

# 环境内分泌干扰物急性暴露对大鼠海马组织蛋白表达水平的影响

窦浩瑜 朱彧 周为

**【摘要】 目的** 通过蛋白组学技术考察环境内分泌干扰物 (Environmental endocrine disruptors, EEDs) 双酚 A (Bisphenol A, BPA) 和邻苯二甲酸二(2-乙基) 乙酯 [Di-(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP] 急性暴露对大鼠海马组织蛋白表达水平的影响。**方法** 选取健康清洁级初断乳雄性 SD (Sprague dawley) 品系大鼠 20 只, 随机分为对照组和暴露组, 每组各 10 只; 对照组行生理盐水灌胃, 暴露组大鼠经 BPA  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{bw}^{-1}$  + DEHP  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{bw}^{-1}$  灌胃急性暴露 4 h 后取海马组织经高效液相色谱-串联质谱分析差异蛋白表达水平, 通过 GO (Gene ontology) 分析考察生物过程 (Biological process, BP) 和细胞成分 (Cell component, CC), 京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 进行通路富集分析, 通过生化法分析谷胱甘肽氧化还原系统蛋白水平的变化。**结果** 经高效液相色谱-串联质谱分析共检测到蛋白 4073 个, 其中与对照组比较, 暴露组大鼠海马组织显著下调蛋白 179 个, 显著上调蛋白 230 个; 细胞因子分泌负调控、嘌呤核苷代谢过程、轴突引导的信号素-丛状蛋白信号通路等生物过程以及细胞器膜、线粒体、核膜等细胞成分发生显著改变; 经 KEGG 分析发现谷胱甘肽代谢、突触功能、阿尔茨海默病等通路发生了显著改变, 还原型谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 和谷胱甘肽还原酶 (Glutathione reductase, GSR) 水平显著降低, 氧化型谷胱甘肽 (Glutathione oxidized, GSSG) 水平显著升高。**结论** BPA + DEHP 急性暴露诱导大鼠海马组织蛋白表达水平改变, 其机制可能与氧化还原失衡有关。

**【关键词】** 环境内分泌干扰物 蛋白质组学 氧化还原失衡

**【中图分类号】** R742 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2023)03-0294-04

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2023.03.012

## Effects of acute exposure to environmental endocrine disruptors on protein expression in rat hippocampus

Dou Haoyu\*, Zhu Yu, Zhou Wei. \*General Department, Tianjin Shuanghuancun Street Community Health Service Center, Tianjin 300131

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of environmental endocrine disruptors (EEDs) Bisphenol A (BPA) and Di-(2-ethylhexyl phthalate) (DEHP) on protein expression in rat hippocampus. **Methods** 20 healthy and clean grade male Sprague dawley (SD) rats were selected and randomly divided into control group and exposure group, with 10 rats in each group. The control group received normal saline gavage, and the rats in the exposure group received BPA  $10 \text{ mg/kg} \cdot \text{bw}$  + DEHP  $500 \text{ mg/kg} \cdot \text{bw}$  gavage acutely for 4 hours. MS) analyze differential protein expression, and the biological process (BP) and cell component (CC) were analyzed by Gene Ontology (GO), pathway enrichment was analyzed through Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), the glutathione oxidation reduction system was analyzed by biochemistry assay. **Results** A total of 4073 proteins were detected by HPLC-MS/MS analysis. Compared with the control group, the hippocampus of the exposed group significantly down-regulated 179 proteins and significantly up-regulated 230 proteins. The BP of negative regulation of cytokine secretion, purine nucleoside metabolic process, semaphorin-plexin signaling pathway involved in axon guidance, the CC of organelle envelope, mitochondrion nuclear and envelope were significant changed. The KEGG analysis found that the pathways such as glutathione metabolism, synaptic function and Alzheimer's disease were significant changed. The level of glutathione and glu-

基金项目:天津市卫生健康科技项目(KJ20084)

作者单位:300131 天津市双环邨街社区卫生服务中心全科(窦浩瑜);天津市海河医院检验科(朱彧);天津市人民医院神经内科[周为(通信作者)]

tathione reductase was significant decreased, the glutathione oxidized was increased. **Conclusion** BPA + DEHP exposure induces changes in protein expression in the hippocampus of rats, which may be related to functions such as purine metabolism, glutathione metabolism, synaptic function and Alzheimer's disease.

**【Key words】** Environmental endocrine disruptors Proteomics Oxidation reduction imbalance

随着工业的不断发展,环境内分泌干扰物(Environmental endocrine disruptors, EEDs)已威胁人类健康<sup>[1]</sup>。EEDs 广泛存在于水源、空气和生活用品中,干扰人体激素合成和分泌,破坏机体稳态,造成疾病<sup>[2]</sup>。双酚 A(Bisphenol A, BPA)和邻苯二甲酸二(2-乙基)乙酯[Di-(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP]是常见的 EEDs,由于其较强的亲脂性,可能是导致神经功能缺损的潜在因素<sup>[3-4]</sup>。本研究构建 BPA + DEHP 暴露诱导 SD 大鼠模型,通过蛋白组学技术分析大鼠海马组织蛋白表达水平的变化,分析 EEDs 对神经功能损伤的机制。

## 1 材料与方法

1.1 动物实验 选取健康清洁级初断乳雄性 SD 大鼠 20 只(购自厦门大学,许可证号为 SYXK(闽)2018~0009),适应性饲养 1 周后随机分为对照组和暴露组,每组各 10 只;对照组行生理盐水灌胃,暴露组大鼠经 BPA 10 mg·kg<sup>-1</sup>·bw<sup>-1</sup> + DEHP 500 mg·kg<sup>-1</sup>·bw<sup>-1</sup> 急性暴露 4 h;各组小鼠经腹腔注射 10%水合氯醛进行麻醉,麻醉后断头处死,冰浴下取海马组织;分离后经磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)溶液洗涤,加入裂解液置于冰上进行超声,经 4℃条件下 15000 g 离心 15 min,取上清液用于后续实验<sup>[5]</sup>。

1.2 蛋白组学分析 蛋白上清液经二喹啉甲酸(Bicinchoninic acid, BCA)法进行蛋白水平测定,取 500 ng 蛋白溶于流动相 A(97%水、3%乙腈、0.1%甲酸);梯度条件为 0~5 min, 5%流动相 B(100%乙腈、0.1%甲酸);6~16 min, 5%~10%流动相 B; 17~51 min, 10%~22%流动相 B; 52~71 min, 22%~30%流动相 B; 72 min, 30%~95%流动相 B; 78 min, 95%流动相 B; C18 色谱柱(75 μm×150 mm)在初始条件下平衡 15 min,柱流速维持在 0.6 μL/min,柱温维持在 30℃;Q Exactive HF 液质联用色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)进行质谱分析<sup>[6]</sup>。

1.3 生化法分析 取 0.1 g 大鼠海马组织在液氮中研磨,放射免疫沉淀法裂解缓冲液(Radio immu-

noprecipitation assay, RIPA)裂解后 10000 r/min 离心, 4℃离心 10 min;收集上清液,取 20 μg 总蛋白,按照说明书要求通过分光光度计(Scientific Multiskan FC, 美国 Thermo 公司)测定还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)、谷胱甘肽还原酶(Glutathione reductase, GSR)和氧化型谷胱甘肽(Glutathione oxidized, GSSG)水平(购自 Solarbio 公司)。

1.4 数据分析及统计学处理 质谱数据通过 MaxQuant(version 1.5.3.8)软件进行蛋白匹配分析,蛋白表达水平以 1.2 或 0.87 倍改变作为显著性变化阈值,采用 Cytoscape 软件(3.8.0)进行 GO 分析,采用 KOBAS 软件(<https://www.kegg.jp/>)进行差异表达蛋白的 KEGG 通路富集分析,以  $P < 0.05$  表示具有显著性差异。

## 2 结果

2.1 EEDs 对大鼠海马组织蛋白表达水平的影响 经高效液相色谱-串联质谱分析共检测到蛋白 4265 个,其中与对照组比较,暴露组大鼠海马组织显著下调蛋白 203 个,显著上调蛋白 264 个,即 BPA + DEHP 暴露可诱导大鼠海马组织中的蛋白表达水平发生改变。

2.2 EEDs 对大鼠海马组织差异蛋白的生物信息分析 通过对大鼠海马组织显著变化蛋白进行 GO (Gene ontology)分析, BPA + DEHP 暴露可影响大鼠海马组织细胞因子分泌负调控、嘌呤核苷代谢过程、轴突引导的信号素-丛状蛋白信号通路等生物过程(Biological process, BP)(表 1)以及细胞器膜、线粒体、核膜等细胞成分(Cell component, CC)(表 2)。KEGG 分析发现 BPA + DEHP 暴露可诱导大鼠海马组织中的嘌呤代谢、谷胱甘肽代谢、突触功能、阿尔茨海默病等通路发生了显著改变( $P$  均  $< 0.05$ )(表 3)。

2.3 EEDs 对大鼠海马组织谷胱甘肽氧化还原系统的影响 与对照组比较,暴露组大鼠海马组织 GSH 和 GSR 水平显著降低, GSSG 水平显著升高(表 4)。

表 1 EEDs 急性暴露调控大鼠海马组织差异蛋白的生物过程富集分析

生物过程	P	生物过程	P
细胞因子分泌的负调控	7.62E-04	面神经结构组织	1.73E-02
嘌呤核苷代谢过程	9.59E-04	脂肪酸分解过程	2.24E-02
轴突引导的信号素-丛状蛋白信号通路	2.64E-03	丝状伪足组装正调控	2.39E-02
三叉神经结构组织	2.68E-03	蛋白酶体泛素依赖蛋白质分解过程负调控	2.39E-02
臂运动神经元轴突引导	5.09E-03	多巴胺代谢过程	4.42E-02
内质网应激反应的负调控	5.90E-03	氧化应激诱导细胞死亡负调控	4.47E-02
逆行蛋白转运的负调控	1.23E-02	淀粉样蛋白形成调控	4.51E-02
内质网到胞质转运	1.73E-02	蛋白酶体蛋白分解过程负调控	4.65E-02

表 2 EEDs 急性暴露调控大鼠海马组织  
差异蛋白的细胞成分富集分析

细胞成分	P	细胞成分	P
细胞器膜	6.60E-07	线粒体被膜	1.36E-02
线粒体	7.78E-07	球形高密度脂蛋白颗粒	1.85E-02
线粒体基质	3.35E-04	G 蛋白复合物	2.54E-02
核膜	4.35E-04	生长锥	2.55E-02
质膜外在成分	1.91E-03	远端轴突	3.23E-02
轴突	9.91E-03	过氧化物酶体	3.45E-02
分泌小泡	1.02E-02		

表 3 EEDs 急性暴露调控大鼠海马组织  
差异蛋白的 KEGG 通路

通路名称	富集 倍数	通路名称	富集 倍数
多巴胺能突触	5.83	抗生素的生物合成	5.41
间隙连接	6.84	碳代谢	6.67
轴突引导	5.29	代谢途径	2.14
血清素突触	4.85	缬氨酸、亮氨酸和异亮 氨酸降解	8.81
吗啡成瘾	5.72	氧化磷酸化	4.48
长期抑郁	6.07	丙酸代谢	11.53
昼夜节律	4.65	糖酵解/糖异生	6.15
胆碱能突触	4.03	三羧酸循环	8.41
谷氨酸能突触	3.93	阿尔茨海默病	3.19
r-氨基丁酸(r-aminobutyric acid, GABA)能突触	4.32	脂肪酸降解	5.72
Ras 信号通路	2.61	阿尔茨海默病	2.66

表 4 EEDs 急性暴露对谷胱甘肽氧化  
还原系统的影响(n=10)

指标	对照组	暴露组	P
GSH	12.93±2.21	9.51±2.30	<0.0001
GSR	8.76±2.04	7.01±1.72	0.004
GSSG	1.02±0.60	1.49±0.78	0.0313

3 讨 论

近些年来,神经退行性疾病的发病率有增高的趋势,对于患者的身体健康和生活方式有很大的影响<sup>[7-8]</sup>。BPA 和 DEHP 广泛应用于食品容器、化妆品等日常用品,可通过吸入、摄入和皮肤接触等方式

进入人体<sup>[9]</sup>。同时由于 BPA 和 DEHP 具有亲脂性,能够穿透血脑屏障,从而影响神经功能<sup>[10]</sup>。

海马组织中正常的蛋白质相互作用网络对于维持神经功能稳态具有重要意义,蛋白网络紊乱会导致神经失能<sup>[11-12]</sup>。突触是人类神经网络的重要节点,突触发育和功能相关蛋白表达紊乱可导致神经细胞间相互连接和通讯异常。本研究观察到 BPA 和 DEHP 可诱导大鼠海马组织中蛋白质表达改变,可能是影响神经功能的原因之一。为了探索 BPA 和 DEHP 暴露所诱导的大鼠神经功能缺损机制,本研究对大鼠海马组织中差异表达的蛋白进行了生物信息学分析,其结果表明 EEDs 可导致神经元修复功能受损、细胞“废物处理”机制受损、能量代谢失调造成的线粒体功能障碍和氧化损伤、适应性细胞压力应激损伤、神经元钙离子调节能力失调、神经信号转导异常等方式影响神经系统的功能,最终引起阿尔茨海默病等神经退行性疾病<sup>[13-14]</sup>。

还原型谷胱甘肽(Reduced glutathione,GSH)是一种内源性抗氧化肽,在预防氧化应激中起主要作用,从而起到保护神经元和防止细胞凋亡的作用。在许多神经退行性疾病中 GSH 水平已明显下降,从而导致抵御活性氧(Reactive oxygen species,ROS)的能力减弱。因此,GSH 耗竭是神经退行性疾病中 1 个被广泛研究的现象。谷胱甘肽转移酶(Glutathione-S-transferase,GST)是一类重要的抗氧化酶,可以促进氧化产物与谷胱甘肽结合而降低氧化损伤。本研究发现,EEDs 急性暴露后大鼠海马组织中 GSH 的水平降低,氧化型谷胱甘肽(Oxidized glutathione,GSSG)水平升高。本研究推测,EEDs 导致大鼠海马组织氧化应激,EEDs 暴露后 GSH 下调,GST 活性被激活,继而消耗了 GST 的活性,最终导致神经元发育和功能受损。

总之,环境内分泌干扰物具有神经毒性,环境内  
(下转第 306 页)

- [J]. *Cardiol Clin*, 2016, 34(2): 255-268.
- [3] Zimetbaum P. Atrial fibrillation[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2017, 166(5): ITC33-ITC48.
- [4] Folstein MF, P R Mchugh. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician[J]. *J Psychiatr Res*, 1975, 12(3): 189-198.
- [5] Thompson E. Hamilton rating scale for anxiety (HAM-A) [J]. *Occup Med (Lond)*, 2015, 65(7):601.
- [6] Fleck, P M. Factorial structure of the 17-item Hamilton Depression Rating Scale[J]. *Acta Psychiatr Scand*, 1995, 92(3): 168-172.
- [7] Brand ML, Markowitsch HJ. Neuropsychological correlates of decision-making in ambiguous and risky situations[J]. *Neural Netw*, 2006, 19(8): 1266-1276.
- [8] Brand, M. Decision-making impairments in patients with Parkinson's disease[J]. *Behav Neurol*, 2004, 15(3/4): 77-85.
- [9] Labudda, K. Decision making under risk condition in patients with Parkinson's disease; a behavioural and fMRI study[J]. *Behav Neurol*, 2010, 23(3): 131-143.
- [10] Hewig J, Straube T, Trippe RH, et al. Decision-making under risk: an fMRI study[J]. *J Cogn Neurosci*, 2009, 21(8): 1642-1652.
- [11] Singh-Manoux S, A. Atrial fibrillation as a risk factor for cognitive decline and dementia[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(34): 2612-2618.
- [12] Liao, NJ. Risk and prediction of dementia in patients with atrial fibrillation—a nationwide population-based cohort study[Z], 2015;25-30.
- [13] Bunch, JT. Atrial fibrillation is independently associated with senile,vascular,and Alzheimer's dementia[J]. *Heart Rhythm*, 2010, 7(4): 433-437.
- [14] Madhavan, M. Cognitive dysfunction in atrial fibrillation[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(12): 744-756.
- [15] Pertl, TM. Decision making and ratio processing in patients with mild cognitive impairment[J]. *J Alzheimers Dis*, 2015, 48(3): 765-779.
- [16] Wang, Y. Decision-making impairments under ambiguous and risky situations in patients with prefrontal tumor:A neuropsychological study[J]. *Brain Behav*, 2021, 11(1): e01951.
- [17] Kim ES, Hopper T. Decision making by People with aphasia: a comparison of linguistic and nonlinguistic measures [J]. *J Speech Lang Hear Res*, 2020, 63(6): 1845-1860.

(2022-10-08 收稿)

(上接第 296 页)

分泌干扰物暴露可导致神经功能异常或神经退行性疾病的发生。

### 参 考 文 献

- [1] Rock KD, Gillera SEA, Devarasetty P, et al. Sex-specific behavioral effects following developmental exposure to tetrabromobisphenol A (TBBPA) in Wistar rats [J]. *Neurotoxicology*, 2019, 75: 136-147.
- [2] Liang AA, Yin NY, Liang SX, et al. Bisphenol a and several derivatives exert neural toxicity in human neuron-like cells by decreasing neurite length [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 135: 111015.
- [3] Jocsak G, Ioja E, Kiss DS, et al. Endocrine disruptors induced distinct expression of thyroid and estrogen receptors in rat versus mouse primary cerebellar cell cultures[J]. *Brain Sci*, 2019, 9(12): 359.
- [4] Mukherjee A, Su A, Rajan K. Deep learning model for identifying critical structural motifs in potential endocrine disruptors [J]. *J Chem Inf Model*, 2021, 61(5): 2187-2197.
- [5] 穆轶, 朱彧. 抑肝散提取物对环境内分泌干扰物神经毒性的抑制作用[J]. *天津医科大学学报*, 2022, 28(2): 151-155.
- [6] Jin XH, Wang JB, Zou S, et al. Cinobufagin triggers defects in spindle formation and Cap-Dependent translation in liver cancer cells by inhibiting the AURKA-mTOR-eIF4E axis[J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(3): 651-678.
- [7] Elkfury JL, Antunes LC, Dal Moro Angoleri L, et al. Dysfunctional eating behavior in fibromyalgia and its association with serum biomarkers of brain plasticity (BDNF and S100B): an exploratory study[J]. *Arch Endocrinol Metab*, 2021, 65(6): 713-722.
- [8] Setti SE, Reed MN. Network activity changes in the pathophysiology of Alzheimer's disease: the role of aging and early entorhinal cortex dysfunction [J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(2): 289-298.
- [9] Taheri E, Riahi R, Rafiei N, et al. Bisphenol a exposure and abnormal glucose tolerance during pregnancy: systematic review and meta-analysis [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2021, 28(44): 62105-62115.
- [10] Santoro A, Scafuro M, Troisi J, et al. Multi-systemic alterations by chronic exposure to a low dose of bisphenol a in drinking water: effects on inflammation and NAD<sup>+</sup>-Dependent deacetylase sirtuin1 in lactating and weaned rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9666.
- [11] Ren J, Jiang FX, Wang ST, et al. Hydrophilic hindering and hydrophobic growing: a vesicle glycometabolism multi-drug combination therapeutic against Alzheimer's disease [J]. *Biomater Sci*, 2021, 9(19): 6444-6460.
- [12] Ruiz-Pérez G, Ruiz de Martín Esteban S, Marqués S, et al. Potentiation of amyloid beta phagocytosis and amelioration of synaptic dysfunction upon FAAH deletion in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 223.
- [13] Torgasheva A, Malinovskaya L, Zadesenets KS, et al. Highly conservative pattern of sex chromosome synapsis and recombination in neognathae birds [J]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(9): 1358.
- [14] Czapski GA, Babiec L, Jęsko H, et al. Synaptic alterations in a transgenic model of tuberous sclerosis complex: relevance to autism spectrum disorders [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 10058.

(2022-12-07 收稿)