

双酚 A 对雄性大鼠抗氧化能力影响的初步研究 *

王 轩 张 展 董惠斌 王守林[△]

(南京医科大学公共卫生学院 南京 210029)

摘要 目的 探讨双酚 A(BPA)对成年大鼠抗氧化能力的影响。方法 将健康成年雄性 SD 大鼠 84 只随机分为 5 个双酚 A 染毒剂量组(200、50、5、0.5、0.0005 mg/kg)和 1 个对照组,连续灌胃染毒 8 周,并监测体重变化,染毒结束后测定血浆超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px)含量,此外,提取肝脏组织 RNA,用荧光实时定量 PCR 测定肝脏硫氧还原蛋白过氧化物酶 2(prdx2)mRNA 的表达水平。结果 随着染毒时间的延长,50 mg/kg 及 200 mg/kg 剂量组的动物体重增长速度逐渐减慢,自 4 周开始,与对照组相比有显著差异($P<0.05$),染毒结束时,其体重分别为对照组的 90.52 %和 91.61 %($p<0.05$),而其它低剂量组间则无明显差异;大鼠血浆 GSH-Px 含量总体上呈下降趋势,且 5 mg/kg 以上剂量组与对照组相比差别均有统计学意义($p<0.01$);染毒组血浆 SOD 水平虽也低于对照组,但无统计显著性;此外,大鼠肝脏组织 prdx2 mRNA 水平随双酚 A 剂量增高呈剂量依赖性降低,与对照组相比,其在最低剂量组(0.0005 mg/kg)即有显著差异($p<0.01$)。结论 双酚 A 可造成大鼠抗氧化酶系统失衡,导致氧化损伤效应,prdx2 可能是反映其氧化损伤敏感的生物标志。

关键词 双酚 A;氧化损伤;硫氧还原蛋白过氧化物酶 2

中图分类号:Q95-3 R114 R135 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)08-1420-04

Effect of Bisphenol A on Antioxidant Capacity in Male Rats*

WANG Xuan, ZHANG Zhan, DONG Hui-bin, WANG Shou-lin[△]

(Public Health Department of NanJing Medical University, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of bisphenol A (BPA) on antioxidant capacity of adult Sprague-Dawley rats. **Methods:** A total of 84 healthy adult male SD rats were divided into 5 different concentration of BPA groups (200, 50, 5, 0.5, 0.0005 mg/kg/d) and a control group. The weight of the rats was detected, and the levels of SOD and GSH-Px in the plasma was detected. The mRNA of prdx2 was determined by real-time PCR. **Results:** The increasing of weight in 50 and 200 mg/kg/d BPA groups got slow day after day from the 4th week; At the end of the experiment, the weight of the two groups reached 90.52 % and 91.61 % of that of control ($p<0.05$). Plasma GSH-Px had declined in all groups except 0.0005 mg/kg/d compared with that of the control. All BPA groups of plasma SOD were lower than that of control group; The levels of prdx2 mRNA in the rat liver was significant dose-responses, with BPA increasing, the mRNA decreased. **Conclusions:** BPA caused unbalance of antioxidant enzyme system of adult male SD rats, and led to oxidative damage. Prdx2 may be the sensitive biomarker of oxidative damage.

Key Words: Bisphenol A; Oxidative damage; Peroxiredoxin 2

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R114, R135 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)08-1420-04

前言

双酚 A(bisphenol A, BPA), 烷基酚类化合物, 是世界上使用最广泛的工业化合物之一, 主要应用于聚碳酸酯、环氧树脂等多种高分子材料的生产, 还可用于生产增塑剂、阻燃剂、热稳定剂等精细化工产品。双酚 A 可通过食品包装容器、塑料薄膜、餐具及牙齿封闭剂^[1,2]等产品接触并进入人体, 已有报道证明双酚 A 已在血及尿等多种人群样本中被检出^[3-5]。

氧化应激(oxidative stress)是机体最常见的一类应激反应, 指在一些损伤因素的作用下, 细胞内氧化代谢物增加, 或细胞中氧化保护机制不足时, 使活性氧(ROS)堆积并攻击细胞内生

物大分子物质, 进一步可引发 DNA 损伤、细胞凋亡等效应。所以氧化与抗氧化系统间的失衡状态是产生氧化损伤的重要原因^[6]。

双酚 A 被认为是一种环境内分泌干扰物, 可以导致动物生殖系统、神经系统、免疫系统等多方面的损伤。已有体外实验报道双酚 A 可以造成人胚肝细胞 L-02 SOD 下降, MDA 升高, 并能诱导细胞凋亡^[7]。进入体内的双酚 A 主要经肝脏的相酶代谢排出^[8], 并对动物肝脏、睾丸、大脑等组织产生氧化损伤作用^[9,10]。据报道双酚 A 在高剂量下, 对雄性大鼠有一定的生物蓄积性^[11]。虽然以往的研究 BPA 可导致动物的氧化损伤, 但都是高剂量的作用, 对环境剂量水平的研究尚未见报道, 也未见双

* 基金项目 国家自然科学基金(30771782) 江苏省高校自然科学重大基础研究项目(06KJA33028)

作者简介 王轩(1985-) 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 生殖毒理 电话: 025-86862039,

E-mail: wx_20100101@163.com

[△]通讯作者 王守林 E-mail: wangshl@njmu.edu.cn

(收稿日期: 2011-01-03 接受日期: 2011-01-26)

酚 A 对硫氧还原蛋白过氧化物酶 2(prdx2)影响的研究。为此,本研究拟通过亚慢性染毒实验,观察低剂量双酚 A 对成年雄性大鼠抗氧化能力的影响,试图寻找敏感的生物标志物,为探讨 BPA 的低剂量损伤效应及其机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 84 只,6-8 周龄,体重 180-200 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物生成许可证号 SCXK(沪)2007 0005,合格证号 0061939。

1.2 主要试剂与器材

双酚 A(BPA)(纯度 >99.7%)、玉米油均购自 Sigma-Aldrich 公司;谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px)测试盒及超氧化物歧化酶(SOD)测试盒由南京建成生物研究所提供;ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒及 SYBR Green THUNDERBIRD qPCR Mix 试剂盒购自日本 TOYOBO 公司;Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司;异丙醇、氯仿及乙醇等(分析纯)购自国药集团;7300 荧光定量 PCR 扩增仪为 Applied Biosystems 产品。

1.3 实验方法

1.3.1 动物饲养及处置 将大鼠按体重随机分组,观察饲养一周后进行试验。整个实验过程中,大鼠均饲养于实验动物屏障中心中,环境中的空气经严格过滤、大鼠饲料和饮水均经过严格消毒,实验人员需经风淋消毒并换带隔离衣后方可试验。根据 BPA 的环境暴露水平和人体暴露剂量、NOAEL、LOAEL 以及 LD₅₀ 值,确定 5 个染毒剂量组,其中 3 个为低剂量组(0.0005、0.5、5 mg/kg),2 个为相对高剂量组(50、200 mg/kg),另设 1 个溶剂对照组(玉米油),每组 14 只,经口灌胃染毒 8 周,每周连续染毒 6 天。染毒期间大鼠自由摄食、饮水,按 12 小时白昼的节律调节光照。每周称重 2 次并记录。染毒结束后,禁食 12 小时,CO₂ 麻醉,心脏采血处死,取肝脏组织,于液氮中保存待用。

1.3.2 血浆 SOD 及 GSH-Px 含量的测定 碳酸锂抗凝管采血,4℃静置数小时后,3500 r/min 离心 10 min 分离血浆。血浆 SOD 和 GSH-Px 分别采用黄嘌呤氧化酶法和二硫代二硝基苯甲酸法比色法检测,根据试剂盒说明书提供的具体方法进行操作。

1.3.3 肝脏 RNA 的提取 取适量肝脏组织置于研钵中,并加入液氮研磨成粉末,置于 1 ml Trizol 中,经过裂解后采用氯仿提取法提取 RNA,溶解于双蒸水中,并用紫外分光光度计检测其浓度,取 2 μg RNA 逆转录为 cDNA。

1.3.4 肝脏中 prdx2 mRNA 检测 采用荧光实时定量 PCR 法。每个剂量组随机选择 3 只大鼠肝脏的 cDNA 进行等量混合后配制反应体系,各个剂量组做 6 平行复孔。引物设计使用 Primer Primer 5.0 软件,peroxiredoxin 2 (NM_017169) sense 5' TGTCCTTCGCCAGATCAC3' anti-sense 5' AAGTATTCCTTGCTGTCA TCC 3',以 GAPDH 为内参 (NM_017008) sense 5' CAAGGTCATCCATGACAACTTTG3' anti-sense 5' GTCCACCA-CCCTGTTGCTGAG3'。PCR 反应条件为:第一步,50℃ 2 min;第二步,95℃ 10 min;第三步,95℃ 变性 15 s,60℃ 退火/延伸 1 min,循环 40 次,并采集荧光值;第四步,95℃ 15 s,60℃ 30 s,95℃ 保温 1 min 后制作熔解曲线,确定扩增产物的特异性。计算 prdx2 相对 mRNA 表达量,其计算公式为:相对 mRNA

表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100\%$,其中 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{prdx2} - \Delta Ct_{control}$ (ΔCt 为各组目的基因 Ct 值减去内参后的 Ct 值)。

1.3.5 数据处理与分析 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差分析(LSD 法)及趋势卡方检验,检验水准 α 为 0.05。

2 结果

2.1 BPA 对大鼠生长的影响

由图 1 可见,随着 BPA 染毒时间的延长,不同剂量组大鼠的体重呈现出两组曲线,增加较快的一组为对照组和三个低剂量组,它们间的体重无明显差异,增长较慢的一组为两个高剂量组,自第 3 周开始它们的体重即开始慢于第剂量组和对照组,且从第 4 周开始,其体重差异具有统计显著性($P < 0.05$)。至 8 周染毒结束后,这种差异变化最明显,50 mg/kg 及 200 mg/kg 两个高剂量组体重则分别为对照组的 90.52% 和 91.61% (图 2)。提示,高剂量 BPA 暴露可以影响大鼠的生长,而低剂量 BPA 对大鼠的生长几乎不影响。

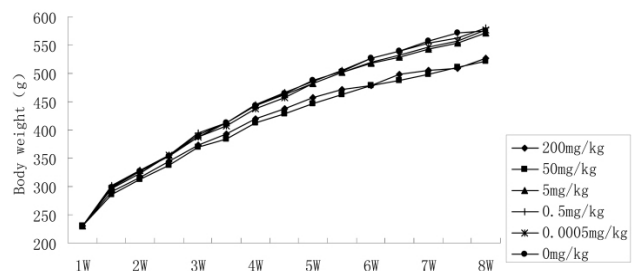


图 1 BPA 染毒 8 周内大鼠体重变化趋势

Fig.1 Trends of rat body weight changes in 8 weeks exposure of BPA

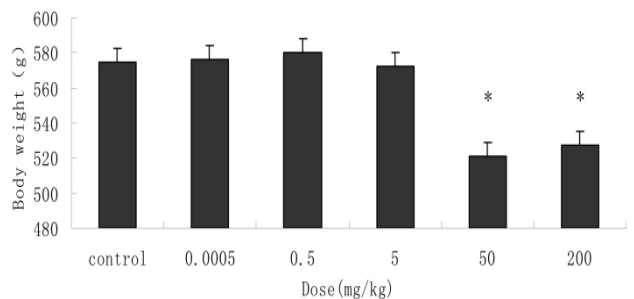


图 2 BPA 染毒 8 周后各组大鼠的体重 * 与对照组相比, F 检验, $p < 0.05$

Fig.2 Body weight of rats in BPA groups with different dose:*, compared with control group, F test, $p < 0.05$

2.2 BPA 对大鼠血浆 SOD、GSH-Px 的影响

表 1 显示, BPA 染毒可使大鼠血浆 GSH-Px 含量总体上呈下降趋势, 具有剂量反应关系, 且 5、50 及 200 mg/kg 剂量组 GSH-Px 含量与对照组相比, 差别均有统计学意义($p < 0.01$)。虽然染毒组血浆 SOD 的总体水平(除最低剂量组外)都低于对照组, 但变化不显著。

2.3 肝脏 prdx2 mRNA 水平的变化

prdx2 mRNA 表达水平的 qRT-PCR 曲线见图 3, 所有样品扩增均达到平台期, 且 Ct 值范围在 22-27 之间。由表 2 可见,

表 1 BPA 对血浆 SOD 及 GSH-Px 含量的影响
Table 1 Effects of BPA on the levels of plasma SOD and GSH-Px

Dose(mg/kg)	n	SOD(U/ml) $\bar{x}\pm s$	GSH-Px(U/ml) $\bar{x}\pm s$
control	14	238.91±35.78	3070.80±1572.46
0.0005	14	239.40±25.86	3085.00±1219.92
0.5	14	205.04±84.51	2958.00±1418.29
5	14	213.65±45.59	1870.20±624.69**
50	14	215.40±26.65	1521.80±753.42**
200	14	221.55±24.43	1402.00±497.09**

注：**,与对照组相比 F 检验 p<0.01
Note:**, compared with control group, F test, p<0.01

大鼠肝脏 prdx2 mRNA 水平随着双酚 A 染毒剂量的增加而呈逐渐下降趋势,具有明显的剂量反应关系,且从最低剂量组开始,其表达水平即与对照相比具有非常显著的差异(p<0.01),在高剂量组(50 mg/kg)这种变化更为明显。

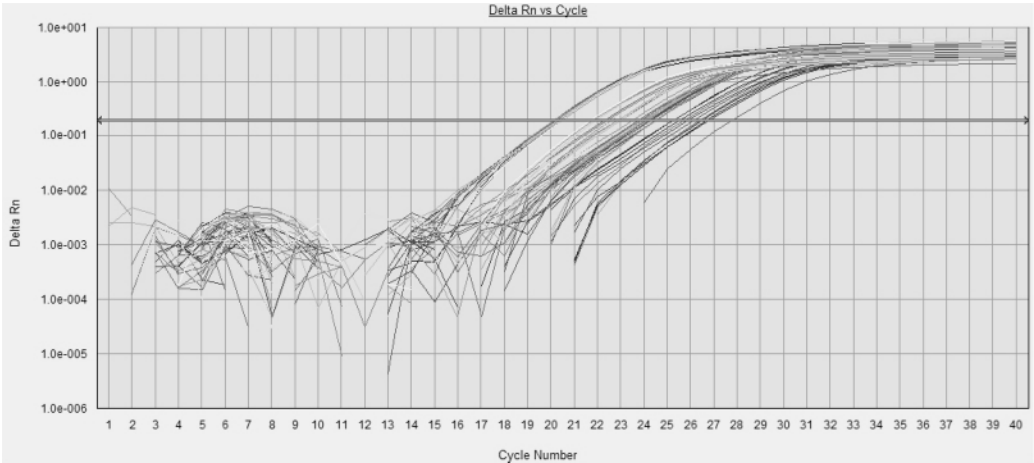


图 3 GAPDH 和 prdx2 基因 qRT-PCR 扩增曲线
Fig.3 GAPDH and prdx2 gene qRT-PCR amplification plot

表 2 BPA 对肝脏 prdx2 mRNA 水平的影响
Table 2 Effects of BPA on mRNA of prdx2 in liver of male rats

Dose(mg/kg)	n	prdx2 relative multiple $\bar{x}\pm s$
control	6	1.0030±0.0838
0.0005	6	0.6781±0.0478**
0.5	6	0.6883±0.0291**
5	6	0.5926±0.0322**
50	6	0.1180±0.0228**
200	6	0.1009±0.0076**

注：**,与对照组相比 F 检验 p<0.01
Note:**, compared with control group, F test, p<0.01

3 讨论

近年来,双酚 A 作为环境内分泌干扰物的一种,其慢性损害效应受到广泛关注。本实验发现,50 和 200 mg/kg/d 双酚 A 长期作用可减缓成熟雄性大鼠体重的增长,说明此剂量下双酚

A 可能会影响到大鼠的进食及营养吸收、利用等状况。本研究采用的动物为清洁级,且饲养条件规范、优良,保证了实验的可靠性,因此其敏感性也高于以往的研究报道^[12],动物各项有害效应的剂量更低。
SOD、GSH-Px 及 prdx 等是生物体自身抗氧化系统中的重

要成分。SOD 是体内唯一以自由基为底物的抗氧化酶,可以通过歧化反应消除 $O_2\cdot^-$,生成过氧化氢^[13]。GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶,它能催化 GSH 变为 GSSG,使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物,同时促进过氧化氢的分解,从而保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物的干扰及损害。经证实血浆 GSH-Px 与清除细胞外的过氧化氢和参与 GSH 的运输有关^[14]。本实验结果证实随双酚 A 剂量的升高血中 GSH-Px 呈现明显的下降趋势,而 SOD 水平也有一定程度的降低,且出现明显改变的剂量比较低,接近于 LOAEL。究其原因可能是低剂量刺激下 GSH-Px 代偿性的增加,而高剂量时无法代偿,出现损伤效应;而双酚 A 长期作用下对 SOD 影响并不明显,提示低剂量双酚 A 的暴露也可能引起机体的氧化损伤,导致抗氧化能力的下降。体外实验 $50\mu\text{M}$ 双酚 A 可诱导张氏肝细胞 GSH-Px 水平下降, SOD 水平升高^[15]。H. Kabuto 等人^[16]用 25 及 50 mg/kg 双酚 A 染毒 5 天后,小鼠肝脏及肾脏 GSH-Px 均呈下降趋势,而肝脏 SOD 则呈现上升趋势。

硫氧还原蛋白过氧化物酶 2(prdx2)属于抗氧化蛋白超家族中的一员,在体内肝、肾等多种组织细胞的胞质中表达。它主要通过硫氧还原蛋白还原过氧化物或超氧化物,在消除代谢过程产生的过氧化物中发挥重要作用。Lee TH 等人的研究发现 prdx2 缺陷的小鼠可以正常发育至性成熟,但是会出现脾肿大,且外周血中出现 Heinz 小体,异常形态的红细胞数量及 ROS 含量均增加^[17]。prdx2 可被过氧化氢诱导而表达升高, prdx2 也可降低过氧化氢的水平,但与此同时发生可逆性的失活^[18,19]。本研究发现双酚 A 染毒 8 周后大鼠肝脏组织中的 prdx2 mRNA 水平呈下降趋势,且在最低剂量组(即环境暴露剂量)下即出现了显著的下降,提示低剂量双酚 A 可通过抑制 prdx2 而达到干扰机体抗氧化的能力,导致氧化损伤效应。

综上所述,本次研究揭示了环境暴露剂量下的双酚 A 可以干扰机体的氧化还原系统,导致氧化损伤效应,其机制可能是由清除过氧化氢的抗氧化酶系统失衡而造成的。prdx2 可能是敏感的生物标志,结合相关指标分析,有助于评价环境剂量双酚 A 的损伤效应,为全面评价双酚 A 对人群的低剂量慢性危害提供线索。

参考文献(References)

- [1] Olea N. Bisphenol A and Dental Sealants: Olea's Response[J]. Environ Health Perspect, 2000, 108(12): 546-552
- [2] 王玉飞, 陈衡平, 陈晖. 桶装饮用水中双酚 A 的溶出及 GC/MS 分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(5):581-582
WANG Yu-fei, CHEN Heng-ping, CHEN Hui. Detection of bisphenol A in barreled drinking water by GC/MS [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2003(5):581-582
- [3] Volkel W, Kiranoglu M, Fromme H, et al. Determination of free and total bisphenol A in urine of infants[J]. Environ Res, 2010, doi:10.1016
- [4] Yi B, Kim C, Yang M, et al. Biological monitoring of bisphenol A with HPLC/FLD and LC/MS/MS assays [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(27):2606-2610
- [5] He Y, Miao M, Herrinton LJ, et al. Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels[J]. Environ Res, 2009, 109(5):629-633
- [6] Ho YS, Magnenat JL, Gargano M, et al. The nature of antioxidant

defense mechanisms: a lesson from transgenic studies [J]. Environ Health Perspect, 1998, 106(5):1219-1228

- [7] 李华文, 刘燕群, 石丹, 等. 双酚 A 对人胚肝细胞 L-02 的毒性作用研究[J]. 环境与职业医学, 2005, 22(2):102-108
LI Hua-wen, LIU Yan-qun, SHI Dan, et al. The toxic effects of bisphenol A on human embryo liver L-02 cell [J]. J Environ Occup Med, 2005, 22(2):102-108
- [8] Yokota H, Iwano H, Endo M, et al. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver [J]. Biochem J, 1999, 340 (Pt 2): 405-409
- [9] Lin Y, Zeng XG, Wu DS, et al. Study on bisphenol A induced primary cultured mesencephalic neuronal cell injury by oxidative stress [J]. Journal of Hygiene Research, 2006, 35(4):419-422 (In Chinese)
- [10] Kabuto H, Amakawa M, Shishibori T. Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice[J]. Life Sci, 2004, 74(24):2931-2940
- [11] Hanioka N, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, et al. Interaction of bisphenol A with rat hepatic cytochrome P450 enzymes [J]. Chemosphere, 2000, 41(7):973-978
- [12] 宋清坤, 郝卫东, 尚兰琴, 等. 双酚 A 对青春期雄性大鼠生殖发育的影响[J]. 癌变·畸变·突变, 2008, 20(4):267-271
SONG Qing-kun, HAO Wei-dong, SHANG Lan-qin, et al. The effects of bisphenol A on reproduction and development of pubertal male rats [J]. Carcino Genesis, Terato Genesis and Muta Genesis, 2008, 20 (4):267-271
- [13] Su Yan, Fan Di-min, Luo Yi, et al. Antioxidant Response in Serum of Carassius auratus under Tetrabromobisphenol A Exposure[J]. Journal of NanJing University (Natural Science), 2007, 43 (2):164-170(In Chinese)
- [14] 马森. 谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽转硫酶研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(10):53-56
MA Sen. Progress in glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2008, 29(10):53-56
- [15] Oh PS, Lim KT. Blocking of intracellular ROS production by phytylglycoprotein (30 kDa) causes anti-proliferation in bisphenol A-stimulated Chang liver cells [J]. J Appl Toxicol, 2008, 28 (6): 749-758
- [16] Kabuto H, Hasuiki S, Minagawa N, et al. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues [J]. Environ Res, 2003, 93(1):31-35
- [17] Lee TH, Kim SU, Yu SL, et al. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice[J]. Blood, 2003, 101(12): 5033-5038
- [18] Nonn L, Berggren M, Powis G. Increased expression of mitochondrial peroxiredoxin-3 (thioredoxin peroxidase-2) protects cancer cells against hypoxia and drug-induced hydrogen peroxide-dependent apoptosis[J]. Mol Cancer Res, 2003, 1(9):682-689
- [19] Cho CS, Lee S, Lee GT, et al. Irreversible inactivation of glutathione peroxidase 1 and reversible inactivation of peroxiredoxin II by H₂O₂ in red blood cells[J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 12(11):1235-1246a