

五氯苯酚暴露致花鲈(*Lateolabrax japonicus*) 肝脏损伤的转录组分析*

郑丹^{1,2} 焦海峰² 严小军¹ 张乐³ 阮松林³

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 宁波市海洋与渔业研究院 宁波 315103;
3. 杭州市农业科学研究院 杭州 310021)

摘要 为了探明五氯苯酚暴露后花鲈(*Lateolabrax japonicus*)肝脏的损伤变化, 本文利用 Illumina HiSeq^{TM2000} 测序技术对不同浓度五氯苯酚(0, 0.1, 1.0, 10.0, 100 μ g/L)暴露后花鲈肝脏组织进行了转录组测序。经 Trinity 软件拼接, 得到 clean reads 共 247914284 条, 获得 53716 条基因。对照不同浓度暴露组和对照组的转录组测序结果, 获得共有的差异性表达基因 135 个, 特异性的差异基因数分别有 127—819 个不等, 差异蛋白表达数量随着受试浓度的升高而上升。经 BLAST 搜索, 其中有 21459、26464、18896、12403、17262 和 19159 条分别注释到 Swiss-prot、Nr、Pfam、KEGG、KOG 和 GO 数据库。KEGG 代谢通路分析结果显示获得的差异基因分别映射到 6 大类 141 条通路, 这些差异表达基因在与环境信息进程相关的信号传导和与组织系统相关的免疫系统的通路中富集最多。KOG 数据库预测和分类表明 16571 条基因归属于 25 大类, 参与一般功能预测和信号传导机制的数量最多, 参与翻译后修饰、蛋白质转换与分子伴侣路径的也占较大比例。总体来看, 在受到五氯苯酚类物质胁迫后, 花鲈体内的信号传导系统首先发生响应, 导致机体出现紊乱。污染物暴露后, 花鲈机体的应对机制尚待深入分析。

关键词 花鲈; 转录组; 五氯苯酚; 差异性表达基因

中图分类号 Q955; S949; X55 **doi:** 10.11693/hyh20170500133

氯酚类化合物(Chlorophenols, CPs)是芳香族化合物中的一类, 其用途广、毒性大、对环境造成的污染较为严重 (U.S. Environmental Protection Agency, 1992; 金小伟等, 2009; 房彦军等, 2009)。五氯苯酚是此类化合物中毒性最大的, 许多国家已将其列入优先污染物和持久性有机污染物名录(许文青等, 2011)。目前, 针对五氯苯酚在环境中的残留量已经开展了很多工作, 它们在水体(do Nascimento *et al*, 2004; Kot-Wasik *et al*, 2004; Kawaguchi *et al*, 2005; 刘金林等, 2006; 董军等, 2009)、沉积物(张兵等, 2001; 刘金林等, 2006)和生物体(张兵等, 2001; Liu *et al*, 2006)中广泛存在。五氯苯酚化合物高剂

量时能致生物体死亡, 低剂量可以对水生生物产生毒性效应, 如王辅明等(2009)研究了稀有鮰鲫(*Gobiocypris rarus*)受五氯苯酚暴露后体内 SOD、GSH 和 HSP70 含量的变化, 房彦军等(2009)研究了稀有鮰鲫受到三氯苯酚暴露后肝脏损伤的比较蛋白质组变化, 李伟民等(2003)研究了五氯苯酚对鲫鱼(*Carassius auratus*)肝脏氧化损伤的变化, 均表明氯酚类化合物是对水生生物产生毒性效应的重要因素。

转录组学技术是伴随着后基因组学发展起来的新兴科学(Lockhart *et al*, 2000), 它可以在分子水平上研究水产动物受污染物胁迫后相关基因的差异表达, 进一步从基因水平阐述污染物对水产动物的

* 公益性行业(农业)科研专项, 201303047 号; 宁波市科技局重点项目, 2013C11027 号。郑丹, 高级工程师, 博士研究生, E-mail: 317103638@qq.com

通讯作者: 严小军, 博士生导师, 研究员, E-mail: xiaojunyan@hotmail.com

收稿日期: 2017-05-17, 收修改稿日期: 2017-11-30

毒性机制(Huang *et al*, 2012; Bougas *et al*, 2013; Guo *et al*, 2013; Elran *et al*, 2014; Hook *et al*, 2014; Hussainzada *et al*, 2014; 潘泳嘉等, 2016), 该技术已经成为研究生物应激生理、生长发育、抗病免疫等作用机制的有力工具(罗辉等, 2015)。花鲈(*Lateolabrax japonicus*)是肉食性鱼类, 肉质细嫩、营养丰富, 在对杭州湾新区南岸生物体氯代苯酚风险评估的研究发现, 花鲈等水产品的非致癌风险和致癌风险指数值均高于其他海域(邱纪时等, 2016)。目前, 关于复杂环境因素对花鲈的动态影响过程研究, 污染物分子毒性、过程和原理研究, 以及对五氯苯酚暴露致鱼类肝脏损伤的转录组研究, 尚未见报道。

本文通过对五氯苯酚暴露致花鲈肝脏损伤的转录组研究, 探究花鲈在五氯苯酚暴露环境下机体生物化学变化过程和生物体的应激反应, 研究成果可以为氯代苯酚类化合物生物体监测、环境监测以及水产种质资源保护提供支撑资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

花鲈取自宁波市奉化双山网箱养殖区, 在水泥池中暂养 7d 以上, 充气, 每天投喂 2 次(颗粒饲料, 早晚各一次)。实验时, 将花鲈用丁香酚麻醉后转入实验水槽中, 水槽的体积为 1m³, 24h 后开始实验。实验水体温度 20℃左右, pH 值为 7.8±0.7, 期间充气, 每天投喂颗粒饲料 1 次。挑选健康无病和规格较为一致的个体作为实验样本, 规格为 368±15g。

1.2 暴露实验方法

设置对照组 0μg/L (CVST0)和四个浓度胁迫组 0.1μg/L (CVST0.1)、1.0μg/L (CVST1.0)、10μg/L (CVST10)和 100μg/L (CVST100), 每个浓度组设置 3 个平行, 每个平行放花鲈 15 尾。

通风条件下称取适量的五氯苯酚, 放置入 100mL 的三角瓶中, 充分溶解后, 缓慢倒入不同浓度组的实验水槽中。期间每日换水 1 次, 换水 1/2, 换水

后及时加入足量海水, 并添加五氯苯酚溶液维持实验浓度。实验 5 天后, 将鱼麻醉、处死后, 在低温条件下解剖, 取出肝脏, 迅速置入液氮中冷冻 4h, 后转入-80℃超低温冰箱中保存, 备用。

1.3 RNA 提取、文库构建

肝脏 RNA 提取、制备文库和测序, 均利用 Illumina 公司提供的标准步骤执行。转录组的测序工作由杭州联川生物科技有限公司完成。

1.4 转录组组装

原始数据通过去除截断后长度小于 100bp 的序列和截断后 N 的含量在 5%以上的序列成为清洁数据(Clean Data)。同时计算 Q20、Q30、GC 含量和重复序列水平, 后续分析均在清洁数据基础上进行。测序数据利用 Trinity 软件进行拼接。

1.5 基因功能注释

运用 NCBI Nr 数据库、Swiss-Prot 数据库、KEGG pathway 数据库、Pfam 数据库和 KOG 数据库, 使用 BLAST 软件比对, 得到组装拼接后的 unigenes 不同数据库的注释描述。

2 结果与分析

2.1 转录组序列分析和组装

花鲈肝脏 cDNA 提取样本经 Illumina 测序后, 每个样本的测序量均获得超过 6.00G 的数据量。利用 Trinity 软件进行序列组装, 得到 clean reads 共 247914284 条, 获得 53716 条基因, 其 N50 长度为 1189bp。组装后得到转录本 71258 条, 其 N50 长度为 1559bp。Genes GC 含量与 Transcripts GC 含量均呈正态分布, 数据组装效果理想。

2.2 重复相关性检验

本文实验样本之间基因表达水平的相关系数较高, 仅 10 组样本之间的相关系数小于 0.500。不同受试实验组的 PCA 分析见图 1, 转录组基因长度分布见图 2, 由图可以看出, 实验样本选取具有代表性, 生物学重复性较好。

表 1 花鲈肝脏转录组测序组装质量统计
Tab.1 Assembly quality of *L. japonicus* liver transcriptome

| 科目 | 全部 | GC | | 长度 | | | | 总装配数 | N50 |
|------|-------|---------|--------|-----|-----|-----|------|----------|------|
| | | 中位数 GC% | 均值 GC% | 最小值 | 中位数 | 均值 | 最大值 | | |
| 基因数 | 53716 | 45.10 | 45.46 | 201 | 329 | 655 | 8167 | 35215806 | 1189 |
| 转录组数 | 71258 | 45.50 | 45.64 | 201 | 410 | 823 | 8167 | 58678631 | 1559 |

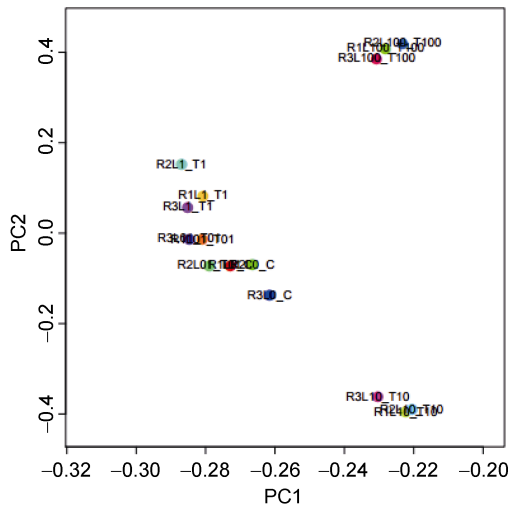


图 1 样品 PCA 分析

Fig.1 Results of PCA for different samples

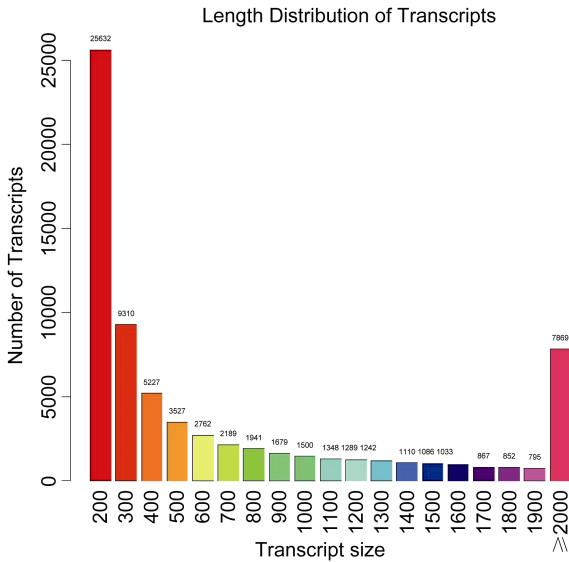


图 2 转录组基因长度分布

Fig.2 Length distribution of genes and transcripts

2.3 显著性差异基因表达分析

不同暴露浓度组与对照组之间的显著性差异基因表达分析结果见图 3, 四个浓度暴露组分别获得了 1447、730、1592、2044 个差异性表达基因。其中, 4 个浓度暴露组的共有差异性表达基因为 135 个, 特异性的差异基因数分别为 661、127、819 和 1116 个。

2.4 GO 功能注释

拼接获得 genes 后, 与 5 个公共数据库进行比对, 取阈值 e^{-10} , 进行功能注释(表 2)。通过设定 BLAST 参数 E-value 值, 共有 21594 条 unigenes 获得

成功注释, 占总基因数的 40.20%。Swiss-prot 数据库中注释了 21459 条 unigenes, 占 39.95%; Nr 数据库注释到 26464 条 unigenes, 占 49.27%; Pfam 数据库注释到 18896 条 unigenes, 占 35.18%; KEGG 数据库注释到 12403 条 unigenes, 占 23.09%; KOG 数据库注释到 17262 条 unigenes, 占 32.14%; GO 数据库注释到 19159 条 unigenes, 占 35.67%。

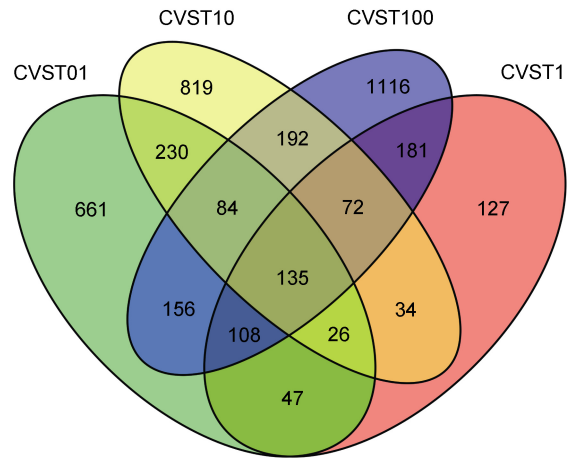


图 3 五氯苯酚暴露花鲈肝脏的差异表达基因韦恩图

Fig.3 The Venn diagrams of differentially-expressed genes of *L. japonicus*

GO 功能注释结果分别反映了生物过程 (biological process)、细胞组分 (cellular component) 和分子功能 (molecular function)。本文中富集到的与生物学过程有关的 unigenes 的前 25 类主要涉及到转录、DNA 依赖 (transcription, DNA-dependent), 转录调控、DNA 依赖 (regulation of transcription, DNA-dependent); 与细胞组分有关的前 15 类主要涉及膜的组成 (integral to membrane)、细胞质 (cytoplasm), 细胞核 (nucleus) 和细胞质膜 (plasma membrane); 分子功能有关的前 10 类主要涉及 ATP 结合 (ATP binding)、锌离子结合 (zinc ion binding)、蛋白质结合 (protein binding)、DNA 结合 (DNA binding) 和金属离子结合 (metal ion binding) 等, 上述 GO 功能过程的占比均超过了 33% (图 4)。

2.5 KEGG 注释分类

使用 KEGG 注释系统进行 unigenes 代谢途径分析 (图 5), 15239 条 unigenes 基因分别富集到 141 条通路, 涉及 6 类: 组织系统、基础代谢、人类疾病、遗传信息进程、环境信息进程和细胞进程。其中 1000 条 unigenes 以上的通路有信号转导 (Signal transduction), 1410 条 (9.25%), 免疫系统 (Immune

表 2 Unigenes 在不同数据库中的注释
Tab.2 Annotation of unigenes in different databases

| 基因数目 | Swiss-prot 库 | Nr 库 | Pfam 库 | KEGG 库 | KOG 库 | GO 库 |
|-------|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 53716 | 21459 | 26464 | 18896 | 12403 | 17262 | 19159 |
| 100% | 39.95% | 49.27% | 35.18% | 23.09% | 32.14% | 35.67% |

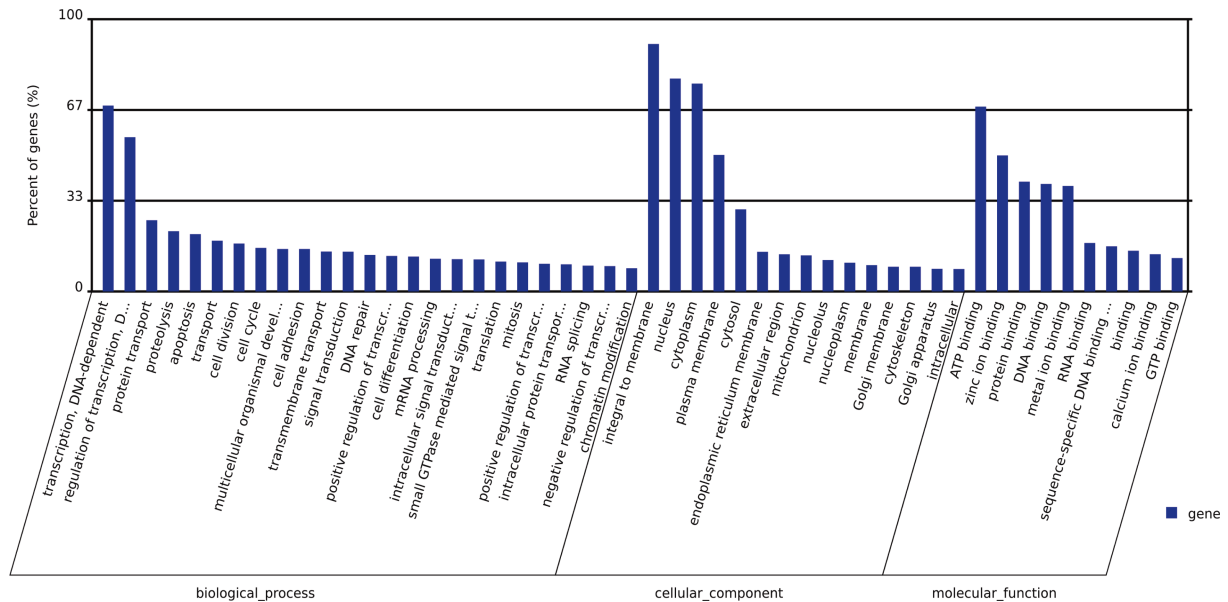


图 4 Unigenes 的 GO 分类

Fig.4 Gene ontology (GO) functional categories of unigenes

system), 1090 条(7.15%); 含有 500—1000 条 unigenes 的通路有细胞通讯(cell communication), 963 条(6.32%), 转运和分解代谢(transport and catabolism), 950 条(6.23%), 内分泌系统(Endocrine system)、706 条(4.63%), 癌症(cancers), 697 条(4.57%), 碳水化合物代谢(Carbohydrate metabolism), 672 条(4.41%), 神经变性疾病(neurodegenerative disease), 637 条(4.18%), 传染病(infectious disease), 635 条(4.17%), 细胞生长和凋亡(cell growth and death), 559 条(3.67%), 信号分子与相互作用(signaling molecules and interaction), 554 条(3.64%), 氨基酸代谢(Amino acid metabolism), 521 条(3.42%); 其中低于 100 条 unigenes 的通路有感官系统(sensory system), 85 条(0.56%), 环境适应(environmental adaptation), 70 条(0.46%), 萜类化合物和聚酮化合物的代谢(metabolism of terpenoids and polyketides), 69 条(0.45%), 其他次生代谢物的生物合成(biosynthesis of other secondary metabolites), 77 条(0.50%); 其他通路的 unigenes 数量在 100—500 条之间。

2.6 KOG 注释分类

此外, 所有 unigenes 经过 KOG 数据库功能预测和分类, 共有 16571 条基因被划分为 25 类(图 6)。其中信号传导机制(Signal transduction mechanisms)和一般功能(general function prediction only)数量最多, 分别有 2600 条(15.69%)和 2595 条(15.66%), 然后是参与翻译后修饰、蛋白质转换、分子伴侣(Posttranslational modification, protein turnover, chaperones)的有 1392 条(8.40%), 参与转录(Transcription)的有 1137 条(6.86%), 参与细胞内运输、分泌和水泡运输(Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport)的有 997 条(6.02%), 参与骨架(Cytoskeleton)、RNA 加工和修饰(RNA processing and modification)、翻译, 核糖体结构和生物发生(Translation, ribosomal structure and biogenesis)、碳水化合物运输和代谢(Carbohydrate transport and metabolism)、细胞周期控制、细胞分裂和染色体分区(Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning)的依次有 748 条(4.51%)、653 条(3.94%)、

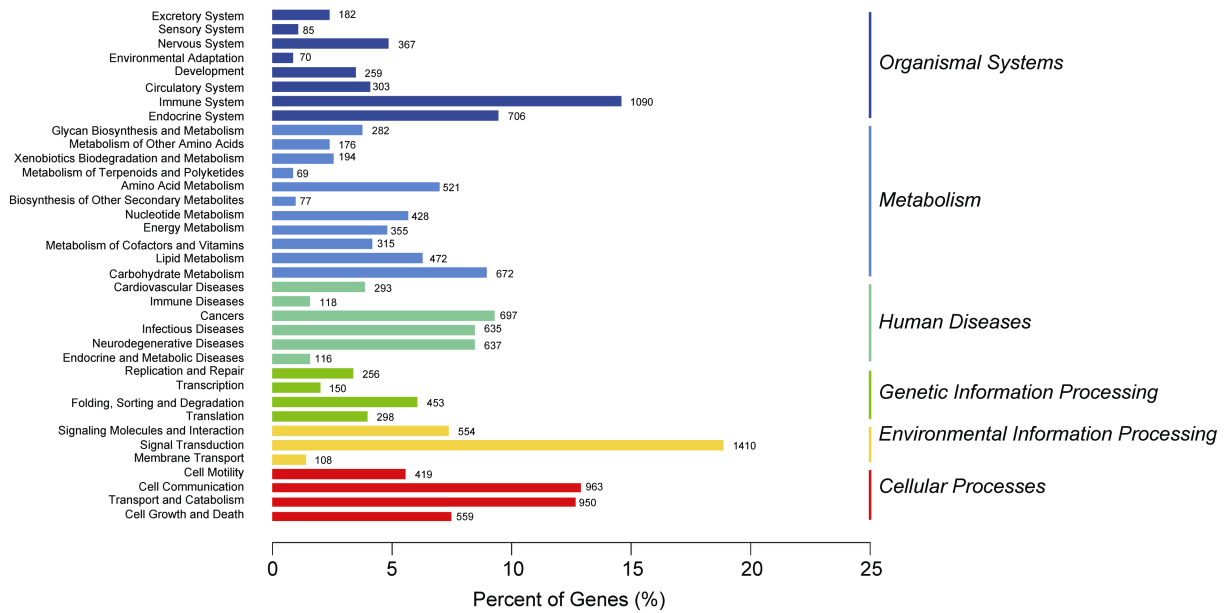


图 5 Unigenes 的 KO 功能分类
Fig.5 KO functional categories of unigenes

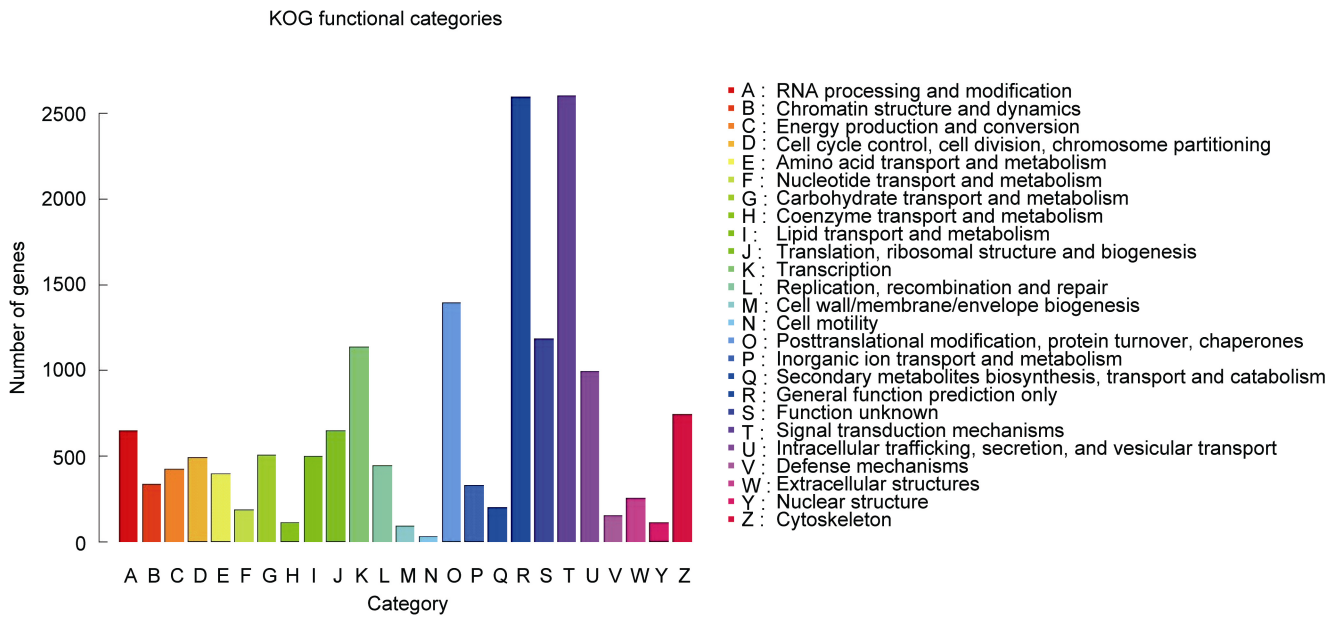


图 6 Unigenes 的 KOG 分类
Fig.6 Clusters of orthologous groups classification

652 条(3.93%)、505 条(3.05%)、497 条(3.00%)。此外，功能未知的(Function unknown)的有 1185 条(7.15%)。其他 unigenes 数量均少于 500 条，其中细胞运动(cell motility)的数量最少，仅有 34 条(0.21%)。

2.7 SSR 多态性分析

由表 3 可见，花鲈肝脏转录组 SSR 种类较丰富，以重复 6 次的频率最高，有 1586 个，占总 SSR 总数

的 15.12%，其次是重复 7 次和重复 5 次，分别有 1195 个和 1101 个，占 SSR 总数的 11.40%和 10.50%。SSR 的长度影响其多态性高低的重要因素，Temnykh 等 (2001)研究表明 SSR 长度小于 12bp 的多态性极低，因此本文将 SSR 长度低于 12bp 的剔除。经过筛选花鲈 SSR 的总数为 9951 条，其长度范围为 12—220bp: 其中长度在 12—20bp 之间的有 8256 条(占 82.97%)，

长度大于 20bp 的达到 1695 条(占 17.03%), 而长度大于 20bp 的 SSR 具有较高的多态性。

本文被识别的 SSR 总数为 10486 条, 其中二碱基重复 SSR 最多, 有 4176 条, 占 39.82%; 单碱基重复

SSR 次之, 有 3993 条, 占 37.51%; 三碱基重复 SSR 有 1992 条, 占 19.00%; 四碱基重复 SSR 有 234 条, 占 2.23%; 五碱基重复和六碱基重复 SSR 分别有 95 条和 56 条, 分别占 0.91%和 0.53%。

表 3 花鲈肝脏转录组中 Unigenes 的 SSR 分析结果
Tab.3 Summary of simple sequence repeats (SSRs) of unigenes in *L. japonicus* liver transcriptome

| 重复数 | 基因序列重复类型 | | | | | | 小计 | 比例(%) |
|-------|----------|-------|-------|------|------|------|------|-------|
| | 单碱基 | 二碱基 | 三碱基 | 四碱基 | 五碱基 | 六碱基 | | |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 81 | 56 | 137 | 1.31 |
| 5 | 0 | 0 | 904 | 183 | 14 | 0 | 1101 | 10.50 |
| 6 | 0 | 1054 | 481 | 51 | 0 | 0 | 1586 | 15.12 |
| 7 | 0 | 656 | 539 | 0 | 0 | 0 | 1195 | 11.40 |
| 8 | 0 | 502 | 68 | 0 | 0 | 0 | 570 | 5.44 |
| 9 | 0 | 729 | 0 | 0 | 0 | 0 | 729 | 6.95 |
| 10 | 0 | 882 | 0 | 0 | 0 | 0 | 882 | 8.41 |
| 11 | 0 | 336 | 0 | 0 | 0 | 0 | 336 | 3.20 |
| 12 | 838 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 855 | 8.15 |
| 13 | 618 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 618 | 5.89 |
| 14 | 556 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 556 | 5.30 |
| 15 | 390 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 390 | 3.72 |
| 16 | 346 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 346 | 3.30 |
| 17 | 277 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 277 | 2.64 |
| 18 | 227 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 227 | 2.16 |
| 19 | 221 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 221 | 2.11 |
| 20 | 220 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 220 | 2.10 |
| 21 | 149 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 149 | 1.42 |
| 22 | 61 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 61 | 0.58 |
| 23 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 25 | 0.24 |
| 24 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0.05 |
| 总计 | 3933 | 4176 | 1992 | 234 | 95 | 56 | | |
| 比例(%) | 37.51 | 39.82 | 19.00 | 2.23 | 0.91 | 0.53 | | |

3 讨论

氯酚类化合物是一类毒性较强的芳香族化合物, 不易降解, 容易在环境和生物体内蓄积(张文生等, 1995), 能对人体健康造成严重威胁(杨淑贞等, 2005)。房彦军等(2009)研究三氯酚暴露对稀有鮕鲫肝脏的损伤, 发现在三氯酚暴露后鱼体肝脏内与氧化应激及氧化磷酸化相关的蛋白发生了显著变化。同时, 低浓度的五氯苯酚暴露后, 随着浓度的升高和暴露时间的延长, 稀有鮕鲫体内 SOD 活性分别表现为先抑制后激活和先激活后抑制的趋势, 而 GSH 和 HSP70 的变化不明显(王辅明等, 2009), 因此推断氯苯酚类化合物胁迫后, 生物体内的超氧化物歧化酶

首先发生应激应答。这种应激后的应答, 在鲫鱼中也有发现(李伟民等, 2003), 受到 PCP 暴露后, 鲫鱼体内的 SOD 活性下降, GSH 含量降低, MDA 含量提高, 从而造成了肝脏的损伤, 同样的损伤现象在鲫鱼的血液淋巴细胞中也有发现, 张民等(2005)年研究了五氯苯酚对鲫鱼血液淋巴细胞的毒性, 发现乳酸脱氢酶(LDH)显著增加。本文研究发现, 受到五氯苯酚胁迫后, 不同受试浓度组共有的差异性表达基因 135 个, 特异性的差异基因数分别有 127—819 个不等。因此本文就五氯苯酚对生物体造成的毒性效应得到了进一步证实。

随着基因组学技术的发展, 转录组学被广泛应用于生物受到污染物暴露后的水生动物毒理学研究

中, 其中在重金属元素的毒性暴露研究中开展的较多。不同浓度的氯化镍、氯化钴和重铬酸钠暴露斑马鱼后, 斑马鱼(*Brachydanio rerio*)差异表达基因分别有 287 个、461 个和 696 个, 其中共有的差异表达基因 106 条, 进一步分析发现重金属污染物扰乱了多种生物学过程, 主要表现在与核糖体生物合成、蛋白酶体降解和 p53 信号级联放大相关, 同时抑制与氨基酸和脂类代谢相关的氧气产生途径(Hussainzada *et al*, 2014)。不同浓度的镍和镉分别造成了黄金鲈(*Perca flavescens*)转录组谱的变化, 其中共有的差异性表达基因有 106 条, 这些差异主要影响与铁代谢、转录和转化过程、维生素代谢、血液凝结和钙转运相关基因的转录的过程(Bougas *et al*, 2013)。本文在没有参考测序数据的情况下, 每个实验组均获得了超过 6.0G 的原始数据, 经 Trinity 软件进行序列组装后获得了 53716 条 clean 基因, 组装后获得 71258 条转录本。不同实验样本之间的基因表达水平相关系数仅 10 组样本小于 0.500, 另有 14 组样本的相关系数大于 0.900, 进一步应用 PCA 分析发现, 样本的代表性较好、生物学重复也良好。同时研究五氯苯酚胁迫后花鲈肝脏转录组的变化后, 发现不同浓度组的差异性表达基因数目分别为 1447、730、1592 和 2044 个, 差异蛋白表达数量随着受试浓度的升高呈上升的趋势。表明转录组学技术能较好地反映花鲈受五氯苯酚胁迫后机体的生物学变化。

逆境胁迫影响生物的基本代谢过程, 已经得到研究者的证实(Cadigan *et al*, 1997; 曹莹, 2005; Pilon *et al*, 2006; 吴兆毅等, 2009)。氯苯酚类化合物显著影响生物体的生理生化过程, GO 功能分析结果显示, 受到五氯苯酚胁迫后, 花鲈肝脏内参与转录、DNA 依赖, 转录调控的生物学过程有显著变化, 影响分子功能主要是体现在 ATP 结合、DNA 结合和重金属离子结合有关的基因, 影响的细胞组分主要是涉及膜的组成。在 KEGG 代谢通路中, 其中与环境信息进行相关的信号传导和与组织系统相关的免疫系统变化最为显著, 富集最明显的是 MAPK 信号通路(466 个), 其次是钙信号通路(238 个)和 Wnt 信号通路(259 个), 另外差异蛋白的也同时富集在磷脂酰肌醇信号系统(181 个)和 TGF- β 信号通路(171 个)中。在 MAPK 信号通路中主要影响了乙酰辅酶 AC 乙酰转移酶、谷氨酰胺合成酶、糖磷酸盐传感蛋白 UhpC、丝裂原活化蛋白激酶激酶等酶的活性; 而在钙信号通路中主要影响了钙离子运输 ATP 酶、肌钙蛋白 C、钙/钙调素

依赖性蛋白激酶(CaM 激酶)II、钙调蛋白以及不同磷脂酶 C 的活性。分析发现, 在受到五氯苯酚类物质暴露后, 花鲈体内的信号传导系统首先发生响应, 导致机体的三羧酸代谢途径发生变化, 以应对外界胁迫。钙离子运输 ATP 酶是一类联系依赖 Ca^{2+} 的 ATP 水解活性和 Ca^{2+} 转运出红细胞的蛋白质, 可以调控 Ca^{2+} 的时空分布, 从而协助 Ca^{2+} 参与多种生命过程(卫涛涛, 2012), 本文中钙离子运输 ATP 酶发生了明显的富集, 推测花鲈是为了更好地应对外界的胁迫应激。如上述, 当五氯苯酚暴露后, 花鲈肝脏内的 Wnt 信号通路发生了明显富集, 这在斑马鱼的胚胎发育过程期也有发现(吴兆毅等, 2009), 当斑马鱼胚胎受到五氯苯酚的暴露后, 机体的 Wnt 信号通路中重要的调控基因 *fzd2*、*fzd10*、*gsk3b*、*axin2*、*PLC- γ* 的表达均发生了显著变化, 包括成纤维生长因子信号通路(FGF)可激活酪氨酸蛋白激酶(RTK)活性, 活化的 RTK 又进一步激活了 *PLC- γ* , 从而导致机体的胚胎发育异常(曹莹, 2005; Pilon *et al*, 2006; 吴兆毅等, 2009), 此外, 对胚胎发育具有重要 Wnt 信号通路除调节作用外, 它还与肿瘤的发生有密切关系(Cadigan *et al*, 1997), 所以本文推测, 成年花鲈 Wnt 代谢通路发生变化后, 虽然不会对其胚胎发育造成影响, 但能造成生物的致癌、致畸风险。

4 结论

五氯苯酚暴露后, 致使花鲈肝脏发生了明显的变化, 经 Trinity 软件拼接, 共获得了 53716 条基因。不同浓度组的共差异表达基因 135 个, 特异性的差异基因分别有 127—819 个不等。在受到五氯苯酚暴露胁迫后, 花鲈体内多条代谢通路发生变化, 其中以信号传导的通路变化尤为明显。但是, 生命有机体在应对外界的污染物暴露后, 会表现出复杂的应激反应过程或现象, 目前难以用统一的代谢通路来进行表述, 或者说这个复杂的过程并不是简单地表现为一种形式, 这也是生命复杂性的重要表现。因此, 在后续研究中需要继续深入开展数据的挖掘, 以便揭示受污染物暴露后机体的应对机制。

参 考 文 献

- 卫涛涛, 2012. 质膜钙离子 ATP 酶. 生物物理学报, 28(7): 549—564
王辅明, 朱祥伟, 马永鹏等, 2009. 低浓度五氯酚暴露对稀有鮰体内 SOD 活性、GSH 和 HSP70 含量的影响. 生态毒理学报, 4(3): 415—421

- 刘金林, 胡建英, 万 玮等, 2006. 海河流域和渤海湾沉积物和水样中五氯酚的分布. 环境化学, 25(5): 539—542
- 许文青, 樊柏林, 陈 明等, 2011. 五氯苯酚和五氯苯酚钠毒性作用研究进展. 中国药理学与毒理学杂志, 25(6): 596—600
- 李伟民, 尹大强, 周 岩等, 2003. 五氯酚对鲫鱼肝脏的氧化损伤. 生态与农村环境学报, 19(1): 40—42
- 杨淑贞, 韩晓冬, 陈 伟, 2005. 五氯酚对生物体的毒性研究进展. 环境与健康杂志, 22(5): 396—398
- 吴兆毅, 胡 平, 赵庆顺等, 2009. 五氯酚对斑马鱼胚胎发育期 Wnt 信号通路的影响. 生态毒理学报, 4(4): 494—499
- 邱纪时, 钟惠英, 祝翔宇等, 2016. 杭州湾南岸海水中的氯酚类化合物的污染特征及生态风险评价. 海洋环境科学, 35(2): 231—237
- 张 民, 顾宇飞, 顾 颖等, 2005. 低浓度五氯酚对鲫鱼血液细胞毒性的体外研究. 环境化学, 24(3): 302—306
- 张 兵, 郑明辉, 刘芑岩等, 2001. 五氯酚在洞庭湖环境介质中的分布. 中国环境科学, 21(2): 165—167
- 张文生, 许小青, 周静珍等, 1995. 金坛地区五氯酚环境污染及其对人群健康影响. 江苏预防医学, (2): 20—23
- 罗 辉, 叶 华, 肖世俊等, 2015. 转录组学技术在水产动物研究中的运用. 水产学报, 39(4): 598—607
- 金小伟, 查金苗, 许宜平等, 2009. 3 种氯酚类化合物对河蚬的毒性和氧化应激. 生态毒理学报, 4(6): 816—822
- 房彦军, 高先军, 查金苗等, 2009. 三氯酚暴露致稀有鮎鲫肝脏损伤的比较蛋白质组研究. 生态毒理学报, 4(6): 834—840
- 曹 莹, 2005. Fgf17b 及其负反馈因子 Mkp3 在斑马鱼胚胎早期发育中的作用. 北京: 清华大学博士学位论文
- 董 军, 李向丽, 栾天罡等, 2009. 珠江口地区沉积物中酚类物质污染及其生态安全评价. 安全与环境学报, 9(5): 113—116
- 潘泳嘉, 周遵春, 王 摆等, 2016. 苯系物联合暴露仿刺参管足转录组差异表达基因分析. 生态毒理学报, 11(6): 82—92
- Bougas B, Normandeau E, Pierron F *et al*, 2013. How does exposure to nickel and cadmium affect the transcriptome of yellow perch (*Perca flavescens*)—results from a 1000 candidate-gene microarray. Aquatic Toxicology, 142—143: 355—364
- Cadigan K M, Nusse R, 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. Genes & Development, 11(24): 3286—3305
- do Nascimento N R, Nicola S M C, Rezende M O O *et al*, 2004. Pollution by hexachlorobenzene and pentachlorophenol in the coastal plain of São Paulo state, Brazil. Geoderma, 121(3—4): 221—232
- Elran R, Raam M, Kraus R *et al*, 2014. Early and late response of *Nematostella vectensis* transcriptome to heavy metals. Molecular Ecology, 23(19): 4722—4736
- Guo H, Ye C X, Wang A L *et al*, 2013. Transcriptome analysis of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to nitrite by RNA-seq. Fish & Shellfish Immunology, 35(6): 2008—2016
- Hook S E, Osborn H L, Gissi F *et al*, 2014. RNA-Seq analysis of the toxicant-induced transcriptome of the marine diatom, *Ceratoneis closterium*. Marine Genomics, 16: 45—53
- Huang Q S, Dong S J, Fang C *et al*, 2012. Deep sequencing-based transcriptome profiling analysis of *Oryzias melastigma* exposed to PFOS. Aquatic Toxicology, 120—121: 54—58
- Hussainzada N, Lewis J A, Baer C E *et al*, 2014. Whole adult organism transcriptional profiling of acute metal exposures in male Zebrafish. BMC Pharmacology and Toxicology, 15(1): 15
- Kawaguchi M, Ishii Y, Sakui N *et al*, 2005. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for determination of chlorophenols in water and body fluid samples. Analytica Chimica Acta, 533(1): 57—65
- Kot-Wasik A, Dębska J, Namieśnik J, 2004. Monitoring of organic pollutants in coastal waters of the Gulf of Gdańsk, Southern Baltic. Marine Pollution Bulletin, 49(3): 264—276
- Liu Y, Wen B, Shan X Q, 2006. Determination of pentachlorophenol in wastewater irrigated soils and incubated earthworms. Talanta, 69(5): 1254—1259
- Lockhart D J, Winzler E A, 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays. Nature, 405(6788): 827—836
- Pilon N, Oh K, Sylvestre J R *et al*, 2006. *Cdx4* is a direct target of the canonical Wnt pathway. Developmental Biology, 289(1): 55—63
- Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A *et al*, 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. Genome Research, 11(8): 1441—1452
- U.S. Environmental Protection Agency, 1992. Guidelines for exposure assessment. Federal Register, 57(104): 22888—22938

TRANSCRIPTOMIC PROFILES OF *LATEOLABRAX JAPONICUS* LIVER INJURED BY PENTACHLOROPHENOL STRESS

ZHENG Dan^{1,2}, JIAO Hai-Feng², YAN Xiao-Jun¹, ZHANG Le³, RUAN Song-Lin³

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Ningbo Academy of Oceanology and Fishery, Ningbo 315103, China;

3. Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract To analyze the toxic mechanism of *Lateolabrax japonicus* liver injury after exposure to different concentrations of pentachlorophenol (0, 0.1, 1.0, 10.0, and 100 μ g/L), we conducted the transcriptome sequencing and analysis by Illumina HiSeq^{TM2000}. A total of 247914284 clean reads and 53716 genes were determined by software Trinity. By comparing the four stress groups with the control, the number of common differentially expressed genes was 135, and the number of specific differentially expressed genes was from 127 to 819. These unigenes were partially matched with known proteins in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database, as determined by BLAST search, with 21459, 26464, 18896, 12403, 17262, and 19159 unigenes assigned to Swiss-Prot, Nr database, Pfam database, KEGG, KOG and Gene Ontology (GO), respectively. The KEGG pathway analysis indicated that differentially expressed genes were enriched in 141 pathways of six categories. These differentially expressed genes were enriched in the signaling pathways that associated with environmental information process and immune system, and as well as in the signal endocrine system, cell communication, transport and catabolic processes. The result of KOG database prediction and classification indicates that 16571 genes are enriched in the 25 categories. About these genes, the function of general functional predictions and signal transduction mechanisms accounted for the largest proportion. The pathways involved in post-translational modification, protein conversion, and molecular chaperone pathways also accounted for a large proportion. Overall, the signal transduction system of *L. japonicus* was first responded after pentachlorophenol stress, resulting in the body disorder.

Key words *Lateolabrax japonicus*; transcriptome; pentachlorophenol; differentially expressed genes