

邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯对INS-1细胞氧化应激和凋亡的影响

秦晋, 李奕明, 刘雨薇, 吴岷, 陈波, 厉曙光

复旦大学公共卫生学院营养与食品卫生教研室, 公共卫生安全教育部重点实验室, 上海 200032

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18635

摘要:

[目的] 邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)是一种具有代表性的邻苯二甲酸酯类增塑剂,常被用于塑料制品的生产加工,暴露来源广泛。有流行病学证据表明DEHP暴露与糖尿病的发生发展有一定关联,但鲜见相关基础研究。本研究探究DEHP对大鼠胰岛 β 细胞(INS-1细胞)氧化应激及细胞凋亡的影响。

[方法] 体外培养INS-1细胞,并用30、60、120 $\mu\text{mol/L}$ 的DEHP处理24 h。用MTT法检测细胞增殖抑制率,流式细胞仪检测细胞凋亡率。用2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)检测细胞内活性氧(ROS)含量,可溶性噻唑盐(WST-8)法检测细胞内超氧化物歧化酶(SOD)活性,5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)比色法检测还原型谷胱甘肽(GSH)及氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量,硫代巴比妥酸(TBA)法检测脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量,用JC-1检测线粒体膜电位。用60、120、240 $\mu\text{mol/L}$ 的DEHP作用于INS-1细胞24 h后,用Western blot检测凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2、细胞色素C(Cyt-C)、Caspase-3、Caspase-9的表达。

[结果] MTT实验和细胞凋亡检测结果显示,DEHP可导致INS-1细胞的增殖抑制,且120 $\mu\text{mol/L}$ DEHP还会引起凋亡($P < 0.05$)。与对照组相比,30、60、120 $\mu\text{mol/L}$ 的DEHP可造成INS-1细胞内ROS荧光强度分别增强13.9%、20.7%和33.7%,MDA含量分别增加42.9%、44.8%和67.7%($P < 0.01$);60、120 $\mu\text{mol/L}$ 的DEHP可造成细胞内GSH含量分别下降9.2%和54.8%,GSSG含量分别增加101.2%和444.1%,且还原型与氧化型谷胱甘肽的比值GSH/GSSG分别下降54.8%和91.7%($P < 0.05$);120 $\mu\text{mol/L}$ 的DEHP可造成SOD活性降低26.4%($P < 0.05$);30、60、120 $\mu\text{mol/L}$ 的DEHP可导致INS-1细胞线粒体膜电位降低,由此引起红绿荧光比值分别降低10.6%、36.8%和38.4%($P < 0.01$)。Western blot结果显示,与对照组相比,60、120、240 $\mu\text{mol/L}$ 的DEHP染毒组中,Cyt-C相对表达量增加;120、240 $\mu\text{mol/L}$ DEHP组Bax/Bcl-2值升高;240 $\mu\text{mol/L}$ DEHP组Caspase-9和Caspase-3相对表达量也增加($P < 0.05$)。

[结论] DEHP可引起INS-1细胞氧化应激,降低线粒体膜电位,激活细胞凋亡线粒体通路相关蛋白的表达,诱导细胞凋亡。

关键词: 邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯;胰岛 β 细胞;氧化应激;线粒体膜电位;细胞凋亡

Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on apoptosis and oxidative stress of INS-1 cells QIN Jin, LI Yi-ming, LIU Yu-wei, WU Min, CHEN Bo, LI Shu-guang (Key Laboratory of Public Health Safety of Ministry of Education, Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract:

[Objective] Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), a representative plasticizer, is commonly used in plastics production and widely present in environment. Epidemiological studies have proved that DEHP is associated with the occurrence and development of diabetes, but the mechanism research is exiguous. The current study is conducted to explore the oxidative stress and apoptosis in rat islet β cells (INS-1 cells) induced by DEHP.

[Methods] INS-1 cells were cultured *in vitro*, following exposure to 30, 60, and 120 $\mu\text{mol/L}$ DEHP for 24 h. MTT assay was used to measure the cell proliferation inhibition rate, and flow cytometry for cell apoptosis. Cellular reactive oxygen species (ROS) generation was detected by 2', 7'-dichlorodi-hydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) method, the activity of superoxide dismutase (SOD) by water soluble tetrazolium-8 (WST-8) method, reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG) by 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) method, malondialdehyde (MDA) by thiobarbituric acid (TBA) method, and mitochondrial membrane potential (MMP) by JC-1 staining. The cell apoptosis associated proteins, including Bax, Bcl-2, cytochrome C (Cyt-C),

组稿专家

张蕴晖(复旦大学公共卫生学院),
E-mail: yhzhang@shmu.edu.cn
厉曙光(复旦大学公共卫生学院),
E-mail: leeshuguang@fudan.edu.cn

基金项目

国家重点研发计划(2016YFD0400602)

作者简介

秦晋(1994—),女,硕士生;
E-mail: 16211020024@fudan.edu.cn

通信作者

厉曙光, E-mail: leeshuguang@fudan.edu.cn

利益冲突 无申报

收稿日期 2018-09-29

录用日期 2019-02-03

文章编号 2095-9982(2019)04-0327-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

秦晋, 李奕明, 刘雨薇, 等. 邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯对INS-1细胞氧化应激和凋亡的影响[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(4): 327-332.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18635

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LI Shu-guang, E-mail: leeshuguang@fudan.edu.cn

Competing interests None declared

Received 2018-09-29

Accepted 2019-02-03

►To cite

QIN Jin, LI Yi-ming, LIU Yu-wei, et al. Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on apoptosis and oxidative stress of INS-1 cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(4): 327-332.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18635

Caspase-3, and Caspase-9, were detected by Western blot after exposure to 60, 120, and 240 $\mu\text{mol/L}$ DEHP for 24 h.

[Results] The MTT and flow cytometry results showed that DEHP induced cell proliferation inhibition, and 120 $\mu\text{mol/L}$ DEHP caused apoptosis ($P < 0.05$). Compared with the control group, the cellular ROS fluorescence intensities in the 30, 60, and 120 $\mu\text{mol/L}$ DEHP-exposed cells increased by 13.9%, 20.7%, and 33.7%, respectively, and the MDA increased by 42.9%, 44.8%, and 67.7%, respectively ($P < 0.01$); the cellular GSH in the 60 and 120 $\mu\text{mol/L}$ DEHP-exposed cells decreased by 9.2% and 54.8%, the GSSG increased by 101.2% and 444.1%, and the GSH/GSSG decreased by 54.8% and 91.7%, respectively ($P < 0.05$); the cellular SOD activity in the 120 $\mu\text{mol/L}$ DEHP-exposed cells decreased by 26.4% ($P < 0.05$); the MMP red-to-green fluorescence ratios in the 30, 60, and 120 $\mu\text{mol/L}$ DEHP-exposed cells decreased by 10.6%, 36.8% and 38.4%, respectively ($P < 0.01$). The results of Western blot showed that compared with the control group, 60, 120, and 240 $\mu\text{mol/L}$ DEHP treatments increased Cyt-C expression levels; 120 and 240 $\mu\text{mol/L}$ DEHP treatments increased Bax/Bcl-2; 240 $\mu\text{mol/L}$ DEHP treatment increased Caspase-3 and Caspase-9 expression levels ($P < 0.05$).

[Conclusion] DEHP may promote oxidative stress, reduce MMP, and induce cell apoptosis by activating proteins related to mitochondrial pathway.

Keywords: di(2-ethylhexyl) phthalate; islet β cell; oxidative stress; mitochondrial membrane potential; apoptosis

邻苯二甲酸酯 (phthalates, PAEs) 也称为增塑剂或塑化剂, 常作为化工助剂被用于食品包装材料、医用材料、个人护理及家庭清洁用品、儿童玩具等的生产制造中。其中邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯 [di(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP] 作为生产量和使用量最大的增塑剂, 其环境暴露水平在过去十年间逐渐增加^[1]。增塑剂与母体共聚物通过氢键和范德瓦耳斯力的作用而结合, 因此在温度、pH 值等外部环境发生变化时易从高分子材料中逸出^[2], 它可以通过消化道、呼吸道和皮肤接触等途径进入人体, 在体内经历一级或多级代谢后排出体外。增塑剂作为一类环境内分泌干扰物, 具有内分泌毒性和生殖毒性^[3-4]。近年来, 陆续有流行病学研究发现人群尿或血中增塑剂代谢物的含量与糖尿病患病率及胰岛素抵抗有一定相关性^[5-6], 胰岛素抵抗和 β 细胞功能障碍是糖尿病发生发展过程中的两个重要因素, 目前已有研究表明 DEHP 可能通过影响肌肉细胞摄取葡萄糖进而导致胰岛素抵抗^[7], 但其对于胰岛细胞损害的机制至今尚未见文献报道。本研究以大鼠胰岛 β 细胞 (INS-1 细胞) 为实验对象, 旨在探究 DEHP 对 INS-1 细胞的毒性作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

CO_2 恒温细胞培养箱 (赛默飞世尔公司, 美国); xMark 微孔板吸光度分光光度计、Mini-PROTEAN Tetra 电泳系统、ChemiDoc 成像系统 (Bio-Rad 公司, 美国); CytoFLEX 流式细胞仪 (Beckman Coulter 公司, 美国); MH-2 微量振荡器 (其林贝尔仪器制造有限公司, 中国)。

RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (赛默飞世尔公司, 美国); 二甲基亚砜、丙酮酸钠、2-巯基乙醇、胰酶、2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) (Sigma 公司, 美国); MTT、4-羟乙基哌嗪乙磺酸、PBS (生工生

物工程公司, 中国); 线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1 法), 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (super oxide dismutase, SOD)、还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 及氧化型谷胱甘肽 (oxidized glutathione, GSSG) 检测试剂盒, SDS-PAGE 凝胶, 蛋白定量试剂盒, 电化学发光 (ECL) 试剂盒 (碧云天生物技术公司, 中国); Annexin V-FITC/PI (东仁化学科技有限公司, 日本); Bax、Caspase-3、Cyt-C、 β actin 兔抗大鼠一抗及羊抗兔二抗 (Cell Signaling Technology, 美国); Bcl-2、Caspase-9 一抗 (Abcam, 英国)。

1.2 细胞培养

大鼠胰岛 β 细胞购于上海锐赛生物技术有限公司, 培养于含 10% 胎牛血清、10 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸、1 mmol/L 丙酮酸钠和 50 $\mu\text{mol/L}$ 2-巯基乙醇的 RPMI-1640 培养基中, 在含 5% CO_2 的细胞培养箱中 37 $^\circ\text{C}$ 孵育, 待细胞生长至约 80% 时按 1:3 比例传代, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 细胞增殖抑制及凋亡率检测

1.3.1 细胞增殖抑制率 取对数生长期细胞消化重悬, 调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 96 孔板, 置于培养箱中培养至贴壁。本研究预实验结果表明, DEHP 作用于 INS-1 细胞 24 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 240 $\mu\text{mol/L}$, 以此为参考, 实验分别设空白对照组和 30、60、120 $\mu\text{mol/L}$ DEHP 染毒组, 每组设 6 个平行孔。24 h 后每孔加入 10 μL 0.5% 的 MTT 溶液培养 4 h。移去上清液, 每孔加入 100 μL 二甲基亚砜, 振荡 10 min, 于 490 nm 处测定光密度值, 计算得到细胞的增殖抑制率。

1.3.2 细胞凋亡率 按前述方式将 INS-1 细胞接种于 6 孔板, 置于培养箱中培养至贴壁。待细胞处于对数生长期时, 实验分别设空白对照组和 30、60、120 $\mu\text{mol/L}$ DEHP 染毒组, 每组设 3 个平行对照。培养 24 h 后, 收集细胞并用 PBS 清洗 3 次, 用 Annexin V 结合液将细胞密度调

整为 1×10^6 /mL, 取 100 μ L 先后加入 5 μ L Annexin V-FITC 结合物和 5 μ L PI 反应 15 min 后, 将上述悬液稀释 5 倍, 用流式细胞仪检测凋亡率。

1.4 检测细胞内氧化应激水平

实验分别设空白对照组和 30、60、120 μ mol/L DEHP 染毒组。

1.4.1 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测 将 INS-1 细胞接种于 6 孔板中, 按照上述分组染毒 24 h 后用胰酶消化并收集细胞, 每组加入 1 mL 含 10 μ mol/L DCFH-DA 的培养基孵育 30 min, 结束后用 600 μ L PBS 重悬细胞, 用流式细胞仪检测荧光强度。

1.4.2 MDA 含量测定 染毒结束后用 PBS 漂洗, 用 RIPA 溶液裂解细胞, 用 TBA 法测定上清液中的 MDA 含量, 并用总蛋白含量进行校正。

1.4.3 SOD 酶活性测定 染毒结束后用胰酶消化并收集细胞, 用预冷的 PBS 于冰上充分研磨得到细胞匀浆液, 取上清液用 WST-8 酶法测定 SOD 活性, 并用总蛋白含量校正。

1.4.4 GSH 和 GSSG 含量测定 染毒结束后收集细胞, 反复冻融并离心得到上清液, 采用 5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 比色法分别测定 GSH 和 GSSG 的含量, 结果以细胞沉淀的质量进行校正。

1.5 线粒体膜电位检测

将 INS-1 细胞接种于 6 孔板, 设空白对照组和 30、60、120 μ mol/L DEHP 染毒组, 作用 24 h 后, 用 JC-1 染色工作液培养 20 min, 缓冲液清洗 3 次后重悬, 用流式细胞仪检测。

1.6 细胞凋亡相关蛋白表达

实验分别设空白对照组和 60、120、240 μ mol/L DEHP 染毒组, 染毒 24 h 后用含 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟的裂解液裂解细胞, 冰上适度匀浆以得到胞浆蛋白, 并用 BCA 法对上清液蛋白进行定量后加入上样缓冲液煮沸变性。配制 12% 的 SDS-PAGE 凝胶, 每孔道加入 30 μ g 蛋白样品进行电泳, 转膜后用 5% BSA 溶液室温封闭 2 h, 加入 1 : 1000 稀释的一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 二抗按 1 : 2000 稀释后室温孵育 1 h 后, 加入 ECL 发光液避光反应 5 min。用 ChemiDoc 成像系统曝光并拍照, 用 Image J 对蛋白条带进行分析, 以相对于 β -actin 的灰度值表示蛋白丰度。

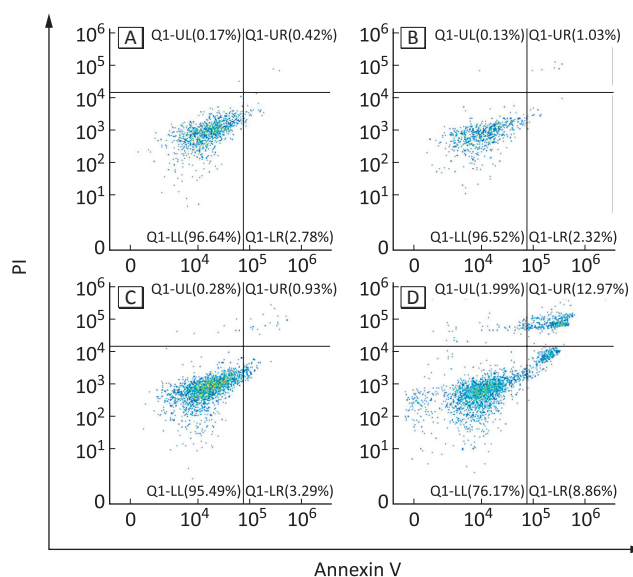
1.7 统计学分析

用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 7.0 对结果进行统计分析, 用单因素方差分析进行多组间差异比较; Dunnett-t 法比较各染毒组与对照组的差异。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 DEHP 对 INS-1 细胞增殖及凋亡的影响

不同浓度的 DEHP 作用于 INS-1 细胞 24 h 后, 凋亡率和增殖抑制率均有增加。其中, 120 μ mol/L 染毒组的细胞凋亡率与对照组相比升高 ($P < 0.01$), 且主要表现为晚期凋亡细胞数量增多, 见图 1 和表 1。所有染毒组的增殖抑制率与对照组相比均升高 ($P < 0.01$)。



[注] A : 空白对照组; B : 30 μ mol/L DEHP 组; C : 60 μ mol/L DEHP 组; D : 120 μ mol/L DEHP 组。UL : 坏死细胞; UR : 晚期凋亡细胞; LL : 正常细胞; LR : 早期凋亡细胞。

[Note] A: Blank control; B: 30 μ mol/L DEHP group; C: 60 μ mol/L DEHP group; D: 120 μ mol/L DEHP group. UL: Necrotic cells; UR: Advanced apoptotic cells; LL: Normal cells; LR: Early apoptotic cells.

图 1 不同浓度 DEHP 对 INS-1 细胞凋亡的影响

Figure 1 Effects of DEHP exposure at different concentrations on apoptosis of INS-1 cells

表 1 不同浓度 DEHP 对 INS-1 细胞凋亡率和增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effects of DEHP exposure at different concentrations on apoptosis rate and proliferation inhibition rate of INS-1 cells

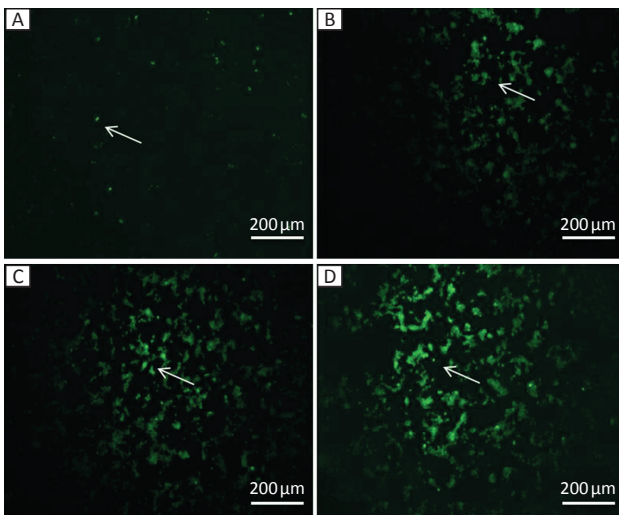
DEHP (μ mol/L)	细胞凋亡率 (%) Apoptosis rate	<i>D</i>	增殖抑制率 (%) Proliferation inhibition rate
0	3.54 \pm 1.24	0.88 \pm 0.02	0.00 \pm 2.55
30	3.05 \pm 0.22	0.79 \pm 0.01 [#]	12.93 \pm 1.56 [#]
60	4.73 \pm 1.58	0.74 \pm 0.05 [#]	17.63 \pm 1.84 [#]
120	23.23 \pm 5.52 [#]	0.72 \pm 0.01 [#]	21.24 \pm 6.84 [#]

[注] # : 与对照组相比, $P < 0.01$ 。

[Note] #: Compared with the control group, $P < 0.01$.

2.2 DEHP 对 INS-1 细胞氧化应激的影响

不同剂量 DEHP 处理细胞 24 h 后, 分别用荧光显微镜和流式细胞仪观察细胞内 ROS 荧光强度的变化, 结果显示, 与对照组相比, 30、60、120 μ mol/L DEHP 染毒组细胞内荧光强度分别为 1.14 \pm 0.0019、1.21 \pm 0.0083、1.34 \pm 0.0081 ($P < 0.01$), 见图 2。



[注] A: 空白对照组; B: 30 $\mu\text{mol/L}$ DEHP 组; C: 60 $\mu\text{mol/L}$ DEHP 组; D: 120 $\mu\text{mol/L}$ DEHP 组。→: 产生荧光的细胞。

[Note] A: Blank control; B: 30 $\mu\text{mol/L}$ DEHP group; C: 60 $\mu\text{mol/L}$ DEHP group; D: 120 $\mu\text{mol/L}$ DEHP group. →: Cells with fluorescence.

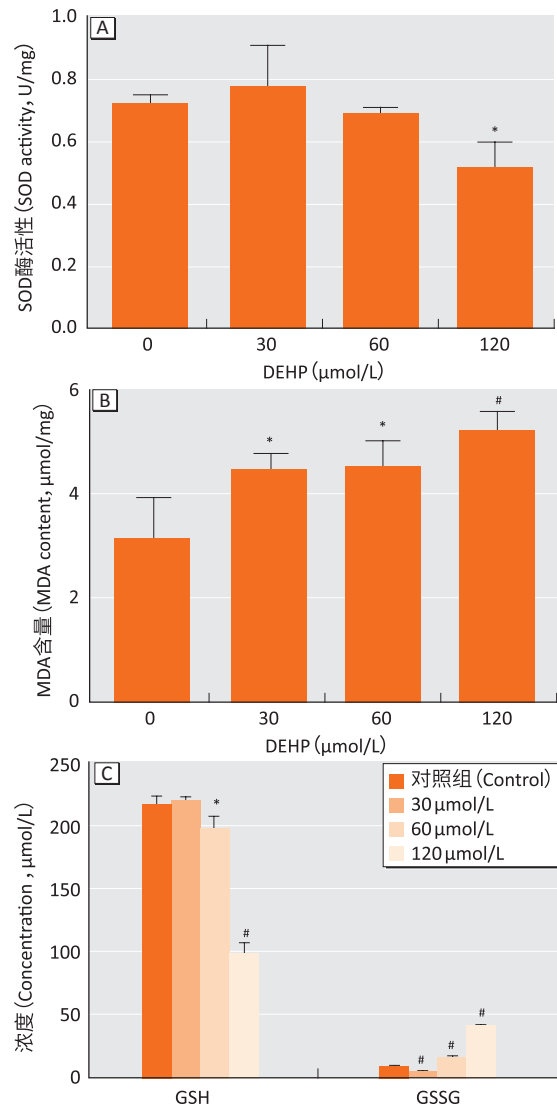
图2 不同浓度DEHP对INS-1细胞内ROS含量的影响

Figure 2 Effects of DEHP exposure at different concentrations on ROS generation in INS-1 cells

在120 $\mu\text{mol/L}$ 的DEHP作用下,细胞内SOD的活性与对照组相比有所降低(0.53 ± 0.10 vs. 0.72 ± 0.06 , $P < 0.05$),而在30、60 $\mu\text{mol/L}$ 的DEHP作用下,SOD活性无明显改变,见图3A。在30、60、120 $\mu\text{mol/L}$ 的DEHP作用下,细胞内MDA含量逐渐增加,分别为 4.43 ± 0.33 、 4.49 ± 0.51 、 5.20 ± 0.38 ,且均高于对照组(3.10 ± 0.82) ($P < 0.05$),见图3B。在30 $\mu\text{mol/L}$ 的DEHP作用下,细胞内GSH/GSSG值为 67.33 ± 5.17 ,高于对照组(29.60 ± 1.17) ($P < 0.01$),而在60、120 $\mu\text{mol/L}$ 的DEHP作用下,细胞内GSH/GSSG值逐渐降低,分别为 13.38 ± 1.09 、 2.46 ± 0.24 ,与对照组相比差异亦有统计学意义($P < 0.05$),见图3C。以上结果提示,在较低浓度(30 $\mu\text{mol/L}$)的DEHP作用下,INS-1细胞内的氧化还原系统能够维持稳定或产生毒物兴奋效应,但此时细胞内的ROS及脂质损伤产物MDA已开始积累,随着染毒浓度的升高,SOD活性与GSH/GSSG比值均下降,ROS含量和MDA含量也随之进一步增加。

2.3 DEHP对INS-1细胞线粒体膜电位的影响

在线粒体膜电位较高时,JC-1荧光探针聚合产生红色荧光,当膜电位降低时单体则发出绿色荧光。与对照组(3.02 ± 0.04)相比,在30、60、120 $\mu\text{mol/L}$ 的DEHP作用下,反映线粒体膜电位的红绿荧光比值降低($P < 0.05$),分别为 2.71 ± 0.04 、 1.91 ± 0.05 和 1.86 ± 0.05 ,表明DEHP可引起INS-1细胞线粒体膜电位降低,见图4。

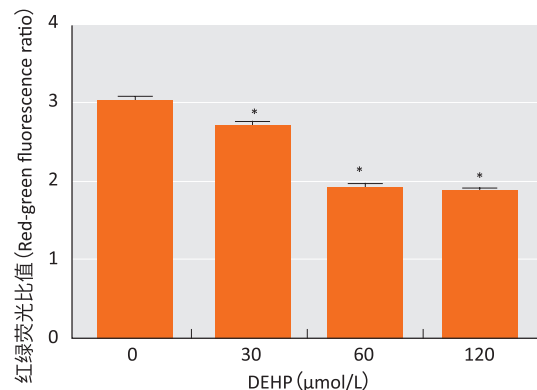


[注] 与对照组相比, * : $P < 0.05$; # : $P < 0.01$ 。

[Note] Compared with the control group, * : $P < 0.05$; # : $P < 0.01$.

图3 不同浓度DEHP对INS-1细胞内SOD活性(A)、MDA含量(B)及GSH/GSSG浓度(C)的影响

Figure 3 Effects of DEHP exposure at different concentrations on SOD activity (A), MDA content (B), and GSH/GSSG concentrations (C) of INS-1 cells



[注] * : 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

[Note] * : Compared with the control group, $P < 0.05$.

图4 不同浓度DEHP对INS-1细胞线粒体膜电位的影响

Figure 4 Effects of DEHP exposure at different concentrations on mitochondrial membrane potential of INS-1 cells

2.4 凋亡相关蛋白的表达

当细胞启动线粒体凋亡通路时, 凋亡调控因子表达发生改变, 半胱天冬酶原 (Pro Caspase) 变为活化的剪切体形式 (Cleaved Caspase) 进而诱导细胞凋亡。与对照组相比, 60、120、240 μmol/L 的 DEHP 染毒组中, Cyt-C 相对表达量增加; 120、240 μmol/L DEHP 组 Bax/Bcl-2 值升高; 240 μmol/L DEHP 组 Caspase-9 和 Caspase-3 相对表达量也增加; 以上差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 5 和表 2。

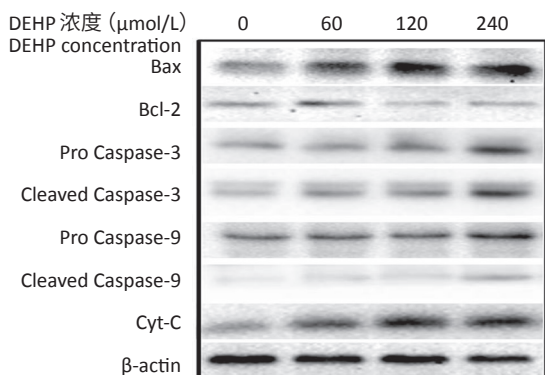


图 5 不同浓度 DEHP 对 INS-1 细胞线粒体途径相关凋亡蛋白表达的影响

Figure 5 Effects of DEHP exposure at different concentrations on expressions of apoptosis proteins related to mitochondrial pathway of INS-1 cells

表 2 不同浓度 DEHP 对 INS-1 细胞线粒体途径凋亡蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of DEHP exposure at different concentrations on relative expressions of apoptosis proteins related to mitochondrial pathway of INS-1 cells

DEHP (μmol/L)	Bax/Bcl-2	Pro Caspase-3	Cleaved Caspase-3	Pro Caspase-9	Cleaved Caspase-9	Cyt-C
0	1.54±0.24	0.38±0.02	0.40±0.01	0.56±0.03	0.11±0.01	0.42±0.04
60	1.53±0.12	0.40±0.01	0.61±0.04 [#]	0.65±0.03	0.16±0.01	0.67±0.03 [#]
120	3.23±0.13 [#]	0.50±0.01	0.64±0.05 [#]	0.63±0.03	0.15±0.00	0.78±0.03 [#]
240	3.07±0.04 [#]	0.76±0.04 [#]	1.11±0.01 [#]	0.87±0.03 [#]	0.43±0.03 [#]	0.90±0.06 [#]

[注] #: 与对照组相比, $P < 0.01$ 。

[Note] #: Compared with the control group, $P < 0.01$.

3 讨论

糖尿病是当今社会最常见的代谢性疾病之一, 胰岛 β 细胞功能障碍是 I 型与 II 型糖尿病发病的共同基础^[8], 而损害胰岛 β 细胞功能的因素包括肥胖、压力、环境污染、不良饮食习惯等, 其重要机制之一是氧化应激对胰岛 β 细胞的损伤^[9]。正常细胞内的促氧化物和抗氧化物维持在平衡状态, 前者包括内源性代谢过程及外源性理化因素损害产生的活性氧, 后者包括非酶系抗氧化物 (如谷胱甘肽, 维生素 B、C、D、E, 微量元素硒等) 和酶系抗氧化物 (如 SOD, GSH-Px 等)^[10]。

INS-1 细胞作为体内唯一能分泌胰岛素的细胞, 其代谢和蛋白质合成能力较强, 但抗氧化物质尤其是谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶的表达量较低, 抗氧化能力较其他细胞更弱, 因此更易受到氧化损伤^[11-12]。

DEHP 作为生产量和使用量最大的增塑剂, 其进入人体后, 首先被酯酶水解为单酯 MEHP, 后者继而发生羟基化和氧化反应, 在生成二级代谢产物 (5cx-MEPP、2cx-MMHP、5OH-MEHP、5oxo-MEHP) 的同时, 也会产生一系列氧化中间产物^[13-14]。本实验表明, DEHP 可造成 INS-1 细胞不同程度的氧化还原稳态失衡及损伤。在实验中, DEHP 引起 INS-1 细胞 ROS 明显增加的最低作用浓度为 30 μmol/L, 低于其他文献报道的 200 μmol/L (睾丸间质细胞) 和 62.5 μmol/L (肝细胞)^[15-16], 造成细胞内抗氧化物 GSH 和 SOD 含量下降的最低浓度分别为 60 μmol/L 和 120 μmol/L, 同样低于其他文献报道的 200 μmol/L (精母细胞)^[17]。尽管 SOD 和 GSH 在低浓度染毒时尚可维持正常, 但 MDA 含量却始终随 DEHP 的作用而升高。以上结果表明, 相较于其他细胞, DEHP 更易造成 INS-1 细胞的氧化应激。对实验结果分析发现, 在较低浓度下 (30 μmol/L), 虽然 INS-1 细胞内 ROS 清除能力不足, 但抗氧化系统尚能维持稳态, GSH/GSSG 值甚至有所升高, 出现毒物兴奋效应, 即低剂量毒物可刺激细胞产生适应性自我保护的过程。而随着 DEHP 浓度升高, 该稳态被打破, SOD 和 GSH 被耗竭, 细胞处于氧化应激状态。

在生理条件下, 细胞的 ROS 主要来源于呼吸过程中线粒体的电子传递, 因此, 线粒体是细胞内产生氧自由基的重要场所, 同时也是最易受到 ROS 攻击的细胞器之一^[18]。氧化应激可导致线粒体膜通透性转换孔开放, 线粒体膜电位下降, 一些原本存在于内外膜之间的促凋亡因子 (如 Cyt-c) 释放入胞质中, 与 Apaf-1、Caspase-9 结合形成凋亡复合体, 最终造成 Caspase-9 活化, 进而激活下游通路。此外, Bcl-2 家族也参与调控与凋亡相关的线粒体事件^[19]。本实验表明, DEHP 可以造成线粒体损伤, 并诱导细胞凋亡。30 μmol/L 的 DEHP 即可明显降低线粒体膜电位, 增加线粒体膜通透性。但预实验结果表明, 此浓度并不会造成 Cyt-c 的释放和凋亡蛋白的表达改变, 因此本研究检测了 60、120、240 μmol/L DEHP 作用下 INS-1 细胞的凋亡蛋白表达情况, 结果显示, 60 μmol/L 的 DEHP 可使 Cyt-c 向胞质中释放, 120 μmol/L 的 DEHP 可改变 Bax 和 bcl-2 的相对表达量, 使促凋亡蛋白 Bax 表达增多, Bax/

Bcl-2 比值升高, 240 $\mu\text{mol/L}$ 的 DEHP 可促进 Caspase-9、Caspase-3 的剪切活化。120 $\mu\text{mol/L}$ 的 DEHP 可诱导细胞凋亡, 且明显增加晚期凋亡细胞的数目。相较于细胞凋亡, 增殖抑制率这一指标则更为敏感, 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 DEHP 即可引起 INS-1 细胞的增殖受到抑制。

综上所述, DEHP 能够造成 INS-1 细胞内 ROS 产生增多, SOD、GSH 耗竭, 进而引起细胞氧化还原稳态失衡, 造成脂质损伤和线粒体功能障碍, 导致线粒体膜电位降低, 促凋亡蛋白 Bax 表达量增加, 促进 Cyt-c 从线粒体中释放入胞质, Caspase-9 与 Cyt-c 结合形成凋亡复合体而活化, 并进一步激活凋亡过程终末剪切酶 Caspase-3, 诱导细胞凋亡并抑制细胞增殖。INS-1 细胞对机体血糖调节有着非常关键的作用, 外源性因素的作用可能通过诱导 INS-1 细胞凋亡和扰乱 INS-1 细胞功能两个途径影响胰岛素的分泌, 由于 INS-1 细胞蛋白质生物合成作用较强, 早先的许多研究都将重点放在研究外源性化学物对 INS-1 细胞内质网应激的作用上^[20], 而关于增塑剂对 INS-1 细胞线粒体的影响国内尚未见报道, 本研究结果为 DEHP 影响胰岛细胞功能的机制探究提供了新思路。但 DEHP 造成的 INS-1 细胞凋亡是否存在其他机制? DEHP 能否在减少 INS-1 细胞数量的基础上同时影响其胰岛素分泌功能? 这些问题仍需进一步探究。

参考文献

- [1] CHEN L, ZHAO Y, LI L, et al. Exposure assessment of phthalates in non-occupational populations in China [J]. *Sci Total Environ*, 2012, 427-428 : 60-69.
- [2] BENJAMIN S, PRADEEP S, JOSH MS, et al. A monograph on the remediation of hazardous phthalates [J]. *J Hazard Mater*, 2015, 298 : 58-72.
- [3] 张励倩, 孙静, 顾磊, 等. 血清中邻苯二甲酸酯与子宫内膜异位症的相关性 [J]. *环境与职业医学*, 2013, 30 (7) : 503-509.
- [4] SHANLE E K, XU W. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling : identification and mechanisms of action [J]. *Chem Res Toxicol*, 2010, 24 (1) : 6-19.
- [5] DALES RE, KAURI LM, CAKMAK S. The associations between phthalate exposure and insulin resistance, β -cell function and blood glucose control in a population-based sample [J]. *Sci Total Environ*, 2018, 612 : 1287-1292.
- [6] STOJANOSKA M M, MILOSEVIC N, MILIC N, et al. The influence of phthalates and bisphenol a on the obesity development and glucose metabolism disorders [J]. *Endocrine*, 2017, 55 (3) : 666-681.
- [7] VISWANATHAN M P, MULLAINADHAN V, CHINNAIYAN M, et al. Effects of DEHP and its metabolite MEHP on insulin signalling and proteins involved in GLUT4 translocation in cultured L6 myotubes [J]. *Toxicology*, 2017, 386 : 60-71.
- [8] QUAN W, JO E K, LEE MS. Role of pancreatic β -cell death and inflammation in diabetes [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2013, 15 (S3) : 141-151.
- [9] NEWSHOLME P, HABER EP, HIRABARA S M, et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction : role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity [J]. *J Physiol*, 2007, 583 (1) : 9-24.
- [10] MAIESE K. New insights for oxidative stress and diabetes mellitus [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015 : 875961.
- [11] NEWSHOLME P, REBELATO E, ABDULKADER F, et al. Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and β -cell function : a critical role for amino acids [J]. *J Endocrinol*, 2012, 214 (1) : 11-20.
- [12] GEHRMANN W, ELSNER M, LENZEN S. Role of metabolically generated reactive oxygen species for lipotoxicity in pancreatic β -cells [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2010, 12 (S2) : 149-158.
- [13] CHOI K, JOO H, CAMPBELL JR J L, et al. *In vitro* intestinal and hepatic metabolism of Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in human and rat [J]. *Toxicol in Vitro*, 2013, 27 (5) : 1451-1457.
- [14] KOCH H M, BOLT H M, PREUSS R, et al. New metabolites of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP [J]. *Arch Toxicol*, 2005, 79 (7) : 367-376.
- [15] ZHOU L, BEATTIE M C, LIN C Y, et al. Oxidative stress and phthalate-induced down-regulation of steroidogenesis in MA-10 Leydig cells [J]. *Reprod Toxicol*, 2013, 42 : 95-101.
- [16] CHEN X, QIN Q, ZHANG W, et al. Activation of the PI3K-AKT-mTOR signaling pathway promotes DEHP-induced Hep3B cell proliferation [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 59 : 325-333.
- [17] ZHU L, LU J, TANG X, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces apoptosis of GC-2spd cells via TR4/Bcl-2 pathway [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 44 : 18-24.
- [18] CIRCU M L, MOYER M P, HARRISON L, et al. Contribution of glutathione status to oxidant-induced mitochondrial DNA damage in colonic epithelial cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47 (8) : 1190-1198.
- [19] SINHA K, DAS J, PAL P B, et al. Oxidative stress : the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis [J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87 (7) : 1157-1180.
- [20] SUN X, LIN Y, HUANG Q, et al. Di (2-ethylhexyl) phthalate-induced apoptosis in rat INS-1 cells is dependent on activation of endoplasmic reticulum stress and suppression of antioxidant protection [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19 (3) : 581-594.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 汪源; 校对: 丁瑾瑜)