

双酚 A 对 SD 大鼠大脑皮层星形胶质细胞的影响及机制

张慧慧,陆海华,唐思文,王 军,肖 杭,高 蓉*

(南京医科大学公共卫生学院卫生毒理系神经毒理教研室,现代毒理教育部重点实验室,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究环境内分泌干扰物双酚 A(BPA)对 SD 大鼠血-脑屏障成分表达及星形胶质细胞活力的影响并探讨其损伤机制。方法:通过 MTT 检测细胞活力,高效液相色谱法(HPLC)检测谷氨酸含量的变化,实时荧光定量 PCR 检测星形胶质细胞中 Claudin-3、Claudin-4、Claudin-5、JAM-1、JAM-2、ZO-1、E-cadherin 基因的表达。结果: 10^{-7} mg/ml 的 BPA 与星形胶质细胞孵育 24 或 48 h 后即可引起细胞活力的下降,具有统计学差异。在该浓度的暴露下,血-脑屏障紧密连接相关蛋白 Claudin-3、Claudin-4、JAM-1、E-cadherin 蛋白的 mRNA 水平下调,而 Claudin-5、JAM-2、ZO-1 蛋白基因表达上调且具有统计学意义;HPLC 结果显示,谷氨酸的浓度上调。结论:环境内分泌干扰物 BPA 对血-脑屏障的完整性具有潜在的损伤作用。

[关键词] 环境内分泌干扰物;双酚 A;星形胶质细胞;血-脑屏障

[中图分类号] R758.63

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)05-587-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20140510

Effects of BPA on astrocytes of SD rat cerebral cortical and its potential mechanism

Zhang Huihui, Lu Haihua, Tang Siwen, Wang Jun, Xiao Hang, Gao Rong*

(The Ministry of Education Key Lab of Modern Toxicology, School of Public Health, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the major effects of environmental endocrine disruptors (EDCs) BPA on SD rat blood-brain barrier component expression, cell viability of astrocytes and explore the mechanism. **Methods:** The MTT assay was performed to evaluate the astrocyte viability, HPLC was performed to detect glutamate levels, and by real-time quantitative PCR the mRNA levels of Claudin-3, Claudin-4, Claudin-5, JAM-1, JAM-2, ZO-1 and E-cadherin were detected. **Results:** After astrocytes were exposed to BPA for 24 or 48 hours, the cell viability significantly decreased. The realtime-PCR data showed that mRNA levels of blood-brain barrier tight junctional protein, Claudin-3, Claudin-4, JAM-1, E-cadherin, were significantly down-regulated. Meanwhile, Claudin-5, JAM-2 and ZO-1 mRNA expressions were significantly up-regulated. Furthermore, HPLC showed that the concentration of glutamate was increased. **Conclusion:** Taken together, EDCs BPA demonstrated the potential toxic effects on the blood-brain barrier integrity.

[Key words] environmental endocrine disrupting chemicals; BPA; astrocytes; blood brain barrier

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(05): 587-591]

双酚 A (bisphenol A, BPA) 是一种常见具有拟雌激素作用的环境内分泌干扰物^[1], 广泛应用于染料、医疗器械、罐头内包装、食品包装材料与饮料容器^[2]。美国 NIH 的一项研究表明近 95% 的被测人群尿液中含有 BPA, 在人体血液中也检出 BPA, 浓

度为 0.3~4.0 ng/ml^[3-4]。因此, 其潜在毒性作用日益引起人们关注。BPA 可影响动物和人类的生殖健康, 引起雄性哺乳动物性腺发育不良、精子数量减少和雌性哺乳动物阴道、子宫、卵巢等形态及功能上的改变, 亦对机体胚胎发育、神经系统、免疫系统、肿瘤发生等产生影响^[5-6]。

BPA 具有脂溶性, 易于通过血-脑屏障^[2]。但 BPA 对血-脑屏障的影响至今未见报道。星形胶质细胞 (astrocyte, AS) 是中枢神经系统内数目最多的一类细胞, 它在神经系统发育、突触传递、神经组织修复与再生、神经免疫等多种生理过程发挥重要作

[基金项目] 国家自然科学基金 (81273115, 81273113); 江苏省高校优势学科建设工程项目 (CX09B_264Z); 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划项目 (2012JSSPITP1040)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: Gaorong@njmu.edu.cn

用,同时星形胶质细胞是血-脑屏障的主要构成部分。本实验以大鼠星形胶质细胞作为研究对象,观察BPA对星形胶质细胞及其紧密连接蛋白表达的影响,进而为BPA引起的神经毒性提供理论依据^[7-8]。

1 材料和方法

1.1 材料

SD大鼠,孕18 d。SPF级(南京医科大学实验动物中心),饲养环境:温度20~26℃,湿度40%~70%,昼夜明交替12 h/12 h。饲料为全价颗粒饲料(南京安立默实验动物科技有限公司)。

BPA (Sigma公司,美国),细胞培养基血清(Gibco公司,美国),GFAP抗体(Abcam公司,美国),谷氨酸标准品(含量99%以上,Sigma公司,美国),实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, qPCR)试剂(TaKaRa公司,日本),其余试剂均购自美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 星形胶质细胞分离培养及鉴定

根据McCarthy等方法并适当改进^[7,9-10]:孕大鼠麻醉后断头处死,取胎鼠大脑组织。胰蛋白酶消化,经细胞筛网过滤。以 $2.5\sim 3.0 \times 10^7$ 个/瓶密度接种培养。37℃,5%CO₂培养箱中培养8~10 d(每3 d更换培养液1次)。待细胞融合后,置于37℃摇床中,280 r/min摇6 h。分离获取星形胶质细胞。用星形胶质细胞特异性抗体GFAP抗体进行纯度鉴定,纯度大于95%可用于后续实验。

1.2.2 分组与处理

实验分别设空白对照组和BPA处理组。根据美国NIH的一项研究人群尿液中和血液中BPA的浓度^[3-4],确定BPA处理组的加药浓度为 10^{-7} mmol/L。处理方法:BPA和星形胶质细胞共同孵育24 h,观察细胞活力及损伤情况。

1.2.3 细胞损伤实验

MTT比色法检测细胞活力(每次实验的样本数为5,实验重复次数 ≥ 3 次)。提纯的星形胶质细胞种96孔板贴壁后和 10^{-7} mol/L的BPA分别共同孵育24 h和48 h。弃去培养液,小心用PBS冲2~3遍后,再每孔加MTT溶液,继续孵育4 h,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加150 μ l DMSO,振荡10 min,在酶联免疫检测仪490 nm处测量各孔的吸光值。根据吸光值计算细胞活力的变化。

1.2.4 紧密连接蛋白mRNA表达的检测

用qPCR法(每次实验的样本数为5,实验重复

次数 ≥ 3 次),按照TRIzol试剂盒(TaKaRa公司,日本)说明书提取细胞总RNA,采用实时荧光定量逆转录试剂盒(TaKaRa公司,日本)合成cDNA;实时荧光定量SYBR试剂盒(TaKaRa公司,日本)应用 $\Delta\Delta C_t$ 法对蛋白mRNA的水平进行相对定量分析。PCR所用引物^[11-15]:ZO-1引物(上游:5'-GCTCCTC-CCACCTCGCACGT-3',下游:5'-GACCTGCTGGAG-CATAGGGCTG-3'),JAM-1引物(上游:5'-TGCT-GACCTGCTCAGAGAGA-3',下游:5'-GGAAGAGT-TGCTGAAGGCAC-3'),Claudin-3引物(上游:5'-GAGGTTGGGAGTACCGAT-3',下游:5'-GGGTG-GGTTGGACTTAGCTT-3'),Claudin-4引物(上游:5'-GTTCCCGCCAGCAACTATG-3',下游:5'-CCITCAG-CCCCGTATCCA-3'),Claudin-5引物(上游:5'-GCA-CCAGAATCAGCCCCCAACCCA-3',下游:5'-AGTC-GTCTGCGCCGTCACGATA-3'),E-cadherin引物(上游:5'-GTCAAACGGCATCTAAAGC-3',下游:5'-TCAGACCCTGGTGAAGC-3'),JAM-2引物(上游:5'-AGCTAAGCACAAGTCGCTGT-3',下游:5'-TGCC-AGTGACTCCCGATAGA-3')和GAPDH引物(上游:5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG-3',下游:5'-AG-GTGAAGAATGGGAGTTG-3')均由上海Invitrogen生物技术公司合成。GAPDH作为对照。独立样本 t 检验比较实验组与对照组mRNA的表达水平。

1.2.5 谷氨酸含量测定

细胞与 10^{-7} mmol/L的BPA共同孵育24 h后,取培养液上清经4℃溶解离心后,取50 μ l上清液于离心管中,加入150 μ l甲醇,涡旋30 s,4℃、14 000 r/min离心20 min,取50 μ l上清液于进样瓶,以标准谷氨酸为对照,用安捷伦1260 Infinity高效液相色谱仪、G1321B荧光检测器、Eclipse AAA色谱柱(4.6 mm \times 150.0 mm,3.5 μ m)对样品中的谷氨酸进行测量(每次实验的样本数为5,实验重复次数 ≥ 3 次)。

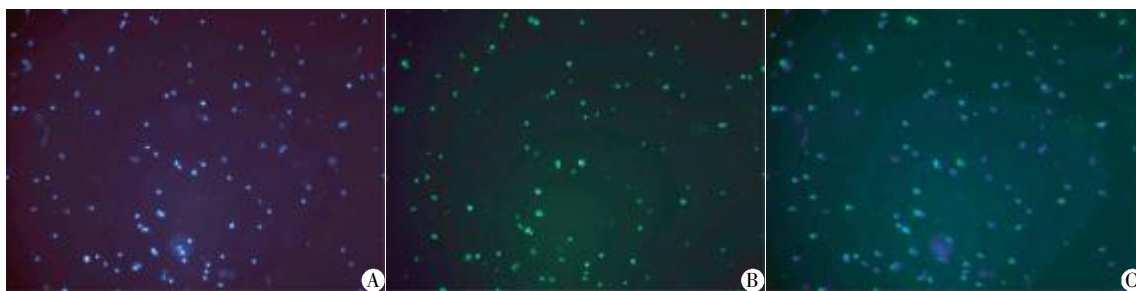
1.3 统计学方法

实验结果数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS13.0统计软件进行分析。两组间比较用独立样本 t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 星形胶质细胞纯度鉴定

提纯后的星形胶质细胞运用免疫荧光法,比较得到星形胶质细胞的纯度;从图1中可以看出,用本实验方法得到的星形胶质细胞纯度在95%以上。



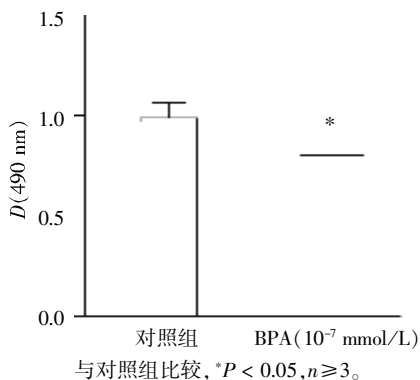
A: DAPI 染核的图片($\times 200$); B: 星形胶质细胞用特异性抗体 GFAP 结合并孵育 FITC 荧光二抗的图片; C: 两者融合后的图片。

图 1 星形胶质细胞纯度鉴定

Figure 1 Purity identification of astrocytes

2.2 细胞活力检测

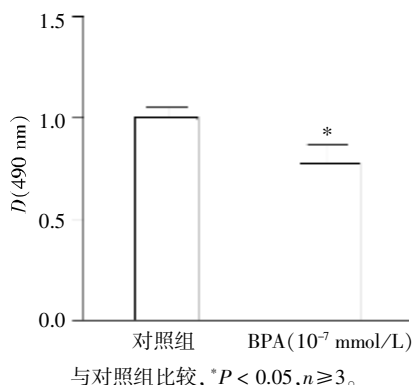
10^{-7} mmol/L 的 BPA 和星形胶质细胞分别共同孵育 24 h 和 48 h 发现细胞活力较对照组下降, 细胞抑制率分别为 20.6% 和 22.9%, 且都具有统计学意义(图 2, 3)。



与对照组比较, $*P < 0.05, n \geq 3$ 。

图 2 星形胶质细胞和 BPA 共同孵育 24 h 后细胞相对活力的变化

Figure 2 Relative changes in astrocytes viability after incubation with BPA 24 hours



与对照组比较, $*P < 0.05, n \geq 3$ 。

图 3 星形胶质细胞和 BPA 共同孵育 48 h 后细胞相对活力的变化

Figure 3 Relative changes in astrocytes viability after incubation with BPA 48 hours

2.3 谷氨酸浓度的检测

10^{-7} mmol/L 的 BPA 和星形胶质细胞共同孵育

24 h 后取其上清, 检测星型胶质细胞谷氨酸的释放情况, 检测时线性回归曲线的 R^2 值均 > 0.999 , RT (出峰时间) = (1.6508 ± 0.0038) min。虽然没有统计学意义, 但重复实验发现有上升的趋势, 上升了 0.035 ± 0.018 (图 4)。

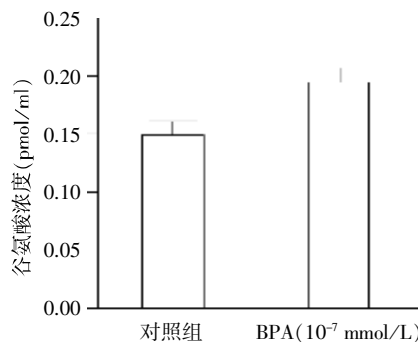


图 4 星形胶质细胞和 BPA 共同孵育 24 h 后谷氨酸浓度的变化

Figure 4 Changes in glutamate concentration after astrocytes were incubated with BPA 24 hours

2.4 对 Claudin-3、Claudin-4 等紧密连接蛋白基因表达水平的影响

实验结果显示: Claudin-3、Claudin-4、JAM-1、E-cadherin 基因的表达下降且有统计学意义; Claudin-5、JAM-2、ZO-1 基因的表达上调且具有统计学意义(图 5)。

3 讨论

美国 NIH 的研究表明人血液中 BPA 的浓度约为 $10^{-7} \sim 10^{-6}$ mmol/L^[3-4]。本实验选择 BPA 处理组的加药浓度为 10^{-7} mmol/L。

星形胶质细胞属于神经外胚层衍生的大胶质细胞, 与神经元和血管保持着密切的联系, 是血-脑屏障的主要构成部分, 为神经元、轴突及少突胶质细胞提供能量支持^[16]。星形胶质细胞分泌多种营养因子, 也参与了中枢神经系统的免疫调节^[17], 影响神经系

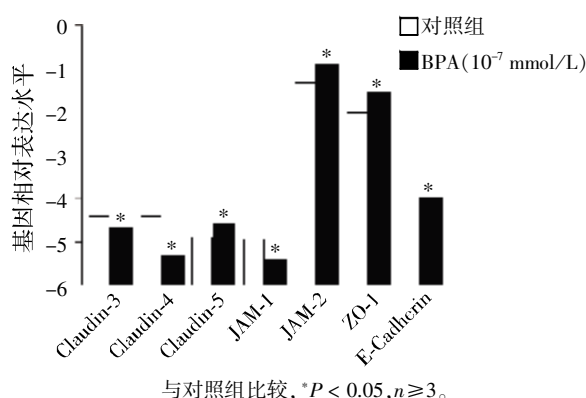


图5 星形胶质细胞和BPA共同孵育24 h后多种紧密连接蛋白mRNA水平的变化

Figure 5 Changes in mRNA level of multiple Claudins after astrocytes were incubated with BPA 24 hours

统发育^[16]。实验研究显示,暴露于 10^{-7} mmol/L的BPA 24 h和48 h后,星形胶质细胞活力均显著下降,说明BPA引起星形胶质细胞的损伤,提示BPA对血-脑屏障可能有一定的损伤作用。

谷氨酸(glutamate, Glu)作为哺乳动物脑内含量最为丰富的一种氨基酸,主要由突触前神经元释放并作用于突触后膜上的Glu受体,引发中枢神经系统的快速兴奋性传导,并调节突触可塑性。然而,Glu的过量释放所产生的兴奋性毒性也是多种脑损伤性疾病和神经退行性疾病发生发展的关键因素之一。星形胶质细胞不仅可以释放Glu,还可以对Glu进行再摄取,而且星形胶质细胞的量也远超出神经元10倍,对维持脑内Glu稳态具有重要作用^[18]。本实验研究显示,BPA处理后,星形胶质细胞Glu的释放量有一定的增加,但不是特别显著,提示BPA一方面可能损伤了星形胶质细胞,从而导致少量Glu的释放;另一方面,也可能是BPA阻碍了星形胶质细胞对Glu的再摄取作用。具体机制需要进一步研究。

血-脑屏障(blood brain barrier, BBB)指血-脑及血-脑脊液屏障(blood cerebrospinal fluid barrier, BCSEB or BCB),是维持中枢神经系统内环境稳定的结构基础,而紧密连接是BBB的重要结构^[19]。紧密连接是构成BBB的结构基础,主要由Claudins、ZOs、occludin和细胞骨架蛋白组成,是BBB通透性调节的中心环节^[19]。其组成蛋白表达水平的变化与脑微血管通透性的改变及脑水肿的程度密切相关。

Wolburg等^[19]研究表明:Claudin-3是决定体内血-脑屏障紧密连接的主要成分。而本实验结果显示,星形胶质细胞和BPA共同孵育24 h后,

Claudin-3的表达是显著下降,间接说明BPA对血-脑屏障有一定的破坏作用。Kiss, Abbruscato等^[20-22]研究表明,血-脑屏障及其他生物屏障在受到某些物质影响后,完整性受到了破坏,通透性增加,而在这过程当中内皮或上皮细胞的Claudin-4、JAM-1、E-cadherin基因的表达下降。而本实验结果显示,星形胶质细胞和BPA共同孵育24 h后,构成血-脑屏障紧密连接的重要蛋白Claudin-4、JAM-1、E-cadherin基因表达下降,说明BPA增加了血-脑屏障的通透性,破坏了血-脑屏障的完整性,间接说明BPA对血-脑屏障有一定的破坏作用。

刘坤等^[23]研究发现,水蛭素通过上调Claudin-5的表达,使血-脑屏障通透性降低,从而减轻脑水肿程度。本实验结果显示Claudin-5基因表达的上升,这一结果提示,BPA可能通过上调Claudin-5的表达,使血-脑屏障通透性降低,从而减轻BPA对血-脑屏障的损伤程度。Mahajan等^[24]研究发现,较低剂量的吗啡能通过调节紧密连接蛋白,破坏血-脑屏障的完整性,其中JAM-2蛋白基因表达是上升。而本实验结果显示,在较低剂量的BPA作用下,JAM-2 mRNA表达亦上升,间接说明BPA可能对血-脑屏障的完整性有一定的损伤作用。Salian等^[25]研究发现,BPA能引起成年雄性大鼠的生精和生育能力的障碍,而在这个过程中,睾丸上ZO-1基因的表达显著上升。本实验结果显示ZO-1基因表达的显著上升,与之前的这一研究结果一致,提示BPA可能对血-脑屏障有一定的破坏作用,但具体机制有待进一步研究。

后续实验将进一步从蛋白水平验证BPA对大鼠大脑皮层星形胶质细胞紧密连接蛋白的影响并探讨其机制,为BPA暴露引起的神经性病理性病变提供理论和干预依据。

[参考文献]

- [1] 吴同俊,石峻岭,周志俊. 双酚A的人群接触与生物监测[J]. 中国职业医学, 2006, 33(2): 132-134
- [2] Masuo Y, Ishido M. Neurotoxicity of endocrine disruptors: possible involvement in brain development and neurodegeneration[J]. J Toxicol Envir Health, Part B, 2011, 14(5-7): 346-369
- [3] Liu J, Yu P, Qian W, et al. Perinatal bisphenol a exposure and adult glucose homeostasis: Identifying Critical Windows of Exposure[J]. PLoS ONE, 2013, 8(5): e64143
- [4] Vandenberg L, Chahoud I, Heindel JJ, et al. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate

- widespread exposure to bisphenol A [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2010, 118(8):1055-1070
- [5] 秦定霞,崔毓桂,刘嘉茵. 双酚A对生殖系统的影响及其作用机制[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2010, 29(1):26-29
- [6] 杨丹,李丹丹,刘姗姗,等. 双酚A对机体的影响及其作用机制[J]. *现代预防医学*, 2008, 35(17):3280-3282
- [7] Gu B, Zeng Y, Yin C, et al. Sinomenine reduces iNOS expression via inhibiting the T-bet IFN- γ pathway in experimental autoimmune encephalomyelitis in rats [J]. *J Biomed Res*, 2012, 26(6):448-455
- [8] 张芸,张志坚,端礼荣,等. 大鼠脑皮层星形胶质细胞培养与鉴定[J]. *江苏大学学报:医学版*, 2007, 16(6):493-495
- [9] Latronico T, Brana M T, Gramegna P, et al. Inhibition of myelin-cleaving proteolytic activities by interferon-beta in rat astrocyte cultures. Comparative analysis between gelatinases and calpain-II [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(2):e49656
- [10] McCARTHY KEN D, De Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue[J]. *Cell Biol*, 1980, 85(3):890-902
- [11] Lee HS, Kim DK, Kim YB, et al. Effect of acute stress on immune cell counts and the expression of tight junction proteins in the duodenal mucosa of rats [J]. *Gut Liver*, 2013, 7(2):190-196
- [12] Helms HC, Waagepetersen HS, Nielsen CU, et al. Paracellular tightness and claudin-5 expression is increased in the BCEC/astrocyte blood-brain barrier model by increasing media buffer capacity during growth[J]. *AAPS*, 2010, 12(4):759-770
- [13] Zhou Y K, Qin H L, Zhang M, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* on gut barrier function in experimental obstructive jaundice[J]. *WJG*, 2012, 18(30):3977-3991
- [14] Géraud C, Evdokimov K, Straub BK, et al. Unique cell type-specific junctional complexes in vascular endothelium of human and rat liver sinusoids [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(4):e34206
- [15] Chen SW, Wu BY, Xu SP, et al. Suppression of CB1 cannabinoid receptor by lentivirus mediated small interfering RNA ameliorates hepatic fibrosis in rats [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(12):50850
- [16] 王磊. 星形胶质细胞在神经系统疾病中的作用[J]. *生物技术通报*, 2010, 6(1):33-51
- [17] 黄琳,万琪. 星形胶质细胞参与神经病理痛机制的研究进展[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2013, 19(1):52-54
- [18] 庞磊,杨岳,杨菁,等. 高糖对高钾刺激引起新生大鼠星形胶质细胞谷氨酸释放和再摄取的影响[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26(2):163-167
- [19] Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, et al. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme [J]. *Acta Neuropathologica*, 2003, 105(6):586-592
- [20] Kiss L, Walter FR, Bocsik A, et al. Kinetic analysis of the toxicity of pharmaceutical excipients cremophor EL and RH40 on endothelial and epithelial cells [J]. *J Pharma Sci*, 2013, 102(4):1173-1181
- [21] 蒋伟平,陈祿招,李兵. 实验性脑出血后紧密连接蛋白 JAM-1 的分布与表达变化 [J]. *中华神经医学杂志*, 2012, 11(7):649-652
- [22] Abbruscato TJ, Davis TP. Protein expression of brain endothelial cell E-cadherin after hypoxia/aglycemia: influence of astrocyte contact [J]. *Brain Res*, 1999, 842(2):277-286
- [23] 刘坤,姚阳. 水蛭素对大鼠脑出血后血脑屏障通透性和紧密连接相关蛋白 claudin-5 表达的作用 [J]. *沈阳医学院学报*, 2011, 13(3):137-139
- [24] Mahajan SD, Aalinkeel R, Sykes DE, et al. Tight junction regulation by morphine and HIV-1 tat modulates blood-brain barrier permeability [J]. *J Clin Immunol*, 2008, 28(5):528-541
- [25] Salian S, Doshi T, Vanage G. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis [J]. *Toxicology*, 2009, 265(1):56-67

[收稿日期] 2014-01-13