

杀螟硫磷暴露对大鼠肝细胞的代谢毒性及机制研究

李一凡¹, 冯伟伟¹, 茆广华¹, 赵婷², 陈瑶¹, 罗梦娜¹, 耿鑫¹, 吴朝琼¹, 仰榴青², 吴向阳^{1*}

1.江苏大学环境与安全工程学院, 江苏 镇江 212013;

2.江苏大学化学化工学院, 江苏 镇江 212013

摘要: 为了研究低剂量杀螟硫磷(fenitrothion-O-analog, FNT)暴露对大鼠肝细胞(buffalo rat liver cells, BRL)的代谢毒性, 并通过作用于体外的一系列指标分析其作用机制, 分别对空白对照组和杀螟硫磷暴露组(13.78、27.55、55.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)暴露 48 h, 观察其对 BRL 内糖代谢、胰岛素敏感和糖原合成信号通路中蛋白表达的影响。实验结果表明, 杀螟硫磷暴露能够显著抑制 BRL 细胞的活力, 半数抑制浓度(IC_{50})为 275.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。杀螟硫磷暴露使超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和乙酰胆碱酯酶 AchE 活力显著降低($P<0.01$), 其体内丙二醛(malonaldehyde, MDA)含量显著增加($P<0.01$), 引起细胞氧化损伤。杀螟硫磷暴露使其细胞内糖原、胰岛素和葡萄糖糖激酶含量显著降低($P<0.01$), 增加胰岛素抵抗。杀螟硫磷暴露显著下调胰岛素敏感信号通路中 IRS 的表达, 抑制 IRS 的磷酸化, 并显著上调 AKT 和 PI3K 的表达, 显著上调糖原合成信号通路中 GSK-3 α 和 GSK-3 β 的表达。因此, 杀螟硫磷暴露使 BRL 产生糖代谢毒性的机制是通过氧化应激诱发胰岛素抵抗, 从而改变糖代谢相关信号通路中蛋白的表达而实现的。

关键词: 杀螟硫磷; 糖代谢; 代谢毒性; 信号通路

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2024.0005

中图分类号: Q493.4, R333.4

文献标志码: A

Metabolic Toxicity and Mechanism of Fenitrothion Exposure on BRL Cells

LI Yifan¹, FENG Weiwei¹, MAO Guanghua¹, ZHAO Ting², CHEN Yao¹, LUO Mengna¹, GENG Xin¹, WU Chaoqiong¹, YANG Liuqing², WU Xiangyang^{1*}

1.School of the Environment and Safety Engineering, Jiangsu University, Jiangsu Zhenjiang 212013, China;

2.School of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu University, Jiangsu Zhenjiang 212013, China

Abstract: To study the metabolic toxicity of low dose fenitrothion (FNT) exposure on rat BRL cells, and analyze its mechanism through a series of indicators in vitro, the control group and fenitrothion exposure groups (13.78, 27.55 and 55.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were exposed for 48 h respectively. We observed its effects on the intracellular glucose metabolism level in BRL cells, the expression of insulin sensitivity related proteins and glycogen synthesis related proteins in the signaling pathway of glucose metabolism. The experiment results showed that the viability of BRL cells was significantly inhibited by fenitrothion exposure with an IC_{50} of 275.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Exposure to fenitrothion significantly decreased SOD and AchE activities ($P<0.01$), increased the content of MDA ($P<0.01$), and caused oxidative damage to cells. Exposure to fenitrothion significantly reduced intracellular glycogen content, insulin concentration, and glucokinase content ($P<0.01$), increasing insulin resistance. Fenitrothion exposure significantly reduced IRS content, inhibited IRS phosphorylation, and significantly increased AKT, PI3K, GSK-3 α and GSK-3 β content. Therefore, The mechanism of glucose metabolism toxicity of fenitrothion exposure on BRL cells is that oxidative stress induces insulin resistance and changes the expression of proteins in the signaling pathways related to glucose metabolism.

Key words: fenitrothion; glucose metabolism; metabolic toxicity; signaling pathways

收稿日期: 2023-11-09; 接受日期: 2024-03-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(22276079)。

联系方式: 李一凡 E-mail: 616513065@qq.com; *通信作者 吴向阳 E-mail: wuxy@ujs.edu.cn

杀螟硫磷(fenitrothion-O-analog, FNT)是一种使用广泛的硫代磷酸酯类有机磷农药,在农作物以及各种环境介质如水体^[1]、土壤^[2]、空气^[3]中均可检测到。作为一种环境内分泌干扰物,杀螟硫磷可通过摄入、呼吸和皮肤接触等途径进入生物体血液并蓄积于体内,导致生物体代谢紊乱并进一步危害人体健康^[4]。目前关于杀螟硫磷暴露致糖代谢毒性的研究表明,FNT直接暴露可显著升高Wistar大鼠血清的葡萄糖含量,显著降低大鼠肝脏的绝对重量和相对重量,影响其糖代谢并产生糖代谢毒性^[5]。糖原受激素调控,激素失调影响血糖稳态,造成糖代谢异常。当轮虫暴露于FNT时,轮虫的葡萄糖吸收速率显著升高^[6]。另有研究表明,当马达加斯加发声大蠊暴露于FNT时,其葡萄糖吸收速率显著升高,血液中海藻糖水平显著降低^[7]。但是关于杀螟硫磷暴露致糖代谢毒性的分子机制尚不明确。

目前,环境污染被认为是导致糖尿病患病率逐年升高的诱因之一,而环境污染暴露对糖尿病人群健康的危害更大^[8],亟需关注其对糖代谢的影响。因此,本文以大鼠肝细胞系BRL为研究对象,通过对细胞活力、糖代谢相关指标及糖代谢信号通路相关蛋白和mRNA表达的分析,系统研究低剂量杀螟硫磷暴露对细胞的糖代谢毒性,以期探明潜在的作用机制,为此类环境内分泌干扰物的精准环境管控与健康效应评价提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠肝细胞系BRL购于中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

主要试剂:杀螟硫磷标准品(纯度 $\geq 98.32\%$)购于英国LGC公司,其余分析纯试剂均购于国药集团;噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)购于美国Sigma公司;胰岛素(insulin, INS)和葡萄糖激酶(glucokinase, GCK)酶联免疫试剂盒购于合肥博美生物科技有限公司;高糖培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)和胎牛血清(foetal bovine serum, FBS)购于美国Cell Signaling Technology公司。

主要仪器:二氧化碳培养箱(Panasonic, 日

本);生物显微镜(Olympus, 日本);高速冷冻离心机(Thermo, 美国);多功能微孔板检测仪(BioTek, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 MTT法检测细胞活力 采用MTT法研究杀螟硫磷暴露对大鼠肝细胞BRL细胞活力的影响。杀螟硫磷暴露浓度为0、50、100、150、200、250、300、400、500、750和1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,并设置空白对照组,孵育24 h;弃上清液, PBS冲洗细胞,每孔加100 μL MTT,孵育4 h;弃上清液,每孔加100 μL DMSO溶液,水平摇床振荡10 min,酶标仪570 nm测定吸光度。

1.2.2 杀螟硫磷暴露实验 将BRL细胞分别以 1×10^5 cells $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种于六孔板中,为空白对照组(加入2 mL细胞培养液)和低、中、高浓度杀螟硫磷暴露组,培养48 h。根据杀螟硫磷暴露对细胞活力的影响实验确定其暴露浓度,其浓度分别为1/20、1/10和1/5 IC_{50} ,即13.78、27.55、55.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2.3 测定氧化应激相关酶 收集细胞培养液上清,加入PBS于离心机4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,按照超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和乙酰胆碱酯酶(AchE)试剂盒测定上清中SOD和AchE活性。PBS冲洗细胞2次后收集细胞,按照丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒方法提取细胞蛋白,并测定MDA含量。

1.2.4 测定糖代谢相关酶 收集细胞培养液,弃上清液,用PBS冲洗细胞2次后收集细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,按照胰岛素(insulin, INS)和葡萄糖激酶(glucokinase, GCK)试剂盒测定GCK和INS含量。

1.2.5 测定BRL细胞胰岛素受体表达水平 弃上清,用PBS冲洗细胞2次后收集细胞,提取细胞蛋白,按照BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,根据大鼠胰岛素受体 β (ISR- β) ELISA Kit测定胰岛素受体的表达量。

1.2.6 测定BRL细胞胰岛素受体信号通路相关蛋白水平 收集杀螟硫磷暴露后的细胞蛋白,采用Western blot方法测定杀螟硫磷暴露对BRL细胞胰岛素受体信号通路中葡萄糖转运和胰岛素敏感相关蛋白(GLUT4、IRS2a、PI3K和AKT2)、糖原合成相关蛋白(GSK-3 α 、GSK-3 β)和细胞凋亡相关蛋白表达的影响。提取总蛋白,与上样缓冲液按4:1体积比混合,对其进行预处理,至终浓度为

$1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。取样 $20 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 置于 12% SDS-PAGE 加样孔中,80 V 电泳 2 h 将蛋白分离,利用半干法转印 20 min 将蛋白转印至甲醇激活的 PVDF 膜,脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 清洗 3 次。将 PVDF 膜置于对应一抗在 4°C 下孵育过夜, TBST 清洗 3 次,用对应二抗在室温下孵育 1 h, TBST 清洗 3 次,采用化学成像系统进行成像分析。

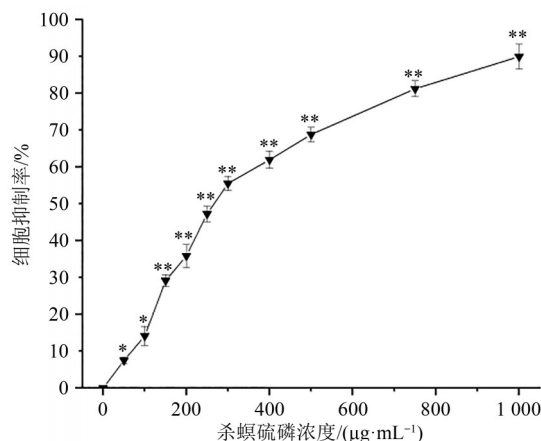
1.3 统计分析

采用 SPSS 26.0 对数据进行统计分析,结果用平均数 $\pm$ 标准差(SD)表示。采用 Levene's test 和 Kolmogorov-Smirnov test 检验数据的方差齐性是否符合正态分布,采用单因素方差分析并使用图基检验(Tukey test)进行多重比较。 $P < 0.05$ 表示两组之间具有显著性差异, $P < 0.01$ 表示两组之间具有极显著差异。

2 结果与分析

2.1 对细胞活力的影响

如图 1 所示,杀螟硫磷暴露后,细胞活力均受到显著抑制,呈剂量效应关系。与空白对照组相比,50 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 杀螟硫磷组的细胞抑制率显著上升($P < 0.05$),150、200、250、300、400、500、750 和 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 杀螟硫磷组的细胞抑制率上升极显著($P < 0.01$)。通过 SPSS 计算得出杀螟硫磷对 BRL 细胞的半抑制浓度 IC_{50} 为 $275.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因



注: *和**分别表示与空白对照组相比较在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平有统计学差异。

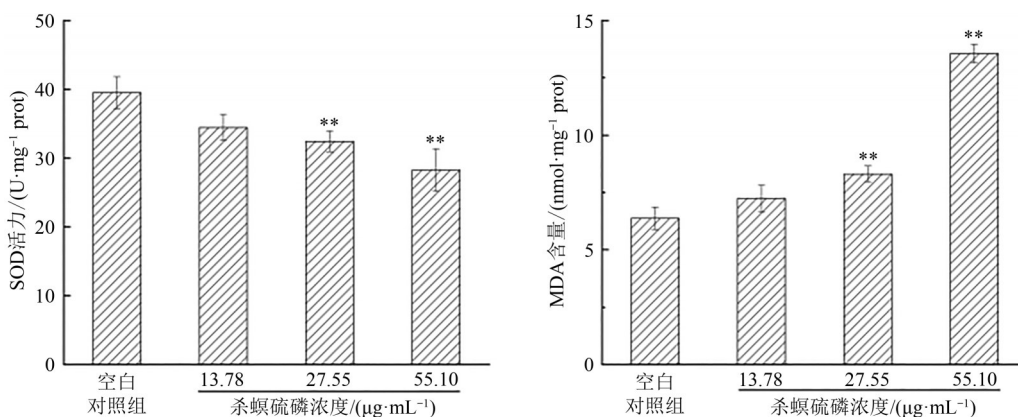
图1 MTT法检测不同浓度杀螟硫磷对BRL细胞活力的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of fenitrothion on the viability of BRL cells by MTT assay

此,剂量为 $50 \sim 1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 杀螟硫磷暴露均可显著抑制BRL细胞活力。

2.2 氧化应激指标和AChE活性的改变

2.2.1 氧化应激指标改变 杀螟硫磷暴露对BRL细胞SOD活力的影响如图2所示。与空白对照组相比,各暴露剂量组细胞的SOD活力均呈下降趋势。27.55 和 $55.10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 暴露组SOD活力分别下降 17.94% 和 28.49%, 极显著低于空白对照组($P < 0.01$)。



注: **表示与空白对照组相比较在 $P < 0.01$ 水平有统计学差异。

图2 杀螟硫磷暴露对氧化应激相关酶的影响

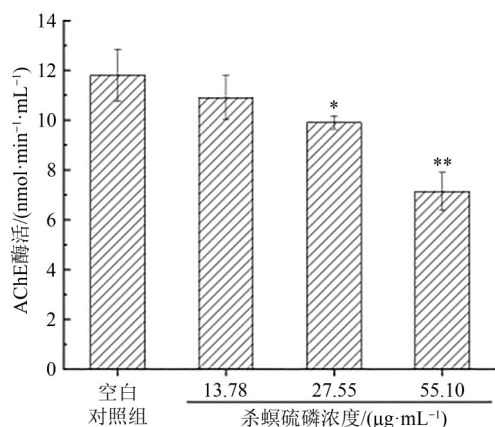
Fig. 2 Effects of fenitrothion exposure on oxidative stress-related enzymes

杀螟硫磷暴露对BRL细胞内MDA含量的影响如图2所示。与空白对照组相比,杀螟硫磷暴

露增加了胞内MDA含量,27.55 和 $55.10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 暴露剂量组MDA含量分别提高 30.37% 和 112.68%,

极显著高于空白对照组($P<0.01$)。

2.2.2 AchE 活性改变 BRL细胞的乙酰胆碱酯酶(AchE)活性变化如图3所示。各暴露剂量组细胞内酶活性呈下降趋势,其中 $27.55\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组显著下降, $55.10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组极显著下降,与空白对照组相比,分别下降16.10%和39.54%。



注: *和**分别表示与空白对照组相比较在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平有统计学差异。

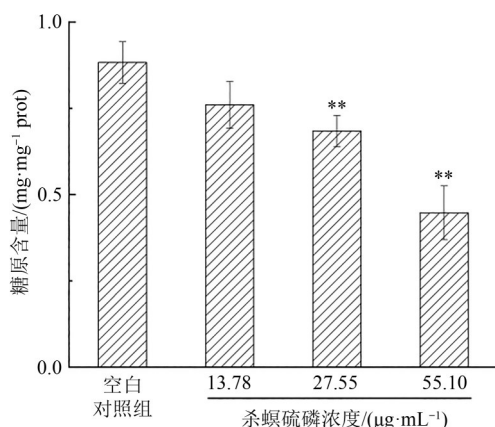
图3 杀螟硫磷暴露对AchE活性的影响

Fig. 3 Effects of fenitrothion exposure on acetylcholinesterase activity

可见杀螟硫磷暴露可显著影响SOD活力、AchE活性及MDA含量,从而诱导细胞损伤。

2.3 对糖代谢及相关酶含量的影响

2.3.1 对糖原含量的影响 杀螟硫磷暴露对BRL细胞内糖原含量的影响如图4所示。与空白对照组相比, 27.55 和 $55.10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 杀螟硫磷暴露组糖



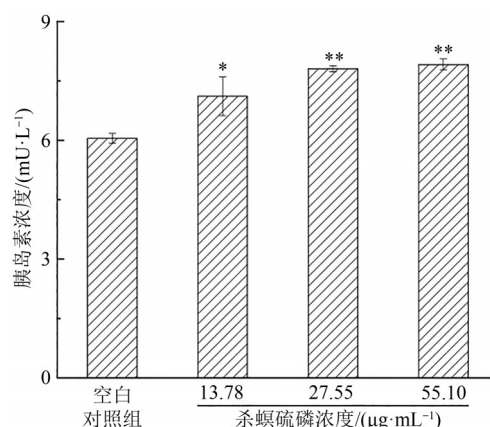
注: **表示与空白对照组相比较在 $P<0.01$ 水平有统计学差异。

图4 杀螟硫磷暴露对糖原含量的影响

Fig. 4 Effects of fenitrothion exposure on glycogen content

原含量极显著下降($P<0.01$),分别下降了22.50%和49.36%。可见,杀螟硫磷暴露可以显著降低胞内糖原的含量,影响其糖代谢。

2.3.2 对胰岛素含量的影响 杀螟硫磷暴露对BRL细胞内的INS浓度变化如图5所示。与空白对照组相比, $13.78\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 杀螟硫磷暴露组可显著增加INS含量($P<0.05$),增长率为17.51%, 27.55 和 $55.10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 杀螟硫磷暴露组INS含量极显著增加($P<0.01$),增长率分别为22.50%和30.85%。可见,杀螟硫磷暴露可以显著增加胞内胰岛素的含量,加重胰岛素抵抗。

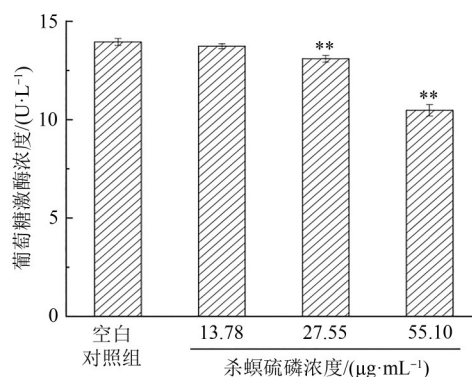


注: *和**分别表示与空白对照组相比较在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平有统计学差异。

图5 杀螟硫磷暴露对胰岛素含量的影响

Fig. 5 Effects of fenitrothion exposure on insulin content

2.3.3 对糖代谢相关酶的影响 杀螟硫磷暴露对BRL细胞内GCK含量的影响如图6所示。与空白对照组相比, 27.55 和 $55.10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 杀螟硫磷暴露



注: **表示与空白对照组相比较在 $P<0.01$ 水平有统计学差异。

图6 杀螟硫磷暴露对糖代谢相关酶的影响

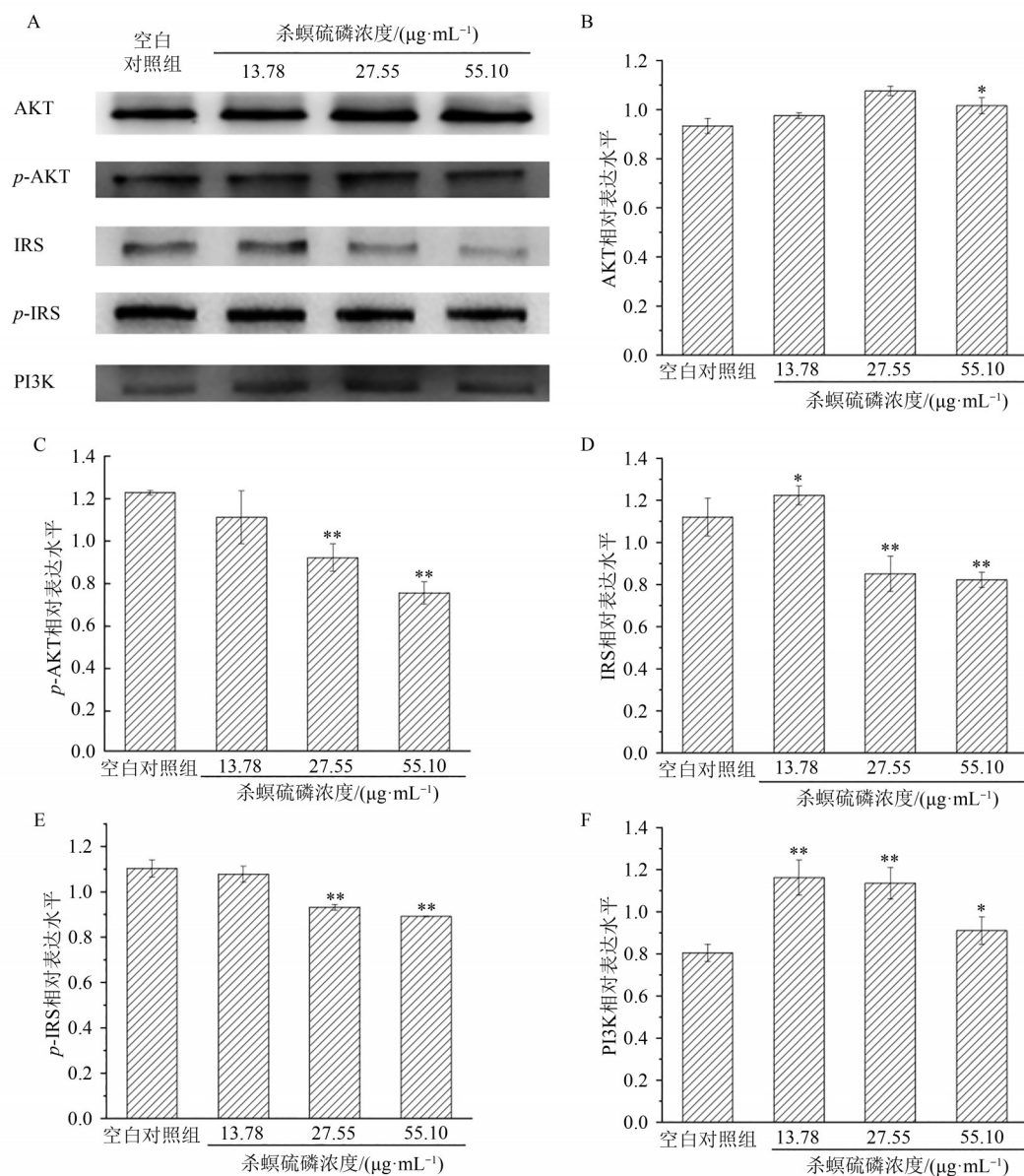
Fig. 6 Effects of fenitrothion exposure on glucose metabolism related enzymes

组GCK的含量极显著降低($P<0.01$),下降幅度分别为6.14%和24.87%,表现出剂量-效应关系。可见,杀螟硫磷暴露可以显著减少BRL细胞内葡萄糖激酶含量,同时表明BRL细胞受胰岛素调节,抑制肝细胞中糖原的合成,进一步影响其糖代谢。

2.4 对糖代谢相关蛋白表达的影响

2.4.1 对胰岛素敏感信号通路中相关蛋白表达的影响 如图7所示,随着杀螟硫磷浓度的升高,IRS和PI3K表达水平逐渐降低,27.55和55.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

杀螟硫磷组显著降低IRS的含量,并抑制IRS的磷酸化水平($P<0.01$),下降幅度分别为24.1%、26.6%和15.5%、19.2%,表现出剂量-效应关系。与对照组相比,27.55和55.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 暴露组AKT表达量呈先上升后下降趋势,并抑制AKT的磷酸化水平,磷酸化下降幅度为25.2%和38.8%。暴露组中PI3K蛋白表达水平显著高于空白组。可见,杀螟硫磷暴露可以显著影响胰岛素敏感相关蛋白的表达,降低胰岛素敏感性。



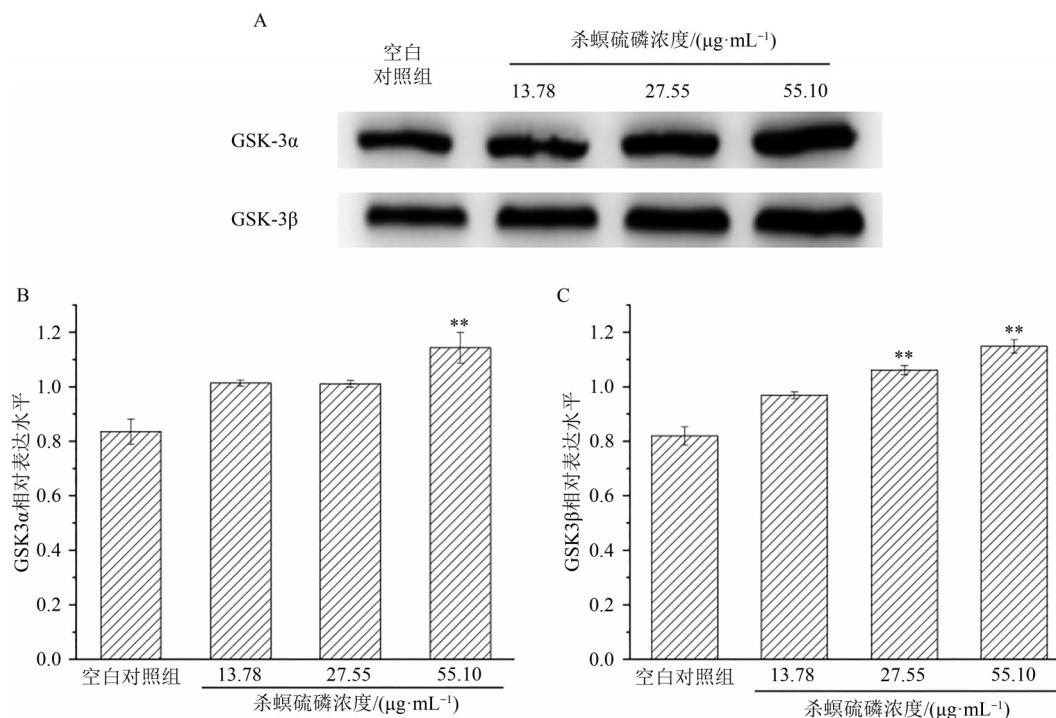
A: 杀螟硫磷对BRL细胞胰岛素敏感信号通路相关蛋白表达影响的电泳结果; B: 杀螟硫磷对BRL细胞ATK表达的影响; C: 杀螟硫磷对BRL细胞p-ATK表达的影响; D: 杀螟硫磷对BRL细胞IRS表达的影响; E: 杀螟硫磷对BRL细胞p-IRS表达的影响; F: 杀螟硫磷对BRL细胞PI3K表达的影响。*和**分别表示与空白对照组相比较在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平有统计学差异。

图7 杀螟硫磷对BRL细胞胰岛素敏感信号通路中相关蛋白表达的影响

Fig. 7 Effects of fenitrothion on the expression of related proteins in insulin sensitive signaling pathway of BRL cells

2.4.2 对糖原合成信号通路中相关蛋白表达的影响 如图7所示,与空白对照组相比,55.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 杀螟硫磷组显著上调GSK-3 α 表达水平($P<0.01$),上调幅度为36.8%;且27.55和55.10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 杀螟

硫磷组显著上调GSK-3 β 表达水平($P<0.01$),上调幅度分别为29.5%和40.0%。可见,杀螟硫磷暴露可影响糖原合成信号通路中GSK-3 α 和GSK-3 β 的表达,影响糖原合成。



A: 杀螟硫磷对BRL细胞糖原合成信号通路中相关蛋白表达影响的电泳结果; B: 杀螟硫磷对BRL细胞GSK-3 α 表达的影响; C: 杀螟硫磷对BRL细胞GSK-3 β 表达的影响。**表示与空白对照组相比较在 $P<0.01$ 水平有统计学差异。

图8 杀螟硫磷对BRL细胞糖原合成信号通路中相关蛋白表达的影响

Fig. 8 Effects of fenitrothion on the expression of related proteins in glycogen synthesis signaling pathway of BRL cells

3 讨论

氧化应激是肝脏氧化损伤和代谢功能障碍的主要原因^[9],其中SOD是清除自由基的主要抗氧化酶^[10],破坏氧化与抗氧化系统间的平衡将影响正常细胞的生长。MDA是膜脂氧化的最终产物之一,可以用来评估细胞的损伤^[11]。MDA水平升高,导致细胞的氧化损伤。杀螟硫磷可能通过干扰胰岛素受体信号通路,诱导机体细胞异常增殖和凋亡,从而产生糖代谢毒性作用。本研究结果发现,杀螟硫磷暴露可显著减少SOD、AChE活性,产生氧化应激反应,而MDA含量显著上升,抑制细胞活力,造成氧化损伤。

糖原是葡萄糖的多分支多糖,在动物体内作为一种能量储存形式,并主要调节血糖稳态^[12-13]。

GCK是葡萄糖代谢中的酶,对调节人和动物的血糖稳态非常重要^[14-15],本研究发现糖原和GCK含量显著降低,表明杀螟硫磷可抑制机体的糖代谢水平。胰岛素抵抗的主要原因之一是(INS receptor, IR)胰岛素受体。分泌减少,IR分泌减少可加重胰岛素抵抗,进而影响正常代谢^[16]。本研究结果表明杀螟硫磷可通过影响葡萄糖转运干扰胰岛素信号通路和胰岛素信号转导,增加细胞的胰岛素抵抗。可见,杀螟硫磷抑制糖原合成并加重胰岛素抵抗,产生糖代谢毒性。

胰岛素受体底物1(IRS1)作为胰岛素信号传导的关键节点^[17],其表达不足或者磷酸化异常均会导致胰岛素抵抗^[18-19]。PI3K和Akt是胰岛素信号通路中IRS的下游信号元件,PI3K和Akt在胰岛素信号转导中起着重要作用

用^[20]。胰岛素首先与细胞表面受体结合,并通过IRS1激活PI3K-AKT途径,促进葡萄糖的吸收。PI3K信号转导途径在转导过程中的各级组成蛋白包括IRS、PI3K、PDK、Akt、PKC和GLUT4等^[21]。PI3K/AKT通过FoxO1和GSK3调控葡萄糖代谢,降低机体内葡萄糖水平,改善高血糖微环境,减少氧化应激对细胞造成的损伤。GSK-3是参与糖原代谢的关键酶,能使糖原合成酶磷酸化,降低糖原合成,使血糖升高,GSK-3 α 和GSK-3 β 可以调控糖原合成酶的活性^[22]。本研究发现,杀螟硫磷暴露会抑制IRS和AKT的磷酸化水平,诱导PI3K和AKT蛋白显著表达,影响对胰岛素敏感相关蛋白的调控,且杀螟硫磷暴露会显著提高GSK-3 α 和GSK-3 β 的表达水平,进一步干扰胰岛素信号转导,抑制葡萄糖的转运和利用,产生糖代谢毒性。

综上所述,杀螟硫磷暴露会使BRL细胞造成氧化损伤,并且影响细胞胰岛素敏感性增加胰岛素抵抗,抑制糖原合成,产生糖代谢毒性,其可能的作用机制是通过机体氧化应激,诱发胰岛素抵抗,改变糖代谢相关信号通路中胰岛素敏感信号通路和糖原合成信号通路中相关蛋白的表达。

参 考 文 献

- [1] RODRÍGUEZ A G P, LEÓN J A A. Methods for determination of pesticides and fate of pesticides in the fields[J/OL]. Controll. Release Pestic. Sustain. Agric., 2020, doi: 10.1007/978-3-030-23396-9_2[2024-03-16]. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23396-9_2.
- [2] ALAVINIA S J, MIRVAGHEFI A, FARAHMAND H, *et al.* DNA damage, acetylcholinesterase activity, and hematological responses in rainbow trout exposed to the organophosphate malathion[J/OL]. Ecotoxicol. Environ. Saf., 2019, 182: 109311 [2024-03-16]. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.081>.
- [3] MOUSSAOUI Y, TUDURI L, KERCHICH Y, *et al.* Atmospheric concentrations of PCDD/Fs, dl-PCBs and some pesticides in northern Algeria using passive air sampling[J]. Chemosphere, 2012, 88(3): 270-277.
- [4] KAWAHARA J, HORIKOSHI R, YAMAGUCHI T, *et al.* Air pollution and young children's inhalation exposure to organophosphorus pesticide in an agricultural community in Japan[J]. Environ. Int., 2005, 31(8): 1123-1132.
- [5] MILOŠEVIĆ M D, PAUNOVIĆ M G, MATIĆ M M, *et al.* Role of selenium and vitamin C in mitigating oxidative stress induced by fenitrothion in rat liver[J]. Biomed. Pharmacother., 2018, 106: 232-238.
- [6] KASHIWADA S, MOCHIDA K, ADACHI Y, *et al.* Influence of fenitrothion-exposure on the metabolic activity of a rotifer (*Brachionus plicatilis*) to organophosphorus insecticides[J]. J. Pest. Sci., 2002, 27(1): 59-63.
- [7] SAWCZYN T, DOLEZYCH B, KLOSOK M, *et al.* Alteration of carbohydrates metabolism and midgut glucose absorption in *Gromphadorhina portentosa* after subchronic exposure to imidacloprid and fenitrothion[J]. J. Environ. Sci. Health A Tox Hazard. Subst. Environ. Eng., 2012, 47(11): 1644-1651.
- [8] DENDUP T, FENG X, CLINGAN S, *et al.* Environmental risk factors for developing type 2 diabetes mellitus: a systematic review[J/OL]. Int. J. Environ. Res. Public. Health, 2018, 15(1): E78[2024-03-16]. <https://doi.org/10.3390/ijerph15010078>.
- [9] RUART M, CHAVARRIA L, CAMPRECIÓS G, *et al.* Impaired endothelial autophagy promotes liver fibrosis by aggravating the oxidative stress response during acute liver injury[J]. J. Hepatol., 2019, 70(3): 458-469.
- [10] TANG Q, TANG J, REN X, *et al.* Glyphosate exposure induces inflammatory responses in the small intestine and alters gut microbial composition in rats[J/OL]. Environ. Pollut., 2020, 261: 114129 [2024-03-16]. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114129>.
- [11] TSIKAS D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges[J]. Anal. Biochem., 2017, 524: 13-30.
- [12] ZHANG C, FENNEL E M J, DOUILLET C, *et al.* Exposures to arsenite and methylarsonite produce insulin resistance and impair insulin-dependent glycogen metabolism in hepatocytes[J]. Arch. Toxicol., 2017, 91(12): 3811-3821.
- [13] TAPPY L, LÊ K A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity[J]. Physiol. Rev., 2010, 90(1): 23-46.
- [14] LUZZATTO L, ALLY M, NOTARO R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency[J]. Blood, 2020, 136(11): 1225-1240.
- [15] IYNEDJIAN P B. Molecular physiology of mammalian glucokinase[J]. Cell. Mol. Life Sci., 2009, 66(1): 27-42.
- [16] 丁阳阳. 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯暴露对发育期2型糖尿病小鼠的代谢毒性效应、易感性及机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2021.
- [17] DING Y Y. Study on the metabolic toxicity, susceptibility and mechanism of DEHP on adolescent mice with type 2 diabetes mellitus (T2DM) [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2021.
- [17] KITANO H. Computational systems biology[J]. Nature, 2002, 420: 206-210.
- [18] LAVIN D P, WHITE M F, BRAZIL D P. IRS proteins and diabetic complications[J]. Diabetologia, 2016, 59(11): 2280-2291.
- [19] 吴洁, 秦兴华, 侯作旭, 等. MiR-494-3p通过下调胰岛素受体底物-1促糖尿病大鼠心肌细胞胰岛素抵抗[J]. 生理学报, 2019, 71(2): 271-278.
- [19] WU J, QIN X H, HOU Z X, *et al.* MiR-494-3p reduces insulin sensitivity in diabetic cardiomyocytes by downregulation of insulin receptor substrate 1[J]. Acta Physiol. Sin., 2019, 71(2): 271-278.
- [20] DU X, LI X, CHEN L, *et al.* Hepatic miR-125b inhibits insulin signaling pathway by targeting PIK3CD[J]. J. Cell. Physiol., 2018, 233(8): 6052-6066.
- [21] DONNELLY R, QU X. Mechanisms of insulin resistance and new pharmacological approaches to metabolism and diabetic complications[J]. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 1998, 25(2): 79-87.
- [22] JOPE R S, YUSKAITIS C J, BEUREL E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics[J]. Neurochem. Res., 2007, 32(4): 577-595.