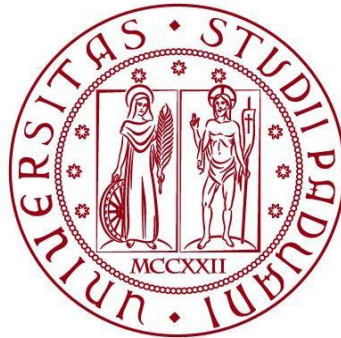


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

Effetti positivi dell'Epigallocatechina-3-gallato (EGCG) sulla resistenza all'insulina e sulla disbiosi microbica intestinale indotta dal bisfenolo A

Tutor: Prof.ssa Paola Costantini

Dipartimento di Biologia

Laureanda: Giulia Feder

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

| | |
|---|-----------|
| ABSTRACT..... | 1 |
| | |
| 1. STATO DELL'ARTE..... | 2 |
| 1.1 Effetti del BPA..... | 2 |
| 1.2 Il microbiota intestinale..... | 3 |
| 1.3 Diabete di tipo 2 ed insulino resistenza..... | 3 |
| 1.4 Effetti benefici dell'EGCG..... | 4 |
| 2. APPROCCIO SPERIMENTALE..... | 5 |
| 2.1 Animali e cure..... | 5 |
| 2.2 Disegno sperimentale..... | 5 |
| 2.3 Raccolta di campioni..... | 6 |
| 2.4 Analisi biochimiche ed analisi ELISA..... | 6 |
| 2.5 Real-time PCR..... | 7 |
| 2.6 Analisi WESTERN BLOT..... | 7 |
| 2.7 Analisi del microbiota intestinale..... | 8 |
| 2.8 Analisi statistica..... | 8 |
| 3. RISULTATI..... | 8 |
| 3.1 L'EGCG migliora la resistenza all'insulina e le anomalie del glicogeno indotte dal BPA..... | 8 |
| 3.2 L'EGCG inverte la diminuzione del contenuto di glicogeno epatico indotta dal BPA..... | 10 |
| 3.3 Effetti di BPA ed EGCG sulla funzione epatica e sui parametri lipidici..... | 10 |
| 3.4 Ripristino delle giunzioni strette intestinali da parte dell'EGCG..... | 11 |
| 3.5 Effetti di BPA ed EGCG sulla composizione del microbiota intestinale..... | 12 |
| 4. DISCUSSIONE..... | 15 |
| 5. CONCLUSIONI..... | 18 |

ABSTRACT

Lo studio trattato ha l'obiettivo di dimostrare gli aspetti benefici dell'Epigallocatechina-3-gallato (EGCG) sulla resistenza all'insulina e sui disturbi microbici indotti dal bisfenolo A (BPA). Il bisfenolo A è una sostanza plastificante, spesso presente in recipienti per alimenti. In minima quantità, è in grado di migrare in cibi e bevande, causando all'organismo disturbi metabolici. Nello studio sono stati inizialmente trattati topi con BPA, dove è stato possibile osservare un aumento della produzione di glucosio sierico, insulina, trigliceridi totali e colesterolo totale. Successivamente gli stessi individui sono stati sottoposti all'Epigallocatechina-3-gallato, osservando così una diminuzione di ciò che era stato prodotto in eccesso. In particolare, EGCG modula la fosforilazione del gene IRS-1 (che codifica per la proteina recettore dell'insulina) e delle proteine Akt e GSK-3beta. Agendo in questo modo EGCG ha migliorato la sensibilità ai segnali dell'insulina a livello dei tessuti periferici. Un altro elemento interessante è il fatto che EGCG ha aumentato le concentrazioni di acidi grassi fecali a catena corta proteggendo la barriera intestinale che era stata danneggiata dal BPA. Inoltre, l'analisi dell'rRNA 16S per il microbiota fecale ha dimostrato che, aumentando la concentrazione di EGCG, è aumentata anche la presenza di *Ruminiclostridium*, *Blautia*, *Ruminococcaceae* non identificate e *Candidatus_Saccharimonas*. Nel complesso, i risultati hanno dimostrato gli effetti positivi dell'EGCG sulla resistenza all'insulina indotta dal BPA e sulla disbiosi microbica intestinale. Il presente studio fornisce inoltre, un potenziale trattamento per la tossicità metabolica cronica del BPA.

1.STATO DELL'ARTE

1.1 Effetti del BPA

Noto come bisfenolo A (BPA), il 2,2-bis (4-idrossifenil) propano è un prodotto chimico abbondantemente presente a livello mondiale. Essendo un plastificante, esso viene particolarmente utilizzato per produrre bottiglie d'acqua, contenitori per alimenti e sigillanti dentali. Nonostante il BPA abbia una scarsa solubilità in acqua, in condizioni specifiche, ad esempio esposto a calore, acidità o luce solare, i legami esterici tra le molecole di BPA, nei prodotti in policarbonato, diventano più facilmente idrolizzabili. Per questo motivo la solubilità del BPA aumenta negli alimenti che assumiamo quotidianamente: un esempio concreto è rappresentato dalle bevande calde contenute nella plastica. Nel 2008, alcuni ricercatori hanno scoperto che, riscaldando continuamente le bottiglie d'acqua in policarbonato, i livelli di diffusione di BPA nell'acqua sono particolarmente elevati, e con valori compresi tra 228 e 521 µg/L. A prova della bassa biodisponibilità della somministrazione orale del BPA, si è osservato che nei ratti oggetto di questi esperimenti il BPA assorbito risultava meno della metà, mentre il 52-83% di quello consumato si era accumulato nell'intestino, per essere poi eliminato sotto forma di composto invariato attraverso le feci. Anche se la maggior parte del BPA presente negli alimenti non viene assorbita, la piccola quantità di BPA che entra in circolazione avrà comunque un effetto negativo sulla salute.

Ad oggi, molte ricerche hanno riportato che: stress ossidativo, alterazioni della funzionalità degli organi riproduttivi¹, mutazioni del DNA, disordini metabolici² ed altri effetti dannosi sono indotti dall'esposizione al BPA. A livello dei tessuti periferici l'esposizione al BPA può compromettere la via di segnalazione all'insulina e portare di conseguenza ad un aumento della secrezione di insulina stessa, che causa a sua volta resistenza all'insulina, fino a determinare diabete. Il BPA non assorbito, oltre a danneggiare la via di segnalazione dell'insulina potrebbe disturbare il microambiente intestinale; questo perché il BPA riduce l'espressione di proteine che vanno a costituire la giunzione stretta delle cellule intestinali, andando di conseguenza ad aumentare la permeabilità intestinale. È stato inoltre dimostrato che nei topi trattati con BPA, la composizione del microbiota intestinale risultava simile a quella dei topi alimentati con una dieta ad alto contenuto di grassi e saccarosio. Questa evidenza suggerisce quindi che gli effetti del BPA sul metabolismo del glucosio potrebbero essere associati alla disbiosi del microbiota intestinale³.

La tossicità cronica dovuta all'esposizione al BPA può determinare un rischio sistemico al metabolismo del glucosio, andando a colpire organi come pancreas e fegato, sistema muscolare scheletrico, ma anche compromettendo il microbiota intestinale.

1.2 Il microbiota intestinale

Il microbiota intestinale assume un ruolo importante sia a livello del microambiente intestinale dell'ospite sia nel metabolismo del glucosio. Diversi studi hanno evidenziato che la struttura del microbiota intestinale nei pazienti con diabete di tipo 2 (T2DM) e in pazienti con obesità è molto diversa dai soggetti non affetti da tali patologie; infatti, ad essere alterata è la proporzione di batteri che appartengono ai phylum Firmicutes (Gram positivi), Bacteroidetes (Gram negativi) e Proteobacteria. Alterazioni nella composizione microbica intestinale possono comportare gravi cambiamenti nel metabolismo microbico, ossia tutta la serie di processi e strategie che i microrganismi hanno sviluppato per produrre ATP. Alcuni metaboliti hanno un ruolo fondamentale nella permeabilità intestinale e nelle risposte metaboliche, tra questi troviamo: acidi grassi a corta catena (SCFA), trimetilammina N-ossido, acido indolo e lipopolisaccaride (LPS). Gli SCFA hanno un ruolo benefico per la flora intestinale in quanto regolano il microambiente e migliorano il metabolismo di glucosio e lipidi. L'LPS batterico, invece, risulta essere la componente principale della parete cellulare dei batteri Gram-negativi ed è generalmente costituito da un dominio idrofobo (lipide A), un core non ripetitivo ed un polisaccaride distale che prende il nome di antigene O, il quale rappresenta la componente variabile che caratterizza antigenicamente i tipi ed i ceppi batterici. Nei mammiferi il recettore per l'LPS è rappresentato dal complesso Toll-like 4 (TLR4), il quale una volta attivato, è in grado di innescare risposte immunitarie ed infiammatorie attraverso le citochine, come IL-6, TNF- α e ossido nitrico. Nello specifico, l'ossido nitrico è in grado di attivare l'ossido nitrico sintasi e promuovere così la generazione di S-nitrosotioili, i quali inibiscono a loro volta la fosforilazione del substrato del recettore dell'insulina1 (IRS-1). Con tale meccanismo vengono compromessi i segnali dell'insulina nelle cellule periferiche. L'esposizione al BPA può quindi causare disturbi metabolici e contemporaneamente influenzare il microbiota intestinale; tuttavia, non è ancora noto come i due fenomeni siano connessi tra loro.

1.3 Diabete di tipo 2 ed insulino resistenza

Il diabete mellito di tipo 2, detto anche diabete dell'adulto, rappresenta il 90% dei casi di diabete ed è una malattia cronica in cui i soggetti affetti presentano elevati livelli di glucosio nel sangue, dovuti ad un'alterazione della quantità escretata o al malfunzionamento dell'insulina. L'insulina è un ormone di natura proteica prodotto dalle cellule β del pancreas; essa ha una funzione definita "ipoglicemizzante", ossia è in grado di abbassare la concentrazione di glucosio dal sangue, facilitandone il passaggio alle cellule. Sempre per azione dell'insulina, il glucosio viene accumulato a livello epatico sotto forma di glicogeno (glicogenosintesi); e allo stesso tempo, l'insulina inibisce la degradazione del glicogeno a glucosio. Se il pancreas non è in grado di

produrre quantità sufficienti di insulina o se gli organi bersaglio (muscolo, fegato, tessuto adiposo) non rispondono correttamente all'ormone, l'organismo non è in grado di utilizzare il glucosio circolante come fonte di energia, per cui resta in circolo e determina così una condizione di iperglicemia. I soggetti affetti da diabete di tipo 2 presentano insufficienza nella produzione di insulina da parte del pancreas ed in concomitanza anche "insulino-resistenza", ossia un'inadeguata risposta all'insulina.

1.4 Effetti benefici dell'EGCG

Ad oggi non esistono interventi efficaci per contrastare i danni dovuti ad un'esposizione cronica al BPA, ma è stato dimostrato che il tè verde, bevanda diffusa in tutto il mondo, ha un ruolo di regolazione metabolica. In particolare, individui che bevono regolarmente più di 6 tazze di tè verde al giorno, hanno un rischio significativamente ridotto di sviluppare diabete mellito di tipo 2⁴. L'epigallocatechina-3-gallato, una delle catechine che risulta essere particolarmente abbondante nel tè verde, è considerata il principale componente bioattivo responsabile dei benefici per la salute. Studi e ricerche hanno dimostrato che l'EGCG ha effetti positivi su diabete, resistenza all'insulina e su altri disturbi metabolici, come schematizzato nella figura 1.

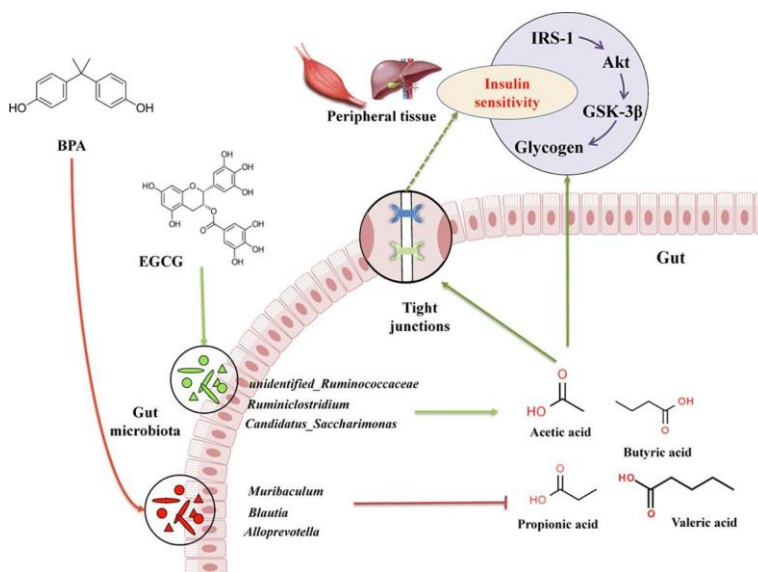


Figura 1

Figura1: Illustrazione schematica degli effetti migliorativi dell'EGCG sull'insulino resistenza indotta dal BPA

Nel 2017, Remely et al., prendendo in considerazione individui che seguivano un'alimentazione ricca di grassi e inserendo nella loro dieta sufficienti quantità di EGCG, hanno dimostrato una diminuzione della quantità batterica, in particolare

dei ceppi presenti in minor abbondanza; inoltre, hanno rilevato una generale attenuazione dell'infiammazione e di danni al DNA. Essendo quindi una componente naturalmente presente nel tè verde, l'EGCG può essere costantemente introdotto nella dieta quotidiana, con possibili effetti positivi sul disordine metabolico, sulla modulazione del microbiota intestinale e sulla tossicità cronica del BPA.

Tuttavia, ci sono ancora poche ricerche relative agli effetti positivi dati dall'EGCG, pertanto, in questo studio l'attenzione è stata posta sul dimostrare se il trattamento continuo all'EGCG possa effettivamente alleviare la resistenza all'insulina indotta dall'esposizione alimentare al BPA nei topi. Inoltre, è stato indagato e chiarito, non essendo ancora del tutto noto, come le alterazioni e i meccanismi della via di segnalazione dell'insulina e del microambiente intestinale siano connessi.

2.APPROCCIO SPERIMENTALE

2.1. Animali e cure

Quaranta topi C57BL/6 maschi, esenti da patogeni specifici (SPF), di 6-7 settimane di età e di 18-20 g di peso, sono stati acquistati dalla Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co. Ltd. (Pechino, Cina). La dieta standard dei topi è stata acquistata dalla Jiangsu Xietong Pharmaceutical Bio-engineering Co., Ltd. (Nanjing, Cina). Ltd. (Nanjing, Cina). I topi avevano libero accesso ad acqua e cibo e sono stati allevati in condizioni di SPF a 25 ± 2 °C e 30-50% di umidità, con cicli luce-buio di 12 ore.

2.2 Disegno sperimentale

Dopo 1 settimana di adattamento, i topi sono stati suddivisi in modo casuale in cinque gruppi:

- I. CON: gruppo di controllo con veicolo, ha ricevuto olio d'oliva (Aladdin, Shanghai, Cina);
- II. BPA: gruppo esposto al BPA, ha ricevuto 500 µg/kg di peso corporeo (p.c.) di BPA disciolto in olio d'oliva.
Ai seguenti gruppi è stata somministrata EGCG ogni giorno dopo l'esposizione al BPA:
- III. BLE: gruppo di intervento a basso dosaggio di EGCG, ha ricevuto 500 µg/kg p.c. di BPA e 50 mg/kg p.c. di EGCG (Yuanye Bio-Technology Co., Ltd., Shanghai, Cina);
- IV. BME: gruppo di intervento a medio dosaggio di EGCG, ha ricevuto 500 µg/kg p.c. di BPA e 100 mg/kg p.c. di EGCG; e

- V. BHE: gruppo di intervento ad alto dosaggio di EGCG, ha ricevuto 500 µg/kg p.c. di BPA e 200 mg/kg p.c. di EGCG.

Tutti i topi sono stati trattati per via *gavage* (alimentazione forzata) e il trattamento è durato 60 giorni. Per ridurre possibilità di interferenze sui risultati finali, i soggetti sono stati sottoposti al test di tolleranza al glucosio orale (OGTT) e al test di tolleranza all'insulina (ITT), rispettivamente tre e due settimane prima della fine dell'esperimento. Per l'OGTT, i topi sono stati tenuti a digiuno per tutta la notte e hanno ricevuto un carico di glucosio (2 g/kg p.c.) per via intragastrica; al fine di misurare la concentrazione di glucosio, il sangue è stato raccolto, dopo un tempo di 0, 15, 30, 60 e 120 minuti, prelevandolo dalla vena della coda attraverso l'utilizzo di un glucometro (Roche, Germania). Per l'ITT, i topi sono stati a digiuno per 6 ore ed è stata somministrata loro insulina (0,75 U/kg p.c.) mediante iniezione intraperitoneale. La glicemia è stata misurata dopo 0, 15, 30, 60, 120 minuti dall'iniezione come OGTT.

2.3 Raccolta di campioni

Due giorni prima della fine dell'esperimento, le feci dei topi sono state raccolte e conservate a -80 °C per ulteriori analisi. Al termine dell'esperimento, tutti i topi sono stati messi a digiuno per una notte e sacrificati mediante dislocazione cervicale. I campioni di sangue sono stati raccolti in provette di plastica sterili e, mediante centrifugazione a 5000 rpm a 4 °C per 15 minuti è stato ottenuto il siero. Il fegato, il muscolo scheletrico e il tessuto del colon sono stati raccolti, lavati con soluzione salina sterile preraffreddata e conservati a -80 °C prima dell'esperimento.

2.4 Analisi biochimiche ed analisi ELISA

I trigliceridi sierici (TG), il colesterolo totale (TC), la transaminasi glutammico-ossalacetica (GOT), la transaminasi glutammico-piruvica (GPT), il glucosio e il glicogeno epatico sono stati misurati utilizzando kit commerciali (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, Cina). Il livello di insulina sierica è stato determinato utilizzando kit commerciali di immunoadsorbimento enzimatico (ELISA) (Bioswamp Life Science Lab, Wuhan, Cina). Per valutare il modello di omeostasi, basandosi sulle ricerche sui ratti condotte precedentemente⁵ è stato utilizzato come indice HOMA-IR:

indice HOMA – IR:

concentrazione di trigliceridi sierici $\left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}}\right) \times$ *concentrazione di insulina* $\left(\frac{\mu\text{U}}{\text{mL}}\right)$
/22.5

2.5 Real-time PCR

Per eseguire la Real-time PCR, l'RNA totale è stato estratto dal tessuto del colon utilizzando il reagente TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) seguendo le istruzioni. La trascrizione inversa dell'RNA in cDNA è stata effettuata utilizzando il kit LunaScript™ SuperMix (NEB, USA) e l'amplificazione della sequenza specifica di DNA è stata eseguita utilizzando la miscela master Luna Universal qPCR (NEB, USA) secondo il seguente protocollo:

1. Denaturazione iniziale a 95 °C per 60 s;
2. Denaturazione a 95 °C per 15 s;
3. Estensione a 60 °C per 30 s.

I primer oligonucleotidici per la RT-qPCR sono elencati nella *Tabella 1* e l'espressione dei geni è stata calcolata e normalizzata con l'espressione della β -actina.

| Gene | Forward primer | Reverse primer |
|----------------|----------------------|----------------------|
| Claudin-1 | AAAGCACCGGGCAGATACAG | CCCAGCAGGATGCCAATTAC |
| Claudin-3 | TCGGCCAACACCATCATCAG | TACAACCCAGCTCCCATCTC |
| Occludin | GGAATGTCCAGGACAAGAAG | GCCGTACATAGATCCAGAAG |
| JAM | GCCAGATCACAGCTCCCTAT | ACTGATCGTCGGCTTGATG |
| ZO-1 | GGGGCTTACTGATCAAGA | TGGAGATGAGGCTTCTGCTT |
| E-cadherin | GGTGAAGGCTTGAGCACAAC | AGGCACTTGACCCTGATACG |
| Mucin-2 | TGGAGGTACAGGTGAACAAG | AGCCGGATGGAGAAAGAAAG |
| β -actin | TAAGAGGAGGATGGTCGCCT | CTCAGACCTGGGCCATTACG |

Tabella1: Sequenze di primer utilizzati nello studio (sequenze 5'-3')

2.6 Analisi WESTERN BLOT

Per determinare i livelli di espressione proteica della via di segnalazione è stata utilizzata la tecnica western blot. I campioni proteici sono stati estratti utilizzando il tampone di lisi RIPA miscelato con Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) e le concentrazioni proteiche sono state misurate utilizzando un kit per il dosaggio delle proteine BCA (Nanjing Jianchengengineering Institute, Nanjing, Cina). Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE al 12,5% o all'8% e trasferite su una membrana di nitrocellulosa per blotting (GE Healthcare, Germania). Le membrane sono state quindi bloccate con latte scremato al 5% per 1-2 ore, successivamente incubate con anticorpi primari e secondari. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: anti-Phospho-IRS-1 (Ser 307) (1:500, #2381, CST, USA), anti-IRS-1 (1:500, #2382,

CST, USA), anti-Akt (pan) (1:1000, #4691, CST, USA), anti-Phospho-Akt (Ser 473) (1:1000, #4060, CST, USA), anti-GSK-3 β (1: 1000, #9315, CST, USA), anti-Fosfo

GSK-3 β (Ser 9) (1: 1000, #5558, CST, USA), anti-Occludina (1:1000, ab216327, Abcam, UK), anti-ZO-1 (1:1000, ab216880, Abcam, UK) e anti-E-caderina (1:1000, # 24E10, CST, USA). L'anticorpo anti-GAPDH (1:2500, ab9485, Abcam, Regno Unito) e l'anticorpo policlonale beta Actin (1:1000, #PA5-16914, ThermoFisher Scientific, USA) sono stati utilizzati come controlli, mentre come anticorpo secondario è stato utilizzato l'anticorpo di capra anti-Rabbit IgG, HRP (1:4000, 31460, Invitrogen, USA). L'immunoreattività delle bande proteiche è stata rilevata con il sistema di imaging ECL (Bio-Rad Laboratories, USA).

2.7 Analisi del microbiota intestinale

Il DNA genomico totale dei campioni di feci è stato estratto con il metodo CTAB, purificato e diluito a 1 ng/ μ L con acqua sterile. Le regioni distinte del 16S rRNA (V3-V4) sono state amplificate utilizzando i primer specifici 515F-806R con il codice a barre e le successive amplificazioni sono state eseguite utilizzando Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (NEB, USA). Dopo la quantificazione e l'analisi qualitativa dei prodotti PCR, la libreria genica è stata sequenziata su una piattaforma Illumina NovaSeq e l'analisi dei dati è stata condotta come descritto negli studi precedenti⁶. I dati di sequenza sono accessibili nel database NCBI Sequence Read Archive (SRA).

2.8 Analisi statistica

Tutti i risultati sono stati presentati sotto forma di medie \pm errori standard delle medie (SEM). Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con il software SPSS 17.0 e i grafici sono stati realizzati con il software Prism 7.0. Le differenze tra i gruppi sono state valutate utilizzando l'ANOVA a una via seguita dal test di Dunnett, mentre l'analisi dell'abbondanza relativa del microbiota è stata eseguita utilizzando un test non parametrico, seguendo le analisi post hoc di Benjamin e Hochberg. La differenza è stata considerata statisticamente significativa quando il valore di $p < 0,05$.

3. RISULTATI

3.1 L'EGCG migliora la resistenza all'insulina e le anomalie del glicometabolismo indotte dal BPA

Inizialmente è stato condotto un OGTT per studiare gli effetti dell'EGCG sull'iperglicemia indotta da BPA. Dopo 5 settimane di trattamento, il livello di glucosio del gruppo BPA, misurato dopo 30 e 120 minuti, era significativamente più alto rispetto al gruppo CON. Invece, il trattamento con EGCG ad alte dosi ha ridotto notevolmente la concentrazione di glucosio dopo 15, 30 e 120 minuti. Anche l'EGCG a basso e medio dosaggio ha ridotto i livelli di glucosio a 30 e 120 minuti (p

< 0,05) (Figura 2B). Prendendo in esame la Figura 2C, l'area sotto la curva (AUC) del gruppo BPA risultata essere il 12,6% in

più rispetto a quella del gruppo CON, mentre l'AUC del gruppo trattato con EGCG risulta significativamente inferiore a quella del gruppo BPA, rispettivamente del 7,59%, 9,93% e 13,04%.

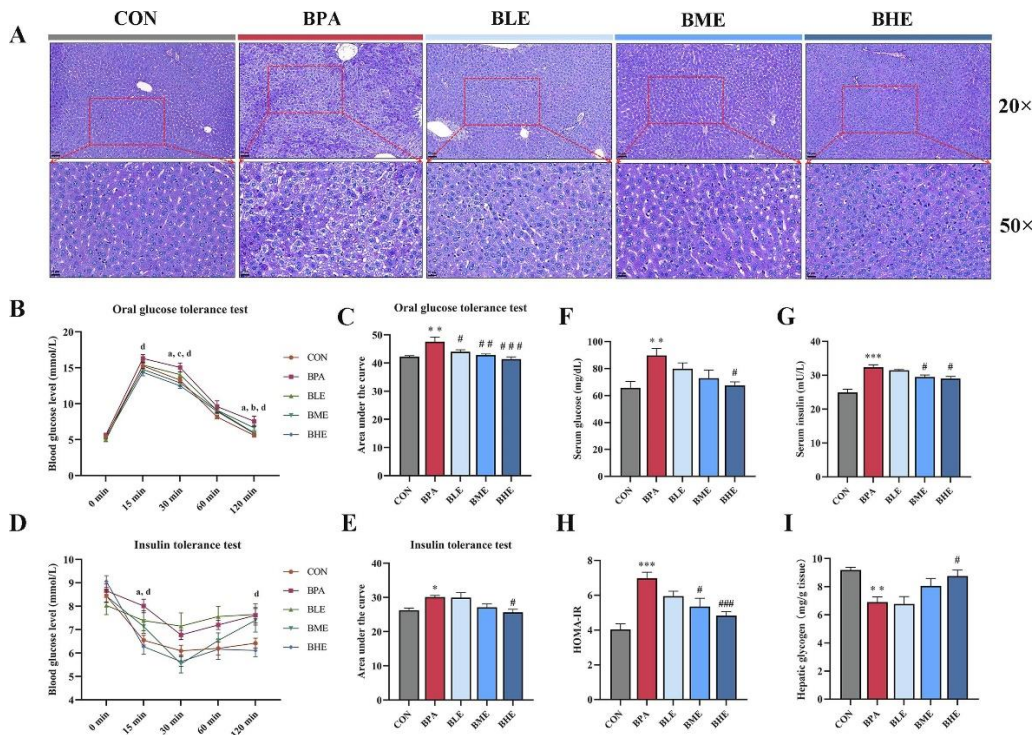


Figura 2: Effetti di BPA ed EGCG sui parametri del glicometabolismo. (A) Analisi istologica del fegato nei gruppi CON, BPA, BLE (EGCG a basso dosaggio), BME (EGCG a medio dosaggio) e BHE (EGCG ad alto dosaggio). (B e C) Variazioni della glicemia del test di tolleranza al glucosio orale (OGTT) e della sua area sotto la curva (AUC). (D ed E) Variazioni della glicemia del test di tolleranza all'insulina (ITT) e relativa AUC. (F) Alterazioni delle concentrazioni di glucosio nel siero, (G) concentrazioni di insulina nel siero e (H) HOMA-IR. (I) Analisi quantitativa del contenuto di glicogeno epatico. I valori sono espressi sotto forma di medie \pm SEM (n = 8).

La sensibilità all'insulina è stata poi misurata mediante ITT e nella Figura 2D è possibile osservare l'andamento della concentrazione di glucosio nel sangue. I livelli di glucosio del gruppo BPA sono aumentati ad un tempo pari a 15 minuti rispetto al gruppo CON. Nel gruppo BHE i livelli di glucosio, messi a confronto con il gruppo BPA, sono inferiori, misurati a 15 e 120 minuti. Come atteso, è emerso un incremento del valore dell'AUC del gruppo BPA del 14,62% rispetto al gruppo CON ($p < 0,05$). L'AUC del gruppo BHE si è dimostrata ridotta rispetto al gruppo BPA, mentre non vi sono differenze significative nei gruppi BLE e BME rispetto al gruppo BPA (Figura 2E).

Dopo 60 giorni di trattamento, i livelli di glicemia a digiuno e di insulina sierica nel gruppo BPA sono aumentati rispettivamente del 28,30% e del 29,80% in confronto al gruppo CON (Figura 2F e G). L'intervento con EGCG ha ridotto la concentrazione di insulina e glucosio ($p < 0,05$). L'indice HOMA-IR del gruppo BPA è risultato molto più alto rispetto ai controlli, indicando una evidente resistenza all'insulina nel gruppo BPA. Dosi medie e alte di EGCG hanno quindi ripristinato l'insulino-resistenza con una riduzione del 23,52% e del 30,82% ($p < 0,05$) rispetto al gruppo BPA (Figura 2H).

3.2 L'EGCG inverte la diminuzione del contenuto di glicogeno epatico indotta dal BPA

Osservando le sezioni di fegato colorate con PAS al microscopio ottico nella Figura 2 è possibile notare dei cambiamenti di glicogeno epatico. La misurazione quantitativa del tessuto epatico mediante un kit di analisi ha mostrato che il contenuto di glicogeno epatico del gruppo BPA era ridotto ($p < 0,01$) rispetto al gruppo CON. La somministrazione di EGCG ha aumentato in modo dose-dipendente il contenuto di glicogeno negli epatociti. Pertanto, l'EGCG ad alte dosi ha ripristinato significativamente il contenuto di glicogeno ($p < 0,05$) a livelli normali rispetto al gruppo BPA (Figura 2I).

3.3 Effetti di BPA ed EGCG sulla funzione epatica e sui parametri lipidici

Il disordine del metabolismo lipidico è una delle caratteristiche principali dell'insulino-resistenza per cui alterazioni del metabolismo energetico epatico possono aggravare ulteriormente il suo sviluppo o quello del diabete. Dai nostri risultati descritti in questo lavoro, l'esposizione continua al BPA ha aumentato significativamente ($p < 0,05$) il livello di TC nel siero, ma non ha avuto un impatto significativo sul livello di TG. Il trattamento con EGCG nel gruppo ad alta dose ha diminuito i livelli sierici di TG e TC ($p < 0,05$), mentre non ci sono state differenze significative tra i gruppi di dosi di BLE e BME (Tabella 2). In generale, né il BPA né l'EGCG hanno influito sulla funzionalità epatica. Tuttavia, il livello di GOT è risultato elevato nel gruppo BPA, anche se non significativamente, ed è stato ridotto in modo dose-dipendente dall'EGCG.

| | Group | | | | |
|-------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | CON | BPA | BLE | BME | BHE |
| Serum TG (mmol/L) | 0.69±0.09 ^{ab} | 0.78±0.03 ^a | 0.74±0.04 ^{ab} | 0.72±0.09 ^{ab} | 0.66±0.06 ^b |
| Serum TC (mmol/L) | 3.12±0.21 ^b | 3.53±0.15 ^a | 3.41±0.33 ^{ab} | 3.33±0.22 ^{ab} | 3.06±0.29 ^b |
| Serum GOT (U/L) | 135.53±22.87 | 160.03±42.10 | 150.29±10.80 | 141.89±18.32 | 136.54±28.46 |
| Serum GPT (U/L) | 35.00±4.50 | 33.75±3.48 | 32.64±3.31 | 31.66±2.22 | 33.19±5.26 |

Tabella 2: Effetti di BPA ed EGCG sulla funzione epatica e sui parametri lipidici. Le differenze significative ($p < 0,05$) tra i valori della stessa riga sono contrassegnate da lettere diverse (a, b). TG, triacilglicerolo; TC, colesterolo totale; GOT, glutammico ossalacetico transaminasi; GPT, glutammica piruvica transaminasi; I valori sono espressi sotto forma di medie \pm SEM ($n = 8$).

3.4 Ripristino delle giunzioni strette intestinali da parte dell'EGCG

Per misurare gli effetti dell'esposizione al BPA e della protezione dell'EGCG sulla barriera intestinale, sono state misurate le espressioni relative di mRNA delle giunzioni strette del colon mediante RT-qPCR (Figura 3A). I risultati hanno evidenziato che l'esposizione al BPA ha causato una grave sotto-regolazione dell'espressione di mRNA delle proteine delle giunzioni strette Claudina (1 e 3), Occludina, ZO-1, JAM ed E-caderina rispetto al gruppo CON ($p < 0,05$). Per quanto riguarda i gruppi BHE e BME ($p < 0,05$), messi a confronto con il gruppo BPA, i livelli di espressione dell'mRNA di queste proteine hanno riportato aumenti estremamente significativi. Anche l'espressione dell'mRNA della mucina-2 è aumentata nel gruppo BHE ($p < 0,05$) ed è stata riportata al livello normale. Inoltre, l'espressione delle proteine Occludina, ZO-1 ed E-caderina, è stata analizzata mediante Western blot (Figura 3B). I risultati si sono rilevati coerenti con l'espressione genica, dal momento che l'espressione proteica è diminuita con l'esposizione al BPA e ripristinata attraverso il trattamento con l'EGCG.

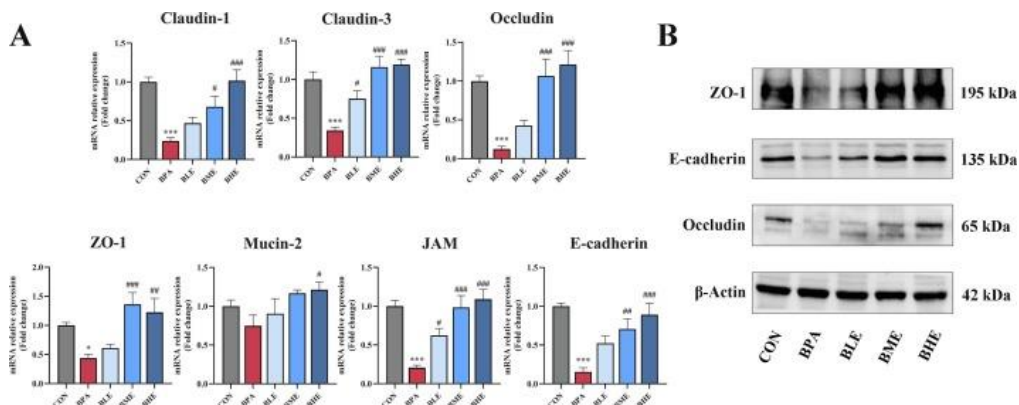


Figura 3: Effetti di BPA ed EGCG sull'espressione di proteine delle giunzioni strette del colon. I livelli relativi di espressione dell'mRNA di Claudina-1, Claudina-3, Occludina, ZO-1, Mucina-2, JAM ed E-caderina sono stati misurati mediante RT-qPCR (A). L'espressione proteiche di Occludina, ZO-1 ed E-caderina è stata misurata mediante western blot (B).

3.5 Effetti di BPA ed EGCG sulla composizione del microbiota intestinale

Il sequenziamento ad alta velocità del microbiota prelevato dalle feci è stato eseguito sulle regioni V3-V4 del 16sRNA batterico. Sulla base della piattaforma di sequenziamento Illumina Nova, sono state utilizzate circa 2.157 Unità Tassonomiche Operative (OTU) per studiare i cambiamenti del microbiota. La diversità beta di *cluster* distinti è stata analizzata utilizzando l'analisi delle coordinate principali (PCoA) basata sulla distanza Unifrac ponderata e sul metodo dei gruppi di coppie non ponderate con media aritmetica (UPGMA) (Figura 4A e B). Il risultato dell'analisi PCoA ha mostrato una differenza significativa tra il gruppo BPA e il gruppo BHE nella componente principale 1 (PC1) ($p < 0,01$) e una differenza significativa tra il gruppo CON e il gruppo BPA nella componente principale 2 (PC2) ($p < 0,05$). Inoltre, come mostrato in UPGMA, i gruppi CON e BHE condividono un'analogia struttura di *clustering*, mentre entrambi presentano una bassa somiglianza di *cluster* con il gruppo BPA.

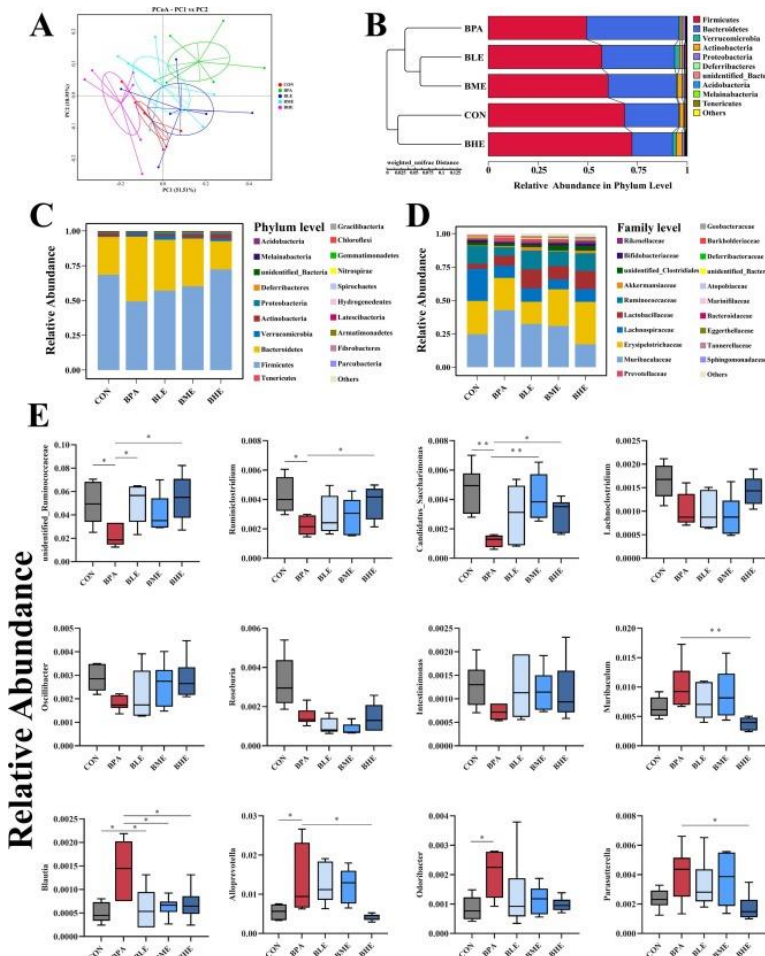


Figura 4: Effetti di BPA ed EGCG sulla composizione del microbiota intestinale. L'analisi di (A) Principal Co-ordinates Analysis (PCoA) e (B) Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean (UPGMA). Le abbondanze relative del microbiota

a livello di phylum (C), famiglia (D) e genere (E). Le abbondanze relative a livello di genere sono espresse sotto forma di medie \pm SEM (n = 6). *q < 0,05, **q < 0,01 indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi.

L'abbondanza del microbiota a livello di phylum è mostrata nella Figura 4C: Firmicutes (49,36-72,27%), Bacteroidetes (20,37-46,42%), Verrucomicrobia (0,48-2,44%) e Actinobacteria (1,04-2,86%) sono i batteri dominanti in tutti i gruppi. Rispetto al gruppo di controllo, l'esposizione al BPA ha riportato una riduzione di Firmicutes, Actinobacteria e Deferribacteres, mentre ha aumentato Bacteroidetes e Proteobacteria. Dopo l'intervento con EGCG, l'abbondanza di Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria è tornata al livello del gruppo CON. A livello di famiglia, l'abbondanza di *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae* è diminuita, mentre quella di *Muribaculaceae* è aumentata notevolmente nel gruppo BPA. Dopo l'intervento con EGCG, la quantità di *Muribaculaceae* si è ridotta, mentre *Ruminococcaceae* è aumentata in modo significativo (p < 0,05). Anche i livelli di *Bifidobacteriaceae* e *Prevotellaceae* sono stati alterati, ma non in modo significativo (Figura 5D). Infine, alterazioni a livello di genere sono mostrate nella Figura 5E. La maggior parte dei batteri con variazioni significative appartiene agli ordini *Eubacteriales* e *Bacteroidales*. Rispetto ai controlli, *Ruminococcaceae non identificate*, *Ruminiclostridium* e *Candidatus_Saccharimonas* sono diminuiti in modo importante dall'esposizione al BPA. *Lachnoclostridium*, *Oscillibacter*, *Roseburia* e *Intestinimonas* presentano tendenze alla diminuzione nel gruppo BPA. Nel gruppo BPA si è riscontrato un grande arricchimento di *Muribaculum*, *Blautia*, *Alloprevotella* e *Odoribacter*.

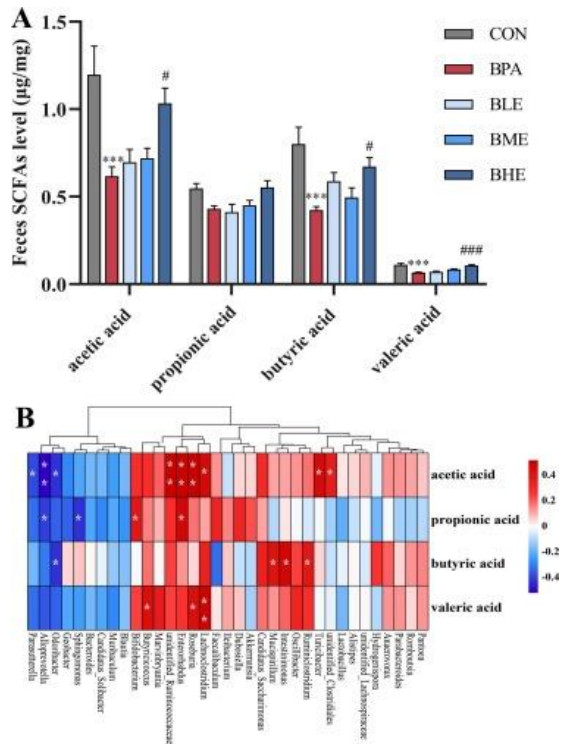


Figura 5: Alterazioni della concentrazione di SCFA fecali e correlazioni con il microbiota. (A) Contenuto di SCFA nelle feci. I livelli di SCFA fecali sono espressi sotto forma di medie \pm SEM (n = 6). ***p < 0,001 rispetto al gruppo di controllo, #p < 0,05 e ###p < 0,001 rispetto al gruppo BPA. (B) La correlazione con il microbiota è stata presentata sotto forma di analisi di Spearman. I colori vanno dal blu (correlazione negativa) al rosso (correlazione positiva) e le correlazioni significative sono annotate con *p < 0,05 e **p < 0,01.

Per identificare la relazione tra i cambiamenti nel microbiota intestinale e la concentrazione di SCFA, è stata eseguita l'analisi di Spearman utilizzando il coefficiente di correlazione di rango (Figura 5B). Il livello di acido acetico è correlato positivamente con l'abbondanza di *Ruminococcaceae non identificate*, *Turicibacter*, *Enterorhabdus*, *Roseburia*, *Lachnoclostridium* e *Clostridiales non identificate*, e negativamente ad *Alloprevotella*, *Parasutterella* e *Odoribacter*. Il livello di acido propionico è invece correlato positivamente con *Bifidobacterium* ed *Enterorhabdus*, ma negativamente con *Alloprevotella*. *Mucispirillum*, *Ruminiclostridium* e *Intestinimonas* presentano una correlazione positiva con la concentrazione di acido butirrico, mentre *Roseburia*, *Lachnoclostridium* e *Butyricoccus* sono associati in modo positivo ai livelli di acido valericico.

4.DISCUSSIONE

Come menzionato nell'introduzione, l'esposizione cronica al BPA, un materiale chimico organico ampiamente utilizzato nelle confezioni alimentari, può portare all'insorgere di disturbi del metabolismo del glucosio e nei casi più gravi persino all'insulino-resistenza. Inoltre, tale sostanza risulta essere anche responsabile dell'accumulo di lipidi a livello epatico. L'uso estensivo e la risposta non monotona, per cui una singola dose di BPA non è sufficiente a dimostrare una relazione causa-effetto ma deve essere testato un intervallo più ampio, sono i principali fattori per cui l'uso di farmaci specifici per il trattamento non risultano efficaci. Fino a questo momento la maggior parte delle ricerche si sono concentrate sulla tossicità del BPA, mentre pochissimi studi hanno evidenziato possibili soluzioni. L'EGCG è un composto bioattivo che si trova in grandi quantità nel tè verde, dove, insieme ai polifenoli (contenuti nel tè), contribuisce ad apportare benefici alla salute. Gli studi si sono quindi soffermati sui risvolti positivi dati dall'introduzione quotidiana dell'EGCG in individui che seguivano un'alimentazione ricca di grassi, nello specifico si sono riscontrati buoni risultati in merito a disturbi del metabolismo del glucosio e sulla sensibilità all'insulina. Tuttavia, si conosce ancora poco in merito all'azione dell'EGCG sulla sindrome metabolica e sui disturbi microbici intestinali indotti dall'esposizione al BPA. Nel presente studio, sono stati somministrati 500 µg/kg p.c. di BPA per indurre l'insulino-resistenza nei topi e sono stati poi utilizzati diversi dosaggi di EGCG per trattare gli individui affetti da disturbi metabolici. I risultati hanno dimostrato che l'esposizione cronica per via orale al BPA conduce ad alterazioni dell'omeostasi energetica, per cui i livelli di glucosio e di insulina nel siero risultano aumentati.

Nei soggetti trattati con BPA è stato riscontrato un aumento dei livelli di TG e TC, che rappresentano un disturbo del metabolismo lipidico. La co-somministrazione di EGCG ad alte dosi ha ridotto significativamente i livelli sierici di glucosio, TG e TC e ha anche migliorato l'insulino-resistenza causata dal BPA. Queste osservazioni hanno suggerito quindi che l'EGCG potrebbe essere un metodo efficace per trattare la sindrome metabolica indotta dall'esposizione cronica al BPA.

Si ritiene inoltre che il microbiota intestinale e i suoi prodotti metabolici, come gli SCFA, svolgano un ruolo importante nel mantenimento del metabolismo del glucosio e della sensibilità all'insulina dell'ospite. Secondo studi precedenti, gli individui affetti da diabete o prediabete molto spesso presentano una riduzione dei *Firmicutes* e un'abbondanza di *Bacteroidetes*, con conseguente abbassamento del rapporto *Firmicutes/Bacteroidetes*. Si sospetta quindi che questa trasformazione abbia un ruolo nella promozione del diabete. È interessante notare che nei roditori esposti al BPA sono state osservate tendenze simili nella comunità batterica. L'abbondanza relativa dei *Proteobacteria*, spesso associati all'infiammazione intestinale, è diminuita durante l'esposizione a lungo termine al BPA. Allo stesso tempo, anche i metaboliti microbici e la permeabilità intestinale

sono stati modificati. Inoltre, l'analisi metagenomica comparativa ha rivelato somiglianze nella struttura della comunità microbica tra topi trattati con BPA e topi alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi/saccarosio, tra cui la crescita di *Proteobacteria* e la riduzione di *Firmicutes* e di *Clostridia*. Ulteriori dati hanno rivelato che il trattamento con EGCG ha portato a un arricchimento significativo di diversi produttori di SCFA, come le famiglie *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*. Questi ultimi, infatti, possono influenzare il metabolismo del glucosio dell'organismo ed essere considerati "nemici" del diabete di tipo 2. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato la correlazione tra taxa di queste famiglie, come *Roseburia* e *Ruminiclostridium*, e il miglioramento del metabolismo lipidico. Tuttavia, al contrario, alcuni dei taxa diminuiti nei gruppi trattati con EGCG, come *Muribaculaceae*, *Blautia* e *Parasutterella*, sono stati associati positivamente al diabete di tipo 2 e ai disturbi lipo-metabolici. Tenendo conto di queste considerazioni, la regolazione del microbiota intestinale potrebbe svolgere un ruolo importante nella regolazione degli effetti dell'EGCG sulla sindrome metabolica indotta dal BPA.

Gli SCFA e i loro sali sono tra i metaboliti più importanti del microbiota intestinale fermentato a partire dall'amido resistente e dalle fibre alimentari indigeribili presenti negli alimenti. Come accennato in precedenza, si ritiene che gli SCFA abbiano effetti regolatori positivi sui disturbi metabolici, così come l'acetato e il propionato, e che possano ridurre l'appetito regolando l'espressione dei neuropeptidi: peptide YY (PYY) e il peptide glucagone-simile 1 (GLP-1).

Secondo risultati relativi agli SCFA e alla regolazione del segnale del glucosio e dell'insulina, l'aumento degli SCFA o dei ceppi produttori di SCFA è spesso accompagnato da una maggiore sensibilità all'insulina nei tessuti periferici. Ad esempio, il livello elevato di *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* è stato correlato positivamente con l'acido butirrico SCFAs e di conseguenza ad una riduzione della glicemia. In un esperimento di intervento su ratti con diabete di tipo 1 indotto da STZ, l'uso di butirrato di sodio ha migliorato efficacemente l'omeostasi del glucosio e aumentato la fosforilazione di Akt. In linea con i risultati sopra citati, è stato riscontrato che le vie di segnalazione dell'insulina, tra cui IRS-1, PI3K, Akt, GSK3 e GLUT-4, sono state attivate o modificate coerentemente con l'alterazione degli SCFA, in particolare al livello di acido butirrico. È stato quindi suggerito che gli SCFA e i loro produttori abbiano un ruolo significativo nella sensibilità all'insulina attraverso la via PI3K-Akt. Nel presente studio, sono stati riscontrati livelli ridotti di SCFA fecali nei topi con insulino-resistenza ed è stato ipotizzato che tale riduzione sia causata dallo squilibrio del microbiota. Questi risultati sono coerenti con lo studio condotto sulla prole di conigli ⁷ esposti al BPA, nei quali, successivamente al trattamento (con il BPA), è stato possibile notare una riduzione dei livelli fecali di SCFA ed un aumento dei livelli sistemici di lipopolisaccaridi (LPS). Nel 2021 è stata riscontrata una relazione inversa tra il butirrato sierico e il livello di BPA nei pazienti con malattia di Crohn, suggerendo che il BPA possa influenzare i livelli di SCFAs.

Oltre agli effetti sul microbiota, alcuni studi hanno descritto anche i danni del BPA sulla barriera intestinale dei ratti, in particolare sulle giunzioni strette. È stato scoperto che un'ampia esposizione al BPA, nelle prime fasi della vita può ridurre la permeabilità paracellulare del colon ed aggravare l'infiltrazione di neutrofili. Il danno al colon dato dall'esposizione al BPA è stato analizzato anche in ulteriori studi, evidenziando l'apoptosi e l'inibizione della proliferazione delle cellule epiteliali *in vitro*. Inoltre, con l'esposizione continua al BPA, l'aumento della permeabilità intestinale è spesso accompagnata da problematiche nella regolazione della flora intestinale e da una riduzione del livello di SCFA, influenzando ulteriormente le risposte infiammatorie e i processi metabolici. Questo tipo di danno è stato verificato anche negli esperimenti riportati precedente e il trattamento con EGCG ha fornito una protezione dose-dipendente contro le lesioni della giunzione stretta. Sebbene alcuni studi abbiano dimostrato il ruolo protettivo dell'EGCG sulla barriera intestinale in casi di dieta ad alto contenuto di grassi o di colite, il miglioramento delle lesioni indotte dal BPA e il potenziale meccanismo devono ancora essere ulteriormente esplorati.

Più volte è stata dimostrata la stretta relazione tra la barriera intestinale, disturbi metabolici e microbiota⁸; gli SCFA derivati dal microbiota, come l'acido acetico e butirrico, infatti, potrebbero essere utilizzati direttamente dalle cellule epiteliali intestinali come fonte di energia per mantenere le funzioni cellulari e svolgere un ruolo nella protezione della barriera intestinale. Di conseguenza, una barriera intestinale sana può impedire a LPS e peptidoglicano di entrare nel sistema circolatorio, evitando infiammazioni e disturbi metabolici. Anche se non sufficientemente documentata, la riparazione della barriera intestinale nel presente studio potrebbe svolgere un ruolo importante nel promuovere la

regolazione del metabolismo da parte dell'EGCG. L'EGCG rappresenta il 50-70% delle catechine contenute nel tè verde ed assume quindi un importantissimo ruolo nella regolazione metabolica. Nello specifico, durante lo studio, sono stati utilizzati 50, 100 e 200 mg/kg di peso corporeo come dose bassa, media e alta di EGCG. Applicando il calcolo della dose equivalente nell'uomo in base all'area della superficie corporea⁹ l'EGCG a bassa dose corrispondeva a 243,6 mg/die per un adulto (60 kg), e questa dose equivale a 313 ml di tè verde al giorno sulla base di 1 g di foglia/100 ml di infuso, secondo il database dei flavonoidi del Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti (USDA)¹⁰. Considerando che una tazza di tè contiene quasi 200 mg di EGCG, la corrispondente dose umana di EGCG ad alto dosaggio rientra nei limiti del consumo normale. Sebbene l'EGCG ad alte dosi abbia mostrato un effetto terapeutico sulla tossicità metabolica indotta dal BPA, potrebbero essere necessari altri campioni di topi per esplorare i meccanismi sottostanti e ulteriori studi potranno essere condotti su indagini epidemiologiche pertinenti.

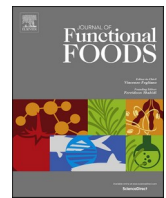
5. CONCLUSIONI

Lo studio ha dimostrato che l'uso di EGCG ha migliorato sia l'insulino-resistenza indotta dal BPA che la fosforilazione di IRS-1, Akt e GSK-3 β della via di segnalazione dell'insulina nel fegato e nel muscolo scheletrico, di conseguenza ha aumentato la capacità di sintesi del glicogeno. Questi effetti benefici potrebbero essere correlati alla regolazione dell'ambiente intestinale attraverso l'aumento dei livelli di SCFA, dei microbi produttori di questi ultimi (*Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*) e della regolazione delle proteine della giunzione stretta. Tuttavia, si ritiene che ci siano ancora pochi dati certi in merito al miglioramento ottenuto grazie all'EGCG sulle lesioni della barriera intestinale indotte dal BPA. Un altro aspetto che può essere ulteriormente esaminato è la correlazione tra disturbi metabolici ed alterazione del microbiota intestinale.

Sono stati poi dimostrati gli effetti protettivi dell'EGCG sull'insulino-resistenza e sulla disbiosi intestinale indotte dal BPA, indicando un potenziale trattamento per la tossicità metabolica cronica del BPA. Sicuramente questo studio può essere utile per migliorare alcune abitudini quotidiane, come moderare l'uso di contenitori di plastica per gli alimenti, evitando così un'esposizione al BPA e allo stesso tempo introdurre nella nostra alimentazione un maggiore consumo di tè verde.

BIBLIOGRAFIA

1. N. Li, H. Kang, Z. Peng, H.F. Wang, S.Q. Weng, X.H. Zeng Physiologically detectable bisphenol A impairs human sperm functions by reducing protein-tyrosine phosphorylation *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 221 (2021), p. 112418, 10.1016/j.ecoenv.2021.112418
2. D.P. Provvisiero, C. Pivonello, G. Muscogiuri, M. Negri, C. de Angelis, C. Simeoli, ..., A. Colaoni Influence of bisphenol A on type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13 (10) (2016), p. 989, 10.3390/ijerph13100989
3. K.-P. Lai, Y.-T. Chung, R. Li, H.-T. Wan, C.-K.-C. Wong. Bisphenol A alters gut microbiome: Comparative metagenomics analysis. *Environmental Pollution*, 218 (2016), pp. 923-930, 10.1016/j.envpol.2016.08.039
4. H. Iso, C. Date, K. Wakai, M. Fukui, A. Tamakoshi, J.S. Grp The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type 2 diabetes among Japanese adults. *Annals of Internal Medicine*, 144 (8) (2006), pp. 554-562, 10.7326/0003-4819-144-8-200604180-00005
5. W. Suwannaphet, A. Meeprom, S. Yibchok-Anun, S. Adisakwattana Preventive effect of grape seed extract against high-fructose diet-induced insulin resistance and oxidative stress in rats *Food and Chemical Toxicology*, 48 (7) (2010), pp. 1853-1857, 10.1016/j.fct.2010.04.021
6. H. Ma, B. Zhang, Y. Hu, J. Wang, J. Liu, R. Qin, ..., S. Wang Correlation analysis of intestinal redox state with the gut microbiota reveals the positive intervention of tea polyphenols on hyperlipidemia in high fat diet fed mice *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (26) (2019), pp. 7325-7335, 10.1021/acs.jafc.9b02211
7. 7.L. Reddivari, D.N.R. Veeramachaneni, W.A. Walters, C. Lozupone, J. Palmer, M.K.K. Hewa ge, J.K.P. Vanamala Perinatal bisphenol A exposure induces chronic inflammation in rabbit offspring via modulation of gut bacteria and their metabolites *Systems*, 2 (5) (2017), 10.1128/mSystems.00093-17
8. G. Yang, J. Wei, P. Liu, Q. Zhang, Y. Tian, G. Hou, ..., X. Jiang Role of the gut microbiota in type 2 diabetes and related diseases *Metabolism*, 117 (2021), p. 154712, 10.1016/j.metabol.2021.154712
9. A.B. Nair, S. Jacob A simple practice guide for dose conversion between animals and human *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7 (2) (2016), pp. 27-31, 10.4103/0976-0105.177703
10. J. Hu, D. Webster, J. Cao, A. Shao The safety of green tea and green tea extract consumption in adults - Results of a systematic review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 95 (2018), pp. 412-433, 10.1016/j.yrtph.2018.03.019



Positive effects of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) intervention on insulin resistance and gut microbial dysbiosis induced by bisphenol A

Xiang Li, Yunhui Zhang, Congying Zhao, Bowei Zhang, Bo Peng, Yan Zhang, Jin Wang, Shuo Wang*

Tianjin Key Laboratory of Food Science and Health, School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China

ARTICLE INFO

Keywords:

Bisphenol A
EGCG
Insulin resistance
Microbiota

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA), a plasticizer, is widely believed to cause metabolic disorders. However, an effective intervention is still absent. This study investigated the beneficial effects of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on insulin resistance and microbial disturbance induced by BPA. The serum glucose, insulin, total triglyceride, and total cholesterol were decreased in BPA-treated mice after the intervention of EGCG. The sensitivity of insulin signals in peripheral tissue was improved by modulating the phosphorylation of IRS-1, Akt, and GSK-3 β . In addition, 16S rRNA analysis for fecal microbiota showed the relative abundance of *Ruminiclostridium*, *Blautia*, *unidentified_Ruminococcaceae*, and *Candidatus_Saccharimonas* were restored by the high dose of EGCG. Furthermore, EGCG increased the concentrations of fecal short-chain fatty acids and protected the gut barrier impaired by BPA. Overall, our results demonstrated the positive effects of EGCG on BPA-induced insulin resistance and gut microbial dysbiosis. The current study provides a potential treatment for the chronic metabolic toxicity of BPA.

1. Introduction

Also known as Bisphenol A (BPA), 2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane is one of the most abundant and widely used chemical products worldwide. As a plasticizer, it is usually used to make plastic water bottles, food containers, and dental sealants (Chevalier & Fénelich, 2015), resulting in extensive exposure in the daily diet. Although BPA has poor water solubility, the ester bonds between BPA molecules in polycarbonate products are easier to hydrolysis under specific conditions like heat, acidity, or sunlight (Nadal et al., 2009), which increases the solubility of BPA in daily foods like hot drinks. In 2008, researchers found that the highest migration levels of BPA in water were up to 228 to 521 $\mu\text{g/L}$ when polycarbonate water bottles were continuously heated (Cao & Corriveau, 2008). Oral administration of BPA has a relatively low bioavailability. In rats, less than half of the administered BPA was absorbed, and 52–83% of consumed BPA accumulated in the gut and excreted with feces in the form of unchanged compound (Pottenger et al., 2000). Although most food-borne BPA will not be absorbed, the small amount of BPA that enters the circulation will still have an adverse effect on health. To date, oxidative stress (Moghaddam et al., 2015), reproductive and genetic toxicity (Li et al., 2021; Tyl et al., 2002), metabolic disorders (Provisiero et al., 2016), and other detrimental

influences were induced by BPA exposure in many research. BPA exposure may impair the insulin signaling pathway in peripheral tissues and lead to a compensatory insulin secretion increase, which further causes insulin resistance or even diabetes. Besides, the unabsorbed BPA is likely to disturb the intestinal microenvironment. On the one hand, BPA exposure was observed to reduce the expression of intestinal tight junction proteins and increase intestinal permeability (Feng et al., 2019). On the other hand, BPA exposure could induce the disorder of gut microbiota. It has been shown that the composition of gut microbes in BPA treated mice was similar to that in the high-fat/sucrose diet-fed mice, suggesting that the effects of BPA on glucose metabolism might be associated with the dysbiosis of gut microbiota (Lai et al., 2016). In general, the chronic toxicity of BPA exposure may cause systematic risk on glucose metabolism, affecting organs including the pancreas, liver, skeletal muscle and gut microbiota.

Gut microbiota plays an important role in the balance of the gut microenvironment and further influences the glucose metabolism of the host. Several studies have indicated that the structure of gut microbiota in type 2 diabetes (T2DM) patients is quite different from that of normal subjects. It has been demonstrated that the proportion of phylum-level species such as Firmicutes, Bacteroidetes, and Proteobacteria is altered in the cases of T2DM or obesity (Larsen et al., 2010). Meanwhile,

* Corresponding author at: No.94 Weijin Road, Tianjin 300071, China.

E-mail address: wangshuo@nankai.edu.cn (S. Wang).

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105083>

Received 6 February 2022; Received in revised form 27 March 2022; Accepted 18 April 2022

Available online 25 April 2022

1756-4646/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

alterations in the gut microbial composition may result in severe changes in microbial metabolites such as short-chain fatty acids (SCFAs), trimethylamine N-oxide, indole propionic acid, and lipopolysaccharide (LPS). These metabolites, as demonstrated, are believed to affect intestinal permeability and metabolic responses to varying degrees. Thereinto, SCFAs are representative beneficial products of gut flora, regulating the intestinal microenvironment and improving glucose and lipid metabolism (Sun et al., 2021; Zhang, Dong et al., 2020). Bacterial LPS is the major component of the cell walls of Gram-negative bacteria. The activation of Toll-like receptors 4 (TLR4) by LPS will then activate nitric oxide synthase and promote the generation of S-nitrosothiols, which inhibits the phosphorylation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1), impairing insulin signals in peripheral tissue (Gomes et al., 2014). As mentioned before, BPA exposure may cause metabolic disorders and simultaneously affect the gut microbiota, but the connection and mechanism between them are still unclear. Moreover, owing to the exposure characteristics of BPA, there are no effective interventions for the harmful effects of chronic BPA exposure.

Green tea, a worldwide beverage, has been shown to process metabolic regulation ability. Epidemiological observation revealed that people who frequently drank green tea more than 6 cups a day had a significantly reduced risk for developing T2DM (Iso et al., 2006). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), one of the most abundant catechins in green tea, is considered the main bioactive component responsible for the health benefits of green tea (Li, Gao et al., 2018). Previous studies and research have proved that EGCG improves diabetes, insulin resistance, or other metabolic disorders (Li, Li, et al., 2018). In 2017, Remely et al. demonstrated the alleviation of lower bacterial abundance along with DNA damage and inflammation induced by the high-fat diet after the intervention of EGCG (Remely et al., 2017). As the main component of green tea, EGCG can be consistently consumed in daily diet. Along with the positive effects on metabolic disorder and modulation of gut microbiota, EGCG might be an ideal dietary ingredient to reduce the chronic toxicity of BPA. However, to our knowledge, there are few relative research on that. Therefore in this study, we aimed to investigate whether continuous EGCG treatment could alleviate dietary BPA exposure-induced insulin resistance in mice. Moreover, the alterations of the insulin signaling pathway and gut microenvironment were determined to clarify the potential mechanisms.

2. Materials and methods

2.1. Animals and treatment

Forty specific-pathogen-free (SPF) male C57BL/6 mice, with 6–7 weeks old and 18–20 g weight, were purchased from Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd. (Beijing, China). The standard chow diet of mice was purchased from Jiangsu Xietong Pharmaceutical Bio-engineering Co., Ltd. (Nanjing, China). And the diets formulations were listed in Table S1 and S2. The mice had free access to water and food and were raised in SPF conditions of 25 ± 2 °C and 30–50% humidity, with 12 h light–dark cycles.

2.2. Experiment design

After 1 week of adaption, the mice were randomly divided into five groups: CON) vehicle control group, received olive oil (Aladdin, Shanghai, China); BPA) BPA exposed group, received 500 µg/kg body weight (b.w.) of BPA dissolved in olive oil. The following groups were administrated EGCG after BPA exposure every day: BLE) low-dose EGCG intervention group, received 500 µg/kg b.w. of BPA and 50 mg/kg b.w. EGCG (Yuanye Bio-Technology Co., Ltd., Shanghai, China); BME) medium-dose EGCG intervention group, received 500 µg/kg b.w. of BPA and 100 mg/kg b.w. EGCG; and BHE) high-dose EGCG intervention group, received 500 µg/kg b.w. of BPA and 200 mg/kg b.w. EGCG. All the mice were treated by gavage and the treatment lasted for 60 days. To

reduce the influence of experimental operation on the final results, all mice were subjected to oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT) three and two weeks before the end of the experiment, respectively. For OGTT, mice were fasted overnight and given the glucose load (2 g/kg b.w.) by intragastric administration, and the blood was collected from the tip of the tail vein for glucose measurement using a glucometer (Roche, Germany) at 0, 15, 30, 60 and 120 min after glucose administration (Li et al., 2016). For ITT, mice were fasted for 6 h and received insulin (0.75 U/kg b.w.) by intraperitoneal injection. The blood glucose was measured after 0, 15, 30, 60, 120 min of injection as OGTT.

2.3. Sample collection

Two days before the end of the experiment, the feces of mice were collected and stored at -80 °C for further analysis. At the end of the experiment, all mice were fasted overnight and sacrificed by cervical dislocation. The blood samples were collected in sterile plastic tubes, and the serum was obtained by centrifugation at 5000 rpm at 4 °C for 15 min. The liver, skeletal muscle, and colon tissue were collected, washed with precooled sterile saline solution, and stored at -80 °C before the experiment.

2.4. Biochemical and ELISA analysis

Serum triglyceride (TG, #A110-2-1), total cholesterol (TC, #A111-2-1), glutamic oxalacetic transaminase (GOT, #C010-2-1), glutamic pyruvic transaminase (GPT, #C009-2-1), glucose concentration (#F006-1-1) and hepatic glycogen (#A043-1-1) were measured using commercial kits (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China). Serum insulin level was determined using commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (#MU30432, Bioswamp Life Science Lab, Wuhan, China). The homeostasis model assessment was calculated in accordance with previous research conducted on rats (Suwannaphet et al., 2010) as HOMA-IR index:

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{serum glucose concentration (mmol/L)} \times \text{serum insulin concentration (}\mu\text{U/mL)}}{22.5}$$

2.5. Histological analysis

The liver section was collected and fixed in 10% formalin, dehydrated, embedded in paraffin, and sliced for periodic acid-Schiff (PAS) staining. In brief, liver tissue sections were dewaxed, hydrated, and stained by Alcian blue for 10–20 min. After three rinses with deionized water, the sections were treated with Periodic acid, Schiff Reagent, Hematoxylin, and acid alcohol in turn and then rinsed with deionized water for 3 min. The sections were then observed with a light microscope.

2.6. Real-time quantitative polymerase chain reaction

Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) analysis was performed following our previously described method (Zhang, Xu et al., 2020). Briefly, the total RNA was extracted from colonic tissue using TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) following the instructions. The reverse transcription of RNA to cDNA using a LunaScript™ SuperMix Kit (NEB, USA) and the amplification of specific DNA sequence was performed using Luna Universal qPCR Master Mix (NEB, USA) as the following protocol: 1. Initial Denaturation at 95 °C for 60 s; 2. Denaturation at 95 °C for 15 s; and 3. Extension at 60 °C for 30 s. The oligonucleotide primers in RT-qPCR were listed in Table 1, and the expression of genes was calculated and normalized with β-Actin expression.

Table 1

Sequence of the primers used in this study [sequence 5'-3'].

| Gene | Forward primer | Reverse primer |
|----------------|-----------------------|----------------------|
| Claudin-1 | AAAGCACCGGGCAGATACAG | CCCAGCAGGATGCCAATTAC |
| Claudin-3 | TCGGCCAACACCATCATCAG | TACAACCCAGCTCCCATCTC |
| Occludin | GGAATGTCCAGGACAAGAAG | GCCGTACATAGATCCAGAAG |
| JAM | GCCAGATCACAGCTCCCTAT | ACTGATCGTCGGCTTGGATG |
| ZO-1 | GGGGCTACTGATCAAGA | TGGAGATGAGGCTTCTGCTT |
| E-cadherin | GGTGAAGGCTTGAGCACAAAC | AGGCACTTGACCTGATACG |
| Mucin-2 | TGGAGGTACAGGTGAACAAG | AGCCGGATGGAGAAAGAAAG |
| β -actin | TAAAGAGGAGTGGTCGCGT | CTCAGACCTGGGCCATTACG |

2.7. Western blot analysis

The protein expression levels of the insulin signaling pathway were determined by western blot (Yin et al., 2021). Briefly, the protein samples were extracted using RIPA lysis buffer mixed with Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), and the protein concentrations were measured using a BCA protein assay kit (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China). The target proteins were separated using 12.5% or 8% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose blotting membrane (GE Healthcare, Germany). The membranes were then blocked with 5% skim milk for 1–2 h, followed by incubation with primary and secondary antibodies. The following primary antibodies were used: anti-Phospho-IRS-1 (Ser 307) (1:500, #2381, CST, USA), anti-IRS-1 (1:500, #2382, CST, USA), anti-Akt (pan) (1:1000, #4691, CST, USA), anti-Phospho-Akt (Ser 473) (1:1000, #4060, CST, USA), anti-GSK-3 β (1:1000, #9315, CST, USA), anti-Phospho-GSK-3 β (Ser 9) (1:1000, #5558, CST, USA), anti-Occludin (1:1000, ab216327, Abcam, UK), anti-ZO-1 (1:1000, ab216880, Abcam, UK) and anti-E-cadherin (1:1000, # 24E10, CST, USA). Anti-GAPDH antibody (1:2500, ab9485, Abcam, UK) and beta Actin Polyclonal Antibody (1:1000, #PA5-16914, ThermoFisher Scientific, USA) were used as loading controls, and Goat anti-Rabbit IgG, HRP (1:4000, 31460, Invitrogen, USA) was used as the secondary antibody. Immunoreactivity of protein bands was detected using the ECL imaging system (Bio-Rad Laboratories, USA).

2.8. Determination of SCFAs in feces

The determination of SCFAs was performed according to our previously described methods (Yu et al., 2016; Zhao et al., 2007). Briefly, 50–100 mg freeze-dried feces were mixed and homogenized with 1 mL distilled water and the supernatant was collected after centrifugation at 13000 rpm for 10 min. The supernatant was then acidized using 100 μ L 10 % sulfuric acid and then adding 500 μ L ether to extract SCFAs. The concentration of SCFA was detected and analyzed using gas chromatography (Agilent Technologies 7890B) equipped with a DB-FFAP capillary column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m, Agilent). Data processing was conducted using Agilent's MSD ChemStation (E.02.00.493).

2.9. Intestinal microbiota analysis

Total genome DNA from feces samples was extracted using the CTAB method, purified, and diluted to 1 ng/ μ L with sterile water. The distinct regions of 16S rRNA (V3-V4) were amplified using specific primers 515F-806R with the barcode, and the following amplifications were carried out using Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (NEB, USA). After PCR products quantification and qualification, the gene library was sequenced on an Illumina NovaSeq platform, and data analysis was conducted as described in the previous studies (Ma et al., 2019). The sequence data is accessible in NCBI Sequence Read Archive (SRA) database with the following link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA770970>.

2.10. Statistic analysis

All the results were presented in the form of means \pm standard errors of the means (SEM). All statistical analyses were performed using the SPSS 17.0 software and graphs were made using Prism 7.0 software. The differences among groups were assessed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test, and the analysis of the relative abundance of microbiota was performed using a non-parametric test, following Benjamin and Hochberg *post hoc* analyses. The difference was considered statistically significant when p value < 0.05.

3. Results

3.1. EGCG ameliorates BPA-induced insulin resistance and abnormal glycometabolism

Firstly, OGTT was conducted to investigate the effects of EGCG on BPA-induced hyperglycemia. After 5 weeks of treatment, the glucose level of the BPA group was significantly higher than the CON group at 30 min and 120 min. High-dose EGCG treatment decreased glucose concentration remarkably at 15, 30, and 120 min. Low-and medium-dose EGCG also decreased glucose levels at 30 min and 120 min (p < 0.05) (Fig. 1B). According to Fig. 1C, the area under the curve (AUC) of the BPA group was significantly elevated 12.6% than that of the CON group, while the AUC of the EGCG intervention group was significantly lower than that of the BPA group by 7.59%, 9.93%, and 13.04% respectively.

The insulin sensitivity was then measured by ITT, and the trends in blood glucose concentration were shown in Fig. 1D. Glucose levels of the BPA group significantly elevated at 15 min compared with the CON group. The BHE group had significantly lower blood glucose levels at 15 and 120 min than the BPA group, respectively. Consistently, it was found that the incremental AUC value of the BPA group was evaluated by 14.62% compared with the CON group (p < 0.05). The AUC of the BHE group was significantly reduced than the BPA group, while there are no significant differences in BLE and BME group when compared with the BPA group (Fig. 1E).

After 60 days of treatment, the levels of fasting blood glucose and serum insulin in the BPA group were significantly increased by 28.30% and 29.80%, respectively, when compared with the CON group (Fig. 1F & G). However, the EGCG intervention dose-dependently reduced insulin and glucose concentration significantly (p < 0.05). The index of HOMA-IR of the BPA group was profoundly higher than that of the controls, indicating a significant insulin resistance in the BPA group. Medium and high doses of EGCG restored insulin resistance with a decrease of 23.52% and 30.82% (p < 0.05) compared with the BPA group (Fig. 1H).

3.2. EGCG reverses decreased hepatic glycogen content induced by BPA

Changes in liver glycogen content were observed in the liver sections stained with PAS under a light microscope (Fig. 1A). The quantitative measurement of liver tissue using an assay kit showed that the hepatic glycogen content of the BPA group was reduced (p < 0.01) compared to the CON group. EGCG administration dose-dependently increased glycogen content in hepatocytes. Thereinto, high dose EGCG significantly restored glycogen content (p < 0.05) to normal level when compared to the BPA group (Fig. 1I).

3.3. Effects of BPA and EGCG on liver function and lipid parameters

Lipid metabolic disorder is one of the main characteristics of insulin resistance, and the alteration of hepatic energy metabolism may further aggravate the development of insulin resistance or diabetes. From our results, continuous BPA exposure significantly (p < 0.05) increased the serum TC level but had no significant impact on the TG level. EGCG

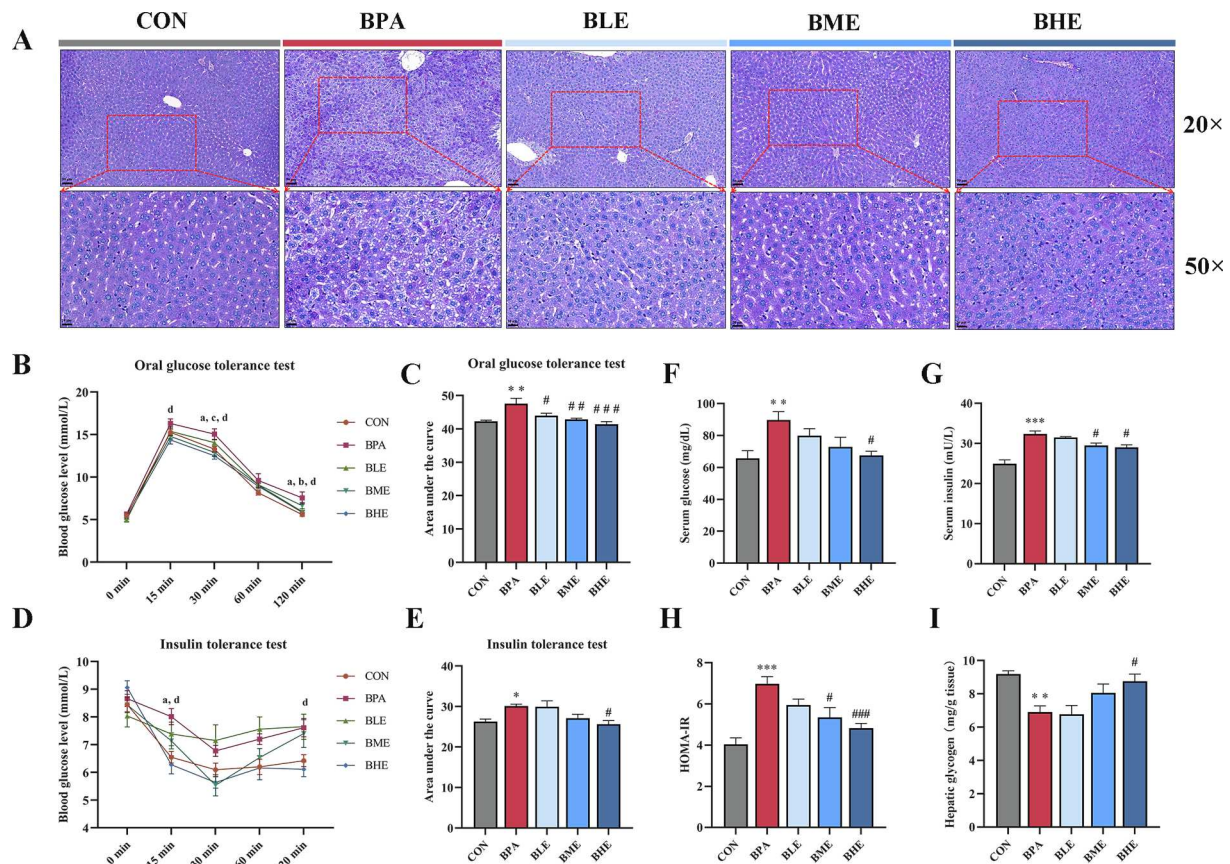


Fig. 1. Effects of BPA and EGCG on parameters of glycometabolism. (A) Histological analysis of liver in groups CON, BPA, BLE (low-dose EGCG), BME (medium-dose EGCG), and BHE (high-dose EGCG). (B and C) Changes of blood glucose of oral glucose tolerance test (OGTT) and its area under the curve (AUC). (D and E) Changes of blood glucose of insulin tolerance test (ITT) and its AUC. (F) Alterations of serum glucose concentrations, (G) serum insulin concentrations and (H) HOMA-IR. (I) Quantitative analysis of liver glycogen content. Values are expressed in the form of means \pm SEM ($n = 8$). The alphabets in (B) and (D) mean significance at $p < 0.05$. a-BPA vs. CON; b-BPA vs. BLE; c-BPA vs. BME; d-BPA vs. BHE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with the control group, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ compared with BPA group.

treatment in the high dose group remarkably reduced serum TG and, TC levels ($p < 0.05$), and there were no significant differences in BLE- and BME- dose groups (Table 2). In general, neither BPA nor EGCG affected liver function parameters. However, GOT level was elevated in the BPA group, though it was not significant and was dose-dependently reduced by EGCG.

3.4. Effects of BPA and EGCG on IRS/Akt/GSK3 β signaling pathway

Akt is an important factor in the metabolic process, and it makes up

Table 2
Effects of BPA and EGCG on liver function and lipid parameters.

| | Group | | | | |
|-------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | CON | BPA | BLE | BME | BHE |
| Serum TG (mmol/L) | 0.69 \pm 0.09 ^{ab} | 0.78 \pm 0.03 ^a | 0.74 \pm 0.04 ^{ab} | 0.72 \pm 0.09 ^{ab} | 0.66 \pm 0.06 ^b |
| Serum TC (mmol/L) | 3.12 \pm 0.21 ^b | 3.53 \pm 0.15 ^a | 3.41 \pm 0.33 ^{ab} | 3.33 \pm 0.22 ^{ab} | 3.06 \pm 0.29 ^b |
| Serum GOT (U/L) | 135.53 \pm 22.87 | 160.03 \pm 42.10 | 150.29 \pm 10.80 | 141.89 \pm 18.32 | 136.54 \pm 28.46 |
| Serum GPT (U/L) | 35.00 \pm 4.50 | 33.75 \pm 3.48 | 32.64 \pm 3.31 | 31.66 \pm 2.22 | 33.19 \pm 5.26 |

Significant differences ($p < 0.05$) among values in the same line are labeled with different letters (a, b). TG, triacylglycerol; TC, total cholesterol; GOT, glutamic oxalacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; Values are expressed in the form of means \pm SEM ($n = 8$).

the insulin signaling pathway along with IRS and GSK-3 β . The protein expression and phosphorylation were measured using western blot to analyze insulin signaling pathway in peripheral tissues (liver and skeletal muscle). In liver tissue, the phosphorylation of protein Akt (Ser 473) and GSK-3 β (Ser 9) were significantly reduced in the BPA group ($p < 0.05$) while the phosphorylated IRS-1 (Ser 307) was significantly elevated ($p < 0.05$). High dose EGCG treatment altered the phosphorylation of IRS-1 (Ser 307) and Akt (Ser 473) ($p < 0.05$), but no alterations of phosphorylated GSK-3 β (Ser 9) were observed in EGCG-treated group (p greater than 0.05) (Fig. 2A & C). In skeletal muscle tissue, increased level of phosphorylation of Akt (Ser 473) and GSK-3 β (Ser 9) and reduced level of phosphorylated IRS-1 (Ser 307) in the BHE group were observed when compared with the BPA group ($p < 0.05$) (Fig. 2B & D), suggesting improved insulin sensitivity in peripheral tissue. These results demonstrated that high-dose EGCG intervention improved protein phosphorylation levels comprehensively compared with the BPA group.

3.5. EGCG restored the expression of intestinal tight junctions

To explore the effects of BPA exposure and protection of EGCG on the gut barrier, the relative expressions of mRNA of colonic tight junctions were measured via RT-qPCR (Fig. 3A). The results showed that BPA exposure caused severe downregulation of the mRNA expressions of relevant proteins of Claudin (1 and 3), Occludin, ZO-1, JAM, and E-cadherin in comparison with the CON group ($p < 0.05$). Compared with that in the BPA group, the mRNA expression levels of these proteins

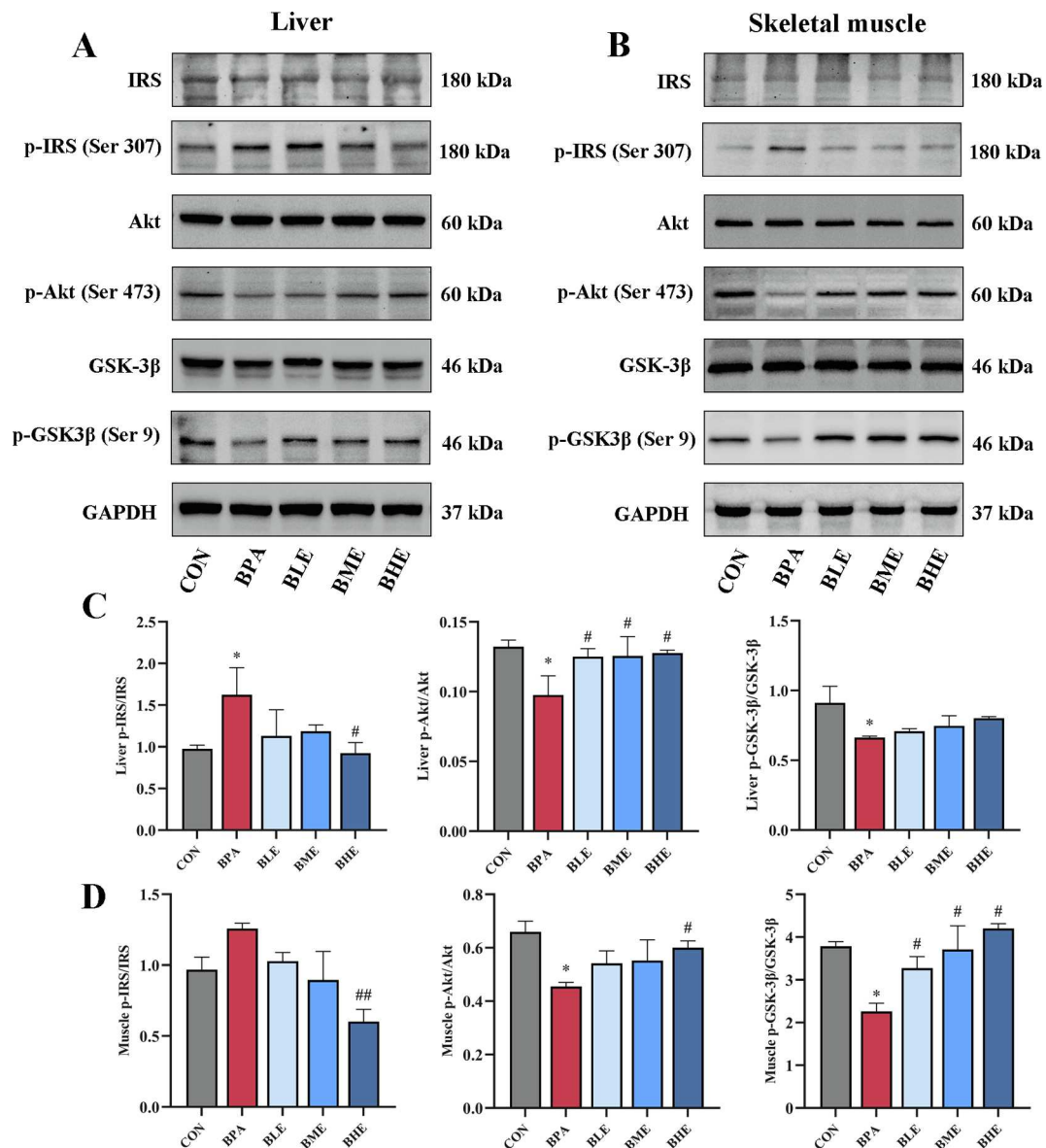


Fig. 2. Effects of BPA and EGCG on IRS-Akt-GSK-3 β pathway. The protein expression of IRS-1, Akt, and GSK-3 β and phosphorylation level of IRS-1 (Ser307), Akt (Ser473), and GSK-3 β (Ser 9) in the liver (A) and skeletal muscle (B). The ratios of phosphorylated protein to total protein are expressed in the form of means \pm SEM (n = 3–4) (C and D). * p < 0.05 compared with the control group, # p < 0.05 and ## p < 0.01 compared with BPA group.

showed extremely significant increases in mice in the BHE and BME groups (p < 0.05). The mRNA expression of mucin-2 was also significantly increased in the BHE group (p < 0.05) and was repaired to the normal level. Besides, the expressions of representative proteins Occludin, ZO-1, and E-cadherin at the protein level were also analyzed by western blot (Fig. 3B). The results were consistent with gene expressions, as the protein expressions were decreased under BPA exposure and restored by EGCG treatment.

3.6. Effects of BPA and EGCG on gut microbiota composition

High-throughput sequencing for feces microbiota was performed on V3-V4 regions of bacterial 16sRNA. Based on the Illumina Nova sequencing platform, about 2, 157 Operational Taxonomic Units (OTUs) were used to investigate microbiota changes. The beta diversity of distinct clustering was analyzed using Principal Coordinates Analysis (PCoA) based on weighted Unifrac distance and Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) (Fig. 4A & B). The result of PCoA analysis showed a significant difference between the BPA group

and BHE group in principal component 1 (PC1) (p < 0.01) and a significant difference between the CON group and BPA group in principal component 2 (PC2) (p < 0.05). Moreover, as shown in UPGMA, the CON and BHE groups shared an analogous clustering structure while both of them had the lowest cluster similarity with the BPA group.

The abundance of microbiota at the phylum level is shown in Fig. 4C. Firmicutes (49.36–72.27%), Bacteroidetes (20.37–46.42%), Verrucomicrobia (0.48–2.44%), and Actinobacteria (1.04–2.86%) were the dominant bacteria in all groups. Compared to the control group, BPA exposure reduced the abundance of Firmicutes, Actinobacteria, and Deferribacteres while increased the abundance of Bacteroidetes and Proteobacteria. After EGCG intervention, the abundance of Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, and Actinobacteria were back to the level of the CON group. At the family level, the abundance of *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae* was decreased, and *Muribaculaceae* was remarkably increased in the BPA group. After EGCG intervention, the abundance of *Muribaculaceae* was reduced, and *Ruminococcaceae* was increased significantly (p < 0.05). The levels of *Bifidobacteriaceae* and *Prevotellaceae* were also altered but not significantly (Fig. 4D). Finally,

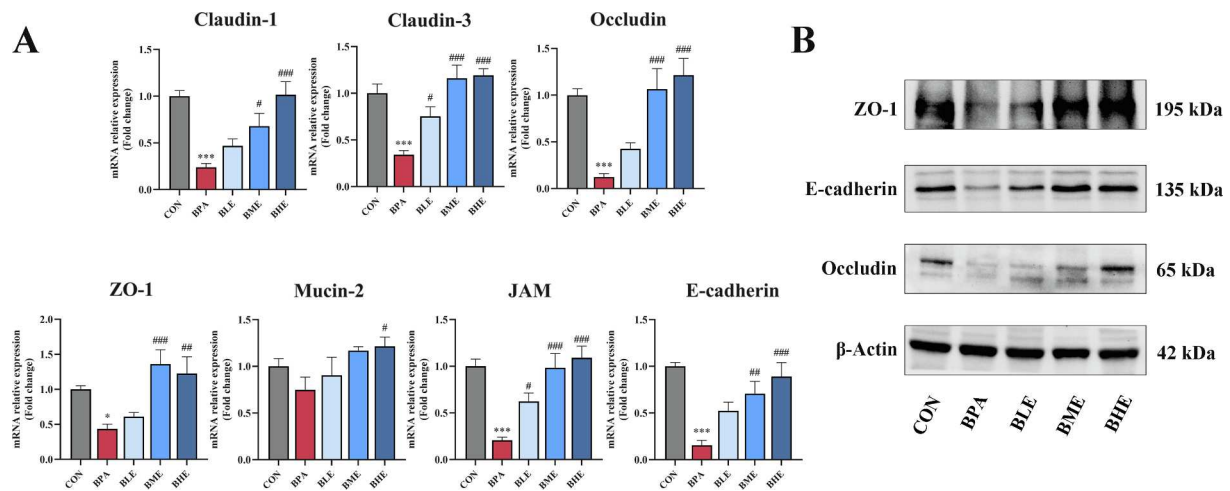


Fig. 3. Effects of BPA and EGCG on the expression of colonic tight junctions. The relative mRNA expression levels of Claudin-1, Claudin-3, Occludin, ZO-1, Mucin-2, JAM, and E-cadherin were measured by RT-qPCR (A). The protein expressions of Occludin, ZO-1 and E-cadherin were measured by western blot (B). The results are expressed in the form of means \pm SEM (n = 6). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared with Control group, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ compared with BPA group.

the alterations of relative abundance of the genus level were shown in Fig. 4E. Most of the bacteria with significant changes were in the orders *Eubacteriales* and *Bacteroidales*. Compared with the controls, *unidentified_Ruminococcaceae*, *Ruminiclostridium*, and *Candidatus_Saccharimonas* were significantly reduced by BPA exposure. Meanwhile, *Lachnoclostridium*, *Oscillibacter*, *Roseburia*, and *Intestinimonas* had downward trends in the BPA group. On the other hand, great enrichment of *Muribaculum*, *Blautia*, *Alloprevotella*, and *Odoribacter* were found in BPA-administered mice. However, the relative abundance of some bacteria was restored to the same level as the control group after EGCG intervention. *Unidentified_Ruminococcaceae*, *Ruminiclostridium*, and *Candidatus_Saccharimonas* were significantly increased, and *Muribaculum*, *Blautia*, *Alloprevotella*, and *Parasutterella* were obviously reduced in the BHE group.

3.7. Effects of BPA and EGCG on gut SCFAs production

To investigate the effects on microbial products, the fecal SCFAs were detected using gas chromatography, and the concentration was significantly altered by BPA and EGCG treatment. Fig. 5A indicated that acetic acid, butyric acid, and valeric acid concentrations were greatly reduced in the BPA group in comparison to the CON group ($p < 0.001$). The high-dose EGCG treatment significantly restored acetic acid, butyric acid, and valeric acid levels reduced by BPA ($p < 0.05$), while the concentration did not rise significantly in the BLE and BME groups.

In order to identify the relationship between changes in gut microbiota and SCFAs concentration, Spearman analysis was performed using rank correlation coefficient (Fig. 5B). The acetic acid level was positively correlated with the abundance of *unidentified_Ruminococcaceae*, *Turicibacter*, *Enterorhabdus*, *Roseburia*, *Lachnoclostridium*, and *unidentified_Clostridiales*, and negatively correlated with the abundance of *Alloprevotella*, *Parasutterella*, and *Odoribacter*. The propionic acid level was positively correlated with *Bifidobacterium* and *Enterorhabdus* but negatively correlated with *Alloprevotella*. *Mucispirillum*, *Ruminiclostridium*, and *Intestinimonas* have a significant positive correlation with butyric acid concentration, and *Roseburia*, *Lachnoclostridium*, and *Butyrivibrio* are significantly positively associated with valeric acid levels.

4. Discussion

It is widely believed that chronic exposure to BPA, an organic chemical material extensively used in food packages, leads to hepatic lipid accumulation (Liu et al., 2020), disorders in glucose metabolism

(Rashid et al., 2020), and even insulin resistance (Rotondo & Chiarelli, 2020). The extensive usage and non-monotonic dose response of BPA give it the characteristics of wide range of exposure, continuous influences, and relatively high chronic toxicity, making it hard to use specific medications for treatment. So far, most of the research has focused on BPA's toxicity, while few studies have offered a solution. EGCG is the most abundant bioactive compound in the green tea component and contributes to the health effects of tea polyphenol (Higdon & Frei, 2003) which could be continuously ingested by daily consumption of green tea. Several studies reported the effects of EGCG on the high-fat diet-induced disorder in glucose metabolism and insulin sensitivity (Lambeth et al., 2015). However, little is known about the effects of EGCG on BPA exposure-induced metabolic syndrome and intestinal microbial disorder. In the present study, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w. BPA was used to induce insulin resistance in mice according to relevant studies (Moghaddam et al., 2015; Vahdati Hassani et al., 2017) and our previous research. Together, different dosages of EGCG modified from previous research (Zhu et al., 2021) were used to treat metabolic disorder mice. The results consistently showed that chronic oral exposure to BPA leads to aberrant alterations of energy homeostasis, including increased serum glucose and insulin levels as well as impaired glucose and insulin tolerance in mice. Moreover, increased TG and TC levels, which represented lipid metabolism disorder, were found in BPA-treated mice. The co-administration of high-dose EGCG significantly decreased the serum levels of glucose, TG, and TC and improved the insulin resistance caused by BPA. These observations suggested that the administration of EGCG could be an effective method for treating chronic BPA exposure-induced metabolic syndrome.

Liver and skeletal muscle are major peripheral tissues responsible for transmitting insulin signals, maintaining insulin sensitivity, and the mutual transformation of glycogen and glucose (Siew et al., 2014). In these tissues, the protein Akt, also known as protein kinase B (PKB), and other related proteins constitute the basic but classic transmission system of insulin signal. Following the activation of IRS-1 and PI3K, Akt is phosphorylated and then promotes glucose transportation and glycogen synthesis (Manning & Cantley, 2007). Of note, other than promotive phosphorylation of tyrosine residue, there is the negative feedback of this signaling pathway as the serine phosphorylation of IRS-1 (Ser307) might disrupt the catalytic structural domain of insulin receptor and phosphotyrosine binding domain on IRS-1, which inhibits the binding of IRS to insulin receptor and the phosphorylation of tyrosine residue of IRS (Aguirre et al., 2002; Li et al., 2016). In the case of insulin resistance or diabetes, the level of phosphorylated Ser307 of IRS-1 might elevate

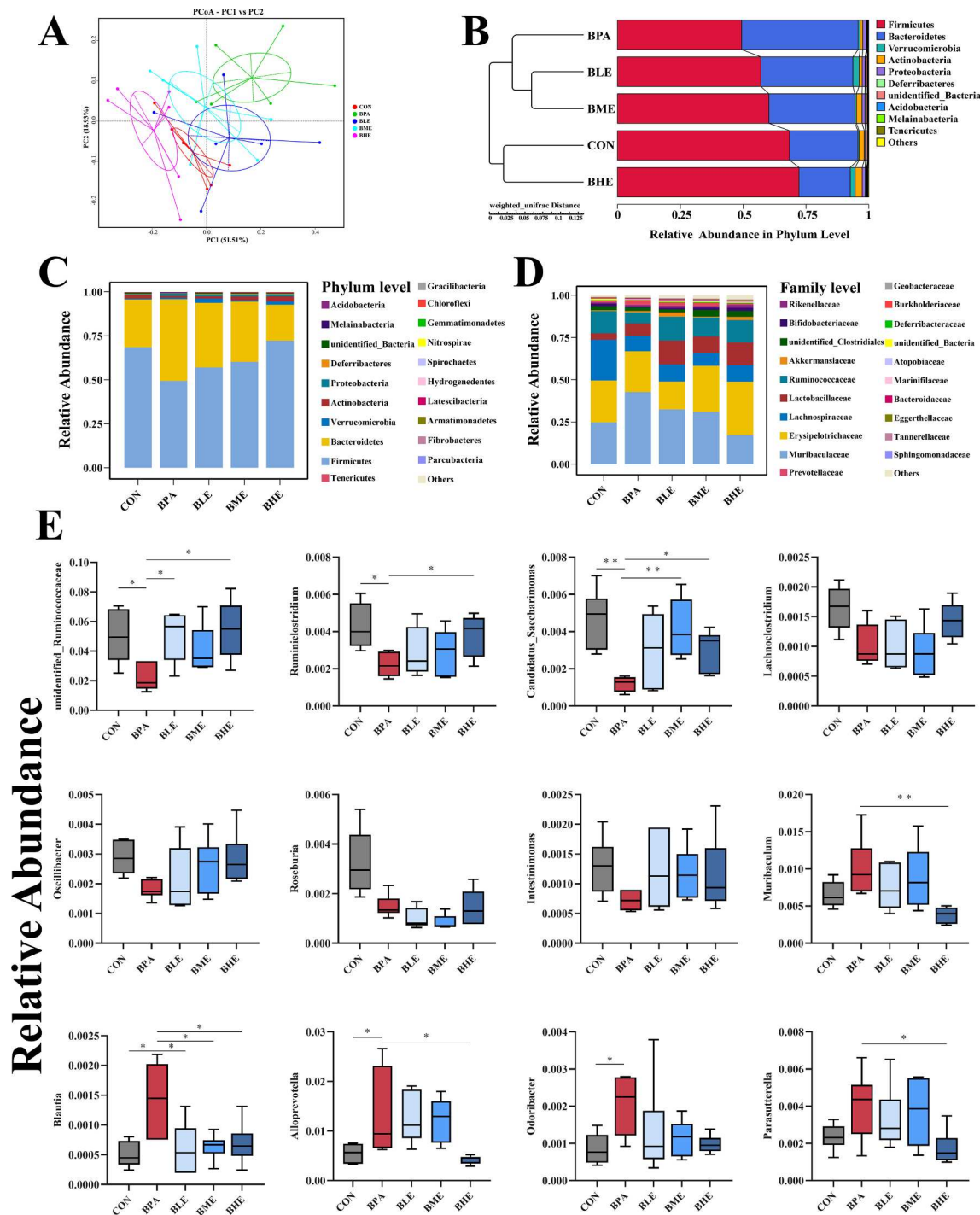


Fig. 4. Effects of BPA and EGCG on the composition of gut microbiota. The analysis of (A) Principal Co-ordinates Analysis (PCoA) and (B) Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean (UPGMA).The relative abundances of microbiota at the phylum level (C), family level (D), and genus level (E). The relative abundances of the genus level are expressed in the form of means \pm SEM (n = 6). * $q < 0.05$, ** $q < 0.01$ indicate statistically significant differences between groups.

and thus hold back further transmission of insulin signal, resulting in reduced organ responsiveness to insulin. Likewise, one of the main detrimental effects of BPA on peripheral tissue is also reflected in the inhibition of the phosphorylation of Akt and its downstream proteins, which impairs insulin signaling and glucose transport in tissues (Fang et al., 2015; Moon et al., 2015). Here our studies showed that EGCG treatment improves the impaired insulin sensitivity by restoring the disturbance of phosphorylation of the insulin signaling pathway and significantly increasing glycogen concentration in liver and skeletal muscle. These results suggested that EGCG regulated the BPA-induced

metabolic syndrome by enhancing insulin sensitivity and regulating the IRS/Akt/GS3K β signaling pathway.

In recent years, the gut microenvironment has become an important target in the intervention of diabetes. Gut microbiota and its metabolic products such as SCFAs are considered to play an important role in maintaining glucose metabolism and insulin sensitivity of the host. According to the previous studies, individuals with diabetes or prediabetes often have reduced Firmicutes and more abundant Bacteroidetes, which consequently lowers the ratio of Firmicutes/Bacteroidetes (Remely et al., 2017), and the transformation was suspected of playing a role in

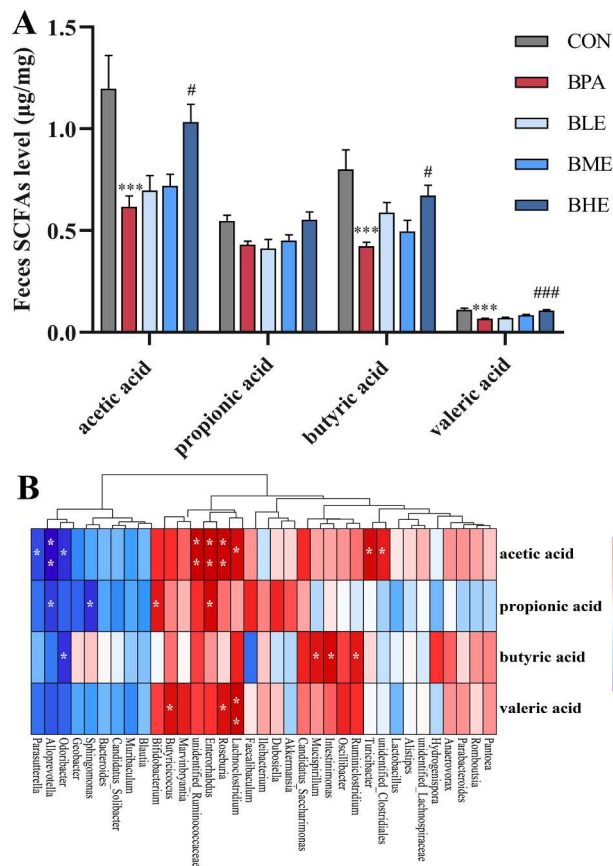


Fig. 5. Alterations of fecal SCFAs concentration and its correlations with microbiota. (A) The content of SCFAs in feces. The levels of fecal SCFAs are expressed in the form of means \pm SEM (n = 6). *** p < 0.001 compared with Control group, # p < 0.05, and ### p < 0.001 compared with BPA group. (B) The correlation with microbiota was presented in the form of spearman analysis. The colors range from blue (negative correlation) to red (positive correlation) and significant correlations are annotated by * p < 0.05 and ** p < 0.01.

promoting diabetes. Interestingly, similar trends of bacterial community structure were also observed in some analyses of intestinal bacteria of BPA-exposed rodents. The relative abundance of *Proteobacteria*, which is often associated with intestinal inflammation, decreased during long-term BPA exposure. Meanwhile, microbial metabolites and intestinal permeability were also changed (DeLuca et al., 2018; Feng et al., 2020). Moreover, comparative metagenomics analysis revealed the similarities of microbial community structure between BPA-treated and high fat/sucrose diet-treated mice, including favored growth of *Proteobacteria* and reduction of the *Firmicutes* and *Clostridia* (Lai et al., 2016). These observations indicate the possibility that microbial changes are widely involved in BPA-induced metabolic imbalance. In the present study, compared with mice in the CON and BHE group, the exposure of BPA significantly reduced the abundance of Firmicutes and Actinobacteria while increased Bacteroidetes. Further data revealed that EGCG treatment led to the significant enrichment of several SCFAs-producers, such as the families *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae*. To our knowledge, *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae* are well-known for the production of SCFAs by degrading carbohydrates such as cellulose as they are rich in a variety of carbohydrate-active enzymes, including glycoside hydrolase, carbohydrate esterase, and carbohydrate-binding modules (Biddle et al., 2013). These bacteria could affect the body's glucose metabolism and mostly remain a negative relation of type 2 diabetes (Labbe et al., 2014; Shang et al., 2016). Besides, several studies demonstrated the correlation between taxa of these families, such as *Roseburia* and *Ruminoclostridium*, and improved lipid metabolism (Companys et al.,

2021; Liu et al., 2019). However, in contrast, some of the decreased taxa in EGCG treated groups such as *Muribaculaceae*, *Blautia*, and *Parasutterella* were positively associated with type 2 diabetes and lipid-metabolic disturbance (Gurung et al., 2020; Wang et al., 2020; Zeng et al., 2019). Taking these into consideration, the regulation of gut microbiota might play an important role in the regulation effects of EGCG on BPA-induced metabolic syndrome.

SCFAs and their salts are one of the most important metabolites of gut microbiota fermented from resistant starch and indigestible dietary fiber in food, and it mainly consists of acetate, propionate, and butyrate, accounting for 60%, 25%, and 15%, respectively (Topping & Clifton, 2001). As mentioned before, SCFAs were considered to have positive regulatory effects on metabolic disorders as acetate and propionate and could reduce appetite by regulating the expression of appetite regulatory neuropeptides, peptide YY (PYY), and glucagon-like peptide 1 (GLP-1) (Frost et al., 2014; Psichas et al., 2015). According to the results related to SCFAs and glucose and insulin signal regulation, the increase of SCFAs or SCFA-producing strains was often accompanied by enhanced insulin sensitivity in peripheral tissue. For example, the elevated level of *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* was positively correlated with SCFAs butyric acid and reduced blood sugar (Zhang et al., 2021), and the administration of probiotics *Lactobacillus plantarum* could improve glucose tolerance and restore SCFAs production (Lee et al., 2021). In an intervention experiment on STZ-induced type 1 diabetes rats, the use of sodium butyrate effectively ameliorated glucose homeostasis and increased the phosphorylation of Akt (Elgamil et al., 2020). In line with the results aforementioned, it was found that the insulin signaling pathway, including IRS-1, PI3K, Akt, GSK3, and GLUT-4, were correspondingly activated or altered along with the alteration of SCFAs, especially butyric acid level, suggesting that SCFAs and their producers might affect insulin sensitivity by PI3K-Akt pathway. Here in the present study, we found reduced levels of fecal SCFAs in mice with insulin resistance, and we rationally hypothesize that the reduction is likely caused by the imbalanced structure of microbiota and reduced abundance of SCFAs-producers in the gut. These results are consistent with the study performed on rabbit offspring exposed to BPA (Reddivari et al., 2017). In 2021, Linares et al. found an inverse relationship between serum butyrate and BPA level in patients with Crohn's disease (Linares et al., 2021), supporting the hypothesis that BPA can affect SCFAs levels.

In addition to the influences on microbiota, a few studies have also described the damage of BPA to intestinal tight junctions. Braniste et al. first demonstrated the potentially harmful effects of BPA on intestinal barrier functions of rats. The authors found that wide exposure to xenoestrogen early in life may reduce the colonic paracellular permeability and aggravate neutrophil infiltration of the inflammatory colon (Braniste et al., 2010). The specific colonic damage of BPA exposure was also investigated in further study, as evidenced by apoptosis and cell proliferation inhibition in colonic epithelial cells line *in vitro* (Zhao et al., 2019). Besides, with the continuous exposure of BPA, increased intestinal permeability is often accompanied by dysregulation of the intestinal flora and reduced level of SCFAs (Reddivari et al., 2017), further influencing inflammatory responses and metabolic processes. This damage effect was also verified in our experiments, and EGCG treatment provided dose-dependent protection against tight junction injury. Although there were some studies that demonstrated the protective role of EGCG on the intestinal barrier in high-fat diet or colitis cases (Dey et al., 2020; Wu et al., 2021), the improvement on the BPA-induced injuries and the potential mechanism still need to be further explored. On the other hand, accumulating studies have proven the close relationship between the intestinal barrier, metabolic disorder, and microbiota (Yang et al., 2021). The microbiota-derived SCFAs such as acetic and butyric acid could be directly utilized by intestinal epithelial cells as an energy source to maintain cell functions and played a role in protecting the intestinal barrier (Couto et al., 2020; Kasubuchi et al., 2015; Peng et al., 2009). As a result, a healthy intestinal barrier can prevent

LPS and peptidoglycan from entering the circulatory system, avoiding inflammation and metabolic disorders. Albeit with varying levels of certainty, the repairment of the intestinal barrier in the current study may play an important role in promoting the regulation of metabolism by EGCG.

Accounting for 50–70% of catechins in green tea, EGCG has a powerful metabolic regulation (Khan & Mukhtar, 2019). In the study, we used 50, 100 and 200 mg/kg b.w. as low, medium and high dose of EGCG. Using human equivalent dose calculation based on body surface area (Nair & Jacob, 2016), low-dose EGCG was equivalent to 243.6 mg/day for an adult (60 kg), and this dose was equivalent to 313 mL green tea a day based on 1 g leaf/100 mL infusion according to the United States Department of Agriculture (USDA) Flavonoid Database (Hu et al., 2018). Considering that a cup of tea contains nearly 200 mg of EGCG (Khan & Mukhtar, 2019), the human equivalent dose converted from high-dose EGCG was within normal consumption limits (Yang et al., 2009). Although the high-dose EGCG showed a therapeutic effect on BPA-induced metabolic toxicity, more mouse samples might be required to explore the underlying mechanisms, and relevant epidemiological investigations can be carried out in further studies.

5. Conclusion

Our study demonstrated that EGCG intervention ameliorated insulin resistance induced by BPA. EGCG improved phosphorylation of IRS-1, Akt, and GSK-3 β of the insulin signaling pathway in liver and skeletal muscle and consequently upregulated glycogen synthesis ability. These beneficial effects might be mediated by the regulation of the gut environment, including the reversion of the decreased SCFAs levels and the up-regulation of tight junction-related protein. Moreover, EGCG increased the abundance of SCFA-producing microbes, including *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae*. This study demonstrated the protective effects of EGCG on BPA-induced insulin resistance and gut dysbiosis, indicating a potential treatment for chronic metabolic toxicity of BPA.

Ethical statement

All protocols and experiments involving animals and tissue samples were conducted in accordance with the National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals and approved by the Institution Animal Care and Use Committee of Nankai University.

CRedit authorship contribution statement

Xiang Li: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization, Project administration. **Yunhui Zhang:** Methodology, Investigation, Data curation, Writing – review & editing. **Congying Zhao:** Investigation, Data curation. **Bowei Zhang:** Formal analysis, Methodology, Writing – original draft. **Bo Peng:** Writing – review & editing. **Yan Zhang:** Supervision, Funding acquisition. **Jin Wang:** Supervision, Funding acquisition. **Shuo Wang:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

This work was funded by Shanxi Province Key R&D Plan (201903D211006), and the National Natural Science Foundation of China (No.32072332).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105083>.

References

- Aguirre, V., Werner, E. D., Giraud, J., Lee, Y. H., Shoelson, S. E., & White, M. F. (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *Journal of Biological Chemistry*, 277(2), 1531–1537. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101521200>
- Biddle, A., Stewart, L., Blanchard, J., & Leschine, S. (2013). Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by lachnospiraceae and ruminococcaceae in diverse gut communities. *Diversity*, 5(3), 627–640. <https://doi.org/10.3390/d5030627>
- Braniste, V., Jouault, A., Gaultier, E., Polizzi, A., Buisson-Brenac, C., Leveque, M., ... Houdeau, E. (2010). Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(1), 448. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907697107>
- Cao, X. L., & Corriveau, J. (2008). Migration of bisphenol A from polycarbonate baby and water bottles into water under severe conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6378–6381. <https://doi.org/10.1021/jf800870b>
- Chevalier, N., & Fénichel, P. (2015). Bisphenol A: Targeting metabolic tissues. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 16(4), 299–309. <https://doi.org/10.1007/s1154-016-9333-8>
- Companys, J., Gosalbes, M. J., Pla-Paga, L., Calderon-Perez, L., Llauro, E., Pedret, A., ... Sola, R. (2021). Gut microbiota profile and its association with clinical variables and dietary intake in overweight/obese and lean subjects: A cross-sectional study. *Nutrients*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/nu13062032>
- Couto, M. R., Goncalves, P., Magro, F., & Martel, F. (2020). Microbiota-derived butyrate regulates intestinal inflammation: Focus on inflammatory bowel disease. *Pharmacological Research*, 159, 104947. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104947>
- DeLuca, J. A., Allred, K. F., Menon, R., Riordan, R., Weeks, B. R., Jayaraman, A., & Allred, C. D. (2018). Bisphenol-A alters microbiota metabolites derived from aromatic amino acids and worsens disease activity during colitis. *Experimental Biology and Medicine*, 243(10), 864–875. <https://doi.org/10.1177/1535370218782139>
- Dey, P., Olmstead, B. D., Sasaki, G. Y., Vodovotz, Y., Yu, Z., & Bruno, R. S. (2020). Epigallocatechin gallate but not catechin prevents nonalcoholic steatohepatitis in mice similar to green tea extract while differentially affecting the gut microbiota. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 84, 108455. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108455>
- Elgamal, D. A., Abou-Elghait, A. T., Ali, A. Y., Ali, M., & Bakr, M. H. (2020). Ultrastructure characterization of pancreatic beta-cells is accompanied by modulatory effects of the HDAC inhibitor sodium butyrate on the PI3/AKT insulin signaling pathway in juvenile diabetic rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 503, 110700. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110700>
- Fang, F., Chen, D., Yu, P., Qian, W., Zhou, J., Liu, J., ... Xiao, H. (2015). Effects of Bisphenol A on glucose homeostasis and brain insulin signaling pathways in male mice. *General and Comparative Endocrinology*, 212, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.01.017>
- Feng, D., Zhang, H., Jiang, X., Zou, J., Li, Q., Mai, H., ... Feng, X. (2020). Bisphenol A exposure induces gut microbiota dysbiosis and consequent activation of gut-liver axis leading to hepatic steatosis in CD-1 mice. *Environmental Pollution*, 265. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114880>
- Feng, L., Chen, S., Zhang, L., Qu, W., & Chen, Z. (2019). Bisphenol A increases intestinal permeability through disrupting intestinal barrier function in mice. *Environmental Pollution*, 254(Pt A), 112960. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112960>
- Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., ... Bell, J. D. (2014). The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature Communications*, 5, 3611. <https://doi.org/10.1038/ncomms4611>
- Gomes, A. C., Bueno, A. A., Souza, R. G. M.d., & Mota, J. F. (2014). Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutrition Journal*, 13(1), 60. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-13-60>
- Gurung, M., Li, Z., You, H., Rodrigues, R., Jump, D. B., Morgun, A., & Shulzhenko, N. (2020). Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine*, 51, 102590. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.051>
- Higdon, J. V., & Frei, B. (2003). Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 89–143. <https://doi.org/10.1080/10408690390826464>
- Hu, J., Webster, D., Cao, J., & Shao, A. (2018). The safety of green tea and green tea extract consumption in adults - Results of a systematic review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 95, 412–433. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.03.019>
- Iso, H., Date, C., Wakai, K., Fukui, M., Tamakoshi, A., & Grp, J. S. (2006). The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type 2 diabetes among Japanese adults. *Annals of Internal Medicine*, 144(8), 554–562. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-144-8-200604180-00005>
- Kasubuchi, M., Hasegawa, S., Hiramatsu, T., Ichimura, A., & Kimura, I. (2015). Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients*, 7(4), 2839–2849. <https://doi.org/10.3390/nu7042839>
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2019). Tea polyphenols in promotion of human health. *Nutrients*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/nu11010039>

- Labbe, A., Ganopolsky, J. G., Martoni, C. J., Prakash, S., & Jones, M. L. (2014). Bacterial bile metabolising gene abundance in Crohn's, ulcerative colitis and type 2 diabetes metagenomes. *PLoS ONE*, 9(12), e115175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115175>
- Lai, K.-P., Chung, Y.-T., Li, R., Wan, H.-T., & Wong, C.-K.-C. (2016). Bisphenol A alters gut microbiome: Comparative metagenomics analysis. *Environmental Pollution*, 218, 923–930. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.039>
- Lambeth, S. M., Carson, T., Lowe, J., Ramaraj, T., Leff, J. W., Luo, L., ... Shah, V. O. (2015). Composition, diversity and abundance of gut microbiome in prediabetes and type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and Obesity*, 2(3), 1–7. <https://doi.org/10.15436/2376-0949.15.031>
- Larsen, N., Vogensen, F. K., van den Berg, F. W. J., Nielsen, D. S., Andreasen, A. S., Pedersen, B. K., ... Jakobsen, M. (2010). Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS ONE*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009085>
- Lee, Y. S., Lee, D., Park, G. S., Ko, S. H., Park, J., Lee, Y. K., & Kang, J. (2021). Lactobacillus plantarum HAC01 ameliorates type 2 diabetes in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice in association with modulating the gut microbiota. *Food & Function*, 12(14), 6363–6373. <https://doi.org/10.1039/D1FO00698C>
- Li, F., Gao, C., Yan, P., Zhang, M., Wang, Y., Hu, Y., ... Sheng, J. (2018). EGCG reduces obesity and white adipose tissue gain partly through AMPK activation in mice. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1366. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01366>
- Li, J., Wang, Y., Fang, F., Chen, D., Gao, Y., Liu, J., ... Xiao, H. (2016). Bisphenol A disrupts glucose transport and neurophysiological role of IR/IRS/AKT/GSK3beta axis in the brain of male mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 43, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.11.025>
- Li, N., Kang, H., Peng, Z., Wang, H. F., Weng, S. Q., & Zeng, X. H. (2021). Physiologically detectable bisphenol A impairs human sperm functions by reducing protein-tyrosine phosphorylation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 221, 112418. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112418>
- Li, X., Li, S., Chen, M., Wang, J., Xie, B., & Sun, Z. (2018). (–)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits starch digestion and improves glucose homeostasis through direct or indirect activation of PXR/CAR-mediated phase II metabolism in diabetic mice. *Food & Function*, 9(9), 4651–4663. <https://doi.org/10.1039/C8FO01293H>
- Linares, R., Fernandez, M. F., Gutierrez, A., Garcia-Villalba, R., Suarez, B., Zapater, P., ... Frances, R. (2021). Endocrine disruption in Crohn's disease: Bisphenol A enhances systemic inflammatory response in patients with gut barrier translocation of dysbiotic microbiota products. *The FASEB Journal*, 35(7), e21697. <https://doi.org/10.1096/fj.202100481R>
- Liu, J., Hao, W., He, Z., Kwek, E., Zhao, Y., Zhu, H., ... Chen, Z. Y. (2019). Beneficial effects of tea water extracts on the body weight and gut microbiota in C57BL/6J mice fed with a high-fat diet. *Food & Function*, 10(5), 2847–2860. <https://doi.org/10.1039/C8FO02051E>
- Liu, Q., Shao, W., Weng, Z., Zhang, X., Ding, G., Xu, C., ... Gu, A. (2020). In vitro evaluation of the hepatic lipid accumulation of bisphenol analogs: A high-content screening assay. *Toxicology in Vitro*, 68, 104959. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104959>
- Ma, H., Zhang, B., Hu, Y., Wang, J., Liu, J., Qin, R., ... Wang, S. (2019). Correlation analysis of intestinal redox state with the gut microbiota reveals the positive intervention of tea polyphenols on hyperlipidemia in high fat diet fed mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(26), 7325–7335. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02211>
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell*, 129(7), 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
- Moghaddam, H. S., Samarghandian, S., & Farkhondeh, T. (2015). Effect of bisphenol A on blood glucose, lipid profile and oxidative stress indices in adult male mice. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 25(7), 507–513. <https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1056395>
- Moon, M. K., Jeong, I. K., Jung Oh, T., Ahn, H. Y., Kim, H. H., Park, Y. J., ... Park, K. S. (2015). Long-term oral exposure to bisphenol A induces glucose intolerance and insulin resistance. *Journal of Endocrinology*, 226(1), 35–42. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0714>
- Nadal, A., Alonso-Magdalena, P., Soriano, S., Quesada, I., & Ropero, A. B. (2009). The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304(1–2), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.016>
- Nair, A. B., & Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(2), 27–31. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>
- Peng, L., Li, Z. R., Green, R. S., Holzman, I. R., & Lin, J. (2009). Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *The Journal of Nutrition*, 139(9), 1619–1625. <https://doi.org/10.3945/jn.109.104638>
- Pottenger, L. H., Domoradzki, J. Y., Markham, D. A., Hansen, S. C., Cagen, S. Z., & Waechter, J. M., Jr. (2000). The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicological Sciences*, 54(1), 3–18. <https://doi.org/10.1093/toxsci/54.1.3>
- Provvissiero, D. P., Pivonello, C., Muscogiuri, G., Negri, M., de Angelis, C., Simeoli, C., ... Colao, A. (2016). Influence of bisphenol A on type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(10), 989. <https://doi.org/10.3390/ijerph13100989>
- Psichas, A., Sleeth, M. L., Murphy, K. G., Brooks, L., Bewick, G. A., Hanyaloglu, A. C., ... Frost, G. (2015). The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents. *International Journal of Obesity*, 39(3), 424–429. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.153>
- Rashid, C. S., Bansal, A., Mesaros, C., Bartolomei, M. S., & Simmons, R. A. (2020). Paternal bisphenol A exposure in mice impairs glucose tolerance in female offspring. *Food and Chemical Toxicology*, 145, 111716. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111716>
- Reddivari, L., Veeramachaneni, D. N. R., Walters, W. A., Lozupone, C., Palmer, J., Hewage, M. K. K., & Vanamala, J. K. P. (2017). Perinatal bisphenol A exposure induces chronic inflammation in rabbit offspring via modulation of gut bacteria and their metabolites. *mSystems*, 2(5). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00093-17>
- Remely, M., Ferk, F., Sterneder, S., Setayesh, T., Roth, S., Kepcija, T., ... Haslberger, A. G. (2017). EGCG prevents high fat diet-induced changes in gut microbiota, decreases of DNA strand breaks, and changes in expression and DNA methylation of Dnmt1 and MLH1 in C57BL/6J Male Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 3079148. <https://doi.org/10.1155/2017/3079148>
- Rotondo, E., & Chiarelli, F. (2020). Endocrine-disrupting chemicals and insulin resistance in children. *Biomedicine*, 8(6), 137. <https://doi.org/10.3390/biomedicine8060137>
- Shang, Q., Shan, X., Cai, C., Hao, J., Li, G., & Yu, G. (2016). Dietary fucoic acid modulates the gut microbiota in mice by increasing the abundance of Lactobacillus and Ruminococcaceae. *Food & Function*, 7(7), 3224–3232. <https://doi.org/10.1039/C6FO00309E>
- Siew, H., Chin, F., Item, S., & Diabetes, M. J. (2014). Opposing effects of reduced kidney mass on liver and skeletal muscle insulin sensitivity in obese mice. *Diabetes*, 64, 1131–1141. <https://doi.org/10.2337/db14-0779>
- Sun, S., Araki, Y., Hanzawa, F., Umeki, M., Kojima, T., Nishimura, N., ... Oda, H. (2021). High sucrose diet-induced dysbiosis of gut microbiota promotes fatty liver and hyperlipidemia in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 93, 108621. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108621>
- Suwannaphet, W., Meeprom, A., Yibchok-Anun, S., & Adisakwattana, S. (2010). Preventive effect of grape seed extract against high-fructose diet-induced insulin resistance and oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(7), 1853–1857. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.04.021>
- Topping, D. L., & Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological Reviews*, 81(3), 1031–1064. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1031>
- Tyl, R. W., Myers, C. B., Marr, M. C., Thomas, B. F., Keimowitz, A. R., Brine, D. R., ... Seely, J. C. (2002). Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD sprague-dawley rats. *Toxicological Sciences*, 68(1), 121–146. <https://doi.org/10.1093/toxsci/68.1.121>
- Vahdati Hassani, F., Mehri, S., Abnous, K., Birner-Gruenberger, R., & Hosseinzadeh, H. (2017). Protective effect of crocin on BPA-induced liver toxicity in rats through inhibition of oxidative stress and downregulation of MAPK and MAPKAP signaling pathway and miRNA-122 expression. *Food and Chemical Toxicology*, 107(Pt A), 395–405. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.007>
- Wang, Y., Qi, W., Song, G., Pang, S., Peng, Z., Li, Y., & Wang, P. (2020). High-fructose diet increases inflammatory cytokines and alters gut microbiota composition in rats. *Mediators of Inflammation*, 2020, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2020/6672636>
- Wu, Z., Huang, S., Li, T., Li, N., Han, D., Zhang, B., ... Wang, J. (2021). Gut microbiota from green tea polyphenol-dosed mice improves intestinal epithelial homeostasis and ameliorates experimental colitis. *Microbiome*, 9(1), 184. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01115-9>
- Yang, C. S., Wang, X., Lu, G., & Picinich, S. C. (2009). Cancer prevention by tea: Animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nature Reviews Cancer*, 9(6), 429–439. <https://doi.org/10.1038/nrc2641>
- Yang, G., Wei, J., Liu, P., Zhang, Q., Tian, Y., Hou, G., ... Jiang, X. (2021). Role of the gut microbiota in type 2 diabetes and related diseases. *Metabolism*, 117, 154712. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154712>
- Yin, J., Zhang, B., Yu, Z., Hu, Y., Lv, H., Ji, X., ... Wang, S. (2021). Ameliorative effect of dietary tryptophan on neurodegeneration and inflammation in d-galactose-induced aging mice with the potential mechanism relying on AMPK/SIRT1/PGC-1alpha pathway and gut microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(16), 4732–4744. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00706>
- Yu, H., Guo, Z., Shen, S., & Shan, W. (2016). Effects of taurine on gut microbiota and metabolism in mice. *Amino Acids*, 48(7), 1601–1617. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2219-y>
- Zeng, Q., Li, D., He, Y., Li, Y., Yang, Z., Zhao, X., ... Dai, W. (2019). Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity-related metabolic abnormalities. *Scientific Reports*, 9(1), 13424. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49462-w>
- Zhang, B., Xu, Y., Liu, S., Lv, H., Hu, Y., Wang, Y., ... Wang, S. (2020). Dietary supplementation of foxtail millet ameliorates colitis-associated colorectal cancer in mice via activation of gut receptors and suppression of the STAT3 pathway. *Nutrients*, 12(8), 2367. <https://doi.org/10.3390/nu12082367>
- Zhang, S., Zhao, J., Xie, F., He, H., Johnston, L. J., Dai, X., ... Ma, X. (2021). Dietary fiber-derived short-chain fatty acids: A potential therapeutic target to alleviate obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. *Obesity Reviews*, e13316. <https://doi.org/10.1111/obr.13316>
- Zhang, X., Dong, L., Jia, X., Liu, L., Chi, J., Huang, F., ... Zhang, R. (2020). Bound phenolics ensure the antihyperglycemic effect of rice bran dietary fiber in db/db mice via activating the insulin signaling pathway in skeletal muscle and altering gut microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(15), 4387–4398. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00584>
- Zhao, G., Liu, J. F., Nyman, M., & Jonsson, J. A. (2007). Determination of short-chain fatty acids in serum by hollow fiber supported liquid membrane extraction coupled

- with gas chromatography. *Journal of Chromatography B*, 846(1–2), 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.027>
- Zhao, Z., Qu, W., Wang, K., Chen, S., Zhang, L., Wu, D., & Chen, Z. (2019). Bisphenol A inhibits mucin 2 secretion in intestinal goblet cells through mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 901–908. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.01.007>
- Zhu, M. Z., Zhou, F., Ouyang, J., Wang, Q. Y., Li, Y. L., Wu, J. L., ... Liu, Z. H. (2021). Combined use of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and caffeine in low doses exhibits marked anti-obesity synergy through regulation of gut microbiota and bile acid metabolism. *Food & Function*, 12(9), 4105–4116. <https://doi.org/10.1039/D0FO01768J>