

芳香烃受体抑制 miR-101a 介导 PM_{2.5} 有机提取物所致斑马鱼胚胎心脏畸形

蔡畅^a, 黄玉洁^a, 陶怡舟^a, 陈涛^a, 姜岩^b

苏州大学医学部 a. 公共卫生学院 b. 基础医学与生命科学学院, 江苏 苏州 215123

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20516

摘要：

[背景] 研究表明芳香烃受体 (AhR) 介导大气 PM_{2.5} 引起的斑马鱼胚胎心脏畸形, 但其具体分子机制有待明确。小分子核糖核酸 (miRNAs) 等表观遗传机制在心脏发育中起重要作用, 而且有报道 AhR 能调控 miRNAs 的表达。因此, PM_{2.5} 有可能通过 AhR 信号通路干扰 miRNAs 表达, 从而导致心脏发育异常。

[目的] 探讨 PM_{2.5} 有机提取物 (EOM) 激活 AhR 后对 miR-101a 的调控, 以及 miR-101a 异常表达影响斑马鱼胚胎心脏发育的作用机制。

[方法] 收集苏州市区 PM_{2.5} 并以索氏提取法提取 EOM, 在受精后 2 h (hpf) 内加入 EOM (5 mg·L⁻¹) 及 AhR 小分子抑制剂 CH223191 (0.05 μmol·L⁻¹) 进行斑马鱼胚胎染毒。以吗啉寡核苷酸进行 AhR 基因敲减, 以 miR-101a 类似物注射进行 miR-101a 过表达。在受精后 72 hpf, 观察各组斑马鱼胚胎发育情况, 统计心脏畸形率。剖取斑马鱼胚胎心脏, 提取总 RNA, 以实时荧光定量 PCR 方法检测 miR-101a 和 *elfa*、*gsk3β*、*cdc42* mRNA 的表达。以在线数据库 Targetscan 进行斑马鱼 miRNA 靶基因预测, 并以 DAVID 数据库对靶基因进行京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。

[结果] 与 DMSO 对照组相比, 5 mg·L⁻¹ EOM 引起 72 hpf 的斑马鱼胚胎心脏畸形率由 5% 升高至 18% ($P < 0.05$)。EOM 引起斑马鱼胚胎心脏中 miR-101a 表达降低至对照组的 60% 左右 ($P < 0.05$), 而 AhR 小分子抑制剂 CH223191 (0.05 μmol·L⁻¹) 及 AhR 基因敲减均对 EOM 所致 miR-101a 表达变化有拮抗作用 ($P < 0.05$)。miR-101a 类似物可减轻 EOM 所致的斑马鱼胚胎心脏畸形 (由 19% 降至 11%, $P < 0.05$)。miR-101a 的预测靶基因集中于 FoxO 及 Wnt 等心脏发育相关的重要信号通路, 并且 Wnt 通路基因 *gsk3β* 及 Rho 家族小分子鸟苷酸三磷酸酶 *cdc42* 的表达在 EOM 染毒斑马鱼胚胎心脏中升高 (升高 1.9 倍, $P < 0.001$; 升高 1.7 倍, $P < 0.01$), 但加入 miR-101a 类似物后恢复正常水平 ($P < 0.01$)。

[结论] 斑马鱼胚胎心脏中, PM_{2.5} 中的 EOM 激活 AhR 后抑制 miR-101a 的表达, 进而通过 *gsk3β* 及 *cdc42* 等基因干扰心脏发育, 引起心脏畸形。

关键词： PM_{2.5}；有机提取物；芳香烃受体；miR-101a；心脏发育；斑马鱼胚胎

Heart malformations of zebrafish embryos exposed to extractable organic matter from PM_{2.5} mediated by aryl hydrocarbon receptor-suppressed miR-101a CAI Chang^a, HUANG Yujie^a, TAO Yizhou^a, CHEN Tao^a, JIANG Yan^b (a.School of Public Health b.School of Biology and Basic Medical Sciences, Medical College of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

Abstract:

[Background] Previous studies have shown that aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediates ambient PM_{2.5}-induced heart defects in zebrafish embryos, but the molecular mechanisms remain to be clarified. Epigenetics such as microRNAs (miRNAs) play an important role in the heart development, and AhR has been reported to regulated the expression of miRNAs. Thus, PM_{2.5} may disturb miRNA expression via AhR signal pathway, leading to aberrant heart development.

[Objective] This study aims to investigate the regulation of miR-101a by AhR, and the effects of aberrant expression of miR-101a on heart development in zebrafish embryos exposed to PM_{2.5} extractable organic matter (EOM).

[Methods] PM_{2.5} was collected in an urban area in Suzhou city, and the EOM were extracted by Soxhlet extraction. Zebrafish embryos were exposed to EOM (5 mg·L⁻¹) and AhR small molecule

组稿专家

陈涛 (苏州大学医学部公共卫生学院),
E-mail: tchen@suda.edu.cn

基金项目

国家自然科学基金项目 (81972999)

作者简介

蔡畅 (1995—), 女, 硕士生;
E-mail: 804434214@qq.com

通信作者

陈涛, E-mail: tchen@suda.edu.cn
姜岩, E-mail: yjiang@suda.edu.cn

伦理审批

已获取
利益冲突 无申报
收稿日期 2020-10-31
录用日期 2021-03-03

文章编号 2095-9982(2021)04-0336-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

蔡畅, 黄玉洁, 陶怡舟, 等. 芳香烃受体抑制 miR-101a 介导 PM_{2.5} 有机提取物所致斑马鱼胚胎心脏畸形 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38 (4): 336-341.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20516

Funding

This study was funded.

Correspondence to

CHEN Tao, E-mail: tchen@suda.edu.cn
JIANG Yan, E-mail: yjiang@suda.edu.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2020-10-31

Accepted 2021-03-03

►To cite

CAI Chang, HUANG Yujie, TAO Yizhou, et al. Heart malformations of zebrafish embryos exposed to extractable organic matter from PM_{2.5} mediated by aryl hydrocarbon receptor-suppressed miR-101a[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(4): 336-341.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20516

inhibitor CH223191 ($0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) within 2 h post-fertilization (hpf). AhR knockdown was achieved by using morpholino, and miR-101a overexpression by miRNA agomir injection. Embryos at 72 hpf were observed under microscope, and the rate of heart malformation was calculated. Total RNA was extracted from isolated hearts, and mRNA and miRNA expression levels were detected using qPCR. The miRNA target genes were predicted using the Targetscan online tool, and a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was performed using the DAVID online tool.

[Results] The EOM at $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ significantly increased cardiac malformation rates in the zebrafish embryos at 72 hpf compared with the DMSO control (from 5% to 18%, $P<0.05$). Furthermore, EOM caused a significant decrease in the expression of miR-101a in the heart of zebrafish embryos (decreased about 60%, $P<0.05$). Both AhR small molecule inhibitor CH223191 ($0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and AhR gene knockdown attenuated the EOM-induced miR-101a expression changes ($P<0.05$). miR-101a agomirs alleviated the $\text{PM}_{2.5}$ -caused heart defects (from 19% to 11%, $P<0.05$). In addition, predicted miR-101a target genes were enriched in FoxO and Wnt signal pathways which are essential to heart development. Moreover, EOM significantly increased the expression levels of Wnt signaling gene *gsk3 β* and the Rho GTPase family gene *cdc42* in the heart of zebrafish embryos (1.9 fold upregulation, $P<0.001$, and 1.7 fold upregulation, $P<0.01$, respectively), which were further counteracted by miR-101a agomirs ($P<0.01$).

[Conclusion] In the heart of zebrafish embryos, AhR activated by $\text{PM}_{2.5}$ EOM significantly represses miR-101a expression, which in turn disrupts heart development via genes including *gsk3 β* and *cdc42*, resulting in cardiac malformations.

Keywords: $\text{PM}_{2.5}$; extractable organic matter; aryl hydrocarbon receptor; miR-101a; heart development; zebrafish embryo

先天性心脏病是最为常见的出生缺陷之一，发病率为0.6%~1%，如不及时治疗，约有1/3的患者会在出生后1年内死亡。先天性心脏病的病因尚不明确，研究表明环境因素起重要作用^[1]。大气污染是目前我国面临的最为严峻的环境问题，其中大气细颗粒物($\text{PM}_{2.5}$)指粒径小于 $2.5 \mu\text{m}$ 的颗粒物，是空气质量的重要指标^[2]。 $\text{PM}_{2.5}$ 由于比表面积大，可携带多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)等大量有害物质，能直接进入循环系统，并透过血胎屏障，影响胎儿发育^[2-3]。多项流行病学研究表明， $\text{PM}_{2.5}$ 与先天性心脏病密切相关^[4-5]，动物实验也发现， $\text{PM}_{2.5}$ 引起斑马鱼^[6]和小鼠^[7]胚胎心脏发育异常。鉴于苯并芘等PAH物质的心脏致畸性，有理由认为 $\text{PM}_{2.5}$ 有机组分中的PAH在心脏发育毒性中起重要作用^[8-9]。

芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)是属于碱性螺旋-环-螺旋蛋白超家族的转录因子，结合二噁英或PAH配体后可以从细胞质转运入细胞核中，与芳香烃受体核转位蛋白形成异二聚体，调控下游靶基因表达^[10-11]。城市大气 $\text{PM}_{2.5}$ 有机提取物(extractable organic matter, EOM)中富含苯并芘等PAH类物质。本课题组先前的研究表明，在斑马鱼胚胎和小鼠畸胎瘤细胞P19中EOM能激活AhR信号通路，进而引起心脏畸形和心肌细胞分化异常^[12-14]，但分子机制有待进一步阐明。

小分子核糖核酸(microRNAs, miRNAs)是一类小非编码RNA，在基因表达的转录后调控中发挥重要作用^[15]。miRNAs参与调节众多生物学过程，如细胞分化、凋亡和增殖等，在心脏发育中起重要作用，而

miRNAs的异常表达与心肌细胞的异常分化和功能障碍有关^[16-17]。研究表明多个miRNAs表达可受AhR调控^[18]， $\text{PM}_{2.5}$ 染毒的斑马鱼胚胎中也发现多个miRNAs表达异常，其中miR-101a的表达降低最为显著^[19]。为此，本研究检测 $\text{PM}_{2.5}$ 中EOM染毒斑马鱼胚胎心脏中miR-101a的表达变化及AhR对其的调控，进一步探讨miR-101a可能通过哪些靶基因介导 $\text{PM}_{2.5}$ 的心脏发育毒性。

1 对象与方法

1.1 主要试剂、试剂盒与仪器

二氯甲烷及DMSO等主要试剂均为分析纯，购于国药集团化学试剂有限公司。AhR小分子抑制剂CH223191(CH, CAS 301326-22-7)购于美国MedChemExpress公司。台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司)，NanoDrop ND-2000分光光度计(美国Thermo公司)，体式显微镜(加拿大Optech公司)。

1.2 收集 $\text{PM}_{2.5}$ 及提取EOM

苏州市区 $\text{PM}_{2.5}$ 采集于2015年8月1—7日，EOM提取分析的具体过程见课题组之前报道^[12]。为除去膜内有机物污染，先在马弗炉中将47 mm石英膜 500°C 烘烤2 h。然后将石英膜置于天虹TH-150C $\text{PM}_{2.5}$ 采样器(中国武汉天虹仪表有限责任公司)中进行24 h不间断采样。干燥24 h后以分析天平定量。以索氏提取法用二氯甲烷为溶剂提取EOM，用旋转蒸发仪和氮吹仪浓缩吹干后溶解于DMSO中并在 -20°C 保存。EOM中可检测到10种美国环保署认定的优先控制PAH，总质量浓度为 $178.25 \text{ ng}\cdot\text{m}^{-3}$ ，其中苯并芘质量

浓度为 $24.64 \text{ ng} \cdot \text{m}^{-3}$, 具体见本课题组之前的报道^[12]。

1.3 斑马鱼胚胎染毒

野生 (AB 品系) 斑马鱼购自中国斑马鱼资源中心, 按照 1:1 雌雄比例将野生型斑马鱼成鱼饲养在循环水产养殖系统中, 水温 $(28 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 光照周期 14 h, 黑暗周期 10 h。将收集的斑马鱼胚胎按每组 100 个随机分至各玻璃培养皿中, 于受精后 2 h (hours post-fertilization, hpf) 内按具体组别加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EOM 及/或 $0.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AhR 小分子抑制剂 CH 进行染毒处理 (EOM 和 CH 浓度选择参见本实验室前期已发表的文章, 均对心脏畸形有明显效应且对胚胎存活的影响没有统计学意义^[12])。根据设置的不同组别补充 CH, 以 DMSO 为阴性照。保持各组中 DMSO 体积分数不大于 0.1% (此体积分数下 DMSO 对胚胎发育的影响没有统计学意义^[12])。之后将培养皿放置在恒温培养箱中, 温度 $(28 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 14 h 光照、10 h 黑暗, 使胚胎继续发育。每隔 24 h 定时更换斑马鱼胚胎系统培养水, 并重新加入各种药物进行染毒处理。收集 72 hpf 期胚胎在解剖镜下检测存活、心脏畸形, 并剖取各组斑马鱼胚胎心脏。本实验中所有动物程序均已通过苏州大学伦理委员会动物护理机构的审查及批准 (无编号)。

1.4 反义吗啉寡核苷酸 (morpholino, MO) 及 miR-101a 类似物 (agomir, Ago) 注射

用微型注射器 (Applied Scientific Instrumentation MPPI-3, Eugene, 美国) 将 MO (用于 AhR 基因敲减) 和 Ago (用于 miR-101a 过表达) 注射入 1~2 个细胞阶段的斑马鱼胚胎内。ahr2 (5'-TGTACCGATACCCGCCGACATGGTT-3') 由美国 Gene Tools 公司合成。miR-101a 类似物 (5'-UACAGUACUGUGAUAAACUGAAG-3' 和 5'-UCAGUUAUCACAGUACUGUAUU-3') 及非特异对照 miRNA 类似物 (5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' 和 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3') 由中国吉玛基因公司合成。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测 miRNA 及 mRNA 表达

每组取 100 个左右 72 hpf 斑马鱼胚胎心脏混合后, 以 TRNzol-A⁺ 总 RNA 提取试剂盒 (中国天根公司) 提取总 RNA, 用 NanoDrop ND-2000 分光光度计检测所提取的 RNA 纯度和浓度。分别用一步法 miRNA 反转录试剂盒 (中国 HaiGene 公司) 和 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (美国 Thermo 公司) 进行 miRNA 和 mRNA 的反转录。在 ABI QuantStudio 6 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo 公司) 上, 使用 FS

Universal SYBR Green Master mix (诺唯赞, 中国) 进行实时荧光定量 PCR。采用 U6 为 miRNA 表达对照, gapdh 和 elfa 为 mRNA 表达对照, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 中使用的基因引物序列

Table 1 Sequences of primers used in qPCR

基因 Gene	正向 Forward (5'-3')	反向 Reverse (5'-3')
U6	CTCGCTTCGGCCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT
miR-101a	GCGCAGTACAGTACTGTGA	GGTCCAGTTTTTTTTTTTCTCTCA
gapdh	GACGCTGGTGCTGGTATTGCT	CTACTCCTTGGAGGCCATGTGT
elfa	CTTCTCAGGCTGACTGTGC	CCGCTAGCATTACCTCC
gsk3 β	GAAGCCATTGCCTTGCTC	TGACATTGGTTCCCGCAGT
cdc42	ATACGTGGAATGCTCCGCTC	TTCCGTTTTGCTGCGTTTC

1.6 miRNA 靶基因预测

在线数据库 Targetscan 进行斑马鱼 miRNA 靶基因预测, 并以 DAVID 数据库对靶基因进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件, 以 one-way ANOVA 加 Turkey 事后检验方法进行多组统计分析。所有结果以均数 $\pm$ 标准误表示。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

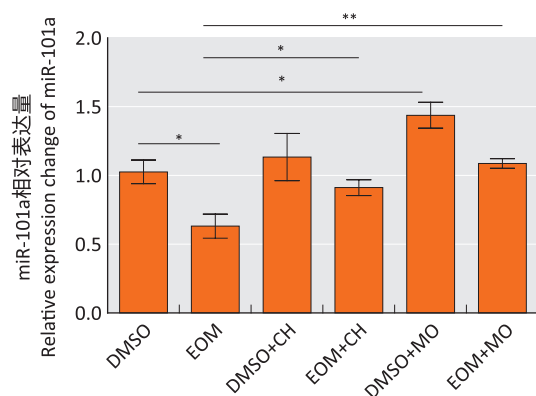
2 结果

2.1 PM_{2.5} 中 EOM 通过 AhR 降低斑马鱼胚胎心脏中 miR-101a 表达

以 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ EOM 染毒斑马鱼胚胎, 发现心脏中 miR-101a 的表达下降至对照组的 60% 左右 ($P<0.05$), 而 AhR 小分子抑制剂 CH ($0.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可拮抗 EOM 所致的 miR-101a 表达下降 ($P<0.05$)。进一步以 AhR 特异性的 MO 敲减 AhR, 发现敲减 AhR 同样拮抗 EOM 引起的 miR-101a 表达降低 ($P<0.05$)。此外, 敲减 AhR 本身增加了斑马鱼胚胎心脏中 miR-101a 的表达 (1.5 倍左右, $P<0.05$) (图 1)。

2.2 miR-101a 类似物减轻 PM_{2.5} 中 EOM 引起的斑马鱼胚胎心脏畸形

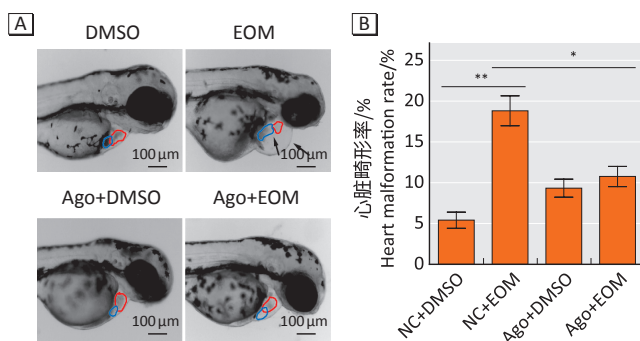
EOM 组中观察到的心脏畸形主要有心包水肿和心脏线性化等 (图 2A), EOM 提高了斑马鱼胚胎心脏畸形率 (由 5% 升至 18% 左右, $P<0.05$) (图 2B)。miR-101a 类似物抑制 EOM 引起的心脏畸形率升高 (由 19% 降至 11% 左右, $P<0.05$), 但仍高于 DMSO 对照组 (图 2B)。



[注] EOM: 5 mg·L⁻¹; CH: 0.05 μmol·L⁻¹; MO: *ahr2* 反义吗啉寡核苷酸。每组胚胎数大于 100 至少独立重复 3 次。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。
[Note] EOM: 5 mg·L⁻¹; CH: CH223191 0.05 μmol·L⁻¹; MO: *ahr2* morpholino. For each group $n > 100$ with at least 3 independent replications. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

图 1 受精后 72 h 斑马鱼胚胎中抑制 AhR 可拮抗 EOM 所致 miR-101a 表达降低

Figure 1 EOM-induced decrease of miR-101a expression attenuated by AhR inhibition in zebrafish embryos at 72 hpf



[注] A: 受精后 72 h 斑马鱼胚胎代表性图像。实线标注心房 (红色) 和心室 (蓝色)。箭头所示为心包水肿和心脏线性化。B: 心脏畸形率。NC: 非特异 miRNA 类似物对照; Ago: miR-101a 类似物。每组胚胎数大于 100, 至少独立重复 3 次。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

[Note] A: Representative images of zebrafish embryos at 72 hpf. Dotted lines mark atrium (red) and ventricle (blue). Arrows indicate pericardial edema and heart linearization; B: Heart malformation rate. NC: Non-specific miRNA agomir control; Ago: miR-101a agomir. For each group $n > 100$ with at least 3 independent replications. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

图 2 受精后 72 h 斑马鱼胚胎的心脏畸形

Figure 2 Heart malformation of zebrafish embryos at 72 hpf

2.3 miR-101a 介导 PM_{2.5} 中 EOM 对心脏发育关键基因的调控

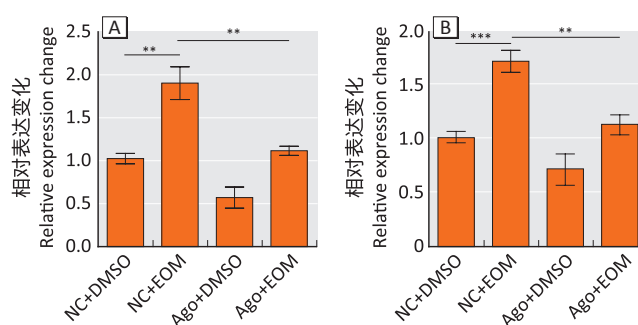
对 miR-101a 的靶基因预测结果进行 KEGG 分析, 发现 FoxO 及 Wnt 等信号通路富集, 表 2 列出了部分富集程度高的信号通路。进一步检测了 Wnt 通路基因 *gsk3β* 及 Rho 家族小分子鸟苷酸三磷酸酶 *cdc42* 的表达。如图 3 所示, EOM 引起斑马鱼胚胎心脏中 *gsk3β* mRNA 表达升高约 1.9 倍 ($P < 0.01$), *cdc42* mRNA 表达升高约 1.7 倍 ($P < 0.01$), 而注射 miR-101a 类似物具有

拮抗作用 ($P < 0.01$)。

表 2 miR-101a 靶基因预测结果 KEGG 分析 ($n=556$)

Table 2 KEGG analysis of predicted miR-101a target genes ($n=556$)

信号通路 Signaling pathway	基因数目 Count	百分比/% Percentage/%	p
FoxO	13	2.3	0.005
Wnt	12	2.2	0.011
ErbB	9	1.6	0.016
MAPK	17	3.0	0.025
GnRH	9	1.6	0.025
Insulin resistance	9	1.6	0.044
Regulation of actin cytoskeleton	14	2.5	0.059



[注] A: *gsk3β* 基因; B: *cdc42* 基因; NC: 非特异 miRNA 类似物对照; Ago: miR-101a 类似物。每组胚胎数大于 100, 至少独立重复 3 次。*: $P < 0.01$, **: $P < 0.001$ 。

[Note] A: *gsk3β*; B: *cdc42*; NC: Non-specific miRNA agomir control; Ago: miR-101a agomir. For each group $n > 100$ with at least 3 independent replications. *: $P < 0.01$, **: $P < 0.001$.

图 3 受精后 72 h 斑马鱼胚胎心脏中 miR-101a 对 Wnt 通路基因 mRNA 表达的影响

Figure 3 Effects of miR-101a on mRNA expression of genes involved in Wnt signaling pathway in zebrafish embryonic heart at 72 hpf

3 讨论

miRNA 在心脏发育中起关键调控作用, 环境化学物可以通过 miRNA 的异常表达导致心脏畸形^[1]。本课题组之前报道了三氯乙烯引起斑马鱼胚胎心脏中 miR-133a 表达降低, 导致心脏发育异常^[20]。近期有研究发现 PM_{2.5} 染毒的斑马鱼胚胎中也发现多个 miRNA 表达异常, 其中 miR-101a 的表达降低最为显著^[19]。miR-101a 在心脏的纤维化中起着不可或缺的作用^[17], 其过表达可抑制 AMI 大鼠心肌细胞凋亡^[21]。由于之前的研究仅检测整体胚胎的 miRNA 表达变化^[19], 本研究中剖取斑马鱼胚胎心脏并提取总 RNA, 检测 miR-101a 在心脏中的特异表达。本研究发现 PM_{2.5} 中的 EOM 引起斑马鱼胚胎心脏畸形, 同时抑制 miR-101a 在心脏中的表达, 这与整体胚胎中的结果一致^[19]。进一步发现 miR-101a 类似物拮抗 EOM 所致的心脏畸形, 表

明 miR-101a 的异常低表达在 EOM 的斑马鱼胚胎心脏发育毒性中起重要作用。

城市 PM_{2.5} 的 EOM 中富含苯并芘等 PAH 类物质,能有效激活 AhR^[22]。激活的 AhR 可作为转录因子调控 miRNA 表达,如小鼠肺组织中 AhR 受香烟烟雾激活后调控多个 miRNA 表达,导致氧化应激和细胞凋亡^[23]。本研究通过添加 AhR 小分子抑制剂和 AhR 基因敲减,表明 PM_{2.5} 中 EOM 对 miR-101a 的表达调控受 AhR 介导;下一步研究将用双荧光报告酶系统验证 miR-101a 是否为 AhR 的直接靶基因。

Wnt 通路是心肌细胞分化的关键信号通路。本课题组之前的研究报道了大气 PM_{2.5} 激活 AhR 后抑制 Wnt 通路,导致斑马鱼胚胎心脏发育的关键基因表达异常^[12],但 PM_{2.5} 激活 AhR 后对 Wnt 通路的具体调控机制尚不明确。本研究发现 miR-101a 的预测靶基因中有包括 *gsk3β* 在内的多个 Wnt 通路基因,同时 miR-101a 类似物拮抗 PM_{2.5} 中 EOM 引起的 *gsk3β* 表达异常。因此,PM_{2.5} 中 EOM 激活 AhR 后,可能通过 miR-101a 干扰 Wnt 通路基因表达。

cdc42 是目前被了解的最为清楚的一种 Rho 家族小分子鸟苷酸三磷酸酶,对心脏发育过程中心肌细胞增殖及细胞间黏附有重要作用^[24]。本研究结果表明 PM_{2.5} 中 EOM 可能通过 miR-101a 引起 *cdc42* 的异常表达,导致心脏发育异常。miR-101a 靶基因预测还发现 FoxO 及 MAPK 等信号通路,它们在心脏发育中也有重要作用,是下一步研究的重点。

本研究中斑马鱼胚胎心脏畸形率等统计虽有一定人为偏倚及随机误差,但每次样本量一般超过 100,有 3 次以上独立重复,且心脏畸形有两人共同认定,这些都减少了偏差。对于基因表达检测,由于是每组大约 100 个胚胎的混合后提取总 RNA,这增加了研究的可重复性。

总之,本研究表明在斑马鱼胚胎中 PM_{2.5} 中 EOM 激活 AhR 后抑制 miR-101a 表达,干扰 Wnt 信号通路,从而导致心脏发育异常。下一步研究将验证 AhR 对 miR-101a 的具体抑制机制,miR-101a 是否直接调控 *gsk3β* 等 Wnt 通路基因表达,以及 FoxO 等信号通路的作用。

参考文献

- [1] VECOLI C, PULIGNANI S, FOFFA I, et al. Congenital heart disease : the crossroads of genetics, epigenetics and environment [J]. Curr Genomics, 2014, 15 (5) : 390-399.
- [2] World Health Organization (WHO). Ambient (outdoor) air pollution [EB/OL]. [2020-10-31]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/en/>.
- [3] HUHTA J, LINASK K K. Environmental origins of congenital heart disease : the heart-placenta connection [J]. Semin Fetal Neonatal Med, 2013, 18 (5) : 245-250.
- [4] ZHANG B, YANG S, ZHAO J, et al. Maternal exposure to air pollutant PM_{2.5} and PM₁₀ during pregnancy and risk of congenital heart defects [J]. J Expo Sci Environ Epidemiol, 2016, 26 (4) : 422-427.
- [5] HUANG CC, CHEN BY, PAN SC, et al. Prenatal exposure to PM_{2.5} and congenital heart diseases in Taiwan [J]. Sci Total Environ, 2019, 655 : 880-886.
- [6] DUAN J, HU H, ZHANG Y, et al. Multi-organ toxicity induced by fine particulate matter PM_{2.5} in zebrafish (*Danio rerio*) model [J]. Chemosphere, 2017, 180 : 24-32.
- [7] TANWAR V, ADELSTEIN JM, GRIMMER JA, et al. PM_{2.5} exposure in utero contributes to neonatal cardiac dysfunction in mice [J]. Environ Pollut, 2017, 230 : 116-124.
- [8] HUANG MC, CHEN FY, CHOU MT, et al. Fluoranthene enhances p53 expression and decreases mutagenesis induced by benzo [a] pyrene [J]. Toxicol Lett, 2012, 208 (3) : 214-224.
- [9] KNECHT AL, GOODALE BC, TRUONG L, et al. Comparative developmental toxicity of environmentally relevant oxygenated PAHs [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 271 (2) : 266-275.
- [10] KAWAJIRI K, FUJII-KURIYAMA Y. The aryl hydrocarbon receptor : a multifunctional chemical sensor for host defense and homeostatic maintenance [J]. Exp Anim, 2017, 66 (2) : 75-89.
- [11] BILLIARD SM, TIMME-LARAGY AR, WASSENBERG DM, et al. The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish [J]. Toxicol Sci, 2006, 92 (2) : 526-536.
- [12] ZHANG H, YAO Y, CHEN Y, et al. Crosstalk between AhR and wnt/β-catenin signal pathways in the cardiac developmental toxicity of PM_{2.5} in zebrafish embryos [J]. Toxicology, 2016, 355-356 : 31-38.
- [13] YUE C, JI C, ZHANG H, et al. Protective effects of folic acid on PM_{2.5}-induced cardiac developmental toxicity in zebrafish

- embryos by targeting AhR and Wnt/ β -catenin signal pathways [J]. *Environ Toxicol*, 2017, 32 (10) : 2316-2322.
- [14] CHEN T, JIN H, WANG H, et al. Aryl hydrocarbon receptor mediates the cardiac developmental toxicity of EOM from PM_{2.5} in P19 embryonic carcinoma cells [J]. *Chemosphere*, 2019, 216 : 372-378.
- [15] BOON RA, DIMMELER S. MicroRNAs in myocardial infarction [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2015, 12 (3) : 135-142.
- [16] CHEN Y, ZHAO Y, CHEN W, et al. MicroRNA-133 overexpression promotes the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells on acute myocardial infarction [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8 (1) : 268.
- [17] PAIVA S, AGBULUT O. MiRroring the multiple potentials of microRNAs in acute myocardial infarction [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2017, 4 : 73.
- [18] MULERO-NAVARRO S, FERNANDEZ-SALGUERO P M. New trends in aryl hydrocarbon receptor biology [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4 : 45.
- [19] DUAN J, YU Y, LI Y, et al. Comprehensive understanding of PM_{2.5} on gene and microRNA expression patterns in zebrafish (*Danio rerio*) model [J]. *Sci Total Environ*, 2017, 586 : 666-674.
- [20] HUANG Y, JIANG B, XIA Y, et al. Downregulation of miR-133a contributes to the cardiac developmental toxicity of trichloroethylene in zebrafish [J]. *Chemosphere*, 2020, 251 : 126610.
- [21] ZHOU F Q, ZHAO X F, LIU F Y, et al. MiR-101a attenuates myocardial cell apoptosis in rats with acute myocardial infarction via targeting TGF- β /JNK signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23 (10) : 4432-4438.
- [22] JAYASUNDARA N, VAN TIEM GARNERL, MEYER J N, et al. AHR2-mediated transcriptomic responses underlying the synergistic cardiac developmental toxicity of PAHs [J]. *Toxicol Sci*, 2015, 143 (2) : 469-481.
- [23] ROGERS S, DE SOUZA AR, ZAGO M, et al. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) -dependent regulation of pulmonary miRNA by chronic cigarette smoke exposure [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 : 40539.
- [24] LI J, LIU Y, JIN Y, et al. Essential role of Cdc42 in cardiomyocyte proliferation and cell-cell adhesion during heart development [J]. *Dev Biol*, 2017, 421 (2) : 271-283.

(英文编辑：汪源；责任编辑：汪源)

(上接第 335 页)

- LYU S J. Effects of exposure to benzo (α) pyrene during pregnancy on neurobehavior and *BDNF* gene 5hmc in offspring rats [D]. Taiyuan : Shanxi Medical University, 2019.
- [10] O'BRIEN J L, LANGLOIS P H, LAWSON C C, et al. Maternal occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and craniosynostosis among offspring in the National Birth Defects Prevention Study [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2016, 106 (1) : 55-60.
- [11] LANGLOIS P H, HOYT A T, DESROSIERS T A, et al. Maternal occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and small for gestational age offspring [J]. *Occup Environ Med*, 2014, 71 (8) : 529-35.
- [12] ROTHMAN N, CORREA-VILLASEÑOR A, FORD D P, et al. Contribution of occupation and diet to white blood cell polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in wildland firefighters [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1993, 2 (4) : 341-347.
- [13] WAKX A, NEDDER M, TOMKIEWICZ-RAULET C, et al. Expression, localization, and activity of the aryl hydrocarbon receptor in the human placenta [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (12) : 3762.
- [14] LARIGOT L, JURICEK L, DAIROU J, et al. AhR signaling pathways and regulatory functions [J]. *Biochim Open*, 2018, 7 : 1-9.
- [15] SHARMA N, POLLINA E A, NAGY M A, et al. ARNT2 tunes activity-dependent gene expression through NCoR2-mediated repression and NPAS4-mediated activation [J]. *Neuron*, 2019, 102 (2) : 390-406.e9.
- [16] PRUUNSILD P, SEPP M, ORAV E, et al. Identification of cis-elements and transcription factors regulating neuronal activity-dependent transcription of human *BDNF* gene [J]. *J Neurosci*, 2011, 31 (9) : 3295-3308.

(英文编辑：汪源；责任编辑：汪源)