

网络出版时间: 2016-8-10 11:04:48 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160810.1104.015.html>

◇预防医学研究◇

双酚 A 诱导肥胖小鼠中脂肪组织巨噬细胞聚集

李应配¹, 罗时猛¹, 冷银芝¹, 陆晓桐², 张书雅², 蒋建华³, 朱启星⁴, 沈彤^{1, #}

摘要 目的 研究饮水摄入低剂量双酚 A (BPA) 诱导的肥胖小鼠中脂肪组织巨噬细胞的聚集。方法 将 4 周龄雄性 C57BL/6 小鼠随机分为正常饮食 (ND) 组和高脂饮食 (HFD) 组, 每组再分别设溶剂对照组、10 nmol/L BPA 组、100 nmol/L BPA 组和 1 000 nmol/L BPA 组。小鼠经饮水摄取 BPA 20 周后称量体重, 处死, 无菌取附睾脂肪垫, HE 染色观察脂肪组织炎症细胞浸润, 免疫组化法检测脂肪组织 IL-6 的表达, 流式细胞术分析脂肪组织血管基质成分 (SVF) 巨噬细胞比例。结果 与各自对照组比较, ND 和 HFD 小鼠 BPA 暴露组体重和附睾脂肪垫系数明显升高 ($P < 0.05$), 且随 BPA 剂量的增加而上升 ($P < 0.05$); BPA 暴露组脂肪组织脂肪细胞体积和细胞间隙增大, 间隙有炎细胞浸润; BPA 暴露可致脂肪组织炎症因子 IL-6 表达上调和附睾脂肪垫 SVF 中巨噬细胞比例明显升高 ($P < 0.05$)。结论 低剂量 BPA 暴露可以诱导小鼠肥胖, 而脂肪组织巨噬细胞的聚集可能与 BPA 诱导肥胖相关。

关键词 双酚 A; 炎症; 脂肪组织巨噬细胞

中图分类号 R 114

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)10-1464-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.015

双酚 A (bisphenol A, BPA) 是制造环氧树脂、聚碳酸酯等的单体, 广泛应用于食品包装材料、饮料容器、生产牙套等塑料工业, 已成为世界上年产量最大的化学制品之一。研究^[1]报道人体多种生物样本都可检测到 BPA, 表明人类已广泛暴露于环境 BPA。动物实验和人群研究^[2-5]均表明 BPA 暴露与超重和肥胖显著相关, 但是具体机制尚不清楚。肥

胖是一种全身慢性低度炎症的病理状态, 在脂肪组织中有大量脂肪组织巨噬细胞 (adipose tissue macrophages, ATM) 的浸润, 而且不断聚集、激活, 增加脂肪组织中炎症因子分泌^[6]。研究^[7-8]显示, BPA 暴露可以下调巨噬细胞的活力, 从而影响其功能。研究^[9]表明 BPA 可以调控人类脂肪组织巨噬细胞中细胞因子的表达, 影响炎症应答。但 BPA 诱导肥胖中脂肪组织巨噬细胞的聚集目前仍未见报道。该研究通过动物实验, 研究长期低剂量 BPA 暴露诱导肥胖小鼠中脂肪组织巨噬细胞的聚集, 为阐明 BPA 与肥胖间关系提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 BPA (99.9% 分析纯, 国药集团化学试剂北京有限公司); 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (美国 Sigma 公司); BPA 用 DMSO 溶解 (DMSO 终浓度不超过 1%); 藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) - anti-F4/80 抗体 (美国 Biolegend 公司); 兔来源多克隆 IL-6 抗体 (稀释比 1:100) (武汉 Elabscience 生物公司); 通用型生物素 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司)。

1.2 实验动物和处理 SPF 级 4 周龄雄性 C57BL/6 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 饲养于清洁级动物房, 自由进食, 温度维持在约 25 °C, 12 h 光照和 12 h 黑暗的昼夜环境。适应性饲养 1 周后随机分为正常饮食 (normal diet, ND, 12% 脂肪能量) 组和高脂饮食 (high fat diet, HFD, 45% 脂肪能量) 组, 每组分别设溶剂对照组、10 nmol/L BPA 组、100 nmol/L BPA 组和 1 000 nmol/L BPA 组, 每组 6 只小鼠。小鼠经饮水摄入不同浓度的 BPA, 每天观察小鼠状态并记录饮水量和饲料消耗量, 每周称体重 1 次。为保持饮水中 BPA 含量, 每 2 d 换水 1 次。处理 20 周后称量体重, 处死小鼠, 无菌取附睾脂肪垫并称重。动物实验经过安徽医科大学实验动物伦理委员会的批准, 按照安徽医科大学实验动物规范进行。

2016-05-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81473015); 安徽省自然科学基金 (编号: 1508085MH161); 安徽省大学生创新训练计划项目 (编号: AH201410366103)

作者单位: 安徽医科大学公共卫生学院¹ 卫生毒理学系、2012 级食品质量与安全专业、⁴ 职业卫生与环境卫生学系, 合肥 23003

³ 安徽医科大学第一附属医院临床营养科, 合肥 230022

作者简介: 李应配, 男, 硕士研究生;

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

1.3 组织病理学观察附睾脂肪组织炎性细胞浸润

取新鲜附睾脂肪组织,用4%多聚甲醛固定24 h,脱水、石蜡包埋,制成5 μm 切片。脱蜡、HE染色、中性树脂封片,显微镜下观察脂肪组织炎性细胞浸润情况。

1.4 免疫组化法检测附睾脂肪组织 IL-6 的表达

5 μm 石蜡切片98 $^{\circ}\text{C}$ 烧烤30 min,常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,0.01 mmol/L枸橼酸钠缓冲液进行抗原修复,3% H_2O_2 于37 $^{\circ}\text{C}$ 中恒温孵育20 min,50 μl /片正常山羊血清封闭,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育30 min,吸去血清,滴加50 μl 兔来源多克隆IL-6抗体(稀释比1:100)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,室温下复温30~60 min, PBS洗3遍,每次5 min;滴加50 μl 生物素山羊抗兔IgG工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育10~15 min, PBS洗3遍,每次5 min,再滴加50 μl 羊抗兔辣根酶标记二抗工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育10~15 min, PBS充分清洗后, DAB显色,苏木精复染,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,光学显微镜下观察。在400倍下选取6个代表性视野,用ImagePro-Plus软件计算每个视野中累积光密度值,求其平均值。

1.5 附睾脂肪垫基质血管碎片(stromal vascular fraction, SVF)的提取 取新鲜附睾脂肪组织,中性PBS冲洗3次,剪成碎片,在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中用4 ml的1 mg/ml II型胶原酶消化40 min,200 μm 过滤网过滤,1 000 r/min离心8 min,吸去上面脂肪层,2 500 r/min离心10 min,倒去上清液,底层颗粒细胞即为SVF。

1.6 流式细胞术检测 SVF 巨噬细胞比例 SVF细胞悬液[(1~10) $\times 10^5$ /ml]中加入2 μl PE-抗小鼠F4/80抗体,震荡后,常温下避光孵育30 min,加3 ml PBS震荡,1 500 r/min离心10 min,去除上层液体,加300 μl PBS,震荡,Beckman Coulter流式细胞仪检测,Flow Jo软件分析巨噬细胞比例。

1.7 统计学处理 采用SPSS 17.0软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间比较采用LSD检验。

2 结果

2.1 饮水摄入不同浓度 BPA 对小鼠体重和附睾脂肪垫的影响 暴露20周后,HFD小鼠体重均高于ND小鼠,BPA暴露组ND和HFD小鼠体重和附睾脂肪垫系数均明显高于各自对照组,且体重和附睾脂肪垫系数随BPA浓度上升而增加。与对照组比

较,ND小鼠和HFD小鼠在100 nmol/L和1 000 nmol/L BPA处理时差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 不同剂量BPA暴露20周对小鼠体重和附睾脂肪垫系数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重 (g)	附睾脂肪垫 系数(%)
ND对照	6	32.55 \pm 2.48	2.99 \pm 0.24
ND+10 nmol/L BPA	6	34.77 \pm 2.17	3.21 \pm 0.28
ND+100 nmol/L BPA	6	37.27 \pm 2.65*	3.62 \pm 0.31*
ND+1 000 nmol/L BPA	6	39.25 \pm 3.60*	3.98 \pm 0.46*
F值		6.642	10.055
P值		0.003	0.000
HFD对照	6	46.50 \pm 5.08	5.04 \pm 0.34
HFD+10 nmol/L BPA	6	48.73 \pm 2.71	5.31 \pm 0.48
HFD+100 nmol/L BPA	6	52.00 \pm 4.61*	5.92 \pm 0.59*
HFD+1 000 nmol/L BPA	6	53.98 \pm 5.34*	6.35 \pm 0.42*
F值		3.218	9.553
P值		0.045	0.000

与相同饮食对照组比较: * $P < 0.05$

2.2 饮水摄入 BPA 对小鼠附睾脂肪组织炎性细胞浸润的影响 与ND小鼠比较,HFD小鼠脂肪细胞体积变大,细胞间隙增大,间隙有炎细胞浸润。与各自对照组比较,BPA处理组随着BPA剂量递增,脂肪细胞体积和细胞间隙越来越大,间隙炎细胞浸润也越来越明显,见图1。

2.3 饮水摄入 BPA 对小鼠脂肪组织 IL-6 表达的影响 免疫组化显示,与ND小鼠比较,HFD小鼠脂肪组织IL-6表达明显增强;与各自对照组比较,BPA处理组随着BPA剂量递增,IL-6表达逐渐增强,见图2。

2.4 饮水摄入 BPA 对小鼠脂肪组织巨噬细胞比例的影响 流式细胞术分析附睾脂肪垫巨噬细胞的比例,结果显示,与ND小鼠比较,HFD小鼠附睾脂肪垫巨噬细胞比例明显升高($P < 0.05$,表中未显示)。与各自对照组比较,在ND小鼠和HFD小鼠中BPA暴露组巨噬细胞比例都明显升高,且均随BPA剂量的升高而上升,ND小鼠和HFD小鼠在100 nmol/L和1 000 nmol/L BPA处理时差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

3 讨论

BPA是一种典型的环境内分泌干扰物,在强酸、强碱、高温等情况下,容易从塑料制品中释放出来,通过消化道、呼吸道或皮肤等多种途径进入人体^[10]。本研究小鼠采用饮水摄入的方法暴露BPA,与人类的暴露途径相似。美国环保署规定BPA的

表2 BPA 暴露对小鼠 SVF 巨噬细胞比例的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	巨噬细胞比例(%)
ND 对照	6	22.07 ± 1.23
ND + 10 nmol/L BPA	6	23.52 ± 2.81
ND + 100 nmol/L BPA	6	26.63 ± 4.05*
ND + 1 000 nmol/L BPA	6	30.82 ± 4.30*
F 值		8.126
P 值		0.001
HFD 对照	6	33.65 ± 10.17
HFD + 10 nmol/L BPA	6	35.87 ± 5.08
HFD + 100 nmol/L BPA	6	42.00 ± 4.49*
HFD + 1 000 nmol/L BPA	6	45.65 ± 5.49*
F 值		4.066
P 值		0.021

与相同饮食对照组比较: * P < 0.05

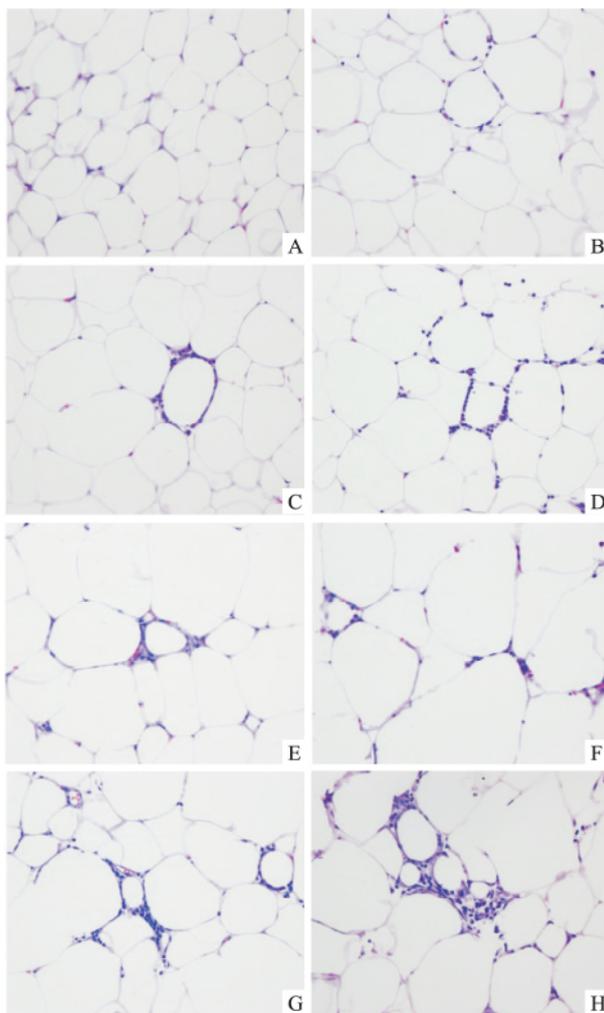


图1 各组脂肪组织染色结果 HE × 400

A: ND 对照组; B: 10 nmol/L BPA + ND 组; C: 100 nmol/L BPA + ND 组; D: 1 000 nmol/L BPA + ND 组; E: HFD 对照组; F: 10 nmol/L BPA + HFD 组; G: 100 nmol/L BPA + HFD 组; H: 1 000 nmol/L BPA + HFD 组

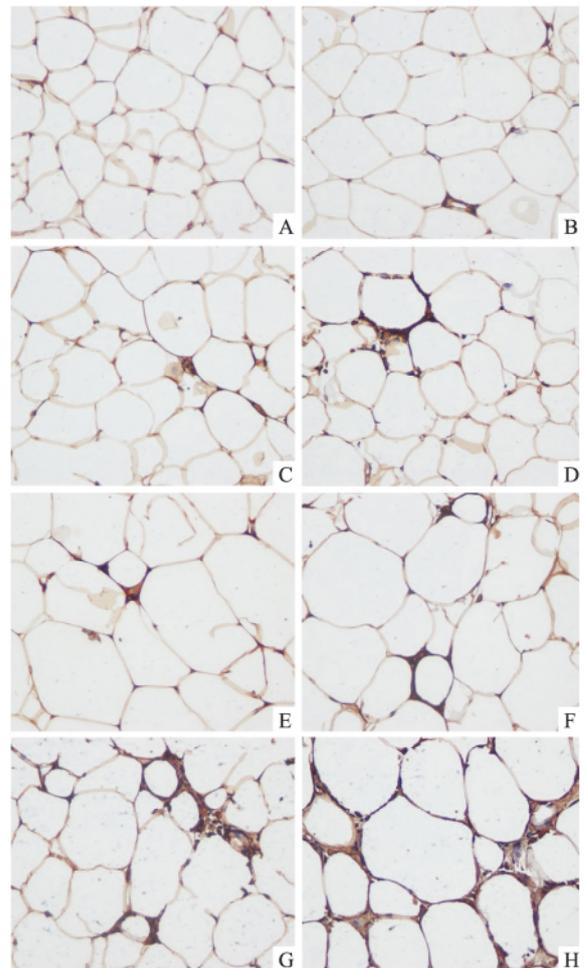


图2 免疫组化法检测各组小鼠附睾脂肪组织 IL-6 表达 × 400

A: ND 对照组; B: 10 nmol/L BPA + ND 组; C: 100 nmol/L BPA + ND 组; D: 1 000 nmol/L BPA + ND 组; E: HFD 对照组; F: 10 nmol/L BPA + HFD 组; G: 100 nmol/L BPA + HFD 组; H: 1 000 nmol/L BPA + HFD 组

安全剂量为 50 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,许多动物实验都已经证实了低于这剂量的 BPA 仍然可以引起机体副作用。本研究 BPA 暴露最高剂量为 1 000 nmol/L,即 228.29 $\mu\text{g}/\text{L}$,如果小鼠每天饮水量为 5 ml,也只有 0.114 15 μg ,远低于规定的安全剂量。

许多动物实验和流行病学研究^[2-4]都已经证明 BPA 可以引起肥胖。肥胖机体中常常表现出大量脂肪组织巨噬细胞的浸润,而巨噬细胞的不断聚集、激活,增加脂肪组织中炎症因子的分泌,是肥胖诱导机体发生慢性低度炎症和进一步发展为胰岛素抵抗以及代谢综合征的关键环节^[6]。故研究 BPA 引起肥胖小鼠脂肪组织巨噬细胞的聚集可以为阐明 BPA 诱导肥胖的发生机制提供实验证据。

本研究结果显示长期低剂量 BPA 暴露在 ND 小鼠和 HFD 小鼠中都可以引起体重和附睾脂肪垫

系数的升高,且随 BPA 暴露剂量的升高而上升; HE 染色病理观察显示附睾脂肪组织中脂肪细胞形态和细胞间隙明显增大,且存在炎性细胞浸润,与 BPA 暴露剂量相关;免疫组化显示脂肪组织炎性因子 IL-6 的表达在 BPA 组较对照组显著升高;这些结果均表明低剂量 BPA 暴露在 ND 小鼠和 HFD 小鼠中,都可能引起小鼠体重增加,脂肪组织出现炎症状态,在 HFD 小鼠中尤为明显。流式细胞术检测附睾脂肪组织中巨噬细胞的比例显示 BPA 暴露可导致脂肪组织巨噬细胞的比例明显升高,且与 BPA 剂量相关,与体重和炎症趋势相似,表明 BPA 诱导肥胖中脂肪组织巨噬细胞发生明显的聚集,且脂肪组织巨噬细胞的聚集可能在肥胖的发生发展中起着重要作用。

综上所述,低剂量 BPA 长期暴露可诱导小鼠肥胖,而脂肪组织巨噬细胞的聚集可能与肥胖的发生机制相关;而 BPA 暴露介导脂肪组织巨噬细胞聚集的机制以及不同巨噬细胞亚型在 BPA 诱导肥胖中的作用是进一步研究的方向。

参考文献

[1] vom Saal F S, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment [J]. *Environ Health Perspect*, 2005, 113(8): 926-33.

[2] Wang T, Li M, Chen B, et al. Urinary bisphenol A concentration associates with obesity and insulin resistance [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(2): E223-7.

[3] Ko A, Hwang M S, Park J H, et al. Association between urinary bisphenol A and waist circumference in Korean adults [J]. *Toxicol Res*, 2014, 30(1): 39-44.

[4] Ma Y, Xia W, Wang D Q, et al. Hepatic DNA methylation modifications in early development of rats resulting from perinatal BPA exposure contribute to insulin resistance in adulthood [J]. *Diabetologia*, 2013, 56(9): 2059-67.

[5] Marmugi A, Lasserre F, Beuzelin D, et al. Adverse effects of long-term exposure to bisphenol A during adulthood leading to hyperglycaemia and hypercholesterolemia in mice [J]. *Toxicology*, 2014, 325: 133-43.

[6] Gregor M F, Hotamisligil G S. Inflammatory mechanisms in obesity [J]. *Ann Rev Immunol*, 2011, 29: 415-45.

[7] Byun J A, Heo Y, Kim Y O, et al. Bisphenol A-induced downregulation of murine macrophage activities *in vitro* and *ex vivo* [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2005, 19(1): 19-24.

[8] Pyo M Y, Kim H J, Back S K, et al. Downregulation of peritoneal macrophage activity in mice exposed to bisphenol A during pregnancy and lactation [J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30(11): 1476-81.

[9] Liu Y, Mei C, Liu H, et al. Modulation of cytokine expression in human macrophages by endocrine-disrupting chemical Bisphenol-A [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 451(4): 592-88.

[10] Le H H, Carlson E M, Chua J P, et al. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons [J]. *Toxicol Lett*, 2008, 176(2): 149-56.

Accumulation of adipose tissue macrophages in obese mice induced by bisphenol A

Li Yingpei, Luo Shimeng, Leng Yinzhi, et al

(Dept of Health Toxicology, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the accumulation of macrophages in the adipose tissue from the obese mice induced by low-dose bisphenol A (BPA) intake through potable water. **Methods** Four-week C57BL/6 male mice were randomly divided into normal diet (ND) group and high fat diet (HFD) group. Each group was further divided into vehicle control, 10 nmol/L BPA, 100 nmol/L BPA and 1 000 nmol/L BPA group. Mice were exposed to BPA through drinking water. After 20 weeks, mice were weighed and sacrificed. The epididymis fat pad was obtained under sterile conditions. The infiltration of inflammatory cells in adipose tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. IL-6 expression in adipose tissues was detected by immunohistochemistry. The proportion of macrophages in stromal vascular fractions (SVF) was analyzed by flow cytometry. **Results** In ND and HFD groups, the body weight and coefficients of epididymis fat pad in BPA exposed mice were significantly increased compared with the corresponding control, and as a dose-dependent manner. The volumes of adipocytes and gap between adipocytes were exaggerated. Infiltration of inflammatory cells in adipose tissue was observed in BPA treated mice. In addition, BPA exposure upregulated IL-6 expression in adipose tissue and elevated the percentages of macrophages in SVF. **Conclusion** Low-dose BPA exposure can induce obesity in mice, which is associated with the accumulation of macrophages in adipose tissue.

Key words bisphenol A; inflammation; adipose tissue macrophages