

双酚 S 对 BDNF/TrkB/CREB 通路损伤妊娠小鼠子代相关基因表达的影响

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 通路损伤妊娠小鼠子代相关基因表达的影响。方法:采用实时荧光定量核酸扩增检测系统(qPCR), 检测 BPS 在不同浓度下海马组织 BDNF、TrkB 及 CREB mRNA 相对表达水平的变化。结果:与 B 组相比, C、D、E 组 CREB mRNA 表达水平随着 BPS 剂量的增加而降低; 与 B 组比较, C 组幼鼠海马组织 BDNF、TrkB 及 CREB mRNA 相对表达量明显降低, 差异具有统计学意义(P<0.05)。结论:BPS 抑制 BDNF/TrkB/CREB 信号通路上主要基因的表达, 且可能与浓度依赖相关。

关键词: 双酚 S; BDNF/TrkB/CREB 通路; 妊娠小鼠子代

BDNF/TrkB/CREB 信号分子参与神经元发育、突触连接和长时程增强形成, 调节突触蛋白合成, 提高突触效能, 而且也是成熟的中枢及周围神经系统的神经元维持生存及正常生理功能所必需, 并在学习和记忆中扮演着重要的角色^[1]。本文采用不同浓度的 BPS 处理后, 观察妊娠小鼠子代 BDNF/TrkB/CREB 信号通路的表达, 并利用逆转录荧光定量 PCR (qRT-PCR) 进行检测, 以期为今后预防 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, 二甲亚砜, 聚苯乙烯, 逆转录荧光定量试剂盒等。

1.2 方法

1.2.1 小鼠模型的建立

建模方式, 以陈聪^[2]作为参考。

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/mL BPS 组 (C 组)、3mg/mL BPS 组 (D 组)、0.3mg/mL BPS 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 检测逆转录荧光定量 PCR (qRT-PCR)

取 20 mg 海马组织, 采用离心柱法提取总 RNA, 严格按照试剂盒说明书进行操作, 测定浓度, 将样本总 RNA 浓度稀释为 200 mg/L 后反转录为 cDNA, 加入扩增反应体系运用 RT-qPCR 法扩增, 40 个循环结束后采用 2 $\Delta\Delta$ Ct 法进行相对定量分析, 检测基因 mRNA 相对表达水平^[3]。取 20 mg 海马组织, 采用离心柱法提取总 RNA, 严格按照试剂盒说明书进行操作, 测定浓度, 将样本总 RNA 浓度稀释为 200 mg/L 后反转录

为 cDNA, 加入扩增反应体系运用 RT-qPCR 法扩增, 40 个循环结束后采用 2 $\Delta\Delta$ Ct 法进行相对定量分析, 以 β -actin 为内参, 检测基因 mRNA 相对表达水平。

基因名称	引物	产物长度 (dp)
BDNF	F:GCCCATGAAAAGAAGTAAACGTCC	136
	R:AGTGTACGCCAGTGATGTCGTC	
TrkB	F:AACGGAGACTACACCCTGATGG	251
	R:GCAATCACCACCACGGCATA	
CREB	F:TGGCTAACAATGGTACGGATGG	195
	R:GTGCTGTGCGGATCTGGTATGT	
β -actin	F:TAGAGCTATATAGCCCGG	118
	R:TAATTAGGTATGCTAGG	

1.4 统计分析

采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计分析。

2 结果

结果显示, 与 B 组相比, C、D、E 组 CREB mRNA 表达水平随着 BPS 剂量的增加而降低; 与 B 组比较, C 组幼鼠海马组织 BDNF、TrkB 及 CREB mRNA 相对表达量明显降低, 差异具有统计学意义 (P<0.05)。具体见表 1, 图 1。

表 1 各组幼鼠海马组织 BDNF、TrkB 及 CREB mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (只)	浓度 (mg/mL)	BDNF mRNA	TrkB mRNA	CREB mRNA
B	10	-	1	1	1
C	10	30	0.14 \pm 0.17	0.58 \pm 0.12	0.25 \pm 0.23
D	10	3	0.61 \pm 0.41	0.91 \pm 0.17	0.79 \pm 0.24
E	10	0.3	1.06 \pm 0.19	1.02 \pm 0.22	0.95 \pm 0.26

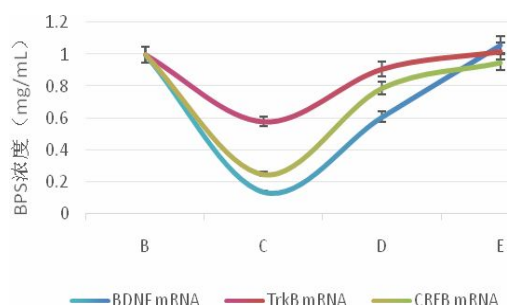


图1 各组幼鼠海马组织 BDNF、TrkB 及 CREB mRNA 表达趋势

3 讨论

BDNF 是神经营养因子家族的重要成员之一，在中枢神经系统、周围神经系统、内分泌系统、骨和软骨组织中广泛分布，在海马组织中表达最为丰富^[4]。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^[5]。研究表明^[6-7]，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。

BPS 能干扰神经递质受体表达，显著降低海马区相应受体蛋白及 mRNA 的表达量^[8]。BPS 也可靶向 BDNF/TrkB/CREB 通路，影响相关蛋白酶和相应病症。近年来，流行病学研究表明，环境中的双酚类物质与自闭症谱系障碍和精神分裂症等神经发育障碍疾病的发病存在相关关系^[9-10]。本研究显示，与 B 组相比，C、D、E 组 CREB mRNA 表达水平随着 BPS 剂量的增加而降低。因此，BPS 具有抑制 BDNF/TrkB/CREB 信号通路上主要基因的表达，且具有浓度依赖性。

参考文献：

[1]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.

[2]陈聪. BDNF/TrkB/CREB 信号通路在双酚 S 致 SK-N-SH 细胞毒性作用及机制研究[D].南华大学,2020.

[3]韩勇军,吴新荣.鱼藤素对斑马鱼胚胎 COX/EP 信号通路相关基因表达的影响[J].医药导报,2011,30(09):1129-1132.

[4]籍新潮,徐如祥.脑源性神经营养因子在中枢神经系统损伤中的多种神经保护作用及其机制的研究进展[J].中华神经创伤外科电子杂志,2016,2(03):168-172.

[5]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.

[6]Erickosn K I, Miller D L, Roecklein K A. The aging hippocampus: interactions between exercise, depression, and BDNF [J]. Neuroscientist, 2012, 18(1): 82-97.

[7]Wang H,Xu J,Lazarovici P,et al.cAMP Response Element-Binding Protein (CREB): A Possible Signaling Molecule Link in the Pathophysiology of Schizophrenia [J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11:255.

[8]Sathyanarayana S,Braun J M,Yolton K,et al.Case report:High prenatal bisphenol a exposure and infant neonatal neurobehavior [J].Environmental Health Perspectives,2011,119(8):1170-1175.

[9]Stein T P,Schluter M D,Steer R A,et al.Bisphenol A exposure in children with autism spectrum disorders[J].Autism Research,2015, 8(3):272-283.

[10]刘再腾,赵小余,张义宁等.双酚 A 及其替代物对肠-脑调节的潜在影响及相关机制研究进展 [J].生态毒理学报,2023,18(03):159-174.

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