

· 论 著 ·

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯对 3T3-L1 前脂肪细胞成脂分化和脂肪分解的影响

欧阳碧云, 王俊程, 赵秀兰

(山东大学齐鲁医学院公共卫生学院, 山东 济南 250012)

摘要:目的 观察邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)对 3T3-L1 前脂肪细胞脂质代谢的影响及其可能的作用机制。方法 采用鸡尾酒诱导法对 3T3-L1 前脂肪细胞诱导脂肪分化,诱导的同时给予 DEHP 0(细胞对照组), 3.125, 6.25, 12.5, 25 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 诱导过程中每天显微镜下观察 3T3-L1 细胞脂滴大小和数量的变化。诱导完成(7 d)后细胞继续培养 3 d(第 10 天),显微镜下观察油红 O 染色后细胞内脂滴大小和数量,甘油三酯(TG)测定试剂盒测定细胞培养液中(细胞外)TG 水平,分光光度法测定油红 O 染色细胞洗脱液中(细胞内)脂肪含量,Western 印迹法检测细胞中脂肪 TG 脂肪酶(ATGL)、激素敏感脂肪酶(HSL)、Ser660 和 Ser563 位点磷酸化 HSL 及磷酸化蛋白激酶 A 底物蛋白表达水平,并采用 Western 印迹法和免疫荧光法检测细胞中解偶联蛋白 1(UCP1)蛋白表达水平。结果 显微镜下观察发现,诱导分化第 5 天,细胞对照组细胞内尚未发现脂滴,DEHP 3.125~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞内均出现小脂滴;诱导分化第 6 天,细胞对照组开始出现脂滴,DEHP 3.125~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组脂滴数量增多;第 10 天,DEHP 12.5, 25 和 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组油红 O 着色细胞与细胞对照组相比增多,尤其 DEHP 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组可见较大脂滴和“指环”样脂肪细胞。与细胞对照组相比,DEHP 3.125~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞外 TG 水平和细胞内脂肪含量均明显升高($P<0.01$);DEHP 12.5~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞 ATGL 蛋白水平明显下降($P<0.01$);DEHP 3.125~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞中蛋白激酶 A 活性、HSL 磷酸化水平、UCP1 表达水平和 UCP1 表达阳性细胞数目明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 DEHP 促进 3T3-L1 前脂肪细胞成脂分化,并抑制脂肪分化细胞脂肪分解。

关键词: 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯;脂肪分化;脂肪分解;肥胖

中图分类号: R979.12, R994.6 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002-(2022)09-0673-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.09.005

超重和肥胖是心血管疾病、高血压和糖尿病等多种慢性疾病的重要诱因,特别是肥胖现已成为广受关注的全球性公共卫生问题^[1-2]。超重和肥胖为体内异常的脂肪累积,是由能量摄入与消耗失衡导致的。近年来研究表明,肥胖的发生亦与环境污染密切相关,许多环境污染物能够通过多种途径导致能量失衡^[3]。邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(diethylhexyl phthalate, DEHP)广泛用于生产食品包装材料、化妆品、医疗用品、建筑材料和儿童玩具,是目前使用量最大的增塑剂。人群流行病学调查资料显示,DEHP 暴露与胰岛素抵抗和肥胖代谢综合征相关^[4]。本课题组动物实验研究表明,DEHP 能够增加 C57 小鼠体重,并伴随 C57 小鼠皮下脂肪

组织分解降低^[5-6]。3T3-L1 小鼠胚胎成纤维细胞(前脂肪细胞)具有分化为脂肪细胞的潜能,是目前研究脂肪细胞分化的常用模型^[7]。本研究观察 DEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞成脂诱导分化和脂肪分解影响,进一步探讨 DEHP 对脂质代谢的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂和仪器

3T3-L1 小鼠胚胎成纤维细胞,北京北纳创联生物技术研究院。DEHP、油红 O、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、3-异丁-1-甲黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)、地塞米松和胰岛素,美国 Sigma-Aldrich 公司;DMEM 细胞培养液、胎牛血清、青霉素和链霉素,美国 Gibco 公司;胰蛋白酶,美国 Hyclone 公司;甘油三酯(triglycerides, TG)检测

基金项目: 国家自然科学基金(82073587)

作者简介: 欧阳碧云, 硕士研究生, 主要从事卫生毒理学研究。

通讯作者: 赵秀兰, E-mail: zhao.xl@sdu.edu.cn

试剂盒,南京建成生物工程研究所有限公司;BCA 蛋白质浓度测定试剂盒,美国 Pierce Biotechnology 公司;兔抗小鼠磷酸化蛋白激酶 A(phosphorylated protein kinase A, p-PKA)底物、激素敏感脂肪酶(hormone-sensitive triglyceride lipase, HSL)、Ser563 位点磷酸化 HSL(p-HSL Ser563)和 p-HSL Ser660 多克隆抗体,美国 Cell Signaling Technology 公司;兔抗小鼠解偶联蛋白 1(uncoupling protein 1, UCP1)和脂肪 TG 脂肪酶(adipose triglyceride lipase, ATGL)单克隆抗体及 Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG 抗体,美国 Abcam 公司;兔抗小鼠 GAPDH 多克隆抗体,美国 Sigma-Aldrich 公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗兔 IgG 抗体,北京中杉金桥生物技术有限公司。Olympus BX 43 正置显微镜,日本 Olympus 有限公司;EVOS FL 荧光显微镜,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Infinite® M200 Pro 多功能酶标仪,瑞士 TECAN 公司。

1.2 3T3-L1 前脂肪细胞成脂分化诱导和 DEHP 处理

3T3-L1 前脂肪细胞复苏后,采用含 10% 胎牛血清和 1% 青、链霉素的 DMEM 培养液在 5%CO₂, 37°C 恒温箱中培养。细胞融合度达 90% 时,采用鸡尾酒诱导法诱导成脂分化,即依次给予诱导液 A (IBMX 0.5 mol·L⁻¹、地塞米松 2.5 mmol·L⁻¹ 和胰岛素 2 mg·L⁻¹) 和诱导液 B (胰岛素 2 mg·L⁻¹) 分别诱导 3 和 4 d,其后更换含 10% 胎牛血清和 1% 青、链霉素的 DMEM 培养液继续培养 3 d(第 10 天)。诱导液 A 和诱导液 B 加入的同时给予 DEHP 暴露,DEHP 终浓度分别为 0(细胞对照组),3.125,6.25,12.5,25 和 50 μmol·L⁻¹。DEHP 采用 DMSO 溶解,细胞对照组给予等体积 DMSO(终浓度为 0.5%),各组设 6 复孔。诱导分化过程中,每天采用显微镜观察细胞内脂滴大小和数量的变化。

1.3 油红 O 染色检测诱导成脂分化细胞中脂滴形成

按 1.2 处理细胞,于第 10 天采用油红 O 对细胞内脂肪进行染色。细胞经 4% 多聚甲醛固定、蒸馏水洗涤和 60% 异丙醇润洗后,油红 O 室温避光染色,苏木素复染,镜下观察脂滴的大小和数量,细胞内油红 O 着色部分即为脂滴。

1.4 成脂分化细胞外 TG 水平和细胞内脂肪含量检测

按 1.2 处理细胞,于第 10 天取细胞培养液,用 TG 试剂盒测定培养液即细胞外中 TG 水平。TG 水平(mmol·L⁻¹)=(样本 A_{546 nm}-空白 A_{546 nm})/(校准 A_{546 nm}-空白 A_{546 nm})×校准品浓度(mmol·L⁻¹)。收集细胞,进行油红 O 染色。染色后先用 PBS 洗涤,随

后加异丙醇 2 mL 洗脱细胞脂肪染色,于 562 nm 处检测洗脱液吸光度(A_{562 nm})值。A_{562 nm} 值表示细胞内脂肪含量。

1.5 Western 印迹法检测成脂分化细胞中脂肪分解相关蛋白的表达

按 1.2 处理细胞,于第 10 天弃培养液,用 PBS 洗涤后加入 RIPA 蛋白裂解液,冰浴中裂解 30 min;4°C,12 000×g 离心 10 min,取上清,用 BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白质含量并定量,随后加入等体积上样缓冲液,置金属浴中变性 10 min。取 20 μg 变性蛋白进行 SDS-PAGE,并转印至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h。TBST 洗膜后,分别加入抗 p-PKA 底物、HSL、p-HSL Ser563、p-HSL Ser660、UCP1 和 ATGL 单克隆抗体(1:1000)4°C 孵育过夜, TBST 洗膜;加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体(1:5000)室温孵育 1 h,加入 ECL 发光液后感光 X 胶片, Image J 软件进行积分吸光度分析。GAPDH 为内参蛋白,以目标蛋白与内参蛋白积分吸光度比值表示待测蛋白相对表达水平。

1.6 免疫荧光实验检测诱导成脂分化细胞中 UCP1 表达

按 1.2 处理细胞,于第 10 天经 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤,加入 0.5% Triton X-100 通透 20 min; PBS 洗涤,加山羊血清室温封闭 30 min;加入兔抗小鼠 UCP1 单克隆抗体(1:500)4°C 孵育过夜; PBS 洗涤后,加入 Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG 抗体(1:5000),室温避光孵育 1 h;含 DAPI 防荧光猝灭剂封片,荧光显微镜下观察、拍照。细胞内呈现绿色荧光的细胞即为 UCP1 表达阳性细胞,采用 Image J 计数该细胞。

1.7 统计学分析

实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS20.0 软件单因素方差分析进行统计学分析,两组间比较采用 LSD(方差齐)或 Dunnett's T3(方差不齐)分析。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DEHP 对 3T3-L1 诱导成脂分化细胞脂滴形成的影响

显微镜下观察发现,3T3-L1 前脂肪细胞诱导脂肪分化第 5 天,DEHP 3.125~50 μmol·L⁻¹ 组细胞内可见小脂滴,细胞对照组无脂滴出现(图 1A)。诱导分化第 6 天,细胞对照组细胞内出现脂滴,DEHP 3.125~50 μmol·L⁻¹ 组细胞内脂滴数量与细胞对照

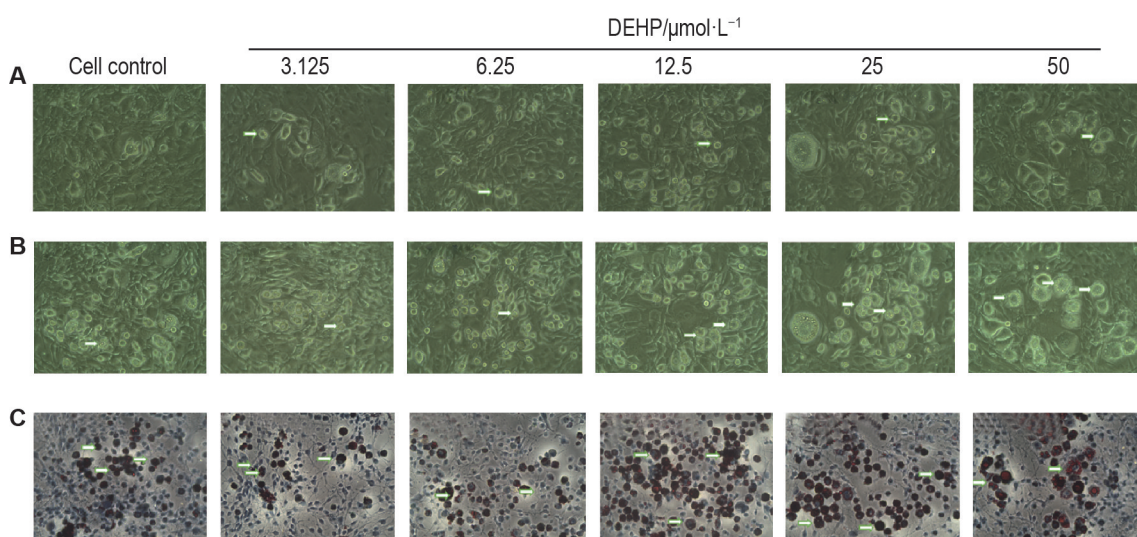


Fig.1 Effect of diethylhexyl phthalate (DEHP) on formation of lipid drops in induced adipogenic differentiated 3T3-L1 cells (200×). The adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocytes were induced by differentiation medium A (3-isobutyl-1-methylxanthine 0.5 mol·L⁻¹, dexamethasone 2.5 mmol·L⁻¹ and insulin 2 mg·L⁻¹) for 3 d, and differentiation medium B (insulin 2 mg·L⁻¹) for 4 d followed by continuous culture for 3 d (the 10th day), which was simultaneous combined with DEHP 3.125–50 μmol·L⁻¹ treatment. A: morphology of 3T3-L1 differentiated adipocytes on the 5th day of induced differentiation; B: morphology of 3T3-L1 differentiated adipocytes on the 6th day of induced differentiation; C: morphology of 3T3-L1 differentiated adipocytes on the 10th day by oil red O staining. Arrows show the lipid droplets.

组相比明显增多(图 1B);第 10 天,与细胞对照组相比,DEHP 3.125~50 μmol·L⁻¹组油红 O 着色细胞增多,其中 DEHP 12.5,25 和 50 μmol·L⁻¹组脂滴数量增加较为明显,DEHP 50 μmol·L⁻¹组细胞中可观察到含有较大脂滴和“指环”样脂肪细胞(图 1C)。

2.2 DEHP 对 3T3-L1 诱导成脂分化细胞外 TG 水平和细胞内脂肪含量的影响

与细胞对照组相比,DEHP 3.125~50 μmol·L⁻¹组 3T3-L1 前脂肪细胞成脂诱导分化后细胞外 TG 水平和细胞内脂肪含量均明显增加($P<0.01$),其中 DEHP 12.5 μmol·L⁻¹组增加更为明显(图 2),提示 DEHP 处理可明显增加 3T3-L1 成脂诱导分化。

2.3 DEHP 对 3T3-L1 诱导成脂分化细胞脂肪分解通路相关蛋白表达的影响

与细胞对照组相比,DEHP 12.5~50 μmol·L⁻¹组细胞中 ATGL 蛋白表达水平明显下降($P<0.01$),DEHP 3.125~50 μmol·L⁻¹组 p-PKA 底物蛋白水平亦明显下降($P<0.01$)(图 3);DEHP 3.125~50 μmol·L⁻¹组 p-HSL Ser563 和 p-HSL Ser660 蛋白表达水平均显著降低($P<0.01$),总 HSL 蛋白表达水平无明显变化(图 4)。

2.4 DEHP 对 3T3-L1 诱导成脂分化细胞 UCP1 表达的影响

Western 印迹法结果(图 5A)显示,与细胞对照组相比,DEHP 3.125~50 μmol·L⁻¹组细胞中 UCP1 蛋白表达水平随 DEHP 浓度增加明显降低($P<$

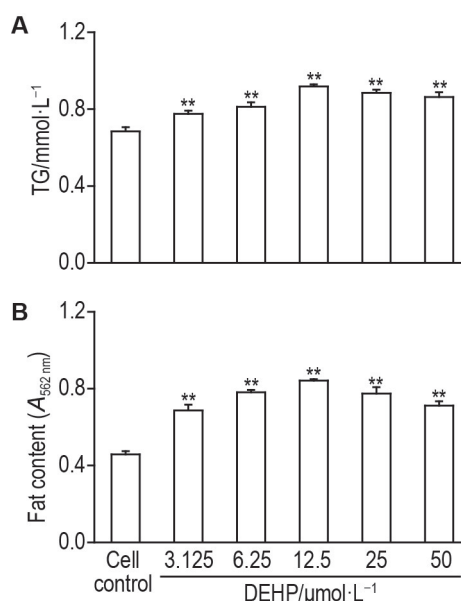


Fig.2 Effect of DEHP on extracellular triglycerides (TG) level (A) and intracellular fat content (B) in induced adipogenic differentiated 3T3-L1 cells. See Fig.1 for the cell treatment. On the 10th day of induction, the TG level of culture medium was detected by TG assay kit and the cells were stained with oil red O. The stained cells were washed by PBS and eluted with 2 mL isopropanol, then the A_{562 nm} of the elution was detected by spectrophotometry. $\bar{x} \pm s$, $n=6$. ** $P<0.01$, compared with cell control group.

0.01)。免疫荧光法检测结果(图 5B)与上述结果变化趋势相似,DEHP 3.125~50 μmol·L⁻¹组 UCP1 表达阳性细胞数目与细胞对照组相比亦明显减少($P<0.05$, $P<0.01$)。

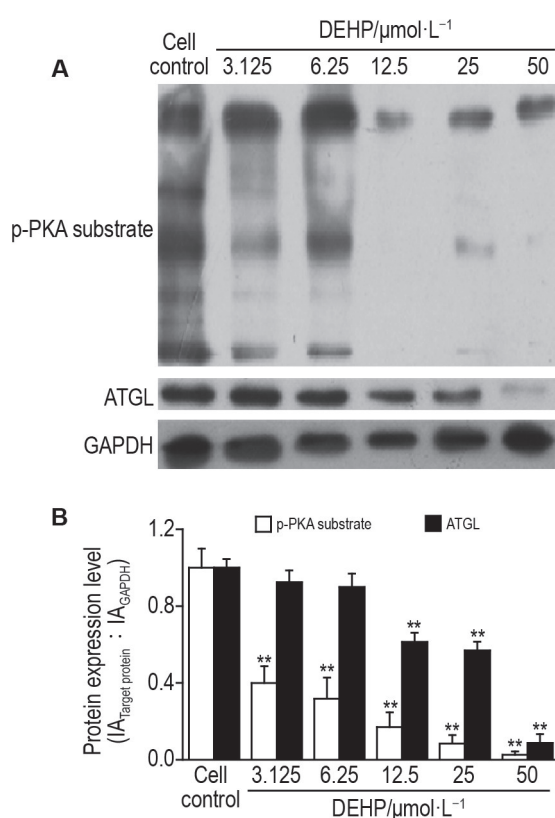


Fig.3 Effect of DEHP on protein expressions of phosphorylated protein kinase A (p-PKA) substrate and adipose triglyceride lipase (ATGL) in 3T3-L1 differentiated adipocytes by Western blotting. See Fig.1 for the cell treatment. B was the semi-quantitative result of A. $\bar{x}\pm s$, $n=6$. ** $P<0.01$, compared with cell control group.

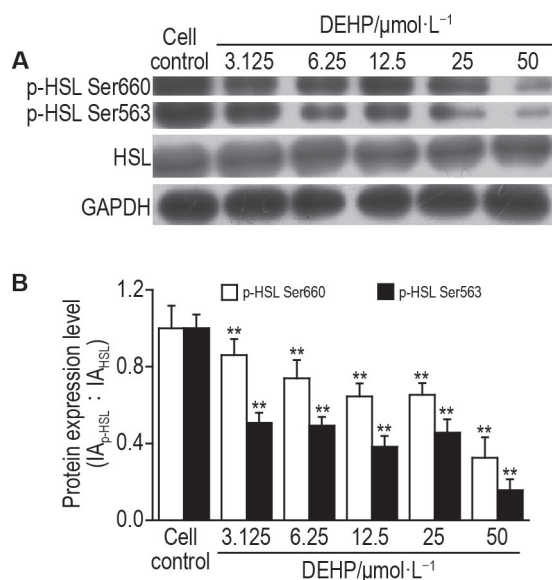


Fig.4 Effect of DEHP on protein expressions of hormone-sensitive triglyceride (HSL), phosphorylated HSL at Ser563 (p-HSL Ser563) and p-HSL Ser660 in 3T3-L1 differentiated adipocytes by Western blotting. See Fig.1 for the cell treatment. B was the semi-quantitative result of A. $\bar{x}\pm s$, $n=6$. ** $P<0.01$, compared with cell control group.

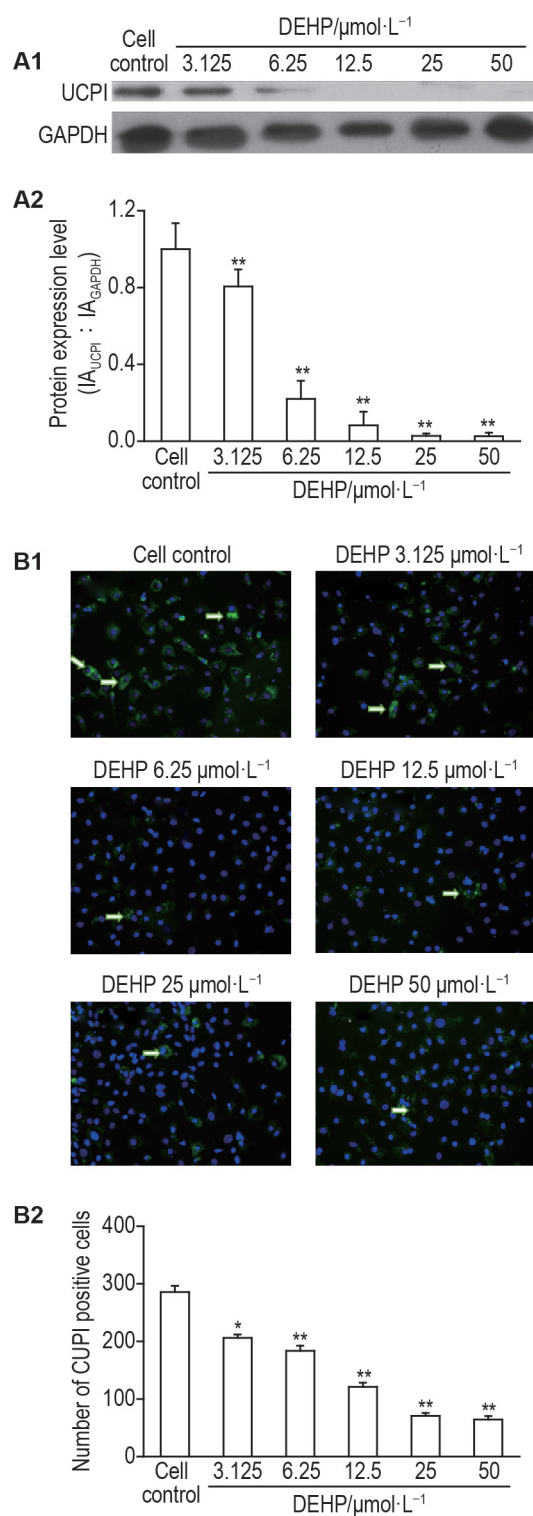


Fig.5 Effect of DEHP on protein expression of uncoupling protein 1 (UCP1) in 3T3-L1 differentiated adipocytes by Western blotting and immunofluorescence assay. See Fig.1 for the cell treatment. A: the expression of UCP1 protein; B: the number of UCP1 positive cells, the arrows show the UCP1 positive cells (200 \times); A2 and B2 were the semi-quantitative results of A1 and B1, respectively. $\bar{x}\pm s$, $n=6$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with cell control group.

3 讨论

塑料污染已引起全球关注。作为使用最为广

泛的塑料添加剂, DEHP 的健康效应引起广泛关注^[8]。人群调查资料和动物研究显示, DEHP 与肥胖密切相关, 但确切的作用机制尚不明确^[9-10]。脂肪细胞分化是肥胖发生发展的早期关键事件。3T3-L1 前脂肪细胞是研究脂肪代谢紊乱最常用的细胞模型之一, 通常采用诱导剂促进其分化为成熟脂肪细胞。Hao 等^[11]已报道, 对 3T3-L1 前脂肪细胞采用单纯胰岛素诱导成脂分化的同时给予 DEHP 暴露, 未观察到 DEHP 对 3T3-L1 细胞脂肪分化具有明显促进作用。本研究采用经典鸡尾酒法, 即序贯加入 IBMX、地塞米松和胰岛素组成的 A 液和含胰岛素 B 液进行成脂分化诱导, 同时给予 DEHP 暴露。形态学结果显示, DEHP 可使 3T3-L1 前脂肪细胞中脂滴出现更早, 脂滴体积和数量也明显增加。对细胞内油红 O 着色的脂肪滴洗脱液脂肪含量和培养液中 TG 水平检测结果表明, DEHP 可明显增加 3T3-L1 诱导成脂分化后细胞内脂肪含量和细胞外 TG 水平。已知 DEHP 进入体内后可代谢为邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯(mono-2-ethylhexyl phthalate, MEHP), MEHP 是过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptors, PPAR γ) 的激活剂^[12], PPAR γ 是脂肪分化的关键调节因子^[13]。本课题组采用 PPAR γ 过表达的 NIH-3T3 小鼠胚胎成纤维细胞研究表明, 与野生型 NIH-3T3 细胞相比, DEHP 和 MEHP 均能明显促进 PPAR γ 过表达细胞中脂滴形成, 且 MEHP 的促进作用更强(待发表)。故推测 DEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞成脂分化的促进作用可能部分由于其在细胞内代谢形成 MEHP 并激活 PPAR γ 所致。

脂肪细胞以 TG 的形式储存剩余能量, TG 的分解与合成是生物体脂肪积累的重要调节因素。通常 TG 分解需经 ATGL、活化的 HSL 和甘油单酯脂肪酶共同完成。ATGL 首先将 TG 水解为甘油二酯和游离脂肪酸, 甘油二酯随后可活化 HSL 水解生成甘油单酯和游离脂肪酸, 甘油单酯继续在甘油单酯脂肪酶的作用下水解为甘油和游离脂肪酸。HSL 的激活需在活性 PKA 作用下将 563 位点和 660 位点的丝氨酸磷酸化, 组织中 PKA 活性一般由磷酸化 PKA 底物的水平表示^[14]。通常刺激因素作用于脂肪细胞表面肾上腺素受体, 激活细胞内腺苷酸活化酶, 升高环磷酸腺苷水平, 导致 PKA 活化, 磷酸化激活 HSL, 参与甘油二酯水解^[15]。本研究结果显示, DEHP 降低了 ATGL 的表达, 同时观察到 DEHP 处理后细胞中 PKA 的活性也明显降低, 伴随 HSL660 和 563 位点丝氨酸磷酸化水平的明显下降, 提示

DEHP 抑制了 HSL 的激活。Ellero-Simatos 等^[16]对人源皮下前脂肪细胞诱导成脂分化 11 d, 在成脂分化率达 70% 时加入 MEHP 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 48 h。结果表明, 细胞内 TG 含量明显升高; 但作用 24 h 时成脂分化和脂肪分解相关基因 ATGL 和 HSL 表达均上调。另有研究报道, 3T3-L1 首先给予 DEHP 暴露 2 d, 其后再常规诱导成脂分化, 至第 8 天诱导完成时, 细胞增殖明显提高, 但细胞内 TG 含量明显降低^[17]。本研究结果与上述研究结果不一致, 可能与 DEHP 作用时间和作用方式不同所致。

UCP1 是棕色脂肪组织线粒体中特异表达的解偶联蛋白质, 该蛋白解偶联呼吸链、进而产热, 能减少体内脂肪累积。研究显示, 白色脂肪细胞向棕色脂肪细胞转化能增加全身能量消耗, 并减少体内脂肪, 该作用与 UCP1 表达密切相关^[18]。本研究用 Western 印迹法和免疫荧光法检测 3T3-L1 诱导成脂分化细胞中 UCP1 表达水平。结果均显示, DEHP 明显降低 3T3-L1 诱导成脂分化细胞内 UCP1 蛋白的表达, 提示 DEHP 处理细胞脂肪含量增加也可能与 UCP1 表达降低相关。本课题组先前动物实验结果表明, 雄性 C57 小鼠经灌胃分别给予 DEHP 0.05 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (环境相关剂量) 和 500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (导致明显生殖功能损伤剂量) 连续 13 周, 小鼠脂肪组织中 UCP1、p-PKA 底物、HSL 及 p-HSL Ser563 和 p-HSL Ser660 蛋白表达水平均明显降低^[6], 与本研究体外实验结果一致。

考虑到无诱导剂时 3T3-L1 前脂肪细胞成脂能力低且成脂分化率不稳定, 本研究未观察 DEHP 对非诱导细胞的成脂促进作用。同时, 在 DEHP >12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 也未观察到细胞外 TG 水平和细胞内脂肪含量具有明显的浓度依赖性。高浓度 DEHP 作用下, 成脂分化细胞中脂滴较大但易脱落, 推测该现象可能是高浓度时细胞内外脂肪含量无明显增加的原因之一。

综上, 本研究结果表明, DEHP 促进 3T3-L1 前脂肪细胞的成脂分化, 并抑制脂肪分化细胞的脂肪分解, 提示 DEHP 可能是促进肥胖发生的潜在危险因素, 具体分子机制待深入探讨。

参考文献:

- [1] Engin A. The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 960: 1-17.
- [2] Ou XH, Zhu CC, Sun SC. Effects of obesity and diabetes on the epigenetic modification of mammalian

- gametes [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 7847-7855.
- [3] Nadal A, Quesada I, Tudurí E, *et al.* Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(9): 536-546.
- [4] Dirinck E, Dirtu AC, Geens T, *et al.* Urinary phthalate metabolites are associated with insulin resistance in obese subjects [J]. *Environ Res*, 2015, 137:419-423.
- [5] 王俊程, 孙浩桐, 张兰, 等. 邻苯二甲酸二乙基己酯对小鼠脂肪和葡萄糖代谢的影响[J]. 毒理学杂志(*Journal of Toxicology*), 2019, 33(1): 17-21.
- [6] 冯赫平, 王俊程, 田奥, 等. 邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯暴露对雄性小鼠脂肪代谢的影响[J]. 毒理学杂志(*Journal of Toxicology*), 2020, 34(2): 90-97.
- [7] Cave E, Crowther NJ. The use of 3T3-L1 murine preadipocytes as a model of adipogenesis [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1916: 263-272.
- [8] Wright SL, Kelly FJ. Plastic and human health: a micro issue? [J]. *Environ Sci Technol*, 2017, 51(12): 6634-6647.
- [9] James-Todd TM, Huang T, Seely EW, *et al.* The association between phthalates and metabolic syndrome: the National Health and Nutrition Examination Survey 2001–2010[J/OL]. *Environ Health*, 2016, 15: 52(2016-04-14) [2021-10-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27079661/>. DOI: 10.1186/s12940-016-0136-x.
- [10] Ernst J, Grabiec U, Falk K, *et al.* The endocrine disruptor DEHP and the ECS: analysis of a possible crosstalk[J]. *Endocr Connect*, 2020, 9(2): 101-110.
- [11] Hao CJ, Cheng XJ, Guo J, *et al.* Perinatal exposure to diethyl-hexyl-phthalate induces obesity in mice [J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2013, 5: 725-733.
- [12] Kratochvil I, Hofmann T, Rother S, *et al.* Mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) and mono (2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate (MEOHP) but not di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) bind productively to the peroxisome proliferator-activated receptor γ [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2019, 33(S1): 75-85.
- [13] Dasgupta S, Rai RC. PPAR- γ and Akt regulate GLUT1 and GLUT3 surface localization during *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 440(1-2): 127-138.
- [14] Lee YG, Sue YM, Lee CK, *et al.* Synergistic effects of cAMP-dependent protein kinase A and AMP-activated protein kinase on lipolysis in kinsenoside-treated C3H10T1/2 adipocytes [J]. *Phytomedicine*, 2019, 55: 255-263.
- [15] Larsson S, Jones HA, Goransson O, *et al.* Parathyroid hormone induces adipocyte lipolysis via PKA-mediated phosphorylation of hormone-sensitive lipase [J]. *Cell Signal*, 2016, 28(3): 204-213.
- [16] Ellero-Simatos S, Claus SP, Benelli C, *et al.* Combined transcriptomic-¹HNMR metabolomic study reveals that monoethylhexyl phthalate stimulates adipogenesis and glyceroneogenesis in human adipocytes [J]. *Proteome Res*, 2011, 10(12): 5493-5502.
- [17] Klötting N, Hesselbarth N, Gericke M, *et al.* Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) causes impaired adipocyte function and alters serum metabolites [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0143190 (2015-12-02) [2021-08-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26630026/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0143190.
- [18] Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(1): 24-36.

Effect of diethylhexyl phthalate on adipogenic differentiation and lipolysis of 3T3-L1 preadipocytes

OUYANG Bi-yun, WANG Jun-cheng, ZHAO Xiu-lan

(School of Public Health, Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: OBJECTIVE To observe the effect of diethylhexyl phthalate (DEHP) on lipid metabolism of 3T3-L1 preadipocytes, and the possible mechanism. **METHODS** Adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocytes was induced using the cocktail method and DEHP 0 (cell control group), 3.125, 6.25, 12.5, 25 and 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ were added simultaneously. The changes in the lipid droplet size and number of 3T3-L1 cells were observed every day under a microscope during induction. After 7 d of induction, the 3T3-L1 cells continued to be cultured for 3 d (the 10th day). Oil red O staining was used to reveal the intracellular lipid droplets, the intracellular fat content in the eluent of oil red O stained cells and triglyceride

(TG) levels in the cell culture medium were detected by spectrophotometry respectively. Western blotting was used to detect the protein expressions of adipose triglyceride lipase (ATGL), hormone sensitive lipase (HSL) and phosphorylated HSL (p-HSL) at Ser660 and Ser563 sites, and phosphorylated protein kinase A (p-PKA) substrate in 3T3-L1 differentiated adipocytes. The protein level of uncoupling protein 1 (UCP1) in 3T3-L1 differentiated adipocytes was also analyzed by immunofluorescence and Western blotting. **RESULTS** On the 5th day of induction of differentiation, some tiny lipid droplets were observed in the DEHP 3.125–50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group, but not in the cell control group. On the 6th day, the lipid droplets appeared in the cell control group, and the numbers of lipid droplets in the DEHP 3.125–50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups were increased compared with the cell control group. On the 10th day, oil red O staining showed that the number of oil red O stained cells in the DEHP treated cells was much larger than that of the cell control group, especially in DEHP 12.5, 25 and 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups. Larger lipid droplets and ring-like adipocytes could be observed in DEHP 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ treated 3T3-L1 cells. Compared with the cell control group, the extracellular fat content and intracellular TG level in DEHP 3.125–50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups significantly increased ($P<0.01$), the protein expression of ATGL in DEHP 12.5, 25 and 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups was obviously down-regulated ($P<0.01$), and the PKA active level, HSL phosphorylation, UCP1 protein expression and the number of UCP1-positive cells in DEHP 3.125–50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups were also significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** DEHP may promote 3T3-L1 preadipocytes into adipocytes and inhibit the lipolysis of adipogenic cells.

Key words: diethylhexyl phthalate; adipose differentiation; lipolysis; obesity

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (82073587)

Corresponding author: ZHAO Xiu-lan, E-mail: zhao.xl@sdu.edu.cn

(收稿日期: 2021-08-20 接受日期: 2022-07-30)

(本文编辑: 齐春会)

《中国药理学与毒理学杂志》对图表的要求

1. 论文中的病理照片、电泳图及化学结构式图等要求以“插入”→“图片”方式插入 word 文档, 不要使用复制粘贴。病理照片必须加标尺, 并以箭头指示典型病变位置。除照片外, 其他图尽量不用彩色。

2. 统计的数据图表(包括线图和柱图等)一般通过“插入”→“图表”方式插入 word 文档, 双击该图即可直接进入此图的作图软件, 看到作图数据。

3. 双栏图大小: 宽与高的比为 3:2, 宽 ≤ 7.5 cm; 通栏图大小为: 宽 ≤ 15 cm; 横、纵坐标字体为 Arial, 字号为 8 或 9 磅。

4. 论著中的图表(包括图表题和图表注)全部使用英文, 要求图表自明。图表注内容包括分组设计、药物浓度、给药顺序、作用时间、指标测试时间、各种缩写的解释说明、对观察内容必要的描述和统计方法等。

5. 线图图例依次使用 \circ \bullet \triangle \blacktriangle \square \blacksquare 等, 柱图按组别顺序依次用空心、左斜线、右斜线和网格线填充。图例字体用 Arial, 字号为 6 磅。

6. 论著中的数据统计图表, 应该首先进行一级比较, 如模型组与正常对照组比较, 结果用“*”表示; 各给药组与模型组比较, 为二级比较, 用“#”表示; 待测药各组组间比较或者与阳性对照组比较, 为三级比较, 用“ Δ ”表示。统计学分析结果分 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 两个水平给出即可。

7. 综述中的图表全部使用中文。