

三(2-氯乙基)磷酸酯(TCEP)对大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)免疫相关 基因表达的影响

刘 聪¹, 衣 丹², 柴迎梅¹, 丛柏林^{2*}

(1. 山东大学 海洋学院, 山东 威海 264200;

2. 自然资源部第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘 要: 三(2-氯乙基)磷酸酯(Tris(2-carboxyethyl)phosphine, TCEP)是一种新型内分泌干扰物(Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs), 低剂量就会造成很强的生物毒性。通过研究不同质量浓度梯度的 TCEP 对养殖大菱鲆的胁迫, 发现其在 24 h、48 h、72 h 和 96 h 的半致死浓度(LC₅₀)分别为 190.76 mg/L、159.94 mg/L、140.70 mg/L 和 110.71 mg/L; 安全浓度(SC)为 33.60 mg/L。24 h 内不同质量浓度梯度的 TCEP 和不同胁迫时间对养殖大菱鲆的影响表明, 高于质量浓度 33.60 mg/L 的 TCEP 对大菱鲆具有急性毒性效应。用实时荧光定量 PCR 技术分析 TCEP 急性胁迫的养殖大菱鲆体内 2 种细胞免疫因子——组织相容性复合体 α (MHC-II α)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的基因相对表达水平, 发现经 TCEP 胁迫后 2 种细胞免疫因子的表达量都显著上调; 随 TCEP 的质量浓度升高, 特别是达到 47.69 mg/L($\frac{1}{4}$ LC₅₀)以上时表达量的变化更加明显; 而胁迫时间超过 12 h, 基因表达量会呈现先上升后下降的趋势, 说明对大菱鲆免疫系统造成急性损伤。研究结果可为大菱鲆健康养殖提供参考, 并为环境污染物检测提供分子标记参考。

关键词: 三(2-氯乙基)磷酸酯(TCEP); 大菱鲆; 半致死浓度(LC₅₀); 免疫相关基因

中图分类号: P735; Q754

文献标志码: A

文章编号: 1671-6647(2022)03-0473-11

doi: 10.12362/j.issn.1671-6647.20201015001

引用格式: 刘聪, 衣丹, 柴迎梅, 等. 三(2-氯乙基)磷酸酯(TCEP)对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)免疫相关基因表达的影响[J]. 海洋科学进展, 2022, 40(3): 473-483. LIU C, YI D, CHAI Y M, et al. Effects of TCEP on immune-related functional gene in *Scophthalmus maximus*[J]. Advances in Marine Science, 2022, 40(3): 473-483.

三(2-氯乙基)磷酸酯(Tris(2-carboxyethyl)phosphine, TCEP), 分子式为 C₆H₁₂Cl₃O₄P, 分子量为 285.31, 属于有机磷酸酯(organophosphate esters, OPEs)。2017 年 7 月底 TCEP 在内的 7 种有机磷酸酯类阻燃剂被联合国环境署国际化学污染小组列在 45 种内分泌干扰物(Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs)清单中^[1]。EDCs 作为类激素, 在生物体内较低剂量也能产生较强的生物学效应^[2]。多种 EDCs 通过各种途径汇集于水体环境后会通过食物链的生物浓缩和放大效应对水体生物和养殖动物产生影响^[3]。目前随着使用量的增加及在不同水体环境中的积累, TCEP 已成为各水系中普遍存在的新型污染物, 其危害已被广泛关注^[4-9]。目前包括 TCEP 在内的 OPEs 类化合物的毒性研究刚刚开始, 相应的环境质量标准的缺乏阻碍了对这类化合物进行高效化学污染管理。而 TCEP 这类物质在自然界中稳定存在, 且能毒性累积, 针对其大量使用的现状, 我们急需认清 TCEP 的环境毒性^[10]。TCEP 可对多种生物产生危害, 如 TCEP 会造成鱼类内分泌干扰毒性以

收稿日期: 2020-10-15

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目——内分泌干扰物对海水养殖大菱鲆的生物学效应研究 (GY0218Q03)

作者简介: 刘 聪(1995—), 男, 硕士研究生, 主要从事鱼类免疫方面研究. E-mail: excong@163.com

* 通信作者: 丛柏林(1980—), 男, 副研究员, 博士, 主要从事鱼类免疫方面研究. E-mail: biolin@fio.org.cn

(高 峻 编辑)

及神经毒性^[11-12],还会造成鲑鱼(*Oncorhynchus keta*)氧化应激反应和脂质过氧化^[13-14]。在无脊椎动物中,TCEP会造成线虫(*Caenorhabditis Elegans*)运动能力下降,损害线虫神经元,同时具有诱发帕金森病的神经毒性^[15]。在哺乳动物中,TCEP可造成大鼠(*Rattus norvegicus*)肝肾免疫器官毒理损伤^[16],造成小鼠(*Mus culus*)氧化应激和内分泌紊乱^[17]。由此可见,TCEP可造成多种动物内分泌干扰及免疫器官损害。

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)俗称“多宝鱼”,肉质鲜嫩、营养高、易消化、经济效益高,是国内外公认的优质海水养殖鱼类^[18-19]。它属冷水性鱼类,对海水水质要求较高^[20]。随着工业及生活污水排放量的增加,海水中累积的各类污染物给大菱鲆养殖行业带来了严重威胁。目前,常见的农药残留、重金属污染等危害已被广泛关注和研究,并采取了相应解决措施,而近些年来出现的新型污染物对大菱鲆养殖业的潜在危害尚未被完全认知。TCEP对大菱鲆免疫的影响尚未见报道。

近年来随着TCEP使用量增加,在海水中监测到的积累量不断升高,对大菱鲆等海水养殖鱼类的威胁性增加。我们通过测定大菱鲆的TCEP半致死浓度(lethal concentration 50%, LC_{50})^[21]以及安全浓度(safe concentration, SC)^[21],评估TCEP对大菱鲆的生物毒性效应,这是毒理学研究的有效方法。已有研究表明,肿瘤坏死因子 α (TNF- α)基因在脂多糖LPS刺激虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)巨噬细胞反应和组织相容性复合体 α (MHC-II α)基因表达时起增强剂的作用^[22]。在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、金枪鱼(*Thunnus albacores*)和斑马鱼(*Danio rerio*)等硬骨鱼不同器官中,MHC-II α 和TNF- α 的基因表达具有相关性^[23-25]。所以我们将免疫相关因子MHC-II α 和TNF- α ^[26-29]作为共同生物标志物,评估TCEP对大菱鲆免疫系统的影响。以期为大菱鲆健康养殖提供科学依据,为大菱鲆环境污染物检测提供分子标记参考。

1 材料和方法

1.1 样品和试剂

实验用大菱鲆于2019年10月11日购于山东烟台宗哲水产养殖公司,大菱鲆幼鱼先后2批共400条,生长期4个月,未达到性成熟,单条体长(17 ± 2) cm,体重(56 ± 4) g,用于测定半致死浓度 LC_{50} 及免疫相关基因变化;大菱鲆成鱼1批,共50条,生长期1 a,已达到性成熟,单条体重约600 g,约为幼鱼的10倍,用于测定半致死浓度 LC_{50} 。实验用海水在胶州湾岸边由水泵抽取,并用纱布进行过滤除去杂质。实验室内大菱鲆的培养条件为盐度(34.2 ± 0.2)、温度(16 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、pH(7.8 ± 0.2)、溶氧质量浓度(7.5 ± 0.2) mg/L。在实验室培养条件下养殖7 d后开始实验,利用TCEP进行胁迫处理。实验开始前2 d停止喂食,停食期间大菱鲆无死亡。实验动物处置方法符合动物伦理学标准。三(2-氯乙基)磷酸酯(TCEP)购于上海麦克林生化科技有限公司,纯度99%(CAS编号:115-96-8)。

1.2 TCEP对大菱鲆的半致死浓度 LC_{50} 和安全浓度的测定

半致死浓度(LC_{50})是衡量水体中污染物对生物毒性大小的重要参数,安全浓度(SC)是指长期暴露但不会产生不良效应的指标。

2003年Fisk等研究添加TCEP对鱼类96 h的 LC_{50} 数据范围为6.30~250.00 mg/L^[30]。我们在此基础上进行了预实验,并结合所购买的TCEP的质量浓度(1.39 g/mL),将实验组TCEP质量浓度分别设定为83.40 mg/L、97.30 mg/L、132.10 mg/L、152.90 mg/L、187.70 mg/L、197.40 mg/L和228.20 mg/L。取8个68 L培养箱,分别注入30 L过滤海水,每个培养箱放置10条大菱鲆幼鱼,实验组加入不同质量浓度梯度的TCEP,对照组不添加TCEP。添加TCEP时少量多次添加、不断搅拌致溶液呈透明,水面无油滴状,保证其在海水中充分溶解。在实验过程中实验组每隔24 h观测记录一次大菱鲆的死亡率,对照组大菱鲆未出现死亡现象。

统计不同质量浓度梯度TCEP处理大菱鲆幼鱼24 h、48 h、72 h和96 h时的死亡数量,通过寇氏法^[31]计

算半致死浓度 LC_{50} 及标准误。采用 24 h 时幼鱼的 TCEP 半致死浓度对 40 条大菱鲆成鱼进行毒性试验。安全浓度(SC, mg/L)采用 Turubell 氏公式^[31] 计算:

$$\rho_{sc} = 0.3B/(A/B)^2, \quad (1)$$

式中: A 为 24 h LC_{50} ; B 为 48 h LC_{50} 。数据统计和计算采用 Excel 软件^[32], 数值=平均值 $\pm$ 标准差($n=3$)。

1.3 MHC-II α 和 TNF- α 基因表达的测定

鱼类主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)参与调节机体免疫和激发机体特异性免疫反应^[26]。MHC II 类分子不仅能识别和清除抗原, 还参与和调控机体免疫应答反应^[27]。鱼类 MHC II 类分子主要由 α 链和 β 链异二聚体组成, 与哺乳动物的 MHC-II α 在跨膜区保守区存在差异^[28]。肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 主要存在于动物血清中, 具有杀伤肿瘤细胞、抑制肿瘤细胞增殖的作用^[29]。

根据我们测定获得的 24 h 时 TCEP LC_{50} , 设置实验组的 TCEP 质量浓度分别为 23.85 mg/L($\frac{1}{8} LC_{50}$)、47.69 mg/L($\frac{1}{4} LC_{50}$)和 95.38 mg/L($\frac{1}{2} LC_{50}$), 设不添加 TCEP 的海水对照组。每个箱内放入 14 条大菱鲆幼鱼。在 TCEP 处理 3 h、6 h、12 h 和 24 h 后, 从各实验组随机捞取 3 条幼鱼, 经 20 mg/L 丁香酚麻醉后^[33], 取脾脏、头肾、鳃和肠, 取样后将 3 条鱼的相同组织混合, 立刻用液氮冷冻。采用 Trizol[®] Reagent(上海 Invitrogen 公司生产, 编号 15 596 026)和 PrimeScript RT[®] reagent kit with gDNA Eraser(大连 Takara 公司生产, 编号 RR047A), 参照说明书提取大菱鲆幼鱼的 mRNA 并反转录为 cDNA。

利用 Primer5.0 软件设计 β -actin, MHC-II α 和 TNF- α 基因(Gene Bank 序列号分别为 AY008305.1, DQ094170.1, FJ654645.1)的引物^[34]: β -actin F: TGTCCCTGTATGCCTCTGGTCG, β -actin R: CAGTGGTGGTGAAGGAGTAGCC, MHC-II α F: CTCAACATTCCCTATCCCAACA, MHC-II α R: CAATAGTCAGACCCAGTCCACA, TNF- α F: CACAG GATATGGCGGTACTCG, TNF- α R: AGCTCGGACAGCATGTTGGT。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

将同一条件下处理的 3 条幼鱼不同组织所获得的 cDNA 混合后作为模板, 采用 MX3005P 荧光定量仪(美国 Stratagene 公司生产)进行实时荧光定量 PCR(quantitative reverse transcription-PCR, qRT-PCR)分析。采用 SYBR Premix Ex Taq II(大连 Takara 公司生产, 编号 RR820A)试剂盒, 扩增体系: SYBR[®] Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus)(2 $\times$), 10 μ L; PCR Forward Primer(10 μ mol/L), 0.8 μ L; PCR Reverse Primer(10 μ mol/L), 0.8 μ L; ROX Reference Dye(50 $\times$), 0.4 μ L; 1 $\times$ DNA 模板, 2.0 μ L; dH₂O(灭菌蒸馏水)6.0 μ L; 总计 20.0 μ L 的体系。扩增条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 40 个循环; 熔解曲线分析 95 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 30 s。采用 MxPro 软件包对溶解曲线进行数据采集和结果分析^[35], MHC-II α , TNF- α 和 β -actin 基因的溶解曲线呈单一峰值, 且荧光定量 Ct 值范围为 15~35, 说明 qRT-PCR 实验体系可靠。以 β -actin 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[36] 计算 MHC-II α 和 TNF- α 基因相对表达量, 数值=平均值 $\pm$ 标准差($n=3$)。采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行 t 检验^[37], $p<0.05$ 为显著性差异, $p<0.01$ 为极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 TCEP 对大菱鲆的 LC_{50} 和安全浓度的影响

不同质量浓度梯度 TCEP 条件下 24 h、48 h、72 h 和 96 h 的大菱鲆幼鱼死亡率数据见表 1。幼鱼死亡率随 TCEP 质量浓度的增加而升高。24 h、48 h、72 h 和 96 h 时大菱鲆幼鱼死亡率曲线见图 1。

通过寇氏法^[31] 计算表中数据可知, 大菱鲆幼鱼在 TCEP 处理 24 h、48 h、72 h 和 96 h 时的 LC_{50} 分别为 190.76 mg/L(24 h)、159.94 mg/L(48 h)、140.70 mg/L(72 h)和 110.71 mg/L(96 h)。标准误分别为 0.027 2、0.012 1、0.012 0、0.015 4。对照组大菱鲆幼鱼无死亡现象。以 190.76 mg/L 质量浓度的 TCEP 处理大菱鲆成鱼 24 h 时,

其死亡数量正好达到全部大菱鲆成鱼数量的 50%，说明大菱鲆成鱼和幼鱼的 LC_{50} 相当。根据 Turubell 氏公式计算得 ρ_{sc} 为 33.60 mg/L。

表 1 不同质量浓度梯度 TCEP 胁迫大菱鲆幼鱼的死亡率
Table 1 Death rate of juvenile *Scophthalmus maximus* treated with different mass concentrations gradient of TCEP

$\rho_{TCEP}/(mg \cdot L^{-1})$	死亡率/%			
	24 h	48 h	72 h	96 h
83.40	0	0	0	0
97.30	0	0	0	30
132.10	0	0	20	80
152.90	0	40	80	100
187.70	30	90	100	100
197.40	70	100	100	100
228.20	100	100	100	100

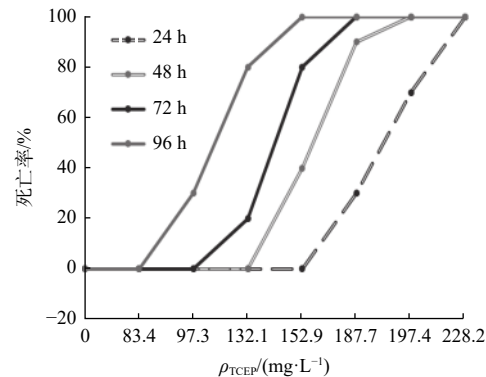


图 1 不同 TCEP 质量浓度梯度和处理时间对大菱鲆幼鱼死亡率的影响
Fig. 1 Effect of TCEP concentrations and treatment times on the mortality rate of *Scophthalmus maximus*

2.2 TCEP 对大菱鲆幼鱼 $MHC-II \alpha$ 和 $TNF-\alpha$ 基因表达的影响

2.2.1 $MHC-II \alpha$ 基因的表达

添加不同质量浓度 TCEP 胁迫处理的大菱鲆免疫相关组织中 $MHC-II \alpha$ 基因表达变化如图 2 所示。分别添加 23.85 mg/L、47.69 mg/L 和 95.38 mg/L 的 TCEP 后，3 h、6 h、12 h 和 24 h 时内大菱鲆幼鱼脾脏、头肾、鳃和肠组织中的 $MHC-II \alpha$ 基因相对表达量较对照组都显著或极显著提高。

在脾脏中，随 TCEP 质量浓度升高和胁迫时间延长， $MHC-II \alpha$ 基因相对表达量总体上呈现上升趋势；TECP 质量浓度为 47.69 mg/L ($\frac{1}{4} LC_{50}$) 和 95.38 mg/L ($\frac{1}{2} LC_{50}$) 的处理组的上升幅度高于 23.85 mg/L ($\frac{1}{8} LC_{50}$) 的处理组。脾脏中胁迫 3 h 时 TCEP 质量浓度为 47.69 mg/L ($\frac{1}{4} LC_{50}$) 的处理组 $MHC-II \alpha$ 表达上升极显著 ($p < 0.01$)，TCEP 质量浓度为 95.38 mg/L ($\frac{1}{2} LC_{50}$) 的处理组 $MHC-II \alpha$ 表达显著上升 ($p < 0.05$)；胁迫 6 h 时与 3 h 时类似，但是 TCEP 质量浓度为 95.38 mg/L ($\frac{1}{2} LC_{50}$) 的处理组 $MHC-II \alpha$ 表达上升极显著 ($p < 0.01$)；胁迫 12 h 时，只有在 95.38 mg/L ($\frac{1}{2} LC_{50}$) 的处理组 $MHC-II \alpha$ 表达上升极显著；TCEP 质量浓度为 95.38 mg/L ($\frac{1}{2} LC_{50}$) 的处理组中，24 h 时表达量达到最高值。

在头肾组织中， $MHC-II \alpha$ 基因相对表达量总体上呈现上升趋势，在 TCEP 质量浓度为 23.85 mg/L ($\frac{1}{8} LC_{50}$) 的处理组中上升幅度最大，在 24 h 时相对表达量达到最高值。在鳃组织中， $MHC-II \alpha$ 基因相对表达量总体上呈现先上升后下降和持续上升两种分化趋势，在胁迫 6 h 时 47.69 mg/L 和 95.38 mg/L 的处理组中达到最高值，但随着时间延长，12 h 以后相对表达量开始下降，在 TCEP 质量浓度为 23.85 mg/L ($\frac{1}{8} LC_{50}$) 和 47.69 mg/L ($\frac{1}{4} LC_{50}$) 的处理组 $MHC-II \alpha$ 表达上升极显著 ($p < 0.01$)，而 TCEP 质量浓度为 95.38 mg/L ($\frac{1}{2} LC_{50}$) 的处理组 $MHC-II \alpha$ 表达上升 ($p < 0.05$)；胁迫 24 h 与胁迫 12 h 的趋势变化一致。在肠组织中 $MHC-II \alpha$ 基因相对表达量总体上呈现先上升后下降的趋势，在 47.69 mg/L ($\frac{1}{4} LC_{50}$) 处理组中变化幅度较大，3 h 的相对表达量与 6 h 相近，6 h 时相对表达量达到最高值，在 24 h 时相对表达量降低。在受到 TCEP 胁迫后，实验组中 $MHC-II \alpha$ 基因的表达量显著提高，随 TCEP 的质量浓度升高， $MHC-II \alpha$ 基因在较高浓度 47.69 mg/L ($\frac{1}{4} LC_{50}$) 和 95.38 mg/L ($\frac{1}{2} LC_{50}$) 的处理组中表达量变化明显，反映出高质量浓度的 TCEP 对免疫系统的影响更明显；而在胁迫时间超过 12 h 时，表达量呈现出先上升后下降的趋势，可能是免疫系统受到的损伤无法及时复原，导致免疫反应的强度下降。

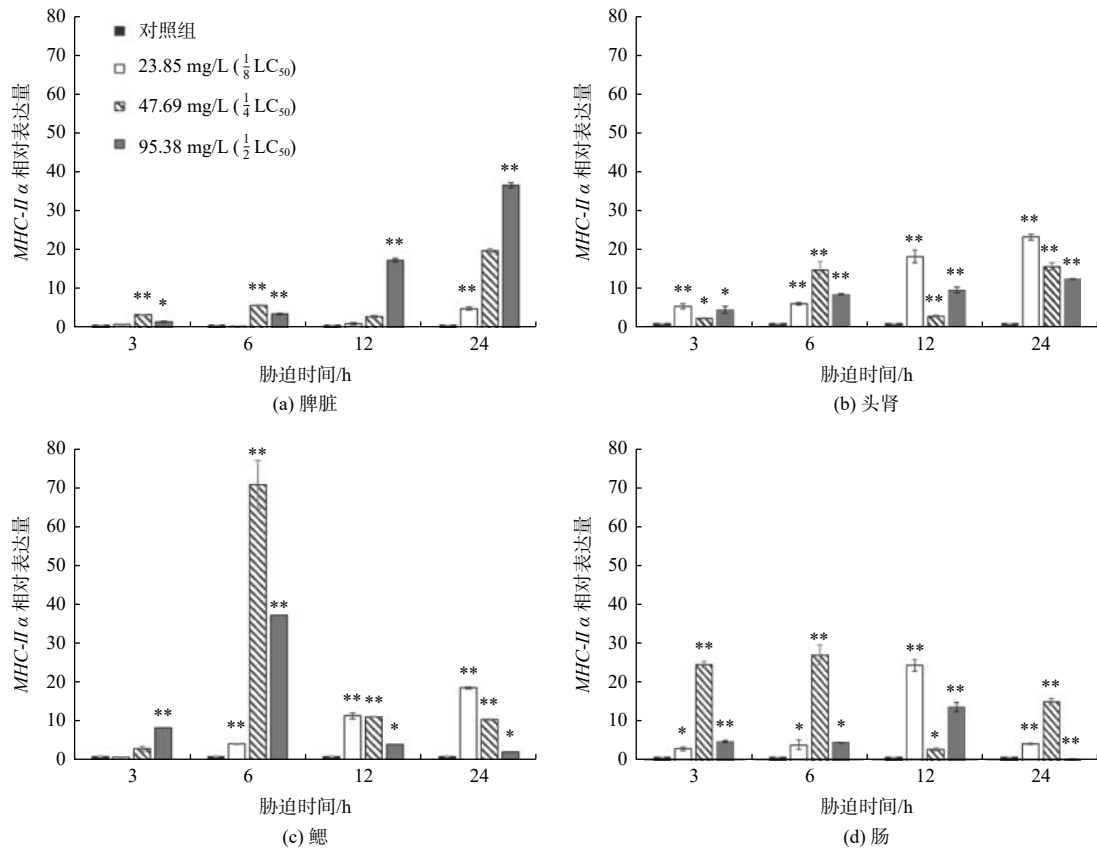


图2 大菱鲆主要组织相容性复合体基因 *MHC-II α* 在脾脏、头肾、鳃和肠组织中随胁迫时间的相对表达

(*表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$, $n = 3$)

Fig. 2 Relative expression of *MHC-II α* in spleen, anterior kidney, gill and intestines of *Scophthalmus maximus* with different stress times

(* is $p < 0.05$, ** is $p < 0.01$, $n = 3$)

2.2.2 *TNF-α* 基因的相对表达

添加不同质量浓度 TCEP 胁迫处理的大菱鲆免疫相关组织中 *TNF-α* 基因表达变化如图 3 所示。在分别添加 23.85 mg/L、47.69 mg/L 和 95.38 mg/L 的 TCEP 后, 3 h、6 h、12 h 和 24 h 时内大菱鲆幼鱼脾脏、头肾、鳃和肠组织中的 *TNF-α* 基因相对表达量较对照组都显著提高 ($p < 0.05$)。

在脾脏中, 随 TCEP 质量浓度升高和胁迫时间延长, *TNF-α* 基因相对表达量总体上呈现先上升后下降和波浪式的趋势, TCEP 质量浓度为 95.38 mg/L ($\frac{1}{2}$ LC₅₀) 的处理组中变化最为明显, 在 12 h 时表达量达到最高值, 24 h 时相对表达量下降; 在胁迫 3 h 和 6 h 的 TCEP 质量浓度为 47.69 mg/L ($\frac{1}{4}$ LC₅₀) 的处理组 *TNF-α* 基因表达呈显著性变化。

在头肾组织中, *TNF-α* 基因相对表达量在 TCEP 质量浓度为 47.69 mg/L ($\frac{1}{4}$ LC₅₀) 处理组中变化较为明显, 在 12 h 时相对表达量达到最高值, 24 h 之后相对表达量下降。在鳃组织中, *TNF-α* 基因相对表达量总体上呈现先上升后下降的趋势, 在胁迫 6 h 时各处理组中都达到最高值, 随着时间延长相对表达量开始下降, 24 h 时表达量极低。在肠组织中, *TNF-α* 基因相对表达量在 TCEP 质量浓度为 23.85 mg/L ($\frac{1}{8}$ LC₅₀) 和 47.69 mg/L ($\frac{1}{4}$ LC₅₀) 处理组中呈现上升趋势, 在 TCEP 质量浓度为 95.38 mg/L ($\frac{1}{2}$ LC₅₀) 处理组中呈现下降趋势; 胁迫 3 h 和 6 h 的 TCEP 质量浓度为 23.85 mg/L ($\frac{1}{8}$ LC₅₀) 处理组的 *TNF-α* 基因表达变化不呈显著性, 其余处理组都呈显著或极显著变化 ($p < 0.05$)。

在受到 TCEP 胁迫后, 实验组中 *TNF-α* 基因与 *MHC-II α* 基因的表达量变化趋势相似, 随 TCEP 的质量浓

度升高, *TNF- α* 基因在较高质量浓度 47.69 mg/L($\frac{1}{4}$ LC₅₀)和 95.38 mg/L($\frac{1}{2}$ LC₅₀)的处理组中表达量变化幅度更大,而在胁迫时间超过 12 h 时, *TNF- α* 基因表达量呈现出下降的趋势,可能与免疫系统受到的损伤无法及时复原相关。

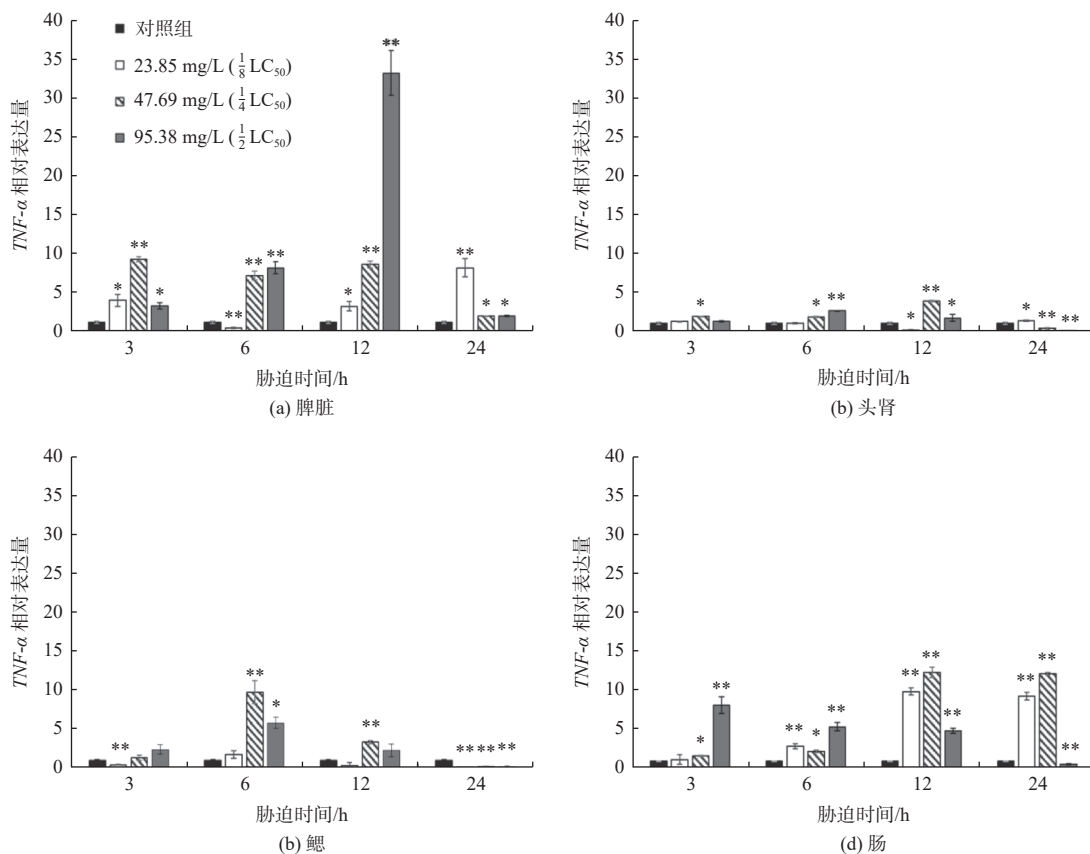


图3 *TNF- α* 基因在大菱鲆脾脏、头肾、鳃和肠组织中随胁迫时间的相对表达
(*表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$, $n=3$)

Fig. 3 Relative expression of *TNF- α* in spleen, anterior kidney, gill and intestines of *Scophtalmus maximus* with different stress times
(*is $p < 0.05$, ** is $p < 0.01$, $n=3$)

3 讨论

内分泌干扰物是指环境中存在的能够干扰生物体内源激素的合成、释放、转运、结合、作用或清除,从而影响机体的内环境稳定、生殖、发育及行为的外源性物质^[38]。TCEP是一种新型的内分泌干扰物,属于有机磷酸酯(OPEs),主要作为阻燃剂添加到塑料产品、纺织品、电器设备、家具及建筑物中^[39-40]。TCEP的广泛应用使其在环境中不断累积。2011年英国亚尔河水中检出了质量浓度极高的OPEs(平均为6 350 ng/L)^[4]。2015年德国、奥地利、西班牙、意大利、美国、日本等多个国家的地表水中,OPEs的质量浓度范围为76~2 230 ng/L^[5],其中TCEP都是主要污染组分。地表水中的部分OPEs随河流入海,德国易北河和莱茵河排放入北海的包括TCEP在内的OPEs分别可达5.5和42.5 t/a^[6]。2014年的调查数据中,我国珠江入海口总OPEs质量浓度达3.120 ng/L,其中TCEP和TCPP(磷酸三(2-氯丙基)脂)为主要污染物^[7];2015年我国黄、渤海40条入海河流中,包括TCEP、TCPP和TPPO(三(N,N-四亚甲基)磷酸胺)在内的12种OPEs在河流中的总OPEs质量浓度范围为9.6~1 549.0 ng/L,OPEs中含氯的TCEP、TCPP及TPPO为主要

污染物^[8]。还有研究发现 TCP 和 TCEP 可通过渗透进入地下水,并在地下水中持久存在^[9]。上述研究说明, TCEP 在水环境中的积累量已经不容忽视,而对于 TCEP 对淡水和海洋生物的生物毒性亟需开展更广泛的检测与研究。TCEP(CAS: 115-96-8)水溶解度为 7.82 g/L,我们实验所用的 TCEP 最大质量浓度为 0.19 g/L,远低于其溶解度,能够充分溶解。另外在前期实验了 4-甲基苄亚甲基樟脑(4-MBC)、对羟基苯甲酸丙酯(PP)、邻苯二甲酸二甲酯(DMP)等其他内分泌干扰物,并测试了其溶解性, TCEP 无晶体析出,溶解性良好。

采用生态毒理学理论评估 TCEP 危害^[21],常用表型观测方式(LC₅₀和 SC 为主要指标)和生物标志物检测。表型观测方式研究结果表明,0.5 和 5.0 mg/L 的 TCEP 可以抑制斑马鱼(*Danio rerio*)幼鱼运动距离,通过产生氧化损伤造成神经毒性^[10],也对人类细胞及斑马鱼具有内分泌干扰毒性^[11]。5 mg/L TCEP 还能通过改变神经营养因子及相关受体基因表达对鳊鲫(*Gobiocypris rarus*)产生神经毒性^[12]。已有 OPEs 急性毒性研究表明 TCP 对斑马鱼(*Danio rerio*)成鱼 96 h 的 LC₅₀ 值为 47.06 mg/L^[41]、对大鼠(*Rattus norvegicus*)经口的急性毒性 LC₅₀ 为 500~4 200 mg/kg^[42]、对黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)96 h 的 LC₅₀ 值为 51.00 mg/L^[12,43];在相关研究中, TDCPP 对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)96 h 的 LC₅₀ 值为 1.10 mg/L,对斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎仔鱼 116 h 的 LC₅₀ 值为 7.00 mg/L^[43-44]; TCEP 对于鱼类 96 h 的 LC₅₀ 值范围为 6.30~250.00 mg/L^[30]。我们发现 TCEP 对于大菱鲆的 LC₅₀ 分别为 190.76 mg/L(24 h)、159.94 mg/L(48 h)、140.70 mg/L(72 h)和 110.71 mg/L(96 h),符合内分泌干扰物低剂量强生物学效应的特点。根据《水和废水监测分析方法》, TCEP 对大菱鲆幼鱼属于中毒(100~1 000 mg/L)级别^[45]。鉴于 TCEP 对大菱鲆幼鱼的急性毒性和致死作用,在其养殖活动中需对养殖海水中 TCEP 的质量浓度及时监控,确保不超过 33.60 mg/L 的安全浓度。

生物标志物的检测可深入探究 TCEP 毒性机理^[21]。鱼类免疫系统分为非特异性免疫和特异性免疫,一般情况下鱼类依靠非特异性免疫来抵御环境胁迫^[46]。而非特异性免疫依赖各种免疫因子参与,具有代表性的免疫因子可以作为指示非特异性免疫变化的生物标志物。大菱鲆免疫相关因子主要分布在头肾、脾脏和黏膜相关的淋巴组织中。头肾是鱼类初级外周免疫器官,主要由淋巴组织构成,是免疫细胞发生、分化和增殖的重要场所,也是捕获抗原和产生抗体的主要器官,在免疫应答过程中发挥协同作用^[41]。脾脏是鱼体次级外周免疫器官,是鱼体红细胞、粒细胞等免疫细胞产生、贮存和成熟的主要场所^[47],在清除大分子物质、促进抗体生成中起着重要作用^[48]。黏膜相关淋巴组织(MALT)指鱼体中不具备完整淋巴结构的、较为分散的淋巴生成中心,主要包括皮肤、肠和鳃淋巴组织^[49]。分析 *MHC-II α* 和 *TNF-α* 的基因表达结果可以看出,在受 TCEP 胁迫后,大菱鲆免疫相关的基因相对表达量升高,但在不同免疫器官中的反应速度和强度有所不同。随着 TCEP 胁迫时间延长及质量浓度增加, *MHC-II α* 基因相对表达量最高的器官为鳃,在脾脏和头肾组织中基因相对表达量呈升高趋势;而在鳃和肠组织中,基因相对表达量呈先升后降趋势。在相关的研究中,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)受感染实验表明,其肝脏和头肾中的 *MHC* 基因在 12 h 时上升,但在 36 h 后呈下降趋势,之后逐渐恢复正常^[50]。大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)在鳃弧菌感染后, *MHC-II α* 相对基因表达有显著变化,在 12 h 时分别达到最大值,且在脾脏组织的表达量高于肝脏组织的^[51]。在鳃组织中, *MHC-II α* 基因相对表达量在 12 h 以后开始下降,这可能是由于鳃是最直接与 TCEP 接触的器官,其表达趋势也符合转录水平的变化规律。

我们的研究中大菱鲆的 *MHC-II α* 受到 TCEP 胁迫时迅速变化与此类似。*TNF-α* 基因表达的变化趋势与 *MHC-II α* 相似,在脾脏、头肾和肠组织中相对表达量高峰均出现在 12 h,在鳃组织中相对表达量高峰出现在 6 h。这与细菌感染日本比目鱼(*Pacific Halibut*)的研究^[24]和菌株感染比目鱼的研究^[52]中 *TNF-α* 基因表达的变化趋势一致。即在鱼体内,头肾作为初级外周免疫器官,脾脏作为次级外周免疫器官,共同在免疫反应中发挥作用^[53]。鳃和肠作是黏膜相关淋巴组织,也属于免疫器官中外周免疫器官,可以产生淋巴细胞,对机体起到免疫保护作用^[54],在受免疫胁迫时,淋巴组织会及时对胁迫作出反应。*TNF-α* 和 *MHC-II α* 在不同器官中表达顺序不同,可能是由于鳃和肠首先接触到含 TCEP 的海水,而头肾和脾脏接触较晚。先接触 TCEP 的鳃和肠通过免疫相关因子呈递抗原,引起机体免疫应答;头肾和脾脏受到 TCEP 影响后,免疫相关

因子增多,同时分化产生大量免疫细胞,促进抗体生成。随胁迫时间延长,免疫相关因子表达量下降,可能是由于 TCEP 造成的影响无法消除,导致免疫器官受到损伤,免疫防御能力下降;高质量浓度 TCEP 胁迫的大菱鲆相对表达量下降出现时间更早,说明高质量浓度 TCEP 对免疫器官造成的伤害更为严重。

TCEP 的胁迫会使大菱鲆免疫相关组织的 *MHC-II α* 和 *TNF-α* 免疫相关基因的表达量上升,说明 TCEP 的胁迫对大菱鲆的免疫系统造成了影响;随着 TCEP 的胁迫时间延长,基因表达量会出现先上升后下降的趋势,这可能是免疫器官受损导致免疫相关因子分泌减少,表现出 TCEP 对大菱鲆的免疫系统造成了损伤;随着 TCEP 的质量浓度上升,表达量的变化更明显,说明高质量浓度 TCEP 的生物学效应更明显。水环境中 TCEP 积累的量逐渐增长将成为更为严重的威胁。*MHC-II α* 和 *TNF-α* 基因表达水平的变化反映了大菱鲆在受到 TCEP 不同程度影响后的状态,因此两者可以作为评估和预警 TCEP 这种内分泌干扰物造成的污染状况的分子标志物。

4 结 语

我们研究不同质量浓度的 TCEP 对大菱鲆不同组织中关键免疫因子基因表达的影响,测定了 TCEP 胁迫条件下 *MHC-II α* 和 *TNF-α* 基因的时空表达特征,推测其可能会对大菱鲆免疫系统造成急性损伤。

内分泌干扰物是具有低剂量强生物学效应及生物链放大效应的化合物,作为一种新型污染物要警惕其危害性。TCEP 是一种新型内分泌干扰物,近年来随着使用量不断增加,在环境中的积累量也不断增加。TCEP 由于带有氯离子,是一种可以长期稳定存在的有机磷酸酯,需要我们进一步明确其毒性。我们的研究表明 TCEP 对大菱鲆的 LC_{50} 分别为 190.76 mg/L(24 h)、159.94 mg/L(48 h)、140.70 mg/L(72 h)和 110.71 mg/L(96 h);在海水养殖大菱鲆过程中,海水中 TCEP 积累量不可超过 33.60 mg/L 的安全浓度,这为大菱鲆的健康养殖提供了数据支持。TCEP 作为内分泌干扰物能对大菱鲆产生免疫胁迫,使免疫相关因子 *MHC-II α* 和 *TNF-α* 的基因表达发生变化,即 TCEP 促进免疫相关因子基因相对表达量提高。在急性胁迫实验中,受到 TCEP 胁迫的大菱鲆 *MHC-II α* 和 *TNF-α* 的相对表达量对比对照组会有明显上升,当质量浓度超过 47.69 mg/L($\frac{1}{4} LC_{50}$)胁迫时间持续超过 12 h 时,基因相对表达量会呈现先上升后下降的趋势。这可能是由于 TCEP 可以影响大菱鲆的免疫系统,而高质量浓度的 TCEP 会造成大菱鲆免疫器官的损伤,进而影响免疫相关因子的基因表达。因此 *MHC-II α* 和 *TNF-α* 可作为潜在的预警污染物的分子标志物,可以为大菱鲆的健康养殖和环境污染内分泌干扰物 TCEP 的检测提供可参考的分子标记参考。TCEP 的毒性和对大菱鲆免疫的影响是其生物学效应的一部分,后续研究其对大菱鲆生殖方面的影响,将是其对大菱鲆繁殖影响的直接证据。

参考文献 (References):

- [1] The United Nations. UN list of identified Endocrine Disrupting Chemicals [EB/OL]. (2018-08-20) [2021-03-08]. https://www.chemsafetypro.com/Topics/Restriction/UN_list_identified_endocrine_disrupting_chemicals_EDCs.html.
- [2] 杜源生, 蒋学武. 低剂量内分泌干扰物暴露的生物效应研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(1): 85-87. DU Y S, JIANG X W. Advances in biological effects of low dose endocrine disruptors exposure[J]. Journal of Environment and Health, 2009, 26(1): 85-87.
- [3] LAI K M, SCRIMSHAW M D, LESTER J N. Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems[J]. Science of The Total Environment, 2002, 289(1/2/3): 159-168.
- [4] CRISTALE J, KATSOYIANNIS A, SWEETMAN A J, et al. Occurrence and risk assessment of organophosphorus and brominated flame retardants in the River Aire(UK)[J]. Environmental Pollution, 2013, 179: 194-200.
- [5] WEI G L, LI D Q, ZHUO M N, et al. Organophosphorus flame retardants and plasticizers: sources, occurrence, toxicity and human exposure[J]. Environmental Pollution, 2015, 196: 29-46.
- [6] MARKLUND A, ANDERSSON B, HAGLUND P. Organophosphorus flame retardants and plasticizers in air from various indoor environments[J]. Journal of Environmental Monitoring, 2005, 7(8): 814-819.
- [7] WANG X, HE Y, LIN L, et al. Application of fully automatic hollow fiber liquid phase microextraction to assess the distribution of organophosphate es-

- ters in the Pearl River Estuaries[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 470/471: 263-269.
- [8] WANG R, TANG J, XIE Z, et al. Occurrence and spatial distribution of organophosphate ester flame retardants and plasticizers in 40 rivers draining into the Bohai Sea, north China[J]. *Environmental Pollution*, 2015, 198: 172-178.
- [9] REGNERY J, PÜTTMAN W, MERZ C, et al. Occurrence and distribution of organophosphorus flame retardants and plasticizers in anthropogenically affected groundwater[J]. *Journal of Environmental Monitoring: JEM*, 2011, 13(2): 347-401.
- [10] XIE Z Y, WANG P, WANG X, et al. Organophosphate ester pollution in the oceans[J]. *Nature Reviews Earth & Environment*, 2022, 3(5): 309-322.
- [11] LIU C, SU G, GIESY J P, et al. Acute exposure to Tris(1, 3-dichloro-2-propyl) Phosphate (TDCIPP) causes hepatic inflammation and leads to hepatotoxicity in Zebrafish[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19045.
- [12] YUAN L, LI J, ZHA J, et al. Targeting neurotrophic factors and their receptors, but not cholinesterase or neurotransmitter, in the neurotoxicity of TDCPP in Chinese rare minnow adults (*Gobiocypris rarus*)[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 208: 670-677.
- [13] ARUKWE A, CARTENY C C, EGGEN T. Lipid peroxidation and oxidative stress responses in juvenile salmon exposed to waterborne levels of the organophosphate compounds tris(2-butoxyethyl)- and tris(2-chloroethyl) phosphates[J]. *Journal of Toxicology & Environmental Health: Part A*, 2016, 79(13/14/15): 515-540.
- [14] ARYKWE A, CARTENY C C, MOEDER M, et al. Differential modulation of neuro- and interrenal steroidogenesis of juvenile salmon by the organophosphates-tris(2-butoxyethyl)- and tris(2-chloroethyl) phosphate[J]. *Environmental Research*, 2016, 148: 63-71.
- [15] 徐天天. 有机磷阻燃剂对秀丽线虫的慢性毒性[D]. 上海: 华东师范大学, 2017. XU T T. Chronic toxicity of organophosphorus flame retardants to *Caenorhabditis elegans*: an example for TCEP and TCPP[D]. Shanghai: East China Normal University, 2017.
- [16] 杨伟群, 赵飞, 李丽, 等. 三(2-氯乙基)磷酸酯对SD大鼠的肝肾毒性作用的代谢组学研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2017, 51(11): 1041-1047. YANG W Q, ZHAO F, LI L, et al. Metabolomics study of tris(2-chloroethyl) phosphate induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in Sprague-Dawley rats[J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2017, 51(11): 1041-1047.
- [17] CHEN G, JIN Y, WU Y, et al. Exposure of male mice to two kinds of organophosphate flame retardants (OPFRs) induced oxidative stress and endocrine disruption[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2015, 40(1): 310-318.
- [18] PURDOM C E, JONES A, LINCOLN R F. Cultivation trials with turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Aquaculture*, 1972, 1: 213-230.
- [19] WITESKA M, JEZIERSKA B, CHABER J. The influence of cadmium on common carp embryos and larvae[J]. *Aquaculture*, 1995, 129(1/2/3/4): 129-132.
- [20] 雷霖霖, 门强, 王印庚, 等. 大菱鲆"温室大棚+深井海水"工厂化养殖模式[J]. *海洋水产研究*, 2002, 23(4): 1-7. LEI J L, MEN Q, WANG Y G, et al. Review of "green house + deep well seawater" industrialized culture pattern of turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Marine Fisheries Research*, 2002, 23(4): 1-7.
- [21] 滕晓强, 陆宏峰, 郭心月, 等. 二氯苯醌对斑马鱼胚胎发育及超氧化物歧化酶的影响[J]. *环境科学学报*, 2020, 40(7): 2659-2664. TENG X Q, LU H F, GUO X Y, et al. The effect of 2, 6-DCBQ on the development and superoxide dismutase of zebrafish embryo[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2020, 40(7): 2659-2664.
- [22] KNIGHT J, STET R J M, SECOMBES C J. Modulation of MHC class II expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophages by *TNF-α* and LPS[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, 8(7): 545-553.
- [23] YAZAWA R, HIRONO I, OHIRA T, et al. Induction of Japanese flounder TNF promoter activity by lipopolysaccharide in Zebrafish Embryo[J]. *Marine Biotechnology*, 2005, 7(3): 231-235.
- [24] LI S, LI X J, GEN X Y, et al. Identification and characterization of lipopolysaccharide-induced TNF-α factor gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 2014, 157(3/4): 182-189.
- [25] NOVOA B, ORDAS M C, COSTA M M, et al. Turbot TNF α gene: molecular characterization and biological activity of the recombinant protein[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(4): 389-400.
- [26] 张彦. 鱼类主要组织相容性复合体 II 类基因结构与表达分析的研究概况[J]. *科技信息*, 2009(36): 403. ZHANG Y. Analysis of the structure and expression of major histocompatibility complex II genes in fish[J]. *Science & Technology Information*, 2009(36): 403.
- [27] 邢凤. 山羊 DQA1、DQB1、DQA2 基因外显子 2 多态性及与线虫抗性、免疫性状的相关研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2008. XING F. Studies on polymorphisms analysis in Exon2 of DQA1, DQB1, DQA2 gene and their relationship with nematode resistance and immune traits[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2008.
- [28] 徐田军, 陈松林. 鱼类 MHC 及其基因研究进展[J]. *海洋水产研究*, 2008, 29(4): 116-126. XU T J, CHEN S L. Progress of major-histocompatibility-complex(MHC) and relevant gene research in fish[J]. *Marine Fisheries Research*, 2008, 29(4): 116-126.
- [29] KIM M, JUNG Y, LEE K, et al. Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein[J]. *Archives of Pharmacol Research (Seoul)*, 2000, 23(6): 633-636.
- [30] FISK P R, GIRLING A E, WILDEY R J, et al. Prioritisation of flame retardants for environmental Risk assessment[M]. London: Environment Agency United Kingdom, 2003: 127-128.

- [31] 李翠萍, 吴民耀, 王宏元. 3种半数致死浓度计算方法之比较[J]. *动物医学进展*, 2012, 33(9): 89-92. LI C P, WU M Y, WANG H Y. LC_{50} Calculated by Kochi, Probit analysis and linear regression Methods[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2012, 33(9): 89-92.
- [32] 姜礼燾. 鱼药的安全浓度评价方法[J]. 中国医院药学杂志, 1995(6): 27. JIANG L F. Methods for evaluating the safe concentration of fish medicine[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 1995(6): 27.
- [33] TAN C, ZHOU H H, WANG X, et al. Resveratrol attenuates oxidative stress and inflammatory response in turbot fed with soybean meal based diet[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 91: 130-135.
- [34] 任亮, 朱宝芹, 张轶博, 等. 利用软件Primer Premier 5.0进行PCR引物设计的研究[J]. 锦州医学院学报, 2004(6): 43-46. REN L, ZHU B Q, ZHANG Y B, et al. The research of applying Primer Premier 5.0 to design PCR primer[J]. *Journal of Jinzhou Medical University*, 2004(6): 43-46.
- [35] 何锦园. 含钙肾结石患者肾组织中TRPV5的表达[D]. 广州: 广州医学院, 2010. HE J Y. The expression of TRPV5 in renal tissue of patients with Calcium-contained renal calculi[D]. Guangzhou: Guangzhou Medical University, 2010.
- [36] YU L, DENG J, SHI X, et al. Exposure to DE-71 alters thyroid hormone levels and gene transcription in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of zebrafish larvae[J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 97(3): 226-233.
- [37] 张波, 叶文成, 李莹, 等. 核因子 κ B受体活化因子配体在牙源性角化囊性瘤开窗减压前、后的表达[J]. *上海口腔医学*, 2017, 26(4): 434-436. ZHANG B, YE W C, LI Ying, et al. Expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in keratocystic odontogenic tumor before and after decompression[J]. *Shanghai Journal of Stomatology*, 2017, 26(4): 434-436.
- [38] 史熊杰, 刘春生, 余珂, 等. 环境内分泌干扰物毒理学研究[J]. 化学进展, 2009, 21(2/3): 340-349. SHI X J, LIU C S, YU K, et al. Toxicological research on environmental endocrine disruptors[J]. *Progress in Chemistry*, 2009, 21(2/3): 340-349.
- [39] 曾维斌. 北部湾海水养殖区有机磷酸酯污染特征及海产品食用风险[D]. 南宁: 广西大学, 2019. ZENG W B. Occurrence of organophosphorus esters and risk assessment of seafood in mariculture areas of the Beibu Gulf[D]. Nan'ning: Guangxi University, 2019.
- [40] STEVENS R, VAN E D S, BEZEMER R, et al. The structure-activity relationship of fire retardant phosphorus compounds in wood[J]. *Polymer Degradation & Stability*, 2006, 91(4): 832-841.
- [41] 皮天星, 蔡磊明, 蒋金花, 等. 新型阻燃剂TCPP对斑马鱼的毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(2): 247-256. PI T X, CAI L M, JIANG J H, et al. Toxicity effects of a new flame retardant Tris(2-chloroisopropyl)phosphate to Zebrafish(*Danio rerio*)[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(2): 247-256.
- [42] LEISEWITZ A, KRUSE H, SCHRAMM E. Substituting environmentally relevant flame retardants: assessment fundamentals, Volume I: results and summary overview[R]. Berlin: German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt), 2001.
- [43] World Health Organization. Flame retardants: tris (chloropropyl) phosphate and tris (2-chloroethyl) phosphate[M]. Geneva: World Health Organization, 1998.
- [44] LIU C, WANG Q, LIANG K, et al. Effects of tris(1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate and triphenyl phosphate on receptor-associated mRNA expression in Zebrafish embryos/larvae[J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 128: 147-157.
- [45] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法 (第四版)[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2002. Editorial Board of the Water and Wastewater Monitoring and Analysis Method of the State Environmental Protection Administration. Methods for monitoring and analysis of water and wastewater (fourth edition) [M]. Beijing: China Environment Publishing Group, 2002.
- [46] 甘楨, 王蓓, 鲁义善, 等. 罗非鱼免疫学研究进展[J]. *生物技术通报*, 2014(11): 32-39. GAN Z, WANG P, LU Y S, et al. Research progress on Tilapia immunology[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014(11): 32-39.
- [47] ESPEMES A, PRESS C M, DANNEVIG B H, et al. Immune-complex trapping in the splenic ellipsoids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Cell & Tissue Research*, 1995, 282(1): 41-48.
- [48] 王艳玲, 赵金良, 赵岩. 环境胁迫对鱼类免疫机制影响的研究进展[J]. *河北渔业*, 2020, 317(5): 50-54, 66. WANG Y L, ZHAO J L, ZHAO Y. Research progress on the effect of environmental stress on the immune mechanism of fish[J]. *Hebei Fisheries*, 2020, 317(5): 50-54, 66.
- [49] 李彦, 江育林. 环境胁迫因子对鱼类免疫功能的影响[J]. *中国兽医学报*, 1997, 17(6): 611-614. LI Y, JIANG Y L. Effects of environmental stress factors on immune function of fish[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 1997, 17(6): 611-614.
- [50] HANSEN J D, PATRA S L. Induction of the rainbow trout MHC class I pathway during acute IHNV infection[J]. *Immunogenetics*, 2002, 54(9): 654-661.
- [51] 刘桓君. 大弹涂鱼主要组织相容性复合体(MHC)基因的鉴定与免疫应答研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019. LIU H J. The identification and immune response of MHC genes of *Boleophthalmus pectinirostris*[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2019.
- [52] ESTEFANIA M, CARLOS A, SUSANA M, et al. In vitro and in vivo evaluation of lactic acid bacteria of aquatic origin as probiotics for turbot (*Scophthalmus maximus*) farming[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 570-580.
- [53] WANG C Q, CHEN Z H, LU Y M, et al. Neurotoxicity and related mechanisms of flame retardant TCEP exposure in mice[J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2020, 30(7): 490-496.
- [54] MATTHEWS H B, DIXON D, HERR D W, et al. Subchronic toxicity studies indicate that tris(2-chloroethyl)phosphate administration results in lesions in the rat hippocampus[J]. *Toxicology & Industrial Health*, 1990, 6(1): 1-15.

Effects of TCEP on Immune-related Functional Gene in *Scophthalmus maximus*

LIU Cong¹, YI Dan², CHAI Ying-mei¹, CONG Bai-lin²

(1. Marine College, Shandong University, Weihai 264200, China;

2. First Institute of Oceanography, MNR, Qingdao 266061, China)

Abstract: Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) is a new endocrine disruptor (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs), which can cause strong biological toxicity at low doses. With the increasing use and sewage of TCEP entering the sea through rivers, its accumulation in seawater and its threat to aquatic organisms are increasing. Turbot (*Scophthalmus maximus*) is a common large-scale mariculture fish, the TCEP accumulated in seawater will affect the development of its aquaculture industry. By studying the effects of different concentrations gradient and different stress times of TCEP on turbot, LC₅₀ at four time points were 190.76 mg/L (24 h), 159.94 mg/L (48 h), 140.70 mg/L (72 h) and 110.71 mg/L (96 h), and safe concentration (SC) was 33.60 mg/L. This provided a basis for healthy culture and toxicologic research of the burbot. Using real-time fluorescence quantitative PCR technique, the relative expression levels of two cytokines, histocompatibility complex α (*MHC-II α*) and tumor necrosis factor α (*TNF- α*), were analyzed. It was found that the expressions of these cytokines were up-regulated after TCEP treatment; With the increase of mass concentration of TCEP, especially it reached 47.69 mg/L ($\frac{1}{4}$ LC₅₀), the changes of gene expressions were more obvious; While the stress time was more than 12 h, the gene expressions showed a trend of increasing first and decreasing afterward. It showed that TCEP can cause acute injury to the immune system of turbot. This study can provide the reference for both the healthy culture of turbot and a molecular marker for detection of environmental pollutants.

Key words: Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP); *Scophthalmus maximus*; lethal concentration 50% (LC₅₀); immune related genes

Received: October 15, 2020