

## 母体暴露壬基酚对仔鼠脾脏组织的氧化损伤

许洁<sup>1,2</sup>, 俞捷<sup>2</sup>, 汪洋<sup>1\*</sup>, 张子萍<sup>2</sup>, 张洋<sup>2</sup>, 吴伟成<sup>2</sup>

**摘要:** [目的] 研究母体暴露壬基酚(NP)对仔鼠脾脏的氧化损伤。[方法] 将SD母鼠随机分为50、100、200 mg/kg NP暴露组及对照组, 每组6~7只动物。在母鼠妊娠第9~15天灌胃NP, 仔鼠(F<sub>1</sub>)于出生60天龄时处死并取脾脏称重。比色法测定脾脏组织中超氧化物歧化酶(SOD)活力及脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量; 透射电镜观察其超微结构改变。[结果] 与对照组比较, 200 mg/kg NP组仔鼠的脾脏重量及脏器系数均明显降低( $P<0.05$ ), 且与染毒剂量呈负相关( $r_{\text{脾}}=-0.618$ ,  $r_{\text{脏}}=-0.530$ ,  $P<0.05$ ); 100、200 mg/kg NP组仔鼠脾脏组织的SOD活力降低, 200 mg/kg NP组MDA含量升高( $P<0.05$ ), 均存在剂量效应关系( $r_{\text{SOD}}=-0.460$ ,  $r_{\text{MDA}}=0.747$ ,  $P<0.05$ )。高暴露组仔鼠脾脏电镜下可见脾细胞线粒体肿胀呈空泡样变, 染色质浓缩成块状聚集在核周围。[结论] NP可透过胎盘屏障致仔鼠脾脏脂质过氧化损伤。

**关键词:** 壬基酚; 仔鼠; 脾脏; 脂质过氧化

**Toxicity of Nonylphenol on F<sub>1</sub> Rats' Spleen after Gestation Exposure** XU Jie<sup>1,2</sup>, YU Jie<sup>2</sup>, WANG Yang<sup>1\*</sup>, ZHANG Zi-ping<sup>2</sup>, ZHANG Yang<sup>2</sup>, WU Wei-cheng<sup>2</sup> (1.School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2.Department of Preventive Medicine, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China). \*Address correspondence to WANG Yang; E-mail: wangyang8289@163.com

**Abstract:** [Objective] To investigate the adverse effects on F<sub>1</sub> rats' spleen while the pregnant mother rats were exposed to nonylphenol (NP). [Methods] Pregnant rats were exposed to NP via gavage at doses of 0, 50, 100 and 200 mg/kg by body weights respectively per day, from pregnant days 9 to 15. The level of malondialdehyde (MDA) and activity of super oxide dimutase (SOD) in F<sub>1</sub> rats' spleen homogenate were detected respectively at the age of 60<sup>th</sup> day. The ultrastructure of spleen tissues were observed under electronic microscope. [Results] Compared with the control group, the absolute and relative weight of spleen were decreased dramatically in the 200 mg/kg NP treated group and negative relation between the weight and dose was found ( $r_{\text{spleen}}=-0.618$ ,  $r_{\text{coefficient}}=-0.530$ ,  $P<0.05$ ). The SOD activity of spleen tissues decreased in NP 100 and 200 mg/kg exposed fetal rats, while the levels of MDA increased in NP 200 mg/kg exposed fetal rats. Both of them were in a dose-dependent manner ( $r_{\text{SOD}}=-0.460$ ,  $r_{\text{MDA}}=0.747$ ,  $P<0.05$ ). The differences mentioned above were statistical significant compared to control group ( $P<0.05$ ). The changes of the ultrastructure were found among the spleen of NP 200 mg/kg group that characterized with chromatin condensed, clumped in circa-nuclei and mitochondrial tumefaction and vacuolization. [Conclusion] NP can get across the placenta barrier to make the F<sub>1</sub> offspring rats' spleen damage of lipid peroxidation.

**Key Words:** nonylphenol; rat offspring; spleen; lipid peroxidation

壬基酚(nonylphenol, NP)是一类结构简式为C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OH)C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>的几种同分异构体的总称, 作为乳化剂广泛应用于工业中。NP常温下相当稳定, 在环境中难于降解, 具有高度脂溶性和生物蓄积性, 可由污水排入水体环境。NP可经过食物及食物链、空气、水等多种途径进入人体。目前, 有关NP等环境内分泌干扰物对机体的胚胎毒性研究报道较多<sup>[1-2]</sup>, 本研究的前期实验初步表明母体孕期暴露NP对雄性仔鼠免疫功能有影响<sup>[3]</sup>, 在以往研

究的基础上, 本实验拟将NP暴露时间提前集中在免疫器官胚胎发育敏感期, 即大鼠孕9~15天, 检测60天龄仔鼠脾脏重量及脾脏组织中超氧化物歧化酶(SOD)活力及脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量, 并采用电镜观察其超微结构的改变, 从而进一步探索NP对免疫器官脾脏的损伤作用及机制, 为预防NP对人类的危害、维持机体自身的稳定状态提供基础数据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物

雌性清洁级SD大鼠50只, 体重(260±20)g; 雄性25只, 体重(180±10)g, 第三军医大学实验动物中心提供[SCXK(渝)20080003]。饲养条件: 相对湿度(60±5)%, 温度(20±2)℃, 自然通风, 12 h光照12 h黑暗, 自由取食、饮水。

#### 1.2 动物分组及染毒

大鼠按雌雄2:1同笼交配, 次日晨将雌鼠逐一阴道涂片镜

[基金项目] 贵州省自然科学基金(编号: 黔科2019号); 遵义市自然科学基金(编号: 遵市科合社字200805); 遵义医学院院基金(编号: 2007-61-22)

[作者简介] 许洁(1979-), 女, 博士生, 副教授; 研究方向: 毒理学; E-mail: xujie360@sina.com

[\*通信作者] 汪洋教授; E-mail: wangyang8289@163.com

[作者单位] 1. 重庆医科大学公共卫生学院, 重庆 400010; 2. 遵义医学院预防医学教研室, 贵州 遵义 563003

检,发现精子当日记为孕期0天,将交配成功的28只孕鼠随机分配到0、50、100、200mg/kg NP暴露组。对照组灌胃溶剂花生油,暴露组于受孕第9~15天空腹灌胃NP,体积均为10mL/(kg·d)。每剂量组6~7只孕鼠,仔代出生3d后减窝至每窝2~3只仔鼠,各剂量组仔鼠约12~20只,于60天龄每组随机抽取10只仔鼠进行指标检测。

1.3 实验材料

NP(常州染料化工厂),一级花生油(山东鲁花集团),SOD和MDA试剂盒(南京建成生物工程研究所),电子天平(上海精密科学仪器厂),-80℃低温冰箱(日本Sanyo公司),可调高速电动匀浆器(上海浦东物理光学仪器厂),721分光光度计(上海电化仪表自控公司),冷冻离心机(德国Eppendorf公司)。

1.4 脾脏脏器系数

对出生60d龄仔鼠称重后处死,在并冰块上取脾脏,电子天平称重。脏器系数=(脏器重量/体重)×100%。

1.5 脾脏SOD活性及MDA含量测定

对仔鼠脾脏称重后,用可调高速电动匀浆机制备10%脾脏组织匀浆(每次6s,间隔10s,共20次)。蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法,脾脏组织SOD活力和MDA含量依照试剂盒说明用比色法进行测定。

1.6 脾脏组织超微结构的变化

仔鼠脾脏组织放在干净的蜡板上,滴一滴冷却的固定液,快速将其切成若干1mm³的小块,置于2%戊二醛和1%锇酸,各块分别固定,环氧树脂618包埋、铀铅双染色,采用透射电镜观察不同放大倍数下脾细胞的超微结构的变化。

1.7 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析,差异有统计学意义则进一步LSD-*t*检验进行组间差异比较,剂量-效应关系采用Pearson相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 NP对仔鼠脾脏重量的影响

与对照组比较,200mg/kg NP组仔鼠体重、脾脏重量和脏器系数均明显低于对照组( $P < 0.01$ );并存在剂量-效应关系( $r_{\text{体}} = -0.582, r_{\text{脾}} = -0.618, r_{\text{脏}} = -0.530, P < 0.05$ ),见表1。

表1 仔鼠脾脏重量和脏器系数( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Spleen weights and organ coefficients of rat offsprings

| 组别<br>Group | 体重(g)<br>Body weight | 脾脏重量(mg)<br>Spleen weight | 脏器系数<br>Organ coefficients |
|-------------|----------------------|---------------------------|----------------------------|
| 0           | 169.30 ± 6.43        | 4.30 ± 0.63               | 2.55 ± 0.40                |
| 50          | 169.30 ± 6.00        | 4.20 ± 0.37               | 2.48 ± 0.18                |
| 100         | 166.40 ± 4.09        | 3.84 ± 0.59               | 2.30 ± 0.32                |
| 200         | 160.30 ± 3.33**      | 3.35 ± 0.61**             | 2.09 ± 0.21*               |
| F           | 7.67                 | 6.84                      | 4.79                       |
| P           | 0.000                | 0.001                     | 0.007                      |

[注]\*:与对照组比较(Compared with control group), $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ 。

2.2 NP对仔鼠脾脏组织SOD活性和MDA含量的影响

100、200mg/kg NP组仔鼠脾脏组织SOD活力明显低于对

照组,200mg/kg NP组脾脏组织MDA含量高于对照组( $P < 0.05$ ),存在剂量-效应关系( $r_{\text{SOD}} = -0.460, r_{\text{MDA}} = 0.747, P < 0.05$ ),见表2。

表2 NP对脾脏SOD活力、MDA含量的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 2 Effects of NP on activity of SOD and MDA content in spleen of rat offsprings( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别  | SOD[U/(mg protein)] | MDA[nmol/(mg protein)] |
|-----|---------------------|------------------------|
| 0   | 22.198 ± 2.187      | 5.838 ± 0.046          |
| 50  | 21.623 ± 8.006      | 5.643 ± 0.249          |
| 100 | 18.410 ± 1.308**    | 5.915 ± 0.406          |
| 200 | 16.869 ± 1.164**    | 6.982 ± 0.517**        |
| F   | 3.631               | 29.219                 |
| P   | 0.022               | 0.000                  |

[注]\*\*:与对照组比较(Compared with control group), $P < 0.01$ 。

2.3 电镜观察脾细胞超微结构的变化

不同放大倍数电镜下观察,对照组脾细胞核内染色质均匀分布,细胞浆中各种细胞器分布正常(图A、C、E);200mg/kg NP暴露组脾细胞核大、胞质深染,部分染色质成块状浓集、边聚,内质网丰富,线粒体明显肿胀,空泡化(图B、D、F箭头所示)。

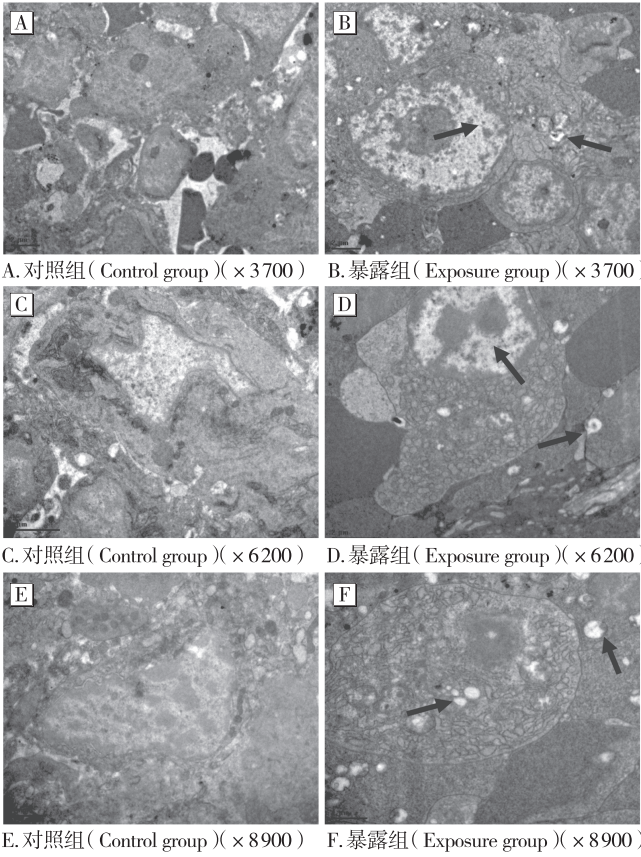


图1 电镜下脾细胞超微结构

Figure 1 Ultrastructure of spleen cells under electron microscope

3 讨论

免疫系统是对外源性化学物比较敏感的系统,脾脏属外周免疫器官,是各种免疫细胞增殖并产生免疫效应物质和发生特异性免疫应答的重要基地,其重量可作为衡量免疫系统发育状态的定量指标之一,脏器系数是反映脏器受损的灵敏、有效(下转第370页)

研究院、上海市计量测试技术研究院以及南华大学氡实验室等国家授权的检定/校准机构进行校准。而上述检定/校准机构出具的检定/校准报告中氡浓度低值一般为 600~1 000 Bq/m<sup>3</sup>, 高值一般为 1 700~3 000 Bq/m<sup>3</sup>, 而国家规定民用建筑氡浓度限值 I 类氡 ≤ 200 Bq/m<sup>3</sup>、II 类氡 ≤ 400 Bq/m<sup>3</sup>。上海地区为冲沙型地质结构, 非地下结构环境空气中氡浓度一般低于国家标准限制水平, 因此, 开展氡浓度检测实验室间比对, 是保证氡检测仪校准状态可信度的重要技术手段之一, 有助于保证检测结果有效性和一致性, 提高实验室检测能力和管理水平。

对于现场检测仪器因存在需经常搬动、使用环境温度、湿度变化较大等不利因素, 在检定或校准周期内应采用期间核查方法来保证仪器校准状态的可信度, 但期间核查是目前实验室仪器设备管理中较为薄弱的环节, 特别是现场检测仪器设备因缺乏有效的期间核查技术手段、方法以及科学的评价指标, 使得该项工作开展得较少。本次建立的氡浓度现场检测比对方法, 可作为测氡仪期间核查的方法, 能保证仪器的校准状态的可信度, 具有较高的实际应用价值。

#### 参考文献:

- [1] 河南省建筑科学研究院. GB 50325—2001 民用建筑工程室内环境污染控制规范(2006 年版)[S]. 北京: 中国计划出版社, 2006.
- [2] 中华人民共和国卫生部, 国家环境保护总局. GB/T 18883—2002 室内空气质量标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.

- [3] 中华人民共和国卫生部. GBZ/T 155—2002 空气中氡浓度的闪烁瓶测定方法[S]. 北京: 法律出版社, 2002.
- [4] 中华人民共和国国家环境保护局. GB/T 14582—1993 环境空气中氡的标准测量方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1993.
- [5] 中国实验室国家认可委员会. GB/T 15483.1—1999 利用实验室间比对的能力验证——第 1 部分: 能力验证计划的建立和运作(ISO/IEC Guide43-1, IDT)[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- [6] 中国实验室国家认可委员会. GB/T 15483.2—1999 利用实验室间比对的能力验证——第 2 部分: 实验室认可机构对能力验证的选择和使用(ISO/IEC Guide43-2, IDT)[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.
- [7] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL02: 2007 能力验证结果的统计处理和评价指南[S/OL]. (2006-06-30) [2009-03-06]. <http://www.cnas.org.cn/extra/co123/1153814692.pdf>.
- [8] 中国合格评定国家认可委员会. 实验室认可与管理基础知识[M]. 北京: 中国计量出版社, 2003: 85-96.
- [9] 国家认证认可监督管理委员会. 实验室资质认定工作指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2007: 11-47.
- [10] 中国合格评定国家认可中心. GB/T 27025—2008 检测和校准实验室能力的通用要求(ISO/IEC 17025: 2005, IDT)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

(收稿日期: 2009-10-14)

(编辑: 洪琪; 校对: 郭薇薇)

(上接第 367 页)

和经济的指标, 它可验证脏器重量改变是否与整体重量变化有关。本实验结果显示: 母体妊娠 9~15 天暴露 NP, 可导致仔鼠体重、脾脏重量和脏器系数明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 说明 NP 能透过胎盘屏障抑制仔鼠免疫系统的发育, 这将进而影响其功能。电镜观察见暴露组脾细胞核大、胞质深染, 部分染色质成块状浓集、边聚, 内质网丰富, 线粒体明显肿胀, 空泡化, 说明 NP 对脾细胞有毒性作用, 这将对免疫功能造成不可逆的影响。以往研究表明: 从孕期、哺乳期持续到第 64 天暴露 NP 的仔鼠, 其脾脏、胸腺重量及脏器系数均下降, 其体内自然杀伤细胞活性降低, 淋巴细胞亚群数量减少<sup>[4-7]</sup>, 都表明 NP 对免疫器官的毒性影响了机体免疫功能。本课题组以往研究还发现<sup>[8]</sup>: NP 可透过胎盘屏障致仔鼠胎盘和肝脏脂质过氧化损伤。本次研究显示, NP 暴露组脾脏组织 SOD 活力明显低于对照组, MDA 含量高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 说明成年仔鼠脾脏损伤可能是 NP 致组织内的氧自由基增多且得不到及时消除, 或者内源性氧自由基产生和消除失去正常平衡之故。另外, 本实验中脾脏重量及脏器系数均下降, 尤其是脏器系数是在抵消了因体重降低对脾脏重量减轻影响的情况下, 仍表现出剂量效应关系 ( $r_{\text{脏}} = -0.530$ ,  $P < 0.05$ ), 说明脾脏重量的降低不受体重影响, 但仅凭该点还难以推断 NP 对脾脏是否有特异毒性作用, 尚需进一步研究。

随着工业的发展, 人一生中很难避免接触环境中的内分泌干扰物, 包括 NP, 尤其是在妊娠过程中接触这类物质造成的潜在危害性更大, 因此孕妇与环境雌激素 NP 接触对后代健康

发育的影响应引起足够的重视并应对其进行深入的研究。

#### 参考文献:

- [1] 许洁, 范奇元, 胡斌丽, 等. 妊娠期壬基酚暴露对雄性仔鼠生长发育的影响[J]. 环境与健康. 2007, 24(11): 901-904.
- [2] 许洁, 俞捷, 刘晓云, 等. 壬基酚对胎鼠发育的毒性作用研究[J]. 工业卫生与职业病, 2009, 35(3): 132-134.
- [3] 许洁, 范奇元, 罗军敏, 等. 孕期壬基酚暴露对雄性仔鼠免疫功能影响[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(5): 611-612.
- [4] 马全祥, 范雪晖, 毛泽善. 壬基酚对小鼠免疫功能的影响[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(2): 201-202.
- [5] 胡双庆, 李延, 王珺, 等. 壬基酚对鲫鱼 (*Carassins auratus*) 巨噬细胞的免疫毒性[J]. 南京大学学报, 2004, 40(3): 341-348.
- [6] YAMASHITA U, KURODA E, TOSHIDA Y, et al. Effect of endocrine disruptors on immune responses in vivo[J]. J UOEH., 2003, 25(4): 365-374.
- [7] KARROW NA, GUO TL, DELCLOS KB, et al. Nonylphenol alters the activity of splenic NK cells and the numbers of leukocyte subpopulations in Sprague-Dawley rats: a two-generation feeding study[J]. Toxicology, 2004, 196(3): 237-245.
- [8] 许洁, 李研, 陈佳瑜, 等. 母体暴露壬基酚对仔鼠肝脏的损伤作用[J]. 现代预防医学, 2008, 35(1): 37-38.

(收稿日期: 2009-10-26)

(编辑: 洪琪; 校对: 郭薇薇)