

# 青春期双酚 A 暴露对老年 CD-1 小鼠海马 齿状回 Synaptotagmin 1 含量的影响

吴鹏超, 陈贵海\*, 葛海, 随旭  
(安徽医科大学第一附属医院神经内科, 合肥 230022)

**摘要:** 探讨青春期双酚 A 暴露对老年期齿状回 Synaptotagmin 1 (Syt 1) 含量的影响。结果显示, 18 月龄 CD-1 小鼠齿状回 Syt 1 相对含量显著高于 6 月龄小鼠 ( $P < 0.05$ ); 青春期双酚 A 暴露高剂量小鼠齿状回 Syt 1 表达量显著高于同年龄对照小鼠 ( $P < 0.05$ ), 雌鼠更明显。这些结果进一步支持小鼠海马 Syt 1 呈年龄相关性增加的结论, 青春期双酚 A 暴露可加剧这种增加。

**关键词:** 衰老; 双酚 A; 海马; 齿状回; Synaptotagmin 1

中图分类号: S865.13; R339.38

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)04-0597-04

## Effect of exposure to bisphenol A during puberty on synaptotagmin 1 level in dentate gyrus of dorsal hippocampus in the aged CD-1 mice

WU Pengchao, CHEN Guihai, GE Hai, SUI Xu

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract:** This study was to explore the effect of exposure to bisphenol A during puberty on synaptotagmin (Syt) 1 level in dentate gyrus of dorsal hippocampus in aged CD-1 mice. The results showed that the expression level of Syt 1 in the 18-month control mice was significantly higher than that in the 6-month control mice ( $P < 0.05$ ). The Syt 1 level of dentate gyrus in the 18-month mice exposed to bisphenol A during adolescent significantly increased compared to the same-age control mice ( $P < 0.05$ ), especially in the females. These results further supported the conclusion that the increase of Syt 1 was age-related in dorsal hippocampus. Bisphenol A exposure during puberty may exacerbate such an increase.

**Key words:** aging; bisphenol A; hippocampus; synaptotagmin-1

Syt 1 作为钙离子通道依赖的突触活性带蛋白, 是目前被研究的最多的 Syt 家族成员之一<sup>[1]</sup>。本课题组前期研究<sup>[2]</sup>表明, SAMP8 小鼠、C57BL/6 小鼠背海马 Syt1 含量随年龄增加而升高, 且与学习记忆能力损害呈正相关。双酚 A (Bisphenol A, BPA) 化学结构类似雌二醇, 是目前最常见的内分泌干扰物之一<sup>[3-4]</sup>, 其引起的健康安全问题的日益得到重视。已有研究表明安全剂量的 BPA 可影响脑和行为的发育, 而高剂量 BPA (20 mg/kg/day) 暴露对 C57BL 小鼠学习记忆能力有显著损害<sup>[4-5]</sup>。考虑到 Syt 1 与年龄相关性学习记忆损害的关系<sup>[2]</sup>, 而目前关于

BPA 暴露引起海马 Syt 1 表达变化尚未见报道, 我们探讨了青春期 BPA 暴露对老年 CD-1 小鼠背海马齿状 Syt 1 含量的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

60 只雌雄各半的 CD-1 小鼠购自安徽省医学实验动物中心 (3 周龄, 清洁级)。雄鼠单笼饲养, 雌鼠每 3~4 只一笼饲养。常规条件喂养, 自由进食、进水。饲养环境温度 20~25°C; 湿度 50%±5%; 每日早 7:00 开灯、晚上 7:00 关灯。适应性喂养 1

收稿日期: 2014-04-15

基金项目: 国家自然科学基金 (30872730, 81370444) 资助。

作者简介: 吴鹏超, 硕士研究生。

\* 通信作者: 陈贵海, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: chenguihai1964@163.com

周后(4周龄)的CD-1小鼠被随机分为3组:对照组、BPA高剂量组( $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、BPA低剂量组( $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),每组20只,雌雄各10只。各组均用统一规格饮水瓶,BPA溶解于1%酒精,然后配成上述2组浓度,供小鼠自由饮用,对照组正常饮用蒸馏水;每日定时清洗饮水瓶,更换溶液,防止BPA浓度变化。BPA组小鼠足4周龄时接受暴露,连续4周,足8周龄后饮水与对照组相同。该批小鼠饲养至17月龄时,再从安徽省医学实验动物中心引进健康清洁级5月龄CD-1小鼠20只(雌雄各半),饲养方式同上述对照组,作为青年对照组。1月后筛除各组中脱毛、肿块、运动障碍的小鼠,剩余小鼠进入行为(结果另行报告)和组织学检测。

### 1.2 主要试剂

抗Syt 1蛋白多克隆抗体(Sigma公司);生物素标记羊抗兔IgG S-P超敏试剂盒(SP-9001,北京中杉金桥生物科技有限公司分装,美国ZYMED公司);BPA购于美国Sigma公司。

### 1.3 标本制备

小鼠引白处死,冰上迅速开颅取脑,冰上迅速开颅取脑,置于4%的多聚甲醛溶液中固定、石蜡包埋。 $-20^{\circ}\text{C}$ 冷冻蜡块后连续冠状切片,片厚 $4.0\text{ }\mu\text{m}$ 。最终进入免疫组织化学法试验的标本有57个: BPA高剂量组13个(雄性8个、雌性5个)、BPA低剂量组15个(雄性8个、雌性7个)、老年空白对照组13个(雄性7个、雌性6个)、青年对照组16个(雄性8个、雌性8个)。

### 1.4 免疫组织化学染色

采用超敏S-P法进行免疫组化检测。组织芯片脱蜡、水化及抗原热修复后,每张切片滴加3滴3%

$\text{H}_2\text{O}_2$ 室温孵育10 min,滴加山羊血清或兔血清工作液 $37^{\circ}\text{C}$ 下封闭12 min。去除组织表面的血清封闭液后,每张切片滴加适量Syt 1多克隆抗体(抗体稀释度为1:600), $4^{\circ}\text{C}$ 恒温下过夜。滴加适量DAB显色,根据预实验在显微镜下观察染色情况,设定Syt 1染色3 min。切片经由梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固。

### 1.5 摄像和分析

选取染色较好海马结构完整的玻片,在 $10\times 20$ 倍显微镜下光学显微镜下拍摄海马DG区图像,以TIFF格式保存图像。用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统对DG区各个亚层的Syt 1表达量进行光密度值分析。各层的Syt 1相对含量用免疫反应产物光密度值表示。由于在选取各个标本的面积和形状的不同保持一致,故取平均光密度值作为Syt 1相对含量水平进行统计学分析。

### 1.6 统计学处理

实验数据通过检验符合正态分布,采用均数 $\pm$ 标准差表( $\bar{x}\pm S$ )表示。采用方差分析检验检测CD-1小鼠背海马齿状回各区各亚层Syt 1相对表达量的差异;检验水准设定为 $P<0.05$ 。所有数据均由SPSS 16.0统计软件完成统计分析。

## 2 结果与分析

光镜下观察海马齿状回结构,可见Syt 1在小鼠齿状回各层均有表达。老年对照组Syt 1免疫组化反应强于青年对照组,高剂量BPA处理组强于老年对照组。表1显示了Syt 1半定量分析的结果:①与青年对照组比较,老年对照组DG门区( $F_{(1,28)}=18.528$ , $P<0.001$ )、颗粒细胞层( $F_{(1,28)}=$

表1 各组小鼠CD-1小鼠海马齿状回不同亚层中Syt 1平均OD值

Table 1 Mean optical density of Syt 1 in the different subfields of dentate gyrus in dorsal hippocampus in the CD-1 mice

组别 Group		门区 Hilus	颗粒细胞层 Granulosum layer	分子层 Stratum molecula
BPA 高剂量组 Higher-dose mice	总计 Total	$0.151\pm 0.005^*$	$0.091\pm 0.005$	$0.111\pm 0.004^*$
	雄鼠 Male	$0.145\pm 0.006$	$0.097\pm 0.007$	$0.109\pm 0.007$
	雌鼠 Female	$0.162\pm 0.008^*$	$0.101\pm 0.003$	$0.114\pm 0.006^*$
BPA 低剂量组 Lower-dose mice	总计 Total	$0.137\pm 0.005$	$0.094\pm 0.005$	$0.101\pm 0.004$
	雄鼠 Male	$0.136\pm 0.007$	$0.087\pm 0.007$	$0.098\pm 0.006$
	雌鼠 Female	$0.144\pm 0.008$	$0.101\pm 0.005$	$0.104\pm 0.004$
青年对照组 Young control	总计 Total	$0.119\pm 0.004^*$	$0.076\pm 0.005^*$	$0.093\pm 0.003^*$
	雄鼠 Male	$0.125\pm 0.006^*$	$0.072\pm 0.008^*$	$0.092\pm 0.006^*$
	雌鼠 Female	$0.115\pm 0.007^*$	$0.080\pm 0.006^*$	$0.093\pm 0.003$
老年对照组 Old control	总计 Total	$0.135\pm 0.005$	$0.091\pm 0.005$	$0.101\pm 0.004$
	雄鼠 Male	$0.135\pm 0.006$	$0.083\pm 0.007$	$0.101\pm 0.007$
	雌鼠 Female	$0.135\pm 0.007$	$0.099\pm 0.004$	$0.100\pm 0.006$

\*  $P<0.05$ , 与老年对照组比较 Compared to the old controls.

13.561,  $P=0.001$ )、分子层 ( $F_{(1,28)}=9.855$ ,  $P=0.004$ ) Syt 1 相对含量显著升高; 分开性别进行比较, 老年对照组雌鼠 DG 门区 ( $F_{(1,13)}=9.63$ ,  $P=0.039$ )、颗粒细胞层 ( $F_{(1,13)}=7.349$ ,  $P=0.001$ ), 雄鼠 DG 门区 ( $F_{(1,14)}=8.832$ ,  $P=0.011$ )、颗粒细胞层 ( $F_{(1,14)}=6.11$ ,  $P=0.028$ )、分子层 ( $F_{(1,14)}=7.281$ ,  $P=0.018$ ) Syt 1 相对含量均显著升高。②与老年对照组比较, BPA 高剂量组在 DG 门区 ( $F_{(1,25)}=13.74$ ,  $P=0.001$ ) 和分子层 ( $F_{(1,25)}=4.305$ ,  $P=0.05$ ) Syt 1 相对含量显著升高; 同性别间比较, BPA 高剂量组雌性小鼠在 DG 门区 ( $F_{(1,10)}=10.944$ ,  $P=0.004$ )、分子层 ( $F_{(1,10)}=5.477$ ,  $P=0.044$ ) syt 1 相对含量显著升高。

### 3 讨论

海马脑区由于在学习与记忆过程中的重要作用而被广泛研究, 海马内存在一条主要的多突触连接通路: 来自内嗅皮层的穿通纤维进入齿状回, 经苔状纤维投射至 CA3 区, 再经 Schaffer 侧枝投射至 CA1, 最终经 CA1 投射至海马下脚。作为进入海马的首要通道, 齿状回调控从内皮层传入的兴奋性信号<sup>[6]</sup>, 对海马依赖型学习记忆产生重要作用<sup>[7]</sup>。这种海马依赖型的学习记忆能力对衰老敏感, 但机制不明确。

突触神经递质释放是实现它各种神经电生理功能的物质基础, 关键步骤是突触囊泡在突触活性带的锚定、预激、融合和膜的再循环, 这些过程需要许多蛋白的协调作用。任何过程的变化均有可能引起突触可塑性改变<sup>[8]</sup>, 影响神经递质的传递效率。Syt 1 被认为是快速相钙离子感受器<sup>[2]</sup>, 是调节融合的关键蛋白之一。本课题组前期研究表明 SAMP8 小鼠背海马 Syt 1 呈环路特异性升高, 且与老年性学习记忆能力减退及新物体再认能力改变相关<sup>[2, 9]</sup>, 胚胎期 LPS 暴露可以使 CD-1 鼠中年后背侧海马 Syt1 含量升高<sup>[10]</sup>。最近有研究证实全海马的 Syt 随年龄而增加<sup>[11]</sup>。本研究利用超敏 SP 法免疫组织化学技术测定了 Syt 1 相对含量, 结果显示 18 月龄比 6 月龄 CD-1 小鼠背海马齿状回门区、颗粒细胞层、分子层增加, 雌鼠更明显。这个结果与我们的放射状水迷宫结果一致(待另文发表, 证明 18 月龄 CD-1 小鼠的空间性学习记忆显著差于 6 月龄小鼠)。

成人疾病发育源假说认为在生命早期阶段暴露不良因素, 如有毒物质、炎症、缺氧等, 对成年后的各器官功能及疾病的发生发展有持续影响<sup>[12]</sup>。有研究发现围生期母体双酚 A 暴露影响子代大鼠<sup>[4]</sup>的学习记忆能力。目前尚未见青春期双酚 A 暴露对老

年期行为和脑生化改变的研究报告。青春期是脑和各种生命器官生长发育的关键阶段之一, 对外界因素易感性强, 尽管不如围生期。本研究发现 CD-1 小鼠青春期(第 4 至第 8 周龄, 相当于人类 10~18 岁)暴露不同剂量双酚 A, 到老年期它们的背海马齿状回各层 Syt 1 含量有显著改变。这种改变呈剂量依赖性, 雌鼠更明显。这些与对应的行为学结果一致: 也显示经过双酚 A 暴露的小鼠学习记忆能力减退重于同龄对照, 雌鼠也更严重。

青春期双酚 A 暴露加剧老年期 Syt 1 升高的可能机制是内分泌功能紊乱。双酚 A 是最常见的一类环境雌激素, 其化学结构与雌二醇类似。虽然在体内能模拟雌激素作用<sup>[13]</sup>, 但它不是真正的雌激素, 仅有弱雌激素活性, 然而, 双酚 A 与雌激素受体结合的亲和力是雌激素的 80 倍<sup>[14]</sup>。所以, 双酚 A 暴露会干扰正常状态下雌激素对学习记忆能力的增强作用<sup>[15]</sup>。这种干扰可能通过某种机制如表观修饰保持到生命晚期。

总之, 本研究提示 Syt 1 蛋白在背海马齿状回年龄相关性增加, 青春期双酚 A 暴露可以使 Syt 1 蛋白含量增加, 可能是加速脑衰老的机制之一。

### 参考文献:

- [1] Wierda K D, Sørensen J B. Innervation by a GABAergic neuron depresses spontaneous release in glutamatergic neurons and unveils the clamping phenotype of synaptotagmin-1[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2014, 34(6): 2100-2110.
- [2] Chen G H, Wang Y J, Qin S, et al. Age-related spatial cognitive impairment is correlated with increase of synaptotagmin 1 in dorsal hippocampus in SAMP8 mice[J]. *Neurobiol Aging*, 2007, 28(4): 611-618.
- [3] Anderson D J, Brozek E M, Cox K J, et al. Biomonitoring method for bisphenol A in human urine by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 953-954: 53-61.
- [4] Kim M E, Park H R, Gong E J, et al. Exposure to bisphenol A appears to impair hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory[J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(12): 3383-3389.
- [5] Luo G, Wei R, Niu R, et al. Pubertal exposure to bisphenol A increases anxiety-like behavior and decreases acetylcholinesterase activity of hippocampus in adult male mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 60: 177-180.
- [6] Hsu D. The dentate gyrus as a filter or gate: a look back and a look ahead[J]. *Prog Brain Res*, 2007, 163: 601-613.
- [7] Sahay A, Drew M R, Hen R. Dentate gyrus neurogenesis and depression[J]. *Prog Brain Res*, 2007, 163: 697-822.
- [8] Driscoll I, Hamilton D A, Petropoulos H, et al. The aging hippocampus: cognitive, biochemical and structural findings[J]. *Cereb Cortex*, 2003, 13(12): 1344-1351.

- [9] 杨启纲, 陈贵海. 年龄对 SAMP8 小鼠新物体再认能力的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2006, 33(2): 167-169.
- [10] 尹廷伟, 陈贵海, 杨启纲, 等. 胚胎晚期母体暴露 LPS 对子代中年 CD-1 子鼠背海马 Synaptotagmin I 含量的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2010, 37(4): 614-616.
- [11] Mohrmann R, de Wit H, Connell E, et al. Synaptotagmin interaction with SNAP-25 governs vesicle docking, priming, and fusion triggering[J]. *Neuroscience*, 2013, 33(36): 14417-14430.
- [12] 蒋文跃, 韩巍, 李志新. 成人疾病胎源说的证据及机制[J]. 北京大学学报, 2007, 39(1): 96-100.
- [13] Wolstenholme J T, Rissman E F, Connelly J J. The role of bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior[J]. *Horm Behav*, 2011, 59(3): 296-305.
- [14] Bhan A, Hussain I, Ansari K I, et al. Bisphenol-A and diethylstilbestrol exposure induces the expression of breast cancer associated long noncoding RNA HOTAIR in vitro and in vivo[J]. *Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 141: 160-170.
- [15] Luine V N, Richards S T, Wu V Y, et al. Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters[J]. *Horm Behav*, 1998, 34(2): 149-162.