

低剂量双酚 A 影响哺乳动物神经发育研究现状及争议

吕琳^{1,2},董梦琦^{1,2},秦占芬^{1,2*} (1.中国科学院生态环境研究中心,环境化学与生态毒理学国家重点实验室,北京 100085; 2.中国科学院大学,北京 100049)

摘要: 为全面认识低剂量 BPA(双酚 A)对哺乳动物神经发育的影响,本文从中国知网、PubMed 和 Web of Science 3 个数据库中获取了国内外关于低剂量 BPA 影响哺乳动物神经发育的研究报道,并使用 toxR 工具对其可信度进行评估,最终筛选获得 26 项相关研究;从美国食品药品监督管理局(FDA)工作网站上获取最新 BPA 毒性报告 1 篇.通过比较分析这些研究,发现大部分研究报道低剂量 BPA 暴露导致哺乳动物神经行为、特定脑区内组织学结构和细胞特征、神经递质和激素稳态、脑中关键基因表达以及表观遗传特征发生改变.但是,就导致的神经行为的改变而言,一些研究的结果并不一致甚至有诸多矛盾之处.这些不一致的结果可能与动物实验设计的差异有关,其中神经行为测试的质量控制和统计方法中统计单元的选择对于研究结果的影响尤其值得关注.总之,从目前的文献来看,低剂量 BPA 对哺乳动物神经发育的影响尚待进一步的确认.

关键词: 双酚 A; 脑发育; 发育神经毒性; 行为测试; 质量控制

中图分类号: X503 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2021)10-4864-08

Research progress and controversy of low dose bisphenol A on neurodevelopment in mammals. LÜ Lin^{1,2}, DONG Meng-qi^{1,2}, QIN Zhan-fen^{1,2*} (1.State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2.University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China). *China Environmental Science*, 2021,41(10): 4864~4871

Abstract: Bisphenol A (BPA) is a high-production volume chemical and ubiquitous in both the environment and the human body. Nowadays, a large number of animal studies have shown that BPA can affect brain development, along with epidemiological data supporting the results from animals. However, other studies, especially from regulatory agencies reported no significant developmental neurotoxicity of low doses of BPA. In order to develop a more comprehensive understanding of the effects of low-dose BPA on mammalian neurodevelopment, we obtained research reports on the effects of low-dose BPA on mammalian neurodevelopment from the three databases of CNKI, PubMed and Web of Science, and used the toxR tool to evaluate its credibility, and finally screened 26 relevant studies; obtained 1 latest BPA toxicity report from the U.S. Food and Drug Administration (FDA) work website. The major studies reported that BPA caused abnormalities in neurobehaviors, histological structure and cellular features in certain specific brain regions, neurotransmitters and hormones, brain key gene expression, and epigenetic modifications in mammals. In terms of neurobehavioral alterations, however, some results were inconsistent and even contradictory, which may be due to some differences in experimental design, especial the quality control of neurobehavioral tests and the choose of statistical unit. Overall, further research is needed to clarify the effects of BPA on neurodevelopment in mammals.

Key words: bisphenol A; brain development; developmental neurotoxicity; behavioral test; quality control

双酚 A(BPA)为高产化学品,主要用于合成聚碳酸酯、环氧树脂等高分子材料,后者用来制造各类消费品,如食品容器或者食品容器的内涂层.另外,单体的 BPA 在热敏纸、化妆品、个人护理品、衣物、玩具等消费品中也有应用.通过日常使用接触这些消费品、摄入被污染的食物等途径,普通人群每天持续暴露 BPA,据估算 BPA 的日摄入量在 0.01~4.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重.因此,在血液、尿液、胎盘、母乳等人体样品中普遍有 BPA 存在^[1-3],血清中浓度甚至可达 μmol 水平^[4].因此,BPA 的毒性效应和健康影响一直受到关注.

神经毒性研究报道,哺乳动物发育过程中暴露 BPA 会导致其在后期出现神经行为异常,且伴随关键脑区细胞和分子特征的改变^[5-7].同时,有人群流行病学调查数据显示,儿童焦虑、注意力缺陷等神经行为的异常与母亲孕期尿液中的 BPA 浓度相关^[8],这些人群数据为动物实验结果提供了支持.为此,一些研究人员主张 BPA 具有神经发育毒性,应该加强监

收稿日期: 2021-02-25

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901103);国家自然科学基金资助项目(21876196)

* 责任作者, 研究员, qinzhafen@rcees.ac.cn

管.但是,来自化学品监管部门的数据认为,低剂量的 BPA 没有包括发育神经毒性在内的明显的毒性效应.当综合评估 BPA 毒性效应的已有文献时,监管部门依旧坚持认为,虽然有数据提示 BPA 具有潜在的发育神经毒性及其他毒性的风险,但同时存在不一致的结果,需要进一步的研究^[9].尽管如此,本着预防的原则,目前加拿大、美国、欧盟等一些国家或地区已经禁止了 BPA 在婴儿奶瓶中使用,但更多的产品中仍然有 BPA 的大量使用.

为全面认识 BPA 发育神经毒性研究现状,探讨科学界、监管界关于 BPA 安全性争议的原因,有必要对相关文献进行系统分析.本文在中国知网、PubMed 及 Web of Science 数据库中,以“双酚 A& 神经发育毒性/脑/行为”或“bisphenol A & Developmental

neurotoxicity/brain/behavior”为关键词进行检索,以美国食品药品监督管理局(FDA)规定的每日容许摄入量(ADI)50 μ g/kg·bw/天为标准^[10],筛选关注该剂量或低于该剂量的 BPA 哺乳动物神经发育毒性相关文献.为了确定所得文献的可信度,使用 ToxR 工具^[11]对所得文献进行评估,最终获得 26 篇符合标准的文献(见表 1).其中,有 6 篇文献缺少对实验动物只数的表述,但在综合评估其文献内容后,认为其结果较为可信,可以用于文分析讨论.此外,从美国食品药品监督管理局(FDA)工作网站上获取最新 BPA 毒性报告 1 篇.在此基础上,本文综述 BPA 对哺乳动物行为、脑组织中细胞行为、脑中关键效应分子、脑中关键基因表达以及表观遗传修饰的影响相关报道,并对部分研究结果存在差异的原因进行讨论.

表 1 低剂量双酚 A 暴露对哺乳动物神经发育的影响

Table 1 Effects of low-dose bisphenol A exposure on mammalian neurodevelopment

文献	实验动物	每组窝数	统计单元	暴露时期	剂量	暴露方式	检测时期	检测方法	结论
[12]	Wistar 大鼠	4	只	GD0-PND21	40	饮食	PND46	Y 迷宫	空间记忆能力下降,雌性小鼠出现焦虑行为
[13]	Sprague-Dawley 大鼠	1	只	GD0-PND21	40	灌胃	PND60 PND85 PND56	MWM EPM 旷场测试	空间记忆能力下降 未观察到实质性改变 雄性小鼠出现焦虑行为
[14]	白化病小鼠	10	不明确	GD7-PND21	50	灌胃	PND21/56	免疫荧光	大脑皮层和海马中突触密度降低,兴奋性突触和抑制性突触比例改变
[15]	Long-Evans 大鼠	3	只	GD1-PND14	5 50	饮食	PND90	MWM EPM	未见显著差异 性别差异消除
[16]	Sprague-Dawley 大鼠	不明确	窝	GD0-PND21	40	灌胃	PND35/45/55	行为观察	雌性子鼠社交行为为雄性化
[17]	CD-1 小鼠	3	窝	GD11-PND8	10	饮食	PND30 PND70	新异探索行为测试 旷场测试、EPM	性别差异消失 性别差异消失
[18]	Sprague-Dawley 大鼠	不明确	只	PND7-PND21	0.5	皮下注射	PND28 PND35	Y 迷宫 高尔基染色观察 仪器分析	学习能力下降 海马突触密度下降 雄鼠谷氨酸、乙酰胆碱水平升高,5-HT、 γ -氨基丁酸水平降低;雌鼠仅 5-HT 水平降低
[19]	Sprague-Dawley 大鼠	不明确	窝	PND23-30	40	灌胃	PND45 PND>90	行为观察 行为观察	未见显著性差异 雄性小鼠嗅探行为减少
[20]	Sprague-Dawley 大鼠 (卵巢切除)	不明确	只	PND38-49	40	皮下注射	PND49/59/87 PND49/77 PND56/84	高尔基染色观察 EPM、旷场实验 对象放置试验条件及被动回避测试	海马 DG 区树突棘密度下降 未见显著性差异 鼠空间记忆能力显著下降
[21]	Wistar 大鼠	不明确	不明确	PND21-90	40	灌胃	PND90	免疫荧光	空间记忆能力下降 髓磷脂含量降低

续表 1

文献	动物	每组窝数	统计单元	暴露时期	剂量	暴露方式	检测时期	检测方法	结论
[22]	CD-1 小鼠	不明确	只	PND32-87	40	灌胃	PND>90	旷场试验、EPM、MWM	少突胶质细胞标记物及 Notch 信号通路相关基因表达量下调 梳毛、喂养行为、空间记忆能力等性别差异消除
[23]	Sprague-Dawley 大鼠	11/12	窝	GD6-PND21	2.5/25.0	灌胃	PND26-79	旷场试验、水迷宫	无显著性差异
[24]	Sprague-Dawley 大鼠	11/12	窝	GD6-PND21	2.5/25.0	灌胃	PND26-79	旷场试验、EPM	无显著性差异
[25]	C57BL/9J 小鼠	1	只	GD8.5-18.5	40	灌胃	PND21 或产后 14 月	高尔基染色观察	海马 CA1 区突触密度下降、分支减少
[26]	Wistar 大鼠	不明确	不明确	GD6-PND21	40	灌胃	PND42	BrdU、免疫荧光、RT-qPCR	海马细胞增殖被抑制,神经源性基因及 Wnt 信号基因表达下降
[27]	Wistar 大鼠	不明确	不明确	GD6-PND28	40	灌胃	PND49	BrdU、RT-qPCR、Western blot	海马中细胞的增殖被抑制,Wnt 信号基因表达下降
[28]	Wistar 大鼠	不明确	不明确	GD6-PND22	40	灌胃	PND21	BrdU	海马中神经干细胞增殖被抑制
[29]	C57BL/9J 小鼠	不明确	只	GD0-16.5	20	皮下注射	GD10.5-18.5	免疫组化、RT-qPCR	脑室区细胞增殖水平下降,神经分化相关基因表达水平异常
[30]	C57BL/6J 小鼠	不明确	只	GD6-PND21	10	皮下注射	产后 3/6/9 月	仪器分析	多巴胺代谢过程受到干扰
[31]	C57BL/7J 小鼠	不明确	窝	GD10-PND20	0.25	皮下注射	产后第 4 或 9 周	仪器分析	鼠大脑中 5-羟色胺代谢加快
[32]	Sprague-Dawley 大鼠	4	窝	GD15-22	10	饮食	PND1	免疫组化	视前内侧核 PR 表达增加,且被 ER 拮抗剂逆转
[33]	Sprague-Dawley 大鼠	2	窝	PND1-10	5	皮下注射	PND13、PND90-120	ELISA	血清 T4 水平降低、T3 无变化
[34]	Avy 杂合小鼠	1	只	GD0-PND21	50	饮食	十月龄	RT-qPCR	Kchq1、Dnm1、Tet1/2 表达上调
[35]	Long-Evans 大鼠	3/4	窝	PND0-2	50	皮下注射	PND4/10	原位杂交	下丘脑 ESR1/2 表达量性别差异消除
[36]	Sprague-Dawley 大鼠	11/12	窝	GD6-21	2.5/25.0	灌胃	PND2	原位杂交	杏仁核下丘脑 ESR1/2 表达下降
[39]	CD-1 小鼠	3	窝	GD0-12.5/14.5	20	皮下注射	GD12.5/14.5	RLGS	多个基因甲基化水平改变
[40]	瑞士白化小鼠	10	不明确	GD7-PND21	50	灌胃	PND21/56	甲基胞嘧啶印迹分析、蛋白印迹分析	大脑皮质及海马中 DNA 甲基化水平下降,但组蛋白乙酰化水平升高

注:表中暴露剂量单位均为 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$;GD表示妊娠天数,PND表示产后天数。

1 低剂量 BPA 哺乳动物发育神经毒性研究现状

1.1 低剂量 BPA 对哺乳动物神经行为的影响

神经行为异常是化学品神经发育毒性的直观效应之一。一些动物研究显示,发育过程中接触低剂量 BPA 会导致动物行为学指标发生改变。孕期-哺乳期是哺乳动物脑发育的关键时期,所以几个研究集中在这一时期对孕鼠进行低剂量 BPA 持续暴露,待子鼠进入青春期或成年后对其进行行为学测试。Change 及其团队通过灌胃方式对 Sprague-Dawley 大鼠进行了 $40\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ BPA 暴露,将其子鼠饲养至

成年,发现 BPA 暴露组的子鼠在莫里斯水迷宫试验(MWM)中逃脱时间增长,指示子鼠空间记忆能力受损^[12]。Poimenova 等^[13]则令 Wistar 大鼠在这一时期通过饮食途径摄入相同剂量 BPA,对子鼠进行 Y 迷宫训练试验,发现其进入新异臂的次数显著减少,这同样指示了空间记忆能力的损伤。除此之外,Chang 的团队还发现雌性子鼠同时出现了焦虑样行为,这表明 BPA 还使动物出现了情绪异常^[12]。类似地,Kumar 等人对小鼠进行 $50\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 剂量的 BPA 灌胃,在旷场试验中发现雄性子鼠出现焦虑样行为,雌性子鼠却未出现明显的焦虑反应^[14]。Jones 等^[15]则

在 Long-Evans 大鼠的食物中加入 BPA,使其摄入剂量为 $5\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$,然后在高架迷宫(EPM)中分别观察雌性子鼠和雄性子鼠的表现,发现 BPA 消除了两性子鼠在 EPM 中表现的性别差异,这可能指示了 BPA 对动物焦虑反应性别差异的影响.另外,Dessi-Fulgheri 等^[16]还观察到了雌性子鼠社交等行为的雄性化.这些研究均认为,孕期-哺乳期持续接触 BPA 会导致子鼠出现神经行为的异常,且部分影响可能是性别相关的.

除孕期-哺乳期持续暴露外,仅在发育过程中某一阶段接触 BPA 的子鼠也出现了行为学指标的改变.Gioiosa 等^[17]在围产期通过饮食途径对母鼠进行 $10\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的 BPA 暴露,发现其子鼠在新异性探索行为测试、旷场测试以及 EPM 中的性别差异消失.Zhang 等^[18]则在哺乳期对母鼠进行了 $0.5\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 的 BPA 皮下注射后,同样观察到子鼠在 Y 迷宫中表现出空间记忆能力的下降.另外,有四项研究分别在青春期对子鼠进行了 $40\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ BPA 暴露.其中,Della Seta 等^[19]观察了雄性子鼠性成熟后的生殖行为,发现其嗅探行为减少,Bowman 团队^[20]通过对对象放置试验发现子鼠的空间记忆能力下降,Tandon 等^[21]通过条件及被动回避测试得到了同样的结论.Xu 等^[22]则在旷场试验、EPM 和 MWM 中观察到了子鼠多种行为的性别差异消除^[22].这些研究均显示,BPA 在关键发育阶段暴露对动物神经行为产生了影响.

值得注意的是,尽管上述研究中都出现了某些行为学测试的阳性结果,但是也存在某些阴性的结果,尤其在上述研究之间,存在诸多矛盾之处(表 2).Ferguson 等^[23]在孕期哺乳期对母鼠进行了一系列浓度的 BPA 灌胃,在旷场试验、迷宫试验中均未观察到 BPA 对子鼠行为产生任何显著影响;Rebuli 团队^[24]以同样的方案进行暴露,在 EPM 中也未观察到 BPA 的影响.同样使用 MWM 和 EPM 进行测试时,使用灌胃方法进行暴露的 Chang 团队^[13]观察到 BPA 影响了鼠在 MWM 中的表现,但未影响其在 EPM 中的行为,而使用饮食暴露的 Jones^[15]却观察到了完全相反的现象.Poimenova 等^[12]的实验中,雌性小鼠出现焦虑样行为,Kumar 等^[14]的研究却显示雄性小鼠出现焦虑、雌性小鼠无显著性差异.另外, Xu 报道了青春期 BPA 暴露会导致鼠出现社交行为改

变^[22],但 Della Seta 等^[19]却未观察到这一现象.

表 2 低剂量 BPA 暴露对哺乳动物行为影响的实验结果差异
Table 2 Differences of experimental results: effects of low-dose bisphenol A on mammalian behavior

文献	学习记忆	焦虑情绪	社交行为	生殖行为
[12]	●	●	/	/
[13]	●	/	/	/
[14]	●	/	/	/
[15]	○	●	/	/
[16]	/	/	●	/
[17]	/	●	/	/
[18]	●	/	/	/
[19]	/	/	●	●
[20]	●	○	/	/
[21]	●	/	/	/
[22]	●	●	●	/
[23]	○	○	/	/
[24]	/	○	/	/

注:●,影响与性别无关;●,影响与性别有关;○,无显著影响;/,未关注该项指标.

总体来说,已有研究显示 BPA 对动物神经行为存在潜在的影响,但目前并未得到一致的结论,其具体效应仍需进一步研究.

1.2 BPA 对哺乳动物特定脑区内组织学结构和细胞特征的影响

除神经行为学指标外,脑组织形态以及其中细胞特征也是指示脑发育的重要指标.神经元突触是神经系统中的功能单位,其数量与形态的正常与否指示了脑发育过程是否受到干扰.海马是脑中负责记忆、学习功能的主要结构,其中神经元形态是评价化学品神经发育毒性的指标之一.Kimura 等^[25]在 GD8-18 对孕鼠进行 $40\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ BPA 暴露后,观察到子鼠海马中突触密度下降、分支减少,且这一改变在其成年后依然存在.如前所述,Zhang 等^[18]通过行为学测试观察到 BPA 损伤鼠的空间记忆能力,与此同时,该研究也观察到了海马中突触密度的改变^[18].Bowman 等^[20]报道了类似的发现,并认为二者是相关的.

神经干细胞(NSCs)的增殖及分化异常可能说明脑发育过程受到了干扰.一些研究使用 BrdU、Ki67 等标记正在增殖的 NSCs,结果显示,发育过程中低剂量 BPA 暴露会抑制脑中神经干细胞的增殖^[26-29],Nakamura 等^[29]的研究显示这种抑制出现在子鼠接触药物一段时间后.BPA 还可能影响 NSCs 的

命运决定,Tiwari 的团队进行了两项研究,发现 BPA 造成子鼠海马和脑室下区(SVZ)中神经源性标记物含量降低,认为 BPA 抑制了 NSCs 向神经谱系的分化^[26-27].Tandon 等^[21]通过标记髓磷脂等髓鞘标记物发现,BPA 干扰了海马中髓鞘形成过程.Kumar 等^[14]则通过标记不同类型神经突触发现,BPA 造成子鼠大脑皮层中兴奋性和抑制性突触比例改变,他们认为这是子鼠出现焦虑样行为的原因。

从已有研究来看,低剂量 BPA 在组织、细胞层面影响脑发育过程,主要表现为突触形成改变和 NSCs 增殖及分化受到干扰。

1.3 BPA 对哺乳动物神经递质和激素的影响

神经递质的合成及代谢稳态是评估脑功能的指标之一,有研究报道了 BPA 对这一过程产生了干扰.几项研究分别对处于重要发育时期的鼠进行低剂量 BPA 暴露后,在其青春期或成年后检测了其血清或脑组织中几种重要神经递质的水平,发现 BPA 会影响动物体内的神经递质水平,例如多巴胺^[30]、5-羟色胺^[18,31]、谷氨酸^[18]、乙酰胆碱^[18]等.部分研究还发现,这种递质水平的变化同时伴随着其与其代谢产物比例的改变,因此,BPA 可能干扰了脑中神经递质的代谢稳态^[30-31].另外,也有研究显示了这种干扰的性别相关性^[18].

目前,BPA 被认为具有内分泌干扰作用,其对脑中重要激素的作用也是神经发育毒性关注的指标.Fahrenkopf 和 Wagner 的研究显示,孕期 BPA 暴露会以 ER 依赖的方式诱导小鼠大脑视前内侧核中细胞的孕激素受体表达,说明 BPA 干扰了脑中雌激素的作用过程^[32].Fernandez 等^[33]则发现 BPA 会影响子鼠血清中的甲状腺素(T4)水平,但对三碘甲状腺原氨酸(T3)水平无显著影响。

1.4 BPA 对哺乳动物脑中关键基因表达及重要信号通路的影响

有研究在孕期及哺乳期对孕鼠进行环境剂量 BPA 暴露后将其子鼠饲养至成年,然后检测脑中关键基因的表达水平.据报道,BPA 对多种基因的表达水平产生了干扰.Malloy 等^[34]发现小鼠在孕期-哺乳期通过饮食摄入 BPA 后,其大脑中关键基因如钾电压门控通道蛋白 Kcnq1、DNA 甲基转移酶 Dnmt1、tet 甲基胞嘧啶双加氧酶 Tet1/2 的表达水平上调,而这些基因的表达水平可能与胶质细胞分化相关。

Tandon 及其团队对大鼠进行 BPA 灌胃后检查了其大脑基因表达水平,发现其中少突胶质细胞标记物 PLP、Olig1、MBP 等分子表达水平降低^[21].除大脑外,Cao 等^[35-36]还发现 BPA 对下丘脑雌激素受体相关基因表达水平产生影响。

发育过程中,不同时空位置、不同种类的细胞中的基因表达受到多种信号通路的调节.在脑发育过程中,较为重要的信号通路包括 Wnt、Notch、BMP 等.研究人员推测,如果这些信号通路受到干扰,脑发育就可能受到影响.Tiwari 团队^[26-27]的研究显示,BPA 对脑中的 Wnt 信号通路产生干扰,改变了其靶基因的表达水平,且这种干扰并非只是分子层面的,其最终造成了海马神经干细胞的异常增殖;当使用外源物质逆转这种干扰时,这种异常增殖也随之消失;研究认为,BPA 确实影响了脑细胞中的 Wnt 信号通路,并由此干扰了脑的发育.Tandon 等^[21]则在观察到 BPA 影响鼠行为以及髓鞘形成的同时发现,BPA 改变了大脑中 Notch 信号通路相关基因的表达水平,如 Notch 受体 Notch1、配体 Jagged1、靶基因 Hes1 等,这说明 BPA 干扰了脑中的 Notch 信号通路。

综合来看,在基因表达调控层面,BPA 对脑发育产生了一定的影响。

1.5 BPA 对哺乳动物脑细胞中表观遗传修饰的影响

脑发育过程中,DNA 甲基化、组蛋白修饰等表观遗传修饰机制能够影响神经干细胞命运决定等过程^[37],还参与了脑的性二态分化^[38].Yaoi 等^[39]对鼠进行低剂量 BPA 暴露后对其脑细胞进行了限制性标记基因组扫描(RLGS),发现其中多个基因启动子 CpG 岛甲基化水平改变.Kumar 等^[40]也关注了 BPA 对大脑表观遗传修饰的改变,发现 BPA 不仅降低了大脑皮层和海马中的 DNA 甲基化水平,还升高了组蛋白乙酰化水平.由此可见,发育过程中的 BPA 接触会导致动物脑中表观遗传修饰水平改变。

综上所述,现有低剂量 BPA 神经发育毒性研究显示,特定脑区内组织学结构和细胞特征、神经递质和激素稳态、脑中关键基因表达以及表观遗传特征等非经典神经毒性指标均受到 BPA 影响.但是,经典的神经毒性指标,即神经行为的相关研究所得结论存在较大分歧.因此从目前的文献来看,低剂量 BPA 对神经发育的影响仍需进一步研究明确。

2 BPA 研究结果的不一致性分析

尽管众多科学研究均报道了 BPA 对动物的脑发育过程具有干扰作用,但这一观点并未完全被化学品监管部门认可。欧盟化学品管理局(ECHA)、美国食品药品监督管理局(FDA)等化学品监管机构分别综合审查了 BPA 神经发育毒性的相关研究报道后,在 BPA 毒性报告中都陈述了其潜在的神经发育毒性风险,但并未因此提升 BPA 的管控力度。目前,FDA 在官方网站上标称 BPA 是“安全(SAFE)”的。这与大部分科学研究得到的结论相反。化学品监管机构得出这一结论的主要原因是,现有的 BPA 神经发育毒性研究结果之间存在分歧。很多因素可能会导致这种差异性结果的出现,具体分析如下:

第一,实验动物品系可能是影响因素之一。首先,不同品系的鼠之间认知能力存在差异,这导致其在迷宫试验等行为学测试中的表现差异较大,会影响神经毒理学实验的结果^[41]。另外,不同品系鼠的脑发育过程对于不同物质的敏感性也有所不同。例如,美国国家环境健康科学研究所(NIEHS)和 FDA 共同发起了“学术界和监管机构对双酚 A 毒性的联合研究”(CLARITY-BPA)项目,并与毒理学研究人员开展了合作研究。与先前的研究不同,这些研究未观察到 BPA 对动物非生殖行为产生影响。但同时,他们也未在所设置的对照组中观察到预期的性别差异^[42]。经过分析,研究人员认为美国国家毒理学中心(NCTR)供给的 Sprague-Dawley 大鼠在行为学上与其他品系大鼠存在差异,其可能对性别相关的干扰不敏感。可见,动物品系的选择会影响得到的结果^[42-43]。在本文综述的 26 篇低剂量 BPA 神经发育毒性相关研究中,有 16 篇使用大鼠作为研究对象^[11-12,14-15,17-20,22-23,25,27,31-32,34-35],10 篇使用小鼠进行研究^[13,16,21,24,28-30,33,38-39],大鼠、小鼠分别包含不同的品系,这可能带来结果的分歧。

第二,不同的暴露方式可能会影响毒理学实验的结果。本文综述研究中,有 8 篇^[17,19,28-30,32,34,38]采取皮下注射的方式进行暴露,而有 18 篇通过口服途径进行暴露。这两种不同的暴露途径可能导致实际摄入 BPA 的量不同。因此,即使暴露相同剂量的 BPA,动物脑组织最终的 BPA 及其代谢产物水平可能不一致,这可能导致动物受到的影响产生差异。在口服

暴露的研究中,使用灌胃方法^[12-13,15,18,20-25,27,35,39]的研究有 13 项,通过饮食暴露^[11,14,16,31,33]的有 5 项。这 3 种方法中,食物暴露和饮水暴露不易确定动物实际接触的药物量,可能会导致结果受到影响。而灌胃暴露已经被证明会给动物造成强大的压力,这种压力对动物行为的影响甚至可能超过 BPA 的影响^[43-44]。这可能是采用该种暴露方式的研究报道阴性结果的原因之一。

第三,在毒理学研究中,对不同处理组的动物进行指标检测及数据统计时应以“窝”为单位,并在同一处理组保证足够的窝数,以此排除遗传背景带来的误差。但是,在现有的 BPA 神经发育毒性研究中,仅有 11 项明确统计单元为“窝”^[15-16,18,22-23,30-32,34-35,38],其余研究均以“只”^[11-12,14,17,19,21,24,28-29]为单元或描述不清^[13,20,25,27,39]。不同遗传背景的动物可能在行为学测试中表现不同,不合适的统计方法可能会造成假阳性或是假阴性的结果出现。

第四,本文在综述现有相关研究后发现,即使是不存在上述问题的研究得到的结果依然存在差异,尤其是行为学测试的结果。这可能是由于行为学测试受到的影响因素较为复杂,本身就不易得到高度一致的重复。现有研究显示,动物饲养条件的细微不同、实验时环境噪音的不同、实验人员数量及相对位置的不同均会影响动物在行为学测试中的表现。这些细节一般不会在研究报告中完整体现,而两项实验设计看似完全相同的研究可能因此得到不同的结果^[42]。另外,现有的行为学测试往往被认为指示了动物的某一项认知功能。例如,鼠在莫里斯水迷宫中的逃生时间增加被认为是空间记忆能力损害的表现。但事实上,这些测试中的指标并非仅由一项认知功能决定。Tanila 在综合评估鼠的行为学试验报道后发现,在莫里斯水迷宫试验中,如果鼠出现焦虑情绪,其游泳速度会加快、逃生时间变短,而这可能被误认为是空间记忆能力较好的表现^[42]。一些非认知功能受到影响也会影响鼠在行为学试验中的表现,例如嗅觉、运动能力等。Karl 等人在综述了鼠神经毒理学相关研究后认为,毒理学中不一致的行为测试结果可能来自未被关注到的健康指标^[44]。

总体来说,现有的发育神经毒性测试方法受到的影响因素非常复杂,包括动物品系、暴露方式、统计方式等,行为学测试本身易受干扰的特点也是因

素之一.这些都可能是 BPA 神经发育毒性研究结论不一致的原因.

3 结论与展望

3.1 结论

大部分研究显示,发育过程中低剂量 BPA 暴露会导致哺乳动物神经发育受损,但其中行为学结果存在差异,其可能与实验设计的差异相关,尤其是统计单元的选择和行为学测试质量控制.

3.2 展望

目前,低剂量 BPA 神经发育毒性仍需进一步明确.未来,在研究 BPA 对神经系统发育的影响时应着重关注实验设计,例如使用“窝”为统计单元以排除遗传背景的影响,使用饮食途径等对动物行为影响较小的暴露方式等,以明确低剂量 BPA 对脑发育的不良效应及其产生效应的浓度.在进行行为学测试时,应尽量使用自动化设备以排除实验人员的影响,并综合评估包括动物本身健康状况在内的多项指标以得出更准确的结论.

参考文献:

- [1] Michałowicz J. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014,37(2):738–758.
- [2] Vandenberg L N, Hauser R, Marcus M, et al. Human exposure to bisphenol A (BPA) [J]. *Reproductive Toxicology*, 2007,24(2):139–177.
- [3] Andra S S, Charisiadis P, Arora M, et al. Biomonitoring of human exposures to chlorinated derivatives and structural analogs of bisphenol A [J]. 2015,85:352–379.
- [4] Yang J, Wang H, Du H, et al. Serum Bisphenol A, glucose homeostasis, and gestational diabetes mellitus in Chinese pregnant women: A prospective study [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020.<https://doi.org/10.1007/s11356-020-11263-4>.
- [5] Itoh K, Yaoi T, Fushiki S. Bisphenol A, an endocrine-disrupting chemical, and brain development [J]. *Neuropathology*, 2012,32(4):447–457.
- [6] Mhaouty-Kodja S, Belzunces L P, Canivenc M-C, et al. Impairment of learning and memory performances induced by BPA: Evidences from the literature of a MoA mediated through an ED [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2018,475:54–73.
- [7] Wolstenholme J T, Rissman E F, Connelly J J. The role of bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior [J]. *Hormones and Behavior*, 2011,59(3):296–305.
- [8] Grohs M N, Reynolds J E, Liu J, et al. Prenatal maternal and childhood bisphenol a exposure and brain structure and behavior of young children [J]. *Environmental Health*, 2019,18(1):85.
- [9] FDA. Updated Review of Literature and Data on Bisphenol A [R/OL]. <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/bisphenol-bpa>, 2021.
- [10] Beronius A, Johansson N, Ruden C, et al. The influence of study design and sex-differences on results from developmental neurotoxicity studies of bisphenol A, implications for toxicity testing [J]. *Toxicology*, 2013,311(1/2):13–26.
- [11] Segal D, Makris S L, Kraft A D, et al. Evaluation of the ToxRTool's ability to rate the reliability of toxicological data for human health hazard assessments [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2015,72(1):94–101.
- [12] Chang H, Wang M, Xia W, et al. Perinatal exposure to low-dose bisphenol A disrupts learning/memory and DNA methylation of estrogen receptor alpha in the hippocampus [J]. *Toxicology Research*, 2016,5(3):828–835.
- [13] Poimenova A, Markaki E, Rahiotis C, et al. Corticosterone-regulated actions in the rat brain are affected by perinatal exposure to low dose of bisphenol A [J]. *Neuroscience*, 2010,167(3):741–749.
- [14] Kumar D, Thakur M K. Anxiety like behavior due to perinatal exposure to Bisphenol-A is associated with decrease in excitatory to inhibitory synaptic density of male mouse brain [J]. *Toxicology*, 2017, 378:107–113.
- [15] Jones B A, Watson N V. Perinatal BPA exposure demasculinizes males in measures of affect but has no effect on water maze learning in adulthood [J]. *Hormones and Behavior*, 2012,61(4):605–610.
- [16] Dessi-Fulgheri F, Porrini S, Farabollini F. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on play behavior of female and male juvenile rats [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2002,110:403–407.
- [17] Gioiosa L, Fissore E, Ghirardelli G, et al. Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice [J]. *Hormones and Behavior*, 2007,52(3):307–316.
- [18] Zhang H, Kuang H, Luo Y, et al. Low-dose bisphenol A exposure impairs learning and memory ability with alterations of neuromorphology and neurotransmitters in rats [J]. *Science of the Total Environment*, 2019,697:134036.
- [19] Della Seta D, Minder I, Belloni V, et al. Pubertal exposure to estrogenic chemicals affects behavior in juvenile and adult male rats [J]. *Hormones and Behavior*, 2006,50(2):301–307.
- [20] Bowman R E, Hagedorn J, Madden E, et al. Effects of adolescent Bisphenol-A exposure on memory and spine density in for ovariectomized female rats: Adolescence vs adulthood [J]. *Hormones and Behavior*, 2019,107:26–34.
- [21] Tandon A, Singh S J, Gupta M, et al. Notch pathway up-regulation via curcumin mitigates bisphenol-A (BPA) induced alterations in hippocampal oligodendrogenesis [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020,392:122052.
- [22] Xu X, Tian D, Hong X, et al. Sex-specific influence of exposure to bisphenol-A between adolescence and young adulthood on mouse behaviors [J]. *Neuropharmacology*, 2011,61(4):565–573.
- [23] Ferguson S A, Law C D, Jr., Abshire J S. Developmental treatment with bisphenol A or ethinyl estradiol causes few alterations on early preweaning measures [J]. *Toxicological Sciences*, 2011,124(1):149–160.

- [24] Rebuli M E, Camacho L, Adonay M E, et al. Impact of low-dose oral exposure to bisphenol A (BPA) on juvenile and adult rat exploratory and anxiety behavior: A CLARITY-BPA Consortium Study [J]. *Toxicological Sciences*, 2015,148(2):341-354.
- [25] Kimura E, Matsuyoshi C, Miyazaki W, et al. Prenatal exposure to bisphenol A impacts neuronal morphology in the hippocampal CA1 region in developing and aged mice [J]. *Archives of Toxicology*, 2016,90(3):691-700.
- [26] Tiwari S K, Agarwal S, Seth B, et al. Inhibitory effects of bisphenol-A on neural stem cells proliferation and differentiation in the rat brain are dependent on Wnt/beta-catenin pathway [J]. *Molecular Neurobiology*, 2015,52(3):1735-1757.
- [27] Tiwari S K, Agarwal S, Tripathi A, et al. Bisphenol-A mediated inhibition of hippocampal neurogenesis attenuated by curcumin via canonical Wnt pathway [J]. *Molecular Neurobiology*, 2016,53(5):3010-3029.
- [28] Agarwal S, Yadav A, Tiwari S K, et al. Dynamin-related Protein 1 Inhibition Mitigates Bisphenol A-mediated Alterations in Mitochondrial Dynamics and Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016,291(31):15923-15939.
- [29] Nakamura K, Itoh K, Yaoi T, et al. Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of bisphenol A [J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2006,84(6):1197-1205.
- [30] Yao J, Wang J, Wu L, et al. Perinatal exposure to bisphenol A causes a disturbance of neurotransmitter metabolic pathways in female mouse offspring: A focus on the tryptophan and dopamine pathways [J]. *Chemosphere*, 2020,254:126715.
- [31] Matsuda S, Matsuzawa D, Ishii D, et al. Perinatal exposure to bisphenol A enhances contextual fear memory and affects the serotonergic system in juvenile female mice [J]. *Hormones and Behavior*, 2013,63(5):709-716.
- [32] Fernandez M O, Bourguignon N S, Arocena P, et al. Neonatal exposure to bisphenol A alters the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in female rats [J]. *Toxicology Letters*, 2018,285:81-86.
- [33] Fernandez M O, Bourguignon N S, Arocena P, et al. Neonatal exposure to bisphenol A alters the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in female rats [J]. *Toxicology Letters*, 2018,285:81-86.
- [34] Malloy M A, Kochmanski J J, Jones T R, et al. Perinatal bisphenol A exposure and reprogramming of imprinted gene expression in the adult mouse brain [J]. *Frontiers in Genetics*, 2019:10.
- [35] Cao J, Mickens J A, Mccaffrey K A, et al. Neonatal Bisphenol A exposure alters sexually dimorphic gene expression in the postnatal rat hypothalamus [J]. *Neurotoxicology*, 2012,33(1):23-36.
- [36] Cao J, Rebuli M E, Rogers J, et al. Prenatal bisphenol A exposure alters sex-specific estrogen receptor expression in the neonatal rat hypothalamus and amygdala [J]. *Toxicological Sciences*, 2013,133(1):157-173.
- [37] Miller F D, Gauthier A S. Timing is everything: Making neurons versus glia in the developing cortex [J]. *Neuron*, 2007,54(3):357-369.
- [38] Westberry J M, Trout A L, Wilson M E. Epigenetic regulation of estrogen receptor alpha gene expression in the mouse cortex during early postnatal development [J]. *Endocrinology*, 2010,151(2):731-740.
- [39] Yaoi T, Itoh K, Nakamura K, et al. Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008,376(3):563-567.
- [40] Kumar D, Thakur M K. Effect of perinatal exposure to Bisphenol-A on DNA methylation and histone acetylation in cerebral cortex and hippocampus of postnatal male mice [J]. *Journal of Toxicological Sciences*, 2017,42(3):281-289.
- [41] Tanila H. Testing cognitive functions in rodent disease models: Present pitfalls and future perspectives [J]. *Behavioural Brain Research*, 2018, 352:23-27.
- [42] Patisaul H B. Achieving CLARITY on bisphenol A, brain and behaviour [J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2020,32(1):e12730.
- [43] Prins G S, Patisaul H B, Belcher S M, et al. CLARITY-BPA academic laboratory studies identify consistent low-dose Bisphenol A effects on multiple organ systems [J]. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2019,125:14-31.
- [44] Karl T, Pabst R, Von Horsten S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research [J]. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2003,55(1):69-83.

作者简介: 吕琳(1998-),女,北京人,中国科学院生态环境研究中心硕士研究生,主要从事环境毒理学研究。