[3] FRANCO A A, ZANARDI O Z, JACOB C R O, et al. Susceptibility of *Euseius concordis* (Mesostigmata: Phytoseiidae) to pesticides used in citrus production systems[J]. Exp Appl Acarol, 2017, 73(1): 61-77.

[4] QU Y Y, XIAO D, LIU J J, et al. Sublethal and hormesis effects of *beta*-cypermethrin on the biology, life table parameters and reproductive potential of soybean aphid *Aphis glycines*[J]. Ecotoxicology, 2017, 26(7): 1002-1009.

[5] LENG G, BERGER-PREIβ E, LEVSEN K, et al. Pyrethroids used indoor-ambient monitoring of pyrethroids following a pest control operation[J]. Int J Hyg Environ Health, 2005, 208(3): 193-199.

[6] SCOTT J G, YOSHIMIZU M H, KASAI S. Pyrethroid resistance in

Culex pipiens mosquitoes[J]. Pestic Biochem Physiol, 2015, 120: 68-76.

[7] WANG X, HE B N, KONG B D, et al. *β*-Cypermethrin and its metabolite 3-phenoxybenzoic acid exhibit immunotoxicity in murine macrophages[J]. Acta Biochimica Biophysica Sinica (Shanghai) , 2017, 49(12): 1083-1091.

[8] HUGHES M F, ROSS D G, STARR J M, et al. Environmentally relevant pyrethroid mixtures: a study on the correlation of blood and brain concentrations of a mixture of pyrethroid insecticides to motor activity in the rat[J]. Toxicology, 2016, 359-360: 19-28.

[9] MAURYA S K, MISHRA J, ABBAS S, et al. Cypermethrin stimulates $GSK_3\beta$-dependent A*β* and p-tau proteins and cognitive loss in young rats: reduced HB-EGF signaling and downstream neuroinflammation as critical regulators[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(2): 968-982.

[10] BASKAR M K, MURTHY P B. Acute *in vitro* neurotoxicity of some pyrethroids using microelectrode arrays[J]. ToXicology in Vitro, 2018, 47: 165-177.

[11] AL-HAMDANI N M H, NARASINHACHARY Y H. Endocrine disruptive action of cypermethrin in male mice[J]. Toxicol Environ Health Sci, 2011, 3(2): 69-79.

[12] CALDERÓN-SEGURA M E, GÓMEZ-ARROYO S, CORTÉS-ESLAVA J, et al. *In vitro* cytotoxicity and genotoxicity of Furia®180 SC (*zeta*-cypermethrin) and Bulldock 125®SC (*β*-cyfluthrin) pyrethroid insecticides in human peripheral blood lymphocytes[J]. Toxicol Mech Methods, 2018, 28(4): 268-278.

[13] HUSSIEN H M, ABDOU H M, YOUSEF M I. Cypermethrin induced damage in genomic DNA and histopathological changes in brain and haematotoxicity in rats: the protective effect of sesame oil[J]. Brain Res Bull, 2013, 92: 76-83.

[14] SEIFERTOVÁ M, ČECHOVÁ E, LLANSOLA M, et al. Determination of selected neurotoxic insecticides in small amounts of animal tissue utilizing a newly constructed mini-extractor[J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409(25): 6015-6026.

[15] YUN X M, HUANG Q C, RAO W B, et al. A comparative assessment of cytotoxicity of commonly used agricultural insecticides to human and insect cells[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2017, 137: 179-185.

[16] WANG Q, XU L F, ZHOU J L, et al. Antagonism effects of cypermethrin on interleukin-6-induced androgen receptor activation[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2015, 40(1): 172-174.

[17] MANNA S, BHATTACHARYYA D, MANDAL T K, et al. Repeated dose toxicity of *alfa*-cypermethrin in rats[J]. J Vet Sci, 2004, 5(3): 241-245.

[18] WEI K Q, YANG J X. Oxidative damage induced by copper and *beta*-cypermethrin in gill of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2015, 113: 446-453.

[19] ZHANG J Y, LIU L L, REN L, et al. The single and joint toxicity effects of chlorpyrifos and *beta*-cypermethrin in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages[J]. J Hazard Mater, 2017, 334: 121-131.

[20] CHEN L, XU P, DIAO J L, et al. Distribution, metabolism and toxic effects of *beta*-cypermethrin in lizards (*Eremias argus*) following oral administration[J]. J Hazard Mater, 2016, 306: 87-94.

[21] HUANG F, LIU Q Y, XIE S J, et al. Cypermethrin induces macrophages death through cell cycle arrest and oxidative stress-mediated JNK/ERK signaling regulated apoptosis[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6): 885.

[22] WANG X Z, LIU S S, SUN Y, et al. *Beta*-Cypermethrin impairs reproductive function in male mice by inducing oxidative stress[J]. Theriogenology, 2009, 72(5): 599-611.

[23] HOCINE L, MERZOUK H, MERZOUK S A, et al. The effects of *alpha*-cypermethrin exposure on biochemical and redox parameters in pregnant rats and their newborns[J]. Pestic Biochem Physiol, 2016, 134: 49-54.

[24] GIRAY B, GÜRBAY A, HINCAL F. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol[J]. Toxicol Lett, 2001, 118(3): 139-146.

[25] PETERSON G L. A simplification of the protein assay method of Lowry, et al which is more generally applicable[J]. Anal Biochem, 1977, 83(2): 346-356.

[26] ZHOU Y J, WANG X D, XIAO S, et al. Exposure to *beta*-cypermethrin impairs the reproductive function of female mice[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2018, 95: 385-394.

[27] ZHOU Y J, WANG J H, WANG L Q, et al. Effect of *beta*-cypermethrin exposure on embryo implantation in mice[J]. Reprod Toxicol, 2018, 76: 1-11.

[28] SOCCIO R E, BRESLOW J L. Intracellular cholesterol transport[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(7): 1150-1160.

[29] TSUCHIYA M, INOUE K, MATSUDA H, et al. Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and LH receptor in MA-10 cells[J]. Life Sci, 2003, 73(22): 2855-2863.

[30] MARETTOVA E, MARETTA M, LEGÁTH J. Effect of pyrethroids on female genital system[J]. Anim Reprod Sci, 2017, 184: 132-138.

[31] DE JONG F H. Inhibin[J]. Physiol Rev, 1988, 68(2): 555-607.

(责任编辑: 唐 静)