

利用基因芯片探讨五氯酚发育毒性的作用机制

吴兆毅¹, 胡平², 赵庆顺², 尹大强^{1,3*}

(1. 南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093; 2. 南京大学模式动物研究所, 南京 210089; 3. 同济大学长江水环境教育部重点实验室, 上海 200092)

摘要: 0hpf 斑马鱼胚胎经 50 $\mu\text{g/L}$ 五氯酚(PCP)暴露染毒 8 h, 提取其总 RNA, 与 Affymetrix 公司的斑马鱼基因组芯片杂交, 发现与对照组相比, 染毒样本中 1 149 个基因的表达显著增强(Signal log ratio > 1), 501 个基因的表达显著减弱(Signal log ratio < -1). 利用 Chipinfo、Genmapp 等生物信息学软件对差异表达基因进行了基因本体论功能分类和发育调控通路分析, 结果显示, 显著差异表达的基因涉及抗氧化、信号传导、翻译调节、转录调节等多个分子功能. 五氯酚暴露后斑马鱼胚胎发育重要的调控通路 BMP 信号、ERK 通路、FGF 信号、Nodal 信号的调控基因 *smad2*、*smad5*、*bmp4*、*bmp7*、*flh*、*n-ras* 的表达发生了显著变化, Signal log ratio 分别为 4.6、2.1、1.6、1.0、1.3、1.0. 这些结果为进一步阐明五氯酚的发育毒性作用机制提供了标志物.

关键词: 五氯酚; 斑马鱼; 基因芯片; 发育毒性; 生物信息学

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)11-3382-06

Exploration of Developmental Toxicity Mechanism of Pentachlorophenol Using cDNA Microarray

WU Zhao-yi¹, HU Ping², ZHAO Qing-shun², YIN Da-qiang^{1,3}

(1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Model Animal Research Center, Nanjing University, Nanjing 210089, China; 3. Key Laboratory of Yantze Aquatic Environment, Ministry of Education, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: 0hpf zebrafish embryos were exposed to 50 $\mu\text{g/L}$ pentachlorophenol(PCP) for 8h *in vitro*. Total RNA sample was extracted then and hybridized with Affymetrix Zebrafish Genome Array representing approximately 14 900 transcripts. A total of 1 149 transcripts was significantly up-regulated while 501 transcripts were down-regulated. Bioinformatic tools were used for further analysis. The result indicated that genes with significant expression changes were related to molecular functions including antioxidant activity, signal transducer activity, translation regulator activity, transcription regulator activity, *et al.* Genes regulated by BMP signals, FGF signals, and Nodal signals including *smad2*, *smad5*, *bmp4*, *bmp7*, *flh*, *n-ras* may involve in the developmental toxicity of PCP, with Signal log ratios of 4.6, 2.1, 1.6, 1.0, 1, 1.3, 1.0, respectively. This investigation may provide new biomarkers to further study of the developmental toxicity of PCP.

Key words: pentachlorophenol; zebrafish; cDNA microarray; developmental toxicity; bioinformatics

五氯酚(pentachlorophenol, PCP)是一种典型的持久性有机污染物(POPs), 被美国 EPA 列为优先检测污染物和潜在致癌物, 也是我国优先监测污染物. 研究表明, PCP 可对水生生物产生多种发育毒性效应^[1,2]. Owens 等^[3]观察到经 PCP 染毒的日本青鳞胚胎眼睛及心血管发育异常. Duan 等^[4]的实验则表明, PCP 可造成斑马鱼胚胎心脏水肿、孵化延迟及尾部畸形. 阐明 PCP 的发育毒性作用机制, 对于阐明五氯酚生态安全及人类健康影响具有重要意义.

毒理基因组学(toxicogenomics)主要研究基因组结构、功能与外来化合物产生的有害生物效应之间的关系^[5]. 由于新的生物技术手段及信息技术的应用, 毒理基因组学可以同时研究数以千计的基因表达, 具有传统毒理学研究无法比拟的高通量、并行性等优势, 且可以更深刻地阐释毒作用的分子机制. 在环境领域, 毒理基因组学在寻找生物标志物、通过基

因表达谱来表征污染物的毒作用机制、污染物的生态风险评价及预测等方面都展现出巨大的潜力.

基因芯片技术近年来发展迅速, 其高通量、快捷迅速的优点使其成为毒理基因组学研究的有力工具. 但鲜见利用该技术研究氯酚类化合物对水生脊椎动物发育毒性的报道. 本研究以斑马鱼为模式动物, 利用基因芯片检测低浓度五氯酚暴露下斑马鱼胚胎基因表达的变化, 并用生物信息学软件对结果进一步进行了功能分类和发育调控通路分析, 从毒理基因组学角度探讨五氯酚发育毒性的作用机制, 以期发展有毒化学品发育毒性的生物标志物提供依据.

收稿日期: 2008-12-01; 修订日期: 2009-04-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(20577022)

作者简介: 吴兆毅(1983~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生态毒理学, E-mail: wuzhaoyi_83@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: yindq@tongji.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 受试生物

斑马鱼(*Danio rerio*)取自南京大学模式动物研究所,于平均水温 28℃,光暗比为 14 h:10 h,以除氯自来水驯养.

1.1.2 试剂

PCP(Sigma, CAS 87-86-5, 纯度 > 98%)溶于 DMSO, 制备成 1 000 倍的浓缩液,使用时稀释 1 000 倍.

1.2 实验方法

1.2.1 胚胎染毒

新鲜采集的单细胞时期的斑马鱼胚胎置于含 50 μg/L PCP 的 Danieau 溶液中[pH 7.6, 含 58 mmol/L NaCl, 0.7 mmol/L KCl, 0.4 mmol/L MgSO₄, 0.6 mmol/L Ca(NO₃)₂, 5 mmol/L HEPES],以 0.1% DMSO(PCP 助溶剂)作为对照,28℃下培育 8 h.

1.2.2 总 RNA 提取

取 80 枚斑马鱼胚胎加入玻璃匀浆器,用移液器吸干多余水分,加入 1 mL TRIzol(Invitrogen),迅速充分匀浆;将溶液转移至 1.5 mL RNase-free 离心管中,室温静置 5 min;在离心管中加入 200 μL 氯仿,振荡混匀;将离心管在 4℃,12 000 r/min 条件下,离心 15 min;用移液器吸出上层水相,加入另一离心管中,加入 500 μL 异丙醇;−20℃条件下沉淀 30 min;再在 4℃,12 000 r/min 条件下离心 10 min;移出上清液,沉淀中加入 1 mL 75% 乙醇,在 4℃,12 000 r/min 条件下,离心 10 min;重复用 75% 乙醇洗涤一次 RNA 沉淀,去上清,稍微晾干,加入约 30 μL 的 RNase-free 的水,充分溶解.

1.2.3 芯片实验

经紫外分光光度计和变性凝胶电泳检测合格的总 RNA 样品,经 Affymetrix 公司的标准工作程序分别与芯片(Affymetrix Zebrafish Genome Array, 含约 14 900 个转录本)杂交并检测信号.主要步骤包括:纯化总 RNA、合成和纯化 cDNA、合成和纯化 cRNA、cRNA 片段化以及芯片杂交、洗脱和扫描^[6].这些步骤由上海晶泰生物技术有限公司完成.

1.3 数据分析

应用 Affymetrix 公司的 GCOS 软件对扫描信号进行分析,并对信号值进行归一化处理.生物信息学软件 Chipinfo^[7]及 Genmapp^[8]分别用于 GO 功能分类和通路分析.

2 结果与分析

2.1 芯片实验

本研究将显著差异表达基因的筛选标准设定为:上调基因:change 为 I(increase)或 M I(marginal increase),处理组 scaling detection 为 P(presence),Signal log ratio ≥ 1;下调基因:change 为 D(decrease)或 MD(marginal decrease),对照组 scaling detection 为 P,Signal log ratio ≤ −1.结果显示,与对照组相比,五氯酚暴露后共产生斑马鱼胚胎中 1 149 个基因显著上调,501 个基因显著下调.

2.2 GO 分子功能分类

根据基因本体论 GO(<http://www.geneontology.org>)的定义,利用 Chipinfo 软件对显著差异表达的基因进行了分子功能分类,共涉及 12 类分子功能:抗氧化功能(antioxidant activity)、酶活性调节功能(enzyme regulator activity)、运动功能(motor activity)、信号传导功能(signal transducer activity)、结构分子功能(structure molecule activity)、转录调节功能(transcription regulator activity)、翻译调节功能(translation regulator activity)、转运功能(transporter activity)、辅助转运蛋白功能(auxiliary transport protein activity)、结合功能(binding)、催化功能(catalytic activity)和化学吸引功能(chemoattractant activity).显著上调的 1 149 个基因中有注释的基因为 650 个,显著下调的 501 个基因中有注释的基因为 253 个,各自的功能分类情况见表 1 和图 1.

表 1 显著差异表达基因的功能分类结果

Table 1 GO molecular function classification of significant up-regulated and down-regulated genes

分子功能	上调基因数	下调基因数
抗氧化功能	2	1
酶活性调节功能	23	8
运动功能	10	0
信号传导功能	24	8
结构分子功能	7	8
转录调节功能	42	29
翻译调节功能	4	5
转运功能	44	29
辅助转运功能	16	9
结合	413	163
催化功能	249	90
化学吸引功能	1	0

2.3 发育调控通路分析

BMP(bone morphogenetic protein, 骨形态发生蛋白)信号、ERK(extracellular signal-regulated kinase, 细

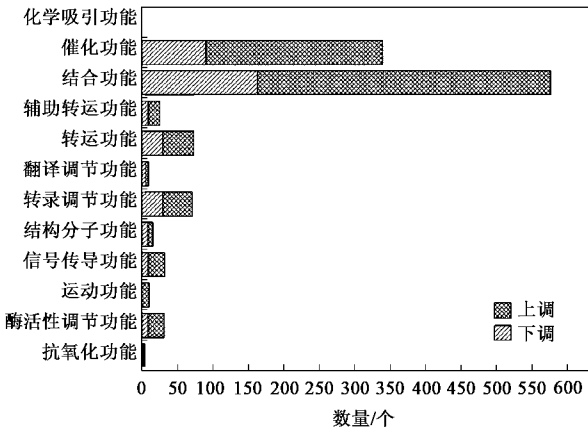


图 1 各分子功能基因上调及下调的分布

Fig.1 Distribution of significantly regulated genes of GO molecular functions

胞外信号调节激酶)信号、FGF(fibroblast growth factor,成纤维细胞生长因子)信号和 Nodal(结节蛋白)信号在斑马鱼胚胎的发育过程中起着极为重要的调控作用.这 4 个信号的独立作用和相互作用可影响背腹分化、中胚层诱导等胚胎发育中的重要事件.本研究利用 Genmapp 软件对显著差异表达的基因进行了这 4 个信号的通路分析.结果见图 2~图 5,其中深灰色代表基因显著上/下调(即上/下调超过 2 倍),浅灰色代表基因上/下调但不显著(即上下调小于 2 倍).

3 讨论

BMP 和 Nodal 均属在生长发育中起重要调控作用的 TGF- β 超家族的亚家族成员.其信号作用的途径很简单:配体与受体结合并使后者磷酸化,磷酸化后的受体活化细胞内的 Smad (mothers against decapentaplegic homolog)蛋白,活化的 Smad 蛋白进入细胞核激活下游基因的转录.不同的信号活化不同的 Smad 蛋白:脊椎动物中,BMP 信号通过受体激活 Smad1 或相近的 Smad5、Smad8,而 Nodal 激活 Smad2 和 Smad3^[9].在本研究的结果中(图 2、图 5),Smad5 的 Signal log ratio 为 2.1(即上调了 2 的 2.1 次方倍),Smad2 的 Signal log ratio 为 4.6.表明 PCP 可能通过 Smad5 和 Smad2 影响了 BMP 和 Nodal 信号通路.

Bmp 蛋白可以通过从沿腹部到背部的浓度梯度指导在发育中非常重要的背腹分化过程.在本研究的结果中,*bmp4* 和 *bmp7* 均显著上调(图 2),Signal log ratio 分别为 1.6、1.0. Bmp4 可以腹部化胚胎,而且腹部化的程度与所用的 Bmp4 的浓度有关^[10].此外,侧板中胚层和腹部中胚层的标记基因 *flh* 也显著上调(图 5),Signal log ratio 为 1.3.这表明五氯酚影响了斑马鱼胚胎发育中的背腹分化过程,可能会造成胚胎发育过程中的腹部化.

FGF 是一类重要的多肽生长因子,在胚胎发育的许多方面都起着重要的作用,包括细胞的增殖分

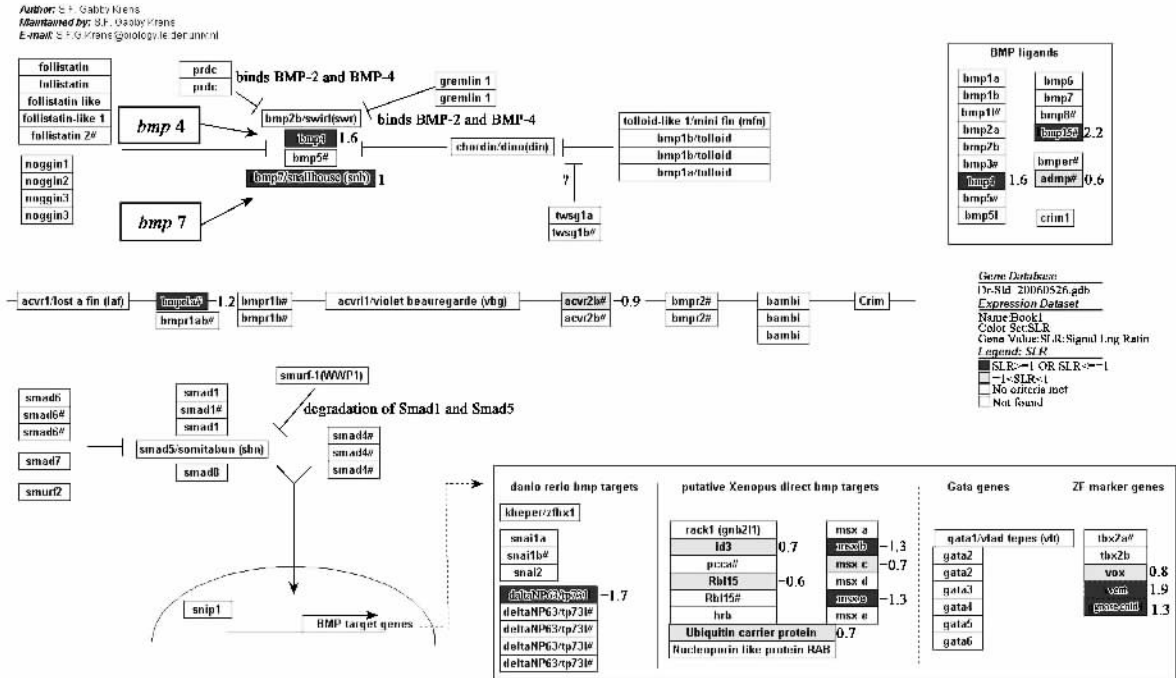


图 2 BMP 信号通路分析

Fig.2 BMP signal pathway analysis

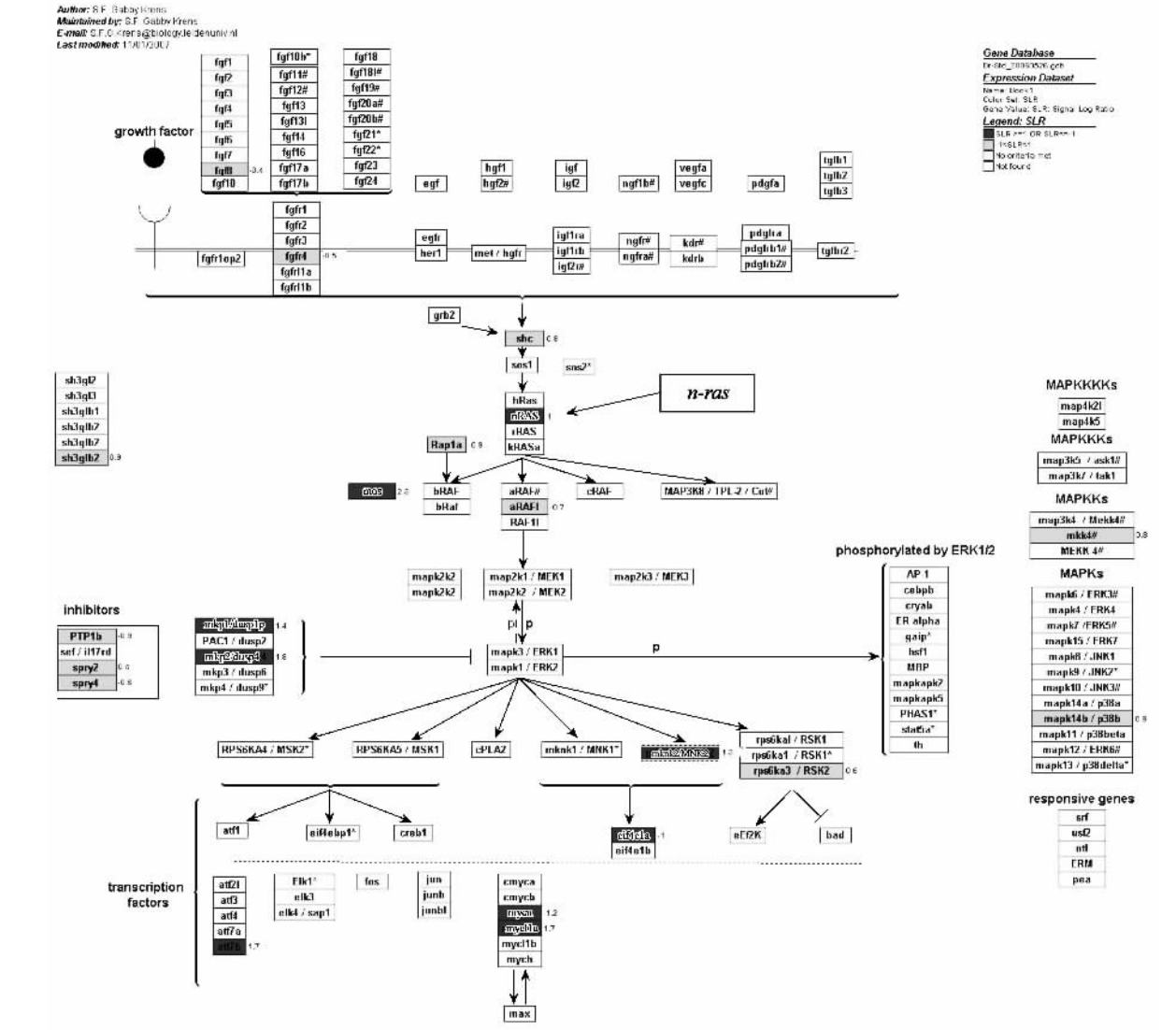


图 3 ERK 信号通路分析

Fig.3 ERK signal pathway analysis

化、胚胎的背腹分化、体结分化、脑的发育、眼睛的发育、肢芽的发育等^[9,11]。此外,FGF 还和与细胞生长、分化及个体发育有重要关系的 ERK 途径^[12]有相互作用。Fgf 与 Fgfr(FGF 受体)胞外受体部分结合,使受体二聚化;受体二聚化自磷酸化,激活胞内酪氨酸蛋白激酶(RTK)活性;活化的 RTK 磷酸化 Frs2(FGF receptor stimulated 2)蛋白,后者会召集 Grb2(growth factor receptor-bound protein 2)、Sos(son of sevenless nucleotide exchange factor)和 Shp2(src homologue phosphatase 2)蛋白,导致 Ras 蛋白 GDP-GTP 互换,从而被活化;活化的 Ras 蛋白与 Raf 蛋白(即 MAPKKK,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶)的氨基端结构域结合并激活后者;活化的 Raf 结合并磷酸化另一种蛋白激酶 MEK(MAPKK),使其丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化;

MEK 磷酸化其唯一底物 MAPK(mitogen-activated protein kinase 有丝分裂原活化蛋白激酶)的丝氨酸/苏氨酸残基使其激活,MAPK 根据功能结构分为 3 种,即 ERK、JNK 和 P38(Signal log ratio 为 0.8)^[9]。在斑马鱼体内,fgf 家族 fgf1 ~ fgf23 中目前仅有 6 个有报道(fgf 3、fgf 4、fgf 8、fgf10、fgf17、fgf18),此外还发现一个仅存在于斑马鱼中的 fgf24。fgfr 共有 4 个(fgfr 1、fgfr2、fgfr3、fgfr4)。本研究的实验结果(图 3)显示,五氯酚可能影响了 fgf8 的表达,进而影响了 fgfr4 与 fgf 8 的结合。fgf8 的过量表达会在胚胎发育过程中造成明显的背部化^[13],而本研究的结果中 fgf8 下调(图 4),这支持了 Bmp 信号和 Nodal 信号分析得到的结论,即五氯酚可能影响斑马鱼胚胎发育背腹分化。

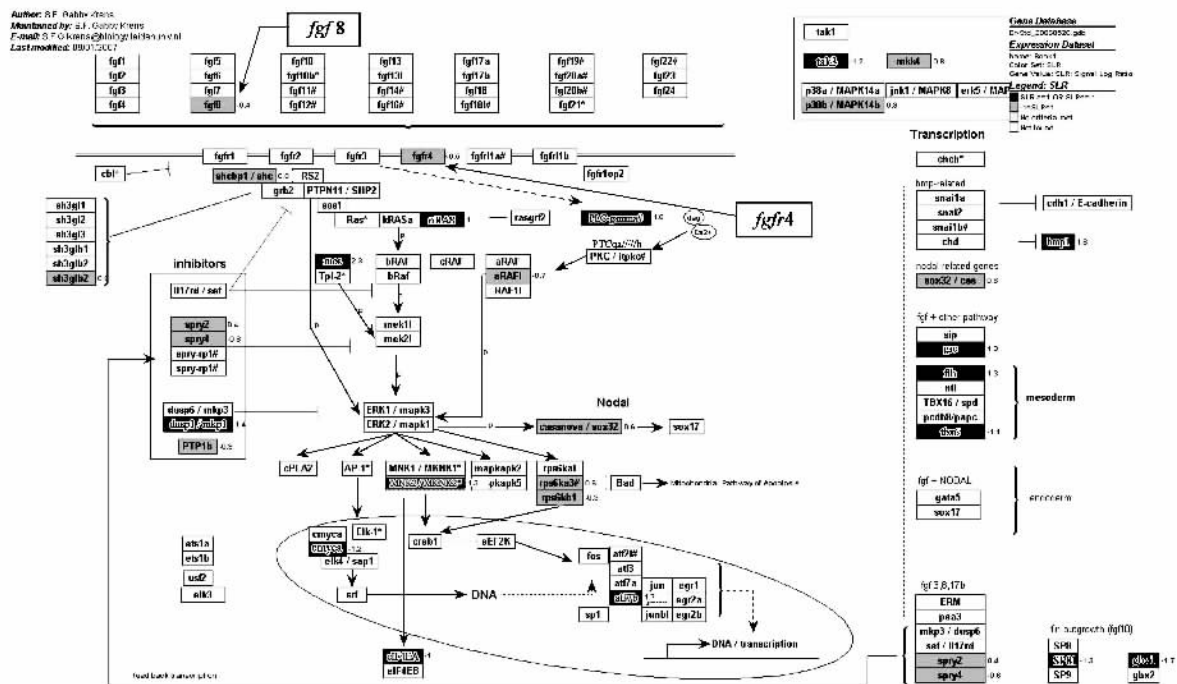


图4 FGF 信号通路分析

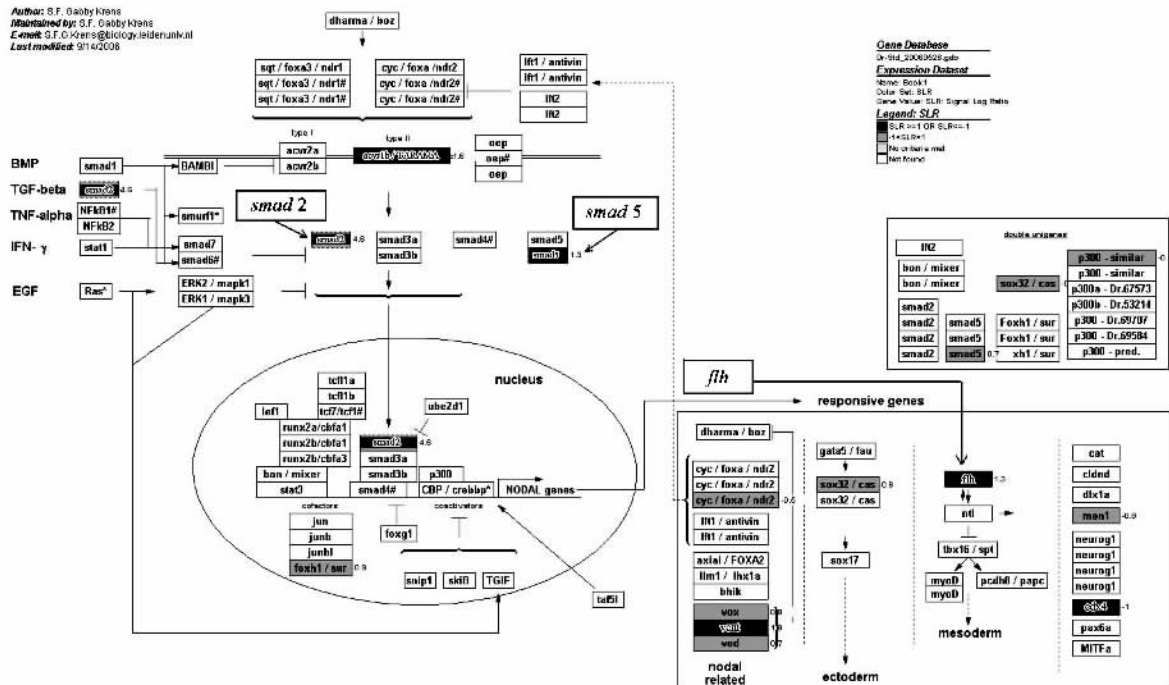


图5 Nodal 信号通路分析

根据上述分析,推测五氯酚对斑马鱼胚胎发育 FGF 信号、ERK 通路相互作用的影响如图 6 所示,即:五氯酚可在影响 *fgf8* 和 *fgfr4* 的表达后,通过激活 RTK、磷酸化 Shc、激活 Grb2 来激活 N-Ras 蛋白

(Signal log ratio 为 1), 最终影响了 ERK 通路及其下游转录因子的表达.

本课题组前期研究已经证明五氯酚可引起斑马鱼抑癌基因 *p53* 基因的点突变^[14], 产生基因毒性,

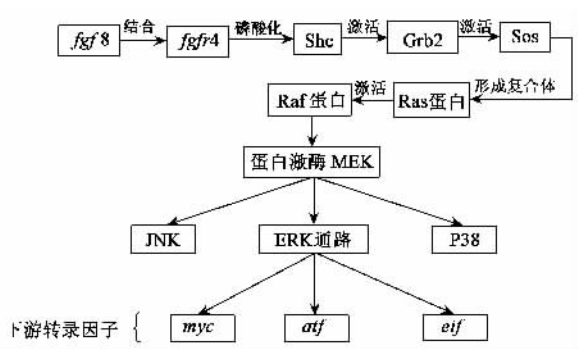


图 6 五氯酚对斑马鱼胚胎 FGF 通路、ERK 通路相互作用的影响

Fig.6 Effect of PCP on the interaction of FGF, ERK signaling of Zebrafish embryo

但作用机制不清楚.本研究显示,五氯酚暴露后斑马鱼胚胎原癌基因 *ras* 家族中的 *n-ras* 显著变化(图 3). *ras* 家族成员在许多癌前病变中都有过表达,活化状态的 Ras 蛋白可能造成细胞不可控地增殖、恶变,并且凋亡减少.因此,五氯酚的基因毒性是否是通过 *p53* 基因和 *n-ras* 基因相互作用而产生的,其有待进一步研究.

除 FGF 可通过激活 Ras 途径及其后的一系列途径来激活 ERK 通路外,其它信号间的也存在相互作用.在中胚层诱导以及维持过程中,Nodal 信号需要通过 FGF 介导信号:一方面,Nodal 信号能直接诱导 *fgf* 基因的表达,另一方面,FGF 信号也可以直接诱导 *oep* 的表达,从而介导 Nodal 信号对 *oep* 的诱导作用,进一步维持和扩大 Nodal 信号.而 FGF 在背部化的过程中则起到了抑制 BMP 信号的作用,一方面可以通过诱导 *chordin* 表达来拮抗 BMP 信号,另一方面也可以直接抑制 BMP 的转录^[9].五氯酚是否能通过影响这 2 个通路的相互作用而产生发育毒性,需要进一步的研究证实.

4 结论

(1)与对照组相比,五氯酚处理组斑马鱼胚胎有 1 149 个基因显著上调,501 个基因显著下调.

(2)显著差异表达的基因涉及抗氧化功能、酶活性调节功能、运动功能、信号传导功能、结构分子功能、转录调节功能、翻译调节功能、转运功能、辅助转运蛋白功能、结合功能、催化功能和化学吸引功能等多种分子功能.

(3)五氯酚影响斑马鱼胚胎发育 BMP 信号、

ERK 通路、FGF 信号、Nodal 信号等信号通路中一些关键基因的表达.分析推测,五氯酚可能通过 Smad 蛋白(Smad5 和 Smad2)影响了 BMP 和 Nodal 信号通路,或通过生长因子关键基因 *fgf8* 影响 ERK 通路及其下游转录因子的表达,从而导致发育毒性.

参考文献:

[1] National Toxicology Program (NTP). NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of pentachlorophenol[R]. April 1999.

[2] Agency for Toxic Substances, Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for pentachlorophenol, update[R]. 2001.

[3] Owens K D, Baer K N. Modifications of the topical japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryo larval assay for assessing developmental toxicity of pentachlorophenol and *p*, *p'*-dichlorodiphenyltrichloroethane[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2000, **47**: 87-95.

[4] Duan Z, Zhu L, Zhu L, *et al*. Individual and joint toxic effects of pentachlorophenol and bisphenol A on the development of zebrafish (*Danio rerio*) embryo[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2008, **71**: 774-780.

[5] Aardema M J, MacGregor J T. Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies[J]. Mutat Res, 2002, 499: 13-25.

[6] Affymetrix Inc., CA, U. S. Affymetrix Protocols[EB/OL]. <http://www.affymetrix.com/index.affx>.

[7] Zhong S, Li C, Wong W H. ChipInfo: Software for extracting gene annotation and gene ontology information for microarray analysis[J]. Nucleic Acids Res, 2003, **31**: 3483-3486.

[8] Salomonis K H, Zambon A C, Vranizan K, *et al*. GenMAPP 2: new features and resources for pathway analysis[J]. BMC Bioinf, 2007, **8**: 217.

[9] 曹莹. *Fgf17b* 及其负反馈因子 *Mkp3* 在斑马鱼胚胎早期发育中的作用[D]. 北京:清华大学, 2005.

[10] Dosch R, Gawantka V, Delrus H, *et al*. Bmp-4 acts as a morphogen in dorsoventral mesoderm patterning in *Xenopus*[J]. Dev, 1997, **124**: 2325-2334.

[11] Maroon H, Walshe J, Mahmood R, *et al*. *Fgf3* and *Fgf8* are required together for formation of the otic placode and vesicle[J]. Dev, 2002, **129**: 2009-2108.

[12] Shaul Y D, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, **1773**: 1213-1226.

[13] Furthauer M, Thisse C, Thisse B. A role for FGF-8 in the dorsoventral patterning of the zebrafish gastrula[J]. Dev, 1997, **124**: 4253-4264.

[14] Yin D, Gu Y, Li Y, *et al*. Pentachlorophenol treatment *in vivo* elevates point mutation rates in zebrafish *p53* gene[J]. Mut Res, 2006, **609**: 92-101.

[15] Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, *et al*. Stages of embryonic development of the zebrafish[J]. Dev Dyn, 1995, **203**: 253-310.