

围产期 PFOS 暴露对幼鼠海马 BDNF/TrkB/CREB 信号通路影响

陈聪, 黄炼, 吴艳红, 王婧, 单晓云, 曾怀才

南华大学公共卫生学院预防医学与放射卫生实验中心, 湖南 衡阳 421001

摘要: **目的** 探讨观察母孕鼠围产期全氟辛烷磺酸盐(perfluorooctane sulphonate, PFOS)暴露对幼鼠海马组织 BDNF/TrkB/CREB 信号通路关键基因表达的影响。**方法** 20 只昆明种雌性小鼠随机分为对照组和低、中、高剂量组,从孕鼠怀孕第 2 d 开始(gestation day2, GD2)到幼鼠出生后 21 d(postnatal day21, PND21)分别给予低、中、高剂量组孕鼠 PFOS 剂量为 0.1、1.0、5.0 mg/(kg·bw)灌胃染毒,对照组给予等体积的 0.05% Tween-20 水溶液。灌胃量为 0.1 ml/10 (g·bw)。PND 21 d 处死幼鼠,收集脑组织,分离海马及皮层。HE 染色观察脑组织常规病理改变,实时荧光定量 PCR(Quantitative Real-time PCR, QPCR)检测海马组织中 BDNF、TrkB、CREB、Syn1 及 Syp 的 mRNA 表达水平。**结果** 与对照组相比较,低、中、高三个剂量组对幼鼠的死亡率和体质量的影响差异无统计学意义($P>0.05$)。但是在高剂量组幼鼠海马组织出现空泡,海马 BDNF、TrkB、CREB mRNA 水平显著降低,分别由对照组的(0.98±0.11)、(1.03±0.09)、(1.08±0.12)下降到(0.22±0.21)、(0.71±0.14)、(0.37±0.26),并在中、高剂量组引起了幼鼠突触相关蛋白 Syn1 和 Syp 的 mRNA 水平显著降低,分别由对照组的(1.10±0.09)、(0.97±0.08)下降到中剂量的(0.41±0.23)、(0.71±0.17)和高剂量的(0.39±0.19)、(0.63±0.19),差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** PFOS 损伤海马 BDNF/TrkB/CREB 信号通路可能是 PFOS 神经发育毒性之一。

关键词: 全氟辛烷磺酸盐;神经发育毒性;围产期暴露;海马组织;BDNF/TrkB/CREB 信号通路

中图分类号:R-332 **文献标识码:**A **文章编号:**1006-3110(2019)09-1043-04 **DOI:**10.3969/j.issn.1006-3110.2019.09.006

Effect of perinatal exposure to perfluorooctane sulfonate on BDNF/TrkB/CREB signaling pathways in hippocampus of mice offspring

CHEN Cong, HUANG Lian, WU Yan-hong, WANG Jing, SHAN Xiao-yun, ZENG Huai-cai

Preventive Medicine and Radiation Health Laboratory Center, School of Public Health,

University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

Corresponding author: ZENG huai-cai, E-mail: zenghuaicai@126.com

Abstract: **Objective** To explore the effect of perinatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) on key gene expression of BDNF/TrkB/CREB signaling pathways in hippocampus of mice offspring. **Methods** Twenty pregnant Kunming mice were randomly divided into the control group and the low-, middle- and high-dose groups. The mice in the low-, middle- and high-dose groups were respectively administrated with 0.1, 1.0 and 5.0 mg/(kg·bw) PFOS by gavage from the gestation day 2 to the postnatal day 21. The control group received 0.05% Tween-20 solution. The gavage volume was 0.1 ml/10 (g·bw). The offspring's brain tissues were collected and observed pathologically by hematoxylin-eosin (HE) staining on the postnatal day 21. Quantitative real-time PCR (QPCR) was used to detect mRNA expression levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), tropomyosin-related receptor kinase B (TrkB), cAMP response element-binding protein (CREB), synapsin I (Syn1) and synaptophysin (Syp) in hippocampus tissues. **Results** No statistically significant differences were found in the mortality rate and body weight of mice offspring between the control group and the low-, middle- and high-dose groups ($P>0.05$). However, vacuole was observed in offspring's hippocampus tissues in the high-dose PFOS group. The mRNA levels of BDNF, TrkB and CREB in hippocampus tissues significantly decreased from (0.98±0.11), (1.03±0.09) and (1.08±0.12) in the control group to (0.22±0.21), (0.71±0.14) and (0.37±0.26), respectively. The mRNA levels of Syn1 and Syp in the middle- and high-dose PFOS groups also significantly decreased, which decreased from (1.10±0.09) and (0.97±0.08) in the control group to (0.41±0.23) and (0.71±0.17) in the middle-dose PFOS group and (0.39±0.19) as well as (0.63±0.19) in the high-dose PFOS group, showing statistically significant differences (all $P<0.05$). **Conclusions** PFOS can damage BDNF/TrkB/CREB signaling pathways in hippocampus tissues, which may be one of the mechanisms leading to developmental neurotoxicity of PFOS.

Key words: perfluorooctane sulfonate; developmental neurotoxicity; perinatal exposure; hippocampus tissue; BDNF/TrkB/CREB signaling pathways

基金项目:国家自然科学基金(81273026),湖南省自然科学基金(2017JJ4047),南华大学研究生科学基金(2018KYY224),南华大学大学生创新性实验项目(2018XJXZ400)

作者简介:陈聪(1993-),男,在读研究生,主要从事神经系统疾病的研究工作。

通信作者:曾怀才, E-mail: zenghuaicai@126.com。

全氟辛烷磺酸盐(perfluorooctane sulphonate, PFOS)由于其良好的表面活性、极好的稳定性及疏水疏油性被广泛应用生产生活等多个领域。PFOS 是一种新型的持续性有机污染物,在环境中很难降解。研究表明,PFOS 具有肝脏毒性、免疫毒性、神经毒性等多器官系统毒性。PFOS 能通过血脑屏障和胎盘屏障,其发育毒性尤其是神经发育毒性备受关注。PFOS 能致啮齿类动物神经系统发育迟缓^[1],无论是孕期还是哺乳期 PFOS 暴露,均能使大鼠和小鼠的子代产生认知及行为功能障碍,学习和空间记忆能力异常,影响大鼠的运动行为发育^[2]。离体实验显示,PFOS 能够抑制神经细胞的增殖,诱发神经细胞凋亡^[3]。但 PFOS 神经毒性的确切机制尚不清楚。BDNF/TrkB/CREB 信号通路参与神经系统的发育,维持神经系统的功能^[4]。如 BDNF 与其受体 TrkB 特异性结合后能够激活 MAPK/ERK、PI3K/Akt 和 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{CaMK}$ 等信号通路,发挥对学习记忆功能的促进作用^[5]。本课题组前期研究证实,孕鼠围产期 PFOS 暴露能导致子代大鼠海马组织的突触超微结构发生改变,突触标志物 Syp、突触素等水平降低^[6]。因此,本研究拟通过母鼠围产期 PFOS 暴露,观察幼鼠脑组织的常规病理改变,检测海马组织中 BDNF、TrkB、CREB、Syp 及 Syn1 等基因的转录水平改变,观察 PFOS 对 BDNF/TrkB/CREB 信号通路的影响,探讨 PFOS 的神经发育毒性机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 无特定病原体(SPF)级昆明种小鼠雌性 20 只,雄性 10 只,购自南华大学实验动物部,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2015-002。实验动物使用许可证号:SYXK(湘)2015-0001,体质量 25~28 g,动物饲养条件符合 GB 14925-2010《实验动物 环境及设施》中 SPF 级屏障系统的要求,实验动物室温度控制在 22℃~25℃,相对湿度控制在 50%~60%,气压差控制在 35~45 Pa,12 h 明暗交替。本研究经过南华大学实验动物伦理委员会批准。

1.1.2 仪器和试剂 显微镜;切片机;iQ5 Multicolor Real-Time 聚合酶类反应(PCR)仪(美国 Bio-Rad 公司)。全氟辛烷磺酸钾(K^+ PFOS,德国 Fluka 公司);Trizol Reagent(美国 Invitrogen 公司);RevertAidTM First Strand cDNASynthesis Kit(美国 Thermo 公司);Universal SYBR[®] Green Supermix(美国 Bio-Rad 公司);吐温 20(Tween-20,美国 Sigma 公司);HE;其它试剂为

国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和染毒 小鼠在 SPF 动物房适应性饲养 1 周后,按雌雄比例 2:1 合笼,第 2 d 8:00 检查雌鼠阴栓,发现有阴栓当天定为怀孕 1 d(gestation day 1, GD1),从 GD2 开始给予孕鼠灌胃染毒,至幼鼠出生后 21 d 结束。小鼠分为对照组和低、中、高剂量组 4 组,后 3 组分别给予 PFOS 剂量为 0.1、1.0、5.0 mg/(kg·bw)灌胃染毒,对照组给予等体积的 0.05% Tween-20 水溶液。灌胃量为 0.1 ml/10 g 体质量。幼鼠出生后的 1(postnatal day 1, PND1)、3、7、12、21 d 称量幼鼠体质量。幼鼠出生后 21 d,采用颈椎脱臼法处死,于冰上快速取出脑组织,剥离海马及皮层, -80℃ 保存备用。

1.2.2 幼鼠脑组织病理形态观察 幼鼠出生后 21 d,每组取 3 只,采用颈椎脱臼法处死,分离脑组织,体积分数为 4.00%多聚甲醛溶液固定 24 h,常规脱水、石蜡包埋后,将组织蜡片置于切片机连续切片,厚度为 3 μm ,常规进行 HE 染色,光学显微镜下观察组织形态。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测 mRNA 水平 取 50~100 mg 海马组织,加入 1 ml Trizol 试剂,冰上制备匀浆,然后根据 Trizol 试剂操作说明提取总 RNA,经逆转录合成 cDNA,荧光定量 PCR 检测 mRNA 的水平。本研究所需引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计与合成(表 1)。每窝随机抽取 1 只幼鼠,称取海马组织 50~100 mg,用 Trizol 试剂抽提总 RNA,分光光度计测定吸光度(A)比值 $A_{260}/A_{280} > 1.8$ 时为纯度合格。cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA,采用荧光染料法进行 PCR 扩增。20 μl 的反应体系含 cDNA 1 μl 、上游引物(浓度为 1×10^{-5} mol/L) 0.4 μl 、下游引物(浓度为 1×10^{-5} mol/L) 0.4 μl 、2 \times SYBR Green qPCR 混合液 10.0 μl 、蒸馏水 8.2 μl 。qPCR 扩增条件:95℃,5 min;95℃,15 s;60℃,45 s,共 40 个循环。每个样品设 3 个复孔,根据文献^[7]报道,采用比较循环阈值法($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)。以溶剂 Trion X-20 作为对照组,设为 1,将各剂量组与对照组作比较,得倍数为 N($N = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$),其中 $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{PFOS}) - \Delta\text{Ct}(\text{Control})$, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{test gene}) - \text{Ct}(\beta\text{-actin})$ 。

表 1 各基因 QPCR 的引物序列

基因名称	引物序列	大小(bp)
BDNF	正向引物:CCTCTTGGGGTTAGGAGAACTCA	197
	反向引物:GCCACTTTGTTTCACCCCTTCC	
TrkB	正向引物:CTGCTGGTGAATAATGGGGACT	198

续表 1

基因名称	引物序列	大小(bp)
CREB	反向引物:GGGCTGCTTGCCGTAGCTG	92
	正向引物:GTTCGTCCGTGCCACCTTG	
Syn1	反向引物:TGAGCCTGCCTTCCACTTGAT	99
	正向引物:GGGATGGGCAAGGTCAAGGT	
Syp	反向引物:AATGAAGGGCTCAGCAGTGCC	115
	正向引物:GCTGCTGGCAGACATGGACG	
β-actin	反向引物:GGCGAAGATGGCAAAGACCC	101
	正向引物:TCTTTTCAGCCTTCCTTCTTG	
	反向引物:AGAGGTCTTACGGATGTCAACG	

1.3 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件建立数据库并对数据进行统计分析。计量资料经检验符合正态分布,以进行统计描述;多组数据的组间比较采用单因素方差分析(总体方差齐,进一步通过 LSD-*t* 检验进行多重比较)或 Kruskal-Wallis *H* 检验(总体方差不齐,进一步通过 Nemenyi 法进行多重比较),体重的变化采用重复测量方差分析,计数资料采用率进行描述,组间比较采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 围产期 PFOS 暴露对出生后 21 d 幼鼠存活率的影响 对照组和低、中、高剂量组总幼鼠数分别为 58、

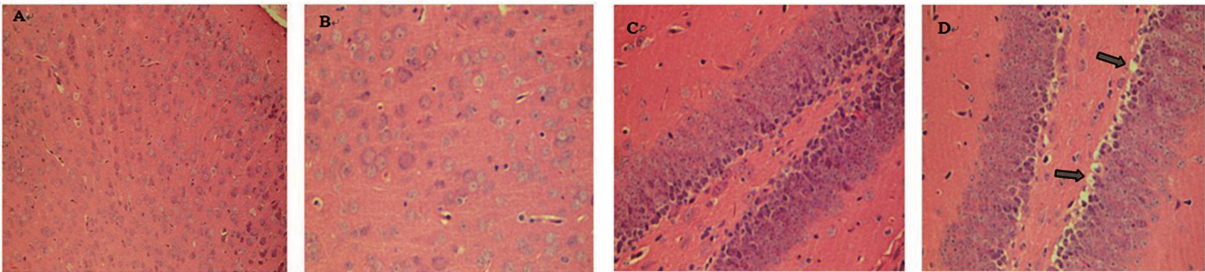
62、55、57 只,PND21 d 的活幼鼠数分别为 57、61、52、53 只,PND21 d 的存活率分别为 98.3%、98.4%、94.5%和 93.0%。各剂量组幼鼠 PND21 d 的存活率与对照组比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.15, P=0.375$)。

2.2 围产期 PFOS 暴露对出生后幼鼠体质量的影响 低、中、高剂量组幼鼠出生 1、3、7、12 和 21 d 体质量与对照组比较及各剂量组之间,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 围产期 PFOS 暴露对出生后幼鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	PND1	PND3	PND7	PND12	PND21
对照组	57	1.64±0.11	2.35±0.12	4.21±0.41	6.59±0.88	10.78±1.49
低剂量组	61	1.66±0.13	2.41±0.13	4.11±0.38	6.48±0.87	10.27±1.32
中剂量组	52	1.58±0.12	2.44±0.11	4.15±0.52	6.54±0.97	10.42±1.68
高剂量组	53	1.59±0.22	2.25±0.14	4.01±0.42	6.45±0.89	10.41±1.65
<i>F</i> 值		0.195	1.338	0.112	0.014	0.060
<i>P</i> 值		0.897	0.329	0.951	0.997	0.979

2.3 围产期 PFOS 暴露对出生后 21 d 幼鼠脑组织病理形态影响 幼鼠出生后 21 d 组织病理学观察显示,围产期 PFOS 暴露未导致幼鼠大脑皮层出现病理损伤(图 1A 和 1B),但高剂量组幼鼠海马组织出现明显空泡(箭头所示)(图 1C 和 1D)。



注:A:对照组皮层,B:5.0 mg/(kg·bw)组皮层;C:对照组海马,D:5.0 mg/(kg·bw)组海马。

图 1 围产期 PFOS 暴露对出生后 21 d 幼鼠脑组织病理形态的影响(HE 染色,10×40 倍)

2.4 围产期 PFOS 暴露对出生后 21 d 幼鼠海马组织中相关基因表达的影响 应用实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR,QPCR)检测出生后 21 d 幼鼠海马组织 BDNF、TrkB、CREB、Syp 及 Syn1 mRNA 表达水平,结果显示,低及中剂量组幼鼠海马组织 BDNF、TrkB 及 CREB mRNA 相对表达量与对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),高剂量组幼鼠海马组织 BDNF、TrkB 及 CREB mRNA 与对照组比较相对表达量下调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。低剂量组幼鼠海马组织 Syp 和 Syn1 mRNA 相对表达水平与对照组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),中、高剂量组幼鼠海马组织 Syp 和 Syn1 mRNA 与对照组比较相

对表达水平下调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 围产期 PFOS 暴露对幼鼠海马组织 BDNF、TrkB、CREB、Syp 及 Syn1 mRNA 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	BDNF	TrkB	CREB	Syp	Syn1
对照组	5	0.98±0.11	1.03±0.09	1.08±0.12	1.10±0.09	0.97±0.08
低剂量组	5	1.09±0.12	1.01±0.24	0.90±0.25	0.95±0.24	0.94±0.18
中剂量组	5	0.71±0.33	0.95±0.15	0.85±0.27	0.41±0.23 ^a	0.71±0.17 ^a
高剂量组	5	0.22±0.21 ^a	0.71±0.14 ^a	0.37±0.26 ^a	0.39±0.19 ^a	0.63±0.19 ^a
<i>F/H</i> 值		2.475 *	4.026	8.458	17.327	12.239 *
<i>P</i> 值		0.006	0.026	<0.001	<0.001	0.007

注:* 采用 Kruskal-Wallis *H* 检验;与对照组比较,^a $P<0.05$ 。

3 讨论

PFOS 是 PFCs 的典型代表物,已在多种环境介质中检出。PFOS 能够蓄积于多种生物的多个器官与组织,蓄积量以肝脏、血液、肾脏及脑组织中较高^[8]。PFOS 能够引起肝脏、肺脏、心血管及神经多系统多器官的毒性^[6]。研究表明,PFOS 能够影响啮齿类动物的行为^[8],导致斑马鱼、非洲爪蟾等实验动物胚胎畸形^[10-11],引发脑坏死,并降低学习记忆以及认知水平。但是 PFOS 的神经毒性机制不明确。而发育中的神经系统更为敏感,所遭受的损害持久且不可逆,故 PFOS 神经发育毒性的研究备受关注。

BDNF/TrkB/CREB 信号分子参与神经元发育、突触连接和长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 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^[12]。BDNF 是神经营养因子家族的重要成员之一,它与 TrkB 结合后,能激活 MAPK 信号通路,促进突触 Syn1、Syp 等多种突触相关蛋白的表达,调节树突形成及树突棘形态,从而调节神经系统的功能^[13]。

本研究结果显示,围产期 PFOS 暴露没有影响幼鼠的生长发育,这与 Johansson 等^[14]的研究结果一致。但是,PFOS 暴露损伤了幼鼠的海马组织结构,造成了海马组织中空泡的出现,同时降低了 BDNF、TrkB、CREB、Syn1 和 Syp 的表达水平。由于 BDNF 基因和 CREB 基因在神经发育中起着至关重要的作用,并且在学习和记忆行为中起着“开关”作用^[13,15],所以 BDNF 和 CREB mRNA 水平的下降可能影响了小鼠的空间学习和记忆能力,但是需要进一步实验证明。Syn1 和 Syp 基因对于神经元的可塑性、存活和神经元功能起着重要作用,本研究中发现中、高剂量组幼鼠海马组织 Syp 和 Syn1 mRNA 表达水平较对照组下降,可能与高剂量 PFOS 暴露损伤海马组织结构有关。此外,有研究证实 BDNF/TrkB/CREB 信号通路能够调节 Syn1 和 Syp 基因水平^[16-17],所以本研究中 BDNF、TrkB、CREB 基因的改变可能是 PFOS 引起 Syn1 和 Syp 基因 mRNA 改变的原因之一。总而言之,围产期 PFOS 暴露对幼鼠神经系统的发育具有损伤作用,其机制可能与 PFOS 损伤 BDNF/TrkB/CREB 信号通路有关。

参考文献

[1] Wang F, Liu W, Ma J, et al. Prenatal and neonatal exposure to perfluorooctane sulfonic acid results in changes in miRNA expression profiles and synapse associated proteins in developing rat brains [J]. Environ Sci Technol, 2012, 46(12): 6822-6829.

[2] Wang Y, Liu W, Zhang Q, et al. Effects of developmental perfluorooctane sulfonate exposure on spatial learning and memory ability of rats and mechanism associated with synaptic plasticity [J]. Food Chem Toxicol, 2015, 76: 70-76.

[3] Sun P, Nie X, Chen X, et al. Nrf2 signaling elicits a neuroprotective role against PFOS-mediated oxidative damage and apoptosis [J]. Neurochem Res, 2018, 43(12): 2446-2459.

[4] Chen J, Niu Q, Xia T, Zhou G, et al. ERK1/2-mediated disruption of BDNF-TrkB signaling causes synaptic impairment contributing to fluoride-induced developmental neurotoxicity [J]. Toxicology, 2018, 410: 222-230.

[5] Sasi M, Vignoli B, Canossa M, et al. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling [J]. Pflugers Arch, 2017, 469(5-6): 593-610.

[6] Chen T, Zhang L, Yue JQ, et al. Prenatal PFOS exposure induces oxidative stress and apoptosis in the lung of rat off-spring [J]. Reprod Toxicol, 2012, 33(4): 538-545.

[7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[8] Zeng HC, He QZ, Li YY, et al. Prenatal exposure to PFOS caused mitochondria-mediated apoptosis in heart of weaned rat [J]. Environ Toxicol, 2015, 30(9): 1082-1090.

[9] Spulber S, Kilian P, Wan Ibrahim WN, et al. PFOS induces behavioral alterations, including spontaneous hyperactivity that is corrected by dexamfetamine in zebrafish larvae [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94227.

[10] Jantzen CE, Annunziato KM, Cooper KR. Behavioral, morphometric, and gene expression effects in adult zebrafish (*Danio rerio*) embryonically exposed to PFOA, PFOS, and PFNA [J]. Aquat Toxicol, 2016, 180: 123-130.

[11] 孙诗博, 李武, 潘小元, 等. PFOS 对斑马鱼胚胎发育及 SOD、MDA 和 GSH 含量的影响 [J]. 实用预防医学, 2015, 22(6): 648-651.

[12] Song M, Martinowich K, Lee FS, et al. BDNF at the synapse: why location matters [J]. Mol Psychiatry, 2017, 22(10): 1370-1375.

[13] Yoshii A, Constantine-Paton M. Post-synaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease [J]. Dev Neurobiol, 2010, 70(5): 304-322.

[14] Johansson N, Eriksson P, Viberg H. Neonatal exposure to PFOS and PFOA in mice results in changes in proteins which are important for neuronal growth and synaptogenesis in the developing brain [J]. Toxicol Sci, 2009, 108(2): 412-418.

[15] Landeira BS, Santana TTDS, Araújo JAM, et al. Activity-independent effects of creb on neuronal survival and differentiation during mouse cerebral cortex development [J]. Cereb Cortex, 2018, 28(2): 538-548.

[16] Matsumoto T, Numakawa T, Yokomaku D, et al. Brain-derived neurotrophic factor-induced potentiation of glutamate and GABA release: different dependency on signaling pathways and neuronal activity [J]. Mol Cell Neurosci, 2006, 31(1): 70-84.

[17] Kumamaru E, Numakawa T, Adachi N, et al. Glucocorticoid prevents brain-derived neurotrophic factor-mediated maturation of synaptic function in developing hippocampal neurons through reduction in the activity of mitogen-activated protein kinase [J]. Mol Endocrinol, 2008, 22(3): 546-558.