

斑马鱼基因芯片技术在双酚 A 毒性机制研究中的应用

端正花^{1,2}, 朱琳^{*}, 冯鸣凤¹, 卜文俊², Lam Siew Hong³, 宫知远³

(1. 南开大学环境科学与工程学院, 环境污染过程与基准教育部重点实验室, 天津 300071; 2. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 3. 新加坡国立大学生物科学系, 117543, 新加坡)

摘要: 运用斑马鱼基因芯片技术和实时定量 RT-PCR 方法, 从分子水平上研究了双酚 A (BPA) 对斑马鱼的毒性作用机制. 试验将受精后的斑马鱼胚胎在 0.5、1.5 和 4.5 mg/L BPA 暴露 8 d 基因芯片并经实时定量 RT-PCR 验证检测出 50 个特异基因表达上调或下调、并呈显著的剂量-毒性效应 ($p < 0.05$). 这些差异表达基因的发现证明 BPA 具有遗传毒性, 并且通过它们功能和作用途径的分析, 可以为前期工作中观察到的生理毒性和代谢紊乱等机制研究提供支持.

关键词: 斑马鱼基因芯片; 实时定量 RT-PCR; 双酚 A; 毒性; 机制

中图分类号: X171.5; X503.225 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)03-0808-07

Application of Zebrafish Microarray on the Toxicity Mechanism Study of Bisphenol A

DUAN Zheng-hua^{1,2}, ZHU Lin¹, FENG Ming-fen¹, BU Wen-jun², Lam Siew Hong³, GONG Zhi-yuan³

(1. Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071; 3. Department of Biological Sciences, National University of Singapore, 117543, Singapore)

Abstract The toxicity mechanism of bisphenol A (BPA) to zebrafish (*Danio rerio*) was studied in the molecular level by the method of zebrafish microarray and quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). Zebrafish embryos were exposed to 0.5, 1.5 and 4.5 mg/L BPA for 8 days since fertilization. The results from microarray and validated by qRT-PCR showed that 50 specific genes were up- or down-regulated and dose-responses for them were significant ($p < 0.05$). This study demonstrates the genotoxicity of BPA. Moreover, according to their function and pathway analysis, it could support the mechanisms for the morphological toxicity and metabolize turbulence observed in prophase study.

Key words zebrafish microarray; quantitative real-time RT-PCR; bisphenol A (BPA); toxicity mechanisms

现代高通量分子生物技术的发展为环境污染物毒性机制研究提供了契机^[1,2]. 环境毒理学中常用的标准生物模式种斑马鱼有 25 条染色体, 基因全长 1.7 GB, 有 100 000 个基因, 基因的保守性与人类基因组相比约为 60%. 20 世纪 90 年代初斑马鱼开始被用于混合化学物的急、慢性毒性检测^[3]. 近年来, 斑马鱼基因芯片技术应用于毒理学研究已逐渐成为该领域的热点^[4~6]. 分子对不同毒性物质的反应将诱导很多对毒性产生响应的指示基因表达上的变化, 同时一套基因表达对一类特殊化合物的响应是特定的^[7]. 因此, 利用斑马鱼基因芯片技术研究特定类别环境污染物的毒性作用机制, 可以为人类安全健康评价提供分子水平的科学依据.

内分泌干扰物 (endocrine disrupting chemicals, EDCs) 所引起的危害在我国也日益受到重视^[8]. 国家环境保护“十一五”科技规划已经把内分泌干扰物的机制研究作为重要的攻关科技项

目. 双酚 A ($C_{15}H_{16}O_2$, BPA) 作为一种生产聚碳酸 (PC) 树脂和环氧树脂 (EP) 的主要有机化工原料, 已经被证实为典型的环境内分泌干扰物质^[9,10]. 国内外研究证明 BPA 能够转化成 DNA 加合物, 具有潜在的遗传毒性和胚胎毒性^[11,12].

BPA 广泛存在于生产过程中产生的工业废水、生活污水以及污泥中. BPA 制品在使用过程中其单体的溶出也是环境中 BPA 的来源之一^[13]. 例如婴儿奶瓶、微波炉饭盒及其它许多食品饮料的包装材料在高温加热灭菌中会有 BPA 溶出^[14]. 环境中 BPA 大都以低浓度长期暴露. US EPA (US Environmental Protection Agency) 规定^[15] 人体安全摄

收稿日期: 2009-04-21; 修订日期: 2009-07-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30470319)

作者简介: 端正花 (1981~), 女, 博士, 主要研究方向为生态毒理学,
E-mail: duanzhenghua@mail.nankai.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: zhulin@nankai.edu.cn

食 BPA 的量为 $50 \mu\text{g} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$, 假设 60 kg 的人每天饮用 2 L 水, 则饮用水中 BPA 的安全浓度为 1.5 mg/L 。对于这个“安全标准”国内外很多科学工作者提出了质疑^[16-19]。

本研究将受精后的斑马鱼胚胎在 0.5 、 1.5 和 4.5 mg/L BPA 暴露 8 d 通过斑马鱼基因芯片技术从整体水平上系统的阐述低剂量环境污染物对生物体的毒性效应, 进一步补充和证实了 BPA 的致毒机制, 并可为环境内分泌干扰物对水生生物的毒性风险评估提供技术框架。

1 材料与方法

1.1 试验生物

实验室自养成年斑马鱼 (雌雄比 1:2) 饲养于水族箱中, 每日喂食活虾芽苗 (brine shrimps World Aquatechs USA) 一次, (26 ± 1) °C、光照/黑暗周期 (14/10) 条件下控制培养 1 个月开始收集鱼卵。饲养用水经生物过滤器过滤并充分曝气, pH 值保持 8.0 左右。

1.2 试剂

双酚 A 购自 Sigma-Aldrich 公司 (USA), 优级纯。称取一定量 BPA 粉末溶于培养液 (双蒸水配置的 60 mg/L 海盐溶液) 中, 加入少量无水乙醇助溶 (实际染毒溶液中乙醇的浓度不超过 0.01%), 配制好的 10 mg/L BPA 溶液作为储备液待用。

1.3 暴露

试验设置了空白试剂对照组、 0.5 、 1.5 和 4.5 mg/L BPA 暴露组。每组挑选出完整健康的鱼卵 50 枚, 置于直径 10 cm 的表面皿中, 用胶头滴管小心吸干残留的水分, 再加入 BPA 溶液 50 mL, 置于光照培养箱中培养, 每日更新 $2/3$ 体积的溶液, 暴露 8 d 后取出。

1.4 RNA 提取

利用 Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, US) 方法从 50 条发育 8 d 的仔鱼中提取 RNA, 测定样品在 260、280 和 230 nm 的吸收值, 确定 RNA 的浓度和质量。RNA 的质量要求 $D_{260}/D_{280} > 1.9$ 和 $D_{260}/D_{230} > 1.8$ 采用 1% 的琼脂糖凝胶以 $0.5 \times \text{TBE}$ 为电泳缓冲液, 60 V 下电泳检验 RNA 质量。每个样品设 6 个平行, 提取的 RNA 一部分用于斑马鱼芯片分析, 另一部分用于实时定量 RT-PCR 分析。

1.5 斑马鱼基因芯片

研究所用斑马鱼芯片含有总共 22 000 个寡核苷

酸 (65 mer) 片段, 包括基因库 (GenBank) 从斑马鱼的 mRNA 和表达序列标签 (EST) 发现的全部基因。其中 16 400 个探针由 Campugen (USA) 公司设计, 其余的由新加坡基因组研究所 (Genome Institute of Singapore, GIS) 设计, 芯片合成由 GIS 完成。

按照 Amnioallyl-dUTP (Sigma-Aldrich, USA) 方法将 $10 \mu\text{g}$ 上述总 RNA 反转录成 cDNA。用荧光染料 Cy3 (Amersham, USA) 标记 reference RNA, 用 Cy5 (Amersham, USA) 标记各组样品 RNA, 与上述基因芯片进行 16 h 过夜杂交 (MAUI USA)。杂交技术后清洗, 用 GenePix 4000B 芯片扫描仪 (Axon Instruments, USA) 对杂交结果进行扫描, 用 GenePix Pro 4.0 图形分析软件 (Axon Instruments, USA) 进行分析, 用 LOWESS 算法将数据进行标准化。Cy5/Cy3 的比值 > 2 或 < 0.5 认为基因表现出显著差异。所得数据与 mAbd 数据库和 Gene Ontology 数据库进行比对。设计引物, 用实时定量 RT-PCR 对所发现的 30% 的 marker gene 进行验证。

1.6 实时定量 RT-PCR

取 $3 \mu\text{g}$ 上述总 RNA, 按照常规方法反转录成 cDNA (Invitrogen, USA), 用于实时定量 RT-PCR 分析。引物设计采用 Primer Premier 5.0 软件, 详细资料如表 1 所示。

利用 LightCycle 480 (Roche Applied Science) 设备及配备的试剂盒 (Roche Applied Science) 进行实时定量 RT-PCR 分析。反应参数为首先在 95°C 预反应 5 s, 其次从 95°C 、10 s 变成 60°C (退火具体温度与所用引物有关)、10 s, 然后 72°C 、5 s 循环 35 次; 最后在 PCR 反应完成后进行裂解曲线程序。扩增结束后, 由 LightCycle 480 自带软件分析数据。每个样品设 6 个平行, 以 B-ACTIN 为内参, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法计算相对表达量。

1.7 统计分析

每个试验组设 6 个平行样。采用 SPSS13.0 软件, 组内进行 student-t 检验, 并用标准误差 SD 表示; 组间用 one way-ANOVA 检验, $p < 0.05$ 表示有显著差异。

2 结果与分析

2.1 基因芯片

本次试验所使用的基因芯片含有 22 000 个斑马鱼基因。将各个染毒组特异基因与试剂对照进行 t-Test 检验, 发现 50 个特异基因表达上调或下调、并呈显著的剂量-毒性效应 ($p < 0.05$)。经过 mAbd 数

表 1 待测基因引物序列
Table 1 Primer sequences of target genes

序号	基因序号	基因名称	引物序列	扩增长度 /bp
1	A 1722041	B-ACT N	Fo _{rw} and ATGGA TGATGA AATTGCCG C R e _{verse} AGTGGT GACA ATA CCGTG C	200
2	A F359428	CLDN 1	Fo _{rw} and GCTCTGGGAA TTTTAGGA CTCATTG R e _{verse} TTTTA CA CTG CTG CTGACCG	163
3	CV 576584	ZGC: 153172	Fo _{rw} and CCGA TGTGT GAGGTTGATTTTATG R e _{verse} TCCTGTGTGAATTTCTGTGGTC	165
4	A F030560	FGF8A	Fo _{rw} and GTAGA GACAGACACATTTGGGAGTC R e _{verse} AG CCTTCG TACTTCACATTCTG	184
5	A 1437419	PAK2B	Fo _{rw} and GGTTTCTGTG CCCAGATCA CTC R e _{verse} ATGCCCAAT GACCAG ATGTC	131
6	BC076453	ZGC: 91895	Fo _{rw} and ACCGTCA GCATGGAGA CA GTAA C R e _{verse} G CTCAGTGAAGAAG TAGAGG ACTG	157
7	BM 185389	CSR P2BP	Fo _{rw} and GTCTGTA AGGAAA GGGTTTATCAG R e _{verse} AA TCTCTGAGAG CAAA CG CAG	175
8	AW 566954	TBXAS1	Fo _{rw} and GTGTTAAA CGGT CAG TTTCTG C R e _{verse} CCTTGG CTTC TGGAGTGAAC	130
9	AW 115780	STAU 2	Fo _{rw} and CAGGTATGGGACTCTGAAGG CAG R e _{verse} TG GGTG CTGTG CTG TCA G	129
10	BC053313	SP4	Fo _{rw} and GTCAGGATGGGGCTCAA AGTTCAGTC R e _{verse} GGG TCGCTGTG TTTCTGCC	196
11	CV 486461	ZGC: 112337	Fo _{rw} and TATAA ACCCAA CAGA GGAGTCTG C R e _{verse} CGATG AAGCGTAG CG TTTG	178
12	A 1641140	SI CH211- 15406 2	Fo _{rw} and ATATTCA TCTGTCCACGCACAC R e _{verse} TCCTTCT GAACCG CTTCTCTC	194
13	AY070229	EGR2A	Fo _{rw} and CCA CCCCCTTACACCTGTAG R e _{verse} A CTG CCAATG TTG TCCCTTTG	197
14	BC049470	APOEB	Fo _{rw} and ACCTACA CA CG CAAA CTGAAGAAAC R e _{verse} ATGTATG GCTGGAAC CGGTC	140
15	BI672229	NCL1	Fo _{rw} and ATGTGGCGTTTGTCTGTGCTCTG R e _{verse} TGA TCTTCTTGGA CCATCG	174
16	BC076343	CALCA	Fo _{rw} and CAGAAGAGAGCCTGTAA CACGG R e _{verse} CAATCAAA GAGGAACTGTGGA C	213

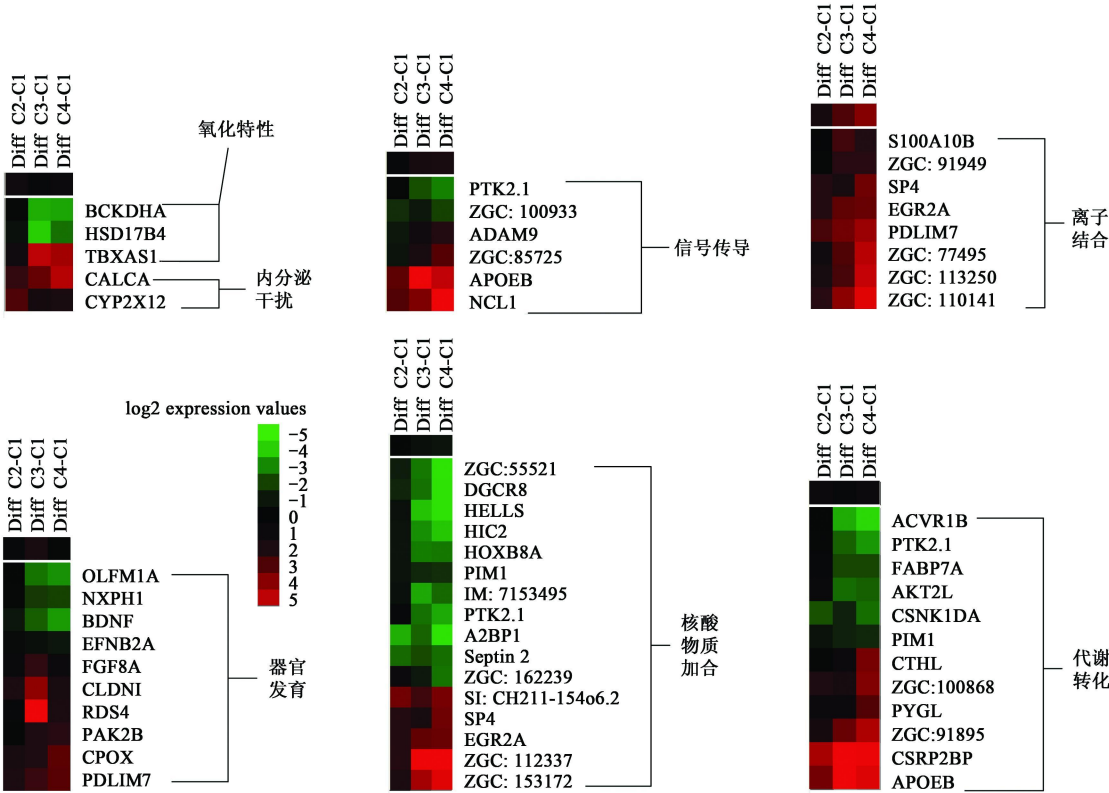
据库和 GeneOntology 数据库检索分析发现, 根据功能区划, BPA 引起的 8 d 斑马鱼仔鱼主要 6 个相关方面的基因表达差异: 信号传导、离子结合、核酸加合、器官发育、代谢转化以及 BPA 特有的氧化性特性和内分泌干扰特性(图 1).

BPA 特性的氧化性活性和内分泌干扰特性在基因芯片分析中得到体现. 其中, 氧化还原相关基因 BCKDHA、HSD17B4 下调而 TBXAS1 上调. 荷尔蒙活性相关基因 CALCA 和 CYP11B2 的表达都显著增强, 证明 BPA 具有内分泌干扰特性. 试验发现信号集和和传递活性相关基因 (PIK2. 1 和 ZGC100933) 的表达受到抑制, 而信号传递媒介、阴性调节和信号识别相关基因 (ADAM9、ZGC85725、APOEB 和 NCL1) 的表达增强. 钙离子、锌离子和铁离子, 它们都是生物所必需的营养元素. 试验结果 BPA 暴露下, 与这些金属离子结合相关的基因的表达都增强,

可能 BPA 能够刺激生物对这些离子的结合.

BPA 的遗传毒性在基因芯片中主要表现在对 DNA、RNA、ATP、GTP 等核酸物质的加合 (addition). 在选择研究的核酸加合相关的 16 个基因中, 10 个表达受到抑制, 6 个表达增强, 并且都有显著的剂量效应关系, 14 个基因在 1.5 mg/L BPA 下差异显著. 这些具有相似功能的基因在 BPA 刺激下表现出不同的表达降低或增强效应, 可能是由于这些基因具有各自的特性所造成的. 但不管怎样, BPA 能够影响核酸物质的加合, 从而造成遗传毒性.

BPA 能够显著影响斑马鱼仔鱼神经系统的发育, 选择研究的 4 个神经系统相关基因的表达都受到抑制, 并存在剂量毒性效应. 其他器官发育相关的基因包括脑部、心脏、色素等相关基因的表达都增强, 并且在 1.5 mg/L BPA 下表现出显著差异. BPA



C1. 空白试剂对照组; C2. 0.5 mg/L BPA 染毒组; C3. 1.5 mg/L BPA 染毒组; C4. 4.5 mg/L BPA 染毒组. Diff C2-C1, Diff C3-C1 和 Diff C4-C1 分别表示基因在 3 个暴露浓度组的表达量均值与其在空白对照组 (C1) 表达量均值的差值

图 1 BPA 中暴露 8 d 斑马鱼基因芯片数据

Fig 1 Microarray data of zebrafish exposed to BPA for 8 days (n = 6)

还能够作用于斑马鱼仔鱼体内的代谢转化. 如表所示, 脂肪酸相关基因 (FABP7A) 和蛋白氨基酸磷酸化相关基因 (ACVR1B、PTK2.1、CSNK1DK、AKT2L 和 PIM1) 的表达都受到抑制, 而代谢相关基因包括氨基酸、固醇、碳水化合物和脂蛋白代谢相关基因的表达都增强.

2.2 实时定量 RT-PCR

基因芯片试验过程中存在以下 3 个主要误差: ①由于基因芯片是对整体基因进行扫描, 会降低个体基因的特异性; ②试验中所用的参照 mRNA 是成鱼和幼鱼的混合物 (成鱼雌鱼: 成鱼雄鱼: 8 d 仔鱼 mRNA 量 = 1: 1: 3), 也就是说各个浓度组包括试剂对照组所得到的各个基因表达量是相对于所在芯片的参照 mRNA 而言, 不是绝对量; ③芯片扫描的过程中, 需要 Cy3/Cy5 (目的样品/参照样品) 的值大约在 1 左右, 但是不可能全部达到 1, 而且扫描一片芯片需要 0.5 h 左右, 由于扫描时间的不一致, 会造成芯片的曝光时间不一致, 曝光时间越长, 荧光信号越弱. 因此, 基因芯片的结果需要实时定量 RT-PCR 的

验证.

试验随机选取了上述表中功能基因的 15 个 (共 50 个, 占 30%) 进行结果验证. 由表 2 可得, 15 个基因在基因芯片和实时定量 RT-PCR 的结果是一致的, 大部分基因在实时定量 RT-PCR 的表达量更高.

3 讨论

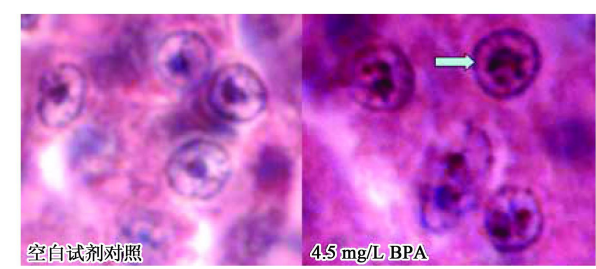
前期试验发现, BPA 对斑马鱼胚胎发育造成的亚致死敏感效应表现为: 孵化率降低 > 血流障碍 > 心包囊水肿 > 尾畸和脊椎弯曲^[20]. 组织切片发现 BPA 能使斑马鱼肝脏细胞明显受损 (如图 2 所示). 代谢组学发现 BPA 暴露能使斑马鱼体内的有益不饱和脂肪酸的百分含量降低, 饱和脂肪酸和氨基酸的百分率升高.

这些试验指标除了 24 h 血流障碍是在斑马鱼胚胎发育 24 h 后观察到的以外, 其他的都是胚胎暴露 8 d 后得到的结果, 暴露方式和样品收集方式都是一致的, 因此具有可比性. 而基因芯片所得到的

表 2 基因芯片结果的实时定量 RT-PCR验证¹⁾
Table 2 Quantitative real-time RT-PCR validation of microarray results

基因序号	基因特征	结果	D iff C2-C1	D iff C3-C1	D iff C4-C1	t-T est C2	t-Test C3	t-T est C4
AF359428	CLDN 1	M	0. 493 5	0. 911 5	0. 437 9	0. 002 1	0. 002 3	0. 124 0
		R	- 0. 849 4	1. 609 8	2. 876 9	0. 322 4	0. 009 6	0. 000 2
CV576584	ZGC: 153172	M	0. 355 4	0. 725 0	0. 915 5	0. 012 8	0. 000 7	0. 046 3
		R	0. 827 6	1. 107 1	1. 486 1	0. 016 0	0. 004 0	0. 000 3
AF030560	FGF8A	M	0. 162 2	0. 545 2	0. 227 1	0. 018 6	0. 001 0	0. 270 6
		R	- 0. 229 7	0. 473 7	0. 329 9	0. 683 4	0. 022 6	0. 136 2
A1437419	PAK2B	M	- 0. 061 1	0. 479 8	0. 520 5	0. 581 6	0. 004 2	0. 048 4
		R	- 0. 262 3	0. 438 1	0. 726 3	0. 483 0	0. 024 0	0. 001 7
BC076453	ZGC: 91895	M	0. 316 9	0. 585 6	0. 789 3	0. 001 8	0. 071 2	0. 085 4
		R	1. 055 9	0. 952 4	1. 867 0	0. 074 0	0. 060 6	0. 001 6
BM185389	CSRP2BP	M	0. 822 3	1. 084 3	1. 024 7	0. 008 5	0. 003 2	0. 000 4
		R	0. 441 7	0. 390 2	0. 861 8	0. 009 4	0. 015 6	0. 008 2
AW566954	TBXAS1	M	0. 270 0	0. 755 6	0. 684 4	0. 239 1	0. 005 0	0. 013 0
		R	1. 363 7	1. 906 9	2. 100 5	0. 000 0	0. 000 0	0. 000 0
AW115780	STAU2	M	0. 637 9	0. 477 8	0. 322 8	0. 001 5	0. 034 4	0. 354 8
		R	0. 174 3	0. 233 5	0. 365 4	0. 164 9	0. 206 9	0. 011 5
BC053313	SP4	M	0. 349 2	0. 300 4	0. 583 3	0. 000 9	0. 022 4	0. 032 3
		R	0. 811 7	0. 848 0	1. 428 0	0. 035 8	0. 032 2	0. 003 2
CV486461	ZGC: 112337	M	0. 393 5	1. 061 6	1. 130 4	0. 038 3	0. 033 1	0. 000 9
		R	0. 240 0	1. 031 3	0. 826 4	0. 592 1	0. 025 1	0. 049 5
A1641140	SLCH211-15406.2	M	0. 626 3	0. 426 7	0. 577 8	0. 016 4	0. 000 4	0. 020 0
		R	0. 562 5	0. 975 8	0. 599 7	0. 054 4	0. 019 8	0. 040 9
AY070229	EGR2A	M	0. 312 4	0. 494 9	0. 515 8	0. 036 9	0. 008 5	0. 003 4
		R	0. 982 0	1. 115 8	1. 108 9	0. 000 3	0. 048 5	0. 004 9
BC049470	APOEB	M	0. 681 7	1. 221 2	1. 015 8	0. 059 2	0. 035 6	0. 003 6
		R	0. 771 0	1. 231 4	1. 480 7	0. 073 3	0. 009 9	0. 001 7
BK72229	NCL1	M	0. 636 4	0. 786 0	1. 229 7	0. 033 7	0. 024 2	0. 002 0
		R	0. 808 9	1. 148 1	1. 054 3	0. 000 3	0. 001 1	0. 000 0
BC076343	CALCA	M	0. 334 1	0. 452 8	0. 649 8	0. 000 5	0. 136 5	0. 000 0
		R	1. 053 1	1. 918 8	0. 695 0	0. 009 3	0. 027 1	0. 042 4

1)M: 基因芯片结果; R 实时定量 RT-PCR 验证结果; C1: 空白试剂对照组; C2 0.5 mg/L BPA 染毒组; C3: 1.5 mg/L BPA 染毒组; C4 4.5 mg/L BPA 染毒组; 粗体标记的表示与对照相比 $p < 0.05$, 有显著差异; Diff C2-C1, Diff C3-C1 和 Diff C4-C1 分别表示基因在 3 个暴露浓度组的表达量与其在空白对照组 (C1) 表达量的差值, t-Test C2, t-Test C3 和 t-Test C4 分别表示基因在 3 个暴露浓度组与其在空白对照组 (C1) 表达差异的显著性

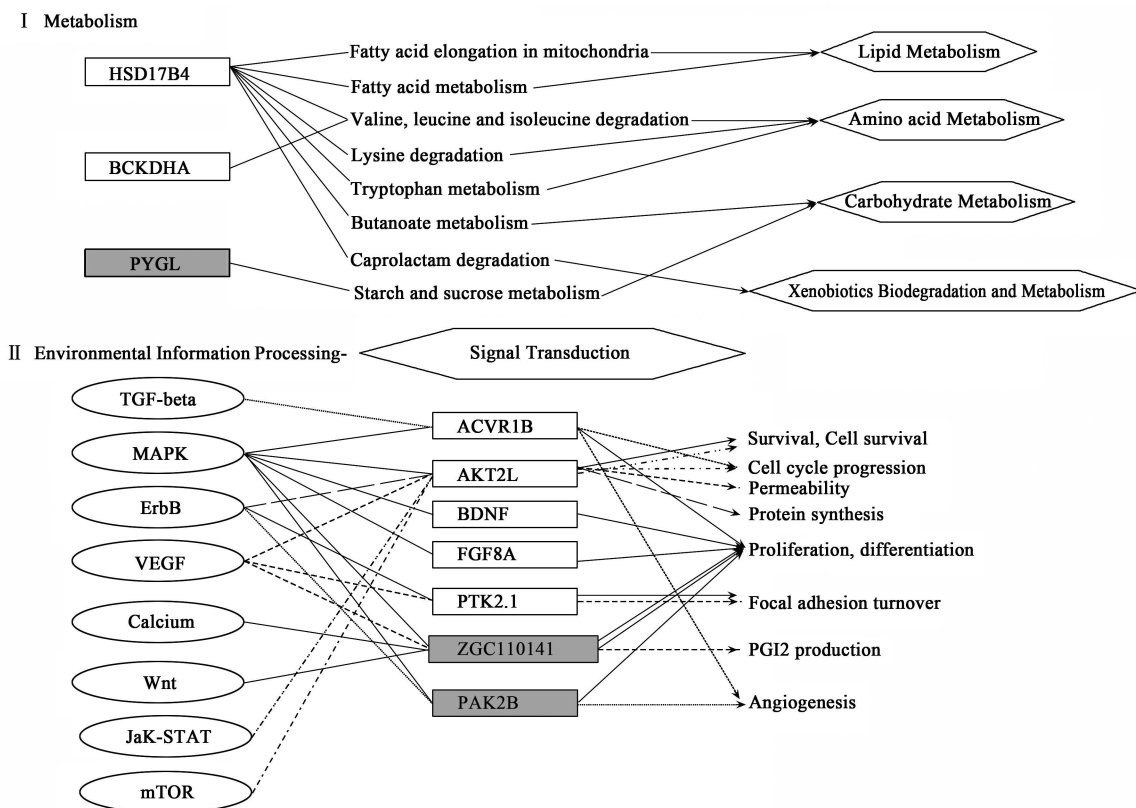


空白对照组肝细胞核的核仁完整的处于细胞核的中心, 而 4.5 mg/L BPA 暴露能观察到核仁的破碎和不规则分布
图 2 BPA 暴露下斑马鱼肝脏毒性表征
Fig 2 Hepatic toxicity of BPA to zebrafish

基因表达差异与笔者前期工作中生理观察、组织切片观察和代谢组学所得到的结果具有相关性。

利用 KEGG 软件 (www.genome.jp) 对这些特异表达基因进行生物学途径分析, 如图 3 所示, 发现 BPA 主要作用于斑马鱼代谢 (包括脂代谢、氨基酸代谢、碳水化合物代谢和外源化合物降解) 以及环境信息处理中的信号传导这 2 个方面的生物途径。代谢组学中, 不饱和脂肪酸和氨基酸的相对百分含量发生了变化, 这可能与作用于脂肪酸和氨基酸代谢途径中的 HSD17B4 和 BCKDHA 基因的下调有关, 但这需要蛋白组学的进一步研究验证。

KEGG 分析发现特异表达基因主要涉及到 8 个信号传导作用途径 (TGF-beta MAPK、ErkR VEGF、Calcium、Wnt、JAK-STAT 和 mTOR signaling pathway), 可能造成变化的生理指标有个体或细胞



无色方框代表基因表达下调,灰色方框代表基因表达上调,六边形代表作用途径所属类别,椭圆代表单个作用途径名称

图 3 基因表达与生理指标和代谢组分关系示意

Fig 3 Relations between gene expressions with pathology and metabolomics

成活率、血小板聚集抑制剂 (PGI₂) 的产量、血管生成等. 这对应于 24 h BPA 暴露下胚胎会出现血流障碍现象以及组织切片发现的肝脏细胞受损现象. BPA 是如何调节这些基因的表达的, 这些基因又是怎样调节或控制信号传导路径的, 是都需要进一步的研究. 例如试验发现有 6 个基因在 MAPK 信号途径中发生作用, 都能影响细胞增殖分化作用, 它们之间在这个途径中没有上下游的关系. 其中 4 个基因表现为下调, 2 个基因表现为上调, 而这 2 个上调的基因又与血液相关. 这 6 个基因的联合作用于细胞增殖分化的过程很复杂, 如果能借助于相关蛋白的深入分析, 将更有利于找出 BPA 的作用机制.

4 结论

(1) 1.5 mg/L BPA 能引起的 8 d 斑马鱼仔鱼 50 个基因表达差异 ($p < 0.05$). 证明了低剂量 BPA 的遗传毒性效应.

(2) 这些基因的功能涉及到信号传导、离子结合、核酸加合、器官发育、代谢转化以及 BPA 特有的氧化性特性和内分泌干扰特性 6 个方面, 为前期工

作中观察到的生理毒性和代谢紊乱等机制研究提供了支持.

参考文献:

- [1] Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics [J]. Nature 2003, 422(6928): 193-197.
- [2] Zhao B, Poh C L. Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics [J]. Proteomics 2008, 8(4): 874-881.
- [3] McGonnell IM, Fowkes R C. Fishing for gene function-endocrine modelling in the zebrafish [J]. J Endocrinol 2006, 189(3): 425-439.
- [4] Martyniuk C J, Gerrie E R, Popescu J T, et al. Microarray analysis in the zebrafish (*Danio rerio*) liver and telencephalon after exposure to low concentration of 17 α -ethinylestradiol [J]. Aquat Toxicol 2007, 84(1): 38-49.
- [5] Naciff J M, Hess K A, Overmann G J et al. Gene expression changes induced in the testis by transplacental exposure to high and low doses of 17 α -ethinylestradiol, genistein or bisphenol A [J]. Toxicol Sci 2005, 86(2): 396-416.
- [6] 端正花, 朱琳, 官知远. 己烯雌酚在斑马鱼胚胎中的生物蓄积及毒性机制研究 [J]. 环境科学, 2009, 30(2): 522-526.
- [7] 戴家银, 王建设. 生态毒理基因组学和生态毒理蛋白质组学研究进展 [J]. 生态学报, 2006, 26(3): 930-934.

- [8] 卫立, 张洪昌, 张爱茜, 等. 环境内分泌干扰物低剂量-效应研究进展[J]. 生态毒理学报, 2007, **2**(1): 25-31.
- [9] 张洪昌, 陈良燕, 刘树深, 等. BPA 与 3 种双酚类化合物的联合作用雌激素效应[J]. 环境科学, 2009, **30**(1): 260-265
- [10] 端正花, 郑敏, 朱琳. 五氯酚和双酚 A 联合毒性对斑马鱼胚胎发育的毒性[J]. 中国环境科学, 2006, **26**(增刊): 121-124
- [11] 朱毅, 舒为群, 卓鉴波, 等. 双酚 A 体外类雌激素活性评价及其作用机制的初步研究[J]. 重庆环境科学, 2003, **4**(25): 20-22.
- [12] Atkinson A, Roy D. *In vitro* conversion of environmental estrogenic chemical Bisphenol A to DNA binding metabolite(s) [J]. Biochem Biophys Res Commun 1995, **210**(2): 424-433.
- [13] Sajki J, Yonekubo J. Leaching of bisphenol A (BPA) to seawater from polycarbonate plastic and its degradation by reactive oxygen species[J]. Chemosphere, 2003, **51**(1): 55-62
- [14] Brotons JA, Olea-Serrano M F, Vilibios M, *et al*. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans[J]. Environ Health Perspect 2005, **103**(6): 608-612.
- [15] Johnson A, Jrgens M D. Endocrine active industrial chemicals release and occurrence in the environment[J]. Pure Appl Chem, 2003, **75**(11-12): 1895-1904.
- [16] Chitra K C, Latchoumycandane C, Mathur P P. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats [J]. Toxicology, 2003, **185**(1-2): 119-127
- [17] Kubo K, Arai O, Omura M, *et al*. Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats[J]. Neurosci Res 2003, **45**(3): 345-356.
- [18] 郭彤, 张高峰, 朱宝长. 壬基酚或双酚 A 对原代培养鲫肝细胞毒性的影响[J]. 首都师范大学学报 (自然科学版), 2009, **30**(2): 35-40.
- [19] 沈万赞. 双酚 A、壬基酚慢性暴露对斑马鱼 (*Danio rerio*) 生长和生殖影响的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2007.
- [20] 端正花, 张斌田, 朱琳. 双酚 A 对斑马鱼胚胎发育阶段的毒性及生物蓄积[J]. 中国环境科学, 2008, **28**(3): 260-263