

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20210220002

张鹏, 郑丽洋, 高会会, 等. 三氯生暴露加剧高脂饮食诱导的小鼠肠道和肝脏功能损伤[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(4): 131-140 Zhang P, Zheng L Y, Gao H H, et al. Triclosan exposure exaggerates injury of intestine and liver function induced by high fat diet in mice [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(4): 131-140 (in Chinese)

三氯生暴露加剧高脂饮食诱导的小鼠肠道和肝脏功能 损伤

张鹏^{1,3},郑丽洋²,高会会²,毛大庆²,罗义^{1,3,*}

南开大学环境科学与工程学院,天津 300350
 南开大学医学院,天津 300071
 南京大学环境学院,污染控制与资源化国家重点实验室,南京 210093
 收稿日期:2021-02-20
 录用日期:2021-03-15

摘要:三氯生(triclosan, TCS)在环境中被广泛检出,已成为重要的环境污染物,且 TCS 暴露能够影响机体的肠道菌群组成和脂 类物质代谢过程。为了探讨 TCS 暴露对高脂饮食(high fat diet, HFD)诱导的肝脏功能损伤的影响及其机制,C57BL/6J 小鼠随 机分为正常饮食对照组、TCS 组、HFD 组和 HFD+TCS 组;首先对 TCS 组和 HFD+TCS 组小鼠进行提前一周 TCS(10 μg·g⁻¹饲 料)暴露,然后再同时进行 6 周的 TCS 暴露和 HFD 喂养。实验结束后,利用细菌特征序列对肠道菌群进行绝对定量分析,利用 苏木精-伊红染色、实时荧光定量 PCR、酶联免疫吸附测定、蛋白免疫印迹和流式细胞术等试验技术检测小鼠肠道和肝脏等生 理变化状况。与对照组相比,TCS 暴露和高脂饮食均能明显引起肠道菌群中厚壁菌门和拟杆菌门含量降低,同时引起小鼠脾 脏中 CD8⁺和 CD4⁺ T 细胞比例失调,但未导致显著的肠道屏障损伤和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)异位;高脂饮食能够显著 提高小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)和甘 油三酯(triglyceride, TG)的水平,而单独 TCS 暴露并没有引起明显的肝脏功能紊乱。与 HFD 组相比,HFD 和 TCS 协同作用激 活了小鼠肝脏中 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4)炎症通路,造成小鼠肝脏炎症反应,并显著提高了小鼠 ALT 和 AST 水 平,加剧了高脂饮食对小鼠肝脏功能的损伤。由此可知,TCS 暴露通过引起小鼠肠道菌群紊乱和机体免疫响应,加剧高脂饮 食诱导的小鼠肠道损伤和肝脏功能紊乱。

关键词:三氯生;高脂饮食;肠道菌群;肝脏;炎症;TLR4 通路 文章编号:1673-5897(2021)4-131-10 中图分类号:X171.5 文献标识码:A

Triclosan Exposure Exaggerates Injury of Intestine and Liver Function Induced by High Fat Diet in Mice

Zhang Peng^{1,3}, Zheng Liyang², Gao Huihui², Mao Daqing², Luo Yi^{1,3,*}

1. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300350, China

2. School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China

3. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China

Received 20 February 2021 accepted 15 March 2021

第一作者:张鹏(1991—),男,博士研究生,研究方向为健康毒理学,E-mail: zpeng@mail.nankai.edu.cn

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: luoy@nankai.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(41831287);国家杰出青年科学基金资助项目(41525013);天津市自然科学基金资助项目 (19JCZDJC40800)

Abstract: Triclosan (TCS) as an antimicrobial ingredient, is commonly added into the consumer products, such as soaps, toothpastes, cosmetics and other daily necessities. Due to the massive usage in daily life, TCS has been widely detected in the environment especially rivers and lakes. TCS exposure affected the composition of gut microbiota and disturbed the lipid metabolism process in aquatic organisms and murine models. In order to investigate the effect of TCS exposure on liver function injury induced by high fat diet (HFD), we constructed a mice model fed with HFD. After adaptation to the specific pathogen free (SPF) environment for one week, these C57BL/6J mice were randomly divided into 4 groups, the control group fed with normal chow, TCS group fed with normal chow containing TCS (10 µg · g⁻¹ diet), HFD group fed with HFD, HFD+TCS group fed with HFD containing TCS. The group of TCS and HFD+TCS were firstly exposed to TCS by feeding normal chow with TCS for one week, then the group of HFD was fed with HFD and HFD+TCS group was fed with HFD containing TCS, and the whole experiment last for another 6 weeks. At the end of the experiment, the abundance of Firmicutes, Bacteroidetes and Enterobacteriaceae were quantitated by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) based on the bacterial characteristic sequences. Physiological changes in the murine intestine and liver tissues were characterized by H&E staining, RT-qPCR, ELISA, Western blotting and flow cytometry. Compared with the control group, the treatment of TCS and HFD significantly reduced the contents of Firmicutes and Bacteroidetes and increased the abundance of Enterobacteriaceae in the gut microbiota, but caused no significant intestinal barrier damage and could not promote the lipopolysaccharide (LPS) translocation from the intestinal tract into the circulatory system. In addition, TCS exposure and HFD also caused the imbalance of CD8⁺ and CD4⁺ T cells in the spleen of mice. Moreover, the HFD treatment significantly increased alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and triglyceride (TG) levels in mice, while single TCS exposure did not cause significant liver dysfunction. Compared with the HFD group, the combination of HFD and TCS activated the Toll-like receptor 4 (TLR4) protein and promoted the inflammatory responses in the liver of mice, which significantly increased the levels of ALT and AST and aggravated the injury of the liver function caused by the HFD. In conclusion, TCS exposure can exacerbate intestine and liver dysfunction induced by HFD via disordering the gut microbiota and body immunity, and promoting liver inflammation.

Keywords: triclosan; high fat diet; gut microbiota; liver; inflammation; TLR4 pathway

三氯生(triclosan, TCS),又名三氯沙、三氯新,其 作为一种抗菌剂被广泛添加到2000多种日常生活 用品,如肥皂、牙膏、化妆品、服装、家具甚至儿童玩 具等^[1]。由于含 TCS 日用品的广泛使用, TCS 随着 生活污水的排放已经对淡水生态系统造成了较严重 的污染^[2]。研究表明,残留于环境中的 TCS 及其代 谢产物具有持久性和生物累积性,对水生生态系统 平衡造成了显著影响,甚至对动物以及人类健康造 成威胁^[3]。越来越多的证据表明, TCS 作为杀菌剂 能够加速环境中细菌的进化^[4],扰乱水生生物肠道 菌群^[5],并造成水生生物(蝌蚪和水蚤等)脂类物质代 谢异常[6-7]。最近的研究发现,在人体血液、尿液甚 至母乳中均可检测到一定水平的 TCS^[8-10],并且 TCS 暴露能够显著改变人体肠道菌群^[11]。基于流 行病学调查和动物模型的研究发现,TCS 暴露与机 体内分泌功能紊乱和心血管功能衰竭等不良健康反

应有关^[12-16],而且 TCS 暴露能够通过加剧肝脏组织 再生和纤维化显著改变肝脏功能,甚至引起肝癌^[17]。

近几年的研究表明,高脂饮食作为当前人类最 重要的一种饮食方式存在诸多健康风险,其中肠道 微生态紊乱与高脂饮食引起的代谢系统疾病关系密 切^[18],尤其是肠道菌群对于宿主肝脏生理稳态的维 持意义重大。肠道内的细菌代谢物或细菌组分(如 革兰氏阴性细菌细胞壁组分——脂多糖)通过门静 脉直接进入肝脏,会引起肝脏低水平炎症和糖代谢 紊乱,扰乱机体肝脏功能^[19]。然而,目前对 TCS 引 起的肠道菌群紊乱在机体健康中潜在风险的研究还 存在不足,尤其是 TCS 能否影响高脂饮食引起的机 体肝脏功能紊乱的证据缺乏,而这对于 TCS 暴露和 摄入高脂饮食过多的人群具有重要意义。本研究旨 在阐述 TCS 是否加重高脂饮食诱导的肝脏功能紊乱 及其潜在的机制,首次在高脂饮食模型小鼠中证实了 TCS 引起的肠道菌群紊乱通过诱发肝脏炎症加剧高 脂饮食诱导的肝脏功能损伤,为全面阐述 TCS 对机 体的毒性及其使用策略的调控提供了理论依据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 主要试剂与仪器

三氯生(CAS No.: 3380-34-5), 购于大连美仑生 物技术有限公司,纯度>99%;组织 RNA 提取试剂 TRIzol,购于美国 Life Technologies 公司:大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,粪便总 DNA 提取试剂盒、小鼠 白介素(interleukin, IL)-6 ELISA 试剂盒、红细胞裂解 液、蛋白酶抑制剂、组织蛋白提取裂解液(高效 Ripa 裂解液)、BCA蛋白定量分析试剂盒、蛋白上样缓冲 液、二抗和辣根过氧化物酶显色液等购于北京索莱 宝生物科技有限公司;RNA 反转录试剂盒和实时荧 光定量 PCR(RT-qPCR)试剂盒购于宝日医生物技术 (北京)有限公司;质粒 DNA 提取试剂盒和 AT 克隆 试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;小 鼠脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)ELISA 试剂盒购 自武汉华美生物工程有限公司;小鼠流式抗体 APC-CD3、FITC-CD4 和 PE-CD8 购自美国 Biolegend 公 司;小鼠蛋白一抗 TLR4、TNF- α 和 β -actin 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche, LightCycler96);赛多利斯电子天平(上海赛多利斯, Secura);天能化学发光凝胶成像系统(上海天能, 5200Multi);超微量分光光度计(德国 Implen, N50); 全波长多功能酶标仪(瑞士 Tecan, M1000);流式细 胞仪(美国 BD, Accuri C6);全自动生化分析仪(深圳 迈瑞,BS-200);离心机(德国 Eppendorf,5430R)。

1.2 动物暴露实验

4~5周洁净级(specific pathogen free, SPF) C57BL/6J 雄性小鼠 32 只,购自北京华阜康生物科 技股份有限公司。小鼠饲养条件:温度 22℃±1℃、 湿度(50±10)%、12h有光/12h黑暗,自由进水和食 物。高脂饲料(45% fat kJ%)和对照饲料(10% fat kJ%)购自江苏美迪森生物医药有限公司,将 TCS 分 别均匀混入饲料制成含 TCS(10 μg·g⁻¹)的对照饲料 和高脂饲料颗粒。小鼠适应性喂养一周后随机分为 4组,每组8只,分别为正常饮食对照组(control)、三 氯生组(TCS)、高脂饮食组(HFD)和高脂饮食加三氯 生组(HFD+TCS),并随即对 TCS 组和 HFD+TCS 组 喂养含 TCS 的对照饲料。一周后, HFD 开始以高脂

饲料喂养,HFD+TCS 组开始喂食含 TCS 的高脂饲 料,每周检测小鼠体质量并收集小鼠新鲜粪便,连续 饲养6周。实验结束后摘眼球取血,然后颈椎脱臼 处死小鼠,迅速在无菌条件下取出小鼠脾脏、结肠和 肝脏等组织,用于下一步实验。

1.3 肝脏组织蛋白提取和蛋白免疫印迹分析

根据组织蛋白提取试剂盒说明,将 50 mg 肝脏 组织在冰上剪成细小碎片,加入1 mL 裂解液和适 量的蛋白酶抑制剂,涡旋混匀,直至充分裂解,然后 将样品在4℃条件下12000g离心5min,取部分上 清进行 BCA 蛋白含量测定,并将其他上清与蛋白上 样缓冲液混合用于 Western blotting 分析。取 30 µg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳(浓缩胶,65 V 30 min; 分离胶, 100 V 90 min), 然后将胶上蛋白湿 转到 PVDF 膜上(恒流 200 mA, 2 h), 接着 5% 脱脂奶 粉封闭 60 min,小鼠 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)、TNF- α 和 β -actin 一抗孵育过夜。经 TBST 洗 涤3次后,室温条件下孵育偶联辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP)的二抗 60 min。最后 经化学发光显影液处理并使用凝胶成像系统进行拍 照,利用 ImageJ 软件对蛋白条带进行半定量分析。

1.4 组织总 RNA 提取和 RT-qPCR 分析

使用 TRIzol 法提取小鼠结肠和肝脏组织总 RNA,利用超微量分光光度计进行 RNA 含量测定。 取1 µg RNA 样本进行反转录获得 cDNA, 然后使用 TB Green 嵌合荧光法对 cDNA 样本进行靶基因检 测,引物序列如表1所示。RT-qPCR的反应条件 为:95 ℃预变性 5 min,然后进行 40 个循环的 95 ℃ 变性15 s 和60 ℃延伸30 s,之后进行仪器默认的溶 解曲线分析。以管家基因 β -actin 作为 mRNA 表达 分析的内参,并采用2^{-ΔΔC_T}法对各处理组靶基因进 行相对定量分析^[20]。

1.5 粪便菌群绝对定量

通过 AT 克隆的方法构建含小鼠厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和肠杆菌科(Enterobacteriaceae)特征序列的质粒载体,然后转入到 DH5 α 感受态细胞,挑选阳性克隆扩增培养,然后提 取质粒 DNA,并使用超微量分光光度计进行质粒 DNA 含量测定,并计算出质粒拷贝数,通过 RTqPCR 方法确定每种靶标菌序列 CT 值和拷贝数之 间的标准曲线,然后再对粪便菌群 DNA 进行 RTqPCR 方法分析,最后计算出各类肠道菌在粪便样 本中的拷贝数。公式如下:

$PCN = \frac{CP \times 6.022 \times 10^{23}}{LP \times 1 \times 10^{9} \times 650}$

式中:PCN 为平均每个细菌的质粒拷贝数(plasmid copy number), CP 为含每类菌特征序列质粒 DNA 的浓度($ng \cdot \mu L^{-1}$), LP 为含每类特征菌序列的质粒 长度(bp)。

1.6 脾脏淋巴细胞分离和流式细胞分析

将分离的脾脏组织浸泡在预冷的1 mL 无菌磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,取部分脾脏组织轻轻研磨并过100 目不锈钢筛网,将过滤液在4 ℃条件下400 g 离心10 min,取上清,加2 mL 红细胞裂解液,并于37 ℃孵育2 min,然后用 PBS 洗2 遍并去上清,收集淋巴细胞进行染色。将小鼠 APC-CD3、FITC-CD4和 PE-CD8 抗体与淋巴细胞混匀,并于暗室中冰上孵育30 min,然后用预冷的 PBS 洗2 遍,收集染色后的细胞并用 0.1% 多聚甲醛固定。最后使用流式细胞仪进行淋巴细胞分析,并使用 FlowJo 对各细胞系进行分析获得数据。

1.7 生化分析

通过全自动生化分析仪检测肝功能指标丙氨酸 氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬 氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)和 甘油三酯(triglyceride, TG)水平;血清 IL-6 含量、血 清 LPS 和粪便 LPS 含量通过 ELISA 方法检测。

1.8 统计方法

数据处理采用 Graphpad Prism 8 软件的单因素 方差分析(ANOVA),随后采用 Turkey 法进行显著性 分析,并用字母标记法对各组间分析进行显著性标记。标记原则为:相同字母表示组间差异不显著,不同字母表示组间有显著性差异(P<0.05)。

2 结果(Results)

2.1 TCS 暴露加重高脂饮食对小鼠的损伤

如图 1(a)所示,4~5 周的小鼠适应环境后使用 TCS 处理一周,高脂饮食再喂养小鼠 6 周。与对照 组相比,TCS 暴露 7 周后小鼠体质量和肝脏质量没 有显著性差异;HFD 组的小鼠体质量从第 4 周开始 表现出明显的差异;而 HFD 和 TCS 一起处理小鼠 的体质量在第 3 周就表现出明显差异。如图 1(b)所 示,与 HFD 组小鼠相比,HFD+TCS 组的小鼠体质 量从第 4 周开始明显提高。如图 1(c)所示,HFD 组 的小鼠相对肝脏质量为(6.3±0.7)%,显著高于 control 组(4.3±0.1)%和 TCS 组(4.4±0.4)%小鼠的相对 肝脏质量,但是明显低于 HFD+TCS 组小鼠的相对 肝脏质量(8.4±0.9)% (P<0.05)。

2.2 TCS 暴露扰乱肠道菌群稳态

如图 2(a)所示,与对照组相比,单独 TCS 暴露 能够降低粪便中厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门 (Bacteroides)肠道菌的含量,增加肠杆菌科(Enterobacteriaceae)肠道菌的含量;与 TCS 组和 HFD 组相 比,HFD 和 TCS 联合处理进一步降低了粪便中厚壁 菌门和拟杆菌门肠道菌的含量,增加了肠杆菌科肠 道菌的含量。如图 2(b)所示,HFD+TCS 组小鼠单位 质量粪便(g)中 LPS 的含量显著高于其他处理组。

Table 1 Gene-specific primer sequences used for RT-qPCR		
基因名称 Gene	上游引物(5'~3') Forward primer (5'~3')	下游引物(5'~3') Reverse primer (5'~3')
ZO-1	ACCCGAAACTGATGCTGTGGATAG	AAATGGCCGGGCAGAACTTGTGTA
Occludin	GGACCCTGACCACTATGAAACAGACTAC	ATAGGTGGATATTCCCTGACCCAGTC
MUC2	ATGCCCACCTCCTCAAAGAC	GTAGTTTCCGTTGGAACAGTGAA
<i>IL-1β</i>	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	GATCCACACTCTCCAGCTGCA
ІІ-6	CACTTCACAAGTCGGAGGCT	CTGCAAGTGCATCATCGTTGT
IL-10	AGTGGAGCAGGTGAAGAGTG	TTCGGAGAGAGGTACAAACG
β-actin	AGGGAAATCGTGCGTGACAT	CGTTGCCAATAGTGATGACC
Firmicutes	GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA	AGCTGACGACAACCATGCAC
Bacteroidetes	GTTTAATTCGATGATACGCGAG	TTAASCCGACACCTCACGG
Enterobacteriaceae	GTGCCAGCAGCCGCGGTAA	GCCTCAAGGGCACAACCTCCAAG

表1 RT-qPCR 引物序列

注:ZO-1 为肠道紧密连接蛋白中的闭合蛋白(Zonula occludens-1), MUC2 为黏蛋白(Mucin 2), IL 为白介素。

Note: ZO-1 represents intestinal tight junction protein, Zonula occludens-1; MUC2 represents mucin protein, Mucin 2; IL represents interleukin.



图 1 TCS 暴露加重高脂饮食对小鼠体质量和肝脏的影响

注:(a)实验流程图,(b)实验过程中小鼠体质量变化曲线图,(c)实验结束时小鼠相对肝脏质量(肝脏质量/体质量);数据表示为平均值±标准差(mean±SD),每组8只小鼠,图中不同字母代表存在组间显著性差异(P<0.05),图(b)中#(P<0.05)和##(P<0.01)表示在不同喂养时间处理组与 对照组相比存在显著性差异,*(P<0.05)和**(P<0.01)表示在不同喂养时间 HFD+TCS 组与 HFD 组相比存在显著性差异。

Fig. 1 TCS exposure exaggerates the effects of high fat diet on body mass and liver in mice Note: (a) the schedule of the experiment, (b) the curve of body mass change of mice during the experiment, (c) the relative liver mass of mice (liver mass/body mass); the data are expressed as mean±SD of eight mice; different letters indicate the significant differences between groups (P<0.05), # (P<0.05) and ## (P<0.01) indicate the significant difference between the control group and other groups, and * (P<0.05) and ** (P<0.01) indicate the significant difference between the HFD group and HFD+TCS group.</p>





注:(a)单位质量(g)小鼠粪便中厚壁菌门、拟杆菌门和肠杆菌科肠道菌的拷贝数,(b)单位质量(g)粪便中细菌脂多糖的含量; 数据表示为平均值±标准差(mean±SD), n=5,不同字母代表存在组间显著性差异(P<0.05)。

Fig. 2 TCS exposure disturbed the gut microbiota

Note: (a) the copy numbers of Firmicutes, Bacteroides and Enterobacteriaceae per gram of feces, (b) the lipopolysaccharides (LPS) contents per gram of feces; the data are expressed as mean \pm SD, n=5; different letters indicate the significant differences between groups (P < 0.05).

2.3 TCS 暴露加重高脂饮食诱导的肠道屏障损伤

如图 3(a)所示, H&E 染色结果表明, TCS 组和 HFD 组小鼠表现出一定程度的肠道损伤, 而 HFD+ TCS 组小鼠结肠损伤程度明显高于 TCS 组和 HFD 组; HFD+TCS 组小鼠结肠组织病理学评分显著高 于其他组。为进一步探究 TCS 和 HFD 对小鼠肠道 屏障功能的影响,本研究检测了紧密连接蛋白基因 ZO-1、Occludin 和粘蛋白 MUC2 在 mRNA 水平上的 相对表达量。如图 3(b)~(d)所示, 与对照组、TCS 组和 HFD 组相比, TCS+HFD 组小鼠肠道组织中紧 密连接蛋白基因 ZO-1、Occludin 和粘蛋白 MUC2 的 表达都出现显著降低的趋势。肠道屏障损伤的加剧 可导致 LPS 从肠腔异位到血液循环系统^[21], 如图 3 (e)所示, HFD+TCS 组小鼠血清中 LPS 的含量显著 高于其他组; 而 TCS 组和 HFD 组小鼠的 LPS 含量 与对照组没有显著性差异。

2.4 TCS 暴露加重 HFD 引起的免疫紊乱 如图 4 所示, TCS 和 HFD 引起了机体免疫变化。



图 3 TCS 暴露加重高脂饮食诱导的肠道屏障损伤

注:(a)末端结肠组织的 H&E 染色(左)和组织学评分(右),

(b)结肠组织中基因 ZO-1 的相对表达量,(c)结肠组织基因 Occludin 的相对表达量,(d)结肠组织中基因 MUC2 的相对表达量,
(e)小鼠血清中 LPS 水平;图中数据表示为平均值±标准差(mean±SD),n=5;图中不同字母代表存在组间显著性差异(P<0.05)。
Fig. 3 TCS exposure aggravates intestinal barrier damage induced by high fat diet

Note: (a) representative H&E-stained colon sections (Left) and histological score (Right), (b) gene expression of ZO-1 in colon, (c) gene expression of Occludin in colon, (d) gene expression of MUC2 in colon, (e) concentration of LPS in serum; the data are expressed as mean±SD, n=5; different letters indicate the significant differences between groups (P<0.05).



图 4 TCS 暴露加重高脂饮食引起的机体免疫紊乱

注:(a)小鼠脾脏中 CD3⁺ T 细胞群中 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞亚群的分群状况,(b) CD3⁺CD4⁺ T 细胞亚群占 CD3⁺ T 细胞群的比例, (c) CD3⁺CD8⁺ T 细胞亚群占 CD3⁺ T 细胞群的比例,(d) CD3⁺ T 细胞群中 CD8⁺和 CD4⁺ T 细胞亚群的比例, (e)小鼠血清中 IL-6 水平;图中数据表示为平均值±标准差(mean±SD),*n*=5;图中不同字母代表存在组间显著性差异(*P*<0.05)。

Fig. 4 TCS exposure aggravates immune disorders induced by high fat diet

Note: (a) the cluster profiles of CD4⁺ and CD8⁺ subgroup T cells in CD3⁺ T cells of murine spleen, (b) the proportion of CD3⁺CD4⁺ T cells in CD3⁺ T cells, (c) the proportion of CD3⁺CD8⁺ T cells in CD3⁺ T cells, (d) the ratio of CD4⁺ to CD8⁺ subgroup T cells in CD3⁺ T cells, (e) the serum IL-6 level; the data are expressed as mean±SD, n=5; different letters indicate the significant differences between groups (P<0.05).

与对照组相比(图 4(a)~(d)), TCS 组和 HFD 组小鼠 脾脏中 CD3⁺CD4⁺T 细胞比例显著降低, CD3⁺CD8⁺ T 细胞的比例明显提高。与 HFD 组相比, HFD + TCS 组小鼠的机体免疫进一步紊乱, CD3⁺T 细胞群 中 CD4⁺T 细胞的比例明显降低, 而 CD8⁺T 细胞群 CD3⁺T 细胞群中的比例以及 CD8⁺T 细胞相对 CD4⁺T 细胞的比例明显提高(P<0.05)。如图 4(e)所 示, 与对照组相比, TCS 和 HFD 处理显著提高了小 鼠血清 IL-6 水平; 而 HFD+TCS 组小鼠血清中的 IL-6 水平明显高于 TCS 组或 HFD 组(P<0.05)。IL-6 作 为重要的炎症介质, 对机体细菌感染和炎症有重要 意义。

2.5 TCS 暴露加重 HFD 引起的肝脏功能紊乱

如图 5(a)~(c)所示,与对照组相比,TCS 处理轻 微提高了小鼠血液中 ALT、AST 和 TG 的水平,但是 不存在显著性差异(P>0.05);HFD 处理显著提高了 小鼠 ALT、AST 和 TG 水平(P<0.05)。此外,HFD+ TCS 组小鼠的 ALT、AST 和 TG 水平明显高于 HFD 组(P<0.05),表明 TCS 处理能够加重 HFD 引起的肝 脏功能紊乱。

TCS 暴露明显提高了 HFD 处理小鼠血清中 LPS 含量,而 LPS 能够激活肝脏炎症反应加重肝脏 损伤。如图 6(a)所示,与对照组相比,TCS 和 HFD 处理没有激活肝脏中 TLR4 和 TNF-α 蛋白的表达, 而 TCS 和 HFD 协同处理显著提高了肝脏中 TLR4 蛋白和 TNF-α 蛋白的表达(*P*<0.05)。如图 6(b)所 示,与对照组相比,TCS 处理没有改变肝脏中炎症 因子 IL-1β 和 IL-6 及抗炎因子 IL-10 的基因表达; 而 HFD 显著提高了肝脏中 IL-1β 和 IL-6 的基因表 达,并降低了 IL-10 的基因表达(P<0.05)。与 HFD 组相比,TCS 和 HFD 协同暴露显著提高了炎症因子 IL-1β 和 IL-6 的表达,并进一步降低了抗炎因子 IL-10 的基因表达(P<0.05)。

3 讨论(Discussion)

本研究分析了 TCS 和 HFD 对小鼠肠道菌群、 肠道屏障功能、机体免疫以及肝脏功能的影响。结 果显示,TCS 处理引起肠道菌群紊乱和粪便 LPS 升 高,通过受损的肠道屏障造成 LPS 异位到血液循环 系统,加剧了 HFD 引起的肝脏功能紊乱。

目前,TCS 的毒性作用机制还没有被完全阐明,然而不断有研究表明,TCS 暴露能够引起水生生物,哺乳动物甚至人体肠道菌群的紊乱^[22-24]。有研究发现,环境相关浓度(environmentally relevant concentrations)约0.35~3.45 nmol·L⁻¹ TCS 暴露使黑头软口鲦(*Pimephales promelas*)肠道菌群多样性显著降低^[25]。由于含 TCS 日用品废弃物的大量排放导致淡水生态系统中 TCS 污染严重,甚至某些地区 TCS 成为河流中排名前十的污染物^[26],因此 TCS 对水生生态系统平衡有不可忽视的负面影响。随着研究深入,TCS 暴露对水生生物代谢方面的影响不断被揭示,其中环境相关浓度 TCS 暴露能够显著影响非洲蟾蜍(*Xenopus tropicalis*)肝脏代谢和机体免疫^[27-28],尤其是对正常肝脏脂代谢功能的损伤表明



图 5 TCS 暴露加重高脂饮食引起的肝脏功能紊乱

注:(a)小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶水平,(b)小鼠血清中天门冬氨酸氨基转移酶水平;(c)小鼠血清中甘油三酯水平; 图中数据表示为平均值±标准差(mean±SD),n=5;图中不同字母代表存在组间显著性差异(P<0.05)。

Fig. 5 TCS exposure aggravates liver function disorders induced by high fat diet

Note: (a) the alanine aminotransferase (ALT) levels in mice serum, (b) the aspartate transaminase (AST) levels in mice serum, (c) the triglyceride levels in mice serum; the data are expressed as mean \pm SD, n=5; different letters indicate the significant differences between groups (P < 0.05).



图 6 TCS 暴露通过炎症反应加重高脂饮食诱导的肝脏功能紊乱

注:(a)肝脏组织中 TLR4 和 TNF-α 蛋白的表达水平,(b)肝脏组织炎症因子 IL-1β 和 IL-6及抗炎因子 IL-10 的基因表达水平; 图中数据表示为平均值±标准差(mean±SD), n=5;图中不同字母代表存在组间显著性差异(P<0.05)。

Fig. 6 TCS exposure aggravates liver function disorders induced by high fat diet via inflammatory responses Note: (a) the protein expression of TLR4 and TNF- α in liver tissues, (b) the gene expression of pro-inflammation cytokines of *IL-1* β and *IL-6* and anti-inflammation cytokines *IL-10* in liver tissues; the data are expressed as mean±SD, n=5; different letters indicate the significant differences between groups (P<0.05).

TCS 暴露有导致非酒精性脂肪性肝病的风险。此外,利用斑马鱼作为研究对象,TCS 同样对机体脂 代谢过程有一定影响^[29]。本研究发现,TCS 暴露能 够引起小鼠肠道菌群紊乱,降低肠道中厚壁菌门和拟 杆菌门等肠道共生菌的含量,并造成一定程度的肠道 损伤,但是并没有导致显著的小鼠肝脏功能改变。

高脂饮食摄入是当前普通人群肥胖的主要诱 因,其中高脂饮食主要通过影响肝脏脂肪代谢加剧 机体负担,甚至诱发多种慢性疾病^[30]。虽然高脂饮 食损伤肝脏正常生理功能是一个相对缓慢的过程, 但是不断有研究表明,多种环境污染物(如多氯联苯 和有机磷农药等)能够加速这个过程,进而造成严重 的机体负担^[31-33]。进一步的毒理学研究发现,除了 此类环境污染物对肝脏的直接毒性外,肝脏作为机 体最重要的解毒和异生质转化器官,缺乏对大多数 环境污染物的直接代谢机制而造成异生质的累积也 是造成肝脏功能紊乱的重要原因^[34]。然而,越来越 多的研究表明,肠道菌群在机体健康中发挥重要作 用,同时大多数环境污染物引起的肠道菌群变化及 其对机体健康的影响也不断被阐明^[35-36]。高脂饮食 能够引起小鼠肠道菌群紊乱和机体免疫响应,造成 小鼠血液中 AST、ALT 和 TG 含量明显升高,进而导 致肝脏功能异常。本文的研究结果表明,TCS 暴露 能够显著提高 HFD 暴露小鼠血液中 AST、ALT 和 TG 水平,加重小鼠的肝脏功能损伤。

本研究中,为了探讨 TCS 引起的肠道菌群变化 的作用,在喂养高脂饮食前一周开始 TCS 处理,最 终引起小鼠肠道菌群中厚壁菌门和拟杆菌门肠道菌 的含量显著降低,这与之前的研究结果一致^[37]。此 外我们还发现 TCS 暴露极大地提高了 HFD 饲养小 鼠肠道中肠杆菌科丰度和粪便 LPS 含量,这可能导 致肠道菌群致病潜能的增加^[38]。由于肠杆菌科细菌 的丰度增加与代谢系统疾病和炎症性肠病密切相 关^[39-40],已经有研究将肠道中肠杆菌科作为一种可 能的疾病微生物特征^[41]。其中,肠杆菌科细菌的过 度生长首先会引起肠道炎症,损伤肠道屏障功能,导 致肠道菌群及其产物(如 LPS 等)异位到血液循环系 统中,使机体处于炎症状态。低浓度 TCS(约 8~10 μg·g⁻¹饲料)暴露 3 周能够引起小鼠轻微的肠道炎 症响应^[42],而相似浓度 TCS 暴露 8 个月后引起明显 的小鼠肝脏纤维化甚至肝癌^[43]。在我们的研究中, TCS(10 μg·g⁻¹饲料)处理 7 周后引起了机体免疫反 应,但是没有引起明显的肝脏炎症和肝脏功能改变; 尽管如此,TCS 处理显著增强了高脂饮食对小鼠肝 脏功能的损伤,其中血液中累积的 LPS 通过 TLR4 途径激活的肝脏炎症反应可能发挥重要作用。该研 究为全面了解 TCS 的毒性以及其通过扰乱肠道菌 群加重 HFD 对机体肝脏功能损伤的机制提供了借 鉴,同时为探索众多环境污染物对机体健康的影响 提供了思路。

通讯作者简介:罗义(1971—),女,博士,教授,主要研究方向 为环境中耐药基因的来源、分布和归趋及耐药基因的人体健 康效应。

参考文献(References):

- Halden R U. On the need and speed of regulating triclosan and triclocarban in the United States [J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(7): 3603-3611
- [2] Perez A L, de Sylor M A, Slocombe A J, et al. Triclosan occurrence in freshwater systems in the United States (1999—2012): A meta-analysis [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2013, 32(7): 1479-1487
- [3] Yueh M F, Tukey R H. Triclosan: A widespread environmental toxicant with many biological effects [J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2016, 56: 251-272
- [4] Lu J, Guo J H. Disinfection spreads antimicrobial resistance [J]. Science, 2021, 371(6528): 1-474
- [5] Narrowe A B, Albuthi-Lantz M, Smith E P, et al. Perturbation and restoration of the fathead minnow gut microbiome after low-level triclosan exposure [J]. Microbiome, 2015, 3: 6
- [6] Chai L H, Chen A X, Luo P P, et al. Histopathological changes and lipid metabolism in the liver of *Bufo gargarizans* tadpoles exposed to triclosan [J]. Chemosphere, 2017, 182: 255-266
- [7] Sengupta N, Reardon D C, Gerard P D, et al. Exchange of polar lipids from adults to neonates in *Daphnia magna*: Perturbations in sphingomyelin allocation by dietary lipids and environmental toxicants [J]. PLoS One, 2017, 12

(5): e0178131

- [8] Heffernan A L, Baduel C, Toms L M, et al. Use of pooled samples to assess human exposure to parabens, benzophenone-3 and triclosan in Queensland, Australia [J]. Environment International, 2015, 85: 77-83
- [9] Provencher G, Bérubé R, Dumas P, et al. Determination of bisphenol A, triclosan and their metabolites in human urine using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2014, 1348: 97-104
- [10] Yin J, Wei L, Shi Y, et al. Chinese population exposure to triclosan and triclocarban as measured via human urine and nails [J]. Environmental Geochemistry and Health, 2016, 38(5): 1125-1135
- Bever C S, Rand A A, Nording M, et al. Effects of triclosan in breast milk on the infant fecal microbiome [J]. Chemosphere, 2018, 203: 467-473
- [12] Feng Y X, Zhang P, Zhang Z B, et al. Endocrine disrupting effects of triclosan on the placenta in pregnant rats[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0154758
- [13] Shim J, Weatherly L M, Luc R H, et al. Triclosan is a mitochondrial uncoupler in live zebrafish [J]. Journal of Applied Toxicology, 2016, 36(12): 1662-1667
- [14] Cherednichenko G, Zhang R, Bannister R A, et al. Triclosan impairs excitation-contraction coupling and Ca²⁺ dynamics in striated muscle [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(35): 14158-14163
- [15] Weatherly L M, Shim J, Hashmi H N, et al. Antimicrobial agent triclosan is a proton ionophore uncoupler of mitochondria in living rat and human mast cells and in primary human keratinocytes [J]. Journal of Applied Toxicology, 2016, 36(6): 777-789
- [16] Anderson S E, Franko J, Kashon M L, et al. Exposure to triclosan augments the allergic response to ovalbumin in a mouse model of asthma [J]. Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology, 2013, 132 (1): 96-106
- [17] Yueh M F, Taniguchi K, Chen S J, et al. The commonly used antimicrobial additive triclosan is a liver tumor promoter [J]. PNAS, 2014, 111(48): 17200-17205
- [18] Wang B H, Yao M F, Lv L, et al. The human microbiota in health and disease [J]. Engineering, 2017, 3(1): 71-82
- [19] Cani P D, Amar J, Iglesias M A, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance [J]. Diabetes, 2007, 56(7): 1761-1772
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene ex-

pression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta *C*(T)) Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408

- [21] Mu Q H, Kirby J, Reilly C M, et al. Leaky gut as a danger signal for autoimmune diseases [J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8: 598
- [22] Yueh M F, He F, Chen C, et al. Triclosan leads to dysregulation of the metabolic regulator FGF21 exacerbating high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(49): 31259-31266
- [23] Hu J Z, Raikhel V, Gopalakrishnan K, et al. Effect of postnatal low-dose exposure to environmental chemicals on the gut microbiome in a rodent model [J]. Microbiome, 2016, 4(1): 26
- [24] Sanidad K Z, Xiao H, Zhang G D. Triclosan, a common antimicrobial ingredient, on gut microbiota and gut health[J]. Gut Microbes, 2019, 10(3): 434-437
- [25] Schultz M M, Bartell S E, Schoenfuss H L. Effects of triclosan and triclocarban, two ubiquitous environmental contaminants, on anatomy, physiology, and behavior of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2012, 63(1): 114-124
- [26] Yang G C, Tsai H J, Chang F K. Occurrence of triclosan in the tropical rivers receiving the effluents from the hospital wastewater treatment plant [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2015, 187(3): 151
- [27] Regnault C, Willison J, Veyrenc S, et al. Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo[a]pyrene and triclosan in *Xenopus tropicalis* [J]. Chemosphere, 2016, 155: 519-527
- [28] Usal M, Regnault C, Veyrenc S, et al. Concomitant exposure to benzo[a]pyrene and triclosan at environmentally relevant concentrations induces metabolic syndrome with multigenerational consequences in Silurana (*Xenopus*) tropicalis [J]. Science of the Total Environment, 2019, 689: 149-159
- [29] Ho J C H, Hsiao C D, Kawakami K, et al. Triclosan (TCS) exposure impairs lipid metabolism in zebrafish embryos [J]. Aquatic Toxicology, 2016, 173: 29-35
- [30] Asgharpour A, Cazanave S C, Pacana T, et al. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer [J]. Journal of Hepatology, 2016, 65(3): 579-588
- [31] Liang Y R, Zhan J, Liu D H, et al. Organophosphorus

pesticide chlorpyrifos intake promotes obesity and insulin resistance through impacting gut and gut microbiota [J]. Microbiome, 2019, 7(1): 19

- [32] Chi Y L, Lin Y, Zhu H M, et al. PCBs-high-fat diet interactions as mediators of gut microbiota dysbiosis and abdominal fat accumulation in female mice [J]. Environmental Pollution, 2018, 239: 332-341
- [33] Leung Y K, Govindarajah V, Cheong A, et al. Gestational high-fat diet and bisphenol A exposure heightens mammary cancer risk [J]. Endocrine-Related Cancer, 2017, 24 (7): 365-378
- [34] Österreicher C H, Trauner M. Xenobiotic-induced liver injury and fibrosis [J]. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2012, 8(5): 571-580
- [35] Rude K M, Pusceddu M M, Keogh C E, et al. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) in the maternal diet causes host-microbe defects in weanling offspring mice [J]. Environmental Pollution, 2019, 253: 708-721
- [36] Petriello M C, Hoffman J B, Vsevolozhskaya O, et al. Dioxin-like PCB 126 increases intestinal inflammation and disrupts gut microbiota and metabolic homeostasis [J]. Environmental Pollution, 2018, 242: 1022-1032
- [37] Mahalak K K, Firrman J, Lee J J, et al. Triclosan has a robust, yet reversible impact on human gut microbial composition *in vitro* [J]. PLoS One, 2020, 15 (6): e0234046
- [38] Rizzatti G, Lopetuso L R, Gibiino G, et al. Proteobacteria: A common factor in human diseases [J]. BioMed Research International, 2017, 2017: 9351507
- [39] Sovran B, Planchais J, Jegou S, et al. Enterobacteriaceae are essential for the modulation of colitis severity by fungi [J]. Microbiome, 2018, 6(1): 152
- [40] Hoyles L, Jiménez-Pranteda M L, Chilloux J, et al. Metabolic retroconversion of trimethylamine N-oxide and the gut microbiota [J]. Microbiome, 2018, 6(1): 73
- [41] Palmela C, Chevarin C, Xu Z L, et al. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease [J]. Gut, 2018, 67(3): 574-587
- [42] Yang H X, Wang W C, Romano K A, et al. A common antimicrobial additive increases colonic inflammation and colitis-associated colon tumorigenesis in mice [J]. Science Translational Medicine, 2018, 10(443): eaan4116
- [43] Yueh M F, Taniguchi K, Chen S J, et al. The commonly used antimicrobial additive triclosan is a liver tumor promoter [J]. PNAS, 2014, 111(48): 17200-17205