

论著

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯的遗传毒性研究

李军涛¹, 李文学¹, 张岩¹, 杨光宇¹, 庄润璇², 张晓君², 杨辉³, 张波², 朱伟¹, 杨颖⁴(1. 广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510440; 2. 南方医科大学公共卫生学院, 广东 广州 510515;
3. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100022; 4. 广东省疾病预防控制中心, 广东 广州 511430)

摘要:目的 评价邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)的遗传毒性。方法 采用细菌回复突变试验(Ames试验)、体外细胞染色体畸变、微核和彗星试验、体内小鼠骨髓红细胞微核试验、小鼠精原细胞染色体畸变试验评价DEHP诱发基因突变、染色体畸变及DNA损伤等遗传毒性。结果 Ames试验结果为阴性;中国仓鼠肺(CHL)细胞遗传毒性测试结果显示,DEHP各剂量组(0.312 5~5 mg/mL)染色体畸变率与溶剂对照组差异不具有统计学显著性($P>0.05$),高剂量(2.5和5.0 mg/mL)下微核率升高,5.0 mg/mL剂量下彗星尾部DNA含量增加,与溶剂对照组相比差异具有统计学显著性($P<0.05$)。DEHP各剂量组(3.75~15 g/kg)小鼠骨髓红细胞微核率与阴性对照组差异不具有统计学显著性($P>0.05$)。小鼠精原细胞染色体畸变结果显示,阴性对照组、3.75(24 h)、7.5(24 h)、15(24 h)及15 g/kg·BW(48 h)精原细胞染色体畸变率分别为1.6%、1.4%、1.8%、2.4%和3.8%,虽有增加的趋势,组间差异不具有统计学显著性($P>0.05$)。结论 本试验条件下未观察到DEHP诱发基因突变、染色体畸变和DNA损伤。

关键词: 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯; 基因突变; DNA损伤; 染色体畸变

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2022)05-0878-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2022.05.003

Genotoxicity of Di (2-ethyl hexyl) phthalate

LI Juntao¹, LI Wenxue¹, ZHANG Yan¹, YANG Guangyu¹, ZHUANG Runxuan², ZHANG Xiaojun²,
YANG Hui³, ZHANG Bo², ZHU Wei¹, YANG Ying⁴

(1. Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Guangzhou 510440, China;

2. School of Public Health, Southern Medical University, Guangdong Guangzhou 510515, China;

3. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China;

4. Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Guangzhou 511430, China)

Abstract: Objective To assess the genotoxicity of Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). **Methods** A series of guideline-compliant assays were performed to evaluate mutagenicity, chromosomal or DNA damage of DEHP, including Ames test, *in vitro* mammalian chromosome aberration assay and micronucleus test, comet assay, *in vivo* mice bone marrow micronucleus assay, and spermatogonial chromosomal aberration test. **Results** Ames tests results were negative. In *in vitro* tests, DEHP did not increase the frequency of chromosomal aberration, micronucleus and DNA break except in the dose of 2.5 and 5.0 mg/mL, which significantly increased the frequency of micronucleus and DNA break. In *in vitro* mammalian cell micronucleus test was negative. The chromosomal aberration rates in mice spermatogonial cells were 1.6%, 1.4%, 1.8%, 2.4% and 3.8% in negative control, 3.75 (24 h), 7.5 (24 h), 15 (24 h) and 15 (48 h) mg/kg·BW of DEHP, respectively. There was an increasing trend without statistical significant between groups. **Conclusion** DEHP showed no obvious genotoxicity under the test conditions.

Key words: Di(2-ethylhexyl) phthalate; mutagenicity; DNA damage; chromosomal aberration

收稿日期: 2021-11-18

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1603100); 广东省重点领域研发计划(2019B020210003)

作者简介: 李军涛 女 主任技师 研究方向为卫生毒理学

E-mail: jtw11011@163.com

通信作者: 杨颖 女 主任医师 研究方向为应用毒理学

E-mail: yang99063@qq.com

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(Di (2-ethyl hexyl) phthalate, DEHP)是一种典型的增塑剂,在食品领域用于塑料快餐盒、保鲜膜及食品容器,可能造成食品污染。作为一种持久性有机污染物,DEHP在环境中普遍存在。我国长江中DEHP浓度为54.73 $\mu\text{g}/\text{L}$ ^[1-2],天津海河中也发现了最高浓度为101 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的DEHP^[3]。另外,在我国人体尿液样本

中也检测到了 DEHP 的代谢物成分^[4-5]。DEHP 被国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)在 2011 年以动物致癌证据充分,人类致癌证据缺乏而被评为人类可能致癌物(2B 类)^[6],其可能机制是通过核受体过氧化物酶体增殖物激活受体 α (Peroxisome proliferators-activated receptor α , PPAR α)活化而促进细胞增殖^[7]。DEHP 的遗传毒性仍存在争议,尽管大多数实验室遗传毒性测试结果为阴性^[8],但人群调查发现尿液中 DEHP 的代谢产物与精子 DNA 损伤相关^[9]。此外,遗传毒性测试方法众多,化学品的危害识别应综合不同方法的测试结果。本研究采用《食品安全国家标准》GB15193 中的多种遗传毒性评价方法对 DEHP 遗传毒性进行系统性评价。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DEHP(CAS No. 117-81-7)、丝裂霉素 C、环磷酰胺、细胞松弛素 B 和二甲基亚砷均购自美国 Sigma 公司;秋水仙素、柠檬酸三钠、冰乙酸和吉姆萨染液购自上海生物工程有限公司;1640 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司;Tripton-100 购自英国 Biotech 公司;正常熔点琼脂糖购自法国 BIOWEST 公司;低熔点琼脂糖购自美国 Life Sciences 公司;Cometslide 平板购自 Trevigen。

在体外细胞试验中,DEHP 溶解于二甲基亚砷(Dimethylsulfoxide, DMSO),DMSO 浓度低于 0.5%;在小鼠体内试验中,DEHP 溶解于 ddH₂O,制成混悬液,灌胃前置置于微型振荡器上混匀。

1.2 实验动物

选择健康成年雄性 SPF 级 NIH 小鼠,由广东省医学实验动物中心提供,动物合格证号:No. 00157527。动物饲养于广州市疾病预防控制中心屏障级实验动物设施,实验动物设施使用许可证号为:SYXK(粤)2016-0162。温度为 20℃~24℃,相对湿度 40%~70%,实验期间动物自由摄食、饮水。

1.3 试验菌株

选用《食品安全国家标准》GB 15193—2014 中规定的标准菌株,即鼠伤寒沙门菌组氨酸缺陷型 TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 试验菌株,实验前进行基因型和生物学性状鉴定。试验选用瑞德肝脏疾病研究(上海)有限公司提供的大鼠肝匀浆 S9 作为体外活化系统。

1.4 细胞株

中国仓鼠肺(Chinese Hamster Lung, CHL)细胞购自中国医学科学院细胞库。CHL 细胞复苏后,使

用 RPMI 1640 培养基(含 1% 青霉素混合液和 10% 胎牛血清)在 37℃、5% CO₂ 条件下培养。

1.5 细菌回复突变试验(Ames 试验)

参照 GB 15193.4—2014 进行^[10]。根据受试物情况,本试验共设五个剂量组,分别为 5 000、1 000、200、40、8 $\mu\text{g}/\text{皿}$,设自发回变组、溶剂对照组和阳性对照组,每组均包括使用代谢活化系统(+S9)和不使用代谢活化系统(-S9)。实验采用平板掺入法,每一剂量组均设三个平行皿,置 37℃ 下培养 48 h,记录各试验组每皿回变菌落数。当受试物组回变菌落数的增加超过溶剂对照组 2 倍以上,并有剂量-反应关系或至少某一测试点有可重复的并有统计学意义的阳性反应时,判定为该受试物 Ames 试验为阳性。

1.6 体外哺乳动物细胞微核试验

参照 GB 15193.28—2020 进行^[11]。用含 0.3125、0.625、1.25、2.5 和 5 mg/L 浓度 DEHP 的新鲜培养基培养。阴性对照为溶剂,阳性对照为丝裂霉素 C(不加 S9,终浓度为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和环磷酰胺(加 S9,终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。取对数生长期的 CHL 细胞接种于 6 孔板中,24 h 进行不同剂量的 DEHP 染毒 4 h,后加入细胞松弛素 B(终浓度为 4.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),继续培养 24 h。收获细胞、滴片、染色、阅片。每个剂量组计数 1 000 个细胞中单核、双核及多核细胞数,按下列公式计算复制系数(Replication index, RI)以评价细胞毒性(T:受试物组,C:阴性对照组),并计数 2 000 个双核细胞中出现微核的细胞百分比。

$$RI = \frac{(\text{双核细胞数}_T + 2 \times \text{多核细胞数}_T) / 1\,000}{(\text{双核细胞数}_C + 2 \times \text{多核细胞数}_C) / 1\,000} \times 100$$

1.7 体外哺乳类细胞染色体畸变试验

染色体畸变试验参照 GB 15193.23—2014 开展^[12]。CHL 细胞复苏后接种于 6 孔板中,DEHP 剂量、阴性、阳性对照设置同 1.6。加 S9 情况下连续染毒 6 h;不加 S9 情况下连续染毒 24 h。细胞收获前约 2 h,在培养液中加入秋水仙素(终浓度 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。收获细胞、制片、染色,在显微镜下(100 \times)选择处于中期分裂相且分散良好的细胞进行观察,每一剂量组分析 100 个中期分裂相细胞。记录染色体结构畸变的畸变类型(包括裂隙、断裂和交换等)和含结构畸变细胞数,以及出现染色体数目畸变的细胞数。

1.8 体外哺乳类细胞彗星试验

参照文献[13]进行实验。细胞处理同 1.6,利用碱性彗星实验检测 DNA 单链断裂和碱性易变位点损伤。用 8.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的吖啶橙 100 μL 染色,荧光显微镜下观察。每一处理组随机取 30 个细胞进

行分析并拍摄,用 CASP 彗星图像分析软件进行分析。

1.9 小鼠骨髓红细胞微核试验

参照 GB 15193.5—2014 进行^[14]。选用 SPF 级 NIH 小鼠 50 只,随机分为 5 组,雌雄各半,DEHP 剂量设置 15(1/2LD₅₀)、7.5(1/4LD₅₀)、3.75 g/kg·BW (1/8LD₅₀),经口灌胃,灌胃量为 0.2 mL/kg·BW,阴性对照为 ddH₂O,阳性对照组动物腹腔注射环磷酰胺(40 mg/kg·BW)。24 h 重复上述步骤,第 2 次染毒 6 h 后处死小鼠,取骨髓、涂片、镜检。每只小鼠观察 1 000 个骨髓嗜多染红细胞(Polychromatic erythrocytes, PCE),计数微核细胞数,计算微核率(%)。计数 200 个红细胞中 PCE 与正染红细胞(Normochromatic erythrocytes, NCE)的个数,计算 PCE/NCE 的比值。

1.10 小鼠精原细胞染色体畸变试验

参照 GB 15193.8—2014 进行^[15]。选用 SPF 级 NIH 小鼠 50 只(体质量 25~30 g)随机分为 6 组,DEHP 剂量设置同 1.9,经口灌胃染毒,中、低剂量组设置染毒后 24 h 观察点,高剂量组设置 24 h 和 48 h 两个观察点,阳性对照组腹腔注射环磷酰胺(40 mg/kg·BW)。动物处死前 4~5 h 腹腔注射秋水仙素(4 mg/kg·BW)。动物处死后取双侧睾丸,经低渗、固定、软化、染色等步骤制备精原细胞染色体标

本,每个标本在生物显微镜下观察 100 个中期分裂相细胞,分析精原细胞染色体畸变,记录每个动物染色体结构畸变的细胞数和每个细胞的染色体畸变数,比较组间差异。

1.11 统计学分析

实验数据中,计量资料以平均值±标准差(Mean±SD)表示,计数资料以率表示。采用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计分析,其中细菌回复突变试验中试验组平均每皿中的回复菌落数大于或等于溶剂对照组数值 2 倍时判断结果为阳性;染色体畸变试验中各组结构畸变率及数据畸变率差异使用 χ^2 检验比较;采用 Poisson 分布比较微核率的组间差异。小鼠体内试验,汇报各组小鼠的汇总结果,并计算率。 $P < 0.05$ 时,认为差异具有统计学显著性。

2 结果

2.1 细菌回复突变试验(Ames 试验)

由表 1 可见,DEHP 对 5 种鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 无论加或不加代谢活化系统 S9,各剂量组回变菌落数均未超过溶剂对照菌落数 2 倍,其回变菌落数与阴性对照差异无统计学意义($P > 0.05$),亦无剂量反应关系,试验结果为阴性。

表 1 DEHP 对鼠伤寒沙门菌回复突变的影响($n=3$)

Table 1 Effects of DEHP on the bacterial reverse mutation number ($n=3$)

组别	TA97		TA98		TA100		TA102		TA1535	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
40 $\mu\text{g}/\text{皿}$ DEHP	159.7±6.6	161.3±3.3	35.3±2.4	35.3±0.9	186.3±4.5	182.3±8.7	306.3±3.1	296.3±11.6	11.7±0.9	11.0±1.0
200 $\mu\text{g}/\text{皿}$ DEHP	161.7±6.9	161.0±5.7	34.7±2.1	34.7±2.4	184.3±2.4	179.0±7.5	294.3±6.6	293.7±8.5	11.7±1.7	13.5±1.5
1 000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ DEHP	163.3±5.2	157.3±6.2	36.0±1.4	36.7±1.9	179.3±3.7	181.7±6.2	292.7±7.9	305.7±3.7	13.3±0.9	13.0±1.0
5 000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ DEHP	157.7±8.7	162.7±9.0	33.3±1.2	35.3±2.5	187.0±4.2	178.7±8.2	301.0±3.7	302.7±3.4	11.7±0.9	12.0±1.0
阴性对照(ddH ₂ O)	158.3±6.2	163.3±7.3	34.3±0.5	36.3±1.7	186.3±3.3	179.7±4.2	290.7±3.9	299.7±6.3	13.3±2.4	10.0±0.0
溶剂对照(DMSO)	159.0±4.3	164.0±8.5	35.7±1.9	34.0±0.8	178.3±5.4	186.0±2.8	293.0±6.4	297.0±10.2	11.0±0.8	13.5±0.5
阳性对照*	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000	>1 000

注:*阳性对照:-S9:TA97 和 TA98 为 50.0 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 的敌克松,TA100 为 1.5 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 的叠氮钠,TA102 为 1.5 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 的丝裂霉素 C;+S9:TA97、TA98 和 TA100 为 10 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 的 2-氨基苄,TA102 为 60 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 的 1,8-二羟蒽醌

2.2 体外哺乳动物细胞微核试验

如表 2 所示,DEHP 各剂量组中,剂量大于 1.25 mg/mL 可见细胞毒性作用,5 mg/mL 时,DEHP 对细胞增殖的抑制率达为 44.5%(-S9)~54.5%(+S9)。在加入代谢活化系统 S9 的情况下,微核细胞率随染毒剂量的增加而升高,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 体外哺乳动物细胞染色体畸变试验

染色体畸变实验结果显示(表 3),在添加代谢活化系统和不添加代谢活化系统的条件下,未见 DEHP (剂量范围 0.312 5~5 mg/mL)所致染色体结构畸变

和染色体数目畸变率异常,与对照组比较差异均无统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 体外哺乳类细胞彗星试验

如表 4 所示,5 mg/mL DEHP 可引起 CHL 细胞彗星尾部 DNA 含量增加,与对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 小鼠骨髓红细胞微核试验

骨髓红细胞微核试验结果(表 5)显示,本试验条件下 DEHP 各剂量组小鼠骨髓红细胞微核未见异常,与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表2 DEHP对体外哺乳类细胞微核的影响

Table 2 Effects of DEHP on micronucleus rate *in vitro* in CHL cells

组别	RI值		细胞毒性/%(100-RI)		需观察双核细胞数/个		含微核双核细胞数/个		微核细胞率/%	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
0.312 5 mg/mL DEHP	92.8	90.5	7.2	9.5	1 000	1 000	4	3	0.4	0.3
0.625 mg/mL DEHP	90.1	87.6	9.9	12.4	1 000	1 000	7	6	0.7	0.6
1.25 mg/mL DEHP	86.5	82.6	13.5	17.4	1 000	1 000	6	8	0.6	0.8
2.5 mg/mL DEHP	73.4	69.8	26.6	30.2	1 000	1 000	8	10	0.8	1.0*
5 mg/mL DEHP	55.5	45.5	44.5	54.5	1 000	1 000	9	13	0.9*	1.3**
溶剂对照	98.8	96.5	1.2	3.5	1 000	1 000	5	6	0.5	0.6
0.05 μg/mL 丝裂霉素 C	90.5	89.6	9.5	10.4	1 000	1 000	25	—	2.5	—
10 μg/mL 环磷酰胺	91.2	82.3	8.8	17.7	1 000	1 000	—	18	—	1.8

注:与阴性对照组相比,*、**分别表示P<0.05和P<0.01

表3 DEHP对体外哺乳类细胞染色体畸变的影响

Table 3 Effects of DEHP on chromosomal aberration *in vitro* in CHL cells

组别	S9 mix	处理时间/h	畸变数/个							Total/[n(%)]	gap/[n(%)]
			csb	ctb	cse	cte	frg	gap	gap		
0.312 5 mg/mL DEHP	-	24	0	1	0	0	0	0	1(2.0)	0(0.0)	
0.625 mg/mL DEHP	-	24	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	
1.25 mg/mL DEHP	-	24	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	
2.5 mg/mL DEHP	-	24	0	0	0	0	1	1	1(2.0)	0(0.0)	
5 mg/mL DEHP	-	24	0	0	0	1	0	0	0(2.0)	1(2.0)	
0.312 5 mg/mL DEHP	+	6	0	0	1	0	0	0	0(0.0)	1(2.0)	
0.625 mg/mL DEHP	+	6	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	
1.25 mg/mL DEHP	+	6	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	
2.5 mg/mL DEHP	+	6	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	
5 mg/mL DEHP	+	6	0	0	1	0	0	0	0(0.0)	1(2.0)	
溶剂对照		6	0	0	0	0	0	0	0(0.0)	0(0.0)	
0.05 μg/mL 丝裂霉素 C	-	24	1	4	1	7	0	13	13(26.0)*	0(0.0)	
10 μg/mL 环磷酰胺	+	6	1	1	1	7	0	10	10(20.0)*	0(0.0)	

注:在倒置显微镜下计数染色体断裂(csb)、染色单体断裂(ctb)、染色体交换(cse)、染色单体交换(cte)、染色体碎片(frg)以及染色单体或染色体间隙(gap)的细胞数;gap不纳入总数计算;*表示P<0.05

表4 DEHP对CHL细胞DNA损伤的影响

Table 4 Effects of DEHP on DNA damage and repair *in vitro* in CHL cells

组别	彗尾光密度	
	-S9	+S9
0.312 5 mg/mL DEHP	1.02±0.23	1.05±0.11
0.625 mg/mL DEHP	1.24±0.19	1.21±0.19
1.25 mg/mL DEHP	1.06±0.24	1.09±0.21
2.5 mg/mL DEHP	1.86±0.22	1.99±0.34
5 mg/mL DEHP	2.01±0.15*	2.89±0.26*
溶剂对照	1.01±0.12	1.05±0.21
0.05 μg/mL 丝裂霉素 C	24.85±3.69**	—
10 μg/mL 环磷酰胺	—	29.65±5.69**

注:与阴性对照组相比,*、**分别表示P<0.05和P<0.01

表5 DEHP对小鼠骨髓红细胞微核的影响

Table 5 Effects of DEHP on micronucleus rate *in vivo* in mice bone marrow erythrocyte

组别	观察PCE数/个	含微核PCE数/个	微核率/%	PCE/NCE
3.75 g/kg DEHP	10×1 000	19	1.9	16.05
7.5 g/kg DEHP	10×1 000	17	1.7	17
15 g/kg DEHP	10×1 000	18	1.8	17.08
阴性对照(ddH ₂ O)	10×1 000	16	1.6	18.54
40 mg/kg 环磷酰胺(i.p.)	10×1 000	276	27.6	15.96

2.6 小鼠精原细胞染色体畸变试验

染毒期间高剂量组(15 g/kg·BW)小鼠出现体质

量增长缓慢及明显消化不良症状。分析结果显示,染色体畸变率随染毒剂量和时间的增加虽有升高的趋势,但组间差异无统计学意义(P>0.05)。

表6 DEHP对小鼠精原细胞染色体损伤的影响

Table 6 Effects of DEHP on chromosomal aberration *in vivo* in mice spermatogonial cells

组别	观察数/个	染色体畸变类型/个				畸变细胞/[n(%)]
		断裂	微小体	双微小体	单体互换	
3.75 g/kg DEHP (24 h)	5×100	5	2	0	0	79 7(1.4)
7.5 g/kg DEHP (24 h)	5×100	6	2	1	0	65 9(1.8)
15 g/kg DEHP (24 h)	5×100	9	2	1	0	62 12(2.4)
15 g/kg DEHP (48 h)	5×100	13	4	2	0	55 19(3.8)
阴性对照(ddH ₂ O)	5×100	5	2	1	0	68 8(1.6)
40 mg/kg 环磷酰胺(i.p.)	5×100	70	18	5	4	157 97(19.4)

3 讨论

本研究通过细菌回复突变试验(Ames试验)、体外哺乳类细胞染色体畸变、微核和彗星试验以及小鼠骨髓红细胞微核试验和小鼠精原细胞染色体畸

变试验等观察了 DEHP 的遗传毒性效应。研究表明,大部分测试结果为阴性,但在体外细胞遗传毒性测试中,在细胞毒性显著的剂量下(2.5 和 5 mg/mL),细胞微核率升高,彗星试验中彗星尾部 DNA 含量增加;在小鼠体内试验中,精原细胞染色体畸变率随 DEHP 染毒剂量增加而增加,但组间差异不具备统计学显著性,且低于阳性对照。由于观察到的遗传毒性出现在细胞毒性显著的情况下,因此在本研究认为 DEHP 在测试条件下并未呈现显著的遗传毒性。

评价遗传毒性的方法众多,本研究涵盖的遗传毒性终点包括基因突变(Ames 试验)、DNA 损伤(彗星试验)及染色体损伤(染色体畸变和微核),在方法学上包括了体外和体内(外周血细胞和生殖细胞)测试,能较全面地反映 DEHP 的遗传毒性。本研究与大部分研究结果一致^[8]。但也有研究显示 DEHP 能够引起 HEK-293 细胞的 DNA 损伤,其机制与氧化应激诱导 DNA 链断裂有关^[16]。CHOI 等^[17]报道人源 HepG2 细胞暴露于低剂量 DEHP(0.97 μg/mL)24 h 及 48 h 后彗星试验尾部 DNA 含量增加。DEHP 在 9.4~38 μg/mL 剂量范围内处理 24 h,呈剂量依赖的形式引起 DNA 损伤增加(彗星试验)^[18]。而在人群研究中,尿液中 DEHP 的代谢产物与精子 DNA 损伤正相关^[9]。不同研究间结果的不一致可能与染毒剂量、时间、细胞类型等有关,人群研究结果无法完全排除混杂因素的影响,应采用争取证据权重的方法对 DEHP 遗传毒性进行综合评价。

综上,DEHP 在动物中的致癌性及基于 PPAR α 的非遗传毒性致癌机制已被证实^[8],虽然包括本研究在内的大部分监管机构认可的遗传毒性测试认为 DEHP 不是 DNA 活性物质,但人群流行病学调查以及新的遗传毒性终点测试如表观遗传毒性^[19]测试,显示 DEHP 在低剂量情况下呈现基因突变、DNA 损伤之外的遗传毒性^[8],因此应采用新的研究方法,观察 DEHP 在广泛剂量范围内,对 DNA 和染色体其它组分的影响,探索致癌机制。

参考文献

- [1] WEI L Y, LI Z H, SUN J T, et al. Pollution characteristics and health risk assessment of phthalate esters in agricultural soil and vegetables in the Yangtze River Delta of China[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 726: 137978.
- [2] ZHANG Z M, ZHANG J, ZHANG H H, et al. Pollution characteristics, spatial variation, and potential risks of phthalate esters in the water-sediment system of the Yangtze River Estuary and its adjacent East China Sea[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 265: 114913.
- [3] LIU Y, HE Y, ZHANG J D, et al. Distribution, partitioning behavior, and ecological risk assessment of phthalate esters in sediment particle-pore water systems from the main stream of the Haihe River, Northern China[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 745: 141131.
- [4] GAO C J, LIU L Y, MA W L, et al. Phthalate metabolites in urine of Chinese young adults: Concentration, profile, exposure and cumulative risk assessment[J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 543: 19-27.
- [5] GAO D W, LI Z, WANG H, et al. An overview of phthalate acid ester pollution in China over the last decade: Environmental occurrence and human exposure[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 645: 1400-1409.
- [6] GROSSE Y, BAAN R, SECRETAN-LAUBY B, et al. Carcinogenicity of chemicals in industrial and consumer products, food contaminants and flavourings, and water chlorination byproducts[J]. *The Lancet Oncology*, 2011, 12(4): 328-329.
- [7] ITO Y, YAMANOSHITA O, ASAEDA N, et al. Di (2-ethylhexyl) phthalate induces hepatic tumorigenesis through a peroxisome proliferator-activated receptor α -independent pathway[J]. *Journal of Occupational Health*, 2007, 49(3): 172-182.
- [8] IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. Some chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking-water[J]. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 2013, 101: 9-549.
- [9] HAUSER R, MEEKER J D, SINGH N P, et al. DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites[J]. *Human Reproduction*, 2006, 22(3): 688-695.
- [10] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 细菌回复突变试验: GB 15193.4—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014. National Health and Family Planning Commission. Shipin anquan guojia biao zhun xijun hui fu tubian shi yan: GB 15193.4—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.
- [11] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 体外哺乳类细胞微核试验: GB 15193.28—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020. National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. Shipin anquan guojia biao zhun tiwai burulei xibao wei he shi yan: GB 15193.28—2020[S]. Beijing: Standards Press of China, 2020.
- [12] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 体外哺乳类细胞染色体畸变试验: GB 15193.23—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015. National Health and Family Planning Commission. Shipin anquan guojia biao zhun tiwai burulei xibao ranseti jibian shi yan: GB 15193.23—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- [13] TICE R R, AGURELL E, ANDERSON D, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing[J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2000, 35(3): 206-221.
- [14] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 哺乳动物红细胞微核试验: GB 15193.5—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.

- National Health and Family Planning Commission. Shipin anquan guojia biao zhun buru dongwu hongxibao weihe shiyan: GB 15193.5—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.
- [15] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 小鼠精原细胞或精母细胞染色体畸变试验: GB 15193.8—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- National Health and Family Planning Commission. Shipin anquan guojia biao zhun xiaoshu jingyuan xibao huo jingmu xibao ranseti jibian shiyan: GB 15193.8—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.
- [16] AMARA I, TIMOUMI R, GRAIET I, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces cytotoxicity in HEK-293 cell line, implication of the Nrf-2/HO-1 antioxidant pathway [J]. Environmental Toxicology, 2019, 34(9): 1034-1042.
- [17] CHOI S, PARK S Y, JEONG J, et al. Identification of toxicological biomarkers of di-(2-ethylhexyl) phthalate in proteins secreted by HepG2 cells using proteomic analysis[J]. Proteomics, 2010, 10(9): 1831-1846.
- [18] PARK S Y, CHOI J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure[J]. Environment International, 2007, 33(6): 817-822.
- [19] GHOSH K, CHATTERJEE B, NALLA K, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate triggers DNA methyltransferase 1 expression resulting in elevated CpG-methylation and enrichment of MECP₂ in the p21 promoter *in vitro*[J]. Chemosphere, 2022, 293: 133569.