

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20121011002

宋双双, 安立会, 郑丙辉, 等. 浑河流域野生鲫鱼卵黄蛋白原基因表达[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(1): 121-129

Song S S, An L H, Zheng B H, et al. Vitellogenin mRNA expression in wild crucian carp (*Carassius auratus auratus*) from Hun River [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(1): 121-129 (in Chinese)

## 浑河流域野生鲫鱼卵黄蛋白原基因表达

宋双双<sup>1,2</sup>, 安立会<sup>1,2,\*</sup>, 郑丙辉<sup>2</sup>, 赵艳民<sup>2</sup>, 李子成<sup>2</sup>, 陈浩<sup>2</sup>,  
赵兴茹<sup>2</sup>, 刘代成<sup>1</sup>

1. 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014
2. 中国环境科学研究院国家环境保护河口与海岸带重点实验室, 北京 100012

**摘要:** 为揭示浑河流域水环境内分泌干扰物对水生态的潜在风险, 利用兼并引物扩增获得鲫鱼卵黄蛋白原(Vtg)和核糖体蛋白L7(RPL-7)基因部分碱基序列(分别为825和450 bp), 建立以RPL-7为内参基因、定量鲫鱼Vtg基因表达的实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)方法, 并将该方法用于定量浑河野生鲫鱼肝组织Vtg基因表达分析。结果显示: 与上游对照点(S1)相比, 7月下旬各点(S4~S8)雄鱼、S4和S6点雌鱼肝组织的Vtg mRNA表达水平皆显著升高( $P < 0.05$ ); 11月在雄鱼中未检出Vtg mRNA的有效表达, 雌鱼也仅在S2和S3点的表达水平升高( $P < 0.05$ )。研究表明, 浑河流域野生鲫鱼尤其是在7月明显受到了环境雌激素类物质的影响。另外, qRT-PCR方法能够灵敏检测出鲫鱼Vtg基因表达的时空差异。

**关键词:** 环境内分泌干扰物; 卵黄蛋白原; 实时定量PCR; 浑河; 鲫鱼

文章编号: 1673-5897(2013)1-121-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Vitellogenin mRNA Expression in Wild Crucian Carp (*Carassius auratus auratus*) from Hun River

Song Shuangshuang<sup>1,2</sup>, An Lihui<sup>1,2,\*</sup>, Zheng Binghui<sup>2</sup>, Zhao Yanmin<sup>2</sup>, Li Zicheng<sup>2</sup>,  
Chen Hao<sup>2</sup>, Zhao Xingru<sup>2</sup>, Liu Daicheng<sup>1</sup>

1. College of Life Science, Shandong Normal University, Ji'nan 250014, China
2. State Environmental Protection Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

**Received** 11 October 2012      **accepted** 10 December 2012

**Abstract:** To evaluate the potential ecological risk caused by endocrine disrupting chemicals in Hun River, a partial vitellogenin (Vtg) and ribosomal protein L7 (RPL-7) genes in crucian carp (*Carassius auratus auratus*) were isolated, amplified and sequenced (825 bp and 450 bp). According to the two gene sequences, a real-time quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay was developed for quantifying the Vtg mRNA expression in crucian carp, using RPL-7 as a reference gene. The established qRT-PCR method was applied to quantify Vtg mRNA expression in livers of wild crucian carp from Hun River. Results showed that the Vtg mRNA ex-

收稿日期: 2012-10-11 录用日期: 2012-12-10

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2009ZX07528-03)

作者简介: 宋双双(1988-), 女, 硕士生, 研究方向为水环境毒理学, E-mail: 467447703@qq.com

\* 通讯作者( Corresponding author) E-mail: anlhui@163.com

pressions in males from S4 to S8 (down-stream sites) increased to be significantly higher than those from S1 (upstream reference site) in July ( $P < 0.05$ ). Similar results were also found in female crucian carp of S4 and S6 in July ( $P < 0.05$ ). In November, no significant Vtg mRNA expression was detected in males. Increased Vtg mRNA expression was only observed in females of S2 and S3 (down-stream sites) ( $P < 0.05$ ). The study suggested that the wild crucian carp in Hun River were affected by the environmental estrogens especially in July. The present qRT-PCR method can be applied to detect the spatial and temporal differences of Vtg mRNA expressions in crucian carp.

**Keywords:** endocrine disrupting chemicals; vitellogenin; qRT-PCR; Hun River; crucian carp; *Carassius auratus auratus*

浑河是辽河流域主要支流之一,浑河水环境质量对流域水生态安全和流域人体健康具有直接影响。最近的调查结果表明<sup>[1]</sup>,以浑河作为水源的沈阳某自来水中检测出了较高浓度的4-壬基酚(OP) ( $690.5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )、壬基酚(NP) ( $2791.6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )和双酚A(BPA) ( $161.0 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )等具有明显雌激素效应的环境内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)。边海燕<sup>[2]</sup>对浑河下游的大辽河的研究结果表明,大辽河表层水中NP的含量介于 $180.4 \sim 276.9 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (平均浓度为 $222.6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )而表层沉积物中NP的含量为 $1.54 \sim 162.5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ (以干质量计)(平均浓度为 $36.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )并且在浑河与太子河交汇处的浓度最高。而Wang等<sup>[3]</sup>在辽河流域包括辽河、浑河和太子河的水体和沉积物中均检测出高浓度的OP(水: $52.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ;沉积物: $8.6 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )、NP(水: $2065.7 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ;沉积物: $558.4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )、BPA(水: $755.6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ;沉积物: $33.8 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )、雌二醇( $E_1$ ) (水: $55.8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ;沉积物: $7.9 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )、雌二醇( $E_2$ ) (水: $7.4 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ;沉积物: $< \text{检测限}$ )和三氯生(水: $81.3 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ;沉积物: $33.9 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ )等具有较强雌激素效应的物质。这些调查结果说明,浑河流域水环境中EDCs可能具有着较高的生态风险,但到目前为止有关浑河EDCs诱导的生物效应研究相对较少。

鲫鱼(crucian carp, *Carassius auratus auratus*),在我国河流和湖泊中广泛分布,主要摄食浮游生物和底泥中的有机质,体内污染物水平和产生的生物效应能够客观反映水环境中污染状况,可以作为研究河流、湖泊水生态(环境)质量的一种合适的环境指示生物。为了揭示浑河环境EDCs污染具有的潜在生态风险,本研究在克隆鲫鱼卵黄蛋白原(Vtg)基因序列基础上,建立了鲫鱼Vtg基因表达的实时定量PCR分析方法,并将该方法用于定量浑河流域野生鲫鱼肝组织Vtg基因表达,以期为浑河流域水环境风险管理提供方法学基础。

## 1 材料与方法(Materials and methods)

### 1.1 样品采集

分别于2011年7月和11月利用电鱼机、流刺网和垂钩等方式采集浑河干流的野生鲫鱼。调查起点为浑河大伙房水库坝下的章党大桥(S1),下游至大辽河西安镇月亮河(S8)(图1)。现场测量所有野生鲫鱼体长、体质量(见表1)根据公式(1)计算肥满度(CF)、根据公式(2)计算性腺指数。肉眼区分雌雄(雄鱼性腺呈乳白色,雌鱼性腺呈淡黄色并且卵粒明显),分别取肝组织置于液氮冻存。现场分析水温、pH、盐度、DO和电导率等水质参数(见表2)。

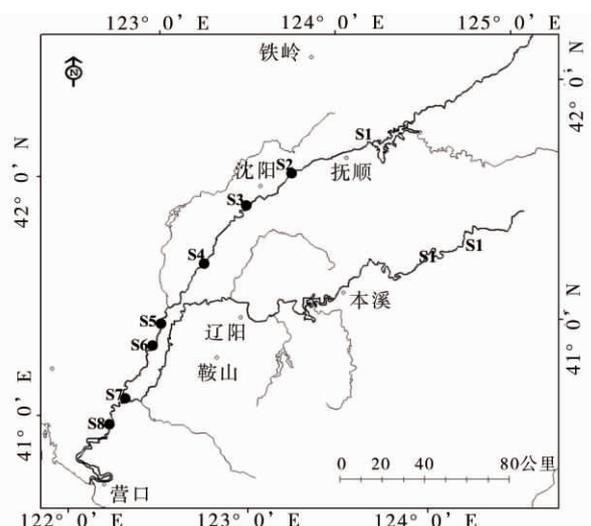


图1 浑河流域野生鲫鱼采样点(S1~S8)

Fig. 1 Sampling sites (S1~S8) for wild crucian carp from Hun River Basin, north of China

$$\text{肥满度}(CF) = \frac{\text{体质量}(\text{g}) \times 100}{\text{体长}^3(\text{cm})^3} \quad (1)$$

$$\text{性腺指数}(GSI, \%) = \frac{\text{性腺质量}(\text{g})}{\text{去内脏体质量}(\text{g}) \times 100} \quad (2)$$

表 1 浑河野生鲫鱼基本参数  
Table 1 Basic parameters of wild crucian carp from Hun River

采样站点	月份	体长/cm	体质量/g	CF	性腺指数(GSI) /%		性别比(F: M)
					雌	雄	
S1	7	11.58 ± 2.20	41.95 ± 32.90	2.37 ± 0.39	13.54 ± 5.46	3.76 ± 1.39	1.23(38/31)
	11	14.76 ± 3.26	56.28 ± 41.73	1.45 ± 0.20	8.20 ± 1.96	4.39 ± 1.77	5.92(71/12)
S2	7	13.35 ± 1.75	66.96 ± 25.26	2.70 ± 0.24	15.19 ± 9.90	1.93 ± 1.09	1.13(17/15)
	11	16.66 ± 4.49	85.93 ± 66.48	1.49 ± 0.15	8.11 ± 4.00	3.30 ± 1.43	2.47(47/19)
S3	7	14.68 ± 2.50	97.25 ± 56.30	2.84 ± 0.30	14.44 ± 10.55	3.46 ± 2.40	2.12(34/16)
	11	18.36 ± 1.09	82.65 ± 15.38	1.33 ± 0.19	8.28 ± 3.67	4.56 ± 2.12	1.00(19/19)
S4	7	12.64 ± 1.32	58.58 ± 18.09	2.84 ± 0.32	11.45 ± 8.22	3.92 ± 1.71	1.53(29/19)
	11	18.91 ± 1.57	105.7 ± 25.95	1.54 ± 0.12	9.08 ± 4.36	3.31 ± 0.94	1.46(118/81)
S5	7	10.70 ± 0.77	33.30 ± 6.90	2.70 ± 0.21	13.24 ± 5.93	1.08 ± 0.62	1.53(49/32)
	11	15.49 ± 1.21	51.14 ± 16.49	1.34 ± 0.15	7.17 ± 1.92	3.38 ± 1.91	1.25(129/103)
S6	7	12.07 ± 1.23	49.61 ± 18.05	2.70 ± 0.28	21.38 ± 17.29	3.06 ± 1.54	1.77(23/13)
	11	16.39 ± 1.42	60.21 ± 17.74	1.34 ± 0.08	7.39 ± 3.57	2.84 ± 1.70	1.02(108/106)
S7	7	11.70 ± 0.83	44.80 ± 10.82	2.80 ± 0.12	7.35 ± 3.84	1.44 ± 0.64	1.52(64/42)
	11	15.00 ± 0.83	47.16 ± 6.31	1.41 ± 0.22	7.04 ± 1.35	3.01 ± 0.87	1.27(38/30)
S8	7	11.11 ± 0.94	33.93 ± 8.39	2.43 ± 0.17	12.21 ± 8.45	2.59 ± 1.59	3.27(49/15)
	11	17.59 ± 2.48	91.85 ± 49.31	1.57 ± 0.17	11.52 ± 3.61	2.66 ± 1.49	1.36(19/14)

表 2 浑河水质基本参数

Table 2 Basic parameters of water quality of Hun River

采样站点	月份	水温 / °C	TDS / (mg·L <sup>-1</sup> )	pH	电导率 / (mS·m <sup>-1</sup> )	盐度 / ‰	DO / (mg·L <sup>-1</sup> )
S1	7	17.5	0.15	7.11	0.19	0.11	4.47
	11	9.4	0.24	7.75	0.26	0.18	9.13
S2	7	26.5	0.33	7.47	0.51	0.24	5.58
	11	11.2	0.66	7.66	0.75	0.51	7.26
S3	7	26.9	0.34	7.77	0.53	0.25	8.85
	11	12.2	0.55	7.31	0.65	0.42	3.21
S4	7	29.6	0.33	8.06	0.55	0.30	6.28
	11	10.4	0.51	7.57	0.57	0.39	7.00
S5	7	27.0	0.37	7.49	0.59	0.27	2.92
	11	12.5	0.57	7.75	0.67	0.44	8.02
S6	7	26.7	0.41	7.12	0.64	0.30	2.78
	11	10.8	0.57	7.65	0.65	0.44	7.56
S7	7	26.7	0.38	7.62	0.61	0.28	2.35
	11	11.0	0.49	8.01	0.55	0.37	8.56
S8	7	28.2	0.40	7.70	0.65	0.29	3.02
	11	12.3	0.52	8.33	0.61	0.40	9.80

## 1.2 鲫鱼 Vtg 与核糖体蛋白 L-7(Ribosomal protein L-7, RPL-7) 基因扩增与测序

取液氮冻存的鲫鱼肝组织约 20 ~ 30 mg 利用 Trizol 试剂提取总 RNA 并经 DNase I(大连宝生物公司) 消化处理可能存在的 DNA 污染。紫外检测 RNA 质量( $1.8 < A_{260/280} < 2.0$ ) 并调整总 RNA 浓度至  $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。然后逆转录合成 cDNA: 取  $1 \mu\text{L}$  总 RNA ( $\approx 1 \mu\text{g}$ )  $2 \mu\text{L}$  的 dNTPs ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 大连宝生物公司)  $0.5 \mu\text{L}$  Oligo (dT)<sub>15</sub> ( $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , Promega Co., USA) 和  $0.5 \mu\text{L}$  的 M-MLV 逆转录酶 ( $200 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , Invitrogen Ltd, USA) 加入灭菌水补足到  $10 \mu\text{L}$ 。另取不加 RNA 样品作为阴性对照。反应混合液按照 M-MLV 逆转录试剂说明进行逆

转录合成 cDNA 第 1 条链。利用 Bioedit 7.0 软件比对 NCBI 数据库中已发表的其他生物 Vtg 基因序列<sup>[4]</sup> 利用 Primer Premier 5.0 在保守区设计兼并引物, 正向引物为 5'-GATCCCATCAAGTTTGA(A/C/G)TA-3', 反向引物为 5'-(A/G)AACTTCTCCTTGATGAAT(T/C)T-3'。以上述合成的 cDNA 为模板, 利用 MyCycler™ PCR 仪(Bio-Rad, USA) 扩增鲫鱼 Vtg 基因:  $95^\circ\text{C}$  2 min 1 个循环;  $95^\circ\text{C}$  C 30 s  $55^\circ\text{C}$  45 s  $72^\circ\text{C}$  60 s 40 个循环; 最后在  $72^\circ\text{C}$  条件下延伸 6 min。反应体积为  $50 \mu\text{L}$ 。所得扩增产物在质量分数为 1.2% 琼脂糖凝胶中进行电泳和 EB 染色, 在紫外照射条件下切取目的条带回收、纯化, 送至大连宝生物公司测序。利用 BLAST 在线比对所得序列<sup>[5]</sup>。

采用同样的方法, 利用不同生物 RPL-7 已知序列设计的兼并引物扩增鲫鱼 RPL-7 基因序列, 正向引物为 5'-CACAAAGGA(A/G)TA(T/C)A(A/G)GCAG(A/C)T-3', 反向引物为 5'-GGTC(T/C)TC-CCTGTT(T/G)CC(A/T/G)GC-3'。其余条件均与扩增 Vtg 基因条件一致。

## 1.3 浑河野生鲫鱼 Vtg 基因表达分析

在证实所得序列为鲫鱼 Vtg 和 RPL-7 基因序列后, 利用 Primer Express 3.0 软件分别设计 Vtg 和 RPL-7 的实时定量 PCR 特异引物。在此基础上, 对提取的肝组织 cDNA 进行特异扩增。PCR 反应混合液包括 SYBR Green PCR Master Mix  $10 \mu\text{L}$ , 正向和反向引物各  $0.2 \mu\text{L}$  ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 样品 cDNA 模板  $5 \mu\text{L}$ , 加灭菌的蒸馏水补足至  $20 \mu\text{L}$ 。扩增条件为:  $50^\circ\text{C}$  保持 2 min  $95^\circ\text{C}$  保持 10 min, 然后  $95^\circ\text{C}$  15 s  $60^\circ\text{C}$  1 min 40 个循环(ABI Prism® 7500, USA)。在最后 1

个循环结束后做溶解曲线验证引物的特异性。

采用双标准曲线法相对定量 Vtg 基因表达<sup>[6]</sup>。首先建立 Vtg 和 RPL-7 的标准曲线:以不同稀释度的组织 cDNA (1、1/10、1/100、1/1 000、1/10 000) 为模板,在上述条件下分别以 Vtg 和 RPL-7 的定量引物进行特异扩增,在  $C_i$  值(扩增循环数)与样品稀释度之间建立相对标准曲线。筛选两条标准曲线斜率差小于 0.1、且扩增效率处于 90%~110% 之间(见公式(3))的引物为最终定量引物。在此基础上,计算浑河各采样点野生鲫鱼肝组织样本中 Vtg 与 RPL-7 的初始表达值。为了消除样品间因 RNA 初始浓度或 cDNA 浓度差异产生的表达差异,利用 RPL-7 对 Vtg 表达值进行归一化处理。最后通过公示(4)计算得出不同样本、不同组之间 Vtg 表达量的差异倍数。

$$\text{扩增效率}(E) = 10^{\frac{1}{\text{斜率}}} - 1 \quad (3)$$

$$\text{相对表达倍数} = \frac{\text{实验组目标基因表达值} / \text{实验组内参基因表达值}}{\text{对照组目标基因表达值} / \text{对照组内参基因表达值}} \quad (4)$$

#### 1.4 数据分析

如果各组数据方差齐性且样本服从正态分布,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验各组数据差异性;如果方差不齐或不符合正态分布,采用秩和检验(Kruskal-Wallis test)。如果方差分析或秩和检验结果显著( $P < 0.05$ )进一步做多重比较分析。

## 2 结果与讨论(Results and discussion)

### 2.1 鲫鱼 Vtg 和 RPL-7 基因

利用设计的兼并引物,分离扩增鲫鱼 Vtg 的 cDNA 片段,经测序获得 825 个碱基。根据三联体密码子规则,该 825 个碱基对应着 275 个氨基酸(图 2)并经 BLAST<sup>[5]</sup>在线比对确认为 Vtg 基因,提交至 NCBI 数据库(Genebank 接收号:JQ776511)。经与 NCBI

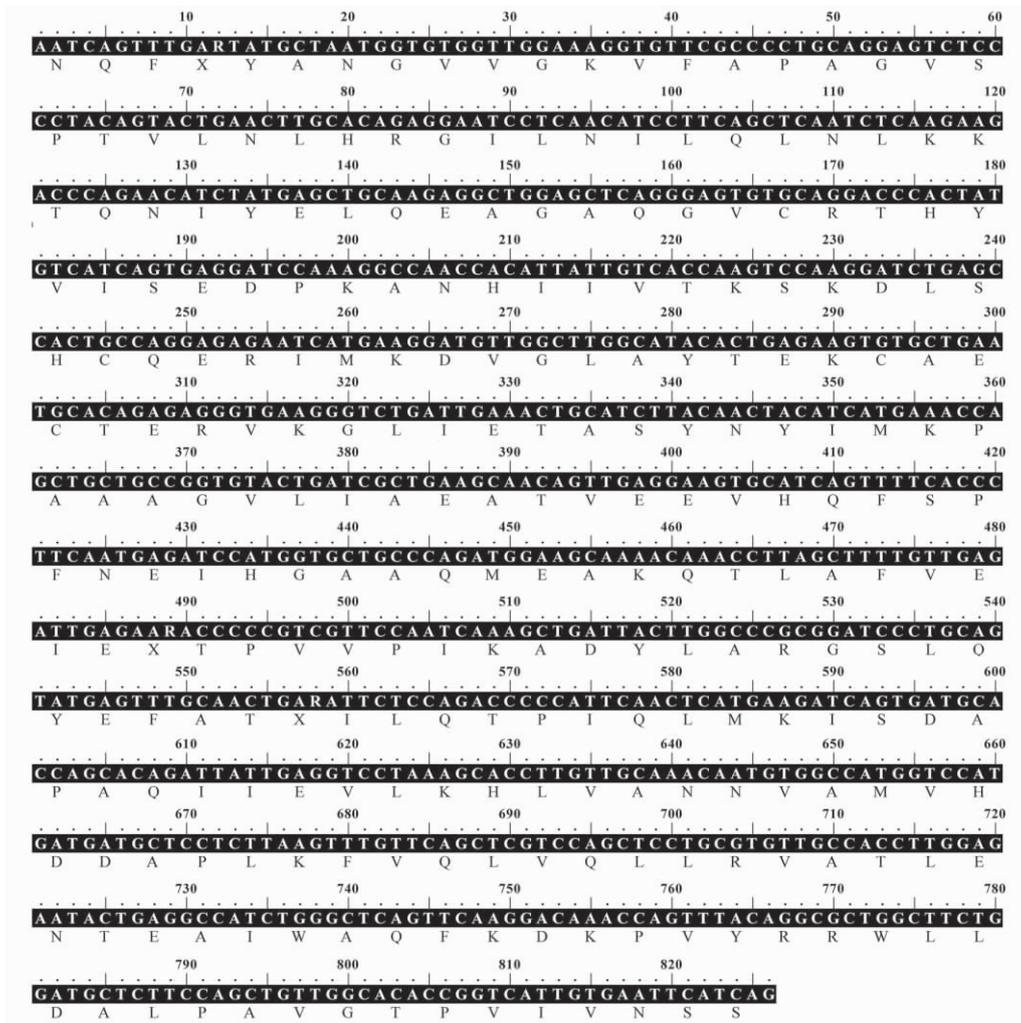


图 2 鲫鱼 Vtg 基因碱基与对应的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleobase and corresponding amino acid sequences of Vtg genes of crucian carp

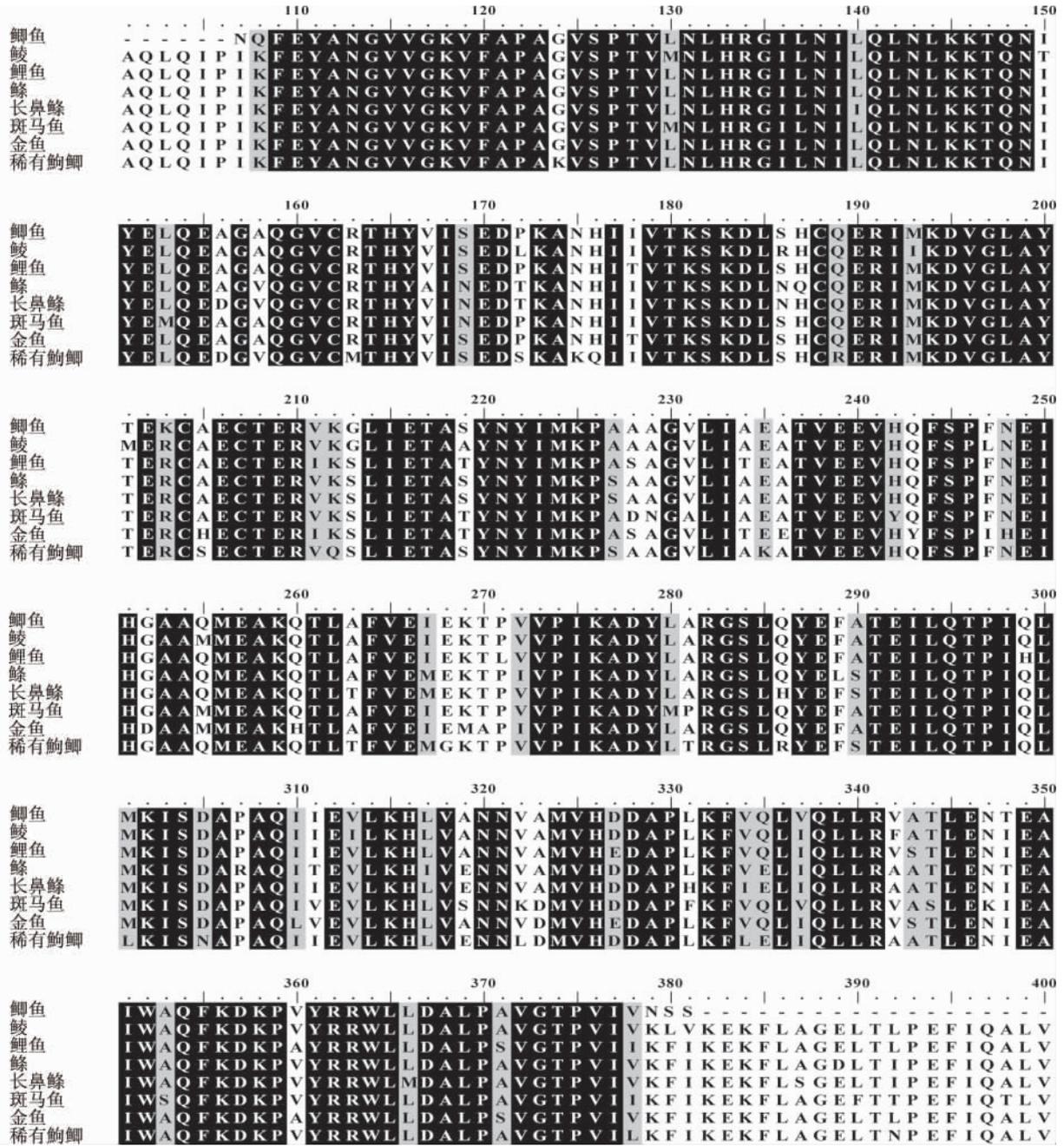


图 3 鲫鱼 Vtg 基因部分氨基酸序列与鲮( ADB77954)、鲤鱼( BAF73406)、鲮( AF130354)、长鼻鲮( ABP97429)、斑马鱼( CAK03614)、金鱼( ABG22139)和稀有鮡鲫( ABR27689) Vtg 氨基酸序列比对

Fig. 3 Comparison of partial amino acid sequence alignments of Vtg genes of crucian carp with those of mud carp DB77954), common carp (BAF73406), fathead minnow (AF130354), longnose dace (ABP97429), zebrafish (CAK03614), goldfish (ABG22139) and Chinese minnow (ABR27689)

数据库登记的其他物种 Vtg 比对, 本研究扩增的鲫鱼 Vtg 基因序列与鲮( ADB77954)、鲤鱼( BAF73406)、鲮( AF130354)、长鼻鲮( ABP97429)、斑马鱼( CAK03614)、金鱼( ABG22139)和稀有鮡鲫( ABR27689)的相似性分别为 95%、94%、92%、92%、91%、90%和 88%(图 3)。

利用相似方法得到鲫鱼 RPL-7 基因部分序列和对应的氨基酸序列 (Genebank 接收号: JQ776517) (见图 4), 并与斑马鱼( AAI07516)、斑点叉尾鮰( AAK95131)、青鳉( NP001098340)、彩虹鲑( ACO09163)、梭鱼( ACO14436)和比目鱼

(BAF98652) RPL-7 的氨基酸序列相似性分别为 97%、98%、96%、96%、95%和 95% (见图 5)。

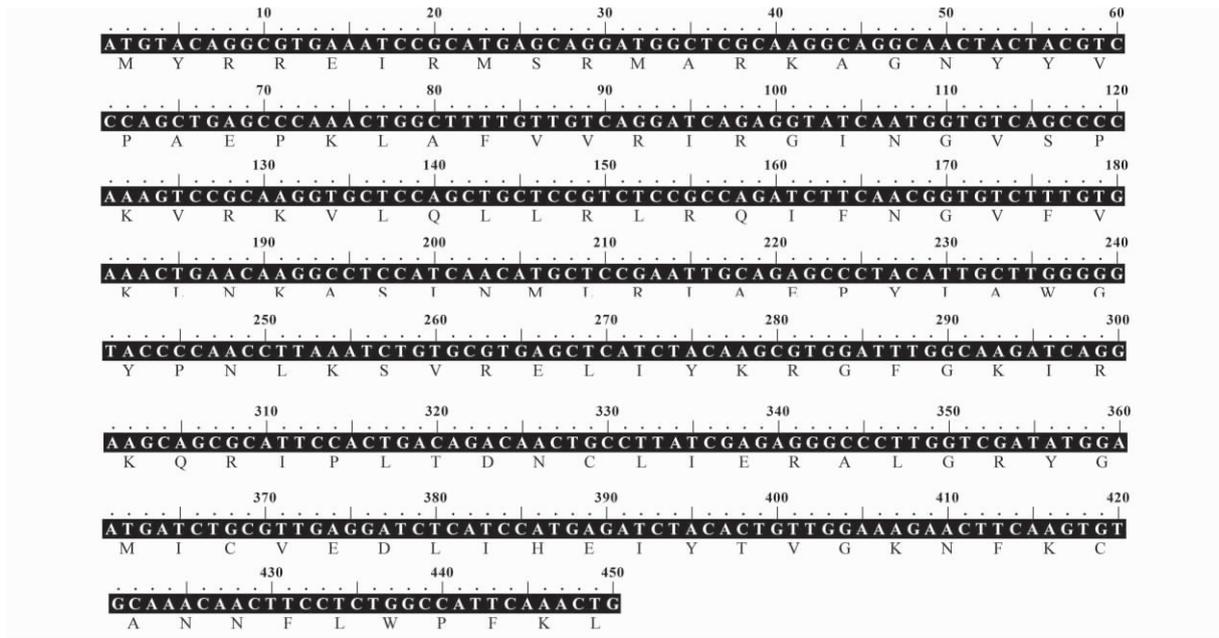


图 4 鲫鱼 RPL-7 基因部分碱基与对应的氨基酸序列

Fig. 4 Partial nucleobase and corresponding amino acid sequences of RPL-7 genes of crucian carp

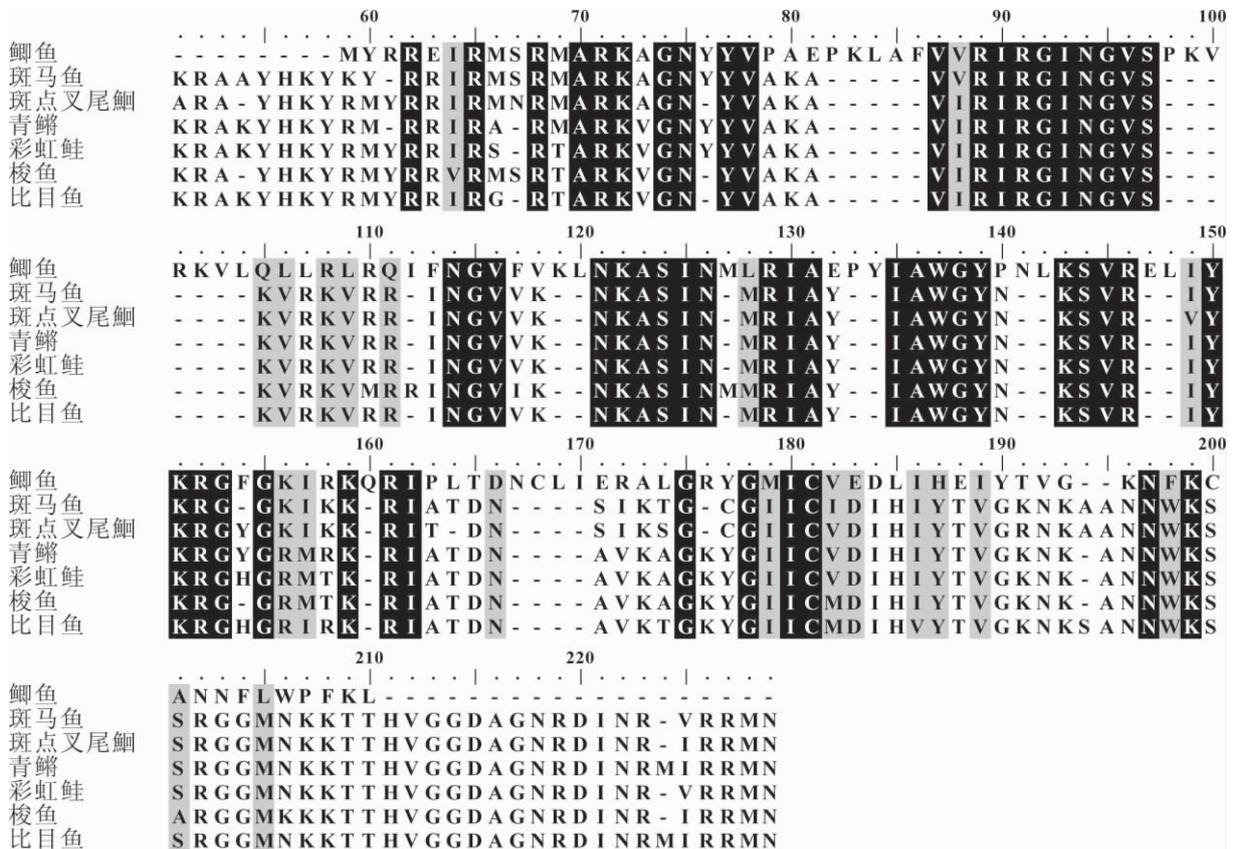


图 5 鲫鱼 RPL-7 基因部分氨基酸序列与斑马鱼 (AAI07516)、斑点叉尾鮰 (AAK95131)、青鳉 (NP001098340)、彩虹鲑 (ACO09163)、梭鱼 (ACO14436) 和比目鱼 (BAF98652) RPL-7 氨基酸序列比对

Fig. 5 Comparison of partial amino acid sequence alignments of RPL-7 genes of zebrafish (AAI07516), zebra nel catfish (AAK95131), medaka (NP001098340), rainbow salmon (ACO09163), pike (ACO14436), and flounder (BAF98652)

### 2.2 鲫鱼 Vtg 实时定量 PCR 的建立

在获得鲫鱼 Vtg 和 RPL-7 基因序列基础上, 利用 Primer Express 3.0 设计不同定量引物进行特异扩增, 建立每对引物的标准曲线, 并根据标准曲线斜率计算每对引物的扩增效率。在此基础上, 筛选、优化定量鲫鱼 Vtg 和 RPL-7 的实时定量 PCR 引物(见表 3), 并采用相对标准曲线法定量鲫鱼 Vtg 和 RPL-7 的基因表达。

对于基因表达的实时定量, 目前有 2 种方法, 即绝对定量和相对定量。其中, 绝对定量是采用标准曲线定量, 而相对定量又分为相对标准曲线法和比较  $C_t$  法<sup>[7]</sup>。对于标准曲线法的绝对定量, 首先需要制备每个基因的高质量标准品纯品, 并建立每个基因的标准曲线, 这不仅增加了工作量, 并且不同数据之间缺少可比性。而相对定量通过内参基因进行校正而无需制备标准品的纯品, 并且结果也具有一定的可比性。但无论哪种方法, 定量引物的扩增效率对定量结果均有非常大的影响<sup>[8]</sup>。因此, 优化定量引物对于采用荧光方法实时定量基因表达非常关键。在本研究中, 两个基因扩增效率处于 90% ~ 110% 之间, 满足定量引物扩增效率要求。因此, 所设计的定量引物可以高效率扩增目标基因。

表 3 浑河野生鲫鱼 Vtg 与 RPL-7 的 qRT-PCR 引物与扩增效率  
Table 3 qRT-PCR primers and amplification efficiencies for Vtg and RPL-7 of wild crucian carp from Hun River

基 因	引物序列	扩增效率/%
Vtg	正向: GATGATGCTCCTCTTAAGTTTGTTTCAG	99.3
	反向: ATGGCCTCAGTATTCTCCAAGGT	
RPL-7	正向: GTCTCCGCCAGATCTTCAAC	98.6
	反向: GGCAGTTGCTCTGTCAGTGGA	

### 2.3 实时定量浑河野生鲫鱼 Vtg 表达

利用上述建立的实时定量 PCR 方法分析了浑河各采样点野生雌鲫和雄鲫鱼肝组织 Vtg 基因表达情况 ( $n=6$ ) (见图 6)。与上游 S1 点(对照点)相比, 7 月下游 S4 点和 S6 点雌鱼肝组织 Vtg 水平明显升高, 分别是 S1 点的 3.42 倍和 2.51 倍 ( $P < 0.05$ ) (图 6-A); 而各点尤其是 S4 ~ S8 点雄鱼肝组织 Vtg 基因表达水平显著升高, 是 S1 点的 3.06 ~ 7.52 倍 ( $P < 0.05$ ) (见图 6-B)。与夏季不同, 在 11 月捕获的雄鲫鱼肝组织中没有检出 Vtg mRNA 的有效表达 ( $C_t$  值低于 35), 但 S2 和 S3 点雌鱼表达水平却明显升高, 分别是 S1 点的 2.21 倍和 2.71 倍 ( $P < 0.05$ ) (图 6-C)。

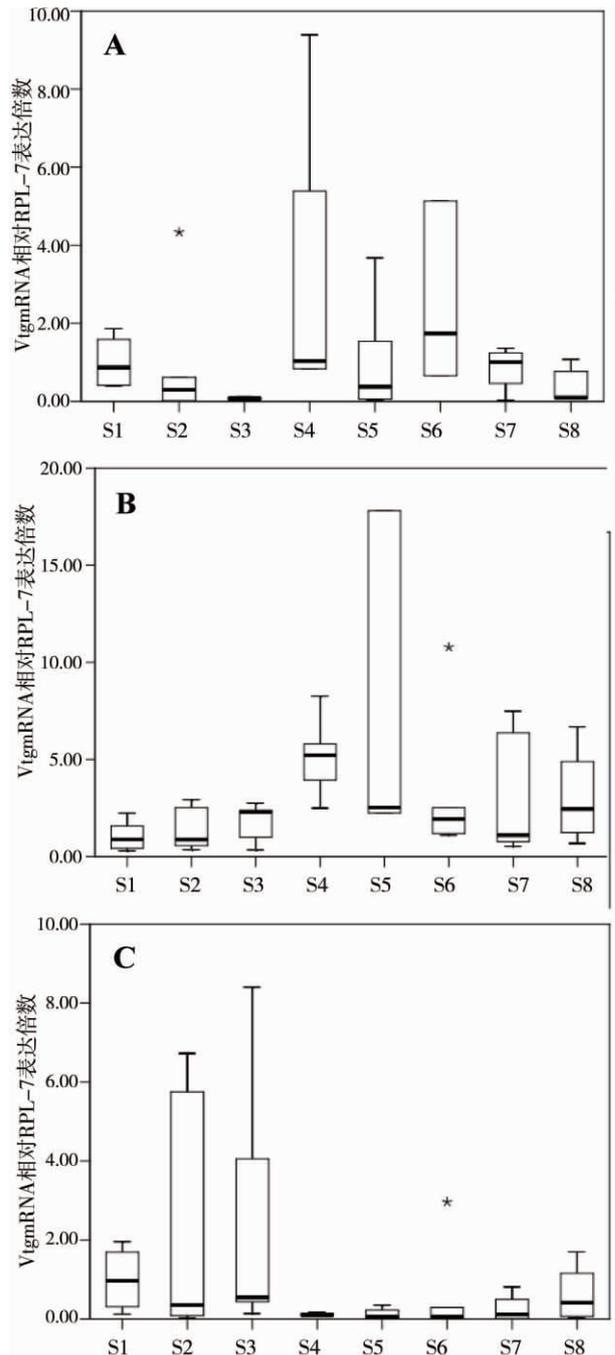


图 6 浑河野生鲫鱼肝组织中 Vtg 基因相对表达 ( $n = 6$ )  
注: A 7 月雌鱼; B 7 月雄鱼; C 11 月雌鱼; 各点 Vtg 的相对表达倍数以 S1 点为对照点, \*  $P < 0.05$ 。

Fig. 6 Vtg mRNA expressions in wild crucian carp from Hun River ( $n = 6$ ) (\*,  $P < 0.05$ ). A: females from July; B: males from July; C: females from November.

The S1 was the reference site

Vtg 是雌性生物包括鱼类特有的一种蛋白, 但在雌激素作用下雄鱼能够被诱导异常产生该蛋白, 因此, Vtg 作为监测环境雌激素类物质的敏感生物

标志物已得到广泛研究<sup>[9-40]</sup>。在本调查中,夏季浑河下游各点野生雌雄鲫鱼尤其是雄鱼肝组织 Vtg 基因的相对表达水平均较上游对照点(S1)升高。S1点位于大伙房水库坝下(章党大桥),现场调查没有发现该区域受到外源污染的显著影响,将该点各种水质参数和野生鲫鱼的各生理参数(包括 Vtg 基因表达水平)作为环境背景值与下游各点进行了比较。与对照点相比,下游各点水温、pH、总悬浮颗粒物(TDS)、电导率和盐度均有所升高,但溶氧(DO)稍有降低(见表2),而上下游野生鲫鱼形体规格包括体长、体质量和肥满度指数(CF)和性比均没有明显变化(见表1),但S6点(高坎大桥)雌鱼性腺指数( $21.38 \pm 17.29$ )较S1点( $13.54 \pm 5.46$ )明显偏高,说明S6点鲫鱼性腺发育较其他点成熟,这可能导致该点雌鱼肝组织 Vtg mRNA 具有较高的表达水平。除了S6点,同属浑河沈阳城市段下游的S3点(沈阳浑河大坝)和S4点(辽阳黄蜡坨大桥)鲫鱼 Vtg 基因表达却表现出不一致,即S3点的雌鱼 Vtg 基因表达受到抑制,而S4点雌鱼 Vtg 基因表达水平却比S1点显著升高(3.42倍)。经现场调查可知,S3点上游有沈水湾污水处理厂向浑河排放出水的多个排水口。根据相关研究结果<sup>[11-12]</sup>,城市污水处理厂出水中存在诱导鱼类异常产生 Vtg 的各种雌激素类物质,理论上S3点应具有诱导鲫鱼肝组织异常合成 Vtg 的能力,但城市污水处理厂排水中同时存在各种抗雌激素物质如PAHs等,因此,这种复合污染可能会导致水环境中的雌激素不能“正常”诱导 Vtg 产生,这在今后的研究中还需进一步分析确认。S4点则位于远离沈阳城市的下游,接受了通过细河从沈阳城区排放的大量生活和工业污水,其中含有的环境雌激素类物种诱导鲫鱼异常产生 Vtg。在该点下游的S5~S8点,雄鱼肝组织 Vtg 基因表达也明显升高,说明上游排放的环境雌激素类物质对整个流域水生态产生了影响,如浑河下游的大辽河段水环境中NP达到了 $222.6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,沉积物中则为 $36.0 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ (以干质量计),并且在浑河与太子河交汇处的浓度最高<sup>[2]</sup>。尽管本研究未对浑河水环境和鱼体内的雌激素类物质进行分析,但Wang等<sup>[3]</sup>在同时期对浑河流域的调查显示,与上游相比,夏季(7月)下游水环境中具有较高浓度的雌激素类物质,如E<sub>1</sub>为 $1.5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ (低于检测限 $\sim 15.2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ),NP为 $178.7 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ( $126.3 \sim 900.7 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ )并且下游水环境中的雌激素活性当量(EEQ)( $4.68 \sim 17.52$ )明显高于上游( $0.58$

$\sim 0.82 \text{ EEQ}$ )<sup>[3]</sup>,这与本调查发现下游鲫鱼 Vtg 基因表达明显升高的结果一致,说明浑河流域雌激素类物质不仅诱导野生鲫鱼产生异常 Vtg,并对野生鲫鱼健康产生潜在的不利影响<sup>[13]</sup>。

与夏季相比,秋季采集的野生鲫鱼规格略大,但肥满度指数略有降低,并且雌鱼性腺指数也明显降低(见表1),这与北方鱼类的正常繁殖周期一致。然而,雄鱼性腺指数却较夏季略有升高,但并没有在各点野生雄鱼肝组织中检出 Vtg 基因的有效表达。然而,Wang等<sup>[3]</sup>的调查结果表明,秋冬季(11月)浑河水环境中的雌激素物质包括4-t-OP、4-NP、BPA和E1较夏季(7月)高,并且下游水环境的雌激素活性当量也明显升高,这与本研究结果相反。对于导致这种差异的原因目前还无法做出准确判断,但分析认为浑河流域在秋季的水温相对较低(本调查中秋季水温较夏季平均降低 $15^\circ\text{C}$ ,见附表1)可能是影响因素之一,由于水温对鱼类产生 Vtg 具有明显影响,如水温为 $10^\circ\text{C}$ 时比 $3^\circ\text{C}$ 时所诱导大西洋鲑幼鱼肝组织合成的 Vtg 更高<sup>[14]</sup>;同样,随着水温从 $4^\circ\text{C}$ 增至 $15^\circ\text{C}$ ,虹鳟合成 Vtg 的速率和水平也会增加<sup>[15]</sup>。这说明,环境EDCs对流域水生态的影响不仅仅与其存在的环境浓度水平有关,还与环境因子(如温度)有关,这在进行环境EDCs的生态风险时需加以考虑。当然,具体原因还有待于深入分析。另外,S2点和S3点雌鱼肝组织 Vtg 基因表达水平明显高于对照点(S1)( $P < 0.05$ )。从采样点分布(图1)可知,S2点位于抚顺市下游、沈阳城市上游(东陵大桥),S3点位于沈阳城市段下游(沈阳市内浑河铁路大坝)。由于秋季浑河降水量较小(在浑河流域75%的降水都集中在夏季),对上游排放污水的稀释作用不明显,因此该时期水环境对野生雌鱼具有明显的雌激素效应。

S2点和S3点水质常规指标中只有温度发生了明显变化(见表2),而其他指标并未见明显变化,说明水质常规指标并不能反映水环境中微量污染物如内分泌干扰物的变化。然而,非常遗憾的是本研究没有对采样期间水环境中内分泌干扰物质的种类和浓度进行分析,但鱼体异常合成产生 Vtg 是对水环境中各种内分泌干扰物暴露的一个综合反应,可以通过 Vtg 蛋白水平或者 mRNA 表达水平变化及时、准确地反映水环境中内分泌干扰物的变化,这也是生物标志物被用于监测水环境质量、预警水环境风险的优势之一。对于在下游S4~S8点 Vtg 基因表达没有受到诱导反而被抑制的具体原因,还有待于

进一步分析。

另外,从图 6 可以看出,夏季雄鱼肝组织 Vtg 基因的相对表达明显高于雌鱼,这可能与雄鱼自身较低的雌激素阈值有关,例如同属鲤科鱼类的拟鲤 (Roach, *Rutilus rutilus*: Cyprinidae) 雄鱼内源性雌二醇为  $200 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,而雌鱼则高达  $850 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ <sup>[16]</sup>。然而,An 等<sup>[17]</sup>的研究发现,污水处理厂二沉出水可诱导幼龄雌鲫产生比幼龄雄鲫更高水平的 Vtg,而 Jung 等<sup>[18]</sup>也发现幼龄石斑 (rockfish, *Sebastes schlegeli*) 雌鱼比幼龄雄鱼对 4-NP 具有更高的灵敏性,这可能是由于处于不同发育时期的鱼类(本调查中雌雄鱼均发育性成熟)对外源雌激素类物质暴露具有不同的响应模式有关。

通讯作者简介: 安立会(1975-),男,环境科学博士,副研究员,主要研究方向为环境(生态)毒理与风险评估,发表学术论文 30 余篇。

#### 参考文献:

- [1] 汤先伟,金一和,张颖花,等. 沈阳市自来水中的烷基酚类污染物[J]. 环境与健康杂志,2005,22(3): 190-191  
Tang X W, Jing Y H, Zhang Y H, et al. Alkyl phenols in tap water in Shenyang [J]. Journal of Environment and Health, 2005, 22(3): 190-191 (in Chinese)
- [2] 边海燕. 河口近海环境中烷基酚的分布特征与潜在生态风险评估[D]. 青岛: 中国海洋大学,2010: 45-52  
Bian H Y. Distribution characteristics and potential ecological risks of alkyl phenols in estuarine and coastal areas [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010: 45-52
- [3] Wang L, Ying G G, Zhao J L, et al. Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao River system in northeast China using combined chemical and biological tools [J]. Environmental Pollution, 2011, 159(1): 148-156
- [4] U. S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information [EB/OL]. [2010-4-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- [5] U. S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information [EB/OL]. [2010-5-10]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- [6] 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(4): 402-408
- [7] Nolan T, Hands R E, Bustin S A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR [J]. Nature Protocols, 2006, 1(3): 1559-1582
- [8] 刘正霞,徐阳,徐进梅,等. 不同引物及数据分析方法对定量 PCR 结果的影响[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版,2009,29(8): 1112-1117  
Liu Z X, Xu Y, Xu J M, et al. The effects of different primers and data analysis methods on real-time PCR [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing: Natural Science, 2009, 29(8): 1112-1117
- [9] Wallace R A. Vitellogenesis and Oocyte Growth in Non-mammalian Vertebrates [M]. New York: Saunders College Publishing, Developmental Biology, Plenum Publishing Corporation, 1985: 127-177
- [10] Specker J L, Sullivan C V. Vitellogenesis in Fishes: Status and Perspectives [M]. Ottawa: Perspectives in Comparative Endocrinology, National Research Council, 1994: 1304-315
- [11] Ying G G, Kookana R S, Kumar A. Fate of estrogens and xenoestrogens in four sewage treatment plants with different technologies [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008, 27(1): 87-94
- [12] Ying G G, Kookana R S, Kumar A, et al. Occurrence and implications of estrogens and xenoestrogens in sewage effluents and receiving waters from South East Queensland [J]. Science of the Total Environment, 2009, 407(18): 5147-5155
- [13] Folmar L C, Gardner G R, Schreiber M P, et al. Vitellogenin-induced pathology in male summer flounder (*Paralichthys dentatus*) [J]. Aquatic Toxicology, 2001, 51(4): 431-441
- [14] Korsgaard B, Mommsen T P, Saunders R L. The effect of temperature on the vitellogenic response in Atlantic salmon post-smolts (*Salmo salar*) [J]. General and Comparative Endocrinology, 1986, 62(2): 191-201
- [15] MacKay M E, Lazier C B. Estrogen responsiveness of vitellogenin gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kept at different temperatures [J]. General and Comparative Endocrinology, 1993, 89: 255-266
- [16] Jobling S, Beresford N, Nolan M, et al. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents [J]. Biology of Reproduction, 2002, 66(2): 272-281
- [17] An L H, Hu J Y, Yang M. Evaluation of estrogenicity of sewage effluent and reclaimed water using vitellogenin as a biomarker [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008, 27(1): 154-158
- [18] Jung J H, Shim W J, Addison R F, et al. Protein and gene expression of VTG in response to 4-nonylphenol in rockfish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 2006, 143(2): 162-170