

全氟辛烷磺酸类物质对剑尾鱼 *Cu/Zn-SOD* 及相关应激基因表达的影响

张 晶^{1,2}, 梁 岳^{1,3}, 方展强^{1*}

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东省高等学校生态与环境科学重点实验室, 广东 广州 510631;

2. 佛山环境健康与安全评价研究中心, 广东 佛山 528000;

3. 广东第二师范学院生物系, 广东 广州 510303)

摘要: 研究全氟辛烷磺酸类物质 (PFOS) 暴露对剑尾鱼肝脏 *Cu/Zn-SOD* 及相关应激基因表达的影响, 探讨筛选导致体内氧化应激反应的敏感生物标志物, 并首次克隆和分析剑尾鱼 *Cu/Zn-SOD* 的 cDNA 全序列。实验将剑尾鱼随机分为 5 组, 包括对照组和 3.5、7.0、14.0 和 28.0 mg/L 等 4 个 PFOS 实验暴露组, 同时设置平行组。定量测定了 24 h、48 h、96 h 和 14 d 肝脏组织中的 *Cu/Zn-SOD*、*HSP70-1*、*HSP70-2* 和 *GST* mRNA 表达水平的变化, 成功克隆包含 794 bp 核苷酸和编码 154 个氨基酸的剑尾鱼 *Cu/Zn-SOD* 的 cDNA 全序列。通过与其他相关鱼类 *Cu/Zn-SOD* 的核苷酸序列和氨基酸序列相似性比较发现, 核苷酸和氨基酸序列相似性分别达到 77%~83% 和 79%~88%。高浓度 PFOS 暴露后, 剑尾鱼肝脏中与应激相关的各种基因发生不同程度的变化。通过 RT-PCR 技术检测 *Cu/Zn-SOD* mRNA 表达在剂量效应上不显著, *Cu/Zn-SOD* mRNA 表达和 SOD 活性之间并没有相关性, 推断是其他类型的 SOD 基因在 PFOS 暴露下发挥更为重要的作用。随着暴露时间的持续延长, *Cu/Zn-SOD* 基因的转录水平变化趋势与 SOD 活性变化及 *HSP70-1* mRNA 表达相一致, 表明 HSP70 通过提高剑尾鱼体内 SOD 水平以保护机体免受氧化损伤。*HSP70-2* mRNA 水平比 *HSP70-1* mRNA 表达更加敏感。*HSP70-2* 变化趋势与 *Cu/Zn-SOD* mRNA 表达相关性不强, 其相关机制有待进一步研究。*GST* mRNA 表达呈不断上升趋势, 这与 Nrf2 信号传导途径有关, 也可能是机体在应对 PFOS 进入鱼体后的一种防御措施。剑尾鱼在体实验表明, PFOS 能够诱导肝脏氧化应激反应, *GST* mRNA 和 *HSP70-2* mRNA 表达可以作为 PFOS 暴露的敏感生物标志物。

关键词: 剑尾鱼; 全氟辛烷磺酸类物质; 应激基因表达; 分子生物学; 毒性作用

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

剑尾鱼 (*Xiphophorus helleri* Heckel) 是一种热带小型淡水鱼类, 卵胎生, 隶属于鲮形目 (Cyprinodontiformes), 花鲮科 (Poeciliidae), 剑尾鱼属 (*Xiphophorus*)。雌雄鱼体型差异较大, 雄鱼体型细长, 尾鳍最下叶 5~6 条鳍条延伸呈剑状, 臀鳍演变成生殖鳍, 而雌鱼的腹部圆大, 尾鳍、臀鳍均成扇形, 存在性逆转特性。由于剑尾鱼具有体型小、食性杂、繁殖周期短、繁殖力强以及便于

在实验室条件下进行纯化培养等特点, 已被用作水生实验动物的培养对象^[1], 加上其对某些农药、有机物和重金属敏感, 所以被广泛应用于水环境监测、水产药物安全性评价、化学品毒性检测等领域的研究^[2]。已有的研究表明, 汞^[3]和多氯联苯 (PCBs)^[4] 对剑尾鱼肝脏和鳃组织中的 Na^+ , K^+ -ATPase 具有抑制作用; PCB 对其肝脏和卵巢的超氧化物歧化酶 (SOD) 活性有明显影

收稿日期: 2013-11-22

修回日期: 2014-02-22

资助项目: 广东高校城市水环境生态治理与修复工程技术研究中心建设项目 (2012gcxA004)

通信作者: 方展强, E-mail: fangzhq@scnu.edu.cn

响,在染毒后最初 12 h 内,SOD 活性略有上升,但随着暴露时间延长或浓度增加,SOD 活性均呈下降趋势^[5]。壬基酚(NP)和双酚 A(BPA)等化合物短期暴露后对该鱼产生一定的雌激素效应,诱导雄鱼卵黄蛋白原(VTG) mRNA 表达,组织病理学研究发现精巢组织细胞受损,影响其繁殖力^[6]。17 β -雌二醇(E₂)也可诱导该鱼卵黄蛋白原的合成^[7]。由此可见,剑尾鱼在水环境监测和内分泌干扰研究中具有较好的应用前景。

本实验以剑尾鱼为研究对象,首次克隆并获得了剑尾鱼肝脏 Cu/Zn-SOD 的 cDNA 全序列。在全氟辛烷磺酸类物质(perfluorooctane sulfonate,PFOS)对剑尾鱼肝脏抗氧化酶活性变化研究的前提下,运用 RT-PCR 分析 SOD、GST 和 HSP70 家族两亚型在转录水平的表达,进一步从核酸转录水平上揭示 PFOS 对剑尾鱼氧化应激反应的影响。本实验拟从 3 个方面进行探讨:①揭示在 PFOS 暴露下,剑尾鱼肝脏中的 SOD 在核酸水平与酶活性之间是否存在相关性;②鱼类是否与哺乳动物和蜘蛛一样,体内 HSP70 在细胞内具有抗氧化生物活性,能够直接释放和增加内源性过氧化酶(如 SOD)水平,并探讨 HSP70-mRNA 和 SOD-mRNA 在剑尾鱼体内是否存在相关性;③筛选 PFOS 导致体内氧化应激反应在核酸转录水平上的敏感生物标志物。

1 材料与方 法

1.1 化学试剂

暴露试剂 全氟辛烷磺酸类物质(Sigma-Aldrich 公司,美国),纯度高于 96%。用去离子水配制 400 mg/L 的母液,使用时稀释成所需要的浓度。

分子试剂 Total RNA 提取试剂盒(RNAiso Plus)(TaKaRa 公司);TIANScrip t cDNA 第一链合成试剂盒(TIANScrip t RT Kit)(天根生化科技有限公司);2 \times Taq PCR Master Mix 试剂盒(天根生化科技有限公司);E. Z. N. A. TMGel Extraction Kit 胶回收试剂盒(美国 Omega 生物技术公司);200 bp DNA ladder 和 Marker II(天根生化科技有限公司);6 \times Loading buffer(TaKaRa 公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物

剑尾鱼由中国水产科学研究院珠江水产研究所李凯彬工程师惠赠。选择健壮,体长范围为 4~5 cm 的幼鱼,在实验室驯养一周以上。暂养期间

死亡率低于 3%;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,外观上没有异常现象的幼鱼随机分组。实验鱼的使用及实验过程参照实验动物使用的 3R 原则进行^[8]。

1.3 染毒与制样方法

参考文献[9-11],设计 3.5、7.0、14.0 和 28.0 mg/L 4 个处理组和一个对照组,同时设有平行组。实验用水为充分曝气的自来水,水温保持在 26~28 $^{\circ}$ C,pH 值为 6.8~7.2。每组水量为 20 L,放入剑尾鱼 30 尾。实验期间各组未出现死亡现象。每组分别于 24、48、96 h 和 14 d 取出剑尾鱼肝脏,每次每组每个时间点随机取出 6 尾,其中将 2 尾鱼肝脏混合成一个样本进行测定,每组每个时间点共有 3 个平行样本。肝脏取出后,用预冷的 0.86% 生理盐水冲洗,滤纸吸干,称重后装袋密封,放入 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.4 肝细胞总 RNA 提取和第一链 cDNA 合成

取剑尾鱼新鲜肝脏组织,按 Trizol 说明书提取总 RNA,利用 RNAprep pure Cell/Bacteria Kit 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 OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.8~2.0。利用 DNase I 处理 RNA,去除残留的基因组 DNA 污染。以总 RNA(约 2 μ g)为模板,以 OligodT18 为引物,按照逆转录酶 M-MLV 说明书合成第一链 cDNA。

1.5 引物设计,PCR 扩增 Cu/Zn-SOD 及其他基因 cDNA 片段

根据 NCBI 数据库上近缘动物爪哇青鳉(*Oryzias javanicus*)(GenBank 登陆号:DQ660322)设计各基因引物,利用 NCBI 在线 Blast 程序分析其保守区域,在此区域分别设计一对引物(具体序列与产物大小见表 1)。扩增剑尾鱼 Cu/Zn-SOD cDNA 中间片段,以第一链 cDNA 为模板,PCR 反应总体积均为 25 μ L,各含 2.5 μ L 10 \times 反应缓冲液,0.5 μ L 上、下游引物(各 10 μ mol/L),0.5 μ L dNTPs(10 mmol/L),Taq 酶 1.25 U,模板量 1 μ L,以 ddH₂O 补足体积(以下 PCR 反应体系均同此)。PCR 程序均为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。分别将 PCR 产物切胶纯化回收后,连接到 pMD-20T 载体,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经鉴定后将阳性克隆测序。利用 NCBI 的在线 Blast 程序,BioXM2.6,MEGA 4.0 等软件对获得的序列进行分析。

表 1 实验所用的引物序列
Tab.1 Primers used for all the experiments

基因 gene	引物 primer	GC	T_m	物种 species
HSP70-1	sense:5'AGCCTATTTCATGACTCCCA 3'	42.9%	56.6	<i>X. helleri</i>
	antisense:5'GTTGTCGCTGATGTCCTTCTT3'	47.6%	56.8	
HSP70-2	sense:5'CCTGGGCACTACCTACTCTT3'	46%	53.6	<i>X. helleri</i>
	antisense:5'TCACCACGGCATTGTTAT3'	50.8%	54.3	
GST	sense:5'AAGAACCAAGGCAACAAG 3'	44.4%	40.6	<i>X. helleri</i>
	antisense:5'ACCACTGGGAAGACGATG 3'	55.6%	45.2	
SOD	sense:5'GGTTCCATGTCCATGCTTTT3'	45.45%	58.2	<i>X. helleri</i>
	antisense:5'GACTCTCCTCATTGCCTCCTT3'	50.00%	60.0	
β -actin	sense:5'TGAGCAGGAAATGGGAACT3'	51.3%	43.5	<i>X. helleri</i>
	antisense:5'GACAGGGAAGCCAGGATG 3'	45.8%	46.7	

1.6 引物设计及荧光定量 PCR

根据已获得的剑尾鱼 *Cu/Zn-SOD* 或其他基因序列,分别设计其基因的荧光定量 PCR 引物,采用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒 (TaKaRa, Dalian, China),在荧光定量仪 ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (PerkinElmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 上进行荧光定量 PCR 扩增。反应体系为 25 μ L,各含 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2 \times) 12.5 μ L,0.5 μ L 上、下游引物 (10 μ mol/L),cDNA 模板 2 μ L,以 ddH₂O 补足体积。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s;95 $^{\circ}$ C 5 s 变性,60 $^{\circ}$ C 34 s 退火、延伸,PCR 循环 40。扩增结束后进行溶解曲线分析,确定 PCR 质量。以 β -actin 为管家基因校正实验误差。运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法 [$\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{管家基因}}})_{\text{实验组}} - (C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{管家基因}}})_{\text{对照组}}$] 计算目的基因的表达倍数。采用 SPSS 16.0 软件对组间数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 表明差异显著,

$P < 0.01$ 表明差异极显著。所有结果以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。

2 结果

PFOS 暴露实验期间,各浓度组均未发现实验鱼死亡现象,同时在暴露全过程中实验组与对照组相比较也未发现有行为异常,表明在实验范围内 PFOS 对剑尾鱼无可观测的急性毒性作用。

2.1 剑尾鱼 *Cu/Zn-SOD* 基因的序列分析

根据近缘物种爪哇青鲮已知 *Cu/Zn-SOD* 的保守序列设计引物,以 RACE READY cDNA 为模板,分别进行 5'端和 3'端扩增,产物检测结果显示,5'端长度在 260 bp 左右,3'端在 680 bp 左右,产物大小符合预期结果。测序后运用软件进行拼接,最终获得 794 bp 核苷酸编码 154 个氨基酸的 *Cu/Zn-SOD* 基因全序列 (图 1 和图 2)。通过与已知其他鱼类 *Cu/Zn-SOD* 的核苷酸和氨基酸序列相似性比较发现,核苷酸和氨基酸序列相

```

M V L K A V C
61 GTCCTAAAAGGAGCTGGAGAAACCACTGGGACGGTTCATTTTGAGCAGGAGATTGAGTCA
V L K G A G E T T G T V H F E Q E I E S
121 GTCCTGTGAAAGTTACTGGAGAAATCAGTGGCCTCACACCTGGTGACCATGGTTTCCAT
A P V K V T G E I S G L T P G D H G F H
181 GTCCATGCTTTTGGAGATAACACAAATGGGTGCATCAGTGCAGGACCACACTACAATCCC
V H A F G D N T N G C I S A G P H Y N P
241 TTTACAAAGAACCATGGTGGTCTACTGATGTGGAGCGACACGTTGGAGATTGGGGAAT
F T K N H G G P T D V E R H V G D L G N
301 GTGACTGCTGGCGCCGACAATATAGCCAAGATTGACATTAAGACACTTTTATCAAGCTC
V T A G A D N I A K I D I K D T F I K L
361 TCAGGACCCAACCTCCATTATGGCAGAACTATGGTGATCCATGAGAAGGCTGATGATCTT
S G P N S I I G R T M V I H E K A D D L
421 GGAAAAGGAGGAAATGAAGAAAGCCTTAAGACGGGTAACGCTGGCGGGCGCCTGGCCTGT
G K G G N E E S L K T G N A G G R L A C
481 GGAGTTATTGGCATCACCCAGTAAATCGAGTTCATAAATGAAGCACTGAAAAGTTCCAA
G V I G I T Q *
541 AAGCATTTAATGAGACCAACATAGCTACTAGATGTTACCTTGTCTTTTCAGAAGTGA
601 TGAGCTTTTGATTTGTTGATAGTTAGCCACTCTGCCCTATCTGTTCTATTTGAAGTT
661 GTCCAAATGGGGTCTGTCTGCCAAATAACTTTGGCCAGAAAGATTGGTAACGCACAAGT
721 CATTTATAAATGTATACTATTGCAAAATGAATAAATATTCTTCGAAAAAAAAAAAAAAAA
781 AAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 克隆的剑尾鱼肝脏 *Cu/Zn-SOD* cDNA 序列及推测的相应氨基酸序列

Fig.1 *Cu/Zn-SOD* cDNA sequence and deduced amino acids in *X. helleri* livers

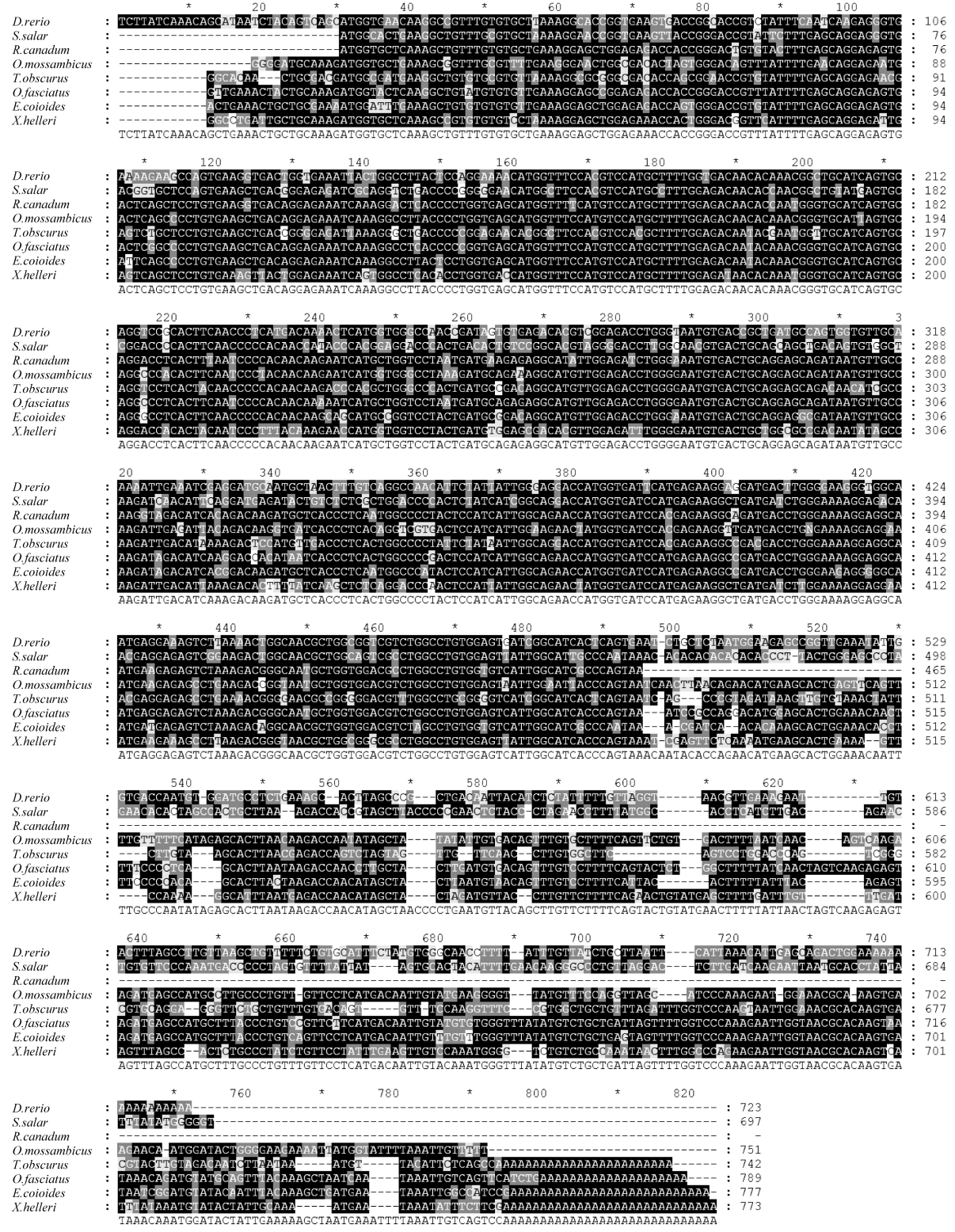


图 2 剑尾鱼肝脏 Cu/Zn-SOD 核苷酸序列和已知鱼类相应序列同源性比较

Fig. 2 The alignment of Cu/Zn-SOD sequence of *X. helleri* and other known fishes

D. rerio; *Danio rerio* (斑马鱼); *S. salar*; *Salmo salar* (大西洋鲑鱼); *R. canadum*; *Rachycentron canadum* (军曹鱼); *O. mossambicus*; *Oreochromis mossambicus* (吴郭鱼); *T. obscurus*; *Takifugu obscurus* (暗纹东方鲀); *O. fasciatus*; *Oplegnathus fasciatus* (横带石鲷); *E. coioides*; *Epinephelus coioides* (点带石斑鱼); *X. helleri*; *Xiphophorus helleri* (剑尾鱼)

似性分别达到 77%~83% 和 79%~88% (表 2)。利用 MEGA 4.0 的 Neighbor-Joining 法绘制基因进化树(图 3)。

2.2 PFOS 暴露下 *Cu/Zn-SOD* mRNA 在剑尾鱼肝脏中的表达

除 14 d 外, *Cu/Zn-SOD* mRNA 的表达均呈

现先降低后升高的趋势,在 3.5 mg/L 时达到最低点,随后在 7.0 mg/L 时上升,并在高浓度组(14.0 和 28.0 mg/L)达到最高点(图 4)。但是,只有 24 h 28.0 mg/L 组 *Cu/Zn-SOD* mRNA 的表达与对照组相比呈极显著增加($P < 0.01$),其他各组与对照组相比没有显著性变化($P > 0.05$)。

表 2 剑尾鱼 *Cu/Zn-SOD* 核苷酸及氨基酸序列相似性与其他已知鱼类的比对
Tab.2 Comparison of nucleotide and amino acid sequence of *Cu/Zn-SOD* with other known fishes

种类 species	GenBank 注册号 accession number	核苷酸相似性/% nucleotide identity	GenBank 注册号 accession number	氨基酸相似性/% amino acid identity
横带石鲷 <i>Oplegnathus fasciatus</i>	AY613390.1	83	AAT36615.1	88
吴郭鱼 <i>Oreochromis mossambicus</i>	AY291056.1	81	AAR82969.1	83
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	NM001124329.1	77	NP001117801.1	80
爪哇青鳉 <i>Oryzias javanicus</i>	DQ660322.1	78	ABG54484.1	79
伯氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus bernacchii</i>	AY736280.1	78	AAW59359.1	80
银鱼 <i>Chionodraco hamatus</i>	AY736281.1	79	AAW59360.1	80

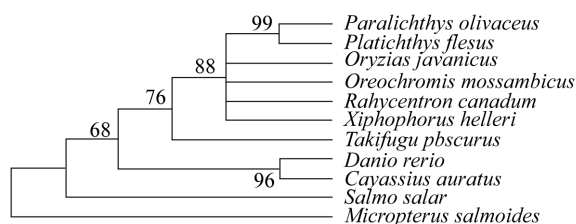


图 3 剑尾鱼肝脏和其他鱼类的 *Cu/Zn-SOD* 基因进化树

Fig.3 The homology tree of *Cu/Zn-SOD* in fish

Paralichthys olivaceus: 牙鲆; *Platichthys flesus*: 欧洲川鲽; *Oryzias javanicus*: 爪哇青鳉; *Oreochromis mossambicus*: 吴郭鱼; *Rachycentron canadum*: 军曹鱼; *Xiphophorus helleri*: 剑尾鱼; *Takifugu obscurus*: 暗纹东方鲀; *Danio rerio*: 斑马鱼; *Carassius auratus*: 鲫; *Salmo salar*: 大西洋鲑鱼; *Micropterus salmoides*: 大口黑鲈

2.3 PFOS 暴露下 *HSP70-1* 和 *HSP70-2* mRNA 在剑尾鱼肝脏中的表达

HSP70-1 和 *HSP70-2* 是 *HSP70* 家族的两个不同亚型。在 PFOS 暴露下,两个亚型在转录水平上呈现出不同表达方式。其中, *HSP70-1* mRNA 表达趋势与 *CuZn-SOD* mRNA 表达的趋势相似。24 h 和 96 h 时,随着暴露浓度的增加, *HSP70-1* mRNA 表达呈先下降再上升的趋势,分别在最高两个浓度组达到最高值,与对照组相比呈显著($P < 0.05$)或极显著差异($P < 0.01$)。在 14 d 时, *HSP70-1* mRNA 表达也呈现先增高后降低的变化趋势。48 h 时各浓度组的变化趋势不明显。随着 PFOS 暴露时间的延长,两个最高浓度组均表现出先升高后下降的变化趋势,其中 28.0 mg/L 组在 24 h 时达到最大值,与对照组相比呈

显著性增高($P < 0.05$),随后 *HSP70-1* mRNA 表达不断降低,在 14 d 时达到最低点。14 mg/L 组在 96 h 时达到最高点,与对照组相比呈显著性增高($P < 0.05$),到 14 d 时表达有所下降(图 5)。

PFOS 暴露下, *HSP70-2* mRNA 水平比 *HSP70-1* mRNA 表达更加敏感(图 6),24 h 时,3.5 mg/L 组与对照组相比呈显著性增加($P < 0.05$),并一直持续到 14 d。到 48 h 时,7.0 和 14.0 mg/L 组呈显著性下降趋势($P < 0.05$),但随着暴露时间的延长,这种降低趋势逐渐消失, *HSP70-2* mRNA 水平开始上升,并且在 14 d 时 7.0 mg/L *HSP70-2* mRNA 水平表达与对照组相比呈极显著升高($P < 0.01$)。28 mg/L 组 *HSP70-2* mRNA 水平表达始终低于对照组,并在 48 h 和 96 h 时这种降低趋势达到极显著水平($P < 0.01$)。

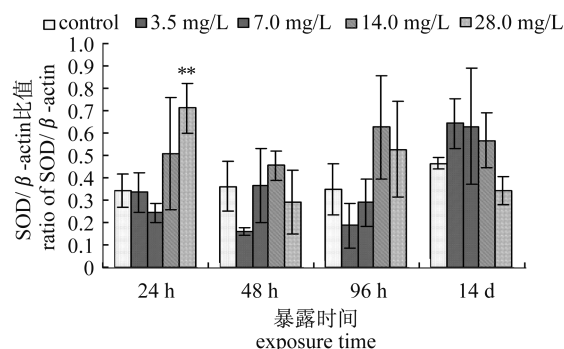


图 4 PFOS 对剑尾鱼肝脏 *Cu/Zn-SOD* mRNA 表达的影响
Fig.4 Effects of PFOS on the expression of *Cu/Zn-SOD* mRNA in swordtails

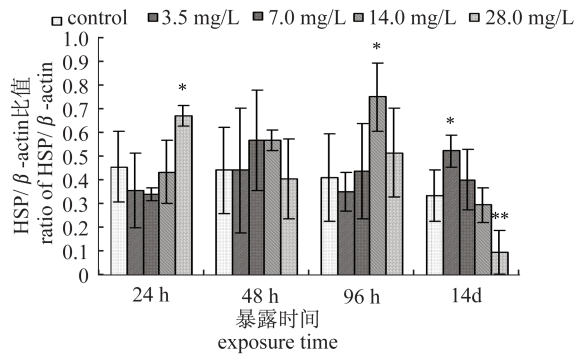


图5 PFOS对剑尾鱼肝脏HSP70-1 mRNA表达的影响
Fig. 5 Effects of PFOS on the expression of HSP70-1 mRNA in swordtails

2.4 PFOS暴露下GST mRNA在剑尾鱼肝脏中的表达

不同时间PFOS暴露下,GST mRNA水平的表达呈剂量依赖性上升趋势(图7)。除24 h没有显著性变化外,其他各组与对照组相比均表现为极显著差异($P < 0.01$),同时,时间效应也十分明显。随着暴露时间的延长,GST mRNA水平的表达呈不断上升趋势。

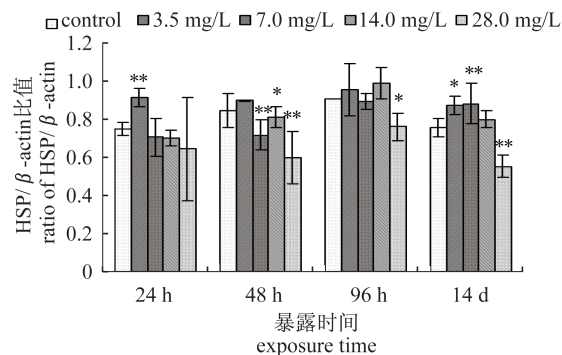


图6 PFOS对剑尾鱼肝脏HSP70-2 mRNA表达的影响
Fig. 6 Effects of PFOS on the expression of HSP70-2 mRNA in swordtails

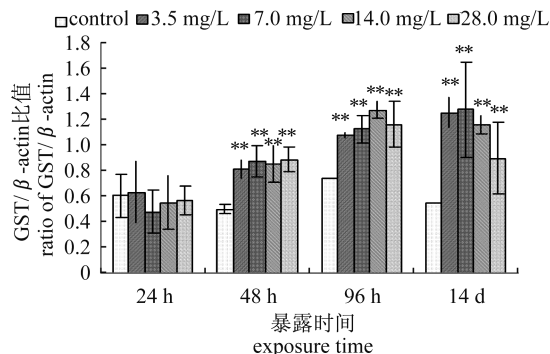


图7 PFOS对剑尾鱼肝脏GST mRNA表达的影响
Fig. 7 Effects of PFOS on the expression of GST mRNA in swordtails

3 讨论

研究表明,机体中具有抗氧化防御系统抵抗各种氧化应激,其中超氧化物歧化酶(SOD)作为抗氧化系统的第一道防线,能够催化超氧阴离子自由基发生歧化反应生成过氧化氢和水^[12]。SOD按照辅基的不同,主要分为Cu/Zn-SOD、Fe-SOD、Mn-SOD和Ni-SOD。Cu/Zn-SOD在真核生物中广泛存在,Fe-SOD主要存在于叶绿体和原核生物中,Mn-SOD广泛存在于真核生物线粒体和原核细胞胞浆中。其中,Cu/Zn-SOD是最早被发现的超氧化物歧化酶,它的结构中含有两个亚基,每个亚基含有1分子Cu和1分子Zn。Cu与其催化活性有关,而Zn主要用来维持分子结构的完整性^[13-14]。Cu/Zn-SOD在进化方面高度保守,来源于牛血的Cu/Zn-SOD和人类同源性高达80%以上。目前,SOD基因在基因库中已达上千个,分别来自各种微生物、植物和动物。但是相对其他动物而言,鱼体内SOD基因的研究尚少。本实验成功克隆了剑尾鱼Cu/Zn-SOD cDNA的全序列,并在此基础上,利用RT-PCR技术检测暴露在不同浓度PFOS下剑尾鱼Cu/Zn-SOD mRNA的表达情况。本研究中,不同浓度PFOS暴露下,除14 d外,Cu/Zn-SOD mRNA表达均呈现先降低后升高的趋势,但是与对照组相比没有显著性差异。相同浓度PFOS暴露下,同一时间点剑尾鱼肝脏SOD活性随浓度升高而升高^[11],这与Cu/Zn-SOD mRNA表达情况不一样。但是,在时间效应上,各浓度组Cu/Zn-SOD mRNA表达从24 h到14 d都有不同程度的增加,而3个PFOS低浓度组中,SOD活性均随暴露时间延长而上升,28.0 mg/L组在24~96 h时两者也表现出相似的变化趋势,即先下降后上升。因此,剑尾鱼肝脏中SOD活性与Cu/Zn-SOD mRNA表达虽然在剂量效应上不一致,但是在时间效应上具有相关性,这种相关性对SOD活性变化较Cu/Zn-SOD mRNA表达更为显著。这可能是由于PFOS暴露后,剑尾鱼在短期内遭遇氧化应激,导致机体中活性氧(ROS)含量增加。机体作出各种应答,如激活特殊转录因子Nrf2^[15]或其他应激蛋白HSP70^[16-18]等去诱导抗氧化酶基因的表达。SOD是一种多基因家族,生命体中一种形式SOD被抑制,会导致其他形式的SOD基因表达的增

加。PFOS 暴露下,除了 *Cu/Zn-SOD* mRNA,其他类型如 *Mn-SOD* mRNA 可能被诱导。*Cu/Zn-SOD* mRNA 在 PFOS 暴露下表达不显著可能是其他类型 SOD 基因被诱导,并发挥了更为重要的作用。其相关机制有待进一步研究。因此,*Cu/Zn-SOD* mRNA 表达不能作为 PFOS 导致氧化应激的敏感生物标志物。

近年来,由于 HSP70 具有高度保守性以及受到环境胁迫下能够大量表达的特性,已被作为评估重金属、有机物、高温等应激条件的敏感生物标志物。研究表明, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、17- α 炔雌醇和氯仿等污染物暴露时,都能引起鱼体内 HSP70 显著诱导^[19-21]。本实验中,HSP70 的两个亚型 HSP70-1 和 HSP70-2 mRNA 在 PFOS 暴露下表现出不同的表达方式。HSP70-1 mRNA 与 *Cu/Zn-SOD* mRNA 表达在 24 h、96 h 和 14 d 时表现出相似的变化趋势,即在 24 h 和 96 h 时,随着 PFOS 浓度升高,两基因表达呈先下降后上升的变化趋势,96 h 时则刚好相反。因此,HSP70-1 mRNA 与 *Cu/Zn-SOD* mRNA 表达具有一定的相关性,推测这与 HSP70 具有抗氧化的功能有关,已有研究也表明,它能够抑制产生氧自由基的关键酶即烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶,通过反馈抑制作用减少氧自由基的产生;HSP70 还可对抗 H_2O_2 对细胞膜的损伤,减少 Ca^{2+} 进入细胞,从而保护细胞免受由活性氧族介导的 Ca^{2+} 内流引起的细胞毒性和细胞凋亡^[16,22]。另外,Wilczek^[16]对采自波兰南部奥尔库兹和皮利察两处牧场的两种不同蜘蛛进行高温和杀虫剂暴露,结果表明,用高温和杀虫剂不仅诱导出蜘蛛 HSP70 表达增强,而且证明 HSP70 表达与超氧化物歧化酶(SOD)及过氧化氢酶(CAT)的表达呈正相关,并认为 HSP70 阳性细胞有抗凋亡的作用。将黑腹果蝇幼虫 37 °C 热应激 30 或 60 min 后,*Cu/Zn-SOD* mRNA 表达上调,并且 HSP70 mRNA 表达与 *Cu/Zn-SOD* mRNA 表达增高相一致^[17]。Chen 等^[18]对氟中毒病人头发中 HSP70 mRNA 表达及 SOD、CAT 和 GPx 等抗氧化酶活性进行了测定,目的在于探讨 Se 在氟中毒防御机制中的作用。结果显示,在高 Se + F 组,HSP70 mRNA 表达明显高于其他组,而且该组中所有酶活性也是显著高于其他组^[18]。综上所述,机体中的 HSP70 还可提高内源性过氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD)水平,从

而加快氧自由基的清除。这些结果与本研究的结论相吻合。因此,PFOS 暴露下,HSP70 mRNA 与 *Cu/Zn-SOD* mRNA 表达具有相关性,并且 HSP70 通过提高剑尾鱼体内 SOD 水平保护机体免受氧化损伤。本实验结果还表明,HSP70-2 mRNA 表达比 HSP70-1 mRNA 表达更加敏感,3.5 mg/L 处理组中 HSP70-2 mRNA 一直保持在较高水平。随着 PFOS 暴露时间的延长,7.0 和 14.0 mg/L 处理组的 HSP70-2 mRNA 表达呈现不同程度的上升趋势,而 28.0 mg/L 处理组 HSP70-2 mRNA 表达始终低于对照。这一亚型与 *Cu/Zn-SOD* mRNA 表达完全不一样,其相关机制有待进一步研究。

谷胱甘肽 S 转移酶(GST)是广泛存在于细菌、植物和动物体内的一类多功能同工酶家族^[23]。目前国内外关于 GST 的报道很多。Nahrgang 等^[24]将鳕鱼(*Boreogadus saida*)暴露于不同浓度原油中后,GST mRNA 表达很微弱,但是高浓度组 GST mRNA 表达在 2 周后迅速上调,与对照组相比有显著性差异,低浓度组此时无变化。到 4 周或 6 周时,各浓度组的 GST mRNA 表达恢复到对照水平。在酶活性方面,4 周暴露期 GST 活性无显著性变化,但是,高浓度组在 2 周净化期后 GST 活性呈显著性上升趋势。由此可见,GST mRNA 分子转录水平和 GST 酶活性没有相关性。并且研究者认为,GST mRNA 分子转录水平和 GST 酶活性在原油暴露下变化不大,可能是在肝脏中第 II 阶段另一解毒酶——葡萄糖醛基转移酶在原油解毒与排泄过程中较 GST 发挥更主要的作用。相关 GST mRNA 分子转录水平变化不大的研究在 PFOS 暴露中也有报道^[25]。但是,本研究发现,不同时间和浓度 PFOS 暴露下,GST mRNA 水平的表达呈剂量依赖性上升趋势。除 24 h 没有显著性变化外,其他各组与对照组相比均表现为极显著诱导($P < 0.01$)。同时,时间效应也十分明显,随着暴露时间的延长,GST mRNA 水平的表达呈不断上升趋势。因此,这种酶分子转录水平的高水平表达,是鱼体在应对外源 PFOS 进入体内后的一种防御措施。另外,Shi 等^[26]研究发现 Nrf2 是一种预防 PFOS 诱导斑马鱼幼体产生氧化应激的途径。Nrf2 是细胞调节抗氧化应激反应的重要转录因子,氧化应激作用下,Nrf2 与核内抗氧化元件 ARE 上

GCTGAGTCA 位点结合,启动 ARE 调控的第 II 相解毒酶和抗氧化酶基因表达,增加细胞对氧化应激的抗性。因此,本研究中 *GST* mRNA 核酸转录水平的提高与该转录因子的调控有关。

参考文献:

- [1] Huang Z B, Wu S Q, Shi C B, *et al.* Study on biological characteristics of swordtails, *Xiphophorus helleri* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2000, 7(3): 107 - 109. [黄志斌, 吴淑勤, 石存斌, 等. 剑尾鱼若干生物学特性研究. 中国水产科学, 2000, 7(3): 107 - 109.]
- [2] Long H, Wang D Q, Chen J W, *et al.* Recent studying situation of several experimental fishes [J]. Laboratory Animal and Comparative Medicine, 2005, 25(3): 175 - 181. [龙华, 汪登强, 陈建武, 等. 几种实验用鱼的研究现状. 实验动物与比较医学, 2005, 25(3): 175 - 181.]
- [3] Fang Z Q, Wang C F, Wei H R. Effects of mercury and selenium on Na^+/K^+ -ATPase activity in *Xiphophorus helleri* Heckel [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2006, 12(2): 220 - 223. [方展强, 王春风, 卫焕荣. 硒对汞致剑尾鱼鳃和肝脏组织 Na^+/K^+ -ATPase 活性变化的拮抗性影响. 应用与环境生物学报, 2006, 12(2): 220 - 223.]
- [4] Fang Z Q, Zhang F J, Zheng W B, *et al.* Effects of polychlorinated biphenyls on activity of Na^+/K^+ -ATPase activity in *Xiphophorus helleri* [J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(1): 89 - 92. [方展强, 张凤君, 郑文彪, 等. 多氯联苯对剑尾鱼 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响. 水产学报, 2004, 28(1): 89 - 92.]
- [5] Fang Z Q, Zhang F J, Zheng W B, *et al.* Effects of polychlorinated biphenyls on activity of superoxide dismutase in swordtails (*Xiphophorus helleri*) [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2004, 12(2): 96 - 99. [方展强, 张凤君, 郑文彪, 等. 多氯联苯对剑尾鱼超氧化物歧化酶活性的影响. 中国实验动物学报, 2004, 12(2): 96 - 99.]
- [6] Kwak H J, Shin J S, Makynen E A, *et al.* Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2001, 20(4): 787 - 795.
- [7] Wen R S, Fang Z Q, Jiang S G, *et al.* Induction of vitellogenin by 17-estradiol in swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2007, 15(4): 280 - 284. [温茹淑, 方展强, 江世贵, 等. 17 β -雌二醇对剑尾鱼卵黄蛋白原的诱导研究. 中国实验动物学报, 2007, 15(4): 280 - 285.]
- [8] He Z M, Li G M, Xin R C. The formation, development and its application in life science research in 3 R theory [J]. Laboratory Animal Science and Administration, 2000, 17(3): 43 - 47. [贺争鸣, 李冠民, 邢瑞昌. 3R 理论的形成、发展及在生命科学研究中的应用. 实验动物科学与管理, 2000, 17(3): 43 - 47.]
- [9] Liu C, Yua K, Shi X J, *et al.* Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Aquatic Toxicology, 2007, 82(2): 135 - 143.
- [10] Krove A V, Softeland 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.
- [11] Zhang J, Fang Z Q. Effects of perfluorooctane sulfonate on hepatic antioxidant enzyme activities in swordtails (*Xiphophorus helleri*) [J]. Acta Laboratorium Animals Scientia Sinica, 2013, 21(4): 61 - 67. [张晶, 方展强. 全氟辛烷磺酰基化合物 (PFOS) 对剑尾鱼抗氧化酶活性的影响. 中国实验动物学报, 2013, 21(4): 61 - 67.]
- [12] Kumar P, Tewari R K, Shama P N. Cadmium enhances generation of hydrogen peroxide and amplifies activities of catalase, peroxidases and superoxide dismutase in Maize [J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 2008, 194(1): 72 - 80.
- [13] Abreu I A, Cabelli D E. Superoxide Dismutases—A review of the metal-associated mechanistic variations [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2010, 1804(2): 263 - 274.
- [14] Perry J J P, Shin D S, Getzoff E D, *et al.* The structural biochemistry of the superoxide dismutases [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2010, 1804(2): 245 - 262.
- [15] Shi Y, Pan Y, Yang R, *et al.* Occurrence of perfluorinated compounds in fish from Qinghai-Tibetan Plateau [J]. Environment International, 2010, 36(1): 46 - 50.
- [16] Wilczek G. Apoptosis and biochemical biomarkers of stress in spiders from industrially polluted areas

- exposed to high temperature and dimethoate [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2005, 141 (2): 194 - 206.
- [17] Niedzwiecki A, Reveillaud I, Fleming J E. Changes in superoxide dismutase and catalase in aging heat-shocked *Drosophila* [J]. *Free Radical Research Communications*, 1992, 17(6) : 355 - 367.
- [18] Chen Q, Wand Z L, Xiong Y M, *et al.* Selenium increases expression of HSP70 and antioxidant enzymes to lessen oxidative damage in Fincoal-type fluorosis [J]. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2009, 34(4) : 399 - 405.
- [19] Hu W, Wang Y P, Zhou Y X. The induction of stress protein in *Grobioocypris rarus* by Cu^{2+} and Zn^{2+} [J]. *ActaHydrobiologica Sinica*, 2000, 25 (1): 50 - 53. [胡伟,汪亚平,周永欣. Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 诱导稀有鮡鲫应激蛋白质的研究. *水生生物学报*, 2000, 25(1) : 50 - 53.]
- [20] Li J F, Li W H, Yang J, *et al.* Effects of 17α -ethynylestradiol on the expression of estrogen-responsive genes [J]. *Journal of Labour Medicine*, 2006, 23 (2): 127 - 130. [李洁雯,李卫华,杨键. 17α -炔雌醇对雌激素反应基因表达的影响. *环境与职业医学*, 2006, 23(2) : 127 - 130.]
- [21] Su Y, Ren L, Luo Y, *et al.* Effects of two kinds of typical chlorophenols on the induction of heat shock protein 70 (HSP70) in the Cracian carp brown tissue [J]. *China Environmental Science*, 2007, 27 (2): 260 - 263. [苏燕,任磊,罗义,等. 两种典型氯酚对鲫鱼脑组织应激蛋白 HSP70 的诱导. *中国环境科学*, 2007, 27(2) : 260 - 263.]
- [22] Han C B, Zhou Q H, Qian Y N. The regulation of heat shock protein to cell stress [J]. *The Journal of Clinical Anaesthesiology*, 2008, 24(8) : 699 - 700.
- [23] Blanchette B, Feng X, Singh B R. Marine glutathione S-transferases [J]. *Marine Biotechnology (NY)*, 2007, 9(5) : 513 - 542.
- [24] Nahrgang J, Camus L, Gonzalez P, *et al.* Biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to dietary crude oil [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 96 (1): 77 - 83.
- [25] Bilbao E, Raingard D, de Cerio O D, *et al.* Effects of exposure to Prestige-like heavy fuel oil and to perfluorooctane sulfonate on conventional biomarkers and target gene transcription in the thicklip grey mullet *Chelon labrosus* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 98(3) : 282 - 296.
- [26] Shi X, Zhou B. The role of Nrf2 and MAPK pathways in PFOS-induced oxidative stress in zebrafish embryos [J]. *Toxicological Sciences*, 2010, 115(2) : 391 - 400.

The effects of perfluorooctane sulfonate on *Cu/Zn-SOD* and stress-related gene expression in swordtails (*Xiphophorus helleri*)

ZHANG Jing^{1,2}, LIANG Yue^{1,3}, FANG Zhanqiang^{1*}

(1. Key Laboratory of Ecology and Environmental Science in Guangdong Higher Education, College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

2. Foshan Research Center for Environmental Health and Safety Evaluation, Foshan 528000, China;

3. Department of Biology, Guangdong University of Education, Guangzhou 510303, China)

Abstract: The effects of perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure on hepatic *Cu/Zn-SOD* and stress-related gene expression in swordtails (*Xiphophorus helleri*) were studied in order to screen the sensitive biomarkers induced oxidative stress in vivo. We cloned and analyzed the swordtail fish *Cu/Zn-SOD* cDNA of full sequence. Swordtails were randomly divided into five groups, with one control group and four experimental groups (3.5, 7.0, 14.0 and 28.0 mg/L PFOS). Parallel experimental groups were also established. The *Cu/Zn-SOD*, *HSP70-1*, *HSP70-2* and *GST* mRNA expression levels in fish livers were determined after 24 h, 48 h, 96 h, and 14 d exposure. The *X. helleri Cu/Zn-SOD* cDNA was cloned, which had 794 bp nucleotides, encoding 154 amino acids. The comparison among the similarity nucleotide sequence and amino acid sequence of *Cu/Zn-SOD* in other related fishes showed that nucleotide and amino acid sequence similarity were 77% – 83% and 79% – 88%, respectively. After exposure to high concentrations of PFOS, a variety of stress-related genes in *X. helleri* liver changed in different degrees. The expression of *Cu/Zn-SOD* mRNA in the dose-effect was not significant by RT-PCR, and with no correlation between the SOD activity and the expression of *Cu/Zn-SOD* mRNA. It may be other types of *SOD* gene that play more important role under the PFOS exposure. With the exposure time to increase continuously, *Cu/Zn-SOD* gene changes were consistent with the SOD activity and the expression of *HSP70-1* mRNA. Thus *HSP70* by increasing the level of swordtail fish SOD protected the body from oxidative damage. *HSP70-2* mRNA was more sensitive than the levels of *HSP70-1* mRNA expression. The changes of *HSP70-2* were not relevant with *Cu/Zn-SOD* mRNA expression. The underlying mechanism needed further study. *GST* mRNA expression was constantly increasing, which is related with the Nrf2 signal transduction pathways, and it may also be a form of defense in fish when PFOS entered the body. Swordtails in vivo experiments showed that PFOS could induce oxidative stress in the liver. The expression of *GST* mRNA and *HSP70-2* mRNA could act as sensitive biomarkers of PFOS exposure.

Key words: *Xiphophorus helleri*; perfluorooctane sulfonate (PFOS); stress-related gene expression; molecular biology; toxicity

Corresponding author: FANG Zhanqiang. E-mail: fangzhq@sncu.edu.cn