

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20210509001

刘佳欣, 付朝旭, 代霖, 等. 邻苯二甲酸二乙基己酯与双酚 A 联合染毒对小鼠学习记忆障碍及淀粉样前体蛋白酶解通路的影响[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(1): 255-265

Liu J X, Fu C X, Dai L, et al. Effects of combined exposure of diethylhexyl phthalate and bisphenol A on learning and memory impairment and amyloid precursor protein processing pathway in mice [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(1): 255-265 (in Chinese)

邻苯二甲酸二乙基己酯与双酚 A 联合染毒对小鼠学习记忆障碍及淀粉样前体蛋白酶解通路的影响

刘佳欣, 付朝旭, 代霖, 金慧玲, 许妍姬*

延边大学医学院预防医学教研室, 延吉 133002

收稿日期: 2021-05-09 录用日期: 2021-08-09

摘要: 研究邻苯二甲酸二乙基己酯(diethylhexyl phthalate, DEHP)与双酚 A(bisphenol A, BPA)联合染毒对小鼠学习记忆障碍及淀粉样前体蛋白(APP)酶解通路的影响。选用昆明种小鼠 80 只, 随机分为空白对照(CT)组、BPA 染毒组($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、不同浓度的 DEHP 染毒组(100 、 250 和 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)与联合染毒组。经口灌胃染毒, 以 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 的剂量灌胃, 7 次/周, 持续 6 周。使用 Morris 水迷宫、避暗、跳台的行为学实验方法检测 2 种污染物单独及联合染毒对小鼠学习记忆的影响; 检测小鼠大脑组织中丙二醛(MDA)的含量和单胺氧化酶(MAO)、过氧化氢酶(CAT)、乙酰胆碱酯酶(AChE)的活性; 采用酶联免疫分析(ELISA)法检测脑组织中的 β 、 γ -分泌酶活性和 $\text{A}\beta_{1-42}$ 的含量; Western Blot 法检测 APP、PS1、BACE1 和 Tau 的蛋白表达水平; 免疫组化法观察小鼠脑组织海马区 HE 染色情况。行为学测试结果表明, 与 CT 组比较, 单独染毒处理组小鼠学习记忆能力出现障碍, 空间探索能力较弱; 联合染毒组与单独染毒组相比, 小鼠于目标象限停留时间短, 穿台次数少, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 生化指标结果显示, 随着毒物浓度增加, 脑组织中 MDA 含量、MAO 和 AChE 活性逐渐增加, CAT 活性逐渐降低, 联合染毒组的变化更为明显, 染毒处理组 β 、 γ -分泌酶活性和 $\text{A}\beta_{1-42}$ 含量增加, 联合染毒组比单独染毒组酶活性增加更明显; 各组差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。DEHP 与 BPA 单独染毒, 对小鼠脑组织均显示有神经毒性作用, 会造成小鼠学习记忆功能障碍; 随着联合染毒组 DEHP 浓度的增加, 联合染毒组与对应剂量的单独染毒组相比, 小鼠行为学测试结果与生化指标变化更加明显, 采用效应相加模型对其联合毒性作用进行评价, 表现为协同作用; 染毒组小鼠脑组织神经递质明显减少, 具体机制可能与氧化应激及 APP 酶解通路的作用有关。

关键词: 双酚 A; DEHP; 联合染毒; APP 酶解通路

文章编号: 1673-5897(2022)1-255-11 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Combined Exposure of Diethylhexyl Phthalate and Bisphenol A on Learning and Memory Impairment and Amyloid Precursor Protein Processing Pathway in Mice

Liu Jiaxin, Fu Chaoxu, Dai Lin, Jin Huiling, Xu Yanji*

Department of Preventive Medicine, Medicine College, Yanbian University, Yanji 133002, China

Received 9 May 2021 accepted 9 August 2021

基金项目: 吉林省大学生创新创业训练计划项目(202010184017); 吉林省中医药科技项目(2018-135); 吉林省教育厅“十三五”科学技术研究项目基金(JJKH20200532KJ)

第一作者: 刘佳欣(2000—), 女, 本科生, 研究方向为神经毒理学, E-mail: 1204982479@qq.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: xuyanji@ybu.edu.cn

Abstract: To study the effects of combined exposure of diethylhexyl phthalate (DEHP) and bisphenol A (BPA) on learning and memory impairment and amyloid precursor protein (APP) processing pathway in mice. 80 Kunming mice were selected and randomly divided into a blank control (CT) group, a BPA exposure group ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), DEHP exposure groups of different concentrations ($100, 250$ and $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and combined exposure groups. The mice were exposed to the toxin by oral gavage at $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 7 times a week for 6 weeks. Morris water maze, step-through training and jumping platform experiment methods were used to detect the effects of two chemicals and their combined exposure on learning and memory of mice. The content of malondialdehyde (MDA) and monoamine oxidase (MAO), catalase (CAT) and activities of acetylcholinesterase (AChE) were detected from brain tissue; enzyme-linked immunoassay (ELISA) method were used to detect the activity of β -secretase and γ -secretase and the content of $A\beta_{1-42}$ in brain tissue; Western Blot method was used to detect the protein expression levels of APP, PS1, BACE1 and Tau; immunohistochemistry was used to observe HE staining in the hippocampus of mouse brain tissue. Compared with the CT group, the behavioral test results showed that mice in the single chemical exposure group had dysfunction in the learning and memory ability, and the spatial exploration capability was weaker. In the combined exposure group the target quadrant stay time was shorter and the number of crossings was less than the single-exposure group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Biochemical indicators show that as the concentration of the chemical increases, the content of MAD, the activities of MAO and AChE were gradually increased, and CAT activity was gradually decreased in the brain tissue. This changes in the combined exposure group showed more obviously. In the exposure groups, the activity of β -secretase and γ -secretase and the content of $A\beta_{1-42}$ were increased, and the enzyme activity of the combined exposure group were increased more significantly than single exposure group; the differences in each group were statistically significant ($P < 0.05$). DEHP and BPA exposure have separate neurotoxic effects on mouse brain tissues, and both cause learning and memory dysfunction in mice; with the increase of DEHP concentration in the combined exposure group, the behavioral test results and biochemical indicators were changed more obviously compared with the single exposure group with the corresponding dose. The combined effect mode was evaluated by the effect additive model, which showed a synergistic effect; the neurotransmitters of brain tissue were significantly reduced in the exposure group, and the specific mechanism may be related to the oxidative stress and APP processing pathway.

Keywords: bisphenol A; DEHP; combined exposure; APP processing pathway

增塑剂具有延展性、能够增加塑料的强度及稳定性,因此在现代生产生活中被大量应用到塑料制品中^[1-2],邻苯二甲酸二乙基己酯(diethylhexyl phthalate, DEHP)是产量最大且被使用最为广泛的一种增塑剂,也是人类经常暴露的环境污染物^[3];由于DEHP与塑料之间仅依靠键能较弱氢键或范德华力连接,其结合不紧密,导致了环境污染和对机体的毒性损伤^[4],本文将探讨其对神经毒性的影响。另一种增塑剂双酚A(bisphenol A, BPA),是一种烷基酚类的环境内分泌干扰物,其在生殖毒性、肝脏毒性和免疫毒性方面的研究已得到证实^[5-8];随着发展与进步,BPA的神经毒性逐渐受到关注。

DEHP和BPA这类的环境污染物对机体神经系统具有负面影响,现有研究表明,孕期母体摄入的DEHP会影响子代小鼠的神经发育^[9];人体主要通

过经口、呼吸吸入、医疗和皮肤接触等途径暴露于DEHP中^[10],BPA主要经过环境和食物等途径进入人体,在机体中能够通过胎盘屏障和血脑屏障,从而损害中枢神经^[11]。阿尔兹海默病(Alzheimer disease, AD)作为一种典型的中枢神经系统退行性疾病,起病隐袭且病程较为缓慢,容易受环境污染物影响,淀粉样前体蛋白(APP)酶解通路异常是AD致病机制中的重要过程。相关塑料制品的磨损老化以及高温、强酸、强碱等条件下的使用使得人体经常同时暴露于2种毒物中。以往的研究中DEHP和BPA二者的单独毒性作用均已得到证实^[10-12],实际生产生活中,由于人体经常会同时暴露在DEHP与BPA的环境中,其联合毒性引发的安全问题需要重新进行探讨;为探究二者的联合毒性作用,为职业场所和生活场所DEHP和BPA联合暴露导致的健康问题提

供实验参考和科学依据,本次实验对小鼠进行联合染毒并采用动物行为学测试和生化指标的检测,探讨 BPA 与 DEHP 联合染毒的毒性作用与机制以及对小鼠学习记忆能力的影响。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验动物

选择 80 只 SPF 级昆明(Kun Ming, KM)种雄性小鼠,体质量为(20.0±2.0) g,由延边大学动物科学实验中心提供;在延边大学医学院动物饲养房集中饲养 5 d,光、暗周期交替,温度控制在 22~25℃,相对湿度保持在 40%~70%。

1.2 实验仪器与试剂

1.2.1 实验仪器

酶标仪(美国伯腾仪器有限公司,型号 BioTek)、超声波细胞破碎机(上海乔跃电子有限公司,型号 JY96-II)、电泳仪(上海碧云天生物科技有限公司,型号 165-8033)、小动物避暗穿梭测试仪(北京众实迪创,型号 YLS3TB)和小动物跳台记录仪(北京众实迪创,型号 YLS-17B)、Morri 水迷宫(上海欣软,型号 XR-XM101)、高速冷冻离心机(Thermo Electron,型号 CR3i)。

1.2.2 实验试剂

双酚 A(纯度 99.0%,上海化成工业发展有限公司)、邻苯二甲酸双(2-乙基己基)酯(纯度 99.0%,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司)、吐温 80(纯度 99.0%,天津市科密欧化学试剂有限公司);丙二醛(MDA)、乙酰胆碱酯酶(AchE)、单胺氧化酶(MAO)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒均购于南京建成生物工程有限公司;APP、PS1、tau、BACE1、tubulin 抗体(赛默飞世尔科技(中国)有限公司);Aβ₁₋₄₂ 酶联免疫试剂盒、β-分泌酶和 γ-分泌酶联免疫分析试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)。

1.3 试剂配制

将 DEHP 与吐温 80(Tween-80)按照体积为 1:1 助溶,并使用双蒸水配制成浓度分别为 100、250 和 500 mg·kg⁻¹ 的染毒液。将 1 mg BPA 溶解于 10 mL 的无水乙醇,加入 1 L 水配制成 1 mg·L⁻¹ 的染毒液;2 种毒物均采用灌胃染毒的方式对小鼠进行染毒处理。

1.4 实验分组与模型建立

白金等^[3]通过对小鼠进行染毒,研究 DEHP 对雄性小鼠大脑皮质氧化损伤及 Bcl-2、Bax 蛋白表达影响,结果表明,DEHP 各染毒组的大脑皮质 Bcl-2

蛋白表达减少,500 mg·kg⁻¹ 和 1 000 mg·kg⁻¹ 剂量组 Bax 蛋白表达增高,提示 DEHP 可致小鼠大脑皮质氧化损伤及凋亡相关蛋白改变;冯强伟^[4]进行了 DEHP 联合甲醛暴露实验,生化指标测试结果表明,1.0 mg·m⁻³ 和 3.0 mg·m⁻³ 甲醛与 500 mg·kg⁻¹ DEHP 以及联合暴露组 1.0 mg·m⁻³ 甲醛+50 mg·kg⁻¹ DEHP 和 3.0 mg·m⁻³ 甲醛+500 mg·kg⁻¹ DEHP 可以导致小鼠氧化损伤、炎症反应。本次实验以此为依据确定了染毒暴露组浓度^[4]。选择 80 只昆明种小鼠,随机分为 8 组,每组各 10 只,具体分组如表 1 所示。

BPA 和 DEHP 处理组每天按照 0.01 mL·g⁻¹ 的剂量对小鼠进行灌胃染毒,对照组按照相同比例的剂量给予双蒸水(double distilled water, DDW)灌胃处理,各组均自由摄食、饮水,连续染毒 42 d。实验期间,每天观察小鼠的毛色、呼吸和状态,并记录各组小鼠的体质量、摄食量以及饮水量。

表 1 实验分组与染毒剂量 (n=10)
Table 1 Experimental grouping and exposure dose (n=10)

序号 No.	组别 Group	剂量 Dose
1	CT	0 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ DEHP+DDW
2	BPA	0 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ DEHP+1 mg·L ⁻¹ BPA
3	低 DEHP Low dose DEHP	100 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ DEHP+DDW
4	低 DEHP+BPA Low dose DEHP+BPA	100 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ DEHP+1 mg·L ⁻¹ BPA
5	中 DEHP Medium dose DEHP	250 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ DEHP+DDW
6	中 DEHP+BPA Medium dose DEHP+BPA	250 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ DEHP+1 mg·L ⁻¹ BPA
7	高 DEHP High dose DEHP	500 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ DEHP+DDW
8	高 DEHP+BPA High dose DEHP+BPA	500 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ DEHP+1 mg·L ⁻¹ BPA

注:CT 表示空白对照组,BPA 表示双酚 A,DEHP 表示邻苯二甲酸二乙基己酯,DDW 表示双蒸水。

Note: CT stands for blank control group; BPA stands for bisphenol A; DEHP stands for diethylhexyl phthalate; DDW stands for double distilled water.

1.5 动物行为学实验

1.5.1 小鼠 Morris 水迷宫测试

实验周期的第 42 天进行小鼠 Morris 水迷宫训练,训练期间照常定时给药。水迷宫由直径为 1.2 m 的圆形水池构成,水池分为 4 个象限,平台位于第 4 象限,水池水位位于平台上 2 cm 处,由顶部摄像头进行录像拍摄。实验过程中,水温保持在 $(23\pm 1)^\circ\text{C}$ 。实验前 5 d 为定位航行实验:每次将小鼠的头朝向池壁,分别从 1、2、3、4 象限的固定位置投入水池中,时长为 60 s,记录小鼠从不同象限游上平台的时间,在平台停留 5 s 为成功上台;若未能成功找到平台,则通过引导棒将其引导上台,并让小鼠在平台停留 10 s,增强学习记忆能力。每间隔 24 h 训练一次,训练 5 d;第 6 天、第 7 天、第 9 天进行空间探索实验,将小鼠从平台对角线的象限固定点投入水中,记录路线、穿台次数和目标象限停留时间,以此来测试小鼠的空间学习记忆能力。

1.5.2 小鼠避暗实验

第 6 周时训练,分为模拟训练和正式测试。将小鼠放进避暗仪的明箱中,使其消除恐惧,适应环境;3 min 后打开明暗室的隔板,开启避暗仪进行测定,电压设定为 36 V,持续记录 5 min,24 h 后进行相同的测试为正式测试,记录小鼠第 1 次从明箱到暗箱受到电击所用的时间和小鼠从明箱穿梭到暗箱受到电击的次数,即其潜伏期和错误次数。

1.5.3 小鼠跳台实验

第 6 周时进行训练,分为模拟训练和正式测试 2 部分。实验开始之前将动物放入跳台箱内适应 3 min,底部通电,动物受到电刺激,正常反应时跳上平台躲避伤害性刺激,染毒作用的小鼠会削弱这种反应记忆能力;第 2 天将小鼠再次重复该操作,进行正式测试,时间设置为 5 min,观察并记录小鼠从绝缘平台跳下所花费的时间和小鼠从平台跳下的次数,即逃避潜伏期和跳台错误次数。

1.6 生化指标的测定

1.6.1 小鼠脑组织 MDA 含量以及 MAO、AchE、CAT 活性的检测

小鼠处死后置于冰上取脑,用天平称其 1/4 的质量,按照 9(mL):1(g)的比例加入生理盐水,置于冰上用粉碎机进行粉碎,2 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取其上清液,严格按照试剂盒说明书对样本进行检测。

1.6.2 ELISA 法检测脑组织中 β 、 γ -分泌酶活性和 $\text{A}\beta_{1-42}$ 含量

小鼠处死后置于冰上取脑,用天平进行准确称量,按照 9(mL):1(g)的比例加入 PBS,置于冰上用粉碎机粉碎,离心后取上清液,采用 ELISA 法进行检测。严格按照说明书进行操作。

1.6.3 脑组织中 APP、PS1、BACE1 和 Tau 蛋白表达水平的检测

采用蛋白印迹法,杀鼠后将脑组织加入 RIPA 缓冲液和 PMSF,充分研磨,超声粉碎,再次加入 PMSF,冰上孵育 30 min,离心后取上清液,严格根据说明书测得蛋白浓度。在 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳,取样量为 20 μL ,电泳后转移印记至 PVDF 膜,洗涤液洗涤,封闭液封闭 2 h,加入一抗后在摇床中震荡 1.5 h 后,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱孵育过夜,次日回收一抗,洗涤后在摇床中孵育二抗 1 h,回收二抗,再次洗涤,曝光取影,观察各组蛋白表达水平。

1.7 免疫组化染色

将固定在 10% 福尔马林固定液中的脑组织依次进行脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色、封片和显微镜观察等操作,观察脑组织海马区的形态及结构差异。

1.8 联合毒性评价分析

目前联合染毒作用评价方式主要有浓度加和模型(CA)、效应相加模型(ES)、独立作用模型(IA)和联合指数法(CI)^[15-16]。为更具有统计学意义,本实验采用效应相加模型进行评价。该模型假设各物质之间不存在相互作用,将这 2 种毒物联合处理时的毒性效应作为“实测值”,单独处理时的毒效应作为“预测值”,2 个值进行显著性差异分析判断其联合作用;若该项指标实测值大于预测值,联合染毒作用表现为协同作用。

1.9 统计学方法

采用 SPSS26.0 软件进行单因素方差分析,组间差异使用 LSD-*t* 的检验方法, $P<0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果(Results)

2.1 小鼠 Morris 水迷宫实验

空间探索结果表明,对照组小鼠穿台次数明显高于其他组,目标象限停留时间较长,空间探索具有较强的目的性;DEHP 和 BPA 单独作用组小鼠轨迹杂乱,对于平台的记忆能力较弱;联合染毒组几乎不穿过目标象限,轨迹极其不规律,空间探索能力很差;与对照组相比,差异性具有统计学意义($P<0.05$) (表 2 和图 1)。

表 2 定位航行实验逃避潜伏期 ($\bar{x}\pm s, n=10$)
Table 2 Evasion incubation period of positioning navigation experiment ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别 Group	第 1 天 1 st day	第 2 天 2 nd day	第 3 天 3 rd day	第 4 天 4 th day	第 5 天 5 th day
CT	52.77±7.22	44.33±8.88	39.07±9.81	33.73±11.12	28.45±11.87
BPA	54.82±8.86	45.55±9.65	39.95±7.29	39.71±11.86	36.93±9.19
低 DEHP Low dose DEHP	57.19±8.13	46.15±9.17	43.65±7.42	40.23±7.42	38.33±11.53 ^a
中 DEHP Medium dose DEHP	57.60±9.26 ^a	48.80±8.18	44.43±11.17	42.46±10.80 ^a	44.78±10.09 ^a
高 DEHP High dose DEHP	58.20±9.41	49.73±8.44	47.33±9.84	44.39±10.83 ^a	46.23±10.15 ^{ab}
低 DEHP+BPA Low dose DEHP+BPA	57.78±7.52 ^a	52.35±7.46 ^a	47.60±9.89	45.42±7.98 ^a	47.68±10.67 ^{abc}
中 DEHP+BPA Medium dose DEHP+BPA	58.56±5.31 ^a	54.51±4.83 ^{ab}	49.30±9.52 ^{ab}	50.27±7.76 ^{ab}	49.14±7.26 ^{ab}
高 DEHP+BPA High dose DEHP+BPA	59.89±9.96 ^{ab}	55.96±10.27 ^{ab}	52.82±11.65 ^{ab}	57.78±8.09 ^{abc}	54.13±13.49 ^{abc}

注:a 表示与 CT 组比较, $P<0.05$; b 表示与 BPA 组比较, $P<0.05$; c 表示与相同剂量 DEHP 染毒组比较, $P<0.05$ 。
Note: a means compared with CT group, $P<0.05$; b means compared with BPA group, $P<0.05$; c means compared with the same dose of DEHP group, $P<0.05$.

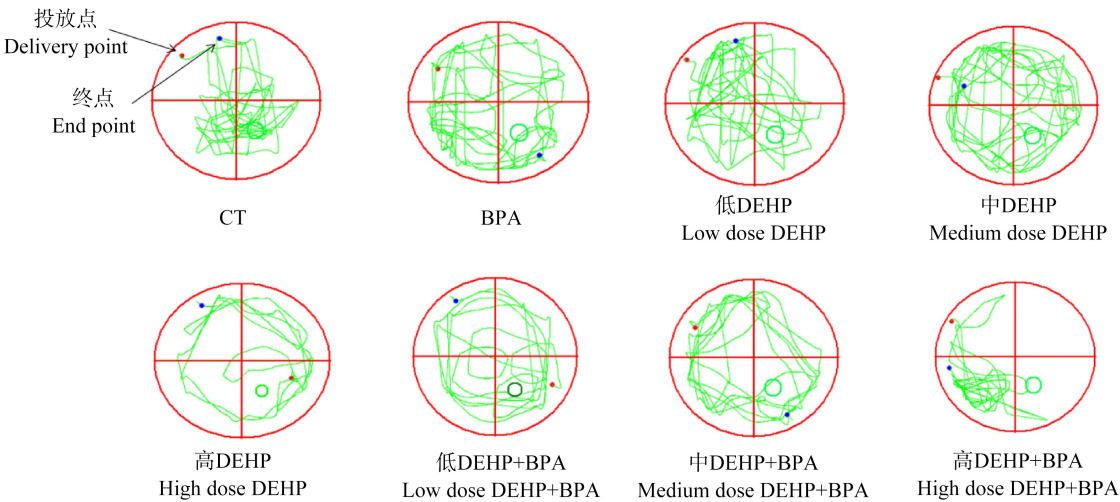


图 1 各组空间探索实验活动轨迹

Fig. 1 The trajectory of each group of space exploration experiments

2.2 避暗和跳台实验

与对照组相比, BPA 或 DEHP 单独染毒组以及联合染毒组的潜伏期缩短, 错误次数明显增加($P<0.05$), 联合染毒组与其对应的单独染毒组比较, 其逃避潜伏期与错误次数均具有统计学意义($P<0.05$)(图 2)。

2.3 小鼠脑组织 MDA 含量以及 MAO、AChE 和 CAT 活性的检测结果

与对照组相比, 染毒组 MDA 含量、MAO 和 AChE 活性逐渐增加, 脑组织中 CAT 活性逐渐降低, 具有显著差异性($P<0.05$); 联合染毒组与对应的单独染毒组相比, MDA 含量、MAO 和 AChE 活性明显

增加, CAT 活性明显降低($P<0.05$), 实测值超过其理论值, 表现为协同作用(表 3)。

2.4 小鼠脑组织 β 、 γ -分泌酶活性和 $A\beta_{1-42}$ 的含量
与对照组相比, 单独染毒组与联合染毒组的 β 、 γ -分泌酶活性和 $A\beta_{1-42}$ 的含量增多($P<0.05$), 联合染毒组与其对应的单独染毒组比较, β 、 γ -分泌酶活性和 $A\beta_{1-42}$ 的含量增加更明显($P<0.05$)(图 3)。

2.5 蛋白表达水平

与正常组对比, 单独染毒组 APP、PS1、BACE1 和 Tau 蛋白表达水平明显增强($P<0.05$), 其中, 联合染毒组 APP、PS1、BACE1 和 Tau 的蛋白表达水平明显高于单独染毒组($P<0.05$)(图 4)。

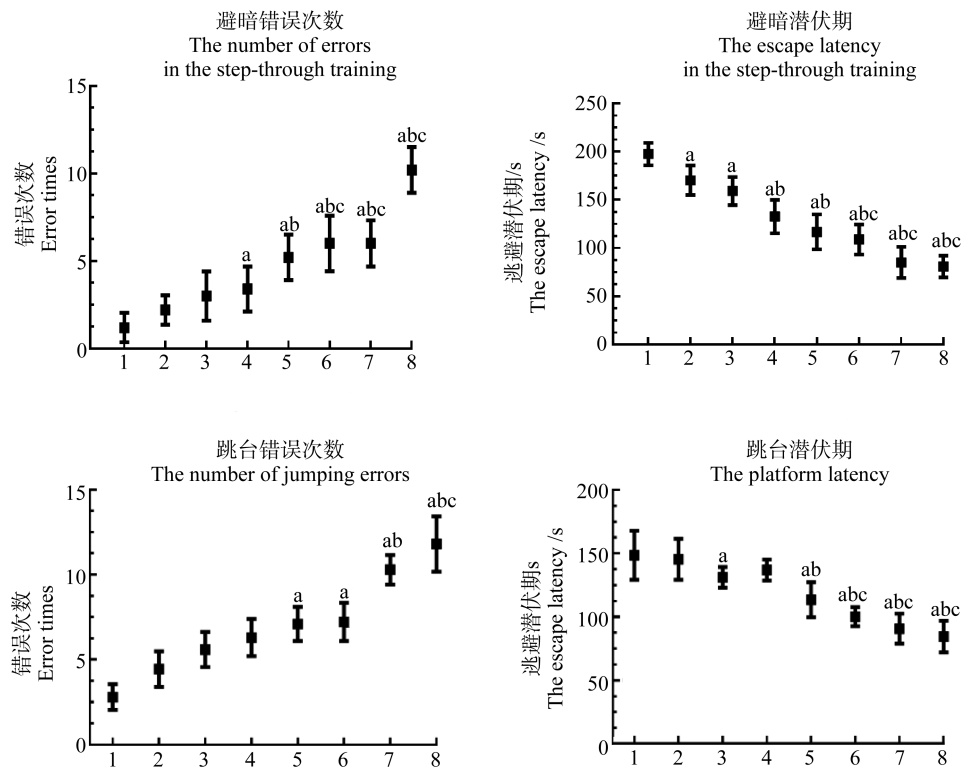


图 2 各组避暗、跳台实验潜伏期和错误次数的比较

注: a 表示与 CT 组比较, $P<0.05$; b 表示与 BPA 组比较, $P<0.05$; c 表示与相同剂量 DEHP 染毒组比较, $P<0.05$; 1 表示 CT 组, 2 表示 BPA 组, 3 表示低 DEHP 组, 4 表示中 DEHP 组, 5 表示高 DEHP 组, 6 表示低 DEHP+BPA 组, 7 表示中 DEHP+BPA 组, 8 表示高 DEHP+BPA 组。

Fig. 2 Comparison of the latency and the number of errors in the dark avoidance and platform jump experiments in each group

Note: a means compared with CT group, $P<0.05$; b means compared with BPA group, $P<0.05$; c means compared with the same dose of DEHP group, $P<0.05$; 1 indicates CT group; 2 indicates BPA group; 3 indicates low dose DEHP group; 4 indicates medium dose DEHP group; 5 indicates high dose DEHP group; 6 indicates low dose DEHP+BPA group; 7 indicates medium dose DEHP+BPA group; 8 indicates high dose DEHP+BPA group.

表 3 小鼠脑组织中丙二醛(MDA)含量、单胺氧化酶(MAO)、乙酰胆碱酯酶(AchE)和过氧化氢酶(CAT)活性的比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 3 Comparison of malondialdehyde (MDA) content and the activities of monoamine oxidase (MAO), acetylcholinesterase (AchE) and catalase (CAT) in mouse brain tissue ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	MDA	MAO	AchE	CAT
Group	$/(\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1})$	$/(\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$	$/(\text{U}\cdot\text{mL}^{-1})$	$/(\text{U}\cdot\text{g}^{-1})$
CT	1.07 ± 0.58	1.51 ± 0.17	1.23 ± 0.38	2.10 ± 0.27
BPA	1.40 ± 0.26	1.96 ± 0.64^a	1.86 ± 0.13^a	1.54 ± 0.49^a
低 DEHP Low dose DEHP	1.34 ± 0.33	1.74 ± 0.27	1.56 ± 0.14	1.65 ± 0.34
中 DEHP Medium dose DEHP	1.46 ± 0.48	2.11 ± 0.21^a	1.80 ± 0.35^a	1.52 ± 0.24^a
高 DEHP High dose DEHP	1.69 ± 0.34^a	2.04 ± 0.27^a	2.00 ± 0.26^a	1.24 ± 0.36^a
低 DEHP+BPA Low dose DEHP+BPA	1.78 ± 0.34^a	2.46 ± 0.18^{ab}	2.36 ± 0.55^{abc}	1.45 ± 0.33^a
中 DEHP+BPA Medium dose DEHP+BPA	2.00 ± 0.42^{abc}	2.69 ± 0.29^{abc}	2.60 ± 0.25^{abc}	1.21 ± 0.30^a
高 DEHP+BPA High dose DEHP+BPA	2.26 ± 0.23^{abc}	3.07 ± 0.22^{abc}	3.03 ± 0.38^{abc}	0.72 ± 0.46^{abc}

注: a 表示与 CT 组比较, $P<0.05$; b 表示与 BPA 组比较, $P<0.05$; c 表示与相同剂量 DEHP 染毒组比较, $P<0.05$ 。

Note: a means compared with CT group, $P<0.05$; b means compared with BPA group, $P<0.05$; c means compared with the same dose of DEHP group, $P<0.05$.

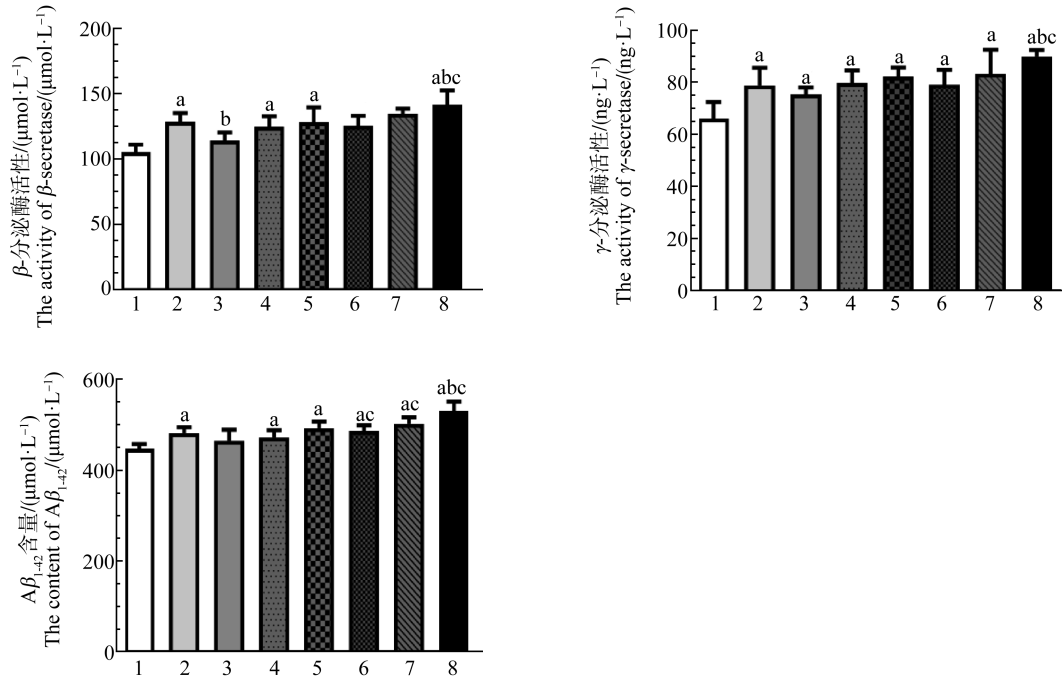


图 3 小鼠脑组织中 β -分泌酶、 γ -分泌酶活性和 $\text{A}\beta_{1-42}$ 含量

注:a 表示与 CT 组比较, $P<0.05$; b 表示与 BPA 组比较, $P<0.05$; c 表示与相同剂量 DEHP 染毒组比较, $P<0.05$; 1 表示 CT 组, 2 表示 BPA 组, 3 表示低 DEHP 组, 4 表示中 DEHP 组, 5 表示高 DEHP 组, 6 表示低 DEHP+BPA 组, 7 表示中 DEHP+BPA 组, 8 表示高 DEHP+BPA 组。

Fig. 3 The activities of β -secretase, γ -secretase and $\text{A}\beta_{1-42}$ content in mouse brain tissue

Note: a means compared with CT group, $P<0.05$; b means compared with BPA group, $P<0.05$; c means compared with the same dose of DEHP group, $P<0.05$; 1 indicates CT group; 2 indicates BPA group; 3 indicates low dose DEHP group; 4 indicates medium dose DEHP group; 5 indicates high dose DEHP group; 6 indicates low dose DEHP+BPA group; 7 indicates medium dose DEHP+BPA group; 8 indicates high dose DEHP+BPA group.

2.6 脑组织海马区 HE 染色结果

采用 HE 染色方法对小鼠进行脑组织石蜡切片并染色,观察其海马区形态变化及病理性特征。对照组形态正常,海马神经元细胞排列整齐,颜色较浅,形态正常;单独染毒组排列不规则且杂乱,染色颜色较深。联合染毒组与其对照组相比:其细胞核较多,颜色较深,呈现出更深的颜色,排列极不规则(图 5)。

3 讨论 (Discussion)

DEHP 与 BPA 经常联合暴露于职业环境和室内空气环境中,例如,化工行业用作原料生产的各类塑料制品、医疗器械和餐饮食品外包装等^[17-18],二者联合毒性作用值得探讨。

环境污染是近年来影响健康的不可忽视因素,日常暴露的环境污染物除了损伤呼吸系统、循环系统和肝脏系统外,大脑亦是其攻击的靶点之一^[19],AD 作为最常见的一种神经退行性疾病,与环境污染物的暴露存在密切关系。Feng 等^[20]的研究表明,DEHP 的潜在神经毒性机制可能与 cAMP-PKA-

ERK1/2-CREB 信号传导和 Ca^{2+} 信号传导途径协同介导相关,这与本实验发现的 APP 酶解通路异常存在潜在的关联性。DEHP 由于可以通过血脑屏障,接触后会在大脑中积累,通过调节突触前膜 Ca^{2+} 通道的活力对中枢神经系统产生影响;现有研究表明,DEHP 是一种过氧化物酶体增殖剂,通过激活生物体内过氧化物酶体增殖物从而激活受体(PAPR),使活性氧为主的各种自由基增加,从而导致氧化应激^[21-22],加速细胞凋亡,与本实验 MDA、CAT、MAO 和 AchE 等生化指标的检测结果相符。研究表明,BPA 通过影响神经元细胞的迁移,造成神经递质和突触可塑性的形成障碍,降低海马体中椎体神经元的树突棘密度,影响突触可塑性持续重塑,因此难以建立复杂的大脑神经网络^[23],从而引起认知功能障碍和学习记忆能力的衰退。

行为学实验结果表明,BPA 与 DEHP 均会对小鼠学习记忆能力产生消极影响,使其空间定位能力出现障碍,联合染毒组神经毒性作用明显高于单独染毒组,使用效应相加模型进行评价,表现为协同作用。

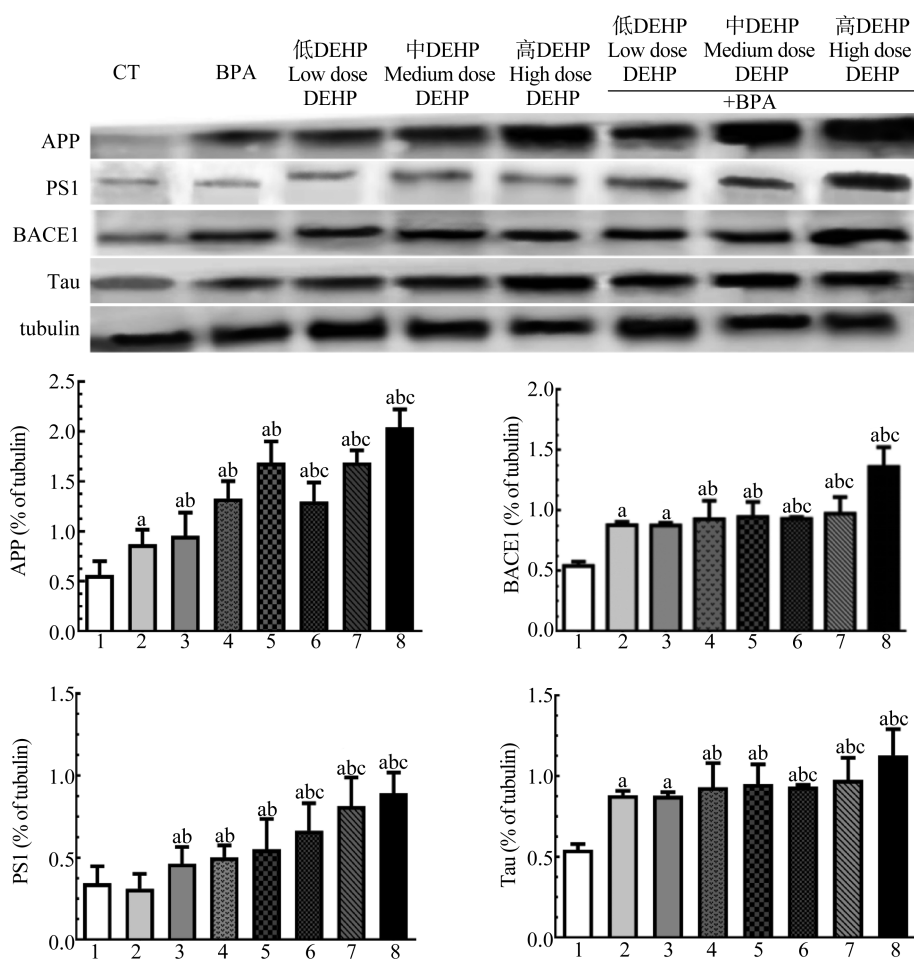


图 4 各组 APP、PS1、BACE1 和 Tau 蛋白表达

注: a 表示与 CT 组比较, $P < 0.05$; b 表示与 BPA 组比较, $P < 0.05$; c 表示与相同剂量 DEHP 染毒组比较, $P < 0.05$; 1 表示 CT 组, 2 表示 BPA 组, 3 表示低 DEHP 组, 4 表示中 DEHP 组, 5 表示高 DEHP 组, 6 表示低 DEHP+BPA 组, 7 表示中 DEHP+BPA 组, 8 表示高 DEHP+BPA 组。

Fig. 4 APP, PS1, BACE1 and Tau protein expression in each group

Note: a means compared with CT group, $P < 0.05$; b means compared with BPA group, $P < 0.05$; c means compared with the same dose of DEHP group, $P < 0.05$; 1 indicates CT group; 2 indicates BPA group; 3 indicates low dose DEHP group; 4 indicates medium dose DEHP group; 5 indicates high dose DEHP group; 6 indicates low dose DEHP+BPA group; 7 indicates medium dose DEHP+BPA group; 8 indicates high dose DEHP+BPA group.

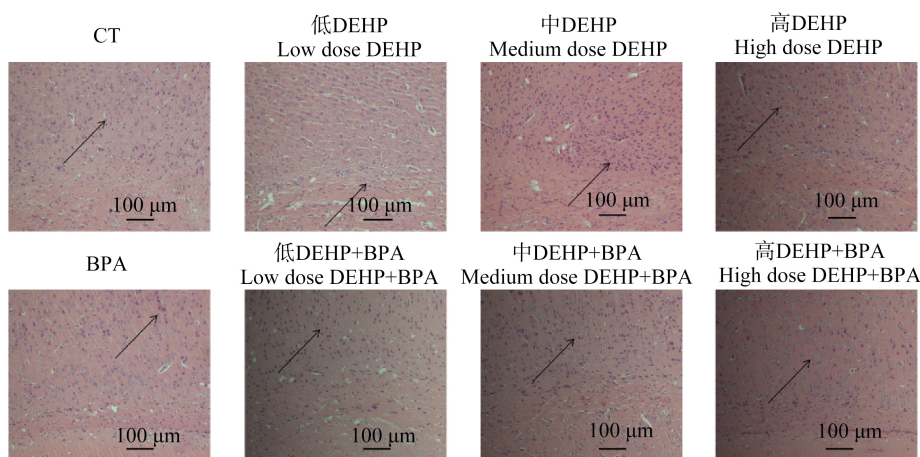


图 5 苏木精-伊红 (HE) 染色小鼠海马组织神经元形态

Fig. 5 Hematoxylin-Eosin (HE) staining neuron morphology of mouse hippocampus

为进一步探讨其毒性作用及机制,对MDA、CAT、MAO和AChE等生化指标进行检测。结果显示,随着DEHP浓度增加,MDA含量、MAO和AChE活性逐渐增加,联合染毒组MDA含量、MAO和AChE活性增加明显,实测值超过其理论值,表现为协同作用。联合染毒组与对照组及单独染毒组相比,脑组织中CAT活性逐渐降低,通过观察其活性可以判断经联合染毒处理的小鼠脑组织氧化应激损伤程度更高;提示联合染毒处理组的小鼠体内活性氧作用增加,抗氧化能力降低,抵抗衰老和认知功能障碍的能力减退^[24]。神经递质释放量的正常与稳定,是保证学习记忆能力的重要环节^[25-26];本实验中生化指标结果显示染毒处理组小鼠脑组织中单胺类神经递质与乙酰胆碱类神经递质含量减少,提示其发生学习记忆功能障碍。

秦晋等^[27]研究发现, DEHP 可引起 INS-1 细胞氧化应激, 使线粒体膜电位降低, 诱导细胞凋亡。异常的细胞代谢反过来会影响 β -淀粉样蛋白(amyloid,

A β)和过度磷酸化 Tau 蛋白的产生与积累,这会加剧线粒体功能障碍和活性氧(ROS)的产生,从而导致恶性循环^[28-29]。A β 由 APP 经过 β 、 γ -分泌酶水解产生,正常情况下 APP 经 α -分泌酶水解产生可溶性的 SAPP- α 和 CTF α ,此途径可阻止 A β 的形成和沉积^[30],而经过 γ -分泌酶水解会产生异常的 A β ,目前认为 A β_{1-42} 是细胞外淀粉样变性的主要成分,神经元内的病变也与 A β_{1-42} 相关。实验结果显示,各染毒处理组 β 、 γ -分泌酶活性增加,A β_{1-42} 含量增加,联合染毒组相比单独染毒组酶活性增加更为明显。

APP 酶解通路是造成学习记忆障碍和 AD 发病的关键机制,相关中枢神经系统过度磷酸化的 Tau 神经原纤维缠结(NFTs)和细胞外淀粉样老年斑(SP)是 AD 的主要病理变化特征^[29](图 6)。神经原纤维缠结的主要成分是异常沉积的 tau 蛋白,SP 的核心成分是 $A\beta^{[31-32]}$ 。本实验通过测定相关生化指标及蛋白表达发现 DEHP 与 BPA 联合染毒对小鼠学习记忆损伤作用与 APP 酶解通路异常有关。

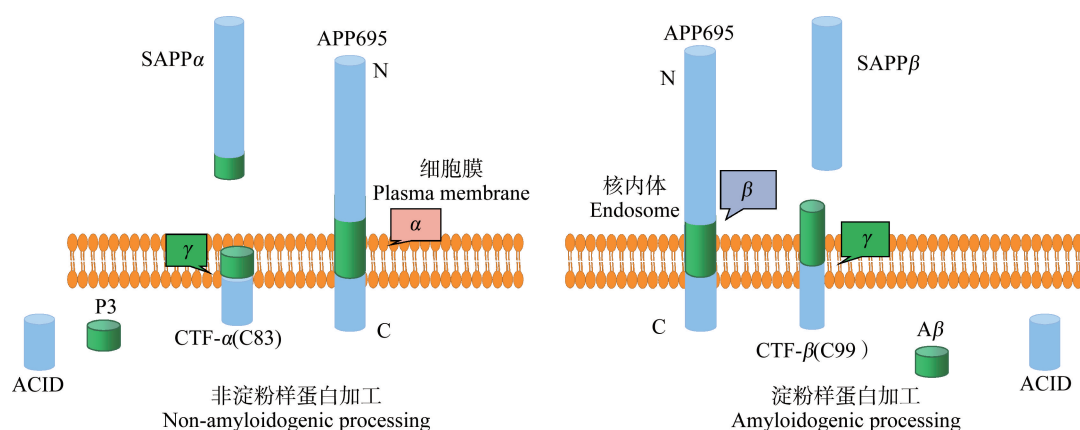


图6 淀粉样前体蛋白 (APP) 酶解通路示意图

Fig. 6 Schematic diagram of amyloid precursor protein (APP) processing pathway

联合染毒毒性作用评价目前主要有浓度加和模型(CA)、效应相加模型(ES)、独立作用模型(IA)和联合指数法(CI)^[15-16]。本次实验选择了效应相加模型判断,通过效应相加模型研究可知,DEHP 与 BPA 二者联合染毒,毒性作用增强,表现为协同作用,这与化学毒物自身的结构及内部相关反应结合有关,有待于进一步探讨。未来降低环境污染物的重要途径可以是研发 DEHP 和 BPA 的替代品,从根源上降低环境污染物对机体神经系统、生殖系统等方面的损害作用,从而降低和避免环境污染物联合暴露对人类造成的损害。

综上所述,BPA 与 DEHP 联合染毒对小鼠脑组织具有明显的神经毒性作用,其联合作用表现为协同作用,造成小鼠的认知功能障碍,损伤神经系统结构,机制可能与氧化应激及 APP 酶解通路异常相关,更深的分子生物学机制有待于进一步的研究。

通讯作者简介:许妍姬(1973—),女,博士,教授,主要研究方向为神经毒理学。

参考文献 (References):

- [1] 许昕月, 郭晶晶, 叶海伟. 消费型塑料制品中邻苯二甲

- 酸酯的暴露途径评估探讨[J]. 塑料工业, 2020, 48(S1): 156-161
- Xu X Y, Guo J J, Ye H W. The discussion on the exposure pathway assessment of phthalates for plastic products consumer use [J]. China Plastics Industry, 2020, 48(S1): 156-161 (in Chinese)
- [2] Yin J C, Liu R, Jian Z H, et al. Di (2-ethylhexyl) phthalate-induced reproductive toxicity involved in DNA damage-dependent oocyte apoptosis and oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 163: 298-306
- [3] 唐佳琦. 增塑剂邻苯二甲酸二乙基己酯对昆明小鼠神经行为学的影响[D]. 武汉: 华中师范大学, 2013: 6-7
- Tang J Q. Neurobehavioral changes of the Kunming mice exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate [D]. Wuhan: Central China Normal University, 2013: 6-7 (in Chinese)
- [4] 曹龙, 张朝升, 陈秋丽, 等. 邻苯二甲酸酯的环境污染和生态行为及毒理效应研究进展[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(2): 34-46
- Cao L, Zhang C S, Chen Q L, et al. Progress in the study of environmental pollution and ecological behavior and toxicological effects of phthalate ester [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(2): 34-46 (in Chinese)
- [5] 盖巧玥, 冷芳群, 王玉洁, 等. 外卖塑料包装餐盒中双酚 A 迁移风险初探[J]. 现代预防医学, 2020, 47(15): 2824-2827
- Gai Q Y, Leng F Q, Wang Y J, et al. Preliminary study on the migration risk of biophenol A for plastic package of take-out food [J]. Modern Preventive Medicine, 2020, 47(15): 2824-2827 (in Chinese)
- [6] 孙志宏, 白占涛, 陈小威, 等. 双酚 A 对小鼠肾组织的毒性研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009, 37(9): 23-26
- Sun Z H, Bai Z T, Chen X W, et al. Toxicity of systematic bisphenol A to mice kidney tissue [J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2009, 37(9): 23-26 (in Chinese)
- [7] 梁书秋, 陶亚楠, 李丹, 等. 双酚 A 对小鼠睾丸间质细胞毒性及 miR-203-3p 和 PI3K/AKT/FOXO1 信号通路的影响[J]. 实用药物与临床, 2020, 23(7): 584-588
- Liang S Q, Tao Y N, Li D, et al. Effects of bisphenol A on the toxicity and miR-203-3p and PI3K/AKT/FOXO1 signaling pathway in Leydig cells of mice [J]. Practical Pharmacy and Clinical Remedies, 2020, 23(7): 584-588 (in Chinese)
- [8] 王硕, 庄太凤. 双酚 A 对新生儿的健康危害[J]. 环境化学, 2020, 39(9): 2404-2412
- Wang S, Zhuang T F. Health effects of bisphenol A on newborns [J]. Environmental Chemistry, 2020, 39(9): 2404-2412 (in Chinese)
- [9] 楼张琪, 余起帆, 申雪知, 等. 孕鼠 DEHP 暴露对子代神经行为的影响及其机制[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2021, 47(2): 323-329
- Lou Z Q, Yu Q F, Shen X Z, et al. Effect of DEHP exposure in pregnant mice on neurobehavior of offsprings and its mechanism [J]. Journal of Jilin University: Medicine Edition, 2021, 47(2): 323-329 (in Chinese)
- [10] 朱奉敏. 增塑剂 DEHP 生物毒性及控制策略的研究进展[J]. 山西化工, 2020, 40(4): 29-30, 33
- Zhu F M. Research progress on biological toxicity and control strategy of plasticizer DEHP [J]. Shanxi Chemical Industry, 2020, 40(4): 29-30, 33 (in Chinese)
- [11] 吴凤娟, 林任, 孟沉, 等. 孕期和哺乳期双酚 A 暴露对雄性子代小鼠学习记忆能力的影响[J]. 中国医科大学学报, 2019, 48(10): 865-869
- Wu F J, Lin R, Meng Y, et al. Effect of bisphenol A exposure during pregnancy and lactation on learning and memory ability in male mice offspring [J]. Journal of China Medical University, 2019, 48(10): 865-869 (in Chinese)
- [12] 顾杰, 吉贵祥, 周林军, 等. 双酚 A 及其类似物的环境分布和毒性效应研究进展[J]. 环境与职业医学, 2020, 37(8): 826-832
- Gu J, Ji G X, Zhou L J, et al. Research progress on environmental distributions and toxic effects of bisphenol A and its analogues [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(8): 826-832 (in Chinese)
- [13] 白金, 张玉, 张娟, 等. 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯对雄性小鼠大脑皮质氧化损伤及 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响[J]. 中国工业医学杂志, 2020, 33(1): 46-48, 66
- Bai J, Zhang Y, Zhang J, et al. Effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on oxidative damage of cerebral cortex and expression of Bcl-2, Bax proteins in male mice [J]. Chinese Journal of Industrial Medicine, 2020, 33(1): 46-48, 66 (in Chinese)
- [14] 冯强伟. 孕期暴露邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯对雌性胎鼠神经发育性的影响[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2019: 35-38
- Feng Q W. Effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure during pregnancy on female fetal neurodevelopment [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2019: 35-38 (in Chinese)
- [15] 汪阅, 张胜男, 赵元慧, 等. 重金属铜和两种苯酚类化合物对大型蚤的联合毒性[J]. 东北师大学报: 自然科学版, 2019, 51(2): 140-143
- Wang Y, Zhang S N, Zhao Y H, et al. Study of joint tox-

- icity of copper and two substituted phenols to *Daphnia magna* [J]. Journal of Northeast Normal University: Natural Science Edition, 2019, 51(2): 140-143 (in Chinese)
- [16] Wei S, Wang F H, Chen Y J, et al. The joint toxicity effect of five antibiotics and dibutyl phthalate to luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*) [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25(26): 26504-26511
- [17] Ma Y, Liu H H, Wu J X, et al. The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms [J]. Environmental Research, 2019, 176: 108575
- [18] Chen M Y, Liu H P, Liu C H, et al. DEHP toxicity on vision, neuromuscular junction, and courtship behaviors of *Drosophila* [J]. Environmental Pollution, 2018, 243(Pt B): 1558-1567
- [19] Manivannan B, Yegambaram M, Supowit S, et al. Assessment of persistent, bioaccumulative and toxic organic environmental pollutants in liver and adipose tissue of Alzheimer's disease patients and age-matched controls [J]. Current Alzheimer Research, 2019, 16(11): 1039-1049
- [20] Feng W W, Liu Y C, Ding Y Y, et al. Typical neurobehavioral methods and transcriptome analysis reveal the neurotoxicity and mechanisms of di (2-ethylhexyl) phthalate on pubertal male ICR mice with type 2 diabetes mellitus [J]. Archives of Toxicology, 2020, 94(4): 1279-1302
- [21] 张婉, 胡珊, 许丁亮, 等. 孕期邻苯二甲酸二乙基己酯 (DEHP)暴露对胎儿生长发育的影响[J]. 长江大学学报: 自科版, 2016, 13(6): 78-81, 5
- Zhang W, Hu S, Xu D L, et al. Influences of prenatal exposure to DHEP on the abnormal fetal development [J]. Journal of Yangtze University: Natural Science Edition, 2016, 13(6): 78-81, 5 (in Chinese)
- [22] 李飞, 周静, 孙红梅, 等. 靶向TLR4的siRNA慢病毒感染减少过氧化氢诱导的心肌H9C2细胞凋亡及氧化损伤[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(6): 665-670
- Li F, Zhou J, Sun H M, et al. Targeting TLR4 siRNA lentivirus infection reduced cardiomyocyte apoptosis and oxidative damage induced by hydrogen peroxide [J]. Chinese Journal of Immunology, 2019, 35(6): 665-670 (in Chinese)
- [23] Santoro A, Chianese R, Troisi J, et al. Neuro-toxic and reproductive effects of BPA [J]. Current Neuropharmacology, 2019, 17(12): 1109-1132
- [24] Cui Y Z, Chang R X, Zhang T, et al. Chinese herbal formula (CHF₀₃) attenuates non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) through inhibiting lipogenesis and anti-oxidation mechanisms [J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10: 1190
- [25] Zhang X Y, Jing S, Lin H J, et al. Anti-fatigue effect of anwulignanviathe NRF₂ and PGC-1 α signaling pathway in mice [J]. Food & Function, 2019, 10(12): 7755-7766
- [26] Liu J X, Zhu M Y, Feng C Y, et al. Bamboo leaf extract improves spatial learning ability in a rat model with senile dementia [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2015, 16(7): 593-601
- [27] 秦晋, 李奕明, 刘雨薇, 等. 邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯对INS-1细胞氧化应激和凋亡的影响[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(4): 327-332
- Qin J, Li Y M, Liu Y W, et al. Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on apoptosis and oxidative stress of INS-1 cells [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(4): 327-332 (in Chinese)
- [28] Picone P, Nuzzo D, Giacomazza D, et al. *B*-amyloid peptide: The cell compartment multi-faceted interaction in Alzheimer's disease [J]. Neurotoxicity Research, 2020, 37(2): 250-263
- [29] Tönnies E, Trushina E. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease [J]. Journal of Alzheimer's Disease, 2017, 57(4): 1105-1121
- [30] Funamoto S, Tagami S, Okochi M, et al. Successive cleavage of β -amyloid precursor protein by γ -secretase [J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2020, 105: 64-74
- [31] 朱雯菲, 付朝旭, 代霖, 等. 刺五加提取液对小鼠学习记忆障碍和淀粉样前体蛋白酶解通路影响及作用机制[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(12): 2976-2981
- Zhu W F, Fu C X, Dai L, et al. Effect of *Acanthopanax* root extract on learning and memory impairment and amyloid precursor protein processing pathway in aging model mice [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2019, 39(12): 2976-2981 (in Chinese)
- [32] 付朝旭, 许妍姬. 鱼油联合锌硒对衰老模型小鼠学习记忆障碍及淀粉样前体蛋白酶解通路的保护作用[J]. 营养学报, 2020, 42(1): 56-60
- Fu Z X, Xu Y J. The protective effect of fish oil combined with selenium and zinc on learning and memory deficit and amyloid precursor protein processing in aged mice [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2020, 42(1): 56-60 (in Chinese)