

DOI:10.11918/202401092

苯并芘对鲤鱼胆囊的毒性效应及响应机制

郝其睿^{1,2}, 张植元³, 王鹏¹, 范泽⁴, 李晨辉¹, 杨基先², 王威²

(1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所 农业农村部渔业环境及水产品质量监督检验测试中心(哈尔滨), 哈尔滨 150070;
2. 哈尔滨工业大学 环境学院, 哈尔滨 150090; 3. 四川水利职业技术学院 四川水利创新发展研究院, 成都 611231;
4. 黑龙江省水生动物病害与免疫重点实验室(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所), 哈尔滨 150070)

摘要: 为探讨苯并芘对鲤鱼胆囊的毒理机制, 以鲤鱼(*Cyprinus carpio*)为试验材料, 采用15 d慢性毒性试验(苯并芘质量浓度分别为0.0.025和0.25 mg/L), 通过检测鲤鱼胆囊中苯并芘质量分数、抗氧化参数、转录应答及免疫基因表达。结果显示: 胆囊组织中的苯并芘质量分数积累随着苯并芘胁迫质量浓度显著升高, 侧面反映了胆囊在解毒和排毒过程中扮演着重要角色; B[a]P暴露后胆囊抗氧化酶活性(超氧化物歧化酶、过氧化氢酶及谷胱甘肽过氧化物酶)和丙二醛浓度均升高, 表明机体可通过激活抗氧化酶系统以应对氧化应激; 低质量浓度B[a]P暴露会引起鲤胆囊组织的免疫应答, 激活Notch受体信号通路, 进而引起细胞凋亡并消除自身组织中过多或异常的细胞; 而高质量浓度B[a]P暴露会抑制RIG-I和Notch受体信号通路, 引起胆囊免疫稳态失衡, 细胞凋亡受到抑制, 从而延长异常细胞的存活时间, 并进一步激活免疫细胞, 导致自身组织的损伤。本研究初步揭示了鲤胆囊细胞应对苯并芘暴露的可能自我保护机制, 实现对水环境中多环芳烃污染的早期预警及生态风险评估提供理论基础。

关键词: 苯并芘; 鲤鱼; 胆囊; 氧化应激; 细胞凋亡

中图分类号: S949

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2024)06-0034-10

Toxic effects of benz[a]opyrene on gall bladder of common carp (*Cyprinus carpio*) and its response mechanism

HAO Qirui^{1,2}, ZHANG Zhiyuan³, WANG Peng¹, FAN Ze⁴, LI Chenhui¹, YANG Jixian², WANG Wei²

(1. Supervision, Inspection and Testing Center for Fishery Environment and Aquatic Products(Harbin), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;
2. School of Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China; 3. Sichuan Water Conservancy Innovation and Development Research Institute, Sichuan Water Conservancy Vocational College, Chengdu 611231, China; 4. Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Immune Technology of Heilongjiang Province (Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences), Harbin 150070, China)

Abstract: To explore the toxicological mechanism of benz[a]opyrene (B[a]P) in gall bladder for aquatic animals, common carp (*Cyprinus carpio*) was used as the experimental material in this study. A 15-day chronic toxicity test was conducted with different concentrations of B[a]P (0, 0.025 and 0.25 mg/L) exposure to examine the toxicological mechanisms of B[a]P on carp gall bladder by measuring the content of B[a]P, antioxidant parameters, transcriptional response and immune gene expressions in common carp gall bladder. Results show that the accumulation of B[a]P in gall bladder tissues increased significantly with the concentration of B[a]P stress, which indicates that gall bladder plays an important role in detoxification. The activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase) and the concentration of malondialdehyde increased after B[a]P exposure, indicating that the gall bladder can respond to oxidative stress by activating the antioxidant oxidase system. In addition, exposure to low concentrations of B[a]P can induce immune responses in common carp gall bladder tissues, activating the Notch receptor signaling pathway, thereby causing apoptosis and eliminating excessive or abnormal cells in their own tissues. However, high-concentration exposure to B[a]P can inhibit the RIG-I and Notch receptor signaling pathways, causing an imbalance in gall bladder immune homeostasis. This inhibition of cell apoptosis prolongs the survival time of abnormal cells, and further activates immune cells, leading to self-tissue damage. This study provides preliminary insights into the potent self-

收稿日期: 2024-01-29; 录用日期: 2024-03-22; 网络首发日期: 2024-05-08

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/23.1235.T.20240507.1615.002>

基金项目: 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2023TD60); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(HSY201904M)

作者简介: 郝其睿(1987—), 男, 博士, 助理研究员; 王威(1983—), 男, 博士, 教授, 博士生导师

通信作者: 李晨辉, lichenhui@hrfri.ac.cn; 王威, wangweirs@hit.edu.cn

protective mechanisms of common carp gall bladder cells in response to B[a]P exposure, laying the foundation for early warning and ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in water environment.

Keywords: benz[a]opyrene (B[a]P); common carp (*Cyprinus carpio*); gall bladder; oxidative stress; apoptosis

苯并芘(benz[a]opyrene, B[a]P)作为多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)中的一种,在全球水环境中的分布受到广泛关注。人为活动是B[a]P对水生生态系统造成污染的主要原因,包括城市径流、航运活动、冶炼厂和化石燃料的使用等^[1]。此外,不加选择地倾倒废物、化石燃料不完全燃烧、各种污水排放化学工业和石油及其副产品偶然泄漏到毗邻的陆地系统中都会造成水生生态系统的PAHs污染^[2-3]。进而导致水生生物将多环芳烃等污染物从水、沉积物和食物中吸收至组织中,引起水生生物毒害作用^[4]。在水体环境中,B[a]P普遍以附着于浮动颗粒或积淀物、溶解于水相以及胶体态3种形态存在。研究表明,中国湛江湾表层沉积物中的B[a]P质量分数高达19.90 ng/g干质量^[5];在中国渤海海域,表层海水中总PAHs质量浓度为139.16~1 717.87 ng/L,悬浮颗粒物的质量浓度为226.57~1 404.85 ng/L,沉积物中的质量分数为276.26~1 606.89 ng/g^[6];西北地中海地区溶解态和颗粒态PAHs分别高达217 ng/L和1 597 ng/L^[7]。因此,探究水生生物在B[a]P胁迫条件下造成的损伤与免疫应答机制具有重要意义。

全球水产养殖业正在以每年约6%的增长率迅速扩张,并已逐渐成为全球食品产业的一个不可或缺的支柱。鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[8]作为淡水生态系统中的一个重要组成部分,对于生态完整性具有不可忽视的影响。鲤鱼不仅是重要的食物链组成部分,还参与多种生态过程,包括营养物质、水体环境循环和改变。因此,鲤鱼的健康状况直接影响到生态系统的稳定性和生物多样性,其也经常被推荐用于评估水生生态系统中新出现或潜在环境污染物^[9]。同时,鲤鱼是一种在咸水和淡水生态系统中都能广泛分布的底栖-浮游鱼种,由于其杂食性和倾向于栖息在沉积物中的习性,相比浮游鱼更易于积累各种污染物。除了在生态系统科学研究中的不可替代价值外,鲤鱼在促进环境可持续性和生态系统管理方面也有一定贡献^[10-11]。综上,鲤鱼作为水生生态科学和环境科学研究的一个优秀模型生物,其在环境毒理学、可持续环境管理、环境风险评估与模拟等多个研究领域都具有科学价值和实用潜力。

鱼体内胆囊组织负责储存和排泄脂溶性物质,水生动物暴露于B[a]P后,会激活胆囊组织中的脂质代谢通路。胆囊分泌的胆汁不仅参与脂质的消

化,还有助于将体内的毒素排出体外^[12]。在B[a]P暴露后,胆囊可能会经历一系列复杂的适应性变化和损伤,进而激活胆囊组织中的氧化应激细胞凋亡通路。随着B[a]P在鲤鱼体内的降解和排出过程,相关的硫酸还原通路和氧化还原通路在胆囊组织中也会被激活^[13-14]。但目前缺乏苯并芘对鲤鱼胆囊组织的毒性效应及响应机制研究。

B[a]P对水环境造成的污染日益严重,但对其所带来的环境影响及健康风险评价尚不明确,缺乏相关基础数据。且在水生环境中,虽然基于鱼类的毒理学研究已较为广泛,但是针对位于食物链上层的鲤科鱼类毒性机制研究还鲜有报道。本研究取B[a]P作为受试PAHs,以鱼类模式生物——鲤鱼作为受试生物,以低质量浓度B[a]P暴露和高质量浓度B[a]P暴露的方式,采用生理学、分子生物学及转录组学等方法,系统解析B[a]P暴露对鲤鱼胆囊的毒性作用及其对B[a]P的应激响应机制。研究结果将为实现对水环境中以B[a]P为代表的PAHs污染早期预警提供重要理论基础,对环境污染风险评估和生物标志物的开发具有重要意义,并为中国经济鱼类养殖环境的监测与评估提供参考依据。

1 实验

1.1 实验材料

实验所用鲤鱼由中国水产科学研究院黑龙江水产研究所呼兰水产试验场提供。暴露实验所用苯并芘质量分数>98%,生产商为西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司(Sigma-Aldrich)。

1.2 实验设置

1.2.1 B[a]P暴露胁迫试验

选取质量为(50 ± 10) g的鲤鱼作为研究对象,养殖在200 L的水族箱中(见图1),水族箱使用循环充氧的淡水,用于鲤鱼暴露的水按照ISO-7346-3(ISO,1996)中的公式配制。在(26 ± 2) °C的条件下养殖两周,其间没有B[a]P暴露。适应期后,将鲤鱼转移到9个配备有水循环和自动供氧系统的200 L水族箱中。根据已有文献报道的B[a]P对鲤鱼的96 h半致死浓度来确定本实验中B[a]P暴露质量浓度^[15]。本实验分为3个处理组:对照组(无B[a]P暴露)、B[a]P低质量浓度暴露组(0.025 mg/L)和B[a]P高质量浓度暴露组(0.25 mg/L),每个处理组3个重复,每个重复30尾鱼。B[a]P以0.05%丙

酮为载体稀释至所需质量浓度,并投加至对应处理组的水族箱中。根据课题组先前的研究知丙酮不会在鱼体中残留^[16],因此,在本研究中仅设立了空白对照组。以 15 d 作为暴露周期,每日检测 B[a]P 质量浓度并进行相应调整。此外,实验所用鲤鱼均来自同一批次养殖。在鱼类饲养期间,每日定期更换 10% 的水体,每日换水后监测暴露组水体药品浓度。并严格控制每日光周期为 14 h:10 h(光处理时间:暗处理时间)。水族箱的水温、pH、溶解氧等参数均在标准范围内(水温为 $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$,pH 为 7.75 ± 0.75 ,溶解氧 $\geq 5\text{ mg/L}$),并通过自动监测系统实现实时调控。

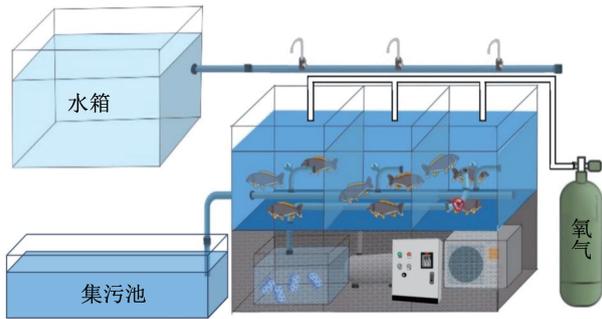


图 1 养殖装置简图

Fig. 1 Schematic diagram of breeding device

1.2.2 样品采样

试验结束时,经 100 mg/L 的 MS-222 麻醉后,每个缸取 3 尾鱼解剖获取胆囊, 0.9% 生理盐水(质量分数)清洗干净后保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,用于测定抗氧化酶活性;另取 3 尾鱼解剖取得胆囊用于免疫基因的检测,还有 2 尾鱼的胆囊用于转录组测序。

1.3 参数测定

1.3.1 抗氧化酶活性的测定

胆囊粗酶液的制备:将组织与 0.9% 生理盐水按照 1:9 比例配制成 10% 的组织匀浆液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min 后吸取上清液,存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。胆囊抗氧化相关指标(过氧化氢酶 CAT、谷胱甘肽过氧化物酶 GSHPx 及超氧化物歧化酶 SOD 活性,丙二醛 MDA 浓度)采用南京建成生物工程研究所测定试剂盒。

1.3.2 转录组测序

RNA 提取:使用 TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 进行样品总 RNA 的提取。具体步骤如下:将约 50 mg 的组织样品在 2 mL 的 TRIzol 试剂中均质化,添加 $200\text{ }\mu\text{L}$ 氯仿并充分混合,然后离心以分离相。取上层水相,并加入等体积的异丙醇以沉淀 RNA,沉淀物用 75% 乙醇(体积分数)洗涤后在 $50\text{ }\mu\text{L}$ DEPC 处理过的水中重悬。使用 NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA) 和 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 进行提取 RNA 的质量和数量评估,当 RIN 值(RNA 完整性数)大于 7 时,RNA 样品才可用于后续实验。

文库构建与测序:使用寡聚磁珠从总 RNA 中纯化含有 mRNA 的 Poly-A,并使用二价阳离子在 $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下裂解成 $200\text{ }\sim\text{ }600\text{ bp}$ 的片段。裂解后的 RNA 片段用于合成第一链和第二链互补 DNA (cDNA),dUTP 混合物用于第二链 cDNA 合成。使用 NEBNext[®] Ultra[™] RNA Library Prep Kit for Illumina[®] (NEB, Ipswich, MA, USA) 进行 RNA 的片段化和一链 cDNA 合成。具体而言,将 $1\text{ }\mu\text{g}$ 的总 RNA 在 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下加热 5 min 以进行片段化,然后使用随机六聚体引物和反转录酶进行一链 cDNA 合成。一链 cDNA 通过添加 dNTPs 和 DNA 聚合酶进行二链化。使用 T4 DNA 聚合酶进行 cDNA 片段末端修复,使用 T4 DNA 连接酶将预处理过的接头连接到修复过的 cDNA 末端。

使用带有接头特异性引物的 PCR 进行文库的扩增,其中 $10\text{ }\mu\text{L}$ PCR 反应体系包括 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 引物、 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ cDNA、 $5.0\text{ }\mu\text{L}$ SYBR 和 $4.0\text{ }\mu\text{L}$ 灭菌双蒸水,PCR 扩增程序为预变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5 min ,变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 15 s ,退火 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 15 s 和延伸 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 15 s 。文库用 Agilent 2200 进行质量控制,使用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行 150 bp 双端测序。其中,每个样本的测序深度至少为 30 兆读长。

数据处理与分析:使用 FastQC v0.11.9 进行原始测序数据的质量控制,使用 Trimmomatic v0.39 去除低质量的读取和接头。使用 HISAT2 v2.2.1 进行鲤鱼参考基因组比对(版本:CF_000951615.1),并使用 StringTie v2.1.5 进行转录本的组装和定量。使用 EBSeg2 v1.30.0 进行差异表达基因的分析。设置 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 和 $P < 0.05$ 作为显著差异表达的阈值。使用 Gene Ontology (GO) 和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 进行功能注释,使用 DAVID v6.8 进行 GO 和 KEGG 富集分析。使用 ggplot2 v3.3.3 进行数据可视化,包括热图、火山图和 PCA 图。

1.3.3 定量 Real-time PCR 验证

用于基因表达测定的胆囊经液氮迅速冷冻后,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。利用 Trizol 法提取各组织总 RNA,参照 TaKaRa PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Code No. RR047A) 说明书,将总 RNA 反转录为 cDNA。根据 Genbank 及相关文献中现有的鲤鱼相关基因的保守序列设计引物,所有引物均由生工生物工程(上海)

有限公司合成(表1)。实时荧光定量PCR反应根据SYBR® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (Code: RR420A) 试剂盒说明书进行,采用SYBR Green 染色法,在Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System 实时PCR检测系统下进行。为了避免扩

增批次间的差异,目的基因与其对应的内参基因同时扩增,每个模板均做3个重复,得到3个C_t值,取其平均值作为最终C_t值,后运用比较C_t法(ΔΔC_t)分析所得数据,得到各模板中基因的相对表达量,计算公式为:相对表达量 = 2^{-ΔΔC_t} = 2^{-(C_t处理 - C_t内参) - (C_t对照 - C_t内参)} [18]。

表1 试验所用引物

Tab.1 Primers in experiment

基因	上游引物	下游引物
<i>smcr8b</i>	AGCTGCAGCCTGATTTTCATGAAG	TATAGCGGTTACCTGTGATTAGAAA
<i>CTSΒ</i>	CTCGGCTGCAGCGCTGGTGAGTG	TTTGGGAGCAGGGAGAAGCTTTATTGA
<i>cxcl19</i>	ATGAACGTCCTGCTGATGTTAAGTGT	ACAAGAAACACAGAAAAGCATGATGATTC
<i>CXC chemokine</i>	AGATTACCCTTTGAAGAGGCTGTG	CCTCATTATCTTGTTTATTGAAAGTTTAAGCA
<i>Hey</i>	AGTCGAACGCCGTTCCGCGCACAC	CACTTATACACTCATCGCTTTATTTACA
<i>β-actin</i>	GATCGGCAATGAGCGTTTCC	ACCGTGTGGCATAACAGGTC

1.4 数据统计

所有数据均以平均值 ± 标准差表示,并利用SPSS23.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),若差异达到显著水平(P < 0.05),则进行Duncan's 法多重比较。采用GraphPad Prism 9.0 绘制图形。

2 实验结果

2.1 B[a]P 在鲤鱼胆囊组织中的残留量

采用GC-MS 检测不同剂量的B[a]P 暴露后,其在鲤鱼胆囊组织中的蓄积量。表2 结果表明,不同质量浓度B[a]P 暴露条件下,高质量浓度B[a]P 处理组(DH 组)中胆囊组织的B[a]P 蓄积量为8 947.90 μg/kg;低质量浓度B[a]P 处理组(DL 组)中胆囊组织的B[a]P 蓄积量为3 784.72 μg/kg,对照组(DC 组)中胆囊组织的B[a]P 蓄积量为0 μg/kg。

表2 所有处理中胆囊中的B[a]P 质量分数

Tab.2 B[a]P Content of gall bladder in all treatments

组别	DC	DL	DH
B[a]P 质量分数/ (μg·kg ⁻¹)	0.00 ± 0.00 ^a	784.72 ± 25.89 ^b	8 947.90 ± 100.45 ^a

注:a,b,c 表示显示显著差异(P < 0.05)。

2.2 B[a]P 对鲤鱼胆囊组织氧化应激的影响

图2 为B[a]P 暴露下鲤鱼胆囊组织中的抗氧化指标变化,可以看出,胆囊组织中过氧化氢酶CAT、谷胱甘肽过氧化物酶GSHPx 及超氧化物歧化酶SOD 活性随着苯并芘质量浓度的升高而显著升高(P < 0.05),且胆囊组织中丙二醛表现出同样的变化趋势(P < 0.05)。

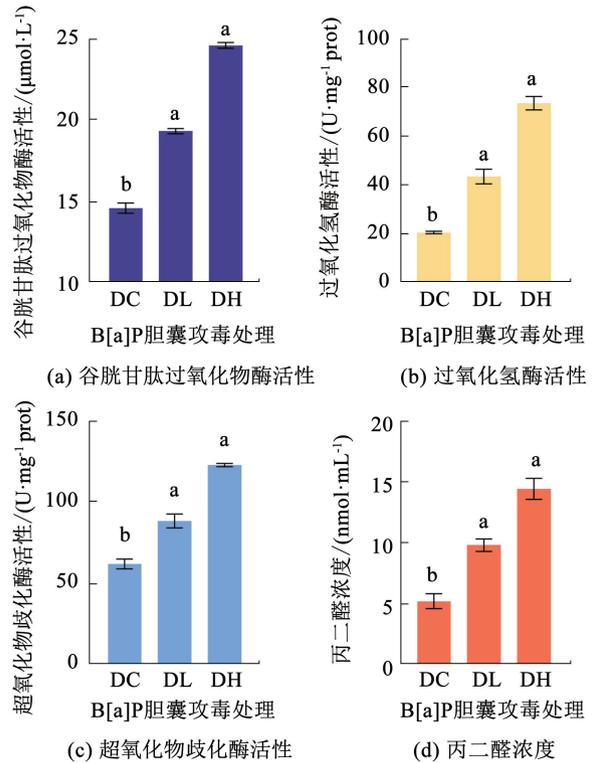


图2 B[a]P 暴露下鲤鱼胆囊组织中的抗氧化指标变化

Fig.2 B[a]P Changes of antioxidant indexes in gall bladder of *Cyprinus carpio* under B[a]P exposure

2.3 B[a]P 暴露下鲤鱼胆囊组织差异基因的表达情况

如表3 所示,在对照组和处理组中共鉴定出4 996 个差异表达基因(|log₂| ≥ 1, P < 0.05)。与对照组相比,DL 组中共鉴定出2 600 个差异显著表达基因,其中,924 个基因显著上调,1 676 个基因显著下调。与对照组相比,DH 组有1 662 个显著性差异表达基因,其中,鉴定出451 个上调基因,1 211 个下调基因;与DL 组相比,DH 组有734 个差异表达

基因,其中,共鉴定出 287 个上调基因,447 个下调基因。差异表达基因的结果表明,不同质量浓度的 B[a]P 暴露下,差异表达基因的数量不同,预示着不同质量浓度的 B[a]P 会引起机体细胞不同程度的毒性效应。

表 3 鲤鱼胆囊组织差异表达基因的统计结果

Tab. 3 Statistical results of differentially expressed genes in gall bladder tissue of *Cyprinus carpio*

处理组	上调基因数	下调基因数	总数
DL 组 vs DC 组	924	1 676	2 600
DH 组 vs DC 组	451	1 211	1 662
DH 组 vs DL 组	287	447	734
合计	1 662	3 334	4 996

2.4 B[a]P 暴露下鲤鱼胆囊组织差异基因的聚类分析

为了进一步探究 B[a]P 暴露对鲤鱼胆囊组织的毒性效应及免疫功能的影响,使用 KEGG 数据库 (<https://www.genome.jp/kegg/>) 作为标注资源作 KEGG 通路富集分析。如图 3 所示,主要富集的通路包括:细胞周期、氧化磷酸化、凋亡、RIG-I 样受体信号通路、FoxO 信号通路、细胞衰老、MAPK 信号通路、DNA 复制、P53 信号通路、Toll 样受体信号通路、

核糖体、错配修复、卵母细胞减数分裂、代谢途径、N-Glycan 生物合成、糖胺聚糖生物合成 - 硫酸软骨素/硫酸皮聚糖、视黄醇的新陈代谢、ABC 转运蛋白、细胞因子 - 细胞因子受体相互作用、Notch 信号通路、吞噬体、MAPK 信号通路、 α -亚麻酸代谢、FoxO 信号通路、亚油酸代谢、花生四烯酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、糖酵解/糖异生代谢通路等。参与这些途径的细胞的基本代谢过程对细胞生命周期和先天免疫至关重要。此外,对比分析揭示了几种免疫相关通路在不同质量浓度 B[a]P 处理组中的富集情况。其中,与 DC 组相比,DL 组吞噬体通路、溶酶体通路、自噬体通路和 RIG-I 样受体信号通路呈现下调,而 Notch 信号通路呈现上调;与 DC 组相比,DH 组 Notch 信号通路、RIG-I 样受体信号通路和自噬体通路呈现下调,而 N-聚糖生物合成通路呈现上调;与 DL 组相比,DH 组 RIG-I 样受体信号通路、Notch 信号通路和自噬体通路均被下调。以上结果表明,低质量浓度 B[a]P 处理组胆囊激活 Notch 受体信号通路以调控机体的免疫应答。高质量浓度 B[a]P 则会导致自身免疫稳态失衡,过度抑制细胞凋亡。

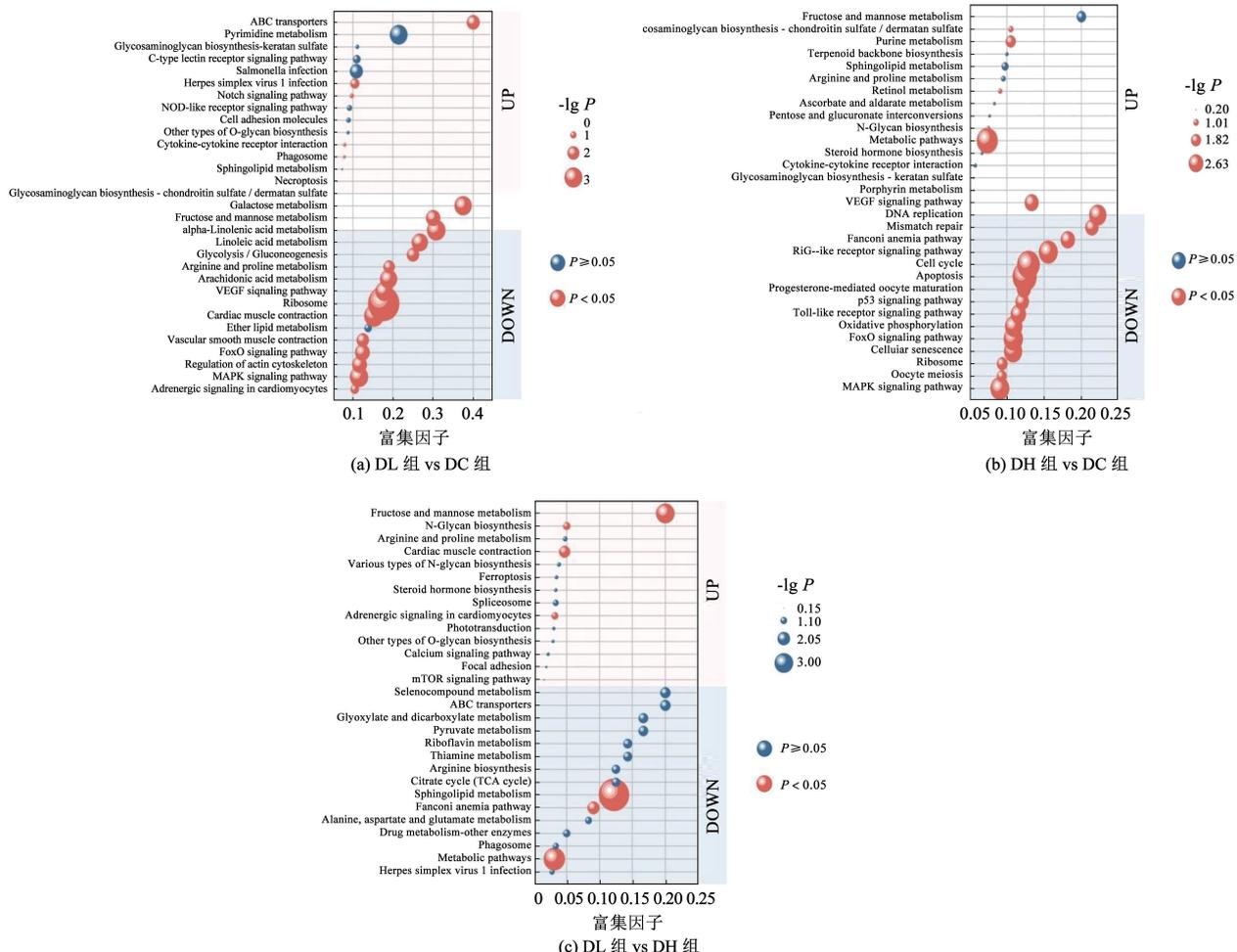


图 3 各组间差异表达基因富集的 KEGG 通路

Fig. 3 KEGG pathways enriched in differentially expressed among different groups

2.5 相关免疫基因表达验证

图4为B[a]P暴露下鲤鱼胆囊组织中相关免疫基因表达量的变化。可以看出,胆囊组织中自噬体通路中 *smcr8b* 基因和溶酶体通路中 *CTSB* 基因表达量均随苯并芘质量浓度的升高而显著降低,表明B[a]P暴露后会抑制胆囊细胞的自噬活性;此外,RIG-I样受体信号通路中 *cxcl19* 及 *CXC chemokine* 与前

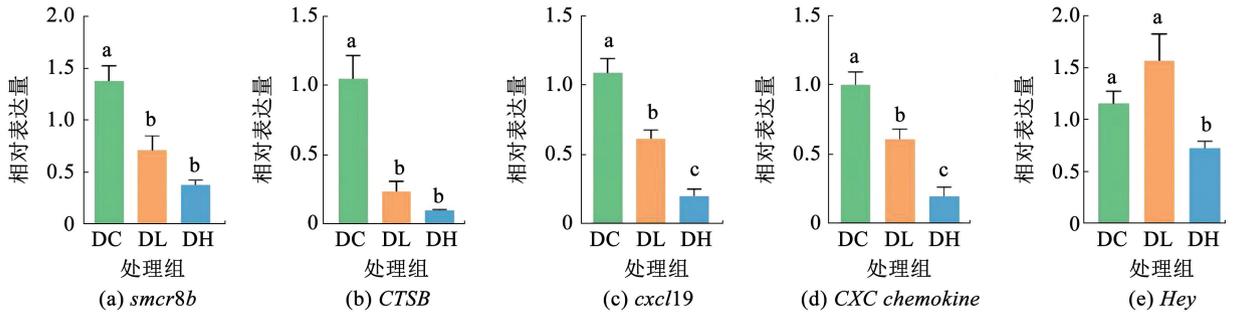


图4 B[a]P暴露下鲤鱼胆囊组织中相关免疫基因表达验证

Fig. 4 Validation of expression of relevant immune genes in gall bladder of *Cyprinus carpio* under B[a]P exposure

3 讨论

胆囊组织中B[a]P的蓄积量呈现出高质量浓度B[a]P处理组(DH组) > 低质量浓度B[a]P处理组(DL组) > 对照组(DC组)的趋势,说明胆囊组织中的B[a]P积累呈现出浓度依赖性的分布特点。胆囊在解毒和排泄过程中扮演着重要角色,胆囊通过集中和储存胆汁,将废物和毒素积聚其中^[18]。这些废物和毒素可以通过胆汁与消化道中的食物残渣结合,随后通过排便从体内排出,以应对B[a]P对细胞的损伤。

氧化应激作用是毒性物质常见的引起细胞毒性的作用机制,也是较为关键的作用路径。当细胞中ROS的清除和产生之间的平衡被打破后,ROS在细胞中大量堆积并引发氧化应激,造成相应的组织和器官的氧化损伤,甚至引起细胞凋亡和坏死的发生^[19]。本研究通过测定MDA浓度和抗氧化酶活性(GSH、SOD和CAT)以评估不同质量浓度B[a]P胁迫下胆囊细胞的氧化应激水平。其中,MDA是膜脂过氧化作用的最终产物,其浓度可以作为衡量细胞受到氧化胁迫程度的指标。抗氧化酶活性(GSH、SOD和CAT)可以有效清除过量的活性氧和膜脂过氧化产物,保护细胞的完整性和活性氧的动态平衡^[20]。结果显示,处理组MDA的活性呈现剂量依赖性变化特征,其在低质量浓度与高质量浓度胁迫组中均显著高于对照组,且高质量浓度组的MDA活性水平高于低质量浓度组。此外,胆囊组织的抗氧化酶活性(GSH、SOD和CAT)在各处理组中也表

述二者表现出相同的变化趋势($P < 0.05$),且低质量浓度组与高质量浓度组间亦差异性显著($P < 0.05$),表明RIG-I样受体信号通路在高质量浓度组中被显著抑制,进而导致组织细胞受损。而胆囊组织Notch信号通路中*Hey*基因表达量先上升后下降,DL组显著高于DH组($P < 0.05$),表明Notch信号通路在高质量浓度组中被显著抑制。

现出类似的趋势,即在B[a]P胁迫期间,DH组浓度均显著高于DC组。这说明鲤鱼在低质量浓度B[a]P暴露下启动了抗氧化防御机制,并不会产生严重的氧化损伤,高质量浓度B[a]P暴露下则引起了更严重的氧化损伤。为了抵御B[a]P产生的氧化毒性,中和体内多余的氧自由基,缓解细胞受到的氧化胁迫,高质量浓度B[a]P暴露下鲤鱼胆囊细胞中的抗氧化酶系统被进一步激活。

细胞自噬是一个受到严密调控的通路,执行重要的代谢功能,允许细胞通过分解代谢和再循环消除有害或受损成分,以维持微环境营养和能量的稳态^[21]。自噬同时也是一种重要的保护机制,可使胆囊细胞在各种外界环境压力下存活,如营养物质或生长因子被剥夺、缺氧、ROS积累和DNA损伤等^[22]。自噬功能的缺陷通常表现为炎症反应失调,严重时可导致组织损伤^[21]。自噬体(自噬囊泡)的形成是自噬过程的起点,该过程是由一系列Atg(自噬相关)蛋白协同作用驱动的。自噬囊泡会与内质网膜融合,形成扩张的自噬囊泡,并包裹凋亡细胞内线粒体、内质网等细胞器和其他胞质成分。成熟的自噬囊泡随后与溶酶体进行融合,形成自噬溶酶体。这个融合过程依赖于溶酶体膜与自噬囊泡膜上的特定蛋白质,包括LAMP-1和SNARE蛋白质。融合后,自噬囊泡的内容物进入溶酶体内部。自噬溶酶体内部的酸性环境和降解酶(如蛋白酶和核酸酶)协同作用,将被包裹的细胞成分降解为小分子物质。这些小分子物质随后通过溶酶体膜上的转运蛋白质释放到细胞质中,以供细胞进一步利用^[23]。此外,大

量研究表明, mTORC1 是自噬通路的关键调节剂, 可通过感受和整合外界信息进而调节自噬过程的不同步骤, 如成核、自噬体延伸、自噬体成熟和终止过程^[24]。激活的 mTOR 通路可抑制自噬, 而 mTOR 的负性调节促进自噬^[25]。因此, mTOR 可被认为是调控自噬体通路极具潜力的靶标。在本研究中, 与 DC 组相比, 自噬体通路中与 C9orf72 介导的同自噬起始相关的 DEGs (*smcr8b*) 和溶酶体通路中与溶酶体酸溶解酶相关的 DEGs (*CTSB*) 在 DL 和 DH 组中均显示下调。表明 B[a]P 暴露后会抑制胆囊细胞的自噬活性, 阻断自噬囊泡的形成和降解。B[a]P

暴露下鲤鱼胆囊组织中出现大量疑似未完全溶解的囊泡结构验证了这一结果。此外, B[a]P 暴露后, mTOR 通路被激活, 导致形成的自噬调节复合物失活, 从而影响自噬体的生物发生。以上结果表明, B[a]P 胁迫下会导致自噬溶酶体通路被抑制, 自噬的抑制可能使细胞对应激条件敏感, 从而导致细胞损伤或死亡(图 5)。此外, 相比低质量浓度处理组, 高质量浓度处理组中自噬溶酶体通路表达下调, 表明高质量浓度 B[a]P 胁迫会抑制自噬通路, 进而造成胆囊组织损伤。

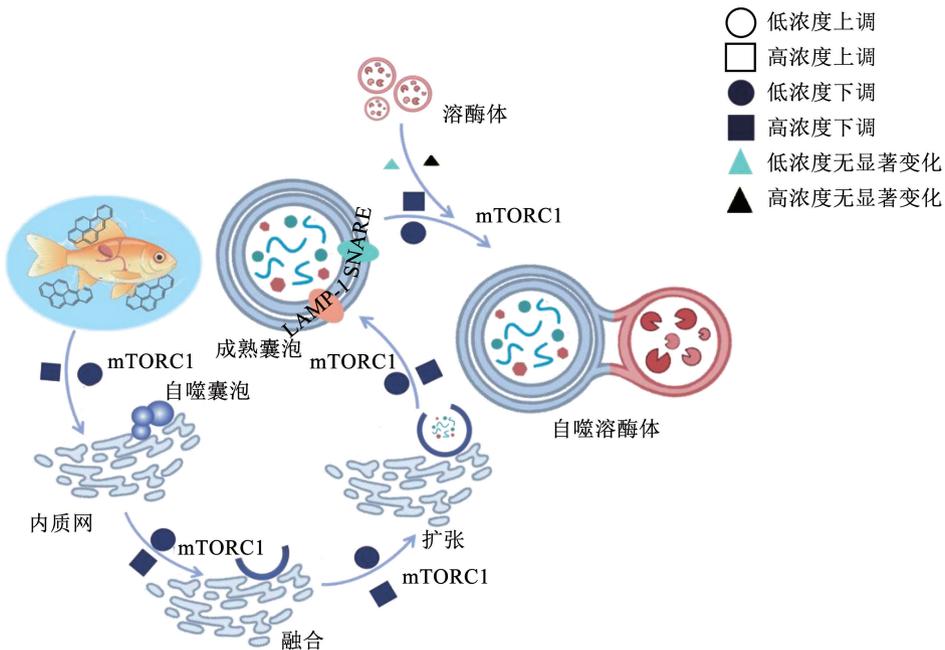


图 5 B[a]P 暴露下鲤鱼胆囊组织细胞自噬机制示意

Fig. 5 Schematic diagram of autophagy mechanism of gall bladder tissue in *Cyprinus carpio* induced by B[a]P

进一步对参与机体免疫系统的通路进行分析, 结果表明, B[a]P 可诱导机体免疫机制发生显著变化。RIG-I 样和 Notch 受体信号通路是机体诱导免疫调节的两条重要通路, 其可识别入侵的病原体及有害物质, 并将其作为预警信号, 向抗原呈递细胞发出警报, 从而启动免疫调节^[26]。越来越多的证据表明, RIG-I 样受体信号通路对于调控免疫途径至关重要, 因此, 在应对氧化应激时细胞可激活 RIG-I 样受体信号通路以发挥重要的免疫功能^[27]。RIG-I 样受体 (RLR) 可以识别细胞中的毒性物质, 进而激活并调节细胞中的抗毒性免疫机制。RIG-I 具有一个特殊的 caspase 活化和招募结构域 CARD, 该结构域可协助 RIG-I 与接头蛋白 MAVS 相互作用并结合形成多聚体, 进而诱导下游信号转导, 导致干扰素调节

因子 IRF-3、IRF-7、NF-κB 的磷酸化和激活^[28]。NF-κB 通路可诱导促炎性细胞因子的转录和表达, 最终促进机体的抗毒性免疫过程以清除损伤或变性细胞^[29]。值得注意的是, 与对照组相比, 低质量浓度组 and 高质量浓度组中与 RIG-I 样受体信号通路相关的 DEGs (*cxcl19* 和 *CXC chemokine*) 均被下调。*cxcl19* 和 *CXC chemokine* 基因表达量的下调会抑制免疫细胞进入感染部位, 进而抑制免疫细胞的表达, 导致组织细胞受损。这可能是胆囊细胞中部分胆囊黏膜上皮细胞空泡变性的原因。此外, 与低质量浓度组相比, 高质量浓度组中与 RIG-I 样受体信号通路被抑制, 表明 B[a]P 在胆囊内的过度积累会引起细胞代谢障碍和损伤(图 6)。

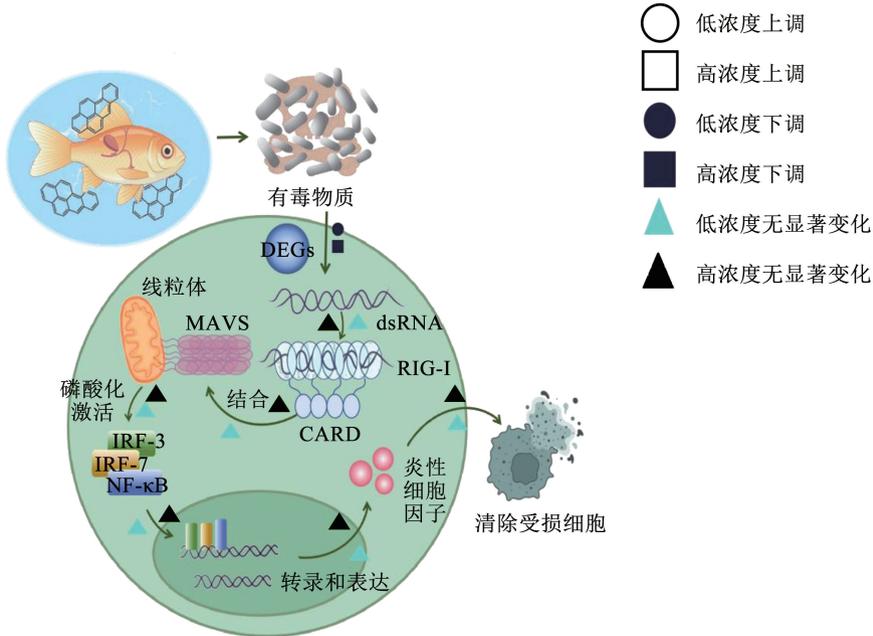


图 6 B[a]P 暴露下鲤鱼胆囊组织 RIG-I 样受体信号通路示意

Fig. 6 Schematic diagram of RIG-I receptor signaling pathway of gall bladder tissue in *Cyprinus carpio* induced by B[a]P

Notch 受体信号通路是一种进化上保守的细胞间信号传导途径,作为决定细胞命运最重要的通路之一,Notch 信号通路在调节细胞分化、增殖、凋亡和个体发育中起着关键作用^[30]。Notch 受体、Notch 配体、CSL-DNA 结合蛋白和下游靶基因是组成 Notch 信号通路的主要组成成分,其活性发生改变将会对 Notch 信号传递产生影响。Notch 受体表达于信号接收细胞表面,通过与配体结合而触发 Notch 信号的活化。Notch 受体胞内结构域(NICD)被水解切割并进一步转移到细胞核,进入细胞核的 NICD 与 DNA 转录蛋白结合形成转录复合物,激活 Notch

靶基因即调节细胞分化相关基因 *Hes* 家族以及 *Hey* 家族等分子的转录,从而促进 M1 型巨噬细胞极化^[31]。在本研究中,与对照组相比,低质量浓度组 Notch 信号通路被激活,且参与 Notch 蛋白水解激活和 NICD 裂解的基因 *Hey* 和 γ -分泌酶复合体表达量上调,表明低质量浓度组可通过促进 NICD 进入细胞核而激活 Notch 信号通路,进而通过巨噬细胞的极化清除受损细胞^[32]。然而与低质量浓度组相比,高质量浓度组中 Notch 信号通路下调,表明 B[a]P 在细胞中的过度积累会导致胆囊组织损伤,进而导致细胞免疫受损(图 7)。

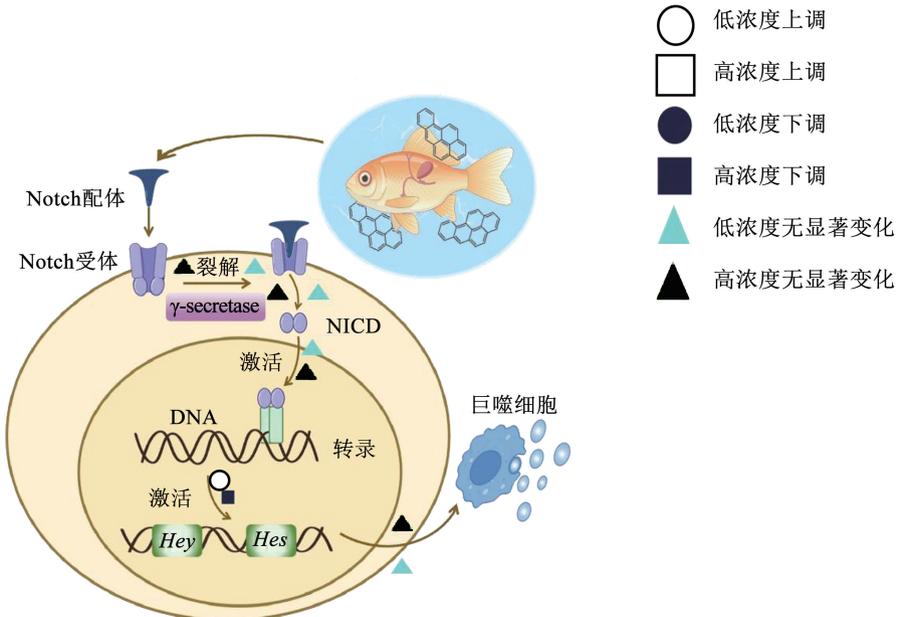


图 7 B[a]P 暴露下鲤鱼胆囊组织 Notch 受体信号通路示意

Fig. 7 Schematic diagram of Notch receptor signaling pathway of gall bladder tissue in *Cyprinus carpio* induced by B[a]P

4 结 语

本研究应用转录组学技术,从基因层面上揭示了B[a]P胁迫下鲤鱼的免疫应答途径及B[a]P对鲤鱼的免疫损伤机制。低质量浓度B[a]P处理鲤鱼的胆囊组织后,机体会通过激活Notch受体信号通路以调控机体的免疫应答,进而通过细胞凋亡清除机体内的受损细胞。而高质量浓度B[a]P会导致鲤鱼的胆囊细胞自身免疫稳态失衡,引发细胞凋亡的过度抑制,进而导致胆囊组织和细胞的损伤或死亡。研究成果为分析和评价B[a]P的淡水生态毒性提供理论依据,为中国淡水经济鱼类养殖环境中PAHs污染的早期预警及生态风险评估提供基础数据。

参 考 文 献

- [1] INCARDONAJ P, DAY H L, COLLIER T K, et al. Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism [J]. *Toxicology Applied Pharmacology*, 2006, 217(3): 308. DOI: 10.1016/j.taap.2006.09.018
- [2] CARLS M G, RICE S D, HOSE J E. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasii*) [J]. *Environmental Toxicology Chemistry: An International Journal*, 1999, 18(3): 481. DOI: 10.1002/etc.5620180317
- [3] HEINTZ R A, RICE S D, WERTHEMER A C, et al. Delayed effects on growth and marine survival of pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* after exposure to crude oil during embryonic development [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2000, 208: 205. DOI: 10.3354/meps208205
- [4] SUN Lingbin, ZUO Zhenehong, CHEN Meng, et al. Reproductive and transgenerational toxicities of phenanthrene on female marine medaka (*Oryzias melastigma*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 162: 109. DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.03.013
- [5] INGBRIGTSEN K, CHRISTIANSEN J, LINDHE Ö, et al. Disposition and cellular binding of 3 H-benzo (a) pyrene at subzero temperatures: studies in an agglomerular arctic teleost fish-the polar cod (*Boreogadus saida*) [J]. *Polar Biology*, 2000, 23: 503. DOI: 10.1007/s003000000112
- [6] 刘燕. 渤海沉积物中石油烃类污染现状及研究进展[J]. *海洋湖沼通报*, 2023, 45(3): 180
LIU Yan. Current situation and research progress of hydrocarbon pollution in the sediments of Bohai Sea [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2023, 45(3): 180. DOI: 10.13984/j.cnki.cn37-1141.2023.03.024
- [7] 周艾诗, 孙亚乔, 叶菲, 等. 渭河陕西段干支流多环芳烃分布特征及潜在生态风险研究[J]. *水利水电技术(中英文)*, 2024, 55(604): 133
ZHOU Aishi, SUN Yaqiao, YE Fei, et al. Study on distribution characteristics and potential ecological risks of polycyclic aromatic hydrocarbons in the mainstream and tributaries of the Shaanxi section of the Weihe River [J]. *Water Resources and Hydropower Engineering*, 2024, 55(604): 133. DOI: 10.1746.TV.20231229.0935.002.html
- [8] Food and Agriculture Organization (FAO). The state of world fisheries and aquaculture 2022 [C]//Towards Blue Transformation. Rome: FAO, 2022
- [9] BROWN P, GILLIGAN D. Optimising an integrated pest-management strategy for a spatially structured population of common carp (*Cyprinus carpio*) using meta-population modelling [J]. *Marine and Freshwater Research*, 2014, 65(6): 538. DOI: 10.1071/MF13117
- [10] PETERSON D, PEARSON J, SIMPSON W. Effects of common carp on water quality and submerged vegetation: results from a short-term mesocosm experiment in an artificial wetland [J]. *Marine and Freshwater Research*, 2022, 73(7): 974. DOI: 10.1071/MF22008
- [11] KAEMINGK M A, JOLLEY J C, PAUKERT C P. Common carp disrupt ecosystem structure and function through middle-out effects [J]. *Marine and Freshwater Research*, 2016, 68(4): 974. DOI: 10.1071/MF15068
- [12] 李霞. 水产动物组织胚胎学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2006
LI Xia. Histoembryology of aquatic animals [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2006
- [13] HIMMELBERG A M, BRUELS T, FARMANI Z, et al. Anaerobic degradation of phenanthrene by a sulfate-reducing enrichment culture [J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(10): 3589. DOI: 10.1111/1462-2920.14335
- [14] NORTON S B, CORMIER S M, SUTERG W, et al. Determining probable causes of ecological impairment in the Little Scioto River, Ohio, USA. Part 1: listing candidate causes and analyzing evidence [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2002, 21(6): 1112. DOI: 10.1002/etc.5620210604
- [15] 李玉. 苯并(a)芘对鲤肝脏、鳃、性腺组织结构及主要生物标志物的影响 [D]. 曲阜: 曲阜师范大学, 2019
LI Yu. Effects of benzo(a) pyrene on the liver, gill, sexual gland structure and main biomarkers of *Cyprinus carpio* [D]. Qufu: Qufu Normal University, 2019
- [16] 韩英, 郝其睿, 魏菁, 等. 毒死蜱和阿特拉津对鲤肝脏的影响 [J]. *东北农业大学学报*, 2015, 46(3): 67
HAN Ying, HAO Qirui, WEI Jing, et al. Effect of atrazine and chlorpyrifos on common carp's liver [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2015, 46(3): 67. DOI: 10.19720/j.cnki.issn.1005-9369.2015.03.010
- [17] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
- [18] 林浩然. 鱼类生理学 [M]. 广东: 中山大学, 2011
LIN Haoran. Fish physiology [M]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2011
- [19] 范泽, 吴迪, 李晨辉, 等. 苦瓜皂苷对饲喂高糖饲料松浦镜鲤幼鱼生长、消化及肝脏健康的影响 [J]. *水产学杂志*, 2023,

- 36(3): 29
- FAN Ze, WU Di, LI Chenhui, et al. Effects of bitter melon *Momordica charantia* Saponins on growth, digestion and hepatopancreas health of juvenile Songpu mirror carp (*Cyprinus carpio* Songpu) fed high-carbohydrate diets[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2023, 36(3): 29. DOI:10.3969/j.cnki.issn.1005-3832.2023.03.0029.09
- [20] 华东, 王剑伟, 胡兵, 等. 镧对稀有鮡鲫肝脏抗氧化酶活性及MDA含量的影响[J]. 水生生态学杂志, 2019, 40(2): 108
- HUA Dong, WANG Jianwei, HU Bing, et al. Effect of Lanthanum exposure on the antioxidase activity and MDA content in the hepatopancreas of *Gobiocypris rarus*[J]. Journal of Hydroecology, 2019, 40(2): 108. DOI:10.15928/j.1674-3075.2019.02.016
- [21] DERETIC V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism[J]. Immunity, 2021, 54(3): 437. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.01.018
- [22] ZHOU Zhixia, HE Yanxin, WANG Shoushi, et al. Autophagy regulation in teleost fish: a double-edged sword[J]. Aquaculture, 2022, 558: 738369. DOI:10.1016/j.aquaculture.2022.738369
- [23] XU Y, WAN W. Acetylation in the regulation of autophagy[J]. Autophagy, 2023, 19(2): 379. DOI: 10.1080/15548627.2022.2062112
- [24] PAQUETTE M, EL-HOUJEIRI L, PAUSE A. mTOR pathways in cancer and autophagy[J]. Cancers, 2018, 10(1): 18. DOI: 10.3390/cancers10010018
- [25] KIM J, KUNDU M, VIOLLET B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1[J]. Nature Cell Biology, 2011, 13(2): 132. DOI: 10.1038/ncb2152
- [26] 丁云磊, 孙英杰, 王晓旭, 等. RIG-I样受体信号通路及其调控研究进展[J]. 中国动物传染病学报, 2014, 22(5): 72
- DING Yunlei, SUN Yingjie, WANG Xiaoxu, et al. Advances in signaling pathways and regulation of RIG-I-like receptor [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2014, 22(5): 72. DOI:10.3969/j.cnki.issn.1674-6422.2014.05.0072.08
- [27] HEIDEGGER S, WINTGES A, STRIZKE F, et al. RIG-I activation is critical for responsiveness to checkpoint blockade[J]. Science Immunology, 2019, 4(39): 8943. DOI: 10.1126/sciimmunol.aau8943
- [28] 宋涛. 七鳃鳗 RIG-I 和 MAVS 的分子特征及其在抗病毒免疫中的信号通路[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2019
- SONG Tao. Molecular characteristics of RIG-I and MAVS of the lamprey and their signaling pathways in antiviral immunity[D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2019
- [29] WANG Pengtao, LI Ning, WANG Xinyue, et al. RIG-I, a novel DAMPs sensor for myoglobin activates NF- κ B/caspase-3 signaling in CS-AKI model[J]. Military Medical Research, 2021, 8(1): 40. DOI:10.1186/s40779-021-00333-4
- [30] MENG Yao, BO Zhihan, FENG Xinyi, et al. The notch signaling pathway: mechanistic insights in health and disease [J]. Engineering, 2024, 34(3): 215. DOI:10.1016/j.eng.2023.11.011
- [31] 连小月. Notch 信号通路调控巨噬细胞极化参与自身免疫性甲状腺炎过程的分子机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022
- LIAN Xiaoyue. The molecular mechanism of Notch signaling pathway regulates macrophage polarization and participates in the process of autoimmune thyroiditis [J]. Shenyang: China Medical University, 2022. DOI:10.27652/d.cnki.gzyku.2021.001498
- [32] FUJIMAKI S, MATSUMOTO T, MURAMATSU M, et al. The endothelial Dll4-muscular Notch2 axis regulates skeletal muscle mass[J]. Nature Metabolism, 2022, 4(2): 180. DOI:10.1038/s42255-022-00533-9

(编辑 刘 彤)