



壬基酚致红鲫发育畸形的机制

田雨苏¹, 孙远东^{1*}, 欧密^{2*}, 刘雨芳¹, 崔小娟¹,
周定港¹, 车文安¹, 陈昆慈²

(1. 湖南科技大学生命科学学院, 湖南 湘潭 411201;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部热带亚热带水产种质资源利用与
养殖重点实验室, 广东 广州 510380)

摘要: 壬基酚 (nonylphenol, NP) 是广泛存在于水体中的环境内分泌干扰物, 对生物体的生长发育造成影响。为了探究壬基酚致红鲫发育畸形的机制, 本研究以红鲫为研究对象, 采用 Illumina HiSeq 2500 对正常神经胚期胚胎 (NC)、正常 21 体节期胚胎 (SC) 和暴露 5 $\mu\text{mol/L}$ NP 中发育畸形的神经胚期胚胎 (NNP)、畸形 21 体节期胚胎 (SNP) 进行转录组测序 (RNA-seq), 并结合实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证差异表达基因 (differential expression gene, DEG)。RNA-seq 共得到 89 166 条高质量 unigenes, 其中 30 319 条 unigenes 获得注释结果。NC、SC、NNP 和 SNP 两两比较分析发现, NC/NNP 中 DEGs 153 个, SC/SNP 中 DEGs 10 个, NC/SC 中 DEGs 6 121 个, NNP/SCP 中 DEGs 7 270 个。KEGG 分析发现, 上述 DEGs 多数聚集在细胞过程、环境信息处理和新陈代谢通路上。利用 qRT-PCR 验证了生长、发育、细胞骨架及心血管循环相关的 25 个 DEGs, 它们的表达变化在 qRT-PCR 和 RNA-seq 中结果一致, 一方面说明了 RNA-seq 结果可靠, 另一方面初步挖掘出 NP 胁迫致红鲫胚胎发育畸形的候选基因, 为后续深入探讨 NP 致畸的分子机制研究提供前期数据。

关键词: 红鲫胚胎; 壬基酚; 转录组测序; 荧光定量 PCR

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

壬基酚聚乙氧基化物 (NPEOs) 是一种广泛用于制造业的表面活性剂, 在环境中普遍存在^[1]。NPEOs 本身及其分解产物对环境与健康有很大危害, 被许多国家禁止使用^[2]。壬基酚 (NP) 是 NPEOs 生物降解产物之一, 是一种内分泌干扰物^[3], 它可以模拟体内雌激素与其受体结合, 干扰内分泌代谢并对生物体产生毒性作用^[4]。研究发现 NP 可导致雄性生殖功能障碍, 影响精巢发育, 导致雄性生育能力和精子数量下降^[5-6]。Tanaka 等^[7]的研究表明, 暴露于 NP 中雌雄同体花盖溪鲃 (*Rivulus marmoratus*) 性腺发育异常, 精巢发育不全。剑

尾鱼 (*Xiphophorus hellerii*) 短期 (3d) 和相对长期 (60d) 暴露于 NP 的实验表明, 短期 NP 暴露的剑尾鱼精巢中存在生殖损伤, 长期的 NP 暴露影响了其生长^[8]。青鳉 (*Oryzias latipes*) 精子短暂接触 NP 后其运动精子的百分比显著低于对照组^[9], 长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 精子暴露于 NP 中获得了同样的结果^[10]。

NP 不仅影响成鱼, 同样对鱼类的胚胎发育影响很大。玫瑰无须鲃 (*Puntius conchonius*) 胚胎暴露于 NP 中, 胚胎出现卵凝结、脊椎畸形以及发育延迟等变化^[5]。斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎暴

收稿日期: 2019-09-30 修回日期: 2020-01-01

资助项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0200400); 湖南省教育厅重点项目 (17A072); 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室开放课题基金

通信作者: 孙远东, E-mail: syd@hnust.edu.cn; 欧密, E-mail: om1990@prfri.ac.cn

露在不同浓度的 4-NP 溶液中, 其胚胎尾部畸形率和仔鱼的心包囊肿率显著增加, 其中胚胎尾部畸形率随着处理浓度的增高而增加, 其剂量—效应关系呈正相关; 经 4-NP 暴露处理的斑马鱼仔鱼的体长及 30 s 心跳数较对照组均显著下降^[11]。NP 对金鱼 (*Carassius auratus*) 胚胎也具有明显的发育毒性, 且金鱼胚胎对 NP 具有较高敏感性^[12]。目前, 关于 NP 对水生动物的毒性研究主要集中在成体组织变化、精子活性、胚胎存活率、半致死浓度 (LC₅₀) 以及胚胎发育过程中的形态学变化等方面, 对其生物毒性影响的分子机制的研究还相对较少。

转录组测序 (RNA-seq) 技术可以快速、全面地获得某一特定物种中特定细胞或组织的基因表达信息, 已广泛运用在动植物应激反应中基因差异表达的研究^[13]。邓素贞等^[14]运用 RNA-seq 对高温胁迫下的大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 进行分析, 发现大量差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的功能与氧化还原反应、蛋白质折叠和去折叠、糖和脂代谢以及某些疾病的发生相关。姜宇等^[15]利用 RNA-seq 探索了高铁环境下生存的斑马鱼与野生型斑马鱼基因表达的不同, 发现铁过载对骨形成蛋白 2 (BMP2) 有抑制作用, 导致成骨代谢异常。张辉等^[16]通过 RNA-seq 技术对镉胁迫的栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 消化盲囊组织进行测序, 对差异表达基因进行注释发现, 基因集中在蛋白绑定、细胞黏附、免疫应答、细胞凋亡和能量代谢等方面。RNA-seq 为在分子水平揭示基因表达和调控机理提供了基础数据。

红鲫 (*Carassius auratus red var.*) 性成熟早、繁殖力强、耐低氧、适应温度广, 易于人工饲养; 其体型小、杂食性、饲养成本低, 体色全红, 便于观察淘汰变异个体, 上述优点满足红鲫作为实验动物的基本要求^[17], 同时红鲫对 NP 的敏感性高^[18], 因此, 本研究以红鲫胚胎为实验材料, 用不同浓度 NP 对其进行处理, 观察胚胎发育的形态学特征, 并记录孵化时间和胚胎死亡数; 用 RNA-seq 技术对正常神经胚期胚胎 (neuroblast stage embryos in control group, NC)、正常 21 体节期胚胎 (21 somite stage in control group, SC)、暴露 5 $\mu\text{mol/L}$ NP 中发育畸形的神经胚期胚胎 (monstrous embryos in neural stage exposed to 5

$\mu\text{mol/L}$ NP, NNP) 及畸形 21 体节期胚胎 (monstrous embryos in 21 somite stage exposed to 5 $\mu\text{mol/L}$ NP, SNP) 这 4 组胚胎进行测序; 结合生物信息学分析和文献资料选取 DEGs, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 对 DEGs 进行验证, 以期挖掘出 NP 胁迫下影响红鲫胚胎发育的关键基因及调控通路, 为进一步探讨 NP 影响红鲫发育畸形的机制研究提供前期数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用红鲫由湖南师范大学淡水鱼类发育生物学国家重点实验室提供。3 对性成熟雌、雄红鲫的卵和精子采用半干法授精, 将受精卵放置于盛有曝气水的培养皿中孵育, 2 min 后将培养皿中的曝气水换成相应浓度的实验液, 弃去未受精的卵及形态异常的胚胎再进行下一步实验^[18]。

1.2 胚胎毒性实验与取材

经过预实验计算出红鲫胚胎在 NP 处理 74 h 时的半致死浓度为 3.2 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$ NP 处理下红鲫胚胎表型更加明显, 7 $\mu\text{mol/L}$ NP 处理下胚胎的存活率极低, 因此选择 NP 浓度为 3、5 和 7 $\mu\text{mol/L}$ 作为实验组。将刚受精的胚胎分别暴露于浓度为 3、5、7 和 0 $\mu\text{mol/L}$ (空白对照, 0.01% 无水乙醇) 的 NP 溶液, 胚胎孵育和暴露在直径为 25 cm 的玻璃培养皿中进行 (25 ± 1 °C), 每个浓度设置 5 个平行, 每个平行约 300 个胚胎^[19]。每隔 4 h 换 1 次水, 并测量水温, 保持 NP 浓度相对恒定, 同时用胶头滴管及时剔除死亡胚胎, 以保持水质清洁, 记录各组胚胎死亡数及各组胚胎发育情况, 并确定 NP 暴露下红鲫胚胎的半致死浓度 (LC₅₀)。

根据下列公式计算胚胎畸形率和存活率:

$$\text{畸形率 (\%)} = \frac{\text{畸形数}}{\text{存活数}} \times 100\%$$

$$\text{存活率 (\%)} = \frac{\text{存活数}}{\text{受精数}} \times 100\%$$

RNA-seq 样本采集浓度 0 和 5 $\mu\text{mol/L}$, 将正常神经胚期胚胎 (受精后 12.5 h, 12.5 hpf)、正常 21 体节期胚胎 (25.5 hpf)、暴露 5 $\mu\text{mol/L}$ NP 中发育畸形的神经胚期胚胎 (2.5 hpf) 及畸形 21 体节期胚胎 (25.5 hpf) 4 组胚胎收集在冻存管中, 每组 3 个重复, 液氮速冻后 -80 °C 保存备用。

1.3 转录组文库构建及测序

采用 TRIzol 法提取 NNP、SNP、NC 和 SC 4 组红鲫胚胎总 RNA, 每组胚胎重复 3 次, 共 12 个样品, 1% 琼脂糖电泳法和酶标仪测定总 RNA 质量及浓度, -80°C 保存备用^[20]。带有 Oligo (dT) 的磁珠富集胚胎的 mRNA, 加入 Fragmentation Buffer 将 mRNA 进行随机打断, 以 mRNA 为模板, 使用六碱基随机引物 (random hexamers) 和 M-MuLV 逆转录酶合成第一条 cDNA 链, 然后加入 RNase H 和 DNA polymerase I 合成第二条 cDNA 链, 利用 AMPure XP 磁珠纯化 cDNA, 纯化的双链 cDNA 再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 利用 AMPure XP beads 进行片段大小选择, 最后通过 PCR 扩增得到 cDNA 文库。文库构建完成后, 分别使用 Qubit 2.0 荧光计和安捷伦 2100 生物分析仪对文库的浓度和插入片段大小进行检测, 使用 qRT-PCR 法对文库的有效浓度进行准确定量, 以保证文库质量。库检合格后, 用 Illumina HiSeq 2000 进行高通量测序^[21-22], 此工作委托百迈客生物科技有限公司完成。

1.4 转录组数据组装及去冗余后的基因序列 (unigene) 功能注释

在进行后续分析之前, 去除带接头的序列 (reads) 以及低质量值 reads 得到过滤后数据 (clean data), 使用 Trinity 软件对 clean data 进行序列组装, 获得 unigene。使用 BLAST^[23] 软件将 unigene 序列与 NR、Swiss-Prot、GO、COG、KOG、eggNOG 4.5、KEGG 数据库比对, 使用 KOBAS 2.0 软件得到 unigene 在 KEGG 中的 KEGG Orthology 结果, 预测完 unigene 的氨基酸序列之后, 使用 HMMER 软件与 Pfam 数据库比对, 获得 unigene 的注释信息。

1.5 DEGs 筛选

采用 Bowtie 工具^[24] 将测序得到的 reads 与 unigene 库进行比对, 根据比对结果, 结合 RSEM 软件^[25] 进行表达量水平分析, 利用 FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) 方法^[26] 计算 unigene 的表达量。使用 edgeR 软件包^[27] 进行差异表达分析, 获得 2 个样品之间的差异表达基因。采用 Benjamini-Hochberg 方法对 P -value 进行校正, 即错误发现率 (false discovery rate, FDR) 作为 DEGs 筛选指标。2 个样品组间差异表达基因为 $\text{FDR} \leq 0.05$ 且 |差异倍数

(Fold Change, FC)| ≥ 2 的基因。

采用 GO 数据库 (<http://www.Geneontology.org/>) 对 DEGs 进行 GO 功能富集显著性分析, 同时使用 KOBAS 软件对 DEGs 进行 KEGG 代谢通路富集性分析^[28-29]。

1.6 qRT-PCR 验证 RNA-seq 结果

为了验证 RNA-seq 的结果, 选择 25 个 DEGs, 其中编号 1~4 的 DEGs 只在 NC/SC 中差异表达, 在 NNP/SNP 中表达正常; 编号 5~9 的 DEGs 只在 NNP/SNP 中差异表达, 在 NC/SC 中并未出现差异表达现象; 编号 10~17 的 DEGs 在 SC/SNP 中差异表达, 编号 18~25 的 DEGs 在 NC/NNP 中差异表达。使用 Primer premier 5 软件设计引物 (表 1)。采用 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo, Japan) 合成 cDNA, SYBR Green[®] Realtime PCR Master Mix (Toyobo, Japan) 试剂和 StepOnePlus Real-Time PCR System (ABI, USA) 进行 qRT-PCR。各样品重复 3 次, 以 β -actin 为内参^[30], 按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法^[31] 计算相对表达量, 通过单因素方差分析分析 25 个基因的表达水平 (表示为平均值 $\pm$ 标准偏差), 使用 SPSS Statistics 20 软件进行 Dunnett's 多重比较检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 NP 暴露引起胚胎畸形

将红鲫胚胎暴露于 NP 溶液中, 随着暴露时间的增加, NP 处理组胚胎存活率不断降低。NP 处理后 5 h 胚胎存活率开始下降, 15 h 下降最明显, 24~55 h 存活率下降速度趋于稳定, 74 h 高浓度 NP 处理组的胚胎存活率再次明显降低 (图 1)。

NP 处理组和对照组的胚胎存活率在处理 9 h 内并无明显差异, 15 h 后 $5 \mu\text{mol/L}$ 及 $7 \mu\text{mol/L}$ NP 溶液中红鲫胚胎存活率相较于对照组和 $3 \mu\text{mol/L}$ NP 处理组显著降低 ($P < 0.05$), 但是 $5 \mu\text{mol/L}$ NP 处理组胚胎存活率要小于 $7 \mu\text{mol/L}$ NP 处理组的胚胎存活率。 $7 \mu\text{mol/L}$ NP 处理组胚胎在处理 74 h 存活率开始小于 $5 \mu\text{mol/L}$ NP 处理组, 仅有 4.6% (表 2)。

暴露于 NP 的红鲫胚胎发育出现形态学上的异常, 包括脊柱弯曲、尾部畸形、心包异常和血栓 (图版)。利用 SPSS 的线性回归法计算得出

表 1 qRT-PCR 所用引物

Tab. 1 Primers used in qRT-PCR

编号 no.	基因ID gene ID	基因名称 gene name	正向引物 forward primer	反向引物 reverse primer
1	c120573.graph_c0	<i>TET2</i>	CCTGCTTATCCTCTCTCTGACC	CTCAGAGTCATTTCGAAAGCCT
2	c137711.graph_c1	<i>Frmpd1</i>	ATTCAGTTGTTCCCTTAGCG	TACGCCAATCTGCCTTTCCT
3	c150556.graph_c0	<i>Gfra2</i>	CGGCAATCAGGAGGAAGAGTGT	CGGCAATCAGGAGGAAGAGTGT
4	c138218.graph_c1	<i>cadherin</i>	CGGGCTTCCTCTTGTGCTA	CTCTGTGTTTGCCGTGGTTG
5	c152327.graph_c0	<i>GATA1</i>	AATGGGATGAGTGGCTGTAGAC	GTGTAACGCTTGCGGACTCTAT
6	c151648.graph_c2	<i>SNAP-25</i>	GACACACGACGACACTTCCT	AGAAATGCTTTGGCTCCCCT
7	c150901.graph_c0	<i>mGluR7</i>	ATTTCTAAGCAACAAGCGGC	ACGACCATAGAGCCTTTCAA
8	c155811.graph_c1	<i>β-dystrobrevin</i>	ACTCAGTGGATGACGTTTG	CTATGTGCGAATGCCAGAGA
9	c143520.graph_c0	<i>MCM6</i>	TGATGAGGTGGAAAAGCAGGAG	ATGAGACTCTTCTTGGCGACGA
10	c146410.graph_c0	<i>ApoD</i>	CAATCTTGGCAGTTCCTCA	TGGGAGAGTGTAGCCAAGCC
11	c161675.graph_c5	/	AGACAGCGGGGAAGTCGTTA	GGGGGTGGCGACTGTTTACT
12	c165175.graph_c1	/	GAAGCCAATATTACGCCCT	CTGGCAGACCCGACAGAGAT
13	c152695.graph_c1	/	AGCCGCTAACAGGCATTGAT	CCGTTGCTCGCCACTACTA
14	c147376.graph_c0	/	CAAATCCTGACGAACTCCGA	GATTTGATGCCCGATTATTA
15	c158361.graph_c0	/	TCACTGAGGAATGAAAAGGAGG	AGTTCCCATAGCAAATCAAAAT
16	c153211.graph_c1	/	TCTAACTTCGGTCCGTGAT	ACCTTTTATCCGTTGAGCGACA
17	c153211.graph_c3	/	CGAAGTTACGGGGGCATTTT	ACGATGCGGATAAAAAGTGG
18	c83315.graph_c0	<i>CD59</i>	ACAGAAGTCCGTCTAAATGATG	GATTCAACTTCCCTCCATTCAT
19	c133534.graph_c0	<i>RPS29</i>	ATCGCTTGAGTTCAGGGG	GGGTCTCGCTGTATCGCTCA
20	c146956.graph_c0	<i>Pou12</i>	GAGGCGGATGAGAGAATGCT	TTACGACAATACGGGGAGGG
21	c149202.graph_c0	<i>VMO</i>	AGCCTGAGCCTTTGAAGAGACT	TCTGTCCGAGTGGAACATACGC
22	c144939.graph_c0	<i>Ca7</i>	TGGTGGTGGAGTTCACGGAC	TCCAATGAACCAGATGAAGC
23	c132866.graph_c0	<i>LIS1</i>	CGGCTCCGTATGTCGTCA	GGTGGGTGAGAACCGTGG
24	c139229.graph_c0	<i>natterin-3</i>	CTTTGTCACCGTAGGGGTAATG	GTTCGCCGAGCAGTAGAGCAAG
25	c163252.graph_c0	<i>MICAL</i>	CGGTTTCCTCGTCTTCTCATC	TGGAGTTGGAGTGGAGGCTTCG
		<i>β-actin</i>	GGCCTCCCTGTCTATCTTCC	TTGAGAGGTTTGGGTGGTC

注：/ 表示基因无命名
Notes: / means that the genes have no name

NP 对红鲫胚胎 74 h 的半致死浓度(LC₅₀) 为 3.2 μmol/L (表 2)。

2.2 测序数据的组装与质量分析

对照组 (NC 和 SC) 及 NP 处理组 (NNP 和 SNP) 胚胎进行 RNA-seq，原始测序数据上传至 NCBI

<https://www.china-fishery.cn>

数据库，登录号为 SRR6981193~SRR6981201，去除低质量 reads 后，获得 clean data 达 94.67 G(表 3)，各样品 clean data 均达到 7.0 G，Q30 (Q30 表示质量值 ≥30 的碱基所占百分比) 均达到 90%，CG 含量在 47%~50% 之间。

clean data 组装后共得到 89 166 条 unigene，其

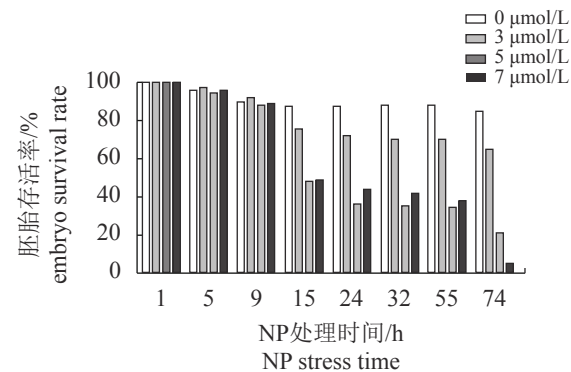


图 1 不同浓度 NP 处理 74 h 内红鲫存活率

Fig. 1 Survival rate of *C. auratus* red var. within 74 h treated with different concentrations of NP



图版 体视镜观察红鲫仔鱼

1-4 分别为 0, 3, 5, 7 μmol/L NP 处理 74 h 后红鲫仔鱼在体视镜下的图像

Plate Stereoscope observation of *C. auratus* red var. larvae

1-4. images of *C. auratus* red var. larvae under stereoscope at 74 h after 0, 3, 5 and 7 μmol/L NP treatment

表 2 不同浓度 NP 暴露下 74 h 红鲫胚胎毒性效应

Tab. 2 Toxic effects of NP-stressed *C. auratus* red var. embryos for 74 h

NP处理浓度/ (μmol/L)	畸形率/%	存活率/%	半致死浓度 LC ₅₀ /(μmol/L)
NP treatment concentration	malformation rate	survival rate	semilethal concentration
0	2.3	84.8	3.2
3	97.4	64.3	
5	100.0	21.4	
7	100.0	4.6	

中长度在 1 kb 以上的 unigene 有 28 775 条, 最大 unigene 长度为 16 402 bp (c166470.graph_c0), 最

小 unigene 长度为 201 bp (c100072.graph_c0), unigene 的 N50 (unigene 从长到短进行排列, 然后相加, 当恰好加到序列全长的 50% 时, 这一条 unigene 的长度) 为 2 247 bp(图 2 和表 4)。

2.3 差异表达基因的筛选

使用 edgeR 软件进行对照组和 NP 处理组的差异基因表达分析, FPKM 法计算基因表达水平, 将|Fold Change|≥2, FDR<0.05 的基因定义为 DEGs, 以此为标准分别获得差异表达基因集合。NC、SC、NNP 和 SNP 两两比较的 DEGs 共 13 554 个, 其中 NC/SC, NC/NNP, SC/SNP 和 NNP/SNP 中 DEGs 数量分别为 6 121、153、10 和 7 270 (表 5)。基于火山图和 MA 图对差异基因的 FDR、表达丰度和差异倍数的统计学显著性进行了可视化处理。结果发现, 在对照组, 与神经胚期相比, 红鲫胚胎 21 体节期有 4 267 条 unigene 呈现出上调趋势, 有 1 854 条 unigene 呈现出下调趋势; 与对照组相比, NP 处理下神经胚期胚胎有 38 条 unigene 呈现出上调趋势, 有 115 条 unigene 呈现出下调趋势; 与对照组相比, NP 处理下 21 体节期胚胎有 7 条 unigene 呈现出上调趋势, 有 3 条 unigene 呈现出下调趋势; 在 NP 处理组, 与神经胚期相比, 红鲫胚胎 21 体节期有 5 161 条 unigene 呈现出上调趋势, 有 2 109 条 unigene 呈现出下调趋势 (图 3)。在本次实验中, 以基因表达的 FPKM 值为参考, 对 NC、SC、NNP 和 SNP 4 组胚胎的差异表达基因做聚类分析, 从结果图颜色上可以看出 NC 和 SC、NNP 和 SNP 之间基因表达差异十分大, 这是基因在胚胎发育过程中时序表达的结果; 在 NC 和 NNP、SC 和 SNP 之间也有较多基因表达有差异, 这与 NP 处理有关 (图 4)。

2.4 差异表达基因的 GO 富集分析

所有 DEGs(13 554 个) 比对到 GO 数据库, 共有 10 0461 条 GO 注释信息。对这些信息进行 GO 分类, 发现在“分子功能”、“细胞组分”和“生物学过程”三大类中, 生物学过程 DEGs 的数量最多, 有 47 697 个 GO 注释; 细胞组分次之, 有 33 207 个 GO 注释; 分子功能最少, 有 19 557 个 GO 注释。在 GO 二级分类中分子功能中的“黏合”拥有最多的 DEGs(8 851 条), 其次是生物学过程中的“细胞过程”(8 742 条), 细胞组分中的“胶原蛋白三聚物”和“细胞区域”并列第三

表 3 样品测序数据评估统计表

Tab. 3 Sample sequencing data evaluation statistical table

样品 samples	读数数量/个 read number	碱基数量/个 base number	GC含量/% GC content	≥Q30/%
NC-1	26 901 742	8 037 462 014	48.6	90.1
NC-2	27 165 454	8 115 806 590	49.0	90.4
NC-3	23 393 678	6 990 363 052	48.5	89.7
SC-1	25 594 033	7 652 706 352	49.4	89.7
SC-2	30 471 725	9 086 340 760	49.9	90.0
SC-3	25 523 487	7 634 133 108	48.9	90.5
NNP-1	27 116 622	8 112 771 808	47.4	89.3
NNP-2	23 583 621	7 048 216 124	48.6	89.9
NNP-3	27 342 933	8 169 791 638	48.3	89.6
SNP-1	30 386 245	9 086 087 254	48.7	90.0
SNP-2	23 762 950	7 095 798 524	48.1	89.7
SNP-3	25 529 373	7 638 119 634	48.8	90.8

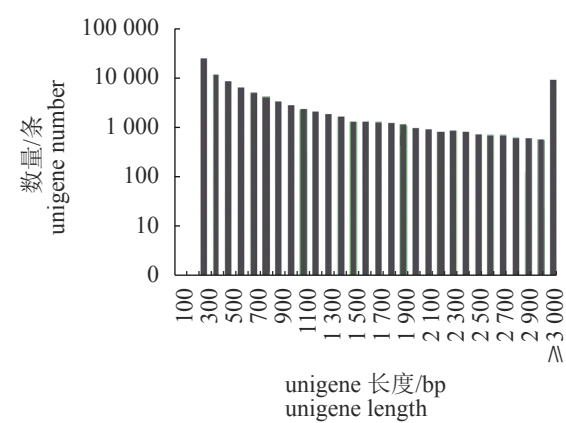


图 2 unigene 长度分布图

Fig. 2 unigene length distribution

(7284 条)。NC/SC 中 DEGs 占了总 DEGs 的 45.1%，有 2 883 条，在生物学过程中的“单一生物过程”、“细胞过程”和“生物调节”占比例较高，在细胞组分中，“细胞”、“细胞部分”所占比例较高，在分子功能中，“黏合”和“催化活性”所占比例较高(图 5-a)。NC/NNP 中 DEGs 在 GO 各二级功能中的注释情况于 NC/SC 类似，但是 NC/NNP 的 DEGs 在“激素分泌”中有注释，NC/SC 则无(图 5-b)。在 NC/SC 中，生物学过程的“细胞聚集”、细胞组分中的“病毒体”和“细胞外基质”以及分子功能中“甲脒基核苷酸交换系数”等功能中出现 DEGs，

在 NC/NNP 中没有，可能与 NC/NNP 中 DEGs 只有 78 条，仅占总 DEGs 的 1.2% 有关。在 SC/SNP 中只有 1 个 DEGs 得到了注释，与生物学过程的“定位”、细胞组分中的“胞外区”、分子功能的“黏合”以及“转运活性”有关(图 6-a)。NNP/SNP 中的 DEGs 最多，占了总 DEGs 的 53.6%，共有 3 417 条，其 DEGs 在 GO 各二级功能中的注释情况与 NC/SC 基本一致(图 6-b)。

2.5 KEGG 代谢通路显著性富集分析

通过 KEGG 代谢通路富集分析，可以揭示 DEGs 参与的主要生理活动途径，KEGG 代谢通路将差异基因富集到 6 大类一级通路中，分别为“细胞过程”、“环境信息处理”、“遗传信息处理”、“人类疾病”、“新陈代谢”和“有机系统”。NC/SC(图 7)中有 2 408 个 DEGs 在 KEGG 数据库中得到注释，参与 50 条二级分支代谢体系，其中一级通路细胞过程中的“黏着斑”、“调节肌动蛋白细胞骨架”和环境信息处理过程中的“MAPK 信号通路”占据该二级通路的前三位，DEGs 数量分别为 140、79 和 91，占 DEGs 总数的 5.8%、3.2% 和 3.7%。此外，在“ECM-受体相互作用”、“钙信号通路”、“胞吞作用”、“心肌细胞中的肾上腺素能信号传导”等途径也富集了一定数量的 DEGs。

表 4 组装结果统计表

Tab. 4 Assembly results statistics

序列种类 sequence types	200~300 bp/个	300~500 bp/个	500~1 000 bp/个	1 000~2 000 bp/个	≥2 000 bp/个	总长度/bp total length	N50长度/bp N50 length	平均长度/bp mean length
转录本 transcripts	25 916	26 515	39 429	44 641	55 184	304 122 107	2 619	1 586.5
单基因 unigenes	22 595	18 084	19 712	13 880	14 895	100 612 599	2 247	1 128.3

表 5 差异表达基因数量统计表

Tab. 5 Statistical table of differentially expressed genes

DEG组 DEG set	所有DEG数量/个 all DEGs	上调数量/个 up-regulated	下调数量/个 down-regulated
NC/SC	6 121	4 267	1 854
NC/NNP	153	38	115
SC/SNP	10	7	3
NNP/SNP	7 270	5 161	2 109

NC/NNP(图 8) 中有 61 个 DEGs 得到注释, 其中一级通路细胞过程中的“黏着斑”、环境信息处理过程中的“TGF-β 信号通路”、“细胞黏附分子 (CAMs)”和“ECM-受体相互作用”占比例较大, DEGs 数量分别为 4、3、3 和 3, 占 DEGs 总数的 6.5%、4.9%、4.9% 和 4.9%。SC/SNP 中 DEGs 未得到注释, 可能是 SC/SNP 中 DEGs 较少的原因。NNP/SNP(图 9) 中有 2 829 个 DEGs 得到注释, 与 NC/SC 相似, DEGs 在一级通路细胞过程中的“黏着斑”、“调节肌动蛋白细胞骨架”和环境信息处理过程中的“MAPK 信号通路”中所占比例较大, DEGs 数量分别为 149、86 和 98, 占 DEGs 总数的 5.2%、3.0% 和 3.4%。此外, 在“紧密连接”、“Wnt 信号通路”、“胰岛素信号通路”、“嘌呤代谢”等途径也富集了一定数量的 DEGs。

2.6 qRT-PCR 验证 RNA-seq 结果

从 NC/SC、NC/NNP、SC/SNP 和 NNP/SNP 转录组数据中挑选 25 个基因, qRT-PCR 检测 25 个基因的表达情况。25 个 DEGs 包括 3 个部分: 第 1 部分为基因 1~9, 只在 NC/SC(1~4) 或者 NNP/SNP (5~9) 中差异表达 (图 10-a), 这 9 个基因的 qRT-PCR 结果与 RNA-seq 结果一致 (图 10-b); 第 2 部分为基因 10~17, RNA-seq 中这 8 个基因在 SC/SNP 中差异表达 (图 11-a), qRT-PCR 结果与 RNA-seq 结果一致 (图 11-b); 第 3 部分为基因 18~25, 它们在 NC/NNP 中差异表达 (图 12-a), 它们的表达在 qRT-PCR 和 RNA-seq 中一致 (图 12-b), (图 10~

图 12 中出现的基因编号 1~25 分别对应表 1 中的基因编号 1~25)。

3 讨论

本研究建立了 NP 处理组 (3、5 和 7 μmol/L) 和对照组, 观察记录不同浓度 NP 处理下红鲫胚胎发育形态及存活率, 结合发育状况、LC₅₀ 和存活率, 选取 5 μmol/L NP 处理下发育至神经胚期和 21 体节期的胚胎进行 RNA-seq, 对差异表达基因进行 qRT-PCR 验证。实验表明, NP 处理组的红鲫胚胎发育异常, 具体表现包括脊柱弯曲, 尾部畸形, 心包异常和血栓形成, 这表明 NP 可能影响其脊椎发育和心血管循环。RNA-seq 获得了 89 166 个高质量的 unigenes, NC/SC 中有 6121 个 DEGs, NC/NNP 中有 153 个 DEGs, SC/SNP 中有 10 个 DEGs, NNP/SNP 中有 7 270 个 DEGs。NC/SC 和 NNP/SNP 中 DEGs 数量极大, 这可能与基因的时序表达有关; NC/NNP 中 DEGs 数量多于 SC/SNP, 说明 NP 对神经胚期 (13 hpf) 影响较大, 体节期 (26 hpf) 影响较小。RNA-seq 结果与胚胎毒性实验结果相吻合, 红鲫胚胎暴露于 NP 溶液后 9~15 h, 胚胎存活率大幅度降低, 而暴露于 NP 溶液 24~32 h 胚胎存活率变化不大, 这说明红鲫胚胎在 NP 胁迫 9~15 h 所受影响大于其在 NP 胁迫 24~32 h 时所受影响, 有更多差异表达基因。在 NP 对玫瑰无须鲃胚胎的毒性实验中^[5], 也出现了相似的结果, 5 μmol/L NP 处理玫

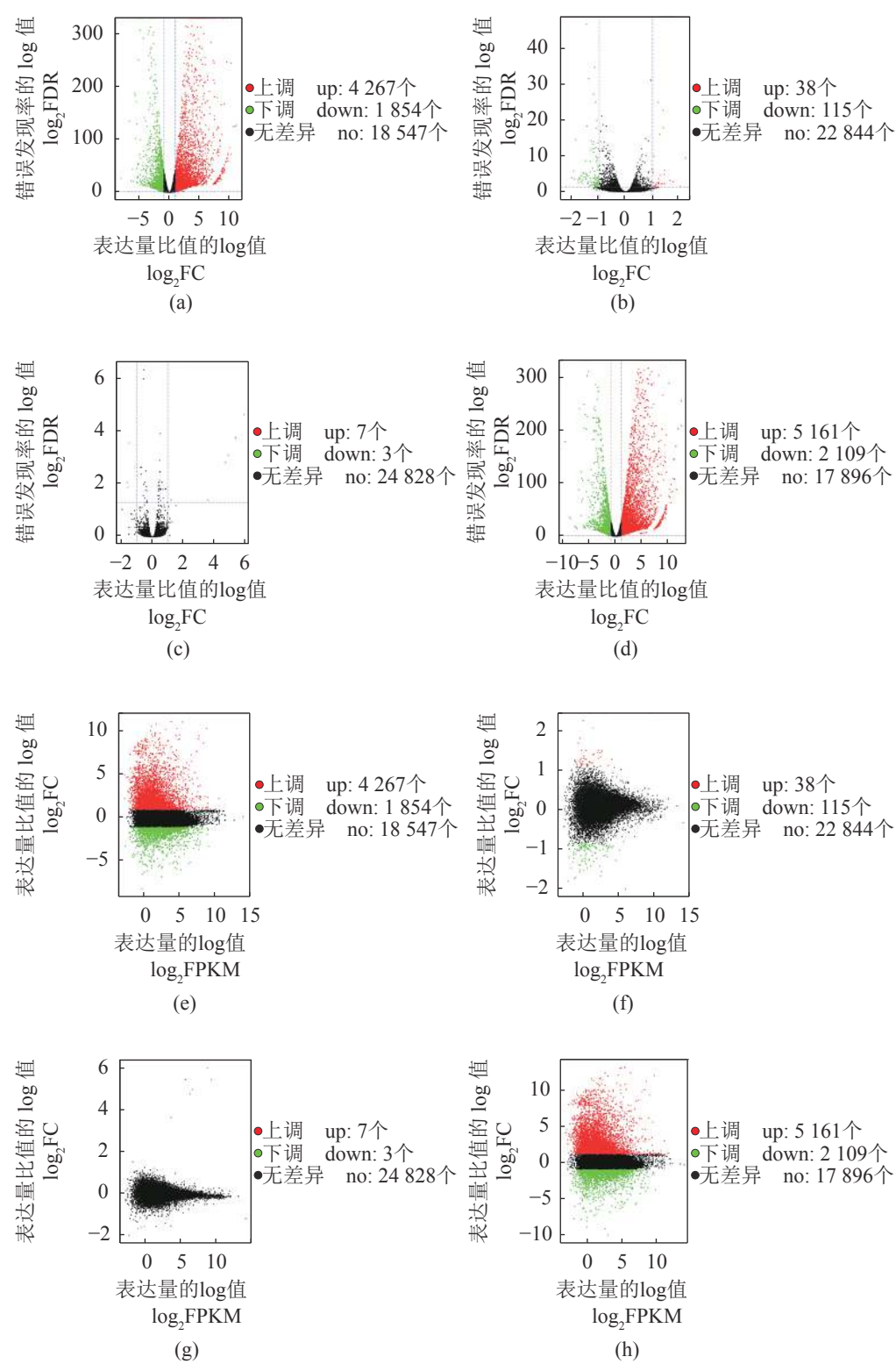


图3 各组间差异基因火山图及MA图

(a)~(d) 分别为 NC/SC、NC/NNP、SC/SNP 以及 NNP/SNP 的差异基因表达火山图；(e)~(h) 分别为 NC/SC、NC/NNP、SC/SNP 以及 NNP/SNP 的差异基因表达 MA 图

Fig. 3 The volcano and MA plots associated with DEGs

(a)~(d). volcano plots of differentially expressed genes among NC/SC, NC/NNP, SC/SNP and NNP/SNP, respectively; (e)~(h). MA plots of differentially expressed genes among NC/SC, NC/NNP, SC/SNP and NNP/SNP, respectively

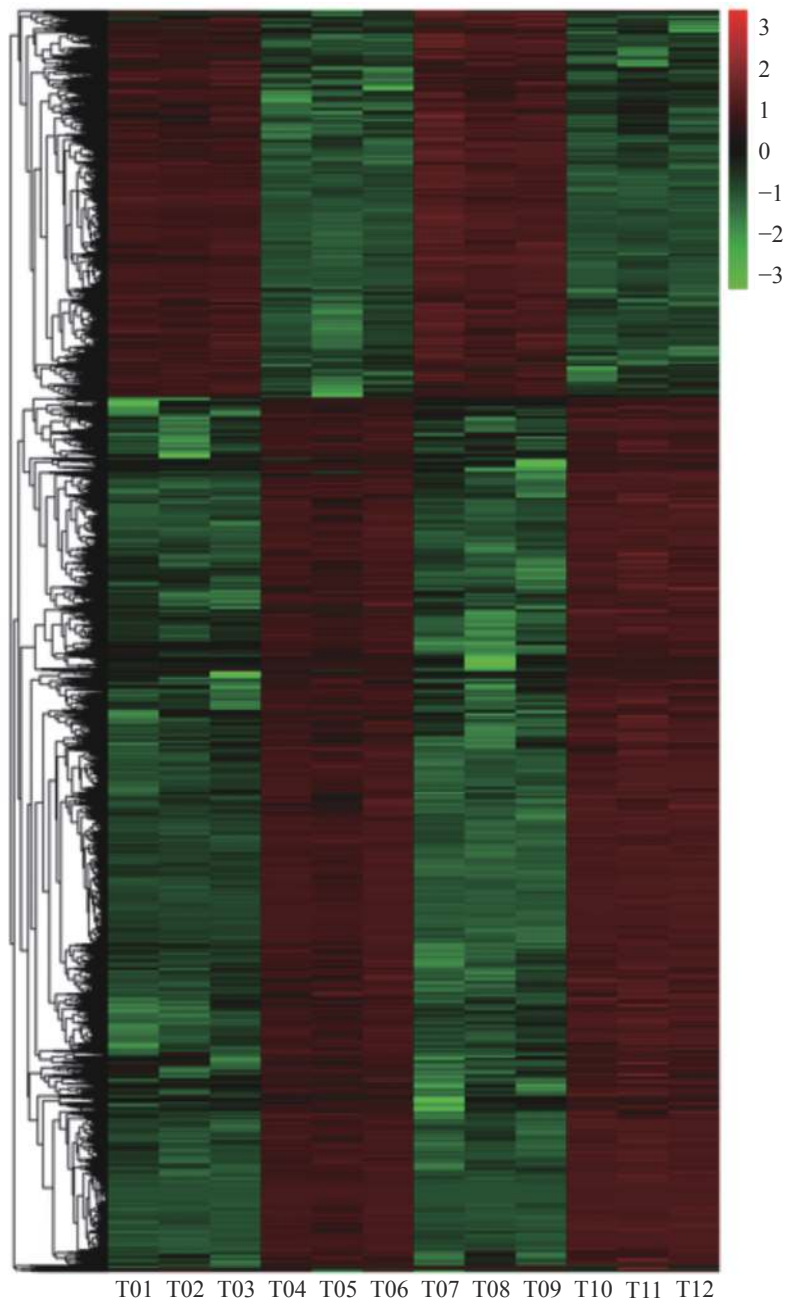


图 4 差异表达基因聚类热图

横向为样品聚类，纵向为基因聚类；不同颜色代表相对表达量，红色表示表达量高，绿色表达表达量低；T01~T03 为 NC，T04~T06 为 SC，T07~T09 为 NNP，T10~T12 为 SNP

Fig. 4 Cluster heat map of differentially expressed genes

Horizontal clusters are sample clusters and vertical clusters are gene clusters; different colors represent relative expression levels, red indicates high expression levels and green indicates low levels; T01-T03 represent NC T04-T06 represent SC, T07-T09 represent NNP, and T10-T12 represent SNP

瑰无须鲃胚胎，12~20 h 时胚胎存活率下降了 10%，而 20~26 h 时胚胎存活率只下降了 5%，说明 NP 胁迫对玫瑰无须鲃早期发育影响更大。

从 NC、SC、NNP 和 SNP 中挑选出两两比较的 DEGs，qRT-PCR 对选择的 25 个基因进行验证，结果与 RNA-Seq 结果一致，表明 RNA-seq

结果可靠。25 个 DEGs 中 *TET2*(基因 1)、*Frmpd1*(基因 2)、*Gfra2*(基因 3)、*cadherin*(基因 4)、*GATA1*(基因 5)、*SNAP-25*(基因 6)、*mGluR7*(基因 7)、*β-dystrobrevin*(基因 8)、*MCM6*(基因 9)、*ApoD*(基因 10)、*CD59*(基因 18)、*RPS29*(基因 19)、*Pou12*(基因 20)、*VMO*(基因 21)、*Ca7*(基因 22)、*LIS1*(基因

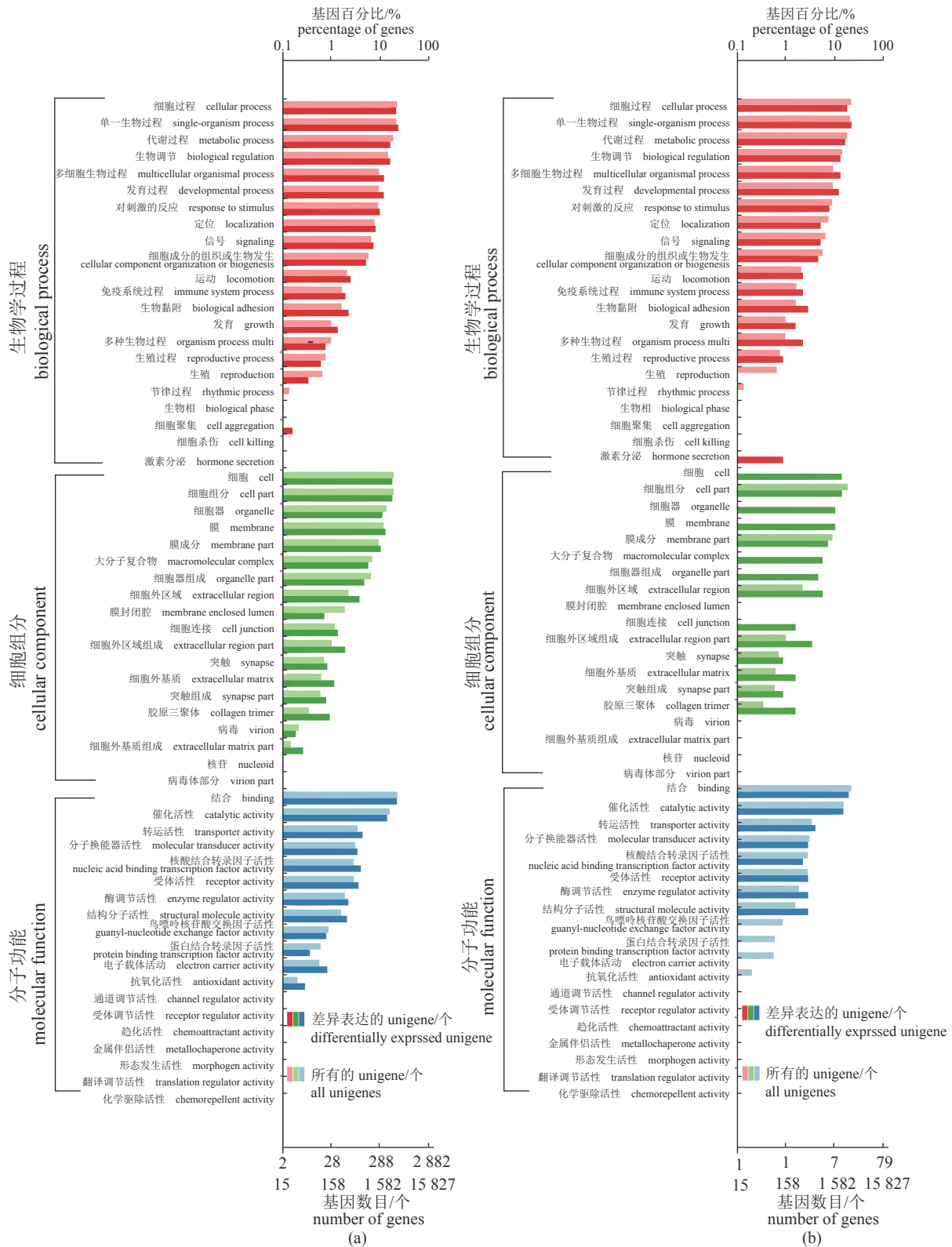


图5 不同处理组间差异基因的GO注释图

(a) NC与SC的差异基因GO注释图; (b) NC与NNP的差异基因GO注释图; 横坐标轴上第1排数字表示差异表达基因个数, 第2排数字表示所有基因个数; 下同

Fig. 5 GO annotation map associated with DEGs

(a) GO annotation map of differential genes between NC and SC; (b) GO annotation map of differential genes between NC and NNP; the first row of numbers on the abscissa represent the number of DEGs, and the second represent the number of all genes; the same below

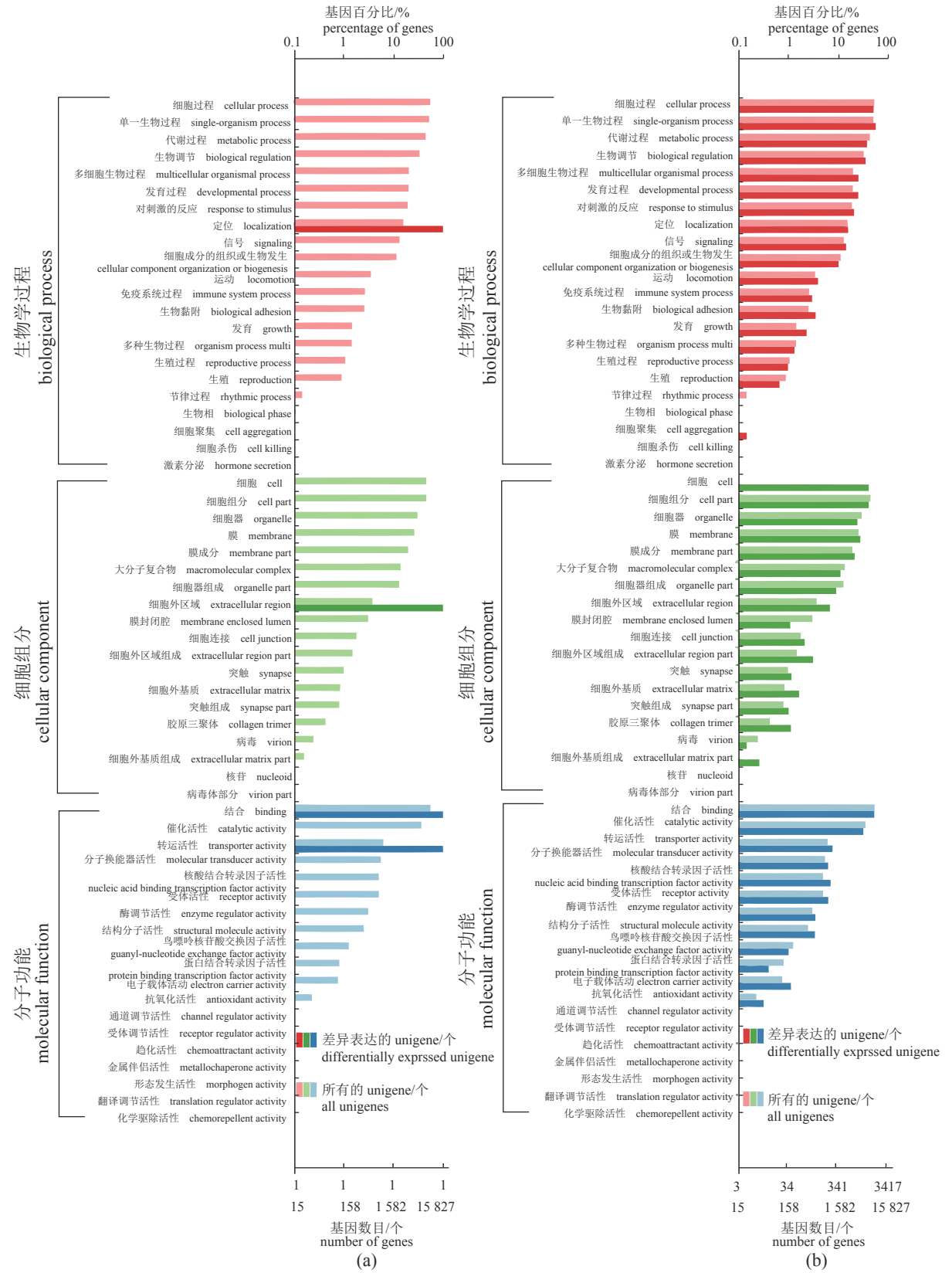


图 6 不同处理组间差异基因的 GO 注释图

(a) SC 与 SNP 的差异基因 GO 注释图; (b) NNP 与 SNP 的差异基因 GO 注释图

Fig. 6 The GO annotation map associated with DEGs

(a) GO annotation map of differential genes between SC and SNP; (b) GO annotation map of differential genes between NNP and SNP

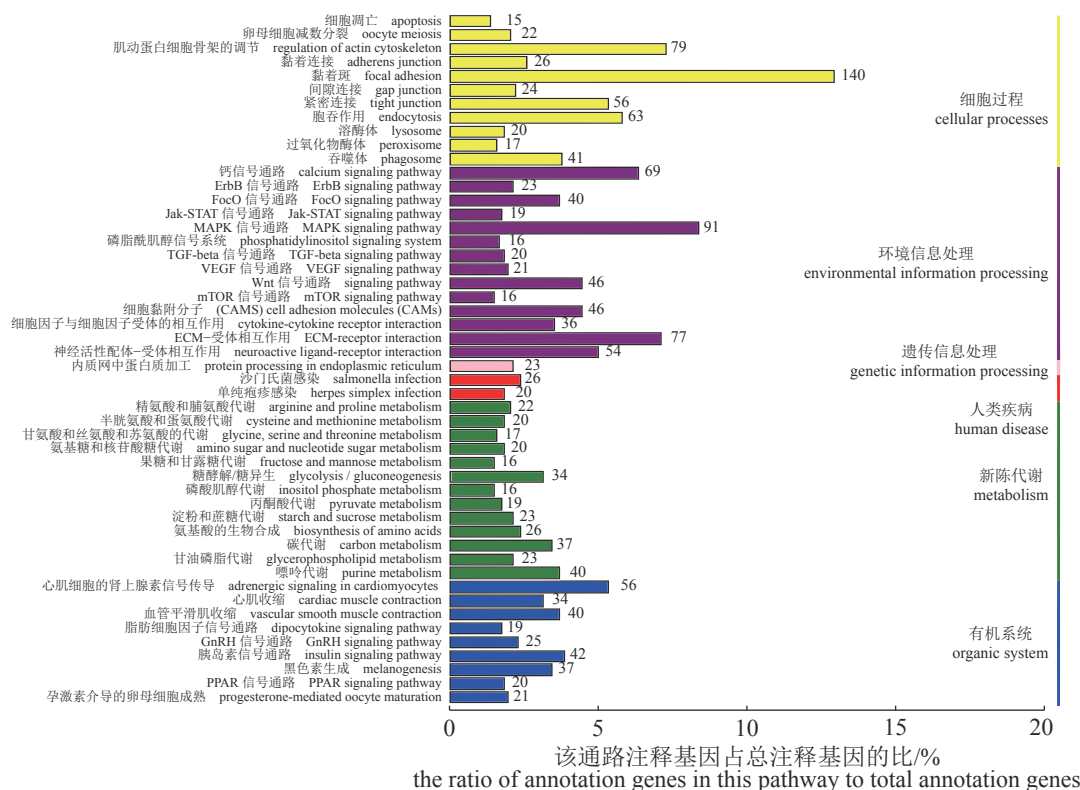


图 7 NC 与 SC 间差异基因的 KEGG 分类图

Fig. 7 KEGG classification of differential genes between NC and SC

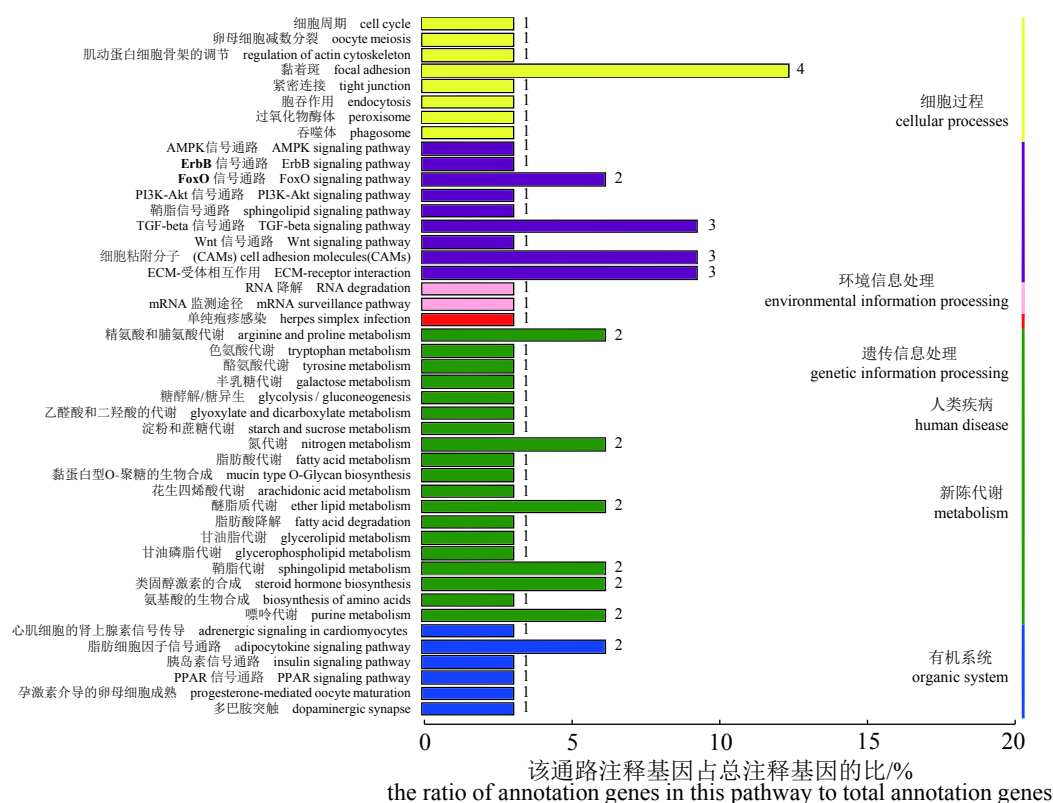


图 8 NC 与 NNP 间差异基因的 KEGG 分类图

Fig. 8 KEGG classification of differential genes between NC and NNP

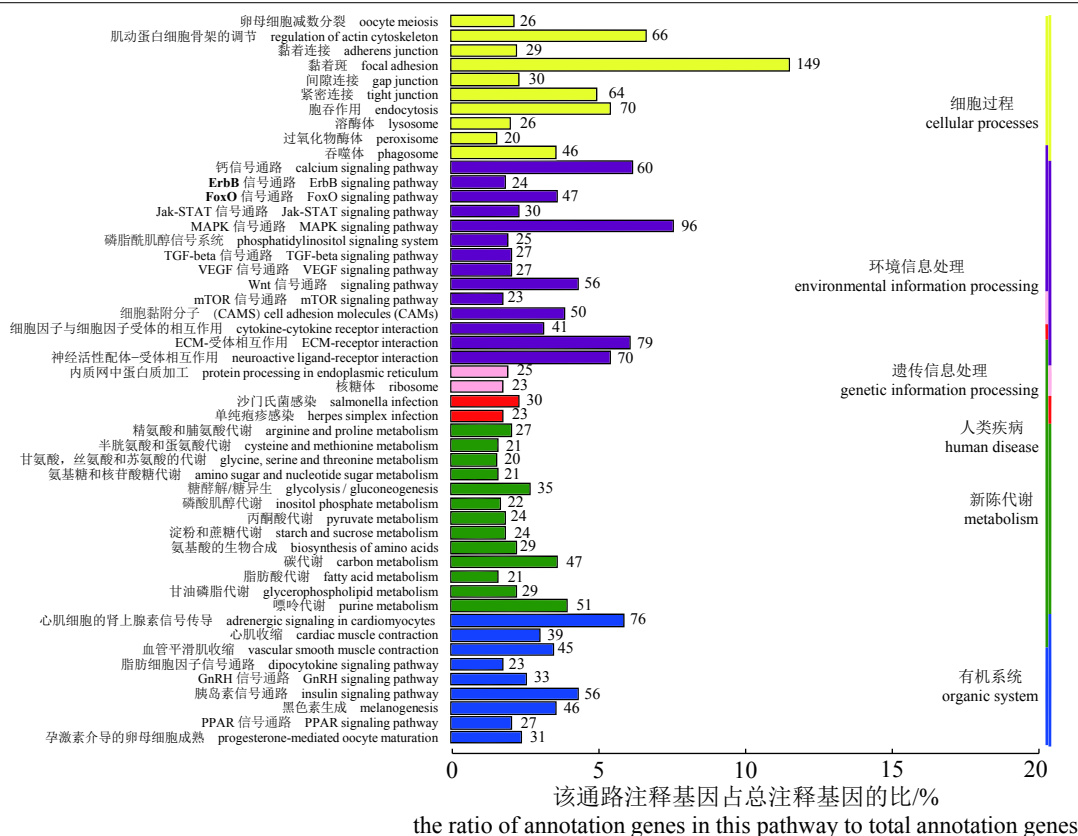


图 9 NNP 与 SNP 间差异基因的 KEGG 分类图

Fig. 9 KEGG classification of differential genes between NNP and SNP

23)、*natterin-3*(基因 24) 和 *MICAL*(基因 25), 都与生长发育及免疫反应有关。*GATA1*, *SNAP-25*, *mGluR7*, *β -dystrobrevin*, *MCM6* 这 6 个基因在正常神经胚期和 21 体节期表达相似, 在 NP 暴露的神经胚期和 21 体节期之间差异表达, NP 胁迫可能影响了这些基因的表达, 从而使 NP 暴露下的红鲫胚胎出现了多种形态学上的畸形。*TET2*、*Frmpd1*、*Gfra2* 和 *cadherin* 在正常神经胚期和 21 体节期中差异表达, 这种表达变化可能是胚胎正常发育所需要的; NP 暴露下, 这 4 个基因在神经胚期和 21 体节期中表达变化不大, 可能是 NP 胁迫影响了这部分基因的表达模式, 造成胚胎了异常发育。*ApoD* 是一种脂质运载蛋白, 其功能的缺失会增加氧化应激的敏感性和脑脂质过氧化水平, 损害运动和学习能力; 过表达会产生相反的作用, 增加存活并阻止氧化剂处理后脑脂质过氧化物的升高^[32]。在 SC/SNP 中 *ApoD* 差异表达; NP 暴露下, 21 体节期胚胎中 *ApoD* 表达量增大, 可能是机体在外界胁迫下为细胞提供的一种保护防御机制。*natterin-3* 和 *MICAL*

是 NC/NNP 中的 DEGs, *Natterins* 是炎症反应白细胞与内皮细胞相互作用的有效抑制剂^[33]。*MICAL* 家族参与细胞骨架动力学控制及其相关生物过程, 如细胞分化和迁移, 神经肌肉接头的形成, 血管生成等, *MICAL* 过表达与多种疾病有关^[34]。NC/NNP 中 *natterin-3* 表达量下降, 可能是机体受到 NP 胁迫后免疫系统发生了免疫应答; *MICAL* 表达量上升, 可能会影响 *MICAL* 参与的细胞骨架动力学控制过程。

KEGG 分析显示, 注释基因主要富集在细胞过程、环境信息处理和新陈代谢, 其中细胞过程中“黏着斑”通路中的基因数量最多。黏着斑参与调节细胞生长或者死亡、细胞运动、细胞骨架重建和基因表达的变化, 将细胞嵌合在正确的位置上, 从而保持细胞的正常结构和发挥其正常功能^[35-37]。NC/SC 中的 DEGs 有 140 个注释到“黏着斑”通路中, SC/SNP 中有 149 个, 比 NC/SC 多 9 个; NC/NNP 中有 4 个 DEGs 注释到“黏着斑”通路中, NP 胁迫可能影响了胚胎发育过程中细胞骨架的构建, 导致其发育畸形。NC/NNP 中的

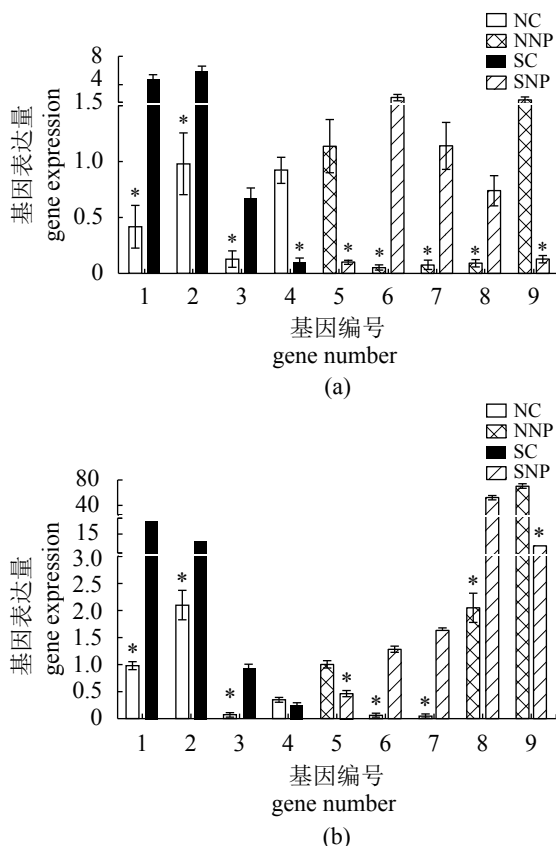


图 10 基因 1~9 在 RNA-seq 和 qRT-PCR 的表达

(a) 基因的 RPKM 值; (b) 基因在 qRT-PCR 中的表达, 表达量的值为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 以 NC 中基因 1 的表达为基准 (1.0); 其中, 1~4 为 NC/SC 中差异表达, 而 NNP/SNP 中表达相似; 5~9 为 NNP/SNP 中差异表达, 而 NC/SC 中不差异表达; *. 表示显著性差异; 图中基因编号与表 1 一致; 下同

Fig. 10 Expression of genes 1-9 in RNA-seq and qRT-PCR

(a) RPKM value of the gene, (b) expression of the gene in qRT-PCR, the expression value is $2^{-\Delta\Delta C_t}$, based on the expression of gene 1 in NC (1.0). 1-4 is differentially expressed in NC/SC, while expression was similar in NNP/SNP; 5-9 is differentially expressed in NNP/SNP, while NC/SC is not differentially expressed; *. indicates significant difference; the gene number in the figure is consistent with table 1; the same below

DEGs 在“TGF- β 信号通路”、“细胞黏附分子 (CAMs)”和“ECM-受体相互作用”也有较多的注释。转化生长因子- β (TGF- β) 信号通路在多种细胞过程中起重要作用, 包括细胞生长、分化、黏附、迁移、细胞凋亡及细胞外基质形成和免疫抑制^[38]。研究表明, TGF- β 是纤维化疾病 (主要发生器官包括心血管系统、眼睛、神经系统和骨骼等) 中成纤维细胞活化的关键调节因子^[39], TGF- β 表达和信号转导失常会导致骨骼发育和血管生长异常^[40-41]。NC/NNP 中的 DEGs 在“TGF- β

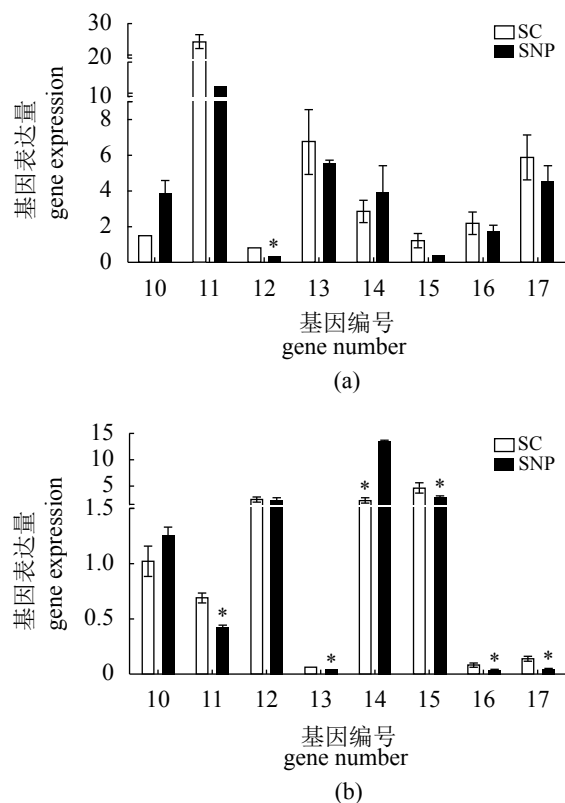


图 11 基因 10~17 在 RNA-seq 和 qRT-PCR 的表达

(a) 基因的 RPKM 值, (b) 基因在 qRT-PCR 中的表达, 表达量的值为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 以 SC 中基因 10 的表达为基准 (1.0); 10~17 为 SC/SNP 中差异表达的基因; *. 表示显著性差异

Fig. 11 Expression of genes 10-17 in RNA-seq and qRT-PCR

(a) RPKM value of the gene, (b) expression of the gene in qRT-PCR, the expression value is $2^{-\Delta\Delta C_t}$, based on the expression of gene 10 in SC (1.0); 10-17 is a differentially expressed gene in SC/SNP; *. indicates significant difference

信号通路”得到注释, 表示在 NP 胁迫下“TGF- β 信号通路”出现了异常表达, 这可能与胚胎发育畸形有关。CAMs 参与细胞的识别、活化、增殖、分化、伸展与移动, 是免疫应答、炎症发生、凝血等一系列重要生理和病理过程的分子基础^[42]。NC/NNP 中 CAMs 通路基因的差异表达可能是红鲫胚胎在 NP 胁迫下发生了免疫应答和炎症反应。ECM 是由细胞分泌到细胞外间质中的大分子物质, 具有重要的生物学作用, 能够影响细胞的存活、死亡、控制细胞分化、参与细胞增殖与迁移^[43]。ECM 通路异常会引起结缔组织病 (皮肤病、成骨不全症、遗传性多发性外生骨疣、假性软骨发育不全等), 器官系统相关病症 (血管发育不全、纤维化) 以及癌症等^[44]。NC/NNP 中的

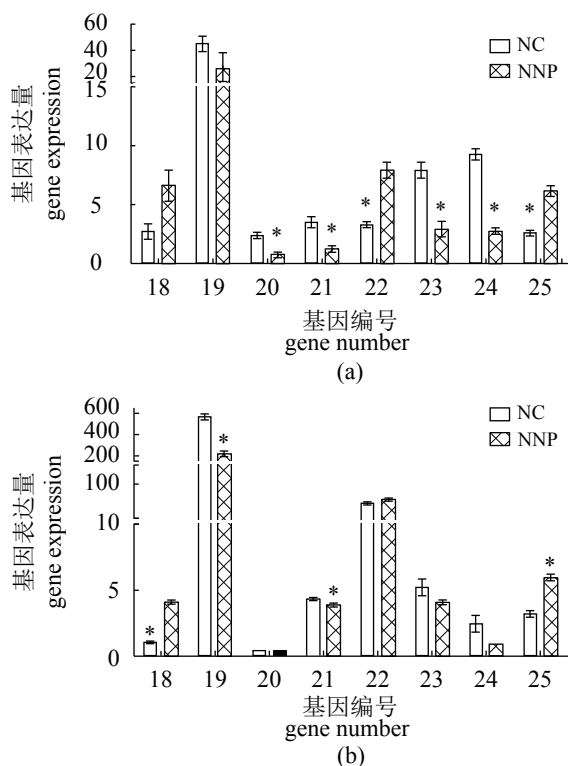


图 12 基因 18~25 在 RNA-seq 和 qRT-PCR 的表达
(a) 基因的 RPKM 值, (b) 基因在 qRT-PCR 中的表达, 表达量的值为 $2^{-\Delta\Delta C_T}$, 以 NC 中基因 18 的表达为基准 (1.0); 18~25 为 NC/NNP 中差异表达的基因; * 表示显著性差异

Fig. 12 Expression of genes 18-25 in RNA-seq and qRT-PCR

(a) RPKM value of the gene, (b) expression of the gene in qRT-PCR, the expression value is $2^{-\Delta\Delta C_T}$, based on the expression of gene 18 in NC (1.0). 18-25 is a differentially expressed gene in NC/NNP; * indicates significant difference

DEGs 注释到“ECM-受体相互作用”信号通路中, 说明在 NP 处理可能影响了 ECM 及其受体的表达, 导致了胚胎发育畸形。

4 结论

NP 胁迫影响红鲫胚胎发育, 出现脊柱弯曲、尾部畸形、心包异常和血栓等形态学畸形。5 $\mu\text{mol/L}$ NP 处理和正常发育至神经胚期和 21 体节期的红鲫胚胎进行 RNA-seq, 结合生物信息学分析和文献阅读, 利用 qRT-PCR 对其中 25 个 DEGs 进行验证, qRT-PCR 和 RNA-seq 结果一致, 说明 RNA-seq 结果可靠。25 个 DEGs 大部分与生长、发育、细胞骨架及心血管循环相关, NP 暴露影响了这些基因的表达变化, 可能导致胚胎发育畸形。NP 胁迫下 DEGs 的 KEGG 通路富集分析发现, 大量 DEGs 在“黏着斑”、“TGF- β 信

号通路”、“细胞黏附分子 (CAMs)”和“ECM-受体相互作用”高度富集。本研究通过转录组表达谱分析挖掘了 NP 胁迫下影响红鲫胚胎发育的候选基因, 并初步阐述了 NP 胁迫影响发育的信号通路, 对于后续深入探讨 NP 影响红鲫胚胎发育畸形的分子机制研究提供了前期数据基础。

参考文献 (References):

- [1] Sjöström Å E, Collins C D, Smith S R, *et al.* Degradation and plant uptake of nonylphenol (NP) and nonylphenol-12-ethoxylate (NP₁₂EO) in four contrasting agricultural soils[J]. *Environmental Pollution*, 2008, 156(3): 1284-1289.
- [2] Bai N L, Wang S, Abuduaini R, *et al.* Isolation and characterization of *Sphingomonas* sp. Y2 capable of high-efficiency degradation of nonylphenol polyethoxylates in wastewater[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(12): 12019-12029.
- [3] 时国庆, 李栋, 卢晓坤, 等. 环境内分泌干扰物的健康影响与作用机制[J]. *环境化学*, 2011, 30(1): 211-223.
Shi G Q, Li D, Lu X K, *et al.* The health effects and related mechanism of environmental endocrine disruptors[J]. *Environmental Chemistry*, 2011, 30(1): 211-223(in Chinese).
- [4] 俞捷, 吴芹, 张镠, 等. 壬基酚对机体的毒性影响及其机制[J]. *环境卫生学杂志*, 2013, 3(3): 268-272.
Yu J, Wu Q, Zhang B, *et al.* Toxic effects of nonylphenol on the organisms and its mechanism[J]. *Journal of Environmental Hygiene*, 2013, 3(3): 268-272(in Chinese).
- [5] 肖勤, 许玉艳. 壬基酚对玫瑰无须鲃(*Puntius conchonius*) 胚胎发育的影响[J]. *安全与环境学报*, 2010, 10(6): 9-12.
Xiao Q, Xu Y Y. On the effects of nonylphenol on the embryonic development of *Puntius conchonius*[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2010, 10(6): 9-12(in Chinese).
- [6] Lukac N, Lukacova J, Pinto B, *et al.* The effect of nonylphenol on the motility and viability of bovine spermatozoa *in vitro*[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2013, 48(8): 973-979.
- [7] Tanaka J N, Grizzle J M. Effects of nonylphenol on the gonadal differentiation of the hermaphroditic fish, *Rivulus*

- lus marmoratus*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 57(3): 117-125.
- [8] Kwak H I, Bae M O, Lee M H, *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.
- [9] Kawana R, Strüssmann C A, Hashimoto S. Effect of p-Nonylphenol on sperm motility in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2003, 28(1-4): 213-214.
- [10] Nice H E. Sperm motility in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) is affected by nonylphenol[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, 50(12): 1668-1674.
- [11] 张慧, 姜锦林, 张宇峰, 等. 4-壬基酚对斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎/仔鱼的毒性效应[J]. *生态与农村环境学报*, 2017, 33(8): 737-742.
- Zhang H, Jiang J L, Zhang Y F, *et al.* Toxic effects of 4-nonyl phenol on zebrafish (*Danio rerio*) embryo/larva[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2017, 33(8): 737-742(in Chinese).
- [12] 张琼宇, 孙远东, 王中军, 等. 壬基酚对金鱼(*Carassius auratus*)胚胎发育毒性的初步研究[J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(16): 3040-3043.
- Zhang Q Y, Sun Y D, Wang Z J, *et al.* Toxic effects of nonylphenol on the embryonic development of goldfish (*Carassius auratus*)[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16(16): 3040-3043(in Chinese).
- [13] Hrdlickova R, Toloue M, Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 2017, 8(1): e1364.
- [14] 邓素贞, 韩兆方, 陈小明, 等. 大黄鱼高温适应的转录组学分析[J]. *水产学报*, 2018, 42(11): 1673-1683.
- Deng S Z, Han Z F, Cheng X M, *et al.* Transcriptome analysis of high-temperature adaptation in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(11): 1673-1683(in Chinese).
- [15] 姜宇, 阎一林, 朱国兴, 等. 铁过载对斑马鱼成骨影响的机制[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(6): 713-717.
- Jiang Y, Yan Y L, Zhu G X, *et al.* The effect and mechanism of iron overload on zebra fish osteogenesis[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2016, 22(6): 713-717(in Chinese).
- [16] 张辉, 翟毓秀, 姚琳, 等. 栉孔扇贝在镉污染胁迫下消化盲囊组织的转录组分析[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(4): 802-810.
- Zhang H, Zhai Y X, Yao L, *et al.* Discovery of genes associated with cadmium accumulation from the digestive gland of scallop *Chlamys farreri* by using high-throughput sequencing[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(4): 802-810(in Chinese).
- [17] 吴端生. 实验红鲫标准化研究与应用的现状及展望[J]. *实验动物科学*, 2016, 33(3): 56-60.
- Wu D S. Current situation and prospect of the standardization research and application of laboratory red crucian carp[J]. *Laboratory Animal Science*, 2016, 33(3): 56-60(in Chinese).
- [18] 吕晓华, 古燕, 宋艳. 壬基酚对红鲫、草鱼和鲢鱼的毒性及组织蓄积研究[J]. *卫生研究*, 2012, 41(5): 785-789.
- Lü X H, Gu Y, Song Y. Toxicity and tissue accumulation of nonylphenol in *Carassius auratus* red variety, Grass carp and Silver carp[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2012, 41(5): 785-789(in Chinese).
- [19] Zhang Q P, Bethmann C, Worth N F, *et al.* Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery-Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity[J]. *Human Molecular Genetics*, 2007, 16(23): 2816-2833.
- [20] Chen W B, Zhang Z, Yan F F, *et al.* Identification of three selenoprotein T paralogs in goldfish (*Carassius auratus*) and expression analysis in response to environmental stressors[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 203: 65-75.
- [21] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, *et al.* Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644-652.
- [22] Liu L, Hua N, Wang B, *et al.* A brief utilization report on the Illumina HiSeq 2000 sequencer[J]. *Mycology*, 2011, 2(3): 169-191.
- [23] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [24] Langmead B, Trapnell C, Pop M, *et al.* Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(3): 25-35.

- [25] Bo L, Dewey C N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323-339.
- [26] Trapnell C, Williams B A, Pertea G, *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(5): 511-515.
- [27] Robinson M D, McCarthy D J, Smyth G K. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139-140.
- [28] Wu J M, Mao X Z, Cai T, *et al.* KOBAS server: a web-based platform for automated annotation and pathway identification[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(S2): W720-W724.
- [29] Smoot M E, Ono K, Ruscheinski J, *et al.* Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(3): 431-432.
- [30] Wang J S, Wei Y H, Li X M, *et al.* The identification of heat shock protein genes in goldfish (*Carassius auratus*) and their expression in a complex environment in Gaobeidian Lake, Beijing, China[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2007, 145(3): 350-362.
- [31] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [32] Ganfornina M D, Do Carmo A, Lora J M, *et al.* Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress[J]. *Aging Cell*, 2008, 7(4): 506-515.
- [33] Ferreira M J, Lima C, Lopes-Ferreira M. Anti-inflammatory effect of Natterins, the major toxins from the *Thalassophryne nattereri* fish venom is dependent on TLR4/MyD88/PI3K signaling pathway[J]. *Toxicon*, 2014, 87: 54-67.
- [34] Cai Y Q, Lu J P, Tang F Q. Overexpression of MICAL2, a novel tumor-promoting factor, accelerates tumor progression through regulating cell proliferation and EMT[J]. *Journal of Cancer*, 2018, 9(3): 521-527.
- [35] Maziveyi M, Dong S L, Baranwal S, *et al.* Nischarin regulates focal adhesion and Invadopodia formation in breast cancer cells[J]. *Molecular Cancer*, 2018, 17(1): 21-32.
- [36] Shen J, Cao B B, Wang Y T, *et al.* Hippo component YAP promotes focal adhesion and tumour aggressiveness via transcriptionally activating THBS1/FAK signalling in breast cancer[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2018, 37: 175-192.
- [37] Lai H L, Zhao X J, Qin Y, *et al.* FAK-ERK activation in cell/matrix adhesion induced by the loss of apolipoprotein E stimulates the malignant progression of ovarian cancer[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2018, 37(1): 32.
- [38] Ji F, Fu S J, Shen S L, *et al.* The prognostic value of combined TGF- β 1 and ELF in hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 32-43.
- [39] Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, *et al.* Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis[J]. *Nature Communications*, 2012, 3: 735-747.
- [40] Loots G G, Keller H, Leupin O, *et al.* TGF- β regulates sclerostin expression via the ECR5 enhancer[J]. *Bone*, 2012, 50(3): 663-669.
- [41] Nguyen H L, Lee Y J, Shin J, *et al.* TGF- β signaling in endothelial cells, but not neuroepithelial cells, is essential for cerebral vascular development[J]. *Laboratory Investigation*, 2011, 91(11): 1554-1563.
- [42] Cavallaro U, Dejana E. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, 12(3): 189-197.
- [43] Naba A, Clauser K R, Ding H M, *et al.* The extracellular matrix: tools and insights for the “omics” era[J]. *Matrix Biology*, 2016, 49: 10-24.
- [44] Iozzo R V, Gubbiotti M A. Extracellular matrix: the driving force of mammalian diseases[J]. *Matrix Biology*, 2018, 71-72: 1-9.

Preliminary studies on the mechanism of nonylphenol-induced malformation of *Carassius auratus* red var.

TIAN Yusu¹, SUN Yuandong^{1*}, OU Mi^{2*}, LIU Yufang¹, CUI Xiaojuan¹,
ZHOU Dinggang¹, CHE Wen'an¹, CHEN Kunci²

(1. School of Life Sciences, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China;

2. Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fishery Resources Application and Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Nonylphenol (NP) is the environmental endocrine disruptor that is widely present in water, which affects the growth and development of species. In order to explore the mechanism of nonylphenol-induced developmental malformation in red crucian carp (*Carassius auratus* red var.), red crucian carp was used as the research object, transcriptome sequencing (RNA-seq) of normal embryos in neural stage (NC), normal embryos in 21 somites stage (SC), monstrous embryos in neural stage and monstrous embryos in 21 somite stage exposed to 5 $\mu\text{mol/L}$ NP (SNP) were performed on Illumina HiSeq 2500 platform. Furthermore, differentially expressed genes (DEGs) were verified by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). A total of 89 166 high-quality unigenes were obtained from RNA-seq, of which 30 319 unigenes were annotated. Pairwise comparison among NC, SC, NNP and SNP showed that there were 153 DEGs in NC/NNP, 10 DEGs in SC/SNP, 6 121 DEGs in NC/SC and 7 270 DEGs in NNP/SCP. KEGG pathway analysis revealed that most of these above DEGs were enriched to cellular processes, environmental information processing and metabolism signal pathways. 25 DEGs related to growth, development, cytoskeleton and cardiovascular circulation were verified by qRT-PCR. Their expression changes are consistent in qRT-PCR and RNA-seq. On the one hand, this consistency indicates that the RNA-seq results are reliable, on the other hand, the candidate genes of developmental malformation caused by NP stress are preliminarily excavated, which provides prophase data for further study on the molecular mechanism of NP teratogenesis.

Key words: *Carassius auratus* red var. embryo; nonylphenol; transcriptome sequencing; qRT-PCR

Corresponding authors: SUN Yuandong. E-mail: syd@hnust.edu.cn;

OU Mi. E-mail: om1990@prfri.ac.cn

Funding projects: National Key R&D Program of China (2017YFD0200400); Hunan Provincial Department of Education Key Project (17A072); Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application and Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs