实验研究
Experiment

磷酸化胞外信号调节激酶 1/2 在邻苯二甲酸二丁酯致雄性小鼠肝损伤中的作用

万涛[1]，晏彪[2]，洪亮[1]

1. 黄石中心医院普爱院区腹部肿瘤外科，湖北 黄石 435000
2. 湖北科技学院基础医学院，湖北 咸宁 437100

摘要：

[背景] 邻苯二甲酸二丁酯（DBP）具有潜在的肝毒性。胞外信号调节激酶 1/2（ERK1/2）的活化形式磷酸化 ERK1/2（p-ERK1/2）被证实与肝脏损伤有关。但尚不清楚 DBP 暴露是否通过 p-ERK1/2 导致肝损伤。

[目的] 探讨氧化应激介导的 p-ERK1/2 在 DBP 所致小鼠肝损伤中的作用。

[方法] SPF 级雄性 KM 小鼠 28 只，随机分为 4 组：对照组、50 mg·kg^{-1}·d^{-1} DBP 组、2.5 mg·kg^{-1}·d^{-1} U0126（一种非三磷酸腺苷竞争性的抑制剂，可阻断 ERK1/2 的磷酸化和激活）组、50 mg·kg^{-1}·d^{-1} DBP+2.5 mg·kg^{-1}·d^{-1} U0126 组，实验周期 28 d。实验结束后测定小鼠肝脏的脏器系数，HE 染色观察肝组织病理学变化，采用二氯二氢荧光素 - 乙酰乙酸酯（DCFH-DA）荧光染料检测各组小鼠肝组织的活性氧（ROS）水平，硫代巴比妥酸比色法检测丙二醛（MDA）含量，化学比色法检测总抗氧化能力（T-AOC），蛋白质印迹法检测肝组织 ERK1/2 及其磷酸化（p-ERK1/2）蛋白表达，全自动生化分析仪测定各组小鼠血清中丙氨酸转氨酶（ALT）、天冬氨酸转氨酶（AST）、白蛋白（ALB）含量。

[结果] 染毒 28 d 后，与对照组相比，DBP 组小鼠肝脏的脏器系数［(4.97±0.14) %］下降，ALT/AST（2.02±0.25）上升，ALB 含量［(18.54±2.64) U·L^{-1}］下降，ROS 荧光强度（6 387.0±84.80）增加、MDA 含量［(1.65±0.10) μmol·g^{-1}（以蛋白计）］上升，T-AOC 水平［(0.55±0.05) U·mg^{-1}］下降，p-ERK1/2 蛋白表达水平（1.29±0.02）上升（P<0.05）。经 U0126 处理后，与 DBP 组比较，DBP+U0126 组小鼠肝脏的脏器系数［(5.36±0.33) %］上升，ALT/AST（1.40±0.17）下降，ALB 含量［(28.92±0.69) U·L^{-1}］上升，ROS 荧光强度（5 934.8±38.07）减弱、MDA 含量［(1.10±0.08) μmol·g^{-1}（以蛋白计）］下降，p-ERK1/2 蛋白表达水平（0.90±0.13）下调（P<0.05）。

[结论] DBP 可提高雄性小鼠肝组织的氧化应激水平，上调 p-ERK1/2 蛋白表达，引起肝功能障碍；而 U0126 可通过抑制 ERK1/2 的磷酸化，改善 DBP 诱导的肝损伤，提示 p-ERK1/2 参与了 DBP 诱导的肝损伤。

关键词：邻苯二甲酸二丁酯；胞外信号调节激酶 1/2；氧化应激；肝损伤；U0126

Role of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 in dibutyl phthalate-induced hepatic damage in male mice

WAN Tao[1], YAN Biao[2], HONG Liang[1] (1.Department of Abdominal Cancer Surgery, Puai Branch of Huangshi Central Hospital, Huangshi, Hubei 435000, China; 2.College of Basic Medical Sciences, Hubei University of Science and Technology, Xianning, Hubei 437100, China)

Abstract:

[Background] Dibutyl phthalate (DBP) has potential hepatotoxicity. The activated form of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2), has been confirmed to be associated with liver injury. It is unclear whether DBP exposure can lead to hepatic damage through p-ERK1/2.

[Objective] This study explores the role of p-ERK1/2 mediated by oxidative stress in DBP-induced hepatic damage in mice.

[Methods] SPF male KM mice (n=28) were randomly divided into four groups: control group, 50 mg·kg^{-1}·d^{-1} DBP group, 2.5 mg·kg^{-1}·d^{-1} U0126 (a non-adenosine triphosphate competitive specific inhibitor of ERK1/2) group, and 50 mg·kg^{-1}·d^{-1} DBP+2.5 mg·kg^{-1}·d^{-1} U0126 group. After 28 days

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19733

作者简介
万涛（1982—），男，硕士，主治医师；
E-mail：627096995@qq.com

通信作者
洪亮，E-mail：32041118@qq.com

伦理审批 已获取
利益冲突 无申报
收稿日期 2019-10-28
录用日期 2020-03-23

文章编号 2095-9982(2020)06-0622-06
中图分类号 R114
文献标志码 A

▸引用
万涛，晏彪，洪亮. 磷酸化胞外信号调节激酶 1/2 在邻苯二甲酸二丁酯致雄性小鼠肝损伤中的作用［J］. 环境与职业医学，2020，37（6）：622-627.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19733

Correspondence to
HONG Liang, E-mail: 32041118@qq.com

Ethics approval Obtained
Competing interests None declared
Received 2019-10-28
Accepted 2020-03-23

▸To cite
WAN Tao, YAN Biao, HONG Liang. Role of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 in dibutyl phthalate-induced hepatic damage in male mice[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(6): 622-627.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19733

of experiment, the organ coefficient of mice liver was measured; the liver pathological changes were observed after HE staining; the level of reactive oxygen species (ROS) in liver was detected with 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA); the level of malondialdehyde (MDA) was detected by thiobarbituric acid colorimetric method; the total antioxidative capacity (T-AOC) was detected by chemical colorimetric assay; the expressions of ERK1/2 and p-ERK1/2 in liver tissues were detected by Western blotting; the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and albumin (ALB) in serum were determined with automatic biochemical analyzer.

[Results] After 28 days of designed treatment, compared with the control group, the DBP group showed decreased liver organ coefficient [(4.97±0.14) %], increased ALT/AST (2.02±0.25), decreased ALB level [(18.54±2.64) U·L^{-1}], increased fluorescence intensity of ROS (6 387.0±84.80), increased MDA level [(1.65±0.10) μmol·g^{-1} (in protein)], decreased T-AOC level [(0.55±0.050) U·mg^{-1}], and increased p-ERK1/2 protein expression level (1.29±0.02) (P<0.05). After the U0126 treatment, compared with the DBP group, the DBP+U0126 group showed reversed effects, including increased liver organ coefficient [(5.36±0.33) %], decreased ALT/AST (1.40±0.17), increased ALB level [(28.92±0.69) U·L^{-1}], decreased fluorescence intensity of ROS (5 934.8±38.07), decreased MDA level [(1.10±0.08) μmol·g^{-1} (in protein)], and decreased expression level of p-ERK1/2 (0.90 ±0.13) (P<0.05).

[Conclusion] DBP could increase the level of oxidative stress and up-regulate the expression of p-ERK1/2 protein in the liver tissues of male mice, resulting in liver dysfunction; while U0126 could repair the DBP-induced hepatic damage by inhibiting the phosphorylation of ERK1/2, suggesting that p-ERK1/2 is involved in the hepatic damage caused by DBP.

Keywords: dibutyl phthalate; extracellular regulated protein kinase 1/2; oxidative stress; hepatic damage; U0126

邻苯二甲酸二丁酯（dibutyl phthalate，DBP）是一类主要的邻苯二甲酸酯塑化剂，通过淋洗、迁移、蒸发等方式被释放到环境中，导致人类潜在的环境相关疾病，如引起发育和（或）生殖障碍[1]。大量证据表明，DBP可通过血液循环和代谢转化进入人体并作用于肝脏[2-3]。人体内邻苯二甲酸酯代谢产物与氧化应激生物标志物活性氧（reactive oxygen species，ROS）的增加密切相关[4]。胞外信号调节激酶1/2（extracellular signal-regulated kinase 1/2，ERK1/2）是真核生物中丝裂原活化蛋白激酶（mitogen activated protein kinase，MAPK）家族的成员之一[5]，可被具有抑制蛋白磷酸酶活性的ROS激活，其活化形式——磷酸化ERK1/2（phosphorylated ERK1/2，p-ERK1/2）与肝脏病理损伤有关[6]。U0126是一种有效、非三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）竞争性的抑制剂，可阻断ERK1/2的磷酸化和激活，对ERK通路活化所致的细胞死亡有保护作用[7]，可抑制肝癌细胞的增殖[8]。本研究拟通过检测DBP暴露后昆明小鼠肝组织氧化应激水平、ERK1/2和p-ERK1/2蛋白表达水平、肝功能，同时观察U0126对DBP所致肝损伤的影响，探讨氧化应激介导的p-ERK1/2在DBP所致小鼠肝损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

全自动生化分析仪（iMagic-M7，中国深圳市库贝尔生物科技有限公司），酶标仪（ELx800，美国Bio-Tek），电泳仪（DYY-6C，中国北京市六一仪器厂），显微镜（BX51，日本Olympus）。DBP（纯度≥99.6%，美国Sigma），U0126（美国MedChemExpress），DCFH-DA荧光染料（美国Sigma），小鼠血清白蛋白（albumin，ALB）、谷丙转氨酶（glutamic-pyruvic transaminase，ALT）、天冬氨酸转氨酶（aspartate aminotransferase，AST）检测试剂盒（深圳市库贝尔生物科技有限公司），总抗氧化能力（total antioxidant capacity，T-AOC）检测试剂盒（中国南京建成生物工程研究所），十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶制备试剂盒、放射免疫沉淀分析总蛋白裂解液、聚氰基丙烯酸正丁酯蛋白质浓度测定试剂盒、免疫印迹底物化学发光检测试剂盒（美国ASPEN），一抗均为兔抗小鼠，肌动蛋白（β-actin）（英国Abcam），ERK、p-ERK（美国CST），其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物与分组

SPF级雄性昆明小鼠28只，购自湖北省实验动物研究中心，体重（17±1）g，随机分成四组（n=7）：对照组、50 mg·kg^{-1}·d^{-1} DBP组、2.5 mg·kg^{-1}·d^{-1} U0126组、50 mg·kg^{-1}·d^{-1} DBP+2.5 mg·kg^{-1}·d^{-1} U0126（DBP+U0126）组。王彝白纳等[9]报道我国居民膳食24类食品中的DBP含量范围为0~46.50 mg·kg^{-1}[9]，据此，本实验DBP暴露浓度设置为50 mg·kg^{-1}·d^{-1}。参考Kim等[10]研究，U0126组小鼠腹腔注射2.5 mg·kg^{-1}·d^{-1} U0126，DBP+U0126组先腹腔注射2.5 mg·kg^{-1}·d^{-1} U0126，30 min后再灌胃50 mg·kg^{-1}·d^{-1} DBP。各组小鼠每日均给药1次，给药体积为10 mL·kg^{-1}，实验周期28 d。在动物实验中遵循3R(替代、优化、减少)原则，本研究经黄石

中心医院实验动物伦理委员会批准（编号：2018-03）。

1.3 方法

1.3.1 小鼠脏器系数的测定 实验前后称量小鼠体重并记录，颈椎脱臼法处死小鼠，取完整肝组织，称重并记录，计算脏器系数。

1.3.2 肝组织切片观察 实验结束后，取小鼠部分肝脏，用质量分数4%多聚甲醛固定，经常规脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋后，制备肝组织切片（厚度约4 μm），HE染色，在显微镜下观察不同组小鼠肝组织的病理学变化。

1.3.3 肝功能测定 采用全自动生化分析仪测定各组小鼠的肝功能指标ALB、ALT及AST。

1.3.4 小鼠肝组织匀浆制备 取约2 g的肝组织置于预冷PBS（pH=7.4）中漂洗，滤纸拭干，置于匀浆器中按照每克组织加入10 mL预冷的PBS制成10%匀浆液，4℃，10 000×*g*离心10 min后取上清，用于ROS、丙二醛（malondialdehyde，MDA）和T-AOC的检测。

1.3.5 ROS水平测定 肝组织匀浆中ROS水平采用DCFH-DA荧光染料定量分析[11]，取肝组织上清液，加入100 μL荧光染料DCFH-DA进行染色，避光反应5 min，用酶标仪检测，结果用相对荧光强度表示。

1.3.6 MDA含量测定 肝组织匀浆中MDA含量用硫代巴比妥酸法[12]进行测定。

1.3.7 T-AOC水平测定 肝组织匀浆中T-AOC水平的测定参照试剂盒说明书进行。

1.3.8 蛋白质印迹法检测肝组织ERK1/2、p-ERK1/2蛋白表达 小鼠肝组织被剪成小块，加总蛋白裂解液裂解，冰浴匀浆后，提取总蛋白，并测定样品中蛋白浓度。上样量10 μg，10%电泳胶分离蛋白，然后转膜至0.45 μm聚偏二氟乙烯膜上，加一抗封闭缓冲液室温震荡1 h，再分别加入β-actin（5%脱脂牛奶，稀释比例1∶10 000）、ERK1/2（5%牛血清白蛋白，稀释比例1∶2 000）及p-ERK1/2（5%牛血清白蛋白，稀释比例1∶1 000）抗体，4℃封闭过夜。TBST缓冲液洗膜，加羊抗兔二抗室温孵育1 h，显影。采集β-actin、ERK1/2及p-ERK1/2条带，以β-actin作内参，分别得到各样品ERK1/2、p-ERK1/2与β-actin的灰度比值。

1.4 统计学分析

采用SPSS 19.0进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，两因素两水平比较采用析因设计的方差分析，组间多重比较SNK-*q*检验，检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 脏器系数的变化

染毒后DBP组小鼠的肝脏脏器系数较对照组下降（$P<0.05$）；DBP+U0126组小鼠的肝脏脏器系数较DBP组升高（$P<0.05$），与U0126组间的差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表1。

表1 各组小鼠染毒前、后体重变化及染毒后肝脏脏器系数（n=7，$\bar{x}\pm s$）

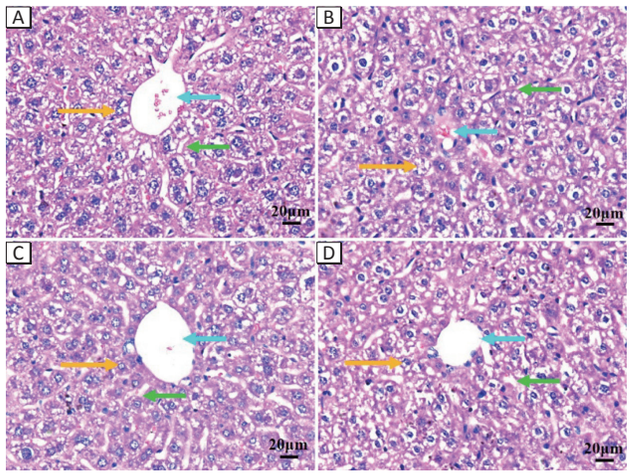
Table 1 Weight change and liver organ coefficient of mice in each group before and after exposure (n=7, $\bar{x}\pm s$)

组别	染毒前体重/g	染毒后体重/g	染毒后肝脏脏器系数/%
对照组	17.86±0.44	40.35±1.75	5.89±0.12
DBP组	17.73±0.83	41.95±3.04	4.97±0.14[a]
U0126组	17.63±0.53	38.12±2.65	5.44±0.11
DBP+U0126组	17.25±0.59	39.29±3.82	5.36±0.33[b]

[注] a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与DBP组比较，$P<0.05$。

2.2 肝组织的病理学观察结果

对照组小鼠的肝组织结构及肝细胞形态正常；DBP组小鼠肝组织中央静脉淤血，肝细胞水肿，胞内圆形空泡较大（空泡较大是细胞核被挤于一边所造成），肝索结构尚清晰，肝窦明显受压变窄；U0126组小鼠肝组织结构及肝细胞形态也趋于正常，病理学改变不明显；DBP+U0126组小鼠部分肝细胞内可观察到大小不等的圆形空泡，以及一定程度的水肿。见图1。



[注] A：对照组；B：DBP组；C：U0126组；D：DBP+U0126组。黄色箭头表示肝细胞，蓝色箭头表示肝索，绿色箭头表示中央静脉。

图1 各组小鼠肝组织的HE染色结果（×200）

Figure 1 HE staining results of liver tissues of mice in each group (×200)

2.3 肝功能指标的变化

与对照组比较，DBP组小鼠血清中AST、ALT及AST/

ALT 上升，ALB 下降（$P<0.05$）。与 DBP 组比较，DBP+U0126 组小鼠血清中 AST/ALT 下降，ALB 上升（$P<0.05$），AST、ALT 在两组间的差异均无统计学意义。DBP+U0126 组小鼠血清中 AST、ALT、AST/ALT 和 ALB 与 U0126 组相比，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。见表 2。

表 2 各组小鼠肝功能指标的变化（n=7，$\bar{x}\pm s$）

Table 2 Changes of liver function indicators of mice in each group（n=7，$\bar{x}\pm s$）

组别	AST/U·L^{-1}	ALT/U·L^{-1}	AST/ALT	ALB/U·L^{-1}
对照组	137.40±24.74	56.67±5.48	1.00±0.11	28.48±1.62
DBP 组	331.50±50.32^{a}	81.14±7.71^{a}	2.02±0.25^{a}	18.54±2.64^{a}
U0126 组	260.00±47.21	65.20±10.59	1.29±0.19	30.24±0.64
DBP+U0126 组	322.00±56.84	76.80±4.03	1.40±0.17^{b}	28.92±0.69^{b}
F	3.200*	2.894*	5.503*	7.708*
F_{DBP}	7.064$^{\#}$	7.021$^{\#}$	8.266$^{\#}$	3.846$^{\#}$
F_{U0126}	1.378	0.007	0.706	7.620$^{\#}$
$F_{交互}$	1.879	1.368	5.574$^{\&}$	6.562$^{\&}$

[注] *：$P<0.05$；a：与对照组比较，b：与 DBP 组比较，$P<0.05$。经析因方差分析，#：$P<0.05$；&：$P<0.05$。

2.4 肝组织 ROS 荧光强度、MDA 含量及 T-AOC 水平的变化

与对照组比较，DBP 组小鼠肝组织 ROS 荧光强度、MDA 含量增加，T-AOC 水平下降（$P<0.05$）；与 DBP 组比较，DBP+U0126 组小鼠肝组织 ROS 荧光强度、MDA 含量下降（$P<0.05$），T-AOC 水平改变均无统计学意义；DBP+U0126 组小鼠肝组织 ROS 荧光强度、MDA 含量及 T-AOC 水平与 U0126 组相比，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。见表 3。

表 3 各组小鼠肝组织 ROS 荧光强度、MDA 含量及 T-AOC 水平（n=7，$\bar{x}\pm s$）

Table 3 ROS fluorescence intensity, MDA content, and T-AOC level in liver tissues of mice in each group（n=7，$\bar{x}\pm s$）

组别	ROS（荧光强度）	MDA$^{\triangle}$/μmol·g^{-1}	T-AOC$^{\triangle}$/U·mg^{-1}
对照组	5 916.6±101.7	1.31±0.27	0.71±0.02
DBP 组	6 387.0±84.80^{a}	1.65±0.10^{a}	0.55±0.05^{a}
U0126 组	6 058.3±71.22	0.95±0.18	0.68±0.02
DBP+U0126 组	5 934.8±38.07^{b}	1.10±0.08^{b}	0.64±0.03
F	7.686*	4.092*	4.466*
F_{DBP}	4.848$^{\#}$	5.379$^{\#}$	10.449$^{\#}$
F_{U0126}	3.884	12.540$^{\#}$	0.713
$F_{交互}$	14.207$^{\&}$	0.125	3.769$^{\&}$

[注] *：$P<0.05$；a：与对照组比较，b：与 DBP 组比较，$P<0.05$。经析因方差分析，#：$P<0.05$；&：$P<0.05$。△：以蛋白计。

2.5 肝组织 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达

DBP 组小鼠肝组织 p-ERK1/2 表达水平较对照组上调（$P<0.05$）；DBP+U0126 组小鼠肝组织 p-ERK1/2 表达水平较 DBP 组下调，较 U0126 组上调（$P<0.05$）。各组小鼠肝组织 ERK1/2 表达水平无明显差别。见图 2、图 3。

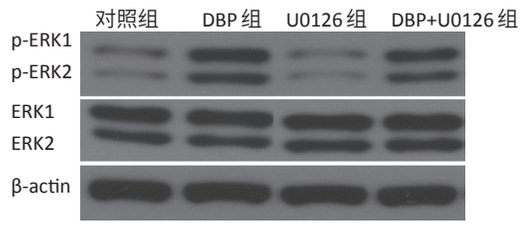
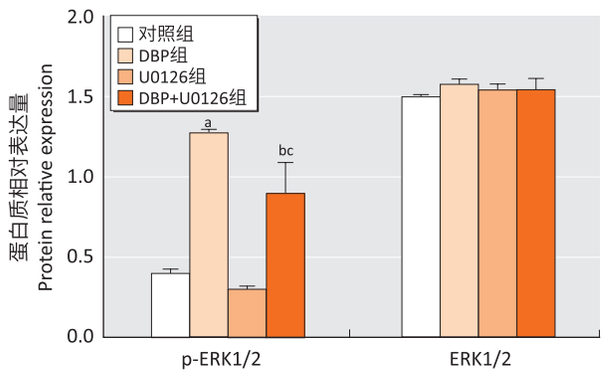


图 2 各组小鼠肝组织 ERK1/2、p-ERK1/2 的电泳条带

Figure 2 Electrophoretic bands of ERK1/2 and p-ERK1/2 in liver tissues of mice in each group



[注] a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与 DBP 组比较，$P<0.05$；c：与 U0126 组比较，$P<0.05$。经析因方差分析，F_{DBP}=12.018，F_{U0126}=12.801，$P<0.05$；$F_{交互}$=4.233，$P<0.05$。

图 3 各组小鼠肝组织 ERK1/2、p-ERK1/2 的相对表达量

Figure 3 Relative expressions of ERK1/2 and p-ERK1/2 in liver tissues of mice in each group

3 讨论

在人体内，某些邻苯二甲酸盐通过水解、氧化和结合代谢过程被消化；消化的邻苯二甲酸盐进入血液并到达肝脏进行解毒，肝脏在这些暴露物的解毒过程中发挥着重要功能[3]。DBP 是一种研究较多的涉及人体代谢的化合物，人类持续暴露于 DBP 可能导致肝脏解毒酶被抑制，并可能导致肝功能障碍[13]。体内毒理学实验结果表明，DBP 作为一种外源性氧化物，可引起肝组织的氧化应激反应，并可能激活 MAPK 级联信号转导通路[3, 14]。其他研究表明，50 mg·kg^{-1} DBP 可诱导白化大鼠的肝细胞增生，胆红素升高，而总蛋白和胆固醇下降（$P<0.01$）[15]。本研究进一步发现，相同剂量下 DBP 短期内持续暴露可提高雄性小鼠肝组织的氧化应激水平，上调 p-ERK1/2 蛋白表达，引起肝功能指标紊乱并导致肝损伤；而 U0126 可通过抑制 ERK1/2 的磷酸化，改善 DBP 诱导的肝损伤，提示

p-ERK1/2 亦介导 DBP 诱导的肝损伤。

目前研究认为 DBP 诱导肝毒性的上游分子机制之一是氧化应激[3, 14]。本实验结果显示，DBP 暴露后小鼠肝组织的 ROS、MDA 水平上升、T-AOC 水平降低，进一步证实了 DBP 可以提高雄性小鼠肝组织的氧化应激水平。ROS 是氧化应激的主要标志物，ROS 的过量产生导致胞内大分子如脂质被攻击，MDA 是脂质过氧化终产物，其含量的增加与细胞膜的破坏或改变相关，这也为解释 DBP 暴露后肝功能之所以出现障碍提供了细胞结构基础[16]。

此外，在氧化应激过程中产生的 ROS 作为上游信号分子还参与了信号转导[16]。ROS 可激活 ERK1/2，使其发生磷酸化[5-6]。ERK1/2 是信号转导通路的枢纽分子，其激活或磷酸化可将信号从细胞质转移到细胞核内，从而介导下游转录因子如核因子 -κB 和激活蛋白 -1 的活化，进而调节细胞增殖、分化、凋亡和其他生物学功能[17-18]。Ghosh 等[19] 研究发现，DBP 的同系物邻苯二甲酸二辛酯可激活 ERK1/2，p-ERK1/2 诱导肝细胞凋亡是邻苯二甲酸二辛酯引起肝毒性的分子机制之一。本实验结果显示，DBP 组小鼠肝组织 p-ERK1/2 的表达水平随着氧化应激的增强而升高；给予 U0126 处理后，DBP+U0126 组小鼠肝组织 p-ERK1/2 水平降低，以上结果进一步说明 ERK1/2 的激活亦参与了 DBP 暴露引起的肝损伤。

ERK1/2 分布在肝组织中，在肝癌病例中可以发现 ERK1/2 的过度激活或磷酸化[20-21]。ALT 主要存在于肝细胞的细胞浆中，AST 主要存在于肝细胞的细胞浆和线粒体中。正常肝细胞由于细胞膜完整，ALT 和 AST 不会被释放到血液中，但当肝细胞受到损伤时，细胞膜通透性增加，肝细胞中的 ALT 和 AST 释放入血，从而导致血清中 ALT 和 AST 水平升高。AST/ALT 值是临床常用的反映肝细胞损害的指标[22]。如果 AST/ALT 值高于 1.44，提示可能患有慢性肝炎[22]。ALB 是人体血浆中最主要的蛋白质，维持机体营养与渗透压。Chen 等[23] 研究表明，灌胃给药邻苯二甲酸二异壬酯可降低 Balb/c 小鼠血清中 ALB 水平，且下降的程度与暴露浓度呈负相关。本研究中肝功能指标检测结果表明，DBP 组雄性小鼠血清 AST/ALT 值升高，ALB 降低；经 U0126 处理后，DBP 所引起的 AST/ALT 值明显降低，ALB 相应升高，提示通过抑制 ERK1/2 的激活，可改善 DBP 引起的肝功能指标紊乱。

ERK1/2 的激活还与肝脏的病理状态有关[6]。本研究中组织学切片观察结果表明，DBP 暴露后小鼠的肝细胞有一定程度的水肿，肝细胞结构出现病理学改变；经 U0126 处理后，DBP+U0126 组小鼠的肝细胞的形态及结构未见明显异常。本实验结果提供了 ERK1/2 的激活参与 DBP 引起肝脏组织病理学变化的证据。

尽管本研究并未检测 ERK1/2 信号通路的全部指标，但鉴于 ERK1/2 激酶是通路中的关键分子且发生了磷酸化，这为后续深入探究 DBP 诱导肝毒性的机制提供了一个新的思路。综上，本研究探讨了 DBP 所致肝损伤与 ERK1/2 的关联，并以拮抗剂 U0126 作为分子事件阻断剂，明确了 ERK1/2 的激活或磷酸化在 DBP 致雄性小鼠肝损伤中的介导作用。

参考文献

[1] RADKE E G，BRAUN J M，MEEKER J D，et al. Phthalate exposure and male reproductive outcomes：A systematic review of the human epidemiological evidence [J]. Environ Int，2018，121：764-793.

[2] BENJAMIN S，MASAI E，KAMIMURA N，et al. Phthalates impact human health：Epidemiological evidences and plausible mechanism of action [J]. J Hazard Mater，2017，340：360-383.

[3] PRAVEENA S M，TEH S W，RAJENDRAN R K，et al. Recent updates on phthalate exposure and human health：a special focus on liver toxicity and stem cell regeneration [J]. Environ Sci Pollut Res Int，2018，25（12）：11333-11342.

[4] FERGUSON K K，MCELRATH T F，CHEN Y H，et al. Urinary phthalate metabolites and biomarkers of oxidative stress in pregnant women：a repeated measures analysis [J]. Environ Health Perspect，2015，123（3）：210-216.

[5] HAN A，ZOU L，GAN X，et al. ROS generation and MAPKs activation contribute to the Ni-induced testosterone synthesis disturbance in rat Leydig cells [J]. Toxicol Lett，2018，290：36-45.

[6] DE SÁ JUNIOR P L，DIAS CÂMARA D A，SAJ PORCACCHIA A，et al. The roles of ROS in cancer heterogeneity and therapy [J]. Oxid Med Cell Longev，2017，2017：2467940.

[7] COOK S J，STUART K，GILLEY R，et al. Control of cell death and mitochondrial fission by ERK1/2 MAP kinase signalling [J]. FEBS J，2017，284（24）：4177-4195.

[8] HORIUCHI H，KAWAMATA H，FURIHATA T，et al. A MEK

inhibitor（U0126）markedly inhibits direct liver invasion of orthotopically inoculated human gallbladder cancer cells in nude mice［J］. J Exp Clin Cancer Res，2004，23（4）：599-606.

［9］王彝白纳，蒋定国，杨大进，等. 中国居民邻苯二甲酸二丁酯膳食摄入水平及其风险评估［J］. 中国食品卫生杂志，2016，28（6）：800-804.

［10］KIM D G，BAE G S，CHOI S B，et al. Guggulsterone attenuates cerulein-induced acute pancreatitis via inhibition of ERK and JNK activation［J］. Int Immunopharmacol，2015，26（1）：194-202.

［11］SHEKHOVA E，KNIEMEYER O，BRAKHAGE A A. Induction of mitochondrial reactive oxygen species production by Itraconazole，Terbinafine，and Amphotericin B as a mode of action against *Aspergillus fumigatus*［J］. Antimicrob Agents Chemother，2017，61（11）：e00978-17.

［12］ANSARIN K，KHOUBNASABJAFARI M，JOUYBAN A. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders［J］. Bioimpacts，2015，5（3）：123-127.

［13］田雨，李玲，李丰宝. 邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二（2-乙基己基）酯联合染毒对雄性大鼠肝脏P450酶的影响［J］. 环境与健康杂志，2014，31（1）：19-22.

［14］ZHU M，HUANG C，MA X，et al. Phthalates promote prostate cancer cell proliferation through activation of ERK5 and p38［J］. Environ Toxicol Pharmacol，2018，63：29-33.

［15］KIRAN S，JOSHI M. Liver function test of albino rats exposed to di-n-butyl phthalate［J］. J Exp Zool India，2011，14（1）：137-139.

［16］ZHANG J，WANG X，VIKASH V，et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling［J］. Oxid Med Cell Longev，2016，2016：4350965.

［17］BUSCÀ R，POUYSSÉGUR J，LENORMAND P. ERK1 and ERK2 Map Kinases：Specific roles or functional redundancy［J］. Front Cell Dev Biol，2016，4：53.

［18］KOINZER S，REINECKE K，HERDEGEN T，et al. Oxidative stress induces biphasic ERK1/2 activation in the RPE with distinct effects on cell survival at early and late activation［J］. Curr Eye Res，2015，40（8）：853-857.

［19］GHOSH J，DAS J，MANNA P，et al. Hepatotoxicity of di-（2-ethylhexyl）phthalate is attributed to calcium aggravation，ROS-mediated mitochondrial depolarization，and ERK/NF-κB pathway activation［J］. Free Radic Biol Med，2010，49（11）：1779-1791.

［20］梁佳，包翠芬，魏嘉，等. P38和ERK1/2在肝细胞癌中的表达及意义［J］. 中国组织化学与细胞化学杂志，2009，18（2）：202-206.

［21］MEHDIZADEH A，SOMI M H，DARABI M，et al. Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in cancer therapy：a focus on hepatocellular carcinoma［J］. Mol Biol Rep，2016，43（2）：107-116.

［22］RINELLA M E. Nonalcoholic fatty liver disease：A systematic review［J］. JAMA，2015，313（22）：2263-2273.

［23］CHEN Y，LI C，SONG P，et al. Hepatic and renal tissue damage in Balb/c mice exposed to diisodecyl phthalate：The role of oxidative stress pathways［J］. Food Chem Toxicol，2019，132：110600.

（英文编辑：汪源；责任编辑：陈姣）