

环境雌激素双酚 A 对成年小鼠学习记忆 和突触结构的影响*

刘幸毅¹ 徐晓虹^{1,2} 张 勤¹ 张广侠¹ 季佳琳¹ 董芳妮¹ 杨艳玲¹

(¹ 浙江师范大学化学与生命科学学院; ² 浙江师范大学心理研究所, 浙江金华 321004)

摘 要 双酚 A (bisphenol, BPA) 是一种广泛存在的环境内分泌干扰物, 它可与雌激素受体结合干扰内源性雌激素对中枢神经系统的调控作用。本研究通过将 10 周龄小鼠灌胃染毒 BPA (0.4、4、40 mg/kg/day) 3 个月, 研究长期 BPA 暴露对成年小鼠记忆行为和突触可塑性的影响。开场行为测试结果表明, BPA (0.4、4、40 mg/kg/day) 增加雄性的站立次数和理毛频率, BPA (4 mg/kg/day) 却显著减少雌鼠的站立次数。水迷宫和被动回避行为模型检测显示, BPA 主要损伤雄鼠的空间学习记忆和被动回避记忆。通过制备海马 CA1 区超薄切片后, 电镜观测发现, BPA (0.4、40 mg/kg/day) 暴露降低雄鼠海马 CA1 区突触数密度, 缩短雄鼠突触前活性带长度, 减小雄鼠突触后致密体(PSD)厚度, 增加雄鼠突触间隙宽度。进一步用 Western blot 方法检测突触前、后的标志性蛋白 Synapsin I 和 PSD95 以及兴奋性氨基酸 NMDA 受体 NR1 亚基和 AMPA 受体 GluR1 亚基蛋白的表达, 发现 BPA 暴露致雄鼠 Synapsin I、PSD95、NR1 蛋白表达水平下调。而 BPA 对雌鼠的记忆行为、突触形态、突触蛋白和受体蛋白均没有明显作用。以上结果提示长期 BPA 暴露性别特异性地影响成年小鼠的活动性和探究行为, 损伤雄鼠的学习记忆, 这些作用可能通过下调突触蛋白和 NMDA 受体的表达而负性影响突触结构可塑性, 最终影响雄鼠的学习记忆功能。

关键词 双酚 A; 学习记忆; 突触形态结构; Synapsin I; PSD-95; NMDA 受体

分类号 B845

1 前言

双酚 A (bisphenol A, BPA) 大量使用于食品和饮料的碳酸聚酯包装材料、树脂内膜和牙齿固封剂, 以及各种化学日用品的添加材料。来自一些发达国家的调查显示长期以来人们一直暴露于低剂量的 BPA 中(Erlar & Nova, 2010)。美国疾病控制中心的报告显示, 来自 394 份被测人群尿液样本中有 95% 检测出 BPA (Calafat et al., 2005)。BPA 是一种兼有拟雌激素、抗雌激素和抗雄激素活性的环境内分泌干扰物, 它不仅可以通过低亲和性与雌激素受体结合, 还可与雄激素受体结合而干扰内源性激素对脑的调节作用 (Leranth, Szigeti-Buck, Maclusk, & Hajszan, 2008)。由于性激素在神经发育及其性别分化中的重要作用, 大量的研究聚焦在发育期特别是

围生期 BPA 暴露对脑发育及其成年后神经行为的影响(Fujimoto, Kubo, & Aou, 2007; Gioiosa, Fissore, Ghirardelli, Parmigiani, & Palanza, 2007; Goncalves, Cunha, Barros, & Martinez, 2010; Xu, Zhang, Wang, Ye, & Luo, 2010; Patisaul, Fortino, & Polston, 2007; Patisaul & Bateman, 2008; Narita, Miyagawa, Mizou, Yoshida, & Suzuki, 2007; Negishi et al., 2004; Kiguchi, Fujita, Lee, Shimizu, & Koshikawa, 2007)。然而, 性激素也参与调节成年脑的功能活动, 因此, 推测长期暴露于 BPA 环境的成年人其神经行为可能会受到影响。有人发现在妊娠和哺乳期间长期暴露于低剂量 BPA 的母鼠其母性行为发生改变(Seta, Minder, Dessi-Fulgheri, & Farabollini, 2005)。我们前期研究发现青春期暴露于 BPA 性别特异性的影响成年小鼠的探究、焦虑和学习记忆等多种行为

收稿日期: 2012-11-27

* 国家自然科学基金项目(81172627), 浙江省自然科学基金重点项目(Z2090955)。

通讯作者: 徐晓虹, E-mail: xuxh63@zjnu.cn; 电话: (0579)82282269

(田栋等, 2011)。但成年期 BPA 暴露对行为的影响极其机制知之甚少。

海马的突触可塑性与学习记忆行为密切相关, 雌激素可通过正向调节突触发生、神经环路联系和突触传递而促进突触可塑性(Brinton, 2009; Woolley, 1998)。最近, 有人发现 BPA 可以干扰性激素的突触重塑作用(Hajszan & Leranth, 2010)。在大鼠和灵长类, BPA 可抑制雌激素和雄激素诱导增加的海马和前皮层 70%~100%的棘突触(Leranth & Szigeti-Buck et al., 2008; Leranth, Hajszan, Szigeti-Buck, Bober & MacLusky 2008; MacLusky, Hajszan, & Leranth, 2005), BPA 暴露数天促进新生大鼠小脑蒲肯野氏细胞的树突生长和下丘脑神经元树突密度(Yokosuka et al., 2008; Shikimi, Sakamoto, Mezaki, Ukena, & Tsutsui, 2004)。我们以往的研究发现 BPA 快速增加体外海马神经元树突丝密度和运动性(Xu & Ye et al., 2010)。突触界面是一个对行为训练和化学物质非常敏感的结构, 其中的一些参数, 如突触间隙(synaptic cleft)、突触前活性带(synaptic active zone)、突触后致密体(postsynaptic density, PSD)和突触界面曲率(curvature of synaptic interface)可因刺激而发生改变(Marrone & Petit, 2002)。雌激素改善卵巢摘除小鼠记忆行为的同时伴随有海马和前皮层突触界面结构的变化, 包括突触间隙的缩小和 PSD 厚度增加(Xu & Zhang, 2006)。位于突触后膜上的 PSD 含有细胞骨架和脚手架蛋白、谷氨酸受体、钙调蛋白结合蛋白、离子通道和信号分子等多种蛋白, 这些蛋白表达的改变和相互作用均可影响突触活性和可塑性, 同时也改变 PSD 的厚度(Trinidad, Thalhammer, Specht, Schoepfer, & Burlingame, 2005)。那么, BPA 影响成年神经行为是否与突触界面结构修饰的改变有关呢?

本研究通过将成年小鼠长期暴露于低剂量 BPA, 研究 BPA 对成年小鼠活动性、探究、学习记忆等行为的影响, 观察海马 CA1 区神经元突触密度和突触界面结构的改变; 进一步通过 Western blot 检测海马突触蛋白 Synapsin I 和 PSD-95 (postsynaptic density protein of 95 kDa), 以及兴奋性氨基酸 NMDA 和 AMPA 受体表达的改变, 探讨 BPA 影响行为和突触结构可塑性的机制。

2 材料和方法

2.1 实验动物模型制备与分组

清洁级 8 周龄 ICR 雌雄小鼠, 雄性体重 30~35

g, 雌性体重 25~30 g, 购于浙江省金华市药检所。小鼠雌雄分开饲养, 每笼 10~11 只小鼠, 饲养环境为昼夜 12 h 交替, 饲养室温度控制在 18~22℃, 湿度在 50%~60%, 水和食物自由摄取。小鼠适应 2 周后, 随机分为 BPA 暴露组(0.4, 4, 40 mg/kg/day) (BPA, 99.8%, 上海生工生物工程技术服务有限公司)和溶媒对照组(金龙鱼食用油), 每组雌雄各 22 只。每天上午 8 点灌胃染毒, 持续 12 周。染毒结束 3 天后进行实验。

2.2 行为测试

各组小鼠在 BPA 暴露结束 3 天后, 按以下顺序分别检测各项行为。每次开始行为测试前, 都对动物进行 3 次抚摸用以适应行为学测试。

2.2.1 开场行为

旷场箱为一正方形模型(40 cm × 40 cm × 30 cm), 分为 16 小格。记录小鼠 1 min 和 5 min 内由底面中心开始跑动所穿越的格数、站立和理毛的次数。穿越格数可评价小鼠运动活性, 站立次数评价小鼠在新异环境中的探究行为, 理毛的次数反应动物在冲突状态下的一种转移行为(Frye & Seliga, 2001)。各项指标由动物行为分析系统(TSE System GmbH, 德国)记录。每组 12 只动物, 每只小鼠测试结束后清除粪便及尿液, 并用酒精擦拭旷场箱, 然后进行下一只小鼠的测试。

2.2.2 水迷宫测试

开场行为测试后的第二天检测, 每组 12 只动物。Morris 水迷宫(Morris water maze)用于检测动物的空间学习记忆能力。水迷宫为高 45 cm, 直径 90 cm 的黑色圆柱形水池, 水深 25 cm, 水温度控制在 25±1℃, 一个直径为 10 cm 的黑色平台位于水下 1 cm 处。训练时将小鼠面向池壁放入水中, 由摄像头记录小鼠 60 s 内在池中寻找平台的游泳轨迹, 小鼠找到平台并在平台上停留 15 s 后, 放回饲养笼内休息 30 s, 然后进行下一次训练。如果小鼠在 60 s 内找不到平台, 就人为将小鼠放到平台上停留 15 s。水迷宫人为划分为 4 个象限, 每次在不同象限将小鼠放入水中。每天连续训练 4 次, 为期 4 天。由测试软件(TSE System GmbH, 德国)分析搜索路径。

2.2.3 被动回避反应

水迷宫测试后的第二天检测, 每组 12 只动物。跳台实验用于检测动物被动回避电击的学习记忆行为。被动回避反应箱为 15 cm × 15 cm × 30 cm 的塑料箱, 箱底由直径为 0.3 cm 的铜栅栏铺设, 间距

宽度为 0.5cm。箱内一角落放置一个高 2.5 cm, 直径 5 cm 的橡胶平台作为动物回避电击的安全区。实验开始前将小鼠放置在回避箱内自由适应 3 min, 第二天将小鼠放置在橡胶平台上, 当小鼠跳下平台时立即给予电击(40V 交流电) 5 sec, 记录小鼠跳下平台所需时间为起始潜伏期。24 h 后检测小鼠记忆保持力, 将小鼠放置在平台上, 记录小鼠跳下平台的潜伏期, 记录时间为 3 min, 超过 3 min 还没有跳下来的小鼠潜伏期记为 180 sec (Hiramatsu, Sasaki, & Kameyama, 1995)。动物电击后跳下平台潜伏期越短表明其被动回避记忆能力越差。

2.3 体重、生殖器官系数、血液性激素水平

分别称重每组雌、雄小鼠 BPA 暴露前(10 w 龄)、后(22.5 w 龄)的体重($n=12$)。行为测试结束后的第二天(24 w 龄), 小鼠眼眶采血, 放射免疫法分别检测雌、雄鼠的血清雌二醇和睾酮水平($n=10$); 分离子宫或双侧睾丸, 称重, 计算生殖器官系数($n=10$)。

2.4 电镜超薄切片制备和突触形态测算

2.4.1 超薄切片制备

BPA 暴露后 3d, 每组取 6 只小鼠断头取脑, 用 3%的戊二醛固定, 待脑块稍变硬后, 小心剥取海马并分离 CA1 区。按常规方法制备海马 CA1 区超薄切片(片厚为 70 nm), 用 H-7650 TEM 型电镜 (Hitachi, Japan)拍摄海马 CA1 区的 Gray I 型(即兴奋型)突触照片, 用 Image Pro-Plus 图像分析软件

(Media Cybernetics, USA)计算突触数密度($\times 10,000$)和测量突触界面结构($\times 100,000$)。每组 40 张照片, 测定过程采用“双盲法”。

2.4.2 突触数密度测算

突触数密度(N_v)用立体计量学方法定量分析(陈玉翠, 韩太真, 沈建新, 乔建天, 1999)。选用的参照系均为单位体积(面积)的组织。所用公式如下:

$N_v = 8ENa / \pi^2$ (Na 为单位面积中的突触数目, E 为 PSD 长度倒数的平均值);

$Na = \sum Nx / \sum Ar$ (Nx 为每张 1 万倍的照片上的突触数目, Ar 为每张照片的面积)

2.4.3 突触界面结构测量

突触间隙宽度取每个突触上最大、最小和中间 3 个值的平均, PSD 厚度为 PSD 的最大值, 突触界面曲率以突触界面弧长与弦长之比表示, 活性带长度以突触小泡密集的区域长度(图 1)。每组测算约 90 个突触。

2.5 蛋白的 Western blot 检测

2.5.1 蛋白样品的制备

BPA 暴露后 3 d, 小鼠断头取脑($n=4$), 分离海马组织后迅速放入液氮, 在转存于 -80°C 低温冰箱。按组织净重(g): 裂解液体积(ml)=1:10 的比例, 加入相应体积蛋白抽提剂匀浆, 4°C 800 g 离心 10 min, 取上清, 4°C 12000 g 离心 30 min, 弃上清, 收集沉淀, 加等量上样缓冲液, 沸水煮沸 3~5 分钟变性, 分装, -20°C 保存。

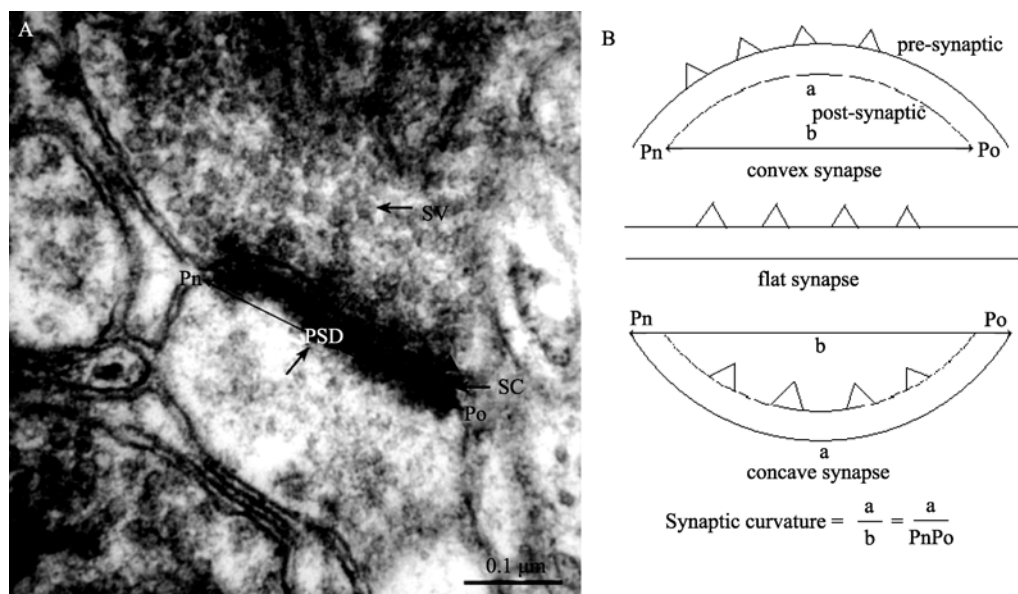


图 1 突触界面结构超微结构测量示意图

注: 箭头所示为突触前活性带长度; 突触界面曲率= $a/b=a/PnPo$; SC—突触间隙; SV—突触囊泡

2.5.2 Western blot 分析

取 10-15 μ l 蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳。将蛋白湿转至硝酸纤维素膜上(300 mA, 2 h)后, 用 5%脱脂牛奶封闭 2 h; 分别与一抗[NR1 (1:700, Santa Cruz, 美国)、 GluR1 (1:1000, Abcam, 美国)、synapsin I (1:1000, Cell signaling technology, 美国)、PSD-95 (1:1000, Abcam, 美国)、 β -actin (1:700, Santa Cruz, 美国)]孵育 2h, 漂洗 15 min \times 3; 二抗(1:700, 武汉博士德)孵育 1h, 漂洗 3 min \times 5; 显色, 用免疫化学发光试剂(ECL 试剂)反应 0.5~1min 后, 用保鲜膜覆盖 NC 膜, X-胶片(美国 Kodak 公司)曝光、显影和定影, 显现特异的蛋白条带。曝光好的 X-光胶片用扫描仪扫描, 应用 Metamorph (美国 Universal Imaging Corp)软件进行条带光密度的半定量分析。

2.6 统计学处理

所得的数据用平均值 \pm 标准误表示, 采用 SPSS 18.0 软件包, 水迷宫 4 天训练结果采用重复三因素(BPA 暴露 \times 性别 \times 训练天数)方差分析(three-way ANOVE), 其它行为结果、体重和突触形态测算采用重复双因素(BPA 暴露 \times 性别)方差分析(two-way ANOVE), 生殖器官系数、血清激素水平和 Western blot 结果用单因素(BPA 暴露)方差分析(one-way ANOVE)。然后进行事后检验(Post-hoc test, LSD)。 $p < 0.05$ 作为具有统计学差异显著性。

3 结果

3.1 体重、生殖器官/体重比、血液中激素含量

BPA 暴露前(10 周龄) 小鼠体重没有明显的性别差异, 随后, 雄鼠的体重增长加速, 到 22.5 周龄时, 雄鼠体重明显高于雌鼠, $F(1,88)=548.32$, $p < 0.001$ 。BPA 暴露 \times 性别的交互作用显著影响小鼠体重, $F(3,82)=5.76$, $p=0.001$; 而暴露因素对体重没有影响, $F(3,86)=0.22$, $p=0.882$ (图 2)。与同性别对照组相比, 0.4 和 40 mg/kg/day BPA 暴露 12 周显著

增加雄鼠的体重($p < 0.05$)。BPA 暴露对雌、雄小鼠生殖器官/体重比、雌鼠血清雌二醇水平均没有显著影响, 但 0.4 和 4 mg/kg/day BPA 显著降低雄鼠血清的睾酮水平($p < 0.05$) (表 1)。

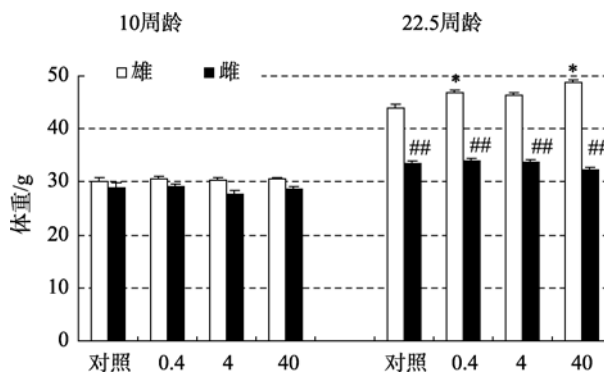


图 2 BPA 暴露对成年小鼠体重的影响($M \pm SE$, $n=12$)

注: * $p < 0.05$, 与对照组相比; ## $p < 0.01$, 与雄性相比。

3.2 旷场行为

双因素方差分析表明, BPA 暴露 \times 性别交互作用对小鼠第 1 min 和 5 min 的跑格数没有明显作用, 但显著影响站立和理毛次数 [$F(3,82)=5.01$, $p=0.003$; $F(3,82)=26.91$, $p < 0.001$, $n=90$]。性别因素对第 1 min 和 5 min 的跑格数、站立和理毛次数均有显著影响, 分别为 $F(1,88) = 18.63$, $p < 0.001$; $F(1,88) = 5.17$, $p=0.025$; $F(1,88) = 5.27$, $p=0.024$; $F(1,88) = 18.52$, $p < 0.001$ 。其中, 正常雄鼠第 1 分钟的跑格数明显高于雌鼠($p < 0.05$), 4 mg/kg/day BPA 消除了这一性别差异。暴露因素显著影响第 1 min 的跑格数 ($F(3,86)=3.23$, $p=0.026$) 和理毛次数 ($F(3,86)=12.69$, $p < 0.001$)。与同性别对照组相比, BPA 显著增加雄鼠的理毛和站立次数 ($p < 0.05$, $p < 0.01$), 却降低雌鼠的站立次数 (0.4 mg/kg/day, $p < 0.05$), 并因此诱导雄性高于雌性的性别差异 ($p < 0.05$, $p < 0.01$)。这些结果表明长期 BPA 暴露促进雄鼠却抑制雌鼠的探究活动, 加剧雄鼠在冲突情况下的焦虑样状态(表 2)。

表 1 双酚 A 暴露对成年小鼠血清性激素水平和生殖器官系数的影响($Mean \pm SE$)

| 组别 | <i>n</i> | 血清雌二醇 (pg/ml) | 子宫/体重比 (mg/g %) | 血清睾酮 (ng/ml) | 睾丸/体重 (mg/g %) |
|-------------------|----------|------------------|--------------------|------------------|-------------------|
| 对照组 | 10 | 2.63 \pm 0.26 | 0.54 \pm 0.01 | 1.06 \pm 0.07 | 0.72 \pm 0.06 |
| BPA 0.4 mg/kg/day | 10 | 2.88 \pm 0.29 | 0.55 \pm 0.03 | 0.66 \pm 0.04* | 0.69 \pm 0.04 |
| BPA 4 mg/kg/day | 10 | 3.25 \pm 0.36 | 0.51 \pm 0.02 | 0.81 \pm 0.09 | 0.71 \pm 0.06 |
| BPA 40 mg/kg/day | 10 | 3.50 \pm 0.42 | 0.51 \pm 0.03 | 0.84 \pm 0.04 | 0.67 \pm 0.03 |

注: * $p < 0.05$, 与同性别对照组相比。

表 2 成年期双酚 A 暴露对小鼠旷场行为的影响($Mean \pm SE$)

| 组别 | <i>n</i> | 一分钟跑格数 | 五分钟跑格数 | 理毛次数 | 站立次数 |
|-----------------|----------|-----------|------------|--------------|-------------|
| 雄 | | | | | |
| 对照组 | 12 | 65.0±4.7 | 209.8±15.5 | 3.31±0.56 | 13.4±2.0 |
| BPA0.4mg/kg/day | 12 | 69.2±4.2 | 224.2±22.8 | 4.08±0.57 | 21.6±2.6* |
| BPA4mg/kg/day | 12 | 71.2±3.4 | 233.8±12.3 | 6.23±0.67 * | 23.2±3.1* |
| BPA40mg/kg/day | 12 | 65.2±2.8 | 201.2±9.7 | 13.90±0.65** | 19.8±1.1 |
| 雌 | | | | | |
| 对照组 | 12 | 44.2±4.3# | 175.2±12.5 | 2.92±0.49 | 16.6±2.4 |
| BPA0.4mg/kg/day | 12 | 52.9±4.7# | 199.8±11.5 | 2.85±0.27 | 9.08±1.5*## |
| BPA4mg/kg/day | 12 | 65.2±6.4 | 204.8±12.7 | 3.31±0.36# | 12.9±2.2# |
| BPA40mg/kg/day | 12 | 49.7±3.5# | 181.3±13.7 | 4.85±0.62## | 20.3±2.2 |

注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 与同性别对照组相比; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, 与同处理雄性相比。

3.3 水迷宫

在 4 天的水迷宫训练中, 各组小鼠的游泳平均速度没有明显差异, 但每天探索平台的平均距离表现为随训练天数的增加而缩短, 说明各组小鼠都具有一定的空间学习和记忆能力, 但正常雌鼠探索平台所需的平均距离大于雄鼠(第 3、4 天, $p < 0.05$), 表明正常状态下雄鼠具有更好的空间学习记忆能力。多因素方差分析表明, BPA 暴露×性别×训练时间($F(9,313)=2.58$, $p=0.007$)、BPA 暴露×性别($F(3,337)=2.81$, $p=0.040$)、性别×训练时间($F(3, 337)=3.34$, $p=0.020$)的交互作用均显著影响小鼠搜索平台的平均距离。性别以及训练时间因素也显著影响小鼠搜索平台的平均距离($F(1,343)=15.03$, $p < 0.001$; $F(3, 341) = 81.02$, $p < 0.001$)。BPA 暴露显著延长雄鼠搜索平台的平均距离($p < 0.05$), 但对雌鼠没有影响。表明长期 BPA 暴露性别特异性地损伤成年雄鼠的空间记忆能力, 并因此消除空间学习记忆的性别差异(图 3)。

3.4 被动回避反应

电击前, 各组小鼠步下平台的潜伏期没有差异,

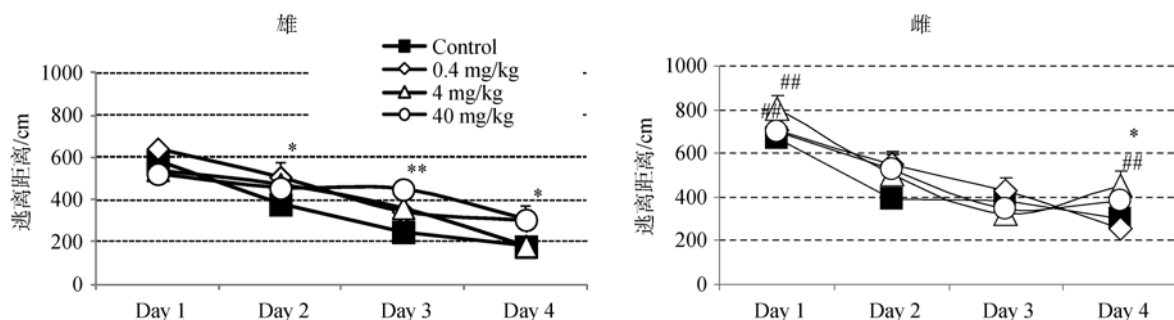
均可在 5 sec 内跳下平台。电击后 24 h, 正常小鼠步下平台的潜伏期均显著延长, 并表现出性别差异($p < 0.05$, 雄鼠>雌鼠)。双因素方差分析表明, BPA 暴露×性别的交互作用对电击后步下潜伏期没有影响, 但 BPA 暴露以及性别因素均显著影响雄鼠遭电击后的步下潜伏期($F(3,89)=2.75$, $p=0.048$; $F(1, 91)=4.03$, $p=0.046$)。与同性别对照组相比, 40 mg/kg/day BPA 明显缩短了雄鼠电击后的步下潜伏期($p < 0.05$); 表明长期 BPA 暴露性别特异性地损伤成年雄鼠的被动回避记忆能力, 并因此消除其性别差异(图 4)。

3.5 突触数密度和突触界面结构

为了分析长期 BPA 暴露对学习记忆行为影响与突触形成和结构的关系, 本研究检查了与学习记忆关系密切的海马 CA1 区锥体细胞的突触数密度和突触结构修饰。

3.5.1 BPA 暴露对突触数目的影响

双因素方差分析表明, BPA 暴露×性别的交互作用、BPA 暴露、以及性别因素对突触数密度均有显著影响($F(3,40)=4.35$, $p=0.01$; $F(3,40)=3.89$, $p <$

图 3 双酚 A 暴露对成年小鼠水迷宫搜索平台距离的影响($M \pm SE$)

注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 与同性别对照组相比; # $p < 0.05$, 与同剂量的雌性相比。

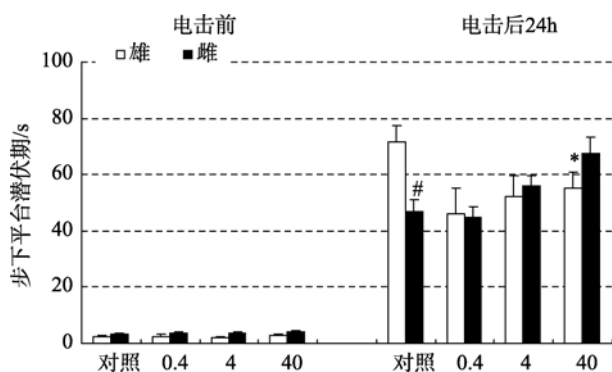


图4 成年双酚A暴露对小鼠被动回避行为的影响($M \pm SE$)

注: * $p < 0.05$, 与同性别对照组相比; # $p < 0.05$, 与同剂量的雄性相比。

0.05; $F(1,78)=4.91$, $p < 0.01$)。0.4 和 40 mg/kg/day BPA 暴露显著降低了雄鼠海马 CA1 区突触数密度 ($p < 0.01$), 并因此诱导成年小鼠海马 CA 区突触密度的性别差异 ($p < 0.01$, 雄鼠 < 雌鼠) (图 5)。

3.5.2 BPA 暴露对突触界面结构的影响

双因素方差分析表明, BPA 暴露×性别的交互作用、BPA 暴露、以及性别因素对突触活性带长度和突触间隙宽度均没有影响, 但 BPA 暴露×性别的交互作用显著影响突触间隙宽度 ($F(3,712)=3.54$, $p = 0.015$) 和突触后致密体厚度 (PSD, $F(3,712)=3.91$,

$p < 0.001$), BPA 暴露因素也具有相似作用 (突触间隙, $F(3,712)=4.49$, $p < 0.001$; PSD, $F(3,712)=3.81$, $p = 0.01$)。与同性别对照组相比, BPA 显著加宽雄鼠海马的突触间隙宽度 ($p < 0.05$, $p < 0.01$), 缩短其活性带长度 (0.4 mg/kg/day, $p < 0.05$), 并减小 PSD 厚度 (0.4、40 mg/kg/day, $p < 0.05$), 但对雌鼠没有影响 (图 6)。以上结果表明长期 BPA 暴露主要影响成年雄鼠的突触形成和结构修饰, 该结果与 BPA 对记忆行为的影响相一致。

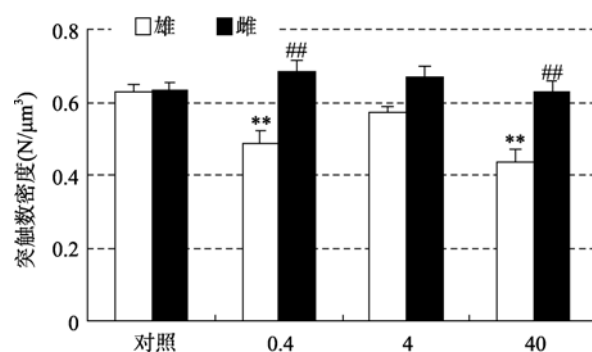


图5 成年双酚A暴露对小鼠海马CA1区突触数密度的影响($M \pm SE$)

注: ** $p < 0.01$, 与同性别对照组相比; ## $p < 0.01$, 与同剂量的雄性相比。

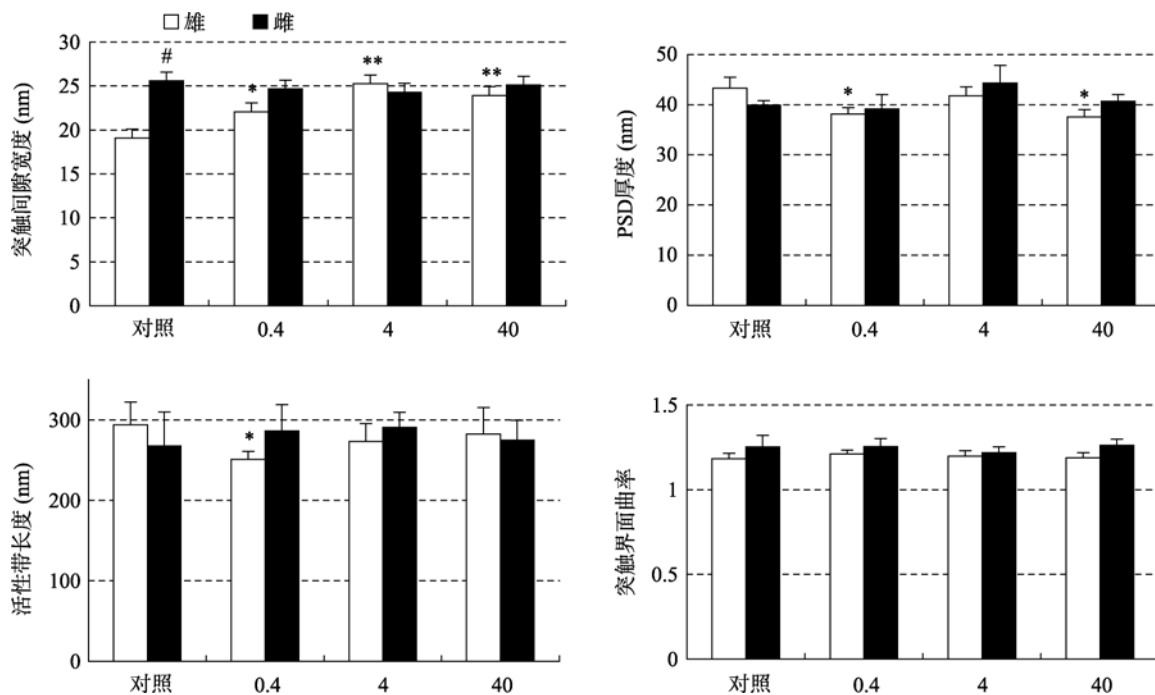


图6 成年双酚A暴露对小鼠海马CA1区突触界面结构的影响($M \pm SE$)

注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 与同性别对照组相比; # $p < 0.05$, 与同剂量的雄性相比。

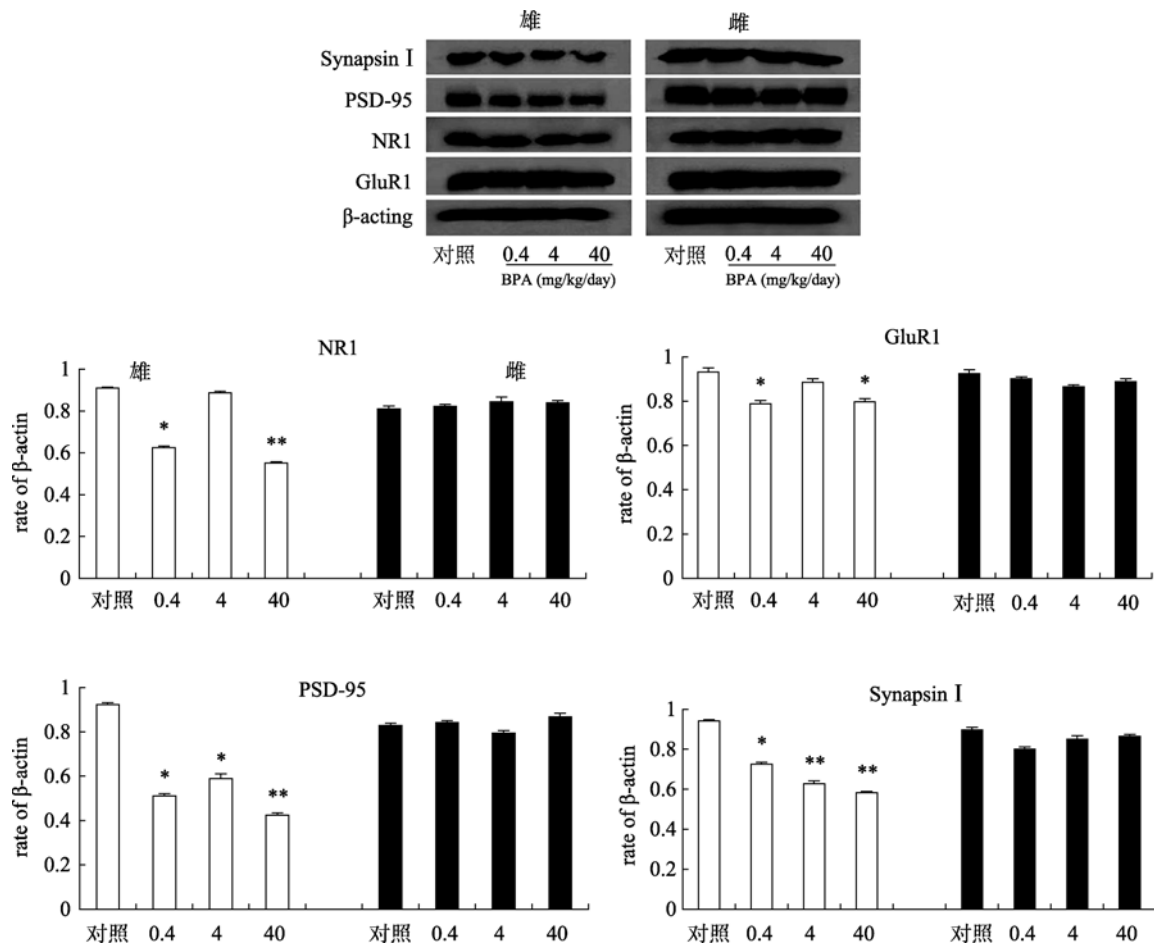


图 7 双酚 A 暴露对成年小鼠海马突触蛋白和受体表达的影响($M \pm SE$)

注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 与同性别对照组相比。

3.6 突触蛋白和 NR1 和 GluR1 的表达

为了进一步分析 BPA 损伤学习记忆和突触形成的机制, 本研究采用 Western blot 分析了长期 BPA 暴露后, 海马突触标志性蛋白和谷氨酸 NMDA 和 AMPA 受体表达的变化。结果表明, BPA 性别特异性地抑制突触蛋白和受体的表达, 主要表现为 3 个剂量 BPA 均下调雄鼠 Synapsin I 和 PSD-95 表达($p < 0.05$, $p < 0.01$), 0.4 和 40 mg/kg/day BPA 下调 NMDA 受体 NR1 亚基表达($p < 0.05$, $p < 0.01$), 但对雌鼠的这些蛋白没有明显影响; 此外, BPA 不影响雌、雄鼠的 AMPA 受体亚基 GluR1 表达。以上结果提示成年雄鼠海马的突触蛋白和 NMDA 受体对 BPA 更为敏感, 该结果与 BPA 引起的突触形成和结构变化相一致的(图 7)。

4 讨论

由于性激素在脑发育及其性别分化中的重要作用, 目前大多数 BPA 神经毒性研究都聚焦在围

生期暴露对远期神经行为的影响。本研究首次报道了成年动物长期暴露于 BPA 可以改变包括学习记忆在内的多种神经行为。

开场行为实验表明, 正常雄性小鼠比雌鼠具有更高的活动性, 但这一性别差异经长期 BPA (4 mg/kg/day) 暴露后消失。与此不同, BPA 对小鼠的探究活性具有明显的性别差异性作用, 促进雄鼠却抑制雌鼠的探究活动, 并因此诱导探究行为出现性别差异。许多采用啮齿类进行的开场行为研究都报道雄性的探究行为对 BPA 较为敏感(Fujimoto et al., 2007; Goncalves, Cunha, Barros, & Martinez, 2010; Zhang, Xu, Wang, Luo, & Ye, 2009)。我们以往的研究也发现, 围生期 BPA 暴露对成年后雄鼠的探究行为有促进作用(Zhang et al., 2009), 这与本研究发现的成年时长期 BPA 暴露促进雄鼠探究活性的结果一致, 但与围生期暴露不同, 成年期暴露抑制了雌鼠的探究活性。理毛行为反应动物在矛盾冲突状态下的一种转移行为, 是一种焦虑的表现。与围生

期暴露相同(Negishi et al., 2003; Zhang et al., 2009), 成年期 BPA 暴露主要增加雄性的理毛频率, 表明 BPA 对雄性有促焦虑样作用。

来自动物和人类的大量研究均发现空间学习记忆存在雌(女)性劣于雄(男)性的性别差异(Carr et al., 2003; Driscoll, Hamilton, Yeo, Brooks, & Sutherland, 2005), 本研究也发现了类似现象, 在水迷宫航行测试中, 雌鼠需游过更长距离才能找到平台。然而, 长期 BPA 暴露主要损伤雄鼠的空间记忆, 对雌鼠没有明显影响, 因而使正常的空间记忆性别差异消除。目前关于成年 BPA 暴露对动物学习记忆影响的报道很少。仅有的数据来自 Eilam-Stock 等, 一次性 0.04 mg/kg BPA 急性处理损伤雄性成年大鼠的物体识别和空间位置的视觉和空间记忆(Eilam-Stock, Serrano, Frankfurt, & Luine, 2012), 阻断 17 β -雌二醇(17 β -E₂)对卵巢摘除成年雌鼠视觉和空间记忆的改善作用(Inagaki, Frankfurt, & Luine, 2012)。我们曾经观察青春至成年早期 BPA 暴露对学习记忆的影响, 发现也是主要损伤雄性的记忆行为(田栋等, 2011)。Kim 等也发现青年雄性小鼠 BPA (0.04 mg/kg) 暴露 2 周后空间记忆受损(Kim et al., 2011)。

被动回避模型用于检测动物情景依赖的学习记忆, 该记忆在啮齿类动物也表现出雄性优于雌性的性别差异。长期 BPA (40 mg/kg)暴露性别特异性地损伤雄性的被动回避记忆, 消除了该行为的正常性别差异。目前关于成年期 BPA 暴露与被动回避记忆的研究几乎没有, 但已有的围生期暴露研究均发现 BPA 可损伤雄性或两性的被动回避记忆; 而青春至成年早期 BPA 暴露主要损伤雄性的被动回避记忆(田栋等, 2011)。这些结果提示成年雄性的被动回避记忆对 BPA 更为敏感。

许多证据表明性激素通过调节海马和前额叶皮层的结构和功能突触可塑性参与调控人和动物的认知和情感等高级神经活动(McEwen, 2002; Brinton, 2009; Woolley, 1998; Frye & Seliga, 2001; Hajszan, Mzclusky, Johanse, Jordan & Leranth, 2007)。近来, 有人发现 BPA 可影响记忆相关脑区的突触可塑性。0.3 mg/kg BPA 处理 4 天可阻断雄激素诱导的正常成年雄鼠和睾丸摘除雄鼠的内侧前额叶皮层和海马 CA1 区棘突触的形成(Leranth & Szigeti-Buck et al., 2008); 一次性 BPA 处理后 30 分钟可抑制雌激素依赖的卵巢摘除大鼠海马棘突触的形成(MacLusky et al., 2005), 表明 BPA 对雌激素

和雄激素诱导的突触形成均有拮抗作用。本研究发现, 长期 BPA 暴露降低成年雄鼠的海马 CA1 区突触数密度, 但对雌性没有影响, 提示 BPA 性别选择性地抑制雄性海马的突触形成; 而 BPA 对雌性突触形成影响的不一致可能与暴露时间和是否有内源性雌激素存在有关。

突触界面是一个对行为训练、化学刺激和环境变化非常敏感的结构, 因此我们检查了长期 BPA 暴露对海马 CA1 区突触界面结构的影响。结果发现, BPA 对雌鼠的突触结构影响不大, 但 BPA 暴露使雄鼠的多个突触界面参数发生改变, 包括突触间隙的增大、突触前活性带的缩短和突触后致密体(PSD)的变薄。突触间隙存在丰富的神经递质降解酶, 间隙增大可降低神经递质的传递效率。突触前活性带上分布着贴靠到前膜上的突触囊泡, 这些囊泡在突触前兴奋传来时可以释放神经递质。活性带越长, 能够释放递质的突触囊泡越多, 对突触后的兴奋作用就越大(Marrone & Petit, 2002)。Weeks 等报道突触长时程增强(LTP)诱导后突触活性带长度增加(Weeks, Ivanco, Leboutillier, Racine, & Petit, 2001)。PSD 是一个因刺激而容易改变的突触参数, 为含有细胞骨架和脚手架蛋白、受体、离子通道和信号分子的复杂结构, 与突触后兴奋过程的信号转导有关(Trinidad et al, 2005)。学习记忆过程可以诱导 PSD 增厚(Qiang, Wang, Wu, Xie, & Qian, 2000), 雌激素改进卵巢摘除小鼠记忆功能的同时伴随有 PSD 的增厚和突触间隙减小(Xu & Zhang, 2006)。本研究 BPA 损伤雄鼠学习记忆的同时, 负性改变其海马突触界面结构修饰, 而雌性的记忆行为和突触结构均没有显著改变, 提示长期 BPA 暴露损伤成年雄鼠学习记忆可能与其诱导突触界面结构的改变有关。

为了阐明 BPA 改变突触可塑性的机制, 我们进一步分析了海马中与突触可塑性密切相关的突触蛋白 Synapsin I 和 PSD-95。结果发现, BPA 暴露的雄鼠海马 Synapsin I 和 PSD-95 水平显著下调, 但雌鼠没有明显变化, 该结果与 BPA 性别选择性诱导的雄鼠突触形成抑制和突触界面结构负性变化相符。与我们的发现相一致, 最近 Eilam-Stock 等报道 BPA 急性处理 2 h 不仅损伤成年雄鼠的视觉和空间记忆, 还下调海马 CA1 的 Synapsin I 和 PSD-95 水平(Eilam-Stock et al., 2012)。Synapsin I 是突触前标志性蛋白, 其主要功能是调节突触囊泡的移动聚集到活性带, 并因此调控神经递质的释放和突触形

成(Bykhovskaia, 2011; Fdez & Hilfiker, 2006; Shupliakov, Haucke & Pechstein, 2011)。Synapsin I 基因缺失的小鼠突触前活性带的囊泡密度降低(Shupliakov et al, 2011)。近来发现, BPA 显著降低脑内 Synapsin I 在 Ser-9 and Ser-603 位点的磷酸化水平(Iwakura et al., 2010), 而 Synapsin I 磷酸化是调节突触囊泡释放递质的一个重要因素。因此, Synapsin I 表达下调可能与 BPA 诱导的突触形成抑制和突触前活性带的缩短有关, 并影响动物的学习记忆行为。PSD-95 是突触后最具代表性的脚手架蛋白, 为突触受体活动和稳定性所必需, 在突触可塑性中起重要作用。PSD-95 基因敲除小鼠树突棘形态变化和棘稳定性均减弱, LTP 诱导受阻, 记忆受损, 而过表达 PSD-95 的小鼠树突棘密度增加, 微小兴奋性突触后电流增大(Ehrlich, Klein, Rumpel, & Malinow, 2007)。本研究发现, BPA 不仅减小了雄鼠海马的 PSD 厚度, 还下调了 PSD-95 和谷氨酸 NMDA 受体 NR1 亚基水平。NMDA 和 AMPA 受体参与兴奋性突触的形成和突触传递(Adams, Fink, Janssen, Shah, & Morrison, 2004; Sanderson et al., 2010)。PSD-95 不仅可以锚定 NMDA 和 AMPA 受体于 PSD 上, 还可帮助 NMDA 受体与细胞内其他信号分子间的联系, 比如, PSD-95 可将 Ca^{2+} 内流的信号传递给特异性的下游信号事件(Xu, 2011)。因此, 长期 BPA 暴露可能通过下调突触蛋白和 NMDA 受体水平, 而抑制突触的形成和突触界面结构的负性变化, 从而损伤雄性学习记忆功能。

在成年雄性啮齿类动物, 雄激素可能对海马棘突触的可塑性调节起主要作用, 而雌激素的作用相对较弱(Hajszan & Leranth, 2010)。雄激素可通过海马的雄激素受体(androgen receptors, ARs)促进雄鼠的学习记忆(Edinger & Frye, 2007)。此外, ERs 通过与睾酮代谢产物的结合而介导雄激素对雄性中枢神经系统的调节作用(Ogawa et al., 1998)。睾酮一方面可经芳香化形成 $17\beta\text{-E}_2$, 另一方面还可经 5α -还原为二氢睾酮和 3α -二氢雄甾酮(3α -androstenediol), 这些代谢产物与 $\text{ER}\beta$ 均具有高亲和性。 $\text{ER}\beta$ 在海马有较高的表达, 是性激素调控海马突触可塑性和学习记忆的主要受体(Pak et al., 2005)。同时, BPA 不仅通过与 α 和 β 型 ER 结合而表现出雌激素受体激动剂和拮抗剂效应, 还可与 AR 结合表现出雄激素拮抗作用(Bonefeld-Jorgensen, Long, Hofmeister, & Vinggaard, 2007; Lee, Chattopadhyay, Gong, Ahn, & Lee, 2003; Wolstenholme, Rissman, & Connelly,

2011; Xu et al., 2008)。因此, AR 和 ER 均有可能介导 BPA 对成年雄性小鼠行为和突触可塑性影响, 但还需要进一步的研究为此提供证据。在本研究中, 我们发现 BPA 暴露的雄鼠血清睾酮水平下降, 而雌鼠血清雌激素水平变化不明显。此外, 有人发现 BPA 在体内的代谢受内源性性激素的调节, 使雄性血清的 BPA 水平高于雌性(Schonfelder et al., 2002; Takeuchi & Tsutsumi, 2002)。这些发现或许可以解释成年雄鼠的记忆行为和突触可塑性更容易受 BPA 影响的原因。

综上分析, 成年时期长期暴露于低剂量 BPA 可性别选择性地损伤雄性小鼠的学习记忆行为和负性改变海马神经元的突触可塑性, 突触蛋白和 NMDA 受体表达水平的下调可能参与以上过程。由于人们在日常生活中广泛使用含 BPA 的日用品而长期暴露于低水平的 BPA 环境中, 因此, 环境低浓度 BPA 暴露对人类的认知功能存在一定的健康风险。

参 考 文 献

- Adams, M. M., Fink, S. E., Janssen, W. G., Shah, R. A., & Morrison, J. H. (2004). Estrogen modulates synaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit distribution in the aged hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 474(3), 419–426.
- Bonefeld-Jorgensen, E. C., Long, M., Hofmeister, M. V., & Vinggaard, A. M. (2007). Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environmental Health Perspectives*, 115(Suppl 1), 69–76.
- Brinton, R. D. (2009). Estrogen-induced plasticity from cells to circuits: predictions for cognitive function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(4), 212–222.
- Bykhovskaia, M. (2011). Synapsin regulation of vesicle organization and functional pools. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(4), 387–392.
- Calafat, A. M., Kuklenyik, Z., Reidy, J. A., Caudill, S. P., Ekong, J., & Needham, J. L. (2005). Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environmental Health Perspectives*, 113, 391–395.
- Carr, R., Bertasi, F., Betancourt, A., Bowers, S., Gandy, B. S., Ryan, P., & Willard, S. (2003). Effect of neonatal rat bisphenol A exposure on performance in the Morris water maze. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 66(21), 2077–2088.
- Chen, Y. C., Han, T. Z., Shen, J. X., & Qiao, J. T. (1999). A quantitative study on the synaptic ultrastructural alterations in visual cortex in the maintenance of LTP. *Acta Physiologica Sinica*, 51(1), 73–79.
- [陈玉翠, 韩太真, 沈建新, 乔建天. (1999). 视皮层 LTP 维持阶段的突触形态计量学研究. *生理学报*, 51(1), 73–79.]
- Driscoll, I., Hamilton, D. A., Yeo, R. A., Brooks, W. M., & Sutherland, R. J. (2005). Virtual navigation in humans: The

- impact of age, sex, and hormones on place learning. *Hormones and Behavior*, 47(3), 326–335.
- Edinger, K. L., & Frye, C. A. (2007). Androgens' effects to enhance learning may be mediated in part through actions at estrogen receptor- β in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87, 78–85.
- Ehrlich, I., Klein, M., Rumpel, S., & Malinow, R. (2007). PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(10), 4176–4181.
- Eilam-Stock, T., Serrano, P., Frankfurt, M., & Luine, V. (2012). Bisphenol-A impairs memory and reduces dendritic spine density in adult male rats. *Behavioral Neuroscience*, 126(1), 175–185.
- Erlor, C., & Nova, J. (2010). Bisphenol A exposure: Human risk and health policy. *Journal of Pediatric Nursing*, 25(5), 400–407.
- Fdez, E., & Hilfiker, S. (2006). Vesicle pools and synapsins: New insights into old enigmas. *Brain Cell Biology*, 35(2-3), 107–115.
- Frye, C. A., & Seliga, A. M. (2001). Testosterone increases analgesia, anxiolysis, and cognitive performance of male rats. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*, 1(4), 371–381.
- Fujimoto, T., Kubo, K., & Aou, S. (2007). Environmental impacts on brain functions: Low dose effects of bisphenol A during perinatal critical period. *International Congress Series*, 1301, 226–229.
- Gioiosa, L., Fissore, E., Ghirardelli, G., Parmigiani, S., & Palanza, P. (2007). Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. *Hormones and Behavior*, 52(3), 307–316.
- Gonçalves, C. R., Cunha, R. W., Barros, D. M., & Martínez, P. E. (2010). Effects of prenatal and postnatal exposure to a low dose of bisphenol A on behavior and memory in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30(2), 195–201.
- Hajszan, T., & Leranthy, C. (2010). Bisphenol A interferes with synaptic remodeling. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(4), 519–530.
- Hajszan, T., MacLusky, N. J., Johansen, J. A., Jordan, C. L., & Leranthy, C. (2007). Effects of androgens and estradiol on spine synapse formation in the prefrontal cortex of normal and testicular feminization mutant male rats. *Endocrinology*, 148, 1963–1967.
- Hiramatsu, M., Sasaki, M., & Kameyama, T. (1995). Effects of dynorphin A-(1-13) on carbon monoxide-induced delayed amnesia in mice studied in a step-down type passive avoidance task. *European Journal of Pharmacology*, 282, 185–191.
- Inagaki, T., Frankfurt, M., & Luine, V. (2012). Estrogen-induced memory enhancements are blocked by acute bisphenol A in adult female rats: Role of dendritic spines. *Endocrinology*, 153(7), 3357–3367.
- Iwakura, T., Iwafuchi, M., Muraoka, D., Yokosuka, M., Shiga, T., Watanabe, C., & Ohtani-Kaneko, R. (2010). In vitro effects of bisphenol A on developing hypothalamic neurons. *Toxicology*, 272(1-3), 52–58.
- Kiguchi, M., Fujita, S., Lee, J., Shimizu, N., & Koshikawa, N. (2007). Behavioral responses to methylphenidate and apomorphine in rats exposed neonatally to bisphenol-A. *Journal of Oral Science*, 49(4), 311–318.
- Kim, M. E., Park, H. R., Gong, E. J., Choi, S. Y., Kim, H. S., & Lee, J. (2011). Exposure to bisphenol-A appears to impair hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory. *Food & Chemical Toxicology*, 49, 3383–3389.
- Lee, H. J., Chattopadhyay, S., Gong, E. Y., Ahn, R. S., & Lee, K. (2003). Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicological Sciences*, 75(1), 40–46.
- Leranthy, C., Hajszan, T., Szigeti-Buck, K., Bober, J., & MacLusky, N. J. (2008). Bisphenol A prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(37), 14187–14191.
- Leranthy, C., Szigeti-Buck, K., MacLusky, N. J., & Hajszan, T. (2008). Bisphenol A prevents the synaptogenic response to testosterone in the brain of adult male rats. *Endocrinology*, 149, 988–994.
- MacLusky, N. J., Hajszan, T., & Leranthy, C. (2005). The environmental estrogen bisphenol A inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 113, 675–679.
- Marrone, D. F., & Petit, T. L. (2002). The role of synaptic morphology in neural plasticity: Structural interactions underlying synaptic power. *Brain Research Reviews*, 38(3), 291–308.
- McEwen, B. (2002). Estrogen actions throughout the brain. *Recent Progress in Hormone Research*, 57, 357–384.
- Narita, M., Miyagawa, K., Mizuo, K., Yoshida, T., & Suzuki, T. (2007). Changes in central dopaminergic systems and morphine reward by prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A in mice: Evidence for the importance of exposure period. *Addiction Biology*, 12(2), 167–172.
- Negishi, T., Kawasaki, K., Suzuki, S., Maeda, H., Ishii, Y., Kyuwa, S., ... Yoshikawa, Y. (2004). Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environmental Health Perspectives*, 112, 1159–1164.
- Negishi, T., Kawasaki, K., Takatori, A., Ishii, Y., Kyuwa, S., Kuroda, Y., & Yoshikawa, Y. (2003). Effects of perinatal exposure to bisphenol A on the behavior of offspring in F344 rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 14, 99–108.
- Ogawa, S., Washburn, T. F., Taylor, J., Lubahn, D. B., Korach, K. S., & Pfaff, D. W. (1998). Modifications of testosterone-dependent behaviors by estrogen receptor- α gene disruption in male mice. *Endocrinology*, 139(12), 5058–5069.
- Pak, T. R., Chung, W. C., Lund, T. D., Hinds, L. R., Clay, C. M., & Handa, R. J. (2005). The androgen metabolite, 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol, is a potent modulator of estrogen receptor- β -mediated gene transcription in neuronal cells. *Endocrinology*, 146, 147–155.
- Patisaul, H. B., & Bateman, H. L. (2008). Neonatal exposure to endocrine active compounds or an ER β agonist increases adult anxiety and aggression in gonadally intact male rats. *Hormones and Behavior*, 53, 580–588.
- Patisaul, H. B., Fortino, A. E., & Polston, E. K. (2007). Differential disruption of nuclear volume and neuronal phenotype in the preoptic area by neonatal exposure to genistein and bisphenol-A. *Neurotoxicology*, 28(1), 1–12.
- Qiang, M., Wang, S. D., Wu, F. M., Xie, J. P., & Qian, J. T. (2000). Involvement of NAME in synaptic plasticity

- following behavioral trainings in rats: An ultrastructural study. *Chinese Journal of Neuroscience*, 16, 185–191.
- Sanderson, D. J., McHugh, S. B., Good, M. A., Sprengel, R., Seeburg, P. H., Rawlins, J. N. P., & Bannerman, D. M. (2010). Spatial working memory deficits in GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice reflect impaired short-term habituation: evidence for Wagner's dual-process memory model. *Neuropsychologia*, 48(8), 2303–2315.
- Schonfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C. E., Paul, M., & Chahoud, I. (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environmental Health Perspectives*, 110(11), A703–A707.
- Seta, D. D., Minder, I., Dessi-Fulgheri, F., & Farabollini, F. (2005). Bisphenol-A exposure during pregnancy and lactation affects maternal behavior in rats. *Brain Research Bulletin*, 65, 255–260.
- Shikimi, H., Sakamoto, H., Mezaki, Y., Ukena, K., & Tsutsui, K. (2004). Dendritic growth in response to environmental estrogens in the developing Purkinje cell in rats. *Neuroscience Letters*, 364(2), 114–118.
- Shupliakov, O., Haucke, V., & Pechstein, A. (2011). How synapsin I may cluster synaptic vesicles. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(4), 393–399.
- Takeuchi, T., & Tsutsumi, O. (2002). Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291, 76–78.
- Tian, D., Xu, X. H., Hong, X., Chen, L., Xie, L. D., & Li, T. (2011). Effects of adulthood exposure to Bisphenol-A on behaviors in mice. *Acta Psychologica Sinica*, 43(5), 534–543.
- [田栋, 徐晓虹, 洪星, 陈蕾, 谢灵丹, 李涛. (2011). 成年期双酚 A 暴露对小鼠行为的影响. *心理学报*, 43(5), 534–543.]
- Trinidad, J. C., Thalhammer, A., Specht, C. G., Schoepfer, R., & Burlingame, A. L. (2005). Phosphorylation state of postsynaptic density proteins. *Journal of Neurochemistry*, 92(6), 1306–1316.
- Weeks, A. C., Ivanco, T. L., Leboutillier, J. C., Racine, R. J., & Petit, T. L. (2001). Sequential changes in the synaptic structural profile following long-term potentiation in the rat dentate gyrus: III. Long-term maintenance phase. *Synapse*, 40(1), 74–84.
- Wolstenholme, J. T., Rissman, E. F., & Connelly, J. J. (2011). The role of bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Hormones and Behavior*, 59(3), 296–305.
- Woolley, C. S. (1998). Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Hormones and Behavior*, 34(2), 140–148.
- Xu, L. C., Liu, L., Ren, X. M., Zhang, M. R., Cong, N., Xu, A. Q., & Shao, J. H. (2008). Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of some pesticides in vitro. *Toxicology*, 243(1–2), 59–65.
- Xu, W. F. (2011). PSD-95-like membrane associated guanylate kinases (PSD-MAGUKs) and synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(2), 306–312.
- Xu, X. H., Ye, Y. P., Li, T., Chen, L., Tian, D., Luo, Q. Q., & Lu, M. (2010). Bisphenol-A rapidly promotes dynamic changes in hippocampal dendritic morphology through estrogen receptor-mediated pathway by concomitant phosphorylation of NMDA receptor subunit NR2B. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 249(2), 188–196.
- Xu, X. H., Zhang, J., Wang, Y. M., Ye, Y. P., & Luo, Q. Q. (2010). Perinatal exposure to bisphenol-A impairs learning-memory by concomitant down-regulation of N-methyl- D-aspartate receptors of hippocampus in male offspring mice. *Hormones and Behavior*, 58(2), 326–333.
- Xu, X. H., & Zhang, Z. G. (2006). Effects of estradiol benzoate on learning-memory behavior and synaptic structure in ovariectomized mice. *Life Sciences*, 79(16), 1553–1560.
- Yokosuka, M., Ohtani-Kaneko, R., Yamashita, K., Muraoka, D., Kuroda, Y., & Watanabe, C. (2008). Estrogen and environmental estrogenic chemicals exert developmental effects on rat hypothalamic neurons and glias. *Toxicology in Vitro*, 22, 1–9.
- Zhang, J., Xu, X. H., Wang, Y. M., Luo, Q. Q., & Ye, Y. P. (2009). Perinatal Exposure to bisphenol-A affects sexual differentiation of behaviors in offspring mice. *Acta Psychologica Sinica*, 41, 832–841.

The Effects of Environmental Endocrine Disrupter Bisphenol A on Learning-memory and Synaptic Structure of Adult Mice

LIU Xingyi¹; XU Xiaohong^{1,2}; ZHANG Qin¹; ZHANG Guangxia¹; JI Jialin¹; DONG Fangni¹; YANG Yanling¹

⁽¹⁾ College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University;

⁽²⁾ Psychology Research Center, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China)

Abstract

Bisphenol A (BPA), one of the most common environmental endocrine disrupters, can bind to estrogen receptors (ERs) to interfere with the regulation of endogenous estrogen on the central nervous system. The aim of the present study was to investigate the effects of long-term exposure to BPA on the learning and memory behavior. The adult mice at age of 10 weeks were exposed to BPA (0.4, 4, and 40 mg/kg/day) or sesame oil for 12 weeks. In open field test, BPA increased the frequencies of rearing and grooming of the males, but reduced

the frequency of rearing in the females. Exposure to BPA (0.4 or 40 mg/kg/day) extended the escape pathlength to find the hidden platform in Morris water maze and shortened the step-down latency 24 h after footshock of the males, but no changes were found in the females. Meanwhile, BPA induced a reduced numeric synaptic density and a negative effect on the synaptic structural modification, including the enlarged synaptic cleft and the reduced length of active zone and PSD thickness in the hippocampus of the males. Western blot analyses further indicated that BPA down-regulated the expressions of synaptic proteins (synapsin I and PSD-95) and NMDA receptor subunit NR1 in the hippocampus of the males. These results suggest that long-term exposure to the low levels of BPA in adulthood sex-specifically impaired spatial and passive avoidance memory of mice. These effects may be associated with the higher susceptibility of hippocampal synaptic plasticity processes, such as remodeling of spinal synapses and the expressions of synaptic proteins and NMDA receptor, to BPA in the adult males.

After acclimatization for one week, adult male and female ICR mice were orally exposed to BPA dissolved in peanut oil (40, 4, 0.4 mg/kg/day) or only peanut oil as a vehicle control from 10 weeks of age throughout 22 weeks. At 22 weeks of age, open field, elevated plus-maze, Morris water maze, and step-down were respectively used to test spontaneous activity and exploratory behavior, anxiety, spatial learning and memory, and passive avoidance memory in mice. After the behavior detection, using Western blot method detecting NMDA and AMPA receptor NR1、GluR1、Synapsin I and PSD 95. At the same time, take animals which were not used in Behavioral experiments for electron microscope observation of microscopic structure change.

Test results show that the opening behavior BPA (0.4, 4, 40 mg/kg/day) increase the stand number and frequency of grooming male, BPA (4 mg/kg/day) was significantly decrease the number of stand for females. Water maze and passive avoidance behavior model test showed that BPA main damage male rats of passive avoidance and spatial learning memory. Ultrathin slice through the preparation of hippocampus CA1 area, electron microscope observation found that BPA (0.4, 40 mg/kg/day) exposed to lower the synaptic number density in the male rat hippocampal CA1 zone, shorten the males presynaptic active zone length, reducing male mice postsynaptic density (PSD) thickness, increase male mice width of synaptic cleft. Further using Western blot method to detect the synapse the iconic Synapsin I protein before and after and PSD95 and excitatory amino acids GluR1 NMDA receptor NR1 and and AMPA receptor subunit proteins expression, and found that BPA exposure to male mice of Synapsin I cut, PSD95, NR1 protein expression level. And BPA memory for female behavior, synaptic proteins and receptors, synaptic form are not obvious.

Adulthood long-term exposure to low doses of BPA can gender selective damage of male rats learning and memory behavior and negative change in synaptic plasticity of hippocampal neurons, synaptic proteins and NMDA receptor expression levels may participate in the above process.

Key words Bisphenol A; learning and memory; synaptic morphology; Synapsin I; PSD-95; NMDA receptor