环境激素对纹沼螺RXR基因表达的影响

刘人杰^{1,2,3,4}, 崔铁峰^{1,2,3}, 史文卓³, 何建武³, 安立会³, 王宏伟^{1,2*}, 王菲菲^{3*}

1. 河北大学生命科学学院, 保定 071002;

2. 河北大学生命科学与绿色发展研究院, 保定 071002;

3. 中国环境科学研究院, 环境基准与风险评估国家重点实验室, 北京 100012;

4. 中国医学科学院基础医学研究所&北京协和医学院基础学院, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005

* 联系人, E-mail: whw6688@126.com; wangff@craes.org.cn

收稿日期: 2021-06-11; 接受日期: 2021-07-03; 网络版发表日期: 2021-09-16

国家自然科学基金(批准号: 21577137)、教育部留学回国基金(批准号: 201808130270)、河北省引进留学人员资助项目(2021)、白洋淀水生生物资源环境调查与水域生态修复项目(批准号: 2130135)、河北省自然科学基金(批准号: C2019201390)和河北大学实验创新项目(批准号: sy202091)资助

摘要 维甲酸X受体(RXR)基因在调控软体动物内分泌行为过程中起着关键作用. 为揭示环境激素对软体动物RXR基因表达的调控作用, 在前期构建纹沼螺转录组基础上, 利用RACE技术扩增获得纹沼螺RXR基因cDNA全序列, 并采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)对环境激素暴露后纹沼螺RXR基因表达水平进行定量分析. 研究结果显示, 纹沼螺RXR基因与其他软体动物RXR具有较高的同源性, 雌激素处理后RXR基因的表达先被抑制后被促进, 雄激素处理后RXR基因的表达先被诱导后被抑制, 并且不同暴露浓度组RXR基因表达差异不显著. 研究结果表明, 环境激素可能对纹沼螺有一定的毒理效应, 为从分子水平上深入探究环境激素对软体动物危害机制提供了数据支持及理论基础.

关键词 纹沼螺, 维甲酸X受体(RXR), 雌二醇(E2), 甲基睾酮(MT)

环境激素(environmental hormones)即环境内分泌干扰物(Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs)^[1], 是一类能够干扰生物体激素正常合成、分泌、转运、结合、作用或消除的外源物质, 能够影响人类和其他动物的正常内分泌功能. 环境激素在水体中难以降解, 导致水体中环境激素污染日趋严重^[2,3]. 例如, 贡江以及珠江的水样中, 雌二醇(17 β -estradiol, E2)的浓度约为LOD~1.5 ng/L, 雌酮(estrone, E1)的浓度也达到LOD~8.2 ng/L^[4]. 在长江重庆段检出8种环境雌激素总质量

浓度范围甚至达到了46.16~10985.79 ng/L^[5]. 另外, 在日本、韩国、意大利等国河流中也均检测到了不同种类和不同浓度水平的环境激素^[6~8]. 环境激素会直接影响水生生物, 产生相应的生物效应. 雌二醇E2和甲基睾酮(17 α -methyltestosterone, MT)是生物性激素, 对生物的性别分化、生长和发育过程均产生影响. 例如, 将雌二醇E2、睾酮(Testosterone)和孕酮(Progesterone)注射到虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)体内后, 机体内的卵子发生和精子发生过程会被诱导, 进而增加性

引用格式: 刘人杰, 崔铁峰, 史文卓, 等. 环境激素对纹沼螺RXR基因表达的影响. 中国科学: 生命科学, 2021, 51: 1328–1338

Liu R J, Cui T F, Shi W Z, et al. Expression profiles of the gene retinoid X receptor in *Parafossarulus striatulus* (freshwater snail) exposed to environmental hormones (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2021, 51: 1328–1338, doi: 10.1360/SSV-2021-0316

腺重量^[9]。陈立黎^[10]、刘颖^[11]等学者的研究也表明, 外源雌激素和雄激素会干扰性腺基因表达以及内分泌系统。范家诚等人^[12]的研究中也证实天然雌激素E2、环境类雌激素NP和TBT的暴露可以诱导雄性斑马鱼肝脏中卵黄蛋白原基因和雌激素受体基因的表达, 雌二醇(E2)还能够诱导雄性中华鳖胚胎性腺分化^[13,14], 同时还能够促进雌性尼罗罗非鱼的生长^[15]。环境雌激素双酚A甚至会扰乱大鼠性行为^[16]。然而, 目前研究更多集中在鱼类、两栖类和鸟类等脊椎动物, 对环境激素影响无脊椎动物内分泌行为的了解还非常有限。

与其他物种相比, 腹足类动物对环境激素更为敏感, 维甲酸X受体(Retinoid X receptor, RXR)信号通路参与腹足类的内分泌干扰作用已被证实。目前的工作主要集中于研究RXR基因mRNA的相对变化, 而最近的研究表明抗雄激素类药物能够引起轮虫RXR mRNA水平显著升高^[17]。软体动物还可通过维甲酸X受体信号途径来诱导性畸变的产生^[18]。已有文献报道克隆了狗岩螺(*Nucella lapillus*)、疣荔枝螺(*Thais clavigera*)等软体动物的RXR基因, 并表明RXR能够调节软体动物性腺发育的过程以及内分泌行为^[19-23]。但目前未见有关淡水螺RXR的报道。

纹沼螺(*Parafossarulus striatulus*)是浅水草型湖泊中的优势种类^[24], 属软体动物门, 前鳃亚纲, 中腹足目, 豆螺科, 沼螺属。纹沼螺是雌雄异体, 个体小, 体轻, 喜附着于水草上。作为生态系统中重要的生态类群——底栖生物具有移动能力差、活动范围小和对环境变化敏感的特点, 因此可作为水生态环境质量评价的重要指示物种^[25,26]。为了揭示环境激素对软体动物RXR基因的调控作用, 本研究以纹沼螺为实验材料, 在克隆和分析纹沼螺RXR基因序列基础上, 研究了E2和MT对纹沼螺RXR基因表达的影响, 为从分子水平上揭示环境激素通过调控RXR表达影响软体动物内分泌行为提供可靠的分子生物学信息, 也为开展以纹沼螺为潜在模式生物的水生态毒理学奠定基础。

1 材料与方法

1.1 纹沼螺饲养及组织收集

本实验所需纹沼螺(*P. striatulus*)均采自湖北省鄂州市梁子湖天然水域, 平均壳长(9.51±0.7) mm, 平均体重(0.18±0.03) g。在实验室饲养用于后续实验, 饲养

条件如下: pH(7.8±0.2), 溶解氧大于6.5 mg/L, 水温(22±1)℃, 光照强度(550±200) lx以及光周期14 h(光照): 10 h(黑暗), 每天用浓缩的新鲜小球藻(*Chlorella vulgaris*)喂养。取纹沼螺软体组织提取总RNA。

1.2 RNA提取和cDNA合成

按Trizol试剂盒(Invitrogen, 美国)操作方法从纹沼螺中提取总RNA。将RNA用DNase I 试剂(宝生物公司, 大连)处理, 防止基因组DNA的污染。依次加入10 μL无RNA酶的DNA酶 I (RNase free DNase I), 0.5 μL Ribocombinant RNasin®Ribonuclease inhibitor(40 U/μL), 5 μL 10×DNase I buffer, 20~50 μL总RNA, 最后加无RNA酶的去离子水至50 μL, 37℃温浴30 min后, 加入50 μL DEPC水(在超纯水中加入0.1%(体积比)DEPC过夜后, 高压灭菌)和苯酚/氯仿/异戊醇(25/24/1)(分析纯, 北京化工厂), 充分混匀, 离心取上层水相, 依次加入10 μL 3 mol/L醋酸钠(pH 5.2)与250 μL预冷过的无水乙醇, -20℃放置30 min; 离心, 弃去上清, 经DEPC处理的75%酒精清洗; 干燥后, 复溶于50 μL DEPC处理水中。用超微量分光光度计(P330, 德国)检测RNA浓度和纯度, 确认 $A_{260/280}$ 值在1.8~2.0, 并用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性。利用M-MLV反转录试剂盒(Invitrogen, 美国)及其PCR体系, 按照25℃, 5 min; 37℃, 50 min; 70℃, 15 min的程序合成cDNA后置于-80℃保存, 用于RXR基因mRNA水平表达分析。

1.3 RXR基因的克隆及序列生物信息学分析

根据本实验室前期获得的纹沼螺转录组数据库, 利用PrimerPremier5设计RACE引物序列(表1)。以纹沼螺总RNA为模板, 3'adaptor为引物反转录合成cDNA的第一条链后进行3'RACE扩增。

以合成的cDNA的第一条链为模板配制25 μL反应液体系进行第一轮巢式PCR扩增: 基因特异性引物(GSP1) 0.5 μL; 3'outer引物0.5 μL; 2× GC Buffer I 12.5 μL; dNTP(2.5 mmol/L) 4 μL; 模板1 μL; ddH₂O 6.3 μL; Taq酶(5 U/μL) 0.2 μL。以第一轮巢式PCR稀释产物作为模板配制50 μL反应液体系进行第二轮巢式PCR扩增: 基因特异性引物(GSP2) 1 μL; 3'outer引物1 μL; 2× GC Buffer I 25 μL; dNTP(2.5 mmol/L) 8 μL; 模板1 μL; ddH₂O 12.5 μL; Taq酶(5 U/μL) 0.5 μL。按照下列参数进行两轮巢式PCR扩增: 95℃预变性3 min; 94℃变

表 1 纹沼螺RXR基因克隆引物及实时荧光定量PCR中所用的引物

Table1 Primers used for cloning RXR gene of *P. striatulus* and used for quantitative real-time PCR

引物	引物序列(5'→3')	描述
3'adaptor	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGTGTTTTTTTTTTTTTTTTT	3'RACE
3'outer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAAC	
3'inner	GCTACGTAACGGCATGACAGTG	
3'-GSP1	CGGCAGCGCAACAGGTGTCAATAC	
3'-GSP2	CAGCAGGGCATGAAGAGAGAAGCTGTAC	
5'adaptor	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGGGGGGGGGGGGGGG	5'RACE
5'-RT	GCTTCCATGATCTGTTCCACAGGCAT	
5'-outer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAAC	
5'-GSP3	ACGTGCTCTCCACCTCATCCCCTTT	
5'-GSP4	CTCCTGTACAGCTTCTCTCTTCATGCCCT	
Forward	CGCCAGATCTTCAACGGTGTAT	RPL-7
Reverse	AGGCTCAGCAATCCTCAGCAT	
Forward	GCTCTTCAATCCCGATGCTAA	RXR
Reverse	GAGGAAAGTGTCATGGGTGTAT	

性30 s; 58℃退火30 s; 72℃延伸60 s; 72℃修复延伸7 min; 33个循环。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离后, 采用凝胶成像系统(Gene Genius公司, 美国)成像, 割胶回收目的片段并纯化。回收的PCR纯化产物连接到pMD18-T载体, 连接反应体系如下: Solution I: 4 μL; PCR Product 5 μL; pMD18-T 0.2 μL; H₂O 0.5 μL, 在16℃下连接过夜后转化至感受态细胞(SK2301), 转化步骤如下: 100 μL感受态细胞, 置于冰上, 完全解冻后轻轻将细胞均匀悬浮; 加入10 μL连接液, 轻轻混匀。冰上放置30 min; 42℃水浴热激60 s。冰上放置10~15 min; 加400 μL LB培养基, 37℃ 200~250 r/min振荡培养1 h; 室温下500×g离心5 min, 用枪头吸掉400 μL上清液, 用剩余的培养基将细胞悬浮; 将细菌涂布在预先用20 μL 100 mmol/L IPTG和100 μL 20 mg/mL X-gal涂布的氨苄青霉素平板上, 倒置培养过夜。以pMD18-T载体的通用引物做PCR, 经菌液PCR后, 产物经纯化后送至上海生工进行测序。

随后以RXR-RT为引物反转录得到的cDNA经RNase H和TdT处理后进行5'RACE扩增。以基因特异性引物(GSP3)和5'adaptor、基因特异性引物(GSP4)和3'outer为引物按照下列参数进行两轮巢式PCR扩增: 95℃预变性3 min; 94℃变性30 s; 58℃退火30 s; 72℃延伸60 s; 72℃修复延伸7 min; 33个循环。PCR产物经

1%琼脂糖凝胶电泳分离后, 割胶回收目的片段并纯化。回收的PCR产物克隆与pMD18-T载体, 连接反应及细菌转化按照pMD18-T载体试剂盒说明书进行操作。经菌液PCR后, 产物经纯化后送至上海生工进行测序。

使用生物学软件DNASTAR将3'RACE及5'RACE扩增后得到的cDNA序列进行拼接, 获得RXR基因全长cDNA序列。通过NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)在线程序ORF Finder对RXR基因可读框(open reading frame, ORF)进行预测并推导氨基酸序列, 确定基因CDS区。利用ClustalW与NCBI数据库中已发表的其他生物RXR基因进行多重比对分析, 采用MEGA软件中的最大似然法构建系统进化树进行同源性分析。利用ProtParam程序(<http://www.expasy.ch/tools/>)对RXR编码蛋白理化性质进行预测; ProtScale程序预测该蛋白疏水性轮廓; TMHMM软件(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测RXR基因编码蛋白跨膜结构域。

1.4 雌二醇及甲基睾酮暴露

将实验室饲养的纹沼螺分别暴露于浓度分别为5, 50, 500 ng/L^[27]的17β-estradiol(E2)和17α-methyltestosterone(MT)的水体中, 并以二甲基亚砜(dimethyl sulfox-

ide, DMSO)($<0.005\%$, 体积比)为试剂对照. 每个暴露组 40个/2 L, 并设置三个重复组, 每24 h换水一次. 在暴露的24, 48, 96 h^[28]分别从每个缸中随机抽取10个样品纹沼螺, 辨别雌雄后, 各取3只解剖出组织单独存于含有RNAlater溶液的2 mL离心管中提取RNA后合成cDNA.

1.5 实时荧光定量PCR

根据本实验室克隆得到的纹沼螺RXR基因的cDNA序列, 利用PrimerPremier5设计特异性引物(表1), 从转录水平研究环境激素对纹沼螺RXR基因的影响. 以合成的cDNA为模板, 配制20 μ L反应液体系: SYBR® Green PCR Master Mix(Applied-Biosystems公司, 美国) 10 μ L, Forward Primer 0.8 μ L, Reverse Primer 0.8 μ L, cDNA 2.5 μ L, Nuclease-Free Water 5.9 μ L, 利用ABI Prism 7500 Real-time PCR仪(Applied Biosystems公司, 美国)按照下列参数进行实时荧光定量PCR反应: 50°C, 2 min; 95°C, 10 min; 95°C, 15 s, 40个循环; 60°C, 60 s. 在最后一个循环结束后做熔解曲线, 以验证PCR反应质量. 良好的PCR反应熔解曲线呈现单一峰, 当熔解曲线出现两个峰甚至多个峰时表明扩增时出现了引物二聚体、错配或者非特异扩增. 实验中每个样品设置3个重复及空白对照, 选用文献[29]中RPL-7作为内参基因最为稳定.

1.6 数据分析

实时荧光定量PCR结束后, Ct值使用ABI Prism 7500 SDS软件(Applied Biosystems, CA, USA)根据手册进行分析. 根据内参基因用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算暴露组与对照组基因变化的倍数; 利用GraphPad prism 7软件对基因表达差异进行单因素方差分析(ANOVA)Dunnett检验(95%置信区间), 当 $P<0.05$ 时, 认为差异显著, 当 $P<0.01$ 时, 认为差异极显著.

2 结果

2.1 纹沼螺RXR基因全长cDNA克隆及分析

提取的纹沼螺总RNA以3'adaptor为引物进行反转录, 并以此得到的cDNA为模板进行巢式PCR扩增, 3' RACE扩增后电泳图显示得到的序列约为850 bp; 以RXR-RT反转得到的cDNA为模板进行5'RACE克隆, 扩增后电泳图显示得到的序列约为650 bp(图1).

图1 RACE结果电泳图. A: 3'RACE结果; B: 5'RACE结果
Figure 1 RACE results electrophoretic chart. A: 3'RACE results; B: 5'RACE results

采用5'RACE和3'RACE法对RXR基因全长cDNA序列进行克隆后, 得到RXR基因cDNA序列全长1437 bp. 测序结果经NCBI在线程序ORF查找RXR基因可读框, 得到该基因存在长度为1356 bp能够编码451个氨基酸的可读框. ProtParam程序对RXR基因编码蛋白性质进行预测发现, 其蛋白分子式是 $C_{2171}H_{3455}N_{619}O_{658}S_{38}$, 分子质量为49.9744 kD, 理论等电点为6.81, 提示RXR编码产物可能是一个偏酸性蛋白. RXR编码蛋白组成中碱性氨基酸(Arg和Lys)占总氨基酸的比例为10.8%, 而酸性氨基酸(Asp和Glu)在总氨基酸中的比例分别为11.4%, 消光系数为29755, 半衰期为30 h;

疏水性轮廓预测能够帮助判断蛋白质的跨膜结构区域, 对疏水性轮廓进行预测发现RXR基因编码蛋白中亲水残基比例多于疏水残基, 说明此蛋白为亲水性蛋白. 对RXR基因编码蛋白的跨膜结构域进行预测, 结果显示RXR基因编码的蛋白产物不存在跨膜结构.

2.2 系统进化树

克隆的纹沼螺RXR基因序列与其他软体动物及其他门类的动物比对后进行分析, 使用MEGA软件以

最大似然法构建系统进化树比较纹沼螺RXR基因与其他物种之间的亲缘关系。选取的13种RXR及其序列号如下: *Mouse*(GenBank登录号: M84817.1); *Tripedalia cystophora*(GenBank登录号: AF091121.1); *Biomphalaria glabrata*(GenBank登录号: AY048663.1); *Rattus norvegicus*(GenBank登录号: NM_012805.2); *Nucella lapillus*(GenBank登录号: EU024473.1); *Thais clavigera*(GenBank登录号: AY704160.1); *Danio rerio*(GenBank登录号: U29940.1); *Homo sapiens*(GenBank登录号: NM_002957.5); *Crassostrea gigas*(GenBank登录号: KX590999.1); *Chlamys farreri*(GenBank登录号: JQ778315.1); *Haliotis diversicolor*(GenBank登录号: HM484209.1); *Patella vulgata*(GenBank登录号: KT883915.1); *Lymnaea stagnalis*(GenBank登录号: AY846875.1)。

脊椎动物和软体动物各聚成一支, 腔肠动物为单独一支。其中纹沼螺属前鳃亚纲中腹足目, 与同为新腹足目的疣荔枝螺和狗岩螺为一支, 同源性最高。其他软体动物杂色鲍、静水椎实螺、光滑双脐螺、长牡蛎、栉孔扇贝等为一大支(图2)。

2.3 序列比对

氨基酸序列比对显示纹沼螺RXR含有典型的RXR家族结构, 含有两个保守的蛋白结构域: DNA结合域(DBD)和配体结合域(LBD)。DBD中含有P-box, D-box和T-box, LBD中含有AF-2区域(图3)。

2.4 实时定量纹沼螺RXR表达

采用实时荧光定量PCR检测纹沼螺在不同浓度17 β -estradiol(E2)和17 α -methyltestosterone(MT)暴露24, 48和96 h后RXR基因的表达情况。

(1) E2和MT在不同暴露时间下对纹沼螺RXR基因表达的影响。实时荧光定量PCR结果显示, 雌性纹沼螺经E2处理后, RXR基因的表达水平基本都发生显著变化。处理24 h后, 除高浓度组(500 ng/L)外RXR基因表达均被显著抑制, 而处理48 h后, RXR基因的表达被诱导, 低浓度组(5 ng/L)显著上调($P<0.05$)。96 h后, RXR基因表达量极显著上调($P<0.01$), 低浓度组上调2倍多(图4A)。雄性纹沼螺经E2处理后, 24 h后RXR基因表达均被抑制, 其中中浓度(50 ng/L)和高浓度(500 ng/L) RXR基因表达被极显著抑制($P<0.01$), 48 h

图2 纹沼螺与其他物种RXR基因的系统进化树分析

Figure 2 Phylogenetic analysis of *psRXR* against selected RXRs from other species

图 3 RXR 的氨基酸序列比对。黑色粗框代表 DNA 结合域 (DBD)，黑色虚线框代表配体域 (LBD)。蓝色虚线框从前至后分别代表 P-box, D-box, T-box 和 AF-2 区域

Figure 3 Alignment of the amino acid sequence of Gene RXR. The thick black frame shows the DNA binding domain (DBD), and the dotted black frame shows the ligand binding domain (LBD). The dotted blue frames show P-box, D-box, T-box and AF-2

后除中浓度组表达量仍低于对照组, 但不显著, 96 h后, 低浓度组RXR的表达显著上调1倍左右(图4B)。在E2处理下, 总体来看, 随着暴露时间的增加, RXR的表达水平处于一个上升的趋势, 但将处理组与空白组进行对比, RXR基因的表达是先抑制后诱导的趋势。

经低浓度(5 ng/L)的MT处理纹沼螺24 h后(图4A, B), RXR基因的表达显示出极显著上调($P<0.01$), 上调1倍多。暴露48以及96 h后, 处理组中RXR基因的表达显著下调($P<0.05$)。中浓度(50 ng/L)MT处理纹沼螺24 h后, 雌螺中RXR基因表达有所上调, 但并不显著($P>0.05$)(图4C); 雄螺中RXR基因表达量也上调近1倍(图4D)。48及96 h时对RXR基因表达进行检测发现, RXR表达被抑制, 在雌螺中显著下调($P<0.05$), 而雄螺中下调不明显, 且在96 h时, 与空白组表达水平相当($P>0.05$)。纹沼螺经高浓度(500 ng/L)MT处理, 24 h后RXR基因的表达显著上调, 而48 h后与24 h的基因表达水平相比较, 有显著的抑制变化, 且与对照组水平相当。96 h时, RXR基因的表达量处于极显著抑制的状态($P<0.05$)。经MT处理后, RXR基因的表达在24 h时均发生显著上调, 而随着暴露时间的增加, RXR基因的表达量又会被明显地抑制, 总体呈现出先诱导后抑制的趋势。

结果表明, E2的暴露能够使纹沼螺RXR基因的表达呈现出先抑制后诱导的趋势; 而MT对纹沼螺RXR基因表达的影响随时间呈现出先诱导后抑制的趋势。

(2) 不同浓度E2和MT对纹沼螺RXR基因表达的影响。根据qPCR结果显示, 纹沼螺经不同浓度(5, 50, 500 ng/L)E2处理24 h后, RXR基因的表达量均被抑制, 且除雌螺高浓度(500 ng/L)处理组外, 其他处理组均表现出显著下调, 低浓度与中浓度组比高浓度组的抑制作用更明显; E2处理雌螺48 h后, 低浓度组RXR基因表达量显著上调; 中浓度也有所上调, 但不显著; 高浓度组仍处于不明显的抑制状态, 且三组表达水平差异不大(图4A)。在雄螺中, RXR基因表达未发生显著的变化, 但仍处于一个相对抑制的状态(图4B)。不同浓度的E2处理96 h后, 雌螺中RXR基因表达量均极显著上调, 但相比低浓度(5 ng/L)的E2处理, 中浓度(50 ng/L)和高浓度的(500 ng/L)E2处理后的RXR基因表达量较低(图4A)。在雄螺中, RXR基因的表达也都有所升高, 但除低浓度组外, 其他并不显著(图4B)。结果发现, 除雌螺96 h处理情况下不同浓度之间存在差异较明显外, 其他情况中, 同一暴露时间, 不同浓度组之间差异不明显。

雌性纹沼螺经不同浓度(5, 50, 500 ng/L)MT处理24 h后, RXR基因的表达水平均发生明显的上调, 中浓度处理组除外。处理48 h后, RXR基因的表达量均被抑制, 且在低浓度处理组和中浓度处理组中, RXR基因表达呈显著性下调, 但三种浓度条件下, RXR的表达差异并不明显($P>0.05$)。待处理到96 h时, 相比对照组, RXR基因的表达水平均发生显著的变化, 且三种浓度下的RXR基因表达量相当(图4C)。雄螺在经不同浓度(5, 50, 500 ng/L)MT处理24 h后, RXR基因的表达量均表现出极显著上调。在处理48 h后, RXR基因的表达被抑制, 且不同浓度对应的RXR基因表达量之间无明显差异, 水平相当($P>0.05$); 待96 h后进行检测, 低浓度与高浓度组虽呈现出明显抑制状态, 但不同浓度对应的RXR基因表达量之间并未表现出明显的差异(图4D)。结果表明, 在暴露时间一定的条件下, 不同浓度组的RXR基因表达差异并不明显。

3 讨论

本文克隆得到了全长为1437 bp的纹沼螺RXR基因cDNA序列。截至目前, 已经有很多物种的RXR研究相继被报道, 包括狗岩螺^[18]、疣荔枝螺^[20]、静水椎实螺^[30]、中华绒螯蟹^[31]、三疣梭子蟹^[32]等。因而根据NCBI数据库信息, 将克隆基因序列与其他物种RXR基因序列进行序列比对, 并构建系统发育树, 直观地表现出物种间的亲缘关系。序列比对后发现该蛋白与前人研究的其他软体动物的RXR蛋白一致, 具有两个主要功能区: 最保守的DNA结合区(DBD)以及配体结合区(LBD), 其中纹沼螺RXR的DNA结合区中包含的P-box, D-box以及T-box三个重要的结构域也几乎与其他软体动物的RXR在该区域的序列完全一致, 提示纹沼螺的RXR在功能上可能与其他软体动物的RXR类似。进化树分析表明纹沼螺与疣荔枝螺和狗岩螺的亲缘关系是最近的, 表明本实验中克隆出的RXR为纹沼螺RXR基因。

雌、雄激素是典型的环境激素, 在极低浓度(10^{-12} ~ 10^{-9} g/L)下, 也能对生物造成伤害^[33]。现如今, 由其引起的生殖发育问题已经被全世界所关注^[34]。当机体被雌、雄激素处理后, 与雌、雄性腺分化与发育相关的基因的表达会受到抑制或激活。本文在实验室条件下使用E2和MT暴露纹沼螺, 并采用qRT-PCR的

图 4 雌性(A, C)、雄性(B, D)纹沼螺分别暴露于E2(A, B)和MT(C, D)中的RXR基因转录水平

Figure 4 RXR transcript levels in female (A, C), male (B, D) *P. striatulus* exposed to E2 (A, B) and MT(C, D), respectively

方法, 从分子生物学水平上研究性激素对纹沼螺RXR基因表达的影响. 结果显示, RXR基因的表达随E2暴露时间的增加呈现先抑制后诱导的趋势; 随MT暴露时间的增加呈现出先诱导后抑制的趋势. RXR基因的表达在性激素刺激下有所抑制和激活. 另外, 不同浓度的性激素对纹沼螺RXR基因的表达模式影响较为一致, 一方面说明RXR对E2和MT未呈现出一定的剂量依赖性, 也说明500 ng/L质量分数的性激素并没有达到过量抑制的效果. 在先前有关于甲基睾酮对性别分化基因表达影响的报道中^[35]也表明, 6和60 mg/kg MT对性别分化相关基因的影响较为一致, 是由于60 mg/kg没有达到过量抑制的效果. 另一方面可能是由于暴露浓度远高于环境浓度所导致^[36]. 通过李国超^[37]在斑马鱼的研究中表明, E2能上调雌性相关基因的表达, 下调部分雄性相关基因的表达, 而在王成等人^[35]之前的研究中发现, 甲基睾酮MT处理能够使雌性相关基因的表达先被抑制后被促进. 而本文发现甲基睾酮MT能够先诱导后抑制RXR基因的表达, 说明

RXR不是雌性相关基因, 而有可能是一种雄性相关基因. 若想进一步确定其是否参与了性激素决定性别分化的过程, 还需要与暴露不同年龄阶段的纹沼螺制作性腺切片, 结合组织学观察鉴定等研究手段.

4 结论

本实验应用RACE技术, 成功克隆出纹沼螺的RXR基因全长cDNA序列, 并预测出RXR基因结构及编码蛋白质性质与特征. 另外采用实时荧光定量PCR从转录水平研究性激素对纹沼螺RXR基因的影响. 结果表明, 纹沼螺RXR基因在调控软体动物性别发育和内分泌行为过程中起着关键作用, 进一步推测RXR可能是性激素参与性别决定及分化过程的调控基因, 为深入在分子角度研究环境激素在软体动物性腺分化与发育中的作用奠定生物学基础, 并通过研究环境激素对底栖生物纹沼螺的毒理效应为进一步掌握水体污染水平提供理论依据.

参考文献

- 1 Du M, Zhang M, Li Z C, et al. Effectiveness of macroporous adsorption resin for removal of phenolic environmental hormones in drinking water

- (in Chinese). *China Water Wastewater*, 2021, 37: 49–57 [杜萌, 张敏, 李宗超, 等. 大孔吸附树脂去除饮用水中酚类环境激素的效能. *中国给水排水*, 2021, 37: 49–57]
- 2 Qin F. The effects of EDCs exposure on the expression of reproductive regulation related genes and transcriptome in the brain of rare minnow (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Xianyang: Northwest A&F University, 2014 [秦芳. EDCs暴露对稀有鮡鲫脑中生殖调控相关基因表达及转录组的影响. 博士学位论文. 咸阳: 西北农林科技大学, 2014]
 - 3 Liu T H, Gan H T, Ding Z Y, et al. Progress in studying the toxic effects of environmental hormones on aquatic organisms (in Chinese). *Modern Agric Sci Technol*, 2020, 24: 200–202 [刘统昊, 甘宏涛, 丁子媛, 等. 环境激素对水生生物的毒性效应研究进展. *现代农业科技*, 2020, 24: 200–202]
 - 4 Gong J, Ran Y, Chen D, et al. Occurrence and environmental risk of endocrine-disrupting chemicals in surface waters of the Pearl River, South China. *Environ Monit Assess*, 2009, 156: 199–210
 - 5 Zhuo L, Xu R F, Shi Y G, et al. Estrogens in surface water of the Yangtze River in Chongqing section (in Chinese). *Asian J Ecotoxicol*, 2020, 15: 149–157 [卓珣, 许榕发, 石运刚, 等. 重庆长江流域水体中8种典型环境雌激素污染特征. *生态毒理学报*, 2020, 15: 149–157]
 - 6 Kawaguchi M, Ishii Y, Sakui N, et al. Stir bar sorptive extraction with *in situ* derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry in the multi-shot mode for determination of estrogens in river water samples. *J Chromatogr A*, 2004, 1049: 1–8
 - 7 Duong C N, Ra J S, Cho J, et al. Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. *Chemosphere*, 2010, 78: 286–293
 - 8 Aerni H R, Kobler B, Rutishauser B V, et al. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 378: 688–696
 - 9 Varaksina G, Varaksin A. Effect of Estradiol, Progesterone and testosterone on oogenesis of the Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis*. *Biol Morya-marine Biol*, 1991, 51: 61–68
 - 10 Chen L L. Effects of estrogen and androgen on sex differentiation and gonadal gene expression (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Chongqing: Southwest University, 2016 [陈立黎. 雌、雄激素对罗非鱼性别分化和性腺基因表达的影响. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学, 2016]
 - 11 Liu Y. Mechanisms for endocrine disrupting effects of environmental estrogens: 17 β -E2 in *Chlamys farreri* (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Dalian: Dalian Ocean University, 2014 [刘颖. 环境雌激素17 β -E2对栉孔扇贝内分泌干扰的作用机制. 硕士学位论文. 大连: 大连海洋大学, 2014]
 - 12 Fan J C, Cui X Y, Wu Y N, et al. Combined effects of 17 β -Estradiol, Nonylphenol, and Tributyltin on Estrogen-Responsive Genes of Zebrafish (*Danio rerio*) (in Chinese). *Period Ocean Univ China*, 2019, 49: 66–73 [范家诚, 崔晓莹, 武亚男, 等. 雌二醇、壬基酚和三丁基锡对斑马鱼雌激素响应基因表达的影响. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2019, 49: 66–73]
 - 13 Cai H, Sun W, Liu H B, et al. Molecular cloning and expression pattern of Amh and its preliminary functional analysis in male sexual differentiation in *Pelodiscus sinensis* (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2016, 46: 1423–1433 [蔡晗, 孙伟, 刘豪彬, 等. 中华鳖Amh基因的克隆、表达及在雄性分化中的功能初探. *中国科学: 生命科学*, 2016, 46: 1423–1433]
 - 14 Ge C T, Sun W, Sang Y P, et al. Molecular Cloning and Expression Pattern of Dmrt1 and Its Expression Change in Sex Reversal in *Pelodiscus sinensis* (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2014, 44: 1173–1182 [葛楚天, 孙伟, 桑亚鹏, 等. 中华鳖Dmrt1基因的克隆、表达及在性逆转中的变化分析. *中国科学: 生命科学*, 2014, 44: 1173–1182]
 - 15 Ma X L, Zhang Y, Chen Y Z, et al. Steroid hormones (E2 and MT) displayed difference in sex for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (in Chinese). *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46: 1487–1493 [马细兰, 张勇, 陈勇智, 等. 性类固醇激素E2、MT对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)雌、雄生长差异的影响. *海洋与湖沼*, 2015, 46: 1487–1493]
 - 16 Chen L, Xu X H, Tian D. Effects of the environmental estrogen bisphenol A on brain and behavioral development (in Chinese). *Sci China Ser C-Life Sci*, 2009, 39: 1111–1119 [陈蕾, 徐晓虹, 田栋. 环境雌激素双酚A对脑和行为发育的影响. *中国科学C辑: 生命科学*, 2009, 39: 1111–1119]
 - 17 Joaquim-Justo C, Gismondi E. Expression variations of two retinoid signaling pathway receptors in the rotifer *Brachionus calyciflorus* exposed to three endocrine disruptors. *Ecotoxicology*, 2021, 30: 343–350
 - 18 Castro L F C, Lima D, Machado A, et al. Imposed induction is mediated through the retinoid X receptor signalling pathway in the neogastropod *Nucella lapillus*. *Aquat Toxicol*, 2007, 85: 57–66
 - 19 Sternberg R M, Gooding M P, Hotchkiss A K, et al. Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: implications for

- the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs. *Ecotoxicology*, 2010, 19: 4–23
- 20 Bouton D, Escriva H, De mendonca R, et al. A conserved retinoid x receptor (RXR) from the mollusk *Biomphalaria glabrata* transactivates transcription in the presence of retinoids. *J Mol Endocrinol*, 2005, 34: 567–582
 - 21 Smith B S. Male characteristics on female mud snails caused by antifouling bottom paints. *J Appl Toxicol*, 1981, 1: 22–25
 - 22 Nishikawa J I, Mamiya S, Kanayama T, et al. Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods. *Environ Sci Technol*, 2004, 38: 6271–6276
 - 23 Horiguchi T, Nishikawa T, Ohta Y, et al. Retinoid X receptor gene expression and protein content in tissues of the rock shell *Thais Clavigera*. *Aquat Toxicol*, 2007, 84: 379–388
 - 24 Tan B C, Zhu X L, Ning X Y, et al. Effects of *Parafossarulus striatulus* on the Growth of *Vallisneria spiralis* (in Chinese). *Acta Ecol Sin*, 2015, 35: 3199–3203 [谈冰畅, 朱小龙, 宁晓雨, 等. 纹沼螺对苦草生长的影响. *生态学报*, 2015, 35: 3199–3203]
 - 25 Dhiman V, Pant D. Environmental biomonitoring by snails. *Biomarkers*, 2021, 26: 221–239
 - 26 Wang H W, Lai Z, Zhang J, et al. Influence of environmental estrogenic hormone in sediment on benthos (in Chinese). *J Hebei Univ (Nat Sci Ed)*, 2013, 33: 443–448 [王宏伟, 赖照, 张洁, 等. 水体沉积物中环境雌激素对底栖动物的影响. *河北大学学报(自然科学版)*, 2013, 33: 443–448]
 - 27 An L H, Zheng B H, Liu R Z, et al. Transcriptomic response to estrogen exposure in the male Zhikong scallop, *Chlamys farreri*. *Mar Pollut Bull*, 2014, 89: 59–66
 - 28 Ma F, Han X, An L, et al. Freshwater snail *Parafossarulus striatulus* estrogen receptor: characteristics and expression profiles under lab and field exposure. *Chemosphere*, 2019, 220: 611–619
 - 29 Liu Q, Lei K, Ma Q, et al. Ribosomal protein L7 as a suitable reference gene for quantifying gene expression in gastropod *Bellamya aeruginosa*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 43: 120–127
 - 30 Carter C J, Farrar N, Carlone R L, et al. Developmental expression of a molluscan RXR and evidence for its novel, nongenomic role in growth cone guidance. *Dev Biol*, 2010, 343: 124–137
 - 31 Wang Y, Yang Z G, Guo Z H, et al. The full length cDNA cloning and expression analysis of RXR from the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) (in Chinese). *J Fish China*, 2013, 37: 1761–1769 [王瑶, 杨志刚, 郭子好, 等. 中华绒螯蟹RXR基因全长cDNA克隆及表达分析. *水产学报*, 2013, 37: 1761–1769]
 - 32 Wang W, Wu X G, Lou B, et al. Cloning of retinoid X receptor (RXR) and its expression analysis during molting in *Portunus trituberculatus* (in Chinese). *Oceanol Limnol Sin*, 2014, 45: 1105–1114 [王伟, 吴旭干, 楼宝, 等. 三疣梭子蟹RXR基因克隆及其在蜕皮过程中的表达分析. *海洋与湖泊*, 2014, 45: 1105–1114]
 - 33 Campbell C G, Borglin S E, Green F B, et al. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: a review. *Chemosphere*, 2006, 65: 1265–1280
 - 34 Yang M, Li Y X, Feng C H, et al. Environmental Behaviors of Steroid Hormones and the Influencing Factors (in Chinese). *J Agro-Environment Sci*, 2012, 31: 849–856 [杨明, 李艳霞, 冯成洪, 等. 类固醇激素的环境行为及其影响因素. *农业环境科学学报*, 2012, 31: 849–856]
 - 35 Wang C, Yu Q G, Liu S L, et al. Effect of methyltestosterone on sex differentiation related genes in gynogenetic culter alburnus juveniles (in Chinese). *Acta Agric Boreali-occidentalis Sin*, 2018, 27: 763–771 [王成, 余秋果, 刘士力, 等. 甲基睾酮对雌核发育翘嘴鲇幼鱼性别分化基因表达的影响. *西北农业学报*, 2018, 27: 763–771]
 - 36 Ciocan C M, Cubero-Leon E, Puinean A M, et al. Effects of estrogen exposure in mussels, *Mytilus edulis*, at different stages of gametogenesis. *Environ Pollut*, 2010, 158: 2977–2984
 - 37 Li G C. Toxicity of 17-beta-estradiol for zebrafish (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2015 [李国超. 17 β -雌二醇对斑马鱼毒性研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2015]

Expression profiles of the gene retinoid X receptor in *Parafossarulus striatulus* (freshwater snail) exposed to environmental hormones

LIU RenJie^{1,2,3,4}, CUI TieFeng^{1,2,3}, SHI WenZhuo³, HE JianWu³, AN LiHui³, WANG HongWei^{1,2} & WANG FeiFei³

¹ School of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China;

² Institute of Life Sciences and Green Development, Hebei University, Baoding 071002, China;

³ State Key Laboratory of Environmental Benchmarking and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China;

⁴ State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Retinoid X receptor (RXR) is an important gene with various roles in the regulation of sex development and endocrine behavior in mollusks. To reveal the regulatory effect of environmental hormones on RXR gene expression in mollusks, the RXR gene was cloned from *Parafossarulus striatulus* using reverse transcriptase polymerase chain reaction and rapid-amplification of cDNA ends, and then primers were designed based on the previous construction of the RXR transcriptome of *P. striatulus*. Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction was performed to quantify the expression level of the RXR gene in *P. striatulus* exposed to environmental hormones. The expression of the RXR gene was first inhibited and then increased after E2 treatment, but was first induced and then inhibited after MT treatment. The results indicate that environmental hormones may have toxicological effects on *P. striatulus*. At the molecular level, the results provide an analytical method to determine the effects of environmental hormones on RXR and the associated regulation of endocrine behavior of mollusks, and to establish a basis for molecular informatics analysis.

***Parafossarulus striatulus*, RXR (Retinoid X receptor), E2 (17 β -estradiol), MT (17 α -methyltestosterone)**

doi: [10.1360/SSV-2021-0316](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0316)