

邻苯二甲酸二丁酯 对雄性子代大鼠 学习记忆及海马 Spinophilin 表达的 影响

Effects of DBP on Learning and Memory and Spinophilin Expression in Hippocampus of the F1 Generation Rats

LI Yuan-feng, ZHUANG Mei-zhu, LI Tao*, HU Xiong-fei,
WANG Kai-liang, WANG Zhe, SHI Nian
(Department of Health Toxicology, MOE Key Laboratory
of Environmental and Health, Tongji Medical College of
Huazhong University of Science and Technology,
Wuhan 430030, Hubei, China)

李元锋/庄梅株/李涛*/胡雄飞/

王开亮/王哲/石年

(华中科技大学同济医学院公共卫生学院卫生
毒理学系 教育部环境与健康重点实验室 湖北
武汉 430030)

【摘要】背景与目的：观察邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)暴露对子代大鼠学习记忆能力的影响和海马 *spinophilin* 基因表达的影响。材料与方法：妊娠 Wistar 大鼠随机分成 4 组：3 个不同 DBP 剂量(25、75、225 mg/kg)的实验组和溶剂对照组，各组孕鼠于孕第 6 d 至产后 28 d 分别给予 DBP 或溶剂灌胃。观察孕鼠、仔鼠染毒后的基本情况，采用定量 PCR 检测 21 d 龄雄性仔鼠海马中 *spinophilin* 基因的表达情况，Morris 水迷宫实验测试 1 月龄雄性仔鼠的学习记忆能力。结果：在实验剂量范围内，孕鼠无明显中毒表现，DBP 高剂量组(225 mg/kg)雄性仔鼠肛殖距、尾长明显缩短($P < 0.01$)。在水迷宫实验中，DBP 低剂量组(25 mg/kg)仔鼠逃避潜伏期较对照组相对延长($P < 0.05$)，空间搜索试验中目标象限的停留时间也相对缩短($P < 0.01$)。低剂量组仔鼠海马 *spinophilin* 基因的表达较对照组上调 35.7% ($P < 0.05$)。结论：DBP 孕期和哺乳期暴露会降低子代雄性大鼠的学习记忆能力，促进 *spinophilin* 基因的表达，两者之间可能存在一定的联系。

【关键词】邻苯二甲酸二丁酯；学习记忆；水迷宫；*spinophilin* 基因；实时定量 RT-PCR

中图分类号：R741

文献标识码：A

文章编号：1004-616X(2008)05-0380-05

【ABSTRACT】 BACKGROUND AND AIM: To study the effects of dibutyl phthalate (DBP) exposure on learning and memory of the F1 generation rats, as well as the expression of spinophilin gene in the hippocampus. MATERIALS AND METHODS: Pregnant Wistar rats were randomly divided into 3 experimental groups and control group, each treated with 25、75、225 mg/kg DBP or vehicle only(corn oil) by gavage since gestation day 6 to postnatal day 28. The general effects of DBP on the pregnant rats and the offspring were observed. The expression level of spinophilin gene in hippocampus of the 21 day-old male pups was determined by Real Time RT-PCR, and the learning and memory abilities of the one month-old male pups was evaluated through Morris water maze. RESULTS: No overt sign of toxicity was found in the dams, but the male pups in the high dose group showed shortened AGD and tail length($P < 0.01$). In the water maze test, latency to find a hidden platform was longer in the low dose group than that of control($P < 0.05$). The pups in the former group also spent less time in the target quadrant in the probe test($P < 0.01$). Moreover, the expression of spinophilin gene was up-regulated 35.7% in this group as compared with control($P < 0.05$). CONCLUSION: In utero and lactational DBP exposure decreased learning and memory of the F1 generation rats, associated with up-regulated spinophilin expression in the hippocampus, suggesting a causal relationship.

【KEY WORDS】 dibutyl phthalate; learning and memory; water maze; *spinophilin* gene; real time quantitative RT-PCR

邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)是一种稳定的无色油状液体,被广泛用作塑料工业的增塑剂和

收稿日期：2008-04-09；修订日期：2008-06-02

基金项目：国家自然科学基金资助项目(30600485)

作者简介：李元锋(1977-)，男，四川眉山人，博士研究生，研究方向：神经毒理。

* Correspondence to: LI Tao, Tel: 027-83692720; E-mail: hovembertao@163.com

软化剂。由于未与塑料基质牢固结合,在某些条件下容易游离出来进入人体,对健康产生不同程度的危害,目前已被美国和欧盟列入优先控制的污染物名单。DBP 的急性毒性比较低,大鼠一次经口 LD_{50} 在 8~20 g/kg 体重。然而长期、低剂量的接触却表现出明显的生殖毒性和发育毒性,尤其是在妊娠期和哺乳期的暴露。目前认为,DBP 的生殖发育毒性的一个重要的机制是其内分泌干扰作用。由于神经、内分泌是密切联系又互相影响的两个系统,围生期内分泌系统受到干扰很可能对学习记忆能力的发育产生影响。

Spinophilin 是 Allen 等^[1]在 1997 年发现的一种突触蛋白,对树突棘的兴奋性突触传递和树突棘的形态有重要的调节作用。而树突棘与神经可塑性以及长期记忆的形成又有密切的联系。由于目前对 DBP 的神经毒性研究不多,尤其是对学习记忆的影响研究得更少。因此本课题在测试了妊娠期和哺乳期 DBP 暴露对大鼠学习记忆影响的基础上,进一步检测海马 spinophilin 的表达情况,从而从树突棘的角度初步探讨此影响的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

DBP 购自美国 Sigma 公司, RNA 抽提试剂 Trizol 为美国 Invitrogen 公司产品,逆转录试剂盒、荧光实时 PCR 试剂盒购于宝生物工程(大连)有限公司。其它试剂均为国产分析纯。紫外分光光度计(德国 Eppendorf 公司), 9700PCR 扩增仪(美国 ABI 公司), KDC-160 高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司), Morris 水迷宫分析系统 EthoVision 3 (荷兰 Noldus 公司)。

1.2 孕鼠的染毒与分组

健康成年 Wistar 大鼠, 清洁级。体重: 雌性 200~250 g, 雄性 250~300 g, 购于湖北省实验动物研究中心。合格证 SCXK(鄂)2003-0005。人工昼夜, 各 12 h, 室温(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 相对湿度 $50\% \pm 5\%$, 自由饮食饮水。所有大鼠适应性喂养一周后, 雌雄 1:1 合笼, 次日 8:00 左右发现阴栓, 且阴道涂片发现精子的雌鼠定为妊娠第 0 d, 交配成功的孕鼠随机分为 3 个不同 DBP 剂量的实验组和 1 个溶剂对照组, 共 4 组, 每组 10 只, 合笼饲养(每笼 3~4 只)直到待产。自妊娠第 6 d 起, 3 个实验组分别给予 DBP 25、75、225 mg/kg 体重(玉米油为溶剂), 对照组给予等体积玉米油灌胃, 直到产后 28 d。

1.3 染毒后的一般情况观察

染毒期间观察孕鼠的一般行为, 阴道有无流血及死亡等。产后 1 d 称量仔鼠的平均体重、尾长、肛殖距等, 观察仔鼠有无外观畸形, 根据母鼠营养状况调整窝仔数

为 8 ± 2 。每日观察仔鼠的生长、死亡情况, 21 d 龄时每窝随机抽取雄性仔鼠 1 只断头处死, 取海马置液氮保存备用, 取主要脏器观察并称量计算脏器系数。断乳后, 1 月龄时每窝随机抽取雄性仔鼠 1 只进行水迷宫试验。

1.4 Morris 水迷宫实验

1.4.1 水迷宫装置 装置主体由一个直径 120 cm、高 50 cm 的圆形水池组成, 池壁由东西南北 4 个等距点将水池等分为 SW、NW、SE 及 NE 4 个象限。在 SE 象限的正中距离池壁 30 cm 处放置一直径为 9.5 cm、高 25 cm 的黑色圆形平台, 平台低于水面 1.5 cm。迷宫所在房间布置固定图案作为大鼠定位平台的空间参照物, 实验期间保持周围环境恒定。大鼠的水迷宫轨迹由迷宫上方的摄像机记录并传入计算机, 最后由 EthoVision 3 软件分析。

1.4.2 定位航行试验 用于测量大鼠对水迷宫学习和记忆的能力。实验历时 5 d, 每天训练 3 次, 训练时按随机顺序从其余 3 个象限(SW、NW、NE)边缘中点位置面向池壁放入水中, 记录在 1 min 内找到平台的时间(逃避潜伏期)。若大于 1 min 未找到平台, 由实验者用手将其引导上平台停留 15 s 后移开, 潜伏期记为 60 s。本试验反映动物空间记忆的获得情况, 即空间学习记忆能力。

1.4.3 空间搜索试验 用于测量大鼠学会寻找平台后, 对平台空间位置的记忆能力。即在训练期结束后, 试验第 6 d 拆掉平台, 然后从任意选择的一个入水点(本试验选择 SW)入水, 由软件记录在 60 s 内大鼠在目标象限(NE)运动的时间和跨越原平台位置的次数。

1.5 海马 Spinophilin 表达检测

1.5.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 21 日龄仔鼠断头取脑, 冰上分离海马, 用预冷的焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的生理盐水冲洗, 液氮中速冻, 过夜后转入 -80°C 冰箱保存。临用时, 每组随机抽取 7 个样本, 取一半海马(约 80~100 mg), 参考 Trizol 试剂说明书提取总 RNA。用紫外分光光度计测定其纯度与浓度, 调整各管总 RNA 浓度一致。按照宝生物逆转录试剂盒要求进行逆转录, 用无菌双蒸水稀释 10 倍后分装, -20°C 保存。

1.5.2 引物合成 内参 β -actin 基因序列来自文献[2], 用 Primer5 跨内含子设计 spinophilin 序列, blast 确定序列特异性。 β -actin 上游引物为 5'-TGACAGGATGCA GAAGGAGA-3'; 下游引物为 5'-TAGAGCCACCAATCCAC ACA-3' 扩增片段长度为 104 bp。Spinophilin 上游引物为 5'-CCTGGAGCGAAAGTACAGCAAG-3'; 下游引物为 5'-GACAGGGGTAAGGATAATGGAG-3'; 扩增片段长度为



258 bp。两对引物均由上海英俊生物技术有限公司合成并纯化。

1.5.3 SYBR Green 实时定量 PCR 采用实时荧光定量 PCR 仪检测海马中 *spinophilin* 基因相对于管家基因 β -*actin* 的表达情况。采用 20 μ l 反应体系进行 2 步法 PCR,反应体系参见试剂盒说明书。反应条件:95 $^{\circ}$ C 10 s 预变性,95 $^{\circ}$ C 5 s 变性,64.7 $^{\circ}$ C 30 s 退火、延伸,共 40 个循环。PCR 反应完成后做熔解曲线检测扩增产物的特异性,其条件为:95 $^{\circ}$ C 15 s,64.7 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s。以无菌双蒸水代替模板作为阴性对照,每个样品做 3 个平行样取平均值为该样品的 C_t 值。最后 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳进一步确定特异性。

1.6 统计学方法

采用 SPSS12.0 统计软件,计数资料采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 LSD 两

两比较。定位航行试验中的逃避潜伏期采用重复测量的方差分析。检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 孕鼠及仔鼠染毒后的一般情况

所有孕鼠均未见流产、早产及死亡等情况,与对照组比较,3 个 DBP 剂量组对孕鼠体重增长无明显影响。中(75 mg/kg)、低(25 mg/kg)剂量组各有只孕鼠少许脱毛,但在哺乳期好转。各试验组仔鼠无明显外观畸形,活仔数、性别比例各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),高剂量组(225 mg/kg)雌性仔鼠体重减低,雄性仔鼠肛殖距和尾长明显变短,与对照组比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。产后 21d,各试验组雄性仔鼠体重、脏器系数和对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 DBP 处理后大鼠的生殖指标的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)
Table 1 Effects of DBP on reproductive parameters in rats ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Item	Control	DBP			
		25 mg/kg	75 mg/kg	225 mg/kg	
Body weight gain GD6-GD20 (g)	117.40 \pm 18.0	115.50 \pm 15.3	120.90 \pm 18.9	127.90 \pm 21.7	
Gestation days	21.95 \pm 0.37	22.15 \pm 0.34	22.00 \pm 0.33	21.90 \pm 0.31	
Live pups per liter	12.80 \pm 3.2	12.60 \pm 3.2	11.40 \pm 2.9	12.00 \pm 2.4	
Sex ratio (male/female)	73/55	65/61	59/55	64/56	
Live pup weight at birth (g)	Male	6.51 \pm 0.69	6.42 \pm 0.52	6.75 \pm 0.72	6.15 \pm 0.52
		Female	6.48 \pm 0.44	6.09 \pm 0.63	6.33 \pm 0.60
Anogenital distance (mm)	Male	3.80 \pm 0.15	3.67 \pm 0.13	3.72 \pm 0.20	3.59 \pm 0.22 ^{**}
	Female	1.38 \pm 0.12	1.39 \pm 0.13	1.36 \pm 0.16	1.35 \pm 0.07
Tail length (mm)	Male	17.96 \pm 1.19	17.86 \pm 1.09	17.28 \pm 0.73	16.79 \pm 0.41 ^{**}
	Female	17.98 \pm 1.12	17.63 \pm 1.22	17.85 \pm 0.93	17.02 \pm 0.45

Compared with control group: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, (pups parameters were calculated on litter means)

2.2 DBP 对仔鼠迷宫学习的影响

大鼠于孕期和哺乳期给予 DBP 染毒后,雄性仔鼠在定位航行试验中逃避潜伏期的改变见表 2。各组大鼠随训练时间增加,逃避潜伏期显著缩短 ($P < 0.01$),如图 1 所示,说明训练使大鼠获得了一定的空间学习和记忆能力。而在训练第 4 d、第 5 d 25 mg/kg 剂量组的潜伏期与对照组比较相对增加,差异具有统计学意义

($P < 0.05$)。在空间搜索试验中,各组大鼠在目标象限的停留时间都超过 25%,表明获得了一定的空间记忆,但低、中剂量组的停留时间明显低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。尽管试验组大鼠跨越原隐蔽平台的次数和对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但以上结果仍提示低剂量(可能还有中剂量)的 DBP 导致大鼠空间学习能力相对减弱。

表 2 DBP 染毒后雄性大鼠水迷宫结果的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)
Table 2 Effects of DBP on the results of water maze test of male rats ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Item	Control	DBP			
		25 mg/kg	75 mg/kg	225 mg/kg	
Hidden platform trial	Day1	44.46 \pm 11.36	46.50 \pm 10.65	44.61 \pm 6.72	48.34 \pm 11.11
	Day2	37.82 \pm 11.26	35.19 \pm 8.36	35.74 \pm 8.14	39.33 \pm 9.57
	Day3	29.51 \pm 7.82	29.46 \pm 9.57	28.35 \pm 8.61	26.41 \pm 8.71
	Day4	19.25 \pm 7.72	27.21 \pm 8.94 [*]	18.24 \pm 9.48	20.00 \pm 8.58
	Day5	12.86 \pm 5.12	18.67 \pm 6.04 [*]	12.10 \pm 4.61	13.46 \pm 5.84
Probe trial (%)	34.36 \pm 6.88	26.66 \pm 4.77 ^{**}	26.13 \pm 6.04 ^{**}	31.06 \pm 8.01	
Number of crossings	3.90 \pm 1.1	2.60 \pm 1.8	3.10 \pm 1.2	3.40 \pm 1.5	

Compared with control group: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

2.3 海马 spinophilin mRNA 表达的改变

结果见图 2。图中出现单一尖锐的熔解曲线峰说明扩增产物的特异性好, spinophilin 和 β -actin 的扩增效率分别为 95.6% 和 97.5%, 二者扩增效率均大于 95% 且

非常接近, 可以采用 $\Delta\Delta Ct$ 法^[3] 来进行相对定量, 其结果见表 3, $\Delta\Delta Ct = -0.44$, 表明 25 mg/kg 组海马 spinophilin mRNA 的表达为对照的 $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1.357$ 倍, 即表达增加 35.7%。

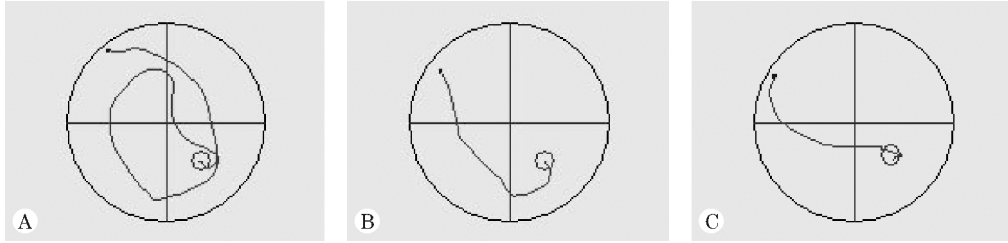


图 1 大鼠的水迷宫游泳轨迹图 A、B、C 分别显示大鼠的游泳轨迹逐渐缩短, 体现空间记忆的获得过程。

Figure 1 Swimming trails of the rats in the water maze. A, B, C: showed the swimming path getting shorter and indicated the acquisition of spatial memory.

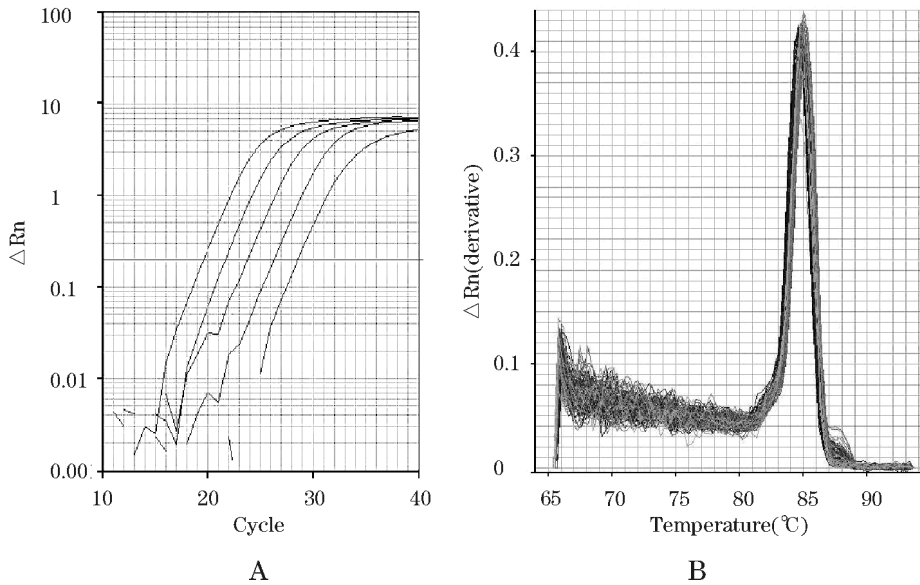


图 2 spinophilin 实时荧光定量分析结果(β -actin 与之类似 略) A 为 4 倍比稀释的模板扩增曲线, 用于计算扩增效率; B 为 spinophilin 的熔解曲线, 单一的尖锐峰表明产物具有很好的特异性

Figure 2 Real time Q RT-PCR results for the mRNA of spinophilin (result of β -actin not shown). A: The amplification curve of spinophilin for calculating the amplification efficiency; B: Melting curves of spinophilin, indicating the products were specific.

表 3 各组雄性仔鼠海马 spinophilin、 β -actin 基因扩增的循环次数(Ct 值)
Table 3 Ct value of spinophilin and β -actin genes in hippocampus of male rats ($n = 7, \bar{x} \pm s$)

Ct	Control	DBP		
		25 mg/kg	75 mg/kg	225 mg/kg
Spinophilin	19.54 ± 0.37	19.09 ± 0.21	19.56 ± 0.28	19.64 ± 0.38
β -actin	16.90 ± 0.18	16.89 ± 0.09	17.09 ± 0.31	17.14 ± 0.23
ΔCt	2.64 ± 0.24	2.20 ± 0.19*	2.47 ± 0.39	2.49 ± 0.37
$\Delta\Delta Ct$	-	-0.44*	-0.17	-0.15

Note: $\Delta Ct = Ct(\text{spinophilin}) - Ct(\beta\text{-actin})$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{treated}) - \Delta Ct(\text{control})$. Compared with control: * $P < 0.05$

3 讨论

DBP 作为一种环境中广泛存在内分泌干扰物, 尽管毒性作用的主要靶器官是雄性生殖系统, 其对神经系

统的影响同样值得重视。流行病学资料表明邻苯二甲酸类的化合物对神经系统有一定的损害作用^[4]。动物实验也表明, DBP 影响大鼠的行为功能, 并且与性别有关^[5]。对内分泌干扰物而言, 行为的观察终点常常比形态的观察终点更为敏感^[6], 低水平暴露时就可能影响到学习记忆的能力^[7]。因此, 本课题着重于研究 DBP 妊娠期和哺乳期暴露对雄性大鼠学习记忆能力的影响来探讨 DBP 的神经毒性。研究中发现, 225 mg/kg 组暴露对雄性仔鼠产生明显的生殖毒性, 表现为肛殖距、尾长变短等, 与既往的研究结果类似^[8]; 而在低于目前报道的无明显副作用剂量水平 (50 mg/kg) 的相对低水平 (25 mg/kg) DBP 暴露时, 雄性大鼠的学习记忆能力明显



降低。提示 DBP 对大鼠具有一定的神经毒性,并且其危害可能发生在更低的暴露水平下。

树突棘是树突分枝上的棘状突起,是神经元间形成突触的主要部位。树突棘的数量和形态被认为与长期记忆的形成有着密切的联系。Spinophilin 是位于树突棘的重要蛋白之一,在树突棘,spinophilin 将蛋白磷酸酶-1(protein phosphatase, PP-1) 引导至其特异的底物,控制其磷酸化状态。Spinophilin 和 PP-1 形成的复合体在调控 AMPA 和 NMDA 受体活性、钙信号、海马的 LTP 和 LTD 过程、以及树突棘的形态中起重要的作用。Spinophilin 参与的这些细胞水平的生物学活动都与学习记忆过程有着密切的联系。研究表明,小鼠 spinophilin 基因敲除后 LTD 降低而 LTP 无影响,发育期间树突棘的密度显著增加,还能抵抗海人酸诱导的神经元的凋亡^[9]。因而认为 spinophilin 与突触的可塑性、神经细胞的凋亡等脑发育过程中的重要事件密切相关。在我们的实验中,雄性大鼠在水迷宫实验前 spinophilin 基因就表达上调,很可能提示海马细胞的 LTD 和 LTP 之间的平衡、突触的可塑性受到 DBP 的直接或间接的影响,从而导致后期学习记忆能力的下降。也有研究表明,spinophilin 的表达受到雌激素的调节,去势的雄性大鼠经雌激素处理后海马中 spinophilin 的含量降低^[10]。既然雌激素已被证明可以促进大鼠的空间记忆能力,DBP 也可以干扰体内雌激素水平,那么 DBP、雌激素、树突的形态和功能以及学习记忆能力之间是否存在某种必然联系,有待进一步研究。

本研究结果的一个明显的特点就是相对低剂量(25 mg/kg)的 DBP 暴露影响大鼠的学习记忆能力和 spinophilin 的表达,而在相对较高的剂量(225 mg/kg)时影响却不明显,无明显的剂量-反应关系。类似的研究也发现邻苯二甲酸二-(2-乙基己基)酯在相对的低剂量时影响小鼠的神经行为和大鼠脑芳香化酶的活性,而在相对高的剂量时却没有明显影响^[11-12]。说明这种现象并非来自偶然,提示 DBP 对机体的影响可能有多种作用方式,在不同剂量时机理不同。此外,大鼠和人在 DBP 的代谢上有很多不一致的地方,因此 DBP 对大鼠学习记忆的影响尚不能直接外推到人,但这种低剂量长期暴露产生的危害比较隐匿,提示今后在评估 DBP 暴露(尤其是和多种邻苯二甲酸类化合物联合暴露)对人体健康的影响时应引起充分重视。

参考文献:

- [1] Grossman SD, Futter M, Snyder GL, et al. Spinophilin is phosphorylated by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II resulting in regulation of its binding to F-actin [J]. J Neurochem, 2004, 90(2): 317-324.
- [2] Tian YF, Zhang PB, Xiao XL, et al. The quantification of ADAMTS expression in an animal model of cerebral ischemia using real-time PCR[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2007, 51(2): 158-164.
- [3] 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.
- [4] Gilioli R, Bulheroni C, Terrana T, et al. A transversal and longitudinal neurological study of a working population engaged in the production of phthalates [J]. Med Lav, 1978, 69(5): 620-631.
- [5] Lee HC, Yamanouchi K, Nishihara M. Effects of perinatal exposure to phthalate/adipate esters on hypothalamic gene expression and sexual behavior in rats [J]. J Reprod Dev, 2006, 52(3): 343-352.
- [6] Dessi-Fulgheri F, Porrini S, Farabollini F. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on play behavior of female and male juvenile rats [J]. Environ Health Perspect, 2002, 110 (Suppl 3): 403-407.
- [7] Hsu ST, Ma CI, Hsu SK, et al. Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: a four-year followup [J]. Environ Health Perspect, 1985, 59(2): 5-10.
- [8] Zhang Y, Jiang X, Chen B. Reproductive and developmental toxicity in F1 Sprague-Dawley male rats exposed to dibutyl phthalate in utero and during lactation and determination of its NOAEL[J]. Reprod Toxicol, 2004, 18(5): 669-676.
- [9] Feng J, Yan Z, Ferreira A, et al. Spinophilin regulates the formation and function of dendritic spines [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(16): 9287-9292.
- [10] Lee SJ, Romeo RD, Svenningsson P, et al. Estradiol affects spinophilin protein differently in gonadectomized males and females [J]. Neuroscience, 2004, 127(4): 983-988.
- [11] Tanaka, T. Reproductive and neurobehavioural toxicity study of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) administered to mice in the diet [J]. Food Chem Toxicol, 2002, 40(10): 1499-1506.
- [12] Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE et al. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity [J]. Toxicology, 2006, 227(3): 185-192.