

邻苯二甲酸单乙基己基酯对 HepG2 细胞内三酰甘油合成的影响

贺真, 白剑英, 李耀福, 姜雪霞, 谭清, 夏娜, 杨守林

山西医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 山西 太原 030001

摘要:

[目的] 邻苯二甲酸盐是一类公认的环境内分泌干扰物, 其作为塑化剂的普遍应用性使得人们可通过各种途径广泛接触, 并越来越关注其健康危害。尽管现有的文献报道了邻苯二甲酸盐的肝脏毒性, 但是具体机制还需进一步研究。本研究通过观察邻苯二甲酸单乙基己基酯 (MEHP) 对 HepG2 细胞内三酰甘油 (TG) 合成的影响, 从而进一步探讨 MEHP 对脂肪代谢的影响。

[方法] 分别用不同浓度的 MEHP (0、0.8、4.0、20.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$) 以及 0.05 mmol/L 油酸 (OA, 阳性对照) 对 HepG2 细胞染毒 24、48 h, 用化学-酶法测定 HepG2 细胞内以及细胞培养液上清中 TG 含量。用不同浓度的 MEHP (0、0.01、1.0、10.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$) 以及 1 mmol/L OA (阳性对照) 对 HepG2 细胞进行染毒 6、24、48 h, 采用实时定量 PCR 法检测细胞内 TG 合成相关基因 *GPAM*、*AGPAT2*、*LPIN2*、*DGAT2* 的 mRNA 表达水平。

[结果] 与阴性对照组比较: 染毒 24 h, 仅 0.5 mmol/L OA 可使 HepG2 细胞上清 TG 含量增加, 20.0~100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 和 0.5 mmol/L OA 可使 HepG2 细胞内 TG 含量增加 ($P < 0.05$); 染毒 48 h, 100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 和 0.5 mmol/L OA 可使 HepG2 细胞上清 TG 含量增加, 20.0~100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 和 0.5 mmol/L OA 可使 HepG2 细胞内 TG 含量增加 ($P < 0.05$)。与阴性对照组比较: 1.0~100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 染毒 6 h, 100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 染毒 24 h 以及 10.0~100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 染毒 48 h 均可使 HepG2 细胞内 *GPAM* mRNA 的表达水平升高 ($P < 0.05$); 不同浓度 MEHP 染毒 6、24、48 h, *AGPAT2* mRNA 的表达水平均升高 ($P < 0.05$); 染毒 6、24、48 h, *LPIN2* mRNA 表达水平在 10.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 剂量组均升高 ($P < 0.05$); 染毒 6 h, 10.0、100 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 使细胞内 *DGAT2* mRNA 的表达水平升高 ($P < 0.05$); 染毒 24 h, 仅有 100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 可使 *DGAT2* mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$); 染毒 48 h, MEHP 染毒各剂量组均可使 *DGAT2* mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$)。

[结论] 高剂量 MEHP 染毒可引起 HepG2 细胞内 TG 含量增加, 导致肝细胞内脂质代谢紊乱。

关键词: 邻苯二甲酸单乙基己基酯; HepG2 细胞; 三酰甘油; 脂质累积

Effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate on triglyceride synthesis in HepG2 cells HE Zhen, BAI Jian-ying, LI Yao-fu, JIANG Xue-xia, TAN Qing, XIA Na, YANG Shou-lin (Department of Environmental Health, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract:

[Objective] Phthalates is a kind of recognized environmental endocrine disruptors, and its universal applications as a plasticizer allow various exposure pathways and have raised increasing health concerns. Although available studies have reported its hepatotoxicity, the specific mechanism requires further investigation. This study is designed to observe the effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on triglyceride (TG) synthesis in HepG2 cells, and to further assess the effects of MEHP on lipid metabolism.

[Methods] HepG2 cells were treated with various concentrations of MEHP (0, 0.8, 4.0, 20.0, and 100.0 $\mu\text{mol/L}$) and 0.5 mmol/L oleic acid (OA, positive control) for 24 h and 48 h, respectively, and detected for intra- and extra-hepatocellular TG contents by chemical-enzymatic method. HepG2 cells were treated with various concentrations of MEHP (0, 0.01, 1.0, 10.0, and 100.0 $\mu\text{mol/L}$) and 1 mmol/L OA (positive control) for 6 h, 24 h, and 48 h, respectively, and measured for the mRNA expression levels of genes related to TG synthesis by real-time quantitative PCR, including *GPAM*, *AGPAT2*, *LPIN2*, and *DGAT2*.

[Results] Compared with the negative control group, after 24 h treatment, only the 0.5 $\mu\text{mol/L}$

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18806

基金项目

山西省自然科学基金 (201701D121140)

作者简介

贺真 (1991—), 女, 硕士生;
E-mail: 525287101@qq.com

通信作者

白剑英, E-mail: jybai66@aliyun.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2018-12-04

录用日期 2019-02-25

文章编号 2095-9982(2019)04-0339-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

贺真, 白剑英, 李耀福, 等. 邻苯二甲酸单乙基己基酯对 HepG2 细胞内三酰甘油合成的影响 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (4): 339-344.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18806

Funding

This study was funded.

Correspondence to

BAI Jian-ying, E-mail: jybai66@aliyun.com

Competing interests None declared

Received 2018-12-04

Accepted 2019-02-25

►To cite

HE Zhen, BAI Jian-ying, LI Yao-fu, et al. Effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate on triglyceride synthesis in HepG2 cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(4): 339-344.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18806

OA significantly increased the extra-hepatocellular TG contents, and the 20-100 $\mu\text{mol/L}$ MEHP and the 0.5 $\mu\text{mol/L}$ OA significantly increased the intra-hepatocellular TG contents ($P < 0.05$); after 48 h treatment, the 100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP and the 0.5 $\mu\text{mol/L}$ OA significantly increased the extra-hepatocellular TG contents, and the 20.0-100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP and 0.5 $\mu\text{mol/L}$ OA significantly increased the intra-hepatocellular TG contents ($P < 0.05$). Compared with the negative control group, the mRNA expression levels of *GPAM* were increased in HepG2 cells treated with 1.0-100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP for 6 h, 100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP for 24 h, and 10.0-100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP for 48 h ($P < 0.05$); the mRNA expression levels of *AGPAT2* were increased after exposure to all designed concentrations of MEHP for 6, 24, and 48 h ($P < 0.05$); the mRNA expression levels of *LPIN2* were increased after 10.0-100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP exposure for 6, 24, and 48 h ($P < 0.05$); the mRNA expression levels of *DGAT2* were increased after being treated with 10.0-100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP for 6 h, 100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP for 24 h, and 0.01-100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP for 48 h ($P < 0.05$).

[Conclusion] High concentrations of MEHP can increase TG contents in HepG2 cells, leading to lipid metabolism disorder.

Keywords: mono(2-ethylhexyl) phthalate; HepG2 cell; triglyceride; lipid accumulation

塑化剂, 又称增塑剂, 工业上被广泛用作高分子材料助剂, 以增加材料的柔韧性^[1]。邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(diethylhexyl phthalate, DEHP)是目前用量最大且应用最广泛的邻苯二甲酸酯类增塑剂, 已被世界卫生组织列为环境内分泌干扰物^[2]。由于DEHP与聚合物基质间为非共价键结合, 在塑料制品使用过程中, DEHP极易从塑料中释放出来, 并对环境造成污染^[3]。同时, DEHP可以经消化道、呼吸道、静脉输液、皮肤吸收等多种方式进入人体, 并在体内代谢成一种有毒的代谢物——邻苯二甲酸单乙基己基酯[mono-(2-ethylhexyl) phthalate, MEHP], 实验证据表明MEHP的毒性效力可达DEHP的10倍, 是DEHP暴露可靠的生物标志。本课题组研究发现, MEHP染毒确实对HepG2细胞活力有抑制作用, 并存在明显的剂量效应关系^[4]。多项研究也证实, DEHP长期低剂量暴露可对人体健康和动物造成不同程度的危害, 具有明显的生殖发育毒性^[5-6]、免疫毒性^[7-8]以及肝毒性等^[9-10]。肝脏是毒物代谢的主要器官, DEHP对肝脏的影响不容忽视。有研究显示DEHP染毒可致大鼠肝脏肿大, 脏体比值增加, 肝窦变窄, 肝细胞水肿, 个别细胞出现空洞产生脂肪变性^[11]。DEHP的大鼠肝毒性作用主要是由其代谢产物MEHP所致, MEHP在肝脏中累积量最多^[12]。在这些研究的基础上, 有理由推测, MEHP可诱导脂质合成过程发生改变, 而脂质在肝脏中的蓄积作用可能会加速2型糖尿病、肥胖症、高脂血症、脂肪肝和动脉粥样硬化的发展。为此, 本研究以肝细胞HepG2为研究对象, 探讨DEHP的主要代谢产物MEHP对人体肝细胞内三酰甘油(triacylglycerol, TG)合成的主要影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

二氧化碳培养箱(Eppendorf, 美国), 台式高速冷冻离心机(力康生物医疗科技控股有限公司, 中国),

BX51倒置显微镜(Olympus, 日本), YGC-96型氮吹仪(成都雅源科技有限公司, 中国), UV-2450型紫外分光光度计(上海纳诺仪器有限公司, 中国), Line Gene9600荧光定量PCR仪(杭州BIOER科技有限公司, 中国)。

DMEM高糖培养基(Gibco, 美国), 小牛血清(杭州四季青生物材料公司, 中国), MEHP(Aladdin, 美国), 二甲基亚砜(北京Solarbio life sciences公司), 油酸(Sigma, 美国), E1003三酰甘油酶法测定试剂盒(北京普利莱试剂有限公司, 中国), 胰蛋白酶、BCA蛋白质定量试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, 中国), 异丙醇、己烷、乙醚、氯仿、乙醇(天津化学试剂三厂, 中国), RNAiso Plus、反转录试剂盒PrimerScript RT MASTER Mix、SYBR®Premix Ex Taq™II(TaKaRa, 中国), PCR引物(生工生物工程有限公司, 中国)。

1.2 细胞培养

将人肝癌细胞株HepG2细胞(购自中国上海细胞生物研究所)接种于含10%(体积分数)胎牛血清的DMEM完全培养基。于37℃、5%CO₂(体积分数)培养箱中培养, 每天更换一次培养基, 隔天进行细胞传代。选择对数生长期的细胞进行进一步实验。将MEHP溶于二甲基亚砜, 配置成500 mmol/L储备液, 待用时再溶于DMEM完全培养基中并进行稀释。共设置6个剂量组: 1个阴性对照组(完全培养基), 1个阳性对照组(油酸, oleic acid, OA), 4个MEHP处理组(MEHP染毒剂量参照毒理学研究相关文献^[13]、课题组前期MTT细胞活力检测实验^[4]以及流行病学人群暴露水平筛选实验浓度^[14])。

1.3 HepG2细胞内总TG含量的测定

待细胞处于对数生长期时, 调整合适的细胞密度并接种于6孔板中, 每组8个平行, 培养24 h后分别以0.8、4.0、20.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP进行染毒24 h和48 h, 留取细胞上清液用于测定上清中TG含量。用1×PBS缓冲液清洗细胞1次, 每孔加入2 mL PBS缓冲液, 轻轻吹打制成细胞悬液。其中1 mL细胞悬液用二

喹啉甲酸法 (BCA) 法进行蛋白定量, 另外 1 mL 用来测定 TG 的含量。测定细胞内总 TG 含量时, 首先取 2 mL 异丙醇-己烷-水混合液 (体积比为 80:20:2) 加至已标记好的玻璃试管中, 将 250 μ L 的细胞悬液加至上述玻璃管中, 避光静置 30 min。各试管中加入 500 μ L 己烷-乙醚混合液 (体积比为 1:1)。然后各管中加入 1 mL 蒸馏水, 避光静置 10 min 直到水相与有机相完全分离。最后从上层有机相中取出 400 μ L 至干燥玻璃试管并标记, 用氮吹仪吹干样品。按照 TG 试剂盒说明采用化学-酶法分析各组细胞内或上清中 TG 含量。同时按说明书配置甘油标准品, 并取梯度稀释的标准品各 10 μ L 加入干燥玻璃试管中。向吹干的各样品玻璃管中加入 10 μ L 三蒸水, 再向标准品和样品玻璃管中均加入 190 μ L 工作液 ($R_1:R_2=4:1$), 而后置于 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡培养箱中孵育 10 min。最后移取 150 μ L 各玻璃管中溶液于 96 孔酶标板内, 在 550 nm 波长处测量光密度 (D)。细胞内测定结果用蛋白含量进行校正。

1.4 HepG2 细胞内 TG 合成相关基因表达的测定

把处于对数生长期的细胞接种于 6 孔板, 调整细胞密度为 3×10^6 mL $^{-1}$ 。以 0.01、1.0、10.0、100.0 μ mol/L 的浓度进行染毒, 每个实验组设置三个平行对照, 分别染毒 6、24、48 h。Trizol 法提取细胞总 RNA, 然后用紫外分光光度计读取 RNA 在 260 nm 和 280 nm 处的 D 值及两者的比值 R , 来检测 RNA 的纯度和浓度 ($R=D_{260}/D_{280}$)。用两步反转录法进行 cDNA 的合成, 在冰上进行操作。用 5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix 试剂反转录合成 cDNA。然后将 cDNA 和添加了耐热性 RNA 酶的 SYBR Green Premix Ex Taq II 混合, 用实时定量 PCR 法在 BIOER Line gene 9600 序列检测系统对目的基因进行探测。荧光发射数据要求 60 $^{\circ}$ C 退火和 40 个循环。基因引物序列见表 1。加样时, 同一剂量组和基因做 3 个复孔, 反应

结束后确认扩增曲线及熔解曲线, 取 C_t 值的平均值, 再用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算各基因的相对表达量。

1.5 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, 采用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计学分析。多组间比较使用单因素方差分析。若总体方差齐, 用 LSD 检验进行组间两两比较; 若总体方差不齐, 则采用 Games-Howell 检验。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 对 TG 含量的影响

由表 2 可看出, 与阴性对照组比较, 染毒 24 h, 仅 0.5 mmol/L OA 可使 HepG2 细胞上清 TG 含量增加, 20.0~100.0 μ mol/L MEHP、0.5 mmol/L OA 可使 HepG2 细胞内 TG 含量增加 ($P<0.05$)。染毒 48 h, 100.0 μ mol/L MEHP 和 0.5 mmol/L OA 可使 HepG2 细胞上清 TG 含量增加, 20.0~100.0 μ mol/L MEHP 和 0.5 μ mol/L OA 可使 HepG2 细胞内 TG 含量增加 ($P<0.05$)。

表 2 不同浓度 MEHP 染毒对 HepG2 细胞内及上清中 TG 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$, mmol/g)

Table 2 Effects of MEHP at designed concentrations on the intra- and extra-hepatocellular TG levels in HepG2 cells

组别 Group	细胞内 Intra-hepatocellular		上清中 Extra-hepatocellular	
	24 h	48 h	24 h	48 h
阴性对照 Negative control	0.26 $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.02
0.8 μ mol/L MEHP	0.31 $\pm$ 0.08	0.62 $\pm$ 0.06	0.17 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01
4.0 μ mol/L MEHP	0.35 $\pm$ 0.04	0.66 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.02
20.0 μ mol/L MEHP	0.48 $\pm$ 0.08*	1.00 $\pm$ 0.33*	0.19 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.02
100.0 μ mol/L MEHP	0.54 $\pm$ 0.11*	1.13 $\pm$ 0.25*	0.17 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.02*
0.5 mmol/L OA	0.60 $\pm$ 0.08*	2.16 $\pm$ 0.40*	0.26 $\pm$ 0.03*	0.18 $\pm$ 0.02*
F	5.794	19.14	3.744	15.925
P	0.003	<0.001	0.020	<0.001

[注] *: 与阴性对照组比较, $P<0.05$ 。

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

2.2 对 TG 合成相关基因 mRNA 表达的影响

2.2.1 *GPAM* 与阴性对照组比较, 1.0~100 μ mol/L MEHP 染毒 6 h, 100 μ mol/L MEHP 染毒 24 h 以及 10.0~100.0 μ mol/L MEHP 染毒 48 h 均可使 HepG2 细胞内 *GPAM* mRNA 的表达水平升高 ($P<0.05$) (图 1A)。

2.2.2 *AGPAT2* 和 *LPIN2* 与阴性对照组比较, 不同浓度 MEHP 染毒 6、24、48 h, *AGPAT2* mRNA 表达水平均升高 ($P<0.05$) (图 1B)。与阴性对照组比较, 10.0、100.0 μ mol/L MEHP 染毒 6、24、48 h 均使 *LPIN2* mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$) (图 1C)。

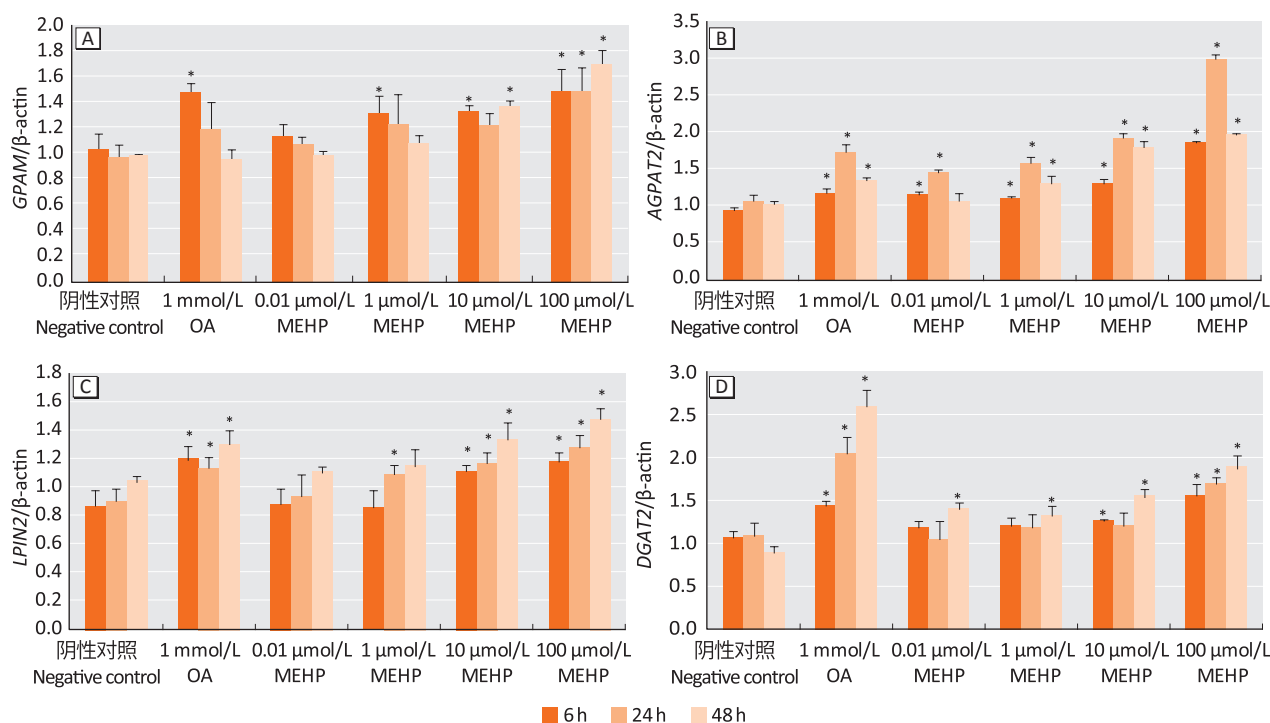
表 1 实时定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time quantitative PCR

基因 (Gene)	引物序列 (Primer sequence, 5'-3')
<i>β-actin</i>	正向 (Forward): TGGCACCCAGCACAATGAA
	反向 (Reverse): CTAAGTCATAGTCCGCTAGAAGCA
<i>GPAM</i>	正向 (Forward): TGATTGCAATCTGGCTGAG
	反向 (Reverse): AGATCAATTCCCTGCCTGTG
<i>AGPAT2</i>	正向 (Forward): GTCACAGTGACAGGTGCTGGAAG
	反向 (Reverse): TGGAGATGTGGAGGAAGTGGTTC
<i>LPIN2</i>	正向 (Forward): AATCAACGGCAGTGCACTGGATC
	反向 (Reverse): AATTGGTGAGGTGGCAAGGTAAGC
<i>DGAT2</i>	正向 (Forward): CCTGGCAAGAATGCAGTCAC
	反向 (Reverse): GGCGAAACCAATGTATTCTGGA

2.2.3 DGAT2 与阴性对照组比较, 染毒6h时, 10.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 均可使 *DGAT2* mRNA 表达水平升高 ($P<0.05$) ; 染毒时间达到24h后, 仅有100 $\mu\text{mol/L}$

MEHP 使细胞内 *DGAT2* mRNA 的表达水平升高 ($P<0.05$) ; 当染毒时间达到48h, 0.01~100 $\mu\text{mol/L}$ MEHP 均可使 *DGAT2* mRNA 的表达水平升高 ($P<0.05$) (图1D)。



[注] A: *GPAM*; B: *AGPAT2*; C: *LPIN2*; D: *DGAT2*。*: 与阴性对照组相比, $P<0.05$ 。

[Note] A: *GPAM*; B: *AGPAT2*; C: *LPIN2*; D: *DGAT2*。*: Compared with the negative control group, $P<0.05$.

图1 MEHP对HepG2细胞TG合成相关基因表达水平的影响

Figure 1 Effects of MEHP treatment on the mRNA expression levels of genes related to triglyceride synthesis in HepG2 cells

3 讨论

DEHP是塑料行业应用最为广泛的一种增塑剂,也是一类重要的环境内分泌干扰物。动物实验研究发现,DEHP可引起肝脏的脏体比值增加,形态学分析可见肝细胞体积肿胀、脂肪空泡形成,胞浆疏松^[12, 15],提示其可能导致非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)。随着生活方式和饮食结构的变化,NAFLD的患病率逐年升高。在美国,NAFLD成为慢性肝病的最主要原因之一,美国成人患病率达10%~24%;在我国,NAFLD的发病率也达到15%~20%^[16]。NAFLD是一组以肝细胞脂肪变性、坏死,炎性细胞浸润等为主要特征的临床病理综合征。脂肪在肝脏的蓄积是脂肪性肝病形成的重要因素,游离的脂肪酸进入肝脏,重新酯化变成TG。而TG增多、极低密度脂蛋白合成及分泌减少、TG转运障碍均可导致脂肪在肝细胞的蓄积并形成脂肪肝^[17]。DEHP主要通过其代谢物MEHP来发挥毒性作用,即MEHP对DEHP的毒性作用负有责任,至少是部分责任^[18]。因此,探讨MEHP对

TG合成的影响,可以为研究MEHP对肝脏脂质代谢的作用提供参考。

本课题组前期的研究已经证实DEHP和MEHP对HepG2细胞活力有明显的抑制作用,说明较高浓度的DEHP和MEHP对肝癌细胞存在直接的损伤作用^[4],并通过油红O染色法在不同浓度DEHP、MEHP染毒的HepG2细胞内观察到脂滴,说明DEHP、MEHP可引起HepG2细胞发生脂肪蓄积。在此基础上,课题组还进行了细胞内和上清中TG含量测定以进一步验证MEHP致HepG2细胞发生脂肪蓄积的作用。在本实验中,TG含量测定结果发现,20.0~100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP染毒24、48h,均可使细胞内TG含量增加,这说明MEHP确实可以引起HepG2细胞内脂肪代谢紊乱。而100.0 $\mu\text{mol/L}$ MEHP染毒48h,细胞外TG含量增加,推测可能是由于MEHP染毒干扰了HepG2细胞内极低密度脂蛋白的合成和分泌,从而使多余的TG不能完全被转运至细胞外而导致胞内和胞外的TG含量均增加,而TG在非脂肪细胞中的过度积累是一种病理表现。

TG 是机体主要的储能物质, 对于肝脏中产生极低密度脂蛋白也是必不可少的。TG 合成和储存的紊乱, 可增加心血管疾病、糖尿病和血脂异常的易感性^[19-20]。资料显示, TG 的合成主要通过单酰甘油途径和二酯甘油途径^[21]。甘油一酯途径主要发生在小肠黏膜细胞^[22], 而甘油二酯途径则发生在大多数细胞类型中, 如肝细胞和脂肪细胞^[23]。甘油-3-磷酸酯的酰化过程是逐步发生的, 每个酰基由不同的酰基转移酶催化。甘油-3-磷酸酰基转移酶 (glycerol-3-phosphate acyltransferases, GPATs) 是 TG 合成的第一步反应, 催化甘油-3-磷酸和脂肪酰基-辅酶 A 生成溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA)。尽管其线粒体亚型 GPAM 在脂肪组织中含量很低, 但在肝脏中占 GPATs 总活性的 50%^[24], 提示 GPAM 可能是肝细胞中参与 TG 生物合成的酶。本实验发现 MEHP 处理后 HepG2 细胞内 GPAM mRNA 表达水平升高, 提示 TG 合成的第一步反应被有效激活。随后 LPA 和脂肪酰基-辅酶 A 在 AGPAT 家族催化下, 产生磷脂酸 (phosphatidic acid, PA), 它可以作为二酰甘油 (diacylglycerol, DAG) 的前体。AGPAT 可通过酰化作用在甘油主链的甘油第二个碳链位置 (Sn-2) 加入一个酰基。在 AGPAT 家族中, AGPAT2 高表达于脂肪组织、肝脏和心脏^[25]。AGPAT2 也被证实是家族中唯一与人类疾病——先天性全身性脂肪营养不良直接相关的成员。本实验发现, MEHP 处理后, AGPAT2 mRNA 表达水平在各剂量组均有明显的升高, 且随着剂量组的增加表现出明显的剂量效应关系, 这种关系在 24 h 时表现最为明显, 提示 MEHP 可影响 HepG2 细胞内 TG 的合成。

随后, lipin 催化磷脂酸去掉磷酸基, 生成 DAG。lipin 是磷脂酶磷酸酶的一个保守家族, 哺乳动物基因组中含有三个脂肪酶家族成员的基因, 分别是 LPIN1、LPIN2、LPIN3^[26]。其中 LPIN2 缺乏会影响包括肝脏和大脑等非脂肪组织的脂质稳态, 并在人类中引起马吉德综合征^[27-28]。最终, 通过 DGAT 在 Sn-3 位点进一步酰化, DAG 与脂肪酰基-辅酶 A 反应生成 TG。有研究发现, DGAT1 可能是在小肠中通过单酰甘油途径重新包装游离脂肪酸中发挥作用, 而 DGAT2 可能主要在 TG 合成和肝脏输出中发挥作用^[29]。本实验发现, 染毒 6、24、48 h, MEHP 高剂量组均可使 LPIN2 和 DGAT2 mRNA 表达水平升高, 且随着染毒时间的延长, mRNA 表达水平升高的也越来越明显。推测随着染毒时间的增加, LPIN2 的高表达为细胞内 TG 的合成提供更多底

物, 促进 DGAT2 的催化作用, 促使 DAG 更多地向 TG 转化, 从而使 HepG2 细胞内 TG 出现大量蓄积, 最终导致细胞内发生脂质代谢紊乱。

综上所述, 高剂量 MEHP 可引起 HepG2 细胞内 TG 含量增加, 导致 HepG2 细胞内发生脂肪堆积, 可能是通过增加细胞内 GPAM、AGPAT2、LPIN2、DGAT2 mRNA 的表达水平, 从而使细胞内的 TG 合成增加, 最终导致脂质代谢发生紊乱。同时, 这些基因表达水平的异常, 无疑将进一步吸引研究者们对这些酶在 TG 和磷脂合成、脂质信号转导和脂质代谢中的作用进行深层次的探索。

参考文献

- [1] LATINI G. Monitoring phthalate exposure in humans [J]. Clin Chim Acta, 2005, 361 (1/2): 20-29.
- [2] KOO HJ, LEE BM. Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment [J]. J Toxicol Environ Health A, 2004, 67 (23/24): 1901-1914.
- [3] KHAN MH, JUNG JY. Ozonation catalyzed by homogeneous and heterogeneous catalysts for degradation of DEHP in aqueous phase [J]. Chemosphere, 2008, 72 (4): 690-696.
- [4] 李耀福, 白剑英, 贺真, 等. 邻苯二甲酸二 (2-乙基己基) 酯对 HepG2 细胞脂质代谢的影响 [J]. 环境与职业医学, 2018, 35 (3): 234-240.
- [5] GRAY JR LE, BARLOW NJ, HOWDESHELL KL, et al. Transgenerational effects of Di (2-ethylhexyl) phthalate in the male CRL: CD (SD) rat: added value of assessing multiple offspring per litter [J]. Toxicol Sci, 2009, 110 (2): 411-425.
- [6] HOWDESHELL KL, RIDER CV, WILSON VS, et al. Mechanisms of action of phthalate esters, individually and in combination, to induce abnormal reproductive development in male laboratory rats [J]. Environ Res, 2008, 108 (2): 168-176.
- [7] DEUTSCHLE T, REITER R, BUTTE W, et al. A controlled challenge study on di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in house dust and the immune response in human nasal mucosa of allergic subjects [J]. Environ Health Perspect, 2008, 116 (11): 1487-1493.
- [8] MATSUDA T, KUROHANE K, IMAI Y. Di- (2-ethylhexyl) phthalate enhances skin sensitization to isocyanate haptens in mice [J]. Toxicol Lett, 2010, 192 (2): 97-100.
- [9] 李欣洋. 邻苯二甲酸二 (2-乙基己基) 酯中毒机制研究进展

- [J]. 医学综述, 2015, 21 (9): 1581-1584.
- [10] NAKASHIMA R, HAYASHI Y, MD K, et al. Exposure to DEHP decreased four fatty acid levels in plasma of prepartum mice [J]. *Toxicology*, 2013, 309: 52-60.
- [11] 袁筱琴, 蔡红平, 万红萍, 等. 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯对大鼠不同脏器的损伤 [J]. *环境与健康杂志*, 2009, 26 (3): 212-214.
- [12] 董晋, 董新文, 赵跃, 等. 长期暴露的邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯在雌性大鼠体内的代谢及对肝脏的影响 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2017, 29 (3): 211-215.
- [13] YANG G, ZHANG W, QIN Q, et al. Mono (2-ethylhexyl) phthalate induces apoptosis in p53-silenced L02 cells via activation of both mitochondrial and death receptor pathways [J]. *Environ Toxicol*, 2015, 30 (10): 1178-1191.
- [14] 杨伟浩, 王艳梅, 徐宁, 等. 邻苯二甲酸酯暴露与血脂异常的关系研究 [J]. *中国工业医学杂志*, 2017, 30 (1): 9-13.
- [15] 赵文红, 厉曙光. DEHP 染毒后小鼠各脏器含量的测定及其意义 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15 (3): 262-263.
- [16] 蔡红慧. 非酒精性脂肪性肝病与磷脂及磷脂酶A2关系的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [17] 魏苏宁, 苏雪莹, 徐国恒. 肝细胞甘油三酯代谢途径异常与脂肪肝 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2016, 32 (2): 123-132.
- [18] KOO HJ, LEE B M. Toxicokinetic relationship between di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono (2-ethylhexyl) phthalate in rats [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2007, 70 (5): 383-387.
- [19] 范慧, 张鹏睿, 徐援. 2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝与胰岛素抵抗及心血管病变发生的关系研究 [J]. *中国全科医学*, 2011, 14 (2): 147-150.
- [20] AGARWAL AK, GARG A. Congenital generalized lipodystrophy: significance of triglyceride biosynthetic pathways [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2003, 14 (5): 214-221.
- [21] COLEMAN RA, LEE D P. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation [J]. *Prog Lipid Res*, 2004, 43 (2): 134-176.
- [22] TAKEUCHI K, REUE K. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 296 (6): E1195-E1209.
- [23] MANSBACH II CM, GORELICK F. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 293 (4): G645-G650.
- [24] IGAL RA, WANG S, GONZALEZ-BARÓ M, et al. Mitochondrial glycerol phosphate acyltransferase directs the incorporation of exogenous fatty acids into triacylglycerol [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (45): 42205-42212.
- [25] AGARWAL AK, TUNISON K, DALAL JS, et al. Metabolic, reproductive, and neurologic abnormalities in Agpat1-null mice [J]. *Endocrinology*, 2017, 158 (11): 3954-3973.
- [26] ZHANG P, O'LOUGHLIN L, BRINDLEY DN, et al. Regulation of lipin-1 gene expression by glucocorticoids during adipogenesis [J]. *J Lipid Res*, 2008, 49 (7): 1519-1528.
- [27] REUE K, ZHANG P. The lipin protein family: dual roles in lipid biosynthesis and gene expression [J]. *FEBS Lett*, 2008, 582 (1): 90-96.
- [28] DONKOR J, SARIAHMETOGLU M, DEWALD J, et al. Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (6): 3450-3457.
- [29] TURKISH A, STURLEY SL. Regulation of triglyceride metabolism. I. Eukaryotic neutral lipid synthesis: "many ways to skin ACAT or a DGAT" [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292 (4): G953-G957.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 汪源; 校对: 童玲)