

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.19.005

双酚 A 和邻苯二甲酸二丁酯暴露对雌性幼鼠青春期发育的影响^{*}

罗小娟¹, 曹 科^{1△}, 叶炳均¹, 陶明俊¹, 陈小文², 张 琴³, 陈运生¹

广东省深圳市儿童医院:1. 检验科;2. 儿科研究所;3. 内分泌科, 广东深圳 518038

摘 要:目的 研究双酚 A(BPA)和邻苯二甲酸二丁酯(DBP)对雌性幼鼠青春期发育的影响。方法 将 64 只 21 日龄 SD 雌性幼鼠用随机数字表法分为 BPA 干预组(BPA 0.25 mg/kg 灌胃 10 d)、DBP 干预组(DBP 50 mg/kg 灌胃 10 d)、BPA+DBP 干预组(BPA 0.20 mg/kg+DBP 40 mg/kg 灌胃 10 d)、雌二醇(E₂)组(E₂ 0.1 mg/kg 灌胃 10 d)、BPA 空白对照组(10 mL/kg 不含 BPA 的玉米油溶液灌胃 10 d)、DBP 空白对照组(10 mL/kg 不含 DBP 的玉米油溶液灌胃 10 d)、正常对照组(不做任何处理)和溶剂组(10 mL/kg 玉米油溶液灌胃 10 d),每组 8 只。观察幼鼠阴道开口时间(VOD),收集子宫、卵巢进行病理学检查,采用酶联免疫吸附试验检测血清卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)和 Kisspeptin 水平,采用实时荧光定量 PCR 检测下丘脑 KISS-1、G 蛋白偶联受体 54(GPR54)和卵巢雌激素受体(ER) α 、ER β mRNA 表达水平。结果 与正常对照组和溶剂组相比,BPA 干预组和 E₂ 组 VOD 提前,差异有统计学意义($P<0.05$)。BPA 干预组血清 LH、FSH、LH/FSH、E₂、Kisspeptin 水平明显高于 BPA 空白对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。E₂ 组血清 LH、FSH 和 Kisspeptin 水平明显低于正常对照组和溶剂组,差异有统计学意义($P<0.05$)。BPA 干预组下丘脑 KISS-1、GPR54 mRNA 表达水平明显高于 BPA 空白对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。E₂ 组下丘脑 KISS-1 和卵巢 ER β mRNA 表达水平明显低于正常对照组和溶剂组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 BPA 暴露可致雌性幼鼠性早熟,其致病机制可能与下丘脑 Kisspeptin-KISS-1/GPR54-促性腺激素释放激素信号传导和下丘脑-垂体-性腺轴提前激活有关。

关键词:双酚 A; 邻苯二甲酸二丁酯; 阴道开口时间; KISS-1; 雌性幼鼠; 性早熟

中图法分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)19-2803-06

Impact of exposure to bisphenol A and dibutyl phthalate on puberty development of female young rats^{*}

LUO Xiaojuan¹, CAO Ke^{1△}, YE Bingjun¹, TAO Mingjun¹,

CHEN Xiaowen², ZHANG Qin³, CHEN Yunsheng¹

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Children Research Institute;

3. Department of Endocrinology, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518038, China

Abstract:Objective To evaluate the impact of exposure to bisphenol A (BPA) and dibutyl phthalate (DBP) on puberty development of female young rats. **Methods** A total of 64 SD female young rats aged 21 days were divided into BPA intervention group (BPA 0.25 mg/kg gavage for 10 d), DBP intervention group (DBP 50 mg/kg gavage for 10 d), BPA+DBP intervention group (BPA 0.20 mg/kg+DBP 40 mg/kg gavage for 10 d), estradiol (E₂) group (E₂ 0.1 mg/kg gavage for 10 d), BPA blank control group (10 mL/kg corn oil solution without BPA gavage for 10 d), DBP blank control group (10 mL/kg corn oil solution without DBP gavage for 10 d), normal control group (without any treatment) and solvent group (10 mL/kg corn oil solution gavage for 10 d) by random number table method, 8 cases in each group. Observed the vaginal opening day (VOD) of young rats, collected uterus and ovaries for pathological examination. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect serum follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and Kisspeptin levels. Real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression levels of hypothalamic KISS-1, G protein-coupled receptor 54 (GPR54) and ovarian estrogen receptor (ER) α and ER β mRNA. **Results** Compared with normal control group and solvent group, the VOD of BPA intervention group and E₂ group was earlier, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The levels of serum LH, FSH,

^{*} 基金项目:广东省深圳市科技计划项目(JCYJ20180228175408411);广东省深圳市卫生和计划生育委员会科研项目(SZFZ2018054)。

作者简介:罗小娟,女,副主任技师,主要从事女童性早熟相关激素和机制研究。△ 通信作者,E-mail:cocoa526878@126.com。

本文引用格式:罗小娟,曹科,叶炳均,等.双酚 A 和邻苯二甲酸二丁酯暴露对雌性幼鼠青春期发育的影响[J].检验医学与临床,2021,18(19):2803-2808.

LH/FSH, E_2 and Kisspeptin in BPA intervention group were significantly higher than those in BPA blank control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The serum levels of LH, FSH and Kisspeptin in E_2 group were significantly lower than those in normal control group and solvent group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expression levels of hypothalamic KISS-1 and GPR54 mRNA in BPA intervention group were significantly higher than those in BPA blank control group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expression levels of hypothalamic KISS-1 and ovarian $ER\beta$ mRNA in E_2 group were significantly lower than those in normal control group and solvent group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** BPA exposure could cause precocious puberty in female young rats, and its pathogenic mechanism might relate to hypothalamic Kisspeptin-KISS-1/GPR54-gonadotropin releasing hormone signaling and early activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.

Key words: bisphenol A; dibutyl phthalate; vaginal opening day; KISS-1; female young rats; precocious puberty

近年来,女童性早熟发病率呈明显上升趋势,从人体血液、尿液等标本中检出的双酚 A (BPA)、邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 等环境内分泌干扰物 (EEDCs) 对女童青春期发育和内分泌的干扰作用,以及对生殖系统的毒性机制,引起公众和学术界的广泛关注。目前,研究认为 EEDCs 可通过受体和非受体介导途径模拟或拮抗内源性激素,并可干扰内源性激素的生物合成、分泌、转运、结合、反应和代谢等过程,从而对生物个体的生殖、神经和免疫系统等的功能产生影响,引起可逆或不可逆的生物学效应。BPA 和 DBP 在人类生活环境中广泛存在,是具有一定代表性的 EE-DCs。本研究以处于青春期启动前关键时期的雌性幼鼠 (生后第 21 天) 作为研究对象,通过灌胃的给药方式制备动物研究模型,探讨 BPA 和 DBP 是否可导致雌性幼鼠青春期启动提前,其机制是否与下丘脑-垂体-性腺轴和 Kisspeptin-KISS-1/G 蛋白偶联受体 54 (GPR54)-促性腺激素释放激素 (GnRH) 信号系统相关,以明确 BPA 和 DBP 对雌性幼鼠青春期发育的影响及作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料来源 经检疫合格的 1 日龄清洁级 SD 雌性幼鼠 14 窝 (共 153 只),购自广东省医学实验动物中心 (实验动物质量合格证明编号: 44007200025061),在无特定病原体 (SPF) 级饲养室饲养,饲养室温度、湿度等条件保持稳定,自由进食饮水,整个实验过程均用不含大豆异黄酮等植物雌激素的饲料喂养,饲料配方为玉米淀粉 32.0%,蔗糖 30.0%,酪蛋白 23.0%,纤维素 5.0%,玉米油 5.0%,93G 混合矿物质 3.5%,93G 混合维生素 1.0%,蛋氨酸 0.3%,氯化胆碱 0.2%,饲料质量合格证编号: No. 44200300007449。幼鼠于 21 日龄称取体质量,留取 64 只,用随机数字表法分成 8 组,分别为 BPA 干预组、DBP 干预组、BPA+DBP 干预组、雌二醇 (E_2) 组、BPA 空白对照组、DBP 空白对照组、正常对照组、溶剂组,每组 8 只,各组采用不同的处理方法。

1.2 仪器与试剂 BPA、DBP (分析纯 99%) 购于美国 Sigma 公司;玉米油 (溶剂) 购于益海嘉里投资有限

公司;血清卵泡刺激素 (FSH)、黄体生成素 (LH)、 E_2 和 Kisspeptin 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒购于上海心语生物科技有限公司;酶标分析仪购于深圳市汇松科技发展有限公司;总 RNA 提取试剂盒购于广州洪祥生物医药科技有限公司;合成 cDNA 和 PCR 反应试剂盒购于日本 Takara 公司;ABI 7900HT 荧光定量 PCR 仪购于美国赛默飞世尔公司;KISS-1、GPR54、雌激素受体 (ER) α 、 $ER\beta$ 引物由美国 Invitrogen 公司合成;其他生化试剂及耗材等均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 各组干预方法 (1) BPA 干预组: BPA 溶液每天灌胃 1 次,剂量为 0.25 mg/kg,连续干预 10 d,于幼鼠阴道开口当天处死; (2) DBP 干预组: DBP 溶液每天灌胃 1 次,剂量为 50 mg/kg,连续干预 10 d,于幼鼠阴道开口当天处死; (3) BPA+DBP 干预组: 0.20 mg/kg BPA 溶液+40 mg/kg DBP 溶液每天灌胃 1 次,连续干预 10 d,于幼鼠阴道开口当天处死; (4) E_2 组: E_2 溶液每天灌胃 1 次,剂量为 0.1 mg/kg,连续干预 10 d,以其作为阳性对照,于幼鼠阴道开口当天处死; (5) BPA 空白对照组: 每天给予 10 mL/kg 的不含 BPA 的玉米油溶液灌胃 1 次,处死 BPA 干预组时等比例处死; (6) DBP 空白对照组: 每天给予 10 mL/kg 的不含 DBP 的玉米油溶液灌胃 1 次,处死 DBP 干预组时等比例处死; (7) 正常对照组: 只观察不干预,于幼鼠阴道开口当天处死; (8) 溶剂组: 因为除正常对照组外,其余各组均以玉米油为溶剂,为排除玉米油对雌性幼鼠发育的影响,本研究特设溶剂组,每天给予 10 mL/kg 玉米油溶液连续灌胃 10 d,于幼鼠阴道开口当天处死。采用被毛染色法,在幼鼠体表不同部位的被毛涂染斑点,根据染色情况和笼具双重编号标记识别。每天称取幼鼠体质量,并根据体质量调整药物剂量。观察并记录幼鼠阴道开口时间 (VOD),处死时采用心脏穿刺采血,离心留取血清,留取卵巢、下丘脑组织置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下冰箱保存。同时取部分子宫和卵巢组织置于 4% 多聚甲醛溶液中保存,用于组织形态观察。

1.3.2 检测方法 采用 ELISA 检测 FSH、LH、E₂ 和 Kisspeptin 水平,按照试剂盒说明书步骤操作。取卵巢和子宫垂直横断面,常规石蜡包埋,切片,染色,光学显微镜下观察各组幼鼠卵巢和子宫组织形态。提取下丘脑和卵巢组织总 RNA,将 RNA 反转录为 cDNA。根据 SYBRGreen Real-Time PCR Master Mix 试剂盒说明书,检测下丘脑 KISS-1、GPR54 mRNA,卵巢 ER α 、ER β mRNA 和内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的表达情况。相关引物序列见表 1。

1.4 统计学处理 采用 SPSS23.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组基本资料比较 与正常对照组和溶剂组相比,BPA 干预组和 E₂ 组 VOD 提前,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组第 1 次给药前体质量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);BPA 干预组、BPA 空白对

照组和 E₂ 组处死时体质量低于其余各组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但 BPA 干预组和 BPA 空白对照组处死时体质量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。溶剂组与正常对照组 VOD、处死时体质量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 引物序列		
基因	引物序列(5'-3')	引物长度 (bp)
KISS-1	F:GATCTCGCTGGCTTCTTGGC	112
	R:GGACTGTTGGCCTGCGGGTT	
GPR54	F:GTCTCGGTGCAAGCCACATG	232
	R:CACCCAGATGCTGAGGCTGAC	
ER α	F:TGAAGCACAAGCGTCAGAGA	501
	R:CGTAGCCAGCAACATGTCAA	
ER β	F:GAAGCTGAACCACCCAATGT	210
	R:CAGTCCCACCATTAGCACCT	
GAPDH	F:CCC TCTATGAGGGTTACGC	150
	R:TTTAATGTCACGCACGATTTC	

注:F 为上游引物,R 为下游引物。

表 2 各组基本资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	VOD(d)	第 1 次给药前体质量(g)	处死时体质量(g)
BPA 干预组	8	31.13 $\pm$ 2.64	60.80 $\pm$ 2.28	103.48 $\pm$ 27.56
BPA 空白对照组	8	—	61.58 $\pm$ 5.19	106.18 $\pm$ 23.18
DBP 干预组	8	35.50 $\pm$ 3.34	61.63 $\pm$ 3.18	138.23 $\pm$ 15.24 ^{abc}
DBP 空白对照组	8	—	61.47 $\pm$ 4.29	139.12 $\pm$ 9.86 ^{abc}
BPA+DBP 干预组	8	36.50 $\pm$ 1.93	60.92 $\pm$ 3.74	137.56 $\pm$ 17.37 ^{abc}
E ₂ 组	8	25.13 $\pm$ 0.35	60.78 $\pm$ 4.12	98.92 $\pm$ 11.31
正常对照组	8	35.25 $\pm$ 1.83 ^{ab}	60.56 $\pm$ 4.04	139.38 $\pm$ 5.63 ^{abc}
溶剂组	8	35.13 $\pm$ 2.03 ^{ab}	61.27 $\pm$ 4.02	139.26 $\pm$ 8.76 ^{abc}

注:与 BPA 干预组比较,^a $P < 0.05$;与 E₂ 组比较,^b $P < 0.05$;与 BPA 空白对照组比较,^c $P < 0.05$;—表示无数据。

2.2 各组血清性激素水平比较 BPA 干预组血清 LH、FSH、LH/FSH、E₂、Kisspeptin 水平明显高于 BPA 空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),且 BPA 干预组 LH/FSH >1 ,提示性发育已启动。BPA 干预组血清 LH、FSH、LH/FSH、E₂、Kisspeptin 水平与正常对照组和溶剂组相比,差异无统计学意义($P >$

0.05)。E₂ 组血清 LH、FSH 和 Kisspeptin 水平明显低于正常对照组和溶剂组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。溶剂组与正常对照组血清 LH、FSH、LH/FSH、E₂、Kisspeptin 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 各组血清性激素水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	LH(ng/L)	FSH(ng/L)	LH/FSH	E ₂ (ng/L)	Kisspeptin(pg/mL)
BPA 干预组	8	8.26 $\pm$ 0.58	6.72 $\pm$ 0.60	1.23 $\pm$ 0.09	14.75 $\pm$ 0.87	12.76 $\pm$ 1.29
BPA 空白对照组	8	4.84 $\pm$ 1.35 ^a	5.48 $\pm$ 0.93 ^a	0.88 $\pm$ 0.19 ^a	9.74 $\pm$ 0.48 ^a	8.08 $\pm$ 0.60 ^a
DBP 干预组	8	7.96 $\pm$ 0.76	6.68 $\pm$ 0.81	1.19 $\pm$ 0.14	13.97 $\pm$ 0.79	12.48 $\pm$ 0.74
DBP 空白对照组	8	8.06 $\pm$ 0.52	6.85 $\pm$ 0.74	1.21 $\pm$ 0.24	14.04 $\pm$ 0.86	11.96 $\pm$ 0.84
BPA+DBP 干预组	8	8.24 $\pm$ 0.56	6.62 $\pm$ 0.83	1.24 $\pm$ 0.12	14.37 $\pm$ 0.74	12.28 $\pm$ 0.64
E ₂ 组	8	5.76 $\pm$ 1.05	5.68 $\pm$ 0.82	1.02 $\pm$ 0.19	14.91 $\pm$ 0.48	9.36 $\pm$ 0.58
正常对照组	8	8.13 $\pm$ 0.46 ^b	6.59 $\pm$ 0.73 ^b	1.26 $\pm$ 0.14	14.27 $\pm$ 0.76	12.50 $\pm$ 0.68 ^b
溶剂组	8	8.28 $\pm$ 0.57 ^b	6.93 $\pm$ 0.72 ^b	1.19 $\pm$ 0.12	14.63 $\pm$ 0.78	12.56 $\pm$ 1.08 ^b

注:与 BPA 干预组比较,^a $P < 0.05$;与 E₂ 组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.3 子宫、卵巢组织病理学检查结果 BPA 空白对照幼鼠卵巢皮质可见各级卵泡,以原始卵泡及生长卵泡居多,未见黄体;子宫体积较小,黏膜上皮排列整齐,可见少量腺体,见图 1~2。BPA 干预组幼鼠卵巢皮质可见大量生长卵泡,少量闭锁卵泡、成熟卵泡及黄体;子宫体积增大,子宫壁增厚,腺体增多,幼鼠性发育提前,见图 3~4。溶剂组和正常对照组幼鼠子宫内膜及腺体、卵巢内各级卵泡数量和形态大致正常,见图 5~6。与溶剂组和正常对照组相比, E_2 组幼鼠在出现阴道开口时,子宫内膜厚度和腺体发育成熟度,以及卵巢内卵泡数量和黄体发育程度明显降低,见图 7~8。BPA 干预组、DBP 干预组、BPA+DBP 干预组幼鼠子宫内膜及腺体、卵巢内各级卵泡数量和形态均未见明显病理学改变。

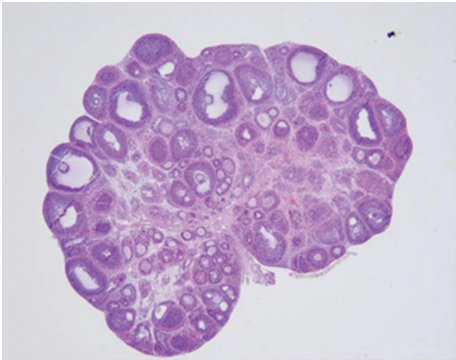


图 1 BPA 空白对照组幼鼠卵巢组织 HE 染色图片($\times 40$)

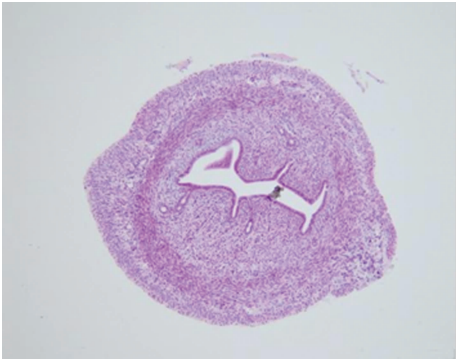


图 2 BPA 空白对照组幼鼠子宫组织 HE 染色图片($\times 100$)

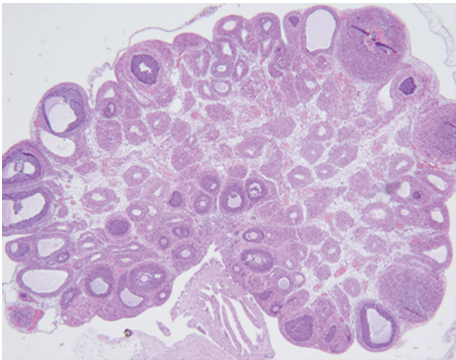


图 3 BPA 干预组幼鼠卵巢组织 HE 染色图片($\times 40$)

2.4 各组下丘脑 KISS-1、GPR54 和卵巢 $ER\alpha$ 和 $ER\beta$ mRNA 表达水平比较 BPA 干预组下丘脑 KISS-1、GPR54 mRNA 表达水平明显高于 BPA 空白

对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);BPA 干预组下丘脑 KISS-1、GPR54 mRNA 表达水平与正常对照组和溶剂组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。 E_2 组下丘脑 KISS-1 和卵巢 $ER\beta$ mRNA 表达水平明显低于正常对照组和溶剂组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。

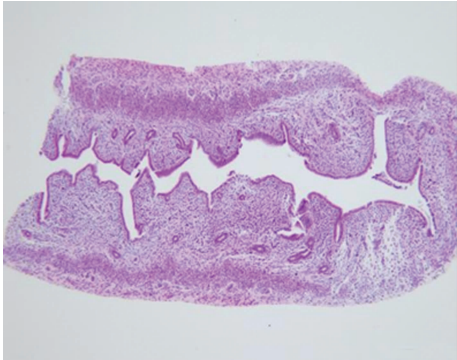


图 4 BPA 干预组幼鼠子宫组织 HE 染色图片($\times 100$)

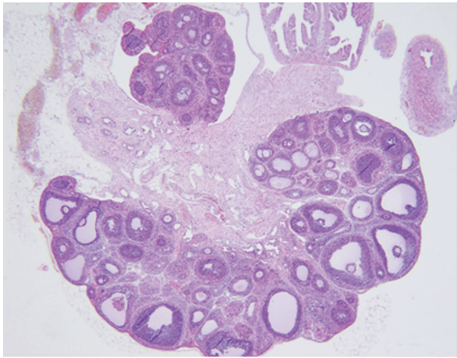


图 5 溶剂组幼鼠卵巢组织 HE 染色图片($\times 40$)

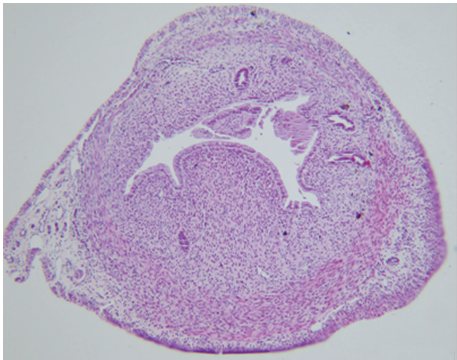


图 6 溶剂组幼鼠子宫组织 HE 染色图片($\times 100$)

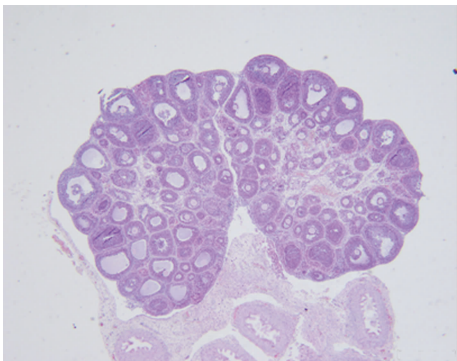


图 7 E_2 组幼鼠卵巢组织 HE 染色图片($\times 40$)

表 4 各组下丘脑 KISS-1、GPR54 和卵巢 ER α 、ER β mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	KISS-1 mRNA	GPR54 mRNA	ER α mRNA	ER β mRNA
BPA 干预组	8	1.74 $\pm$ 0.40	1.41 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.24	1.04 $\pm$ 0.18
BPA 空白对照组	8	1.00 $\pm$ 0.17 ^a	0.97 $\pm$ 0.42 ^a	0.87 $\pm$ 0.38	0.94 $\pm$ 0.34
DBP 干预组	8	1.68 $\pm$ 0.34	1.38 $\pm$ 0.17	0.98 $\pm$ 0.18	1.00 $\pm$ 0.21
DBP 空白对照组	8	1.72 $\pm$ 0.24	1.42 $\pm$ 0.28	0.86 $\pm$ 0.25	0.95 $\pm$ 0.22
BPA+DBP 干预组	8	1.74 $\pm$ 0.40	1.39 $\pm$ 0.10	1.08 $\pm$ 0.34	1.05 $\pm$ 0.28
E ₂ 组	8	1.16 $\pm$ 0.15	1.38 $\pm$ 0.32	0.92 $\pm$ 0.19	0.56 $\pm$ 0.18
正常对照组	8	1.71 $\pm$ 0.32 ^b	1.32 $\pm$ 0.12	1.02 $\pm$ 0.21	0.98 $\pm$ 0.18 ^b
溶剂组	8	1.69 $\pm$ 0.40 ^b	1.40 $\pm$ 0.24	0.86 $\pm$ 0.32	1.04 $\pm$ 0.26 ^b

注:与 BPA 干预组比较,^a $P<0.05$;与 E₂ 组比较,^b $P<0.05$ 。

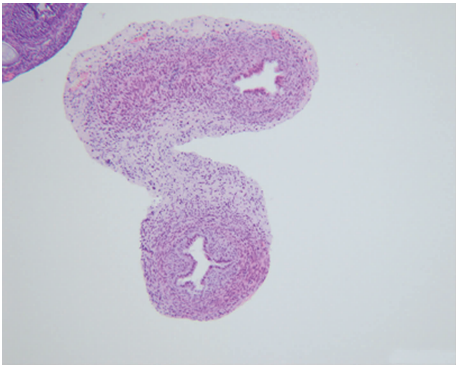


图 8 E₂ 组幼鼠子宫组织 HE 染色图片($\times 100$)

3 讨 论

个体青春期发育和性启动过程受遗传基因、营养代谢和生活环境等多因素调控^[1-2],近年来,生存环境中广泛存在的痕量持久性有机物和 EEDCs 备受关注^[3-4],其中,BPA 和 DBP 是世界上产量位于前列的有机化工原料,广泛存在于人类生活环境和日常用品中,具有类雌激素样干扰作用和内分泌生殖毒性,且存在低剂量效应和联合作用^[5-8]。以文献[9-11]为主要参考依据,本研究分别选择 BPA 0.25 mg/kg,DBP 50 mg/kg,BPA 0.20 mg/kg+DBP 40 mg/kg 为干预剂量,上述剂量为在人群日常暴露范围内,生殖毒性实验研究中较低的剂量。美国以每日接触量 ≤ 0.05 mg/kg 作为人类 BPA 暴露的“安全剂量”,按照等效药物剂量换算,实验鼠药物剂量约为人类的 5 倍,即 0.25 mg/kg^[12]。本研究结果显示,0.25 mg/kg BPA 可致处于青春期启动前关键时期的雌性幼鼠 VOD 提前,导致雌性幼鼠性早熟,与 WANG 等^[13]的研究结果一致,值得引起重视。但是目前 BPA 引起性早熟的有效剂量范围和剂量效应关系有待进一步研究。DBP 50 mg/kg、联合干预(BPA 0.20 mg/kg+DBP 40 mg/kg)均未引起 VOD 提前,可能与其剂量有关,且二者联合在生物体内存在相互拮抗而非协同作用。研究报道,EEDCs 存在“U”效应现象,即在一定的剂量范围内,剂量-效应曲线的斜率发生正负转换^[14-15]。不同组合的 EEDCs,其联合效应也可随剂量改变发生协同或拮抗双向改变。

青春期发育由下丘脑-垂体-性腺轴的启动激活引起,由基因 KISS-1 编码的神经递质 Kisspeptin 是下丘脑 GnRH 最重要的调控因子,Kisspeptin 与内源性受体蛋白 GPR54 结合后能刺激 GnRH 的释放,并且其促性腺激素效应的基本位点是在下丘脑 GnRH 神经元内,且该效应是唯一通过 GPR54 介导表达实现的^[16]。下丘脑 Kisspeptin-KISS-1/GPR54-GnRH 信号系统的激活,ER 表达增加并反馈调节 GnRH 神经元,性激素 LH、FSH 水平随之升高,进而作用于性腺靶器官,启动青春期发育。阴道开口是雌性幼鼠性发育启动的外在标志,是判断青春期发育启动的重要标准。本研究结果显示,0.25 mg/kg BPA 可引起雌性幼鼠 VOD 提前,BPA 干预组血清 LH、FSH、LH/FSH、E₂、Kisspeptin 水平,下丘脑 KISS-1、GPR54 mRNA 表达水平明显高于 BPA 空白对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),BPA 的毒性机制可能涉及下丘脑 Kisspeptin-KISS-1/GPR54-GnRH 信号传导和下丘脑-垂体-性腺轴提前激活,中枢性关键基因 KISS-1 和蛋白 Kisspeptin 提前表达,导致青春期发育启动和性发育提前(性早熟)。但 BPA 干预组下丘脑 KISS-1、GPR54 mRNA 表达水平,血清 Kisspeptin、性激素水平与正常对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),提示 BPA 干预并未破坏雌性幼鼠青春期发育启动的中枢性关键环节 Kisspeptin-KISS-1/GPR54 信号系统,其下丘脑-垂体-性腺轴启动过程和效应并未发生明显改变,推测 BPA 暴露引起 VOD 提前并不是直接通过改变 KISS-1 基因表达来实现^[17],可能与其上游调控因子或 GnRH 相关抑制因素破坏相关,提示青春期启动涉及兴奋和抑制双向有序调节的多基因功能网络系统,其确切机制有待进一步实验验证。

本研究将 E₂ 暴露作为雌性幼鼠 VOD 提前和卵巢发育异常的阳性对照^[17]。结果显示,E₂ 组 VOD 提前,但与 BPA 干预组不同的是,E₂ 组雌性幼鼠在出现阴道开口时,其下丘脑 KISS-1 和卵巢 ER β mRNA 表达水平,血清 LH、FSH 和 Kisspeptin 水平,子宫内膜

厚度和腺体发育成熟度,以及卵巢内卵泡数量和黄体发育程度均明显低于正常对照组和溶剂组。以上结果表明高水平的 E₂ 暴露可对处于青春期启动前关键时期的雌性幼鼠下丘脑、子宫、卵巢发育造成严重影响,推测其可能机制与 E₂ 暴露导致雌性幼鼠下丘脑 KISS-1 基因神经元应对性激素正反馈通路破坏有关;也可能是通过性腺、类固醇代谢、转运蛋白或受体途径干扰内源性类固醇生成,高水平 E₂ 通过负反馈调控机制抑制下丘脑 GnRH 分泌,甚至破坏 GnRH 脉冲发生器的正常功能,从而使 LH 和 FSH 的正常分泌受到影响,干扰和破坏下丘脑-垂体-性腺轴的正常功能。溶剂组 VOD、第 1 次给药前体质量、处死时体质量、性激素水平,下丘脑 KISS-1、GPR54 和卵巢 ER α 、ER β mRNA 表达水平与正常对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),可基本排除溶剂本身对幼鼠青春期发育和性腺器官的影响。

综上所述,BPA 暴露可致雌性幼鼠性早熟,其致病机制可能与下丘脑 Kisspeptin-KISS-1/GPR54-GnRH 信号传导和下丘脑-垂体-性腺轴提前激活有关,但尚需进一步对剂量效应关系,以及其确切的分子生物学和表观遗传学致病机制进行深入探讨,以避免 EEDCs 对女童性早熟等生长发育的干扰和生殖毒性危害。

参考文献

[1] LIVADAS S,CHROUSOS G P. Control of the onset of puberty[J]. Curr Opin Pediatr,2016,28(4):551-558.

[2] LEKA-EMIRI S,CHROUSOS G P,KANAKA-GANTENBEIN C. The mystery of puberty initiation:genetics and epigenetics of idiopathic central precocious puberty (ICPP)[J]. J Endocrinol Invest,2017,40(8):789-802.

[3] 苏普玉,徐耿,韩阿珠,等. 下丘脑 Polycomb 蛋白关键基因甲基化在孕期双酚 A 暴露致子代雌鼠青春期发育提前中的作用[J]. 中华预防医学杂志,2019,53(3):303-308.

[4] 张秋菊,曹林波,翁少梅,等. 固相微萃取-高效液相色谱法测定牛奶和肉类中己烯雌酚、丙酸睾酮和双酚 A[J]. 中国卫生检验杂志,2017,27(5):635-638.

[5] ÖZGEN I T,TORUN E,BAYRAKTAR-TANYERI B,et al. The relation of urinary bisphenol A with kisspeptin in girls diagnosed with central precocious puberty and premature thelarche[J]. J Pediatr Endocrinol Metab,2016,29(3):337-341.

[6] WATKINS D J,PETERSON K E,FERGUSON K K,et

al. Relating phthalate and BPA exposure to metabolism in peripubescence:the role of exposure timing,sex,and puberty[J]. J Clin Endocrinol Metab,2016,101(1):79-88.

[7] SUPORNSILCHAI V,JANTARAT C,NOSOOGNOEN W,et al. Increased levels of bisphenol A (BPA) in Thai girls with precocious puberty[J]. J Pediatr Endocrinol Metab,2016,29(11):1233-1239.

[8] LEONARDI A,COFINI M,RIGANTE D,et al. The effect of bisphenol A on puberty:a critical review of the medical literature[J]. Int J Environ Res Public Health,2017,14(9):1044.

[9] HENGSTLER J G,FOTH H,GEBEL T,et al. Critical evaluation of key evidence on the human health hazards of exposure to bisphenol A[J]. Crit Rev Toxicol,2011,41(4):263-291.

[10] 杨帆,陈临琪,金美芳,等. 新生儿期不同剂量双酚 A 暴露对雌性大鼠青春发育的影响[J]. 中国当代儿科杂志,2014,16(7):754-758.

[11] WANG P,LUO C,LI Q,et al. Mitochondrion-mediated apoptosis is involved in reproductive damage caused by BPA in male rats[J]. Environ Toxicol Pharmacol,2014,38(3):1025-1033.

[12] 孙瑞元,马越鸣,洪宗元. 药理实验设计及统计分析[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2001:202-204.

[13] WANG X,CHANG F,BAI Y,et al. Bisphenol A enhances kisspeptin neurons in periventricular nucleus of female[J]. J Endocrinol,2014,221(2):201-213.

[14] MINATOYA M,ITOH S,YAMAZAKI K,et al. Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and behavioral problems in children at preschool age:the hokkaido study on environment and children's health[J]. Environ Health Prev Med,2018,23(1):43.

[15] GAN W,ZHOU M,XIANG Z,et al. Combined effects of nonylphenol and bisphenol a on the human prostate epithelial cell line RWPE-1[J]. Int J Environ Res Public Health,2015,12(4):4141-4155.

[16] ROA J,NAVARRO V M,TENA-SEMPERE M. Kisspeptin in reproductive biology:consensus knowledge and recent developments[J]. Biol Reprod,2011,85(4):650-660.

[17] LOSA-WARD S M,TODD K L,MCCAFFREY K A,et al. Disrupted organization of RFamide pathways in the hypothalamus is associated with advanced puberty in female rats neonatally exposed to bisphenol A[J]. Biol Reprod,2012,87(2):28.