· 实验研究 ·

ERK-MAPK 通路在 DBP 致大鼠睾丸缝隙连接损伤中作用*

赵金昌, 靳曙光, 徐一波, 李剑桥, 李环

摘　要: 目的　探讨邻苯二甲酸二丁酯(DBP)对大鼠睾丸的损害作用及与细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号通路激活、缝隙连接损伤关联性。**方法**　SD 大鼠随机分为 3 个 DBP 剂量组(50、500、1 000 mg/kg)和溶剂对照组, 经口灌胃染毒, 每日 1 次, 持续 5 周。酶联免疫吸附试验检测大鼠血清卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、睾酮等生殖激素水平; 精子分析仪分析精子密度、活率和总畸形率; 苏木素 - 伊红染色法观察睾丸组织结构变化; Western blot 法检测 ERK1/2 和 p-ERK 蛋白表达; RT-PCR 法检测缝隙连接蛋白 43(Cx43)mRNA 表达。**结果**　与对照组比较, 中、高剂量 DBP 组大鼠血清睾酮水平[(6.65 ± 0.97)、(3.57 ± 0.54) nmol/L]明显降低($P < 0.05$), 高剂量 DBP 组大鼠精子密度(64.71 ± 11.36) 10^5 个/mL 显著降低($P < 0.05$), 中、高剂量 DBP 组大鼠精子总畸形率[(13.64 ± 1.68)%、(19.54 ± 2.86)%]明显升高($P < 0.05$); 随 DBP 剂量升高大鼠睾丸组织结构损伤程度增加; 与对照组比较, 中、高剂量 DBP 组大鼠睾丸组织中 p-ERK 表达明显升高, 各剂量 DBP 组大鼠睾丸组织中 Cx43 mRNA 表达均明显下降, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论**　DBP 可激活 ERK 通路、下调 Cx43 表达, 引起大鼠睾丸组织结构和功能损伤。

关键词: 邻苯二甲酸二丁酯(DBP); 支持细胞; 细胞外调节蛋白激酶(ERK); 连接蛋白 43(Cx43)
中图分类号: R 697.+21　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2017)02-0206-05　DOI: 10.11847/zgggws2017-33-02-09

Role of ERK-MAPK signaling pathway in dibutyl phthalate induced gap junction injury in testis of rat

ZHAO Jin-chang, JIN Shu-guang, XU Yi-bo, et al (*Department of Environment Health, School of Public Health, Beihua University, Jilin, Jilin Province* 132013, China)

Abstract: Objective　To investigate the adverse effect of dibutyl phthalate (DBP) on testis of rat and to explore the relationship between extracellular regulated protein kinase (ERK) signaling pathway and gap junction injury. **Methods**　Four groups of Sprague-Dawley (SD) rats were administered with 50, 500 or 1000 mg/kg DBP or corn oil (control group) by gavage once a day continuously for 5 weeks. Follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and testosterone (T) in serum were detected with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The density, mobility and overall malformation rate of sperm in epididymis were evaluated with sperm morphology analyzer. The histopathological changes in testes of the rats of each group were observed with haematoxylin and eosin (HE) staining. Western blot was applied to quantify the expression of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (p-ERK1/2) protein which are responsible for ERK signaling pathway. The mRNA expression of connexin 43 (Cx43), the predominant protein of gap junction, was estimated by reverse transcriptase PCR (RT-PCR). **Results**　The serum testosterone level (6.65 ± 0.97 and 3.57 ± 0.54 nmol/L) of the rats exposed to moderate and high dosage DBP decreased significantly compared to that of the control (both $P < 0.05$); the sperm density (64.71 ± 11.36 × 10 000/mL) of the rats of high dose DBP exposure group decreased significantly ($P < 0.05$), while the overall malformation rate of sperm (13.64 ± 1.68% and 19.54 ± 2.86%) for the rats exposed to moderate and high dosage DBP increased significantly (both $P < 0.05$). The damage severity of testis tissues of the rats was positively related to DBP exposure dose. The expression of p-ERK1/2 protein in testis tissues for the rats with moderate and high dose DBP exposure increased significantly (both $P < 0.05$) but the expression of Cx43 mRNA decreased for the rats exposed to various doses of DBP significantly compared to those of the control rats ($P < 0.05$). **Conclusion**　DBP could activate ERK signaling pathway and down-regulate Cx43 expression, resulting in structure and function damage in testis tissue in rats.

Key words: dibutyl phthalate; sertoli cell; extracellular regulated protein kinase; connexin 43

邻苯二甲酸酯(phthalic acid esters, PAEs)是一类重要的有机化合物, 广泛用作塑料的增塑剂。研究显示 PAEs 是一种内分泌干扰物, 可引起雄性生殖发育异常[1-2]。邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)是 PAEs 中最常见的一种, 对男性生殖的影响已被广泛报道[3-4]。DBP 已被中国列为

* **基金项目**: 吉林省科技发展计划项目(201205038; 20130101141JC); 吉林省教育厅计划项目(2014211)
作者单位: 北华大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 吉林 吉林 132013
作者简介: 赵金昌(1992 -), 男, 河北邢台人, 本科在读, 研究方向: EEDs 生殖毒作用机制。
通讯作者: 李环, E-mail: jllihuan@126.com
数字出版日期: 2016 - 4 - 5 10:31
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160405.1031.036.html

优先控制的环境污染物之一。目前已知睾丸是 DBP 毒作用的靶器官，DBP 可破坏生精上皮结构、损伤睾丸支持细胞与生精细胞间连接、造成生精上皮脱落、导致精子生成障碍[5-6]。连接蛋白 43（connexin 43，Cx43）是睾丸中最主要表达的缝隙连接蛋白，参与构成血 - 睾屏障（blood-testis barrier，BTB），也是多种毒物作用的靶点[7-8]。Cx43 表达下调可能是 DBP 发挥毒作用的机制之一。细胞外调节蛋白激酶（extracellular regulated protein kinase，ERK）信号通路是最早发现的经典丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）信号转导途径。它们存在于睾丸支持细胞及各级生精细胞中，对精子发生与成熟具有至关重要作用，可调节细胞连接蛋白的表达[9-10]。研究表明邻苯二甲酸酯引起的生精阻滞可能与睾丸中的 ERK-MAPK 信号通路激活有关[11]。本研究旨在观察 DBP 对大鼠睾丸的损伤作用及机制，结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　DBP（分析纯，纯度 99.5%）（美国 Sigma 公司），大鼠卵泡刺激素（follicle-stimulating hormone，FSH）、黄体生成素（luteinizing hormone，LH）和睾酮酶联免疫吸附法（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（上海江莱生物公司）；兔抗大鼠 ERK1/2、p-ERK1/2 和 tubulin 多克隆抗体（北京 Solarbio 公司）；Western blot 试剂盒（武汉博士德公司）；Trizol 试剂（美国 Invitrogen 公司）；RT-PCR 试剂盒［TaKaRa（大连）公司］，PCR 引物由上海生工公司合成。酶标仪、电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）；WLJY - 9000 彩色精子质量检测系统（北京伟力公司）；凝胶成像分析系统（美国 UVP 公司）；PCR 扩增仪（美国 ABI 公司）。

1.2　实验动物分组与处理　6 周龄清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 32 只（吉林大学实验动物中心），许可证号：SCXK（吉）2010 - 0005，体重（205 ± 10）g。适应性饲养 1 周，确认正常后纳入实验。大鼠随机分为 3 个 DBP 染毒组（50、500、1 000 mg/kg）和溶剂（玉米油）对照组，灌胃染毒，灌胃量为 2 mL/100 g，连续 5 周，1 次/d，染毒结束后，颈椎脱臼法处死大鼠，取血并迅速分离睾丸和附睾。经液氮快速冷冻后 - 80 ℃保存备用。

1.3　指标与方法

1.3.1　大鼠血清生殖激素水平测定　收集血液，2 000 g、4 ℃离心 10 min 得到血清，运用 ELISA 测定血清中 FSH、LH 和睾酮水平，按照试剂盒说明书操作。

1.3.2　精子质量分析　取双侧附睾，制备精子滤液；采用精子质量检测系统进行精子密度、精子活率及总畸形率的分析检测。

1.3.3　睾丸组织病理学检查　取睾丸样品，4% 多聚甲醛溶液固定，常规脱水、石蜡包埋、切片、苏木精 - 伊红（haematoxylin and eosin，HE）染色制作睾丸组织切片。光学显微镜 200 倍下观察生精上皮细胞层次、形态结构、脱落细胞及管腔受损程度。

1.3.4　睾丸组织中 ERK1/2 及 p - ERK1/2 蛋白表达检测　采用 Western blot 法，将睾丸剪碎后置于匀浆器中，加入裂解液后匀浆，置于冰上裂解 30 min。于 4 ℃ 下 13 000 r/min 离心 10 min，取上清。用牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）做标准曲线，考马斯亮蓝法测定样品蛋白含量。以每泳道 50 μg 上样，进行十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl-polyacryl gradient gel electrophoresis，SDS-PAGE）。终止电泳后将蛋白电转移至硝酸纤维素膜上，用含 5% 脱脂奶粉的 TBST（Tris buffered saline with Tween 20，pH = 7.4）溶液于摇床上室温封闭 1.5 h；加入一抗（兔抗大鼠 ERK1/2，1∶1 000 稀释；兔抗大鼠 p-ERK1/2，1∶2 000稀释），4 ℃孵育过夜；TBST 洗涤 4 次，每次 10 min；加入适当比例稀释的山羊抗兔二抗，室温孵育 1.5 h，充分清洗；使用化学发光试剂盒显影，成像系统扫描并采用 Quantity One 软件分析目标条带的光密度值。结果用目的蛋白与 tubulin 的比值表示。

1.3.5　睾丸组织中 Cx43 mRNA 检测　采用 RT-PCR 法，睾丸样品加入 1 mL Trizol 后匀浆，加入氯仿离心，取上层水相，加异丙醇沉淀，75% 乙醇洗涤 2 次，溶于酰化剂二乙基焦碳酸酯水中，获得总 RNA，按总 RNA 提取试剂盒说明书操作；提取的总 RNA 反转录获得 cDNA，过程参照 RT - PCR 试剂盒说明书。用于 PCR 扩增的 Cx43 引物序列如下，上游：5′-TACCACGCCACCACCGGCCCA-3′，下游：5′-GGCATTTTGGCTGTCGTCAGGGAA-3′。以 β-actin 作为内参照，引物序列如下，上游：5′-TCAGGTCATCACTATCGGCAAT-3′，下游：5′-AAAGAAAGGGTGTAAAACGCA-3′。PCR 循环参数为：94 ℃预变性 3 min，94 ℃变性 30 s，60 ℃（Cx43）/54 ℃（β - actin）退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，循环 30 次；72 ℃延伸 7 min。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，成像分析系统扫描分析结果。

1.4　统计分析　数据用表示，采用 SPSS 16.0 软件包进行统计分析，多样本间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD - t 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　DBP 对大鼠体重和睾丸系数影响（表 1）　随

中国公共卫生 CPH

染毒剂量增加,各剂量 DBP 组大鼠体重、睾丸重量与睾丸系数呈逐渐降低趋势;与对照组比较,中、高剂量 DBP 组大鼠睾丸系数下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1　DBP 对大鼠体重、睾丸重量及睾丸系数影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别(mg/kg)	体重(g)	睾丸重量(g)	睾丸系数(%)
对照组	296.41 ± 23.54	1.52 ± 0.22	0.58 ± 0.03
DBP　50	288.58 ± 31.12	1.47 ± 0.30	0.56 ± 0.05
500	271.68 ± 29.54	1.37 ± 0.28	0.53 ± 0.05[a]
1 000	262.43 ± 20.65[a]	1.26 ± 0.23[a]	0.52 ± 0.03[a]

注:与对照组比较,a $P<0.05$。

2.2　DBP 对大鼠血清生殖激素水平影响(表 2)　与对照组比较,中、高剂量 DBP 组大鼠血清中 FSH 水平升高,高剂量 DBP 组大鼠血清中 LH 水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与对照组比较,中、高剂量 DBP 组大鼠血清中睾酮水平明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2　DBP 对大鼠血清生殖激素水平影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别(mg/kg)	FSH(IU/L)	LH(IU/L)	睾酮(nmol/L)
对照组	5.94 ± 1.08	12.54 ± 3.16	11.86 ± 1.82
DBP　50	6.27 ± 1.82	12.86 ± 4.13	10.05 ± 1.32
500	10.39 ± 1.46[a]	14.28 ± 3.66	6.65 ± 0.97[a]
1 000	13.56 ± 2.02[a]	16.68 ± 4.08[a]	3.57 ± 0.54[a]

注:与对照组比较,a $P<0.05$。

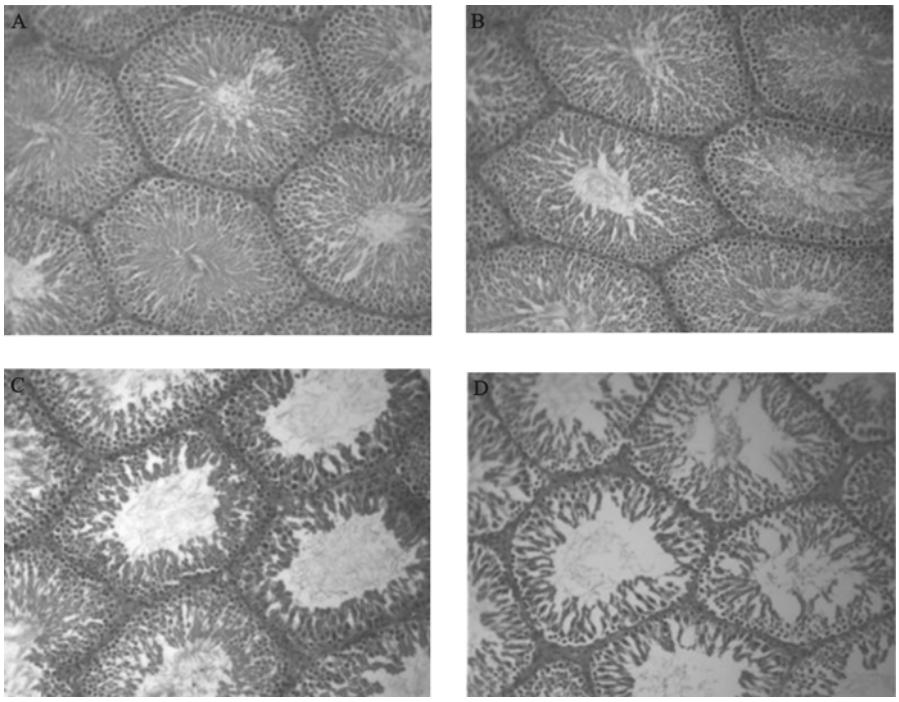
2.3　DBP 对大鼠睾丸精子质量影响(表 3)　与对照组比较,高剂量 DBP 组大鼠精子密度、精子活率明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05$);与对照组比较,中、高剂量 DBP 组大鼠精子总畸形率明显升高差异具有统计学意义($P<0.05$);呈剂量效应关系。

表 3　DBP 对大鼠精子质量影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别(mg/kg)	精子密度(10^5/mL)	精子活率(%)	总畸形率(%)
对照组	1 68.56 ± 130.42	83.63 ± 15.10	4.35 ± 0.93
DBP　50	1 81.93 ± 126.03	79.84 ± 13.35	6.06 ± 0.78
500	1 207.94 ± 112.75	76.80 ± 12.52	13.64 ± 1.68[a]
1 000	631.26 ± 106.49[ab]	64.71 ± 11.36[ab]	19.54 ± 2.86[ab]

注:与对照组比较,a $P<0.05$;与 DBP50、500 mg/kg 组比较,b $P<0.05$。

2.4　DBP 对大鼠睾丸组织形态学影响(图 1)　对照组大鼠睾丸曲细精管排列规则,结构完整,管腔中无脱落细胞,支持细胞数量和结构正常(图 1A);与对照组比较,低剂量 DBP 组大鼠睾丸组织结构变化不明显(图 1B);中剂量 DBP 组大鼠睾丸曲细精管排列规则,但直径变小,间质增宽,生精上皮层次减少,而且可见生精细胞脱落现象(图 1C);高剂量 DBP 组大鼠睾丸曲细精管排列明显不规则,生精上皮细胞严重受损,支持细胞锐减,且呈现空泡样改变(图 1D)。

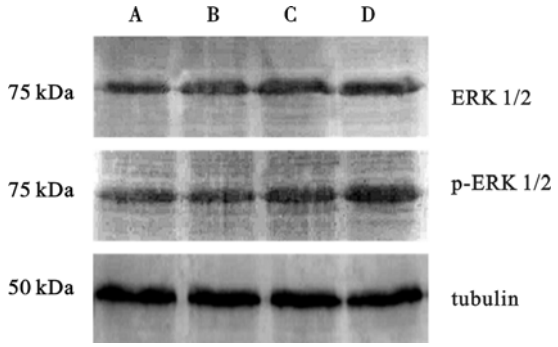


注:A:对照组;B、C、D:50、500、1 000 mg/kg DBP 组。

图 1　DBP 对大鼠睾丸组织形态学影响(HE, ×200)

2.5　DBP 对大鼠睾丸 ERK 通路影响(图 2)　对照组、低、中、高剂量 DBP 组大鼠睾丸组织中 ERK1/2 与 p-ERK1/2 表达水平分别为(0.43 ± 0.05)、(0.47 ± 0.07)、(0.51 ± 0.09)、(0.52 ± 0.06)和(0.20 ±

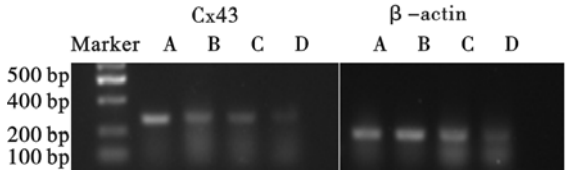
0.06)、(0.25 ± 0.03)、(0.42 ± 0.07)、(0.44 ± 0.03);与对照组比较,各剂量 DBP 组大鼠睾丸组织中 ERK1/2 表达水平无明显变化,中、高剂量 DBP 组大鼠睾丸组织中 p-ERK1/2 表达水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:A:对照组;B、C、D:50、500、1 000 mg/kg DBP 组。

图 2　DBP 对大鼠睾丸组织中 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达影响

2.6　DBP 对大鼠睾丸 Cx43 mRNA 表达影响(图 3)　对照组、低、中、高剂量 DBP 组大鼠睾丸组织中 Cx43 mRNA 表达水平分别为(0.78 ± 0.03)、(0.59 ± 0.05)、(0.52 ± 0.02)、(0.48 ± 0.03);与对照组比较,各剂量 DBP 组大鼠睾丸组织中 Cx43 mRNA 表达均明明显下调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:A:对照组;B、C、D:50、500、1 000 mg/kg DBP 组。

图 3　DBP 对大鼠睾丸组织中 Cx43 mRNA 表达影响

3　讨　论

邻苯二甲酸二丁酯(DBP)作为增塑剂大量应用于塑料工业中。由于 DBP 并未真正与塑料高分子碳链聚合,因此会逐渐释放入环境中,对空气、水体、土壤及生物体造成污染,并可通过不同途径进入人体,对人群健康构成潜在危害[12-13]。作为一种环境内分泌干扰物,DBP 具有明显的雄性生殖毒性,可引起雄性啮齿类动物睾丸萎缩、重量减轻、睾丸标志酶活性下降、曲细精管萎缩、生精细胞丧失、生殖道畸形等[5,14-15]。目前认为 DBP 对睾丸毒作用机制可能包括干扰生殖激素的生成与调节、引起生殖细胞凋亡、损伤支持细胞等[16-18],但具体机制尚未完全阐明。雄性生殖功能主要受下丘脑-垂体-睾丸轴调控。下丘脑分泌促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)作用于腺垂体,使后者分泌 FSH、LH 等分别作用于睾丸生精细胞、支持细胞和间质细胞,引起睾酮等雄激素分泌,从而实现生精过程的启动和调节。血清生殖激素的检测可判断睾丸受损状态。本研究结果显示,与对照组比较,高剂量 DBP 组大鼠血清中 FSH、LH 明显升高、睾酮水平明显下降。提示,DBP 具有雄激素干扰作用,这与已有报道一致[19-20]。

精子质量评价可反应环境因素对雄性生殖损害的最终毒效应。研究发现,DBP 可降低雄性动物的精子密度和活率、升高精子畸形率[21-22],与本研究结果相似。表明 DBP 干扰了精子发生过程,显示出雄性生殖毒性。本研究睾丸病理学观察显示,DBP 导致睾丸组织结构出现损伤,表现为生精小管紊乱、支持细胞空泡化、生殖细胞脱落等。提示 DBP 除通过内分泌干扰途径间接损伤睾丸外,还可直接对睾丸组织结构造成损害,同时也表明支持细胞可能是 DBP 直接毒作用的靶点[17]。睾丸支持细胞又被称为生精细胞的保姆细胞,最重要作用是参与构成血-睾屏障(blood-testis barrier, BTB)。BTB 主要由相邻支持细胞间的紧密连接(tight junction, TJ)构成,BTB 的有序开放是精子生成的重要保证[23]。Cx43 是睾丸中表达最多的缝隙连接蛋白,同样也是 BTB 的构成成分之一。Cx43 已被证实可调节紧密连接相关蛋白在支持细胞膜上的分布,由此影响 BTB 的完整性[24]。睾丸的发育与 Cx43 密不可分,Cx43 敲除或下调可导致睾丸萎缩、BTB 解聚[25-26]。而 Cx43 也是多种外源性化学物诱导产生生殖毒性的重要靶点[27-28]。

ERK 是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族中的重要成员之一,其信号转导途径是细胞增殖、分化、凋亡等的信号网络核心[29]。ERK 基本信号转导步骤遵循经典的 MAPKs 3 级酶促级联反应,ERK 的活化形式为 p-ERK。ERK 激活后便可迅速穿过核膜,激活下游转录因子,进一步调节相关基因的转录和蛋白表达,最终影响细胞的代谢和功能,产生特定的生物学效应[30]。ERK 信号通路已被证明参与雄性生殖过程的很多阶段,并可介导细胞连接蛋白的表达调控[31-32]。已有报道显示环境毒物引起的支持细胞紧密连接受损与 ERK 通路激活有关[33]。本研究结果显示,DBP 染毒后 ERK1/2 表达改变不明显,而 p-ERK1/2 表达明显增加,Cx43 mRNA 表达明显下调。提示,DBP 所致的睾丸损伤可能与 ERK 通路激活、Cx43 表达下调有关。

参考文献

[1] Latini G, Del Vecchio A, Massaro M, et al. Phthalate exposure and male infertility[J]. Toxicology, 2006, 226(2/3): 90-98.

[2] Matsumoto M, Hirata-koizumi M, Ema M. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2008, 50(1): 37 – 49.
[3] Foster PM. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters[J]. Int J Androl, 2006, 29(1): 140 – 147.
[4] Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, et al. NTP Center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-butyl phthalate[J]. Reprod Toxicol, 2002, 16(5): 489 – 527.
[5] Fukuoka M, Kobayashi T, Zhou Y, et al. Mechanism of testicular atrophy induced by di-n-butyl phthalate in rats. Part 4. Changes in the activity of succinate dehydrogenase and the levels of transferrin and ferritin in the Sertoli and germ cells[J]. J Appl Toxicol, 1993, 13(4): 241 – 246.
[6] 张蕴晖,曾郁,林玲,等. Fas/FasL 系统在邻苯二甲酸二丁酯睾丸毒性机制中的作用[J]. 复旦学报:医学版, 2006, 33(6): 749 – 752.
[7] Mok KW, Mruk DD, Lee WM, et al. Spermatogonial stem cells alone are not sufficient to re-initiate spermatogenesis in the rat testis following adjudin-induced infertility[J]. Int J Androl, 2012, 35(1): 86 – 101.
[8] Siu ER, Mruk DD, Porto CS, et al. Cadmium-induced testicular injury[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 238(3): 240 – 249.
[9] Almog T, Lazar S, Reiss N, et al. Identification of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 MAPK as regulators of human sperm motility and acrosome reaction and as predictors of poor spermatozoan quality[J]. J Biol Chem, 2008, 283(21): 14479 – 14489.
[10] Wong CH, Cheng CY. Mitogen-activated protein kinases, adherens junction dynamics, and spermatogenesis: a review of recent data[J]. Dev Biol, 2005, 286(1): 1 – 15.
[11] Bhattacharya N, Dufour JM, Vo MN, et al. Differential effects of phthalates on the testis and the liver[J]. Biol Reprod, 2005, 72(3): 745 – 754.
[12] 王立鑫,杨旭. 邻苯二甲酸酯毒性及健康效应研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2010, 27(3): 276 – 281.
[13] Harris CA, Henttu P, Parker MG, et al. The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*[J]. Environ Health Perspect, 1997, 105(8): 802 – 811.
[14] 敖红,林玲,阚海东,等. 邻苯二甲酸二丁酯雄性生殖毒性分子作用机制[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(5): 631 – 633.
[15] Mahood IK, Scott HM, Brown R, et al. In utero exposure to di(n-butyl)phthalate and testicular dysgenesis: comparison of fetal and adult end points and their dose sensitivity[J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(Suppl 1): 55 – 61.
[16] Alam MS, Ohsako S, Matsuwaki T, et al. Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: a possible estrogenic effect of di(n-butyl)phthalate[J]. Reproduction, 2010, 139(2): 427 – 437.
[17] Kleymenova E, Swanson C, Boekelheide K, et al. Exposure in utero to di(n-butyl)phthalate alters the vimentin cytoskeleton of fetal rat Sertoli cells and disrupts Sertoli cell-gonocyte contact[J]. Biol Reprod, 2005, 73(3): 482 – 490.
[18] Ryu JY, Lee BM, Kacew S, et al. Identification of differentially expressed genes in the testis of Sprague-Dawley rats treated with di(n-butyl)phthalate[J]. Toxicology, 2007, 234(1/2): 103 – 112.
[19] Christen V, Crettaz P, Oberli-Schrammli A, et al. Antiandrogenic activity of phthalate mixtures: validity of concentration addition[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 259(2): 169 – 176.
[20] Lee BM, Koo HJ. Hershberger assay for antiandrogenic effects of phthalates[J]. J Toxicol Environ Health A, 2007, 70(15 – 16): 1365 – 1370.
[21] Kwack SJ, Kim KB, Kim HS, et al. Comparative toxicological evaluation of phthalate diesters and metabolites in Sprague-Dawley male rats for risk assessment[J]. J Toxicol Environ Health A, 2009, 72(21 – 22): 1446 – 1454.
[22] 田晓梅,李玲,宋琦如,等. 邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二(2 – 乙基己基)酯联合染毒对雄性大鼠精子生成的影响[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(10): 853 – 856.
[23] Cheng CY, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception[J]. Pharmacol Rev, 2012, 64(1): 16 – 64.
[24] Li MW, Mruk DD, Lee WM, et al. Connexin 43 is critical to maintain the homeostasis of the blood-testis barrier via its effects on tight junction reassembly[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(42): 17998 – 18003.
[25] Brehm R, Zeiler M, Ruttinger C, et al. A sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis[J]. Am J Pathol, 2007, 171(1): 19 – 31.
[26] Sridharan S, Simon L, Meling DD, et al. Proliferation of adult sertoli cells following conditional knockout of the gap junctional protein GJA1(connexin 43) in mice[J]. Biol Reprod, 2007, 76(5): 804 – 812.
[27] Cyr DG. Connexins and pannexins: coordinating cellular communication in the testis and epididymis[J]. Spermatogenesis, 2011, 1(4): 325 – 338.
[28] Pointis G, Gilleron J, Carette D, et al. Testicular connexin 43, a precocious molecular target for the effect of environmental toxicants on male fertility[J]. Spermatogenesis, 2011, 1(4): 303 – 317.
[29] Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, et al. ERK implication in cell cycle regulation[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773(8): 1299 – 1310.
[30] Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human[J]. Physiol Rev, 1999, 79(1): 143 – 180.
[31] Chapin RE, Wine RN, Harris MW, et al. Structure and control of a cell-cell adhesion complex associated with spermiation in rat seminiferous epithelium[J]. J Androl, 2001, 22(6): 1030 – 1052.
[32] Xia W, Cheng CY. TGF-beta3 regulates anchoring junction dynamics in the seminiferous epithelium of the rat testis via the Ras/ERK signaling pathway: an *in vivo* study[J]. Dev Biol, 2005, 280(2): 321 – 343.
[33] 仇梁林,钱颖赟,瞿建华,等. PFOA 通过 ERK MAPK 途径损伤 Sertoli 细胞紧密连接[J]. 中国公共卫生, 2014, 30(12): 1539 – 1541.

收稿日期: 2015 – 11 – 20　　(解学魁编辑　刘铁校对)

中国公共卫生 CPH