

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20190403003

田宇, 徐晨露, 黄丹妮, 等. 交通空气污染对大鼠子代发育及社交行为的影响[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(2): 104-112

Tian Y, Xu C L, Huang D N, et al. Effects of traffic-related air pollution on development and social behavior of offspring rats [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(2): 104-112 (in Chinese)

交通空气污染对大鼠子代发育及社交行为的影响

田宇¹, 徐晨露¹, 黄丹妮¹, 冯钰东², 陈佳峰², 刘晨阳², 金永堂^{1,*}

1. 环境表观遗传实验室, 杭州 310058

2. 浙江大学医学部, 杭州 310058

收稿日期: 2019-04-03 录用日期: 2019-06-27

摘要: 交通空气污染与儿童自闭症的关联时有报道, 但其因果关系仍待进一步探索。为研究出生前后暴露于不同水平的交通空气污染环境对生长发育和自闭症相关社交行为的影响, 将 Wistar 大鼠雌雄 1:1 交配, 受孕雌鼠根据子代接触交通污染的时间(出生后暴露或胚胎期暴露)及浓度(低、中和高 3 个水平)分为 6 组。在子代出生后 21 ~ 27 d, 测量子代的体重、身长及大脑脏器系数, 并根据三箱实验评估社交行为, 同时检测仔鼠脑组织组蛋白 H3 第 4 个赖氨酸(H3K4)的甲基化水平。结果显示, 出生前后, 尤其是胚胎发育阶段接触较高浓度的交通空气污染物可导致幼鼠体重及大脑湿重较低, 身长较短、大脑脏器系数偏高等生长发育特征改变。同时, 出生前后较高浓度的交通空气污染物暴露可导致幼鼠出现社交能力下降、社交记忆受损及社交新颖性减弱等典型自闭症样行为改变。虽然组蛋白 H3K4 甲基化水平与交通空气污染物浓度之间未见统计学关联, 但出生后暴露组具有较高的 H3K4 甲基化水平, 提示出生前后接触交通空气污染物可能与自闭症的发生发展有关, 而不同暴露时期对脑组织 H3K4 甲基化水平的影响, 为今后进一步探讨自闭症的表观遗传机制提供了线索。

关键词: 交通空气污染; 组蛋白 H3K4 甲基化; 自闭症; 社交行为

文章编号: 1673-5897(2020)2-104-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Traffic-Related Air Pollution on Development and Social Behavior of Offspring Rats

Tian Yu¹, Xu Chenlu¹, Huang Danni¹, Feng Yudong², Chen Jiafeng², Liu Chenyang², Jin Yongtang^{1,*}

1. Environmental Epigenetics Laboratory, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

2. Department of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Received 3 April 2019 accepted 27 June 2019

Abstract: It has been reported that the occurrence of autism in children might be associated with traffic-related air pollution, which needs to be further explored. To study the effects of different levels of traffic-related air pollution, Wistar rats were used to study growth development and social behavior after exposure to traffic-related air pollution before and after birth. Wistar rats were mated at the male to female ratio of 1:1. Pregnant female rats were divided into six groups and then exposed to different concentration of traffic-related air pollutants (i.e., low, medium and high levels) at different time point (i.e., postnatal or embryonic). From the 21st to 27th day after the birth, the body

基金项目: 国家自然科学基金项目(81673124)

作者简介: 田宇(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境卫生学, E-mail: 21718610@zju.edu.cn

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: jinedu@zju.edu

weight, length and brain coefficient of the offspring were measured and social behavior was assessed by three chambers test, while the methylation of histone 3 lysine 4 (H3K4) in brain tissues was detected. The results showed that the offspring rats had lower body weight, shorter body length and higher organ coefficient with higher concentrations of traffic-related air pollutants exposure, especially during the embryonic development. Likewise, typical autistic-like behavioral changes such as decreased social competence, impaired social memory and reduced social novelty in offspring rats can also be observed. Although there was no positive correlation between levels of histone H3K4 methylation and concentration of traffic-related air pollution, the postnatal exposure group had higher level of H3K4 methylation. The above data suggested that traffic-related air pollution might be a potential reason of autism. Moreover, the changes in H3K4 methylation in brain tissues that induced by traffic-related air pollution at different exposure time point could provide an evidence for further study on the epigenetic mechanism of autism.

Keywords: traffic-related air pollution; histone H3K4 methylation; autism; social behavior

随着城市化进程的加快,全球空气质量已不容乐观,根据世界卫生组织的数据,全球 91% 的人口每天呼吸着受污染的空气,而尾气排放已成为空气污染的主要原因^[1]。交通尾气成分非常复杂,主要有害物质包括细颗粒物、氮氧化物和二氧化硫等。这些污染物可以通过呼吸系统进入血液循环,透过血脑屏障进入大脑,造成炎症反应和氧化应激损伤,引起中枢神经系统异常改变^[2]。

自闭症是一种神经发育障碍性疾病,主要表现为沟通困难、社交障碍和重复刻板行为。美国国家疾控中心数据显示,自闭症患病率从 2012 年的 1.46% 增长到 2016 年的 2.47%^[3],但病因未明,且治疗困难。Volk 等^[4-6]对美国加利福尼亚州的病例进行研究发现,母亲怀孕期间和后代出生后第一年暴露于与交通有关的空气污染、NO₂、PM_{2.5} 和 PM₁₀ 与自闭症有关。Kerin 等^[7]的调查显示,孕早期 NO₂ 暴露剂量与儿童认知、适应能力评分呈负相关。Pagalan 等^[8]的研究指出,儿童自闭症与母亲孕期 NO 暴露有关(优势比(OR)=1.07,95% 置信区间(CI)=1.01~1.13)而与 NO₂ 和 PM_{2.5} 无关。总的来说,在交通空气污染与自闭症关系的研究中,虽然有一些阴性结论^[9],但大部分研究结果都证明了二者的联系^[6,10-11],也提示仍需要进一步实验性研究来证明交通空气污染与自闭症的因果关联。有研究利用动物实验,采用柴油机颗粒物急性吸入的方式模拟交通空气污染物暴露,研究结果显示,动物出现了自闭症样改变,但模拟浓度较高,无法真实反映人群的尾气暴露状况^[12]。

自闭症病因机制未明,目前认为,除了遗传因素外,受环境影响的组蛋白甲基化等表观遗传改变可能在调控大脑发育过程中发挥了关键作用。H3K4

甲基化修饰作为一种染色质标志,广泛参与许多生物学过程,包括异染色质的形成、X 染色体失活和转录调控等,与基因表达激活有关^[13]。H3K4 甲基化异常会改变其与 RNA 聚合酶的结合状态,影响 DNA 转录,进而引起大脑发育的改变,与神经发育和神经系统疾病有关^[14]。有研究表明,一些与 H3K4 去甲基化相关的特异性酶发生基因突变与自闭症有关^[15-16]。此外,部分自闭症患者脑组织中存在 H3K4 甲基化上调及分布范围扩大,伴相应基因转录产物的表达异常,而这些基因通常与神经元连接、社会行为和认知功能有关^[17-18]。值得注意的是,人类大脑皮质中的 H3K4 甲基化修饰从产前发育期间到幼儿期甚至青春期都是动态调节的^[19],可能会在与外界环境相互作用的过程中发生一些自闭症相关的改变。

因此,本研究采用模拟人体生活环境的交通道路实地暴露方法,将 Wistar 孕鼠在整个孕期或窝鼠整个哺乳期分别置于校园对照区域、普通路段及城市主干道十字路口进行交通空气污染物暴露,然后对其子代进行生长发育测量及行为学分析,通过更真实的人群生活环境来探索出生前后交通空气污染暴露对大鼠自闭症样行为的影响,并分析出生前后暴露于交通空气污染物与脑组织 H3K4 甲基化调控的关系,为深入认识自闭症的危险因素、病因机制和预防措施提供思路。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 主要仪器材料

纤维滤膜(江苏盐城思锐仪器),中等流量悬浮颗粒物采样器(浙江恒达仪器,ZC-Q0101),PM_{2.5}-PM₅-PM₁₀-TSP 切割器(浙江恒达仪器),Any-maze 动物行为分析系统(美国 Stoelting 公司),总组蛋白提

取试剂盒(美国 Epigentek 公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天公司),总组蛋白 H3K4 甲基化定量检测试剂盒(美国 Epigentek 公司)。

1.2 实验动物

SPF 级健康成年 Wistar 大鼠(上海斯莱克),雌雄各 36 只,体重 250~300 g。

1.3 实验方法

1.3.1 动物处理及分组

将 Wistar 大鼠雌雄 1:1 合笼过夜,次日清晨检查到阴栓的雌鼠认为交配成功,记为胚胎期第 0 天(E0),产仔当天记为出生后第 0 天(P0)。根据暴露时间(胚胎期 E、出生后 P)和暴露浓度(低 L、中 M、高 H)将受孕雌鼠随机分为 6 组,每组 6 只,分别为 EL、EM、EH、PL、PM 和 PH。

1.3.2 暴露地点与暴露装置

根据交通车流量及城市道路等级,选择浙江大学紫金港校区内某树林作为低污染暴露组,选择紫荆花北路(四车道)某点作为中污染暴露组,选择城市主干道文一西路和古墩路交叉口作为高污染暴露组。暴露时,E 组大鼠每 2~3 只一笼,妊娠晚期分笼;P 组大鼠每窝一笼。各自放置于校园内、紫荆花北路路边及十字路口路边 0.5~1.0 m 高处进行暴露。暴露从清晨 7:30 开始到傍晚 19:30 结束,持续 20 d(E1~E20、P1~P20)。出生后 21 d(P21 d)断奶,每组仔鼠中取雌雄各 10 只进行后续研究。

1.3.3 现场污染物监测

暴露期间,每天记录杭州市气象监测数据,包括天气、气压、温湿度、风力风向和空气质量指数(Air Quality Index, AQI),并从中选取 7 d 进行高峰期交通空气污染物浓度的现场检测,检测指标包括 NO_x 和 $\text{PM}_{2.5}$,每次监测持续 1 h,各暴露点同时检测。

1.3.4 生长发育测量

P25 d,对仔鼠称重、测量身长后施安乐死,迅速

解剖取脑组织称重,将生物样本编号并放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.3.5 社交行为测试

P21 d 断奶后,从每组中选取雌雄各 10 只,送到浙江大学动物中心适应性饲养 1~2 d, P22~P23 d 进行三箱社交行为测试。三箱社交实验是检测社会交往能力的经典实验,也是评价自闭症动物模型时最常用到的行为测试^[13],如图 1。实验包括 3 个阶段:第一阶段让被测鼠在 3 个箱室内自由活动 5 min 以适应环境;第二阶段随机向其中一个笼子内放入陌生鼠 1 (Stranger 1),让被测鼠自由活动 10 min,被测鼠对陌生鼠 1 或空笼(Empty)的嗅探时间(Sniffing times)及嗅探频次(Sniffing frequencies)代表它的社交意向:社交能力正常的仔鼠倾向于接触新朋友而非空笼;第三阶段向笼内放入另一只陌生鼠 2 (Stranger 2)代表新朋友,陌生鼠 1 代表老朋友,通过记录 10 min 内被测鼠与二者的接触可评估其社交记忆能力及社交新颖性:通常情况下,大鼠具有探索及喜新厌旧的本性,更愿意接触新鲜事物。测试结束后带回实验室,饲养于洁净环境中。

1.3.6 组蛋白 H3K4 甲基化检测

取仔鼠大脑皮质组织样本 0.2 g 进行组蛋白提取,用 BCA 法测定蛋白浓度,之后根据总组蛋白 H3K4 甲基化试剂盒提供的方法定量检测总组蛋白 H3K4 甲基化水平,记为 $\text{H3K4me}(\text{ng} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{prot}) = \text{OD}(\text{样品}-\text{空白}) \times 1000 / (\text{蛋白量} \times \text{斜率})$ 。

1.4 统计学方法

数据采用 SPSS 22.0 统计分析。定量资料用均值 $\pm$ 标准差表示。2 组间比较采用独立样本 t 检验或配对 t 检验,3 组间比较采用单因素方差分析,多重比较用 LSD 法(方差齐)或盖姆斯法(方差不齐)。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。



图1 三箱实验示意图

Fig. 1 Sketch map of three chambers test

2 结果 (Results)

2.1 暴露现场空气污染状况

研究选取的高浓度暴露点位于古墩路和文一西路交叉口,这 2 条道路均为杭州市区主干道,通常情况下每小时车流量为 2 000 ~ 2 500 次,高峰期可达 3 500 次以上,且经常出现交通拥堵及车辆怠速。中浓度暴露点位于紫金花北路,是城市辅助道路,通常情况下每小时车流量为 800 ~ 1 000 次,高峰期为 1 500 次以上。校园内清洁区域内树木植被较多,通常情况下无车辆通行。图 2 是杭州城市信息一点通网站公布的某日高峰期暴露地点周边的车流量情况。

低、中和高浓度暴露点 NO_x (以 NO_2 计)的 1 h 平均浓度均未超过国家卫生标准(GB3095—2012),分别为 (52.76 ± 22.46) 、 (110.30 ± 59.32) 和 $(138.89 \pm 65.89) \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$;方差分析有统计学意义($P < 0.05$),两两比较显示低、高浓度间存在差异($P < 0.01$)。暴露期间杭州市区 NO_2 月平均浓度为 $44.5 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ 。

$\text{PM}_{2.5}$ 的 1 h 平均浓度在低、中和高浓度暴露点分别为 (71.67 ± 38.47) 、 (91.43 ± 45.38) 和 $(101.67 \pm$

$53.37) \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$;组间差异无统计学显著性($P > 0.05$)。暴露期间杭州市区 $\text{PM}_{2.5}$ 月平均浓度为 $45 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ 。

2.2 子代一般体征和发育指标检测

各组子鼠均未出现明显异常,皮毛顺滑,活动及饮食正常,双眼无异常分泌物。出生后 25 d,测量子鼠身长体重并施安乐死,剥离完整大脑并称重计算脏器系数,生长发育指标见表 1。胚胎期暴露于不同浓度的交通空气污染对出生后体重、身长及大脑脏器系数均有影响($P < 0.001$),对身体质量指数(Body Mass Index, BMI)无影响($P > 0.05$);出生后暴露于不同浓度交通空气污染对生长发育的影响均无统计学差异($P > 0.05$)。在中、低浓度水平下,出生后暴露组的体重、身长及 BMI 均低于胚胎期暴露组($P < 0.001$),大脑脏器系数则高于胚胎期暴露组($P < 0.001$);高浓度下虽然也出现这种趋势,但差异并无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 社交能力检测

交通空气污染对各组仔鼠社交能力的影响如图 3 所示。EL 组接触 Stranger 1 的频次及时间均显著大于空笼($P < 0.01$),EM 组接触 Stranger 1 的频次更



图 2 某日高峰期暴露地点周边的车流量情况
Fig. 2 Traffic flow around exposure site in a daily peak period

高($P<0.05$)而时间无差异($P>0.05$),EH 组接触 Stranger 1 和空笼的频次及时间均无统计学差异($P>0.05$)。方差分析显示,胚胎期不同浓度组间对 Stranger 1 的嗅探时间及频次均存在差异($P<0.01$),其中 EH 组的嗅探时间及频次最低。PL、PM 和 PH 各组接触 Stranger 1 的频次和时间均大于空笼($P<$

0.05),但出生后不同浓度组间对 Stranger 1 和空笼的嗅探时间及频次均无差异($P>0.05$)。

在低、中浓度下,暴露时期不同对子代接触 Stranger 1 和空笼的时间及频次均无影响($P>0.05$)。在高浓度下,胚胎期暴露组接触 Stranger 1 的时间更短,差异有统计学意义($P<0.01$)。

表 1 子代一般发育指标

Table 1 General developmental indicators of offspring

	胚胎期暴露组				出生后暴露组			
	Embryonic exposure groups				Postnatal exposure groups			
	体重/g	身长/cm	大脑脏器系数 ¹	BMI ²	体重/g	身长/cm	大脑脏器系数 ¹	BMI ²
	Weight/g	Length/cm	Brain organ coefficient ¹		Weight/g	Length/cm	Brain organ coefficient ¹	
低 Low	49.49±4.89	19.38±0.89	2.09±0.15	1.32±0.08	37.87±5.47	17.31±0.89	2.52±0.36	1.26±0.11
中 Medium	48.88±4.91	19.41±1.01	2.14±0.18	1.30±0.07	38.55±6.71	17.59±1.05	2.55±0.46	1.24±0.14
高 High	40.95±9.66	17.96±1.34	2.53±0.54	1.25±0.13	38.27±5.70	17.80±0.65	2.59±0.32	1.21±0.11
	***####	***####	***####					

注:¹为保留 2 位小数后分析方便,本文中显示的是大脑脏器系数乘以 100 后的数值;² BMI 为体重指数,为保留 2 位小数后分析方便,本文中显示的是 BMI×10 的数值;与低浓度比较,* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$;与中浓度比较,# $P<0.05$ 、## $P<0.01$ 、### $P<0.001$;下同。

Note: ¹ In order to facilitate analysis after reserving two decimal numbers, the value shown in this paper is the value of 100 times the coefficient of brain organs; ² BMI is body mass index, in order to facilitate analysis after reserving two decimal numbers, the value shown in this paper is the value of 10× BMI; * compared with low concentration, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; compared with medium concentration, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$; the same below.

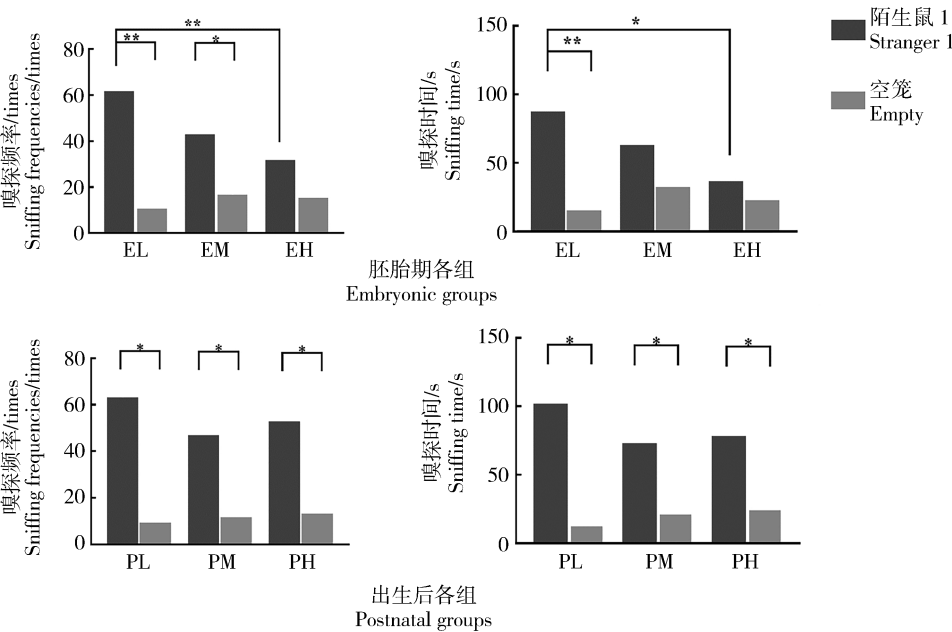


图 3 交通空气污染对仔鼠社交能力的影响

注:EL、EM 和 EH 分别表示胚胎期低浓度、胚胎期中浓度、胚胎期高浓度暴露,PL、PM 和 PH 分别表示出生后低浓度、出生后中浓度、出生后高浓度暴露;下同。

Fig. 3 Effects of traffic-related air pollution on social ability of offspring

Note: EL, EM and EH stand for low, medium and high concentrations of exposure in the embryo, respectively, while PL, PM and PH stand for low, medium and high concentrations of exposure after birth, respectively; the same below.

2.4 社交记忆及新颖性检测

交通空气污染对各组仔鼠社交记忆及新颖性的影响如图 4 所示。EL、EM 组接触 Stranger 2 的时间及频次均高于 Stranger 1($P<0.05$),EH 组对二者的嗅探无差异($P>0.05$)。方差分析显示,不同浓度组对 Stranger 1 或 Stranger 2 的嗅探时间及频次均无差异。PL 组对 Stranger 1 和 Stranger 2 的嗅探存在差异($P<0.05$),PM、PH 组对二者的嗅探均无差异($P>0.05$)。不同浓度间对 Stranger 1 的嗅探时间及频次随浓度增加而递增,对 Stranger 2 的嗅探递减,但均无统计学差异($P>0.05$)。相同浓度下,未见暴露时期对接触 Stranger 1 或 Stranger 2 的频次及时间的影响($P>0.05$)。

2.5 组蛋白 H3K4 甲基化水平

采用酶联免疫吸附法测定了各暴露组仔鼠脑皮质的总组蛋白 H3K4 甲基化水平(图 5)。结果显

示,E 组在各浓度下的 H3K4 甲基化未见统计学差异($P>0.05$),P 组 H3K4 甲基化则出现浓度依赖性下调,但并无统计学意义($P>0.05$)。在相同浓度下,P 组 H3K4 甲基化显著高于 E 组,差异有统计学意义(L, $P<0.01$; M, $P<0.001$; H, $P<0.05$)。

2.6 组蛋白 H3K4 甲基化水平与污染物相关性分析

分析了各组子代脑皮质区组蛋白 H3K4 甲基化与 $PM_{2.5}$ 、 NO_x 浓度的相关性(表 2),均未发现统计学关联($P>0.05$)。

3 讨论 (Discussion)

本实验进行期间,对杭州市区环境空气质量及天气状况进行了记录,并对暴露现场高峰期交通空气污染物 $PM_{2.5}$ 、 NO_x 浓度进行了抽样,发现 3 个暴露点的污染物含量虽未超过国家标准,但呈现逐级递增的趋势,且均高于杭州市区平均值,最高浓度可

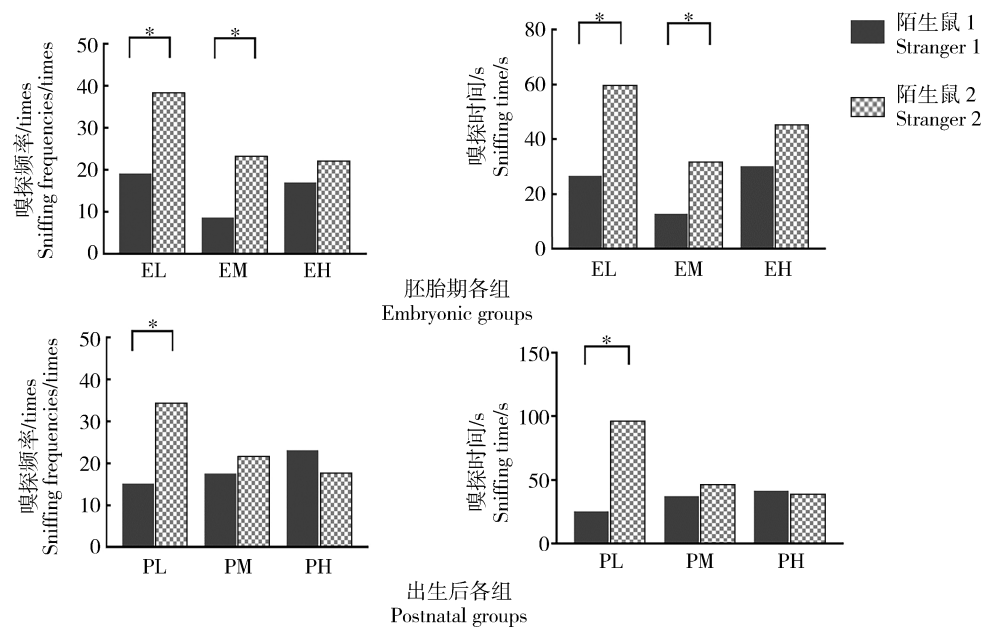


图 4 交通空气污染对仔鼠社交记忆及新颖性的影响

Fig. 4 Effects of traffic-related air pollution on social memory and novelty of offspring

表 2 组蛋白 H3K4 甲基化与污染物浓度的相关性

Table 2 The correlation between histone H3K4 methylation and pollutant concentration

污染物 Pollutant	胚胎期 Embryonic exposure		出生后 Postnatal exposure	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
$PM_{2.5}$	0.018	0.896	-0.142	0.335
NO_x	0.018	0.896	-0.142	0.336

注: r 表示相关系数, P 表示显著性水平。
Note: r means the correlation coefficient, P means the significance level.

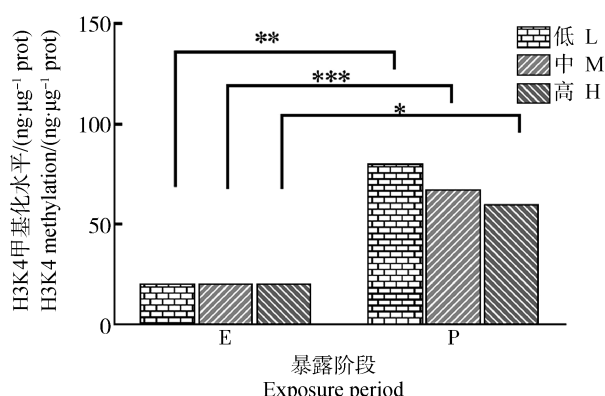


图5 组蛋白 H3K4 甲基化水平

Fig. 5 The level of histone H3K4 methylation

达 $101.67 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ 。主干道十字路口的 NO_x 浓度显著高于校园对照点 ($P < 0.01$), 最高浓度达 $138.89 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$, 提示该区域交通尾气污染严重。

本研究中, 虽然各组仔鼠在第一阶段社交能力测试中, 接触同伴的时间均大于空笼, 但胚胎期高浓度暴露组对二者的接触没有统计学差异, 且仔鼠对同伴的接触呈随着浓度增加而减弱的趋势; 出生后暴露各组虽然对二者的选择性接触均有统计学差异, 但对空笼的接触呈随浓度增加而增加的趋势。这说明, 生长发育阶段接触高浓度的交通空气污染, 尤其是胚胎发育期, 会影响子代的社交能力。在第三阶段社交记忆和社交新颖性的测试中, 胚胎期暴露组接触新朋友的时间均大于旧朋友, 提示社交记忆良好, 但高污染组对新、旧朋友的接触无统计学差异, 提示其社交新颖性受影响; 出生后各组随着暴露浓度增高, 仔鼠接触新朋友的时间递减, 接触旧朋友的时间递增, 高浓度组接触旧朋友的时间甚至超过新朋友, 说明其社交记忆和社交新颖性受损。此前, Chang 等^[20]发现, 小鼠宫内和早期生命发育过程中暴露于柴油废气污染 ($\text{PM}_{2.5}$ 约 $300 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ 、 $6 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $5 \text{ d} \cdot \text{week}^{-1}$, 等于时间加权浓度 $53 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$) 会出现自闭症样行为缺陷, 如交往和社会偏好测试中的社交能力降低, T-迷宫和大理石掩埋测试中的重复行为增加等。Yokota 等^[21]将孕鼠于妊娠期暴露于柴油废气环境中 ($90 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ 、 $8 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$), 发现后代雄性的攻击性增强。Church 等^[22]将围产期孕鼠暴露于 $\text{PM}_{2.5}$ 环境中 ($135.8 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$, 全天), 发现幼仔社交能力下降, 重复刻板行为增加。Thirtamara 等^[12]通过孕鼠及子代妊娠期柴油机颗粒物暴露 ($1\ 000 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ 、 $4 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $5 \text{ d} \cdot \text{week}^{-1}$), 发现孕鼠产仔数、体重和

健康状态未受到影响; 子代虽未出现明显的社交障碍和沟通异常, 但自我修饰、饲养和刻板行为增加, 与孤独症患者的重复性/强迫行为类似。Li 等^[23]于雄鼠出生后 $8 \sim 22 \text{ d}$ 经鼻内滴注 $\text{PM}_{2.5}$ (2 或 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天一次), 发现 2 组大鼠均表现出典型的孤独症行为特征, 包括沟通障碍、社会交往不良和回避新奇等。综合以上发现, 再结合本次研究结果, 可以推测城市交通主干道的汽车尾气排放水平已经可以对生长发育阶段的幼鼠产生不良影响, 使其产生自闭症样行为。

细颗粒物粒径小, 可以通过呼吸系统入肺并沉积在肺泡, 已被证实与心血管系统疾病、呼吸道疾病及癌症有关。2016 年全球 $\text{PM}_{2.5}$ 死因构成比达 7.6% , 死亡人口达 420 万^[1]。此外, $\text{PM}_{2.5}$ 还可以随着血液循环通过血脑屏障入脑^[24], 或通过胎盘屏障进入胎儿体内^[25], 造成 DNA 损伤或表观遗传异常^[26-27], 引起氧化应激与胶质细胞激活等神经炎症^[28], 甚至造成幼鼠神经发育改变^[29]。 NO_x 是指有氮、氧 2 种物质组成的化合物, 作为空气污染指标的 NO_x 主要包括 NO 和 NO_2 , 而 NO 在光照等条件下最终变成 NO_2 , 除了造成酸雨及臭氧层破坏, 还与呼吸道疾病及自闭症有关^[30-32]。毒理^[29,33-34]和病理研究^[35-36]提示自闭症的发病或与交通空气污染物引起神经系统免疫应激及神经炎症等毒性作用有关。这些交通空气污染物引起的氧化应激和炎症损伤会增加遗传物质的不稳定性, 可能通过与基因产生交互作用^[37-39]以及表观遗传修饰的途径影响蛋白质表达, 进而诱导自闭症^[26,39]。

为了初步探讨交通空气污染物引起仔鼠出现自闭症样异常社交行为的潜在表观遗传机制, 本研究检测了各组仔鼠脑皮质区组蛋白 H3K4 甲基化的水平。结果显示, 在不同暴露浓度下, H3K4 甲基化水平并未出现显著差异。而 Cantone 等^[40]发现, 长期职业性接触富含重金属 (镍、砷和铁) 的颗粒物会引起工人血清 H3K4 甲基化水平上调。本研究中未发现 H3K4 甲基化水平与交通空气污染物的关联, 可能是因为当地人群实际生活条件下的污染物浓度梯度尚不足以引起大鼠脑组织 H3K4 甲基化出现统计学上显著的线性变化, 也许还因为 H3K4 在体内不同组织区域内甲基化水平不一致有关。并且组蛋白修饰往往存在交叉对话, 与其他非组蛋白因素共同作用形成级联修饰, 使基因转录调节更加复杂多变, 未来的研究可以将更多表观遗传效应纳入研究

中。此外,与胚胎期接触交通空气污染物相比,出生后暴露的仔鼠脑组织中 H3K4 甲基化水平更高,说明不同暴露时期交通空气污染物对脑组织组蛋白 H3K4 甲基化的影响是有差异的。大脑各个功能区发育的窗口期出现及持续的时间不一样,那么相应基因表达及修饰发生的时间也不同。之前研究表明^[19],大脑高级皮质区的发育与皮质转录组的广泛变化有关,而 H3K4 甲基化作为转录调节的分子标志,其甲基化的快速增加或减少主要发生在妊娠晚期到出生后第一年,之后逐渐变缓,发育窗口期的外界环境刺激可能更容易影响基因的转录与翻译。

本研究创新地模拟了人群交通空气污染物自然吸入环境,构造的动物模型更接近于人体暴露条件,可以最大限度地还原真实环境。利用经典的社交评价模型——三箱试验,可以根据社交沟通、社交记忆及社交新颖性来评估动物行为,证明本研究中交通污染路口暴露的动物确实出现了自闭症样行为,与此前几项交通污染所致自闭症动物模型结论一致,对自闭症危险因素的研究有一定的参考意义。与此同时,本研究首次比较了不同暴露时期对脑组织 H3K4 甲基化水平的影响,为今后进一步探讨自闭症的表现遗传机制提供了线索。

通讯作者简介:金永堂(1963—),男,教授,博士生导师,主要研究方向为环境暴露的健康效应及机制,复杂疾病的环境表现遗传学及环境卫生与健康促进。

参考文献 (References):

- [1] Cohen A J, Brauer M, Burnett R, et al. Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: An analysis of data from the Global Burden of Diseases Study [J]. *Lancet*, 2017, 389(10082): 1907-1918
- [2] Costa L G, Cole T B, Coburn J, et al. Neurotoxicity of traffic-related air pollution [J]. *Neurotoxicology*, 2017, 59: 133-139
- [3] Xu G, Strathearn L, Liu B, et al. Prevalence of autism spectrum disorder among US children and adolescents, 2014-2016 [J]. *The Journal of the American Medical Association*, 2018, 319(1): 81-82
- [4] Volk H E, Hertz-Picciotto I, Delwiche L, et al. Residential proximity to freeways and autism in the CHARGE study [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2011, 119(6): 873-877
- [5] Volk H E, Kerin T, Lurmann F, et al. Autism spectrum disorder: Interaction of air pollution with the MET receptor tyrosine kinase gene [J]. *Epidemiology*, 2014, 25(1): 44-47
- [6] Volk H E, Lurmann F, Penfold B, et al. Traffic-related air pollution, particulate matter, and autism [J]. *JAMA Psychiatry*, 2013, 70(1): 71-77
- [7] Kerin T, Volk H, Li W, et al. Association between air pollution exposure, cognitive and adaptive function, and ASD severity among children with autism spectrum disorder [J]. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 2018, 48(1): 137-150
- [8] Pagalan L, Bickford C, Weikum W, et al. Association of prenatal exposure to air pollution with autism spectrum disorder [J]. *JAMA Pediatrics*, 2019, 173(1): 86-92
- [9] Gon T, Dalman C, Wicks S, et al. Perinatal exposure to traffic-related air pollution and autism spectrum disorders [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2017, 125(1): 119-126
- [10] Becerra T A, Wilhelm M, Olsen J, et al. Ambient air pollution and autism in Los Angeles County, California [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2013, 121(3): 380-386
- [11] Jung C R, Lin Y T, Hwang B F. Air pollution and newly diagnostic autism spectrum disorders: A population-based cohort study in Taiwan [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e75510
- [12] Thirtamara R K, Doherty-Lyons S, Bolden C, et al. Prenatal and early-life exposure to high-level diesel exhaust particles leads to increased locomotor activity and repetitive behaviors in mice [J]. *Autism Research*, 2013, 6(4): 248-257
- [13] Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, 6(11): 838-849
- [14] Wynder C, Stalker L, Doughty M L. Role of H3K4 demethylases in complex neurodevelopmental diseases [J]. *Epigenomics*, 2010, 2(3): 407-418
- [15] Adegbola A, Gao H, Sommer S, et al. A novel mutation in JARID1C/SMCX in a patient with autism spectrum disorder (ASD) [J]. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2008, 146A(4): 505-511
- [16] Akbarian S, Huang H S. Epigenetic regulation in human brain-focus on histone lysine methylation [J]. *Biological Psychiatry*, 2009, 65(3): 198-203
- [17] Shulha H P, Cheung I, Whittle C, et al. Epigenetic signatures of autism: Trimethylated H3K4 landscapes in prefrontal neurons [J]. *Archives of General Psychiatry*, 2012, 69(3): 314-324
- [18] Shen E, Shulha H, Weng Z, et al. Regulation of histone

- H3K4 methylation in brain development and disease [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 2014, 369 (1652): 20130514
- [19] Shulha H P, Cheung I, Guo Y, et al. Coordinated cell type-specific epigenetic remodeling in prefrontal cortex begins before birth and continues into early adulthood [J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(4): e1003433
- [20] Chang Y C, Cole T B, Costa L G. Prenatal and early-life diesel exhaust exposure causes autism-like behavioral changes in mice [J]. *Particle and Fibre Toxicology*, 2018, 15(1): 18
- [21] Yokota S, Oshio S, Moriya N, et al. Social isolation-induced territorial aggression in male offspring is enhanced by exposure to diesel exhaust during pregnancy [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e149737
- [22] Church J S, Tijerina P B, Emerson F J, et al. Perinatal exposure to concentrated ambient particulates results in autism-like behavioral deficits in adult mice [J]. *Neurotoxicology*, 2018, 65: 231-240
- [23] Li K, Li L, Cui B, et al. Early postnatal exposure to airborne fine particulate matter induces autism-like phenotypes in male rats [J]. *Toxicological Science*, 2018, 162 (1): 189-199
- [24] Genc S, Zadeoglulari Z, Fuss S H, et al. The adverse effects of air pollution on the nervous system [J]. *Journal of Toxicology*, 2012, 2012: 782462
- [25] Shallie P D, Naicker T. The placenta as a window to the brain: A review on the role of placental markers in prenatal programming of neurodevelopment [J]. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2019, 73: 41-49
- [26] Wei H, Liang F, Meng G, et al. Redox/methylation mediated abnormal DNA methylation as regulators of ambient fine particulate matter-induced neurodevelopment related impairment in human neuronal cells [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 33402
- [27] Jiang R, Jones M J, Sava F, et al. Short-term diesel exhaust inhalation in a controlled human crossover study is associated with changes in DNA methylation of circulating mononuclear cells in asthmatics [J]. *Particle and Fibre Toxicology*, 2014, 11: 71
- [28] Bilbo S D, Block C L, Bolton J L, et al. Beyond infection—Maternal immune activation by environmental factors, microglial development, and relevance for autism spectrum disorders [J]. *Experimental Neurology*, 2018, 299(Pt A): 241-251
- [29] Allen J L, Liu X, Pelkowski S, et al. Early postnatal exposure to ultrafine particulate matter air pollution: Persistent ventriculomegaly, neurochemical disruption, and glial activation preferentially in male mice [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2014, 122(9): 939-945
- [30] Fluegge K. Structural brain alterations in autism and environmental exposure to nitrous oxide [J]. *Epilepsy & Behavior*, 2018, 83: 247-248
- [31] Fluegge K. Revisiting the link between precipitation and the risk of autism: The role of environmental nitrous oxide exposure [J]. *JAMA Pediatrics*, 2017, 171(6): 596
- [32] Faustini A, Rapp R, Forastiere F. Nitrogen dioxide and mortality: Review and meta-analysis of long-term studies [J]. *European Respiratory Journal*, 2014, 44(3): 744-753
- [33] Wei H, Feng Y, Liang F, et al. Role of oxidative stress and DNA hydroxymethylation in the neurotoxicity of fine particulate matter [J]. *Toxicology*, 2017, 380: 94-103
- [34] Allen J L, Oberdorster G, Morris-Schaffer K, et al. Developmental neurotoxicity of inhaled ambient ultrafine particle air pollution: Parallels with neuropathological and behavioral features of autism and other neurodevelopmental disorders [J]. *Neurotoxicology*, 2017, 59: 140-154
- [35] Gu F, Chauhan V, Kaur K, et al. Alterations in mitochondrial DNA copy number and the activities of electron transport chain complexes and pyruvate dehydrogenase in the frontal cortex from subjects with autism [J]. *Translational Psychiatry*, 2013, 3: e299
- [36] Chen J C, Wang X, Wellenius G A, et al. Ambient air pollution and neurotoxicity on brain structure: Evidence from women's health initiative memory study [J]. *Annals of Neurology*, 2015, 78(3): 466-476
- [37] Frustaci A, Neri M, Cesario A, et al. Oxidative stress-related biomarkers in autism: Systematic review and meta-analyses [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, 52 (10): 2128-2141
- [38] El-Ansary A, Bjorklund G, Chirumbolo S, et al. Predictive value of selected biomarkers related to metabolism and oxidative stress in children with autism spectrum disorder [J]. *Metabolic Brain Disease*, 2017, 32 (4): 1209-1221
- [39] Ladd-Acosta C, Feinberg J I, Brown S C, et al. Epigenetic marks of prenatal air pollution exposure found in multiple tissues relevant for child health [J]. *Environment International*, 2019, 126: 363-376
- [40] Cantone L, Nordio F, Hou L, et al. Inhalable metal-rich air particles and histone H3K4 dimethylation and H3K9 acetylation in a cross-sectional study of steel workers [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2011, 119(7): 964-969