

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20180524001

张也, 李崇尧, 刘蕾, 等. 增塑剂邻苯二甲酸二异癸酯致小鼠肺组织氧化损伤作用[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(6): 242-249

Zhang Y, Li C Y, Liu L, et al. Oxidative damages induced by plasticizer diisodecyl phthalate in lung tissue of mice [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(6): 242-249 (in Chinese)

增塑剂邻苯二甲酸二异癸酯致小鼠肺组织氧化损伤作用

张也, 李崇尧, 刘蕾, 杨湘梅, 向先兰, 宋鹏, 武阳, 晏彪, 马萍*

湖北科技学院基础医学院 环境-免疫与神经系统疾病实验室, 咸宁 437100

收稿日期: 2018-05-24 录用日期: 2018-09-03

摘要: 探究邻苯二甲酸二异癸酯(diisodecyl phthalate, DIDP)对小鼠肺组织的氧化损伤。以 BALB/c 小鼠为受试动物, 随机分为 7 组, 包括 1 个阴性对照组(生理盐水), 4 个 DIDP 染毒组(0.15, 1.5, 15, 150 mg·kg⁻¹), 1 个维生素 E(100 mg·kg⁻¹)组和 1 个高剂量 DIDP(150 mg·kg⁻¹)加维生素 E(100 mg·kg⁻¹)组, 灌胃染毒 14 d。处死小鼠, 制备肺组织匀浆样品, 以化学荧光法检测活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量, 以分光光度试剂盒法检测还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)的含量、以硫代巴比妥酸(TBA)法检测丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量、以酶联免疫吸附(EILSA)试剂盒法检测 8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-deoxyguanosine, 8-OHdG)的含量, 同时观察肺组织的病理变化与荧光染色结果。随着 DIDP 染毒剂量的升高, 肺组织的 ROS、MDA、8-OHdG 含量逐渐上升, GSH 含量逐渐降低, 各指标呈一定的剂量-效应关系。染毒剂量为 15 mg·kg⁻¹时, ROS、GSH、8-OHdG 含量差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 染毒剂量为 150 mg·kg⁻¹时, 上述指标差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。小鼠肺组织 H&E 染色和荧光染色观察结果表明, 随着 DIDP 染毒剂量的增加, 小鼠肺细胞的病理损伤越严重。与 150 mg·kg⁻¹ DIDP 剂量组比较, 150 mg·kg⁻¹ DIDP+维生素 E 组的 ROS、MDA 和 8-OHdG 含量均有下降, GSH 含量上升($P < 0.05$, $P < 0.01$); 小鼠肺组织病理损伤减轻。以上结果说明, 较高剂量(≥ 15 mg·kg⁻¹)的 DIDP 能造成小鼠肺组织的氧化损伤, 维生素 E 对其损伤有拮抗作用。

关键词: 邻苯二甲酸二异癸酯; 活性氧; 还原型谷胱甘肽; 丙二醛; 8-羟基脱氧鸟苷; 氧化损伤

文章编号: 1673-5897(2018)6-242-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Oxidative Damages Induced by Plasticizer Diisodecyl Phthalate in Lung Tissue of Mice

Zhang Ye, Li Chongyao, Liu Lei, Yang Xiangmei, Xiang Xianlan, Song Peng, Wu Yang, Yan Biao, Ma Ping*

Lab of Environment-immunological and Neurological Diseases, School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China

Received 24 May 2018 accepted 3 September 2018

Abstract: This study investigates the oxidative damage induced by diisodecyl phthalate (DIDP) on mouse lung tissue. BALB/c mice are randomly classified into seven groups and orally administered with drugs daily for fourteen days. Those groups include one solvent control group (normal saline), four diisodecyl phthalate groups, one vitamin

基金项目: 湖北省大学生创新训练计划项目(201710927028); 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目(T201717); 湖北省卫生计生委重点支撑项目(WJ2017Z027)

作者简介: 张也(1997-), 女, 本科生, 研究方向为环境毒理学, E-mail: 913732088@qq.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: mping68@126.com

E (100 mg·kg⁻¹) group and one high dose DIDP (150 mg·kg⁻¹) plus vitamin E (100 mg·kg⁻¹) group. The exposure doses of diisodecyl phthalate groups are 0.15, 1.5, 15 and 150 mg·kg⁻¹ respectively. The content of reactive oxygen species (ROS) is detected by chemiluminescence method in mice lung tissue homogenate samples. The content of reduced glutathione (GSH) is measured by spectrophotometric kit. The content of malondialdehyde (MDA) was determined by barbituric acid (TBA) method and the content of 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (EILSA) kit. At the same time, the pathological changes and fluorescent staining results of lung tissue are observed. With the increase of DIDP dose, the contents of ROS, MDA and 8-OHdG in lung tissue increase gradually, and the content of GSH decreases gradually. Each indicator has a certain dose-effect relationship. In the 15 mg·kg⁻¹ exposure group, the contents of ROS, GSH and 8-OHdG are higher compared with the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the high-dose exposure groups, the differences of the above indicators are all statistically significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). H&E staining and fluorescence staining of mouse lung tissue shows that the pathological damage of mouse lung cells are more serious with the increase of DIDP dose. Compared with the 150 mg·kg⁻¹ DIDP dose group, the levels of ROS, MDA and 8-OHdG in the 150 mg·kg⁻¹ DIDP+vitamin E group are lower while that of the GSH content is increasing ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and tissue damage is alleviated. The above results indicate that high dose (≥ 15 mg·kg⁻¹) of DIDP can cause oxidative damage in mouse lung tissue, whereas, vitamin E has antagonistic effect on the damage.

Keywords: diisodecyl phthalate; reactive oxygen species; glutathione; malonaldehyde; 8-hydroxydeoxyguanosine; oxidative damage

邻苯二甲酸酯(phthalic acid esters, PAEs),又称为酞酐酯,是一大类脂溶性化合物,一般为无色透明的油状粘稠液体,难溶于水,不易挥发,凝固点低,易溶于甲醇、乙醇、乙醚等有机溶剂,并且有毒性,其用途主要是增塑剂^[1-2]。邻苯二甲酸二异癸酯(diisodecyl phthalate, DIDP)与邻苯二甲酸二乙基己酯(di-(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP)、邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)都属于邻苯二甲酸酯^[2],但因前者碳链较长,相对分子质量较大,沸点高,毒性较小,由其添加应用的增塑剂,更适合于做增塑剂,常被通俗地称为环保型增塑剂^[3-4]。

流行病学研究指出,长期接触含 DIDP 的聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)玩具、吸食室内灰尘和空气的儿童,仍有较高的健康风险^[5],而且在人体尿液中已检测出了 DIDP 的一些代谢物^[6]。动物实验研究表明,DIDP 虽然对实验动物具有低毒性,但仍可引起肝脏肿大,促进过氧化物酶体的增生^[7]。肺是人体的呼吸器官,也是人体重要的造血器官,一方面人体可经肺吸入室内灰尘和空气而直接接触 DIDP,另一方面,通过接触玩具而摄入的 DIDP 极有可能经肝脏代谢后作用于肺脏^[4]。目前,国内有关 DIDP 对小鼠肺组织的影响研究并不多见。

已有研究报道,DIDP 的同系物邻苯二甲酸二异壬酯(diisononyl phthalate, DINP)可以造成小鼠肺

细胞氧化损伤^[8],维生素 E(vitamin E, VitE)在小鼠肺组织氧化损伤中具有拮抗作用^[9]。因此本研究以无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性 BALB/c 小鼠为实验对象,以不同剂量 DIDP 作为暴露物, VitE 为拮抗剂,通过检测肺组织匀浆测定活性氧(ROS)、还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)的含量,并同时观察肺组织的病理变化与荧光染色结果,探讨 DIDP 致小鼠肺组织氧化损伤及 VitE 的拮抗作用,以期为全面评估 DIDP 的毒性效应及分子机制提供参考。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

1.1.1 主要仪器与试剂

Power wave XS 酶标仪(美国 Bio-Tek 仪器有限公司), FLx 800 荧光酶标仪(美国 Bio-Tek 仪器有限公司), Olympus BX-53 荧光正置显微镜(日本 Olympus 公司), 5415R 低温冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司), RM2245 切片机(德国 LEICA 公司), HH-42 三用电热恒温水箱(长源实验仪器厂,北京); DCFH-DA 荧光染料(>99.9%, Sigma 公司), Hoechst 33258 荧光染料(>99.9%, Sigma 公司), 蛋白酶 K(Sigma 公司), 小鼠 GSH 试剂盒、8-OHdG 鸟苷 ELISA 检测试剂盒(济南朋远生物技术有限公司), 硫代巴比妥酸(TBA, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 邻苯

二甲酸二异癸酯(DIDP, $\geq 99\%$, Sigma 公司)。

1.1.2 实验动物

选用湖北省实验动物研究中心提供的雄性 BALB/c 小鼠 70 只, 饲养 1 周后实验, 实验过程中, 小鼠饲养于笼内, 保持温度在 20 ~ 25 °C 内, 笼内相对湿度为 50% ~ 70%, 以商业鼠粮饲养小鼠, 及时补充饮用水, 并避免其接触其他干扰致病源, 小鼠可自由进食进水。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组和染毒

70 只 BALB/c 小鼠随机分为 7 组, 包括 1 个阴性对照组、4 个 DIDP 染毒组(0.15、1.5、15、150 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、1 个拮抗剂 VitE 组, 1 个 150 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DIDP + 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ VitE 处理组。每组 10 只。每组均经口灌胃给予, 灌胃量为 10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天一次, 连续染毒 14 d, 分别于实验前称小鼠体重并记录。

1.2.2 肺组织切片的制备和观察

染毒结束后用颈椎脱臼法处死小鼠, 立即取肺组织, 肺组织用 4% 的多聚甲醛固定, 常规脱水, 石蜡切片, 苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)染色, 普通光学显微镜下观察肺组织的病理组织学变化。

1.2.3 肺组织荧光染色

称取 Hoechst 33258 试剂 1 mg, 用 20 mL 蒸馏水溶解后, 过滤, 4 °C 避光保存。使用时, 用 10 倍的蒸馏水稀释成染色液, 工作浓度为 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。常规包埋切片后, 脱蜡, 透明; 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)或 0.9% 生理盐水洗 2 遍, 每次 3 min, 吸尽液体, 手动晃动数次; 加入 0.5 mL Hoechst 33258 染色液, 染色 5 min; 用 PBS 或 0.9% 生理盐水洗 2 遍, 每次 3 min; 将切片置于载玻片上, 滴一滴抗淬灭封片液, 盖上一洁净的盖玻片, 尽量避免产生气泡, 然后用 Olympus BX-53 荧光显微镜观察。

1.2.4 肺组织匀浆和悬液的制备

将肺组织在冰冷的 PBS(pH7.5)中漂洗, 滤纸拭干, 给肺组织加 PBS 制成 10% 匀浆液, 低温离心后取上清, 用于 ROS、GSH、MDA 和 8-OHdG 的检测。

1.2.5 ROS 含量的测定

取上清液 4 μL , 加入 396 μL PBS 作 100 倍稀释。取 100 μL 稀释液于酶标板中排列, 并加入 100 μL 荧光染料 2,7-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)

染色, 避光反应 5 min, 用荧光酶标仪检测。

1.2.6 蛋白质含量和 GSH 含量的测定

蛋白质含量按照 Folin 酚法测定, GSH 含量的测定严格按照试剂盒操作说明进行。GSH 含量($\mu\text{mol} \cdot \text{g} \text{ prot}^{-1}$) = [(测定 OD 值 - 空白 OD 值) / (标准 OD 值 - 空白 OD 值)] × 标准管浓度 × 样本稀释倍数 ÷ 待测匀浆蛋白浓度($\text{g} \text{ prot} \cdot \text{L}^{-1}$)。

1.2.7 MDA 含量的测定

取 500 μL 上清液于试管中, 并加入 2 mL 0.6% 2-硫代巴比妥酸(2-thiobarbituric acid, TBA), 沸水浴 15 min。取上清 1 mL 于 EP 管中, 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。取上清 100 μL 于酶标板中排列, 用全波长酶标仪检测, 分别在 450、532、600 nm 波长下测定吸光值(以加 PBS 的为参照), 按照公式计算 MDA 浓度($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) = 6.45(A532 - A600) - 0.56A450, 式中 A 为吸光度。

1.2.8 8-OHdG 含量的测定

8-OHdG 含量的测定严格按照试剂盒操作说明进行。以 0、3、6、12、24、48 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 等标准品浓度为横坐标, 450 nm 处 OD 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 根据标准曲线来确定样品中 8-OHdG 的含量。

1.3 统计分析

实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 12.0 统计分析软件进行统计分析, 多组间均数比较使用单因素方差分析(ANOVA), 然后使用 LSD-t 检验比较 2 组间均数的差异性, $P < 0.05$, 表示差异具有统计学意义。

2 结果(Results)

2.1 小鼠肺组织形态的光镜观察结果

结果如图 1 所示: 空白对照组肺组织结构正常, 肺泡腔结构完整, 肺泡壁清晰可见, 肺泡间隔未见明显毛细血管扩张; 0.15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DIDP 组肺组织结构轮廓清晰, 肺泡腔基本完整, 干净透亮。肺泡壁稍增宽, 肺泡间隔细胞轻度增生, 肺间隔毛细血管可见不连续轻度扩张; 1.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DIDP 组肺组织结构轮廓可以区分, 肺泡腔结构基本存在, 但受压扭曲肺泡壁明显增宽, 肺泡间隔细胞大量增生, 肺间隔毛细血管若隐若现不呈连续状分布, 提示有的血管受压受损, 有的血管尚可见; 15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DIDP 组肺组织结构改变, 肺泡腔结构基本存在, 但明显变小, 腔大小不等, 少量红细胞漏出, 肺泡壁明显增宽增厚, 肺泡隔细胞大量增生明显, 肺组织内血管扩张充血, 肺泡壁未见毛细血管, 见少量红细胞, 提示血管受压破

损;150 mg·kg⁻¹ DIDP 组肺组织结构难以辨认,肺泡腔大小不一,腔内可见散落不均的红细胞,肺泡壁弥漫性增宽,肺泡隔细胞大量增生,肺组织内血管扩张充血,肺泡间隔未见毛细血管,但见红细胞,提示明显出血,血管损伤严重。与空白对照组相比较,100 mg·kg⁻¹ VitE 组肺组织结构和细胞形态正常,而 100 mg·kg⁻¹ VitE+150 mg·kg⁻¹ DIDP 组肺组织结构轮廓基本可见,但不规则,肺泡腔大小不一,基本能分辨肺泡壁,但宽窄不均,细胞增生不均,部分肺泡壁增厚,部分断裂,肺组织内血管扩张充血明显,可见肺泡壁毛细血管扩张。

2.2 小鼠肺组织的荧光染色观察结果

由 Hoechst 荧光染料 33258 染色的细胞核呈蓝色,细胞质及其他组织呈绿色。如图 2 所示,对照组中细胞核大多数呈圆形或椭圆形、淡蓝色、视野内细

胞核分布密集,肺泡腔结构基本完整;0.15 mg·kg⁻¹ DIDP 组中,细胞核大多数呈椭圆形、淡蓝色,且细胞核分布较为密集,但肺泡壁增宽;1.5 mg·kg⁻¹ DIDP 组中,细胞核大多数呈椭圆形,开始缩小,呈蓝色,有明显的蓝色颗粒,细胞核内突显凋亡小体,肺泡壁明显增宽,受压扭曲;15 mg·kg⁻¹ DIDP 组中,细胞核大多数不规则,开始变形,呈亮蓝色,细胞核内凋亡小体明显增多,肺组织结构基本存在,明显变小;150 mg·kg⁻¹ DIDP 组中,细胞核稍显畸形,不规则,出现细胞核边集,呈亮蓝色,且细胞核内凋亡小体十分密集,肺组织结构血管不规则,扭曲变形;150 mg·kg⁻¹ DIDP+VitE 组与 150 mg·kg⁻¹ DIDP 组相比,细胞核大多数呈椭圆形,颜色改变为蓝色,细胞核内凋亡小体减少,且肺泡壁相对变窄,说明 VitE 能起到一定的保护作用。

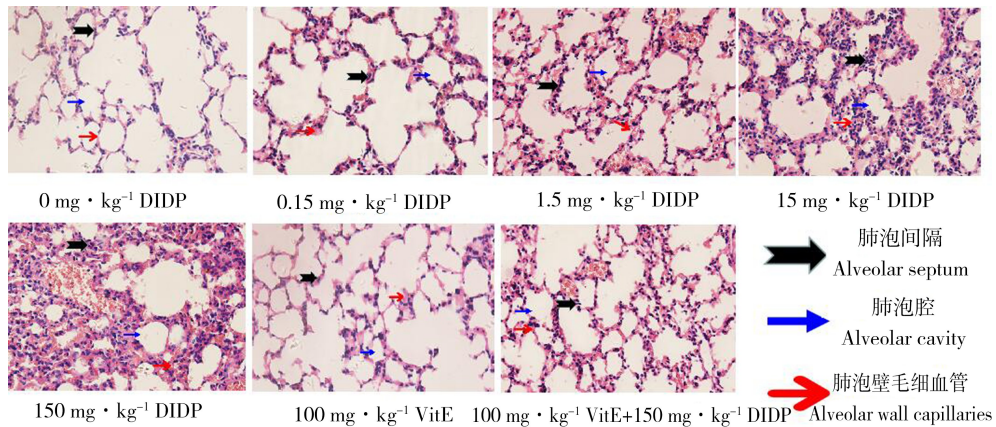


图 1 邻苯二甲酸二异癸酯 (DIDP) 不同处理组小鼠肺组织 H&E 染色结果 (10×40)

Fig. 1 H&E staining of lung tissue in different treatment groups of diisodecyl phthalate (DIDP) (10×40)

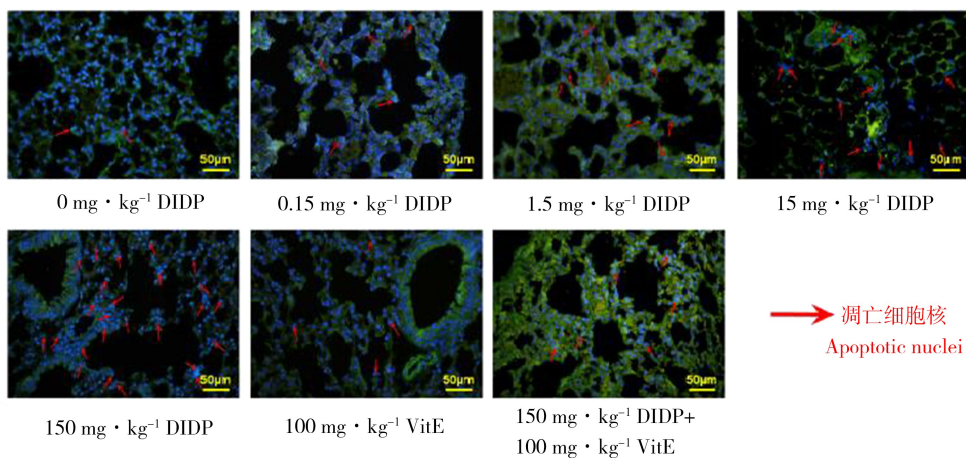


图 2 DIDP 不同处理组小鼠肺组织荧光染色结果 (10×40)

Fig. 2 Fluorescence staining of lung tissue in different treatment groups of DIDP (10×40)

2.3 小鼠肺组织 ROS 含量的变化

ROS 含量是反映机体氧化应激水平的指标,图 3 可见不同处理组肺组织的 ROS 含量的变化,随着染毒剂量的增多,ROS 含量逐渐上升,呈一定的剂量-效应关系。与对照组比较,较高剂量的 DIDP 能造成 ROS 含量的上升。与单独 150 mg·kg⁻¹ 的 DIDP 组比较,150 mg·kg⁻¹ DIDP+100 mg·kg⁻¹ VitE 组的 ROS 含量显著下降。

2.4 小鼠肺组织 GSH 含量的变化

GSH 是谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)催化过氧化物还原的必需底物,可反映机体抗氧化应激的水平,由图 4 可以看出随着 DIDP 染毒剂量的升高,GSH 含量逐渐下降,呈一定的剂量-效应关系。与对照组比较,0.15、1.5 mg·kg⁻¹ 剂量组差异无统计学意义,15、150 mg·kg⁻¹ 剂量组差异有统计学意义($P < 0.01$)。在较高剂量的 DIDP 作用下,小鼠肺的 GSH 含量下降明显。与 150 mg·kg⁻¹ DIDP 组比较,150 mg·kg⁻¹ DIDP+100 mg·kg⁻¹ VitE 组的 GSH 含量显著上升。

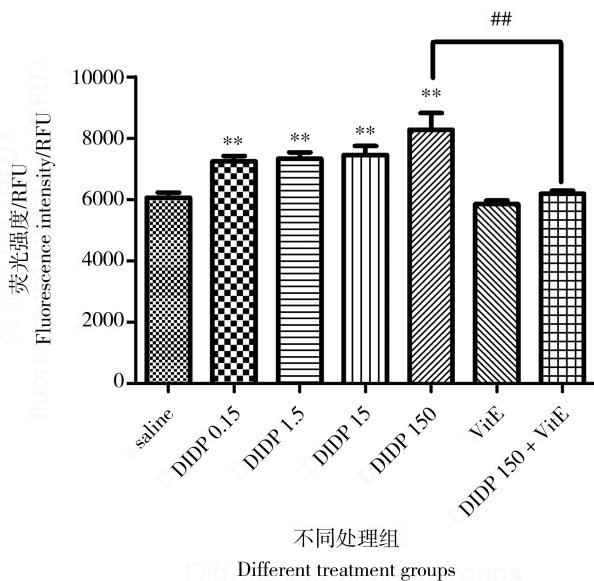


图 3 不同处理组小鼠肺组织 ROS 含量

注:图中 DIDP 的浓度单位为 mg·kg⁻¹,下同;

** $P < 0.01$,与对照组相比较;## $P < 0.01$,与 150 mg·kg⁻¹ DIDP+100 mg·kg⁻¹ VitE 组比较。

Fig. 3 ROS content in mouse lung of different groups

Note: The concentration unit of DIDP in the figure is mg·kg⁻¹.

** $P < 0.01$, compared with the control group; ## $P < 0.01$, compared with the 150 mg·kg⁻¹ DIDP+100 mg·kg⁻¹ VitE group.

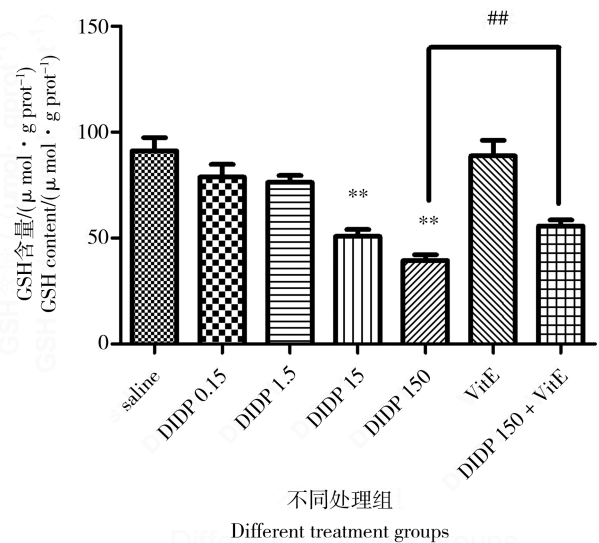


图 4 不同处理组小鼠肺组织 GSH 含量

注:** $P < 0.01$,与对照组相比较;## $P < 0.01$,与 150 mg·kg⁻¹ DIDP+100 mg·kg⁻¹ VitE 组比较。

Fig. 4 GSH content in mouse lung of different groups

Note: ** $P < 0.01$, compared with the control group; ## $P < 0.01$,

compared with the 150 mg·kg⁻¹ DIDP+100 mg·kg⁻¹ VitE group.

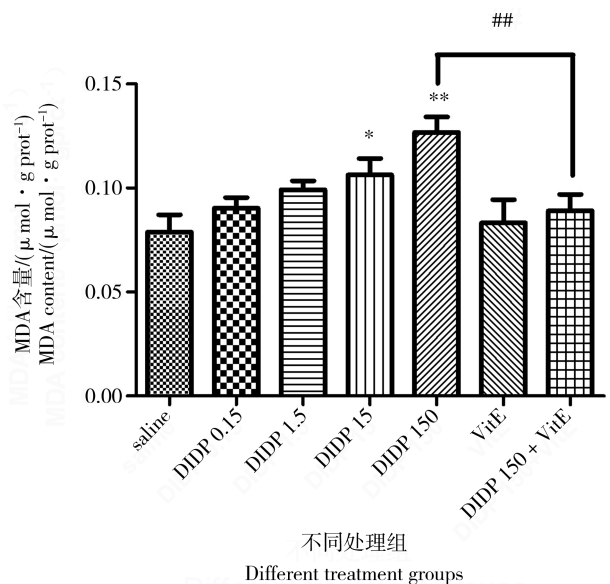


图 5 不同处理组小鼠肺组织 MDA 含量

注:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,与对照组相比较;## $P < 0.01$,与 150 mg·kg⁻¹ DIDP+100 mg·kg⁻¹ VitE 组比较。

Fig. 5 MDA content in mouse lung of different groups

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the control group;

$P < 0.01$, compared with the 150 mg·kg⁻¹ DIDP+100 mg·kg⁻¹ VitE group.

2.5 小鼠肺组织 MDA 含量的变化

脂质过氧化反应的主要代谢产物是 MDA,其反映的是脂质的过氧化作用。由图 5 可见,与对照组比较,不同剂量的 DIDP 均能使小鼠肺 MDA 含量有不同程度的升高。0.15、1.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组差异无统计学意义,15、150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),这表明小鼠肺组织已受到损伤。与单独 150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 DIDP 组比较,150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DIDP+100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ VitE 组的 MDA 含量显著下降。

2.6 小鼠肺组织 8-OHdG 含量的变化

不同处理组肺组织的 8-OHdG 含量的变化见图 6。与对照组比较,不同剂量的 DIDP 能使小鼠肺 8-OHdG 含量有不同程度的升高。0.15、1.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组差异无统计学意义,15、150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),在较高剂量的 DIDP 作用下,小鼠肺组织的 8-OHdG 含量升高明显。与单独 150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 DIDP 组比较,150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DIDP+100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ VitE 组的 8-OHdG 含量显著下降。

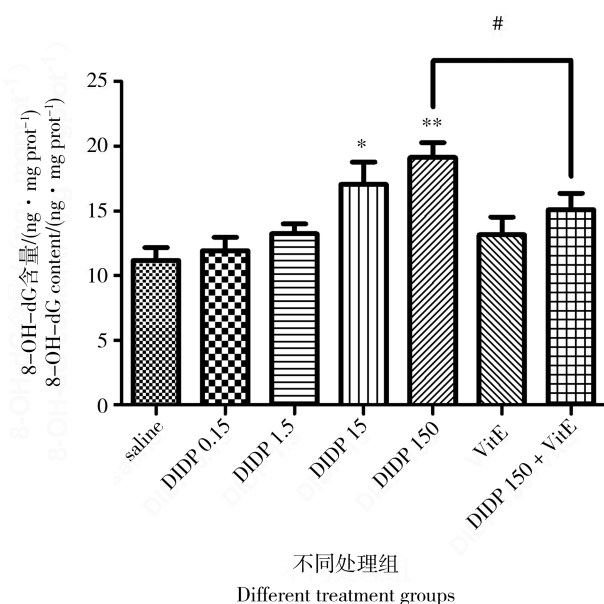


图 6 不同处理组小鼠肺组织 8-OHdG 含量

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组相比较; # $P < 0.05$,

与 150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DIDP+100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ VitE 组比较。

Fig. 6 8-OHdG content in mouse lung of different groups

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the control group;

$P < 0.05$, compared with the 150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DIDP+

100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ VitE group.

3 讨论 (Discussions)

DIDP 可通过饮食摄入、呼吸道吸入和皮肤接触等途径进入人体,其中饮食摄入是普通人群接触 DIDP 的最主要途径^[4]。有研究指出,邻苯二甲酸酯可经消化道吸收进入血液循环到达肺脏^[8]。本研究中病理学观察结果显示,随着 DIDP 染毒剂量的升高,小鼠肺组织出现不同程度的病理损伤,尤其 150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DIDP 组肺组织结构难以辨认,肺泡腔大小不一,肺泡壁弥漫性增宽,肺泡间隔细胞大量增生,提示较高剂量 DIDP 可对肺实质部的肺泡和肺泡囊造成损伤,而肺泡是气体交换的主要功能单位,对肺泡细胞的损伤将直接影响肺功能。此外,通过 Hoechst 33258 荧光染色分析结果表明,当 DIDP 的染毒浓度达到 15 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 以上时,细胞核开始变形,核由于浓集由淡蓝色逐渐变为亮蓝色,或核呈分叶、碎片状,肺组织结构发生改变。这提示较高剂量的 DIDP 可对肺组织结构造成一定的损伤。

Ma 等^[10]的研究表明,氧化应激可能是邻苯二甲酸酯致相关疾病和毒理作用的重要机制之一,其原因在于:人和动物机体内由于细胞呼吸和能量代谢时刻发生着有氧氧化,在细胞中产生活性氧分子(ROS)。而肺是直接暴露于高氧环境中的唯一器官,肺泡部分的氧分压要比心、肝、脑等其他脏器要高得多,更易导致氧化应激。氧化应激分子能够对生物大分子如蛋白质、脂质、核酸等造成损伤,引发肺组织细胞凋亡、肺部炎症反应,进而表现出各种病理学改变。

ROS 在线粒体氧化代谢过程中产生,是反映细胞内氧自由基水平的主要指标^[11]。ROS 在机体正常代谢状态下含量很低,但当细胞受到内外环境的刺激后,ROS 产生增多,过量的 ROS 会使细胞内氧化与抗氧化不平衡,从而导致氧化应激的发生^[12]。谷胱甘肽(GSH)是维持细胞氧化还原状态重要的巯基氧化还原反应系统。还原型的 GSH 是 ROS 的主要清除剂,它的消耗能反映机体的受氧化损伤程度^[13-14],因此在评价氧化损伤中具有重要意义。本研究中,随着 DIDP 染毒剂量的升高,ROS 含量逐渐上升,GSH 含量逐渐下降,且有浓度效应关系,说明较高剂量 DIDP 暴露可使小鼠肺组织细胞产生过量的 ROS,GSH 消耗,导致细胞的抗氧化能力下降;同时,加入抗氧化剂 VitE 后,DIDP+VitE 组 ROS 含量下降,GSH 含量上升,提示 VitE 可降低 DIDP 暴露后产生的 ROS。

脂质发生过氧反应是由过量的 ROS 造成的,其使细胞膜脆性增加、膜之间的成分发生交联,导致离子转运、能量代谢等细胞稳态功能紊乱。脂质过氧化反应的主要代谢产物是 MDA,MDA 反映的是脂质的过氧化作用,其水平的高低代表脂质的过氧化强度^[15]。在本研究中,15、150 mg·kg⁻¹ DIDP 剂量组 MDA 含量与对照组差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),这表明小鼠肺组织的脂膜已受到损伤。同时,加入抗氧化剂 VitE 后,DIDP+VitE 组 MDA 含量下降,提示 VitE 可降低 DIDP 暴露后产生的 MDA。

8-OHdG 是活性氧自由基如羟自由基、单线态氧等攻击 DNA 分子中的鸟嘌呤碱基第 8 位碳原子而产生的一种氧化性加合物,是内源性及外源性因素对 DNA 氧化损伤作用的生物标志物^[16]。8-OHdG 在体内稳定存在,为代谢终产物,且只能通过 DNA 氧化损伤途径形成,是目前国际上公认的一种新型评价 DNA 氧化损伤和氧化应激的生物标志物,测定机体 8-OHdG 含量对评估体内氧化损伤和修复程度有重要意义^[17]。本研究中,随着 DIDP 染毒剂量的增加,小鼠肺组织中 8-OHdG 含量有不同程度的升高,与对照组比较 15、150 mg·kg⁻¹ DIDP 剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),说明较高剂量的 DIDP 能在小鼠肺组织内形成 8-OHdG,造成肺组织的损伤。同时,加入抗氧化剂 VitE 后,DIDP+VitE 组 8-OHdG 含量下降,提示 VitE 可降低 DIDP 暴露后产生的 8-OHdG。

本研究中,DIDP 作为外源物质,可在肺脏内参与氧化还原代谢途径,产生大量 ROS,一方面破坏肺脏的抗氧化保护机制,另一方面直接诱发肺细胞的脂质过氧化作用,进而损伤肺细胞的结构和功能^[8,18]。维生素 E(Vitamin E, VitE),又称生育酚(tocopherol, TH),是一种脂溶性维生素,主要存在于细胞线粒体膜和内质网上,具有良好的抗衰老、抗过氧化及抗紫外线损伤作用,VitE 结合在细胞膜上使细胞免受自由基进攻和氧化损伤^[19-21]。根据本实验结果,在 DIDP 的高剂量组中加入抗氧化剂 VitE 与高剂量 DIDP 单独暴露组相比,小鼠肺组织所致的氧化损伤程度有所减轻,提示 VitE 可拮抗 DIDP 产生的氧化应激从而对肺组织起着一定的保护作用。

综上所述,在较高剂量的 DIDP 诱导下,小鼠肺组织产生过量的 ROS,破坏自身的氧化与抗氧化平衡,使细胞的抗氧化能力下降,间接引起了小鼠肺组织的脂质过氧化反应和 8-OHdG 的形成,造成肺组

织的氧化损伤和病理损伤。抗氧化剂 VitE 可通过拮抗氧化应激,从而降低 DIDP 所致小鼠肺组织的氧化损伤和病理损伤。

通讯作者简介:马萍(1968-),女,教授,主要从事环境医学、分子毒理学方面的研究,发表学术论文 40 余篇。

参考文献(References):

- [1] 王民生. 邻苯二甲酸酯(塑化剂)的毒性及对人体健康的危害[J]. 江苏预防医学, 2011, 22(4): 68-70
Wang M S. Toxicity of phthalate (plasticizer) and its harm to human health [J]. Jiangsu Preventive Medicine, 2011, 22(4): 68-70 (in Chinese)
- [2] 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
Wang L X, Yang X. Research progress on toxicity and health effects of phthalate [J]. Journal of Environment and Health, 2010, 27(3): 276-281 (in Chinese)
- [3] 徐国忠, 柴瑞丹, 张军. 环境友好型增塑剂对软质 PVC 光稳定性能的影响[J]. 塑料助剂, 2015(1): 37-43
Xu G Z, Chai R D, Zhang J. Effect of environment-friendly plasticizer on photostability of soft PVC [J]. Plastic Additive, 2015(1): 37-43 (in Chinese)
- [4] Shen S, Li J, You H, et al. Oral exposure to diisodecyl phthalate aggravates allergic dermatitis by oxidative stress and enhancement of thymic stromal lymphopoietin [J]. Food & Chemical Toxicology, 2016, 99: 60-69
- [5] Stringer R, Labunska I, Santillo D, et al. Concentrations of phthalate esters and identification of other additives in PVC children's toys [J]. Environmental Science & Pollution Research International, 2000, 7(1): 27-36
- [6] Koch H M, Lorber M, Christensen K L Y, et al. Identifying sources of phthalate exposure with human biomonitoring: Results of a 48 h fasting study with urine collection and personal activity patterns [J]. International Journal of Hygiene & Environmental Health, 2013, 216(6): 672-681
- [7] Cho W S, Jeong J, Choi M, et al. 26-Week carcinogenicity study of di-isodecyl phthalate by dietary administration to CB6F1-rasH2 transgenic mice [J]. Archives of Toxicology, 2011, 85(1): 59-66
- [8] 马萍, 李金泉, 晏彪, 等. 增塑剂邻苯二甲酸二异壬酯致小鼠肺细胞氧化损伤作用的研究[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(2): 702-707
Ma P, Li J Q, Yan B, et al. Oxidative damage of mouse lung cells induced by plasticizer diisononyl phthalate [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(2): 702-707 (in

- Chinese)
- [9] 马萍, 周慧芬, 陈姣娥, 等. 维生素 E 对氯氟菊酯致小鼠肺组织氧化损伤的拮抗[J]. 环境与健康杂志, 2013, 30(3): 207-210
- Ma P, Zhou H F, Chen J E, et al. Antagonism of vitamin E on oxidative injury of lung tissue induced by cypermethrin in mice [J]. Journal of Environment and Health, 2013, 30(3): 207-210 (in Chinese)
- [10] Ma P, Yan B, Zeng Q, et al. Oral exposure of Kunming mice to diisononyl phthalate induces hepatic and renal tissue injury through the accumulation of ROS. Protective effect of melatonin [J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 68: 247-256
- [11] Finkel T, Holbrook N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. Nature, 2000, 408: 239-247
- [12] Ray P D, Huang B W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signalling [J]. Cellular Signalling, 2012, 24(5): 981-990
- [13] Birben E, Sahiner U M, Sackesen C, et al. Oxidative stress and antioxidant defense [J]. World Allergy Organization Journal, 2012, 5(1): 9-19
- [14] 闵安娜, 刘锋明, 晏彪, 等. 邻苯二甲酸丁基苄酯致神经细胞氧化损伤[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(1): 97-102
- Min A N, Liu F M, Yan B, et al. Neurotoxicity and the oxidative damage induced by butyl benzyl phthalate [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(1): 97-102 (in Chinese)
- [15] 武阳, 常青, 杨旭. 不同浓度甲醛致大鼠肝细胞 DNA 氧化损伤作用[J]. 环境科学学报, 2009, 29(11): 2415-2419
- Wu Y, Chang Q, Yang X. Oxidative damage of DNA in rat hepatocytes induced by different concentrations of formaldehyde [J]. Journal of Environmental Science, 2009, 29(11): 2415-2419 (in Chinese)
- [16] Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis [J]. Mutation Research, 1997, 387: 147-163
- [17] 武阳, 常青, 杨旭. 8-羟基脱氧鸟苷在污染物遗传毒性研究中的应用分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2009, 20(1): 57-59
- Wu Y, Chang Q, Yang X. Application of 8-hydroxyl deoxy guanosine in the study of genotoxicity of pollutants [J]. Public Health and Preventive Medicine, 2009, 20(1): 57-59 (in Chinese)
- [18] Bargagli E, Olivieri C, Bennett D, et al. Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: A review [J]. Respiratory Medicine, 2009, 103(9): 1245-1256
- [19] Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals [J]. Veterinary Journal, 2007, 173(3): 502-511
- [20] Niki E. Antioxidant capacity of foods for scavenging reactive oxidants and inhibition of plasma lipid oxidation induced by multiple oxidants [J]. Food & Function, 2016, 7(5): 2156-2168
- [21] Maalouf S, El-Sabban M, Darwiche N, et al. Protective effect of vitamin E on ultraviolet B light-induced damage in keratinocytes [J]. Molecular Carcinogenesis, 2002, 34(3): 121-130
- ◆