

于阴性对照组,且有一定的剂量-反应关系。染毒组小鼠睾丸组织 MDA 含量显著升高,而 GSH 活性和 SOD 含量显著下降,且有一定的剂量-反应关系,可见染毒后睾丸组织的自由基与不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应增强,而机体抗氧化损伤的能力下降,机体精子细胞受到自由基严重攻击,导致精子膜损伤,损害生殖细胞的功能,这可能也是氯化镉染毒小鼠精子数和精子活动度下降的原因之一。

参考文献:

- [1] Xu H E. The progress of resource, environment and health in China [M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2004: 43-64.
- [2] 陈祖义. 稀土元素的脑部蓄积性及其毒性效应 [J]. 世界元素医学, 2005, 12 (2): 5-9.
- [3] He X, Zhang Z Y, Zhang H F, et al. Neurotoxicological evaluation of long-term lanthanum chloride exposure in rats [J]. Toxicol Sci, 2008, 103: 354-361.
- [4] 张军, 潘发明. 甲胺磷对小鼠精子质量的影响 [J]. 中国工业医学杂志, 2002, 15 (4): 208-210.
- [5] Rees M D, Kennett E C, Whitelock J M, et al. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies [J]. Free Radic Biol Med, 2008, 44 (12): 1973-2001.
- [6] Matough F A, Budin S B, Hamid Z A, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications [J]. Sultan Qaboos Univ Med J, 2012, 12 (1): 5-18.

邻苯二甲酸二辛酯对大鼠卵巢颗粒细胞分泌功能的影响

Effect of dioctyl phthalate (DOP) on secretion of ovarian granulose cells in rats

赵力军¹, 沈晟¹, 王静², 陈曦¹, 孙增荣¹, 汤乃军¹

ZHAO Li-jun¹, SHEN Sheng¹, WANG Jing², CHEN Xi¹, SUN Zeng-rong¹, TANG Nai-jun¹

(1. 天津医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 天津 300070; 2. 天津市疾病预防控制中心, 天津 300011)

摘要:以邻苯二甲酸二辛酯 (DOP) 对大鼠卵巢颗粒细胞进行体外染毒、培养来研究 DOP 对卵巢颗粒细胞分泌功能的影响。提取未成年大鼠卵巢颗粒细胞进行体外培养, DOP 染毒后测定细胞分泌产物 (雌二醇和孕酮) 含量。染毒组与对照组比较, 雌二醇和孕酮水平均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。雌二醇含量与 DOP 剂量的相关系数为 -0.68 ($P < 0.01$); 孕酮含量与 DOP 剂量的相关系数为 -0.79 ($P < 0.01$), 提示在实验剂量下产生剂量-反应关系。DOP 对大鼠卵巢颗粒细胞分泌功能有抑制作用。

关键词: 邻苯二甲酸二辛酯; 大鼠; 卵巢颗粒细胞; 雌二醇; 孕酮

中图分类号: R994.6

文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2012)04-0278-03

邻苯二甲酸酯类 (phthalic acid esters, PAEs) 化合物是一类可干扰内分泌功能的环境污染物, 包括邻苯二甲酸二乙己基酯 (DEHP) 等 30 多种化合物^[1]。PAEs 化合物作为增塑剂, 遇到水或有机溶剂时极易释放出来, 从而对环境造成污染^[2]。PAEs 化合物是目前地球上最为广泛的污染物之一^[3], 具有生殖毒性^[4,5]、致癌性、致畸致突变作用^[6-8], 并可引起哮喘^[9]。邻苯二甲酸二辛酯 (DOP) 是一种应用非常广泛的增塑剂, 除用于塑料、橡胶、油漆及乳化剂等工业外, 还用于生产食品包装材料、医疗卫生制品等。本实验研究拟通过体外培养方法, 观察 DOP 对大鼠卵巢颗粒细胞分泌功能

的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物: 二级 Wistar 大鼠, 由中科院实验动物中心提供。

试剂: DMEM 培养基 (天津百若克医药生物技术有限责任公司), 青霉素、链霉素、标准胎牛血清 (天津灏洋生物制品科技有限公司), 孕马血清 (PMSG, 沈阳光大制药有限公司), DOP (分析纯)、二甲基亚砷 (天津化学试剂厂), 大鼠雌二醇、大鼠孕酮试剂盒 (美国 R&D)。

1.2 方法

取 DMEM 培养液, 无菌加入 10% 的标准胎牛血清, 再分别按照 60 U/ml、60 μ g/ml 加入青霉素和链霉素, 振荡摇匀, 4℃ 中保存。

采用未成年雌性大鼠, 皮下注射 PMSG, 100 IU/100 g, 48 h 后颈椎脱臼处死, 取出双侧卵巢, 在平皿中用磷酸缓冲液 (PBS) 清洗, 于 DMEM 培养基中用无菌的 20 ml 注射器针头刺破卵泡, 冲洗出颗粒细胞, 移入刻度离心管, 1 000 r/min 离心, 沉淀, 弃去上清液, 重复 3 次后用 DMEM 培养液定容细胞混悬液至 4 ml。

用培养液调整细胞密度, 按 1×10^6 个/L 浓度 200 μ l/孔于培养板中, 37℃、5% CO₂ 的培养箱培养。培养至细胞充分贴壁后更换不加血清的培养基, 并加入受试物, 再培养 24 h, 测定细胞分泌产物雌二醇、孕酮含量^[10]。

细胞分泌产物测定: 分别取标准品、待测培养液 25 μ l/孔加于相应反应孔中, 于 450 nm 处读取吸光度值。数据处理后获得标准曲线, 从标准曲线上查出被测样品的雌二醇、孕酮含量。

实验设高、中、低 3 个剂量组, 终浓度为 40、8、1.6 μ g/ml; 设等体积阴性对照与空白对照组。阴性对照不加受试

收稿日期: 2011-11-18; 修回日期: 2012-03-20

基金项目: 天津市科技支撑计划重点项目 (09ZCaYSF01700), 天津医科大学科研基金 (2010ky13)。

作者简介: 赵力军 (1955—), 男, 副教授, 研究方向: 工业毒理。

物,空白对照不含颗粒细胞,其他处理条件同染毒组,每组设 4 个平行孔。

用 SPSS11.7 统计软件进行数据单因素方差和相关分析。

2 结果

2.1 DOP 对大鼠雌二醇分泌的影响

表 1 可见,3 个染毒组的雌二醇均较阴性对照组低,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),进一步两两比较显示除低剂量组与中剂量组、中剂量与高剂量组外,其他组间差别均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 DOP 对大鼠卵巢颗粒细胞雌二醇分泌的影响

组别	孔数	染毒剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	雌二醇 (ng/ml)	F 值	P 值
高剂量组	4	40.00	$161.95 \pm 29.69^*$	12.370	0.001
中剂量组	4	8.00	$215.51 \pm 33.90^*$		
低剂量组	4	1.60	$310.22 \pm 25.60^*$		
阴性对照组	4	0.00	373.82 ± 54.09		

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.01$ 。

2.2 DOP 对大鼠孕酮分泌的影响

表 2 可见,3 个染毒组的孕酮水平均较阴性对照组低,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);进一步两两比较显示 3 个剂量组间的孕酮含量的差别均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 2 DOP 对大鼠卵巢颗粒细胞孕酮分泌的影响

组别	孔数	染毒剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	孕酮 (ng/ml)	F 值	P 值
高剂量组	4	40.00	$61.60 \pm 6.13^*$	90.810	0.0001
中剂量组	4	8.00	$84.46 \pm 9.00^*$		
低剂量组	4	1.60	$113.07 \pm 7.63^*$		
阴性对照组	4	0.00	153.70 ± 5.48		

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.01$ 。

2.3 雌二醇、孕酮与 DOP 剂量的相关性分析

雌二醇含量与 DOP 剂量的相关系数为 -0.679 ,且具有统计学意义 ($P < 0.01$),二者存在负向变化趋势联系;孕酮含量与 DOP 剂量的相关系数为 -0.794 ,且具有统计学意义 ($P < 0.01$),二者亦有负向变化趋势联系。

3 讨论

邻苯二甲酸酯类化合物对机体生殖健康的影响主要表现在以下四个方面:抵抗内源性雌激素的作用,模拟内源性雌激素的作用,改变体内性激素受体水平,改变内源性激素的合成和代谢^[1]。

由于护肤品的使用,使女性暴露于 PAEs 化合物的机会更多。PAEs 的暴露可引起女孩乳腺发育过早^[2],女工长期暴露于 DEHP 而出现受孕率下降、流产率升高,部分女工还出现与雌激素水平降低和排卵障碍相关的一些妇科病变。也有调查发现怀孕的并发症与尿样中 PAEs 含量具有相关性。另外,Cobellis L 等人调查发现血浆 DEHP 的浓度与子宫内膜异位症具有相关性,并首次提出 PAEs 可能是子宫内膜异位症病因^[3]。

Davis 等人建立 PAEs 雌性生殖毒性动物及细胞模型,发现 DEHP 可引起受试大鼠动情周期延长和不排卵,大鼠卵泡的体积减小和出现多囊肿卵巢^[4];还发现 DEHP 主要是通过其代谢产物邻苯二甲酸单乙基己基酯 (MEHP) 影响卵巢功能引起雌性生殖毒性作用,其作用位点主要是卵巢颗粒细胞。DEHP 可显著抑制排卵前期颗粒细胞产生雌二醇,使雌激素水平降低、黄体生成素 (LH) 峰消失而导致自然排卵周期改变^[5]。在几种结构上有联系的 PAEs 中,仅有 DEHP 能导致颗粒细胞中芳香化酶 mRNA 水平的下降,而芳香化酶是雌激素向雌激素转化的限速酶,芳香化酶的减少导致了雌激素水平的下降,从而引起相关的生殖毒性^[6,7]。

本研究中染毒组的雌二醇和孕酮均较对照组为低,与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);进一步的两两比较显示,3 个剂量组间的雌二醇含量高剂量组与低剂量组的差异有统计学意义 ($P < 0.01$);而孕酮含量各组之间的差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。相关分析结果显示:雌二醇含量与 DOP 剂量的相关系数为 -0.679 ,且有统计学意义 ($P < 0.01$);孕酮含量与 DOP 剂量的相关系数为 -0.794 ,且有统计学意义 ($P < 0.01$),均存在负向变化趋势,提示在实验剂量下均产生剂量-反应关系,证实 DOP 对大鼠卵巢的毒性作用,可以抑制大鼠颗粒细胞的分泌功能。

由于条件的限制,本实验仅对 DOP 单个物质进行研究,在今后研究中,我们应关注多种邻苯二甲酸酯类化合物的协同作用,从而对邻苯二甲酸酯类化合物对机体的影响作出科学综合的评价,进一步补充和完善其毒性作用及对人类健康的潜在危害性,为人体健康提供理论依据。

参考文献:

- [1] 裴赛峰,张昀,袁东,等. 邻苯二甲酸酯类化合物的环境污染及人体暴露水平 [J]. 环境与职业医学,2008,25 (3): 306-309.
- [2] 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 [J]. 广东化工,2006,33 (155): 29-30.
- [3] Babich M A, Chen S B, Greene M A, *et al.* Risk assessment of oral exposure to diisononyl phthalate from children's products [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2004, 40 (2): 151-167.
- [4] 蔡智鸣,杨科峰,厉曙光,等. DBP、DOP 对小鼠的联合遗传毒性 [J]. 环境与职业医学,2002,19 (3): 197-198.
- [5] Kasahara E, Sato E F, Miyoshi M, *et al.* Role of oxidative stress in germ cells apoptosis induced by Di-(2-ethylhexyl) phthalate [J]. Biochem, 2002, 365 (pt3): 849-856.
- [6] Doull J, Cattle K, Elcombe C, *et al.* A cancer risk assessment of Di-(2-ethylhexyl) phthalate: applicant of the new US EPA risk assessment guidelines [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 1999, 180 (1): 113-121.
- [7] George R Douglas, Alida P Hugenholtz, David H Blakey. Genetic toxicology of phthalate esters: mutagenic and other genotoxic effects [J]. Environmental Health Perspectives, 1986, 65 (3): 255-262.
- [8] 徐新云. DOP 对小鼠精子形态的影响 [J]. 工业卫生与职业病, 1994, 20 (6): 349-358.
- [9] Scott A. Industry slams its own study after it links asthma to phthalates [J]. Chemical Week, 2004, 106 (28): 13.

- [10] 刘英华, 王静, 王晓军, 等. 大鼠卵巢颗粒细胞培养及分泌物测定条件的研究 [J]. 毒理学杂志, 2008, 22 (1): 5.
- [11] 解玮, 朱惠刚. 环境雌激素的男性生殖健康效应 [J]. 上海环境科学, 2003, 22 (2): 132-136.
- [12] Colonl, Caro D, Bourdony C J, *et al.* Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development [J]. Environ Health Perspect, 2000, 108: 895-900.
- [13] Cobellis L, Latini G, De Felice C, *et al.* High plasma concentrations of Di-(2-ethylhexyl) phthalate in women with endometriosis [J]. Hum Reprod, 2003, 18 (7): 1512-1515.
- [14] Davis B J, Maronpot R R, Heindel J J. Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1994, 128 (2): 216-223.
- [15] Noci I, Maggi M, Fuzzi B, *et al.* Effects of low day 3 luteinizing hormone levels on in vitro fertilization treatment outcome [J]. Gynecol Endocrinol, 2000, 14 (5): 321-326.
- [16] Lovekamp T N, Davis B J. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2001, 172 (3): 217-224.
- [17] Lovekamp S T, Davis B J. Mechanisms of phthalate esters toxicity in the female reproductive system [J]. Environ Health Perspect, 2003, 111 (2): 139-145.

柴油机废气颗粒物诱导哺乳动物细胞 DNA 损伤实验研究

Experimental study on DNA damage caused by diesel exhaust particles in mammalian cells

周雪松, 王军, 韩丹, 王声远, 吴永会

ZHOU Xue-song, WANG Jun, HAN Dan, WANG Sheng-yuan, WU Yong-hui

(哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要: 以国产柴油机排气口废气采集物为受试物, 用噻唑蓝 (MTT) 染色的方法检验受试物各浓度作用 12 h、24 h、36 h 的细胞相对存活率; 单细胞凝胶电泳技术检测作用 2 h、4 h、8 h 受试物致细胞的 DNA 损伤。随着染毒时间的延长和染毒剂量的增加, 细胞存活率下降; 柴油机废气颗粒物引起细胞的拖尾率、尾矩和细胞尾部 DNA 含量增加。柴油机废气颗粒物的各浓度组在不同时间诱导的细胞拖尾率和尾部 DNA 含量均高于阴性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示柴油机废气颗粒物可以降低细胞的相对存活率, 并不同程度地致 NIH/3T3 细胞的 DNA 损伤。

关键词: 柴油机废气; DNA 损伤; 细胞毒性

中图分类号: R994.6 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2012)04-0280-02

近年来, 柴油机废气颗粒物已经成为大气污染的重要来源, 柴油机废气颗粒物成分十分复杂, 其中含有的有机成分多环芳香烃和多环芳香烃的硝基化合物已被证实有很强的致癌性和致突变性^[1]。1989 年国际癌症研究协会把柴油机排出颗粒物定为人可能致癌物^[2], 近年来研究发现, 长时间接触柴油机废气颗粒物还会对神经系统^[3]和心脑血管系统^[4]产生不良影响。本文采用噻唑蓝 (MTT) 比色法和彗星试验 (单细胞凝胶电泳试验), 以某工厂柴油机废气颗粒物为受试物, 检测其对哺乳动物细胞 (NIH/3T3 细胞) 的毒性作用。

1 材料与方法

收稿日期: 2011-11-28; 修回日期: 2012-03-16

基金项目: 黑龙江省卫生厅科研课题 (编号: 2009-225)

作者简介: 周雪松 (1983—), 男, 在读硕士, 主要从事工业毒理学研究。

通讯作者: 吴永会, 男, E-mail: 103071182@qq.com。

1.1 受试物与靶细胞

受试物采自国内某工厂柴油机尾部废气颗粒物, 经玻璃纤维滤膜阻留采样, 二氯甲烷索氏提取法提取。NIH/3T3 细胞购自北京市肿瘤研究所。

1.2 主要试剂和仪器

正常熔点的琼脂糖 (NMPA); 低熔点琼脂糖 (LMPA); 溴化乙锭 (EB) 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; MTT 1.0 mg/ml 。电泳仪 (Bio-RAD200/2.0, 美国 Bio-RAD 公司), OLYMPUS 荧光显微镜 (NIKONE600, 日本 OLYMPUS 公司)。

1.3 细胞相对存活率的 MTT 法检测

柴油机废气颗粒物浓度分别为 500.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、250.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、125.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、62.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组作为阴性对照组。在 37℃、5% CO_2 培养箱中分别培养 12、24、36 h。计算细胞相对存活率。

1.4 细胞 DNA 损伤的检测

将 NIH/3T3 细胞接种于培养瓶内, 24 h 细胞贴壁后加入受试物, 受试物分 5 个剂量组 (500.00、250.00、125.00、62.50、0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 将 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作为阴性对照组, 每组 3 瓶分别培养 2、4、8 h, PBS 冲洗终止染毒。取未加受试物的 3 瓶细胞用超净工作台上的紫外灯照射 3 min 做阳性对照。进行彗星试验并使用 EB 染色, 用软件对拖尾细胞进行分析, 将数据存入数据库。

1.5 统计分析

应用 SPSS18.0 统计软件对数据进行分析。细胞存活率和彗星试验结果数据组间差异比较采用单因素方差分析; 不同组细胞拖尾率采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 柴油机废气颗粒物对 NIH/3T3 细胞相对存活率的影响

受试物在不同浓度下, 细胞的相对存活率下降, 随作用