

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.04.019

幼年期小鼠双酚 F 暴露对其行为的影响

梁维凤, 李子木, 常晶晶, 胡 繁

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘 要:双酚 F(bisphenol F, BPF)作为双酚 A(bisphenol A, BPA)的主要替代物,对大脑功能影响的研究并不多。文章以幼年期(21~49 d)为时间窗口,通过不同的行为学范式研究 BPF 暴露对小鼠行为的影响。研究发现,1 mg/(kg·d) BPF 暴露不会影响小鼠的体质量、饮水量等生理状态,但显著减少小鼠进入旷场中央区的时间与次数,增加小鼠在悬尾、强迫游泳时的静止时间以及减弱小鼠在三箱社交中与陌生鼠 1 的交流,而与陌生鼠 2 的交流时间没有变化。结果表明,幼年期小鼠 BPF 暴露会诱导其焦虑与抑郁样行为,损害小鼠的社交能力。该研究将为 BPF 引起的神经系统损伤提供有价值的信息,并在工业生产中为 BPA 替代物的选择提供理论依据。

关键词:双酚 F(BPF);双酚 A(BPA);焦虑;抑郁;社交

中图分类号:R994.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-5060(2023)04-0554-06

Effects of juvenile bisphenol F exposure on the behavior of mice

LIANG Weifeng, LI Zimu, CHANG Jingjing, HU Fan

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: There are few researches on the effects of bisphenol F(BPF), the main substitute of bisphenol A(BPA), on brain function. This paper chose the juvenile(21-49 d) as exposure time window to study the effects of BPF on the behavior of mice through different behavioral paradigms. The results showed that 1 mg/(kg·d) BPF treatment did not affect the physiological status of mice, such as body weight and water consumption, but significantly reduced the time and frequency of mice entering the central area in open field test, increased the immobile time of mice in tail suspension test and forced swimming test and weakened the sniffing time with strange mice 1 while the social novelty with strange mice 2 had no changes in three-chamber test. Those results suggested that juvenile BPF exposure could induce anxiety-and depressive-like behaviors and impair the social ability of mice. This paper will provide valuable information for BPF-induced nervous system impairments and provide theoretical basis for industrial production choosing BPA alternative as raw material.

Key words: bisphenol F(BPF); bisphenol A(BPA); anxiety; depression; social

双酚 A(bisphenol A, BPA)是一种人工合成的化学物质,广泛应用于合成聚碳酸酯以及环氧树脂。作为食品包装的重要单体原料, BPA 可以通过物化迁移至食品内容物中,从而进入人体^[1]。人类接触 BPA 的途径主要为饮食和环境,其中饮

食暴露超过 95%,环境暴露^[2]低于 5%。文献[2-5]研究表明 BPA 暴露与不良健康有关,例如低出生体质量、癌症、糖尿病、生殖问题、心血管疾病、肥胖和神经性疾病等。因此,许多国家在一些食品包装中禁止 BPA 的使用,这也刺激了工业上使

收稿日期:2021-04-01;修回日期:2021-04-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21876041)

作者简介:梁维凤(1995—),女,安徽阜阳人,合肥工业大学硕士生;

胡 繁(1982—),女,湖北襄阳人,博士,合肥工业大学副教授,硕士生导师,通信作者, E-mail: hufan@hfut.edu.cn.

用BPA的替代物进行生产,它们与BPA具有相似的化学结构。据了解,目前一共有16种BPA替代物进行工业生产,最主要的包含BPF^[6]。其中BPA与双酚F(bisphenol F, BPF)的结构式如图1所示。

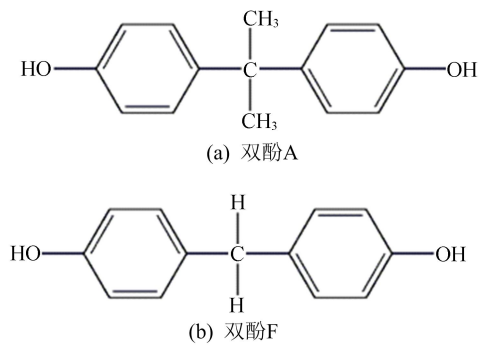


图1 双酚A和双酚F的结构简式

BPF也可以作为合成环氧树脂的单体,并且可应用于清漆、黏合剂、塑料、水管、牙科密封剂、食品包装涂料等^[7],其中在食品包装中的应用可能给人类健康带来威胁。目前在地表水、沉积物以及室内灰尘中均已发现了BPF的存在^[6,8]。在对中国孕妇血清中的双酚物质检测中发现BPF的检出率^[9]为20.4%,类似地,在来自西班牙女性乳汁中BPF的检测水平^[10]为22%,文献^[11]显示在人类尿液中所检测到BPF的浓度、频率与BPA相当。本实验室前期的研究表明,幼年期小鼠1 mg/(kg·d) BPA暴露会扰乱大脑突触可塑性进而影响啮齿类动物的行为^[12],这一剂量远低于目前公认最低观察到BPA的不良反水平剂量50 mg/(kg·d),且低于未观察到啮齿类动物全身不良反应水平剂量^[13]5 mg/(kg·d)。此外,根据人类与小鼠的体表面积药理剂量换算,该剂量与人类在日常生活中暴露BPA的水平相当^[14]。作为BPA的主要替代物,尽管体内与体外研究已表明BPF的毒性作用^[15],然而目前关于BPF对大脑功能的影响研究并不多。本文利用行为学中经典的行为学范式,观察幼年期1 mg/(kg·d) BPF暴露对小鼠行为的影响,这将在工业生产中为BPA替代物的使用选择提供理论依据,并为在食品包装领域BPF的添加标准提供支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

二甲基亚砜(DMSO)、BPF均购于上海 Sig-

ma-Aldrich 贸易有限公司;乙醇购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪 器

旷场箱、悬尾箱、强迫游泳水桶以及三箱社交箱来源于中国科学技术大学动物行为研究中心。

1.3 实 验 方 法

1.3.1 动 物 的 处 理

12只C57BL/6J雄鼠(21 d)购于北京维通利华实验动物技术有限公司,其中对照组与BPF暴露组各6只,动物饲养于中国科学技术大学动物实验中心。为了模拟人类暴露BPF的途径,本文选择口服饮水的方式暴露BPF,将BPF先溶于DMSO中,再溶于水中,同时对对照组小鼠饮用水中加入相同体积的DMSO。其中暴露剂量为1 mg/(kg·d),暴露时间为4周(21~49 d)。由于小鼠不断成长,体质量与饮水量也在不断增加,因此药物暴露期间每隔4 d称量小鼠体质量以及饮水量,及时更换水中BPF的浓度,给药结束后第2天进行行为学检测。

1.3.2 旷 场 测 试

旷场装置是长、宽、高分别为50、50、25 cm的白色无盖长方体,其中旷场底部被分为16个均等的小方格,中间4个小方格为中央区。将每只小鼠从相同位置放入旷场中,任其自由探索5 min,整个期间通过红外摄像机记录下来,且每只小鼠在测试前用75%酒精擦拭箱体,以免上只小鼠的气味造成干扰。后期使用EthoVision 8.5软件分析小鼠进入中央区的潜伏期、时间、频率以及小鼠的运动总距离。

1.3.3 悬 尾 测 试

在距离小鼠尾巴2 cm处使用胶带将尾巴悬挂在悬尾箱的钩子上(距离地面25 cm),由摄像机记录6 min,后期使用双盲法统计小鼠在后5 min内的总静止时间。

1.3.4 强 迫 游 泳 测 试

强迫游泳装置为直径15 cm、高30 cm的无盖玻璃圆柱体,其中水深15 cm,温度保持在25℃左右。将小鼠单独放入水中游泳6 min并通过摄像机记录下来,后期使用双盲法统计小鼠在后5 min内小鼠的总静止时间。且每只小鼠结束后换干净的水以免前一只小鼠的排泄物、气味等造成干扰。

1.3.5 三 箱 社 交 测 试

三箱社交箱是长、宽、高分别为60、40、25 cm的白色无盖长方体,且被分割成长、宽、高分别为

20、40、25 cm 的 3 个均等隔间,小鼠可以自由穿入 3 个箱体。小鼠连续适应社交箱 3 d,第 4 天进行测试。测试分为 2 个阶段:第 1 阶段测试小鼠的社交能力,在三箱体的左箱体中放入 1 个金属笼,右箱体对侧放入 1 只同龄雄鼠(陌生鼠 1)于相同的金属笼中,将实验鼠放入中间箱体自由探索 10 min;第 2 阶段测试小鼠的社交新奇能力,将另一只同龄雄鼠(陌生鼠 2)放于左箱体的金属笼中,右箱体金属笼中仍为陌生鼠 1,任小鼠在三箱体中继续探索 10 min,整个测试阶段用摄像机记录下来,且每只小鼠测试前用 75%酒精擦拭三箱体以免上只小鼠的气味造成干扰。

使用 EthoVision 8.5 软件分析小鼠在各个阶段与空金属笼、陌生鼠 1、陌生鼠 2 的嗅探总时间。其中:社交指数为第 1 阶段测试期间实验小鼠与陌生鼠 1、金属笼的嗅探时间之差比两者之和;社交偏好指数为第 2 阶段测试期间实验小鼠与陌生鼠 1、陌生鼠 2 的嗅探时间之差比两者之和。

1.4 数据分析

采用 Prism 5.0 对所有行为数据进行 t 检验分析,其中小鼠体质量与饮水量选择重复测量方差分析,数据均表示为(平均值±标准差),其中:*表示 $P < 0.05$ 时具有统计学差异;**表示 $P < 0.01$ 时具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 BPF 暴露对小鼠体质量及饮水量的影响

小鼠在幼年期暴露 BPF 期间,每隔 4 d 称取

体质量以及饮水量来观察小鼠的生理状态,如图 2 所示。由图 2a 可知,幼年期 BPF 暴露组与对照组小鼠的成长体质量之间没有差异;由图 2b 可知,2 组小鼠在幼年期药物暴露期间的饮水量之间也没有差异。结果表明,幼年期 BPF 暴露不会影响小鼠的生理状态。

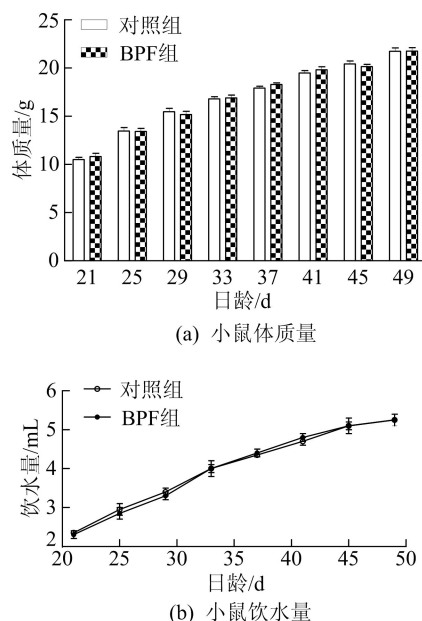


图 2 小鼠在 BPF 暴露期间的生理状态变化

2.2 BPF 暴露对小鼠旷场行为的影响

旷场测试是用来评估啮齿类动物“焦虑样”行为以及基本运动能力的经典行为范式,小鼠在旷场中的表现如图 3 所示。

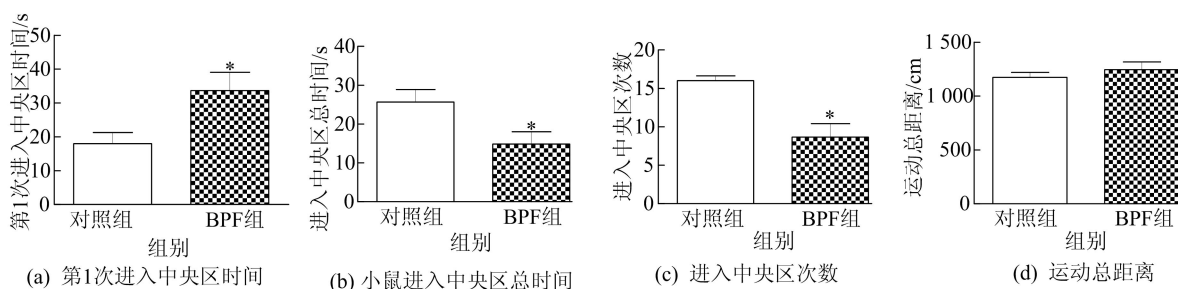


图 3 小鼠在旷场测试期间的行为表现

由图 3a 可知,BPF 暴露组小鼠在第 1 次进入中央区的时间显著高于对照组;由图 3b 可知,BPF 暴露组小鼠进入中央区的总时间显著低于对照组;由图 3c 可知,BPF 暴露组小鼠进入中央区的总次数显著低于对照组,即 BPF 组小鼠在中央区的活跃程度不高,表现出焦虑行为。此外,本文还分析了小鼠在旷场中的总运动距离,统计结

果如图 3d 所示。由图 3d 可知,两组小鼠之间没有差异,即小鼠的基本运动状况正常。结果表明,幼年期 BPF 暴露会诱导小鼠的焦虑情绪,且这种焦虑行为与小鼠的运动状况无关。

2.3 BPF 暴露对小鼠悬尾行为的影响

悬尾测试示意图如图 4a 所示,它是基于小鼠处于困境下,想要逃脱而又无法逃脱从而可能放

弃挣扎,进入一种抑郁不动的状态,结果如图 4b 所示。由图 4b 可知,幼年期 BPF 暴露显著增加小鼠在悬尾期间的静止时间。

强迫游泳期间的总静止时间,这与悬尾的结果是一致的。结果表明幼年期 BPF 暴露会诱导小鼠的抑郁情绪。

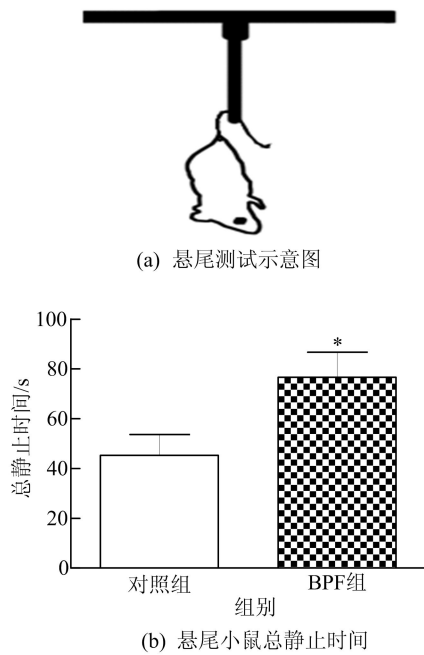


图 4 小鼠在悬尾测试期间的行为表现

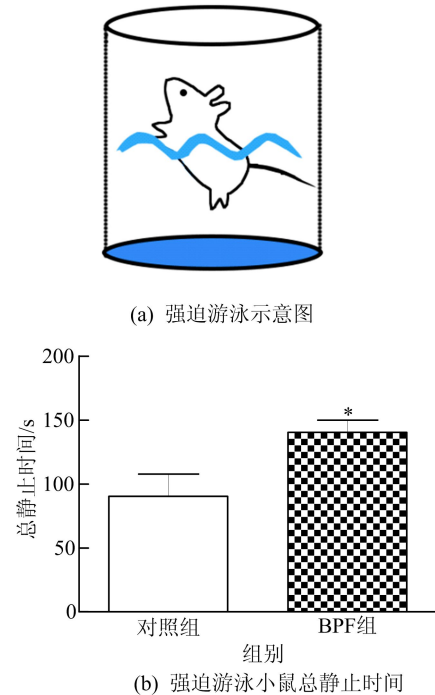


图 5 小鼠在强迫游泳测试期间的行为表现

2.4 BPF 暴露对小鼠强迫游泳行为的影响

强迫游泳测试的示意图如图 5a 所示,其原理与悬尾测试的原理相同。

小鼠在强迫游泳的总静止时间如图 5b 所示,从图 5b 可以看出,BPF 暴露同样会增加小鼠在

2.5 BPF 暴露对小鼠三箱社交行为的影响

三箱社交测试第 1 阶段用来评估小鼠的社会交往能力,小鼠在三箱社交测试期间的行为表现如图 6 所示。

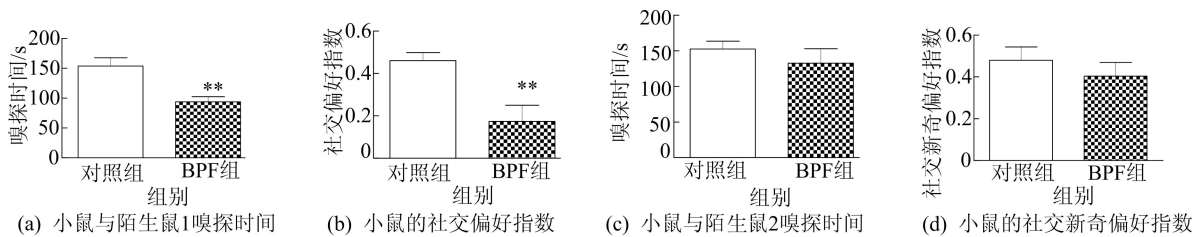


图 6 小鼠在三箱社交测试期间的行为表现

由图 6a 可知,BPF 暴露小鼠与陌生鼠 1 的嗅探时间显著低于对照组,即 BPF 暴露组小鼠不愿意与陌生鼠交流。由于不同小鼠的活泼好动程度不同,为了消除这种个体差异性,本文借鉴前人的分析方法分析小鼠的社交偏好指数,分析结果如图 6b 所示,该结果与嗅探时间分析的结果是一致的,即 BPF 暴露小鼠的社交偏好指数也显著低于对照组。

偏好能力,即小鼠是否愿意与新的小鼠交流。从图 6c 可以看出,BPF 暴露组小鼠与陌上鼠 2 的嗅探时间与对照组相比没有差异。

为了消除小鼠个体差异,本文分析了小鼠的社交新奇偏好指数,如图 6d 所示,结果发现,两组小鼠之间也没有显著差异。结果表明幼年期 BPF 暴露会损害小鼠的社交能力,而对社交新奇能力没有影响,即小鼠的探索能力不会因 BPF 暴露而改变。

三箱社交测试第 2 阶段用来评估小鼠的社交

3 讨 论

近年来,情绪障碍患者逐年增加,很多人把其归因于工作和生活压力,而忽略了源于饮食、环境等潜在危害。尽管大量研究已表明 BPA 的毒性作用且其已被限制使用,然而 BPF 作为 BPA 的主要替代物,它的研究仍未完全展开。此外,幼年期作为大脑发育关键期,尽管激素水平稳定,但神经系统仍易受到外界环境物质的干扰^[16]。因此,本文以幼年期为时间窗口,观察 BPF 暴露对小鼠情绪以及社交行为的影响。

本文首先分析了小鼠在幼年期经 BPF 暴露对其体质量及饮水量的影响,结果表明 BPF 暴露不会影响小鼠的正常生理状态。旷场测试结果显示 BPF 暴露显著减弱小鼠在中央区的活动程度,诱导小鼠产生焦虑行为。这一结果与先前在围产期^[17]、青春期^[18]以及成年期^[19]暴露 BPA 对啮齿类动物的研究一致。文献^[20]研究表明尿液中 BPA 浓度与男孩的焦虑抑郁状态呈正相关。然而,目前关于 BPF 对人类流行病学研究很少。抑郁症以持续的情绪低落为主要症状,是目前世界上最常见的神经性疾病之一。本文以悬尾和强迫游泳 2 种经典的行为范式对 BPF 暴露小鼠进行评估,行为结果表明两者在小鼠处于困境下放弃挣扎、静止不动的时间是一致的,即 BPF 暴露诱导小鼠产生抑郁行为。这与 BPA 的结果类似,且无论是对动物还是人类的研究中,BPA 诱导产生的异常情绪中焦虑与抑郁行为一般同时存在^[16-19]。此外,文献^[21]发现在妊娠期通过口服暴露 10 mg/(kg·d) BPF 诱导子代小鼠的焦虑和抑郁行为,这与本文在幼年期以较低剂量暴露的结果是一致的。

社交是动物本质的内在需求,是不同个体之间相互来往的社会活动。焦虑抑郁状态下可能伴随着社交障碍,这些行为相关的脑区之间有重叠但不完全相同。为了评估 BPF 暴露对社交行为的影响,本文选择经典行为范式三箱社交。结果表明 BPF 暴露损害小鼠的社交能力而对社交新奇能力没有影响。

文献^[22]研究发现 BPA 暴露影响 4 岁儿童的社交能力,且每当 BPA 浓度增加 2 倍,社交沟通障碍增加 11.8%。文献^[23]以小鼠为模型,发现 BPA 暴露引起小鼠社交缺陷,这与本文 BPF 暴露具有相似的结果。结果表明,BPF 作为 BPA 的替代物,长期暴露似乎与 BPA 具有相似的行为

损伤,长期 BPF 暴露对人类的潜在危害令人担忧。

BPF 与 BPA 暴露这种行为相似的结果与它们在大脑中发挥的类雌激素作用有关。文献^[24]以斑马鱼为模型,研究了 BPA 及其替代物的雌激素活性,发现 BPA 的雌激素活性与 BPF 相当;文献^[25]报道 BPF 的雌激素活性高于 BPA,这种结果的不一致性可能与双酚物质的暴露剂量和时期不同有关;文献^[26]在妊娠期以 10 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 暴露 BPA、BPS 以及 BPF,发现双酚物质暴露组均降低大鼠前额叶皮层 5 α -还原酶的 mRNA 水平,影响多巴胺、5-羟色胺相关基因表达。情绪以及社交行为的表达受到来自大脑前额叶皮层的调控^[27-28],而 BPF 暴露诱导小鼠行为的异常表达可能与前额叶功能发挥异常有关。未来将继续探究双酚物质对神经系统的影响及可能的生理机制,为工业上以双酚物质为原料的生产,尤其是在食品包装领域的应用提供理论支持。

4 结 论

本文研究发现,幼年期 1 mg/(kg·d) BPF 暴露可诱导小鼠的焦虑行为、抑郁行为,减弱小鼠的社会交往能力,而对新奇小鼠的探索性以及小鼠本身的成长生理状态没有影响。前额叶与杏仁核是调控情绪以及社交行为的关键脑区,将进一步探讨 BPF 可能影响这些脑区功能的生理机制。此外,BPF 作为 BPA 的主要替代物,在工业上的生产应用仍需谨慎,且 BPF 对大脑发育关键期的毒性作用应引起重视。

[参 考 文 献]

- [1] MERCEA P. Physicochemical processes involved in migration of bisphenol A from polycarbonate[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2010, 112(2): 579-593.
- [2] SUSANA A, ANTONIO R, MAIRA A G, et al. Bisphenol A: food exposure and impact on human health[J]. Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety, 2018, 17(6): 1503-1517.
- [3] ROGERS J A, METZ L, YONG V W. Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms[J]. Molecular Immunology, 2013, 53(4): 421-430.
- [4] KERI R A, HO S M, HUNT P A, et al. An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A[J]. Reproductive Toxicology, 2007, 24(2): 240-252.
- [5] RANCIERE F, LYONS J G, LOH V H Y, et al. Bisphenol

- A and the risk of cardiometabolic disorders: a systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence [J]. *Environmental Health*, 2015, 14(46): 1-23.
- [6] CHEN D, KANNAN K, TAN H, et al. Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity-a review [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(11): 5438-5453.
- [7] LIAO C Y, LIU F, YING G, et al. Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the united states and several asian countries: implications for human exposure [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(16): 9138-9145.
- [8] YANG Y, LU L, ZHANG J, et al. Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography; electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1328: 26-34.
- [9] LI A J, ZHANG T F, SHI W, et al. Serum concentration of bisphenol analogues in pregnant women in China [J]. *Science of The Total Environment*, 2020, 707: 1-7.
- [10] DUALDE P, PARDO O, CORPAS-BURGOS F, et al. Bio-monitoring of bisphenols A, F, S in human milk and probabilistic risk assessment for breastfed infants [J]. *Science of The Total Environment*, 2019, 668: 797-805.
- [11] ZHOU X L, KRAMER J P, CALAFAT A M, et al. Automated on-line column-switching highperformance liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry method for the quantification of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S, and 11 other phenols in urine [J]. *Journal of Chromatography B*, 2014, 944: 152-156.
- [12] HU F, LI T, GONG H, et al. Bisphenol A impairs synaptic plasticity by both preand postsynaptic mechanisms [J]. *Advanced Science*, 2017, 4(8): 1-11.
- [13] TYL R W, MYERS C B, MARR M C, et al. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD sprague-dawley rats [J]. *Toxicological Sciences*, 2002, 68(1): 121-146.
- [14] BERTOLI S, LEONE A, BATTEZZATI A, et al. Human bisphenol A exposure and the "diabesity phenotype" [J]. *Dose-Response*, 2015, 13(3): 1-12.
- [15] ELADAK S, GRISIN T, MOISON D, et al. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound [J]. *Fertility and Sterility*, 2015, 103(1): 11-21.
- [16] SISK C L, ZEHR J L. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior [J]. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2005, 26(3/4): 163-174.
- [17] XU X H, HONG X, XIE L D, et al. Gestational and lactational exposure to bisphenol-A affects anxiety-and depression-like behaviors in mice [J]. *Hormones & Behavior*, 2012, 62(4): 480-490.
- [18] WEINSTEIN S D, VILLAFANE J J, JULIANO N, et al. Adolescent exposure to Bisphenol-A increases anxiety and sucrose preference but impairs spatial memory in rats independent of sex [J]. *Brain Research*, 2013, 1529(13): 56-65.
- [19] XU X H, DONG F N, YANG Y L, et al. Sex-specific effects of long-term exposure to bisphenol-A on anxiety-and depression-like behaviors in adult mice [J]. *Chemosphere*, 2015, 120: 258-266.
- [20] PERERA F, NOLTE E R, WANG Y, et al. Bisphenol A exposure and symptoms of anxiety and depression among inner city children at 10-12 years of age [J]. *Environmental Research*, 2016, 151: 195-202.
- [21] OHTANI N, IWANO H, SUDA K, et al. Adverse effects of maternal exposure to bisphenol F on the anxiety-and depression-like behavior of offspring [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2017, 79(2): 432-439.
- [22] LIM Y H, BAE S, KIM B N, et al. Prenatal and postnatal bisphenol A exposure and social impairment in 4-year-old children [J]. *Environmental Health*, 2017, 16(79): 1-10.
- [23] GAO T, YIN Z, WANG M, et al. The effects of pubertal exposure to bisphenol-A on social behavior in male mice [J]. *Chemosphere*, 2019, 244: 1-11.
- [24] MOREMAN J, LEE O, TRZNADEL M, et al. Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and bisphenol AF in zebrafish embryo [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(21): 12796-12805.
- [25] LEFOL V, AIT-AISSA S, SONAVANE M, et al. In vitro and in vivo estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 142(8): 150-156.
- [26] CASTRO B, SANCHE P, TORRES J M, et al. Bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S affect differently 5alpha-reductase expression and dopamine-serotonin systems in the prefrontal cortex of juvenile female rats [J]. *Environmental Research*, 2015, 142: 281-287.
- [27] LIU W Z, ZHANG W H, ZHENG Z H, et al. Identification of a prefrontal cortex-to-amygdala pathway for chronic stress-induced anxiety [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1-15.
- [28] KUMAR S, HULTMAN R, HUGHES D, et al. Prefrontal cortex reactivity underlies trait vulnerability to chronic social defeat stress [J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 1-9.

(责任编辑 闫杏丽)