

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20130403003

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)

邻苯二甲酸丁基苄酯致神经细胞氧化损伤

闵安娜, 刘锋明, 晏彪, 陈明清[#], 杨旭^{*}

华中师范大学生命科学学院 调控与整合生物学湖北省重点实验室 武汉 430079

收稿日期: 2013-04-03 录用日期: 2013-04-25

摘要: 为探究邻苯二甲酸丁基苄酯(butyl benzyl phthalate, BBP)对小鼠神经的毒性作用,进行了小鼠体外毒理学研究。首先用不同浓度的邻苯二甲酸丁基苄酯染毒神经模型细胞—N₂a神经瘤细胞,通过噻唑蓝比色法(MTT),Hoechst 33258染色实验评价邻苯二甲酸丁基苄酯的细胞毒效应;通过对染毒细胞氧自由基(ROS)、丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)含量的检测来探究BBP对小鼠神经瘤细胞的氧化损伤效应。随着BBP浓度的不断增高,细胞的MTT值逐渐变小,当BBP的浓度达到10 g·L⁻¹时,MTT实验结果与对照组出现显著性差异;Hoechst 33258染色结果显示:高浓度的BBP导致细胞核呈现出不规则状态,出现了凋亡小体;随着BBP染毒浓度的升高,N₂a细胞中的ROS水平和MDA含量逐渐上升,分别在0.16 g·L⁻¹和10 g·L⁻¹开始与对照组相比出现了显著性的差异(p < 0.05);而GSH系数呈现下降趋势,在0.32 g·L⁻¹时开始出现显著性差异(p < 0.05)。实验结果表明高浓度的邻苯二甲酸丁基苄酯可以导致神经瘤细胞的凋亡,并产生氧化损伤效应。

关键词: 邻苯二甲酸丁基苄酯; 细胞凋亡; 细胞毒性; 氧化损伤; 神经毒性

文章编号: 1673-5897(2014)1-097-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Neurotoxicity and the Oxidative Damage Induced by Butyl Benzyl Phthalate

Min Anna, Liu Fengming, Yan Biao, Chen Mingqing[#], Yang Xu^{*}

Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079

Received 3 April 2013 accepted 25 April 2013

Abstract: To study the toxicity of butyl benzyl phthalate (BBP) on nerve cells. Mouse neuroblastoma (N₂a) cells were exposed in vitro to different concentrations of BBP. Then the toxicity of BBP on N₂a cells were evaluated by MTT, Hoechst 33258 test. Furthermore the reactive oxygen species (ROS) level, malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) contents were measured for studying on the effects of oxidative damage induced by BBP. It was showed that the (OD) value of MTT assay decreased with the increasing of BBP concentrations and was significantly difference from the control at dose of 10 g·L⁻¹. It was found that the nucleus irregular degree increased and appeared apoptotic bodies at high dose of BBP by Hoechst 33258 staining.

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAJ02B003); 国家自然科学基金重点项目(51136002)

作者简介: 闵安娜(1989-),女,湖北,在读硕士研究生,研究方向:分子生物学; E-mail: 469289785@qq.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: yangxu@mail.ccnu.edu.cn;

[#]共同通讯作者(Co-corresponding author), E-mail: chenmq@mail.ccnu.edu.cn

Along with the increasing of BBP concentrations, the enhancement of ROS level and MDA content at N_2a cells were observed. There was significantly difference at dose of $0.16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively ($p < 0.05$). And GSH content decreased as exposure of BBP and was significantly difference from the control at dose of $0.32 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. These results suggested that high concentration of BBP could trigger off apoptosis and induce oxidative damage to N_2a cells.

Keywords: butyl benzyl phthalate (BBP); apoptosis; cell toxicity; oxidative damage; malondialdehyde (MDA); neurotoxicity

近年来,饮料、白酒等行业频频发生的塑化剂污染事件引发了人们对食品安全的普遍担忧,并将邻苯二甲酸酯(phthalate esters, PAEs)推向了公众视野。邻苯二甲酸酯又称酞酸酯,是世界上产量最大、应用最广、人工合成的有机化合物之一,也是一类全球性的环境污染物^[1]。邻苯二甲酸丁基苄酯(butyl benzyl phthalate, BBP)是邻苯二甲酸酯类化合物(PAEs)的一种,是应用最广泛的邻苯二甲酸酯之一。由于BBP应用广泛、难以降解,因此成为备受关注的全球性环境污染物之一。BBP被美国国家环保局(EPA)列为优先控制污染物^[2]。而中国是世界上最大的增塑剂消费国,占全球消费量的1/4,因此,BBP的危害和污染控制更应该引起高度的重视。BBP可以作为增塑剂、软化剂、添加剂和载体来使用,广泛应用于塑料制品、儿童玩具、工业涂料、化妆品、汽车、服装、农药等行业。由于BBP与高分子聚合物之间不是以共价键化学结合,而是物理结合,随着时间的推移,BBP会慢慢从材料中逸出,污染空气、土壤、水源乃至食物。因此,在城市污泥及大气中BBP有较高的含量^[3-4]。BBP可通过呼吸道、消化道和皮肤等途径进入人体,其中,经饮食进入体内是最主要的途径,已在人的尿液、乳汁、血液和精液等体液中检测出BBP^[5-6]。邻苯二甲酸丁基苄酯被认为是一种环境激素干扰物,具有生殖和发育毒性^[7]。研究表明,BBP可以改变性别分化,使子宫增大,对胎儿具有一定的致畸性。BBP还可以导致睾丸发育不良,睾酮水平降低^[8]。BBP的生殖毒性被研究得最多,BBP对雄性和雌性的生殖都有影响,其中对雄性的影响较大,国内外对BBP的生殖和发育毒性报道较多,但对神经系统的危害还不甚明了。有研究表明,长期接触BBP会在一定程度上损害神经系统,导致神经衰弱和记忆力下降^[9-11]。但BBP对神经细胞的毒性效果和影响机理并不清楚。

为此,本研究拟通过体外检测BBP对小鼠神经瘤细胞的毒性和氧化损伤水平来探讨BBP神经毒性效应,并将进一步探讨BBP导致神经毒性的机理。

1 材料和方法(Materials and methods)

1.1 主要试剂与仪器

仪器:细胞培养箱,低温冷冻离心机(Eppendorf-5415R),电热恒温水箱,涡旋器,全波长酶标仪(Bio-teck),荧光酶标仪(Bio-teck)。

试剂:邻苯二甲酸丁基苄酯(BBP),(Sigma公司,纯度>99%),2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)(Sigma公司,纯度>97%),硫代巴比妥酸(TBA,国药集团化学试剂有限公司),5',5'-二硫代二硝基苯甲酸(DTNB,分析纯,国药集团化学试剂有限公司)其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养

本研究所用细胞是未分化的小鼠神经瘤母细胞(N_2a)。细胞培养条件为 37°C ,5% CO_2 的环境,所用培养基为90% DMEM和10% FBS,每2 d传代一次。

1.3 噻唑比色(MTT)试验

将长势良好(达到 10^6 个细胞/ml)的 N_2a 细胞,加入新鲜的培养基中,吹打、悬浮、混匀,铺板于96微孔板中(每孔 $100 \mu\text{L}$),四周用PBS代替。培养18 h之后,分别用不同浓度的BBP染毒液(0.08 、 0.16 、 0.32 、 0.625 、 1.25 、 2.5 、 5 、 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)作为实验组进行染毒,即将BBP与二甲基甲酰胺(DMF)按体积比1:1混合配制成 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的染毒母液,按比例稀释成 0.08 、 0.16 、 0.32 、 0.625 、 1.25 、 2.5 、 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的染毒液进行试验。同时设置对照组DMEM和DMF染毒时长为24 h。吸出染毒液,用PBS洗一次,再加入 $180 \mu\text{L}$ 培养基,每孔加入 $20 \mu\text{L}$ $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的MTT溶液,黑暗中孵育4 h, 37°C 。再吸出培养基,加入 $150 \mu\text{L}$ DMSO,低速振荡10 min,测 $\text{OD}_{490 \text{ nm}}$ 。

1.4 细胞凋亡的检测(Hoechst 33258染色法)

将 N_2a 细胞以 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种于用35 mm培养皿,35 mm培养皿每孔 $1.5 \sim 2 \text{ ml}$, 37°C ,5% CO_2 孵箱中培养至细胞贴壁。加入BBP染毒液,继续培养过夜。用4%多聚甲醛在 4°C 固定10~20 min。去固定液,用PBS洗2遍,每次3 min,吸尽液体。

摇动洗涤后,加 Hoechst 33258 染色液,室温 10 min,再用 PBS 洗两遍,每次 3 min,超净台中避光风干,在荧光倒置显微镜下观察。

1.5 氧自由基(ROS)水平的测定

细胞中活性氧(ROS)水平的测定使用的是 DCF 荧光法^[12]。将神经瘤细胞铺板于 96 微孔板中,培养 18 h 之后分别用不同的 BBP 染毒液(0.16、0.32、0.625、1.25、2.5、5、10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)进行染毒,用 DMEM、DMF 作为对照组, NAC 作为阻断组,染毒时长为 24 h。将染毒细胞用 PBS 重悬。将 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DCFH-DA 荧光染料用 PBS 缓冲液稀释 1 000 倍,加入 100 μL 待测细胞重悬液混匀,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存 10 min 后,测量其在 480 nm 激发光, 520 nm 发射光下的荧光强度。

1.6 丙二醛(MDA)含量的测定

丙二醛含量的测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法,MDA 可与 TBA 缩合,形成红色产物,且在 532 nm 处有最大吸收峰,通过吸光值的测量、计算,就可知道细胞中 MDA 的含量^[13]。取 10 mL 试管,每管加入 0.5 mL 待测样品液,调零管加入 0.5 mL PBS,然后各管加入 2 mL 0.6% TBA 溶液,混匀后沸水浴 15 min,取出后流水冷却。10 000 rpm 离心 10 min,取上清液分别在 450 nm、532 nm 和 600 nm 波长下测定吸光值,按照公式 $C_{\text{MDA}} = 6.45(D_{532} - D_{600}) - 0.56D_{450}$,计算出每管样品中 MDA 的浓度^[14]($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

1.7 还原型谷胱甘肽(GSH)含量的测定

还原型谷胱甘肽(GSH)的含量采用荧光染料 DTNB 来测定,GSH 为易溶于水的巯基化合物,它可以与无色的 DTNB 结合,形成黄色的 5-巯基-2-硝基苯甲酸,该物质在 412 nm 处有最大光吸收,通过光吸收值的测定、计算,即可得出细胞中 GSH 的量^[15]。取 200 μL 细胞悬液,加入 50 μL 浓度为 10%的 TCA 混匀。10 000 rpm 离心 5 min。然后取 50 μL 上清加入酶标板,再加 150 μL 60 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DTNB 室温避光 5 min,测定 412 nm 波长下的吸光值。

1.8 统计学分析

用 Origin 6.1 统计分析软件对实验数据先进行 ANOVA 分析,然后用 t 检验法检验染毒组与对照组之间的差异。

2 结果(Results)

2.1 MTT 实验结果

为检测 BBP 的细胞毒性,我们进行了 MTT 实

验(图 1)。实验结果显示对照组 DMEM 和 DMF 组之间无显著性差异,说明 DMF 可以作为一种对细胞伤害较小的良好的促溶剂。随着染毒浓度的增加,细胞存活数目减少,在 BBP 暴露剂量为 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时出现了显著性差异。随着染毒浓度的升高,细胞呈现出膨大、裂解、不规则状态。但是有趣的是在较低浓度组时,细胞的 MTT 值较对照组有比较明显的升高,这提示低浓度的 BBP 可能对细胞的生长有促进作用。

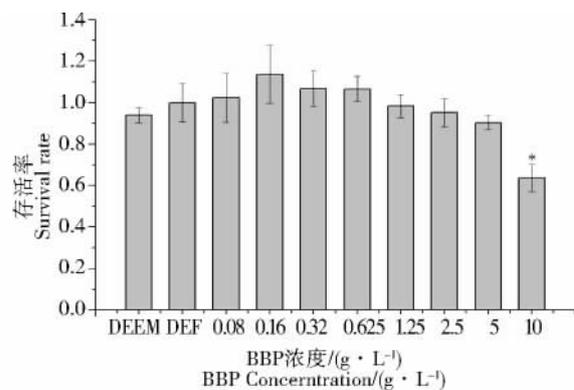


图1 不同浓度 BBP 染毒对 N_2a 细胞的存活的影响 (与空白组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Fig. 1 The effect of BBP on the relative survival rate of N_2a cells (compared with control group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

2.2 细胞凋亡的染色检验

通过不同浓度的 BBP 染毒后,对 N_2a 细胞进行了 Hoechst 33258 染色分析(图 2)。Hoechst 33258 染色结果显示:随着染毒浓度的增加,细胞存活减少,并且细胞核不规则程度增加,开始出现凋亡小体;并且在常规镜下观察时,发现细胞界限不清,培养基中漂浮的细胞增多,并且细胞粘附能力即贴壁能力下降,容易被吹打下来。

2.3 ROS 测量结果

通过 DCF 荧光法我们检测 N_2a 细胞中的 ROS 水平。结果显示对照组 DMEM 与 DMF 组并无明显差别,随着染毒浓度的增加,ROS 荧光越来越强(图 3),这表明 BBP 导致了 ROS 水平的升高。研究发现:随着染毒浓度的增加,细胞形态由椭长形变圆形或椭圆形,细胞贴壁能力下降,细胞之间的交联度下降。在最高浓度组出现了凋亡小体。

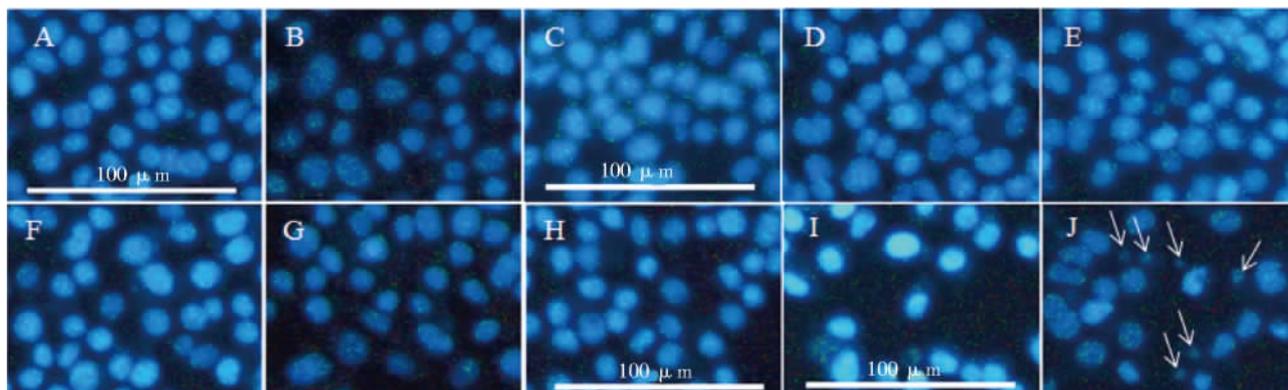


图2 Hoechst 33258 染色结果(A: DMEM 组; B: DMF 组; C: $0.08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; D: $0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; E: $0.32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; F: $0.625 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; G: $1.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; H: $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; I: $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; J: $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Fig. 2 The results of Hoechst 33258 by different concentrations of BBP(A: DMEM group; B: DMF group; C: $0.08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; D: $0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; E: $0.32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; F: $0.625 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; G: $1.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; H: $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; I: $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; J: $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

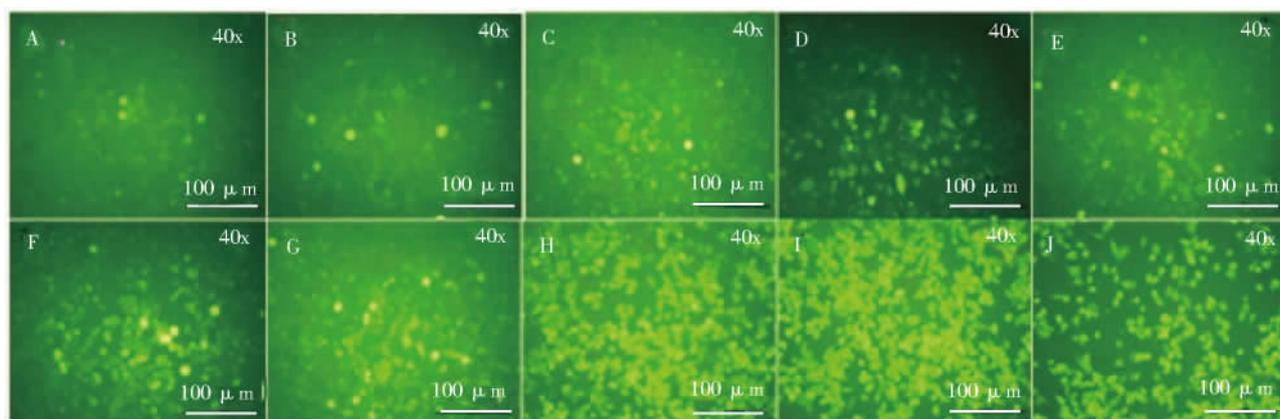


图3 不同 BBP 染毒浓度下的 ROS 荧光图(A: DMEM 组; B: DMF 组; C: $0.08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; D: $0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; E: $0.32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; F: $0.625 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; G: $1.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; H: $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; I: $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; J: $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Fig. 3 The results of ROS fluorography by different concentrations of BBP(A: DMEM group; B: DMF group; C: $0.08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; D: $0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; E: $0.32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; F: $0.625 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; G: $1.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; H: $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; I: $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; J: $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

进一步分析实验数据发现:DMEM 和 DMF 组之间并无显著性的差异,说明 DMF 是一种良好的促溶剂,对细胞的影响较小。NAC 作为阻断剂,ROS 出现降低现象,另外染毒组随着染毒浓度的增加 ROS 出现上升趋势,而且在 $0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.31 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 出现显著性差异($p < 0.05$) 在 $0.625 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时出现极显著性差异($p < 0.01$) 说明 BBP 暴露导致了神经瘤细胞出现氧化应激效应。

2.4 MDA 实验结果

为检测 BBP 对 N_2a 细胞的氧化损伤,我们测定了细胞的 MDA 含量(图 5)。结果显示:随着 BBP

染毒浓度的增加,MDA 系数呈现上升的趋势。当 BBP 的浓度为 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时与对照组相比出现了显著性差异。说明 BBP 能够对小鼠神经瘤细胞产生脂质过氧化,并且随着 BBP 浓度的越大,氧化损伤程度越高。

2.5 GSH 实验结果

通过 GSH 实验我们发现:随着染毒浓度的增加,GSH 系数呈现下降趋势(图 6),且在 $0.32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时出现显著性差异,在 0.625 、 1.25 、 5 和 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时出现极显著性差异。以上结果表明 BBP 能够使小鼠神经瘤细胞产生氧自由基,并且 BBP 浓度的越大,氧化损伤程度越高,消耗的 GSH 的量也更多。

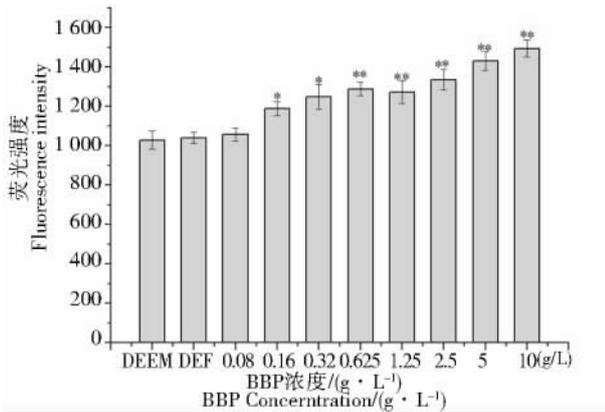


图 4 不同浓度 BBP 染毒 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 N_2a 细胞 ROS 含量的影响(与空白对照组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Fig. 4 The effect of different exposure groups on ROS content in N_2a (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with control group)

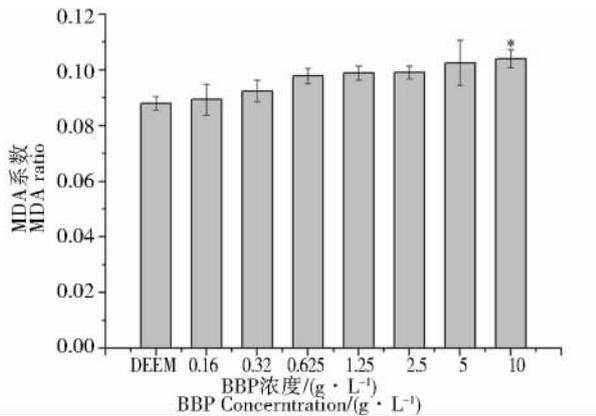


图 5 不同浓度 BBP 染毒 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 N_2a 细胞的 MDA 系数的影响(与对照组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Fig. 5 The effect of different exposure groups on MDA ratio in N_2a (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with control group)

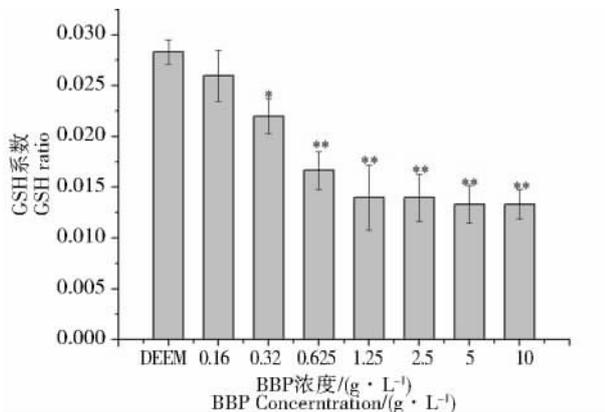


图 6 不同浓度 BBP 染毒 ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 GSH

系数的影响(与对照组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Fig. 6 The effect of different BBP exposure groups on GSH ratio in N_2a (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with control group)

3 讨论 (Discussion)

邻苯二甲酸丁基苯酯是最广泛使用的酞酸酯之一。由于邻苯二甲酸丁基苯酯的大量生产和在生活中的大量使用,邻苯二甲酸丁基苯酯对人和动物的暴露,事实上是难以避免的。在作为增塑剂使用时,由于 BBP 不与高分子材料共价结合,因而极易外泄进入环境。可通过饮食、呼吸、皮肤接触等途径进入人和动物体内。因此,世界上很多国家把 BBP 列为优先控制的污染物。

评价邻苯二甲酸酯的毒性及其致病机制是当前的研究热点之一。特别是邻苯二甲酸酯被认为是一种内分泌干扰物,它的生殖毒性和发育毒性引起了人们广泛的重视,并得到了很多动物毒理学及流行病学调查研究的支持^[16-47]。截至目前,对 BBP 的毒性研究仍然主要停留在它的生殖毒性、氧化损伤作用上^[18-20],而且也已经有了比较完备的反应机制来解释氧化损伤的原因。并且提出了邻苯二甲酸酯相关毒性的分子模型来更加完整的解释 PAEs 对人或动物的毒性。然而 BBP 对神经系统毒性却鲜有文献报道。我们通过 MTT 实验和 Hoechst 33258 染色分析对 BBP 的细胞毒性进行了评价。结果表明当 BBP 染毒浓度到 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时,存活细胞减少,并且细胞界限不清,开始出现凋亡小体。这表明高浓度的 BBP 可以抑制神经细胞的生长,导致神经细胞的凋亡。

氧化损伤被认为是引起机体细胞衰老、损伤、凋亡、死亡的重要原因。已有研究认为 DEHP、DBP、BBP 等邻苯二甲酸酯类都能导致氧化损伤^[21-22]。Wormud 等对离体大鼠肺细胞进行 BBP 染毒,结果表明 BBP 对大鼠肺细胞有着明显的毒性作用,能使其发生氧化损伤^[23]。为探讨 BBP 暴露对神经细胞的毒性作用机制,我们以神经瘤细胞为模型细胞进行研究。我们检测了小鼠神经瘤细胞的氧化损伤水平。研究结果显示 BBP 导致神经瘤细胞中活性氧自由基含量水平显著上升,特别是在 $0.625 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BBP 染毒组与对照组相比具有极显著性差异 ($p < 0.01$)。MDA 检测表明 BBP 能够对神经瘤细胞产生脂质过氧化,并且随着 BBP 浓度的增大,氧化损伤程度升高。GSH 检测显示 BBP 染毒随着染毒剂量的升高,细胞中 GSH 含量逐渐下降。染色观察也发现细胞出现凋亡现象,因此我们认为 BBP 可以引起神经瘤细胞的氧化损伤。在高浓度的 BBP 作用下,神经瘤细胞发生了氧化损伤,这种损伤又导致了神经细胞的凋亡。

但是, BBP 的其他相关毒性的作用还不确定,比如 BBP 是通过改变组织基因水平的表达还是改变

激素的代谢水平来干扰内分泌系统? 虽然已经有学者研究发现, 在细胞受到氧化损伤后细胞会启动相应的凋亡程序, 细胞内相关的信号通路的某些关键蛋白的表达和调控会发生明显的改变^[24]; 但是这一机制是否可以用来解释 BBP 对细胞的毒性作用, 进而导致了它的神经毒性, 还值得进一步探讨。

通讯作者简介: 杨旭(1954—), 男, 医学博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为环境毒理学。

参考文献:

- [1] Wezel A P, Vlaardingen V, Posthumus R, et al. Environmental risk limits for two phthalates, with special emphasis on endocrine disruptive properties [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, 46(3): 305–321
- [2] 张锡辉. 高等环境化学与微生物学原理及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 147–149
- [3] Cantreeds W. Comparison between the organic fraction of suspended matter at a background and an urban station [J]. *Science of the Total Environment*, 1997, 8(1): 79–88
- [4] 莫测辉, 蔡全英, 吴启堂, 等. 我国城市污泥中邻苯二甲酸酯的研究[J]. *中国环境科学*, 2001, 21(4): 362–366
- [5] Mikula P, Svobodová Z, Smutná M. Phthalates: Toxicology and food safety—a review [J]. *Czech Journal of Food*, 2005, 23(6): 217–223
- [6] 刘慧杰, 舒为群. 邻苯二甲酸酯类化合物的毒理学效应及对人类健康的危害[J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26(19): 1778–1781
- [7] Swan S H. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans [J]. *Environmental Research*, 2008, 108(2): 177–184
- [8] Lyche J L, Gutleb A C, Bergman A, et al. Reproductive and developmental toxicity of phthalates [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 2009, 12(4): 225–249
- [9] Minoru K. Toxicity of butylbenzyl phthalate (BBP) and other phthalate esters to nervous tissue in culture [J]. *Toxicology Letters*, 1980, 6(6): 373–378
- [10] 杨波, 李文兰. 邻苯二甲酸丁基苯酯对雄性大鼠生殖系统影响[J]. *哈尔滨商业大学学报(自然科学版)*, 2006, (5): 11–13
- [11] Tanida T, Warita K, Ishihara K, et al. Fetal and neonatal exposure to three typical environmental chemicals with different mechanisms of action: Mixed exposure to phenol, phthalate, and dioxin cancels the effects of sole exposure on mouse midbrain dopaminergic nuclei [J]. *Toxicology Letters*, 2009, 189(1): 40–47
- [12] 聂金雷, 时庆德, 张勇, 等. 利用荧光探针直接测定线粒体活性氧的形成[J]. *中国应用生理学杂志*, 2002, 18(2): 196–198
- [13] Tandon V, Gupta R K. Effect of Vitex negundo on oxidative stress [J]. *Indian Journal of Pharmacology*, 2005, 37(1): 38–40
- [14] 张志良. 植物生理学实验指导(第二版)[M]. 北京: 北京高等教育出版社, 1990
- [15] 马萍, 杜娟, 罗清, 等. 纳米 Fe₃O₄ 对小鼠肺细胞的氧化损伤[J]. *生态毒理学报*, 2012, 7(1): 44–48
- [16] Ma P, Du J, Luo Q, et al. Fe₃O₄ nanoparticles to the oxidative damage of rats' pneumocyte [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2012, 7(1): 44–48 (in Chinese)
- [17] Seo K W, Kim K B, Kim Y J, et al. Comparison of oxidative stress and changes of xenobiotic metabolizing enzymes induced by phthalates in rats [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42(1): 107–114
- [18] McIntyre B S, Barlow N J, Wallace D G, et al. Effects of in utero exposure to linuron on androgen-dependent reproductive development in the male Crl: CD(SD) BR rat [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000, 167(2): 87–99
- [19] Schanbacher B D, Ewing L L. Simultaneous determination of testosterone, α -androstane-17 β -ol-3-one, 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol and 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol in plasma of adult male rabbits by radioimmunoassay [J]. *Endocrinology*, 1975, 97(4): 787–792
- [20] Parks LG, Ostby J S, Lambright C R, et al. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat [J]. *Toxicological Sciences*, 2000, 58(2): 339–349
- [21] McIntyre B S, Barlow N J, Sar M, et al. Effects of in utero linuron exposure on rat Wolffian an duct development [J]. *Reproductive Toxicology*, 2002, 16(2): 131–139
- [22] Gray L E, Ostby J, Furr J, et al. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat [J]. *Toxicological Sciences*, 2000, 58(2): 350–365
- [23] Wormuth M, Scheringer M, Vollenweider M, et al. What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans [J]. *Risk Analysis*, 2008, 6(2): 803–824
- [24] 王婧, 蔡凤云, 曾强, 等. 邻苯二甲酸丁基苯酯致大鼠肺细胞氧化损伤作用的体外研究[J]. *医学研究杂志*, 16–18
- [25] 李文兰, 季宇彬, 姜安玺, 等. 环境激素邻苯二甲酸丁基苯酯在动物脏器中的代谢[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2005(12): 1674–1677