

六价铬在斜带石斑鱼胚胎中的生物累积及其对*igt2*、*glut2*和*pparg*基因表达的影响

周小芳 张鹏飞 曾会玲 叶恒振 冯浩 李慧莹 靳方方 梁智策 郭志强

EFFECTS OF WATERBORNE HEXAVALENT CHROMIUM (Cr^{6+}) EXPOSURE ON CR BIOACCUMULATION, *IGF2*, *GLUT2* AND *PPARG* EXPRESSION ON GROUPER EMBRYO DEVELOPMENT

ZHOU Xiao-Fang, ZHANG Peng-Fei, ZENG Hui-Ling, YE Hen-Zhen, FENG Hao, LI Hui-Ying, JIN Fang-Fang, LIANG Zhi-Ceng, GUO Zhi-Qiang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2020.138>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

斜带石斑鱼L-氨基酸氧化酶基因克隆及表达分析

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION ANALYSIS OF L-AMINO ACID OXIDASE IN GROUPER (*EPINEPHELUS COIOIDES*)

水生生物学报. 2020, 44(2): 303–309 <https://doi.org/10.7541/2020.037>

嗜酸乳杆菌对斜带石斑鱼幼鱼生长、消化性能和抗病力的影响

EFFECTS OF *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* (GIM:1.730) ON GROWTH, DIGESTIVE CAPACITY, DISEASE RESISTANCE OF JUVENILE, *EPINEPHELUS COIOIDES*

水生生物学报. 2019, 43(5): 992–1000 <https://doi.org/10.7541/2019.118>

三种不同的铜源对珍珠龙胆石斑鱼生长、抗氧化酶活性及肠道形态的影响

EFFECTS OF THREE KIND CU SOURCES ON GROWTH PERFORMANCE, ANTIOXIDANT ENZYMES AND INTESTINAL MORPHOLOGY OF JUVENILE PEARL GENTIAN GROUPER (*EPINEPHELUS LANCELATUS* ♂ × *EPINEPHELUS FUSCOCUTTATUS* ♀)

水生生物学报. 2019, 43(4): 739–747 <https://doi.org/10.7541/2019.087>

南海石斑鱼苗种肠道微孢子虫病病原的鉴定

THE TAXONOMIC POSITION OF CAUSATIVE AGENT OF ENTERIC MICROSPORIDIOSIS OF HATCHERY-BRED JUVENILE GROUPER, *EPINEPHELUS* SPP., CULTURED IN THE AREA OFF COAST OF SOUTH CHINA SEA

水生生物学报. 2018, 42(5): 942–949 <https://doi.org/10.7541/2018.116>

兴国红鲤*ER*基因克隆表达及EE2暴露对肝中*ER*表达的影响

CLONE AND EXPRESSION OF *ER* GENES IN XINGGUO RED CARP AND THEIR EXPRESSION IN LIVER UPON EE2 EXPOSURE IN JUVENILES

水生生物学报. 2017, 41(1): 26–32 <https://doi.org/10.7541/2017.4>

草鱼*cadm2b*基因的克隆及在成体组织中的表达分析

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSING ANALYSIS OF *CADM2B* IN ADULT TISSUES OF GRASS CARP, *CTENOPHARYNGODON IDELLUS*

水生生物学报. 2017, 41(1): 9–17 <https://doi.org/10.7541/2017.2>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2020.138

六价铬在斜带石斑鱼胚胎中的生物累积及其对*igf2*、*glut2*和 *pparg*基因表达的影响

周小芳¹ 张鹏飞¹ 曾会玲¹ 叶恒振¹ 冯浩¹ 李慧莹¹ 靳方方¹
梁智策¹ 郭志强²

(1. 海南大学海洋学院, 南海海洋资源利用国家重点实验室, 海口 570228; 2. 海南大学生命科学与药学院,
热带生物资源教育部重点实验室, 海口 570228)

摘要: 以斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)为研究对象, 探讨了水中不同浓度梯度六价铬(0、0.20、0.60、1、5、10、20、40、60和80 mg/L)在胚胎发育不同阶段(桑葚期、囊胚期、原肠末期、脑泡形成期和心脏跳动期)的生物累积及其对细胞生长基因*igf2*和营养代谢基因*glut2*、*pparg*的mRNA表达的影响。结果表明, 胚胎中Cr⁶⁺生物累积量和吸收率随暴露浓度的增加而增加, 且吸收率随胚胎发育时期的延伸而降低。在桑葚期时, 斜带石斑鱼胚胎吸收Cr⁶⁺能力最强, 是心脏跳动期的20倍。在桑葚期、囊胚期和原肠末期, Cr⁶⁺对胚胎中*igf2*和*glut2*基因mRNA表达水平有显著促进作用($P < 0.05$), 但对*pparg*基因mRNA表达水平有显著抑制作用($P < 0.05$)。在原肠末期和脑泡形成期, Cr⁶⁺对胚胎中*pparg*基因mRNA表达水平有显著促进作用($P < 0.05$)。研究表明水中Cr⁶⁺暴露在斜带石斑鱼胚胎发育过程中有明显的生物累积, 且对细胞生长水平和营养代谢有明显的影响, 研究为斜带石斑鱼早期生活史阶段适宜生境和资源保护提供了理论基础。

关键词: 六价铬; 生物累积; 斜带石斑鱼; 胚胎; *igf2*; *glut2*; *pparg*

中图分类号: S941.99 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2020)06-1191-08

斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*), 俗称青斑, 是石斑鱼属极具代表性的养殖品种^[1], 我国野生斜带石斑鱼种群主要分布于南海海域和台湾海峡^[2]。海南岛东部岛屿是南海斜带石斑鱼最主要的栖息地之一^[1, 3]。近十几年来, 我国野生斜带石斑鱼资源日益衰退^[3]。因此, 对该鱼野生资源的保护已是迫在眉睫。在前期研究过程中, 有研究发现环境污染是斜带石斑鱼资源退化的重要原因之一^[1], 但是相关的研究极其缺乏。

重金属是近海环境中主要的环境污染物之一, 主要通过水体和食物途径累积到水生生物体内^[4, 6], 对机体产生氧化胁迫、组织损伤和基因突变等毒害作用^[7, 9]。铬(Cr)是环境中常见的重金属污染物, Cr在环境中主要以Cr⁶⁺和Cr³⁺两种价态存在。即使在较低的浓度下, Cr⁶⁺也可能是剧毒的^[10]。水体中

Cr⁶⁺的污染对水生生物及鱼类具有生物毒性, 主要包括对细胞水平、免疫水平和抗氧化应激酶等方面具有毒性效应^[11, 14]。

鱼类早期生活阶段对外界环境极为敏感, 即使低浓度的重金属暴露也可能对其胚胎发育和仔鱼生长存活造成损害, 导致种群数量和质量的降低^[15]。因此, 利用鱼类胚胎和仔鱼对重金属的毒理学反应进行生物监测已成为评价水体污染效应的重要手段^[15]。目前重金属对鱼类早期发育阶段研究已取得初步进展, 主要采用孵化率、孵化时间和畸形率等发育指标展开研究, 常忽略了胚胎发育阶段对污染物的生物累积和分子监测指标方面的研究。石斑鱼胚胎发育属于内源性营养, 而胰岛素样生长因子2(Insulin like growth factor 2, IGF2)、葡萄糖转运蛋白(Glucose transporter 2, GLUT₂)和过氧化物酶

收稿日期: 2019-08-05; 修订日期: 2020-03-11

基金项目: 国家自然科学基金(31872574和41866003); 海南大学科研启动基金(KYQD(ZR)1803)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31872574, 41866003); Research Foundation of Hainan University (KYQD(ZR)1803)]

作者简介: 周小芳(1994—), 女, 硕士; 研究方向为鱼类痕量生理与毒理学。E-mail: 553590173@qq.com

通信作者: 郭志强(1983—), 男, 教授; 主要研究方向为鱼类痕量生理与毒理学。E-mail: guozq@scsio.ac.cn

体增植物激活受体(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPARG)这3种基因在生长和营养功能方面起着重要作用,可用作胚胎发育的分子指标。*igf2*具有刺激DNA和蛋白质合成,促进细胞有丝分裂,调节糖原代谢的作用,是最早发现的内源性印记基因之一,也是胚胎发育的主要促进因子^[16]。*glut2*基因和*pparg*基因分别为糖代谢水平和脂质代谢水平的重要基因,其中*glut2*基因是调节胰岛素分泌的葡萄糖传感器^[17],而*pparg*基因是脂肪组织中调控脂肪酸代谢的核心转录因子,影响脂肪细胞脂肪酸沉积及脂滴形成,也是脂肪细胞生长、分化的重要指示基因^[18]。

为了深入研究重金属在胚胎发育过程中的吸收和生物累积规律及其对胚胎发育过程中关键基因表达的影响,本实验研究了水体中 Cr^{6+} 在斜带石斑鱼胚胎中的生物累积量和吸收率及其对*glut2*、*igf2*和*pparg*基因mRNA表达的影响,评价 Cr^{6+} 暴露对石斑鱼胚胎细胞发育和营养代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

斜带石斑鱼受精卵于2018年4月1日购自海南晨海水产有限公司(陵水基地)。受精卵收集后,洗净,除去未受精的卵,取上浮受精卵置于孵化桶中用于 Cr^{6+} 暴露实验。斜带石斑鱼的受精卵呈圆球形,为浮性卵,卵径为 (0.85 ± 0.01) mm,油球直径为 (0.27 ± 0.01) mm。

实验所用重铬酸钾($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)试剂为分析纯(CAS No: 7646-85-7,纯度>99.9%,购自国药化学试剂公司),先用去离子水配制成浓度3000 mg/L Cr^{6+} 母液备用,实验前用膜过滤($0.22 \mu\text{m}$ 滤膜)海水,并稀释 Cr^{6+} 溶液成所需浓度。据预实验及相关研究^[19,20],确定0.20、0.60、1、5、10、20、40、60、80 mg/L 9个 Cr^{6+} 质量浓度梯度进行暴露实验,每个浓度设3个平行,实验使用500 mL的烧杯,共20个烧杯,用10 mL移液枪吸约受精卵(显微镜下均为刚受完精鱼卵)1万粒加入各个烧杯中,实验期间用气石曝气保持水体正常溶氧,光周期14L:10D,实验海水盐度 $(32 \pm 1)\text{‰}$,温度 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, pH为 7.5 ± 0.30 ,溶解氧 (6.3 ± 0.80) mg/L(平均值 $\pm$ SD, $n=3$)。实验周期为30h,分别在3h11min(桑葚胚期)、5h42min(囊胚期)、10h45min(原肠末期)、17h30min(脑泡形成期)、24h25min(心脏跳动期)取样,用于测定其累积量样品放置 -20°C 冰箱,用于测定分子样品放置 -80°C 冰箱,每个浓度一式5份样品进行分析。

Cr^{6+} 暴露实验期间,各处理组中 Cr^{6+} 的实测浓

度误差均<10%,符合OECD关于此类实验误差在 $\pm 20\%$ 范围内的要求^[21]。

1.2 样品测定

样品 Cr^{6+} 含量测定 样品解冻后用蒸馏水清洗两遍除去表面的 Cr^{6+} ,然后置于烘箱 65°C 下48h烘干至恒重,称重后转移至15 mL离心管,加入1 mL HNO_3 (69%, ultrapure, Fisher Scientific, Geel, Belgium), 80°C 下消化48h。使用电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS; iCAP RQ Thermo Fisher, USA)测定样品中的 Cr^{6+} 含量。

总RNA的提取及反转录 总RNA抽提试剂Trizol购自Invitrogen公司。总的RNA用反转录试剂盒(公司)反转录。实时定量PCR试剂盒SYBR Premix ExTaq购自TaKaRa公司,反应在实时定量PCR仪(ABI7500 Real-Time PCR System, 美国)上进行。测出的数据用内参 β -actin进行归一化处理。

引物设计 荧光定量PCR引物采用Primer 5.0软件设计,由广州天一辉远生物科技有限公司合成,引物序列及参数见表1。

反应体系及条件 使用10 μL 荧光定量扩增体系,反应条件为: 95°C 30s预变性; 95°C 5s, 58°C 30s,进行40个循环。每循环第2步结束时进行荧光信号收集。每个待测样品设置3个重复,对3个阈值循环(C_t 值)取平均值,以备带入公式计算。

标准曲线的建立 分别将 β -actin、*igf2*、*glut2*和*pparg*4个基因的反转录产物用RNA-free离子水梯度稀释成 10^{-9} —1,选择 10^{-6} —1共7个浓度为标准品,标准品反应条件同上,设置3个重复。基线由实时定量PCR仪自动设置,标准曲线由软件自动分析,得到斜率和扩增效率。

产物测序 PCR产物由广州天一辉远生物技术有限公司测序,登陆NCBI网站上与所找的鱼类的序列同源性比较,测得同源性均为98%以上。

表1 为所合成引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因名称 Gene	引物Primer (5'—3')	登录号Accession number
<i>β-actin</i>	F1 TACGAGCTGCCTGACG GACA	HQ441040.1
	R1 CGCTGTGATCTCCTTC TGCA	
<i>igf2</i>	F1 AAACCCGCCAAGTCCG	AY552787.1
	R1 CGCCTGCCTCCGAAAC	
<i>glut2</i>	F1 GACTGCGATGGGTCTT TGC	KY656467.1
	R1 GCTGATGAGGATGCCA ATAAC	
<i>pparg</i>	F1 TCCACCGCAGCACGAA	KM052849.1
	R1 AAACCCTTACAGCCCC TCACA	

1.3 数据统计

吸收率 $[J_w, \mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})]$ 通过计算其生物累积量和暴露时长两个变量的线性回归方程斜率获得, 吸收常数 k_u 按如下公式计算^[22]:

$$k_u = \frac{J_w}{C_w^b}$$

式中, k_u 代表胚胎对水相 Cr^{6+} 的累积能力, b 代表常数, C_w 是水相 Cr^{6+} 浓度(mg/L)。

根据系统自动分析的*igf2*、*glut2*、*pparg*及 β -*actin*标准曲线的斜率可得PCR扩增效率:

$$E=10^{-1/\text{Slope}}$$

式中, E 扩增效率, Slope 为标准曲线斜率。 *igf2*、*glut2*、*pparg*及 β -*actin*的扩增效率都接近100%且相互间效率偏差在5%以内, 以目的基因mRNA的拷贝数与对应样品内参基因mRNA的拷贝数的比值表示基因mRNA的相对表达量。

所有数据以平均值 $\pm$ 标准差($\text{Mean}\pm\text{SD}$)表示, 采用 t 检验检查处理组与对照组之间的差异显著性来判断其 Cr^{6+} 暴露对胚胎重金属吸收、累积及目的基因表达的影响, $P<0.05$ 表示差异显著。数据统计分析使用SPSS19.0软件, 图表制作采用Sigmaplot和Graphpad prism软件。

2 结果

2.1 六价铬在胚胎发育过程中的生物累积和吸收率

如图1所示, 各发育时期胚胎的生物累积量随着浓度的增加而呈线性增加。低浓度 Cr^{6+} 暴露组

($\text{Cr}^{6+}\leq 5 \text{ mg}/\text{L}$), 生物累积量在胚胎发育期间变化不显著, 而在高浓度 Cr^{6+} 暴露组(Cr^{6+} 为60和80 mg/L), Cr^{6+} 在胚胎发育期间持续累积。

如图2所示, 不同发育时期的胚胎吸收率不仅随暴露浓度的增加而增加, 还随着胚胎的发育时期而逐渐降低。桑葚胚期、囊胚期、原肠末期、脑泡形成期和心脏跳动期的 Cr 吸收常数 k_u 分别是2.79、0.50、0.25、0.18和0.14 $\text{L}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。

2.2 六价铬暴露对斜带石斑鱼胚胎发育时期*igf2*基因的mRNA表达量的影响

与对照组相比, 在桑葚期浓度为0.6、1、10和

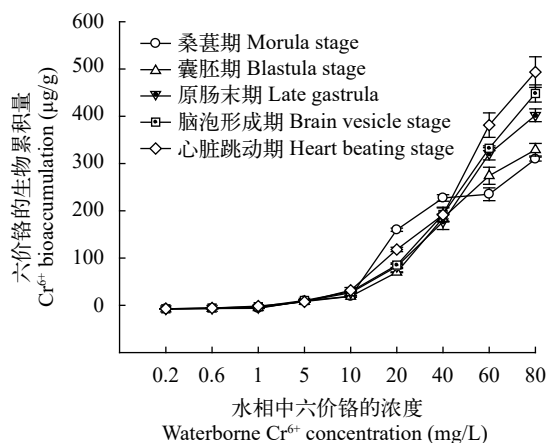


图1 在不同浓度的 Cr^{6+} 暴露下的斜带石斑鱼胚胎发育时期的 Cr^{6+} 生物累积量

Fig. 1 The Cr^{6+} bioaccumulation ($\mu\text{g}/\text{g}$) in *Epinephelus coioides* embryos under waterborne Cr^{6+} treatment

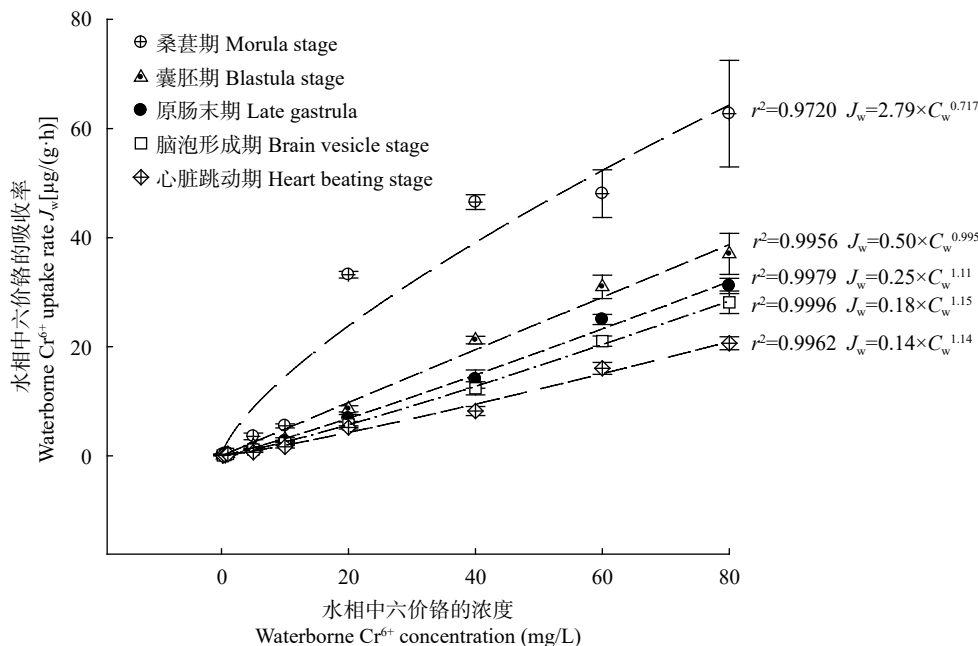


图2 在不同浓度的 Cr^{6+} 暴露下的斜带石斑鱼胚胎不同发育时期的 Cr^{6+} 吸收率

Fig. 2 The Cr^{6+} uptake rate [$\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$] in *Epinephelus coioides* embryos under waterborne Cr^{6+} treatment

80 mg/L的 Cr^{6+} 暴露下, 石斑鱼胚胎的*igf2*基因的mRNA的表达量有显著促进作用(图 3A, $P<0.05$); 囊胚期时除了在浓度为60 mg/L的 Cr^{6+} 暴露下, 其他浓度的 Cr^{6+} 暴露, 对*igf2*基因mRNA的表达量有显著促进作用(图 3B, $P<0.05$); 在原肠末期时, 仅在浓度为1 mg/L的 Cr^{6+} 暴露下的表达量有显著促进作用(图 3C, $P<0.05$); 在脑泡形成期时, 在浓度为0.2、0.6、1和5 mg/L的 Cr^{6+} 暴露下的*igf2*基因mRNA的表达量有显著促进作用(图 3D, $P<0.05$); 在浓度为10—80 mg/L的 Cr^{6+} 暴露下的*igf2*基因mRNA的表达量为显著抑制作用(图 3E, $P<0.05$)。在*igf2*基因中, 在浓度为1 mg/L的 Cr^{6+} 暴露下的*igf2*基因mRNA的表达量在整个胚胎发育时期中为显著促进作用(图 3)。

2.3 六价铬暴露对斜带石斑鱼胚胎发育过程*glut2*基因的mRNA表达量影响

与对照组相比, 在桑葚期时, 除了在浓度为20和80 mg/L Cr^{6+} 暴露外, 其他浓度的 Cr^{6+} 暴露对*glut2*基因的mRNA的表达量有显著促进作用(图 4A, $P<0.05$); 在囊胚期(图 4B), Cr^{6+} 暴露对*glut2*基因的mRNA的表达量有显著促进作用($P<0.05$); 而在原肠末期(图 4C)中仅在浓度为0.2—5 mg/L的 Cr^{6+} 暴露下有显著促进作用($P<0.05$); 在脑泡形成期(图 4D)时, 仅在浓度为0.6、1和20 mg/L Cr^{6+} 暴露下, *glut2*基因的mRNA的表达量有显著促进作用($P<0.05$); 在心脏跳动期(图 4E)时, 在浓度为0.2、0.6、1、5和20 mg/L的 Cr^{6+} 暴露下, *glut2*基因的mRNA的表达量有显著性作用($P<0.05$), *glut2*基因的mRNA的表达量, 在浓度为80 mg/L的六价铬暴露下被显著抑制($P<0.05$)。在*glut2*基因中发现, 浓度为0.2—5 mg/L的 Cr^{6+} 暴露下, mRNA的表达量在石斑鱼胚胎发育的5个时期中都为显著促进作用(图 4)。

2.4 六价铬暴露对斜带石斑鱼胚胎发育时期*pparg*基因的mRNA表达量的影响

与对照组相比, 在桑葚期(图 5A)和囊胚期(图 5B)中, Cr^{6+} 暴露下的*pparg*基因的mRNA的表达量被显著抑制或不表达($P<0.05$); 在心脏跳动期(图 5E)时, 仅在浓度为5 mg/L的 Cr^{6+} 暴露下有显著促进作用($P<0.05$); 在原肠末期(图 5C)和脑泡形成期(图 5D)中, Cr^{6+} 暴露下的*pparg*基因的mRNA的表达量有显著促进作用($P<0.05$); 特别是在脑泡形成期(图 5D)时, 仅在最高浓度80 mg/L暴露下的 Cr^{6+} *pparg*基因的mRNA的表达量无显著差异。在 Cr^{6+} 暴露下的石斑鱼胚胎在发育的5个时期中, *pparg*基因的mRNA的表达水平普遍被抑制或者无明显差异, 仅在原肠末期(图 5C)和脑泡形成期(图 5D)时, *pparg*基因的mRNA的表达量显著促进作用($P<0.05$)。

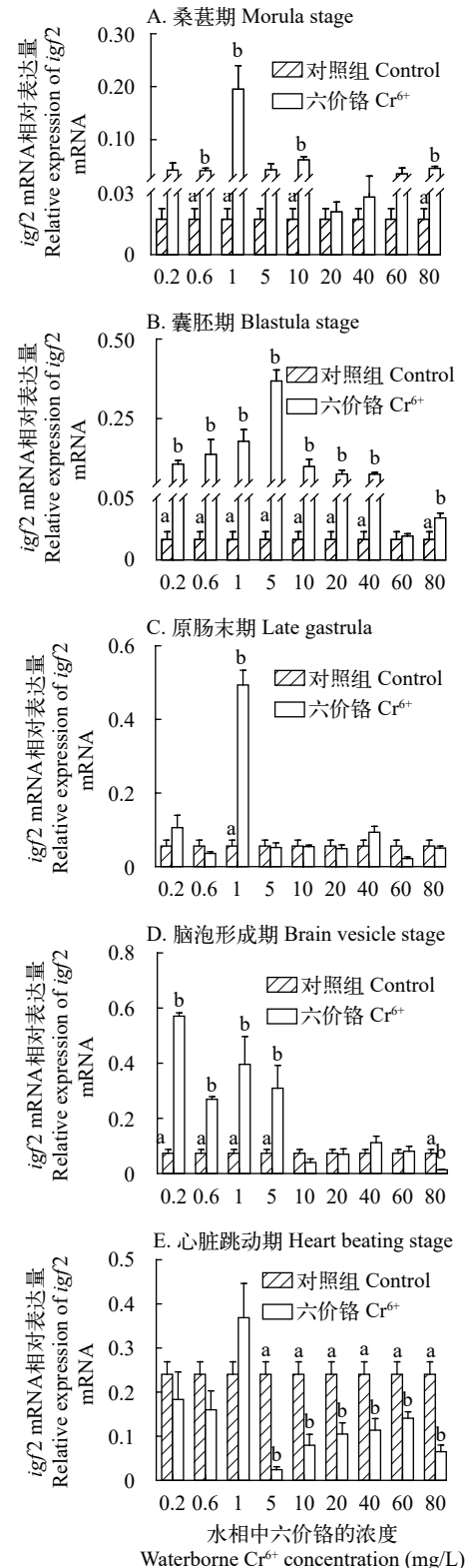


图 3 不同浓度 Cr^{6+} 暴露下的斜带石斑鱼胚胎发育时期*igf2*基因的mRNA的表达水平

Fig. 3 The effect of waterborne Cr^{6+} exposure on insulin like growth factor 2 (*igf2*) gene expressions in the grouper embryos

不同小写字母代表显著性差异($P<0.05$); 下同

The means with different letters were significantly different ($P<0.05$). The same applies below

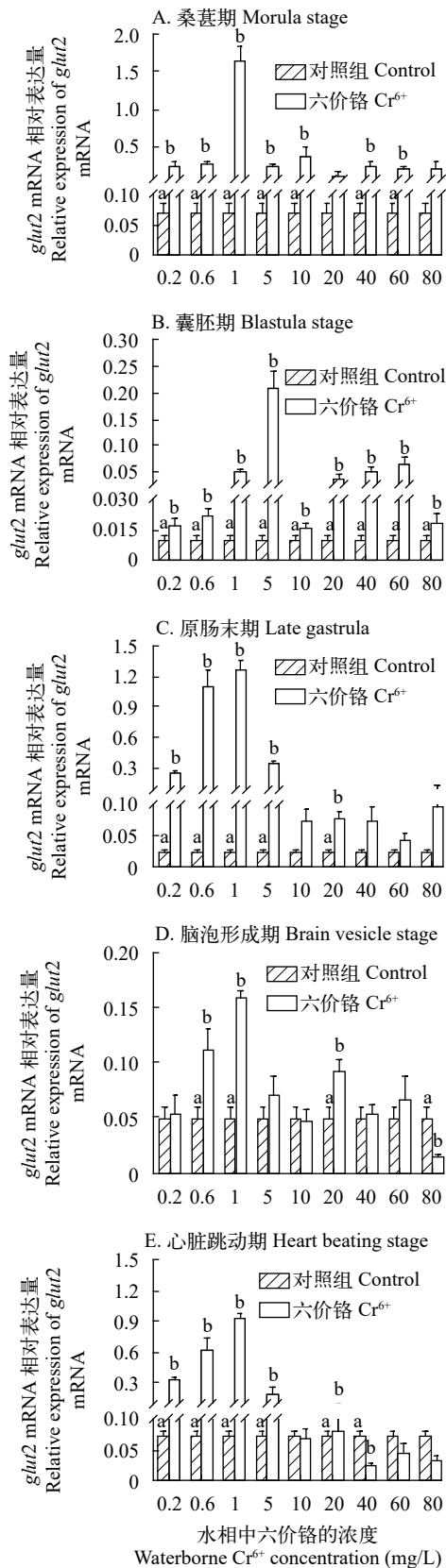


图4 不同浓度 Cr^{6+} 暴露下的斜带石斑鱼胚胎发育时期*glut2*基因mRNA的表达水平

Fig. 4 The effect of waterborne Cr^{6+} exposure on glucose transporter 2 (*glut2*) gene expressions in the grouper embryos

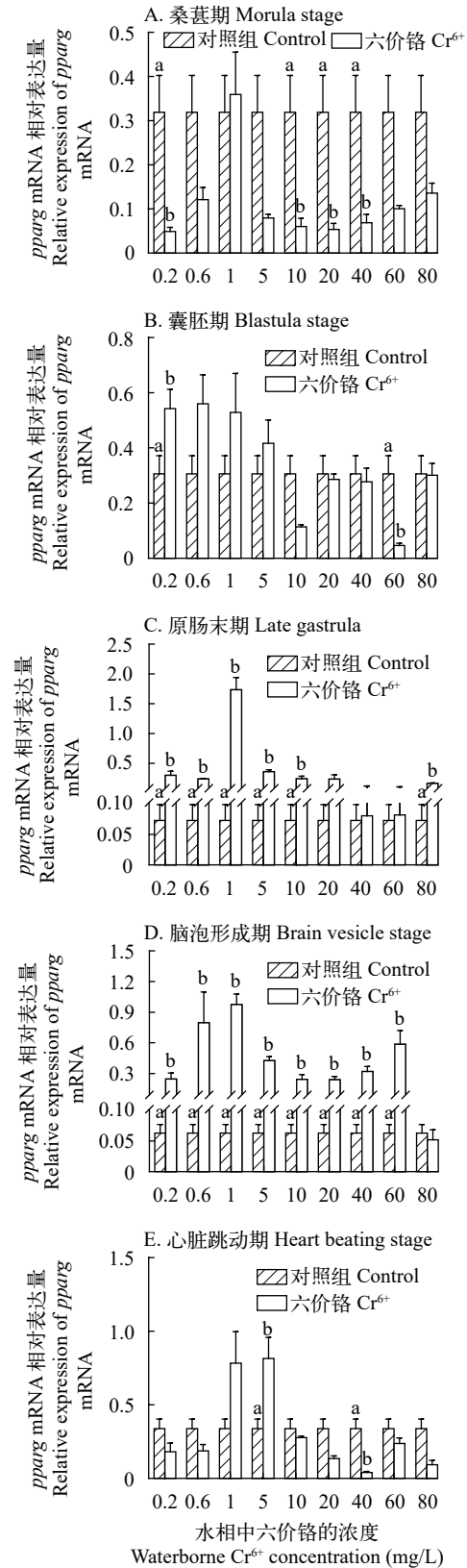


图5 在不同浓度 Cr^{6+} 暴露下的斜带石斑鱼胚胎发育时期的*pparg*基因的mRNA的表达水平

Fig. 5 The effect of waterborne Cr^{6+} exposure on peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*pparg*) gene expressions in the grouper embryos

3 讨论

3.1 斜带石斑鱼胚胎对六价铬吸收和累积

环境中 Cr^{6+} 通过细胞膜离子通道进入细胞并产生危害^[23]。本实验设置更大区间的 Cr^{6+} 暴露,并通过计算动力学参数首次量化了斜带石斑鱼胚胎对重金属的吸收和生物累积作用。发现石斑鱼胚胎在 Cr^{6+} 暴露下的生物累积量随浓度的增加而增加,暴露浓度越高,其胚胎的生物累积量越高;有研究报道,鱼类组织中 Cr^{6+} 的浓度升高是导致每个营养级水平的生物放大作用产生根本原因,尤其是底栖肉食性鱼类^[24]。同时 Cr^{6+} 及其化合物为剧毒物且容易进入细胞产生毒性^[23],随着暴露时间的增加,胚胎的生物累积量逐渐增加并达到饱和状态,因此随着胚胎的发育其吸收率也随之降低;另一方面,随着胚胎内 Cr^{6+} 的累积,重金属的生物毒性会导致胚胎内的生命活动减弱直至停止,相应的胚胎对 Cr^{6+} 的吸收率也随之降低。

3.2 六价铬暴露影响了斜带石斑鱼胚胎胰岛素样生长因子

*igf2*基因是胚胎发育的促进因子^[13]。斜带石斑鱼桑葚胚期、囊胚期、原肠末期和脑泡形成期胚胎在低浓度(0.2—5 mg/L) Cr^{6+} 暴露下,*igf2*基因mRNA表达水平显著高于对照组($P<0.05$)。生长激素会影响棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)中的*igf2*基因水平,低浓度1和10 nmol/L促进*igf2* mRNA显著高于高浓度100 nmol/L处理组^[25]。在石斑鱼胚胎心脏形成期,*igf2*基因mRNA水平显著低于对照组($P<0.05$)。我们推测 Cr^{6+} 对石斑鱼胚胎*igf2*基因mRNA表达具有剂量效应,即低剂量 Cr^{6+} 短时间暴露刺激而高剂量以及长时间暴露则抑制该基因在胚胎发育期间的表达。在本次实验结束后不同保留浓度的孵化率也间接验证了这一推断。在实验结束时,经过28h的孵化对照组及低浓度暴露组(0.2、0.6、1和5 mg/L)胚胎全部孵化成仔鱼,而高浓度组(10、20、40和80 mg/L)胚胎孵化率极低(<30%),说明高浓度 Cr^{6+} 暴露严重阻碍了石斑鱼的胚胎发育。因此从本实验*igf2*基因表达的结果来看,高浓度 Cr^{6+} (10—80 mg/L)暴露会抑制斜带石斑鱼胚胎*igf2*基因mRNA表达进而延长胚胎发育时间。

3.3 六价铬暴露影响了斜带石斑鱼胚胎发育营养物质的代谢

*glut2*基因能促进葡萄糖转运效率,该基因表达量主要受激素水平,饥饿及胁迫水平^[26]的影响。比如武昌鱼(*Megalobrama amblycephala*)饥饿4d后,*glut2*基因的mRNA的表达水平高于饥饿1d和2d的

表达水平^[27]。本研究发现在中低浓度 Cr^{6+} (0.2—5 mg/L)暴露下,石斑鱼胚胎发育期间暴露在*glut2*基因mRNA水平显著高于对照组($P<0.05$),特别是浓度为1 mg/L的 Cr^{6+} 暴露下,*glut2*基因的mRNA的水平在整个胚胎发育过程中几乎是最高的,说明低浓度 Cr^{6+} 暴露能刺激*glut2*基因mRNA的表达水平。这可能是由于低剂量 Cr^{6+} 诱发的细胞内抗氧化等解毒反应额外增加了细胞的能量消耗,进而刺激*glut2*基因增加表达以提供更多能量。

激素会干扰*pparg*基因在各种生物中的调节功能^[28]。 Cr^{6+} 是一种“金属雌激素”^[29],在河鳟(*Salmo trutta fario*)幼鱼中分离的原代肝细胞暴露在不同浓度的雌二醇和睾酮中,发现低浓度的雌二醇会干扰*pparg*基因的mRNA的表达水平,而高浓度的睾酮也会干扰*pparg*基因的mRNA的表达水平^[30]。在本研究中,低浓度的 Cr^{6+} 暴露会刺激原肠末期和脑泡形成期的石斑鱼胚胎*pparg*基因的mRNA的表达水平。这有可能是由于重金属污染对鱼类胚胎发育器官形成期前的影响最大^[31],所以在斜带石斑鱼胚胎的原肠末期和脑泡形成期时低浓度的 Cr^{6+} 暴露,刺激了*pparg*基因的mRNA的表达来抵御由 Cr^{6+} 引起的应激反应。

4 结论

为探讨斜带石斑鱼胚胎发育不同时期在水相中 Cr^{6+} 的暴露,对其生物累积量、吸收率、细胞生长基因*igf2*、营养水平基因*glut2*和*pparg*的mRNA水平的影响。本研究发现 Cr^{6+} 生物累积量和吸收率不仅随暴露浓度的增加呈线性增加,还延长了胚胎孵化时间。相比其他胚胎发育时期,桑葚期吸收水中 Cr^{6+} 最强。在转录水平上我们发现*igf2*、*glut2*和*pparg*基因在浓度为0.2、0.60、1和5 mg/L的 Cr^{6+} 暴露下,mRNA的表达水平更显著。我们推测低浓度的0.2、0.60、1和5 mg/L的 Cr^{6+} 暴露就能引起石斑鱼胚胎在细胞生长水平和营养代谢水平的干扰作用。

参考文献:

- [1] Lin B, Huang Z W, Luo J, et al. Embryonic development observation of *Epinephelus fuscoguttatus* [J]. *Journal of Hainan Normal University (Natural Science)*, 2010, 23(1): 87-92. [林彬, 黄宗文, 骆剑, 等. 棕点石斑鱼胚胎发育的观察 [J]. 海南师范大学学报(自然科学版), 2010, 23(1): 87-92.]
- [2] Sadovy Y, Cornish A S. Reef Fishes of Hongkong [M]. Hongkong: Hongkong University Press, 2000: 1-270.
- [3] Luo J, Huang Z W, Chen G H, et al. Microsatellite ana-

- lyses of wild population and cultivation artificial propagation population in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) in the South China Sea [J]. *Journal of Tropical Organisms*, 2011, **2**(2): 123-128. [骆剑, 黄宗文, 陈国华, 等. 南海斜带石斑鱼野生群体与人工繁殖群体的微卫星分析 [J]. *热带生物学报*, 2011, **2**(2): 123-128.]
- [4] Rogers J T, Wood C M. Characterization of branchial lead-calcium interaction in the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2004, **207**(5): 813-825.
- [5] Grosell M, McDonald M D, Walsh P J, *et al.* Effects of prolonged copper exposure in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) II: copper accumulation, drinking rate and Na⁺/K⁺-ATPase activity in osmoregulatory tissue [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, **68**(3): 263-275.
- [6] Dai D F, Rabinovitch P S. Cardiac aging in mice and humans: the role of mitochondrial oxidative stress [J]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2009, **19**(7): 213-220.
- [7] Luo Q Y, Yan Y L, Li J, *et al.* On effect of lead on embryonic development and larval survival of Southern catfish (*Silurus meridionalis*) [J]. *Journal of Southwest China Normal University* (Natural Science Edition), 2015, **40**(5): 67-74. [罗其勇, 闫玉莲, 李健, 等. 水体中铅暴露对南方鲇*Silurus meridionalis*胚胎发育和仔鱼存活的影响 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2015, **40**(5): 67-74.]
- [8] Lloyd J R, Harding C L, Macaskie L E. Tc (VII) reduction and accumulation by immobilized cells of *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1997, **55**(3): 505-510.
- [9] Mishra V K, Tripathi B D. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes [J]. *Bioresource Technology*, 2008, **99**(15): 7091-7097.
- [10] Dhal B, Thatoi H N, Das N N, *et al.* Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: a review [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013(250): 272-291.
- [11] Al-Akel A S, Shamsi M J K. Hexavalent chromium: toxicity and impact on carbohydrate metabolism and haematological parameters of carp (*Cyprinus carpio* L) from Saudi arabia [J]. *Aquatic Sciences*, 1996, **58**(1): 24-30.
- [12] Hegde P, Qi R, Abernathy K, *et al.* A concise guide to cDNA microarray analysis [J]. *Biotechniques*, 2000, **29**(3): 548-562.
- [13] Mishra A K, Mohanty B. Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch) [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2008, **26**(2): 136-141.
- [14] Kubrak O I, Lushchak V, Lushchak J V, *et al.* Chromium effects on free radical processes in goldfish tissues: comparison of Cr (III) and Cr (VI) exposures on oxidative stress markers, glutathione status and antioxidant enzymes [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2010, **152**(3): 360-370.
- [15] Huang W, Cao L, Dou S Z. Studies of toxicity effects of heavy metals on early life stage of fish: a review [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, **40**(8): 1272-1288. [黄伟, 曹亮, 窦硕增. 重金属对鱼类早期发育的生态毒理效应 [J]. 水产学报, 2016, **40**(8): 1272-1288.]
- [16] Wang S K. Advances in the relationship between IGF2 genomic imprinting and tumorigenesis [J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 2010, **23**(2): 113-116. [王书奎. 胰岛素样生长因子2的基因组印迹及与肿瘤关系的研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2010, **23**(2): 113-116.]
- [17] Ohtsubo K, Chen M Z, Olefsky J M, *et al.* Pathway to diabetes through attenuation of pancreatic beta cell glycosylation and glucose transport [J]. *Nature Medicine*, 2011, **17**(9): 1067.
- [18] Beppu F, Hosokawa M, Tanaka L, *et al.* Potent inhibitory effect of trans 9, trans11 isomer of conjugated linoleic acid on the growth of human colon cancer cells [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2006, **17**(12): 830-836.
- [19] Chen W Y, Liao C M. Toxicokinetics/toxicodynamics links bioavailability for assessing arsenic uptake and toxicity in three aquaculture species [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2012, **19**(9): 3868-3878.
- [20] Zhang L, Wang W X. Alteration of dissolved cadmium and zinc uptake kinetics by metal pre-exposure in the black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 2006, **25**(5): 1312-1321.
- [21] TG212 O. Fish, short term toxicity test on embryo and sac-fry stages [J]. *Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development*, 1998: 9.
- [22] Wang W X, Rainbow P S. Comparative approaches to understand metal bioaccumulation in aquatic animals [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2008, **148**(4): 315-323.
- [23] Sasso A F, Schlosser P M. An evaluation of in vivo models for toxicokinetics of hexavalent chromium in the stomach [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2015, **287**(3): 293-298.
- [24] Obasohan E E. Heavy metals concentrations in the offal, gill, muscle and liver of a freshwater mudfish (*Parachanna obscura*) from Ogba River, Benin city, Nigeria [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2007, **6**(22): 426-438.
- [25] Yang H, Chen H, Zhao H, *et al.* Molecular cloning of the insulin-like growth factor 3 and difference in the expression of *igf* genes in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015(186):

- 68-75.
- [26] Zhang Y R, Wang R Y, Liu Z H, *et al.* The expression of glucose transporter 2 and protein tyrosine phosphatase-1B in the pancreas of pregnancy rats with thyrotoxicosis [J]. *Chinese Journal of Diabetes*, 2015, **23**(5): 459-462. [张艳荣, 王瑞英, 刘志红, 等. 葡萄糖转运蛋白2和蛋白酪氨酸磷酸酶-1B在甲状腺毒症妊娠大鼠胰腺中表达的观察 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2015, **23**(5): 459-462.]
- [27] Kapur K, Yadav N A. The effects of certain heavy metal salts on the development of eggs in common carp, *Cyprinus carpio* var. *communis* [J]. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 1982(10): 517-522.
- [28] Qiu W, Yang M, Liu J, *et al.* Bisphenol S-induced chronic inflammatory stress in liver via peroxisome proliferator-activated receptor γ using fish *in vivo* and *in vitro* models [J]. *Environmental Pollution*, 2019(246): 963-971.
- [29] Darbre P D. Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast [J]. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 2006, **26**(3): 191-197.
- [30] Lopes C, Madureira T V, Ferreira N, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in brown trout: Interference of estrogenic and androgenic inputs in primary hepatocytes [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2016(46): 328-336.
- [31] Kapur K, Yadav N A. The effects of certain heavy metal salts on the development of eggs in common carp, *Cyprinus carpio* var. *communis* [J]. *Acta Hydrochimica Hydrobiologica*, 1982(10): 517-522.

EFFECTS OF WATERBORNE HEXAVALENT CHROMIUM (Cr⁶⁺) EXPOSURE ON CR BIOACCUMULATION, *IGF2*, *GLUT2* AND *PPARG* EXPRESSION ON GROUPER EMBRYO DEVELOPMENT

ZHOU Xiao-Fang¹, ZHANG Peng-Fei¹, ZENG Hui-Ling¹, YE Hen-Zhen¹, FENG Hao¹, LI Hui-Ying¹, JIN Fang-Fang¹, LIANG Zhi-Ceng¹ and GUO Zhi-Qiang²

(1. State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea, School of Life and Pharmaceutical Sciences, College of Ocean, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Key Laboratory of Tropical Biological Resource of Ministry of Education, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: To investigate the bioaccumulation and genotoxicity of waterborne hexavalent chromium (Cr⁶⁺) in the embryos of the grouper (*Epinephelus coioides*), the embryos were exposed to a gradient levels of hexavalent chromium (0, 0.2, 0.6, 1, 5, 10, 20, 40, 60 and 80 mg/L) for 30 hours to measure the Cr bioaccumulation and the mRNA expression levels of cell growth gene *igf2*, nutrient metabolism genes *glut2* and *pparg* at the morula stage, the blastula stage, the late gastrula, the brain vesicle stage and the heart beating stage. The results showed that the Cr bioaccumulation and the uptake rate increased with the increased waterborne Cr⁶⁺, but the uptake rate decreased with the development of the embryo. The morula stage had the strongest ability to absorb waterborne Cr⁶⁺, which is 20 times that of the heart beating stage. At the morula stage, blastula stage and late gastrula, the waterborne Cr⁶⁺ exposure significantly promoted *igf2* and *glut2* mRNA expression, while it clearly inhibited the *pparg* mRNA expression ($P < 0.05$). At the late gastrula and the brain vesicle stage, the waterborne Cr⁶⁺ exposure enhanced significantly *pparg* mRNA expression ($P < 0.05$). These findings demonstrated that the waterborne Cr⁶⁺ exposure had a significance effect on the Cr bioaccumulation, cell growth and nutrient metabolism of grouper embryos, which provide a theoretical basis for the grouper embryos protection in the aquatic environment.

Key words: Cr⁶⁺; Bioaccumulation; *Epinephelus coioides*; Embryos; *igf2*; *glut2*; *pparg*