

论著

两种邻苯二甲酸酯类物质的抗雄激素作用研究

燕高峰^{1,2},毛伟峰²,贾旭东²,张文众²,李志华¹,初传传^{1,2},陈晨³,刘兆平²

(1. 潍坊医学院公共卫生学院, 山东 潍坊 261053; 2. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021; 3. 中国疾病预防控制中心营养与健康所, 北京 100050)

摘要:目的 探讨邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)和邻苯二甲酸二丁酯(DBP)的抗雄激素作用。方法 参照 OECD Hershberger 试验指南进行,以6周龄雄性去势SD大鼠为实验动物,随机分为16组(7只/组),分别以DEHP和DBP为受试物,DEHP剂量分别为35、70、150、250、500、1 000 mg/kg BW, DBP剂量分别为70、150、250、500、750、1 000 mg/kg BW;阴性对照组和阳性对照组分别灌胃给予玉米油和3.0 mg/kg BW 氟他胺,连续10 d。灌胃前各组均皮下注射丙酸睾酮。试验结束后测定阴茎头、腹侧前列腺、精囊、肛提肌-海绵体肌、尿道球腺重量和血清中睾酮、黄体生成素水平。利用基准剂量分析软件分析雄激素依赖器官重量的剂量-反应关系。结果 250、500、1 000 mg/kg BW DEHP剂量组腹侧前列腺、肛提肌-海绵体肌、尿道球腺重量低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);500、750、1 000 mg/kg BW DBP剂量组肛提肌-海绵体肌、尿道球腺重量低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),各组间血清激素水平差异无统计学意义($P > 0.05$);基准剂量分析发现,DEHP和DBP对肛提肌-海绵体肌、尿道球腺重量影响具有剂量-反应关系,两种物质抗雄激素作用的基准剂量下限分别为150.38和276.78 mg/kg BW。结论 经口摄入DEHP、DBP均会产生抗雄激素作用,肛提肌-海绵体肌、尿道球腺重量变化是较敏感指标。

关键词:邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯;邻苯二甲酸二丁酯;Hershberger试验;抗雄激素;基准剂量;内分泌;毒理学试验
中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)02-0149-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.02.003

Study of anti-androgenic effect of two of phthalate esters

YAN Gao-feng, MAO Wei-feng, JIA Xu-dong, ZHANG Wen-zhong, LI Zhi-hua,
CHU Chuan-chuan, CHEN Chen, LIU Zhao-ping

(School of Public Health, Weifang Medical University, Shandong Weifang 261053, China)

Abstract: Objective Study the anti-androgenic effect of diethylhexyl phthalate (DEHP) and dibutyl phthalate (DBP). **Methods** According to Hershberger bioassay form OECD guideline, 6 weeks old male castrated SD rats were randomly divided into 16 groups, DEHP (35, 70, 150, 250, 500, 1 000 mg/kg BW) and DBP (70, 150, 250, 500, 750, 1 000 mg/kg BW) were given by oral gavage, respectively. Meanwhile, corn oil was given by oral gavage as a negative control, and 3.0 mg/kg BW flutamide was given by oral gavage as a positive control for 10 consecutive days. In addition, 0.2 mg/kg BW testosterone propionate was given to each group by subcutaneously inject before gavage. In the end of test, animals were anesthetized, weight of glans penis, ventral prostate, seminal vesicles, levatorani-bulbocavernosus muscles, Cowper's glands were measured, testosterone and luteinizing hormone levels were measured. The dose-response were analyzed by benchmark does software. **Results** In comparison with negative control, weight of ventral prostate, levatorani-bulbocavernosus muscles and Cowper's glands were significantly decreased in the group of 250, 500 and 1 000 mg/kg BW DEHP ($P < 0.05$), and weight of levatorani-bulbocavernosus muscles and Cowper's glands were significantly decreased in the group of 500, 750 and 1 000 mg/kg BW DBP ($P < 0.05$). Benchmark does of DEHP and DBP was 150.38 and 276.78 mg/kg BW. **Conclusion** DEHP and DBP had anti-androgenic effects in vivo and weight of levatorani-bulbocavernosus muscles and Cowper's glands are sensitive indexes.

Key words: Diethylhexyl phthalate; dibutyl phthalate; Hershberger bioassay; anti-androgenic; benchmark does; endocrine; toxicology test

收稿日期:2016-02-29

基金项目:国家自然科学基金项目(81273081)

作者简介:燕高峰 男 硕士生 研究方向为内分泌干扰物

E-mail:haidementu@163.com

通信作者:刘兆平 男 研究员 研究方向为食品毒理学和化学物
风险评估 E-mail:liuzhaoping@cfsa.net.cn

近年来,邻苯二甲酸酯类物质(PAEs)的内分泌干扰作用逐渐成了国内外的研究热点。在我国,邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)和邻苯二甲酸二丁酯(DBP)的使用量占增塑剂总使用量的前两位^[1],在食品包装材料、器皿、医疗用品、化妆品以

及人造革等方面都被广泛应用^[2-3]。2012年和2013年中国台湾发生塑化剂事件和大陆白酒检出塑化剂事件,由于这两种塑化剂是主要检出物质,其毒性和健康风险备受关注。

已有研究表明,DEHP、DBP具有不同程度的神经毒性、生殖毒性、发育毒性、免疫毒性、胚胎毒性等毒性效应^[4-6]。也有研究资料提示该类物质可能具有内分泌干扰作用^[7-10]。目前对于DEHP和DBP在抗雄激素作用上的研究较为鲜见,缺乏抗雄激素作用准确的毒性参考阈值和剂量-反应关系研究。

本研究参照经济合作与发展组织试验指南(OECD TG441)^[11],通过Hershberger试验研究DEHP和DBP的抗雄激素作用,利用基准剂量法分析其剂量-反应关系,并获得基准剂量(BMD)和基准剂量下限(BMDL),为探讨DEHP和DBP的内分泌干扰效应及其联合作用研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF级6周龄SD雄性大鼠112只,体质量190~210g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号:SCXK(京)2012-0009],饲养于中国疾病预防控制中心动物实验室[许可证号:SYXK(京)2009-0032]。饲养条件:温度20~24℃,湿度40%~70%、动物房照度15~20Lx,换气次数≥15次/h、12h昼夜交替、空气清洁度7级、噪声(A)≤60dB。

1.1.2 主要仪器与试剂

BiotekSynergy 4多功能酶标仪(基因有限公司)、低速高速离心机、伽马计数器、电子天平。

DEHP、DBP、氟他胺(FT)均购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司,丙酸睾酮(TP,北京冠星宇科技有限公司),金龙鱼玉米胚芽油[丰益贸易(中国)有限公司],血清睾酮(T)、黄体生成素(LH)放射免疫试剂盒均购自北京北方生物工程研究所,去大豆成分饲料(北京华阜康生物科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理

参照OECD TG441等^[11-12]方法,SD大鼠适应性喂养3d后,观察无异常,用血管结扎的方法摘除睾丸和附睾。术后恢复1周,将大鼠按照体质量随机分为8组:1个阴性对照组、1个阳性对照组、6个剂量组。试验分两次完成,分别为关于DEHP和DBP的Hershberger试验,将TP、FT、DEHP或者DBP用玉米油溶解为相应浓度的溶液,各组均皮下注射0.2mg/kg BW的TP(皮下注射量为0.5ml/kg

BW),30min后,阴性对照(SC)灌胃(灌胃量为5ml/kg BW)给予玉米油,阳性对照(PC)灌胃给予FT(灌胃量为3mg/kg BW),DEHP剂量组分别灌胃给予35、70、150、250、500、1000mg/kg BW的DEHP, DBP剂量组分别灌胃给予70、150、250、500、750、1000mg/kg BW的DBP。连续给予样品10d,期间每隔24h称重且记录,并以体质量调整灌胃量。

1.2.2 器官称量和血清睾酮、黄体生成素检测

最后一次给予样品24h后称量大鼠体质量,并用2%戊巴比妥钠麻醉。待大鼠进入麻醉状态后,将其解剖,经腹主动脉采血后,取5个雄激素依赖性组织器官(阴茎头、腹侧前列腺、精囊、肛提肌-海绵体肌、尿道球腺)以及肝脏、肾脏、肾上腺称重(精确到0.001g)并记录,计算肝脏、肾脏、肾上腺的脏器系数,脏器系数公式为:

$$\text{脏器系数} = \frac{\text{脏器重量(g)}}{\text{大鼠终体重量(g)}} \times 100\%$$

采用放免法检测血清中睾酮和黄体生成素含量,具体操作程序依照相应试剂盒说明规程进行。

1.3 数据分析

1.3.1 统计学分析

试验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析和两变量线性相关分析,方差齐时两两比较用LSD法,方差不齐时两两比较用Dunnett's T3法,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.3.2 BMD法拟合数据

使用基准剂量软件(BMDS)2.6.0中文版分析DEHP和DBP对雄激素依赖性组织器官重量的剂量-反应关系,根据指标性质,选择合适模型。本试验数据为连续型,可选模型为:指数模型、希尔模型、线性模型、多项式模型、幂模型。将指标参数纳入模型进行检验,当剂量-反应关系检验 $P_1 < 0.1$ 与拟合优度检验 $P_2 > 0.1$ 同时满足时,接受该模型;如果多个模型被接受,根据赤池信息量准则(AIC)选择AIC值最小的模型。基准反应(BMR)参数选择10%时,拟合推算相应的BMD和BMDL,即BMD₁₀和BMDL₁₀。

2 结果

2.1 一般观察和动物体质量

大鼠去势后恢复良好,活动和进食正常。各组在给予样品前、给予样品后体质量以及各组大鼠增重均差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表1。

表1 DEHP和DBP对大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=7, g$)
Table 1 Influence of DEHP and DBP on body weight change of rat

受试物	分组 ^b	体质量		
		给予样品前	给予样品后	体质量变化
DEHP	阴性对照组	261.1 ± 8.0	328.5 ± 14.5	67.4 ± 7.2
	35 mg/kg BW 剂量组	257.8 ± 4.7	327.3 ± 11.5	69.4 ± 9.2
	70 mg/kg BW 剂量组	261.9 ± 6.4	332.1 ± 7.8	70.2 ± 8.1
	150 mg/kg BW 剂量组	259.1 ± 9.5	333.8 ± 12.3	74.7 ± 5.2
	250 mg/kg BW 剂量组	258.7 ± 7.5	331.6 ± 17.7	72.9 ± 11.3
	500 mg/kg BW 剂量组	256.1 ± 9.9	329.4 ± 22.7	73.3 ± 13.9
	1 000 mg/kg BW 剂量组	258.7 ± 12.8	324.1 ± 12.5	65.4 ± 5.5
	阳性对照组	262.4 ± 11.3	328.1 ± 13.4	65.7 ± 5.1
DBP	阴性对照组	253.0 ± 10.5	325.4 ± 18.1	72.5 ± 10.9
	70 mg/kg BW 剂量组	254.7 ± 15.3	324.9 ± 20.2	70.1 ± 7.1
	150 mg/kg BW 剂量组	251.2 ± 5.8	322.7 ± 9.1	71.5 ± 5.5
	250 mg/kg BW 剂量组	253.9 ± 12.8	328.2 ± 19.3	74.3 ± 9.8
	500 mg/kg BW 剂量组	250.4 ± 13.3	320.4 ± 19.4	70.0 ± 11.6
	750 mg/kg BW 剂量组	248.1 ± 9.7	321.5 ± 13.1	73.4 ± 7.4
	1 000 mg/kg BW 剂量组	254.5 ± 11.3	324.1 ± 13.9	69.6 ± 6.9
	阳性对照组	252.3 ± 10.9	319.5 ± 12.9	68.2 ± 4.9

注:b表示各剂量组均加入TP

2.2 雄激素依赖性组织器官的重量及比较

由表2可见,与阴性对照相比,250、500、1 000 mg/kg BW DEHP剂量组的大鼠腹侧前列腺、肛提肌-海绵体肌、尿道球腺重量,以及1 000 mg/kg BW DEHP剂量组的大鼠阴茎头和精囊重量降低,差异

有统计学意义($P < 0.05$);与阴性对照相比,500、750、1 000 mg/kg BW DBP剂量组的大鼠肛提肌-海绵体肌、尿道球腺重量,以及750、1 000 mg/kg BW DBP剂量组的大鼠腹侧前列腺和精囊重量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 DEHP和DBP对大鼠雄激素依赖性组织器官重量的影响($\bar{x} \pm s, n=7, g$)

Table 2 Influence of DEHP and DBP on androgen-dependent tissues weights of rats

受试物	分组 ^b	分组 ^b				
		阴茎头	腹侧前列腺	精囊	肛提肌-海绵体肌	尿道球腺
DEHP	阴性对照组	75.3 ± 3.7	118.4 ± 27.7	344.5 ± 78.7	490.1 ± 78.6	36.0 ± 4.2
	35 mg/kg BW 剂量组	71.4 ± 4.5	108.3 ± 17.7	337.0 ± 23.0	421.0 ± 41.7	32.0 ± 5.2
	70 mg/kg BW 剂量组	71.4 ± 2.8	117.1 ± 21.8	381.3 ± 44.1	451.5 ± 84.6	36.4 ± 9.6
	150 mg/kg BW 剂量组	70.4 ± 6.3	104.7 ± 19.0	373.9 ± 56.0	435.3 ± 58.0	33.4 ± 4.8
	250 mg/kg BW 剂量组	70.1 ± 6.2	95.7 ± 14.6 ^a	308.6 ± 52.4	368.7 ± 96.2 ^a	25.6 ± 2.6 ^a
	500 mg/kg BW 剂量组	69.9 ± 5.1	96.9 ± 13.4 ^a	349.1 ± 67.5	392.0 ± 53.5 ^a	27.6 ± 5.2 ^a
	1 000 mg/kg BW 剂量组	66.6 ± 7.7 ^a	82.6 ± 17.5 ^a	256.3 ± 36.3 ^a	339.7 ± 84.4 ^a	24.3 ± 4.8 ^a
	阳性对照组	50.8 ± 3.7 ^a	37.4 ± 16.7 ^a	126.9 ± 45.5 ^a	163.1 ± 27.4 ^a	7.3 ± 2.2 ^a
DBP	阴性对照组	71.6 ± 2.6	109.0 ± 19.1	371.6 ± 63.6	294.6 ± 21.2	25.3 ± 4.6
	70 mg/kg BW 剂量组	71.6 ± 3.1	107.0 ± 17.4	350.7 ± 82.2	295.6 ± 61.6	28.4 ± 5.0
	150 mg/kg BW 剂量组	70.1 ± 8.8	109.0 ± 22.4	327.7 ± 43.6	272.0 ± 53.5	23.0 ± 3.5
	250 mg/kg BW 剂量组	70.9 ± 5.0	109.6 ± 24.9	392.7 ± 79.8	280.3 ± 44.4	25.9 ± 7.5
	500 mg/kg BW 剂量组	66.5 ± 4.9	92.8 ± 8.2	331.7 ± 66.3	236.5 ± 35.2 ^a	17.8 ± 5.5 ^a
	750 mg/kg BW 剂量组	68.8 ± 5.8	75.5 ± 14.4 ^a	260.6 ± 36.4 ^a	243.2 ± 50.0 ^a	17.6 ± 7.3 ^a
	1 000 mg/kg BW 剂量组	66.7 ± 4.2	80.1 ± 19.3 ^a	277.4 ± 44.4 ^a	233.3 ± 39.5 ^a	18.1 ± 3.4 ^a
	阳性对照组	48.8 ± 3.6 ^a	36.0 ± 16.0 ^a	122.0 ± 43.8 ^a	156.8 ± 26.3 ^a	7.0 ± 2.2 ^a

注:a表示此组数据与阴性对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);b表示各剂量组均加入TP

2.3 其他脏器的脏器系数及比较

由表3所示,与阴性对照相比,150、250、500、1 000 mg/kg BW DEHP剂量组肝脏系数,以及500、1 000 mg/kg BW DEHP剂量组肾脏系数升高,均差异有统计学意义($P < 0.05$),其中肝脏系数随剂量的增加而增加,呈正相关关系($r = 0.875, P < 0.05$);与阴性对照相比,500、750、1 000 mg/kg BW DBP剂量组肝脏系数,以及750、

1 000 mg/kg BW DBP剂量组的肾脏系数升高,均差异有统计学意义($P < 0.05$),其中肝脏系数随剂量的增加而增加,呈正相关关系($r = 0.542, P < 0.05$)。

2.4 血清T、LH的测定与比较

血清T、LH测定结果显示,阴性对照组、阳性对照组与各受试物剂量组之间均差异无统计学意义($P > 0.05$)

表3 DEHP和DBP对大鼠其他脏器的脏器系数影响($\bar{x} \pm s, n=7, \%$)

Table 3 The influence of DEHP and DBP on organ coefficient of rats

受试物	分组 ^b	分组 ^b		
		肝脏	肾脏	肾上腺
DEHP	阴性对照组	3.24 ± 0.18	0.70 ± 0.04	0.20 ± 0.03
	35 mg/kg BW 剂量组	3.55 ± 0.34	0.70 ± 0.03	0.20 ± 0.02
	70 mg/kg BW 剂量组	3.61 ± 0.17	0.67 ± 0.03	0.20 ± 0.01
	150 mg/kg BW 剂量组	4.25 ± 0.26 ^a	0.70 ± 0.07	0.21 ± 0.02
	250 mg/kg BW 剂量组	4.22 ± 0.31 ^a	0.74 ± 0.04	0.20 ± 0.03
	500 mg/kg BW 剂量组	4.85 ± 0.60 ^a	0.77 ± 0.04 ^a	0.22 ± 0.04
	1 000 mg/kg BW 剂量组	5.31 ± 0.20 ^a	0.77 ± 0.05 ^a	0.20 ± 0.02
	阳性对照组	3.58 ± 0.34	0.74 ± 0.05	0.23 ± 0.06
DBP	阴性对照组	3.41 ± 0.30	0.74 ± 0.06	0.25 ± 0.03
	70 mg/kg BW 剂量组	3.41 ± 0.20	0.72 ± 0.04	0.23 ± 0.04
	150 mg/kg BW 剂量组	3.55 ± 0.13	0.78 ± 0.04	0.22 ± 0.04
	250 mg/kg BW 剂量组	3.56 ± 0.24	0.76 ± 0.05	0.22 ± 0.04
	500 mg/kg BW 剂量组	3.69 ± 0.30 ^a	0.79 ± 0.02	0.26 ± 0.03
	750 mg/kg BW 剂量组	3.71 ± 0.26 ^a	0.81 ± 0.02 ^a	0.25 ± 0.05
	1 000 mg/kg BW 剂量组	3.81 ± 0.07 ^a	0.81 ± 0.05 ^a	0.28 ± 0.07
	阳性对照组	3.38 ± 0.30	0.73 ± 0.04	0.21 ± 0.05

注:a表示此组数据与阴性对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);b表示各剂量组均加入TP

2.5 BMDs 分析结果

BMD分析结果显示,雄激素依赖性组织器官的发育与DEHP、DBP均具有剂量-反应关系($P_1 < 0.1$),相应的BMD₁₀和BMDL₁₀见表4。其中,肛提肌-海绵体肌、尿道球腺对DEHP和DBP的反应均

最为敏感,剂量-反应关系分别见图1至图4。按照模型接受拟合优度检验原则,DEHP选择基于肛提肌-海绵体肌为终点的希尔模型,DBP选择基于尿道球腺为终点的希尔模型,两种物质的BMDL₁₀分别为35.87和261.78 mg/kg BW。

表4 DEHP、DBP导致不同终点的BMD和BMDL值

Table 4 DEHP, DBP result in BMD and BMDL values of different endpoints

受试物	参数 (重量)	BMD ₁₀ /(mg/kg BW)	BMDL ₁₀ /(mg/kg BW)	拟合模型	P ₁ 值	P ₂ 值	AIC
DEHP	阴茎头	1 193.15	732.75	指数模型	0.08	0.69	216.04
	腹侧前列腺	309.25	211.19	指数模型	0.02	0.62	341.18
	精囊	947.15	324.77	幂模型	<0.01	0.12	447.23
	肛提肌-海绵体肌	198.59	35.87	希尔模型	<0.01	0.32	475.10
	尿道球腺	168.51	150.38	希尔模型	<0.01	0.36	227.77
	DBP	阴茎头	1 483.42	867.32	指数模型	0.04	0.79
腹侧前列腺		505.38	362.82	希尔模型	<0.01	0.99	366.55
精囊		541.01	473.29	希尔模型	<0.01	0.29	458.66
肛提肌-海绵体肌		406.65	276.78	指数模型	0.03	0.76	423.82
尿道球腺		384.08	261.78	希尔模型	<0.01	0.42	219.95

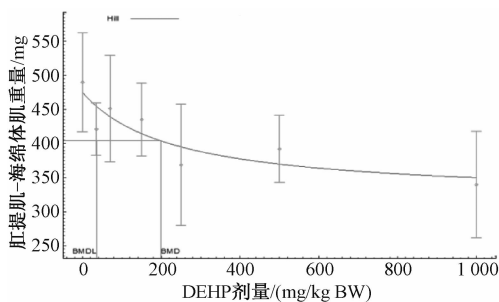


图1 希尔模型拟合DEHP和肛提肌-海绵体肌重量的剂量-反应关系

Figure 1 Does-response curve of DEHP and levatorani-bulbocavernosus muscles weight was fitted Hill model

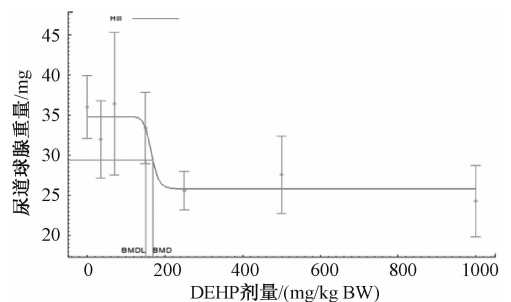


图2 希尔模型拟合DEHP和尿道球腺重量的剂量-反应关系

Figure 2 Does-response curve of DEHP and Cowper's glands weight was fitted Hill model

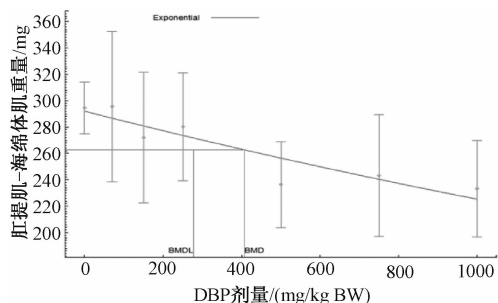


图3 指数模型拟合 DBP 和肛提肌-海绵体肌重量的剂量-反应关系

Figure 3 Does-response curve of DBP and levator ani-bulbocavernous muscles weight was fitted Exponential model

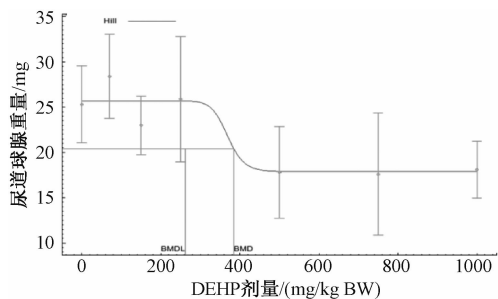


图4 希尔模型拟合 DBP 和尿道球腺重量的剂量-反应关系

Figure 4 Does-response curve of DBP and Cowper's glands weight was fitted Hill model

3 讨论

Hershberger 试验通过给青春期雄性大鼠去势,使大鼠体内内源性雄激素水平降到最低,减少内源性雄激素的个体差异。去势后的大鼠经过 7 d 恢复后雄激素依赖性器官组织重量达到一致的基准水平,此时雄激素依赖性器官组织对雄激素的敏感性更强,当靶器官组织受到参照雄激素(TP)刺激后重量的增加会相对一致。Hershberger 试验是目前检测抗雄激素的最有效的筛检方法^[13]。本课题组的阳性物 FT 在 Hershberger 试验中对大鼠的雄激素依赖性器官产生了明显的抑制作用,成功建立了检测模型。

Hershberger 试验指出,如果剂量组中两个或两个以上的组织器官重量出现明显减少时,可以认为试验结果呈阳性,即受试物具有抗雄激素作用。本研究发现 DEHP 和 DBP 可明显影响肛提肌-海绵体肌、尿道球腺、腹侧前列腺重量,说明两种物质表现出抗雄激素作用。其他研究结果提示了这两种物质抗雄激素作用的潜在机制,比如:500 mg/kg BW DEHP 剂量组影响青春前期雄性大鼠精子的发生、分化和成熟,血清 T 水平较对照组降低^[14];PAEs 导致雄性成年小鼠睾丸重量减轻和生精小管的萎缩,

并伴有精原细胞的凋亡^[15];低剂量的 DEHP 导致大鼠前列腺质量减轻,高剂量的 DEHP 暴露导致睾丸的组织生理学改变^[16]。但体外受体结合试验表明 DEHP 和 DBP 不能直接结合雄激素受体(AR)^[17-18],也有研究表明 DEHP、DBP 是通过雄激素受体非依赖性机制诱导抗雄激素作用^[19]。由于 Hershberger 试验模型大鼠无睾丸,下丘脑-垂体-性腺轴无法通过反馈机制进行内分泌调节,因此推测 DEHP 和 DBP 可能通过干扰雄激素转运或者改变受体水平进而影响组织对雄激素的反应能力。

Blohm 等^[20]研究表明,DEHP 的抗雄激素作用强于 DBP,本研究也说明了这一点。本研究结果显示,DEHP 在剂量达到 250 mg/kg BW 时,对模型大鼠的腹侧前列腺、肛提肌-海绵体肌、尿道球腺产生明显抑制作用,并且存在剂量-反应关系;DBP 剂量达到 500 mg/kg BW 时,对模型动物的肛提肌-海绵体肌、尿道球腺产生抑制作用,剂量上升到 750 mg/kg BW 时,腹侧前列腺和精囊也产生抑制作用。从靶器官敏感度角度来看,肛提肌-海绵体肌、尿道球腺、腹侧前列腺的反应较为敏感,精囊次之,阴茎头反应最不敏感。早有研究表明肛提肌-海绵体肌的发育依赖于睾酮^[21],前列腺的发育依赖于双氢睾酮^[22],因此结合肛提肌-海绵体肌和前列腺两个靶器官可以用于内分泌干扰作用机制的研究。

BMD 法是目前毒理学领域确定化学物毒性参考值的最新方法,较传统的化学物未观察到有害作用剂量水平(NOAE)和观察到有害作用最低水平(LOAEL)更科学^[23-24]。DEHP 和 DBP 分别在 250、500 mg/kg BW 剂量组表现出了抗雄激素作用,即 DEHP 和 DBP 的抗雄激素作用 LOAEL 值分别为 250 和 500 mg/kg BW,相应的 NOAEL 值分别为 150 和 250 mg/kg BW。结合表 4 显示结果,可知 DEHP 和 DBP 的抗雄激素作用的 BMDL₁₀ 分别为 150.38 和 276.78 mg/kg BW,两种物质的 BMDL₁₀ 通过希尔模型和指数模型拟合所得,得到的 BMDL₁₀ 在数值上与 NOAEL 相近,但 BMD 法充分利用了所有的剂量-反应资料并且通过 BMDL₁₀ 来说明数据的变异性及不确定性,因此结果更加可靠^[25]。

另外,本试验结果显示,DEHP 剂量为 150 mg/kg BW 及以上时,大鼠肝脏器系数明显高于阴性对照组,剂量为 500 mg/kg BW 及以上时,大鼠肾脏器系数也明显高于阴性对照组;DBP 在剂量为 500 和 750 mg/kg BW 时也分别表现为肝和肾脏器系数增加。在多项研究^[26]中也表述了相似的结论,其作用机制有待进一步研究。

综上所述,本研究中 DEHP 和 DBP 单独暴露均

表现出了抗雄激素作用,但对其抗雄激素作用机制尚不明确。由于在环境中 DEHP 和 DBP 不可能简单的单独暴露,因此关于两者联合暴露效果的研究实际意义更大,需进一步探究它们的联合作用模式,为该类物质的风险评估和风险管理提供科学依据。

参考文献

- [1] 张蕴晖,陈秉衡,训城,等. DBP, DEHP 及其代谢物 MBP, MEHP 的体内雌激素样活性分析 [J]. 环境与职业医学, 2005, 22(1):11-13.
- [2] Joffe M. Are problems with male reproductive health caused by endocrine disruption [J]. Occup Environ Med, 2001, 58(4): 281-287.
- [3] 赵文红,厉曙光. VitC、VitE 对 DEHP 致果蝇脂质过氧化的拮抗作用 [J]. 同济大学学报医学版, 2003, 24(3):179-181.
- [4] Ilona Q, Madeleine R B, Margot V B. The dynamics of autism spectrum disorders: how neurotoxic compounds and neurotransmitters interact [J]. Environ Res Public Health, 2013, 10(8): 3384-3408.
- [5] Guyton K Z, Chiu W A, Bateson T F, et al. A reexamination of the PPAR-alpha activation mode of action as a basis for assessing human cancer risks of environmental contaminants [J]. Environmental Health Perspectives, 2009, 117(11): 1664-1672.
- [6] 罗芬兰,蔡文琴,张吉强. 大鼠孕期染邻苯二甲酸二丁酯对子代神经干细胞增殖分化的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(11):1188-1191.
- [7] Howdeshell K L, Wilson V S, Furr J, et al. A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the Sprague-Dawley rat in a cumulative, dose-additive manner [J]. Toxicological Sciences, 2008, 105(1):153-165.
- [8] Hirosawa N, Yano K, Suzuki Y, et al. Endocrine disrupting effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate on female rats and proteome analyses of their pituitaries [J]. Proteomics, 2006, 6(3): 958-971.
- [9] SHI W, WANG X, HU G, et al. Bioanalytical and instrumental analysis of thyroid hormone disrupting compounds in water sources along the Yangtze River [J]. Environmental Pollution, 2011, 159(2):441-448.
- [10] Carbone S, Samaniego Y A, Cuatrecasas R, et al. Different effects by sex on hypothalamic-pituitary axis of prepubertal offspring rats produced by in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) [J]. Neurotoxicology, 2012, 33(1):78-84.
- [11] Organization for Economic Co-operation and Development. OECD test guideline 441 Hershberger bioassay in rats: a short-term screening assay for (anti) androgenic properties [EB/OL]. (2013-11-14) [2015-12-01] http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-441-hershberger-bioassay-in-rats_9789264076334-en.
- [12] 张文众,王伟,张晓鹏,等. 大豆异黄酮对大鼠内分泌干扰作用研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(3):228-231.
- [13] Yamada T, Kunimatsu T, Sako H, et al. Comparative evaluation of a 5-day Hershberger assay utilizing mature male rats and a pubertal male assay for detection of flutamide's antiandrogenic activity [J]. Toxicol Sci, 2000, 53(2):289-96.
- [14] 李祥婷,蔡德培. 环境内分泌干扰物对青春前期雄性大鼠性腺发育的不良影响及益肾填精方的治疗作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(12):1690-1695.
- [15] De Iulius G N, Thomson L K, Mitchell L A, et al. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress [J]. Biol Reprod, 2009, 81(3):517-524.
- [16] Christiansen S, Boberg J, Axelstad M, et al. Low-dose perinatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate induces anti-androgenic effects in male rats [J]. Reprod Toxicol, 2010, 30(2):313-321.
- [17] Tae S K, CHANG Y Y, Ki K J, et al. In vitro study of Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) endocrine disruptor screening and testing methods- establishment of a recombinant rat androgen receptor (rrAR) binding assay [J]. The Journal of Toxicological Sciences, 2010, 35(2):239-243.
- [18] Akingbemi B T, Ge R, Klinefelter G R, et al. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(3): 775-780.
- [19] Lee B M, Koo H J. Hershberger assay for anti-androgenic effects of phthalates [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health A, 2007, 70(15/16):1365-1370.
- [20] Blohm T R, Laughlin M E, Benson H D, et al. Pharmacological induction of 5 alpha-reductase deficiency in the rat: separation of testosterone-mediated and 5 alpha-dihydrotestosterone-mediated effects [J]. Endocrinology, 1986, 119(3):959-966.
- [21] EDSTAC. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) final report [R]//U. S. Environmental Protection Agency, 1998.
- [22] Rabovsky J, Fowles J, Hill M D, et al. A health risk benchmark for the neurologic effects of styrene: comparison with NOAEL/LOAEL approach [J]. Risk Anal, 2001, 21(1):117-126.
- [23] 方瑾,贾旭东. 基准计量法及其在风险评估中的应用 [J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(1):50-53.
- [24] 陈文婕,戴红,陈敏,等. 邻苯二甲酸二乙基己酯 (DEHP) 对小白鼠肝脏毒性及脂质过氧化损伤 [J]. 生态毒理学报, 2012, 7(1):93-98.
- [25] 胡帅尔,张紫虹,王凤岩,等. 邻苯二甲酸二(2-乙基己酯)对大鼠的亚慢性毒性研究 [J]. 环境与健康杂志, 2015, 32(7):362-364.
- [26] 王秀琴,李玲,田晓梅,等. 邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯联合染毒对雌性大鼠肝脏氧化应激的影响 [J]. 环境与健康杂志, 2011, 28(6):505-507.