

网络出版时间: 2019-3-22 16:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190321.1437.019.html>

◇预防医学研究◇

双酚 A 对高脂饮食小鼠肝损伤与 GSK3 表达的影响

葛晓蕾¹ 陆晓桐¹ 张小飞¹ 吴明¹ 杜志远² 朱启星¹ 沈彤¹

摘要 目的 研究双酚 A (BPA) 暴露对高脂饮食 (HFD) 小鼠肝脏炎症性损伤及糖原合成酶激酶 3 (GSK3) 表达的影响。方法 4 周龄雄性 C57BL/6 小鼠用正常饮食 (ND) 和 HFD 喂养, 分别设置溶剂对照组、10、100 和 1 000 nmol/L BPA 组, 经饮水暴露 BPA 8 周和 12 周时处死小鼠, 取肝脏, HE 染色观察肝脏病理变化, 免疫组化 (IHC) 法检测肝脏白介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的表达, Western blot 法检测肝脏 GSK3 α 、GSK3 α -S21、GSK3 β 、GSK3 β -S9 蛋白的表达。结果 与 ND 喂养小鼠比, 同一时间点 HFD 喂养小鼠肝脏炎症性细胞浸润增多, TNF- α 和 IL-1 β 表达明显增强; ND 或 HFD 喂养小鼠中, 肝脏组织病理学变化、TNF- α 和 IL-1 β 表达增强呈 BPA 暴露剂量依赖性, 12 周时较 8 周时更显著; 与 ND 喂养小鼠比, HFD 喂养的同时点小鼠肝组织 GSK3 β -S9 和 GSK3 α -S21 表达显著降低 ($P < 0.05$); ND 或 HFD 喂养小鼠中, 肝组织 GSK3 β -S9 表达降低呈 BPA 剂量依赖性。结论 BPA 暴露可导致小鼠肝脏炎症性损伤, 且与 HFD 具有协同作用, 而 GSK3 β -S9 表达降低后上调炎症因子表达在其中发挥重要作用。

关键词 双酚 A; 糖原合成酶激酶 3; 肝脏; 炎症损伤

中图分类号 Q 591.1; R 994.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)03-0433-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.019

双酚 A (bisphenol A, BPA) 是一种常见的环境内分泌干扰物, 主要做为合成聚碳酸酯、环氧树脂等塑料的单体, 用于制造食品包装材料及输液袋等日常用品。当遇到热或强酸强碱时, BPA 会从中释出并进入机体, 对人体造成危害^[1-3]。研究^[4-7]显示 BPA 暴露可导致肝脏明显损伤, 而且炎症细胞因子参与其中, 但 BPA 暴露诱导肝损伤中炎症细胞因子表达及调控机制目前知之甚少。糖原合成酶激酶

3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3) 是体内广泛表达的多功能丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 其氨基端的丝氨酸 (GSK3 α -Ser21 或 GSK3 β -Ser9) 磷酸化可显著抑制其活性, 调节炎症损伤^[8]。该研究通过检测 BPA 暴露小鼠在正常饮食 (normal diet, ND) 和高脂饮食 (high fat diet, HFD) 喂养情况下肝损伤、炎症细胞因子白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 表达以及 GSK3 蛋白表达情况, 探讨 BPA 暴露与 HFD 协同诱导肝脏炎症性损伤与 GSK3 蛋白表达的关系。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 BPA (99.9% 分析纯) 购自国药集团化学试剂北京有限公司; 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自美国 Sigma 公司; BPA 用 DMSO 溶解 (DMSO 终浓度不超过 1%); 兔 Anti-GSK3 α 抗体、Anti-GSK3 α -S21 抗体、Anti-GSK3 β 抗体、Anti-GSK3 β -S9 抗体购自美国 Abcam 公司; 兔 Anti-IL-1 β 抗体、Anti-TNF- α 抗体购自武汉 Elabscience 生物公司; 小鼠抗 β -Actin 单抗和通用超敏组化试剂盒、辣根过氧化物标记山羊抗兔 IgG 抗体、辣根过氧化物标记山羊抗鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 倒置荧光显微镜 IX73 购自日本奥林巴斯有限公司; ELX800 酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司; Fine-do X6 显影仪购自上海天能科技有限公司; Microfuge[®] 22R 超速冷冻离心机购自美国贝克曼库尔特有限公司。

1.2 实验动物及其处理 SPF 级 4 周龄雄性 C57BL/6 野生型小鼠 96 只, 体质量 (14.53 \pm 0.97) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 饲养于安徽医科大学动物实验中心清洁动物房, 自由进食, 温度 (21 \pm 2) $^{\circ}$ C, 湿度 (50 \pm 5) %, 12 h 交替照明。适应性饲养 1 周后, 随机分为 8 组, 每组 12 只。ND (12% 脂肪能量) 和 HFD (45% 脂肪能量, 购自南京协同医药有限责任公司) 各喂养 4 组。ND 和 HFD 喂养小鼠分别设溶剂对照、10、100 和 1 000

2018-10-31 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81473015、81773467); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (编号: 201810366029)

作者单位: 安徽医科大学公共卫生学院¹ 职业卫生与环境卫生学系、²2016 级预防医学专业, 合肥 230032

作者简介: 葛晓蕾, 女, 硕士研究生;

沈彤, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ah-musht@163.com

nmol/L BPA 组,通过饮水暴露于 BPA,每 2 d 换 1 次水以保持饮水中 BPA 含量。每日观察小鼠一般状态,记录饮水量和饲料消耗量,每周称体质量 1 次。8 周和 12 周时分别麻醉颈椎脱臼处死小鼠 6 只,无菌收集肝脏组织,称质量并计算脏器系数,分别用于以下实验。脏器系数计算方法:脏器系数 = 脏器质量(g) / 小鼠体质量(g)。本研究在安徽医科大学实验动物伦理委员会的批准下,按照安徽医科大学实验动物规范进行。

1.3 HE 染色观察小鼠肝脏组织病理学改变 用 10% 中性福尔马林固定小鼠肝脏组织 24 h,常规石蜡包埋(脱水、透明、浸蜡、包埋),制成 5 μm 切片,苏木精-伊红(HE)染色,脱水,用二甲苯透明,中性树胶封装,显微镜下观察各组肝组织病理学变化。

1.4 免疫组化染色(IHC)检测肝脏组织 TNF-α、IL-1β 的表达 新鲜肝组织用 4% 多聚甲醛固定 24 h,脱水,石蜡包埋,制成 5 μm 切片,正常脱蜡水合,用 Triton X-100 进行细胞通透,用正常羊血清封闭,甩去羊血清,用小鼠抗 TNF-α 抗体、抗 IL-1β 抗体 4 °C 冰箱孵育过夜,室温下复温 30 min ~ 1 h,然后用过氧化物酶结合的二抗 37 °C 孵育 15 min, PBS 充分清洗后,再用辣根酶在 37 °C 孵育 15 min。PBS 充分清洗后,DAB 显色,苏木素复染,干燥、封片,显微镜下观察拍片。

1.5 Western blot 检测肝脏组织 GSK3α、GSK3α-S21、GSK3β、GSK3β-S9 的表达 肝脏组织匀浆后提取总蛋白并定量,经 SDS-PAGE 变性凝胶电泳分离,转至 PVDF 膜,纯水洗涤 3 次,加入一定浓度的一抗,包括 Anti-GSK3α 抗体、Anti-GSK3α-S21 抗体、Anti-GSK3β 抗体、Anti-GSK3β 抗体、Anti-GSK3β-S9 抗体蛋白(美国 Abcam 公司) 4 °C 过夜。复温后用 TBST 洗涤 3 次,加入稀释的二抗室温孵育 1.5 h,最后用 TBST 再次洗涤(3 × 5 min)。将化学发光试剂 A 和 B(美国 Advansta 公司)以 1 : 1 混合并滴加到 PVDF 膜上,通过显影液显影。用凝胶图像处理系统(Image J 软件)进行相对 OD 分析。GSK3α、GSK3α-S21、GSK3β、GSK3β-S9 分子量分别为 51、50、46、46 ku。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 进行统计分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Graph Pad Prism 5 软件进行作图。多组间的均数比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA),两两比较用 Turkey 法 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BPA 暴露对小鼠一般状况和肝脏系数的影响

实验期间,各组小鼠一般状态良好,未出现死亡现象。不同时间点,各组小鼠日平均饮水量和食物消耗量差异无统计学意义。与 ND 喂养小鼠比,同一时间点,8 周和 12 周时各组间差异均无统计学意义。见表 1。

2.2 BPA 暴露对小鼠肝脏组织病理学影响 与 ND 喂养小鼠比,同一时间点 HFD 喂养小鼠肝脏组织肝小叶结构模糊,肝细胞排列紊乱,细胞肿胀明显,大泡样脂肪变性严重,炎性细胞浸润增多;ND 或 HFD 喂养小鼠中,肝脏组织病理学改变呈 BPA 暴露剂量依赖性,12 周时较 8 周时炎性浸润更显著。见图 1。

2.3 BPA 暴露对小鼠肝脏组织 TNF-α、IL-1β 表达的影响 与 ND 喂养小鼠比,同一时间点 HFD 喂养小鼠肝脏组织 TNF-α 和 IL-1β 表达明显增强;ND 或 HFD 喂养小鼠中,肝组织 TNF-α 和 IL-1β 表达增强呈 BPA 剂量依赖性,而且 12 周时较 8 周时表达更明显。见图 2、3。

表 1 不同剂量 BPA 暴露 ND 和 HFD 喂养小鼠肝脏脏器系数($\bar{x} \pm s$)

组别	n	8 周	12 周
ND	6	0.049 3 ± 0.002 0	0.051 8 ± 0.003 3
ND + 10 nmol/L BPAP	6	0.049 9 ± 0.002 2	0.052 6 ± 0.001 9
ND + 100 nmol/L BPA	6	0.050 1 ± 0.003 7	0.053 4 ± 0.001 1
ND + 1 000 nmol/L BPA	6	0.049 3 ± 0.003 2	0.054 3 ± 0.002 6
F 值		0.167	0.000
P 值		0.848	1.000
HFD	6	0.051 3 ± 0.003 3	0.055 2 ± 0.003 2
HFD + 10 nmol/L BPA	6	0.052 9 ± 0.003 7	0.056 6 ± 0.004 6
HFD + 100 nmol/L BPA	6	0.053 2 ± 0.003 3	0.058 3 ± 0.002 8
HFD + 1 000 nmol/L BPA	6	0.054 6 ± 0.002 5	0.060 5 ± 0.004 2
F 值		0.079	0.042
P 值		0.925	0.959

2.4 BPA 暴露对小鼠肝脏 GSK3α、GSK3α-S21、GSK3β、GSK3β-S9 表达的影响 与 ND 喂养小鼠比,HFD 喂养同时点相同 BPA 剂量暴露小鼠肝组织 GSK3β-S9 和 GSK3α-S21 表达降低,差异均有统计学意义(GSK3α-S21: $F = 6.883, P = 0.000$; GSK3β-S9: $F = 50.285, P = 0.000$);ND 或 HFD 喂养小鼠中,肝组织 GSK3β-S9 表达降低呈 BPA 剂量依赖性,但 GSK3α-S21 表达无 BPA 剂量依赖性。ND 或 HFD 喂养小鼠,肝 GSK3α 和 GSK3β 表达在各组

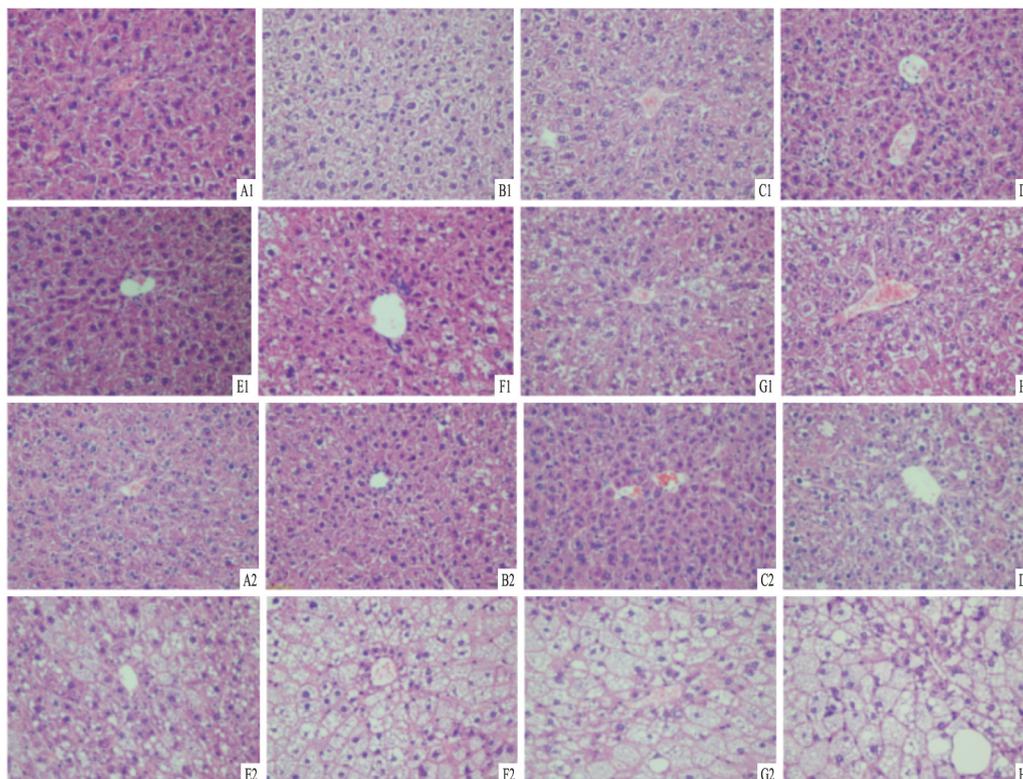


图1 不同剂量BPA暴露ND和HFD喂养小鼠肝组织病理学观察结果 HE×200

A: ND组; B: 10 nmol/L BPA + ND组; C: 100 nmol /L BPA + ND组; D: 1 000 nmol/L BPA + ND组; E: HFD组; F: 10 nmol/L BPA + HFD组; G: 100 nmol/L BPA + HFD组; H: 1 000 nmol/L BPA + HFD组; 1: 8周; 2: 12周

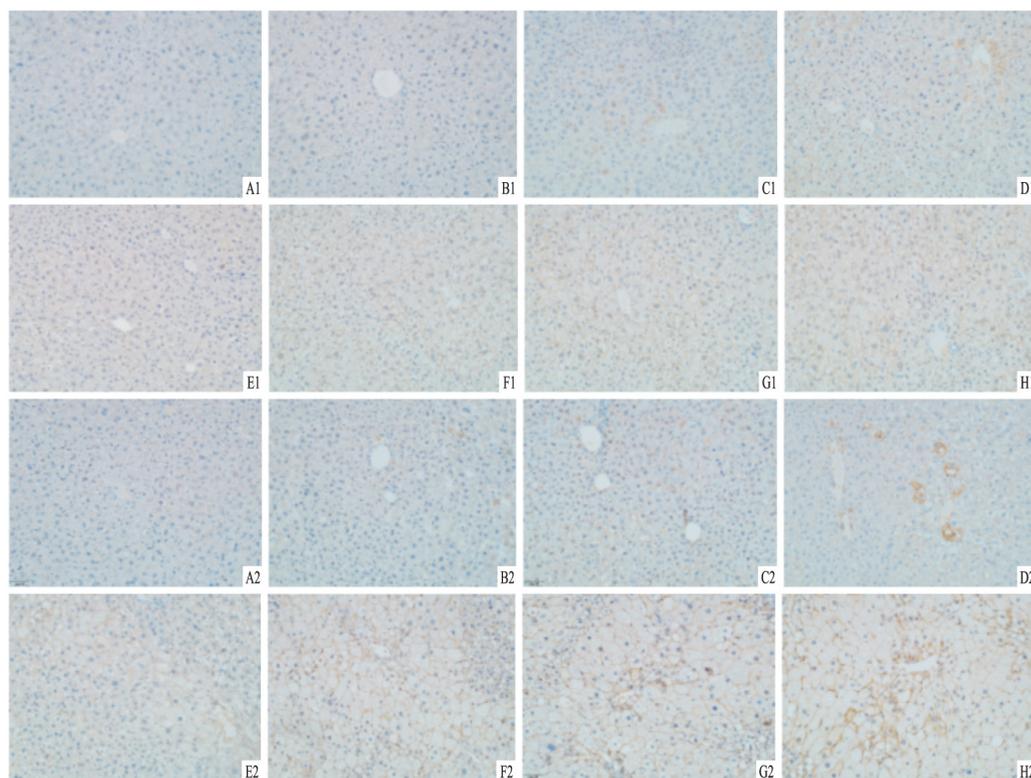


图2 不同剂量BPA暴露ND和HFD喂养小鼠肝组织TNF-α表达情况 IHC×200

A: ND组; B: 10 nmol/L BPA + ND组; C: 100 nmol/L BPA + ND组; D: 1 000 nmol/L BPA + ND组; E: HFD组; F: 10 nmol/L BPA + HFD组; G: 100 nmol/L BPA + HFD组; H: 1 000 nmol/L BPA + HFD组; 1: 8周; 2: 12周

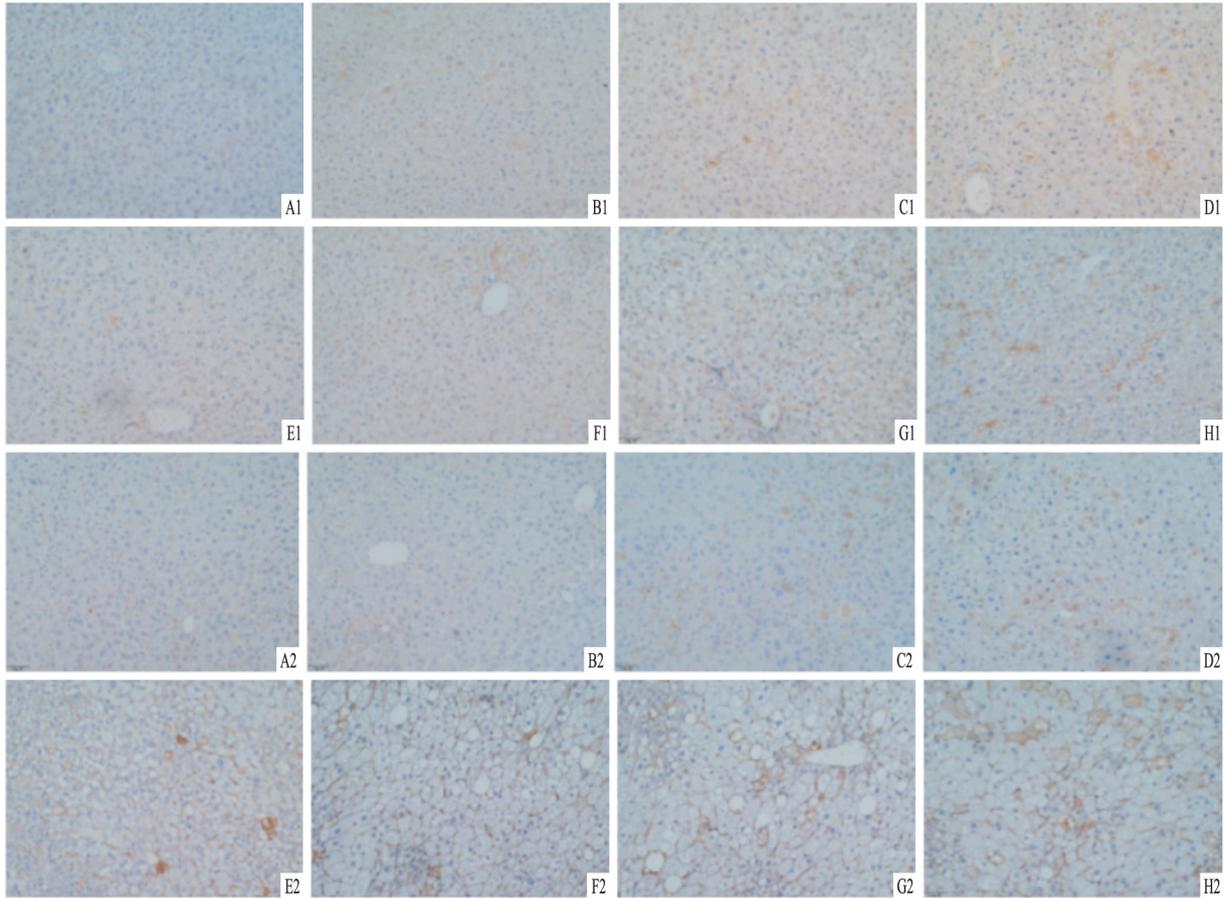


图3 不同剂量BPA暴露ND和HFD喂养小鼠肝组织IL-1β表达情况 IHC ×200

A: ND组; B: 10 nmol/L BPA + ND组; C: 100 nmol/L BPA + ND组; D: 1 000 nmol/L BPA + ND组; E: HFD组; F: 10 nmol/L BPA + HFD组; G: 100 nmol/L BPA + HFD组; H: 1 000 nmol/L BPA + HFD组; 1: 8周; 2: 12周

间差异无统计学意义 (GSK3α: $F = 0.147, P = 1.000$; GSK3β: $F = 0.027, P = 1.000$)。见图4~8。

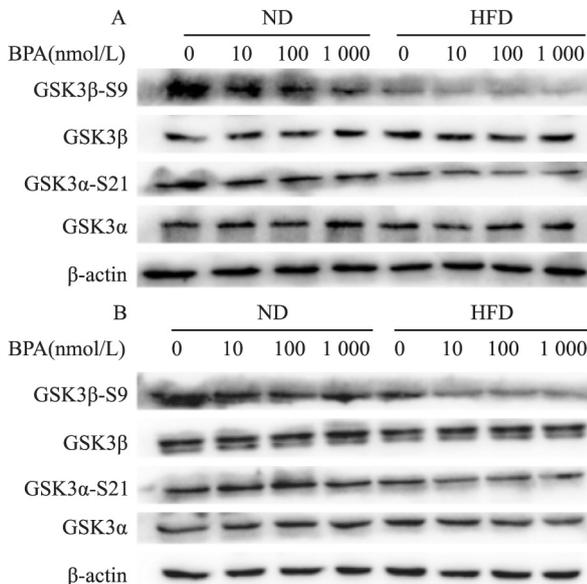


图4 不同剂量BPA暴露ND和HFD喂养小鼠肝GSK3α、GSK3α-S21、GSK3β、GSK3β-S9蛋白表达

A: 8周; B: 12周

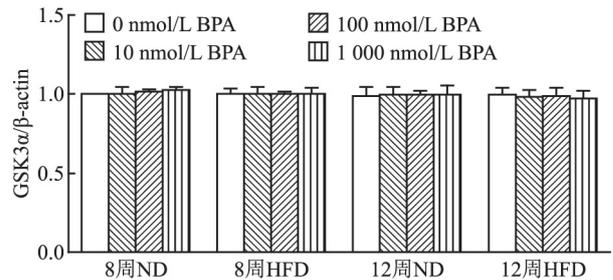


图5 BPA暴露对小鼠肝GSK3α蛋白相对表达量影响 (n = 3)

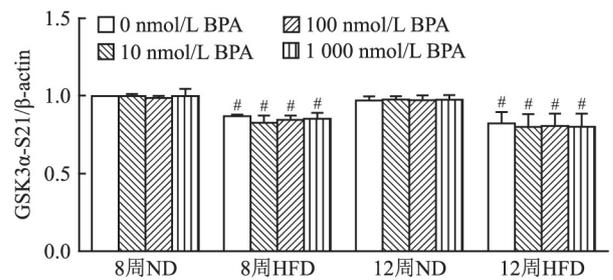
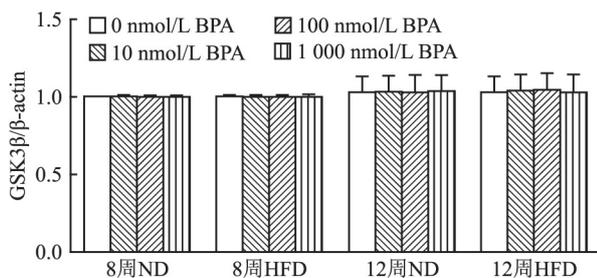
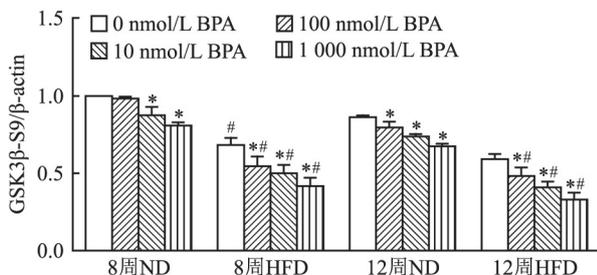


图6 BPA暴露对小鼠肝GSK3α-S21蛋白相对表达量影响 (n = 3)

与同时时间点同剂量ND组比较: # $P < 0.05$

图7 BPA暴露对小鼠肝GSK3 β 蛋白相对表达量影响($n=3$)图8 BPA暴露对小鼠肝GSK3 β -S9蛋白相对表达量影响($n=3$)
与各自溶剂对照组比较: * $P < 0.05$; 与同时间点同剂量ND组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

环境低剂量BPA暴露与肥胖、糖尿病、非酒精性脂肪肝等代谢性疾病的关系日益受到关注^[9-10]。本研究中小鼠暴露的BPA最高剂量为1 000 nmol/L,以每天饮水量5 ml计算,对应的暴露剂量为22.8 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,仍低于欧洲食品安全局和美国国家环境保护局规定的参考剂量50 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。结果显示,此剂量BPA可导致小鼠肝组织病理学改变,出现大泡样脂肪变性,炎性细胞浸润增多等损伤。研究^[7]表明可控性炎症在代谢性疾病的发生发展中起着关键作用。本研究的结果也显示肝脏组织中炎性细胞因子TNF- α 和IL-1 β 表达均增加,且随着BPA剂量的增加而加重,且HFD组比ND组更加明显。表明低剂量BPA可诱导小鼠肝脏炎症性损伤,且与HFD具有协同作用,与相关文献^[11-12]报道类似。但BPA与HFD协同作用的具体机制尚不明确。

研究^[13]表明GSK3在机体内具有广泛的底物性,参与炎症介质如TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和胰岛素细胞的信号传导的调控,其丝氨酸残基(GSK3 α -Ser21或GSK3 β -Ser9)磷酸化时可抑制其活性,导致下游炎症细胞因子表达上调,因此被认为是炎症和自身免疫疾病中潜在的治疗靶点^[14]。本研究表明,低剂

量BPA诱导小鼠肝组织GSK3 β -S9和GSK3 α -S21表达降低,其中GSK3 β -S9表达降低具有BPA剂量依赖性,且HFD组明显低于ND组,提示低剂量BPA暴露与HFD可共同促进GSK3活化,上调肝脏炎症因子的表达,导致肝脏炎症性损伤。

综上所述,本研究结果显示低剂量BPA暴露可导致小鼠肝脏炎症性损伤,且与HFD具有协同作用,而GSK3 β -S9表达降低导致GSK3活化,进而上调炎症因子的表达,在其所致肝脏炎症性损伤中发挥一定作用。本研究结果为BPA暴露,尤其是与HFD协同诱导肝损伤的发病机制提供基础资料,可为寻找控制BPA引发肝损伤的潜在靶点提供进一步的实验依据,对预防和治疗BPA暴露诱导的肝损伤及相关代谢综合征具有重要的理论和现实意义。但低剂量BPA暴露诱导肝损伤中,诱导GSK3 β -S9表达降低的具体机制需进一步的深入探讨,而环境低剂量BPA暴露人群研究也是今后研究的方向之一。

参考文献

- [1] Caporossi L, Papaleo B. Bisphenol A and metabolic diseases: challenges for occupational medicine [J]. Int J Environ Pub Health, 2017, 14(9): 959-72.
- [2] Jeong J S, Nam K T, Lee B, et al. Low-dose Bisphenol A increases bile duct proliferation in juvenile rats: a possible evidence for risk of liver cancer in the exposed population? [J]. Biomol Ther, 2017, 25(5): 545-52.
- [3] Van Esterik J C, Dollé M E, Lamoree M H, et al. Programming of metabolic effects in C57BL/6JxFVB mice by exposure to bisphenol A during gestation and lactation [J]. Toxicology, 2014, 321: 40-52.
- [4] Wei J, Sun X, Chen Y, et al. Perinatal exposure to bisphenol A exacerbates nonalcoholic steatohepatitis-like phenotype in male rat offspring fed on a high-fat diet [J]. J Endocrinol, 2014, 222(3): 313-25.
- [5] Moon M K, Kim M J, Jung I K, et al. Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level [J]. J Korean Med Sci, 2012, 27(6): 644-52.
- [6] Elswefy S E, Abdallah F R, Atteia H H, et al. Inflammation, oxidative stress and apoptosis cascade implications in bisphenol A induced liver fibrosis in male rats [J]. Int Exp Pathol, 2016, 97(5): 369-79.
- [7] Kubes P, Mehal W Z. Sterile inflammation in the liver [J]. Gastroenterology, 2012, 143(5): 1158-72.
- [8] Lee J, Kim M S. The role of GSK3 in glucose homeostasis and the development of insulin resistance [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2007, 77(S1): S49-57.
- [9] 孙婉婉, 毕宇芳. 双酚A与胰岛素抵抗及2型糖尿病关系的研究进展 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2012, 32(5):

- 670–73.
- [10] Savastano S, Tarantino G, D'Esposito V, et al. Bisphenol-A plasma levels are related to inflammatory markers, visceral obesity and insulin-resistance: a cross-sectional study on adult male population [J]. *J Transl Med*, 2015, 13(1): 169.
- [11] Liu J, Yu P, Qian W, et al. Perinatal bisphenol A exposure and adult glucose homeostasis: identifying critical windows of exposure [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64143.
- [12] Ding S, Fan Y, Zhao N, et al. High-fat diet aggravates glucose homeostasis disorder caused by chronic exposure to bisphenol A [J]. *J Endocrinol*, 2014, 221(1): 167–79.
- [13] Beurel E, Michalek S M, Jope R S. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3) [J]. *Trends Immunol*, 2010, 31(1): 24–31.
- [14] Jope R S, Cheng Y, Lowell J A, et al. Stressed and inflamed, can GSK3 be blamed? [J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(3): 180–92.

Effect of bisphenol A on liver injury and GSK3 expression in mice with high fat diet

Ge Xiaolei, Lu Xiaotong, Zhang Xiaofei, et al

(Dept of Occupational and Environmental/Lental Health,

School of Public Health, Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the effects of bisphenol A (BPA) exposure on liver injury and glycogen synthase kinase 3 (GSK3) expression in high fat diet-fed mice. **Methods** Four-week-old male C57BL/6 mice were fed with normal diet (ND) and high fat diet (HFD), and divided into solvent control group, 10 nmol/L BPA, 100 nmol/L BPA and 1 000 nmol/L BPA groups. The mice were exposed to BPA by drinking water. Eight weeks and 12 weeks after administered, the mice were killed. The liver of the mice was taken and the pathological changes of the liver were observed by H&E staining. The expression of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the liver was detected by immunohistochemistry (IHC). The expression of GSK3 α , GSK3 α -S21, GSK3 β , GSK3 β -S9 protein in the liver was detected by Western blot. **Results** Compared with ND-fed mice, infiltration of inflammatory cells and TNF- α , IL-1 β expression at the same time point were increased significantly in liver tissue of HFD-fed mice. In the mice fed with ND or HFD, the histopathological changes of liver and the increased expression of TNF- α and IL-1 β in liver were dose-dependent on BPA exposure. Those of 12 weeks were more significantly than those of 8 weeks. Compared with ND-fed mice, at the same time point, the expression of GSK3 β -S9 and GSK3 α -S21 in liver were significantly decreased in mice fed with HFD ($P < 0.05$). In the mice fed with ND or HFD, the decreased expression of GSK3 β -S9 in the liver were dose-dependent on BPA exposure ($P < 0.05$). **Conclusion** Exposure to BPA can cause inflammatory injury in the liver of mice, and has a synergistic effect with HFD, and decreased expressions of GSK3 β -S9 may play an important role in it by up-regulating the expression of inflammatory factors.

Key words bisphenol A; glycogen synthase kinase 3; liver; inflammatory injury