

基于 Illumina RNA-Seq 分析的三种内分泌干扰物对斑马鱼神经毒性效应与机制

郭子一¹, 王伟伟², 宋杰¹, 王慧利^{1*} (1.苏州科技大学, 江苏 苏州 215009; 2.温州医科大学, 浙江 温州 325035)

摘要: 三氯生、三氯卡班和双酚 A 均具内分泌干扰作用,但从转录组学层面上揭示其靶分子及神经毒性机制鲜有报道,因此,本文借助 RNA-Seq 测序获得它们暴露斑马鱼幼鱼的转录组数据,基于生物信息分析证明:三种药物暴露组差异表达基因(DEGs)的 GO 功能和 KEGG 代谢途径富集在生物过程、细胞组成和分子功能上,富集的 DEGs 数量和功能均不同,在神经相关途径上均有富集,但具体信号通路和途径不同.PPI 网络节点关联度计算发现:富集在神经通路的 Hub 基因也不同,且与神经标志功能基因之间存在丰富间接的互作网络.将 DEGs 与 TCGA 数据库中胶质母细胞瘤 GBM 突变基因整合,证实其环境暴露均有诱发 GBM 风险,但发生途径和调控信号通路不同,故从分子水平上解析了三种污染物诱导神经毒性机制的根源.

关键词: 内分泌干扰物; 斑马鱼; 转录组测序; 神经毒性; 神经胶质母细胞瘤

中图分类号: X171 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2023)02-0946-11

Neurotoxicity effects of the three endocrine disruptors on zebrafish and the underlying molecular mechanisms by using the Illumina RNA-seq technique. GUO Zi-yi¹, WANG Wei-wei², SONG Jie¹, WANG Hui-li^{1*} (1.Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, China; 2.Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China). *China Environmental Science*, 2023,43(2): 946–956

Abstract: Triclosan (TCS), triclocarban (TCC), and bisphenol A (BPA) are all proved to possess endocrine disrupting effects; however, little data are available on their neurotoxicity effects on zebrafish (*Danio rerio*) and the underlying molecular mechanisms. Herein, zebrafish transcriptomic data was obtained with the aid of RNA-Seq after exposure to the aforementioned three pollutants. By means of bioinformatics analysis, nine common positively differential expression genes (DEGs) were screened in the three exposure treatments. The GO functions and KEGG pathways of nine DEGs were mainly attributable to biological process, cellular component, and molecular function, in which the number and function were different with varying chemical exposure. Notably, most of the DEGs were found to be enriched in the nerve-related pathways, but their detailed pathways were different for three chemicals. The computation of node-correlation degree of PPI network showed that the hub genes enriched in neural pathways were different in the three treatments, which had rich and indirect interaction networks with neural marker genes. By integrating DEGs with GBM mutant gene of glioblastoma in the TCGA database, we confirmed that chemical exposure induced GBM risk, but the related occurrence pathway and regulatory signaling pathway were different. Therefore, the underlying neurotoxicity mechanisms induced by the three pollutants were disclosed at the molecular level.

Key words: endocrine disruptors; zebrafish; transcriptome sequencing; neurotoxicity; glioblastoma

环境内分泌干扰物(EDCs)是一类广泛存在于环境中,可干预生物体内源激素的合成、分泌、转运、降解过程,对生物体的生殖、免疫、内分泌和神经各大系统造成伤害的化学物质^[1],其污染问题已经受全球重点关注.EDCs 主要来自医药或农药中,也用于塑料、洗涤剂、涂料及化妆品等.自然环境中 EDCs 含量较低,多数以 10^{-12} 浓度或者 10^{-15} 浓度为主,然而由于目前工业生产废气、生产生活废水、农药的残留沉降、垃圾填埋物等污染,自然环境中 EDCs 含量逐渐增多^[2].近期的体内、体外实验和流行病学研究表明,EDCs 暴露增加了精神退行性疾病、肥胖、代谢综合征和 2-型糖尿病的发生的风险^[3].2022 年 5

月,国务院办公厅印发的《新污染物治理行动方案》中环境内分泌干扰物被列入需加强风险管理的新污染物范畴.这类化学物质污染的毒性效应已成为新的公共卫生问题,引起全世界高度关注.

三氯生(Triclosan, TCS)和三氯卡班(Triclocarban, TCC)均为高效广谱性杀菌剂,广泛应用于医药、精细化工等领域^[1].其大量频繁使用产生的“二次污染”对生态环境隐患已成不争的事实^[2-3].尽管 2016–2017 年美国 FDA 禁止二者在手皂和沐

收稿日期: 2022-07-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(32071617)

* 责任作者, 教授, whuili@163.com

浴露中使用,2019 年在临床护理、洗手液和牙膏产品中禁用,但是,其仍被添加到各种家庭和工作场所的领先品牌产品中,在世界范围内销售。目前,全球 TCS 和 TCC 的年产量分别约为 $1.05 \times 10^5 \text{t}$ 、 $7.5 \times 10^5 \text{t}$ 。TCC 在中国的年产量超过 6000t^[3],经污水处理厂处理后的出水有 3% 以上的 TCC 残留,其已被美国国家环境保护局列入最常见的十大水污染物之一^[4]。由于 TCS ($\log_{Kow}=5.46$) 和 TCC ($\log_{Kow}=4.9$) 的亲脂性比较强,故有较强的生物蓄积、生物放大作用。研究者在水藻、鱼虾,甚至 80% 妇女的乳汁和脐带血中均检出二者的存在^[5]。TCS 和 TCC 的化学结构近似于非固醇类激素,与典型的内源激素干扰物双酚 A(BPA)、多氯联苯和多溴联苯醚等结构的相似性可预测其潜在的(抗)雄或雌激素效应。越来越多的体内外实验也证实了它们作用于免疫、生殖、神经三大系统并会干扰人和动物的内分泌系统。虽然目前致代谢紊乱、免疫和生殖毒性研究已比较成熟,但对神经毒性效应及机制研究尚欠缺充足数据。

由于不同污染物作用受体、靶分子和致毒机制不同,给环境健康带来不同的风险,尤其是诱发神经相关疾病和机制还不明了。斑马鱼作为继小鼠之后的第二大脊椎模式动物,以其与人类基因超高相似度(87%)而被用于环境污染物的毒性研究模型^[5]。有研究表明,低剂量 BPA 暴露就会导致斑马鱼畸形率升高^[6],神经元数量增多,导致斑马鱼过度活跃而出现多动症^[7]。而 TCS 会干扰鱼类的甲状腺,其对神经发育有重要作用^[8]。TCC 除了改变胚胎神经元细胞的表现遗传状态,还会导致早期发育阶段脑神经元自噬^[9-11]。但大多数研究依旧局限于个体、组织器官或功能评判层面,故本研究选择斑马鱼为模式生物,以 BPA、TCS、TCC 为研究对象,利用转录组深度测序获取了三者急性暴露斑马鱼幼鱼的转录组数据,借助生物信息学分析,将其转录组数据与 TCGA 数据库整合分析,从分子层面上评判三种内分泌干扰物对水生生物的神经毒性效应,分析比较其作用靶标、作用途径、致毒机理及可能诱发神经相关疾病的异同,评判其诱发神经胶质瘤的潜在风险。为从分子水平上评判环境污染物健康风险与预警提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 LC_{50} 的计算

在 ChemDraw 软件中分别绘制三种内分泌干扰物的结构式,以 mol 格式导出至 Ecosar Application 软件,点击 Submit 进行数据处理,得出 BPA、TCS、TCC 三种内分泌干扰物的 LC_{50} 预测值。再根据软件预测的 LC_{50} ,选择浓度对斑马鱼进行梯度浓度暴露。胚胎从 6hpf 开始在培养皿中进行暴毒处理,每组 50 颗胚胎,每 24h 更换药液一次,其中 BPA 的梯度浓度分别为 0, 5.5, 6.5, 7.0, 8.0, 9.0mg/L, TCS 的梯度浓度分别为 0, 0.20, 0.25, 0.30, 0.40, 0.50mg/L, TCC 的梯度浓度分别为 0, 100, 300, 350, 400, 500 $\mu\text{g/L}$, 分别统计在 120hpf 各暴露浓度对应的斑马鱼死亡率,获得剂量-效应关系曲线,50% 死亡率的对应暴露浓度即为 LC_{50} 。

1.2 斑马鱼的饲养与暴露

使用的实验动物为野生型斑马鱼 AB 品系,根据斑马鱼的养殖指南,雌雄母鱼分开饲养在专用养殖系统中。调节水温为 $(28.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, pH 值为 6.8~7.5; 设置为 14h 光照:10h 黑暗循环周期,每 d 08:00 和 18:00 喂食两次新鲜丰年虾。

对照组、BPA 组、TCS 组、TCC 组四组胚胎从 6hpf 开始在培养皿中进行暴毒处理,暴露浓度均为 225 $\mu\text{g/L}$ 每 24h 更换暴露药液 1 次,持续暴露至实验所需。

1.3 Illumina RNA-Seq 测序

选取连续暴露在三种药物 5d 的斑马鱼幼鱼(5dpf),分别提取 RNA,建立测序文库,采用 Illumina Hiseq4000 进行测序,测序读长为双端 $2 \times 150\text{bp}$ 。测序原始数据(Raw data)进行过滤去杂和质控分析,获得合格测序数据,测序数据以 FPKM(Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped reads),即指在每百万测序碱基中每千个转录本测序碱基中所包含的测序片段数,表示基因在不同处理组中的表达丰度。将表达丰度不同的序列通过比对到 Ensembl 上最新的 Zv9.0 斑马鱼序列(ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-66/fasta/danio_rerio/dna/),获得全面转录本信息,并进行基因表达定量,按 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$, $P\text{-value} < 0.05$ 的阈值选取所有阳性差异表达基因(DEGs)进行后续分析。

1.4 差异基因的 GO 功能分类和 KEGG Pathway 富集分析

将筛选出的 DEGs 及其差异变化倍数导入微生

信在线分析网(<https://www.bioinformatics.com.cn>),根据基因标识以生物过程(Biological Process)、细胞组成(Cell Component)和分子功能(Molecular Function)进行GO功能分类及KEGG富集分析,GO功能分析作用是将筛选得到的差异表达基因进行GO功能条目富集,判断其显著相关的生物学功能,涉及生物过程(Biological Process)、细胞组成(Cell Component)和分子功能(Molecular Function)三方面.KEGG信号通路分析是对各处理组差异基因的代谢通路Pathway分析,寻找不同药物暴露下的差异基因可能与哪些细胞通路的改变有关.最终确定差异基因主要参与的GO Term及信号通路.

1.5 差异表达基因的蛋白互作分析

将筛选出来的DEGs导入STRING 11.0 (<http://www.string-db.org/>),在线进行候选DEGs能够互作的蛋白分析,构建蛋白互作网络(Protein-protein interaction, PPI),将蛋白互作网络导入Cytoscape 3.9.1软件进行可视化分析,使用Cytohub插件对DGEs进行模块化分析,从DGEs中筛选出与蛋白互作积分较高的Hub基因以备其功能评判.

1.6 胶质母细胞瘤突变基因筛选与分析

cBioPortal(<https://www.cbioportal.org/>)是一个开源平台,用于探索、可视化和分析多维癌症基因组学和临床数据.cBioPortal包含200多项癌症基因组学研究^[12],包括来自癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)的所有数据.通过cBioPortal平台下载胶质母细胞瘤(Glioblastoma, GBM)的突变

基因数据,共有14972个突变基因,筛选出其中976个致癌基因将其与三种药物处理的转录组测序数据中候选DEGs在STRING转化后进行比较分析,筛选出污染暴露差异基因与TCGA致癌基因的交集基因,评判污染物暴露诱发GBM的风险.

2 结果与分析

2.1 三种污染物对不同水生生物的LC₅₀预测与对斑马鱼幼鱼的LC₅₀实验值测定

经过Ecosar Application软件分析得出BPA、TCS和TCC对不同生物的半致死浓度(表1),由表1可知三种污染物对鱼类、水蚤和绿藻的毒性大小排序均为TCC>TCS>BPA.表明TCC对水生动物的毒性最高.尽管三种环境雌激素结构相似(图1),但对水生生物的毒性效应却不同.

表1 三种典型环境雌激素污染物的LC₅₀预测
Table 1 LC₅₀ prediction on the three typical environmental estrogens

污染物名称	生物体	持续时间(h)	终点	浓度(mg/L)
双酚 A (BPA)	鱼	96	LC ₅₀	1.280
	水蚤	48	LC ₅₀	5.240
	绿藻	96	EC ₅₀	1.330
三氯生 (TCS)	鱼	96	LC ₅₀	0.582
	水蚤	48	LC ₅₀	0.839
	绿藻	96	EC ₅₀	0.057
三氯卡班 (TCC)	鱼	96	LC ₅₀	0.358
	水蚤	48	LC ₅₀	0.041
	绿藻	96	EC ₅₀	0.034

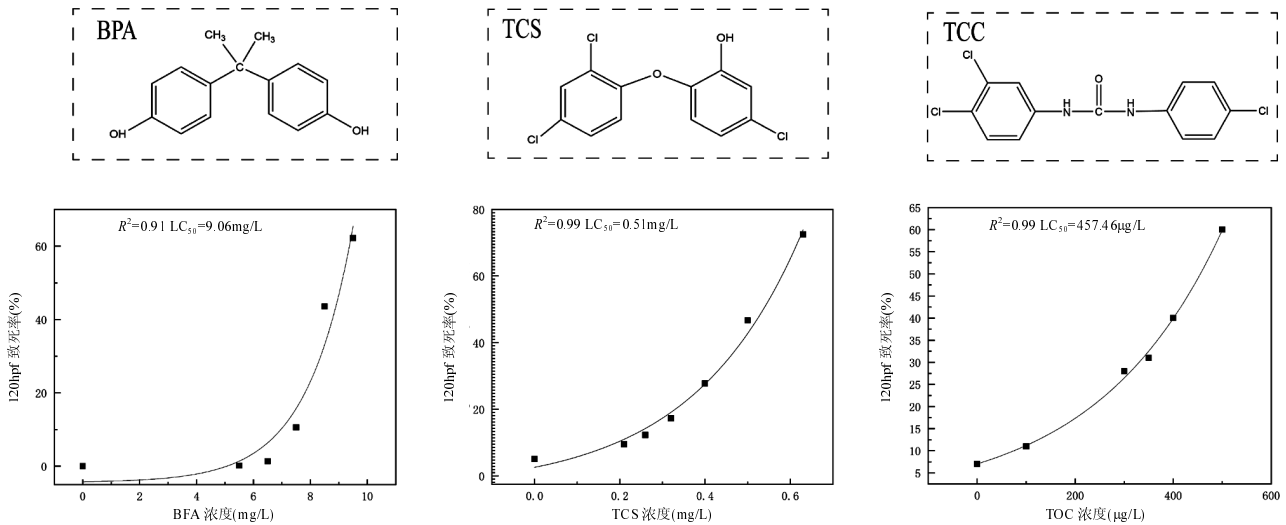


图1 三种污染物化学结构式及其对120hpf斑马鱼幼鱼LC₅₀模拟

Fig.1 Structural formulas of the three pollutants and the 120-hpf LC₅₀ values to zebrafish larvae

参考三种污染物鱼类对应的 LC_{50} 预测值, 分别在其上下各设定 2~3 个浓度梯度暴露处理 6hpf 的斑马鱼胚胎(hpf 为受精几小时后的缩写), 放置 6 孔板中持续暴毒至 120hpf, 模拟出 BPA、TCS、TCC 对斑马鱼幼鱼(120hpf) LC_{50} 分别为 9.06、0.51 和 0.46mg/L. 拟合回归曲线 R^2 值分别为 0.91、0.99 和 0.99, BPA、TCS 和 TCC 剂量-效应回归方程的 R^2 值均超过 90%(图 1). 因此, 后续转录组测序实验选取半致死剂量的约 1/2 作为亚致死处理剂量(225 μ g/L).

2.2 污染物暴露斑马鱼转录组测序差异表达基因筛选和功能分析

为了分析比较三种环境内分泌干扰物的毒性效应的分子靶标, 以 225 μ g/L 相同浓度的三种不同污染物暴露斑马鱼胚胎, 暴露第 5 天时进行转录组测序. 对表达丰度不同的测序进行差异分析, 设定

显著差异的阈值标准为 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ 且 $P < 0.05$, 筛选出三种污染物处理组与对照组之间的差异基因, 绘制如图 2(A) 的火山图, 由图可见 TCC 处理组发生显著变化的基因明显多于 BPA 和 TCS 暴露组, 且 TCC 处理组的差异基因变化幅度明显高于其它两个药物暴露组. 由图 2(B) 发现, 与对照组相比, BPA、TCS、TCC、分别产生 99、581、740 个 DEGs, 其中 BPA 处理组有 37 个上调和 62 个下调 DEGs. TCS 处理组约 272 个差异基因表达上调和 309 个表达下调, TCC 处理组存在 174 个上调基因和 564 个下调基因. 图 2(C) 显示三种污染物处理组中存在 9 个重叠的显著差异基因, 说明这 3 种环境污染物致斑马鱼幼鱼差异变化的基因大多数不同, 预示其作用靶分子或毒性效应机制不同.

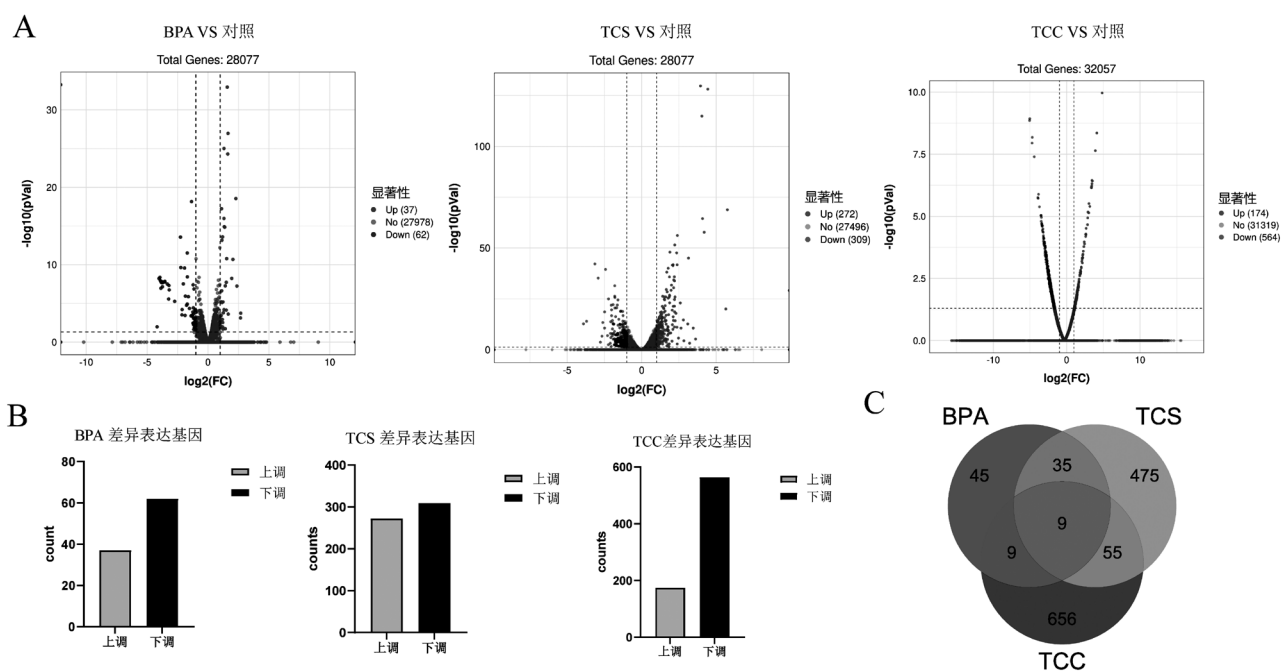


图 2 各处理组差异基因火山图(A)、统计图(B)、韦恩图(C)

Fig.2 The volcano plot (A), statistical graph (B), and venn diagrams (C) of DEGs in each treatment groups

2.3 三种污染物差异表达基因 GO 富集分类

为了进一步分析比较三种内分泌干扰物差异表达基因的分布功能以及作用途径, 我们对差异表达基因进行了 GO 和 KEGG 富集分析, 以了解三种 EDCs 暴露组中所有差异表达基因所富集的生物学功能和涉及的代谢调控 Pathway, 以深入阐明 EDCs 暴露作用的相关分子机制. 图 3 展示了各处理组所富集到的排名前 10 的 GO terms ($P < 0.05$), 气泡图的左

侧为相应的基因富集的生物过程、通路、部位等名称, 气泡的大小代表所富集到的 DEGs 的数量.

GO 分析显示, TCS 处理组在生物过程 (Biological Process) 方面, 有大部分差异基因富集在“对外来刺激的反应 (Response to xenobiotic stimulus)”、“药物反应 (Response to drug)”以及“药物代谢过程 (Drug metabolic process)”等生物过程. 而在细胞组成 (Cell Component) 方面, 差异基因主要富集

要富集的KEGG途径 ($P < 0.05$), 分别是“精氨酸和脯氨酸代谢(Arginine and proline metabolism)”与“甘油酯代谢(Glycerolipid metabolism)”通路. 由此可知, 三种污染

物尽管均具有内分泌干扰作用或雌激素作用, 但是他们靶向的差异基因富集在不同的代谢途径, 表明由不同的信号通路介导.

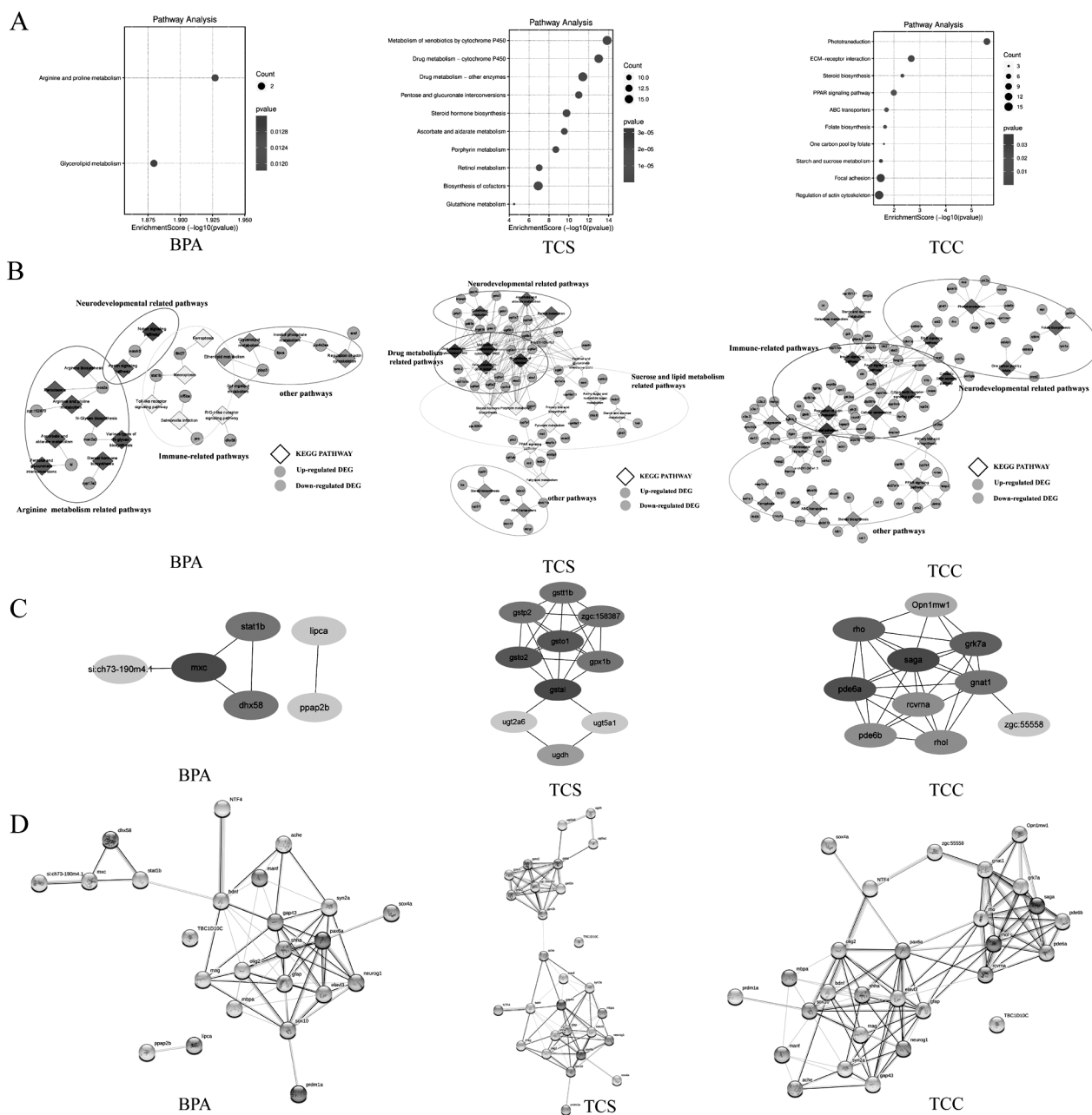


图4 不同EDCs处理下差异表达基因(DEGs)KEGG功能分析

Fig.4 KEGG function analyses of DEGs under the different EDCs exposure

将各自富集出的前20个通路及其基因导入Cytoscape v3.9.1软件进行可视化展示, 分析其基因的表达模式聚类(图4B). 棱形代表KEGG信号通路, 蓝色小球代表下调的DEGs, 红色小球代表上调的DEGs. TCS显著富集的通路大致可以划分为三大类: 药物相关代谢途径(红色圈内), 包括细胞色素P450

对异生素的代谢、药物代谢-细胞色素P450、药物代谢-其他酶类、辅因子的生物合成; 糖类和脂质代谢相关途径(黄色圈内), 包括类固醇激素生物合成、氨基糖和核苷酸糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、脂肪酸代谢等途径; 神经发育相关途径(紫色圈内), 包括谷胱甘肽代谢、视黄醇代谢、抗坏血酸和醛糖代

谢.TCC 显著富集的通路大致可以划分为免疫相关途径(红色圈内),包括胰岛素信号通路、C 型凝集素受体信号通路、粘着斑等途径;神经发育相关途径(紫色圈内),包括光转导、叶酸生物合成、叶酸的一个碳库、ErbB 信号通路;其他途径例如 PPAR 信号通路等(绿色圈内).

BPA 显著富集的四条通路划分为精氨酸和脯氨酸代谢途径(红色圈内),包括精氨酸生物合成、各种类型的 N-聚糖生物合成等途径;免疫相关途径(黄色圈内),包括铁死亡、RIG-I 样受体信号通路、Toll 样受体信号通路等途径;神经相关途径(紫色圈内),包括 Notch 信号通路、Apelin 信号通路;其他途径例如甘油酯代谢等途径(绿色圈内).上述分析表明,三种污染物差异表达基因的 KEGG 通路在神经相关途径均有富集,但是,作用于神经通路是不同的.TCS 富集的神经作用途径主要是周围神经系统生长分化相关的通路,TCC 富集的神经作用途径主要是叶酸合成和 ErbB 信号通路;而 BPA 的神经富集途径关于 Notch 信号通路、Apelin 信号通路.从富集的基因数量来看,TCS 和 TCC 富集的差异基因比较多,然而而 TCS 主要是上调的基因参与神经相关通路,TCC 主要是下调的差异基因参与(图 4B).

Cytohubba 软件可对 PPI 网络节点关联度进行计算,计算出 PPI 网络中最密集的区域,筛选出基因组合中的关键基因(Hub 基因).为比较和探索三种污染物对神经毒性的机制,选取富集在神经发育相关途径的基因进行 Hub 基因的筛选.如图 4C,TCS 组中前 10 的 Hub 基因为 *gstt1b*、*gstp2*、*gstol*、*gstol2*、*gstal*、*gpx1b*、*ugt2a6*、*zgc:158387*、*ugt5a1*、*ugdh*.其中 *gpx1*,有研究报道癫痫持续状态(SE)后大鼠海马体中 GPx1 蛋白时空分布表达发生了改变^[13],并表明谷胱甘肽介导 GPx1 的调节可能影响 SE 诱导的神经元死亡和自噬性星形胶质细胞变性.TCC 处理组中前 10Hub 基因为 *opn1mw1*、*rho*、*pde6a*、*pde6b*、*saga*、*rcvrna*、*rho1*、*grk7a*、*gnat1*、*zgc:55558*;其中 Rho 家族 GTP 酶是小 G 蛋白,充当在活性和非活性形式之间穿梭的分子开关^[13].Rho GTPases 调节多种细胞过程,例如生长、迁移、粘附和分化^[14].Rho GTPases 也在调节神经元形态和功能方面发挥着重要作用^[15].刘晓楠等^[16]发现了 Gstp 可以通过 JNK 信号调节神经元轴突形成,表明了 Gstp 蛋白在皮质发

育过程中在神经突起起始中的新功能.BPA 组中的前 6 个 Hub 基因为 *mxs*、*dhx58*、*stat1b*、*lipca*、*ppap2b*、*si:ch73-190m4.1*,其中 *mxs* 在维持果蝇幼虫大脑中的神经干细胞命运和神经节母细胞分化中起关键作用.Elena Butturini 等^[17]已证明氧化应激诱导 STAT1 的 S-谷胱甘肽化并过度激活其在小胶质细胞 BV2 中的信号传导,并指出这种转录因子在神经炎症中的重要性.

为证明上述筛选的 Hub 基因与神经标志功能基因蛋白之间的互作网络及 Hub 基因调控神经毒性的作用模式,即为比较三种污染物的神经毒性效应机制.如图 4D 所示,BPA 组筛选出的 Hub 基因 *stat1b* 与脑源性神经营养因子 *bdnf* 之间存在相互作用;TCS 组筛选的 Hub 基因 *gpx1b* 与神经递质乙酰胆碱酯酶 *ache* 具有互作关系;TCC 组筛选的 Hub 基因中 *zgc:55558* 与神经营养因子 *4ntf4* 有相互作用,Hub 基因 *rho*、*rho1* 和 *rcvrna* 与配对盒蛋白 *pax6a*、Elav 样蛋白 *elavl3*、胶质纤维酸性蛋白 *gfap* 有相互作用.综上所述,TCS、TCC、BPA 均能直接靶向于神经相关的 Hub 基因诱导不同的神经毒性,也可通过 Hub 基因间接地与神经标志基因的互作而诱导神经毒性.就像 BPA 在神经毒性通路上富集 KEGG pathway 和 Hub 基因较少,但是 Hub 基因与神经标志功能基因之间存在丰富而间接的蛋白互作网络.这些发现使我们在分子水平上了解了三种污染物诱导神经发育毒性效应不同、作用的分子机制与途径不同.

2.5 三种污染物差异基因与胶质母细胞瘤突变癌基因的比较分析

胶质母细胞瘤是成人最常见、最具侵袭性的原发性脑肿瘤,占原发性恶性脑肿瘤的 45.6%^[18].胶质母细胞瘤的年发病率随着年龄增长而增加,从儿童的 0.15/10 万增加到 75~84 岁患者的峰值 15.03/10 万^[19].一些环境的致癌因素也可影响胶质瘤的发生.与神经外器官的肿瘤相比,胶质母细胞瘤和原发性脑肿瘤的发生率普遍较低,可能是由于血脑屏障的对大脑的保护,血脑屏障的三磷酸腺苷结合盒(ABC)家族转运体限制化学诱变剂向大脑扩散,使其免受毒性应激的影响.有研究表明妊娠期暴露于 EDCs 可能会干扰儿童正常大脑发育,并容易导致以后行为功能障碍^[20],且由于这三种环境内分泌干扰物都是脂溶性物质,都具有神经毒性相关的报道.因此我们进行

了这些药物暴露诱发脑胶质瘤的潜在风险的分析,通过 cBioPortal(<https://www.cbioportal.org/>)下载了TCGA 中胶质母细胞瘤的突变基因数据,共有 14972 个突变基因,其中有 976 个致癌基因与三种药物处理的转录组测序数据中候选 DEGs 在 STRING 转化后进行比较分析.如图 5 所示,BPA 暴露组差异表达基因在转化后与 976 个癌基因共有 2 个交集基因,为 NOTCH3、ARAF;TCS 暴露组与其有 10 个交集基因,为 TET3、NOTCH3、SOCS2、AFF4、PMAIP1、ARID1B、ARID3A、ARNT、PTPRT、PIK3R2;TCC 暴露组与其有 27 个交集基因,为 DDX6、FAT4、ARAF、AXIN1、EML4、MIB1、ZNF750、HDAC7、IRF8、PRSS1、STAT3、CDKN1A、ABL2、PALB2、MST1、CBL、STAT4、DUSP4、S1PR2、SAMHD1、SCG5、ROS1、REL、SHOC2、TP63、RPTOR、PPARG.

BPA 暴露组的交集基因中,NOTCH3 是一个高度保守的基因,是一种跨膜的发育信号受体,它在细胞发育模式、细胞命运、细胞存活和增殖的调节中

起许多关键作用^[21].最近的研究已经发现了 NOTCH3 在神经元干细胞和神经元分化中有重要作用,NOTCH3 能调节室管膜下区的静止干细胞群^[22-23].穆罕默德·艾尔库达等^[24]发现 NOTCH3 基因是 17% 的胶质瘤组织活检中最显著的扩增之一,NOTCH3 在许多恶性肿瘤中经常被异常调控,可能在胶质瘤发生中起主要作用.ARAF 是丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶 Raf 家族的成员.在丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路中,Raf 激酶被认为是 Ras 和 MEK 之间的重要节点^[25].在典型的受体酪氨酸激酶(RTK)-Ras-Raf-MEK-MAPK 信号转导过程中,Raf 在 RTK 刺激下直接与 GTP 结合的 RAS 转位到质膜,然后 Raf 通过磷酸化激活双特异性激酶 MEK1 和 MEK2,进而激活 ERK2,从而构成经典的三级 MAPK 激酶级联.Ras-Raf-MEK-MAPK 通路的异常激活常见于各种类型的癌症^[26,27].BPA 暴露可能会通过影响 NOTCH3 的表达以及 Raf 信号通路导致神经胶质细胞发生癌变继而引起神经胶质瘤.

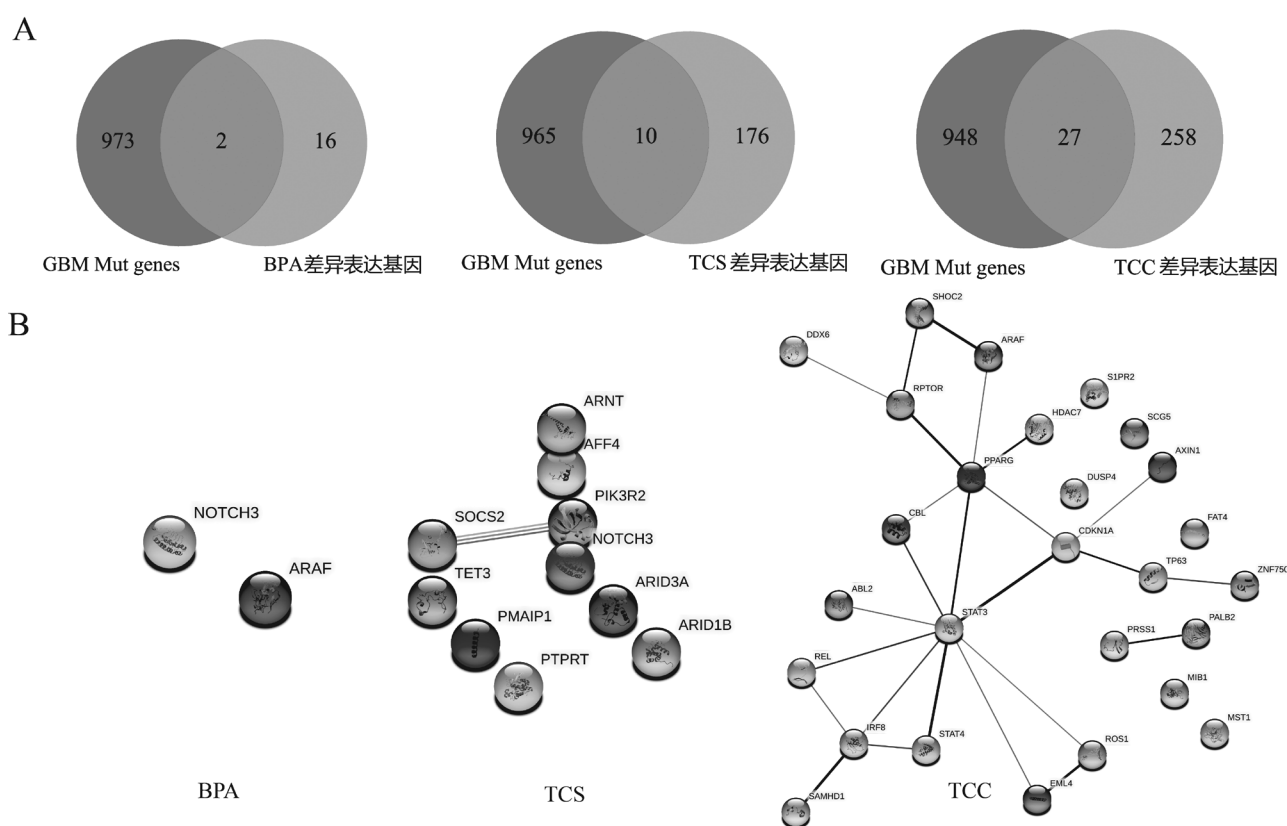


图 5 不同 EDCs 处理下差异表达基因(DEGs)与 GBM 突变基因的交集

Fig.5 Intersections between GBM mutant genes and DEGs under the EDCs exposure

TCS 暴露组中,细胞因子信号(SOCS)蛋白抑制

剂是细胞因子和生长因子信号的调节剂,其异常调

节与多种炎症和肿瘤疾病有关^[28].细胞因子信号抑制因子(SOCS)家族成员最为人知的是 JAK/STAT 途径的信号负调节因子.该家族的一些成员,尤其是 SOCS2,在神经系统中具有促进神经元分化和轴突生长等神经营养素的作用^[29-30].SOCS2 还可影响胶质母细胞瘤(GBM)对甲基环己氯乙亚硝脲化疗敏感性的核心基因.磷酸肌醇 3 激酶调节亚基 2(PIK3R2)是一种肿瘤驱动因子.有研究表明 XLOC 可以募集特异性蛋白 1(Sp1)转录因子,并促进 Sp1 与 PIK3R2 启动子的结合^[31],从而提高 PIK3R2 在 mRNA 和蛋白水平的表达.PIK3R2 介导的 PI3K/AKT 信号通路的激活促进了替莫唑胺(TMZ)耐药和胶质瘤细胞增殖^[32].由此分析可知,TCS 暴露可能会通过影响 SOCS2 的表达以及 PIK3/AKT 信号通路影响脑胶质瘤的发生及其预后.

TCC 暴露组与 GBM 突变基因交集中,信号转导和转录激活因子 3(STAT3)是参与调节细胞生长、分化和存活的 7 个 STAT 家族成员之一.研究表明^[33],胶质瘤细胞中 STAT3 及其下游基因,如细胞周期蛋白 D1(cyc-linD1)、c-Myc、Bcl-2、Bcl-xl 和 VEGF 等,常显示异常表达或活性增强,从而使细胞生长失控,抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤血管生成,参与肿瘤免疫逃逸.PPAR γ 系统可以快速感知细胞压力,并以多种抗炎和神经保护方式在神经胶质细胞、神经元和脑血管内皮细胞的中枢神经系统中发挥作用.有研究说明了 PPAR γ 的异常表达可能与 GBM 患者的存活时间有关^[34].CDKN1A 是一个细胞生长调节因子,其能降低细胞生长速度,且 CDKN1A 与肿瘤发生有关,有研究发现 CDKN1A 参与 AKT 介导的胶质瘤细胞的 TMZ 抗性^[35].此外,CDKN1A 可能参与 GBM 中的补体和凝血级联通路^[36].TCC 暴露可能会通过影响 STAT3、PPAR γ 、CDKN1A 等癌基因的表达导致脑胶质瘤的发生.

综上所述,BPA、TCS、TCC 三种内分泌干扰物环境暴露均在一定程度上有诱导脑胶质瘤发生的风险,但三者诱导脑胶质瘤发生的途径和介导的信号通路不同,其中 TCC 的风险远大于另外两种污染物.

3 结语

基于多数内分泌干扰物对斑马鱼神经毒性效

应与机制的研究依旧局限于个体、组织器官或功能评判层面,故本研究从分子层面上评判三种 EDCs 对水生生物的神经毒性效应,分析比较其作用靶标、作用途径、致毒机理及可能诱发神经相关疾病的异同,评判其诱发神经胶质瘤的潜在风险.

1)基于转录组测序和生物信息学的系统分析,揭示了 BPA、TCS、TCC 差异基因的 GO 功能富集存在差异.此外,尽管三种污染物差异表达基因的 KEGG 通路在神经发育相关途径均有富集,但是其作用于神经通路是不同的.

TCS 富集的神经发育相关途径主要是周围神经系统生长分化相关的通路,例如视黄醇代谢、抗坏血酸代谢.抗坏血酸已被证明在周围神经系统(PNS)中具有重要功能.抗坏血酸可以通过形成含有胶原蛋白和层粘连蛋白的细胞外基质在体外促进髓鞘形成^[37].视黄酸可以促进分化的视网膜神经节细胞和外周感觉神经元的轴突再生.在发育过程中内源性视黄酸能够促进神经胶质和神经元分化以及体外实验中视黄酸可以促进分化的视网膜神经节细胞和外周感觉神经元的轴突再生^[38].

TCC 富集的神经发育作用途径主要是叶酸合成和 ErbB 信号通路,髓磷脂对于中枢和外周神经系统(PNS)中轴突快速准确地传导电脉冲至关重要.PNS 中的髓鞘发育依赖于 Nrg1/ErbB 受体提供的轴突信号.有证据表明,大脑中有一个最佳的 NRG/ERBB 信号水平,偏离它会损害大脑功能^[39].NRGs/ERBBs 和下游信号通路可能为特定的神经精神症状提供治疗靶点.叶酸可调节神经系统中不同细胞的行为包括对神经胶质细胞产生趋化反应,诱导神经营养因子释放,以及刺激细胞系统的神经元分化.

BPA 富集于 Notch 信号通路、Apelin 信号通路.Notch 信号通路是多细胞生物进化上保守的信号通路,其已被证明可调节突触分化和传递^[40].有研究证明 Notch 信号是神经形成过程中神经周围迁移和分化所必需的,神经周围细胞中 Notch 信号的丢失会导致雪旺细胞分化失败^[41].Apelin/APJ 受体系统已被证明在下丘脑调节功能中发挥作用,例如食物摄入、体液稳态、神经内分泌控制,以及心血管、胃肠运动和呼吸功能等自主神经/内脏运动信号的调控^[42].

2) 三种内分泌干扰物差异基因表达和富集的通路存在差异, 并且 TCC 的差异更为显著, 可能是由于三种药物结构不同, 构效关系不同导致其作用的靶分子也不同。由于 TCC 分子结构中含有的脲键可以作为调节药物分子理化性质的功能基团, 调节分子间的氢键作用。而氢键是药物与蛋白之间最主要的相互作用, 其中脲键的羰基可作为氢键受体, -NH- 既可为氢键供体也可为受体。故 TCC 中形成的氢键较多, 所作用的靶蛋白可能较其他两种药物多, 以及与靶蛋白作用的作用力可能强于其他两种药物^[43]。

3) 通过进行 Hub 基因筛选, 发现 TCS、TCC、BPA 均能直接靶向于神经相关的 Hub 基因诱导不同的神经毒性, 也可通过 Hub 基因间接地与神经标志功能基因的互作而诱导神经毒性。

4) 最后, 我们评估了这三种内分泌干扰物引起脑胶质瘤的可能风险, BPA 暴露可能会通过影响 NOTCH3 的表达以及 Raf 信号通路导致神经胶质细胞发生癌变继而引起神经胶质瘤。TCS 暴露可能会通过影响 SOCS2 的表达以及 PIK3/AKT 信号通路影响脑胶质瘤的发生及其预后。TCC 暴露可能会通过影响 STAT3、PPARG、CDKN1A 等癌基因的表达导致脑胶质瘤的发生。

5) 总而言之, 这些发现使我们在分子水平上了解了三种污染物诱导神经毒性效应的靶基因不同、作用的分子机制与途径不同, 为从分子水平上评判环境内分泌干扰物的健康风险与预警提供科学依据。然而, 还需要进一步的实验来证明其如何通过 Hub 基因与神经标志基因的互作而诱导神经毒性, 以及通过经典的通路抑制剂和激动剂的使用证明具体信号通路的介导作用。另外对于内分泌干扰物的暴露是否会增加脑胶质瘤形成的风险、易感性及其预后, 以及内分泌干扰物暴露的时间和剂量与诱发风险的关系均需要进一步实验研究来证实。

参考文献:

- [1] 王 杨, 吴国辉, 钱秋慧, 等. 三氯生对斑马鱼发育和脂质代谢的影响 [J]. 中国环境科学, 2022,(3):1394-1400.
Wang Y, Wu G G, Qian Q H, et al. Effects of triclosan environmental exposure on zebrafish development and lipid metabolism [J]. China Environmental Science, 2022,(3):1394-1400.
- [2] 赵晨曦, 王 杨, 钱秋慧, 等. 三氯卡班环境暴露对斑马鱼神经行为的影响 [J]. 中国环境科学, 2022,(1):456-464.
Zhao C X, Wang Y, Qian Q H, et al. Effects of environmental exposure to triclocarban on the neurobehavior of zebrafish (Danio rerio) [J]. China Environmental Science, 2022,(1):456-464.
- [3] Gomes M F, de Paula V C S, Martins L R R, et al. Sublethal effects of triclosan and triclocarban at environmental concentrations in silver catfish (Rhamdia quelen) embryos [J]. Chemosphere, 2021,263:127985.
- [4] Yun H, Liang B, Kong D, et al. Fate, risk and removal of triclocarban: A critical review [J]. Journal of hazardous materials, 2020,387:121944.
- [5] Gao C J, Kannan K. Phthalates, bisphenols, parabens, and triclocarban in feminine hygiene products from the United States and their implications for human exposure [J]. Environment international, 2020, 136:105465.
- [6] 宋静文, 靳亚茹, 刘红玲. 典型酚类污染物内分泌干扰效应研究—对斑马鱼发育及核受体介导基因调控的分子影响 [J]. 中国环境科学, 2020,(9):4065-4076.
Song J W, Jin Y R, Liu H L. Research on the endocrine disruption effect of typical phenolic pollutants: The embryonic development effects and molecule effects of gene regulation mediated by nuclear receptor on Zebrafish [J]. China Environmental Science, 2020,(9):4065-4076.
- [7] Kim S S, Hwang K S, Yang J Y, et al. Neurochemical and behavioral analysis by acute exposure to bisphenol A in zebrafish larvae model [J]. Chemosphere, 2020,239:124751-124752.
- [8] Lee J, Moon K W, Ji K. Systematic review of exposure to bisphenol A alternatives and its effects on reproduction and thyroid endocrine system in zebrafish [J]. Applied Sciences, 2021,11(4):1832-1837.
- [9] Coumailleau P, Tremont S, Pellegrini E, et al. Impacts of bisphenol A analogues on zebrafish post-embryonic brain [J]. Journal of Neuroendocrinology, 2020,32(8):e12879.
- [10] Qiu W, Liu S, Chen H, et al. The comparative toxicities of BPA, BPB, BPS, BPF, and BPAF on the reproductive neuroendocrine system of zebrafish embryos and its mechanisms [J]. Journal of hazardous materials, 2021,406:124300-124304.
- [11] Gyimah E, Xu H, Dong X, et al. Developmental neurotoxicity of low concentrations of bisphenol A and S exposure in zebrafish [J]. Chemosphere, 2021,262:128043-128046.
- [12] Buechner P, Hinderer M, Unberath P, et al. Requirements analysis and specification for a molecular tumor board platform based on cBioPortal [J]. Diagnostics, 2020,10(2):92-93.
- [13] Kim J E, Lee D S, Kim T H, et al. Glutathione regulates GPx1 expression during CA1 neuronal death and clastodendrosis in the rat hippocampus following status epilepticus [J]. Antioxidants, 2022,11(4):744-756.
- [14] Humphries B, Wang Z, Yang C. Rho GTPases: big players in breast cancer initiation, metastasis and therapeutic responses [J]. Cells, 2020, 9(10):2166-2167.
- [15] Kalpachidou T, Spiecker L, Kress M, et al. Rho GTPases in the physiology and pathophysiology of peripheral sensory neurons [J]. Cells, 2019,8(6):591-598.
- [16] Liu X, Blazejewski S M, Bennison S A, Toyo-Oka K. Glutathione S-transferase Pi (Gstp) proteins regulate neuritogenesis in the developing cerebral cortex [J]. Hum. Mol. Genet., 2021,30(1):30-45.

- [17] Butturini E, Carcereri de Prati A, Mariotto S. Redox regulation of STAT1 and STAT3 signaling [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020,21(19):7033–7037.
- [18] Tan A C, Ashley D M, López G Y, et al. Management of glioblastoma: State of the art and future directions [J]. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2020,70(4):299–312.
- [19] Alexander B M, Cloughesy T F. Adult glioblastoma [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2017,35(21):2402–2409.
- [20] Braun J M. Early-life exposure to EDCs: Role in childhood obesity and neurodevelopment [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2017,13(3):161–173.
- [21] Aburjania Z, Jang S, Whitt J, et al. The role of Notch3 in cancer [J]. *The oncologist*, 2018,23(8):900–911.
- [22] Hosseini-Alghaderi S, Baron M. Notch3 in development, health and disease [J]. *Biomolecules*, 2020,10(3):484–489.
- [23] Hevia C F, Engel-Pizcueta C, Udina F, et al. The neurogenic fate of the hindbrain boundaries relies on Notch3-dependent asymmetric cell divisions [J]. *Cell Reports*, 2022,39(10):110915.
- [24] Alqudah MA, Agarwal S, Al-Keilani MS, et al. NOTCH3 is a prognostic factor that promotes glioma cell proliferation, migration and invasion via activation of CCND1 and EGFR. *PLoS One*. 2013, 8(10):e77299
- [25] An S, Yang Y, Ward R, et al. A-Raf: A new star of the family of raf kinases [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2015,50(6):520–531.
- [26] Zhou Z W, Ambrogio C, Bera A K, et al. KRASQ61H preferentially signals through MAPK in a RAF dimer-dependent manner in non-small cell lung Cancer KRASQ61H signals in a RAF dimer-dependent manner [J]. *Cancer research*, 2020,80(17):3719–3731.
- [27] Meng L D, Shi G D, Ge W L, et al. Linc01232 promotes the metastasis of pancreatic cancer by suppressing the ubiquitin-mediated degradation of HNRNP A2B1 and activating the A-Raf-induced MAPK/ERK signaling pathway [J]. *Cancer Letters*, 2020,494:107–120.
- [28] Trengove M C, Ward A C. SOCS proteins in development and disease [J]. *American journal of clinical and experimental immunology*, 2013, 2(1):1–6.
- [29] Beldi-Ferchiou A, Skouri N, Ben Ali C, et al. Abnormal repression of SHP-1, SHP-2 and SOCS-1 transcription sustains the activation of the JAK/STAT3 pathway and the progression of the disease in multiple myeloma [J]. *PloS one*, 2017,12(4):e0174835.
- [30] Nguyen C H, Glüxam T, Schlerka A, et al. SOCS2 is part of a highly prognostic 4-gene signature in AML and promotes disease aggressiveness [J]. *Scientific Reports*, 2019,9(1):1–13.
- [31] Hermawan A, Putri H. Bioinformatics studies provide insight into possible target and mechanisms of action of nobiletin against cancer stem cells [J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 2020,21(3):611–616.
- [32] Tomar V S, Patil V, Somasundaram K. Temozolomide induces activation of Wnt/ β -catenin signaling in glioma cells via PI3K/Akt pathway: implications in glioma therapy [J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2020,36(3):273–278.
- [33] Dan L U. Anticancer mechanism of scutellarin [J]. *Journal of International Oncology*, 2015,42(8):682–686.
- [34] Wang Q, Cai J, Fang C, et al. Mesenchymal glioblastoma constitutes a major ceRNA signature in the TGF- β pathway [J]. *Theranostics*, 2018,8(17):4721–4733.
- [35] Ohta K, Hoshino H, Wang J, et al. Micro RNA-93 activates c-Met/PI3K/Akt pathway activity in hepatocellular carcinoma by directly inhibiting PTEN and CDKN1A [J]. *Oncotarget*, 2015,6(5):3211–3217.
- [36] Hu K, Li J, Wu G, et al. The novel roles of virus infection-associated gene CDKN1A in chemoresistance and immune infiltration of glioblastoma [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021,13(5):6662.
- [37] Gess B, Röhr D, Young P. Ascorbic acid and sodium-dependent vitamin C transporters in the peripheral nervous system: from basic science to clinical trials [J]. *Antioxidants & redox signaling*, 2013, 19(17):2105–2114.
- [38] Mey J. Retinoic acid as a regulator of cytokine signaling after nerve injury [J]. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2001,56(3/4):163–176.
- [39] Ho B L, Goh Q, Nikolaou S, et al. NRG/ErbB signaling regulates neonatal muscle growth but not neuromuscular contractures in neonatal brachial plexus injury [J]. *FEBS letters*, 2021,595(5):655–666.
- [40] Hayashi Y, Nishimune H, Hozumi K, et al. A novel non-canonical Notch signaling regulates expression of synaptic vesicle proteins in excitatory neurons [J]. *Sci Rep*. 2016;6:23969. Published 2016 Apr 4.
- [41] Binari L A, Lewis G M, Kucenas S. Perineurial glia require Notch signaling during motor nerve development but not regeneration. *J Neurosci*. 2013,33(10):4241–4252.
- [42] Travagli M B A. “Novel transmitters in brain stem vagal neurocircuitry: New players on the pitch [J].” *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2018,315(1):G20–G26.
- [43] Ghosh A K, Brindisi M. Urea derivatives in modern drug discovery and medicinal chemistry [J]. *Journal of medicinal chemistry*, 2019, 63(6):2751–2788.

作者简介: 郭子一(2000-),女,山东枣庄人,苏州科技大学硕士研究生,主要从事风险评价与生态安全方面的研究。