

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 21620130154094

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

斑马鱼胚胎时期苯并(a)芘暴露后的毒性  
效应及机制研究

Toxicity of BaP exposure during embryonic stage in  
zebrafish: the mechanisms involved

高东旭

指导教师姓名: 王重刚 教授

专业名称: 动 物 学

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩时间: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2016 年 5 月

斑马鱼胚胎时期苯并(a)芘暴露后的毒性效应及机制研究

高东旭

指导教师: 王重刚 教授

厦门大学

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。
2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

# 目录

摘要 .....	I
ABSTRACT .....	IV
第一章 前言 .....	1
1.1 苯并(a)芘的污染及研究现状 .....	1
1.1.1 苯并(a)芘的理化特性 .....	1
1.1.2 BaP 的污染现状 .....	1
1.2 BaP 的毒性效应及机制研究进展 .....	3
1.2.1 致癌性、致畸性、致突变性 .....	3
1.2.2 BaP 神经毒性及其研究进展 .....	4
1.2.3 BaP 生殖毒性及其研究进展 .....	4
1.2.4 其它毒性 .....	5
1.3 环境因素与神经退行性疾病的关系 .....	6
1.4 环境因素与 DNA 甲基化的关系 .....	7
1.5 斑马鱼性腺的功能形态学 .....	8
1.6 鱼类“下丘脑-垂体-性腺轴”与生殖的关系 .....	9
1.7 研究的对象、目的和意义 .....	10
1.7.1 研究内容与目的 .....	10
1.7.2 研究意义 .....	10
第二章 材料和方法 .....	12

2.1 主要仪器 .....	12
2.2 主要药品与试剂 .....	13
2.3 合成及测序 .....	13
2.4 主要试剂配制 .....	13
2.4.1 斑马鱼胚胎收集培养以及成年斑马鱼培养所需主要溶液 .....	13
2.4.2 石蜡切片所需主要溶液 .....	13
2.4.3 TUNEL 需主要溶液 .....	14
2.4.4 免疫组化所需主要溶液 .....	14
2.4.5 Western blot 分析所需主要溶液 .....	14
2.4.6 基因组 DNA 提取所需主要溶液 .....	15
2.4.7 DNA 片段胶回收及克隆所需主要溶液 .....	15
2.4.8 大肠杆菌感受态制备相关溶液 .....	15
2.4.9 大肠杆菌培养基 .....	15
2.5 实验动物及其暴露实验 .....	15
2.6 主要实验方法 .....	16
2.6.1 斑马鱼行为学分析 .....	16
2.6.2 石蜡包埋、切片及 HE 染色 .....	17
2.6.3 免疫组化 .....	18
2.6.4 细胞凋亡 .....	18
2.6.5 神经递质和 A $\beta$ 42 淀粉样蛋白及总蛋白含量测定 .....	19
2.6.6 Western blot .....	19
2.6.7 组织总 RNA 提取 .....	20

2.6.8 1st cDNA 合成 .....	21
2.6.9 实时荧光定量 PCR (Real time PCR, RT-PCR) .....	21
2.6.10 PCR 扩增.....	24
2.6.11 纯化回收片段与载体的连接.....	24
2.6.12 感受态大肠杆菌的制备 .....	25
2.6.13 片段 DNA 连接质粒后转化 .....	25
2.6.14 高通量 MeDIP 测序筛选差异甲基化基因 .....	25
2.6.15 基因组 DNA 的提取 .....	26
2.6.16 全基因组 DNA 亚硫酸氢盐转化 .....	26
2.6.17 亚硫酸氢盐测序法 (Bisulfite sequencing PCR, BSP) 检测基因 甲基化水平 .....	27
2.6.18 组织中性激素水平测定 .....	29
<b>2.7 数据处理</b> .....	<b>30</b>
<b>第三章 结果分析</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1 低剂量 BaP 长期暴露对斑马鱼的神经毒性效应</b> .....	<b>31</b>
3.1.1 低剂量 BaP 长期暴露后对斑马鱼脑体比的影响.....	31
3.1.2 低剂量 BaP 长期暴露对斑马鱼运动能力的影响.....	32
3.1.3 低剂量 BaP 长期暴露对斑马鱼学习记忆能力的影响.....	33
3.1.4 低剂量 BaP 长期暴露导致斑马鱼端脑神经退行性病变.....	35
3.1.5 低剂量 BaP 长期暴露对斑马鱼脑部多巴胺神经元数量的影响 .....	36
3.1.6 低剂量 BaP 长期暴露后斑马鱼脑部细胞凋亡情况.....	38
3.1.7 低剂量 BaP 长期暴露对斑马鱼脑内神经递质含量及 PD、AD 相关基因 mRNA 表达的影响 .....	41

<b>3.2 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年斑马鱼的神经毒性效应</b> .....	43
3.2.1 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年斑马鱼的运动能力的影响	43
3.2.2 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年斑马鱼脑内多巴胺神经元数 量的影响 .....	45
3.2.3 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年斑马鱼学习记忆能力的影响 .....	47
3.2.4 胚胎时期低剂量 BaP 暴露导致成年斑马鱼脑部神经元退化	48
3.2.5 胚胎时期低剂量 BaP 暴露增加成年斑马鱼脑细胞凋亡.....	50
3.2.6 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年斑马鱼神经递质含量的影响 .....	52
<b>3.3 胚胎时期低剂量 BaP 暴露引起成年斑马鱼神经毒性效应的机制</b> ...	54
3.3.1 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对 96 hpf 仔鱼和成年斑马鱼脑内甲基 转移酶表达的影响 .....	54
3.3.2 甲基化高通量测序筛选 BaP 暴露后的差异甲基化基因.....	56
3.3.3 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对仔鱼及成年斑马鱼脑内神经发育 相关基因甲基化水平及 mRNA 水平的影响 .....	58
<b>3.4 胚胎时期低剂量 BaP 暴露引起成年斑马鱼的生殖毒性</b> .....	61
3.4.1 胚胎时期低剂量 BaP 暴露改变成年雄鱼性体比.....	61
3.4.2 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年雄鱼精巢组织学的影响...	61
3.4.3 胚胎时期低剂量 BaP 暴露降低成年雄鱼生殖能力.....	63
3.4.4 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年雄鱼性激素的影响.....	65
3.4.5 胚胎时 BaP 期暴露对成年雄鱼脑、精巢生殖相关基因表达的影 响 .....	66
3.4.6 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年雌鱼性体比的影响.....	67
3.4.7 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年雌鱼卵巢组织学的影响...	68

3.4.8 胚胎时期低剂量 BaP 暴露降低成年雌鱼生殖能力.....	70
3.4.9 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年雌鱼性激素的影响.....	72
3.4.10 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年雌鱼脑、卵巢、肝脏中生殖 相关基因表达的影响 .....	73
3.4.11 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年斑马鱼脑中 <i>gnrhr3</i> 甲基化状 态及其 mRNA 表达量的影响 .....	75
<b>第四章 讨论</b> .....	<b>78</b>
4.1 低剂量 BaP 长期暴露对斑马鱼的神经毒性效应 .....	78
4.2 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年斑马鱼的神经毒性效应 .....	80
4.3 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年斑马鱼神经毒性效应的分子机制	81
4.4 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年斑马鱼的生殖毒性效应 .....	82
4.5 胚胎时期低剂量 BaP 暴露对成年斑马鱼生殖毒性效应的分子机制	84
<b>第五章 结论与展望</b> .....	<b>86</b>
5.1 本研究所取得的主要结论 .....	86
5.2 本研究的创新点 .....	86
5.3 展望 .....	87
<b>参考文献</b> .....	<b>88</b>
<b>缩略词对照表</b> .....	<b>103</b>
<b>攻读博士学位期间发表的论文</b> .....	<b>106</b>
<b>致谢</b> .....	<b>107</b>



# Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	I
<b>Abstract in English</b> .....	IV
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	1
<b>1.1 The study of BaP polltion</b> .....	1
1.1.1 The characteristics of BaP .....	1
1.1.2 The pollution study of BaP .....	1
<b>1.2 The toxicities of BaP</b> .....	3
1.2.1 Carcinogenicity .....	3
1.2.2 Neurotoxicity .....	4
1.2.3 Reproductive toxicity.....	4
1.2.4 Others.....	5
<b>1.3 Environmental factors on neurodegenerative disease</b> .....	6
<b>1.4 Environmental factors on DNA methylation</b> .....	7
<b>1.5 The gonad of zebrafish</b> .....	8
<b>1.6 The hypothalamic-pituitary-gonadal axis in fish</b> .....	9
<b>1.7 Purpose and significance of this study</b> .....	10
1.7.1 The purpose.....	10
1.7.2 The significance.....	10
<b>Chapter 2 Materials and methods</b> .....	12
<b>2.1 Experimental apparatuses</b> .....	12

<b>2.2 Experimental reagents</b> .....	13
<b>2.3 Sequencing</b> .....	13
<b>2.4 Solutions</b> .....	13
2.4.1 Solutions for zebrafish culture and exposure.....	13
2.4.2 Solutions for paraffin-embedded, section and staining .....	13
2.4.3 Solutions for TUNEL.....	14
2.4.4 Solutions for immunohistochemical procedure .....	14
2.4.5 Solutions for Western blot .....	14
2.4.6 Solutions for genomic DNA extraction .....	15
2.4.7 Solutions for DNA gel extraction and ligation.....	15
2.4.8 Solutions for competent cell.....	15
2.4.9 Culture medium .....	15
<b>2.5 Zebrafish exposure experiment</b> .....	15
<b>2.6 Methods</b> .....	16
2.6.1 Behavior analysis .....	16
2.6.2 Paraffin-embedded, section and staining .....	17
2.6.3 Immunohistochemical procedure .....	18
2.6.4 TUNEL.....	18
2.6.5 A $\beta$ 42 and neurotransmitter assay .....	19
2.6.6 Western blot .....	19
2.6.7 Total RNA extraction.....	20
2.6.8 cDNA synthesization .....	21

2.6.9 Real time PCR.....	21
2.6.10 PCR .....	24
2.6.11 DNA gel extraction and ligation.....	24
2.6.12 Preparation of competent cell.....	25
2.6.13 Transformation.....	25
2.6.14 MeDIP sequencing .....	25
2.6.15 Genomic DNA extraction .....	26
2.6.16 Genomic DNA conversion .....	26
2.6.17 Bisulfite sequencing PCR, BSP.....	27
2.6.18 Analysis of sex steroid hormone.....	29
<b>2.7 Data analyses .....</b>	<b>30</b>
<b>Chapter 3 Results .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Neurotoxicity in zebrafish after low dose BaP chronic exposure ....</b>	<b>31</b>
3.1.1 Effects of BaP on brain weight to body weight ratio .....	31
3.1.2 Effects of BaP on locomotor activity .....	32
3.1.3 Effects of BaP on cognitive ability .....	33
3.1.4 BaP induced neurodegeneration .....	35
3.1.5 Effects of BaP on the number dopaminergic neurons .....	36
3.1.6 BaP elevated cell apoptosis in zebrafish brain .....	38
3.1.7 BaP affected the concentrations of neurotransmitter and the expression of some PD and AD relevant genes .....	41
<b>3.2 Neurotoxicity in adult zebrafish after BaP exposure during embryonic stage.....</b>	<b>43</b>

3.2.1 Effects of BaP on locomotor activity in adult zebrafish .....	43
3.2.2 Effects of BaP on the number dopaminergic neurons in adult zebrafish .....	45
3.2.3 Effects of BaP on cognitive ability in adult zebrafish.....	47
3.2.4 BaP induced neurodegeneration in adult zebrafish .....	48
3.2.5 BaP elevated cell apoptosis in adult zebrafish brain.....	50
3.2.6 BaP affected the concentrations of neurotransmitter .....	52
<b>3.3 Mechanisms involved in the neurotoxicity caused by BaP exposure during embryonic stage .....</b>	<b>54</b>
3.3.1 Effects of BaP on the expression of DNMTs in 96 hpf larvae and adult brain .....	54
3.3.2 Differentially methylated genes caused by BaP exposure .....	56
3.3.3 Effects of BaP on the levels of mRNA and methylation in nervous development genes .....	58
<b>3.4 Reproductive toxicity in adult zebrafish after BaP exposure during embryonic stage .....</b>	<b>61</b>
3.4.1 BaP changed the GSI of male zebrafish.....	61
3.4.2 Effects of BaP on the testis .....	61
3.4.3 BaP reduced the reproductive ability in male zebrafish.....	63
3.4.4 Effects of BaP on the sex steroid hormone in male zebrafish ....	65
3.4.5 Effects of BaP on the mRNA levels of genes related to reproduction in brain and testis .....	66
3.4.6 BaP changed the GSI of female zebrafish .....	67
3.4.7 Effects of BaP on the ovary.....	68
3.4.8 BaP reduced the reproductive ability in female zebrafish .....	70

3.4.9 Effects of BaP on the sex steroid hormone in female zebrafish..	72
3.4.10 Effects of BaP on the mRNA levels of genes related to reproduction in brain, ovary and liver .....	73
3.4.11 BaP affected the methylation level and mRNA level in gnrhr3.	75
<b>Chapter 4 Discussion</b> .....	<b>78</b>
<b>4.1 Neurotoxicity in zebrafish after low dose BaP chronic exposure</b> .....	<b>78</b>
<b>4.2 Neurotoxicity in adult zebrafish after BaP exposure during embryonic         stage</b> .....	<b>80</b>
<b>4.3 Mechanisms involved in the neurotoxicity on adult zebrafish after BaP         exposure during embryonic stage</b> .....	<b>81</b>
<b>4.4 Reproductive toxicity in adult zebrafish after BaP exposure during         embryonic stage</b> .....	<b>82</b>
<b>4.5 Mechanisms involved in the reproductive toxicity on adult zebrafish         after BaP exposure during embryonic stage</b> .....	<b>84</b>
<b>Chapter 5 Conclusions and prospects</b> .....	<b>86</b>
<b>5.1 Main conclusions</b> .....	<b>86</b>
<b>5.2 Innovation points</b> .....	<b>86</b>
<b>5.3 Prospects</b> .....	<b>87</b>
<b>References</b> .....	<b>88</b>
<b>Abbreviations</b> .....	<b>103</b>
<b>Publications</b> .....	<b>106</b>
<b>Acknowledgments</b> .....	<b>107</b>

## 摘要

多环芳烃 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, PAH) 是环境中一类分布广泛的持久性有机污染物。苯并 (a) 芘 (Benzo(a)pyrene, BaP) 作为代表性的 PAH 具有包括神经毒性和生殖毒性在内的多种毒性。截至目前, 关于 BaP 神经毒性的研究大多集中于高浓度或短期的暴露实验, 而环境水平浓度下、长期的 BaP 暴露是否能引起同样的神经毒性则研究得较少; 此外, 胚胎时期低浓度 BaP 暴露对成年阶段的神经毒性、生殖毒性效应及其机制研究更为少见。因此本研究以斑马鱼为模式动物, 分别进行环境水平浓度 (0, 0.05, 0.5, 5, 50 nmol/L) BaP 长期暴露和胚胎时期短暂暴露 (后正常清水中养至一年大), 并利用行为学、病理学、生物化学、分子生物学等手段, 研究 BaP 的神经毒性和生殖毒性, 分析其可能的毒性作用机制。本研究主要结果如下:

(1) 对斑马鱼从 0.5–1.5 hpf (hours post fertilization, 受精后小时数) 的胚胎时期开始连续暴露低剂量 BaP 至 230 天后, 斑马鱼运动距离和平均运动速度均显著下降; 学习记忆能力减退; 斑马鱼脑体比显著下降; 端脑和间脑内多巴胺神经元数量显著减少; 端脑出现神经元退化现象, 神经元密度显著降低; 脑内  $\beta$  淀粉样蛋白含量增加; 端脑和间脑内细胞凋亡显著增加; 脑内多巴胺、二羟基苯乙酸、乙酰胆碱含量显著降低; 与神经退行性疾病相关的 *dat*, *dj-1*, *pink1*, *uch-l1*, *lrrk2*, *psen1*, *psen2* 和 *appb* 的 mRNA 表达均发生下调。由此可见, BaP 长期暴露可导致斑马鱼产生神经退行性疾病类似症状。

(2) 对 0.5–1.5 hpf 的斑马鱼胚胎连续暴露低剂量 BaP 至 96 hpf 后转至清水中养到一年大, 检测其引起的神经毒性。结果显示, 成年斑马鱼的运动能力和学习记忆能力均显著下降; 脑内  $\beta$  淀粉样蛋白含量增加; 端脑和间脑内的多巴胺神经元数量显著减少; 端脑总神经元密度显著降低; 三种神经递质 (多巴胺、二羟基苯乙酸、去甲肾上腺素) 含量均显著降低。由此可见, 胚胎时期低剂量 BaP 暴露可导致成年斑马鱼产生神经退行性疾病类似症状。进一步对 96 hpf 的仔鱼和成鱼脑进行相关蛋白的 western blot 分析。结果显示, DNMT1 和 DNMT3a 在仔鱼和成鱼脑内表达量均显著上升。应用甲基化高通量测序技术, 我们筛选到在启

动子区域发生差异甲基化的 *gucy2f*、*drd4-rs* 和 *zc4h2*，这三个基因均与神经系统发育相关。通过 BSP (Bisulfite sequencing PCR) 验证，其中，*gucy2f* 和 *drd4-rs* 在 96hpf 仔鱼和成鱼脑内均保持高甲基化状态，Real-time PCR 结果显示它们的 mRNA 表达水平则成下降趋势；相反，*zc4h2* 在 96hpf 仔鱼和成鱼脑内保持低甲基化状态，mRNA 表达水平成上升趋势。基于此，我们认为胚胎时期低剂量的 BaP 暴露可导致 *gucy2f*、*drd4-rs* 和 *zc4h2* 持久的 DNA 甲基化改变，进而引起成年斑马鱼发生神经退行性病变。

(3) 对 0.5–1.5 hpf 的斑马鱼胚胎连续暴露低剂量 BaP 至 96 hpf 后转至清水中养到一年大，检测其引起的生殖毒性。结果显示，成年雄鱼的性体比呈倒 U 型变化；组织学检查发现精巢内成熟精子数量显著减少；与正常雌鱼交配后所产胚胎的受精率、出膜率显著下降，畸形率显著升高；雄鱼肌肉组织中睾酮含量无明显变化，雌二醇含量增加；Real-time PCR 结果显示雄鱼脑内 *GnRH3*、*Fsh $\beta$* 、*LH $\beta$* 、*LH $\gamma$* 、*cyp19a1a* 及 *cyp19b* 的 mRNA 表达量均显著下降；精巢内 *cyp19a1a* 及 *cyp19b* 表达量显著降低，雌激素受体 *esr1* 和 *esr2 $\beta$*  的 mRNA 表达量上升。成年雌鱼性体比显著下降，产卵量显著下降；卵巢切片结果显示，成熟卵母细胞数量和面积显著降低；与正常雄鱼交配后所产胚胎的受精率、出膜率和蛋白含量均显著降低，畸形率显著增大；雌鱼肌肉组织中睾酮与雌二醇含量均显著下降；Real-time PCR 结果显示雌鱼脑内 *GnRH3*、*Fsh $\beta$* 、*LH $\beta$* 、*LH $\gamma$* 、*cyp19a1a* 及 *cyp19b* 的 mRNA 表达量均显著下降；卵巢内 *cyp19a1a*、*cyp19b*、*esr1* 和 *esr2 $\beta$*  的 mRNA 表达量均显著降低；雌鱼肝脏内 *vtg1*、*vtg2*、*esr1* 和 *esr2 $\beta$*  的 mRNA 表达量均显著降低。甲基化高通量测序结果显示，BaP 暴露后斑马鱼 *gnrhr3* 启动子区域发生了高甲基化。通过 BSP 验证，发现在 96 hpf 仔鱼和成年雌鱼、雄鱼脑内 *gnrhr3* 均保持高甲基化状态，而 mRNA 表达水平则呈下降趋势。基于以上结果，我们认为胚胎时期低剂量 BaP 暴露引起的生殖毒性效应机制可能与“脑-垂体-性腺轴”中与生殖相关基因的 mRNA 表达异常有关。同时与 *gnrhr3* 启动子区域发生高甲基化有关，且这种高甲基化状态一直维持到成年；脑中 *gnrhr3* 启动子区域的高甲基化降低了该基因 mRNA 的表达，导致 *GnRH3* 和 *gnrhr3* 结合受限，进而抑制垂体中 FSH 和 LH 的释放，进一步影响性腺中性激素的合成与分泌，最终对精巢和卵巢的发育与成熟产生显著影响，表现为成年斑马鱼的生殖能力降

低。

根据以上结果我们认为，长期环境水平的 BaP 暴露可导致斑马鱼在行为、病理、神经递质等方面产生与神经退行性疾病较为相似的症状，提示 BaP 可能是一种新的神经退行性疾病环境风险因子。胚胎时期低剂量 BaP 短期暴露对成年斑马鱼产生的毒性效应，可能是 BaP 暴露引起的表观遗传改变导致的。

**关键词：**苯并（a）芘；胚胎时期；神经毒性；生殖毒性；斑马鱼

厦门大学博硕士论文摘要库



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.