

◇ 预防医学研究 ◇

双酚 A 对小鼠腹腔巨噬细胞极化影响的体外研究

李美玲¹ 李应配¹ 冷银芝¹ 蒋建华² 朱启星³ 沈 彤^{1,3}

摘要 目的 探讨体外实验条件下,双酚 A(BPA)对小鼠腹腔巨噬细胞极化的影响。方法 提取 C57BL/6J 雄性小鼠腹腔巨噬细胞,用(10 ng/ml)干扰素- γ (IFN- γ)和(500 ng/ml)细菌脂多糖(LPS)诱导其向 M1 型极化;用(10 ng/ml)白介素-4(IL-4)诱导其向 M2 型极化;同时加入 0.1、1、10 μ mol/L BPA 处理细胞,并设立空白对照组和溶剂对照组。流式细胞术检测 M1 型和 M2 型巨噬细胞比例,ELISA 法检测 M1 型和 M2 型巨噬细胞各自分泌的诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和精氨酸酶(Arg-1)活性。结果 不同浓度 BPA 促进 IFN- γ 和 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞向 M1 型极化,1、10 μ mol/L BPA 组 M1 型巨噬细胞比例较空白对照组分别升高 11.3% 和 17.4%,M1 型巨噬细胞分泌的 iNOS 活性分别升高 1.95 和 2.29 倍,差异均有统计学意义。不同浓度 BPA 抑制 IL-4 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞向 M2 型极化,1、10 μ mol/L BPA 组 M2 型巨噬细胞比例分别较空白对照组降低 9.0% 和 14.3%,M2 型巨噬细胞分泌的 Arg-1 活性分别下降 0.37 和 0.49 倍,差异均有统计学意义。结论 体外条件下,低剂量 BPA 促进小鼠腹腔巨噬细胞向 M1 型极化,抑制其向 M2 型极化。

关键词 双酚 A;巨噬细胞;极化

中图分类号 R 114

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)06-0782-05

双酚 A(bisphenol A,BPA)是高产量化学物之一,主要作为合成聚碳酸酯塑料和聚丙烯树脂的单体,广泛用于饮料和食物容器的内衬、医疗设备以及热敏纸等的制造^[1]。研究^[2]显示 BPA 已成为一种普遍存在的环境污染物,人类广泛暴露于 BPA。BPA 是一种公认的环境内分泌干扰物,可对内分泌、神经行为、免疫功能、生殖发育等产生危害^[3]。最近,环境 BPA 暴露与肥胖的关系受到广泛关注^[4-5],但具体机制仍然不清楚。研究^[6]表明肥胖

是全身慢性低度炎症的病理状态,主要表现为脂肪组织巨噬细胞浸润;而巨噬细胞在脂肪组织的聚集和浸润与其极化状态明显相关。巨噬细胞可分为经典激活的 M1 型(F4/80⁺CD11c⁺CD206⁻)和替代激活的 M2 型(F4/80⁺CD11c⁻CD206⁺),其中 M1 型特征性表达 CD11c,主要产生肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)- α 、白介素(interleukin,IL)-6 和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthases,iNOS)等促炎因子,发挥促炎作用;M2 型相对高表达 CD206,主要分泌精氨酸酶(arginase,Arg)-1、IL-10 和转化生长因子(transforming growth factor,TGF)- β 等抗炎因子,发挥抗炎作用^[7]。然而,BPA 暴露对巨噬细胞极化有何影响目前未见报道。该研究采用体外研究的方法,通过检测不同剂量 BPA 处理的小鼠腹腔巨噬细胞表面表达的分子及分泌的细胞因子的改变,探讨 BPA 暴露对巨噬细胞极化的影响,为阐明 BPA 暴露导致肥胖等代谢紊乱性疾病的发病机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 BPA(99.9%分析纯)购自天津市大茂化学试剂厂;二甲亚砜(dimethylsulfoxide,DMSO)购自美国 AMRESCO 公司;不同浓度 BPA 用 DMSO(终浓度不超过 1%)助溶;DMEM 培养基和胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)购自美国 HyClone 公司;青霉素和链霉素购自华北制药华胜公司;胰酶购自江苏海门碧云天公司;异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FTTC)标记的抗小鼠 CD11c 抗体、抗小鼠 CD206 抗体、藻红蛋白(phycoerythrin,PE)标记的抗小鼠 F4/80 抗体购自美国 Bionlegend 公司;iNOS 和 ARG-1 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自苏州卡尔文生物科技有限公司;干扰素- γ (interferon-gamma,IFN- γ)和白介素-4(interleukin-4,IL-4)购自美国 Peprotech 公司;细菌脂多糖(lipopolysaccharides,LPS)购自美国 Sigma 公司;Beckman Coulter 流式细胞仪购自美国 Beckman 公司;CO₂ 培养箱购自美国 SHELL/JB 公司; μ Quant 酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司;倒置显微镜购自德

2015-04-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81473015)

作者单位:安徽医科大学公共卫生学院¹ 卫生毒理学系³ 职业卫生与环境卫生学系,合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院临床营养科,合肥 230022

作者简介:李美玲,女,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

国 OLYMPUS 公司。

1.2 小鼠腹腔巨噬细胞的分离培养 SPF 级健康 6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠购自安徽省实验动物中心。颈椎脱臼处死小鼠,75%酒精浸泡 2~3 min,无菌条件下向腹部注入含双抗(100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素)的 DMEM 培养基,轻揉腹部 2~3 min 静置 5 min 后,用注射器抽取腹腔液约 4 ml;常温下 1 000 r/min 离心 8 min 弃上清液,用含双抗的 DMEM 培养基洗涤 1 遍。再用含 10% FBS 和双抗的 DMEM 培养液调整细胞至所需浓度,接种于 12 孔培养板,37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱培养 3 h。弃上清液, PBS 洗 2 遍,用含 10% FBS 和双抗的 DMEM 培养液培养。

1.3 小鼠腹腔巨噬细胞体外极化的诱导及 BPA 处理 细胞培养 24 h 后,用 10 ng/ml 的 IFN- γ 和 500 ng/ml 的 LPS 诱导其向 M1 型极化,用 10 ng/ml 的 IL-4 诱导其向 M2 型极化。在加入诱导剂的同时用 0.1、1、10 μ mol/L 的 BPA 处理细胞,用 DMSO 作溶剂对照。诱导向 M1 型极化时,先用 10 ng/ml 的 IFN- γ 诱导 24 h,再加入 500 ng/ml 的 LPS 刺激细胞 24 h,然后收集上清液和细胞。诱导向 M2 型极化时,用 10 ng/ml 的 IL-4 诱导 24 h 后收集上清液和细胞。

1.4 流式细胞术检测 M1 型和 M2 型巨噬细胞比例 细胞用 PBS 洗后将浓度调至 5×10^5 个/管。检测 M1 型时,细胞悬液中加入 1 μ l FITC-抗小鼠 CD11c 抗体和 5 μ l PE-抗小鼠 F4/80 抗体;检测 M2 型时,加 1 μ l FITC-抗小鼠 CD206 抗体和 5 μ l PE-抗小鼠 F4/80 抗体,常温下避光孵育 30 min, PBS 重悬。Beckman Coulter 流式细胞仪检测,Cell Quest 软件分析 M1 型(F4/80⁺ CD11c⁺)和 M2 型(F4/80⁺ CD206⁺)巨噬细胞比例。

1.5 ELISA 法检测细胞上清液 iNOS 和 Arg-1 活性 用 ELISA 法试剂盒检测上清液 iNOS 和 Arg-1 活性,按说明书操作。酶标仪检测吸光度(absorbance A)值,用标准曲线计算活性。

1.6 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),两组间均数比较采用两独立样本的 *t* 检验。

2 结果

2.1 体外诱导小鼠腹腔巨噬细胞向 M1 型和 M2 型极化结果 用 IFN- γ (10 ng/ml) 和 LPS (500 ng/

ml) 诱导小鼠腹腔巨噬细胞向 M1 型极化,流式细胞术显示诱导后 M1 型细胞比例较诱导前升高 2.50 倍,差异有统计学意义($t = 8.073, P = 0.001$); M1 型巨噬细胞分泌的 iNOS 活性诱导后较诱导前升高 5.2 倍,差异有统计学意义($t = 25.228, P < 0.001$)。

用 IL-4 (10 ng/ml) 诱导小鼠腹腔巨噬细胞向 M2 型极化,流式细胞术测定显示诱导后 M2 型细胞比例较诱导前升高 2.33 倍,差异有统计学意义($t = 8.827, P < 0.01$); M2 型巨噬细胞分泌的 Arg-1 活性诱导后较诱导前升高 7.87 倍,差异有统计学意义($t = 11.550, P < 0.01$),见表 1。

表 1 诱导前后 M1 和 M2 比例
以及相应的细胞因子活性($n = 3, \bar{x} \pm s$)

项目	细胞比例(%)		细胞因子活性(U/L)	
	M1	M2	iNOS	Arg-1
诱导前	19.27 \pm 3.46	18.33 \pm 3.85	0.45 \pm 0.05	0.42 \pm 0.05
诱导后	48.23 \pm 5.16**	42.63 \pm 2.81**	2.36 \pm 0.12**	3.34 \pm 0.43**

与诱导前比较: ** $P < 0.01$

2.2 BPA 对 IFN- γ 和 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞向 M1 型极化的影响 用 IFN- γ 和 LPS 诱导小鼠腹腔巨噬细胞向 M1 型极化,加入 0.1、1、10 μ mol/L 的 BPA,流式细胞术检测结果显示,各组间比较差异有统计学意义($F = 4.342, P = 0.027$)。与空白对照组相比,溶剂对照组和 0.1 μ mol/L BPA 组的 M1 型巨噬细胞比例差异无统计学意义;而 1、10 μ mol/L BPA 组 M1 型巨噬细胞比例分别升高 11.3% 和 17.4%,差异有统计学意义($P = 0.044、0.005$),见图 1。ELISA 法检测不同剂量 BPA 对 IFN- γ 和 LPS 诱导极化的 M1 型巨噬细胞分泌的 iNOS 活性影响,结果显示,各组间比较差异有统计学意义($F = 27.519, P < 0.001$)。与空白对照组相比,溶剂对照组和 0.1 μ mol/L BPA 组 iNOS 活性差异无统计学意义;而 1、10 μ mol/L BPA 组 iNOS 活性分别升高 1.95 和 2.29 倍,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。

2.3 BPA 对 IL-4 诱导小鼠腹腔巨噬细胞向 M2 型极化的影响 用 IL-4 诱导小鼠腹腔巨噬细胞向 M2 型极化,加入 0.1、1、10 μ mol/L 的 BPA,流式细胞术检测结果显示,各组间比较差异有统计学意义($F = 6.229, P = 0.011$)。与空白对照组相比,溶剂对照组和 0.1 μ mol/L BPA 组的 M2 型巨噬细胞比例差异无统计学意义;而 1、10 μ mol/L BPA 组 M2 型巨噬细胞比例分别降低 9% 和 14.3%,差异有统计学

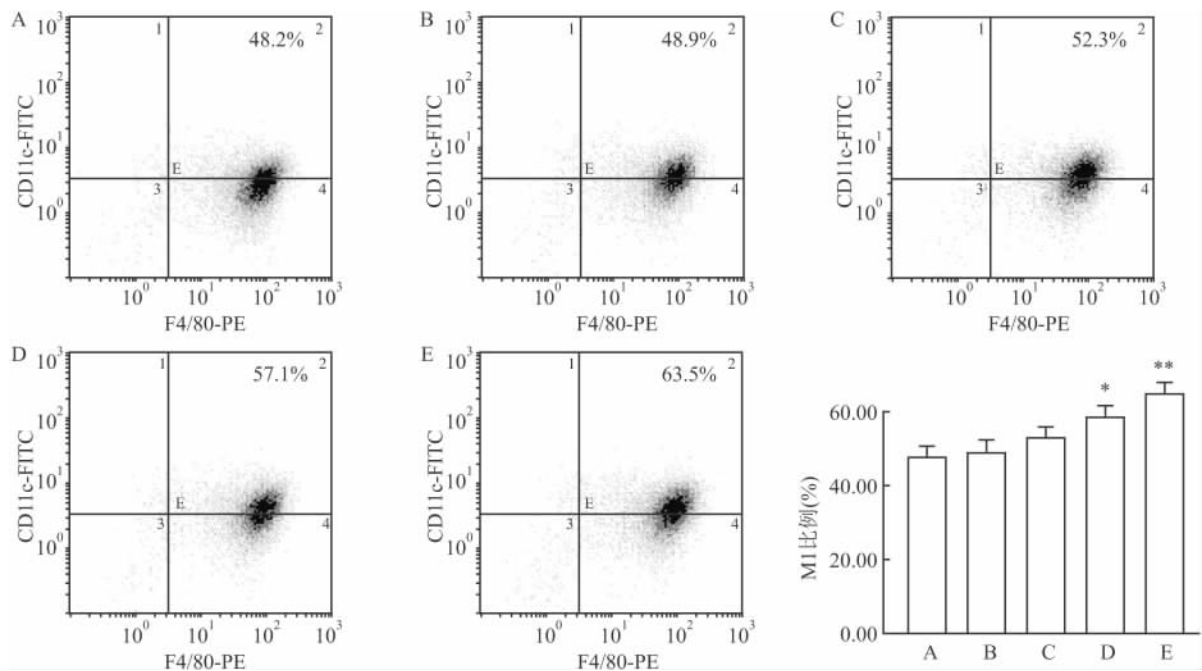


图1 流式细胞术检测不同浓度 BPA 对 IFN-γ 和 LPS 诱导极化的 M1 型巨噬细胞比例的影响

A:空白对照组;B:溶剂对照组;C:0.1 μmol/L BPA 组;D:1 μmol/L BPA 组;E:10 μmol/L BPA 组;与空白对照组比较: * P < 0.05 , ** P < 0.01

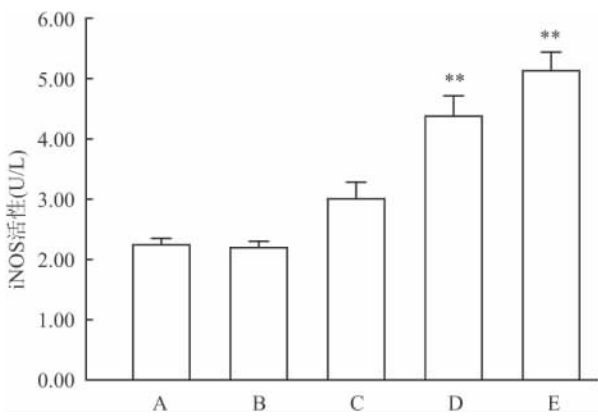


图2 不同浓度 BPA 对 M1 型巨噬细胞分泌 iNOS 活性的影响

A: 空白对照组;B:溶剂对照组;C:0.1 μmol/L BPA 组;D:1 μmol/L BPA 组;E: 10 μmol/L BPA 组;与空白对照组比较: ** P < 0.01

3 讨论

全球范围内流行的肥胖以及由此引起的代谢综合征,引领“环境致肥胖因子”领域研究的迅猛发展。人群研究^[8-9]显示较高的尿 BPA 浓度与超重、肥胖、胰岛素抵抗和糖尿病显著相关;动物试验^[10-11]也显示,生命早期接触 BPA 与体重增加和脂肪沉积显著相关;围产期暴露于认为安全水平的 BPA,在正常饮食条件下,会导致子代成年时体重和血清胰岛素增加,葡萄糖耐量受损;在高脂饮食条件下,以上有害作用加速加重,而且出现肥胖、高脂血症、高血糖、高胰岛素血症和葡萄糖抵抗等代谢综合征症状。研究 BPA 致肥胖的发病机制,对预防和治疗 BPA 诱导的肥胖及相关代谢综合征有十分重要的理论和现实意义。

在高脂饮食或外源化学物作用下,脂肪组织中脂肪细胞肥大,刺激脂肪组织分泌脂肪因子和更多的促炎因子,诱导巨噬细胞由外周循环进入脂肪组织并使其激活;激活的巨噬细胞可分泌更多的 IL-6、TNF-α 等多种炎症因子,诱发机体低度炎症和进一步发展成胰岛素抵抗和代谢综合征^[6]。巨噬细胞在脂肪组织中的聚集和激活与其亚型相关,而巨噬细胞的亚型受其极化状态的调控。在不同微环境

意义($P = 0.035, 0.003$),见图 3。ELISA 法检测不同剂量 BPA 对 IL-4 诱导极化的 M2 型巨噬细胞分泌的 Arg-1 活性影响,结果显示,各组间比较有差异($F = 15.080, P < 0.001$)。与空白对照组相比,溶剂对照组和 0.1 μmol/L BPA 组 Arg-1 活性差异无统计学意义,而 1、10 μmol/L BPA 组 Arg-1 活性分别下降 0.37 和 0.49 倍,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 4。

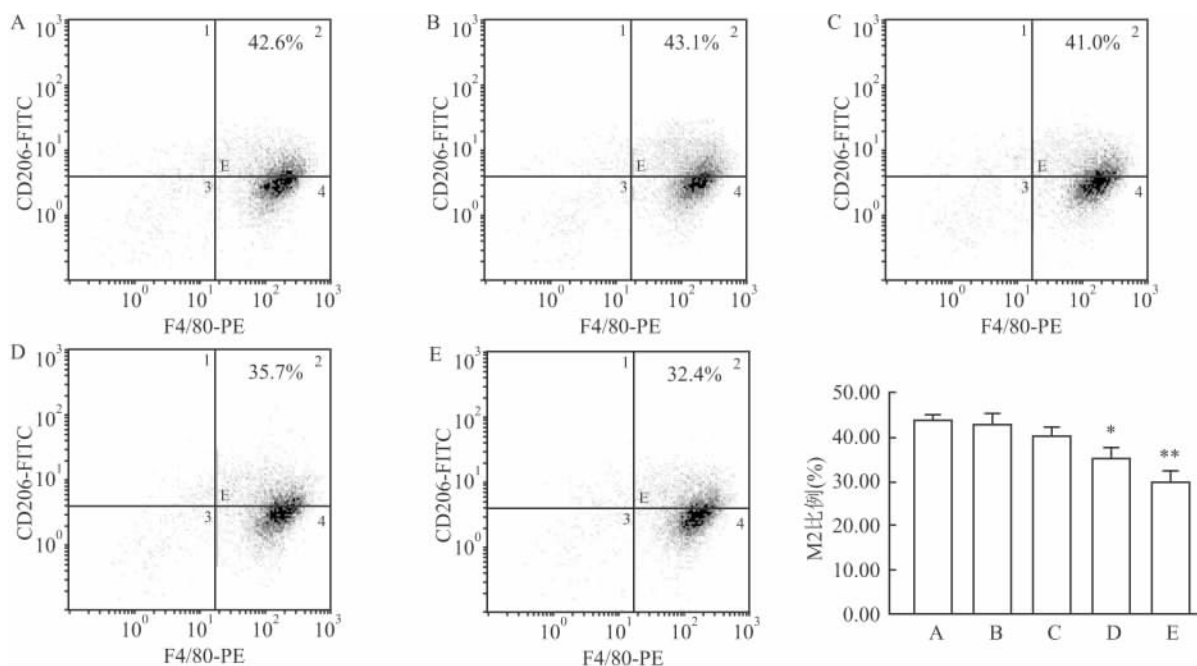


图3 流式细胞术检测不同浓度BPA对IL-4诱导极化的M2型巨噬细胞比例的影响

A: 空白对照组 M2; B: 溶剂对照组; C: 0.1 μmol/L BPA 组; D: 1 μmol/L BPA 组; E: 10 μmol/L BPA 组; 与空白对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

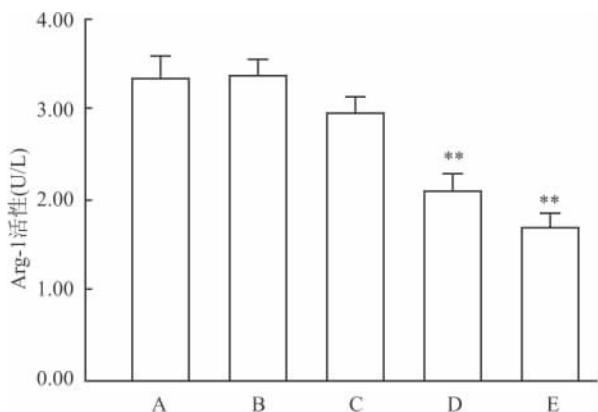


图4 不同浓度BPA对M2型巨噬细胞分泌的Arg-1活性的影响

A: 空白对照组; B: 溶剂对照组; C: 0.1 μmol/L BPA 组; D: 1 μmol/L BPA 组; E: 10 μmol/L BPA 组; 与空白对照组比较: ** P < 0.01

下 静息巨噬细胞可激活极化为 M1 或 M2 型; 而且在合适条件下, 不同的表型之间还可以发生相互转换^[12]。研究^[13]显示正常或瘦脂肪组织中巨噬细胞主要为 M2 型, 而在肥胖发生和发展中 M2 型向 M1 型发生转换, 导致 M1 型明显增多且聚集在脂肪细胞周围形成皇冠状结构; 表明巨噬细胞的极化状态改变即不同功能的巨噬细胞亚型之间的相互转换是介导肥胖中巨噬细胞聚集和激活的重要机制。

本研究采用分离的 C57BL/6J 小鼠腹腔巨噬细胞, 在体外培养条件下, 用 IFN-γ 和 LPS 诱导其向 M1 型极化, 用 IL-4 诱导其向 M2 型极化, 诱导极化的同时加入不同剂量的 BPA, 探讨了 BPA 对体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞极化的影响。结果显示不同浓度 BPA 促进 IFN-γ 和 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞向 M1 型极化, 与空白对照相比, 1、10 μmol/L BPA 处理组 M1 型巨噬细胞比例明显升高, 分泌的 iNOS 活性也明显, 差异均有统计学意义。不同浓度 BPA 抑制 IL-4 诱导小鼠腹腔巨噬细胞向 M2 型极化, 与空白对照相比, 1、10 μmol/L BPA 处理组 M2 型巨噬细胞比例明显下降, 分泌的 Arg-1 活性也显著下降, 差异均有统计学意义。

本研究结果表明体外条件下, 低剂量 BPA 对小鼠腹腔巨噬细胞极化有明显影响, 促进其向 M1 型极化, 抑制其向 M2 型极化。这些结果虽为阐明 BPA 诱导肥胖及相关的代谢综合征发病机制提供了一定的研究线索, 但 BPA 诱导肥胖过程中, 对巨噬细胞极化的影响、在其中的作用及具体机制还需进行整体实验和流行病学研究加以阐明。

参考文献

[1] Geens T, Goeyens L, Covaci A. Are potential sources for human

- exposure to bisphenol-A overlooked? [J]. *Int J Hyg Environ Health* 2011 ,214(5) :339 -47.
- [2] Vandenberg L N ,Chahoud L ,Heindel J J ,et al. Urinary , circulating , and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A [J]. *Environ Health Perspect* 2010 ,118(8) : 1055 -70.
- [3] Rogers J A , Metz L , Yong V W. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms [J]. *Mol Immunol* 2013 ,53(4) :421 -30.
- [4] Lakind J S , Goodman M , Mattison D R. Bisphenol A and indicators of obesity , glucose metabolism/type 2 diabetes and cardiovascular disease: A systematic review of epidemiologic research [J]. *Crit Rev Toxicol* 2014 ,44(2) :121 -50.
- [5] Trasande L , Attina T M , Blustein J. Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents [J]. *JAMA* 2012 ,308(11) : 1113 -21.
- [6] Gregor M F , Hotamisligil G S. Inflammatory mechanisms in obesity [J]. *Ann Rev Immunol* 2011 ,29: 415 -45.
- [7] Wynn T A , Chawla A , Pollard J W. Macrophage biology in development , homeostasis and disease [J]. *Nature* , 2013 , 496 (7446) : 445 -55.
- [8] Harley K G , Aguilar Schall R , Chevrier J , et al. Prenatal and postnatal bisphenol A exposure and body mass index in childhood in the CHAMACOS cohort [J]. *Environ Health Perspect* ,2013 , 121(4) :514 -20.
- [9] Wang T , Li M , Chen B , et al. Urinary bisphenol A (BPA) concentration associates with obesity and insulin resistance [J]. *J Clin Endocrinol Metab* ,2012 ,97(2) :E223 -7.
- [10] 李云 , 房魏 , 李美玲 , 等. 出生前后母鼠饮水摄入双酚 A 对子代未成年期体重的影响 [J]. *安徽医科大学学报* ,2013 ,48(11) :1333 -5.
- [11] Wei J , Lin Y , Li Y , et al. Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet [J]. *Endocrinology* 2011 ,152(8) : 3049 -61.
- [12] Han M S , Jung D Y , Morel C , et al. JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation [J]. *Science* 2013 ,339(6116) :218 -22.
- [13] Fujisaka S , Usui I , Bukhari A , et al. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice [J]. *Diabetes* 2009 ,58(11) :2574 -82.

Effects of bisphenol A on polarization of mice peritoneal macrophage *in vitro*

Li Meiling , Li Yingpei , Leng Yinzhi , et al

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

Abstract Objective To explore the effect of bisphenol A (BPA) on the polarization of mice peritoneal macrophage *in vitro*. **Methods** Peritoneal macrophages isolated from C57BL/6J male mice were stimulated with murine (10 ng/ml) IFN- γ and LPS (500 ng/ml) for induction of M1-type macrophages , and (10 ng/ml) IL-4 for M2-type , respectively. Meanwhile cells were treated with 0.1 , 1 and 10 μ mol/L BPA , blank control group and vehicle control group were established at the same time. The proportions of M1-type and M2-type macrophages were determined by FACS analysis , the activities of iNOS (cytokines secreted by M1) and Arg-1 (cytokines secreted by M2) were measured by ELISA assay. **Results** Different concentrations of BPA promoted M1-type polarization of mice peritoneal macrophage induced by IFN- γ and LPS. Compared with the blank control group , M1 type proportion was increased by 11.3% and 17.4% , and iNOS activity was elevated by 1.95 and 2.29 times in 1 and 10 μ mol/L BPA group respectively , and the differences were statistically significant. Different concentrations of BPA inhibited M2-type polarization of mice peritoneal macrophage induced by IL-4. Compared with the blank control group , M2 type proportion was decreased by 9% and 14.3% and Arg-1 activity was reduced by 0.37 and 0.49 times in 1 and 10 μ mol/L BPA group respectively , and the differences were statistically significant. **Conclusion** Low dose exposure of BPA can promote M1-type polarization of mice peritoneal macrophage , while inhibit M2-type polarization *in vitro*.

Key words bisphenol A; macrophages; polarization