

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20190313001

段晨晖, 房彦军, 梁俊, 等. 邻苯二甲酸酯类增塑剂的体外细胞毒性评价[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(6): 23-31

Duan C H, Fang Y J, Liang J, et al. *In vitro* cytotoxicity evaluation of phthalate plasticizers [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(6): 23-31 (in Chinese)

邻苯二甲酸酯类增塑剂的体外细胞毒性评价

段晨晖^{1,2}, 房彦军², 梁俊^{1,*}, 高志贤^{2,#}

1. 天津科技大学省部共建食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457

2. 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所, 天津市环境与食品安全风险监控技术重点实验室, 天津 300050

收稿日期: 2019-03-13 录用日期: 2019-06-11

摘要: 邻苯二甲酸酯(Phthalate esters, PAEs)是环境介质中的一类典型的有机污染物。已有研究表明, PAEs具有明显的内分泌干扰毒性, 并会对动物和人体的生殖发育与神经系统造成损伤。体外细胞评价模型因具有高通量、测试周期短、成本低和毒性效应易于阐明等技术优点, 被广泛应用到 PAEs 毒理学效应的研究中。本文从内分泌干扰毒性、胚胎发育毒性、神经毒性、免疫毒性、遗传毒性以及致癌作用等方面, 对 PAEs 的一些体外细胞毒性评价模型进行了分类和总结, 并对其相应的研究进展进行了综述。本文旨在为体外细胞毒性评价模型的有效利用提供借鉴, 并对 PAEs 毒性作用机制的深入研究提供思路和依据。

关键词: 邻苯二甲酸酯类(PAEs); 毒理学效应; 体外细胞毒性评价

文章编号: 1673-5897(2019)6-023-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

In Vitro Cytotoxicity Evaluation of Phthalate Plasticizers

Duan Chenhui^{1,2}, Fang Yanjun², Liang Jun^{1,*}, Gao Zhixian^{2,#}

1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2. Tianjin Key Laboratory of Risk Assessment and Control Technology for Environment and Food Safety, Institute of Environmental and Operational Medicine, Academy of Military Medical Science, Academy of Military Science, Tianjin 300050, China

Received 13 March 2019 accepted 11 June 2019

Abstract: Phthalates esters(PAEs) are a group of typical organic compounds in the environment. Studies have shown that PAEs have significant endocrine disrupting toxicity and can cause damage to the reproductive development and nervous system of animals and humans. The *in vitro* cytotoxicity evaluation model is widely used in the study of toxicological effects of PAEs due to its high throughput, short test period, low cost, and easiness for detecting toxic effects. In this paper, some *in vitro* cytotoxicity evaluation models of PAEs were classified and summarized from the aspects of endocrine disrupting toxicity, embryonic developmental toxicity, neurotoxicity, immunotoxicity, genotoxicity and carcinogenesis, and the corresponding research progress was reviewed. It is hoped that this paper can provide reference for the effective use of *in vitro* cytotoxicity evaluation model, and provide ideas and basis for the in-depth study of the toxic mechanism of PAEs.

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2018YFC1603001)

作者简介: 段晨晖(1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品接触材料的毒理学效应, E-mail: thomas1103@163.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: jliang1118@yeah.net

共同通讯作者(Co-corresponding author), E-mail: gaozhx@163.com

Keywords: phthalates (PAEs); toxicological effect; *in vitro* cytotoxicity evaluation

增塑剂可以提高塑料产品的透明性、可塑性和柔韧性,被广泛应用于塑料包装的生产过程中^[1]。近年来,增塑剂特别是邻苯二甲酸酯类物质,引起了不少食品安全事件。邻苯二甲酸酯(phthalate esters, PAEs)广泛应用于塑料快餐盒、生鲜食品保鲜膜及食品容器中,造成食品的污染^[2]。另外,这类物质非常容易散发到空气中,难以降解,已成为全球性污染物。中国湖泊、江河中都普遍检出了 PAEs,最常见的是邻苯二甲酸二正丁酯(dibutyl phthalate, DBP)和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(bis(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP)。DBP 和 DEHP 是长江的主要污染物,浓度为 35.65 和 54.73 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,天津海河中也发现了最高浓度为 41 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DBP 和 101 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DEHP^[3]。另外,在人体尿液和组织样本中也检测到了邻苯二甲酸酯代谢物成分。Gao 等^[4]对中国新生儿母亲群体进行了 PAEs 的累积暴露风险评估(CRA),结果显示,至少 1.9% 的新生儿母亲的危险指数(HI)大于安全阈值,这说明 PAEs 在人群中存在潜在的不良影响。大量的研究表明,PAEs 能够干扰人类和动物一些激素调节的生理过程,改变内分泌

和生殖系统的正常功能,是一种典型的环境内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)^[5]。另外,这类物质还具有一定程度的神经毒性、生殖发育毒性和潜在的致癌作用。最近的一些研究结果表明,低分子量的 PAEs 如 DEHP 和 DBP 毒性相对较强,而高分子量的 PAEs 如邻苯二甲酸二异壬酯(diisononyl phthalate, DINP)毒性相对较弱^[6]。REACH 是欧盟关于化学品及其安全使用的法规,一些低分子量的 PAEs 如 DBP、邻苯二甲酸丁基苄酯(benzyl butyl phthalate, BBP)、DEHP 和邻苯二甲酸二异丁酯(diisobutyl phthalate, DIBP)在 REACH 中被归类为非常危险的物质。在动物研究的基础上,欧洲当局将它们归类为 1B 类,即被认为对生殖有毒的物质^[7]。表 1 总结了几种常见的 PAEs 的暴露水平^[8-13]。

针对人体尤其是婴幼儿长期暴露于这些物质造成的健康风险,有必要对其毒理效应进行全方位的评估。PAEs 毒理学效应研究的传统方法主要是体内实验,即传统的整体动物毒性研究,虽然这种方法能够为毒理学研究提供全面而丰富的数据和资料,但其所需的费用大、时间长,所得的毒性结果往往是

表 1 几种常见的邻苯二甲酸酯(PAEs)代谢物在人体内的暴露水平

Table 1 Exposure levels of several common phthalate esters (PAEs) metabolites in humans

($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)

数据来源 Data sources	mMP	mEP	mBP	miBP	DEHP 代谢物总和 Total metabolites of DEHP
					mECPP, mCMHP, mEHHP, mEOHP, mEHP
中国 ^[8] China ^[8]	31.8	37.5	67.0	57.2	67.0
中国 ^[9] China ^[9]	13.8(男 Male)	18.5(男 Male)	62.3(男 Male)	65.6(男 Male)	77.3(男 Male)
	15.5(女 Female)	25.6(女 Female)	64.6(女 Female)	48.6(女 Female)	74.2(女 Female)
日本 ^[10] Japan ^[10]	17.5	14.8	15.7	8.4	36.2
德国 ^[11] Germany ^[11]	na	na	49.0	46.7	73.4
美国 ^[12] United States ^[12]	1.4	208	25.9	4.9	98.3
加拿大 ^[13] Canada ^[13]	na	49.1	23.8	na	55.9

注:DEHP 表示邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯,mMP 表示邻苯二甲酸单甲酯,mEP 表示邻苯二甲酸单乙酯,mBP 表示邻苯二甲酸单丁酯,miBP 表示邻苯二甲酸单异丁酯,mECPP 表示邻苯二甲酸单(2-乙基-5-羧基戊基)酯,mCMHP 表示邻苯二甲酸单[(2-羧甲基)己基]酯,mEHHP 表示邻苯二甲酸单(2-乙基-5-羟基己基)酯,mEOHP 表示邻苯二甲酸单(2-乙基-5-氧己基)酯,mEHP 表示邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯,na 表示数据不可得(尚未得到相关数据)。

Note: DEHP stands for bis(2-ethylhexyl) phthalate; mMP stands for monomethyl phthalate; mEP stands for monoethyl phthalate; mBP stands for monobutyl phthalate; miBP stands for mono-2-isobutyl phthalate; mECPP stands for mono(2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate; mCMHP stands for mono-[(2-carboxymethyl) hexyl] phthalate; mEHHP stands for mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate; mEOHP stands for mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate; mEHP stands for mono(2-ethylhexyl) phthalate; na stands for not available (data has not been obtained yet).

继发性的或最后的综合损伤。由于传统体内试验的诸多不便之处,更具针对性的体外细胞毒性评价开始越来越多地应用在 PAEs 毒理学效应的研究中。近年来,体外细胞毒性评价由于其周期短、成本低和作用机制易于探明等优势得到快速的发展^[14],成为 PAEs 毒理学研究的主流方法。与传统的动物模型毒性评价相比,体外细胞毒性评价具有高通量、低成本、灵敏度高和重复性好等优点,适合针对特定作用位点进行快速初筛,减少了实验动物的使用,提高了毒理学检测的效率。本文从内分泌干扰毒性、生殖发育毒性、神经毒性、免疫毒性、遗传毒性以及致癌作用几个方面对 PAEs 的体外细胞毒性评价方法进行介绍,并简略概述了其基本原理。

1 PAEs 内分泌干扰毒性的体外检测 (*In vitro* evaluation of endocrine disrupting effects of PAEs)

目前,常用的 PAEs 内分泌干扰效应体外检测方法主要有 2 类:一类是核受体介导的报告基因方法,主要用来检测目标化合物对与内分泌功能相关的一些核受体的干扰作用;另一类是检测目标化合物对一些特定细胞激素合成、分泌、转运和代谢的影响。这 2 类测试方法的作用原理和途径各不相同,具有其各自的优势和应用范围。

1.1 核受体介导的报告基因方法

类固醇激素(包括雌激素、雄激素和孕激素等),可直接进入细胞内与相应受体结合成复合物,并转移至细胞核内激活靶基因的转录,完成一系列复杂的生物学功能。这些受体是一类极其重要的转录调节因子,称为核受体超家族(nucleic receptor superfamily)^[15]。雌激素受体(estrogen receptor, ER)、雄激素受体(androgen receptor, AR)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、甲状腺激素受体(thyroid hormone receptor, TR)和维甲酸受体(retinoic acid receptor, RAR)都是重要的转录调节因子,可与激素或配体结合后转移到细胞核内,激活靶基因转录并发挥调节作用,与生殖过程、新陈代谢调节和分化发育密切相关。

Engel 等^[16]运用稳定转染的细胞系 ER α -HEK 和 ER β -HEK 进行了荧光素酶报告基因测定(luciferase reporter gene assay),检测了一些 PAEs 及其主要和次要代谢物对人类 ER α 或 ER β 活性的影响。实验结果表明,除了 BBP 以外的其他 PAEs 及其代谢产物均未增强 ER α 和 ER β 的活性;而大部分 PAEs 对 ER α 和 ER β 的活性具有抑制作用。Ghisari 和 Bonefeld-Jorgensen^[17]使用 MVLN 反式激活报告基

因法测定了几种 PAEs 对 ER 的诱导作用,在该测定中,只有 BBP 和 DBP 微弱增强了 ER 的活性,DEHP、邻苯二甲酸二乙酯(diethyl phthalate, DEP)未引起 ER 介导的反应。沈欧玺^[18]运用核受体介导的报告基因试验方法(也称为转录激活试验),研究了 2 种邻苯二甲酸酯类增塑剂及其代谢物包括 DEHP、DBP 和邻苯二甲酸单丁酯(monobutyl phthalate, MBP)对 ER、AR 和 TR 的干扰作用。研究表明,这 3 种物质均具有抗雄激素活性和抗甲状腺激素活性,无拟雌激素活性。Czernych 等^[19]使用双酵母杂交技术(XenoScreen YES/YAS)研究了几种 PAEs 的雌激素和雄激素活性,发现一些 PAEs 在较低的浓度范围内表现出较强的抗雌激素和抗雄激素效应。

这类核受体介导的报告基因检测方法普遍具有高通量、低成本和灵敏度高优势,但其局限性在于只能用来评价环境内分泌干扰物对核受体的干扰作用。内分泌系统是一个复杂精密的系统,环境污染物不仅可以通过影响天然激素与受体结合的受体介导途径发生作用,还可通过干扰激素合成、分泌、转运和代谢等非受体介导途径干扰内分泌系统的正常运作^[20]。

1.2 非受体介导途径的体外细胞模型

为了检测一些环境污染物非受体介导途径的内分泌系统干扰作用,各种具备不同功能和特点的细胞模型也陆续被开发出来。

激素应答小鼠睾丸间质肿瘤细胞系(Hormone-responsive mouse Leydig MA-10 tumor cell line)是一种有效的激素应答细胞模型,这种细胞能够在人绒毛膜促性腺激素(Human chorionic gonadotropin, hCG)的作用下诱导孕酮的生成。Boisvert 等^[21]测试了 DEHP 的代谢产物邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯(mono(2-ethylhexyl) phthalate, MEHP)对 MA-10 细胞中孕酮合成的影响,结果显示,浓度为 10^{-4} mol·L⁻¹ 的 MEHP 显著抑制了 MA-10 细胞孕酮的生成。H295R 细胞系源于人肾上腺皮质瘤,能表达类固醇激素合成过程中涉及的所有酶类,具有类似未分化的胚胎肾上腺细胞的生理特性,能生成肾上腺皮质合成的所有类固醇激素,如孕激素、雄激素、雌激素、糖皮质激素和盐皮质激素等,并与正常的人肾上腺细胞对毒物的反应水平一致^[22],因此, H295R 细胞系成为体外筛选环境类固醇激素干扰物和研究其机制的最具潜力的工具。Harvey 等^[23]指出 H295R 细胞系是一种有效的体外筛选环境类固醇激素干扰物

的细胞模型。叶婷等^[24]研究了 DEHP 及其代谢产物 MEHP 对 H295R 细胞类固醇激素合成有关的关键基因表达的影响,实验结果表明,DEHP、MEHP 均可影响 H295R 细胞类固醇激素合成过程中关键基因的表达,并且 MEHP 的影响更加明显。Mankidy 等^[25]通过 H295R 类固醇生成实验,发现暴露于 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DEHP 导致培养基内的雌二醇(E2)浓度增加 4 倍;暴露于 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DEP 导致培养基内的 E2 浓度增加 2.3 倍。除此之外,人胎盘绒毛膜癌(JEG-3)细胞系也是一种很有效的细胞模型,这种细胞能够表达在发现于胎盘中的特定类固醇生成酶中,并具有非常高的芳香酶活性^[26]。由 CYP19 编码的胎盘芳香酶催化雄激素芳构化为雌激素,它是雌激素生物合成中的关键酶,也是内分泌干扰物靶向的关键终点^[27],这对于母体怀孕期间的健康非常重要。Perez-Albaladejo 等^[28]研究了一些 PAEs 对 JEG-3 细胞系 P450 芳香酶活性的影响,实验结果表明,BBP 和 DBP 显著降低了 P450 芳香酶的活性(IC_{50} 值大致为 $14 \sim 15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。综上所述,一些 PAEs 在人和动物体内所造成的内分泌干扰效应很有可能是通过干扰激素合成的途径引起的。

2 PAEs 胚胎发育毒性的体外检测 (*In vitro* detection of embryonic developmental toxicity of PAEs)

大量动物研究表明,DEHP 具有胚胎毒性,影响胚胎、胎儿发育。近 20 年来,随着干细胞研究的日臻成熟,胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)已成为发育毒性实验的一种崭新受试对象,能灵敏、准确地评价有害物质的毒性作用^[29]。根据胚胎干细胞特性发展起来的胚胎干细胞模型,可用于评价环境内分泌干扰物潜在的胚胎毒性和致畸性。

崔栋等^[30]建立了小鼠胚胎干细胞试验模型,对 DEHP 的胚胎毒性进行了评价,研究结果表明,DEHP 为弱胚胎毒性化合物。Yin 等^[31]使用小鼠胚胎干细胞评估了 DEP 和 DBP 的早期发育神经毒性。实验结果表明,在浓度约为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,DEP 和 DBP 可以显著改变神经外胚层与神经祖细胞形成过程中关键基因的表达,这表明 DEP 与 DBP 具有潜在的神经发育毒性。李玉秋等^[32]分析了不同浓度的 DEHP 及其代谢产物 MEHP 对小鼠胚胎干细胞活力与增殖的影响,研究发现随着染毒剂量的增加($0.01 \sim 1\,000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),DEHP、MEHP 对小鼠 ESC 活性的抑制作用增强,且存在明显的剂量-效应关系,高剂量($1\,000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的 DEHP 和 MEHP 对小鼠

胚胎干细胞的增殖具有明显的抑制作用。

综上所述,经过许多研究者的验证,ESC 已越来越多地应用于化学品胚胎发育毒性的预测。胚胎干细胞试验(embryonic stem cell test, EST)使用小鼠或人的胚胎干细胞来评估化学物潜在的胚胎发育毒性,非常适合于胚胎毒性评估。目前 EST 已经被证明能够在早期胚胎发育以及基因表达模式分化的时期指定细胞发育的流程^[33],从而得到不同功能的细胞类型,这种强大的分化潜力为化学物的毒理研究提供了丰富的实验素材。

3 PAEs 神经毒性的体外检测 (*In vitro* detection of neurotoxicity of PAEs)

近几年,PAEs 的神经毒性开始受到人们的关注。PAEs 具有脂溶性,易通过胎盘及血脑屏障进入脑组织,影响神经系统的发育^[34]。流行病学调查研究显示,尿液中的 DEHP 代谢物 MEHP 的浓度可能与儿童的注意缺陷多动症有关^[35]。此外,有人发现胚胎期暴露于 DEHP 可损伤啮齿动物的记忆行为,并认为可能与神经细胞内 Ca^{2+} 浓度升高以及诱导神经细胞凋亡有关^[36]。目前,对于 PAEs 神经毒性的体外评价主要是从待测细胞的氧化应激、细胞凋亡以及增殖分化这几个方面进行。

PC 12 细胞来源于大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤,因其在神经生长因子刺激培养下表现出的形态、结构和功能皆类似于神经细胞,因而在神经科学实验研究中得到广泛应用^[37]。朱才众等^[38]研究了低剂量的 DBP 对 PC12 细胞的毒性效应,结果表明,不同剂量的 DBP 暴露对 PC12 细胞的增殖具有显著的抑制作用,且在低剂量慢性暴露条件下引起了 PC12 细胞的凋亡。同时 DBP 暴露还显著降低了 PC12 细胞的脂质过氧化物酶活性,造成了细胞的氧化应激损伤。Chen 等^[39]使用 PC12 细胞作为神经发育模型来研究 MEHP 暴露对神经元发育过程的影响,他们将未分化的 PC12 细胞暴露于 MEHP 中,研究其对细胞增殖和分化的影响。实验结果表明,MEHP 以剂量依赖性的方式抑制细胞增殖,并且促进了 PC12 细胞的胆碱能表型分化。这是 MEHP 通过影响细胞增殖和分化中的特定事件引发神经发育毒性的第一次证明。除了 PC12 细胞,小鼠神经瘤细胞也可作为研究神经毒性的模型细胞。闵安娜等^[40]研究了 BBP 对小鼠神经瘤细胞的凋亡和氧化损伤水平的影响,研究发现,当 BBP 染毒浓度 $\geq 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,存活细胞减少,并且细胞界限不清,开始出现凋亡小体,

这说明高浓度的 BBP 可以抑制神经细胞的生长并造成神经细胞的凋亡;而对染毒后细胞的活性氧(ROS)水平、丙二醛(MDA)以及还原型谷胱甘肽(GSH)含量的测定结果则表明 BBP 的暴露可以引起神经瘤细胞的氧化损伤,从而进一步诱导了细胞的凋亡。

4 PAEs 免疫毒性的体外检测 (*In vitro* detection of immunotoxicity of PAEs)

免疫毒性是指外源化学物通过损伤一些免疫细胞的形态和功能,干扰神经内分泌网络,使得机体免疫功能低下;或是通过影响免疫细胞的抗原识别能力和敏感性,导致过度的免疫应答,从而引起超敏反应或自身免疫性疾病。有关 PAEs 的免疫毒性,特别是其对免疫细胞的作用和介导超敏反应的研究已经有了一些进展。Hoppin 等^[41]在美国全国范围内调查了人群尿液中的 PAEs 代谢产物含量并调查了人群过敏症状,对相关数据进行了分析统计,结果显示,DEHP 和 BBP 的代谢产物能够诱导与哮喘、花粉热和关节炎等疾病密切相关的 19 种特异性抗体的产生,这说明,PAEs 的接触暴露与一些超敏反应及自身免疫性疾病的发病有关。Kruger 等^[42]研究发现,人角膜内皮细胞 B4G12 暴露于 DEHP 后,炎症相关因子 IL-1 β 、IL-8 和 IL-16 的分泌增加,其基因表达水平也有所升高。韩佳紫等^[43]研究了 DEHP 对巨噬细胞的免疫毒性作用,实验中采用了不同剂量的 DEHP 处理小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 细胞,通过检测细胞活力、细胞吞噬能力、细胞因子分泌及活性氧水平的变化来评估 DEHP 暴露对免疫系统的毒性作用;实验结果表明,高浓度的 DEHP 处理可造成 RAW264.7 细胞的急性损伤,抑制了其细胞吞噬能力和细胞因子(TNF- α 、IL-12 和 IL-23)的分泌能力,并且造成细胞内的活性氧产生。以上研究均表明,PAEs 的暴露可从多方面影响免疫应答,造成免疫毒性作用。

5 PAEs 遗传毒性的体外检测 (*In vitro* detection of genotoxicity of PAEs)

目前,已经有许多体内外的研究表明,PAEs 暴露能够造成染色体和 DNA 的损伤,引发遗传毒性作用。单细胞凝胶电泳技术(single cell gel electrophoresis, SCGE)又称彗星实验,是一种广泛应用于遗传毒理学的技术,在检测一些外源化学物对 DNA 的损伤方面有很高的灵敏性。Wang 等^[44]使用人胚

胎肾细胞系(HEK-293),通过单细胞凝胶电泳检测了 DEHP 诱导的 DNA 链断裂,并通过检测细胞中 GSH 含量的变化评估了氧化应激在 DNA 损伤过程中的作用;实验结果表明,DEHP 能够引起 HEK-293 细胞的 DNA 损伤,DEHP 是通过氧化应激诱导 DNA 链断裂的,研究还发现,溶酶体和线粒体可能是 DEHP 诱导 DNA 损伤的重要靶点。细胞分裂阻滞微核测定(cytokinesis-block micronucleus, CBMN)也是检测染色体或有丝分裂器损伤的一种试验方法。Molino 等^[45]运用了彗星试验和微核测定 2 种方法评估了不同浓度的 DEHP 对欧洲鲑鱼胚胎细胞系(DLEC)的遗传毒性作用;彗星试验的结果表明,DLEC 细胞 DNA 链断裂的总量随着 DEHP 浓度的增加而显著增加;微核测定的结果表明,DEHP 染毒浓度的增加引起了 DLEC 细胞微核率的显著上升。以上研究都充分证明了 PAEs 潜在的遗传毒性作用。

6 PAEs 致癌作用的体外检测 (*In vitro* detection of carcinogenesis of PAEs)

PAEs 潜在的致癌作用也是近年来学者关注的重点。流行病学研究表明,PAEs 暴露与人乳腺癌发病率呈正相关^[46]。Crobeddu 等^[47]将乳腺癌上皮细胞 T-47D 暴露于接近环境剂量的 DEHP 和 MEHP,实验结果表明暴露于 10 000 nmol·L⁻¹ 的 DEHP 或 0.1 nmol·L⁻¹ 的 MEHP 可显著促进 T-47D 细胞的增殖,而不会诱导细胞凋亡。该实验还表明,DEHP 和 MEHP 可以通过激活孕酮受体(progesterone receptor, PR)信号传导促进乳腺癌上皮细胞的增殖,这可能增加乳腺癌发生的风险。Wu 等^[48]研究了 BBP 对 ER(+)MCF-7 乳腺癌细胞与 ER(-)MDA-MB-231 乳腺癌细胞增殖的诱导作用,实验结果表明,BBP 能够显著促进这 2 种乳腺癌细胞的增殖,并加速其细胞周期从 G1 期进展至 S 期。同时,该研究团队还首次发现 microRNA-19 通过靶向 PTEN 3' UTR(某种抑癌基因片段),在 BBP 促进乳腺癌细胞增殖的过程中发挥了至关重要的作用。Zhu 等^[49]研究发现,低剂量的 PAEs (DEHP、DBP 和 BBP)能够促进 PC-3 和 22RV1 前列腺癌细胞的增殖,改变细胞周期相关基因的表达,并激活与癌症细胞增殖密切相关的一些转录因子,这说明 PAEs 可能是前列腺癌的癌症启动子。

7 总结及展望 (Summary and prospects)

随着国内外学者对 PAEs 毒理作用研究的不断

深入,各种针对其内分泌干扰效应、生殖发育毒性、神经毒性、免疫毒性、遗传毒性以及致癌作用的体外细胞毒性评价模型开始得到广泛的应用(表2)。细胞毒性评价是从细胞类型的选择、到评价指标的确定、进而选择适合的检测方法的过程。在这一过程中,需要根据所测试的毒性效应来选择具有不同功能和特点的细胞模型,例如,在评价待测物的内分泌干扰效应时被广泛应用的核受体介导的报告基因筛选细胞模型,用于胚胎发育毒性评价的 ESC 试验模型,用于评价神经毒性作用的 PC12 细胞和神经瘤细胞模型,以及用于免疫毒性检测的巨噬细胞模型等。体外细胞毒性评价具有周期短、成本低和机制易于探明等优点,细胞培养所需器材和原料的成本与动物养殖相比较低廉,且不像动物实验那样需要大量的人力投入,相对地易于操作和管理,节省人力物力。目前,PAEs 体外细胞毒性评价的研究领域已经从细胞水平上升到基因水平,通过数字基因表达谱测序、荧光定量 PCR(qRT-PCR)等分子生物学技

术,能够筛选出一些与细胞凋亡、增殖、代谢和分化等生理指标密切相关的差异表达的基因,进而揭示出 PAEs 不同毒性效应的作用机制。

PAEs 在环境中的浓度很低,大多数在机体中通过不断蓄积或者几种化学物共同作用,对生殖、免疫和神经系统造成损害,严重影响机体健康^[50]。而且 PAEs 是脂溶性物质,这些物质在环境中被动物和人体接触暴露后,一旦进入体内,便很快积蓄到脂肪组织里,不宜排泄出去,这可能导致动物体内高浓度的 PAEs 残留。由此可见,除了单一的体外细胞毒性研究,PAEs 对人和动物整体毒性作用的研究也是非常必要的。体外细胞试验模型在毒理学评价的过程中虽然具有各种显著的优势,但也有其不足之处。由于细胞毒性评价只是体外单细胞水平上做出的毒性评估,没有生物整体水平上的验证,缺乏生物体内各细胞、组织和系统之间的相互联系,因此无法准确地得出 PAEs 在体内环境下经各系统作用后的整体毒性。因此,PAEs 的体外毒性评价还需与体内实验相

表 2 用于邻苯二甲酸酯 (PAEs) 体外细胞毒性评价的细胞模型汇总

Table 2 Summary of cell models for *in vitro* cytotoxicity evaluation of phthalate esters (PAEs)

毒性评价类别 Toxicity evaluation category	细胞株/系 Cell line/lineage	起源 Origin	种属 Species
内分泌干扰效应 Endocrine disruption effect	HEK-293	胚胎肾 Embryonic kidney	人 Human
	GH3	垂体 The pituitary	大鼠 Rat
	MCF-7	乳腺癌细胞 Breast cancer cells	人 Human
	CV1	肾 Kidney	非洲绿猴 African green monkey
	双杂交酵母 Two-hybrid yeast	酵母细胞 Yeast cell	真菌 Fungus
	MA-10	睾丸间质 Leydig of testis	小鼠 Mice
	H295R	肾上腺癌 Adrenal adenocarcinoma	人 Human
胚胎/神经发育毒性 Embryo & neural developmental toxicity	JEG-3	胎盘绒毛膜癌 Placental choriocarcinoma	人 Human
	mESC	胚泡内细胞团 Blastocyst inner cell mass	小鼠 Mice
神经毒性 Neurotoxicity	hSC	囊胚内细胞团 Inner cell mass (ICM)	人 Human
	PC12	肾上腺嗜铬细胞瘤 Pheochromocytoma	大鼠 Rat
免疫毒性 Immunotoxicity	N ₂ a	神经瘤母细胞 Neuroblasts	小鼠 Mice
	B4G12	角膜内皮细胞 Corneal endothelial cells	人 Human
遗传毒性 Genotoxicity	RAW264.7	巨噬细胞 Macrophage	小鼠 Mice
	DLEC	欧洲鲈鱼胚胎细胞系 Embryonic cell line of European bass	鲈鱼 Perch
致癌作用 Carcinogenesis	T-47D	乳腺癌细胞 Breast cancer cells	人 Human
	MDA-MB-231		
	PC-3	前列腺癌细胞 Prostate cancer cells	
	22RV1		

结合,或是尽可能地模拟体内环境,增强实验数据的准确性与可靠性。相信随着新的技术和方法的不断出现,以及国内外学者的共同努力,PAEs毒理学效应的研究将会迈向更高的水平。

通讯作者简介:梁俊(1978—),男,博士生导师,主要研究方向为储运过程中食品的品质及安全控制。

共同通讯作者简介:高志贤(1966—),男,博士生导师,研究员,主要研究方向为食品安全快速检测技术。

参考文献(References):

- [1] 孙树萍,阮文举.食品塑料包装中的有害物质[J].化学教育,2007,28(6):3-5,10
Sun S P, Ruan W J. Harmful substances in food plastic package [J]. Chinese Journal of Chemical Education, 2007, 28(6): 3-5, 10 (in Chinese)
- [2] 祝惠惠,罗世鹏,刘君峰,等.快餐和早点包装中邻苯二甲酸酯类塑化剂迁移风险的研究[J].食品安全质量检测学报,2014,5(11):3571-3575
Zhu H H, Luo S P, Liu J F, et al. Studies on migration risk of phthalic acid esters in packaging of fast food and breakfast [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2014, 5(11): 3571-3575 (in Chinese)
- [3] Gao D, 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
- [4] Gao H, Xu Y Y, Huang K, et al. Cumulative risk assessment of phthalates associated with birth outcomes in pregnant Chinese women: A prospective cohort study [J]. Environmental Pollution, 2017, 222: 549-556
- [5] 李剑,饶凯锋,马梅,等.核受体超家族及其酵母双杂交检测技术[J].生态毒理学报,2008,3(6):521-532
Li J, Rao K F, Ma M, et al. Nuclear receptor super family and yeast two-hybrid system [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2008, 3(6): 521-532 (in Chinese)
- [6] 张景,王竹天,樊永祥,等.邻苯二甲酸酯类的毒性、分析方法及使用规定[J].中国食品卫生杂志,2012,24(5):504-517
Zhang J, Wang Z T, Fan Y X, et al. A review of toxicity, analytical methods and regulations on phthalic acid esters [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2012, 24(5): 504-517(in Chinese)
- [7] Ventrice P, Ventrice D, Russo E, et al. Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2013, 36(1): 88-96
- [8] 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(Pt A): 19-27
- [9] Guo Y, Wu Q, Kannan K. Phthalate metabolites in urine from China, and implications for human exposures [J]. Environment International, 2011, 37(5): 893-898
- [10] Guo Y, Alomirah H, Cho H S, et al. Occurrence of phthalate metabolites in human urine from several Asian countries [J]. Environment Science & Technology, 2011, 45(7): 3138-3144
- [11] Fromme H, Bolte G, Koch H M, et al. Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population [J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2007, 210(1): 21-33
- [12] Colacino J A, Harris T R, Schecter A. Dietary intake is associated with phthalate body burden in a nationally representative sample [J]. Environmental Health Perspectives, 2010, 118(7): 998-1003
- [13] Saravanabhavan G, Gua M, Langlois É, et al. Biomonitoring of phthalate metabolites in the Canadian population through the Canadian Health Measures Survey (2007-2009) [J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2013, 216(6): 652-661
- [14] 刘涛,郭辰,赵晓红.毒理学研究中的体外细胞毒性评价[J].生命科学,2014,26(3):319-324
Liu T, Guo C, Zhao X H. *In vitro* cytotoxicity evaluation in toxicology [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2014, 26(3): 319-324 (in Chinese)
- [15] 李剑.核受体超家族检测环境内分泌干扰物新技术[D].北京:中国科学院研究生院,2008:29-60
Li J. Novel bioassays based on nuclear receptor superfamily for screening the endocrine disrupting chemicals [D]. Beijing: Graduate School of Chinese Academy of Sciences, 2008: 29-60 (in Chinese)
- [16] Engel A, Buhrke T, Imber F, et al. Agonistic and antagonistic effects of phthalates and their urinary metabolites on the steroid hormone receptors ERalpha, ERbeta, and AR [J]. Toxicology Letters, 2017, 277: 54-63
- [17] Ghisari M, Bonefeld-Jorgensen E C. Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions [J]. Toxicology Letters, 2009, 189(1): 67-77
- [18] 沈欧玺.邻苯二甲酸酯类化学物的内分泌干扰效应[D].南京:南京医科大学,2010:23-38
Shen O X. Endocrine disruption effects of phthalate chemicals [D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2010: 23-

- 38 (in Chinese)
- [19] Czernych R, Chraniuk M, Zagozdzon P, et al. Characterization of estrogenic and androgenic activity of phthalates by the XenoScreen YES/YAS *in vitro* assay [J]. *Environmental Toxicology & Pharmacology*, 2017, 53: 95-104
- [20] 杨蓉, 李娜, 马梅, 等. 全氟辛基磺酸及其替代产品的内分泌干扰效应评价[J]. *生态毒理学报*, 2013, 8(5): 702-707
- Yang R, Li N, Ma M, et al. Hormonal activity assessment of PFOS and its substitutes [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(5): 702-707 (in Chinese)
- [21] Boisvert A, Jones S, Issop L, et al. *In vitro* functional screening as a means to identify new plasticizers devoid of reproductive toxicity [J]. *Environmental Research*, 2016, 150: 496-512
- [22] 周景明, 路纪琪. H295R 细胞系筛选环境类固醇激素干扰物的研究进展[J]. *环境与健康杂志*, 2009, 26(4): 374-375
- Zhou J M, Lu J Q. Research progress of application of H295R cell line for screening environmental steroid hormone disruptors [J]. *Journal of Environment and Health*, 2009, 26(4): 374-375 (in Chinese)
- [23] Harvey P W, Everett D J, Springall C J. Adrenal toxicology: A strategy for assessment of functional toxicity to the adrenal cortex and steroidogenesis [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2010, 27(2): 103-115
- [24] 叶婷, 董四君, 王佳, 等. DEHP 和 MEHP 对 H295R 细胞类固醇激素合成基因表达的影响[J]. *生态毒理学报*, 2018, 13(3): 78-86
- Ye T, Dong S J, Wang J, et al. Effects of DEHP and MEHP on the expression of steroidogenic genes in the H295R cells [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2018, 13(3): 78-86 (in Chinese)
- [25] Mankidy R, Wiseman S, Ma H, et al. Biological impact of phthalates [J]. *Toxicology Letters*, 2013, 217(1) : 50-58
- [26] Samson M, Labrie F, Luu-The V, et al. Specific estradiol biosynthetic pathway in choriocarcinoma (JEG-3) cell line [J]. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 116(3-5): 154-159
- [27] Vinggaard A M, Hnida C, Breinholt V, et al. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity *in vitro* [J]. *Toxicology in Vitro*, 2000, 14(3): 227-234
- [28] Perez-Albaladejo E, Fernandes D, Lacorte S, et al. Comparative toxicity, oxidative stress and endocrine disruption potential of plasticizers in JEG-3 human placental cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 2017, 38: 41-48
- [29] 马明月. 应用胚胎干细胞模型研究环境内分泌干扰物胚胎毒性的展望[J]. *沈阳医学院学报*, 2016, 18(2): 65-67, 73
- Ma M Y. Research progress of environmental endocrine disruptors on embryotoxicity by embryonic stem cell test [J]. *Journal of Shenyang Medical College*, 2016, 18(2): 65-67, 73 (in Chinese)
- [30] 崔栋, 杨淋清, 罗凌凤, 等. 应用胚胎干细胞试验(EST)评价邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)的胚胎毒性[J]. *毒理学杂志*, 2015, 29(2): 123-126
- [31] Yin N, Liang S, Liang S, et al. DEP and DBP induce cytotoxicity in mouse embryonic stem cells and abnormally enhance neural ectoderm development [J]. *Environmental Pollution*, 2018, 236: 21-32
- [32] 李玉秋, 段志文, 裴秀丛, 等. DEHP、MEHP 对小鼠胚胎干细胞细胞毒性的研究[J]. *实用药物与临床*, 2016, 19(8): 925-928
- Li Y Q, Duan Z W, Pei X C, et al. Effect of DEHP and MEHP on the cytotoxicity of embryonic stem cell of mouse [J]. *Practical Pharmacy and Clinical Remedies*, 2016, 19(8): 925-928 (in Chinese)
- [33] Rezvanfar M A, Hodjat M, Abdollahi M, et al. Growing knowledge of using embryonic stem cells as a novel tool in developmental risk assessment of environmental toxicants [J]. *Life Sciences*, 2016, 158: 137-160
- [34] 薄存香, 杨治峰, 杜忠君. 邻苯二甲酸酯的神经毒性作用研究进展[J]. *环境与健康杂志*, 2015, 32(7): 647-649
- Bo C X, Yang Z F, Du Z J. Research advances in neurological toxicity of phthalates [J]. *Journal of Environment and Health*, 2015, 32(7): 647-649 (in Chinese)
- [35] Engel S M, Zhu C B, Berkowitz G S, et al. Prenatal phthalate exposure and performance on the Neonatal Behavioral Assessment Scale in a multiethnic birth cohort [J]. *Neurotoxicology*, 2009, 30(4): 522-528
- [36] 刘艳华, 刘秋芳, 潘亮, 等. 邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP) 胚胎期暴露对子代大鼠神经行为发育的影响[J]. *毒理学杂志*, 2011, 25(6): 414-417
- Liu Y H, Liu Q F, Pan L, et al. Effects on neurobehavioral development in offspring rats after embryonic exposure to di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) [J]. *Journal of Toxicology*, 2011, 25(6): 414-417 (in Chinese)
- [37] Shafer T J, Atchison W D. Transmitter, ion channel and receptor properties of PC12 cells; a model for neurotoxicological studies [J]. *Neurotoxicology*, 1991, 12(3): 473-492
- [38] 朱才众, 熊鸿燕, 李亚斐, 等. 增塑剂邻苯二甲酸二丁酯低剂量与神经系统毒性效应的评估[J]. *中国临床康复*, 2006, 10(8): 76-78
- Zhu C Z, Xiong H Y, Liu Y F, et al. Low-dose dibu-

- tylphthalate and its toxic effect on nervous system [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2006, 10(8): 76-78 (in Chinese)
- [39] Chen T, Yang W, Li Y, et al. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate impairs neurodevelopment: Inhibition of proliferation and promotion of differentiation in PC12 cells [J]. Toxicology Letters, 2011, 201(1): 34-41
- [40] 闵安娜, 刘锋明, 晏彪, 等. 邻苯二甲酸丁基苄酯致神经细胞氧化损伤[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(1): 97-102
Min A N, Liu F M, Yan B, et al. Neurotoxicity and the oxidative damage induced by butyl benzyl phthalate [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(1): 97-102 (in Chinese)
- [41] Hoppin J A, Jaramillo R, London S J, et al. Phthalate exposure and allergy in the U.S. population: Results from NHANES 2005-2006 [J]. Environmental Health Perspectives, 2013, 121(10): 1129-1134
- [42] Kruger T, Cao Y, Kjaergaard S K, et al. Effects of phthalates on the human corneal endothelial cell line B4G12 [J]. International Journal of Toxicology, 2012, 31(4): 364-371
- [43] 韩佳萦, 苏伊玲, 熊丽, 等. 塑化剂 DEHP 暴露对小鼠巨噬细胞的免疫毒性作用[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(4): 673-679
Han J Y, Su Y L, Xiong L, et al. Immunotoxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate to macrophages [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2018, 37(4): 673-679 (in Chinese)
- [44] Wang X, Jiang L, Ge L, et al. Oxidative DNA damage induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate in HEK-293 cell line [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2015, 39(3): 1099-1106
- [45] Molino C, Filippi S, Stoppiello G A, et al. *In vitro* evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of di(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) embryonic cell line [J]. Toxicology in Vitro, 2019, 56: 118-125
- [46] Lopez-Carrillo L, Hernandez-Ramirez R U, Calafat A M, et al. Exposure to phthalates and breast cancer risk in northern Mexico [J]. Environment Health Perspectives, 2010, 118(4): 539-544
- [47] Crobeddu B, Ferraris E, Kolasa E, et al. Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) increases proliferation of epithelial breast cancer cells through progesterone receptor dysregulation [J]. Environmental Research, 2019, 173: 165-173
- [48] Wu J, Jiang Y, Cao W, et al. miR-19 targeting of PTEN mediates butyl benzyl phthalate-induced proliferation in both ER(+) and ER(-) breast cancer cells [J]. Toxicology Letters, 2018, 295: 124-133
- [49] Zhu M, Huang C, Ma X, et al. Phthalates promote prostate cancer cell proliferation through activation of ERK5 and p38 [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2018, 63: 29-33
- [50] 吴德生, 秦道云, 谭琴, 等. 邻苯二甲酸酯类化合物的生殖毒性及其环境内分泌干扰效应[J]. 癌变·畸变·突变, 2015, 27(4): 316-318, 322

