

孕哺期十溴联苯醚暴露对子鼠神经甾体水平和学习记忆能力的影响

蒋荣娟¹, 赵超超², 王程强², 宋家乐², 钱波²

1. 桂林医学院附属医院超声科, 广西 桂林 541000

2. 桂林医学院公共卫生学院环境卫生与职业医学教研室, 广西 桂林 541000

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.20137

摘要:

[背景] 十溴联苯醚 (BDE209) 的神经发育毒性机制尚不清楚, 研究资料提示神经甾体紊乱可能是其诱发神经发育毒性的重要原因。

[目的] 探索 BDE209 对神经甾体水平的影响, 以及神经甾体紊乱在 BDE209 诱发神经发育毒性中的作用。

[方法] 60 只 ICR 雌鼠随机分为 0、225、900 mg·kg⁻¹ BDE209 染毒组, 受孕成功后经口灌胃母鼠 BDE209 至子鼠出生后第 21 天。每个剂量组选取 24 只子鼠, 通过 Morris 水迷宫实验检测子鼠学习记忆能力, 使用酶联免疫吸附试验测定子鼠大脑和血清孕酮 (PROG)、3 α -5 α 四氢孕酮 (3 α -5 α -THP)、脱氢表雄酮 (DHEA)、孕烯醇酮 (PREG) 水平, 采用 JC-1 荧光探针检测子鼠海马线粒体膜电位。

[结果] 水迷宫实验结果显示: 各组逃避潜伏期随着训练天数增加均呈下降趋势, 与训练第 1 天相比, 训练第 4 天, 对照组、225 mg·kg⁻¹ 染毒组和 900 mg·kg⁻¹ 染毒组逃避潜伏期分别下降 51.34%, 27.20% 和 16.87%。水迷宫实验第 5 天, 225、900 mg·kg⁻¹ 染毒组象限穿越次数与对照组相比分别下降 51.81% 和 67.47%, 象限停留时间分别下降 48.45% 和 77.47%, 平台穿越次数分别下降 64.29% 和 75.00% (均 $P < 0.05$)。大脑神经甾体检测结果显示, 与对照组相比: 225、900 mg·kg⁻¹ 染毒组 PROG 分别下降 36.51% 和 69.28%, 3 α -5 α -THP 分别下降 31.84% 和 57.43%, DHEA 分别下降 31.13% 和 60.15%, PREG 分别下降 31.17% 和 68.07% (均 $P < 0.05$)。血清神经甾体检测结果显示, 与对照组相比: 225、900 mg·kg⁻¹ 染毒组 PROG 分别下降 29.49% 和 63.44%, 3 α -5 α -THP 分别下降 25.12% 和 53.71%, DHEA 分别下降 29.09% 和 56.97%, PREG 分别下降 25.39% 和 47.07% (均 $P < 0.05$)。海马线粒体膜电位检测结果显示: 225、900 mg·kg⁻¹ 染毒组线粒体膜电位与对照组相比分别下降 10.06% 和 25.58% (均 $P < 0.05$)。

[结论] BDE209 具有神经发育毒性, 孕哺期 BDE209 染毒可能通过诱发神经甾体紊乱从而抑制子鼠学习记忆能力。

关键词: 十溴联苯醚; 神经发育毒性; 神经甾体紊乱; 学习记忆

Effects of decabromodiphenyl ether exposure during pregnant and lactating periods on neurosteroid and learning and memory ability of offspring mice JIANG Rong-juan¹, ZHAO Chao-chao², WANG Cheng-qiang², SONG Jia-le², QIAN Bo² (1. Department of Ultrasound, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541000, China; 2. Department of Environmental Health and Occupational Medicine, School of Public Health, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541000, China)

Abstract:

[Background] Decabromodiphenyl ether (BDE209) has neurodevelopmental toxicity, but the associated mechanism is not clear. Previous studies have shown that neurosteroid disorder may be one of the main reasons.

[Objective] This experiment explores the effect of BDE209 on neurosteroid levels, and the role of neurosteroid disorder in neurodevelopmental toxicity induced by BDE209.

[Methods] Sixty female ICR mice were randomly divided into 0, 225, and 900 mg·kg⁻¹ BDE209 exposure groups. After conception, the pregnant mice were administered with BDE209 by oral gavage to 21 days after offspring birth. Twenty-four offspring mice of each group were selected,

基金项目

广西高校中青年骨干教师基础能力提升项目 (2018KY0423); 广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划资助 (桂教人 [2018] 18 号); 人社部“高层次留学人才回国资助计划” (人社厅函 [2019]160 号); 桂林医学院引进人才科研启动基金 (04010150001)

作者简介

蒋荣娟 (1993—), 女, 学士, 初级护师; E-mail: 373548068@qq.com

通信作者

钱波, E-mail: 805558188@qq.com

伦理审批

已获取

利益冲突

无申报

收稿日期

2020-03-28

录用日期

2020-06-01

文章编号

2095-9982(2020)09-0909-06

中图分类号

R114

文献标志码

A

► 引用

蒋荣娟, 赵超超, 王程强, 等. 孕哺期十溴联苯醚暴露对子鼠神经甾体水平和学习记忆能力的影响 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37(9): 909-914.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.20137

Funding

This study was funded.

Correspondence to

QIAN Bo, E-mail: 805558188@qq.com

Ethics approval

Obtained

Competing interests

None declared

Received

2020-03-28

Accepted

2020-06-01

► To cite

JIANG Rong-juan, ZHAO Chao-chao, WANG Cheng-qiang, et al. Effects of decabromodiphenyl ether exposure during pregnant and lactating periods on neurosteroid and learning and memory ability of offspring mice [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(9): 909-914.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.20137

their learning and memory ability was tested by Morris water maze, their levels of progesterone (PROG), 3 α -5 α -tetrahydroprogesterone (3 α -5 α -THP), dehydroepiandrosterone (DHEA), and pregnenolone (PREG) in brain and serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, and mitochondrial membrane potential in hippocampus was detected using a JC-1 fluorescence probe.

[Results] The water maze experiment results showed that the escape latencies of the designed groups decreased with prolonged training days, and the decreases on day 4 versus day 1 of the control group, the 225 mg·kg⁻¹ exposure group, and the 900 mg·kg⁻¹ exposure group were 51.34%, 27.20%, and 16.87%, respectively. On day 5 of the water maze experiment, compared with the control group, the number of quadrant crossing of the 225 and 900 mg·kg⁻¹ exposure groups were decreased by 51.81% and 67.47%, the quadrant staying time by 48.45% and 77.47%, and the number of platform crossing by 64.29% and 75.00%, respectively ($P < 0.05$). The brain neurosteroid test results showed that compared with the control group, the PROG of the 225 and 900 mg·kg⁻¹ exposure groups were decreased by 36.51% and 69.28%, the 3 α -5 α -THP by 31.84% and 57.43%, the DHEA by 31.13% and 60.15%, and PREG by 31.17% and 68.07%, respectively ($P < 0.05$). The serum neurosteroid test results showed that compared with the control group, the PROG of the 225 and 900 mg·kg⁻¹ exposure groups were decreased by 29.49% and 63.44%, the 3 α -5 α -THP by 25.12% and 53.71%, the DHEA by 29.09% and 56.97%, and the PREG by 25.39% and 47.07%, respectively ($P < 0.05$). The mitochondrial membrane potential test results showed that the mitochondrial membrane potential of the 225 and 900 mg·kg⁻¹ exposure groups were decreased by 10.06% and 25.58% compared with the control group respectively ($P < 0.05$).

[Conclusion] BDE209 has neurodevelopmental toxicity, and BDE209 exposure during pregnancy and lactation may inhibit learning and memory ability of offspring mice by inducing neurosteroid disorder.

Keywords: decabromodiphenyl ether; neurodevelopmental toxicity; neurosteroid disorder; learning and memory

多溴联苯醚 (polybrominated diphenyl ethers, PBDEs) 在减少火灾引起的生命财产损失方面发挥着重要的作用, 但其与原材料以非共价键结合容易逸散到周围环境中并进行远距离迁移^[1]。研究证实, PBDEs 不仅具有明显的神经毒性、生殖毒性以及内分泌干扰作用, 还可以随食物链进行生物富集^[2]。部分溴系阻燃剂如四溴二苯醚、五溴二苯醚在《斯德哥尔摩公约》中已被正式列为持久性有机污染物并在发达国家已被禁止使用, 但存在毒性争议的溴系阻燃剂十溴联苯醚 (decabromodiphenyl ether, BDE209) 仍然在中国、印度等发展中国家继续使用^[3-4]。近年来, 人体样本中也不断检出 PBDEs, 而且检出浓度以 BDE209 最高^[5]。虽然 BDE209 对成人的毒性很小, 但婴幼儿因为母乳喂养和其特殊的手口暴露途径会造成其 BDE209 暴露风险明显高于成人。研究发现婴幼儿的 BDE209 暴露水平不仅高于母亲^[6], 而且长期随访也观察到孕哺期 BDE209 暴露会造成子代认知、智力发育损伤^[7]。因此, 研究 BDE209 的神经发育毒性和毒性机制具有十分重要的现实和科学意义。

BDE209 具有典型的内分泌干扰毒性, 从神经内分泌角度探索 BDE209 的神经发育毒性机制是目前的主要研究方向。神经甾体是一类在脑内合成和部分外周合成并经血脑屏障进入神经系统的类固醇激素及其代谢衍生物, 主要包括兴奋性甾体孕烯醇酮 (pregnenolone, PREG)、脱氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone, DHEA) 以及抑制性甾体孕酮 (progesterone, PROG)、3 α -5 α 四氢孕酮 (3 α -5 α -

tetrahydroprogesterone, 3 α -5 α -THP) 等。神经甾体能够通过作用于神经甾体细胞膜表面离子通道型受体参与调控神经系统发育、学习记忆形成以及情绪反应等生理过程^[8]。在研究 BDE209 内分泌干扰毒性的体内外实验中观察到, BDE209 能够通过抑制小鼠神经甾体合成酶的表达, 诱导睾丸 PROG 合成障碍^[9-10]。神经甾体在脑内含量丰富, 而 PROG 也是多种神经甾体合成的前体物质^[8]。虽然上述研究提示 BDE209 可能会通过干扰神经甾体的合成影响神经系统的发育和功能形成, 然而大多数研究集中在体外实验, 而且关于 BDE209 干扰脑内神经甾体的报道目前尚属空白。因此本研究拟通过建立孕哺期 BDE209 小鼠染毒模型, 通过检测小鼠学习记忆能力、神经甾体水平、海马线粒体膜电位变化, 初步探索孕哺期 BDE209 暴露诱发神经发育毒性的生物机制, 为 BDE209 的安全性和危险性评价以及相关卫生标准制订提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 孕哺期 BDE209 染毒模型建立

60 只性成熟 ICR 雌鼠 (22~24 g, 购于桂林医学院动物实验中心) 随机分为对照组、低剂量组和高剂量组, 每组各 20 只。动情期雌鼠与同期 ICR 雄鼠于傍晚按雌雄比例进行 2:1 合笼交配, 次日 8 点检查阴栓。各组取 12 只受孕成功的雌鼠, 使用花生油 (中国山东鲁花) 作为载体避光溶解 BDE209 (纯度 >99%, 美国 Sigma), 经口灌胃染毒。由于人群样本检出的 BDE209 跨度较大 (1.25~620 ng·g⁻¹), 所以基于美国国家环境保

护局的最大无作用剂量 ($2.22 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)，前期实验使用了跨度较大的BDE209暴露剂量 (0、1.5、225 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 进行染毒，但剂量-反应关系并不明显。因此本次研究将在前期工作^[11]和相关动物实验^[12]的基础上扩大染毒范围，将低剂量组和高剂量组染毒剂量调整为225和900 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，对照组灌胃花生油，以期探索BDE209与其神经发育毒性的剂量-反应关系。孕鼠分娩后继续对母鼠进行染毒直至子鼠断乳 (约为出生后第21天)，染毒结束后按窝别随机选取各剂量组24只子鼠用于后续实验。实验动物于桂林医学院公共卫生学院实验中心清洁剂动物房进行饲养，饲养条件：12h光暗循环，温度为 $(22\pm 2)^\circ\text{C}$ ，自由饮水饮食。动物实验已经桂林医学院动物实验伦理委员会审批 (编号：SCXK桂2013-0001)。

1.2 Morris水迷宫实验

染毒结束后随机选取各剂量组10只子鼠，使用Morris水迷宫 (中国上海欣软信息科技) 检测子鼠的学习记忆能力，实验装置为一圆形水桶 (直径为150 cm，高为50~60 cm，水池水深为30~40 cm，圆形平台直径为8 cm，藏匿于水面1 cm之下)。在圆桶的上缘等距离地设4个标记点，作为动物进水池的入水点，并依标记点将水面和水桶均等地分为4个象限。水温保持在23~25 $^\circ\text{C}$ 。小鼠连续4d，每天从水迷宫4个不同的象限各进行1次强迫游泳训练实验，记录逃避潜伏期。实验第5天移走隐藏站台，记录小鼠在平台所在象限内的停留时间、跨越象限次数、跨越平台次数。

1.3 神经甾体水平检测

水迷宫结束后随机选取各剂量组6只子鼠，取大脑组织样本0.5 g，加入4.5 mL预冷磷酸盐缓冲液，用匀浆器将样本匀浆充分，室温800 $\times g$ 离心20 min收集上清；血液样本室温自然凝固10~20 min，室温800 $\times g$ 离心20 min收集上清。应用竞争抑制酶联免疫分析法使用PREG、DHEA、PROG、 $3\alpha\text{-}5\alpha\text{-THP}$ 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒 (中国云克隆生物) 测定大脑和血清神经甾体水平。检测步骤如下：酶标板分别设标准孔、待测样品孔、空白孔。设标准孔5孔，依次加入50 μL 不同浓度的标准品，空白孔加50 μL 标准品稀释液，余孔加待测样品50 μL 。然后每孔加检测溶液A工作液50 μL ，混匀覆膜37 $^\circ\text{C}$ 温育1 h，弃孔内液体用350 μL 洗涤液洗涤3次。随后每孔加检测溶液B工作液100 μL ，覆膜37 $^\circ\text{C}$ 温育30 min，弃去孔内液体洗板5次。每孔加

底物溶液90 μL ，覆膜37 $^\circ\text{C}$ 避光显色，每孔加终止溶液50 μL 终止反应，用酶标仪 (美国Thermo) 在450 nm波长处测量各孔的光密度。

1.4 线粒体膜电位检测

水迷宫结束后随机选取各剂量组6只子鼠，采用JC-1线粒体膜电位检测试剂盒 (中国北京索莱宝)，使用荧光探针方法检测线粒体膜电位，实验步骤如下：取新鲜海马组织用剪刀或刀片把组织剪切成组织碎片，加入添加了苯甲基磺酰氟的线粒体分离试剂A在冰浴上进行匀浆，匀浆后600 $\times g$ 、4 $^\circ\text{C}$ 离心5 min，取上清11000 $\times g$ 、4 $^\circ\text{C}$ 离心10 min。弃上清分离得到的线粒体，用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法进行蛋白浓度测定，随后加入配置好的JC-1染色工作液，混匀后直接用荧光酶标仪 (美国Thermo) 进行检测。检测JC-1单体 (绿色) 时，激发光设置为490 nm，发射光设置为530 nm；检测JC-1聚合物 (红色) 时，激发光设置为525 nm，发射光设置为590 nm。线粒体膜电位为JC-1聚合物荧光强度与JC-1单体荧光强度的比值。

1.5 统计学分析

计数资料以率表示，计量资料以均数 \pm 标准差表示，采用SPSS 22.0软件进行统计分析，组间均数采用单因素方差分析LSD-*t*法进行两两比较。双侧检验，检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

如表1所示，与对照组相比，染毒组子鼠雌雄比、出生体重、死亡率在BDE209染毒之后并没有明显变化，但900 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 染毒组产子数下降21.97% ($P<0.05$)，225 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和900 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 染毒组子鼠处死体重与对照组相比分别下降8.74%和16.44% ($P<0.05$)。

表1 孕哺期BDE209暴露对子鼠体重的影响

Table 1 Effect of pregnant and lactational exposure to BDE209 on the weight of offspring mice

BDE209	母鼠 ($n=12$)			子鼠 ($n=24$)	
	产子数	子鼠雌雄比	子鼠死亡率/%	出生体重/g	处死体重/g
0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	13.2 \pm 2.1	1.15 \pm 0.83	9.0	1.58 \pm 0.20	16.48 \pm 1.58
225 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	9.8 \pm 0.6 ^a	1.35 \pm 1.43	10.9	1.63 \pm 0.21	15.04 \pm 1.36 ^a
900 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	10.3 \pm 1.5 ^a	1.14 \pm 0.71	13.2	1.61 \pm 0.25	13.77 \pm 1.22 ^{ab}

[注] a :与0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组比较, $P<0.05$; b :与225 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组比较, $P<0.05$ 。

2.2 学习记忆能力

实验结果显示，3组子鼠逃避潜伏期随着训练天数增加均呈下降趋势。与训练第1天相比，训练第4

天, 对照组、225 mg·kg⁻¹ 染毒组和 900 mg·kg⁻¹ 染毒组逃避潜伏期分别下降 51.34%、27.20% 和 16.87% (图 1)。水迷宫实验第 5 天, 与对照组相比, 225、900 mg·kg⁻¹ 染毒组象限穿越次数分别下降 51.81% 和 67.47% ($P < 0.05$), 象限停留时间分别下降 48.45% 和 77.47% ($P < 0.05$), 平台穿越次数分别下降 64.29% 和 75.00% ($P < 0.05$) (图 2)。

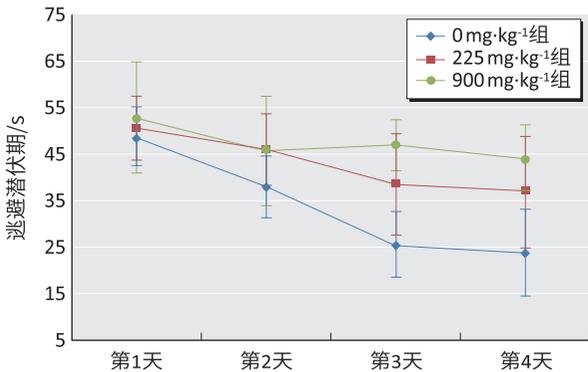
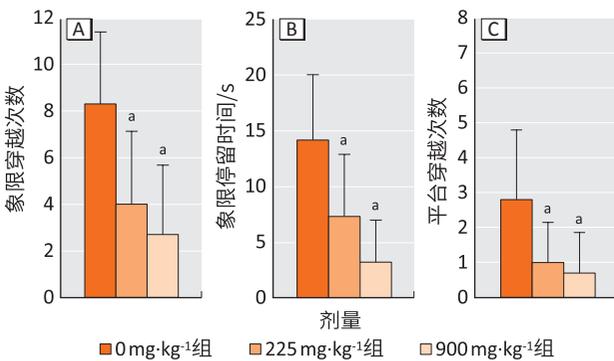


图 1 孕哺期 BDE209 暴露后子鼠第 1~4 天水迷宫实验逃避潜伏期变化趋势 (n=10)

Figure 1 Escape latency changes of offspring mice after pregnant and lactational exposure to BDE209 in water maze from day 1 to day 4 (n=10)



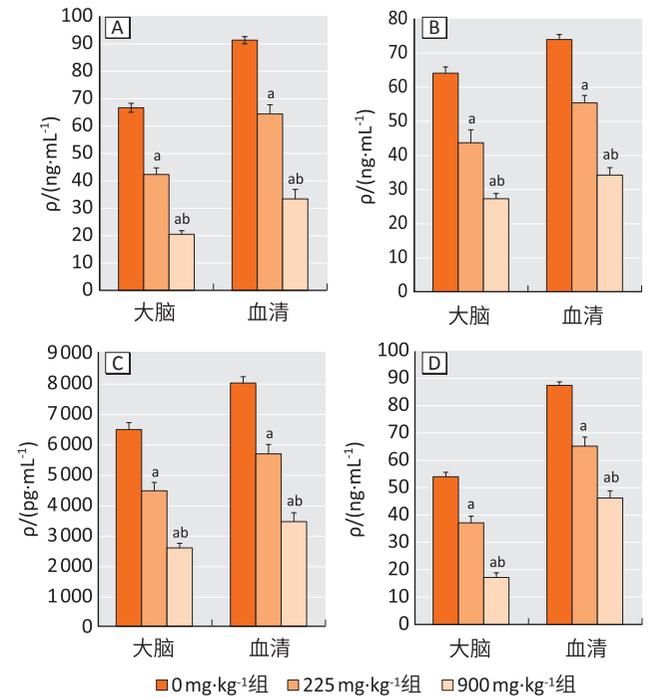
[注] a : 与 0 mg·kg⁻¹ 组比较, $P < 0.05$ 。

图 2 孕哺期 BDE209 暴露对子鼠第 5 天水迷宫实验象限穿越次数 (A)、象限停留时间 (B)、平台穿越次数 (C) 的影响 (n=10)
Figure 2 Effects of pregnant and lactational exposure to BDE209 on the number of quadrant crossing (A), quadrant staying time (B), and the number of platform crossing (C) of offspring mice (n=10)

2.3 神经递体

大脑神经递体检测结果显示, 与对照组相比: 225、900 mg·kg⁻¹ 染毒组 PROG 分别下降 36.51% 和 69.28%, 3 α -5 α -THP 分别下降 31.84% 和 57.43%, DHEA 分别下降 31.13% 和 60.15%, PREG 分别下降 31.17% 和 68.07% (均 $P < 0.05$)。血清神经递体检测结果显示, 与对照组相比: 225、900 mg·kg⁻¹ 染毒组 PROG 分别下降 29.49% 和 63.44%, 3 α -5 α -THP 分别下降 25.12% 和 53.71%, DHEA 分别下降 29.09% 和 56.97%, PREG 分别

下降 25.39% 和 47.07% (均 $P < 0.05$)。见图 3。

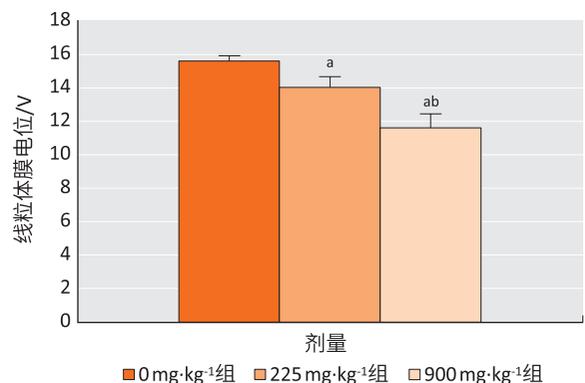


[注] a : 与 0 mg·kg⁻¹ 组比较, $P < 0.05$; b : 与 225 mg·kg⁻¹ 组比较, $P < 0.05$ 。

图 3 孕哺期 BDE209 暴露对子鼠大脑和血清 PROG (A)、3 α -5 α -THP (B)、DHEA (C) 和 PREG (D) 水平的影响 (n=6)
Figure 3 Effects of pregnant and lactational exposure to BDE209 on PROG (A), 3 α -5 α -THP (B), DHEA (C), and PREG (D) levels in brain and serum of offspring mice (n=6)

2.4 海马线粒体膜电位

海马线粒体膜电位检测结果显示: 225、900 mg·kg⁻¹ BDE209 染毒组线粒体膜电位与对照组相比分别下降 10.06% 和 25.58% (均 $P < 0.05$)。见图 4。



[注] a : 与 0 mg·kg⁻¹ 组比较, $P < 0.05$; b : 与 225 mg·kg⁻¹ 组比较, $P < 0.05$ 。

图 4 孕哺期 BDE209 暴露对子鼠海马线粒体膜电位的影响 (n=6)
Figure 4 Effect of pregnant and lactational exposure to BDE209 on hippocampal mitochondrial membrane potential of offspring mice (n=6)

3 讨论

虽然在一些动物实验中并未发现 BDE209 暴露与成年动物健康损伤的关系, 但大量研究证据显示儿童

和新生儿对BDE209暴露更加敏感^[6-7]。研究发现幼儿血液中BDE209质量分数(1.5 ng·g⁻¹,以脂质计)明显高于母亲血液中BDE209质量分数(0.86 ng·g⁻¹,以脂质计)^[6],而且母乳中过高的BDE209水平也增加了新生儿智力发育损伤风险($b=-2.40$, 95%CI: -4.79~-0.01)^[13]。同时长期随访研究显示孕期室内粉尘中BDE209暴露与6岁男童智力发育有明显的负相关性($b=-6.36$, 95%CI: -12.53~-0.19)^[7]。本次研究通过建立孕哺期小鼠染毒模型模拟自然条件婴幼儿暴露途径观察BDE209对小鼠神经发育的影响,结果发现与对照组相比,染毒组小鼠在水迷宫实验中空间学习和记忆能力均出现下降,与上述研究结果基本一致。

BDE209的神经发育毒性机制尚不清楚,但神经甾体紊乱有可能是BDE209诱发神经发育毒性的重要原因。传统观点认为神经甾体激素只在性腺和肾上腺产生,发挥与生殖相关的作用,但随后的研究发现神经甾体激素能够不依赖于内分泌腺体而由神经系统自主产生^[8]。本次实验中观察到孕哺期BDE209暴露后小鼠大脑和血清PREG、DHEA、PROG、3 α -5 α -THP水平均出现剂量依赖性下降,提示BDE209具有明显的神经甾体干扰毒性,BDE209对外周和中枢神经甾体的产生都有明显的抑制作用。神经甾体在促进神经发育和功能形成方面发挥着重要作用^[14]。神经甾体能够作用于细胞膜受体,通过选择性开放其介导的离子通道,参与调控中枢神经系统的发育和功能^[15]。PREG和DHEA是生物体内具有兴奋作用的神经甾体,能够诱导神经突触形成,促进神经元增殖分化,还能够通过增加神经元兴奋性参与学习记忆能力的形成。研究发现,特异性阻断PREG和DHEA合成会引起N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体活性和兴奋性突触后电位明显下降,而使用外源性PREG和DHEA干预则能完全恢复上述抑制现象^[16]。因此PREG和DHEA的下降很可能是BDE209诱发小鼠学习记忆能力出现抑制的重要原因。PROG、3 α -5 α -THP则是生物体内发挥保护作用的神经甾体,不仅能够促进髓鞘形成和神经元增生,还能通过多种途径发挥抗神经元凋亡作用。新生儿大脑中PROG、3 α -5 α -THP水平下降会抑制海马、白质和小脑髓鞘的形成,是神经发育障碍的重要原因^[17]。

生理情况下机体可以通过神经甾体正常水平的波动引起离子通道型受体亚基改变,并通过开放其介导的离子通道保持神经元内离子水平稳态,从而维

持正常的神经元兴奋水平^[15]。但BDE209诱发的神经甾体紊乱很可能会打破这种平衡诱发神经发育毒性。BDE209直接暴露不仅能通过干扰NMDA受体表达抑制神经元发育,损害学习记忆能力^[18],还能通过改变胞内离子水平干扰线粒体能量代谢并进一步诱发细胞凋亡^[19],而本研究对小鼠海马线粒体膜电位的检测结果也发现孕哺期BDE209染毒之后小鼠海马线粒体膜电位剂量依赖性下降,离子水平紊乱是导致线粒体膜电位下降的重要原因,也是凋亡的早期征象^[20]。这进一步说明神经甾体紊乱是BDE209诱发神经发育毒性的上游重要环节,BDE209可能会通过干扰脑内神经甾体水平抑制离子通道型受体功能,造成神经元内离子水平紊乱,并进一步影响下游与神经发育相关的信号通路。目前关于BDE209影响神经甾体的研究较少,有限的研究主要集中在BDE209对生殖系统神经甾体分泌的影响,但包括BDE209在内的绝大多数PBDEs暴露均会造成PROG分泌减少。据我们所知目前关于PBDEs影响其他神经甾体的报道较少,本研究结果初步系统报道BDE209影响大脑和血清神经甾体的研究。

BDE209诱发神经甾体紊乱的机制可能与干扰神经甾体的合成过程有关。P450胆固醇裂解酶是神经甾体合成过程中首个限速酶,在其作用下胆固醇在线粒体内裂解生成PREG。PREG是所有神经甾体合成的前提物质,在17 α -羟化酶和3 β -羟类固醇脱氢酶催化作用下可以分别转化为DHEA和PROG,而PROG通过5 α -还原酶等酶的作用则能够进一步生成3 α -5 α -THP^[21]。近期研究也发现孕哺期BDE209暴露28d后的小鼠P450胆固醇裂解酶和 β -羟类固醇脱氢酶蛋白表达和活性均出现下调^[9],而且BDE209还能够通过抑制小鼠睾丸间质肿瘤细胞P450胆固醇裂解酶和 β -羟类固醇脱氢酶的蛋白和mRNA表达,干扰PROG分泌^[10],说明抑制神经甾体合成酶的转录和翻译是BDE209诱发神经甾体紊乱的主要原因之一。然而目前尚未见有BDE209影响17 α -羟化酶和5 α -还原酶转录和翻译的研究报道,还需进一步实验验证。

人群生物样品(血液、乳汁)中BDE209的检测水平约为ng级别(1~1000 ng·g⁻¹)^[22],室内灰尘接触是人类的主要暴露途径之一,而部分地区室内灰尘的暴露质量分数高达3.5 mg·g⁻¹^[22]。目前绝大多数动物实验使用的暴露剂量与室内灰尘的暴露水平相当(0.1~1.5 mg·g⁻¹)^[22]。基于上述研究证据可以推测BDE209环境暴露水平约为体内暴露水平的10⁶倍。但

BDE209 在生物体内代谢过程复杂, 不仅会降解为低溴联苯醚, 还能转化为羟基和甲氧基代谢物。未来还需要进一步检测 BDE209 染毒之后母鼠和子鼠 BDE209 及其代谢物的内暴露水平, 才能明确 BDE209 环境暴露与体内暴露水平之间的关系, 以及神经损伤指标与 BDE209 暴露之间的因果关系。本次实验证据初步提示, 孕哺期 BDE209 染毒有可能通过诱发神经甾体水平紊乱从而抑制子鼠学习记忆能力。本研究为未来深入探索其神经发育毒性机制提供了一种可能思路。

参考文献

- [1] VENIER M, SALAMOVA A, HITES RA. Halogenated flame retardants in the great lakes environment [J]. *Acc Chem Res*, 2015, 48 (7) : 1853-1861.
- [2] WON EJ, CHOI B, LEE CH, et al. Variability of trophic magnification factors as an effect of estimated trophic position : application of compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids [J]. *Environ Int*, 2020, 135 : 105361.
- [3] CHEN Y, LI J, TAN Q. Trends of production, consumption and environmental emissions of Decabromodiphenyl ether in mainland China [J]. *Environ Pollut*, 2020, 260 : 114022.
- [4] KUMARI K, SHARMA JK, KANADE GS, et al. Investigation of polybrominated diphenyl ethers in old consumer products in India [J]. *Environ Monit Assess*, 2014, 186 (5) : 3001-3009.
- [5] TANG J, ZHAI JX. Distribution of polybrominated diphenyl ethers in breast milk, cord blood and placentas : a systematic review [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2017, 24 (27) : 21548-21573.
- [6] SAHLSTRÖM LM, SELLSTRÖM U, DE WIT CA, et al. Brominated flame retardants in matched serum samples from Swedish first-time mothers and their toddlers [J]. *Environ Sci Technol*, 2014, 48 (13) : 7584-7592.
- [7] CHEVRIER C, WAREMBOURG C, LE MANER-IDRISSI G, et al. Childhood exposure to polybrominated diphenyl ethers and neurodevelopment at six years of age [J]. *Neurotoxicology*, 2016, 54 : 81-88.
- [8] RATNER MH, KUMARESAN V, FARB DH. Neurosteroid actions in memory and neurologic/neuropsychiatric disorders [J]. *Front Endocrinol*, 2019, 10 : 169.
- [9] SARKAR D, SINGH SK. Inhibition of testicular steroidogenesis and impaired differentiation of Sertoli cells in peripubertal mice offspring following maternal exposure to BDE-209 during lactation suppress germ cell proliferation [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 290 : 83-96.
- [10] HAN X, WANG Y, CHEN T, et al. Inhibition of progesterone biosynthesis induced by deca-brominated diphenyl ether (BDE-209) in mouse Leydig tumor cell (MLTC-1) [J]. *Toxicol in Vitro*, 2019, 60 : 383-388.
- [11] QIAN B, WANG C, ZHAO C, et al. Effects of maternal exposure to BDE209 on neuronal development and transcription of iodothyronine deiodinase in offspring mice [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2019, 29 (8) : 569-579.
- [12] 施蓉, 谢欣, 高宇, 等. 十溴联苯醚 (BDE-209) 孕期染毒对雄性子代大鼠海马 BDNF 蛋白表达的影响 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2017, 35 (9) : 652-655.
- [13] GASCON M, FORT M, MARTÍNEZ D, et al. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in breast milk and neuropsychological development in infants [J]. *Environ Health Perspect*, 2012, 120 (12) : 1760-1765.
- [14] 曹园, 易成腊. 神经甾体对中枢神经损伤修复的研究进展 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37 (1) : 49-52.
- [15] FROGER N. New therapeutic avenues for neurosteroids in psychiatric diseases [J]. *Biol Aujourd'hui*, 2019, 213 (3/4) : 131-140.
- [16] TANAKA M, SOKABE M. Continuous de novo synthesis of neurosteroids is required for normal synaptic transmission and plasticity in the dentate gyrus of the rat hippocampus [J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62 (7) : 2373-2387.
- [17] CUMBERLAND AL, PALLISER HK, WALKER DW, et al. Cerebellar changes in guinea pig offspring following suppression of neurosteroid synthesis during late gestation [J]. *Cerebellum*, 2017, 16 (2) : 306-313.
- [18] CHEN J, LI X, LI X, et al. The environmental pollutant BDE-209 regulates NO/cGMP signaling through activation of NMDA receptors in neurons [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2018, 25 (4) : 3397-3407.
- [19] WANG L, ZHENG M, ZHANG S, et al. Roles of mtDNA damage and disordered Ca²⁺ homeostasis in the joint toxicities of cadmium and BDE209 [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 186 : 109767.
- [20] 尹元, 郑雅娟, 王霁雪, 等. 氯离子通道阻滞剂对人眼小梁细胞增生及凋亡的影响 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30 (1) : 12-16.
- [21] CAI H, CAO T, ZHOU X, et al. Neurosteroids in schizophrenia : pathogenic and therapeutic implications [J]. *Front Psychiatry*, 2018, 9 : 73.
- [22] COSTA LG, GIORDANO G. Is decabromodiphenyl ether (BDE-209) a developmental neurotoxicant? [J]. *Neurotoxicology*, 2011, 32 (1) : 9-24.

(英文编辑 : 汪源 ; 责任编辑 : 王晓宇)