双酚 S 影响 3T3-L1 前脂肪细胞分化及其作用机制的研究

周兴华，张晓伟，孙鑫娟，肖香，赵延胜，祝莹，董英
（江苏大学食品与生物工程学院，江苏镇江 212013）

摘要：双酚 A（BPA）的内分泌干扰作用以及对人体产生的不良影响，使双酚 S（BPS）作为替代品在食品包装材料中应用更加广泛。BPS 在大规模应用之前，并没有对其安全性进行充分研究。本文以 3T3-L1 前脂肪细胞为体外模型，探究 BPS 对 3T3-L1 前细胞分化的影响及作用途径，评价 BPS 安全性的同时，也为肥胖等慢性代谢疾病的预防提供参考。研究结果表明：BPS 能促进 3T3-L1 前脂肪细胞生长，当浓度超过 400 μmol/L 时，才能显著抑制细胞的增殖；BPS 能显著诱导分化的 3T3-L1 细胞内脂质的积累，并呈现非剂量依赖关系；与模型组相比，BPA 上调 PPARγ、C/EBR 和 aP2 基因的表达，而 BPS 只作用 PPARγ 基因的过表达，BPS 和 BPA 都能使 GLUT4 基因的表达显著下降（p<0.01）。总之 BPS 和 BPA 作用脂肪细胞分化的途径不完全一样，可能是在多种转录因子的共同作用下完成的。

关键词：双酚 A；双酚 S；3T3-L1 细胞；肥胖；内分泌干扰物；食品包装；安全评价
文章篇号：1673-9078(2017)11-1-6 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.11.001

Effect of BPS on the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes and Its Mechanism

ZHOU Xing-hua, ZHANG Xiao-wei, SUN Xin-juan, XIAO Xiang, ZHAO Yan-sheng, ZHU Ying, DONG Ying
(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Bisphenol A (BPA) is restricted for its endocrine disruption and adverse health effects on the human body, so that bisphenol S (BPS) is widely used as a substitute n a variety of food packaging materials. The security of BPS has not been fully studied before its large-scale application.. In this study, 3T3-L1 preadipocytes were used as an in vitro model to investigate the effect of BPS on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and its mechanism, to evaluate the safety of BPS and provide reference for the prevention of chronic metabolic diseases such as obesity. The results showed that BPS could promote the growth of 3T3-L1 preadipocytes and could significantly inhibit the proliferation of cells when the concentration was over 400 μmol/L. BPS could significantly induce the accumulation of lipid in the differentiated 3T3-L1 cells which showed a non-dose-dependent relationship. Compared with the model group, BPA up-regulated the expressions of PPARγ, C/EBR and aP2 genes, whereas BPS only seems to up-regulate the expression of PPARγ. In addition, BPS and BPA could significantly decrease the expression of GLUT4 gene (p<0.01). In conclusion, the pathways of BPS and BPA acting on adipocytes differentiation were not exactly the same, which might be accomplished under the combined action of various transcription factors.

Key words: BPS; BPA; 3T3-L1 cells; obesity; endocrine disruptor; food packaging; safety evaluation

双酚 A（bisphenol A，BPA）作为一种重要的有机化工原料几乎无处不在，广泛用于食品包装及各种制造业产品中，例如各种水瓶、饮料瓶、食品罐内衬、婴幼儿奶瓶、牙齿密封剂及热敏纸等[1]。大量研究表明，BPA 是重要的“内分泌干扰物”之一，与激素合成、乳腺发育、肥胖、心脏病和糖尿病等密切相关[2~6]。由于双酚 A 的安全性受到质疑，加拿大（2008）、欧盟（2011）、中国（2011）、美国（2012）等国家先后禁止了 BPA 在婴幼儿奶瓶中的使用，法国（2015）禁止了 BPA 在食品包装材料的使用[7]。于是双酚 S（bisphenol S，BPS）作为替代物被用于禁止或限制 BPA 使用的产品。Liao 等[8]研究表明，在所有的双酚类物质中 BPA 的检出量是最高的，尽管 BPS 从食品容器浸出的量还比较少，但已广泛存在于各类食品当

收稿日期：2017-08-21
基金项目：国家自然科学基金资助项目（31501569）；江苏大学高级专业人才专项（13JDG037）
作者简介：周兴华（1982-），女，讲师，研究方向：食品安全
通讯作者：董英（1954-），女，教授，博士生导师，研究方向：食品营养与安全

中（包括饮料、奶制品、油脂、海产品、谷物、肉制品及蔬菜水果等），随着 BPS 的进一步替代使用，未来的暴露量可能更多。但是目前关于 BPS 的安全性我们还知之甚少，其潜在内分泌干扰作用及代谢机制尚不清楚[9]。

肥胖已经成为一个严重的公共健康问题，在过去几十年，成年人的肥胖率增长 28%，然而儿童肥胖率却增长了 47%，肥胖的诱因不仅与食物过度摄入及运动的减少有关，一些环境内分泌干扰剂也是不可忽视的危险因素[10]。大量的动物实验表明，围产期暴露 BPA 可导致子代体重明显增加，尤其在宫内和哺乳期这两个关键发育时期更易诱导肥胖的发生[11~13]。而人群流行病学调查研究也发现，BPA 的暴露水平与肥胖的发生也是密切相关，对儿童和青少年的作用更明显[14]。BPS 作为 BPA 一种替代物使用，每年的产量都在增加，由于 BPA 和 BPS 的分子结构及其相似，BPS 的直接暴露是否会影响脂肪细胞的分化及脂代谢紊乱，目前研究甚少。因此，本实验以 3T3-L1 前脂肪细胞为模型，研究低浓度暴露 BPS 对其脂滴生成及相关基因的调控作用，以期进一步阐明 BPS 的毒性作用，为相关疾病的控制提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器设备

BPA 和 BPS，美国 Sigma 公司；3-异丁基-1-甲基黄嘌呤（IBMX）、胰岛素（INS）、地塞米松（DEX），上海创赛科学仪器有限公司；荧光定量 PCR 引物，上海生工生物工程有限公司；荧光定量 PCR 相关试剂盒，Takara 公司；其他生化试剂，国药集团。

CO_2 恒温培养箱，芬兰 Thermo 公司；荧光定量 PCR，美国 Bio-Rad 公司；FlexStationII 384 酶标仪，Molecular Devices 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 试剂的配制

诱导剂Ⅰ：用（含 10% FBS）DMEM 高糖培养基配制终浓度为 0.5 mmol/L IBMX、0.25 μmol/L DEX 的诱导剂。诱导剂Ⅱ：用（含 10% FBS）DMEM 高糖培养基配制终浓度为 1 μg/mL INS 诱导剂。BPS 和 BPA 溶液配制：用乙醇溶解制成 0.1 mol/L 储备液，临用时稀释至所需浓度，最终配成 10%乙醇工作液。

1.2.2 细胞培养

3T3-L1 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养液于细胞培养箱内培养。当细胞数目达到 80%左右，则要传代培养。

1.2.3 细胞存活率的测定

取对数生长期的 3T3-L1 前脂肪细胞接种于 96 孔板中。分为正常组和试验组，每组 6 个平行。正常组加入正常细胞培养液，试验组分别加入含不同浓度样品的细胞培养液（0.1、1、10、100、400、700、1000 μmol/L）。双波长法（测定波长 490 nm，参考波长 630 nm）测定 OD 值。计算公式为见（1）。

$$细胞存活率(\%)=\frac{OD_{样品490nm}-OD_{样品630nm}}{OD_{对照490nm}-OD_{对照630nm}}\times 100 \quad (1)$$

1.2.4 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化

将对数生长期的 3T3-L1 前脂肪细胞以每孔 2×10^4 个/mL 的细胞密度接种于 48 孔板中培养，2 d 后（第 0 d）进行诱导分化。加入诱导液Ⅰ，同时加入样品，模型组只加诱导液Ⅰ和Ⅱ，空白组只加普通培养基。2 d 后（第 2 d）撤去诱导液Ⅰ，均换用诱导液Ⅱ培养 2 d（第 4 d），之后每 2 d 换 DMEM 高糖培养液，至第 6 d 大部分细胞处于脂肪细胞表型的状态，用于对脂质积累、葡萄糖消耗和基因表达的分析。

1.2.5 油红 O 染色观察

诱导至第 6 d，吸弃旧的培养液，经过固定、染色和分色等步骤，倒置显微镜拍照观察。

1.2.6 葡萄糖消耗量的测定

取 2×10^4 个/mL 接种密度的 3T3-L1 细胞在 48 孔板中培养。试验分为样品组、模型组和空白组，细胞诱导分化方法和 1.2.4 相同，但第 0 d 以后均换成无酚红的 DMEM 高糖培养液。诱导至第 6 d，按照葡萄糖测定试剂盒的操作说明进行测定。葡萄糖消耗相对含量的计算见公式（2）。

$$葡萄糖消耗相对含量(\%)=\frac{模型组葡萄糖含量-样品组葡萄糖含量}{空白组葡萄糖含量-正常组葡萄糖含量}\times 100\% \quad (2)$$

1.2.7 甘油三酯（TG）含量的测定

将 3T3-L1 细胞以 3×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板，诱导分化方按照 1.2.4 方法进行。试验结束后按照 TG 测定试剂盒的操作指示测定 TG 含量。上清液蛋白含量根据 BCA 法试剂盒的提示进行测定，计算公式见（3）。

$$TG相对含量(\%)=\frac{试验组TG含量}{正常组TG含量}\times 100 \quad (3)$$

1.2.8 脂代谢相关基因转录水平的测定

采用 RNAiso Plus 试剂盒法提取不同浓度 BPS 和 BPA 处理的 3T3-L1 细胞中的总 RNA。每个样本中的 RNA 按照试剂盒的步骤反转录生成 cDNA。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$

表 1 RT-PCR 特异基因引物序列表

Table 1 Gene-specific primers used for the RT-PCR

引物		引物序列
PPAR-γ	上游引物	5’-gagatgccattctggcccaccaccttcgg-3’
	下游引物	5’-tatcataaataagcttcaatcggatggttc-3’
β-Actin	上游引物	5’-agccatgtacgtagccatcc-3’
	下游引物	5’-tccctctcagctgtggtggtgaa-3’
GLUT4	上游引物	5’-gattctgctgcccttctgtc-3’
	下游引物	5’-attggacgctctctctccaa-3’
aP2	上游引物	5’-agcatcaaaccctagatggcg-3’
	下游引物	5’-cataacacattccaccaccagc-3’

的方法计算 mRNA 的相对表达量。RT-PCR 特异基因引物序列可见表 1。

1.2.9 数据统计分析

采用统计软件 Original 及专业图像分析软件 Image-Pro Plus 对结果进行分析，各组数据以 x±SD（平均值±标准偏差）表示，采用 SPSS 分析来确定数据间的显著性差异，显著水平设定为 $p<0.05$ 或 $p<0.01$。

2 结果与分析

2.1 BPS 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响

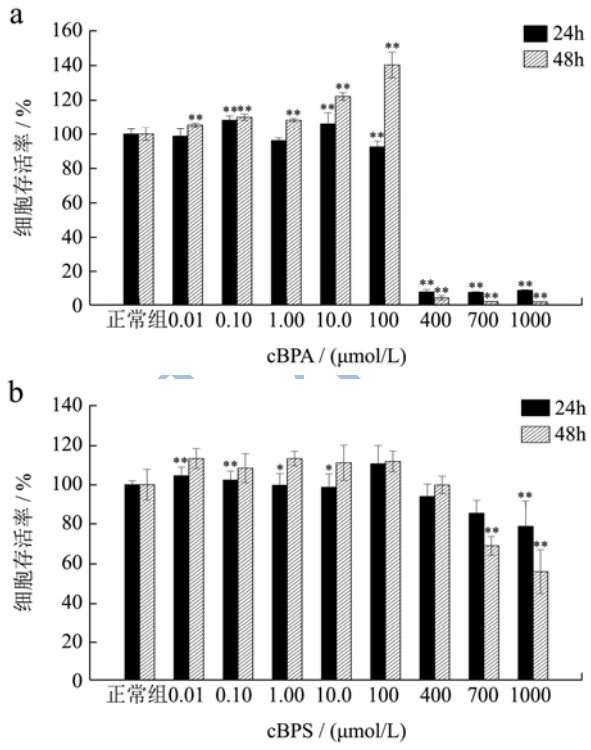


图 1 不同浓度 BPA 和 BPS 作用 24h 和 48h 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of BPA and BPS on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes after incubation for 24 h and 48 h

注：与正常组相比，$*p<0.05$，$**p<0.01$。

图 1 显示了 BPA 和 BPS 分别处理 24、48 h 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响。由图可知，低浓度两种双酚物质均能促进 3T3-L1 前脂肪细胞生长，随着时间延长，促进效果更明显。当其浓度超过 100 μmol/L 时，BPA 显著抑制了 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖，BPS 在浓度超过 400 μmol/L 时，显著抑制了 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖。当浓度达到 1000 μmol/L 时，细胞的存活率分别为：55.73% (BPS)，2.37% (BPA)。研究表明，两者双酚化合物的细胞毒性作用很小，只有在高浓度 10^{-4} mol/L 时可以减少细胞的存活率，与 BPA 比较，BPS 的毒性作用相对较弱。

2.2 BPS 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响

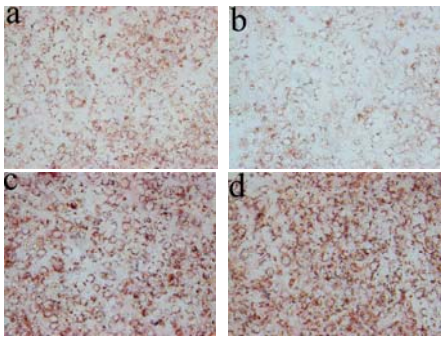


图 2 不同浓度双酚物质诱导前脂肪细胞分化的照片（×200）

Fig.2 Pictures of differentiated 3T3-L1 preadipocytes induced by different concentrations of bisphenols (×200)

注：a，模型组；b，空白组；c，BPS(10^{-11} mol/L)；d，BPA(10^{-11} mol/L)。

3T3-L1 前脂肪细胞在分化成熟后在细胞内会聚集大量脂滴，油红 O 染色能较明显地反应脂滴积累的程度。由图 2 可看出，大量脂滴聚集在分化成熟的 3T3-L1 细胞内，细胞形态明显增大，细胞核周内布满红色脂滴，形成“指环样”结构。经 BPA 和 BPS 处理 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化 6 d 后，与模型组细胞相比，双酚物质都可以增加细胞内脂质的含量，其中 BPA

作用更为明显（p<0.01）。BPS 在 10^{-5} mol/L 和 10^{-15} mol/L 浓度作用下无显著差异，其他浓度均呈现显著性差异，其中在 10^{-7} mol/L 下细胞分化率最大达到 154.3%（p<0.01）。研究表明，BPA 和 BPS 都可以促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞，加速细胞内脂质的积累，但并不呈现剂量依赖关系。

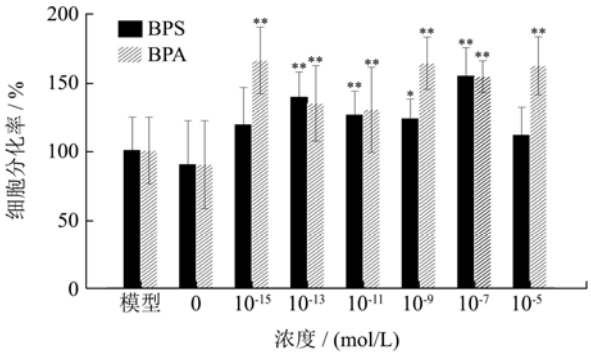
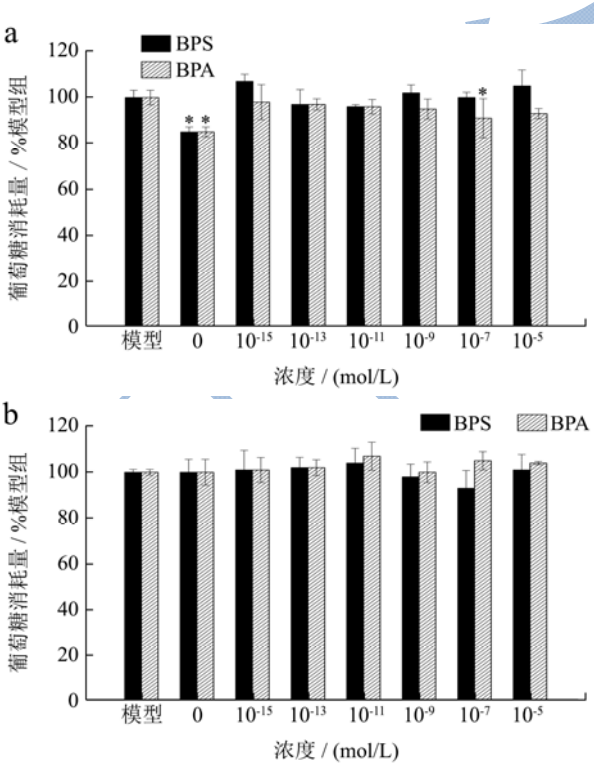


图 3 不同浓度双酚物质对前脂肪细胞分化的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of bisphenols on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes

注：与模型组相比，*p<0.05，**p<0.01。

2.3 双酚物质对 3T3-L1 细胞葡萄糖消耗量的影响



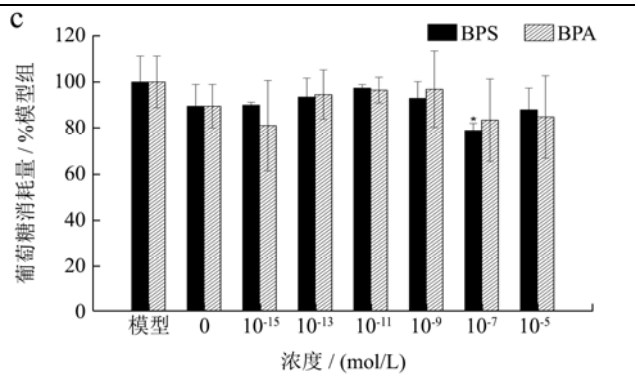


图 4 双酚物质在诱导分化不同天数时对 3T3-L1 细胞消耗量的影响

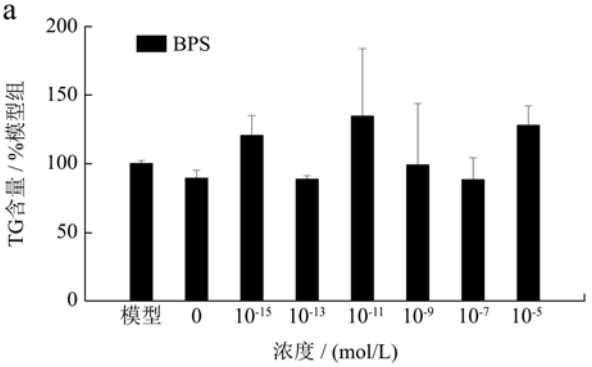
Fig.4 Effects of bisphenols on the glucose consumption of 3T3-L1 cells in different days of differentiation

注：a、b、c 分别表示第 2 d、第 4 d、第 6 d；与模型组相比，*p<0.05，**p<0.01。

由图 4 可见，在诱导分化的第 2 d，与模型组相比，空白组的葡萄糖消耗量显著下降，BPA 作用 10^{-7} mol/L 浓度下葡萄糖消耗量显著下降，其它浓度与模型组相比均无显著性差异。在诱导分化的第 4 d，不同//浓度 BPA 和 BPS 对葡萄糖消耗量均无显著性差异。在诱导分化的第 6 d，与模型组相比，BPS 作用 10^{-7} mol/L 浓度下葡萄糖消耗量显著下降。研究表明，随着诱导天数增加，细胞葡萄糖消耗量逐渐减少，但是相比于模型组，BPA 和 BPS 对细胞葡萄糖的消耗量影响不大。

2.4 双酚物质对 3T3-L1 细胞 TG 含量的影响

由图 5 可见，部分浓度 BPA 和 BPS 可以诱导细胞内甘油三酯含量低程度增加（比如 10^{-15} mol/L BPA：139%，10^{-11}mol/L BPS：134%）。研究表明，低剂量的 BPS 和 BPA 能低程度促进脂肪细胞内甘油三酯的积累，但是 BPS 和 BPA 不同浓度作用程度不同，且不具有剂量依赖性。



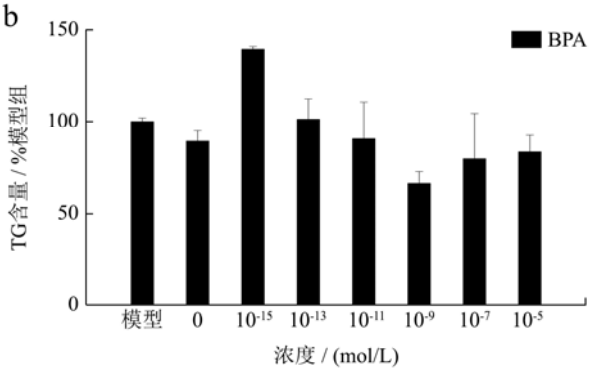


图 5 双酚物质对 3T3-L1 细胞 TG 含量的影响

Fig.5 Effects of bisphenols on the TG content of 3T3-L1 cells

注：与模型组相比，*p<0.05，**p<0.01。

2.5 双酚物质对 3T3-L1 细胞脂代谢相关基因转录水平的调控

图 6 显示的是 BPS 和 BPA 对 3T3-L1 前细胞脂肪分化相关基因表达的影响。

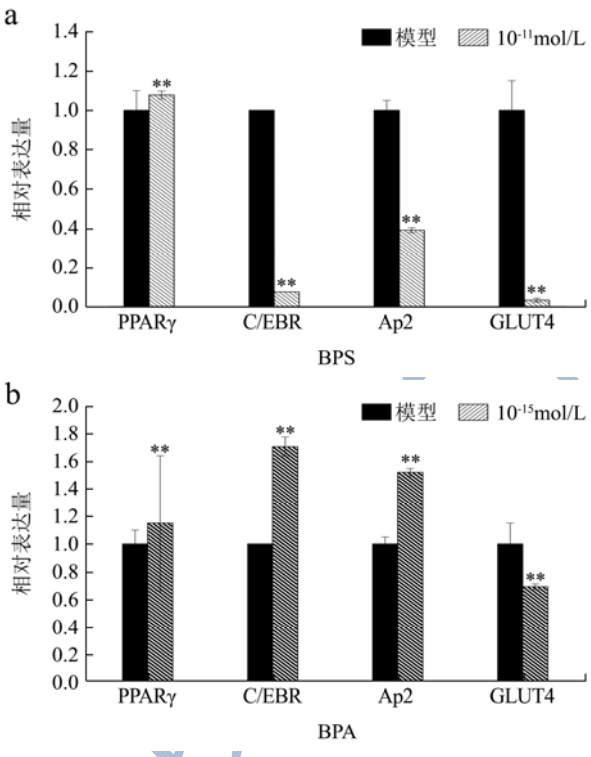


图 6 双酚物质对 3T3-L1 前脂肪细胞分化相关转录因子基因表达的影响

Fig.6 Effects of bisphenols on the mRNA expressions of transcription factors associated with differentiation of 3T3-L1 preadipocytes

注：与模型组相比，*p<0.05，**p<0.01。

由图 6 可见，与模型组相比，10^{-15} mol/L BPA 都可以显著上调 PPARγ、C/EBR、aP2 基因 mRNA 的表达量，相反，BPS 只上调了 PPARγ 表达，但可以显著下调 C/EBR、aP2 基因 mRNA 的表达量。另外，BPS 和 BPA 都同时使 GLUT4 基因的表达显著下降（p<0.01）。研究表明，BPS 和 BPA 作用脂肪细胞分化的途径不完全一样，它可能是在多种转录因子的共同作用下进行的。

3 结论

3.1 目前 BPS 被广泛用于代替 BPA 的使用，但是并没有充分的证据证明 BPS 是安全无害的，很多政府和环境安全机构也对此极大关注。目前关于 BPS 与脂肪代谢及其与肥胖的关联报道甚少，仅有三个课题组在做相关性研究[15~17]。本研究通过 3T3 前脂肪细胞模型，与相同浓度 BPA 进行比较，分析 BPS 对其脂肪细胞分化及代谢的影响，研究发现，BPS 和 BPA 均可以增加脂肪细胞分化脂滴的积累，即使是低浓度也能起作用，两者干扰脂肪细胞分化并不具有剂量依赖性，而且其作用脂肪细胞分化基因表达不完全一致，说明其作用途径是不同的。

3.2 机体内脂肪细胞积累和增长都与其分化直接相关，而脂肪细胞分化是一个复杂而精细的过程，受多种信号通路及转录因子的调控。PPARγ、C/EBR 的过表达可以诱导并加快脂肪细胞分化，本研究表明 BPA 可以通过调节这两个因子的过表达，从而促进脂肪细胞的分化，同时通过上调脂肪酸吸收关键基因 aP2 的表达，从而增加细胞对脂肪酸的吸收。然而 BPS 仅上调了 PPARγ 的表达，C/EBR、aP2 基因表达却显著下降，说明 BPS 并不是通过和 BPA 一样的作用途径促进脂肪细胞分化。Cécile 等[15]在 3T3 前脂肪细胞的研究却发现 BPA 上调了 PPARγ、aP2、SREBP-1c、ERRα 和 ERRγ 基因的表达，而 BPS 仅作了 PGC1α 和 ERRγ 两个基因的表达，另外 Cécile 还发现 BPS 能增加细胞对葡萄糖和甘油三酯的吸收，BPA 仅能促进甘油三酯的吸收，而本试验中却并未发现 BPS 影响葡萄糖的吸收，且 GLUT4 基因的表达也出现了下调趋势。Moral 等[17]通过动物实验研究发现，与高脂饮食对照组比较，BPS 饮食暴露引起了雄鼠血清胆固醇的增加但并没有引起血糖及甘油三酯的显著变化。脂肪组织不仅是人体重要的储能和产能器官，它还具有强大的内分泌功能。Jonathan 等[16]通过人前脂肪研究发现，BPS 作用会引起脂滴积累和脂质相关基因表达，雌激素受体抑制剂 ICI-182,780 能显著影响 BPS 介导的脂质积累，而糖皮质激素受体抑制剂 RU486 则对此影响不大，推测 BPS 也可能通过干扰 PPARG 途径作用脂质代谢。Moral 等[17]通过体内动物实验，使孕期小鼠每天持续暴露低剂量的 BPS，结果发现，在正常饮食下

BPS 单一作用并不能引起雄鼠或雌鼠体重和体脂的增加，高脂饮食结合 BPS 暴露能引起雄鼠体重和体脂的增加，但是对雌鼠却影响不大，另外 BPS 也增加了胰岛素和瘦素的表达，引起了胰岛素抵抗，抑制了脂肪分解速度，加剧了脂肪的积累，导致了肥胖的产生。总之 BPS 参与脂质代谢途径是相当复杂的，虽然 BPS 与 BPA 的分子结构极为相似，但是作用途径可能并不一样，关于 BPS 与肥胖及脂质代谢的关联应在分子水平上进行更深入的研究。

参考文献

[1] Vom S F S, Nagel S C, Coe B L, et al. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2012, 354(1): 74-84

[2] Zhang X, Hong C, Wiseman S, et al. Bisphenol a disrupts steroidogenesis in human H295R cells [J]. Toxicological Sciences An Official Journal of the Society of Toxicology, 2011, 121(2): 320-327

[3] Moral R, Wang R, Russo I H, et al. Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature [J]. Journal of Endocrinology, 2008, 196(1): 101-112

[4] Kato H. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice [J]. Journal of Atherosclerosis & Thrombosis, 2007, 14(5): 245-252

[5] Rezg R, El-Fazaa S, Gharbi N, et al. Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives [J]. Environment International, 2014, 64(3): 83-90

[6] Rochester J R. Bisphenol A and human health: a review of the literature [J]. Reproductive Toxicology, 2013, 42(12): 132-135

[7] Amat E, Rihouey-Robini L. Bisphenol A in January 2015: french prohibition and EFSA study [J]. European Food and Feed Law Review, 2015, 10(2): 138-138

[8] Liao C, Kannan K. Concentrations and profiles of bisphenol a and other bisphenol analogues in foodstuffs from the united states and their implications for human exposure [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2013, 61(19): 4655-4662

[9] Glausiusz J. Toxicology: The plastics puzzle [J]. Nature, 2014, 508(7496): 306-308

[10] And E J R, Linden K G. Degradation of endocrine disrupting chemicals bisphenol a, ethinyl estradiol, and estradiol during UV photolysis and advanced oxidation processes [J]. Environmental Science & Technology, 2004, 38(20): 5476-5483

[11] Panagiotidou E, Zerva S, Mitsiou D J, et al. Perinatal exposure to low-dose bisphenol A affects the neuroendocrine stress response in rats [J]. Journal of Endocrinology, 2014, 220(3): 207-218

[12] 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]. Journal of Endocrinology, 2014, 222(3): 313-325

[13] Rubin B S, Paranjpe M, Dafonte T, et al. Perinatal BPA exposure alters body weight and composition in a dose specific and sex specific manner: the addition of peripubertal exposure exacerbates adverse effects in female mice [J]. Reproductive Toxicology, 2017, 68: 130-144

[14] Mirmira P, Evansmolina C. Bisphenol A, obesity, and Type 2 diabetes mellitus: genuine concern or unnecessary preoccupation? [J]. Translational Research, 2014, 164(1): 13-21

[15] Hélièstoussaint C, Peyre L, Costanzo C, et al. Is bisphenol S a safe substitute for bisphenol A in terms of metabolic function? an *in vitro* study [J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 2014, 280(2): 224-235

[16] Boucher J G, Ahmed S, Atlas E. Bisphenol S induces adipogenesis in primary human preadipocytes from female donors [J]. Endocrinology, 2016, 157(4): 1397-1407

[17] Moral L I D, Corre L L, Poirier H, et al. Obesogen effects after perinatal exposure of 4,4′-sulfonyldiphenol (bisphenol S) in C57BL/6 mice [J]. Toxicology, 2016, 357-358: 11-20