

文章编号 1006-8147(2022)02-0151-05

论著

抑肝散提取物对环境内分泌干扰物神经毒性的抑制作用

穆轶¹, 朱彧²

(1.天津医科大学第二医院药理学部, 天津 300211; 2.天津市海河医院检验科, 天津 300350)

摘要 目的: 考察抑肝散提取物抑制环境内分泌干扰物(EEDs)双酚A(BPA)和邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯(DEHP)神经毒性的作用并分析其机制。方法: 小鼠神经母细胞瘤细胞 Neuro-2a 细胞经 BPA(0.1 mmol/L)+DEHP(0.1 mmol/L)与 3 mg/mL(低剂量组)和 6 mg/mL(高剂量组)抑肝散乙醇/氯仿提取物共培养 72 h, 观察细胞凋亡和氧化损伤(活性氧簇, ROS)的变化。按照暴露剂量为 25 μ g/(kg·d) BPA 和 50 μ g/(kg·d) DEHP 给予初断乳雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 BPA 连续灌胃暴露 90 d, 同时将抑肝散乙醇/氯仿提取物按 300 mg/kg(低剂量组)和 600 mg/kg(高剂量组)给大鼠灌胃给药, 通过 Y 迷宫实验观察大鼠短期记忆能力(自发交替正确率)的变化。取大鼠海马组织后, 检测海马组织总抗氧化能力(T-AOC)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、游离脂肪酸(FFAs)葡萄糖含量和线粒体膜电位(MMP)的变化, 分析星形胶质细胞胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和巢蛋白(nestin)、caspase-3 以及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路活性的变化。结果: Neuro-2a 细胞经 BPA+DEHP 暴露后, 24、48、72 h 细胞增殖均受到抑制($t=3.951, 8.823, 7.060$, 均 $P<0.05$), 早期和晚期凋亡率均上调($t=14.072, 6.590$, 均 $P<0.05$), 抑肝散提取物可促进细胞增殖(与暴露组相比, 低剂量组 $t=2.963, 5.814, 2.101$, 均 $P<0.05$, 高剂量组 $t=3.796, 10.370, 5.311$, 均 $P<0.05$), 抑制早期和晚期细胞凋亡(与暴露组相比, 低剂量组 $t=0.770, 1.475$, 均 $P<0.05$, 高剂量组 $t=6.187, 4.368$, 均 $P<0.05$)。大鼠经 BPA+DEHP 暴露后, 短期记忆能力显著下降($t=2.123, P<0.05$), 其海马组织氧化应激、GFAP 表达和 caspase-3 活性上调($t=3.634, 5.043, 8.914$, 均 $P<0.05$), nestin 表达、线粒体膜电位、MDA、GSH、T-AOC 和 mTOR 磷酸化水平下调($t=8.398, 9.979, 3.754, 9.621, 7.193, 25.982$, 均 $P<0.05$), 抑肝散提取物可缓解 BPA+DEHP 暴露后大鼠短期记忆能力损伤(与暴露组相比, 低剂量组 $t=1.339, P>0.05$, 高剂量组 $t=2.293, P<0.05$)以及海马组织的上述表型改变(与暴露组相比, 低剂量组 $t=1.147, 1.683, 1.594, 1.611, 4.469, 2.070, 5.346, 5.499, 6.124$, 除 MDA 外均 $P<0.05$, 高剂量组 $t=2.642, 3.385, 3.728, 4.899, 8.083, 3.719, 4.707, 5.761, 12.252$, 均 $P<0.05$)。结论: 抑肝散提取物可通过调节氧化应激和糖代谢紊乱, 抑制 EEDs 的神经毒性。

关键词 抑肝散; 环境内分泌干扰物; 神经毒性

中图分类号 R9

文献标志码 A

The inhibitive effect of Yigansan extract on neurotoxicity of environmental endocrine disruptors

MU Yi¹, ZHU Yu²

(1. Department of Pharmacy, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Haihe Hospital, Tianjin 300350, China)

Abstract **Objective:** To investigate the neurotoxicity of Yigansan extract in the treatment of environmental endocrine disruptors bisphenol A(BPA) and di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and analyze its mechanism. **Methods:** Mouse neuroblastoma cell line Neuro-2a cells were co-cultured with BPA (0.1 mmol/L)+DEHP (0.1 mmol/L) and 3 mg/mL (low dose group) and 6 mg/mL (high dose group) Yigansan ethanol/chloroform extract for 72 h, and apoptosis and oxidative damage (ROS) were measured. According to the exposure dose of 25 μ g/(kg·d) BPA and 50 μ g/(kg·d) DEHP, the first weaned male Sprague-Dawley (SD) rats were given BPA for continuous gastric exposure for 90 days. At the same time, the ethanol/chloroform extract of Yigansan was administered at 300 mg/kg (low-dose group) and 600 mg/kg (high-dose group) were intragastrically administered to rats, and the changes in short-term memory ability (spontaneous alternation accuracy) of rats were observed by Y maze experiment. After taking the rat hippocampus tissue, the changes of total antioxidant capacity (T-AOC), malondialdehyde (MDA), glutathione (Glutathione, GSH), free fatty acid (FFAs) glucose content and mitochondrial membrane potential (MMP) of hippocampus were measured. The astrocyte glial fibrillary acidic protein (GFAP) and nestin, caspase-3 and mammalian rapamycin target protein mTOR signal pathway activity changes were analyzed. **Results:** After Neuro-2a cells are exposed to BPA+DEHP, cell proliferation in 24, 48 and 72 h was inhibited ($t=3.951, 8.823, 7.060$, all $P<0.05$), and the early and late apoptosis rate was increased ($t=14.072, 6.590$, all $P<0.05$). Yigansan extract could promote cell proliferation (compared with exposure group, $t=2.963, 5.814, 2.101$, all $P<0.05$ in low-dose group, $t=3.796, 10.370, 5.311$, all $P<0.05$ in high-dose group) and inhibit cell early and late apoptosis (compared with exposure group, $t=0.770$ and 1.475 , all $P>0.05$ in low-dose group, $t=6.187$ and 4.368 , all $P<0.05$ in high-dose group). Rats exposed to BPA+DEHP showed significant decrease in short-term memory ability ($t=2.123, P<0.05$), and the hippocampal oxidative stress, GFAP expression and caspase-3 activity increased ($t=3.634, 5.043, 8.914$, all $P<0.05$), nestin expression, mitochondrial membrane potential, MDA, GSH, T-AOC and mTOR phosphorylation level decreased ($t=8.398, 9.979, 3.754, 9.621, 7.193, 25.982$, all $P<0.05$), Yigansan extract could alleviate BPA+DEHP exposure-induced damage of rats' short-term memory ability (compared with exposure group, $t=1.339, P>0.05$ in low-dose group, $t=2.293, P<0.05$ in high-dose group) and the above phenotypic changes of hippocampus (compared with exposure group, $t=1.147, 1.683, 1.594, 1.611, 4.469, 2.070, 5.346, 5.499, 6.124$, except MDA, all $P<0.05$ in low-dose group, $t=2.642, 3.385, 3.728, 4.899, 8.083, 3.719, 4.707, 5.761, 12.252$, all $P<0.05$ in high-dose group). **Conclusion:** Yigansan extract can regulate oxidative stress and carbohydrate metabolism disorder, inhibit the neurotoxicity of EEDs.

基金项目 天津市中医药管理局中医中西医结合科研课题(2019125)

作者简介 穆轶(1982-),男,主管药师,学士,研究方向:临床药学及医院药学;通信作者:朱彧, E-mail:zhuyutj@126.com。

group). After the rats were exposed to BPA+DEHP, the short-term memory ability was significantly decreased ($t=2.123, P<0.05$), the hippocampal oxidative stress, GFAP expression and caspase-3 activity were up-regulated ($t=3.634, 5.043, 8.914$, all $P<0.05$), nestin expression, mitochondrial membrane potential, MDA, GSH, T-AOC and mTOR phosphorylation level were down-regulated ($t=8.398, 9.979, 3.754, 9.621, 7.193, 25.982$, all $P<0.05$). Yigansan could alleviate short-term memory injury (compared with exposure group, $t=1.339, P>0.05$ in low-dose group, $t=2.293, P<0.05$ in high-dose group) and the above-mentioned phenotypes (compared with exposure group, $t=1.147, 1.683, 1.594, 1.611, 4.469, 2.070, 5.346, 5.499, 6.124$, all $P<0.05$ except for MDA in low-dose group, $t=2.642, 3.385, 3.728, 4.899, 8.083, 3.719, 4.707, 5.761, 12.252$, all $P<0.05$ in high-dose group) of hippocampus in rats after BPA+DEHP exposure. **Conclusion:** Yigansan extract can alleviate the neurotoxicity of environmental endocrine disruptors by regulating oxidative stress and glucose metabolism disorders.

Key words Yigansan; environmental endocrine disruptors; neurotoxicity

双酚 A (bisphenol A, BPA) 和邻苯二甲酸二-(2-乙基)己酯(di-(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP) 是广泛存在于日用品的环境内分泌干扰物(environmental endocrine disruptors, EEDs), 主要存在于饮用水、食品容器、化妆品以及供水管等, 主要暴露途径包括吸入、摄入和皮肤接触等^[1]。BPA 和 DEHP 能够穿透血-脑屏障, 影响神经功能^[2]。

抑肝散出自明代薛铠所著《保婴撮要》, 可养血活血舒肝、抑制肝气亢盛和郁结, 已应用于临床多年, 疗效确切^[3-4]。本研究考察了抑肝散对 BPA+DEHP 暴露大鼠神经功能的保护作用及机制, 为抑肝散应用于 EEDs 神经毒性防治提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 药物和试剂 BPA 和 DEHP 购自美国 Sigma 公司; 小鼠神经母细胞瘤细胞 Neuro-2a 细胞购自北京协和细胞资源中心; 抑肝散由钩藤、柴胡、茯苓、白术、川芎、当归、甘草按 3:4:2:4:1.5:3:3 比例组成, 所有均购自天津医科大学第二医院, 经乙醇/氯仿提取后使用; caspase-3 活性、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH) 含量和线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP) 试剂盒均购自索莱宝公司; 星形胶质细胞胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、巢蛋白(nestin)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 mTOR、 β -actin 抗体和羊抗兔 IgG-FITC 荧光二抗均购自 Santa Cruz 公司; CCK8 试剂盒购自美国 abcam 公司; Annexin V-PE 细胞凋亡检测试剂盒和活性氧检测试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司; 全自动生化分析仪购自美国 Beckman Coulter 公司, 酶标仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, FACS Aria 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 细胞培养 小鼠神经母细胞瘤细胞 Neuro-2a 细胞培养于 37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中, 培养基为 H-DMEM, 添加 10%胎牛血清。0.25%胰酶-EDTA 消化传代, 所有实验均采用对数生长期细胞。

1.3 细胞增殖实验 将 Neuro-2a 细胞(5 000 个/孔) 培养于 96 孔板中, 经 BPA (0.1 mmol/L)+DEHP (0.1 mmol/L) 与 3 mg/mL (低剂量组) 和 6 mg/mL (高剂量组) 抑肝散乙醇/氯仿提取物共培养 72 h 后, 更换新鲜完全培养基, 加入 10 μ L/孔 CCK-8 溶液, 37℃孵育 4 h, 应用酶标仪在 460 nm 吸收波长处检测 OD 值。未处理组作为对照组, BPA+DEHP 处理组作为暴露组。

1.4 流式细胞术 将 Neuro-2a 细胞(3×10^5 个/孔) 培养于 6 孔板中, 经 BPA (0.1 mmol/L)+DEHP (0.1 mmol/L) 与 3 mg/mL (低剂量组) 和 6 mg/mL (高剂量组) 抑肝散乙醇/氯仿提取物共培养 72 h 后, 0.25%胰酶-EDTA 消化后转移至 PE 管中, 加入 5 μ L Annexin V-PE 溶液, 室温避光孵育 10 min, 通过流式细胞仪检测细胞凋亡水平。加入 10 μ L 荧光探针 DCFH-DA, 室温避光孵育 20 min, 通过流式细胞仪检测细胞 ROS 水平。未处理组作为对照组, BPA+DEHP 处理组作为暴露组。

1.5 动物实验 初断乳雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(180~220 g), 购自北京华阜康生物科技有限公司, 许可证号: SCXK(京)2019-0008。于实验前适应性饲养 1 周, 饲养温度 25℃, 湿度 60%, 自由饮食。所有行为学实验操作步骤均严格参照动物伦理协会指导原则进行。

将 25 μ g/(kg·d) BPA+50 μ g/(kg·d) DEHP (溶于玉米油) 连续灌胃暴露 90 d, 同时隔天灌胃给予 300 mg/kg (低剂量组) 和 600 mg/kg (高剂量组) 抑肝散乙醇/氯仿提取物 (重新溶于玉米油), 玉米油作为对照组, 构建抑肝散治疗大鼠模型, 分为对照组、暴露组、低剂量组和高剂量组, 12 只/组。

暴露和给药结束时, 通过 Y 迷宫实验观察 BPA+DEHP 对大鼠短期记忆能力的影响, 具体步骤如下: 将大鼠放入 Y 迷宫三臂交汇处, 让其自由探索 8 min, 记录大鼠正确臂的次数和进臂总次数, 计算出自发交替正确率。自发交替正确率=进入正确臂的次数/(进臂总次数-2) $\times 100\%$ 。

Y 迷宫实验后,将大鼠禁食过夜,并且在 24 h 后,大鼠经腹腔注射 10%水合氯醛(3 mg/kg)麻醉,并腹膜内注射肝素(1 U/g 体重)以避免血液凝固。然后将海马组织切除,生理盐水冲洗后,称重,保存在 4℃下 4%液氮中。

1.6 免疫荧光实验 取大鼠海马组织切片,75℃烘片 1 h,脱蜡,柠檬酸钠溶液 120℃、2.5 min 抗原修复,5% BSA 溶液室温封闭 20 min,GFAP(1:1 500)和 nestin(1:1 500)一抗 4℃孵育过夜,PBS 溶液清洗后在切片上滴加羊抗兔 IgG-FITC 荧光二抗,37℃避光孵育 1.5 h,封片后经荧光显微镜观察(100×)。

1.7 生化法检测 取海马组织液氮反复冻融 3 次,4℃条件下 800 r/min 离心(5 min)2 次,均取上清。按照试剂盒说明书方法,通过酶标仪根据吸光度检测海马组织中丙二醛、还原型谷胱甘肽含量、总抗氧化能力和 caspase-3 活性的变化,通过全自动生化分析仪检测葡萄糖含量的变化。

1.8 线粒体膜电位检测 取海马组织匀浆后,4℃条件下 800 r/min 离心(5 min)2 次,均取上清,4℃条件下 10 000 r/min 离心 10 min,取沉淀在离心管底部的线粒体,洗涤后 4℃条件下 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清取线粒体。按照试剂盒说明书方法,通过酶标仪检测海马组织中线粒体膜电位的变化。

1.9 Western 印迹实验 将海马组织剪碎、细胞裂解、收集蛋白,取等量蛋白质以 12% SDS-PAGE 分离,然后转移至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭后以 p-mTOR(1:2 000)和 mTOR(1:2 000)抗体检测目标蛋白,以 HRP 连接的二抗温育,洗涤,显示免疫反应条带, β -actin(1:5 000)作为内参。

1.10 realtime PCR 实验 海马组织经匀浆器研磨、Trizol 法提取总 RNA,通过逆转录试剂盒进行逆转录得到 cDNA,通过荧光定量 PCR 技术对靶基因以及内参基因 GAPDH 进行荧光定量 PCR 反应(95℃ 10 min 后,95℃ 10 s、60℃ 30 s,共进行 40 个循环),分别取得 CT 值,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析各个样品的基因相对表达差异(表 1)。

表 1 PCR 引物序列

Tab 1 PCR primer sequence

基因名称	引物序列(5'→3')	引物大小
GFAP	上游: ACCTCGGCACCTGAGGCAG	151 bp
	下游: CCAGCGACTCAACCTTCCTC	
nestin	上游: CAGGCTTCTCTTGGCTTTCTGG	159 bp
	下游: TGGTGAGGTTGAGGGTTGT	
GAPDH	上游: TGCTGAGTATGTCGTGGAG	288 bp
	下游: GCTCTCTGAGTGCCAGTGAT	

注:GFAP:星形胶质细胞胶质纤维状酸性蛋白;nestin:巢蛋白;GAPDH:3-磷酸甘油醛脱氢酶

1.11 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件,数据经过正态性检验符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单向方差分析(One-way ANOVA),组间多重比较采用 LSD-t 检验,以 $P<0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Neuro-2a 细胞增殖、凋亡和氧化应激 BPA+DEHP 处理可抑制 Neuro-2a 细胞体外增殖,诱导凋亡和氧化应激,抑肝散提取物可逆转 BPA+DEHP 对 Neuro-2a 细胞体外增殖、凋亡和 ROS 的影响(表 2~4)。

表 2 Neuro-2a 细胞体外增殖的改变(OD 值, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Tab 2 The changes in Neuro-2A cell proliferation in vitro (OD value, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.11±0.02	0.30±0.04	0.58±0.07	1.03±0.14
暴露组	0.11±0.03	0.22±0.05 [*]	0.34±0.05 [*]	0.67±0.08 [*]
低剂量组	0.11±0.03	0.28±0.04 [#]	0.47±0.05 [#]	0.75±0.09
高剂量组	0.11±0.02	0.29±0.03 [#]	0.55±0.04 ^{##}	0.86±0.08 ^{##}
F	1.000	7.828	40.002	23.993
P	0.404	0.000	0.000	0.000

注:与对照组相比,^{*} $P<0.05$;与暴露组相比,[#] $P<0.05$;与低剂量组相比,^{##} $P<0.05$

表 3 Neuro-2a 细胞凋亡率的改变(% , $\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab 3 The changes in apoptosis rate of neuro-2A cells(% , $\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	活细胞	早期凋亡	晚期凋亡	死亡细胞
对照组	91.87±1.50	1.77±0.45	1.93±0.38	4.43±0.97
暴露组	64.80±3.85 [*]	20.97±2.32 [*]	7.67±1.46 [*]	6.57±0.93
低剂量组	71.53±6.28	17.47±7.52	6.00±1.31	5.00±0.72
高剂量组	82.63±2.64 ^{##}	8.97±2.43 [#]	3.77±0.51 [#]	4.63±0.51 [#]
F	27.072	13.161	17.843	4.376
P	0.000	0.002	0.001	0.042

注:与对照组相比,^{*} $P<0.05$;与暴露组相比,[#] $P<0.05$;与低剂量组相比,^{##} $P<0.05$

表 4 Neuro-2a 细胞氧化应激水平的改变($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab 4 The changes in oxidative stress levels of neuro-2A cells($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	荧光相对强度
对照组	1.00±0.08
暴露组	2.52±0.72 [*]
低剂量组	1.99±0.35 [#]
高剂量组	1.38±0.20 ^{##}
F	7.839
P	0.009

注:与对照组相比,^{*} $P<0.05$;与暴露组相比,[#] $P<0.05$;与低剂量组相比,^{##} $P<0.05$

2.2 大鼠短期记忆能力分析 各组大鼠 Y 迷宫的进臂总次数无统计学差异($P>0.05$),BPA+DEHP 暴露组大鼠自发交替正确率显著降低,抑肝散组大鼠自发交替正确率有所提高,其中高剂量组正确率显著提高($P<0.05$)(表 5),表明 BPA+DEHP 可造成大

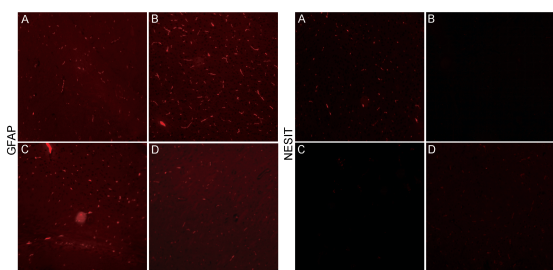
鼠短期记忆能力下降,而抑肝散提取物可抑制 BPA+DEHP 对大鼠短期记忆能力的损害。

表 5 大鼠短期记忆能力的改变($\bar{x}\pm s, n=12$)

Tab 5 The changes in rat short-term memory ability ($\bar{x}\pm s, n=12$)		
组别	进臂总次数	自发交替正确率(%)
对照组	12.00 \pm 3.05	63.88 \pm 24.06
暴露组	11.42 \pm 2.94	46.51 \pm 14.97*
低剂量组	11.17 \pm 3.13	54.87 \pm 15.60
高剂量组	11.50 \pm 2.75	60.26 \pm 14.40*
F	0.165	2.182
P	0.920	0.104

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与暴露组相比,* $P<0.05$

2.3 大鼠海马组织神经标志物和线粒体膜电位分析 免疫荧光组化实验和 realtime PCR 结果均显示,BPA+DEHP 暴露组大鼠海马组织中 GFAP 表达上调,nestin 表达下调,海马组织线粒体膜电位显著降低,抑肝散组大鼠海马组织 GFAP 表达下调,nestin 表达上调,线粒体膜电位显著提高,且高剂量组高于低剂量组,表明 BPA+DEHP 可损伤大鼠海马组织神经元和线粒体功能,而抑肝散提取物可抑制 BPA+DEHP 的上述毒性作用(图 1,表 6)。



注:A:对照组;B:暴露组;C:低剂量组;D:高剂量组

图 1 大鼠海马组织中神经标志物的表达

Fig 1 The expression of neural markers in rat hippocampus

表 6 大鼠海马组织神经标志物 mRNA 和线粒体膜电位的改变($\bar{x}\pm s, n=12$)

Tab 6 The changes of neuronal marker mRNA and mitochondrial membrane potential in rat hippocampus ($\bar{x}\pm s, n=12$)			
组别	GFAP	nestin	MMP
对照组	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.07	1.00 \pm 0.10
暴露组	1.35 \pm 0.23*	0.76 \pm 0.07*	0.55 \pm 0.12*
低剂量组	1.23 \pm 0.09*	0.80 \pm 0.05*	0.76 \pm 0.11*
高剂量组	1.12 \pm 0.05* [#]	0.90 \pm 0.07* [#]	0.90 \pm 0.09* [#]
F	15.742	32.283	40.922
P	0.000	0.000	0.000

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与暴露组相比,* $P<0.05$;与低剂量组相比,* $P<0.05$

2.4 大鼠海马组织氧化和葡萄糖消耗分析 BPA+DEHP 暴露组大鼠海马组织中 Glu、T-AOC 以及还原性物质 MDA 和 GSH 水平显著降低,抑肝散组大鼠 Glu、T-AOC、MDA 和 GSH 水平显著提高($P<0.05$)

(表 7),表明 BPA+DEHP 可增强大鼠海马组织氧化反应,而抑肝散提取物可增强大鼠海马组织中的抗氧化能力,可能与降低大鼠脑组织葡萄糖消耗有关。

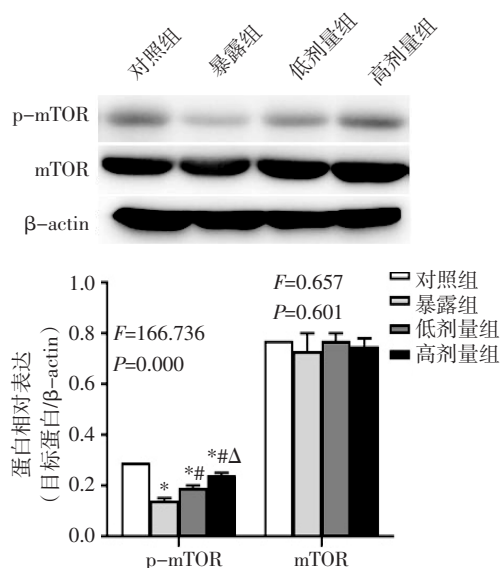
表 7 大鼠海马组织氧化和葡萄糖水平的改变($\bar{x}\pm s, n=12$)

Tab 7 The changes of oxidation and glucose in rat hippocampus ($\bar{x}\pm s, n=12$)				
组别	T-AOC (mmol/mg prot)	Glu (mmol/L)	MDA (nmol/mg prot)	GSH (μ mol)
对照组	4.28 \pm 0.67	3.16 \pm 0.38	3.54 \pm 0.83	5.15 \pm 0.73
暴露组	2.44 \pm 0.58*	2.81 \pm 0.56	2.49 \pm 0.50*	2.49 \pm 0.62*
低剂量组	3.92 \pm 0.73*	3.00 \pm 0.51	2.98 \pm 0.65	3.98 \pm 0.74*
高剂量组	4.07 \pm 0.79*	3.17 \pm 0.28	3.28 \pm 0.54*	4.02 \pm 0.94*
F	17.363	1.722	5.899	24.331
P	0.000	0.176	0.002	0.000

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与暴露组相比,* $P<0.05$

2.5 海马组织凋亡和信号通路活性 BPA+DEHP 暴露组大鼠海马组织 capase-3 活性显著上调[暴露组(1.35 \pm 0.11)*vs.*对照组(1.00 \pm 0.08)]($P<0.05$);高剂量抑肝散组 capase-3 活性显著下调[低剂量组(1.29 \pm 0.07)*vs.*暴露组(1.35 \pm 0.11)]($P>0.05$)[高剂量组(1.19 \pm 0.10)*vs.*暴露组(1.35 \pm 0.11)]($P<0.05$),且高剂量组显著低于低剂量组($P<0.05$),表明 BPA+DEHP 的神经毒性可能与诱导大鼠海马组织神经元凋亡有关,而抑肝散提取物可缓解神经元凋亡。

BPA+DEHP 暴露组大鼠海马组织 mTOR 磷酸化水平下调,抑肝散组 mTOR 磷酸化上调,且高剂量组磷酸化低于低剂量组,表明 BPA+DEHP 的神经毒性可能与诱导 mTOR 磷酸化有关,而抑肝散提取物可抑制 mTOR 磷酸化(图 2)。



注:与对照组相比,* $P<0.05$;与暴露组相比,* $P<0.05$;与低剂量组相比,* $P<0.05$

图 2 大鼠海马组织中 p-mTOR 和 mTOR 的表达

Fig 2 The expression of p-mTOR and mTOR in rat hippocampus

3 讨论

EEDs 是一种广泛存在的危险化学品,可对人体内分泌、神经、免疫和生殖系统功能产生广泛的危害^[5-6]。本课题组前期研究发现,苯并[a]芘暴露可以抑制人胚胎干细胞来源拟胚体的体外增殖,诱导细胞凋亡,抑制间充质转变和 Akt/GSK-3 β 信号通路活性,提示 EEDs 具有显著的神经毒性^[7]。本研究发现,将 BPA+DEHP 与小鼠神经母细胞瘤细胞 Neuro-2a 细胞共培养,也可以抑制细胞体外增殖,诱导细胞凋亡并产生氧化损伤。体内实验中,大鼠经 BPA+DEHP 灌胃暴露 90 d 后,其短期记忆能力下降,证实了 BPA+DEHP 可损伤神经功能的假设。

中枢神经系统中星形胶质细胞增生是退行性病变及中枢神经损伤引发神经组织变化的主要表现^[8-9]。GFAP 是星形胶质细胞特异性标志物,与微管和微丝构成神经元细胞的骨架,维护星形胶质细胞形态稳定,参与神经递质循环、营养支持、突触功能调节等多种神经功能^[10-11]。Nestin 是特异性的表达于神经上皮干细胞上的一种中间丝类型的蛋白,是神经干细胞的特征性标志物^[12-14]。本研究发现,BPA+DEHP 暴露可导致大鼠海马组织中 GFAP 表达上调,nestin 表达下调,细胞凋亡早期标志线粒体膜电位下降、caspase-3 活性升高和 mTOR 磷酸化下调,证实了 BPA+DEHP 可损伤神经细胞增殖能力,诱导细胞凋亡的体外实验结果,并提示 BPA+DEHP 的神经毒性可能与抑制 mTOR 信号通路活性有关。

本研究发现,BPA+DEHP 增强海马组织氧化反应可能与提高大鼠脑组织葡萄糖消耗有关。结合前期研究,笔者认为 EEDs 首先通过抑制生长和凋亡造成神经元损伤^[7],机体通过增强能量和营养供给修复神经元的损伤,但是由于过度氧化应激激活凋亡途径,进一步的加重了神经元损伤,最终造成神经失能。

中医理论认为“肝脑相维”,肝主疏泄,又主藏血,气机调畅,气血和调,则脑清神聪,疏泄失常,则情志失调。抑肝散中包括钩藤、柴胡、茯苓、白术、川芎、当归、甘草,其中钩藤具有平肝镇静的作用,与柴胡、甘草合用可缓解肝气亢盛,镇静神经兴奋。当归和川芎滋润肝血,促进肝脏血液循环,疏通肝血,缓解肝气亢盛,茯苓和白术可以调节肝气,缓解交感神经紧张。本研究通过乙醇/氯仿提取抑肝散中黄酮等活性成分,并证实可抑制 BPA+DEHP 的神经毒性,其机制可能与增强大鼠海马组织中的抗氧化能

力并调节糖代谢紊乱,进而缓解由于氧化应激造成的神经元凋亡和神经损伤有关,并为传统方剂抑肝散的新剂型开发提供了研究基础。

参考文献:

- [1] TASSINARI R, TAIT S, BUSANI L, et al. Toxicological assessment of oral co-exposure to Bisphenol A (BPA) and Bis (2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) in Juvenile rats at environmentally relevant dose levels: evaluation of the synergic, additive or antagonistic effects[J]. Int J Environ Res Public Health, 2021, 18(9): 4584.
- [2] DA SILVA R C, SAINARA TMF, DE SOUSA E A, et al. Potential risk of BPA and phthalates in commercial water bottles: a minireview [J]. J Water Health, 2021, 19(3): 411-435.
- [3] 赵驰, 郭蓉娟, 任非非, 等. 抑肝散活性成分治疗阿尔茨海默病伴发抑郁障碍的网络药理学研究[J/OL]. 海南医学院学报, 2022, 28(2): 124-134.
- [4] 应娜, 李莹, 李姗姗, 等. 抑肝散发挥抗抑郁作用的机制研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(1): 46-49.
- [5] RUBIN B S. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2011, 127(1/2): 27-34.
- [6] ABDEL-MAKSOUUD F M, LEASOR K R, BUTZEN K, et al. Prenatal exposures of male rats to the environmental chemicals bisphenol A and Di (2-Ethylhexyl) phthalate impact the sexual differentiation process[J]. Endocrinology, 2015, 156(12): 4672-4683.
- [7] WANG H, ZHU Y, CHI Y, et al. A human embryonic stem cell-based model for benzo[a]pyrene-induced embryotoxicity[J]. Reprod Toxicol, 2019, 85: 26-33.
- [8] MAREFATI N, BEHESHTI F, VAFAEE F, et al. The effects of in-censole acetate on neuro-inflammation, brain-derived neurotrophic factor and memory impairment induced by lipopolysaccharide in rats [J]. Neurochem Res, 2021, 46(9): 2473-2484.
- [9] FAN S R, REN T T, YUN M Y, et al. Edaravone attenuates cadmium-induced toxicity by inhibiting oxidative stress and inflammation in ICR mice[J]. Neurotoxicology, 2021, 86: 1-9.
- [10] KACÍOVÁ M, ŽELEZNÁ B, BLÁŽKOVÁ M, et al. Aging and high-fat diet feeding lead to peripheral insulin resistance and sex-dependent changes in brain of mouse model of tau pathology THY-Tau22[J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 141.
- [11] SCRIMGEOUR A G, CONDLIN M L, LOBAN A, et al. Omega-3 fatty acids and vitamin D decrease plasma T-Tau, GFAP, and UCH-L1 in experimental traumatic brain injury[J]. Front Nutr, 2021, 8: 685220.
- [12] YANG Z J, WANG Q, WU H, et al. Nestin is required for spindle assembly and cell cycle progression in glioblastoma cells[J]. Mol Cancer Res, 2021; 19(10): 1651-1665.
- [13] KHAVINSON V K, LIN KOVA N S, UMNOR R S. Peptide KED: molecular-genetic aspects of neurogenesis regulation in Alzheimer's disease[J]. Bull Exp Biol Med, 2021, 171(2): 190-193.
- [14] NUNOMURA S, KITAJIMA I, NANRI Y, et al. The FADS mouse: a novel mouse model of atopic keratoconjunctivitis[J]. J Allergy Clin Immunol, 2021, 148(6): 1596-1602.e1.

(2021-09-08 收稿)