

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2026.08.018

β -羟基丁酸缓解双酚 A 致肝脏脂质沉积

王梦雅, 谷小珍

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:双酚 A(BPA)是一种环境内分泌干扰物,可导致肝脏脂质代谢紊乱,而 β -羟基丁酸(β -HB)是在禁食期间,主要由脂肪酸 β 氧化供应能量而产生的酮。文章研究了 β -HB 的摄入对双酚 A 暴露小鼠肝脏的影响,并分析了其影响机制。该研究将 C57 小鼠分为对照组、BPA 组、 β -HB 组、 β -HB+BPA 组,通过 HE 和油红 O 染色以鉴定小鼠体内的脂质沉积。实验结果表明,与空白对照组相比,BPA 组在小鼠体内产生肝脏脂质积聚,而补充的 β -HB 可通过抑制组蛋白去乙酰化酶 HDAC2 来缓解 BPA 暴露导致的脂质沉积。该研究有助于提升公众对环境污染健康危害的认知,也为环境因素致肝脏脂质代谢损伤的治疗提供了理论依据。

关键词:环境内分泌干扰物; β -羟基丁酸(β -HB);双酚 A(BPA);肝脏;脂质代谢

中图分类号:Q943.2

文献标志码:A

文章编号:1003-5060(2026)08-1130-05

β -HB relieves liver lipid deposition caused by bisphenol A

WANG Mengya, GU Xiaozhen

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: Bisphenol A (BPA) is an environmental endocrine disruptor that can cause disturbances in liver lipid metabolism. During fasting, β -Hydroxybutyrate (β -HB) is the primary ketone body produced through fatty acid β -oxidation to supply energy. This paper investigates the effect of β -HB intake on the liver of mice exposed to BPA and the underlying mechanisms. C57 mice were used and divided into four groups: control, BPA, β -HB, and β -HB+BPA. The lipid deposition in mice was identified through HE and Oil Red O staining. The experimental results showed that compared with the blank control group, the BPA group induced liver lipid accumulation in mice, while β -HB supplementation alleviated lipid accumulation caused by BPA exposure through inhibiting histone deacetylase HDAC2. This study helps to enhance public understanding of the impact of environmental pollution on health, and provides new strategies for the treatment of liver lipid metabolism disorders caused by environmental factors.

Key words: environmental endocrine disruptors (EEDs); β -Hydroxybutyrate (β -HB); bisphenol A (BPA); liver; lipid metabolism

双酚 A(BPA)是一种环境内分泌干扰物,其可以通过摄入、母婴传播、吸入、皮肤接触和眼睛接触等方式影响人体各个系统。环境中 BPA 的分布十分普遍,可以在水体、土壤和空气被发现^[1]。研究显示,BPA 可以干扰多种代谢相关通

路,从而扰乱代谢相关基因、蛋白质和酶的表达,导致肝脏脂质代谢紊乱^[2]。BPA 可以影响肝脏中胆固醇和脂肪酸的生物合成^[3]。

肝脏疾病在全球最常见的死亡原因中排第 11 位,全球发病率排第 15 位^[4]。虽然肝病有

收稿日期:2024-04-01;修回日期:2024-05-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(82273666)

作者简介:王梦雅(1998—),女,安徽铜陵人,合肥工业大学硕士生;

谷小珍(1990—),女,安徽合肥人,博士,合肥工业大学讲师,通信作者,E-mail: xiaozhen@mail.hfut.edu.cn.

许多病因,但非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)所占的比例一直在迅速增长^[5]。自1987年首次发现NAFLD以来^[6],它的发病率急剧上升,据估计,目前全世界有25%的成年人患NAFLD^[7-8]。NAFLD是一种以肝脏脂肪沉积为主要特征的疾病,其发病机制涉及遗传、环境、生活方式和代谢因素等多种因素。脂肪代谢紊乱是NAFLD发生、发展的核心,NAFLD往往伴随着脂肪氧化能力受损、慢性炎症的发生、氧化应激^[9]。而 β -羟基丁酸(β -HB)是脂肪酸 β 氧化产生的主要酮体,具有抗氧化、抗炎和促进脂肪氧化等多种生物学功能^[10],有助于改善NAFLD的病理状态。在人体中,当肌肉和肝脏的糖原储存耗尽后,脂肪酸从脂肪细胞中被动员出来,并被运输到肝脏中转化为酮体,其中包括 β -HB。脂肪酸通过 β 氧化途径进入线粒体,经过一系列反应被氧化成为乙酰辅酶A。乙酰辅酶A在Krebs循环中代谢受限的情况下,会转化为 β -HB, β -HB的代谢和合成受到多种酶的调节,其中一些关键的调节酶包括 β -羟基丁酸脱氢酶(BDH1)、乙酰辅酶A羟基酶(HADH1)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A羧化酶(HMG-CoA合成酶)、4-乙酰-CoA羟基酶(ACH)^[10]。有研究表明, β -HB给药4周后的小鼠内脏脂肪质量减少了16%,脂肪细胞体积减小了30%, β -HB降低了血清中的脂解产物^[11]。

本文研究了 β -HB对BPA暴露导致的小鼠NAFLD修复作用,对研究 β -HB缓解BPA导致的NAFLD具有重要的意义,不仅可以为NAFLD的治疗提供新的思路和方法,还有助于阐明NAFLD的发病机制及应对环境污染带来的健康风险,并指导临床实践。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及细胞

实验所用C57小鼠(雄)从安徽医科大学动物实验中心获得,喂养在恒温25℃,光照12h/黑暗12h的SPF级动物房内,将小鼠分为对照组、BPA组、 β -HB组、 β -HB+BPA组;AML12细胞购于国家鉴定细胞培养物保藏中心。

1.1.2 实验仪器

实验所用仪器有:LD5720冷冻切片机(徕卡仪器(上海)有限公司);高速冷冻离心机(上海天美生化仪器设备工程有限公司);XW-80A旋涡

混合器(上海琪特分析仪器有限公司);小型离心机(上海安亭科学仪器厂);IC Pure超纯水仪(赛默飞世尔科技(中国)有限公司);制冰机(常熟市雪科电器有限公司);电热恒热鼓风干燥箱(上海三发科学仪器有限公司);荧光显微镜(尼康精机(上海)有限公司);冰箱(合肥美的电冰箱有限公司);906GP-ULTS超低温冰箱(赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司);Heracell 240i CO₂恒温培养箱(赛默飞世尔科技(中国)有限公司);二级生物安全柜(美国贝克公司);Tanon 1600化学发光成像仪(上海天能科技有限公司);VE-586电泳转膜槽(上海天能科技有限公司);水平摇床(上海天能科技有限公司);酶标仪(帝肯(上海)实验器材有限公司)。

1.1.3 主要试剂

实验所用主要试剂有: β -HB(上海麦克林生化科技股份有限公司,625-71-8);1×DMEM不完全高糖培养基(江苏凯基生物技术股份有限公司);胰酶细胞消化液(上海碧云天生物技术股份有限公司);澳洲胎牛血清(西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司);脱脂纯牛奶(内蒙古伊利实业集团股份有限公司);PVDF膜(默克股份两合公司(德国达姆施塔特),IPVH00010);双酚A(80-05-7)、TEMED(110-18-9)、硫酸铵(7783-20-2)、Tween20(9005-64-5)、 β -巯基乙醇(60-24-2)、30%丙烯酰胺(A1010)、甘氨酸(G8200)、Tris(T1070)、SDS(S8010)、Triton X-100(T8200)(北京索莱宝科技有限公司);乙腈(分析纯)、氢氧化钠、甘油、甲醇、异丙醇、无水乙醇、DMSO、三氯甲烷均(国药集团化学试剂有限公司)。

主要抗体有:Anti-Hdac2(武汉三鹰生物技术有限公司);Anti-GAPDH(格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司)。

实验所用试剂盒有:BCA蛋白浓度测定试剂盒(BL521A)购于白鲨生物科技有限公司;甘油三酯测定试剂盒(A110-1-1)、总胆固醇测定试剂盒(A111-1-1)、低密度脂蛋白胆固醇测定试剂盒(A113-1-1)、高密度脂蛋白胆固醇测定试剂盒(A112-1-1)、无毒快速油红O染液(D027-1)均购于南京建成生物工程研究所有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 血清培养基的配制

将45 mL DMEM不完全高糖培养液(1×)与5 mL胎牛血清混合均匀,使用0.22 μ m的过滤头和医用注射器过滤,装至无菌的50 mL的Cor-

ning 离心管中,置于 4℃下保存。

1.2.2 AML12 细胞复苏及培养

1) 细胞的复苏。从液氮罐中取出冻存细胞,立刻置于 37℃水浴锅中,左右轻轻摇晃使其受热均匀,约 2 min 后融化;均匀喷洒 75%的酒精后,将冻存管转移到超净工作台内,吹打混匀细胞悬液并转移至 2 mL EP 管中,室温低速离心 3 min (2 000 r/min);使用新鲜培养液重悬细胞并计数,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL 后接种到培养皿中,放置于培养箱静置培养(培养条件为 37℃, 5%CO₂),每 48 h 换液 1 次。

2) 细胞的培养。每 2 d 更换 1 次培养基,保持细胞的正常生长状态;观察细胞的形态和密度,确保细胞的健康生长,当细胞密度达到 80%~90%时,可以传代。用 0.25%胰酶-EDTA 溶液将细胞从培养皿中剥离,并将细胞按 1×10^5 个/mL 种到新的培养皿中,定期检测细胞的纯度、活性和受污染情况。经过适当的培养和传代后,AML12 细胞可用于后续实验处理。

1.2.3 细胞活性的测试

AML12 细胞接种到 96 孔板中,进行 BPA 暴露(0、1、10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$)处理;第 24 小时移除培养基,各孔中加入 100 μL CCK-8 工作溶液(由 90 μL 新鲜完全培养基和 10 μL 的 CCK-8 溶液混合组成),在 37℃、5%CO₂ 的培养箱中孵育 2 h,检测各孔在 450 nm 处的吸光度值。

1.2.4 脂质分泌情况及甘油三酯(TG)定量检测

小鼠肝脏细胞 AML12 以适宜密度接种到 24 孔板进行 BPA(0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)暴露处理,提前 10 min 将油红 O 试剂 1 储备液和稀释液按 5:2 的体积比配制,称为试剂 1 应用液,将该应用液用滤纸过滤待用。移除培养基,向各孔中加入适量试剂 1 应用液染色 15 min,用 37℃蒸馏水清洗 20 s;加入试剂 2 复染液染色 5 min,水洗 1 min;每孔中加入蒸馏水覆盖细胞并镜检。

小鼠肝脏细胞 AML12 接种到 6 孔板,遵循测定试剂盒中说明书步骤检测 TG 质量分数。

1.2.5 实验动物造模

C57 雄鼠适应 1 周后,将其随机分配为对照组(自第 8 周起灌胃 DMSO 至第 20 周,第 18 周起腹腔注射 H₂O 作对照至第 20 周)、BPA 组(自第 8 周起灌胃 BPA(剂量为 500 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$)至第 20 周,第 18 周起腹腔注射 H₂O 至第 20 周)、 β -HB 组(自第 8 周起灌胃 DMSO 至第 20 周,第 18 周起腹腔注

射 β -HB(剂量为 200 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$)至第 20 周)、 β -HB+BPA 组(自第 8 周起灌胃 BPA(剂量为 500 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$)至第 20 周,第 18 周起腹腔注射 β -HB(剂量为 200 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$)至第 20 周)。

1.2.6 血清、肝脏和脂肪组织样本采集

过夜禁食后,将小鼠用二氧化碳窒息处死后采集血样,将血样放入 4℃冰箱过夜后再放入冷冻离心机低温高速离心 15 min(4℃, 12 000 r/min),分离出的血清储存于-80℃冰箱备用。采集的肝脏放入预冷的 1×PBS 洗后称其质量,其中一部分于干冰中速冻后放入-80℃冰箱备用,另一部分置于 4%多聚甲醛中固定,留待染色。附睾脂肪组织使用预冷 1×PBS 清洗后称其质量,其中一部分于干冰中速冻放入-80℃冰箱备用,另一部分置于脂肪组织固定液中固定,留待染色。

1.2.7 肝脏和脂肪组织 HE 染色

肝脏组织和脂肪组织分别置于 4%多聚甲醛和脂肪组织专用固定液中室温固定 48 h;按不同梯度乙醇脱水后浸泡在 65℃的液体石蜡中 1 h 进行浸蜡,结束后置于通风橱中晾干,进行组织包埋;切片(厚度为 5~7 μm),将切片分 2 次各浸于二甲苯中 15 min 进行脱蜡;依次浸泡于无水乙醇、95%乙醇、80%乙醇、75%乙醇、蒸馏水各 2 min;苏木素染色 5 min,水洗;盐酸乙醇分化 30 s,自来水冲洗返蓝;70%乙醇、90%乙醇浸泡各 1 min 脱水;放置于伊红液中 1 min 染色;无水乙醇、二甲苯依次浸泡,进行脱水和透明化;最后中性树胶封片,显微镜观察染色结果。

1.2.8 TG 质量分数测定

TG 质量分数测定遵循测定试剂盒中说明书(南京建成)步骤进行检测。

1.2.9 肝脏组织蛋白提取

剪取适量肝脏组织置于无酶 EP 管中,用剪刀剪碎,加入裂解液,匀浆机破碎组织,置于冰上裂解 1 h,之后低温高速离心(4℃, 14 000 r/min) 20 min,取上清,检测组织蛋白浓度。

1.2.10 蛋白质免疫印迹分析

1) 配胶。将玻璃板清洗干净、晾干并固定于支架上,配制分离胶,混匀后置于两板间隙,加入一定量的异丙醇压胶,室温静置 1 h;配制压缩胶,混匀后置于两板间填满空隙,插入梳子,排干净气泡,室温静置 1 h。

2) 电泳。每孔加入适当蛋白量(总蛋白量 30~50 μg),除蛋白 Marker 外,空余的孔补加 1×SDS sample buffer 使胶保持平衡。浓缩胶电

泳参数为恒压 80 V、350 mA、20 min;分离胶电泳参数为恒压 120 V、400 mA、60 min。

3) 转膜。提前用甲醇浸泡激活 PVDF 膜;按照阴极板—海绵—滤纸—胶—PVDF 膜—滤纸—海绵—阳极板顺序固定并夹紧,每层之间不能留有气泡;转膜参数为恒流 350 mA、400 V、90 min,转膜槽外添加冰水混合物。

4) 封闭。PVDF 膜脱脂牛奶室温封闭 1 h。

5) 孵育。弃去脱脂牛奶,PVDF 膜表面滴加一抗,4℃冰箱孵育过夜;室温二抗孵育 1 h,孵育完毕后再次用 1×PBST 清洗 PVDF 膜。

6) 显影。A 液与 B 液按体积比 1:1 混合,配制显影液;将 PVDF 膜条带放入其中来回晃动均匀沾上显影液,用化学发光成像仪(上海天能生命科学有限公司)进行显影。

1.3 数据分析

采用 GraphPad Prism 8 处理实验数据,用平均值±标准差表示数据;*表示 $P<0.05$;**表示 $P<0.01$;***表示 $P<0.001$;****表示 $P<0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 BPA 对小鼠肝脏脂质代谢的影响

2.1.1 BPA 对 AML12 细胞存活率的影响

用 CCK-8 方法检测不同浓度 BPA 对 AML12 细胞存活率的影响,结果如图 1 所示。

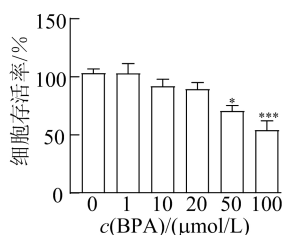


图1 BPA 浓度对 AML12 细胞存活率的影响

图 1 中,BPA 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 即为对照组,下同。从图 1 可以看出,50 $\mu\text{mol/L}$ 以下浓度的 BPA 处理 24 h 对 AML12 细胞的存活率没有显著影响。因此本文选择 20 $\mu\text{mol/L}$ 以下的浓度处理 AML12 细胞进行后续研究。

2.1.2 BPA 对 AML12 细胞脂质代谢的影响

将 AML12 暴露于 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的 BPA 中,24 h 后进行油红 O 染色,结果如图 2 所示。

由图 2 可知,随着 BPA 浓度的升高,AML12 细胞的脂质沉积愈加严重。

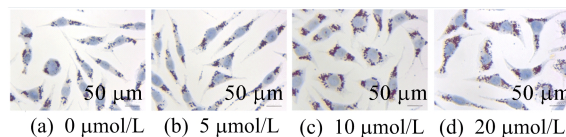


图2 不同浓度 BPA 处理 AML12 细胞油红 O 染色结果

为了进一步验证结果的准确性,本文对 AML12 细胞内 TG 质量分数进行检测,结果如图 3 所示。由图 3 可知,TG 质量分数的检测结果与图 2 结果一致,TG 质量分数也随着 BPA 浓度的升高而升高。

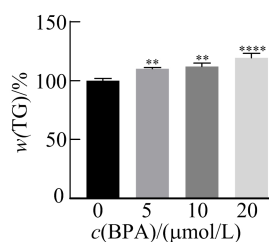


图3 BPA 对 AML12 细胞中 TG 的影响

2.2 β -HB 对 BPA 小鼠肝脏脂质代谢的影响

2.2.1 β -HB 对 BPA 暴露后小鼠肝脏的影响

为了验证 β -HB 对 BPA 暴露后的小鼠脂质代谢的紊乱是否有修复作用,本文对小鼠肝脏进行了 HE 和油红 O 染色,结果如图 4 所示。

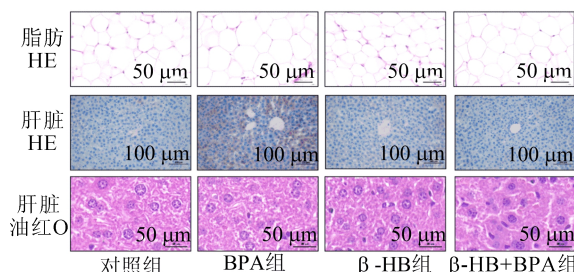


图4 脂肪组织的 HE 染色、肝脏 HE 和油红 O 染色结果

由图 4 可知:与对照组相比,BPA 组的小鼠肝脏脂质沉积明显,而且脂肪细胞体积更大, β -HB 组没有明显差别;与 BPA 组相比, β -HB+BPA 组明显修复了这一现象。

2.2.2 β -HB 对 BPA 小鼠血清中 TG 的影响

TG 是脂肪储存和能量供应的重要物质,参与了维持脂肪代谢平衡的过程。本文对血清中 TG 的浓度进行了检测,结果如图 5 所示。

从图 5 可以看出,各组别小鼠血清中,BPA 组 TG 浓度显著高于对照组 ($P<0.05$),而 β -HB+BPA 组和对照组没有显著区别。血清 TG 的改变说明 BPA 暴露后将导致小鼠机体脂代谢

的紊乱,而 β -HB 缓解了 BPA 暴露导致的 TG 浓度升高。

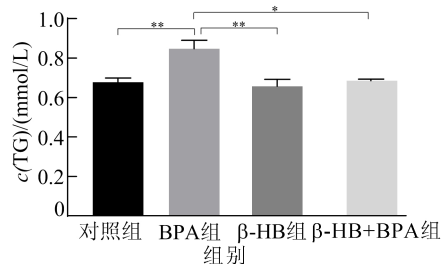


图 5 血清中 TG 的浓度

2.2.3 β -HB 对 BPA 小鼠肝脏 Hdac2 的影响

β -HB 是 Hdac2 的抑制剂,本课题组前期研究表明,BPA 会导致大脑中 Hdac2 的表达升高。为了探究其中的机制,本实验检测了 Hdac2 的表达,结果如图 6 所示。从图 6 可以看出,BPA 组 Hdac2 的蛋白表达量升高,而 β -HB 缓解了 BPA 暴露导致的 Hdac2 增加。

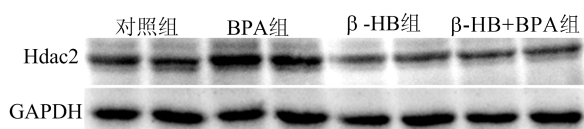


图 6 Hdac2 的蛋白表达

3 讨 论

BPA 作为一种普遍存在于环境中的化学物质,其与 NAFLD 之间的关系引起了人们的关注。 β -HB 是一种酮体,具有抗氧化、抗炎和能量调节等多种生物学功能,对肝脏健康可能具有保护作用。如果 β -HB 能够缓解 BPA 导致的 NAFLD,那么可能为人类应对环境污染带来的健康风险提供一种新的方向,此外,这也可能有助于提高人们对环境污染对健康危害的认识,促使政府和相关部门采取更加积极的措施保护公众健康。研究 β -HB 如何缓解 BPA 导致的 NAFLD 有助于更深入地了解 NAFLD 的发病机制。例如, β -HB 可能通过抑制炎症反应、改善线粒体功能或调节脂质代谢等途径发挥保护作用。这些机制有助于更好

地理解 NAFLD 的发病过程,并为开发其他治疗方法提供参考。

[参 考 文 献]

- [1] Liao C, Liu F, Moon H B, et al. Bisphenol analogues in sediments from industrialized areas in the United States, Japan, and Korea: spatial and temporal distributions[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(21): 11558-11565.
- [2] Liu L, Cui H, Huang Y, et al. Enzyme-mediated reactions of phenolic pollutants and endogenous metabolites as an overlooked metabolic disruption pathway [J]. Environmental Science & Technology, 2022, 56(6): 3634-3644.
- [3] Jeong-Hun K, Daisuke A, Riki T. Bisphenol A (BPA) and cardiovascular or Cardiometabolic diseases[J]. J Xenobiot, 2023, 13(4): 775-810.
- [4] Shantanu Cheemarla M D, Maya Balakrishnan M D M P H. Global epidemiology of chronic liver disease [J]. Clinical Liver Disease, 2021, 17(5): 365-370.
- [5] Clayton-Chubb D, Kemp W, Majeed A, et al. Understanding NAFLD: from case identification to interventions, outcomes, and future perspectives[J]. Nutrients, 2023, 15(3): 2907.
- [6] Le M H, Yeo Y H, Li X, et al. 2019 Global NAFLD prevalence: a systematic review and meta-analysis[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2021, 20(12): 2809-2817.
- [7] Younossi Z M, Koenig A B, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. Hepatology, 2016, 64(1): 73-84.
- [8] Huang Y Q, Wong C K, Zheng J S, et al. Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts[J]. Environment International, 2012, 42: 91-99.
- [9] Sjaak P, Nasser S, Yitka G, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss [J]. BMC Endocr Disord, 2022, 22(1): 63.
- [10] Newman J C, Verdin E. β -hydroxybutyrate: a signaling Metabolite[J]. Annu Rev Nutr, 2017, 37(1): 51.
- [11] Caminhoto R D O, Komino A C M, Silva F D F, et al. Oral β -hydroxybutyrate increases ketonemia, decreases visceral adipocyte volume and improves serum lipid profile in Wistar rats[J]. Nutrition & Metabolism, 2017, 14(1): 31.

(责任编辑 闫杏丽)