· 实验研究 ·

DEHP 对大鼠海马神经元树突和突触形态发育影响*

王文波，陆阳，徐晓虹

摘　要：目的　探讨邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯[di-2-ethylhexyl)phthalate，DEHP]对大鼠海马神经元树突和突触形态发育的影响。**方法**　体外培养 5 d 的新生大鼠海马神经元 DEHP 暴露 5 d 后，激光共聚焦显微镜下观察免疫荧光染色后的神经元，分析树突丝、树突棘和突触密度，采用 Western blot 法检测突触蛋白表达水平。**结果**　0.10、1、10 μmol/L DEHP 显著下调体外培养海马神经元的树突丝、树突棘和突触密度；与对照组比较，1 μmol/L DEHP 组海马神经元树突丝、树突棘和突触密度[分别为(6.23 ± 0.19)、(4.91 ± 0.09)、(4.04 ± 0.13)个/20 μm]明显下降($P < 0.01$)，该作用可被雌激素受体阻断剂 ICI182，780 部分消除($P < 0.01$)；1 μmol/L DEHP 还可拮抗 0.01 μmol/L 17β-E2 对树突和突触密度的促进作用($P < 0.01$)；Western blot 分析结果显示，与对照组比较，1 μmol/L DEHP 神经细胞突触蛋白 synapsin I、PSD-95、N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体亚基 NR2B、磷酸化胞外调节蛋白激酶(p-ERK)1/2 表达[分别为(0.53 ± 0.08)、(0.75 ± 0.03)、(0.66 ± 0.06)、(0.67 ± 0.02)]明显降低($P < 0.01$)。**结论**　DEHP 可能由雌激素受体介导抑制大鼠海马神经元树突和突触形态发育，其机制可能与突触蛋白和 NMDA 受体表达水平下降及 ERK1/2 信号通路抑制有关。

关键词：邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯(DEHP)；树突；突触；胞外调节蛋白激酶(ERK)；雌激素受体
中图分类号：R 114　**文献标志码**：A　**文章编号**：1001-0580(2016)11-1476-05　DOI：10.11847/zgggws2016-32-11-07

DEHP inhibits morphological development of dendrite and synapse of hippocampal neurons in rats

WANG Wen-bo, LU Yang, XU Xiao-hong (*Institute of Ecology, Chemistry and Life Sciences College, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang Province* 321004, China)

Abstract: Objective　To investigate the effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on dendritic and synaptic morphology of hippocampal neurons in rats. **Methods**　Cultured hippocampal neurons of rats at day 5 *in vitro* were exposed to DEHP for 5 days. After immunofluorescence staining, the neurons were morphologically observed under confocal laser scanning microscope, and the densities of dendritic filopodia, dendritic spine and synapse were analyzed. Furthermore, the expression level of synapsin was detected with Western blot. **Results**　Exposures to DEHP at 100 nM, 1 μM, and 10 μM for 5 days significantly reduced the densities of dendritic filopodia, spine, and synapse in the cultured hippocampal neurons. Compared with the control, the densities of dendritic filopodia, spine, and synapse after DEHP treatment at 1 μmol/L significantly reduced to 6.23 ± 0.19, 4.91 ± 0.09, and 4.04 ± 0.13/20 μm, respectively ($P < 0.01$ for all). However, the inhibitive effect was partly rescued by ICI 182,780, an inhibiter of estrogen receptor ($P < 0.01$). DEHP antagonized promotive effect of 17β-estradiol (17β-E2) on the morphological development of dendrite and synapse when DEHP was combined with 17β-E2 ($P < 0.01$). Furthermore, decreased expressions of synapsin I (0.53 ± 0.08), post synaptic density protein 95 (PSD-95) (0.75 ± 0.03), N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor 2B subunit (NR2B) (0.66 ± 0.06), and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 (0.67 ± 0.02) were found after 1 μM of DEHP treatment ($P < 0.01$ for all). **Conclusion**　DEHP may inhibit the development of dendritic and synaptic morphology of hippocampal neurons in rats through estrogen receptors, and decreased expressions of synaptic proteins and NMDA receptors and the inhibition of ERK1/2 signaling may be involved in the inhibitions, suggesting that DEHP has a toxic effect on the development of neurons.

Key words: di-(2-ethylhexyl) phthalate; dendry; synapse; extracellular signal-regulated kinase; estrogen receptor

邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯[di-(2-ethylhexyl) phthalate，DEHP]是一种大量应用于各种塑料产品的邻苯二甲酸酯类(phthalic acid esters，PAEs)增塑剂，使人和野生动物不可避免地暴露于 DEHP 环境[1]。DEHP 具有拟雌激素和抗雄激素活性，长期暴露可导致内分泌、生殖和神经系统功能紊乱而危害健康[2]。研究发现，围生期母体暴露于 DEHP 可损伤仔鼠空间学习记忆能力，并加剧其焦虑和抑郁样行为[3-4]，提示发育中的脑对 DEHP 很敏感。突触是介导神经元间信息传递的特殊部位，其结构和功能直接决定动物的神经行为。神经元的树突是形成突触后的关键成分，决定神经元的突触传递效

* **基金项目**：国家自然科学基金(81472935；81172627)
作者单位：浙江师范大学化学与生命科学学院，浙江 金华 321004
作者简介：王文波(1991 -)，女，内蒙古赤峰人，硕士在读，研究方向：神经毒理学。
通讯作者：徐晓虹，E-mail：xuxh63@zjnu.cn
数字出版日期：2016 - 2 - 23 8：12
数字出版网址：http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160223.0812.020.html

率[5],在学习记忆中发挥重要作用。研究表明,雌激素可通过促进海马和皮层的新树突棘和突触形成而调节突触可塑性[6-8]。本研究利用体外培养的新生大鼠海马神经元,探讨 DEHP 对神经元树突和突触形态发育的影响及其机制。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　SD 大鼠乳鼠(浙江医学科学院实验动物中心),许可证号:SCXK(浙)2014 - 0001;Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)培养基(美国 Gibco Invitrogen 公司),胰蛋白酶、L - 谷氨酰胺(美国 Amresco 公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程公司),多聚赖氨酸(美国 Sigma 公司),雌激素受体(ER)阻断剂 ICI182,780(美国 Tocris 公司),硝酸纤维素膜(武汉博士德公司),β - actin一抗(美国 Santa Cruz 公司),胞外调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)1/2、synapsin I(美国 Cell signaling Technology 公司)。Leica TCS - SP5 激光共聚焦扫描显微镜(德国徕卡公司),Meta Morph 软件(美国 Molecular Devices 公司)。

1.2　海马神经元原代培养　海马神经元取自新生 24 h 内乳鼠海马组织,置于含 5 mL 预冷 DMEM 培养基的玻璃瓶内剪碎,移除培养基,加入 0.125% 胰蛋白酶培养箱中 37 ℃消化 30 min,加入 2 倍胰酶体积含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化,1 000 r/min 4 ℃离心 5 min。将神经细胞悬浮于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,种植在 35 mm 培养皿内包被了多聚赖氨酸的玻片上(5 mm × 5 mm),用于形态学观测的细胞密度为(1 ~ 2) × 10^4 cells/cm^2;用于 Western blot 分析的细胞种植于包被了多聚赖氨酸的培养板内,细胞密度为 2 × 10^5 cells/cm^2。5% CO_2 37 ℃孵育 4 h 后,换上含 2% B27 和 0.5 mmol/L L - 谷氨酰胺的 neurobasal 培养基继续培养,每 3 d 半量换液 1 次,培养至第 10 天。

1.3　分组与处理　海马神经元培养至第 5 天时,加入终浓度为 0.01、0.10、1.00、10.00 μmol/L DEHP(此时树突棘尚未出现,树突丝是树突干上主要的突起);对照组加入终浓度 < 0.01% 二甲基亚砜;DEHP 暴露时间为 5 d。17β 雌二醇组(17β-estradiol, 17β-E2 终浓度 0.01 μmol/L),与 DEHP 一起处理细胞;雌激素受体阻断剂 ICI 组(ICI182,780 终浓度 5 μmol/L)预处理神经元 30 min 后,再加入 DEHP 染毒处理。台盼蓝分析,所有神经元成活率在 92.7% ~93.6% 之间。

1.4　指标与方法

1.4.1　免疫细胞染色　取处理后海马神经元,用预温的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS; 0.01 mmol/L, pH 7.4)漂洗 3 次后,4% 多聚甲醛固定神经细胞 20 min;加入 0.3% Triton X - 100 通透细胞 5 min,加入 1% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)室温下孵育 1 h。若是 synapsin I 和 filamentous-actin(F-actin)双染,神经细胞先结合用 1% BSA 稀释的 synapsin I 多克隆一抗(1:100)后,在 4 ℃孵育过夜;PBS 漂洗后,结合 Alexa 488 荧光标记的二抗,暗室孵育 1 h;PBS 漂洗后,暗室孵育罗丹明标记的鬼笔环肽(1:25)以显示 F-actin。PBS 漂洗后,所有玻片倒置于加适量抗荧光淬灭封片液的载玻片上,封片。

1.4.2　神经元树突及突触分析　将样品置于激光共聚焦扫描显微镜下观察,分别设置波长为 488 nm 和 543 nm 的激光器激发绿色和红色荧光,选用 63 × 物镜;采集红色、绿色和红绿荧光叠加的 3 组图片,所有图片扫描分辨率为 512 × 512 pixel。为避免相近波长之间相互干扰,采用序列扫描模式采集图像,设置通道 1 为标记 synapsin I 的绿色荧光,通道 2 为标记 F-actin 的红色荧光。F-actin 是突触部位主要的骨架蛋白,F-actin 染色可敏感标记树突形态,其与突触前 synapsin I 免疫荧光共标记显示突触位置。体外培养 7 d 前的神经细胞树突干上主要生长树突丝,然后逐渐形成树突棘。树突丝长度大于 2 μm,具有指状尖端;树突棘长度为 0.5 ~ 2 μm,直径约为 0.5 μm,或具有球状顶端突起。测量树突丝/棘密度时,随机选取神经细胞 3 ~ 5 支二级树突,计数 20 μm 树突上的树突丝或树突棘数目,以平均值作为该细胞的树突丝/棘密度;测量突触密度时,每个神经细胞随机选取 3 ~ 5 支二级树突,分析 20 μm树突上红、绿色荧光叠加区域的个数,以平均值作为该细胞的突触密度。参考相关文献共测算来自 3 个独立皿的 35 个细胞[9]。所有图像使用 Meta Morph 软件进行分析。

1.4.3　神经元突触蛋白表达检测　采用 Western blot 法,DEHP 处理后神经细胞用 4 ℃ PBS 迅速漂洗,加入细胞裂解液(1% NP - 40, 50 mmol/L 4 - 羟乙基哌嗪乙磺酸(2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine] ethanesulfonic acid, HEPES), pH 7.4, 2 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 4 ℃ 12 000 g 离心 30 min,样品(20 μg)用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,同时用预染 Marker 标记目标蛋白位置,将蛋白转至硝酸纤维素膜上,再用 TBS-Tween 20 配制的 5% 脱脂奶粉于 37 ℃封闭2 h,一抗 β-actin(1:800)、ERK1/2、p-ERK1/2 (1:800)、synapsin I(1:2 000)、PSD-95(1:1 000)、N-甲基-D-

天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA)受体亚基 NR2B(1∶700)于 37 ℃孵育2 h,TBS-Tween 20 漂洗 10 min×3 次;37 ℃孵育辣根过氧化物酶连接的二抗 1.5 h,TBS-Tween 20 洗膜,化学发光免疫标记目标蛋白;β-actin 作为内参,用 Quantity One 分析软件定量分析目的蛋白条带的光密度值。

1.5　统计分析　数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　DEHP 对海马神经元树突和突触形态发育影响(表 1)　与对照组比较,0.10、1.00、10.00 μmol/L DEHP 组神经元树突丝密度树突棘密度明显下降,差异有统计学意义($P<0.01$);与对照组比较,0.10、1.00、10.00 μmol/L DEHP 组神经元突触密度明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1　DEHP 对海马神经元树突丝/棘和突触密度影响($\bar{x} \pm s, n=35$)

组别 (μmol/L)		树突丝密度 (个/20 μm)	树突棘密度 (个/20 μm)	突触密度 (个/20 μm)
对照组		10.52 ± 0.11	9.09 ± 0.14	7.98 ± 0.12
DEHP	0.01	10.21 ± 0.09	8.79 ± 0.11	7.63 ± 0.16
	0.10	8.85 ± 0.10[a]	7.49 ± 0.10[a]	6.80 ± 0.09[b]
	1.00	6.23 ± 0.19[a]	4.91 ± 0.09[a]	4.04 ± 0.13[a]
	10.00	5.81 ± 0.06[a]	4.03 ± 0.08[a]	3.58 ± 0.15[a]

注:与对照组比较,a $P<0.01$,b $P<0.05$。

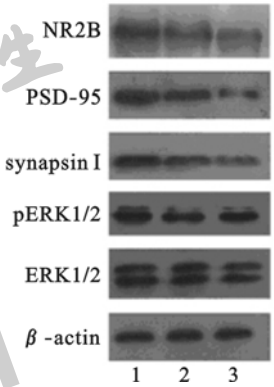
2.2　ERs 介导 DEHP 对神经元树突和突触发育影响(表 2)　结果显示,与 1 μmol/L DEHP 组比较,ICI 组神经元树突丝、树突棘和突触密度明显升高($P<0.01$);与 17β-E2 组(0.01 μmol/L)比较,1 μmol/L DEHP + 0.01 μmol/L 17β-E2 组神经元树突丝、树突棘及突触密度明显下降($P<0.01$)。提示,DEHP 具有拮抗雌激素对树突和突触形态发育的促进作用,而 estrogen receptor(ER)可能介导 DEHP 对树突和突触发育的抑制作用。

2.3　DEHP 对海马神经元突触蛋白和 p-ERKs 表达水平影响(图 1、表 3)　结果显示,与对照组比较,0.10、1.00 μmol/L DEHP 组神经元 synapsin I、post synaptic density protein 95(PSD-95)和 N-methyl-D-aspartate receptor 2B subunit(NR2B)表达水平均下降($P<0.01$);与对照组比较,DEHP 组神经元 ERK1/2 蛋白表达水平无明显变化,DEHP 组神经元 p-ERK 表达水平明显下调($P<0.01$)。提示 DEHP 抑制海马树突和突触发育可能与其下调神经元 ERKs 信号通路表达有关。

表 2　ERs 介导 DEHP 对神经元树突和突触密度影响($\bar{x} \pm s, n=35$)

组别 (μmol/L)		树突丝密度 (个/20 μm)	树突棘密度 (个/20 μm)	突触密度 (个/20 μm)
对照组		10.59 ± 0.16	9.04 ± 0.13	8.11 ± 0.13
DEHP	1.00	6.11 ± 0.17[a]	4.86 ± 0.08[a]	4.10 ± 0.11[a]
17β-E2	0.01	13.63 ± 0.15[a]	12.03 ± 0.14[a]	10.74 ± 0.20[a]
DEHP + 17β − E2		9.11 ± 0.19[bd]	7.58 ± 0.11[bd]	6.65 ± 0.18[ad]
ICI	5	10.13 ± 0.27	8.83 ± 0.23	8.04 ± 0.20
ICI + DEHP		8.88 ± 0.18[bc]	7.31 ± 0.17[ac]	6.54 ± 0.14[ac]

注:与对照组比较,a $P<0.01$,b $P<0.05$;与 DEHP 组比较,c $P<0.01$;与 17β-E2 组比较,d $P<0.01$。



注:1:对照组;2、3:0.10、1.00 μmol/L DEHP 组。

图 1　DEHP 对海马神经元突触蛋白和 p-ERKs 表达水平影响

表 3　DEHP 对海马神经元突触蛋白和 p-ERKs 表达水平影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

突触蛋白	对照组	DEHP(μmol/L)	
		0.10	1.00
NR2B	1.23 ± 0.06	0.92 ± 0.18[a]	0.66 ± 0.06[a]
synapsin I	1.21 ± 0.05	0.73 ± 0.08[a]	0.53 ± 0.08[a]
PSD-95	1.65 ± 0.03	0.93 ± 0.02[a]	0.75 ± 0.03[a]
p-ERKs	2.12 ± 0.05	1.56 ± 0.04[a]	1.50 ± 0.03[a]
ERKs	2.33 ± 0.07	2.29 ± 0.05	2.24 ± 0.06
p-ERKs/ERKs	0.91 ± 0.03	0.68 ± 0.03[a]	0.67 ± 0.02[a]

注:与对照组比较,a $P<0.01$。

3　讨　论

海马脑区与学习记忆密切相关,是性激素调节突触可塑性的重要靶位。最近发现,在大鼠出生后 16~22 d 暴露于环境内分泌干扰物(DEHP)显著降低雄鼠海马 CA3 区轴突标志物以及齿状回和 CA3 区成熟和未成熟神经元密度[10]。本研究结果显示,DEHP 暴露 5 d,海马神经元树突丝、树突棘和突触密度明显下降,该作用可被雌激素受体阻断剂 ICI182,780 部分消除;同时 DEHP 可拮抗 E2 对树突丝、树突棘和突触密度的促进作用。提示,DEHP 暴露可抑制海马神经元树突和突触形态发育。

中国公共卫生 CPH

树突丝和树突棘是树突干上主要突起,在神经元发育早期,树突丝通过快速伸缩运动,参与树突棘和突触形成;随后,树突丝密度下降,而树突棘和突触密度增加。精确突触连接是神经元之间网络功能发育的关键,而形态学上的变化可改变突触间传递效能[11]。树突形态和突触可塑性对雌激素敏感,可随大鼠动情周期血清雌激素水平波动而变化[11]。本研究结果显示,17β-E2 可显著增加海马神经元树突丝/棘和突触密度;与 17β-E2 组比较,DEHP + 17β-E2 组神经元树突丝/棘和突触密度明显下降,提示 DEHP 具有拮抗雌激素作用。DEHP 是一类具有弱雌激素和抗雄激素活性的内分泌干扰物,DEHP 可降低大鼠血清雌激素水平并抑制排卵[12]。体外研究显示,DEHP 及其主要代谢产物邻苯二甲酸单-2-乙基己酯[mono(2-ethylhexyl)phthalate, MEHP]与 E2 共同处理均可抑制体外窦状卵泡生长并降低其雌激素水平[13]。这可能与 DEHP 抑制雌激素的合成有关,MEHP 可干扰编码芳香化酶的基因转录而影响雄激素转化成雌激素的关键酶——芳香化酶的合成而影响体内雌激素的正常水平[14]。本研究结果表明,DEHP 暴露前先用 ER 阻断剂 ICI 182,780 预处理,可部分消除 DEHP 对树突和突触形态发育的抑制作用,提示 ER 可能参与 DEHP 对海马神经元形态发育影响过程。

Synapsin I 是突触前蛋白,主要调节突触囊泡移动并聚集到活性带区域而调控神经递质的释放,同时也参与突触形成[15]。Synapsin I 基因缺失的小鼠突触前活性带囊泡密度降低[16]。PSD-95 是突触后的脚手架蛋白,能锚定受体和下游信号分子于突触后致密区,为突触受体活动和稳定性所必需[17]。PSD-95 基因敲除小鼠树突棘形态变化和棘稳定性均减弱,长时程增强(long-term potentiation, LTP)诱导受阻,而过表达 PSD-95 的小鼠树突棘密度增加,微小兴奋性突触后电流增大[18]。NMDA 受体在突触传递和可塑性中发挥重要作用,其中突触上的 NMDA 受体含 NR2B 亚基[19]。研究显示,含 NR2B 的 NMDA 受体介导海马的 LTP[20]。前脑过表达 NR2B 的转基因小鼠突触可塑性增强,动物学习能力升高[19]。本研究结果显示,DEHP 可明显下调 synapsin I、PSD-95、和 NMDA 受体 NR2B 亚基表达水平。提示 DEHP 暴露下调突触蛋白 synapsin I、PSD-95 和 NMDA 受体 NR2B 表达可能与其抑制树突和突触发育有关。

胞外调节蛋白激酶(ERKs)是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族成员之一,参与调节突触可塑性和学习记忆[21]。阻断 ERKs 信号通路可抑制海马长时程抑制(long-term depression, LTD)的诱导[22]。研究显示,ERK1/2 参与脑内雌激素和环境雌激素对中枢神经系统的作用[23]。神经末梢的 synapsin I 是 ERKs 的主要底物,轴突末梢的 ERK 激活可磷酸化 synapsin I 而调控突触囊泡的分配和回收[15]。NMDA 诱发皮质神经元 ERKs 磷酸化主要由含 NR2B 的 NMDA 受体介导[24]。本研究结果显示,DEHP 暴露对海马神经元 ERK1/2 表达无明显影响,但明显降低 ERK1/2 磷酸化水平。表明 DEHP 可能通过抑制 ERKs 信号通路激活,降低突触蛋白表达水平,从而抑制海马神经元树突和突触形态发育。

参考文献

[1] Lyche JL, Gutleb AC, Berginan A, et al. Reproductive and developmental toxicity of phthalates[J]. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2009, 12: 225 – 249.

[2] Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J. Phthalates: toxicology and exposure[J]. Int J Hyg Environ Health, 2007, 210: 623 – 634.

[3] Dai Y, Yang Y, Xu X, et al. Effects of uterine and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate on spatial memory and NMDA receptor of hippocampus in mice[J]. Hormones and Behavior, 2015, 71: 41 – 48.

[4] Xu X, Yang Y, Wang R, et al. . Perinatal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate affects anxiety- and depression-like behaviors in mice[J]. Chemosphere, 2015, 124: 22 – 31.

[5] Kayser MS, Nolt MJ, Dalva MB. EphB receptors couple dendritic filopodia motility to synapse formation[J]. Neuron, 2008, 59: 56 – 69.

[6] Srivastava DP, Woolfrey K, Jones KA, et al. Rapid enhancement of two-step wiring plasticity by estrogen and NMDA receptor activity[J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 2008, 105: 14650 – 14655.

[7] Li C, Brake WG, Romeo RD, et al. Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice[J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 2004, 101: 2185 – 2190.

[8] Liu F, Day M, Munñiz LC, et al. Activation of estrogen receptor-regulated hippocampal synaptic plasticity and improves memory [J]. Nat Neurosci, 2008, 11: 334 – 343.

[9] Xu X, Lu Y, Zhang G, et al. Bisphenol A promotes dendritic morphogenesis of hippocampal neurons through estrogen receptor-mediated ERK1/2 signal pathway[J]. Chemosphere, 2014, 96(8): 129 – 137.

[10] Smith CA, Macdonald Holahan MR. Acute postnatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate adversely impacts hippocampal development in the male rat[J]. Neuroscience, 2011, 193: 100 – 108.

[11] Yuste R, Bonhoeffer T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity[J]. Annu Rev Neurosci, 2001, 24: 1071 – 1089.

[12] Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ. Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1994, 128: 216 – 223.

[13] Gupta RK, Singh JM, Leslie TC, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate inhibit growth and reduce estradiol levels of antral follicles *in vitro*[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2010, 242: 224 – 230.

[14] Davis BJ, Weaver R, Gaines LJ, et al. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol production independent of FSH-cAMP stimulation in rat granulose cells[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1994, 128: 224 – 228.

[15] Chi P, Greengard P, Ryan TA. Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin I phosphorylation pathways at different frequencies[J]. Neuron, 2003, 38: 69 – 78.

[16] Shupliakov O, Haucke V, Pechstein A. How synapsin I may cluster synaptic vesicles[J]. Semin Cell Dev Biol, 2011, 22(4):

393 – 399.
[17] Kim E, Sheng M. PDZ domain proteins of synapses[J]. Nat Rev Neurosci, 2004, 5: 771 – 781.
[18] Ehrlich I, Klein M, Rumpel S, et al. PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization [J]. Proc Natl Acad Sciences USA, 2007, 104(10): 4176 – 4181.
[19] Kim MJ, Dunah AW, Wang YT, et al. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking[J]. Neuron, 2005, 46: 745 – 760.
[20] Kohr G, Jensen V, Koester HJ, et al. Intracellular domains of NMDA receptor subtypes are determinants for long-term potentiation induction[J]. J Neurosci, 2003, 23(34): 10791 – 10799.
[21] Sweatt J. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory[J]. Curr Opin Neurobiol, 2004, 14: 311 – 317.
[22] Tang YP, Shimizu E, Dube GR, et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice[J]. Nature, 1999, 401(6748): 63 – 69.
[23] Thiels E, Kanterewicz BI, Norman ED, et al. Long-term depression in the adult hippocampus *in vivo* involves activation of extra-cellular signal-regulated kinase and phosphorylation of Elk-1 [J]. J Neurosci, 2002, 22: 2054 – 2062.
[24] Xu Y, Dong S, Zhou Q, et al. The effect of mechanical stimulation on the maturation of TDSCs-poly(L-lactide-co-ecaprolactone)/collagen scaffold constructs for tendon tissue engineering [J]. Biomaterials, 2014, 35(9): 2760 – 2772.

收稿日期: 2015-10-08 (解学魁编辑 郑新校对)

· 实验研究 ·

TLR4 与胰岛素抵抗小鼠主动脉炎性细胞因子表达*

饶小娇, 于曼丽, 朱晓波, 郝敏, 常晓彤

摘 要: 目的 探讨 Toll 样受体 4(TLR4)对小鼠胰岛素抵抗的作用及对主动脉炎性细胞因子的影响。**方法** 选取出生 21 d 雄性 C57BL/6 小鼠 45 只,随机分为 3 组,每组 15 只,对照组(基础饲料)、高脂对照组和 TAK – 242 组(给予高脂饲料);7 个月后,行葡萄糖耐量试验(GTT)和胰岛素耐量试验(ITT);TAK – 242 组(胰岛素抵抗小鼠)给予 TLR4 抑制剂 TAK – 242 干预 5 个月,采血进行 GTT 和 ITT 后,处死小鼠,收集血清和主动脉组织标本;采用实时荧光定量 PCR 方法检测小鼠主动脉组织 TLR4 的表达及其下游肿瘤坏死因子 α(TNF – α)和白细胞介素 – 6(IL – 6)含量;采用全自动生化分析仪测定血清总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL – C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL – C)和甘油三酯(TG)含量。**结果** 与对照组比较,高脂组小鼠在高脂饲喂 3 个月后体重明显升高,7 个月后小鼠调节血糖能力受损,胰岛素敏感性降低;TAK – 242 干预 5 个月后,与高脂对照组比较,TAK – 242 组小鼠葡萄糖调节能力和胰岛素敏感性均有所改善;与对照组比较,高脂对照组与 TAK – 242 组小鼠血清中 TG、TC、LDL – C、HDL – C 水平均明显升高($P < 0.05$);高脂对照组与 TAK – 242 组小鼠血清中 TG、TC、LDL – C 和 HDL – C水平无明显差异;实时荧光定量 PCR 结果显示,高脂对照组小鼠主动脉组织中 TLR4、TNF – α 和 IL – 6 表达水平[分别为(1.91 ± 0.32)、(2.71 ± 0.52)、(3.24 ± 0.41)]与对照组比较[分别为(1.00 ± 0.20)、(1.00 ± 0.17)、(1.00 ± 0.23)]明显升高($P < 0.01$);与高脂对照组比较,TAK – 242 组小鼠主动脉组织中 TLR4、TNF – α 和 IL – 6 表达水平[分别为(1.23 ± 0.27)、(1.93 ± 0.35)、(1.67 ± 0.30)]均下调($P < 0.05$)。**结论** 高脂饮食可诱导小鼠胰岛素抵抗;胰岛素抵抗状态下,主动脉炎症的发生可能与 TLR4 信号通路活化有关。

关键词: 高脂饮食;胰岛素抵抗;Toll 样受体 4(TLR4);主动脉组织;肿瘤坏死因子 α(TNF – α);白细胞介素 – 6(IL – 6)
中图分类号: R 392 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-0580(2016)11-1480-05 DOI: 10.11847/zgggws2016-32-11-08

Effect of TLR4 on expression of inflammatory cytokine in aortic artery in mice with insulin resistance

RAO Xiao-jiao, YU Man-li, ZHU Xiao-bo, et al (*Key Laboratory of Clinical Diagnostics, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei Province* 075000, China)

Abstract: Objective To investigate the role of Toll-like receptor (TLR4) in insulin resistance and the effect of TLR4 on inflammatory cytokine expression in aortic artery in mice with insulin resistance (IR). **Methods** Forty-five male C57BL/6 mice (21 days old) were randomly divided into three groups (15 in each group): a control group fed with basic diet (low fat diet, LFD), a high fat diet control group (HFD-C) and a TAK-242 treatment group (HFD-T) both fed with high fat diet. Seven months after the treatments, glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT) were performed in all the mice. After the establishment of IR model, the mice of HFD-T group were injected intraperitoneally with TLR4 inhibitor TAK-242 twice a week for five consecutive months. All the mice were sacrificed and

* **基金项目:** 河北省自然科学基金(C2011405015);河北北方学院创新人才培育项目(CXRC1316)
作者单位: 河北北方学院 临床检验诊断学重点实验室,河北 张家口 075000
作者简介: 饶小娇(1984 –),女,湖北云梦人,硕士在读,研究方向:脂代谢障碍相关疾病的分子机制与临床应用。
通讯作者: 常晓彤,E-mail: changxt1212@vip.sina.com
数字出版日期: 2016 – 10 – 18 14:53
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20161018.1453.006.html