

维生素 E 对邻苯二甲酸二丁酯细胞毒性的影响

裴秀丛, 李哲, 张玉敏, 段志文

(沈阳医学院公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110034)

摘要: 目的 探讨邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 对小鼠淋巴瘤细胞 (EL4) 的毒作用及维生素 E (ViE) 对细胞的保护作用。方法 分别用 10、100、500、1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP 作用细胞 24 h 并且 ViE 进行干预, 检测细胞增殖、乳酸脱氢酶 (LDH) 活力及丙二醛 (MDA) 含量。结果 DBP 作用 EL4 细胞 24 h 100~1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP 均能明显促进 EL4 细胞增殖。1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP 可明显升高 EL4 细胞上清液中 LDH 活力及 MDA 含量。与 1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP 组比较, 50 $\mu\text{mol/L}$ ViE 能显著降低细胞上清液中 LDH 活力及 MDA 含量。结论 DBP 使 EL4 细胞产生氧化损伤, 这可能与 DBP 的免疫毒性有关。

关键词: 邻苯二甲酸二丁酯 (DBP); 小鼠淋巴瘤细胞 (EL4); 细胞毒性; 维生素 E

中图分类号: R994.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2008)02-0082-03

Effect of vitamin E on cytotoxicity of p-dibutyl phthalate in EL4 cells

PEIXIUCONG, LI Zhe, ZHANG Yumin, DUAN Zhiwen

(School of Public Health, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China)

Abstract: Objective To investigate the cytotoxicity of p-dibutyl phthalate (DBP) on EL4 cell and the protective role of vitamin E (ViE). Methods EL4 cells were exposed to different concentrations of 10, 100, 500 and 1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP respectively for 24 h, then received treatment with different concentrations of ViE, then to detect the status of cell proliferation, LDH activity in supernatant and MDA levels in cultural cells. Results The exposure to 100-1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP for 24 h might promote the proliferation of EL4 cell. 1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP exposure might significantly increase the LDH activities in supernatant and MDA levels in cells. While 50 $\mu\text{mol/L}$ ViE could significantly decrease the LDH activities and MDA levels. Conclusions DBP produces the oxidation injury in EL4 cell, which may be related to its immunotoxicity.

Key words: Dibutyl phthalate (DBP); EL4 cell; Cytotoxicity; Vitamin E

随着塑料制品的大量使用, 人类对邻苯二甲酸二丁酯 (dibutyl phthalate, DBP) 的暴露越来越严重。DBP 是邻苯二甲酸酯 (PAEs) 中使用最为普遍的增塑剂之一, 可由塑料迁移到外环境, 成为环境中无所不在的全球性污染物。流行病学研究表明人体内血液、尿液等均存在 DBP 污染, 残留体内的 DBP 将严重影响人类生殖、免疫、神经等系统^[1,2]。EL4 细胞是用 9,10-二甲基-1,2-苯蒽基在 C57BL 小鼠中诱导的淋巴瘤细胞。本实验拟通过研究 DBP 对 EL4 细胞的损伤作用, 为进一步探讨 DBP 的免疫毒性提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

小鼠淋巴瘤细胞 (EL4) 购于中国科学院上海细胞库; 邻苯二甲酸二丁酯 (DBP)、ViE 购于国药集团化学试剂有限公司; 二甲基亚砷 (DMSO)、四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购于美国 Sigma 公司; RPMI

1640 培养液购于 GIBCO 公司; 考马斯亮蓝蛋白测试盒、LDH 测试盒、MDA 测试盒均购于南京建成生物工程研究所。

1.2 细胞培养

用含 10% 胎牛血清的 1640 培养液培养 EL4 细胞, 条件为 5% CO_2 、37°C, 实验前将细胞离心, 用无血清的 1640 培养液培养 24 h, 调整细胞浓度为 5×10^5 个/ m^3 , 接种于 96 孔板, 备用。

1.3 实验分组及处理

实验时将细胞以 1 500 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 染毒。分别设 (1) 对照组: 0.1% DMSO; (2) 染毒组: 用 10、100、500、1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP 单独作用细胞; (3) 干预组: 用 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 ViE 与 1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP 共同培养。作用时间为 24 h, 每个剂量复设 3 孔。

1.4 细胞增殖实验 (MTT 法)

实验终点, 每孔加 MTT 溶液 20 μl , 4 h 后终止培养。小心吸弃孔内培养液, 每孔加入 DMSO 150 μl , 振荡 5~10 min, 使紫色结晶物充分溶解。用 DMSO 调零, 在酶标仪上于 570 nm 波长处测定各孔的吸光度 (OD) 值。

收稿日期: 2007-08-04; 修回日期: 2008-01-07

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助 (30700671)

作者简介: 裴秀丛 (1975-), 女, 博士, 研究方向: 环境毒理学。

1.5 IDH活力、MDA含量及蛋白含量的测定

按照各试剂盒说明书进行操作。

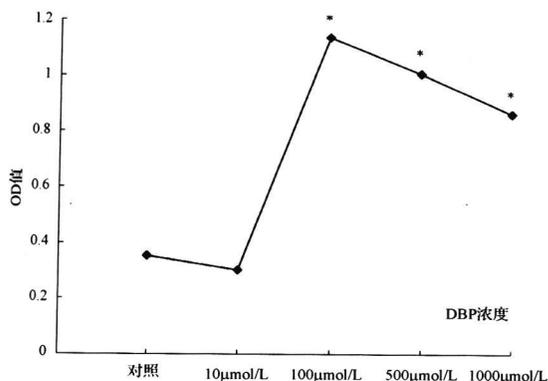
1.6 统计学方法

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS1.5 统计软件进行单因素方差分析 (One way ANOVA), 组间比较用 LSD 法。

2 结果

2.1 DBP对细胞增殖的影响

与对照组比较, 100 ~ 1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP 均能促进 EL4 细胞明显增殖, 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中 100 $\mu\text{mol/L}$ DBP 增殖作用最明显。当 DBP 浓度 $> 100 \mu\text{mol/L}$ 时, 其对细胞的增殖作用呈下降趋势 (见图 1)。



与对照组比较 * $P < 0.05$

图 1 DBP 对 EL4 细胞增殖的影响

2.2 DBP对 LDH活力及 MDA含量的影响

不同浓度的 DBP 均使 EL4 细胞上清液中 LDH 活力和细胞中 MDA 含量有不同程度增加。与对照组比较, 1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP 能明显升高细胞上清液中 LDH 活力及细胞中 MDA 含量, 具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 DBP 对 EL4 细胞 LDH 活力、MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LDH (U/mg Pro)	MDA (nmol/mg Pro)
对照组	47.11 ± 7.91	18.65 ± 0.57
100 $\mu\text{mol/L}$ DBP	110.05 ± 13.34	21.85 ± 5.25
500 $\mu\text{mol/L}$ DBP	93.42 ± 41.15	29.61 ± 10.83
1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP	130.20 ± 41.32*	35.62 ± 3.49*

与对照组比较, * $P < 0.05$

2.3 VitE对 DBP致 EL4细胞毒性的影响

与 1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP 组比较, 50 $\mu\text{mol/L}$ VitE 能显著降低 EL4 细胞上清液中 LDH 活力及细胞中 MDA 含量, 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 100 $\mu\text{mol/L}$ VitE 使细胞中 MDA 含量略有升高, 但无统计学意义, 见表 2。

表 2 VitE 对 DBP 致 EL4 细胞毒性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LDH (U/mg Pro)	MDA (nmol/mg Pro)
对照组	47.11 ± 7.91	18.65 ± 0.57
1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP	130.20 ± 41.32*	35.62 ± 3.49*
1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP + 50 $\mu\text{mol/L}$ VitE	65.19 ± 13.18 [▲]	15.59 ± 5.88 [▲]
1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP + 100 $\mu\text{mol/L}$ VitE	111.01 ± 29.12*	27.60 ± 9.51

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP 组比较, [▲] $P < 0.05$

3 讨论

本实验结果显示 100 ~ 1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP 均能明显促进 EL4 细胞的增殖。当 DBP 浓度大于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 其对细胞的增殖作用呈下降趋势, 提示一定浓度的 DBP 能促进 EL4 细胞增殖。有报道 DBP 使 RBL-2H3 肥大细胞内 Ca^{2+} 浓度增加从而引起细胞脱颗粒^[3]。而 Ca^{2+} 能通过 Ca^{2+} -CaN-NFAT 信号通路引发细胞活化增殖。因此 DBP 可能通过影响 EL4 细胞内的 Ca^{2+} 浓度而促进 EL4 细胞增殖。

本实验 DBP 作用 EL4 细胞 24 h 与对照组比较只有 1 000 $\mu\text{mol/L}$ DBP 能明显升高细胞上清液 LDH 活力及 MDA 含量, 提示 DBP 已损伤细胞膜, 使细胞发生氧化损伤, 即 DBP 对 EL4 细胞已产生细胞毒性。

VitE 是一个重要的抗氧化剂, 它可直接清除过氧化物或自由基而起到抗氧化或阻止氧化胁迫损伤作用, 也能限制超氧化物及相应的活性氧或氮化合物的生成和水平, 发挥其抗氧化功能^[4]。本实验结果表明 50、100 $\mu\text{mol/L}$ VitE 对 DBP 致 EL4 细胞毒性具有一定的保护作用, 50 $\mu\text{mol/L}$ VitE 的保护作用优于 100 $\mu\text{mol/L}$ VitE。这进一步反映氧化损伤参与了 DBP 对 EL4 细胞的毒作用。研究表明, 细胞内钙超载与细胞膜钙通道开放和细胞超微结构损伤有关, 也与脂质过氧化作用增强、抗氧化能力下降有关^[5]。PAE 能通过非基因效应途径影响烟碱型乙酰胆碱受体 (nAChR) 相关的钙信号^[6]; PAE 及代谢产物通过抑制细胞膜上的 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶而升高脑、肝及红细胞内的 Ca^{2+} 浓度^[7]。因此 DBP 对 EL4 产生的细胞毒性也可能与钙超载有关。

DBP 能明显增加 BALB/c 和 DBA/2 小鼠血清中 IgE 含量, 具有一定的免疫毒性^[8]。本实验表明 DBP 能使 EL4 细胞产生氧化损伤, 具有一定的细胞毒性, 这可能与免疫毒性有关, 而其毒性机制是否涉及钙信号还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘慧杰, 舒为群. 邻苯二甲酸酯类化合物的毒理学效应及对人群健康的危害 [J]. 第三军医大学学报, 2004, 26 (1): 1778-1781

(下转第 98 页)

氧疗,轻度中毒者给予鼻导管低流量吸氧(2~3 L/min),中、重度中毒者面罩高流量吸氧(5~8 L/min)。高压氧治疗,入院后给予综合治疗,病情允许时尽早使用高压氧,高压氧压力0.25 MPa(2.5 ATA),每次1 h。中度中毒者每天1次,重度中毒者1周内每天2次,1周后改为每天1次,10 d为1个疗程,共2~3个疗程;3例出现肺水肿、急性呼吸衰竭患者自主呼吸6~9次/min,应用呼吸兴奋剂尼可刹米和洛贝林,并予以气管插管,呼吸机辅助呼吸,通气模式为辅助/控制通气,依据 SaO_2 和血气分析值调整通气参数,3 h内设定氧浓度60%~100%,呼气末正压(PEEP)8~10 mm H₂O。低氧血症减轻后逐步调整氧浓度至40%~50%,PEEP调至5~6 mm H₂O。3例分别于中毒后24 h、28 h、30 h肺水肿减轻、低氧血症缓解,呼吸衰竭改善,自主呼吸14~18次/min。复查血气分析:3例 HI 7.35~7.42, PaO_2 89~96 mm Hg, $PaCO_2$ 36~42 mm Hg, SaO_2 92%~96%,予以撤除呼吸机,进行高压氧治疗。7例重度中毒者予甲强龙500 mg/d,中度中毒者予甲强龙160~250 mg/d,静脉滴注3 d。中、重度中毒者予654-2 20~30 mg/d,静脉滴注3 d,盐酸戊乙奎醚注射液(长托宁)1 mg,肌内注射,12 h 3 d。重度中毒者加用乌司他丁40万 U/d,静脉滴注,7~10 d。视病情给予解痉、脱水、利尿、营养心肌、护肝、抑酸剂、促进脑细胞代谢药物等治疗,使用安定、甘露醇、速尿、纳洛酮、极化液、1,6-二磷酸果糖、洛赛克、抗生素等药物,同时给予眼局部治疗。经上述处理后,6例轻度中毒者眼及呼吸道症状24 h内消失,头晕、乏力等症状3~5 d消失。中度中毒者24 h内意识转清,重度中毒者2~3 d意识转清,3例肺水肿患者肺水肿症状、体征逐渐消失,胸部X线片示3~5 d恢复正常。病程中3例出现肺部感染,1例出现应激性溃疡、消化道出血,治疗后缓解。中毒第3天2例重度中毒者出现少尿,尿量200~300 ml/d,血BUN 23~28 mmol/L, Cr 332~438 μ mol/L,发生急性肾功能衰竭,给予血液透析一周后渡过少尿期,经过多尿期后肾功能逐渐恢复正常。经抢救全部病例出院时尿常规、肝功能、肾功能、心肌酶、血气分析、心电图、X线胸片、头部CT均正常,治疗7~45 d出院。

(上接第83页)

- [2] Walsh HG, Hong Q, Sube D. Simultaneous analysis of the di-(2-ethylhexyl) phthalate metabolites 2-ethylhexanoic acid, 2-ethylhexyldioxyhexanoic acid and 2-ethylhexyl-oxohexanoic acid in urine by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2001; 758 (2): 213-219.
- [3] Nakamura R, Teshima R, Sawada J. Effect of dialkyl phthalates on the degranulation and Ca^{2+} response of RBL-2H3 mast cells [J]. Immunol Lett 2002; 80 (2): 119-124.
- [4] 黄进, 杨国宇, 李宏基, 等. 抗氧化剂作用机制研究进展 [J]. 科技进展 2003; 26 (2): 74-78.
- [5] 史明, 张文岚, 薄立华, 等. 缺血再灌注细胞内钙水平与氧化应激损伤研究 [J]. 中国生物制品杂志, 2003; 16 (5): 311-313.

2 讨论

硫化氢在人体内毒物代谢资料较少,动物实验表明硫化氢在体内转化后以硫酸盐形式于24 h内经尿排出,无蓄积^[1]。硫化氢吸收后主要与呼吸链中细胞色素氧化酶及二硫键(-S-S-)起作用,影响细胞氧化过程,造成组织缺氧。吸入极高浓度时,刺激颈动脉球和主动脉体化学感受器,反射性地引起呼吸停止;也可直接引起呼吸中枢麻痹,导致窒息,造成“电击样”死亡。

本组病例表现为脑、肺、心、肝、肾等多脏器损害,主要损害中枢神经和呼吸系统,导致缺氧、脑水肿、肺水肿。硫化氢中毒发生急性肾衰的报道尚少,2例出现急性肾衰原因有待进一步分析。硫化氢中毒的机制较复杂,中毒早期是否应用亚甲蓝等解毒药观点不一,较为一致的治疗方案强调尽早高压氧及对症、支持治疗。合理给氧,防治脑水肿、肺水肿,给予糖皮质激素、脱水、利尿是主要的措施。本组病例按上述原则治疗获满意效果,未用亚甲蓝等解毒药。机械通气治疗可显著改善硫化氢中毒所致呼吸衰竭患者的血气指标和临床症状,疗效较好。高压氧可加速硫化氢与细胞色素氧化酶结合的解离,恢复酶的活性;可提高血氧含量,改善血液粘稠度,迅速纠正机体缺氧状态,控制肺水肿、脑水肿^[2]。新型抗胆碱药长托宁可解除微血管痉挛,减少腺体分泌,解除支气管平滑肌痉挛,减轻气道阻力,增加呼吸流量,对急性肺水肿疗效较好^[3]。乌司他丁具有抗休克、改善循环、改善氧合、降低死亡率的作用,其作用类似于糖皮质激素,但应激性溃疡、高血糖和真菌感染发生率均较低^[4]。

参考文献:

- [1] 韩志英. 硫化氢中毒研究进展 [J]. 工业卫生与职业病, 2006; 32 (2): 118-121.
- [2] 高春锦, 杨捷云. 实用高压氧学 [M]. 北京: 学苑出版社, 1997: 150-151.
- [3] 韩继媛, 曹锋生, 王一镗, 等. 长托宁的临床应用 [J]. 中华急诊医学杂志, 2005; 14 (2): 173-174.
- [4] 李文放, 陈杰. 乌司他丁在急性呼吸窘迫综合征的临床应用研究 [J]. 中国急救医学, 2006; 26 (9): 644-646.
- [6] Lu K Y, Tseng F W, Wu C J, et al. Suppression by phthalates of the calcium signaling of human nicotinic acetylcholine receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. Toxicology 2004; 200 (2-3): 113-121.
- [7] Dhanya CR, Indu AR, Deepadevi KV, et al. Inhibition of membrane Na^{+} - K^{+} -ATPase of the brain, liver and RBC in rats administered di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), a plasticizer used in polyvinyl chloride (PVC) blood storage bags [J]. Indian J Exp Biol 2003; 41 (8): 814-820.
- [8] Lim SY, Ghosh SK. Autoreactive responses to environmental factors: 3 mouse strain-specific differences in induction and regulation of anti-DNA antibody responses due to phthalate isomers [J]. J Autoimmun 2005; 25 (1): 33-45.