

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20210816003

张鹏宇, 王宝堃, 刘可春, 等. 双酚芬对斑马鱼神经行为的影响及毒性作用机制[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(3): 157-166

Zhang P Y, Wang B K, Liu K C, et al. Toxic effects of bisphenol fluorene on zebrafish neurobehavior and its underlying mechanism [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(3): 157-166 (in Chinese)

双酚芬对斑马鱼神经行为的影响及毒性作用机制

张鹏宇^{1,2}, 王宝堃¹, 刘可春¹, 靳梦^{1,*}

1. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所山东省科学院药物筛选技术重点实验室, 济南 250103

2. 华北理工大学心理与精神卫生学院, 唐山 063200

收稿日期: 2021-08-16 录用日期: 2021-10-15

摘要: 基于斑马鱼模型探究双酚芬(9,9-bis(4-hydroxyphenyl)fluorene, BHPF)诱导的神经毒性及作用机制。通过黑白箱测试、新型水槽测试和 T 迷宫测试开展 BHPF 对斑马鱼神经行为学影响的检测,通过实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)研究 BHPF 神经毒性的作用机制。黑白箱测试结果显示, BHPF 造成斑马鱼运动能力异常;新型水槽测试结果显示, BHPF 导致斑马鱼探索行为异常;T 迷宫测试结果显示, BHPF 对斑马鱼学习记忆能力产生影响。qRT-PCR 结果显示, BHPF 可以造成斑马鱼神经发育、自噬和凋亡相关基因的异常表达。本研究揭示了 BHPF 可以造成斑马鱼运动能力和探索行为异常,影响学习记忆功能。BHPF 通过影响神经发育、自噬和凋亡等途径诱导神经毒性。

关键词: 双酚芬; 斑马鱼; 神经行为学; 神经发育; 自噬; 急性毒性

文章编号: 1673-5897(2022)3-157-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Toxic Effects of Bisphenol Fluorene on Zebrafish Neurobehavior and Its Underlying Mechanism

Zhang Pengyu^{1,2}, Wang Baokun¹, Liu Kechun¹, Jin Meng^{1,*}

1. Institute of Biology, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Key Laboratory of Drug Screening Technology of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250103, China

2. College of Psychology and Mental Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, China

Received 16 August 2021 accepted 15 October 2021

Abstract: Investigating the neurotoxicity induced by 9,9-bis(4-hydroxyphenyl) fluorene (BHPF) and its mechanism based on zebrafish model. Using zebrafish as a model, the neurobehavioral study of BHPF was carried out by using light/dark tests, novel tank tests, and T-maze tests. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to investigate the mechanism of neurotoxicity induced by BHPF. Light/dark tests showed that BHPF caused abnormal locomotor ability of zebrafish. Novel tank tests indicated that BHPF induced abnormal exploration behavior of zebrafish. T-maze tests revealed that BHPF had adverse effects on learning and memory ability of zebrafish. qRT-PCR results showed that BHPF could cause abnormal expression of genes related to neurodevelopment, autophagy, and apoptosis. This study revealed that BHPF causes abnormal locomotor ability and exploration behavior in ze-

基金项目: 山东省“外专双百计划”(WST2020008); 齐鲁工业大学(山东省科学院)科教产融合创新试点工程项目(2020KJC-ZD08, 2020KJC-GH02, 2020KJC-ZD10)

第一作者: 张鹏宇(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为认知与行为的神经机制, E-mail: Zpy961120@163.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: mjin1985@hotmail.com

brafish, as well as injured learning and memory ability. BHPF induces neurotoxicity by affecting neurodevelopment, autophagy, and apoptosis.

Keywords: bisphenol fluorene; zebrafish; neurological behavior; neurodevelopment; autophagy; acute toxicity

双酚芬(9,9-bis(4-hydroxyphenyl)fluorene, BHPF)是双酚 A(BPA)的替代物之一,现已广泛用于塑料产品的生产。因为 BHPF 能够较好地替代 BPA,所以常用在与食物接触的材料或容器中,包括水瓶、奶瓶和婴儿水瓶等^[1-2]。2018 年加拿大联邦水质指南将 BPA 水中安全浓度规定为 $3\ 500\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[3]。研究发现,加拿大淡水样本的 BPA 浓度范围为 $3.05\sim 1\ 888.51\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$,五大湖流域中 BPA 含量最高的 3 个流域中,其浓度分别为 309.4、217.6 和 $184.2\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。另有研究发现^[4],慢性低剂量 BPA($50\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $500\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)暴露能够影响斑马鱼对复杂环境的适应能力。考虑到 BHPF 在食品容器加工中的广泛应用,特别是儿童用品,因此人们格外关注其对环境和健康的潜在影响。在长期使用 BHPF 饮料瓶的饮水人群血清中检测到了 BHPF,说明 BHPF 可以从塑料瓶释放到饮用水中从而进入人和动物体内。此外,Zhang 等^[5]研究发现,即使在 BPA 无毒剂量下,BHPF 仍可以干扰内分泌,在小鼠体内产生抗雌激素效应。以上研究表明,BHPF 可以进入动物和人体内,对生物体健康产生潜在影响,并且 BHPF 可能具有强于 BPA 的毒性效应。Jiao 等^[1]研究发现,BHPF 能够抑制小鼠和猪卵母细胞减数分裂进程,造成卵母细胞内纺锤体组装异常、微丝构建紊乱、线粒体功能异常、能量水平下降、过氧化物水平升高和早期凋亡发生等。另外还发现 BHPF 可以通过改变卵母细胞内组蛋白修饰水平和皮质颗粒分布影响卵母细胞质量。

近些年,随着我国经济的不断发展,水环境污染问题日趋严重。环境中各种污染物在水体中的积累不仅会对水生生物的生存构成威胁,同时也会对人类的健康造成直接或间接的影响^[6]。诸多研究表明^[7],环境污染物可以对生物体的行为以及神经系统造成不同程度的影响。斑马鱼因其体型小、繁殖快、胚胎透明和对水环境的变化十分敏感等特点,被广泛用于水体环境中污染物毒性的检测。还因其具有与人类神经系统高度相似的中枢神经系统功能^[8],而被广泛应用于神经发育和神经毒性研究。在神经发育方面,斑马鱼发育至第 5 天就能够自主运动,便于对其行为活动进行实时监测,这一优势是

其他脊椎动物不能替代的。值得注意的是,斑马鱼对于毒性的敏感性在一定程度上高于哺乳动物,表明斑马鱼对于检测一些低毒或者毒性表现不明显的物质具有重要意义^[9]。本课题组前期基于斑马鱼模型的研究发现^[10],BHPF 对下丘脑-垂体-甲状腺轴产生毒物兴奋效应,破坏髓鞘形成。在此基础上,本论文以斑马鱼成鱼为模型,开展黑白箱测试、新型水槽测试和 T 迷宫测试并对神经发育、自噬和凋亡相关基因进行检测,探究 BHPF 的神经毒性和作用机制。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 材料

1.1.1 试剂

RNA 试剂盒(RN2802,北京艾德莱生物科技有限公司);反转录试剂盒(近岸蛋白质科技有限公司);荧光定量 PCR 试剂盒(RR036A、RR091A TaKaRa 公司)。

1.1.2 仪器

斑马鱼养殖系统(Z-A-S5,上海海圣公司);Zebbrabox 斑马鱼行为分析仪(Viewpoint 公司);实时荧光定量 PCR 仪器(13720,罗氏诊断产品有限公司);C1000 Touch 梯度 PCR 仪(伯乐生命医学产品有限公司);超微量分光光度计(NDoneC,基因有限公司)。

1.1.3 动物

野生型成年斑马鱼 AB 由山东省科学院生物研究所提供,将斑马鱼养殖在水温 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的系统中进行培养,每天给予 14 h 照明:10 h 黑暗的光照交替,早晚定点喂食。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组及处理

将野生型成年斑马鱼 AB 随机分为 3 组:空白对照组、 $0.1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 组、 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 组。设置 3 个平行组,每组 4 条,连续给药 3 周,每隔 24 h 换一次药,给药后将斑马鱼放置于恒温 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$,14 h 光照:10 h 黑暗的鱼房进行培养。

1.2.2 行为学检测

1.2.2.1 黑白箱测试

黑白箱是一个长 22 cm 宽 14 cm 高 14 cm 的长方体水箱。水箱一侧用黑色塑料袋在外围包裹起

来,使缸内呈现黑暗状态,另一侧用白纸包裹起来,使缸内呈现较明亮状态,之后将水箱放置在 LED 灯箱上,抽出水箱中间的挡板,将斑马鱼放入水箱中,每次一条。斑马鱼放入水箱中先静置 10 min 使其适应环境,当斑马鱼游至黑白分界线时开始计时,记录时间为 3 min,观察和分析成年斑马鱼在黑、白箱中游动的距离和时间。

1.2.2.2 新型水槽测试

新型水槽实验在一个长 22 cm 宽 14 cm 高 14 cm 的长方体透明水槽中进行,并将其放置在 LED 灯箱前面。在水箱外壁画一条中线,将水箱分成上下 2 个相等的部分,中线以上为上部区域,中线以下为下部区域。将斑马鱼放入水槽中,每次一条,斑马鱼在水槽中静置 10 min 使其适应环境,之后当斑马鱼游至水槽中线时开始记录,记录时间为 3 min,观察和分析斑马鱼在上、下区域游动的时间和距离。

1.2.2.3 T 迷宫测试

T 迷宫检测装置的起始臂 21 cm,长臂 20 cm,短臂 11 cm,同时有 4 个 6 cm³ 的深水区,深水区比其他手臂深 4 cm,都是由不透明的塑料板组成,深水区是一个不透明的黑色区域,健康斑马鱼更偏好于黑暗深水环境。将 T 迷宫放置于 LED 灯箱上,先对每只斑马鱼进行训练,待斑马鱼游到深水区时,将其捞出换下一条继续训练,所有斑马鱼训练结束后,开始观察和分析斑马鱼在起始臂、长臂、短臂和进入深水区的距离和时间,每条斑马鱼的实验时间为 5 min。

1.2.3 荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

在行为学检测后,将每组成年斑马鱼取脑,鱼脑按组别放置 EP 管中,每组取 2 个鱼脑用 PBS 冲洗 2~3 次,加入裂解液,在破碎机中充分研磨,使其完全裂解,然后将研磨后的裂解物放入离心机中离心,取上清液。RNA 提取后,利用超微量分光光度计检测不同组别 RNA 的浓度,检测得到的结果 A260/A280 应在 2.0~2.5 之间;之后立即使用 C1000 Touch 梯度 PCR 仪将 RNA 进行反转,将反转得到的 cDNA 进行稀释,然后加入相应的引物用实时荧光定量 PCR 仪对各个基因进行扩增,以 *rpl13a* 为内参基因(表 1)。Real-time PCR 扩增结束后,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法计算各组基因的相对表达量。

1.2.4 统计学分析

利用 Graphpad prism 7.0 软件对实验结果进行 One-way ANOVA 检验,以 Correct for multiple comparisons using statistical hypothesis testing. (Bonferoni)进行组间比较,并以 Mean±SEM 表示。

2 结果 (Results)

2.1 黑白箱测试结果提示 BHPF 造成斑马鱼运动能力异常

黑白箱测试结果显示健康成年斑马鱼更偏好

表 1 Real-time PCR 所需引物序列信息
Table 1 Primer sequence for real-time PCR

基因名称 Gene	引物序列 Primer sequence
<i>rpl13a</i>	Forward: TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC Reverse: AGACGCACAATCTTGAGAGCAG
<i>c-fos</i>	Forward: GCTCCTGGCTAAAGCGGAGCTG Reverse: GACGTGTAGGTGGTGCAGGCTGG
<i>gfap</i>	Forward: GGATGCAGCCAATCGTAAT Reverse: ATCCTTTCACGACCATCT
<i>mbp</i>	Forward: AATCAGCAGGTTCTTCGG Reverse: AAGAAATGCACGACAGGGTTGACG
<i>syn2a</i>	Forward: GTGACCATGCCAGCATTTTC Reverse: TGGTTCCTCACTTTCACCTT
<i>tuba1b</i>	Forward: AATCACCAATGCTTGCTTCGAGCC Reverse: TTCACGTCTTTGGGTACCACG
<i>apaf1</i>	Forward: TTCTACAGTAAACGCCACC Reverse: TATCTAGTATTTCCCATATTC
<i>cyto C</i>	Forward: AACCATATGCCAACCCCTGAG Reverse: CACGTAATCTTCGCTCCAT
<i>bax</i>	Forward: GGCTATTTCAACCAGGGTTCC Reverse: TGCGAATCACCAATGCTGT
<i>caspase8</i>	Forward: CCAGACAATCTGGATGAACCTTAC Reverse: TCCTTGTCTCTGGTCTCTGT
<i>p53</i>	Forward: ACCACTGGGACCAAACGCTAG Reverse: AGATCTCCTCATCGCTGCTG
<i>caspase9</i>	Forward: ACCACTGGGACCAAACGCTAG Reverse: AGATCTCCTCATCGCTGCTG
<i>caspase3</i>	Forward: CCGCTGCCCATCACTA Reverse: ATCCTTTCACGACCATCT
<i>atg5</i>	Forward: AGGGGATAACAGCACAAACG Reverse: CTTCTTATGCAGCGTGTCCA
<i>beclin1</i>	Forward: GTTCAGGTGGTCTGCGTTTT Reverse: GCAAACAGAAGCCAGTGTC
<i>ulk2</i>	Forward: ACCTCTGATTGGCTGACAAAAT Reverse: GAGATTGCAAGAGGCTTGAGTT
<i>parkin</i>	Forward: GCGAGTGTGTCTGAGCTGAA Reverse: GCCCTGAAGTGTGGATTTCAT

黑暗区域中运动,且运动能力正常。 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 处理后的斑马鱼运动能力下降,而 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 组斑马鱼运动能力有所提高,提示低浓度 BHPF 可能对斑马鱼运动能力产生更加显著的影响。与空白对照组相比, $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 组和 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 组斑马鱼在黑暗区域的运动距离/总距离、黑暗区域的运动时间/总时间的比值虽有下降趋势,但不具有统计学意义(图 1)。该实验结果提示,BHPF 能够导致斑马鱼运动能力异常,但对认知能力无显著影响。

2.2 新型水槽测试结果提示 BHPF 引起斑马鱼探索行为异常

新型水槽实验发现,经 BHPF 处理后的斑马鱼运动轨迹出现了明显变化,与空白对照组相比, $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 组斑马鱼在水缸上部区域运动轨迹显著增加,斑马鱼表现出行为异常(图 2(a))。经过数据统计发现, $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 组斑马鱼在上部区域的运动距离/总距离、上部区域的运动时间/总时间的比值均显著增加,具有统计学意义(图 2(b)和(c))。 $0.1 \mu\text{g}$

$\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 组斑马鱼在上部区域的运动距离/总距离的比值和上部区域的运动时间/总时间的比值虽都有变化,但均不具有统计学意义。综上所述,在新型水槽实验中,BHPF 引起斑马鱼探索行为异常。

2.3 T 迷宫测试结果提示 BHPF 造成斑马鱼学习记忆能力损伤

通过 T 迷宫测试,探究 BHPF 对斑马鱼学习记忆能力的影响。与空白对照组相比, $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 组斑马鱼在 T 迷宫中运动轨迹明显减少,抑制了斑马鱼的运动能力; $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 组斑马鱼运动轨迹显著增加,出现运动过度活跃现象并且在错误臂出现的次数增多(图 3(a))。通过数据统计发现, $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 组斑马鱼在错误臂的运动距离/总距离、错误臂运动时间/总时间的比值均增加,但不具有统计学意义;而 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 组斑马鱼在错误臂的运动距离/总距离、错误臂的运动时间/总时间的比值均显著增加,具有统计学意义(图 3(b)和(c))。以上实验结果提示,BHPF 对斑马鱼学习记忆能力造成了损伤。

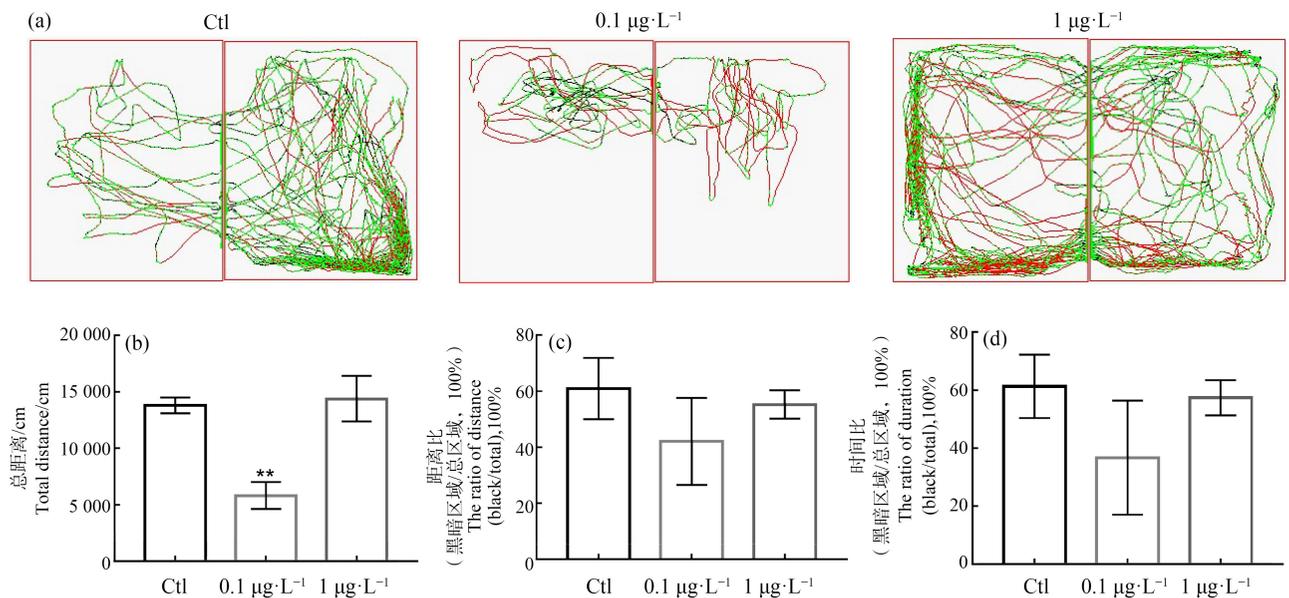


图 1 双酚芬 (BHPF) 引起斑马鱼运动能力异常

注:(a) 黑白箱实验中斑马鱼的运动轨迹;红线表示快速运动($v > 5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$),绿线表示中速运动($2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1} \leq v \leq 5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$),黑线表示慢速运动($v < 2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$);(b)不同组斑马鱼在黑白箱中运动的总距离;(c)不同组斑马鱼在水箱黑暗区域游动距离与总游动距离的比值;(d)不同组斑马鱼在水箱黑暗区域游动时间与游动总时间的比值; ** 表示与空白对照组相比差异显著($P < 0.01$)。

Fig. 1 9,9-bis(4-hydroxyphenyl)fluorine (BHPF) caused abnormal locomotor ability of zebrafish

Note: (a) Zebrafish swimming path in light/dark preference tests; red line indicates fast movement ($v > 5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$), green line indicates medium speed movement ($2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1} \leq v \leq 5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$), and black line indicates slow speed movement ($v < 2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$); (b) Total distance travelled of zebrafish in light-dark preference tests; (c) The ratio of distance (black/total) of zebrafish in light-dark preference tests; (d) The ratio of duration (black/total) of zebrafish in light-dark preference tests, ** $P < 0.01$ indicates significant difference compared with blank control group.

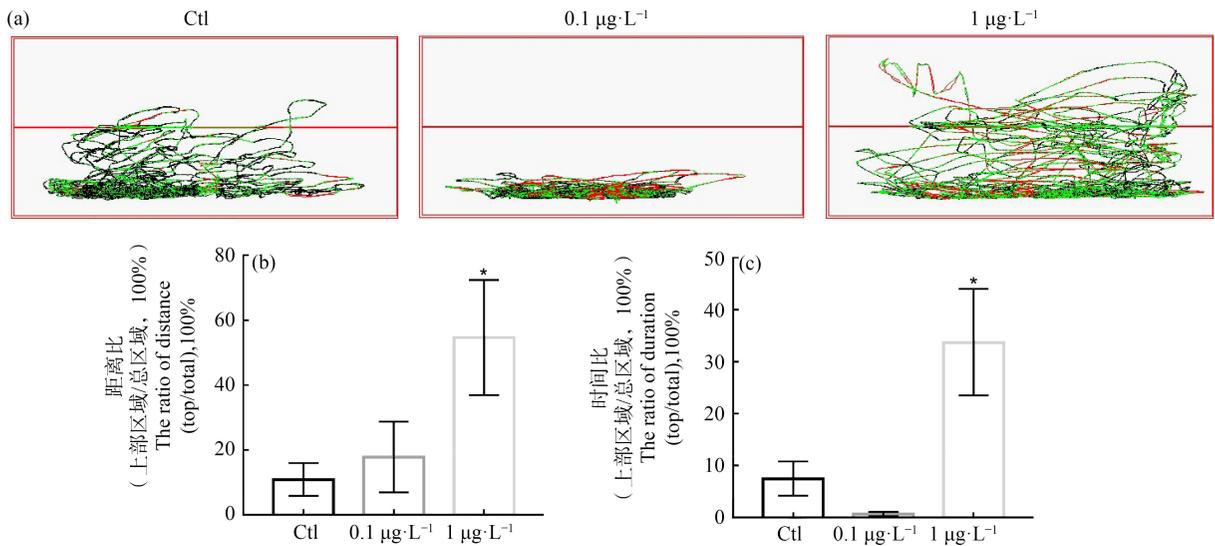


图 2 BHPF 造成斑马鱼探索行为异常

注:(a) 新型水槽测试中斑马鱼的运动轨迹;红线表示快速运动($v > 5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$),绿线表示中速运动($2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1} \leq v \leq 5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$),黑线表示慢速运动($v < 2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$);(b) 不同组斑马鱼在水槽上部区域运动距离与在整个水槽内运动总距离的比值;(c) 不同组斑马鱼在水槽上部区域运动时间与在整个水槽内运动总时间的比值;*表示与空白对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 2 BHPF induced abnormal exploration behavior of zebrafish

Note: (a) Zebrafish swimming path in novel tank diving tests; red line indicates fast movement ($v > 5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$), green line indicates medium speed movement ($2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1} \leq v \leq 5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$), and black line indicates slow speed movement ($v < 2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$); (b) The ratio of distance (top/total) of zebrafish in novel tank diving tests; (c) The ratio of duration (top/total) of zebrafish in novel tank diving tests; * $P < 0.05$ indicates significant difference compared with blank control group.

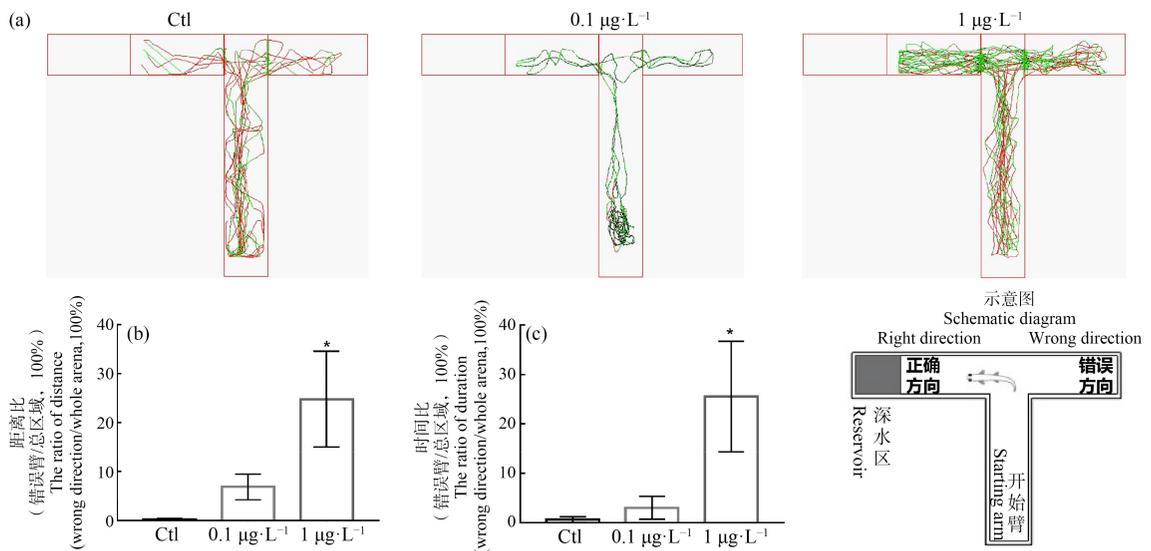


图 3 BHPF 影响斑马鱼学习记忆能力

注:(a) T 迷宫测试中斑马鱼的运动轨迹;红线表示快速运动($v > 5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$),绿线表示中速运动($2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1} \leq v \leq 5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$),黑线表示慢速运动($v < 2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$);(b) 不同组斑马鱼在 T 迷宫错误臂运动距离与在整个水槽内运动总距离的比值;(c) 不同组斑马鱼在 T 迷宫错误臂运动时间与在整个水槽内运动总时间的比值;*表示与空白对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 3 BHPF had adverse effects on learning and memory ability of zebrafish

Note: (a) Zebrafish swimming path in T-maze tests; red line indicates fast movement ($v > 5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$), green line indicates moderate movement ($2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1} \leq v \leq 5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$), and black line indicates slow movement ($v < 2 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$); (b) The ratio of distance (wrong direction/whole arena) of zebrafish in T-maze tests; (c) The ratio of duration (wrong direction/whole arena) of zebrafish in T-maze tests; * $P < 0.05$ indicates significant difference compared with blank control group.

2.4 BHPF影响神经发育相关基因的表达

为进一步探究 BHPF 造成斑马鱼行为异常的神经毒性作用机制,本研究利用 qRT-PCR 从神经发育、自噬和凋亡 3 个方面对斑马鱼脑内相关基因进行检测。与空白对照组相比,低、高浓度 BHPF 处理组 *c-fos* (c-proto-oncogene protein)、*syn2a* (synchronous2a)、*tuba1b* (tubulin alpha-1b chain)、*mbp* (myelin basic protein) 和 *gfap* (glial fibrillary acidic protein) 的表达显著上调,且具有浓度依赖性(图 4)。研究结果提示,BHPF 影响斑马鱼脑内神经发育相关基因表达。

2.5 BHPF影响凋亡相关基因的表达

为探究 BHPF 引起的神经毒性是否与凋亡机制相关,本研究对 *cyto C* (cytochrome C)、*apaf1* (apoptotic protease activating factor-1)、*bax* (bcl2-associated x protein)、*caspase8* (cysteiny l aspartate specific proteinase8)、*p53* (tumor suppressor gene)、*caspase9* (cysteiny l aspartate specific proteinase9) 和 *caspase3* (cysteiny l aspartate specific proteinase3) 基因进行检测(图 5)。与空白对照组相比,0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 组 *apaf1*、*cyto C*、*bax*、*caspase8*、*p53*、*caspase9* 和 *caspase3* 表达上调,但 *apaf1* 和 *bax* 表达差异不具有统计学意义。与空白对照组相比,1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 组 *apaf1*、*cyto C*、*bax*、*caspase8*、*p53*、*caspase9* 和 *caspase3* 表达均显

著上调,具有统计学意义。研究结果提示,BHPF 可以调控斑马鱼脑内凋亡相关基因,并且随着浓度增加,BHPF 对基因表达的影响越显著。

2.6 BHPF影响自噬相关基因的表达

为探究 BHPF 产生神经毒性是否与自噬机制有关,对 *atg5* (autophagyrelated gene 5)、*beclin1*、*ulk2* (unc-51-like kinase 2) 和 *parkin* 进行检测(图 6)。与空白对照组相比,0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 组和 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BHPF 组的 *atg5*、*beclin1*、*ulk2* 和 *parkin* 基因的表达以浓度依赖方式上调,具有统计学意义。研究结果提示,BHPF 可以通过影响斑马鱼脑内自噬相关基因从而导致神经毒性。

3 讨论(Discussion)

为探究 BHPF 对环境和生物健康的潜在威胁,本研究以斑马鱼成鱼为模型,进行了神经行为学和相关基因检测,以揭示 BHPF 诱导的神经毒性和内在机制。黑白箱测试主要对斑马鱼的认知能力进行检测,健康成年斑马鱼更偏好于黑暗环境,而不喜欢明亮环境;新型水槽测试对斑马鱼探索能力进行检测,健康成年斑马鱼的探索欲望更强,在水槽上部运动更加活跃;T 迷宫测试检验斑马鱼的学习记忆能力,健康成年斑马鱼通过训练能够减少游到深水区的的时间和游到错误区的次数。3 种行为学测试探究

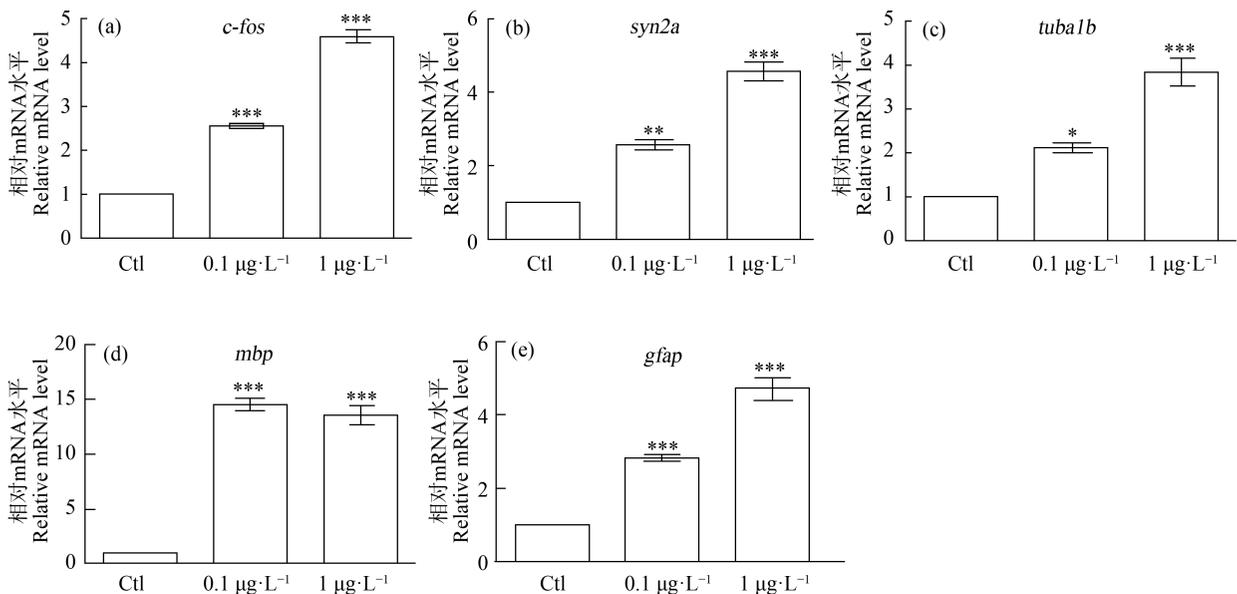


图 4 BHPF 对神经发育相关基因表达的影响

注:与空白对照组相比差异显著,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

Fig. 4 Effects of BHPF on the expression of neurodevelopment-related genes

Note: Compared with blank control group, there is significant difference, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

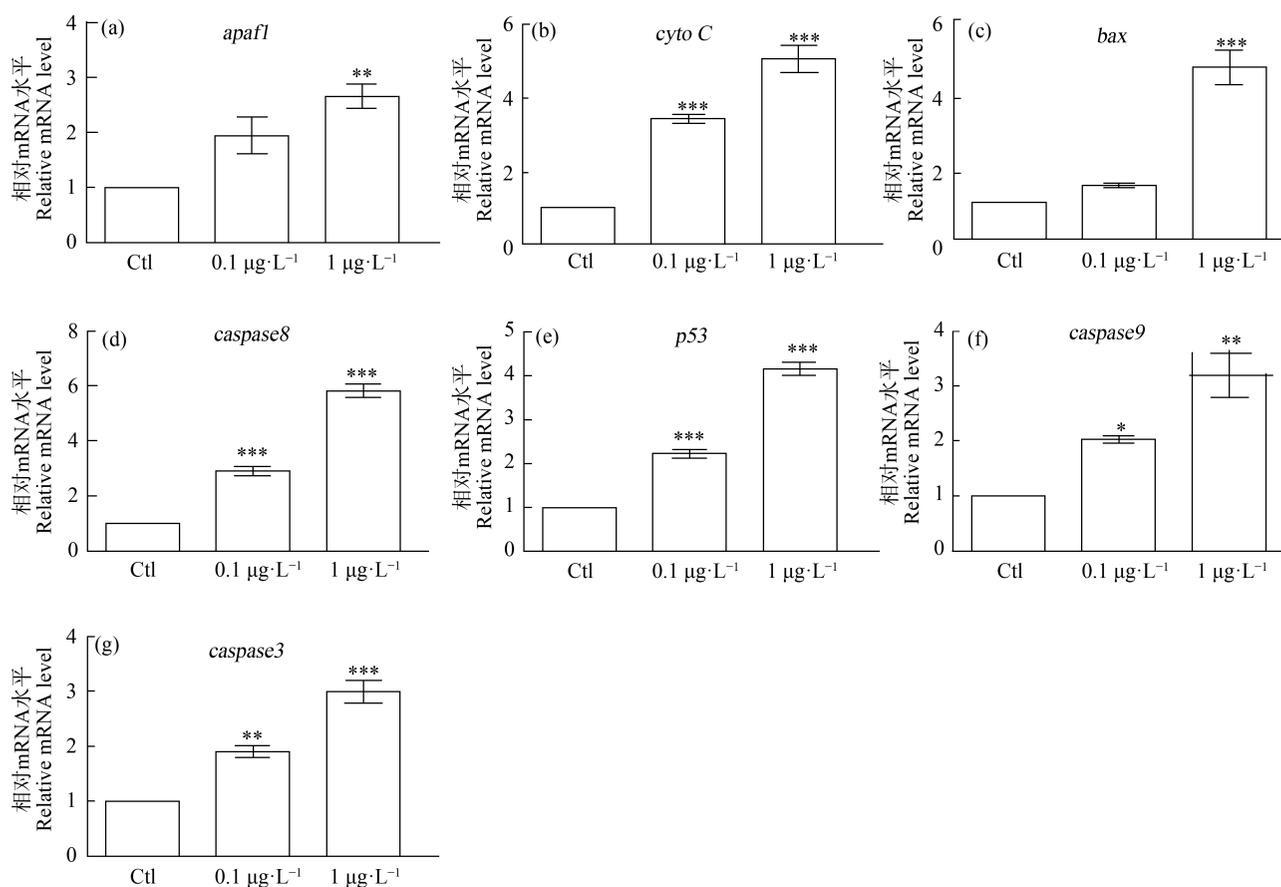


图 5 BHPF 对凋亡相关基因表达的影响

注:与空白对照组相比差异显著, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Fig. 5 Effects of BHPF on the expression of apoptosis-related genes

Note: Compared with blank control group, there is significant difference, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

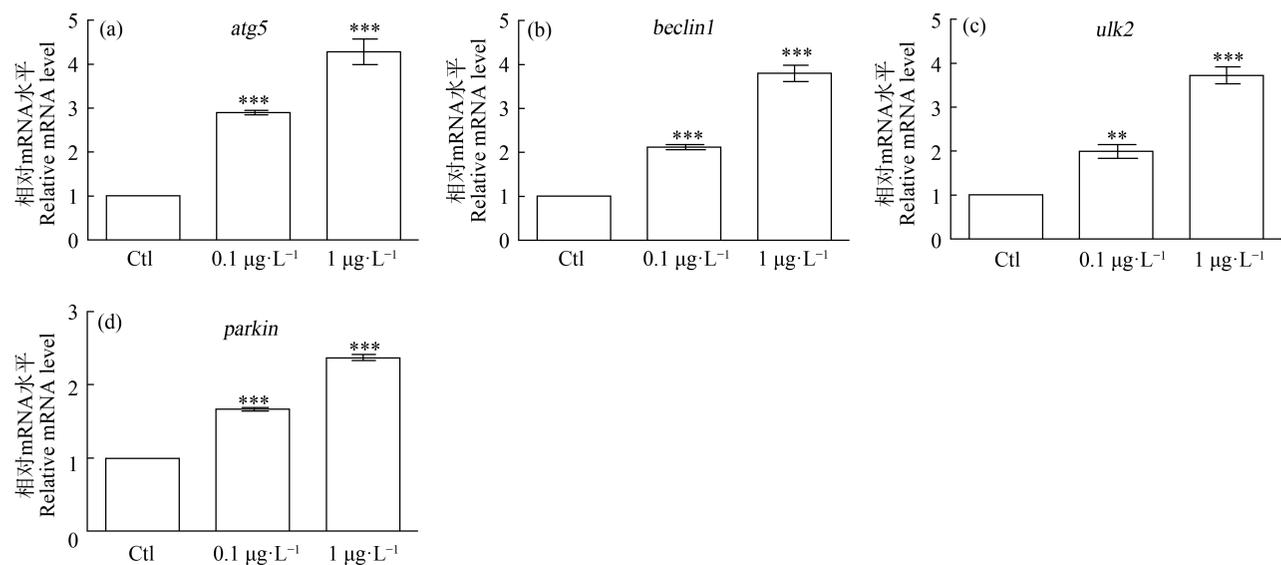


图 6 BHPF 对自噬相关基因表达的影响

注:与空白对照组相比差异显著, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Fig. 6 Effects of BHPF on autophagy related gene expression

Note: Compared with blank control group, there is significant difference, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

的都是斑马鱼的神经损伤情况,三者之间具有相互作用关系,本研究发现黑白箱测试中 BHPF 对斑马鱼运动能力产生影响;新型水槽测试显示 BHPF 使斑马鱼探索欲望降低,进一步说明 BHPF 可以对斑马鱼运动能力产生影响;T 迷宫测试结果发现,BHPF 不仅对斑马鱼运动能力产生影响还会对斑马鱼学习记忆造成损伤。以往研究利用斑马鱼新型水槽测试揭示了 BHPF 的抗雌激素毒性^[11]。T 迷宫测试显示了 BPA 另一种替代物双酚 AF(4,4'-六氟-2-二酚,BPAF)使斑马鱼在错误臂出现次数增加,揭示了 BPAF 对斑马鱼产生神经毒性效应^[12]。Li 等^[4]研究发现,健康成年斑马鱼与红色相比更偏好绿色区域,50 ng·L⁻¹ BPA 处理后的斑马鱼对绿色和红色没有明显的偏好,但运动能力降低;当 BPA 浓度达到 500 ng·L⁻¹时,虽仍然没有明显的颜色偏好,但运动开始恢复到正常水平。同样在红色与蓝色偏好测试中发现,健康成年斑马鱼更偏好红色区域,50 ng·L⁻¹ BPA 处理后的斑马鱼对红色和蓝色没有明显的偏好,但运动能力降低;当 BPA 浓度达到 500 ng·L⁻¹时,虽然仍然没有对红色或蓝色的偏好,但运动开始恢复到正常水平。究其原因可能在于低浓度 BPA 可使血清素阳性神经元数量减少得更加明显,从而造成斑马鱼运动能力降低。上述行为学测试结果与本研究结果相似,黑白箱测试和新型水槽测试中低浓度 BHPF 可以对斑马鱼行为运动产生影响,T 迷宫实验 BHPF 可以对斑马鱼学习记忆产生损伤,提示 BHPF 诱导斑马鱼成鱼的神经毒性。研究发现,BHPF 处理组使神经发育、自噬和凋亡相关基因表达显著上调,这与之前有毒化合物暴露对斑马鱼的影响的研究结果相类似。韩沐汐等^[13]研究发现,氯化铈处理的斑马鱼凋亡和自噬相关基因表达显著上调。又有研究表明^[14],铅暴露导致斑马鱼神经发育相关基因过表达。本研究的主要目的是探究 BHPF 对斑马鱼产生的神经毒性及作用机制,但是探讨 BHPF 和 BPA 的毒性效应差异及内在机制对于水生环境的监测和人类健康发展也是至关重要的。因此,本课题组今后的研究重点将会详细比较和分析 BHPF 和 BPA 的毒性效应差异和内在机制。

c-fos 是斑马鱼神经元兴奋性的标志物^[15]; *gfap* 表达上调可产生神经毒性^[16]; *tubal1b* 在中枢神经系统中发挥重要作用; *mbp* 在斑马鱼胚胎发育阶段的神经系统中表达丰富。*syn2a* 是哺乳动物突触形成的生物标志物,在突触发生和神经递质释放中发挥

重要作用^[17]。本实验发现,BHPF 对 *c-fos*、*gfap*、*tubal1b*、*mbp* 和 *syn2a* 等神经发育相关基因的表达具有调控作用,上述基因表达上调提示 BHPF 可能通过影响神经元活动、中枢神经系统结构、突触的发生和神经递质释放产生神经毒性。

细胞凋亡是一种继发性程序化死亡过程,多种基因参与调控,其中 *bax* 是启动凋亡的关键基因^[18],随着死亡信号的刺激,促凋亡蛋白 BAX 直接被激活,随后移位至线粒体并形成同源二聚体通道,促进 CYTO C 释放至胞浆导致 APAF1 活化,从而使 CASPASE 蛋白激活并诱导细胞凋亡。p53 能通过激活促凋亡因子,同时抑制抗凋亡因子增加线粒体通透性并参与凋亡程序^[19]。结果发现,BHPF 使 *apaf1*、*cyto C*、*bax*、*caspase3*、*caspase8*、*caspase9* 和 *p53* 凋亡相关基因表达上调,提示 BHPF 可以通过诱导细胞凋亡产生神经毒性。

自噬是细胞进化的正常生理过程^[20],正常生理情况下对细胞有利,在应激刺激时自噬活性升高以应对不利环境。当刺激持续存在时,将会过度激活自噬活性,从而导致细胞的损伤或死亡。*atg5* 基因参与自噬体的形成,在自噬过程中起关键作用^[21]。*beclin1* 是第一个被发现与自噬调控相关的关键因子^[22]。*parkin* 作为 E3 泛素连接酶,能从胞质转移到线粒体中,泛素化线粒体蛋白,形成自噬体,进而通过自噬降解受损的线粒体^[23]。*ulk2* 能阻止不溶性泛素化蛋白聚集物的积累^[24]。研究显示^[1],BHPF 可以调控 *beclin1* 表达显著上调,说明 BHPF 可以诱导线粒体自噬,降解线粒体结构蛋白,这与本实验结果类似。本研究进一步检测了 *atg5*、*parkin* 和 *ulk2* 自噬相关基因,提示 BHPF 可能由于造成过度自噬产生神经毒性。

综上所述,本研究通过行为学检测(黑白箱测试、新型水槽测试和 T 迷宫测试)和基因检测(神经发育、自噬和凋亡)相结合的方法,明确了 BHPF 对斑马鱼成鱼的神经毒性及作用机制,为水生环境的监测和人类健康发展提供了理论基础。

通讯作者简介:靳梦(1985—),女,博士,研究员,主要研究方向为神经系统疾病模型建立和神经药理毒理学。

参考文献 (References):

- [1] Jiao X F, Liang Q M, Wu D, et al. Effects of acute fluorene-9-bisphenol exposure on mouse oocyte *in vitro* maturation and its possible mechanisms [J]. Environmen-

- tal and Molecular Mutagenesis, 2018, 60(3): 243-253
- [2] 李红梅,熊忆茗,徐海明,等.双酚A类似物的雄性生殖毒性研究进展[J].中国环境科学,2021,41(6):2939-2945
- Li H M, Xiong Y M, Xu H M, et al. Research progress in male reproductive toxicity of bisphenol A analogues [J]. China Environmental Science, 2021, 41(6): 2939-2945 (in Chinese)
- [3] Lalonde B, Garron C. Spatial and temporal distribution of BPA in the Canadian freshwater environment [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2020, 78(4): 568-578
- [4] Li X, Sun M Z, Li X, et al. Impact of low-dose chronic exposure to bisphenol A (BPA) on adult male zebrafish adaptation to the environmental complexity: Disturbing the color preference patterns and relieving the anxiety behavior [J]. Chemosphere, 2017, 186: 295-304
- [5] Zhang Z B, Hu Y, Guo J L, et al. Fluorene-9-bisphenol is anti-oestrogenic and may cause adverse pregnancy outcomes in mice [J]. Nature Communications, 2017, 8: 14585
- [6] 何锦,薛永来,周磊,等.几类常见污染物对斑马鱼运动影响的研究进展[J].生态毒理学报,2020,15(2):19-28
- He J, Xue Y L, Zhou L, et al. Research advances in the effects of several common pollutants on zebrafish movement [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(2): 19-28 (in Chinese)
- [7] Rice N C, Rauscher N A, Langston J L, et al. Behavioral toxicity of sodium cyanide following oral ingestion in rats: Dose-dependent onset, severity, survival, and recovery [J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 114: 145-154
- [8] Jeong J Y, Kwon H B, Ahn J C, et al. Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish [J]. Brain Research Bulletin, 2008, 75(5): 619-628
- [9] Alzualde A, Behl M, Sipes N S, et al. Toxicity profiling of flame retardants in zebrafish embryos using a battery of assays for developmental toxicity, neurotoxicity, cardiotoxicity and hepatotoxicity toward human relevance [J]. Neurotoxicology and Teratology, 2018, 70: 40-50
- [10] Jin M, Dang J, Paudel Y N, et al. The possible hormetic effects of fluorene-9-bisphenol on regulating hypothalamic-pituitary-thyroid axis in zebrafish [J]. The Science of the Total Environment, 2021, 776: 145963
- [11] Mi P, Zhang Q P, Zhang S H, et al. The effects of fluorene-9-bisphenol on female zebrafish (*Danio rerio*) reproductive and exploratory behaviors [J]. Chemosphere, 2019, 228: 398-411
- [12] 朱小乔,唐天乐,彭翔,等.双酚AF暴露降低斑马鱼学习记忆能力并影响神经系统相关基因表达[J].生态毒理学报,2017,12(1):119-126
- Zhu X Q, Tang T L, Peng X, et al. Bisphenol AF exposure reduces learning and memory ability and influences expression of nervous system genes in zebrafish [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(1): 119-126 (in Chinese)
- [13] 韩沐汐,杨晋娴,吴依帆,等.氯化锑对斑马鱼胚胎发育的影响[J].毒理学杂志,2018,32(6):447-451
- Han M X, Yang J X, Wu Y F, et al. Effects of antimony trichloride exposure on development of zebrafish embryo [J]. Journal of Toxicology, 2018, 32(6): 447-451 (in Chinese)
- [14] Jin M, Ji X N, Zhang B Y, et al. Synergistic effects of Pb and repeated heat pulse on developmental neurotoxicity in zebrafish [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 172: 460-470
- [15] Herrera D G, Robertson H A. Activation of c-fos in the brain [J]. Progress in Neurobiology, 1996, 50(2-3): 83-107
- [16] Church B G, van Sprang P A, Chowdhury M J, et al. Updated species sensitivity distribution evaluations for acute and chronic lead toxicity to saltwater aquatic life [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2017, 36 (11): 2974-2980
- [17] He X W, Gao J W, Dong T Y, et al. Developmental neurotoxicity of methamidophos in the embryo-larval stages of zebrafish [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2016, 14(1): 23
- [18] Eryilmaz A, Cengiz A, Basal Y, et al. The correlation of prognostic biomarkers (Ki-67, Bcl-2, HIF-1 α , cyclin D1) with metabolic tumor volume measured by F-FDG PET/CT in laryngeal cancer [J]. Journal of Cancer Research and Therapeutics, 2018, 14(5): 994-998
- [19] Feng L, Liu Y, Jin L, et al. MiR-486-3p regulates proliferation, apoptosis, migration and invasion of colorectal cancer cells by directly targeting BIK [J]. Chinese Journal of Immunology, 2021, 37(8): 964-969
- [20] Huang F, Wang B R, Wang Y G. Role of autophagy in tumorigenesis, metastasis, targeted therapy and drug resistance of hepatocellular carcinoma [J]. World Journal of Gastroenterology, 2018, 24(41): 4643-4651
- [21] Han Q, Deng Y C, Chen S, et al. Downregulation of ATG5-dependent macroautophagy by chaperone-mediated autophagy promotes breast cancer cell metastasis [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 4759
- [22] Wang X, Fu Y F, Liu X, et al. ROS promote ox-LDL-in-

- duced platelet activation by up-regulating autophagy through the inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 2018, 50(5): 1779-1793
- [23] Cackovic J, Gutierrez-Luke S, Call G B, et al. Vulnerable parkin loss-of-function *Drosophila* dopaminergic neurons have advanced mitochondrial aging, mitochondrial network loss and transiently reduced autophagosome recruitment [J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2018, 12: 39
- [24] Fuqua J D, Mere C P, Kronemberger A, et al. ULK2 is essential for degradation of ubiquitinated protein aggregates and homeostasis in skeletal muscle [J]. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2019, 33 (11): 11735-11745 ◆