

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20190503001

吕钧惠, 王悦, 周蕾, 等. 雌二醇暴露中国青鳉原代肝细胞转录组分析[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(5): 118-127

Lv J H, Wang Y, Zhou L, et al. Transcriptome analysis of *Oryzias sinensis* primary hepatocytes under the exposure of estradiol [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(5): 118-127 (in Chinese)

雌二醇暴露中国青鳉原代肝细胞转录组分析

吕钧惠^{1,2}, 王悦², 周蕾², 范晓琳², 肖寒², 杨磊², 胥建卫^{1, #}, 张照斌^{2, *}

1. 西北农林科技大学理学院, 杨凌 712100

2. 北京大学城市与环境学院, 北京 100871

收稿日期: 2019-05-03 录用日期: 2019-06-14

摘要: 鱼类雌激素响应基因的发掘及其作为生物标记物基因的应用一直是生态毒理学的研究热点。近年来的相关研究普遍采用活体实验, 易受到动物个体差异影响, 存在一定不确定性。通过建立鱼类原代肝细胞培养方法, 利用实验室多代繁育的中国青鳉(*Oryzias sinensis*)作为实验动物, 基于新一代测序技术(NGS), 开展了不同浓度雌二醇(0.01、0.1、1、10 和 100 nmol·L⁻¹)暴露下的中国青鳉肝细胞转录组分析, 获得并注释中国青鳉表达序列标签(ESTs)65 765 条, 发现雌激素暴露后具有良好剂量效应关系的显著差异表达基因(DEG)105 个(37 个上调, 68 个下调), 其中有 9 个未知基因。GO 和 KEGG Pathway 分析发现, DEG 显著富集于雌激素的细胞响应、脂质运输、骨骼肌组织发育、钙离子运输、蛋白磷酸化等生物学过程以及钙离子信号通路和 MAPK 信号通路等。通过 RT-qPCR 对部分雌激素响应基因进行了分析验证, 结果表明 NGS 数据可靠。卵黄原蛋白(VTG)和卵壳前体蛋白(CHG)基因家族在 0.1 nmol·L⁻¹ 雌二醇浓度时均能够显著升高, *vtg2* 响应最明显。该研究提供了一个可靠的中国青鳉肝脏雌激素响应基因列表, 以及一种利用本土物种细胞离体实验开展化学物质雌激素活性测定的方法, 该方法比一些常用环境雌激素生物测试方法灵敏度更高。

关键词: 雌二醇(E₂); 中国青鳉; 原代肝细胞; 转录组分析; RT-qPCR

文章编号: 1673-5897(2020)5-118-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Transcriptome Analysis of *Oryzias sinensis* Primary Hepatocytes under the Exposure of Estradiol

Lv Junhui^{1,2}, Wang Yue², Zhou Lei², Fan Xiaolin², Xiao Han², Yang Lei², Xu Jianwei^{1, #}, Zhang Zhaobin^{2, *}

1. College of Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

2. College of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

Received 3 May 2019 accepted 14 June 2019

Abstract: The identification of estrogen-responsive genes in fishes and their uses as biomarkers in monitoring environmental estrogens in the water are of concern in ecotoxicological studies. Recently, many estrogen-responsive genes have been investigated in model fishes such as zebrafish using *in vivo* exposure experiments. Because of the

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2017YFF0211202); 政府间国际科技创新合作重点专项(2016YFE0117800); 国家自然科学基金资助项目(21777003)

第一作者: 吕钧惠(1988—), 女, 硕士, 研究方向为生物物理学, E-mail: 15829012547@163.com

*** 通讯作者 (Corresponding author),** E-mail: zhangzb@pku.edu.cn

共同通讯作者 (Co-corresponding author), E-mail: xxujianwei@nwfau.edu.cn

individual difference, there are always non-negligible errors and uncertainties during the *in vivo* studies. In this paper, we developed a method for fish primary hepatocyte culture, and studied the gene expressions in response to estradiol exposure at different concentrations (0.01, 0.1, 1, 10 and 100 nmol·L⁻¹) in primary hepatocytes of Chinese medaka (*Oryzias sinensis*) using next-generation sequencing technology (NGS). A total of 65 765 expression sequence tags (ESTs) were obtained and annotated by NGS, and 105 differentially expressed genes (DEGs) (37 up-regulated, 68 down-regulated, 9 unknown genes) were detected and show good dose-response relationship after estradiol exposure. GO and KEGG Pathway analyses showed that the DEGs were significantly enriched in the biological process of “response to estradiol”, “lipid transport”, “skeletal muscle tissue development”, “calcium ion transport”, “protein phosphorylation”, etc., and KEGG pathways of “ubiquitin mediated proteolysis”, “MAPK signaling pathway”, etc. Analyses of some DEGs by RT-qPCR confirmed the expression results of NGS. The expressions of vitellogenin (VTG) genes and choriogenin (CHG) genes were found to be significantly increased at concentration of 0.1 nmol·L⁻¹ estradiol and higher, and the expression of *vtg2* was the largest increased. This study provides a reliable list of estrogen-responsive genes in liver of Chinese medaka and a method for measuring the estrogenic activity of chemicals *in vitro* using native species. The method is more sensitive than some traditional bioassays.

Keywords: estradiol (E₂); *Oryzias sinensis*; primary hepatocytes; transcriptome analysis; RT-qPCR

环境雌激素(EEs)是水环境中最受关注的内分泌干扰物质类型^[1-4]。研究表明,暴露在EEs污染的环境中,鱼类会出现雄性生殖能力下降、雌雄同体、雄性逆转为雌性和性激素水平异常等问题,进而造成鱼类种群的繁殖能力下降,种群数量减少,甚至灭绝^[5-7]。卵黄原蛋白(vitellogenin, VTG)和卵壳前体蛋白(choriogenin, CHG)是鱼类等卵生动物卵巢发育过程中需要的2类蛋白质,正常情况下,雌性个体中,2类蛋白质在内源雌激素刺激下在肝脏合成后运输至卵巢。鱼类幼体和雄性中VTG和CHG基因通常不表达或表达量极低,但是在环境雌激素作用下幼鱼和雄鱼中VTG和CHG基因也会大量表达^[8-9],因此,VTG和CHG基因被开发为生物标记物(biomarker),广泛应用于化学物质雌激素活性的评估。近年来,随着新一代测序技术(NGS)的成熟,人们开始用其研究鱼类其他雌激素响应基因,以期阐明环境雌激素影响鱼类生殖发育的分子机理,同时也希望找到更多可以利用的生物标记物基因。Kausch等^[10]发现斑马鱼肝脏中有211个雌激素响应基因。在环境雌激素的生态毒理学研究中,国内外常用斑马鱼和日本青鳉等^[11-13]作为模式生物,我国的一些学者也采用本土物种稀有鮎鲫开展研究^[14-16]。国际通用的模式生物的优势在于其生物学信息较全面,包括基因组、转录组和基因功能等已有大量基础研究,数据信息可以在现存常规数据库中调阅,如斑马鱼模式物种数据库 ZFIN (Zebrafish Model Organism Database)和基因组注释数据库 En-

sembl、Vega 和 UCSC Genome Browser^[17];而本土物种材料易得,甚至可以直接从环境水体中获得,且不存在外来物种入侵风险。近年来 NGS 的迅速发展,使得一个独立课题组也能够开展一个物种的基因组和转录组分析,能够较容易地分析本地物种的基因组和转录组。在本研究中,选择在中国南北方均广泛分布的中国青鳉作为实验动物,通过实验室多代驯化培育,获得了实验室内稳定传代的野生型实验品系。利用 NGS 和生物信息学软件,对其肝脏转录组进行分析。

在开展环境雌激素的鱼类毒理学研究中,通常采用活体暴露方式,其优点在于暴露方式与现实环境暴露形式相同。但是在机理性研究时,往往由于实验动物的个体差异,造成一些误差和不确切的结果。因此,建立和采用鱼类细胞培养方法,利用离体细胞开展机理研究更为理想^[18-21]。为此,以中国青鳉肝细胞为实验对象,经不同浓度的 17 β -雌二醇(E₂)暴露后,利用 NGS 获得转录本后筛选雌激素响应基因,并通过 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析,揭示肝脏雌激素响应基因的功能和通道;然后利用 RT-qPCR 方法,验证 NGS 结果并建立雌激素响应基因与 E₂ 浓度的关系,以期建立有效的环境雌激素生物检测方法。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

实验动物为雄性中国青鳉(*Oryzias sinensis*),取自本实验室繁育的4月龄个体,体长2.8~3.5 cm,

体重 0.2 ~ 0.28 g。该实验品系最初采自北京市海淀公园湖泊,目前在本实验室已繁育>3 a,繁育代数超过 6 代。养殖条件:采用活性炭处理的自来水,水温 (25±1) ℃,水硬度 8.0 mg·L⁻¹,pH 7.5 ~ 7.8,溶解氧 8.0 ~ 9.0 mg·L⁻¹,光照周期昼夜比为 16 h:8 h,饲料为新孵化丰年虾,每日喂食 2 次。

E₂ 纯度>98%,购于美国 Sigma 公司;DMEM 高糖培养基和青链霉素溶液购自美国 Gibco 公司;胎牛血清(FBS)购自以色列 BI 公司;0.28% 胰蛋白酶-EDTA 溶液和生理盐水(两栖动物专用,无菌)购自中国 Leagene 公司;二甲基亚砜(DMSO)分析纯,购自美国 VWR 公司;RNA 提取试剂 Trizol 和实时定量 PCR 试剂 SYBR[®] Green PCR Master Mix 购自美国 Life Technologies 公司;M-MLV 反转录酶、M-MLV-RT 缓冲液、dNTP Mix、Oligo(dT)15 Primer 和 RNA 酶抑制剂购自美国 Promega 公司;35 mm 培养皿、6 孔培养板购自美国 Costar 公司;96 孔光学 PCR 板和光学透明塑料盖膜购自美国 Axygen 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 中国青鳉原代肝细胞采集

将鱼置于冰上麻醉,用 1% 的次氯酸钠和 75% 的酒精对鱼体表消毒,解剖取肝脏组织,置于生理盐水(两栖动物专用,无菌)中;肝脏经多次洗涤后转移至培养皿中,剪刀剪碎后用胰酶消化 2 ~ 3 min 至组织块松散,去掉胰酶,加入完全培养基(15% FBS+80% DMEM+5% H₂O+0.1% 青链霉素)终止反应;用 150 目滤网过滤,将滤液置于 15 mL 离心管,1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,收集肝细胞弃上清;用培养基悬浮细胞,计数细胞密度,采用台盼兰染色法评估细胞活力达到 90% 以上方可使用;采用完全培养

基培养细胞。

1.2.2 E₂ 暴露实验

将鱼原代肝细胞接种于 6 孔板中,对照组加入 DMSO,实验组加入 E₂ 溶液,置于 25 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h,E₂ 溶液由 DMSO 配制,浓度梯度为 0.01、0.1、1、10 和 100 nmol·L⁻¹,DMSO 含量不超过 0.01%,每个浓度设置 3 个生物学重复,暴露时间 24 h。

1.2.3 RNA 提取和转录组测序

细胞总 RNA 用 Trizol 试剂提取,提取方法按 Trizol 试剂说明书。用 Agilent 2100(美国安捷伦科技公司)和 Nanodrop 2000c(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)检测 RNA 的完整性。检测合格的 RNA 样品构建测序文库,在北京大学高通量测序平台 Illumina Hiseq 进行测序,获得 clean reads 数据。

1.2.4 转录组组装、基因注释与差异表达基因筛选

通过 CLC Genomics Workbench 软件对 clean reads 进行剪切(trim)和组装,得到表达序列标签(ESTs)。通过 CLC Genomics Workbench 软件中 blastX 功能对 ESTs 序列进行注释。将 ESTs 序列作为参考序列分析各个样品的表达数据,以 RPKM 作为衡量基因表达水平指标进行组间比较。以差异倍数绝对值|fold change (FC)| ≥ 2、P<0.05 作为筛选标准,进行差异表达基因(DEG)筛选。最后通过 GO 分析和 KEGG Pathway 分析得到 GO 功能注释和 Pathway 富集分析。

1.2.5 RT-qPCR 方法

用 Primer Express(美国 Applied Biosystems)软件设计引物,引物序列如表 1 所示。先将 RNA 按照反转录试剂盒说明书反转录为 cDNA,以 *rpl7* 为内参基因,以 cDNA 为模版进行荧光定量 PCR。反应程

表 1 RT-qPCR 引物
Table 1 Primers for RT-qPCR

引物名称 Primer name	正向引物序列(5' ~ 3') Forward primer sequences (5' ~ 3')	反向引物序列(5' ~ 3') Reverse primer sequences (5' ~ 3')
<i>rpl7</i>	GCCATCCGTGTCAAGAAGTTGCT	CCTCTCCATCTGCTGTACTCCTT
<i>esr1</i>	AGGAGGAGGTGGAGGAAGACTGT	GTGTACGGTCGGCTCAACTTCTG
<i>vtg1</i>	AACCACCTCTGTCAATGTTGGCTTC	CTAAGATCCCTAGAGAATCAGCAGCAA
<i>vtg2</i>	CCGCCATACCTCTGAGTGCTACA	TCACCTAAGTGGTTGACCTGCTTCT
<i>vtg3</i>	TCCCAGTAACATCTTTGAAAGCAGT	GCCAGGTGAGCCACTGTTGA
<i>chg-l</i>	TGATCCACATAGAGGCTACCGTCAA	GGCTTGAGTTTCGCATCAGGTGAA
<i>chg-h</i>	TGCCATAGACTGCTGCCACGAT	CCACCACAACGATGAAGTGTCAT
<i>chg-hm</i>	ATGAGCCTGGTGTCTTGTCTATGA	CTCCACGAGGTCCAATAGCAACTTC

序为:95 ℃预变性 1 min,95 ℃变性 20 s,60 ℃退火 1 min,40 个循环,溶解曲线条件为:95 ℃变性 1 min,60 ℃退火 30 s,95 ℃保温 30 s。基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算。

1.3 数据处理方法

使用 Excel 2016 对实验数据进行整理,用 SPSS 进行单因素方差分析(ANOVO),显著性水平为 $P<0.05$,通过 Origin 9.0 作图。

2 结果与分析(Results and analysis)

2.1 中国青鳉原代肝细胞培养方法建立

以 DMEM(无酚红,高糖)为基础培养基,加入 15% FBS,添加 5% 的超纯水调节渗透压。细胞采集过程中,鱼体需经过 2 层体表消毒,1% 次氯酸钠和 75% 酒精,减少细菌污染机会。原代细胞分离过程中采用机械破碎和胰蛋白酶消化相结合的方式能有效提高活细胞比例,经过 72 h 培养后,细胞数量

明显增多(图 1)。

2.2 转录组序列组装结果

中国青鳉肝细胞暴露于不同浓度(0.01、0.1、1、10 和 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 E_2 中 24 h,提取 RNA 测序。经 Illumina 测序后,对原始数据进行过滤,获得 clean reads,每个样本均获得 6 G 左右的测序数据量。各样本 reads 有 88% 以上能匹配到参考序列上,具体结果如表 2 所示。

通过 CLC Genomics Workbench 对 clean reads 进行 De novo 组装,共获得 65 765 条 ESTs,最大 contig 长度为 46 862 bp,平均长度为 531 bp,N50 为 596 bp,GC 含量 44.7%,组装结果比较理想。

2.3 差异基因表达筛选与分析

以差异表达变化倍数和显著性 $P<0.05$ 为筛选标准,筛选出差异基因 105 个,其中,上调基因 38 个,下调基因 67 个,如表 3 所示,基因表达聚类分析如图 2 所示。

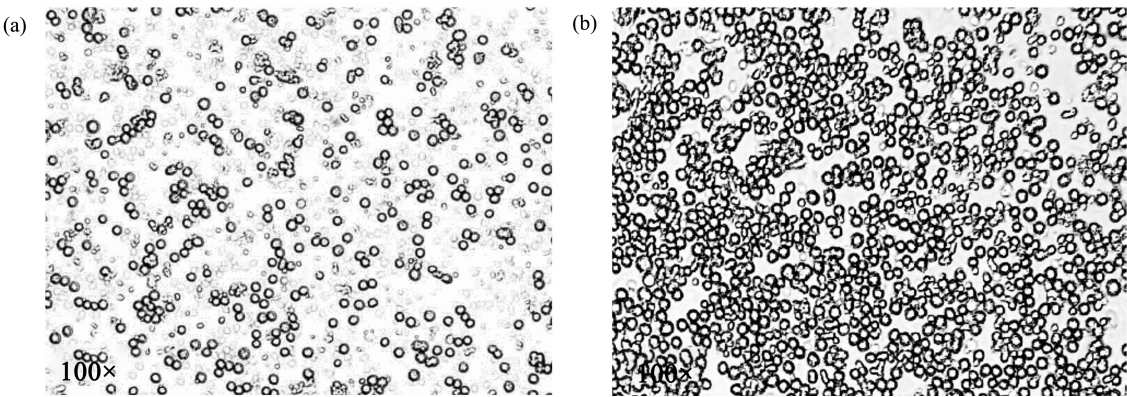


图1 中国青鳉原代肝细胞照片(100 倍)
注:(a)细胞培养开始时;(b)细胞培养 72 h 时。

Fig. 1 Primary hepatocytes of *Oryzias latipes* (100 times)
Note: (a) before cell culture; (b) after 72 h of cell culture.

表2 各样本转录组数据结果统计表

Table 2 Summary of different sample transcriptome sequencing data

样本 Sample	Clean reads 数 Number of clean reads	Reads 覆盖度/% Reads mapped/%
对照 1 Control 1	60 575 689	89.69
对照 2 Control 2	59 687 368	89.79
0.01 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E_2	54 927 104	89.17
0.1 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E_2	52 225 930	88.81
1 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E_2	60 567 390	89.18
10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E_2	57 505 374	89.02
100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E_2	68 498 752	89.16

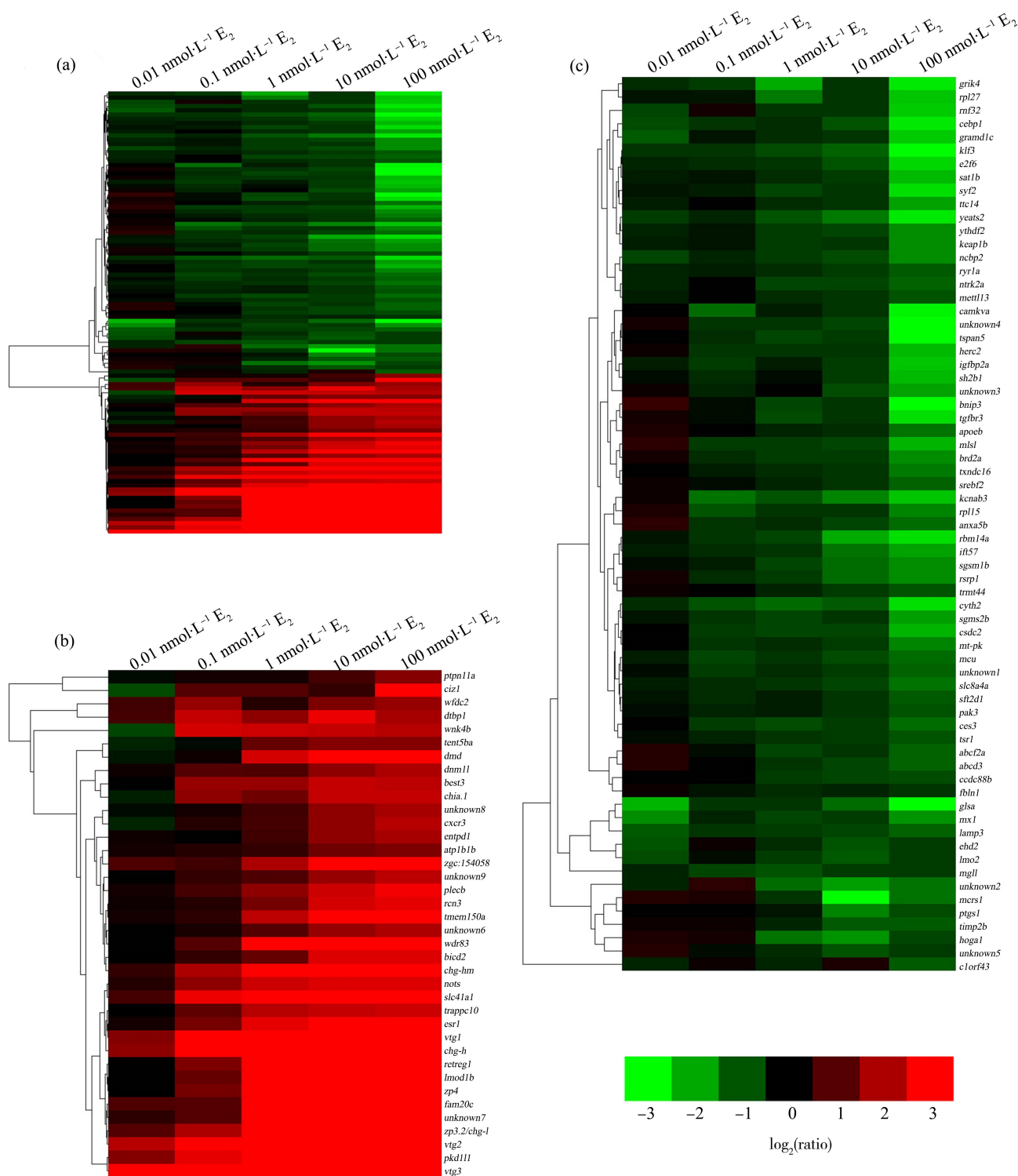


图 2 差异表达基因聚类分析

注:(a)为总体差异表达基因;(b)为上调差异表达基因;(c)为下调差异表达基因。

Fig. 2 Cluster analysis of differentially expressed genes

Note: (a) total differentially expressed genes; (b) up-regulated differentially expressed genes; (c) down-regulated differentially expressed genes.

2.4 差异基因的 GO 和 KEGG Pathway 富集分析

将筛选到的 105 个差异表达基因通过在线分析

网站 DAVID(Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)分别进行 GO 和 KEGG 富

集分析,结果如图 3 和图 4 所示。差异表达基因主要富集到的生物学过程为雌激素的细胞响应、脂质运输和代谢、转录调控、蛋白磷酸化、骨骼肌组织发育、钙离子运输、胞内信号传递、对外来物的刺激反应、红细胞分化和肌肉收缩。上调基因主要富集到的生物学过程为雌激素的细胞响应、脂质运输、骨骼肌组织发育、对外来物的刺激反应和肌原纤维组装。下调基因主要富集到了转录调控、蛋白磷酸化、跨膜转运、钙离子运输、蛋白泛素化、红细胞分化和血管发育。KEGG Pathway 富集分析显示,差异表达基因主要富集到的生物学过程为蛋白泛素化降解、MAPK 信号通路和钙离子信号通路。

2.5 标记物基因的浓度效应关系

肝脏中与雌激素相关的基因有 *esr1*、VTG 家族和 CHG 家族等,ESR1 为雌激素核受体,介导下游基因表达。VTG 和 CHG 都由肝脏产生,通过血液运输到卵巢,对鱼类的繁殖发育有重要影响。本实验选取了生物标记基因 *esr1*、*vtg1*、*vtg2*、*vtg3*、*chg-1*、*chg-h* 和 *chg-hm*,以 *rpl7* 作为管家基因进行 RT-qPCR,验证实验方法的可靠性。将得到的循环数经 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算后,通过 SPSS 进行单因素方差分析,实验结果如图 5 所示。随着 E_2 浓度的增加,基因表达水平显著提高,与转录组测序结果一致。VTG 家族对雌激素的响应比 CHG 家族更灵敏,与对照组相比,雌激素受体 *esr1* 在 $0.1\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E_2 暴露后升高了 2.70 倍,*chg-1*、*chg-h* 和 *chg-hm* 在 $0.1\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E_2 暴露后分别升高了 2.08 倍、3.75 倍和 1.84 倍,而 *vtg1*、*vtg2* 和 *vtg3* 在 $0.1\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ E_2 暴露后时分别

升高了 70.81 倍、11.39 倍和 18.68 倍,具有很高的灵敏度。

3 讨论 (Discussion)

结合胰蛋白酶-EDTA 法和机械分散法处理肝脏,获得的肝脏细胞分散均匀且损伤小,有别于传统的单一处理方法。淡水鱼类细胞培养常用的培养基为 EMEM,且多用于细胞系培养,RPMI-1640 多用于悬浮细胞培养,M199 适用范围比较广^[22-23],本实验采用的是 DMEM 高糖无酚红培养基加胎牛血清的方法,适用于各种原代细胞及细胞系的培养,尤其适合附着性较差的细胞培养。原代细胞培养保留了部分甚至全部体细胞的生理功能特性,广泛应用于药物测试和毒理学研究等领域。

ER、VTG、CHG 以及脑特异性芳香化酶 B(AroB)是雌激素暴露的生物标志物,已被广泛用于检测雌激素内分泌干扰物。为了寻找其他的雌激素响应基因,Lam 等^[24]通过寡核苷酸微阵列技术获得了雄性斑马鱼的雌激素响应基因 1 092 个;Levi 等^[25]通过转录组分析研究了斑马鱼肝脏中的雌激素响应基因并筛选出了 20 个显著差异基因;Hao 等^[26]研究了斑马鱼早期胚胎发育的雌激素响应基因。本研究筛选出肝细胞雌激素响应基因 105 个,包含 7 个生物标记基因 *esr1*、*vtg1*、*vtg2*、*vtg3*、*chg-1*、*chg-h* 和 *chg-hm*,7 个报道过的雌激素响应基因 *klf3*、*cxc3*、*chia.1*、*zgc:154058*、*nots*、*fam20c* 和 *apoebmgl1*,82 个新发现的雌激素响应基因以及 9 个未命名的基因,这些新发现的基因表达量显著上调或下调,可以作为新的生物标记物。

表 3 上调和下调基因列表
Table 3 Up and down regulated gene list

	个数 Number	基因名 Gene symbol
上调基因 Up-regulated genes	38	<i>atp1b1b</i> 、 <i>tent5ba</i> 、 <i>ptpn11a</i> 、 <i>wfdc2</i> 、 <i>entpd1</i> 、 <i>dtbp1</i> 、 <i>dnm11</i> 、 <i>wnk4b</i> 、 <i>cxc3</i> 、 <i>best3</i> 、 <i>chia.1</i> 、 <i>trappc10</i> 、 <i>bicd2</i> 、 <i>nots</i> 、 <i>rcn3</i> 、 <i>plecb</i> 、 <i>esr1</i> 、 <i>dmd</i> 、 <i>zgc:154058</i> 、 <i>tmem150a</i> 、 <i>ciz1</i> 、 <i>pkd11l</i> 、 <i>retreg1</i> 、 <i>slc41a1</i> 、 <i>fam20c</i> 、 <i>lmod1b</i> 、 <i>zp4</i> 、 <i>zp3.2/chg-1</i> 、 <i>wdr83</i> 、 <i>chg-hm</i> 、 <i>chg-h</i> 、 <i>vtg1</i> 、 <i>vtg2</i> 、 <i>vtg3</i> 、 <i>unknown6</i> 、 <i>unknown7</i> 、 <i>unknown8</i> 、 <i>unknown9</i>
下调基因 Down-regulated genes	67	<i>grik4</i> 、 <i>abcd3</i> 、 <i>abcf2a</i> 、 <i>anxa5b</i> 、 <i>apoeb</i> 、 <i>bnip3</i> 、 <i>brd2a</i> 、 <i>c1orf43</i> 、 <i>mcu</i> 、 <i>camkva</i> 、 <i>ccdc88b</i> 、 <i>cebp1</i> 、 <i>ces3</i> 、 <i>csdc2</i> 、 <i>cyth2</i> 、 <i>ehd2</i> 、 <i>fbln1</i> 、 <i>glsa</i> 、 <i>gramd1c</i> 、 <i>herc2</i> 、 <i>hoga1</i> 、 <i>ift57</i> 、 <i>igfbp2a</i> 、 <i>keap1b</i> 、 <i>klf3</i> 、 <i>lmo2</i> 、 <i>lamp3</i> 、 <i>mcrs1</i> 、 <i>mettl13</i> 、 <i>mgll</i> 、 <i>mx1</i> 、 <i>mt-pk</i> 、 <i>ncbp2</i> 、 <i>ntrk2a</i> 、 <i>pak3</i> 、 <i>ptgs1</i> 、 <i>rbm14a</i> 、 <i>rnf32</i> 、 <i>rpl15</i> 、 <i>rpl27</i> 、 <i>rsrp1</i> 、 <i>ryr1a</i> 、 <i>sat1b</i> 、 <i>sft2d1</i> 、 <i>sgms2b</i> 、 <i>sgsm1b</i> 、 <i>sh2b1</i> 、 <i>slc8a4a</i> 、 <i>srebf2</i> 、 <i>syf2</i> 、 <i>tgfbr3</i> 、 <i>timp2b</i> 、 <i>e2f6</i> 、 <i>trmt44</i> 、 <i>tspan5</i> 、 <i>tsr1</i> 、 <i>ttc14</i> 、 <i>txndc16</i> 、 <i>kcnab3</i> 、 <i>yeats2</i> 、 <i>ythd12</i> 、 <i>mlsl</i> 、 <i>unknown1</i> 、 <i>unknown2</i> 、 <i>unknown3</i> 、 <i>unknown4</i> 、 <i>unknown5</i>

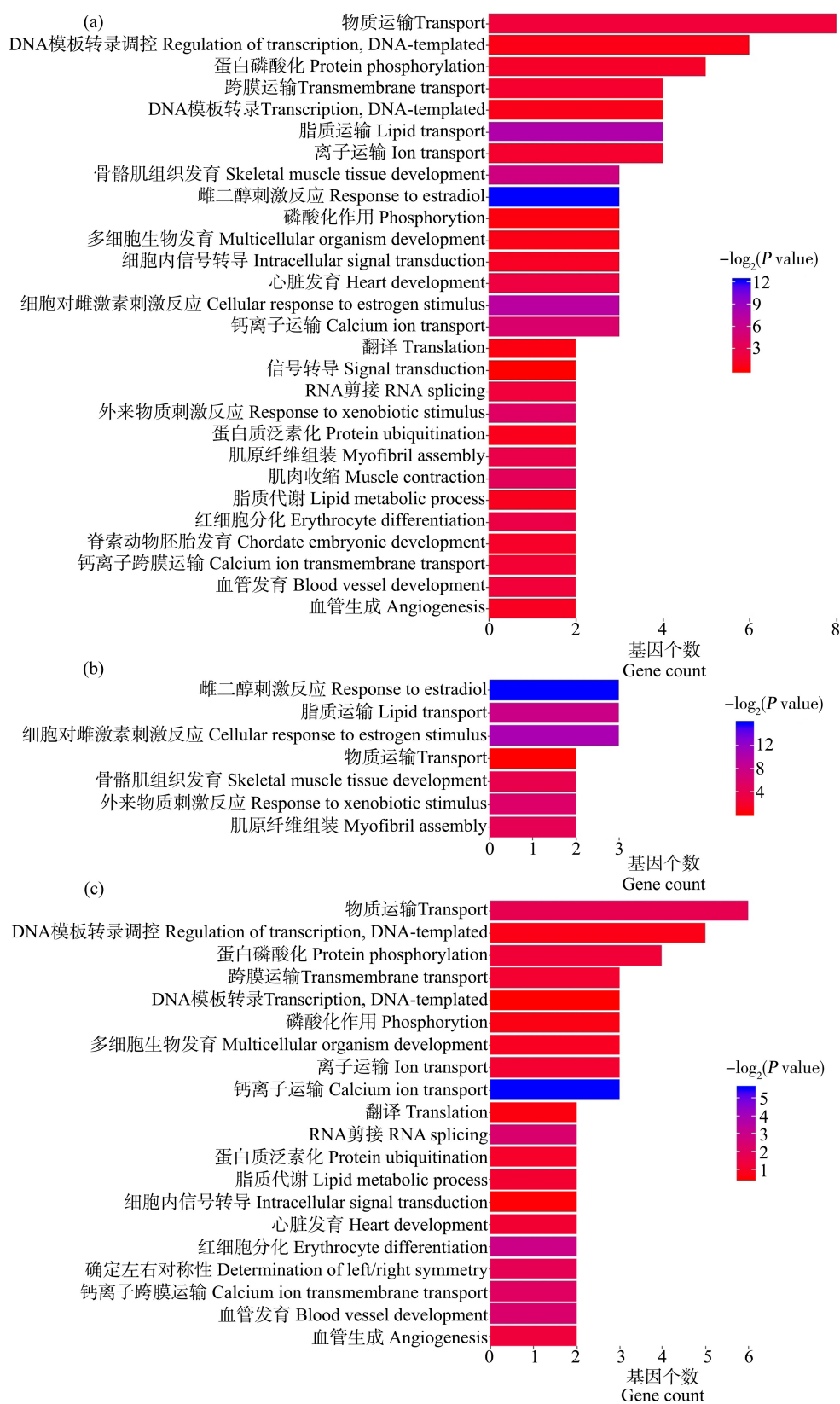


图 3 差异表达基因 GO 富集分析

注:(a)为总体差异表达基因;(b)为上调差异表达基因;(c)为下调差异表达基因。

Fig. 3 GO enrichment analysis of differentially expressed genes

Note: (a) total differentially expressed genes; (b) up-regulated differentially expressed genes; (c) down-regulated differentially expressed genes.

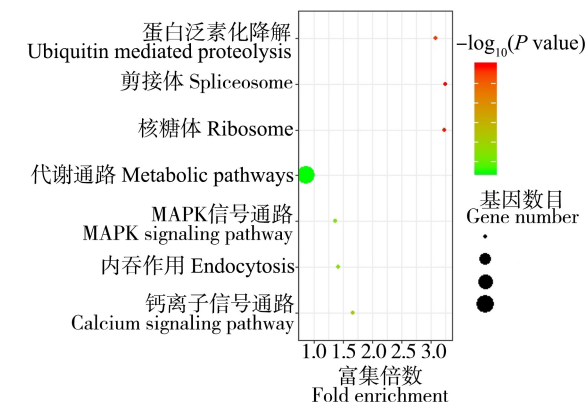


图 4 差异表达基因 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes

GO 和 KEGG Pathway 分析显示,差异表达基因主要参与了雌激素响应、脂质运输和代谢、转录调控、蛋白磷酸化、钙离子运输和信号传递等生物学过程以及蛋白泛素化降解、MAPK 信号通路和钙离子信号通路,分子功能富集分析显示差异表达基因主要与脂质运输代谢和离子运输相关。Jin 等^[27]的研究证明了雌激素影响肝脏的脂质代谢。雌激素作用于肝细胞后,雌激素受体磷酸化程度增加,激活了 MAPK 信号通路,MAPK 通路的激活增强了 Ser-118 和 Ser-167 的磷酸化^[28]。雌激素可以引起内质网钙离子释放,钙离子可以参与 ERK 通路的活化^[29-30]。

ESR1 为雌激素受体,VTG 和 CHG 是卵黄蛋白和卵壳蛋白的前体,影响鱼类的胚胎和幼体早期发

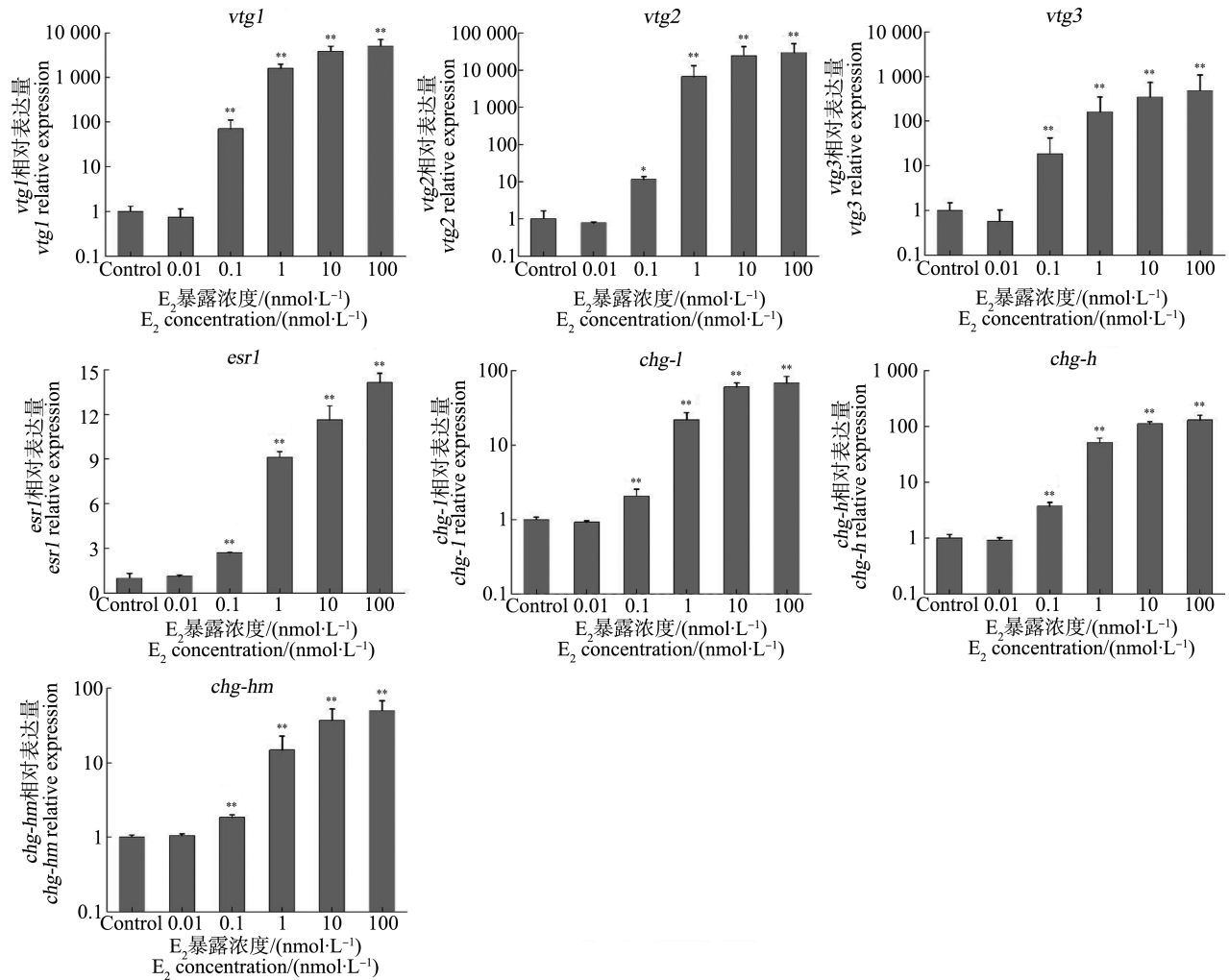


图 5 不同浓度雌二醇 (E_2) 暴露下基因表达变化

注:样本数 $n=3$,与对照组相比,* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 。

Fig. 5 Changes of gene expression in groups with different concentrations of estradiol (E_2)

Note: Number of samples, $n=3$, * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ compared to control group.

育,对雌激素暴露反应敏感,常作为生物标记物^[31]。本实验通过原代肝细胞培养来检测雌激素活性,RT-qPCR 结果与转录组测序结果一致,证明中国青鳉原代肝细胞作为检测环境雌激素的实验方法可行。*esr1*、VTG 和 CHG 基因在 $0.01 \sim 100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ E_2 浓度范围内都有很好的剂量效应关系,且 VTG 家族比 CHG 家族对雌激素的响应更灵敏,*vtg1* 在 $0.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ E_2 暴露后升高了 70.81 倍,*vtg2* 在 $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ E_2 暴露后升高了 29 227.91 倍。罗平^[32]通过高效液相色谱法检测地表水中 E_2 ,检出限为 $0.04 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;Kovalchuk 等^[33]的酵母双杂交实验结果表明, E_2 最低浓度为 $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时与雌激素受体有相互作用,Tyler 等^[34]通过酶联免疫吸附试验(ELISA)测定了黑头软口鲮 VTG 的含量,建立了鱼早期发育阶段的雌激素体内检测体系, E_2 暴露浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,VTG 含量是对照组的 100 多倍。这些结果表明,原代细胞培养结合 RT-qPCR 的方法灵敏度高,对雌激素的响应明显。

通讯作者简介:张照斌(1975—),男,博士,副教授,主要研究方向为环境毒理学和生态毒理学。

共同通讯作者简介:胥建卫(1979—),男,博士,教授,主要研究方向为量子物理学和理论生物物理学。

参考文献 (References):

- [1] Guillelte L J, Gross T S, Masson G R, et al. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida [J]. Environmental Health Perspectives, 1994, 102(8): 680-688
- [2] Jobling S, Sumpter J P, Sheahan D A, et al. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1996, 15(2): 194-202
- [3] Kang I J, Yokota H, Oshima Y, et al. Effect of 17 beta-estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Chemosphere, 2002, 47(1): 71-80
- [4] Matthiessen P, Wheeler J R, Weltje L. A review of the evidence for endocrine disrupting effects of current-use chemicals on wildlife populations [J]. Critical Reviews in Toxicology, 2018, 48(3): 195-216
- [5] Blazer V S, Iwanowicz L R, Iwanowicz D D, et al. Inter-sex (testicular oocytes) in smallmouth bass from the Potomac River and selected nearby drainages [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 2007, 19(4): 242-253
- [6] Fuzzen M L, Bennett C J, Tetreault G, et al. Severe inter-sex is predictive of poor fertilization success in populations of rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) [J]. Aquatic Toxicology, 2015, 160: 106-116
- [7] Kidd K A, Blanchfield P J, Mills K H, et al. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(21): 8897-8901
- [8] 宋凯, 骆源, 张春晓, 等. 皮质醇对斜带石斑鱼原代培养肝细胞糖代谢的影响[J]. 动物营养学报, 2016, 28(11): 3520-3527
- [9] Song K, Luo Y, Zhang C X, et al. Effects of cortisol on glycometabolism in primary cultured hepatocytes from *Epinephelus coioides* [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(11): 3520-3527 (in Chinese)
- [9] 马陶武, 王子健, 易浪波. 稀有鮡鲫和日本青鳉肝细胞原代培养及其对 2,3,7,8-TCDD 的敏感性比较[J]. 环境科学学报, 2010, 30(6): 1243-1249
- [10] Ma T W, Wang Z J, Yi L B. Primary culture of hepatocytes from rare minnow (*Gobiocypris rarus*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and comparison of their sensitivity to 2,3,7,8-TCDD [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2010, 30(6): 1243-1249 (in Chinese)
- [10] Kausch U, Alberti M, Haindl S, et al. Biomarkers for exposure to estrogenic compounds: Gene expression analysis in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Environmental Toxicology, 2008, 23: 15-24
- [11] Sipes N S, Padilla S, Knudsen T B. Zebrafish: As an integrative model for twenty-first century toxicity testing [J]. Birth Defects Research Part C-Embryo Today: Reviews, 2011, 93(3): 256-267
- [12] 李洁斐, 李卫华, 金泰虞, 等. 斑马鱼及其在环境毒理学中的应用[J]. 环境与职业医学, 2005, 22(5): 78-81
- [12] Li J F, Li W H, Jin T Y, et al. Zebrafish and its application in environment toxicology [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2005, 22(5): 78-81 (in Chinese)
- [13] Tabata A, Miyamoto N, Ohnishi Y, et al. The effect of chlorination of estrogenic chemicals on the level of serum vitellogenin of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Water Science and Technology, 2003, 47(9): 51-57
- [14] 曹文宣, 王剑伟. 稀有鮡鲫——一种新的鱼类试验动物[J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(z1): 96-99
- [14] Cao W X, Wang J W. Rare minnow: A new laboratory animal in China [J]. Laboratory Animal Science and Management, 2003, 20(z1): 96-99 (in Chinese)

- [15] 王剑伟, 曹文宣. 中国本土鱼类模式生物稀有鮡鲫研究应用的历史与现状[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(2): 20-33
- Wang J W, Cao W X. *Gobiocypris rarus* as a Chinese native model organism: History and current situation [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(2): 20-33 (in Chinese)
- [16] 马陶武, 王子健, 陈剑锋, 等. 乙炔基雌二醇对稀有鮡鲫肾脏的毒性效应[J]. 环境科学学报, 2004, 24(3): 487-491
- Ma T W, Wang Z J, Chen J F, et al. Toxic effects of 17- α -ethinylestradiol to the kidney of rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2004, 24(3): 487-491 (in Chinese)
- [17] 肖安, 张博. 斑马鱼核心数据库简介[J]. 遗传, 2013, 35(4): 545-546
- [18] 贾睿, 曹丽萍, 丁炜东, 等. 鱼类肝细胞分离、原代培养与应用研究综述[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(1): 147-157
- Jia R, Cao L P, Ding W D, et al. Isolation, primary culture and application of fish hepatocytes: An overview [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2012, 34(1): 147-157 (in Chinese)
- [19] Wolf K, Quimby M C. Established eurythermic line of fish cells *in vitro* [J]. Science, 1962, 135(3508): 1065-1066
- [20] Pesonen M, Andersson T B. Fish primary hepatocyte culture; an important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies [J]. Aquatic Toxicology, 1997, 37(2/3): 253-267
- [21] Yin G, Cao L, Xu P, et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of glycyrrhiza glabra extract against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2011, 37: 209-216
- [22] Wolf K, Ahne W. Fish cell culture [J]. Cell Culture, 1982, 2: 305-328
- [23] Bols N C, Lee L E J. Technology and uses of cell cultures from the tissues and organs of bony fish [J]. Cytotechnology, 1991, 6(3): 163-187
- [24] Lam S H, Lee S G, Lin C Y, et al. Molecular conservation of estrogen-response associated with cell cycle regulation, formonal carcinogenesis and cancer in zebrafish and human cancer cell lines [J]. BMC Medical Genomics, 2011, 4(1): 41
- [25] Levi L, Pekarski I, Gutman E, et al. Revealing genes associated with vitellogenesis in the liver of the zebrafish (*Danio rerio*) by transcriptome profiling [J]. BMC Medical Genomics, 2009, 10: 141
- [26] Hao R, Bondesson M, Singh A V, et al. Identification of estrogen target genes during zebrafish embryonic development through transcriptomic analysis [J]. The Public Library of Science One, 2013, 8(11): e79020
- [27] Jin B, Wang W J, Bai W P, et al. The effects of estradiol valerate and remifemin on liver lipid metabolism [J]. Acta Histochemica, 2017, 119(6): 610-619
- [28] Lannigan D A. Estrogen receptor phosphorylation [J]. Steroids, 2003, 68(1): 1-9
- [29] Roan C J, Huang C C, Cheng H H, et al. Diethylstilbestrol-induced estrogen receptor-dependent Ca²⁺ rises and apoptosis in Chinese hamster ovary (CHO) cells [J]. Journal of Receptor and Signal Transduction Research, 2008, 28(3): 307-322
- [30] Wang Q, Ye Q, Lu R, et al. Effects of estradiol on high-voltage-activated Ca²⁺ channels in cultured rat cortical neurons [J]. Endocrine Research, 2014, 39(2): 44-49
- [31] Min J, Lee S, Gu M B. Effects of endocrine disrupting chemicals on distinct expression patterns of estrogen receptor, cytochrome P450 aromatase and P53 genes in *Oryzias latipes* liver [J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2003, 17(5): 272-277
- [32] 罗平. 高效液相色谱法测定地表水中5种雌激素残留[J]. 化学分析计量, 2017, 26(5): 78-81
- Luo P. Determination of the residues of five kinds of estrogen in surface water [J]. Chemical Analysis and Meterage, 2017, 26(5): 78-81 (in Chinese)
- [33] Kovalchuk S N, Kozhemyako V B, Atopkina L N, et al. Estrogenic activity of triterpene glycosides in yeast two-hybrid assay [J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 101(4-5): 226-231
- [34] Tyler C R, Aerle R V, Hutchinson T H, et al. An *in vivo* testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1999, 18(2): 337-347 ◆