

三氯生对大鼠脂肪代谢的影响

唐 丽*, 孙秀发, 张 军

(华中科技大学同济医学院营养与食品卫生学教研室, 湖北 武汉 430030)

摘要: 目的 探讨三氯生对大鼠脂肪代谢的影响。方法 给 SD 大鼠三氯生按 50、150 及 250 mg·kg⁻¹ 剂量 ig, 每天 1 次, 连续 5 周, 测定血清、肝脏和脂肪组织甘油三酯(TG)含量及肝脏和脂肪组织脂肪酸合酶(FAS)活性, 并进行肝脏组织切片染色检测脂肪颗粒含量。结果 三氯生可明显抑制肝脏和脂肪组织 FAS 活性, 使脂肪合成受到影响, 血清、肝脏、脂肪组织 TG 含量均减小。同时三氯生也可使大鼠的日平均进食量减少。结论 三氯生不仅可抑制细菌脂肪酸合成, 而且对大鼠脂肪合成也起抑制作用。**关键词:** 三氯生; 肝; 脂肪组织; 脂肪酸合酶

中图分类号: R962

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2002)01-0070-05

三氯生(triclosan)化学名为二氯苯氧氯酚[2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether], 是一种对革兰阳性(G⁺), 革兰阴性(G⁻)和真菌都有抑制作用的广谱抗菌剂^[1]。30 年来一直被广泛应用于与人类直接接触的日用品及口腔防龋, 手术前准备处理, 婴儿和病人护理等产品中^[2,3]。最新研究表明三氯生是通过作用于细菌脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)系统中的烯酰基载体蛋白还原酶(enoyl-acyl carrier protein reductase, EACPR), 抑制脂肪酸的合成而起抗菌作用, 有关其对细菌脂肪代谢方面的研究文章相继发表^[4,5]。

鉴于细菌与哺乳动物及人类 FAS 具有极大的同源性^[6]; 三氯生具有较强的皮肤吸收性^[7]及广泛的应用性, 因而它对哺乳动物和人类的影响应给予重视。因为机体脂肪合成一旦受阻, 将对健康造成

极为不利的影 响。本研究以大鼠为实验对象, 从肝脏和脂肪组织两个方面来探讨三氯生对哺乳动物脂肪代谢的影响。目前尚未见国内外该方面的研究报告。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂

清洁级 Sprague-Dawley(SD)大鼠 40 只, ♂, 体重(216±7)g($\bar{x} \pm s$), 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。三氯生购自美国 KIC Chemicals Inc, 纯度>99%; 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO), 郑州化学试剂三厂, 分析纯; 乙酰辅酶 A, 丙二酰辅酶 A, NADPH 均购自 Sigma 公司。

1.2 动物分组及喂养

动物适应性喂养 3 d 后, 按体重随机分为 5 组: 对照组, 低剂量组, 中剂量组, 高剂量组, 配对喂养组。3 种剂量用药组以 DMSO 为溶剂, 分别 ig 给予三氯生 50, 150, 250 mg·kg⁻¹, 每天 1 次, 连续喂养 5 周, 直至实验结束。ig 容积为 2.5 mL·kg⁻¹·d⁻¹。对照及配对喂养两组以相应容积的 DMSO ig。除配对喂养组外, 其余各组每天自由摄食, 记录进食量。配对喂养组则根据高剂量组进食量给予饲料。动物自由饮水, 每 3 d 称 1 次体重。实验结束时断头处死, 收集样品。

动物以高碳水化合物低脂饲料喂养, 其成分含量为: 碳水化合物 81.5%, 蛋白质 11.75%, 脂类 4%。由购自同济医科大学实验动物中心的基础饲料与玉米淀粉(需糊化)按 1:1 混合而成。

1.3 指标及方法

1.3.1 血清甘油三酯及肝脏、脂肪组织甘油三酯含量

甘油磷酸氧化酶法(试剂盒, 购自上海荣盛生物技术有限公司)及乙酰丙酮显色法。

1.3.2 肝脏及脂肪组织脂肪酸合酶活性

参照文献^[8]进行并修改。断头处死大鼠, 分离

收稿日期: 2001-02-07 接受日期: 2001-10-10

作者简介: 唐 丽(1974-), 女, 云南昆明市人, 医学硕士研究生, 主要从事食品毒理方面的研究。

* 联系作者. Tel: (0871)5162847

E-mail: tangli20@hotmail.com

肝脏及睾丸周围脂肪组织。取组织加入适量匀浆缓冲液(0.1 mol·L⁻¹ Na₃PO₄, 0.07 mol·L⁻¹ NaHCO₃, 1 mmol·L⁻¹ EDTA, 1 mmol·L⁻¹ DTT, pH 8), 在冰浴中进行充分匀浆后, 离心(10 000 × g, 15 min), 除去较大颗粒沉淀。再离心(100 000 × g, 50 min), 除去细颗粒沉淀及上浮脂肪。取上清液, 立即测定酶活性。离心均使用高速冷冻离心机, 控制 4℃ 恒温。测定在含有 1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 7 的 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸钾缓冲液中进行, 底物浓度为乙酰辅酶 A 6 μmol·L⁻¹, 丙二酰辅酶 A 12 μmol·L⁻¹, NADPH 37.5 μmol·L⁻¹, 体积 2 mL, 置于 1 cm 光径石英杯中。37℃ 水浴恒温 4 ~ 5 min, 加入稀释后的高速离心上清液启动酶反应, 于 340 nm 波长下连续监测吸光度的变化, 此为 NADPH 经 FAS 催化氧化为 NADP 所致。测定于紫外分光光度计进行。FAS 活性单位为每毫克蛋白质中 37℃ 下每分钟氧 1 nmol NADPH 的酶量(μmol·min⁻¹·g⁻¹蛋白)。

1.3.3 蛋白质含量

用 Lowry 等^[9]法测定。

1.3.4 肝脏组织切片检查

取出新鲜肝脏组织, 于 10% 福尔马林溶液中固定后, 制备冰冻切片, 以染料苏丹 IV 进行脂肪染色。用高清晰度北航病理图像分析系统进行图像分析, 测定结果以平均吸光度(A) = 阳性区域面积/总面积表示。每张切片随机选取 5 个视野进行测定, 取其平均值。

1.4 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。本实验采用 SAS 软件包进行方差分析及组间两两比较; 并计算指标之间的相关系数及进行多因素的回归分析。

2 结果

2.1 大鼠体重与日平均进食量

由表 1 可见, 低、中、高剂量组大鼠的进食量逐渐降低, 均明显低于对照组; 体重增长值也呈下降趋势。高剂量组与配对喂养组相比, 虽进食量相同, 但体重增长值却显著降低。

2.2 肝脏/体重比值和睾丸周围脂肪组织/体重比值

表 2 的结果表明, 低、中、高三剂量组动物的睾丸周围脂肪组织/体重比值逐渐降低, 而肝脏/体重比值则逐渐增高; 但仅高剂量组两指标与对照组及配对喂养组相比, 具有显著性差异。

Tab 1. Effects of triclosan on body weight gain and average daily food intake of rats

Group	Body weight gain/g	Food intake/g·d ⁻¹
Control	64 ± 27	17.0 ± 0.1
Triclosan 50	59 ± 20	16.3 ± 0.4* * #
Triclosan 150	41 ± 20#	15.6 ± 0.8* * #
Triclosan 250	30 ± 21* * #	14.1 ± 0.8* *
Matched-pair	61 ± 16	14.1 ± 0.8* *

Control and matched-pair groups were given ig dimethyl sulfoxide (DMSO) 2.5 mL·kg⁻¹·d⁻¹; other groups were given ig triclosan 50, 150, 250 mg·kg⁻¹·d⁻¹, respectively, once a day for five weeks. $\bar{x} \pm s$, n = 8. * P < 0.05, ** P < 0.01, compared with control group; # P < 0.05, ## P < 0.01, compared with matched-pair group.

Tab 2. Effects of triclosan on liver/body weight and adipose tissue around testis/body weight of rats

Group	(Liver/body weight) × 10 ² /mg·g ⁻¹	(Adipose tissue around testis/body weight) × 10 ³ /mg·g ⁻¹
Control	2.94 ± 0.26	13.7 ± 2.4
Triclosan 50	3.13 ± 0.18#	12.2 ± 2.2
Triclosan 150	3.17 ± 0.12* #	11.1 ± 2.9
Triclosan 250	3.25 ± 0.20* * #	9.5 ± 1.6* * # #
Matched-pair	2.79 ± 0.38	13.2 ± 2.6
r	0.90	-0.99
P	> 0.05	< 0.05

The treatments were the same as described in Tab 1. $\bar{x} \pm s$, n = 8. * P < 0.05, ** P < 0.01, compared with control group; # P < 0.05, ## P < 0.01, compared with matched-pair group.

2.3 血清、肝脏及脂肪组织中甘油三酯含量

表 3 的结果表明, 与对照组相比, 各组血清、肝脏及脂肪组织中甘油三酯(TG)含量均降低, 与三氯生之间呈剂量效应关系。但仅有高剂量组的 3 个指标均显著低于对照组, 而与配对喂养组之间无显著性差异。

2.4 肝脏及脂肪组织脂肪酰合酶活性

表 4 的结果表明, 低、中、高剂量组大鼠肝脏及脂肪组织 FAS 活性逐渐降低, 其中高剂量组大鼠的肝脏和脂肪组织 FAS 活性显著低于对照组和配对喂养组, 而配对喂养组与对照组之间无显著性差异。

2.5 肝脏组织切片结果

用苏丹 IV 对肝脏组织中的脂肪颗粒进行染色,

Tab 3. Effects of triclosan on serum, liver, adipose tissue triglyceride(TG) content

Group	Serum TG /mmol·L ⁻¹	Liver TG /mg·g ⁻¹	Adipose tissue TG /mg·g ⁻¹
Control	1.07 ± 0.19	37 ± 4	20 ± 8
Triclosan 50	0.98 ± 0.17	36 ± 4	118 ± 6
Triclosan 150	0.91 ± 0.19	33 ± 3*	116 ± 6
Triclosan 250	0.76 ± 0.12**	31 ± 3**	108 ± 9*
Matched-pair	0.90 ± 0.20	35 ± 4	112 ± 9
<i>r</i>	-0.99	-0.99	-0.95
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

The treatments were the same as described in Tab 1. $\bar{x} \pm s$, $n = 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control group. There are no significant differences compared with matched-pair group.

Tab 4. Effects of triclosan on fatty acid synthase (FAS) activity of liver and adipose tissue around testis

Group	FAS activity/ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ protein	
	Liver	Adipose tissue around testis
Control	17.7 ± 2.2	30.1 ± 2.2
Triclosan 50	15.8 ± 2.7	27.8 ± 2.8
Triclosan 150	15.0 ± 3.2	26.9 ± 3.6
Triclosan 250	12.4 ± 2.5***	24.6 ± 3.2***
Matched-pair	16.0 ± 1.6	28.9 ± 2.1

The treatments were the same as described in Tab 1. $\bar{x} \pm s$, $n = 8$. *** $P < 0.01$, compared with control group; ** $P < 0.01$, compared with matched-paired group.

可见肝细胞核呈蓝紫色,脂肪颗粒呈猩红色,分布于胞浆中。光镜下观察,各剂量组随三氯生剂量升高,肝脏中沉积的脂肪颗粒逐渐减少,着色变浅,而对照组脂肪颗粒明显多于高剂量组,染色较深,分布密集。用北航病理图像分析系统随机选取5个视野进行分析,低、中、高剂量组平均吸光度值(*A*)分别为 0.34 ± 0.07 , 0.30 ± 0.08 , 0.19 ± 0.08 , 对照组 0.36 ± 0.08 , 配对喂养组 0.30 ± 0.07 。其中高剂量组与对照组及配对喂养组相比均具有显著性差异($P < 0.05$)。

2.6 单相关分析

分别以三氯生剂量,肝脏及脂肪组织 FAS 活性为自变量,以日平均进食量,肝脏吸光度值及脂肪组织/体重比值为因变量,做单相关分析。表 5 结果显

示,三氯生剂量与进食量,肝脏 FAS 活性与其吸光度值,脂肪组织 FAS 活性与脂肪组织/体重比值之间呈显著相关关系。

Tab 5. Correlation coefficients between parameters

Parameter	Correlation coefficient	<i>P</i> Value
A-B	-0.99	<0.01
C-D	0.94	<0.05
E-F	0.99	<0.01

A: Triclosan dose. B: Food intake. C: Liver FAS activity. D: Fatstaining absorbance in liver slice. E: Adipose tissue FAS activity. F: Weight ratio of adipose tissue and body.

2.7 多元逐步回归分析

分别以血清 TG(Y_1),肝脏 TG(Y_2),脂肪组织 TG(Y_3)为因变量,以肝脏 FAS 活性(X_1)及脂肪组织 FAS 活性(X_2),日平均进食量(X_3)为筛选因素,按选入和筛出水准 $\alpha = 0.05$ 进行分析。结果表明:①只有肝脏 FAS 活性和日平均进食量进入影响血清 TG 含量的回归方程: $Y_1 = 0.039X_1 + 0.037X_3 - 0.24$, X_1 和 X_3 的偏相关系数分别为 0.9138, 0.0853; ②肝脏 TG 主要受肝脏 FAS 活性的影响,回归方程为: $Y_2 = 1.15X_1 + 16.48$, 偏相关系数为 0.9118; ③脂肪组织 TG 仅与脂肪组织 FAS 活性有关,回归方程为: $Y_3 = 3.54X_3 + 60.11$, 偏相关系数为 0.9333。

3 讨论

FAS 由 7 个具有不同功能的酶组成,是生物体内合成脂肪酸的关键酶^[10]。细菌体内的 FAS 是由七段基因编码^[11],而人类和哺乳动物的 FAS 则是由一条基因编码^[12],细菌与人类及哺乳动物 FAS 之间具有极大的同源性,三氯生作用于细菌 EACPR,形成稳固的 EACPR-NAD⁺-三氯生三重化合物^[13,14],从而抑制脂肪酸合成,起抗菌作用。本实验表明三氯生同样可作用于大鼠肝脏和脂肪组织的 FAS,使其活性降低。FAS 活性受抑,则脂肪酸合成受阻,TG 的含量相应地发生改变。肝脏中脂肪颗粒沉积减少,睾丸周围脂肪组织减少。

实验中使用高碳水化合物饲料喂养大鼠,目的是刺激大鼠脂肪合成,提高实验指标敏感性。研究发现,三氯生可显著影响大鼠的进食量,大鼠的体重也随三氯生剂量的升高而呈下降趋势。肝脏为三氯

生的作用靶器官^[1], 实验中大鼠肝脏/体重比值随三氯生剂量上升而增大, 高剂量组显著大于对照组和配对喂养组, 正是表明肝脏受到影响的证据。

为了排除进食量因素对实验结果的影响, 我们设立了两个对照组, 即不限制进食的自由进食组和限食的配对喂养组, 配对喂养组与高剂量组动物作对照。在本文所检测的所有指标中, 高剂量组与对照组之间均具有显著性差异; 与配对喂养组之间, 除了血清, 肝脏和脂肪组织 TG 含量外, 也均具有显著性差异; 而对照组和配对喂养组之间均无显著性差异。以进食量, 肝脏及脂肪组织 FAS 活性为筛选因素, 对上述三指标进行多元逐步回归分析, 结果表明血清 TG 含量受进食量和肝脏 FAS 活性的影响, 但肝脏 FAS 活性是其主要影响因素; 而肝脏和脂肪组织 TG 仅与各自的 FAS 活性有关。这说明剂量组大鼠脂肪代谢受到干扰并不是因进食量减少所致, 而是与三氯生的作用密切相关。

研究证明三氯生不仅可以抑制细菌的脂肪酸合成, 对大鼠的脂肪合成同样也有抑制作用, 这就为推论三氯生对人类脂肪合成的影响提供了依据。因此, 目前对三氯生广泛的应用, 尤其是在与人类直接接触的产品中的应用应给予重视。在细菌中 EACPR 是 NADH 依赖型, 人类及哺乳动物的 EACPR 则是由 NADPH 提供还原当量, 所以三氯生是否也是以同样的方式作用于大鼠 FAS, 还是一个尚未解决的问题。另外, 在对三氯生产生耐药性的大肠杆菌体内发现编码 EACPR 的基因发生点突变^[5], 这提示我们注意三氯生在基因水平上对哺乳动物又存在着什么样的影响呢? 这些都还需要继续研究。

4 参考文献:

- [1] Bhargava HN, Leonard PA. Triclosan: applications and safety[J]. *Am J Infect Control*, 1996, **24**(3):209 - 218.
- [2] Regos J, Zak O, Solf R, Vischer WA, Weirich EG. Antimicrobial spectrum of triclosan, a broad-spectrum antimicrobial agent for topical application. II. comparison with some other antimicrobial agents[J]. *Dermatologica*, 1979, **158**(1):72 - 79.
- [3] Xie ZL. Studies on drugs of inhibiting bacterial plaque[J]. *Foreign Med Sci, Stomatology Section* (国外医学口腔医学分册), 1992, **19**(3):140 - 142.
- [4] Heath RJ, Yu YT, Shapiro MA, Olson E, Rock CO. Broad spectrum antimicrobial biocides target the Fab I component of fatty acid synthesis[J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**(46):30316 - 30320.
- [5] McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. Triclosan targets lipid synthesis[J]. *Nature*, 1998, **394**(6693):531 - 532.
- [6] Amy CM, Williams-Ahlf B, Naggert J, Smith S. Intron-exon organization of the gene for the multifunctional animal fatty acid synthase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(3):1105 - 1108.
- [7] Kanetoshi A, Katsura E, Ogawa H, Ohyama T, Kaneshima H, Miura T. Acute toxicity, percutaneous absorption and effects on hepatic mixed function oxidase activities of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether (Irgasan DP300) and its chlorinated derivatives[J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1992, **23**(1):91 - 98.
- [8] Tian WX, Dong Y, Quan H, Cheng WF. The dependence of fat level of hen on activity of fatty acid synthase in liver on different ages[J]. *Arch Biochem Mol Biol* (中国生物化学和分子生物学报), 1996, **12**(2):234 - 236.
- [9] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measured with the Folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**(1):263 - 275.
- [10] Heath RJ, Rock CO. Enoyl-acyl carrier protein reductase (fab I) plays a determinant role in completing cycles of fatty acid elongation in *Escherichia coli* [J]. *J Biol Chem*, 1995, **270**(44):26538 - 26542.
- [11] Heath RJ, Rock CO. Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli* [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**(18):10996 - 10000.
- [12] Sul HS, Wang D. Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription[J]. *Annu Rev Nutr*, 1998, **18**:331 - 351.
- [13] Heath RJ, Rubin JR, Holland DR, Zhang E, Snow MK, Rock CO. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis[J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**(16):11110 - 11114.
- [14] Stewart MJ, Parikh S, Xiao G, Tonge PJ, Kisker C. Structural basis and mechanism of enoyl reductase inhibition by triclosan[J]. *J Mol Biol*, 1999, **290**(4):859 - 865.

Effects of triclosan on fat metabolism in rats

TANG Li, SUN Xiu-Fa, ZHANG Jun

(Department of Nutrition and Food Hygiene, Tongji Medical College, HuaZhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **AIM** The effects of triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether) on fat metabolism in rats were observed. **METHODS** Various concentration of triclosan (50, 150, 250 mg·kg⁻¹, ig) was given daily for five weeks. The liver and adipose tissue were examined by biochemical analysis of triglyceride and fatty acid synthase (FAS) activity and image analysis of liver slice stained with Sudan IV. **RESULTS** Triclosan decreased FAS activity in liver and adipose tissue, inhibited fatty acid synthesis, and lowered

triglyceride of serum, liver and adipose tissue. Pathology examination of liver supported this result. In the meantime, we found triclosan resulted in decreasing food intake in a dose-dependent manner. **CONCLUSION** The results suggest triclosan inhibit fatty acid synthesis in liver and adipose tissue and affect the fat metabolism in mammal animal rats.

Key words: triclosan; liver; adipose tissue; fatty acid synthase

(本文编辑 周宇红)

中国毒理学会第三届全国学术会议暨第三次全国会员代表大会在南京召开

中国毒理学会第三届全国学术会议暨第三次全国会员代表大会于2001年10月17—19日在南京举行。学术会议的参加者226名,其中216名来自大陆24个省、市、自治区;10名(包括3名非华裔学者)来自台湾地区以及日本、美国。中国工程院吴德昌院士和何凤生院士参加了会议。

大会报告论文12篇,分会场(四个)报告112篇,74篇以板报形式进行交流。会议内容广泛,覆盖医学卫生、药物开发、环境保护、农业生态等各个领域,在所交流的论文总数中分别占47%、35%、10%和8%,反映了国民经济各方面对毒理学研究的需求,也体现了中国科协对本学会在学科建设上体现“大毒理”精神的要求。

由于毒理学学科的特点,宏观报告了20世纪重大毒性灾害及其历史教训、危险性评价在不同分支学科中的应用;微观报了基因水平的毒性效应以及探测这些效应所采取的基因芯片技术。水系环境涉及到长江、太湖、沿海水域中的污染;已有的及在研的药物负面效应也有所探讨,力求用不断涌现的高新技术解决实际问题。

经会议认真评议,选出12篇中青年(45岁以下)优秀论文,发证以资鼓励。