双酚 S 对 BDNF/TrKB/CREB 信号通路的影响

刘慧伶　郭承熙　杨剪瑜　胡洁如　钟宇杰　张辉（通讯作者）
(长沙医学院　湖南长沙　410219)

摘要:目的:探讨双酚 S（bisphenol S, BPS）对 BDNF/TrKB/CREB 信号通路的影响。方法:选择 C37 雌性小鼠 50 只，随机选取 10 只做为正常空白对照组（A 组）其余 40 只则作为实验组，将造模成功的母鼠随机分为四组，每组 10 只，即阴性对照组（B 组）、30mg/mLBPS 组(C 组)、3mg/mLBPS 组（D 组）、0.3mg/mLBPS 组(E 组)，从 GD2 开始给予孕鼠含有 BPS 的药物喂养，至幼鼠出生后 21 d 结束，检测幼鼠海马组织病理形态、超微结构以及幼鼠海马组织中通路相关蛋白表达。结果:幼鼠出生后 21 d 组织病理学观察显示，与阴性对照组相比，C 组幼鼠海马组织可见明显空泡；超微结构结果表明，C 组幼鼠海马组织大量神经细胞凋亡，胞浆内可见肿胀的线粒体，突触数量减少；与 B 组相比，C、D、E 组 BDNF/TrkB 蛋白表达水平、CREB 磷酸化水平逐渐降低，差异有统计学意义（$P < 0.05$）。结论:BPS 引起妊娠小鼠子代海马组织活性下降，损害组织形态结构，BPS 干扰 BDNF/TrKB/CREB 信号通路，降低突触相关蛋白表达。
关键词:BPS；小鼠；BDNF；TrKB；CREB；突触

BPS，与双酚 A 结构类似，也被证明是外源性环境内分泌干扰物，被用作消费品中双酚 A 的替代品，因此 BPS 出现在多数日常生活消费用品中，如塑料，食品包装，婴儿奶瓶，玩具，牙科材料和个人护理用品等[1]。已有研究表明，BPS 具有急性毒性、内分泌干扰效应、神经毒性、生殖与发育毒性、心血管毒性、细胞与基因毒性与潜在的致癌性等[2]。其中，在神经毒性方面，BPS 能够影响神经细胞的发育，诱导神经细胞的凋亡[3]。因此本文通过对 BPS 结构及其功能的了解，来探讨 BPS 在神经发育方面存在的影响，为今后预防 BPS 提供相应的实验依据。

1.动物与方法

1.1 实验动物及主要材料

选择健康清洁、大小等量的 C37 雌性小鼠，共 50 只，所有小鼠饲养于长沙医学院动物房，环境温度 22~26℃，湿度 40%~70%，实验前小鼠可以自由进食、饮水，适应环境至少一周后开始实验，目的是为了稳定正常指标及代谢状况。主要材料：BPS，多聚甲醛溶液，戊二醛、四氧化锇、醋酸铀和枸橼酸铅等。

1.2 方法

1.2.1 小鼠模型的建立

随机选取 10 只做为正常空白对照组（A 组）其余 40 只则作为实验组，按雌雄比例 2:1 合笼，第 2 d 8: 00 检查雌鼠阴栓，发现有阴栓当天定为怀孕 1 d(GD1)，从 GD2 开始给予孕鼠含有 BPS 的药物喂养，至幼鼠出生后 21 d 结束。为了尽量减少实验处理之外的 BPA 暴露，我们使用聚苯乙烯鼠笼饲养动物，根据剂量采用药物饲养。

1.2.2 动物分组级处理

将造模成功的母鼠随机分为四组，每组 10 只，即阴性对照组（B 组）、30mg/mLBPS 组(C 组)、3mg/mLBPS 组（D 组）、0.3mg/mLBPS 组(E 组)，随机抽取 10 只为阴性对照组，将玉米油注入母鼠饲料中喂养。将 BPS 溶于二甲亚砜，配置成母液 30mL,将母液定容至 10mL(1.5mg/mL),再用稀释，最终配置成 0.3mg/mL 的应用液，将应用液注入小鼠饲料中。

1.3 检测指标

1.3.1 幼鼠海马组织病理形态观察

幼鼠出生后 21 d，采用颈椎脱臼法处死，取海马组织，制作病理玻片参照[4]，光学显微镜下观察

1.3.2 海马组织的超微结构的观察

取海马组织，制作玻片参照[5]，电镜下观察。

1.3.3 检测小鼠海马组织中通路相关蛋白表达

采用 WesternBlot 法检测小鼠海马组织中 TrKB/CREB 信号通路相关蛋白表达水平[6]，采用 ELISA 法检测小鼠海马组织中 BDNF 表达水平[7]。

1.4 统计分析

应用 SPSS24 进行统计学分析。

2 结果

2.1 BPS 暴露对幼鼠海马组织病理形态比较

幼鼠出生后 21 d 组织病理学观察显示，与阴性对照组相比，30mg/mL BPS 组(C 组)幼鼠海马组织可见明显空泡。具体见图 1。

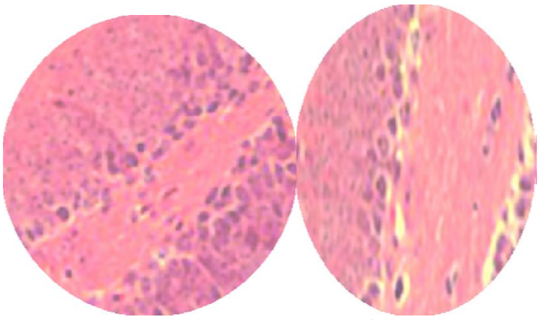

图 1 BPS 暴露对幼鼠脑组织病理形态观察

2.3 BPS 暴露对幼鼠海马组织超微结构的影响

结果表明，A、B 组幼鼠海马组织神经细胞结构基本正常，突触数量较多；C 组幼鼠海马组织细胞胞浆内可见肿胀的线粒体，突触数量明显减少；D 组幼鼠海马组织细胞胞浆内也可见肿胀的线粒体，突触数量和突触小泡较少；E 组幼鼠海马组织细胞胞浆电子密度增大，线粒体轻度肿胀，突触数量稍减少，突触小泡较丰富，具体见图 2。

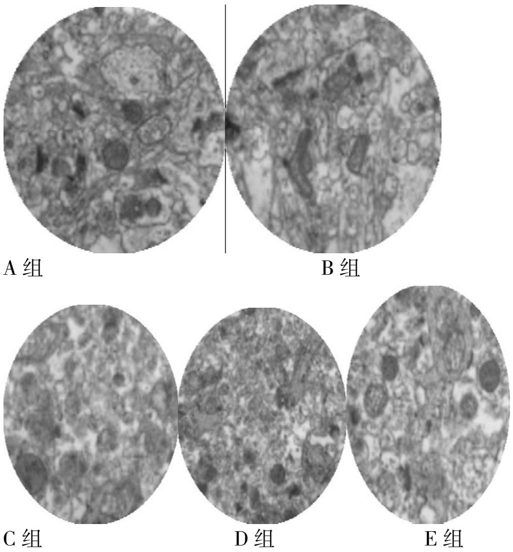

图 2 各组幼鼠海马组织在 BPS 暴露下超微结构观察

2.2 BPS 对 BDNF/TrkB/CREB 信号通路表达的影响

结果表明，随着 BPS 浓度的不断增加，BDNF/TrkB/CREB 蛋白表达水平不断减少；与 B 组相比，C、D、E 组 BDNF/TrkB 蛋白表达水平、CREB 磷酸化水平逐渐降低，差异有统计学意义（$P < 0.05$），具体见图 3、4。

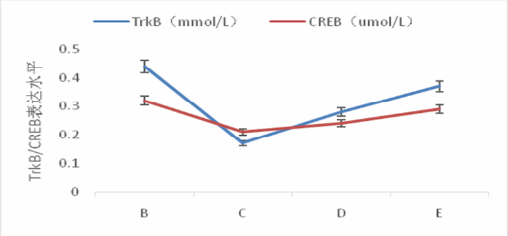

图 3 BPS 暴露下各组小鼠 TrkB/CREB 信号通路表达水平

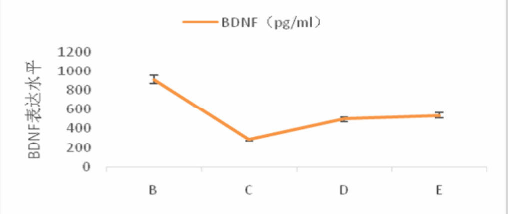

图 4 BPS 暴露下各组小鼠 BDNF 信号通路表达水平

3 讨论

脑源性神经营养因子(Brain derived neurotrophic factor), BDNF，一种脑内的碱性蛋白质，是神经营养因子家族的成员之一，其中以啮齿类动物大脑中最丰富、分布最广的神经营养因子，分布于整个中枢神经系统，主要位于大脑灰质区域，如皮层、海马和基底前脑，在早期和青少年大脑发育过程中发挥重要作用，并调节成熟大脑的学习和记忆过程[8]。在人类的成熟神经元和突触可塑性中起着至关重要的作用。BDNF 的合成，是由前体（pro BDNF）从细胞中分泌到细胞外空间，再通过各种细胞外蛋白酶，如丝氨酸蛋白酶、血纤维蛋白溶酶、基质金属蛋白酶（MMPs）生产合成，成为成熟的 BDNF 再通过于 TrKB 结合激活下游通路发挥生物作用[9]。BDNF 与特异性受体 TrKB 结合时，使 TrkB 受体内在的酪氨酸磷酸化，触发一系列级联信号传导，如丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路、磷酸肌醇-3-激酶（P13k）等信号通路[10]。总的来说，p75NTR 和 TrKB 受体的选择性分泌、或成熟 BDNF 的表达被认为是决定一个神经元是否存活[11]。由于细胞死亡和存活的调控对功能神经元回路的建立至关重要，因此成熟的 BDNF 的高表达水平被认为是中枢神经系统突触可塑性过程 的关键，BDNF mRNA 和蛋白质水平降低与许多神经系统疾病有关，如阿尔茨海默病、抑郁症、帕金森病或自闭症[12]。

CREB 是胚胎皮质脑内神经元细胞内 BDNF 诱导基因表达的重要因子，由 341 威氨基酸残基构成，C 端是天冬氨酸，N 端是蛋氨酸[13]。CREB 以去磷酸化的形式存在于细胞核中，此时并没有活动，它主要通过 133 位点而去磷酸化发挥抑制细胞凋亡、细胞分化再生，促进细胞损伤后修复进而发挥调节学习记忆等生物学效应[14]。许多研究表示，CREB 和 BDNF 具有相互作用，CREB 可促进 BDNF 转录，BDNF 同样也能促进 CREB 的转录[15]。BPS 可通过靶向 BDNF/TrKB/CREB 通路激活甲基化修饰、组蛋白修饰、非编码 RNA 调控和染色质重塑等[16]。DNA 甲基化还可降低下丘脑和海马的 BDNF 基因表达，导致 BDNF 蛋白表达水平下降[17]。本文研究表明，随着 BPS 浓度的不断增加，BDNF/TrkB/CREB 蛋白表达水平不断减少；与 B 组相比，C、D、E 组 BDNF/TrkB 蛋白表达水平、CREB 磷酸化水平逐渐降低，差异有统计学意义（$P < 0.05$），与以往研究基本一致。因此我们推测 BPS 干扰 BDNF/TrKB/CREB 信号通路，降低突触相关蛋白表达，并且可能具有剂量依赖性，其具体机理还需进一步的研究。

参考文献：

[1]雷鹏辉. 环境内分泌干扰物双酚 S 和双酚 F 对斑马鱼早期发育的免疫毒性效应及致毒机理[D].上海大学,2019.

[2]王英红,徐虹,孔庆鑫等.双酚 S 急性暴露对斑马鱼胚胎及子代胚胎发育的毒性效应[J].中国卫生检验杂志,2019,29(01):32-36.

[3]宋淑玲,马生明.双酚 S 毒理学、人体暴露水平与健康效应研究进展[J].环境化学,2018,37(02):200-208.

[4]何军琴,尹晓丹,辛明蔚.补肾调肝清心方对围绝经期抑郁症睡眠障碍大鼠模型海马 5-羟色胺 1A 受体、5-羟色胺 2A 受体的影响[J].环球中医药,2014,7(06):411-414.

[5]徐义勇,朱丽娟,田真真等.温胆汤对精神分裂症模型鼠 NRG1-ErbB4 信号通路及海马组织超微结构的影响[J].中华中医药学刊,2019,37(07):1612-1616+1805-1806.

[6]何丽玲,龙清华,胡慧等.大补元煎通过上调 BDNF/TrkB/CREB 信号通路改善 APP/PS1 双转基因痴呆小鼠海马突触可塑性[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(21):1-7.

[7]权伟,张辉,袁东亮等.舒肝解郁胶囊对 CUMS 小鼠 TRPC6、p-CREB 和 BDNF 表达的影响[J].西北药学杂志,2020,35(03):400-404.

[8]Bjorkholm C, Monteggia L M. BDNF – a key transducer of antidepressant effects [J]. Neuropharmacology, 2016, 102:72-79.

[9]Rantamaki T. TrkB neurotrophin receptor at the core of antidepressant effects, but how? [J]. Cell Tissue Res, 2019, 377(1): 115-124.

[10]Montroull L E, DaneloV, Cragnolini A B, et al. Loss of TrkB Signaling Due to Status Epilepticus Induces a proBDNF-Dependent Cell Death [J]. Front Cell Neurosci, 2019, 13:4.

[11]Liu S, LLiX, Gao J, et al. Icariside II, a Phosphodiesterase-5 Inhibitor, Attenuates Beta-Amyloid-Induced Cognitive Deficits via BDNF/TrkB/CREB Signaling [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(3): 985.

[12]Leey J, Kih R, L C Y, et al. 2-Phenylethylamine (PEA) Ameliorates Corticosterone-Induced Depression-Like Phenotype via the BDNF/TrkB/CREB Signaling Pathway [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(23): 9103.

[13]Wimmer M E, Cui R, Blackwkll J M, et al. CREB is Required in Excitatory Neurons in the Forebrain to Sustain Wakefulness [J]. Sleep, 2020, zsaa267.

[14]Sharma P, Kumar A, Singn D. Dietary Flavonoids Interaction with CREBBDNF Pathway: An Unconventional Approach for Comprehensive Management of Epilepsy [J]. Curr Neuropharmacol, 2019, 17(12): 1158-1175.

[15]Hogg S J, Beavis P A, Dawson M A, et al. Targeting the epigenetic regulation of antitumour immunity [J]. Nat Rev Drug Discov, 2020, 19(11): 776- 800.

[16]Kumara R, JAIN V, Kusnwan N, et al. Role of DNA Methylation in Hypobaric Hypoxia-Induced Neurodegeneration and Spatial Memory Impairment [J]. Ann Neurosci, 2018, 25(4): 191-200.

[17]Pang Q，Li Y，Meng L，et al. Neurotoxicity of BPA，BPS，and BPB for the hippocampal cell line （HT-22）: An implication for the replacement of BPA in plastics[J]. Chemosphere，2019，226 ：545-552.

第一作者：刘慧伶，女，汉族，本科在读，临床医学专业

通讯作者：张辉，男，汉族，博士，助教，研究方向：脑卒中

项目基金：2022 年湖南省大学生创新训练计划项目，湘教通（2022）174 号-4591