

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.09.010

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯对大鼠胎盘组织的影响*

顾 潇^{1,2} 徐 婉² 王 心² 尚丽新^{2△} 余 辉²

(1 第四军医大学 陕西 西安 710032; 2 北京军区总医院妇产科 北京 100700)

摘要 目的:探讨孕期不同剂量邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)暴露对大鼠胎盘组织形态学和超微结构的影响,以推断DEHP对胎盘结构和功能的损害。**方法:**健康雌性Wistar大鼠40只,随机分为4组,妊娠第11日起每日给予DEHP灌胃,剂量分别为:对照组(玉米油)、低剂量组(100 mg/kg)、中剂量组(500 mg/kg)和高剂量组(1000 mg/kg),妊娠第19日处死孕鼠,取胎盘组织分别做HE染色和电镜制片,观察各剂量组胎盘形态学及超微结构的变化。**结果:**各剂量组胎盘形态学和超微结构的变化与DEHP摄入量呈负相关,低剂量组胎盘无明显改变;中剂量组胎盘缩小,空泡化细胞增多,微观结构显示胞质内线粒体水肿;高剂量组胎盘迷路带血窦扩张淤血严重,滋养细胞变性、坏死。**结论:**DEHP可导致大鼠胎盘形态结构发生改变,这种病理改变是胎盘功能减退的形态学基础,可直接影响胚胎发育和妊娠结局。

关键词:邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP);孕鼠;胎盘

中图分类号:Q95-3;R714 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)09-1643-04

Effect of di(2-ethylhexyl) Phthalate Exposure on Rat Placenta*

GU Xiao^{1,2}, XU Wan², WANG Xin², SHANG Li-xin^{2△}, YU Hu²

(1 The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Obstetrics and Gynecology, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing, 100700, China)

ABSTRACT Objective: Discuss the effect of different doses of DEHP exposure on placental tissue morphology and ultra-structure changes in pregnant rats, and conclude DEHP have adverse impact on the structure and function of placental. **Methods:** 40 healthy female Wistar rats were randomly divided into 4 groups, that is control group (corn oil), low dose group (DEHP 100 mg/kg), middle dose group (DEHP 500 mg/kg) and high dose group (DEHP 1000 mg/kg). On eleventh day of pregnancy, rats were given DEHP/corn oil daily respectively by intragastric administration. On the nineteenth day pregnant rats were killed, placental tissues were studied with HE staining and electron microscope, to observe the morphology and ultra-structure changes of each dose group. **Results:** Placental tissue morphology and ultra-structure changes were negatively correlated with DEHP daily intake. Low dose group had no obvious change; the placental in middle dose group were shrinked, vacuolated cells increased, mitochondria edema in the cytoplasm was detected by observing the microstructure. Labyrinth blood sinus in high dose group of placental were dilated and congestion seriously, trophoblastic cells were degeneration and necrosis. **Conclusions:** DEHP can cause the changes of morphological structure in rat's placental, the pathological change is the morphological basis of placental dysfunction, it can directly affect the development of embryos and pregnancy outcome.

Key words: Di(2-ethylhexyl) phthalate(DEHP); Pregnant rats; Placenta

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R714 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)09-1643-04

前言

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(di(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP)是邻苯二甲酸酯类化合物(phthalatic esters, PAES)中的重要成员,是目前工业中使用最普遍的一种增塑剂,广泛应用于医疗器具、儿童玩具、食品包装等领域^[1,2]。在塑膜加工过程中,DEHP并不是通过共价化学键与氯乙烯分子相结合,而是以氢键和范德华力连接。随着时间的推移,其可不断从塑料制品中释放出来,直接进入人体或者外环境,对空气、水体以及土壤造成污染^[3,4]。人体可通过饮食、呼吸、皮肤、静脉注射等多种

途径吸收DEHP,其中消化道吸收是最主要的方式^[5,7]。目前研究发现DEHP是一种环境内分泌干扰物,它的毒性作用主要表现为雄性和雌性的生殖毒性、胚胎发育毒性、肝肾毒性以及血液和生化方面的改变^[8-11],对人体健康可产生不同程度的危害。

胎盘是维持胎儿在子宫内营养发育的重要器官,具有物质交换、防御及合成等功能,孕期胎盘结构的病理改变与胚胎的生长发育直接相关,与新生儿的出生状况及远期预后也有一定的关联^[12,13]。因此胎盘结构的改变可作为一个客观指标,评价环境污染物对人体的毒性作用。DEHP可通过胎盘屏障和胎盘转运进入胎儿体内,在此过程中对胎盘的组织结构直接造成损

* 基金项目:全军“十一五”科技攻关项目(06G019)

作者简介:顾潇(1985-),女,博士研究生,主要研究方向为围产医学, E-mail: xaj66198@163.com

△通讯作者:尚丽新, E-mail: 19932003@163.com

(收稿日期:2014-08-30 接受日期:2014-09-23)

伤,从而影响胚胎发育和妊娠结局^[4]。本研究通过建立妊娠中晚期大鼠 DEHP 染毒模型,给予孕鼠不同剂量的 DEHP,观察胎盘组织形态学的变化,以了解 DEHP 对胎盘结构和功能的损害,为孕期 DEHP 暴露对子代的生长发育影响提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(美国 Sigma 公司,纯度>99%),玉米油(市售);光学显微镜及照相系统(日本奥林巴斯公司),超薄切片机(德国 LEICA 公司),透射电子显微镜(日本电子株式会社)。

1.2 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 60 只购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号:SCXK(京 2012-0001)。其中雌鼠 40 只,体重 190 g-220 g,雄鼠 20 只,体重 200-230 g。雌鼠经阴道脱落细胞涂片筛查,性周期正常。实验动物适应性饲养一周,自由饮水摄食,饲养环境温度(20±2℃),湿度为 45%-60%,每日光照与黑暗时间均为 12 小时。

1.3 动物分组及染毒

雌鼠随机分为 4 组:对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组 10 只。雌雄大鼠以 2:1 的比例合笼过夜,次日早 8:00 检查雌鼠阴栓,阴栓是由雄鼠精液、雌鼠阴道分泌物与阴道上皮共同组成的混合物,性交后在阴道口形成,呈白色粘稠状。查见雌鼠阴栓的当日计为孕 0 天,大鼠编号并称重。妊娠期第 11-18 日,低、中、高三个剂量组每日经口灌胃给予 DEHP,灌胃体积为 5 mL/kg,剂量分别为:低剂量组:DEHP100 mg/kg;中剂量组:DEHP 500 mg/kg;高剂量组:DEHP 1000 mg/kg;对照组给予等量玉米油。

1.4 胎盘采集

妊娠第 20 天孕鼠于 4%水合氯醛腹腔麻醉后,纵行剖开腹腔及子宫,逐一快速取出胎盘组织。肉眼观察各组胎盘的外观及颜色,测量胎盘直径和重量。部分胎盘组织用 4%甲醛固定后进行 HE 染色,观察组织形态的变化;部分胎盘组织制作电镜透射样本,观察超微结构的改变。

1.5 胎盘透射电镜标本的制备

胎盘取出后立即置于冰块上,在中央区贯穿全层切取大小 1 mm×1 mm×2 mm 的组织薄块若干,2.5%戊二醛 4℃下固定 2 小时以上,0.1 M 磷酸缓冲液漂洗后置于 1%锇酸固定液固定 2-3 小时,冲洗后乙醇梯度脱水,环氧树脂浸透包埋,超薄切片机切片,2%醋酸铀-枸橼酸铅双染色,在 JEM-2000EX 透射电镜下观察。

1.6 统计学处理

各组计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS19.0 统计软件对实验数据进行方差齐性检验,四组间两两比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 表示各组之间的差别显著,有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠的一般情况

在实验过程中,大鼠一般情况良好,各组大鼠均未出现死亡现象,无反应淡漠、皮毛脱落、体重显著下降等异常表现,保证了动物模型的要求。

2.2 胎盘肉眼观结果

正常大鼠胎盘中央厚、边缘薄,外观似吸盘,呈暗红色,由胎儿面和母体面组成,胎儿面覆盖羊膜组织,羊膜表面光滑、无血管、半透明。低剂量组胎盘未见异常。中剂量组胎盘颜色变暗,呈紫红色、胎儿面无光泽,胎盘体积减小,中央变薄,高剂量组部分胎盘组织明显淤血、水肿,体积增大,羊膜色黄、混浊,周边卷曲增厚(图 1)。

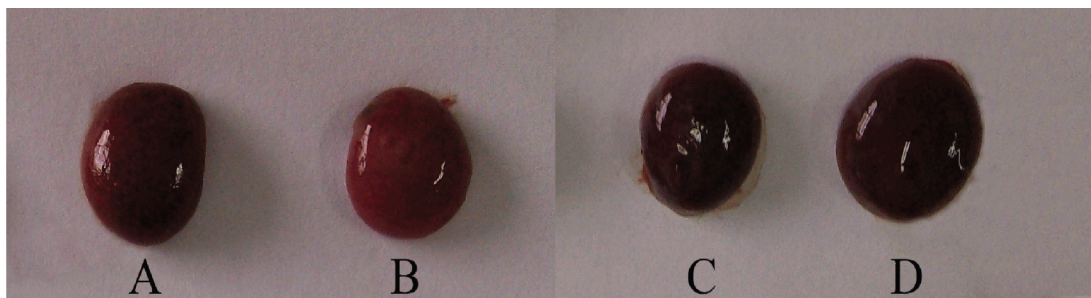


图 1 四组胎盘肉眼观察

A 为对照组胎盘;B 为低剂量组胎盘;C 为中剂量组胎盘,可见胎盘萎缩,中央部分变薄;D 为高剂量组胎盘,图示胎盘淤血水肿明显,胎儿面羊膜混浊

Fig. 1 Four groups of placenta tissue by visual inspection

A is control group; B is the low dose group of placenta; C is the middle dose group of placenta, the central part were thinning, placenta were shrinked; D is the high dose group of placenta, it is obvious that tissue congestion swelling, the fetal face of amniotic was opacity

2.3 胎盘的直径和质量

各实验组分别计数 5 只大鼠胎盘的个数,并测量胎盘直径和重量。各组胎盘数差异无统计学意义。中剂量组胎盘直径减小,重量降低,与对照组和低剂量组相比均有统计学意义($P < 0.05$);高剂量组胎盘直径和重量显著大于其他三组($P < 0.05$)。

2.4 胎盘光镜结果

大鼠足月妊娠胎盘由母体面和子体面共同组成。子体面胎盘有 3 层结构,从胎鼠侧依次为:迷路带、海绵滋养层和巨细胞层。迷路带为母儿血液交换区,含有丰富的子体血管和母体血窦;海绵滋养层是由细胞滋养层细胞及少量富含糖原的糖原细胞共同组成的网络样结构;巨细胞层由巨细胞和少量的母体血窦组成。

表 1 不同组别大鼠胎盘个数、直径、重量的比较

Table 1 The number, diameter and weight of rat placental in different dose groups

Group	Number	Diameter(mm)	Weight(g)
Control	52	15.02± 0.35	0.45± 0.15
Low	50	15.10± 0.43	0.46± 0.17
Middle	52	13.49± 0.38 ^{ab}	0.37± 0.16 ^{ab}
High	51	16.23± 0.48 ^{abc}	0.55± 0.21 ^{abc}

注: ^a P<0.05 vs 对照组; ^b P<0.05 vs 低剂量组; ^c P<0.05 vs 中剂量组。

Note: ^a P<0.05 contrast with control group; ^b P<0.05 contrast with low dose group; ^c P<0.05 contrast with middle dose group.

对照组胎盘结构层次清楚,细胞形态规则,绒毛滋养细胞排列紧密;低剂量组胎盘细胞形态大致正常,排列紧密,各层之间界限清晰,组织结构无明显异常;与对照组相比中剂量组胎盘海绵滋养层变薄,滋养细胞皱缩,呈空网状,迷路带红细胞密集增多,血窦扩张;高剂量组胎盘各层界限不明显,迷路带血窦扩张淤血严重,海绵滋养细胞层明显变薄,细胞皱缩,退变,粘液样变性,组织结构紊乱,胞浆内呈空网状。糖原细胞变性、坏死,核皱缩,染色体浓集,无明显核结构(图 2)。

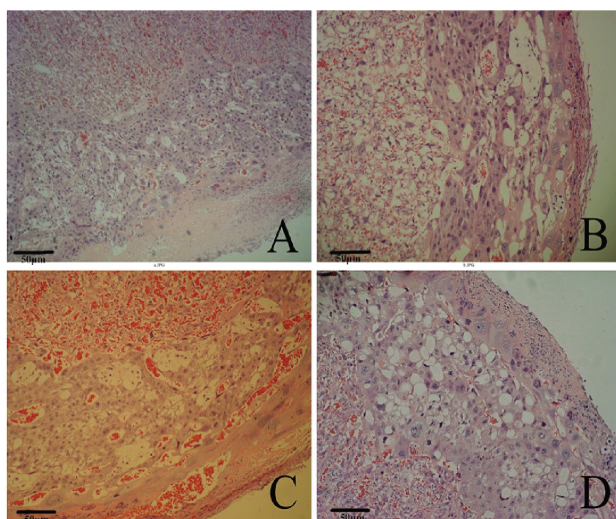


图 2 各组胎盘光镜下观察所示结果

A 为对照组胎盘,可见迷路带、海绵滋养层和巨细胞层结构(HE× 100); B 为低剂量组胎盘,可见胎盘组织结构无明显改变(HE× 100);C 为中剂量组胎盘,图示滋养细胞皱缩,呈空网状,迷路带红细胞密集(HE× 100);D 为高剂量组胎盘,海绵滋养层明显变薄,细胞皱缩,组织结构紊乱,胞浆内呈空网状(HE× 100)

Fig. 2 The results of different groups of placenta observed under the microscope

A is control group, showing the three layers, labyrinth, trophoblast and giant cell layer (HE× 100); B is group of low dosage, placenta tissue structure has no significant change (HE × 100); C is the middle dose group of placenta, trophoblast are shrunked, and vacuolation of cells were increased, red cells in labyrinth area were extremely dense (HE× 100); D is the high dose group of placental, trophoblast was thinner, cells were shrunked and organization structure was disordered (HE× 100)

2.5 胎盘电镜结果

对照组滋养层细胞表面有排列整齐、形态均一的微绒毛,染色质分布均匀,细胞结构完整。胞质内细胞器丰富,内质网发达,有较多的线粒体;低剂量组胎盘滋养层细胞表面微绒毛均一、排列整齐,细胞结构完整,内质网轻度扩张、肿胀;中剂量组

滋养层细胞游离面的微绒毛短小、稀疏,胞质内有较多大小不等的空泡,细胞核形不规则,核内染色质的分布欠均匀,有的细胞发生变性。线粒体肿胀、水肿,粗面内质网池扩张,数目增多,部分扩张呈小管状或小泡状;高剂量组细胞表面微绒毛明显稀疏,部分区域微绒毛缺失,滋养层细胞线粒体肿胀、空泡化明显,异染色质沿核膜边缘浓缩聚集,核膜腔扩张,部分细胞核溶解、可见明显的凋亡小体(图 3)。

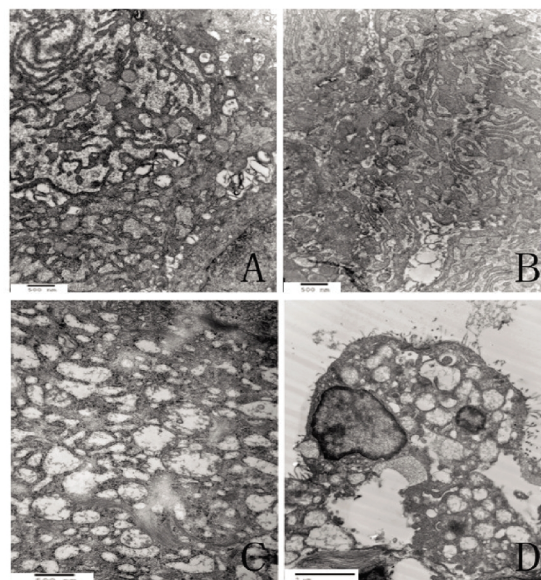


图 3 各组胎盘透射电镜结果

A 为对照组胎盘,图示细胞结构完整,胞质内细胞器丰富(× 15000);B 为低剂量组胎盘,可见内质网轻度扩张、肿胀(× 15000);C 为中剂量组胎盘,胞质内空泡状结构增多,核内染色质分布欠均匀,图示线粒体肿胀水肿(× 25000);D 为高剂量组胎盘,可见滋养层细胞线粒体肿胀、空泡化明显,异染色质沿核膜边缘浓缩聚集,核膜腔扩张,部分细胞核溶解(× 25000)

Fig. 3 The results of electron microscopy of different placental groups

A is the control group, showing that cell structure was integrated, organelles are rich in the cytoplasm(× 15000); B is the low dosage group, endoplasmic reticulum were expansion and swelling mildly(× 15000); C is the middle group of placenta tissue. vacuole structure are increased in the cytoplasm, chromatin in the nuclear is very unevenly distributed (× 25000); D is the high dose group. The mitochondria of placental trophoblastic cells are swelling, heterochromatin concentrated along the nuclear edge, nuclear membrane were expanded and some nucleus were dissolved(× 25000)

3 讨论

DEHP 是一种脂溶性的环境雌激素,可经多种途径进入人体并在体内蓄积,会干扰机体多项生理活动的调节,对人体多个系统造成损害^[15,16]。研究显示大鼠孕期暴露于 DEHP 可导致胎鼠出现实眼、露脑、骨骼异常等多发畸形,同时 DEHP 还会影响胚胎的发育,导致胚胎生长缓慢^[17]。DEHP 作用的敏感时期是胚胎在宫内的发育阶段,妊娠中、晚期影响最显著,并且存在剂量 - 反应关系^[18]。本实验首先构建了 DEHP 染毒孕鼠模型,孕中期起给予 Wistar 大鼠不同剂量的 DEHP 灌胃染毒,建立了简便、有效的妊娠中晚期接触 DEHP 的毒性评价系统。通过对 DEHP 染毒大鼠胎盘组织的观察,以了解 DEHP 的胚胎发育毒性,并探讨其可能的机制。

胎盘是母亲与胎儿之间进行物质交换的器官,胎儿依靠胎

盘从母体获取营养,胎盘结构的改变,直接影响胚胎的生长发育,其结构和功能的稳定关系着子代的健康^[9]。本实验结果显示 DEHP 可使胎盘的形态学和超微结构发生变化。肉眼观中剂量组和高剂量组胎盘的颜色明显变暗,中剂量组胎盘萎缩,直径减小,重量降低,与对照组和低剂量组相比均有统计学意义($P<0.05$)。高剂量组部分胎盘淤血、水肿,颜色加深,中央区域变薄,体积增大,与对照组、低剂量组和中剂量组相比,胎盘直径和重量明显增大,差异有统计学意义($P<0.05$)。

光镜结果示对照组各结构层次清晰,可见迷路带、海绵滋养层和巨细胞层三层结构;低剂量组胎盘结构无显著变化;与对照组相比中剂量组胎盘海绵滋养层变薄,滋养细胞皱缩,呈空网状,迷路带红细胞密集增多,血窦扩张。提示中剂量 DEHP 暴露对胎盘滋养细胞产生损伤作用,迷路带血窦扩张说明胎盘局部血液循环不良;高剂量组胎盘迷路带血窦扩张淤血严重,滋养细胞变性,组织结构紊乱。海绵滋养层和迷路带细胞变性、大片空泡化细胞均说明胎盘灌注不足^[20]。

电镜下各剂量组胎盘的变化主要表现在微绒毛、线粒体和内质网等细胞器结构的改变,及细胞凋亡现象。微绒毛是细胞游离面的细胞质突起,其主要作用是增加细胞的表面积,有利于同外界物质的交换,胎盘微绒毛数量的减少影响了母子间的物质交换^[21]。中和高剂量组滋养细胞微绒毛短小、稀疏、甚至缺失,说明细胞的吸收能力降低。线粒体可以看做是“细胞的能源工厂”,它的主要功能是将氧化产生的能量转化为 ATP,线粒体的功能受损直接影响 ATP 的合成,继而进一步引起质膜离子泵功能障碍,导致细胞水肿或坏死^[21]。中剂量组线粒体肿胀说明细胞有氧代谢减弱。高剂量组滋养细胞异染色质沿核膜边缘浓缩聚集,核膜腔扩张,部分细胞发生核溶解、可见凋亡小体,上述实验结果提示细胞凋亡增加,继而引起胎盘功能失调,导致胎儿出现生长发育障碍。

综上,本实验研究显示中和高剂量 DEHP 暴露会对大鼠胎盘造成损伤,引起细胞器的显著改变,这些改变的程度与 DEHP 的剂量密切相关。DEHP 染毒剂量越高,胎盘结构的改变越明显。光镜及电镜结果提示 DEHP 可对胎盘滋养细胞造成损伤,引起胎盘的血液循环和母-胎间物质交换的障碍,从而出现子代生长发育不良。

参考文献(References)

- [1] Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J. Phthalates: toxicology and exposure[J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2007, 210(5): 623-634
- [2] Chiellini F, Ferri M, Latini G. Physical-chemical assessment of di-(2-ethylhexyl)-phthalate leakage from poly (vinyl chloride) endotracheal tubes after application in high risk newborns [J]. *Int J Pharm*, 2011, 409(1-2): 57-61
- [3] Teil MJ, Blanchard M, Chevreuil M. Atmospheric fate of phthalate esters in an urban area[J]. *Sci Total Environ*, 2006, 354(2-3): 212-223
- [4] Zeng F, Wen J, Cui K, et al. Seasonal distribution of phthalate esters in surface water of the urban lakes in the subtropical city, Guangzhou, China[J]. *J Hazard Mater*, 2009, 169(1-3): 719-725
- [5] Guo Y, Kannan K. Comparative assessment of human exposure to phthalate esters from house dust in china and the United States[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(8): 3788-3794
- [6] Zimmermann S, Gruber L, Schlummer M, et al. Determination of phthalic acid diesters in human milk at low ppb levels[J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2012, 29(11): 1780-1790
- [7] Wittassek M, Koch H M, Angerer J, et al. Assessing exposure to phthalates-the human biomonitoring approach[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2011, 55(1): 7-31
- [8] Do RP, Stahlhut RW, Ponzi D, et al. Non-monotonic dose effects of in utero exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on testicular and serum testosterone and anogenital distance in male mouse fetuses[J]. *Reprod Toxicol*, 2012, 34(4): 614-621
- [9] Serrano SE, Karr CJ, Seixas NS, et al. Dietary phthalate exposure in pregnant women and the impact of consumer practices [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2014, 11(6): 6193-6215
- [10] Xue-Feng Huang, Yan Li, Yi-Hua Gu, et al. The Effects of Di-(2-ethylhexyl)-phthalate Exposure on Fertilization and Embryonic Development In Vitro and Testicular Genomic Mutation In Vivo[J]. *PLoS one*, 2012, 7(11): e50465
- [11] Vincent Muczynski, Charlotte Lecureuil, Se'bastien Messiaen, et al. Cellular and Molecular Effect of MEHP Involving LXR in Human Fetal Testis and Ovary[J]. *PLoS one*, 2012, 7(10): e48266
- [12] Min Li, S. Joseph Huang. Innate immunity, coagulation and placental-related adverse pregnancy outcomes[J]. *Thromb Res*, 2009, 124(6): 656-662
- [13] Martina J. Rosenberg, Christina R. Wolff, Ahmed El-Emawy, et al. Effects of moderate drinking during pregnancy on placental gene expression[J]. *Alcohol*, 2010, 44(0): 673-690
- [14] Xu Y, Kanipp GT, Cook TJ. Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its metabolites on the lipid profiling in rat HRP-1 trophoblast cells [J]. *Arch Toxicol*, 2006, 80(5): 293-298
- [15] Latini G, Verrotti A, DeFelice C. Di-2-ethylhexyl phthalate and endocrine Disruption: a review[J]. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2004, 4(1): 37-40
- [16] Chighizola C, Meroni PL. The role of environmental estrogens and autoimmunity[J]. *Autoimmun Rev*, 2012, 11(6-7): A493-501
- [17] Yan Xu, Shruti Agrawal, Thomas J Cook, et al. Maternal Di-(2-ethylhexyl)-phthalate Exposure Influences Essential Fatty Acid Homeostasis in Rat Placenta[J]. *Placenta*, 2008, 29(11): 962-969
- [18] Ema M, Miyawaki E, Kawashima K. Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given dibutyl phthalate during late pregnancy [J]. *Toxicol Lett*, 2000, 111(3): 271-278
- [19] 王海青, 成要平, 何玉洁. 妊娠期大鼠汽车尾气暴露对仔鼠生殖毒性及遗传毒性研究[J]. *环境与健康*, 2011, 28(2): 122-124
- [20] Wang Hai-qing, Cheng Yao-ping, He Yu-jie. Productive Toxicity and Genotoxicity of Automobile Exhaust [J]. *J Environ Health*, 2011, 28(2): 122-124
- [21] 刘萍, 成要平, 何玉洁. 三聚氰胺对孕鼠胎盘和仔鼠的影响[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2010, 18(6): 8-10
- [22] Liu Ping, Cheng Yao-ping, He Yu-jie. Effects of Melamine on placenta of pregnant rats and their progeny [J]. *Chinese Journal of Birth Health & Heredity*, 2010, 18(6): 8-10
- [23] 王自能, 朱颖. 嗜酒对胎盘超微结构的影响 [J]. *电子显微学报*, 2003, 22(4): 263-266
- [24] Wang Zi-neng, Zhu Ying. The influence of alcohol to the placental ultrastructure [J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2003, 22(4): 263-266