专栏：芳香烃受体的毒作用机制
Special column: Toxic mechanism of aryl hydrocarbon receptors

芳香烃受体介导双酚A致斑马鱼胚胎发育毒性

王伟，何梦婷，许洁，张洁

苏州大学医学部公共卫生学院卫生毒理学教研室，江苏 苏州 215123

摘要：

[背景] 双酚A（BPA）在生命早期暴露会导致发育毒性，芳香烃受体（AhR）能够调控各种发育和生理功能，研究发现BPA可使其激活。

[目的] 以斑马鱼作为模式动物，研究AhR在BPA所致斑马鱼胚胎发育毒性中的作用。

[方法] 将斑马鱼胚胎随机分为8组进行染毒，分别为DMSO对照组、AhR抑制剂CH223191（CH）对照组、BPA暴露组（1、5、25 μmol·L^{-1}）、CH+BPA（1、5、25 μmol·L^{-1}）组。染毒时间为受精后2 h（2 hpf）至受精后96 h（96 hpf），分别观察斑马鱼胚胎的死亡率、孵化率、畸形率、心率、体长及运动能力。通过荧光定量PCR方法检测AhR相关基因（*ahr2*、*cyp1a1*、*cyp1b1*）、心脏发育关键基因（*nkx2.5*、*sox9b*）、神经发育关键基因（*elavl3*、*gfap*、*mbp*、*syn2a*）、氧化应激相关基因（*nrf2*、*sod1/2*、*ho1*、*nqo1*）的表达。

[结果] 与DMSO对照组相比，25 μmol·L^{-1} BPA暴露组斑马鱼胚胎出现孵化延迟、心率下降、畸形率升高，5 μmol·L^{-1}和25 μmol·L^{-1} BPA暴露组出现死亡率增加、体长缩短以及运动距离下降的现象（$P<0.05$）。与相应BPA暴露组相比，CH+25 μmol·L^{-1} BPA组斑马鱼的心率、畸形率、运动能力和CH+5 μmol·L^{-1} BPA组及CH+25 μmol·L^{-1} BPA组的体长均有所恢复（$P<0.05$）。但孵化率和死亡率并未受CH影响。荧光定量PCR结果表明，BPA组AhR相关基因（*ahr2*、*cyp1a1*和*cyp1b1*）的表达上调（$P<0.05$）；CH联合处理后能降低各BPA组*ahr2*、*cyp1a1*基因的过表达及25 μmol·L^{-1} BPA组*cyp1b1*的过表达（$P<0.05$）。心脏发育相关基因（*nkx2.5*和*sox9b*）的表达分别在25 μmol·L^{-1}和5、25 μmol·L^{-1} BPA组出现下调（$P<0.05$）；CH联合处理后上述基因的低表达恢复（$P<0.05$）。神经发育相关基因*elavl3*在25 μmol·L^{-1} BPA组出现下调，*gfap*和*syn2a*在5、25 μmol·L^{-1} BPA组出现下调，*mbp*在各BPA组均出现下调（$P<0.05$）；CH联合处理后上述基因的低表达恢复（$P<0.05$）。BPA暴露后氧化应激相关基因的表达也出现改变，其中*nrf2*在25 μmol·L^{-1} BPA组出现上调，*sod1*、*ho1*和*nqo1*在5、25 μmol·L^{-1} BPA组出现上调，*sod2*在各BPA组均出现上调（$P<0.05$）；CH干预后这些基因的表达均恢复到正常水平（$P<0.05$）。

[结论] BPA可能通过激活AhR，上调*cyp1a1*和*cyp1b1*基因的表达，增强活性氧的产生，从而导致斑马鱼胚胎的发育毒性。

关键词：双酚A；芳香烃受体；氧化应激；斑马鱼；发育毒性

Aryl hydrocarbon receptor-mediated developmental toxicity in zebrafish embryos induced by bisphenol A

WANG Wei, HE Mengting, XU Jie, ZHANG Jie (Department of Health Toxicology, School of Public Health, Medical College of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

Abstract:

[Background] Exposure to bisphenol A (BPA) in the early life period can induce developmental toxicity. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) can regulate various developmental and physiological functions, and can be activated by BPA.

[Objective] This experiment uses zebrafish as a model animal to study the role of AhR in the developmental toxicity of zebrafish embryos induced by BPA.

[Methods] Zebrafish embryos were randomly divided into eight groups: DMSO control group, AhR inhibitor CH223191 (CH) control group, BPA exposure groups (1, 5, and 25 μmol·L^{-1}), and CH+BPA (1, 5, and 25 μmol·L^{-1}) groups. The exposure period was from 2 h post-fertilization (2 hpf) to 96 h post-fertilization (96 hpf). The mortality, hatching rate, malformation rate, heart rate, body length, and locomotor ability of zebrafish embryos were evaluated. The expressions of AhR-related genes (*ahr2*, *cyp1a1*, and *cyp1b1*), cardiac development-related genes (*nkx2.5* and *sox9b*), and neurodevelopment-related genes (*elavl3*, *gfap*, *mbp*, and *syn2a*), and reactive oxygen

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20505

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（81673203）

作者简介
共同第一作者。
王伟（1992—），男，硕士生；
E-mail：804434214@qq.com
何梦婷（1995—），女，硕士生；
E-mail：2872489764@qq.com

通信作者
张洁，E-mail：zhangjie_78@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 2021-03-02

文章编号 2095-9982(2021)04-0342-08
中图分类号 R114
文献标志码 A

▸引用
王伟，何梦婷，许洁，等. 芳香烃受体介导双酚A致斑马鱼胚胎发育毒性 [J]. 环境与职业医学，2021，38（4）：342-349.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20505

Funding
This study was funded.

Correspondence to
ZHANG Jie, E-mail: zhangjie_78@suda.edu.cn

Ethics approval Obtained
Competing interests None declared
Received 2020-10-31
Accepted 2021-03-02

▸To cite
WANG Wei, HE Mengting, XU Jie, et al. Aryl hydrocarbon receptor-mediated developmental toxicity in zebrafish embryos induced by bisphenol A[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(4): 342-349.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20505

species-related genes (*nrf2*, *sod1*, *sod2*, *ho1*, and *nqo1*) were detected by fluorescence quantitative PCR.

[Results] Compared with the DMSO control group, the zebrafish embryos in the 25 μmol·L^{-1} BPA group had delayed hatching, decreased heart rate, and elevated malformation rate, and the 5 μmol·L^{-1} and 25 μmol·L^{-1} groups showed shortened body length, increased mortality, and decreased movement distance ($P<0.05$). Compared with corresponding BPA exposure groups, the heart rate, malformation rate, and locomotor ability of the zebrafish in the CH+25 μmol·L^{-1} BPA group, and the body length of the CH+5 μmol·L^{-1} BPA group and the CH+25 μmol·L^{-1} BPA group all recovered ($P<0.05$). However, the hatching rate and mortality rate were not affected by CH. The results of fluorescence quantitative PCR showed that AhR-related genes (*ahr2*, *cyp1a1*, and *cyp1b1*) were up-regulated in the BPA groups ($P<0.05$), and CH combined treatment reduced the overexpression of *ahr2* and *cyp1a1* in each BPA group and *cyp1b1* in the 25 μmol·L^{-1} BPA group ($P<0.05$). The expression of cardiac development-related gene *nkx2.5* was down-regulated in the 25 μmol·L^{-1} BPA group and that of *sox9b* was down-regulated in the 5 and 25 μmol·L^{-1} BPA groups, respectively ($P<0.05$), and the expressions were recovered after the CH combined treatment ($P<0.05$). The neurodevelopment-related gene *elavl3* was down-regulated in the 25 μmol·L^{-1} BPA group ($P<0.05$), *gfap* and *syn2a* were down-regulated in the 5 and 25 μmol·L^{-1} BPA groups ($P<0.05$), and *mbp* was down-regulated in all BPA groups ($P<0.05$) ; the above genes were recovered after the CH combined treatment ($P<0.05$). The expressions of reactive oxygen species-related gene *nrf2* was up-regulated in the 25 μmol·L^{-1} BPA group, *sod1*, *ho1*, and *nqo1* were up-regulated in the 5 and 25 μmol·L^{-1} BPA groups, and *sod2* was up-regulated in all BPA groups ($P<0.05$) ; after the CH treatment, the expressions of these genes returned to normal levels ($P<0.05$).

[Conclusion] BPA may activate AhR, up-regulate the expressions of *cyp1a1* and *cyp1b1* genes, and enhance the production of ROS, leading to the developmental toxicity in zebrafish embryos.

Keywords: bisphenol A; aryl hydrocarbon receptor; zebrafish; oxidative stress; developmental toxicity

环境内分泌干扰物双酚A（bisphenol A，BPA）被广泛应用于制造多种生活日用品，包括罐头食品包装、婴儿奶瓶、医疗器械等。据统计，每年约有超过100 t BPA制品释放到环境中，它们可通过直接接触，迁移至食物或饮品中，或扩散到水源或空气中，最终对生物体和生态环境造成破坏[1-2]。一项对普通美国居民的调查发现，他们尿液中BPA检出率高达93%[3]，而我国一般人群中BPA的暴露情况也十分普遍[4]。需要注意的是，BPA可以穿过胎盘屏障[5]，75%的母乳以及93%的新生儿尿液中也能检测到BPA[6]。因此，BPA暴露（尤其是生命早期暴露）对于人类健康的影响不容忽视。研究发现妊娠期小鼠BPA暴露能增加子代小鼠成年后尤其是雌鼠的焦虑水平，并且减少小鼠成年后的探索行为及增加抑郁行为[7]。围产期低剂量BPA暴露能改变子代大鼠的大脑神经发育[8-9]。BPA处理斑马鱼胚胎后通过介导氧化应激和DNA修复障碍导致斑马鱼胚胎发育毒性，出现运动行为异常等变化[10-11]。Kim等[12]发现，斑马鱼暴露于BPA后出现血清素能、多巴胺能、胆碱能和γ-氨基丁酸能等神经递质的高积累和随之而来的失调，从而导致斑马鱼的运动行为异常。除此之外，BPA暴露也会引起斑马鱼甲状腺功能紊乱，从而导致胚胎发育异常[13-15]。多个出生队列研究显示孕期BPA暴露与儿童的行为异常[16]及神经发育[17]相关。因此，阐明BPA早期暴露所致发育毒性的机制显得尤为重要。

芳香烃受体（aryl hydrocarbon receptor，AhR）是碱性螺旋-环-螺旋超家族中一类配体依赖性的转录激活因子，可以被包括某些多环芳香烃在内的多种环境化学物质激活[18]，进入细胞核与AhR核异位蛋白形成异二聚体，与下游调控基因的二噁英反应元件相结合，诱导I相和II相外源化学物代谢酶的表达，参与多种毒性反应。最近研究表明，三氯乙烯可以通过激活AhR，诱导细胞凋亡和氧化应激，进而导致斑马鱼的发育毒性[19]。Nakamura等[20]研究发现，BPA可以通过激活AhR和雌激素受体，从而诱导nrf2相关药物代谢酶的异常。Meng等[21]发现，围产期小鼠暴露于BPA后，可能通过激活TLR4/NF-κB和AhR通路引起炎症反应，从而降低雄性后代的精子生成能力和提高精子畸形率。那么，AhR是否可以介导BPA所致胚胎发育毒性？

斑马鱼因其生殖能力强，生长周期短，身体透明易观察等特点，逐渐成为毒理学研究的理想动物模型。本研究以斑马鱼作为模式动物，运用AhR抑制剂CH223191（CH），通过观察斑马鱼幼鱼运动能力、死亡率、畸形率、孵化率、心脏毒性以及相关基因表达来探讨AhR在BPA所致发育毒性中的作用。

1 对象与方法

1.1 实验动物与试剂

实验用AB系野生型斑马鱼鱼卵（木芮生物科技有限公司，中国）。BPA、AhR抑制剂CH223191（CH）（Sigma-Aldrich公司，美国），二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）（国药集团化学试剂有限公司，中国）。

1.2 主要仪器

体式显微镜（Olympus公司，日本），Zebrabox斑马

鱼行为追踪分析仪（ViewPoint 公司，法国），NanoDrop 2000 分光光度计（Thermo Fisher 公司，美国），荧光定量 PCR 仪（ABI 公司，美国）。

1.3 实验方法

1.3.1 斑马鱼胚胎染毒实验 根据实验室前期 BPA 半数致死浓度的实验结果以及选择合适的死亡率和畸形率以便后续实验的进行，故选择 1/2 LC_{50}，即 25 μmol·L^{-1} BPA[10]。用 DMSO 配制 1、5、25 μmol·L^{-1} 的 BPA 工作液以及 0.5 μmol·L^{-1} 的 CH 工作液，用锡纸包好后 -20℃冰箱避光保存备用。将受精后 2 h（2 hours post-fertilization，2 hpf）大小均一的健康斑马鱼受精卵随机放入 6 孔板中，每孔放置 30 只鱼卵。每孔的液体总体积为 3 mL，按照 1 000∶1 的比例将 BPA 和 CH 加入 6 孔板中。分组情况为 DMSO 对照组，CH 对照组，1、5、25 μmol·L^{-1} BPA 染毒组，以及 1 μmol·L^{-1} BPA+CH、5 μmol·L^{-1} BPA+CH、25 μmol·L^{-1} BPA+CH 干预组，同步设置 3 个平行组。将 6 孔板置于标准培养环境中，保持 28.5℃恒温，14 h∶10 h 光 - 暗周期。每天更换培养液，直至 96 hpf。每天定时观察，及时挑除死鱼，并记录死亡数。在 72 hpf 记录斑马鱼的孵化数，在 96 hpf 时记录斑马鱼的畸形数、死亡数、心率，以及镜下测量斑马鱼的体长。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）。

1.3.2 幼鱼行为运动能力测试 在 96 hpf 时，将观察后的幼鱼用卵水清洗两次，然后全部更换为卵水继续培养至 120 hpf。分别从 8 组中随机取 12 条无畸形的幼鱼置于 96 孔板中，每孔 1 条，加入 200 μL 卵水，保证幼鱼可以自由游动。将 96 孔板放置于 Zebrabox 斑马鱼行为追踪分析仪中，设置仪器每 20 min 照明与 20 min 黑暗交替出现，重复 140 min，开始记录前适应 20 min。记录 120 min 内幼鱼的游动距离。

1.3.3 引物设计及合成 本研究所用引物均根据相关序列用软件 Primer5 设计，并通过 Blast（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/）检验其保守性。检测基因包括心脏发育关键基因（*nkx2.5*、*sox9b*）、神经发育关键基因（*elavl3*、*gfap*、*mbp*、*syn2a*）、氧化应激相关基因（*nrf2*、*sod1/2*、*ho1*、*nqo1*），引物序列见表 1。

1.3.4 斑马鱼胚胎总 RNA 提取及基因检测 每个组收取≥20 个胚胎，使用 Trizol 法提取总 RNA。逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA 后，向 cDNA 中加入 SYBR green 以及正向、反向引物进行实时定量 PCR 实验。结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析目的基因表达的相对差异。正常状态下斑马鱼在 72 hpf 时完成孵化，此时心脏发育已趋完善。96 hpf 时斑马鱼的整体发育已基本完成，并且 96 hpf 为暴露终点，因此主要检测该点的发育指标和基因表达。

表 1 本研究中荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 The sequence of qPCR primers in this study

引物名称 Primer	引物序列（Sequence）（5′-3′）	
	正向（Forward）	反向（Reverse）
β-actin	ACGAACGACCAACCTAAACTCT	TTAGACAACTACCTCCCTTTGC
ahr2	GGGAAGGTGGTTCTTGGCTAC	CTCCTGTCTTTATCATTCTGATGTGGTT
cyp1a1	GCATTACGATACGTTCGATAAGGAC	GCTCCGAATAGGTCATTGACGAT
cyp1b1	AGTGTGTTGCTGTCGCTGATG	GAGAACGGACCCGGTACCA
nkx2.5	GCATCAGAGCTTGGTGAACA	ATGCGCACGCATAAACATTA
sox9b	TGACGAGTTGTTCTCCAGAG	AGGCCACACGTCTATAACCC
elavl3	GTCAGAAAGACATGGAGCAGTTG	GAACCGAATGAAACCTACCCC
gfap	AGTACCAGGACCTGCTCAA	ACAGTTCGCACAACTATGCT
mbp	AATCAGCAGGTTCTTCGGAGGAGA	AAGAAATGCACGACAGGGTTGACG
syn2a	GTGACCATGCCAGCATTTC	TGGTTCTCCACTTTCACCTT
sod1	GTCCGCACTTCAACCCTCA	CCCAAGTCATCCTCCTTCTCAT
sod2	GCTTGGGATAGATGTCTGGG	CTTGGAAACGCTCGCTGA
nqo1	CTCTGACAAAGAAAGGCTACA	CACAAAGTGCTCGGGATT
nrf2	GACAAAATCGGCGACAAAAT	TTAGGCCATGTCCACACGTA

1.4 统计学分析

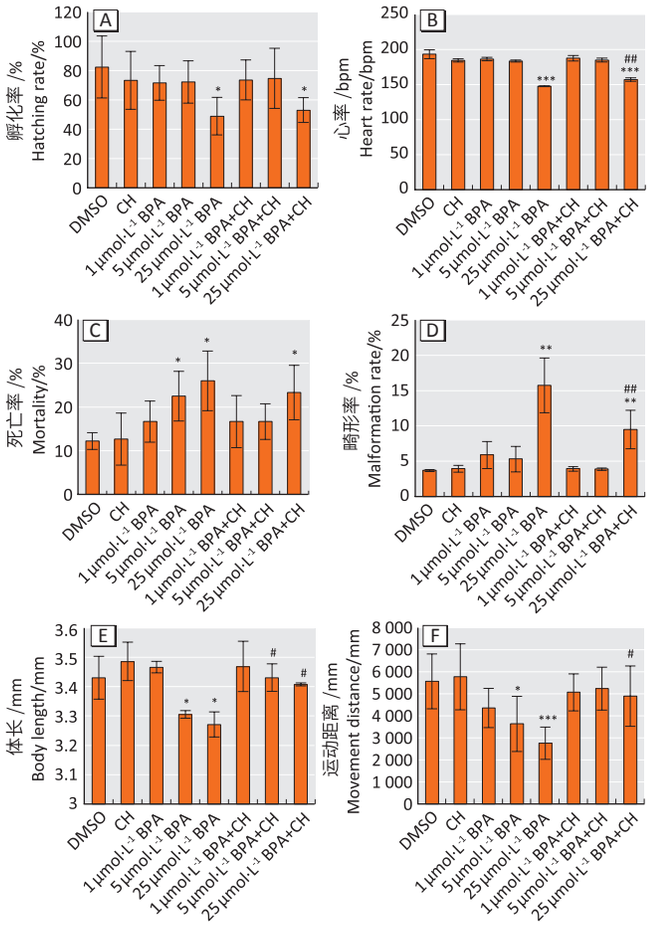
死亡率、畸形率、孵化率、体长以及运动能力测试的实验数据通过 Office 2016 Excel 处理，计量结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析，根据方差齐性结果，如果方差齐，两两比较采用 LSD-t 检验；如果方差不齐，两两比较则采用 Dunnet-t' 检验。检验水准为 α=0.05。

2 结果

2.1 BPA 和 CH 暴露对斑马鱼胚胎发育的影响

72 hpf 时，与 DMSO 对照组相比，25 μmol·L^{-1} BPA 染毒组和 25 μmol·L^{-1} BPA+CH 组斑马鱼孵化率分别下降 33.6% 和 29.4%（P<0.05），且该 CH 组与染毒组差异无统计学意义（P>0.05）（图 1A）。96 hpf 时，与 DMSO 对照组相比，25 μmol·L^{-1} BPA 组和 25 μmol·L^{-1} BPA+CH 组斑马鱼的心率分别下降 23.6% 和 18.7%（P<0.001），但 25 μmol·L^{-1} BPA+CH 组心率高于 25 μmol·L^{-1} BPA 组（P<0.01）（图 1B）。96 hpf 时，5、25 μmol·L^{-1} BPA 组及 25 μmol·L^{-1} BPA+CH 组斑马鱼胚胎的死亡率较 DMSO 对照组分别升高 10.3%、13.8% 和 11.1%（P<0.05），且 25 μmol·L^{-1} BPA+CH 组与 25 μmol·L^{-1} BPA 染毒组差异无统计学意义（P>0.05）（图 1C）。96 hpf 时，25 μmol·L^{-1} BPA 染毒组与 25 μmol·L^{-1} BPA+CH 组斑马鱼的畸形率较 DMSO 对照组分别升高 12.0% 和 5.8%（P<0.01），但 25 μmol·L^{-1} BPA+CH 组畸形率低于 25 μmol·L^{-1} BPA 染毒组（P<0.01）

（图1D）。与DMSO对照组相比，斑马鱼胚胎的体长在5、25 μmol·L^{-1} BPA染毒组分别缩短3.6%和4.6%（$P<0.05$）；而BPA+CH组的体长大于相应的BPA染毒组（$P<0.05$），且与DMSO对照组相比差异无统计学意义（$P>0.05$）（图1E）。120 hpf时行为检测发现，5、25 μmol·L^{-1} BPA染毒组斑马鱼的运动距离较对照组分别降低34.7%和50.4%，25 μmol·L^{-1} BPA+CH组运动距离高于25 μmol·L^{-1} BPA组（$P<0.05$），该CH组与DMSO对照组相比差异无统计学意义（$P>0.05$）（图1F）。



［注］A. 72 hpf；B~E. 96 hpf；F. 120 hpf。与DMSO组比较，*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，***：$P<0.001$；BPA组与相同浓度BPA+CH联合暴露组比较，#：$P<0.05$，##：$P<0.01$。

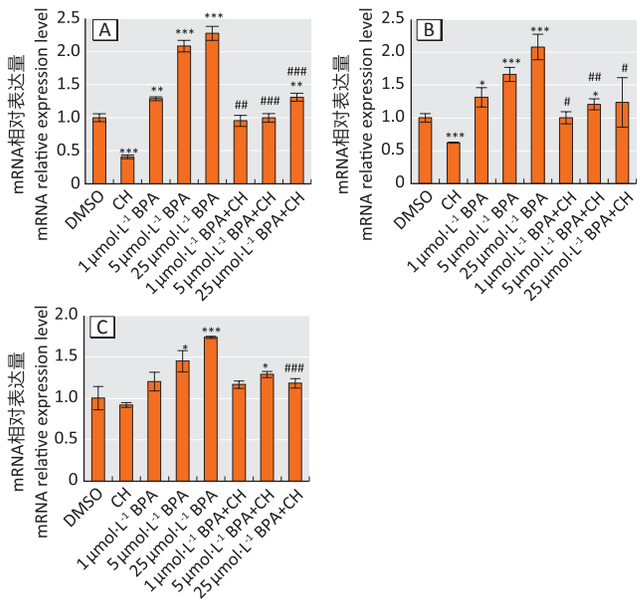
［Note］A. 72 hpf; B-E. 96 hpf; F. 120 hpf. Compared with the DMSO group, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$. Compared between BPA groups and corresponding BPA+CH combined exposure groups, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$.

图1 BPA和CH暴露对斑马鱼胚胎发育的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Figure 1 The effects of BPA and CH exposure on zebrafish embryo development ($\bar{x}\pm s$, n=3)

2.2 BPA和CH暴露对斑马鱼胚胎AhR信号通路相关基因表达的影响

如图2所示，在BPA暴露96 hpf后，与DMSO对照组相比，AhR受体基因*ahr2*的表达在各BPA染毒组及25 μmol·L^{-1} BPA+CH组均上调，各CH组的表达均低于相应BPA染毒组（$P<0.01$），其中1、5 μmol·L^{-1} BPA+CH组与DMSO对照组相比差异无统计学意义（$P>0.05$）。下游代谢酶CYP基因*cyp1a1*在各染毒组也均上调，各CH组的表达均低于相应BPA染毒组（$P<0.05$），其中1、25 μmol·L^{-1} BPA+CH组与DMSO组相比差异无统计学意义（$P>0.05$）。*cyp1b1*在5、25 μmol·L^{-1} BPA染毒组及5 μmol·L^{-1} BPA+CH组表达上调，25 μmol·L^{-1} BPA+CH组的表达低于25 μmol·L^{-1} BPA染毒组（$P<0.05$），且该CH组与DMSO对照组相比差异无统计学意义（$P>0.05$）。



［注］A. *ahr2*；B. *cyp1a1*；C. *cyp1b1*。与DMSO组比较，*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，***：$P<0.001$；BPA组与相同浓度BPA+CH联合暴露组比较，#：$P<0.05$，##：$P<0.01$。

［Note］A. *ahr2*; B. *cyp1a1*; C. *cyp1b1*. Compared with the DMSO group, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$. Compared between BPA groups and corresponding BPA+CH combined exposure groups, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$.

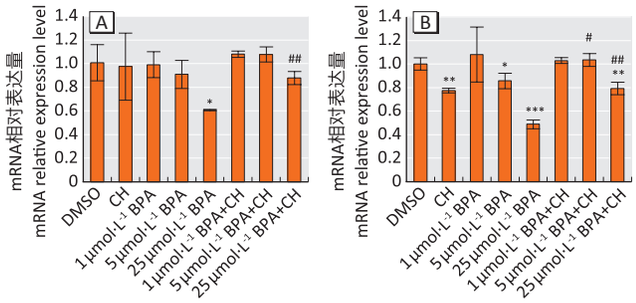
图2 BPA和CH暴露对斑马鱼胚胎AhR信号通路相关基因表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Figure 2 The effects of BPA and CH exposure on the expressions of genes related to AhR signaling pathway in zebrafish embryos ($\bar{x}\pm s$, n=3)

2.3 BPA和CH暴露对斑马鱼胚胎心脏发育相关基因表达的影响

如图3所示，在BPA暴露96 hpf后，与DMSO对照组相比，*nkx2.5*基因表达量在25 μmol·L^{-1} BPA染毒组下调39.7%，25 μmol·L^{-1} BPA+CH组的表达高于相应染毒组（$P<0.05$），且该CH组与DMSO对照组差异无统计学意义（$P>0.05$）。*sox9b*基因表达量则在5、25 μmol·L^{-1} BPA染毒组及25 μmol·L^{-1} BPA+CH组分别下调14.4%、51.2%和20.7%（$P<0.05$），且5、25 μmol·L^{-1} BPA+CH组的表达均高于相应染毒组（$P<0.05$），而其

中 5 μmol·L^{-1} BPA+CH 组与 DMSO 对照组相比无统计学意义（P>0.05）。



［注］A. *nkx2.5*；B. *sox9b*。与 DMSO 组比较，*：P<0.05，**：P<0.01，***：P<0.001；BPA 组与相同浓度 BPA+CH 联合暴露组比较，#：P<0.05，##：P<0.01。

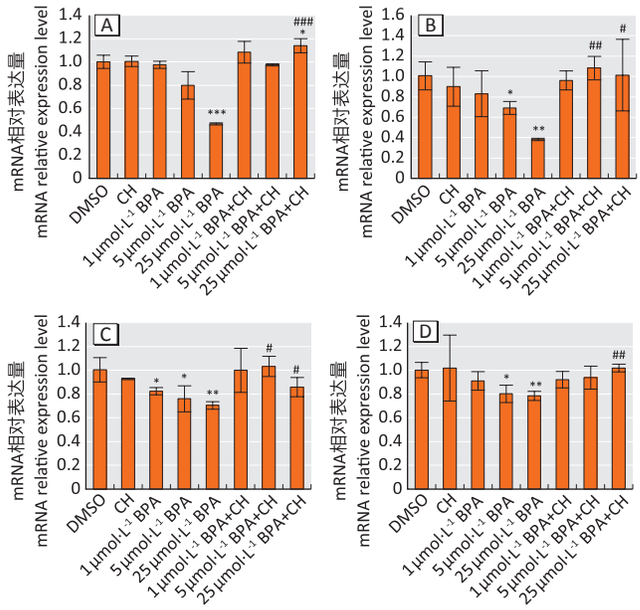
［Note］A. *nkx2.5*; B. *sox9b*. Compared with the DMSO group, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001. Compared between BPA groups and corresponding BPA+CH combined exposure groups, #: P<0.05, ##: P<0.01.

图 3 BPA 和 CH 暴露对斑马鱼胚胎心脏发育相关基因表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Figure 3 The effects of BPA and CH exposure on the expressions of genes related to zebrafish cardiac development ($\bar{x}\pm s$, n=3)

2.4 BPA 和 CH 暴露对斑马鱼胚胎神经发育相关基因表达的影响

如图 4 所示，在 BPA 暴露 96 hpf 后，*elavl3* 的基因表达在 25 μmol·L^{-1} BPA 染毒组下调 53.1%，且相应 CH 组的表达高于染毒组和 DMSO 对照组（P<0.001）。*gfap* 和 *mbp* 基因表达在 5、25 μmol·L^{-1} BPA 染毒组较 DMSO 对照组均出现下调，并且 *mbp* 在 1 μmol·L^{-1} BPA 染毒组也出现下调，相应 CH 组的表达均高于染毒组（P<0.05），且与 DMSO 对照组相比差异无统计学意义（P>0.05）。*syn2a* 基因表达在 5、25 μmol·L^{-1} BPA 染毒组均下调，25 μmol·L^{-1} BPA+CH 组基因表达高于相应染毒组（P<0.05），且与 DMSO 对照组组相比差异无统计学意义（P>0.05）。



［注］A. *elavl3*；B. *gfap*；C. *mbp*；D. *syn2a*。与 DMSO 组比较，*：P<0.05，**：P<0.01，***：P<0.001；BPA 组与相同浓度 BPA+CH 联合暴露组比较，#：P<0.05，##：P<0.01。

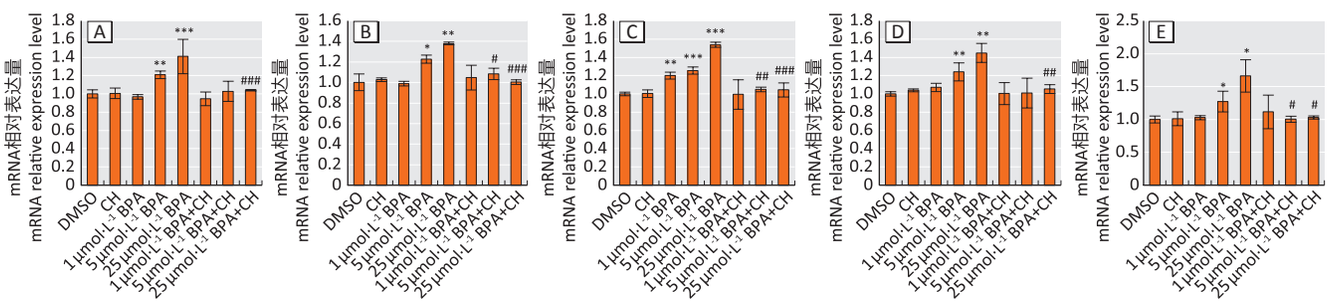
［Note］A. *elavl3*; B. *gfap*; C. *mbp*; D. *syn2a*. Compared with the DMSO group, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001. Compared between BPA groups and corresponding BPA+CH combined exposure groups, #: P<0.05, ##: P<0.01.

图 4 BPA 和 CH 暴露对斑马鱼胚胎神经发育相关基因表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Figure 4 The effects of BPA and CH exposure on the expressions of genes related to zebrafish neurodevelopment ($\bar{x}\pm s$, n=3)

2.5 BPA 和 CH 暴露对斑马鱼胚胎氧化应激相关基因表达的影响

如图 5 所示，在 BPA 暴露 96 hpf 后，*nrf2* 基因表达在 5、25 μmol·L^{-1} BPA 染毒组较 DMSO 对照组分别上调 20.9% 和 40.9%，25 μmol·L^{-1} BPA+CH 组基因表达低于相应染毒组（P<0.01），且与 DMSO 组无统计学差异（P>0.05）。*sod1* 和 *sod2* 基因表达在 5、25 μmol·L^{-1} BPA 染毒组均出现上调，其中 *sod2* 基因表达在 1 μmol·L^{-1}



［注］A. *nrf2*；B. *sod1*；C. *sod2*；D. *ho1*；E. *nqo1*。与 DMSO 组比较，*：P<0.05，**：P<0.01，***：P<0.001；BPA 组与相同浓度 BPA+CH 联合暴露组比较，#：P<0.05，##：P<0.01。

［Note］A. *nrf2*; B. *sod1*; C. *sod2*; D. *ho1*; E. *nqo1*. Compared with the DMSO group, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001. Compared between BPA groups and corresponding BPA+CH combined exposure groups, #: P<0.05, ##: P<0.01.

图 5 BPA 和 CH 暴露对斑马鱼胚胎氧化应激相关基因表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Figure 5 The effects of BPA and CH exposure on the expressions of genes related to zebrafish reactive oxygen species ($\bar{x}\pm s$, n=3)

BPA 染毒组也出现上调（$P<0.05$）；且 5、25 μmol·L^{-1} BPA+CH 组的 *sod1* 和 *sod2* 基因表达均低于各自 BPA 染毒组（$P<0.05$），并与 DMSO 对照组相比差异无统计学意义（$P>0.05$）。*ho1* 和 *nqo1* 基因在 5、25 μmol·L^{-1} BPA 组出现过表达（$P<0.05$）；*ho1* 在 25 μmol·L^{-1} BPA+CH 组表达低于相应 BPA 组，且与 DMSO 对照组相比差异统计学意义（$P>0.05$）；*nqo1* 在 5、25 μmol·L^{-1} BPA+CH 组表达均低于各自 BPA 染毒组（$P<0.05$），并与 DMSO 对照组相比差异无统计学意义（$P>0.05$）。

3 讨论

作为一种内分泌干扰物，BPA 在低浓度暴露时会干扰动物正常的内分泌功能，导致其生长发育异常[22]。本研究发现 BPA 胚胎期暴露可导致斑马鱼的发育毒性，表现为死亡率和畸形率增加，孵化延迟，体长和心率下降，运动能力下降。用 CH 干预后，心率和畸形率都较相应 BPA 染毒组有所改善，并且体长和运动距离都恢复到了正常水平，表明 AhR 信号通路的激活参与了 BPA 所致斑马鱼胚胎的发育毒性。目前，关于 BPA 毒作用的机制主要包括影响内分泌功能、雌激素受体介导的通路、拮抗雄激素受体介导的通路、组织内的酶等。

AhR 在无脊椎动物中仅具有生理功能，而在脊椎动物中能够结合二噁英类物质。哺乳动物仅有 *ahr1*，而斑马鱼中有两个 AhR 基因，且 *ahr2* 是主要的效应基因。研究表明 AhR 可以通过上调代谢酶细胞色素酶 P4501a1 和细胞色素酶 P4501b1 来诱导活性氧（reactive oxygen species，ROS）的产生[23-24]，本研究发现 BPA 暴露后 *ahr2* 以及下游代谢酶基因 *cyp1a1* 和 *cyp1b1* 均上调，而 CH 可使其恢复正常。上述结果表明 BPA 暴露后，会引起 AhR 通路的活化，这与 Nakamura 等[20]研究结果一致。

Wnt/β-catenin 通路在心脏发育中起着至关重要的作用[25]，β-catenin 的靶基因 *nkx2.5* 和 *sox9b* 是心脏发育的关键转录因子。研究表明，*nkx2.5* 基因突变后会导致斑马鱼心脏畸形的发生[26]，而 *sox9b* 的缺失会导致斑马鱼心脏畸形，如心包水肿和心脏肿大[27]。与 Huang 等[28]研究结果一致，本研究中，在 BPA 暴露后斑马鱼心脏出现发育异常并且 *nkx2.5* 和 *sox9b* 的基因表达出现下调；在用 CH 干预后，*nkx2.5* 和 *sox9b* 的下调均得到了较好的逆转。在斑马鱼早期发育过程中，光暗交替刺激下的自由运动距离下降表明 BPA 引起斑马鱼脊柱运动神经元、肌肉或神经肌肉接头潜在结构或功能问题。神经系统特异性 RNA 结合蛋白 elavl3 是斑马鱼早期神经元的标志基因，是神经元分化和维持中重要的 elavl 样基因家族成员之一[29]。作为中间丝结构蛋白家族成员的 gfap 在分化胶质细胞方面有很高的表达[30]，其在中枢神经系统的放射状胶质细胞和星形胶质细胞中有高表达。研究发现，当斑马鱼胚胎暴露于磷酸三苯酯后，*elavl3* 基因表达水平下降，使得斑马鱼胚胎出现神经发育毒性[31]。当大鼠在产前和产后早期暴露于铅时，由于神经发育受损，导致 *gfap* 表达下降。与此相同的是，在某些神经发育阶段暴露于铅的斑马鱼表现出 *gfap* 表达缺乏[32]。髓鞘碱性蛋白 MBP 则是髓鞘形成的生物标志物，而突触蛋白 SYN2A 是一种神经磷蛋白质，在突触形成和神经递质释放过程中发挥重要作用[33]。GU 等[34]发现斑马鱼胚胎早期暴露于双酚 S 后行为异常，*mbp* 和 *syn2a* 基因表达下调，进而导致斑马鱼胚胎的神经发育紊乱。FU 等[35]也发现斑马鱼暴露于 BPA 后 *mbp* 和 *syn2a* 的基因和蛋白表达下调，胚胎出现神经发育毒性，进而导致运动能力的下降。本研究的结果与上述研究结果一致，当斑马鱼胚胎暴露于 BPA 后出现运动能力的下降，基因检测发现神经发育相关基因 *elavl3*、*gfap*、*mbp* 和 *syn2a* 均出现不同程度的下调。使用 CH 进行干预后，这些基因的表达基本回到正常水平，并且运动能力也回到正常水平。

氧化应激被认为是肝脏、心血管和神经系统等靶器官的药物诱发毒性机制之一[36]。最近研究表明，AhR 的激活可能通过上调 CYP 代谢酶的表达和释放过氧化物 / 过氧化氢来引起 ROS 的产生[37-38]。另外，CH 可以减弱颗粒物和苯并[*a*]芘引起的 ROS 产量增加[39-40]。转录因子核因子红细胞 2 相关因子被广泛认为是细胞抗氧化应激的关键因素[41]，并通过多种途径调节抗氧化防御系统，从而影响 ROS 的稳态[42]。本研究结果显示 BPA 暴露后，*nrf2* 基因的表达出现上调。Nrf2 下游抗氧化相关基因（*sod1*、*sod2*、*ho1*、*nqo1*）的表达也出现了上调，表明 *nrf2* 通路被激活，CH 的干预使得这些基因回到正常水平。Jin 等[19]发现用三氯乙烯处理斑马鱼后，通过 AhR 通路介导了氧化应激，从而导致斑马鱼胚胎心脏发育毒性，并且使用 CH 后可挽救该毒性作用。

以上结果表明，BPA 可能通过激活 AhR，然后使得 *cyp1a1* 和 *cyp1b1* 过表达增强 ROS 的产生，从而导致斑

马鱼胚胎的发育毒性（见补充材料 http: //www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20505）。该研究中仍有一些不足：一是 BPA 激活 AhR 的机制还需要深入探讨；二是死亡率和孵化率并未受到 CH 挽救以及有些毒性表型未能完全挽救，这可能是由于还有别的途径导致这些毒性作用，还需要进一步进行研究。

参考文献

[1] HUANG YQ，WONG CK，ZHENG JS，et al. Bisphenol A（BPA）in China：a review of sources，environmental levels，and potential human health impacts [J]. Environ Int，2012，42：91-99.

[2] HENGSTLER JG，FOTH H，GEBEL T，et al. Critical evaluation of key evidence on the human health hazards of exposure to bisphenol A [J]. Crit Rev Toxicol，2011，41（4）：263-291.

[3] CALAFAT AM，YE X，WONG LY，et al. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-*tertiary*-octylphenol：2003-2004 [J]. Environ Health Perspect，2008，116（1）：39-44.

[4] NING G，BI Y，WANG T，et al. Relationship of urinary bisphenol A concentration to risk for prevalent type 2 diabetes in Chinese adults：a cross-sectional analysis [J]. Ann Intern Med，2011，155（6）：368-374.

[5] VANDENBERG LN，HAUSER R，MARCUS M，et al. Human exposure to bisphenol A（BPA）[J]. Reprod Toxicol，2007，24（2）：139-177.

[6] IKEZUKI Y，TSUTSUMI OT，TAKAI Y，et al. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure [J]. Hum Reprod，2002，17（11）：2839-2841.

[7] XU X，HONG X，XIE L，et al. Gestational and lactational exposure to bisphenol-A affects anxiety- and depression-like behaviors in mice [J]. Horm Behav，2012，62（4）：480-490.

[8] JAŠAREVIĆ E，WILLIAMS SA，VANDAS GM，et al. Sex and dose-dependent effects of developmental exposure to bisphenol A on anxiety and spatial learning in deer mice（*Peromyscus maniculatus bairdii*）offspring [J]. Horm Behav，2013，63（1）：180-189.

[9] LEE BE，PARK H，HONG YC，et al. Prenatal bisphenol A and birth outcomes：MOCEH（Mothers and Children's Environmental Health）study [J]. Int J Hyg Environ Health，2014，217（2/3）：328-334.

[10] 郭依晨，韩静静，严锐，等. 双酚A胚胎期暴露对斑马鱼的发育毒性及运动行为的影响 [J]. 毒理学杂志，2018，32（2）：152-155.

GUO YC，HAN JJ，YAN R，et al. Effects of bisphenol A on the developmental toxicity and behavior of zebrafish embryo [J]. J Toxicol，2018，32（2）：152-155.

[11] WANG X，DONG Q，CHEN Y，et al. Bisphenol A affects axonal growth，musculature and motor behavior in developing zebrafish [J]. Aquat Toxicol，2013，142-143：104-113.

[12] KIM SS，HWANG KS，YANG JY，et al. Neurochemical and behavioral analysis by acute exposure to bisphenol A in zebrafish larvae model [J]. Chemosphere，2020，239：124751.

[13] CHAN WK，CHAN KM. Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in zebrafish embryo-larvae following waterborne exposure to BDE-47，TBBPA and BPA [J]. Aquat Toxicol，2012，108：106-111.

[14] GUO Y，CHEN L，WU J，et al. Parental co-exposure to bisphenol A and nano-TiO_2 causes thyroid endocrine disruption and developmental neurotoxicity in zebrafish offspring [J]. Sci Tot Environ，2019，650：557-565.

[15] GIBERT Y，SASSI-MESSAI S，FINI JB，et al. Bisphenol A induces otolith malformations during vertebrate embryogenesis [J]. BMC Dev Biol，2011，11：4.

[16] BRAUN JM，KALKBRENNER AE，CALAFAT AM，et al. Impact of early-life bisphenol A exposure on behavior and executive function in children [J]. Pediatrics，2011，128（5）：873-882.

[17] YOLTON K，XU Y，STRAUSS D，et al. Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and infant neurobehavior [J]. Neurotoxicol Teratol，2011，33（5）：558-566.

[18] ANDERSSON E，ROTANDER A，VON KRONHELM T，et al. AhR agonist and genotoxicant bioavailability in a PAH-contaminated soil undergoing biological treatment [J]. Environ Sci Pollut Res Int，2009，16（5）：521-530.

[19] JIN H，JI C，REN F，et al. AHR-mediated oxidative stress contributes to the cardiac developmental toxicity of trichloroethylene in zebrafish embryos [J]. J Hazard Mater，2020，385：121521.

[20] NAKAMURA M，YAMANAKA H，OGURO A，et al. Bisphenol A induces Nrf2-dependent drug-metabolizing enzymes through nitrosylation of Keap1 [J]. Drug Metab Pharmacokinet，2018，33（4）：194-202.

[21] MENG Y，LIN R，WU F，et al. Decreased capacity for sperm production induced by perinatal bisphenol A Exposure is associated with an increased inflammatory response in the offspring of C57BL/6 male mice [J]. Int J Environ Res Public

Health，2018，15（10）：2158.

[22] 国先芬，王贻鑫，耿存珍，等. 环境激素双酚A的毒理学研究进展[J]. 环境科学与技术，2013，36（2）：86-92，99.
GUO X F，WANG Y X，GENG C Z，et al. Progress on toxicological effect of environmental endocrine biophenol A [J]. Environ Sci Technol，2013，36（2）：86-92，99.

[23] GREEN R M，HODGES N J，CHIPMAN J K，et al. Reactive oxygen species from the uncoupling of human cytochrome P450 1B1 may contribute to the carcinogenicity of dioxin-like polychlorinated biphenyls [J]. Mutagenesis，2008，23（6）：457-463.

[24] YAGHINI F A，SONG C Y，LAVRENTYEV E N，et al. Angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell migration and growth are mediated by cytochrome P450 1B1-dependent superoxide generation [J]. Hypertension，2010，55（6）：1461-1467.

[25] THURSTON G D，BURNETT R T，TURNER M C，et al. Ischemic heart disease mortality and long-term exposure to source-related components of U.S. fine particle air pollution [J]. Environ Health Perspect，2016，124（6）：785-794.

[26] Ren F，Ji C，Huang Y，et al. AHR-mediated ROS production contributes to the cardiac developmental toxicity of $PM_{2.5}$ in zebrafish embryos [J]. Sci Total Environ，2020，719：135097.

[27] FAJERSZTAJN L，SALDIVA P，PEREIRA L A，et al. Short-term effects of fine particulate matter pollution on daily health events in Latin America：a systematic review and meta-analysis [J]. Int J Public Health，2017，62（7）：729-738.

[28] HUANG Q，FANG C，CHEN Y，et al. Embryonic exposure to low concentration of bisphenol A affects the development of *Oryzias melastigma larvae* [J]. Environ Sci Pollut Res，2012，19（7）：2506-2514.

[29] VATINE G，VALLONE D，GOTHILF Y，et al. It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock [J]. FEBS Lett，2011，585（10）：1485-1494.

[30] ZIV L，LEVKOVITZ S，TOYAMA R，et al. Functional development of the zebrafish pineal gland：light-induced expression of period2 is required for onset of the circadian clock [J]. J Neuroendocrinol，2005，17（5）：314-320.

[31] 彭涛，王思思，任琳，等. 磷酸三苯酯对斑马鱼早期生命阶段的神经毒性研究[J]. 生态毒理学报，2016，11（1）：254-260.
PENG T，WANG S S，REN L，et al. Neurotoxicity of triphenyl phosphate on the early life stages of zebrafish [J]. Asian J Ecotoxicol，2016，11（1）：254-260.

[32] WEGER B D，SAHINBAS M，OTTO G W，et al. The light responsive transcriptome of the zebrafish：function and regulation [J]. PLoS One，2011，6（2）：e17080.

[33] FAN C Y，COWDEN J，SIMMONS S O，et al. Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening [J]. Neurotoxicol Teratol，2010，32（1）：91-98.

[34] GU J，ZHANG J，CHEN Y，et al. Neurobehavioral effects of bisphenol S exposure in early life stages of zebrafish larvae（Danio rerio）[J]. Chemosphere，2019，217：629-635.

[35] FU J，GUO Y，YANG L，et al. Nano-TiO_2 enhanced bioaccumulation and developmental neurotoxicity of bisphenol a in zebrafish larvae [J]. Environ Res，2020，187：109682.

[36] DEAVALL D G，MARTIN E A，HORNER J M，et al. Drug-induced oxidative stress and toxicity [J]. J Toxicol，2012，2012：645460.

[37] TAKEI K，HASHIMOTO-HACHIYA A，TAKAHARA M，et al. Cynaropicrin attenuates UVB-induced oxidative stress via the AhR-Nrf2-Nqo1 pathway [J]. Toxicol Lett，2015，234（2）：74-80.

[38] ZHOU B，WANG X，LI F，et al. Mitochondrial activity and oxidative stress functions are influenced by the activation of AhR-induced CYP1A1 overexpression in cardiomyocytes [J]. Mol Med Rep，2017，16（1）：174-180.

[39] CHIBA T，UCHI H，TSUJI G，et al. Arylhydrocarbon receptor（AhR）activation in airway epithelial cells induces MUC5AC via reactive oxygen species（ROS）production [J]. Pulm Pharmacol Ther，2011，24（1）：133-140.

[40] HARMON A C，HEBERT V Y，CORMIER S A，et al. Particulate matter containing environmentally persistent free radicals induces AhR-dependent cytokine and reactive oxygen species production in human bronchial epithelial cells [J]. PLoS One，2018，13（10）：e0205412.

[41] MOTOHASHI H，YAMAMOTO M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism [J]. Trends Mol Med，2004，10（11）：549-557.

[42] MA Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol，2013，53：401-426.

（英文编辑：汪源；责任编辑：汪源）