DOI:10.16016/j.2097-0927.202110024

50 Hz 磁场和双酚 A 暴露对大鼠脑组织和 Neuro-2a 细胞 Tau 蛋白磷酸化的影响

张彦文,吕艳玲,马秦龙,高 鹏,陈纯海,何旻蒂,张 蕾,卢永辉,皮会丰,余争平 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系军队劳动卫生学教研室,电磁辐射医学防护教育部重点实验室

[摘要] **目的** 研究 50 Hz 磁场、双酚 A(bisphenol A,BPA)单独和联合暴露对神经细胞 Tau 蛋白磷酸化的影响。**方法** 24 只 SD 雄性大鼠,体质量(150±10) g,分为对照组(生理盐水灌胃+50 Hz 磁场假性暴露)、50 Hz 磁场暴露组(0.5 mT、4 h/d 50 Hz 磁场暴露+生理盐水灌胃)、BPA 暴露组(BPA 20 μg·kg^{-1}·d^{-1} 灌胃+50 Hz 磁场假性暴露)、50 Hz 磁场和 BPA 复合暴露组(BPA 20 μg·kg^{-1}·d^{-1} 灌胃+0.5 mT、4 h/d 50 Hz 磁场暴露)4 组,每组 6 只。处理 1 次/d,6 d/周,连续 12 周。小鼠神经母细胞瘤细胞株(Neuro-2a),分为对照组、50 Hz 磁场暴露组(1 mT、48 h)、BPA 暴露组(100 μmol/L、24 h)、50 Hz 磁场+BPA 复合暴露组(1 mT、48 h +100 μmol/L, 24 h)4 组。大鼠暴露结束按标准方法取材,组织免疫荧光化学方法检测大脑皮层和海马脑组织 Tau-Thr^{231}、Tau-Ser^{404} 的表达以及细胞凋亡。细胞实验暴露后采用 CCK-8 法检测细胞活力,采用细胞免疫荧光化学和 Western blot 方法检测 Tau-Thr^{231}、Tau-Ser^{404}、Caspase-3 的表达。**结果** 50 Hz 磁场暴露 12 周后,大鼠皮层和海马脑区 Tau-Thr^{231} 位点磷酸化水平明显升高(P<0.05);BPA 暴露或与 50 Hz 磁场复合暴露 12 周后,大鼠皮层和海马脑区 Tau-Thr^{231} 位点磷酸化水平、皮层 Tau-Ser^{404} 位点磷酸化水平明显升高(P<0.05),复合暴露组皮层和海马脑区细胞凋亡水平变化明显(P<0.05)。50 Hz 磁场暴露、BPA 单独暴露或与 50 Hz 磁场复合暴露 48 h 后,Neuro-2a 细胞活力均明显低于对照组(P<0.05)。50 Hz 磁场暴露 48 h 后,Neuro-2a 细胞 Tau-Ser^{404} 位点磷酸化水平明显高于对照组(P<0.05);BPA 单独暴露或与 50 Hz 磁场复合暴露 48 h 后,Neuro-2a 细胞 Tau-Thr^{231} 位点和 Tau-Ser^{404} 位点磷酸化水平、Caspase-3 的表达水平明显升高(P<0.05)。**结论** 50 Hz 磁场、BPA 暴露可引起神经细胞 Tau 蛋白不同位点过度磷酸化,并且二者之间存在协同效应,可引起神经细胞损伤。

[关键词] 50 Hz 磁场;双酚 A;雄性大鼠;Neuro-2a 细胞;Tau 蛋白磷酸化
[中图法分类号] R122.4; R136.32; R322.81 [文献标志码] A

Effects of 50-Hz magnetic field and bisphenol A exposure on phosphorylation of Tau protein in rat brain tissue and Neuro-2a cells

ZHANG Yanwen, LYU Yanling, MA Qinlong, GAO Peng, CHEN Chunhai, HE Mindi, ZHANG Lei, LU Yonghui, PI Huifeng, YU Zhengping Department of Occupational Health, Key Laboratory of Electromagnetic Radiation Protection of Ministry of Education, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of 50-Hz magnetic field and bisphenol A (BPA) alone or combined exposure on the phosphorylation of Tau protein in nerve cells. **Methods** A total of 24 SD male rats (body weight 150±10 g) were randomly and equally divided into 4 groups: control group (normal saline gavage + magnetic field sham-exposure), 50-Hz magnetic field exposure group (0.5 mT, 50 Hz magnetic field exposure 4 h/d+normal saline gavage), BPA exposure group (BPA 20 μg·kg^{-1}·d^{-1} gavage+ magnetic field sham-exposure), and combined exposure group (BPA 20 μg·kg^{-1}·d^{-1} gavage+0.5 mT, 50 Hz magnetic field exposure 4 h/d). The magnetic field exposure was performed once per day, 6 days per week, for consecutive 12 weeks. The protein expression of Tau-Thr^{231} and Tau-Ser^{404}, as well as cell apoptosis

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31770906)
[通信作者] 张彦文,E-mail: zhangyw20022002@aliyun.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

in frozen slices of cerebral cortex and hippocampus were detected by immunohistofluorescence assay and TUNEL assay, respectively. For cell experiments, Neuro-2a cells were exposed to 50 Hz magnetic field (1.0 mT, 48 h), BPA treatment (100 μmol/L, 24 h), as well as combined exposure (50 Hz magnetic field+BPA), respectively. Cell viability was tested by CCK-8 assay, and the protein expression of Tau-Thr^{231}, Tau-Ser^{404} and Caspase-3 were measured using immunofluorescence assay and Western blotting. **Results** As compared with the control group, the phosphorylation of Tau-Thr^{231} was significantly increased in cerebral cortex and hippocampus of rats after 12 weeks of 50 Hz magnetic field exposure ($P<0.05$). The Tau-Thr^{231} phosphorylation in rat cerebral cortex and hippocampus and the Tau-Ser^{404} phosphorylation in cerebral cortex were remarkably elevated after 12 weeks of BPA exposure alone or in combination with 50 Hz magnetic field ($P<0.05$). The co-exposure also induced obvious neuronal apoptosis in cerebral cortex and hippocampus of rats ($P<0.05$). For cell experiments, the Neuro-2a cell viability was greatly lowered after exposure to 50 Hz magnetic field, BPA alone or combined treatment for 48 h ($P<0.05$). The Tau-Ser^{404} phosphorylation was notably up-regulated ($P<0.05$) after 50 Hz magnetic field exposure; the phosphorylation of Tau-Thr^{231} and Tau-Ser^{404}, as well as the expression of Caspase-3 were also enhanced ($P<0.05$) after BPA exposure or co-exposure. **Conclusion** Exposure to 50 Hz magnetic field and/or BPA can induce hyperphosphorylation of Tau protein at different amine acid site, and there are synergistic effects between the 2 exposures, which may cause nerve cell damage.

[**Key words**] 50 Hz magnetic field; bisphenol A; male rats; Neuro-2a cells; Tau phosphorylation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31770906). Corresponding author: ZHANG Yanwen, E-mail: zhangyw20022002@aliyun.com

极低频电磁场(extremely low frequency electromagnetic field,ELF-EMF)指频率在 300 Hz 以下的交变电磁场,使用交流电的各类设备、输电线等都可以产生 50 Hz 的极低频电磁场,可以说 50 Hz 电磁场遍布我们生活工作的每一个角落,给人们的健康产生潜在的危害。极低频电磁辐射暴露可引起动物和人群学习记忆功能下降等神经行为障碍、海马脑区氧化应激等[1-3]。特别是职业暴露于极低频电磁场中可出现头痛头昏、乏力疲劳、记忆力减退、睡眠障碍等精神症状,并且是促进痴呆和阿尔茨海默病(alzheimer's disease,AD)发生的高危险因素[4]。

双酚 A(bisphenol A,BPA),属于环境内分泌干扰素,其作为添加剂(如塑化剂等)的制品同样广泛存在于人们的日常生活中,如碳酸饮料瓶、矿泉水瓶、婴幼儿奶瓶、塑料桶、食品包装材料、口腔修补牙齿材料等[5]。BPA 可通过渗入水和食物等过程主要经消化道进入人体内,职业环境中还可通过呼吸道和皮肤进入人体内。根据美国国家卫生和营养调查结果显示,几乎所有美国公民的尿液和血液中均可检测出 BPA 的代谢产物[6]。研究表明,BPA 不仅可影响生殖系统、免疫系统、代谢功能,导致内分泌失调、性早熟、癌症发生、胚胎和子代的生长发育等,还可影响神经系统,是神经退行性疾病的高危险因素[6-9]。由此可知,极低频电磁辐射和 BPA 的联合暴露广泛存在于普通人群的日常生活和工作过程中,而且这两类因素均是神经退行性疾病的高危险因素。由于暴露的剂量有差异或比较低,还没有引起人们的高度关切。本实验初步研究了 50 Hz 磁场和 BPA 单独和联合暴露对在体和离体神经细胞 Tau 蛋白磷酸化的影响,为解释 AD 的分子机制提供基础研究支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

实验动物为 24 只 SD 雄性大鼠,购自陆军军医大学实验动物中心,体质量(150±10)g,分为对照组(SHAM 组,生理盐水灌胃+50 Hz 磁场假性暴露)、50 Hz 磁场暴露组(50 Hz 组,0.5 mT、4 h/d 50 Hz 磁场暴露+生理盐水灌胃)、BPA 组(BPA 20 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 灌胃+50 Hz 磁场假性暴露)、50 Hz 磁场和 BPA 复合暴露组(50 Hz+BPA 组,BPA 20 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 灌胃+0.5 mT、4 h/d 50 Hz 磁场暴露)4 组,每组 6 只。上述处理 1 次/d,6 d/周,连续 12 周。50 Hz 磁场动物暴露装置见图 1。

离体细胞实验采用神经母细胞瘤细胞株(Neuro-2a),分为对照组(SHAM 组)、50 Hz 磁场暴露组(50 Hz 组,1 mT、48 h)、BPA 组(100 μmol/L、24 h)、50 Hz 磁场和 BPA 复合暴露组(50 Hz+BPA 组,1 mT、48 h +100 μmol/L、24 h)4 组。50 Hz 磁场细胞暴露装置购自瑞典(IT'IS Foundation, Zurich, Switzerland)。



图 1 50 Hz 磁场动物暴露装置

1.2 主要试剂和仪器

DMEM 培养基(Gibco 美国),胎牛血清(PAN Biotech 德国),SDS-PAGE 配胶试剂盒、低荧光 PVDF 膜、蛋白电泳系统和蛋白转印系统(Bio-Rad,美国),RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、QuickBlock Western 封闭液、QuickBlock Western 一抗稀释液、QuickBlock Western 二抗稀释液、HRP 标记二抗、DAPI 染色液、青霉素/链霉素溶液(碧云天,中国),蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(Roche 罗氏),Cell Counting Kit-8(Dojindo 日本),Tunel 试剂盒(Roche 罗氏),Anti-Tau(phospho S404)(ab131338,abcam),Anti-Tau(phospho T231)(ab151559,abcam),Anti- capase-3(Sigma,美国),荧光二抗(A11034,ThermoFisher),HRP 化学发光检测试剂盒(millipore),Tecan 酶标仪、冰冻切片机、荧光显微镜(Leica),凝胶成像系统(Bio-Rad,美国)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及处理 Neuro-2a 细胞使用含 1%青-链霉素溶液及 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养。按照实验设计,在 Neuro-2a 细胞生长融合至 80%左右的密度时,将 4 组细胞分别放于 50 Hz 磁场细胞暴露培养箱内的暴露盒(50 Hz 磁场单独暴露组细胞、50 Hz 磁场和 BPA 复合暴露组细胞)和假性暴露盒(对照组细胞、BPA 单独暴露组细胞)内,50 Hz 磁场暴露 24 h 后,在 50 Hz 磁场 BPA 复合暴露组细胞和 BPA 单独暴露组细胞培养基内添加 BPA(终浓度 100 μmol/L),之后继续在 50 Hz 磁场细胞暴露培养箱内暴露 24 h。

1.3.2 细胞活力测定 将 Neuro-2a 细胞接种于透明平底的 96 孔板中,每组接种 3 个复孔,同时另外设置 3 个空白对照孔。培养箱孵育 12 h 至 18 h,按 1.3.1 处理细胞后,弃去培养基,按 CCK-8 试剂盒说明书操作,使用 Tecan 酶标仪在波长为 450 nm 处检测光密度 $D(450)$,细胞活力 = $[D(450)_{处理组}-D(450)_{空白组}]/[D(450)_{对照组}-D(450)_{空白组}]\times100\%$。

1.3.3 细胞免疫荧光染色 将 Neuro-2a 细胞接种于提前包被好的含细胞爬片的 24 孔板中,培养箱孵育 12 ~18 h,按 1.3.1 处理细胞后,弃去培养基,按常规方法进行漂洗、固定、通透、封闭、抗体孵育(一抗稀释比例为 1∶200,荧光二抗)、DAPI 复染核、抗荧光猝灭剂封片,荧光显微镜进行图像采集,用 Image J 软件进行图像分析。

1.3.4 组织免疫荧光染色 SD 雄性大鼠经 12 周处理后,5%水合氯醛麻醉、4%多聚甲醛灌注固定、取大脑、4%多聚甲醛后固定、梯度蔗糖脱水(10%蔗糖 12 h、20%蔗糖 24 h、30%蔗糖 48 h)、OCT 包埋剂包埋、冰冻切片机切片(10 μm),切片按常规方法进行漂洗、通透、封闭、抗体孵育(一抗稀释比例为 1∶100,荧光二抗)、DAPI 复染核,将切片捞出贴附在载玻片上,滴加抗荧光猝灭剂封片,荧光显微镜进行图像采集。

1.3.5 组织细胞凋亡检测 SD 雄性大鼠脑组织冰冻切片(10 μm)按常规方法进行漂洗、通透后将切片捞出贴附在载玻片上,按 TUNEL 试剂盒说明书每片滴加 30 μL TUNEL(末端脱氧核苷酰基转移酶介导性 dUTP 切口末端标记,terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling)反应混合液(TdT:荧光素标记的 dUTP = 1∶9,现用现配)湿盒内室温避光孵育 2 h,之后 PBS 漂洗、DAPI 复染核、滴加抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜进行图像采集。

1.3.6 Western blot 检测 按 1.3.1 处理培养在 6 孔板的细胞后,预冷 PBS 清洗、RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂)裂解、刮下细胞至 1.5 mL EP 管中、4 ℃ 20 000×g 离心 20 min、吸取上清、按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度、分装并置-80 ℃冰箱保存备用或直接用于后续实验。用微量进样针取分装的蛋白 50 μg 上样进行 SDS-PAGE 电泳(5%浓缩胶、10%~12%分离胶、80~100 V 恒压)、蛋白转印(250 mA 恒流、≥1 h),PVDF 膜按常规方法进行封闭、抗体孵育(一抗稀释比例为 1∶500~1∶1 000,二抗稀释比例为 1∶2 000)、TBST 漂洗、HRP 化学发光检测

试剂盒显色、用凝胶成像系统成像并进行灰度值分析。

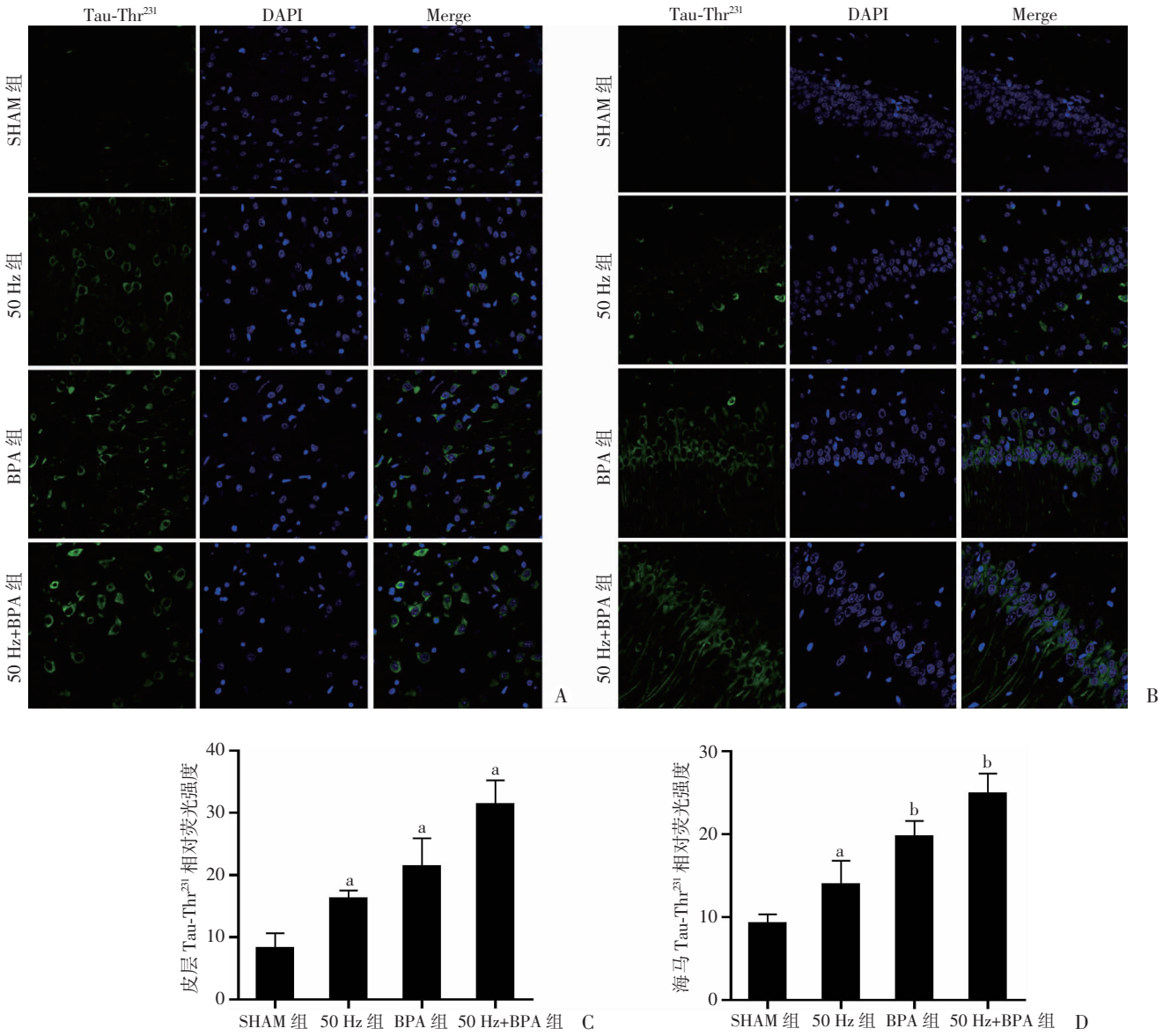
1.4　统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 Student-t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　50 Hz 磁场和 BPA 暴露对大鼠脑组织 Tau 蛋白磷酸化和细胞凋亡的影响

0.5 mT 50 Hz 磁场暴露 12 周后,SD 雄性大鼠皮层和海马脑组织 Tau-Thr^{231} 位点磷酸化水平比对照组大鼠明显升高($P<0.05$);20 μg·kg^{-1}·d^{-1} BPA 灌胃暴露 12 周后,SD 雄性大鼠皮层和海马脑组织 Tau-Thr^{231} 位点磷酸化水平同样比对照组大鼠明显升高($P<0.01$),甚至比 50 Hz 磁场暴露组大鼠升高幅度更明显;50 Hz 磁场和 BPA 联合暴露 12 周后,SD 雄性大鼠皮层和海马脑组织 Tau-Thr^{231} 位点磷酸化水平明显高于对照组($P<0.01$),比单独暴露组大鼠升高幅度更明显(图 2)。



A:免疫荧光观察大脑皮层(×100);B:免疫荧光观察海马组织(×100);C:大脑皮层组织免疫荧光相对荧光强度　a:$P<0.01$,与 SHAM 组比较;D:海马组织免疫荧光相对荧光强度　a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 SHAM 组比较

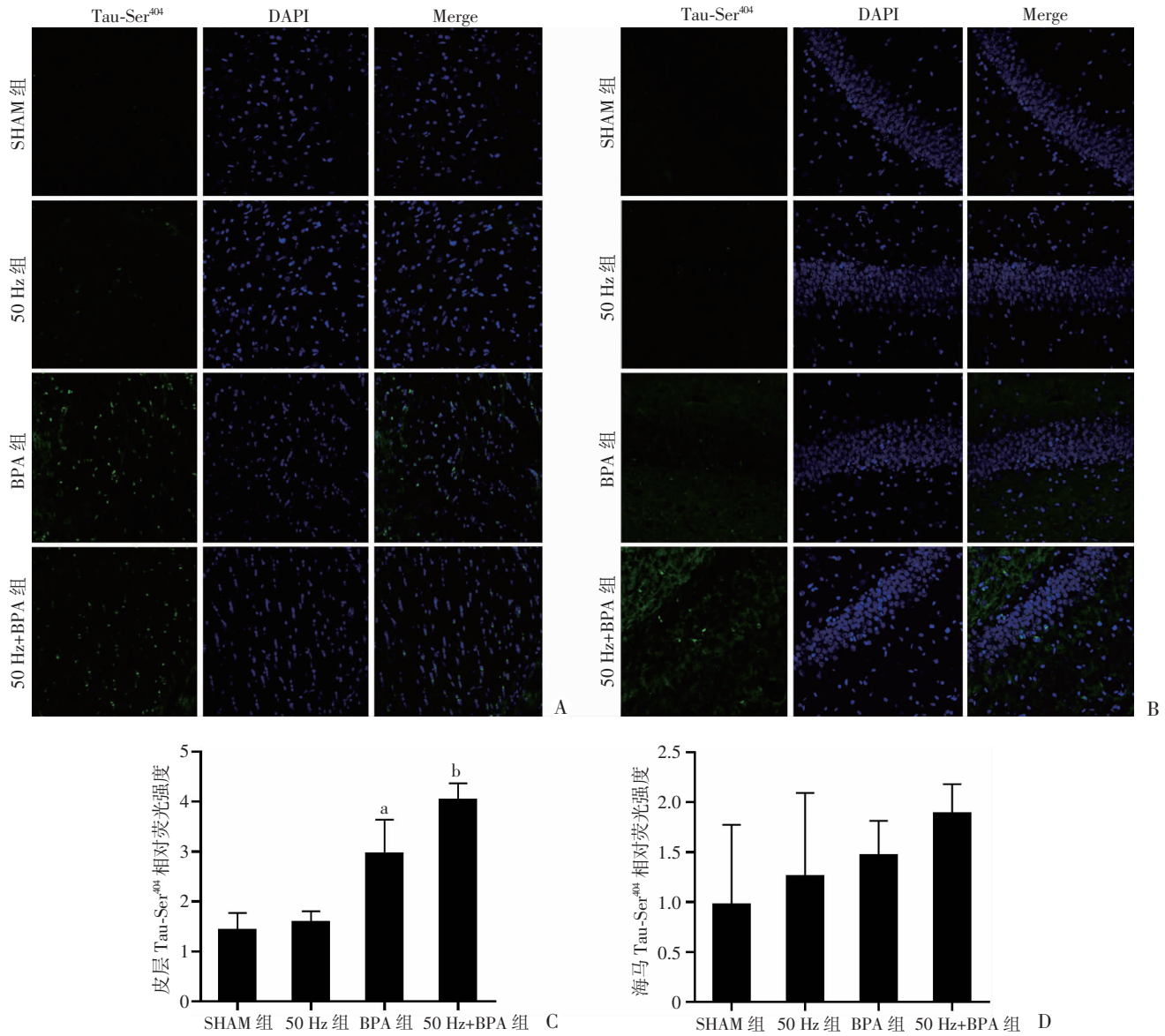
图 2　50 Hz 磁场和 BPA 暴露对 SD 雄性大鼠脑组织 Tau-Thr^{231} 表达的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

0.5 mT 50 Hz 磁场暴露 12 周后,SD 雄性大鼠皮层和海马脑组织 Tau-Ser^{404} 位点磷酸化水平与对照组大鼠比无明显变化(P>0.05);20 μg·kg^{-1}·d^{-1}BPA 灌胃暴露 12 周后,SD 雄性大鼠皮层脑组织 Tau-Thr^{404} 位点磷酸化水平明显高于对照组大鼠(P<0.05),但海马脑组织 Tau-Ser^{404} 位点磷酸化水平与对照组大鼠比变化不太明显(P>0.05);50 Hz 磁场和 BPA 联合暴露 12 周后,SD 雄性大鼠皮层脑组织 Tau-Thr^{404} 位点磷酸化水平明显高于对照组大鼠(P<0.01),但海马脑组织 Tau-Thr^{404} 位点磷酸化水平升高不太明显(P>0.05,图 3)。

0.5 mT 50 Hz 磁场和 20 μg·kg^{-1}·d^{-1}BPA 灌胃单独分别暴露 12 周后,SD 雄性大鼠皮层和海马脑组织细胞凋亡水平与对照组大鼠比均无明显变化(P>0.05);50 Hz 磁场和 BPA 联合暴露 12 周后,SD 雄性大鼠皮层和海马脑组织细胞凋亡水平均明显高于对照组大鼠(P<0.05,图 4)。

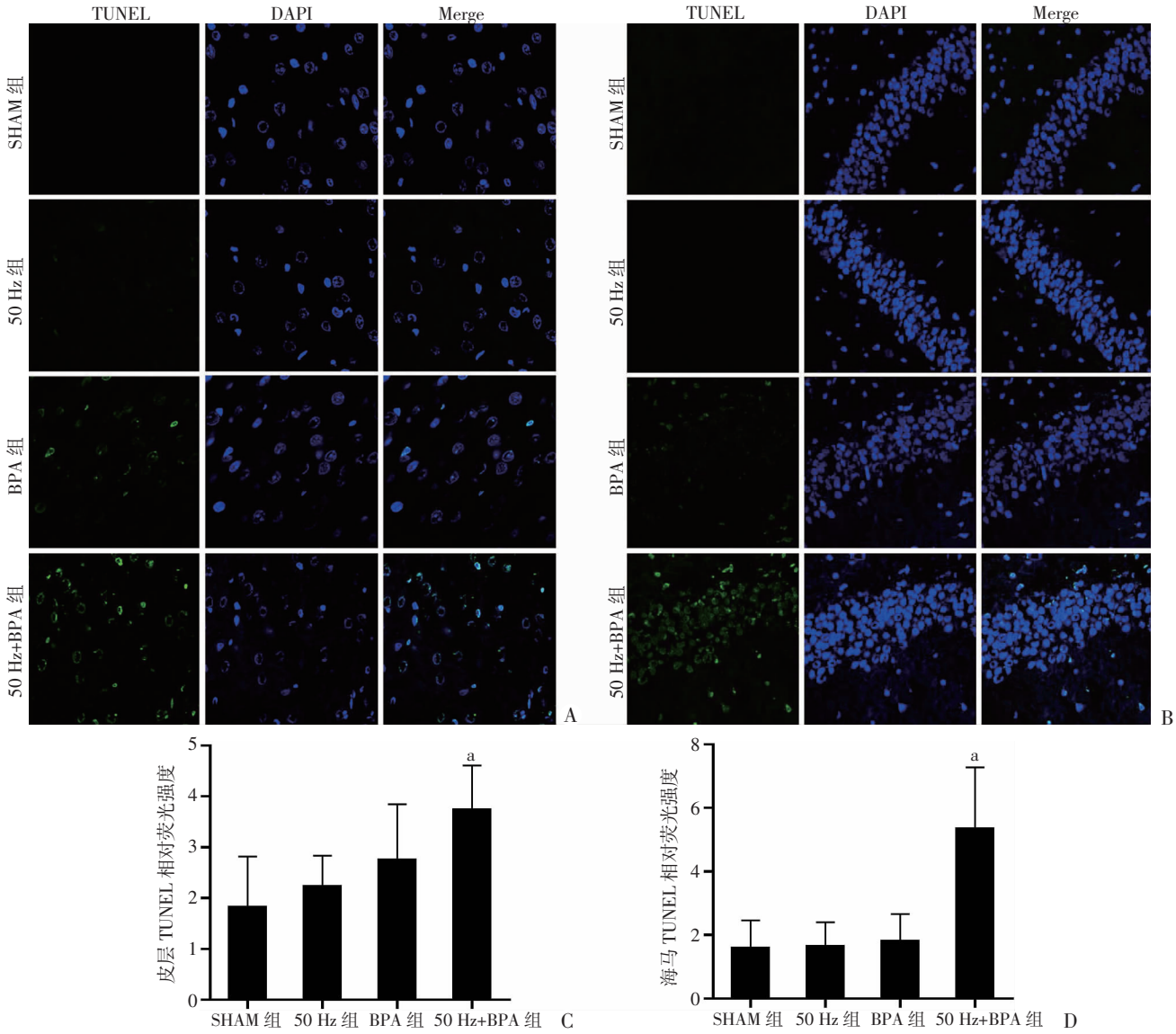
2.2 50 Hz 磁场和 BPA 暴露对 Neuro-2a 细胞活力的影响

50 Hz 磁场(1.0 mT、48 h)暴露后,Neuro-2a 细胞活力明显低于对照组(P<0.05);BPA 单独暴露或与 50 Hz 磁场复合暴露 Neuro-2a 细胞活力均非常明显低于对照组(P<0.001,图 5)。



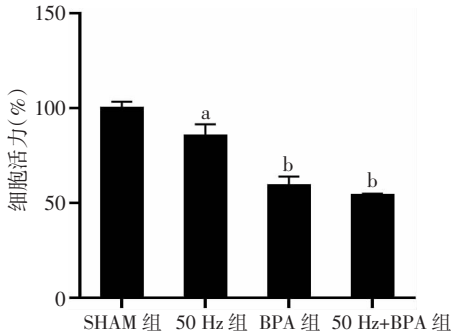
A:免疫荧光观察大脑皮层(×40);B:免疫荧光观察海马组织(×40);C:大脑皮层组织免疫荧光相对荧光强度 a:P<0.05, b:P<0.01,与 SHAM 组比较;D:海马组织免疫荧光相对荧光强度

图 3 50 Hz 磁场和 BPA 暴露对 SD 雄性大鼠脑组织 Tau-Ser^{404} 表达的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)



A:大脑皮层(TUNEL×100);B:海马组织(TUNEL×100);C:大脑皮层组织 TUNEL 染色相对荧光强度 a:$P<0.05$,与 SHAM 组比较;D:海马组织 TUNEL 染色相对荧光强度 a:$P<0.05$,与 SHAM 组比较

图 4 50 Hz 磁场和 BPA 暴露对 SD 雄性大鼠脑组织细胞凋亡的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)

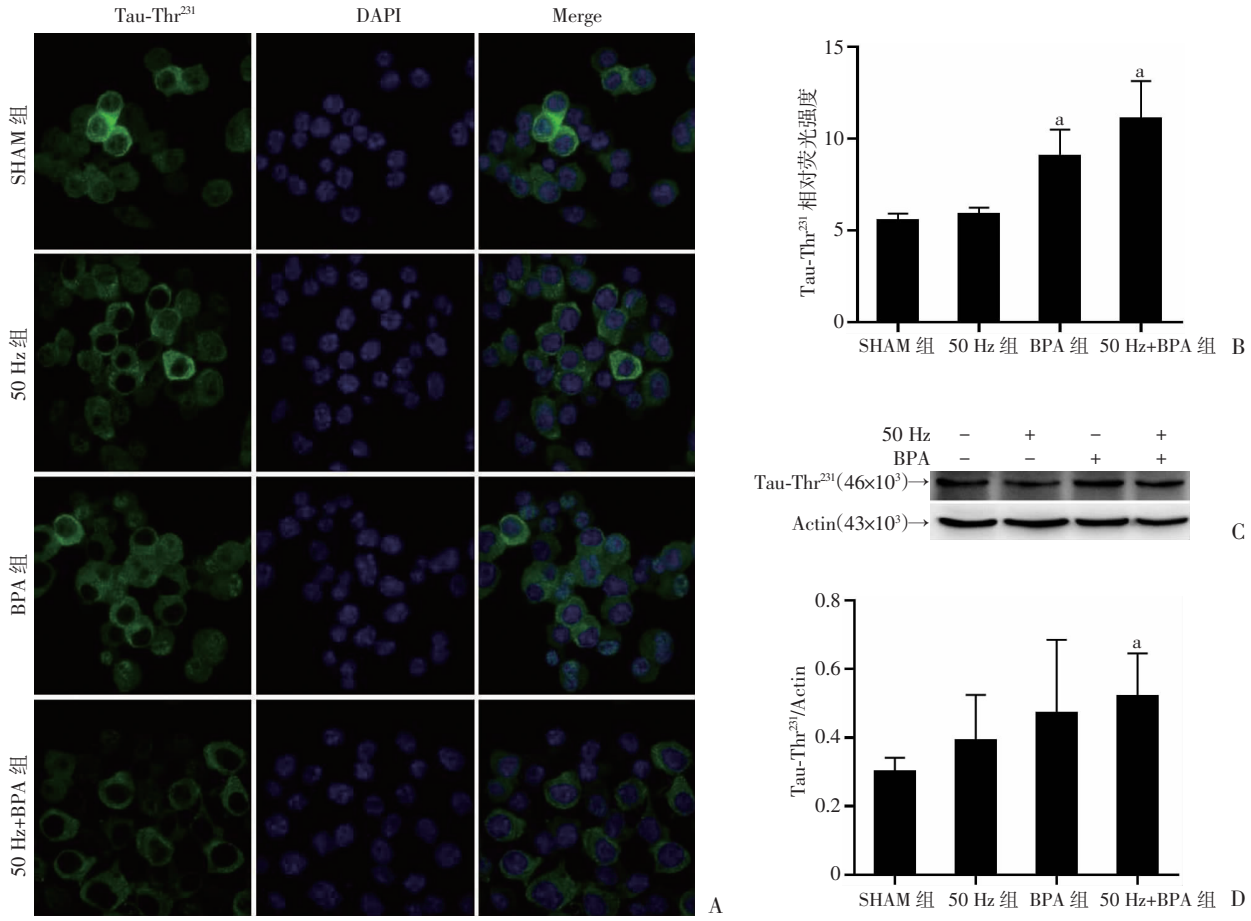


a:$P<0.05$, b: $P<0.001$,与 SHAM 组比较

图 5 50 Hz 磁场和 BPA 暴露对 Neuro-2a 细胞活力的影响($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.3 50 Hz 磁场和 BPA 暴露对 Neuro-2a 细胞 Tau 蛋白磷酸化的影响

细胞免疫荧光和 Western blot 检测结果显示,50 Hz 磁场(1.0 mT, 48 h)暴露后,Neuro-2a 细胞 Tau-Thr^{231} 位点磷酸化水平与对照组比差异均无统计学意义($P>0.05$)。细胞免疫荧光检测结果显示,BPA 单独暴露或与 50 Hz 磁场复合暴露,Neuro-2a 细胞 Tau-Thr^{231} 位点磷酸化水平均明显升高($P<0.05$),尤以复合暴露变化更明显;而 Western blot 检测结果显示,只有 BPA 与 50 Hz 磁场复合暴露后 Neuro-2a 细胞 Tau-Thr^{231} 位点磷酸化水平明显高于对照组($P<0.05$),而 BPA 单独暴露后变化差异无统计学意义(图 6)。



A:免疫荧光观察 Neuro-2a 细胞变化(×200);B:细胞免疫荧光相对荧光强度 a:$P<0.05$,与 SHAM 组比较;C、D:Western blot 检测结果及半定量分析结果 a:$P<0.05$,与 SHAM 组比较

图 6 50 Hz 磁场和 BPA 暴露对 Neuro-2a 细胞 Tau-Thr^{231} 表达的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

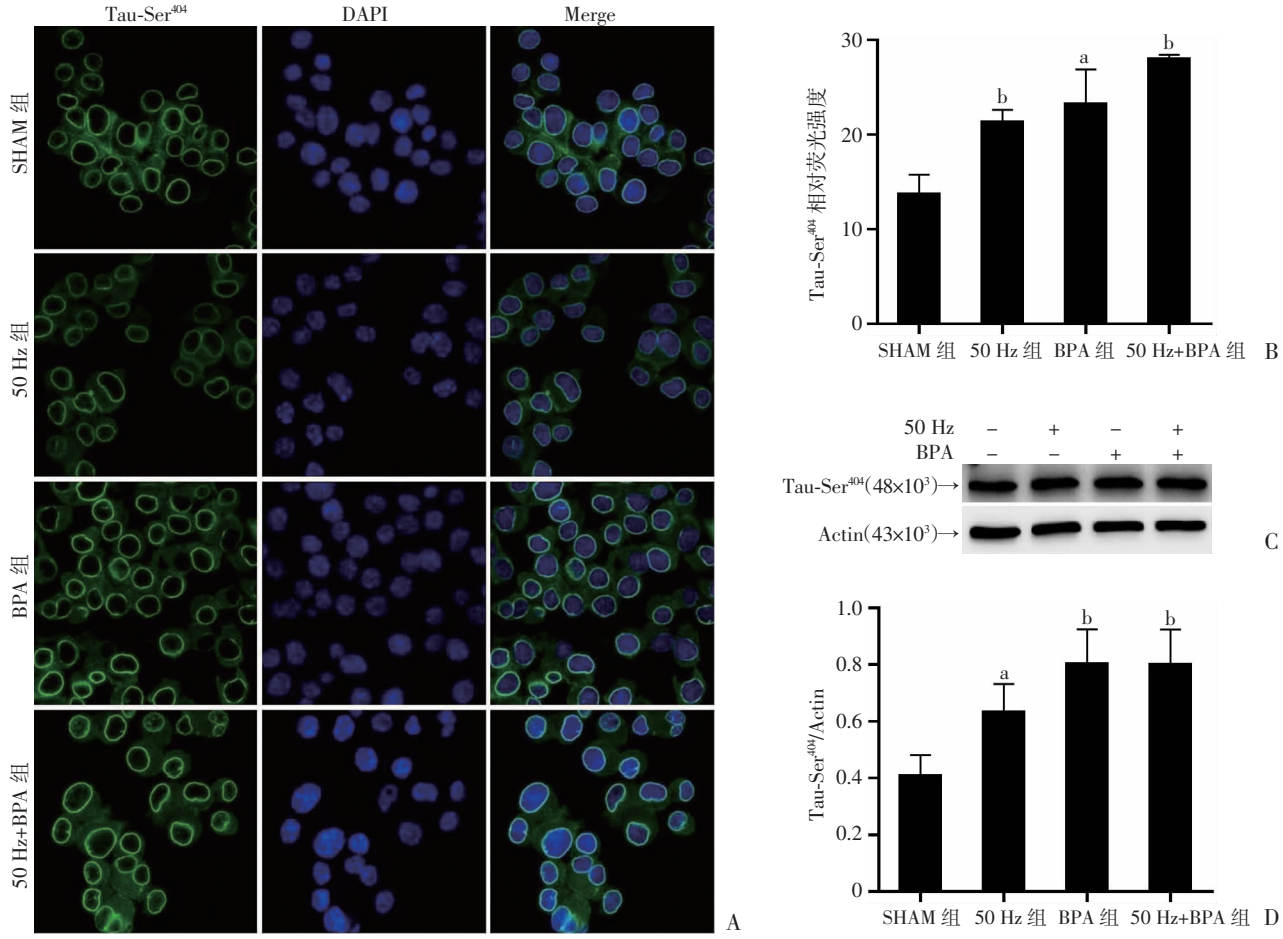
细胞免疫荧光和 Western blot 检测结果显示,50 Hz 磁场(1.0 mT, 48 h)暴露后,Neuro-2a 细胞 Tau-Ser^{404} 位点磷酸化水平均明显高于对照组($P<0.05$);BPA 单独暴露或与 50 Hz 磁场复合暴露,Neuro-2a 细胞 Tau-Ser^{404} 位点磷酸化水平均明显高于对照组($P<0.05$),尤以复合暴露变化更明显(图 7)。

2.4 50 Hz 磁场和 BPA 暴露对 Neuro-2a 细胞 Caspase-3 表达的影响

细胞免疫荧光和 Western blot 检测结果显示,50 Hz 磁场(1.0 mT, 48 h)暴露后,Neuro-2a 细胞 Caspase-3 的表达水平与对照组比差异均无统计学意义($P>0.05$);BPA 单独暴露或与 50 Hz 磁场复合暴露,Neuro-2a 细胞 Caspase-3 的表达水平只有 Western blot 检测结果明显升高($P<0.05$),细胞免疫荧光检测结果差异均无统计学意义(图 8)。

3 讨论

随着老龄化社会的到来,痴呆患病人数将会大幅增高。据世卫组织报告,2019 年世界范围内罹患痴呆的人群已达到 5 520 万人,死亡 160 万(居第 7 位死因),相关费用达 1.3 万亿美元;预计到 2030 年罹患人数将达到 7 800 万人,相关费用将达 1.7 万亿美元;预计到 2050 年罹患人数将达到 13 900 万人,相关费用将达 2.8 万亿美元[10]。能导致痴呆的疾病很多,最主要是 AD,占 50%~75%。A_β 蛋白的沉积和神经原纤维缠结是 AD 的两大病理学重要特征,而神经原纤维缠结的主要成分就是过度磷酸化的 Tau 蛋白。Tau 蛋白是一种微管相关蛋白,正常情况下能够促进微管的组装和稳定、轴突生长和运输等,过度磷酸化的 Tau 蛋白不仅丧失这些生物学活性,而且对蛋白水解酶的抵抗性增加,自聚集形成双螺旋丝,会导致神经元功能紊乱和退行性变[11]。从 AD 患者脑中分离的 Tau 蛋白大约有 40 个磷酸化位点,并且不同位点磷酸化的 Tau 蛋白有不同的生物学功能和病理学意义[12]。如前所述,早期研究显示极低频电磁辐射暴露不仅可影响学习记忆等神经行为,而且可能是促进AD发生的高危

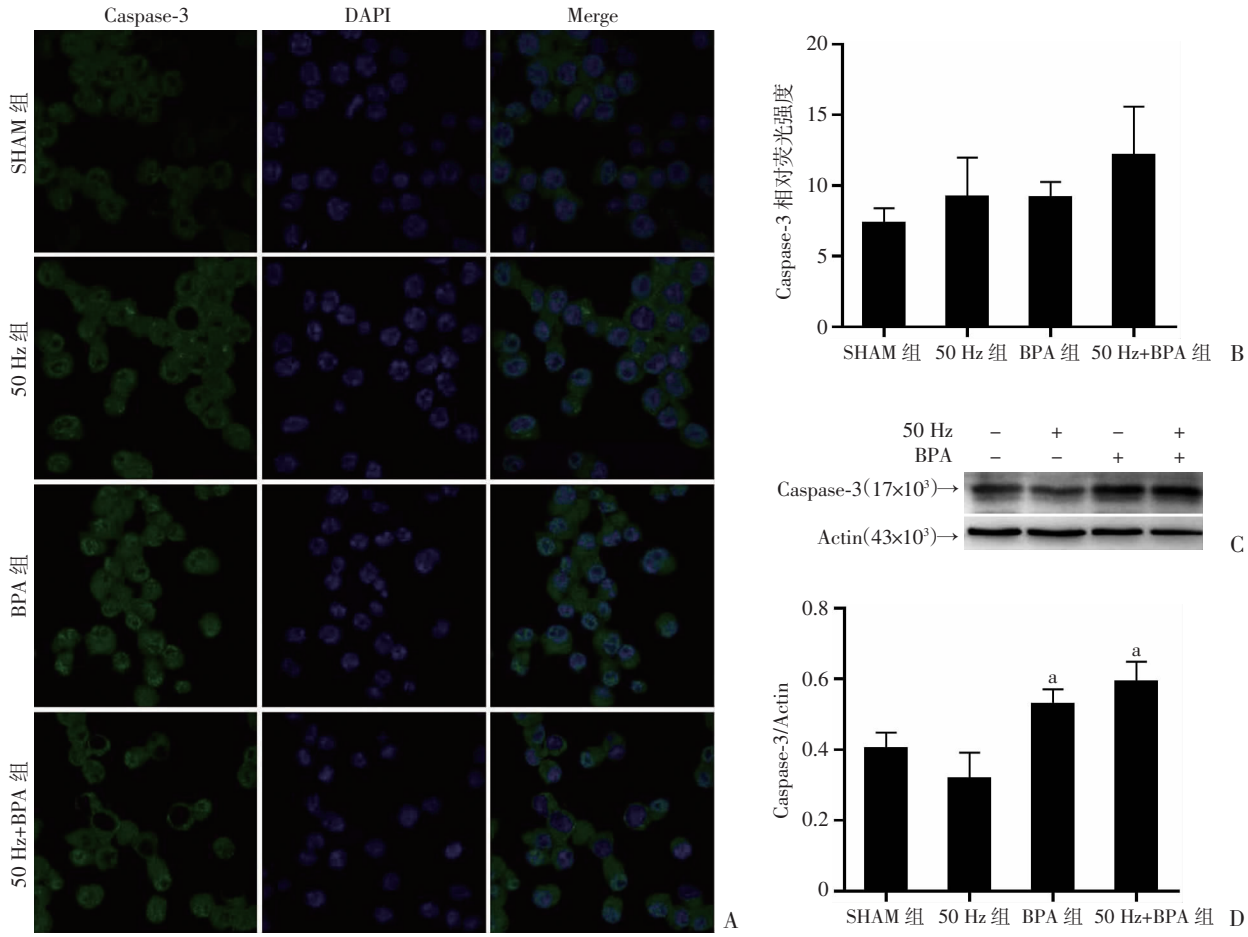


A:免疫荧光观察 Neuro-2a 细胞变化(×200);B:细胞免疫荧光相对荧光强度 a:$P<0.05$, b: $P<0.01$,与 SHAM 组比较;C、D:Western blot 检测结果及半定量分析结果 a:$P<0.05$, b: $P<0.01$,与 SHAM 组比较

图 7 50 Hz 磁场和 BPA 暴露对 Neuro-2a 细胞 Tau-Ser^{404} 表达的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

因素,但一直缺乏足够实验室研究数据的支持,并且近年来本就不多的研究结果还相互矛盾。意大利学者研究发现 3.1 mT 50 Hz 磁场整晚暴露后可影响 H_4 神经胶质瘤细胞(H_4/APPswe,转染人 β-淀粉状蛋白前体蛋白)的淀粉样蛋白形成过程,表现为 A_β 蛋白分泌明显增加,但不影响该细胞的活力[13]。我们前期的研究发现用 50 Hz 磁场辐照小鼠 8 周后(2 mT,4 h/d),可影响小鼠的学习记忆能力,同时小鼠皮层和海马组织 Tau 蛋白 Ser^{404} 位点和 Ser^{396} 位点磷酸化水平明显高于对照组[14]。但有研究表明 50 Hz 磁场(500 μT)暴露 3 个月却可改善 3xTg 小鼠[AD 模型动物,转染了 APP、PS_1、Tau (P301L),6 月龄后就可表现为认知缺陷]的认知缺陷,Tau 蛋白磷酸化水平不增反降,作者认为 50 Hz 磁场可作为 AD 有效治疗的对策[15]。本研究发现,50 Hz 磁场在体暴露(0.5 mT,4 h/d,6 d/周,12 周)和离体暴露(1 mT,48 h)均可引起 Tau 蛋白磷酸化水平明显升高,但磷酸化位点有所不同,且均不足以导致细胞凋亡水平的明显变化,提示在本实验条件下 50 Hz 磁场暴露可能会对神经细胞的功能有一定影响,比如神经行为学的改变。但本研究未对动物的神经行为学进行评价,这是本研究的不足,今后需进一步研究 Tau 蛋白磷酸化的生理或病理学意义,明确 Tau 蛋白过度磷酸化与神经行为学之间的联系。

BPA 作为环境内分泌干扰素,早期的研究主要关注对生殖健康、内分泌和代谢功能、生长发育等的影响。近年来随着研究的深入和延伸,发现 BPA 暴露对神经系统也有影响。BPA(>100 μmol/L,24 h)可通过影响细胞骨架蛋白和突触的完整性(比如 MAP_2、Tau 蛋白和 mRNA 表达均明显下降等)抑制 Neuro-2a 细胞的增殖和发育[8]。BPA(>20 nmol/L,12 h)暴露可引起 SH-SY_5Y 细胞 AD 样神经毒性,表现为 BACE-1、淀粉状蛋白前体蛋白(amyloid precursor protein,APP)、$A\beta_{1-42}$、不同位点磷酸化的 tau 蛋白(Ser^{199}、Ser^{396}、Thr^{205}、Ser^{214} 和 Ser^{404})等表达增加,并且与胰岛素信号



A:免疫荧光观察 Neuro-2a 细胞变化(×200);B:细胞免疫荧光相对荧光强度;C、D:Western blot 检测结果及半定量分析结果 a:$P<0.05$,与 SHAM 组比较

图 8 50 Hz 磁场和 BPA 暴露对 Neuro-2a 细胞 Caspase-3 表达的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

通路明显紊乱有关[6]。另外怀孕小鼠围产期 BPA 暴露(2、10、100 μg·kg^{-1}·d^{-1})可致其子代(3、6、9 月龄)AD 样神经毒性,表现为皮层和海马脑区 tau 蛋白不同位点(Thr^{205}、Ser^{199}、Ser^{396}、Ser^{404} 和 Ser^{214})磷酸化水平明显增加[9]。本研究发现 BPA(20 μg·kg^{-1}·d^{-1}、6 d/周)灌胃 12 周可引起 SD 雄性大鼠皮层和海马脑组织 Tau-Thr^{231} 位点以及皮层 Tau-Ser^{404} 位点磷酸化水平明显升高,并可导致神经细胞凋亡数量增加;100 μmol/L BPA 暴露 24 h 同样可致 Neuro-2a 细胞 Tau-Thr^{231} 位点和 Tau-Ser^{404} 位点磷酸化水平明显升高,细胞活力明显下降,Caspase-3 表达水平明显升高;并且 BPA 暴露和 50 Hz 磁场暴露之间存在联合协同效应。进一步提示 50 Hz 磁场和 BPA 暴露可能是 AD 发生的高危因素。

Tau 蛋白磷酸化水平受 Tau 蛋白激酶和 Tau 蛋白磷酸酶双重调节,激酶促使其磷酸化,磷酸酶促使其去磷酸化,蛋白激酶和蛋白磷酸酶的平衡紊乱可能是导致 Tau 蛋白过度磷酸化的重要原因。细胞周期素依赖的蛋白激酶 5(cyclin dependent kinase 5, CDK_5)和糖原合成酶激酶(glycogen-synthase kinase 3β, $GSK_{3\beta}$)是最明确的 Tau 蛋白激酶,最主要的 Tau 蛋白磷酸酶是蛋白磷酸酶 1(protein phosphatases 1, PP_1)和蛋白磷酸酶 2A(protein phosphatases 2A, PP_{2A})。已有研究表明 BPA 暴露确实可激活 $GSK_{3\beta}$、CDK_5 活性、抑制 PP_{2A} 活性[6,9,16],表明 BPA 暴露可通过影响蛋白激酶和蛋白磷酸酶的平衡导致 Tau 蛋白的过度磷酸化,促进 AD 的发生。但未见研究报道 50 Hz 磁场暴露也有类似的研究结果,而是有相反的结果,即 50 Hz 磁场暴露可抑制 $GSK_{3\beta}$、CDK_5 酶活性,激活 PP_{2Ac},降低 Tau 蛋白磷酸化水平,改善 AD 模型动物的认知缺陷[15]。另外,在 Tau 蛋白的翻译后修饰中,糖基化和磷酸化可以竞争性的结合同一位点,Tau 蛋白的磷酸化水平还要受到 O-联-N-乙酰葡糖胺(O-linked N-acetylglucosamine, O-GlcNAc)糖基化修饰的负性调

节[17]。因此,今后有必要进一步研究不同参数 50 Hz 磁场暴露对 Tau 蛋白更多位点磷酸化和糖基化的影响,以及 CDK_5、$GSK_{3\beta}$、O-GlcNAc 糖基化信号通路在其中的作用。

参考文献:

[1] CUI Y, GE Z, RIZAK J D, *et al*. Deficits in water maze performance and oxidative stress in the Hippocampus and striatum induced by extremely low frequency magnetic field exposure[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e32196. DOI:10.1371/journal.pone.0032196.

[2] MANIKONDA P K, RAJENDRA P, DEVENDRANATH D, *et al*. Extremely low frequency magnetic fields induce oxidative stress in rat brain[J]. Gen Physiol Biophys, 2014, 33(1): 81-90. DOI:10.4149/gpb_2013059.

[3] DAVANIPOUR Z, TSENG C C, LEE P J, *et al*. Severe cognitive dysfunction and occupational extremely low frequency magnetic field exposure among elderly Mexican Americans[J]. Br J Med Med Res, 2014, 4(8): 1641-1662. DOI:10.9734/bjmmr/2014/7317.

[4] QIU C, FRATIGLIONI L, KARP A, *et al*. Occupational exposure to electromagnetic fields and risk of Alzheimer's disease[J]. Epidemiology, 2004, 15(6): 687-694. DOI:10.1097/01.ede.0000142147.49297.9d.

[5] KUNDAKOVIC M, CHAMPAGNE F A. Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A[J]. Brain Behav Immun, 2011, 25(6): 1084-1093. DOI:10.1016/j.bbi.2011.02.005.

[6] WANG T W, XIE C W, YU P F, *et al*. Involvement of insulin signaling disturbances in bisphenol A-induced Alzheimer's disease-like neurotoxicity[J]. Sci Rep, 2017, 7: 7497. DOI:10.1038/s41598-017-07544-7.

[7] MA Y, LIU H, WU J, *et al*. The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms[J]. Environ Res, 2019, 176: 108575. DOI:10.1016/j.envres.2019.108575.

[8] YIN Z, HUA L, CHEN L, *et al*. Bisphenol-A exposure induced neurotoxicity and associated with synapse and cytoskeleton in Neuro-2a cells[J]. Toxicol in Vitro, 2020, 67: 104911. DOI:10.1016/j.tiv.2020.104911.

[9] XUE J, ZHANG L, XIE X, *et al*. Prenatal bisphenol A exposure contributes to Tau pathology: Potential roles of CDK5/GSK3β/PP2A axis in BPA-induced neurotoxicity[J]. Toxicology, 2020, 438: 152442. DOI:10.1016/j.tox.2020.152442.

[10] World Health Organization. Global status report on the public health response to dementia[R/OL]. [2021-09-02]. https://www.who.int/health-topics/dementia.

[11] STOOTHOFF W H, JOHNSON G V W. Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences[J]. Biochim et Biophys Acta BBA Mol Basis Dis, 2005, 1739(2/3): 280-297. DOI:10.1016/j.bbadis.2004.06.017.

[12] GONG C X, LIU F, GRUNDKE-IQBAL I, *et al*. Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease[J]. J Neural Transm (Vienna), 2005, 112(6): 813-838. DOI:10.1007/s00702-004-0221-0.

[13] DEL GIUDICE E, FACCHINETTI F, NOFRATE V, *et al*. Fifty Hertz electromagnetic field exposure stimulates secretion of beta-amyloid peptide in cultured human neuroglioma[J]. Neurosci Lett, 2007, 418(1): 9-12. DOI:10.1016/j.neulet.2007.02.057.

[14] DENG Y, ZHANG Y, JIA S, *et al*. Effects of aluminum and extremely low frequency electromagnetic radiation on oxidative stress and memory in brain of mice[J]. Biol Trace Elem Res, 2013, 156(1/2/3): 243-252. DOI:10.1007/s12011-013-9847-9.

[15] HU Y, LAI J, WAN B, *et al*. Long-term exposure to ELF-MF ameliorates cognitive deficits and attenuates tau hyperphosphorylation in 3xTg AD mice[J]. Neurotoxicology, 2016, 53: 290-300. DOI:10.1016/j.neuro.2016.02.012.

[16] LI J, WANG Y, FANG F, *et al*. Bisphenol A disrupts glucose transport and neurophysiological role of IR/IRS/AKT/GSK3β axis in the brain of male mice[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2016, 43: 7-12. DOI:10.1016/j.etap.2015.11.025.

[17] GONG C X, LIU F, GRUNDKE-IQBAL I, *et al*. Impaired brain glucose metabolism leads to Alzheimer neurofibrillary degeneration through a decrease in tau O-GlcNAcylation[J]. J Alzheimers Dis, 2006, 9(1): 1-12. DOI:10.3233/jad-2006-9101.

(收稿:2021-10-08;修回:2021-12-06)

(编辑 王 红)