

韩佳萦, 苏伊玲, 熊 丽, 等. 塑化剂 DEHP 暴露对小鼠巨噬细胞的免疫毒性作用[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(4): 673–679.

HAN Jia-ying, SU Yi-ling, XIONG Li, et al. Immunotoxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate to macrophages[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(4): 673–679.

塑化剂 DEHP 暴露对小鼠巨噬细胞的免疫毒性作用

韩佳萦¹, 苏伊玲², 熊 丽², 耿 辉^{2*}

(1. 华中师大一附中, 武汉 430223; 2. 华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079)

摘要: 为了研究邻苯二甲酸二乙基己酯 (DEHP) 对巨噬细胞的免疫毒性, 采用不同浓度剂量 DEHP 处理小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 细胞和腹腔巨噬细胞, 通过检测细胞吞噬、细胞因子分泌及活性氧水平变化探讨 DEHP 暴露对免疫系统的毒性作用。结果表明: 高浓度 (20、40、80 mg·L⁻¹) DEHP 处理 48 h 后对 RAW264.7 细胞可造成急性损伤。低浓度 (1、5、10 mg·L⁻¹) DEHP 连续染毒处理 10 代后, RAW264.7 细胞吞噬红细胞百分率及吞噬指数显著抑制 ($P < 0.05$)。RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 、IL-12 和 IL-23 等细胞因子能力明显降低, 并表现出一定的剂量-效应关系。随着 DEHP 暴露浓度的增加, DEHP 染毒造成 RAW264.7 细胞内活性氧产生, 受损加剧。除此之外, DEHP 暴露还能明显抑制小鼠腹腔巨噬细胞对红细胞的吞噬能力 ($P < 0.05$)。以上结果表明, DEHP 暴露对巨噬细胞具有免疫抑制作用, 损伤了巨噬细胞正常免疫功能发挥。

关键词: 邻苯二甲酸二乙基己酯 (DEHP); 巨噬细胞; RAW264.7 细胞; 免疫毒性

中图分类号: X503.22 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2018)04-0673-07 doi:10.11654/jaes.2017-1495

Immunotoxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate to macrophages

HAN Jia-ying¹, SU Yi-ling², XIONG Li², GENG Hui^{2*}

(1. High School Affiliated to Huazhong Normal University, Wuhan 430223, China; 2. College of Life Science, Huazhong Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: To evaluate the potential immunotoxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), RAW264.7 cells and peritoneal macrophages were treated with different concentrations of DEHP. Further, the phagocytosis efficiency and cytokine secretion and reactive oxygen species (ROS) production ability of RAW264.7 cells, and adherence ability and phagocytosis efficiency of peritoneal macrophages were determined. The results revealed that the phagocytosis efficiency of RAW264.7 cells treated with 1, 5 mg·L⁻¹ and 10 mg·L⁻¹ DEHP was significantly inhibited. The concentration of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-12, and IL-23 decreased significantly in the cell culture supernatant. Furthermore, there was a dose-effect relationship between DEHP exposure and concentration of TNF- α , IL-12, and IL-23. The production of ROS in DEHP-treated RAW264.7 cells was inhibited significantly with increase in the concentration of DEHP. Further, DEHP inhibited the adherence ability and phagocytosis efficiency of peritoneal macrophages collected from DEHP-treated mice. These results indicate that DEHP treatment can inhibit the normal function of both RAW264.7 cells and peritoneal macrophages.

Keywords: di(2-ethylhexyl)phthalate; macrophage; RAW264.7 cell; immunotoxicity

收稿日期: 2017-09-29 录用日期: 2018-02-08

作者简介: 韩佳萦 (2001—), 女, 湖北武汉人。E-mail: hanjiaying3639@163.com

* 通信作者: 耿 辉 E-mail: genghui@mail.ccnu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30972693); 湖北省自然科学基金重点项目 (2014CFA079); 中央高校基本科研业务费资助项目 (CCNU16A02044)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China (30972693); Hubei Province Natural Science Key Foundation Project (2014CFA079); Fundamental Research Funds for the Central Universities (CCNU16A02044)

邻苯二甲酸二-2-乙基己酯(di-2-ethylhexylphthalate, DEHP), 又名邻苯二甲酸二异辛酯, 是邻苯二甲酸酯类化合物(PAE)的重要成员, 是塑料材料中使用量最大的增塑剂, 在PVC材料中DEHP含量高达30%~50%^[1]。DEHP在塑料中以游离的形式存在, 其与塑料成分之间不是以共价化学键结合, 而是通过氢键或范德华力相连, 因此极易释放到环境中。据文献报道, DEHP在长江、黄河、珠江、辽河和海河等我国主要水系流域均有高浓度检出。有文献报道重庆市和三峡库区水环境中DEHP最高浓度达到 $5.421 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 对浙江省10个水厂的源水进行抽样分析, 发现每个水厂均有邻苯二甲酸酯类检出, 其中DEHP最高含量达到 $17 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[2]。而且DEHP很难降解, 在环境中存留时间较长, 在生物体内具有富集效应, 对人体健康和环境安全造成极大的威胁。

DEHP受到广泛的关注还与其多重毒性作用有关。许多动物毒理学研究表明, DEHP具有肝脏毒性、生殖毒性、发育毒性和致癌性等多种毒性, 并具有类雌性激素活性^[1,3-7]。目前有关DEHP对免疫系统作用, 特别是介导超敏反应发生已有一些研究。Lee等^[8]报道DEHP可诱导CD4⁺T细胞向Th2型细胞分化并分泌IL-4, IL-4刺激B细胞产生IgE型抗体并通过介导炎症级联反应导致超敏反应。流行病学调查研究证实, 职业性接触DEHP的人群发生哮喘的几率大幅增加。Hoppin等^[9]报道DEHP及其体内代谢产物邻苯二甲酸单苄酯(Monobenzyl phthalate, MBzP)能够诱导与哮喘、花粉热、关节炎等疾病密切相关的19种特异性IgE抗体的产生, 提示DEHP接触与哮喘、花粉热、关节炎等超敏反应及关节炎为代表的自身免疫性疾病的发病有关。DEHP可明显增加人和大鼠免疫细胞膜表面分子CD11b的表达, CD11b专司免疫细胞从血管至炎症部位的迁移与附着, 表明DEHP能够影响免疫炎症反应^[10]。Kuo等^[11]发现DEHP通过抑制MAPK-MEK1/2-ERK-ELK1和NF κ B信号传导途径, 抑制髓系DC细胞分泌IFN- α /IFN- β , 从而削弱DC细胞对T细胞的辅佐作用, 诱导免疫应答反应向Th2方向发展。Eljezi等^[3]发现 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度剂量的DEHP对鼠细胞系L929表现明显的细胞毒性作用。人角膜内皮细胞B4G12体外暴露于DEHP后, 炎症相关因子IL-1 β 、IL-8和IL-16的分泌增加, 基因表达水平也升高^[12]。以上研究提示DEHP暴露可能从多方面影响免疫应答。

由于DEHP在日常用品中的广泛使用, 土壤、水

体等均已受到不同程度的DEHP污染。DEHP可以通过食物摄入、呼吸空气、饮用水、皮肤吸收等多种途径进入人体。2009年美国CDC开展的第四次针对环境化合物暴露检测报告显示, 接受检查的2636例受检者体内都可以检测到DEHP及其代谢产物的存在(www.cdc.gov/exposurereport/pdf/fourthreport.pdf)。本文选用小鼠巨噬细胞株RAW264.7细胞和腹腔巨噬细胞作为研究材料, 通过检测DEHP对巨噬细胞吞噬活性、细胞因子产生、活性氧水平的变化, 探讨DEHP暴露对机体免疫系统的毒性作用, 为DEHP暴露对免疫系统干扰/毒性风险评估提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

DEHP购于上海阿拉丁试剂公司(纯度 $\geq 98\%$), DMEM培养基购于Gibco公司, 胎牛血清购于杭州四季青公司, Giemsa染色试剂购自南京建成生物公司, TNF- α 、IL-12、IL-23 ELISA检测试剂盒购自三鹰生物, 2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)购自江苏凯基生物公司, 其他相关试剂均为国产分析纯。二氧化碳培养箱型号为Thermo-BB15, 倒置显微镜及照相系统型号为Olympus IX-50, Spectra Max M5多功能酶标仪型号为Molecular Devices-SpectraMax i3x。

1.2 巨噬细胞系RAW264.7细胞培养

巨噬细胞系RAW264.7细胞系华中科技大学基础医学院生物化学教研室惠赠。复苏冻存的RAW264.7细胞方法如下: 从液氮罐中取出保存RAW264.7细胞的冻存管, 立即将其置于40℃的温水中快速解冻。70%酒精喷洒细胞冻存管消毒, 置于超净工作台内, 移液器吸取将细胞转移至15 mL离心管中, 再补加10倍体积的10%胎牛血清-DMEM培养基, $1000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心8 min, 弃上清, 重新加入含有10%血清的DMEM完全培养基, 轻轻吹打混匀, 转移至 25 cm^2 细胞培养瓶, 放入37℃、5% CO₂培养箱静置培养。定时观察培养基颜色变化及细胞状态, 及时更换新鲜培养基, 待细胞长满整个培养瓶底部, 进行传代培养。

1.3 DEHP处理RAW264.7细胞

将正常RAW264.7细胞接种到培养瓶中, 待培养细胞的密度达到80%后进行DEHP暴露。设置1、5、10、20、40、80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP处理组、0.05%的丙酮溶剂和DMEM完全培养基对照组。DEHP暴露48 h更换正常培养基培养24~48 h, 连续细胞传代和贴壁再生

长,待培养细胞的密度达到80%后进行DEHP暴露,如此重复10代。染毒DEHP暴露10代后收获细胞,用于红细胞吞噬实验、细胞因子分泌、活性氧水平检测。巨噬存活率经0.04%台盼蓝染色确定细胞存活。

1.4 腹腔巨噬细胞分离培养

BALB/c小鼠购于湖北省疾病预防控制中心。小鼠暴露浓度设计依据体外实验结果确定。选取30只8~12周龄雄性健康BALB/c小鼠随机分成5组,分别设置为1、5、10 mg·L⁻¹ DEHP处理组、0.05%的丙酮溶剂和蒸馏水对照组,采用自由饮水方式喂饲小鼠,连续饲养20周后颈椎脱臼处死小鼠,75%酒精浸泡5 min,剪开腹下部皮肤打开腹腔,用吸管吸取PBS反复冲洗腹腔,收集腹腔渗出液,1000 r·min⁻¹离心8 min,弃上清,PBS洗涤2遍。用10%胎牛血清-DMEM培养基调节细胞浓度至5×10⁶细胞·mL⁻¹,接种于24孔板中,每孔2 mL,置37℃、5%CO₂培养箱培养,每2 h定时取出培养板于倒置显微镜下观察巨噬细胞贴壁情况。

1.5 红细胞吞噬实验

向培养有巨噬细胞的培养板中按1:50比率加入绵羊红细胞,放回CO₂培养箱中孵育,3 h后取出培养板,PBS反复冲洗未被巨噬细胞吞噬的红细胞,自然干燥后加入冷丙酮溶液固定5 min。滴加Giemsa染液10 min,自来水冲干净,在显微镜下观察计数吞噬百分率和吞噬指数。

吞噬百分率=吞噬红细胞的巨噬细胞/100个巨噬细胞×100%

吞噬指数=被吞噬的红细胞/100个巨噬细胞

1.6 ELISA 检测 TNF-α、IL-12、IL-23 细胞因子表达

将经过DEHP处理的RAW264.7细胞浓度调至1×10⁷·mL⁻¹,培养于24孔板中,每孔加入1 mL细胞悬液和2×10⁻³ μg·L⁻¹ LPS刺激(每种剂量浓度DEHP均设3个重复孔),培养72 h后,吸取培养上清液用于细胞因子的测定。以双抗体夹心ELISA法,测定培养上清液中TNF-α、IL-12、IL-23细胞因子浓度。操作步骤按三鹰生物公司提供的检测试剂盒中说明书进行。

1.7 活性氧(ROS)水平检测

将经过DEHP连续处理10代的RAW264.7细胞浓度调至1×10⁷·mL⁻¹,接种于24孔板,加入2×10⁻³ μg·L⁻¹ LPS刺激2 h后,按照凯基活性氧检测试剂盒的操作说明,采用对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,检测DEHP不同浓度处理组细胞内活性氧的变化。

1.8 统计学处理

应用GraphPad Prism 5统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),实验数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,两组间计量资料的比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 DEHP对RAW264.7细胞的毒性作用

为评估DEHP暴露对巨噬细胞的毒性作用,首先用不同浓度剂量的DEHP(1、5、10、20、40、80 mg·L⁻¹)处理巨噬细胞株RAW264.7细胞。RAW264.7细胞暴露于1、5、10 mg·L⁻¹ DEHP 48 h后,未发现细胞活力状态及死亡细胞数目发生变化(图1)。然而经20、40、80 mg·L⁻¹ DEHP处理后,RAW264.7细胞的活力状态变弱,死亡细胞的数目显著增加(图2)。

2.2 DEHP对RAW264.7细胞吞噬能力的影响

鉴于动物与人体接触环境中DEHP的实际情况是低剂量长时间暴露,我们采用1、5、10 mg·L⁻¹浓度剂量的DEHP对巨噬细胞株RAW264.7进行持续染毒。经连续染毒处理10代后,RAW264.7细胞的活力、形态以及繁殖传代时间未见显著变化(结果未显示)。细胞吞噬功能测定显示,向DMEM完全培养基和丙酮对照组RAW264.7细胞中加入绵羊红细胞2 h后,可观察到巨噬细胞吞噬红细胞,被吞噬红细胞及巨噬细胞形态轮廓清晰可辨,被吞噬红细胞数目从一个到多个不等,有部分红细胞粘附在巨噬细胞外围将要被吞噬(图3)。而经DEHP连续处理10代后,

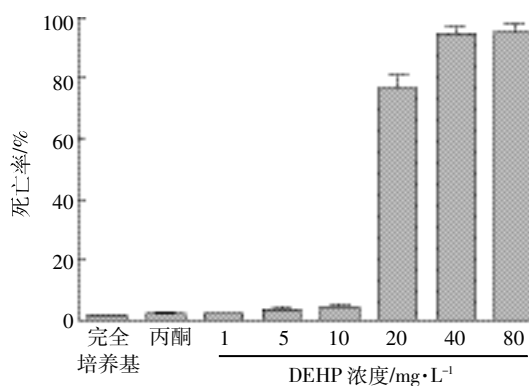


图2 RAW264.7细胞接受不同浓度剂量DEHP处理后的死亡率($n=3$)

Figure 2 The mortality of RAW264.7 cells by treated with different dosages of DEHP($n=3$)

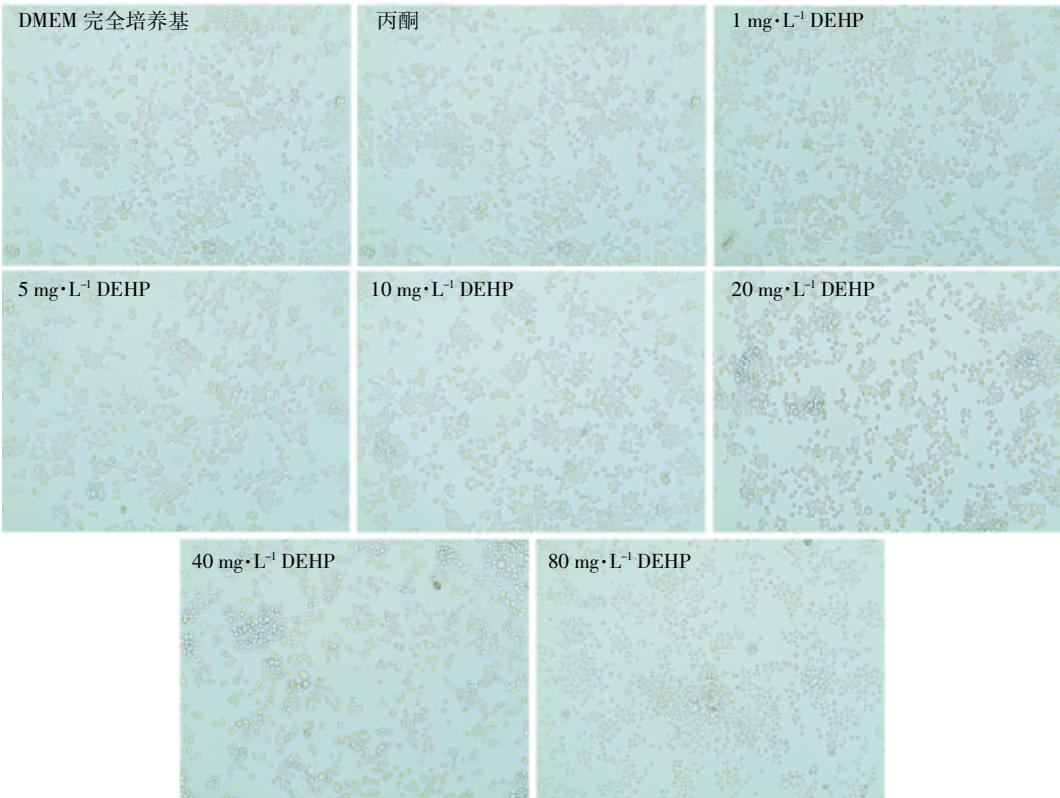


图 1 不同浓度剂量 DEHP 处理 RAW264.7 细胞 48 h 后的镜检结果(放大倍数:×200)

Figure 1 Microscopic images of RAW264.7 cells treated with different dosages of DEHP after 48 h treatment (Magnification:×200)

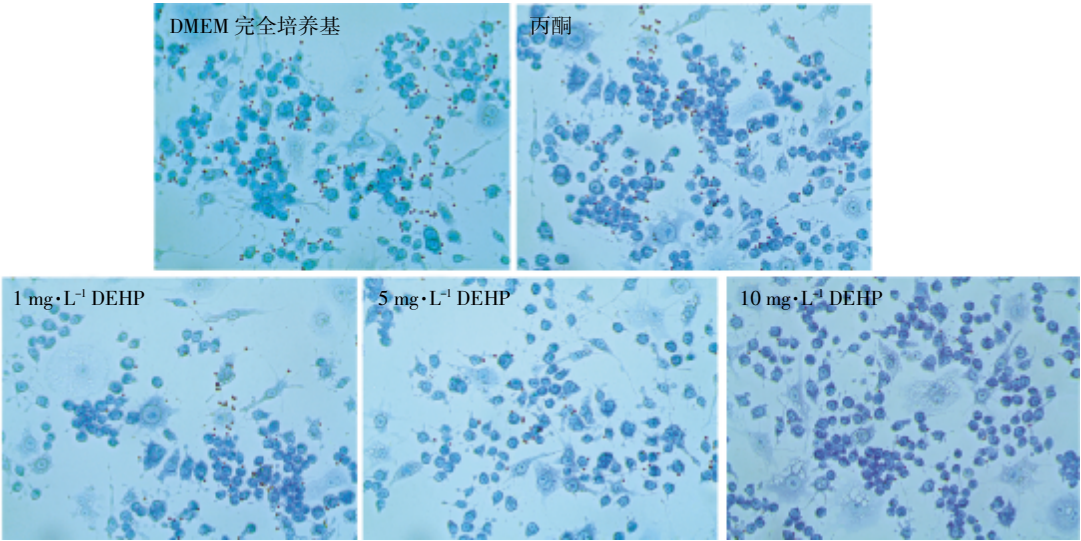


图 3 RAW264.7 细胞吞噬红细胞镜检结果(放大倍数:×400)

Figure 3 Microscopic examination of phagocytosis efficiency with RAW264.7 cell (Magnification:×400)

RAW264.7 细胞的吞噬红细胞能力显著减弱(图 3)。每组实验重复 3 次,统计结果显示 DMEM 完全培养基与丙酮对照组相比,吞噬百分率和吞噬指数无统计学差异(表 1),而 1、5、10 mg·L⁻¹ DEHP 各暴露组与丙酮对照组相比,吞噬百分率和吞噬指数均呈现显著下

降趋势($P<0.05$)。

2.3 DEHP 对 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 、IL-12、IL-23 细胞因子的影响

1、5、10 mg·L⁻¹ DEHP 连续处理 10 代后,换用正常培养基继续培养 24~48 h,再接受 LPS 刺激 72 h 后

表 1 不同剂量 DEHP 暴露对 RAW264.7 细胞吞噬活性的影响
Table 1 Effects of different dose DEHP exposure on phagocytosis of RAW264.7

组别	剂量	吞噬百分率/%	P 值(吞噬百分率)	吞噬指数	P 值(吞噬指数)
DMEM 完全培养基	—	81.31±12.72	>0.05	2.13±1.41	>0.05
丙酮/%	0.05	78.65±13.84	—	1.89±0.93	—
DEHP/mg·L ⁻¹	1	30.24±6.31	<0.05	0.62±0.45	<0.05
	5	19.15±7.63	<0.05	0.37±0.26	<0.05
	10	17.33±6.15	<0.05	0.14±0.09	<0.05

收集细胞上清液,TNF- α 、IL-12、IL-23 的变化趋势见图 4。由图 4 可以看出,经 1、5、10 mg·L⁻¹ 的 DEHP 连续处理后,RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 、IL-12、IL-23

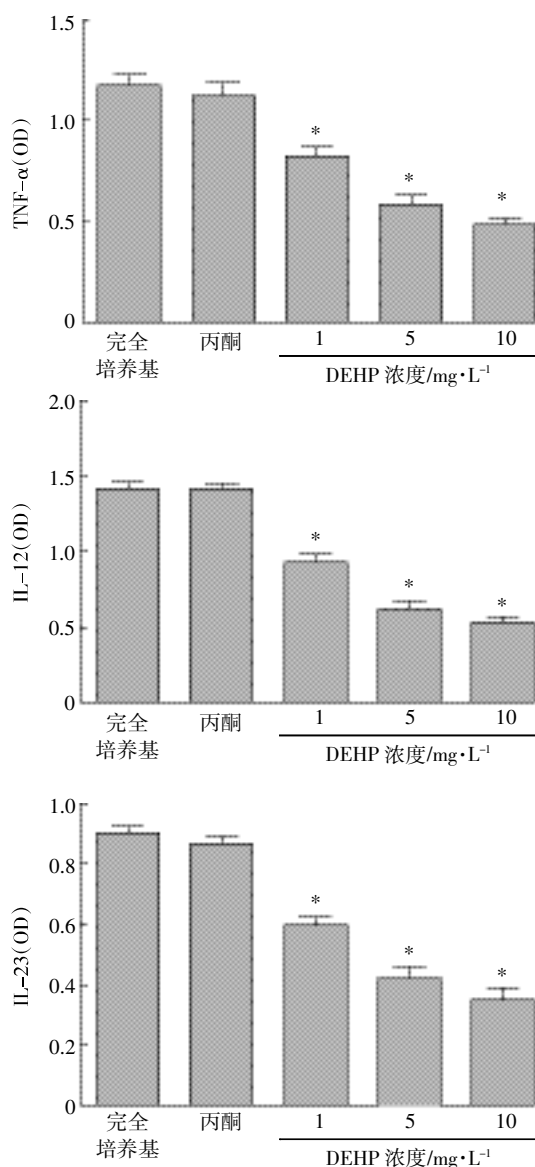


图 4 DEHP 暴露对 RAW264.7 细胞因子分泌的影响
(OD:光密度, $n=3$,* $P<0.05$)

Figure 4 Effects of different dosages of DEHP on cytokines secretion of RAW264.7(OD:Optical density, $n=3$,* $P<0.05$)

等细胞因子的能力较丙酮对照组比较显著降低。并且 TNF- α 、IL-12、IL-23 下降趋势与 DEHP 暴露浓度呈现剂量-效应关系,提示 DEHP 能抑制 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α 、IL-12、IL-23 等细胞因子。

2.4 DEHP 对 RAW264.7 细胞 ROS 产生的影响

1、5、10 mg·L⁻¹ DEHP 连续处理 10 代后,换用正常培养基继续培养 48 h,加入 2×10^{-3} $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LPS 刺激 2 h 后,用 DCFH-DA 荧光探针标记 RAW264.7 细胞,测定细胞内荧光强度以反映 ROS 的产生量。图 5 显示,经 1、5、10 mg·L⁻¹ 浓度剂量的 DEHP 连续染毒后,RAW264.7 细胞内的 ROS 水平与丙酮对照组相比显著下降,随着 DEHP 浓度的加大,DEHP 对 RAW264.7 细胞 ROS 水平的抑制作用逐渐增强,当 DEHP 浓度达到 10 mg·L⁻¹ 时,细胞内 ROS 水平降至对照组水平的 34.69%。

2.5 DEHP 对腹腔巨噬细胞贴壁及吞噬能力的影响

为进一步验证 DEHP 对巨噬细胞免疫功能的影响,我们还选用了小鼠腹腔巨噬细胞作为研究材料。采用 1、5、10 mg·L⁻¹ DEHP 喂饲小鼠,连续饲养 20 周后收集小鼠腹腔巨噬细胞,隔 2 h 于倒置显微镜下观察巨噬细胞粘附贴壁情况及形态变化。对照组腹腔巨噬细胞于体外培养 2 h 后逐渐伸展增大,4 h 后能粘附到 24 孔培养板上,形状呈梭形或不规则形并有伪足或突起伸出。而各剂量浓度 DEHP 对巨噬细胞黏附伸展能力均有一定的影响,其中 5、10 mg·L⁻¹ DEHP 暴露组巨噬细胞黏附伸展能力下降显著,分别需要 12、14 h 才能完全贴壁。红细胞吞噬实验显示,各剂量浓度 DEHP 暴露与丙酮对照组相比,巨噬细胞吞噬红细胞数目、吞噬百分率及吞噬指数均显著降低(表2)。

3 讨论

DEHP 是日常生活中使用和接触最多的增塑剂,DEHP 可不断地从塑料中释放。从近年来我国各大水系的检测结果来看,水环境中 DEHP 的含量已经超出我

表 2 不同剂量 DEHP 暴露对小鼠腹腔巨嗜细胞吞噬活性的影响

Table 2 Effects of different dose DEHP exposure on phagocytosis of murine peritoneal macrophages

组别	剂量	吞噬百分率/%	P 值(吞噬百分率)	吞噬指数	P 值(吞噬指数)
ddH ₂ O	—	45.5±2.3	>0.05	0.58±0.16	>0.05
丙酮	0.05%	42.5±2.1	—	0.55±0.22	—
DEHP/mg·L ⁻¹	1	37.5±1.9	<0.05	0.39±0.15	<0.05
	5	30.5±1.6	<0.05	0.23±0.08	<0.05
	10	25.5±1.5	<0.05	0.14±0.09	<0.05

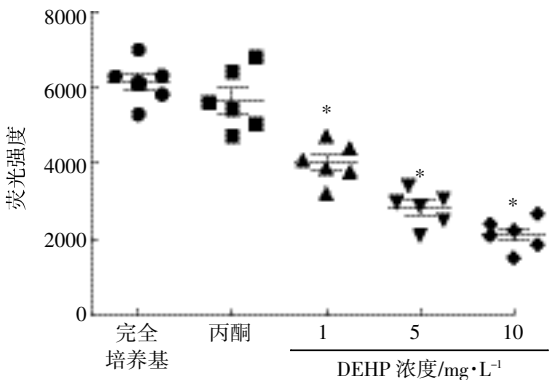


图 5 DEHP 对 RAW264.7 细胞 ROS 产生的影响(n=3, 重复检测次数:2 次,*P<0.05)

Figure 5 DEHP inhibited ROS production in RAW264.7 cells (n=3, Repeated detection times:2, * P<0.05)

国水环境中允许的浓度范围^[13]。由于 DEHP 具有较高的脂-水分配系数, 可被土壤吸附并且可被生物富集, 因此生物体中 DEHP 的含量要远高于水体和土壤^[14]。

自 1981 年首次报道 DEHP 诱发啮齿类动物肿瘤以来, 关于 DEHP 毒性研究的文献日渐增多。巨噬细胞是机体内重要的免疫效应细胞, 具有多种免疫功能, 包括免疫防御、免疫监视、免疫调节以及抗原呈递等, 在机体的免疫系统中起着重要作用^[15]。由于巨噬细胞株 RAW264.7 细胞已经成功建系, 易于体外传代培养, 因此本研究首先选用 RAW264.7 细胞作为研究对象, 探讨 DEHP 对巨噬细胞功能的影响。结果显示, 虽然较低浓度剂量(1、5、10 mg·L⁻¹) DEHP 暴露并没有急性毒性作用, 然而经连续 10 代持续暴露后, DEHP 对细胞株 RAW264.7 吞噬功能有明显抑制作用。接受外来抗原刺激后分泌细胞因子(如 TNF-α、IL-12、IL-23)是巨噬细胞应答的基本反应^[16]。本研究证实, DEHP 对 RAW264.7 细胞接受 LPS 刺激后分泌 TNF-α、IL-12、IL-23 等细胞因子有明显的抑制作用, 且呈一定的剂量-效应关系。细胞内 ROS 水平也是反映巨噬细胞功能的指标之一^[17]。吞噬细胞受到刺激时通过呼吸暴发机制, 产生大量 ROS, ROS 是吞噬细胞

发挥吞噬和杀伤作用的主要介质。在机体免疫防御过程中, 巨噬细胞通过产生一定量的 ROS, 破坏细菌的细胞膜和病毒的蛋白质, 从而消灭外来病原微生物。本研究发现, DEHP 连续处理巨噬细胞株 RAW264.7 后, 再接受 LPS 刺激 2 h 后, 用 DCFH-DA 荧光探针法检测 ROS 的产生, 显示细胞 ROS 的产生受到抑制, 并且随着 DEHP 浓度的增大, 细胞内 ROS 水平下降愈加明显。这些结果说明 DEHP 对巨噬细胞正常功能发挥具有显著的抑制作用。

由于腹腔巨嗜细胞游离存在于腹腔的腹水中, 易于获得, 因此本研究还选用腹腔巨噬细胞作为研究对象。结果表明 DEHP 对腹腔巨噬细胞粘附贴壁及吞噬能力均有显著抑制作用。粘附贴壁能力反应巨噬细胞的活力状态, 吞噬能力是反映其免疫防御能力的一个重要指标^[18], DEHP 抑制腹腔巨噬细胞的粘附贴壁及吞噬能力, 表明 DEHP 可影响巨噬细胞的免疫防御功能, 从而对机体的免疫能力产生抑制作用。

4 结论

- (1)高浓度(20、40 和 80 mg·L⁻¹)DEHP 暴露可对巨噬细胞株 RAW264.7 细胞造成急性损伤。
- (2)低浓度(1、5、10 mg·L⁻¹)DEHP 长时间暴露对 RAW264.7 和腹腔巨噬细胞有免疫毒性作用。
- (3)本研究评估了 DEHP 对巨噬细胞的免疫毒性作用, 这对全面了解 DEHP 的毒性具有十分重要的意义, 研究结果可为 DEHP 的免疫毒性风险评估提供一定的科学依据。

参考文献:

[1] Erythropel H C, Maric M, Nicell J A, et al. Leaching of the plasticizer di (2-ethylhexyl) phthalate(DEHP) from plastic containers and the question of human exposure[J]. *Apply Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(24): 9967-9981.

[2] Liu X W, Shi J H, Bo T, et al. Occurrence of phthalic acid esters in source waters: A nationwide survey in China during the period of 2009—2012[J]. *Environmental Pollution*, 2014, 184: 262-270.

- [3] Eljezi T, Pinta P, Richard D, et al. *In vitro* cytotoxic effects of DEHP-alternative plasticizers and their primary metabolites on a L929 cell line [J]. *Chemosphere*, 2017, 173:452-459.
- [4] Nardelli T C, Erythropel H C, Robaire B. Toxicogenomic screening of replacements for di(2-Ethylhexyl) phthalate (DEHP) using the immortalized TM4 sertoli cell line[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10):e0138421.
- [5] Qureshi M S, Yusoff A R, Wirzal M D, et al. Methods for the determination of endocrine-disrupting phthalate esters[J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2016, 46(4):146-159.
- [6] Mallow E B, Fox M A. Phthalates and critically ill neonates: Device-related exposures and non-endocrine toxic risks[J]. *Journal of Perinatology*, 2014, 34(12):892-897.
- [7] 刘瑾, 叶萍英, 蔡军, 等. 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯对小鼠子宫发育的毒性作用[J]. 环境与健康杂志 2012, 29(10):894-899. LIU Jin, YE Ping-ying, CAI Jun, et al. Toxic effect of DEHP on uterus development in mice[J]. *Journal of Environmental Health*, 2012, 29(10):894-899.
- [8] Lee M H, Park J, Chung S W, et al. Enhancement of interleukin-4 production in activated CD4⁺ T cells by diphtalate plasticizers via increased NF-AT binding activity[J]. *Internation Archievs of Allergy Immunology*, 2004, 134(3):213-222.
- [9] Hoppin J A, Jaramillo R, London S J, et al. Phthalate exposure and allergy in the U. S. population: Results from NHANES 2005-2006[J]. *Environ Health Perspect*, 2013, 121(10):1129-1134.
- [10] Gourlay T, Samartzis I, Stefanou D, et al. Inflammatory response of rat and human neutrophils exposed to di-(2-ethyl-hexyl)-phthalate-plasticized polyvinyl chloride[J]. *Artif Organs*, 2003, 27(3):256-260.
- [11] Kuo C H, Hsieh C C, Kuo H F, et al. Phthalates suppress type I interferon in human plasmacytoid dendritic cells via epigenetic regulation [J]. *Allergy*, 2013, 68(7):870-879.
- [12] Kruger T, Cao Y, Kjaergaard S K, et al. Effects of phthalates on the human corneal endothelial cell line B4G12[J]. *International Journal of Toxicology*, 2012, 31(4):364-371.
- [13] 陈济安, 邱志群, 舒为群, 等. 我国水环境中邻苯二甲酸酯污染现状及其生物降解研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2012, 19(3):212-215. CHEN Ji-an, QIU Zhi-qun, SHU Wei-qun, et al. Pollution of PAEs in water and the biodegradations studies in China [J]. *Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis*, 2012, 19(3):212-215.
- [14] Fromme H, Kuchler T, Otto T, et al. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment[J]. *Water Research*, 2002, 36(6):1429-1438.
- [15] 金柏泉. 医学免疫学[M]. 5版. 人民卫生出版社, 2008. JIN Bo-quan. Medical immunology[M]. Fifth Edition. People's Medical Press, 2008.
- [16] 周宪宾, 姚成芳. 巨噬细胞 M1/M2 极化分型的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(10):957-960. ZHOU Xian-bin, YAO Cheng-fang. Advances in M1/M2 polarization typing of macrophages[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2012, 28(10):957-960.
- [17] 黄行许, 马晓冬, 乔东访, 等. ROS 对小鼠腹腔巨噬细胞凋亡的影响[J]. 免疫学杂志 2000, 16(5):334-338. HUANG Xing-xu, MA Xiao-dong, QIAO Dong-fang, et al. Effects of ROS on apoptosis in murine peritoneal macrophage[J]. *Journal of Immunology*, 2000, 16(5):334-338.
- [18] Murray P J, Wynn T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets[J]. *Natural Review Immunology*, 2011, 11(11):723-737.