

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2014.10.001

PCBs 暴露 ApoE^{-/-} 小鼠肝脏的 microRNA 和 mRNA 调控网络研究 *

黄风尘 单秋丽 王 静** 杜宇国

(环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 中国科学院生态环境研究中心, 北京, 100085)

摘 要 本研究通过 microRNA-mRNA 相互作用考察 PCBs 的基因毒性, 探讨 PCBs 致动脉粥样硬化可能的分子机制. 研究使用 8 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠, 腹腔注射 PCBs 混合物 Aroclor1254 (55 mg·kg⁻¹ 体重), 暴露 6 周后获取其肝脏, 提取总 RNA, 获取 cDNA 或对 RNA 去磷酸化及特征标记. 采用 Affymetrix GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 基因芯片和 Agilent Mouse microRNA array 芯片, 分析 Aroclor1254 暴露前后 mRNAs 和 miRNAs 的差异表达情况. 随后, 结合 Affymetrix mRNA 芯片平台, 使用 IPA 软件分析差异表达的 miRNAs 和 mRNAs, 揭示 Aroclor1254 暴露对基因调控网络和信号通路的影响. 研究结果显示, Aroclor1254 暴露后有 18 个差异表达的 miRNAs 能够靶向调控 110 个差异表达的 mRNAs, 二者可共同影响糖代谢、脂代谢、细胞死亡、分子运输等生物学功能. 进一步考察与动脉粥样硬化发生发展密切相关的糖代谢、脂代谢网络调控, 发现 miRNA-22、let-7family、miRNA-15a/b, 以及靶基因 *PPARα*、*PPARγ* 辅助激活因子 1α 和 *Foxo1*, 在 PCBs 暴露致动脉粥样硬化发生发展的糖脂代谢异常中发挥了重要作用.

关键词 PCBs, microRNAs, 动脉粥样硬化, 基因芯片.

MicroRNA-mRNA interaction network in the liver of ApoE^{-/-} mice exposed to PCBs

HUANG Fengchen SHAN Qiuli WANG Jing** DU Yuguo

(State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085, China)

Abstract: microRNAs (miRNAs) are powerful negative regulators of mRNA expression, and therefore, are responsible for the modulation of important mRNA networks. Polychlorinated biphenyls (PCBs), among the important family numbers of persistent organic pollutants (POPs), are known to induce the development of atherosclerosis, probably through the alteration of gene expression. The present study was aimed to investigate the changes of miRNA-mRNA networks and their associations with the genotoxicity of PCBs, the potential molecular mechanisms involved in the atherosclerosis. Male ApoE^{-/-} mice of 8 weeks were exposed to Aroclor1254 (a representative mixture of PCBs, 55 mg·kg⁻¹ body weight) by intraperitoneal injection four times over six weeks of duration. The total RNA was isolated from the liver of ApoE^{-/-} mice with or without exposure to Aroclor1254. cDNA and the RNA with specific staining after dephosphorylation were used in gene arrays with Affymetrix GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 gene chip and Agilent Mouse microRNA array, respectively. Then IPA software, combined with the platform of Affymetrix mRNA gene array was used to analyze the alterations of mRNAs and miRNAs. The results were furthermore used to evaluate the effects of Aroclor1254 on the gene regulation network and the related cell signaling pathways. Our results showed that 18 miRNAs regulated 110 mRNAs after Aroclor1254 exposure, both of them could modulate the common biological functions, such as glucose metabolism, lipid metabolism, cell death

2014 年 3 月 11 日收稿.

* 国家自然科学基金(21077127); 国家重点基础研究发展计划(2009CB421605)资助.

** 通讯联系人, Tel: 010-62923539; E-mail: avacn@gmail.com

and survival and cell transport. Further investigation showed that miRNA-22, let-7 family, miRNA-15a/b and the target genes of *PPARα*, *PPARγ-coactivator1α* and *Foxo1* play important roles on the metabolism of glucose and lipid, which are closely related with the development of atherosclerosis.

Keywords: PCB, microRNAs, atherosclerosis, microarray.

miRNA 是在进化上高度保守的非编码小分子单链 RNA, 约有 22 个碱基, 在基因表达调控中发挥至关重要的作用, 越来越多的证据表明 miRNAs 几乎参与了生物体所有的生理和病理过程^[1]. 大多数 miRNAs 能够以完全配对或非完全配对的方式与其靶向 mRNAs 的 3' 非编码区结合, 引起 mRNAs 降解或抑制其翻译过程^[2]. 因此, miRNAs 可以负向调控靶 mRNAs 的表达, miRNA 能够调节多个基因, 使其成为基因的潜在管理者. 已有证据显示, 生物体内 10%—30% 的基因表达是由 miRNAs 调控的^[3]. 研究 miRNA 和 mRNA 的相互作用关系可以揭示一些重大疾病的病理原因, 特别是在癌症和心血管疾病领域^[4-6].

心血管疾病是中国导致成人死亡的首要原因^[7], 而动脉粥样硬化是引起心血管疾病的重要原因. 动脉粥样硬化以血管内皮损伤和脂质代谢紊乱为特征, 由遗传和环境因素, 包括饮食、污染等之间复杂的相互作用所引起. 持久性有机污染物 (Persistent organic pollutants, POPs) 是指在环境中具有持久性、生物富集性、半挥发性, 可通过各种环境介质对生物体健康产生危害的有机化合物. 研究表明 POPs 可通过在环境中长距离的运输至未被使用和生产的地区, 影响到全球的人体健康^[8], 乃至极地区域^[9]. 多氯联苯类化合物 (Polychlorinated Biphenyls, PCBs), 作为 POPs 中重要的一类, 在各种环境介质以及人体组织中都有较高的含量^[10]. 越来越多的研究表明, PCBs 暴露能导致动脉粥样硬化的发展^[11-13]. 随着中国人口的快速增长, 化学杀虫剂和化肥总量的使用也显著增加, 导致 POPs 的污染也随之增加. 此外, 随着经济的快速发展, 电气、电子设备的回收已经成为中国 PCBs 的主要释放源^[14]. 有研究表明, POPs 污染水平的增加与心血管疾病影响因子, 如高血压, 肥胖和糖尿病等的关系密切^[15-16]. 因此, POPs 在国内的广泛污染很有可能是导致动脉粥样硬化形成和心血管疾病死亡的重要原因.

已有的流行病学研究表明, PCBs 暴露能够导致人体的心血管疾病. 如一项研究发现, 暴露在 PCBs 污染 5 年以上的瑞典电容器制造业工人中, 心血管疾病的死亡率明显增加^[17]. 住在含有 PCBs 废品站附近的人群, 心血管疾病发病风险因素明显增加, 如糖尿病^[11]、高血压^[13]、冠心病和心肌梗塞^[18]等. 此外, PCBs 具有影响脂肪酸代谢, 加速某些脂肪酸的促动脉粥样硬化的特性^[19]. 有证据表明 PCBs 暴露能够影响葡萄糖和脂肪生成的酶, 从而导致血浆和组织中脂质的改变^[20-22]. 此外, 越来越多的研究表明暴露环境污染物和 miRNA 异常有显著的关联性^[23]. 如生活在污染地区的孕妇, 其血液中总 PCBs 的含量与 miR-191 的表达水平呈正相关^[24]. Zhu 等的研究显示, 在 P19 细胞向心肌细胞分化过程中, miRNAs 在调节 PCBs 的影响上发挥了重要的作用^[25]. 因此, PCBs 暴露可导致心血管疾病, 但是 miRNAs 在 PCBs 诱导的动脉粥样硬化中的作用还很不清楚.

Aroclor1254 作为商业化的 PCBs 混合物已经生产近 50 年, 尽管现在已不再生产, 但还广泛存在于全球环境中. 肝脏在糖尿病、代谢综合征和动脉粥样硬化的发生发展中起重要作用, 而且肝脏被认为是环境毒物的重要靶器官, Aroclor1254 也被证实具有肝毒性及可引起脂肪肝等疾病^[26-28]. 此外, 基因芯片的表达数据能够帮助发现环境污染物诱导的特定 miRNAs, 并提供新型生物监测与防御策略的新思路.

本文使用 Aroclor1254 为 PCBs 混合物的代表物, ApoE^{-/-}小鼠为动脉粥样硬化的研究模型, 考察 Aroclor1254 暴露后 ApoE^{-/-}小鼠肝脏中与动脉粥样硬化发生相关的 mRNAs 和 miRNAs 差异表达及网络调控. 拟通过 microRNA-mRNA 相互作用考察 PCBs 的基因毒性, 探讨 PCBs 致动脉粥样硬化的分子机制.

1 材料和方法

1.1 动物实验

8 周龄纯合子雄性 ApoE^{-/-}小鼠从北京大学实验动物中心购得. ApoE^{-/-}小鼠被饲养在无菌、温度恒定、12 h 昼夜交替的环境下. 小鼠被随机分为 Aroclor1254 处理组 and 对照组, 每组 6 只小鼠, 喂养啮齿动物标准颗粒食物和纯净水. 将 Aroclor1254 标准品溶解在玉米油中达到指定的浓度, 按照 55 mg·kg⁻¹体重的

剂量,通过腹腔注射暴露给 ApoE^{-/-}小鼠.Aroclor1254 分 4 次暴露,在第一周注射前两次,每次注射之间相隔 3 d,后两次注射在 6 周暴露实验的第四周.暴露实验结束时,处理组和对照组的 ApoE^{-/-}小鼠需饥饿过夜.随后,按照标准方法对实验小鼠进行麻醉、获取组织.肝脏组织在获取后,立即称重并储存在液氮中,然后将冷冻的组织保存在-80 ℃冰箱中用于后续分析.所有动物实验操作都是在动物保健和使用委员会的批准下进行,并且遵循美国国立卫生研究院实验动物的保护和使用(SCXK 2008—0005).

1.2 RNA 提取

用 Trizol 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 提取 Aroclor1254 处理组和对照组 ApoE^{-/-}小鼠肝脏中的总 RNA.用 DNase I 在 37 ℃ 消化 15 min 以去除残留 DNA,然后用 RNeasy 试剂盒 (Qiagen, Hilden, Germany) 纯化得到.RNA 的浓度和质量通过分光光度计和 1% 甲醛变性凝胶电泳测定.核糖体 28S 和 18S 的亮带比值大于 1.5 被认为可以用于芯片杂交实验.对于 miRNA 芯片,用 mirVana miRNA 分离试剂盒 (Ambion, Austin, TX, USA) 分离总 RNA 中的 miRNA,用于 miRNA 芯片实验.

1.3 芯片杂交和数据分析

1.3.1 mRNA 芯片杂交和数据分析

Affymetrix GeneChip[®] Mouse Genome 430 2.0 基因芯片用于检测 Aroclor1254 处理组和对照组中 ApoE^{-/-}小鼠肝脏的基因表达情况.每个实验组做 3 个独立的生物学重复.Affymetrix GeneChip[®] Mouse Genome 430 2.0 Array 包涵 45000 个探针检测小鼠中 34000 个基因.芯片杂交、数据采集以及数据分析由北京博奥生物有限公司完成.100 ng 总 RNA 用于 cDNA 的合成,并且用 GeneChip IVT 标记试剂盒 (Affymetrix) 在 cDNA 上标记生物素.15 μg 片段化的 cDNA 以及 oligo B2 对照和真核杂交控制 (bioB、bioC、bioD、cre),根据操作指导在 45 ℃ 条件下杂交 16 h (Affymetrix GeneChip Hybridization Oven 640).杂交后的基因芯片经洗涤后,用 SAPE (streptavidin phycoerythrinonan) 染色,最后用 Affymetrix 基因芯片扫描仪 3000 7G 进行扫描.

使用 AGCC 软件 (Affymetrix GeneChip Command Console Software, TGCC) 将芯片的荧光信号扫描图像保存成.DAT 文件以待分析.过滤掉缺失的数值,将剩下的数值进行分析,芯片数据用 RMA 算法^[29] 进行标准化处理.SAM 算法 (Significance Analysis of Microarrays, SAM) 用于确定差异表达的基因,SAM 算法通过计算特定基因的 *t*-test 和发现错误率 (False Discovery Rate, FDR),从而确定在统计上显著差异表达的基因.为了筛选差异表达的基因,设定差异表达倍数变化>1.5 或<-1.5,FDR 值(*q*-value) <5% 的基因为具有显著的差异表达.

1.3.2 miRNA 芯片杂交和数据分析

用 Agilent Mouse microRNA array 基因芯片检测 Aroclor1254 处理组和对照组中 ApoE^{-/-}小鼠肝脏 miRNAs 的表达情况.每个实验组做 3 个独立的生物学重复.芯片包含 1079 个成熟的小鼠 miRNAs 探针,所有的探针信息都是基于 Sanger miRBase R18.0 数据库建立,并包含 47 个小鼠病毒 miRNAs.每个 miRNA 探针检测重复 30 次.此外,芯片上还含有 2164 个控制探针.芯片实验的操作步骤根据操作指南^[30-31] 进行.简单来讲,100 ng 总 RNA 去磷酸化,被标记上 pCp-Cy3,经纯化后与 miRNA 芯片做杂交.Agilent 芯片扫描仪将收集信号,用 Agilent 特征提取软件 (Agilent feature extraction software version 10.10) 进行后续分析.GeneSpring 软件被用来对分析 miRNA 芯片数据汇总,标准化和质量控制.为了筛选差异表达的基因,设定差异表达倍数变化>1.5 或<-1.5,*P* 值<0.05 的 miRNAs 具有显著的差异表达.

1.4 miRNA 靶基因预测

经上述步骤筛选的差异表达的 miRNAs 数据导入 IPA (Ingenuity Systems, Inc) 软件中,在 IPA 软件中,使用 miRNA 靶基因筛选功能预测差异表达 miRNA 的靶基因.IPA 软件整合了 TarBase,TargetScan 和 miRecords 3 个靶基因预测数据库来对 miRNA 的靶基因进行预测.为了保证预测结果的可靠性,只有实验验证的结果以及高度预测的结果才被选中做后续分析.基于 miRNA 和 mRNA 之间的负向调控关系,只有 miRNA 和 mRNA 的表达值呈负相关才被选中分析其内在联系.

1.5 PCBs 暴露后 miRNA-mRNA 相互作用关系

基于 miRNA 可以负向调控 mRNA 靶基因的假设,将差异表达的 miRNAs 和 mRNAs 整合在一起.首先,IPA 所预测 miRNAs 的靶 mRNAs 在 Affymetrix mRNA 芯片平台做筛查.然后,对 miRNAs 以及 mRNAs

差异表达的一致性做筛选,保留 miRNA 和其靶 mRNA 在相反方向上差异表达的数据.将所筛选的 miRNA-mRNA 数据用热图直观表示.

1.6 IPA 基因调控网络和信号通路分析

IPA 软件用于对差异表达的 mRNAs 及其相关联的 miRNAs 做生物学注释,IPA 可以识别差异表达的基因所涉及特定的细胞途径和过程.将 mRNA 和 miRNA 差异表达的芯片数据分别导入 IPA,核心分析,能快速得出差异表达基因影响的信号代谢通路、分子网络和生物学过程,预测所涉及的疾病并计算相应的 *P* 值.

2 结果与讨论

2.1 PCBs 暴露后 ApoE^{-/-}小鼠肝脏的 mRNAs 表达谱

Affymetrix GeneChip® Mouse Genome 430 2.0 用于检测经 Aroclor1254 暴露后 ApoE^{-/-}小鼠肝脏的 mRNAs 表达情况.用 SAM 算法对芯片结果进行分析,表达倍数变化>1.5 或<-1.5,且 *P* 值<0.05 的 mRNAs 被认为具有显著性的差异表达.结果显示,经 Aroclor1254 暴露有 410 个差异表达的基因,其中 157 个基因上调,253 个基因下调.其中过氧化物酶体 α (peroxisome proliferators-activated receptor α, *PPARα*)下调 1.64 倍,过氧化物酶体 γ 辅助激活因子 1α (peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator 1α, *PPARγC1A*)上调 1.70 倍,叉头转录因子 O1 (Forkhead box O1, *Foxo1*)下调 1.58 倍.

IPA 生物信息软件用来预测经 Aroclor1254 暴露后差异表达的 mRNAs 所涉及的生物学通路,结果见表 1.从表 1 可见,Aroclor1254 暴露后 ApoE^{-/-}小鼠肝脏的 410 个差异表达的 mRNAs 所影响的分子及细胞功能有脂质代谢、糖代谢、分子运输、小分子生化及细胞死亡和生存等 5 大生物学功能.

表 1 IPA 预测经 PCB 暴露下差异表达的 mRNAs 所影响的 5 个主要生物学功能

Table 1 Top five biofunctions predicted by IPA to be regulated by mRNA expression under PCB-exposure					
分子和细胞功能	脂质代谢	分子运输	小分子生化	细胞死亡和生存	糖代谢
涉及基因数	96	109	112	145	64
<i>P</i> 值	5.50×10 ⁻¹⁴ — 6.57×10 ⁻³	5.50×10 ⁻¹⁴ — 6.63×10 ⁻³	5.50×10 ⁻¹⁴ — 6.57×10 ⁻³	7.72×10 ⁻¹³ — 6.83×10 ⁻³	9.04×10 ⁻¹⁰ — 6.63×10 ⁻³

2.2 PCBs 暴露后 ApoE^{-/-}小鼠肝脏的 miRNAs 表达谱

Agilent Mouse MicroRNA Array 基因芯片检测经 Aroclor1254 暴露后 ApoE^{-/-}小鼠肝脏的 miRNAs 表达情况,表达倍数变化>1.5 或<-1.5,且 *P* 值<0.05 的 miRNAs 被认为具有显著差异表达.结果显示,经 Aroclor1254 暴露后,有 22 个 miRNAs 的表达发生显著变化,其中 14 个 miRNAs 上调,8 个 miRNAs 下调,如图 1 所示.其中 miR-122 上调 1.71 倍,let-7family 中 7 个成员 let-7a、let-7b、let-7c、let-7d、let-7f、let-7g、let-7i 均有 1.63 到 1.84 倍的上调,miRNA-15a 上调 1.57 倍,miRNA-15b 上调 1.82 倍.

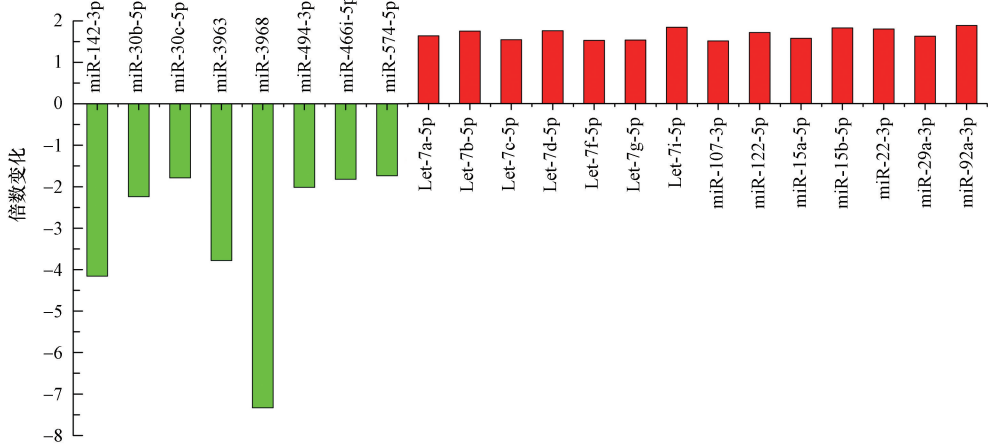


图 1 PCB 暴露后差异表达的 miRNAs

Fig.1 Differentially expressed miRNAs after PCB exposure

2.3 PCBs 暴露后 miRNA-mRNA 相互作用关系

在筛选出410个差异表达的mRNAs以及22个miRNAs的基础上,通过预测miRNAs的靶基因,将差异表达的 mRNAs 和 miRNAs 联系在一起.基于 miRNA 负向调控 mRNA 靶基因的理论,miRNAs 和 mRNAs 在相反方向上差异表达的数据被筛选.由于 410 个差异表达的 mRNAs 中没有 miR- 3963、miR-3968、miR-574 和 miR-466i 的靶 mRNAs,所以,最后共有 18 个差异表达的 miRNAs 与 110 个差异表达的 mRNAs 通过 miRNA-mRNAs 的负向调控作用联系起来.这些 miRNA-mRNA 相互作用数据通过热图表示,见图 2.

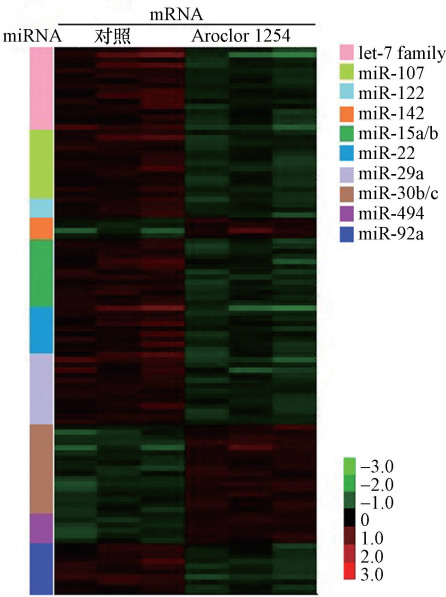


图 2 差异表达 microRNA 和 mRNA 相互作用热图
Fig.2 Heatmap of significantly altered microRNA-mRNA interactions

表达的 miRNAs 靶向调控 110 个差异表达的 mRNAs.这 110 个差异表达的 mRNAs 所涉及的生物学功能包括糖代谢和脂代谢.糖、脂代谢与动脉粥样硬化具有密切关系,为了进一步研究 miRNA-mRNA 网络调控在动脉粥样硬化中的作用,将 Aroclor1254 暴露后的 mRNAs 芯片结果中与糖、脂代谢相关的基因筛选出来,并结合差异表达的 miRNAs,利用 IPA 软件做基因调控网络分析,可得到图 3.从图 3 中可看出,参与糖、脂代谢调节的 miRNAs 有 let-7 family、miR-92a、miR-494-3p、miR-107-3p、miR-29a-3p、miR-15a/b-5p 和 miR-22,重要的基因则有 *PPARα*、*Pka*、*PPARγC1A* 和 *Foxo1*.

2.4 PCBs 暴露后糖、脂代谢相关的 mRNAs 和 miRNAs 调控网络

由以上结果可知,mRNA-miRNA 相互作用下,Aroclor1254 暴露后 ApoE^{-/-}小鼠肝脏中有 18 个差异

表 2 IPA 预测经 PCB 暴露下差异表达的 miRNA 的靶 mRNAs 所影响的 5 个主要生物学功能

Table 2 Top five biofunctions predicted by IPA to be regulated by miRNA target mRNA expression under PCB-exposure		
分子和细胞功能	涉及基因数	P 值
细胞死亡和生存	52	5.53×10 ⁻⁷ —9.03×10 ⁻³
糖代谢	24	1.00×10 ⁻⁶ —9.49×10 ⁻³
分子运输	37	1.00×10 ⁻⁶ —9.43×10 ⁻³
脂代谢	31	1.39×10 ⁻⁶ —1.03×10 ⁻²
小分子生化	38	1.39×10 ⁻⁶ —1.03×10 ⁻²

PPARα 在与 mRNA 和 miRNAs 糖脂代谢相关调控网络中发挥重要作用,*PPARα* 调节众多脂质代谢和脂蛋白相关基因的表达,如 *FADS2*、*CD36* 等.*PPARα* 基因在肝脏中表达丰富,并在调控肝脏脂代谢中发挥重要作用.*PPARα* 的低表达会减弱脂质吸收和脂肪酸氧化,导致脂代谢的失调以及高血脂症^[32-33].而 *PPARα* 是 miR-22、miR-15a/b 和 let-7i family 调控的靶基因.前人实验证据已显示 *PPARα* 是 miR-22 的靶基因^[34];并且 miR-22 的过表达会导致肝细胞中脂质的积累^[35].此外,miR-22 还靶向磷脂转运蛋白 (phospholipid transfer protein, *PLTP*),而 *PLTP* 在参与脂质的运输过程中起重要作用.miR-15b 在高脂质导致的非酒精性脂肪肝中高表达,并被作为分子靶标^[36].miR-15b 的另一靶基因 *CREB* 调控转录激活因子 3 (*CREB-regulated transcription coactivator 3*, *CRTC3*) 在脂类分解、脂肪酸氧化中发挥了重要作用^[37-38]. Let-7family 则能够调节葡萄糖代谢的各个方面^[39],而且 let-7family 还可调控脂肪酸脱氢酶 2 (fatty acid desaturase 2, *FADS2*),在非饱和脂肪酸的生物合成中至关重要^[40].

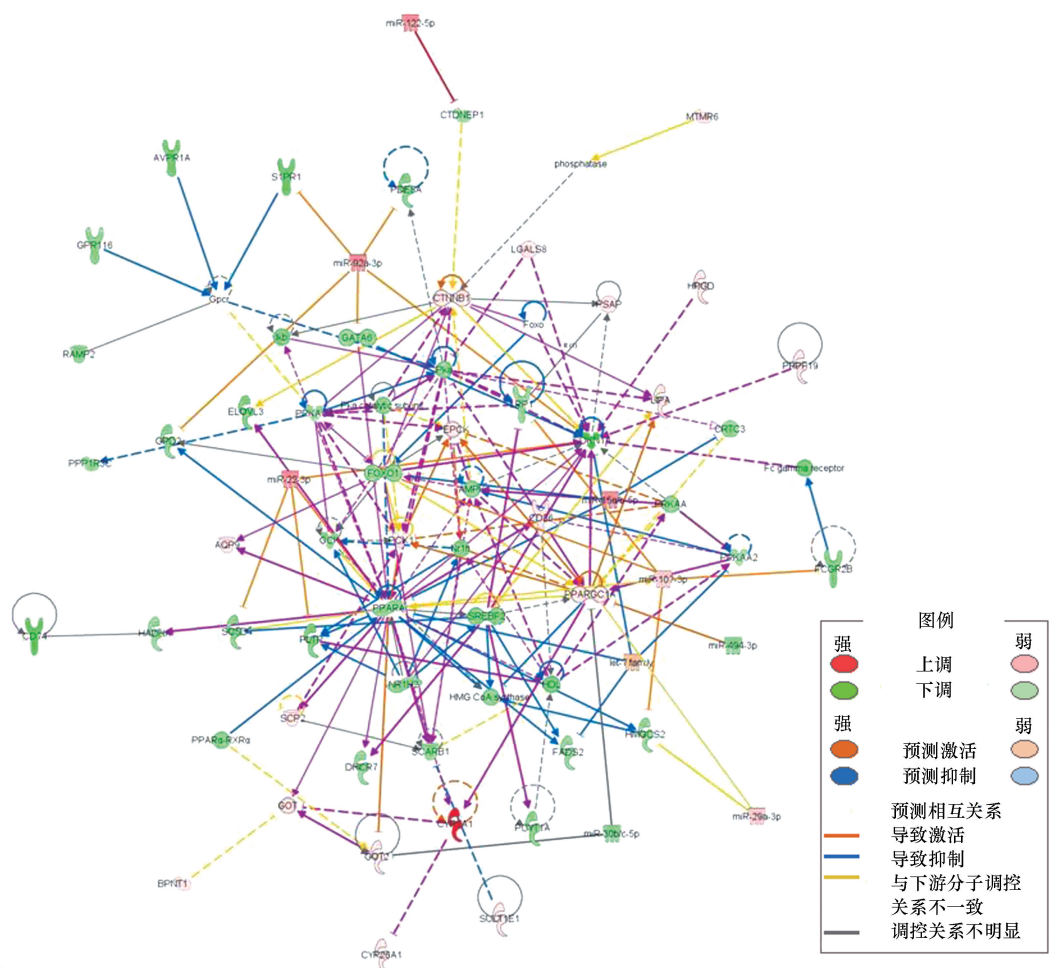


图 3 PCB 暴露后糖脂代谢相关 mRNAs 和 miRNAs 调控网络

Fig.3 MicroRNA-mRNA interaction participate in sugar or lipid metabolism pathways after PCB exposure

此外,PPAR γ C1A 是与细胞能量代谢相关的核受体的转录共激活因子,能够调节线粒体的生物合成和功能^[41].PPAR γ C1A 能够通过调节 HNF4A、LPL、PPAR α 、MEF2C 和 PPAR γ 影响氧化代谢、脂肪生成和糖异生^[42].因此,PPAR γ C1A 被发现与胰岛素抵抗,脂质氧化和肥胖密切相关^[43-44].研究发现,miR-29a 在糖尿病小鼠肝脏中高表达;并且 miR-29a 在原代肝细胞和肝脏中的过量表达,能检测到 PPAR γ C1A 蛋白表达量下降,反之亦然,说明 PPAR γ C1A 是 miR-29a 调控的一个靶基因.此外,在原代肝细胞中 PPAR γ C1A 的过表达也会增加 miR-29a 的表达^[45].Foxo1 是胰岛素信号通路和葡萄糖信号通路的重要转录调节者^[46].越来越多地研究表明,Foxo1 在调节肝脂质平衡中发挥重要作用,Foxo1 功能异常与高血糖和高甘油三酯密切相关^[47].miR-107 在肥胖小鼠中高表达,并且 miR-107 在调控葡萄糖稳态和胰岛素敏感性方面发挥重要作用^[48].研究发现,Foxo1 表达水平受到 miR-107 的负向调控^[49].

3 结论

通过本研究发现,Aroclor1254 暴露 ApoE^{-/-}小鼠 6 周后,能显著引起其肝脏中 mRNAs 和 miRNAs 的表达变化,其中有 410 个 mRNAs 和 22 个 miRNAs 差异表达.基于 miRNAs 负向调控 mRNAs 原则,将 18 个差异表达的 miRNAs 与 110 个差异表达的 mRNAs 联系起来.进一步使用 IPA 软件分析生物学功能和通路,结果显示,Aroclor1254 暴露后肝脏中差异表达的 mRNAs 所影响主要的生物学功能包括糖代谢、脂代谢等,而糖代谢、脂代谢在动脉粥样硬化发生发展过程发挥了重要作用.与糖代谢、脂代谢密切关联的 miRNAs 有 let-7 family、miR-92a、miR-494-3p、miR-107-3p、miR-29a-3p、miR-15a/b-5p 和 miR-22,重要的基因则有 PPAR α 、Pka、PPAR γ C1A 和 Foxo1.本研究结果显示,PCBs 暴露能显著影响与

糖代谢和脂代谢密切相关 mRNAs 和 miRNAs.因此,miRNAs 可能在调节与动脉粥样硬化发生发展密切相关的糖代谢、脂代谢异常的靶基因中发挥重要作用。

总而言之,本研究首次利用了 miRNA 和 mRNA 基因芯片的研究方法来探讨 PCBs 暴露诱导动脉粥样硬化发生发展的潜在分子机制.重点从 miRNAs 和 mRNAs 的相互作用网络调控为切入点,找到了 Aroclor1254 暴露 ApoE^{-/-}小鼠后,肝脏中主要差异表达的 miRNAs 和其靶向调控的 mRNAs.并结合生物学功能的变化,发现一些重要的 miRNAs 和潜在的靶基因在 PCBs 暴露后的糖代谢和脂质代谢异常中发挥了重要作用,该工作的完成为进一步从体内外考察具体的分子调控机制提供了重要的导向。

参 考 文 献

- [1] Filipowicz W,Bhattacharyya S N,Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: Are the answers in sight? [J].Nature Reviews Genetics,2008,9(2):102-114
- [2] Bartel D P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function [J].Cell,2004,116(2):281-297
- [3] Friedman R C,Farh K K,Burge C B,et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [J].Genome Research,2009,19(1):92-105
- [4] Santovito D, Mezzetti A, Cipollone F. MicroRNAs and atherosclerosis: New actors for an old movie [J]. Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases; NMCD,2012,22(11):937-943
- [5] Madrigal-Matute J, Rotllan N, Aranda J F, et al. MicroRNAs and atherosclerosis [J].Current Atherosclerosis Reports,2013,15(5):322
- [6] Siasos G, Kollia C, Tsigkou V, et al. MicroRNAs: Novel diagnostic and prognostic biomarkers in atherosclerosis [J].Current Topics in Medicinal Chemistry,2013,13(13):1503-1517
- [7] Hu S S, Kong L Z, Gao R L, et al. Outline of the report on cardiovascular disease in China,2010 [J].Biomedical and Environmental Sciences; BES,2012,25(3):251-256
- [8] Birnbaum L S. Endocrine effects of prenatal exposure to PCBs, dioxins, and other xenobiotics-implications for policy and future-research [J]. Environmental Health Perspectives,1994,102(8):676-679
- [9] Letcher R J, Bustnes J O, Dietz R, et al. Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish [J].Science of the Total Environment,2010,408(15):2995-3043
- [10] Imamura T, Kanagawa Y, Matsumoto S, et al. Relationship between clinical features and blood levels of pentachlorodibenzofuran in patients with Yusho [J].Environmental Toxicology,2007,22(2):124-131
- [11] Kouznetsova M, Huang X, Ma J, et al. Increased rate of hospitalization for diabetes and residential proximity of hazardous waste sites [J]. Environmental Health Perspectives,2007,115(1):75-79
- [12] Hennig B, Oesterling E, Toborek M. Environmental toxicity, nutrition, and gene interactions in the development of atherosclerosis [J]. Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases; NMCD,2007,17(2):162-169
- [13] Huang X, Lessner L, Carpenter D O. Exposure to persistent organic pollutants and hypertensive disease [J].Environmental Research,2006,102(1):101-106
- [14] Sepúlveda A, Schlup M, Renaud F G, et al. A review of the environmental fate and effects of hazardous substances released from electrical and electronic equipments during recycling; Examples from China and India [J].Environmental Impact Assessment Review,2010,30(1):28-41
- [15] Uemura H. Associations of exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls with diabetes: based on epidemiological findings [J].Nippon Eiseigaku Zasshi (Japanese Journal of Hygiene),2012,67(3):363-374
- [16] Lee D H, Lind L, Jacobs D R, et al. Associations of persistent organic pollutants with abdominal obesity in the elderly: The Prospective Investigation of the Vasculature in Uppsala Seniors (PIVUS) study [J].Environment International,2012,40:170-178
- [17] Gustavsson P, Hogstedt C. A cohort study of Swedish capacitor manufacturing workers exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs) [J]. American Journal of Industrial Medicine,1997,32(3):234-239
- [18] Sergeev A V, Carpenter D O. Hospitalization rates for coronary heart disease in relation to residence near areas contaminated with persistent organic pollutants and other pollutants [J].Environmental Health Perspectives,2005,113(6):756-761
- [19] Watkins B A, Hannon K, Ferruzzi M, et al. Dietary PUFA and flavonoids as deterrents for environmental pollutants [J].The Journal of Nutritional Biochemistry,2007,18(3):196-205
- [20] Kakela R, Kinnunen S, Kakela A, et al. Fatty acids, lipids, and cytochrome p-450 monooxygenase in hepatic microsomes of minks fed fish-based diets and exposed to Aroclor 1242 [J].Journal of Toxicology and Environmental Health Part A,2001,64(5):427-446
- [21] Kamei M, Ohgaki S, Kanbe T, et al. Highly hydrogenated dietary soybean oil modifies the responses to polychlorinated biphenyls in rats [J].Lipids,1996,31(11):1151-1156
- [22] Bratberg M, Olsvik P A, Edvardsen R B, et al. Effects of oil pollution and persistent organic pollutants (POPs) on glycerophospholipids in liver and brain of male Atlantic cod (*Gadus morhua*) [J].Chemosphere,2013,90(7):2157-2171

- [23] Hou L, Wang D, Baccarelli A. Environmental chemicals and microRNAs[J]. *Mutation Research*, 2011, 714(1/2): 105-112
- [24] Guida M, Marra M L, Zullo F, et al. Association between exposure to dioxin-like polychlorinated biphenyls and miR-191 expression in human peripheral blood mononuclear cells[J]. *Mutation Research*, 2013, 753(1): 36-41
- [25] Zhu C, Yu Z B, Zhu J G, et al. Differential expression profile of micromRNAs during differentiation of cardiomyocytes exposed to polychlorinated biphenyls[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(12): 15955-15966
- [26] Reymann S, Borlak J. Transcriptome profiling of human hepatocytes treated with Aroclor 1254 reveals transcription factor regulatory networks and clusters of regulated genes[J]. *BMC Genomics*, 2006, 7: 217
- [27] Nash J T, Szabo D T, Carey G B. Polybrominated diphenyl ethers alter hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase enzyme kinetics in male Wistar rats; Implications for lipid and glucose metabolism[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 2013, 76(2): 142-156
- [28] Kutlu S, Colakoglu N, Halifeoglu I, et al. Comparative evaluation of hepatotoxic and nephrotoxic effects of aroclors 1221 and 1254 in female rats[J]. *Cell Biochemistry and Function*, 2007, 25(2): 167-172
- [29] Irizarry R A, Hobbs B, Collin F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data[J]. *Biostatistics*, 2003, 4(2): 249-264
- [30] Liu C G, Calin G A, Meloon B, et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(26): 9740-9744
- [31] Thomson J M, Parker J, Perou C M, et al. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression[J]. *Nature Methods*, 2004, 1(1): 47-53
- [32] Kersten S, Seydoux J, Peters J M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1999, 103(11): 1489-1498
- [33] Rosenson R S. Fenofibrate: Treatment of hyperlipidemia and beyond[J]. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 2008, 6(10): 1319-1330
- [34] Iliopoulos D, Malizos K N, Oikonomou P, et al. Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks[J]. *PloS One*, 2008, 3(11): e3740
- [35] Kaur K, Pandey A K, Srivastava S, et al. Comprehensive miRNome and in silico analyses identify the Wnt signaling pathway to be altered in the diabetic liver[J]. *Molecular BioSystems*, 2011, 7(12): 3234-3244
- [36] Zhang Y, Cheng X, Lu Z, et al. Upregulation of miR-15b in NAFLD models and in the serum of patients with fatty liver disease[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2013, 99(3): 327-334
- [37] Bachman E S, Dhillon H, Zhang C Y, et al. BetaAR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance[J]. *Science*, 2002, 297(5582): 843-845
- [38] Than T A, Lou H, Ji C, et al. Role of cAMP-responsive element-binding protein (CREB)-regulated transcription coactivator 3 (CRTC3) in the initiation of mitochondrial biogenesis and stress response in liver cells[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(25): 22047-22054
- [39] Frost R J, Olson E N. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(52): 21075-21080
- [40] Lee H, Park W J. Unsaturated Fatty acids, desaturases, and human health[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2014, 17(2): 189-197
- [41] Puigserver P, Spiegelman B M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): Transcriptional coactivator and metabolic regulator[J]. *Endocrine Reviews*, 2003, 24(1): 78-90
- [42] Sevane N, Armstrong E, Cortes O, et al. Association of bovine meat quality traits with genes included in the PPARG and PPARGC1A networks[J]. *Meat Science*, 2013, 94(3): 328-335
- [43] Esterbauer H, Oberkofler H, Linnemayr V, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 gene locus: Associations with obesity indices in middle-aged women[J]. *Diabetes*, 2002, 51(4): 1281-1286
- [44] Muller Y L, Bogardus C, Pedersen O, et al. A Gly482Ser missense mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 is associated with altered lipid oxidation and early insulin secretion in Pima Indians[J]. *Diabetes*, 2003, 52(3): 895-898
- [45] Liang J, Liu C, Qiao A, et al. MicroRNA-29a-c decrease fasting blood glucose levels by negatively regulating hepatic gluconeogenesis[J]. *Journal of Hepatology*, 2013, 58(3): 535-542
- [46] Accili D, Arden K C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation[J]. *Cell*, 2004, 117(4): 421-426
- [47] Gross D N, van den Heuvel A P, Birnbaum M J. The role of FoxO in the regulation of metabolism[J]. *Oncogene*, 2008, 27(16): 2320-2336
- [48] Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, et al. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity[J]. *Nature*, 2011, 474(7353): 649-653
- [49] Li F, Liu B, Gao Y, et al. Upregulation of MicroRNA-107 induces proliferation in human gastric cancer cells by targeting the transcription factor FOXO1[J]. *FEBS Letters*, 2014, 588(4): 538-544