

双酚 A 对稀有鮕鲫精巢载脂蛋白 E 基因的影响及调控机制

居建, 朱珠, 杨辉, 魏文志, 张莹莹*
扬州大学动物科学与技术学院, 渔业环境与健康养殖实验室, 江苏扬州 225000

摘要:

【目的】双酚 A (BPA) 是一种具有雌激素效应的塑化剂, 对雄性生殖影响显著, 载脂蛋白 E (ApoE) 对精巢中甘油三酯和胆固醇等脂质的运输过程有重要作用。本研究探讨 BPA 对精巢 ApoE 基因的影响及调控机制, 以期找到 BPA 所引起的雄性生殖问题与脂代谢之间的潜在联系。

【方法】将稀有鮕鲫暴露于 BPA (15 $\mu\text{g/L}$) 1、3 和 5 周, 通过实时荧光定量 (qPCR)、免疫印迹 (WB) 及免疫荧光 (IF) 检测 BPA 对 ApoE 基因表达和分布的影响, 通过染色质免疫共沉淀 (ChIP) 和 DNA 甲基化检测探究 BPA 对 ApoE 的调控机制。

【结果】qPCR、WB 及 IF 结果显示, BPA 可以显著影响精巢 ApoE 基因的表达和分布。ChIP 结果显示, ApoE 的启动子区存在一个雌激素相关受体 γ (Esrrg) 阳性作用位点, ApoE mRNA 的表达变化与 Esrrg 的募集变化一致。DNA 甲基化检测结果显示, ApoE 的启动子区处于未甲基化状态, BPA 处理对其无显著影响。

【结论】BPA 可以通过调控稀有鮕鲫精巢 ApoE 基因启动子区域的 Esrrg 的募集直接干扰 ApoE 基因表达, BPA 可能通过影响稀有鮕鲫精巢脂质转运影响其生殖功能。本研究结果将为后续从脂质代谢角度探究环境内分泌干扰物对雄性生殖的影响提供参考。

关键词:稀有鮕鲫; 双酚 A; 载脂蛋白 E; 精巢; 雌激素相关受体 γ

双酚 A (BPA) 是一种环境内分泌干扰物, 是合成环氧树脂和聚碳酸酯的原料, 目前被大量地应用于食品饮料包装、奶瓶、牙齿填充物、医用输液管、金属罐头内壁涂层以及热敏纸等^[1]。水环境是多种污染物的聚集场所, BPA 可以通过多种方式进入水生环境, 如垃圾渗滤液、生活污水和工业废水。BPA 存在于世界上大多数的河流和湖泊中, 但其浓度通常小于 1 $\mu\text{g/L}$ 。然而, 在受污染的水中, BPA 浓度可达到数十至数百 $\mu\text{g/L}$ ^[2-3]。

BPA 的化学结构与合成雌激素——己烯雌酚相似, 具备雌激素活性, 与机体的雌激素受体结合会产生抗雌激素或拟雌激素作用, 从而干扰机体正常的内分泌活动^[4]。BPA 对雄性生殖的影响是一直以来的关注热点, 男性尿液中的 BPA 含量与其精子的活力显著负相关^[5]。在



第一作者: 居建, 从事生态毒理学研究, E-mail: 13328143718@163.com



通信作者: 张莹莹, 水生生物学博士, 硕士生导师, 从事生态毒理学研究。在水生生物的环境响应机制、毒性评估方法及生态风险预测等方面积累了丰富的研究经验, 致力于为水域生态保护和水生生物健康管理提供科学依据, E-mail: zhangyingying@yzu.edu.cn

资助项目: 国家自然科学基金 (32371704); 扬州市政策引导类计划 (国际科技合作)(YZ2021175)

收稿日期: 2022-06-17
修回日期: 2023-07-04

文章编号:
1000-0615(2025)03-039103-10
中图分类号: Q 785; S 917.4
文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)



小鼠和鱼类的研究中都发现 BPA 可以干扰性激素合成、破坏血睾屏障、诱导生殖细胞凋亡以及降低精子活力等^[6-8]。许多研究表明 BPA 还会影响脂质代谢^[9-10], 而脂代谢紊乱与生殖关系密切, 如甘油三酯是重要的能源物质, 为配子的生成及其功能发挥提供能源^[11], 胆固醇又是合成类固醇激素的原料和细胞膜的重要成分, 影响性激素合成和精子的形态功能^[12]。以往的研究也证明, 发现 15 $\mu\text{g/L}$ 的 BPA 暴露会引起稀有鮡鲫 (*Gobiocypris rarus*) 精巢胆固醇水平异常, 性激素合成紊乱, 精子膜破损率增加, 运动及受精能力下降^[13-14]。但是 BPA 作用下, 雄性生殖与脂代谢紊乱之间关系鲜少有报道。

载脂蛋白 E(ApoE) 是载脂蛋白家族成员, 是载脂蛋白的重要成分, 在甘油三酯和胆固醇等脂质的运输过程中起重要作用^[15-17]。ApoE 的研究一般集中在肝脏, 其次是脑。但也有研究证明其在精巢组织中表达, 并推测其可能像脑中的 ApoE 功能一样负责细胞内的脂类重新分配, 从而保持组织内环境中的脂质平衡^[18-19]。有调查发现, 人类携带 ApoE 的不同等位基因与其所生子女数量关系密切, 并解释这可能与 ApoE 影响机体胆固醇水平, 从而导致性激素等类固醇激素合成差异有关^[20]。敲除 ApoE 后的小鼠脂质积累增加, 卵泡闭锁和凋亡的比例也增加^[21]。ApoE 基因很可能是联系脂代谢与生殖的关键基因之一。之前的研究发现, BPA 可以通过调控雌激素相关受体 γ (Esrrg) 和启动子区 CpG 位点甲基化调控稀有鮡鲫肝脏 ApoE 基因的表达^[22], BPA 可能对稀有鮡鲫精巢中的 ApoE 基因表达具有相似的影响。

目前关于 BPA 影响 ApoE 基因的报道极少。稀有鮡鲫是我国特有的小型鲤科 (Cyprinidae) 鱼类, 生长快, 繁殖周期短, 对内分泌干扰物有较高的敏感性, 并且其精巢组织大小约是斑马鱼 (*Danio rerio*) 的 5 倍, 可满足本研究的需求。本研究旨在探究不同暴露周期下, BPA 对稀有鮡鲫精巢 ApoE 的影响及调控机制, 期待找到 BPA 及其同类环境内分泌物暴露下脂代谢紊乱与雄性生殖间的潜在联系。

1 材料与方法

1.1 BPA 暴露与采样

使用的 5 月龄雄性稀有鮡鲫购自中国科学

院水生生物研究所。在玻璃缸中饲养, 养殖用水均经过曝气除氯, 水温控制在 $(25.0 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$, 光暗比为 14 : 10, 每天喂食摇蚊幼虫 2 次。适应 2 周后, 随机选取稀有鮡鲫 (0.688 ± 0.141) g 暴露于 BPA (98%, Sigma, 美国) 和溶剂对照 (0.001% 二甲亚砜, Sigma, 美国), 保证至少 1 L 水饲养 1 g 鱼。在本研究中, 设对照与 BPA 暴露 2 个组, 每组 3 个平行, 共使用 6 个玻璃缸, 234 条鱼。BPA 的暴露剂量 (15 $\mu\text{g/L}$) 参照文献^[13]选择。暴露期间, 每天用去氯自来水替换一半的暴露水, 并添加相应量的 BPA, 保持 BPA 的暴露浓度恒定。分别在暴露的 1、4、7、14、21、28 和 35 d 检测暴露水体 BPA 实际浓度。在 BPA 暴露组中, 实际平均 BPA 浓度为 $(11.58 \pm 1.74) \mu\text{g/L}$, 对照组水中未有 BPA 检出。在整个实验过程中, 严格遵守扬州大学动物伦理委员会的实验动物伦理要求, 在样品采集前, 先使用 MS-222 对鱼进行麻醉, 然后解剖采集精巢组织以备后续实验。

1.2 实时荧光定量 PCR(qPCR)

使用 qPCR 检测精巢 *ApoE* mRNA 的表达。每组 6 条鱼的精巢 (每个重复 2 条鱼, 3 个重复) 在每个采样时间点用于 qPCR 分析, 共选使用 36 条鱼。采用 trizol 一步法分离总 RNA。用总 RNA、M-MLV 逆转录酶 (with gDNA wiper)、低聚核苷酸 (dT) 引物 (Vazyme, 中国) 和随机引物合成 cDNA, 并使用 DNA 酶去处基因组 DNA。选择 18S 和真核翻译延伸因子 1 (*ef1a*) 作为内参基因 (表 1)。引物扩增效率 (E) 均为 90%~110%。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量^[18]。

1.3 免疫印迹 (WB)

使用 WB 检测精巢 ApoE 蛋白的表达。每组 6 条鱼的精巢 (每个重复 2 条鱼, 3 个重复) 在每个采样时间点用于 WB 分析, 共使用 36 条鱼。用冷冻 RIPA 裂解液 (CWBIO, 中国) 裂解精巢, 提取蛋白。蛋白质样品经 SDS-PAGE 分离后, 转移到 PVDF 膜上 (Millipore, 美国)。经一抗 (anti-apoE: 由稀有鮡鲫 ApoE 重组蛋白制备的抗体, 已经特异性检测, HUABIO, 中国; anti-tubb: GXY, 中国) 和适当的二抗孵育后, 使用增强化学发光试剂 (Advansta, 美国) 显示免疫条带, 用凝胶图像处理系统分析目标带的

表 1 qPCR, ChIP 和 DNA 甲基化引物
Tab. 1 Primers for qPCR, ChIP and DNA methylation

基因 gene	用途 purpose	引物名称 primers name	序列信息 sequence
18S	qPCR	F	TGACGAAAAATAACAATGCGG
		R	GCGGGACACTCGGTAAAGA
<i>efla</i>	qPCR	F	AGGAAGATTGAACGCAAGAG TG
		R	GAGCAAAGTTGACCACCATA CC
<i>ApoE</i>	qPCR	F	ACACCGTGGCAACCTATCTG
		R	TCCTCTGCGGTCTGTCCA
	ChIP	A1F	TAAACAGGCCATAGACGTGG
		A1R	GCTAGAGCATTCCTAATTTTGT TT
		A2F	AACAAAATTAGGAATGCTCTA GCT
		A2R	TTCGGATTAGCATTACATGA
		A3F	CATGTGAATGCTAATCCGAA TG
		A3R	CAACATTATTGCTCGTACGGTT
		A4F	ACCTTCAGGCTTAATTGTCTC TT
		A4R	GTGTCAGTATTGCTGCGTGG
	DNA methylation	F (559)	TGTTATTATTTATGTGAATGTT AATT
		R (359)	AAATATAACTATAAAACAAAT TCCTC
		F (364)	ATATTTATAGTTTTTTGATTTA AAAA
		R (147)	TAAACTACTAATACCCAAATA ATTC
	ChIP (positive control)	F	GCAAGAAAGCAAGTGTAGCA AT
		R	TACAAGCTGATGATATTCCG CA

分子量和净光密度值。

1.4 免疫荧光 (IF) 分析

使用 IF 技术分析 ApoE 蛋白在精巢组织分布变化。每个采样时间点每组 6 条鱼的一半精巢 (每个重复 2 条鱼, 3 个重复) 用于该检测, 共使用 36 条鱼。使用石蜡包埋精巢组织, 用石蜡切片机 (徕卡, 德国) 切 6 μm 厚的石蜡切片。切片在二甲苯中脱蜡后使用梯度乙醇水化, 用 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭, 切片用抗 ApoE 抗体 (HUABIO, 中国) 和相应的二抗 (DyLight 488, HUABIO, 中国) 孵育。阴性对照用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液代替抗 ApoE 抗体。显微镜检查采用荧光显微镜进行, 并拍照记录。各组

ApoE 的荧光光度值采用 Image J 分析统计。

1.5 染色质免疫沉淀 (ChIP) 检测

ApoE 的启动子序列由实验克隆获得 (GenBank: MZ606378) 通过 JASPAR 数据库 (<http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspardb.pl>) 预测雌激素受体 (Esr) 和雌激素相关受体 γ (Esrrg) 的顺式作用元件, 并在作用元件两端设计相应检测引物。首先利用 Magna ChIP™ G 组织型试剂盒 (Millipore, 美国) 分析精巢 ApoE 启动子中 Esrrg 和 Esr 作用元件对相应抗体的募集, 确定阳性 Esrrg 和 Esr 作用元件。在 BPA 对阳性作用位点的募集影响分析时, 每组使用 9 条鱼的精巢 (每个重复中 3 只鱼的精巢混合为一个样本, 3 个重复) 在每个采样时间点用于 ChIP 检测, 共 48 条鱼进行 ChIP 分析。把这些精巢切成小块, 用甲醛固定。用甘氨酸解交联, 用裂解缓冲液收集组织, 然后再通过超声处理裂解液产生 300~800 bp DNA 片段, 再分别使用 Esrrg 抗体 (Abcam, 英国) 和 Esr 抗体 (Abcam, 英国) 进行后续 ChIP 实验 (Esrrg 和 Esr 抗体已经过特异性检验), 详细操作参照试剂盒说明书进行。阳性对照使用 RNA polymerase II 抗体, 用内参基因肌动蛋白 (*actb*) 设计阳性对照检测引物。在阴性对照中, 使用 IgG (Santa Cruz, 美国) 代替抗体, 纯化处理后样品获得 DNA 片段, 进行 qPCR 检测。引物的扩增效率均保证在 90%~110% (表 1), 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量^[23], 同时每个样本中保留一定量超声处理后未进行 ChIP 实验的染色质裂解液作为 Input 样本, 直接进行纯化和 qPCR。各个样本目标抗体的最终募集量对比 Input 进行归一化处理。

1.6 DNA 甲基化分析

在 1、3 和 5 周 3 个时间点, 对照组和暴露组各取 5 条鱼的精巢 (重复 1 和 2 各 2 条鱼, MT1-MT4, 重复 3 各 1 条鱼, MT5)(MT: 雄鱼精巢) 用于 DNA 甲基化测定, 共使用 30 条鱼。首先使用亚硫酸氢盐处理的 DNA (EZ DNA 甲基化 Gold™ 试剂盒, Zymo, 美国), 纯化后的 DNA 随后在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存以供进一步研究。亚硫酸氢盐处理后引物由网站 (http://www.urogene.org/cgi_bin/methprimer/methprimer.cgi) 设计, 选择评分最高的 2 对, 共包括了 12 个 CpG 位点。

PCR 扩增产物纯化后使用插入 pMD18-T 载体 (TA 克隆试剂盒, TaKaRa, 日本)。对于每个个体, 随机选取 5 个克隆测序分析甲基化状态, 测序由南京擎科生物科技有限公司进行 (表 1)。

1.7 数据分析

所有的数据均使用使用平均值 $\pm$ 标准误 (mean $\pm$ SE) 表示。使用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 分析数据的显著性。在分析之前首先进行数据的正态性分布 (Shapiro-Wilk) 以及方差同质性 (Levene's test) 检验, 不符合正态性分布或者方差同质的数据需进行 log 转化, 然后再进行单因素方差分析。对存在显著型差异的数据采用 Tukey post-hoc test 进行后续检验。分析使用 SPSS Statistics 17.0 软件进行。

2 结果

2.1 BPA 对精巢 ApoE mRNA 和蛋白表达的影响

BPA 暴露后, 精巢 ApoE mRNA 的表达在第 1 周受到显著抑制, 而在第 3 周被显著诱导, 第 5 周又受到显著抑制 (图 1-a)。ApoE 蛋白在第 1 周的表达受到明显抑制, 而在第 3 周的表达有一定上升, 在第 5 周的表达显著上升 (图 1-b)。

2.2 BPA 对精巢 ApoE 蛋白分布的影响

在对照组精巢中, ApoE 蛋白广泛分布于生殖细胞的不同发育阶段, 在精原细胞上分布最多, 在初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和精子上分布依次减少 (图版-1~3)。BPA 暴露 1 和 3 周后, ApoE 在精巢的分布无明显变化, BPA 暴露 5 周后, ApoE 蛋白在生殖细胞上的分布趋势与对照组相同, 但量增加, 特别是在精原细胞, 初级精母细胞和次级精母细胞上的分布明显高于对照组 (图版-16~18)。Image J 分析 ApoE 的荧光光度值结果也显示, 在暴露 1 和 3 周, BPA 暴露组的 ApoE 蛋白荧光值为对照组的 (0.90 $\pm$ 0.07) 倍 ($P=0.055$) 和 (1.10 $\pm$ 0.15) 倍 ($P=0.107$), 但差异不显著; 而暴露 5 周, BPA 暴露组的 ApoE 蛋白荧光值为对照组的 (1.69 $\pm$ 0.23) 倍 ($P<0.001$)。

2.3 ApoE 基因启动子分析

通过对 DNA 启动子片段的分析 (12 个位点由“DNA 甲基化分析”引物设计网站推荐), 实验

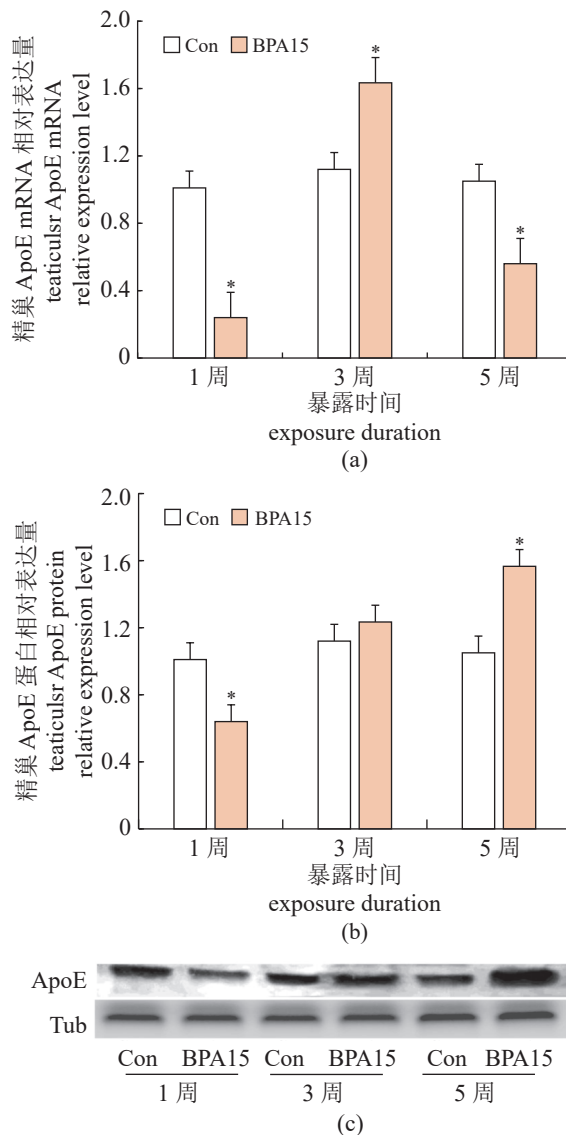


图 1 BPA 对精巢 ApoE 表达的影响

(a) ApoE mRNA 的表达; (b) ApoE 蛋白的表达; (c) 两组在 3 个时间点的 ApoE 蛋白印迹。* $P<0.05$, Tub. 微管蛋白, WB. 内参。

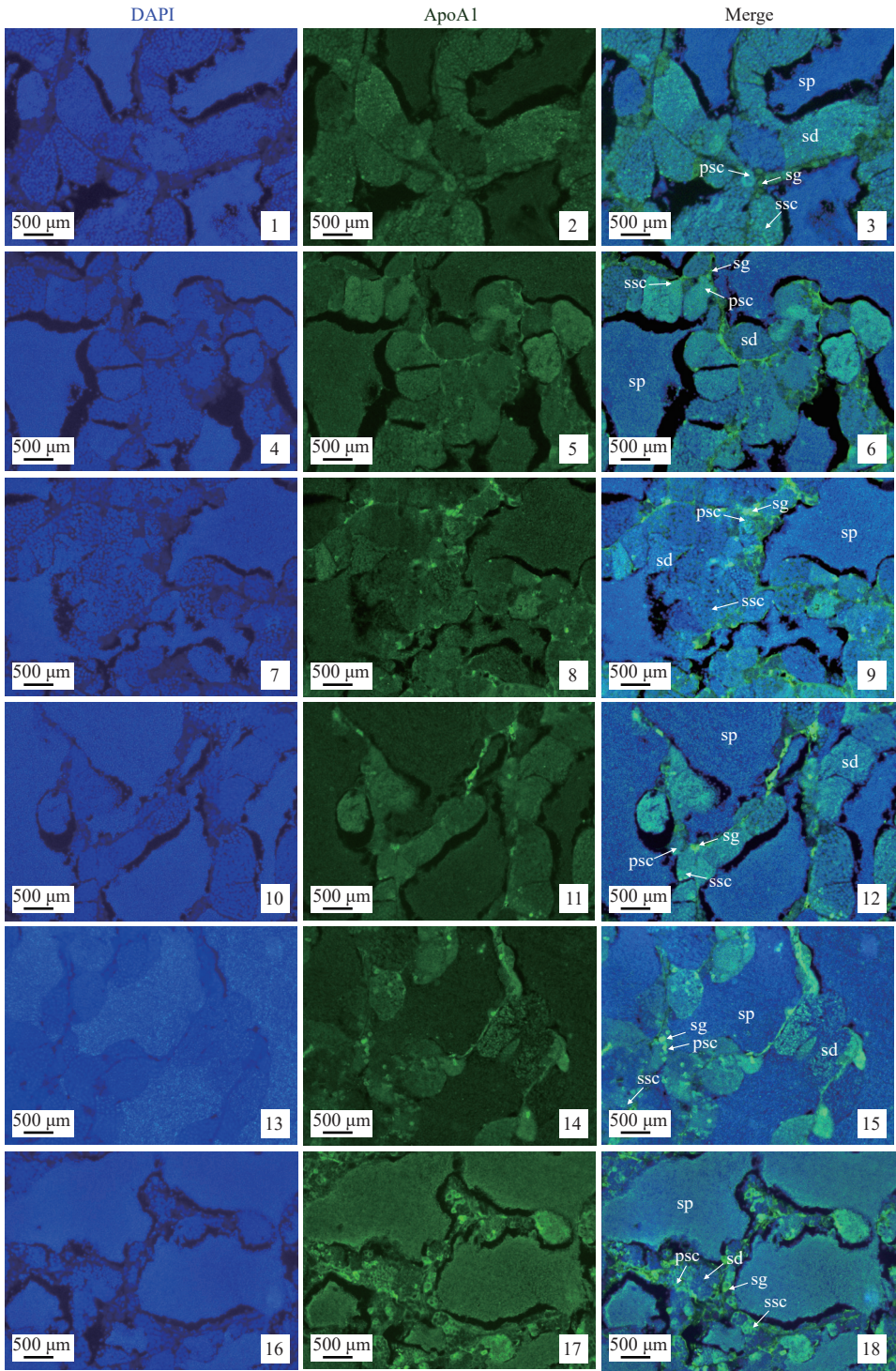
Fig. 1 Effect of BPA on ApoE expression in testis

(a) expression of ApoE mRNA; (b) ApoE protein expression; (c) ApoE blotting was performed in two groups at three time points. * $P<0.05$, Tub. tubulin, WB. reference genes.

找到了 4 个雌激素相关受体 γ (Esrrg) 和一个雌激素受体 (Esr) 顺式作用元件。其中, Esr 位点预测为-516~-502, Esrrg 位点预测为-773~-762 (T1)、-581~-571 (T2)、-519~-509 (T3) 和-328~-317 (T4) (图 2)。

2.4 ChIP 分析结果

ApoE 的 T4-Esrrg 位点被证明是精巢中 Esrrg 的阳性作用位点 (图 3-a)。qPCR 结果显示,



图版 BPA 对精巢 ApoE 分布的影响

1~3.第 1 周 ApoE 蛋白在 Con 组的分布; 4~6.第 1 周 ApoE 蛋白在 BPA 处理组的分布; 7~9.第 3 周 ApoE 蛋白在 Con 组的分布; 10~12.第 3 周 ApoE 蛋白在 BPA 处理组的分布; 13~15.第 5 周 ApoE 蛋白在 Con 组的分布; 16~18.第 5 周 ApoE 蛋白在 BPA 处理组的分布。DAPI. 4',6-二脒基-2-苯基吲哚, Merge. 结合图, sg. 精原细胞, psc. 初级精原细胞, ssc. 次级精母细胞, sd. 精子细胞, sp. 精子。

Plate Layouts Effect of BPA on ApoE distribution in testis

1-3. ApoE protein distribution in Con group at week 1; 4-6. ApoE protein distribution in the BPA treated group at week 1; 7-9. ApoE protein distribution in Con group at week 3; 10-12. ApoE protein distribution in the BPA treated group at week 3; 13-15. ApoE protein distribution in Con group at week 5; 16-18. ApoE protein distribution in the BPA treated group at week 5. DAPI. 4',6-diamidino-2-phenylindole, Merge. combined graph, sg. spermatogonial cell, psc. primary spermatogonial cell, ssc. secondary spermatocyte, sd. sperm cell, sp. sperm.

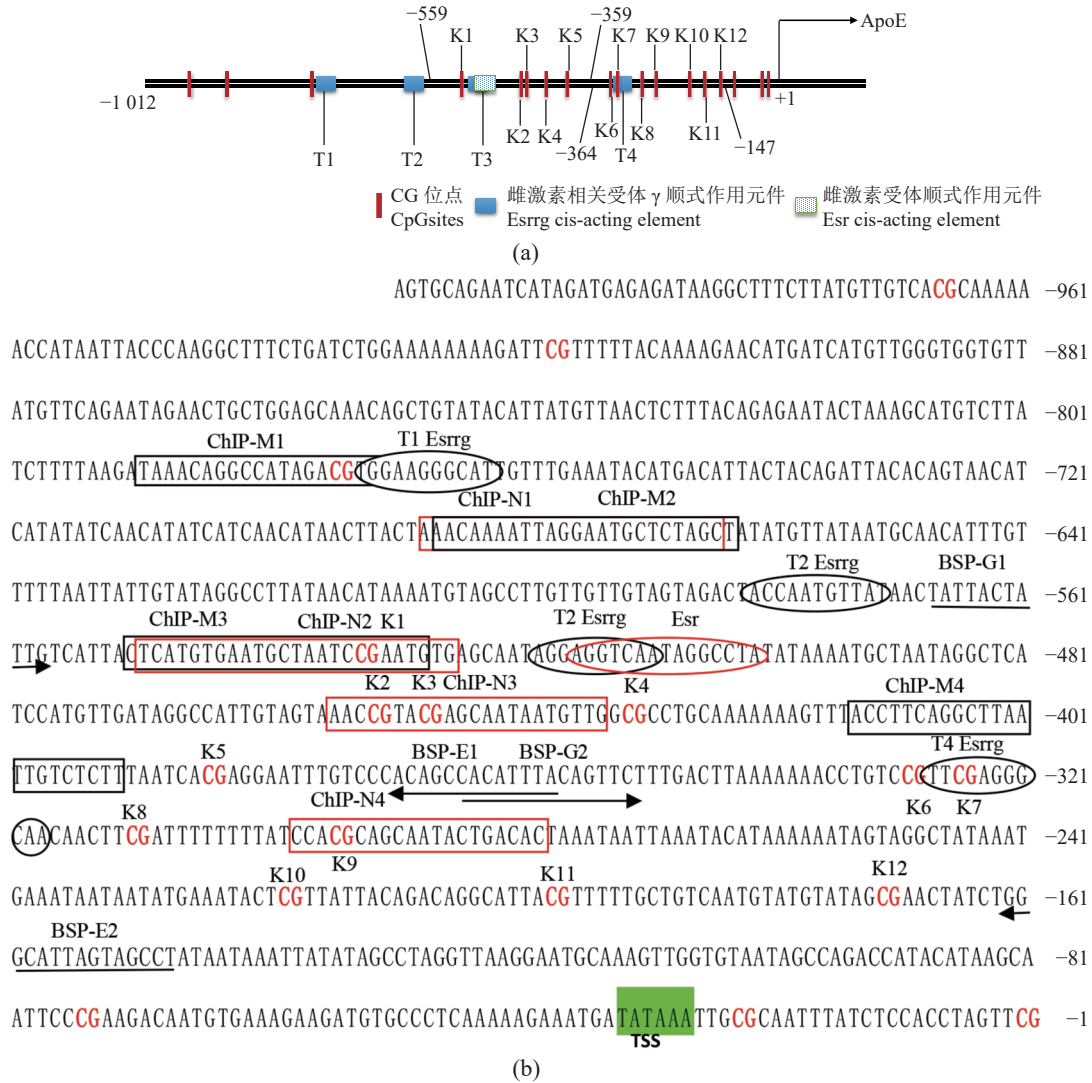


图 2 ApoE 启动子的分析预测

黑色方框为 ChIP 检测上游引物, 红色方框为 ChIP 检测下游引物, 黑色圆圈为 Esrrg 位点, 红色圆圈为 Esr 位点, 右箭头为 DNA 甲基化检测上游引物, 左箭头为 DNA 甲基化检测下游引物, TSS. 转录起始位点, K. CpG 位点。

Fig. 2 Analysis and prediction of ApoE promoter

Black boxes indicate ChIP detection upstream primers, red boxes indicate ChIP detection downstream primers, black circles indicate the Esrrg sites, red circle indicates the Esr site, right arrows indicate upstream primers for DNA methylation detection, left arrows indicate downstream primers for DNA methylation detection, TSS. transcriptional start site, K. CpG site.

ApoE 启动子中的 Esrrg 的募集在第 1 周显著减少, 而在 BPA 暴露后的第 3 周显著增强, 第 5 周显著减弱 (图 3-b)。

2.5 DNA 甲基化检测结果

MT1 和 MT3 的对照组在第 5 周有个别位点发生甲基化, 在 BPA 影响下, 暴露组在第 1 周部分 K10 发生甲基化, 在第 5 周 MT3、MT4、MT5 暴露组也有个别位点发生甲基化。结果表明, 精巢 ApoE 的启动子区处于未甲基化状态, BPA 处理对其无显著影响 (图 4)。

3 讨论

在本实验中, 稀有鮟鲫精巢 ApoE 基因 mRNA 的表达在 BPA 暴露后的第 1 周和第 5 周被显著抑制, 而在第 3 周被显著诱导, 呈现倒“U”形变化趋势。虽然目前关于 BPA 不同暴露时间的非单调效应研究较少, 但是以往研究发现不同剂量的 BPA 暴露的确会呈现非单调的剂量反应效应, 尤其是“U”形和倒“U”形剂量效应^[24-25]。有研究发现, BPA 在不同的剂量范围由不同的作用机制主导, 在低剂量时可通受

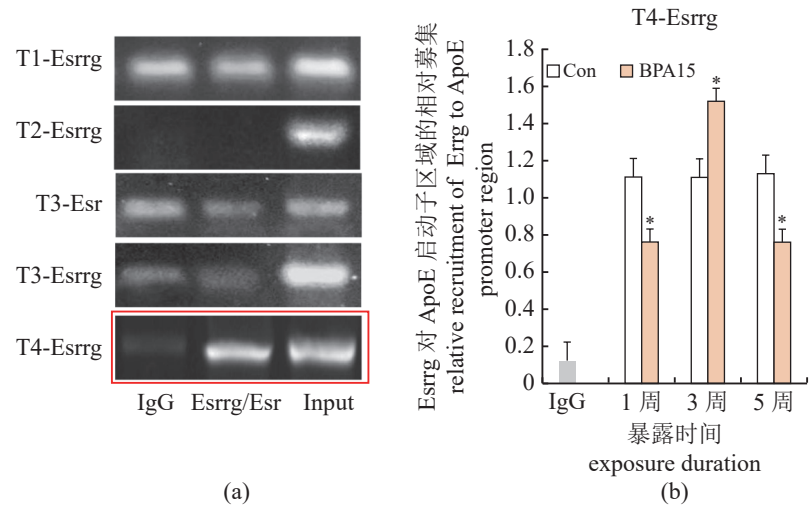


图 3 精巢 ApoE 启动子中 Esrrg 响应元件的 ChIP 检测结果

(a) ChIP 法对双酚 A 暴露组和对照组混合样品中 Esrrg 响应元件的验证; (b) ApoE 启动子 T4 位点 Esrrg 募集的变化。IgG. 阴性对照, Input. 阳性对照, 红框表示阳性位点, *表示组内差异显著, $P<0.05$ 。

Fig. 3 ChIP detection results of Esrrg response elements in ApoE promoter of testis

(a) verification of Esrrg response elements by ChIP method in mixed samples of bisphenol A exposure group and control group; (b) changes in Esrrg recruitment at T4 of ApoE promoter. IgG. negative control, Input. positive control, the red box indicates the positive sites, * represents significant difference in the group, $P<0.05$.

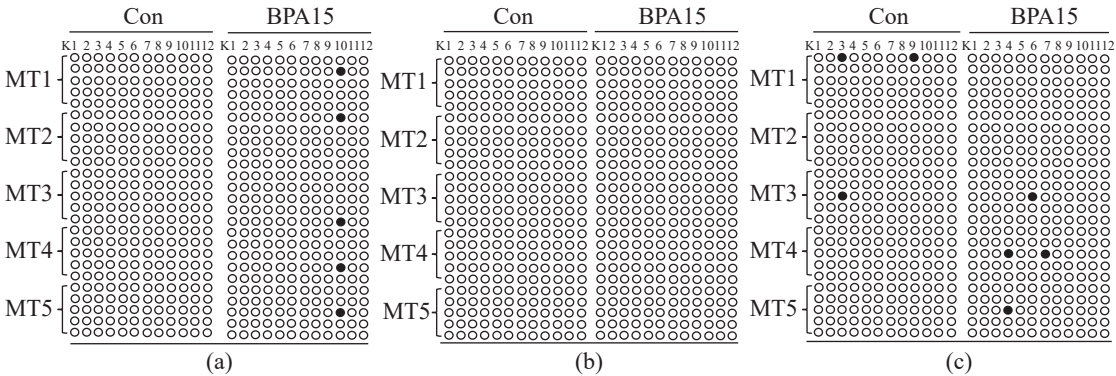


图 4 精巢 ApoE 基因的 DNA 甲基化检测结果

(a) 1 周, (b) 2 周, (c) 3 周。

Fig. 4 DNA methylation analysis of ApoE in testis

(a) 1 week, (b) 2 weeks, (c) 3 weeks.

体介导产生低剂量效应;而随着浓度升高,受体的作用逐渐饱和,受体的响应被抑制,细胞内反馈调节机制减缓其作用效应;但当剂量增加到更高水平时,会产生一定反应性的急性毒性机制,对细胞的结构和功能造成损伤^[26],这可能是导致倒“U”形或其他非线性剂量效应的重要原因。本研究中 ApoE 的蛋白表达变化与 mRNA 转录变化并不一致,在第 5 周时蛋白表达增强,这可能是转录与翻译之间存在时间滞后,当蛋白翻译达到峰值时 mRNA 已经有了一定的降解^[26]。Sims 等^[27]的研究表明,通常大约

30% 到 85% 的蛋白质水平变化可归因于 mRNA 表达的变化。其他 15% 到 70% 的变异可以由转录后和翻译后调控以及测量误差来解释,但这种比例在不同的生物之间差异很大,比如原核生物与真核生物或单细胞和多细胞生物之间蛋白质与 mRNA 的相关性较小,所以 mRNA 与蛋白之间可能存在着更内在和复杂的调控机制。

ApoE 具有多态性,参与脂蛋白的转化与代谢过程,在调节脂质代谢中发挥重要作用^[28]。在本实验中,暴露于 BPA 下 5 周的精巢内 ApoE 的分布没有发生变化但数量增加,这可能导致

精巢内的脂质转运加速^[29]。BPA 的化学结构与合成雌激素——己烯雌酚相似, 具有雌激素活性, 与机体的雌激素受体结合会产生抗雌激素或拟雌激素作用, 从而干扰机体正常的内分泌活动^[4]。不仅 BPA, 其他的雌激素也对 ApoE 有类似调控作用。Srivastava 等^[30]给小鼠注射雌二醇 (E₂), 发现小鼠的 ApoE 水平和肝脏 ApoE 合成增加了 2 倍多。在阿尔兹海默症的一种疗法中, 就是通过 E₂ 来引起诱导 ApoE 的产生, 从而改善症状^[17]。从这些研究中可以发现, 雌激素或具有雌激素效应的物质可以影响载脂蛋白的合成, 这将为探索雌激素和脂蛋白合成之间的关系提供新的依据。

Esrs 和 Esrrg 可以介导雌激素发挥功能, BPA 也被证实对 Esrs 和 Esrrg 的作用具有亲和力^[31-32]。之前的研究发现, 在稀有鮕鲫精巢组织中 BPA 调控载脂蛋白 A1 (ApoA1) 的表达机制之一就是改变其启动子区 Esr 的募集^[14]。而在稀有鮕鲫肝脏组织中 BPA 调控 ApoE 的表达机制之一则是改变其启动子区 Esrrg 的募集^[22]。所以在本实验中预测了 Esr 和 Esrrg 顺式作用元件, 结果 ApoE 基因的 T4-Esrrg 位点被证明是精巢中 Esrrg 的阳性反应位点, 并且募集变化与 mRNA 的变化相一致。这些实验结果证明了 BPA 可以通过 Esrrg 来干扰载脂蛋白家族的表达。此外, ApoE 基因的表达还可以通过甲基化修饰调控^[33]。之前的研究也证明 BPA 可以改变稀有鮕鲫性腺的甲基化水平, 并通过甲基化修饰调控生殖相关基因的表达^[34-35]。BPA 暴露也的确影响了精巢 ApoA1 和肝脏 ApoE 启动子区 CpG 位点甲基化^[14, 22]。因而在本实验中也检测了 BPA 处理前后稀有鮕鲫精巢组织 ApoE 启动子区 CpG 位点的甲基化水平变化, 但发现 CpG 位点甲基化修饰并未参与 BPA 对稀有鮕鲫精巢组织 ApoE 的表达调控。

4 结论

本研究证明了 BPA 可以通过改变精巢 ApoE 启动子区 Esrrg 的募集影响其 mRNA 表达、蛋白表达与分布。ApoE 可能是 BPA 作用下机体脂代谢紊乱与生殖问题的关键分子。

参考文献 (References):

[1] Rubin B S. Bisphenol A: an endocrine disruptor with wide-

spread exposure and multiple effects[J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 127(1-2): 27-34.

[2] Huang Y Q, Wong C K C, Zheng J S, *et al.* Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts[J]. *Environment International*, 2012, 42: 91-99.

[3] Wang B, Huang B, Jin W, *et al.* Occurrence, distribution, and sources of six phenolic endocrine disrupting chemicals in the 22 river estuaries around Dianchi Lake in China[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(5): 3185-3194.

[4] 王佳, 詹平. 双酚 A 对机体影响及其机制的研究进展 [J]. *预防医学情报杂志*, 2005, 21(5): 541-544.

Wang J, Zhan P. Research progress on the effects of BPA on body and its mechanism[J]. *Journal of Preventive Medicine Information*, 2005, 21(5): 541-544 (in Chinese).

[5] 蒋志惠, 谢文艳, 李新平, 等. 环境雌激素双酚 A 暴露现状及其雄性生殖毒性研究概况 [J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(4): 1-9.

Jiang Z H, Xie W Y, Li X P, *et al.* Bisphenol A exposure and male reproductive injury: an review[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(4): 1-9 (in Chinese).

[6] 解美娜, 王康, 黄传斋, 等. 哺乳期小鼠暴露双酚 A 对其成年后精子质量的影响 [J]. *毒理学杂志*, 2016, 30(1): 56-59.

Xie M N, Wang K, Huang C Z, *et al.* Effects of exposure to BPA on adult sperm quality in lactation mice[J]. *Journal of Toxicology*, 2016, 30(1): 56-59 (in Chinese).

[7] 张宁. 低剂量双酚 A 对小鼠精子功能的影响及机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2018: 22-27.

Zhang N. Study on the effects and mechanism of low dose Bisphenol A on sperm functions in male mice[D]. Changchun: Jilin University, 2018: 22-27 (in Chinese).

[8] 朱龙. BPA 对稀有鮕鲫雄性生殖和子代发育的影响及分子机制研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.

Zhu L. Impact of BPA on the male reproduction and offspring development in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) and the underlying molecular mechanisms[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2021 (in Chinese).

[9] Wassenaar P N H, Trasande L, Legler J. Systematic review and meta-analysis of early-life exposure to bisphenol A and obesity-related outcomes in rodents[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2017, 125(10): 106001.

[10] Do M T, Chang V C, Mendez M A, *et al.* Urinary bisphenol A and obesity in adults: Results from the canadian health measures survey[J]. *Health Promotion and Chronic Disease Preven-*

- tion in Canada, 2017, 37(12): 403-412.
- [11] Lahnsteiner F, Patzner R A, Weismann T. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei)[J]. *Reproduction Nutrition Development*, 1993, 33(4): 349-360.
- [12] Kim N, Nakamura H, Masaki H, *et al.* Effect of lipid metabolism on male fertility[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 485(3): 686-692.
- [13] Zhang Y Y, Guan Y J, Zhang T, *et al.* Adult exposure to bisphenol A in rare minnow *Gobiocypris rarus* reduces sperm quality with disruption of testicular aquaporins[J]. *Chemosphere*, 2018, 193: 365-375.
- [14] Zhang Y Y, Zhang M, Zhu Z, *et al.* Bisphenol A regulates apolipoprotein A1 expression through estrogen receptors and DNA methylation and leads to cholesterol disorder in rare minnow testis[J]. *Aquatic Toxicology*, 2021, 241: 105999.
- [15] 廖峥嵘, 吕品, 吕雨虹, 等. 载脂蛋白 E 基因异常表达对小鼠血脂代谢的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(2): 254-255.
- Liao Z R, Lü P, Lv Y H, *et al.* Effects of the abnormal expression of the apolipoprotein E gene on the lipoprotein metabolism[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2011, 31(2): 254-255 (in Chinese).
- [16] Mahley R W, Huang Y D, Weisgraber K H. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116(5): 1226-1229.
- [17] Sparks D L. Coronary artery disease, hypertension, ApoE, and cholesterol: a link to Alzheimer's disease?[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1997, 826(1): 128-146.
- [18] Law G L, McGuinness M P, Linder C C, *et al.* Expression of apolipoprotein E mRNA in the epithelium and interstitium of the testis and the epididymis[J]. *Journal of Andrology*, 1997, 18(1): 32-42.
- [19] Zhang J, Liu Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain[J]. *Protein & Cell*, 2015, 6(4): 254-264.
- [20] Corbo R M, Scacchi R, Cresta M. Differential reproductive efficiency associated with common apolipoprotein E alleles in postreproductive-aged subjects[J]. *Fertility and Sterility*, 2004, 81(1): 104-107.
- [21] Zhang T, Dai P Y, Cheng D, *et al.* Obesity occurring in apolipoprotein E-knockout mice has mild effects on fertility[J]. *Reproduction*, 2014, 147(2): 141-151.
- [22] Zhang Y Y, Zhu Z, Liu Q, *et al.* Bisphenol A disrupts apolipoprotein E expression through estrogen-related receptor gamma and DNA methylation in the liver of male rare minnow *Gobiocypris rarus*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 228: 113041.
- [23] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [24] Calabrese E J, Baldwin L A. A general classification of U-shaped dose-response relationships in toxicology and their mechanistic foundations[J]. *Human & Experimental Toxicology*, 1998, 17(7): 353-364.
- [25] Zhang Y Y, Yuan C, Gao J C, *et al.* Testicular transcript responses in rare minnow *Gobiocypris rarus* following different concentrations bisphenol A exposure[J]. *Chemosphere*, 2016, 156: 357-366.
- [26] 高常安, 张爱茜, 蔺远, 等. 酚类化合物非单调剂量-效应毒理学机制的 QSAR 研究 [J]. *科学通报*, 2009, 54(2): 161-170.
- Mu Y S, Zhang A Q, Gao C A, *et al.* QSAR study on the non-monotonic dose-response curve of PCBs in chicken embryo hepatocyte bioassay[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2009, 52(5): 662-669 (in Chinese).
- [27] Sims J S, Milner D A. Transcription[M]//Kremsner P G, Krishna S. Encyclopedia of malaria. New York: Springer, 2014.
- [28] Paoli D, Zedda S, Grasseti D, *et al.* Are apolipoprotein E alleles correlated with semen quality?[J]. *International Journal of Andrology*, 2012, 35(5): 714-719.
- [29] 任歆, 李志坚, 王文蕾. 载脂蛋白 E 基因多态性与颈动脉粥样硬化相关性的研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2014, 11(21): 162-164.
- Ren X, Li Z J, Wang W L. Research progress of apolipoprotein E gene polymorphism and carotid atherosclerosis[J]. *China Medical Herald*, 2014, 11(21): 162-164 (in Chinese).
- [30] Srivastava R A K, Srivastava N, Averna M, *et al.* Estrogen up-regulates Apolipoprotein E (ApoE) gene expression by increasing ApoE mRNA in the translating pool via the estrogen receptor α -mediated pathway[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(52): 33360-33366.
- [31] Gould E, Tanapat P, McEwen B S, *et al.* Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(6): 3168-3171.
- [32] Matsushima A, Kakuta Y, Teramoto T, *et al.* Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR γ [J]. *The Journal of Biochemistry*, 2007,

- 142(4): 517-524.
- [33] Ma Y Y, Smith C E, Lai C Q, *et al.* Genetic variants modify the effect of age on *ApoE* methylation in the genetics of lipid lowering drugs and diet network study[J]. *Aging Cell*, 2015, 14(1): 49-59.
- [34] Yuan C, Zhang Y 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]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 178: 99-105.
- [35] Zhang T, Liu Y, Chen H, *et al.* The DNA methylation status alteration of two steroidogenic genes in gonads of rare minnow after bisphenol A exposure[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2017, 198: 9-18.

Effect and mechanism of bisphenol A on apolipoprotein E gene in rare minnow (*Gobiocypris rarus*)

JU Jian , ZHU Zhu , YANG Hui , WEI Wenzhi , ZHANG Yingying *

*Fishery Environment and Healthy Aquaculture Laboratory,
College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225000, China*

Abstract: Bisphenol A (BPA), a plasticizer with estrogenic activity, has significant effects on male reproduction. Apolipoprotein E (ApoE) plays an important role in the transport process of lipids, such as triglycerides and cholesterol in spermatozoa. In this study, we investigated the effects of BPA on the ApoE gene in testis and its regulatory mechanism, to elucidate the potential relationship between BPA-induced male reproductive problems and lipid metabolism. Rare minnows were exposed to BPA (15 µg/L) for 1, 3 and 5 weeks. The effects of BPA on ApoE gene expression and distribution were assessed using real-time fluorescence quantification (qPCR), immunoblotting (WB), and immunofluorescence (IF). Additionally, the regulatory mechanisms of BPA on ApoE were explored using chromatin immunoprecipitation (ChIP) and DNA methylation assays. Results from qPCR, WB, and IF demonstrated that BPA significantly affected ApoE gene expression and distribution in spermatozoa. ChIP analysis revealed an estrogen-associated receptor γ (Esrrg) positive effect site in ApoE promoter region, with changes in ApoE mRNA expression correlation with Esrrg recruitment. DNA methylation assays showed that the ApoE promoter region was unmethylated, and that BPA treatment did not significantly alter its methylation status. These findings indicated that BPA directly interferes with ApoE gene expression by regulating Esrrg recruitment in the ApoE gene promoter region. Consequently, BPA may affect the reproductive function of rare minnow by disrupting testicular lipid transport. Our results provided a reference for future research on the effects of environmental endocrine disruptors on male reproduction from the perspective of lipid metabolism.

Key words: *Gobiocypris rarus*; bisphenol A; apolipoprotein E; testis; estrogen receptor related receptor γ

Corresponding author: ZHANG Yingying. E-mail: zhangyingying@yzu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32371704); Yangzhou International Science and Technology Cooperation Projects (YZ2021175)