

双酚 A 不同昼夜节律时间点暴露对小鼠肝脏脂质代谢的影响

张岩¹, 王敏², 周梦雅², 卢智田², 李旭东², 张慧红², 吴帆², 庄润璇², 何志妮², 李文学¹, 杨光宇¹, 朱伟¹, 张波²

1. 广州市疾病预防控制中心毒理与生化检验部, 广东 广州 510440

2. 南方医科大学公共卫生学院食品安全与健康研究中心, 广东 广州 510515

摘要:

[背景] 肝脏脂质代谢呈现昼夜变化, 昼夜节律影响环境化学物的肝毒性。

[目的] 观察不同昼夜节律时间点双酚 A (BPA) 暴露对小鼠肝脏、血液脂质代谢指标影响的差异, 探索昼夜节律核心基因在 BPA 干扰肝脏脂质代谢中的作用机制。

[方法] 首先选用 35 只雌性 C57BL/6J 小鼠在 24 h 光照周期内(光照/黑暗为 12 h/12 h)每隔 4 h 处死 5 只, 收集肝脏组织, 检测昼夜节律核心基因 *Rev-erba*、*Bmal1*、*Clock* 及调控脂质代谢关键转录因子基因 *Srebp1c*、*Chrebp* 在 24 h 内不同昼夜节律时间点的表达。随后, 将 30 只雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为 6 组, 每个时间点设置对照组、BPA 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 和 BPA 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组。分别于开灯 3 h 后(ZT3, 光照期)和关灯 3 h 后(ZT15, 黑暗期)两个时间点经口灌胃 BPA, 每日灌胃 1 次, 连续 4 周。实验期间小鼠自由饮食, 每周测量体重。实验结束后在 ZT3 收集血浆, 分离肝组织, 测定生化指标, 检测肝昼夜节律核心基因和脂质代谢基因 mRNA 表达水平。

[结果] 小鼠肝脏 *Rev-erba*、*Bmal1* 和 *Clock* 以及 *Srebp1c*、*Chrebp* 转录水平呈现 24 h 昼夜节律。ZT3 和 ZT15 BPA 染毒 4 周均未引起小鼠体重、血浆葡萄糖、血浆总胆固醇、血浆低密度脂蛋白胆固醇和血浆甘油三酯明显改变($P>0.05$)。ZT3 染毒时, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ BPA 组小鼠血浆高密度脂蛋白胆固醇含量较对照组降低了 14.56%($P<0.05$)。ZT15 染毒时, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ BPA 组小鼠肝脏甘油三酯含量较对照组增加了 115.20%($P<0.05$)。与对照组相比, ZT3 染毒时, BPA 组 *Srebp1c* mRNA 表达下调; ZT15 染毒时, BPA 组 *Chrebp*、*Srebp1c*、*Acc1* mRNA 表达上调($P<0.05$)。ZT3 染毒时, BPA 组 *Bmal1* mRNA 表达上调, *Rev-erba* mRNA 表达下调; 而 ZT15 染毒时, BPA 组 *Bmal1* mRNA 表达下调, *Rev-erba* mRNA 表达上调($P<0.05$)。

[结论] 不同昼夜节律时间点 BPA 暴露对小鼠肝脏脂质代谢的影响不同。黑暗期染毒引起肝脏脂质沉积, 可能的机制是干扰 *Rev-erba* 和 *Bmal1* 构成的昼夜节律反馈环路, 上调调控脂质合成的核受体 *Srebp1c* 和 *Chrebp* 及其靶基因 *Acc1* 表达水平, 促进肝脏脂质沉积。

关键词: 双酚 A; 脂质代谢; 昼夜节律; 肝脏

Effects of bisphenol A exposure at different circadian time on hepatic lipid metabolism in mice
ZHANG Yan¹, WANG Min², ZHOU Mengya², LU Zhitian², LI Xudong², ZHANG Huihong², WU Fan², ZHUANG Runxuan², HE Zhini², LI Wenxue¹, YANG Guangyu¹, ZHU Wei¹, ZHANG Bo² (1. Department of Toxicological and Biochemical Test, Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong 510440, China; 2. Food Safety and Health Research Center, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract:

[Background] Lipid metabolism in liver shows circadian-dependent profiles. The hepatotoxicity of environmental chemicals is dependent on circadian time.

[Objective] To observe the effects of bisphenol A (BPA) exposure at different zeitgeber time (ZT) on hepatic and blood lipid metabolism and decipher the underlying mechanisms related to circadian rhythm in mice.

[Methods] Thirty-five female C57BL/6J mice were sacrificed every 4 h in a light-dark cycle (12 h/12 h). The liver tissues were collected to describe the circadian profiles of hepatic *Rev-erba*, *Bmal1*, *Clock*, *Srebp1c*, and *Chrebp* mRNA expression levels within 24 h. Thirty female mice were



DOI 10.11836/JEOM22248

基金项目

国家自然科学基金面上项目(81773403); 广东省重点领域研发计划项目(2019B020210003); 广州市医学重点学科建设项目(2021202312)

作者简介

并列第一作者。
张岩(1988—), 男, 硕士, 主管医师;
E-mail: zhangyan52@vip.qq.com
王敏(1995—), 女, 硕士生;
E-mail: wangmin274415@163.com

通信作者

朱伟, E-mail: gzcdc_zhuw@gz.gov.cn
张波, E-mail: cnzhangbo@126.com

伦理审批

已获取
利益冲突 无申报
收稿日期 2022-06-19
录用日期 2022-09-13

文章编号 2095-9982(2022)12-1336-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

张岩, 王敏, 周梦雅, 等. 双酚 A 不同昼夜节律时间点暴露对小鼠肝脏脂质代谢的影响[J]. 环境与职业医学, 2022, 39(12): 1336-1342.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM22248

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHU Wei, E-mail: gzcdc_zhuw@gz.gov.cn
ZHANG Bo, E-mail: cnzhangbo@126.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2022-06-19

Accepted 2022-09-13

To cite

ZHANG Yan, WANG Min, ZHOU Mengya, et al. Effects of bisphenol A exposure at different circadian time on hepatic lipid metabolism in mice [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(12): 1336-1342.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM22248

divided into 6 groups by the timing (ZT3 represents the 3 h after light on, ZT15 represents the 3 h after light off) and dose (50 or 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) of BPA exposure to observe hepatotoxicity. Mice were gavaged with designed doses of BPA once per day for 4 weeks. Mice were maintained with *ad libitum* access to food and water and measured body weight weekly. After the experiment, mice were euthanatized and liver tissues were separated to determine the biochemical indicators of lipid metabolism and lipid metabolism- and circadian-related gene mRNA expressions.

[Results] Hepatic *Rev-erba*, *Bmal1*, *Clock*, *Srebp1c*, and *Chrebp* mRNA expression levels were rhythmic during a 24 h period in mice. At ZT3 and ZT15, BPA did not alter body weight, plasma glucose, plasma total cholesterol, plasma low density lipoprotein cholesterol, and plasma triglycerides ($P > 0.05$). The plasma high density lipoprotein cholesterol decreased in the 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ BPA group at ZT3 by 14.56% compared with the control group ($P < 0.05$). The liver triglycerides increased in the 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ BPA group at ZT15 by 115.20% compared with the control group ($P < 0.05$). BPA decreased *Srebp1c* mRNA expression level when dosing at ZT3 and increased *Chrebp*, *Srebp1c*, and *Acc1* mRNA expression levels when dosing at ZT15 compared with the control group ($P < 0.05$). BPA increased *Bmal1* mRNA expression level and decreased *Rev-erba* mRNA expression level at ZT3 exposure and decreased *Bmal1* and increased *Rev-erba* mRNA expression level at ZT15 exposure ($P < 0.05$).

[Conclusion] BPA exposure at light or dark period has different effects on hepatic lipid metabolism in mice. Hepatic lipid deposit appears when BPA is dosed at dark period. *Rev-erba*-*Bmal1* regulation circuits and the subsequent upregulation of *Srebp1c* and *Chrebp* and the target gene *Acc1* may be involved.

Keywords: bisphenol A; lipid metabolism; circadian rhythm; liver

昼夜节律是指生物体的生理、生化和行为呈现以 24 h 为周期的变化,在器官水平上分为中枢节律和外周节律,中枢节律是指下丘脑视交叉上核中细胞的昼夜节律。光照是最重要的中枢授时因子,并通过激素释放等机制使机体各器官昼夜节律保持同步化^[1]。细胞昼夜节律呈现自主性,在基因层面由多个转录-翻译正、负反馈环路构成,转录因子脑和肌肉组织芳香烃受体核转运体类似蛋白 1 (brain and muscle ARNT-like protein 1, BMAL1) 和昼夜活动输出周期障碍蛋白 (circadian locomotor output cycles kaput, CLOCK) 异二聚体与染色体上增强子区域 (enhancer-box, E-box) 结合,激活包括节律抑制因子 *Rev-erba* 的转录,REV-ERB α 蛋白进入细胞核抑制 *Bmal1* 转录,形成最重要的负反馈环路,维持昼夜节律的稳定性^[2-3]。该环路还在体温调节、胰岛素分泌、葡萄糖稳态和脂质代谢等生理功能调节中发挥重要作用^[4-5]。

肝脏是重要的代谢器官,肝细胞对脂肪酸的摄取、氧化、合成及释放过程在基因转录水平受到昼夜节律基因的精细调控^[6-7]。REV-ERB α 作为串联昼夜节律与代谢的重要因子,其缺失将导致肝脏脂肪变性^[8-9],而 *Bmal1* 缺失将加重小鼠高脂饮食诱导的胰岛素抵抗和肝脏脂质沉积^[10]。肝脏 *Bmal1* 特异敲除小鼠肝脏和血液中甘油三酯 (triglycerides, TG) 和胆固醇含量升高,重新在肝脏表达 *Bmal1* 能够缓解上述症状^[7,11]。本课题组前期通过改变实验室光照周期引起小鼠昼夜节律紊乱,发现 4 周处理导致小鼠在光照期空腹血糖和肝糖原含量升高,部分肝脏糖和脂质代谢相关基因表达的时相前移,如 *Foxo1* 和 *Ppara* 分别前移 2.54 h 和 1.06 h^[12]。

双酚 A (bisphenol A, BPA) 是大量生产并在生活中

广泛使用的工业化学品,其在人群中的检出率已经超过 90%^[13],BPA 可干扰肝脏的脂质代谢稳态^[14-15]。美国国家健康与营养调查 (2005—2014 年) 的数据显示,相对于尿液 BPA 含量最低四分位的人群,尿液 BPA 含量处于第三、第四分位的人群非酒精性脂肪肝风险分别升高 69% ($OR=1.69$, 95%CI=1.39~2.04) 和 44% ($OR=1.44$, 95%CI=1.19~1.76)^[16]。韩国国家环境健康调查 (2015—2017 年) 的研究结果类似,尿液中 BPA 含量最高的四分位人群,相对于尿液含量最低的四分位人群,非酒精性脂肪肝风险升高 32% ($OR=1.32$, 95%CI=1.03~1.70)^[17]。基于中国人群的队列研究观察到成年人尿液 BPA 浓度与中心型肥胖、糖脂代谢紊乱的发病风险呈正相关^[18-20]。

动物实验也观察到 BPA 暴露可引起肝脏脂质代谢紊乱。早期一项研究发现 6 周龄雄性 CD-1 小鼠经食物暴露于 5、50、500、5000 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ BPA 28 d,在低剂量范围内 (5、50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) 肝脏 TG 含量增加,肝脏脂质合成基因 (*Fas*、*Acaca*、*Scd* 等) 表达升高, *Ppara* 表达水平下降,而 *Ppar γ* 表达水平上升,转录因子 *Srebp1c*、*Srebp2* 和 *Chrebp* 表达水平升高^[21]。但在既往研究中,有关 BPA 暴露引起肝脏脂质沉积的结果也有不同报道。Marmugi 等^[22]在 2014 年发表的研究中报道雄性 CD-1 小鼠在经口暴露 50、500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ BPA 8 个月观察到肝脏重量无明显变化,但肝脏总胆固醇 (total cholesterol, TC) 含量增加,胆固醇合成基因 *Lss*、*Hmgcr* 和 *Sqle* 表达上调; Lin 等^[23]观察到雄性 C57BL/6J 小鼠经口给予 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ BPA 90 d 后肝脏重量增加,肝脏 TG 含量增加而 TC 水平未见明显变化。

昼夜节律紊乱与 BPA 暴露是肝脏脂质沉积的独

立危险因素,但二者的联合效应并不清楚。课题组前期研究发现光照周期改变和 BPA 暴露均可促进雌性小鼠肝脏脂质沉积,其机制可能与肝脏 *Acaca*、*Cyp7a1*、*Srebp1c* 和 *Srebp2* 基因 mRNA 表达水平改变有关,但基因之间交互调控机制未得到深入研究^[24]。

本研究以雌性 C57BL/6J 小鼠为研究对象,首先观察昼夜节律核心基因及肝脏脂质代谢调节基因表达的昼夜节律;然后在 12 h/12 h 的实验室光照周期中,选择开灯 3 h 后(光照期)和关灯 3 h 后(黑暗期)两个时间点进行 BPA 染毒,探索不同昼夜节律时间点 BPA 暴露对小鼠肝脏脂质代谢的影响及机制。

1 对象与方法

1.1 动物

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)雌性 C57BL/6J 小鼠购于广东省医学实验动物中心,合格证号为: NO.44007200067346,饲养于广州市疾病预防控制中心屏障级实验动物设施,室温(22±2)℃,相对湿度 50%~75%,严格控制光照/黑暗(12 h/12 h),开灯时间为当地时间早上 7 点,关灯时间为当地时间晚上 7 点。实验期间动物自由饮水进食。实验前小鼠经检疫程序在屏障设施环境中适应喂养 2 周。本实验方案由广州市疾病预防控制中心动物伦理委员会审查批准,批准日期 2019-03-08。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与准备 分别以北京时间 7: 00 和 19: 00 为光照开始(记为 ZT0)和结束(记为 ZT12)时间。首先开展昼夜节律基线实验,采用随机数表法根据体重随机将小鼠分为 7 个组,每组 5 只,分别在 ZT0、ZT4、ZT8、ZT12、ZT16、ZT20、ZT24(即下一个周期的 ZT0)时间点处死,获取小鼠基因昼夜节律振荡情况,确定后续实验染毒时间。随后开展 BPA 染毒实验,光照期染毒时间点为 ZT3,黑暗期染毒时间点为 ZT15。采用随机数表法根据体重将 30 只雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为 6 组,每组 5 只。BPA(美国 Sigma-Aldrich)溶解于玉米油中,染毒剂量为 50、500 μg·kg⁻¹·d⁻¹,分别在 ZT3、ZT15 给予灌胃处理,每天 1 次,连续 4 周。

1.2.2 体重测定 在每周第 1 天进行体重测定,第 2 周开始单笼饲养小鼠观察活动情况。

1.2.3 生物样品采集 在实验结束时,小鼠提前禁食 24 h,不禁水。对于基线实验小鼠,从 ZT0 开始, ZT24 截止,每隔 4 h 处死一组小鼠。对于 BPA 染毒实验小鼠,在 ZT3 处死。根据体重,每只行 1%戊巴比妥钠(美

国 Sigma-Aldrich)溶液腹腔内注射麻醉,经下腔静脉采血,离心后收集血浆。采血完毕后,收集肝脏并称重,样品液氮急冻后保存于-80℃冰箱。

1.2.4 血生化指标分析及肝组织 TG 水平检测 取收集的血浆,解冻后,采用葡萄糖检测试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)检测试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)检测试剂盒、TG 检测试剂盒、TC 检测试剂盒(广州东林)在全自动生化分析仪(美国 Drew Scientific)测定血浆葡萄糖、LDL-C、HDL-C、TG、TC 水平。取收集的肝组织,按照组织 TG 酶法测定试剂盒(北京普利莱)说明书操作步骤,加入裂解液研磨成匀浆,取上清稀释 5 倍后,用酶标仪在 550 nm 波长下测定各孔光密度,计算肝组织 TG 含量,采用蛋白浓度校正含量。

1.2.5 肝组织基因表达水平检测 取收集的小鼠肝组织,加入 Trizol(美国 Thermo Fisher)提取总 RNA 并定量分析后,采用逆转录试剂盒(日本 Takara)将 RNA 逆转录为 cDNA。采用实时荧光定量 PCR 法测定脂质代谢及昼夜节律相关基因的表达。按照说明书设计总量为 10 μL 的反应体系,每个样品设 3 个复孔。所有操作均在冰上进行。运行参数: ①50℃、2 min, 95℃、10 min, 1 个循环; ②95℃、15 s, 60℃、1 min, 重复 40 个循环; ③95℃、15 s, 60℃、1 min, 95℃、15 s, 1 个循环; 获得熔解曲线。内参为 β-肌动蛋白(β-actin), 计算 2^{-ΔΔCt} 获得目的基因的相对表达水平。引物由上海捷瑞生物技术公司合成。本研究检测脂质代谢基因 *Chrebp*、*Srebp1c*、*Fasn*、*Acc1*、*Cpt1a*、*Ldlr* 和昼夜节律相关基因 *Bmal1*、*Clock*、*Rev-erba*。引物序列见表 1。

表 1 引物序列表(5'-3')		
Table 1 Table of primer sequences (5'-3')		
基因名称(Gene name)	正向引物(Forward primer)	反向引物(Reverse primer)
<i>Acc1</i>	CGATCTATCCGTCGGTGGTC	GGAGGGCCCATGAAAGCAAT
<i>Fasn</i>	AGACCCGAAGTCCAAGTTATTC	GCAGCTCCTTGATACCTCTCC
<i>Ldlr</i>	ATCCACCGCAACATCTACTG	GGAACAGTGTCTCTCTTTAC
<i>Cpt1a</i>	CCAACGGGCTCATCTTCTAATC	TGGGTACAAAGCACCCATTAC
<i>Srebp1c</i>	TGACCCGGCTATTCCGTGA	CTGGGCTGAGCAATACAGTTC
<i>Chrebp</i>	GATCCGACACTCACCCACC	CCCGGCATAGCAACTTGAGG
<i>Clock</i>	GAGTGTTTCAGTCCCTTGATGAG	GCTGTGTCCCTATGACCATTT
<i>Bmal1</i>	CAACCCATACACAGAAGCAAAAC	CATCTGCTGCCCTGAGAATTA
<i>Rev-erba</i>	GGGCACAAGCAACATTACCA	CACGTCCCCACACCTTAC
<i>β-actin</i>	GAGGTATCCTGACCTGAAGTA	CACACGCAGCTCATTGTAGA

1.3 统计学分析

采用 SigmaPlot 14.0 进行余弦分析和曲线拟合分

析基因的节律性, 绘制昼夜节律相位图。采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, GraphPad 7.0 绘制图。不同组别不同时间点体重比较采用重复测量设计资料的方差分析; 多组间血浆生化指标、肝脏 TG、基因表达水平比较采用单因素方差分析, 组间均数两两比较采用 LSD 检验或 Dunnett T3 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 昼夜节律基线实验

昼夜节律相关基因 *Bmal1*、*Clock*、*Rev-erba* 及脂

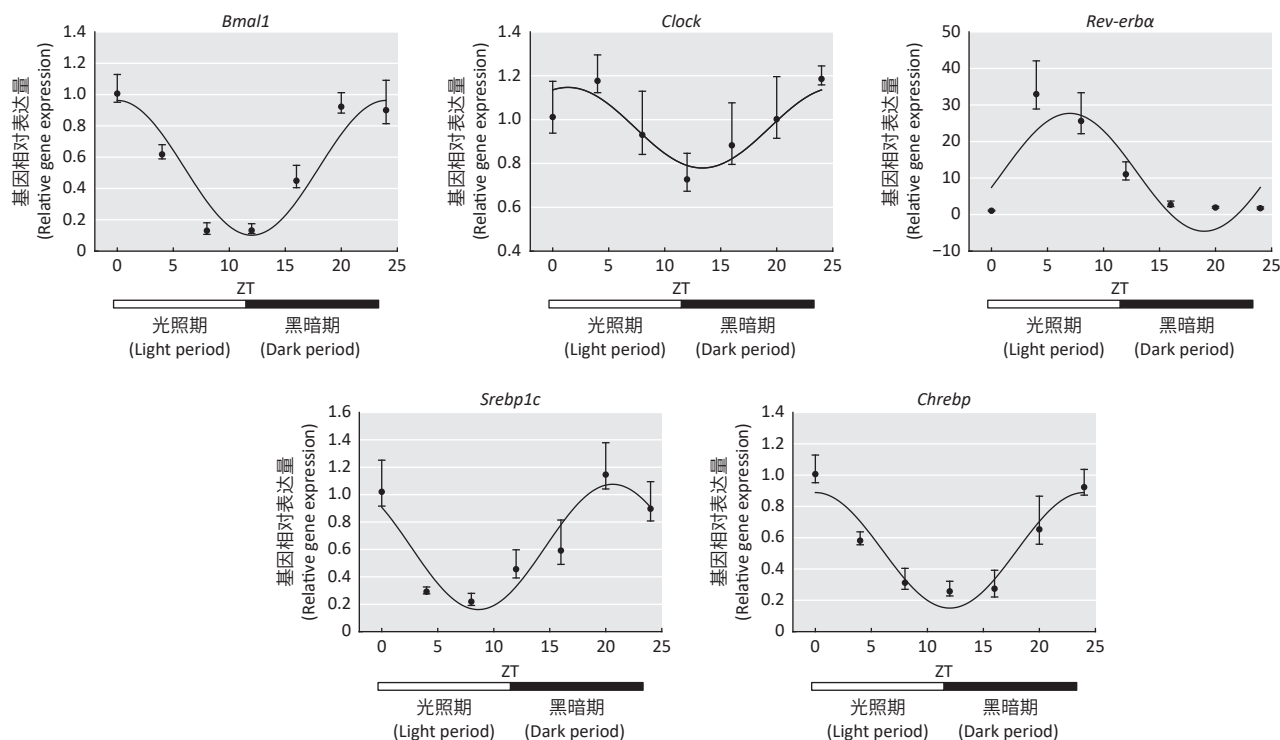


图1 小鼠基线情况下昼夜节律基因和脂质代谢基因的 24 h 表达情况 ($n=5$)

Figure 1 24 h circadian and lipid metabolism gene expressions in mice under baseline conditions ($n=5$)

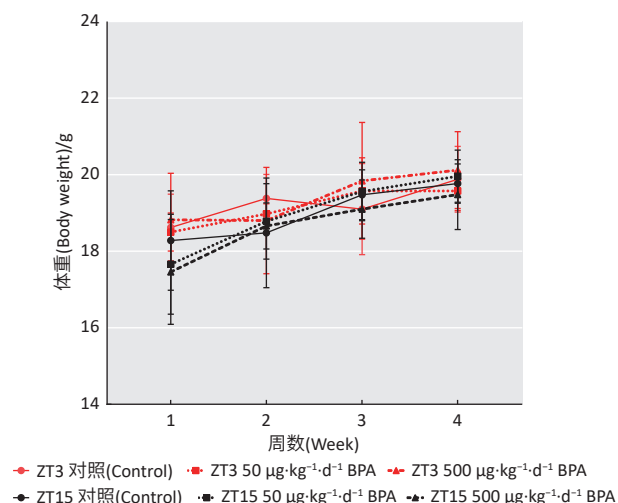


图2 小鼠连续 4 周 BPA 染毒后的体重变化 ($n=5$)

Figure 2 Body weight changes of mice exposed to BPA for 4 weeks ($n=5$)

质代谢的转录因子编码基因 *Chrebp*、*Srebp1c* 转录呈现节律性。*Bmal1*、*Clock* 和 *Chrebp* 转录水平峰相位在 ZT0, *Rev-erba* 转录水平峰相位在 ZT8, *Srebp1c* 表达水平峰相位在 ZT20。见图 1。

2.2 BPA 染毒实验

2.2.1 小鼠体重 实验期间, 各组小鼠精神状态良好, 饮食进水正常。不同灌胃时间点各 BPA 染毒组小鼠体重与各自的对照组相比, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 2。

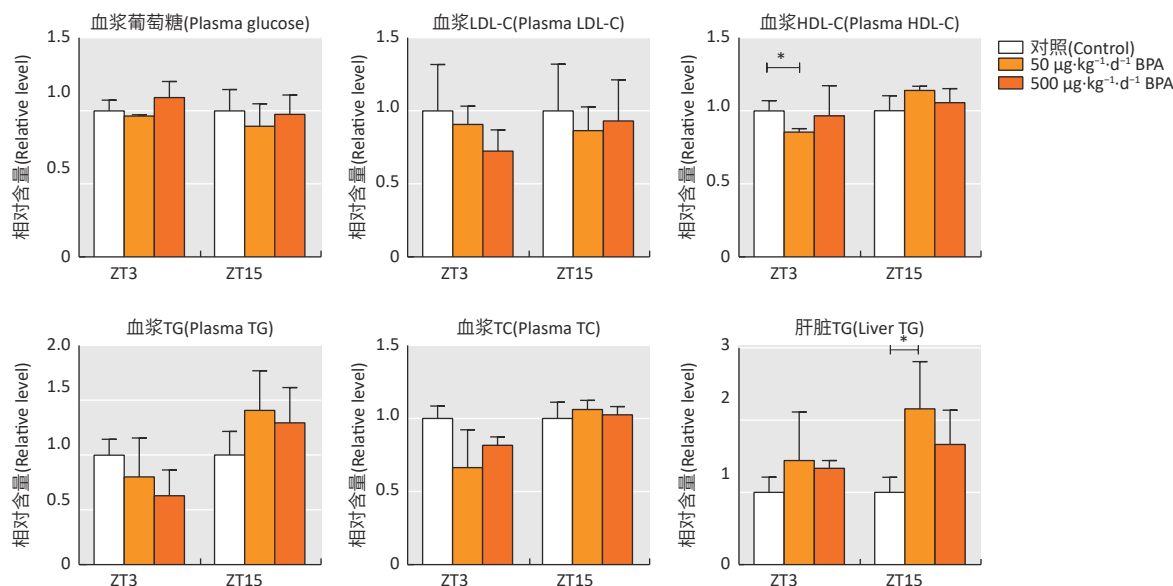
2.2.2 血浆及肝脏生化指标 与对照组相比, BPA 染毒组小鼠血浆葡萄糖、LDL-C、TG、TC 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与对照组相比: ZT3 染毒时 $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ BPA 染毒组小鼠血浆 HDL-C 含量降低了 14.56% ($P<0.05$); ZT3 染毒时 BPA 染毒组小鼠肝脏 TG 含量没有明显变化 ($P=0.056$), 但 ZT15 染毒时 $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ BPA 组的小鼠肝脏 TG 含量增加了 115.20% ($P<0.05$)。见图 3。

2.2.3 肝脏脂质代谢和昼夜节律相关基因表达 在脂质代谢基因表达方面, ZT3 染毒时 50、 $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ BPA 组小鼠 *Srebp1c* mRNA 表达较对照组分别下调了 38.60%、32.66% ($P<0.05$), 而在 ZT15 染毒时分别上调了 75.48% 和 74.23% ($P<0.05$); ZT15 染毒时 50、 $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ BPA 组 *Chrebp* mRNA 表达较对照组分别上调了 86.40% 和 135.40% ($P<0.05$), $500 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ BPA 组 *Acc1* mRNA

表达较对照组上调了 74.20% ($P < 0.05$)。见图 4。

在昼夜节律相关基因表达方面, ZT3 染毒时 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ BPA 组小鼠 *Bmal1* mRNA 表达较对照组上调了 119.96%, *Rev-erba* mRNA 表达下调了 55.87%

($P < 0.05$), 而 ZT15 染毒时 50、500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组小鼠 *Bmal1* mRNA 表达较对照组分别下调了 59.56%、27.81%, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组小鼠 *Rev-erba* mRNA 表达上调了 33.27% ($P < 0.05$)。见图 5。

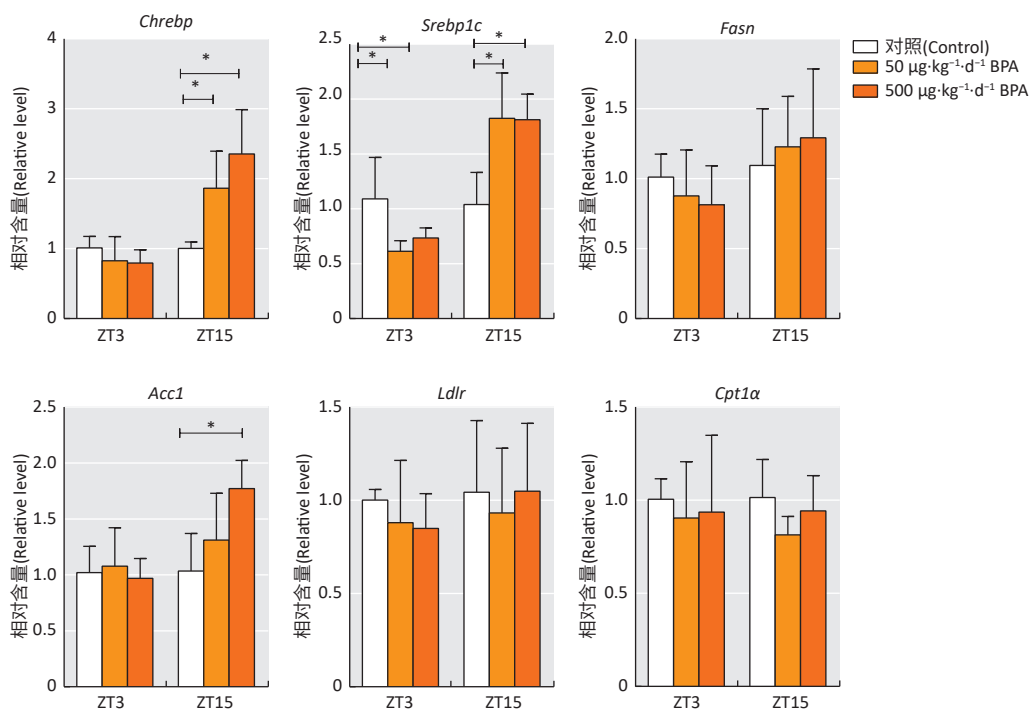


[注] *: $P < 0.05$. ZT3: 开灯 3 h 后(光照期)染毒; ZT15: 关灯 3 h 后(黑暗期)染毒。

[Note] *: $P < 0.05$. ZT3: Exposure at 3 h after light on (light period); ZT15: Exposure at 3 h after light off (dark period).

图 3 小鼠 BPA 灌胃 4 周后血浆及肝脏生化指标 ($n=5$)

Figure 3 Plasma and liver biochemical indicators in mice by gavaging BPA for 4 weeks ($n=5$)

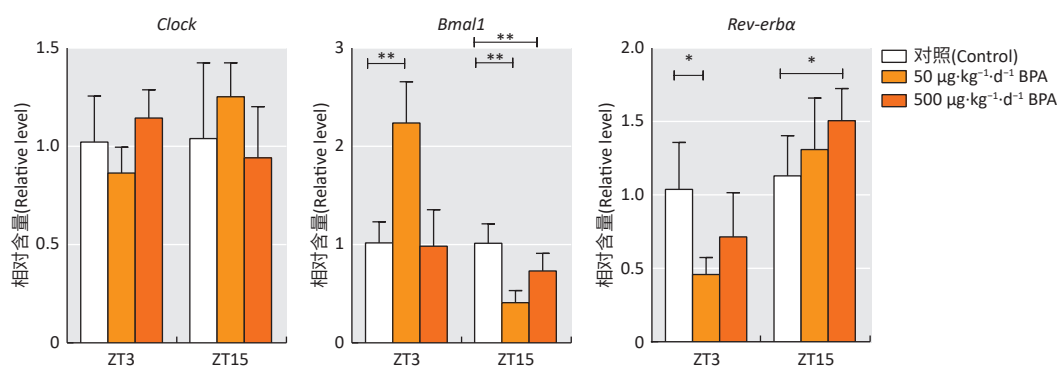


[注] *: $P < 0.05$. ZT3: 开灯 3 h 后(光照期)染毒; ZT15: 关灯 3 h 后(黑暗期)染毒。

[Note] *: $P < 0.05$. ZT3: Exposure at 3 h after light on (light period); ZT15: Exposure at 3 h after light off (dark period).

图 4 小鼠 BPA 灌胃 4 周后肝脏脂质代谢基因表达情况 ($n=5$)

Figure 4 Relative mRNA expressions of hepatic lipid metabolism genes in mice by gavaging BPA for 4 weeks ($n=5$)



[注] *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。ZT3: 开灯 3 h 后(光照期)染毒; ZT15: 关灯 3 h 后(黑暗期)染毒。

[Note] *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$. ZT3: Exposure at 3 h after light on (light period); ZT15: Exposure at 3 h after light off (dark period).

图 5 小鼠 BPA 灌胃 4 周后肝脏昼夜节律基因表达情况 ($n=5$)

Figure 5 Relative mRNA expressions of hepatic circadian genes in mice by gavaging BPA for 4 weeks ($n=5$)

3 讨论

BPA 是一种具有类雌激素效应的环境内分泌干扰物, 人群流行病学研究显示 BPA 暴露与肥胖、2 型糖尿病、非酒精性脂肪肝等相关^[25], 课题组前期动物实验也发现 BPA 暴露可导致肝脏脂质沉积^[21, 24]。本研究旨在比较不同昼夜节律时间点 BPA 染毒对小鼠肝脏脂质代谢的影响, 发现黑暗期 BPA 染毒上调小鼠昼夜节律关键基因 *Rev-erba*, 下调 *Bmal1*, 上调脂质代谢基因 *Srebp1c* 和 *Chrebp* 及其靶基因 *Acc1* 表达水平, 促进肝脏脂质沉积; 而在光照期染毒则下调 *Rev-erba*, 上调 *Bmal1*, 进而抑制 *Srebp1c* 转录, 肝脏脂质沉积不显著。

近年来许多研究表明外源性化学物的毒性与染毒时间存在一定的关联, 在相同的剂量、染毒方式下, 由于不同昼夜节律时间点机体对外源化学物的敏感性不同, 从而造成毒效应的不同, 融合时间生物学和毒理学研究方法探讨外源性化学物与机体内源性昼夜节律相互作用的“时间毒理学”的概念逐渐受到重视^[26-27]。本研究显示 ZT15 BPA 染毒时小鼠肝脏 TG 含量升高, ZT3 染毒时则没有这种改变, 表明小鼠黑暗期暴露于 BPA 对肝脏脂质代谢影响更大。肝脏昼夜节律与脂质代谢密切相关, 但调节机制尚未阐明。SREBP1c 和 ChREBP 是调节肝脏脂肪从头合成 (de-novo lipogenesis, DNL) 的主要转录因子, 直接激活脂肪酸合成酶基因 *Acc1* 和 *Fasn* 的转录, 促进 DNL, 引起肝脏脂质沉积^[28]。昼夜节律抑制因子 REV-ERBα 作为核受体直接参与脂质代谢基因的转录调控, 也可通过与其他昼夜节律因子构成的转录-翻译反馈环路间接参与肝脏代谢的调控^[29-30]。昼夜节律因子 BMAL1 通过 *Srebp1c*、*Chrebp* 调节胆固醇和脂质稳态相关基因

的表达, 肝脏 *Bmal1* 特异敲除小鼠肝脏中 *Srebp1c*、*Chrebp* 表达下降^[31-32]。本研究观察到 ZT15 染毒时, 小鼠肝脏 *Rev-erba* mRNA 表达水平在 BPA 染毒组中升高, *Bmal1* mRNA 表达水平在 BPA 染毒组降低, *Srebp1c*、*Chrebp* mRNA 表达水平显著上调, 靶基因 *Acc1* mRNA 表达水平也相应地上调, 而在 ZT3 染毒时 BPA 暴露未引起上述基因 mRNA 表达水平发生显著变化, 提示小鼠肝脏在 ZT15 时间点对 BPA 更敏感。Nguyen 等^[33]的研究中观察到生命早期 BPA 暴露干扰肝脏昼夜节律信号通路及脂质代谢通路, 显示肝脏昼夜节律和脂质代谢均为 BPA 的毒性靶点。有研究提示 REV-ERBα 可以抑制 BPA 主要代谢解毒酶尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸基转移酶 2B (uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase, UGT2B) 活性^[34], 有助于解释 ZT15 染毒时 BPA 对小鼠肝脏脂质代谢影响更加显著的现象。

本研究的不足之处包括: 一是采用灌胃染毒对小鼠造成紧张刺激可能会影响代谢指标, 虽然组间处理方式一致, 具有可比性, 但不能排除染毒方式与染毒时间的交互作用; 二是采用单一性别小鼠, 无法观察性别差异; 三是仅在两个时间点观察 BPA 暴露的毒性效应, 没有全面评价脂质代谢的昼夜节律变化。

综上, 本研究观察了小鼠正常情况下肝脏基因昼夜表达水平变化规律, 发现黑暗期 (ZT15) 暴露 BPA 更容易引起肝脏脂质沉积。通过 mRNA 检测发现在 ZT15 时间点染毒, BPA 处理影响昼夜节律基因 *Rev-erba* 和 *Bmal1* 的表达, 扰乱了昼夜表达规律, DNL 基因 *Srebp1c* 和 *Chrebp* 及其靶基因 *Acc1* 表达水平升高, 促进了肝脏脂质沉积。本研究提示在化学品毒性测试时应根据毒性终点的昼夜节律选择合适的染毒时间。

参考文献

- [1] BASS J, LAZAR MA. Circadian time signatures of fitness and disease[J]. *Science*, 2016, 354(6315): 994-999.
- [2] PANDA S. Circadian physiology of metabolism[J]. *Science*, 2016, 354(6315): 1008-1015.
- [3] PARTCH CL, GREEN CB, TAKAHASHI JS. Molecular architecture of the mammalian circadian clock[J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(2): 90-99.
- [4] SERIN Y, ACAR TN. Effect of circadian rhythm on metabolic processes and the regulation of energy balance[J]. *Ann Nutr Metab*, 2019, 74(4): 322-330.
- [5] SEGERS A, DEPOORTERE I. Circadian clocks in the digestive system[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(4): 239-251.
- [6] TAHARA Y, SHIBATA S. Circadian rhythms of liver physiology and disease: experimental and clinical evidence[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13(4): 217-226.
- [7] GUAN D, LAZAR MA. Interconnections between circadian clocks and metabolism[J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(15): e148278.
- [8] ZHANG Y, FANG B, EMMETT MJ, et al. GENE REGULATION. Discrete functions of nuclear receptor Rev-erb α couple metabolism to the clock[J]. *Science*, 2015, 348(6242): 1488-1492.
- [9] FENG D, LIU T, SUN Z, et al. A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism[J]. *Science*, 2011, 331(6022): 1315-1319.
- [10] JACOBI D, LIU S, BURKEWITZ K, et al. Hepatic Bmal1 regulates rhythmic mitochondrial dynamics and promotes metabolic fitness[J]. *Cell Metab*, 2015, 22(4): 709-720.
- [11] PAN X, BRADFIELD CA, HUSSAIN MM. Global and hepatocyte-specific ablation of Bmal1 induces hyperlipidaemia and enhances atherosclerosis[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13011.
- [12] ZHONG LX, LI XN, YANG GY, et al. Circadian misalignment alters insulin sensitivity during the light phase and shifts glucose tolerance rhythms in female mice[J]. *PLoS One*, 2019, 14(12): e0225813.
- [13] COLORADO-YOHAR SM, CASTILLO-GONZÁLEZ AC, SÁNCHEZ-MECA J, et al. Concentrations of bisphenol-A in adults from the general population: a systematic review and meta-analysis[J]. *Sci Total Environ*, 2021, 775: 145755.
- [14] HANIOKA N, NAITO T, NARIMATSU S. Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in bisphenol A glucuronidation[J]. *Chemosphere*, 2008, 74(1): 33-36.
- [15] LIU J, LI J, WU Y, et al. Bisphenol A metabolites and bisphenol S in paired maternal and cord serum[J]. *Environ Sci Technol*, 2017, 51(4): 2456-2463.
- [16] KIM D, YOO ER, LI AA, et al. Elevated urinary bisphenol A levels are associated with non-alcoholic fatty liver disease among adults in the United States[J]. *Liver Int*, 2019, 39(7): 1335-1342.
- [17] AN SJ, YANG EJ, OH S, et al. The association between urinary bisphenol A levels and nonalcoholic fatty liver disease in Korean adults: Korean National Environmental Health Survey (KoNEHS) 2015-2017[J]. *Environ Health Prev Med*, 2021, 26(1): 91.
- [18] LU S, YU Y, REN L, et al. Estimation of intake and uptake of bisphenols and triclosan from personal care products by dermal contact[J]. *Sci Total Environ*, 2018, 621: 1389-1396.
- [19] WANG B, LI M, ZHAO Z, et al. Urinary bisphenol A concentration and glucose homeostasis in non-diabetic adults: a repeated-measures, longitudinal study[J]. *Diabetologia*, 2019, 62(9): 1591-1600.
- [20] HAO M, DING L, XUAN L, et al. Urinary bisphenol A concentration and the risk of central obesity in Chinese adults: a prospective study[J]. *J Diabetes*, 2018, 10(6): 442-448.
- [21] MARMUGIA, DUCHEIXS, LASSERRE F, et al. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver[J]. *Hepatology*, 2012, 55(2): 395-407.
- [22] 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: 133-143.
- [23] LIN Y, DING D, HUANG Q, et al. Downregulation of miR-192 causes hepatic steatosis and lipid accumulation by inducing SREBF1: Novel mechanism for bisphenol A-triggered non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, 1862(9): 869-882.
- [24] 周梦雅, 钟礼信, 章霞, 等. 光照周期改变与双酚A联合暴露对雌性小鼠肝脏脂质代谢影响[J]. *中国职业医学*, 2021, 48(2): 135-142.
- ZHOU MY, ZHONG LX, ZHANG X, et al. The effects of photoperiodism and exposure to bisphenol A on hepatic lipid metabolism in female mice[J]. *China Occup Med*, 2021, 48(2): 135-142.
- [25] MA Y, LIU H, WU J, et al. The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms[J]. *Environ Res*, 2019, 176: 108575.
- [26] LIN Y, ZHOU Z, YANG Z, et al. Circadian Cyp3a11 metabolism contributes to chronotoxicity of hyponitine in mice[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 308: 288-293.
- [27] DALLMANN R, OKYAR A, LÉVI F. Dosing-Time makes the poison: circadian regulation and pharmacotherapy[J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22(5): 430-445.
- [28] ISHII S, IIZUKA K, MILLER BC, et al. Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(44): 15597-15602.
- [29] KOJETIN DJ, BURRIS TP. REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(3): 197-216.
- [30] LE MARTELOT G, CLAUDEL T, GATFIELD D, et al. REV-ERB α participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis[J]. *PLoS Biol*, 2009, 7(9): e1000181.
- [31] ZHANG D, TONG X, NELSON BB, et al. The hepatic BMAL1/AKT/lipogenesis axis protects against alcoholic liver disease in mice via promoting PPAR α pathway[J]. *Hepatology*, 2018, 68(3): 883-896.
- [32] SHI D, CHEN J, WANG J, et al. Circadian clock genes in the metabolism of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 423.
- [33] NGUYEN HT, LI L, EGUCHI A, et al. Effects of gestational exposure to bisphenol A on the hepatic transcriptome and lipidome of rat dams: Inter-generational comparison of effects in the offspring[J]. *Sci Total Environ*, 2022, 826: 153990.
- [34] ZHANG T, GUO L, YU F, et al. The nuclear receptor Rev-erb α participates in circadian regulation of Ugt2b enzymes in mice[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 161: 89-97.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 王晓宇)