

上海交通大学

SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

学士学位论文

THESIS OF BACHELOR



论文题目：邻苯二甲酸单乙基己基酯
对前体脂肪细胞增殖和分化的影响

学生姓名： 高润颖
学生学号： 5107509014
专 业： 营养学
指导教师： 杨科峰
学院(系)： 医学院

邻苯二甲酸单乙基己基酯

对前体脂肪细胞增殖和分化的影响

摘要

背景：肥胖已成为严重危害人类健康、全球流行的疾病。在现代工业化进程加快的社会背景下，有学者提出环境内分泌干扰物可能导致肥胖并得到一些实验结果的支持。DEHP（邻苯二甲酸二乙基己基酯）是一类广泛使用的塑化剂，在食物和人体生物样本中普遍检出 DEHP 或其代谢物。已有流行病学调查发现某些人群的 BMI 值和腰围与 DEHP 暴露水平存在一定相关性，由于人群调查的局限，难以反映 DEHP 暴露与肥胖的因果关系，为探讨 DEHP 是否具有诱导肥胖发生的作用，进行体外细胞实验研究其作用机制。

方法：本实验采用 3T3-L1 前脂肪细胞作为模型，用 DEHP 的体内初级代谢产物 MEHP（邻苯二甲酸单乙基己基酯）作为干预物质，用 MTT 法和 RTCA 技术研究 MEHP 对前脂肪细胞增殖的影响；用油红 O 染色法分析 MEHP 对前脂肪细胞分化及聚脂能力的影响。

实验结果：在 $1\mu\text{M}$ ~ $200\mu\text{M}$ 的浓度范围内，MEHP 处理组与对照组的 3T3-L1 前脂肪细胞数量差异无统计学差异；镜下观察 MEHP 处理组的细胞分化率明显高于对照组，且油红 O 染色的 OD 值差异有统计学意义。

结论：MEHP 浓度在 $1\mu\text{M}$ ~ $200\mu\text{M}$ 范围内，不能促进 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖；MEHP 可以显著促进 3T3-L1 前脂肪细胞的分化，其浓度与促分化作用的剂量关系有待进一步研究。

关键词：DEHP, 3T3-L1 细胞, 增殖, 分化

EFFECTS OF MONO (2-ETHYLHEXYL) PHTHALATE ON THE PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION IN PREADIPOCYTES

ABSTRACT

Background: Obesity, as a global epidemic disease, has become a serious hazard to human health. With the acceleration of industrialization in modern society, some scholars have proposed environmental endocrine disruptors may lead to obesity, which has been supported by some experimental results. DEHP (ethylhexyl phthalate) is a widely used plasticizers. DEHP and its metabolites have been generally detected in food or biological samples. Epidemiological investigations have found that there is a correlation between DEHP exposure level and BMI and waist circumference in certain population. Due to the limitations of these investigations, their results cannot reflect the true relationship between DEHP exposure and obesity. To explore whether the effects of DEHP on obesity occurs, in vitro experimental study has been conducted.

Methods: In the present study, 3T3-L1 preadipocytes was used as a cell model in vivo. MEHP (mono ethylhexyl phthalate), the primary metabolite of DEHP, was used as an intervention substance. MTT assay and RTCA technology were applied to research the impact of MEHP on proliferation of preadipocytes, and oil red O staining method to the effect of MEHP on differentiation and polyester capacity.

Results: In the MEHP-treated group of 1 μ M~200 μ M concentration range, no significant difference in 3T3-L1 preadipocyte number was observed compared to the control group; for differentiation in preadipocyte, MEHP-treated group showed higher proportions of differentiated adipocytes and greater OD values in oil red O staining compared to the control group, which was statistically significant.

Conclusion: MEHP cannot promote the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes, whereas MEHP can significantly promote the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. The relationship between dose and effects needs further study.

Key words: DEHP, 3T3-L1 cells, proliferation, differentiation

主要缩写词列表

缩写	英文全称	中文名称
BMI	Body Mass Index	体质指数
CI	Cell index	细胞指数
ddH ₂ O	Double distilled H ₂ O	双蒸水
DEHP	diethylhexyl phthalate	邻苯二甲酸二乙基己基酯
Dex	Dexamethasone	地塞米松
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM 细胞培养基
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亚砷
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine	3-异丁基-1-甲基黄嘌呤
MEHP	Mono(2-ethylhexyl) phthalate	邻苯二甲酸单乙基己基酯
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	噻唑蓝
OD	Optical density	光密度值
PAE	Phthalate	邻苯二甲酸酯
PBS	Phosphate balanced solution	磷酸缓冲液
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor	过氧化物酶体增殖激活受体
Rpm	Rotation per minute	每分钟转速
RTCA	Real Time Cellular Analysis	实时细胞分析技术



目 录

第一章 绪论.....	5
第二章 材料与方法.....	7
2.1 材料.....	7
2.1.1 细胞.....	7
2.1.2 实验仪器.....	7
2.1.3 试剂及试剂配制.....	7
2.2 实验方法.....	8
2.2.1 3T3-L1 前脂肪细胞的培养.....	8
2.2.2 MTT 法研究 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响.....	9
2.2.3 RTCA 技术动态监测 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响.....	9
2.2.4 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化及聚脂能力的影响.....	10
2.2.4 数据分析.....	11
第三章 结果.....	12
3.1 MTT 法研究 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响.....	12
3.2 RTCA 法动态监测 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响.....	12
3.3 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化及聚脂能力的影响.....	14
第四章 讨论.....	16
4.1 MEHP 给药浓度的设定依据.....	16
4.2 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响.....	16
4.2.1 不同浓度 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的作用.....	16
4.2.2 溶剂 DMSO 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的干扰.....	16
4.2.3 运用 MTT 法与 RTCA 技术分析细胞增殖情况的比较.....	17
4.3 MEHP 对前脂肪细胞分化和脂肪细胞聚脂能力的影响.....	17
4.3.1 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响.....	17
4.3.2 MEHP 对脂肪细胞聚脂能力的影响.....	17
4.4 展望及今后研究方向.....	18
第五章 结论.....	19
参考文献.....	20

第一章 绪论

随着社会物质生活的巨大改变,肥胖这一慢性疾病逐渐成为一个全球性问题,不同年龄人群、不同国家均受到肥胖的健康威胁。WHO 宣称,1980 年至 2011 年间,全球肥胖数量翻倍;欧洲半数以上人群超重,高达 30%人口肥胖^[1]。根据 2002 年中国居民营养与健康调查的结果,超重和肥胖人群已近中国总人口四分之一,且随着城市化的进程,肥胖的发生率将继续增加,严重影响居民健康^[2]。另外,中国学生体质与健康调研结果显示:1985 至 2010 年间,中国学生超重与肥胖的检出率持续增加,其中 2005--2010 年乡村学生超重与肥胖检出率年均增长速度已超过城市^[3]。

肥胖的并发症包括冠心病、高血压、脑卒中、糖尿病、非胰岛素依赖型糖尿病、胆囊疾病、某些癌症、血脂异常、骨关节炎和痛风、肺部疾病、包括睡眠呼吸暂停在内的多种疾病,危及人们的生活质量和寿命^[4]。1997 年 WHO 明确将肥胖纳入疾病范畴^[4],肥胖防治的重要性不言而喻,有效防治政策的制定迫在眉睫。

目前对于肥胖的认知尚处于逐步完善的过程中。宏观角度看,能量摄入与消耗的不平衡是肥胖的核心机制,受到生活习惯和基因的影响。在细胞层面上,肥胖的发生伴有脂肪细胞数量增加和脂肪细胞体积的膨胀,这与基因、内分泌、营养、代谢、药理等多个因素相关^[5]。以往观点认为,高热量饮食和缺乏运动的生活习惯是肥胖的元凶,然而,在肥胖病来势汹汹的当今,这并不能作为其发病率急速增加的唯一解释;另一方面,基因变化是缓慢进行的,也无法为肥胖率的激增提供合理解释^[6]。值得人们注意的是,近现代社会工业化迅猛发展,随其进程的不断推进,人工合成的化合物种类和数量都急剧增加,人类生活的化学环境发生着翻天覆地的变化,某些急性毒性极低的环境污染物可能具有未被人类发现的健康隐患。Baillie 在 2002 年提出全球肥胖流行可能与环境中的有毒化学物质存在关系的假设^[7]。2006 年 Blumberg 提出了“环境致肥因子”的概念,有机锡、乙烯雌酚、双酚 A 和邻苯二甲酸盐位列候选^{[8][9]}。近些年,国外一些研究发现环境内分泌干扰物(environmental endocrine-disrupting chemical, EDC)可能引发肥胖,或与肥胖存在相关性^{[10][11]}。EDCs 是指在生产生活过程中排放到环境、对人类和动物内分泌功能产生影响的外源性化学物质,其进入机体后能够干扰体内天然激素的合成、分泌、转运、结合、代谢等过程^[12]。目前,EDC 致肥胖作用的观点已得到美国儿童肥胖总统工作组和美国国立卫生研究院的认可^[12]。以上发现为肥胖病因的研究开辟了新方向。

邻苯二甲酸酯类化合物(PAE)是近期研究报道较多的一类 EDCs。PAEs 又称酞酸酯,是邻苯二甲酸形成的酯的统称,作为增塑剂使用,增加高分子聚合物的柔韧性和拉伸性。由于其存在广泛,已然成为全球公认的环境有机污染物。邻苯二甲酸二乙基己基酯(DEHP)是酞酸酯类增塑剂中重要一种,结构如图 1-1;它被作为增塑剂广泛用于聚氯乙烯(PVC)塑料、油漆、涂料、黏合剂等合成树脂产品中,还用作农药和驱虫剂的载体,此外也是化妆品、香味品、润滑剂、去污剂、合成橡胶、印刷油墨的重要添加剂等;聚氯乙烯塑料中 DEHP 的最高含量可达 50%^[13]。由于 DEHP 与塑料并不以化学键的形式结合,而是与聚合物形成一种固体溶液,在一定的条件下,增塑剂会慢慢从塑料中迁移进入空气、土壤、水源、与之直接接触的物品如食物和药物,因此在日常生活中,DEHP 可以通过呼吸道、消化道、皮肤或静脉等多种途径进入体内,可谓无处不在,防不慎防^[14]。目前,尽管包括 DEHP 在内的三种 PAEs 已被我国列入优先监测污染物黑名单,然而这些塑化剂在生活用品,尤其是婴幼儿产品中仍未被禁止添加^[15]。

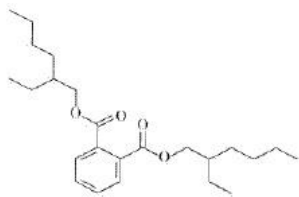


图1-1 DEHP结构式

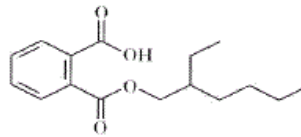


图1-2 MEHP结构式

进入人体后,DEHP 迅速地代谢为乙基己醇和 MEHP(邻苯二甲酸单乙基己基酯);MEHP 是 DEHP 的初级代谢产物,结构如图 1-2,能够被肠道优先吸收进入人体内环境,因此 MEHP 的生物学效应是当今研究的热点^[16]。部分 MEHP 又会发生羟基化和氧化反应生成次级代谢产物,代谢物基本随尿排出体外^[17]。因而 DEHP 的暴露水平常用其尿代谢产物浓度来评估。已有一些流行病学研究发现 DEHP 暴露可能增加肥胖发生的风险:2013 年,一项对中国学生尿 PAEs 代谢物浓度与 BMI 和 WC 相关性的横断面研究显示,MEHP 尿浓度与各年龄段学生的 BMI 和 WC 值的增高存在明显联系^[18];Hatch 等人发现 MEHP 尿浓度与 20-59 岁妇女的 BMI 值存在正向关联性,某些 DEHP 次级代谢物与女性 BMI、WC 值相关^[19];另外,国外也有某些调查得出 DEHP 暴露与肥胖关系为阴性的结果^[20]。目前所报道的各流行病学研究研究对象各不相同,调查方式和数据统计学处理也存在一定差异,而且由于人群调查存在混杂因素多且难控制(性别、年龄、饮食、生活方式以及影响代谢物浓度的因素等)的问题,以上各研究的结果尚不能明确 DEHP 暴露与肥胖是否存在关联;即使存在关联,鉴于肥胖是多方原因协同所产生的疾病,暴露水平的异常很可能只是某个致肥胖因素的副产物,这两者的因果关系仍是扑朔迷离。

相比大规模的人群调查而言,体外细胞实验具有干扰因素易控、实验操作重复性强、实验周期短、成本低等优点;并且可以从分子、基因等水平研究机制、验证结果。更重要的是,细胞实验的着重点可以放在药物暴露对细胞生理特性的影响方面,从而规避了能量摄入和生活方式等因素对结果的干扰作用。因此,对于 DEHP 暴露与肥胖关系的研究,在拥有一定流行病学数据、缺乏有力证据的现阶段,细胞实验非常适合作为研究的方式。

目前,3T3-L1 前脂肪细胞是研究脂肪细胞增殖分化实验中最广泛的细胞株^[21],由 green 与 Kehinde 于 1974 年从 17-19 天龄小鼠胚胎 Swiss3T3 脂肪细胞中分离克隆获得,具有单一分化潜能,不仅可以在体外受诱导分化为成熟脂肪细胞,且植入小鼠体内也可分化并形成脂肪团块,能较好地模拟活体脂肪的生理过程,是国际公认的脂肪细胞研究模型^[22]。

本课题基于上述的研究背景与分析,探讨 DEHP 能否促进前脂肪细胞的增殖和/或分化,进行体外细胞实验。以 3T3-L1 前脂肪细胞为研究模型;考虑到 MEHP 作为 DEHP 体内初级代谢产物,很可能是其发挥生物效应的化学形式,为模拟细胞的体内环境,选择 MEHP 作为 DEHP 的替代物给予细胞不同剂量的刺激,观察不同浓度 MEHP 对前脂肪细胞增殖和分化的影响。

第二章 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 细胞

3T3-L1 小鼠胚胎成纤维细胞，购自 American Type Culture Collection (ATCC)。

2.1.2 实验仪器

实验中用到的仪器清单见表 2-1。

表 2-1 实验器材

仪器	来源
恒温 CO ₂ 培养箱	美国 Thermo Scientific
超净工作台	中国苏净安泰 AIRTECH
倒置荧光显微镜及显微摄像系统 Ti-S	日本 Nikon
电子分析天平 (BSA2245-CN)	德国 Sartorius
MilliQ 纯水仪	美国 Millipore 公司
普通冰箱 (BCD-268TN)	中国海尔
-80℃ 超低温冰箱	美国 Thermo Scientific
液氮罐	美国 Thermo Scientific
程序冷冻盒	美国 Nalgene
电热恒温水浴锅 (DK-8D 型)	上海森信实验仪器有限公司
台式离心机 (ST16R)	美国 Thermo Scientific
低温超速离心机	美国 Thermo Scientific
全自动酶标仪	美国 BioTek, Synergy H1 Hybrid Reader
血球计数板	上海市求精生化试剂仪器有限公司
高压消毒锅 (SX-500)	美国 TOMY
恒温烘箱	美国 Thermo Scientific
xCELLigence RTCA DP 多功能实时无标记 细胞分析仪	美国 Roche Diagnostics and ACEA Bioscience
细胞培养耗材：培养皿、培养板、冻存管、 微孔过滤器等	美国 Corning Incorporated

2.1.3 试剂及试剂配制

2.1.3.1 试剂

主要试剂及来源见表 2-2



表 2-2 实验试剂

试剂	来源
MEHP 纯品	美国 AccuStandard 公司
DMEM (高糖) 细胞培养液	美国 Hyclone 公司
双抗 (含青霉素及链霉素)	美国 Gibco 公司
胎牛血清 (FBS)	美国 Gibco 公司
0.25%胰酶	美国 Gibco 公司
PBS	美国 Hyclone 公司
胰岛素 (Lot I-5500)	美国 Sigma 公司
地塞米松 (Lot D-4902)	美国 Sigma 公司
IBMX (Lot I-7018)	美国 Sigma 公司
油红 O	美国 Sigma 公司
DMSO	美国 MP 公司
MTT	美国 Sigma 公司

2.1.3.2 主要试剂的配制

(1) MEHP 储存液: MEHP 样品纯净度达 99%, 共购得样品 100mg, 溶于 1.798mL 无菌 DMSO, 混匀, 配制成 $2 \times 10^5 \mu\text{M}$ (即 $\mu\text{mol/L}$) 储存液 I; 取出 100 μL 母液用 DMSO 稀释十倍, 配制成 $2 \times 10^4 \mu\text{M}$ 储存液 II, 0.22 μm 微孔滤膜过滤后分装于 EP 管, -4°C 分装冻存。

(2) 胰岛素母液: 天平称取 3mg 胰岛素溶于 1mL 酸化水 (4.9mL 去离子水+0.1mL 冰醋酸混匀) 混匀, 制成胰岛素母液 (10 $\mu\text{g/mL} \times 300$), 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 分装于 EP 管, -20°C 保存待用。

(3) Dex 母液: 称取 3.925mg 地塞米松溶于 10mL 无水乙醇, 混匀, 制成地塞米松母液 (1 $\mu\text{M} \times 1000$), 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 分装于小管, -20°C 保存待用。

(4) IBMX 母液: 称取 11.5mg IBMX, 加入 940 μL ddH₂O 和 60 μL 1mol/L NaOH, 混匀, 制成 IBMX 母液 (0.5 mM $\times 100$), 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 分装小管, -20°C 保存待用。

(5) 油红 O 储存液: 称取 0.25 g 油红 O 染料, 溶解于 50mL 异丙醇制成 0.5%的油红 O 母液, 37°C 水浴, 待完全溶解后于 4°C 避光保存。

(6) MTT 储存液: 称取 MTT 25mg 溶于 5 mL PBS, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 分装于 1.5mL EP 管, 避光- 20°C 可长期保存, 4°C 避光保存不超过 2 周。

(7) DMEM 完全培养液: 50mL 离心管中加入 5mL FBS 和 0.5mL 双抗, DMEM 定容至 50mL, 混匀, 制成含 10%FBS 和 1%双抗的完全培养液, 4°C 保存。

(8) 诱导分化液: 诱导分化液 I: 60 μL IBMX 母液+6 μL Dex 母液+20 μL 胰岛素母液, 加入 DMEM 完全培养基 5.914mL, 混匀; 诱导分化液 II: 20 μL 胰岛素母液+5.98mL 完全培养基, 混匀。为保证诱导分化液活性, 宜即配即用。

2.2 实验方法

2.2.1 3T3-L1 前脂肪细胞的培养

(1) 细胞复苏

水浴锅调至 37°C , 从液氮罐中取出冻存细胞, 立即放入 37°C 水浴, 轻轻晃动冻存管, 使冻存液在 1 分钟内融化。讲细胞悬液移至无菌离心管, 加入完全培养液 5mL, 轻吹打使细胞液混匀, 1000 rpm 离心 5 分钟, 弃上清, 加入新鲜完全培养液, 充分吹打使细胞均匀重悬, 根据细胞数量接种于培养皿或六孔板。

(2) 细胞培养

将细胞种入培养皿或培养板, 加入适量 DMEM 完全培养液, 放入 37°C , 5%CO₂ 细胞

培养箱。两天更换一次培养液。每日于显微镜下观察细胞生长情况，当细胞汇合度达 80%，尽快进行细胞传代或冻存。

(3) 细胞传代

当细胞长至一定密度，为防止接触性抑制，需传代培养。在细胞处于对数生长期时，吸去培养液，用无菌 PBS 液轻轻洗涤一次，加入适量 0.25% 胰蛋白酶液，37℃ 孵育 1~2 分钟，待细胞形态轻微皱缩改变后，加入足量 DMEM 培养液中中止胰酶的消化作用，轻吹打细胞使其脱落，移细胞悬液入离心管，1000 rpm 离心 5 分钟，弃上清，加入新鲜 DMEM 完全培养液，充分吹打使细胞均匀重悬后接种。

(4) 细胞冻存

细胞的收集、离心步骤同细胞传代，离心弃上清，用冻存液（含 90% FBS 和 10% DMSO，当场配制待用）重悬细胞，细胞计数板计数后，以 10^7 个/mL 浓度移入冻存管。冻存管装入程序冷冻盒中，置于 -80℃ 冰箱，24 小时后转移至液氮罐保存。

2.2.2 MTT 法研究 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响

按 2.2.1 的方法消化并收集对数期前脂肪细胞，利用细胞计数板调整细胞悬液的细胞浓度至 1×10^4 个/mL，接种于 96 孔板。96 孔板的边缘孔不接种细胞，用无菌 PBS 填充防止其余孔内培养液蒸发过快。中间 60 孔每孔加入 100 μ L 细胞悬液，37℃，5% CO₂ 培养。次日观察到各孔细胞均已贴壁，换液加药：每孔 200 μ L 完全培养液，设置空白对照组（仅培养液）和 DMSO 组，MEHP 组浓度分为：1 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M、50 μ M、80 μ M、100 μ M、200 μ M。DMSO 组和 MEHP 组的 DMSO 浓度均控制为 0.5%。每组设置 5 个复孔。37℃，5% CO₂ 孵育 48 小时后，每孔加入 20 μ L MTT 溶液，终止细胞生长，于 37℃ 继续培养 4 小时，发现细胞形态改变、染成蓝色，用 1 mL 针筒小心吸除干净孔中培养液，操作过程中勿摇晃 96 孔板以防细胞脱落。每孔加入 150 μ L DMSO，轻轻摇晃至结晶体充分溶解，酶标仪 490 nm 处检测各孔的 OD 值。

2.2.3 RTCA 技术动态监测 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响

实时无标记动态细胞分析技术（RTCA，Real Time Cellular Analysis）是通过特殊工艺，将微电子细胞传感器芯片整合到细胞检测板的底部，用以构建实时、动态、定量跟踪细胞形态和增殖分化等改变的细胞阻抗检测传感系统。当贴壁生长在微电极表面的细胞引起贴壁电极界面阻抗的改变时，这种改变与细胞的实时功能状态改变呈相关性，通过实时动态的电极阻抗检测可以获得细胞生理功能相关的生物信息，包括细胞生长、伸展、形态变化、死亡和贴壁等。RTCA 技术主要设备包括 xCELLigence 或 iCELLigence 细胞功能分析仪、对应的



图 2-1 xCELLigence 细胞功能分析仪的构成



图 2-2 E-Plate 16 检测板

E-Plate 检测板以及位于细胞培养箱内的 RTCA Station 检测台（图 2-1）。

本实验采用 xCELLigence 细胞功能分析系统及对应的 E-Plate 16 检测板（图 2-2）。系统的核心（图 2-3）是把微电子细胞传感器芯片整合到表面适于细胞贴附与生长的细胞检测板的底部或细胞浸润迁移板的微孔膜。微电极阻抗主要由点及周边的离子环境决定，当电场加

在上面的时候可以测量到一个基线阻抗 (Z_0)。细胞的有无以及贴壁程度的改变都会影响电极传感器表面电子和离子的通过。没有细胞时,检测孔底部排列的微电极阵列的阻抗分布近似均匀;加入细胞后,细胞会和电极表面接触粘附,影响电极和溶液间的离子环境,导致阻抗的升高 (Z_{cell}),细胞越多阻抗增加越多,阻抗可以转换成数字信号,以细胞指数 (CI 值) 的形式表现。同样的,细胞与电极表面粘附越紧密伸展,电阻抗增加越大,CI 值也越大。当细胞生物状态发生变化时,系统实时并自动获取其模拟电信号,转化为 CI 值,提取数据后可以进行分析。

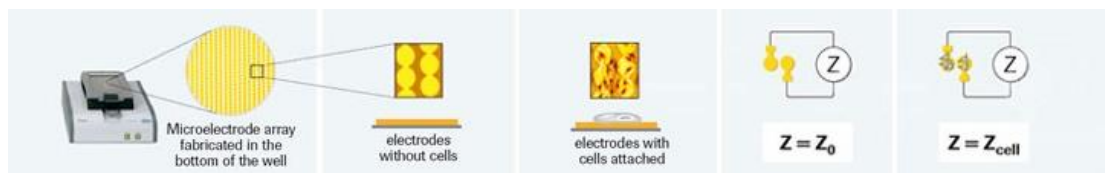


图 2-3 xCELLigence 细胞功能分析系统的技术原理

实验操作如下:于超净台内,在 E-Plate 检测板孔内加入 100 μL 完全培养液,静置 10 到 30 分钟,放到 RTCA Station 上检测基线 (background),并去除 CI 值大于 0.01 的孔。按 2.2.1 的方法消化并收集对数期细胞,利用细胞计数板调整细胞悬液的细胞浓度至 6×10^4 个/mL。取出 E-Plate,每孔加入 100 μL 细胞悬液,即每孔 6000 个细胞,超净台内室温静置 30 分钟,放入 RTCA Station 上开始检测 CI 值。待细胞完全贴壁后,即 CI 曲线趋向水平,暂停检测,取出 E-Plate,每孔吸去 5 μL 培养液,加入 5 μL 事先配制的试剂。实验设置一个空白对照组;一个 DMSO 组,控制 DMSO 浓度为 0.5%;MEHP 分为低、中、高三个浓度梯度,各浓度梯度下细分为三个浓度组,各组浓度及试剂配制见表 2-3。对照组和处理组均设 2 个复孔。将 E-Plate 放到 RTCA Station 上,待 10 到 30 分钟后继续开始检测。

表 2-3 各组浓度及试剂配制

MEHP 浓度	DMSO 组 (μM)	低浓度组 (μM)		中浓度组 (μM)			高浓度组 (μM)		
	0	1	10	20	50	80	100	200	400
培养基 (μL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20
$2 \times 10^5 \mu\text{M}$ MEHP 储存液 (μL)	0	0	0	0	0	0	0	1	2
$2 \times 10^4 \mu\text{M}$ MEHP 储存液 (μL)	0	0.05	0.5	1	2.5	4	5	0	0
DMSO (μL)	5	4.95	4.5	4	2.5	1	0	4	3

2.2.4 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化及聚脂能力的影响

消化并收集对数期细胞,接种于 24 孔板,每孔 500 μL 完全培养液培养。观察到细胞生长至汇合度近 100%,继续培养 2 天待细胞退出生长周期,将细胞培养液换成诱导分化液 I (此时记为第 0 天);培养 48 小时后,换成诱导分化液 II 继续培养 48 小时;再换以含 10%FBS 的完全培养液继续培养,每 2 天一次换液。实验设置空白对照组、DMSO 组,MEHP 处理组分为 50 μM 和 100 μM 两个浓度,DMSO 组及 MEHP 组的 DMSO 浓度均为 0.5%。在加入诱导分化液 I 的同时给药,至细胞培养终止。

诱导分化后,细胞形态变得浑圆,脂滴逐渐积聚,形成“戒环状”结构。诱导分化 10 天后,镜下大部分细胞呈现脂肪细胞的表型、胞浆内可见透亮脂滴。此时进行油红 O 染色,操作如下:小心吸去孔内培养液,PBS 清洗一次。每孔加入 200 μL 4%多聚甲醛固定细胞膜,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 分钟后吸去多聚甲醛,PBS 洗 3 遍。按油红 O 染液:去离子水=3:2 的比例稀释油红 O 母液,混匀后经 0.4 μm 微孔滤膜过滤,每孔加入 200 μL 染料,室温放置,30 分钟后在显微镜下观察脂滴是否染红,如染色完全,弃油红 O,用 PBS 漂洗去多余染料使背景无



色透明，一般漂洗三次。镜下观察脂滴特征并拍照。沥干 PBS，每孔加入 200 μ L 100%异丙醇，轻轻摇晃使油红 O 染料从脂滴内完全溶出，酶标仪 510nm 处检测 OD 值。溶解在脂肪细胞脂滴内的油红 O 与脂肪数量成正比，因此可以用 OD 值反映脂肪细胞积累的总脂肪量。

2.2.4 数据分析

所有数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析，组间均数比较采用单因素方差分析 (ANOVA)，各处理组与对照组数据的比较采用 Dunnett 检验方法， $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

第三章 结果

3.1 MTT 法研究 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响

细胞培养 36 小时后，MTT 法检测不同处理组相对细胞数量的差异，：酶标仪 490nm 处测吸光值，记录各孔 OD 值，数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，见表 3-1。各处理组数据与对照组数据进行比较，差异没有统计学意义。

表 3-1 MTT 法检测不同处理组所得 OD 值

分组	例数	OD 值
DMEM 组	6	0.208±0.01
DMSO 组	6	0.190±0.01
MEHP 1μM	6	0.204±0.01
MEHP 5μM	6	0.198±0.01
MEHP 10μM	6	0.207±0.01
MEHP 20μM	6	0.204±0.01
MEHP 50μM	6	0.216±0.01
MEHP 80μM	6	0.201±0.02
MEHP 100μM	6	0.225±0.02
MEHP 200μM	6	0.191±0.01

3.2 RTCA 法动态监测 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响

RTCA 实验结束后，对数据进行标准化处理，将细胞完全贴壁的时刻作为标准化的时间点，此时的 CI 值统一标记为 1.00，并作为初始接种的细胞数进行结果分析；导出标准化处理的数据和图像进行统计学分析。MEHP 低、中、高三组浓度的研究分别于三块 E-Plate 16 板进行，细胞生长曲线见图 3-1~3-3；导出经标准化处理的 CI 值，经统计学分析，CI 值以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，各 MEHP 组数据采用 Dunnett 检验方法与对照组数据进行比较，结果见表 3-2~3-4。

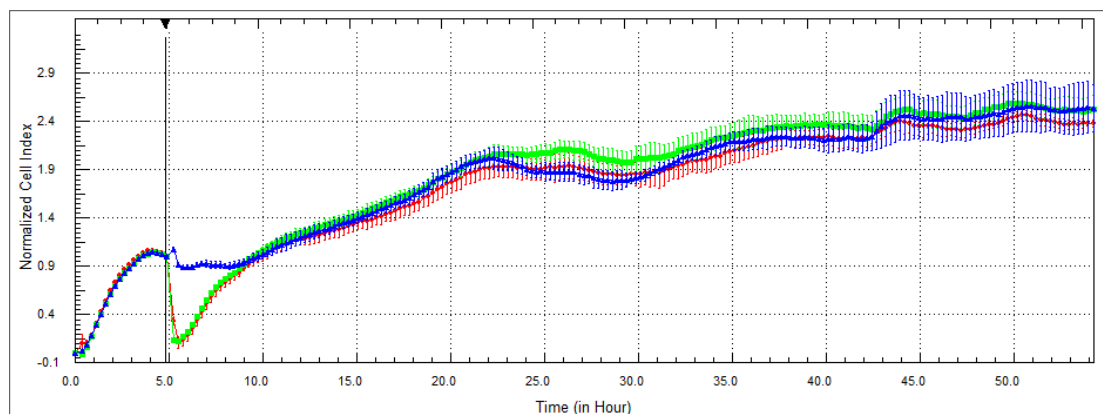


图 3-1 低浓度 MEHP (1μM 和 10μM) 作用下 3T3-L1 前脂肪细胞的生长曲线

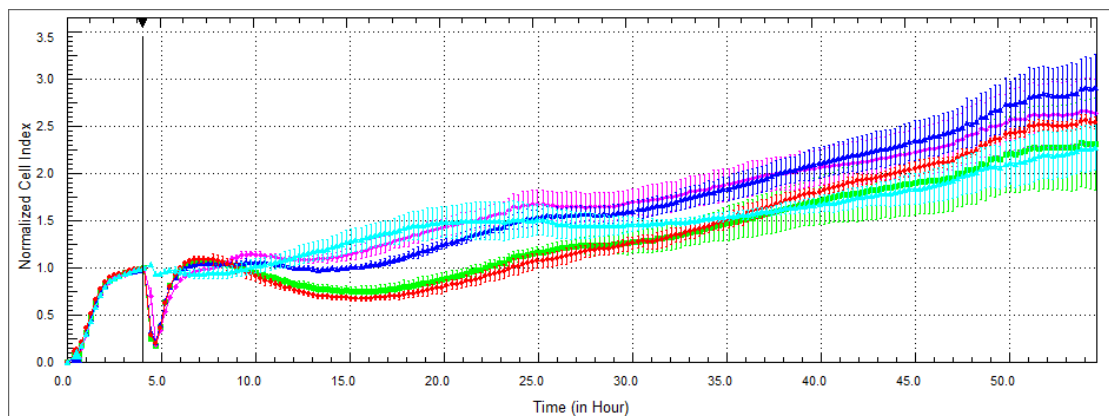


图 3-2 中浓度 MEHP (20 μ M、50 μ M 和 80 μ M) 作用下 3T3-L1 前脂肪细胞的生长曲线

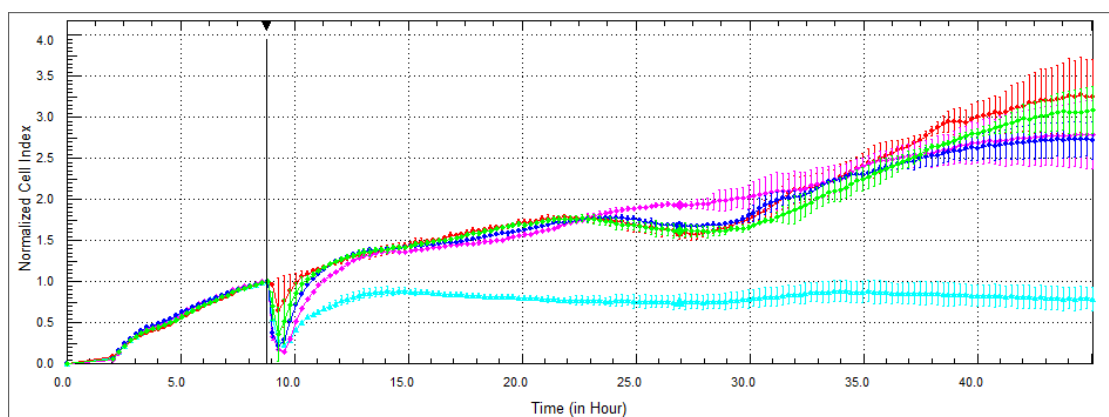


图 3-3 高浓度 MEHP (100 μ M、200 μ M 和 400 μ M) 作用下 3T3-L1 前脂肪细胞的生长曲线

表 3-2 低浓度 MEHP 作用下 3T3-L1 前脂肪细胞的 CI 值

分组	Normalized CI		
	24h	36h	48h
空白对照组	1.78 $\pm$ 0.11	2.22 $\pm$ 0.14	2.51 $\pm$ 0.26
MEHP 1 μ M	1.84 $\pm$ 0.10	2.22 $\pm$ 0.10	2.36 $\pm$ 0.10
MEHP 10 μ M	1.98 $\pm$ 0.11	2.35 $\pm$ 0.15	2.50 $\pm$ 0.15

表 3-3 中浓度 MEHP 作用下 3T3-L1 前脂肪细胞的 CI 值

分组	Normalized CI		
	24h	36h	48h
空白对照组	1.45 $\pm$ 0.11	1.70 $\pm$ 0.10	2.21 $\pm$ 0.25
DMSO组	1.65 $\pm$ 0.15	2.09 $\pm$ 0.21	2.62 $\pm$ 0.35
MEHP 20 μ M	1.58 $\pm$ 0.09	2.16 $\pm$ 0.17*	2.84 $\pm$ 0.32
MEHP 50 μ M	1.25 $\pm$ 0.11	1.76 $\pm$ 0.27	2.28 $\pm$ 0.45
MEHP 80 μ M	1.21 $\pm$ 0.07	1.86 $\pm$ 0.06	2.51 $\pm$ 0.06

*与空白对照组相比, $P < 0.05$ 。

表3-4 高浓度MEHP作用下3T3-L1前脂肪细胞的CI值

分组	Normalized CI		
	24h	36h	48h
空白对照组	2.16±0.16	3.25±0.46	2.82±0.84
DMSO组	2.06±0.12	2.98±0.22	2.60±0.43
MEHP 100μM	2.14±0.03	2.72±0.23	2.31±0.22
MEHP 200μM	2.19±0.21	2.80±0.42	2.50±0.53
MEHP 400μM	0.88±0.12*	0.80±0.14*	0.64±0.17*

*与对照组相比, $P<0.01$ 。

由表 3-2 可知, 在 24h, 36h, 48h 三个时间点, 低浓度 MEHP 组与对照组的 CI 值差异均无有统计学意义。

由表 3-3 可知, MEHP 20μM 组于处理 36h 后, CI 值略高于对照组, 差异有统计学意义; 然而 48h 后, 两者 CI 值接近, 差异不具有统计学意义, 从长期效果考虑, MEHP 20μM 不能促进前脂肪细胞分裂增殖; DMSO 组 CI 值与对照组相比差异没有统计学意义, 表明 0.5% 浓度的 DMSO 对细胞增殖没有明显影响; 其余各组 CI 值与对照组相比差异均无统计学意义。

表 3-4 的数据显示, 高浓度 MEHP 400μM 组各时间点的 CI 值显著低于其他各组, 差异有统计学意义, 明显抑制细胞分裂增殖; 其余各组 CI 值与对照组相比差异均无统计学意义。

3.3 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化及聚脂能力的影响

3T3-L1 前脂肪细胞经诱导分化后, 细胞形态由梭形逐渐变圆, 诱导分化第 4 天, 镜下可见细胞内出现细小脂滴; 随着分化程度增加, 脂滴积聚增多, 分布于核周, 形成典型“戒环状”结构。于分化第 10 天进行油红 O 染色, 在镜下观察细胞分化比例的差异和脂肪积聚的情况。由图 3-4 可见, 与空白对照组 (培养基中仅添加诱导分化液) 相比, DMSO 组前脂肪细胞分化的比例极低, 视野内脂肪细胞分布稀疏, 且染色脂滴小而色淡; MEHP 组, 分化比例极高, 视野内充满脂肪细胞, 但与对照组相比, 大部分染色脂滴较小且色淡。

将油红 O 溶于 DMSO, 酶标仪 510nm 处测 OD 值, 数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析比较组间均值, Dunnett 检验法比较对照组与其他各组的差异, 统计分析结果见表 3-5。

表3-5 脂肪细胞油红O染色的OD值

分组	例数	OD 值
空白对照组	3	0.271±0.01
DMSO 组	3	0.149±0.01*
MEHP 50μM	3	0.398±0.02* [#]
MEHP 100μM	3	0.368±0.01*

*与对照组相比, $P<0.01$ 。 [#]与MEHP 100μM相比, $P<0.05$ 。

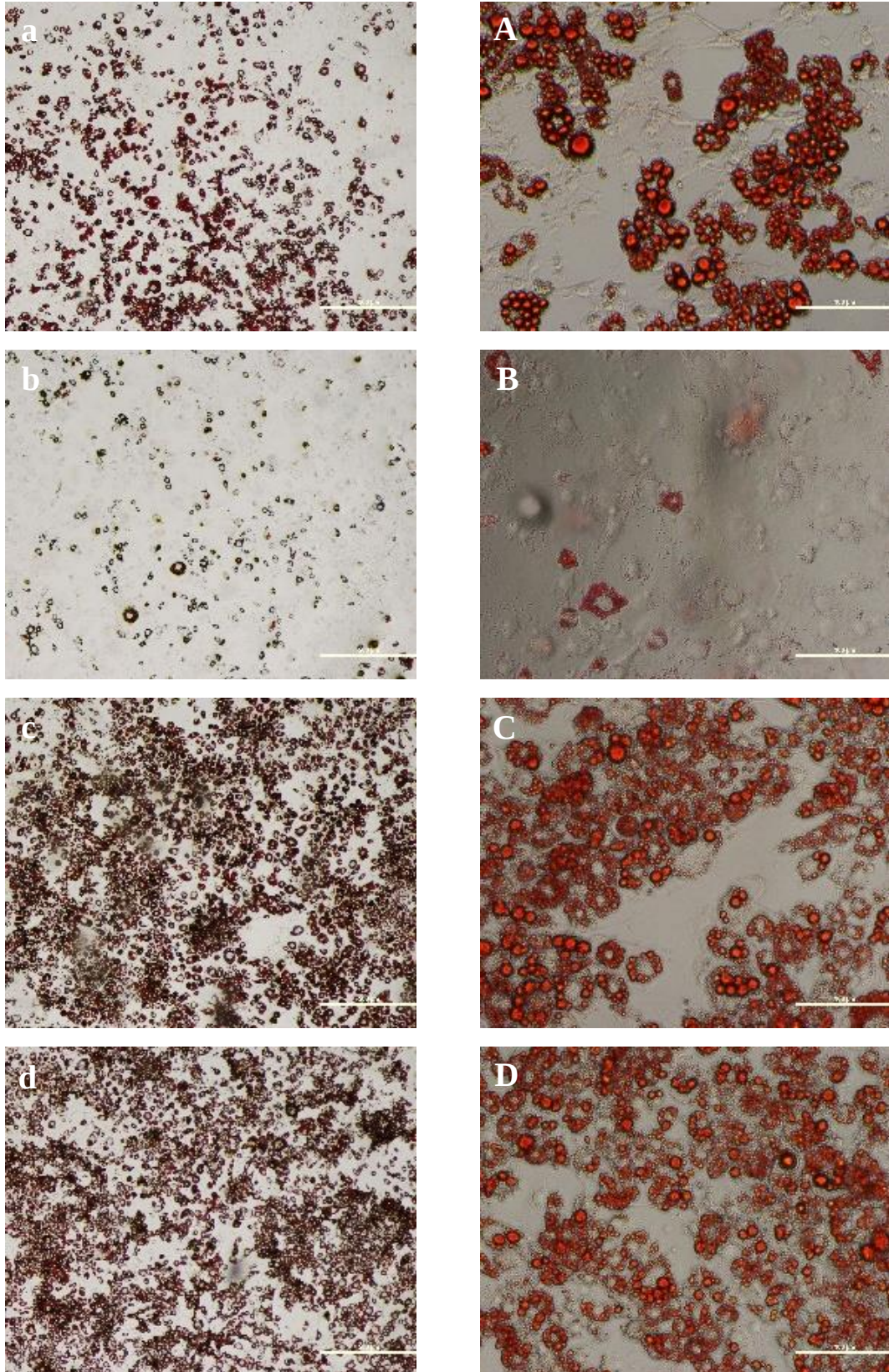


图 3-4 脂肪细胞油红 O 染色的镜下视野（比例尺为 500 μ m 和 100 μ m）

图 a 为对照组放大 40 倍镜下视野，图 A 为放大 200 倍视野；图 b 为 DMSO 组放大 40 倍视野，图 B 为放大 200 倍视野；图 c 为 MEHP 50 μ M 组放大 40 倍视野，图 C 为放大 200 倍视野；图 d 为 MEHP 100 μ M 组放大 40 倍视野，图 D 为放大 200 倍视野。



第四章 讨论

DEHP 是一种应用广泛的增塑剂,也是一种公认的环境内分泌干扰物。由于 DEHP 与塑料并不以化学键形式结合,所以 DEHP 容易从塑料产品中迁移出来;加之 DEHP 应用广泛,人们无时无刻不暴露在充斥着 DEHP 的环境中:在水、土壤、空气和食物中均已检测到 DEHP 的存在^[23]。尽管 DEHP 的急性毒性低,然而长期低剂量的暴露存在致畸、致癌的危害,能够干预人体内分泌系统以及具有潜在的生殖毒性^[23]。目前,欧美多个发达国家已禁止 DEHP 用于健康相关产品,而在我国,儿童玩具、食品包装等的生产过程中 DEHP 仍是合法的添加剂^{[15][23]}。近来,EDCs 的致肥胖作用引起学术界的广泛关注。已有一些流行病学调查结果显示 DEHP 暴露与肥胖的发生存在相关性^{[18][19]};然而迄今为止,DEHP 具有促肥胖作用的假设仍缺乏有力的证据和系统的解释,需要更多的调查和实验来验证此假设。

肥胖的发生源于脂肪组织异常分布或过多堆积。脂肪细胞是脂肪组织构成的基本单位,起源于中胚层,经历:多能干细胞或胚胎干细胞→脂肪母细胞→前脂肪细胞→不成熟脂肪细胞→成熟脂肪细胞的分化过程^[24]。前脂肪细胞呈梭形,有分裂增殖能力,不能积聚脂滴,为定向分化的细胞系,在一定条件下可诱导分化成为具有聚脂能力的脂肪细胞,而脂肪细胞则失去增殖分化的能力^[25]。综上,前体脂肪细胞分化导致脂肪细胞数量增加,脂肪细胞脂肪积聚则细胞体积膨大进而导致肥胖,因此有关 DEHP 致肥胖的假设可以通过前脂肪细胞的体外实验进行研究和探讨,本实验以 3T3-L1 前脂肪细胞为模型,以 DEHP 在人体内初级代谢产物 MEHP 为干预物,研究不同处理方式下前脂肪细胞增殖和分化能力以及脂肪细胞聚脂能力的变化。

4.1 MEHP 给药浓度的设定依据

本研究 MEHP 浓度水平的依据是人群暴露量调查报告,中国女性 DEHP 血清浓度范围在 2.62~22.78mg/L (折合约 5.8~58.4 μ M),男性为 4.05-23.99mg/L (约 10.4~61.5 μ M)^[26];上海郊区健康者血清 DEHP 浓度范围为 ND (未检出)~6.78mg/L (约 0~17.4 μ M);瑞典老年女性血清 MEHP 浓度平均值为 18.9 mg/L (约 68.0 μ M),老年男性 20.3 mg/L (约 73.0 μ M)^[27]。北京的郝婵娟等人进行了 3T3-L1 的细胞实验,结果显示当 MEHP 浓度在 10~100 μ M 范围内,对前脂肪细胞有明显促分化作用^[16]。根据以上数据,确定本实验采用的药物浓度分为低、中、高三个大组,整体药物浓度范围为 1 μ M~400 μ M。

4.2 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响

4.2.1 不同浓度 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的作用

有关 MEHP 对 3T3-L1 细胞增殖方面影响的实验结果,通过 MTT 法没有得到阳性结果;用 RTCA 技术得到的结果可以看出,当细胞暴露于 1 μ M~200 μ M 浓度的 MEHP,暴露组与对照组的生长曲线接近,其中 20 μ M 浓度组的 CI 值在处理 36h 时呈现具有统计学意义的阳性结果,而 48h 这种差异又消失,可能是由于各组细胞自身状态差异造成的偏差,与 MEHP 暴露不存在关联;当 MEHP 浓度高达 400 μ M,细胞生长曲线的走向明显不同与其他处理组,曲线接近水平,CI 值始终小于 1 (代表初始接种的细胞数),说明浓度 $\geq$ 400 μ M 的 MEHP 暴露不仅抑制前脂肪细胞分裂增殖,还具有一定细胞毒性。

4.2.2 溶剂 DMSO 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的干扰

实验过程中采用 DMSO 作为 MEHP 的溶剂。DMSO 为无色液体,可与有机溶剂及水互

溶，是一种重要的极性非质子溶剂。DMSO 密度较大，在 RTCA 实验操作中，由于其给药方式不是换液给药而是直接加药，当高达 20%DMSO（见表 2-3）的浓缩液加入孔内，贴壁细胞受到冲力漂起或变为不完全贴壁状态，就观察到图 3-1~3-3 中 CI 值的骤降，不添加 DMSO 的对照组则无此现象。此外，尽管实验过程中发现 DMSO 浓度达到 2%存在明显细胞毒性，而通过 RTCA 和 MTT 法的数据分析发现，DMSO 组与对照组的差异不存在统计学意义，认为 DMSO 的浓度均控制在 0.5%不影响细胞生长；因此，由于孔数限制，低浓度 MEHP 暴露的研究组中没有进行 DMSO 比对，并不影响其结果的可信度。

4.2.3 运用 MTT 法与 RTCA 技术分析细胞增殖情况的比较

本实验对 3T3-L1 细胞增殖情况的分析采用了经典的 MTT 法和 RTCA 技术这两种方法，两者结果基本一致。MTT 法是目前常用于研究细胞增殖和活力的综合指标，其原理是：外源性 MTT 被活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶还原为蓝紫色结晶甲瓚，而死细胞无此功能；甲瓚不溶于水因而沉积在细胞中，DMSO 能将甲瓚晶体溶解出来，用酶标仪测定其光吸收值可间接反映活细胞的数量。为保证晶体与细胞数呈线性关系，OD 值需要控制在 0.7 以下。MTT 法的缺点是只能测定某一时刻的相对细胞数量；且由于操作繁琐、无法控制初始接种的细胞数等局限，大大增加了实验操作难度和实验结果误差；此外 MTT 有致癌性，操作人员必须做好防护工作。RTCA 实时细胞分析技术是一种新型细胞检测技术，通过检测细胞的电阻抗反映细胞数量甚至形态学的变化，这种新技术的诞生打破了以往细胞检测的瓶颈，与 MTT 法相比，RTCA 存在几个明显的优势：1、采用无标记方法，操作相对简单，避免了标记效率带来的偏倚，且对细胞无损害。2、每 15 分钟检测一次 CI 值，直观反映细胞生长动态。3、智能标准化功能，对某一时刻的 CI 值进行标准化处理以降低初始细胞数目差异带来的误差。目前已有相关文献描述了利用 RTCA 技术检测细胞活动的研究，然而作为一种新型技术，RTCA 的实用性、精准性还有待很多的实践来检验。

4.3 MEHP 对前脂肪细胞分化和脂肪细胞聚脂能力的影响

4.3.1 MEHP 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响

在 MEHP 对前脂肪细胞分化影响的研究中，采用经典的鸡尾酒法诱导细胞分化；于诱导分化第 10 天采用油红 O 染色法，在镜下（40 倍镜）观察细胞分化率的差异。图 3-4 的 abcd 即可直观反映实验结果：与 DMEM 对照组相比，DMSO 组前体脂肪细胞分化的比例极小，染色脂肪细胞寥寥无几，呈散在分布；与之相反，MEHP 组前脂肪细胞分化的比例极大，视野中染色脂肪细胞密集。由此可以说明，MEHP 促进 3T3-L1 细胞分化作用显著，而 DMSO 则明显抑制。

由于时间原因，本实验对前脂肪细胞分化和聚脂能力的研究未能覆盖大范围 MEHP 浓度，仅研究了 50 μ M 和 100 μ M 浓度的 MEHP 对 3T3-L1 细胞分化的影响。考虑到人群 MEHP 血清浓度最高可以到达 60 μ M 以上，而实验结果显示，当 MEHP 浓度达到 50 μ M 即具有明显促进前脂肪细胞分化为脂肪细胞的作用，此结果具有一定实际意义。

4.3.2 MEHP 对脂肪细胞聚脂能力的影响

放大显微镜倍数（200 倍镜）观察脂滴大小的差异（图 3-4 ABCD），发现 DMSO 组染色脂滴的颜色暗淡，脂滴颗粒小，说明脂肪含量少，推断 DMSO 还存在抑制脂肪细胞积聚脂肪的能力；与对照组相比，镜下可见 MEHP 组的染色脂滴大部分呈现颜色较淡、颗粒较小的状态，透亮大脂滴偶见，而对照组可观察到较多含有浑圆大脂滴的脂肪细胞。综合上述现象可以推测：MEHP 不存在抑制脂肪形成的作用，而造成 MEHP 组脂滴较小的原因可能是：1、DMSO 抑制细胞积聚脂肪，与 MEHP 的聚脂能力相互拮抗；2、由于 MEHP 组细胞分化率较高，脂



肪细胞生长空间受限,阻碍大颗粒脂肪的形成;3、由于MEHP组细胞分化率高,脂肪细胞所需营养(主要利用糖原合成脂肪)也多,培养液(每孔500 μ L)不能很好满足细胞聚脂的营养需求,可以考虑在之后的实验中增加培养液剂量,观察脂滴大小有无变化。

镜下观察结束后,用DMSO溶出脂肪中的油红O测其OD值,各组数据的差异具有统计学意义,由小到大依次为: DMSO组<对照组<MEHP 100 μ M组<MEHP 50 μ M组。说明在前脂肪细胞数目相近的前提下,即使存在具有抑制分化和脂肪积聚作用的DMSO,暴露于MEHP的细胞积聚的总脂肪量仍然多于对照组,可以推测MEHP具有潜在的促进脂肪组织生成作用。

4.4 展望及今后研究方向

在前脂肪细胞分化的过程中,特异性基因的转录激活起着关键作用^[28],因此针对前文4.3.2的推测和猜想,在接下去的研究中可以通过检测不同处理组细胞的基因转录因子和相关蛋白的表达水平来进行验证和分析。目前,PPAR γ 、C/EBPs以及ADD1/SREBP-1这三种转录因子已证明与脂肪细胞分化密切相关。PPAR γ (过氧化物酶体增殖物激活受体 γ)属于核受体超家族配体依赖的转录因子,是脂肪组织形成的必要条件;C/EBPs(CCAAT增强子结合蛋白)能够激活特定基因DNA增强子CCAAT重复序列,它包括 α 、 β 和 δ 三种亚型,其中C/EBP- α 高表达于分化的脂肪细胞中,主要调节脂肪细胞胰岛素依赖的葡萄糖摄取功能,C/EBP- α 基因敲除的脂肪细胞失去积累甘油三酯的能力;ADD1(脂肪细胞分化决定因子)也称SREBP-1(固醇调节原件结合蛋白),能促进肝脏脂肪合成以及促3T3-L1细胞分化^[28]。目前已有研究表明MEHP能够作为配体激活PPARs,但是MEHP对C/EBPs和ADD1/SREBP-1的作用并不明确。以上信息为进一步的实验提供了方向,使本课题可以从表象深入到机制的研究中。

尽管有流行病学研究结果显示暴露于DEHP可能增加肥胖发生的风险,但是相关的细胞层面的研究和动物实验并不多见,DEHP致肥胖作用尚无定论,因此本课题具有一定创新性。然而,本实验还存在几个不足,比如DMSO对结果的干扰性、研究细胞分化时干预物质的浓度梯度太少等问题。总之实验结果引发了更多猜想,需要进一步的实验来完善和解答。



第五章 结论

MEHP 给药浓度在 $1\mu\text{M}\sim 200\mu\text{M}$ 范围内, 不能促进 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖能力; 当 MEHP 浓度 $\geq 400\mu\text{M}$, 存在一定细胞毒性。

MEHP 可以显著促进 3T3-L1 前脂肪细胞的分化, MEHP 对脂肪细胞聚脂能力的影响有待进一步研究。

浓度为 0.5% 的 DMSO 可以显著抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的分化和脂肪细胞及积聚脂肪的能力, DMSO 有否可能干扰 MEHP 促脂肪积聚的能力需要进一步研究。

参考文献

- [1] Gnessi L. Obesity and metabolic comorbidities: environmental diseases?[J]. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 2013.
- [2] 武阳丰, 马冠生, 胡永华, 等. 中国居民的超重和肥胖流行现状[J]. *中华预防医学杂志*, 2005, 39(5): 316-320.
- [3] 马军, 蔡赐河, 王海俊. 1985-2010 年中国学生超重与肥胖流行趋势 [J]. *中华预防医学杂志*, 2012, 46(9): 776-780.
- [4] World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic[M]. World Health Organization, 2000.
- [5] Kopelman P G. Obesity as a medical problem[J]. *Nature*, 2000, 404(6778): 635-643.
- [6] Desvergne B, Feige J N, Casals-Casas C. PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic?[J]. *Molecular and cellular endocrinology*, 2009, 304(1): 43-48.
- [7] Baillie-Hamilton P F. Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic[J]. *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*, 2002, 8(2): 185-192.
- [8] Grün F, Blumberg B. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis[J]. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2007, 8(2): 161-171.
- [9] Tabb M M, Blumberg B. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals[J]. *Molecular Endocrinology*, 2006, 20(3): 475-482.
- [10] Newbold R R, Padilla - Banks E, Snyder R J, et al. Developmental exposure to estrogenic compounds and obesity[J]. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 2005, 73(7): 478-480.
- [11] 王斌, 周颖. 环境内分泌干扰物与肥胖流行的关系[J]. *中华预防医学杂志*, 2013, 47(4): 297-300.
- [12] 陈淑珍, 王重刚. 环境内分泌干扰物与肥胖症发生发展的关系[J]. *国外医学: 卫生学分册*, 2007, 34(6): 329-333.
- [13] 张文广. 增塑剂 DEHP 的性能, 合成, 检测方法及其对人体健康的影响[J]. *湖北农业科学*, 2012 (22).
- [14] 林晓帆, 王二卫, 李雪花. 聚氯乙烯及其增塑剂综述. *上海标准化*, 2006 (2): 19-21
- [15] 厉曙光, 张励倩. 酞酸酯类增塑剂 16 年研究的回顾[J]. *上海食品药品监管情报研究*, 2011 (5): 9-15.
- [16] Hao C, Cheng X, Xia H, et al. The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice[J]. *Bioscience reports*, 2012, 32(6): 619-629.
- [17] 林兴桃, 王小逸, 吕文涛, 等. 邻苯二甲酸酯代谢研究进展[J]. *环境与健康杂志*, 2009, 26(2): 182-184.
- [18] Wang H, Zhou Y, Tang C, et al. Urinary phthalate metabolites are associated with body mass index and waist circumference in Chinese school children[J]. *PloS one*, 2013, 8(2): e56800.
- [19] Hatch E E, Nelson J W, Qureshi M M, et al. Association of urinary phthalate metabolite concentrations with body mass index and waist circumference: a cross-sectional study of



- NHANES data, 1999–2002[J]. *Environ Health*, 2008, 7(27): 1-15.
- [20] Teitelbaum S L, Mervish N, L Moshier E, et al. Associations between phthalate metabolite urinary concentrations and body size measures in New York City children[J]. *Environmental research*, 2012, 112: 186-193.
- [21] Kao Y H, Hiipakka R A, Liao S. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate 1[J]. *Endocrinology*, 2000, 141(3): 980-987.
- [22] 郭秀玲, 徐民岗, 张秀丽, 等. 小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞培养与诱导分化方法的建立[J]. *中国药物与临床*, 2013, 12: 010.
- [23] 王丽, 袁晶, 张荣. 邻苯二甲酸二 (2-乙基己基) 酯环境暴露与人群健康研究进展[J]. *环境与健康杂志*, 2009, 26(5): 465-467.
- [24] 王鑫, 刘秀华. 前脂肪细胞的增殖, 分化及其调控 [J]. *淮海医药*, 2006, 24(4): 350-352.
- [25] 陈瑾, 周训伦, 陈洁. 前脂肪细胞分化与肥胖形成关系初探[J]. *中华中医药学刊*, 2007, 25(4): 735-736.
- [26] 张蕴辉, 陈秉衡, 郑力行等. 人体生物样品中邻苯二甲酸酯类的含量[J]. *中华预防医学杂志*, 2003, 37(6): 429-434.
- [27] Lind P M, Roos V, Rönner M, et al. Serum concentrations of phthalate metabolites are related to abdominal fat distribution two years later in elderly women[J]. *Environ Health*, 2012, 11(1): 21.
- [28] 鞠大鹏, 詹丽杏. 脂肪细胞分化及其调控的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2010, 5: 690-695.