

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 (6387.0±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 (5934.8±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 Tao¹, YAN Biao², HONG Liang¹ (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 $[(4.97 \pm 0.14) \%$], increased ALT/AST (2.02 ± 0.25) , decreased ALB level $[(18.54 \pm 2.64) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}]$, increased fluorescence intensity of ROS (6387.0 ± 84.80) , increased MDA level $[(1.65 \pm 0.10) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ (in protein)}]$, decreased T-AOC level $[(0.55 \pm 0.050) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}]$, 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 $[(5.36 \pm 0.33) \%$], decreased ALT/AST (1.40 ± 0.17) , increased ALB level $[(28.92 \pm 0.69) \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}]$, decreased fluorescence intensity of ROS (5934.8 ± 38.07) , decreased MDA level $[(1.10 \pm 0.08) \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ (in protein)}]$, 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 $\geq 99.6\%$, 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 $(17 \pm 1) \text{ g}$, 随机分成四组 ($n=7$): 对照组、 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ DBP 组、 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ U0126 组、 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ DBP+ $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 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 $0 \sim 46.50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[9], 据此, 本实验 DBP 暴露浓度设置为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。参考 Kim 等^[10]研究, U0126 组小鼠腹腔注射 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ U0126, DBP+U0126 组先腹腔注射 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ U0126, 30 min 后再灌胃 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ DBP。各组小鼠每日均给药 1 次, 给药体积为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 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2g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10mL预冷的PBS制成10%匀浆液,4 $^{\circ}\text{C}$,10 000 $\times g$ 离心10min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5min,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1h,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 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。TBST缓冲液洗膜,加羊抗兔二抗室温孵育1h,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 $\alpha=0.05$ 。

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($n=7, \bar{x}\pm s$)

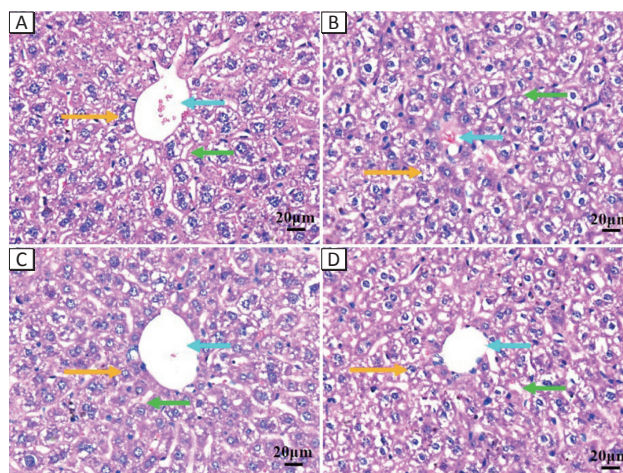
Table 1 Weight change and liver organ coefficient of mice in each group before and after exposure ($n=7, \bar{x}\pm s$)

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 $\pm$ 0.44	40.35 $\pm$ 1.75	5.89 $\pm$ 0.12
DBP组	17.73 $\pm$ 0.83	41.95 $\pm$ 3.04	4.97 $\pm$ 0.14 ^a
U0126组	17.63 $\pm$ 0.53	38.12 $\pm$ 2.65	5.44 $\pm$ 0.11
DBP+U0126组	17.25 $\pm$ 0.59	39.29 $\pm$ 3.82	5.36 $\pm$ 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($\times 200$)

Figure 1 HE staining results of liver tissues of mice in each group ($\times 200$)

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
<i>F</i>	3.200 [*]	2.894 [*]	5.503 [*]	7.708 [*]
<i>F</i> _{DBP}	7.064 [#]	7.021 [#]	8.266 [#]	3.846 [#]
<i>F</i> _{U0126}	1.378	0.007	0.706	7.620 [#]
<i>F</i> _{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 [△] /μmol·g ⁻¹	T-AOC [△] /U·mg ⁻¹
对照组	5916.6±101.7	1.31±0.27	0.71±0.02
DBP 组	6387.0±84.80 ^a	1.65±0.10 ^a	0.55±0.05 ^a
U0126 组	6058.3±71.22	0.95±0.18	0.68±0.02
DBP+U0126 组	5934.8±38.07 ^b	1.10±0.08 ^b	0.64±0.03
<i>F</i>	7.686 [*]	4.092 [*]	4.466 [*]
<i>F</i> _{DBP}	4.848 [#]	5.379 [#]	10.449 [#]
<i>F</i> _{U0126}	3.884	12.540 [#]	0.713
<i>F</i> _{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。

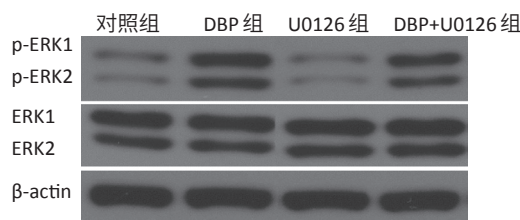
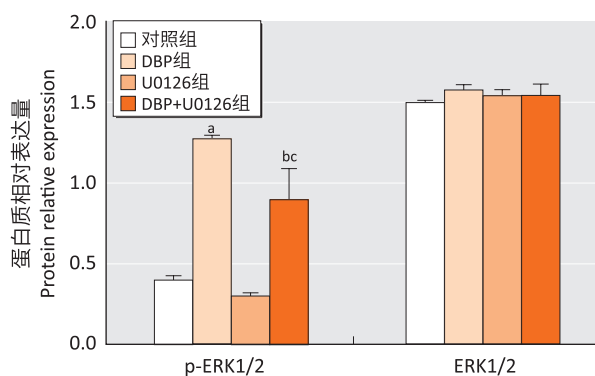


图 2 各组小鼠肝组织 ERK1/2、p-ERK1/2 的电泳条带

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- κ B 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 EG, BRAUN JM, MEEKER JD, 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 SM, TEH SW, RAJENDRAN RK, 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 KK, MCEL RATH TF, CHEN YH, 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 DA, SAJ PORCACCHIA A, et al. The roles of ROS in cancer heterogeneity and therapy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 2467940.
- [7] COOK SJ, 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 DG, BAE GS, CHOI SB, 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 AA. 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- κ B 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 MH, 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 ME. 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)