

亚慢性氟虫腈暴露致小鼠肝脏脂质代谢紊乱的风险及机制研究

刘广南^{1,2}, 郭雅婕³, 黄素丽², 陈颖², 胡肖肖², 钟丹蓉², 唐志⁴, 柯跃斌², 曾怀才^{1,5}, 吕子全²

1. 南华大学公共卫生学院, 湖南 衡阳 421000;
2. 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518055;
3. 中山大学附属第八医院, 广东 深圳 518033;
4. 广东医科大学公共卫生学院, 广东 东莞 523808;
5. 桂林医学院公共卫生学院, 广西 桂林 541000

摘要: **目的** 研究氟虫腈(Fipronil, FPN)亚慢性暴露对不同营养条件下成年雄鼠肝脏脂质代谢稳态的影响与分子机制。**方法** 雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 8 组, 每组 7 只, 4 组喂常规饲料饮食(normal-chow diet, ND), 4 组喂养高脂饲料饮食(high-fat diet, HFD), 每种喂养条件下按 FPN 处理剂量分为对照组, 0.25、1 和 4 mg/kg 组, 每日经口灌胃, 于染毒 5 周后处死, 称取体重、肝脏重量, 并计算肝脏脏器系数; HE 染色观察肝脏组织学形态变化, 生化分析法检测甘油三酯(triglycerides, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)水平; Western Blot 和 qPCR 法检测肝脏脂质代谢相关蛋白和基因的表达情况。**结果** ND、HFD 小鼠肝脏重量和体重均无明显变化。ND 小鼠: HE 染色未见显著病理性变化, 血清 TG 升高($P<0.05$), 肝脏 TG、TC 在 0.25 mg/kg 组升高($P<0.05$), 在 4 mg/kg 组降低($P<0.05$), 肝脏 FFA 降低($P<0.05$), 过氧化物体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor α , PPAR α) 表达增加($P<0.05$), 乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-coa carboxylase, Acc)在 0.25 mg/kg 组表达增加($P<0.05$), 4 mg/kg 组表达下调($P<0.05$)。HFD 小鼠: HE 染色表明 FPN 暴露后有显著病理变化和脂质沉积。血清 TG、TC 水平下降($P<0.05$), 肝脏 TG、TC、FFA 水平升高($P<0.05$)。蛋白 PPAR α 表达随 FPN 染毒剂量增大而降低($P<0.05$), 蛋白 Acc、胆固醇调节元件结合蛋白-1c (sterol regulatory element-binding protein-1c, Srebp-1c) 表达下降($P<0.05$)。**结论** FPN 慢性暴露可导致普通饮食小鼠肝脏脂质代谢紊乱, 增加非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)发生风险, 低剂量的 FPN 诱导 NAFLD 效应更明显; 高脂饮食条件下, FPN 暴露致小鼠肝脏出现明显病理性损害, 且 FPN 对肝脏脂质代谢的干扰效应呈剂量依赖式变化, FPN 暴露剂量越高, 发生肝脏脂质异常积累和 NAFLD 的风险也越高。

关键词: 氟虫腈; 慢性暴露; 非酒精性脂肪肝; 脂质代谢; 稳态

中图分类号: R575.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2022)05-0536-06 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2022.05.006

Risk and mechanism of hepatic lipid metabolism disorders induced by subchronic exposure to fipronil in mice

LIU Guang-nan^{1,2}, GUO Ya-jie³, HUANG Su-li², CHEN Ying², HU Xiao-xiao², ZHONG Dan-rong²,
TANG Zhi⁴, KE Yue-bin², ZENG Huai-cai^{1,5}, LYU Zi-quan²

1. School of Public Health, University of South China, Hengyang, Hunan 421000, China;
2. Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong 518055, China;
3. The Eighth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Shenzhen, Guangdong 518033, China;
4. School of Public Health, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China;
5. School of Public Health, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541000, China

Corresponding authors: ZENG Huai-cai, E-mail: zenghuai cai@126.com; LYU Zi-quan, E-mail: lvzi quan1984@126.com

Abstract: **Objective** To study the effects and molecular mechanisms of subchronic exposure to fipronil (FPN) on the homeostasis of hepatic lipid metabolism in adult male mice under different nutritional conditions. **Methods** C57BL/6J male mice were randomly divided into 8 groups, each group consisting of 7 mice. 4 groups were fed with a normal-chow diet (ND), while other 4 groups with a high-fat diet (HFD). ND-fed and HFD-fed mice were subgrouped by FPN dosage respectively,

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFC1605104); 国家自然科学基金青年科学基金(21876116, 81502789, 81700750); 广东省自然科学基金(2017A030310651); 深圳市医疗卫生三名工程项目(SZSM201611068); 深圳市医学重点学科(SZXX066)

作者简介: 刘广南(1996-), 女, 湖南人, 硕士在读, 研究方向: 公共卫生。

通信作者: 曾怀才, E-mail: zenghuai cai@126.com; 吕子全, E-mail: lvzi quan1984@126.com。

including the control group and FPN groups of 0.25 mg/kg, 1 mg/kg and 4 mg/kg. They experienced daily oral gavage, and were sacrificed after 5 weeks of exposure to FPN. Body weight and liver weight were measured, and the liver coefficient was calculated. HE staining was performed to observe hepatic morphological changes. The levels of triglycerides (TG), total cholesterol (TC) and free fatty acids (FFA) were detected by biochemical analysis methods. Western Blot and qPCR were used to determine protein and gene expression related to liver lipid metabolism. **Results** No obvious alterations in body weight and liver weight were observed in ND-fed or HFD-fed mice after FPN treatment. As for ND-fed mice, no significant hepatic pathological changes were found by HE staining, and serum level of TG increased ($P<0.05$). Hepatic TG and TC levels increased in 0.25 mg/kg FPN group ($P<0.05$), but decreased in 4 mg/kg FPN group ($P<0.05$). Hepatic FFA level declined ($P<0.05$). PPAR α protein expression increased ($P<0.05$). Acc protein expression increased in 0.25 mg/kg FPN group ($P<0.05$), but was down-regulated in 4 mg/kg FPN group ($P<0.05$). As for HFD-fed mice, HE staining revealed that there were significant pathological changes in liver tissue with accumulated lipid deposition. Serum TG and TC levels decreased ($P<0.05$), while hepatic TG, TC and FFA levels increased ($P<0.05$). PPAR α protein expression decreased with the increasing dosage of FPN ($P<0.05$), but Acc and Srebp-1c protein expression decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Subchronic exposure to FPN can disturb the homeostasis of hepatic lipid metabolism in ND-fed mice, which may further initiate the development of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), especially in exposure to low doses of FPN. Under HFD-fed condition, exposure to FPN induces obvious hepatic pathological changes in mice. And there is a dose-response relationship between FPN exposure level and the risk to develop abnormal hepatic lipid accumulation and even NAFLD.

Keywords: fipronil; chronic exposure; nonalcoholic fatty liver disease; lipid metabolism; homeostasis

现代生活中,慢性疾病如非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)已成为全人类健康威胁之一,主要由肝脏脂质代谢失衡导致,全球患病率约为 25.24%,由于其发病机制十分复杂,导致目前全球范围仍没有统一标准的治疗药物,因此对 NAFLD 进行病因学预防意义重大。NAFLD 的发病机制中,环境因素也起重要作用。近年来研究证实农兽药作为内分泌干扰物(endocrine-disrupting chemicals, EDCs)参与诱发 NAFLD,如某项调查发现,有机氯杀虫剂的暴露与成人 NAFLD 发病呈正相关关系^[1];长期低剂量暴露除草剂草甘膦可诱导小鼠 NAFLD^[2]等。但目前,农兽药导致 NAFLD 的具体作用机制还未完全明确,有待进一步研究。

氟虫腈(fipronil, FPN)是一种苯基吡唑类杀虫剂,农作物毒性低,广泛用于农业畜牧业;但 FPN 及其代谢物在环境中存在毒性残留^[3]。研究发现食物如茶叶、鸡蛋^[4]等均检出 FPN 残留;环境介质如加州河流水样中(204~440 ng/L)^[5]和中国华南(38.2 ng/g)、华中、华北三区室内灰尘中均检出 FPN 及其代谢物^[6]。而各类人群中 FPN 也存在普遍暴露,如氟虫腈生产工人($n=159$)血清样品(7.8 ng/ml)^[7],韩国男性血清(氟虫腈 0.130~3.570 ng/ml),孕妇血清(氟虫腈 0.079~2.910 ng/ml)均检出 FPN 及其代谢物^[8]。上述研究提示 FPN 在食品、环境介质以及职业人群、普通人群中都存在着广泛暴露。

FPN 进入生物体内后,高度蓄积在脂肪、肝脏等组织中,实验表明雌性大鼠连续 FPN(3.4 mg/kg)暴

露后肝脏重量增加^[9]。FPN 作为 EDCs 具有潜在内分泌干扰性,而肝脏是 FPN 的重要体内效应靶器官,其所引起的肝脏毒性研究意义重大,且该化合物对肝脏脂质代谢的具体分子机制有待进一步明确。本研究选取雄性 C57BL/6J 小鼠,采用普通饮食和高脂饮食两种饮食模式,系统探究亚慢性 FPN 暴露对不同营养状态的雄性小鼠肝脏脂代谢的毒性作用,通过 HE 染色来观察 FPN 对肝脏脂肪堆积的效应;进一步检测血清和肝脏的甘油三酯(triglycerides, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)和游离脂肪酸(free fatty acids, FFA),全面评估脂代谢效应;最后检测肝脏脂代谢关键基因和蛋白的表达,尝试探讨 FPN 调控肝脏脂质代谢的具体分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 氟虫腈(Aladdin 公司,纯度 $\geq 98\%$),对照组用纯玉米油(Aladdin 公司,纯度 100%),小鼠 TG、TC、FFA 自动分析仪用(酶法)测定试剂盒(上海申索佑福医学诊断用品有限公司)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(BCA Protein Assay Kit, Thermo 公司)。

1.2 仪器与设备 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪、电子显微镜[尼康仪器(上海)有限公司]、SDS-PAGE 电泳仪。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物及处理 野生型雄性 C57BL/6J 小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司),饲养于

SPF 级动物房,室温 22 ℃~25 ℃,昼夜循环 12 h。将小鼠随机分为 8 组,每组 7 只,4 组高脂饲料(HFD, 60 kcal%脂肪; Research Diets Inc 公司)喂养(简称 HFD 小鼠),4 组常规饲料(ND, 10 kcal% 脂肪; Research Diets Inc 公司)喂养(简称 ND 小鼠),每种喂养条件下按 FPN 处理剂量分为对照组,0.25、1 和 4 mg/kg 组,每日经口灌胃染毒,于染毒 5 周后处死,称取体重、肝脏重量,并计算肝脏系数,公式为:肝脏系数(%)=肝重(mg)/体重(g)×100;HE 染色观察肝脏组织学形态变化,生化分析法检测血清和肝脏中 TG、TC、FFA 水平;Western Blot 和 qPCR 检测肝脏脂肪代谢相关蛋白及基因的表达情况。本项目已通过深圳市疾病预防控制中心伦理学委员会审批,审批号为:2020010。

1.3.2 肝脏组织的 HE 染色 小鼠处死后,取肝组织于 4%多聚甲醛固定至少 24 h,常规脱色、包埋、脱蜡后制成切片,进行 HE 染色,利用光学显微镜观察肝细胞内脂滴大小及多少。

1.3.3 血清和肝脏组织的 TG、TC、FFA 含量测定 参照试剂盒说明书方法,肝脏样本先制备成匀浆后再进行测定,并以肝脏总蛋白浓度校准,利用酶标仪测量并计算 TG、TC、FFA 含量。

1.3.4 Western Blot 和 qPCR 检测肝脏组织中脂质代谢相关蛋白和基因的表达 肝脏组织研磨、裂解提取总蛋白,用 BCA 法测蛋白浓度,加上样缓冲液,水浴 10 min。上样,电泳后转至 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭 1 h,放入脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FAS)、乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-coa carboxylase, Acc)、过氧化物体增殖物激活受体 α(peroxisome proliferator activated receptor alpha, PPARα)、肉毒碱棕榈酰基转移酶 1A(carnitine palmitoyltransferase-1, Cpt1a)、胆

固醇调节元件结合蛋白-1c(sterol regulatory element-binding protein-1c, Srebp-1c)抗体中 4 ℃过夜,之后用 TBST 溶液洗膜。与相应的二抗在室温孵育 2 h,曝光显影,用 Quantity One 对条带进行后续统计分析。

提取细胞总 RNA,使用 TaKaRa RT-PCR 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。反应试剂使用 SYBR Green PCR 试剂盒,所使用到的引物序列见表 1,甘油醛 3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Gapdh)用作内参基因。

1.4 统计学分析 用 SPSS 20.0 软件处理数据,数值均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间差异是否有统计学意义采用两独立样本 *t* 检验进行比较,当 *P*<0.05 时,可认为组间差异有统计学意义。

表 1 引物序列

基因名称	上游引物序列(5'-3')	下游引物序列(3'-5')
Fas	CCTGGATAGCATTCCGAACCT	AGCACATCTCGAAGGCTACACA
SCD1	CCGGAGACCCCTTAGATCGA	TAGCCTGTAAGAATTCTCGCAAAAC
PPARα	CTGCAGACCAACCATCCAGAT	CCCCAAGGTCCACCATTTT
Cpt1a	TGGCATCATCACTGGTGTGTT	GTCTAGGGTCCGATTGATCTTTG
Acc	TGACAGACTGATCGCAGAGAAAG	TGGAGAGCCCCACACACA
Lpl	TGAAAGTCGGTTTCTGAGTAT	GGTTAGCCACCGTTTAATATTTC
CD36	TGGTCAAGCCAGCTAGAAA	CCCAGTCTCATTTAGCCAC
Gapdh	TGTGTCCCTCGTGGATCTGA	CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT

2 结果

2.1 FPN 暴露不改变 ND 小鼠的体重和肝脏系数 ND 小鼠染毒 5 周后处死,称量体重和肝脏重量。结果发现,各剂量组小鼠体重均值与对照组比较差异均无统计学意义(*P*>0.05);用肝脏系数反映肝脏重量,各剂量组小鼠肝脏系数均值与对照组比较差异均无统计学意义(*P*>0.05),见表 2。

表 2 FPN 持续暴露对 ND 小鼠体重和肝脏系数的影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	体重(g)	<i>t</i> 值(与对照组比较)	<i>P</i> 值(与对照组比较)	肝脏系数(%)	<i>t</i> 值(与对照组比较)	<i>P</i> 值(与对照组比较)
对照组	27.0±0.6	/	/	4.8±0.1	/	/
0.25 mg/kg	26.9±0.4	0.064	0.950	4.9±0.7	0.026	0.695
1 mg/kg	26.8±0.5	0.543	0.804	4.8±0.1	0.397	0.697
4 mg/kg	26.6±0.4	0.444	0.669	5.1±0.1	-1.396	0.200

2.2 FPN 暴露使 ND 小鼠肝脏组织产生轻度病理性变化 各组小鼠肝脏病理组织镜检结果表明,对照组小鼠肝脏细胞形态规整,无脂肪滴。0.25 mg/kg 组可见肝细胞分布稍散乱;1 mg/kg 组可见肝细胞分布更为散乱,细胞质中出现略多的脂滴空泡;4 mg/kg 组细胞内脂滴空泡也较对照组略多,见图 1。

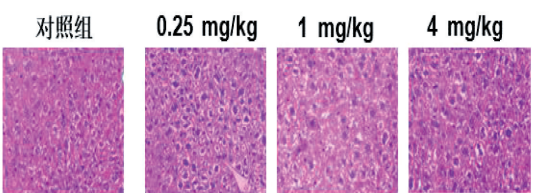


图 1 ND 小鼠各组肝脏组织 HE 染色(×200)

2.3 FPN 暴露致 ND 小鼠的肝脏脂代谢生化指标变化与对照组相比, FPN 剂量组血清 TG 水平升高, 且随 FPN 的浓度增大, 血清 TG 更高 (0.25 mg/kg: $t = -2.771, P < 0.05$; 1 mg/kg: $t = -3.158, P < 0.01$; 4 mg/kg: $t = -4.462, P < 0.01$), 血清 TC 水平在 1 mg/kg 组降低 ($t = 2.231, P < 0.05$), 血清 FFA 水平与对照组比较差异

均无统计学意义 ($P > 0.05$); 肝脏 TG 在 0.25 mg/kg 组水平升高 ($t = -2.108, P < 0.05$), 在 4 mg/kg 组降低 ($t = 3.816, P < 0.05$); 肝脏 TC 变化与 TG 一致, 在 0.25 mg/kg 组水平升高 ($t = -2.212, P < 0.05$), 在 4 mg/kg 组降低 ($t = -2.029, P < 0.05$); 肝脏 FFA 在 4 mg/kg 组降低 ($t = 2.441, P < 0.05$), 见表 3。

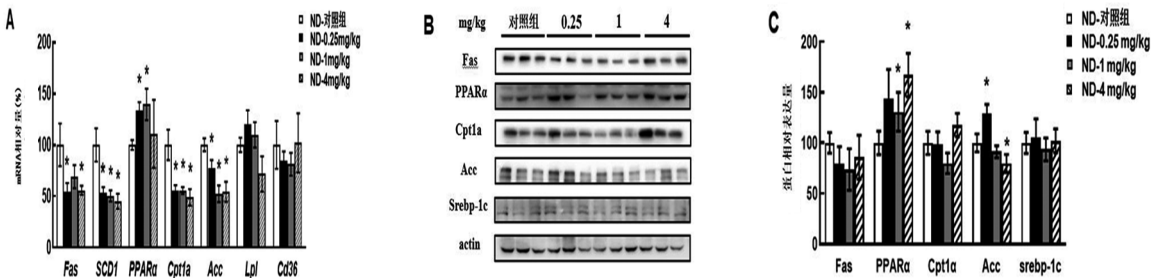
表 3 FPN 持续暴露对 ND 组小鼠肝脏脂质代谢生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	血清			肝脏		
	TG (mg/g)	TC (mg/g)	FFA (mmol/g)	TG (mg/g)	TC (mg/g)	FFA (mmol/g)
对照组	25.3±3.0	175.9±8.1	0.6±0.0	26.2±1.6	3.7±0.3	0.5±0.1
0.25 mg/kg	43.1±4.7 ^a	187.7±12.5	0.6±0.1	33.5±2.2 ^a	4.5±0.2 ^a	0.6±0.1
1 mg/kg	45.4±4.6 ^a	146.7±8.5 ^a	0.6±0.1	30.6±4.0	3.7±0.4	0.5±0.1
4 mg/kg	54.1±4.6 ^a	158.6±6.6	0.7±0.1	13.6±1.8 ^a	2.6±0.3 ^a	0.2±0.1 ^a

注: a FPN 剂量组与对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 FPN 暴露致 ND 小鼠的肝脏脂代谢通路紊乱 qPCR 结果发现, 基因 Fas、SCD1、Acc、Cpt1a 表达水平降低 ($P < 0.05$); PPAR α 在 0.25 和 1 mg/kg 组表达水平升高 ($P < 0.05$), 见图 2A。Western Blot 结果表明, 蛋白 Acc 在 0.25 mg/kg 组表达升高 ($P < 0.05$), 在

4 mg/kg 组表达下降 ($P < 0.05$); 蛋白 PPAR α 在 1 和 4 mg/kg 组表达水平升高 ($P < 0.05$); 蛋白 Fas、Serbp-1c 和 Cpt1a 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 2B、图 2C。



注: A 为肝脏脂代谢相关基因的 mRNA 水平; B 为肝脏脂代谢相关基因的蛋白表达免疫印迹图; C 为肝脏脂代谢相关基因的蛋白表达统计图。与对照组相比, $* P < 0.05$ 。

图 2 FPN 持续暴露对 ND 小鼠肝脏脂质代谢相关基因和蛋白表达的影响

2.5 FPN 暴露不改变 HFD 小鼠的体重和肝脏重量 HFD 小鼠结果表明, 各剂量组小鼠体重均值与对照组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 用肝脏系数反映

肝脏重量, 各剂量组小鼠肝脏系数均值对照组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 4。

表 4 FPN 持续暴露对 HFD 小鼠体重和肝脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	体重 (g)	t 值 (与对照组比较)	P 值 (与对照组比较)	肝脏系数 (%)	t 值 (与对照组比较)	P 值 (与对照组比较)
对照组	36.4±2.1	/	/	5.2±0.5	/	/
0.25 mg/kg	39.5±1.3	-1.191	0.259	4.6±0.2	1.166	0.268
1 mg/kg	36.7±1.8	-0.093	0.927	4.7±0.1	1.047	0.316
4 mg/kg	37.8±0.9	-0.622	0.546	5.3±0.3	-0.049	0.962

2.6 FPN 暴露使 HFD 小鼠肝脏组织产生明显病理性变化 HFD 各组小鼠肝脏病理组织镜检结果可见, 对照组小鼠肝脏细胞形态杂乱, 有大小不一的肝脏脂肪空泡, 脂肪滴明显, 高脂造模成功; 与对照组相比,

0.25 mg/kg 组肝脏脂肪变性程度加重不明显, 但 1 和 4 mg/kg 组的脂肪空泡更大, 提示肝脏脂肪变性程度加重, 见图 3。

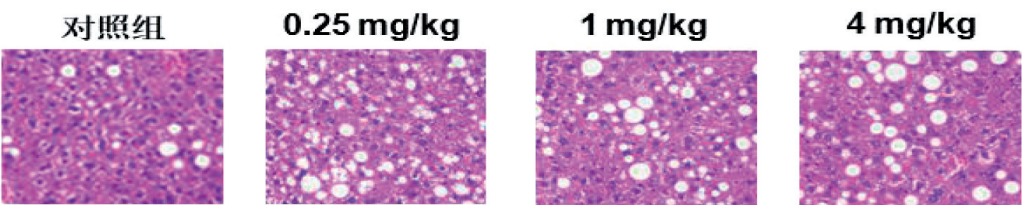


图3 HFD 小鼠各组肝脏组织 HE 染色(×200)

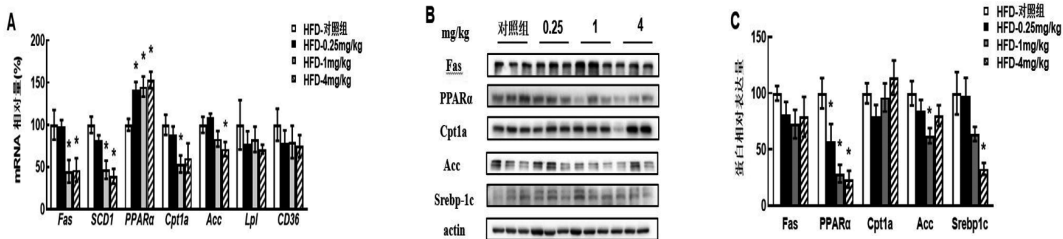
2.7 FPN 暴露致 HFD 小鼠的肝脏脂代谢生化指标变化 HFD 小鼠中 FPN 剂量组与对照组相比,4 mg/kg 组血清 TG 水平降低($t=2.260, P<0.05$),血清 TC 水平在 1 和 4 mg/kg 组降低(1 mg/kg: $t=3.981, P<0.01$;4 mg/kg: $t=2.837, P<0.05$),血清 FFA 水平在 0.25 和 1 mg/kg 组升高(0.25 mg/kg: $t=-2.321, P<0.05$;1 mg/kg: $t=-2.909, P<0.05$);肝脏 TG 随 FPN 剂量升高而升高(0.25 mg/kg: $t=-2.769, P<0.05$; 1 mg/kg: $t=-2.728, P<0.05$;4 mg/kg: $t=-5.192, P<0.01$),肝脏 TC 水平在不同剂量 FPN 组均升高(0.25 mg/kg: $t=-3.424, P<0.01$;1 mg/kg: $t=-2.595, P<0.05$;4 mg/kg: $t=-3.574, P<0.01$);肝脏 FFA 在 4 mg/kg 组升高($t=-2.223, P<0.05$),见表 5。

表5 FPN 持续暴露对 HFD 小鼠肝脏脂质代谢生化指标的影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	血清			肝脏		
	TG (mg/g)	TC (mg/g)	FFA (mmol/g)	TG (mg/g)	TC (mg/g)	FFA (mmol/g)
对照组	22.4±2.0	335.8±9.6	0.4±0.0	27.4±4.6	2.3±0.3	0.3±0.0
0.25 mg/kg	22.7±2.4	339.6±12.3	0.6±0.1 ^a	45.1±3.1 ^a	4.9±0.6 ^a	0.4±0.1
1 mg/kg	26.6±2.3	282.2±6.8 ^a	0.6±0.0 ^a	49.2±5.3 ^a	3.8±0.3 ^a	0.4±0.0
4 mg/kg	15.8±1.1 ^a	282.5±13.8 ^a	0.4±0.1	58.5±2.8 ^a	5.0±0.5 ^a	0.5±0.0 ^a

注:a 为 FPN 剂量组与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.8 FPN 暴露致 HFD 小鼠的肝脏脂代谢紊乱 HFD 小鼠 qPCR 结果发现,基因 Fas、SCD1、Acc 和 Cpt1a 表达水平在 FPN 暴露后下降($P<0.05$),基因 PPARα 表达水平升高($P<0.05$),见图 4A。Western Blot 结果显示蛋白 Acc 在 1 mg/kg 组表达下降($P<0.05$);蛋白 Serbp-1c 在 1 和 4 mg/kg 组表达下降($P<0.05$),蛋白 PPARα 表达均降低($P<0.05$),见图 4B、图 4C。



注:A 为肝脏脂代谢相关基因的 mRNA 水平;B 为肝脏脂代谢相关基因的蛋白表达免疫印迹图;C 为肝脏脂代谢相关基因的蛋白表达统计图。与对照组相比,* $P<0.05$ 。

图4 FPN 持续暴露对 HFD 小鼠肝脏脂质代谢相关基因和蛋白表达的影响

3 讨论

在本研究中,FPN 的染毒剂量为 0.25、1 和 4 mg/(kg·bw),与 Vasylieva 选用剂量接近^[10];按照等效剂量折算,人体的等效暴露剂量分别为 0.03、0.16 和 0.44 mg/(kg·bw)。FPN 的实际暴露水平波动较大,如“欧洲毒鸡蛋”事件,鸡蛋 FPN 含量可达 1.2 mg/kg,美国室内灰尘 FPN 可达 1.32~14.2 mg/kg^[11];均高于本实验染毒剂量所折算的人体摄入浓度;此外,FPN 在农业畜牧业中使用量的迅速增加将极大增加人类的暴露风险。因此,本研究

选用的氟虫腈剂量,具备相当的现实意义。本研究结果表明,ND 小鼠在 FPN 暴露后,低剂量下肝脏脂质积累增加,高剂量下肝脏 TG、TC 和 FFA 水平均降低,但血清 TG 水平升高,其中肝脏 TG 的下降与 Daim 等^[12]在较高剂量下观察到的结果一致(FPN 10 mg/kg),说明 FPN 暴露可致小鼠脂质代谢异常,低剂量肝脏脂质蓄积,高剂量时肝脏脂质蓄积有所缓解,且会诱导高脂血症,而血清 TG 的升高可能是 NAFLD 发展为非酒精性脂肪肝炎的表型^[13],当然这也有可能

是由于脂质稳态调控机制的复杂性所导致。而在高脂饮食条件下,血清 TG 在高剂量组下降,而肝脏内 TG 水平随 FPN 浓度的增高而增高,肝脏 TC 也表现相同趋势。这可能是由于 FPN 暴露使 HFD 小鼠肝细胞脂质分解能力下降,肝脏内 TG 和 TC 蓄积,高剂量组肝脏内升高的 FFA 也对肝细胞有更进一步的损伤作用,这都造成高剂量组肝脏脂质代谢严重失衡。FPN 导致 ND 小鼠血清 TG 升高;HFD 小鼠血清 FFA 水平升高,不仅会对肝细胞有损害作用,更是高血压、冠心病、心衰等心血管疾病的危险因素。

FPN 暴露后,ND 小鼠和 HFD 小鼠 PPAR α 的基因表达都是升高的,但是 ND 小鼠 PPAR α 蛋白表达增强,而 HFD 小鼠 PPAR α 的蛋白表达显著降低,此处蛋白在两种饮食模式下表达趋势相反,这提示在高脂饮食联合 FPN 暴露,可能会影响 PPAR α 基因的转录或翻译后调控(如转录后修饰或翻译后蛋白质三级结构的折叠)。有相关研究证明高脂饮食诱导的 NAFLD 会使肝脏细胞内质网腔内发生蛋白错误折叠与未折叠蛋白聚集,产生内质网应激^[14]。Xu 等^[15] 在研究指出轻度内质网应激时,PPAR α 表达上调,而重度内质网应激时,PPAR α 会被抑制,这与本研究结果相符,HFD 小鼠在 FPN 暴露后会引发重度 NAFLD,在内质网应激过程中 PPAR α 被抑制。这也提示后续研究需关注 FPN 和高脂饮食联合作用下对内质网应激相关因子的影响。

本研究提示,亚慢性 FPN 暴露可导致 ND 小鼠肝脏脂质代谢紊乱,诱发 NAFLD,FPN 在低剂量下增加肝脏脂质积累,高剂量下肝脏脂质蓄积有所缓解,但会诱发高脂血症,这可能和 FPN 在低剂量下激活脂质合成(Acc),在高剂量下激活肝脏 β -氧化(PPAR α)有关。对于高脂饮食条件下的小鼠,FPN 持续暴露可导致明显的肝脏表型变化,诱导脂质代谢紊乱,在各个剂量下都显著增加肝脏脂质蓄积,且呈剂量依赖关系。总之,FPN 暴露可导致小鼠肝脏脂质代谢紊乱,诱发 NAFLD,且这种效应在高脂饮食条件下更为显著。

本研究结果表明 FPN 暴露结合不良饮食模式对肝脏脂质代谢产生联合毒作用。上述结果也为明确 FPN 的毒理学效应提供了新思路。

参考文献

[1] Wahlang B, Jin J, Beier JJ, et al. Mechanisms of environmental contributions to fatty liver disease[J]. Curr Environ Health Rep,

2019, 6(3):80-94.

- [2] Slotkin TA, Brown KK, Seidler FJ. Developmental exposure of rats to chlorpyrifos elicits sex-selective hyperlipidemia and hyperinsulinemia in adulthood[J]. Environ Health Perspect, 2005, 113(10):1291-1294.
- [3] Supowit SD, Sadaria AM, Reyes EJ, et al. Mass balance of fipronil and total toxicity of fipronil-related compounds in process streams during conventional wastewater and wetland treatment[J]. Environ Sci Technol, 2016, 50(3):1519-1526.
- [4] Charalampous AC, Liapis KS, Bempelou ED, et al. Fipronil in eggs. Is LC-MS/MS the only option? A comparison study of LC-MS/MS and GC-ECD for the analysis of fipronil[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019,29(11):121785.
- [5] Gan J, Bondarenko S, Oki L, et al. Occurrence of fipronil and its biologically active derivatives in urban residential runoff[J]. Environ Sci Technol, 2012, 46(3):1489-1495.
- [6] Shi L, Jiang Y, Wan Y, et al. Occurrence of the insecticide fipronil and its degradates in indoor dust from South, Central, and North China[J]. Sci Total Environ, 2020,74(1):110-140.
- [7] Herin F, Boutet-Robinet E, Levant A, et al. Thyroid function tests in persons with occupational exposure to fipronil[J]. Thyroid, 2011, 21(7):701-706.
- [8] Kim YA, Yoon YS, Kim HS, et al. Distribution of fipronil in humans, and adverse health outcomes of in utero fipronil sulfone exposure in newborns[J]. Int J Hyg Environ Health, 2019, 222(3):524-532.
- [9] Vasylieva N, Barnych B, Wan D, et al. Hydroxy-fipronil is a new urinary biomarker of exposure to fipronil[J]. Environ Int, 2017, 103:91-98.
- [10] Foulds CE, Treviño LS, York B, et al. Endocrine-disrupting chemicals and fatty liver disease[J]. Nat Rev Endocrinol, 2017,13(8):445-457.
- [11] Mahler BJ, Van Metre PC, Wilson JT, et al. Fipronil and its degradates in indoor and outdoor dust[J]. Environ Sci Technol, 2009, 43(15):5665-5670.
- [12] Abdel-Daim MM, Shaheen HM, Abushouk AI, et al. Thymoquinone and diallyl sulfide protect against fipronil-induced oxidative injury in rats[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2018, 25(24):23909-23916.
- [13] Mato JM, Alonso C, Nouredin M, et al. Biomarkers and subtypes of deranged lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(24):3009-3020.
- [14] Silva-Veiga FM, Rachid TL, de Oliveira L, et al. GW0742 (PPAR-beta agonist) attenuates hepatic endoplasmic reticulum stress by improving hepatic energy metabolism in high-fat diet fed mice[J]. Mol Cell Endocrinol, 2018,47(4):227-237.
- [15] Xu L, Zhang X, Tian Y, et al. The critical role of PPAR α in the binary switch between life and death induced by endoplasmic reticulum stress[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(8):691-720.

收稿日期:2021-06-16