实验研究
Experiment

双酚A对大鼠胰岛素瘤细胞凋亡及胰岛素分泌水平的影响

李丽萍[1a, 1b]，王乐[2]，德小明[1a, 1b]，李玲[1a, 1b]，张亚娟[1a, 1b]，朱丽敏[1b]

1. 宁夏医科大学 a. 生育力保持教育部重点实验室 b. 公共卫生与管理学院，宁夏 银川 750004
2. 银川市第一人民医院医技科，宁夏 银川 750004

摘要：

[背景] 双酚A（BPA）是一种典型的具有拟雌激素作用的环境内分泌干扰物。越来越多的研究显示，BPA暴露与人类2型糖尿病（T2DM）发生呈正相关，但其作用机制尚不清楚。探讨BPA对糖代谢的影响具有非常重要的意义。

[目的] 探讨双酚A对大鼠胰岛素瘤细胞（INS-1细胞）凋亡及胰岛素分泌水平的影响。

[方法] 常规培养INS-1细胞，待细胞贴壁后，用含不同浓度BPA（6、30、150 μmol·L^{-1}）的RPMI 1640培养基进行染毒，以DMSO为溶剂（终浓度≤0.1%）。采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法（MTT）检测BPA对INS-1细胞存活率的影响；流式细胞术检测BPA对INS-1细胞凋亡率的影响；活性氧（ROS）试剂盒检测BPA染毒对INS-1细胞ROS水平的影响；葡萄糖刺激胰岛素分泌实验检测不同浓度BPA对INS-1细胞胰岛素分泌的影响；荧光定量聚合酶链反应、蛋白质印迹法分别检测BPA对INS-1细胞*Bcl-2*、*Bax*、半胱天冬酶（*caspase*）3基因及其蛋白表达水平的影响。

[结果] 与DMSO溶剂对照组比较，30 μmol·L^{-1} BPA组INS-1细胞存活率增高，150 μmol·L^{-1} BPA组细胞存活率降低（$P<0.01$）。流式细胞术检测结果显示：6、150 μmol·L^{-1} BPA组INS-1细胞总凋亡率增高（均$P<0.05$）。6、30、150 μmol·L^{-1} BPA组INS-1细胞内ROS含量增加（均$P<0.05$）。葡萄糖刺激胰岛素分泌实验结果显示：在基础浓度葡萄糖（5.6 mmol·L^{-1}）刺激下，6、30 μmol·L^{-1} BPA组INS-1细胞胰岛素分泌水平增高（均$P<0.05$），150 μmol·L^{-1} BPA组胰岛素分泌水平下降（$P<0.01$），而在高浓度葡萄糖（16.7 mmol·L^{-1}）刺激下，30 μmol·L^{-1} BPA组胰岛素分泌水平增高（$P<0.05$），6、150 μmol·L^{-1} BPA组胰岛素分泌水平下降（均$P<0.05$）。抑制凋亡基因*Bcl-2*的mRNA及蛋白相对表达水平在6、150 μmol·L^{-1} BPA组降低，在30 μmol·L^{-1} BPA组增高（均$P<0.05$）；促进凋亡基因*Bax*的mRNA和蛋白相对表达水平在150 μmol·L^{-1} BPA组增高（均$P<0.05$）；*caspase3*的mRNA和蛋白相对表达水平在150 μmol·L^{-1}BPA组增高，在30 μmol·L^{-1}BPA组降低（均$P<0.05$）；*Bcl-2*与*Bax*的mRNA和蛋白相对表达比值在6、150 μmol·L^{-1} BPA组降低（均$P<0.05$）；cleaved-caspase3与caspase3蛋白相对表达水平比值在6、150 μmol·L^{-1} BPA组增高（均$P<0.05$）。

[结论] 30 μmol·L^{-1}BPA对INS-1细胞具有一定的促进增殖作用，对INS-1细胞胰岛素分泌水平也具有促进作用；6、150 μmol·L^{-1}BPA可降低INS-1细胞活力，诱导INS-1细胞凋亡，降低胰岛素分泌水平，其作用机制可能与氧化损伤有关。

关键词：双酚A；INS-1细胞；细胞凋亡；*Bcl-2*；*Bax*；*caspase3*；*cleaved-caspase3*

Effects of bisphenol A on apoptosis and insulin secretion of insulinoma cells in rats

LI Li-ping[1a, 1b], WANG Le[2], DE Xiao-ming[1a, 1b], LI Ling[1a, 1b], ZHANG Ya-juan[1a, 1b], ZHU Li-min[1b] (1.a.Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance of Ministry of Education b.College of Public Health and Management, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2.Department of Medical Technology, The First People's Hospital of Yinchuan, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract:

[Background] Bisphenol A (BPA) is a typical endocrine disrupting chemical with estrogen-like effects. More and more studies have shown that there is a positive correlation between BPA exposure and the occurrence of human type 2 diabetes mellitus (T2DM), but its mechanism is unclear. It is of great significance to investigate the effect of BPA on glucose metabolism.

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19793

基金项目
宁夏高等学校科学技术研究项目（NGY2016109）

作者简介
李丽萍（1978—），女，硕士，副教授；
E-mail：coco1809@163.com

通信作者
李丽萍，E-mail：coco1809@163.com

利益冲突 无申报
收稿日期 2019-11-19
录用日期 2020-04-20

文章编号 2095-9982(2020)06-0609-07
中图分类号 R123
文献标志码 A

▸引用
李丽萍，王乐，德小明，等. 双酚A对大鼠胰岛素瘤细胞凋亡及胰岛素分泌水平的影响[J]. 环境与职业医学，2020，37（6）：609-615.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19793

Funding
This study was funded.

Correspondence to
LI Li-ping, E-mail: coco1809@163.com

Competing interests None declared
Received 2019-11-19
Accepted 2020-04-20

▸To cite
LI Li-ping, WANG Le, DE Xiao-ming, et al. Effects of bisphenol A on apoptosis and insulin secretion of insulinoma cells in rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(6): 609-615.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19793

[Objective] This experiment investigates the effects of BPA on apoptosis and insulin secretion of insulinoma cells (INS-1 cells) in rats.

[Methods] INS-1 cells were routinely cultured and exposed in RPMI 1640 medium containing different concentrations of BPA (6, 30, and 150 μmol·L^{-1}, respectively), with DMSO as solvent (final concentration ≤ 0.1%). Methyl thiazolyl tetrazolium assay was used to detect survival rate of INS-1 cells; flow cytometry was used to detect apoptosis rate of INS-1 cells; reactive oxygen species (ROS) kit was used to detect ROS level of INS-1 cells; glucose-stimulated insulin secretion assay was used to detect insulin secretion of INS-1 cells; reverse transcription polymerase chain reaction and Western blotting were used to detect expressions of *Bcl-2*, *Bax*, *caspase3* genes and their proteins in INS-1 cells, respectively.

[Results] Compared with the DMSO solvent control group, the survival rate of INS-1 cells was increased in the 30 μmol·L^{-1} BPA group and decreased in the 150 μmol·L^{-1} BPA group ($P<0.01$). The results of flow cytometry showed that the total apoptosis rate of INS-1 cells was increased in the 6 and 150 μmol·L^{-1} BPA groups ($P<0.05$). The content of ROS in INS-1 cells was increased in the 6, 30, and 150 μmol·L^{-1} BPA groups ($P<0.05$). The results of glucose-stimulated insulin secretion assay showed that under the stimulation of basic concentration of glucose (5.6 mmol·L^{-1}), the level of insulin secretion of INS-1 cells was increased in the 6 and 30 μmol·L^{-1} BPA groups, and decreased in the 150 μmol·L^{-1} BPA group ($P<0.05$); under the stimulation of high concentration of glucose (16.7 mmol·L^{-1}), the level of insulin secretion was increased in the 30 μmol·L^{-1} BPA group ($P<0.05$), and decreased in the 6 and 150 μmol·L^{-1} BPA groups ($P<0.05$). The mRNA and protein relative expression levels of anti-apoptotic gene *Bcl-2* were decreased in the 6 and 150 μmol·L^{-1} BPA groups and increased in the 30 μmol·L^{-1} BPA group ($P<0.05$); the mRNA and protein relative expression levels of pro-apoptotic gene *Bax* were increased in the 150 μmol·L^{-1} BPA group ($P<0.05$); the mRNA and protein relative expression levels of *caspase3* were increased in the 150 μmol·L^{-1} BPA group and decreased in the 30 μmol·L^{-1} BPA group ($P<0.05$), the ratios of mRNA and protein relative expression levels of *Bcl-2* to Bax were decreased in the 6 and 150 μmol·L^{-1} BPA groups; the ratio of protein relative expression level of cleaved-caspase3 to caspase3 was increased in the 6 and 150 μmol·L^{-1} BPA groups ($P<0.05$).

[Conclusion] BPA administration at 30 μmol·L^{-1} could promote proliferation and insulin secretion of INS-1 cells, while that at 6 and 150 μmol·L^{-1} could reduce the viability of INS-1 cells, induce apoptosis, and decrease the level of insulin secretion, which may be related to oxidative damage.

Keywords: bisphenol A; INS-1 cells; apoptosis; *Bcl-2*; *Bax*; *caspase3*; *cleaved-caspase3*

双酚A（bisphenol A，BPA）是一种典型的具有拟雌激素作用的环境内分泌干扰物[1]，作为原料被广泛用于黏合剂、牙科填充材料、食品饮料包装材料、塑料容器、婴幼儿奶瓶奶嘴、眼镜镜片等产品[2]。BPA可通过皮肤接触、空气吸入、饮水摄食等多种途径进入人体，其中胃肠道途径被认为是其暴露的主要途径[3]。

以往关于BPA的研究主要集中于其生殖发育毒性、致癌毒性等，近年来越来越多的学者开始关注其对2型糖尿病（type 2 diabetes，T2DM）的影响，Hwang等[4]对1980—2018年间发表的BPA暴露与T2DM风险的研究进行meta分析，发现BPA暴露与T2DM风险呈正相关（*OR*=1.28，95%*CI*：1.14~1.44）。另有研究显示：BPA暴露可引起大鼠发生氧化应激和胰腺β细胞功能破坏，干扰腓肠肌胰岛素信号转导，导致成年雄性大鼠胰岛素信号传导障碍，发生胰岛素抵抗[5]。氧化应激被认为是影响T2DM发生发展的重要因素，也是许多内分泌学专家公认的机制之一[6]。在糖尿病的发生发展过程中，胰岛β细胞不能随着氧化应激水平的升高而增加抗氧化酶的表达，这使得β细胞容易受到氧化应激的影响，发生细胞凋亡，导致胰岛β细胞数量的进行性减少和功能的进行性恶化，将直接导致胰岛素分泌水平下降，从而延迟胰岛素分泌高峰，加剧血糖浓度的波动，餐后血糖浓度会迅速升高[7]。

基于此，本课题组提出这样的研究假设：BPA能否通过诱导胰岛β细胞发生氧化损伤，诱导胰岛β细胞凋亡，导致胰岛β细胞数量的进行性减少，进而影响胰岛β细胞的胰岛素分泌水平？为了验证这一研究假设，本研究以大鼠胰岛素瘤细胞（INS-1细胞）为靶细胞，通过建立体外细胞模型，进一步探讨BPA对INS-1细胞凋亡和胰岛素分泌水平的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 INS-1细胞系源自X射线照射的移植胰岛瘤的大鼠，胰岛素阳性，可合成胰岛素原Ⅰ和Ⅱ，可用于胰岛β细胞功能研究，本研究中的INS-1细胞由宁夏医科大学陶虹老师馈赠。

1.1.2 主要试剂与仪器 BPA标准品（上海麦克林生化科技有限公司，中国），DMSO（索莱宝，中国），RPMI 1640培养基、胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）（BI，以色列），丙酮酸钠（Gibco，美国），2β-巯基乙醇（Sigma，美国），含/不含EDTA胰酶（索莱宝生物技术公司，中国），100×青霉素/链霉素溶液（Life

Technologies，美国），四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法（methyl thiazol tetrazolium assay，MTT）试剂盒（凯基生物技术有限公司，中国），活性氧（reactive oxygen species，ROS）检测试剂盒（碧云天生物技术有限公司，中国），Annexin V-FITC/PI 检测试剂盒（贝博生物技术有限公司，中国），胰岛素放射免疫试剂盒（伊莱瑞特试剂有限公司，中国），RNA 提取试剂盒（OMGA，中国），RNA 反转录试剂盒、PCR 试剂盒［宝日医生物技术（北京）有限公司，日本］，抗 Bcl-2 一抗、抗 Bax 一抗（Proteintech，美国），抗半胱天冬酶（cysteinyl aspartate-specific proteinase，caspase）3 一抗、抗活化型半胱天冬酶（cleaved caspase）3 一抗（abcam，美国），抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）一抗（博奥森生物有限公司，中国），山羊抗兔辣根过氧化物酶二抗（中杉金桥，中国），含 0.05% Tween20 的 TBST（海利克斯，中国），PBS 缓冲液（pH=7.4，Hyclon，中国），0.22 μm 的聚偏氟乙烯膜（Millipore，美国）。

培养瓶、6 孔板、24 孔板、96 孔板（Corning，美国），超净工作台台（北京东联哈尔仪器制造公司，中国），CO_2 培养箱（Thermo Fisher，美国），倒置显微镜、荧光倒置显微镜（Olympus，日本），酶标仪（Thermo Fisher，美国），流式细胞仪（Sysmex，德国），荧光分光光度计（UV-1900，SHIMADZU，日本）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 INS-1 细胞（17~35 代）常规接种于含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中（含 100 U·mL^{-1} 青霉素、100 mg·mL^{-1} 链霉素、0.11 g·L^{-1} 丙酮酸钠、2 mmol·L^{-1} *L*-谷氨酰胺和 50 μmol·L^{-1} β-巯基乙醇），于 37 °C、5% CO_2 的培养箱中培养。细胞每 1~2 d 换培养基 1 次，3~4 d 传代 1 次。

1.2.2 分组与细胞处理 将 INS-1 细胞用胰酶消化吹打混匀后，按照一定密度接种于培养皿或培养板中，于 37 °C、5% CO_2 的培养箱中常规培养，待细胞贴壁后弃去原培养液，分别加入含不同浓度 BPA（6、30、150 μmol·L^{-1}）的 RPMI 1640 培养基进行染毒处理，以 DMSO 为溶剂（终浓度≤0.1%），每组实验设 3 个复孔或重复 3 次。

1.3 检测指标与检测方法

1.3.1 MTT 试剂盒测定 BPA 对 INS-1 细胞活力的影响 按 3×10^4~4×10^4 个·孔$^{-1}$ 的细胞密度接种 INS-1 细胞于 96 孔培养板，每孔接种体积为 100 μL，置于 37°C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后，按照“1.2.2”中细胞处理方法染毒 24 h 后，每孔加入 50 μL 1×MTT，37°C 孵育 4 h。吸去培养液，加入 150 μL DMSO，用平板摇床振荡 10 min，采用酶标仪检测 490 nm 波长下各孔光密度（*D*）值，利用公式计算细胞存活率。

细胞存活率 =［（BPA 实验组 *D* 值 – 空白对照 *D* 值）/（DMSO 溶剂对照组 *D* 值 – 空白对照 *D* 值）］×100%。

1.3.2 Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡 按 2×10^5 个·孔$^{-1}$ 接种 INS-1 细胞于 6 孔板中，待细胞贴壁后，按照“1.2.2”中细胞处理方法染毒细胞，收集每孔漂浮细胞和贴壁细胞，冷 PBS 洗涤细胞 2 次，400 μL 1×Annexin V 结合液悬浮细胞，每管中加入 5 μL Annexin V-FITC 染色液于 2~8°C 避光孵育 15 min，再加入 10 μL 的 PI 染色液于 2~8°C 避光孵育 5 min，应用流式细胞仪进行细胞凋亡检测。

1.3.3 ROS 测定 按 3×10^5 个·孔$^{-1}$ 的细胞密度接种 INS-1 细胞于 6 孔培养板中，每孔加培养基 2 mL，待细胞贴壁后，按照“1.2.2”中细胞处理方法进行 BPA 染毒，弃旧培养液，将 ROS 检测试剂盒中的 DCFH-DA 用无血清培养液按 1∶1 000 稀释，使其终浓度为 10 μmol·L^{-1}，每孔加入 1 mL 的 10 μmol·L^{-1} DCFH-DA，37°C 培养箱内孵育 20 min，PBS 洗 2 遍，尽可能洗净孔中 DCFH-DA，0.25% 胰酶消化收集细胞，800×*g* 离心 5 min，再用 2 mL PBS 重悬细胞，用荧光分光光度计检测荧光强度（$\lambda_{激发}$=488 nm，$\lambda_{发射}$=525 nm）。

1.3.4 葡萄糖刺激胰岛素分泌实验 按 2×10^5 个·孔$^{-1}$ 密度接种 INS-1 细胞于 24 孔板中，每孔加 1 mL RPMI 1640 培养基，待细胞贴壁后，按照“1.2.2”中细胞处理方法染毒细胞 BPA，弃去含受试物培养液，用 PBS 洗 1 遍，每孔加入含 3 mmol·L^{-1} 葡萄糖 KRBH 缓冲液（含 115 mmol·L^{-1} NaCl、5 mmol·L^{-1} KCl、1 mmol·L^{-1} $MgCl_2$、24 mmol·L^{-1} $NaHCO_3$、2.5 mmol·L^{-1} $CaCl_2$、10 mmol·L^{-1} HEPES 缓冲液、0.5% 牛血清白蛋白）200 μL 平衡 1 h，弃上清，每孔换含 5.6、16.7 mmol·L^{-1} 葡萄糖 KRBH 缓冲液 200 μL，分别干预细胞 1 h，分别建立基础葡萄糖刺激胰岛素分泌模型和高糖刺激胰岛素分泌模型，收集上清液于 –20°C 保存，采用胰岛素放射免疫试剂盒于 562 nm 波长条件下检测各孔 *D* 值，并使用物理裂解的方法裂解细胞，二喹啉甲酸法测定各孔细胞总蛋白含量。每孔胰岛素分泌水平以每孔细胞总蛋白量校正，胰岛素浓度（IU·g^{-1}，以蛋白计）= 每孔胰岛素含量（μIU）/ 每孔细胞总蛋白含量（μg）。

1.3.5 细胞凋亡相关基因 *Bcl-2*、*Bax*、*caspase3* mRNA 表达水平的检测 按 2×10^5 个·孔$^{-1}$密度接种 INS-1 细胞于 6 孔板中，每孔 2 mL，待细胞贴壁后，按照“1.2.2”中细胞处理方法染毒细胞，弃上清，PBS 洗涤细胞 2 次，用无 EDTA 胰酶消化收集细胞，100×*g* 离心 5 min，按照 RNA 提取试剂盒操作方法提取总 RNA 并测定 RNA 浓度与纯度。按 RNA 反转录试剂盒操作方法进行反转录，以 20 μL 体系进行荧光定量 PCR，反应条件为：95℃ 30 s，95℃ 5 s，57℃ 30 s，40 个循环。每组设置 3 个复孔，重复 3 次，按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组基因 mRNA 相对表达量，引物设计合成由上海生工完成，引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	引物序列（5′-3′）	长度/bp
Bcl-2	正向引物：ACGGTGGTGGAGGAACTCTTCAG	168
	反向引物：GGTGTGCAGATGCCGGTTCAG	
Bax	正向引物：CCAGGACGCATCCACCAAGAAG	138
	反向引物：GCTGCCACACGGAAGAAGACC	
caspase3	正向引物：GTACAGAGCTGGACTGCGGTATTG	84
	反向引物：AGTCGGCCTCCACTGGTATCTTC	
GAPDH	正向引物：TGGTGGACCTCATGGCCTAC	92
	反向引物：CAGCAACTGAGGGCCTCTCT	

1.3.6 凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、caspase3、cleaved-caspase3 蛋白表达水平的检测 取对数生长期 INS-1 细胞，接种于 10 cm 培养皿中，待细胞贴壁后，按照“1.2.2”中细胞处理方法染毒细胞 24 h，用细胞刮刮下细胞，冷 PBS 洗 2 遍，100×*g* 离心 10 min，用 RIPA 裂解缓冲液（含 1% 蛋白酶抑制剂和 1% 磷酸盐抑制剂）裂解细胞 20 min 后，4℃、12 000×*g* 离心 20 min 后收集上清，用二喹啉甲酸蛋白检测试剂盒测定上清液中的蛋白浓度，每份样品用裂解缓冲液稀释至相同的浓度，并按照 4∶1 的比例加入 5× 上样缓冲液。上样体积 15 μL，上样量 30 μg，浓缩胶 5%，分离胶 12%。电泳条件：浓缩胶 80 V 30 min，分离胶 120 V 60 min。转膜条件：恒流 300 mA，0.22 μm 聚偏氟乙烯膜，Bcl-2 蛋白转膜 30 min、Bax 蛋白转膜 30 min、caspase3 蛋白转膜 50 min、cleaved-caspase3 蛋白转膜 30 min、GAPDH 蛋白转膜 60 min，转膜完成后，5% 脱脂牛奶封闭 1 h。4℃孵育一抗过夜，TBST 洗膜 3 次，每次 5 min，室温敷育二抗（1∶5 000）1 h，TBST 洗膜 3 次，每次 5 min，电化学发光法曝光拍照，利用 Image J 1.8.0 软件进行蛋白条带灰度分析。

1.4 统计学分析

结果均采用 SPSS 23.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用 one-way ANOVA 进行统计分析；组间两两比较，方差齐时采用 LSD 法，方差不齐时采用 Dunnett *T*3 检验。检验水准 α=0.05。

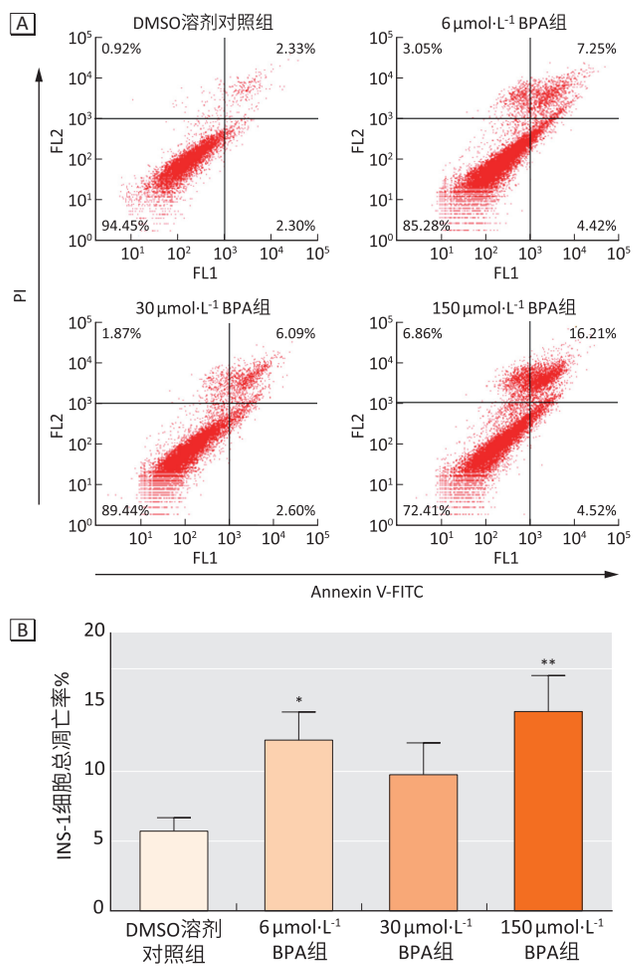
2 结果

2.1 BPA 对 INS-1 细胞活性的影响

与 DMSO 溶剂对照组［(100.00±1.23) %］比较，30 μmol·L^{-1} BPA 组 INS-1 细胞存活率［(121.83±4.09) %］增高（P<0.01），150 μmol·L^{-1} BPA 组 INS-1 细胞存活率［(72.84± 9.13) %］降低（P<0.01）。

2.2 BPA 对 INS-1 细胞凋亡的影响

由图 1 可见，与 DMSO 溶剂对照组比较，6、150 μmol·L^{-1} BPA 组 INS-1 细胞总凋亡率增高（均 P<0.05）。



［注］A：流式细胞术凋亡检测结果图，第 1~4 象限分别表示坏死细胞、晚期凋亡细胞、早期凋亡细胞和活细胞；B：INS-1 细胞总凋亡率。与 DMSO 溶剂对照组比较，*：P<0.05，**：P<0.01。

图 1 BPA 对 INS-1 细胞凋亡率的影响（n=3）

Figure 1 Effects of BPA on apoptosis of INS-1 cells (n=3)

2.3 BPA对INS-1细胞内ROS含量的影响

由表2可知，与DMSO溶剂对照组比较，6、30、150 μmol·L^{-1} BPA组INS-1细胞内ROS含量增加（均$P<0.05$）。

2.4 不同浓度BPA对INS-1细胞胰岛素分泌的影响

由表2可见，与DMSO溶剂对照组比较，在基础浓度葡萄糖（5.6 mmol·L^{-1}）刺激下，6、30 μmol·L^{-1} BPA组胰岛素分泌水平增高（均$P<0.05$），150 μmol·L^{-1} BPA组INS-1细胞胰岛素分泌水平下降（$P<0.01$）；而在高浓度葡萄糖（16.7 mmol·L^{-1}）刺激下，30 μmol·L^{-1} BPA组胰岛素分泌水平增高（$P<0.05$），而6、150 μmol·L^{-1} BPA组INS-1细胞胰岛素分泌水平下降（均$P<0.05$）。

表2 BPA对INS-1细胞胰岛素分泌水平（IU·g^{-1}，以蛋白计）和ROS荧光强度的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 2 Effects of BPA on insulin secretion level (IU·g^{-1}, in protein) and ROS fluorescence intensity of INS-1 cells ($\bar{x}\pm s$, n=3)

分组	葡萄糖浓度/mmol·L^{-1}		ROS荧光强度
	5.6	16.7	
DMSO溶剂对照组	2.12±0.15	2.13±0.53	2.107±0.128
6 μmol·L^{-1} BPA组	2.71±0.44*	1.77±0.32*	2.613±0.568*
30 μmol·L^{-1} BPA组	2.75±0.67*	2.62±0.51*	2.225±0.783*
150 μmol·L^{-1} BPA组	1.12±0.13**	1.11±0.09**	4.422±0.020**

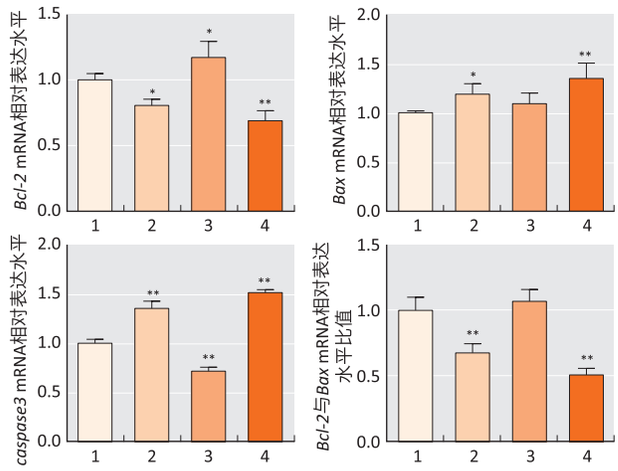
[注] 与DMSO溶剂对照组比较，*：$P<0.05$，**：$P<0.01$。

2.5 BPA对INS-1细胞凋亡相关基因*Bcl-2*、*Bax*、*caspase3* mRNA表达水平的影响

由图2可见，与DMSO溶剂对照组比较，*Bcl-2* mRNA相对表达水平（图2A）在6、150 μmol·L^{-1} BPA组降低（均$P<0.05$），在30 μmol·L^{-1} BPA组增高；*Bax* mRNA相对表达水平（图2B）在6、150 μmol·L^{-1} BPA组增高（均$P<0.05$）；*caspase3* mRNA相对表达水平（图2C）在6、150 μmol·L^{-1} BPA组增高（均$P<0.01$），在30 μmol·L^{-1} BPA组降低（$P<0.01$）；*Bcl-2*与*Bax*的mRNA相对表达水平比值（图2D）在6、150 μmol·L^{-1} BPA组降低（均$P<0.01$）。

2.6 BPA对INS-1细胞凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax、caspase3、cleaved-caspase3表达水平的影响

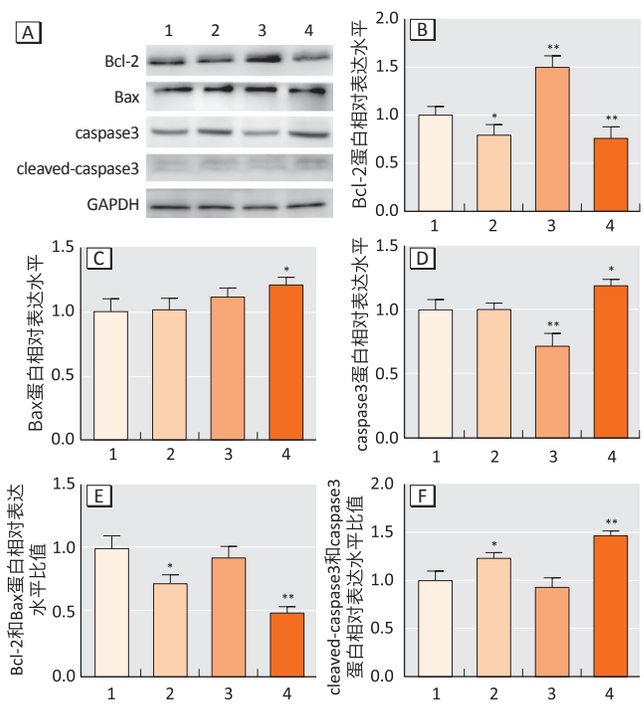
图3A为蛋白质印迹法电泳图。与DMSO溶剂对照组比较，30 μmol·L^{-1} BPA组Bcl-2蛋白表达水平增高，6、150 μmol·L^{-1} BPA组表达水平降低（均$P<0.05$，图3B）。Bax蛋白在150 μmol·L^{-1} BPA组表达水平增高（$P<0.05$，图3C）。caspase3在30 μmol·L^{-1} BPA组表达降低（$P<0.01$），而在150 μmol·L^{-1} BPA组表达增高（$P<0.05$，图3D）。Bcl-2与Bax蛋白相对表达水平的比值在6、150 μmol·L^{-1} BPA组降低（均$P<0.05$）（图3E）。cleaved-caspase3与caspase3蛋白相对表达水平的比值在6、150 μmol·L^{-1} BPA组表达增高（均$P<0.05$）（图3F）。



[注] 与DMSO溶剂对照组比较，*：$P<0.05$，**：$P<0.01$。1：DMSO溶剂对照组；2：6 μmol·L^{-1} BPA组；3：30 μmol·L^{-1} BPA组；4：150 μmol·L^{-1} BPA组。

图2 BPA对INS-1细胞*Bcl-2*、*Bax*、*caspase3* mRNA相对表达水平的影响（n=3）

Figure 2 Effects of BPA on mRNA relative expression levels of *Bcl-2*, *Bax*, and *caspase3* of INS-1 cells (n=3)



[注] A：蛋白电泳图，B、C、D图为Bcl-2、Bax、caspase3蛋白相对表达水平，E图为Bcl-2和Bax蛋白相对表达水平的比值，F图为cleaved-caspase3和caspase3蛋白相对表达水平的比值。与DMSO溶剂对照组比较，*：$P<0.05$，**：$P<0.01$。1：DMSO溶剂对照组；2：6 μmol·L^{-1} BPA组；3：30 μmol·L^{-1} BPA组；4：150 μmol·L^{-1} BPA组。

图3 BPA对INS-1细胞Bcl-2、Bax、caspase3、cleaved-caspase3蛋白相对表达水平的影响（n=3）

Figure 3 Effects of BPA on protein relative expression levels of Bcl-2, Bax, caspase3, and cleaved-caspase3 of INS-1 cells (n=3)

3 讨论

T2DM是一种代谢性疾病，表现为胰岛素抵抗和胰岛素缺乏的症状[8]。全球成人中T2DM的患病人数约为4.15亿，但根据国际糖尿病联合会的预测，预计到2040年将达到6.42亿[9]。糖尿病的发病机制非常复杂，遗传因素和环境因素是影响T2DM发生和发展的主要因素，其中环境因素至关重要。在过去的十年中，越来越多的研究表明人类在早期发育过程中接触不利的环境因素可明显增加慢性疾病的发病率，其中，环境内分泌干扰物暴露与糖尿病发生的关系越来越受到学者们的关注。一项流行病学调查结果显示：环境内分泌干扰物污染严重地区居民T2DM的发病率较其他地区增高[10]。BPA是一种普遍存在于环境中具有拟雌激素功能的环境内分泌干扰物，其以一种内源性雌激素类似的形式与雌激素受体结合，从而产生一系列的生理病理反应，长期低剂量BPA暴露与肥胖、糖尿病、高血压等代谢紊乱疾病存在关联[4]。

本研究结果显示，与DMSO溶剂对照组比较，30 μmol·L^{-1} BPA组INS-1细胞活力增高（P<0.01），150 μmol·L^{-1}组INS-1细胞活力降低（P<0.01），表明30 μmol·L^{-1} BPA对INS-1细胞具有一定的促增殖作用，使细胞活力增高，而150 μmol·L^{-1} BPA可以抑制细胞增殖，对细胞具有一定毒性，这与以往研究结果一致[11]。

葡萄糖刺激胰岛素分泌实验是体外用于评价胰岛β细胞功能最常用的方法。本项研究结果显示：在基础浓度葡萄糖（5.6 mmol·L^{-1}）刺激下，6 μmol·L^{-1} BPA组胰岛素分泌水平高于对照组，但在高浓度葡萄糖（16.7 mmol·L^{-1}）刺激下，胰岛素分泌水平降低，相应的ROS荧光强度高于对照组，分析其可能的原因是由于BPA在低剂量水平下使细胞处于一种代偿状态，INS-1细胞虽未出现明显增殖抑制，但其功能可能已经受损，进而影响了INS-1细胞胰岛素分泌功能，导致在高糖水平下胰岛素分泌水平下降，发生胰岛素抵抗。30 μmol·L^{-1} BPA组胰岛素分泌水平增高（P<0.05），其原因在于在该剂量水平下BPA对INS-1细胞具有一定的促增殖作用；150 μmol·L^{-1} BPA组胰岛素分泌水平降低（P<0.05），其原因可能是由于该剂量水平下BPA可以抑制细胞的活力，对细胞具有一定毒性作用。

胰岛β细胞是唯一分泌胰岛素的细胞，其功能缺陷是血糖代谢紊乱的中心环节。胰岛β细胞中抗氧化酶含量低，极易受到氧化应激的影响，造成细胞数量的进行性减少和细胞功能的恶化。本次研究结果显示6、30、150 μmol·L^{-1} BPA组INS-1细胞内ROS水平升高（P<0.05），说明BPA可诱导INS-1细胞发生氧化损伤。

凋亡是细胞受基因调控的一种程序性死亡，它是一种自然死亡的过程，与生长分化一样是多细胞生物生命活动中必不可少的过程。Bcl-2是公认的细胞凋亡调控靶点，它可以通过与Bax拮抗，抑制Bax的游离数量，下调Bcl-2的蛋白表达，会增加Bax转位到线粒体膜，进而增加线粒体通透性，释放细胞色素c，激活caspase3的级联反应，从而促进细胞凋亡，Bcl-2与Bax的比值决定了caspase3的激活程度，比值越低，激活程度越高[12]。当机体受到外来因素作用时，往往会通过诱导细胞凋亡而导致细胞功能的降低。本次研究发现6、150 μmol·L^{-1} BPA组INS-1细胞均发生不同程度的凋亡，Annexin V-FITC/PI流式细胞凋亡检测结果显示6、150 μmol·L^{-1} BPA组总凋亡率均高于DMSO溶剂对照组（P<0.05）；凋亡相关蛋白*Bcl-2*、*Bax*、*caspase3*、*cleaved-caspase3*表达情况也验证了这一现象，分析其原因是BPA诱导了INS-1细胞发生氧化损伤，而氧化应激是诱导细胞凋亡的主要原因之一。

综上，30 μmol·L^{-1} BPA对INS-1细胞具有一定的促进增殖作用，对INS-1细胞胰岛素分泌水平也具有促进作用；6、150 μmol·L^{-1} BPA可引起INS-1细胞活力降低、胰岛素分泌水平降低，其机制可能是BPA可诱导INS-1细胞发生氧化损伤，进而诱导促进凋亡相关蛋白Bax、caspase3、cleaved-caspase3表达增加，抑制了Bcl-2表达，进而导致INS-1细胞凋亡率增高，从而导致INS-1细胞胰岛素分泌水平下降。

参考文献

[1] 孙婉婉，毕宇芳. 双酚A与胰岛素抵抗及2型糖尿病关系的研究进展[J]. 上海交通大学学报（医学版），2012，32（5）：670-673.

[2] SONNENSCHEIN C，SOTO A M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists[J]. J Steroid Biochem Mol Biol，1998，65（1/2/3/4/5/6）：143-150.

[3] HOEKSTRA E J，SIMONEAU C. Release of bisphenol A from polycarbonate-a review[J]. Crit Rev Food Sci Nutr，2013，53（4）：386-402.

[4] HWANG S，LIM J E，CHOI Y，et al. Bisphenol A exposure and type 2 diabetes mellitus risk：a meta-analysis[J]. BMC Endocr Disord，2018，18（1）：81.

[5] OZAYDIN T，OZNURLU Y，SUR E，et al. Effects of bisphenol A on antioxidant system and lipid profile in rats [J]. Biotech Histochem，2018，93 (4)：231-238.

[6] SHINDE S N，DHADKE V N，SURYAKAR A N. Evaluation of oxidative stress in Type 2 diabetes mellitus and follow-up along with vitamin e supplementation [J]. Indian J Clin Biochem，2011，26 (1)：74-77.

[7] LILLIOJA S，MOTT D M，SPRAUL M，et al. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus：prospective studies of pima Indians [J]. New Engl J Med，1993，329 (27)：1988-1992.

[8] CHAMBERLAIN J J，RHINEHART A S，SHAEFER C F JR，et al. Diagnosis and management of diabetes：synopsis of the 2016 American diabetes association standards of medical care in diabetes [J]. Ann Intern Med，2016，164 (8)：542-552.

[9] OGURTSOVA K，DA ROCHA FERNANDES J D，HUANG Y，et al. IDF Diabetes Atlas：global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040 [J]. Diabetes Res Clin Pract，2017，128：40-50.

[10] 鲁碧楠. 对糖脂毒导致的INS-1细胞损伤的修复作用及机制研究 [D]. 北京：中央民族大学，2013.

[11] 胥志祥，刘君，罗闹，等. DBP和BPA对MCF-7细胞的联合效应及机制 [J]. 中国环境科学，2017，37 (12)：4771-4780.

[12] 崔连鸷，王博，张晓伟，等. 胰腺癌细胞外泌体通过激活线粒体凋亡途径促进β细胞凋亡 [J]. 中国病理生理杂志，2017，33 (12)：2172-2178.

（**英文编辑**：汪源；**责任编辑**：陈姣）

· 告知栏 ·

欢迎订阅2020年《环境与职业医学》

《环境与职业医学》(www.jeom.org) 创刊于1984年，系由上海市疾病预防控制中心、中华预防医学会主办，国内外公开发行的专业性学术期刊 (ISSN 2095-9982，CN 31-1879/R)。目前已入选中国科学引文数据库 (CSCD-C) 源期刊、中文核心期刊 (预防医学、卫生学类核心期刊)、中国科技论文统计源期刊 (中国科技核心期刊)、RCCSE中国核心学术期刊 (A)，并被多家国际知名数据库，如乌利希国际期刊指南、英国国际农业与生物科学研究中心、英国全球健康及美国剑桥科学文摘 (自然科学) 等收录。

本刊内容主要介绍国内外劳动卫生与职业病防治工作，环境危害因素及其治理，以及有关职业和环境卫生学的学术研究、科研成果及实践经验，包括职业与环境流行病学、环境检测、毒理学、环境生态学和职业病临床、应急救援、卫生管理、环境污染与治理、职业病防治实践等方面的原创研究、综述、短篇报道、病例报告等。可供广大疾病控制、卫生监督、厂矿劳动安全、职业卫生与职业病防治、环境保护、环境科学研究等相关单位专业人员，医学院校教学和科研等人员参考。

本刊为月刊，大16开，96页，每月25日出版，定价每期20元，全年240元 (含包装及平邮邮资，需挂号或速递者邮资另计)。由邮局及自办结合发行，邮发代号4-568，邮局可办理2020年征订工作。

汇款方式如下。

1. 银行汇款

户名：上海市疾病预防控制中心；账号：3166 3803 0016 65382；开户行：上海银行白玉支行。

2. 邮局汇款

上海市延安西路1326号 (生物大厦) 22楼《环境与职业医学》编辑部，邮编：200052。

读者如需单行本或合订本，可直接向编辑部联系邮购。

对历年本刊所出的专题专刊 (含会议论文集)，需要者亦可联系邮购。

联系人：高老师；电话：021-61957517；E-mail：zazhi2@scdc.sh.cn