

# 下丘脑 Polycomb 蛋白关键基因甲基化在孕期双酚 A 暴露致子代雌鼠青春期发育提前中的作用

苏普玉 徐耿 韩阿珠 许诺 张国宝 陶芳标

安徽医科大学公共卫生学院儿少卫生与妇幼保健学系/人口健康与优生安徽省重点实验室,合肥 230032

通信作者:苏普玉,Email:supuyu@ahmu.edu.cn,电话:0551-65161169

**【摘要】** 目的 探讨下丘脑 Polycomb 蛋白组(PcG)关键基因 *Eed* 和 *Ezh* 甲基化在孕期双酚 A (BPA)暴露致子代雌鼠青春期发育提前中的作用。方法 采用随机数字表法将 40 只受孕 CD-1 小鼠平均分为对照组(玉米油)和低、中、高剂量暴露组(BPA 染毒剂量分别为 8、40、200 mg/kg),于受孕 1~18 d 每天进行 BPA 灌胃染毒。子代雌鼠出生后 21~33 d 观察阴道开口情况;出生后 34 d 处死,收集下丘脑组织,检测下丘脑 *Eed* 和 *Ezh* 基因的甲基化水平。采用阴道开口提前率、阴道开口时间、第一次动情时间和阴道开口提前天数评价仔鼠青春期发育提前情况。以阴道开口提前天数为因变量,BPA 暴露为自变量,通过路径模型分析 *Eed* 和 *Ezh* 基因甲基化在 BPA 暴露致子代雌鼠青春期提前中的作用。结果 孕期低、中、高剂量 BPA 暴露组子代雌鼠出生 28 d 的阴道开口率[分别为 40.00%(29/72)、47.62%(25/53)、37.84%(20/53)]均高于对照组[14.06%(9/64)];孕期低、中、高剂量 BPA 暴露组子代雌鼠阴道开口时间  $P_{50}(P_{25}, P_{75})$  分别为 28(26, 30)、28(26, 29)和 28(26, 30)d,第一次动情时间分别为 31(27, 32)、30(27, 31)和 31(28, 33)d,均早于对照组的阴道开口时间[30(28, 31)d]和第一次动情时间[32(30, 33)d]( $P$ 值均 $<0.05$ );孕期低、中、高剂量 BPA 暴露组子代雌鼠 *Eed1*(1.61%~1.82%)、*Eed2*(1.36%~1.43%)和 *Ezh2*(2.87%~3.05%)甲基化水平均高于对照组(分别为 1.47%、1.26%、2.56%)( $P$ 值均 $<0.05$ )。路径模型分析结果显示,BPA 暴露对子代雌鼠青春期发育提前无直接作用,经 *Eed2* 和 *Ezh2* 甲基化的间接作用路径系数分别为 0.045 和 0.142。结论 孕期母体 BPA 暴露会通过下丘脑 PcG 蛋白关键基因 *Eed* 和 *Ezh* 甲基化导致子代雌鼠青春期发育提前。

**【关键词】** 小鼠; 甲基化; 青春期发育提前; 双酚 A

**基金项目:**国家自然科学基金(81573163,81874268);安徽医科大学第四批“青年拔尖人才支持计划”(2015)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2019.03.013

## The role of hypothalamus polycomb gene methylation in bisphenol A exposure during pregnancy and premature puberty in female offspring

Su Puyu, Xu Geng, Han Azhu, Xu Nuo, Zhang Guobao, Tao Fangbiao

Department of Maternal, Child and Adolescent Health, School of Public Health, Anhui Medical University/  
Anhui Provincial Key Laboratory of Population Health and Aristogenics, Hefei 230032, China

Corresponding author: Su Puyu, Email: supuyu@ahmu.edu.cn, Tel: 0086-551-65161169

**【Abstract】 Objective** To explore the role of hypothalamus Polycomb Group (PcG) gene (*Eed*, *Ezh*) methylation in the relationship between bisphenol A (BPA) exposure during pregnancy and premature puberty in female offspring. **Methods** A total of 40 pregnant CD-1 mice were randomly and averagely assigned into four groups: control group (corn oil) and low, middle and high BPA-exposed groups (the poisonous doses were 8 mg/kg, 40 mg/kg, and 200 mg/kg, respectively) by random number table method. Each group was administered by gavage from gestational day (GD) 1 to 18. The vaginal opening of female offspring was observed from postnatal day (PND) 21 to 33. All female offsprings were sacrificed, and hypothalamus was remained on the PND 34. The methylation levels of *Eed* and *Ezh* in the hypothalamus

were measured. The early puberty of CD-1 mice was evaluated by the rate of vaginal opening in advance, initial time of vaginal opening, the first estrus occurrence and vaginal opening days in advance. The path model was used to explore the role of *Eed* and *Ezh* gene methylation in the early puberty of female offspring with maternal BPA exposed including the number of days of vaginal opening in advance as a dependent variable and BPA exposure as an independent variable. **Results** The rate of vaginal opening on the 28 day in each maternal BPA-exposure group [low, middle and high BPA-exposed groups were 40.00% (29/72), 47.62% (25/53) and 37.84% (20/53), respectively] was higher than that rate in the control group [14.06%(9/64)]. Similarly, the  $P_{50}(P_{25}, P_{75})$  values of initial time of vaginal opening in low, middle and high BPA-exposed group were 28 (26, 30), 28 (26, 29), 28 (26, 30) days, respectively and the  $P_{50}(P_{25}, P_{75})$  values of the first estrus occurrence in low, middle and high BPA-exposed group were 31 (27, 32), 30 (27, 31), 31 (28, 33) days, respectively, which were earlier than those in the control group [initial time of vaginal opening was 30(28, 31) days, and the first estrus occurrence was 32(30, 33) days] (all  $P$  values<0.05). Compared with the control group (the methylation levels of *Eed1*, *Eed2*, *Ezh2* were 1.47%, 1.26%, 2.56%, respectively), the methylation levels of *Eed1* (1.61%–1.82%), *Eed2* (1.36%–1.43%) and *Ezh2* (2.87%–3.05%) in female offspring were significantly higher in BPA-exposed groups (all  $P$  values<0.05). The results of path model analysis showed that BPA had no direct influence on puberty in advance, but had an indirect effect on puberty in advance (indirect effect path coefficient was 0.045 and 0.142, respectively) by mediating methylation of *Eed2*, and *Ezh2*. **Conclusion** Early puberty in female offspring induced by maternal exposure to BPA during pregnancy through the increased methylation levels of hypothalamus PcG gene (*Eed*, *Ezh*) in female offspring.

**【Key words】** Mice; Methylation; Premature puberty; Bisphenol A

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (General Program: 81573163, 81874268); Youth Top Talent Support Program (IV) of Anhui Medical University (2015)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2019.03.013

双酚 A (bisphenol A, BPA) 是一种广泛存在于人们生产和生活环境中的内分泌干扰物。有研究发现,在美国超过 90% 的人群尿样中能够检测到 BPA<sup>[1]</sup>。当前研究普遍认为 BPA 可以进入机体并与雌激素受体结合,模仿雌激素的作用,干扰正常雌激素的各种生理生化过程<sup>[2]</sup>。近年来,孕期 BPA 暴露对子代健康的影响越来越引起人们的关注<sup>[3]</sup>,研究发现胎儿比成人更容易受到 BPA 的影响<sup>[4]</sup>,母体孕期 BPA 暴露会对胎婴儿健康造成影响,特别是对雌性生殖系统造成破坏<sup>[5-6]</sup>。Prusinski 等<sup>[7]</sup>认为 BPA 暴露可能通过改变青春期启动相关基因的表现基因组来影响青春期发育,而且动物实验也证实了 BPA 暴露可导致 DNA 甲基化状态的改变<sup>[8]</sup>。大鼠动物研究表明下丘脑 Polycomb 蛋白组 (Polycomb Group, PcG) 是青春期启动的主要调控蛋白, PcG 蛋白主要组成部分为 *Eed* 和 *Ezh* 基因编码,而且研究表明 PcG 蛋白能够抑制 Kisspeptin-10 的功能以及翻译过程,从而影响青春期发育<sup>[9]</sup>。因此,本研究建立了孕期不同 BPA 暴露剂量的动物模型,探讨孕期 BPA 暴露对子代雌鼠青春发育的影响,以及子代雌鼠下丘脑 PcG 蛋白关键基因 (*Eed* 和 *Ezh*) 甲基化在孕期 BPA 暴露致子代雌鼠青春发育提前中的作用。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 试剂: BPA (分析纯 99%) 购于美国 Sigma 公司; Trizol、逆转录酶购于美国 Invitrogen 公司; RNA 抑制酶购于美国 Santa Cruz; 凝胶提取试剂盒购自中国北京天根生化科技公司; Miseq 试剂盒购自美国加尼福尼亚州 Illumina 公司; EZ DNA Methylation-Gold 试剂盒购自美国加尼福尼亚州 ZYMO 公司; 10×Reaction buffer 购自日本 TaKaRa 公司; 10×TES、SDS、蛋白酶 K 等生物缓冲液及化学试剂均购自美国 Sigma 公司。

2. 仪器: LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche 公司; 凝胶成像系统购自美国 Invitrogen 公司; Tecan infinite 200 酶标仪购自瑞士 Tecan 公司; Localized Performance 超低温冰箱购自中国赛默飞世尔公司; 9700-PCR 反应扩增仪购自美国 ABI 公司; Millipore-Q A10 超纯水仪购自美国 Millipore 公司; 可见紫外分光光度计购自日本岛津公司; PyroMark Q24 焦磷酸测序仪购自美国 Qiagen 公司; 电子天平购自德国 Sartorius 公司; Eppendorf 5418 低温高速离心机购自德国 Eppendorf 公司; Galaxy 170R 恒温孵箱购自中国赛默飞世尔公司。

## 二、方法

1. 实验动物模型的建立: 根据既往研究结果<sup>[10-11]</sup>, 将 BPA 暴露分为 4 组: 低、中、高剂量组的 BPA 染毒剂量分别为 8、40、200 mg/kg; 以玉米油为对照组。选取健康清洁级 CD-1 小鼠(8 周龄, 雌鼠 28~30 g, 雄鼠 32~34 g), 购于北京维通利华实验动物技术有限公司(合格证编号: NO.201716639)。在 12 h 光照/黑暗循环、恒温(20~25 ℃)和恒湿(50%±5%)的环境下适用性饲养 2 周, 自由获得食物和水。适应性喂养后, 晚上 21:00 将雌鼠和雄鼠按照 2:1 进行合笼交配, 第二天早上 8:00 检查雌鼠阴道口阴栓情况, 检查到阴栓的雌鼠单独饲养, 将初次观察到阴栓日期定为受孕 0 天(Gestational day 0, GD 0)。采用随机数字表法将 40 只怀孕小鼠随机分为 4 组(1 个对照组和 3 个实验组), 通过灌胃方法对实验组中 GD 1~18 的小鼠分别给予 8、40、200 mg/kg 的 BPA(溶于玉米油), 给药剂量基于 1 ml/100 g 的小鼠体重, 每天根据体重进行剂量调整, 保证恒定的剂量水平, 对照组小鼠给予等量玉米油。仔鼠出生天数(postnatal day, PND)通过肛门与生殖器之间距离判断性别。于 PND 21~33 检查子代雌鼠阴道开口, 记录开口时间。正常 CD-1 小鼠 35~50 日龄是青春期起始阶段<sup>[12]</sup>, 因此在 PND 33 晚上将子代雌鼠禁食, 于 PND 34 清晨即青春期发育成熟之前处死留取标本。所有子代雌鼠经眼球穿刺动脉取血后使用颈椎脱臼法处死, 血液样品在 4 ℃ 环境内静置 2 h 后, 2 200×g 离心 15 min, 吸取上清液至 1.5 ml 离心管, 保存于 -80 ℃ 冰箱。将子代雌鼠置于无菌冰桌上, 分离出大脑, 将大脑腹侧面向上, 按照小鼠大脑解剖图谱所示, 剥离大脑及周围组织, 用无菌镊子取出下丘脑, 放入 1.5 ml 无酶离心管中, 置于液氮罐中速冻后, 存于 -80 ℃ 超低温冰箱待测。本研究由安徽医科大学实验动物科学中心和实验动物科学研究中心批准(批号: LLSC20150012)。研究中无虐待动物行为, 保证动物的基本伦理福利, 将动物伤害降至最小。

2. 青春期发育提前的评价: 正常 CD-1 小鼠会在 PND 28 之后阴道打开, 表明体成熟完成, 因此本研究将 PND 28 以前阴道开口定义为阴道开口提前, 阴道开口提前率=阴道开口提前的雌鼠数/雌鼠总数×100%, 阴道开口提前天数=28-阴道开口时间。采用阴道开口提前率、阴道开口时间、第一次动情时间和阴道开口提前天数评价仔鼠青春期发育提前情况。

3. *Ezh* 和 *Eed* 启动子区甲基化水平测定: (1) 下丘脑基因组 DNA 提取: 取出下丘脑组织, 充分研磨成粉末, 加入 0.45 ml TES 溶液, 再加入 50 μl 质量分数 10% 的 SDS 和 5.0 μl 浓度为 20 mg/ml 的蛋白酶 K 溶液。700×g 离心 10 min, 取上层水相到新的 1.5 ml 离心管中, 加入等体积苯酚、氯仿和异戊醇。7 000×g 离心 10 min, 取上层液。再重复一个循环后。加入 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA, 8 500×g 离心 10 min, 弃去乙醇。使用 75% 乙醇洗涤, 7 000×g 离心 5 min, 弃去乙醇, 55 ℃ 干燥 DNA。将提取的 DNA 置于 -20 ℃ 冰箱内保存备用。(2) 亚硫酸氢盐转化: 取 5 μl DNA 配置 PCR 溶液, 置入 PCR 仪器, 依照以下程序设置: 95 ℃ 变性 5 min, 60 ℃ 退火 25 min, 95 ℃ 变性 5 min, 60 ℃ 退火 85 min, 95 ℃ 变性 5 min, 60 ℃ 退火 175 min, 20 ℃ 延伸 20 min。热循环结束后, 依次加入 Buffer BL、BW、BD、BW、EB 清洗。(3) 焦磷酸测序 PCR: 用特异性引物扩增目的区段, 扩增后准备焦磷酸测序。引物设计与合成根据 NCBI 基因文库中小鼠下丘脑 PcG 蛋白关键基因 *Ezh* 和 *Eed* 基因 DNA 序列和基因号。分析上述基因启动子区域的 CpG 岛, 针对上述基因 CpG 岛设计了 PCR 引物。按操作说明书进行单链的分离纯化和焦磷酸测序反应。测定目标位点中 C/胸腺嘧啶(T)的比率, 以此判断目标位点的甲基化程度。

4. *Ezh* 和 *Eed* mRNA 表达水平检测: (1) 下丘脑组织总 RNA 提取: 取出 30 mg 下丘脑组织加入 1 ml Trizol 充分研磨。加入 0.2 ml 氯仿, 4 ℃, 8 500×g 离心 10 min, 取上清。加入等体积的异丙醇。4 ℃, 8 500×g 离心 10 min。弃上清。加入 1 ml 75% 乙醇, 4 ℃, 5 000×g 离心 3 min, 吸上清。晾干, 加入 30~50 ml 不含 RNA 酶的双蒸水, 取 1 ml RNA 在 UV 分光光度计上检测核酸浓度。(2) 逆转录合成 cDNA: 取出 RNA 溶液, 在室温下解冻, 2 200×g 离心 10 s, 依照试剂盒说明书在 PCR 管中合成 20 μl 逆转录反应体系, 将体系混匀后, 42 ℃ 反应 60 min, 95 ℃ 反应 5 min, 合成完成后将 cDNA 存放于 -80 ℃ 保存。(3) 实时荧光定量 PCR 反应: 按照说明在冰上配制 PCR 的总反应体系 20 μl, 加入 PCR 扩增的 DNA 模板, 使用实时荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增反应。扩增反应完成后, 分析融解曲线。以 β-肌动蛋白作为管家基因, 校正每个样品的 Ct 值, 并比较不同样品中每种基因 mRNA 表达差异。

## 三、统计学分析

采用 EpiData3.1 建立数据库, 采用 SPSS 23.0 软



件和 AMOS 22.0 软件进行统计分析。子代小鼠数量符合正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示;阴道开口时间、第一次动情时间均呈正偏态分布,故以  $P_{50}(P_{25}, P_{75})$  表示。采用单因素方差分析比较不同 BPA 暴露组的子代小鼠数量差异;采用  $\chi^2$  检验比较各组间雌鼠阴道开口提前率,采用生存分析比较各组间阴道开口时间、第一次动情时间;采用单因素方差分析比较孕期母体不同剂量 BPA 暴露组子代雌鼠下丘脑 PcG 关键基因 *Eed* 和 *Ezh* 启动子区 DNA 甲基化程度和 mRNA 的表达水平的差异,各暴露组与对照组的两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。以阴道开口提前天数为因变量,暴露为自变量,通过路径模型分析 *Eed* 和 *Ezh* 基因甲基化在 BPA 暴露致子代雌鼠青春期提前中的作用。

## 结 果

1. 不同 BPA 暴露组的子代小鼠数量:对照组、8、40 和 200 mg/kg 剂量组子代小鼠、雌鼠数量分别为  $(11.8 \pm 0.9)$  和  $(6.4 \pm 0.8)$  只、 $(13.6 \pm 1.3)$  和  $(8.1 \pm 0.8)$  只、 $(12.4 \pm 1.2)$  和  $(5.3 \pm 0.8)$  只、 $(12.8 \pm 0.7)$  和  $(5.3 \pm 0.6)$  只,差异均无统计学意义( $F$  值分别为 0.521、2.756,  $P$  值均  $>0.05$ )。

2. BPA 暴露对子代雌鼠青春期发育提前的影响:各 BPA 暴露组的阴道开口提前率和开口时间的差异均有统计学意义( $P$  值均  $<0.001$ )。两两比较发现,低、中和高剂量组的阴道开口提前率和开口时间分别高于和早于对照组( $P$  值均  $<0.001$ )。详见表 1。

3. 不同剂量 BPA 暴露组 CD-1 子代雌性小鼠 *Eed* 与 *Ezh* 基因的 mRNA 表达和甲基化水平的比较:(1)mRNA 表达:孕期不同 BPA 暴露组的子代雌鼠 *Eed1*、*Eed2* 和 *Ezh2* mRNA 表达水平差异均有统计学意义( $P$  值均  $<0.001$ )。两两比较发现,低、中、

表 1 孕期不同剂量 BPA 暴露组 CD-1 子代小鼠的青春期提前特征比较

组别	只数	阴道开口提前率 [只(%)]	阴道开口时间 [d, $P_{50}(P_{25}, P_{75})$ ]	第一次动情时间 [d, $P_{50}(P_{25}, P_{75})$ ]
对照组	64	9(14.06)	30 (28, 31)	32(30, 33)
低剂量组	72	29(40.28) <sup>b</sup>	28(26, 30) <sup>b</sup>	31(27, 32) <sup>a</sup>
中剂量组	53	25(47.17) <sup>b</sup>	28 (26, 29) <sup>b</sup>	30(27, 31) <sup>b</sup>
高剂量组	53	20(37.74) <sup>b</sup>	28(26, 30) <sup>b</sup>	30(28, 33) <sup>b</sup>
统计值		16.23	16.83	23.94
$P$ 值		$<0.001$	$<0.001$	$<0.001$

注:对照组为玉米油,低、中、高剂量组的 BPA 染毒剂量分别为 8、40、200 mg/kg;各组阴道开口提前率采用  $\chi^2$  检验比较,阴道开口时间和第一次动情时间采用生存分析比较;<sup>a</sup>与对照组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>与对照组比较,  $P < 0.001$

高剂量组 *Eed1* 和 *Eed2* mRNA 表达水平均低于对照组,中剂量组 *Ezh2* mRNA 表达水平低于对照组,而高剂量组 *Ezh2* mRNA 表达水平高于对照组,差异均有统计学意义( $P$  值均  $<0.05$ )。(2)甲基化表达:孕期不同剂量 BPA 暴露组子代雌鼠 *Eed1*、*Eed2* 和 *Ezh2* 甲基化水平差异均有统计意义( $P$  值均  $<0.001$ ),而不同剂量组子代雌鼠 *Ezh1* 甲基化水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。两两比较发现,低、中、高剂量组 *Eed1*、*Eed2* 和 *Ezh2* 甲基化水平均高于对照组,差异均有统计意义( $P$  值均  $<0.05$ )。详见表 2。

4. *Eed* 和 *Ezh* 基因甲基化在 BPA 暴露致子代雌鼠青春期发育提前中的作用:子代雌鼠青春发育提前影响因素的路径图见图 1。BPA 暴露对子代雌鼠青春期提前的直接作用无统计学意义( $P > 0.05$ ),经 *Eed2* 和 *Ezh2* 甲基化的间接作用路径系数分别为 0.045 和 0.142( $P$  值均  $<0.05$ ),即 BPA 暴露通过 *Eed2* 和 *Ezh2* 甲基化导致子代雌鼠青春期发育提前。详见表 3。

## 讨 论

有研究表明,小鼠在青春期前的内分泌干扰物

表 2 孕期不同剂量 BPA 暴露组 CD-1 子代雌性小鼠 *Eed* 与 *Ezh* 基因的 mRNA 表达和甲基化水平的比较

组别	只数	mRNA ( $\bar{x} \pm s$ )				甲基化(%)			
		<i>Eed1</i>	<i>Eed2</i>	<i>Ezh1</i>	<i>Ezh2</i>	<i>Eed1</i>	<i>Eed2</i>	<i>Ezh1</i>	<i>Ezh2</i>
对照组	64	1.08±0.28	1.30±0.20	1.50±0.27	1.64±0.22	1.47±0.08	1.26±0.08	2.09±0.24	2.56±0.24
低剂量组	72	0.48±0.18 <sup>b</sup>	0.61±0.23 <sup>b</sup>	1.49±0.33	1.33±0.17 <sup>b</sup>	1.81±0.51 <sup>b</sup>	1.42±0.25 <sup>b</sup>	1.97±0.68	3.01±0.76 <sup>b</sup>
中剂量组	53	0.57±0.20 <sup>b</sup>	0.68±0.14 <sup>b</sup>	1.51±0.32	1.31±0.43 <sup>b</sup>	1.82±0.51 <sup>b</sup>	1.43±0.29 <sup>b</sup>	1.20±0.66	3.05±0.73 <sup>b</sup>
高剂量组	53	0.68±0.22 <sup>b</sup>	0.65±0.25 <sup>b</sup>	1.48±0.18	1.92±0.40 <sup>b</sup>	1.61±0.07 <sup>a</sup>	1.36±0.66 <sup>a</sup>	1.95±0.80	2.87±0.79 <sup>a</sup>
$F$ 值		50.86	29.52	0.01	36.09	11.85	6.67	0.06	5.88
$P$ 值		$<0.001$	$<0.001$	0.999	$<0.001$	$<0.001$	$<0.001$	0.979	$<0.001$

注:<sup>a</sup>与对照组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>与对照组比较,  $P < 0.001$

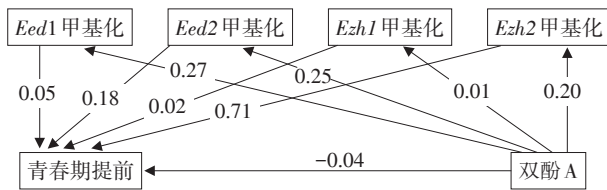


图1 孕期双酚 A 暴露致子代雌鼠青春发育提前的路径图

表3 孕期BPA暴露致子代雌鼠青春发育提前的作用分解图(路径系数)

影响因素	直接作用	总体作用
BPA 暴露 <sup>a</sup>	-0.04 <sup>b</sup>	0.147
<i>Eed1</i> 甲基化	0.05 <sup>c</sup>	0.05
<i>Eed2</i> 甲基化	0.18 <sup>c</sup>	0.18
<i>Ezh1</i> 甲基化	-0.02 <sup>b</sup>	-0.02
<i>Ezh2</i> 甲基化	0.71 <sup>c</sup>	0.71

注:<sup>a</sup> BPA 暴露经 *Eed2* 和 *Ezh2* 基因甲基化的间接作用分别为 0.045<sup>c</sup> 和 0.142<sup>c</sup>; <sup>b</sup>  $P > 0.05$ ; <sup>c</sup>  $P < 0.05$

暴露会影响激素水平和性成熟的时间<sup>[13]</sup>。Chung 等<sup>[14]</sup>给予 PND 8 雌性小鼠皮下注射 BPA,发现暴露组阴道开口时间较早,这可能是由于幼鼠的大脑尚处于性别分化阶段,而生殖系统的发育对外源性物质较为敏感,提示青春期前 BPA 暴露可能促进青春期发育。母体孕期 BPA 暴露通过胎盘屏障影响胚胎发育<sup>[15-16]</sup>。本次研究结果显示,母体孕期 BPA 暴露可导致子代雌鼠阴道开口时间与第一次动情时间的提前,并且增加阴道开口提前率,表明孕期母体 BPA 暴露会使子代雌鼠青春期发育提前。Inagaki 等<sup>[17]</sup>研究发现长期暴露于低剂量 BPA 直到成年期可能破坏正常的大脑功能和行为,其后代即使没有 BPA 暴露也会发生神经发育和行为的缺陷,这表明 BPA 暴露会导致下一代相关功能受损。然而,母体孕期 BPA 暴露影响子代雌性青春期提前机制仍不清楚,一些研究认为孕期 BPA 暴露可能通过改变子代表观基因组从而影响青春期发育<sup>[7]</sup>。

本研究发现,母体孕期 BPA 暴露的子代雌鼠下丘脑 *Eed1* 与 *Eed2* 的 CpG 岛甲基化水平均高于对照组, *Ezh2* 的 CpG 岛甲基化水平也高于对照组,表明母体孕期 BPA 暴露影响了子代雌鼠下丘脑 *Eed* 和 *Ezh2* 启动子区的甲基化水平。已有研究证明基因启动子区 DNA 甲基化状态在基因表达调控中起重要作用,基因启动子区的高甲基化可以有效地沉默相关基因的转录功能<sup>[18-21]</sup>。PcG 蛋白是一类进化上极为保守的转录抑制因子,主要通过染色质修饰调控靶基因的转录抑制子。PcG 蛋白关键基因(*Eed*、*Ezh*)通过表观遗传机制(DNA 甲基化)导致靶基因

沉默是控制和调节青春期启动神经内分泌功能的重要机制,这在其他哺乳动物实验中也得到了验证<sup>[22-23]</sup>。本研究进一步检测了孕期母体 BPA 暴露对子代雌鼠下丘脑 *Eed* 和 *Ezh* 基因的 mRNA 表达水平的影响(对于 *Eed* 与 *Ezh* 两个基因,均发现了两个 CpG 岛),结果显示,与对照组相比,孕期母体 BPA 暴露组子代雌鼠 *Eed1*、*Eed2* mRNA 的表达水平下降,而对 *Ezh1* mRNA 的表达水平没有影响。值得注意的是,孕期母体低和中剂量 BPA 暴露组子代雌鼠 *Eed2* mRNA 表达低于对照组,而孕期母体高 BPA 暴露组子代雌鼠 *Eed2* mRNA 表达水平却高于对照组,差异均有统计学意义( $P$  值均  $< 0.05$ )。此结果提示 mRNA 水平可能与母体 BPA 暴露剂量呈 U 型曲线关系,仍需要进一步研究证明。

路径模型分析结果显示,BPA 暴露对子代雌鼠青春期提前的直接作用无统计学意义,经 *Eed2* 和 *Ezh2* 甲基化的间接作用路径系数分别为 0.045 和 0.142( $P$  值均  $< 0.05$ ),即 BPA 暴露对子代雌鼠青春期发育不产生直接影响,而是通过 *Eed2* 和 *Ezh2* 甲基化导致子代雌鼠青春期发育提前。

综上所述,母体孕期 BPA 暴露可致子代雌鼠青春期发育提前,BPA 暴露通过下丘脑 PcG 蛋白关键基因(*Eed*、*Ezh*)启动子区甲基化对子代雌鼠青春期发育提前产生影响。不过,本研究并没有涉及青春期启动基因相关的代谢酶和蛋白质,所以母体孕期 BPA 暴露影响青春期与 *Eed*、*Ezh* 基因调控的机制还没有完全解释清楚。在未来的研究中,尚需深入研究孕期母体 BPA 暴露对 *Eed*、*Ezh* 基因相关蛋白酶表达的影响,探讨孕期母体 BPA 暴露导致子代雌性青春启动具体机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- Calafat AM, Kuklennyk Z, Reidy JA, et al. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population[J]. Environ Health Perspect, 2005,113(4): 391-395. DOI: 10.1289/ehp.7534.
- 徐耿,苏普玉. 童年期双酚 A 暴露对女童青春期发育提前的影响[J]. 中国儿童保健杂志, 2016, 24(7): 719-722. DOI: 10.11852/zgetbjzz2016-24-07-13.
- 张秋凤,鲍慧惠,吴皖珂,等. 孕早期双酚 A 暴露与学龄前儿童睡眠问题的关联研究[J]. 中华预防医学杂志, 2018, 52(10): 1018-1022. DOI: 10.3760 / cma. j. issn. 0253-9624. 2018.10.010.
- Nishikawa M, Iwano H, Yanagisawa R, et al. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus[J]. Environ Health Perspect, 2010,

- 118(9): 1196-1203. DOI: 10.1289/ehp.0901575.
- [5] Peretz J, Vrooman L, Ricke WA, et al. Bisphenol a and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007-2013[J]. Environ Health Perspect, 2014, 122(8): 775-786. DOI: 10.1289/ehp.1307728.
- [6] Gamez JM, Penalba R, Cardoso N, et al. Low dose of bisphenol A impairs the reproductive axis of prepuberal male rats[J]. J Physiol Biochem, 2014, 70(1): 239-246. DOI: 10.1007/s13105-013-0298-8.
- [7] Prusinski L, Al-Hendy A, Yang Q. Developmental exposure to endocrine disrupting chemicals alters the epigenome: Identification of reprogrammed targets[J]. Gynecol Obstet Res, 2016, 3(1):1-6. DOI: 10.17140/GOROJ-3-127.
- [8] Yuan C, Zhang Y, Liu Y, et al. Enhanced GSH synthesis by Bisphenol A exposure promoted DNA methylation process in the testes of adult rare minnow *Gobiocypris rarus*[J]. Aquat Toxicol, 2016, 178: 99-105. DOI: 10.1016 / j. aquatox.2016.07.015.
- [9] Liu B, Pang B, Wang Q, et al. E2 upregulation correlates with tumor invasiveness, proliferation, and angiogenesis in human pituitary adenomas[J]. Hum Pathol, 2017, 66, 101-107. DOI:10.1016/j.humpath.2017.03.028.
- [10] Hengstler JG, Foth H, Gebel T, et al. Critical evaluation of key evidence on the human health hazards of exposure to bisphenol A[J]. Crit Rev Toxicol, 2011, 41(4): 263-291. DOI: 10.3109/10408444.2011.558487.
- [11] Wang P, Luo C, Li Q, et al. Mitochondrion-mediated apoptosis is involved in reproductive damage caused by BPA in male rats[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2014, 38(3): 1025-1033. DOI: 10.1016/j.etap.2014.10.018.
- [12] Maranghi F, Tassinari R, Moracci G, et al. Effects of a low oral dose of diethylstilbestrol (DES) on reproductive tract development in F1 female CD-1 mice[J]. Reprod Toxicol, 2008, 26(2): 146-150. DOI:10.1016/j.reprotox.2008.07.002.
- [13] Watkins DJ, Téllez-Rojo MM, Ferguson KK, et al. In utero and peripubertal exposure to phthalates and BPA in relation to female sexual maturation[J]. Environ Res, 2014, 134:233-241. DOI: 10.1016/j.envres.2014.08.010.
- [14] Chung YH, Han JH, Lee SB, et al. Inhalation toxicity of bisphenol A and its effect on estrous cycle, spatial learning, and memory in rats upon whole-body exposure[J]. Toxicol Res, 2017, 33(2): 165-171. DOI: 10.5487/tr.2017.33.2.165.
- [15] Ahmed RG. Maternal bisphenol A alters fetal endocrine system: Thyroid adipokine dysfunction[J]. Food Chem Toxicol, 2016, 95: 168-174. DOI:10.1016/j.fct.2016.06.017.
- [16] Nesan D, Sewell LC, Kurrasch DM. Opening the black box of endocrine disruption of brain development: Lessons from the characterization of Bisphenol A[J]. Horm Behav, 2018 Jan 3. pii: S0018-506X(17)30398-7. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2017.12.001.
- [17] Inagaki T, Smith NL, Sherva KM, et al. Cross-generational effects of parental low dose BPA exposure on the Gonadotropin-Releasing Hormone3 system and larval behavior in medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Neurotoxicology, 2016, 57:163-173. DOI: 10.1016/j.neuro.2016.09.021.
- [18] Misawa K, Kanazawa T, Misawa Y, et al. Frequent promoter hypermethylation of tachykinin-1 and tachykinin receptor type 1 is a potential biomarker for head and neck cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(5): 879-889. DOI:10.1007/s00432-013-1393-5.
- [19] Shu J, Jelinek J, Chang H, et al. Silencing of bidirectional promoters by DNA methylation in tumorigenesis[J]. Cancer Res, 2006, 66(10): 5077-5084. DOI: 10.1158 / 0008-5472. CAN-05-2629.
- [20] Michalak EM, Nacerddine K, Pietersen A, et al. Polycomb group gene Ezh2 regulates mammary gland morphogenesis and maintains the luminal progenitor pool[J]. Stem Cells, 2013, 31(9): 1910-1920. DOI:10.1002/stem.1437.
- [21] Siebold AP, Banerjee R, Tie F, et al. Polycomb Repressive Complex 2 and Trithorax modulate *Drosophila* longevity and stress resistance[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(1): 169-174. DOI: 10.1073/pnas.0907739107.
- [22] Lomniczi A, Ojeda SR. The Emerging Role of Epigenetics in the Regulation of Female Puberty[J]. Endocr Dev, 2016, 29: 1-16. DOI: 10.1159/000438840.
- [23] Lomniczi A, Loche A, Castellano JM, et al. Epigenetic control of female puberty[J]. Nat Neurosci, 2013, 16(3):281-289. DOI: 10.1038/nn.3319.

(收稿日期:2018-04-16)

(本文编辑:张振伟)

## 《中华预防医学杂志》第十一届编辑委员会通讯编委名单

(以下按姓氏汉语拼音排序)

陈恩富 陈曦\* 次仁央宗\* 丁贤彬\* 董光辉\* 方利文\* 冯福民 冯国双\* 郭欢\* 何云  
 胡余明 黄芳 黄学勇\* 贾曼红\* 李霓 李秀红\* 刘惠 刘楠 逯晓波\* 马超峰\* 马翔宇\*  
 毛琛\* 孟玲慧\* 潘安\* 潘力军\* 潘晓红\* 潘雪莉 彭措次仁\* 邱茂锋 沈冲\* 史荔\*  
 史卫峰\* 孙殿伟\* 田怀玉\* 王环宇\* 王慧 王建东 王丽敏\* 王鑫\* 夏胜利\* 徐健\* 许松涛\*  
 许雅君\* 杨文君\* 姚应水\* 尹卫东 袁建辉\* 詹军 章树业\* 张洁\* 张茂俊 张晓燕 张严峻\*  
 张之伦 张志勇 郑景山\* 周旺\* 周翊峰

注:加\*为新任通讯编委