

[文章编号] 1674-8115(2011)02-0225-04

· 论著 ·

妊娠中末期邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯暴露对母鼠妊娠结局及子鼠生长发育的影响

丁 瑜, 高 宇, 施 蓉, 周义军, 田 英

(上海交通大学公共卫生学院环境卫生教研室, 上海 200025)

[摘要] 观察妊娠中末期邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯(DEHP)经口染毒对母鼠妊娠结局及子鼠生长发育的影响。方法 50只Wistar雌鼠妊娠12 d时随机分入4个染毒组(DEHP浓度分别为1、250、750、1 000 mg/kg, n=10)和1个对照组(n=10);染毒组DEHP灌胃染毒至妊娠17 d,对照组仅给予玉米油。观察DEHP对母鼠行为、体质量、妊娠结局、脏器系数的影响,以及DEHP对子鼠体质量和雌性子鼠阴道开口的影响。结果 染毒期间,各DEHP染毒组母鼠体质量增加,各染毒组每窝活胎数量与对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);未观察到死胎、畸胎。子鼠出生第22天,各染毒组母鼠子宫、卵巢、肝脏、脾脏、肾脏、胸腺、下丘脑、脑、肾上腺的脏器系数与对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各染毒组子鼠出生后1~22 d体质量增加值与对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。出生后66 d,750 mg/kg及1 000 mg/kg DEHP染毒组雌性子鼠出现阴道闭锁畸形,分别占62.50%和81.25%,其余各组雌性子鼠阴道全部正常开口。结论 750、1 000 mg/kg DEHP妊娠中末期经口染毒未导致大鼠母体、胚胎一般毒性,可观察到雌性子代成年后阴道闭锁现象。

[关键词] 邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯;宫内暴露;雌性;性发育;子代;大鼠

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.02.024

[中图分类号] R711.1

[文献标志码] A

Effects of maternal exposure to Di (2-ethylhexyl) phthalate during mid- to late pregnancy on pregnancy outcome and offspring development

DING Yu, GAO Yu, SHI Rong, ZHOU Yi-jun, TIAN Ying

(School of Public Health, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of maternal exposure to Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) during mid-to late pregnancy on pregnancy outcome and offspring development. **Methods** Fifty pregnant Wistar rats were randomly assigned to 1 mg/kg DEHP treatment group, 250 mg/kg DEHP treatment group, 750 mg/kg DEHP treatment group, 1 000 mg/kg DEHP treatment group and control group (n = 10) on pregnancy day 12. Treatment groups were managed with 1 mg/kg, 250 mg/kg, 750 mg/kg and 1 000 mg/kg DEHP through day 17, respectively, and control group were administered with corn oil. The effects of DEHP on behavior, body weight, pregnancy outcome and organ coefficient of pregnant rats, and the effects of DEHP on body weight of offsprings and on vaginal orifice of female offsprings were observed. **Results** The weight gain of rats in DEHP treatment groups were not affected during exposure period ($P > 0.05$). There was no significant difference in average viable litter size between each treatment group and control group ($P > 0.05$), and no fetal malformation and stillbirth was observed. Twenty-two days after delivery, there was no significant difference in organ coefficient of uterus, ovary, liver, spleen, kidney, thymus, hypothalamus, brain and adrenal gland between treatment groups and control group ($P > 0.05$). There was no significant difference in weight gain of offsprings from day 1 to day 22 after birth between each treatment group and control group ($P > 0.05$). Sixty-six days after birth, 62.5% of female offsprings of 750 mg/kg DEHP treatment group and 81.25% of female offsprings of 1 000 mg/kg DEHP treatment group developed vaginal atresia, while no such abnormality occurred in the other groups. **Conclusion** Maternal exposure to 750 mg/kg and 1 000 mg/kg DEHP during mid- to late pregnancy may not cause significant maternal toxicity, while high incidence of vaginal atresia in adult offsprings can be observed.

[Key words] Di (2-ethylhexyl) phthalate; in utero exposure; female; sexual development; offspring; rat

[基金项目] 国家自然科学基金(30872086);上海市教委基金(07ZZ31);上海市科委研发基地项目(07dz22013);上海市卫生局基金(08GWD11, 08GWQ002) (National Natural Science Foundation of China, 30872086; Shanghai Education Committee Foundation, 07ZZ31; Shanghai Science and Technology Committee Foundation, 07dz22013; Shanghai Municipal Health Bureau Foundation, 08GWD11, 08GWQ002)。

[作者简介] 丁 瑜(1984—),女,硕士生;电子信箱: yuding-ding@hotmail.com。

[通信作者] 田 英,电子信箱: tianmiejp@yahoo.com.cn。

邻苯二甲酸酯(phthalates, PAEs)是使用广泛、最具代表性的聚氯乙烯材料增塑剂的一种,因其与塑料基质之间不形成共价键,而是以氢键和范德华力连接,当加热或接触到有机溶剂时极易从塑料中溶出而污染环境,危害人体^[1]。调查发现,很多地方的大气、水体、土壤、动物以及人体的血液、尿液、精液、羊水、母乳中均可检测到PAEs及其代谢产物^[2-3]。

邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯[Di(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP]作为PAEs中应用最广泛的一种,成为目前研究的焦点^[4]。已有报道显示,DEHP是一种环境内分泌干扰物,可以引起肝、肾、肺、心脏、生殖系统等毒性损害^[5];其中以生殖系统损害最为明显^[6-10],如宫内和哺乳期DEHP暴露可引起睾丸发育不全综合征,成年期接触DEHP可诱发睾丸癌、精子质量和数量下降,以及雌性妊娠及生殖功能疾病(子宫内膜异位症、卵巢囊肿、性周期紊乱、流产率升高、受孕率降低)等。因DEHP呈脂溶性,可以透过胎盘直接作用于胚胎^[11];而胚胎对毒物的代谢能力差,是个体发育的重要阶段,此时有害物质作用可能会导致青春期、成年后的异常,称为“成人疾病的胎儿起源”学说。宫内期是DEHP毒性作用最敏感的窗口期。

有关DEHP宫内暴露引起生殖系统发育损害的研究,目前主要集中于雄性动物,而对雌性动物的研究还比较少。流行病学研究^[12-13]提示,女童青春期性早熟可能与DEHP有关。本实验在妊娠中末期(妊娠12~17 d),即雌性生殖器官发育、性别分化的关键阶段,经口染毒,观察DEHP对雌性子代生殖系统发育的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级Wistar大鼠,6~8周龄;雌性大鼠体质量180~220 g,雄性大鼠体质量250~300 g。动物由中国科学院上海生命科学研究院动物研究中心提供,动物生产许可证号为SCXK(沪)2007-0005,动物使用许可证号为SYXK(沪)2008-0050。大鼠在温度(23 ± 2)℃,湿度(60 ± 10)%,9 h和15 h明暗循环(8:00—17:00灯亮)的环境中适应性饲养1周。雌鼠与雄鼠每日1:1合笼,次日清晨检查脱落阴栓,阳性者记为妊娠第0天(gestation day 0, GD0)。

1.2 动物分组及给药

参考美国环境保护局推荐的人每天可接受的DEHP摄入量(50 μg/kg),将染毒最低剂量设定为

1 mg/kg;根据预实验结果,最高剂量设定为1 000 mg/kg(预实验发现此剂量下未检查到明显的母鼠和胚胎一般毒性)。50只孕鼠GD12时随机分入4个染毒组(DEHP浓度分别为1、250、750、1 000 mg/kg, n=10)和1个对照组(n=10)。染毒组溶剂为玉米油(Sigma),体积为1 mg/kg,每日临用前配制,上午8:00—10:00灌胃给药,至GD17结束;对照组仅给予玉米油。

1.3 观察指标

观察各组母鼠体质量和行为变化以及妊娠结局。子鼠出生第2天(postnatal day 2, PND 2),为保持子鼠营养的均衡性,进行窝标准化操作,每窝保持6只雌性子鼠。PND 22子鼠断乳后称体质量,将母鼠用水合氯醛(3.5%, 1 mL/kg)麻醉,心脏穿刺采血5 mL后处死;称量子宫、卵巢、肝脏、脾脏、肾脏、胸腺、下丘脑、脑、肾上腺质量,计算脏器系数(脏器重量与体质量比值,g/100 g)。成年后(PND 66),观察雌性子鼠阴道开口情况。

1.4 统计学方法

采用SPSS 11.5软件进行统计学分析。正态性分布且方差齐性资料采用单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;率的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 母鼠毒性作用评价

2.1.1 母鼠行为及体质量观察 在整个实验过程中,对照组与各染毒组大鼠活动正常,皮毛光亮、舒展,饮食、饮水量正常,未发现异常行为。染毒开始时(GD12),各染毒组母鼠体质量与对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。染毒期间(GD12~17),各染毒组母鼠体质量增加,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表1)。

2.1.2 母鼠妊娠结局 各染毒组每窝活胎数量与对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表2);未观察到死胎、畸胎。

2.1.3 母鼠脏器系数 PND22,各染毒组母鼠子宫、卵巢、肝脏、脾脏、肾脏、胸腺、下丘脑、脑、肾上腺的脏器系数与对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表3)。

2.2 子鼠毒性作用评价

2.2.1 子鼠体质量比较 PND 1~22各组子鼠体质量增加值与对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表4)。

表 1 GD12~17 各组母鼠体质量增加情况($\bar{x} \pm s$, n=10)

Tab 1 Weight gain of rats in each group during GD12 to GD17
($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	体质量增加/g
对照组	21.42 ± 8.68
染毒组	
1 mg/kg	16.04 ± 7.03
250 mg/kg	18.34 ± 8.47
750 mg/kg	16.32 ± 10.79
1 000 mg/kg	9.05 ± 11.07

表 2 各组母鼠妊娠结局

Tab 2 Pregnancy outcome in each group

组别	子鼠数量	每窝活胎数量
对照组	87	8.7 ± 2.6
染毒组		
1 mg/kg	76	8.7 ± 2.3
250 mg/kg	61	7.8 ± 1.8
750 mg/kg	65	7.9 ± 1.7
1 000 mg/kg	80	8.5 ± 1.3

表 3 PND 22 时母鼠脏器系数的比较($\bar{x} \pm s$, n=10)

Tab 3 Organ coefficient of rats at PND22 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

脏器	对照组	染毒组			
		1 mg/kg	250 mg/kg	750 mg/kg	1 000 mg/kg
肝脏	3.90 ± 0.01	3.99 ± 0.01	4.02 ± 0.01	3.74 ± 0.01	3.94 ± 0.01
肾脏	0.97 ± 0.01	1.17 ± 0.01	1.19 ± 0.01	1.11 ± 0.01	1.14 ± 0.01
脾脏	0.48 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.49 ± 0.01	0.47 ± 0.01	0.47 ± 0.01
脑	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.02
卵巢	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01
胸腺	0.37 ± 0.04	0.37 ± 0.05	0.31 ± 0.08	0.31 ± 0.08	0.34 ± 0.01
子宫	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01
下丘脑	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01
肾上腺	0.52 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01

表 4 PND 1~22 子鼠体质量增加值($\bar{x} \pm s$, n=60)

Tab 4 Weight gain of offsprings ($\bar{x} \pm s$, n=60)

组别	体质量增加/g
对照组	43.74 ± 2.72
染毒组	
1 mg/kg	42.91 ± 3.04
250 mg/kg	43.29 ± 5.54
750 mg/kg	44.65 ± 3.14
1 000 mg/kg	41.81 ± 4.72

2.2.2 雌性子鼠成年后阴道开口观察 750、1 000 mg/kg DEHP 染毒组雌性子鼠出现阴道闭锁畸形,发生率分别为 62.5% (15/24) 和 81.25% (26/32)。而对照组 (38 只)、1 mg/kg DEHP 染毒组 (29 只) 和 250 mg/kg DEHP 染毒组 (25 只) 雌性子鼠阴道全

部正常开口。

3 讨论

文献^[14]报道,雌性大鼠产前和产后 1 周均是生殖系统中枢调控区域发育的关键阶段,此时接触低剂量的环境有害物质,可能会影响其功能。同时,已有 DEHP 雄性动物研究^[15]表明,宫内胚胎期是环境内分泌干扰物作用的敏感窗口期。Ema 等^[16]报道,PAEs 作用于妊娠晚期 (GD15~17) 大鼠时,对其子代的生殖毒性作用最为明显。所以本研究选择宫内性分化关键阶段 (GD 12~17),观察 DEHP 经口途径暴露对母鼠及雌性子代生殖发育的影响,结果发现:染毒期间各组母鼠活动良好,皮毛光亮、舒展,饮食、饮水量正常。各组母鼠妊娠结局未见异常,未观察到死胎、畸胎。PND 22 时,母鼠各主要脏器系数均正常。在 Grande 等^[17]的研究中,进行宫内与哺乳期 (GD 6~PND 22) DEHP (0.015~405 mg/kg) 暴露,结果未发现明显的母鼠毒性,妊娠结局正常。Moore 等^[18]报道,经 DEHP (375、750 mg/kg) GD 3~PND 21 暴露,750 mg/kg GD16~20 母鼠体质量增加较对照组减小,PND 1~21 体质量增加恢复正常,每窝平均胎鼠数等均正常。本实验结果与以上研究相类似,可以认为本研究剂量下未观察到明显的母鼠一般毒性和生殖毒性。

由于 DEHP 是一种脂溶性物质,可以透过胎盘直接作用于胚胎产生毒性。研究表明它可以引起胚胎肝、肾、肺及心脏、生殖系统等的发育畸形,具有一般发育毒性。王蕊等^[19]曾报道,DEHP 暴露可以引起小鼠早期吸收胎、胎鼠尾长、身长、体质量降低、脑室扩大、胸骨和肋骨畸形;体外实验^[20]也表明 DEHP 可导致胚胎颅骨长和脑部生长受抑制。本研究中,子鼠出生后体质量增加与对照组比较无明显差异,提示本实验剂量下未引起明显的一般子代发育毒性。可能因为本研究与上述实验染毒时间(上述胚胎毒性研究多为急性毒性实验)、染毒剂量(上述研究中剂量较高,通常 >1 000 mg/kg)、暴露途径(体外培养)等因素不同,而导致结果无法直接比较。

但是,本实验发现 750、1 000 mg/kg DEHP 染毒组子代雌鼠成年后发生阴道闭锁畸形。研究^[14]表明,啮齿类动物阴道开口是在 PND 30~38,体内第一个雌激素分泌高峰下完成;此时,如果体内雌激素水平异常则可导致阴道开口时间异常,甚至发生阴道闭锁。也可能是 DEHP 引起胎儿宫内发育阶段体内激素水平紊乱所致,正常情况下胎儿在宫内无雄激

素条件下,按照雌性生殖器官正常发育,若外源性物质引起雄激素水平升高,则会干扰宫内生殖器官发育过程,如导致尿生殖窦的窦结节未形成阴道板,或阴道未形成官腔,则可造成阴道闭锁的先天畸形。提示DEHP生殖毒性作用机制可能与其引起体内雄激素增高、雌激素降低作用有关。

美国国家毒物检测标准(The National Toxicology Program, NTP)中,有关研究也证明DEHP或其代谢产物可能会对雌性生殖系统造成影响,如降低体内的雌激素水平,抑制芳香化酶转录,导致子宫内膜异位症等^[21],本研究结果与此相一致。此外,在NTP等已有研究基础上,本实验着重观察生命发育早期DEHP暴露对青春期发育及成年后健康造成的危害,发现750、1 000 mg/kg妊娠中末期DEHP经口染毒,在未引起母体、胚胎一般毒性时,却可导致雌性子代成年期发生阴道闭锁畸形,提示性分化期的暴露是影响子代生殖发育的窗口期,此时接触外源性化学物所造成的损害作用可能要到成年后才表现出来,其远期效应不容忽视。

[参考文献]

- [1] 董夫银,闫杰.欧盟及美国禁用PAEs的法规及其出台始末[J].检验检疫科学,2006,16(3):78-80.
- [2] 张蕴晖,陈秉衡,郑力行,等.人体生物样品中PAEs类的含量[J].中华预防医学,2003,37(6):429-434.
- [3] Yuan SY, Liu C, Liao CS, et al. Occurrence and microbial degradation of phthalate esters in Taiwan river sediments [J]. Chemosphere, 2002, 49 (10): 1295 - 1299.
- [4] Huang PC, Kuo PL, Chou YY, et al. Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns [J]. Environ Int, 2009, 35(1): 14 - 20.
- [5] 厉曙光,赵文红,金泰虞.邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯对小鼠脏器损伤作用[J].中国公共卫生,2006,22(5):589-591.
- [6] Koo HJ, Lee BM. Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment[J]. J Toxicol Environ Health A, 2004, 67 (23 - 24): 1901 - 1914.
- [7] Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, et al. A dose response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult male offspring rats [J]. Toxicology, 2006, 228(1): 85 - 97.
- [8] Spjuth L, Gil MA, Caballero I, et al. Does exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate in pre-pubertal boars affect semen quality post-puberty[J]. Int J Androl, 2006, 29(5): 534 - 542.
- [9] Latini G, De Felice G, Presta G, et al. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate and duration of human pregnancy[J]. Environ Health Perspect, 2003, 111(14): 1783 - 1785.
- [10] Aldyrevva MV, Klimova TS, Izumova AS, et al. The effect of phthalate plasticizers on the generative function[J]. Gig Tr Prof Zabol, 1975, (12): 25 - 29.
- [11] Calafat AM, Brock JW, Silva MJ, et al. Urinary and amniotic fluid levels of phthalate monoesters in rats after the oral administration of di-(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-butyl phthalate[J]. Toxicology, 2006, 217(1): 22 - 30.
- [12] Colon I, Caro D, Bourdony CJ, et al. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development[J]. Environ Health Perspect, 2000, 108(9): 895 - 900.
- [13] 乔丽丽,蔡得培.上海市女童血清中邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸-2-乙基己酯水平与性早熟关系研究[J].卫生研究,2007,36(1):93-95.
- [14] Rasier G, Toppari J, Parent AS, et al. Female sexual maturation and reproduction after prepubertal exposure to estrogens and endocrine disrupting chemicals: a review of rodent and human data[J]. Mol Cell Endocrinol, 2006, 25(254 - 255): 187 - 201.
- [15] Brevini TA, Cillo F, Antonini S, et al. Effects of endocrine disruptors on the oocytes and embryos of farm animals[J]. Reprod Domest Anim, 2005, 40(4): 291 - 299.
- [16] Ema M, Miyawaki E, Kawashima K. Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-n-butyl phthalate during late pregnancy[J]. Toxicol Lett, 2000, 111(3): 271 - 278.
- [17] Grande SW, Andrade AJ, Talsness CE, et al. A Dose-response study following in utero and lactational exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate: effects on female rat reproductive development[J]. Toxicol Sci, 2006, 91(1): 247 - 254.
- [18] Moore RW, Rudy TA, Lin TM, et al. Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate[J]. Environ Health Perspect, 2001, 109(3): 229 - 237.
- [19] 王蕊,李厚勇,王子兰,等.邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯致畸致突变实验研究[J].癌变·畸变·突变,2002,14(2):120-121.
- [20] Seok Rhee G, Hee Kim S, Sun Kim S, et al. Comparison of embryo-toxicity of ESB and phthalate esters using an *in vitro* battery system[J]. Toxicol In Vitro, 2002, 16(4): 443 - 448.
- [21] Kavlock R, Barr D, Bockelheide K, et al. NTP-CERHR expert panel update on the reproductive and developmental toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate[J]. Reprod Toxicol, 2006, 22(3): 391 - 399.

[收稿日期] 2010-04-20

[本文编辑] 吴 洋