

DEHP、DBP 内分泌干扰活性的实验研究

解 玮,蒋颂辉,屈卫东*,朱惠刚 (复旦大学公共卫生学院,上海 200032)

摘要: 利用 MCF-7 细胞增殖实验、细胞周期分析、细胞雌激素受体水平测定和断乳大鼠子宫增重实验探讨了邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP)和邻苯二甲酸二丁酯(DBP)内分泌干扰活性及其可能的作用机制.结果表明,DEHP 和 DBP 可诱导 MCF-7 细胞增殖、细胞内雌激素受体水平增高,对细胞周期无明显影响,DEHP 不引起断乳大鼠子宫增重.推断 DEHP 和 DBP 可能并不是通过模拟雌激素而是引起体内天然激素受体水平改变等其他机制影响机体内分泌系统.

关键词: 邻苯二甲酸二乙基己酯; 邻苯二甲酸二丁酯; 内分泌干扰活性; MCF-7 人乳腺癌细胞; 雌激素受体

中图分类号: X703.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2004)01-0045-04

Experimental studies on the endocrine disrupting activity of DEHP and DBP. XIE Wei, JIANG Song-hui, QU Wei-dong, ZHU hui-gang (Department of Environmental Health, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China). *China Environmental Science*, 2004,24(1): 45~48

Abstract: MCF-7 cell proliferation experiment, cell cycle analysis, cell estrogen receptors level determination and rat weight increase uterotrophic experiment were used to explore endocrine disrupting activity and its possible action of Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and Dibutyl phthalate (DBP). DEHP and DBP could induce MCF-7 cell proliferation and increase the level of estrogen receptors in the cell, did not influence markedly the cell cycle and induce the rat uterotrophic. It was inferred that the influence of DEHP and DBP on endocrine system might not be obtained through mimic estrogen; but through inducement of other mechanism such as change of natural hormone level.

Key words: di (2-ethylhexyl) phthalate ;dibutyl phthalate ;endocrine disrupting activity ;MCF-7 human breast cancer cell ; estrogen receptor

邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP)和邻苯二甲酸二丁酯(DBP)作为聚氯乙烯(PVC)塑料增塑剂,应用极为广泛.水体、颗粒物、底泥和水生生物体内都可检测到 DEHP 和 DBP^[1,2].美国 EPA 将 DEHP 归为很可能的环境内分泌干扰物(EEDs),而 DBP 属于怀疑的 EEDs^[3].DEHP、DBP 在竞争性受体结合实验和重组雌激素酵母报告基因系统检测中都呈现一定的雌激素活性^[4,5].关于 DEHP 和 DBP 内分泌干扰活性及其作用机制,是通过雌激素受体结合,激活雌激素受体调控基因表达,还是通过模拟抗雄激素拮抗体内天然雄激素的生物学作用还存在争论.作者通过研究 DEHP、DBP 对人乳腺癌细胞增殖、细胞中雌激素受体水平、细胞周期和子宫增重的影响,探讨了两种化合物的内分泌干扰活性及其可能的作用机制.

1 材料与方法

1.1 MCF-7 细胞增殖实验

MCF-7 细胞以 2500 个/孔接种于 96 孔板,每孔接种 200 μ L,贴壁培养 24h,PBS 清洗一遍,换无酚红 DMEM(Sigma 公司)培养液(内含 10%活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清,30IU/100mL 胰岛素),培养 48h 后加入不同浓度的 DEHP、DBP (Agrose 公司)及抗雄激素 Flutamid(Sigma 公司),另设 10^{-7} ~ 10^{-12} mol/L 17β -雌二醇(Sigma 公司)6 个浓度组(以上试剂均用乙醇配制,实验中保证乙醇终浓度<0.1%).使终体积为 200 μ L,每浓度 6 孔平行样.细胞在 37 $^{\circ}$ C,95%CO₂ 培养 6d.在第 6d

收稿日期: 2003-05-06

基金项目: 国家“863”项目(2002AA601130)

* 责任作者,博士, wdqu@yahoo.com

终止细胞培养,移去培养液,SRB 染色,用酶标仪在 540nm 读取吸光值^[6].

1.2 细胞周期分析

MCF-7 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板,每孔加 2.5mL,无酚红 DMEM 培养液培养 3d,加入测试物.设空白对照、 10^{-5} mol/L DEHP、 10^{-4} mol/L DBP、 10^{-6} mol/L Flutamid 及 10^{-9} mol/L 浓度 17β -雌二醇共 5 组,每组 3 孔平行样.37℃,5%CO₂ 培养 5d.终止培养,收集 1×10^6 个细胞,离心(2000r/min×5min),弃去培养液,PBS 洗一遍,再离心,弃去 PBS.加入 70%冰预冷乙醇-20℃ 固定 24h.离心并弃固定液后,加入 RNaseA 至终浓度为 50mg/mL,在 37℃ 消化 0.5h,立即转入冰浴中停止反应,以终浓度为 50mg/mL 的 PI(Sigma 公司)避光条件下标记 1h 以上,应用 FACSCalibur 型流式细胞仪(Becton-Dickinson 公司)检测.测量条件为 488nm 氩离子激发,610nm 带通滤片收集 PI 红色荧光,每个样品分析 10^4 个细胞数量.

1.3 雌激素受体水平测定

处理过程同上述 1.2 节.37℃,5%CO₂ 培养 5d.终止培养,取 2.5×10^6 个细胞,缓慢加入 0.5%多聚甲醛溶液 2.5mL,边加边振动试管,以预防细胞聚集,置冰浴下固定 20min;离心(2000r/min×4min),弃上清,PBS 溶液洗涤 2 次;缓慢加入 0.1%Triton X-100 细胞膜渗透剂 2.5mL 同样边加边震荡,置 4℃

下放置 2min,离心,弃上清,PBS 溶液洗涤 2 次.细胞计数,取 1×10^6 个已渗透细胞加入小离心管中,加入 50μL 的人类雌激素受体单克隆抗体(hERMab, Antibody Diagnostica 公司),用 PBS 溶液稀释至 100μL,震荡混匀后置 4℃ 避光温育 2h.离心,弃上清,PBS 洗涤 2 次,分别在试管中加入 50μL 的 FITC-羊抗鼠 IgG(华美生物工程公司),置 4℃ 避光温育 1h.离心,弃上清,PBS 洗涤 2 次后加入少量 PBS 溶液制成单细胞悬液上机检测,试验重复 5 次^[7].在上述操作中,温度均为 4℃ 条件下,用 0.1% Triton X-100 渗透细胞,在以后的溶液中均含有 0.05% Triton X-100.流式细胞仪进行检测. FITC 荧光通过 530/30nm 的带通滤波器进行收集.每个标本检测 10^4 个细胞.流式细胞仪对雌

激素受体进行定量分析主要依据特异性荧光强度而定,该值与每个细胞上雌激素受体结合位数成正比.统计学处理为各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,t 检验用于组间比较.

1.4 断乳大鼠子宫增重实验

新生雌性 SD 大鼠,25±5g,购自上海西普尔/比凯(SIPPR/BK)实验动物公司.按体重随机分为 5 组,每组 10 只.阳性对照组和实验组分别按体重腹腔注射 200μg/kg 的 17β -雌二醇及 3,30,300mg/kg 的 DEHP(精制玉米油配制),阴性对照组腹腔注射等量精制玉米油,18d 断奶后于第 18,19,20d 连续给药 3d.第 4d 称重后,颈部脱臼处死动物取下子宫,去净脂肪、肠系膜等组织称重,计算脏器系数,以 t 检验用于统计分析.

2 结果

2.1 PAEs 对 MCF-7 细胞增殖的影响

由图 1 可见, 10^{-9} mol/L E_2 能引起 MCF-7 细胞的最大增殖效应,增殖指数为 2.99. DEHP、DBP 分别在 10^{-5} 、 10^{-4} mol/L 浓度时引起 MCF-7 细胞的最大增殖效应,增殖指数分别达到 2.21、1.91.以此作为细胞雌激素受体水平分析剂量选择的依据.Flutamid 对 MCF-7 细胞的影响未见文献报道.本试验通过对不同浓度的 Flutamid 体外染毒,测定对细胞增殖的影响确定了 10^{-6} mol/L 为 Flutamid 的最佳试验剂量(对细胞生长无影响).

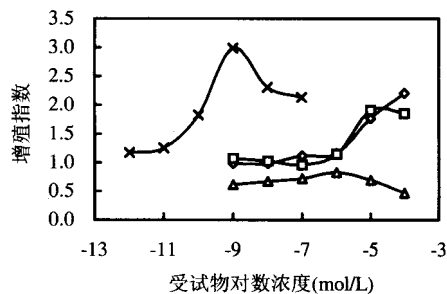


图 1 不同浓度受试物对 MCF-7 细胞增殖的影响

Fig.1 Influences of DEHP, DBP, Flutamid and 17β -estradiol on proliferation of MCF-7 cell

— — DBP — — DEHP — — Flutamid — — E_2

2.2 PAEs 对 MCF-7 细胞周期的影响

由表 1 可见,17β-雌二醇处理 MCF-7 细胞后,G₀/G₁ 期细胞比阴性对照减少 16.69%,S 期细胞比阴性对照增加 6.53%,G₂/M 期细胞比阴性对照增加 10.16%.DEHP、DBP 和 Flutamid 处理 MCF-7 细胞后,G₀/G₁ 期细胞比阴性对照分别减少 6.87%、0.51%、1.63%,S 期细胞比阴性对照分别增加 3.86%、1.15%、0.04%,G₂/M 期细胞比阴性对照分别增加 3.65%、0.63%、2.22%.

表 1 不同细胞周期时相的细胞数变化规律
Table 1 The cell number of various cell cycle phases of MCF-7 cells

处 理	各周期时相细胞分布		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	65.87	21.79	11.71
DEHP 组	59.00	25.65	15.36
DBP 组	65.36	22.94	12.34
Flutamid 组	64.24	21.83	13.93
17β-雌二醇组	49.18	28.32	22.50

2.3 PAEs 对 MCF-7 细胞雌激素受体水平的影响

由图 2 可见,DEHP、DBP 处理对于 MCF-7 细胞雌激素受体含量的影响与 17β-雌二醇类似,其雌激素受体的平均荧光强度与对照组相比显著性增高($P<0.05$),而 Flutamid 处理组的雌激素受体平均荧光强度与对照组比较无差异.提示 DEHP、DBP 和 17β-雌二醇可能诱导了细胞内雌激素受体蛋白表达的增加.

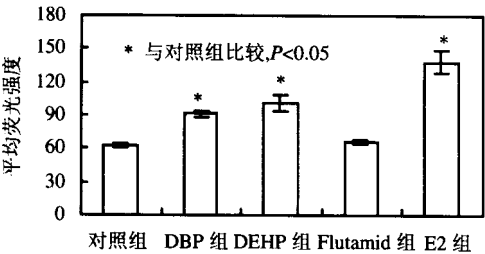


图 2 不同受试物对 MCF-7 细胞雌激素受体水平的影响

Fig.2 Effect on estrogen receptors level of MCF-7 cells of DEHP, DBP, Flutamid and 17β-estradiol

2.4 18d 断奶大鼠子宫增重实验结果

由表 2 可见,低、中剂量 DEHP 组子宫湿重

及其子宫重量系数均大于阴性对照组,但无显著性差异($P>0.05$).高剂量 DEHP 组大鼠体重、子宫重、子宫重量系数均低于阴性对照组,亦无显著性差异($P>0.05$).E2 组的子宫湿重及其子宫重量系数显著大于其他各组($P<0.01$)

表 2 DEHP 对大鼠子宫重量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Table 2 Effect on the uterus weight of rat of DEHP

组 别	平均体重 (g)	平均子宫重 (mg)	子宫重量系数 (%)×1000
溶剂对照	34.86±1.58	37.66±3.76	1.079±0.084
3mg/kg DEHP	34.64±2.13	40.98±4.37	1.181±0.092
30mg/kg DEHP	33.69±1.91	41.05±6.90	1.221±0.0854
300mg/kg DEHP	30.01±1.15	31.94±2.40	1.064±0.061
200i g/kg E ₂	34.56±1.55	70.58±8.36**	2.040±0.127**

注: ** $P<0.01$

3 讨论

体内天然雌激素的作用是由雌激素受体(ERs)介导的.ERs 位于细胞核或细胞浆内,其激活是配体依赖性的.缺乏配体时,受体与 HSP90 相结合成为一个 8~10s 的复合物,此时不能与 DNA 结合,也没有转录活性.一旦与雌激素配体结合,HSP 解离,受体成为 4s 的复合物,然后受体二聚化,通过与靶基因中的雌激素反应元件(ERE)特异性结合,可转录激活靶基因,合成蛋白质,从而促进细胞增殖和分化.这是天然雌激素发挥生物学效应的主要通路,根据这一原理设计了不同的生物学测试方法对环境广泛存在的雌激素干扰物进行筛选和鉴定.

DEHP 是明确的睾丸支持细胞毒物,而且 DEHP 和 DBP 均具有发育毒性,目前研究的热点在于内分泌干扰活性,即低剂量敏感期/长期暴露对机体的有害效应.在体外实验中 DEHP 和 DBP 可以促进 ERs 阳性的 MCF-7 细胞增殖,在增殖实验中,发现不同浓度 17β-E2 促进 MCF-7 细胞增殖的模式呈典型的抛物线.图 1 显示的 DEHP 促进 MCF-7 细胞增殖的模式与 17β-E2 相似,即在低剂量范围内呈正相的剂量—效应关系,但当其浓度超过某一值时,对细胞的促增殖作用

反而降低.这是由于过量的 17β -E2 可通过非 ER 介导途径抑制 II 型 DNA 拓扑异构酶和酪氨酸激酶活性,阻滞细胞进入 S 期,从而抑制细胞增殖.以往文献报道 DBP 对 MCF-7 细胞的促增殖模式也同 17β -E2 相似^[8].细胞周期反映了细胞生长、增殖的效率,决定了细胞分化、分裂和凋亡等.本实验以不同受试物对 MCF-7 细胞的促增殖最大效应浓度处理细胞后对细胞周期分析发现: 17β -E2 导致 MCF-7 细胞 G_1 期细胞减少,S 期细胞增加,影响了细胞周期的正常运行. DEHP、DBP 和 Flutamid 对细胞周期影响并不同于 17β -E2,而同阴性对照组比较无明显差异.因此仅靠 MCF-7 细胞的促增殖试验不能判断 DEHP 和 DBP 具有雌激素活性.

作者首次发现 DEHP 和 DBP 可升高 MCF-7 细胞的 ERs 水平,这点同 17β -雌二醇处理结果相似,因此该物质在体内也可能具有升高组织 ERs 水平的作用,使内源性雌激素与靶器官有效地结合,但以往文献报道在竞争性受体结合实验中,DEHP、DBP 同 17β -雌二醇竞争性与 ERs 结合能力并不强^[4,8],因此推断 DEHP 和 DBP 可能并不是通过模拟雌激素而是引起体内天然激素受体水平的改变而对机体内分泌系统产生影响,这可能也是 DEHP 和 DBP 发挥内分泌干扰活性的可能机制之一.非激素类抗雄激素化合物 Flutamid 对 ERs 水平并无影响.

4 结语

实验未见 DEHP 有增加子宫重量的趋势. DEHP、DBP 的内分泌干扰机制可能并不同于 17β -雌二醇和 Flutamid,即不模拟雌激素也不发挥抗雄激素效应,推断可能通过干扰细胞间信号传导等其他机制影响内分泌系统.

参考文献:

- [1] Yuan S Y, Liu C, Liao C S, *et al.* Occurrence and microbial degradation of phthalate esters in Taiwan river sediments [J]. *Chemosphere*, 2002,49:1295-1299.
- [2] Marttinen S K, Kettunen R H, Rintala J A. Occurrence and

removal of organic pollutants in sewages and landfill leachates [J]. *The Science of the Total Environment*, 2003,301:1-12.

- [3] U.S. Environmental Protection Agency. Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis, EPA/630/R-96/012.1997 [EB/OL]. <http://www.epa.gov/ORD/WebPub-s/endocrine/endocrine.pdf>
- [4] Zacharewski T R, Meek M D, Clemons J H, *et al.* Examination of the in vitro and in vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters [J]. *Toxicological Science*, 1998,46:282-293.
- [5] Nakai M, Tabira Y, Asa D, *et al.* Binding characteristics of dialkyl phthalates for the estrogen receptor [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999,254:311-314.
- [6] Payne J, Jones C, Lakhani S, *et al.* Improving the reproducibility of the MCF-7 cell proliferation assay for the detection of xenoestrogens [J]. *The Science of the Total Environment*, 2000, 248:51-62.
- [7] Stulc T, Klement D, Kvasnicka J, *et al.* Immunocytochemical detection of estrogen receptors in bone cells using flow cytometry [J]. *Biochimica. Et. Biophysica. Acta*, 1997,1356:95-100.
- [8] Catherine A H, Pirkko H, Parker M G, *et al.* The estrogenic activity of phthalate esters in vitro [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1997,105:802-811.

作者简介:解 玮(1973-),男,山西万荣人,复旦大学公共卫生学院在读博士生,主要从事环境毒理学研究.发表论文 2 篇.

环 保 信 息

北京检测室内空气质量 记者从北京市卫生局获悉,北京市日前开始对室内空气质量进行检测,检测的主要指标是 CO_2 、可吸入颗粒物和空气中的细菌总数.此次室内空气质量检测主要是在商场和娱乐公共场所,像影剧院、大型会议室等.此次抽检要求在 1 月 14 日之前完成,各城近郊区抽检不少于 20 家,远郊区则不少于 10 家.另外,市卫生监督部门还将加强游泳池和洗浴业的管理.

摘自《中国环境报》

2004-01-07