

沿江化工园区污水处理厂出水对体外培养的大鼠睾丸细胞生殖毒性研究

胡冠九^{1,2}, 王晓¹, 史薇¹, 柏仇勇², 吴江³, 刘红玲¹, 于红霞^{1*}

(1. 南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093; 2. 江苏省环境监测中心, 南京 210036; 3. 南京大学医学院, 免疫与生殖生物学实验室, 南京 210093)

摘要:应用基于原代培养的大鼠睾丸细胞体外毒性测试方法, 通过支持细胞、生精细胞及间质细胞这 3 种细胞的形态、活力、胞外乳酸脱氢酶(LDH)活力、细胞早期凋亡坏死率和睾酮分泌量等指标对沿江化工园区污水处理厂出水的生殖毒性进行了研究。结果表明, 新开发的沿江化工园区 A 和省级沿江化工园区 B 污水处理厂出水有机提取物浓缩后均能造成不同程度的大鼠睾丸细胞生殖毒性, 园区 A 提取物能明显影响支持细胞($p < 0.01$)、生精细胞($p < 0.05$)和间质细胞($p < 0.05$)的细胞活力, 影响支持细胞和生精细胞胞外 LDH 活力($p < 0.01$), 且其毒性明显高于园区 B。暴露导致支持细胞处于凋亡早期, 而生精细胞比较敏感, 已到了凋亡晚期甚至有小团细胞坏死。虽然间质细胞的形态没有显著变化但园区 A 有机提取物已明显抑制了间质细胞睾酮的分泌($p < 0.01$)。研究表明, 通过基于原代培养的大鼠睾丸细胞体外毒性测试方法能够对污水处理厂出水的生殖毒性做出综合评价, 该方法可以作为现行国家污水综合排放化学监测的有效补充。

关键词:沿江化工园区; 有机提取物; 体外培养; 睾丸细胞; 生殖毒性

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)05-1315-06

Toxicity Evaluation of Sewage Treatment Plant Effluent of Chemical Industrial Park Along the Yangtze River on Rat Testicular Germ Cells *in vitro*

HU Guan-jiu^{1,2}, WANG Xiao-yi¹, SHI Wei¹, BAI Chou-yong², WU Jiang³, LIU Hong-ling¹, YU Hong-xia¹

(1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Environmental Monitoring Center of Jiangsu Province, Nanjing 210036, China; 3. Immunology and Reproductive Biology Laboratory, Medical School, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: By using rat testicular germ cells *in vitro* toxicity testing method based on original cells culture, the reproduction toxicity of sewage treatment plant effluent of Chemical Industrial Park along the Yangtze River was evaluated, through cells changes in morphologic, activity and viability parameters. The results showed that both of the effluents from new developed Chemical Industrial Park A and provincial Chemical Industrial Park B contain reproductive toxic substances. The toxicity of Park A has more significant undergone changes in cells activity of sertoli cells ($p < 0.01$), spermatogenic cells ($p < 0.05$) and leyding cells ($p < 0.05$), lactate dehydrogenase activity ($p < 0.01$) and testosterone secretion ($p < 0.01$) than that of Park B. Sepemmatogenic cells are more sensitive in indicating reproduction toxicity for testicular, compared with leyding cells and sertoli cells. This study demonstrated that, as an indispensable and complementary tool for water quality assessment, rat testicular germ cells *in vitro* toxicity testing based on original cells culture can be used to comprehensively evaluate the reproduction toxicity of sewage treatment plant effluent, and provide prompt and useful discharge quality information.

Key words: Chemical Industrial Park along the Yangtze River; organic extracts; *in vitro*; testicular cells; reproduction toxicity

江苏省沿江化工产业园是我国重要的石油和化学工业特大型制造基地, 沿岸有各级化学工业园近 40 家, 这些重化学化工产业排污口设置过多且与取水口交叉现象严重, 是长江水环境毒物污染的主要来源。化工生产废水经处理后的出水因其化学组分含量低、成分复杂, 不可能对所有化合物逐一分析, 仅用化学手段也不能有效评价各种污染物的联合毒性作用, 出水直接排放至长江对水生生物及饮用水质量都存在着极大的风险^[1,2]。采用生物毒性测试方法可以有效弥补化学分析的不足, 20 世纪 80 年代美国国家环保局(U. S. EPA)已经开始采用全废

水毒性试验(whole effluent toxicity test, WET)来预测有毒排放物质对受纳水体的生态影响^[3,4], 90 年代末我国杨怡等^[5-7]学者就已经对城市污水和工业废水的急性毒性进行评估, 近几年也有了工业废水慢性毒性方面的研究^[8], 主要针对 Ah 受体效应、类雌

收稿日期: 2008-05-30; 修订日期: 2008-07-24

基金项目: 江苏省科技计划项目(BS2007050); 江苏省环境监测科研基金项目(0710); 污染控制与资源化研究国家重点实验室青年创新基金项目(PCREF07002); 江苏省普通高校研究生科研创新计划资助项目(CX07B-170z); 南京大学研究生科研创新基金项目(2007CL11)

作者简介: 胡冠九(1969~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为环境污染监测, E-mail: fanfan_67946@163.com

* 通讯联系人, E-mail: hongxiayu01@yahoo.com.cn

激素效应和遗传毒性效应, 生殖毒性方面的研究较少, 仅在甲基叔丁基醚和辛基酚等单一化合物作用于某一生殖细胞的毒性效应方面有初步研究^[9-11]. 同时应用支持细胞、生精细胞及间质细胞能综合、全面地评价环境样品的睾丸生殖细胞毒性, 在国内鲜见报道.

本研究以 2 个有代表性的江苏省沿江化工园区污水处理厂向长江排放的出水为对象, 同时应用基于原代培养的睾丸支持细胞、生精细胞及间质细胞进行体外毒性测试, 通过细胞形态、细胞活力、胞外 LDH 活力、细胞早期凋亡坏死率和睾酮分泌量等指标评价出水的生殖毒性效应, 旨在引入一种评价化工废水生殖毒性的方便有效的方法, 为废水排放的慢性毒性测试方法的建立和废水处理工艺的有毒物质削减提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 样品的采集与预处理

根据建园时间、规模、产业类型和污水处理厂水处理效率、排水方式等筛选出 2 个具有代表性的园区. 其中 A 为近 20 家新开发的沿江化工园区之一, B 为 6 家江苏省省级沿江化工园区之一, 均配有污水处理厂, 出水直接排放至长江. 2008 年 10 月分别在 A、B 2 个化工厂的污水处理厂采集出水, 采样点的布设和采集方法按照国家标准《地表水和污水监测规范》(HJ/T 91-2002) 和《水质采样技术指导》(GB 12998-91) 进行. 经市级环境监测站检测, 所采集出水均满足国家污水综合排放一级标准.

水样经 0.45 μm 的滤膜过滤后, 采用固相萃取技术富集水中有机物, 萃取柱为 Suplco ENV+ C18 柱 (1 g, 6 mL), 每 5L 水样过柱富集, 过柱流速约为 3~5 mL/min, 固相萃取柱使用前用甲醇和去离子水活化. 萃取完毕后, 萃取柱负压真空干燥. 依次用 20 mL 正己烷、20 mL 正己烷/二氯甲烷 (4:1)、10 mL 二氯甲烷和 20 mL 甲醇/二氯甲烷 (4:1) 淋洗固相萃取柱. 淋洗液经旋转浓缩, 轻柔氮气吹干, 再用 2% 二甲基亚砷 (DMSO) 定容至 3.5 mL, -20℃ 保存备用. 得到的水样有机提取物清单详见表 1.

1.2 细胞原代培养、鉴定及暴露

1.2.1 细胞的原代培养和鉴定

本实验采用的 SD 大鼠购自南京医科大学, 30 d 龄. 支持细胞的原代培养和鉴定参照文献[12~14]的方法, 运用 Feulgen 配以固绿染色, 对支持细胞进行鉴定, 支持细胞纯度达到 95% 以上. 间质细胞

表 1 细胞暴露浓度

Table 1 Concentration of exposure

样品编号	对应采样点	DMSO 含量/%	实验储备液浓度(水样浓缩倍数)	细胞暴露浓度(有机提取物浓缩倍数)
1	前处理程序空白	2	1430	72
2	A	2	1430	72
3	B	2	1430	72

的原代培养和鉴定参照文献[15, 16]的方法, 用 3β-HSD 染色方法检测, 活细胞比率>95%. 生精细胞的原代培养参考文献[9, 17, 18]的方法, 该方法采用除 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS, 避免了胰蛋白酶对细胞活力的影响. 用锥虫蓝检测活细胞比率>95%. 细胞均在含 5% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液中培养, 置于 34℃、CO₂ 培养箱中 (95% 空气, 5% CO₂).

1.2.2 细胞的暴露

原代培养的支持细胞和间质细胞, 培养 4 d 后暴露, 原代培养的生精细胞培养 2 h 暴露. 对照组加入浓缩 72 倍过程空白, 实验组 A、B 分别加入 A、B 化工园出水的 72 倍浓缩样. 毒性暴露实验, 每组设 3 个平行, 且实验重复 2 次. 同时以 0.1% 二甲基亚砷 (DMSO) 进行溶剂空白对照, 实验发现溶剂空白与前处理程序空白均无显著性差异 (下文以前处理程序空白作为对照组).

1.3 生殖毒性检测

1.3.1 FDA/PI 荧光双染检测细胞活性

用二乙酸荧光素 (FDA) 和碘化丙啶 (PI) 2 种荧光染料着色定性测定支持细胞、生精细胞和间质细胞的细胞活力. 将细胞以 10⁵ 个/孔的密度接种到 24 孔细胞培养板中, 在 34℃、5% CO₂ 的培养箱中培养. 以 0.1% 二甲基亚砷 (DMSO) 为对照组, 水样用 DMEM 培养基稀释至 DMSO 含量为 0.1%, 以 500 μL/孔对细胞染毒, 24 h 后用 FDA/PI 双染, 并在倒置的荧光显微镜下观察细胞形态变化和致死情况.

1.3.2 MTT 法检测对细胞增殖的影响

将细胞以 2×10⁴ 个/mL, 100 μL/孔的密度接种于 96 孔板, 预培养 24 h 至细胞完全贴壁, 小心吸去培养液; 加入含不同浓度受试物的培养液 200 μL, 染毒 24 h; 每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 25 μL, 37℃ 继续孵育 4 h, 孵育结束时吸尽所有溶液, 加入 150 μL/孔 DMSO, 在恒温振荡箱中振荡 10 min, 置于酶标仪 570 nm 检测吸光值. 实验另设 0.1% 二甲基亚砷 (DMSO) 空白对照组.

1.3.3 乳酸脱氢酶泄漏检测

乳酸脱氢酶(LDH)是糖酵解过程中一种重要的酶,任何原因引起的细胞损伤均可导致LDH的溢出,因此可以利用细胞外LDH含量来判断细胞膜受损状况.将原代细胞以 10^5 个/孔的密度接种到24孔板中,置于 34°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的培养箱中培养,以 $0.1\% \text{DMSO}$ 作为对照组,水样皆用DMEM培养基稀释至 DMSO 含量为 0.1% ,以 $500 \mu\text{L}$ /孔的量对细胞染毒. 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 饱和湿度下分别培养6、12和18 h,离心后收集上清液,进行细胞胞外LDH测定.剩余细胞中加入混有tritonX-100的培养液,置于 34°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱继续孵育后,收集各管培养液上清测定细胞内LDH,进而计算细胞外液中LDH活力.

1.3.4 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测细胞的早期凋亡和坏死

将原代培养的细胞以 4×10^5 个/孔的密度接种于24孔细胞培养板,置于 34°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的培养箱中培养.至第4 d时, $0.1\% \text{DMSO}$ 作为对照,水样皆用DMEM培养基稀释至 DMSO 的含量为 0.1% ,以 2 mL /孔的量对细胞进行染毒,并置于培养箱中培养24 h.以 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞,收集的细胞用PBS缓冲液洗2次,溶于 $190 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 结合缓冲液,调节细胞密度至 10^6 个/ mL ,加 20 g/L PI $10 \mu\text{L}$,混匀,冰上避光孵育10 min,结合缓冲液洗1次,上流式细胞仪分析.

1.3.5 放射免疫法检测睾酮含量

将原代培养的间质细胞以 10^5 个/孔的密度接种于24孔细胞培养板,置于 34°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 的培养箱中培养.用 $0.1\% \text{DMSO}$ 作为对照组,水样用DMEM培养基稀释至 DMSO 含量为 0.1% ,以 $500 \mu\text{L}$ /孔的量对细胞染毒作用48 h后,用睾酮测定试剂盒测定培养液中睾酮的含量.

2 结果与讨论

2.1 有机提取物对支持细胞的毒性

支持细胞是为发育中的精子提供保护和营养的细胞,精子发育的各个阶段都发生在支持细胞的表面.研究表明,支持细胞是某些环境物质对睾丸毒性作用的原始靶点,这些毒性物质能使支持细胞空泡化并影响生殖细胞生长的微环境,最终导致精母细胞和精子细胞的退变和脱离^[19~22].图1为FDA/PI双染荧光显微照片定性观察水样提取物对支持细胞形态的影响,其中绿色的代表活细胞,正常的大鼠支持细胞、胞浆在亮绿作用下呈淡绿色,细胞多为多边形,相邻细胞发生连接,形成网状结构,红色的代表已经死亡的细胞.从图1可以看出化工园区A、B水样有机提取物皆能导致死亡的支持细胞比例增加且整体细胞数量也大大下降.说明水样提取物对支持细胞有一定损伤作用.进一步的流式分析结果也表明水样有机提取物能导致死亡的支持细胞比例显著增加.

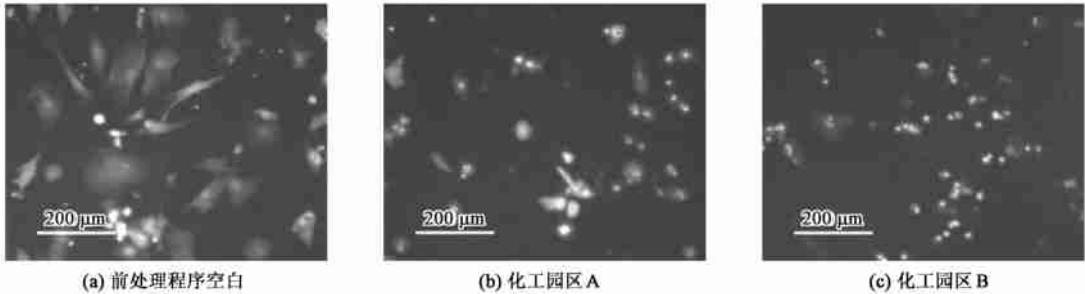


图1 支持细胞暴露后形态变化

Fig. 1 Morphologic changes of sertoli cells after treatment with organic extracts

利用MTT实验方法定量检测提取物对细胞活性的影响,结果如表2所示.园区A的出水提取物对支持细胞具有显著的增殖促进作用,园区B与空白相比没有显著差异,说明园区A的出水存在促进支持细胞增殖的污染物.

由细胞外LDH活力测定结果可知(见表3),园区A水样有机提取物能引起支持细胞胞外LDH泄漏,园区B与空白相比没有显著影响.推测园区A

表2 出水有机提取物对细胞活力的影响¹⁾($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 3$)

Table 2 Effects of exposure to organic extracts on the ability of cultured testicular cells

组别	吸光值		
	支持细胞	生精细胞	间质细胞
前处理空白	0.18 ± 0.00	0.57 ± 0.02	0.19 ± 0.01
化工园区A	$0.21 \pm 0.00^{**}$	$0.44 \pm 0.03^{*}$	$0.22 \pm 0.00^{*}$
化工园区B	0.17 ± 0.02	0.53 ± 0.04	0.19 ± 0.01

1) * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$, 其它表示无显著相关性,下同

表 3 出水有机提取物对细胞外 LDH 活力的影响 ($\bar{x} \pm SD, n = 3$)

组别	胞外 LDH 活力/ U·mL ⁻¹		
	支持细胞	生精细胞	间质细胞
前处理空白	2.67 ± 0.58	222.33 ± 8.96	3.67 ± 0.58
化工园区 A	5.33 ± 0.58*	243.33 ± 3.79*	2.67 ± 2.08
化工园区 B	4.75 ± 3.30	270.33 ± 40.08	3.33 ± 1.16

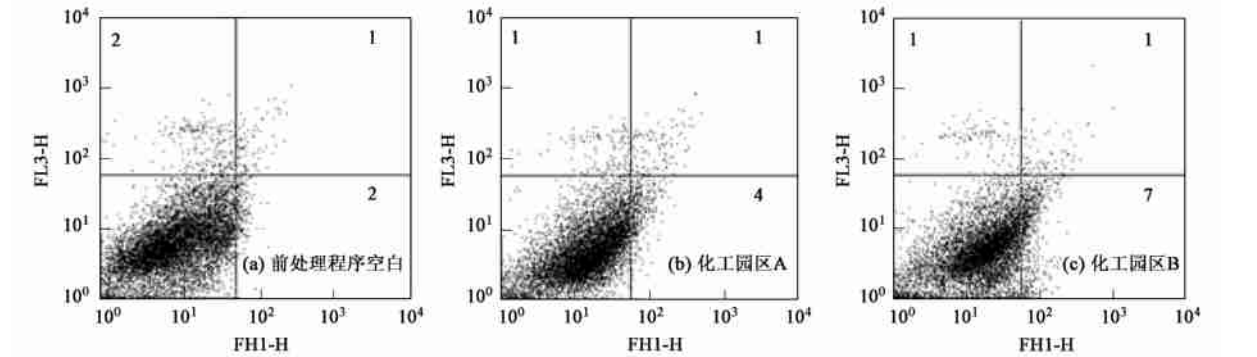


图 2 支持细胞 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞分析

Fig.2 Flow cytometry dot plots of the binding of annexin V-FITC and PI uptake by sertoli cells

直至精子各个类型. 本研究采用没有酶的处理过程原代培养生精细胞,使得各种生精细胞的比例与曲细精管中相同^[17, 23],而且可以减小胰蛋白酶对细胞活力的影响,进而更加准确地判断出水有机提取物对大鼠生精细胞的毒性作用.

图 3 为 FDA/PI 双染显微照片定性观察水样提取物对生精细胞活力的影响,正常情况下生精细胞也比较容易死亡,故对照组[图 3(a)]也有部分死细胞. 从图 3 中可以看出 A、B 化工园区水样有机提取物皆能导致死亡细胞比例增加,而且园区 A 的有机提取物造成了小团细胞死亡.

生精细胞活性检验结果如表 2 所示,园区 A 的出水提取物对生精细胞增殖有明显的抑制作用,园

中含有能引起细胞膜损伤的化合物. 用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪进一步检验水样提取物对支持细胞早期凋亡和坏死的影响. 流式细胞仪检测结果表明染毒后支持细胞的损伤基本处于早期凋亡状态(见图 2).

2.2 有机提取物对生精细胞的毒性

不同发育阶段的各级生精细胞组成曲细精管内的生殖细胞,包括精原细胞、精母细胞、精子细胞、

区 B 与空白相比没有显著影响. 此外,生精细胞胞外 LDH 活力测定结果显示(见表 3),园区 A 的有机提取物能造成显著的胞外 LDH 泄漏,即细胞膜已明显破损. 用双染流式细胞仪检验水样提取物对生精细胞早期凋亡和坏死的影响如图 4 所示,化工园区 A、B 有机提取物染毒的生精细胞处于凋亡后期的比例明显高于空白,说明生精细胞受到严重损伤.

2.3 有机提取物对间质细胞的毒性

睾丸间质细胞是雄性激素的主要来源,能够合成分泌睾酮,调节生精. 由 FDA/PI 双染显微照片可见(图 5),化工园区 A、B 水样有机提取物对间质细胞的毒性作用不显著,细胞形态略有变化,有碎片出现. 间质细胞活性检验结果如表 2 所示,园区 A 的

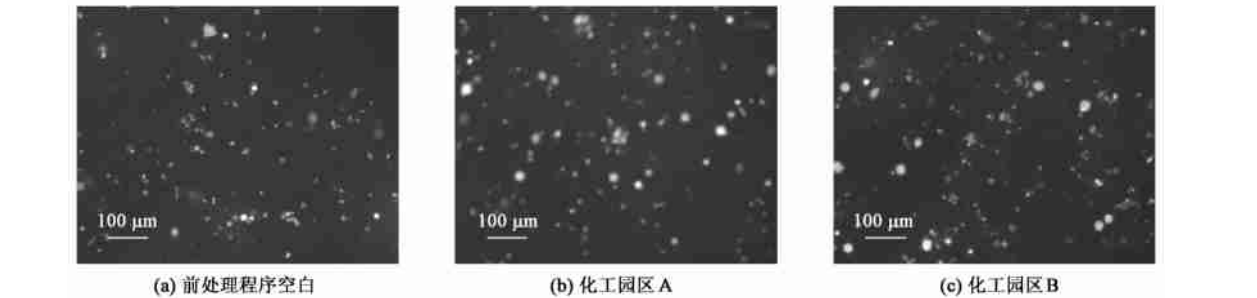


图 3 生精细胞暴露后形态变化

Fig.3 Morphologic changes of spermatogenic cells after treatment with organic extracts

出水提取物对间质细胞具有显著的增殖促进作用, 园区 B 与空白相比没有显著差异, 即园区 A 的出水存在促进支持细胞和间质细胞增殖但抑制生精细胞

增殖的污染物, 而园区 B 出水对 3 种细胞活性均无显著影响. 园区 A、B 的出水提取物对间质细胞胞外 LDH 泄漏无显著影响(见表 3).

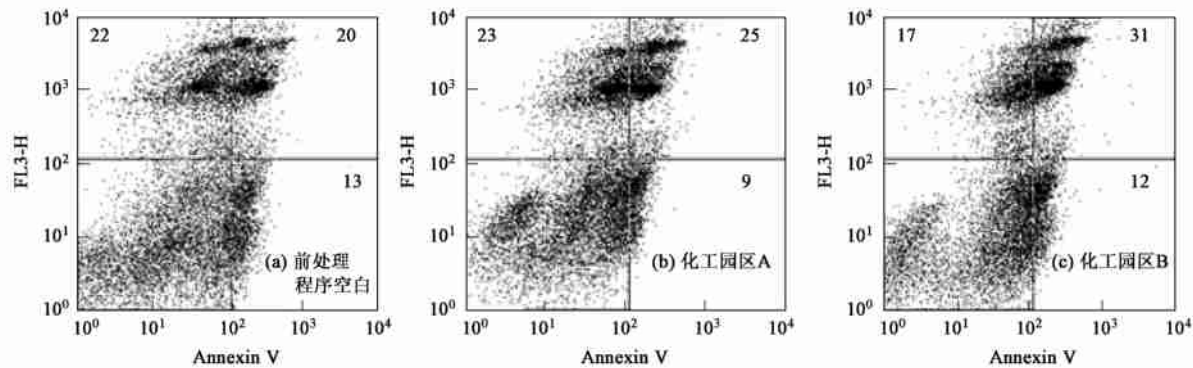


图 4 Annexin V-FITC/PI 双染生精细胞流式细胞分析

Fig. 4 Flow cytometry dot plots of the binding of annexin V-FITC and PI uptake by spermatogenic cells

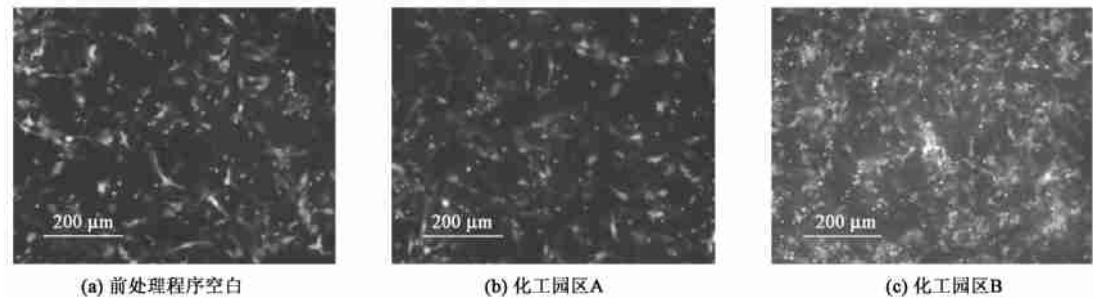


图 5 间质细胞暴露后形态变化

Fig. 5 Morphologic changes of leydig cells following treatment with organic extracts

间质细胞功能受损能引起睾酮分泌减少. 暴露在水样有机提取物下的大鼠间质细胞睾酮含量变化情况如表 4 所示. 结果表明, 工业园区 A 水样有机提取物使间质细胞睾酮分泌量明显减少.

表 4 出水有机提取物对间质细胞分泌睾酮的影响($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 3$)
Table 4 Effects of exposure to organic extracts on the testosterone secretion of leydig cells

组别	睾酮分泌量/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
前处理空白	1.11 ± 0.13
化工园区 A	$0.42 \pm 0.18^{*}$
化工园区 B	0.89 ± 0.32

2.4 水质分析

经有机提取物暴露的支持细胞主要处于凋亡的早期, 而生精细胞基本处于凋亡晚期甚至有小团细胞坏死. 虽然间质细胞的形态没有显著变化, 但化工园区 A 有机提取物已明显抑制了间质细胞对于睾酮的分泌, 且对细胞活力有显著影响. 即化工园区 A、B 污水处理厂出水有机提取物对睾丸生殖细

胞均造成了不同程度的损伤, 其中对生精细胞的损伤最为严重, 特别是显著抑制了细胞的增殖. 对间质细胞造成影响较小, 这可能由于化工废水中能引起生殖毒性的化合物或其代谢产物的作用靶细胞主要为生精细胞和支持细胞, 推测化工废水中可能含有 1, 3-二硝基苯和羟基脲等已经报道的以生精细胞和支持细胞为靶细胞的生殖毒性化合物^[24~27], 当然还有待于进一步化学分析, 追踪确定生殖毒性的来源.

本试验所采集的污水处理厂出水均满足国家排放标准, 细胞暴露浓度即有机提取物浓缩倍数为 72 倍的条件下, 有机提取物均已对睾丸生殖细胞造成了损伤, 而有报道指出对氯苯胺、4 氯联苯等化工废水中常见的非极性和中极性化合物, 在鱼体中的生物富集倍数(bioconcentration factor, BCF) 基本都高于 80^[28, 29], 所以 A、B 沿江化工园区污水处理厂出水长期直接排放进入饮用水源地长江均会对水生生物产生毒性作用, 对人类的健康也有潜在风险, 值得进一步追踪来源, 加强废水排放的生物毒性监测.

3 结论

(1) 新开发的沿江化工园区 A 和省级沿江化工园区 B 污水处理厂出水有机提取物均能造成不同程度的大鼠睾丸生殖细胞毒性, 且园区 A 的有机提取物毒性明显高于园区 B。出水直接排入长江对水生生物和饮用水的安全存在较大风险。

(2) 经有机提取物暴露导致支持细胞凋亡, 生精细胞损伤最为严重, 已经到了凋亡晚期甚至有小团细胞坏死, 间质细胞的睾酮分泌受到了明显抑制, 且细胞活力受到显著影响。

(3) 采用基于原代细胞培养的睾丸生殖细胞体外毒性测试方法与固相萃取等技术结合评估化工废水的潜在生殖毒性有着广泛的应用前景, 可以作为现行国家污水综合排放化学监测方法的有效补充。

致谢: 本实验是在韩晓冬教授的帮助下完成的, 在此表示感谢。

参考文献:

- [1] U. S. EPA-600/6-91/003, Methods for aquatic toxicity identification evaluations: phase I. Toxicity characterization procedures[S].
- [2] U. S. EPA-600/R-92/080, Methods for aquatic toxicity identification evaluations: phase II. Toxicity identification procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity[S].
- [3] U. S. EPA-600/R-92/081, Methods for aquatic toxicity identification evaluations: phase III. Toxicity characterization procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity[S].
- [4] Denise P K, John L N, Marie T B, *et al.* Passaic river sediment interstitial water phase I toxicity identification evaluation [J]. *Chemosphere*, 2008, **70**: 1737-1747.
- [5] 杨怡, 于红霞, 崔玉霞, 等. 以毒性鉴别评价法评价化工废水处理效果的研究[J]. *应用生态学报*, 2003, **14**(1): 105-109.
- [6] Jin H J. A case study on identifying the toxicant in effluent discharged from a chemical plant[J]. *Mar Pollu Bull*, 1999, **39**: 122-125.
- [7] Yang L, Yu H X, Jin H J, *et al.* Contribution of nonpolar organic compounds to the toxicity of a chemical works effluent [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1999, **62**: 434-439.
- [8] 陈盈盈, 马梅, 赛道建, 等. 用成组生物测试评估不同深度处理工艺出水的安全性[J]. *环境科学*, 2005, **26**(1): 100-103.
- [9] Li D M, Han X D. Evaluation of toxicity of methyl tert-butyl ether (MTBE) on mouse spermatogenic cells in vitro[J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2006, **22**: 291-299.
- [10] Samir S R, Charles A B, Clarke F M. Toxic effects of octylphenol on cultured rat spermatogenic cells and sertoli cells[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1999, **157**: 192-202.
- [11] Guan L, Huang Y, Chen Z Y. Developmental and reproductive toxicity of soybean isoflavones to immature SD rats[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2008, **21**(3): 197-204.
- [12] 韩晓冬, 龚, 志刚, 等. 大鼠睾丸支持细胞的原代培养与鉴定[J]. *解剖学报*, 2005, **36**(6): 682-684.

- [13] Lucas T F G, Avellar M C W, Porto C S. Effects of carbachol on rat Sertoli cell proliferation and muscarinic acetylcholine receptors regulation: an *in vitro* study [J]. *Life Sciences*, 2004, **75**: 1764-1773.
- [14] Gong Y, Han X D. Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells[J]. *Reproductive Toxicology*, 2006, **22**: 623-630.
- [15] 应锋, 龚, 韩晓冬. 壬基酚对体外培养大鼠睾丸间质细胞分泌雄激素影响的研究[J]. *中华男科学*, 2006, **12**(4): 300-307.
- [16] Kovacevic R, Vojinovic M M, Teoderovic I, *et al.* Effect of PCBs on Androgen Production by Suspension of Adult Rat Leydig Cells in vitro [J]. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology Volume*, 1995, **52**(6): 595-597.
- [17] Aravindan G R, Pineau C P, Bardin C W, *et al.* Ability of trypsin in mimicking germ cell factors that affect Sertoli cell secretory function[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 1996, **168**: 123-133.
- [18] Muk D D, Cheng C Y. *In vitro* regulation of extracellular superoxide dismutase in Sertoli cells[J]. *Life Sciences*, 2000, **67**: 133-145.
- [19] Tracy M W, Russell C C, Susan J B. Alterations in Endocrine Responses in Male Sprague-Dawley Rats following Oral Administration of Methyl tert-Butyl Ether[J]. *Toxicological Sciences*, 2000, **54**: 168-176.
- [20] Choi J S, Kim I W, Hwang S Y, *et al.* Effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on testicular spermatogenesis-related panels and serum sex hormone levels in rats[J]. *BJU International*, 2008, **101**(2): 250-255.
- [21] Shin W, Fumio T, Tomoko M, *et al.* Spermatogenesis in aged rats after prenatal 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl exposure[J]. *Toxicology*, 2007, **238**(2): 186-191.
- [22] Lee E, Ahn M Y, Kim H J, *et al.* Effect of di(n-butyl) phthalate on testicular oxidative damage and antioxidant enzymes in hyperthyroid rats[J]. *Environmental Toxicology*, 2007, **22**(3): 245-255.
- [23] Li D M, Yin D Q, Han X D. Methyl tert-butyl ether (MTBE)-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat spermatogenic cells[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2007, **27**: 10-17.
- [24] Shin J H, Mori C, Shiota K. Involvement of germ cell apoptosis in the induction of testicular toxicity following hydroxyurea treatment [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1999, **155**(2): 139-149.
- [25] Rita S S S, Martha O M. Reproductive Toxicity of Lapachol in Adult Male Wistar Rats submitted to Short-term Treatment[J]. *Phytotherapy Research*, 2007, **21**: 658-662.
- [26] El R R, Elhkim M O, Lezni S, *et al.* Evaluation of the genotoxic potential of 3-monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) and its metabolites, glycidol and beta-chlorolactic acid, using the single cell gel/comet assay[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, **45**(1): 41-48.
- [27] Ichihara G. Neuro-reproductive toxicities of 1-bromopropane and 2-bromopropane [J]. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 2005, **78**(2): 79-96.
- [28] Hu H Y, Xu F L, Li B G, *et al.* Prediction of the bioconcentration factor of PCBs in fish. Using the molecular connectivity index and fragment constant models[J]. *Water Environment Research*, 2005, **77**: 87-97.
- [29] 解静芳, 郭栋生, 高越, 等. 取代苯化合物生物富集系数的估算[J]. *应用生态学报*, 2006, **17**(12): 2399-2402.