

邻苯二甲酸二丁酯暴露对大型溷miR-153及AKT基因表达的影响和功能分析

张晶, 魏呈卉, 魏杰, 张泽, 张园雯, 王汨*

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

microRNAs参与调控动物所有的生命过程, 包括生长、发育、生物和非生物应激反应等。microRNAs与其调控的靶基因已被证实参与水生动物对环境胁迫的应答。为了探究miR-153的生物学功能及邻苯二甲酸二丁酯(DBP)暴露对大型溷miR-153及其靶基因AKT表达的影响, 我们对各物种miR-153序列进行多序列比对, 利用miRanda和TargetScan分析miR-153的靶基因并对其进行功能富集分析, 实时荧光定量PCR检测了miR-153和AKT在DBP暴露后大型溷体内的表达变化。结果显示, 多序列比对发现11个物种miR-153基因序列保守性很高, 20个碱基完全一致; miR-153的742个靶基因, 主要富集在DNA模板和转录调控、氧化还原和信号转导等生物学过程, 且靶基因参与胞吞、平滑肌收缩、细胞色素P450对异生素的代谢等代谢信号通路的调节; 不同浓度、不同时间的DBP暴露后, 与对照组相比, 大型溷miR-153表达量出现了极显著上升($p < 0.01$), AKT基因的表达量与之相反, 表现出miR-153和AKT的负调控关系。结果表明, 在DBP暴露下miR-153可能通过靶向AKT基因, 影响AKT下游相关基因的表达, 导致AKT参与的大型溷生命活动失调, 本实验为解析DBP对水生动物毒理机制提供科学参考。

关键词

邻苯二甲酸二丁酯, 大型溷, miR-153, AKT

Expression and Function Analysis of miR-153 and AKT gene in *Daphnia magna* Exposed to Dibutyl Phthalate

Jing Zhang, Chenghui Wei, Jie Wei, Ze Zhang, Yuanwen Zhang, Mi 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: 张晶, 魏呈卉, 魏杰, 张泽, 张园雯, 王汨. 邻苯二甲酸二丁酯暴露对大型溷 miR-153 及 AKT 基因表达的影响和功能分析[J]. 海洋科学前沿, 2022, 9(2): 140-149. DOI: 10.12677/ams.2022.92015

Abstract

MicroRNAs are involved in the regulation of animal life processes, including growth, development, biotic and abiotic stress responses. MicroRNAs and target genes have been shown to be involved in the response of aquatic animals to environmental stress. To explore the biological function of miR-153 and the effect of dibutyl phthalate (DBP) exposure on the expression of miR-153 and its target gene AKT in *Daphnia magna*, we performed alignment of miR-153 sequences of various species. Miranda and Targets can were used to analyze the target gene of miR-153 and perform functional enrichment analysis. The changes of miR-153 and AKT in *D. magna* after DBP exposure were detected by real-time quantitative PCR. The results showed that the sequence of miR-153 in 11 species was highly conservative, and 20 bases were completely consistent. The 742 miR-153 targeted genes are mainly concentrated in DNA template, transcriptional regulation, redox, signal transduction biological processes. miR-153 targeted genes are involved in the regulation of endocytosis, smooth muscle contraction, cytochrome P450 metabolism of allotropin and other metabolic signaling pathways. After DBP exposure at different concentrations and at different times, compared with the control group, the expression of miR-153 in *D. magna* increased significantly ($P < 0.01$), and the expression of AKT gene was opposite. It showed a negative regulatory relationship between miR-153 and AKT. The results showed that miR-153 may affect the expression of AKT downstream-related genes by targeting AKT genes after DBP exposure, leading to an imbalance in the vital activities of *D. magna* involved in AKT. This experiment provides a scientific reference for analyzing the toxicological mechanism of DBP on aquatic animals.

Keywords

Dibutyl Phthalate, *Daphnia magna*, miR-153, AKT

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)是一种常见的全球性有机污染物, 作为增塑剂被广泛应用到涂料、包装材料和化妆品等塑料制品中[1]。它作为内分泌干扰物质在生物体内产生生殖毒性、致癌、致畸性、致突变等毒性效应[2]。随着塑料制品大量生产和广泛使用, DBP 不可避免的进入了水环境, 目前在水体、生物体、沉积物等环境样品中普遍检测到 DBP 的存在[3]。DBP 还可以在生物体内蓄积, 通过食物链危害水生生物和以水生生物为食的其他动物。有研究发现, 随着 DBP 浓度的增加, 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、鲤(*Cyprinus carpio*)和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)等受精卵的孵化率逐渐降低, 死亡率和变形率逐渐升高, 影响鱼类等水生动物正常的发育和繁殖[4] [5]。课题组也报道了 DBP 对大型溞(*Daphnia magna*)成溞和幼溞的急、慢性毒性、生殖毒性效应等和机体的氧化损伤[6] [7]。

MicroRNAs (miRNAs)是一类由 20~25 个核苷酸组成的、保守的非编码单链小分子 RNA, 通过与靶基因 mRNA 3'端非翻译区完全或不完全互补配对[8], 降解靶基因 mRNA 或抑制其翻译。每个 miRNA 可以同时影响几十甚至几百个 mRNA 序列的翻译, 调控靶基因参与的细胞重要生命活动[9]。在斑马鱼

(*Brachydanio rerio*)中检测到一些与细胞增殖和心脏发育相关的 miRNA, 如 miR-738 过表达导致斑马鱼胚胎心脏显著增大, miR-738 可通过 Wnt 信号通路调控斑马鱼的心脏发育。miR-155 在氟虫腈作用下负调控 *cyb561d2* 基因, 从而影响斑马鱼细胞增殖以及存活率[10] [11]。miR-8 家族调控斑马鱼胚胎的渗透调节, 能够在鳃形成前的早期发育阶段精确控制离子细胞中的离子转运[12]。据报道有一些与环境胁迫应答相关的 miRNA, 在外界不利环境的刺激下, 参与细胞调控, 使机体对外源污染物产生防御[13]。在重金属镉的暴露下, 鲤鱼体内与免疫相关的 miR-155 和 miR-181a 表达量升高, miR-155 和 miR-181a 通过靶向 HO-1 基因参与镉暴露引起的肾脏免疫毒理学效应[14]。牡蛎(*Ostrea gigas tnumb*)血细胞在受到细菌攻击或热应激胁迫后, miR-10a-5p 和 miR-184b 受到调控, 用来维持牡蛎机体正常的生理功能[15]。有研究表明蚤状溞(*Daphnia pulex*)对重金属镉的耐受性与 miRNA 有关, 如 miR-2、miR-33, miRNA 通过调控 GTPase 和角质层蛋白途径, 将细胞能量分配转换为解毒过程, 从而提高蚤状溞对镉的耐受性[16]。

大型溞是一种广泛分布的浮游动物, 是淡水生态系统食物网中的关键一环, 由于其繁殖力强、生长速度快、饲养方便、易于操作、生活史丰富, 常被用作水生态毒理学测试的模式生物[17]。目前关于 DBP 等典型水环境污染对水生生物机体生理生化反应和基因转录影响的研究较为普遍, 对 DBP 暴露下水生动物 miRNA 作用机制的研究未见报道。miR-153 是一个在进化上高度保守的 miRNA, 通过调控其靶基因, 参与细胞增殖、细胞分化和细胞凋亡等生命活动[18]。AKT 作为 miR-153 的靶基因, 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 也称为蛋白激酶 B, 参与各种信号通路, 如细胞增殖、存活、代谢的信号通路[19] [20]。本文以大型溞为对象, 对 miR-153 的靶基因进行 GO 和 KEGG 功能富集分析, 研究暴露于不同浓度、不同时间的 DBP 对大型溞 miR-153 和靶基因 AKT 表达的影响, 以期鉴定参与 DBP 胁迫反应的关键基因, 研究结果将有助于揭示 DBP 对大型溞的毒性效应和致毒机制。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物和药物处理

实验动物大型溞来源于辽宁省水生生物重点实验室。取一只雌溞进行孤雌生殖, 第一批幼溞培养密度为 30 ± 5 只/L, 培养 3~5 代, 获得足够数量的同步溞用于后续实验。

大型溞共分三组, 两组将大型溞分别暴露于亚致死浓度 1.0 和 2.0 mg/L 的 DBP 中, 一组作为对照。每组设置 4 个重复, 每个重复烧杯中放入 100 只大型溞。为了避免大型溞摄食影响实验结果, 实验期间不投喂。24 和 48 h 后将存活的大型溞分别放入 1.5 ml 离心管中, 吸干水分。处理好的离心管保存到碎冰中, 用于后续 miR-153 和 AKT 基因的 qPCR 分析。

2.2. miR-153 序列的保守性

大型溞 miR-153 序列来自于课题组前期 DBP 暴露下大型溞 miRNA 表达谱测序数据, 序列为 UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUG, 与蚤状溞 miR-153 序列一致。从 miRbase 数据库中检索获得 10 个物种(蚤状溞, 人类, 小鼠, 家鸡, 非洲蟾蜍, 斑马鱼, 猪, 穴兔, 猕猴, 马)的 miR-153 的序列。采用 MEGA 7.0 软件的 cluster w 算法进行多序列比对。

2.3. 靶基因预测和富集分析

miR-153 的靶基因通过 TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80/)和 miRanda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>)获得。

使用 GO 和 KEGG 分析 miR-153 靶基因的主要生物学功能及参与的主要信号通路。富集显著性的阈值为 0.05, 通过显著性富集分析能确定 miRNA-mRNA 关系行使的主要生物学功能。

2.4. qPCR

每个重复取 40 只活的大型蚤立即在冰上用研钵在 RNeasy 溶液(QIAGEN, 美国)中匀浆, 经过消化、离心、洗脱等操作之后。用 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 试剂盒(宝生物工程大连有限公司)提取来自大型蚤的总 RNA, 获得的 RNA 分装之后, 存放至 -80°C 的冰箱中。

在 1.2%琼脂糖凝胶上分析 RNA 的完整性。使用 Scientific nano drop 2000 (nano drop Technologies Wilmington, USA)检测样品总 RNA 的浓度和纯度。miR-153 采用湖南艾科瑞生物工程有限公司提供的 miRNA 1st strand cDNA synthesis kit 和 SYBR® Green Premix Pro Taq HS q-PCR Kit II (Rox Plus)试剂盒。AKT 基因表达用艾科瑞生物公司的 Evo M-MLV RT Kit with gDNA Clean for qPCR 对大型蚤的总 RNA 进行反转录。qPCR 在 Applied Biosystems™ 7500 仪器进行, 反应条件: 95°C 30 s, (95°C 5 s 60°C 20 s), 40 个循环。以 U6 作为 miR-153 的内参基因, Beta-actin 作为 AKT 的内参基因。大型蚤 AKT 基因 NCBI 序列号为: LOC116917643。用 NCBI-Primer 设计特异性引物, 大型蚤 U6、Beta-actin 引物从文献中引用[21] [22], 用于 qPCR 的引物序列如表 1 所示, 由生工生物工程(上海)完成。应用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 法计算大型蚤 miR-153 和 AKT 基因的相对表达量。

Table 1. Primers for qPCR

表 1. qPCR 所用引物

Gene	Primer sequence (5'-3')
miR-153	CCGCGCGCGTTGCATAGTCACAAAAG
AKT primer R	CGGCCATCCATTCTTCCCTTT
AKT primer F	GGACTTGCTGAACCACTCAA
U6-F	CCCCATTTATGAAGGTTACGC
U6-R	CCTTGATGTCACGGACGATTT
Beta-actin-F	CCCCATTTATGAAGGTTACGC
Beta-actin-R	CCTTGATGTCACGGACGATTT

2.5. 数据处理

使用 Excel (T-test 检验)和 SPSS 17.0 (one-way ANOVA)软件分析对照组和 DBP 处理组大型蚤 miR-153 和 AKT 基因的表达量变化, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义(用*表示), $p < 0.01$ 为差异极其显著(用**表示)。

3. 结果

3.1. miR-153 序列保守性分析

在 miRBase 数据库中获得蚤状蚤、斑马鱼、非洲蟾蜍等 10 个物种的 miR-153 基因序列。大型蚤、蚤状蚤、斑马鱼和人类等 11 个物种的 miR-153 和靶基因互补结合的种子序列用绿色标记出来(表 2)。各个物种 miR-153 序列长度为 20 到 23 个碱基不等, 其中大型蚤 miR-153 序列长度为 22 个碱基。

基于 Clustal W 算法的多序列对比分析, 发现大型蚤 miR-153 与近缘物种蚤状蚤的序列完全一致, 结果符合两个物种的进化关系。而且大型蚤、斑马鱼、鸡、兔、马、小鼠、猴和人等 11 个物种, 从低等到高等动物的 miR-153 的 20-23 的核苷酸序列中, 第 1 到第 20 个核苷酸碱基完全一致, 各物种序列仅有 1~3 个核苷酸的差异(图 1), 说明 miR-153 在生物进化过程中高度保守。

Table 2. Mature sequences of miR-153 in eleven species
表 2. 11 个物种中 miR-153 的成熟序列

名称 miRNA name	物种 Species	序列号 Serial number	保守序列 Conservative sequence	序列长度 Sequence length (bp)
dma-miR-153	大型溞 <i>Daphnia magna</i>	-----	UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUG	22
dpu-miR-153	蚤状溞 <i>Daphnia pulex</i>	MIMAT0012642	UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUG	22
dre-miR-153a-3p	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	MIMAT0001849	UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUC	22
hsa-miR-153-3p	人 <i>Homo sapiens</i>	MIMAT0000439	UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUC	22
mmu-miR-153-3p	老鼠 <i>Mus musculus</i>	MIMAT0000163	UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUC	22
eca-miR-153	马 <i>Equus caballus</i>	MIMAT0012936	UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUC	22
ocu-miR-153-3p	穴兔 <i>Oryctolagus cuniculus</i>	MIMAT0048270	UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUCA	23
gga-miR-153-3p	鸡 <i>Gallus gallus</i>	MIMAT0001119	UUGCAUAGUCACAAAAGUGA	20
mml-miR-153-3p	猕猴 <i>Macaca</i>	MIMAT0002271	UUGCAUAGUCACAAAAGUGA	20
ssc-miR-153	猪 <i>Sus scrofa</i>	MIMAT0002160	UUGCAUAGUCACAAAAGUGA	20
xtr-miR-153	非洲蟾蜍 <i>Xenopus tropicalis</i>	MIMAT0003607	UUGCAUAGUCACAAAAGUGA	20

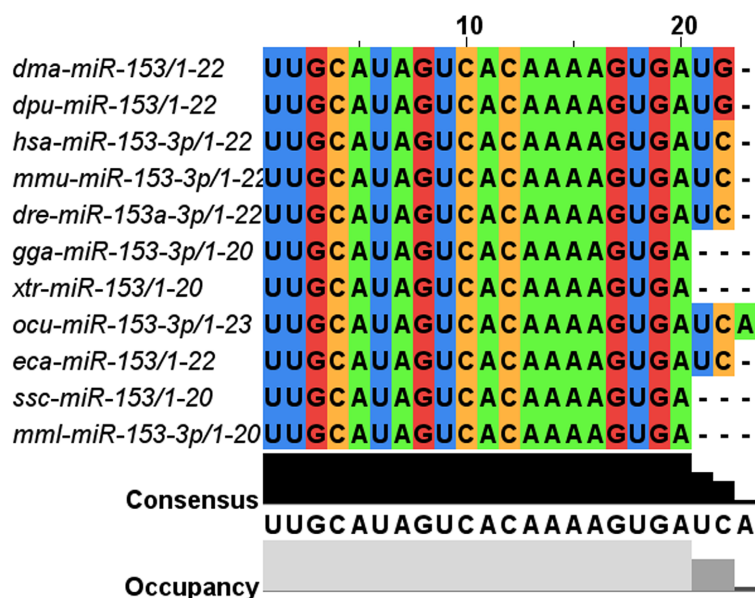


Figure 1. Alignment analysis of miR-153 mature sequences in eleven species
图 1. 11 种物种中 miR-153 成熟序列的多序列比对

3.2. miR-153 靶基因富集分析

通过 miRanda 和 TargetScan 获得 miR-153 的靶基因共有 742 个。将 miR-153 靶基因对应的 GO 注释按照分子功能、细胞组分和生物学过程分为三类。按照靶基因数量从高到低排序(图 2)，miR-153 的靶基因主要聚集在细胞膜(membrane)、细胞器质膜(integral component of membrane)和细胞核(nucleus)等亚细胞组成成分中。miR-153 靶基因所参与生物学过程有 DNA 模板和转录调控(regulation of transcription, DNA-templated)、氧化还原过程(oxidation-reduction process)和信号转导(signal transduction)等, 这些靶基因主要具有与金属离子结合(metal ion binding)和蛋白质结合(protein binding)的分子功能(图 2)。

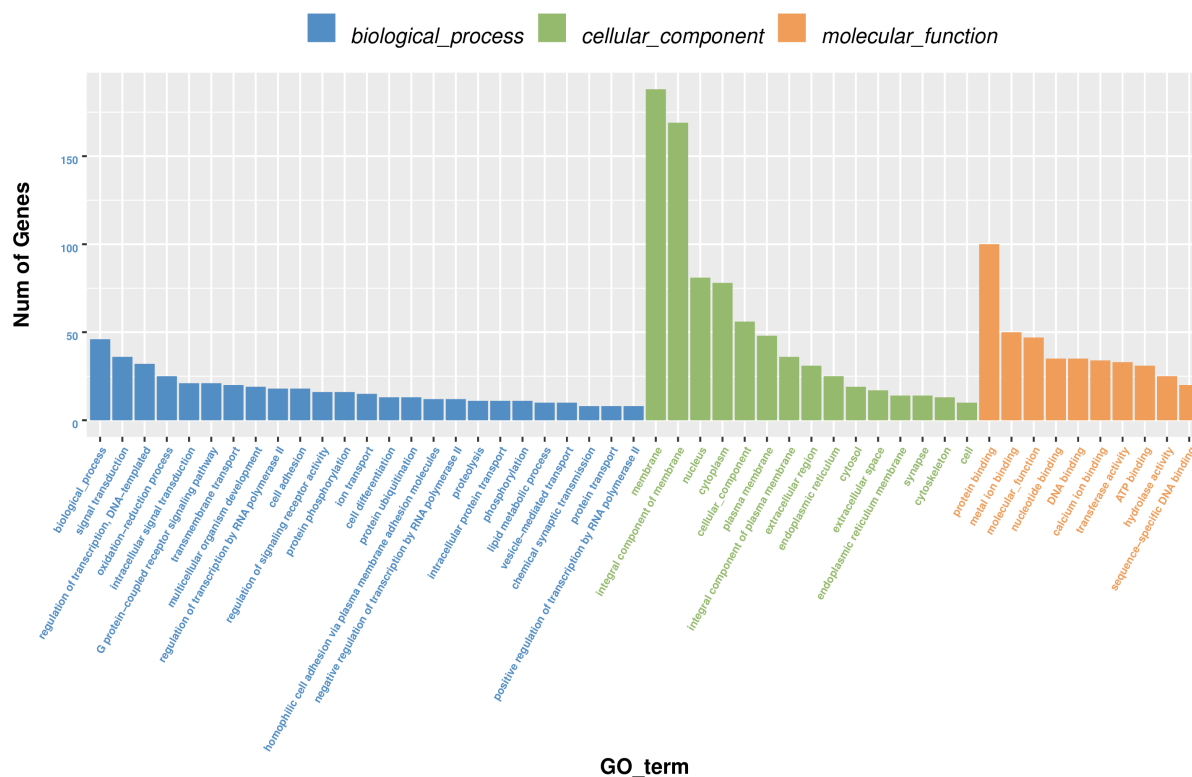


Figure 2. Go enrichment analysis of target genes of miR-153

图 2. miR-153 靶基因的 GO 富集分析

使用 ggplot2 对 KEGG 富集分析结果以散点图形式呈现(图 3)，发现 miR-153 的靶基因聚类到 118 条 KEGG 通路。Rich Factor 越大，靶基因所在的细胞信号通路富集程度越高。P value 值越小，富集越显著。miR-153 的靶基因主要富集在胞吞(Endocytosis) (358 个)、平滑肌收缩(Vascular smooth muscle contraction) (175 个)、细胞色素 P450 对异生素的代谢(Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450) (44 个)等信号通路。

3.3. DBP 暴露对大型溞 miR-153 和 AKT 表达水平的影响

在 DBP 的暴露下，大型溞的 miR-153 表达量变化如图 4(A)所示。与对照组相比，暴露在浓度为 1.0 和 2.0 mg/L 的 DBP 溶液 24、48 小时后，miR-153 表达量均出现极显著升高($p < 0.01$)。大型溞 miR-153 表达量变化与 DBP 处理时间和浓度相关，在 2.0 mg/L 的 DBP 中处理 48 小时后，miR-153 表达量最高。

从图 4(B)可以看出，与对照组相比，大型溞暴露于 1.0 和 2.0 mg/L 的 DBP 溶液中 24 和 48 小时后，

AKT 的 mRNA 表达水平均出现极显著降低($p < 0.01$), 表明 AKT 对 DBP 暴露很敏感, 在不同的浓度和时间节点都呈现为低表达。

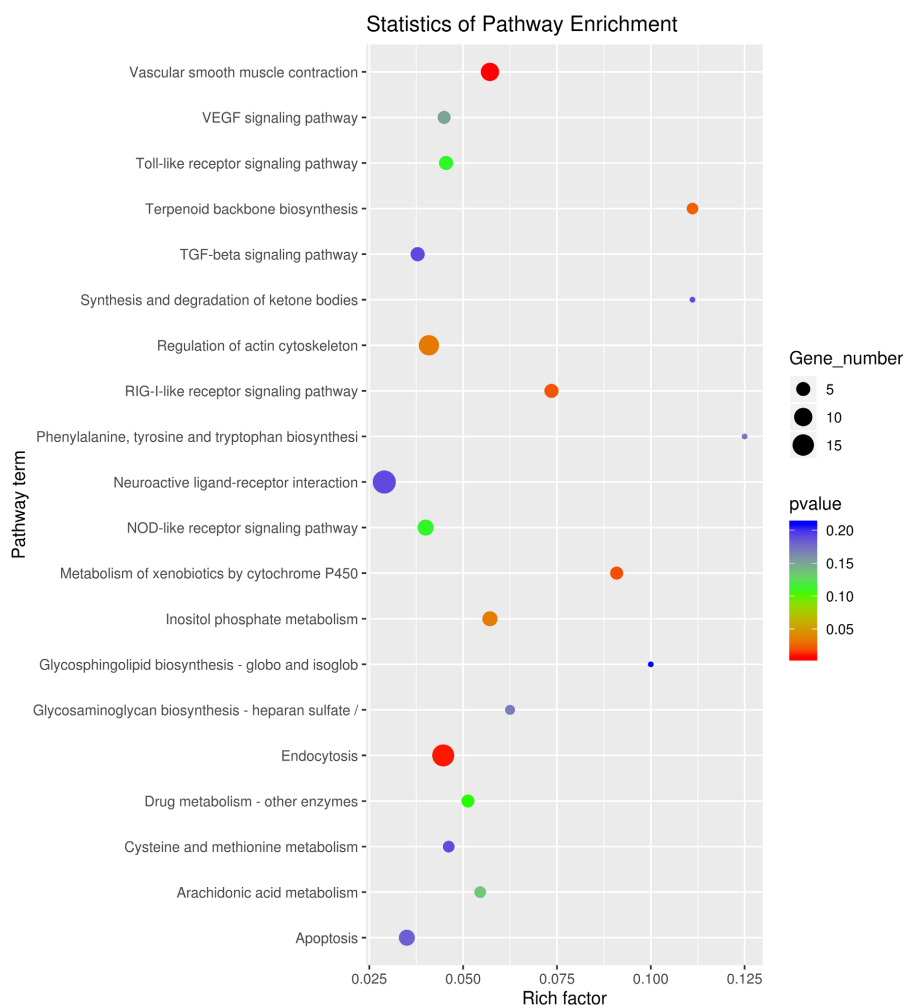


Figure 3. KEGG enrichment analysis of target genes of miR-153

图 3. miR-153 靶基因的 KEGG 富集分析

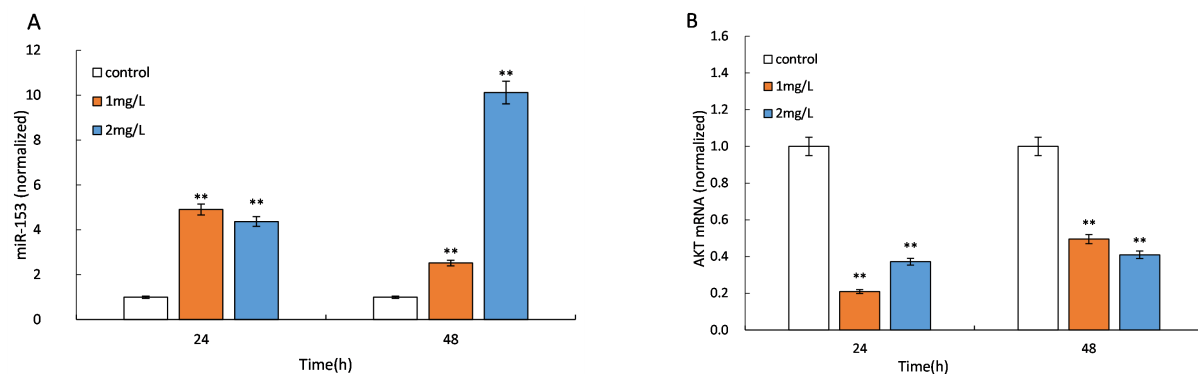


Figure 4. qPCR analysis of miR-153 and AKT expression levels in *Daphnia magna* exposed to DBP (A: Expression of miR-153; B: Expression of AKT)

图 4. DBP 暴露下大型溞 miR-153 和靶基因 AKT 的相对表达量(A: miR-153 的相对表达量; B: AKT 的相对表达量)

4. 讨论

由于 DBP 在水环境的持续输入和具有生物富集性, DBP 的水生态毒理效应已成为国内外关注的热点。研究证明 DBP 对水生动物有明显毒性, 导致动物死亡、生殖发育畸形、精子损伤、性别错乱等[23] [24]。miRNAs 是生物体内一类短的非编码内源性 RNA 家族, 参与各种细胞的生物学过程, 在基因表达过程中起到重要调控作用, 并且参与生物的生长和发育以及胁迫响应[25]。非生物应激因素(如高温、寒冷、重金属和有机污染物等)对生物体 miRNA 的表达有显著影响[26] [27]。DBP 作为环境中普遍存在的污染物, 其急、慢性毒性以及生殖毒性等研究已较为深入[28], 但是在 miRNA 参与的细胞内基因的信号通路层面了解 DBP 毒性作用机制的研究还未见报道。

大型蚤对水环境中的污染物敏感性高, 被用作生态毒理学模式生物, 评估淡水生态系统中存在的污染物的毒性效应[29]。为了探讨 miR-153 在 DBP 暴露对大型蚤的毒性作用中可能介入的生物学过程, 我们首先进行了 miR-153 的保守性和靶基因的功能富集分析。在 miRBase 数据库中对 miR-153 基因序列进行搜索, 发现 miR-153 广泛存在于从低等到高等的各种物种。目前分析 miRNA 的靶基因所使用的生物信息学算法是通过 miRNA 和 mRNA 的 3'末端非翻译区之间的序列互补性进行的, 识别的重点位置是 miRNA 的种子区域(核苷酸 2-8)。我们在大型蚤、蚤状蚤等 11 个物种的 miR-153 序列中标注出其种子序列(表 1)。使用 MEGA7.0 中的 Clustal W 算法对大型蚤的 miR-153 序列与蚤状蚤、斑马鱼等其他十种动物的 miR-153 进行多序列比对(图 1), 发现各物种 miR-153 的大部分碱基序列相同, 且大型蚤和蚤状蚤的 miR-153 序列完全一致, 结果符合物种的系统发生关系。多序列比对结果表明 miR-153 在进化上高度保守。靶基因分析结果表明 miR-153 可靶向数百个不同的 mRNA (图 2 和图 3), 包括已经过双荧光素酶和免疫蛋白印迹实验验证的 Jagged1、SRC、GALNT7、Snail、AKT 等基因[30] [31] [32]。GO 注释发现 miR-153 的靶基因主要参与了 DNA 模板和转录调控过程、氧化还原过程和信号转导等生物学过程。miR-153 的靶基因主要富集在胞吞、血管平滑肌收缩、细胞色素 P450 对异生素的代谢等 KEGG pathway 信号通路。以上结果提示 miR-153 对生物生命活动的调控是一个 miR-153-靶基因调控网络参与的复杂的过程。

miR-153 通过调控靶基因来发挥相关生物学作用, 找到 miR-153 的靶基因是研究其功能的关键。为了检测 miR-153 是否通过对靶基因 AKT 的调控, 参与大型蚤对 DBP 胁迫的分子响应, 我们将大型蚤暴露于 1.0 mg/L 和 2.0 mg/L 的 DBP 溶液 24 小时和 48 小时后, 利用 qPCR 技术观察 DBP 暴露下大型蚤 miR-153 与 AKT 基因 mRNA 的表达变化趋势。实验发现不同浓度、不同时间的 DBP 暴露后, 大型蚤体内的 miR-153 的表达均显著高于对照组(图 4(A))。蚤状蚤在镉胁迫下体内 miR-153 表达水平明显改变, 说明 miR-153 在蚤状蚤应对镉胁迫的过程中发挥了一定的作用[33]。PI3K-AKT 基因信号通路是与水生动物细胞应激反应相关的重要细胞内信号转导途径[34]。最近报道巨型对虾(*Macrobrachium rosenbergii*)经过急性氨氮暴露处理, 对虾 PI3K、AKT 和 FoxO 基因的 mRNA 在不同组织和不同胁迫时间均出现明显的差异表达[35]。AKT 是 PI3K-Akt 信号通路上的核心位置, 它的功能主要有调控细胞周期、凋亡、血管生成以及细胞侵袭等方面[36]。在锌暴露下, 鲤鱼前肠和中肠 AKT 的磷酸化水平显著下调, 表明锌胁迫使 AKT 的活性受到抑制, 可能导致鲤鱼肠道细胞凋亡水平增加[34]。大型蚤 AKT mRNA 在 1 mg/L 和 2 mg/L DBP 暴露下的相对表达量明显下调(图 4(B)), 推测 DBP 可能会干扰 PI3K-AKT 信号通路相关的细胞生命活动。而大型蚤在 DBP 暴露下 miR-153 表达量升高, AKT 的 mRNA 表达量下降, 证实了大型蚤 miR-153 与 AKT 基因 mRNA 的负调控关系。

综上, 本文对物种间 miR-153 序列的保守性及其靶基因功能进行分析, 发现 miR-153 序列在进化上高度保守, 推测大型蚤 miR-153 可通过靶基因参与细胞内的一些重要生物学过程, 如 DNA 模板和转录调控、氧化还原过程和信号转导等; DBP 暴露引起大型蚤 miR-153 的差异表达, 负调控 AKT 基因 mRNA

的表达水平, 可能使 AKT 介导的大型溞生命活动出现异常, 最终导致毒性效应。本研究为进一步解析 DBP 暴露对水生动物的分子毒性效应提供了理论依据。

基因项目

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] Wang, W., Leung, A.O.W., Chu, L.H. and Wong, M.H. (2018) Phthalates Contamination in China: Status, Trends and Human Exposure—With an Emphasis on Oral Intake. *Environmental Pollution*, **238**, 771-782. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.088>
- [2] Sun, G. and Li, Y. (2019) Exposure to DBP Induces the Toxicity in Early Development and Adverse Effects on Cardiac Development in Zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, **218**, 76-82. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.095>
- [3] Wang, J., Chen, G., Christie, P., Zhang, M., Luo, Y. and Teng, Y. (2015) Occurrence and Risk Assessment of Phthalate Esters (PAEs) in Vegetables and Soils of Suburban Plastic Film Greenhouses. *Science of the Total Environment*, **523**, 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.101>
- [4] 李磊, 蒋玫, 王云龙. 邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二辛酯对大黄鱼受精卵及仔鱼的急性毒性效应[J]. 海洋渔业, 2019, 41(3): 346-353.
- [5] Agus, H.H., Erkmen, B., Sümer, S., Sepici-Dinçel, A. and Erkoç, F. (2015) Impact of DBP on Histology and Expression of HSP 70 in Gill and Liver Tissue of *Cyprinus carpio*. *Molecular Biology Reports*, **42**, 1409-1417. <https://doi.org/10.1007/s11033-015-3920-8>
- [6] Shen, C., Wei, J., Wang, T. and Wang, Y. (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>
- [7] Wei, J., Shen, Q., Ban, Y., Wang, Y., Shen, C., Wang, T., Zhao, W. and Xie, X. (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>
- [8] Guarnieri, D.J. and Di Leone, R.J. (2008) MicroRNAs: A New Class of Gene Regulators. *Annals of Medicine*, **40**, 197-208. <https://doi.org/10.1080/07853890701771823>
- [9] Mandemakers, W., Abuhatzira, L., Xu, H., Caromile, L.A., Hébert, S.S., Snellinx, A., Morais, V.A., Matta, S., Cai, T., Notkins, A.L. and De Strooper, B. (2013) Co-Regulation of Intragenic microRNA miR-153 and Its Host Gene *Ia-2 β* : Identification of miR-153 Target Genes with Functions Related to *Ia-2 β* in Pancreas and Brain. *Diabetologia*, **256**, 1547-1556. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2901-5>
- [10] 施林生, 黄建飞, 卢辉和, 等. MiR-738 通过 Wnt 信号通路调控斑马鱼心脏发育[J]. 南通大学学报(医学版), 2014, 34(1): 8-10.
- [11] 王菊, 赵建军, 马旭. 丙烯酰胺对斑马鱼胚胎发育过程中 microRNA 表达的影响[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(3): 169-172.
- [12] Flynt, A.S., Thatcher, E.J., Burkewitz, K., Li, N., Liu, Y. and Patton, J.G. (2009) miR-8 microRNAs Regulate the Response to Osmotic Stress in Zebrafish Embryos. *Journal of Cell Biology*, **185**, 115-127. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807026>
- [13] 王梦婷, 曹杰宇, 王忠新, 等. MicroRNA 参与水生动物环境污染胁迫应答的研究进展[J]. 生物技术通报, 2021, 37(6): 272-278.
- [14] Li, H., Di, G., Zhang, Y., Xue, R., Zhang, J. and Liang, J. (2019) MicroRNA-155 and microRNA-181a, via HO-1, Participate in Regulating the Immunotoxicity of Cadmium in the Kidneys of Exposed *Cyprinus carpio*. *Fish and Shellfish Immunology*, **95**, 473-480. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.010>
- [15] Zhou, Z., Wang, L.L., Song, L.S., Liu, R., Zhang, H., Huang, M.M. and Chen, H. (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>
- [16] Shuai, C., Nichols, K.M., Poynton, H.C., et al. (2016) MicroRNAs Are Involved in Cadmium Tolerance in *Daphnia pulex*. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, **175**, 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.023>
- [17] Stollewerk A. (2010) The Water Flea *Daphnia*—A “New” Model System for Ecology and Evolution? *Journal of Biology*, **9**, Article No. 21. <https://doi.org/10.1186/jbiol212>

- [18] Guo, G., Zhang, Y., Hu, L. and Bian, X. (2019) MicroRNA-153 Affects Nasopharyngeal Cancer Cell Viability by Targeting TGF- β 2. *Oncology Letters*, **17**, 646-651. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9570>
- [19] Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y. and Mills, G.B. (2005) Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, **4**, 988-1004. <https://doi.org/10.1038/nrd1902>
- [20] Kumar, A., Rajendran, V., Sethumadhavan, R. and Purohit, R. (2013) AKT Kinase Pathway: A Leading Target in Cancer Research. *Scientific World Journal*, **2013**, Article ID: 756134. <https://doi.org/10.1155/2013/756134>
- [21] Hu, J., Lin, C., Liu, M., Tong, Q., Xu, S., Wang, D. and Zhao, Y. (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>
- [22] Lyu, K., Zhu, X., Wang, Q., Chen, Y. and Yang, Z. (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/es401521z>
- [23] 王敏. 连续多代暴露于邻苯二甲酸二丁酯对秀丽隐杆线虫的生殖毒性研究[D]: [硕士学位论文]. 遵义: 遵义医科大学, 2021.
- [24] 李磊, 蒋玫, 王云龙. 邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二辛酯对大黄鱼受精卵及仔鱼的急性毒性效应[J]. 海洋渔业, 2019, 41(3): 346-353.
- [25] 刘梦瑶, 张新生, 许何丽, 等. hsa-miR-885-5p 靶基因预测及功能分析[J]. 社区医学杂志, 2020, 18(24): 1646-1651.
- [26] Zhang, Q.L., Dong, Z.X., Xiong, Y., Li, H.W., Guo, J., Wang, F., Deng, X.Y., Chen, J.Y. and Lin, L.B. (2019) Genome-Wide Transcriptional Response of microRNAs to the Benzo(a)pyrene Stress in Amphioxus *Branchiostoma belcheri*. *Chemosphere*, **218**, 205-210. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.119>
- [27] Gao, X., Cong, Y., Yue, J., Xing, Z., Wang, Y. and Chai, X. (2019) Small RNA, Transcriptome, and Degradome Sequencing to Identify Salinity Stress Responsive miRNAs and Target Genes in *Dunaliella salina*. *Journal of Applied Phycology*, **31**, 1175-1183. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1612-1>
- [28] Bhatia, H., Kumar, A., Chapman, J.C. and McLaughlin, M.J. (2015) Long-Term Exposures to Di-n-butyl Phthalate Inhibit Body Growth and Impair Gonad Development in Juvenile Murray Rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Journal of Applied Toxicology*, **35**, 806-816. <https://doi.org/10.1002/jat.3076>
- [29] Zheng, Y., Yuan, J., Gu, Z., Yang, G., Li, T. and Chen, J. (2020) Transcriptome Alterations in Female *Daphnia magna* Exposed to 17 β -Estradiol. *Environmental Pollution*, **261**, Article ID: 114208. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114208>
- [30] Zhao, G., Zhang, Y., Zhao, Z., Cai, H., Zhao, X., Yang, T., Chen, W., Yao, C., Wang, Z., Wang, Z., Han, C. and Wang, H. (2020) MiR-153 Reduces Stem Cell-Like Phenotype and Tumor Growth of Lung Adenocarcinoma by Targeting Jagged1. *Stem Cell Research & Therapy*, **11**, 170. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01679-7>
- [31] 鲍培龙, 徐月亮, 王孝彬. miR-153 对肺腺癌细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡的影响及机制研究[J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(1): 107-113.
- [32] 徐启英, 左英, 郭桂兰, 等. miR-153 靶向调控 GALNT7 对宫颈癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响[J]. 中国高原医学与生物学杂志, 2018, 39(4): 247-251.
- [33] Chen, S., Nichols, K.M., Poynton, H.C. and Sepúlveda, M.S. (2016) MicroRNAs Are Involved in Cadmium Tolerance in *Daphnia pulex*. *Aquatic Toxicology*, **175**, 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.023>
- [34] Guo, M., Wang, Y., Zhao, H., Wang, D., Yin, K., Liu, Y., Li, B. and Xing, M. (2021) Zinc Antagonizes Common Carp (*Cyprinus carpio*) Intestinal Arsenic Poisoning through PI3K/AKT/mTOR Signaling Cascade and MAPK Pathway. *Aquatic Toxicology*, **240**, Article ID: 105986. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105986>
- [35] Zhou, T., Liu, J., Chan, S. and Wang, W. (2021) Molecular Characterization and Expression Dynamics of Three Key Genes in the PI3K-AKT Pathway Reveal Its Involvement in the Immunotoxicological Responses of the Giant River Prawn *Macrobrachium rosenbergii* to Acute Ammonia and Nitrite Stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **208**, Article ID: 111767. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111767>
- [36] Steelman, L.S., Stadelman, K.M., Chappell, W.H., Horn, S., Bäsecke, J., Cervello, M., Nicoletti, F., Libra, M., Stivala, F., Martelli, A.M. and McCubrey, J.A. (2008) AKT as a Therapeutic Target in Cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, **12**, 1139-1165. <https://doi.org/10.1517/14728222.12.9.1139>