

邻苯二甲酸二丁酯对大鼠不同器官 细胞 SOD 抑制作用的研究

王 萌 蔡风云 杨 旭

摘 要 目的 探讨邻苯二甲酸二丁酯(DBP)对不同组织器官的氧化损伤作用及其分子机制。方法 用 0 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、80 $\mu\text{mol/L}$ 的 DBP 溶液对大鼠 4 种脏器(肝脏、肺、睾丸、肾脏)细胞进行体外染毒 1h,测定染毒后几种脏器细胞中超氧化物歧化酶(SOD)的水平。结果 随着 DBP 染毒浓度的升高,大鼠各脏器细胞中 SOD 酶活性下降,且在 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时就与对照组的差异具有良好的统计学意义($P < 0.01$)。结论 DBP 能够对体外大鼠 4 种脏器(肝脏、肺、肾脏、睾丸)细胞造成以 SOD 抑制为特征的氧化损伤。

关键词 邻苯二甲酸二丁酯 氧化损伤 SOD

Suppression Effect of Di-n-butyl Phthalate *in vitro* on Superoxide Dismutase of Various Organs of Mice. Wang Meng, Cai Fengyun, Yang Xu. Hubei Key Lab of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Sciences, Huazhong Normal University, Hubei 430079, China

Abstract Objective The present study was conducted to study the oxidation damage effects of DBP on organs of mice and the molecular mechanisms of the effects. **Methods** The cells of the organs (liver, kidney, testis, lung) were exposed to different concentration of DBP (0 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 80 $\mu\text{mol/L}$) for one hour *in vitro*, and then the superoxide dismutase (SOD) activities of those cells of different organs were measured. **Results** With statistical significance, the SOD activities in liver, kidney, testis, lung cells were increased gradually with the increase of DBP concentrations. **Conclusion** The results suggested that DBP could induce the oxidative damage in liver, lung, kidney and testis cells of mice.

Key words Di-n-butyl phthalate (DBP); Oxidative damage; SOD

邻苯二甲酸酯类物质(PAEs)作为塑料的改性添加剂在增塑剂市场中占主导地位^[1],也应用于涂料、油漆、医疗产品、汽车玻璃、化妆品、杀虫剂等多种产品^[2]。由于 PAEs 类化合物作为增塑剂是以氢键或范德华力与塑料分子结合,因此在使用过程中,遇水或有机溶剂时极易被释放出来,造成对环境的污染^[3]。由于 PAEs 类化合物被广泛使用,目前已经对大气、土壤、水体、动植物造成污染,成为地球上最为广泛的污染物之一^[4]。经欧盟委员会认定,PAEs 属于致癌物质、可诱导有机体突变物质和再生有毒物质,可通过呼吸、饮食和皮肤接触等途径进入人和动物体内^[5]。经实验证明,该类物质急性毒性不大,对 Ames 实验呈阴性反应;亚急性毒性主要表现为肝脏、肾脏、生殖器官的损伤,具有类雌激素作用,是一类典

型的环境内分泌干扰物^[6,7]。

邻苯二甲酸二丁酯(DBP)是 PAEs 类化合物的一种。在动物实验中,DBP 可经肾脏代谢而转化成 MBP,可以莱氏细胞和睾丸支持细胞为靶细胞,从而造成生殖发育毒性^[8]。同时有研究表明,DBP 可对斑马鱼的肝脏产生不良影响,如过氧化作用等^[9]。根据 DBP 的暴露途径,本实验选择肝脏、肾脏、肺、睾丸为研究对象,利用不同浓度的 DBP 溶液对大鼠不同脏器细胞进行体外染毒,检测肝脏细胞、睾丸细胞、肺细胞、肾脏细胞中超氧化物歧化酶的活性,研究 DBP 对机体产生的氧化应激作用,为全面探讨 DBP 毒性的分子机制提供实验证据。

材料与方法

1. 实验仪器: μQuant 连续波长酶标仪(Bio-teck),三用电热恒温水箱,超声仪,超净工作台,显微镜,细胞计数板,涡旋器等。

2. 主要试剂:邻苯二甲酸二丁酯(天津市恒兴化学试剂制造有限公司),纯度 99.0%,其他试剂均为国产分析纯。

3. 实验动物:研究所用的动物为 SPF 级 Wistar 大鼠,体重

基金项目:国家科技支撑计划项目(2006BAI19B05)

作者单位:430079 武汉,华中师范大学生命科学学院湖北省遗传调控和整合生物学重点实验室

通讯作者:杨旭,电子信箱:yangxu@mail.ccnu.edu.cn

150 ~ 180g, 购自湖北省预防医学科学院实验动物中心。

4. 实验方法: ①将 Wistar 大鼠脱颈致死, 迅速取出所需器官(肝脏、肾脏、肺、睾丸)。用冰的生理盐水洗去各器官中的浮血后, 用眼科剪将其剪成糜状(约 1mm^3 的组织块), 4 层擦镜纸过滤, 收集细胞悬液母液; 通过细胞计数, 将细胞悬液密度调整为 $10^6 \sim 10^7$ 个/毫升。取 24 支 1.5ml 的离心管, 分为 4 组, 即每组 6 个平行样。每管各加入 0.5 ml 的细胞悬液和 0.5ml 不同浓度的 DBP 溶液(对照组加入 0.5ml 的生理盐水), 使得各组 DBP 终浓度分别为 $0\mu\text{mol/L}$ 、 $5\mu\text{mol/L}$ 、 $20\mu\text{mol/L}$ 、 $80\mu\text{mol/L}$, 置于 37°C 的水浴锅中孵育 1h; ②超氧化物歧化酶(SOD)含量的测定参照唐学玺等的方法(NBT 法)^[10]略作修改, 其原理是: 超氧化物歧化酶通过抑制氮蓝四唑(NBT)在光下的还原作用来确定酶活性大小, 即还原反应后, 反应液蓝色愈深说明酶活性愈低, 反之酶活性愈高。将染毒结束后的样品置于 -20°C 下冻融一次、反复超声 5 次使细胞破裂, 得到酶液。取 10ml 试管, 各管依次加入 130mmol/L

L 甲硫氨酸(MET)溶液 1.2ml, $100\mu\text{mol/L}$ 乙二胺四乙酸二钠($\text{EDTA} - \text{Na}_2$)溶液 0.24ml, $750\mu\text{mol/L}$ NBT 溶液 0.24ml, 染毒组各加入 0.3ml 酶提取液, 对照组加 0.3ml 生理盐水, 然后加入 1.2ml $20\mu\text{mol/L}$ 核黄素。混匀后将一支对照管置于暗处, 其他各管置于 4000lx 日光灯下反应 20min。反应结束后, 于 560nm 波长下测定吸光值, 按照公式: $\text{SOD Activity} = [(A_{\text{CK}} - A_0) \times V_1] / A_{\text{CK}} \times 50\% \times V_0 \times M$ 计算出 SOD 活性:(式中 A_{CK} : 对照管的吸光度; A_0 : 样品反应液的吸光度; V_1 : 反应液体积; V_0 : 加入反应液中的酶液体积; M : 蛋白质含量); ③蛋白含量测定: 按 Lowry 法测定, 标准蛋白采用牛血清蛋白; ④统计学分析: 用 SPSS10.0 软件对实验数据进行 ANOVA 分析, 用 t -检验法对染毒组与对照组的差异进行检验。

结 果

用不同浓度 DBP 溶液对大鼠肝脏、肾脏、睾丸、肺细胞体外染毒 1h 后, SOD 含量变化见图 1。

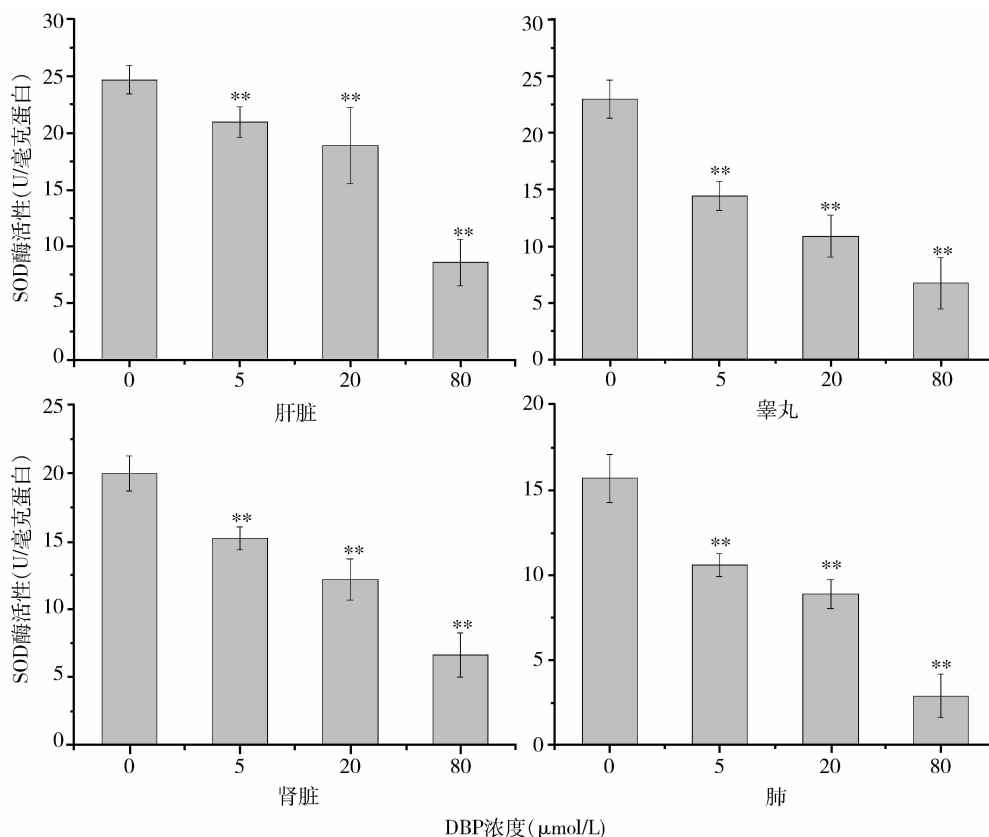


图 1 DBP 染毒致 Wistar 大鼠各脏器细胞 SOD 酶活的变化

$n = 5$, $P < 0.01$, 肝脏: $F = 50.7$; 睾丸: $F = 70.4$; 肾脏: $F = 84.7$; 肺: $F = 115.83793$; 与对照组相比, ** $P < 0.01$

讨 论

邻苯二甲酸酯的大量生产和消费使得人类 DBP 的暴露程度日益严重^[10]。目前, DBP 的暴露所引起的睾丸萎缩、附睾发育不全、曲细精管变性萎缩、生精上皮变薄、隐睾、尿道下裂等雄性生殖系统损害等均

有研究。由于现有研究不足以证明 DBP 具有致突变性、遗传毒性和致癌性^[11], 所以, 对于 DBP 毒性的分子机制还需进一步研究。

外源化合物通过多种途径进入机体后引起各种毒性效应的分子机制主要有: 自由基与氧化损伤、外

源性化合物共价结合、细胞钙稳态紊乱。其中,自由基与氧化损伤机制源于生物体在正常生理生化反应过程中,细胞通过多种途径产生了过多的自由基。自由基通常是指活性氧族(reactive oxygen species, ROS),主要包括超氧阴离子自由基(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($\cdot OH$)和一些含氧的非自由基衍生物。机体内自由基清除系统包括化学清除剂和酶促清除系统,其中非酶类化学清除剂主要有谷胱甘肽和维生素 E,抗氧化酶类主要有超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶等。正常代谢时,自由基清除系统会清除多余的自由基,防止自由基进一步攻击脂质、蛋白质和 DNA^[12]。

细胞内最先形成的 ROS 是超氧阴离子(O_2^-),超氧阴离子继而被转化成羟自由基($\cdot OH$),羟自由基($\cdot OH$)是一种活性最高的活性氧^[13]。而超氧化物歧化酶(SOD)可以催化 O_2^- 产生 H_2O_2 ,从而抑制了 O_2^- 向 $\cdot OH$ 的转化。因此,SOD 不仅是抗氧化损伤的第一道防线,也是唯一一种可以催化该反应的酶,是抗氧化系统中的关键酶。研究表明,多种邻苯二甲酸酯类化合物可以通过增加氧浓度或是降低抗氧化酶的活性产生不利影响^[14]。在本研究中,用不同浓度的 DBP 对大鼠各脏器细胞进行体外急性染毒,在 $5\mu mol/L$ 浓度时,SOD 酶活性就与对照组有统计学意义差异($P < 0.01$),且随着 DBP 浓度的升高而上升,表明 DBP 可导致大鼠各脏器细胞 SOD 酶活性降低,具有显著的氧化损伤作用,从而验证了 DBP 是通过降低 SOD 酶的活性来破坏抗氧化损伤系统,继而使细胞产生损伤。根据本实验室前期工作报告,DBP 可导致大鼠肝脏细胞膜脂质过氧化加剧,DNA-蛋白质交联水平上升^[15],故可以推断,DBP 的急性氧化损伤作用可能是通过抑制 SOD 酶活性,从而对脂质和 DNA 等产生进一步的损伤。

参考文献

- 1 Chang BV, Wang TH, Yuan SY. Biodegradation of four phthalate esters in sludge. *Chemosphere*, 2007, 69:1116-1123
- 2 Marsee K, Woodruff TJ, Axelrad DA, *et al.* Estimated daily phthalate exposure in a population of mothers of male infants exhibiting reduced anogenital distance. *Environmental health perspectives*, 2006, 114(6):805-809
- 3 郑文芝,周勇强,张霖霖. PVC 塑料制品中增塑剂 PAEs 在水环境中迁移规律的研究. *广东化工*, 2006, 33(3):29-30
- 4 Gomez-Hens A, Aguilar-Caballero MP. Social and economic interest in the control of phthalic acid esters. *Trends in analytical chemistry*, 2003, 22:847-857
- 5 吕怡兵,付强. 环境中邻苯二甲酸酯类物质的污染现状与监测方法. *中国环境监测*, 2007, 23(5):66-70
- 6 Louis J, Guillette JR. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in florida. *Environmental health perspectives*, 1994, 102(8):680-688
- 7 Harris CA, Henttu P, Parker MG, *et al.* The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environmental health perspectives*, 1997, 105(8):802-811
- 8 David RM. Proposed mode of action for in utero effects of some phthalate esters on the developing male reproductive tract. *Toxicologic pathology*, 2006, 34(3):209-219
- 9 Ortiz-Zarragoitia M, Trant JM, Cajaravillet MP. Effects of dibutylphthalate and ethynylestradiol on liver peroxisomes, reproduction, and development of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and chemistry*, 2006, 25(9):2394-2404
- 10 Schettler T. Human exposure to phthalates via consumer products. *Int J Androl*, 2006, 29(1):134-139
- 11 张蕴晖,林玲,阚海东,等. 邻苯二甲酸二丁酯的人群综合暴露评估. *中国环境科学*, 2007, 27(5):651-656
- 12 夏世钧,吴中亮. 分子毒理学基础. 武汉:湖北科学技术出版社, 2001:84-87
- 13 Kehrner JP, The Haber. Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 2000, 149:43-50
- 14 Lee E, Ahn MY, Kim HJ, *et al.* Effect of di(n-butyl) phthalate on testicular oxidative damage and antioxidant enzymes in hyperthyroid rats. *Environmental toxicology*, 2007, 22(3):245-255
- 15 蔡凤云,王萌,王婧,等. 邻苯二甲酸二丁酯对体外大鼠肝脏细胞的氧化损伤作用. *公共卫生与预防医学*, 2009, 20(4):4-7

(收稿:2009-12-30)

更正启事:发表于 2010 年《医学研究杂志》第 39 卷第 3 期第 14~16 页作者应乐安的论文《鼻窦和中耳气压性损伤的发病机制及相关研究》参考文献编排有误,现更正如下:第 14 页中角标 5 及整句话应该删掉,角标 6、7、8、9、10、11 应为角标 5、6、7、8、9、10,第 15 页角标 12 和“1944 年,Teed[13]……”中的角标 13 以及整段文字都应该删掉。第 15 页中右侧下面数第 12 行,“文献[14]~[17]所报道的”应改为“文献[11]~[12]所报道的”,第 16 页角标 18~23 及相关文字内容应该删掉,角标 24、25、26、27、28 应改为 14、15、16、17、18。另外,文章最后一段中倒数第 7 行开始遗忘标注角标了,应该是对应参考文献中的[19]~[22]。第 16 页论文后面的参考文献 23~28 删除。特此更正。