

## · 论著 ·

邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯对胰岛 MIN6  $\beta$  细胞毒性作用的研究

赵紫婷 孟颖飞 徐坤 何继瑞

**【摘要】 目的** 观察邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯(DEHP)对胰岛 MIN6  $\beta$  细胞生长活力、细胞周期及细胞凋亡的影响。**方法** 选用小鼠胰岛 MIN6  $\beta$  细胞作为研究对象,并将其分为 DEHP 组和对照组,DEHP 组分别用 0.25、0.5、1、2 mmol/L DEHP 作用 16、48、72 h。对照组用 0.1% 二甲基亚砜(DMSO)作用 16、48、72 h。通过 MTT 实验检测细胞生长活力,流式细胞技术测定细胞凋亡率及细胞周期。**结果** 与对照组相比,在 16、48 及 72 h 随着 DEHP 浓度的增加,MIN6  $\beta$  细胞生长活力受到抑制,细胞存活率明显下降( $F=112.25, 91.06, 589.25, P$  均 $<0.01$ );0.25、0.5、1 mmol/L DEHP 组 MIN6  $\beta$  细胞凋亡率明显升高[(5.00 $\pm$ 0.22)%、(8.33 $\pm$ 0.09)%、(19.62 $\pm$ 0.44)% ,  $F=3\ 006.09, P<0.01$ ];0.5、1 mmol/L DEHP 组受到 MIN6  $\beta$  细胞周期进程受到干扰,  $G_0/G_1$  期细胞比例[(68.50 $\pm$ 0.89)%、(73.63 $\pm$ 0.96)% ,  $F=242.46, P<0.01$ ]明显升高, S 期细胞[(17.57 $\pm$ 1.15)%、(14.40 $\pm$ 0.91)% ,  $F=49.28, P<0.01$ ]与  $G_2/M$  期[(13.93 $\pm$ 0.42)%、(11.97 $\pm$ 1.85)% ,  $F=72.70, P<0.01$ ]比例明显降低。**结论** DEHP 可抑制胰岛 MIN6  $\beta$  细胞增殖、诱导细胞凋亡、导致细胞周期停滞在细胞间期。

**【关键词】** 邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯; MIN6  $\beta$  细胞; 细胞凋亡; 细胞周期

**基金项目:** 甘肃省自然科学基金资助项目(1308RJZA246)

**Cytotoxic effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on MIN6 islet  $\beta$  cells** Zhao Ziting, Meng Yingfei, Xu Kun, He Jirui. Endocrinology and Metabolism Center 3 of the Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: He Jirui, Email: hjrlzys63@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the cytotoxic effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on viability, proliferation and apoptosis of MIN6 islet  $\beta$  cells. **Methods** Murine MIN6 islet  $\beta$  cells were used in this study and were divided into DEHP group and control group. In DEHP group, MIN6  $\beta$  cells were exposed to 0.25, 0.5, 1 or 2 mmol/L DEHP for 16, 48 or 72 hours. Cells in control group were exposed to dimethylsulfoxide(0.1%) for 16, 48 or 72 hours. Cell viability was determined by MTT assay. Apoptosis rate and cell cycle were determined using flow cytometric assay. **Results** Compared with control group, treatment of MIN6  $\beta$  cells with DEHP inhibited cell viability and decreased cell survival rate in a concentration-dependent manner at 16, 48, 72 h( $F=112.25, 91.06, 589.25$ , all  $P<0.01$ ); treatment of MIN6  $\beta$  cells with 0.25, 0.5 or 1 mmol/L DEHP led to a marked increase in apoptosis rate [(5.00 $\pm$ 0.22)%, (8.33 $\pm$ 0.09)%, (19.62 $\pm$ 0.44)%,  $F=3\ 006.09, P<0.01$ ]; treatment of MIN6  $\beta$  cells with 0.5 or 1 mmol/L DEHP significantly disrupted cell cycle, increased the percentage of  $G_0/G_1$  cells [(68.50 $\pm$ 0.89)%, (73.63 $\pm$ 0.96)%,  $F=242.46, P<0.01$ ] and decreased the percentage of cells entering S phase [(17.57 $\pm$ 1.15)%, (14.40 $\pm$ 0.91)%,  $F=49.28, P<0.01$ ] and  $G_2/M$  phase [(13.93 $\pm$ 0.42)%, (11.97 $\pm$ 1.85)%,  $F=72.70, P<0.01$ ]. **Conclusion** DEHP inhibits cell proliferation, induces apoptosis and arrests cell cycle in interphase in MIN6 islet  $\beta$  cells.

**【Key words】** Di-(2-ethylhexyl) phthalate; MIN6  $\beta$  cells; Apoptosis; Cell cycle

**Fund program:** Natural Science Foundation of Gansu Province(1308RJZA246)

除了饮食、生活方式改变、遗传等危险因素外,越来越多的研究证据表明,环境污染物可能是 2 型糖尿病发病的又一个危险因素<sup>[1-2]</sup>。环境污染物中有些化合物可以干扰内分泌系统功能,同时对整个机体或其子代健康造成严重的影响,称为内分泌干扰物。邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯(DEHP)作为一种公认的内分泌干扰物,已被广泛用于各种日常生活用品和医疗用品中,是现代生活不可或缺的一部分<sup>[3]</sup>。与此同时,已经有大量流行病学及动物实验研究证实,DEHP 暴露与糖代谢紊乱密切相关,但对其致病机制目前仍然了解甚少<sup>[4-6]</sup>。考虑到胰岛  $\beta$  细胞在维持葡萄糖代谢平衡中具有重要的作用,本实验选用小鼠胰岛 MIN6  $\beta$  细胞作为实验对象,它能稳定表达葡萄糖转运蛋白-2 和葡萄糖激酶并保持对葡萄糖的反应性,与原代胰岛相似,是研究  $\beta$  细胞增殖和凋亡的理想模型<sup>[7]</sup>。本实验旨在研究 DEHP 对胰岛 MIN6  $\beta$  细胞生长活力、细胞凋亡以及细胞周期的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 MIN6  $\beta$  细胞的培养及处理** MIN6  $\beta$  细胞瘤株(10~15 代)购自上海博谷生物科技有限公司,培养于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素双抗、10  $\mu$ l/L  $\beta$ -巯基乙醇的 DMEM 高糖培养液中。培养条件为 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 混合空气。当 MIN6  $\beta$  细胞生长汇合度达到 80%~90% 时进行传代,比例为 1:2 或 1:3。DEHP 组用不同浓度的 DEHP (0.25、0.5、1、2 mmol/L) 作用于 MIN6  $\beta$  细胞。对照组用 0.1% 的二甲基亚砜(DMSO)作用于 MIN6  $\beta$  细胞。作用时间为 16、48、72 h。

**1.2 主要试剂的配置** DEHP 母液:取 160  $\mu$ l DEHP 原液(天津市凯信化学工业公司)溶于 1 ml DMSO 中,配成浓度为 0.345 mol/L 的母液,根据实验需要用 DMEM 高糖培养液进行稀释。MTT 储备液:取 50 mg MTT 粉末(北京以色列生物科技公司)溶解于 10 ml PBS 缓冲液中,充分混匀,4℃ 过夜,后用 0.22  $\mu$ m 针孔滤器过滤除菌,4℃ 避光保存。RNA 酶:将 25 mg RNA 酶(美国 Sigma 公司)溶于 2.5 ml PBS 中使浓度为 10 g/L,充分溶解后 100℃ 煮沸 15 min,缓慢冷却至室温,后分装储存于 -20℃。

**1.3 MTT 实验测定细胞活力** MIN6  $\beta$  细胞经不同浓度的 DEHP (0.25、0.5、1、2 mmol/L) 作用 16、48、72 h,实验终止后每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20  $\mu$ l, 37℃ 孵育 4 h,小心吸去上清液,PBS 轻轻洗 1 次,加

入 150  $\mu$ l DMSO 终止培养,振荡 30 min 后在波长 565 nm 处测定各孔 OD 值,计算细胞存活率(DEHP 组 OD 值/对照组 OD 值  $\times$  100%),实验重复 3 次。

**1.4 流式细胞术测定细胞凋亡率** MIN6  $\beta$  细胞经不同浓度的 DEHP (0.25、0.5、1 mmol/L) 作用 48 h,实验终止后应用 0.25% 的胰酶消化,冷 PBS 洗细胞 2 次,进行 Annexin-V-FITC、PI 染色,染色步骤参照试剂盒说明书。细胞经处理后于流式细胞仪(美国 BD 公司)检测,Cell Quest 软件分析结果。如图 1 所示,在双变量流式细胞仪的散点图上,左下象限显示活细胞,为 (FITC - /PI -);左上象限是凋亡晚期及坏死细胞,为 (FITC - /PI +);右上象限是晚期凋亡细胞,为 (FITC + /PI +);右下象限为早期凋亡细胞,为 (FITC + /PI -),其中右上象限和右下象限的细胞比例总和即为细胞凋亡率。实验重复 3 次。

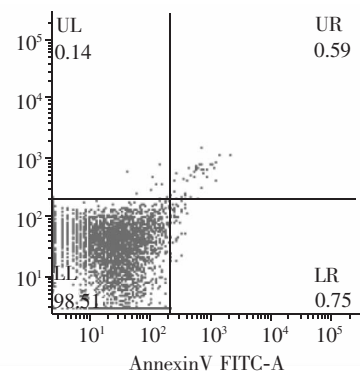


图 1 双变量流式细胞散点图

**1.5 流式细胞技术检测细胞周期** MIN6  $\beta$  细胞经不同浓度的 DEHP (0.5、1 mmol/L) 作用 48 h,实验终止后用 0.25% 的胰酶消化,预冷的 PBS 洗两遍,800 r/min 离心 5 min ( $r = 8.3$  cm) 后去除上清液收集细胞;将离心收集后的细胞,用 70% 乙醇 4℃ 固定过夜;后加入 RNA 酶,碘化丙啶染色 30 min。细胞经处理后于流式细胞仪(美国 BD 公司)检测,Modifit 软件分析细胞周期各期细胞比例。实验重复 3 次。

**1.6 统计学处理** 符合正态分布的实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。应用 SPSS 19.0 软件分析数据,多组间样本均数的比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),两组间比较采用成组资料  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 DEHP 对 MIN6  $\beta$  细胞生长活力的影响** 如表 1、2 所示,与对照组相比,16 h 时不同浓度 DEHP 组的 OD 值均明显降低 ( $P$  均  $< 0.01$ ),细胞存活率明显下降,分别为对照组的 82%、80%、78%、79%,但

不同浓度DEHP组之间细胞存活率并无明显差异,不存在明显的剂量依赖性( $P>0.05$ )。其中0.5 mmol/L DEHP组与0.25、1、2 mmol/L DEHP组相比,细胞生长活力无明显差异( $P$ 均 $>0.05$ )。在48及72 h,随着DEHP浓度的增加,各DEHP组 OD 值呈浓度及时间依赖性减小,细胞生长活力明显降低( $P$ 均 $<0.01$ )。其中0.25 mmol/L DEHP组在48、72 h的细胞存活率分别为对照组的82%、71%( $P$ 均 $<0.01$ );0.5 mmol/L DEHP组在48、72 h的细胞存活率分别为对照组的77%、64%( $P$ 均 $<0.01$ );1 mmol/L DEHP组在48、72 h的细胞存活率为对照组的75%、52%( $P$ 均 $<0.01$ )。而2 mmol/L DEHP组在48、72 h的细胞存活率仅为对照组的52%、37%( $P$ 均 $<0.01$ )。

表1 DEHP对MIN6  $\beta$ 细胞生长活力的影响

(OD 值, $\bar{x} \pm s, n=6$ )			
组别	16 h	48 h	72 h
对照组	1.18 $\pm$ 0.01	1.30 $\pm$ 0.02	1.95 $\pm$ 0.02
0.25 mmol/L DEHP 组	0.97 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	1.07 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	1.39 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
0.5 mmol/L DEHP 组	0.94 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.00 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	1.25 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
1 mmol/L DEHP 组	0.92 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.98 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.01 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
2 mmol/L DEHP 组	0.93 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.68 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
F 值	112.25	91.06	589.25
P 值	0.00	0.00	0.00

注:DEHP:邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯;与对照组相比,<sup>a</sup> $P<0.01$

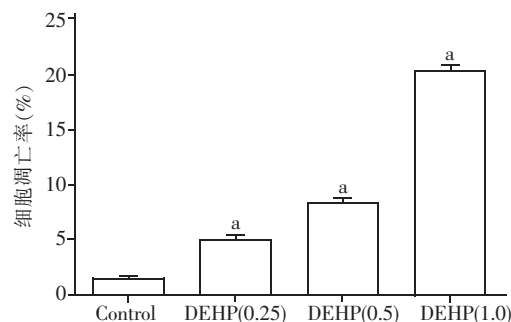
表2 DEHP对MIN6  $\beta$ 细胞存活率的影响

影响( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )			
组别	16 h	48 h	72 h
对照组	1	1	1
0.25 mmol/L DEHP 组	82 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	82 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	71 $\pm$ 6 <sup>a</sup>
0.5 mmol/L DEHP 组	80 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	77 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	64 $\pm$ 5 <sup>a</sup>
1 mmol/L DEHP 组	78 $\pm$ 6 <sup>a</sup>	75 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	52 $\pm$ 7 <sup>a</sup>
2 mmol/L DEHP 组	79 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	52 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	37 $\pm$ 4 <sup>a</sup>
F 值	315.59	4 284.64	7 875.17
P 值	0.00	0.00	0.00

注:DEHP:邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯;与对照组相比,<sup>a</sup> $P<0.01$

2.2 DEHP对MIN6  $\beta$ 细胞凋亡的影响 如图2、3所示,不同浓度的DEHP作用于MIN6  $\beta$ 细胞48 h。

与对照组相比,不同浓度DEHP组细胞凋亡率均显著升高( $F=3\ 006.09, P<0.01$ )。其中0.25、0.5、1 mmol/L DEHP 组的细胞凋亡率分别为(5.00  $\pm$  0.22)%、(8.33  $\pm$  0.09)%、(19.62  $\pm$  0.44)%。



注:DEHP:邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯;Control:对照组;DEHP(0.25):0.25 mmol/L DEHP 组;DEHP(0.5):0.5 mmol/L DEHP 组;DEHP(1.0):1 mmol/L DEHP 组;与对照组相比,<sup>a</sup> $P<0.01$

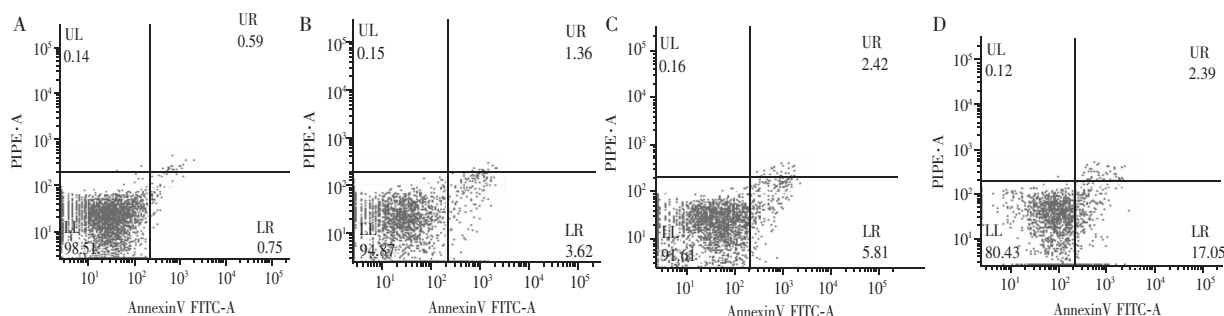
图2 DEHP对MIN6  $\beta$ 细胞凋亡率的影响

2.3 DEHP对MIN6  $\beta$ 细胞周期的影响 如表3、图4所示,0.5、1 mmol/L DEHP 作用于MIN6  $\beta$ 细胞48 h。与对照组相比,0.5、1 mmol/L DEHP 组均可使MIN6  $\beta$ 细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例明显升高( $P<0.01$ ),S期细胞比例和G<sub>2</sub>/M期细胞比例明显减少( $P$ 均 $<0.01$ )。其中0.5 mmol/L DEHP 组MIN6  $\beta$ 细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例明显上升至68.50%,S期细胞降低至17.57%,G<sub>2</sub>/M期细胞比例降低至13.93%;1 mmol/L DEHP组MIN6  $\beta$ 细胞G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例上升至73.63%,S期细胞降低至14.40%,G<sub>2</sub>/M期细胞比例降低至11.97%。其中1 mmol/L DEHP组作用较明显。

表3 DEHP对MIN6  $\beta$ 细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, n=3, \%$ )

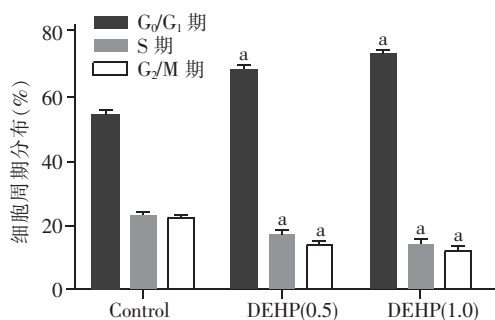
组别	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S 期	G <sub>2</sub> /M 期
对照组	54.86 $\pm$ 1.44	23.47 $\pm$ 1.30	22.13 $\pm$ 0.06
0.5 mmol/L DEHP 组	68.50 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>	17.57 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	13.93 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>
1 mmol/L DEHP 组	73.63 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>	14.40 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>	11.97 $\pm$ 1.85 <sup>a</sup>
F 值	242.46	49.28	72.70
P 值	0.00	0.00	0.00

注:DEHP:邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯;与对照组相比,<sup>a</sup> $P<0.01$



注:A~D 分别为对照组、0.25 mmol/L DEHP 组、0.5 mmol/L DEHP 组、1 mmol/L DEHP 组;DEHP:邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯

图3 流式细胞术检测DEHP对MIN6  $\beta$ 细胞凋亡的影响



注:DEHP: 邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯;Control: 对照组;DEHP(0.5):0.5 mmol/L DEHP 组;DEHP(1.0):1 mmol/L DEHP 组;与对照组相比,<sup>a</sup>*P*<0.01

图 4 DEHP 对 MIN6 β 细胞细胞周期的影响

### 3 讨论

近年来DEHP制品的广泛使用,使环境中此类污染物明显增多,其对人类存在的健康隐患日益受到广大学者的关注。研究证实,DEHP可对机体多个系统产生损害,如生殖和发育毒性、肝毒性、干扰糖代谢平衡以及致畸和致癌性等<sup>[8-12]</sup>。目前DEHP与糖代谢紊乱的相关性研究提示,DEHP暴露可能为糖尿病发生、发展的危险因素<sup>[4-5]</sup>。Stahlhut等<sup>[4]</sup>对美国男性的横断面研究首次发现,尿液中DEHP代谢物与腹型肥胖、胰岛素抵抗密切相关。研究也发现,DEHP可干扰成年雄性大鼠腓肠肌及脂肪组织中胰岛素信号转导和葡萄糖摄取、氧化,导致糖代谢紊乱<sup>[13-14]</sup>。Rengarajan等<sup>[15]</sup>研究发现,DEHP可以减少体外培养的Chang肝细胞胰岛素受体及葡萄糖氧化水平,提示DEHP对糖调节平衡具有损害作用。

本研究结果表明,不同浓度DEHP在各时间段均可明显抑制MIN6 β细胞的生长活力。在48 h及72 h,不同浓度DEHP组的细胞存活率均较对照组明显下降,存在明显的浓度及时间依赖性。在16 h时,各DEHP组与对照组相比细胞存活率下降,其中0.5 mmol/L DEHP组与0.25、1、2 mmol/L DEHP组相比,细胞生长活力无明显差异,提示DEHP在急性期对细胞的损伤不存在明显的浓度依赖性,这可能与DEHP的急性毒性作用较弱,主要表现为慢性蓄积毒性作用有关。本研究结果也显示,不同浓度的DEHP均可诱导MIN6 β细胞出现早期凋亡和晚期凋亡。随着DEHP浓度的增加,细胞凋亡率明显增加,其中早期凋亡率增加较明显。而氧化应激在许多组织细胞凋亡的过程中发挥了重要作用。与其他组织器官相比,胰岛β细胞表达极低水平的谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶<sup>[16-17]</sup>。故此在一些因素的诱导下胰岛β细胞容易受活性氧簇及脂质过氧化物引起的氧化应激损伤,发生细胞凋亡,最终影响糖代谢平衡。

细胞周期是细胞生命活动的基本过程,指细胞从第一次分裂结束到第二次分裂结束所经历的全过程,分为细胞间期与细胞分裂期两个阶段。而机体想要维持正常胰岛素分泌,其中两个重要的条件即为胰岛β细胞稳定的DNA复制和正常的细胞周期进程<sup>[18]</sup>。本研究结果表明,DEHP暴露可明显干扰MIN6 β细胞正常的细胞周期进程。0.5、1 mmol/L的DEHP可使MIN6 β细胞周期停滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期、S期和G<sub>2</sub>/M期细胞比例减少。目前对DEHP影响MIN6 β细胞周期进程的研究报道甚少,其具体导致细胞周期停滞的机制并不清楚。

有研究发现,DEHP可通过抑制体内抗氧化系统的功能以及导致内质网应激来诱导胰岛β细胞凋亡,减少胰岛INS-1β细胞的胰岛素分泌和释放,从而影响正常的糖代谢平衡<sup>[2]</sup>。Srinivasan等<sup>[13]</sup>研究发现,DEHP可导致雄性大鼠腓肠肌组织中过氧化氢、羟自由基以及脂质过氧化物水平明显增加,胰岛素信号转导、葡萄糖摄取及氧化发生障碍,出现明显的糖代谢紊乱;而对DEHP喂养大鼠给予抗氧化剂维生素C、E治疗后发现,活性氧簇及脂质过氧化物减少,糖代谢紊乱明显改善。结合本实验结果可以推测,DEHP可能通过诱导氧化应激,导致体内氧化产物增多。活性氧簇及脂质过氧化物可通过内源性途径诱导细胞凋亡,使细胞凋亡率升高;同时活性氧簇及脂质过氧化物可直接氧化和损伤DNA、蛋白质、脂类,还可作为功能性分子信号,激活细胞内多种应激敏感信号通路,这些信号通路与胰岛素抵抗和β细胞功能受损密切相关。

本实验通过体外培养胰岛MIN6 β细胞研究DEHP对胰岛β细胞毒性作用,仅能部分模拟体内DEHP的细胞毒性作用,在体内复杂的病理生理因素相互作用下是否具有类似作用,需要进一步的基础及临床研究验证。本研究结果虽然说明DEHP可降低胰岛MIN6 β细胞生长活力,诱导细胞凋亡,影响正常细胞周期进程,但需在蛋白水平进行更深入的研究;DEHP导致胰岛MIN6 β细胞毒性作用的具体机制目前仍不明确,需在今后的研究中增加氧化应激机制相关指标的测定。

### 参 考 文 献

- [1] Hectors TL, Vanparys C, van der Ven K, et al. Environmental pollutants and type 2 diabetes: a review of mechanisms that can disrupt beta cell function[J]. Diabetologia, 2011, 54(6):1273-1290. DOI: 10.1007/s00125-011-2109-5.

(下转第 167 页)

- [6] Kubota S, Amino N, Matsumoto Y, et al. Serial changes in liver function tests in patients with thyrotoxicosis induced by Graves' disease and painless thyroiditis[J]. *Thyroid*, 2008, 18(3): 283-287. DOI: 10.1089/thy.2007.0189.
- [7] 赵家军. 甲状腺疾病与肝脏[J]. *中华肝病杂志*, 2014, 22(3): 165-167. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2014.03.002.
- [8] 刘然, 杨倩琳, 赵丽, 等. 1221 例未治疗成年 Graves 病患者肝功能指标异常情况及相关因素分析[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2015, 31(6): 497-500. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2015.06.005.
- [9] Shen C, Zhao CY, Liu F, et al. Acute-on-chronic liver failure due to thiamazole in a patient with hyperthyroidism and trilogy of Fallot: case report[J]. *BMC Gastroenterol*, 2010, 10: 93. DOI: 10.1186/1471-230X-10-93.
- [10] 李承霞, 谭建, 张桂芝, 等. 回顾性研究: 甲状腺机能亢进症伴肝功能损害危险因素分析[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2015, 31(6): 501-505. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2015.06.006.
- [11] 任留梅, 刘萍, 卫红艳, 等. Graves 病甲亢肝损害与免疫因素关系的探讨[J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(3): 436-438. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2011.03.029.
- [12] de Campos Mazo DF, de Vasconcelos GB, Pereira MA, et al. Clinical spectrum and therapeutic approach to hepatocellular injury in patients with hyperthyroidism[J]. *Clin Exp Gastroenterol*, 2013, 6: 9-17. DOI: 10.2147/CEG.S39358.
- [13] Woeber KA. Methimazole-induced hepatotoxicity[J]. *Endocr Pract*, 2002, 8(3): 222-224. DOI: 10.4158/EP.8.3.222.
- [14] Malik R, Hodgson H. The relationship between the thyroid gland and the liver[J]. *QJM*, 2002, 95(9): 559-569.
- [15] Zhang W, Tian LM, Han Y, et al. Presence of thyrotropin receptor in hepatocytes: not a case of illegitimate transcription[J]. *J Cell Mol Med*, 13(11-12): 4636-4642. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00670.x.

(收稿日期: 2016-05-15)

(上接第 148 页)

- [2] 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. DOI: 10.1111/jcmm.12409.
- [3] Škrbić BD, Ji Y, Đurišić-Mladenović N, et al. Occurrence of the phthalate esters in soil and street dust samples from the Novi Sad city area, Serbia, and the influence on the children's and adults' exposure[J]. *J Hazard Mater*, 2016, 312: 272-279. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.03.045.
- [4] Stahlhut RW, 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. DOI: 10.1289/ehp.9882.
- [5] 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. DOI: 10.1016/j.envres.2011.05.015.
- [6] Rajesh P, Sathish S, Srinivasan C, et al. Phthalate is associated with insulin resistance in adipose tissue of male rat: role of antioxidant vitamins[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(3): 558-569. DOI: 10.1002/jcb.24399.
- [7] Hohmeier HE, Newgard CB. Cell lines derived from pancreatic islets[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 228(1-2): 121-128. DOI: 10.1016/j.mce.2004.04.017.
- [8] Abdel-Kawi SH, Hashem KS, Abd-Allah S. Mechanism of diethylhexylphthalate (DEHP) induced testicular damage and of grape seed extract-induced protection in the rat[J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, 90: 64-75. DOI: 10.1016/j.fct.2016.02.003.
- [9] Hannon PR, Niermann S, Flaws JA. Acute exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate in adulthood causes adverse reproductive outcomes later in life and accelerates reproductive aging in female mice[J]. *Toxicol Sci*, 2016, 150(1): 97-108. DOI: 10.1093/toxsci/kfv317.
- [10] Chen H, Zhang W, Rui BB, et al. Di(2-ethylhexyl) phthalate exacerbates non-alcoholic fatty liver in rats and its potential mechanisms[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 42: 38-44. DOI: 10.1016/j.etap.2015.12.016.
- [11] Attina TM, Trasande L. Association of exposure to Di-2-ethylhexylphthalate replacements with increased insulin resistance in adolescents from NHANES 2009-2012[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(7): 2640-2650. DOI: 10.1210/jc.2015-1686.
- [12] Voss C, Zerban H, Bannasch P, et al. Lifelong exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces tumors in liver and testes of Sprague-Dawley rats[J]. *Toxicology*, 2005, 206(3): 359-371. DOI: 10.1016/j.tox.2004.07.016.
- [13] Srinivasan C, Khan AI, Balaji V, et al. Diethyl hexyl phthalate-induced changes in insulin signaling molecules and the protective role of antioxidant vitamins in gastrocnemius muscle of adult male rat[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 257(2): 155-164. DOI: 10.1016/j.taap.2011.08.022.
- [14] Rajesh P, Sathish S, Srinivasan C, et al. Phthalate is associated with insulin resistance in adipose tissue of male rat: role of antioxidant vitamins[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(3): 558-569. DOI: 10.1002/jcb.24399.
- [15] Rengarajan S, Parthasarathy C, Anitha M, et al. Diethylhexyl phthalate impairs insulin binding and glucose oxidation in Chang liver cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2007, 21(1): 99-102. DOI: 10.1016/j.tiv.2006.07.005.
- [16] Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell[J]. *Biochem Soc Trans*, 2008, 36(Pt 3): 343-347. DOI: 10.1042/BST0360343.
- [17] Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues[J]. *Free Radic Biol Med*, 1996, 20(3): 463-466.
- [18] Campbell RK. Type 2 diabetes: where we are today: an overview of disease burden, current treatments, and treatment strategies[J]. *J Am Pharm Assoc*, 2009, 49(Suppl 1): S3-S9. DOI: 10.1331/JAPhA.2009.09077.

(收稿日期: 2016-07-10)