

DEHP 低剂量慢性暴露对雌性大鼠糖代谢的影响

李丽萍^{1a, 1b}, 黄凌燕², 张亚娟^{1a, 1b}, 李玲^{1a, 1b}, 张鹏举^{1b}, 刘贺荣^{1b}, 德小明^{1a, 1b}

摘要:

[目的] 观察邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)低剂量慢性暴露对雌性大鼠糖代谢的影响。

[方法] 将24只SPF级雌性SD大鼠随机分为4组,分别为0、3、30、300 mg/kg(以体重计,下同)DEHP染毒组,每组6只,采用喂饲的方式连续染毒46周,定期测量大鼠空腹血糖,并记录体重变化。于末次染毒24 h后,称量大鼠体重,分别进行口服葡萄糖耐量试验(OGTT)、胰岛素耐量实验(ITT),计算曲线下面积(AUC);随后水合氯醛麻醉,心尖取血处死,取肝脏、胰腺、生殖器周围白色脂肪、腓肠肌称重,并保存于10%(体积分数)中性福尔马林中固定,用于组织病理形态观察(腓肠肌除外)。

[结果] DEHP染毒期间,各组大鼠均未出现明显毒作用表现。与0 mg/kg组比较:①各实验组大鼠体重差异均无统计学意义($P>0.05$)。②300 mg/kg组大鼠肝脏脏器系数升高($P<0.05$),其余剂量组均无统计学差异($P>0.05$);各实验组胰腺、生殖器周围白色脂肪、腓肠肌脏器系数差异均无统计学意义($P>0.05$)。③DEHP暴露18周后,300 mg/kg大鼠空腹血糖升高($P<0.05$),其他时点各组差异均无统计学意义($P>0.05$);各组HOMA-IR、ISI、血清胰岛素水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。④OGTT结果显示,雌性大鼠300 mg/kg组服糖后血糖浓度峰值出现早[15 min出现峰值($P=0.004$)],而服糖后60、120 min时血糖浓度明显下降($P=0.038$, $P=0.039$),且服糖后120 min血糖浓度低于空腹水平,血糖AUC降低($P=0.040$);ITT实验结果显示,30 mg/kg组血糖值在15 min时明显低于0 mg/kg组($P=0.029$),300 mg/kg组血糖值下降较为明显,在60、120 min时血糖值下降超过空腹血糖的50%($P=0.017$, $P=0.038$),且恢复至空腹血糖值缓慢,300 mg/kg组血糖AUC降低($P=0.028$)。肝脏病理形态结果显示:各DEHP染毒组大鼠肝细胞出现不同程度增大、水肿,间质疏松,可见不同程度胆管周围炎。胰腺病理形态结果显示:各DEHP染毒组大鼠胰岛面积减小、细胞数量减少。生殖器周围白色脂肪病理形态结果显示各DEHP染毒组大鼠脂肪细胞不同程度缩小、大小不一,细胞排列不整齐。

[结论] DEHP低剂量慢性暴露可能导致雌性大鼠发生胰岛素抵抗。

关键词: 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯; 慢性; 低剂量; 大鼠; 糖代谢

引用: 李丽萍, 黄凌燕, 张亚娟, 等. DEHP低剂量慢性暴露对雌性大鼠糖代谢的影响[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(8): 669-675.
DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16767

Effects of chronic exposure to low-dose DEHP on glucose metabolism in female rats LI Li-ping^{1a, 1b}, HUANG Ling-yan², ZHANG Ya-juan^{1a, 1b}, LI Ling^{1a, 1b}, ZHANG Peng-ju^{1b}, LIU He-rong^{1b}, DE Xiao-ming^{1a, 1b} (1.a.Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance of Ministry of Education b.Department of Occupational and Environmental Health, College of Public Health and Management, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2.Department of Pathology, Tumor Hospital, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China). Address correspondence to LI Li-ping, E-mail: coco1809@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To observe the effects of chronic exposure to low-dose di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on glucose metabolism in female rats.

[Methods] Twenty-four female SPF SD rats were randomly divided into four groups [0, 3, 30, and 300 mg/kg (in terms of body

• 作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 宁夏医科大学2014年中央与地方共建优秀创新团队项目(编号: 30100402)

[作者简介] 李丽萍(1978—),女,硕士,副教授;研究方向:环境有害因素对健康的影响;E-mail: coco1809@163.com

[通信作者] 李丽萍, E-mail: coco1809@163.com

[作者单位] 1.宁夏医科大学 a. 生育力保持教育部重点实验室 b. 公共卫生与管理学院劳动卫生与环境卫生学系,宁夏 银川 750004; 2.宁夏医科大学总医院肿瘤医院病理科,宁夏 银川 750004

weight) DEHP groups, respectively], with six rats in each group, and exposed to DEHP by gavage for continuous 46 weeks. Fasting blood glucose of rats and body weight change were measured regularly. Twenty-four hours after the last exposure, rats' body weight was measured, and oral glucose tolerance test (OGTT) was conducted to estimate area under curve (AUC) of blood glucose over time. Insulin tolerance test (ITT) was also carried out. Then the rats were given chloral hydrate anesthesia and sacrificed to collect samples of heart apex, weigh liver, pancreas, gastrocnemius muscle, and white fat around genital organs, and to observe histopathological changes of the tissues after fixed in 10% neutral formalin (except muscle sample).

[Results] During the DEHP exposure, no obvious toxic effect was observed in any groups. Compared with the 0 mg/kg group, there was no significant difference in the body weight of the experimental groups ($P > 0.05$). The liver organ coefficients of the 300 mg/kg group was elevated ($P < 0.05$) and the other experimental groups showed no differences ($P > 0.05$) compared with the 0 mg/kg group. There were no significant differences in the organ coefficients of pancreas, white fat around genital, and gastrocnemius muscle among the experimental groups ($P > 0.05$). Compared with the 0 mg/kg group, elevated fasting blood glucose was observed in the 300 mg/kg group treated with DEHP for 18 weeks ($P < 0.05$), while there was no significant difference in the fasting blood glucose at different exposure time ($P > 0.05$). The homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), insulin sensitivity index (ISI), and serum insulin levels showed no differences among all groups ($P > 0.05$). The OGTT results showed that, for the 300 mg/kg group, blood glucose reached peak value at 15 min after administration with glucose ($P = 0.004$) then was significantly decreased at 60 min and 120 min after the administration ($P = 0.038$, $P = 0.039$), and the value at 120 min was lower than the fasting level; in addition, the blood glucose AUC was decreased ($P = 0.040$). The ITT results showed that the blood glucose of the 30 mg/kg group at 15 min was significantly lower than that of the 0 mg/kg group ($P = 0.029$); the blood glucose of the 300 mg/kg group was decreased more obviously with a reduction more than 50% at 60 min and 120 min ($P = 0.017$, $P = 0.038$), and returned to the fasting blood glucose value slowly; the blood glucose AUC of the 300 mg/kg group was also decreased ($P = 0.028$). The liver cells of each DEHP exposure group showed edema, interstitial loose, and varied degrees of bile duct inflammation. Shrinkages in area of pancreatic islets and count of islet cells were observed in each DEHP group. The changes of white fat around genitalia of each DEHP group included shrunk cell morphology, different cell sizes, and irregular cell arrangement.

[Conclusion] Chronic exposure to low-dose DEHP can lead to insulin resistance in female rats.

Keywords: di(2-ethylhexyl) phthalate; chronic; low-dose; rat; glucose metabolism

Citation: LI Li-ping, HUANG Ling-yan, ZHANG Ya-juan, et al. Effects of chronic exposure to low-dose DEHP on glucose metabolism in female rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(8): 669-675. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.16767

在世界范围内,糖尿病已成为继心脑血管疾病、癌症之后危害人类健康的第三大慢性非传染性疾病,是严重威胁人类健康的世界性公共卫生问题。遗传和不良生活方式曾被认为是2型糖尿病的重要诱因,但是越来越多的研究指出,环境污染物的暴露对其产生的诱导作用不容忽视,其中作为增塑剂的酞酸酯类(phthalatic esters, PAEs)物质暴露逐渐被认为是诱导机体糖代谢紊乱的一大风险因素。邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯[di(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP]是目前用量最大、应用最广泛的PAEs,其销售量占PAEs总量的40%,广泛应用于食品包装材料和医用材料的生产。由于DEHP与塑料主体基质间为非共价结合,这类物质极易从塑料制品中释放出来,造成环境污染。DEHP现已被美国国家环保局和中国环境监测总站列为优先控制的环境污染物,人群暴露DEHP引发的健康风险不容忽视。DEHP暴露与机体糖代谢紊乱疾病的关联已经引起环境健康专家的重视,是继探索其与生殖异常、性别分化、神经发育以及肿瘤等关联

后的又一新的研究热点^[1]。有研究表明DEHP暴露与胰岛素抵抗、2型糖尿病等糖代谢紊乱疾病之间存在一定的联系^[2-5],但大都局限于流行病学调查研究,相关实验研究报道较少,且目前相关实验研究采用的DEHP浓度通常远高于环境平均浓度,而实际生活中人群的暴露特点是低剂量长期多途径暴露。为了明确DEHP暴露诱导机体糖代谢紊乱的风险及相关作用机制,本研究采用慢性毒理学试验的方法,观察DEHP慢性低剂量暴露对大鼠糖代谢的影响,以期DEHP与机体糖代谢紊乱的相关性研究提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 One Touch 稳豪型血糖仪(强生,美国), YP202N 电子天平(上海精密科学仪器厂,中国), AY220 分析天平(岛津,日本),超薄切片机(Leica, 德国)。

1.1.2 试剂 生物合成胰岛素 100 U/mL(Lilly, 法国),

大鼠胰岛素 ELISA 测定试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司, 中国), One Touch 稳豪型血糖试纸(强生, 美国), 水合氯醛粉剂(武汉能仁医药化工有限公司, 中国)。DEHP 购于国药集团化学试剂有限公司, 由北京科奥协力饲料有限公司按照本实验设计剂量, 将不同体积受试物 DEHP 加入“SPF 级小鼠生长维持颗粒饲料”中混匀分装备用[产品许可证号: 京饲(配)字第 238 号]。其他试剂均为国产试剂。

1.2 实验动物

24 只 SPF 级雌性 SD 大鼠, 3~4 周, 体重 55~65 g, 购于宁夏医科大学实验动物中心, 动物合格证号 SCXK(宁)2011-0001, 动物房合格证号 SYXK(宁)2011-0001。大鼠置于室温 22~25℃, 湿度为 50%~70%, 24 h 昼夜循环光照条件下饲养, 自由饮水、进食。所有动物均依照《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求进行处置^[6]。

1.3 分组与处理

大鼠适应性饲养 1 周后, 按随机数字表法分为 0、3、30、300 mg/kg (1/100 LD₅₀) 4 组, 每组 6 只, 采用喂饲的方式连续染毒 46 周。染毒期间大鼠自由进食、饮水。于末次染毒 24 h 后, 称量大鼠体重后, 依次进行口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)、胰岛素耐量实验(insulin tolerance test, ITT), 随后水合氯醛麻醉, 心尖取血后处死, 血浆于低温离心机离心 15 min (1 123 × g) 后取上清待测, 取肝脏、胰腺、生殖器周围白色脂肪、腓肠肌称重。

1.4 测试指标

1.4.1 大鼠一般状况、体重以及饮食情况测定 染毒期间, 每 2 周称重 1 次, 观察大鼠日常活动情况, 及时发现有无异常、疾病、受伤或死亡; 同时观察大鼠被毛、皮肤、神经、精神以及行为方面有无变化。

1.4.2 定期血糖监测 分别于 8、18、36、46 周检测大鼠空腹血糖 1 次, 检测前禁食时间不少于 12 h, 于前一天晚上 7 点撤走食物, 检测当日于早晨 7 点剪尾采血, 采用血糖仪检测大鼠空腹血糖。

1.4.3 OGTT 大鼠禁食 12 h, 以 50% (体积分数) 葡萄糖灌胃, 剪尾采血, 测量大鼠 0、15、30、60、120 min 血糖值, 并采用梯形累加法计算血糖-时间曲线下面积(area under curve, AUC)。AUC = (X₀ + X₁₅) × 15/2 + (X₁₅ + X₃₀) × 15/2 + (X₃₀ + X₆₀) × 30/2 + (X₆₀ + X₁₂₀) × 60/2 (其中: X₀、X₁₅、X₃₀、X₆₀、X₁₂₀ 分别代表葡萄糖负荷后 0、15、30、60、120 min 时的血糖浓度)。

1.4.4 ITT 于 OGTT 实验结束后, 大鼠禁食 6 h, 以 0.75 U/kg (以体重计) 腹腔注射胰岛素, 采用剪尾采血法, 用血糖仪检测 0、15、30、60、90、120 min 血糖值, 同样采用梯形累加法计算 AUC。方法同“1.4.3”。

1.4.5 大鼠血清胰岛素测定 心尖取血处死大鼠后, 收集的血液离心 (1 123 × g) 后, 取上清, 用 ELISA 试剂盒检测。

1.4.6 计算稳态模型胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment of insulin resistance, HOMA-IR) 和胰岛素敏感指数(insulin sensitivity index, ISI)^[4, 7] HOMA-IR = 空腹胰岛素(mU/L) × [空腹血糖(mmol/L)/22.5]。ISI = 1/Ln[空腹胰岛素(mU/L) × 空腹血糖(mmol/L)]。

1.4.7 脏器系数计算^[8] 脏器系数(%) = 脏器质量/体重 × 100%。

1.4.8 脏器病理形态改变观察 取胰腺、肝脏、生殖器周围白色脂肪组织, 体积分数 10% 中性福尔马林固定, 体积分数 95% 乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋和切片, 苏木素染色后观察其组织形态学改变。

1.5 统计学分析

研究结果采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 Bonferroni 单因素方差分析, 方差不齐采用 Dunnett T3 检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般状况、体重以及饮食情况

染毒期间, 0 mg/kg 组及各 DEHP 染毒组大鼠在染毒期间未见明显异常表现及疾病、受伤或死亡情况发生; 大鼠被毛、皮肤、神经、精神以及行为方面均未见明显异常。与 0 mg/kg 组比较, 各 DEHP 染毒组雌性大鼠体重差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 1。

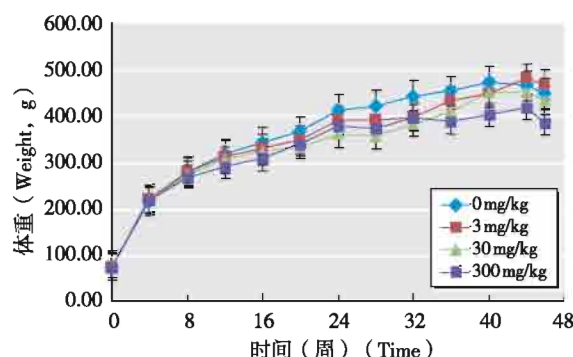


图 1 DEHP 低剂量慢性暴露对雌性大鼠体重增长的影响
Figure 1 Effects of chronic low-dose DEHP exposure on weight gain of female rats

2.2 脏器系数

表1结果显示:与0mg/kg组比较,300mg/kg组大鼠肝脏脏器系数升高,差异有统计学意义($P<0.05$),其余组差异均无统计学意义($P>0.05$);各实验组胰腺、生殖器周围脂肪、腓肠肌系数与0mg/kg组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表1 DEHP低剂量慢性暴露对雌性大鼠脏器系数的影响($\bar{x}\pm s, \%$)

Table 1 Effects of chronic low-dose DEHP exposure on organ coefficients of female rats

组别 (mg/kg) Group	肝脏 Liver	胰腺 Pancreas	生殖器周围脂肪 Fat around genitals	腓肠肌 Gastrocnemius muscle
0	2.49 ± 0.28	0.20 ± 0.04	1.30 ± 0.89	0.47 ± 0.08
3	2.22 ± 0.17	0.18 ± 0.07	1.27 ± 0.93	0.49 ± 0.16
30	2.39 ± 0.23	0.21 ± 0.05	1.87 ± 1.83	0.57 ± 0.02
300	3.44 ± 0.23*	0.23 ± 0.05	1.52 ± 0.60	0.61 ± 0.06
P	0.000	0.654	0.836	0.112

[注]*: 与0mg/kg组比较, $P<0.05$ 。

[Note]*: Compared with the 0mg/kg group, $P<0.05$.

2.3 血糖

2.3.1 不同发育阶段空腹血糖与胰岛功能 与0mg/kg组比较:暴露18周时,300mg/kg组大鼠空腹血糖升高($P<0.05$),其他时间点各染毒组空腹血糖与0mg/kg组比较差异均无统计学意义;各实验组大鼠HOMA-IR、ISI未发生明显变化。见表2。

2.3.2 OGTT结果 雌性大鼠3、30mg/kg组服糖后血糖浓度各时间点与0mg/kg组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。300mg/kg组服糖后血糖浓度急剧增高,峰值出现早[15 min出现峰值,与0mg/kg组比较,差异具有统计学意义($P=0.004$)],而服糖后60、120 min时血糖浓度明显下降[与0mg/kg组比较,差异具有统计学意义($P=0.038, P=0.039$)],且服糖后120 min血糖浓度低于空腹水平,其AUC与对照组比较,差异有统计学意义($P=0.040$)。见图2。

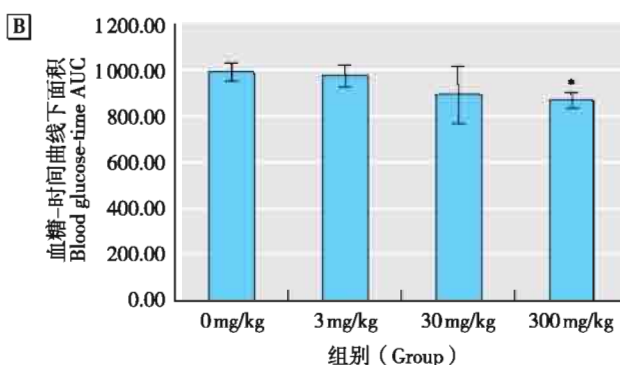
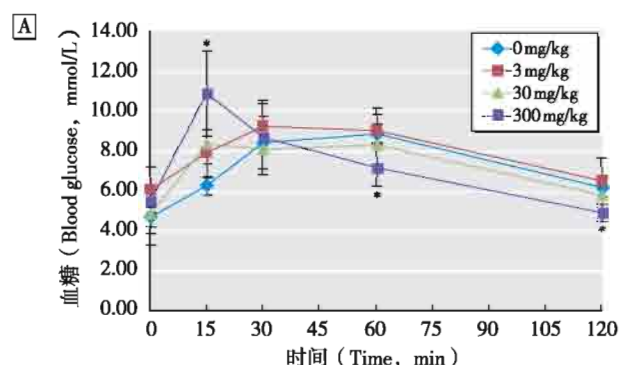
表2 DEHP低剂量慢性暴露对雌性大鼠不同生长阶段空腹血糖、胰岛素、HOMA-IR、ISI的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effects of chronic low-dose DEHP exposure on fasting blood glucose, insulin, HOMA-IR, and ISI at different growth stages of female rats

组别 (Group, mg/kg)	空腹血糖 (Fasting blood glucose, mmol/L)				胰岛素 (Insulin, $\mu\text{g/L}$)	胰岛素抵抗指数 HOMA-IR	胰岛素敏感指数 ISI
	8周 (8 weeks)	18周 (18 weeks)	36周 (36 weeks)	46周 (46 weeks)			
0	5.23 ± 0.44	5.03 ± 0.34	4.70 ± 0.64	4.72 ± 0.58	2.65 ± 0.45	25.47 ± 7.24	0.159 ± 0.008
3	5.37 ± 0.62	5.62 ± 0.33	4.50 ± 0.25	4.76 ± 0.60	2.12 ± 0.59	21.18 ± 6.35	0.163 ± 0.007
30	5.03 ± 0.48	5.25 ± 0.89	4.60 ± 0.19	4.42 ± 0.18	2.87 ± 0.19	30.58 ± 7.60	0.168 ± 0.004
300	5.85 ± 0.75	5.80 ± 0.37*	4.85 ± 0.46	5.06 ± 0.78	2.81 ± 0.24	29.66 ± 5.13	0.167 ± 0.004
P	0.130	0.045	0.606	0.412	0.136	0.259	0.482

[注]*: 与0mg/kg组比较, $P<0.05$ 。

[Note]*: Compared with the 0mg/kg group, $P<0.05$.



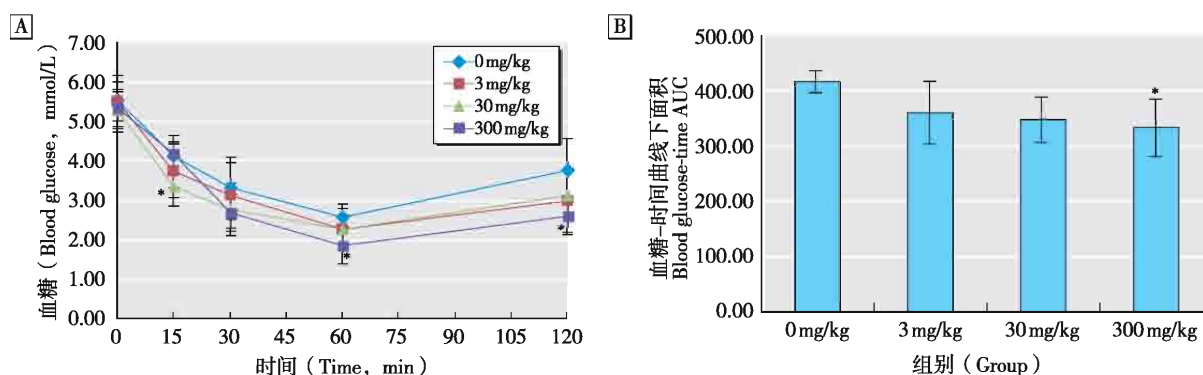
[注]*: 与0mg/kg组比较, $P<0.05$ 。[Note]*: Compared with the 0mg/kg group, $P<0.05$ 。

图2 DEHP低剂量慢性暴露后雌性大鼠OGTT(A)及其AUC(B)结果

Figure 2 Effects on OGTT(A) and OGTT AUC(B) after chronic low-dose DEHP exposure of female rats

2.3.3 ITT结果 雌性大鼠注射胰岛素后,各实验组大鼠血糖值均出现先降低再升高的现象。30mg/kg组血糖值在15 min时明显低于0mg/kg组($P=0.029$);300mg/kg组血糖值下降较为明显,在60、120 min时

血糖值下降超过空腹血糖的50%,与0mg/kg组比较差异均具有统计学意义($P=0.017, P=0.038$),且恢复至空腹血糖值较缓慢。300mg/kg组AUC与0mg/kg组比较,差异具有统计学意义($P=0.028$)。见图3。



[注]*: 与0mg/kg组比较, $P < 0.05$ 。[Note]*: Compared with the 0mg/kg group, $P < 0.05$.

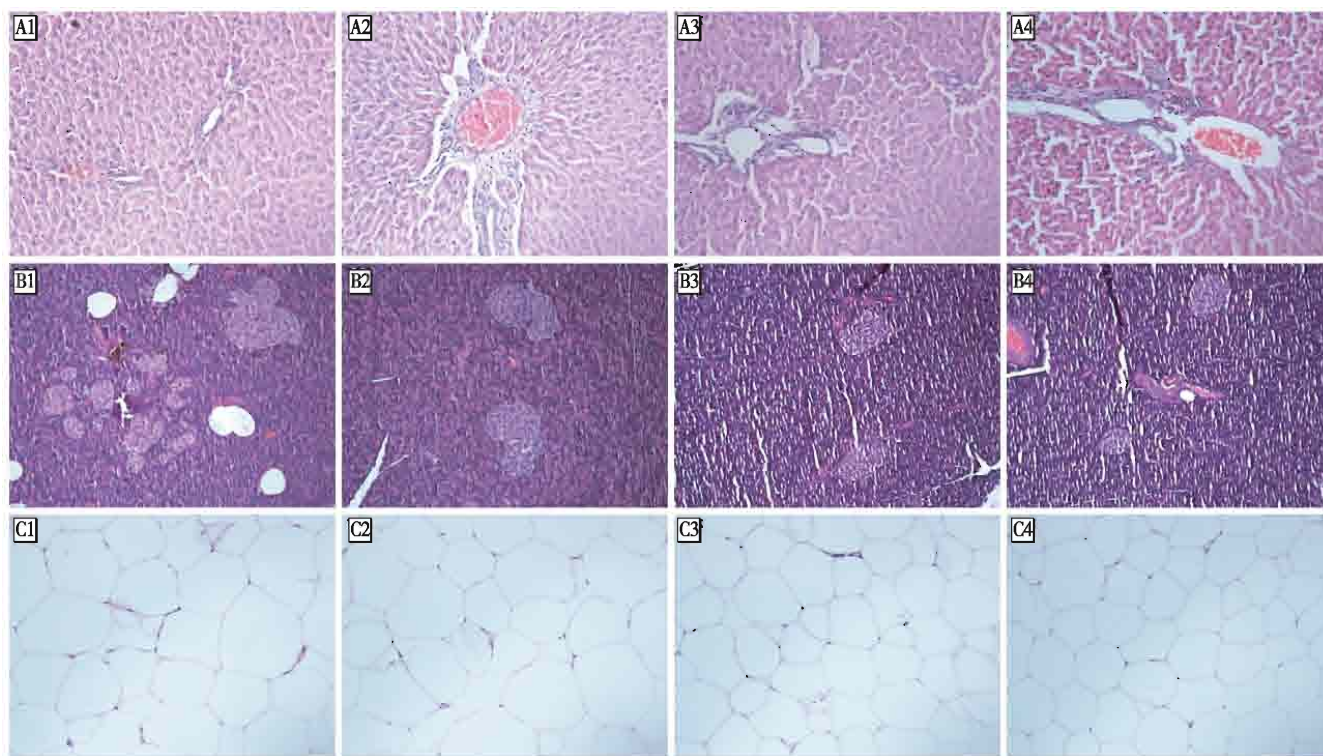
图3 DEHP低剂量慢性暴露后雌性大鼠ITT(A)及其AUC(B)的结果

Figure 3 Effects on ITT(A) and ITT AUC(B) after chronic low-dose DEHP exposure of female rats

2.4 肝脏、胰腺、生殖器周围白色脂肪病理形态

与0mg/kg组比较,各DEHP染毒组大鼠肝细胞出现不同程度增大、水肿,间质疏松,可见不同程度

胆管周围炎;胰岛面积减小、细胞数量减少;脂肪细胞不同程度缩小、大小不一,细胞排列不整齐。见图4。



[注]A: 肝脏($\times 200$); B: 胰腺($\times 100$); C: 生殖器周围白色脂肪($\times 200$)。1: 0mg/kg组; 2: 3mg/kg组; 3: 30mg/kg组; 4: 300mg/kg组。

[Note]A: Liver($\times 200$); B: Pancreatic($\times 100$); C: White fat around genitals($\times 200$)。1: 0mg/kg group; 2: 3mg/kg group; 3: 30mg/kg group; 4: 300mg/kg group.

图4 DEHP低剂量慢性暴露对雌性大鼠组织形态的影响(苏木素染色)

Figure 4 Effects of chronic low-dose DEHP exposure on tissue morphology in female rats (hematoxylin staining)

3 讨论

DEHP是一种典型的环境内分泌干扰物,对其毒性作用的研究主要集中在生殖毒性、免疫毒性和发育毒性方面,目前研究发现DEHP与代谢紊乱有关。

Gayathri^[9]等学者研究发现,在DEHP短期低剂量暴露动物模型中,可以观察到血清胰岛素水平下降和血糖浓度上升,同时存在糖皮质激素水平下降。另外Stahlhut^[10]等研究发现,在美国成年男性尿液中数种

DEHP代谢物浓度的对数与腹型肥胖和胰岛素抵抗呈正相关。

以往关于DEHP毒性作用研究设计的剂量均较高,而人体的暴露特点是长期低剂量多途径暴露。有研究表明,成人血液透析摄入DEHP达 $2.2\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,创伤患者短期大量输血时摄入DEHP更高达 $10\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$;此外,几乎所有的新生儿在医疗保健过程中都有机会暴露DEHP,暴露水平高达 $2.3\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,远超过美国食品药品监督管理局制定的参考剂量 $20\text{ }\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 和欧盟食品安全委员会制定的每日可容许摄入量 $50\text{ }\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ^[11]。

本次研究采用慢性毒理学试验的方法,观察了DEHP慢性低剂量暴露对大鼠糖代谢的影响。结果发现:染毒期间,对照组及各染毒组大鼠均未出现明显毒作用表现,体重差异亦无统计学意义($P>0.05$),表明在该剂量范围慢性经口暴露DEHP不能阻碍/促进雌性大鼠体重的增长。

脏器系数常作为反映实验动物脏器损伤程度的一个较为客观、灵敏有效的指标。有毒物质暴露后,不同脏器会受到不同程度的损伤,如水肿、萎缩、增生等,脏器系数会相应增大或减小。肝脏对维持血糖恒定、调节血糖浓度具有重要的作用,本研究结果显示,300 mg/kg组大鼠的肝脏脏器系数明显高于0 mg/kg组($P<0.05$),病理形态观察结果也显示,各DEHP染毒组大鼠肝细胞出现不同程度增大、水肿,间质疏松,可见不同程度胆管周围炎,均表明慢性经口DEHP暴露可导致肝脏不同程度的肥大、损伤。肝脏是人体内重要的代谢器官,肝脏中糖脂代谢异常会对机体血脂和血糖浓度产生明显影响。机体正常的血糖浓度取决于内源性葡萄糖生成和葡萄糖利用间的动态平衡^[1]。葡萄糖代谢异常被认为是2型糖尿病发病的中心环节。内源性葡萄糖生成主要包括肝脏糖异生和糖原分解两个途径,二者均产生葡萄糖-6-磷酸,经葡萄糖-6-磷酸酶催化生成葡萄糖,释放入血,葡萄糖利用主要发生在骨骼肌。Martinelli等^[12]研究发现雄性Wistar大鼠暴露DEHP出现肝脏组织中葡萄糖-6-磷酸、果糖-6-磷酸、糖原含量降低,葡萄糖激酶活性抑制以及骨骼肌组织中丙酮酸和乳酸含量增加,提示DEHP暴露可能通过破坏肝脏糖异生和糖原分解,引发血糖升高,导致骨骼肌摄取葡萄糖进行无氧酵解等生化反应增加,乳酸和丙酮酸含量升高,并经血液继续转运至肝脏进行糖异生作用,形成一个恶性循环,导致机体

血糖不断升高^[1]。

胰腺的结构和功能改变、胰岛素分泌功能受损,是2型糖尿病发生发展的重要原因之一。本研究结果显示,DEHP经口慢性低剂量暴露可不同程度损伤雌性大鼠胰腺组织结构,各DEHP染毒组大鼠胰岛面积减小、细胞数量减少。王婧^[13]研究发现DEHP不能直接引发糖尿病的发生,而在联合作用诱导的建模组,DEHP暴露发挥了明显的辅助效应,加重对胰岛组织造成的损伤,反映出DEHP对糖尿病发病的影响并不是通过促进糖尿病发生实现的。

脂肪细胞变化是胰岛素抵抗在细胞水平层面上的主要体现,在胰岛素抵抗的发生、发展过程中起到了关键作用^[14]。本研究结果显示,各DEHP染毒组大鼠脂肪细胞不同程度缩小、大小不一,细胞排列不整齐,表现为脂肪细胞增殖旺盛,提示DEHP经口慢性低剂量暴露可能通过影响脂肪细胞的增殖而导致雌性大鼠发生胰岛素抵抗。

根据葡萄糖稳态调控机制,OGTT是用于诊断糖尿病的重要方法,其能有效检测出糖尿病前期以及糖耐量受损受试者^[15]。本次研究中,OGTT结果显示,300 mg/kg组服糖后血糖浓度急剧增高,峰值出现早,而服糖后60、120 min时血糖浓度明显下降,服糖后120 min血糖浓度又低于空腹水平,AUC低于对照组,均表明该剂量DEHP慢性暴露可引起雌性大鼠发生糖耐量异常现象,干扰雌性大鼠糖代谢。ITT是通过测量注射胰岛素后的血糖变化,评价胰岛素敏感性^[16]。ITT结果显示:雌性大鼠注射胰岛素后各实验组血糖值均出现先降低再升高的现象,30 mg/kg组血糖值在15 min时明显低于0 mg/kg组,300 mg/kg组血糖值下降较为明显,在60、120 min时血糖值下降超过空腹血糖的50%,且恢复至空腹血糖值缓慢。与0 mg/kg组比较,300 mg/kg组AUC降低,均表明DEHP低剂量慢性暴露可引起雌性大鼠发生胰岛素抵抗。

胰岛素抵抗的发展先于高血糖症的发生,并且在糖尿病发生前维持很长一段时间,胰岛素抵抗是可逆的代谢紊乱状态,因此早期识别,对于改善糖调节受损和预防糖尿病具有重要意义。本研究成功建立了DEHP低剂量慢性暴露动物模型,通过实验观察、实验室检测及病理学观察,为DEHP与机体糖代谢紊乱的相关性研究提供研究基础,但关于DEHP与机体糖代谢紊乱的作用机制还有待进一步探索与研究。

参考文献

- [1] 孙霞, 林怡, 董四君. 邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯暴露与糖代谢紊乱相关性的研究进展[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(3): 413-419.
- [2] James-Todd T, Stahlhut R, Meeker JD, et al. Urinary phthalate metabolite concentrations and diabetes among women in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2001-2008[J]. Environ Health Perspect, 2012, 120(9): 1307-1313.
- [3] Svensson K, Hernández-Ramírez RU, Burguete-García A, et al. Phthalate exposure associated with self-reported diabetes among Mexican women[J]. Environ Res, 2011, 111(6): 792-796.
- [4] Kim JH, Park HY, Bae S, et al. Diethylhexyl phthalates is associated with insulin resistance via oxidative stress in the elderly: a panel study[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71392.
- [5] Lind PM, Zethelius B, Lind L. Circulating levels of phthalate metabolites are associated with prevalent diabetes in the elderly[J]. Diabetes Care, 2012, 35(7): 1519-1524.
- [6] 科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见(国科发财字[2006]398号)[EB/OL]. (2006-09-30)[2016-11-25]. http://www.most.gov.cn/fggw/zfwj/zfwj2006/200609/t20060930_54389.htm.
- [7] 尹玉竹, 范建辉, 湛小卫, 等. 胰岛素抵抗与胰岛素分泌在妊娠期糖代谢异常发病中的作用[J]. 中国医师杂志, 2006, 8(9): 1167-1169.
- [8] 丁世彬. 双酚A和染料木黄酮对大鼠糖脂代谢的影响[D]. 武汉: 华中科技大学, 2014.
- [9] Gayathri NS, Dhanya CR, Indu AR, et al. Changes in some hormones by low doses of di(2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP), a commonly used plasticizer in PVC blood storage bags & medical tubing[J]. Indian J Med Res, 2004, 119(4): 139-144.
- [10] Stahlhut R W, van Wijngaarden E, Dye TD, et al. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males[J]. Environ Health Perspect, 2007, 115(6): 876-882.
- [11] Koch HM, Preuss R, Angerer J. Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): Human metabolism and internal exposure-an update and latest results[J]. Int J Androl, 2006, 29(1): 155-165.
- [12] Martinelli MI, Mocchiutti NO, Bernal CA. Dietary di(2-ethylhexyl) phthalate-impaired glucose metabolism in experimental animals[J]. Hum Exp Toxicol, 2006, 25(9): 531-538.
- [13] 王婧. DEHP染毒小鼠2型糖尿病模型的建立与初步研究[D]. 武汉: 华中师范大学, 2011.
- [14] 秦培洁. 姜黄素对2型糖尿病模型大鼠及3T3-L1前脂肪细胞PTP1B通路的影响研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [15] Bartoli E, Fra GP, Carnevale Schianca GP. The oral glucose tolerance test(OGTT) revisited[J]. Eur J Intern Med, 2011, 22(1): 8-12.
- [16] Muniyappa R, Lee S, Chen H, et al. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008, 294(1): E15-E26.

(收稿日期: 2016-11-25; 录用日期: 2017-02-28)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 陈姣)