

哺乳期母鼠灌服双酚 A 对雄性后代生殖发育的影响及其机制

解美娜 李锋杰 丁保清 赵惠

(潍坊医学院医学研究实验中心 潍坊 261053)

摘要:母鼠(*Mus musculus*)分娩后第2天起每天灌服双酚A(BPA,剂量5、50、100 mg/kg),仔鼠通过乳汁暴露于BPA,一直持续到第22天断奶,研究BPA对雄性仔鼠成年后精子生成、睾丸结构与睾丸内雌激素受体(ER) α 和增殖细胞核抗原(PCNA)表达的影响及雌激素、抗氧化酶水平变化。结果发现,BPA处理组血清谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px)和总超氧化物歧化酶(SOD)活力显著降低,雌激素水平升高。所有剂量组睾丸发育受到抑制,生精细胞排列紊乱,精子畸形率显著升高,5和100 mg/kg剂量组附睾尾精子数降低。免疫组织化学结果显示,不同曲细精管间ER α 表达呈现出两种模式,一种是仅在支持细胞核内表达,另一种是在支持细胞和精母细胞核内均表达。PCNA表达与ER α 表达有一定相关性,后一种ER α 表达模式的曲细精管内PCNA阳性细胞显著增多。哺乳期接触BPA雄鼠睾丸内ER α 单细胞平均表达强度升高,初级精母细胞PCNA表达量升高。

关键词:双酚A;哺乳期;睾丸;ER α ;PCNA

中图分类号:R994.6 Q492.4 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2010)04-31-08

Effects of Bisphenol A Exposed to Lactating Mice on the Testis Development of Their Male Offspring

XIE Mei-Na LI Feng-Jie DING Bao-Qing ZHAO Hui

(Medicine Experiment Center, Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

Abstract: Bisphenol A (BPA, at dose of 5, 50, or 100 mg/kg) was given daily by gavage to female mice (*Mus musculus*) during lactation, and thus the pre-weaning baby mice were exposed to BPA from maternal milk. The effects of BPA on testis development and the expression of estrogen receptor (ER) α and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in testes were studied. In addition, the serum level of estrogen and some antioxidant enzymes were detected. Results showed that serum concentration of estrogen in mature male mice was higher than that in the vehicle-treated group. The exposed mice had a significant decrease in the activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) and the total superoxide dismutase (SOD). Morphological studies revealed that testis development was inhibited by BPA with germ cells in disordered arrangement. BPA reduced the number of caudal epididymal sperm and increased the number of abnormal sperm significantly. Immunohistochemistry analysis revealed that there were two different patterns of ER α expression, presence only in the nuclei of Sertoli cells or in the nuclei of spermatocytes except for Sertoli cells. PCNA-positive cells were increased in the latter ER α expression pattern. The average integrated optical density (IOD) of ER α -positive

基金项目 山东省高等学校科技计划项目(No. J08LG77) 潍坊医学院青年教师启动基金项目(No. KQ07004);

第一作者介绍 解美娜,女,讲师;研究方向:内分泌干扰物生殖毒理;E-mail:xiemeina@wfmc.edu.cn

收稿日期:2009-12-28,修回日期:2010-04-23

single germ cell in BPA-treated groups was significantly higher than that in the vehicle-treated group. The expression of PCNA in primary spermatocytes was also increased in BPA-treated groups.

Key words: Bisphenol A; Lactation; Testis; ER α ; PCNA

双酚 A (bisphenol A, BPA) 是内分泌干扰物的一种, 其应用领域非常广泛, 包括饮料瓶、食品包装、金属食品罐的内保护层、水管、婴儿奶瓶等许多塑料制品的添加剂。这种物质能够进入周围环境, 导致人和动物的慢性接触。因其具有脂溶性, BPA 存在非常普遍, 在食品、水中, 以及人 (*Homo sapiens*) 的尿液、血液中, 怀孕妇女的胎盘和羊水中, 哺乳妇女的乳汁中均能检测到 BPA 的存在^[1-3]。因为人类的潜在暴露, 近年来引发了广泛的关注。

BPA 是一种外源性雌激素, 可引起生殖系统紊乱。20 世纪 30 年代, 首先发现了 BPA 对大鼠 (*Rattus norvegicus*) 具有雌激素活性, 但是在相当长的时间没有开展广泛的研究^[4]。直到 20 世纪 90 年代, 越来越多的动物实验证明, 低剂量的 BPA 有发育毒性、致癌效应和潜在神经毒性, 另外, 小鼠 (*Mus musculus*) 妊娠期和哺乳期接触 BPA, 可使子代行为发生变化^[5-6]。BPA 对发育期小鼠有致癌效应并且可产生乳腺癌前体^[7]。

在妊娠和哺乳早期阶段, 一些物质通过产妇或奶瓶可能影响婴儿的发育, 特别是一些激素或内分泌干扰物会破坏内分泌系统、生殖系统、免疫系统, 甚至会产生永久性不可逆的影响。生殖系统在发育阶段比成熟期更易受到 BPA 的不良影响。如有研究发现, 孕期对母鼠染毒 30、120 和 360 mg/(kg·d) 剂量的 BPA, 引起 30 日龄仔鼠睾丸曲细精管上皮细胞排列紊乱、成熟精子数量减少, 部分上皮与基底部分离^[8]。刘艳等研究发现, 初断乳大鼠皮下注射 BPA 6 周导致大鼠附睾、前列腺、精囊腺质量和脏器系数均显著下降, 精子数量减少, 畸形率增加^[9]。而目前有关 BPA 对发育中雄性小鼠生殖系统影响机制的研究还很少, 也有一些实验得出不同的结论, 认为接触 BPA 不会引起睾丸形态、精子质量、生殖器官重量的相应变

化^[10-11]。以往对新生期暴露于 BPA 的实验多选择皮下注射^[10-13], 不能代表人类和动物的污染程度。另一方面, 没有令人信服的证据证明双酚 A 是否改变雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 和增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 在睾丸的表达。

本实验采用 ICR (Institute of Cancer Research) 小鼠母鼠灌服 BPA, 幼鼠通过乳汁暴露于 BPA 的给药方式, 给药途径更为合理。根据先前研究发现人母乳中的 BPA 含量在 0.2 ~ 10 ng/ml^[3]。假设 2% 的 BPA 能通过乳汁代谢, 5 mg/kg 组母鼠乳汁中 BPA 含量大约相当于母乳中检测到的最高水平 (10 ng/ml)。50 mg/kg 被认为是生殖系统和新生儿无不良影响剂量 (no observable adverse effect level, NOAEL)^[14]。本实验研究了哺乳期暴露于环境相关剂量的 BPA 对雄鼠成年后血清中雌激素水平、抗氧化酶活性及睾丸结构和睾丸内 PCNA 与 ER α 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 20 只怀孕的 ICR 小鼠 (购自上海实验动物中心), 饲养环境控制在室温 (24 \pm 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度 40% ~ 50%, 饲喂颗粒料, 自由饮清洁水。待分娩后将其分为 4 组, 每组 5 只母鼠, 从分娩第 2 天起一直持续到第 22 天断奶, 分别给母鼠每天灌服溶于玉米油的 BPA (Sigma-Aldrich 公司, 纯度 99%) (0.5、50 和 100 mg/kg)。断奶后, 雄性仔鼠与母鼠分笼饲养至成年, 到第 75 天, 每组取 25 只雄鼠称体重, 被处死, 取血清及包括睾丸、附睾等组织称重并计算脏器系数 (脏器重/体重, g/kg), 将组织固定于 10% 甲醛中。

1.2 血清雌二醇 (E_2) 水平测定 采用 E_2 检测试剂盒 (上海锐聪实验室设备有限公司), 用 ELISA 法检测血清中 E_2 水平, 向酶标板中加入

100 μl 标准品或血清,加入酶联亲和物后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,洗板后加入显色液 A 和 B,避光反应 15 min,加入终止液,充分混匀,终止反应。在 30 min 内,在 450 nm 波长下测定各孔 OD 值。

1.3 血清中 GSH-Px、SOD 酶活力检测 应用谷胱甘肽-过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、总超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒 (购自南京建成生物工程有限公司) 测定血清中 GSH-Px、SOD 酶活力。

1.4 精子数和精子形态变化 小鼠处死后,取附睾尾在磷酸盐缓冲液中剪碎,35 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min 让精子游离出来。用血细胞计数板统计精子密度,并制作精子涂片,苏木素伊红 (H. E) 染色后用于形态学分析。显微镜下观察精子形态,并随机取 200 个精子统计畸形精子数,计算精子畸形率。

1.5 睾丸形态学分析 固定后的睾丸经脱水、透明、浸蜡后包埋,制作成 5 μm 石蜡切片,H. E 染色后观察睾丸形态学变化,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统 (<http://www.verycd.com/topics/73786/>) 进行分析,每张切片选择 5 个视野并测定生精上皮厚度及曲细精管直径和管腔直径。

1.6 免疫组织化学法检测睾丸内 ER α 和 PCNA 表达 5 μm 厚的切片常规脱蜡入水,微波修复抗原,3% H_2O_2 溶液孵育 20 min 以消除

内源性过氧化物酶的活性,PBS 冲洗 (5 min \times 3 次),正常山羊血清 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,滴加一抗 ER α 或 PCNA (购自 Santa Cruz Biotechnology Inc) 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBS 冲洗 (5 min \times 3 次),滴加生物素化羊抗兔 IgG 二抗工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,PBS 冲洗 (5 min \times 3 次),滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,PBS 冲洗 (5 min \times 3 次),DAB (3,3'-二氨基联苯胺) 显色,显微镜下控制显色时间,然后按常规脱水、透明、中性树脂胶封片,光镜下观察染色情况。采用 Image-Pro Plus 图像分析系统对 ER α 和 PCNA 表达情况进行分析。每张切片随机选取 5 个视野 40 个阳性细胞的光密度 (IOD) 值取平均值。

1.7 统计学处理 所得数据采用 SAS (6.12) 软件中 GLM 过程进行方差分析及 Duncan's 进行多重比较。

2 结果

2.1 体重及脏器系数 实验过程中 100 mg/kg 组体重增长较多 (表 1),但生殖器官重量有所减轻,BPA 处理组雄鼠睾丸脏器系数均出现显著下降 ($P < 0.05$),在 5 和 100 mg/kg 组,附睾脏器系数出现显著下降 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.2 血清 E_2 水平变化 在 BPA 处理组, E_2 水平显著升高 ($P < 0.05$),5、50 及 100 mg/kg 组血清雌激素浓度达到对照组血清雌激素水平的 2 倍 (表 2)。

表 1 雄鼠哺乳期接触 BPA 成年后体重及脏器系数变化

Table 1 Changes of body weight and organ coefficient of testis and epididymis in male mice exposed to BPA during lactation

剂量 Dose (mg/kg)	体重平均增长 Average increase of body weight (g)	睾丸系数 Organ coefficient of testis (g/kg)	附睾系数 Organ coefficient of epididymis (g/kg)	精子数 Sperm number ($\times 10^7$)	精子畸形率 The rate of teratospermia (%)
0	32.8	3.66 \pm 0.48	1.20 \pm 0.28	1.02 \pm 0.08	2.75 \pm 0.04
5	31.9	3.09 \pm 0.43*	1.01 \pm 0.04*	0.87 \pm 0.04*	14.63 \pm 0.02*
50	32.8	3.23 \pm 0.21*	1.19 \pm 0.21	1.08 \pm 0.03	52.25 \pm 0.005**
100	35.9	2.46 \pm 0.19*	0.91 \pm 0.04*	0.25 \pm 0.05**	94.50 \pm 0.007**

与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。各组动物数为 25。

Contrast with the control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$. The number of animal in each group is twenty-five.

表 2 雄鼠哺乳期接触 BPA 成年后血清中 E₂ 水平及 GSH-PX 和总 SOD 活力变化
Table 2 Effect of BPA on the activities of GSH-PX and total SOD in serum of adult male mice exposed to BPA during lactation

剂量 (mg/kg) Dose	E ₂ 水平 (pg/ml) The level of E ₂	GSH-PX 活力 (U/ml) Activity of GSH-PX	总 SOD 活力 (U/ml) Activity of total SOD
0	38.66 ± 9.00	1 325.22 ± 142.41	207.22 ± 12.64
5	93.18 ± 14.41*	668.00 ± 197.03*	210.80 ± 24.56
50	75.63 ± 11.66*	698.03 ± 163.01*	182.21 ± 21.01*
100	82.03 ± 15.69*	592.70 ± 136.26*	174.46 ± 18.16*

与对照组比较, * P < 0.05。各组动物数为 25。

Contrast with the control group, * P < 0.05. The number of animal in each group is twenty-five.

2.3 血清 GSH-PX、SOD 活力变化 哺乳期雄鼠接触 BPA, 成年后血清中的 GSH-PX 和 SOD 活力均有下降(表 2)。其中 GSH-PX 活力在 3 个剂量组均有显著下降, 总 SOD 水平在 50 和 100 mg/kg 剂量组中显著降低, 而在低剂量组未见明显变化。

2.4 BPA 对精子生成的影响 BPA 严重影响了雄鼠成年后的精子质量(图 1:A~D), 在 5 和 100 mg/kg 剂量组, 附睾尾平均精子数显著减少(P < 0.05), 畸形率显著升高(P < 0.05)(表 1)。尽管在 50 mg/kg 剂量组中精子数未出现明显改变, 但是精子畸形率显著高于对照组(P < 0.05)。在低中浓度组(5 和 50 mg/kg), 大多数精子呈现尾部卷曲(图 1:B,C), 头部畸形精子占少数, 而在高浓度组(100 mg/kg), 呈现出较普遍的头部分畸形(主要是钩部非正常弯曲)(图 1:D), 畸形率呈剂量效应关系。

2.5 BPA 对睾丸发育的影响 在对照组中, 曲细精管内的细胞规则排列, 细胞质和细胞核饱满丰富(图 1:E)。而在 BPA 处理组中, 睾丸发育也受到严重影响, 曲细精管管腔中出现大量胞质残余体, 部分管腔出现滞留管腔液, 生精细胞排列紊乱, 生精上皮变薄, 管腔变窄, 细胞质空泡化, 细胞核固缩, 出现多核巨细胞(图 1:F~H)。特别在中高浓度组, 支持细胞和各级生精细胞生长受到抑制(图 1:G,H)。

2.6 睾丸内 ERα 和 PCNA 表达变化 免疫组织化学的结果表明, ERα 主要在支持细胞、初级精母细胞、次级精母细胞和间质细胞的细胞核内表达。但是在不同生精小管中出现了两

种不同模式的表达: 部分生精小管内 ERα 只在支持细胞表达; 而在另外一些生精小管除了支持细胞外, 精母细胞也有 ERα 的表达(图 2:A)。此外, 在对照组的阳性细胞内, ERα 呈斑点状表达, 而在 BPA 处理组中 ERα 呈弥散状表达。图像分析结果显示, BPA 处理组单个阳性细胞平均 IOD 值显著高于对照组(P < 0.05)。在对照组中, PCNA 主要在精原细胞核内表达, 其阳性颗粒为浅黄色至棕黄, 曲细精管内阳性精原细胞多排列成为一层, 染色深, 初级精母细胞呈弱阳性或阴性, 次级精母细胞和精子细胞几乎不表达。另外, 我们还发现 ERα 和 PCNA 的表达具有相关性, 在支持细胞、精母细胞均表达 ERα 的曲细精管中, 可见数层 PCNA 阳性的精原细胞和初级精母细胞(图 2:B)。在 BPA 处理组中, PCNA 表达明显增多, 精母细胞内表达明显(图 1:N~P)。

3 讨论

近年, BPA 对胎儿和新生儿的不良影响引起了广泛关注^[15-16]。尽管已经有很好的动物模型来研究一些物质对成年动物的雌激素作用, 但是发育期的暴露更难检测。给哺乳期大鼠口服¹⁴C 标记的双酚 A, 发现一部分放射性物质经受试大鼠母乳转移给了新生仔鼠, 证明双酚 A 可进入母乳^[17]。母体内蓄积的 BPA 会使新生儿暴露于 BPA, 另外, 一些塑料制品包括哺乳瓶内所溶解出的 BPA 也对新生儿存在着潜在的危害。因此研究哺乳期暴露于 BPA 对生殖系统长期的影响具有十分重要的意义。

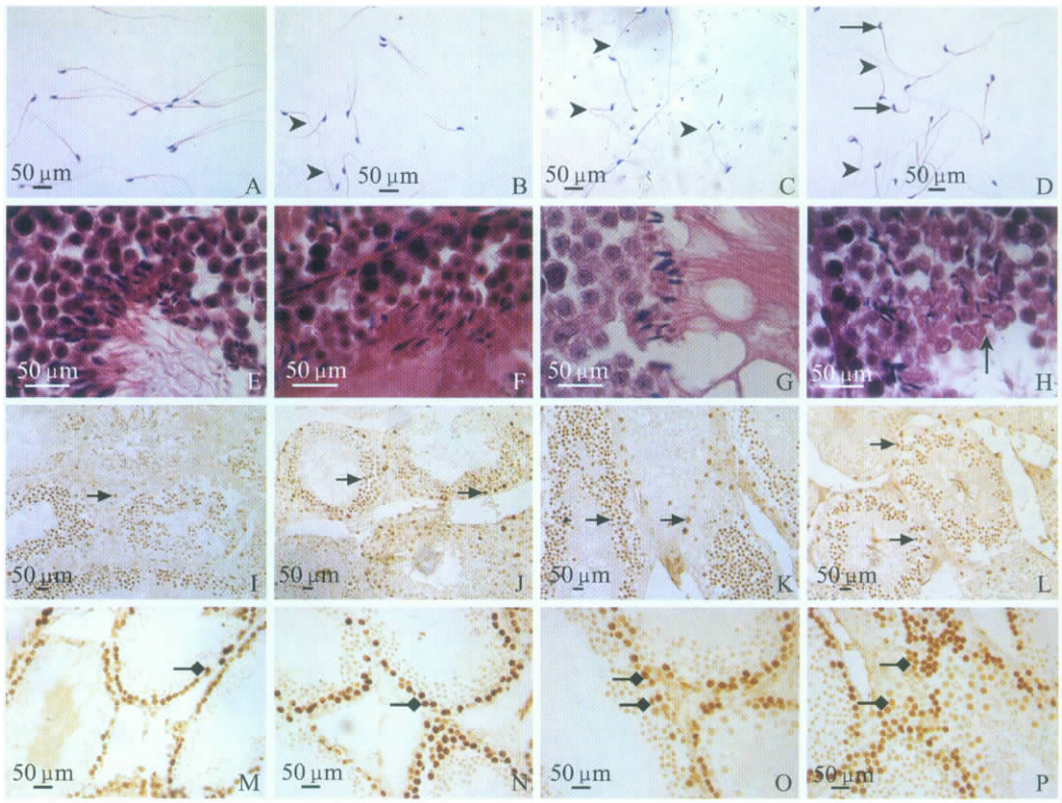


图 1 哺乳期接触 BPA 引起的成年雄鼠精子(A ~ D, × 400)和睾丸(E ~ H, × 1 000)的形态学变化及睾丸内 ERα(I ~ L, × 200)和 PCNA(M ~ P, × 400)表达变化

Fig.1 Morphology changes in spermatozoa (A – D, × 400) and testis (E – H, × 1 000) of adult male offspring treated with BPA during lactation. Alteration of ERα (I – L, × 200) and PCNA (M – P, × 400) expression in testis of adult male mice exposed to BPA during lactation

A、E、I、M:对照组 (Control); B、F、J、N:BPA = 5 mg/kg; C、G、K、O:BPA = 50 mg/kg; D、H、L、P:BPA = 100 mg/kg。
 ▶ 精子尾部畸形; → 精子头部畸形; → 管腔胞质残余体; ▶ ERα 阳性表达细胞; —◆ PCNA 阳性表达细胞。
 ▶ Sperm with caudal malformation; → Sperm with head malformation; → Redundant residual cytoplasm in the lumen of seminiferous tubule; ▶ ERα-positive staining cell; —◆ PCNA-positive staining cell.

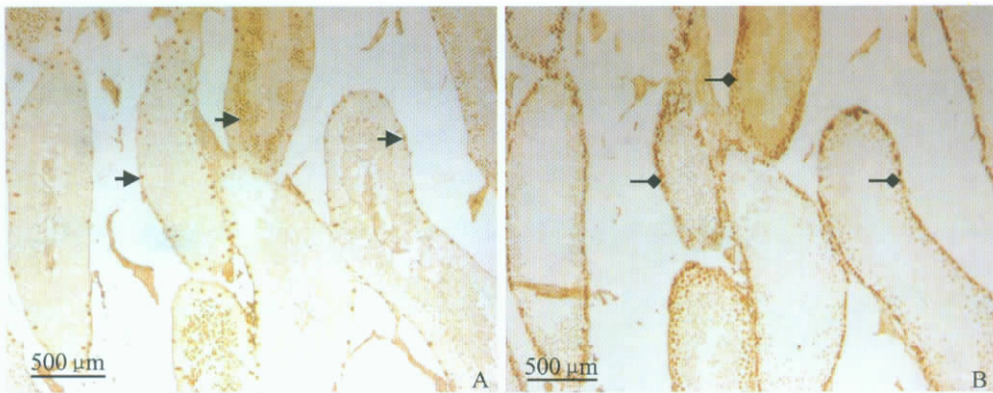


图 2 正常成年雄鼠睾丸 ERα (A, × 100) 和 PCNA (B, × 100) 表达分布

Fig.2 The expressions of ERα (A, × 100) and PCNA (B, × 100) in testis of normal adult mice
 ▶ ERα 阳性表达细胞; —◆ PCNA 阳性表达细胞。▶ ERα-positive staining cell; —◆ PCNA-positive staining cell.

本实验采用更合理的摄入途径来研究哺乳期暴露于 BPA 是否影响雄性生殖系统的发育。结果表明,哺乳期暴露于 BPA 会对雄性生殖系统产生长久的影响。睾丸形态学分析表明,支持细胞生长被抑制,不同发育阶段的生精细胞的生长受到不良影响。支持细胞在睾丸中起到支持和营养生精细胞的作用,BPA 处理组中,曲细精管结构和生精细胞形态的改变可能源自支持细胞的生长和功能受到抑制。支持细胞和生精细胞的破坏注定会影响精子的质量。对附睾尾精子质量的分析也证实 BPA 处理组畸形精子率显著升高。

雌激素水平检测发现哺乳期暴露于 BPA 的雄鼠,成年后血清雌激素水平显著升高。目前已证实,雌激素在雄性生殖系统发育中也发挥着重要生理功能^[18]。另一方面,暴露于过量雌激素也会导致生殖异常,特别是发育阶段雌激素水平的改变可能会对生殖系统产生终生的影响。雌激素样内分泌干扰物同雌激素一样会改变影响睾丸的发育^[19]。本实验中 BPA 对睾丸和精子的不良影响有可能源于雌激素水平的升高。也有实验表明,胚胎期及初生期暴露于雌激素可导致啮齿类动物睾丸变小和精子数目减少^[18-19]。

雌激素必须与特异性雌激素受体(ER α 和 ER β)结合才能发挥其作用。而 ERs 被特异性的类固醇激素激活并调控很多分子途径,包括分化和增殖^[20]。在雌激素受体 α 基因敲除动物模型中,睾丸输出小管发生明显改变,上皮组织的重吸收功能受阻,上皮细胞溶酶体和细胞器的数量减少,而雌激素受体 β 基因敲除小鼠的雄性生殖系统表现正常,证实雌激素受体 α 在雄性生殖系统中具有非常重要的作用^[21]。本实验目的也包括研究 BPA 是否会改变 ER α 的长期表达。BPA 能模拟雌激素活性与 ERs 结合产生拮抗作用^[22]。有研究发现 BPA 能提高新生雄性大鼠下丘脑前叶和新生雌鼠视前区 ER α 和 ER β 的表达^[23-24]。ER α 在睾丸网和输出小管中有重要作用,缺乏 ER α 表达的雄鼠会出现不育^[25]。本实验发现 BPA 处理组睾丸

内单细胞 ER α 表达水平上调。ER α 在单个细胞内的过表达可能会提高细胞对雌激素的敏感性,从而提高患癌症风险。或许这可以解释 BPA 为何会引发乳腺癌和前列腺癌等^[26-27]。BPA 引起单个细胞内 ER α 过表达的机制还需进一步的研究。

PCNA 是存在于细胞核内的一种蛋白质,它和复制因子 C(replication factor, RFC) 一起识别引物-模板复合物,以帮助 DNA 聚合酶 δ 定位,从而促进 DNA 的复制,因此,PCNA 的表达是细胞增殖的标志。在睾丸曲细精管中,精原细胞通过有丝分裂不断增殖,初级精母细胞和次级精母细胞也通过减数分裂进行增殖,因此 PCNA 在精原细胞和初级精母细胞中均有表达,但是在精原细胞中表达较多,提示精原细胞增殖较为旺盛,初级精母细胞中有弱表达或不表达,可能与分裂周期有关。实验中发现,BPA 提高了初级精母细胞中 PCNA 的表达,即促进初级精母细胞的增殖。先前也有研究发现,BPA 会促进子宫上皮 PCNA 表达量升高^[28]。PCNA 的过表达在生精过程中并未提高附睾尾精子数量,相反 BPA 处理组中畸形精子率显著升高,某些剂量组精子数出现明显下降。PCNA 的非正常表达可能影响细胞正常分裂周期,造成生精细胞提前发育,有可能诱发凋亡或产生畸形精子,在对附睾尾精子进行检测时我们发现精子前端钩部异常,尾部呈现波浪状弯曲,对睾丸的形态学分析发现精子细胞在变态为精子的过程中,很多残余胞质未被吸收,残留在管腔内,证实精子发生过程受到不良影响。我们在实验过程中对比相邻睾丸切片中 PCNA 与 ER α 的表达,发现二者存在某种相关联系,不同生精小管间 PCNA 与 ER α 的表达存在着明显的差异,可能睾丸内生精小管上皮处于不同时期导致的生精细胞增殖活跃程度和某些基因表达不同,还有待进一步的研究。

在正常机体内存在着许多清除氧自由基的体系,包括抗氧化酶和抗氧化剂,SOD 和 GSH-PX 是机体内最主要的氧自由基的重要酶类清除剂,其活性的变化直接影响细胞内氧自由基

和其终末产物脂质过氧化物 (lipid peroxides, LPO) 的含量。SOD 可催化超氧阴离子自由基 (O_2^-) 歧化为 H_2O_2 和 O_2 , GSH-PX 能特异地催化还原型谷胱甘肽对氢过氧化物的还原反应, 在细胞内能清除有害的过氧化物代谢产物, 阻断脂质过氧化链锁反应, 从而起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。哺乳期暴露于 BPA 的雄鼠成年后血清 SOD 和 GSH-PX 活力降低, 机体内过量的氧自由基不能清除, 会导致脂质过氧化, 诱发细胞凋亡和细胞周期异常, 从而造成睾丸组织损伤, 生殖能力下降。这可能是双酚 A 对睾丸的生殖功能造成损害的原因之一。

总之, 哺乳期接触 BPA 对雄鼠睾丸发育和精子产生有长期不良影响。其影响机制可能源于 BPA 引起的雌激素水平升高、ER α 和 PCNA 表达水平的改变及抗氧化酶水平的下降导致的细胞损伤。

参 考 文 献

- [1] Heemken O P, Reincke H, Stachel B, et al. The occurrence of xenoestrogens in the Elbe River and the North Sea. *Chemosphere*, 2001, 45: 245 - 259.
- [2] Thomson B M, Grounds P R. Bisphenol A in canned foods in New Zealand: an exposure assessment. *Food Addit Contam*, 2005, 22: 65 - 72.
- [3] Kuruto-Niwa R, Tateoka Y, Usuki Y, et al. Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere*, 2007, 66: 1160 - 1164.
- [4] Dodds E C, Lawson W. Synthetic strogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature*, 1936, 137: 996.
- [5] Lee Y M, Seong M J, Lee J W, et al. Estrogen receptor independent neurotoxic mechanism of bisphenol A, an environmental estrogen. *J Vet Sci*, 2007, 8(1): 27 - 38.
- [6] 张婧, 徐晓虹, 王亚民, 等. 围生期双酚 A 暴露对不同性别子代小鼠行为的影响. *心理学报*, 2009, 41(9): 832 - 841.
- [7] Soto A M, Vandenberg L N, Maffini M V, et al. Does breast cancer start in the womb? *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2008, 102(2): 125 - 133.
- [8] 吕毅, 吕海霞, 王洪海, 等. 双酚 A 对雄性仔鼠生殖功能的影响. *吉林大学学报: 医学版*, 2008, 34(4): 618 - 620.
- [9] 刘艳, 张玉敏, 裴秀丛, 等. 双酚 A 对初断乳雄性大鼠生殖器官发育和精子生成的影响. *中国职业医学*, 2008, 35(1): 4 - 6.
- [10] Nagao T, Saito Y, Usumi K, et al. Low-dose bisphenol A does not affect reproductive organs in estrogen-sensitive C57BL/6N mice exposed at the sexually mature, juvenile, or embryonic stage. *Reprod Toxicol*, 2002, 16(2): 123 - 130.
- [11] Kato H, Furuhashi T, Tanaka M, et al. Effects of bisphenol A given neonatally on reproductive functions of male rats. *Reprod Toxicol*, 2006, 22: 20 - 29.
- [12] Toyama Y, Yuasa S. Effects of neonatal administration of 17 β -estradiol, β -estradiol 3-benzoate, or bisphenol A on mouse and rat spermatogenesis. *Reprod Toxicol*, 2004, 19(2): 181 - 188.
- [13] Noda S, Muroi T, Mitoma H, et al. Reproductive toxicity study of bisphenol A, nonylphenol, and genistein in neonatally exposed rats. *J Toxicol Pathol*, 2005, 18: 203 - 207.
- [14] Tyl R W, Myers C B, Marr M C, et al. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD prague-dawley rats. *Toxicol Sci*, 2002, 68: 121 - 146.
- [15] Goyal H O, Robateau A, Braden T D, et al. Neonatal estrogen exposure of male rats alters reproductive functions at adulthood. *Biol Reprod*, 2003, 68: 2081 - 2091.
- [16] Tando S, Itoh K, Yaoi T, et al. Effects of pre- and neonatal exposure to bisphenol A on murine brain development. *Brain and Dev*, 2007, 29(6): 352 - 356.
- [17] Kurebayashi H, Nagatsuka S, Nemoto H, et al. Disposition of low doses of 14C-bisphenol A in male, female, pregnant, fetal, and neonatal rats. *Arch Toxicol*, 2005, 79: 243 - 252.
- [18] Sharpe R M. The roles of oestrogen in the male. *Trends Endocrinol Metab*, 1998, 9: 371 - 377.
- [19] Toppari J, Larsen J C, Christiansen P, et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect*, 1996, 104: 741 - 803.
- [20] Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med*, 2006, 27(4): 299 - 402.
- [21] Hess R A, Zhou Q, Nie R, et al. Estrogens and epididymal function. *J Reprod Fertil Dev*, 2001, 13(4): 273 - 283.
- [22] Kuiper G, Carlsson B, Grandien K, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 1997, 138(3): 863 - 870.
- [23] Kuurana S, Ranmal S, Ben-Jonathan N. Exposure of

- newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression. *Endocrinology*, 2000, 141 (12): 4512–4517.
- [24] Monje L, Varayoud J, Luque E H, et al. Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor α transcripts with alternative 5' untranslated regions in the female rat preoptic area. *J Endocrinol*, 2007, 194: 201–212.
- [25] Lee K H, Hess R A, Bahr J M, et al. Estrogen receptor α has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules. *Biol Reprod*, 2000, 63 (6): 1873–1880.
- [26] Yang M, Ryu J H, Jeon R, et al. Effects of bisphenol A on breast cancer and its risk factors. *Arch Toxicol*, 2009, 3 (3): 281–285.
- [27] Jenkins S, Raghuraman N, Eltoum I, et al. Oral exposure to bisphenol A increases dimethylbenzanthracene-induced mammary cancer in rats. *Environ Health Perspect*, 2009, 117 (6): 910–915.
- [28] Diane M K, Sylvia C H, Kenneth S K, et al. Activation of a uterine insulin-like growth factor I signaling pathway by clinical and environmental estrogens: requirement of estrogen receptor- α . *Endocrinology*, 2000, 141 (9): 3430–3439.

重庆市蛇类新纪录——龙胜小头蛇

2009年6月24日,重庆市黔江区水市乡居民费智深在该乡海拔约1 000 m的风化石缝中采集到一条活蛇,经鉴定为龙胜小头蛇 (*Oligodon lungshenensis* Zheng and Huang, 1978),为重庆市蛇类新纪录。该标本现保存于重庆市清华中学校动物标本室。其主要特征记述如下。

该蛇 (CTS 20090624) 为雌性,全长 521 (459 + 62) mm;头较小,与颈区分不明显;吻鳞从头背可见甚多;没有鼻间鳞和颊鳞;眶前鳞 1 枚,眶后鳞 2 枚;颞鳞 2 + 2 枚;上唇鳞 6 枚 (2-2-2 式);下唇鳞 7 枚,第 4 枚最大,前 3 枚接前颌片;颌片 2 对;背鳞平滑,通体 15 行,鳞上有黑色细点;腹鳞 172 枚,肛鳞二分;尾下鳞 32 对;体尾背面棕褐色,有 4 条黑褐色纵纹自颈部通达尾末,另有 11 (9 + 2) 条镶黑边的波浪状宽横纹横跨纵纹;腹面中央为橘红色纵线纹,多数腹鳞和尾下鳞的两侧或一侧有黑色矩形斑。头背黄色,有 3 个紧密相连的栗褐色“ \wedge ”形斑,最后一个呈箭头形 (异于饰纹小头蛇的倒心形) 并与颈背 4 条黑褐色纵纹相连 (图 1)。

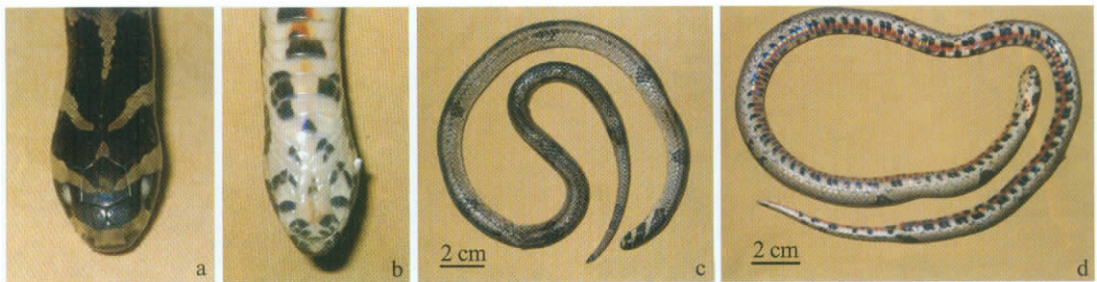


图 1 龙胜小头蛇 *Oligodon lungshenensis*

- a. 头部背面观 (示无鼻间鳞及 3 个相连的 \wedge 形斑); b. 头部腹面观 (示腹鳞上的矩形黑斑);
c. 整体背面观 (示镶黑边的波浪状宽横纹); d. 整体腹面观 (示腹面中央的橘红色纵线纹)。

(下转第 101 页)