

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200626001

袁凤娟, 魏梦薇, 张慧子, 等. 背角无齿蚌硒谷胱甘肽过氧化物酶基因的克隆及2,4-二氯苯酚、2,4,6-三氯苯酚和五氯苯酚对其表达的影响[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(4): 181-190

Yuan F J, Wei M W, Zhang H Z, et al. Cloning of *AwSeGPx* from *Anodonta woodiana* and effects of 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol on its transcription [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(4): 181-190 (in Chinese)

背角无齿蚌硒谷胱甘肽过氧化物酶基因的克隆及2,4-二氯苯酚、2,4,6-三氯苯酚和五氯苯酚对其表达的影响

袁凤娟, 魏梦薇, 张慧子, 王雯, 邵向阳, 李媛, 董艳美, 王梦琪, 齐金旭, 夏西超*

平顶山学院医学院, 平顶山 476000

收稿日期: 2020-06-26 录用日期: 2020-09-22

摘要: 硒谷胱甘肽过氧化物酶(SeGPx)是一类广泛存在于生物体内的重要抗氧化酶, SeGPx 可将有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物, 从而保护细胞膜结构及功能不受过氧化物干扰和损害。为了探讨2,4-二氯苯酚(2,4-DCP)、2,4,6-三氯苯酚(2,4,6-TCP)和五氯苯酚(PCP)对背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)的胁迫效应, 本研究克隆出 *AwSeGPx* 全基因序列, 分析2,4-DCP、2,4,6-TCP 和 PCP 对 *AwSeGPx* 表达的影响。*AwSeGPx* 的 cDNA 序列全长 870 bp, 开放阅读框为 585 bp, 编码 195 个氨基酸。推导的 *AwSeGPx* 蛋白序列包括 GPx 家族标签序列(68LGFPNCN75)和活性位点序列(156WNFEKF161)、一个典型终止密码子(165TGA167)编码的硒代半胱氨酸(U⁴⁴)、酶催化活性相关保守氨基酸位点: 谷氨酰胺(Q⁷⁴)、精氨酸(R⁹⁴ 和 R¹⁵¹)和色氨酸(W¹⁵⁶)。在相同浓度条件下, PCP 对背角无齿蚌毒性效应大于 2,4-DCP 和 2,4,6-TCP。与对照组相比, 浓度 60、120、240、480 和 960 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 2,4-DCP 处理后肝胰腺 *AwSeGPx* mRNA 水平增加了 1.79 倍以上($P<0.05$); 浓度 100、200、400 和 800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 2,4,6-TCP 处理后 *AwSeGPx* mRNA 水平增加了 1.01 倍以上($P<0.05$); 浓度 20、40、80、160 和 320 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PCP 处理能够显著诱导 *AwSeGPx* 的表达。以上结果表明, 2,4-DCP、2,4,6-TCP 和 PCP 处理对背角无齿蚌肝胰腺中 *AwSeGPx* 表达具有明显的诱导作用, 这种诱导效应与动物提高过氧化物的还原能力和增强环境的耐受能力密切相关。

关键词: 2,4-二氯苯酚; 2,4,6-三氯苯酚; 五氯苯酚; 背角无齿蚌; *AwSeGPx*

文章编号: 1673-5897(2021)4-181-10 中图分类号: Q459 文献标识码: A

Cloning of *AwSeGPx* from *Anodonta woodiana* and Effects of 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol and Pentachlorophenol on Its Transcription

Yuan Fengjuan, Wei Mengwei, Zhang Huizi, Wang Wen, Shao Xiangyang, Li Yuan, Dong Yanmei, Wang Mengqi, Qi Jinxu, Xia Xichao*

College of Medicine, Pingdingshan University, Pingdingshan 467000, China

Received 26 June 2020 accepted 22 September 2020

Abstract: Selenium dependent glutathione peroxidase (SeGPx) belongs to the family of selenoprotein, which acts mainly as an antioxidant role in the cellular defense system. In order to explore the effect of 2,4-dichlorophenol (2,

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(20A330002); 河南省教育厅人文社会科学研究项目(2020-ZZJH-339); 平顶山学院博士启动基金资助项目(PXY-BSQD-2018009, PXY-PYJJ-2018005)

第一作者: 袁凤娟(1986—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为细胞增殖分化调控, E-mail: 626189846@qq.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: xiachao8336@163.com

4-DCP), 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP) and pentachlorophenol (PCP) on the freshwater bivalve *Anodonta woodiana*, a SeGPx full length cDNA was cloned from *A. woodiana* and named as *AwSeGPx*, and its expressions were analyzed by real-time PCR. The full length cDNA consists of 870 bp, an open reading frame (ORF) of 585 bp encoded a polypeptide of 195 amino in which conserved domain (68LGFPCNQF75) and a GPx active site (156WNFEKF160) were observed. It had a characteristic codon at 165TGA167 that corresponds to selenocysteine (Sec) amino acid as U⁴⁴. The catalytically related amino acid residues consisting of Gln (Q⁷⁴), Arg (R⁹⁴), Arg (R¹⁵¹) and Trp (W¹⁵⁶) were identified in the deduced *AwSeGPx* protein sequence. Under similar condition, clams *A. woodiana* showed more sensitive to PCP than 2,4-DCP and 2,4,6-TCP. In the 2,4-DCP treated groups (60, 120, 240, 480 and 960 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), *AwSeGPx* mRNA level of hepatopancreas increased more than 1.79 times ($P<0.05$) compared with that of control group. In the 2,4,6-TCP treated groups (100, 200, 400 and 800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), *AwSeGPx* mRNA level of hepatopancreas increased more than 1.01 times ($P<0.05$). In the PCP treated groups (20, 40, 80, 160 and 320 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), expressions of *AwSeGPx* were significantly induced compared with that of control group in the hepatopancreas. These results indicate that *AwSeGPx* plays an active role in inhibiting oxidative stress derived from 2,4-DCP, 2,4,6-TCP and PCP treatment in the hepatopancreas.

Keywords: 2,4-dichlorophenol; 2,4,6-trichlorophenol; pentachlorophenol; *Anodonta woodiana*; *AwSeGPx*

氯酚类化合物(pentachlorophenol, PC)广泛应用于农药、木材防腐剂和个人护肤品等工农业生产中。与此同时,氯酚类化合物是焚烧炉排放气体中二噁英和多环芳烃的最直接前体^[1]。目前,氯酚类化合物在地表水、地下水、污水和饮用水中都被不同程度检测到,其可通过食物链放大效应在生物体内呈现持久性的蓄积效应,对个体生长、发育和繁殖带来潜在的干扰作用,氯酚类化合物毒性机制研究已备受关注^[2]。在氯酚类化合物中,2,4-二氯苯酚(2,4-DCP)、2,4,6-三氯苯酚(2,4,6-TCP)和五氯苯酚(PCP)大量存在于水体中,对水生生物和人类具有潜在的健康风险,并被国际上列入持久性优先控制污染物^[3]。目前,2,4-DCP、2,4,6-TCP和PCP普遍存在于我国的河流之中,其中PCP最为广泛^[4]。研究证实,这些氯酚可以诱发水生生物的氧化应激、生殖毒性和内分泌紊乱^[5]。氯酚诱发线粒体中氧化磷酸化解偶联和活性氧自由基(ROS)生成是其主要毒性作用机制之一^[5-6]。在健康生物个体中ROS保持相对较低的水平,并且ROS生成后会被抗氧化酶迅速清除。

谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)是一类广泛存在于生物体内的重要抗氧化酶,可将有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物,保护细胞膜结构及功能不受过氧化物干扰及损害,进而参与生物体内氧化还原稳态的调控过程。GPx主要包括含硒GPx(SeGPx)和不含硒GPx这2种类型。SeGPx可以还原有机和无机氧化物,能够将过氧化

氢(H_2O_2)还原为 H_2O ;不含硒GPx只能还原有机氧化物^[7]。双壳类是软体动物一个重要类群,常年栖息在海洋、河流和湖泊底部,以滤食生活为主,是检测环境污染的重要指示性生物^[8-9]。这些动物发育至成体后不做长距离迁移并在一个区域生活多年,完成生长、成熟和繁殖^[8-9]。与其他水生生物相比,双壳类动物在水体中污染物检测中更具有代表性^[8-9]。背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)广泛分布于世界各地的淡水环境,在持久性有机污染物、杀虫剂和重金属等水环境污染检测中常用作指示性生物;同时在水体净化、颗粒物过滤、营养释放和沉积物混合等方面也发挥着积极作用^[10]。随着水体污染的加剧,背角无齿蚌数量显著减少,已在北美地区被列入濒危生物。为了深入认识2,4-DCP、2,4,6-TCP和PCP对水生生物的毒性机制,本研究从背角无齿蚌分离出完整的SeGPx基因序列并命名为*AwSeGPx*,分析2,4-DCP、2,4,6-TCP和PCP对肝胰腺中*AwSeGPx*表达的影响,为揭示2,4-DCP、2,4,6-TCP和PCP毒理学效应提供理论参考。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 材料

背角无齿蚌购自南阳市水产市场,2,4-DCP、2,4,6-TCP、PCP和二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自Sigma-Aldrich公司,2,4-DCP、2,4,6-TCP和PCP溶解于DMSO中以制备储备液。TRIzol试剂、M-MLV反转录酶、菌株DH5 α 、克隆载体pMD19-T、连接酶、PCR产物回收纯化试剂盒、RACE试剂盒均购

自宝生物生物科技有限公司,其余常规药品均为进口或国产分析纯。

背角无齿蚌壳长 6.5 cm±0.5 cm,置于实验室自动水循环系统中适应养殖 2 周,期间停止进食。随后,动物处理实验在长方体的塑料盒(长×宽×高:40 cm×25 cm×10 cm)中进行,每个盒子里面 8 只河蚌,饲养采用人工模拟池塘水(每 1 L 去离子水中含 48 mg NaHCO₃、33 mg CaCl₂·2H₂O、60 mg MgSO₄·7H₂O 和 0.5 mg KCl),喂食小球藻(*Chlorella vulgaris*)^[10]。为了确定 *AwSeGPx* 基因的组织分布,对来自同一塑料盒内 5 只动物进行解剖,取斧足、鳃、肝胰脏、闭壳肌、心脏和外套膜等组织,每个蚌每一个组织提取 3 次 RNA,进行 3 次 qPCR,取平均值,5 个平均值加和后再次平均为 *AwSeGPx* 在该组织中的表达水平。

动物处理实验过程中,640 只河蚌动物分为对照组、2,4-DCP 处理组(60、120、240、480 和 960 μg·L⁻¹)、2,4,6-TCP 处理组(50、100、200、400 和 800 μg·L⁻¹)和 PCP 处理组(20、40、80、160 和 320 μg·L⁻¹),对照组用同体积去离子水处理。为确保动物有足够数量取材,每一组设置 5 个平行盒子,每个盒子 8 只河蚌,分别在 0、6、12、24 和 48 h 时于每组中取出 5 只河蚌,解剖,液氮速冻,于-80 °C 保存。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 模板制备

按照试剂盒说明书的要求,使用 TRIzol 法

(Takara,大连)提取总 RNA。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。用 M-MLV 第一链 cDNA 合成试剂盒(Takara,大连)合成第一链 cDNA,作为 PCR 扩增反应的模板。

1.3 *AwSeGPx* 全基因序列的克隆

根据双壳纲、腹足纲、昆虫纲、甲壳纲和脊椎动物在内其他物种的 *SeGPx* 保守区域设计简并引物 *SeGPx1* 和 *SeGPx2*,用于扩增 *AwSeGPx* cDNA 片段,将 PCR 产物克隆到 pMDT-19(Takara,大连),采用双向测序,鉴定为 *SeGPx* 部分序列。以部分 cDNA 序列设计特异引物(表 1),根据 RACE 试剂盒说明书,采用巢式 PCR 方法扩增 *AwSeGPx* cDNA 的 5' 和 3' 区域。扩增产物克隆载体、双向测序、序列比对和拼接。

1.4 序列与系统发育的分析

在 GenBank 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)中采用 BLAST 方法对 *AwSeGPx* 序列进行了比对和分析;采用 DANMEN 软件对 *AwSeGPx* 基因进行多序列比对;采用信号肽预测数据库(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)对 *AwSeGPx* 信号肽序列进行预测;采用 SMART 数据库(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对 *AwSeGPx* 蛋白质二级结构域进行预测;采用 SWISS 模型(<http://swissmodel.expasy.org/>)对 *AwSeGPx* 的三维结构进行预测;用 MEGA 5.0 邻位连接方法,构建 *AwSeGPx* 系统进化树。

表 1 实验过程中的引物

Table 1 Description of the primes used in this study

引物 Primer	序列(5' ~ 3') Sequence (5' ~ 3')
<i>SeGPx1</i>	TTGTAGCCNGTCTNCCCAGG
<i>SeGPx2</i>	GTGTCGNCTGAGANGTAATAGAA
5' Race Innerprimer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
5' Race Outerprimer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG
<i>SeGPx5-1</i>	TCCTTCTCATCGTGGTGCA
<i>SeGPx5-2</i>	ACCACGCCAAACTTGCCCT
3' Race Outerprimer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT
3' Race Innerprimer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG
<i>SeGPx3-1</i>	CCTGAAATTCTCCAGCATATG
<i>SeGPx3-2</i>	ATCCTGCGACCCAGACACTG
<i>SeGPx-F</i>	CGTTGAAGTATGTGCGACCTGG
<i>SeGPx-R</i>	GCCATCAGGAGCAATCAGGAAC
β-F	CATCCCTTGCTCCTCCAACATAG
β-R	CTGGAAGGTAGAGAGAGAAGCCAAG

1.5 real-time PCR 定量检测 *AwSeGPx* 的表达

为了确定 *AwSeGPx* 转录水平,采用 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒并按照说明书的要求进行定量分析。根据已有贝类内参基因研究结果,选取 *β-actin* 作为内参基因^[10-11],根据内参基因和 *AwSeGPx* 特异引物分别分离对应序列(表1),琼脂糖凝胶电泳仅检测出一个扩增条带,PCR 产物回收、测序、鉴别;结合熔解曲线和扩增曲线结果确定内参基因和目的基因表达的特异性高效性。使用 ABI7500 实时检测系统(Applied Biosystems,美国)采用两步法,进行 real-time PCR,构建标准曲线,通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 分析 *AwSeGPx* 表达水平。

1.6 统计学处理

2,4-DCP、2,4,6-TCP 和 PCP 处理后 *AwSeGPx* 表达水平的差异采用单向方差分析(analysis of variance, ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果(Results)

2.1 背角无齿蚌 *AwSeGPx* 分子结构

背角无齿蚌 *AwSeGPx* cDNA 全长由 870 个核苷酸组成(GenBank NO, KU821031),包含一个 36 bp 的 5' 非翻译区(UTR)、69 bp 的 3' UTR。开放阅读框由 585 bp 核苷酸组成,编码 195 个氨基酸的多肽链,分子量为 22.04 kDa,理论等电点为 8.70(图1)。

GAAAAATAGTTACAGCGGACCTAGCGACAGCAACTC	36
ATGGCAGTACGAAGTCCCGTGAAACTACAAAATTTCTCGAATTTACTGCCAAAACCTTA	96
M A V R S P V K L Q N F F E F T A K T L	20
AACGGCCAAGAAGCCAACCTTAGTAAATTCAAAGGGAAAGTAATTTAGTAGAGAATGTA	156
N G Q E A N L S K F K G K V I L V E N V	40
GCCTCTCTCTGAGGAACAACGGTCCGGGATTCACCCAGATGAACGAGCTTGCCTCCAAA	216
A S L U G T T V R D F T Q M N E L A S K	60
TCTGAAGGTAAGCTTGTATCTGGGATTCCTGGTGAACAGTTTGGTCATCAGGAAAAT	276
S E G K L V I L G F P C N Q F G H Q E N	80
GGCAATCACAAGAAATTTGAATTCGTTGAAGTATGTGCGACCTGTAATGGTTTGGAA	336
G N H E E I L N S L K Y V R P G N G F E	100
CCCGCTTTTCCAATTATGGAGAAATGTGACGTCAATGGTAGCAACGCTCACCCACTATTC	396
P A F P I M E K C D V N G S N A H P L F	120
CAGTTTCTCAGGGAAAACTTCCGTTGCCAAGTGACGATCCAGTATCACTGATGACTCAC	456
Q F L R E K L P L P S D D P V S L M T H	140
ACCAAGAATATCATTTGGGAACCAAGTACAAGAAATGATATTTCTGGAACCTTGGAAAAG	516
T K N I I W E P V T R N D I S W N F E K	160
TTCTGATGCTCCTGATGGCATGCCGTATAAACGTTACAGCAGACAATTTCAAACAATT	576
F L I A P D G M P Y K R Y S R Q F Q T I	180
AATATTCAGAATGATATTAAGGACTTATTCAAAAGTTGGTATGTA ACTATCGCATA	636
N I Q N D I K G L I Q K F G M *	195
GTAATTCACGTCTGATTTAAATTTAAATAGCTTGCTGTAATAATACATCTAATCGACTG	696
CAGATGATCAGGACAATGTACCCTCTGAGTCTATGATTGTAAACCCCTAAACCAGCA	756
<i>GTCTGCCTGGGTTGCTTGACGCTTCTCAAGGATGGAATATTGTCGCCAGATGTCTCAG</i>	816
GATAATGCAATATGGTACGTA AATAA GACAAAAGTATACCGTAAAAA	870

图1 背角无齿蚌 *AwSeGPx* 基因的 cDNA 序列和推导的氨基酸序列

注:起始和终止密码用粗体标示,终止信号“AATAAA”用波浪线标示,硒代半胱氨酸(U⁴⁴)氨基酸残基用方框标示,GPx 标签序列(68LGFPCNQF75)和活性位点(156WNFEKF161)结合区域用灰色阴影标示,预测的硒插入片段(SECIS)用斜体标示,谷胱甘肽结合位点的精氨酸(R⁹⁴, R¹⁵¹)用加粗下划线标示,催化的谷氨酰胺(Q⁷⁴)和色氨酸(W¹⁵⁶)用加粗并方框标示。

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *AwSeGPx* of *Anodonta woodiana*

Note: The start and stop codons are indicated with bold; putative polyadenylation signal “AATAAA” is showed with wavy line; the selenocysteine (U⁴⁴) are marked with box; the GPx signature motif (68LGFPCNQF75) and active site motif (156WNFEKF161) are highlighted with shadow; the predicted SECIS element in the 3' UTR is marked with italic; the arginine residues (R⁹⁴, R¹⁵¹) involved in binding glutathione are marked with underline and bold; catalytically important residues of Gln (Q⁷⁴) and Trp (W¹⁵⁶) are bold in a box.

终止信号(AATAAA)在 3' UTR 的 838 ~ 843 位点处。AwSeGPx 氨基酸序列的第 44 位氨基酸为特殊的硒代半胱氨酸 U(165TGA167),这是 SeGPx 家族的主要特征。SignalP 3.0 程序运行结果显示,AwSeGPx 的预测氨基酸序列中没有信号肽(图 1)。

AwSeGPx 的 N 端区域由一个包含 8 个氨基酸(68LGFPcNQF75)的保守结构域和 1 个谷胱甘肽过氧化物酶家族的活性位点(156WNFEKF161)(图 2)。固定硒元素的谷氨酸氨基酸残基和 1 个色氨酸氨基酸残基,以及负责将底物谷胱甘肽转运至 GPx 催化中心的 2 个精氨酸残基(R⁹⁴, R¹⁵¹)(图 2)。

AwSeGPx 与其他物种 SeGPx 序列具有高度的相似性,AwSeGPx 蛋白质二级结构包含 7 个 α -螺旋

和 7 个 β -折叠(图 3(a))。AwSeGPx 三维结构排列和其物种 SeGPx 序列三维结构排列有很高的相似性,尤其是人的 SeGPx 序列(图 3(b))。

2.2 AwSeGPx 插入片段(SECIS)预测

用 SECISearch 2.19 软件预测背角无齿蚌 AwSeGPx 基因的 3' -UTR 有 101 bp 的硒代半胱氨酸插入片段(SECIS),形成一个茎环状的二级结构(图 4(a))。与盘鲍(*Haliotis discus discus*)SeGPx 硒代半胱氨酸插入片段相比,相似度很高,都属于二型硒插入片段,背角无齿蚌硒代半胱氨酸插入片段含有一个顶环,2 个内环,2 个折叠,保守的腺嘌呤(AA)在内环上。5' 茎序列为 UAUGAU,内环序列 3' 茎序列为 UGA(图 4(b))。

<i>Anodonta woodnata</i>	----MAVRSPVKLQNF FEFTAKTLNGQEANLSKF-----KG	32
<i>Danio rerio</i>	-----MAGTMKKFYDLSAKLLSGDLLNFSS-----KG	28
<i>Octopus vulgaris</i>	-----MTTIAKSFFELSAKTLKGEHIDFSRF-----MG	28
<i>Rattus norvegicus</i>	MSAARLS-AVAQSTVYAFSARPLAGGEPVSLGSL-----RG	36
<i>Homo sapiens</i>	MCAARLAAAAAQS VYAFSARPLAGGEPVSLGSL-----RG	36
<i>Haliotis discus discus</i>	MAAATSWTAGLATLVTALCAARAAQKVTCQVPAKTNTFYDFKINDVFDEKLIDFSDFRN	60
<i>Anodonta woodnata</i>	KVILVENVASLUGTTVRDFTQMNELASKSEGK-LVILGFPCNQFGHQEN-GNHEEILNLSL	90
<i>Danio rerio</i>	KVLLIENVASLUGTTVRDFTQMNELHSRYADQGLVVLGAPCQFGHQEN-CKNEEILQSL	87
<i>Octopus vulgaris</i>	KVILVENVASLUGTTTRDYMNMNKLVSQFADK-LVVLGFPCNQFGHQEN-GNGEEILLSL	86
<i>Rattus norvegicus</i>	KVLLIENVASLUGTTTRDYTEMNDLQKRLGPRGLVVLGFPCNQFGHQEN-GKNEEILNLSL	95
<i>Homo sapiens</i>	KVLLIENVASLUGTTVRDFTQMNELQRRLGPRGLVVLGFPCNQFGHQEN-AKNEEILNLSL	95
<i>Haliotis discus discus</i>	KVLLIVNVATYUGHTHQYNGLNALMTDYAGQGDFLVGLPCNQFLKQEPGANGTEIMNGV	120
<i>Anodonta woodnata</i>	KYVRPGNGFEPAPFIMEKCDVNGSNAHPLFQFLREKLPSPDDPVSLMTHTKNI IWEPVT	150
<i>Danio rerio</i>	KYVRPGNGFEPKPFQILEKLEVENGENAHPLFAFLKEKLPQSPDDPVSLMGDPKFI IWSPVC	147
<i>Octopus vulgaris</i>	QSVRPGNGFKNFTIMEKVEVNGENTHAVFQFLKNHLPYPSDDSTFSMKNPSSINWTPVA	146
<i>Rattus norvegicus</i>	KYVRPGGGFEPNFTLFKCEVNGEKAHPLFTFLRNALPAPSDDPALMTDPKYI IWSPVC	155
<i>Homo sapiens</i>	KYVRPGGGFEPNFMLFEKCEVNGAGAHPLFAFLREALPAPSDATALMTDPKLI IWSPVC	155
<i>Haliotis discus discus</i>	KYVRPGLT--PLFNLTQKIDVNGEHQHPLYRFLKSYCKRVESVFRPSN----LLFYEPKE	174
<i>Anodonta woodnata</i>	RNDISWNFEKFLIAPDGMPYKRYSRQFTINIQNDIKGLIQKFGM---	195
<i>Danio rerio</i>	RNDISWNFEKFLIGPDGEPFKRYSRRFLTIDIDADIKELLKRTK----	191
<i>Octopus vulgaris</i>	RNDISWNFEKFLIAPDGKPFLLRYSKSFQTIETIQDKIKSLIEKFS----	190
<i>Rattus norvegicus</i>	RNDISWNFEKFLVGPDPVPRRYSRRFRTIDIEPDIEALLSKQPSNP-	202
<i>Homo sapiens</i>	RNDVAWNFEKFLVGPDPVPLRRYSRRFQTIIDIEPDIEALLSGLSCA-	202
<i>Haliotis discus discus</i>	IGDVYWNFEKFLVGDGHVVKFRYSLEVQPIDVRPDIEALLGRHVPVVG	222

图 2 背角无齿蚌 AwSeGPx 与其他物种 SeGPx 序列多重比对

注:GPx 标签序列(68LGFPcNQF75)和活性位点(156WNFEKF161)结合区域用灰色阴影标示,硒代半胱氨酸(U⁴⁴)氨基酸残基用粗体并下划线标示,负责催化的谷氨酰胺(Q⁷⁴)和色氨酸(W¹⁵⁶)用粗体标示,谷胱甘肽结合位点的精氨酸(R⁹⁴, R¹⁵¹)用下划线标示。

Fig. 2 Multiple alignment of AwSeGPx of *Anodonta woodnata* with other SeGPx

Note: The GPx signature motif (68LGFPcNQF75) and active site motif (156WNFEKF161) are marked with shadow; the selenocysteine (U⁴⁴) are bold with underline; catalytically important residues Gln (Q⁷⁴) and Trp (W¹⁵⁶) are indicated with bold; the arginine residues (R⁹⁴, R¹⁵¹) involved in binding glutathione are marked with underline.

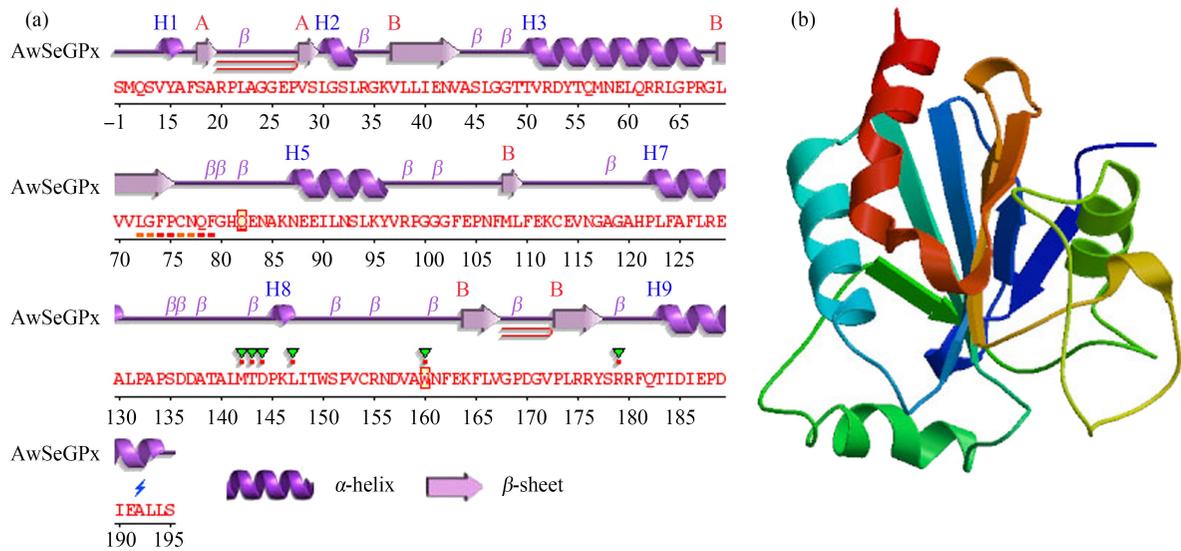


图3 背角无齿蚌 AwSeGPx 二级和三维结构预测

注:(a) AwSeGPx 二级结构;(b) AwSeGPx 的三维结构。

Fig. 3 Predicted secondary and 3D structures of AwSeGPx deduced amino acids of *Anodonta woodiana*

Note: (a) Secondary structure of AwSeGPx; (b) 3D structure of AwSeGPx.

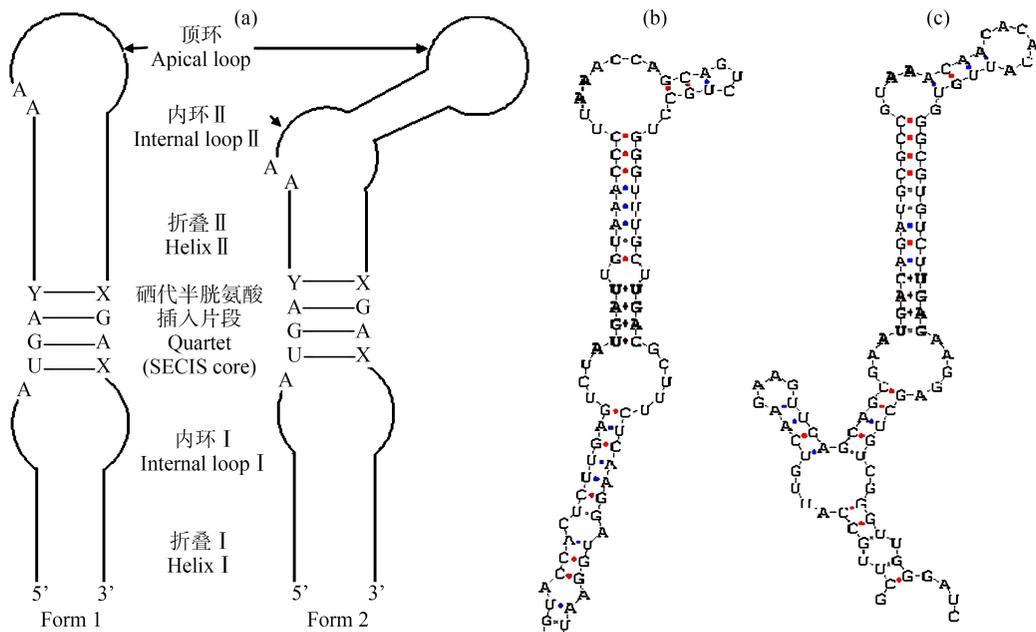


图4 背角无齿蚌与盘鲍硒插入片段比较

注:(a) 1型和2型硒插入片段的颈环结构;(b) 背角无齿蚌硒插入片段结构;(c) 盘鲍(*Haliotis discus discus*)硒插入片段结构。

Fig. 4 Predicted secondary structure in SECIS of AwSeGPx of *Anodonta woodiana* and *Haliotis discus discus*

Note: (a) Schematic representations of stem-loop structures of form 1 and 2 of SECIS; (b) SECIS of *Anodonta woodiana*;

(c) SECIS of *Haliotis discus discus*.

2.3 系统发育分析

BLAST 分析表明, AwSeGPx 的氨基酸序列与其他物种 SeGPx 具有较高的同源性, 与三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 的同源性为 85.64%, 与斑马鱼

(*Danio rerio*) 的同源性为 64.80%, 与盘鲍的同源性为 30.26%。AwSeGPx 与软体动物亲缘关系最近, 其次是脊椎动物, 最后是昆虫和甲壳动物(图 5)。在已证实的软体动物序列中, AwSeGPx 进化关系最近

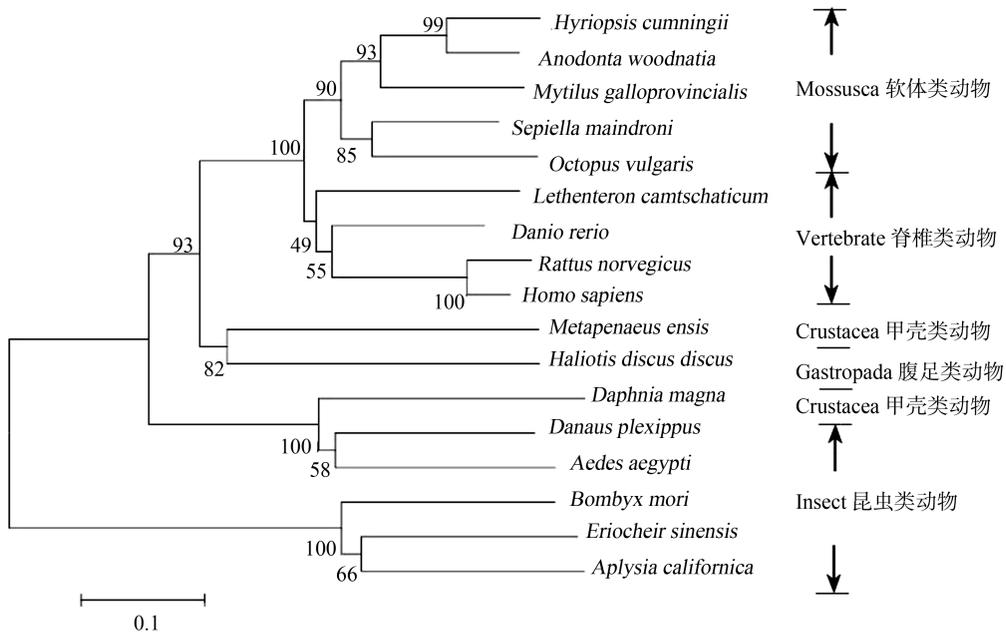


图 5 根据背角无齿蚌 *AwSeGPx* 氨基酸序列使用邻接法构建的系统进化树
Fig. 5 Phylogenetic relation of *AwSeGPx* of *Anodonta woodiana* with other organisms

的是淡水蚌类,其次是海洋蚌类和螺类(图 5)。

2.4 *AwSeGPx* 的组织分布

实时定量 PCR 结果显示,背角无齿蚌 *AwSeGPx* 在斧足、鳃、肝胰脏、闭壳肌、外套膜和心脏壳中广泛表达(图 6)。*AwSeGPx* 在肝胰脏和心脏中存在高表达,外套膜、斧足和鳃中存在中等表达,闭壳肌中存在较低表达(图 6)。

2.5 急性毒性实验

背角无齿蚌 48 h 急性毒性试验结果表明,2,4-DCP、2,4,6-TCP 和 PCP 对背角无齿蚌 LC_{50} 为 0.246、0.194 和 0.139 $mg \cdot L^{-1}$ 。

2.6 2,4-DCP、2,4,6-TCP 和 PCP 对肝胰腺 *AwSeGPx* 表达的影响

2,4-DCP、2,4,6-TCP 和 PCP 处理能够显著诱导肝胰腺中 *AwSeGPx* 的表达(图 7)。与对照组相比,用浓度 60、120、240、480 和 960 $\mu g \cdot L^{-1}$ 的 2,4-DCP 处理后 *AwSeGPx* mRNA 水平 48 h 时比 6 h 时增加了 1.79 倍以上($P < 0.05$)(图 7)。

与对照组相比,用浓度 50 $\mu g \cdot L^{-1}$ 的 2,4,6-TCP 处理后 *AwSeGPx* 水平在 12、24 和 48 h 时显著升高,用浓度 100、200、400 和 800 $\mu g \cdot L^{-1}$ 的 2,4,6-TCP 处理后 *AwSeGPx* 水平在整个实验观察过程中增加了 1.01 倍以上($P < 0.05$)(图 8)。

与对照组相比,用浓度 20、40 和 80 $\mu g \cdot L^{-1}$ 的

PCP 处理后 *AwSeGPx* 水平在 6、12、24 和 48 h 显著升高,*AwSeGPx* mRNA 水平至少增加了 62.65% ($P < 0.05$)(图 9)。用浓度 160 $\mu g \cdot L^{-1}$ 和 320 $\mu g \cdot L^{-1}$ 的 PCP 处理后,*AwSeGPx* mRNA 水平在 6、12 和 24 h 显著升高,*AwSeGPx* 水平在 48 h 下调并降至正常水平(图 9)。

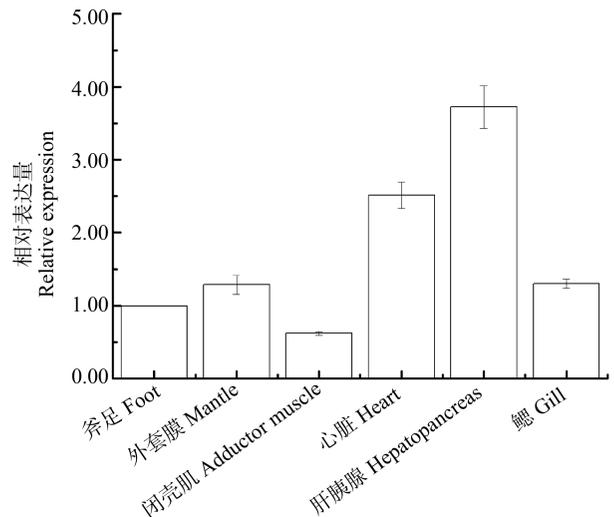


图 6 背角无齿蚌 *AwSeGPx* 基因的空间表达

注:每组数据来源于 5 只动物。

Fig. 6 Real-time PCR analysis of *AwSeGPx* transcript from different tissues of *Anodonta woodiana*

Note: $n=5$ replicates for each group.

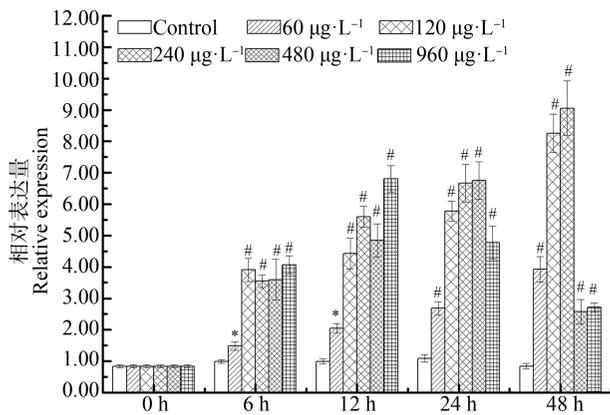


图7 2,4-DCP对背角无齿蚌肝胰腺 AwSeGPx 基因表达的影响

注: $n=5$ /组/时间点; *, #表示与相应对照组相比有显著差异 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

Fig. 7 Temporal expression of AwSeGPx in the hepatopancreas of *Anodonta woodiana* after 2,4-DCP challenge

Note: $n=5$ /each group/each time point; *, # mean significant differences compared with control group at the same time at $P<0.05$, $P<0.01$ level.

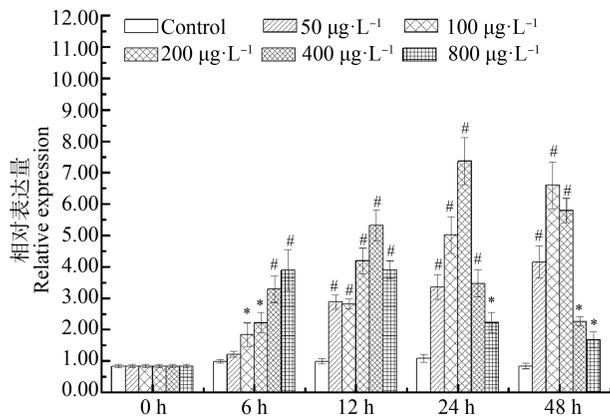


图8 2,4,6-TCP对背角无齿蚌肝胰腺 AwSeGPx 基因表达的影响

注: $n=5$ /组/时间点; *, #表示与相应对照组相比有显著差异 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

Fig. 8 Temporal expression of AwSeGPx in the hepatopancreas of *Anodonta woodiana* after 2,4,6-TCP challenge

Note: $n=5$ /each group/each time point; *, # mean significant differences compared with control group at the same time at $P<0.05$, $P<0.01$ level.

3 讨论 (Discussion)

AwSeGPx cDNA 编码序列中包含一个无义密码子 TGA, 提示 AwSeGPx 是 SeGPx 家族的一员。无义密码子 TGA 编码硒代半胱氨酸这一现象首次在小鼠 GPx 基因中发现, 随后在人类和大鼠中也得

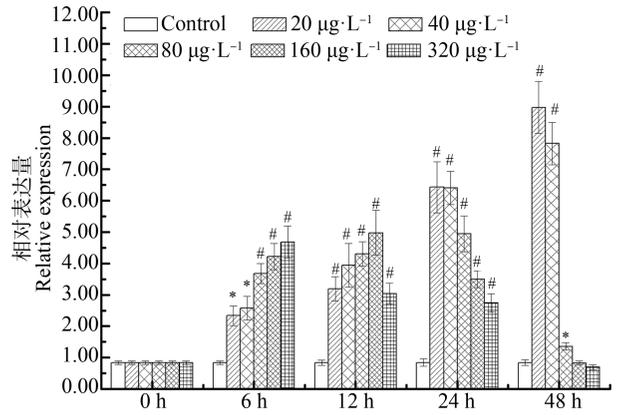


图9 PCP对背角无齿蚌肝胰腺 AwSeGPx 基因表达的影响

注: $n=5$ /组/时间点; *, #表示与相应对照组相比有显著差异 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

Fig. 9 Temporal expression of AwSeGPx in the hepatopancreas of *Anodonta woodiana* after PCP challenge

Note: $n=5$ /each group/each time point; *, # mean significant differences compared with control group at the same time at $P<0.05$, $P<0.01$ level.

到进一步证实^[12-13]。目前, 已在双斑马纹贻贝 (*Dreissena polymorpha*)、扇贝类虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*)、菲律宾蛤仔 (*Venerupis philippinarum*) 和盘鲍等软体动物 SeGPx 中发现该密码子的存在^[14-16]。由此可见, 硒代半胱氨酸是无脊椎动物到脊椎动物中 SeGPx 标签位点, 同时也是该酶催化的重要活性位点。AwSeGPx 氨基酸序列中发现 2 个保守的 SeGPx 基因家族的标签序列, 分别是 68LGFPNCQF75 和 156WNFEKF161, 在这 2 个结构域中, Gln(Q) 和 Trp(W) 常被视为 GPx 催化的重要活性位点, 并参与硒元素的固定^[17]。此外, 多重对比结果显示, AwSeGPx 序列中 Arg94 和 Arg151 与其他 SeGPx 序列存在高度的同源性, 这 2 个精氨酸残基能够通过静电吸附效应将供体底物引导至催化中心^[17]。SECIS 元件是 SeGPx mRNA 序列的一个重要的特征性标签, 在翻译过程中将能够将 Se 引导至 UGA 密码子位置^[18]。AwSeGPx SECIS 元件有 101 个碱基组成, 包括 1 个顶环、2 个内环、2 个折叠、3 个位于内环上腺嘌呤(AA)。已有研究显示, SECIS 元件主要有 1 型和 2 型这 2 种主要形式, 在 1 型中, 腺嘌呤区域位于顶环, 而在 2 型中, 则位于内环^[19]。由此可见, AwSeGPx 的 SECIS 元件属于 2 型类别。

AwSeGPx 广泛分布于鳃、外套膜、闭壳肌、斧足、心脏和肝胰腺中, 提示 AwSeGPx 是一种帮助组织保持氧化还原作用平衡的重要酶; 不同组织中的

AwSeGPx mRNA 水平差异与对抗不同环境中生成的 ROS 有关。在选取的组织中, *AwSeGPx* 在肝胰脏中表达水平最高, 与肝胰腺作为主要代谢器官和氧化应激防御功能器官密切相关^[20]。

本研究结果显示, PCP 对背角无齿蚌的 LC_{50} 低于 2,4-DCP 和 2,4,6-TCP 的, 提示在相同的浓度条件下背角无齿蚌对 PCP 敏感性高于 2,4-DCP 和 2,4,6-TCP。甲壳动物水蚤的急性毒性实验结果显示, 2,4-DCP、2,4,6-TCP 和 PCP 的 LC_{50} 分别为 286.2、341.5 和 11.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 慢性毒性实验结果显示, 2,4-DCP、2,4,6-TCP 和 PCP 的 LC_{50} 分别为 16.3、54.6 和 3.9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在相同浓度条件下, PCP 对水生生物毒性比 2,4-DCP 和 2,4,6-TCP 更强。研究证实, PCP 可以在细胞和组织中通过氧化脱氯进一步转化为其他物质, 其中, PCP 可被细胞色素 P450 氧化酶、还原酶催化形成四氯氢醌, 四氯氢醌是一种毒性比 PCP 更强的代谢产物, 可诱导 DNA 链断裂并消耗谷胱甘肽, 导致细胞和组织出现大量的 ROS 和氧化应激效应^[21-22]。相对于 PCP 而言, 水环境中的 2,4-DCP 和 2,4,6-TCP 化学性质非常稳定, 能够在土壤以及底泥介质中长期停留。

本研究结果显示, 不同浓度 2,4-DCP、2,4,6-TCP 和 PCP 处理能够显著诱导 *AwSeGPx* 表达水平的上调, 提示 *AwSeGPx* 表达水平上调与动物对过氧化物转化能力以及环境耐受能力的增强密切相关。对于生物个体而言, ROS 生成是一种正常的生理现象。在正常状态下, ROS 生成后会被一系列的抗氧化酶迅速转化和代谢, 控制在较低的水平, 以维持细胞氧化和还原状态之间的平衡^[6-7]。背角无齿蚌作为滤食性淡水生物, 水体中氯酚类化合物很容易穿过细胞膜, 并蓄积在体内, 导致 ROS 生成显著增多^[9-10]。与此同时, 机体也可以通过调整抗氧化酶的活性提高对 ROS 清除能力。在这些抗氧化酶体系中, *SeGPx* 可以还原有机和无机过氧化物, 能够将有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物, 保护细胞膜结构及功能不受过氧化物干扰和损害。哺乳动物和硬骨鱼类可以通过提高 *SeGPx* 活性来减轻氧化应激的损伤^[23]。经 Cd 和 Cu 等重金属处理后, 菲律宾蛤仔 *SeGPx* 表达水平显著上调, 提高对重金属环境的耐受能力^[15]。H₂O₂ 处理后盘鲍体内含硒谷胱甘肽过氧化物酶表达水平显著升高, 增强对氧化应激耐受能力^[16]。高浓度 Hg 处理能够抑制紫贻贝 *SeGPx* 活性, 导致动物体内氧化作用和还原作用之

间平衡发生偏移, 使氧化作用占居主导地位, 助推了 Hg 诱发氧化应激效应和遗传毒性作用^[14]。对于机体而言, *SeGPx* 活性高低与丙二醛的含量密切关联, 丙二醛常作为衡量细胞膜脂质过氧化水平的关键指标。由此, 2,4-DCP、2,4,6-TCP 和 PCP 处理后 *AwSeGPx* 表达水平的升高, 一方面反映了这 3 个化合物在高浓度条件下能够导致背角无齿蚌体内脂质过氧化反应, 导致包括细胞膜在内的脂质过氧化损伤; 另一方面与动物对过氧化物的转化能力和对环境的耐受能力有关。

本研究从背角无齿蚌中分离出 *AwSeGPx* cDNA 全基因序列, 该序列具有 *SeGPx* 的标签序列和保守序列。2,4-DCP、2,4,6-TCP 和 PCP 处理后动物机体氧化应激水平增加, 肝胰腺中 *AwSeGPx* 表达水平上调与动物提高过氧化物的还原能力和增强对环境的耐受能力有关。在相同浓度条件下, PCP 对动物毒性和环境危害可能大于 2,4-DCP 和 2,4,6-TCP。

通讯作者简介: 夏西超(1977—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为水生生物毒理学。

参考文献 (References):

- [1] Maheshwari N, Khan F H, Mahmood R. Pentachlorophenol-induced cytotoxicity in human erythrocytes: Enhanced generation of ROS and RNS, lowered antioxidant power, inhibition of glucose metabolism, and morphological changes [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(13): 12985-13001
- [2] Matta R, Chiron S. Oxidative degradation of pentachlorophenol by permanganate for ISCO application [J]. *Environmental Technology*, 2018, 39(5): 651-657
- [3] Yeo B J, Goh S, Zhang J S, et al. Novel MBRs for the removal of organic priority pollutants from industrial wastewaters: A review [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2015, 90(11): 1949-1967
- [4] Lei B L, Huang S B, Jin X W, et al. Deriving the aquatic predicted no-effect concentrations (PNECs) of three chlorophenols for the Taihu Lake, China [J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2010, 45 (14): 1823-1831
- [5] Yin D Q, Gu Y, Li Y, et al. Pentachlorophenol treatment *in vivo* elevates point mutation rate in zebrafish p53 gene [J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2006, 609(1): 92-101
- [6] Maheshwari N, Mahmood R. 3,4-dihydroxybenzaldehyde

- attenuates pentachlorophenol-induced cytotoxicity, DNA damage and collapse of mitochondrial membrane potential in isolated human blood cells [J]. *Drug and Chemical Toxicology*, 2020, 28: 1-18
- [7] Chatziargyriou V, Dailianis S. The role of selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) against oxidative and genotoxic effects of mercury in haemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.) [J]. *Toxicology in Vitro*, 2010, 24: 1363-1372
- [8] Kim U J, Jo H, Lee I S, et al. Investigation of bioaccumulation and biotransformation of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated and methoxylated derivatives in varying trophic level freshwater fishes [J]. *Chemosphere*, 2015, 137: 108-114
- [9] Soo P, Todd P A. The behaviour of giant clams (Bivalvia: Cardiidae: Tridacninae) [J]. *Marine Biology*, 2014, 161 (12): 2699-2717
- [10] 夏西超, 张科, 宋国英, 等. 背角无齿蚌 *AwPrx4A* 基因克隆及在 PFOS 和 PFOA 胁迫下的表达分析[J]. *生态毒理学报*, 2019, 14(6): 118-127
- Xia X C, Zhang K, Song G Y, et al. Effects of PFOS and PFOA on the *AwPrx4A* expression in freshwater bivalve *Anodonta woodiana* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2019, 14(6): 118-127 (in Chinese)
- [11] Xia X C, Xue S P, Wang X Y, et al. Response a chronic effects of PBDE-47: Up-regulations of HSP60 and HSP70 expression in freshwater bivalve *Anodonta woodiana* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 65: 213-225
- [12] Mullenbach G T, Tabrizi A, Irvine B D, et al. Sequence of a cDNA coding for human glutathione peroxidase confirms TGA encodes active site selenocysteine [J]. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15(13): 5484
- [13] De Zoysa M, Pushpamali W A, Oh C, et al. Transcriptional up-regulation of disk abalone selenium dependent glutathione peroxidase by H₂O₂ oxidative stress and *Vibrio alginolyticus* bacterial infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(4): 446-457
- [14] Zhang L B, Liu X L, Chen L L, et al. Transcriptional regulation of selenium-dependent glutathione peroxidase from *Venerupis philippinarum* in response to pathogen and contaminants challenge [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(6): 831-837
- [15] Hliwa P, Zdanowski B, Dietrich G J, et al. Temporal changes in gametogenesis of the invasive Chinese pond mussel *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia: Unionidae) from the Konin Lakes System (Central Poland) [J]. *Folia Biologica*, 2015, 63(3): 175-185
- [16] Ladenstein R, Epp O, Gunzler W A, et al. Glutathione peroxidase on approval [J]. *Life Chemistry Reports*, 1986, 4(1): 37-55
- [17] Aumann K D, Bedorf N, Brigelius-Flohed R, et al. Glutathione peroxidase revisited—Simulation of the catalytic cycle by computer-assisted molecular modelling [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 1997, 10(Z1): 136-155
- [18] Walczak R, Westhof E, Carbon P, et al. A novel RNA structural motif in the selenocysteine insertion element of eukaryotic selenoprotein mRNAs [J]. *RNA*, 1996, 2(4): 367-379
- [19] Grundner-Culemann E, Martin G W, Harney J W, et al. Two distinct SECIS structures capable of directing selenocysteine incorporation in eukaryotes [J]. *RNA*, 1999, 5(5): 625-635
- [20] Carneiro M, Reis B, Azevedo J, et al. Glutathione transferases responses induced by microcystin-LR in the gills and hepatopancreas of the clam *Venerupis philippinarum* [J]. *Toxins*, 2015, 7(6): 2096-2120
- [21] Chen H M, Lee Y H, Wang Y J. ROS-triggered signaling pathways involved in the cytotoxicity and tumor promotion effects of pentachlorophenol and tetrachlorohydroquinone [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2015, 28(3): 339-350
- [22] Pietsch C, Hollender J, Dorusch F, et al. Cytotoxic effects of pentachlorophenol (PCP) and its metabolite tetrachlorohydroquinone (TCHQ) on liver cells are modulated by antioxidants [J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2014, 30(4): 233-252
- [23] Doyen P, Rodius F, L'Hoste L, et al. Identification and mRNA expression of pi-class glutathione S-transferase and selenium-dependent glutathione peroxidase in the gudgeon *Gobio gobio* exposed to PCB 77 [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2012, 155(2): 300-306 ◆