增塑剂邻苯二甲酸二丁酯致血管内皮功能损伤及其机制

李帆¹, 张子绘¹, 谢新雅¹, 校蕾^{1*}, 汪南平^{2*}

1. 西安交通大学医学部基础医学院, 心血管研究中心, 西安 710061;

2. 大连医科大学医学科学研究院, 大连 116044

* 联系人, E-mail: xiaolei0122@xjtu.edu.cn; nanpingwang2003@yahoo.com

收稿日期: 2017-10-16; 接受日期: 2017-11-06; 网络版发表日期: 2018-04-16

国家自然科学基金(批准号: 31430045, 81470373, 81770497)资助

摘要 邻苯二甲酸二丁酯(DBP)是一种常用的增塑剂, 在环境中广泛存在. DBP可以经口、呼吸吸入、皮肤接触、医疗暴露等途径进入人体. 已报道DBP具有多种生物毒性, 包括遗传毒性、神经毒性、生殖毒性和免疫毒性等. 本研究以大鼠(*Rattus norvegicus*)和小鼠(*Mus musculus*)胸主动脉以及牛(*Bovine*)主动脉血管内皮细胞为研究对象, 揭示增塑剂DBP对血管内皮功能的影响. 实验分别采用不同浓度的DBP (0, 5, 25 $\mu\text{mol/L}$)对大鼠和小鼠胸主动脉进行体外孵育, 采用血管张力仪检测血管舒张功能的变化. 分别采用一氧化氮(NO)探针和活性氧簇(ROS)探针, 检测血管内皮细胞内NO和ROS含量. 实时定量PCR和蛋白免疫印迹技术检测DBP对血管内皮细胞NLRP3炎症小体的激活作用. 结果表明, DBP浓度依赖性损伤大鼠和小鼠血管舒张功能; 在培养的内皮细胞中, DBP减少了NO的释放, 增加了ROS的含量; DBP能够激活内皮细胞NLRP3炎症小体, 且ROS清除剂二巯苯磺酸钠能够抑制DBP引起的NLRP3炎症小体的激活, 改善DBP引起的血管舒张功能障碍. 上述结果提示, 增塑剂DBP对血管内皮功能的损伤可能与ROS引起的NLRP3炎症小体的激活以及NO释放减少有关.

关键词 增塑剂, 邻苯二甲酸二丁酯, 内皮功能, NLRP3炎症小体, 活性氧簇

增塑剂(plastisizers)又称塑化剂, 其种类繁多, 是工业生产中广泛使用的高分子材料助剂, 常见于人们日常生活中的各类塑料制品中, 如聚氯乙烯 (polyvinyl chloride, PVC)保鲜膜、PVC制造的玩具、化妆品以及医用材料等. 其中, 邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)与邻苯二甲酸二异辛酯(di(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP)是最常见、使用最普遍的增塑剂^[1]. 增塑剂易渗出而被人体吸收, 对人体产生的危害日益

受到关注, 特别是对透析、输血的病人而言, 暴露在增塑剂中的风险更高. 研究显示, 在储血袋中, 储存一天的血液中DEHP的含量大约为34.3 $\mu\text{mol/L}$, 而到42天时, DEHP的含量可以上升12.6倍, 达到433.2 $\mu\text{mol/L}$ ^[2]. 通过导管的单次输血, 就可以使新生儿的DEHP血浆浓度达到6.1~21.6 $\mu\text{g/mL}$ (1.9~6 $\mu\text{mol/L}$)^[3]. 在临床上, 输血病人在输血30 min后, 血液中的DEHP可升高7倍, 且富集在红细胞上的DEHP需要24 h才能被全部从红

引用格式: 李帆, 张子绘, 谢新雅, 等. 增塑剂邻苯二甲酸二丁酯致血管内皮功能损伤及其机制. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 535–543
Li F, Zhang Z H, Xie X Y, et al. Plasticizer dibutyl phthalate impairs vascular endothelial function (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 535–543, doi: 10.1360/N052017-00247

细胞上清除^[4]。慢性肾功能衰竭的透析病人血液中也检测出高浓度的增塑剂, 这些增塑剂均来自于透析装置中, 吸收量为457 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/天^[5-7]。大量文献已经报道, 增塑剂与炎症、肿瘤、内分泌、生殖系统疾病以及呼吸系统疾病等密切相关^[8-11], 而在输血或透析过程中, 大量的增塑剂会在血液中富集, 从而进入循环系统。然而, 增塑剂是否对心血管功能有影响还未见报道。

血管内皮细胞(endothelial cell, EC)是介于血流和血管壁组织之间的一层单核细胞, 充当着循环血液与血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)之间的屏障。同时, EC介导循环血液与组织之间的相互作用, 发挥运输、内分泌、抗凝、调节血管张力、白细胞黏附、血管中膜增殖等多种生理功能。在生理状态下, EC通过合成和分泌多种血管活性因子, 调节血管的收缩与舒张。NO作为内皮细胞重要的血管舒张因子, 在调节血管功能与结构稳态中发挥重要作用^[12]。NO的生物利用度降低是血管内皮功能紊乱的重要因素, 内皮功能紊乱主要表现为血管内皮依赖性舒张功能的减退, 这种改变也是高血压、动脉粥样硬化等血管性疾病发生、发展的前期阶段。因此, 增塑剂是否影响血管内皮功能这一问题亟待研究。

炎症小体(inflammasome)是一类可识别细胞内病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)或损伤相关分子模式(damage associated molecular patterns, DAMPs)的模式识别受体, 与半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1 (Caspase-1)等蛋白形成的复合物, 通过调控炎症因子如IL-1 β 的释放, 作为机体固有免疫的感受器发挥生理功能^[13]。激活炎症小体可以抵抗病原体感染和应激损伤, 但过度活化的炎症小体会造成炎症效应的放大和器官损伤。在炎症小体中, 目前对核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide-binding oligomerization domain, NOD)样受体家族含pyrin结构域蛋白3 (NOD-like receptor family, pyrin domain-containing protein 3, NLRP3)炎症小体的结构和功能研究最为清楚。NLRP3炎症小体由NOD样受体(NOD-like receptors, NLRs)、凋亡相关的斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)和Caspase-1组成。其激活后可通过Caspase-1水解IL-1 β 前体(pro-IL-1 β)和IL-18前体(pro-IL-18), 使其成熟并释放^[14]。有研究表明, NLRP3炎症小体在糖尿病、动脉

粥样硬化、冠状动脉内皮功能障碍等循环系统疾病中都有重要的病理生理学作用^[15]。

本研究显示, 增塑剂DBP能够损伤大鼠(*Rattus norvegicus*)和小鼠(*Mus musculus*)胸主动脉的舒张功能。进一步通过血管内皮细胞体外实验证实, DBP能够引起内皮细胞活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)上升, 同时激活了NLRP3炎症小体, 并伴随着NO释放的减少, 进而导致血管内皮功能受损。

1 材料与方法

1.1 动物

6~8周龄C57BL/6小鼠和SD大鼠(200~250 g)购自西安交通大学动物实验中心, 所有动物实验方法按照《实验动物管理条例》进行, 并由西安交通大学动物伦理委员会批准。

1.2 化学药品及试剂

DBP、二联苯碘(diphenylene iodonium, DPI)、噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)、硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)、二氢乙啶(dihydroethidium, DHE)荧光探针购自Sigma公司(美国); 一氧化氮(nitric oxide, NO)探针(4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein, DAF-FM DA)荧光探针购自Invitrogen公司(美国); 兔多克隆抗NLRP3抗体购自Abcam公司(美国); 兔多克隆抗Caspase-1抗体购自Cell Signaling Technology公司(美国); 鼠多克隆抗 β -actin抗体购自Santa Cruz Biotechnology公司(美国); 二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)购自MP Biomedicals公司(美国); DMEM购自Gibco公司(美国); 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自Hyclone公司(美国); PVDF膜购自Roche公司(美国)。

1.3 牛主动脉内皮细胞的分离培养

将主动脉放入含青霉素和链霉素的D-Hanks液中, 去除血管外膜的脂肪和纤维组织并剪成8 cm的长段, 纵向切开血管壁, 0.1% I型胶原酶溶液37℃消化10 min。收集消化液, 500 $\times$ g离心10 min, 吸去上清, 加入培养液重悬细胞, 置于5%的CO₂, 37℃饱和湿度的培养箱中培养。

1.4 主动脉环制备与血管环张力测定

分离大鼠或小鼠胸主动脉, 将血管分为2 mm长的血管环. 将动脉环随机分组, 分别采用对照(DMSO)、DBP (5, 25, 100 $\mu\text{mol/L}$)处理大鼠及小鼠血管环, 将血管环在37℃的Krebs溶液中平衡1 h, 使其基础张力维持在10 mN (大鼠)或3 mN (小鼠). KCl (60 mmol/L)处理血管后, 苯肾上腺素(10 $\mu\text{mol/L}$)预收缩血管, 血管达到稳定收缩状态后, 依次加入乙酰胆碱(10^{-3} ~10 $\mu\text{mol/L}$)或硝普钠(3×10^{-4} ~1 $\mu\text{mol/L}$), 血管张力仪(Danish Myo Technology, DMT)记录血管张力变化.

1.5 MTT检测细胞活性

牛主动脉内皮细胞(bovine aorta endothelial cell, BAEC)细胞种于96孔板, 分别使用0, 5, 25, 100 $\mu\text{mol/L}$ DBP处理细胞48 h, 每孔加入MTT (5 mg/mL)20 μL , 37℃孵育4 h后, 加入150 μL DMSO, 震荡10 min后560 nm波长检测吸光值.

1.6 内皮细胞中NO与ROS的检测

生理盐水清洗细胞, 分别使用终浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 的NO荧光探针DAF-FM DA或5 $\mu\text{mol/L}$ 的ROS荧光探针DHE孵育细胞30 min, 激光扫描共聚焦显微镜下检测荧光, 用相应的Olympus Fluoview软件分析荧光强度, 进行统计学分析.

1.7 蛋白免疫印迹实验

蛋白样品在10% SDS-PAGE胶中分离, 转至PVDF膜, 封闭后孵育一抗和二抗, ECL化学发光, 采用Image J软件进行灰度值测定.

1.8 实时定量反转录PCR分析

采用20 μL 扩增体系, 程序如下: 95℃变性30 s; 56℃退火30 s; 72℃延伸30 s, 共35个循环. 引物序列: *NLRP3* (ID:538639)正义链: 5'-CAACGGGGAAGA-GAAGGCAT-3', 反义链: 5'-TTGAGGTTACGCTCT-CACC-3'; β -actin (ID:280979)正义链: 5'-GGCATCCTGACCCTCAAGTA-3', 反义链: 5'-CACGGAGCTCGTTGTAGA-3'.

1.9 统计学分析

实验数据采用GraphPad Prism 5软件进行统计分析. 采用 t 检验分析两组间的测量值的差异, 采用one-way ANOVA分析多组之间的差异. $P<0.05$ 为差异显著.

2 结果

2.1 DBP损伤大鼠及小鼠胸主动脉舒张功能

为了探究DBP对血管舒张功能的影响, 对SD大鼠和C57BL/6小鼠胸主动脉分别使用不同浓度DBP (0, 5, 25 $\mu\text{mol/L}$)孵育6或48 h检测血管舒张功能. 如图1A所示, DBP孵育6 h能够浓度依赖性降低乙酰胆碱诱导的大鼠血管舒张反应; 而DBP孵育6 h则对乙酰胆碱诱导的小鼠血管舒张反应无显著影响(网络版附1A), DBP孵育48 h能够浓度依赖性降低乙酰胆碱诱导的小鼠血管舒张反应(图1B). 此外, 如图1C所示, 给予小鼠胸主动脉高浓度的DBP (100 $\mu\text{mol/L}$)孵育48 h, 乙酰胆碱诱导的血管舒张作用完全受到抑制. 为了进一步明确DBP对血管舒张功能的损伤是否为内皮依赖性, 分别对SD大鼠和C57BL/6小鼠胸主动脉使用不同浓度DBP (0, 5, 25 $\mu\text{mol/L}$)孵育6和48 h, 进而采用NO供体SNP诱导血管舒张反应. 如图1D和E所示, DBP对SNP诱导的血管舒张反应并没有影响. 以上结果提示, DBP显著损伤乙酰胆碱诱导的血管舒张反应, 在高浓度DBP的作用下, 血管舒张功能被完全抑制, 且这种作用是内皮依赖性的, 并没有对平滑肌的功能产生影响.

2.2 DBP降低内皮细胞NO含量

血管舒张功能主要依赖于内皮细胞, 内皮细胞的损伤或功能紊乱会导致血管舒张功能障碍. 在体外选取BAEC细胞为研究对象, 探讨DBP损伤血管舒张功能的机制. 首先, 观察了DBP对BAEC细胞活性的影响. 分别采用对照(DMSO)、DBP (5, 25, 100 $\mu\text{mol/L}$)处理BAEC细胞48 h, 如图2A所示, 5及25 $\mu\text{mol/L}$ 的DBP对细胞活力没有明显影响, 而100 $\mu\text{mol/L}$ DBP则显著抑制了BAEC细胞的活力. 因此, 为了排除DBP对血管内皮细胞毒性的作用, 后续的细胞实验中, 选用了5和25 $\mu\text{mol/L}$ 的DBP进一步研究分子机制.

NO在内皮依赖性的血管舒张反应中发挥着重要

图1 DBP对大鼠及小鼠胸主动脉环舒张反应的影响

DBP (0, 5, 25 μmol/L)分别孵育大鼠胸主动脉6 h (A和D), 小鼠胸主动脉48 h (B和E); DBP (0, 100 μmol/L)孵育小鼠胸主动脉48 h (C). 血管张力仪检测乙酰胆碱(A~C)或硝普钠(D和E)诱导的血管舒张作用. $n=3\sim6$, A~E右图分别为左图中血管张力实时记录代表图. *: 与对照组(DBP 0 μmol/L)比较 $P<0.05$

图 2 DBP对内皮细胞NO含量的影响(网络版彩图)

A: DBP (0, 5, 25, 100 μmol/L)处理BAEC细胞48 h, MTT法检测BAEC细胞存活率; B: DBP (0, 5, 25 μmol/L)处理BAEC细胞48 h, 荧光探针DAF-FM DA检测细胞中NO含量; C: 为B图荧光定量结果. $n=3$, *: 与对照组(DBP 0 μmol/L)比较 $P<0.05$

作用, 为了探究DBP引起的血管舒张功能受损是否与NO的减少有关, 检测了DBP对内皮细胞NO释放的影响. 如图2B和C显示, 5和25 μmol/L DBP分别处理内皮细胞48 h后, DAF-FM DA荧光探针均能检测到细胞内NO水平明显降低, 且呈浓度依赖性. 以上结果提示, DBP损伤血管舒张功能与内皮细胞NO的降低有关.

2.3 DBP增加内皮细胞中ROS含量

ROS降低NO的生物利用度, 从而诱导内皮功能异常. 为此, 检测了DBP对BAEC细胞中ROS含量的影响. 如图3A和B, 不同浓度DBP处理内皮细胞48 h后, 与对照组相比较, 5和25 μmol/L DBP处理的内皮细胞ROS荧光信号呈现浓度依赖性的增加. 以上结果提示, DBP能够增加内皮细胞ROS的含量.

2.4 DBP通过ROS途径激活内皮细胞NLRP3炎症小体

NLRP3炎症小体的激活与内皮功能紊乱有着密切联系^[16]. 为此, 检测DBP是否能够激活内皮细胞NLRP3炎症小体. 采用0, 5和25 μmol/L的DBP处理BAEC细胞48 h, 如图4A~C所示, DBP能够同时上调NLRP3的mRNA表达水平和蛋白水平, Caspase-1的成熟体Caspase-1 p20蛋白水平也能被DBP明显上调. 以上结果提示, DBP能够浓度依赖性的激活内皮细胞NLRP3炎症小体, 进而损伤内皮功能. 随后, 研究了DBP激活NLRP3炎症小体的分子机制. 图3结果提示, DBP能够增加内皮细胞ROS含量. 为了探究DBP激活NLRP3炎症小体是否与细胞ROS增多有关, 采用特异的ROS抑制剂DPI (10 μmol/L)预处理内皮细胞1 h, 再

加入DBP (25 μmol/L)处理细胞48 h, 如图4D和E所示, 在DPI预处理组, NLRP3以及Caspase-1 p20的蛋白水平明显受到了抑制. 以上结果提示, DBP诱导内皮细胞NLRP3炎症小体的激活依赖于ROS含量的增多.

2.5 清除ROS能够改善DBP引起的血管舒张功能障碍

为了进一步探究在血管功能实验中, 清除ROS是否能够改善DBP对血管内皮舒张功能的损伤, 采用DPI预处理小鼠胸主动脉1 h, 再给予25 μmol/L DBP处理48 h. 如图5所示, 在无DPI处理组, DBP能够降低乙酰胆碱诱导的小鼠血管舒张反应, 而在有DPI预处理组, DBP对乙酰胆碱诱导的小鼠血管舒张反应没有影响. 以上结果提示, ROS在DBP引起的血管舒张功能损伤中有重要作用, 清除ROS能够改善DBP引起的血管舒张功能障碍.

3 讨论

随着塑料制品的大规模使用, 人们在生活中会越来越多地接触到作为塑料增塑剂的DBP. DBP以氢键或范德华力与塑料分子结合, 遇到水或有机溶剂时极易释放出来. 大量研究表明, DBP通过影响肝脏、肾脏、生殖系统、神经以及心、肺等, 对人类健康产生了极大的危害. 本研究首次揭示DBP对循环系统内皮功能的影响.

内皮细胞的结构和功能直接影响血管的功能. 内皮细胞的功能可通过内皮依赖性血管舒张和收缩能力来反映. 当内皮细胞受损后内皮功能发生障碍, 其主要

图3 DBP对内皮细胞ROS含量的影响(网络版彩图)

A: DBP (0, 5, 25 μmol/L)处理BAEC细胞48 h, 荧光探针DHE检测细胞中ROS含量, B: 为A图荧光定量结果. $n=3$, *: 与对照组(DBP 0 μmol/L)比较 $P<0.05$

图4 DBP通过ROS途径激活内皮细胞NLRP3炎症小体

DBP (0, 5, 25 μmol/L)处理BAEC 48 h, 实时定量PCR检测NLRP3 mRNA表达水平(A), 蛋白免疫印迹检测NLRP3与Casp-1 p20蛋白水平(B); C: 为B图的定量结果, *, 与对照组(DBP 0 μmol/L)比较, $P<0.05$. DPI (10 μmol/L)预处理BAEC细胞1 h后, 25 μmol/L DBP再处理细胞48 h, 蛋白免疫印迹检测NLRP3与Casp-1 p20蛋白水平(D); E: 为D图定量结果. $n=3$, *: $P<0.05$, NS: 无统计学差异

表现为内皮收缩因子(如内皮素等)释放增加, 内皮舒张因子(如NO等)释放减少^[17]. 生理情况下, 乙酰胆碱作用于内皮细胞, 使其合成和释放NO增加, 从而引起邻近的血管平滑肌的松弛, 从而通过测量血管环对于乙酰胆碱的反应可以反映血管内皮依赖性的舒张功能. 本实验发现, DBP处理组血管环对乙酰胆碱介导的内皮依赖性舒张反应显著降低, 而对NO供体硝普钠引起的舒张反应无影响(图1).

NO生物利用度降低和ROS过量生成是导致内皮

功能紊乱的重要因素. 许多研究表明, 内皮型NO合酶脱偶联(eNOS uncoupling)是导致NO水平下降和氧自由基水平升高的重要机制, 其中ROS水平升高又是造成eNOS脱偶联的主要原因^[18]. 本研究证实, 在DBP刺激下, 内皮细胞NO释放量明显降低, 同时, ROS含量显著增加(图2和3).

炎症介质在动脉粥样硬化、高血压等血管疾病的整个病理过程中都起着重要作用^[19,20]. 有报道指出, 在THP-1细胞中, 增塑剂能够诱导NF-κB入核, 增加TNF-

图5 清除ROS能够改善DBP引起的血管舒张功能障碍

A: DPI (1 $\mu\text{mol/L}$)预处理小鼠胸主动脉1 h后, DBP (25 $\mu\text{mol/L}$)再处理48 h, 血管张力仪检测乙酰胆碱诱导的血管舒张作用. $n=3$, B: A图中血管张力实时记录代表图. *: 与对照组比较 $P<0.05$

α , IL-1 β , IL-6, IL-8等炎症因子的释放^[21]. 增塑剂也可以剂量依赖性上调人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein cells, HUVCs)的ICAM-1, IL-6, IL-8等炎症因子的表达^[22,23]. 此外, 炎症小体对于机体炎症的发生与控制也具有重要的调节作用. 炎症小体活化后产生的IL-1 β 和IL-18等促炎因子的成熟及分泌与机体抵御病原微生物感染、维持自身稳态密切相关. 炎症小体持续活化可引起促炎因子过度表达, 导致慢性炎症的发生, 进而影响到血管内皮功能以及心血管系统疾病^[24]. 本研究显示, DBP可激活内皮细胞NLRP3炎症小体(图4). 关于NLRP3炎症小体的激活机制, 目前认为主要有: (i) 离子环境的改变. 当ATP与细胞膜表面的三磷酸腺苷-配体门控离子通道P2X7受体(adenosine triphosphate-ligand-gated ion channel P2X7 receptor, ATP-P2X7R)结合后, P2X7R被活化, 从而使 K^+ 外流, Ca^{2+} 内流, 并招募细胞膜上缝隙连接半通道泛连接蛋白-1 (pannexin-1, Panx-1), 在细胞膜上形成小孔, 进而允许微生物分子进入细胞质, 激活炎症小体^[25]. (ii) ROS的产生. ROS能够引起硫氧还蛋白相互作用蛋白(thioredoxin(TRX)-interacting protein, TXNIP)和NLRP3相互作用, 激活炎症小体^[26]. (iii) 溶酶体破坏, 进而导致组织蛋白酶B进入细胞质, 激活NLRP3炎症小体^[27]. 有研究报道, ROS是调控NLRP3炎症小体活化的关键信号^[28]. 本研究显示, DBP在BAEC细胞中激活NLRP3炎

症小体与ROS的产生有关(图4).

NO在正常的内皮功能中起着血管扩张和维持血管稳态的作用, ROS和NLRP3炎症小体的激活均可减少NO的生成, 从而导致内皮功能障碍的发生^[29]. 相反, NO能够抑制NLRP3炎症小体的激活^[30]. 研究显示, 脂联素(adiponectin)能够通过抑制NLRP3炎症小体的激活来削弱高糖及高脂对内皮细胞的损伤, 而过表达NLRP3则能取消这种内皮的保护作用^[31]. 在内皮细胞中, 糖基化终产物(advanced glycation end products, AGE)可诱导ROS-NLRP3炎症小体的激活, eNOS的蛋白水平下降, 从而导致内皮功能紊乱. 而当内皮细胞缺失NLRP3后, AGE引起的eNOS的表达下调可被逆转^[32]. 此外, 还有研究显示, 在内皮细胞中, 氧化三甲胺(trimethylamine N-oxide, TMAO)在能够激活ROS-TXNIP-NLRP3炎症小体通路的同时, 也抑制了eNOS水平以及NO的生成, 而这些作用均可被NLRP3的缺失所逆转^[33]. 综上, ROS、炎症小体和NO之间有着密切的联系. 本研究显示, 清除ROS能够抑制DBP引起的NLRP3炎症小体的激活, 同时能够改善DBP引起的血管舒张功能障碍(图5).

综上所述, 本研究阐释了ROS介导的NLRP3炎症小体的激活以及DBP引起的NO的下降可能是DBP损伤血管舒张功能主要原因, 本研究为增塑剂引起的内皮损伤提供了理论依据.

参考文献

- 1 Tickner J A, Schettler T, Guidotti T, et al. Health risks posed by use of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: a critical

- review. *Am J Ind Med*, 2001, 39: 100–111
- 2 Rael L T, Bar-Or R, Ambruso D R, et al. Phthalate esters used as plasticizers in packed red blood cell storage bags may lead to progressive toxin exposure and the release of pro-inflammatory cytokines. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2: 166–171
 - 3 Plonait S, Nau H, Maier R, et al. Exposure of newborn infants to di-(2-ethylhexyl)-phthalate and 2-ethylhexanoic acid following exchange transfusion with polyvinylchloride catheters. *Transfusion*, 1993, 33: 598–605
 - 4 Varlet-Marie E, J Ashenden M, Moerkeberg J, et al. Relevance of di(2-ethylhexyl)phthalate blood levels for blood transfusion detection. *Bioanalysis*, 2014, 6: 1591–1595
 - 5 Pollack G M, Buchanan J F, Slaughter R L, et al. Circulating concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate and its de-esterified phthalic acid products following plasticizer exposure in patients receiving hemodialysis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1985, 79: 257–267
 - 6 Kambia K, Dine T, Azar R, et al. Comparative study of the leachability of di(2-ethylhexyl) phthalate and tri(2-ethylhexyl) trimellitate from haemodialysis tubing. *Int J Pharm*, 2001, 229: 139–146
 - 7 Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, et al. NTP center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-hexyl phthalate. *Reprod Toxicol*, 2002, 16: 709–719
 - 8 Doull J, Cattley R, Elcombe C, et al. A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate: application of the new U.S. EPA risk assessment guidelines. *Regul Toxicol Pharmacol*, 1999, 29: 327–357
 - 9 Lovekamp-Swan T, Davis B J. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect*, 2003, 111: 139–145
 - 10 Chen S Q, Chen J N, Cai X H. Perinatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate leads to restricted growth and delayed lung maturation in newborn rats. *J Perinat Med*, 2010, 38: 515–521
 - 11 乔丽雨, 郑力行, 蔡德培. 上海市女童血清中邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸-2-乙基己酯水平与性早熟关系研究. *卫生研究*, 2007, 36: 93–95
 - 12 Godo S, Shimokawa H. Endothelial functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37: e108–e114
 - 13 Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*, 2010, 140: 821–832
 - 14 Xie Q, Shen W W, Zhong J, et al. Lipopolysaccharide/adenosine triphosphate induces IL-1 β and IL-18 secretion through the NLRP3 inflammasome in RAW264.7 murine macrophage cells. *Int J Mol Med*, 2014, 34: 341–349
 - 15 De Nardo D, Latz E. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease. *Trends Immunol*, 2011, 32: 373–379
 - 16 Koka S, Xia M, Chen Y, et al. Endothelial NLRP3 inflammasome activation and arterial neointima formation associated with acid sphingomyelinase during hypercholesterolemia. *Redox Biol*, 2017, 13: 336–344
 - 17 Sánchez A, Martínez P, Muñoz M, et al. Endothelin-1 contributes to endothelial dysfunction and enhanced vasoconstriction through augmented superoxide production in penile arteries from insulin-resistant obese rats: role of ET(A) and ET(B) receptors. *Br J Pharmacol*, 2014, 171: 5682–5695
 - 18 Xu C, Tang F, Lu M, et al. Astragaloside IV improves the isoproterenol-induced vascular dysfunction via attenuating eNOS uncoupling-mediated oxidative stress and inhibiting ROS-NF- κ B pathways. *Int Immunopharmacol*, 2016, 33: 119–127
 - 19 Wang Y, Han Z, Fan Y, et al. microRNA-9 inhibits NLRP3 inflammasome activation in human atherosclerosis inflammation cell models through the JAK1/STAT signaling pathway. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41: 1555–1571
 - 20 Liang Y F, Zhang D D, Yu J, et al. Hydrogen sulfide in paraventricular nucleus attenuates blood pressure by regulating oxidative stress and inflammatory cytokines in high salt-induced hypertension. *Toxicol Lett*, 2017, 270: 62–71
 - 21 Nishioka J, Iwahara C, Kawasaki M, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces production of inflammatory molecules in human macrophages. *Inflamm Res*, 2012, 61: 69–78
 - 22 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. *Inflammation*, 2012, 35: 859–870
 - 23 Wang J, Liao Y, Fan J, et al. Apigenin inhibits the expression of IL-6, IL-8, and ICAM-1 in DEHP-stimulated human umbilical vein endothelial cells and *in vivo*. *Inflammation*, 2012, 35: 1466–1476
 - 24 Mukohda M, Stump M, Ketsawatsomkron P, et al. Endothelial PPAR- γ provides vascular protection from IL-1 β -induced oxidative stress. *Am J Physiol-Heart Circul Physiol*, 2016, 310: H39–H48
 - 25 Ni J, Zhang Z, Luo X, et al. Plasticizer DBP activates NLRP3 inflammasome through the P2X₇ receptor in HepG2 and L02 cells. *J Biochem Mol*

- Toxicol*, 2016, 30: 178–185
- 26 Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol*, 2010, 10: 210–205
 - 27 Xu F, Wang F, Wen T, et al. Inhibition of NLRP3 inflammasome: a new protective mechanism of cinnamaldehyde in endotoxin poisoning of mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2017, 39: 296–304
 - 28 Zhou R, Yazdi A S, Menu P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 2011, 469: 221–225
 - 29 Zhang Y, Li X, Pitzer A L, et al. Coronary endothelial dysfunction induced by nucleotide oligomerization domain-like receptor protein with pyrin domain containing 3 inflammasome activation during hypercholesterolemia: beyond inflammation. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22: 1084–1096
 - 30 Mishra B B, Rathinam V A, Martens G W, et al. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β . *Nat Immunol*, 2013, 14: 52–60
 - 31 Zhang J, Xia L, Zhang F, et al. A novel mechanism of diabetic vascular endothelial dysfunction: hypoadiponectinemia-induced NLRP3 inflammasome activation. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1863: 1556–1567
 - 32 Deng X, Huang W, Peng J, et al. Irisin alleviates glycation end products-induced inflammation and endothelial dysfunction via inhibiting ROS-NLRP3 inflammasome signaling. *Inflammation*, 2018, 41: 260–275
 - 33 Sun X, Jiao X, Ma Y, et al. Trimethylamine N-oxide induces inflammation and endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 481: 63–70

Plasticizer dibutyl phthalate impairs vascular endothelial function

LI Fan¹, ZHANG ZiHui¹, XIE XinYa¹, XIAO Lei¹ & WANG NanPing²

¹ Cardiovascular Research Center, School of Basic Medical Sciences, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China;

² The Advanced Institute for Medical Sciences, Dalian Medical University, Dalian 116044, China;

Dibutyl phthalate (DBP) is one of the most widely used plasticizers which our bodies are commonly exposed to. DBP is easily absorbed through the mouth, breath, skin and medical exposures. DBP has been previously described to have a number of toxic effects on the neural, reproductive and immune systems in addition to genotoxicity. By using rat and mouse thoracic aortas (TA) and bovine aortic endothelial cells (BAECs), we examined the effects of DBP on vascular endothelial function. Vascular relaxation of the aortas was measured by using a Multi Myograph system. Nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) were determined by using 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein (DAF-FM DA) and dihydroethidium (DHE) probes. Expressions of NLRP3 and caspase-1 were measured by using quantitative reverse transcriptase-PCR (qRT-PCR) and western blot. The results showed that DBP impaired endothelium-dependent vasorelaxation in rat and mouse TA in a dose-dependent manner. Exposure to DBP activated NLRP3 inflammasome and decreased NO but increased ROS productions in ECs. However, diphenylene iodonium, a scavenger of ROS, abrogated the DBP-induced NLRP3 inflammasome activation and impairment of vasorelaxation. Collectively, we demonstrated that DBP impaired vascular endothelial function, which was associated with the activation of ROS-NLRP3 inflammasome and the reduced NO bioavailability.

plasticizer, dibutyl phthalate, endothelial function, NLRP3 inflammasome, reactive oxygen species

doi: 10.1360/N052017-00247