

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.19.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210713.1106.004.html\(2021-07-13\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210713.1106.004.html(2021-07-13))

双酚 A 暴露诱导雌性大鼠性早熟的下丘脑 KISS-1 和 GPR54 基因甲基化分子机制探讨*

罗小娟¹, 曹科^{1△}, 陶明俊¹, 陈小文², 张琴³, 彭刚⁴, 陈运生¹

(广东省深圳市儿童医院:1. 检验科;2. 儿研所;3. 内分泌科;4. 青春期妇科 518038)

[摘要] **目的** 探讨双酚 A(BPA)暴露诱导雌性大鼠性早熟的下丘脑 KISS-1 和 GPR54 基因甲基化分子机制。**方法** 将 SD 雌性幼鼠(21 d 龄)分为 4 组,即 BPA 干预组(0.25 mg/kg)、BPA 空白对照组(与 BPA 组同时处死)、17 β -雌二醇组(E2,0.1 mg/kg)、溶剂对照组(直至大鼠出现阴道开口再处死),每天以灌胃方式持续给药 10 d,以大鼠阴道开口时间(VOD)为观察终点(VOD 当天处死),BPA 干预组阴道开口当天处死时,按 1:1 比例处死 BPA 空白对照组。收集大鼠卵巢和下丘脑组织,采用 real-time PCR 方法检测卵巢 ER α 、ER β mRNA 和下丘脑 KISS-1、GPR54 mRNA 相对表达水平,焦磷酸测序 PCR 方法检测 KISS-1、GPR54 基因甲基化水平。**结果** BPA 干预组和 E2 组 VOD 较溶剂对照组提前($P < 0.05$),BPA 空白对照组处死时未出现阴道开口,BPA 干预组下丘脑 KISS-1、GPR54 mRNA 表达水平明显高于 BPA 空白对照组($P < 0.05$),但与溶剂对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。E2 组下丘脑 KISS-1 mRNA 和卵巢 ER β mRNA 表达水平明显低于溶剂对照组($P < 0.05$)。BPA 干预组、BPA 空白对照组、E2 组和溶剂对照组 4 组间比较,下丘脑 KISS-1 基因 CpG 位点甲基化水平差异无统计学意义,而 GPR54 基因 CpG 位点甲基化水平存在显著性差异,其中 BPA 干预组、E2 组和溶剂对照组 GPR54 片段 1 CpG 位点甲基化水平显著低于 BPA 空白对照组($P < 0.05$),且其甲基化水平与 VOD 呈正相关($r_s = 0.245, P = 0.009$)。BPA 干预组 GPR54 片段 2 CpG 位点甲基化水平显著低于溶剂对照组,而 E2 组卵巢 ER β 基因甲基化水平显著高于溶剂对照组($P < 0.05$)。**结论** BPA 暴露可导致雌性幼鼠阴道开口(性早熟)提前,其下丘脑 GPR54 基因甲基化水平改变可能是毒性机制之一。

[关键词] 双酚 A;阴道开口时间;KISS-1/GPR54 基因;甲基化;雌性大鼠;性早熟**[中图分类号]** R114**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)19-3249-06

Molecular mechanism of hypothalamic KISS-1 and GPR54 gene methylation induced by bisphenol A exposure in female rats with precocious puberty*

LUO Xiaojuan¹, CAO Ke^{1△}, TAO Mingjun¹, CHEN Xiaowen², ZHANG Qin³,
PENG Gang⁴, CHEN Yunsheng¹(1. Department of Laboratory; 2. Department of Children Research Institute;
3. Department of Endocrinology; 4. Department of Adolescent Gynecology, Shenzhen
Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the molecular mechanism of hypothalamic KISS-1 and GPR54 gene methylation in female rats induced by bisphenol A (BPA) exposure. **Methods** The female Sprague-Dawley (SD) rats (21-days-old) were randomly divided into four groups: the BPA intervention group (0.25 mg/kg), the BPA blank control group (executed at the same time as the BPA intervention group), the 17 β -estradiol group (E2, 0.1 mg/kg) and the solvent control group (executed until vaginal opening appeared). The rats were given the intragastric administration for 10 consecutive days, and the vaginal opening day (VOD) was used as the observation end point. The rats were sacrificed on the day of vaginal opening. According to the 1:1 proportion, the rats of the blank control group were sacrificed during the death of the BPA group. The ovary and hypothalamus tissues of the rats were collected, the ovarian ER α , ER β and hypothalamic KISS-1 and GPR54 gene mRNA expression were measured by the real-time PCR. The gene methylation was detected by the pyrosequencing PCR. **Results** The VOD of the BPA intervention group and the E2 group was earlier than

* 基金项目:广东省深圳市科技研发资金(JCYJ20180228175408411);广东省深圳市卫生和计划生育系统科研项目(SZFZ2018054)。

作者简介:罗小娟(1983—),副主任技师,硕士,主要从事女性早熟相关激素和机制研究。△ 通信作者,E-mail:cocoa526878@126.com。

that of the solvent control group ($P < 0.05$), and there was no vaginal opening in the BPA blank control group at the time of death. The hypothalamic KISS-1 and GPR54 mRNA expressions in the BPA intervention group were significantly higher than that in the BPA blank control group ($P < 0.05$), but when compared with the solvent control group, there was no statistical significance ($P > 0.05$). The mRNA expression levels of the KISS-1 in the hypothalamus and ER β in the ovary in the E2 group were significantly lower than those in the solvent control group ($P < 0.05$). There was no statistical difference in the methylation level of the CPG locus of the KISS-1 gene in the hypothalamus between the BPA intervention group, the BPA blank control group, the E2 group and the solvent control group, while there was a significant difference in the methylation level of the GPR54 gene. The methylation level of the GPR54 fragment 1 CPG in the BPA intervention group, the E2 group and the solvent control group was significantly lower than that in the BPA blank control group (no vaginal opening at the time of death) ($P < 0.05$), the methylation level was positively correlated with the VOD ($r_s = 0.245, P = 0.009$). The methylation level of the GPR54 fragment 2 CPG in the BPA intervention group was significantly lower than that in the solvent control group, while the methylation level of ER β gene in ovary in the E2 group was significantly higher than that in the solvent control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The BPA exposure can lead to early vaginal opening (sexual precocity) in female rats, and the changes in the methylation level of the GPR54 gene in hypothalamus may be one of the toxic mechanisms.

[Key words] bisphenol A; vaginal opening day; KISS-1/GPR54 gene; methylation; female rats; sexual precocity

双酚 A(BPA)作为一种环氧树脂和聚碳酸酯塑料的重要化工原料,广泛存在于人类生活用品和生存环境中,并可通过消化道、呼吸道和皮肤等途径暴露于人类,引发公共健康和安全问题^[1-3]。近年来,女童性早熟发病率存在明显上升趋势,随着人体血液、尿液等生物标本 BPA 的检出,其对雌性个体青春发育和内分泌的干扰作用及对生殖系统的毒性机制,引起公众和学术界的广泛关注。有研究认为 BPA 通过拟雌激素样作用,干扰人类内分泌系统的平衡和生殖系统的正常发育和功能,可能与女童特发性中枢性早熟(ICPP)的发生、发展有关^[4-6],但其确切的致病机制尚未阐明。青春期启动与发育是遗传基因与环境因素共同作用的结果,新近研究认为 BPA 暴露可能通过干扰和改变 DNA 甲基化等基因表观遗传学方式影响生殖系统的正常发育和功能^[7-10]。下丘脑 KISS-1/GPR54 基因对促性腺轴的启动至关重要, KISS-1 基因编码蛋白 kisspeptin 通过与受体蛋白 GPR54 结合,可刺激 GnRH 释放而启动下丘脑-垂体-性腺轴(hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPGA),且其促性腺激素效应的基本位点在下丘脑 GnRH 神经元内,且是唯一通过 GPR54 介导的表达来实现。目前,国内外先后运用各种最新技术手段对 KISS-1/GPR54 基因变异和多态性进行检测分析,结果表明 KISS-1/GPR54 基因变异和多态性并不是导致性早熟的常见原因,提示可能存在环境因素通过表观遗传学机制上调 KISS-1/GPR54 基因的表达,进而刺激 GnRH 释放启动 HPGA 导致性早熟。

本研究采用动物模型以处于青春启动前关键期的雌性幼鼠(出生 21 d)作为研究对象,通过灌胃给予 BPA 染毒干预,以 17 β -雌二醇(E2)组作为阳性对照,

同时设立溶剂对照组,通过观察大鼠阴道开口时间(vaginal opening day, VOD, 雌性大鼠性早熟的标志),检测大鼠卵巢 ER α 、ER β mRNA 和下丘脑 KISS-1、GPR54 mRNA 表达和基因甲基化水平。探讨 BPA 暴露诱导雌性大鼠性早熟的 DNA 甲基化分子机制,对降低人类 BPA 暴露危害和女童性早熟等疾病的防治提供科学依据和参考价值。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

BPA(分析纯 99%),美国 Sigma 公司,玉米油(溶剂)购于益海嘉里投资有限公司,核酸分离纯化试剂盒购于广州洪祥生物医药科技有限公司,荧光定量 PCR 反应试剂盒购于日本 TaKaRa 公司,ER α 、ER β 、KISS-1、GPR54 引物由上海 Invitrogen 公司合成, DNA Methylation-Gold 试剂盒购于美国 ZYMO 公司,其他生化试剂及耗材等均购于上海生工生物工程股份有限公司。仪器:Localized Performance 超低温冰箱购于美国 Thermo Fisher 公司, Eppendorf 5418 低温高速离心机购于德国 Eppendorf 公司, Millipore-Q A10 超纯水仪购于美国 Millipore 公司,可见紫外分光光度计购于日本岛津公司, PyroMark Q24 焦磷酸测序仪购于美国 Qiagen 公司, ABI 7900 HT 荧光定量 PCR 仪购于美国 Life Tech 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物模型的建立

经检疫合格的清洁级 1 d 龄 SD 大鼠购自广东省医学实验动物中心,实验动物质量合格证明编号: 44007200025061,无特定病原体(SPF)级动物房饲养,饲养室温度、湿度等条件保持稳定,12 h 光照和黑暗循环、自由进食饮水,整个实验过程均喂以不含大豆

异黄酮等植物雌激素的加工饲料,仔鼠于 21 d 龄断乳称重,取 32 只雌性幼鼠,分成 4 组:BPA 干预组、BPA 空白对照组(以等体积不含 BPA 的玉米油灌胃处理,并与 BPA 干预组同时处死)、E2 组(17 β -estradiol 组,E2 组,0.1 mg/kg)和溶剂对照组(以等体积不含 BPA 的玉米油灌胃处理直至大鼠出现阴道开口再处死),以大鼠皮肤染色和笼具双重编号标记识别。根据既往研究报道^[11-12],BPA 干预浓度设为每天 0.25 mg/kg,在人群日常暴露范围内,每天以灌胃方式持续给药 10 d,溶剂对照组以相同方式给予等量玉米油。每 4 天称重 1 次,依据体重调整药物剂量。每天检查并记录大鼠阴道开口,并于阴道开口当天处死,处死 BPA 干预组时按等比例处死 BPA 空白对照组。留取大鼠下丘脑和卵巢组织置于-80 °C 超低温冰箱保存待测。本研究由广东省医学实验动物中心批准,符合动物伦理原则,将实验大鼠伤害降至最低,无虐待动物行为。

1.2.2 卵巢 ER α 、ER β mRNA 和下丘脑 KISS-1、GPR54 mRNA 表达水平检测

分别取出 30 mg 下丘脑和卵巢组织加入 1 mL TRIzol 充分研磨,按照 RNA 提取试剂盒说明书提取下丘脑和卵巢组织总 RNA,经紫外分光光度计检测核酸纯度,将 RNA 逆转录成 cDNA。根据 SYBR-Green Real-Time PCR Master Mix 试剂盒说明,对下丘脑 KISS-1、GPR54 和卵巢 ER α 、ER β 目的基因和管家基因 GAPDH 分别进行实时 PCR (real-time PCR),real-time PCR 反应体系:PCR Master Mix 10 μ L,正反向引物各 1 μ L,去离子水 6 μ L,cDNA 2 μ L,共 20 μ L。反应条件:95 °C 10 min;95 °C 15 s;60 °C 15 s;72 °C 30 s,共 50 个循环。72 °C 收集荧光,并行基因表达水平分析。各基因引物序列见表 1。

表 1 目的基因和管家基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
KISS-1	正向	211
	反向	
GPR54	正向	232
	反向	
ER α	正向	501
	反向	
ER β	正向	210
	反向	
GAPDH	正向	207
	反向	

1.2.3 卵巢 ER α 、ER β 和下丘脑 KISS-1、GPR54 启动子区甲基化水平测定

分别取卵巢和下丘脑组织经充分研磨,按照 DNA 提取试剂盒说明书分离纯化核酸,将提取的 DNA 置于-20 °C 冰箱内保存备用。亚硫酸氢盐转化和焦磷酸测序 PCR:基因组 DNA 经过亚硫酸氢盐处理,序列中未甲基化的胞嘧啶(C)转变为尿嘧啶(U),而甲基化的胞嘧啶保持不变。采用 CPGPLOT 软件预测目的基因 CpG 岛区域,针对上述基因 CpG 岛设计合成特异性引物扩增目的区段,按仪器和试剂说明书进行单链的分离纯化和焦磷酸测序。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。目的基因 CpG 位点甲基化水平(%) = mC/(mC+T),其中 mC 表示处于甲基化状态的 CpG 位点测序序列条数,T 表示处于非甲基化状态的 CpG 位点测序序列条数。

1.3 统计学处理

运用 SPSS13.0 软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析,组间比较用 LSD 法。不符合正态分布的计量资料以中位数和四分位间距[M(P₂₅, P₇₅)]表示,采用 Wilcoxon 秩和检验分析组间差异。采用秩相关分析 VOD 与目的基因 CpG 位点甲基化水平的相关性。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠 VOD 和体重比较

BPA 干预组和 E2 组 VOD 比溶剂对照组显著提前(P<0.05),E2 组较 BPA 干预组更早(P<0.05);第 1 次给药前各组大鼠体重相当(P>0.05),处死时 BPA 干预组、BPA 空白对照组和 E2 组体重显著低于溶剂对照组(与生存天数相关,P<0.05),BPA 干预组和 BPA 空白对照组间差异无统计学意义(P>0.05)。见表 2。

表 2 各组大鼠 VOD 和体重比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	第 1 次给药前 体重(g)	VOD (d)	处死时体重 (g)
BPA 干预组	31.13 \pm 2.64 ^{ab}	60.80 \pm 2.28	103.48 \pm 27.56 ^a
BPA 空白对照组	—	61.58 \pm 5.19	106.18 \pm 23.18 ^a
E2 组	25.13 \pm 0.35 ^a	60.78 \pm 4.12	98.92 \pm 11.31 ^a
溶剂对照组	35.13 \pm 2.03	61.27 \pm 4.02	139.26 \pm 8.76

^a:P<0.05,与溶剂对照组比较;^b:P<0.05,与 E2 组比较;—:此项无数据。

2.2 各组大鼠卵巢 ER α 、ER β 和下丘脑 KISS-1、GPR54 基因 mRNA 表达情况比较

BPA 干预组下丘脑 KISS-1、GPR54 mRNA 相对表达水平显著高于 BPA 空白对照组(P<0.05),但与溶剂对照组比较差异无统计学意义(P>0.05)。E2 组卵巢 ER β 和下丘脑 KISS-1 mRNA 相对表达水平

明显低于溶剂对照组 ($P < 0.05$)。E2 组和溶剂对照组下丘脑 GPR54 mRNA 相对表达水平显著高于 BPA 空白对照组 (处死时尚未出现 VOD, $P < 0.05$)。见表 3。

2.3 各组大鼠卵巢 ER α 、ER β 和下丘脑 KISS-1、GPR54 基因 CpG 位点甲基化水平比较

BPA 干预组、BPA 空白对照组、E2 组和溶剂对照组 4 组间比较,下丘脑 KISS-1 基因 CpG 位点甲基

化水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而 GPR54 基因 CpG 位点甲基化水平存在明显差异,其中 BPA 干预组、E2 组和溶剂对照组 GPR54 片段 1 CpG 位点甲基化水平显著低于 BPA 空白对照组 (处死时尚未出现 VOD, $P < 0.05$)。BPA 干预组 GPR54 片段 2 CpG 位点甲基化水平显著低于溶剂对照组,而 E2 组卵巢 ER β 基因 CpG 位点甲基化水平显著高于溶剂对照组 ($P < 0.05$),其余未见统计学差异。见表 4。

表 3 各组大鼠卵巢 ER α 、ER β 和下丘脑 KISS-1、GPR54 基因 mRNA 相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	ER α	ER β	KISS-1	GPR54
BPA 干预组	1.00 \pm 0.24	1.04 \pm 0.18	1.74 \pm 0.40 ^a	1.41 \pm 0.10 ^a
BPA 空白对照组	0.87 \pm 0.38	0.94 \pm 0.34	1.00 \pm 0.17	0.97 \pm 0.42
E2 组	0.92 \pm 0.19	0.56 \pm 0.18 ^b	1.16 \pm 0.15 ^b	1.38 \pm 0.32 ^a
溶剂对照组	0.86 \pm 0.32	1.04 \pm 0.26	1.69 \pm 0.40	1.40 \pm 0.24 ^a
F	0.06	3.85	2.36	1.57
P	0.978	0.006	0.021	0.034

^a: $P < 0.05$,与 BPA 空白对照组比较;^b: $P < 0.05$,与溶剂对照组比较。

表 4 各组大鼠卵巢 ER α 、ER β 和下丘脑 KISS-1、GPR54 基因 CpG 位点甲基化水平比较 [$M(P_{25}, P_{75}), \%$, $n=8$]

组别	ER α	ER β	KISS-1	GPR54 片段 1	GPR54 片段 2
BPA 干预组	2.01(1.86,2.25)	1.09(0.97,1.18)	0.91(0.62,1.27)	3.42(2.81,4.50) ^a	4.87(3.12,6.29) ^b
BPA 空白对照组	1.98(1.71,2.01)	1.12(1.03,1.21)	0.90(0.58,1.29)	4.83(3.41,5.32)	5.38(3.53,7.62)
E2 组	1.96(1.74,2.06)	1.26(1.17,1.34) ^b	0.89(0.59,1.28)	3.41(3.09,4.58) ^a	5.34(3.62,7.59)
溶剂对照组	1.99(1.79,2.13)	1.08(0.98,1.17)	0.91(0.61,1.31)	3.39(2.98,4.54) ^a	6.17(4.22,7.73)
Z	-0.855	-2.698	0.022	-2.411	-2.196
P	0.196	0.003	0.509	0.008	0.014

^a: $P < 0.05$,与 BPA 空白对照组比较;^b: $P < 0.05$,与溶剂对照组比较。

2.4 VOD 与各目的基因 CpG 位点甲基化水平的相关性

经秩相关分析,大鼠 VOD 与 GPR54 片段 1 CpG 位点甲基化水平之间呈正相关 ($r = 0.245, P = 0.009$),其余目的基因 CpG 位点甲基化水平与 VOD 之间未见明显相关 ($P > 0.05$),见表 5。

表 5 VOD 与各目的基因 CpG 位点甲基化水平的相关性

项目	ER α	ER β	KISS-1	GPR54 片段 1	GPR54 片段 2
r_s	0.070	0.077	-0.090	0.245	0.405
P	0.470	0.418	0.343	0.009	0.079

3 讨论

个体的生长发育和性成熟过程受基因、环境、营养和社会因素等影响^[13-14],近年来,环境内分泌干扰物 (environmental endocrine disrupting chemicals, EDCs) 对生殖健康和内分泌干扰作用备受关注。BPA 是世界上最高产量的有机化工原料之一,是一种常见且有代表性的 EDCs,具有类雌激素样内分泌干

扰作用和生殖毒性。本研究采用玉米油为溶媒,BPA 空白对照组采用和 BPA 干预组等体积的溶媒灌胃处理,同时设立溶剂对照组,旨在最大限度地减少溶媒对实验结果的影响,保证结论的可信性。研究结果显示,BPA 干预染毒可致处于青春启动前关键期的雌性幼鼠 VOD 提前,与国内外研究结果一致^[11,15-17],提示青春期前 BPA 暴露可促进青春期发育,导致雌性幼鼠性早熟。但是 BPA 引起性早熟的剂量效应关系有待进一步研究分析。据文献报道,EDCs 存在“U”效应现象,即在一定的剂量范围内,剂量-效应曲线的斜率可发生正负转换^[18]。

近年来,随着表观遗传学机制研究的显著进展,DNA 甲基化分子机制在“青春发育启动”这个兼有短期快速和长期缓慢调节特点的复杂生理现象中的调控作用备受关注^[19-20]。EDCs 等环境因素直接改变靶基因序列并不常见,而是主要通过改变靶基因启动子区 DNA 甲基化、组蛋白修饰和微 RNA (micro RNA) 介导等表观遗传学机制调控其转录和表达,启动子区 DNA 高甲基化能抑制转录因子与其结合,导致基因

表达抑制或沉默,从而发挥其毒性和干扰作用。动物研究表明,GnRH、ESR1 等 HPGA 相关基因启动子区甲基化水平改变可能导致青春发育启动时间提前^[21];新生小鼠 BPA 暴露可能通过改变细胞信号通路重要基因甲基化水平,导致成年后前列腺癌的患病风险增加;BPA 暴露水平与不孕症妇女外周血 DNA 甲基化水平相关^[22]。动物和人体研究均表明下丘脑 KISS-1/GPR54 基因系统是 HPGA 激活和青春期启动的关键环节,是 GnRH 神经元和 HPGA 的重要调控基因。本研究结果显示,GPR54 mRNA 表达和基因片段 1 CpG 位点甲基化水平在大鼠 VOD 出现与否组别间存在显著差异,即进入青春期大鼠下丘脑 GPR54 mRNA 表达和基因片段 1 CpG 位点甲基化水平较青春期前发生显著改变。且其甲基化水平与大鼠 VOD 之间存在正相关,推测 GPR54 基因片段 1 CpG 甲基化改变与大鼠青春期启动有关。另外,BPA 干预组 GPR54 片段 2 CpG 甲基化水平显著低于溶剂对照组,且其 mRNA 表达水平显著高于 BPA 空白对照组,提示 GPR54 片段 2 CpG 位点甲基化水平降低和 mRNA 表达增加,可能是 BPA 暴露诱导雌性大鼠性早熟的表现遗传调控机制之一。

本研究发现,BPA 干预组 KISS-1 mRNA 表达水平显著高于空白对照组,但 KISS-1 基因 CpG 位点甲基化水平在 4 组(BPA 干预组、BPA 空白对照、E2 组和溶剂对照组)间差异并无统计学意义($P>0.05$),这可能与 KISS-1 基因上游调控因子的转录抑制有关。LOMNICZI 等^[23]对雌鼠青春发育启动机制研究结果证实,大鼠下丘脑 PcG 蛋白是 KISS-1 基因的转录抑制因子和主要抑制蛋白。大鼠在青春期启动关键期,下丘脑 PcG 蛋白关键基因甲基化增强导致 PcG 蛋白表达下降,对 KISS-1 基因的转录抑制减少,引起 KISS-1 基因表达增强从而激活青春期的启动。如果 PcG 蛋白关键基因启动子的甲基化被抑制,大鼠则无法进入青春期发育。因此,推测 BPA 可能通过 DNA 甲基化机制作用于大鼠下丘脑 PcG 蛋白关键基因启动子区 CpG 位点,导致 PcG 蛋白关键基因抑制或沉默,继而 PcG 蛋白阻断转录活化因子与 KISS-1 基因启动子区结合的功能下调,PcG 蛋白抑制 KISS-1 基因转录作用减弱,从而使得 KISS-1 基因转录增强。也即,BPA 暴露诱导雌性大鼠性早熟的表现遗传学机制,并不是直接通过改变 KISS-1 基因 CpG 位点甲基化实现,提示青春期启动涉及兴奋和抑制双向有序调节的多基因功能网络系统,其明确机制有待进一步实验研究和验证。

本研究将 E2 干预组作为大鼠 VOD 提前的阳性对照^[24]。结果显示,E2 组 VOD 提前较 BPA 干预组更早,E2 干预组大鼠卵巢 ER β 基因 mRNA 表达和 CpG 位点甲基化水平均与溶剂对照组间存在显著差异,且 E2 下丘脑 KISS-1 mRNA 表达水平明显低于

溶剂对照组。表明 E2 暴露可通过改变 ER β 基因 CpG 位点甲基化水平,从而下调卵巢 ER β 基因 mRNA 表达水平。卵巢 ER α 作用以引起卵泡细胞增殖为主,而 ER β 则是卵巢组织中雌激素发挥作用的重要受体和途径^[25]。推测雌性幼鼠给予高浓度 E2 干预,一方面可通过 ER β 基因 CpG 位点甲基化机制下调 ER β 表达水平,另一方面可能导致下丘脑 KISS-1 基因神经元应对性激素正反馈通路破坏导致 KISS-1 mRNA 表达水平下降,最终干扰和破坏 HPGA 的正常功能。

综上所述,本研究初步探讨了 BPA 暴露诱导雌性大鼠性早熟的下丘脑 KISS-1 和 GPR54 基因甲基化分子机制,提示下丘脑 GPR54 基因甲基化水平改变可能是 BPA 生殖毒性机制之一。笔者期待 DNA 甲基化和组蛋白修饰结合特定细胞群分离术等先进技术,以表观遗传学发病机制为突破口,揭示 BPA 等内分泌干扰素与内分泌疾病和性发育异常的关系,以指导人类更好地应对内分泌干扰素暴露和相关疾病的防治。

参考文献

- [1] FENICHEL P, CHEVALIER N, BRUCKER-DAVIS F. Bisphenol A: an endocrine and metabolic disruptor [J]. *Ann Endocrinol*, 2013, 74 (3): 211-220.
- [2] BERGMAN A, HEINDEL J J, KASTEN T, et al. The impact of endocrine disruption: a consensus statement on the state of the science [J]. *Environ Health Perspect*, 2013, 121 (4): A104-A106.
- [3] COSTA E M, SPRITZER P M, HOHL A. Effects of endocrine disruptors in the development of the female reproductive tract [J]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2014, 58 (2): 153-161.
- [4] LEONARDI A, COFINI M, RIGANTE D, et al. The effect of bisphenol a on puberty: a critical review of the medical literature [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14 (9): 1044.
- [5] DURMAZ E, ASÇI A, ERKEKOGLU P, et al. Urinary bisphenol a levels in girls with idiopathic central precocious puberty [J]. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 2014, 6 (1): 16-21.
- [6] KWON A, CHAE H, LEE K H, et al. Serum Kisspeptin and bisphenol a levels in girls with central precocious puberty [J]. *J Korean Med Sci*, 2011, 26 (7): 927-931.
- [7] PRUSINSKI L, AL-HENDY A, YANG Q. De-

- velopmental exposure to endocrine disrupting chemicals alters the epigenome: Identification of reprogrammed targets[J]. *Gynecol Obstet Res*, 2016, 3(1):1-6.
- [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.
- [9] JORGENSEN E M, ALDERMAN M H, TAYLOR H S. Preferential epigenetic programming of estrogen response after in utero xenoestrogen (bisphenol-A) exposure [J]. *FASEB J*, 2016, 30(9):3194-3201.
- [10] ONUZULU C D, ROTIMI O A, ROTIMI S O. Epigenetic modifications associated with in utero exposure to endocrine disrupting chemicals BPA, DDT and Pb [J]. *Rev Environ Health*, 2019, 34(4):309-325.
- [11] 杨帆, 陈临淇, 金美芳, 等. 新生儿期不同剂量双酚 A 暴露对雌性大鼠青春发育的影响 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2014, 16(7):754-758.
- [12] 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.
- [13] LIVADAS S, CHROUSOS G P. Control of the onset of puberty [J]. *Curr Opin Pediatr*, 2016, 28(4):551-558.
- [14] LEKA-EMIRI S, CHROUSOS G P, KANAKA-GANTENBEIN C. The mystery of puberty initiation: genetics and epigenetics of idiopathic central precocious puberty (ICPP) [J]. *J Endocrinol Invest*, 2017, 40(8):789-802.
- [15] WANG X, CHANG F, BAI Y, et al. Bisphenol A enhances kisspeptin neurons in periventricular nucleus of female [J]. *J Endocrinol*, 2014, 221(2):201-213.
- [16] NAH W H, PARK M J, GYE M C. Effects of early prepubertal exposure to bisphenol-A on the onset of puberty, ovarian weights, and estrous cycle in female mice [J]. *Clin Exp Reprod Med*, 2011, 38(2):75-81.
- [17] CHUNG Y H, HAN J H, LEE S B, 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.
- [18] MINATOYA M, ITOH S, YAMAZAKI K, et al. Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and behavioral problems in children at preschool age: the Hokkaido Study on Environment and Children's Health [J]. *Environ Health Prev Med*, 2018, 23(1):43.
- [19] SMITH Z D, MEISSNER A. DNA methylation: roles in mammalian development [J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(3):204-220.
- [20] AVENDANO M S, VAZQUEZ M J, TENA-SEMPERE M. Disentangling puberty: novel neuroendocrine pathways and mechanisms for the control of mammalian puberty [J]. *Human Reproduction Update*, 2017, 23(6):737-763.
- [21] KURIAN J R, LOUIS S, KEEN K L, et al. The methylcytosine dioxygenase ten-eleven translocase-2 (tet2) enables elevated GnRH gene expression in maintenance of male reproductive function [J]. *Endocrinology*, 2016, 157:3588-3603.
- [22] HANNA C W, BLOOM M S, ROBINSON W P, et al. DNA methylation changes in whole blood is associated with exposure to the environmental contaminants, mercury, lead, cadmium and bisphenol-A, in women undergoing ovarian stimulation of IVF [J]. *Hum Reprod*, 2012, 27:1401-1410.
- [23] LOMNICZI A, LOCHE A, CASTELLANO J M, et al. Epigenetic control of female puberty [J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16(3):281-289.
- [24] LOSA-WARD S M, TODD K L, MCCAFFREY K A, et al. Disrupted organization of RFamide pathways in the hypothalamus is associated with advanced puberty in female rats neonatally exposed to bisphenol A [J]. *Biol Reprod*, 2012, 87(2):28.
- [25] BOTTNER M, THELEN P, JARRY H. Estrogen receptor beta: tissue distribution and the still largely enigmatic physiological function [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014, 139:245-251.