

新兴海洋生态毒理学模式生物——海洋青鳉鱼 (*Oryzias melastigma*)

伍辛泷, 黄乾生, 方超, 董四君*

中国科学院城市环境研究所中国科学院城市环境与健康重点实验室, 厦门 361021

摘要: 海洋污染日益加剧, 适用于海洋生态毒理学研究的鱼类模型的建立意义重大。海洋青鳉鱼(*Oryzias melastigma*) 在培养条件、生理和分子信息等方面的优势使其正成为海洋生态毒理学研究领域的代表性潜在模式生物。阐述了海洋青鳉鱼在海洋生态毒理学研究中的优势, 系统介绍了海洋青鳉鱼在毒理学研究中的应用现状, 并着重介绍了其在分子毒理学中的应用, 最后对海洋青鳉鱼在海洋生态毒理学中的研究方向进行了展望。

关键词: 海洋青鳉鱼; 海洋生态毒理学; 模式生物

文章编号: 1673-5897(2012) 4-345-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Oryzias melastigma: A New Promising Model Organism for Marine Ecotoxicology

Wu Xinlong, Huang Qiansheng, Fang Chao, Dong Sijun*

Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China

Received 26 October 2011 accepted 8 February 2012

Abstract: Increasingly serious ocean pollution makes it important to establish a suitable marine fish model for marine ecotoxicological studies. The marine medaka (*Oryzias melastigma*) is becoming a promising potential model organism for ecotoxicology in marine environment due to the advantages of its culture conditions, physiological features and genetic information. In this review, the advantages of *O. melastigma* as model organism in marine ecotoxicological researches were summarized. The applications of *O. melastigma* in toxicological studies were fully introduced, which especially focused on the application in molecular toxicology. Finally, the future studies of *O. melastigma* in marine ecotoxicology were prospected.

Keywords: *Oryzias melastigma*; marine ecotoxicology; model organism

随着工业和城市化的发展, 海洋污染问题日益严重^[1], 加强海洋污染的生态毒理学研究具有重大的现实意义。污染物毒性的生物评价是生态毒理学研究的一种重要手段。目前已有多种广泛使用的模式生物, 如四膜虫、秀丽隐杆线虫、黑腹果蝇、斑马鱼和非洲爪蟾等。物种的敏感性差异是影响毒性评价

的重要因素, 污染物的毒性评价需要从不同的营养水平(即初级生产者、初级消费者和捕食者)中选择合适的生物来进行研究, 以确保评价的全面性。在水生态毒理学的研究中, 常选择藻类(如绿藻和小球藻等)、枝角类(如大型溞和隆线溞等)和鱼类(如斑马鱼和日本青鳉鱼等)作为实验生物。斑马鱼和

收稿日期: 2011-10-26 录用日期: 2012-02-08

基金项目: 中国科学院“百人计划”项目(KZCX2-YW-BR-48); 厦门市科技计划项目(3502Z20112019)

作者简介: 伍辛泷(1988-), 男, 硕士, 研究方向为分子毒理学, E-mail: xlwu@iue.ac.cn;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: sjdong@iue.ac.cn

日本青鳉鱼已被广泛应用于淡水环境的毒理学研究中。然而,国际公认的海洋生态毒理研究的鱼类模型还没有建立起来。海洋青鳉鱼胚胎已被国际生命科学学会健康和环境科学研究所(HESI)认定为毒理学研究的重要工具。本文基于海洋青鳉鱼的毒理学研究最新进展,总结了海洋青鳉鱼作为海洋毒理研究的鱼类模型的优势,系统介绍了海洋青鳉鱼在毒理学研究中的应用现状,并对其成为海洋模式鱼种进行了展望。

1 海洋青鳉鱼应用于海洋生态毒理研究的优势

海水环境与淡水环境存在较大差异,这决定了污染物在海洋环境中的生态毒理学特性与淡水环境不同。由于海水盐度高,其密度、浮力、pH值、离子强度和溶解氧等指标与淡水不同。这些差异造成的影响在毒理学研究中体现在3个方面:第一,影响污染物的形态和性质,例如,海水中较高的离子强度和pH值会改变纳米材料的理化性质,进而增强纳米型二氧化钛(TiO_2)的聚集率和尺寸,影响纳米 TiO_2 在海洋生态系统中的生物有效性^[1];第二,影响污染物在水相和固相中的分配,例如,盐度的升高会导致水相中全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS)富集于底泥中,对生存在底泥中的生物造成影响^[2];第三,影响污染物的生物富集效应。例如,太平洋牡蛎中的PFOS浓度在35‰盐度比在10‰盐度高1.7~2.7倍^[3]。这些差异说明了淡水生态毒理学的研究结果不能直接用于评估海水环境中的毒性效应。但目前水生毒理方面的研究大都基于淡水环境条件,海水生态毒理学研究亟需加强。

斑马鱼(*Danio rerio*)、黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)、食蚊鱼(*Gambusia affinis*)、孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)和日本青鳉(*Oryzias latipes*),在国际上已成为公认的淡水生态毒理学研究模型。与淡水鱼模型相比,海水鱼模型的研究非常滞后。虽然淡水/河口物种(如羊头小鱼(*Cyprinodon variegatus*)和底鳉(*Fundulus heteroclitus*))也适用于海洋环境的生态毒理学研究。不过,它们的缺点也很明显。一方面,种内个体间生长速率差异大,个体差异显著;另一方面,这2个物种的基因信息较贫乏,较难开展分子毒理学研究。

海洋青鳉鱼(*Oryzias melastigma*或*Oryzias danconena*),又名黑点青鳉、海水青鳉和印度马达卡(*Indian medaka*),原产于巴基斯坦、印度、缅甸和泰国沿海及淡水水域。在分类学上,海洋青鳉鱼与日本

青鳉同属脊索动物门辐鳍鱼纲针鱼目怪颌鳉科青鳉属。青鳉属作为模式物种,与斑马鱼相比,具有以下特点(表1)^[4]:(1)温度适应范围较广,方便构建温度敏感性的突变种;(2)盐度适应范围较宽,各物种可分别适应不同的盐度环境;(3)可充分利用同属近缘物种进行比较生物学研究,这与果蝇相似,果蝇属的多个物种的基因组分析大大促进了比较生物学的研究。

海洋青鳉鱼作为毒理学研究模型,具有青鳉属物种所共有的优势^[4]:(1)体型较小(4.5~23 mm),对环境的耐受力较强,容易在实验室条件下进行大规模饲养;(2)性别差异可通过鱼鳍形态的不同而快速辨别,且雌鱼产卵量大,世代周期短(2~3个月);(3)鱼卵体积较大,颜色透明且不易破损,发育各阶段变化明显,极易进行各种实验观察和操作;(4)鱼卵和幼体对环境中的各类污染物的干预敏感,只要找到对污染物响应的特定敏感基因或其他分子水平上的变化,就可快速反映环境污染状况。此外,海洋青鳉鱼在青鳉属中拥有其独特的优势——对盐度的适应范围非常广,可在0‰~35‰的盐度范围内生存。虽然日本青鳉在一定程度上也可适应各种盐度环境,但其适应能力无法与海洋青鳉鱼比拟(表2)。在基因信息方面,日本青鳉全基因组序列已经解析,而海洋青鳉鱼与日本青鳉在系统发育上非常相近,因此海洋青鳉鱼基因信息也可很方便地获得,目前已开发出相关基因芯片^[5]。此外,针对日本青鳉的解剖学和生理学等方面的研究已比较完善和系统,这为海洋青鳉鱼的相关研究提供了参考便利。这些优点使海洋青鳉鱼有潜力成为海水生态毒理学研究的模式生物^[5,8-9]。

表1 青鳉鱼与斑马鱼特征的比较^[4]

Table 1 Comparison of features between medaka and zebrafish

特征	斑马鱼	青鳉鱼
代时	8~12周	8~12周
性别决定	无主要基因	XX-XY
绒毛膜	软	硬
孵化周期	2~3 d	7~10 d
产卵能力	100~200卵/周	10~30卵/d
染色体数目	25对	24对
基因组规模	1 700 Mbp	800 Mbp
胚胎干细胞	不可获得	可获得
转基因技术	成熟	成熟
精子存储	建立	成熟
卵母细胞培养	未建立	建立

表2 海洋青鳉鱼与日本青鳉鱼在海水中生存能力的比较^[6]Table 2 Comparison of survival ability in seawater between *O. melastigma* and *O. latipes*

适应指标	日本青鳉鱼	海洋青鳉鱼
对海水的瞬时适应性	无	很好
对海水的慢性适应性	很好	很好
在海水中雄鱼精子的活力	弱	很强
在海水中的产卵能力	很强	很强
鱼卵在海水中的受精能力	强	很强
胚胎在海水中的发育情况	好	很好
胚胎在海水中的孵化情况	很好	好

2 海洋青鳉鱼在毒理学研究中的应用

2.1 海洋青鳉鱼的分子生物学研究基础

海洋青鳉鱼的分子生物学基础数据正逐步完备。目前已鉴定了一批器官特异性表达分子标记物(涉及脑部、眼部、心脏、胸鳍、胰腺、肝脏、肌肉和神经等器官和系统)(见表3)。器官特异性分子标志物用于指示特异器官的发育状况,其表达异常可指示污染物的器官发育毒性。Chen等^[6]采用原位杂交法分析了11个器官特异表达基因在胚胎发育期各阶段的表达情况。这11个基因包括了前脑(*distal-less homeobox 2, dlx2*)、中脑(*orthodenticle homeobox 2, otx2*)、视网膜(*retinal homeobox protein 2, rx2*)、中后脑边界(*engrailed 2, eng2*)、后脑(*early growth response 2, krox-20*)、肝脏早期分化(*hematopoietically expressed homeobox, hhx*)、神经(*sonic hedgehog-like protein, ssh*)、肌肉(*myosin heavy chain, MYHL2*)、肠(*intestinal peptide transporter, IPT*)、脑皮质(*zinc finger protein 462, ZFP462*)和体细胞(*ubiquitin specific peptidase 2, USP2*)等相对应的标记基因,其中前8个基因在胚胎发育期各阶段的表达情况与斑马鱼和日本青鳉鱼类似。

除器官发育特异基因外,一些功能调节基因也已获得解析。缺氧相关的基因:缺氧诱导因子-1(*hypoxia-inducible factor 1, HIF1*)、端粒酶逆转录酶(*telomerase reverse transcriptase, TERT*)、瘦蛋白受体(*leptin receptor, LepR*)^[11-12]、卵壳前体蛋白基因(*choriogenin H, Chg H; choriogenin L, Chg L*)^[13]、动蛋白超级家族-7基因(*kinesin superfamily 7, KIF7*)^[14]、钠/钾-ATP酶基因(*Na⁺/K⁺-ATPase, NKA*)^[15]和钠、钾、二氯协同转运蛋白基因(*Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter, NKCC*)^[16];心血管发育相关基因:骨形态发生蛋白-4(*bone morphogenetic pro-*

tein, BMP4)、GATA连接蛋白-4(*GATA-binding protein 4, GATA4*)、NK2转录相关因子-5(*NK2 transcription factor related 5, NK2.5*)、成纤维细胞生长因子-8(*fibroblast growth factor 8, FGF8*)和环氧合酶-2(*cyclooxygenase-2, COX2*)等基因^[17];以及2个铁调素基因(*hepcidin 1, HEP1; hepcidin 2, HEP2*)^[18]的cDNA已在海洋青鳉鱼上完成克隆(表3)。环境激素诱导的相关基因,包括受体类:雌激素受体(*estrogen receptor, ER*)、芳烃类受体(*aryl hydrocarbon receptor, AHR*)、过氧化物酶体增殖物激活受体(*peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR*)、卵黄蛋白原(*vitellogenin, VTG*)和细胞色素P450酶系(*cytochrome P450 1A, CYP1A*)等在环境激素类污染下的表达模式已有报道^[19]。这些敏感基因可作为环境胁迫的指示因子。海洋青鳉鱼在缺氧(溶解氧为 $(1.8 \pm 0.2) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)条件下生存3个月,肝脏中TERT的转录与翻译、细胞增殖和凋亡水平都发生了显著改变^[8]。缺氧可上调海洋青鳉鱼肝脏和睾丸组织中TERT的表达,而这种上调是通过缺氧诱导因子-1介导的^[2]。瘦蛋白受体基因的表达受到缺氧的影响,并表现出组织特异性,有望成为一种灵敏的标记基因^[11]。

蛋白的表达量检测通常需要相应的抗体。由于同源蛋白的保守性,抗体在近缘物种间有一定的通用性。而斑马鱼的抗体库已较为完善,因而可直接利用斑马鱼的抗体库进行筛选,获取对海洋青鳉鱼相应同源蛋白具有特异反应的抗体,省去较为繁琐的抗体制备过程。通过全胚胎免疫组化法筛选,17种斑马鱼抗体(α -tubulin、 β -tubulin、 β -catenin、HuC/HuD、Islet-1、SV2、HNK-1、Zn-12、TH、Znf-1、Zpr-1、Zpr-3、MF20、CH1、4D9、H3和EMA-1)可与海洋青鳉鱼发生特异性的免疫反应^[8,10]。这些抗体与神经、心脏和脑部等器官的发育关系密切,为蛋白水平的毒性研究提供了基础。另外,小鼠抗人TERT单克隆抗体mAb476可特异性地与海洋青鳉鱼TERT蛋白结合,TERT蛋白在各组织中的细胞质和细胞核区的表达用蛋白质印迹法(Western blotting)得以定量^[8]。在氧化锌纳米颗粒对海洋青鳉鱼的毒性研究中,用Western blotting检测了金属硫蛋白(*metallothionein, MT*)、超氧化物歧化酶(*superoxide dismutase, SOD*)和热休克蛋白-70(*heat shock protein 70, HSP70*)的表达量,并证实SOD的蛋白表达随着纳米氧化锌的浓度升高而增加^[8]。与蛋白质印迹法相比,

表 3 海洋青鲈鱼已克隆的基因及其在原位杂交和 qRT-PCR 研究中的应用

Table 3 Utilization of the cloned genes of *O. melastigma* in-situ hybridization and qRT-PCR

NCBI 登录号	名 称	功 能	原位杂交	qRT-PCR	文 献
FJ375322	造血表达同源异形盒 (hematopoietically expressed homeobox, hhx)	胚胎肝脏和胰腺发育标记基因	阶段 20 胰, 阶段 28 肝, 阶段 30 肝胰皆有表达	/	[8,10]
FJ375321	小肠寡肽转运蛋白 (intestinal peptide transporter, IPT)	胚胎肠道发育标记基因	阶段 40 咽、肠道和膜鳃表达	/	[8]
FJ375320	刺猬样蛋白 (sonic hedgehog-like protein, shh)	胚胎神经元发育标记基因	阶段 27 脊索和胸鳍表达	/	[8]
FJ375319	锌指蛋白 (zinc finger protein 462, ZFP462)	胚胎大脑皮质层发育标记基因	阶段 19 ~ 20 全身, 后脑部表达	/	[8]
FJ375312	远端缺失同源盒 (distal-less homeobox 2, Dlx2)	胚胎前脑发育标记基因	阶段 20 ~ 24 有表达	/	[8,10]
FJ375318	泛素特异性肽 (ubiquitin specific peptidase 2, USP2)	胚胎胰腺、体节和胸鳍发育标记基因	阶段 22 眼和胰表达, 阶段 33 胰表达	/	[8]
FJ375317	肌球蛋白重链 (myosin heavy chain, MYHL2)	胚胎体节、喉部和胸鳍发育标记基因	阶段 31 ~ 40 体节、喉和鳃表达	/	[8,10]
FJ375316	早期生长反应因子 (early growth response 2, krox-20)	胚胎后脑发育标记基因	阶段 16 ~ 21 后脑表达	/	[8,10]
FJ375315	同源盒蛋白转录因子 EN (engrailed 2, Eng2)	胚胎中脑后脑分界发育标记基因	阶段 17 ~ 31 中后脑分界处表达	/	[8,10]
FJ375314	网膜同源盒蛋白质 (retinal homeobox protein 2, rx2)	胚胎视网膜发育标记基因	阶段 18 ~ 21 视神经囊泡表达	/	[8,10]
FJ375313	间隙基因同源盒 (orthodenticle homeobox 2, Otx2)	胚胎中脑发育标记基因	阶段 17 前、中脑表达, 至阶段 31 仅中脑表达	/	[8,10]
HM582596	肌细胞生成素 (myogenin, myn)	胚胎肌肉发育分化基因	阶段 20 ~ 27 在体节等处表达	/	[10]
HM582597	成肌分化因子 (myogenic differentiation factor-like, myoD)	胚胎肌肉发育决定基因	阶段 20 ~ 27 在体节等处表达	/	[10]
DQ359150	瘦素受体 (leptin receptor, Lep-R)	缺氧相关, 调节能量平衡	/	正常条件, 成鱼肝、肾、腮、脑、心、眼、脾、肠、肌肉和性腺中的表达; 正常与缺氧条件下肝、心和腮中的表达	[11]
/	血红素氧合酶-1 (hemoxygenase-1, HO)	缺氧标记基因	/	正常与缺氧条件下肝、心和腮中的表达	[11]
DQ105650	18S 核糖体 RNA (18S RNA)	表达稳定, 相对定量参照	/	/	[12]
DQ286654	端粒酶逆转录酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT)	缺氧相关, 调节细胞凋亡和增殖等	肝脏和睾丸组织在正常与缺氧条件下的表达	正常条件, 成鱼肝、肾、腮、脑、脾、肠、眼、肌肉、皮肤和性腺中的表达; 正常与缺氧条件下肝脏和睾丸中的表达	[12]
DQ317443	缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF1 α)	调节缺氧相关基因转录	/	成鱼正常、缺氧条件下肝脏和睾丸中的表达	[12]
EF392363	卵壳前体蛋白 (choriogenin H)	雌激素调节相关	胚胎期暴露于雌二醇后表达分布	成鱼暴露于雌二醇、炔二醇后肝脏中的表达	[13]
EF392364	卵壳前体蛋白 (choriogenin L)	雌激素调节相关	胚胎期暴露于雌二醇后表达分布	成鱼暴露于雌二醇、炔二醇后肝脏中的表达	[13]

					续表 3
NCBI 登录号	名 称	功 能	原位杂交	qRT – PCR	文 献
/	驱动蛋白超家族 7(kinesin su- perfamily 7, kif7)	分子驱动蛋白相关	胚胎发育的阶段 21、27、 30 和 33 的表达分布	胚胎阶段 0、8、10、15、21、28、 30、33、34、36、37、38 与幼虫的 表达; 成鱼脑、肾、肝、肌肉、卵 巢和睾丸中表达	[4]
EU490422	肌动蛋白(beta – actin, β – actin)	表达 稳 定, 相 对 定 量 参照	/	/	[5]
EU490421	钠 钾 ATP 酶 (Na^+/K^+ -ATP ase α – subunit, NKA α)	调节体内渗透平衡	/	成鱼在淡水、半海水和海水 中鳃部的表达	[5]
GQ862972	钠、钾、二氯 – 协同转运蛋白 基 因 (Na^+ , K^+ , 2Cl^- co- transporter 1a, NKCC 1a)	离子传输的调节	成鱼在淡水和海水条件 下鳃部的表达分布	在肝、肾、鳃、脑、心、眼、鳍、 肠、肌肉、卵巢和睾丸中的表 达; 不同盐度鳃中的表达	[6]
GQ502445	钠、钾、二氯 – 协同转运蛋白 基 因 (Na^+ , K^+ , 2Cl^- co- transporter 1b, NKCC 1b)	离子传输的调节	/	仅在卵巢中表达	[6]
GQ862971	钠、钾、二氯 – 协同转运蛋白 基 因 (Na^+ , K^+ , 2Cl^- co- transporter 2, NKCC 2)	离子传输的调节	/	仅在鳃、肠、卵 巢 和 辜 丸 中 表达	[6]
DQ415657	促红细胞生成素(erythropoie- tin, EPO)	缺氧相关, 调节血细胞 生成, 心脏发育	/	成鱼正常、缺氧条件下肝脏和 辜丸中的表达; 胚胎期暴露于 PFOS 后各发育期的表达	[2,17]
JF831883	成纤维细胞生长因子-8(fibro- blast growth factor 8, FGF8)	心脏早期发育调控	/	胚胎期暴露于 PFOS 后各发育 期的表达	[7]
HQ662332	环氧化酶-2(cyclooxygenase – 2, COX-2)	与心脏缺陷相关	/	胚胎期暴露于 PFOS 后各发育 期的表达	[7]
HQ662331	SMYD 区 包 含 因 子 (cardiac muscle specific SET and MYND domain containing 1, SMYD1)	心肌特异性表达基因	/	胚胎期暴露于 PFOS 后各发育 期的表达	[7]
HM990657	铁调素 1(hepcidin 1, hep1)	抗菌肽相关基因	细菌感染后肝细胞中表达	胚胎期 (6、7 和 10 dpf) 的 表 达, 成鱼肝、脾、脑、肠、鳃和性 腺中的表达, 细菌感染后肝、 脾、脑和鳃中的表达	[8]
HM990658	铁调素 2(hepcidin 2, hep2)	抗菌肽相关基因	细菌感染后肝细胞中表达	胚胎期 (6、7 和 10 dpf) 的 表 达, 成鱼肝、脾、脑、肠、鳃和性 腺中的表达, 细菌感染后肝、 脾、脑和鳃中的表达	[8]
JF907624	GATA 连接蛋白 – 4(GATA – binding protein 4, GATA4)	心脏特殊性转录因子	/	胚胎期暴露于 PFOS 后各发育 期的表达	[7]
JF831881	NK2 转 录 相 关 因 子-5 (NK2 transcription factor related 5, NKX2.5)	心脏特殊性转录因子	/	胚胎期暴露于 PFOS 后各发育 期的表达	[7]
JF831882	骨形态发生蛋白-4(bone mor- phogenetic protein, BMP4)	心脏早期发育标记	/	胚胎期暴露于 PFOS 后各发育 期的表达	[7]

注: / 指未进行实验或尚未上传至 NCBI 基因库。

免疫组化可直观了解蛋白的组织分布情况(表 4) 。
Kong 等^[9] 利用对成鱼切片后的免疫组化的方法, 观
察了海洋青鲷鱼的 TERT 蛋白在辜丸、卵巢、肌肉、

脑、鳃、肠、肾和肝等器官的表达情况。增殖细胞核
抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 是反
映细胞增殖的标记蛋白, 利用免疫组化的方法可检测

表4 海洋青鳉鱼可用抗体及相应蛋白的表达情况

Table 4 Available anti-bodies and their protein expression patterns in *O. melastigma*

抗体名称	表达情况	文献
DM1A(α -tubulin)	整个胚胎,中枢神经系统信号较强	[8]
E7(β -tubulin)	整个胚胎	[8]
β -catenin	整个胚胎	[8]
HuC/HuD	神经细胞	[8]
Islet-1 (39.4D5)	运动神经元	[8,10]
SV2	运动神经的突触前末梢和新生终端	[8]
HNK-1	标记脑部神经元和神经束	[8]
Zn-12	标记脑部神经元和神经束	[8,10]
酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase)	阶段 25 在后脑甲状腺神经元; 阶段 31 在丘脑多巴胺能神经元	[8]
Znf-1	中枢神经系统神经节细胞层	[8,10]
Zpr-1	集中在阶段 33 眼睛外核层	[8]
Zpr-3	集中在阶段 33 眼睛外核层	[8,10]
MF20	标记心房和心室,胸鳍肌肉和肌节	[8,10]
CH1	标记心房和心室,胸鳍肌肉和肌节,但也在胸鳍肌肉被检测到	[8]
4D9	后脑中脑的分界线	[8]
磷酸化组蛋白(phospho-histone H3)	标记有丝分裂细胞	[8]
EMA-1	自阶段 32 开始,在胸鳍、腹鳍和尾鳍	[8]
增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)	胚胎发育期的表达; 成鱼缺氧条件,腮、肝、睾丸、脑、肠、肾、肌肉和 卵巢中表达	[9-10]
mAb476	缺氧条件,腮、肝、睾丸、脑和肌肉中表达	[8]
MT	在 2 种 ZnO 作用下,表达有显著差异	[20]
Cu/Zn SOD	在 2 种 ZnO 作用下,表达有显著差异	[20]
HSP70	在 2 种 ZnO 作用下,表达差异不显著	[20]
T4	腮部 NKCC 的表达随盐度的变化而变化	[16]
NKA α 5	NKA 在不同盐度下在腮部的表达差异	[15-16]

细胞的增殖情况。实验表明,PCNA 的结果与 TERT 在转录和翻译水平的表达呈现出显著的相关性 [9]。PCNA 检测也可反映海洋青鳉鱼胚胎发育的时空特性 [10]。

第二代高通量测序技术大大提高了基因信息的获取能力。笔者研究组对海洋青鳉鱼进行了多污染物多发育期暴露实验,暴露后提取 RNA,进行 Illumina 高通量测序,获得了 6GB 的数据。在此基础上,进行生物信息学分析,获得了大量毒理学相关基因序列,为毒理学的开展提供了分子基础 [21]。

2.2 常规毒理学应用

在毒性评价过程中,常选用处于不同营养层级的生物共同进行评价,海洋青鳉鱼通常作为较高级生物。在评价纳米型氧化锌毒性时,研究者选用了浮游硅藻 (*Skeletonema costatum*) 和海链藻 (*Thalassiosira pseudonana*),端足目动物片钩虾 (*Elasmopus rapax*),桡足类动物水蚤 (*Tigriopus harpacticoid*),以及海洋青鳉鱼这 5 种海洋生物。其中,前几种用于急性毒性评价,而海洋青鳉鱼用于亚急性毒性评价,利用海洋青鳉鱼超氧化物歧化酶,金属硫蛋白和热休克蛋白 70 评估纳米型和普通氧化锌对海

洋青鳉鱼的亚急性毒性,结果显示,2 种氧化锌对这 3 种蛋白的诱导作用存在差异 [22]。

海洋青鳉鱼也应用于评价重金属毒性,穆景利等 [23] 利用海洋青鳉鱼受精卵和初孵仔鱼对 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 和 Pb^{2+} 进行了 14 d 短期毒性和 96 h 急性毒性实验,发现这 4 种重金属离子高于一定浓度时会显著降低胚胎的孵化能力和心跳速度,并与其他海洋鱼种的数据比较发现,海洋青鳉鱼对重金属胁迫具有较强的敏感性。利用海洋青鳉鱼测定铜、三丁基锡 (TBT) 和 5 种常用防污杀菌剂 (包括均三嗪、敌草隆、吡啶硫酮锌、吡啶硫酮铜和百菌清) 的急性毒性,结果表明,铜、均三嗪和敌草隆的 96 h- LC_{50} 为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 数量级,而其他污染物的 96 h- LC_{50} 为 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 数量级 [23]。海洋青鳉鱼也用于对比海洋卡盾藻 (*Chattonella marina*) 与短裸甲藻 (*Karenia brevis*) 所产生毒素的毒性 [24],暴露于海洋卡盾藻毒素中表现为换气过度,而暴露于短裸甲藻毒素中则表现为换气不足。另外,不同提取方式所获得的毒素的 LC_{50} 也不一致。

海洋青鳉鱼的 LC_{50} 可作为反映污染物毒性的指标,并用于毒性比较和相关性分析。此外,急性毒

性实验可为分子毒理学机制研究提供合适的剂量,例如,通过确定短裸甲藻毒素(brevetoxins, PbTx_s)对海洋青鳉鱼的24 h-LC₅₀值,进而确定后续蛋白组学研究中的裸甲藻毒素浓度^[23]。亚急性毒性实验采用的污染物浓度往往更接近环境值,因而对毒性评价具有重大意义。在评估双壁碳纳米管对海洋生物的毒性时发现,10 mg·L⁻¹的经超声处理后的双壁碳纳米管抑制了海洋青鳉鱼幼鱼的生长^[24]。

在污染物生物体蓄积效应的研究中,海洋青鳉成鱼经食物相暴露于2,2',4,4'-四溴二苯醚(2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether, PBDE-47)后,PBDE-47可通过母源性传递进入鱼卵中^[25]。

2.3 分子毒理学应用

通过荧光定量PCR(qRT-PCR技术)分析发现,缺氧会导致瘦蛋白受体基因在鳃、心脏和肝脏等组织中的表达显著上调^[11]。暴露于较高浓度的17β-乙醇(10、100和500 ng·L⁻¹)和17α-炔雌醇(10、100和500 ng·L⁻¹),肝脏中的卵壳前体蛋白基因的表达显著上调^[13]。原位杂交的结果显示,副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)会诱导海洋青鳉鱼肝脏细胞的细胞核和细胞质的铁调素基因的表达^[13]。硬骨鱼的卵膜蛋白(choriogenins)被认为是卵膜前体细胞的内层结构,对雌激素类污染物非常敏感。海洋青鳉鱼卵膜蛋白的H和L型对雌二醇和壬基酚的暴露非常敏感,而相比雌性,雄鱼的响应更为敏感,说明这2个基因可作为敏感的生物标志物来指示海洋环境中雌激素类物质的污染状况^[13]。

笔者研究组以海洋青鳉鱼胚胎为模型,详细研究了全氟化合物的海洋生物毒性。已有研究表明,PFOS会降低淡水鱼类斑马鱼的孵化速度^[26]。而针对海洋青鳉鱼的研究结果显示,PFOS暴露使海洋青鳉鱼的平均孵化时间显著下降,平均孵化率显著上升,且这2种效应具有浓度梯度依赖性。分子水平上的研究结果与之对应,PFOS暴露显著提高了孵化酶系的mRNA表达和酶活力水平。而进一步的观察发现,提前孵化导致出生1周内的幼鱼死亡率显著提高。同时,笔者还发现PFOS具有心血管系统发育毒性,会导致心脏发育关键基因表达异常,致使心脏形态改变,心脏功能也相应受到影响^[17]。

采用基因芯片技术可大规模获取污染暴露引起的差异表达基因,国内学者已构建了海洋青鳉鱼专用基因芯片,该芯片包含180个与细胞分裂、解毒反应、缺氧反应、氧化应激反应、凋亡、生长和发育、性

别决定和性腺分化以及生殖激素分泌等功能相关的基因,涵盖了毒理学研究的常见标示基因^[7],可有效地用于差异表达基因筛选。蛋白组学(proteomics)是指大规模水平研究蛋白质特征的方法。蛋白组学已成为水生毒理学研究的热点之一^[27]。利用蛋白组学的方法,氯化汞导致与氧化压力、细胞骨架连接、信号转导、蛋白修饰和代谢功能相关的蛋白在海洋青鳉鱼脑部和肝脏表达异常^[30]。在短裸甲藻毒素对海洋青鳉鱼的神经毒性研究中,在鳃和脑部分别有14和24种蛋白质的丰度发生显著改变,这些蛋白质与细胞的结构、大分子代谢、信号传导和神经递质释放等功能相关^[31]。这些发现可帮助阐明水产品毒素对海洋生物靶器官功能影响的可能途径。

3 展望

随着海洋污染越来越受到重视,海洋青鳉鱼在生态毒理学研究中的应用必将越来越深入。在污染物的评价与监测方面,针对利用海洋青鳉鱼评价污染物的毒性将会逐渐建立起标准的测试方法,从而形成一种成熟的海洋青鳉鱼的毒性评价平台。随着转基因技术的发展,生物体发光技术在海洋青鳉鱼上的应用将使海水水质监测实现可视化^[31]。此外,行为毒理学研究将从感觉、运动和认知等功能对污染物对海洋青鳉鱼的毒性效应进行研究,也是很有意义的一种研究手段。

由于海洋青鳉鱼基因组和蛋白组信息的滞后,迄今其相关毒理学研究还比较少。随着分子生物学技术的迅速发展,海洋青鳉鱼在分子毒理学研究方面的应用必将快速推进。在测序方面,测序技术的发展使全基因组测序的成本越来越低,海洋青鳉鱼的基因组和转录组测序将可在短期内完成。近年来,表观遗传学成为生态毒理学研究中的热点,表观遗传学技术的应用将有助于海洋青鳉鱼相关的生态毒理学研究。此外,由于组学技术的兴起,代谢组学和蛋白组学也将成为海洋青鳉鱼相关的生态毒理学研究的重要方法,转录组学、蛋白组学和代谢组学的结合将极大地推进污染物的分子毒理机制的研究。

通讯作者简介:董四君(1966—),男,生物学博士,研究员,主要研究方向为分子毒理学,发表SCI论文20余篇。

参考文献:

- [1] 谷河泉,陈庆强. 中国近海持久性毒害污染物研究进展[J]. 生态学报,2008,28(12): 6243-6251

- Gu H Q, Chen Q Q. Persistent toxic substances in off-shore zone of China: A review [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(12): 6243–6251 (in Chinese)
- [2] French R, Jacobson A, Kim B, et al. Influence of ionic strength, pH, and cation valence on aggregation kinetics of titanium dioxide nanoparticles [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(5): 1354–1359
- [3] You C, Jia C X, Pan G. Effect of salinity and sediment characteristics on the sorption and desorption of perfluorooctane sulfonate at sediment–water interface [J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(5): 1343–1347
- [4] Jeon J, Kannan K, Lim H K, et al. Bioaccumulation of perfluorochemicals in Pacific Oyster under different salinity gradients [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(7): 2695–2701
- [5] Kinoshita M, Murata K, Naruse K, et al. Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols [M]. Ames: Wiley Blackwell, 2009: 9–11, 23–24
- [6] Inoue K, Takei Y. Diverse adaptability in *Oryzias* species to high environmental salinity [J]. *Zoological Science*, 2002, 19(7): 727–734
- [7] 陈瑶, 方志俊, 郑金树, 等. 海洋青鳉鱼专用型基因芯片的设计及其在生态毒理学上的应用研究 [J]. *台湾海峡*, 2010, 29(3): 359–365
- Chen Y, Fang Z J, Zheng J S, et al. Design of marine medaka (*Oryzias melastigma*) functional specific cDNA microarray and its ecotoxicological application [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2010, 29(3): 359–365 (in Chinese)
- [8] Chen X, Li L, Wong C K, et al. Rapid adaptation of molecular resources from zebrafish and medaka to develop an estuarine/marine model [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2009, 149(4): 647–655
- [9] Kong R, Giesy J P, Wu R, et al. Development of a marine fish model for studying in vivo molecular responses in ecotoxicology [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 86(2): 131–141
- [10] Chen X, Li L, Cheng J, et al. Molecular staging of marine medaka: A model organism for marine ecotoxicity study [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 63(5–12): 309–317
- [11] Wong M M L, Yu R M K, Ng P K S, et al. Characterization of a hypoxia-responsive leptin receptor (*omLepR_L*) cDNA from the marine medaka (*Oryzias melastigma*) [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2007, 54(6): 797–803
- [12] Yu R M, Chen E X, Kong R Y, et al. Hypoxia induces telomerase reverse transcriptase (TERT) gene expression in non-tumor fish tissues in vivo: The marine medaka (*Oryzias melastigma*) model [J]. *BMC Molecular Biology*, 2006, 7: 27
- [13] Chen X, Li V W T, Yu R M K, et al. Choriogenin mRNA as a sensitive molecular biomarker for estrogenic chemicals in developing brackish medaka (*Oryzias melastigma*) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 71(1): 200–208
- [14] Ho N Y, Li V W T, Poon W L, et al. Cloning and developmental expression of kinesin superfamily7 (*ki7*) in the brackish medaka (*Oryzias melastigma*), a close relative of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2008, 57(6–12): 425–432
- [15] Kang C K, Tsai S C, Lee T H, et al. Differential expression of branchial Na^+/K^+ -ATPase of two medaka species, *Oryzias latipes* and *Oryzias dancena*, with different salinity tolerances acclimated to fresh water, brackish water and seawater [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2008, 151(4): 566–575
- [16] Kang C K, Tsai H J, Liu C C, et al. Salinity-dependent expression of a Na^+ , K^+ , 2Cl^- cotransporter in gills of the brackish medaka *Oryzias dancena*: A molecular correlate for hyposmoregulatory endurance [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2010, 157(1): 7–18
- [17] Huang Q S, Fang C, Wu X L, et al. Perfluorooctane sulfonate impairs the cardiac development of a marine medaka (*Oryzias melastigma*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 105(1–2): 71–77
- [18] Bo J, Cai L, Xu J H, et al. The marine medaka *Oryzias melastigma*—A potential marine fish model for innate immune study [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 63(5–12): 267–276
- [19] Fang C, Wu X L, Huang Q S, et al. PFOS elicits transcriptional responses of the ER, AHR and PPAR pathways in *Oryzias melastigma* in a stage-specific manner [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 106–107: 9–19
- [20] Wong S W, Leung P T, Djuricic A B, et al. Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: Influences of aggregate size and ion solubility [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396(2): 609–618
- [21] Huang Q, Dong S, Fang C, et al. Deep sequencing-based transcriptome profiling analysis of *Oryzias melastigma* exposed to PFOS [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 120–121: 54–58
- [22] 穆景利, 王莹, 王新红, 等. Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 和

- Pb^{2+} 对黑点青鳉(*Oryzias melastigma*) 早期生活阶段的毒性效应研究 [J]. 生态毒理学报, 2011, 6(4): 352–360
- Mu J L, Wang Y, Wang X H, et al. Toxic effects of cadmium, mercury, chromium and lead on the early life stage of marine medaka (*Oryzias melastigma*) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2011, 6(4): 352–360
- [23] Bao V, Leung K, Qiu J W, et al. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species [J]. Marine Pollution Bulletin, 2011, 62(5): 1147–1151
- [24] Shen M, Xu J L, Tsang T Y, et al. Toxicity comparison between *Chattonella marina* and *Karenia brevis* using marine medaka (*Oryzias melastigma*): Evidence against the suspected ichthyotoxins of *Chattonella marina* [J]. Chemosphere, 2010, 80(5): 585–591
- [25] Tian L, Wang M, Li X, et al. Proteomic modification in gills and brains of medaka fish (*Oryzias melastigma*) after exposure to a sodium channel activator neurotoxin, brevetoxin-1 [J]. Aquatic Toxicology, 2011, 104(3–4): 211–217
- [26] Kwok K W, Leung K M, Flahaut E, et al. Chronic toxicity of double-walled carbon nanotubes to three marine organisms: Influence of different dispersion methods [J]. Nanomedicine, 2010, 5(6): 951–961
- [27] van de Merwe J P, Chan A, Lei E, et al. Bioaccumulation and maternal transfer of PBDE 47 in the marine medaka (*Oryzias melastigma*) following dietary exposure [J]. Aquatic Toxicology, 2011, 103(3–4): 199–204
- [28] Shi X, Du Y, Lam P K S, et al. Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2008, 230(1): 23–32
- [29] Sanchez B C, Ralston-Hooper K, Sepúlveda M S. Review of recent proteomic applications in aquatic toxicology [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2011, 30(2): 274–282
- [30] Wang M, Wang Y, Wang J, et al. Proteome profiles in medaka (*Oryzias melastigma*) liver and brain experimentally exposed to acute inorganic mercury [J]. Aquatic Toxicology, 2011, 103(3–4): 129–139
- [31] Chen X, Kinoshita M, Hirata T, et al. Transgenic marine medaka (*Oryzias melastigma*): A sensitive sentinel for estrogenic pollutants [J]. Molecular & Cellular Toxicology, 2007, 3(4): 34
- ◆