

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20190710001

汪笑宇, 戴媛媛, 贾磊, 等. 全氟辛烷磺酸盐(PFOS)对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)免疫相关基因表达的影响[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(2): 71-80

Wang X Y, Dai Y Y, Jia L, et al. Effects of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on immune-related gene expression in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(2): 71-80 (in Chinese)

## 全氟辛烷磺酸盐 (PFOS) 对半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 免疫相关基因表达的影响

汪笑宇, 戴媛媛, 贾磊\*, 王群山, 陈春秀

天津渤海水产研究所, 天津 300457

收稿日期: 2019-07-10 录用日期: 2019-10-09

**摘要:** 为了解全氟辛烷磺酸盐(perfluorooctane sulfonate, PFOS)暴露对半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis*)免疫功能的影响,在实验室条件下,运用 RT-PCR 方法分析了 PFOS 暴露对半滑舌鲷热休克蛋白 *hsp70*、*hsp90*、C 型凝集素(*c-type lectin*)和细胞色素 c 氧化酶(cytochrome c oxidase, *cox*)等 4 种免疫相关基因表达水平的影响。实验测定了上述 4 种基因在半滑舌鲷肝、鳃、肠及肌肉 4 种不同组织中随时间(0, 24 h, 48 h, 96 h 和 7 d)的表达变化情况。结果表明,在 4 种组织中, *hsp70* 基因的表达与对照相比为上调,其中,肝组织 *hsp70* 基因的表达量显著高于其他各组织,且表达高峰值的出现也早于其他各组织; *hsp90* 基因在肝和鳃组织中表达量随时间不同而波动,在肠组织中表达上调,在肌肉中表达显著下调; *c-type lectin* 基因表达量与对照组相比表达显著下调或无明显差异; *cox* 基因在肝组织和肠组织中表达下调,在鳃和肌肉中表达上调。上述研究表明,PFOS 能引起免疫相关基因的表达变化,对半滑舌鲷具有潜在的免疫毒性。肝组织中各免疫基因对 PFOS 胁迫的响应高于其他组织。本研究可为阐明全氟辛烷磺酸盐对半滑舌鲷的免疫毒性提供基础数据。

**关键词:** 全氟辛烷磺酸盐(PFOS); 半滑舌鲷; 免疫毒性; 免疫相关基因

文章编号: 1673-5897(2020)2-071-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Effects of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) on Immune-related Gene Expression in Half-smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*)

Wang Xiaoyu, Dai Yuanyuan, Jia Lei\*, Wang Qunshan, Chen Chunxiu

Bohai Fisheries Research Institute of Tianjin, Tianjin 300457, China

Received 10 July 2019 accepted 9 October 2019

**Abstract:** Perfluorooctane sulfonate (PFOS) is a persistent organic pollutant. Due to the extensive use of its products, PFOS enters the environment and organisms in various ways and accumulates through the food chain. To understand the effect of PFOS on half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) immune function, we treated 6-month older fish with 2 mg·L<sup>-1</sup> PFOS for 0, 24 h, 48 h, 96 h, and 7 d, respectively. The expressions of four immune-related genes, including the heat shock protein (*hsp70*, *hsp90*), c-type lectin domain (*c-type lectin*), and cyto-

基金项目: 天津市水产局青年科技创新项目(J2016-11 青); 国家鲆鲽类产业技术体系项目(CARS-47-Z01); 天津现代产业技术体系-水产-海水鱼养殖岗位项目(ITTFRS2018045)

作者简介: 汪笑宇(1983—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为水产动物疾病防控, E-mail: smallouc@163.com

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

chrome c oxidase (*cox*), were analyzed in the liver, gill, intestine, and muscle tissues under different exposure time. The results showed that the expression of *hsp70* in these four tissues was significantly up-regulated under exposure respectively. Meanwhile, its expression in liver was significantly higher than other tissues, and the peaked expression of *hsp70* in liver appeared after 24 h PFOS exposure, which responded much earlier than other tissues. The expression of *hsp90* increased significantly after 48 h exposure, recovered to normal after 7 d exposure in liver and gill, and was up-regulated in intestine and down-regulated in muscle significantly. The expression of *c-type lectin* was significantly down-regulated or not significantly different compared with the control in four tissues. The expression of *cox* was significantly up-regulated in liver and intestine, down-regulated in gill and muscle. These results indicated that different tissues in half smooth tongue sole have different immune reaction in regards of PFOS treatment, which has a potential immunotoxicity to half-smooth tongue sole. When faced with PFOS stress, the immune-related genes in the liver could response more quickly. These results could be helpful to understand the immunotoxicity of PFOS on half-smooth tongue sole.

**Keywords:** perfluorooctane sulfonate (PFOS); *Cynoglossus semilaevis*; immunotoxicity; immune-related gene

全氟辛烷磺酸盐 (perfluorooctane sulfonate, PFOS) 有稳定的 C—F 化学结构, 具有化学稳定性高、耐热性高和表面活性高的特点, 是一种持久性有机污染物。PFOS 作为表面活性剂在工业以及民用领域应用十分广泛, 例如纺织业、皮革、食品包装和洗涤剂等。这些产品的大量使用使 PFOS 以各种途径进入到环境及生物体内, 并通过食物链逐级累积传递。

海洋是 PFOS 类污染物的最终归宿<sup>[1]</sup>。近年来, 世界多地的海水和海洋生物体内不断检出 PFOS。Gulkowska 等<sup>[2]</sup>测得来自广东省和浙江省的包括鱼类、螃蟹、小虾、牡蛎、蚌和蛤等 27 个海洋样品中, PFOS 浓度范围为 0.3 ~ 13.9 ng·g<sup>-1</sup> 湿重。近年来, 毒理学研究表明, PFOS 进入生物体内能够影响基因表达, 改变生物酶活性, 导致胚胎发育畸形, 致使生物体重下降, 影响胆固醇水平等<sup>[3-7]</sup>。长期暴露于低浓度 PFOS 中, 可导致斑马鱼胚胎脊柱畸形, 大型蚤 (*Daphnia magna*) 的繁殖受到抑制<sup>[8]</sup>, 使黄海胆 (*Glyptodaris crenulares*) DNA 甲基化水平升高<sup>[9]</sup> 等。Houde 等<sup>[10]</sup>还发现处于相对较高营养级的动物体内 PFOS 浓度较高。这说明, 水环境和水生生物体内的 PFOS 可通过食物链的传递和生物富集作用影响到更高营养级生物, 威胁人类的健康。因此, 各国相继出台了各种措施限制禁止了 PFOS 类物质的使用<sup>[11]</sup>, PFOS 也迅速成为近年来人们关注的热点<sup>[12]</sup>。

半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 生长快, 适应范围广, 营养价值高, 近年来已成为增殖放流和人工养殖的最佳品种之一; 在我国的黄渤海、东海和南海均有分布, 以渤海、黄海海域为多<sup>[13]</sup>, 是一种典型的

近岸海洋海区鱼类。目前, 对半滑舌鳎的研究主要集中在各种环境因子对其生长发育的影响<sup>[14-15]</sup>, 以及各种金属离子对半滑舌鳎的毒性作用方面<sup>[16]</sup>。党红蕾等<sup>[17]</sup>从细胞水平研究了 PFOS 对半滑舌鳎肝细胞的毒性效应, 表明 PFOS 对半滑舌鳎肝细胞具有一定的生物毒性。

本实验以半滑舌鳎为研究对象, 首次从基因表达水平上, 运用 RT-PCR 分析半滑舌鳎热休克蛋白 70 (heat shock 70kDa protein1, *hsp70*)、热休克蛋白 90 (heat shock 90kDa protein, *hsp90*)、C 型凝集素 (c-type lectin domain, *c-type lectin*) 和细胞色素氧化酶 (cytochrome c oxidase, *cox*) 等 4 种免疫相关基因在半滑舌鳎不同组织器官中随时间的表达变化, 从 mRNA 转录水平上探讨 PFOS 对半滑舌鳎的毒性影响。为研究 PFOS 污染对健康养殖和海洋生态环境的影响, 以及保护重要水产经济种类提供更多的理论依据。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 实验动物

半滑舌鳎幼鱼取自天津市兴盛海淡水养殖有限责任公司。实验鱼体长范围为 12 ~ 16 cm, 6 月龄, 在实验室暂养一周以上, 暂养期间无死亡。实验前一天停止投饵。选择体型正常, 反应灵敏, 大小基本一致, 外观无异常现象的幼鱼进行随机分组。

### 1.2 主要试剂及仪器

全氟辛烷磺酸钾 (C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>KO<sub>3</sub>S), 纯度为 AR 级 (Sigma 公司, 美国), 溶解于纯度 >99% 的二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (上海生工), 配成浓度为

10 g·L<sup>-1</sup>的母液,使用时稀释成所需要的浓度。

Trizol(Invitrogen), cDNA 第一链合成试剂盒 All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit(GeneCopoeia 公司), Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG(Life Technologies 公司),其他试剂均为国产分析纯。

Epgiadients PCR 仪(Eppendorf, 德国), ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(Life Technologies 公司, 美国)

### 1.3 染毒与取样方法

根据预实验结果,实验浓度设置为 2 mg·L<sup>-1</sup>, 设置 3 个平行组,同时设有 DMSO 对照组。实验容器为 40 L 透明玻璃缸,每缸水量 25 L,放入半滑舌鳎幼鱼 6~10 尾,供试海水取自自然海水,经沉淀池沉淀和砂滤后待用。实验期间海水 pH 值为 7.6~8.0,温度 18~22 °C。实验过程中昼夜曝气,每天换水 1/2。实验期间各组未出现死亡现象。

实验中分别于 24 h、48 h、96 h 和 7 d 取出半滑舌鳎的肝、鳃、肠和肌肉组织,每次每个时间点随机取出 5 尾,其中将 3 尾鱼的组织随机合成一个样本进行测定,每个时间点共有 3 个平行样本。组织取出后,用预冷的 0.9% 生理盐水冲洗,滤纸吸干,称重后装袋密封,放入-80 °C 冰箱中保存备用。

### 1.4 总 RNA 提取和第一链 cDNA 合成

将保存于-80 °C 冰箱的样品取出后于冰上融化,按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA,电泳检测完整性,核酸定量仪检测其浓度和纯度,保证其 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>=1.8~2.0。利用 DNaseI 处理 RNA,去除残留的基因组 DNA 污染。

以总 RNA(约 1 µg)为模板,按照 All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit (GeneCopoeia Cat. No. AORT-0050)说明书对各组织的总 RNA 进行反转录,合成第一链 cDNA。反应产物 4 °C 备用,或者-20 °C 保存。

## 1.5 引物设计及荧光定量 PCR 扩增

### 1.5.1 引物设计

根据 NCBI 数据库上半滑舌鳎的相关基因序列,分别设计各基因的荧光定量 PCR 引物,相关基因包括 *hsp70*、*hsp90*、*c-type lectin* 和 *cox*。选择基因稳定表达及片段大小合适的  $\beta$ -*actin*(putative beta-actin,  $\beta$ -*actin*)为内参基因。具体序列与产物大小如表 1 所示。

### 1.5.2 荧光定量 PCR 扩增

按照 Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG 试剂盒说明书进行操作,在荧光定量仪 ABI 7500 Fast Real-Time PCR system 上进行荧光定量 PCR 扩增。反应体系为 20 µL,含 cDNA 模板 1 µL,上、下游引物各 2 µL(终浓度为 0.2 µmol·L<sup>-1</sup>), SYBR® Green qPCR SuperMix(2×)10 µL,以 ddH<sub>2</sub>O 补足体积。PCR 反应程序为:95 °C 预变性 10 min;循环条件为 95 °C、15 s,60 °C、30 s,72 °C、30 s,PCR 循环 40。扩增结束后进行熔解曲线分析,确定 PCR 质量,熔解曲线条件为 95 °C、15 s,60 °C、1 min,95 °C、15 s,60 °C、15 s。

相对定量参考 Livak 和 Schmittgen 的方法<sup>[18]</sup>,运用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算目的基因的表达倍数,  $\Delta\Delta C_T = (C_{T目的基因} - C_{T管家基因})_{实验组} - (C_{T目的基因} - C_{T管家基因})_{对照组}$ 。

采用 SPSS 23.0 软件对组间数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  表明差异显著。所有结果以平均值±标准差(mean±SD)表示。

## 2 结果 (Results)

在 PFOS 暴露期间,各对照组和实验组均无实验鱼死亡及行为异常,说明实验浓度范围内 PFOS 对半滑舌鳎无可观测的急性毒性作用。

### 2.1 PFOS 暴露下 *hsp70* mRNA 在半滑舌鳎各组织中的相对表达量分析

PFOS 暴露对半滑舌鳎不同组织 *hsp70* mRNA

表 1 实验所用的引物序列

Table 1 Primers used for all the experiments

序列号 Accession No.	基因 Gene	正向引物(5'~3') Forward primer (5'~3')	反向引物(5'~3') Reverse primer (5'~3')	片段大小/bp Product size/bp
XM_008330429	<i>hsp70</i>	AAAACCAAGGTGGCTCTAA	AAATCTCCTCGGGATTGA	192
XM_008312181	<i>hsp90</i>	TTTGGTTGCCAGTCAGTA	TGTTCGTCCACAGGTATG	324
XM_008313372	<i>c-type lectin</i>	TCAAGTCCTTCTCCACCCG	AGTTCTCCCGCTTCCCTCC	162
FJ797309	<i>cox</i>	TAGTCTGCTTGCGATGA	TTCTACTGCGGATGAGGC	223
KF932267	$\beta$ - <i>actin</i>	TCACCACCACAGCCGAAAG	ATGCCACAGGACTCCATACCAA	223

表达的影响如图1所示。半滑舌鳎 *hsp70* mRNA 相对表达量在各组织中几乎均上调。半滑舌鳎肝组织中 *hsp70* mRNA 相对表达量高于对照组,在24 h达到峰值( $P < 0.05$ ),随后呈现下降趋势,至7 d时已基本恢复至对照组水平( $P > 0.05$ )(图1(a))。鳃组织 *hsp70* mRNA 表达量呈现先升高、再下降的趋势,在48 h达到峰值( $P < 0.05$ ),至7 d时与对照组无显著差异( $P > 0.05$ )(图1(b))。肠组织中 *hsp70* mRNA 表达量在48 h内与对照组并无显著差异( $P > 0.05$ ),96 h升高达到最高值( $P < 0.05$ ),随后呈现下降趋势。肌肉组织 *hsp70* mRNA 的相对表达量呈现先下降后升高的趋势,48 h降至最低( $P < 0.05$ ),96 h升高至峰值( $P < 0.05$ ),随后7 d时回落至对照组水平( $P > 0.05$ )。

## 2.2 PFOS暴露下 *hsp90* mRNA 在半滑舌鳎各组织中的相对表达量分析

PFOS暴露对半滑舌鳎不同组织 *hsp90* mRNA 表达的影响如图2所示。肝组织中 *hsp90* mRNA 的表达量与对照组相比呈显著性差异( $P < 0.05$ ),呈现先

降低后升高,再降低的趋势,在48 h达到最高值( $P < 0.05$ )(图2(a))。鳃组织 *hsp90* mRNA 表达量48 h和7 d时与对照组呈显著性差异( $P < 0.05$ )(图2(b))。肠组织 *hsp90* mRNA 表达量呈现先上升后下降的趋势,在48 h和96 h达到顶峰,7 d后与对照组无显著差异( $P > 0.05$ )。肌肉组织 *hsp90* mRNA 表达量与对照组相比呈现显著下调( $P < 0.05$ )。

## 2.3 PFOS暴露下 *c-type lectin* mRNA 在半滑舌鳎各组织中的相对表达量分析

PFOS暴露对半滑舌鳎不同组织 *c-type lectin* mRNA 表达的影响如图3所示。随着PFOS暴露时间的延长,各组织中 *c-type lectin* mRNA 表达量均呈下调表达或表达水平不变。肝组织中 *c-type lectin* mRNA 表达呈下调趋势,在24 h下降至最低点,随后48 h~7 d时恢复至对照组水平( $P > 0.05$ )(图3(a))。鳃组织中 *c-type lectin* mRNA 呈下调表达,其表达量呈现先下降再升高,再下降的趋势,在7 d时达到最低值,与对照组相比呈显著性差异( $P < 0.05$ )(图3(b))。

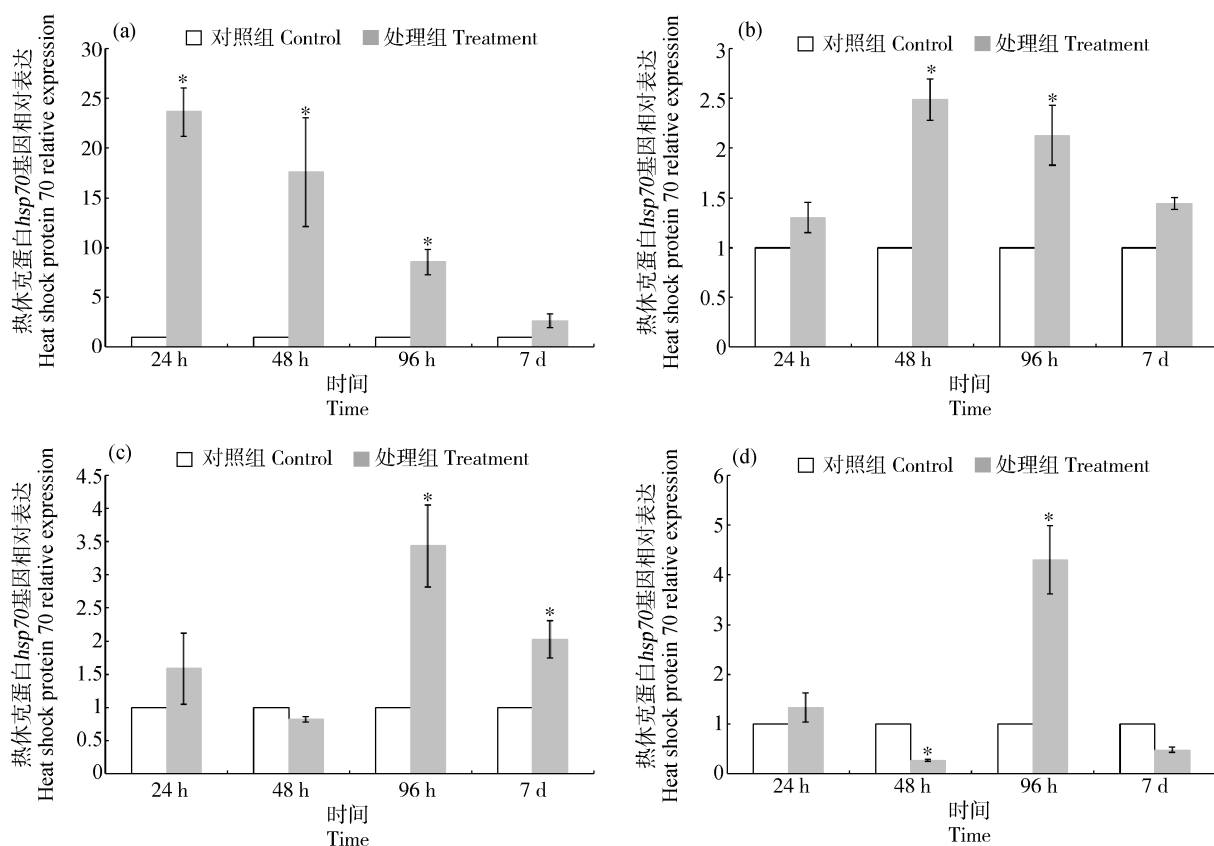


图1 半滑舌鳎不同组织热休克蛋白 *hsp70* mRNA 表达量随全氟辛酸磺酸盐(PFOS)暴露时间的变化

注:(a)肝,(b)鳃,(c)肠,(d)肌肉;\*表示与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 1 Changes of *hsp70* mRNA expression in *Cynoglossus semilaevis* after exposure to perfluorooctane sulfonate (PFOS)

Note: (a) Liver, (b) Gill, (c) Intestine, (d) Muscle; \* means significant difference between PFOS treatment group and control group at 0.05 level.



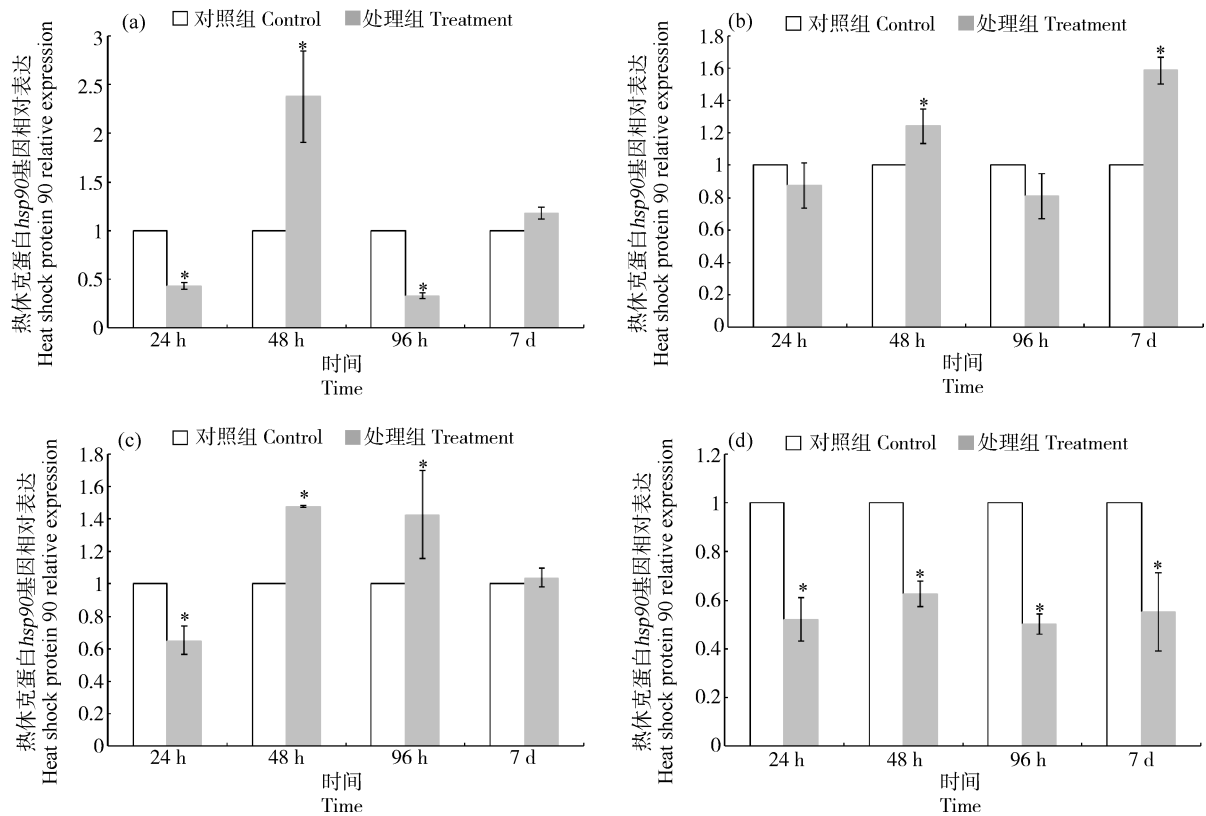


图2 半滑舌鳎不同组织 *hsp90* mRNA 表达量随 PFOS 暴露时间的变化

注: (a)肝, (b)鳃, (c)肠, (d)肌肉; \* 表示与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 2 Changes of *hsp90* mRNA expression in *Cynoglossus semilaevis* after exposure to PFOS

Note: (a) Liver, (b) Gill, (c) Intestine, (d) Muscle; \* means significant difference between PFOS treatment group and control group at 0.05 level.

肠组织中 *c-type lectin* mRNA 表达量与对照组没有明显差异 ( $P > 0.05$ ) (图 3(c))。肌肉组织中 *c-type lectin* mRNA 各时间段表达量下调 ( $P < 0.05$ ), 其相对表达量在 48 h 达到最低值 (图 3(d))。

#### 2.4 PFOS 暴露下 *cox* mRNA 在半滑舌鳎各组织中的相对表达量分析

PFOS 暴露对半滑舌鳎不同组织 *cox* mRNA 表达的影响如图 4 所示。随着 PFOS 暴露时间的延长, 肝组织中 *cox* 基因表达下调, 其 24 h 和 48 h 的相对表达量显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 96 h 时 *cox* mRNA 表达量恢复至对照组水平 ( $P > 0.05$ ) (图 4(a))。鳃组织中 *cox* mRNA 表达量呈现先升高再降低的趋势, 48 h 时 *cox* mRNA 表达量升至最高点, 与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ) (图 4(b))。肠组织中 *cox* mRNA 表达出现下调, 其相对表达量在 24 h 和 48 h 显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 在 96 h 恢复至对照组水平 ( $P > 0.05$ ) (图 4(c))。肌肉组织中 *cox* mRNA 表达量在 24 h 与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ), 随后于 48 h 和 96 h 回落至对照组水平 ( $P > 0.05$ ) (图 4(d))。

### 3 讨论 (Discussion)

目前, PFOS 的毒性作用机制虽尚未完全阐明, 但大量研究表明, PFOS 能引起多种生物的基因转录表达发生变化<sup>[19-22]</sup>。本实验选择了 *hsp70*、*hsp90*、*c-type lectin* 和 *cox* 等 4 种可能与 PFOS 免疫毒性相关的基因, 其中, *hsp70* 和 *hsp90* 属于热休克蛋白家族, 是生物体应对外界压力的标志性基因; *c-type lectin* 是固有免疫系统中的重要模式识别受体; *cox* 是线粒体呼吸链的重要组成部分, 其基因表达量变化可以直接反映出受到外界压力时机体的能量运转情况。本研究通过 RT-PCR 技术检测 PFOS 暴露 24 h、48 h、96 h 和 7 d 后, 半滑舌鳎各组织中基因表达的变化, 初步探讨 PFOS 对半滑舌鳎的免疫毒性作用。

热休克蛋白的主要功能是维持生物体内环境的稳态。当机体暴露在重金属、有机物和高温等恶劣条件下, 机体发生应激反应, 热休克蛋白会大量表达, 从而帮助机体每个细胞维持正常的生理活动, 阻止影响细胞健康的蛋白质相互作用<sup>[23-24]</sup>。San-segundo 等<sup>[19]</sup>

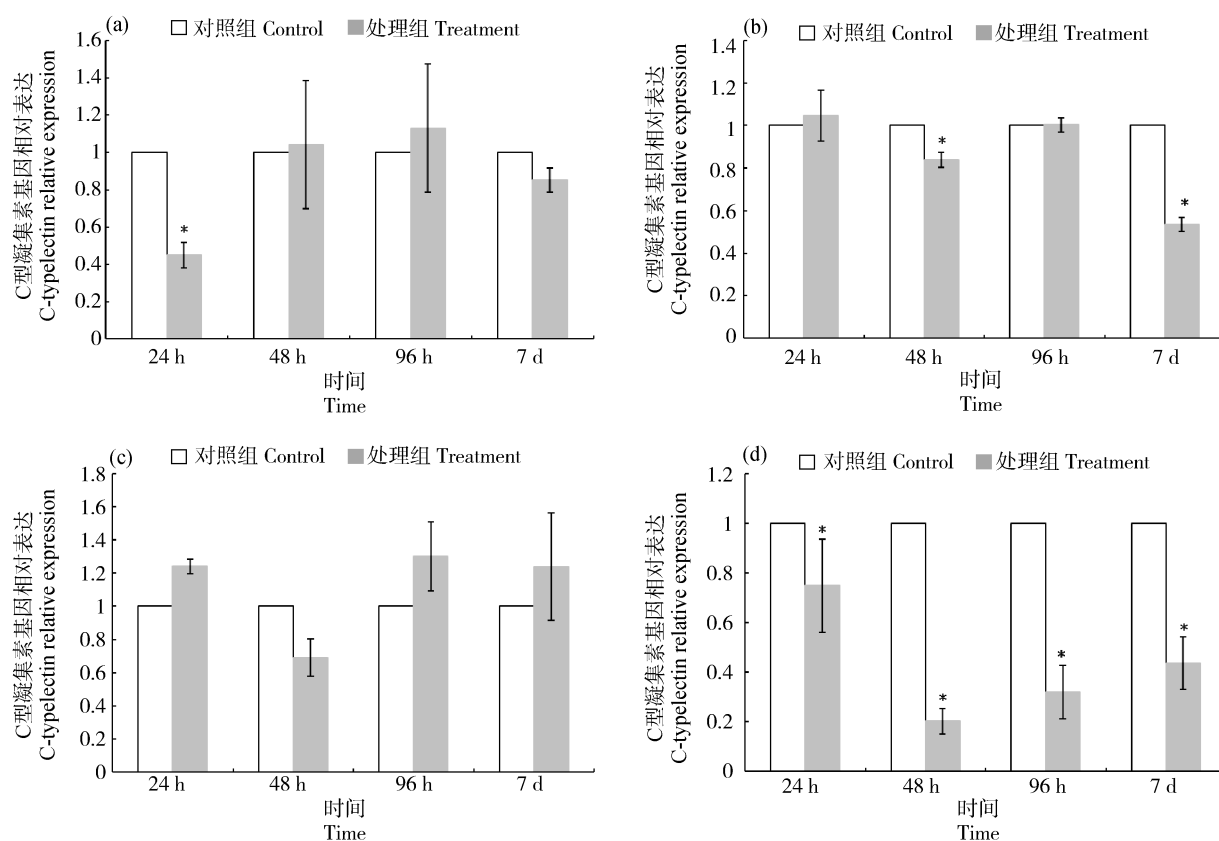


图3 半滑舌鲷不同组织 *c-type lectin* mRNA 表达量随 PFOS 暴露时间的变化

注:(a)肝,(b)鳃,(c)肠,(d)肌肉;\*表示与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 3 Changes of *c-type lectin* mRNA expression in *Cynoglossus semilaevis* after exposure to PFOS

Note: (a) Liver, (b) Gill, (c) Intestine, (d) Muscle; \* means significant difference between PFOS treatment group and control group at 0.05 level.

认为 *hsp70* 的激活可以由化学物质和蛋白质之间的直接相互作用产生,也可以由氧化应激、离子稳态或能量代谢抑制剂引起的细胞氧化还原状态的扰动所造成的损伤而产生。因此,PFOS 作为 *hsp70* 诱导剂,可能直接或间接与热休克蛋白发生相互作用,诱导 *hsp70* 的大量表达。笔者推测 PFOS 进入机体细胞后,通过与热休克转录因子结合,使 *hsp70* 基因第一时间被激活并大量表达,为机体提供了主要的防御机制。具体的结合及调节机制还需进一步的证实。

研究表明,鱼类肝脏是 PFOS 的主要富集场所<sup>[20]</sup>。在本实验中,*hsp70* 基因在肝组织中的相对表达在 24 h 达到峰值,达到对照组的 23 倍左右,表达高峰值的出现也早于其他组织,这表明,肝组织对 PFOS 胁迫反应较为灵敏,在受到应激反应后迅速启动了 *hsp70* 基因的表达。Krøvel 等<sup>[20]</sup>也发现类似现象,将大西洋鲑的肝细胞体外分离后,将其暴露于  $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 PFOS 中 24 h 后,*hsp70* mRNA 表达量

显著增加。PFOS 还能够引起肝细胞结构和细胞膜的交互功能损伤<sup>[25-27]</sup>。因此,在受到 PFOS 胁迫后,肝是发生免疫应激反应的主要器官,在应对有毒物质入侵的免疫反应中占据重要地位。

通过实验数据发现,半滑舌鲷鳃、肠和肌肉中的 *hsp70* 基因的相对表达在 48 h 或 96 h 达到峰值,表达量是对照组的 2 ~ 5 倍左右。而在长时间受到 PFOS 胁迫后,*hsp70* 基因的表达都呈现下降趋势,肝、鳃和肌肉组织在 PFOS 胁迫 7 d 时 *hsp70* 基因表达量均已恢复至对照组水平,推测当胁迫时间超过一定限度时,鱼体免疫功能逐渐下降,从而导致 *hsp70* 表达慢慢回落;也可能是 *hsp70* 只参与了鱼类机体对抗有毒物质的应急机制,随着胁迫时间的延长,机体启动另一套免疫机制来对抗有毒物质的入侵。东亚三角涡虫<sup>[28]</sup>和 大西洋鲑<sup>[20]</sup>的暴露实验结果也表明,暴露于 PFOS 中 24 h 后,*hsp70* mRNA 表达显著上升,暴露于 PFOS 中 48 h 后,其表达量明显下降,与本实验的研究结果一致。

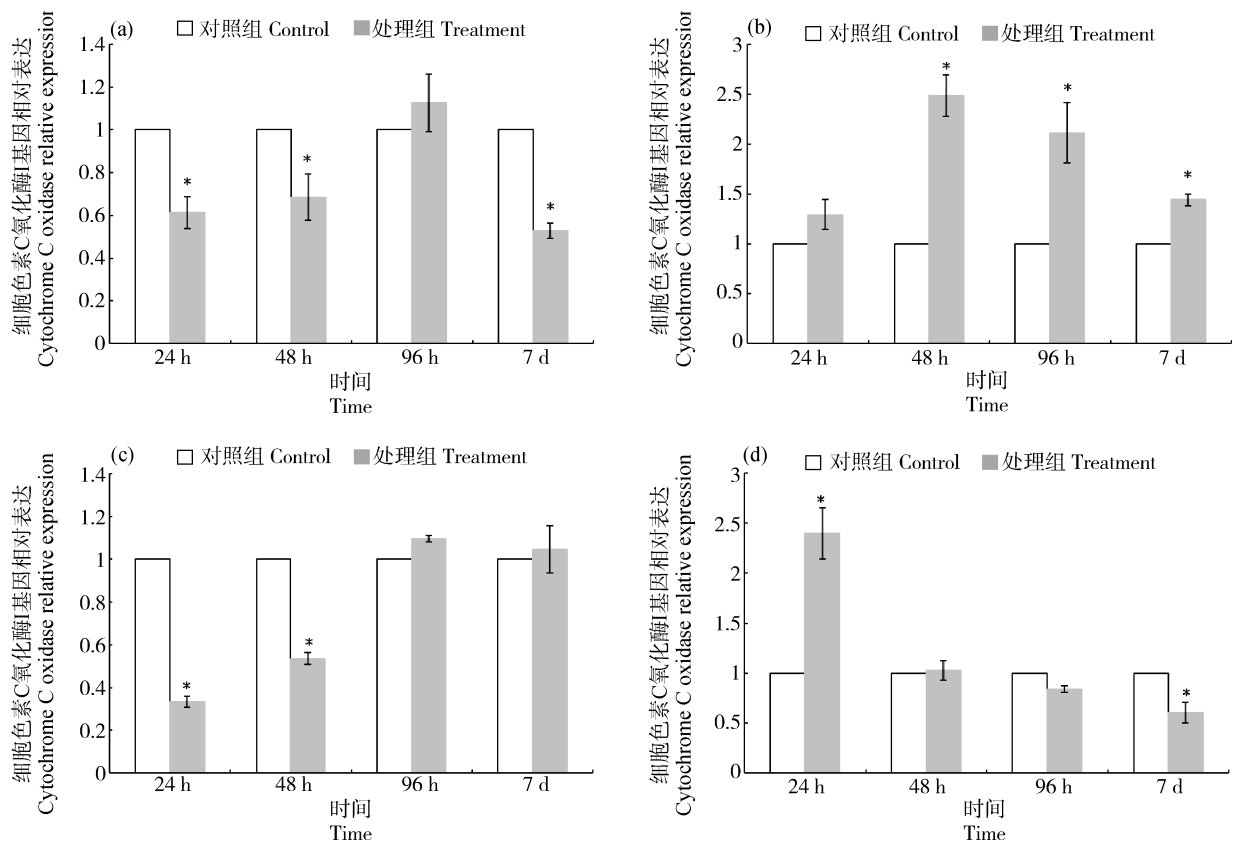


图4 半滑舌鳎不同组织 *cox* mRNA 表达量随 PFOS 暴露时间的变化

注:(a)肝,(b)鳃,(c)肠,(d)肌肉;\*表示与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )。

Fig. 4 Changes of *cox* mRNA expression in *Cynoglossus semilaevis* after exposure to PFOS

Note: (a) Liver, (b) Gill, (c) Intestine, (d) Muscle; \* means significant difference between PFOS treatment group and control group at 0.05 level.

热休克蛋白 *hsp90* 在进化上高度保守,广泛分布于从原核到真核的各类生物体内,在水生动植物的诱导表达研究中发现,*hsp90* 可以参与水生动植物对热激和冷激、高盐和低盐以及对低溶氧的耐受,还参与了疾病防御、发育调控等方面的生理过程<sup>[29]</sup>。本研究中,*hsp90* 在半滑舌鳎肝、肠中均呈现了先升高再降低的趋势,在 48 h 达到最大值,7 d 后恢复至对照组水平。在胁迫条件下,*hsp90* 通过降解变性蛋白和运送蛋白质而保护有机体免受不利环境胁迫伤害,因此,*hsp90* 基因表达升高是机体对胁迫导致的变性蛋白质增多做出的响应。随着胁迫时间进一步延长,机体组织细胞受到损伤,降低了正常细胞的代谢能力,导致了 *hsp90* 表达降低。鳃组织中 *hsp90* 基因的相对表达量在 7 d 后达到峰值,可能是由于全氟化合物具有生物积累作用,随着积累量的增加,*hsp90* 在 7 d 后表达才达高峰,一定程度上反映了 PFOS 积累量与鳃组织免疫机能的关系。肌肉组织 *hsp90* 基因的相对表达受到抑制,这可能与基因表

达的组织特异性有关,肌肉组织不是关键的免疫器官,因此,在机体受到 PFOS 胁迫时,体内的转录调节体系优先上调或正常表达免疫相关的组织中的 *hsp90* 基因。

本研究结果也表明,*hsp70* 和 *hsp90* 基因在半滑舌鳎各组织中出现时序性表达,肝组织中 *hsp70* 和 *hsp90* 达到最大值的时间点分别是 24 h 和 48 h,*hsp90* 较 *hsp70* 延迟;鳃组织中 *hsp70* 在 48 h 达到峰值,而 *hsp90* 在 7 d 后再次上升至峰值;肠组织中达到峰值的时间分别是 96 h 和 48 h,*hsp70* 较 *hsp90* 延迟。这表明,*hsp70* 和 *hsp90* 虽都是热休克蛋白家族的成员,但在半滑舌鳎受到 PFOS 胁迫过程中,它们在不同组织中的响应机制完全不同。本研究中,同一基因在不同组织的表达具有一定的组织特异性,这与组织的功能定位及基因参与不同的免疫通路等有关,具体的调节机制还有待进一步研究。

c-type lectin 是一类具有糖识别结构域(carbon hydrate recognition domain, CRD)的蛋白超家族,在

进化中存在高度保守序列,作为模式识别蛋白参与了众多动物的先天免疫<sup>[30-34]</sup>。目前,关于 *c-type lectin* 基因表达的报道多集中于其在生物体感染致病微生物的过程中发挥重要的免疫功能<sup>[35-36]</sup>。Feng 等<sup>[37]</sup>发现,罗氏沼虾在受到副溶血弧菌和白斑综合征病毒(WSSV)刺激后,鳃和肠中的 *MrLec* 基因表达量均上调。Wang 等<sup>[38]</sup>发现,仿刺参在受到灿烂弧菌刺激后,体腔细胞中的 *CTL-2* mRNA 表达水平显著上升。

本研究中, *c-type lectin* 基因表达量与对照组相比呈显著下调或无明显差异。肝、鳃和肌肉组织中 *c-type lectin* 基因表达水平在 PFOS 胁迫后都出现了显著降低的情况,肠组织中 *c-type lectin* 基因表达水平在 PFOS 胁迫后没有显著性变化,与致病微生物刺激后 *c-type lectin* 的基因表达趋势不同。赵芳芳等<sup>[39]</sup>单独用镉胁迫河南华溪蟹不同时间,肝胰腺、血淋巴中的 *ShLec21* 和 *ShLec23* 表达量没有显著性变化;而镉胁迫河南华溪蟹后再经细菌感染后,肝胰腺和血淋巴中 *ShLec21* 和 *ShLec23* 表达量在有些时间段上调。本研究中,除了肠组织,肝、鳃和肌肉组织中的 *c-type lectin* 基因在 PFOS 暴露后均有表达下调而后又上升的情况,可能是由于 *c-type lectin* 基因并不参与 PFOS 的免疫识别,暴露初期,鱼体免疫系统为应激防御有毒物质,从而降低了不相关基因的表达,而 PFOS 暴露损伤了鱼体的免疫系统,进而导致水体中致病菌的入侵, *c-type lectin* 基因此时才启动表达。综上可知,不同的外源刺激对生物体内 *c-type lectin* 基因表达的影响也不相同,C 型凝集素作为一种模式识别受体,其特有的结构域能够识别、结合微生物并在其免疫防御过程中发挥重要作用,而对非生物因子刺激,C 型凝集素扮演什么样的角色还有待进一步研究。

细胞色素 c 氧化酶(*cox*)是线粒体呼吸链电子传递的终末复合物,是线粒体呼吸链的主要限制酶, *cox* 基因表达量的变化可以反映整条呼吸链的效率<sup>[40]</sup>。而机体在受到外来物质刺激时,其蛋白质利用及糖类的代谢都会大大增加,这些代谢的加快都需要依赖能量的供应,因此,线粒体呼吸链的能量供应与机体的免疫机能息息相关。党红蕾等<sup>[17]</sup>对半滑舌鳎肝脏细胞系进行 PFOS 染毒,发现低浓度 PFOS ( $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )进入细胞后,通过与线粒体呼吸链辅酶结合,产生活性氧(ROS)并阻碍三磷酸腺苷(ATP)合成过程,产生一系列反应从而诱导细胞启动 DNA 修复。本研究中,鱼体暴露于 PFOS 后,鳃组织和肌

肉中 *cox* 基因相对表达量分别在 24 h 和 48 h 上调至峰值,随后回落。Achard-Joris 等<sup>[41]</sup>认为 *cox* 基因上调是为了更有效地消耗分子氧并弥补线粒体活力的下降,通过减少细胞中的活性氧来降低 PFOS 对机体细胞的损害。而肝和肠组织中 *cox* 基因相对表达量显著下调,推测 PFOS 所造成的损伤超出细胞自身修复能力导致了 *cox* 基因表达的下降。以上结果表明,PFOS 能够对 *cox* 基因表达产生影响,进而影响鱼体线粒体能量供应以及细胞的正常运转。

PFOS 可影响多种免疫相关基因的表达,本实验仅选取了其中 4 个基因对 PFOS 的免疫毒性进行了初步探讨,PFOS 的对机体的免疫毒性机制还远不能被准确阐述,还有待于大量实验数据的积累,并结合功能蛋白的表达等多方面的研究结果进行综合分析。目前,PFOS 的生产和使用已受到严格控制,其在自然水域中的浓度远低于本文中的实验浓度,但是 PFOS 在生态系统中的富集效应会对食物链高端生物构成潜在威胁,因此,对 PFOS 毒性仍需作进一步研究。

通讯作者简介:贾磊(1983—),男,水产养殖学硕士,高级工程师,主要研究方向为海水生态养殖。

#### 参考文献(References):

- [1] 鞠晓东. 海洋环境中全氟有机污染物研究的若干进展[J]. 海洋科学, 2010, 34(7): 93-99  
Jv X D. Progress in research on marine environmental pollution of perfluorinated chemicals [J]. Marine Sciences, 2010, 34(7): 93-99 (in Chinese)
- [2] Gulkowska A, Jiang Q T, So M K, et al. Persistent perfluorinated acids in seafood collected from two cities of China [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(12): 3736-3741
- [3] 孙丽莎, 陆光华, 叶秋霞, 等. 全氟化合物的分布、累积及生态毒理学效应[J]. 四川环境, 2012, 31(2): 119-123  
Sun L S, Lu G H, Ye Q X, et al. Distribution and accumulation of PFCs and ecotoxicological effects [J]. Sichuan Environment, 2012, 31(2): 119-123 (in Chinese)
- [4] Elcombe C R, Elcombe B M, Foster J R, et al. P74-Hepatocellular hypertrophy and cell proliferation in Sprague-Dawley rats from dietary exposure to potassium perfluorooctane sulfonate results from increased expression of xenosensor nuclear receptors PPAR $\alpha$  and CAR/PXR [J]. Toxicology, 2012, 293(1-3): 16-29
- [5] 潘若雷, 杨淑雯, 江敏. 全氟辛烷磺酸(PFOS)对三角帆蚌肝胰腺的氧化性损伤[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(6):



- 112-120  
Pan R L, Yang S W, Jiang M. Perfluorooctane sulfonate (PFOS)-induced oxidative damage in hepatopancreas of *Hyriopsis cumingii* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(6): 112-120 (in Chinese)
- [6] 胡芹. 全氟辛烷磺酸(PFOS)对斑马鱼胚胎发育及成鱼的毒性效应研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009: 21-29  
Hu Q. Embryo developmental and maternal toxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in the zebrafish [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009: 21-29 (in Chinese)
- [7] 胡存丽, 仲来福. 全氟辛烷磺酸和全氟辛酸毒理学研究进展[J]. 中国工业医学杂志, 2006, 19(6): 354-358  
Hu C L, Zhong L F. Progress of toxicological study on PFOS and PFOA [J]. Chinese Journal of Industrial Medicine, 2006, 19(6): 354-358 (in Chinese)
- [8] 杨杰频. 典型全氟化合物对大型蚤和斑马鱼生态毒理影响初步研究[D]. 石家庄: 河北科技大学, 2014: 19-39  
Yang J P. The preliminary study for toxicity effects of toxicology of PFCs on *Daphnia magna* and zebrafish embryo [D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2014: 19-39 (in Chinese)
- [9] 王路燕. PFOS对黄海胆体内酶活及DNA甲基化的影响研究[D]. 大连: 大连海事大学, 2013: 27-48  
Wang L Y. A study on the effect of PFOS to enzyme activity and DNA methylation in *Glyptocidaris crenularis* in vivo [D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2013: 27-48 (in Chinese)
- [10] Houde M, Bjuads T A D, Small J, et al. Biomagnification of perfluoroalkyl compounds in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) food web [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(13): 4138-4144
- [11] Wang Z, Boucher J M, Scheringer M, et al. Toward a comprehensive global emission inventory of C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> perfluoroalkane sulfonic acids (PFSA) and related precursors: Focus on the life cycle of C<sub>8</sub>-based products and ongoing industrial transition [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51: 4482-4493
- [12] 张美, 楼巧婷, 邵倩文, 等. 全氟化合物污染现状及风险评估的研究进展[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(3): 1-28  
Zhang M, Lou Q T, Shao Q W, et al. Research progress of perfluorinated compounds pollution status and risk assessment [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(3): 1-28 (in Chinese)
- [13] 颀晓勇, 李加儿, 李纯厚, 等. 半滑舌鳎生物学特性与养殖技术[J]. 水产科技, 2009(2): 40-42  
Xie X Y, Li J E, Li C H, et al. The biology and culture of *Cynoglossus semilaevis* [J]. Fisheries Science & Technology, 2009(2): 40-42 (in Chinese)
- [14] 田相利, 王国栋, 董双林, 等. 盐度和温度对半滑舌鳎生长、渗透生理及能量收支的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4): 771-782  
Tian X L, Wang G D, Dong S L, et al. Effects of salinity and temperature on growth, osmophysiology and energy budget of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 771-782 (in Chinese)
- [15] 柳学周, 徐永江, 马爱军, 等. 温度、盐度、光照对半滑舌鳎胚胎发育的影响及孵化条件调控技术研究[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(6): 1-6  
Liu X Z, Xu Y J, Ma A J, et al. Effects of salinity, temperature, light rhythm and light intensity on embryonic development of *Cynoglossus semilaevis* Günther and its hatching technology optimization [J]. Marine Fisheries Research, 2004, 25(6): 1-6 (in Chinese)
- [16] 柳学周, 徐永江, 兰功刚. 几种重金属离子对半滑舌鳎胚胎发育和仔稚鱼的毒性效应[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(2): 33-42  
Liu X Z, Xu Y J, Lan G G. Toxic effects of several heavy metals on the embryos, larvae of *Cynoglossus semilaevis* Günther [J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(2): 33-42 (in Chinese)
- [17] 党红蕾, 那广水, 高会, 等. 全氟辛烷磺酸(PFOS)对半滑舌鳎肝脏细胞的毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(4): 162-169  
Dang H L, Na G S, Gao H, et al. Toxicity effects of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on liver cells of *Cynoglossus semilaevis* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(4): 162-169 (in Chinese)
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408
- [19] San-segundo L, Guimarães L, Torija C F, et al. Alterations in gene expression levels provide early indicators of chemical stress during *Xenopus laevis* embryo development: A case study with perfluorooctane sulfonate (PFOS) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 127: 51-60
- [20] Krøvel A V, Sjøfteland L, Torstensen B, et al. Transcriptional effects of PFOS in isolated hepatocytes from Atlantic salmon *Salmo salar* L [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology, 2008, 148(1): 14-22
- [21] Park K, Nikapitiya C, Kwak T S, et al. Antioxidative-related genes expression following perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure in the intertidal mud crab, *Macrophthalmus japonicus* [J]. Ocean Science Journal, 2015, 50: 547-556

- [22] Shi X, Du Y, Lam P K, et al. Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008, 230: 23-32
- [23] Wood A W, Janz D M, Van Der Kraak G J. Cell death: Investigation and application in fish toxicology [J]. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 2005, 6: 308-322
- [24] Basu N, Todgham A E, Ackerman P A, et al. Heat shock protein genes and their functional significance in fish [J]. *Gene*, 2002, 295: 173-183
- [25] Giesy J P, Kannan K. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife [J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35: 1339-1342
- [26] Hoff P T, Van de Vijver K, Van Dongen W, et al. Perfluorooctane sulfonic acid in bib (*Trisopterus luscus*) and plaice (*Pleuronectes platessa*) from the Western Scheldt and the Belgian North Sea: Distribution and biochemical effects [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, 22: 608-614
- [27] Hoff P T, Van Campenhout K, Van de Vijver K, et al. Perfluorooctane sulfonic acid and organohalogen pollutants in liver of three freshwater fish species in Flanders (Belgium): Relationships with biochemical and organismal effects [J]. *Environmental Pollution*, 2005, 137: 324-333
- [28] 宫晓宁, 袁佐清, 白芸. PFOS 对东亚三角涡虫 HSP70 蛋白及基因表达的影响 [J]. *生物技术通报*, 2014, 10 (28): 156-160  
Gong X N, Yuan Z Q, Bai Y. Effects of PFOS on expression of HSP70 in Planarian *Dugesia japonica* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014, 10(28): 156-160 (in Chinese)
- [29] 周向红. HSP90 及其在水生动植物中的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(35): 21572-21573  
Zhou X H. Research progress of HSP90 in aquatic animals and plants [J]. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2011, 39(35): 21572-21573 (in Chinese)
- [30] Tanji T, Ohashi-Kobayashi A, Natori S. Participation of a galactose-specific C-type lectin in *Drosophila* immunity [J]. *The Biochemical Journal*, 2006, 396(1): 127-138
- [31] Yu X Q, Kanost M R. Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to Gram-negative bacteria [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (48): 37373-37381
- [32] Schnitger A K D, Yassine H, Kafatos F C, et al. Two C-type lectins cooperate to defend *Anopheles gambiae* against Gram-negative bacteria [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(26): 17616-17624
- [33] Li M, Li C, Ma C, et al. Identification of a C-type lectin with antiviral and antibacterial activity from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 46(2): 231-240
- [34] Zhang J, Xiang J H, Li H, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Flectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44 (4): 598-607
- [35] 王莉, 张杰, 赵贤亮, 等. 鱼类 C-型凝集素结构特征及其免疫功能 [J]. *水产科学*, 2019, 38(2): 282-288  
Wang L, Zhang J, Zhao X L, et al. Structure characteristics and immune function of C-type lectin in fish: A review [J]. *Fisheries Science*, 2019, 38(2): 282-288 (in Chinese)
- [36] Yu S, Yang H, Chai Y, et al. Molecular cloning and characterization of a C-type lectin in roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 582-592
- [37] Feng J J, Huang X, Jin M, et al. A C-type lectin (*MrLec*) with high expression in intestine is involved in innate immune response of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 59(12): 345-350
- [38] Wang H, Xue Z, Liu Z, et al. A novel C-type lectin from the sea cucumber, *Apostichopus japonicus*, (*AjCTL-2*) with preferential binding of D-galactose [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 79(8): 218-227
- [39] 赵芳芳, 郎朗, 张左兵, 等. 镉胁迫对河南华溪蟹两种 C 型凝集素免疫应答的影响 [J]. *水生生物学报*, 2019, 43 (2): 348-355  
Zhao F F, Lang L, Zhang Z B, et al. Effects of cadmium on immune responses of two C-type lectins in the freshwater crab *Sinopotamon henanense* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, 43(2): 348-355 (in Chinese)
- [40] 施大卫, 王利, 娄绘芳, 等. 青石斑鱼细胞色素 C 氧化酶亚基 I (COX I) 基因的克隆鉴定及表达分析 [J]. *中国水产科学*, 2009, 16(4): 467-476  
Shi D W, Wang L, Lou H F, et al. Molecular cloning and characterization of a homologue of Cytochrome C oxidase subunit I in yellow grouper *Epiniphelus awoara* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(4): 467-476 (in Chinese)
- [41] Achard-Joris M, Gonzalez P, Marie V, et al. Cytochrome c oxidase subunit I gene is up-regulated by cadmium in freshwater and marine bivalves [J]. *Biometals*, 2006, 19 (3): 237-244