

邻苯二甲酸二丁酯暴露下大型溞miR-34和Bcl-2基因的表达和功能分析

张 泽, 张琪琛, 魏 杰, 张 晶, 周 妍, 王 媛*

辽宁省省级高校水生生物学重点实验室, 大连海洋大学, 辽宁 大连

收稿日期: 2022年5月23日; 录用日期: 2022年6月20日; 发布日期: 2022年6月30日

摘 要

本文旨在探究miR-34靶基因的功能及邻苯二甲酸二丁酯(Dinbutyl phthalate, DBP)暴露下大型溞miR-34与其靶基因Bcl-2的表达调控关系。首先利用miRbase数据库、Clustal W和MEGA7.0软件分析各物种miR-34序列的保守性; 其次通过Targetscan和miRanda分析miR-34的靶基因, 并运用GO和KEGG进行miR-34靶基因的功能富集分析; 最后采用实时荧光定量PCR方法检测大型溞在环境浓度6 mg/L DBP暴露24 h和48 h后, 大型溞miR-34及其靶基因Bcl-2的表达变化。结果显示, miR-34序列在物种进化过程中具有高度保守性, 13个物种的序列有17个碱基完全一致。miR-34靶基因的GO和KEGG的功能聚类分析发现, 这些靶基因参与多个信号通路, 主要富集在细胞内转录调控、信号转导和胞吞作用等生物学过程中。DBP暴露48 h大型溞miR-34的相对表达水平明显上调, 靶基因Bcl-2的mRNA相对表达则相反, 表明大型溞miR-34与Bcl-2的负调控关系。结果提示miR-34可能在大型溞对DBP毒性作用的响应过程中发挥作用, 其中miR-34可通过调控Bcl-2的表达水平来影响大型溞细胞的生命活动。这对于分析水生无脊椎动物在毒性胁迫时的调节应对机制有一定的借鉴作用。

关键词

大型溞, miR-34, Bcl-2, 邻苯二甲酸二丁酯, 基因富集分析

Expression and Function Analysis of miR-34 and Bcl-2 Gene in *Daphnia magna* Exposed to Dibutyl Phthalate

Ze Zhang, Qichen Zhang, Jie Wei, Jing Zhang, Yan Zhou, Yuan Wang*

Key Laboratory of Hydrobiology in Liaoning Province, Dalian Ocean University, Dalian Liaoning

Received: May 23rd, 2022; accepted: Jun. 20th, 2022; published: Jun. 30th, 2022

*通讯作者。

文章引用: 张泽, 张琪琛, 魏杰, 张晶, 周妍, 王媛. 邻苯二甲酸二丁酯暴露下大型溞 miR-34 和 Bcl-2 基因的表达和功能分析[J]. 海洋科学前沿, 2022, 9(2): 118-127. DOI: 10.12677/ams.2022.92013

Abstract

The purpose of this study was to investigate the function of miR-34 targeted genes and the expression and regulation relationship between miR-34 and its target gene Bcl-2 in *Daphnia magna* exposed to Dibutyl phthalate (DBP). Firstly, miRbase database, Clustal W and MEGA7.0 software were used to analyze the sequence conservation of miR-34 in various species. The target genes of miR-34 were analyzed by Targetscan and miRanda. The functional enrichment analysis of miR-34 target genes was performed using GO and KEGG. Finally, real-time quantitative PCR method was used to detect the expression changes of miR-34 and its target gene Bcl-2 in *D. magna* exposed to environmental concentration of 6 mg/L DBP for 24 h and 48 h. The results showed that the miR-34 sequence was highly conserved during species evolution. The sequences of 13 species have 17 bases identical. GO and KEGG functional clustering analysis of miR-34 target genes found that these target genes were involved in multiple signaling pathways. The main biological processes analyzed for GO enrichment are intracellular transcriptional regulation, signal transduction and endocytosis. The relative expression level of miR-34 was significantly up-regulated in *Daphnia magna* after DBP exposure for 48 h. The relative mRNA expression of the target gene Bcl-2 was opposite. It indicated the negative regulation relationship between miR-34 and Bcl-2 in *D. magna*. The results suggest that miR-34 may play a role in the response of *D. magna* to DBP toxicity. Among them, miR-34 affects the life activities of cells by regulating the expression level of Bcl-2. This has a certain reference for studying the regulatory response mechanism of aquatic invertebrates under toxic stress.

Keywords

Daphnia magna, miR-34, Bcl-2, Dibutyl Phthalate, Gene Enrichment Analysis

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

邻苯二甲酸二丁酯(Dibutyl phthalate, DBP)的广泛应用使其成为一种常见的水体有机污染物。例如近些年我国珠江河口检测到水体中 DBP 含量为 14.8 $\mu\text{g/L}$ [1], 2014 年检测到长江干流江苏段的 DBP 含量为 5.54 $\mu\text{g/L}$ [2], 均超过了中国地表水环境质量标准(饮用水质量标准, GB 5749-2006)规定的地表水中该化学品的上限值(3.0 $\mu\text{g/L}$)。研究表明 DBP 对于水生生物具有一定的毒性作用, 例如氧化损伤[3]、生殖毒性[4] [5]、胚胎致畸作用[6] [7]、脂质代谢紊乱[8]等。课题组前期研究证实 DBP 对大型溞的生殖毒性及跨代效应, 且对成溞和幼溞均有明显的急性毒性, 氧化应激是 DBP 引起大型溞幼溞和成溞死亡的原因之一[9] [10]。近年来 DBP 对水生生物的毒性研究受到了广泛的重视。

MicroRNA (miRNA)作为生物体内对基因表达起转录后调控作用的短链 RNA, 可参与在环境胁迫条件下水生生物基因信号转导通路的调节, 维持有机体生命过程的稳态[11]。例如在重金属镉的胁迫作用下, 鲤鱼肾脏内的 miR-155 和 miR-181a 表达量上升, 经验证 miR-155 与 HO-1 基因形成靶向关系, 启动鲤鱼机体的免疫调节机制以应对镉的毒性胁迫作用[12]。而在细菌激发或者热应激条件下, 牡蛎血细胞中免疫相关的 miRNA 表达量有所变化, 这些 miRNA 通过靶基因在一定程度上调节了机体细胞的氧化应激、细胞自噬和凋亡等信号途径, 从而增加了牡蛎的环境适应和抗病能力[13]。研究报道在氯吡硫磷暴露下, 鲤

鱼 miR-731 和 miR-2188-3p 通过靶向 TLR 基因, 调控细胞凋亡途径, 缓解了氯吡硫磷对鲤鱼机体的损伤[14]。上述研究说明, 水生动物对生物和非生物环境胁迫的响应是一个 miRNA-靶基因调控网络参与的错综复杂的过程。

MiR-34 作为近几年研究比较广泛的 miRNA 之一, 主要的研究仍然集中在哺乳动物之中, 例如小鼠的内皮祖细胞中 miR-34 的表达变化参与了新生血管的调节[15], 以及 miR-34 在人体胶质瘤、结直肠癌、骨肉瘤等肿瘤生物学的研究内容越加丰富[16] [17] [18]。B 淋巴细胞瘤 2 基因(Bcl-2)是 miR-34 的靶基因之一, 在机体细胞的生命活动中如细胞死亡、生长和发育、非生物和生物应激反应中的起到关键作用[19] [20]。Bcl-2 作为细胞凋亡家族中的一员, 具有抗凋亡作用, 其高表达可以抑制细胞凋亡, 反之其低表达可以促进细胞凋亡[21]。细胞凋亡对于生物在环境胁迫响应过程中机体稳态和生理活动的维持至关重要, 例如低氧胁迫降低了鲢心肌细胞中的 Bcl-2 表达, 导致心肌细胞凋亡, 造成心脏损伤甚至个体死亡; 急性高温胁迫 48 h 后大口黑鲈幼鱼肝脏中 Bcl-2 表达量仅为对照组的 0.04 倍, 造成细胞凋亡和一定程度的细胞坏死[22] [23] [24]。

然而, 环境应激条件下, 在水生动物中 miR-34 是否可以通过调控靶基因 Bcl-2 的表达, 影响机体的胁迫响应机制还未见报道。本研究对物种间 miR-34 序列的保守性及其靶基因功能进行分析, 并对 miR-34 在 DBP 暴露下大型蚤胁迫响应中的功能进行了初步探究, 以揭示大型蚤 miR-34 和 Bcl-2 基因在污染物毒性胁迫响应中的部分机制。

2. 材料与方法

2.1. 大型蚤的培养和药物处理

实验所用的大型蚤来自于山东省大汶河, 在辽宁省水生生物重点实验室培养。实验选取一只雌蚤, 将雌蚤孤雌生殖的首批幼蚤以密度为 30 ± 5 只/L 继续培养, 得到足够数量的同步蚤用于后续实验。使用溶解氧为 7.96 ± 0.5 mg/L, 培养液用 pH 为 7.80 ± 0.2 的脱氯自来水, 投喂密度为 $3\sim 4 \times 10^5$ cells/mL 的栅藻作为饵料。

设置 DBP 浓度为 6 mg/L 的药物处理组和对照组, 每组设置 4 个重复, 每个重复在 1000 mL 烧杯中放入 100 只大型蚤。实验过程中不投喂, 以确保实验条件的稳定。24 h 和 48 h 后将存活的大型蚤分别放入 1.5 ml 离心管中, 迅速用针管将里面的水分吸干。将离心管保存后用于后续实验分析。

2.2. miR-34 序列的保守性分析

大型蚤 miR-34 序列来自于课题组前期 DBP 暴露下大型蚤 miRNA 表达谱测序数据, 其序列为 UGGCAGUGUGGUUAGCUGGUUGU。在 miRbase 数据库(<http://mirbase.org>)中获得十二种生物(蚤状蚤、海蠕虫、文昌鱼、果蝇、斑马鱼、非洲爪蟾、马、白唇怪柳猴、山羊、原鸽、小鼠、人类)的 miR-34 序列, 将大型蚤等 13 个物种的 miR-34 序列利用 MEGA7.0 软件的 Cluster W 算法进行多序列比对。

2.3. miR-34 靶基因预测和富集分析

采用 TargetScan 和 miRanda 在线工具对 miR-34 进行靶基因分析, 设置限定条件, 在 TargetScan 算法中去除得分(context score percentile)小于 50 的靶基因, 在 miRanda 算法中去除最大自由能(Max Energy)大于 -10 的靶基因。取两款软件数据的交集作为最终确定的靶基因范围。

应用 GO 生物数据库对 miR-34 靶基因集合进行功能注释, 经显著性分析, 得到具有统计学意义的 GO 术语富集分析结果。利用 KEGG 数据库对于 miR-34 的靶基因集合进行代谢途径的通路富集分析, 可以呈现基因的代谢途径和催化过程中反应酶的注解。通过统计分析具有差异的 p 值, 得到具有统计学意

义的 KEGG 信号通路信息。

2.4. qPCR

总 RNA 的提取方式是按照 MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 试剂盒(宝生物工程大连有限公司)对样品进行匀浆、消化、离心、洗脱等操作,并检测 RNA 的浓度和质量水平。采用 Evo M-MLV RT Kit with gDNA Clean for qPCR 试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司)对大型蚤的总 RNA 进行反转录,得到 cDNA。miR-34 采用 miRNA 1st strand cDNA synthesis kit 试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司)进行反转录分析。

miR-34 的靶基因 Bcl-2 在 NCBI 中的序列号为: LOC116929975。运用 NCBI-Primer 设计特异性引物,miR-34 的内参基因为 U6 [25], 基因编号为 LOC116922842; Bcl-2 的内参基因为 Beta-actin [26], 基因编号为 LOC116919128。引物设计见表 1, 序列由生工生物工程(上海)完成。

Table 1. qPCR primer sequences

表 1. qPCR 引物序列

gene	Primer sequence (5'-3')
U6-F	CCCCATTTATGAAGGTTACGC
U6-R	CCTTGATGTCACGGACGATT
miR-34	CCGTGGCAGTGTGGTTAGCTGGTTGT
Beta-actin-F	CCCCATTTATGAAGGTTACGC
Beta-actin-R	CCTTGATGTCACGGACGATT
Bcl2-F	AGGCACCTAAGTGAGTCTCCA
Bcl-2-R	AGAAAACACTTGTGCCCCCA

miR-34 和 Bcl-2 的相对表达采用艾科瑞生物 SYBR® Green Premix Pro Taq HS q-PCR Kit II (Rox Plus) (湖南)进行检测。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析大型蚤 miR-34 和 Bcl-2 基因的相对表达量。

2.5. 数据处理

使用 Excel (T-test 检验)、SPSS 17.0 (one-way ANOVA)对所取得的数据进行显著性分析,基因表达量显著性范围设为 0.05, 差异极其显著为 0.01 (用**表示)。

3. 结果

3.1. miR-34 序列的保守性分析

大型蚤和从 miRbase 数据库获得蚤状蚤、海蠕虫、文昌鱼、果蝇、斑马鱼、非洲爪蟾、马、白唇怪柳猴、山羊、原鸽、小鼠、人类等 13 个物种的 miR-34 的序列见表 2。miR-34 对靶基因的作用是通过 miR-34 序列的 5'端种子序列(第 2-8 核苷酸)与靶基因 mRNA 的 3' UTR 区进行碱基配对来完成的,表 2 中黄色标记部分即各个物种 miR-34 的种子序列。

采用 MEGA7.0 的 Cluster W 算法对大型蚤等 13 个物种的 miR-34 的序列进行了多序列比对,结果显示在大型蚤中 miR-34 序列长度为 23 bp, 而其他十二种生物的 miR-34 序列长度为 22 bp 到 25 bp 不等,且 13 个物种的序列有 17 个碱基完全一致(图 1), 说明 miR-34 基因在生物进化过程中具有高度保守性。

Table 2. Mature sequences of miR-34 in thirteen species
表 2. 13 个物种中 miR-34 的成熟序列

物种 Species	名称 miRNA name	序列号 Serial number	保守序列 Conservative sequence	序列长度 Sequence length (bp)
大型溞 <i>Daphnia magna</i>	dma-miR-34	-----	U GGCAGUG UGGUUAGCUGGUUGU	23
蚤状溞 <i>Daphnia pulex</i>	dpu-miR-34	MIMAT0012663	U GGCAGUG UGGUUAGCUGGUUGUG	24
海蠕虫 <i>Capitella teleta</i>	cte-miR-34	MIMAT0009516	U GGCAGUG UGGUUAGCUGGUUGU	23
文昌鱼 <i>Branchiostoma floridae</i>	bfl-miR-34a	MIMAT0009475	U GGCAGUG UGGAUAGCUGGCCGUUU	25
果蝇 <i>Drosophila grimshawi</i>	dgr-miR-34	MIMAT0008619	U GGCAGUG UGGUUAGCUGGUUG	22
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	dre-miR-34a	MIMAT0001269	U GGCAGUG UCUUAGCUGGUUGU	22
非洲爪蟾 <i>Xenopus tropicalis</i>	xtr-miR-34a	MIMAT0003578	U GGCAGUG UCUUAGCUGGUUGUU	23
马 <i>Equus caballus</i>	eca-miR-34a	MIMAT0012917	U GGCAGUG UCUUAGCUGGUUGU	22
白唇怪柳猴 <i>Saguinus labiatus</i>	sla-miR-34a	MIMAT0002500	U GGCAGUG UCUUAGCUGGUUGU	22
山羊 <i>Capra hircus</i>	chi-miR-34a	MIMAT0036166	U GGCAGUG UCUUAGCUGGUUGU	22
原鸽 <i>Columba livia</i>	cli-miR-34a-5p	MIMAT0038467	U GGCAGUG UCUUAGCUGGUUGU	22
小鼠 <i>Mus musculus</i>	mmu-miR-34a-5p	MIMAT0000542	U GGCAGUG UCUUAGCUGGUUGU	22
人类 <i>Homo sapiens</i>	hsa-miR-34a-5p	MIMAT0000255	U GGCAGUG UCUUAGCUGGUUGU	22

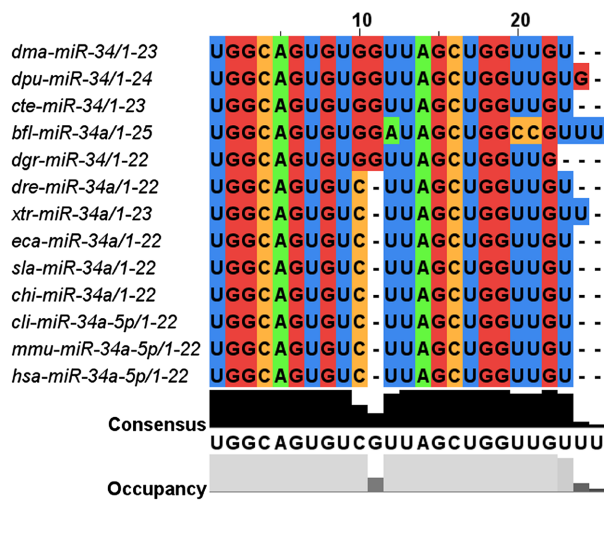


Figure 1. Alignment analysis of miR-34 mature sequences in thirteen species
图 1. 13 种物种中 miR-34 成熟序列的多序列比对

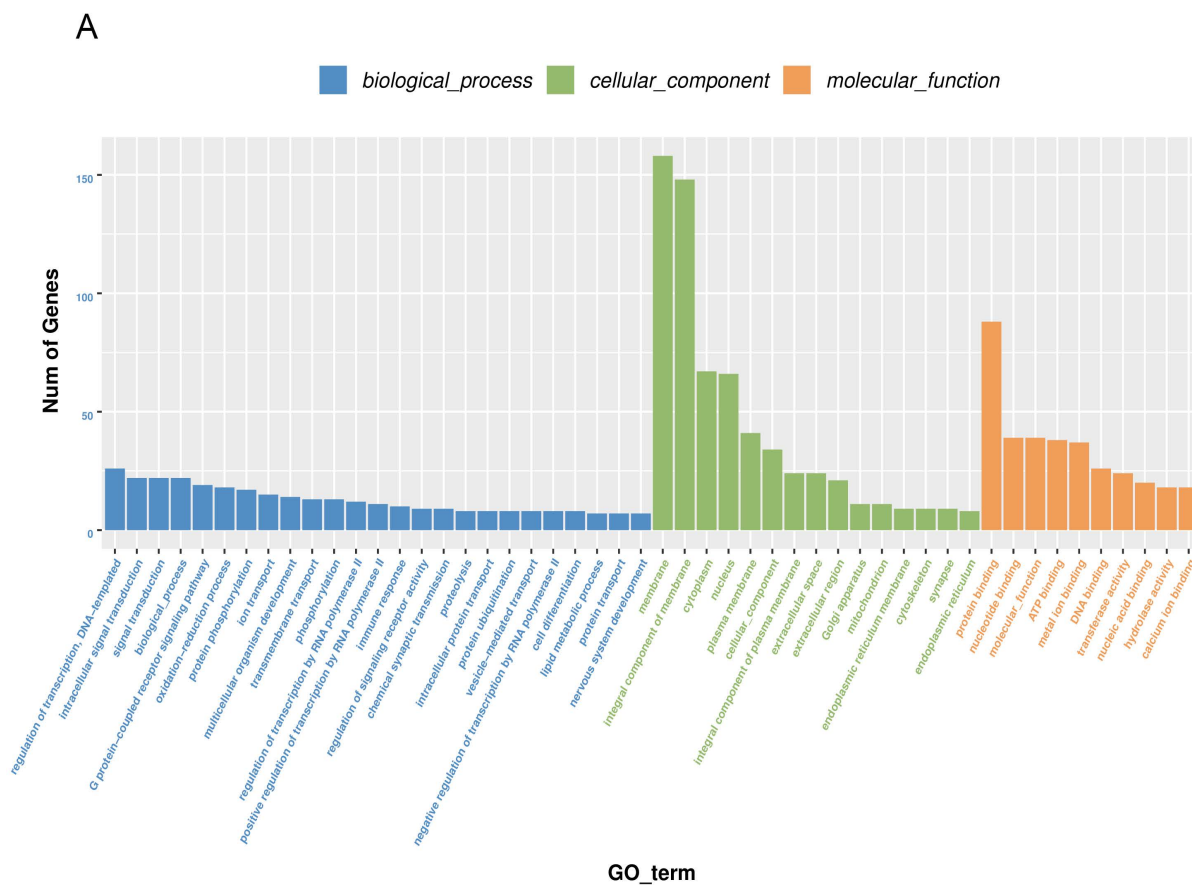
3.2. miR-34 靶基因富集分析

通过 Targetscan 和 miRanda 在线软件对 miR-34 进行靶基因预测, 将二者获得的靶基因取交集, 最终得到 616 个 miR-34 的靶基因。我们利用 GO 数据库对收集到的 616 个靶基因进行了生物学过程、亚细胞定位和分子功能三个方面的 GO 的注释, 结果共得到了 1416 条 GO 的注释信息。如图 2(A)所示, miR-34 靶基因参与的生物学过程主要有转录调控、DNA 模板化、信号转导和胞内信号转导等方面; 大部分基因的亚细胞定位于细胞膜或质膜; 分子功能主要集中在蛋白结合、核苷酸结合和 ATP 结合三个方面。

利用 KEGG 经典通路数据库, 得到的 616 条靶基因共富集到 112 条信号通路中。将结果以散点图的形式呈现(图 2(B)), 通过 Rich factor、P value 和富集在同一条通路上的基因个数衡量 KEGG 富集程度。Rich Factor 是 KEGG 的富集因子, 点的大小越大, 富集度越高。点的颜色代表不同的 P value 值, 数值越小, 富集越显著。miR-34 靶基因在胞吞作用(Endocytosis)、叶酸生物合成(Folate biosynthesis)、丁酸代谢(Butanoate metabolism)、MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway)和 P53 信号通路(p53 signaling pathway)中的富集程度最高。

3.3. DBP 暴露下大型蚤 miR-34 与 Bcl-2 基因的表达分析

将大型蚤置于环境浓度的 6 mg/L DBP 中暴露 24 h, 与对照组相比, miR-34 的表达量显著下调($p = 0.011$) (图 3(A)); 而暴露 48 h, miR-34 的表达量显著上调($p = 0.016$), 且其表达水平明显高于对照组和 24 h 组。将大型蚤暴露于 6 mg/L DBP 24 h 后, 与对照组相比, Bcl-2 基因的 mRNA 表达量下降, 继续暴露到 48 h 后, Bcl-2 的 mRNA 表达量极显著下调($p = 0.007$) (图 3(B))。



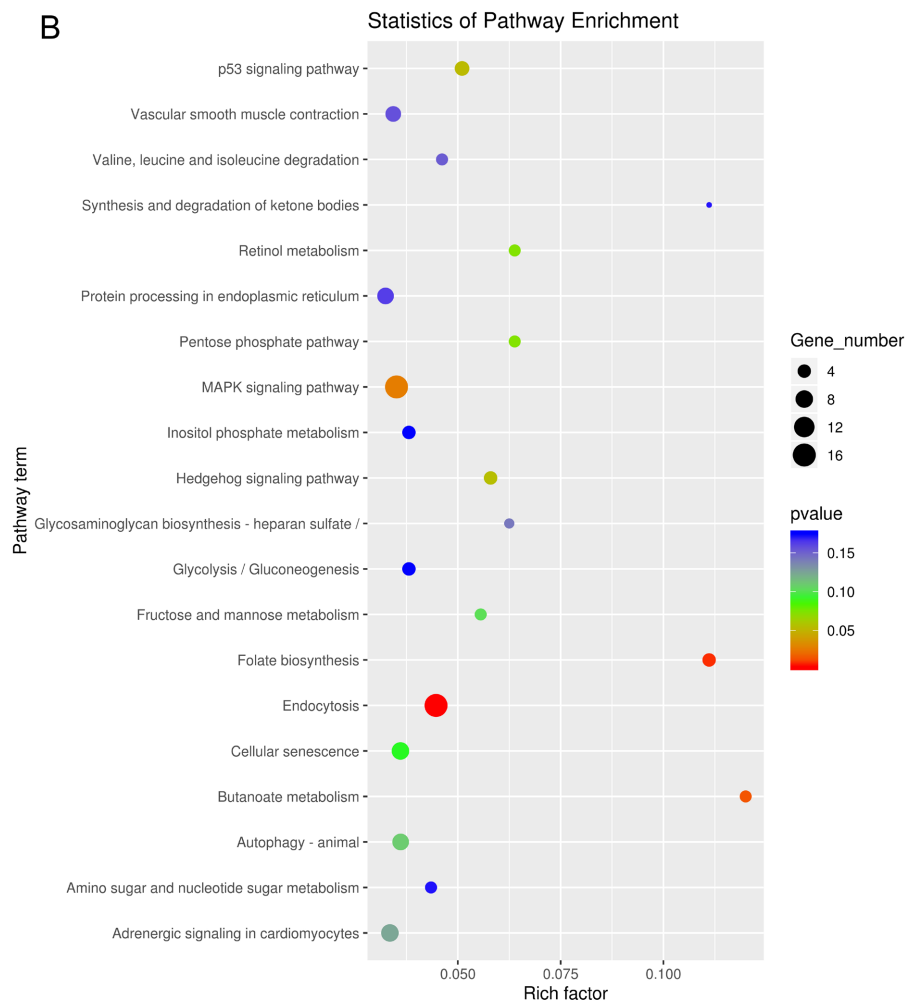


Figure 2. Gene enrichment analysis of target genes of miR-34 (A: GO annotation; B: KEGG pathway)

图 2. miR-34 靶基因的功能富集分析(A: GO 的注释; B: KEGG 信号通路)

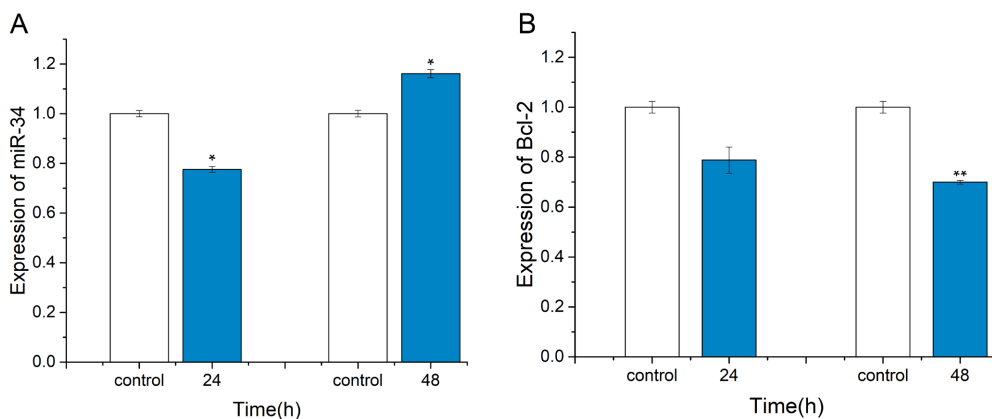


Figure 3. qPCR analysis of miR-34 and Bcl-2 expression levels in *Daphnia magna* exposed to DBP (A: Expression of miR-34; B: Expression of Bcl-2)

图 3. DBP 暴露下大型溞 miR-34 和靶基因 Bcl-2 的相对表达量(A: miR-34 的相对表达量; B: Bcl-2 的相对表达量)

4. 讨论

近年随着 DBP 的广泛使用, 严重污染环境, DBP 可通过不同途径进入水体, 对水生生物的健康造成威胁[27] [28]。大型溞处于水生食物链的关键环节, 水体中有机污染物可通过大型溞传递到更高营养级生物体内, 对其造成危害。迄今对大型溞处于典型重金属和有机污染物暴露条件下生理生化反应和基因转录等研究较为普遍[29], 但是对 DBP 胁迫下大型溞 miRNA 的研究尚未涉及。MiRNA 作为一种生物体内重要的非编码短链 RNA, 在进化过程中通常高度保守, 通过靶向作用于 mRNA 来影响翻译进程, 从而在翻译水平上调控基因表达, 并调控机体的有序运转[30]。miRNA 在水生生物生长、发育、死亡和胁迫应答中发挥调控作用[12] [13] [14]。

miRNA 是通过调控靶基因的表达来影响细胞生命活动, 找到 miR-34 的靶基因是研究其在水生动物中生物学功能的关键。为了探讨 miR-34 在 DBP 胁迫大型溞中的作用机制, 我们首先进行了 miR-34 的保守性和靶基因的功能富集分析。本文将大型溞的 miR-34 序列, 与 miRbase 中的十二种生物的 miR-34 进行多序列比对, 通过 MEGA7.0 中 Clustal W 算法分析表明各物种 miR-34 的碱基序列大部分完全一致(图 1), 说明从无脊椎动物到哺乳动物的进化过程中, miR-34 的保守性比较高。MiR-34 首次发现是在 2011 年对线虫的研究中[18], 后来在多种生物中发现了 miR-34 的存在。MiR-34 序列十分保守, 在无脊椎动物中仅有一种 miR-34, 而在脊椎动物中存在 miR-34 基因家族[31]。研究发现 miR-34 和其他的 miRNA 基因家族类似, 从低等生物到高等动物均具有单一保守的同源序列, 但因为有串联的局部重复和串联重复, 从而在脊椎动物中形成了基因家族[32]。

我们对 miR-34 进行靶基因分析, 共获得 616 个靶基因, 其中包括已经在多种生物中经过双荧光素酶实验验证的 Notch、Bcl-2 和 TGF 基因等[33] [34] [35] [36]。经过 GO 和 KEGG 的注释分析, 发现 miR-34 靶基因的生物学功能主要与信号转导方面密切相关(图 2(A)), 而信号通路则主要富集在胞吞作用、叶酸和丁酸的代谢、MAPK 和 P53 信号通路上(图 2(B))。在对于哺乳动物的研究中, 发现 miR-34 对于细胞的增殖和凋亡有着重要的调控作用, 特别是针对肿瘤细胞, 例如 miR-34 通过靶基因 Notch1 调控子宫内腺癌细胞的增殖和凋亡[37]。而 P53 基因可以调控 miR-34 的表达, 抑制肿瘤细胞的增殖, 激活肿瘤细胞的凋亡[38]。据此, 我们推测, 大型溞体内的 miR-34 基因也可能通过影响机体的物质代谢过程、胞吞作用以及 MAPK 和 P53 等信号通路, 启动或者抑制细胞凋亡途径, 调控细胞的增殖过程, 参与到大型溞的重要生命活动过程中。

我们通过对暴露 6 mg/L DBP 24 h 和 48 h 大型溞 miR-34 和靶基因 Bcl-2 的检测, 发现 DBP 显著干扰了大型溞 miR-34 和细胞增殖及凋亡相关基因 Bcl-2 的表达。在环境浓度 6 mg/L 的 DBP 暴露后, 大型溞体内的 miR-34 相对表达水平明显上调(图 3(A)), 表明 miR-34 可能在大型溞对 DBP 毒性作用的响应过程中发挥作用。已有实验证明在病毒侵染条件下的虾的 miR-34 表达水平明显改变, 说明 miR-34 对环境应激有明显的响应作用[39]。Bcl-2 是细胞凋亡信号通路上的重要基因之一[21], 具有抗凋亡的作用, 能抑制细胞凋亡[40], 是生物机体内维持生存平衡的重要基因[41]。而大型溞 Bcl-2 mRNA 在 6 mg/L DBP 暴露下的相对表达量明显下调(图 3(B)), 推测 DBP 可能会通过细胞凋亡对大型溞造成毒性效应。冷应激会改变黑鲟中 Bcl-2 的表达水平, 使凋亡基因表达比例失调, 增加了细胞凋亡, 使组织结构受损; 草鱼在镉暴露条件下, Bcl-2 表达量明显上调, 抑制细胞凋亡, 说明 Bcl-2 在草鱼应对镉胁迫的过程中发挥了一定的作用[42] [43]。我们发现, 大型溞在 DBP 暴露下 miR-34 高表达, 而 Bcl-2 的 mRNA 持续低表达, 表明大型溞 miR-34 与 Bcl-2 的负调控关系。DBP 对大型溞的毒性作用可能是通过 miR-34 的表达变化靶向介导 Bcl-2 基因 mRNA 的表达水平, 调控细胞凋亡过程, 进而破坏大型溞的正常生命活动。

综上所述, 通过对 miR-34 靶基因的功能富集分析, 发现 miR-34 可能参与大型溞机体细胞内一系列

生物学过程和相关基因的调控,如物质代谢、信号转导、胞吞作用等;qPCR检测发现DBP暴露会影响大型蚤miR-34和Bcl-2的异常表达,推测DBP的致毒效应部分是与大型蚤miR-34和Bcl-2信号轴细胞信号转导失调相关,导致Bcl-2基因参与的细胞凋亡等生命活动紊乱。本实验以期对枝角类生物响应污染物胁迫的机制分析提供基础数据。

基金项目

本论文由国家自然科学基金(42077226)和辽宁省自然科学基金(20180550774)资助。

参考文献

- [1] 孔昊玥,刘红玲.最大累积率识别中国地表水中邻苯二甲酸酯类关键污染物和复合污染生态风险[J].环境化学,2021,40(3):706-716.
- [2] 樊祥科,郑浩,杨振,等.长江干流江苏段水质中邻苯二甲酸酯的测定及分布现状[J].环境监测管理与技术,2016,28(3):45-47+51.
- [3] Zhao, X., Ying, G. and Qi, M. (2014) Toxicity of Phthalate Esters Exposure to Carp (*Cyprinus carpio*) and Antioxidant Response by Biomarker. *Ecotoxicology*, **23**, 626-632. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1194-x>
- [4] 刘慧杰,舒为群.邻苯二甲酸二丁酯生殖发育毒性研究进展[J].环境与健康杂志,2004,21(2):122-124.
- [5] Hu, J., Jiang, K., Tang, X., et al. (2020) Chronic Exposure to Dinbutyl Phthalate Causes Reproductive Toxicity in Zebrafish. *Journal of Applied Toxicology*, **40**, 1694-1703. <https://doi.org/10.1002/jat.4030>
- [6] Tompsett, A.R., Wiseman, S. and Higley, E. (2013) Effects of Exposure to 17 α -Ethinylestradiol during Sexual Differentiation on the Transcriptome of the African Clawed Frog (*Xenopus laevis*). *Environmental Science & Technology*, **47**, 4822-4828. <https://doi.org/10.1021/es400436y>
- [7] Gardner, S.T., Wood, A.T., Lester, R., et al. (2016) Assessing Differences in Toxicity and Teratogenicity of Three Phthalates, Diethyl Phthalate, Di-n-propyl Phthalate, and Di-n-butyl Phthalate, Using *Xenopus laevis* Embryos. *Journal of Toxicology & Environmental Health, Part A*, **79**, 71-82. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1106994>
- [8] Mu, X., Huang, Y., Li, J., et al. (2018) New Insights into the Mechanism of Phthalate-Induced Developmental Effects. *Environmental Pollution*, **241**, 674-683. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.095>
- [9] Shen, C., Wei, J., Wang, T., et al. (2019) Acute Toxicity and Responses of Antioxidant Systems to Dibutyl Phthalate in Neonate and Adult *Daphnia Magna*. *PeerJ*, **7**, e6584. <https://doi.org/10.7717/peerj.6584>
- [10] Wei, J., Shen, Q., Ban, Y., et al. (2018) Characterization of Acute and Chronic Toxicity of DBP to *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **101**, 214-221. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2391-8>
- [11] Ji, Q., Hao, X., Zhang, M., et al. (2009) MicroRNA miR-34 Inhibits Human Pancreatic Cancer Tumor-Initiating Cells. *PLOS ONE*, **4**, e6816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006816>
- [12] Li, H., Di, G., et al. (2019) MicroRNA-155 and microRNA-181a, via HO-1, Participate in Regulating the Immunotoxicity of Cadmium in the Kidneys of Exposed *Cyprinus carpio*. *Fish & Shellfish Immunology*, **95**, 473-480. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.010>
- [13] Zhou, Z., et al. (2014) The Identification and Characteristics of Immune-Related MicroRNAs in Haemocytes of Oyster *Crassostrea gigas*. *PLOS ONE*, **9**, e88397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088397>
- [14] Liu, Q., Yang, J., et al. (2019) Role of miR-731 and miR-2188-3p in Mediating Chlorpyrifos Induced Head Kidney Injury in Common Carp via Targeting TLR and Apoptosis Pathways. *Aquatic Toxicology*, **215**, Article ID: 105286. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105286>
- [15] 黎健,赵婷,陈丰原.miR-34a调控内皮祖细胞介导的血管新生[J].中国动脉硬化杂志,2011,19(3):232-233.
- [16] 楚利涛,李兴华,朱梁豫,等.骨肉瘤患者血清中miR-34a,miR-449a表达及与新辅助化疗耐药的关系[J].实用癌症杂志,2022,37(3):388-391.
- [17] 李华晓,麦浩坚,宋同均,等.miR-34a-5p靶向BCAN对胶质瘤细胞增殖,迁移的影响[J].临床神经外科杂志,2022,19(2):148-155.
- [18] Lau, N.C., et al. (2001) An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **294**, 858-862. <https://doi.org/10.1126/science.1065062>
- [19] Hermeking, H. (2010) The miR-34 Family in Cancer and Apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, **17**, 193-199. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.56>

- [20] Bommer, G.T., *et al.* (2007) p53-Mediated Activation of miRNA34 Candidate Tumor-Suppressor Genes. *Current Biology*, **17**, 1298-1307. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.068>
- [21] Oltval, Z.N., *et al.* (1993) Bcl-2 Heterodimerizes *in Vivo* with a Conserved Homolog, Bax, That Accelerates Programmed Cell Death. *Cell*, **74**, 609-619. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90509-O](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90509-O)
- [22] 陆健, 张佳佳, 周国勤, 等. 急性高温胁迫对大口黑鲈“优鲈 3 号”肝脏凋亡相关酶活性和基因表达的影响[J]. 淡水渔业, 2021, 51(2): 81-86.
- [23] Lawen, A. (2003) Apoptosis—An Introduction. *Bioessays*, **25**, 888-896. <https://doi.org/10.1002/bies.10329>
- [24] 丁晨雨, 胡利双, 李云, 等. 低氧胁迫对鲢心肌细胞凋亡及其调控基因 Bax, Bcl-2 表达的影响[J]. 淡水渔业, 2018, 48(2): 10-15.
- [25] Hu, J., *et al.* (2018) Analysis of the microRNA Transcriptome of *Daphnia pulex* during Aging. *Gene*, **664**, 101-110. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.034>
- [26] Lyu, K., *et al.* (2013) Copper/Zinc Superoxide Dismutase from the Cladoceran *Daphnia magna*: Molecular Cloning and Expression in Response to Different Acute Environmental Stressors. *Environmental Science & Technology*, **47**, 8887-8893. <https://doi.org/10.1021/es4015212>
- [27] 胡卫星, 刘晓宇, 陈贝, 等. 渭河流域西安段水体中 DBP 污染特征及生态风险评估[J]. 环境保护科学, 2020, 46(1): 84-90.
- [28] 陈慧. 环境水体中典型邻苯二甲酸酯的污染水平及其复合暴露对斑马鱼的生殖毒性[D]: [博士学位论文]. 镇江: 江苏大学, 2020.
- [29] 黄涵年, 郭江峰. MicroRNA 在环境毒理学中的研究进展[J]. 生命科学, 2013, 25(11): 1115-1120.
- [30] Lewis, B.P., *et al.* (2003) Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*, **115**, 787-798. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01018-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01018-3)
- [31] 陈晨, 王欣, 沈兴家. miR-34 家族抑制肿瘤作用的研究进展[J]. 温州医科大学学报, 2016, 46(3): 231-235.
- [32] 高佳莉, 罗玉萍, 李思光. miR-34 基因家族的分子进化[J]. 动物学研究, 2007, 28(3): 271-278.
- [33] 王洪一, 郭洪, 李娟, 等. mir-34a 的表达调控及其与肿瘤发生的关系[J]. 医学综述, 2012, 18(7): 1020-1023.
- [34] Yamakuchi, M. and Lowenstein, C.J. (2009) MiR-34, SIRT1 and p53: The Feedback Loop. *Cell Cycle*, **8**, 712-715. <https://doi.org/10.4161/cc.8.5.7753>
- [35] Rokavec, M., *et al.* (2014) The p53/miR-34 Axis in Development and Disease. *Journal of Molecular Cell Biology*, **6**, 214-230. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mju003>
- [36] 王雷. miR-34a 通过 Notch 信号通路影响乳腺癌细胞的生物学行为[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(11): 61-65.
- [37] 李燕玮, 刘艺薇. miR-34a 通过靶基因 Notch1 调控子宫内膜癌细胞的增殖和凋亡[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(1): 26-29.
- [38] Chang, T.C., *et al.* (2007) Transactivation of miR-34a by p53 Broadly Influences Gene Expression and Promotes Apoptosis. *Molecular Cell*, **26**, 745-752. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.010>
- [39] Cui, Y., Yang, X. and Zhang, X. (2017) Shrimp miR-34 from Shrimp Stress Response to Virus Infection Suppresses Tumorigenesis of Breast Cancer. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, **9**, 387-398. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.10.016>
- [40] Yang, J., *et al.* (1997) Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science*, **275**, 1129-1132. <https://doi.org/10.1126/science.275.5303.1129>
- [41] Borner, C. (2003) The Bcl-2 Protein Family: Sensors and Checkpoints for Life-or-Death Decisions. *Molecular Immunology*, **39**, 615-647. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(02\)00252-3](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(02)00252-3)
- [42] 卫明亮, 张志伟, 张志勇, 等. 冷应激对黑鲟组织损伤及细胞凋亡基因表达的影响[J]. 南方水产科学, 2022(18): 1-8.
- [43] 李海军. 草鱼凋亡相关基因 Caspase9 和 BCL-2 克隆、原核表达及其在镉胁迫下表达分析[D]: [硕士学位论文]. 南昌: 江西师范大学, 2016.