

文章编号: 1674-5566(2023)04-0690-09

DOI:10.12024/jsou.20220203730

## 河鲀毒素诱导菊黄东方鲀膜转运蛋白基因的表达

叶雅萍<sup>1,2</sup>, 伍和星<sup>1,2</sup>, 滕飞<sup>1,2</sup>, 鲍宝龙<sup>1,2</sup>, 龚小玲<sup>1,2</sup>

(1. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

**摘要:** 为探究参与河鲀肝脏和皮肤累积河鲀毒素(Tetrodotoxin, TTX)的过程及相关调控基因,按每克体质量河鲀0.25 μg TTX 剂量尾部肌肉注射人工繁育的菊黄东方鲀(*Takifugu flavidus*),发现肝脏中 TTX 含量在注射后4 h 时最高(19.12 ng/g),24 h 下降到8.92 ng/g,TTX 主要在肝实质细胞中累积;皮肤中 TTX 含量一直处于上升趋势,4 h 为13.70 ng/g,24 h 为22.91 ng/g;TTX 主要在皮肤表皮层、基底细胞中累积。比较对照组和注射24 h 后肝脏和皮肤转录组发现:TTX 注射导致肝脏组织338 个基因上调,350 个基因下调;而皮肤组织有598 个基因上调,同时有595 个基因下调;RT-qPCR 验证 *slc2a12*、*slc5a7*、*slc25a22*、*slc25a15*、*slc35a3*、*arap1*、*ugt2a2*、*ggt5*、*psbp2* 等膜转运蛋白相关基因在注射 TTX 后在肝脏和皮肤中的表达水平显著上调,可能与 TTX 累积过程有关。

**关键词:** 菊黄东方鲀; 河鲀毒素; 免疫组化; 液相色谱串联质谱; 膜转运蛋白基因

**中图分类号:** S 917 **文献标志码:** A

东方鲀属(*Takifugu*)鱼类在我国有22种,其体内大多含有河鲀毒素(Tetrodotoxin, TTX)。TTX 毒性很强且具有热稳定性,不易分解<sup>[1-2]</sup>;最早在河鲀中发现而得名,随后在虾虎鱼、织纹螺、蝶螈、涡虫、纽形动物、节肢动物、棘皮动物以及一些细菌中也有发现<sup>[3-4]</sup>。不同的生物对 TTX 的耐受性有明显的差异,有毒河鲀对腹腔注射 TTX 的最小致死量为5 mg TTX/kg,为无毒物种的330~750 倍<sup>[5-6]</sup>。河鲀体内 TTX 的来源最可能是通过食物链累积<sup>[7]</sup>。河鲀通过注射和饲喂方式都可以有效地将 TTX 积累到特定的组织中,主要在肝脏和皮肤中<sup>[8-9]</sup>;但目前对于河鲀是如何在体内累积 TTX 的机制尚未明晰。

野生菊黄东方鲀(*Takifugu flavidus*)在肝脏、卵巢和皮肤中 TTX 含量很高,而人工养殖的菊黄东方鲀毒性可降低到食用标准<sup>[10]</sup>。市场上对毒性低、可直接食用的河鲀需求逐年增加,弄清河鲀体内 TTX 累积和转运机制,可以抑制河鲀体内 TTX 的累积,进而为生产安全无毒可食用河鲀提

供保障。本研究通过肌肉注射 TTX 人工养殖无毒菊黄东方鲀来追踪毒素在肝脏和皮肤组织中累积转运的过程与机理。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验对象

苗种为上海市水产研究所奉贤基地人工饲养的菊黄东方鲀一对亲本培育的后代,仔鱼饲养在室内水泥池中,1 月龄后转移至室外池塘养殖,盐度25;饲养至6 月龄、体质量为50~80 g 时转移到实验室,暂养1 d 后进行 TTX 注射实验。

#### 1.2 肌肉注射河鲀毒素

TTX(纯度99.32%,来自北京普天同创生物科技有限公司)用0.1%乙酸(质谱级纯)溶解到1 mg/mL 作为母液,再稀释至0.25 μg/μL 的标准液用以注射。注射剂量参考 MATSUMOTO 等<sup>[11]</sup>采用0.25 μg TTX/g 注射尾部肌肉,对照组注射0.1%的乙酸溶液。注射后河鲀暂养于人工海水中且不投喂。1、4、8、16、24 h 随机取样4

收稿日期: 2022-02-22 修回日期: 2022-04-30

基金项目: 国家自然科学基金(31872546)

作者简介: 叶雅萍(1997—),女,硕士研究生,研究方向为分子生物学。E-mail: Yypingzjn06@163.com

通信作者: 龚小玲, E-mail: xlgong@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

尾,取肝脏和皮肤组织,液氮速冻保存。

### 1.3 河鲀毒素的提取

乙酸煮沸法提取 TTX<sup>[12]</sup>。组织样本称重后剪碎,加入 4 倍体积 0.1% 乙酸,冰上超声处理 5 min,100 °C 沸水水浴 10 min,冷却后常温 12 000 r/min 离心 10 min,上清过 3 ku 超滤管,常温 12 000 r/min 离心 15 min,滤液过 0.22 μm 滤膜得待测液,液相色谱质谱联用仪(Waters-TQS 液质联用仪,美国 waters 公司)测定样品中 TTX 含量。

### 1.4 TTX 检测方法

#### 1.4.1 液相色谱-质谱/质谱(LC-MS/MS)联用

色谱柱: XBridge Amide column (2.1×100 mm,粒径 1.7 μm),流动相:A 为 0.1% 的甲酸溶液,B 为乙腈。洗脱梯度:0~5 min、45% A,55% B、350 μL/min。柱温 30 °C,进样体积 10 μL。质谱:电喷雾离子源(ESI),多反应检测(MRM),离子源电压 5 500 V,雾化气 400 psi,最优去簇电压 60 V,最优碰撞电压 45 V。离子源温度 500 °C。m/z 320 作为前驱体离子,以 m/z 162 和 m/z 302 处的特征片段离子峰对 TTX 定性和定量。通过样品的出峰时间与 TTX 标准品的出峰时间一致性判别 TTX 有无<sup>[12]</sup>。

#### 1.4.2 标准曲线定量

TTX 标准品溶液配制:将 1 mg/mL 的 TTX 母液稀释成 10 μg/mL 的标准曲线母液,标准工作液梯度为 25、50、100、200、400 ng/mL;以 TTX 的质量浓度为横坐标,出峰面积为纵坐标绘制标准曲线。按照出峰面积计算样品质量浓度及组织中 TTX 含量。

### 1.5 免疫组织化学测定 TTX 在肝脏和皮肤中的分布

通过 TTX 与抗体结合方式来定位 TTX 在肝脏和皮肤的位置<sup>[12]</sup>。组织样本用 4% 多聚甲醛 4 °C 浸泡过夜固定,乙醇梯度脱水、二甲苯透明组织块,浸蜡后包埋切片,切片厚度约 5 μm。切片脱蜡、梯度脱水后加入 TTX 单克隆抗体[Anti-TTX monoclonal Antibody, clone psc214778

(FITC) DMABA-0215] 37 °C 避光孵育 1 h。1×PBS 冲洗,DAPI 将细胞核标记为蓝色荧光,荧光抗体将 TTX 标记为绿色荧光,封片后荧光共聚焦显微镜观察。

### 1.6 RNA 提取、文库构建和高通量测序

使用 Trizol 法分别提取 TTX 注射处理 24 h 后和注射生理盐水的河鲀肝脏及皮肤组织 RNA,转录组测序采用 NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit for Illumina™ (NEB, 美国) 构建文库,基于 Illumina Novaseq 6000™ 高通量平台,对 4 个样本进行转录组测序。

### 1.7 生物信息学分析

参考基因组为已有的菊黄东方鲀基因组(Genome ID 为 14185),转录组的原始数据已上传至 NCBI 公开数据库,登录号为 PRJNA817679。转录组的原始数据去接头(adapter)、低质量数据处理后得高质量数据。使用 DESeq R package<sup>[13]</sup> 的 estimateSizeFactors 函数对数据进行标准化,并使用 nbinomTest 函数计算差异比较的 P 和倍数变化值。挑选出 P<0.05,FC>2 的差异基因,并进行差异基因的 GO 和 KEGG<sup>[14]</sup> 富集分析,以确定表达差异基因代谢途径和信号转导途径。

### 1.8 荧光定量 PCR(RT-qPCR)

Trizol 法提取 RNA,HiScript III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper,Vazyme,南京) 反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板,gapdh(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 为内参基因进行 RT-qPCR(ABI 7500,Applied Biosystems,USA)。使用 SYBR Green 染料法检测,反应体系:1 μL 特异性引物、1 μL cDNA、3 μL 超纯水、5 μL qPCR SYBR Green Master Mix(YENSEN,上海),PCR 反应程序:95 °C 2 min、40 个循环(95 °C 10 s,58 °C 30 s)、95 °C 30 s。设置 3 个重复,相对表达量计算采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法,以 GraphPad Prism 6.0 软件统计分析,t-tests 比较基因差异表达量,各基因扩增引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列  
Tab. 1 Primer sequences for real-time PCR

基因登录号 Gene ID	基因名 Gene symbol	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
KE120694.1	<i>gapdh</i> (3-磷酸甘油醛脱氢酶)	正向 反向	GTCAGCAACGCTTCCTGCAC GTCAGCTTGCCGTTACAGCTC
D4764_19G0007450	<i>slc2a12</i> (溶质载体家族 2 促进葡萄糖转运蛋白成员 12)	正向 反向	CTTGGACGGGTCATAGTGGG AAGCAACGCCAGTGGGATTA
D4764_01G0003190	<i>slc5a7</i> (高亲和力胆碱转运蛋白 1)	正向 反向	TGTCAGATATACTGTGGGTGGC TGAGTGCCTTTTCTGCTGCTTCC
D4764_02G0004940	<i>slc6a2</i> (钠依赖性去甲肾上腺素转运体)	正向 反向	ATCTCCTCACTCAACCCCTGTG AACCTFTGTGTTTGTGGCCCA
D4764_14G0006730	<i>slc7a1</i> (高亲和力阳离子氨基酸转运蛋白 1)	正向 反向	TTGTCATATGGAGGCAGCCG TATCTTCGTGGTCGAAGCCG
D4764_03G0002590	<i>slc9b2</i> (钠/氢交换器 9B2)	正向 反向	CATGCACCAACCAGCACCAG GACTGGCTGGCTTTGTCTGAT
D4764_08G0007090	<i>slc25a22</i> (线粒体谷氨酸载体 1)	正向 反向	ACCCCTCCTGAGGACTTTTCT CTTCTTCACACAGCGAGGGT
D4764_14G0008490	<i>slc25a15</i> (线粒体鸟氨酸转运蛋白 1)	正向 反向	GCTGAGCGATGTGCAGAAAG GACCACTGACCACACCGAAT
D4764_08G0006270	<i>slc26a10</i> (溶质载体家族 26 成员 10)	正向 反向	TTGTGGAGAACCTGCCTCAC CGACAAACGTTATGGCCACC
D4764_15G0002430	<i>slc35a3</i> (UDP-N-乙酰氨基葡萄糖转运蛋白)	正向 反向	GATCCTCCTGAAGACCGCCT CGATTTTAAAGACCTCGGGC
D4764_14G0006980	<i>slc47a1</i> (多药和毒素挤压蛋白 1)	正向 反向	CAGTGCATATGAGAGGCGT CTTTTGTGGGTAACACGGG
VD4764_17G0006120	<i>slc51a</i> (有机溶质转运蛋白亚基 $\alpha$ )	正向 反向	GTCCATGCTCGTCTACCTGG TCAAGAAGCCCTCATCACCC
D4764_14G0012630	<i>arap1</i> (带有 RhoGAP 结构域、锚蛋白重复和 PH 结构域 1 的 ArfGAP)	正向 反向	TCTGACGGTATCCCCGATGT GTATTTGTGCTCGCCTGCTG
D4764_02G0005210	<i>ugt2a2</i> (UDP-葡萄糖醛酸转移酶 2A2)	正向 反向	TCTCTCCAGACTGAGGGCAA GCCTCTGCATGTTAAGTGCC
D4764_20G0000870	<i>ggt5</i> (谷胱甘肽水解酶 5)	正向 反向	TCCACTCCGAGAACAACGTC CTTCGATGCACCCATCCTCC
D4764_18G0001140	<i>psbp2</i> (石房蛤毒素和河鲀毒素结合蛋白 2)	正向 反向	CGGCACGGTGAAGTTCCTTTG TTGTCATCTTGGGCAGCCTT

## 2 结果

### 2.1 TTX 含量

TTX 标准曲线线性方程为  $Y=3281.99X(R^2=0.999)$ ,各样品出峰时间在 1.5~1.7 min 内,与标准品一致,表明样品中所检测的物质为 TTX(图 1)。

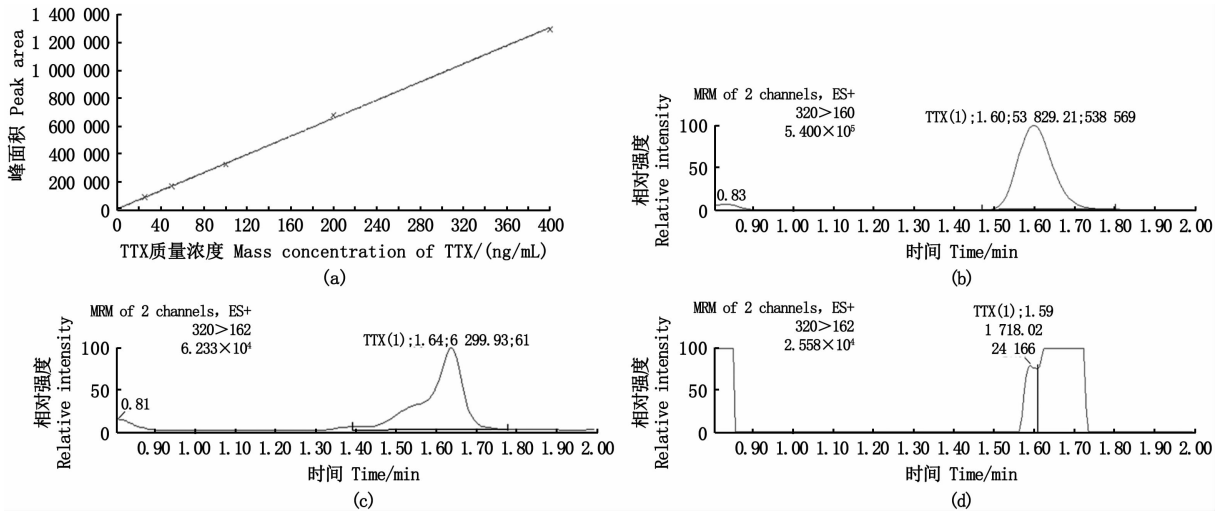
菊黄东方鲀注射 TTX 24 h 内,肝脏在 4 h 时 TTX 含量达到最高,为 19.12 ng/g,后续随注射时间的延长,TTX 在肝脏中累积量逐渐降低,并趋于平缓;而皮肤中 TTX 含量在注射 24 h 内一直

处于上升的趋势,24 h 时达到 22.91 ng/g(图 2)。

### 2.2 TTX 在组织中的定位

#### 2.2.1 皮肤

对未注射和注射 TTX 24 h 的菊黄东方鲀皮肤组织进行免疫组化定位,在注射 24 h 的皮肤组织中检测到 TTX 信号,未注射的皮肤组织中未检测到 TTX 信号。荧光免疫组化显示表皮层的基底细胞可见较强的绿色荧光,在化学免疫组化中也在该部位检测到棕褐色的信号,说明 TTX 在皮肤中表皮层的基底细胞中累积(图版 I)。



(a) TTX 标准曲线; (b) TTX 标准品 LC-MS/MS 色谱图; (c) TTX 处理 24 h 皮肤组织 LC-MS/MS 色谱图; (d) TTX 处理 24 h 肝脏组织 LC-MS/MS 色谱图。

(a) TTX standard curve; (b) LC-MS/MS chromatogram of TTX standard product; (c) LC-MS/MS chromatogram of skin tissue treated with TTX for 24 h; (d) LC-MS/MS chromatogram of liver tissue treated with TTX for 24 h.

图 1 LC-MS/MS 检测图谱  
Fig. 1 LC-MS/MS chromatogram map

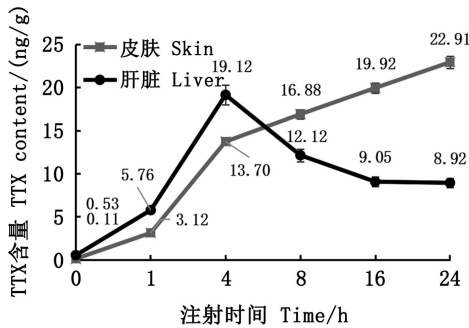


图 2 肌肉注射 TTX 处理后不同时间肝脏和皮肤 TTX 含量检测

Fig. 2 Detection of TTX content in liver and skin at different time after intramuscular injection of TTX

2.2.2 肝脏

河鲀的肝脏为重度脂肪肝,在切片中可见较大的脂肪空泡,肝细胞被脂肪挤到边沿,荧光免疫组化可见在 TTX 注射 24 h 组中肝实质细胞中较强的绿色荧光,化学免疫组化在肝实质细胞也可见棕褐色信号,而在对照组中未见信号,因此 TTX 主要在肝实质细胞中累积(图版 II)。

2.3 TTX 转运相关基因的表达

2.3.1 转录组分析

TTX 注射 24 h 组和对照组各取 4 尾河鲀样本,Trizol 法提取肝脏和皮肤组织的 RNA,进行转

录组测序。各样本 Q30 碱基分布在 93.4% 以上,平均 GC 含量为 51.32%。通过将 reads 比对到参考基因组上,得到各个样本的基因组比对情况,比对率为 90.04%~94.10%,可见测序数据质量较高。根据蛋白编码基因在不同样本中的表达量,进行差异筛选,共设有两个差异分组,检测结果:肝脏中有 688 个差异基因,其中 338 个基因上调、350 个基因下调;皮肤中有差异基因 1 193 个,其中 598 个基因上调、595 个基因下调( $P < 0.05$ )。

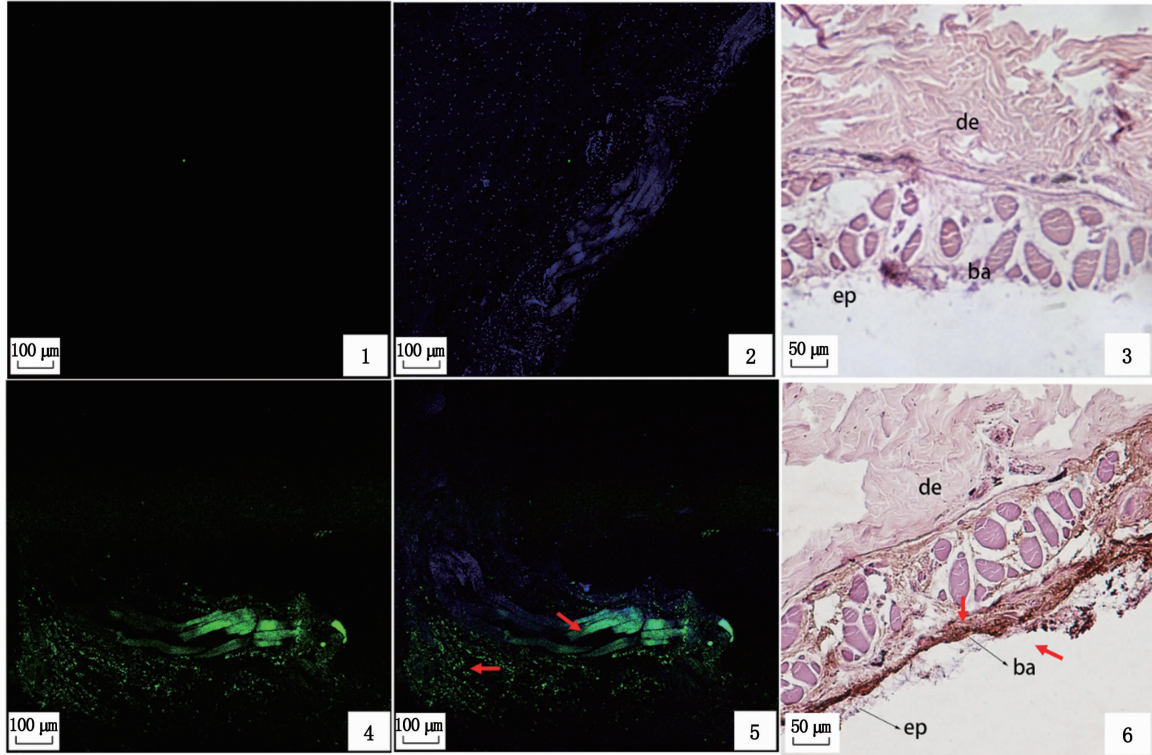
分别对皮肤和肝脏差异基因进行 GO 富集分析。其中肝脏中差异基因富集到的 GO 生物过程包括:生物调节 (Biological regulation)、膜 (Membrane)、结合 (Binding)、转运活动 (Transporter activity) 等。皮肤中的差异基因富集到的 GO 生物过程包括:生物调节 (Biological regulation)、代谢过程 (Metabolic process)、细胞部分 (Cell part)、细胞器 (Organelle) 等。由此可知这些 GO 富集过程和膜的功能有着较大的相关。

2.3.2 转运相关基因表达量

根据转录组中差异基因的 GO 注释及查阅基因相关的功能,从显著上调基因中筛选出膜转运蛋白相关的 *SLC* 家族基因和其他基因。利用 RT-qPCR 检测目的基因在肝脏和皮肤中的表达情况。与对照组相比,注射 TTX 24 h 后,肝脏中 *SLC* 家族基因 *slc2a12*、*slc5a7*、*slc6a2*、*slc7a1*、

*slc9b2*、*slc25a22*、*slc26a10*、*slc35a3*、*slc51a1* 基因 mRNA 表达水平上调,且差异极显著( $P<0.01$ ),而皮肤中 *SLC* 家族基因 *slc2a12*、*slc5a7*、*slc25a22*、*slc25a15*、*slc35a3*、*slc47a1* 基因 mRNA 表达水平上调,差异极显著( $P<0.01$ ),其他膜转运蛋白相关

基因 *arap1*、*ugt2a2*、*Ggt5*、*psbp2* 基因 mRNA 表达水平在肝脏和皮肤中均上调,具有显著性差异( $P<0.05$ ),见图 3。将转录组中的差异表达结果和 RT-qPCR 的验证结果进行比对,表明两者的结果较一致,因此转录组测序的数据较为可信。



1~2 为对照组皮肤免疫荧光; 3 为对照组皮肤化学免疫组化; 4~5 为 TTX 注射 24 h 的皮肤免疫荧光; 6 为 TTX 注射 24 h 的皮肤化学免疫组化; ep. 表皮层; ba. 基底层; de. 真皮层; 4~5 的绿色荧光信号和 6 的棕色信号为 TTX, 蓝色荧光信号为 DAPI(标记细胞核), 箭头指示的是 TTX 信号检测位点。

1-2 are the skin immunofluorescence of the control group; 3 is the skin immunohistochemistry of the control group; 4-5 are the skin immunofluorescence of the TTX injection 24 h; 6 is the skin immunohistochemistry of the TTX injection 24 h; ep. Epidermis; ba. Basal layer; de. Dermis; The green fluorescence signal in 4-5 and the brown signal in 6 are TTX, the blue fluorescence signal is DAPI (labeled cell nucleus), the arrow indicates the TTX signal detection site, the arrows indicate the TTX signals.

图版 I 皮肤组织 TTX 免疫组化定位

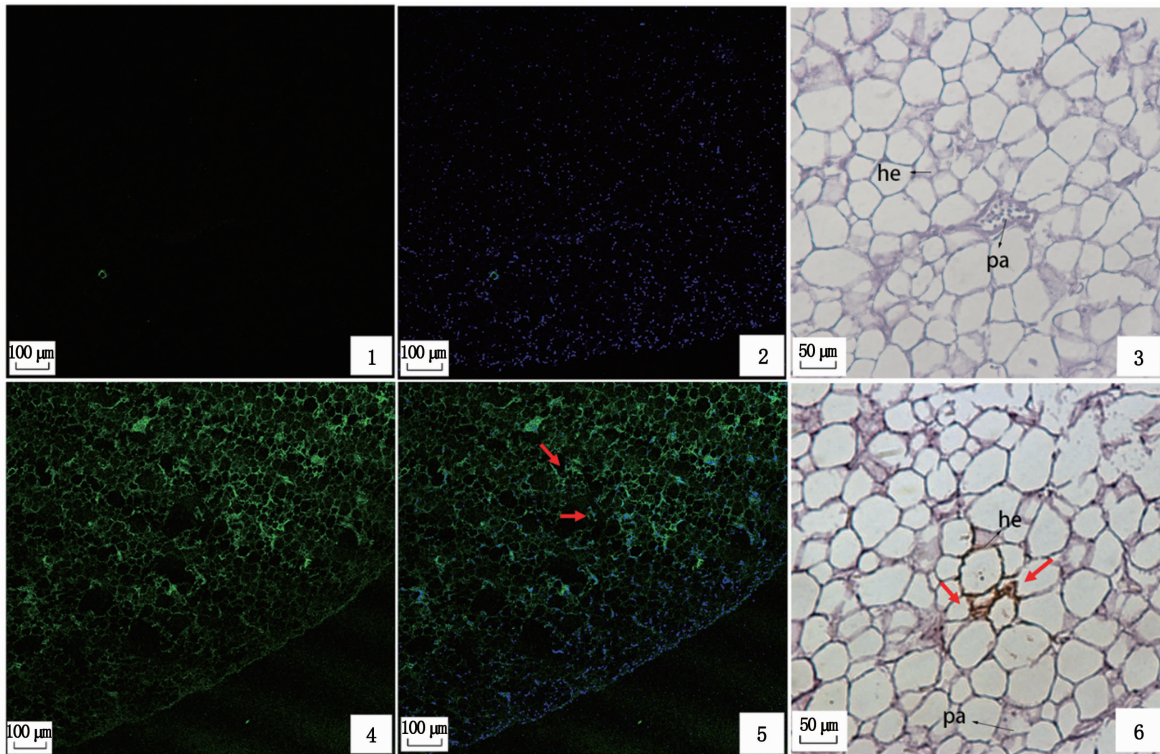
Plate I TTX immunohistochemical localization of skin tissue

### 3 讨论

#### 3.1 肝脏中 TTX 的累积

本研究表明,菊黄东方鲀尾部肌肉注射 TTX, TTX 通过毛细血管壁进入血液循环,再转移到肝脏。根据质谱检测结果显示,4 h 时 TTX 含量在肝脏中达到测定时间段的质量浓度峰值,4 h 后逐渐降低。有研究<sup>[15-16]</sup>表明,肌肉注射 TTX 后 1~4 h 内肝脏 TTX 含量略微下降,4~8 h 肝脏 TTX 含量下降较为明显,12 h 后 TTX 含量趋于稳

定,其结果与本次实验的累积情况较为相似。肝脏是大多数河鲀累积毒素的主要组织,且在有毒的河鲀中肝脏毒性大都为剧毒或强毒。同时,肝脏切片孵育实验也证明了河鲀肝脏能够有效地累积 TTX<sup>[17]</sup>。不同年龄段的河鲀肝脏累积毒素有着差异,随着年龄增长,肝脏累积 TTX 的能力增加<sup>[18]</sup>。因此,TTX 在河鲀体内累积的情况随着生长阶段的不同而有所差异,存在组织特异性,而肝脏保留和代谢 TTX 的能力还需要进一步研究。



1~2 为对照组肝脏免疫荧光; 3 为对照组肝脏化学免疫组化; 4~5 为 TTX 注射 24 h 的肝脏免疫荧光; 6 为 TTX 注射 24 h 的肝脏的化学免疫组化; he. 肝实质细胞; pa. 胰腺外分泌细胞; 4~5 的绿色荧光信号和 6 的棕色信号为 TTX, 蓝色荧光信号为 DAPI(标记细胞核), 箭头指示的是 TTX 信号检测位点。

1~2 are the liver immunofluorescence of the control group; 3 is the liver immunohistochemistry of the control group; 4~5 are the liver immunofluorescence of the TTX injection 24 h; 6 is the liver immunohistochemistry of the TTX injection 24 h; he. Liver parenchyma cells; pa. Pancreatic exocrine cells; The green fluorescent signal in 4~5 and the brown signal in 6 are TTX, the blue fluorescent signal is DAPI (staining for nucleic acid). The arrows indicate the TTX signals.

图版 II 肝脏组织 TTX 免疫组化定位

Plate II TTX immunohistochemical localization of liver tissue

### 3.2 皮肤中 TTX 的累积

菊黄东方鲀的皮肤具有独特的分泌毒素的外分泌腺结构, 注射 TTX 后, 在检测时间段内含量一直处于上升趋势, 24 h 的累积量最高, 为 22.91 ng/g, 而 4~24 h 内肝脏的 TTX 含量下降, 可能是肝脏中有部分 TTX 转移到了皮肤中。有研究<sup>[16]</sup>表明, 肌肉注射 TTX 12 h 后大部分的 TTX 都转移到了皮肤中, 且在 168 h 后仍有 89% 的转运毒素累积。据调查, 我国共有 35 种河鲀具有不同程度的毒性, 常见的菊黄东方鲀、暗纹东方鲀、星点东方鲀等河鲀的皮肤组织都含有强毒<sup>[5]</sup>。MAHMUD 等<sup>[19]</sup>在绿河鲀皮肤的基层细胞和囊状细胞中检测到 TTX 信号, 而在本研究中菊黄东方鲀皮肤的表皮层、基底细胞层中也检测到了信号。幼龄河鲀的皮肤累积 TTX 的能力大约是成年河鲀皮肤的 2 倍, 表明皮肤对 TTX 的累积能力与河鲀体内毒素分布有关,

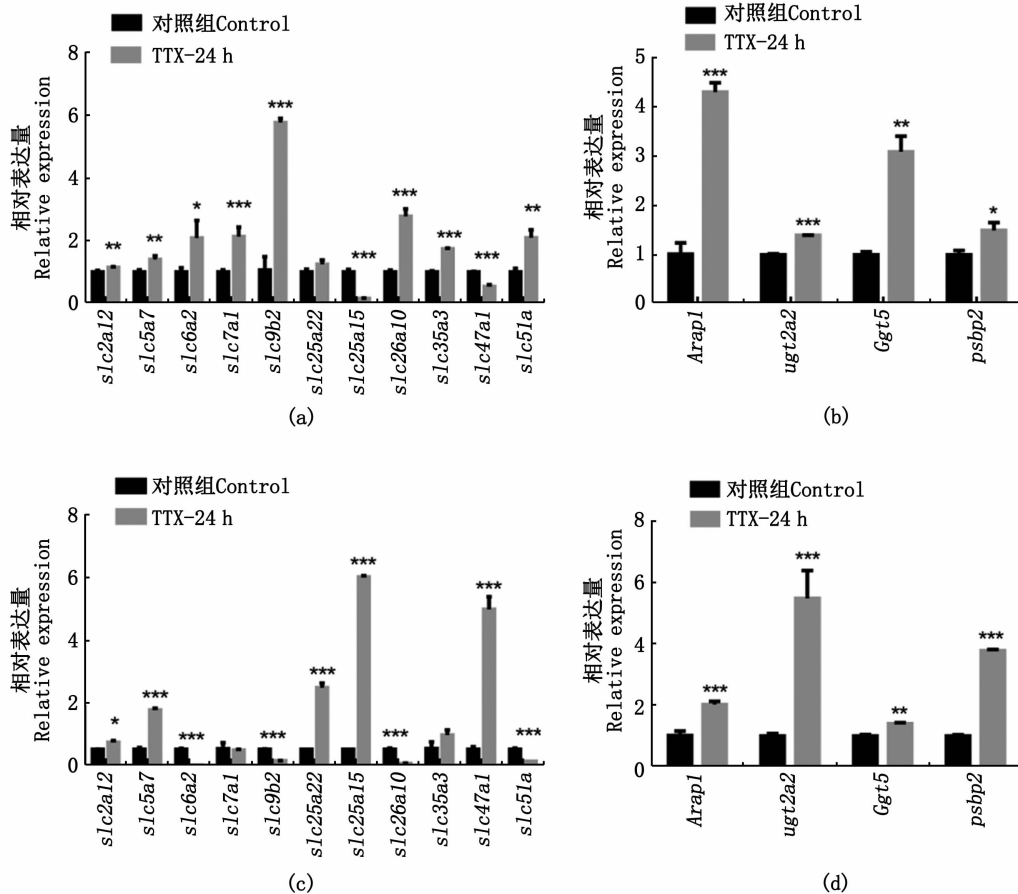
且不同组织累积和代谢 TTX 的能力也存在年龄差异<sup>[20]</sup>。

### 3.3 膜转运蛋白相关基因的表达

通过 GO 富集分析发现, TTX 处理组中膜、结合、转运活动等生物学功能显著富集。TTX 进入到细胞中可能需要转运蛋白的协助, 且在过去的研究<sup>[21]</sup>中已经发现并验证了几种 TTX 的转运蛋白。因此, 在转录组中重点筛选膜转运蛋白。SLC 家族基因可以分布在各种生物膜结构上, 且在注射 TTX 组中上调的数量较多。在筛选的 SLC 家族基因中, *slc9b2* 能够将环境信号转化为细胞反应, 起到药物外排的作用<sup>[22]</sup>, *slc47a1* 基因对百草枯的运输有一定作用<sup>[23]</sup>。TTX 类似于一种有毒药物进入机体, 因此, *slc9b2* 和 *slc47a1* 可能与 TTX 代谢转运到其他组织具有相关性。*slc25a15* 为鸟氨酸-瓜氨酸反转运蛋白<sup>[24]</sup>, *slc25a22* 基因编码一种线粒体谷氨酰胺转运体,

具有 L-谷氨酸跨膜转运蛋白活性,这 2 个基因都在精氨酸的生物合成中发挥作用,而精氨酸与 TTX 合成有关<sup>[25-26]</sup>。*slc5a7* 基因编码一种钠离子依赖性高亲和力转运蛋白<sup>[27]</sup>; TTX 是一种钠离子通道阻滞剂,当机体存在 TTX 时钠离子通道发生阻滞,钠离子的转运蛋白的工作量增加,该基因的存在可能与 TTX 的累积有一定的相关性。*slc35a3* 基因具有 UDP-N-乙酰氨基葡萄糖跨膜转运蛋白活性,而 TTX 的来源也有从五碳糖合成的猜想<sup>[28]</sup>。在筛选的 *arap1*、*ugt2a2*、*ggt5*、*psbp2* 等

膜转运蛋白相关基因中, *psbp2* 为毒素和河豚毒素结合蛋白,与 TTX 的结合有一定的相关性。*arap1* 被认为可以调节参与细胞凋亡的受体蛋白的细胞特异性运输,而外源的 TTX 进入机体后会产生一定程度的代谢作用<sup>[29]</sup>。*ggt5* 基因具有  $\gamma$ -谷氨酰转移酶活性,在精氨酸和谷氨酸的代谢合成中具有一定的作用<sup>[30]</sup>;*ugt2a2* 基因具有消除和解毒药物、外源性化合物和内源性化合物作用,*ugt2a2* 可能和 TTX 的代谢和清除具有一定的相关性<sup>[31]</sup>。



(a) SLC 家族基因在肝脏的表达; (b) 膜转运蛋白相关基因在肝脏的表达; (c) SLC 家族基因在皮肤的表达; (d) 膜转运蛋白相关基因在皮肤的表达; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , 具有显著统计学差异, 无显著性差异未显示。

(a) Expression of SLC family genes in liver; (b) Expression of Membrane transporter related genes in liver; (c) Expression of SLC family genes in skin; (d) Expression of Membrane transporter related genes in skin; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , represent statistical significance, no significant difference is not shown.

图 3 膜转运蛋白相关基因表达差异分析

Fig. 3 Differential analysis of membrane transporter related genes expression

菊黄东方鲀在累积外源 TTX 过程中,先在肝脏中累积后续转移到皮肤中,同时发现了与 TTX 转运相关的膜蛋白基因 *slc2a12*、*slc5a7*、*slc25a22*、*slc25a15*、*slc35a3*、*slc47a1*、*arap1*、*ugt2a2*、*ggt5* 和 *psbp2*, 这为进一步揭示 TTX 在鲀毒鱼类体内累积

机理奠定了基础,后续可对这些基因与 TTX 的结合累积相关性进行进一步的探究。

#### 参考文献:

- [1] BUCCIARELLI G M, LECHNER M, FONTES A, et al.

- From poison to promise: The evolution of tetrodotoxin and its potential as a therapeutic[J]. *Toxins*, 2021, 13(8): 517.
- [2] LAGO J, RODRÍGUEZ L P, BLANCO L, et al. Tetrodotoxin, an extremely potent marine neurotoxin: Distribution, toxicity, origin and therapeutical uses [J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(10): 6384-6406.
- [3] MALYKIN G V, CHERNYSHEV A V, MAGARLAMOV T Y. Intrabody tetrodotoxin distribution and possible hypothesis for its migration in ribbon worms *Cephalothrix* cf. *simula* (Palaeonemertea, Nemertea)[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(9): 494.
- [4] 马廷龙, 龚小玲, 管哲成, 等. 云斑裸颊虾虎鱼体内各组织河鲀毒素的含量[J]. *上海海洋大学学报*, 2014, 23(5): 675-679.
- MA T L, GONG X L, GUAN Z C, et al. Analysis of the tetrodotoxin content of tissues in *Yongleichthys criniger* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2014, 23(5): 675-679.
- [5] 杨桂梅, 鲍宝龙. 河鲀和河鲀毒素之间关系的研究进展[J]. *上海水产大学学报*, 2008, 17(6): 734-739.
- YANG G M, BAO B L. Research progress on the tetrodotoxin in puffer fish[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2008, 17(6): 734-739.
- [6] MAKAROVA M, RYCEK L, HAJICEK J, et al. Tetrodotoxin: History, biology, and synthesis [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(51): 18338-18387.
- [7] KODAMA T, IKEDA K, ARAKAWA O, et al. Evidence of accumulation of tetrodotoxin (TTX) in tissues and body parts of ectoparasitic copepods via their feeding on mucus of TTX-bearing pufferfish[J]. *Toxicon*, 2021, 204: 37-43.
- [8] 张娜, 韦芬, 鲍宝龙. 星点东方鲀及其共生细菌河鲀毒素的提取与检测[J]. *上海海洋大学学报*, 2017, 26(6): 801-807.
- ZHANG N, WEI F, BAO B L. Extraction and detection of tetrodotoxin in *Takifugu niphobles* and its symbiotic bacteria [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2017, 26(6): 801-807.
- [9] GAO W, KANAHARA Y, TATSUNO R, et al. Maturation-associated changes in internal distribution and intra-ovarian microdistribution of tetrodotoxin in the pufferfish *Takifugu pardalis*[J]. *Fisheries Science*, 2018, 84(4): 723-732.
- [10] 纪元, 刘岩, 宫庆礼. 小鼠生物法和酶联免疫法(ELISA)定量监测沿海5省养殖河豚鱼中的河豚毒素(TTX)[J]. *水产学报*, 2010, 34(4): 589-597.
- JI Y, LIU Y, GONG Q L. Tetrodotoxin quantitative monitoring of cultured pufferfish collected from five coastal provinces in China by mouse method and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(4): 589-597.
- [11] MATSUMOTO T, KIRIAKE A, ISHIZAKI S, et al. Biliary excretion of tetrodotoxin in the cultured pufferfish *Takifugu rubripes* juvenile after intramuscular administration [J]. *Toxicon*, 2015, 93: 98-102.
- [12] 毛婕, 龚小玲, 鲍宝龙. 东海区黄鳍东方鲀寄生异尖线虫的鉴定及河鲀毒素检测[J]. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(4): 585-592.
- MAO J, GONG X L, BAO B L. Identification of TTX *Anisakis pegreffii* parasites in *Takifugu xanthopterus* from the East China Sea [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(4): 585-592.
- [13] ANDERS S, HUBER W. Differential expression of RNA-Seq data at the gene level - the DESeq package [J]. *EMBL*, 2013, 29(17): 2153-2161.
- [14] KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36: D480-D484.
- [15] MATSUMOTO T, NAGASHIMA Y, KUSUHARA H, et al. Evaluation of hepatic uptake clearance of tetrodotoxin in the puffer fish *Takifugu rubripes* [J]. *Toxicon*, 2008, 52(2): 369-374.
- [16] IKEDA K, MURAKAMI Y, EMOTO Y, et al. Transfer profile of intramuscularly administered tetrodotoxin to non-toxic cultured specimens of the pufferfish *Takifugu rubripes* [J]. *Toxicon*, 2009, 53(1): 99-103.
- [17] MATSUMOTO T, NAGASHIMA Y, KUSUHARA H, et al. Involvement of carrier-mediated transport system in uptake of tetrodotoxin into liver tissue slices of puffer fish *Takifugu rubripes*[J]. *Toxicon*, 2007, 50(2): 173-179.
- [18] NAGASHIMA Y, TOYODA M, HASOBE M, et al. *In vitro* accumulation of tetrodotoxin in pufferfish liver tissue slices [J]. *Toxicon*, 2003, 41(5): 569-574.
- [19] MAHMUD Y, ARAKAWA O, ICHINOSE A, et al. Intracellular visualization of tetrodotoxin (TTX) in the skin of a puffer *Tetraodon nigroviridis* by immunoenzymatic technique [J]. *Toxicon*, 2003, 41(5): 605-611.
- [20] GAO W, YAMADA M, OHKI R, et al. Evaluation of the tetrodotoxin uptake ability of pufferfish *Takifugu rubripes* tissues according to age using an *in vitro* tissue slice incubation method [J]. *Toxicon*, 2020, 174: 8-12.
- [21] QIAO K, JIANG C Y, XU M, et al. Molecular characterization of the Von willebrand factor type D domain of vitellogenin from *Takifugu flavidus* [J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(4): 181.
- [22] HOLMES R S, SPRADLING-REEVES K D, COX L A. Evolution of vertebrate solute carrier family 9B genes and proteins (*SLC9B*): Evidence for a marsupial origin for testis specific *SLC9B1* from an ancestral vertebrate *SLC9B2* gene [J]. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 2016, 4(3): 1000167.
- [23] 卢硕, 官静静, 万佳明. SLC47A1 表达水平对肾透明细胞癌患者预后的影响 [J]. *热带医学杂志*, 2021, 21(11): 1400-1404, 1408.
- LU S, GUAN J J, WAN J M. The prognostic value of



- SLC47A1 expression in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Journal of Tropical Medicine*, 2021, 21 (11): 1400-1404, 1408.
- [24] FIERMONTE G, DOLCE V, DAVID L, et al. The mitochondrial ornithine transporter: Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution of two human isoforms [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(35): 32778-32783.
- [25] ANDRÉ M V, CACCIAGLI P, CANO A, et al. The phenotype caused by recessive variations in SLC25A22: Report of a new case and literature review [J]. *Archives de Pédiatrie*, 2021, 28(1): 87-92.
- [26] TOYODA Y, TAKADA T, MIYATA H, et al. Identification of GLUT12/SLC2A12 as a urate transporter that regulates the blood urate level in hyperuricemia model mice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(31): 18175-18177.
- [27] RODRÍGUEZ CRUZ P M, HUGHES I, MANZUR A, et al. Presynaptic congenital myasthenic syndrome due to three novel mutations in SLC5A7 encoding the sodium-dependant high-affinity choline transporter [J]. *Neuromuscular Disorders*, 2021, 31(1): 21-28.
- [28] SZULC B, SOSICKA P, MASZCZAK-SENECZKO D, et al. Biosynthesis of GlcNAc-rich N- and O-glycans in the Golgi apparatus does not require the nucleotide sugar transporter SLC35A3 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295 (48): 16445-16463.
- [29] GALLMAN A E, WOLFREYS F D, NGUYEN D N, et al. Abcc1 and Ggt5 support lymphocyte guidance through export and catabolism of S-geranylgeranyl-L-glutathione [J]. *Science Immunology*, 2021, 6(60): eabg1101.
- [30] DIAZ J, ARANDA E, HENRIQUEZ S, et al. Progesterone promotes focal adhesion formation and migration in breast cancer cells through induction of protease-activated receptor-1 [J]. *Journal of Endocrinology*, 2012, 214(2): 165-175.
- [31] SNEITZ N, COURT M H, ZHANG X L, et al. Human UDP-glucuronosyltransferase UGT2A2: cDNA construction, expression, and functional characterization in comparison with UGT2A1 and UGT2A3 [J]. *Pharmacogenetics and Genomics*, 2009, 19(12): 923-934.

## Expression of membrane transporter gene of *Takifugu flavidus* induced by tetrodotoxin

YE Yaping<sup>1,2</sup>, WU Hexing<sup>1,2</sup>, TENG Fei<sup>1,2</sup>, BAO Baolong<sup>1,2</sup>, GONG Xiaoling<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Exploration and University of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** In order to explore the process and related genes involved in the accumulation of TTX in the liver and skin of pufferfish, the artificially bred *Takifugu flavidus* (referred to as "pufferfish") underwent intramuscular injection of 0.25 μg TTX per gram body weight of pufferfish. It was found that the concentration of TTX in the liver was the highest at 4 h after injection (19.12 ng/g), and decreased to 8.92 ng/g at 24 h, TTX was mainly accumulated in hepatocytes; TTX content in the skin was in an upward trend, and it was 13.70 ng/g at 4 h and 22.91 ng/g at 24 h; TTX mainly accumulated in the skin epidermis and basal layer cells. Comparing the control group and the liver and skin transcriptomes 24 h after injection, it was found that: 338 genes were up-regulated and 350 genes were down-regulated in liver tissue by TTX injection, while 598 genes were up-regulated and 595 genes were down-regulated in skin tissue; RT-qPCR verified *slc2a12*, *slc5a7*, *slc25a22*, *slc25a15*, *slc35a3*, *arap1*, *ugt2a2*, *ggt5*, *psbp2* and other membrane transporter-related genes were significantly up-regulated in the liver and skin after TTX injection ( $P < 0.05$ ), which may be related to the accumulation process of TTX.

**Key words:** *Takifugu flavidus*; tetrodotoxin; immunohistochemistry; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; membrane transporter protein gene