

宫内暴露邻苯二甲酸二酯对子代雌性成年大鼠心脏的影响

赵青松¹, 方 瑞², 吴 德¹, 都鹏飞²

摘要 目的 探讨邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)宫内暴露对子代雌性大鼠心脏的影响。方法 自妊娠第1天直至分娩,SD妊娠大鼠分别予以灌胃玉米油、低剂量[10 mg/(kg·d)]DEHP、高剂量[100 mg/(kg·d)]DEHP。观察各组子代雌性大鼠一般状况(体重)、心肌组织学以及心脏的血流动力学指标。结果 ①与正常对照组比较,DEHP染毒组雌性仔鼠自出生至生后70 d的体重增长明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。②高剂量组的心率(HR)、左室舒张压(LVEDP)明显高于正常对照组及低剂量组,而左室收缩压(LVSP)、左室最大上升速率($+dp/dt_{max}$)及左室最大下降速率($-dp/dt_{max}$)明显低于正常对照组及低剂量组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。③光镜下高剂量组子代雌性大鼠的心肌细胞肥大,心肌纤维排列紊乱,大量心肌细胞核核固缩、深染;电镜示大量心肌细胞核固缩、深染,心肌纤维排列紊乱、断裂,线粒体嵴排列大部分断裂、模糊。然而,正常对照组和低剂量组病理变化不明显。结论 怀孕期间大剂量的DEHP接触可引起子代雌性大鼠体重增加、血流动力学异常和心肌细胞结构紊乱。

关键词 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯;胚胎期;心肌细胞;心功能

中图分类号 R 725.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0618-04

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯[Di(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP]是一种工业上添加到聚氯乙烯中使用最广和产量最大的塑化剂,占全世界邻苯二甲

酸酯类消费的80%^[1],在成品塑料中占据40%的比例。DEHP被广泛应用在食品包装、玩具、化妆品和医疗制品等众多领域,可通过皮肤接触、消化道和呼吸道被吸收^[2],也可以通过胎盘屏障影响胎儿。DEHP作为一种环境内分泌干扰物(environmental endocrine disruptors, EEDs),其生殖毒性已经得到研究者的公认。但DEHP对心肌细胞及心脏功能的影响报道甚少。该研究主要通过胚胎期暴露于不同剂量的DEHP,观察子代雌性大鼠心脏组织形态学及测定其血流动力学,为今后DEHP心脏毒性的研究及干预提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 DEHP:分析纯,纯度98.6%(美国Sigma公司);玉米油:市售,金龙鱼牌;BL-420s生物机能试验系统、压力换能器(成都泰盟科技有限责任公司);Tecna F20透射电子显微镜(中国科技大学集成影像中心)。

DEHP染毒溶液的配制:用移液管分别吸取1 ml DEHP,用玉米油分别稀释100倍、10倍,颠倒混匀,配置成10、100 mg/ml的DEHP溶液。

1.2 实验动物分组及染毒方法 选择健康成年清洁级SD大鼠9只,体重为220~250 g,雌:雄为2:1,由安徽医科大学实验动物中心提供。动物可自由饮水、摄食,饲料由安徽医科大学实验动物中心提供。动物室温度为18~23℃,相对湿度为45%~55%。适应性饲养7 d后,将大鼠按雌雄2:1进行合笼后,以发现阴栓当日为妊娠第1天,将孕鼠按体重随机分为3组:正常对照组、低剂量(10 mg/kg)DEHP染毒组、高剂量(100 mg/kg)DEHP染毒组。根据大鼠生活习性,自妊娠第1天起,8:00禁食,

2014-01-05 接收

基金项目:安徽省教育厅自然科学重点项目(编号:KJ2007A096)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院儿科,合肥 230022

²安徽医科大学第二附属医院儿科,合肥 230601

作者简介:赵青松,女,硕士研究生;

都鹏飞,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:dpf.ayfy@163.com

SB203580. The expression of phosphorylation of p38MAPK and 4E-BP1 protein in PTEN loss Ishikawa and HEC-1A cells was significantly decreased. Compared with PTEN intact Ishikawa and HEC-1A cells the difference was significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Loss of PTEN results in the activation of p38MAPK signal pathway, and due to sensitive to p38MAPK signal transduction inhibitors in endometrial carcinoma cells. Those results suggest that cells with loss of PTEN have a feedback downregulation of receptor p38MAPK signalling pathway, which leads to PTEN inactivation of p38MAPK signaling pathway, the transcription change of the downstream gene targeted p38MAPK.

Key words endometrial carcinoma; PTEN; p38MAPK signal transduction inhibitor; sensitivity

14:00 灌胃染毒 DEHP, 正常对照组予以玉米油灌胃, 容量均为 2 ml/kg, 每天 1 次, 直至孕鼠分娩当日为止。给药期间, 每天称重, 根据体重调整给药量。孕鼠产仔后, 单独一笼哺育同剂量染毒组子代雌性仔鼠。

1.3 血流动力学参数测定 子代雌性大鼠出生后 3 个月, 称体重, 水合氯醛 (300 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 固定后, 行气管切开并给与人工机械通气, 予右颈总动脉并插入充满肝素 0.9% 氯化钠溶液的导管, 并外接 BL-420s 生物机能系统的换能器, 观察波形, 将导管顺势推进左心室, 待波形稳定, 分别记录心率 (heart rate, HR)、左心室收缩压 (left ventricular systolic pressure, LVSP)、左心室舒张末压 (left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)、左心室最大上升速率 (maximal rise velocity of left ventricular pressure, $+dp/dt_{max}$) 和左心室最大下降速率 (maximal fall velocity of left ventricular pressure, $-dp/dt_{max}$)。

1.4 左心室心肌组织形态学观察 记录生后 3 个月的子代雌性大鼠的血流动力学数据后, 迅速打开胸腔并取出心脏, 取心尖部分放入 10% 福尔马林固定、石蜡包埋, 连续切片, 片厚 5 μm , 常规 HE 染色等, 光学显微镜下行组织形态学观察。取左心室心肌组织, 迅速投入 3% 戊二醛固定缓冲液中, 预固定 5~10 min, 待柔软组织稍变硬后, 用刀片快速切成 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 大小的组织块, 然后室温继续固定 2 h, 电镜标本常规脱水、包埋, 超薄切片 (厚度为 50~70 nm), 透射电子显微镜观察超微结构。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行成组 t 检验和单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 一般情况 与正常对照组比较, DEHP 染毒组仔鼠的一般行为无明显改变。分别记录子代雌性大鼠出生 (d0)、生后 21 d (d21) 及生后 70 d (d70) 的体重, 每组 10 只。与正常对照组比较, DEHP 染毒组雌性仔鼠自出生至成年体重的增长明显, 且随 DEHP 剂量的增加, 体重增长越明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 血流动力学参数比较 3 组子代成年 SD 雌性大鼠的左心室血流动力学各指标数值, 见表 2, 高剂量组的 HR、LVEDP 明显高于正常对照组及低剂量组 (10 mg/kg), 而 LVSP、 $+dp/dt_{max}$ 及 $-dp/dt_{max}$ 明

显低于正常对照组及低剂量组 (10 mg/kg), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 子代雌性大鼠体重 (g $n=10$, $\bar{x} \pm s$)

时间	正常对照组	低剂量组	高剂量组	F 值	P 值
d 0	6.438 \pm 0.36	7.003 \pm 0.494*	7.008 \pm 0.575*	4.543	0.020
d 21	54.519 \pm 2.599	57.290 \pm 1.947*	59.468 \pm 3.630*	7.847	0.002
d 70	280.600 \pm 8.016	287.100 \pm 3.212	303.300 \pm 10.252*	22.814	0.000

与正常对照组比较: * $P < 0.05$

表 2 左心室功能及血流动力学参数的比较 ($n=11$, $\bar{x} \pm s$)

项目	正常对照组	低剂量组	高剂量组	F 值	P 值
HR (次/min)	370.82 \pm 13.97	373.45 \pm 3.47	407.64 \pm 12.38*	38.571	0.000
LVSP (kPa)	18.86 \pm 0.70	19.30 \pm 0.65	15.04 \pm 0.37*	173.858	0.000
LVEDP (kPa)	0.89 \pm 0.22	0.80 \pm 0.21	2.28 \pm 0.29*	125.607	0.000
$+dp/dt_{max}$ (kPa)	1 074.08 \pm 78.36	1 012.37 \pm 74.53	773.29 \pm 61.98*	53.589	0.000
$-dp/dt_{max}$ (kPa)	-892.30 \pm 71.18	-937.28 \pm 90.26	-567.02 \pm 35.09*	93.250	0.000

与正常对照组比较: * $P < 0.05$

2.3 左心室心肌组织形态学表现

2.3.1 光镜 宫内暴露 DEHP 的子代成年雌性大鼠的心脏病理改变见图 1。正常对照组的雌性大鼠心肌纤维排列整齐, 肌浆丰富, 核呈现卵圆形, 位居中央或一侧。宫内暴露不同剂量 DEHP 的成年雌性大鼠的心脏病变呈不同改变, 见图 1A; 低剂量 (10 mg/kg) DEHP 宫内暴露的成年大鼠的心肌细胞基本同正常对照组心肌细胞大小, 心肌细胞排列基本整齐, 偶见、部分心肌细胞核固缩、深染, 见图 1B; 高剂量 (100 mg/kg) DEHP 宫内暴露的成年雌性大鼠心肌细胞肥大, 心肌纤维排列紊乱, 大量心肌细胞核核固缩、深染, 见图 1C。

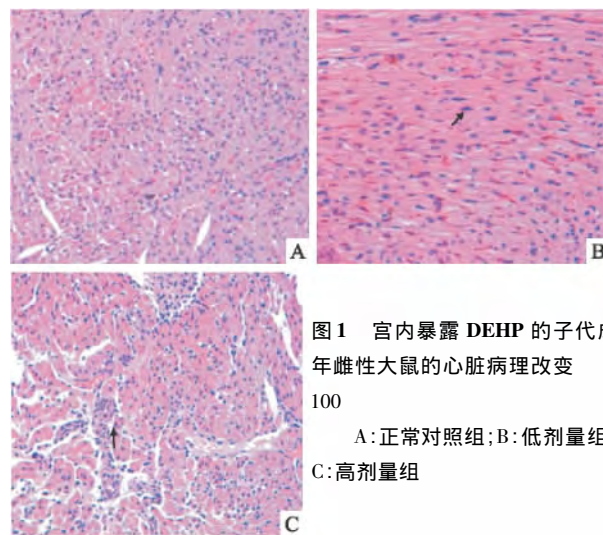


图 1 宫内暴露 DEHP 的子代成年雌性大鼠的心脏病理改变 $\times 100$

A: 正常对照组; B: 低剂量组; C: 高剂量组

2.3.2 电镜

宫内暴露不同剂量 DEHP 的子代成

年雌性大鼠的心肌超微结构改变见图2。正常对照组子代雌性大鼠心肌细胞核染色质分布均匀,肌原纤维横纹清晰,心肌纤维排列正常,线粒体嵴排列清楚,见图2A。宫内暴露不同剂量DEHP的条件下,成年雌性大鼠的心肌细胞超微结构改变程度不同,以高剂量DEHP引起的损伤较重;低剂量组大鼠心肌细胞核形不整(红色箭头所示),心肌纤维排列偶见紊乱(黑色箭头所示),线粒体基质嵴小部分断裂、模糊,见图2B;高剂量组大量心肌细胞核固缩、深染(红色箭头所示),心肌纤维排列紊乱、断裂(黑色箭头所示),线粒体嵴排列大部分断裂、模糊,见图2C。

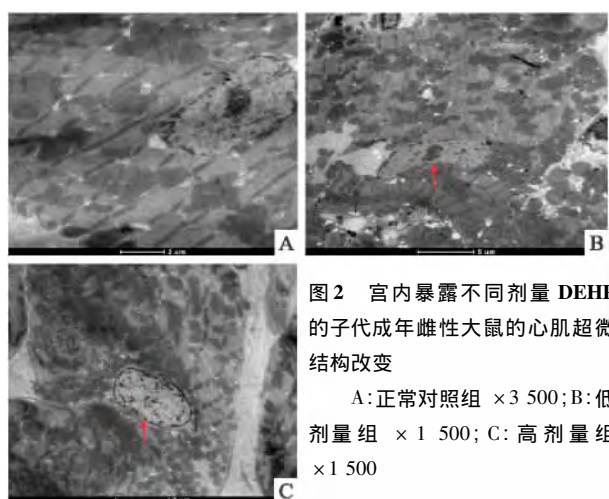


图2 宫内暴露不同剂量DEHP的子代成年雌性大鼠的心肌超微结构改变

A: 正常对照组 $\times 3\ 500$; B: 低剂量组 $\times 1\ 500$; C: 高剂量组 $\times 1\ 500$

3 讨论

DEHP为环境暴露水平最高的一种邻苯二甲酸酯类化合物,作为塑化剂普遍存在日常生活(食品包装、化妆品、玩具等)中,目前在医疗领域的应用也越来越广泛,如血袋、静脉输液袋、输血器、腹膜透析袋、心肺分流术软管、血液透析管等。尤其是新生儿加强监护病房的患儿可以接触到医疗设备中高浓度的DEHP。一般人群的DEHP暴露水平估计平均每天 $3\sim 30\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重(不包括职业暴露、各种医疗暴露及儿童非饮食摄入),主要来源于食品中DEHP的残留^[3]。孕妇和发育期儿童对DEHP更为敏感。

Aronson et al^[4]研究发现DEHP可影响大鼠心脏的电生理变化。2013年第1次发现宫内暴露DEHP可影响子代雄性成年大鼠心血管功能,导致全身动脉收缩压、舒张压及活性均降低^[5]。但对于雌性大鼠的影响未见报道。

本研究显示宫内暴露DEHP的雌性仔鼠,其体重增长与DEHP剂量相关,高剂量组($100\ \text{mg}/\text{kg}$)

子代雌性成年鼠的体重增长明显,与正常对照组及低剂量组($10\ \text{mg}/\text{kg}$)有显著性差异,其机制可能与DEHP在体内被分解为单脂等价物邻苯二甲酸单乙基己基酯(MEHP),MEHP激活过氧化物酶体增值物激活受体- γ (PPAR γ),从而诱导脂肪形成^[6]。普通饮食和含高脂肪的饮食并不会引起动物肥胖^[2]。这可能仅仅是由PPAR α 的肝脏氧化作用导致的,故该试验中玉米油并不影响实验结果,可作为正常对照组。宫内暴露DEHP子代雄性大鼠生后体重的增长与正常对照组比较,其结果无显著差异^[7]。Posnack et al^[8]认为暴露于DEHP的心肌细胞,其代谢元件受到影响,尤其长期脂酸的形可激起心脏出现缺血损害及心室功能不全。

应用左心室插管测定心脏血流动力学参数,可以直接采集并实时定量分析各种血流动力学参数,与超声心动图方法测定心功能比较,更能精准地监测心脏功能学的微小变化。心脏的工作性能主要取决于心室肌的收缩和舒张性能,常以LVSP和 $+dp/dt_{\max}$ 反映左心室的收缩功能;以LVEDP、 $-dp/dt_{\max}$ 反映左心室的舒张性能,反映了心室的充盈度、舒张功能及顺应性。该研究通过宫内暴露DEHP的子代雌性成年大鼠的血流动力学参数的比较,发现高剂量组的LVSP、 $+dp/dt_{\max}$ 及 $-dp/dt_{\max}$ 明显低于正常对照组及低剂量组($10\ \text{mg}/\text{kg}$),LVEDP明显升高,说明高剂量组心脏的收缩功能及舒张功能均受到影响。DEHP低剂量时,心率略增加,LVSP也是略增加的;而DEHP高剂量组的心率继续增加时,LVSP反而下降。这也符合心率影响心肌收缩力的变化规律。宫内暴露DEHP的子代成年雌性大鼠的收缩功能减低,可能是DEHP的代谢物MEHP引起与心脏的负性变力效应^[9]。Gillum et al^[10]也证实了临床浓度的DEHP可使电耦合的调节能力明显低下,也是成为心功能显著损害的可能因素。

另一方面,该研究显示宫内暴露DEHP的子代雌性大鼠的心肌组织都有不同程度的损害,且以高剂量组的心肌组织损害更为显著。主要表现为心肌细胞肥大,心肌纤维排列紊乱、断裂,核固缩、深染,线粒体嵴断裂、模糊等。这些结果可能是导致左心室顺应性减低、心肌收缩的基础结构受到破坏和心肌细胞能量供应受限的原因,从而减弱心脏舒张和收缩能以及心力储备,导致心脏血流动力学参数异常。

本研究探讨宫内DEHP暴露对子代雌性大鼠的体重及心脏功能的影响,结果显示宫内DEHP的暴

露,不仅可以导致子代雌性出现肥胖症等症状,还存在显著的心脏血流动力学异常和心肌超微结构的损伤,值得临床进一步关注。

参考文献

- [1] Kamrin M A. Phthalate risks, phthalate regulation, and public health: a review [J]. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2009, 12(2):157-74.
- [2] Schmidt J S, Schaedlich K, Fiandrese N, et al. Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on female fertility and adipogenesis in C3H/N mice [J]. *Environ Health Perspect* 2012, 120(8):1123-9.
- [3] Koch H M, Drexler H, Angerer J. An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population [J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2003, 206(2):77-83.
- [4] Aronson C E, Serlick E R, Preti G. Effects of di-2-ethylhexyl phthalate on the isolated perfused rat heart [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978, 44(1):155-69.
- [5] Martinez-Arguelles D B, McIntosh M, Rohlicek C V, et al. Maternal in utero exposure to the endocrine disruptor di-(2-ethylhexyl) phthalate affects the blood pressure of adult male offspring [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013, 266(1):95-100.
- [6] Feige J N, Gelman L, Rossi D, et al. The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(26):19152-66.
- [7] Vo T T, Jung E M, Dang V H, et al. Differential effects of flutamide and di-(2-ethylhexyl) phthalate on male reproductive organs in a rat model [J]. *J Reprod Dev*, 2009, 55(4):400-11.
- [8] Posnack N G, Swift L M, Kay M W, et al. Phthalate exposure changes the metabolic profile of cardiac muscle cells [J]. *Environ Health Perspect*, 2012, 120(9):1243-51.
- [9] Rock G, Labow R S, Franklin C, et al. Hypotension and cardiac arrest in rats after infusion of mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), a contaminant of stored blood [J]. *N Engl J Med*, 1987, 316(19):1218-9.
- [10] Gillum N, Karabekian Z, Swift L M, et al. Clinically relevant concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) uncouple cardiac syncytium [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009, 236(1):25-38.

Maternal in utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate affects the heart of adult female offspring

Zhao Qingsong¹, Fang Rui², Wu De¹, et al

(¹ Dept of Pediatrics, The First Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

² Dept of Pediatrics, The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the cardiac effects of DEHP exposure during pregnancy on female rats offspring. **Methods** Pregnant SD rats were gavaged from gestational day 0 until birth with corn oil, low [10 mg/(kg·d)] dose DEHP and high [100 mg/(kg·d)] dose DEHP. Each group consists of two pregnant dams. The outcomes of general morphometry (weight), cardiac histology and cardiac function were studied. **Results** ① When exposed to DEHP during pregnancy, body weight of female rats offspring increased from PND 0 (Postnatal day 0) to PND 70. The increase level of weight was significantly higher in high dose group at PND 70 ($P < 0.05$). ② Compared with control group and low dose DEHP group, the heart rate (HR) and left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) of female adult rats were deteriorated in the high dose DEHP group, while left ventricular systolic pressure (LVSP), maximal rise velocity of left ventricular pressure ($+dp/dt_{max}$) and maximal fall velocity of left ventricular pressure ($-dp/dt_{max}$) of that were significantly decreased ($P < 0.05$). ③ The cardiac histology effects of high dose DEHP exposure as follows: Pathological observation demonstrated cardiac myocyte hypertrophy, myocardial fiber disarray, a large number of myocardial cells karyopycnosis and stained; electron microscopy showed a lot of myocardial cells karyopycnosis and stained, myocardial fiber disorder and fracture arrangement, most of mitochondrial cristae were broken and blurred. However, no obvious change was found in the control group and low dose DEHP group. **Conclusion** High dose DEHP exposure in utero may lead weight increase, hemodynamic and myocardial abnormalities of female rats offspring.

Key words Di(2-ethylhexyl) phthalate; embryo; myocardial cells; cardiac function