

李桂丽, 谭鑫宇, 卜莉萍, 潘红春. 绿草履虫对聚苯乙烯纳米颗粒胁迫的响应转录组分析[J]. 应用与环境生物学报, 2025, 31 (5): 715-727

Li GL, Tan XY, Bu LP, Pan HC. Transcriptomic analysis of the responses of *Paramecium bursaria* to polystyrene nanoparticles [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2025, 31 (5): 715-727

绿草履虫对聚苯乙烯纳米颗粒胁迫的响应转录组分析

李桂丽, 谭鑫宇, 卜莉萍, 潘红春✉

安徽师范大学生命科学学院, 芜湖 241000

摘要 废弃塑料进入自然界后会分解为各种尺寸的塑料颗粒, 其中纳米级塑料颗粒有一定的生物毒性. 为探讨单细胞动物对纳米级塑料颗粒胁迫的响应, 首先基于急性毒理试验和种群增长试验观察聚苯乙烯纳米颗粒 (polystyrene nanoparticles, PS NPs, 粒径20 nm) 对绿草履虫 (*Paramecium bursaria*) 的毒性效应, 结果显示PS NPs对绿草履虫的生存和细胞分裂有明显的影响, 并且有显著的致死效应 (24 h半致死浓度为15.93 mg/L). 在此基础上, 选择13.5 mg/L的PS NPs处理草履虫后进行转录组分析 (对照组PS NPs浓度为0 mg/L). 基于高通量测序的数据, 从绿草履虫的PS NPs处理组与对照组间筛选到了371个差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 包括298个表达上调的DEGs和73个表达下调的DEGs. 基于DEGs共获得764个GO (gene ontology) 显著富集条目 ($P < 0.05$), 而富集最显著的前20个GO条目全部与细胞周期及细胞分裂直接相关; 而基于DEGs还获得了10条显著富集 ($P < 0.05$) 的KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 通路, 其中细胞周期通路、磷脂酶D信号通路、p53信号通路、孕激素介导的卵母细胞成熟通路和卵母细胞减数分裂通路等5条通路是以MAPK信号通路为中心、与细胞分裂调控相关的代谢通路集群. 此外, qRT-PCR测定的10个DEGs的相对表达量与来自RNA-Seq的相对表达量之间较高的相关性验证了转录组高通量测序及分析的可靠性. 总之, 绿草履虫对PS NPs胁迫的分子响应结果暗示PS NPs对绿草履虫细胞分裂活动有一定程度的扰动. (图6 表6 参53)

关键词 绿草履虫; 聚苯乙烯纳米颗粒; 急性毒理试验; 转录组; 细胞分裂

Transcriptomic analysis of the responses of *Paramecium bursaria* to polystyrene nanoparticles

LI Guili, TAN Xinyu, BU Liping & PAN Hongchun✉

College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China

Abstract After entering the natural environment, discarded plastics decompose into particles of various sizes, among which nanoscale particles exhibit biotoxicity. To investigate the responses of unicellular organisms to nanoplastics, in this study, we initially assessed the toxic effects of polystyrene nanoparticles (PS NPs; diameter: 20 nm) on *Paramecium bursaria* via acute toxicity tests and population growth experiments. The PS NPs markedly impacted the survival and cellular division of *P. bursaria*, showing notable lethal effects (24 h $LC_{50} = 15.93$ mg/L). Subsequently, transcriptomic analysis was performed after treating *P. bursaria* with 13.5 mg/L PS NPs (control group: 0 mg/L). High-throughput sequencing revealed 371 differentially expressed genes (DEGs) between the treated and control groups, including 298 upregulated and 73 downregulated genes. Gene Ontology (GO) analysis revealed 764 significantly enriched terms ($P < 0.05$); the top 20 most significant terms were directly related to cell cycle and cellular division. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis revealed 10 significantly enriched pathways ($P < 0.05$), including five metabolic pathway clusters centered on the MAPK signaling pathway that regulate cellular division: the cell cycle, phospholipase D signaling, p53 signaling, progesterone-mediated oocyte maturation, and oocyte meiosis pathways. Furthermore, the high correlation between the relative expression levels of 10 DEGs identified using qRT-PCR analyses and those identified using the RNA-Seq analysis verified the reliability of the high-throughput sequencing and transcriptomic analyses. Thus, our findings underscore the molecular responses of *P. bursaria* to PS NPs; these NPs may disturb cell division-related processes in *P. bursaria* to a certain degree.

Keywords *Paramecium bursaria*; polystyrene nanoparticle; acute toxicity test; transcriptome; cellular division

收稿日期 Received: 2025-03-01 接受日期 Accepted: 2025-05-07

国家自然科学基金项目 (42077208, 31671529) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (42077208, 31671529)

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: panhongchun@126.com)

塑料已经成为现代工业社会广泛应用的材料,但它对人类社会来说是双刃剑,带来显著社会效益的同时也成为主要的环境污染源^[1-3]。相当一部分的塑料材料(如纺织品、轮胎和塑料基日用品等)失去使用价值后被废弃,由于管理不善进入自然界成为不可估量的塑料垃圾,其中宏观塑料(尺寸大于5 mm)垃圾通常会被一些动物误食后堵塞其消化道甚至导致动物死亡,同时宏观塑料垃圾的易扩散性亦使其成为严重影响自然景观的污染源^[4]。在物理磨损及光辐射风化等因素的作用下,宏观塑料会逐渐破碎为微米级塑料颗粒(粒径介于100 nm与5 mm之间)和纳米级塑料颗粒(粒径小于100 nm)^[5]。全球尺度下塑料颗粒污染研究已有十余年的历史,尽管从环境基质中提取、表征和量化粒径小于20 μm 的塑料颗粒在技术上具有一定的挑战性,但相关研究已清楚地表明微米级和纳米级塑料颗粒广泛分布于土壤、湖泊和河流等淡水水体及沉积物,近海甚至远洋和深海水体及沉积物,大气圈及生物圈等生态环境中^[6-8]。与宏观塑料和微米级塑料颗粒相比,纳米级塑料颗粒对生物体有更强的侵入性,已发现纳米塑料颗粒能穿透细胞壁、细胞膜及细胞器膜等生理屏障侵入生物的细胞、组织和器官,因此纳米塑料颗粒可能具有直接或间接的生物毒性^[9-10],从而引发严重的生态危机。因此,科学界、政策制定者和公众迫切需要了解纳米塑料颗粒对生物体和环境过程的影响途径、程度及其作用机理。

聚苯乙烯(polystyrene, PS)是广泛使用的塑料类型之一,聚苯乙烯纳米颗粒(polystyrene nanoparticles, PS NPs)的生物毒性及其机理引发了人们的日益关注^[11]。可能是由于把PS NPs与水溶液混合后再通过超声波处理能便利地配制不同浓度的PS NPs悬浊液,进而能进行定量的PS NPs暴露实验,因此许多相关研究主要以水生动物为实验对象^[12]。绿水螈(*Hydra sinensis*)暴露在一定浓度的PS NPs(粒径20 nm)下逐渐出现触手缩短、触手分解、身体缩短及身体分解等形态学损伤现象直至死亡^[13];水蚤(*Daphnia pulex*)暴露于PS NPs(粒径约75 nm)后表现出生长和繁殖的抑制^[14];贻贝(*Mytilus coruscus*)暴露于PS NPs(粒径约70 nm)两周后其能量收支、过氧化氢酶活性和丙二醛水平平均受到不同程度的扰动^[15];20 d的PS NPs(粒径约23 nm)暴露会导致草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)幼鱼大脑积累PS NPs、氧化应激水平升高以及肝和脑中的乙酰胆碱酯酶活性增加^[16];斑马鱼(*Danio rerio*)暴露在含有PS NPs(粒径约42 nm)的水中96 h后其头部富集大量的PS NPs,随即其生长速率和运动能力下降,抗氧化基因表达下调^[17]。由此可见,PS NPs对水生动物具有明显的生物毒性,但其生物毒性的细胞和分子机理

尚有待深入探讨。

与多细胞动物相比,单细胞动物草履虫(genus *Paramecium*)对外界刺激、环境压力和环境变化的敏感程度较高,因此草履虫具有成为毒理学研究备选模式生物的潜力^[18]。其中,绿草履虫(*Paramecium bursaria*)细胞质中含有数百个内共生小球藻,并与小球藻形成长期稳定的内共生系统,这样在有光照的情况下绿草履虫除了以微生物为食获得营养、还能以共生藻传递的光合作用产物作为营养补充,所以与不含共生藻的草履虫相比,绿草履虫具有较快的细胞分裂速度,因此在人工培养条件下短时间内能获得大量绿草履虫克隆个体,因此绿草履虫作为毒理学等生物学实验的受试动物具有一定的优势^[19]。有报道发现在含有粒径1 μm 的聚苯乙烯微米颗粒(polystyrene microparticles, PS MPs)培养液中的草履虫运动能力减弱,氧化应激水平下降^[20],但目前未见PS NPs对草履虫的影响相关研究。基于此,本研究首先观察PS NPs(粒径20 nm)对绿草履虫的存活、无性繁殖和种群增长的影响,然后基于转录组探讨绿草履虫对PS NPs胁迫的分子响应,旨在为评估PS NPs的生物毒性及机理提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

用去离子水清洗10 g稻草秸秆3次后放入2 000 mL去离子水中煮沸10 min,冷却后用5层医用纱布过滤,再把滤液定容至2 000 mL即得到草履虫培养液。绿草履虫的培养和后续实验均在人工气候箱(光照强度500 lx,温度25 $^{\circ}\text{C}$,光照12 h/d)内进行。绿草履虫原种采自重庆市中央公园水系,在显微镜下从野外采回的水样中挑取一只草履虫建立绿草履虫单克隆无性繁殖系,具体方法如下:在显微镜下使用灭菌去离子水清洗这只草履虫5次后放入凹玻片中央的50 μL 培养液中培养;绿草履虫细胞上一次分裂与下一次分裂之间的间隔时间约为6 h,待凹玻片上的草履虫通过无性分裂使个体数量达到约30只时,把凹玻片上的草履虫全部移入含5 mL培养液的玻璃试管中扩大培养。当试管中绿草履虫的密度达到约1 200只/mL时(绿草履虫种群增长的平台期),从中取200 μL 含草履虫的培养液移入含50 mL培养液的玻璃试管中扩大培养;按此方法不断接种扩大培养草履虫用于后续实验。

粒径20 nm的PS NPs原液购自上海译元生物科技公司,参考杨凯宁等的方法^[13]配制PS NPs工作液。

1.2 急性毒性试验

首先取6管50 mL含绿草履虫的培养液(草履虫的密度为1 200只/mL),6管培养液中的PS NPs浓度分别为0.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 mg/L,加入

PS NPs 24 h后观察绿草履虫的形态变化和存活情况。上述预实验的结果表明, 24 h后20 mg/L PS NPs试管中仅有极少量的绿草履虫存活, 25 mg/L PS NPs离心管中绿草履虫全部死亡。参考预实验结果, 取21管50 mL含绿草履虫的培养液(绿草履虫的密度均为1 200只/mL), 分为7组, 每组3个重复。7组的PS NPs浓度分别为13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、16.5 mg/L和17.5 mg/L, 加入PS NPs 24 h后观察和计数。上述所有实验均在人工气候箱(光照强度500 lx, 温度25 ℃, 光照12 h/d)中进行。使用SPSS 26.0软件对实验数据进行处理, 然后用EXCEL软件制作线性回归方程。根据线性回归方程计算24 h时的PS NPs半致死浓度(semi-lethal concentration, LC_{50})和最小致死浓度(minimum lethal concentration, MLC)。

1.3 种群增长试验

根据 LC_{50} 和MLC设置5个PS NPs浓度梯度, 观察在不同浓度的PS NPs胁迫下绿草履虫的种群增长情况。取15管50 mL含绿草履虫的培养液(草履虫的密度为350只/mL), 分为5组, 每组3个重复。5组的PS NPs浓度分别0、5、10、12.5、15 mg/L。置于人工气候箱(光照强度500 lx, 温度25 ℃, 光照12 h/d)中培养, 每12 h对草履虫进行计数。利用SPSS 26.0对数据进行处理, 再基于EXCEL软件绘制种群增长曲线。

1.4 转录组试验

1.4.1 PS NPs暴露实验和草履虫样品收集 根据 LC_{50} 和MLC, 本研究选择浓度为13.5 mg/L的PS NPs处理草履虫后进行转录组分析。取6管50 mL含绿草履虫的培养液(草履虫的密度为1 200只/mL), 其中3管为实验组(其中的PS NPs浓度均为13.5 mg/L, 分别命名为PB_1、PB_2及PB_2); 另外3管为对照组(其中的PS NPs浓度均为0 mg/L, 分别命名为CK_1、CK_2及CK_2)。置于人工气候箱(光照强度500 lx, 温度25 ℃, 光照12 h/d)中培养, 24 h后分别对每管草履虫进行冷冻离心(4 ℃, 10 min, 10 000 r/min)。离心结束后丢弃上清液, 把管底的草履虫转移至1.5 mL离心管中, 放入1 mL去RNA酶去离子水并充分悬浮草履虫, 再冷冻离心(4 ℃, 10 min, 10 000 r/min)后丢弃上清液。按上述操作方法使用去RNA酶蒸馏水悬浮和清洗草履虫3次后把草履虫样品转移至1.5 mL冻存管, 最后把冻存管浸入液氮中保存备用。

1.4.2 RNA提取及高通量测序 把草履虫样品放入2 mL玻璃匀浆器中冰浴研磨10 min后低速冷冻离心(4 ℃, 5 min, 1 000 r/min), 回收上清液(草履虫匀浆液)后丢弃离心管底部的绿色沉淀(共生藻)。使用TRIzol试剂(Life Technologies, Carlsbad, USA)从草履虫匀浆液中提取总RNA。RNA完整性通过Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA,

USA)进行验证。仅使用RIN评分> 8的样本。根据TruSeq RNA样品制备试剂盒v2指南(Illumina, San Diego, USA)中描述的方案, 从每个样品中提取2 μ g的总RNA用于文库制备。使用Agilent生物分析仪2100 (Agilent, Santa Clara, USA)估计文库的平均插入物大小, 并使用KAPA文库定量试剂盒(KAPA Biosystems, Foster City, USA)进行定量PCR。定量后, 使用HiSeq2500超高通量测序系统(Illumina, San Diego, USA)进行测序。

1.4.3 测序数据的处理与注释 原始测序数据通过TrimGalore (版本0.6.5) 过滤和整理后得到过滤后序列(clean Reads)^[21], 再在纤毛虫门(Ciliophora)为序列搜索背景下使用TopHat软件对clean reads进行比对、分析和注释^[22]。

1.4.4 DEGs的筛选及功能富集分析 采用多因素设计, 使用Bioconductor生物信息学开源软件提供的DESeq2统计软件包鉴定差异表达基因(differential expressed genes, DEGs)。在统计分析之前, 对转录本计数数据进行如下过滤: (1) 去除计数为零的转录本(未表达); (2) 平均每个样本少于1个reads的基因被去除(非常低表达); (3) 去除至少3个样本中不存在的基因(很少表达)。转录产物表达量呈负二项分布拟合, 进一步生成探索性诊断图以检查分散估计。采用Benjamini-Hochberg方法识别DEGs^[23], 将错误发现率(False discovery rate, FDR)控制在0.05以内。

使用DAVID数据库(database for annotation, visualization, and integrated discovery)进行DEGs的GO (gene ontology) 功能富集^[24], 再利用KEGG代谢通路数据库分析DEGs的代谢通路富集情况。GO功能富集及KEGG代谢通路富集分析的P值均经过Fisher检验, 并设定 $P < 0.05$ 为显著富集; 富集结果的可视化处理借助Gplot R软件包来完成。

1.4.5 qRT-PCR验证试验 随机选取10个DEGs (表1) 进行qRT-PCR分析, 使用与高通量测序所用同批次的总RNA为模板进行逆转录反应。所有样品均用Ambion TURBO DNA-free@DNase (Life Technologies, Grand Island, NY) 处理, 以去除RNA中的污染DNA。首先使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Life Technologies, Grand Island, NY) 进行逆转录(RT)反应, 再在Applied Biosystems QuantStudio™12 K Flex系统(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)上进行qRT-PCR。选择18S rRNA作为内参基因(表1), 通过QuantStudio 12 K Flex软件(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)及定量比较Ct法对特定基因的相对表达量进行定量分析^[25]。利用SPSS 26.0对数据进行处理, 再基于EXCEL软件作图。

表1 实时荧光定量PCR引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因名称 Gene name	引物序列 Primer (5'—3')
<i>Mps1</i>	ATGCCGCTGACCGGTCCGATGACCA CAGGTCCTGCAGCGAACCGAAGA
<i>BubR1</i>	CTACAGGTACATGCAAGCTCAG CTGTCATCATGCACAGTCATCA
<i>Dnm</i>	CTGCCACAGATCGCTGTGGTTG CATTTGGTGAATAGACGCGCAGGT
<i>Arf</i>	TCCTAGTGCGATTCTGTTTATTGATGATAT GTCACGATCGTTGCTGTCAACCAC
<i>CycB</i>	ATTACATGAAATATCAACATGATAT TGAAGCCATTAACATCGATGTTAT
<i>RrM2B</i>	CTCCACTGTGACTTTGCTTGCCCTGAT CAGTTCCAGCAGCAGCCTATCAG
<i>AurKA</i>	GTATAATCTCTCAGCAGCCTTCTG CAGCTGATGTTCTACACCTGCT
<i>CaN</i>	ATCATGACTGTCGTTCTGTGCGA CTGATGATCCATAGTGCTTGCT
<i>Eg2</i>	GTACTIONGATGCAGGTGACAATG GATTGCTGGGGCTGATCTTGTA
<i>Hsp90</i>	TCATCCGGATCGTTCCTGATAAGAC GTGCTTGGTCGTGACGATGACT
<i>18S rRNA</i>	ATAGCAGAACCGCGAGACATCTG TGCTTAAGTTCAGCGGGTGATCTTG

2 结果与分析

2.1 PS NPs对绿草履虫的急性毒理试验

急性毒性试验结果表明，绿草履虫暴露在PS NPs一段时间后出现运动速度降低直至停止运动，但当PS NPs浓度较高时绿草履虫会发生细胞破裂和分解现象（死亡）（图1）。对PS NPs处理24 h后绿草履

虫死亡率与PS NPs浓度间相关性进行回归分析后得到拟合方程： $y = 0.1167x - 1.3616$ ， $R^2 = 0.9417$ ， $P = 0.0026$ （图2），再根据该方程进行计算获得PS NPs对绿草履虫的24 h半致死浓度（24 h LC₅₀）为15.93 mg/L，而PS NPs对绿草履虫的24 h最小致死浓度（24 h MLC）为11.63 mg/L。

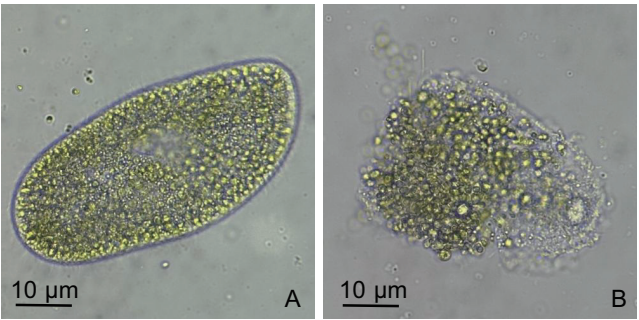


图1 聚苯乙烯纳米颗粒（PS NPs）对绿草履虫形态的影响（光学显微照片）。A：经15 mg/L PS NPs处理0 h后的绿草履虫个体；B：经15 mg/L PS NPs处理24 h后的发生细胞破裂现象的绿草履虫个体。

Fig. 1 Effects of PS NPs on the morphology of *Paramecium bursaria* (optical micrograph). A: *P. bursaria* treated with 15 mg/L PS NPs for 0 h; B: The rupturing cell of *P. bursaria* treated with 15 mg/L PS NPs for 24 h.

2.2 PS NPs对绿草履虫种群增长的影响

种群增长试验结果（图3）表明，与对照组（PS NPs浓度为0 mg/L）相比，5和10 mg/L浓度组各时段种群增长情况接近对照组；而12.5 mg/L和15 mg/L浓度组的绿草履虫密度在0-12 h时段急剧下降且后续各时段绿草履虫密度明显低于对照组。

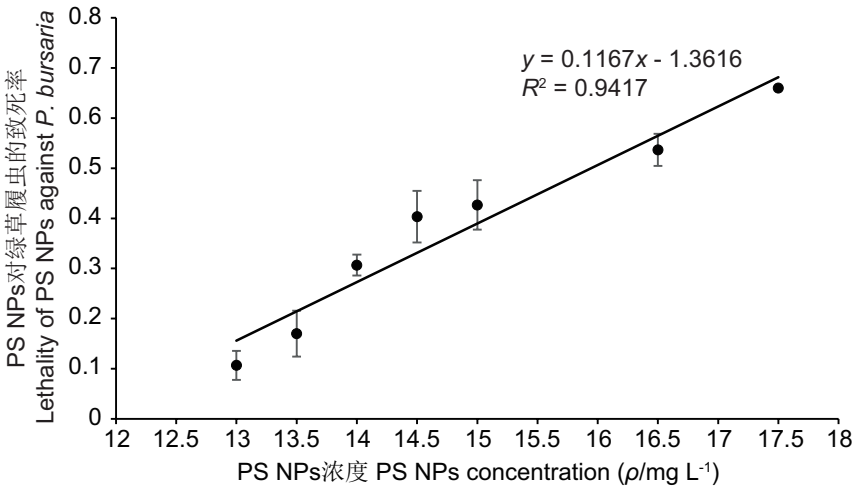


图2 聚苯乙烯纳米颗粒（PS NPs）处理24 h后绿草履虫死亡率与PS NPs浓度间相关性的拟合回归分析。误差线代表基于3次重复实验的标准差。

Fig. 2 Regression fitting analysis of the correlation between the mortality of *Paramecium bursaria* and PS NPs concentration after 24 h treatment. The error bars exhibit the standard deviation of triplicate experiments.

2.3 转录组测序数据的处理、序列拼接及单基因簇 (unigene) 的注释

转录组高通量测序原始数据经过滤处理后每组均获得不低于 3.98×10^7 条的clean reads (表2), clean reads经进一步拼接后共获得了132 441个Transcript和78 081个Unigene. 通过NR数据库注释获得的

Unigene数量最多, 达36 027条, 占拼接后全部基因的46.14%; 在6个数据库 (Nr, GO, KEGG, Pfam, eggNOG及Swissprot) 中都被注释到的Unigene有10 807条, 占拼接后全部基因的13.84% (表3).

2.4 DEGs的聚类分析

基于高通量测序数据, 从绿草履虫的PS NPs

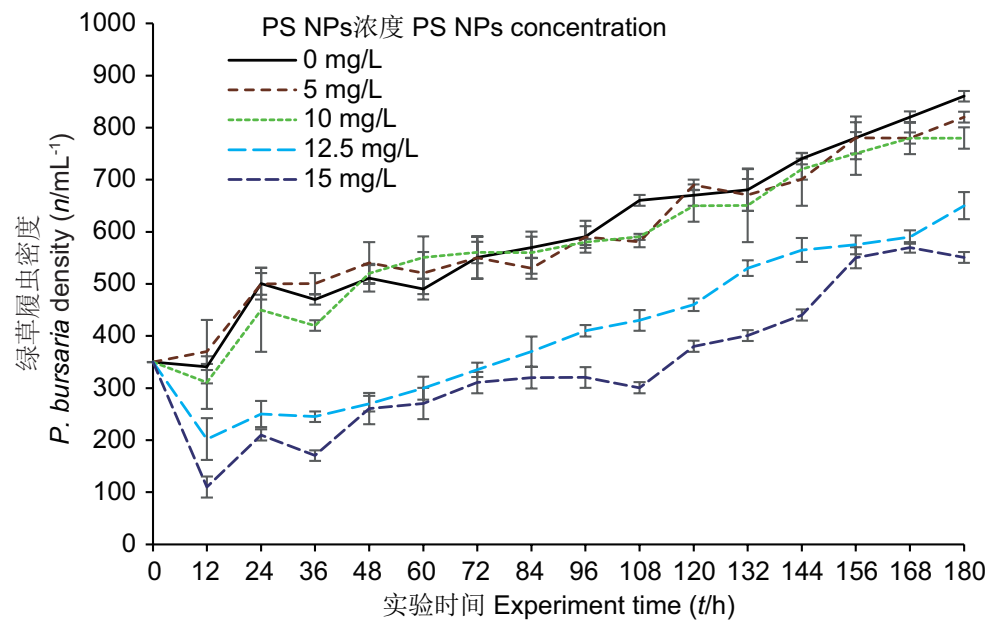


图3 聚苯乙烯纳米颗粒 (PS NPs) 对绿草履虫种群增长的影响. 误差线代表基于3次重复实验的标准差.
Fig. 3 Effects of PS NPs on the population growth of *Paramecium bursaria*. The error bars exhibit the standard deviation of triplicate experiments.

表2 测序数据统计
Table 2 Summary of sequencing data

样本 Sample	过滤后序列数量 Number of clean reads	过滤后序列质量大于20的碱基数比例 Proportion of bases whose sequence quality is greater than 20 after filtering (P/%)	过滤后序列质量大于30的碱基数比例 Proportion of bases whose sequence quality is greater than 30 after filtering (P/%)
CK_1	42507708	98.09	94.65
CK_2	40144342	97.94	94.33
CK_3	39828632	97.74	94.78
PB_1	42800344	97.58	94.67
PB_2	41056724	98.19	94.71
PB_3	40280884	97.78	94.29

表3 单基因簇注释结果统计
Table 3 Summary of unigene annotation results

数据库 Database	单基因簇的数量 Number of unigenes	在单基因簇总数中的占比 Percentage in total unigenes (P/%)
非冗余蛋白序列数据库 Nr	36027	46.14
基因本体论数据库 GO	30370	38.90
京都基因和基因组百科全书 KEGG	23757	30.43
蛋白质家族数据库 Pfam	20400	26.13
基因的进化谱系数据库 eggNOG	36299	46.49
蛋白质序列数据库 Swissprot	35052	44.89
在以上所有6个数据库中都被注释到 Annotated in all the six databases above	10807	13.84

处理组(PB)与对照组(CK)之间筛选到了371个DEGs,其中包括298个上调基因和73个下调基因。DEGs的聚类分析结果(图4)表明,PS NPs对绿草履虫基因表达的影响显著。另外,PS NPs处理组的3个生物学重复间的基因表达模式相似,对照组内的3个生物学重复间的基因表达模式亦相似,这佐证了本次实验高通量测序的重复性较好。

2.5 DEGs的GO功能富集分析

基于371个DEGs进行GO富集分析,共获得了764个GO显著富集条目($P < 0.05$),其中包括90条细胞组分相关条目、95条分子功能相关条目和579条生物过程相关条目。其中富集最显著(P 值越小富集的GO条目越显著)的前20个条目包含16个生物过程相关条目和4个细胞组分相关条目,并且这20个条目全部与细胞周期及细胞分裂直接相关(表4)。

2.6 DEGs的KEGG功能富集分析

基于DEGs总共富集到了166条KEGG通路,其中包含10条显著富集($P < 0.05$)的通路,这10条通路涉及有丝分裂、减数分裂、免疫应答、跨膜运输和物质代谢等5个方面(表5)。其中涉及有丝分裂的细胞周期、磷脂酶D信号通路及p53信号通路等3个通路包含的13个DEGs中的11个基因表达上调、2个基因表达下调;涉及减数分裂的孕激素介导的卵母细胞成熟和卵母细胞减数分裂等2个通路包含的10个DEGs全部表达上调;涉及免疫应答的全身性红斑狼疮通路包含的3个DEGs全部表达上调;涉及跨膜运输的ATP结合盒转运体通路包含的5个DEGs中的4个基因表达上调、1个基因表达下调;涉及物质代谢的嘌呤代谢、精氨酸和脯氨酸代谢和嘧啶代谢等3个通路包含的9个DEGs中的7个基因表达上调、2个基因表达上调。

2.7 绿草履虫与细胞分裂相关的主要DEGs

基于KEGG富集通路的分析结果(表5),进一步统计到了绿草履虫与细胞分裂相关的主要DEGs,共计15个(表6),这些基因大部分(13个)表达上调。其中*Mps1*、*BubR1*及*AurKA*等3个基因涉及蛋白质磷酸化,*CaN*基因涉及蛋白质去磷酸化,*Cdc14*、*Cdc45*及*Orc1*等3个基因与DNA复制起始直接相关,*Rrm2b*基因参与DNA合成,*CycB*和*p53*基因参与细胞周期的启动,*Sos*、*Arf*及*Hsp90*等3个基因涉及细胞周期的调控,*Dnm*基因参与细胞的内存作用,*Eg2*涉及葡聚糖的水解。

2.8 qRT-PCR验证DEGs的表达

qRT-PCR结果得到的10个DEGs的相对表达量与RNA-Seq得到的相对表达量之间相关性较高(图5),这个结果验证了转录组高通量测序及分析的可靠性。

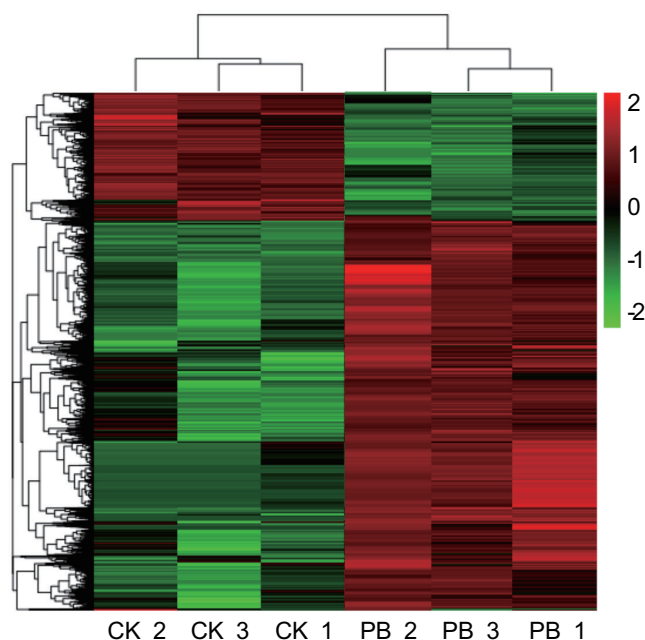


图4 差异表达基因聚类热图。CK: 对照组; PB: PS NPs处理组。每列代表一个样品,每行代表一个基因。基因相对表达量用不同颜色表示,越接近色谱条(位于图的右上角)上段的颜色代表基因表达量越高,越接近色谱条下段的颜色代表基因表达量越低。在筛选差异表达基因时FDR < 0.05。

Fig. 4 Clustering heatmap of the differentially expressed genes. CK: Control group; PB: Group treated with PS NPs. Each column represents a sample and each row represents a gene. The relative gene expression level is represented by different colors. The closer the color is to the upper segment of chromatographic strip (located in the upper right corner of the figure), the higher the gene expression level is; and the closer the color is to the lower segment of the chromatographic strip, the lower the gene expression level is. FDR < 0.05 is applied as the adjusted threshold when screening the differentially expressed genes.

3 讨论与结论

3.1 单细胞生物绿草履虫对PS NPs胁迫具有较强的敏感性

塑料在全球范围内的使用日益增加,废弃的塑料及其逐渐破碎形成的尺寸不一的塑料微粒已造成了严重的健康和环境问题^[26]。对其毒性效应的有限数量的研究表明,与宏观塑料和微米级塑料颗粒相比,纳米级塑料颗粒具有潜在的生物毒性^[27],但纳米级塑料颗粒生物毒性的细胞和分子机理尚有待深入探讨。一些研究表明,纳米级塑料颗粒的生物毒性与其颗粒大小呈现负相关性,即纳米级塑料颗粒尺寸越小其生物毒性越大^[28-29]。目前相关研究还面临以下两个困境:(1)纳米级塑料颗粒的人工制备技术受限,目前能作为实验材料的商业化生产的PS NPs最小尺寸为20 nm^[30];(2)许多受试生物对纳米级塑料颗粒胁迫的表型反应(如行为变异、形态学破坏及死亡等)不明显,这阻碍了直观和准确地评估纳米级塑料颗粒的生

表4 基于绿草履虫聚苯乙烯纳米颗粒处理组与对照组间差异表达基因显著富集到的前20个GO条目 ($P < 0.05$)

Table 4 The top 20 significantly enriched GO terms based on DEGs between PS NPs-treated and control group of *Paramecium bursaria* ($P < 0.05$)

GO条目类型 Category of GO term	GO条目 GO term	表达上调DEGs的数量 Number of up- regulated GEGs	表达下调DEGs的数量 Number of down- regulated GEGs	P值 P-value
生物过程 Biological process	有丝分裂细胞周期 Mitotic cell cycle	40	3	2.30E-10
	细胞器裂变 Organelle fission	29	3	2.60E-10
	细胞核分裂 Nuclear division	26	3	4.10E-09
	细胞分裂 Cell division	29	3	5.90E-09
	减数分裂时的细胞核分裂 Meiotic nuclear division	19	2	9.80E-09
	细胞周期过程 Cell cycle process	41	4	1.20E-08
	有丝分裂细胞周期过程 Mitotic cell cycle process	33	2	1.60E-08
	纺锤体组织 Spindle organization	19	1	1.60E-08
	细胞周期 Cell cycle	47	4	4.50E-08
	有丝分裂时的细胞核分裂 Mitotic nuclear division	19	1	1.10E-07
	细胞周期过程的调节 Regulation of cell cycle process	27	3	1.80E-07
	有丝分裂姐妹染色单体分离 Mitotic sister chromatid segregation	15	0	2.00E-07
	纺锤体组装 Spindle assembly	14	1	2.60E-07
	染色体缩合 Chromosome condensation	11	0	3.40E-07
	减数分裂细胞周期过程 Meiotic cell cycle process	19	2	3.60E-07
	细胞周期的调节 Regulation of cell cycle	33	3	6.30E-07
	染色体的着丝粒区 Centromeric region of chromosome	13	2	2.40E-08
细胞组分 Cellular component	凝聚的染色体的着丝粒区 Centromeric region of condensed chromosome	10	2	1.90E-07
	核染色体 Nuclear chromosome	22	0	2.90E-07
	浓缩的染色体 Condensed chromosome	13	2	6.00E-07

表5 基于绿草履虫聚苯乙烯纳米颗粒处理组与对照组间差异表达基因显著富集到的KEGG代谢通路 ($P < 0.05$)

Tab. 5 The significantly enriched KEGG metabolic pathways based on DEGs between PS NPs-treated and control group of *Paramecium bursaria* ($P < 0.05$)

KEGG代谢通路 类型 Classification of KEGG metabolic pathways	KEGG代谢通路 KEGG metabolic pathway	表达上调DEGs的 数量 Number of up-regulated GEGs	表达下调DEGs的 数量 Number of down- regulated GEGs	P值 P-value
有丝分裂 Mitosis	细胞周期通路 Cell cycle pathway	7	0	3.95E-04
	磷脂酶D信号通路 Phospholipase D signaling pathway	3	2	1.32E-02
	p53信号通路 p53 signaling pathway	3	0	1.75E-02
减数分裂 Meiosis	孕激素介导的卵母细胞成熟通路 Progesterone-mediated oocyte maturation pathway	5	0	5.49E-03
	卵母细胞减数分裂通路 Oocyte meiosis pathway	5	0	3.46E-02
免疫应答 Immune response	系统性红斑狼疮通路 Systemic lupus erythematosus pathway	3	0	6.40E-03
跨膜运输 Transmembrane transport	ATP结合盒转运体通路 ATP-binding cassette transporters pathway	4	1	1.35E-02
物质代谢 Material metabolism	嘌呤代谢通路 Purine metabolism pathway	4	1	3.49E-02
	精氨酸和脯氨酸代谢通路 Arginine and proline metabolism pathway	3	0	4.11E-02
	嘧啶代谢通路 Pyrimidine metabolism pathway	2	1	4.30E-02

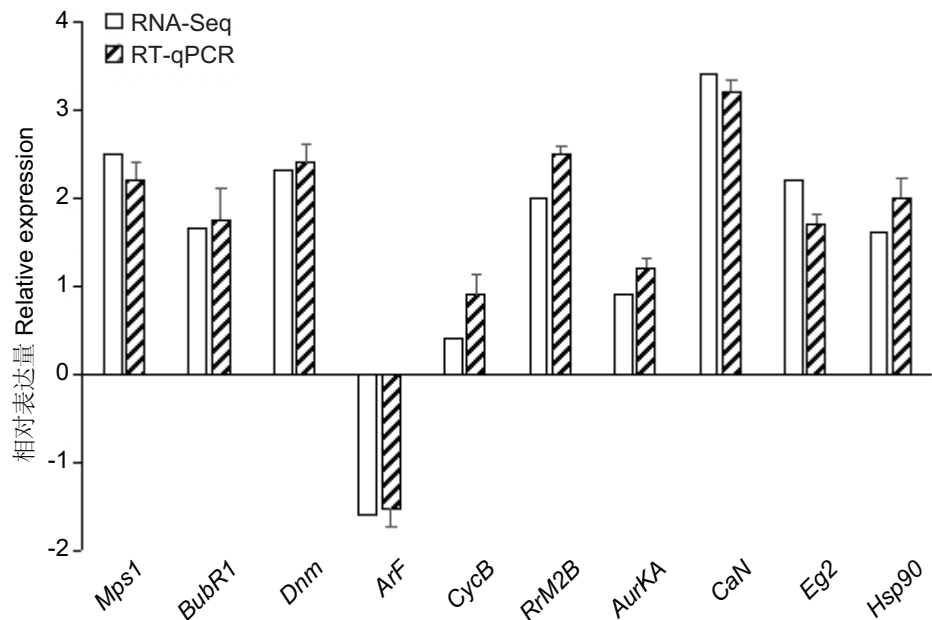


图5 聚苯乙烯纳米颗粒 (PS NPs) 胁迫下绿草履虫差异表达基因的实时荧光定量PCR验证. 误差线代表基于3次重复实验的标准差.
Fig. 5 qRT-PCR validation of DEGs in *Paramecium bursaria* exposed to PS NPs. The error bars exhibit the standard deviation of triplicate experiments.

表6 绿草履虫与细胞分裂相关的主要差异表达基因

Table 6 Major DEGs associated with cellular division of *Paramecium bursaria*

基因ID Gene ID	基因注释 Gene annotation	在绿草履虫中的表达模式 Regulation pattern in <i>P. bursaria</i>	DEGs参与的生命活动 Life activities in which DEGs participate
TRINITY_DN112328_c0_g1	单极主轴蛋白1 Monopolar spindle 1 (<i>Mps1</i>)	上调 Up	蛋白质磷酸化 Protein phosphorylation
TRINITY_DN114966_c0_g1	有丝分裂检查点丝氨酸/苏氨酸激酶B BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B (<i>BubR1</i>)	上调 Up	蛋白质磷酸化 Protein phosphorylation
TRINITY_DN11881_c1_g1	细胞周期蛋白B Cyclin B (<i>CycB</i>)	上调 Up	细胞周期的启动 Cell cycle initiation
TRINITY_DN125485_c0_g1	细胞分裂周期蛋白14 Cell division cycle 14 (<i>Cdc14</i>)	上调 Up	DNA复制起始 DNA replication initiation
TRINITY_DN14312_c0_g1	细胞分裂周期蛋白45 Cell division cycle 45 (<i>Cdc45</i>)	上调 Up	DNA复制起始 DNA replication initiation
TRINITY_DN19636_c0_g2	原点识别复合体亚基 Origin recognition complex subunit 1 (<i>Orc1</i>)	上调 Up	DNA复制起始 DNA replication initiation
TRINITY_DN25088_c0_g1	动力蛋白 Dynamin (<i>Dnm</i>)	上调 Up	细胞的内存作用 Endocytosis
TRINITY_DN30090_c1_g1	无七之子蛋白1 Son of sevenless (<i>Sos</i>)	上调 Up	细胞周期调控 Cell cycle regulation
TRINITY_DN38271_c0_g2	ADP核糖基化因子 ADP-ribosylation factor (<i>Arf</i>)	下调 Down	细胞周期调控 Cell cycle regulation
TRINITY_DN50778_c0_g1	p53诱导核糖核苷酸还原酶的小亚基 M2B ribonucleotide reductase regulatory TP53 inducible subunit M2B (<i>Rrm2b</i>)	上调 Up	DNA合成 DNA synthesis
TRINITY_DN56703_c0_g1	肿瘤抑制蛋白p53 Tumor suppressor protein p53 (<i>p53</i>)	下调 Down	细胞周期的启动 Cell cycle initiation
TRINITY_DN6915_c0_g1	极光激酶A Aurora kinase A (<i>AurKA</i>)	上调 Up	蛋白质磷酸化 Protein phosphorylation
TRINITY_DN79061_c0_g1	钙调磷酸酶 Calcineurin (<i>CaN</i>)	上调 Up	蛋白质去磷酸化 Protein dephosphorylation
TRINITY_DN89195_c0_g1	内切葡聚糖酶2 Endoglucanase 2 (<i>Eg2</i>)	上调 Up	葡聚糖的水解 Glucan hydrolysis
TRINITY_DN99268_c0_g1	热休克蛋白90 Heat shock protein 90 (<i>Hsp90</i>)	上调 Up	细胞周期调控 Cell cycle regulation

物毒性，因此筛选对纳米级塑料颗粒胁迫敏感的受试生物有助于纳米级塑料颗粒生物毒性及机理的研究。

本研究在进行20 nm PS NPs对绿草履虫的急性毒理试验时发现PS NPs对绿草履虫的24 h半致死浓度(24 h LC₅₀)为15.93 mg/L，而PS NPs对绿草履虫的24 h最小致死浓度(24 h MLC)为11.63 mg/L(图2)。而杨凯宁等发现PS NPs(粒径20 nm)对绿水螅的LC₅₀为336 mg/L^[13]，这个数值是20 nm PS NPs对绿草履虫LC₅₀的将近20倍，这反映了绿草履虫对20 nm PS NPs胁迫的敏感性远高于多细胞动物绿水螅。另外，本研究在后续进行的20 nm PS NPs下绿草履虫种群增长试验的结果表明，当PS NPs的浓度低于PS NPs对绿草履虫的MLC时，PS NPs胁迫对绿草履虫种群增长的影响不明显；但当PS NPs的浓度高于MLC时，PS NPs胁迫对绿草履虫种群增长的影响较

为明显(图3)，12.5和15 mg/L浓度组的绿草履虫密度在0-12 h时段急剧下降，这反映了在这两个PS NPs浓度下绿草履虫具有一定的死亡率。12.5 mg/L浓度组的绿草履虫密度到种群增长试验进行到84 h时超过实验开始时的初始密度，而15 mg/L浓度组的绿草履虫密度到种群增长实验进行到120 h时才超过实验开始时的初始密度，且这两个浓度组后续各时段绿草履虫密度均明显低于对照组(图3)，这个现象暗示PS NPs胁迫对绿草履虫的无性分裂生殖产生了一定程度的抑制。总之，急性毒理试验和慢性毒理试验(种群增长试验)的结果均表明绿草履虫对PS NPs胁迫较为敏感，绿草履虫可作为PS NPs生物毒性及机理研究的备选模式生物。

3.2 PS NPs对绿草履虫的可能作用机制

PS NPs侵入生物体的机制和不良后果尚未得到

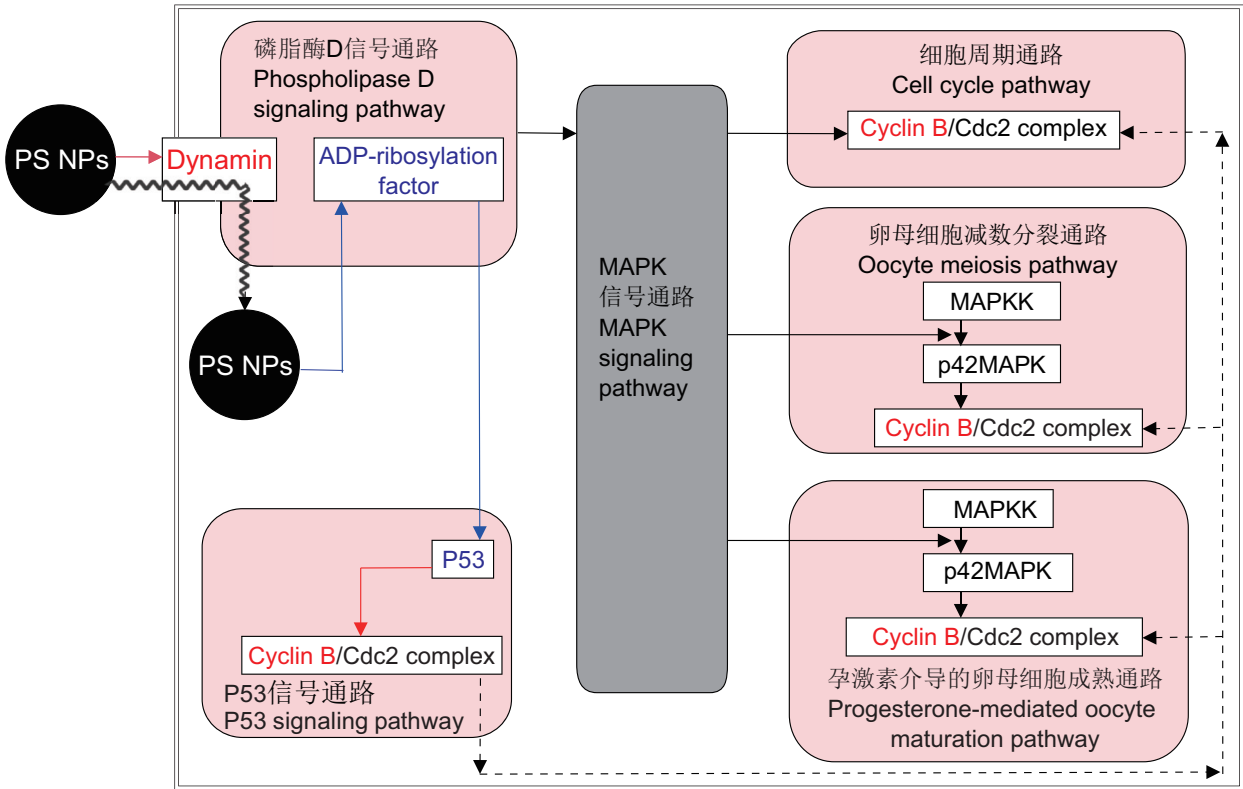


图6 聚苯乙烯纳米颗粒(PS NPs)对绿草履虫细胞分裂相关的5个代谢通路的扰动。黑色实心圆球表示PS NPs; 波浪线表示PS NPs可能通过dynamin途径穿过绿草履虫细胞膜进入其细胞质; 双线表示细胞膜; 带单实线的箭头表示代谢关系, 其中红色带单实线的箭头示正相关关系, 蓝色带单实线的箭头示负相关关系; 圆角文本框表示代谢通路, 而具有浅红色背景文本框表示本研究富集到的代谢通路; 直角文本框表示代谢通路中的重要代谢节点, 其中红字代表表达上调的代谢节点, 蓝字代表表达下调的代谢节点; 虚线表示不同代谢通路具有相同的代谢节点。

Fig. 6 Perturbation of five metabolic pathways associated with cell division in *Paramecium bursaria* by PS NPs. The solid black ball represents PS NPs; wavy line indicates that PS NPs may traverse the cell membrane of *P. bursaria* via dynamin to enter its cytoplasm; double line represents cell membrane; arrows with a single solid line indicate metabolic relationships, where red arrows indicate positive correlations and blue arrows indicate negative correlations; text boxes with rounded corners represent metabolic pathways, while those with light red background are the enriched pathways in this study; rectangular text boxes indicate key metabolic nodes within these pathways, where red text signifies upregulated metabolic nodes, while blue text signifies downregulated metabolic nodes; dashed lines indicate that different metabolic pathways have the same metabolic node.

充分研究. PS NPs已被发现能够穿透和跨越生物屏障,包括肠、肺、脑和胎盘的屏障^[31]. PS NPs能在动物肠道组织中积累,它们还能穿透腔血屏障,转移到血管和远处器官^[32];对鱼类的研究表明,PS NPs可以进入循环系统,通过血脑屏障,并在大脑中积累^[33].此外,在人类胎盘中已检测到了PS NPs,这说明PS NPs能穿过胎盘屏障^[34]. PS NPs的这种能力引发了人们对PS NPs危及人类健康可能性的关切,而最令人担忧的是目前能得到的PS NPs突破生物屏障的机理相关信息非常有限.细胞膜是最基础的生物屏障^[35],本研究发现了两个线索,可能对于探索PS NPs突破生物屏障的机理研究有一定的参考价值.第一个线索是PS NPs胁迫下绿草履虫的GTPase动力蛋白(dynamin)基因的表达显著上调(图5),而GTPase动力蛋白具备GTP结合蛋白的特性、具有独特的机械化学性质,能管化和切断细胞膜,并参与网格蛋白介导的内吞作用和其他囊泡运输过程^[36].肌动蛋白和其他细胞骨架蛋白作为伴侣分子,通常与GTPase动力蛋白自组装成聚合体,从而激动力蛋白的GTPase活性^[37].动力蛋白超家族的许多成员参与各种生物膜(细胞膜和细胞器膜)重塑事件,包括细胞内运输囊泡和大细胞器(如线粒体和叶绿体)的裂变和融合以及全细胞分裂(即细胞质分裂),而GTPase动力蛋白作为“分子剪刀”形成内吞囊泡,是参与内吞作用相关蛋白质的关键调节因子,对细胞膜内外物质交流起到至关重要的作用^[38].第二个线索是基于绿草履虫PS NPs处理组与对照组间DEGs显著富集到了ATP结合盒转运体(ATP-binding cassette transporters)代谢通路(表5).ATP结合盒转运体通过将ATP的结合、水解和磷酸盐释放耦合到不同底物的跨膜转运而发挥分子机器的作用^[39].底物范围从维生素、类固醇、脂质和离子到蛋白质、多糖及外源性物质. PS NPs是否藉由GTPase动力蛋白主导的细胞膜的内吞作用,还是依托ATP结合盒转运体的转运进入绿草履虫细胞,或者这两种转运机制兼而有之,尚待进一步深入研究.

值得注意的是,在基于绿草履虫PS NPs处理组与对照组间DEGs显著富集到的共10个代谢通路中有5个通路细胞分裂直接相关(表5),包括涉及有丝分裂的细胞周期、磷脂酶D信号通路及p53信号通路等3个通路和涉及减数分裂的孕激素介导的卵母细胞成熟和卵母细胞减数分裂等2个通路,而这5个通路是以丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路(MAPK signaling pathway)^[40]为中心的通路集群(图6). PS NPs可能通过磷脂酶D信号通路中的GTPase动力蛋白侵入绿草履虫细胞内后诱发ADP核糖基化因子(ADP-ribosylation factor, Arf)表达下调(图5,图6),Arf

可以与E3泛素蛋白连接酶(负责p53降解的蛋白质)结合并抑制其活性、从而保护肿瘤抑制蛋白p53,也就是说Arf表达下调意味着细胞内的p53总量的减少^[41-42].而在调节细胞周期蛋白B(Cyclin B)和p53之间有很强串扰,一般来说, p53和Cyclin B的表达水平呈负相关^[43],这个现象也体现在本研究实验富集到的p53信号通路中的Cyclin B表达上调(图5,图6). Cyclin B通常与细胞周期蛋白依赖性激酶2(cell division cycle kinase-2, cdc2)结合成复合体参与细胞分裂进程的调节^[44],而在p53信号通路、细胞周期通路、减数分裂的孕激素介导的卵母细胞成熟通路及卵母细胞减数分裂通路等4个通路中Cyclin B-cdc2复合体都是重要的代谢节点(图6).总之, PS NPs可能是通过影响MAPK信号通路框架下的相关代谢通路扰动了绿草履虫细胞分裂的调节,在这个过程中Cyclin B-cdc2复合体承担着重要角色.

从本研究基于KEGG富集通路的分析结果统计到的绿草履虫与细胞分裂相关的15个主要DEGs涉及的生命活动的类型(表6)看, PS NPs可能通过如下3种路径影响绿草履虫的细胞分裂:(1)有研究表明PS NPs对动物体内许多蛋白质特别是细胞分裂相关蛋白质的磷酸化状态有显著的影响^[45-46],而蛋白质的磷酸化和去磷酸化与细胞信号转导直接相关.在绿草履虫与细胞分裂相关的主要DEGs中有3个基因(*Mps1*、*BubR1*及*AurKA*)涉及蛋白质磷酸化,还有1个基因(*CaN*)涉及蛋白质去磷酸化,据此推测PS NPs可能影响绿草履虫一些蛋白质的磷酸化状态,进一步扰动与细胞分裂相关的细胞信号转导途径;(2)DNA的合成与复制是细胞分裂的物质基础^[47],而绿草履虫与细胞分裂相关的主要DEGs中包含*Cdc14*、*Cdc45*及*Orc1*等3个与DNA复制起始直接相关的基因及1个参与DNA合成的基因(*Rrm2b*),这暗示PS NPs也可能通过干扰绿草履虫DNA的合成与复制对其细胞分裂产生影响;(3)细胞分裂由细胞周期的启动和调控来实现^[48],绿草履虫与细胞分裂相关的15个主要DEGs中有5个基因与细胞周期有直接关联(*CycB*和*p53*基因参与细胞周期的启动,而*Sos*、*Arf*及*Hsp90*等3个基因涉及细胞周期的调控),这说明PS NPs可能对绿草履虫细胞周期施加一定程度的影响,最终扰动绿草履虫的细胞分裂,而细胞周期的重要物质基础是细胞骨架, PS NPs是否首先扰动细胞骨架的结构和机能,进而影响到细胞周期?本研究目前没得到这个问题的相关证据,有待继续探讨.

自然界中存在许多生活史中无性生殖和有性生殖两种生殖形式兼有的低等无脊椎动物^[49],这些动物在温度适宜、食物丰富等温和环境条件下进行无性生殖,而当面临温度剧烈变化、食物缺乏等环境压力时

它们通常从无性生殖转变为有性生殖^[50], 这种无性生殖和有性生殖两种生殖形式在不同环境背景下相互转换的生态收益及细胞与分子机理目前仍然未知. 在本研究的培养条件下(光照强度500 lx, 温度25 °C, 光照12 h/d)绿草履虫只进行无性分裂生殖, 而基于绿草履虫PS NPs处理组与对照组间DEGs显著富集到了孕激素介导的卵母细胞成熟通路及卵母细胞减数分裂通路等两个涉及有性生殖的减数分裂的代谢通路(表5), 这个结果可能暗示在PS NPs胁迫下绿草履虫有由无性生殖向有性生殖转变的倾向.

此外, 本研究基于绿草履虫PS NPs处理组与对照组间DEGs还显著富集了系统性红斑狼疮代谢通路, 涉及其中的3个DEGs表达全部上调(表5). 系统性红斑狼疮是一种非常严重的自身免疫性疾病, 生物的免疫系统会错误地攻击自己身体许多部位的健康组织^[51]. 本研究显著富集到的系统性红斑狼疮代谢通路表明PS NPs对绿草履虫的免疫体系形成了较为严重的冲击, 引发了绿草履虫的过度免疫. 无独有偶, 有研究表明PS NPs胁迫导致肥头鲤(*Pimephales promelas*)的中性粒细胞出现初级颗粒脱颗粒和细胞外陷阱释放现象显著增加现象, 暗示PS NPs对肥头鲤先天免疫系统有一定程度的扰动, 从而有可能干扰鱼类种群的抗病性^[52]; 在食用含有PS NPs的饲料一段时间后小鼠(*Mus musculus*)的淋巴细胞中B细胞的比例显著增加, 而其中CD8⁺ T细胞的比例明显降低, 与此同时促炎细胞因子IL-6、TNF- α 和IL-1 β 的表达水平显著升高, 这表明PS NPs胁迫下的小鼠面临组织器官的损伤和相应的免疫系统失衡^[53]. 总之, PS NPs胁迫对生物的免疫系统有一定程度的影响, 相关机制有待深入研究.

值得考虑的是, 由于共生藻能传递光合作用产物

给绿草履虫宿主, 因而绿草履虫有两个方面的营养来源(一是直接内吞微生物为营养, 二是来自共生藻的光合作用产物), 所以其细胞分裂速度较快, 短时间内就能得到大量绿草履虫用于毒理学等试验, 这是绿草履虫成为毒理学等许多生命科学实验模式生物依托的主要优点; 同时, 也正是因为共生藻的存在可能使环境因子或环境胁迫对绿草履虫宿主的生物学效应相关研究出现一定的局限性, 例如本研究的实验材料PS NPs进入绿草履虫细胞质后是否与共生藻有互作效应? 而这个互作效应是否进一步影响绿草履虫宿主? 目前的实验手段尚无法解析这些可能的问题, 因此以后以绿草履虫为模式生物的实验体系尚需进一步完善.

综上所述, 本研究首先基于急性毒理试验和种群增长试验观察了PS NPs(粒径20 nm)对绿草履虫的毒性效应, 结果显示PS NPs对绿草履虫的生存和细胞分裂有明显的影响, 并且有显著的致死效应(24 h半致死浓度为15.93 mg/L). 在此基础上采用比较转录组方法重点研究了绿草履虫对PS NPs胁迫的分子响应. 转录组结果表明, PS NPs主要借助以MAPK信号通路为中心的相关代谢通路扰动绿草履虫细胞分裂的调控和运作, 而PS NPs通过蛋白质的磷酸化状态、DNA的复制与合成及细胞周期这3个途径对绿草履虫的细胞分裂活动施加影响. 此外, PS NPs对绿草履虫的免疫体系形成了较为严重的冲击, 引发了绿草履虫的过度免疫, PS NPs对绿草履虫的致死效应可能与此相关. 尽管本研究是以绿草履虫为实验材料研究PS NPs的生物毒性, 但根据结果推测, PS NPs污染对自然界中包括绿草履虫在内的单细胞生物的生存可能已构成了巨大威胁, 这提示全社会采取减少塑料制品使用、妥善回收和处置废弃塑料等有效措施防止自然界的塑料污染已成为当务之急.

参考文献 [References]

- 1 Orm B, Lotze HK, Jubinville I, Wilcox C, Jambeck J. Plastic as a persistent marine pollutant [J]. *Annu Rev Environ Resour*, 2017, **42** (1): 1-26
- 2 Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, Siegler TR, Perryman M, Andrady A, Narayan R, Law KL. Plastic waste inputs from land into the ocean [J]. *Science*, 2015, **347** (6223): 768-771
- 3 Cowger W, Willis KA, Bullock S, Conlon K, Emmanuel J, Erdle LM, Eriksen M, Farrelly TA, Hardesty BD, Kerge K, Li N, Li Y, Liebman A, Tangri N, Thiel M. Global producer responsibility for plastic pollution [J]. *Sci Adv*, 2024, **10** (17): ead8275
- 4 Kibria MG, Masuk NI, Safayet R, Nguyen HQ, Mourshed M. Plastic waste: challenges and opportunities to mitigate pollution and effective management [J]. *Int J Environ Res*, 2023, **17** (1): 20
- 5 Li P, Wang X, Su M, Zou X, Duan L, Zhang H. Characteristics of plastic pollution in the environment: a review [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2020, **107** (4): 577-584
- 6 Blettler MCM, Abrial E, Khan FR, Sivri N, Espinola LA. Freshwater plastic pollution: recognizing research biases and identifying knowledge gaps [J]. *Water Res*, 2018, **143**: 416-424
- 7 Azevedo-Santos VM, Brito MFG, Manoel PS, Perroca JF, Rodrigues-Filho JL, Paschoal LRP, Gonçalves GRL, Wolf MR, Blettler MCM, Andrade MC, Nobile AB. Plastic pollution: a focus on freshwater biodiversity [J].

- Ambio*, 2021, **50** (7): 1313-1324
- 8 MacLeod M, Arp HPH, Tekman MB, Jahnke A. The global threat from plastic pollution [J]. *Science*, 2021, **373** (6550): 61-65
 - 9 Verma R, Vinoda KS, Papireddy M, Gowda ANS. Toxic pollutants from plastic waste—a review [J]. *Procedia Environ Sci*, 2016, **35**: 701-708
 - 10 Willis K, Hardesty BD, Vince J, Wilcox C. Local waste management successfully reduces coastal plastic pollution [J]. *One Earth*, 2022, **5** (6): 666-676
 - 11 Kelpsiene E, Ekvall MT, Lundqvist M, Torstensson O, Hua J, Cedervall T. Review of ecotoxicological studies of widely used polystyrene nanoparticles [J]. *Environ Sci Process Impacts*, 2022, **24** (1): 8-16
 - 12 Qiao R, Mortimer M, Richter J, Rani-Borges B, Yu Z, Heinlaan M, Lin S, Ivask A. Hazard of polystyrene micro- and nanospheres to selected aquatic and terrestrial organisms [J]. *Sci Total Environ*, 2022, **853**: 158560
 - 13 杨凯宁, 符乐一, 李桂丽, 卜莉萍, 潘红春. 绿水螅野生型品系及无藻品系对聚苯乙烯纳米颗粒胁迫差异化响应的转录组分析[J]. 水生生物学报, 2024, **48** (8): 1333-1347 [Yang KN, Fu LY, Li GL, Pu LP, Pan HC. Transcriptomic analysis of differentiated responses between symbiotic and aposymbiotic strain of *Hydra sinensis* to polystyrene nanoparticles [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2024, **48** (8): 1333-1347]
 - 14 Liu Z, Cai M, Yu P, Chen M, Wu D, Zhang M, Zhao Y. Age-dependent survival, stress defense, and AMPK in *Daphnia pulex* after short-term exposure to a polystyrene nanoplastic [J]. *Aquat Toxicol*, 2018, **204**: 1-8
 - 15 Wang S, Zhong Z, Li Z, Wang X, Gu H, Huang W, Fang JK, Shi H, Hu M, Wang Y. Physiological effects of plastic particles on mussels are mediated by food presence [J]. *J Hazard Mater*, 2021, **404** (Pt A): 124136
 - 16 Shi B, Xu T, Chen T, Xu S, Yao Y. Co - exposure of decabromodiphenyl ethane and polystyrene nanoplastics damages grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) hepatocytes: focus on the role of oxidative stress, ferroptosis, and inflammatory reaction [J]. *Sci Total Environ*, 2024, **940**: 173575
 - 17 Teng M, Zhao X, Wang C, Wang C, White JC, Zhao W, Zhou L, Duan M, Wu F. Polystyrene nanoplastics toxicity to zebrafish: dysregulation of the brain-intestine-microbiota axis [J]. *ACS Nano*, 2022, **16** (5): 8190-8204
 - 18 Vilas-Boas JA, Cardoso SJ, Senra MVX, Rico A, Dias RJP. Ciliates as model organisms for the ecotoxicological risk assessment of heavy metals: a meta-analysis [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, **199**: 110669
 - 19 Tan B, Wang Y, Gong Z, Fan X, Ni B. Toxic effects of copper nanoparticles on *Paramecium bursaria*-*Chlorella* symbiotic system [J]. *Front Microbiol*, 2022, **13**: 834208.
 - 20 Zhang J, Li C, Chen X, Li Y, Fei C, Chen J. *Paramecium bursaria* as a potential tool for evaluation of microplastics toxicity [J]. *Biology (Basel)*, 2022, **11** (12): 1852
 - 21 Javorka P, Raxwal VK, Najvarek J, Riha K. artMAP: a user-friendly tool for mapping ethyl methanesulfonate-induced mutations in *Arabidopsis* [J]. *Plant Direct*, 2019, **3** (6): e00146
 - 22 Ghosh S, Chan CK. Analysis of RNA - seq data using TopHat and Cufflinks [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, **1374**: 339-361
 - 23 Panthagani J, Suleiman K, Vincent RC, Ong HS, Wallace GR, Rauz S. Conjunctival transcriptomics in ocular mucous membrane pemphigoid [J]. *Ocul Surf*, 2023, **30**: 142-149
 - 24 Xie R, Li B, Jia L, Li Y. Identification of core genes and pathways in melanoma metastasis via bioinformatics analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, **23** (2): 794
 - 25 Remon J, Alvarez-Berdugo D, Majem M, Moran T, Reguart N, Lianes P. miRNA-197 and miRNA-184 are associated with brain metastasis in EGFR-mutant lung cancers [J]. *Clin Transl Oncol*, 2016, **18** (2): 153-159
 - 26 Mbachu O, Kaparaju P, Pratt C. Plastic pollution risks in bioretention systems: a case study [J]. *Environ Technol*, 2023, **44** (17): 2525-2538
 - 27 Meng X, Zhang J, Wang W, Gonzalez-Gil G, Vrouwenvelder JS, Li Z. Effects of nano- and microplastics on kidney: physicochemical properties, bioaccumulation, oxidative stress and immunoreaction [J]. *Chemosphere*, 2022, **288** (Pt 3): 132631
 - 28 Hwang KS, Son Y, Kim SS, Shin DS, Lim SH, Yang JY, Jeong HN, Lee BH, Bae MA. Size-dependent effects of polystyrene nanoparticles (PS NPs) on behaviors and endogenous neurochemicals in zebrafish larvae [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, **23** (18): 10682
 - 29 Lu YY, Li H, Ren H, Zhang X, Huang F, Zhang D, Huang Q, Zhang X. Size-dependent effects of polystyrene nanoplastics on autophagy response in human umbilical vein endothelial cells [J]. *J Hazard Mater*, 2022, **421**: 126770
 - 30 Liu A, Richards L, Bladen CL, Ingham E, Fisher J, Tipper JL. The biological response to nanometre-sized polymer particles [J]. *Acta Biomater*, 2015, **23**: 38-51
 - 31 Kopatz V, Wen K, Kovács T, Keimowitz AS, Pichler V, Widder J, Vethaak AD, Hollóczki O, Kenner L. Micro- and nanoplastics breach the blood-brain barrier (BBB): biomolecular corona's role revealed [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2023, **13** (8): 1404
 - 32 Prüst M, Meijer J, Westerink RHS. The plastic brain: neurotoxicity of micro- and nanoplastics [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2020, **17** (1): 24
 - 33 Khan A, Jia Z. Recent insights into uptake, toxicity, and

- molecular targets of microplastics and nanoplastics relevant to human health impacts [J]. *iScience*, 2023, **26** (2): 106061
- 34 Grafmueller S, Manser P, Diener L, Diener PA, Maeder-Althaus X, Maurizi L, Jochum W, Krug HF, Buerki-Thurnherr T, von Mandach U, Wick P. Bidirectional transfer study of polystyrene nanoparticles across the placental barrier in an ex vivo human placental perfusion model [J]. *Environ Health Perspect*, 2015, **123** (12): 1280-1286
 - 35 Fang RH, Luk BT, Hu CM, Zhang L. Engineered nanoparticles mimicking cell membranes for toxin neutralization [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, **90**: 69-80
 - 36 Gu C, Yaddanapudi S, Weins A, Osborn T, Reiser J, Pollak M, Hartwig J, Sever S. Direct dynamin-actin interactions regulate the actin cytoskeleton [J]. *EMBO J*, 2010, **29** (21): 3593-3606
 - 37 Sever S, Damke H, Schmid SL. Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by EGFR and endophilin [J]. *J Cell Biol*, 2000, **150** (6): 1457-1470
 - 38 Schmid SL, Haucke V. Dynamin: a molecular machine for membrane fission [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, **8** (2): 133-147
 - 39 Linton KJ, Higgins CF. ATP-binding cassette transporters in human health and disease: from structure to function [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, **24** (5): 327-345
 - 40 Tian C, Heng D, Zhao N, Liu L, Sheng X, Chen J, Liu L. Short telomeres impede germ cell specification by upregulating MAPK and TGF β signaling [J]. *Sci China Life Sci*, 2023, **66** (2): 324-339
 - 41 Vichi A, Payne DM, Pacheco-Rodriguez G, Moss J, Vaughan M. E3 ubiquitin ligase activity of the trifunctional ARD1 (ADP-ribosylation factor domain protein 1) [J]. *PNAS*, 2005, **102** (6): 1945-1950
 - 42 Liu J, Zhang C, Xu D, Zhang T, Chang CY, Wang J, Liu J, Zhang L, Haffty BG, Zong WX, Hu W, Feng Z. The ubiquitin ligase TRIM21 regulates mutant p53 accumulation and gain of function in cancer [J]. *J Clin Invest*, 2023, **133** (6): e164354
 - 43 Krause K, Wasner M, Reinhard W, Haugwitz U, Dohna CL, Mössner J, Engeland K. The tumour suppressor protein p53 can repress transcription of cyclin B [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28** (22): 4410-4418
 - 44 Sun C, Zheng J, Cheng S, Feng D, He J. EBP50 phosphorylation by Cdc2/Cyclin B kinase affects actin cytoskeleton reorganization and regulates functions of human breast cancer cell line MDA-MB-231 [J]. *Mol Cells*, 2013, **36** (1): 47-54
 - 45 Yang JZ, Zhang KK, Hsu C, Miao L, Chen LJ, Liu JL, Li JH, Li XW, Zeng JH, Chen L, Li JH, Xie XL, Wang Q. Polystyrene nanoplastics induce cardiotoxicity by upregulating HIPK2 and activating the P53 and TGF- β 1/Smad3 pathways [J]. *J Hazard Mater*, 2024, **474**: 134823
 - 46 Wang Y, Wei Z, Xu K, Wang X, Gao X, Han Q, Wang S, Chen M. The effect and a mechanistic evaluation of polystyrene nanoplastics on a mouse model of type 2 diabetes [J]. *Food Chem Toxicol*, 2023, **173**:113642
 - 47 Martin-Folgar R, Sabroso C, Cañas-Portilla AI, Torres-Ruiz M, González-Caballero MC, Dorado H, Velasco I, Morales M. DNA damage and molecular level effects induced by polystyrene (PS) nanoplastics (NPs) after *Chironomus riparius* (Diptera) larvae [J]. *Chemosphere*, 2024, **346**:140552
 - 48 Barbato V, Talevi R, Gualtieri R, Pallotta MM, Di Nardo M, Costanzo V, Catapano G, Capriglione T. Polystyrene nanoparticles may affect cell mitosis and compromise early embryo development in mammals [J]. *Theriogenology*, 2020, **145**:18-23
 - 49 Tököllyi J. Warming increases survival and asexual fitness in a facultatively sexual freshwater cnidarian with winter diapause [J]. *Ecol Evol*, 2023, **13** (4): e9981
 - 50 Picard MAL, Vicoso B, Bertrand S, Escriva H. Diversity of modes of reproduction and sex determination systems in invertebrates, and the putative contribution of genetic conflict [J]. *Genes (Basel)*, 2021, **12** (8): 1136
 - 51 Omer MH, Shafqat A, Ahmad O, Nadri J, AlKattan K, Yaqinuddin A. Urinary biomarkers for lupus nephritis: a systems biology approach [J]. *J Clin Med*, 2024, **13** (8): 2339
 - 52 Greven AC, Merk T, Karagöz F, Mohr K, Klapper M, Jovanović B, Palić D. Polycarbonate and polystyrene nanoplastic particles act as stressors to the innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2016, **35** (12): 3093-3100
 - 53 Li L, Lü X, He J, Zhang L, Li B, Zhang X, Liu S, Zhang Y. Chronic exposure to polystyrene nanoplastics induces intestinal mechanical and immune barrier dysfunction in mice [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, **269**: 115749