

胚胎期及哺乳期全氟辛烷磺酸盐 (PFOS) 暴露对大鼠长时程突触可塑性影响的 miRNA 组学研究

王法琦, 刘薇, 金一和*, 马军胜, 于明曦

大连理工大学环境与生命科学技术学院 教育部工业生态和环境工程重点实验室, 大连 116024

摘要: 为探讨 PFOS 胚胎期及哺乳期暴露对动物子代学习记忆能力影响的分子机理, 采用微小 RNA(miRNA) 芯片技术检测 PFOS 胚胎期及哺乳期暴露对出生第 1 和 7 天大鼠脑组织 miRNA 表达的影响, 分析突触可塑性相关 miRNA 表达的差异变化。结果显示, 经 PFOS 暴露后出生第 1 和 7 天的大鼠脑组织中分别有 24 和 17 个 miRNA 发生显著性差异表达($p < 0.05$), 其中与突触传递和神经递质转运等相关的 miRNA 的差异表达最为显著, 主要包括 miR-466b、miR-672、miR-297、miR-674-3p 和 miR-207。差异表达 miRNA 的路径分析显示出生后 1 和 7 d 的大鼠的长时程增强效应(LTP)均受 PFOS 显著影响($p < 0.05$), 这说明 PFOS 胚胎期及哺乳期暴露可能通过影响 LTP 的形成、发展和维持过程对大鼠子代大脑学习记忆能力造成威胁, 并且 miR-466b、miR-672、miR-297、miR-674-3p 和 miR-207 可能参与了其中的调控过程。

关键词: 全氟辛烷磺酸盐; 长时程增强效应; miRNA 芯片; 突触可塑性

文章编号: 1673-5897(2012)5-491-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effect of Prenatal and Neonatal Exposure to Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) on Long-Term Synaptic Plasticity in Rat by MiRNA Microarray

Wang Faqi, Liu Wei, Jin Yihe*, Ma Junsheng, Yu Mingxi

Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering of Ministry of Education, School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

Received 17 November 2011 accepted 11 January 2012

Abstract: To explore the molecular mechanism underlying the toxic effect of PFOS prenatal and neonatal exposure on the study and memory ability of offspring, miRNA arrays were used to profile the expression of brain miRNAs in neonatal rats on postnatal day (PND) 1 and 7 with prenatal and neonatal exposure of PFOS. The results showed that twenty-four brain miRNAs on PND 1 and seventeen on PND 7 rats were significantly changed after PFOS exposure ($p < 0.05$). miR-466b, miR-672, miR-297, miR-674-3p and miR-207, which participate in neurotransmitter transport and synaptic transmission, showed the highest differential expression. The analysis of pathways associated with differentially expressed miRNAs indicated that long-term potentiation (LTP) in rat pups on PND 1 and 7 rats were significantly affected by PFOS exposure ($p < 0.05$). It is demonstrated that prenatal and neonatal exposure of PFOS could threaten the study and memory ability of rat offspring through the effect of the formation, maturation and maintenance of LTP. Moreover, miR-466b, miR-672, miR-297, miR-674-3p and miR-207 might be involved in the above process.

Keywords: perfluorooctane sulfonate; LTP; miRNA microarray; synaptic plasticity

收稿日期: 2011-11-17 录用日期: 2012-01-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(21177020; 20837004)

作者简介: 王法琦(1982-), 女, 博士, 研究方向为环境毒理学, E-mail: wangfaq317@126.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: jinyihe@dut.edu.cn

全氟辛烷磺酸盐(perfluorooctane sulfonate, PFOS)是各类全氟有机化合物经过化学或生物降解的最终产物,广泛用于表面活性剂、纺织品和泡沫灭火剂等数百种工业和生活用品中^[1]。最近的研究结果显示,若母鼠在妊娠期暴露于PFOS,PFOS可通过胎盘屏障和胎儿血脑屏障,导致仔鼠成年后发生神经行为障碍、潜在的学习和记忆功能异常、神经发育缺陷等一系列的神经中毒症状,这表明PFOS可对仔鼠的中枢神经系统造成永久性伤害^[2-5]。一些学者利用水迷宫实验,以新生鼠为研究对象,记录它们的游泳及逃脱表现、连续学习及记忆情况,未见PFOS直接影响新生鼠的学习记忆能力^[6-7]。由于PFOS引起的神经毒性具有潜伏性,往往在个体成熟后才显现出来^[8]。研究表明,PFOS可影响大鼠的空间学习记忆能力,并且这种影响可能与大脑皮质和海马的NR₂B编码基因表达水平的改变,以及母鼠的应激反应有关^[9-10]。另有研究指出,PFOS引起神经行为及学习记忆能力失调的机制可能是神经内分泌系统受到了影响,包括甲状腺激素系统、皮质酮激素和瘦素(leptin)激素等^[11-12]。而本研究组前期的研究结果表明,PFOS胚胎期及哺乳期暴露对长时程效应生物路径有潜在的毒性效应^[5],这说明PFOS对动物脑学习和记忆相关的生物功能的调控机制需在分子水平上进行深入探究。迄今为止,未见有关PFOS胚胎期及哺乳期暴露对动物成年后学习记忆能力影响的报道。

微小RNA(miRNA)是近年在植物、线虫、昆虫和哺乳动物中新发现的一类长度为18~26个核苷酸(nt)的小非编码RNA。研究表明,miRNA可通过与靶mRNA的3'非编码区(3'-UTR)互补,影响转录体的稳定性,或抑制转录体的翻译,以实现靶基因的抑制^[13],从而参与细胞众多生物学功能的调控,如生长发育,器官形成,造血过程,脂肪代谢,细胞的分化、增殖和凋亡,肿瘤和疾病进程等。利用生物芯片技术检测不同组织中、不同发育期、不同疾病状态下,特别是不同毒物暴露下,受试生物miRNA表达变化情况的研究日渐增多。

长时程效应是突触可塑性的一种细胞生理学表现形式,主要包括长时程增强(LTP)和长时程抑制(LTD)。它们的形成和维持依赖于许多神经过程和调控因子,例如细胞内外Ca²⁺稳态、Ca²⁺信号转导通路、谷氨酸受体、蛋白激酶C激活、磷酸化及去磷酸化过程、新基因的表达和蛋白合成、新树突棘的聚

集延伸等。LTD或LTP并不可能在某个突触的传递过程中独立表达,因为这两者的诱导机制存在一定的相似性^[14]。所不同的是:快速、大量的Ca²⁺流可诱导LTP,而缓慢、持久的Ca²⁺流则可诱导LTD^[15]。脑组织是miRNA表达的主要器官^[16],大量研究证明,脑功能失调与miRNA调控有关^[17-19]。神经系统的miR-297和miR-466-b等基因可参与调控突触传递的长时效应、神经发育和分化等过程^[16,20],而这些突触发生产生长时程延续的毒性效应同时也是PFOS的毒性表征^[21-24]。

由此本研究提出假设,PFOS对脑组织miRNA调控的干扰作用,是造成众多神经功能紊乱,诱导突触传递效能改变的可能机制之一。本研究利用miRNA芯片技术观察了胚胎期及哺乳期PFOS暴露对大鼠脑发育miRNA表达的影响,旨在揭示PFOS对突触可塑性的潜在影响的分子机理。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 染毒饲料的配制

全氟辛烷磺酸钾(K⁺PFOS, C₈F₁₇KO₃S, CAS NO. 2795-39-3,纯度>98%)购自美国Fluka公司。K⁺PFOS的溶剂为2%(体积分数)的吐温20。将配制成的1.6 mg·mL⁻¹ K⁺PFOS溶液按20 mL·kg⁻¹的比例充分混匀于粉状饲料中,染毒剂量为3.2 mg·kg⁻¹,并设置溶剂对照组。利用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术检测染毒饲料中PFOS的含量,以确保PFOS在饲料中的均匀性。

1.2 染毒实验

实验所用Wistar雄性大鼠(250~300 g)及雌性大鼠(180~200 g)购自大连医科大学动物中心。参照Wang等^[5]的方法,将大鼠按3(雌性):1(雄性)的比例夜合笼,次日清晨进行阴道镜检,以阴道镜检出精子记为母鼠妊娠第1天。将孕鼠随机分为对照组和PFOS染毒组(3.2 mg·kg⁻¹)。实验过程中剔除假孕母鼠。染毒起始于母鼠怀孕第1天,终止于仔鼠出生后第1天(PND 1)或第7天(PND 7)。

1.3 脑组织RNA提取

分别选取出生后第1天和第7天仔鼠,脱臼处死,于冰上快速取出脑皮质,小心分离外层组织,采集后的样品均保存于液氮中用于下步检测。

取约100 mg样品进行液氮研磨,RNA的提取过程按照RNA试剂盒(日本Takara公司)说明书操作。采用琼脂糖凝胶电泳,比较28S与18S RNA荧光度以确定RNA的完整性;采用紫外分光光度法

测定 RNA 在波长 260、280 和 320 nm 处的吸光度来计算 RNA 的纯度及浓度。从各实验组随机取出 6 个 RNA 样品(雌雄各半),混合均匀后准备进行 miRNA 芯片分析。

1.4 miRNA 芯片实验

采用鼠 OneArray[®] 芯片(台湾华联生物科技股份有限公司)对大鼠脑组织 miRNA 表达谱进行检测。对照组和 PFOS 染毒组样品共使用芯片 8 张,每组平行芯片 2 张。每张芯片包含 387 个成熟大鼠 miRNA 探针及 105 个阳性对照。每一目标序列有 3 个重复,探针完全根据 Sanger 数据库 V15 中大鼠及小鼠 miRNA 序列设计。对经过质控检测的 RNA 样品,利用 ULS miRNA 标记试剂盒(荷兰 Kreatech 公司)进行标记,为了有效地降低背景信号并提高芯片的检出率,在杂交前,对标记后的样品进行预杂交。之后,使用预热清洗液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液,质量分数为 0.2% 的十二烷基磺酸钠)于 37℃ 洗涤杂交芯片 5 min。采用 Genepix[™] 4100B 激光扫描仪(美国 Molecular Devices 公司)扫描芯片,数据利用 OneArray 芯片分析软件(台湾华联生物科技股份有限公司)进行 75% 归一化处理,找出 PFOS 暴露后的显著差异表达 miRNA。

1.5 生物信息分析

采用 3 种 miRNA 靶基因分析数据库 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)、mirSVR (<http://www.microrna.org/>) 和 miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) 分析差异表达 miRNA 的调控靶基因。利用生物信息数据库 DAVID 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 确定靶基因涉及的生物功能和生物路径。分析项目包括基因组学(gene ontology, GO)中的分子功能(molecular function, MF)与生物过程(bioprocess, BP)以及反映基因间相互联系的 KEGG 分析。分析统计方法为费舍尔的单尾精确概率法(Fisher's one-tailed exact probability value),以确定差异基因的相关丰度,统计学显著性由 P 值确定。

1.6 RT-PCR 验证 miRNA

微小 RNA RT-PCR 实验采用 All-in-One[™] miRNA qRT-PCR 试剂盒(美国 GeneCopoeia 公司)进行,为了降低实验误差,RT-PCR 检测采用与芯片实验相同的总 RNA 和引物序列。方法简述如下,将 1.8 μg 总 RNA 加入 25 μL 含有 1 μL $2.5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Poly A 聚合酶和 1 μL 混合反转录酶的体系中进行逆转录。反应条件为 85℃, 5 min; 37℃, 60 min。取反转录后的 cD-

NAs 2 μL 于 20 μL 体系中进行 PCR 扩增,体系中含有 miRNA PCR 引物和 All-in-One 通用引物各 2 μL , All-in-One 反应混合液 10 μL 。PCR 检测仪器采用 Rotor-Gene 3000 型实时荧光定量 PCR 仪(上海铂力生物科技有限公司,中国),检测条件为: 95℃, 10 min; 95℃, 10 s; 80℃, 20 s; 72℃, 10 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法对结果进行分析^[25]。

2 结果与分析(Results and analysis)

2.1 对仔鼠脑组织 miRNA 表达模式的影响

采用皮尔森(Pearson)方法分析各实验组平行样之间 miRNA 表达谱的相关性,发现平行样之间有良好的相关关系($r > 0.99$)(图 1)。芯片标记的已知 miRNA 共 387 个,其中 243 个在大鼠脑皮质组织中表达。科诺(Kernal)密度曲线显示,胚胎期和哺乳期的 PFOS 暴露对出生后第 1 天和第 7 天的仔鼠的脑 miRNA 表达密度分布有显著影响($P < 0.05$, t 检验)(图 2)。比较 PFOS 染毒组与对照组之间 miRNA 表达数量的差异,发现在出生第 1 天和第 7 天的仔鼠脑中分别有 24 和 17 个 miRNA 显著性差异表达(表 1)。出生第 1 天的仔鼠脑中,11 个 miRNA 上调表达,13 个 miRNA 下调表达。出生第 7 天的仔鼠脑中,2 个 miRNA 上调表达,15 个 miRNA 下调表达。其中,上调表达超过 2 倍的 miRNA 只出现在出生第 1 天的仔鼠脑中,而且都是哺乳动物生命系统中表达量很低的非保守性 miRNA,包括 miR-10b、miR-204* 和 miR-25*。同时还观察到,10 个 miRNA 在出生第 1 天和第 7 天的仔鼠脑中均下调表达,2 个 miRNA 在出生第 1 天和第 7 天的仔鼠脑中均上调表达,2 个 miRNA 的表达在出生第 1 天上调而出生第 7 天下调,没有发现出生第 1 天下调但出生第 7 天上调的 miRNA(图 3)。可见,在发育期经 PFOS 暴露后,出生 1~7 d 的仔鼠中下调表达 miRNA 在数量或变化程度上均明显高于上调表达的 miRNA。

2.2 差异表达 miRNA 调控靶基因及功能分析

差异表达 miRNA 经 3 种靶基因分析工具分析后,综合所有分析结果,去除其中重复的基因,得到不同分析结果的并集。随后,采用 DAVID 6.7 分析确定靶基因相关的生物功能和 KEGG 路径,仅对 $P < 0.01$,且每项功能涉及的基因数 ≥ 2 的生物功能或路径进行后续研究。基因组学分析差异表达 miRNA 相关的生物过程(BP)主要包括突触传递、生长调控、神经脉冲传递、蛋白代谢和有机酸转运等;相关的分子功能(MF)包括电压门控离子通道活性、

蛋白二聚化活性、磷酸肌醇结合、电压门控通道活性和蛋白激酶活性等。KEGG 分析差异表达 miRNA 的生物路径如表 2 所示。差异表达 miRNA 相关生物路径在出生第 1 天为 33 条, 出生第 7 天为 8 条,

而出生第 1 天的这 33 条路径恰好包含了出生第 7 天的所有生物路径, 如致癌途径、神经营养因子信号通路、Wnt 信号通路以及长时程增强效应等(表 2)。

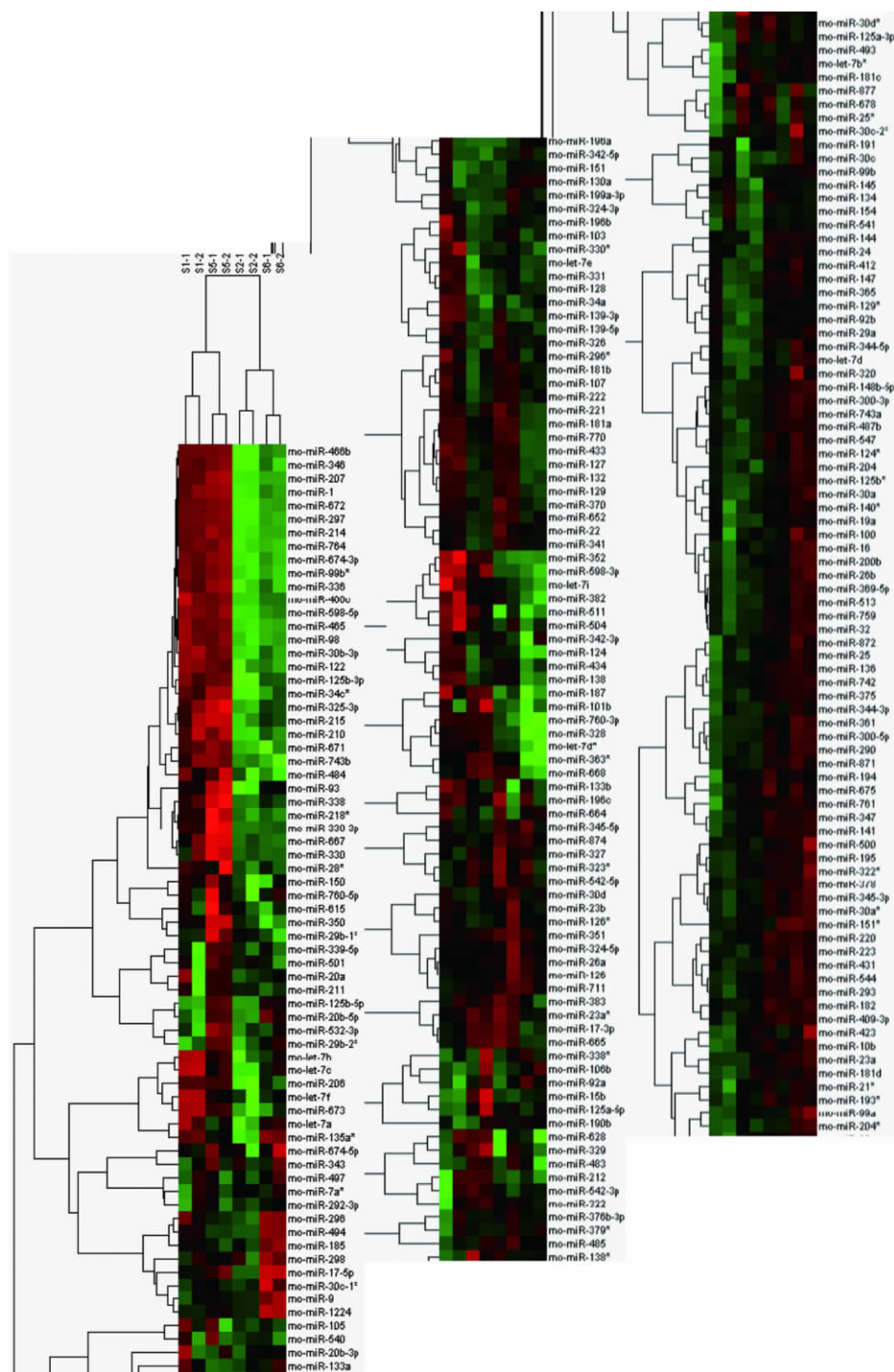


图1 经 PFOS 胚胎期和哺乳期暴露后出生第 1 和 7 天(PND 1 和 PND 7) 仔鼠脑皮质中 miRNA 聚类分析图

注: S1-1、S1-2 表示出生第 1 天的对照组平行样, S2-1、S2-2 表示出生第 1 天的 PFOS 染毒组平行样, S5-1、S5-2 表示出生第 7 天的对照组平行样, S6-1、S6-2 表示出生第 7 天的染毒组平行样。

Fig. 1 Hierarchical clustering scheme of miRNAs detected in the cortex of rat pups on postnatal day 1 and 7 (PND 1 and PND 7) after prenatal and neonatal exposure to PFOS

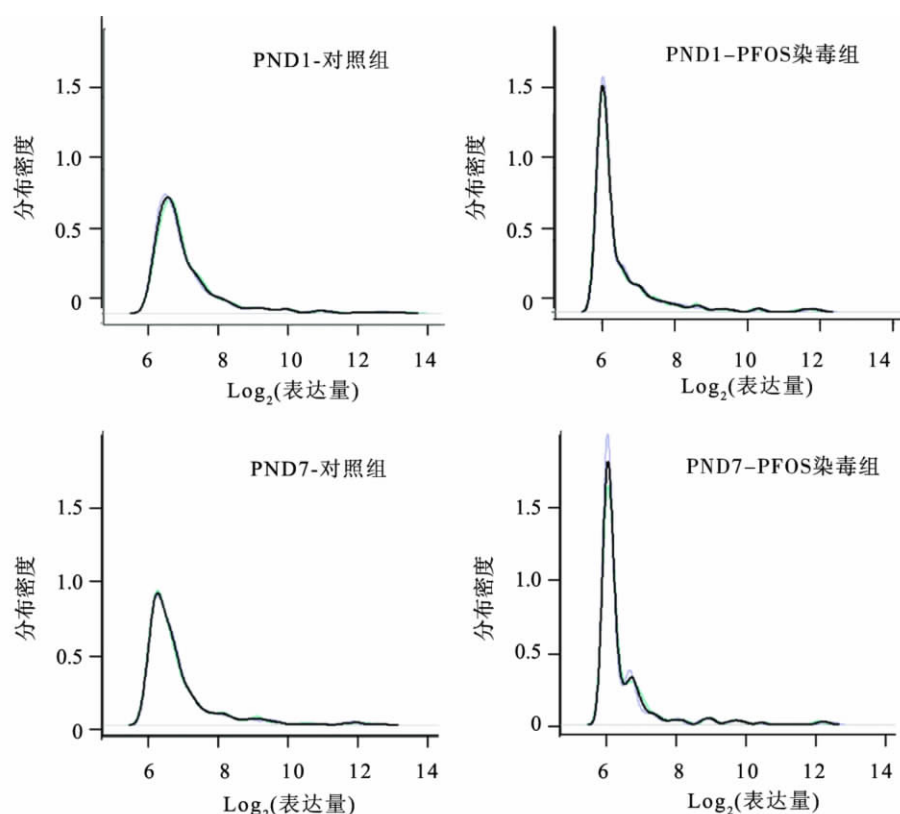


图2 PFOS 胚胎期和哺乳期暴露对出生第1天和第7天仔鼠脑 miRNA 表达分布的影响

Fig.2 Effect of prenatal and neonatal exposure to PFOS on distribution of brain miRNA expression of rat pups on PND 1 and PND 7

2.3 miRNA 与 mRNA 表达谱揭示差异靶基因相关生物功能的比较

将本研究的 miRNA 芯片结果与前期研究组所获的基因表达结果^[5]进行比较,发现 2 种芯片平台共同揭示了一些受 PFOS 潜在影响的靶基因,出生后第 1 天有 76 个,出生后第 7 天有 106 个。2 种芯片平台共同预测了一些差异靶基因相关的生物过程和生物路径,图 4 展示了其中与突触可塑性相关的生物过程和路径,以及各项功能或路径的基因相关丰度,以 PV(percentage value)值表示。

2.4 miRNA 芯片结果的验证

为检验 miRNA 芯片实验结果的准确性,采用 RT - PCR 技术检测了芯片结果中差异表达倍数较高的 4 种 miRNA (miR-672、miR-207、miR-297 和 miR-1)在出生第 1 天和第 7 天大鼠脑皮质中的表达情况,检测的 4 种 miRNA 均在神经突触传递及长时程增强过程中起关键作用。比较 miRNA 芯片与 RT - PCR 的检测结果,发现 4 种 miRNA 的表达量在 2 种技术检测中均表现出一致的差异变化,从而验证了 miRNA 芯片结果的有效性(表 3)。

3 讨论(Discussion)

PFOS 对神经系统发育的影响一直以来都是研究的热点,虽然以往的 PFOS 神经行为学研究显示 PFOS 对生物的学习和记忆能力并没有显著的干扰作用,而仅对其空间学习记忆能力有一定的毒害效应^[9-10]。然而,由于 PFOS 的发育神经毒性具有潜伏性,在生物发育早期没有表现出的毒性效应会在个体成熟后显现出来^[8]。因此,针对这种效应低,但效应持续时间长的生物毒性的研究也应给予足够的重视。本研究通过考察 miRNA 表达谱的变化,发现有 5 种 miRNA 差异表达最显著,分别为 miR-466b、miR-672、miR-297、miR-674-3p 和 miR-207,它们均参与了对长时程突触可塑性相关蛋白的基因转录或翻译过程的调控。其中,miR-297 和 miR-466b 可影响突触神经小体的形成和功能^[20],miR-297 在仔鼠出生的第 1 天和第 7 天均降低至对照的 18%,miR-466b 则在出生的第 1 天和第 7 天分别降低至对照的 10% 和 18%,这表明,PFOS 对神经突触的发生及发展的毒性效应^[20],以及 PFOS 对突触可塑性 LTP/LTD 的潜在干扰作用均可能与 miRNA 表达

改变有关,PFOS对突触的这种毒性效应不断累积,直至影响到动物的学习记忆能力。

表1 经PFOS胚胎期和哺乳期暴露后出生第1天和第7天仔鼠脑皮质中差异表达的miRNA

Table 1 MiRNAs with significant expression levels in cortex of rat pups on PND 1 and PND 7 after prenatal and neonatal exposure to PFOS

miRNA 名称	对照组 (信号强度)	PFOS 暴露组 (信号强度)	FC	Log ₂ FC
PND 1				
下调表达(n = 13)				
rno-miR-466b	6 481.60	669.85	0.10	- 3.27
rno-miR-672	804.24	120.59	0.15	- 2.74
rno-miR-297	474.04	84.38	0.18	- 2.49
rno-miR-674-3p	222.33	84.38	0.38	- 1.40
rno-miR-207	390.91	166.01	0.42	- 1.24
rno-miR-346	196.61	91.01	0.46	- 1.11
rno-miR-466c	168.39	81.47	0.48	- 1.05
rno-miR-125b-3p	419.52	213.37	0.51	- 0.98
rno-miR-325-3p	190.43	107.33	0.56	- 0.83
rno-miR-598-5p	124.70	74.36	0.60	- 0.75
rno-miR-1	135.33	80.82	0.60	- 0.74
rno-miR-336	183.08	110.56	0.60	- 0.73
rno-miR-764	126.24	76.30	0.60	- 0.73
上调表达(n = 11)				
rno-miR-10b	123.15	271.88	2.21	1.14
rno-miR-204*	150.12	314.56	2.10	1.07
rno-miR-25*	1 712.22	3 463.69	2.02	1.02
rno-miR-542-5p	229.48	450.98	1.97	0.97
rno-miR-181c	194.00	353.67	1.82	0.87
rno-miR-17-3p	53.16	97.15	1.83	0.87
rno-miR-126	85.35	152.27	1.78	0.84
rno-miR-23a*	67.18	118.16	1.76	0.81
rno-miR-363*	87.00	147.42	1.69	0.76
rno-miR-668	535.63	892.92	1.67	0.74
rno-miR-665	59.93	98.6	1.65	0.72
PND 7				
下调表达(n = 15)				
rno-miR-672	758.05	131.64	0.17	- 2.53
rno-miR-297	439.63	79.07	0.18	- 2.48
rno-miR-466b	5 377.61	976.68	0.18	- 2.46
rno-miR-363*	2 599.81	828.79	0.32	- 1.65
rno-miR-207	469.94	151.99	0.32	- 1.63
rno-miR-674-3p	228.56	78.49	0.34	- 1.54
rno-miR-325-3p	252.90	113.63	0.45	- 1.15
rno-miR-346	197.94	97.81	0.49	- 1.02
rno-miR-667	214.90	117.14	0.55	- 0.88
rno-miR-668	214.91	118.61	0.55	- 0.86
rno-miR-336	195.38	109.82	0.56	- 0.83
rno-miR-764	124.21	71.16	0.57	- 0.80
rno-miR-1	137.65	80.83	0.59	- 0.77
rno-miR-214	314.56	185.96	0.59	- 0.76
rno-miR-466c	136.16	80.98	0.59	- 0.75
上调表达(n = 2)				
rno-miR-204*	593.00	976.68	1.65	0.72
rno-miR-494	3 596.88	5 940.92	1.65	0.72

注: FC 表示差异倍数; 差异显著性分析显示 $P < 0.05$ 且 $\log_2 FC < -0.7$ 或 > 0.7 。

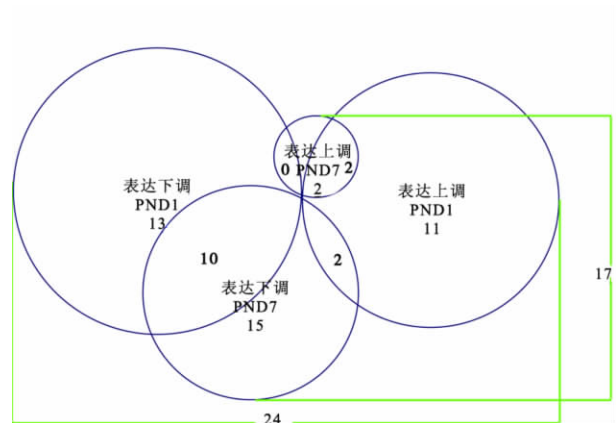


图3 经PFOS胚胎期和哺乳期暴露后出生第1天和第7天仔鼠脑组织差异表达miRNA数量分布

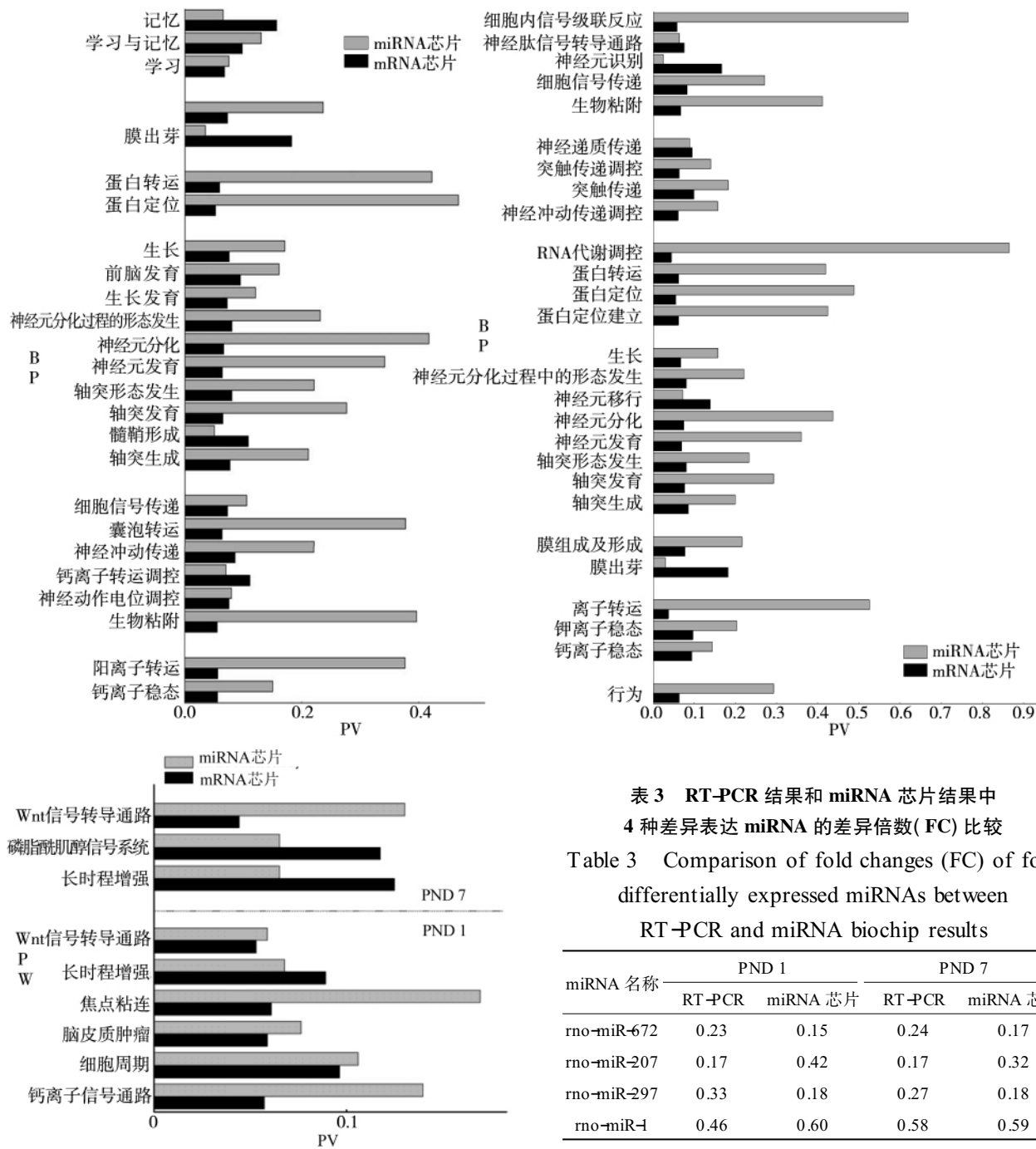
Fig. 3 Numeric distribution of differentially expressed miRNAs in brains of rat pups on PND 1 and PND 7 after prenatal and neonatal exposure to PFOS

表2 经PFOS胚胎期和哺乳期暴露后出生第1天和第7天仔鼠脑皮质中差异表达miRNA的相关生物路径

Table 2 Differentially expressed miRNAs associated biopathways in the cortex of rat pups on PND 1 and PND 7 after prenatal and neonatal exposure to PFOS

路径名称	差异基因百分比/%	PV 值
PND 1		
癌症路径	2.6E+01	1.5E+04
mTOR 信号路径	7.2E+02	3.1E+04
黏着斑形成	1.7E+01	7.4E+04
胰岛素信号通路	1.3E+01	7.5E+04
神经营养蛋白信号通路	1.2E+01	7.6E+04
细胞癌症	8.1E+02	9.5E+04
胰腺癌	8.1E+02	9.5E+04
卵母细胞减数分裂	1.1E+01	1.2E+03
中枢神经系统发育	8.9E+02	1.7E+03
蛋白信号通路	7.2E+02	4.7E+03
ErbB 信号通路	8.5E+02	4.8E+03
Wnt 信号通路	1.2E+01	6.6E+03
细胞内吞作用	1.6E+01	8.0E+03
肌侧萎缩硬化症	6.4E+02	8.5E+03
PND 7		
癌症路径	2.6E+01	1.6E+03
卵母细胞减数分裂	1.2E+01	2.1E+03
黏着斑形成	1.7E+01	3.2E+03
神经营养蛋白信号通路	1.2E+01	5.0E+03
Wnt 信号通路	1.3E+01	7.6E+03

注: 差异基因百分比指芯片结果中某一路径涉及的差异基因数与此项路径相关的总基因数的百分比; PV 值用以表示某一路径的基因相关丰度。



同样,利用生物信息工具分析也得到了类似的结果。miRNA 芯片结果经基因组学分析后得到大量与突触可塑性相关的生物过程(BP)信息,其中一些 BP 也是本研究组前期对 mRNA 芯片结果分析得到的 PFOS 反应性 BP。长时程增强和 Wnt 信号转导通路是 2 种芯片结果中均显示显著变化的路径,而且这 2 条路径也是唯一 2 条在出生第 1 和 7 天均有明显改变的路径。不同的生物芯片在不同的发育期预测出的生物路径的改变具有一致性,这说

明,与其他生物过程相比,这些生物过程或路径在PFOS暴露后发生功能性改变的可能性更大,提示发育早期的PFOS暴露极有可能影响突触传递的长时程增强作用,且这种效应与miRNA的调控有关,这些差异表达miRNA和mRNA相关的生物过程可能参与PFOS的致毒过程。2种芯片结果均显示PFOS对出生第1天和第7天的大鼠的 Ca^{2+} 稳态及转运相关过程有潜在影响,如钙离子稳态和阳离子转运等。突触前后 Ca^{2+} 浓度的变化在突触长时程可塑性中发挥了重要的信息传递作用^[26]。首先, Ca^{2+} 是突触发生的启动信号。神经细胞受到刺激后产生动作电位并向远端的轴突传播,使突触前 Ca^{2+} 通道开放并释放神经递质,作用于突触后神经元相应的兴奋性或抑制性受体上,使突触后神经元局部膜去极化或超极化,从而产生兴奋性电流(ESPS)或抑制性电流(ISPS)^[27]。其次, Ca^{2+} 浓度升高是LTP/LTD形成、维持及产生膜受体变化与即刻早基因(IEG)表达的必要条件。神经元最后形成的是LTP还是LTD,取决于 Ca^{2+} 流的速度和强度^[28]。LTP的后期维持需要新基因的表达和蛋白的合成, Ca^{2+} 作为第二信使通过激活钙调蛋白CaMK II和CREB等多种蛋白因子调控IEG的表达,IEG转录表达后可作用于相关靶基因,诱导重要蛋白的表达,以维持LTP^[26,29]。以往研究已证实,PFOS可改变钙调蛋白CaMK II和CREB表达水平^[30],对 Ca^{2+} 信号通路产生毒性效应。由此可见,PFOS有可能通过干扰 Ca^{2+} 相关生物过程影响突触的长时程增强效应。

在本研究的miRNA表达谱和前期研究的mRNA表达谱中,还发现了一些诸如生物粘附、细胞信号传递、神经冲动传递和神经动作电位调控等PFOS反应性BP,这些BP是LTP/LTD的起始启动信号,它们的改变会影响动作电位的强度及频率,继而对后续的突触传递和长时程效应产生一系列的干扰作用^[31]。长时程效应的产生必须以神经递质有效地转运至突触前膜为前提,当它们与突触囊泡上的 Ca^{2+} 感受器蛋白的突触结合蛋白结合后,改变了处于准备状态的3个SNARE蛋白的疏松结合模式,在极短的时间内使之形成紧密稳定的SNARE核心复合体^[31]。在一系列蛋白相互作用下,囊泡和突触前膜进一步靠拢并形成融合孔,将神经递质释放到突触间隙^[31]。分析结果中的突触传递、囊泡转运和神经递质转运这3种BP涉及的调控miRNA

无论在大鼠出生后1 d或7 d,都是众多差异表达miRNA中变化倍数最显著的,包括miR-466b、miR-672、miR-297、miR-674-3p和miR-207,说明PFOS极有可能通过改变这些miRNA的表达,干扰突触传递中的递质释放转运过程,而对LTP造成影响。

此外,一些BP如蛋白定位、轴突生成及发育、神经元分化及发育和学习记忆等过程也是miRNA和mRNA 2种芯片结果中均有显著变化BP,它们显示了神经元在LTP后期发生的功能变化和形态改变,是突触可塑性的重要体现。突触发育首先表现的是突触后受体的动态转运调节,磷酸化及去磷酸化过程可使突触后受体参与插入膜和内含的动态活动,或者参与调节离子型受体的通道通透性,最终导致蛋白定位的改变^[32]。LTP的诱导和表达可调节特异性基因和蛋白的表达,包括蛋白磷酸化、新基因表达和新蛋白合成等细胞内效应,使整个突触后结构的树突棘发生活跃的动态变化,从而进一步影响神经元的分化和生长以及中枢神经系统的长时程记忆^[33-34]。因此,这些生物过程的显著改变再次证实了发育早期的PFOS暴露对动物子代学习记忆能力有潜在威胁。

综上所述,miRNA分子可能在神经系统发育早期参与了PFOS的致毒过程,其中对长时程增强效应的调控潜能最为显著。LTP是脑学习记忆的细胞基础,大鼠发育早期的PFOS暴露可能对突触传递的LTP产生影响,进而干扰神经系统的突触可塑性,威胁脑的学习记忆功能,一些PFOS反应性脑miRNA可能参与了其中的调控过程,如miR-466b、miR-672、miR-297、miR-674-3p和miR-207。因此,母体在子体胚胎期及出生早期避免PFOS的暴露对保护后代学习记忆功能和脑的健康发育至关重要。

通讯作者简介: 金一和(1959—),男,教授,博士生导师,研究方向为环境毒理学。1990年7月,毕业于日本秋田大学医学部,现任日本毒理学会海外评议员、中国气象学会大气成分委员会委员,并任《生态毒理学报》、《中华预防医学杂志》、《卫生研究》和《国外医学》(卫生学分册)等期刊编委。

参考文献:

- [1] Renner R. Growing concern over perfluorinated chemicals [J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35(7): 154 - 160
- [2] Chang S C, Ehresman D J, Bjork J A, et al. Gestational and lactational exposure to potassium perfluorooctane-sulfonate (K^+ PFOS) in rats: Toxicokinetics, thyroid hormone status, and related gene expression [J]. *Repro-*

- ductive Toxicology, 2009, 27(3-4): 387 - 399
- [3] Johansson N, Fredriksson A, Eriksson P. Neonatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) causes neurobehavioural defects in adult mice [J]. Neurotoxicology, 2008, 29(1): 160 - 169
- [4] Luebker D J, Case M T, York R G, et al. Two-generation reproduction and cross-foster studies of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in rats [J]. Toxicology, 2005, 215(1-2): 126 - 148
- [5] Wang F Q, Liu W, Jin Y H, et al. Transcriptional effects of prenatal and neonatal exposure to PFOS in developing rat brain [J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(5): 1847 - 1853
- [6] Lau C, Thibodeaux J R, Hanson R G, et al. Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II. Postnatal evaluation [J]. Toxicological Sciences, 2003, 74(2): 382 - 392
- [7] Lau C, Butenhoff J L, Rogers J M. The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2004, 198(2): 231 - 241
- [8] Butenhoff J L, Ehresman D J, Chang S C, et al. Gestational and lactational exposure to potassium perfluorooctanesulfonate (K^+ PFOS) in rats: Developmental neurotoxicity [J]. Reproductive Toxicology, 2009, 27(3): 319 - 330
- [9] Liu L, Jin Y H, Wang L, et al. Effects of perfluorooctane sulfonate on learning and memory of rat pups [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2009, 43(7): 622 - 627
- [10] Fuentes S, Colomina M T, Vicens P, et al. Influence of maternal restraint stress on the long-lasting effects induced by prenatal exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS) in mice [J]. Toxicological Letters, 2007, 171(3): 162 - 170
- [11] Austin M E, Kasturi B S, Barber M, et al. Neuroendocrine effects of perfluorooctane sulfonate in rats [J]. Environmental Health Perspectives, 2003, 111(12): 1485 - 1489
- [12] Yu W G, Liu W, Jin Y H, et al. Prenatal and postnatal impact of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on rat development: A cross-foster study on chemical burden and thyroid hormone system [J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(21): 8416 - 8422
- [13] 高宁, 李龙江. 微小 RNA 调控靶基因作用机制的研究进展[J]. 国际口腔医学杂志, 2008, 35(1): 35 - 37
- Gao N, Li L J. Progresses on the study microRNA's regulation mechanism [J]. International Journal of Stomatology, 2008, 35(1): 35 - 37 (in Chinese)
- [14] Laezza F, Doherty J J, Dingledine R. Long-term depression in hippocampal interneurons: Joint requirement for pre- and postsynaptic events [J]. Science, 1999, 285(5432): 1411 - 1414
- [15] Malenka R C, Nicoll R A. Long-term potentiation—A decade of progress? [J]. Science, 1999, 285(5435): 1870 - 1874
- [16] Olsen L, Klausen M, Helboe L, et al. MicroRNAs show mutually exclusive expression patterns in the brain of adult male rats [J]. PLoS One, 2009, 4(10): e7225
- [17] Zhang B, Pan X. RDX induces aberrant expression of microRNAs in mouse brain and liver [J]. Environmental Health Perspectives, 2009, 117(2): 231 - 240
- [18] Sathyan P, Golden H B, Miranda R C. Competing interactions between micro-RNAs determine neural progenitor survival and proliferation after ethanol exposure: Evidence from an ex vivo model of the fetal cerebral cortical neuroepithelium [J]. The Journal of Neuroscience, 2007, 27(32): 8546 - 8557
- [19] Hua Y J, Tang Z Y, Tu K, et al. Identification and target prediction of miRNAs specifically expressed in rat neural tissue [J]. BMC Genomics, 2009, 10(1): 214
- [20] Konecna A, Heraud J E, Schoderboeck L, et al. What are the roles of microRNAs at the mammalian synapse? [J]. Neuroscience Letters, 2009, 466(2): 63 - 68
- [21] Johansson N, Eriksson P, Viberg H. Neonatal exposure to PFOS and PFOA in mice results in changes in proteins which are important for neuronal growth and synaptogenesis in the developing brain [J]. Toxicological Sciences, 2009, 108(2): 412 - 418
- [22] Zeng H C, Zhang L, Li Y Y, et al. Inflammation-like glial response in rat brain induced by prenatal PFOS exposure [J]. Neurotoxicology, 2011, 32(1): 130 - 139
- [23] Zeng H C, Li Y Y, Zhang L, et al. Prenatal exposure to perfluorooctanesulfonate in rat resulted in long-lasting changes of expression of synapsins and synaptophysin [J]. Synapse, 2011, 65(3): 225 - 233
- [24] Wang F Q, Liu W, Jin Y H, et al. Interaction of PFOS and BDE-47 co-exposure on thyroid hormone levels and TH-related gene and protein expression in developing rat brains [J]. Toxicological Sciences, 2011, 121(2): 279 - 291
- [25] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(2): 402 - 408
- [26] Yang H W, Hu X D, Zhang H M, et al. Roles of

- CaMKII, PKA, and PKC in the induction and maintenance of LTP of C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn [J]. *Journal of Neurophysiology*, 2004, 91(3): 1122 – 1133
- [27] Vargas R, Cifuentes F, Morales M A. Differential contribution of extracellular and intracellular calcium sources to basal transmission and long-term potentiation in the sympathetic ganglion of the rat [J]. *Developmental Neurobiology*, 2007, 67(5): 589 – 602
- [28] Xia Z, Storm D R. The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2005, 6(4): 267 – 276
- [29] Frank D A, Greenberg M E. CREB: A mediator of long-term memory from mollusks to mammals [J]. *Cell*, 1994, 79(1): 5 – 8
- [30] Liu X H, Liu W, Jin Y H, et al. Effects of subchronic perfluorooctane sulfonate exposure of rats on calcium-dependent signaling molecules in the brain tissue [J]. *Archives of Toxicology*, 2010, 84(6): 471 – 479
- [31] Lledo P M, Zhang X G, Südhof T C, et al. Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation [J]. *Science*, 1998, 279(5349): 399 – 403
- [32] Oumesmar B N, Vignais L, Duhamel-clerin E, et al. Expression of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule during postnatal myelination and following chemically induced demyelination of the adult mouse spinal cord [J]. *European Journal of Neuroscience*, 1995, 7(3): 480 – 491
- [33] Foster T C. Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory [J]. *Brain Research Reviews*, 1999, 30(3): 236 – 249
- [34] Napolitano M, Marfia G A, Vacca A, et al. Modulation of gene expression following long-term synaptic depression in the striatum [J]. *Molecular Brain Research*, 1999, 72(1): 89 – 96 ◆