2013 年 第 8 卷
第 3 期,350-356

生 态 毒 理 学 报
Asian Journal of Ecotoxicology

Vol. 8, 2013
No. 3, 350-356

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20120305002
王佳, 孙霞, 董四君. 邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP)对 THP-1 细胞 IL-1β 和 MMP-8 表达及 ROS 的影响[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(3): 350-356
Wang J, Sun X, Dong S J. Effects of DEHP on expression of IL-1β and MMP-8 and ROS production in THP-1 cells [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(3): 350-356 (in Chinese)

邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP)对 THP-1细胞 IL-1β 和 MMP-8 表达及 ROS 的影响

王佳, 孙霞, 董四君*

中国科学院城市环境研究所 环境与健康重点实验室,厦门 361021

摘要: 为探讨邻苯二甲酸二乙基己酯((DEHP)的细胞免疫毒性作用与机制,采用 RT-PCR 和 ELISA 方法,考察了 0.05~1 μmol·L^{-1}浓度范围内的 DEHP 对 THP-1 细胞白细胞介素-1β(IL-1β)及基质金属蛋白酶-8(MMP-8)基因和蛋白表达的影响;采用免疫印迹 Western Blot 方法检测 DEHP 对 ERK1/2 磷酸化水平的影响;以 2′,7′-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)为荧光探针检测 1~50 μmol·L^{-1} DEHP 对细胞内活性氧(ROS)产生的影响。结果显示,0.05 和 0.2 μmol·L^{-1} DEHP 在 6 h 内显著诱导 IL-1β 和 MMP-8 基因表达($P<0.05$ 或 0.01);0.05~1 μmol·L^{-1} DEHP 刺激细胞 48 h,可诱导 IL-1β 蛋白表达,并表现出明显的剂量-效应关系,线性拟合的确定系数为 0.937;0.05 μmol·L^{-1} DEHP 刺激细胞 6 或 12 h,显著诱导 MMP-8 蛋白表达($P<0.05$);0.2 μmol·L^{-1} DEHP 在 15~30 min 内快速诱导 ERK1/2 磷酸化;1~50 μmol·L^{-1} DEHP 浓度依赖性刺激细胞中 ROS 的产生;ERK/MAPK 抑制剂 PD98059 显著抑制 DEHP 诱导的 MMP-8 分泌,但对 IL-1β 分泌未表现出抑制作用。研究表明,DEHP 可能是经 ERK/MAPK 信号路径诱导 MMP-8 基因和蛋白的表达,经其他路径诱导 IL-1β 基因和蛋白的表达,诱导细胞内 ROS 的产生,从而激发炎症反应,进而损害免疫系统功能引发哮喘等炎症性疾病。此研究结果可为 DEHP 的暴露风险评估提供参考。

关键词: DEHP; 炎症; 免疫; 过敏; 哮喘; ERK/MAPK; IL-1β; MMP-8
文章编号: 1673-5897(2013)3-350-07 **中图分类号:** X171.5 **文献标识码:** A

Effects of DEHP on Expression of IL-1β and MMP-8 and ROS Production in THP-1 Cells

Wang Jia, Sun Xia, Dong Sijun*
Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China
Received 5 March 2012 **accepted** 22 March 2012

Abstract: To investigate the cellular immunotoxicity of DEHP and its possible mechanism, RT-PCR and ELISA method were used to explore effect of DEHP on mRNA and protein expression of IL-1β and MMP-8 in THP-1 cells within the concentration range of 0.05 to 1 μmol·L^{-1}. Western Blot method was applied to examine the effect of DEHP on the phosphorylation level of ERK1/2. The effect of 1-50 μmol·L^{-1} DEHP on the production of reactive oxygen species (ROS) was evaluated using 2′, 7′-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA) as a fluorescent probe. Results showed that DEHP (0.05 and 0.2 μmol·L^{-1}) significantly induced mRNA expression of IL-1β and MMP-8 within 6 h ($P<0.05$ or 0.01). DEHP (0.05-1 μmol·L^{-1}) could induce the protein expression of IL-1β within 48 h stimula-

收稿日期: 2012-03-05 **录用日期:** 2012-03-22
基金项目: 中国科学院百人计划项目(KZCX2-YW-BR-18);厦门市科技计划项目(3502Z20112019)
作者简介: 王佳(1983-),女,博士,研究方向为环境毒理学、预防医学,E-mail: wangjiabuct@yahoo.com.cn;
* **通讯作者**(Corresponding author),E-mail: sjdong@iue.ac.cn

tion, which displayed obvious dose-effect relationship with correlation coefficient of 0.937. MMP-8 protein expression was significantly enhanced by stimulation of 0.05 μmol·L^{-1} DEHP for 6 h or 12 h ($P<0.05$) . 0.2 μmol·L^{-1} DEHP rapidly induced the phosphorylation of ERK1/2 within 15-30 min. 1-50 μmol·L^{-1} DEHP dose-dependently stimulated the production of cellular ROS. ERK/MAPK inhibitor (PD98059) significantly suppressed DEHP-induced MMP-8 secretion, while it did not show inhibitory effect on IL-1β secretion. It was indicated that DEHP might induce the gene and protein expression of MMP-8 through ERK/MAPK signaling pathway, and induce the production of cellular ROS and the gene and protein expression of IL-1β through other pathways. The function of immune system was accordingly impaired and inflammatory disorders such as asthma were induced. This study could provide a reference for the risk assessment of DEHP exposure.

Keywords: DEHP; inflammation; immunity; allergy; asthma; ERK/MAPK; IL-1β; MMP-8

邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP) 是工业上应用广泛的邻苯二甲酸酯(phthalates acid esters, PAEs) 类化合物之一,主要用作聚氯乙烯(PVC) 塑料增塑剂[1]。DEHP 普遍存在于医疗用品、室内装潢材料、食品包装材料和儿童玩具等日常生活用品中,并不断扩散至周围环境,已经成为全球最广泛存在的有机污染物之一[1-3]。研究表明,DEHP 与过敏和哮喘等炎症性疾病密切相关,DEHP 对免疫系统的毒性作用与机制受到人们越来越多的关注[4]。

机体受到严重的外界刺激时免疫系统的应激激活,发生过度的炎症反应,炎症细胞释放大量的炎性因子,如白细胞介素-1(IL-1) 、白细胞介素-6(IL-6) 和肿瘤坏死因子-α(TNF-α) 等,从而引起免疫失控和免疫紊乱[5]。单核细胞是天然免疫系统的重要组成部分,在炎症反应过程中起着重要作用[6]。实验研究表明,在高浓度 DEHP(200 μmol·L^{-1}) 的作用下,巨噬细胞 THP-1 细胞内炎症因子(如 IL-1β 和 TNF-α) 表达增加,从而激活炎症反应[6]。另外,哮喘等炎症性疾病患者的肺部肺泡灌洗液和血清中 IL-1β、TNF-α 及基质金属蛋白酶-8(matrix metalloproteinase-8, MMP-8) 水平升高,气道上皮细胞中磷酸化胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2) 的免疫染色水平增加[7-10]。这些实验证实了炎症相关因子的表达是研究炎症性疾病的重要指标。目前,低浓度 DEHP 对 THP-1 细胞炎症相关因子的影响鲜有报道。以 THP-1 细胞为研究对象,以 IL-1β 和 MMP-8 的基因和蛋白表达水平、ERK1/2 磷酸化水平、细胞内活性氧(ROS) 水平为主要检测指标,探讨不同浓度和不同时间 DEHP 暴露对 THP-1 细胞的免疫毒性效应与机制,为 DEHP 的暴露风险评估提供参考。

1　材料与方法(Materials and methods)

1.1　仪器与试剂

仪器: MCO-18M CO_2 细胞恒温培养箱(日本 SANYO 公司) ; UNIVERSAL 320R 台式(常温/冷冻) 离心机(德国 Hettich Zentrifugen 公司) ; Spectra Max M5 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司) ; ND-1000 超微量紫外可见分光光度计(美国 Gene Company Limited 公司) ; KODAK Digital Imaging System 化学发光成像仪(日本 Kodak 公司) 。

试剂: 高糖型 DMEM 细胞培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,胰酶-EDTA 溶液购于南京凯基生物科技发展有限公司,Cellbanker 细胞冻存液购自日本 ZENOAQ 公司,二甲亚砜(DMSO) 、ERK/MAPK 抑制剂 PD98059 购自美国 Sigma 公司,邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP) 购于美国 Supelco 公司,p44/42 兔单克隆抗体、磷酸化 p44/42 兔单克隆抗体购于美国 Cell Signaling Technology(CST) 公司。辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L) 购于美国 Pierce 公司。ECL 化学发光试剂购于厦门鹭隆生物科技发展有限公司。活性氧检测试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2　细胞培养

人单核细胞白血病细胞株 THP-1(南京凯基生物科技发展有限公司) 培养于含质量分数为 10% 的胎牛血清的高糖型 DMEM 培养基中,37℃、5% CO_2 恒温培养箱中孵育。3 ~ 4 d 更换 1 次培养基,细胞长至 80% ~90% 时传代,选择对数生长期细胞进行实验。

1.3　IL-1β 和 MMP-8 蛋白表达

调整 THP-1 细胞密度为每毫升 2.5×10^5 个,接种于 24 孔板中。实验分组: 体积分数为 0.1% 的 DMSO 对照组; DEHP(终浓度分别为 0.05、0.2 和 1 μmol·L^{-1}) 组; 提前加 20 μmol·L^{-1} PD98059 再加 DEHP 的处理组。所用试剂均以 DMEM 为溶剂,各孔 DMSO 体积分数为 0.1%。在 37℃、5% CO_2 条件下孵育一定时间后,收集上清。按照 ELISA 试剂盒(博士德,中国) 说明书,在 490 nm 波长处用多功能

酶标仪检测样品吸光度，从相应的标准曲线查得各样品中 IL-1β 和 MMP-8 蛋白的含量。

1.4 实时反转录聚合酶链反应(real time RT-PCR)检测 IL-1β 和 MMP-8 基因的表达

调整 THP-1 细胞密度为每毫升 1.0×10^6 个，接种于 60 mm 培养皿。实验分组：体积分数为 0.1% 的 DMSO 对照组；DEHP(终浓度 0.05、0.2 μmol·L^{-1})组。在 37℃、5% CO_2 条件下孵育 3、6 和 12 h 后收集细胞。按照 RNA 提取试剂盒(Roche，德国)说明书提取总 RNA。用超微量紫外可见分光光度计测定 RNA 浓度。按照 RT-PCR 试剂盒(TakaRa，中国)说明书，将 RNA(终浓度 1 μg·μL^{-1})逆转录为 cDNA。利用 SYBR Green I Master Mix 试剂盒(TakaRa，中国)及 Applied Biosystems 7500 型荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems，美国)，进行实时荧光定量 PCR 分析。所用引物序列见表 1。

表1 上、下游引物序列

Table 1 Sequences of upstream and downstream primers

引物名称	序列
IL-1β F	5′-GGACAAGCTGAGGAAGATGC-3′
IL-1β R	5′-TCGTTATCCCATGTGTCGAA-3′
MMP-8 F	5′-CTTTCAGGGAAACCAGCAAC-3′
MMP-8 R	5′-GCTTGGTCCAGTAGGTTGGA-3′
GAPDH F	5′-GGAGAAGGCTGGGGCTCAT-3′
GAPDH R	5′-TGATGGCATGGACTGTGGTC-3′

1.5 磷酸化 ERK1/2 蛋白表达

1.5.1 总蛋白的提取

调整 THP-1 细胞浓度为每毫升 1.0×10^6 个，接种于 60 mm 培养皿。实验分组：体积分数为 0.1% 的 DMSO 对照组；0.2 μmol·L^{-1} DEHP(5、15、30 和 60 min)组。在 37℃、5% CO_2 条件下孵育相应时间后收集细胞。用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂(Roche，德国)的 RIPA 裂解液(索莱宝，中国)冰上裂解细胞 30 min，12 000×g、4℃ 离心 15 min。收集上清液，用 BCA 蛋白定量试剂盒(Pierce，美国)测定蛋白浓度后，-80℃ 保存备用。

1.5.2 蛋白免疫印迹

取 30 μg 蛋白样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后利用半干转运槽(BIO-RAD，美国)将蛋白转移至 PVDF 膜，封闭液室温封闭 1 h，分别用 p44/42(1∶3 000)和磷酸化 p44/42 (1∶2 000)兔单克隆抗体孵育(4℃ 过夜)。用 TBS-T 洗涤 3 次(每次 5 min)，再用辣根酶标记的山羊抗兔 IgG(H+L)(1∶2 000)室温孵育 2 h，用 TBS-T 洗涤 3 次(每次 5 min)后，加入 ECL 发光试剂，利用化学发光成像仪曝光、拍照。用 Quantity One 图像分析软件对 Western blot 杂交条带进行半定量分析。

1.6 细胞内活性氧(ROS)水平检测

调整 THP-1 细胞浓度为每毫升 1.0×10^6 个，接种于 6 孔板，在 37℃、5% CO_2 条件下孵育过夜。实验分组：体积分数为 0.1% 的 DMSO 对照组；DEHP(终浓度 1、5、25 和 50 μmol·L^{-1})组；阳性对照组。培养 36 h 后收集细胞。按照凯基活性氧检测试剂盒的操作说明，用对 ROS 敏感的荧光探针 DCFH-DA 标记细胞，利用荧光酶标仪在 488 nm 激发波长、525 nm 发射波长下测定不同细胞样品中 DCF 的荧光值，反映细胞内活性氧的产生量。

1.7 数据处理

应用 GraphPad Prism 5 统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)，以平均值±标准误差(mean±SEM)表示，两组间计量资料的比较采用 t 检验。$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果(Results)

2.1 DEHP 对 THP-1 细胞分泌 IL-1β 和 MMP-8 蛋白的影响

有文献报道，人体血液中 DEHP 的浓度可高达 5 559 ng·g^{-1}[11]。Nishioka 等[6]研究高浓度 DEHP(200 μmol·L^{-1})对巨噬细胞 THP-1 细胞的影响，发现 DEHP 处理后炎症因子 IL-1β 和 TNF-α 的表达增加。为探究低浓度 DEHP 对 THP-1 单核细胞的影响，用不同浓度 DEHP 处理细胞一定时间后，采用 ELISA 法检测细胞培养液中 MMP-8(6、12 h)和 IL-1β(24、48 h)蛋白的表达。图 1A 显示，DEHP 使细胞内 IL-1β 的分泌呈浓度依赖性增加，1 μmol·L^{-1} DEHP 处理 48 h 时 IL-1β 增加最为显著($P<0.01$)，约为 48 h 对照组((137.05±4.75) pg·mL^{-1})的 1.3 倍。值得注意的是，对照组细胞 IL-1β 蛋白的表达水平随培养时间的增加而升高(24、48 h 的分泌量分别为(91.08±7.6)和(137.05±4.75) pg·mL^{-1})。

图 1B 显示，0.05 和 0.2 μmol·L^{-1} DEHP 在 6～12 h 内均可以诱导 MMP-8 蛋白表达增加。低浓度 DEHP(0.05 μmol·L^{-1})刺激 6 h 诱导作用更显著($P<0.05$)，MMP-8 蛋白含量比 6 h 对照组((141.52±14.24) pg·mL^{-1})约提高 1.5 倍。值得注意的是，对照组细胞 MMP-8 蛋白的表达水平随培养时间的增加而锐减，与 6 h 对照组相比 12 h 对照组((14.11±3.10) pg·mL^{-1}) MMP-8 蛋白分泌减少 127.41 pg·mL^{-1}。

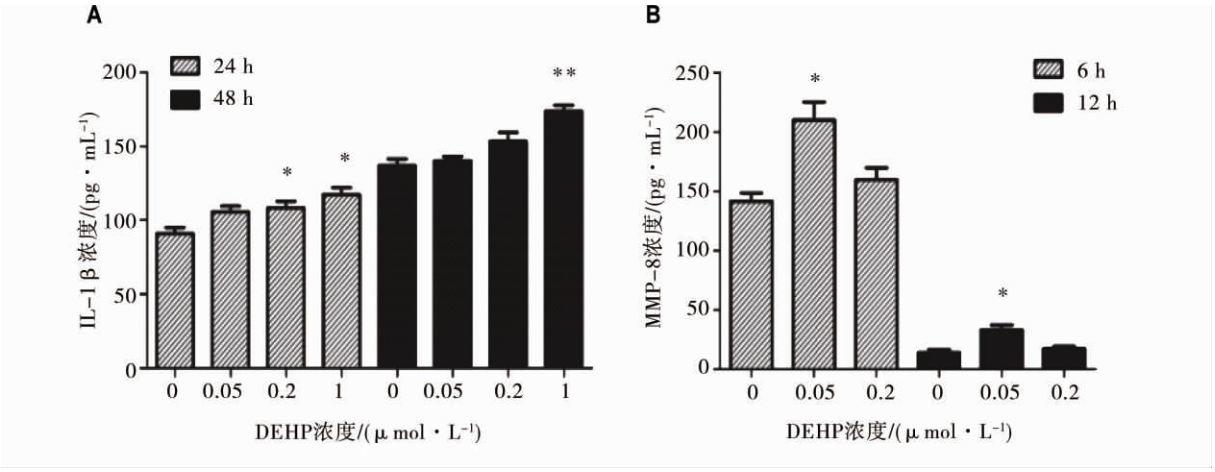

图 1　DEHP 诱导 THP-1 细胞分泌 IL-1β(A) 和 MMP-8(B) 蛋白(* 、 与对照组比较 P <0.05、P <0.01)**

Fig. 1　DEHP induced the protein secretion of IL-1β (A) and MMP-8 (B) in THP-1 cells (* , ** compared with control, P <0.05, P <0.01)

2.2　DEHP 对 THP-1 细胞 IL-1β 和 MMP-8 基因表达的影响

图 2A 的 RT-PCR 结果显示,IL-1β mRNA 表达随 DEHP 浓度的增加而升高,随时间的增加而降低。与对照组相比,0.2 μmol·L⁻¹ DEHP 处理细胞 3 h 后 IL-1β 基因表达显著提高 8 倍左右(P <0.01) 。如图 2B 所示,一定浓度的 DEHP(0.05、0.2 μmol·L⁻¹) 处理细胞 3、6 和 12 h,MMP-8 基因表达均有增加,且增加幅度先升高后降低,0.05 μmol·L⁻¹ DEHP 处理细胞 6 h,MMP-8 基因表达最为显著,约是对照组的 18 倍(P <0.01) 。

2.3　DEHP 对磷酸化 ERK1 /2 蛋白表达的影响

胞外信号调节蛋白激酶 1 /2(ERK1 /2) 在细胞的生存、增殖、凋亡与分化等功能中均起到重要作用[12] 。为研究 DEHP 对 THP-1 细胞中磷酸化 ERK1 /2 的影响,用 0.2 μmol·L⁻¹ DEHP 处理细胞 5 ~60 min 后,利用 Western Blot 方法检测 ERK1 /2 的磷酸化水平。图 3 显示,0.2 μmol·L⁻¹ DEHP 明显诱导 THP-1 细胞中 ERK1 /2 的磷酸化。ERK1 /2 磷酸化水平在加入 DEHP 处理 15 ~30 min 内明显提高,30 min 以后开始降低。

2.4　ERK1 /2 磷酸化对 DEHP 诱导 IL-1β 和 MMP-8 分泌的影响

为研究 ERK/MAPK 信号转导通路在 DEHP 诱导 THP-1 单核细胞分泌 IL-1β 和 MMP-8 中的作用,采用

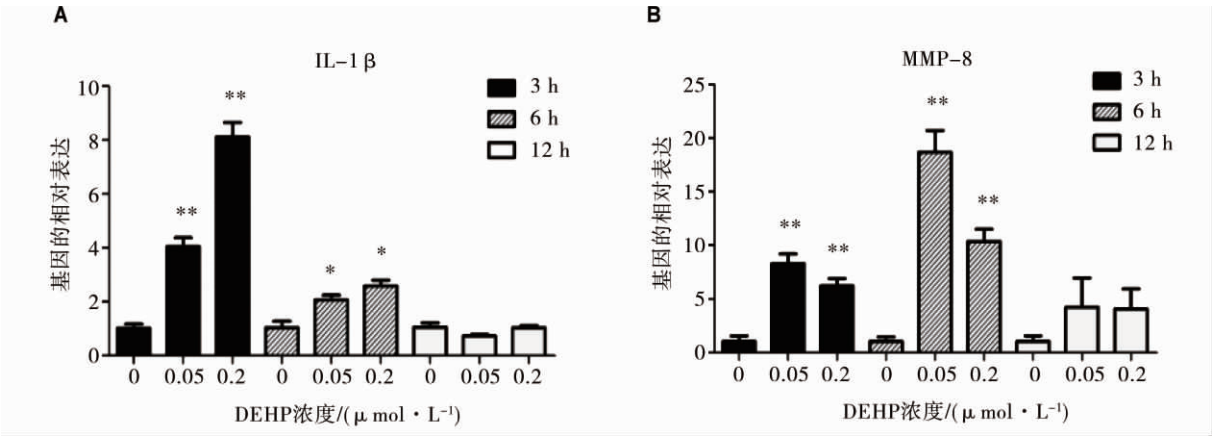

图 2　DEHP 诱导 THP-1 细胞 IL-1β(A) 和 MMP-8(B) 基因表达增加(* 、 与对照组比较 P <0.05、P <0.01)**

Fig. 2　DEHP induced an increase in the mRNA expression of IL-1β (A) and MMP-8 (B) in THP-1 cells (* , ** compared with control, P <0.05, P <0.01)

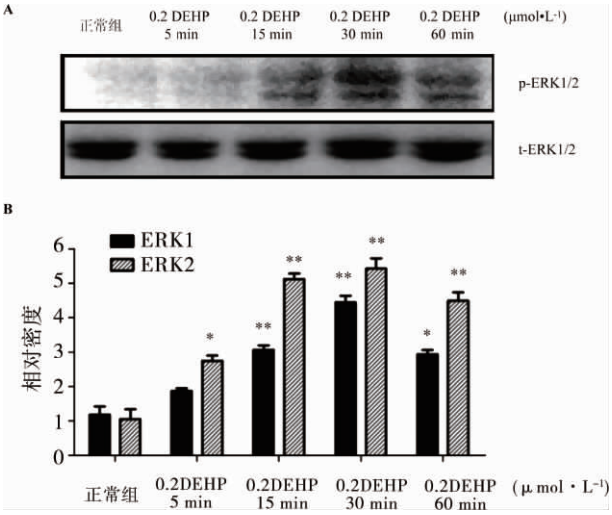

图3 DEHP诱导ERK1/2磷酸化的时间效应(A是Western Blot结果,B是相应的密度分析柱状图;*、与对照组比较P<0.05、P<0.01)**

Fig. 3 Time-response effect of DEHP-induced phosphorylation of ERK1/2 (A was the results of Western Blot analysis and B was the corresponding bar chart of densitometric analysis; *, ** compared with control, P<0.05, P<0.01)

ERK/MAPK抑制剂PD98059(20 μmol·L⁻¹)预处理1 h后加入DEHP,采用ELISA法检测IL-1β和MMP-8的分泌量。图4A显示,PD98059对DEHP诱导的IL-1β分泌未表现出抑制作用,且无显著性差异(P>0.05),这表明DEHP诱导THP-1细胞分泌IL-1β可能不依赖于ERK/MAPK信号路径。图4B显示,PD98059显著性抑制DEHP诱导的MMP-8分泌(P<0.05),这表明,DEHP可能至少部分依赖于ERK/

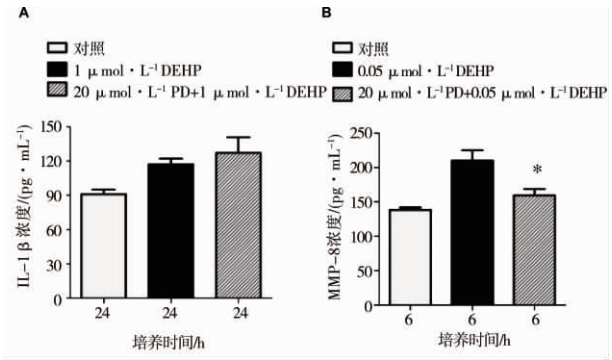

图4 ERK/MAPK抑制剂PD98059对DEHP诱导THP-1细胞分泌IL-1β和MMP-8蛋白的影响(*、与DEHP单独处理组比较P<0.05、P<0.01)**

Fig. 4 Effect of ERK/MAPK inhibitor PD98059 on DEHP-induced protein secretion of IL-1β and MMP-8 in THP-1 cells (* compared with DEHP-treated only, P<0.05)

MAPK信号路径诱导THP-1细胞MMP-8的表达。

2.5 DEHP对THP-1细胞ROS产生的影响

用DCFH-DA荧光探针标记THP-1细胞后,测定细胞内荧光强度以反映ROS的产生量。图5显示,用1~50 μmol·L⁻¹ DEHP处理细胞36 h,浓度依赖性诱导细胞内产生ROS。与对照组相比,50 μmol·L⁻¹ DEHP处理组细胞内ROS荧光强度显著提高1.48倍(P<0.05)。

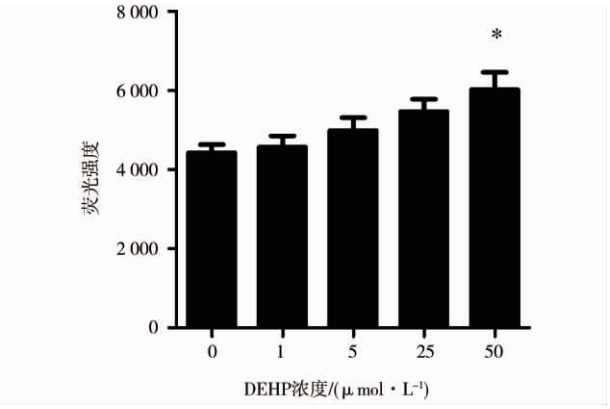

图5 DEHP剂量依赖性诱导THP-1细胞产生ROS(*与对照组比较P<0.05)

Fig. 5 DEHP dose-dependently induced ROS production in THP-1 cells (* compared with control, P<0.05)

3 讨论(Discussion)

邻苯二甲酸酯类化合物(包括DEHP)可能损害人体免疫系统,加重哮喘等过敏性炎症性疾病的发病[13]。许多研究表明,DEHP通过促进炎症细胞中细胞因子和炎症相关因子的表达加剧炎症反应[14]。基质金属蛋白酶-8(MMP-8),也叫胶原蛋白-2或中性粒细胞胶原酶,可以在许多细胞(如单核细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等)中表达,并在急、慢性炎症中起重要的调节作用[15]。研究表明,新确诊为布地缩松吸入性哮喘的儿童,其痰液和气道炎症细胞中MMP-8的表达高于正常儿童,且哮喘症状越严重MMP-8表达水平越高[16]。由此可见,MMP-8可能是哮喘等炎症性疾病重要的标志物,MMP-8的表达调控对预防和治疗外源物刺激的炎症性疾病具有理论指导意义。本研究结果表明,DEHP可诱导MMP-8基因表达增加,增加的幅度在3~12 h内先增大后减小,6 h最为显著(P<0.01),提示DEHP可能通过快速诱导MMP-8的表达来激活炎症反应,进而损害人体免疫系统、引发哮喘等过敏性疾病。0.05 μmol·L⁻¹ DEHP刺激细胞6 h诱导MMP-8的蛋白表

达最为显著($P<0.05$) ,约为 6 h 对照组((141.52 ±14.24) pg·mL^{-1}) 的 1.5 倍。值得注意的是,低浓度 DEHP 对 MMP-8 的诱导作用更为明显。因此,除了 DEHP 的急性毒性外,低浓度 DEHP 的细胞免疫毒性作用也不容忽视。

白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β) ,主要在单核细胞/巨噬细胞中表达,参与许多炎症和自身免疫相关疾病的发病过程,IL-1β 的释放是炎症急性期最基本、最主要的免疫反应现象之一,IL-1β 已经成为人们研究抗炎新药所关注的热点[17]。Oh 等[18] 研究发现,100 μmol·L^{-1} DEHP 能使人肥大细胞(HMC-1) 中炎症性介质 IL-1β 和 COX-2 的表达显著增加($P<0.05$) 。蒋国新[19] 研究发现,哮喘急性发作患者血清 IL-1β 显著高于对照组和哮喘缓解组($P<0.05$) ,并认为哮喘急性发作期血清 IL-1β 参与气道炎症的形成、影响肺通气功能。本研究结果显示,DEHP 刺激细胞 6 h 以内 IL-1β 基因表达增加,增加幅度随时间延长而降低,提示 DEHP 可能通过快速诱导 IL-1β 的表达来激活炎症反应,从而引发急性哮喘。研究发现,DEHP 刺激细胞 48 h,浓度依赖性诱导 IL-1β 蛋白表达,线性拟合确定系数为 0.937; 值得注意的是,随着培养时间的增加对照组细胞分泌 IL-1β 蛋白也增加,该结果与本课题组之前体外实验的结果一致,即: 人脐静脉内皮细胞(HUVECs) 分泌炎性因子(如 IL-6、IL-8) 随着培养时间的延长而增加[20] ,具体分子机制有待进一步研究。

MAPK(丝裂原活化蛋白激酶) 家族可以介导细胞因子表达、细胞增殖和凋亡等多种细胞功能[21]。ERK1 在实验性哮喘的发生、发展过程中起到重要作用[22]。本研究结果表明,0.2 μmol·L^{-1} DEHP 刺激 THP-1 细胞 15 ~ 30 min,可明显提高磷酸化 ERK1/2 水平,提示 ERK/MAPK 信号路径可能参与 DEHP 相关炎症性疾病的发病过程。为研究 ERK/MAPK 信号路径是否影响 DEHP 诱导的 MMP-8 和 IL-1β 的表达,用 ERK/MAPK 抑制剂 PD98059 预处理细胞,显著性抑制 DEHP 诱导的 MMP-8 蛋白表达($P<0.05$) ,表明 DEHP 可能通过 ERK/MAPK 信号路径诱导 MMP-8 表达,从而激活炎症反应,引发哮喘等炎症性疾病,这与 Quercioli 等[23] 的研究结果一致,他们发现 RANKL 诱导的 MMP-8 表达依赖于细胞内 ERK1/2 信号路径的激活。然而,PD98059 预处理对 DEHP 诱导的 IL-1β 分泌并未表现出抑制作用,这表明 DEHP 可能依赖其他信号路径,而不是 ERK/MAPK 路径,诱导 THP-1 细胞分泌 IL-1β,从而激活炎症反应,引发哮喘等炎症性疾病,细胞内信号转导机制有待进一步研究。

许多研究已证实,哮喘等慢性气道疾病与环境中氧化性因素有关,哮喘过程伴随 ROS 的增加[24]。Oh 等[18] 研究发现,100 μmol·L^{-1} DEHP 刺激 HMC-1 细胞 30 min,显著促进细胞内 ROS 的产生($P<0.05$) 。进一步研究发现,1 ~ 50 μmol·L^{-1} DEHP 刺激 THP-1 单核细胞 36 h,浓度依赖性诱导细胞内 ROS 的产生。0.05 ~ 1 μmol·L^{-1} 浓度范围内的 DEHP 对 ROS 无明显诱导作用(数据未展示) 。50 μmol·L^{-1} DEHP 可以显著诱导细胞中 ROS 的产生($P<0.05$) ,提示 ROS 可能参与 DEHP 相关的哮喘等炎症性疾病,具体分子机制有待进一步研究。

通讯作者简介: 董四君(1966—) ,男,生物工学博士,研究员,2009 年入选中国科学院"百人计划",主要研究方向为分子毒理学,发表 SCI 论文 20 余篇。

参考文献:

[1] Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J. Phthalates: Toxicology and exposure [J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2007, 210(5): 623 - 634

[2] Rudel R A, Gray J M, Engel C L, et al. Food packaging and bisphenol A and bis(2-ethyhexyl) phthalate exposure: Findings from adietary intervention [J]. Environmental Health Perspectives, 2011, 119(7): 914 - 920

[3] Shaz B H, Grima K, Hillyer C D. 2-(Diethylhexyl) phthalate in blood bags: Is this a public health issue? [J]. Transfusion, 2011, 51(11): 2510 - 2517

[4] Chen S Q, Chen J N, Cai X H, et al. Perinatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate leads to restricted growth and delayed lung maturation in newborn rats [J]. Journal of Perinatal Medicine, 2010, 38(5): 515 - 521

[5] 唐文红. 丙泊酚对脂多糖刺激人单核细胞分泌细胞因子的影响[D]. 上海: 第二军医大学, 2008: 6
Tang W H. Effect of propofol on the secretion of cytokines from human monocytes stimulated with LPS [D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2008: 6 (in Chinese)

[6] Nishioka J, Iwahara C, Kawasaki M, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces production of inflammatory molecules in human macrophages [J]. Inflammation Research, 2012, 61(1): 69 - 78

[7] Garcia-Rio F, Miravitlles M, Soriano J B, et al. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary dis-

ease: A population-based study [J]. Respiratory Research, 2010, 11(1): 63 – 78

[8] Mattoli S, Marini M, Fasoli A. Expression of the potent inflammatory cytokines, GM-CSF, IL6, and IL8, in bronchial epithelial cells of asthmatic patients [J]. Chest, 1992, 101(3s): 27S – 29S

[9] Prikk K, Maisi P, Piril E, et al. Airway obstruction correlates with collagenase-2 (MMP-8) expression and activation in bronchial asthma [J]. Laboratory Investigation, 2002, 82(11): 1535 – 1545

[10] Liu W, Liang Q, Balzar S, et al. Cell-specific activation profile of extracellular signal-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinases in asthmatic airways [J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2008, 121(4): 893 – 902. e2

[11] Pak V M, McCauley L A. Risks of phthalate exposure among the general population: Implications for occupational health nurses [J]. Official Journal of the American Association of Occupational Health Nurses, 2007, 55(1): 12 – 17

[12] Cargnello M, Roux P P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2011, 75(1): 50 – 83

[13] Halden R U. Plastics and health risks [J]. Annual Review of Public Health, 2010, 31(1): 179 – 194

[14] Lee J, Oh P S, Lim K T. Allergy-related cytokines (IL-4 and TNF-α) are induced by di (2-ethylhexyl) phthalate and attenuated by plant-originated glycoprotein (75 kDa) in HMC-1 cells [J]. Environmental Toxicology, 2011, 26(4): 364 – 372

[15] Van Lint P, Libert C. Matrix metalloproteinase-8: Cleavage can be decisive [J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2006, 17(4): 217 – 223

[16] Obase Y, Rytila P, Metso T, et al. Effects of inhaled corticosteroids on metalloproteinase-8 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the airways of asthmatic children [J]. International Archives of Allergy and Immunology, 2010, 151(3): 247 – 254

[17] Zhang H. Anti-IL-1 beta therapies [J]. Recent Patents on DNA & Gene Sequences, 2011, 5(2): 126 – 135

[18] Oh P S, Lim K, Lim K T. Phytoglycoprotein (75 kDa) inhibits expression of interleukin-1 beta stimulated by DEHP in human mast cells [J]. Cell Biochemistry and Function, 2010, 28(5): 352 – 359

[19] 蒋国新. 哮喘患者血清NO、IL-1β水平变化及其与肺功能的相关性研究[J]. 交通医学, 2009, 23(5): 485 – 487

Jiang G X. Correlation study between serum nitrogen monoxidum, interleukin-1β levels and pulmonary function in asthma [J]. Medical Journal of Communications, 2009, 23(5): 485 – 487 (in Chinese)

[20] Wang J, Dong S. ICAM-1 and IL-8 are expressed by DEHP and suppressed by curcumin through ERK and p38 MAPK in human umbilical vein endothelial cells [J]. Inflammation, 2012, 35(3): 859 – 870

[21] Shan L, Redhu N S, Saleh A, et al. Thymic stromal lymphopoietin receptor-mediated IL-6 and CC/CXC chemokines expression in human airway smooth muscle cells: Role of MAPKs (ERK1/2, p38, and JNK) and STAT3 pathways [J]. The Journal of Immunology, 2010, 184(12): 7134 – 7143

[22] Goplen N, Karim Z, Guo L, et al. ERK1 is important for Th2 differentiation and development of experimental asthma [J]. The Journal of the Federation of American Societies of Experimental Biology, 2012, 26(5): 1934 – 1945

[23] Quercioli A, Mach F, Bertolotto M, et al. Receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) increases the release of neutrophil products associated with coronary vulnerability [J]. Thrombosis and Haemostasis, 2012, 107(1): 124 – 139

[24] van der Vliet A. Nox enzymes in allergic airway inflammation [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects, 2011, 1810(11): 1035-1044 ◆