

邻苯二甲酸二乙基己基酯对新生大鼠肺组织发育的影响

应燕芬^{1,2}, 胡小娅¹, 梁园¹, 林锦³, 吴海山⁴, 蔡晓红¹, 林振浪¹, 陈尚勤¹

(1. 温州医学院附属第二医院 育英儿童医院儿科, 浙江 温州 325027; 2. 浙江省台州医院儿科, 浙江 临海 317000; 3. *Department of Neonatology*, 4. *Department of Pathology, Mount Sinai School of Medicine, New York 10029, USA*)

摘要: 目的 探讨基质金属蛋白酶 9 (MMP-9)、金属蛋白酶 1 组织抑制剂 (TIMP-1) 和转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 是否参与邻苯二甲酸二乙基己基酯 (DEHP) 影响肺组织形态发育的过程。方法 SD 新生大鼠于出生后第 1 天开始分别 ip 给予 DEHP 10, 100 和 750 mg·kg⁻¹, 每天 1 次。每组 1/2 大鼠持续染毒 14 d, 剩余 1/2 大鼠持续染毒 21 d。染毒结束后第 2 天处死大鼠, 取新鲜肺组织, 提取总 RNA, 用实时定量 PCR 方法检测 MMP-9, TIMP-1 和 TGF- β_1 mRNA 的表达; 其余部分石蜡包埋, 制备石蜡切片, HE 染色进行组织形态观察, 或者免疫组化染色检测 MMP-9, TIMP-1 和 TGF- β_1 蛋白表达。结果 DEHP 染毒 14 d, 与溶剂对照组比较, DEHP 100 和 750 mg·kg⁻¹ 组新生大鼠肺泡发育受抑制, 肺间质比例增大 ($P < 0.05$); DEHP 10, 100 和 750 mg·kg⁻¹ 组 MMP-9 和 TGF- β_1 mRNA 表达随着 DEHP 染毒剂量的增加而增加 ($r = 0.979$, $P < 0.01$; $r = 0.990$, $P < 0.01$), MMP-9 和 TGF- β_1 蛋白表达亦随着 DEHP 染毒剂量的增加而增加 ($r = 0.770$, $P < 0.01$; $r = 0.959$, $P < 0.01$); TIMP-1 mRNA 和蛋白表达下降 ($r = 0.904$, $P < 0.01$; $r = 0.795$, $P < 0.01$)。DEHP 染毒 21 d, DEHP 10, 100 和 750 mg·kg⁻¹ 组肺间质比例与溶剂对照组比较无明显变化; MMP-9 和 TGF- β_1 mRNA 表达随着 DEHP 染毒剂量的增加而下降 ($r = 0.879$, $P < 0.01$; $r = 0.904$, $P < 0.01$), MMP-9 和 TGF- β_1 蛋白表达亦随着 DEHP 染毒剂量的增加而下降 ($r = 0.935$, $P < 0.01$; $r = 0.819$, $P < 0.01$); TIMP-1 mRNA 和蛋白表达增加 ($r = 0.819$, $P < 0.01$; $r = 0.619$, $P < 0.01$)。结论 DEHP 通过影响肺组织 MMP-9, TIMP-1 和 TGF- β_1 基因和蛋白的表达影响新生大鼠肺组织形态发育。

关键词: 邻苯二甲酸二乙基己基酯; 肺; 基质金属蛋白酶 9; 金属蛋白酶 1 组织抑制剂; 转化生长因子 β_1

中图分类号: R992 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2013)02-0227-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2013.02.018

邻苯二甲酸二乙基己基酯 [di-(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP] 是一种增塑剂, 被应用于医疗设备如血袋、静脉营养给药袋、气管插管、鼻饲管和深静脉置管中。研究表明, 在成年和幼年动物中 DEHP 作为一种影响内分泌的环境干扰物, 对生殖、肝、肾和肺发育等具有毒性作用^[1-2]。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 是降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的主要介质, 与其特异性组织抑制剂即金属蛋白酶组织抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP) 在肺

发育过程中共同扮演着重要的角色^[3-4]。细胞和 ECM 的相互作用和 ECM 的重建对胎肺的发育至关重要, 尤其是 IV 型胶原为主要成分的基底膜结构变化。MMP-9/TIMP-1 主要作用于基底膜的 IV 型胶原。MMP-9 的过量表达或 MMP-9/TIMP-1 的表达失衡均可导致肺发育受阻^[5-7]。转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β) 是一组功能复杂的多肽生长因子, 在肺支气管树分支生成过程和上皮细胞分化过程中起重要作用^[8], 其异常表达亦影响肺发育。本研究应用 DEHP 染毒新生大鼠, 探讨 DEHP 对肺发育的影响, 并从 ECM 重建角度探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DEHP 和玉米油, Sigma 公司; RT-PCR 逆转录试剂盒, 加拿大 Fermentas (MBI) 公司; PCR 引物,

基金项目: 温州市科技计划对外科技合作交流项目 (H20080065); 浙江省留学人员科技活动项目择优资助经费 ([2008]196); 浙江省人口和计划生育科技项目 ([2010]78)

作者简介: 应燕芬 (1982 -), 住院医师, 儿科新生儿专业硕士, 主要从事儿科新生儿肺发育研究。

通讯作者: 陈尚勤, E-mail: csq5725@yahoo.com.cn, Tel: 13819735725

上海英骏生物工程公司合成; SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Perfect Real Time) 定量试剂盒, 日本 TaKaLa 公司; Trizol RNA 提取液、山羊抗大鼠 MMP-9 抗体和兔抗大鼠 TGF- β_1 抗体, 美国 Santa Cruz 公司; 兔抗大鼠 TIMP-1 抗体, 武汉博士德公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 多聚体或辣根过氧化物酶标记兔抗羊 IgG 多聚体 PV 试剂盒, 美国 GBI 公司。实时荧光定量 PCR 仪, 罗氏 LightCycler[®] 480 实时荧光定量 PCR 系统。

1.2 实验动物和分组

SPF 级 Sprague-Dawley 新生大鼠 120 只购自温州医学院实验动物中心, 动物许可证号: SCXK(浙) 2005-0019, 在 SPF 级实验室内饲养。随机分为溶剂对照组及 DEHP 10, 100 和 750 mg·kg⁻¹ 染毒组。DEHP 染毒组于出生后第 1 天开始分别 ip 给予 DEHP, 溶剂对照组 ip 给予等体积玉米油, 每天 1 次。每组 1/2 大鼠持续染毒 14 d, 另一半持续染毒 21 d。各组大鼠出生体质量无明显差异, 均母乳喂养。

1.3 肺组织标本制备

染毒结束后第 2 天, ip 给予戊巴比妥钠 35 mg·kg⁻¹ 麻醉大鼠, 每组随机取 5 只, 固定, 打开胸腔, 结扎右主支气管, 取出肺组织, 用 4% 中性甲醛溶液经支气管给 20 cm H₂O 的气道压力进行灌注固定, 然后结扎右主支气管, 置于 4% 中性甲醛溶液固定, 48 h 后脱水, 石蜡包埋, 沿肺叶纵轴切片, HE 染色, 光镜下观察组织病理改变; 取鼠左肺组织, 分离剪去肺门部大支气管血管, 将肺新鲜标本用冷生理盐水漂洗去血迹后, 滤纸吸干, 用锡箔纸包裹好, 1 min 内迅速置于液氮中保存, 转移至 -80℃ 冰箱储存用于实时 PCR 检测 MMP-9, TIMP-1 和 TGF- β_1 mRNA 表达水平。

1.4 肺组织 HE 染色形态学观察和肺间质比例测定

制备肺组织石蜡切片, HE 染色, 显微镜下形态学观察并照相, 使显微镜处于同一放大倍数 (100 倍) 及电压, 每张切片随机选择 5 个视野, 测量肺间质比例。首先将切片中的大血管, 支气管去除, 用数字图像分析技术分割图片, 调整照片, 找到肺间质和肺泡对比最强烈的像素阈值 T, T = 100, 根据每个图像位点的像素不同, 可以分割图片为肺间质、肺泡和其他, 每个视野肺间质的像素与总像素的比值表示肺间质比例。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测肺组织 MMP-9, TIMP-1 和 TGF- β_1 mRNA 表达

取 100 mg 新鲜组织, 放到研磨器中, 加入液氮充分研磨至粉末, 加入 1 ml Trizol, 提取组织总 RNA, 紫外分光光度计测量 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$, 计算

RNA 的纯度和浓度。Primer 5.0 软件设计引物, TGF- β_1 的上游引物为 5' CCCCTGGAAAGGGCT-CAACAC3', 下游引物为 5' TCCAACCCAGGTC-CTTCCTAAAGTC3', 扩增产物长度为 136 bp; MMP-9 的上游引物为 5' ACCCCATGTATCAC-TACCACGAG3', 下游引物为 5' ATAGTGCTG-GCTGTGGGGTGTG3', 扩增产物长度为 91 bp; TIMP-1 的上游引物为 5' ATAGTGCTGGCTGT-GGGGTGTG3', 下游引物为 5' TGATCGCTCTGG-TAGCCCTTCTC3', 扩增产物的长度为 130 bp; 内参 β 肌动蛋白的上游引物为 5' TCATGAAGTGT-GACGTTGACATCCGT3', 下游引物为 5' CCTA-GAAGCATTGCGGTGCACGATG3', 扩增产物的长度为 285 bp。取总 RNA 1 μ l 按逆转录操作说明书逆转录成 cDNA; 取 2 μ l 逆转录产物加入 20 μ l 反应体系中, 按以下反应条件扩增: 95℃ 预变性 30 s \rightarrow 95℃ 变性 10 s \rightarrow 57℃ 退火 10 s \rightarrow 72℃ 延伸 20 s, 40 个循环, 72℃ 采集荧光信号。用罗氏 LightCycler[®] 480 实时荧光定量 PCR 系统进行实时 PCR 检测。以 2^{- Δ Ct} 表示各组目标基因 mRNA 相对表达水平。 Δ Ct = Ct_{目标基因} - Ct _{β 肌动蛋白}, Ct 为扩增过程中荧光信号强度达到阈值的循环数。

1.6 免疫组化方法检测肺组织 MMP-9, TIMP-1 和 TGF- β_1 蛋白表达

取肺组织标本经 4% 中性多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μ m 连续切片, 60℃ 烤片 2 h, 梯度乙醇脱水, 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶, 依次加入一抗 (山羊抗大鼠 MMP-9 抗体、兔抗大鼠 TGF- β_1 和 TIMP-1 抗体), 二抗 (辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 多聚体或辣根过氧化物酶标记兔抗羊 IgG 多聚体), DAB 显色, 脱水, 透明, 封片, 镜检。以细胞浆中沉着棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞。用 Imagepro-plus6.0 图像分析软件测定 10 个视野中阳性部位的积分吸光度 (integrated absorbance, IA), 计算 IA 平均值以表达待测蛋白的相对表达水平。IA 值越大, 蛋白表达水平越高。

1.7 采用 SPSS11.5 统计软件, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 方差齐性的采用 LSD 法, 方差不齐的采用 Dunnett *t* 检验; 采用 Logarithmic 进行相关分析, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 DEHP 对新生大鼠肺发育形态和肺间质比例的影响

由图 1 和表 1 结果看出, DEHP 染毒 14 d, 溶

剂对照组新生大鼠(图 1A1)肺泡形态发育正常,未见炎症反应,未见出血;与溶剂对照组比较,DEHP 10 mg·kg⁻¹组(图 1A2)肺间质比例无显著性差异,肺泡未见明显炎症细胞浸润和出血;DEHP 100 和

750 mg·kg⁻¹组(图 1A3 和 A4)可见肺间质增厚,肺泡隔增厚,间质细胞增多,肺间质比例增大($P < 0.05$)。DEHP 染毒 21 d, DEHP 10, 100 和 750 mg·kg⁻¹组(图 1B2 ~ B4)肺间质比例、肺泡大小和肺间质厚度与溶剂对照组(图 1B1)相比无明显差异。

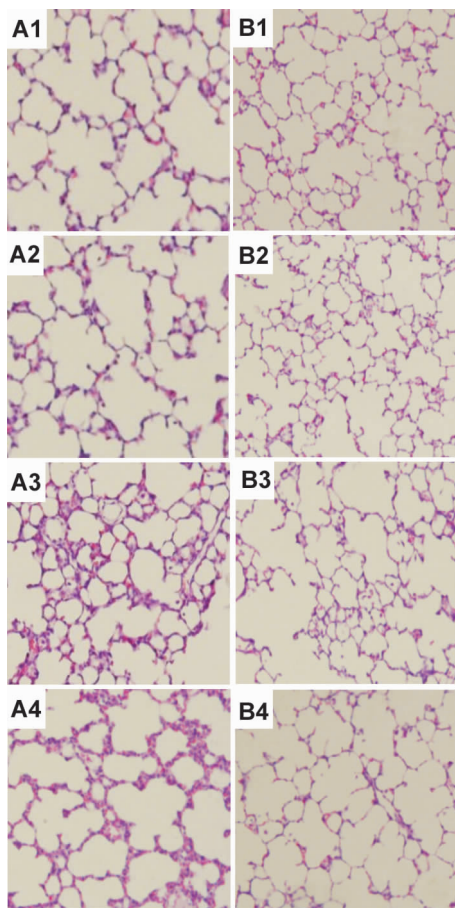


Fig. 1 Effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) given for 14 d (A) and 21 d (B) on lung histopathological changes in newborn rats (HE × 100). The newborn rats were ip given DEHP from the postnatal 1st day, once daily, for 14 or 21 d. The solvent control group (DEHP 0 mg·kg⁻¹) was given equal volume of corn oil. 1: solvent control group; 2, 3 and 4: DEHP 10, 100 and 750 mg·kg⁻¹ groups, respectively.

Tab. 1 Effect of DEHP on lung interstitial tissue proportion of newborn rats

DEHP/mg·kg ⁻¹	Lung interstitial tissue proportion/%	
	14	21(d)
0	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.03
10	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.04
100	0.24 ± 0.03*	0.22 ± 0.02
750	0.27 ± 0.03**	0.22 ± 0.02

See Fig. 1 for the rat treatment. Lung interstitial tissue proportion (%) was expressed as the ratio of the pixel of lung interstitial tissue to the total pixels of lung tissue in one field under the microscope. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with DEHP 0 mg·kg⁻¹ group.

2.2 DEHP 染毒对新生大鼠肺组织 MMP-9, TIMP-1 和 TGF-β₁ mRNA 表达的影响

实时 PCR 结果显示, MMP-9、TIMP-1、TGF-β₁ 和 β 肌动蛋白扩增产物的溶解曲线均为特异性单峰, 扩增曲线呈“S”型, 表明所用引物特异性较好。由表 2 可以看出, DEHP 染毒 14 d, 随着染毒剂量的增加, 新生大鼠肺组织 MMP-9 和 TGF-β₁ mRNA 表达增加 ($r = 0.979$, $P < 0.01$; $r = 0.990$, $P < 0.01$), TIMP-1 mRNA 表达降低 ($r = 0.904$, $P < 0.01$)。DEHP 染毒 21 d, 随着染毒剂量的增加, MMP-9 和 TGF-β₁ mRNA 表达降低 ($r = 0.878$, $P < 0.01$; $r = 0.935$, $P < 0.01$), TIMP-1 mRNA 表达增加 ($r = 0.819$, $P < 0.01$)。

Tab. 2 Effect of DEHP on expression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁) in lung tissue of newborn rats

DEHP/ mg·kg ⁻¹	MMP-9 (×10 ⁻³)		TIMP-1 (×10 ⁻³)		TGF-β ₁ (×10 ⁻³)	
	14	21(d)	14	21(d)	14	21(d)
0	7.1 ± 0.6	11.8 ± 0.8	9.3 ± 0.6	8.4 ± 1.0	12.5 ± 1.0	13.9 ± 0.8
10	8.8 ± 0.6**	6.7 ± 0.6**	8.5 ± 1.0**	18.9 ± 0.9**	16.7 ± 0.9**	10.6 ± 0.7**
100	13.4 ± 0.8**	5.6 ± 0.7**	7.0 ± 0.8**	19.9 ± 1.0**	21.7 ± 1.0**	8.8 ± 0.8**
750	15.8 ± 0.9**	1.8 ± 0.6**	6.6 ± 0.8**	25.4 ± 1.0**	25.7 ± 1.1**	8.2 ± 0.8**

See Fig. 1 for the rat treatment. The mRNA expression was detected with real-time fluorescent quantitative PCR. The relative level of the target gene mRNA expression was expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{Target gene}} - Ct_{\beta\text{-Actin}}$. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. ** $P < 0.01$, compared with corresponding DEHP 0 mg·kg⁻¹ group.

2.3 DEHP 染毒对新生大鼠肺组织 MMP-9, TIMP-1 和 TGF-β₁ 蛋白表达的影响

由图 2 看出,新生大鼠肺组织 MMP-9, TIMP-1 和 TGF-β₁ 蛋白免疫组化染色阳性信号均为棕黄色颗粒,定位于胞浆。溶剂对照组肺组织 MMP-9, TIMP-1 和 TGF-β₁ 蛋白在上皮细胞和间质细胞均有表达(图 2A1, B1, C1); DEHP 10, 100 和 750 mg·kg⁻¹ 染毒 14 d, MMP-9 和 TGF-β₁ 蛋白在肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞、血管内皮细胞和肺泡间质细胞表达增加(图 2A2 ~ A4, C2 ~ C4), TIMP-1 蛋白表达减少(图 2B2 ~ B4)。图像分析结果见表 3,可见 DEHP 染毒 14 d,新生大鼠肺组织 MMP-9 和 TGF-β₁ 蛋白表达随着 DEHP 染毒剂量的增加而增加 ($r=0.770, P<0.01; r=0.959,$

$P<0.01$), TIMP-1 蛋白表达随着 DEHP 染毒剂量的增加而降低 ($r=0.795, P<0.01$)。

由图 3 看出,溶剂对照组新生大鼠肺组织 MMP-9, TIMP-1 和 TGF-β₁ 蛋白在上皮细胞和间质细胞均有表达(图 3A1, B1, C1), DEHP 10, 100 和 750 mg·kg⁻¹ 染毒 21 d,随 DEHP 染毒剂量的增加, MMP-9 和 TGF-β₁ 蛋白在肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞、血管内皮细胞和肺泡间质细胞表达减少(图 3A2 ~ A4, C2 ~ C4), TIMP-1 蛋白表达增加(图 3B2 ~ B4)。图像分析结果可见(表 3), MMP-9 和 TGF-β₁ 蛋白表达随着 DEHP 染毒剂量的增加而降低 ($r=0.904, P<0.01; r=0.819, P<0.01$), TIMP-1 蛋白表达随着 DEHP 染毒剂量的增加而增加 ($r=0.619, P<0.01$)。

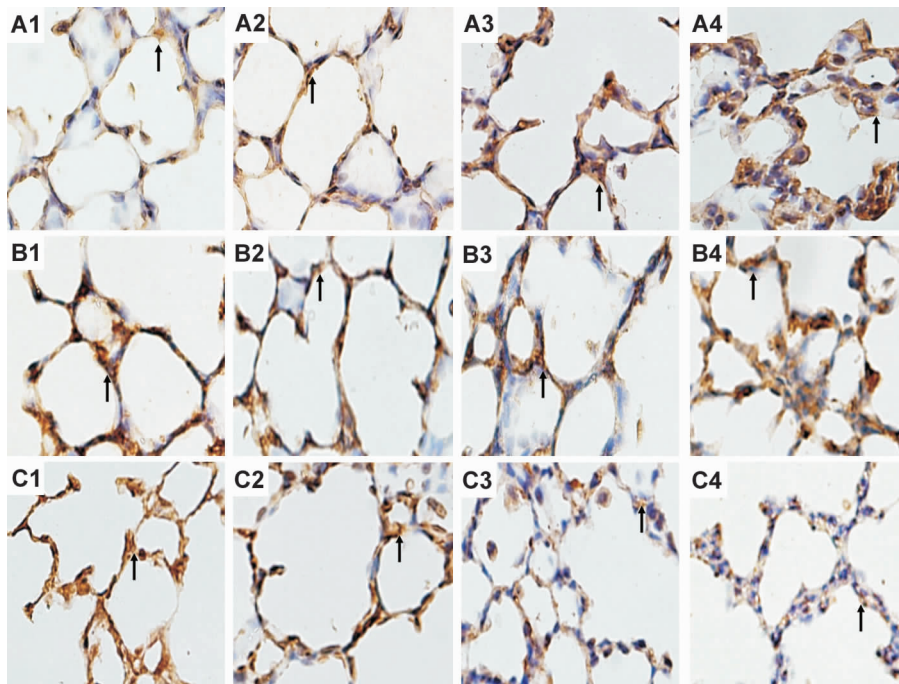


Fig.2 Effect of DEHP given for 14 d on protein expression of MMP-9 (A), TIMP-1 (B) and TGF-β₁ (C) in lung tissue of newborn rats (×200). See Fig.1 for the rat treatment. 1-4: DEHP 0,10,100 and 750 mg·kg⁻¹ group. ↑: immunostaining positive cells.

Tab.3 Effect of DEHP on protein expression of MMP-9, TIMP-1 and TGF-β₁ in lung tissue of newborn rats

DEHP/ mg·kg ⁻¹	MMP-9 (×10 ⁻³)		TIMP-1 (×10 ⁻³)		TGF-β ₁ (×10 ⁻³)	
	14	21(d)	14	21(d)	14	21(d)
0	0.25 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.31 ± 0.01
10	0.30 ± 0.02 **	0.27 ± 0.02 **	0.29 ± 0.02 **	0.33 ± 0.02 **	0.31 ± 0.02 **	0.28 ± 0.04 **
100	0.31 ± 0.01 **	0.25 ± 0.02 **	0.26 ± 0.02 **	0.36 ± 0.02 **	0.37 ± 0.02 **	0.26 ± 0.02 **
750	0.34 ± 0.02 **	0.20 ± 0.02 **	0.22 ± 0.01 **	0.43 ± 0.03 **	0.40 ± 0.01 **	0.22 ± 0.01 **

See Fig. 1 for the rat treatment. The target protein expression was detected with immunostaining. The relative level of the target protein expression was expressed by integrated absorbance of immunostaining positive zone. $\bar{x} \pm s, n=5$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with corresponding DEHP 0 mg·kg⁻¹ group.

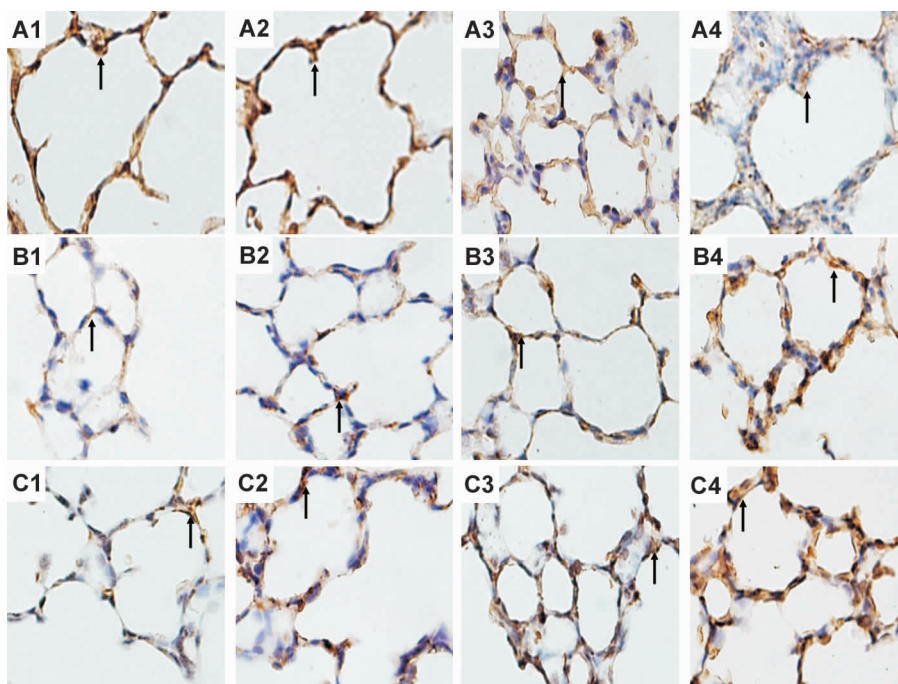


Fig. 3 Effect of DEHP given for 21 d on protein expression of MMP-9 (A), TIMP-1 (B) and TGF- β_1 (C) in lung tissue of newborn rats ($\times 200$). See Fig. 1 for the rat treatment. 1-4: DEHP 0, 10, 100 and 750 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ groups. \uparrow : immunostaining positive cells.

3 讨论

环境污染物 DEHP 在人类生活环境中广泛分布,其污染成为世界范围内威胁人类健康的重大问题。DEHP 可通过多种途径进入人体,DEHP 及其代谢物对机体生殖系统、肺和呼吸系统等均有毒性作用。目前其肺毒性的作用机制尚不清楚。肺泡发育以肺泡壁的变薄以及次级隔的长出、呼吸膜面积的成倍扩大为特征,此过程有赖于细胞、ECM 的相互作用和 ECM 的重建。在肺血管的成熟中 ECM 的重建也至关重要。MMP-9 能特异性地降解 ECM 中各型胶原、蛋白聚糖和弹性蛋白等^[9]。因此, MMP-9/TIMP-1 在肺发育过程中通过对 ECM 的重构而扮演重要角色^[3-4],它们不仅参与胎肺发育早期呼吸道结构的形成和肺分枝形态的发生,而且还参与肺泡化过程中肺泡壁的变薄和胶原蛋白的沉积与更新,同时通过促进肺泡 II 型上皮细胞的迁移以及向肺泡 I 型上皮细胞分化并覆盖新形成的肺泡间隔,扩大呼吸膜内表面积,促进肺组织发育成熟。而在肺泡化后期,则有益于肺泡结构和功能的维持与稳定。TGF- β 是一组功能复杂的多肽生长因子,在肺分支的形态生成过程和上皮细胞分化进而合成表面活性物质的成熟过程中起重要作用^[8]。大量研究表明, TGF- β_1 与支气管肺发育不良有着密切的

联系。过度表达的 TGF- β_1 可以抑制肺泡 II 型上皮细胞增殖、分化而导致新生鼠肺发育障碍^[10-11]。据报道,母大鼠孕期暴露 DEHP 可导致新生大鼠尿道下裂,阴茎内 TGF- β_1 的表达增加,且呈剂量依赖性。同时 MMP-9 能激活 TGF- β_1 , TGF- β_1 选择性抑制 MMP 的表达,诱导 TIMP 的表达^[12]。

本研究结果表明, ip 给予新生大鼠 DEHP 染毒, DEHP 对新生大鼠肺形态发育具有毒性作用,且与 DEHP 的染毒剂量呈一定的相关性。同时研究发现, DEHP 染毒 14 d, 新生大鼠肺组织 MMP-9 mRNA 和蛋白表达随 DEHP 染毒剂量增加而增加, DEHP 100 和 750 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组肺组织出现明显的病理改变,即肺泡数目减少,肺泡体积增大,肺间质增厚,肺泡发育受阻;该结果与本研究集体前期报道一致^[13]。DEHP 染毒 21 d, 新生大鼠肺组织 MMP-9 mRNA 和蛋白表达随 DEHP 染毒剂量增加而减少, DEHP 100 和 750 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组肺组织病理改变减轻,即肺泡间质变薄,肺泡隔变薄,肺间质比例接近溶剂对照组。导致该结果的原因之一可能是随着新生大鼠的发育,各器官功能逐步完善,如肝解毒作用加强;另外,随着大鼠发育其自身修复功能亦增强;原因之二是染毒 14 d 时新生大鼠间质性肺炎反应较重,染毒 21 d 时间质性肺炎反应较轻。因此推测, MMP-9 过量表达可能是 DEHP 肺形态发育

毒性的作用机制之一。

TIMP-1 是 MMP-9 特异性抑制剂。本研究结果表明,DEHP 染毒 14 d,新生大鼠肺组织 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达随着 DEHP 染毒剂量的增加而减少;DEHP 染毒 21 d,肺组织 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达随着 DEHP 染毒剂量的增加而增加;这与 MMP-9 表达的变化趋势相反。由此可见,TIMP-1 对 MMP-9 的表达有调控作用,这与文献报道一致^[14]。据报道,MMP-9/TIMP-1 平衡关系的破坏势必影响肺组织正常发育,从而发生病理形态变化^[15]。由此提示,MMP-9/TIMP-1 失衡可能是 DEHP 肺毒性的作用机制之一。

本研究结果表明,DEHP 染毒 14 d,新生大鼠肺组织 TGF- β_1 mRNA 和蛋白表达随 DEHP 染毒剂量的增加而增加,DEHP 100 和 750 mg·kg⁻¹组肺组织出现明显的病理改变,即肺泡数目减少,肺泡体积增大,肺间质增厚,肺泡隔增厚。DEHP 染毒 21 d,新生大鼠肺组织 TGF- β_1 mRNA 和蛋白表达随 DEHP 染毒剂量的增加而减少,DEHP 100 和 750 mg·kg⁻¹组肺组织病理改变减轻,即肺泡间质变薄,肺泡隔变薄。由此提示,DEHP 的肺毒性可能与其导致肺组织 TGF- β_1 异常表达有关。

综上所述,DEHP 染毒可以抑制新生大鼠肺形态发育,其作用机制可能与其影响肺组织 MMP-9/TIMP-1 平衡以及 TGF- β_1 基因和蛋白表达有关。

参考文献:

- [1] Wang KX, Cai HT. *Practical Industrial Additives Book*(实用工业助剂全书)[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001:133-135.
- [2] Giam CS, Chan HS, Neff GS, Atlas EL. Phthalate ester plasticizers: a new class of marine pollutant[J]. *Science*, 1978, **199**(4327):419-421.
- [3] Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology [J]. *Genes Dev*, 2000, **14**(17):2123-2133.
- [4] Fassina G, Ferrari N, Brigati C, Benelli R, Santi L, Noonan DM, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: regulation and biological activities [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2000, **18**(2):111-120.
- [5] Manji JS, O'Kelly CJ, Leung WI, Olson DM. Timing of hyperoxic exposure during alveolarization influences damage mediated by leukotrienes[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, **281**(4):L799-L806.
- [6] Méhats C, Franco-Montoya ML, Boucherat O, Lopez E, Schmitz T, Zana E, et al. Effects of phosphodiesterase 4 inhibition on alveolarization and hyperoxia toxicity in newborn rats[J]. *PLoS One*, 2008, **3**(10):e3445.
- [7] Franco-Montoya ML, Bourbon JR, Durrmeyer X, Lorotte S, Jarreau PH, Delacourt C. Pulmonary effects of keratinocyte growth factor in newborn rats exposed to hyperoxia [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, **297**(5):L965-L976.
- [8] Bartram U, Speer CP. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease [J]. *Chest*, 2004, **125**(2):754-765.
- [9] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry[J]. *Circ Res*, 2003, **92**(8):827-839.
- [10] Zhao QQ, Deng C, Guo CB, Hua ZY, Feng J. Intra-amniotic endotoxin and postborn hyperoxic exposure upregulate transforming growth factor- β_1 and α -smooth muscle actin in newborn mice lung[J]. *Acta Acad Med Mil Tert*(第三军医大学学报), 2010, **32**(7):642-646.
- [11] Jobe AH, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, **163**(7):1723-1729.
- [12] Liu X, Zhang DY, Wu SD, Xiong J, Wei GH. Di(2-ethylhexyl)phthalate induces hypospadias in mice and its effect on the expression of TGF- β_1 in genital tubercles[J]. *Chin J Pediatr Surg*(中华小儿外科杂志), 2008, **29**(9):565-568.
- [13] Chen SQ, Chen JN, Cai XH, Chen GR, Gao Y, Ge RS, et al. Perinatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate leads to restricted growth and delayed lung maturation in newborn rats [J]. *J Perinat Med*, 2010, **38**(5):515-521.
- [14] Wei LQ, Dong Y, Li ZH. Effect of atorvastatin on MMP-9 and TIMP-1 levels in bronchoalveolar lavage fluid and serum of rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *J Zhejiang Univ (Med Sci)* [浙江大学学报(医学版)], 2011, **40**(1):64-70.
- [15] Liu XY, Xu G, Xue XD. Dynamic expression and effects of MMP-9 and TIMP-1 on type IV collagen in lung tissue of neonatal rats with hyperoxia-induced CLD [J]. *China J Mod Med*(中国现代医学杂志), 2008, **18**(16):2278-2282,2286.

Effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure on lung tissue development in newborn rats

YING Yan-fen^{1,2}, HU Xiao-ya¹, LIANG Yuan¹, LIN Jin³, WU Hai-shan⁴,
CAI Xiao-hong¹, LIN Zhen-lang¹, CHEN Shang-qin¹

(1. Department of Pediatrics, Yuying Children Hospital, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China; 2. Department of Pediatrics, Taizhou Hospital, Linhai 317000, China; 3. Department of Neonatology, 4. Department of Pathology, Mount Sinai School of Medicine, New York 10029, USA)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the role of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in the toxic effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on lung development. **METHODS** The newborn Sprague-Dawley rats were ip given DEHP 10, 100 and 750 mg·kg⁻¹ daily, half from the postnatal 1st day to the postnatal 14th day, and the other half from the postnatal 1st day to the postnatal 21st day. All of the rats were sacrificed on the next day after the last DEHP administration. The fresh lung tissue was taken for RNA extraction. The MMP-9, TIMP-1, and TGF- β_1 mRNA expression in lung tissue was measured by real time PCR. The lung tissue morphological changes were observed by HE staining. The protein expression of MMP-9, TIMP-1 and TGF- β_1 in lung tissue was also examined by immunohistochemistry. **RESULTS** On the postnatal 14th day, the alveolar growth inhibition and thicker alveolar septa were detected during the morphological examination of DEHP 100 and 750 mg·kg⁻¹ groups compared with the solvent control group ($P < 0.05$). The mRNA expression of MMP-9 and TGF- β_1 in DEHP 10, 100 and 750 mg·kg⁻¹ groups was increased dosage dependently ($r = 0.979$, $P < 0.01$; $r = 0.990$, $P < 0.01$), so did the protein expression of MMP-9 and TGF- β_1 of DEHP 10, 100 and 750 mg·kg⁻¹ groups ($r = 0.770$, $P < 0.01$; $r = 0.959$, $P < 0.01$). Meanwhile, the expression of TIMP-1 mRNA and protein was decreased ($r = 0.770$, $P < 0.01$; $r = 0.959$, $P < 0.01$). On the postnatal 21st day, there was no significant change in the ratio of lung interstitial tissue between the solvent control and DEHP groups. The mRNA expression of MMP-9 and TGF- β_1 in DEHP 10, 100 and 750 mg·kg⁻¹ groups was decreased with the increase in DEHP dose ($r = 0.879$, $P < 0.01$; $r = 0.904$, $P < 0.01$), like the protein expression ($r = 0.935$, $P < 0.01$; $r = 0.819$, $P < 0.01$), while the expression of TIMP-1 mRNA and protein was increased ($r = 0.819$, $P < 0.01$; $r = 0.619$, $P < 0.01$). **CONCLUSION** DEHP inhibits the alveoli morphological development of newborn rats by interfering the gene and protein expression of MMP-9, TIMP-1 and TGF- β_1 .

Key words: diethylhexylphthalate; lung; matrix metalloproteinase 9; tissue inhibitor of metalloproteinase-1; transforming growth factor β_1

Foundation item: The project supported by Science and Technology Plan of Wenzhou Foreign Science and Technology Cooperation Projects (H20080065); Students Studying Abroad Science and Technology Activity Project Preferred Funding Funds in Zhejiang Province ([2008]196); and Population and Family Planning Science and Technology Project of Zhejiang Province ([2010]78)

Corresponding author: CHEN Shang-qin, E-mail: csq5725@yahoo.com.cn, Tel: 13819735725

(收稿日期: 2012-10-08 接受日期: 2013-03-02)

(本文编辑: 齐春会)