

• 专题研究:神经精神疾病 •

3-HK 介导双酚 F 致小鼠抑郁的机制及亮氨酸的干预作用

吴宇轩¹, 袁闻婕¹, 卫一敏¹, 范蕴文¹, 刘见佳², 王 军^{1*}

¹南京医科大学公共卫生学院, ²第一临床医学院, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 探究犬尿氨酸(kynurenine, Kyn)代谢通路中的关键神经毒性代谢物 3-羟基犬尿氨酸(3-hydroxy-kynurenine, 3-HK)在双酚 F(bisphenol F, BPF)暴露引起小鼠抑郁样行为中的作用及机制, 并评估亮氨酸干预该通路所产生的神经保护效应, 从而为寻找潜在干预靶点提供实验依据。方法: 构建 BPF 暴露小鼠模型, 通过悬尾实验、强迫游泳、旷场实验等行为学实验观察小鼠抑郁样行为改变, 检测小鼠海马体和前额皮层中 3-HK、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、Kyn 等抑郁相关神经递质水平的改变以及干扰素- γ (interferon gamma, IFN- γ)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等促炎因子和犬尿氨酸单加氧酶(kynurenine-3-monooxygenase, KMO)表达水平的改变; 设置亮氨酸联合干预组, 观察 BPF 诱导的小鼠抑郁样行为是否改善, 并检测神经递质水平、促炎因子和 KMO 表达水平的变化; 采用荧光探针法观察 3-HK 在 BPF 引起原代神经元活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成中的作用。结果: BPF 暴露引起小鼠明显的抑郁样行为, 小鼠海马和皮层中 5-HT 含量无明显变化, 而 Kyn 含量显著减少; BPF 显著上调海马和皮层中 KMO 表达水平, 促进 3-HK 的累积同时引发 IFN- γ 、IL-1 β 等促炎因子增加, 加剧神经损伤; 亮氨酸干预后 BPF 诱导的小鼠抑郁样行为得到改善, 显著逆转了 BPF 诱导的 KMO 及促炎因子的异常表达, 3-HK 水平显著降低, 其余神经递质水平变化不明显; 同时, 竞争性抑制 3-HK 转运或抑制 KMO 明显逆转 BPF 引起的 ROS。结论: BPF 暴露可上调海马和皮层 KMO 表达, 引起 3-HK 异常蓄积, 继而触发 ROS 过度生成和神经炎症, 这些病理变化可能协同参与神经损伤和抑郁样行为。亮氨酸则能抑制该代谢偏移, 减轻氧化应激与炎症, 从而缓解抑郁样行为。

[关键词] 双酚 F; 3-羟基犬尿氨酸; 亮氨酸; 抑郁; 海马体; 大脑皮层

[中图分类号] R749

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2026)07-963-11

doi: 10.7655/NYDXBNSN260263

The mechanism of 3-hydroxykynurenine in the depression-like changes induced by bisphenol F in mice and the intervention effect of leucine

WU Yuxuan¹, YUAN Wenjie¹, WEI Yimin¹, FAN Yunwen¹, LIU Jianjia², WANG Jun^{1*}

¹School of Public Health, ²the First Clinical Medical College, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To explore the role and mechanism of 3-hydroxy-kynurenine (3-HK), a key neurotoxic metabolite in the kynurenine pathway, in bisphenol F (BPF)-induced depressive-like changes in mice and evaluate the intervention effect of leucine by intervening this pathway, thereby providing experimental evidence for identifying potential intervention targets. **Methods:** The BPF exposure mouse model was established to investigate its neurotoxic effects, and the depression-like behaviors were assessed through behavioral tests such as the tail-suspension test, forced swimming test, and open-field test. Concurrently, the levels of depression-related neurotransmitters, including 3-HK, 5-hydroxytryptamine (5-HT), and kynurenine were measured in the hippocampus and prefrontal cortex. Alterations in the expression levels of pro-inflammatory cytokines, including interferon-gamma (IFN- γ) and interleukin-1 β (IL-1 β), as well as kynurenine 3-monooxygenase (KMO), were also detected. Furthermore, a leucine combined intervention group was established to assess whether BPF-induced depression-like behaviors improved, with additional measurements of neurotransmitter levels, pro-inflammatory factors, and KMO expression. The role of 3-HK in BPF-induced reactive oxygen species (ROS) generation in primary neurons was investigated using a fluorescent probe assay. **Results:** BPF exposure induced depressive-like behaviors in mice. While 5-HT levels in the hippocampus and cortex showed no significant change, the content of kynurenine was markedly reduced. BPF exposure significantly increased the expression levels of KMO in the hippocampus and cortex, and promoted the accumulation of 3-HK,

[基金项目] 国家自然科学基金(82473684); 国家级大学生创新训练计划(202310312025Z, 202410312069Z)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: wangjun@njmu.edu.cn (ORCID: 0000-0002-6120-6075)

which facilitated the production of pro-inflammatory factors such as IFN- γ and IL-1 β by activating the inflammatory pathway. Leucine intervention alleviated BPF-induced depressive-like behavior, significantly reversing the abnormal expression of KMO and pro-inflammatory factors, and notably reducing 3-HK levels, though other neurotransmitter levels remained largely unchanged. Meanwhile, competitive inhibition of 3-HK transport or inhibition of KMO significantly reversed the ROS caused by BPF. **Conclusion:** BPF exposure upregulates KMO expression in the hippocampus and cortex, leading to abnormal accumulation of 3-HK, which subsequently triggers excessive ROS generation and neuroinflammation. These pathological changes may collectively contribute to neural damage and depression-like behaviors. In contrast, leucine inhibits this metabolic shift, alleviates oxidative stress and inflammation, thereby mitigating depression-like behaviors.

[Key words] bisphenol F; 3-hydroxy-kynurenine; leucine; depression; hippocampus; cerebral cortex

[J Nanjing Med Univ, 2026, 46(07): 963-972, 990]

据统计,全世界抑郁症患者已达3.5亿,且据世界卫生组织预测,到2030年,抑郁症将成为世界最主要的疾病负担^[1]。除遗传、压力、疾病、不良习惯等危险因素外,越来越多的研究显示,环境化学物暴露也是抑郁症发生的重要危险因素。

作为环氧树脂和聚碳酸酯塑料的主要生产原料,双酚类物质被大量生产和广泛应用^[2]。其中,双酚A(bisphenol A, BPA)作为最典型的环境内分泌干扰物之一,可引起生殖、神经、内分泌等多系统的损伤作用^[3-4]。因此,BPA被多国限用或禁用^[5]。然而,基于其巨大的经济价值,其替代物近年来被大量研发、生产、使用,并不断扩散于环境中。其中,双酚F(bisphenol F, BPF)因其具有更好的耐溶剂性而被大量用于食品包装、塑料管、牙科密封胶等产品中,已成为BPA最主要的替代物之一^[6]。值得注意的是,BPF近期被发现也具有引起精神性疾病以及显著的神经毒性作用,但其潜在机制仍不明确^[7-8]。

3-羟基犬尿氨酸(3-hydroxy-kynurenine, 3-HK)作为犬尿氨酸(kynurenine, Kyn)代谢途径中兴奋性毒性代谢产物,在引起神经损伤、炎性等过程中发挥重要作用^[9]。有研究显示,Kyn在抑郁患者体内发生紊乱,外周3-HK可通过L型氨基酸转运体1(L-type amino acid transporter 1, LAT-1)进入脑内^[10]。而3-HK是否参与BPF引起的神经损伤,以及抑制3-HK转运是否发挥保护作用,目前未见报道。

亮氨酸作为一种必需氨基酸,广泛存在于肉类、豆类、乳制品及蔬菜水果等食物中,与其他氨基酸共同参与维持机体正常的生理功能。既往研究发现,抑郁症患者血浆中亮氨酸水平较健康人群显著降低,提示亮氨酸可能作为抑郁症的潜在生物标志物^[11]。此外,研究显示,亮氨酸与Kyn可通过同一转运体LAT-1进入大脑,两者在跨血脑屏障时存在竞争性抑制关系^[12]。据此推测亮氨酸可能通过竞

争性抑制Kyn向中枢神经系统的转运,减少脑内具有毒性的Kyn代谢产物的积累,进而在抑郁症病理过程中发挥一定的保护作用。

因而,本研究旨在探讨BPF暴露诱发小鼠抑郁样行为的作用及潜在机制,并通过亮氨酸竞争性抑制3-HK的转运及犬尿氨酸单加氧酶(kynurenine-3-monooxygenase, KMO)的表达,观察3-HK在BPF所致抑郁样改变中的潜在作用,以期对BPF相关抑郁的防治提供新靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究中所用C57BL/6J小鼠饲养于南京医科大学SPF级的实验动物中心。12 h:12 h灯光/黑暗循环,温度18~22℃,湿度30%~50%,自由摄食、饮水。本实验获得南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准(伦理号IACUC-1905020-1)。

BPF、玉米油、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(Aldrich公司,美国); TRIzol(AMBION公司,美国); 384孔板、透明封板膜(Thermo Fisher Scientific公司,美国); 异丙醇、氯仿、无水乙醇(上海国药集团化学试剂有限公司); DAPI Fluoromount-GTM、SYBR Green荧光染料(上海翊圣生物科技有限公司); 4%多聚甲醛固定液、免疫组化笔(合肥Biosharp公司); 75%乙醇(山东利尔康医疗科技股份有限公司); KMO抑制剂GSK180(MCE公司,美国); Hoechst染色液、DCFH-DA工作液、DEPC水(上海碧云天生物技术有限公司); PBS(武汉Servicebio公司); 色氨酸(tryptophan, Trp)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、Kyn、3-HK(Sigma公司,德国); 犬尿喹啉酸(kynurenic acid, KynA)、喹啉酸(quinolinic acid, QA)、烟酸(nicotinic acid, NA)、烟酰胺(nicotinamide, NAM)(上海源叶生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型建立

C57BL/6J小鼠适应性饲养1周后,将其随机分为3组:对照组、BPF暴露组[BPF 40 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]、BPF+Leucine组[BPF 40 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ + 亮氨酸 50 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]。

BPF暴露剂量的选择[40 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]参考既往实验室发表的学术论文,该剂量被美国国家环境保护局认为是每日暴露的“安全”剂量;同时,课题组发现该剂量下能稳定诱发小鼠抑郁样行为^[13]。亮氨酸的干预剂量[50 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]主要依据该剂量下亮氨酸能通过与LAT-1竞争性结合,减少Kyn入脑^[14]。

所有处理均通过灌胃途径进行。BPF暴露组每日灌胃给予上述剂量的BPF溶液;BPF+Leucine组在同一时间点同步给予含有BPF与亮氨酸的混合溶液;溶剂对照组灌胃等体积的生理盐水。灌胃处理每日1次,持续30 d,然后进行焦虑抑郁相关行为学测试。

1.2.2 旷场实验(open field test, OFT)

通过OFT观察小鼠焦虑程度,中央区域停留时间、穿越中央区域的频率与次数共同反映动物的焦虑情况及对周围环境的不确定性和对周围环境中可能存在的危险性的观察。实验过程中,将小鼠小心放置于旷场中央区域后任其自由探索6 min,利用摄像头和软件监测记录其不同区域的活动情况。

1.2.3 高架十字迷宫(elevated plus maze, EPM)

将小鼠放置在EPM的开臂与闭臂接合处;打开录像记录系统,记录小鼠在EPM内的活动,总时间5 min;试验结束后将小鼠放回笼内。

1.2.4 悬尾实验(tail suspension test, TST)

从小鼠的尾部1/3开始,将其悬于试验箱中,其头部离箱底约10 cm。将TST期间小鼠6 min内放弃挣扎并停止不动的时间用摄像系统观察并记录。小鼠放弃主动挣扎,身体垂悬不动即为不动状态的标准。

1.2.5 强迫游泳(forced swimming test, FST)

将小鼠放入洁净水[温度(24 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$]的大烧杯中,强迫其游泳,并对各处理组小鼠进行测试。使用摄像头观察并记录FST期间6 min内实验小鼠静止不动的时间。

1.2.6 超高效液相色谱-串联质谱联用法(ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UHPLC-MS/MS)检测脑组织神经递质水平

小鼠麻醉后处死,收集脑组织,立即进行相关

实验或在-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存待后续分析。脑组织样品:准确称取相应样本(10 mg)于离心管中,加入500 μL 冰萃取液(甲醇:水=3:1, V/V),50:1混合内标溶液以及1~2粒不锈钢珠(直径=3 mm),于组织匀浆仪TissueLyser II (Dusseldorf公司,德国)中进行匀质化,重复两次,并进行衍生化处理。

利用Q Exactive四级杆轨道阱高分辨质谱仪(赛默飞世尔科技公司,美国)、Ultimate3000超高效液相色谱仪系统(赛默飞世尔科技公司,美国),检测脑组织Trp、5-HT、Kyn、KynA、3-HK、QA、NA、NAM水平。

液相色谱与质谱检测采用SCIEX Triple QuadTM 5500+系统-QTRAPTM Ready系统。色谱柱:Acquity UPLC HSS T3(2.1 $\times$ 100 mm, 1.8 μm);柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;采用反相色谱梯度洗脱分离,流动相A为含0.1%甲醇的水溶液,流动相B为含0.1%甲酸的乙腈溶液。梯度洗脱程序如下:0~0.5 min, 99% A; 0.5~2.0 min, A相由99%线性降至30%; 2.0~4.0 min, A相由30%线性降至5%; 4.0~5.0 min, 保持5% A; 5.1~7.0 min, 恢复至99% A并平衡至运行结束。色谱流速设定为0.25 mL/min,进样量为2 μL 。质谱采用电喷雾电离源,多反应监测模式进行数据采集,扫描分辨率为70 000。其余质谱参数设置如下:电喷雾电压30 kV,毛细管温度350 $^{\circ}\text{C}$,加热器温度500 $^{\circ}\text{C}$,鞘气流量55 arb,辅助气流量55 arb,吹扫气流量35 arb。其中arb为仪器自设参数单位(arbitrary units)。使用Analyst软件进行数据采集和分析。

1.2.7 qRT-PCR检测mRNA表达水平

取脑组织10 mg于匀浆管中,加入1 mL TRIzol和无酶匀浆珠,充分研磨后加入200 μL 氯仿,混匀静置后离心。转移上清至洁净EP管,加入500 μL 异丙醇,震荡静置离心。弃上清并用无水乙醇洗涤沉淀,重复2次;室温干燥后加入适量DEPC水溶解,进行浓度测定或4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

采用梯度PCR仪行逆转录获得cDNA。定量PCR采用样本反应体系(cDNA+DEPC水)与引物体系(SYBR Green+前后引物)在Roche LightCycler 480 II荧光定量系统上完成。以GAPDH作为内参基因,采用2^{- $\Delta\Delta\text{CT}$} 法计算基因相对表达量,所有实验均重复3次。PCR引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,具体序列见表1。

1.2.8 原代神经元细胞的分离培养和鉴定

麻醉孕18 d SD大鼠,处死后取胎鼠全脑置于含马血清并提前预冷的DMEM/F12培养基中。分离海

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

Gene	Forward(5'→3')	Reverse(5'→3')
IDO1	TTCACGCAAGACTGGCTGAA	AGGCGATGGAGTTCTTCAGG
IFN-γ	ATGAACGCTACACACTGCATC	CCATCCTTTTGCCAGTTCCTC
IL-1β	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	TGGATGCTCTCATCAGGACAG
TNF-α	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
TPH2	CCACCATTGTGACCCTGAATCC	ATGAGGACTCGGTGAGAGCATC
KMO	TGATGTGTACGAAGCTAGGGA	TCATGGGCACACCTTTGGAAA

马和皮层组织后,用木瓜酶和 DNA 酶消化组织,过滤后收集细胞悬液,1 000 r/min 室温离心 5 min,弃上清,重悬细胞并计数,调整密度为 1×10^5 个/cm²。使用原代神经元培养基 Neurobasal+B-27(Thermo-fisher 公司,美国)培养。培养至第 7 天后,神经元突出发育成熟,利用抗微管相关蛋白 2 抗体(anti-microtubule-associated protein 2 antibody, anti-MAP-2)对其进行标记及鉴定。

1.2.9 Hoechst 染色观察神经元细胞核形态

细胞利用 4%多聚甲醛固定液,固定 10 min。用 PBS 清洗后,滴加至载玻片上。晾干后,均匀加入 Hoechst 染色液,染色 5 min,滴加抗荧光淬灭封片液于载玻片上,激光共聚焦显微镜观察细胞情况。

1.2.10 DCFH-DA 荧光探针法检测神经元活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平

BPF 共孵育与 KMO 抑制剂干预:将神经元随机分为对照组、BPF 组、GSK180 组和 BPF+GSK180 共处理组。在 BPF 干预前,用 KMO 抑制剂 GSK180 (2 μmol/L)与神经元细胞共孵育 2 h,再用 PBS 洗去残留的抑制剂,进行 BPF(100 μmol/L)干预。3-HK 共孵育:将神经元随机分为对照组(Control)和 3-HK 组(100 μmol/L)。原代神经元进行 3-HK 染毒,24 h 后,上述处理后的对照组、BPF 处理组、对照与 GSK180 共处理组、BPF 与 GSK180 共处理组和 3-HK 实验组分别加入适量浓度为 10 μmol/L 的 DCFH-DA 工作液,再用无血清培养基洗涤细胞。后用激光共聚焦显微镜进行观察。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 27.0 软件进行实验数据的统计与分析,GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学绘图。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组定量数据比较用 Student's *t* test;多组定量资料比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验,两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 亮氨酸可逆转 BPF 暴露引起的小鼠抑郁样行为

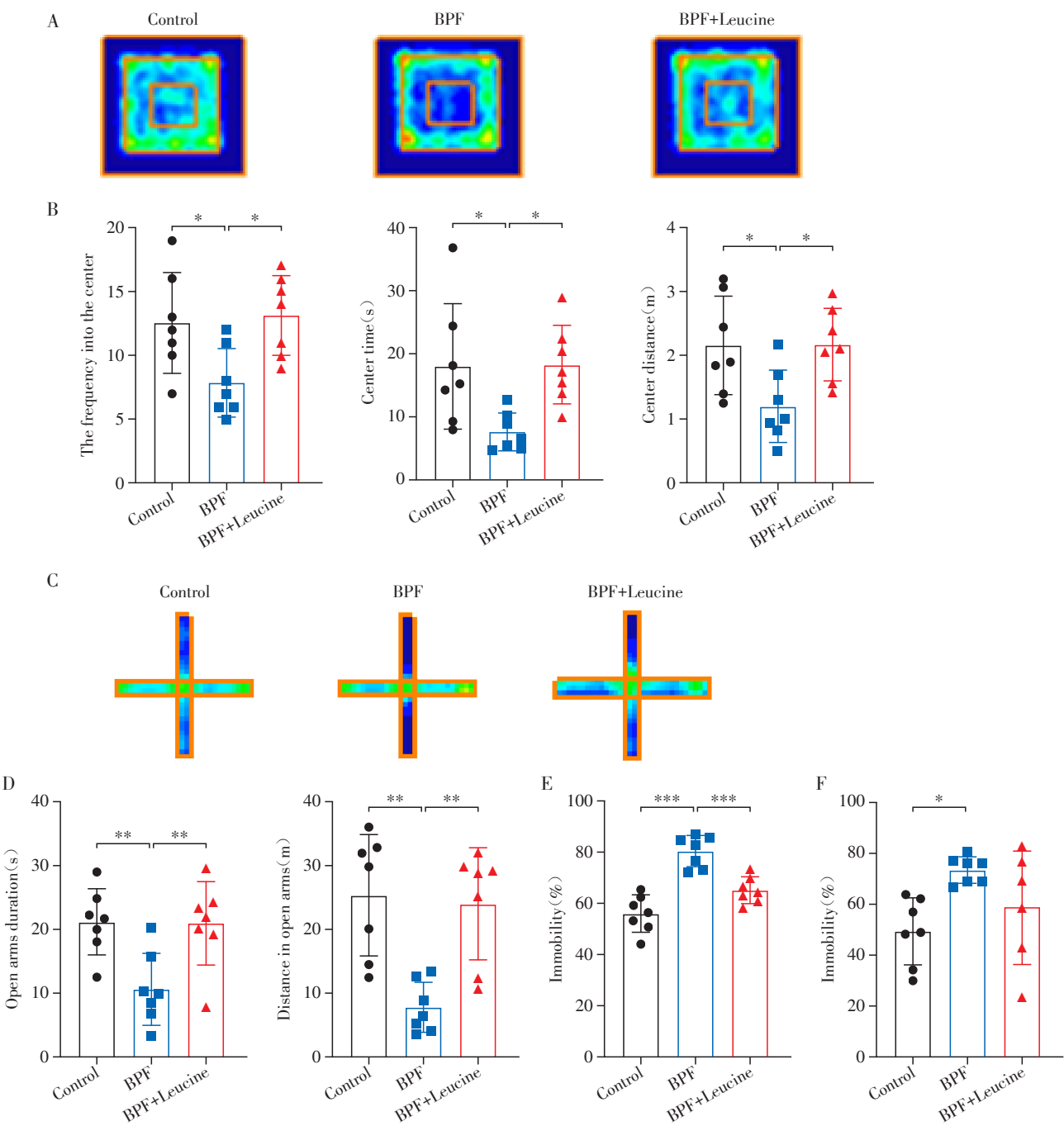
将小鼠随机分为对照组、BPF 暴露组、BPF+Leucine 组,分别处理 30 d 后进行焦虑抑郁相关行为学测试。与对照组相比,在 OFT 中,BPF 暴露组小鼠的中央活动频率降低、次数减少、距离缩短(图 1A、B);在 EPM 实验中,BPF 暴露组小鼠在开放臂中的停留时间显著缩短(图 1C、D)。TST 和 FST 的实验结果显示,相比对照组,BPF 暴露组小鼠的不动时间延长(图 1E、F)。以上结果提示,BPF 暴露后的小鼠表现出快感缺乏与绝望行为,出现抑郁样行为,而上述行为在亮氨酸作用后明显逆转。

2.2 亮氨酸可纠正 BPF 暴露引起的小鼠海马与大脑皮层神经递质代谢紊乱

基于上述 BPF 暴露引起的小鼠抑郁样表型,进一步观察 BPF 暴露后小鼠海马体与大脑皮层中神经递质的变化。借助 UHPLC-MS/MS 技术对小鼠前额皮层和海马组织中的神经递质水平进行检测,结果显示,与对照组相比,BPF 暴露后,小鼠海马体中 Trp、5-HT、NAM 和 NA 含量无明显变化,Kyn、KynA 和 QA 含量显著减少,3-HK 含量显著增高;与 BPF 暴露组比较,BPF+Leucine 组的 Trp、5-HT、Kyn、KynA、QA 和 NA 含量未发现显著变化,而 3-HK 和 NAM 含量显著降低(图 2)。在前额皮层中,与对照组相比,BPF 暴露后 Trp、Kyn 和 KynA 含量显著降低,3-HK 含量显著升高,5-HT、QA、NA 及 NAM 含量无显著变化;BPF+Leucine 组仅 3-HK 含量较 BPF 组显著降低,其余指标差异均无统计学意义(图 3)。

2.3 亮氨酸可抑制 BPF 暴露引起的小鼠海马和皮层中 KMO 过表达及神经炎症反应

BPF 暴露后,3-HK 生成的关键酶 KMO 在小鼠海马和皮层中表达水平显著升高(海马:*F*=28.10, *P* < 0.05;皮层 *F*=28.25, *P* < 0.05,图 4A、5A)。同时炎症因子干扰素-γ(interferon gamma, IFN-γ)、白介

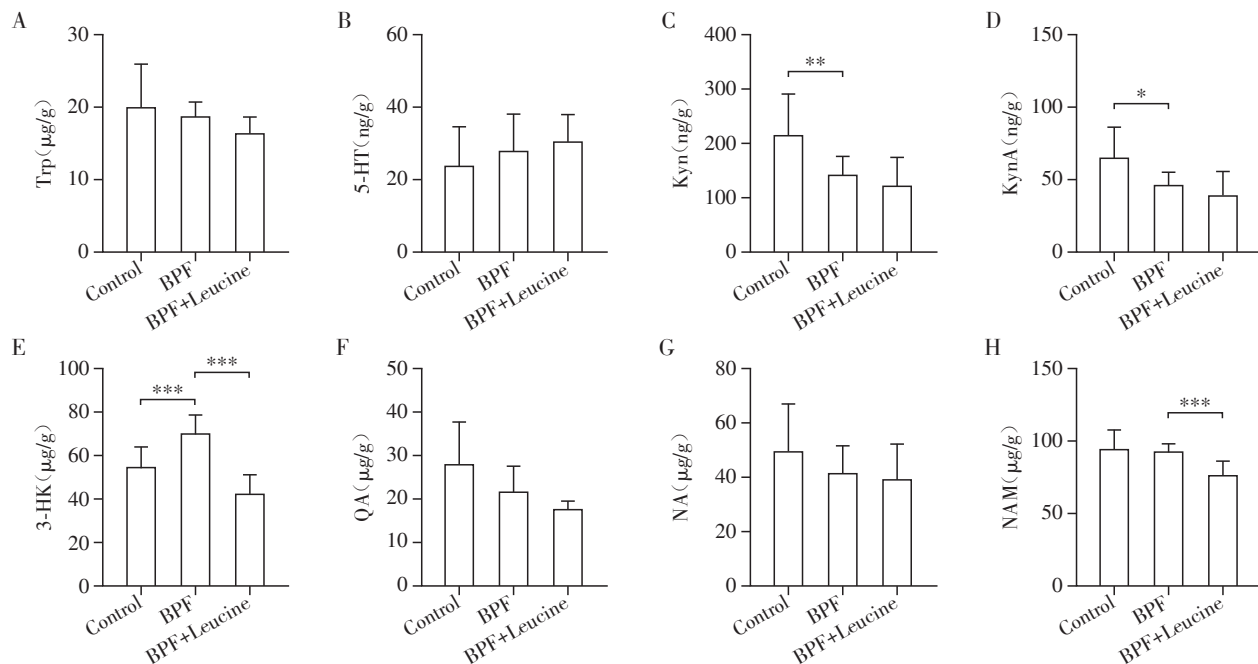


A: Activity trajectory in the OFT. B: Activity frequency, duration, and distance in the OFT($n=7$). C: Activity trajectory in the EPM. D: Total time and distance traveled by mice in the open arms of the EPM($n=7$). E: Time spent immobile in the FST. F: Time spent immobile in the TST. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ ($n=7$ for Control and BPF groups, $n=6$ for BPF+Leucine group).

图1 BPF暴露后小鼠抑郁样行为的改变
Figure 1 Depression-like changes in mice after BPF exposure

素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的表达也显著增加(图4B~D,图5B~D)。亮氨酸可有效抑制BPF诱导的KMO过表达及神经炎症反应($P < 0.05$)。上述结果提示BPF暴露可能通过上调KMO并诱发神经炎症,促进神经毒性代谢物3-HK的积累。

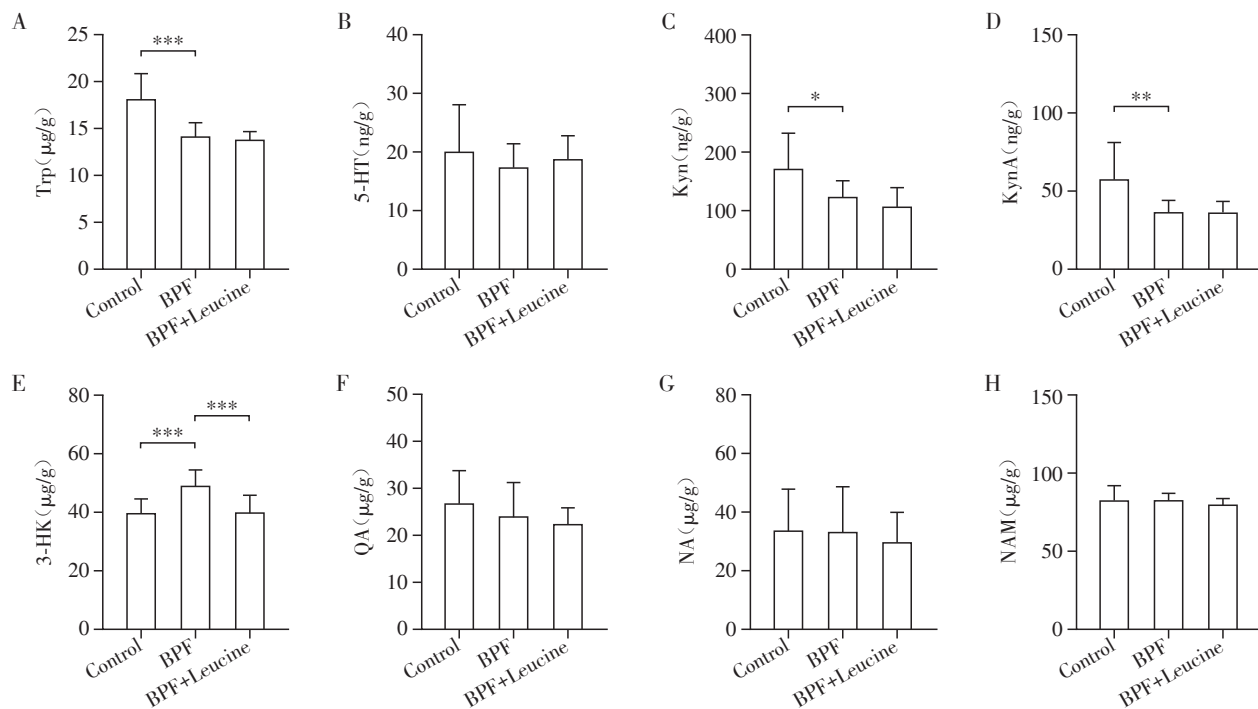
此外,BPF在海马和皮层中均上调IDO1、下调TPH2表达,亮氨酸可部分逆转该变化(图4E、F,图5E、F)。IDO1表达上调与神经炎症状态相符;TPH2表达下调提示炎症可能通过抑制该酶活性,进而减少5-HT的生物合成。这些结果共同提示,BPF暴露可能促使色氨酸代谢更倾向于向犬尿氨酸



The levels of Trp (A), 5-HT (B), Kyn(C), KynA(D), 3-HK(E), QA(F), NA (G) and NAM(H) in the mouse hippocampus among the control group, BPF group, and BPF+Leucine group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ ($n=12$).

图2 BPF暴露引起小鼠海马相关神经递质含量的变化

Figure 2 Changes in hippocampal neurotransmitter levels in mice following BPF exposure



The levels of Trp(A), 5-HT(B), Kyn(C), KynA(D), 3-HK(E), QA(F), NA(G) and NAM(H) in mouse cerebral cortex among the control group, BPF group, and BPF+Leucine group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=14$).

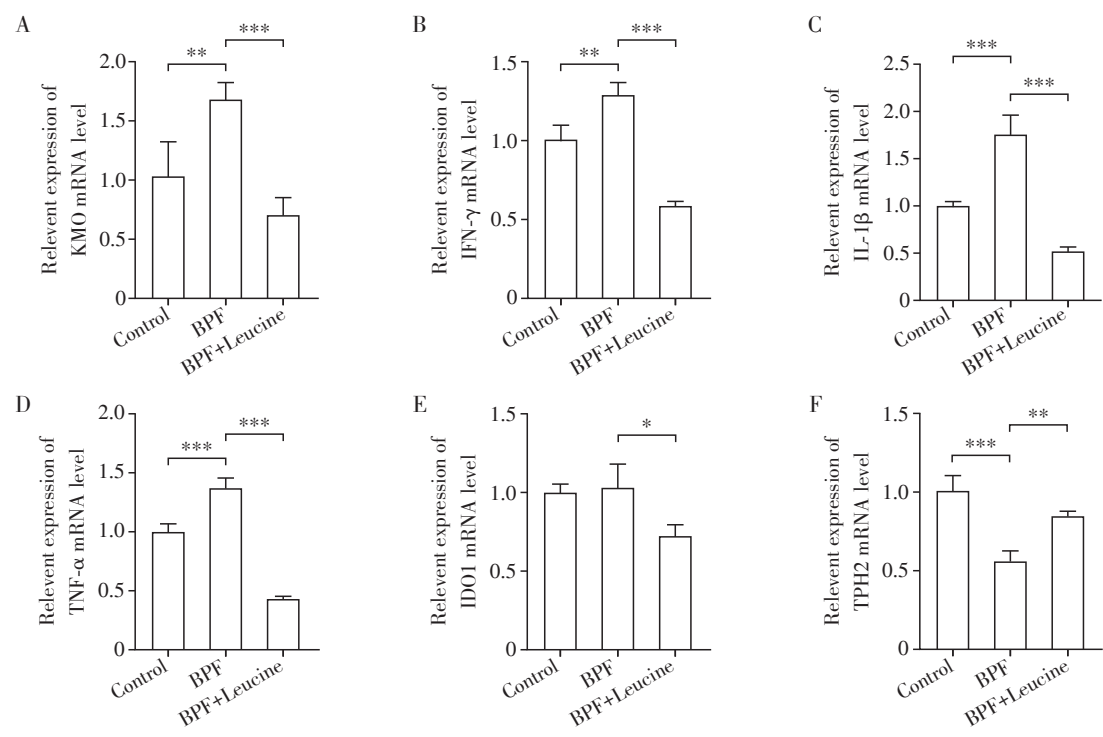
图3 BPF暴露引起小鼠大脑皮层相关神经递质含量的变化

Figure 3 Changes of neurotransmitter levels in mouse cerebral cortex caused by BPF exposure

通路进行,而亮氨酸具有调节该代谢偏移及抑制相关炎症反应的作用。

2.4 原代神经元细胞的鉴定

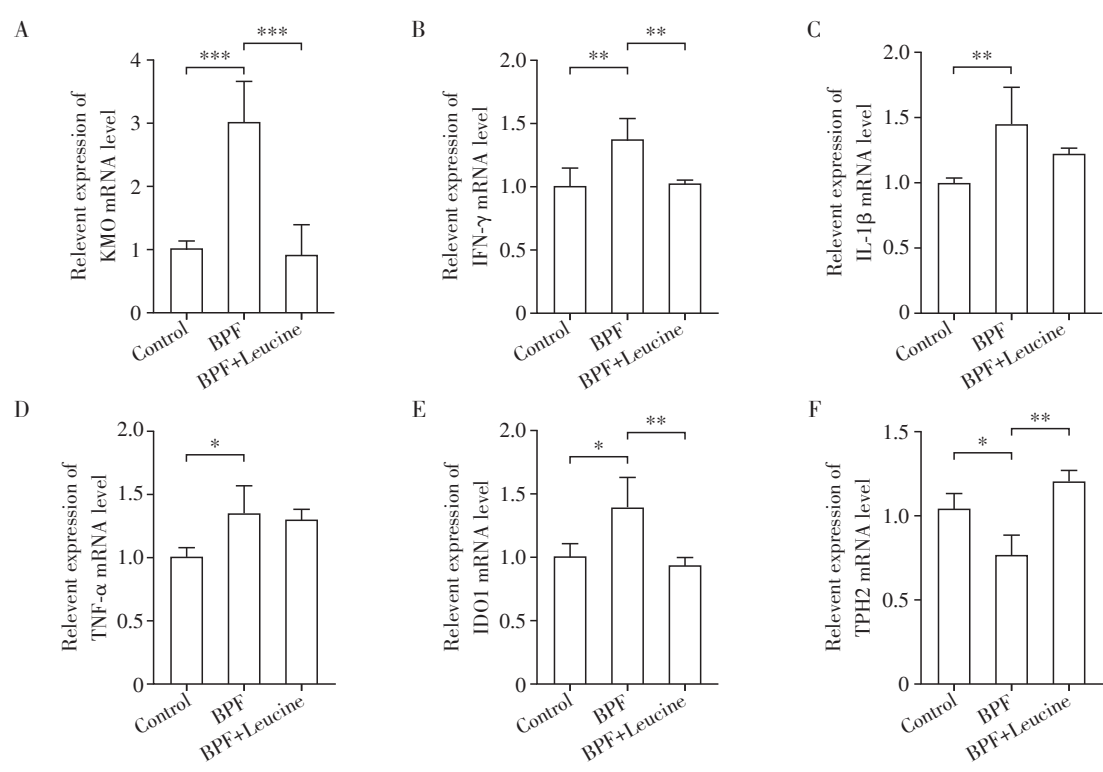
免疫荧光染色结果显示,对神经元特异性标志



A–F: mRNA levels of KMO (A), IFN-γ (B), IL-1β (C), TNF-α (D), IDO1 (E), and TPH2 (F) in the mouse hippocampus across control, BPF, and BPF+Leucine groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ ($n=3$).

图4 BPF暴露引起小鼠海马mRNA含量的变化

Figure 4 BPF exposure-induced alterations in hippocampal RNA levels in mice



A–F: mRNA levels of KMO (A), IFN-γ (B), IL-1β (C), TNF-α (D), IDO1 (E), and TPH2 (F) within the mouse cerebral cortex across control, BPF, and BPF+Leucine groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ ($n=3$).

图5 BPF暴露引起小鼠大脑皮层mRNA含量的变化

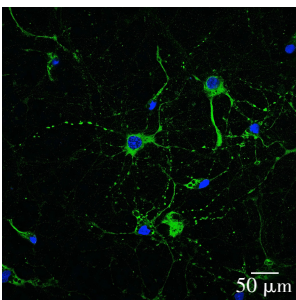
Figure 5 BPF exposure induced alterations in mRNA levels in the mouse cerebral cortex

物 MAP-2 进行染色,发现 DAPI 所标记的所有神经元细胞核都被 MAP-2 所包绕,说明分离出来的细胞就是原代神经元,此外,该系列细胞形态良好,核大而清晰(图 6),为后续神经元相关实验提供了前期基础。

2.5 BPF 通过 3-HK 引起原代神经元损伤

为明确 3-HK 在 BPF 介导的突触损伤中的作用,通过体外培育原代神经元,利用 DCFH-DA 荧光探针法检测原代神经元 ROS 水平。与对照组相比, BPF 组的荧光强度显著增强,表明 BPF 暴露显著促进了细胞内 ROS 的积累(图 7A)。

为单独探究 3-HK 的毒性作用,将神经元与外源性的 3-HK 孵育。结果显示,3-HK 处理组的 ROS 水平与 BPF 暴露组相似,表现为明显的 ROS 水平增加(图 7B)。为进一步验证 3-HK 通路在 BPF 诱导 ROS 生成中的潜在作用,使用特异性 3-HK 通路抑制剂 GSK180 进行干预,发现 GSK180

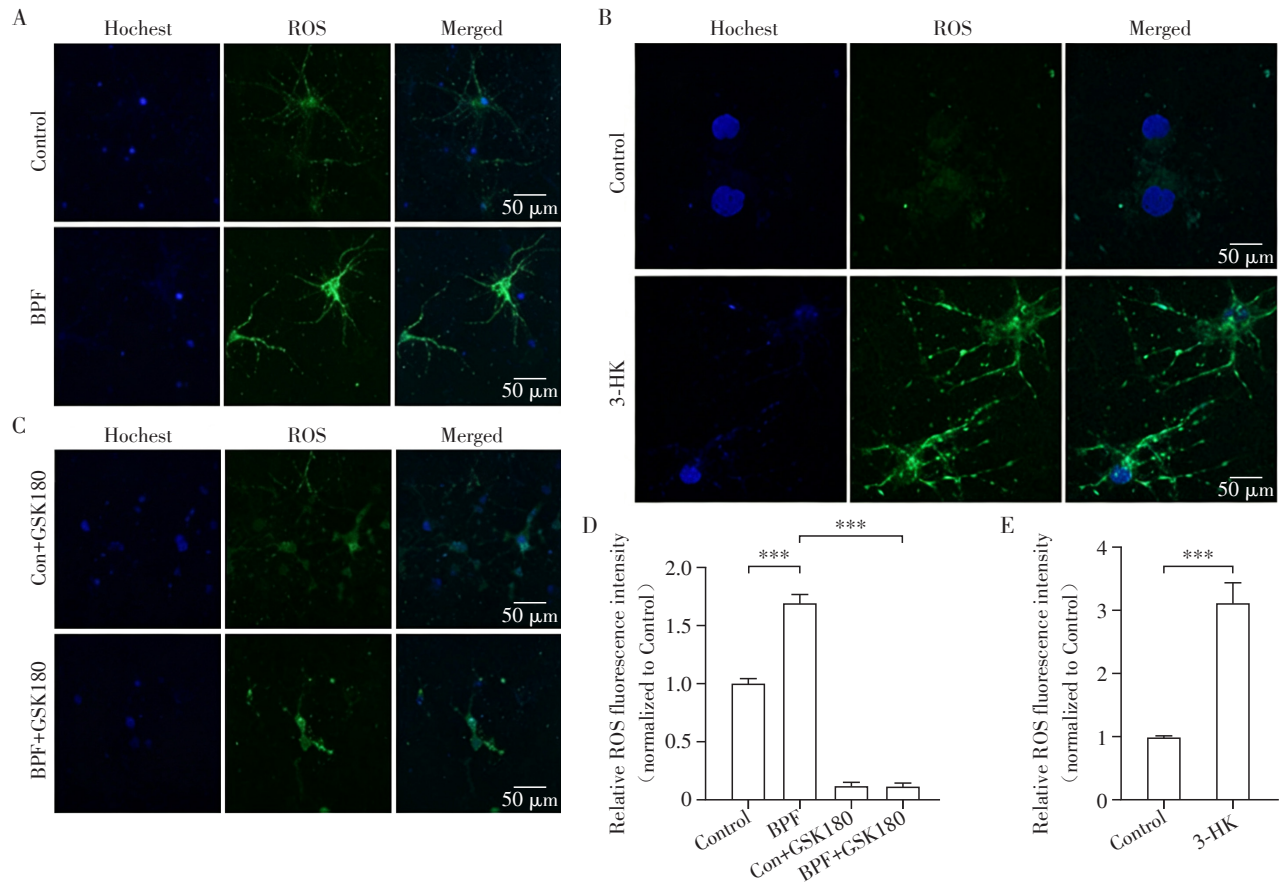


Primary neural cells were identified by immunofluorescence staining for morphological characterization and purity assessment. Nuclei were stained with Hoechst (blue); neurons were labeled with MAP-2 (green). Scale bar=50 μ m.

图 6 原代神经细胞的鉴定

Figure 6 Identification of primary neural cells

能显著逆转 BPF 暴露所诱导的 ROS 升高(图 7C)。上述结果表明, BPF 暴露可能通过增加 3-HK 水平,诱导细胞 ROS 积累,从而导致神经元细胞损伤。



A: ROS fluorescence of mouse brain neurons from the control group, BPF exposure group. B: The ROS fluorescence, in neurons from the control group and the exogenous 3-HK treatment group. C: ROS fluorescence of mouse brain neurons from the control with GSK180 treatment group, and BPF combined with GSK180 treatment group. D: Relative ROS fluorescence intensity treated with BPF, GSK180, or BPF+GSK180(normalized to Control). E: Relative ROS fluorescence intensity treated with 3-HK(normalized to Control). *** $P < 0.001$ ($n=3$).

图 7 BPF 暴露引起神经元损伤的 ROS 荧光图

Figure 7 ROS fluorescence of neuronal damage in mouse brain caused by BPF exposure

3 讨论

双酚类化合物广泛应用于塑料制品、食品包装等日用品的生产,在环境介质、食品及体液中均有检出^[2]。因BPA对人体多个组织具有损伤作用,被多国限制使用或禁用^[5,15]。因此,BPF等作为替代品得以广泛使用,然而其潜在健康危害亟需证据支持。近年来抑郁的发生率呈持续升高的趋势,已对公共卫生健康构成严重挑战,但其与环境因素暴露是否有关,亟需探索。既往研究表明双酚类化学物的暴露与抑郁症的发生有关,在动物实验中,有学者发现围产期BPF暴露对子代小鼠具有神经毒性作用,其子代成年后表现出明显的焦虑抑郁样改变^[16],然而其机制尚未阐明。

3-HK是色氨酸代谢Kyn通路中的关键中间代谢物,其与KynA都是Kyn的重要代谢产物,其中KynA被认为具有神经保护作用,可以缓解神经兴奋性毒性和细胞凋亡效应^[17-18];而3-HK具有神经毒性,会导致神经细胞凋亡、自由基的产生和下游氧化应激等有害影响^[19]。

3-HK异常积累与抑郁症的发病机制密切相关。实验结果提示,BPF暴露诱发小鼠抑郁样行为的可能机制为:3-HK含量上升导致Kyn降解消耗,引发下游物质KynA生成减少、抗炎作用减弱;同时,这一代谢紊乱可能进一步诱发氧化应激,从而共同导致海马与皮层的炎症反应,最终出现抑郁样行为。而NA与NAM作为线粒体代谢过程中烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)的重要前体代谢物质,其含量减少可能与QA含量降低密切相关,该现象可能会削弱细胞的抗氧化能力,进一步加剧ROS及炎症反应,形成正反馈的恶性损伤。

KMO作为色氨酸代谢Kyn通路中的关键限速酶,直接调控3-HK的生成。本研究中,BPF暴露显著上调海马和皮层中KMO表达水平,导致3-HK含量明显增加。3-HK的积累消耗其前体物质Kyn,导致具有神经保护作用的代谢物KynA的生成减少^[18];KynA作为N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体拮抗剂,具有抗炎作用,而3-HK的积累导致KynA水平下降,使神经元更易受到损害^[17,20]。此外,3-HK可促进QA的生成,作为一种NMDA受体激动剂,QA的增加可进一步加剧谷氨酸能神经传递异常,导致神经元凋亡和突触萎缩^[21];3-HK的积累也可激活炎症通路,促进IFN- γ 、IL-1 β

等炎症因子的释放,从而协同激活免疫细胞,促进TNF- α 的释放,形成炎症反应的正反馈环路,加剧神经炎症反应,进一步破坏血脑屏障功能,促进外周免疫细胞浸润,加重海马区的神经退行性病变^[19]。这些报道与该研究中BPF暴露引起3-HK积聚以及神经炎症反应发生的现象一致。此外,该实验还发现,将3-HK生成关键酶KMO抑制后,BPF暴露引起的神经元应激损伤明显缓解。

相关研究表明,亮氨酸缺乏与小鼠大脑发育和行为异常有关^[22]。芬兰地区的纵向双胞胎队列研究发现,亮氨酸在血浆中的含量与抑郁症呈显著负相关^[23]。更值得关注的是,亮氨酸可竞争性结合于LAT-1转运体,降低外周毒物如3-HK的脑转运^[12]。基于该理论,本研究通过给予亮氨酸并发现其显著抑制了BPF引起的小鼠抑郁样改变,从而为BPF暴露导致的抑郁样改变提供了新的干预策略。

综上,BPF暴露可能通过上调KMO这一限速酶的表达促使3-HK大量累积,同时通过减少KynA扰乱Kyn代谢平衡诱发神经炎症及氧化应激等多重机制,导致神经元损伤,最终引发抑郁样行为(图8)。而靶向干预3-HK代谢通路,以及补充亮氨酸可为后续环境因素暴露引发的抑郁症干预提供新策略。

需要指出的是,本研究还存在一些不足之处,如BPF引起的炎症反应、氧化应激及KMO的表达未能在蛋白水平进一步验证,而BPF及3-HK引起的ROS产生也未能在小鼠脑组织中验证,后续实验将围绕上述不足进行补充,从而为BPF暴露引起的抑郁样改变提供更加完整的证据。

利益冲突声明:

作者单位与期刊出版社均隶属南京医科大学,但无利益冲突。

Conflict of Interests:

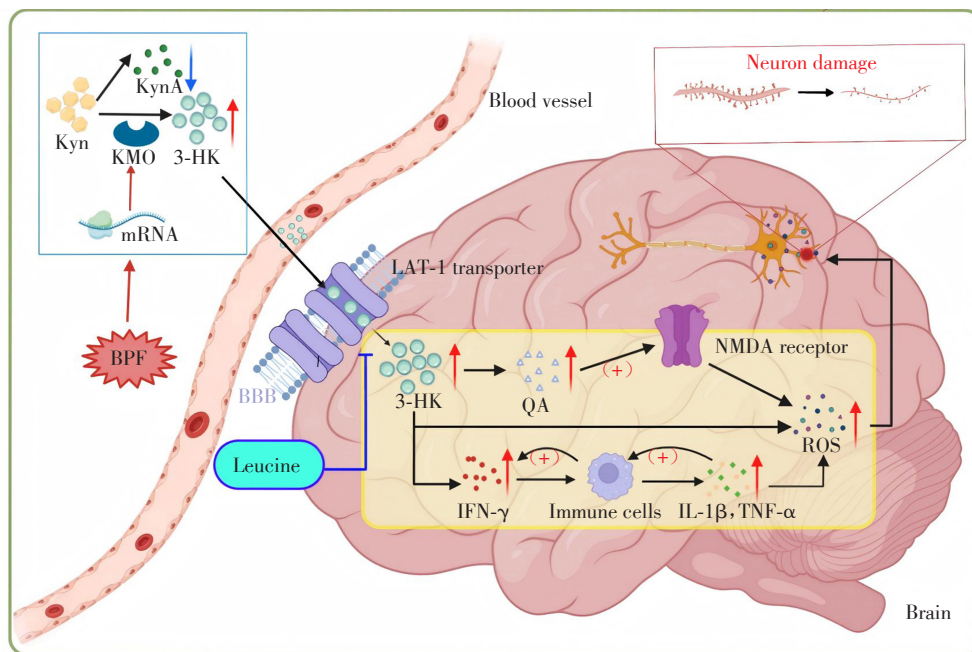
The author's affiliation and the journal publisher are both affiliated with Nanjing Medical University, but there is no conflict of interest in this work.

作者贡献声明:

吴宇轩负责设计及实施实验、数据收集与处理、文章撰写;袁闻婕负责实施实验、数据分析、文章撰写;卫一敏负责协助实验,参与文章校对和修订;范蕴文、刘见佳负责协助实验;王军负责研究设计与实验指导,论文审阅。

Author's Contributions:

WU Yuxuan was responsible for research design, implementation of experiments, data collection and analysis, and manuscript writing; YUAN Wenjie was responsible for the implementation of experiments, data analysis, and article writing; WEI



Kyn: kynurenine; KynA: kynurenic acid; KMO: kynurenine-3-monooxygenase; 3-HK: 3-hydroxy-kynurenine; BPF: bisphenol F; BBB: blood-brain barrier; LAT-1: large neutral amino acid transporter 1; QA: quinolinic acid; ROS: reactive oxygen species; IFN- γ : interferon gamma; IL-1 β : interleukin-1 β ; TNF- α : tumor necrosis factor-alpha.

图8 BPF通过3-HK引起小鼠抑郁样改变的机制

Figure 8 Mechanism of BPF-induced depression-like changes in mice through 3-HK

Yimin assisted in experiments and participated in article proof-reading and revision; FAN Yunwen and LIU Jianjia were responsible for assisting the experiment; WANG Jun was responsible for research design and experimental guidance, as well as paper review.

[参考文献]

[1] NEUTEBOOM D, ZANTVOORD J B, GOYA-MALDONADO R, et al. Accelerated intermittent theta burst stimulation in major depressive disorder: a systematic review[J]. Psychiatry Res, 2023, 327: 115429

[2] LIU J C, ZHANG L Y, LU G H, et al. Occurrence, toxicity and ecological risk of bisphenol A analogues in aquatic environment-a review[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021, 208: 111481

[3] CULL M E, WINN L M. Bisphenol A and its potential mechanism of action for reproductive toxicity[J]. Toxicology, 2025, 511: 154040

[4] MICHAŁOWICZ J. Bisphenol A - sources, toxicity and biotransformation[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2014, 37(2): 738-758

[5] WILLHITE C C, DASTON G P. Bisphenol exposure, hazard and regulation[J]. Toxicology, 2019, 425: 152243

[6] LU S Y, YU Y L, REN L, et al. Estimation of intake and uptake of bisphenols and triclosan from personal care products by dermal contact[J]. Sci Total Environ, 2018,

621: 1389-1396

[7] MENG Z Y, WANG D Z, LIU W, et al. Perinatal exposure to Bisphenol S (BPS) promotes obesity development by interfering with lipid and glucose metabolism in male mouse offspring[J]. Environ Res, 2019, 173: 189-198

[8] GAO C Z, HE H H, QIU W H, et al. Oxidative stress, endocrine disturbance, and immune interference in humans showed relationships to serum bisphenol concentrations in a dense industrial area[J]. Environ Sci Technol, 2021, 55(3): 1953-1963

[9] KRUPA M M, PIENKOWSKI T, TANKIEWICZ-KWEDLO A, et al. Targeting the kynurenine pathway in gliomas: insights into pathogenesis, therapeutic targets, and clinical advances[J]. Biochim Biophys Acta BBA Rev Cancer, 2025, 1880(3): 189343

[10] YE Z H, YANG S R, LU L, et al. Unlocking the potential of the 3 - hydroxykynurenine/kynurenic acid ratio: a promising biomarker in adolescent major depressive disorder [J]. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2025, 275 (4): 1049-1061

[11] BARANYI A, AMOUZADEH-GHADIKOLAI O, VON LEWINSKI D, et al. Branched-chain amino acids as new biomarkers of major depression - a novel neurobiology of mood disorder[J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0160542

(下转第990页)

- plasma glial fibrillary acidic protein, α - synuclein and progression of Parkinson's disease[J]. Chinese Journal of Behavioral Medicine and Brain Science, 2023, 32(11): 999-1004
- [22] ABDELHAK A, FOSCHI M, ABU-RUMEILEH S, et al. Blood GFAP as an emerging biomarker in brain and spinal cord disorders [J]. Nat Rev Neurol, 2022, 18(3): 158-172
- [23] SEGUILLA L, GULBRANSEN B D. Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(8): 571-587
- [24] SANTHOSH S, ZANOLETTI L, STAMP L A, et al. From diversity to disease: unravelling the role of enteric glial cells[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1408744
- [25] HOLLAND A M, BON-FRAUCHES A C, KESZTHELYI D, et al. The enteric nervous system in gastrointestinal disease etiology[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(10): 4713-4733
- [26] MONTALBÁN - RODRÍGUEZ A, ABALO R, LÓPEZ - GÓMEZ L. From the gut to the brain: the role of enteric glial cells and their involvement in the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(2): 1294
- [27] KIMONO D, SARKAR S, ALBADRANI M, et al. Dysbiosis-associated enteric glial cell immune-activation and redox imbalance modulate tight junction protein expression in gulf war illness pathology[J]. Front Physiol, 2019, 10: 1229
- (收稿: 2025-12-24; 修回: 2026-04-14; 录用: 2026-04-30)
(本文编辑: 陈汐敏)

(上接第972页)

- [12] WALKER A K, WING E E, BANKS W A, et al. Leucine competes with kynurenine for blood - to - brain transport and prevents lipopolysaccharide-induced depression-like behavior in mice[J]. Mol Psychiatry, 2019, 24(10): 1523-1532
- [13] YU Z, LIN Y X, WU L L, et al. Bisphenol F exposure induces depression-like changes: roles of the kynurenine metabolic pathway along the "liver-brain" axis[J]. Environ Pollut, 2024, 346: 123356
- [14] SEKINE A, OKAMOTO M, KANATANI Y, et al. Amino acids inhibit kynurenic acid formation via suppression of kynurenine uptake or kynurenic acid synthesis in rat brain *in vitro*[J]. Springerplus, 2015, 4(1): 48
- [15] WINKLER J, LIU P Y, PHONG K, et al. Bisphenol A replacement chemicals, BPF and BPS, induce protumorigenic changes in human mammary gland organoid morphology and proteome[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2022, 119(11): e2115308119
- [16] HUO S M, LI B, DU J Y, et al. Neurotoxic effects of perinatal exposure to Bisphenol F on offspring mice[J]. Environ Pollut, 2024, 362: 124932
- [17] BARONE P. The 'Yin' and the 'Yang' of the kynurenine pathway: excitotoxicity and neuroprotection imbalance in stress-induced disorders[J]. Behav Pharmacol, 2019, 30(2 and 3): 163-186
- [18] HAN Q, CAI T, TAGLE D A, et al. Structure, expression, and function of kynurenine aminotransferases in human and rodent brains[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(3): 353-368
- [19] OKUDA S, NISHIYAMA N, SAITO H, et al. 3 - hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity[J]. J Neurochem, 1998, 70(1): 299-307
- [20] LI Y Q, UNIVERSITY J, ZHANG L Y, et al. Kynurenic acid, a small foodborne molecule with the potential to affect human health [J]. J Agric Food Chem, 2025, 73(15): 8729-8739
- [21] DRYER S E. Glutamate receptors in the kidney [J]. Nephrol Dial Transplant, 2015, 30(10): 1630-1638
- [22] KNAUS L S, BASILICO B, MALZL D, et al. Large neutral amino acid levels tune perinatal neuronal excitability and survival[J]. Cell, 2023, 186(9): 1950-1967
- [23] WHIPP A M, HEINONEN-GUZEJEV M, PIETILÄINEN K H, et al. Branched-chain amino acids linked to depression in young adults [J]. Front Neurosci, 2022, 16: 935858
- (收稿: 2026-03-05; 修回: 2026-05-25; 录用: 2026-05-28)
(本文编辑: 蒋 莉)