

围产期双酚 A 暴露对子代海马组织 APP、Tau 表达的影响

周 景,朱 庆,刘景丽,钱文溢,高 蓉,王 军*,肖 杭*

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

[摘要] 目的:观察 F0 代孕鼠围产期不同时期双酚 A(bisphenol A,BPA)暴露对子代小鼠海马中淀粉样蛋白前体(amyloid precursor protein,APP)、微管相关蛋白(microtubule-associated protein,Tau)、磷酸化的 Tau 蛋白(p-Tau)的影响,探讨雌雄小鼠胎儿发育阶段 BPA 暴露的敏感期。方法:利用 C57BL/6J 胎鼠原代培养的海马神经元共孵 BPA;F0 代小鼠围产期皮下注射建立 BPA 暴露小鼠模型,根据不同暴露期分为 4 组,即对照组、胎儿期(P₆-PND₀)、哺乳期(PND₀-PND₂₁)、胎儿期和哺乳期联合暴露(P₆-PND₂₁),取其成年子代海马组织(8 月龄)通过 Western blot 方法检测 APP、Tau 及 p-Tau 的表达量。结果:海马神经元细胞与不同浓度 BPA 共孵后,APP、Tau 及 p-Tau 的表达均上调,呈剂量依赖性。BPA 连续暴露后的子代小鼠中,雌性小鼠 PND₀-PND₂₁ 组、P₆-PND₂₁ 组海马组织中 APP、Tau 及 p-Tau 表达增加,而雄性小鼠仅 P₆-PND₂₁ 组 3 种蛋白的表达上调。结论:围产期 BPA 连续暴露可引起子代小鼠海马 APP、Tau 及 p-Tau 表达改变,从而可能引起神经损伤,而雌性小鼠相较于雄性小鼠可能对 BPA 引起的神经损伤更敏感。

[关键词] 双酚 A;淀粉样蛋白前体;微管相关蛋白

[中图分类号] R179

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)07-909-06

doi:10.7655/NYDXBNS20140711

Effects of perinatal exposure to bisphenol A on APP and Tau expression in the hippocampus of offspring mice

Zhou Jing, Zhu Qing, Liu Jingli, Qian Wenyi, Gao Rong, Wang Jun*, Xiao Hang*

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression of amyloid precursor protein (APP), microtubule-associated protein (Tau), and phosphorylated Tau protein (p-Tau) of offspring mouse hippocampus after perinatal exposure of F0 mice to bisphenol A (BPA) on different stages, and identify critical windows for fetal development stage susceptibility to BPA exposure in male and female mice.

Methods: The primary cultured hippocampus neurons of C57BL/6J fetal mice received with BPA; F0 mice received perinatal subcutaneous injection of BPA to establish the mouse BPA exposure model. Four groups were classified by different exposure stages, including the control, the fetus period (P₆-PND₀), the lactating period (PND₀-PND₂₁) and the combined exposure (P₆-PND₂₁) groups. The expressions of APP, p-Tau and Tau in offspring mouse (8-month-old) hippocampus were detected by Western blotting assays.

Results: The expressions of APP, p-Tau and Tau protein of hippocampal neurons were increased in a dose dependent manner after incubation with varied concentrations of BPA. BPA obviously increased APP, p-Tau and Tau expressions in the PND₀-PND₂₁ and the P₆-PND₂₁ group of female mice; for the male mice, the three proteins' up-regulation was observed only in the P₆-PND₂₁ group.

Conclusion: Continuous perinatal exposure to BPA could contribute to the up-regulation of APP, p-Tau and Tau, which might subsequently result in neuronal injury. Moreover, female mice are more susceptible to BPA exposure than male mice.

[Key words] bisphenol A; amyloid precursor protein; microtubule-associated protein

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(07):909-914]

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81202230);国家自然科学基金(81273115);江苏省高校优势学科建设工程资助项目(CX09B_264Z);南京医科大学科技发展基金重点项目(2011NJMU275)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangjun535@163.com; hxiao@njmu.edu.cn

双酚 A (bisphenol A, BPA) 是一种广泛应用于食品包装和饮食容器等塑料制品的生产原料, 如牙科密封胶、粘合剂、防护涂料、阻燃剂, 甚至婴儿奶嘴、奶瓶^[1], 食品包装在加热的过程中 BPA 亦会溶入食品, 进入人体, 危害人类健康^[3]。有研究显示 BPA 的生物累积在胎儿体内甚至比母体更高^[2]。目前, 较多研究探讨了 BPA 对中枢神经系统脑发育的影响, 如 BPA 对啮齿动物的自发行为和学习记忆功能造成持续性的畸变^[4], 而针对母体 BPA 暴露后, 子代可能存在的神经损伤则鲜有报道。大脑海马组织与学习记忆功能密切相关, 因此, 本实验通过对围产期雌雄小鼠不同时期的 BPA 暴露, 探讨 BPA 暴露是否能够引起子代小鼠海马组织中病理性改变, 造成潜在的神经损伤, 并阐述雌雄小鼠对 BPA 暴露引起神经损伤的敏感时期。这对于阐述母代 BPA 暴露导致子代可能发生的轻微神经认知障碍, 弄清围产期 BPA 暴露引起神经损伤的敏感时期具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

C57BL/6J 小鼠, 雌雄各半。小鼠等级: 清洁级, 购自南京医科大学实验动物中心 (许可证号: SCXK200201), 饲养环境: 温度 20~26℃, 湿度 40%~70%, 昼夜明暗交替 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、多聚赖氨酸(Sigma 公司, 美国); HBSS、NeuroBasal 培养基(Gibco 公司, 美国); 2.5%胰蛋白酶溶液、胎牛血清(Hyclone 公司, 美国); 兔抗 APP 抗体(1:5 000)、兔抗 p-Tau 抗体(1:10 000)、兔抗 Tau 抗体(1:5 000, Epitomics 公司, 美国); HRP 标记羊抗兔 IgG、HRP 标记羊抗鼠 IgG (1:100 000, Jackson Immuno 公司, 美国); 鼠抗 β -actin 抗体(1:5 000)、RIPA buffer、蛋白酶抑制剂(Sigma 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 海马神经元细胞分离培养及鉴定

参考 Chen 等^[5]方法, 加以改进, 取孕 C57BL/6J 小鼠麻醉后断头处死, 取胎鼠大脑海马组织。胰蛋白酶消化, 细胞筛网过滤。以 2.0×10^6 个/皿的密度接种于 6.0 cm 皿中培养。培养 8 d, 获取海马神经元。利用抗神经元标志蛋白 MAP-2 抗体对分离出的细胞进行鉴定。

1.2.2 分组与处理

体外细胞实验分 6 组, 分别为对照组、DMSO 组、BPA 浓度组(2、20、200、2 000 nmol/L)。BPA 与

海马神经元共孵 24 h 后, 检测 APP、p-Tau、Tau 蛋白表达水平。

动物实验处理方法如下: F0 孕鼠按不同时期分组给予 BPA。皮下注射, 每天 1 次, 连续给药, 剂量为 $100 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。见栓第 1 天称为 P₁, 子鼠出生第 1 天称为 PND₀。分为胎儿期 (P₆-PND₀)、哺乳期 (PND₀-PND₂₁)、胎儿期和哺乳期联合暴露 (P₆-PND₂₁)。对照组小鼠在 P₁ 至 PND₂₁ 给予等体积(50 μl)玉米油皮下注射。子鼠饲养至 8 月龄时处死取海马组织, 检测 APP、p-Tau、Tau 蛋白表达水平。

1.2.3 Western blot 法检测海马 APP、p-Tau 和 Tau 蛋白表达水平

子鼠海马组织加入一定比例组织裂解液 RIPA 进行匀浆后提取总蛋白, 海马神经元细胞直接加入细胞裂解液裂解后提取总蛋白。灌制分离胶和浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳, 一抗/二抗孵育, ECL 发光液 1:1 混合孵膜上显、定影。每实验组平行 3 样, 重复 3 次。所得条带采用 Image J 软件进行灰度值扫描标准化后进行比较。通过 GraphPad 软件制作图片。

1.3 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 多组间比较用单因素方差分析, 两两比较用 Student-Newman-Keuls (SNK) 检验, 以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 BPA 对海马神经元 APP、p-Tau、Tau 蛋白表达的影响

海马神经元与不同浓度 BPA 共同孵育 24 h 后, 观察 APP、p-Tau、Tau 蛋白的表达。由图 1 所示, DMSO 组与对照组比较, 差异没有统计学意义, 而 2 nmol/L BPA 即可引起 APP 蛋白表达增高, 且随 BPA 浓度的增大, APP 蛋白表达水平逐渐增加, 差别有统计学意义 ($P < 0.05, n = 3$, 图 1)。p-Tau 以及总 Tau 蛋白的表达在 2 nmol/L 浓度时即高于对照组和 DMSO 组, 随着 BPA 浓度的增加, 对 p-Tau 以及总 Tau 蛋白表达的增强作用更明显, 具有统计学差异 ($P < 0.05, n = 3$, 图 1)。

2.2 围产期 BPA 持续暴露对雌雄小鼠海马组织中 APP、p-Tau、Tau 蛋白表达的影响

2.2.1 对照组子代雌雄小鼠海马组织中 APP、p-Tau、Tau 蛋白表达水平的比较

未给予 BPA 暴露的对照组子代雌性、雄性小鼠海马组织中的 APP 蛋白、p-Tau 以及总 Tau 蛋白的

表达水平没有明显的统计学差异 ($P > 0.05, n = 6$, 图 2)。

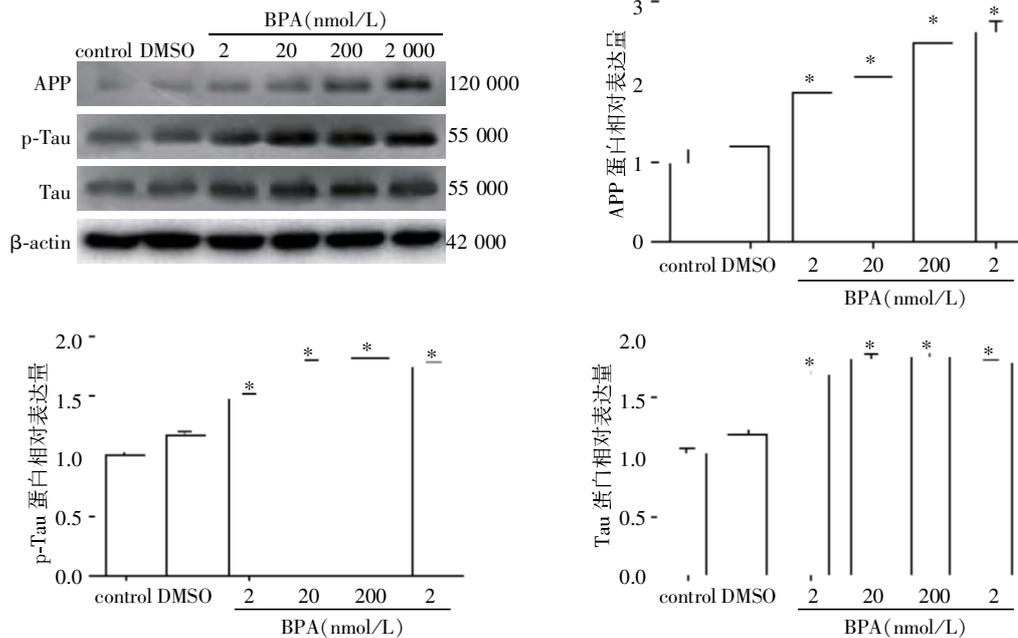
2.2.2 BPA 暴露雌性子代小鼠海马组织 APP、p-Tau、Tau 蛋白表达的变化

围产期 F0 代孕鼠不同时期 BPA 暴露后, 雌性子代小鼠中哺乳期(PND₀-PND₂₁)、胎儿期和哺乳期联合暴露(P₆-PND₂₁)两组中子代小鼠海马的 APP、p-

Tau、Tau 蛋白表达水平均高于对照组, 差别具有统计学意义 ($P < 0.05, n = 6$, 图 3)。而胎儿期(P₆-PND₀)组相较于对照组, APP、p-Tau、Tau 蛋白水平没有明显的升高趋势($P > 0.05, n = 6$, 图 3)。

2.2.3 BPA 暴露雄性子代小鼠海马组织 APP、p-Tau、Tau 蛋白表达的变化

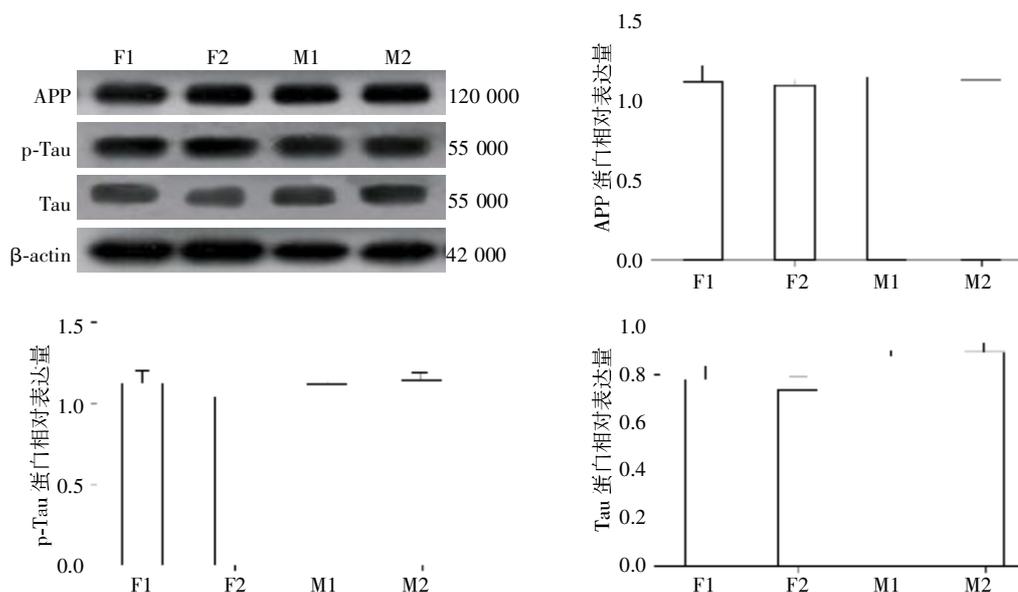
围产期 F0 代孕鼠不同时期 BPA 暴露后, 雄性



与 control 组比较, * $P < 0.05 (n = 3)$ 。

图 1 海马神经元细胞分别与不同浓度 BPA 共孵 24 h 后 APP、p-Tau、Tau 蛋白的变化

Figure 1 APP, p-Tau and Tau protein expressions in hippocampal neurons after incubated with different concentrations of BPA for 24 h



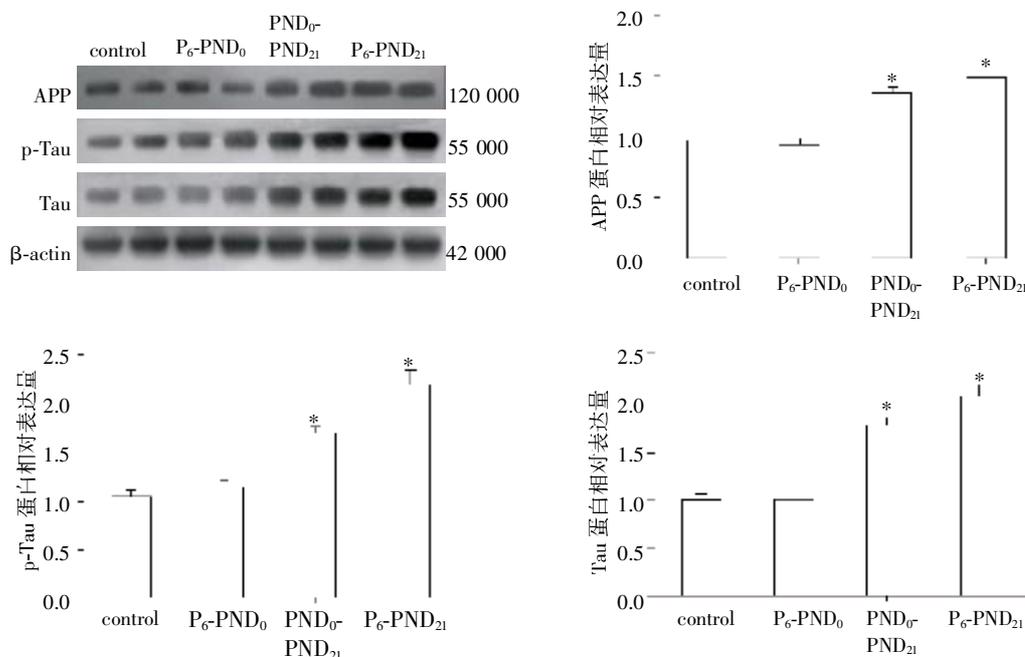
F1、F2: 对照组雌性子代小鼠; M1、M2: 对照组雄性子代小鼠。

图 2 BPA 非暴露组子代小鼠海马中 APP、p-Tau、Tau 蛋白的表达

Figure 2 The expressions of APP, p-Tau and Tau protein in hippocampus of non-BPA exposure offspring mice

子代小鼠中仅胎儿期和哺乳期联合暴露 (P₆-PND₂₁) 组中子代小鼠海马的 APP、p-Tau、Tau 蛋白表达水平高于对照组, 差别具有统计学意义 ($P < 0.05, n = 6$, 图 4)。胎儿期 (P₆-PND₀)、哺乳期

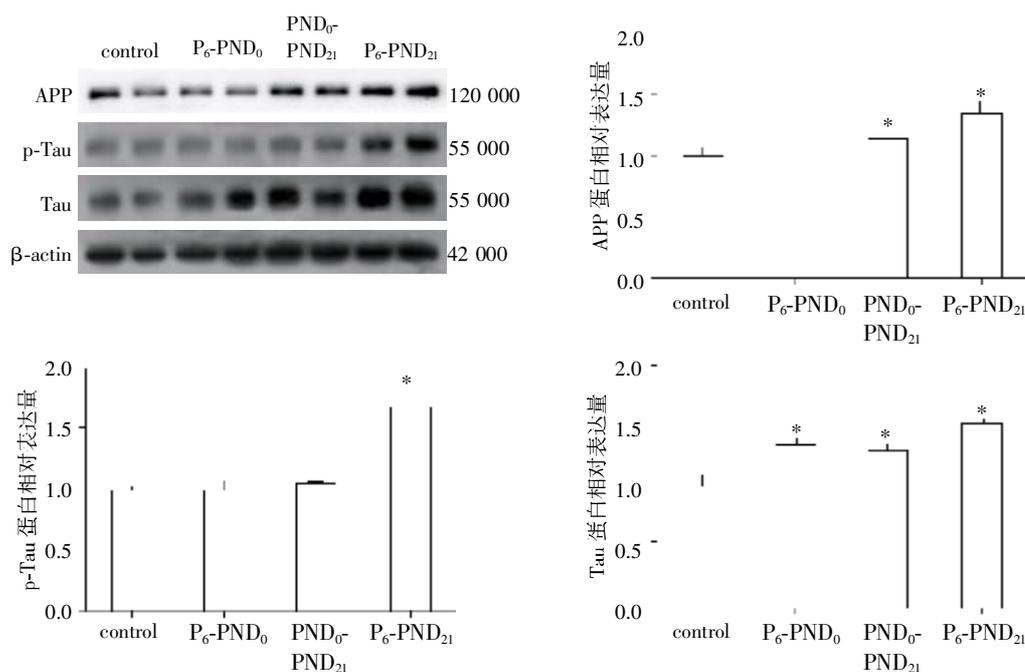
(PND₀-PND₂₁) 两组中, Tau 蛋白的表达水平高于对照组, 差别有统计学意义 ($P < 0.05, n = 6$, 图 4), 而 APP、p-Tau 蛋白水平没有明显的升高趋势 ($P > 0.05, n = 6$, 图 4)。



control: 对照组; P₆-PND₀: 胎儿期暴露组; PND₀-PND₂₁: 哺乳期暴露组; P₆-PND₂₁: 胎儿期和哺乳期联合暴露组。与对照组比较, * $P < 0.05 (n = 6)$ 。

图 3 BPA 处理雌性子代小鼠海马中 APP、p-Tau、Tau 蛋白的表达

Figure 3 The APP, p-Tau and Tau protein expressions in the hippocampus of female offspring mice exposed to BPA



control: 对照组; P₆-PND₀: 胎儿期暴露组; PND₀-PND₂₁: 哺乳期暴露组; P₆-PND₂₁: 胎儿期和哺乳期联合暴露组。与对照组比较, * $P < 0.05 (n = 6)$ 。

图 4 BPA 处理雄性子代小鼠海马中 APP、p-Tau、Tau 蛋白的表达

Figure 4 The APP, p-Tau and Tau protein expressions in the hippocampus of male offspring mice exposed to BPA

3 讨 论

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种中枢神经系统退行性疾病,以记忆减退、认知功能障碍为主要临床表现,以老年斑和神经原纤维缠结为特征性的病理改变^[6]。AD 的发生一方面与遗传因素相关,如 apoEε4 等位基因可能是 AD 的一种遗传危险因素^[7];另一方面与环境因素密切相关。BPA 作为一种具有拟雌激素功能的内分泌干扰物,目前广泛存在于人们的日常生活中。相较于成年人,胎儿期和新生儿期的 BPA 暴露会增加神经发育毒性效应的风险^[8-9],本实验通过对围产期小鼠不同时期 BPA 暴露,发现低浓度 BPA 暴露后可引起子代雌、雄性小鼠大脑海马区病理性神经蛋白表达水平的改变。

APP 是一种跨膜糖蛋白,在 β 和 γ 分泌酶作用下,可分别在细胞膜外或跨膜部分将 APP 水解成小片段的可溶性 β 淀粉样蛋白(A β),A β 的沉积是 AD 中老年斑形成的主要原因,在细胞基质沉淀聚积后具有很强的神经毒性作用,溶解状 APP 通过 G 蛋白干预细胞内信号过程,增加微管相关蛋白激酶的活性^[10]。Tau 蛋白是正常神经原纤维中双股螺旋细丝(PHF)的成分,是含量最高的微管相关蛋白,维持着微管结构的稳定性^[11]。在神经细胞中,微管参与细胞骨架组成,其结构和功能的完整是神经元胞体与轴突间营养物质运输的基础。正常成熟脑中 Tau 蛋白分子含 2~3 个磷酸基,当神经元 Tau 蛋白出现过度磷酸化,将会导致双螺旋丝的聚集,进一步形成神经原纤维缠结^[12-13]。本实验将不同浓度 BPA 与原代海马神经元细胞共同孵育 24 h 后对蛋白水平进行检测,结果发现 2~2 000 nmol/L BPA 均造成 APP、p-Tau 及总 Tau 蛋白表达增高,且具有浓度依赖性,提示 BPA 暴露可引起子代海马组织中病理性蛋白的发生,产生潜在的神经毒性。

体内实验中发现雌性小鼠在哺乳期、胎儿和哺乳期联合暴露 BPA 后大脑海马区 APP、p-Tau、总 Tau 蛋白表达明显增加,而雄性小鼠只有在胎儿和哺乳期联合暴露 BPA 后各蛋白水平发生一致的表达增加现象,提示 BPA 对子代小鼠神经毒性影响的敏感时期可能是胎儿期和哺乳期,且 BPA 对小鼠神经相关蛋白表达水平的影响可能存在性别差异。Nakamura 等^[14-15]的研究中雌性、雄性小鼠胎儿期和哺乳期 BPA 暴露后大脑特定区域的单胺浓度存在着差异;Viberg 等^[16]的研究中成年小鼠新生儿期 BPA(3.2 或 4.8 mg/kg)暴露对大脑皮层和海马中突

触小泡蛋白水平以及 CaMK II 蛋白水平的影响均具有性别差异,这些结果均支持了本实验中观察到的现象,即 BPA 引起的神经毒性可能存在性别差异。但 BPA 作为一种具有拟雌激素功能的内分泌干扰物,如何引起病理性蛋白表达的增高,且具有性别差异性,其机制仍不清楚,有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Garcia-Garcia E, et al. Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis [J]. *Int J Androl*, 2008, 31(2): 194-200
- [2] Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, et al. Human exposure to bisphenol A (BPA) [J]. *Reprod Toxicol*, 2007, 24(2): 139-177
- [3] Tando S, Itoh K, Yaoi T, et al. Effects of pre- and neonatal exposure to bisphenol A on murine brain development [J]. *Brain Dev*, 2007, 29(6): 352-356
- [4] Jang YJ, Park HR, Kim TH, et al. High dose bisphenol A impairs hippocampal neurogenesis in female mice across generations [J]. *Toxicology*, 2012, 296(1-3): 73-82
- [5] Chen L, Liu J, Xu C, et al. HIV-1gp120 induces neuronal apoptosis through enhancement of 4-aminopyridine-sensitive outward K⁺ currents [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25994
- [6] Malenka RC, Malinow R. Alzheimer's disease: Recollection of lost memories [J]. *Nature*, 2011, 469(7328): 44-45
- [7] Fernandez-Martinez M, Elcoroaristizabal Martin X, Blanco Martin E, et al. Oestrogen receptor polymorphisms are an associated risk factor for mild cognitive impairment and Alzheimer disease in women APOE ϵ 4 carriers: a case-control study [J]. *BMJ Open*, 2013, 3(9): e003200
- [8] Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, et al. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population [J]. *Environ Health Perspect*, 2005, 113(4): 391-395
- [9] Mielke H, Gundert-Remy U. Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 190(1): 32-40
- [10] Govaerts L, Schoenen J, Bouhy D. Pathogenesis of Alzheimer's disease: molecular and cellular mechanisms [J]. *Rev Med Liege*, 2007, 62(4): 209-216
- [11] Mandelkow EM, Mandelkow E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(7): a006247
- [12] Wang Y, Feng Y, Fu Q, et al. Panax notoginsenoside Rb1

ameliorates Alzheimer's disease by upregulating brain-derived neurotrophic factor and downregulating Tau protein expression[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 6(3): 826-830

[13] Goedert M, Jakes R, Qi Z, et al. Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase [J]. *J Neurochem*, 1995, 65(6): 2804-2807

[14] Nakamura K, Itoh K, Yoshimoto K, et al. Prenatal and lactational exposure to low-doses of bisphenol A alters brain monoamine concentration in adult mice[J]. *Neurosci Lett*, 2010, 484(1): 66-70

[15] Nakamura K, Itoh K, Dai H, et al. Prenatal and lactational exposure to low-doses of bisphenol A alters adult mice behavior[J]. *Brain Dev*, 2012, 34(1): 57-63

[16] Viberg H, Lee I. A single exposure to bisphenol A alters the levels of important neuroproteins in adult male and female mice [J]. *Neurotoxicology*, 2012, 33 (5): 1390-1395

[收稿日期] 2013-10-23

参考文献的著录格式

1. 期刊

[顺序号] 作者. 题名[J]. 刊名, 年份, 卷号(期号): 起止页码

示例:

[1] 徐春阳, 杨 荣, 张 浩, 等. NOMO1 基因在大鼠胚胎心脏发育过程中的表达[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 32(6): 728-731

[2] Li JZ, Bunney BG, Meng F, et al. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(24): 9950-9955

2. 专著

[顺序号] 作者. 书名[M]. 版本. 出版地: 出版者, 年份: 起止页码

示例:

[3] 何 维. 医学免疫学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 136

3. 析出文献

[顺序号] 析出文献责任者. 析出文献题名[M]//. 析出文献其他责任者或专著主要责任者. 专著题名: 其他题名信息. 出版地: 出版者, 年份: 析出文献起止页码

示例:

[4] 林穗芳. 美国出版业概况[M]//陆本瑞. 世界出版概况. 北京: 中国书籍出版社, 1991: 1-23

[5] 钟文发. 非线性规划在可燃毒物配置中的应用 [C]//赵 玮. 运筹学的理论与应用: 中国运筹学会第五届大会论文集. 西安: 西安电子科技大学出版社, 1996: 468-471

(本刊编辑: 接雅俐)