

双酚 A 对小鼠肾组织的毒性研究

孙志宏,白占涛,陈小威,李延清,韦改娜,张 颖,师帅敏

(延安大学 生命科学学院,陕西 延安,716000)

[摘 要] **【目的】**研究双酚 A(BPA)对小鼠肾组织的毒性效应。**【方法】**将 BPA 溶于金龙食用油中,备用。将 20 只小鼠随机分为 5 组:Ⅰ组为对照组,注射食用油 1 mL/只;Ⅱ~Ⅴ组为药物处理组,分别注射 0.1,0.5,1 或 2 mg/mL 的 BPA 1 mL/只,每 5 d 注射 1 次,连续注射 3 次。于末次注射后第 5,10,15 和 20 天各组分别取 1 只小鼠处死,取肾脏,用多聚甲醛固定,常规方法制备切片,免疫组织化学染色显微观察 β -actin 的分布定位,分析 BPA 对小鼠肾组织 β -actin 阳性细胞表达的影响。**【结果】**第 5~15 天,0.1 和 0.5 mg/mL BPA 处理组小鼠肾组织 β -actin 阳性细胞数量与对照组差异不显著,1 和 2 mg/mL BPA 处理组小鼠肾组织阳性细胞数量与其他 3 组差异显著;第 20 天,各 BPA 处理组小鼠 β -actin 阳性细胞数量与对照组差异显著。**【结论】**小鼠肾组织中 β -actin 阳性细胞随 BPA 剂量的增加与用药时间的延长而减少。

[关键词] 小鼠;双酚 A;环境雌激素;免疫组织化学; β -actin

[中图分类号] R994.6;S859.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)09-0023-04

Toxicity of systematic bisphenol A to mice kidney tissue

SUN Zhi-hong, BAI Zhan-tao, CHEN Xiao-wei, LI Yan-qing,

WEI Gai-na, ZHANG Yin, SHI Shuai-min

(College of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China)

Abstract: **【Objective】** The toxicity of intraperitoneal injection of bisphenol A (BPA) of different doses to kidney tissue of mice was evaluated with the change of β -actin expression. **【Method】** BPA was resolved in Jinlong plant oil. 20 mice were divided into 5 groups. One group injected with the plant oil was used as control. The other groups were injected with different doses of BPA (0.1, 0.5, 1 or 2 mg/mL per mice) at intervals of 5 d for 3 times respectively. After the injection of BPA or oil for 5, 10, 15 and 20 d, the mice were killed respectively. Then, each mouse kidney tissue was removed and fixed in polyformaldehyde. The change of β -actin expression kidney tissue was observed by immunohistochemical staining. **【Result】** Compared with control group, after treatment with BPA from 5 d to 15 d, β -actin expression showed no change with the lower dose of BPA at 0.1 and 0.5 μ g/mL. However, it was decreased significantly with the higher dose of BPA at 1 and 2 mg/mL. After the treatment with BPA for 20 d, the β -actin expression in all of groups treated with BPA was reduced greatly. **【Conclusion】** These results indicated that the number of β -actin-stained positive kidney cells was reduced by bisphenol A at a dose-dependent and time-dependent manner, and thus the systematic bisphenol A showed the strong toxicity of mice kidney tissue.

Key words: mice; BPA; environmental estrogen; immunohistochemistry; β -actin

* [收稿日期] 2009-03-25

[基金项目] 陕西省科技厅自然科学基金项目(SJ08C106);陕西省教育厅自然科学基金项目(08JK501);延安市 2007 年自然科学基金专项基金项目

[作者简介] 孙志宏(1968—),男,陕西延安人,副教授,硕士,主要从事神经生物学和细胞生物学研究。

E-mail: sunzhihong1968@163.com

双酚 A(Bisphenol A,简称 BPA)化学名二酚基丙烷,是一种广泛存在的环境雌性激素,具有雌激素样活性,可模拟内源性雌激素的生理、生化作用,具有拮抗机体内雌激素的合成、分泌、转运、排泄和生理作用的功能,从而影响生物体正常的生理活动^[1]。有关报道指出,环境雌激素可对人和动物机体造成危害,尤其对动物及人类的生殖系统有较明显的影响,可导致生殖障碍、发育异常^[2]、出生缺陷、代谢紊乱、行为失常、引发恶性肿瘤,甚至可能会影响到胚胎的发育等^[3-4]。但是在很长一段时间内,BPA 作为一种常用的化工染料^[5],应用于各行各业,尤其是塑料制品行业,并被不断地开发出新的用途^[6]。含 BPA 的产品随之进入人们的日常生活,这些产品中残留的 BPA 可通过直接接触转移至食物或饮料中,从而被摄入,对机体健康造成潜在的危害。BPA 具有毒性作用剂量少,潜伏期长的特点,对物种和生态环境具有灾难性的影响。因此,研究 BPA 的毒理学效应具有重要的意义。虽然早在 20 世纪 30 年代,就有关于环境雌激素对人类危害的报道,但是直到 20 世纪末,随着越来越多关于 BPA 危害人体健康的研究被报道,才引起了人们对 BPA 的更多关注。目前对环境雌激素的研究,已经成为人类探索生殖障碍、发育异常、癌症等疾病病因的热点之一。在国内外,已有一些关于各类雌激素对大鼠生殖系统损伤作用的报道^[7],但尚未见其对泌尿系统中肾影响的相关报道。

β -actin 是一种肌动蛋白,是重要的细胞骨架蛋白,所有的器官组织均有细胞质来源的肌动蛋白,通常是用于构成细胞微丝^[8]。有报道指出,视黄醇、BPA 和秋水仙素(Colchicine,CLC)均可使支持细胞骨架破坏。用 BPA 处理培养的支持细胞后,细胞活性呈剂量和时间依赖性的方式降低,并伴随着骨架断裂^[9]。本试验用不同剂量 BPA 处理小鼠,通过免疫组织化学技术对 β -actin 的分布情况及其定位进行检测,进而研究 BPA 对肾组织的影响,以期探明 BPA 对肾组织的损伤原理。

1 材料与方法

1.1 试验动物

清洁级、性成熟、体质量 22.5~24 g 的昆明种小鼠 20 只,雌雄随机,由西安交通大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

β -actin 抗体、二抗为辣根过氧化物酶标记抗体

(HRP)和 3,3'-二氨基联苯胺(DAB),均购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 试验设计

将 20 只小鼠随机分为 5 组,每组 4 只,I 组为阴性对照组,腹腔注射金龙食用油 1 mL/只,II~V 组为试验组,分别腹腔注射 0.1,0.5,1 和 2 mg/mL 的 BPA 食用油溶液 1 mL/只,每 5 d 注射 1 次,连续注射 3 次。第 3 次注射后,于第 5,10,15 和 20 天各组分别引颈处死小鼠 1 只,取肾脏,用多聚甲醛固定,然后用 0.2 mol/L 的蔗糖磷酸缓冲溶液(PB 蔗糖溶液)浸泡直到沉淀,在恒温冷冻切片机上快速冷冻切片(片厚 8 μ m),备用。

1.4 免疫组织化学染色

小鼠肾脏冰冻切片免疫组织化学染色采用以下步骤,PBS 洗 3 次,每次 5 min,过氧化氢孵育 10 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min,体积分数 5%正常山羊血清室温孵育 10 min,勿洗;1:200 倍稀释 β -actin 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;PBS 洗 3 次,每次 5 min,1:200 倍稀释 HRP(体积分数 1%BSA-PBS 稀释),室温孵育 1 h;DAB 显色剂显色;苏木精复染、梯度酒精脱水、二甲苯透明、封片、观察。

1.5 β -actin 染色结果的判定

按肾脏细胞着色强度及阳性细胞分布范围将染色结果分为 3 个等级:全片未见细胞着色或极少量细胞散在着色(-);胞质和胞膜呈棕黄色,10%~30%细胞着(+);大于 30%细胞着色(++)^[10]。

1.6 数据统计分析

从 3 套切片中各随机选取 5 个不重复视野,用 BX51/DP71 生物荧光显微镜于 400 倍镜下进行免疫组化阳性细胞数目统计。所有数据应用统计学方法进行方差分析及差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 免疫组织化学染色的显微观察结果

正常对照组第 5 天在镜下观察,结果(图 1-A)发现,肾小管上皮细胞胞质有阳性表达,阳性细胞轮廓清晰,胞质中含有棕褐色或棕色阳性颗粒,呈均质状分布;细胞核深染、浅染或不着色。根据胞体内反应颗粒着色的深浅,可将阳性细胞分为强阳性、中等阳性和弱阳性 3 种,强阳性细胞呈棕褐色,细胞轮廓清晰;中等阳性细胞呈棕色,细胞边缘较清晰;弱阳性细胞呈浅棕色,细胞轮廓模糊(图 1-A)。BPA 注射后, β -actin 阳性细胞呈下降趋势。0.5 mg/mL 组在第 5 天肾小管出现较多的性阳细胞(图 1-B);2

mg/mL组在第 5 天肾小管仅出现少量的阳性表达细胞(图 1-C);第 15 天,1 mg/mL 组也呈少量阳性细胞表达(图 1-D);0.5 mg/mL 组在第 20 天仅有少

量阳性细胞表达(图 1-E);2 mg/mL 组在第 20 天基本无阳性细胞表达(图 1-F)。

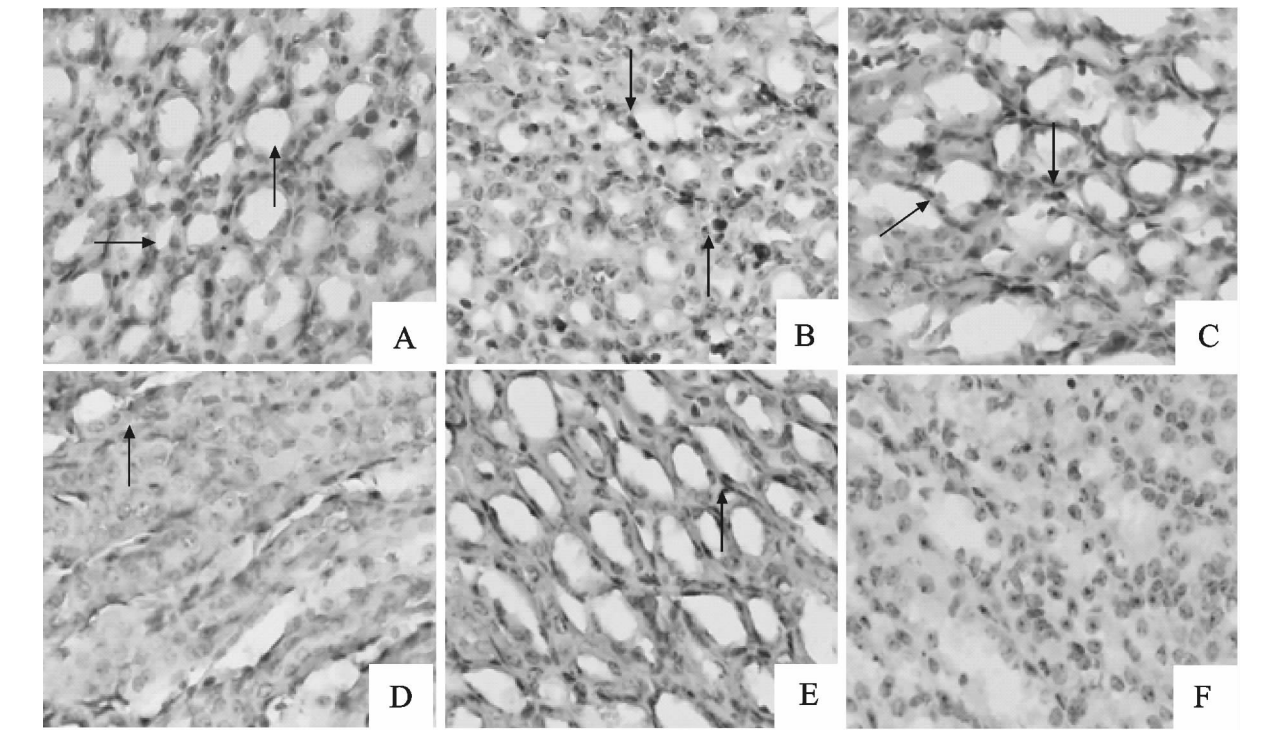


图 1 小鼠肾组织中 β -actin 免疫反应后的阳性细胞 ($\times 400$)

A. 5 d 对照组; B. 5 d 0.5 mg/mL BPA 组; C. 5 d 2 mg/mL BPA 组; D. 15 d 1 mg/mL BPA 组;
E. 20 d 0.5 mg/mL BPA 组; F. 20 d 2 mg/mL BPA 组; $\rightarrow$. 示阳性细胞

Fig. 1 Positive cells of β -actin in mice kidney

A. 5 d control group; B. 5 d 0.5 mg/mL BPA group; C. 5 d 2 mg/mL BPA group; D. 15 d 1 mg/mL BPA group;
E. 20 d 0.5 mg/mL BPA group; F. 20 d 2 mg/mL BPA group; $\rightarrow$. Positive cells

2.2 BPA 对小鼠肾组织 β -actin 阳性细胞表达的影响

统计结果(表 1)显示,第 5~15 天,0.1 和 0.5 mg/mL BPA 处理组的小鼠肾组织 β -actin 阳性细胞数量与对照组差异不显著($P>0.05$),以上 3 组

与 1 和 2 mg/mL BPA 处理组小鼠肾组织阳性细胞数量差异显著($P<0.05$);第 20 天,各 BPA 处理组与对照组差异显著($P<0.05$)。同一 BPA 浓度处理组的肾组织阳性细胞数量随处理时间的延长而减少。

表 1 BPA 对小鼠肾组织 β -actin 阳性细胞表达的影响

Table 1 Effects of BPA Expression of cell number of positive cells of β -actin in mice kidney

组别 Group	BPA/(mg $\cdot$ mL ⁻¹)	5 d	10 d	15 d	20 d
I	0	++	++	++	++
II	0.1	++	++	++	+
III	0.5	++	++	++	+
IV	1	+	+	+	-
V	2	+	+	-	-

3 讨 论

肾脏具有分泌尿液,排出代谢废物、毒物和药物,调节体内水、渗透压、电解质以及内分泌等功能。 β -actin 是细胞中一种重要的蛋白质,为 6 种肌动蛋

白之一,属于非肌肉细胞骨架肌动蛋白^[11],以多聚体形式组成微丝^[8]。

本研究发现,BPA 对小鼠肾脏组织造成了较严重的损伤,且其质量浓度越高损害越明显。显微镜检结果表明,随 BPA 剂量的增加和用药时间的延

长,小鼠肾小管上皮细胞 β -actin 阳性细胞数量下降。有学者指出,BPA 处理后,细胞的数量随剂量的增加和处理时间的延长而降低,并伴随着骨架断裂,导致细胞变形,最终可能导致了肾组织的功能衰退,并会在一定程度上影响到水、无机盐、葡萄糖和氨基酸等的重吸收^[12]。

本试验还发现,BPA 染毒后,肾小管管腔变大。有研究表明,肾小管上皮细胞拥有高度极化的腔面膜和基膜,并有明显不同的脂类和蛋白成分,具有许多结构差异并与不同的生理生化功能有关^[13]。细胞基膜侧紧邻肾间质环境,参与维持细胞的正常状态和信号识别与转导。正常情况下,肾小管上皮细胞中以肌动蛋白为基础、有序排列的细胞骨架是维持正常刷状缘结构、上皮细胞极性、紧密连接完整性以及上皮细胞与基膜粘合的结构基础^[13]。肾小管管腔变大后,会引起肾小管重吸收和排泄功能下降,导致水、电解质和酸碱平衡失调。

近年来有研究发现,不同致病性代谢因素、细胞因子及金属中毒均可影响肾小管上皮细胞内的细胞骨架蛋白表达,且其与细胞功能的改变密切相关^[14]。本试验 BPA 可能是直接作用于 β -actin,或者影响 β -actin 的转录和表达^[10,15]。

本试验结果表明,BPA 对肾脏有较大的危害,影响肾小管的功能。因此在了解 BPA 毒性和作用机理的基础上,需要进一步研究其降解或转化方法,以减少其毒害作用。

[参考文献]

[1] 杨湘山,李景舜,赵淑华,等. 环境雌激素双酚 A 对小鼠脾细胞周期的影响 [J]. 现代预防医学,2007,34(5): 899.
Yang X S, Li J S, Zhao S H, et al. Effects of the environmental estrogen BPA on the cell cycle of mice spleen [J]. Modern Preventive Medicine, 2007, 34(5): 899. (in Chinese)

[2] Kabuto H, Amakawa M, Shishibori T. Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice [J]. Life Sci, 2004, 74: 2931-2940.

[3] Achibana T, Wakimoto Y, Nakamuta N, et al. Effects of bisphenol A (BPA) on placentation and survival of the neonates in mice [J]. J Reprod Dev, 2007, 53(3): 509-514.

[4] Morrissey R E, George J D, Price C J, et al. The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice [J]. Fundam Appl Toxicol, 1987, 8(4): 571-582.

[5] Vandenberg L N, Hauser R, Marcus M, et al. Human exposure to bisphenol A (BPA) [J]. Reprod Toxicol, 2007, 24(2): 139-177.

[6] Stapher C A, Dorn P B, Klecka G M, et al. Review of the environmental fate, effect and exposures of bisphenol A [J]. Chomosphere, 1998, 36(10): 2149.

[7] 邓 茂, 吴俊生, 詹 立. 环境雌激素双酚 A 的生殖毒理研究 [J]. 环境与健康杂志, 2001, 16(1): 39-42.
Deng M, Wu J S, Zhan L. Study on mechanism of reproduction toxicity of to estroic bisphenol-A related to environment [J]. Journal of Environment and Health, 2001, 16(1): 39-42. (in Chinese)

[8] 贺淹才. 肌动蛋白和肌动蛋白基因的研究进展 [J]. 生命的化学, 2002, 22(3): 248-250.
He Y C. Recent advances on the study between actin and actin gene [J]. Chemistry of Life, 2002, 22(3): 248-250. (in Chinese)

[9] Kellerman P S, Clark R A, Hoilien C A, et al. Role of microfilaments in maintenance of proximal tubular structure and functional integrity [J]. Am J Physiol, 1990, 259(2): 279-285.

[10] Tyl R W, Myers C B. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A (BPA) in CD-1 (swiss) mice [J]. Toxicol Sci, 2008, 4(15): 605-611.

[11] Kedes I, Ng S Y, Lin C S, et al. The human beta-actin multi-gene family [J]. Transactions of the Association of American Physicians, 1985, 98: 42-46.

[12] Racusen L C. Tubular injury in human kidneys: pathologic findings and pathogenic mechanisms [J]. Clin Investig, 1993, 71(10): 858-860.

[13] 张 梅, 李晓玫. 细胞骨架蛋白与肾脏疾病 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2003, 12(3): 272-277.
Zhang M, Li X M. Cytoskeleton protein and kidney diseases [J]. Chinese Journal of Nephrology, Dialysis & Transplantation, 2003, 12(3): 272-277. (in Chinese)

[14] Sabolic I, Herak-Kramberger C M, Brown D. Subchronic cadmium treatment affects the abundance and arrangement of cytoskeletal proteins in rat trnal proximal tubule cells [J]. Toxicology, 2001, 165(2/3): 205

[15] 王 琳, 董秉直, 高乃云. 超滤去除水中内分泌干扰物 (BPA) 的效果和影响因素 [J]. 环境科学, 2007, 28(2): 329-334.
Wang L, Dong B Z, Gao N Y. Removal of EDCs (BPA) by ultrafiltration and impact factors [J]. Environmental Science, 2007, 28(2): 329-334. (in Chinese)