

- ical & Biophysical Research Communications, 2013, 432 (1): 1-4.
- [7] Tomás R Guilarte. Manganese and parkinson's disease: A critical review and new findings [J]. Ciencia & sau de coletiva, 2011, 16 (11): 4549-4566.
- [8] Guilarte TR. Manganese neurotoxicity: New perspectives from behavioral, neuroimaging, and neuropathological studies in humans and non-human primates [J]. Frontiers in Aging Neuroscience, 2013, 5 (1): 23.
- [9] Herrero HE. Role of manganese in neurodegenerative diseases [J]. J Trace Elem Med Biol, 2011, 25 (4): 191-203.
- [10] Gallagher M, Burwell R, Burchinal M. Severity of spatial learning impairment in aging: Development of a learning index for performance in the Morris water maze [J]. Behavioral Neuroscience, 1993, 107 (4): 618-626.
- [11] Gehring TV, Luksys G, Sandi C, et al. Detailed classification of swimming paths in the Morris Water Maze: Multiple strategies within one trial [J]. Scientific Reports, 2015, 5 (1): 14562.

- [12] Dalm S, Grootendorst J, de Kloet ER, et al. Quantification of swim patterns in the Morris water maze [J]. Behavior Research Methods Instruments & Computers, 2000, 32 (1): 134-139.
- [13] Tian Y, Chen C, Guo S, et al. Exploration of the establishment of manganese poisoning rat model and analysis of discriminant methods [J]. Toxicology, 2018, 410 (8): 193-198.
- [14] 梁桂强, 卿利, 张东生, 等. 慢性锰染毒对大鼠学习记忆能力及其血浆脑源性神经营养因子含量的影响 [J]. 环境与职业医学, 2014, 31 (9): 776-780.
- [15] 李海因, 张萍, 付明. 锰中毒对植物神经、神经行为功能及神经电生理影响 [J]. 中国职业医学, 2011, 38 (3): 225-226.
- [16] 肖忠新, 牛丕业, 李慧, 等. 锰对大鼠空间学习记忆影响 [J]. 中国公共卫生, 2010, 26 (3): 381-382.
- [17] 周娇娇, 阙建宇, 于雯雯, 等. Morris 水迷宫检测动物学习记忆水平的的方法学 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37 (24): 6274-6277.

(收稿日期: 2019-07-14; 修回日期: 2019-10-08)

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯对雄性小鼠大脑皮质氧化损伤及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

Effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on oxidative damage of cerebral cortex and expression of Bcl-2, Bax proteins in male mice

白金, 张玉, 张娟, 赛林霖, 张元元, 陈尚雅, 薄存香

(山东省职业卫生与职业病防治研究院/山东省第一医科大学/山东省医学科学院, 山东 济南 250014)

摘要: 选用 ICR 初断乳雄性小鼠 40 只, 随机分为对照组 (玉米油) 和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 (DEHP) (250、500、1 000 mg/kg) 染毒组, 经口灌胃, 6 次/周, 连续 8 周。于末次染毒 24 h 后处死动物, 称取大脑质量并计算脏器系数; 检测大脑皮质超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性及丙二醛 (MDA) 的含量; Western Blot 法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平。结果显示, 1 000 mg/kg 染毒组小鼠染毒 1 周时体重增长缓慢, 与对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 染毒 8 周后其大脑系数高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。随着 DEHP 染毒剂量增加, 大脑皮质组织匀浆中 MDA 含量增高, 1 000 mg/kg 染毒组与对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 500、1 000 mg/kg 染毒组 SOD 活力高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 各组 GSH-Px 活力与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); DEHP 各染毒组大脑皮质 Bcl-2 蛋白表达减少, 500、1 000 mg/kg 剂量组 Bax 蛋白表达增高, 与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示 DEHP 可致小鼠大脑皮质氧化损伤及凋亡相关蛋白的改变。

关键词: 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 (DEHP); 小鼠; 神经毒性; 氧化损伤; Bcl-2 蛋白

中图分类号: R994.6 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2020)01-0046-04

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2020.01.015

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 [di-(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP] 是常用的塑化剂, 被广泛用于化妆品、食品包装材料和医疗产品^[1]。DEHP 具有神经毒性作用, 可导致大鼠大脑神经变性^[2], 影响小鼠学习和记忆能力^[3], 其潜在机制尚不清楚。细胞凋亡是在生理或某些病理条件下由基因控制的细胞自主有序的自杀性死亡^[4], 它涉及一系列基因的激活、表达及调控等作用, Bcl-2 家庭成员中的 Bcl-2 及 Bax 在细胞凋亡的基因调控过程中起重要作用。研究表明中枢神经系统的损伤往往伴有大量神经元细胞凋亡^[5], 而且神经毒物所引起的细胞凋亡多发生在大脑皮质^[6]; 另外, 氧化应激也参与神经元的死亡, 并导致许多神经系统疾病的细胞凋亡过程^[6]。本研究选用初断乳 ICR 雄性小鼠, 研究 DEHP 对小鼠大脑皮质氧化损伤及

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目 (2016WS0539); 山东省自然科学基金 (ZR2017YL001); 山东省科技攻关项目 (2018GSF118212)

作者简介: 白金 (1990—), 男, 主治医师, 从事职业病临床工作。

通信作者: 薄存香, 副研究员, E-mail: bocunxiang@163.com

Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响, 揭示其神经毒性可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 DEHP (纯度 $\geq 99.0\%$, 国药集团化学试剂有限公司), 溶剂为玉米油。考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 及谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所), Bcl-2 单克隆抗体、Bax 单克隆抗体及山羊抗小鼠 IgG (上海赛维尔生物科技有限公司)。RIPA 裂解液、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、 β -actin (Servicebio 公司)。

1.2 实验动物及处理 选择初断乳雄性 ICR 小鼠 40 只, 体重 16~18 g, 由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供, 动物合格证号: SCXK (鲁) 20140007。按体重随机分为对照组 (0 mg/kg) 和 DEHP 250、500、1 000 mg/kg 染毒组, 每组 10 只。染毒组连续灌胃染毒 8 周, 6 次/周, 于末次染毒 24 h 后处死; 对照组给予等量玉米油。实验在 SPF 级动物房内进行, 动物房温度 20~24℃, 湿度 40%~70%。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 一般状况观察 每天观察小鼠进食、饮水、行为活动、尿液、粪便等有无异常, 每周称量小鼠体重 1 次以调整给药量。

1.3.2 大脑脏器系数 于染毒 24 h 后称重并断头处死, 迅速剥离小鼠大脑, 吸干水分并称重。

$$\text{脏器系数}(\%) = \frac{\text{脏器湿重}(g)}{\text{体重}(g)} \times 100\%$$

1.3.3 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量检测 每组选取 6 只小鼠大脑剥离皮质, 按重量体积比加入 9 倍生理盐水, 匀浆后低温高速离心, 收集上清, 考马斯亮蓝法测定其蛋白含量。采用羟胺法测定 SOD 活性, 硫代巴比妥酸 (TBA) 法测定 MDA 的含量, 苯甲酸显色法测定 GSH-Px 的活性, 严格按照试剂盒要求步骤操作。

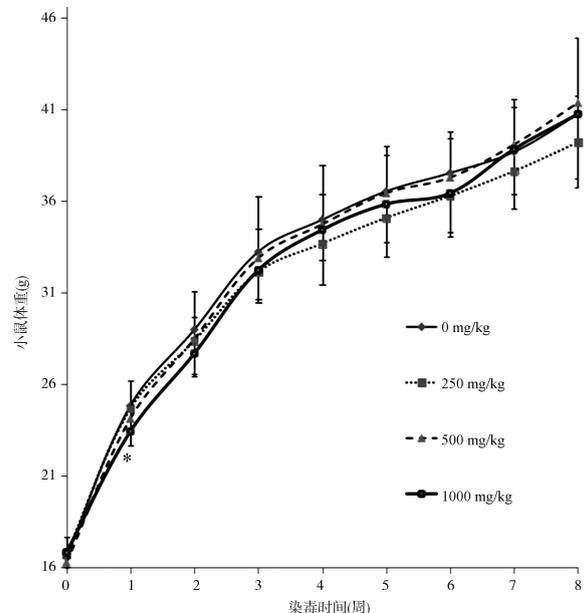
1.3.4 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达检测 每组选取 3 只小鼠大脑皮质裂解, 用预冷的含 1% PMSF 的蛋白裂解液提取总蛋白, BCA 法测定总蛋白含量。样品经 12% 的凝胶电泳分离, 转膜, 封闭, 将膜与一抗 Bcl-2 (稀释比例 1:2000) 和 Bax (稀释比例 1:400) 室温孵育 2 h, 洗涤, 将膜浸入以 1:3 000 体积比稀释的二抗, 室温 2 h, 漂洗后用 ECL 化学发光试剂盒增强发光, X 线胶片显影。使用 Image J 软件测算以上指标的灰度值, 比去内参 β -actin 的灰度值得到相对浓度后, 再用统计软件进行统计。

1.4 统计分析 采用 SPSS 13.0 软件进行分析。数

据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 Dunnett *t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠体重变化情况 500、1 000 mg/kg 染毒组各有 1 只小鼠于给药后第 6 周出现会阴部污秽, 4~6 d 后恢复正常, 其它小鼠未见明显异常症状。小鼠体重仅给药后第 1 周 1 000 mg/kg 染毒组低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。



注: *, 1 000 mg/kg 染毒组与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 DEHP 染毒对小鼠体重的影响 ($n = 10$)

2.2 对小鼠大脑脏器系数的影响 随着 DEHP 染毒剂量增加, 小鼠大脑脏器系数增大, 1 000 mg/kg 染毒组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 DEHP 染毒对小鼠大脑脏器系数的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	大脑系数 (%)
对照组	0.736 \pm 0.043
250 mg/kg 染毒组	0.777 \pm 0.059
500 mg/kg 染毒组	0.752 \pm 0.098
1 000 mg/kg 染毒组	0.797 \pm 0.053*

注: *, 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 对大脑皮质 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量的影响 DEHP 各染毒组小鼠大脑皮质中 SOD 的活性随着染毒剂量的加大而升高, 500、1 000 mg/kg 染毒组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); MDA 含量随着染毒剂量加大而升高, 1 000 mg/kg 染毒组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 各染毒

组 GSH-Px 活性与对照组比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 2。

表 2 DEHP 染毒对小鼠大脑皮质 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量的影响 ($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	SOD (U/mg prot)	GSH-Px (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)
对照组	264.81±40.61	110.95±22.10	2.89±0.54
250 mg/kg 染毒组	276.23±49.28	119.32±26.99	3.32±0.42
500 mg/kg 染毒组	330.06±40.67*	120.61±37.06	3.17±0.60
1 000 mg/kg 染毒组	354.46±40.98**	105.44±32.49	3.64±0.44*

注: 与对照组比较, *, $P<0.05$; **, $P<0.01$ 。

2.4 对小鼠大脑皮质组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 Western Blot 显示 DEHP 各染毒组大脑皮质中 Bcl-2 蛋白表达降低, 与对照组比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 大脑皮质中 Bax 蛋白表达高于对照组, 500、1 000 mg/kg 染毒组差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 2。

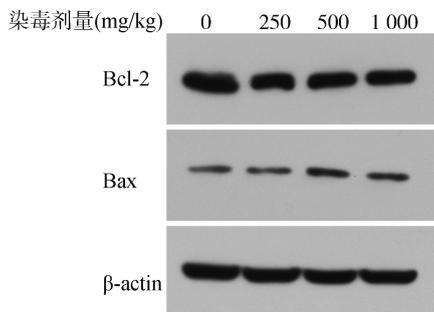


图 2 DEHP 染毒小鼠大脑皮质组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

3 讨论

DEHP 是邻苯二甲酸酯类 (phthalate esters, PAEs) 化合物之一。流行病学资料表明 PAEs 对神经系统有一定的损害作用, 对学龄儿童智力的调查研究发现, 尿液中 PAEs 代谢物含量和智商之间成反比关系^[7], 与注意缺陷多动障碍症 (ADHD) 呈正相关^[8]。动物实验发现 DEHP 能导致小鼠学习记忆能力下降^[9,10]。DEHP 是一种过氧化物酶体增殖剂, 可通过激活生物体内的过氧化物酶体增殖物激活受体 (PAPR), 引起编码过氧化物酶体内各种酶的基因选择性转录, 使以活性氧为主的各种自由基增加, 造成氧化应激状态^[11,12]。过量的 ROS 可以激活细胞内凋亡信号的传导, 诱导 Caspase-3 的活化, 增加 Bax 的表达, 从而促进细胞凋亡的发生^[13,14]。

MDA 是脂质过氧化的一种最终产物, 可间接反映自由基的水平和细胞氧化损伤的程度^[15]。本实验结果显示, 随着 DEHP 染毒剂量加大, 小鼠大脑皮质

组织匀浆中 MDA 含量增高, 1 000 mg/kg 染毒组与对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 可见 DEHP 能引起大脑皮质脂质过氧化损伤。SOD、GSH-Px 在体内有清除活性氧、减轻和阻止活性氧的过氧化作用^[16]。本研究显示, 随着 DEHP 染毒剂量加大, SOD 活力增强, 500、1 000 mg/kg 染毒组与对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$); GSH-Px 活性未见有变化。表明在该剂量范围内, DEHP 对大脑皮质表现了毒物兴奋效应, 即在一定剂量水平机体处于消除毒物和自我保护状态 (代偿期), 表现为抗氧化损伤指标活性增高。由此可见 DEHP 通过脂质过氧化作用对大脑皮质发挥作用。

细胞凋亡是一种非常复杂的过程。Bcl-2 家族可以分为两类, 一类是抗细胞凋亡基因, 以 Bcl-2 基因为代表; 另一类是促细胞凋亡基因, 以 Bax 基因为代表; 它们通过激活一系列下游基因发挥调节凋亡作用^[17]。Bcl-2 分布在膜和细胞质中, 控制着线粒体外膜和内膜的通透性, 可通过抑制细胞线粒体膜电位的降低、Cyt C 和凋亡起始因子的释放及 Caspase 的激活从而抑制凋亡。Bax 正好相反, Bax 发生构象改变或者寡聚化作用, 进入线粒体外膜, 破坏线粒体膜, 引起细胞色素 C 的释放, 从而激活凋亡酶激活因子-1 (Cyt C/Apaf-1) /Caspase-9 信号通路, 导致细胞凋亡^[18]。本实验结果显示, DEHP 染毒组小鼠大脑皮质 Bcl-2 蛋白表达均减少, 500、1 000 mg/kg 染毒组 Bax 蛋白表达增高, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 表明 DEHP 导致神经毒性作用可能与 DEHP 抑制 Bcl-2 及促进 Bax 蛋白表达有关。

由本实验结果可推测, DEHP 引起神经毒性作用应与氧化应激导致细胞凋亡有关, 其具体作用机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] Wan HT, Leung PY, Zhao YG, et al. Blood plasma concentrations of endocrine disrupting chemicals in HongKong populations [J]. Hazard Mater, 2013 (261): 763-769.
- [2] Wu M, Xu L, Teng C, et al. Involvement of oxidative stress in di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)-induced apoptosis of mouse NE-4C neural stem cells [J]. Neurotoxicology, 2019 (70): 41-47.
- [3] 唐佳琦, 张平, 袁焯, 等. 增塑剂邻苯二甲酸二乙基己酯对小鼠学习和记忆能力的影响 [J]. 玉林师范学院学报 (自然科学), 2011, 32 (2): 7-10.
- [4] 李亚妮, 陈楠, 李宣珠, 等. 甲醇吸入染毒对大鼠脑皮质氧化应激及皮质细胞凋亡的影响 [J]. 宁夏医科大学学报, 2018, 40 (10): 1121-1124.

下。目前,依据国内现有的生产工艺、防护措施以及相应的职业卫生管理水平,将我国工作场所空气中 MIAK 的时间加权平均容许浓度 (8 h) 和短时间接触容许浓度 (15 min) 分别设置为 93 mg/m^3 和 234 mg/m^3 , 不会给生产企业带来任何经济上的负担,也可有效地保护接触工人的身体健康。

今后,仍需对使用 MIAK 的企业进行现场职业卫生与流行病学调查,以检验本次研究建立的职业接触限值的可靠性和科学性。

参考文献

[1] Gooch JW. Methyl isoamyl ketone [M]. New York: Springer 2011: 459.

[2] Levin JO, Carleborg L. Evaluation of solid sorbents for sampling ketones in work-room air [J]. *Ann Occup Hyg*, 1987, 31 (1): 31-38.

[3] Tadeusz G. Passive sampling [J]. *Trends in analytical chemistry*, 2002, 21 (4): 276-281.

[4] Bahrami AR, Golbabai F, Mahjub H, *et al.* Determination of exposure to respirable quartz in the stone crushing units at Azendarian-West of Iran [J]. *Industrial Health*, 2008, 46 (4): 404-408.

[5] 林凯, 陈卫, 刘桂华, 等. 工作场所空气中二异丁基甲酮直接进样气相色谱测定方法的研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18

(7): 1339-1340.

[6] 倪松华, 符展明, 任建华, 等. 气相色谱法测定空气中的甲基异丁酮 [J]. *中国卫生检验杂志*, 1995, 5 (6): 382-383.

[7] 项应龙, 胡清启. 气相色谱法测定工作场所空气中丙酮、丁酮、甲基异丁酮及环己酮的含量 [J]. *理化检验 (化学分册)*, 2013, 49 (10): 1202-1204.

[8] 冯婉丽, 李玉萍. 气相色谱法同时测定工作场所空气中丙酮、丁酮、乙酸乙酯、乙酸丁酯、苯、甲苯和二甲苯 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24 (13): 1850-1852.

[9] 汪锡灿, 盛娟芬. 气相色谱法测定车间空气中甲基异丁基甲酮 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 1996, 14 (2): 119-120.

[10] French AD, Bertoniere NR, Brown RM, *et al.* Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology [J]. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, 2003, 117 (1): 175-189.

[11] Bingham E, Cohns B, Powell CH. *Patty's Toxicology Volumes 1-9* [M]. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, 2001: 276.

[12] Lin YW, Hee SS. Regulated workplace ketones and their interference in the PFBHA method for aldehydes [J]. *Appl Occup Environ Hyg*, 2000, 15 (11): 855-862.

[13] Sittig M. *Handbook of toxic and hazardous chemicals and carcinogens*, [M]. 4th ed. New York: Noyes Publications, 2002: 1579.

(收稿日期: 2019-06-25; 修回日期: 2019-09-19)

(上接第 48 页)

[5] 李炜, 李冰. 细胞凋亡与 Nrf 2 信号通路研究进展 [J]. *国外医学医学地理分册*, 2013, 34 (1): 60-64.

[6] 江辰阳. 镉致大鼠神经细胞凋亡的线粒体途径及 NAC 的保护作用 [D]. 扬州: 扬州大学, 2014.

[7] Cho SC, Bhang SY, Hong YC, *et al.* Relationship between environmental phthalate exposure and the intelligence of school-age children [J]. *Environ Health Perspect*, 2010, 118 (7): 1027-1032.

[8] Kim Y, Kim BN, Hong YC, *et al.* Co-exposure to environmental lead and manganese affects the intelligence of school-aged children [J]. *Neurotoxicology*, 2009, 30 (4): 564-571.

[9] 杨艳玲, 徐晓虹. 增塑剂 DEHP 的神经和行为发育毒性 [J]. *心理科学进展*, 2013, 21 (6): 1007-1013.

[10] 马宁, 支媛, 徐海滨, 等. 邻苯二甲酸二异丁酯对雄性小鼠空间学习记忆行为的影响 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2010, 22 (4): 300-305.

[11] 陈文婕, 戴红, 陈敏, 等. 邻苯二甲酸二乙基己酯 (DEHP) 对小白鼠肝脏毒性及脂质过氧化损伤 [J]. *生态毒理学报*, 2012, 7 (1): 93-98.

[12] 张婉, 胡珊, 许丁亮, 等. 孕期邻苯二甲酸二乙基己酯 (DEHP) 暴露对胎儿生长发育的影响 [J]. *长江大学学报 (自*

科版), 2016, 13 (6): 78-81.

[13] 李飞, 周静, 孙红梅, 等. 靶向 TLR4 的 siRNA 慢病毒感染减少过氧化氢诱导的心肌 H9C2 细胞凋亡及氧化损伤 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35 (6): 665-670.

[14] Bacaksiz A, Teker ME, Buyukpinarbasili N, *et al.* Does pantoprazole protect against reperfusion injury following myocardial ischemia in rats? [J]. *Eur Rev Med Pha Sci*, 2013, 17 (2): 269-275.

[15] 李丽萍, 刘秀芳, 宁艳花, 等. DEHP 对大鼠睾丸能量代谢酶的影响及其氧化损伤作用 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2010, 32 (1): 74-77.

[16] 于涛, 逯晓波, 潘亮, 等. 邻苯二甲酸二 (2-乙基己基) 酯宫内暴露所致子代雄性大鼠睾丸氧化应激及维生素 C 的干预作用 [J]. *环境与健康杂志*, 2011, 28 (9): 775-777.

[17] 陆兴热, 代宏剑, 高仕萍, 等. 三七总苷对人胃癌 BGC-823 细胞 Bcl2 和 Bax 表达的影响 [J]. *药物分析杂志*, 2011, 31 (3): 570-573.

[18] 聂超, 朱萱萱, 刘沈林, 等. 黄芪多糖对人胃癌细胞移植瘤的抑制效应及对 Bcl2、Bax 表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32 (5): 1115-1117.

(收稿日期: 2019-07-03; 修回日期: 2019-10-12)