

论著·实验研究

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

杨帆¹ 陈临琪¹ 金美芳² 周文文¹ 吴海瑛¹

(1. 苏州大学附属儿童医院内分泌科, 江苏 苏州 215003; 2. 苏州大学儿科医学研究所, 江苏 苏州 215003)

[摘要] **目的** 研究新生儿期不同剂量双酚 A (BPA) 暴露对雌性大鼠阴道开口时间 (VOD) 和下丘脑 Kiss-1 基因、卵巢雌激素受体 (ER) 基因表达的影响。**方法** 将新生雌性 Sprague-Dauley 大鼠随机分为 6 组, 即空白对照组、溶剂组、17 β -雌二醇组 (17 β -estradiol, E₂, 10 μ g/d)、低剂量 BPA 组 (每日 25 μ g/kg)、中剂量 BPA 组 (每日 50 μ g/kg) 和高剂量 BPA 组 (每日 250 μ g/kg), 在生后 0~6 d (PND 0~6) 经皮下注射每日给药。记录 VOD, 并于当天处死, 取出下丘脑、卵巢并称量, 计算下丘脑、卵巢脏器系数。通过 real-time PCR 的方法测定下丘脑 Kiss-1 mRNA 和卵巢中 ER α mRNA、ER β mRNA 表达量。**结果** 与对照组相比, E₂ 组、中、高剂量 BPA 组 VOD 提前; E₂ 组下丘脑 Kiss-1 mRNA、卵巢 ER β mRNA 表达量较对照组明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** 新生儿期每日 50 μ g/kg 及 250 μ g/kg BPA 暴露可引起的大鼠青春期启动提前, 但并非通过 Kiss-1 基因表达改变来实现; 新生儿期每日 25 μ g/kg BPA 暴露未引起大鼠青春期启动提前。

[中国当代儿科杂志, 2014 (), 16 (7) : 754-758]

[关键词] 双酚 A; 阴道开口时间; 下丘脑 Kiss-1 基因; 卵巢雌激素受体; 新生大鼠

Impact of neonatal exposure to different doses of bisphenol A on puberty in female rats

YANG Fan, CHEN Lin-Qi, JIN Mei-Fang, ZHOU Wen-Wen, WU Hai-Ying. Department of Endocrinology, Children's Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215003, China (Chen L-Q, Email: chenlinqi631203@126.com)

Abstract: Objective To evaluate the effects of neonatal exposure to different doses of bisphenol A (BPA) on the vaginal opening day (VOD), hypothalamic Kiss-1 mRNA expression, and ovarian estrogen receptor (ER) mRNA expression in female rats. **Methods** Neonatal female Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into six groups: blank control, vehicle, 17 β -estradiol (17 β -estradiol, E₂, 10 μ g/d), low-dose BPA [25 μ g(kg·d)], medium-dose BPA [50 μ g(kg·d)], and high-dose BPA groups [250 μ g(kg·d)]. The rats were subcutaneously injected with respective agents on postnatal days 0-6. The VOD was recorded, and each rat was sacrificed on the same day. The hypothalamus and ovary were taken and weighed, and the organ coefficients of hypothalamus and ovary were calculated. The hypothalamic Kiss-1 mRNA expression and ovarian ER α and ER β mRNA expression were measured by real-time PCR. **Results** Compared with the control group, the E₂ and medium- and high-dose BPA groups had advanced VOD, and the E₂ group had significantly reduced hypothalamic Kiss-1 mRNA expression and ovarian ER β mRNA expression ($P < 0.05$). **Conclusions** Neonatal exposure to medium- and high-dose BPA [50 and 250 μ g/(kg·d)] can induce precocious puberty in rats, but it may not result from the change in hypothalamic Kiss-1 mRNA expression. Neonatal exposure to low-dose BPA [25 μ g/(kg·d)] does not induce precocious puberty in rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(7): 754-758]

Key words: Bisphenol A; Vaginal opening day; Hypothalamic Kiss-1 gene; Ovarian estrogen receptor; Neonatal rats

[收稿日期] 2013-11-09; [接受日期] 2014-02-26

[基金项目] 苏州市科技局科技发展计划 (应用基础研究) 项目 (SYS201242)。

[作者简介] 杨帆, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 陈临琪, 女, 主任医师, 副教授。

女童性早熟发生的病因很多,环境污染的影响受到越来越多的关注。双酚A(bisphenol A, BPA)是环境内分泌干扰物中的一种,1993年Krishnan首次提出BPA具有类雌激素样作用后^[1],BPA对人类生长发育的影响受到了广泛关注。

虽然美国政府将每日50 mg/kg暴露作为BPA的可观察到有害作用的最低剂量,每日50 μg/kg暴露作为人类BPA暴露“安全剂量”^[2]。但这仅是成人暴露剂量,在儿童乃至婴幼儿BPA“安全剂量”尚不明确。文献报道BPA具有“U”效应^[3],即在一定的剂量范围内,剂量-效应曲线的斜率可发生正负的转换。大剂量的BPA暴露(每日>50 mg/kg)可能导致肝、肾功能或者体重改变^[4],低剂量BPA暴露对人类的影响尚不清楚,故BPA低剂量暴露对儿童性发育的影响需进一步探讨。青春期是由下丘脑-垂体-性腺轴启动引起,下丘脑Kisspeptin-Kiss-1R-GnRH信号系统的激活,雌激素受体的表达增多并反馈调节GnRH神经元,再通过靶器官的雌激素受体(estrogen receptor, ER),从而启动青春发育^[5],环境内分泌干扰物可能干扰此过程。本研究拟通过不同剂量BPA干预新生大鼠,了解其是否可能引起大鼠青春期启动提前,如提前是否与下丘脑Kiss-1基因表达改变相关及对外周性腺ER表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

BPA(美国Sigma公司),E₂(美国Sigma公司),玉米油(金龙鱼,益海嘉里投资有限公司),无水乙醇(江苏强盛功能化学股份有限公司)。DEPC(上海华舜生物工程公司);随机引物(上海生工生物工程公司合成);Trizol、RNase Inhibitor(Invitrogen公司);RNase Inhibitor、M-MLV、dNTP MIX(10mM)(Promega公司);设计引物采用Primer 5软件,经GenBank Blast进行同源检索后合成。引物由上海生工生物工程公司合成。实验药物溶剂为无水酒精:玉米油以1:9比例制成的混合溶液^[6]。E₂与BPA均溶于上述混合溶剂中,E₂组溶液化学物浓度为 2×10^{-4} g/mL,低剂量BPA组溶液化学物浓度为 5×10^{-6} g/mL,中剂量BPA组溶液化学物浓度为 1×10^{-5} g/mL,高剂量BPA组溶

液化学物浓度为 5×10^{-5} g/mL。

1.2 试验动物及饲养条件

清洁级雌性Spuague-Dawley(SD)大鼠8只,体重150 g左右;雄性4只,体重120 g左右,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。饲养环境为昼夜12 h交替,室内温度控制在18~22℃之间,湿度50%~60%,食物和水自由摄取。新生仔鼠母乳喂养,生后21 d断奶。

1.3 动物分组和观察指标

雌雄鼠分开喂养,适应性饲养至雌雄鼠均约200 g,按雌雄比2:1合笼交配,每日进行阴道涂片检查,查到精子存在即为妊娠,雌雄鼠分笼。孕鼠单独喂养,每日观察孕鼠情况。记录分娩时间,设分娩当天为仔鼠生后0 d(postnatal day 0, PND 0)。仔鼠以交叉培育方式喂养,每只母鼠喂养12只仔鼠,雌雄比为1:1。为排除大鼠新生儿期玉米油与无水酒精混合物暴露对机体生长发育的影响,本实验特设溶剂组。48只雌性仔鼠随机分为6组:空白对照组(只观察不干预)、溶剂组(于PND 0~6皮下注射上述混合溶剂,约0.05 mL/只)、E₂组(PND 0~6皮下注射E₂组溶液,约0.05 mL/只)、低剂量BPA组(于PND 0~6皮下注射低剂量BPA溶液约0.005 mL/g,即25 μg/kg)、中剂量BPA组(于PND 0~6皮下注射中剂量BPA溶液约0.005 mL/g,即50 μg/kg)、高剂量BPA组(于PND 0~6皮下注射高剂量BPA溶液约0.005 mL/g,即250 μg/kg)。给药期间每天称重,根据体重调整药量。仔鼠在PND 21断奶,断奶后每日观察雌性仔鼠是否阴道开口并记录阴道开口时间(vaginal opening day, VOD)。在阴道开口当天颈椎脱臼法处死仔鼠,称重,立刻取出卵巢、下丘脑,称取其湿重后投入液氮,-80℃低温保存用于RT-PCR检测。下丘脑取材范围为头侧至视交叉前3 mm、尾侧至乳头体、两侧至下丘脑沟,深度为3 mm。卵巢取材范围为与子宫角紧密相连的两侧肾脏外下方呈淡粉色的卵巢,体积约为3 mm×4 mm×4 mm大小,仔细剥离其周围的脂肪组织,双侧对称剥离。

1.4 脏器系数计算

取出下丘脑及卵巢后,迅速称取其湿重,计算下丘脑脏器系数(下丘脑湿重/体重)。卵巢脏器系数(双侧卵巢湿重/体重)。

1.5 RT-PCR 检测

1.5.1 总 RNA 的提取 TRIzol 一步法提取总 RNA。紫外分光光度计测定 RNA 浓度及纯度，A260/A280 比值在 1.8~2.0 之间。

1.5.2 合成 cDNA 按 42℃，60 min；95℃，5 min 将 RNA 逆转录成 cDNA，-20℃保存。

1.5.3 PCR 反应 引物序列为 Kiss-1 上游引物：5'-GATCTCGCTGGCTTCTTGGC-3'，下游引物：5'-GGACTGTTGGCCTGCGGGTT-3'（产物长度 112 bp）。ER α 上游引物：5'-TGAAGCACAAGCG-TCAGAGA-3'，下游引物：5'-CGTAGCCAGCAACA-TGTCAA-3'（产物长度 501 bp）。ER β 上游引物：5'-GAA-GCTGAACCACCCAATGT-3'，下游引物：5'-CAGTCCCACCATTAGCACCT-3'（产物长度 210 bp）。内参上游引物：5'-CCCA TCTATGAGGG-TTACGC-3'，下游引物：5'-TTTAATGTCACGCAG-ATTTC-3'（产物长度 150 bp）。反应条件为：95℃，10 min；95℃，15 s；60℃，15 s；72℃，30 s，72℃收集荧光，共 50 个循环。

1.6 统计学分析

采用参照基因的 Δ CT 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量，用相对定量法计算各基因 mRNA 表达水平 (Q)，直接用管家基因来校正样品初始量，定量公式为： $Q = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ， $\Delta\Delta Ct = (\text{待测样品目的基因平均 Ct 值} - \text{待测样品管家基因平均 Ct 值}) - (\text{标准品目的基因平均 Ct 值} - \text{标准品管家基因平均 Ct 值})$ ，Ct 值为每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较用

单因素方差分析，多个样本均数的两两比较采用 SNK 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况

各组间 PND 0 体重差别无统计学意义 ($F=0.264, P=0.930$)；各组间 PND 6 体重差异亦无统计学意义 ($F=0.063, P=0.997$)。见表 1。

2.2 各组 VOD 比较

E₂ 组 VOD 较其余各组均提前，差别具有统计学意义 ($P < 0.05$)；中、高剂量 BPA 组 VOD 较对照组、溶剂组、低剂量 BPA 组提前，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 各组下丘脑脏器系数比较

各组下丘脑脏器系数的差异无统计学意义 ($F=0.231, P=0.947$)，见表 3。

2.4 各组卵巢脏器系数比较

E₂ 组卵巢脏器系数较其余各组降低明显，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 3。

2.5 各组下丘脑 Kiss-1 mRNA 相对表达量比较

E₂ 组下丘脑 Kiss-1 mRNA 相对表达量较其余各组降低明显，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，见表 4。

2.6 各组卵巢 ER α mRNA 和 ER β mRNA 相对表达量比较

各组间卵巢 ER α mRNA 相对表达量差异无统计学意义 ($F=1.365, P=0.257$)；E₂ 组卵巢 ER β mRNA 相对表达量较其余各组降低明显，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 1 各组仔鼠 PND 0 和 PND 6 体重的比较 ($\bar{x} \pm s, g$)

组别	n	PND 0	PND 6
对照组	8	6.4 \pm 0.5	16.1 \pm 0.6
溶剂组	8	6.4 \pm 0.7	16.2 \pm 0.9
E ₂ 组	8	6.3 \pm 0.6	16.2 \pm 1.1
低剂量 BPA 组	8	6.6 \pm 0.8	16.3 \pm 1.1
中剂量 BPA 组	8	6.5 \pm 0.6	16.2 \pm 1.2
高剂量 BPA 组	8	6.6 \pm 0.8	16.4 \pm 1.2
F 值		0.264	0.063
P 值		0.930	0.997

表 2 各组 VOD 比较 ($\bar{x} \pm s, d$)

组别	n	VOD
对照组	8	33.8 \pm 1.0
溶剂组	8	33.6 \pm 1.3
E ₂ 组	8	29.1 \pm 0.6 ^{ab}
低剂量 BPA 组	8	34.1 \pm 0.8 ^c
中剂量 BPA 组	8	30.3 \pm 0.9 ^{abc,d}
高剂量 BPA 组	8	30.8 \pm 0.7 ^{abc,d}
F 值		42.945
P 值		<0.05

注：a 示与对照组比较， $P < 0.05$ ；b 示与溶剂组比较， $P < 0.05$ ；c 示与 E₂ 组比较， $P < 0.05$ ；d 示与低剂量 BPA 组比较， $P < 0.05$ 。

表 3 下丘脑、卵巢脏器系数比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	下丘脑脏器系数	卵巢脏器系数
对照组	8	0.0369 ± 0.0079	0.0734 ± 0.0047
溶剂组	8	0.0351 ± 0.0067	0.0710 ± 0.0089
E ₂ 组	8	0.0357 ± 0.0058	0.0531 ± 0.0119 ^{ab}
低剂量 BPA 组	8	0.0366 ± 0.0050	0.0712 ± 0.0069 ^c
中剂量 BPA 组	8	0.0338 ± 0.0047	0.0713 ± 0.0077 ^c
高剂量 BPA 组	8	0.0355 ± 0.0075	0.0719 ± 0.0096 ^c
F 值		0.231	6.409
P 值		0.947	<0.05

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与溶剂组比较, $P < 0.05$; c 示与 E₂ 组比较, $P < 0.05$ 。

表 4 下丘脑 Kiss-1 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Kiss-1 mRNA
对照组	8	1.00 ± 0.22
溶剂组	8	0.97 ± 0.13
E ₂ 组	8	0.53 ± 0.14 ^{ab}
低剂量 BPA 组	8	0.95 ± 0.05 ^c
中剂量 BPA 组	8	0.93 ± 0.19 ^c
高剂量 BPA 组	8	0.92 ± 0.17 ^c
F 值		9.381
P 值		<0.05

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与溶剂组比较, $P < 0.05$; c 示与 E₂ 组比较, $P < 0.05$ 。

表 5 卵巢 ER mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ER α mRNA	ER β mRNA
对照组	8	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.15
溶剂组	8	0.84 ± 0.34	1.04 ± 0.24
E ₂ 组	8	0.87 ± 0.09	0.54 ± 0.09 ^{ab}
低剂量 BPA 组	8	1.17 ± 0.45	1.02 ± 0.16 ^c
中剂量 BPA 组	8	1.18 ± 0.43	1.07 ± 0.19 ^c
高剂量 BPA 组	8	1.08 ± 0.42	0.96 ± 0.14 ^c
F 值		1.365	11.322
P 值		0.257	<0.05

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与溶剂组比较, $P < 0.05$; c 示与 E₂ 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

青春期启动一般认为是由下丘脑-垂体-性腺轴启动引起, 即性激素通过其受体正反馈作用于下丘脑导致 Kiss-1 基因编码产物 kisspeptin 与其受体 GPR54 结合, 引起促性腺激素释放激素 (GnRH) 的表达增加, 刺激垂体前叶分泌促性腺激素、黄体生成素 (LH) 及卵泡刺激素 (FSH), 引起外周性腺甾体类激素分泌增多, 促进外周性腺发育。由此可知 Kiss-1 基因在青春期启动中

发挥重要作用^[7-8]。ER 主要有两种类型— α 受体 (ER α) 和 β 受体 (ER β), 卵巢 ER α 主要作用是引起卵泡细胞增殖, ER β 是性激素在卵巢组织上发挥作用的重要途径^[9]。脏器系数又称脏体比, 是实验动物某脏器的重量与其体重之比值。正常时各脏器与体重的比值比较恒定。染毒后受损脏器重量可以发生改变, 故脏器系数也随之而改变^[10]。

Navarro 等^[11] 研究结果显示, E₂ 在 PND 0 单次暴露和 BPA 以每只 100 μg 、500 μg 剂量在 PND 1~5 d 染毒大鼠即可导致 PND 30 时大鼠下丘脑 Kiss-1 mRNA 水平下降。有研究显示在 PND 5 至 PND 11, 经母乳染毒 BPA 可引起雌性 SD 大鼠在 PND 70 时其卵巢 ER α 、ER β 表达下降^[12], 推测 BPA 在上述剂量及作用时间条件下, 可影响大鼠下丘脑 Kiss-1 基因及卵巢 ER α 、ER β 表达。但上述 BPA 剂量均较大, 正常生存环境中较难发生, 目前对 BPA 少量暴露对青春发育及外周性腺影响的研究较少, 因此本研究着重关注新生大鼠少量 BPA 暴露对其青春期启动及下丘脑 Kiss-1 基因、卵巢 ER 表达影响。

0~6 月婴儿若使用塑料奶瓶喂养, 其 BPA 暴露量 95% 参考值范围上限约为每日 4.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[13]。按照等效药物剂量换算, 大鼠药物剂量约为人类 5~6 倍^[14]。因此本研究中采用的 BPA 低剂量约为每日 4.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 6 倍, 即 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 中剂量选择人类暴露“安全剂量” (每日 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 高剂量选择高于人类“安全剂量” 5 倍的剂量 (每日 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 旨在模拟人类在婴儿期可能存在的潜在 BPA 暴露。将 E₂ 暴露作为可以引起大鼠阴道 VOD 提前和卵巢发育异常的阳性对照^[6]。

本研究结果显示, 在干预起始及结束当天测仔鼠体重, 各干预组与对照组相比未见明显差异, 可推测本实验所选用药物剂量未对动物基本生长产生影响。溶剂组各实验结果与对照组均无明显差异, 可排除溶剂本身对大鼠青春期启动及卵巢发育的影响。而各干预组与对照组的下丘脑脏器系数差异无统计学意义, 说明新生儿期 BPA、E₂ 暴露未对下丘脑重量产生明显影响。

本研究显示, E₂ 组、中、高剂量 BPA 组与对照组相比 VOD 提前, 其中 E₂ 组最早, 此结果与 Losa-Ward 等^[6] 的研究基本一致。说明新生儿期中、高剂量 BPA 暴露可以引起大鼠 VOD 提前。下丘脑

Kiss-1 基因 RT-PCR 结果显示, 青春期启动时, E₂ 组的 Kiss-1 mRNA 表达水平较对照组明显降低, 推测其原因可能是大鼠新生儿期 E₂ 暴露后, 其下丘脑 Kiss-1 基因神经元应对性激素正反馈通路遭到破坏导致^[15]。虽然 E₂ 组的 Kiss-1 mRNA 表达降低, 中、高剂量 BPA 暴露 Kiss-1 mRNA 表达水平与对照组相比无明显差异, 但中、高剂量 BPA 组及 E₂ 组 VOD 均提前, 提示大鼠 VOD 提前可能与下丘脑中 GnRH 有抑制作用的基因破坏相关, 而非 Kiss-1 表达增加导致^[6], 该结果有待进一步实验验证。

本研究中 E₂ 组卵巢脏器系数及卵巢 ER β mRNA 较对照组明显下降, 但 BPA 组与对照组相比无明显差异。因卵巢发育及其 ER 表达与外周血浆中 FSH、LH、外周性腺甾体类激素相关。而 Kiss-1 编码合成的 kisspeptin 与其受体 GPR54 结合可以引起 GnRH 分泌增加, 从而进一步导致 FSH、LH 分泌增加, 甾体类激素分泌增多, 外周性腺发育^[7-8]。因此可以推测由于本研究中 E₂ 组下丘脑 Kiss-1 表达较对照组明显下降, 导致其 GnRH、LH、FSH 也随之下降, 甾体类激素分泌减少, 而卵巢 ER α 主要作用仅是引起卵泡细胞增殖, ER β 才是性激素在卵巢组织上发挥作用的重要途径^[9], 因此 E₂ 组卵巢脏器系数及卵巢 ER β mRNA 较对照组明显下降。根据 E₂ 组下丘脑 Kiss-1 mRNA 及卵巢脏器系数、卵巢 ER β mRNA 均下降, 可推测新生儿期高浓度 E₂ 暴露可对雌性大鼠下丘脑及卵巢发育造成严重影响。本研究中, 中、高剂量 BPA 组与对照组相比, VOD 时间提前, 但下丘脑、卵巢脏器系数及下丘脑 Kiss-1 mRNA、卵巢 ER mRNA 与对照组相比无差异, 可知新生儿期每日 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPA 持续暴露可以引起大鼠 VOD 提前, 但并没有对下丘脑 Kiss-1 基因表达及外周卵巢 ER α 、ER β 表达产生明显影响。可以推测新生大鼠每日 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPA 暴露引起 VOD 提前可能不是通过影响下丘脑 Kiss-1 基因表达变化来实现, 且上述两种剂量 BPA 暴露未对大鼠下丘脑 Kiss-1 基因主导的性发育产生严重影响; 而更小剂量 (每日 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) BPA 暴露不会引起大鼠 VOD 提前。

- estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving[J]. *Endocrinology*, 1993, 132(6): 2279-2286.
- [2] Adewale HB, Jefferson WN, Newbold RR, et al. Neonatal bisphenol-a exposure alters rat reproductive development and ovarian morphology without impairing activation of gonadotropin-releasing hormone neurons[J]. *Biol Reprod*, 2009, 81(4): 690-699.
- [3] Bouskine A, Nebout M, Brucker-Davis F, et al. Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor[J]. *Environ Health Perspect*, 2009, 117(7): 1053-1058.
- [4] Tyl RW, Myers CB, Marr MC, et al. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats[J]. *Toxicol Sci*, 2002, 68(1): 121-146.
- [5] Roa J, Vigo E, Castellano JM, et al. Follicle-stimulating hormone responses to kisspeptin in the female rat at the preovulatory period: modulation by estrogen and progesterone receptors[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(11): 5783-5790.
- [6] Losa-Ward SM, Todd KL, McCaffrey KA, 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.
- [7] Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, et al. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of Kiss-1 peptide, the natural ligand of GPR54[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(1): 156-163.
- [8] Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, et al. Kiss1^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54^{-/-} mice[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(10): 4927-4936.
- [9] 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.
- [10] 袁本利. 药物安全评价中脏器系数的意义及不足 [J]. *中国新药杂志*, 2003, 12(11): 960-963.
- [11] Navarro VM, Sanchez-Garrido MA, Castellano JM, et al. Persistent impairment of hypothalamic Kiss-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation[J]. *Endocrinology*, 2009, 150(5): 2359-2367.
- [12] 刘兆平, 张晓鹏, 张文众, 等. 大豆异黄酮和双酚 A 联合暴露对雌性大鼠不同组织雌激素受体表达的影响 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2008, 20(6): 510-514.
- [13] Organization WH. Joint FAO/WHO Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A: Summary Report[J]. World Health Organization, Ottawa, CA. 2010.
- [14] 孙瑞元, 马越鸣, 洪宗元. 药理实验设计及统计分析 [M] // 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理试验方法学. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 202-204.
- [15] Patisaul HB, Todd KL, Mickens JA, et al. Impact of neonatal exposure to the ER α agonist PPT, bisphenol-A or phytoestrogens on hypothalamic kisspeptin fiber density in male and female rats[J]. *Neurotoxicology*, 2009, 30(3): 350-357.

[参 考 文 献]

(本文编辑: 王庆红)

[1] Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, et al. Bisphenol-A: an