

长期高氨氮暴露对海水青鳉毒理效应的蛋白质组学研究

高娜^{1,2,3}, 朱丽梅^{1,2}, 于德良^{3,4}, 张黎^{1,2}

1. 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东 广州 510301;
2. 中国科学院南海海洋研究所, 广东省应用海洋生物学重点实验室, 广东 广州 510301;
3. 中国科学院大学, 北京 100049;
4. 中国科学院烟台海岸带研究所, 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室, 山东省海岸带环境过程重点实验室, 山东 烟台 264003

摘要: 氨氮是大多数硬骨鱼的氮代谢产物, 但是环境中氨氮浓度过高也会对鱼类产生毒性作用。该研究结果显示, 海水青鳉暴露于 0.6 和 1.1 mmol·L⁻¹ NH₄Cl 4 周后的死亡率分别为 21.25% 和 40%。这说明高浓度氨氮暴露对海水青鳉具有明显的毒性作用, 而且暴露浓度越高, 毒性越大。利用蛋白质组学的研究技术研究海水青鳉在长期氨氮暴露后的蛋白质响应变化, 发现在 0.6 mmol·L⁻¹ NH₄Cl 暴露条件下有 16 种蛋白的表达发生明显的变化, 而在 1.1 mmol·L⁻¹ NH₄Cl 暴露条件下有 7 种蛋白的表达发生明显的变化。这些蛋白主要参与氧化应激的产生, 影响海水青鳉细胞结构组成、肌肉收缩、视觉通路、代谢调节和免疫调节, 引起神经毒性。该研究利用蛋白质组学的研究方法研究了长期氨氮暴露对海水青鳉的毒理效应, 为利用蛋白质组学探讨环境污染物的毒性效应提供了更深刻的认识。

关键词: 长期氨氮暴露; 蛋白质组学; 海水青鳉; 毒理效应

中图分类号: P735 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2017)05-0040-09

Proteomic responses of marine medaka (*Oryzias melastigma*) to chronic high environment ammonia exposure

GAO Na^{1,2,3}, ZHU Limei^{1,2}, YU Deliang^{3,4}, ZHANG Li^{1,2}

1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;
2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;
3. University of Chinese Academy Sciences, Beijing 100049, China;
4. Key Laboratory of Coastal Zone Environmental Processes and Ecological Restoration, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Shandong Provincial Key Laboratory of Coastal Zone Environmental Processes, Yantai 264003, China

Abstract: Most teleost fish excretes nitrogen waste as ammonia, but high environment ammonia is toxic to fish. In this study, we demonstrated that the death rate of marine medaka *Oryzias melastigma* exposed to 0.6 and 1.1 mmol·L⁻¹ NH₄Cl for four weeks were 21.25% and 40.00%, respectively, suggesting high environment ammonia is toxic to the fish. Besides, the higher concentration the ambient ammonia, the more toxic it is to the fish. We investigated the responses of chronic ammonia

收稿日期: 2016-12-02; 修订日期: 2017-04-21。孙淑杰编辑

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(2015CB452904); 国家自然科学基金项目(41376161、31501862); 中国科学院百人计划项目; 广东省科技计划项目(2014B030301064)

作者简介: 高娜(1988—), 女, 山东省新泰市人, 博士研究生, 主要从事海洋生物学研究。E-mail: gaona12@mails.ucas.ac.cn

通信作者: 张黎(1981—), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事生态毒理学研究。E-mail: zhangli@scsio.ac.cn

Received date: 2016-12-02; Revised date: 2017-04-21. Editor: SUN Shujie

Foundation item: State Key Development Program for Basic Research of China (2015CB452904); National Natural Science Foundation of China (41376161, 31501862); 100 Talents Program of the Chinese Academy of Sciences to ZHANG Li; Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, China (2014B030301064).

Corresponding author: ZHANG Li. E-mail: zhangli@scsio.ac.cn

exposure in marine medaka using proteomics. Sixteen proteins were found to be remarkably altered in the fish exposed to $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ and seven proteins, in the fish exposed to $1.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$. The function of these proteins included inducing oxidative stress, neurotoxicity, disturbance in cell structure, muscle contraction, visual pathway, metabolic and immunological regulation. This is the first report of studying the toxicological effect of ammonia on marine medaka using proteomics. It provides important insights into toxicological effects of environmental contaminant using proteomics.

Key words: chronic ammonia exposure; proteomic; marine medaka; toxicological effect

近年来, 人类生产活动对自然水体环境的影响日益突出, 生活污水的倾倒、工业废水的排放以及化肥饲料的大量使用等使自然水体中的氨氮浓度不断升高。在水产养殖业中, 鱼体密度过大、投喂饲料过多、水体流动受限等也会导致水体中氨氮浓度过高。研究显示, 一个集约型水产养殖系统中的氨氮含量可高达 $2.7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Chen et al, 1988)。

尽管氨氮是大部分硬骨鱼的主要氮代谢产物, 但是水体中氨氮浓度过高也会对鱼体产生毒性作用 (Eddy, 2005)。传统的生态毒理学研究发现环境中高浓度氨氮暴露会抑制鱼体生长 (Dosdat et al, 2003), 扰乱鱼体离子平衡 (Sinha et al, 2012), 使鱼体产生氧化应激 (Sinha et al, 2014; Cheng et al, 2015) 和增加鱼体患病率 (Ackerman et al, 2006) 等。

到目前为止, 有关氨氮对鱼类的急性毒性效应已有大量研究 (Kumar et al, 2007; Wood et al, 2011; Liew et al, 2013)。然而, 在自然环境或者水产养殖业中, 水体一旦受到氨氮污染, 鱼类会长期受到高浓度氨氮的胁迫。因此, 研究长期氨氮暴露对鱼类的生态毒理作用既具有生态学和环境保护上的意义, 也对经济活动起着重要的指导作用。

随着现代分析技术的发展, 组学 (包括基因组学、转录组学、蛋白质组学和代谢组学) 的研究方法逐渐成熟并已成功地被运用到环境毒理学的研究 (Fedorenkova et al, 2010; Santos et al, 2010)。在这些方法中, 基于双向凝胶电泳 (2-DE) 和质谱技术 (MS) 的蛋白质组学可用于呈现复杂的生物功能蛋白质网络 (Choi et al, 2012)。蛋白质组学不仅可以在器官水平、组织水平和细胞水平描述完整的蛋白质组, 而且可以用于环境污染物胁迫下的比较蛋白质组学研究 (Ahsan et al, 2009; Wu et al, 2013)。所有有生命的有机体会通过改变多种蛋白质或基因的表达来应对微小的环境变化。蛋白质变化是受有毒物质直接或间接影响的第一个功能阶段, 因此评估蛋白质组在毒理科学研究中具有重要意义。此外, 研究不足以引起生理改变的低浓度有毒物质对蛋白质组的变化有助于揭示参与毒性反应的早期分子事件 (Lemos et al, 2010)。利用蛋白质组学研究环境污染物 (如神经

毒素、重金属) 对水生生物毒理效应的研究有很多 (Tian et al, 2011; Ji et al, 2013a, b; Liu et al, 2013; Wu et al, 2013), 但是氨氮对海洋鱼类毒性效应的研究尚未有报道。本研究利用蛋白质组学的方法研究长期氨氮暴露对海水青鳉的毒性效应, 以便为利用蛋白质组学探讨环境污染物的毒性效应提供更深刻的认识。

1 材料和方法

1.1 海水青鳉

海水青鳉 *Oryzias melastigma* 已在本实验室自行繁育五代, 第一代海水青鳉由香港科技大学获得。海水青鳉在盐度为 $(30\pm 1)\%$ 、温度为 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 、pH 为 8.0 ± 1 的充气海水中养殖, 光照周期 12 h/12 h, 每天换掉原水体积的 1/2 ~ 1/3。

1.2 暴露实验

氨氮对海水青鳉的 96h 半致死浓度 (96h LC_{50}) 为 $2.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ (预实验结果)。将 96h LC_{50} 的 40% 设定为长期暴露时的最高氨氮浓度 (Person-Le Ruyet et al, 1995)。因此, 本实验选用最高氨氮暴露浓度为 $1.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ 。选用 4 个月龄的海水青鳉 60 尾, 体重 $0.04\pm 0.004 \text{ g}$, 体长 $1.67\pm 0.12 \text{ cm}$, 将其平均分成 3 组, 分别暴露于含 0、0.6 和 $1.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ (由 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ 母液配制) 的海水中, 连续暴露 4 周。暴露期间, 每天上午 9:00 投喂磨碎的人工饲料 (粗蛋白 44%; 粗灰分 15%; 粗纤维 5%; 水分 12%; 总磷 0.5%~3%; 钙 0.5%~3%; NaCl 0.3%~3%; 赖氨酸 2%), 投喂量为鱼重的 3%~5%, 投喂 1 h 后, 清除食物残渣, 并换水 1/2。新添加的海水加入一定量的 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$ 母液以保证前后氨氮暴露浓度一致。每天分别从 3 个暴露组取水样, 用靛酚蓝法 (Ivančić et al, 1984) 测定水中氨氮的浓度, 其实际浓度分别为 0.02 ± 0.01 、 0.61 ± 0.03 、 $1.11\pm 0.02 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。暴露期间统计海水青鳉死亡情况, 计算死亡率。

1.3 取样

暴露结束后, 从对照组及两个暴露组中分别任意取 6 尾海水青鳉 (取样前 24h 停止投喂), 立即用液氮速冻, 并保存于 -80°C , 待分析。

1.4 海水青鳉蛋白样品提取

在 1.5mL 离心管中加入 1mL Trizol 试剂, 将海水青鳉全鱼放于离心管中, 先用剪刀尽量剪碎, 然后放于匀浆机下匀浆至无成形颗粒(整个过程在冰上操作)。匀浆完成后, 离心($10743\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5min, 4°C)。取上清液至另一离心管中, 加入 200 μL 氯仿, 剧烈振荡 3min 后再静置 3min, 离心($10743\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15min, 4°C)。弃掉离心后的上清, 在剩下的混合液中加入 300 μL 乙醇涡旋振荡 3 次(每次振荡 20s), 振荡混匀后室温静置 3min, 离心($4269\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5min, 4°C)。在离心后的上清液中加入 750 μL 异丙醇, 涡旋混匀, 并在室温下静置 30min, 再离心($12757\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10min, 4°C), 弃上清。所得沉淀用体积分数为 95%的乙醇洗涤 2 次。将洗涤后的沉淀溶解在裂解液($7\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, $2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫脲, 浓度为 $40\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CHAPS, $65\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT 及浓度为 $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的生物裂解液)中, 室温孵育 3h 后离心($12011\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min), 上清液用于蛋白浓度测定及电泳。

1.5 蛋白浓度测定

每尾鱼提取一份蛋白, 每两份蛋白合为一个样品测定蛋白浓度。蛋白浓度测定利用 BSA 蛋白质定量试剂盒(天根生化科技有限公司)。先将考马斯亮蓝染液的温度平衡至室温, 混匀。分别取 0、1、2、3、4、5 和 6 μL 牛血清蛋白(BSA)标准溶液($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)于 96 孔板中, 各自加入一定量的 PBS (pH 7.2~7.4; NaCl $137\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; KCl $2.7\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; Na_2HPO_4 $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; KH_2PO_4 $1.76\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)补足至 10 μL 。取 2 μL 样品分别加入到 96 孔板中, 再加入 8 μL PBS。向各孔中加入 190 μL 考马斯亮蓝染液, 混匀, 室温放置 5~10min。用酶标仪测定 595nm 处吸光值, 记录读数。绘制标准曲线, 计算样品中的蛋白浓度。

1.6 双向凝胶电泳、胶图的获得及分析

将 500 μg 总蛋白溶解在裂解液中并定容至 450 μL , 上样。等电聚焦缓冲液主要成分为 $7\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素、 $2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫脲、浓度为 $40\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CHAPS、 $65\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT、0.001%溴酚蓝及体积浓度 0.2% 生物裂解液。选用 24cm IPG 干胶条(pH 4~7), 胶面朝下, 将胶条从正极缓慢覆盖在胶槽中, 滴加 2mL 覆盖油于胶条上, 置于 Ettan IPGphor 等点聚焦仪中, 设置电泳参数, 电压及时间依次为: 水化电压 30V, 12h; 100V, 5h; 500V, 1h; 1000V, 1h; 线性增加至 8000V, 11h, 总计 85858Vh。

一向电泳结束后, 将胶条置于含体积浓度为 1% DTT 的平衡缓冲液($0.05\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH

8.8; $6\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素; 体积浓度为 30%的甘油)平衡 15min, 然后再置于含碘乙酰胺的平衡缓冲液中平衡 15min。选用 Ettan DALTsix 垂直电泳系统进行第二向 SDS-PAGE 电泳, 胶的浓度为 12.5%。

对电泳后的凝胶进行银染。步骤如下: 先将凝胶放入染色盒中, 加入 1L 固定液(体积浓度为 30%的乙醇和 10%的醋酸), 过夜。弃去固定液, 加入超纯水冲洗 3 次, 每次 10min。然后加入 1L 致敏液(质量浓度为 $0.2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫代硫酸钠), 致敏 1~2min。弃去致敏液, 加入超纯水冲洗 3 次, 每次 10min。之后加入 1L 染色液(质量浓度为 $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AgNO_3), 避光染色 20min。再加入超纯水冲洗 2 次, 每次 30s。然后进行显色处理, 先加入 0.5L 显色液(质量浓度为 $25\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Na_2CO_3 和体积浓度为 37%的甲醛)进行第一次显色 1min, 再加入 1L 显色液进行第二次显色 3~8min。最后加入 5%的醋酸终止显色并水洗, 终止时间为 10min。

用 ImageScanner 扫描凝胶获得胶图, 并用 ImageMaster 2D Platinum 7.0 定量分析。通过分析每张图上每个蛋白点的体积百分数确定蛋白点的丰度, 丰度出现 1.5 倍以上差异即被认为具有统计学意义。

1.7 蛋白质酶解

扣取差异蛋白点, 将其用超纯水洗 3 次。加入 50 μL NH_4HCO_3 ($25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 吸涨 5min 后吸出液体, 再加 100 μL 50%的乙腈, 5min 后吸出液体。然后加 100 μL 100%的乙腈脱水, 至胶块完全变白, 吸出液体。加入 10 μL 酶液覆盖液($0.02\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶、 $25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4HCO_3 和 10%的乙腈), 将样品重新水化 30min。之后在 $25\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4HCO_3 和 10%乙腈的混合液中, 37°C 下酶解过夜。吸取上清至新的离心管中。在剩下的胶中加入溶解在 67%乙腈中的 5%TFA, 37°C 下温浴 30min, 并离心($6935\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5min)。合并两次上清, 冻干待做质谱。

1.8 质谱检测

将冻干后的干粉重新溶解在 5 μL 0.1%的 TFA 溶液中, 然后按照 1:1 的比例与溶解在 50%乙腈中的 α -氰基-4-羟基肉桂酸饱和溶液混合。取 1 μL 样品于 ABI 4800 串联飞行时间质谱仪中进行质谱 MALDI-TOF/TOF 鉴定。采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据, PMF 的质谱扫描范围为 800~3500Da, 选取强度最大的 10 个峰进行二级质谱鉴定。整合一级质谱和二级质谱数据, 使用 GPS V3.6 分析质谱数据并进行蛋白鉴定。利用 NCBI 和 UniProt 数据库检索蛋白信息。搜索参数为: NCBI nr MEtazoa (Aniamls) 数据库; 胰蛋白酶作为消化酶;

最大漏切位点为 1; 可变修饰为半胱氨酸脲甲基化 (cysteine Carbamidomethyl 1) 和甲硫氨酸氧化 (methionine oxidization), 没有固定修饰; 一级质谱偏差度为 0.15u, 二级质谱偏差度为 0.25u; 蛋白得分 (Protein score C.I.%) 大于 95 即为鉴定成功。

2 结果与讨论

氨氮暴露前 2 周, 2 个暴露组的海水青鳞死亡率均较低, 从最初暴露到暴露 2 周, 暴露于 0.6 和 1.1 mmol·L⁻¹ NH₄Cl 的海水青鳞死亡率分别以约 3.4% 和 1.2% 的速度缓慢增加。从第 2 周开始, 暴露于 0.6 mmol·L⁻¹ NH₄Cl 的海水青鳞死亡率以大约 7% (每周) 的速度增加, 到第 4 周时达到 21.25% (图 1); 而暴露于 1.1 mmol·L⁻¹ NH₄Cl 的海水青鳞死亡率以约 23% (每周) 的速度迅速增加, 到第 4 周时达到 40%。这一结果一方面说明了长期氨氮暴露对海水青鳞具有明显的毒性作用; 另一方面说明长期暴露条件下, 氨氮浓度越高, 其对海水青鳞的毒性越强。前 2 周 2 个暴露组的海水青鳞死亡率较低, 说明鱼体可以耐受较短时间的高氨氮暴露。暴露时间越久, 死亡率明显上升, 说明氨氮可能对鱼体造成了不可修复的损伤, 影响了体内各种蛋白质的功能 (讨论见下)。鱼体的个体差异可能是造成前 2 周较高暴露浓度组海水青鳞死亡率略低于较低暴露浓度组的原因。因此, 与急性暴露实验相比, 长期暴露实验更能模拟自然环境, 对生态保护和水产养殖业的发展具有重要的指导意义。

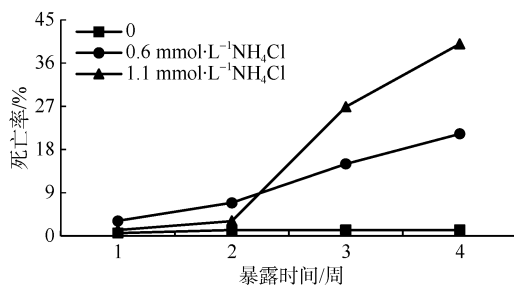


图 1 暴露于 0、0.6 和 1.1 mmol·L⁻¹ NH₄Cl 的海水青鳞在 4 周期间的死亡率

Fig. 1 Death rate of marine medaka exposed to 0, 0.6 and 1.1 mmol·L⁻¹ NH₄Cl during 4-week exposure

为研究长期氨氮暴露对海水青鳞的毒理机理, 我们利用蛋白质组学的研究手段分析长期氨氮暴露后海水青鳞体内的蛋白变化。研究发现, 暴露于 0.6 和 1.1 mmol·L⁻¹ NH₄Cl 中的海水青鳞体内分别有 16 种和 7 种蛋白质的表达发生明显变化 (图 2)。发生变

化的蛋白质主要参与氧化应激的产生, 影响细胞结构组成、肌肉收缩、视觉通路、代谢调节和免疫调节, 引起神经毒性。其中, 只有一种参与细胞结构组成的蛋白质 (类透明质酸蛋白聚糖连接蛋白 1) 的表达同时在两个暴露组被监测到发生明显变化, 且随氨氮暴露浓度增加越多, 该蛋白表达量下降得越多, 具有明显的剂量效应。其他蛋白则只在特定浓度下出现明显的表达变化, 具有浓度特异性。造成这种浓度特异性的原因尚不清楚, 还需进一步针对每种发生表达变化的蛋白进行研究。很多学者利用蛋白质组学探究环境因子改变或有毒物质对生物体蛋白

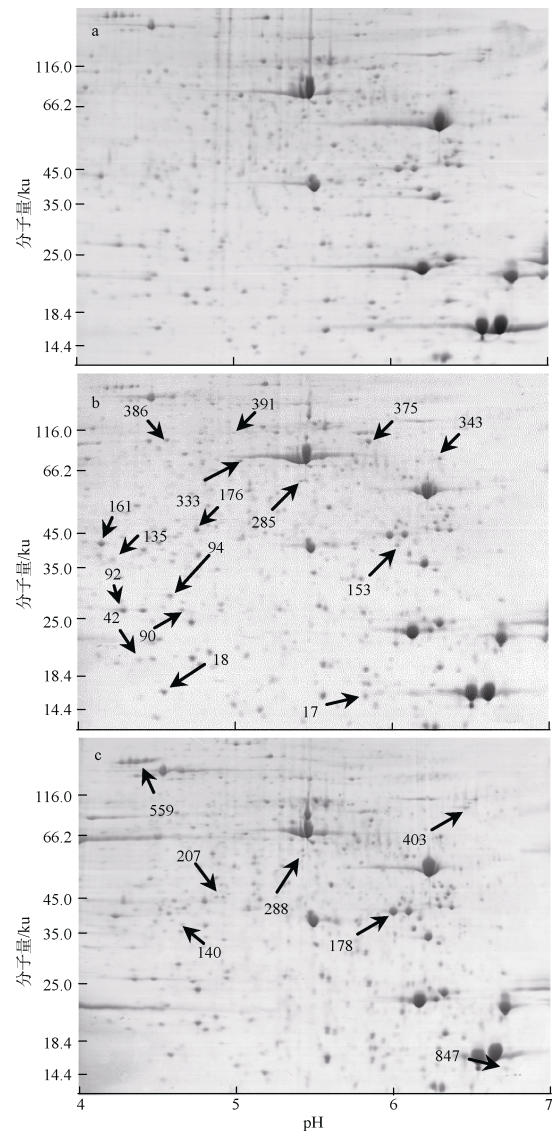


图 2 氨氮暴露后海水青鳞双向电泳图谱

a. 对照组; b. 0.6 mmol·L⁻¹ NH₄Cl 暴露组; c. 1.1 mmol·L⁻¹ NH₄Cl 暴露组

Fig. 2 Representative 2-DE images of proteins extracted from marine medaka in control group (a), exposed to 0.6 mmol·L⁻¹ NH₄Cl (b) and exposed to 1.1 mmol·L⁻¹ NH₄Cl (c)

质表达变化没有明显的剂量效应,而是有一定的浓度特异性(Ji et al, 2013a; Liu et al, 2013; Wu et al, 2013)。例如,在雄性贻贝 *Mytilus galloprovincialis* 鳃中,暴露于不同浓度四溴联苯醚(0、1、 $10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)后,低浓度暴露组有 7 种蛋白质表达变化,而高浓度暴露组有 3 种,其中只有一种蛋白质表达同时在两个暴露组发生明显变化(Ji et al, 2013a)。

长期氨氮暴露使海水青鳉产生氧化应激。过氧化氢还原酶是抗氧化蛋白中的一员,它可以保护机体不受活性氧自由基的攻击,从而防止 DNA 损伤(Arockiaraj et al, 2012)。在 $0.6\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl 暴露后的海水青鳉体内过氧化物氧化还原酶-5(peroxiredoxin-5)的表达明显增加(表 1),表明鱼体可以通过增加该酶的表达来减弱氧化应激。很多种鱼在氨氮暴露下会产生氧化应激,例如弹涂鱼 *Boleophthalmus boddarti*, 氨氮($8\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl , 48h 暴露)会引起鳃和大脑的氧化应激,因其参与氧化应激的蛋白的表达发生明显变化,如脂过氧化氢、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽等(Ching et al, 2009)。蛋白酶体(proteasome)是一种降解细胞内蛋白的多酶复合物,它可以通过水解蛋白来控制参与细胞周期和细胞凋亡的蛋白水平,从而维持机体稳态(Adams, 2004)。暴露于 $1.1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl 的海水青鳉的类蛋白酶体 β 亚基 4 (proteasome subunit beta type-4-like)表达水平显著上升(表 1),一方面说明高氨氮暴露可能导致海水青鳉细胞凋亡,另一方面说明鱼体可以通过提高蛋白酶体的表达积极应对外界高氨氮环境,从而减小氨氮对机体的损伤。胰蛋白酶原(trypsinogen)也是一种蛋白水解酶,对鱼类消化和生长起着重要作用。在斑马鱼中检测到 3 种胰蛋白酶的表达,它们除了分布在肠中,在脑中也均有表达,说明胰蛋白酶原除了具有消化吸收的功能,在神经系统的调节中也可能发挥着重要作用(陈文波等, 2013)。在人类和小鼠的研究中也发现,胰蛋白酶分布广泛,除了进行食物的消化吸收,它还参与许多病理过程,如炎症反应(Koshikawa et al, 1998)。而在 $1.1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氨氮暴露下,海水青鳉胰蛋白酶表达明显上升(表 1),可能是高氨氮引起鱼体炎症反应表现。

长期氨氮暴露影响海水青鳉细胞结构。透明质酸和蛋白聚糖连接多糖通过稳定透明质酸和硫酸软骨素蛋白多糖聚集体参与细胞外基质的组织完整性(Spicer et al, 2003; Rose-Martel, 2015)。在 0.6 和 $1.1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl 暴露下的海水青鳉的类透明质酸

和蛋白聚糖连接多糖 1(hyaluronan and proteoglycan link protein 1-like)表达均显著下降,前者下降 1.54 倍,后者下降 1.71 倍(表 1)。这表明氨氮会造成海水青鳉细胞结构的损伤,且氨氮暴露浓度越高,造成的损伤越大。

长期氨氮暴露影响海水青鳉的肌肉收缩功能。在 $0.6\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl 暴露下,海水青鳉的类原肌球蛋白 $\alpha 1$ 链亚型 4 (tropomyosin alpha-1 chain-like isoform 4)和肌钙蛋白 T, 类快骨骼肌型亚型 2 (troponin T, fast skeletal muscle isoforms-like)的表达均明显下调(表 1),说明了氨氮暴露可能会降低海水青鳉的运动能力。很多种鱼在氨氮暴露条件下,其运动能力受到限制。例如,虹鳉在高氨氮暴露($288\pm 15\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl)时,其游泳能力显著下降(Shingles et al, 2001),这可能是因为氨氮抑制了虹鳉体内参与肌肉收缩的蛋白的表达。而暴露于 $0.6\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl 的海水青鳉类丝切蛋白(cofilin-2-like)表达显著上升(表 1),该蛋白是一种肌动蛋白细胞动力学中的关键调节蛋白(Bobkov et al, 2006),该结果说明尽管海水青鳉运动能力受到影响,但在较低氨氮浓度暴露条件下,鱼体可以在细胞水平上进行一定程度的修复。

长期氨氮暴露影响海水青鳉的视觉通路。暴露在 $0.6\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl 的海水青鳉类中间丝蛋白 ON3 亚型 2(intermediate filament protein ON3-like isoform 2)表达明显上升(表 1)。在对金鱼的研究中发现类中间丝蛋白 ON3 主要分布在视神经细胞,是构成其视觉通路的重要结构蛋白(Giordano et al, 1989)。另外,与视觉有关的晶状体蛋白(α -晶状体 A 链(alpha-crystallin A chain),类 β -晶状体 B1 链(beta-crystallin B1-like)和类 β -晶状体 A2 链亚型 1(beta-crystallin A2-like isoform 1)表达水平也在该暴露浓度下均明显上升(表 1)。晶状体蛋白(crystallins)是晶状体中的主要结构蛋白,也是一种应激蛋白。它有两个基因家族: α -晶状体蛋白和 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白,其中 α -晶状体蛋白是防止异常蛋白质相互作用的分子伴侣,有重建和保护细胞骨架的功能,能抑制细胞凋亡。 $\beta\gamma$ -晶状体蛋白在晶状体发育过程中起重要作用(Andley, 2007)。因鱼类没有眼睑,所以眼球始终暴露于外界水环境,很容易受到水环境的影响。海水青鳉体内中间丝蛋白及晶状体蛋白的表达发生明显变化,表明氨氮可能引起了鱼体眼球的应激作用,而其又通过这些蛋白表达的增加来减弱氨氮引起的损伤。

表 1 长期氨氮暴露后海水青鳉体内差异表达蛋白质谱鉴定结果

Tab. 1 List of proteins which were differentially expressed in *O. melastigma* induced by chronic ammonia exposure

	蛋白 点数	组 别	蛋白名称	物种	序列号	分子量/u	等电点	蛋白 得分	序列 覆盖率	匹配 肽数	倍数 变化
氧化 应激	94	A	低分子量蛋白: 类线粒体的 过氧化物还原酶 5	青鳉	gi 432899770	20491	8.68	114	0.18	2	4.26
	140	B	类蛋白酶体 β 亚基 4	青鳉	gi 432881057	28758	6.32	138	0.20	3	2.58
	178	B	胰蛋白酶原	青鳉	gi 145966014	26708	5.16	255	0.12	1	1.63
细胞 结构	285	A	类透明质酸蛋白聚糖连接蛋白 1	青鳉	gi 432874420	37805	8.18	63	0.03	1	-1.54
	288	B	类透明质酸蛋白聚糖连接蛋白 1	青鳉	gi 432874420	37805	8.18	76	0.03	1	-1.71
肌肉 收缩	92	A	类丝切蛋白-2	青鳉	gi 432936587	18889	6.62	426	0.37	4	1.60
	343	A	类原肌球蛋白 $\alpha 1$ 链亚型 4	青鳉	gi 432861692	31829	4.77	268	0.19	3	-1.70
	333	A	肌钙蛋白 T, 类快骨骼肌型亚型 2	青鳉	gi 432860165	27699	9.41	96	0.10	2	-1.55
	403	B	类钙腔蛋白 B	青鳉	gi 432863493	29610	4.42	152	0.18	3	-1.92
视觉 通路	176	A	中间丝蛋白 ON3 亚型 2	青鳉	gi 432864505	57350	5.06	69	0.02	1	1.63
	90	A	α -晶状体 A 链	青鳉	gi 432958610	19919	5.95	184	0.44	6	1.70
	135	A	类 β -晶状体 B1 链	青鳉	gi 432878256	28885	8.36	70	0.23	4	4.88
	161	A	类 β -晶状体 A2 链亚型 1	青鳉	gi 432964694	23855	6.09	377	0.51	5	2.07
代 谢 调 节	17	A	14ku 载脂蛋白部分片段	海水青鳉	gi 328963182	11405	6.23	134	0.32	1	-1.53
	375	A	类线粒体 ATP 合成酶 β 亚基	青鳉	gi 432849647	55238	5.10	562	0.24	6	2.15
	386	A	类 α -烯醇酶	青鳉	gi 432866138	45323	6.36	431	0.30	5	1.99
	207	B	类异戊烯基二磷酸 Δ 异构酶 1	青鳉	gi 432927313	32545	6.06	110	0.23	3	-3.27
免 疫 调 节	153	A	类组织蛋白酶 B	青鳉	gi 432852559	37145	5.93	90	0.05	1	2.07
	42	A	类半乳凝素 9	青鳉	gi 432852360	23618	8.81	90	0.16	2	2.81
	559	B	类胎球蛋白 B	大黄鱼	gi 734621215	57367	5.99	63	0.01	1	2.75
神 经 毒 性	18	A	类 S100 蛋白 A	青鳉	gi 432908621	11360	5.62	60	0.08	1	1.90
	391	A	突触囊泡膜蛋白 VAT-1 同系物	青鳉	gi 432922308	46708	5.40	150	0.10	3	1.53
	847	B	类 S100B 亚型 1	青鳉	gi 432848584	11052	4.43	67	0.17	1	-2.70

注: 组 A: 0.6 mmol·L⁻¹ NH₄Cl 暴露组; 组 B: 1.1 mmol·L⁻¹ NH₄Cl 暴露组。

长期氨氮暴露影响海水青鳉的代谢调节。鱼类利用脂类作为主要的能量来源, 因此脂代谢对于维持鱼体体内稳态有重要作用(Kondo et al, 2005)。载脂蛋白具有转运脂类的功能, 并且对保持鳃上皮结构的完整性起决定性作用(Smith et al, 2005)。暴露于 0.6mmol·L⁻¹ NH₄Cl 的海水青鳉载脂蛋白片段(14ku) (14 ku apolipoprotein, partial)表达明显下降(表 1), 说明了氨氮暴露会破坏海水青鳉的能量产生。烯醇酶可以催化 2-磷酸甘油酸形成高能化合物磷酸烯醇式丙酮酸, 是糖酵解中的关键酶。类 α 烯醇酶 (α -enolase-like)在 0.6mmol·L⁻¹ NH₄Cl 暴露条件下表达明显上升, 说明了在脂质代谢受到抑制的情况下, 海水青鳉可能通过糖酵解来提供能量。同时该浓度氨氮暴露下的鱼体内类线粒体 ATP 合成酶 β 亚基(ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like)表

达也明显上调, 说明体内 ATP 合成增加, 从而证明海水青鳉在氨氮胁迫下虽然通过脂代谢提供能量的途径受损, 但是它可以通过增加糖代谢来增加能量的产生, 以此对抗外界高氨氮环境。异戊烯基二磷酸 Δ 异构酶参与催化类异戊二烯的生物合成, 并且是合成多种必需细胞代谢物, 包括多萜醇, 维生素 A、D、E 和 K, 固醇, 胆固醇, 类固醇激素和胆汁酸的酶(Oleksiak, 2008)。暴露于 1.1mmol·L⁻¹ NH₄Cl 的海水青鳉的类异戊烯基二磷酸 Δ 异构酶 1(isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1-like)表达下降了 3.27 倍(表 1), 说明海水青鳉体内脂类代谢明显受到抑制。两个暴露组的海水青鳉体内脂类代谢均受到抑制, 说明氨氮暴露会严重影响鱼类的能量产生, 进而引起其他代谢的紊乱。

长期氨氮暴露引起鱼体细胞凋亡并引起免疫反

应。本研究发现,两个不同氨氮暴露组的海水青鳉类组织蛋白酶 B(cathepsin B-like)、类半凝乳素(galectin-9-like)和类胎球蛋白 B(fetuin-B-like)表达均明显上调(表 1)。其中,组织蛋白酶 B(cathepsin B)是一种半胱氨酸蛋白酶,除了参与蛋白周转,它在生理和病理过程中也发挥着重要作用;其次,它还参与细胞凋亡过程(Conus et al, 2008)。胎球蛋白(fetuin)则是半胱氨酸蛋白酶抑制剂。Galectin-9 在小鼠中有引起细胞凋亡的作用(Wada et al, 1997a, b),这几种蛋白的表达的上调说明了高氨氮暴露引起了海水青鳉的氧化应激,而鱼体也调动了免疫系统进行调节。同样,高氨氮暴露会引起河豚 *Takifugu obscuru* 细胞内活性氧自由基的产生并导致细胞凋亡。另外,氨氮暴露还会提高 *T. obscurus* 体内与炎症相关的细胞因子的表达,说明先天性免疫系统在氨氮暴露时发挥着重要作用(Cheng et al, 2015)。

长期氨氮暴露引起海水青鳉的神经毒性。蛋白 S100A1 和 S100B 属于 Ca^{2+} 结合蛋白家族,可以与转录因子或酶结合,调节细胞骨架组成、蛋白磷酸化和细胞周期进行(Adami et al, 2001)。它们在哺乳动物星型细胞和横纹肌细胞中广泛分布,并可通过与微管壁相互作用引起微管分解,从而引起神经毒性(Sorci et al, 2000)。低浓度氨氮暴露引起海水青鳉类 S100A1(S100A1-like)表达明显升高,说明该浓度的氨氮可能引起海水青鳉的神经毒性。而高浓度氨氮暴露引起海水青鳉 S100B-like 表达明显下降,说明高浓度氨氮破坏了鱼体正常的细胞骨架组成或影响了细胞周期的正常调控(Kosenko et al, 1999),从而导致细胞凋亡。氨氮通过干扰神经系统对所有的脊椎动物产生毒性(Randall et al, 2002)。在 $0.6\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl 暴露下的海水青鳉的突触囊泡膜蛋白 VAT-1 同系物(synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog)表达显著提升(表 1),而突触泡位于神经末梢用于调节神经递质储存和释放(Zimmermann, 1982)。突触泡膜蛋白的表达的增加说明氨氮暴露可能增加了鱼体神经细胞内神经递质的释放,从而可能导致 Ca^{2+} 大量内流,产生过多自由基从而损伤神经细胞(Hernández-Fonseca et al, 2008)。

综上所述,氨氮暴露对海水青鳉产生的毒性效应,可能是外界氨氮使鱼体内氧化自由基增加,引起氧化应激,从而破坏细胞结构,引起蛋白损伤,导致免疫调节、代谢调节的紊乱,引发神经毒性,最终引起细胞凋亡并导致机体死亡。基于我们的研究

结果,我们总结了长期氨氮暴露对海水青鳉的毒性机制假设模型(图 3)。模型显示高浓度氨氮损伤能量代谢,在鱼体中产生活性氧自由基(ROS)。机体是一个复杂而又统一的有机体,鱼体产生的 ROS,引起鱼体氧化应激并导致机体免疫调节紊乱,蛋白结构损伤,代谢紊乱,破坏细胞结构,引起神经毒性等,最终导致细胞凋亡。

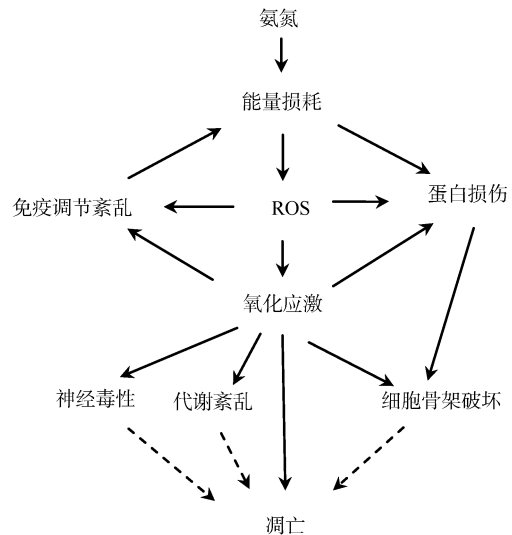


图 3 长期氨氮暴露对海水青鳉产毒性效应的机制假设模型

Fig. 3 The hypothetical model of the toxicity mechanism in the marine medaka to chronic ammonia exposure

3 结论与展望

本文将海水青鳉分别暴露于 0.6 和 $1.1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4Cl 的海水环境中 1 个月,死亡率的结果直接说明了长期高氨氮暴露对海水青鳉的毒性作用。我们接着利用蛋白质组学的研究技术研究长期氨氮暴露后海水青鳉体内蛋白质的变化,并从分子和细胞水平上阐述了长期氨氮暴露对海水青鳉的毒性效应机制。这在水产养殖业中具有重要的指导作用,而且对于生态环境保护也具有重要意义。

利用蛋白质组学的方法可以成功地鉴定出高浓度氨氮暴露前后海水青鳉体内发生显著变化的蛋白质,为揭示海水青鳉应对长期氨氮暴露的生理毒理响应机制提供了基础。然而由于蛋白质与生物机体的复杂关系,利用蛋白质组学的方法鉴定的蛋白种类多样,如何从这些差异蛋白中筛选出引起生物毒理效应的关键蛋白仍有待进一步研究。结合分子生物学的方法,通过设立不同的环境污染浓度梯度,分析各差异蛋白相应基因的表达变化将是进一步确定引起生物生理毒理效应的有效方法之一。

参考文献 References

- 陈文波, 李卫国, 张珍, 等, 2013. 斑马鱼 3 种胰蛋白酶原基因的克隆、序列分析及组织表达[J]. 中山大学学报(自然科学版), 52(1): 111–117. CHEN WENBO, LI WEIGUO, ZHANG ZHEN, et al, 2013. Molecular cloning, sequence analysis and tissue expression of three forms trypsinogens in zebrafish, *Danio rerio*[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 52(1): 111–117 (in Chinese with English abstract).
- ACKERMAN P A, WICKS B J, IWAMA G K, et al, 2006. Low levels of environmental ammonia increase susceptibility to disease in Chinook salmon smolts[J]. Physiological and Biochemical Zoology, 79(4): 695–707.
- ADAMI C, SORCI G, BLASI E, et al, 2001. S100B expression in and effects on microglia[J]. GLIA, 33(2): 131–142.
- ADAMS J, 2004. The proteasome: A suitable antineoplastic target[J]. Nature Reviews Cancer, 4(5): 349–360.
- AHSAN N, RENAUT J, KOMATSU S, 2009. Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals[J]. Proteomics, 9(10): 2602–2621.
- ANDLEY U P, 2007. Crystallins in the eye: function and pathology[J]. Progress in Retinal and Eye Research, 26(1): 78–98.
- AROCKIARAJ J, EASWVARAN S, VANARAJA P, et al, 2012. Immunological role of thiol-dependent peroxiredoxin gene in *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 33(1): 121–129.
- BOBKOV A A, MUHLRAD A, PAVLOV D A., et al, 2006. Cooperative effects of cofilin (ADF) on actin structure suggest allosteric mechanism of cofilin function[J]. Journal of Molecular Biology, 356(2): 325–334.
- CHEN J C, LIU P C, LIN Y T, et al, 1988. Super intensive culture of red-tailed shrimp *Penaeus penicillatus*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 19(3): 127–131.
- CHENG CHANGHONG, YANG FANGFANG, LING RENZHI, et al, 2015. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*)[J]. Aquatic Toxicology, 164: 61–71.
- CHING BIYUN, CHEW S F, WONG W P, et al, 2009. Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (mudskipper)[J]. Aquatic Toxicology, 95(3): 203–212.
- CHOI J W, LIU HAO, SONG H, et al, 2012. Plasma marker proteins associated with the progression of lung cancer in obese mice fed a high-fat diet[J]. Proteomics, 12(12): 1999–2013.
- CONUS S, SIMON H U, 2008. Cathepsins: Key modulators of cell death and inflammatory responses[J]. Biochemical Pharmacology, 76(11): 1374–1382.
- DOSDAT A, PERSON-LE RUYET J, COVÈS, et al, 2003. Effect of chronic exposure to ammonia on growth, food utilisation and metabolism of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. Aquatic Living Resources, 16(6): 509–520.
- EDDY F B, 2005. Ammonia in estuaries and effects on fish[J]. Journal of Fish Biology, 67(6): 1495–1513.
- FEDORENKOVA A, VONK J A, LENDERS H J R, et al, 2010. Ecotoxicogenomics: Bridging the gap between genes and populations[J]. Environmental Science & Technology, 44(11): 4328–4333.
- GIORDANO S, GLASGOW E, TESSER P, et al, 1989. A type II keratin is expressed in glial cells of the goldfish visual pathway[J]. Neuron, 2(5): 1507–1516.
- HERNÁNDEZ-FONSECA K, CÁRDENAS-RODRÍGUEZ N, PEDRAZA-CHAVERRI J, et al, 2008. Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons[J]. Journal of Neuroscience Research, 86(8): 1768–1780.
- IVANČIČ I, DEGOBBIS D, 1984. An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by the indophenol blue method[J]. Water Research, 18(9): 1143–1147.
- JI CHENGLONG, WU HUIFENG, WEI LEI, et al, 2013a. Proteomic and metabolomic analysis reveal gender-specific responses of mussel *Mytilus galloprovincialis* to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE 47)[J]. Aquatic Toxicology, 140–141: 449–457.
- JI CHENGLONG, WU HUIFENG, WEI LEI, et al, 2013b. Responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenges by metabolomics and proteomics[J]. Fish & Shellfish Immunology, 35(2): 489–498.
- KONDO H, MORINAGA K, MISAKI R, et al, 2005. Characterization of the pufferfish *Takifugu rubripes* apolipoprotein multigene family[J]. Gene, 346: 257–266.
- KOSENKO E, KAMINSKI Y, LOPATA O, et al, 1999. Blocking NMDA receptors prevents the oxidative stress induced by acute ammonia intoxication[J]. Free Radical Biology and Medicine, 26(11–12): 1369–1374.
- KOSHIKAWA N, HASEGAWA S, NAGASHIMA Y, et al, 1998. Expression of trypsin by epithelial cells of various tissues, leukocytes, and neurons in human and mouse[J]. The

- American Journal of Pathology, 153(3): 937–944.
- KUMAR S, SHARMA J G, CHAKRABARTI R, 2007. Acute toxicity of ammonia to a freshwater teleost, *Labeo bata* larvae[J]. Toxicological & Environmental Chemistry, 89(2): 327–336.
- LEMOS M F L, SOARES A M V M, CORREIA A C, et al, 2010. Proteins in ecotoxicology-how, why and why not?[J]. Proteomics, 10(4): 873–887.
- LIEW H J, SINHA A K, NAWATA C M, et al, 2013. Differential responses in ammonia excretion, sodium fluxes and gill permeability explain different sensitivities to acute high environmental ammonia in three freshwater teleosts[J]. Aquatic Toxicology, 126: 63–76.
- LIU XIOLI, WU HUIFENG, JI CHENGLONG, et al, 2013. An integrated proteomic and metabolomic study on the chronic effects of mercury in *Suaeda salsa* under an environmentally relevant salinity[J]. PLoS One, 8(5): e64041.
- OLEKSIAK M F, 2008. Changes in gene expression due to chronic exposure to environmental pollutants[J]. Aquatic Toxicology, 90(3): 161–171.
- PERSON-LE RUYET J, CHARTOIS H, QUEMENER L, 1995. Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response[J]. Aquaculture, 136(1–2): 181–194.
- RANDALL D J, TSUI T K N, 2002. Ammonia toxicity in fish. Marine Pollution Bulletin, 45(1–2): 17–23.
- ROSE-MARTEL M, SMILEY S, HINCKE M T, 2015. Novel identification of matrix proteins involved in calcitic biomineralization[J]. Journal of Proteomics, 116: 81–96.
- SANTOS E M, BALL J S, WILLIAMS T D, et al, 2010. Identifying health impacts of exposure to copper using transcriptomics and metabolomics in a fish model[J]. Environmental Science & Technology, 44(2): 820–826.
- SHINGLES A, MCKENZIE D J, TAYLOR E W, et al, 2001. Effects of sublethal ammonia exposure on swimming performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Journal of Experimental Biology, 204(15): 2691–2698.
- SINHA A K, ABDELGAWAD H, GIBLEN T, et al, 2014. Anti-oxidative defences are modulated differentially in three freshwater teleosts in response to ammonia-induced oxidative stress[J]. PLoS One, 9(4): e95319.
- SINHA A K, DIRICX M, CHAN L P, et al, 2012. Expression pattern of potential biomarker genes related to growth, ion regulation and stress in response to ammonia exposure, food deprivation and exercise in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Aquatic Toxicology, 122–123: 93–105.
- SMITH R W, WOOD C M, CASH P, et al, 2005. Apolipoprotein AI could be a significant determinant of epithelial integrity in rainbow trout gill cell cultures: A study in functional proteomics[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 1749(1): 81–93.
- SORCI G, AGNELETTI A L, DONATO R, 2000. Effects of S100A1 and S100B on microtubule stability. An *in vitro* study using triton-cytoskeletons from astrocyte and myoblast cell lines[J]. Neuroscience, 99(4): 773–783.
- SPICER A P, JOO A, BOWLING JR R A, 2003. A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chondroitin sulfate proteoglycan core protein genes: the missing links[J]. Journal of Biological Chemistry, 278(23): 21083–21091.
- TIAN LI, WANG MINGHUA, LI XIAOMIN, et al, 2011. Proteomic modification in gills and brains of medaka fish (*Oryzias melastigma*) after exposure to a sodium channel activator neurotoxin, brevetoxin-1[J]. Aquatic Toxicology, 104(3–4): 211–217.
- WADA J, KANWAR Y S, 1997a. Identification and characterization of galectin-9, a novel β -galactoside-binding mammalian lectin[J]. Journal of Biological Chemistry, 272(9): 6078–6086.
- WADA J, OTA K, KUMAR A, et al, 1997b. Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin[J]. Journal of Clinical Investigation, 99(10): 2452–2461.
- WOOD C M, NAWATA C M, 2011. A nose-to-nose comparison of the physiological and molecular responses of rainbow trout to high environmental ammonia in seawater versus freshwater[J]. Journal of Experimental Biology, 214(21): 3557–3569.
- WU HUIFENG, LIU XIAOLI, ZHANG XINGYAN, et al, 2013. Proteomic and metabolomic responses of clam *Ruditapes philippinarum* to arsenic exposure under different salinities[J]. Aquatic Toxicology, 136–137: 91–100.
- ZIMMERMANN H, 1982. Biochemistry of the isolated cholinergic vesicles[M]//KLEIN R L, LAGERCRANTZ H, ZIMMERMANN H. Neurotransmitter Vesicles. New York: Academic, 271: 304.