



การแสดงออกของยีน *DHX38* ในหอยแมลงภู (*Perna viridis*) ที่ได้รับสาร bisphenol A

DHX38 gene expression in Asian green mussel (*Perna viridis*) exposed to bisphenol A

เกรียงไกร สมคำ¹ ชูตา บุญภักดี^{1,2,3*} และหยาดเพชร โอเจริญ^{2,3}

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

²โครงการบัณฑิตศึกษา สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

³ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อมและพิษวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

*Corresponding Author, E-mail: chuta@buu.ac.th

บทคัดย่อ

Bisphenol A (BPA) เป็นสารในกลุ่มรบกวนระบบต่อมไร้ท่อ (endocrine disrupting chemicals: EDCs) ที่มีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกายสัตว์โดยเฉพาะในระบบสืบพันธุ์ ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้เครื่องหมายทางชีวภาพ (biomarker) หลายชนิดในการตรวจหาการปนเปื้อนสาร BPA ในสิ่งแวดล้อม การศึกษาครั้งนี้ทำการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *DEAH box polypeptide 38 (DHX38)* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR ในเนื้อเยื่อ digestive gland หรือ hepatopancreas ของหอยแมลงภู (*Perna viridis*) ตัวเต็มวัยที่ได้รับสาร BPA 10 นาโนกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ($\text{ng g}^{-1}\text{dw}$) โดยวิธีการฉีด เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร BPA ($0 \text{ ng g}^{-1}\text{dw}$) นาน 0, 6 และ 12 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ระหว่างหอยแมลงภูเพศผู้และเพศเมีย ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และเมื่อพิจารณาหอยแมลงภูไม่แยกเพศศึกษา พบว่ากลุ่มทดสอบที่ได้รับสาร BPA นาน 6 ชั่วโมง มีระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* เท่ากับ 0.96 ± 0.11 มากกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.74 ± 0.09 แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในขณะที่เวลา 12 ชั่วโมง หอยแมลงภูทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบมีระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่เวลาเริ่มต้นและ 6 ชั่วโมง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดสอบที่เวลา 12 ชั่วโมงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังนั้นควรมีการทดสอบหอยแมลงภูที่ได้รับสาร BPA ที่ระยะเวลาสั้นขึ้นเพื่อ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ในหอยแมลงภู่ และใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของสาร BPA ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is an endocrine disrupting chemicals (EDCs), which affects animal metabolism, especially in the reproductive system. Nowadays, there are plenty of biomarkers used to detect BPA contamination in the environment. In this study, *DEAH box polypeptide 38* (*DHX38*) gene expression levels in the digestive gland (or hepatopancreas) of adult Asian green mussel (*Perna viridis*) was investigated by semi-quantitative RT-PCR. The animals exposed to BPA by injection at 10 ng g⁻¹ dry weight (dw) compared to the control group (BPA at 0 ng g⁻¹dw), for 0, 6 and 12 hours were examined. The results showed that the expression levels of *DHX38* gene between male and female were not significantly different ($p>0.05$). Considering the expression level of *DHX38* gene in both sexes of mussel exposed to BPA for 6 hours was 0.96 ± 0.11 , higher than in the control group (0.74 ± 0.09), but no statistically significant difference ($p>0.05$). While both the control and BPA exposed groups at 12 hours had the lower expression levels of *DHX38* gene than the control group at 0 and 6 hours ($p<0.05$), the expression levels of *DHX38* gene of these two groups at 12 hours were not significantly different ($p>0.05$), however. Therefore, the BPA exposure time should be extended. This could be a crucial factor for studying the changes in *DHX38* expression in Asian green mussel and could be useful as a sensitive biomarker of exposure for detecting BPA contamination in aquatic resources.

คำสำคัญ: การแสดงออกของยีน ตัวชี้วัดชีวภาพ บิสฟีนอลเอ บีพีเอ หอยแมลงภู่

Keywords: Gene expression, Biomarker, Bisphenol A, BPA, Green mussel

บทนำ

Bisphenol A (BPA) เป็นสารเคมีในกลุ่มรบกวนระบบต่อมไร้ท่อ ปัจจุบันใช้เป็นสารขึ้นรูปในอุตสาหกรรมพลาสติก เช่น บรรจุภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม กลไกการทำงานของสาร BPA คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน เมื่อสัตว์ได้รับสาร BPA สารนี้จะไปแย่งจับกับตัวรับสัญญาณเอสโตรเจนที่อยู่ภายในนิวเคลียส มีผลกระตุ้นให้มีการสร้างฮอร์โมนเพศมากผิดปกติ และส่งผลต่อกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

ทั้งในสัตว์วัยอ่อนและตัวเต็มวัยในปริมาณความเข้มข้นต่ำ (Vandenberg et al., 2009; Alonso-Magdalena et al., 2012) ส่วนในมนุษย์มีรายงานการศึกษาผลของสาร BPA ต่อการเกิดโรคมะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก โดยสาร BPA จะไปกระตุ้นให้มีการสร้าง endometrial endothelial cells เป็นจำนวนมากกว่าสภาวะปกติ (Helmestam et al., 2014) รวมถึงส่งผลทำให้การสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดกันของ Sertoli cells ในอัณฑะลดลง (Freitas et al., 2016) จากการสำรวจในปี ค.ศ. 2009 พบว่าทั่วโลกมีการ

ปล่อยสาร BPA ออกสู่สิ่งแวดล้อมประมาณ 2.7×10^{18} ng ต่อปี (Vandenberg et al., 2009) และในปี ค.ศ. 2005-2007 ประเทศต่าง ๆ ในทวีปเอเชียพบประมาณ 1.8 ± 0.2 ถึง 15.5 ± 1.2 ng L⁻¹ ส่วนในประเทศไทยพบสารดังกล่าว 2.4 ± 0.5 ng L⁻¹ (Duong et al., 2010) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่มีความเป็นพิษต่อสัตว์ที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ

ยีน *DHX38* (*DEAH box polypeptide 38*) แพลรหัสเป็นเอนไซม์ PRP16 (Pre-mRNA splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16) ทำหน้าที่ในกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต เช่น ยีสต์ สาหร่าย พืชและสัตว์ เป็นต้น (Schwer and Guthrie, 1991) ดังมีรายงานการวิจัยในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ปลา European flounder (*Platichthys flesus*) พบว่าสาร 17β -estradiol (E_2) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเอสโตรเจนเช่นเดียวกับสาร BPA สามารถชักนำให้ปลาสังเคราะห์ PRP16 ได้มากกว่าสภาวะปกติ (Williams et al., 2007) แต่ทั้งนี้ยังไม่พบรายงานการศึกษาในระดับยีน (messenger RNA) ซึ่งการตรวจวัดจะมีความไวมากกว่าในระดับโปรตีนหรือระดับการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะในกลุ่มของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีขนาดเล็กและเคลื่อนที่เล็กน้อยจะมีโอกาสได้รับสัมผัสสาร BPA ได้มากกว่าสัตว์กลุ่มอื่น ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้หอยแมลงภู (*Perna viridis*) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Mytilidae ระยะตัวเต็มวัยเป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนสาร BPA ในแหล่งน้ำ ซึ่งมีตัวอย่างงานวิจัยของ Salgueiro-González et al. (2016) พบสารรบกวนระบบต่อมไร้ท่อ (BPA และ alkylphenols) ในระดับสูงเฉลี่ย 604 ng g⁻¹ dw ในหอยกะพงเมดิเตอร์เรเนียน (*Mytilus galloprovincialis*) ที่เก็บตัวอย่างมาจากแหล่งที่มีการปล่อยน้ำเสียลงสู่ทะเลบริเวณชายฝั่ง Spanish

Atlantic และอ่าว Biscay ในทวีปยุโรป นอกจากนี้ในประเทศไทย หอยแมลงภูยังเป็นสัตว์ทะเลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยในปี ค.ศ. 2014 มีปริมาณการส่งออก 127,030 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 26.5 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (USD) (Food and Agriculture Organization, 2014) และบางพื้นที่ที่ใช้เป็นแหล่งเพาะและเลี้ยงหอยแมลงภูของประเทศไทยนั้นเป็นแหล่งรับน้ำเสียจากบ้านเรือนรวมถึงโรงงานอุตสาหกรรม หอยแมลงภูจึงมีโอกาสได้รับสาร BPA ในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการโดยให้หอยแมลงภูได้รับสาร BPA ในระดับที่ตรวจพบในแหล่งน้ำธรรมชาติของประเทศต่าง ๆ ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Duong et al., 2010) และในปริมาณต่ำที่สามารถชักนำระดับการแสดงออกของยีน *estrogen receptor 2* (*ER2*) และ ยีน *Metallothionein* ในหอยกะพงเมดิเตอร์เรเนียน (Canesi et al., 2007) การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้ยีน *DHX38* ในหอยแมลงภูเป็นเครื่องหมายทางชีวภาพในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร BPA ในแหล่งน้ำ

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. โพรเมอร์ในปฏิกิริยา PCR ที่จำเพาะต่อยีน *DHX38*

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *DHX38* ของหอยแมลงภูที่นำมาใช้ออกแบบโพรเมอร์จำเพาะนั้นได้มาโดยบังเอิญจากปฏิกิริยา PCR ของคูโพรเมอร์ที่ใช้โปรแกรม Primer 3 (Untergasser et al., 2012) ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *estrogen receptor 2* ของหอยกะพงเมดิเตอร์เรเนียน (GenBank accession no. AB257135) โดยภายหลังจากที่นำผลผลิต PCR ไปทำการโคลนและอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วทำการออกแบบโพรเมอร์ขึ้นใหม่ที่มี

ความจำเพาะกับยีน *DHX38* คือไพรเมอร์ DHX-F 5'-TCTGGATGGTGTTCCTTTGACA และ DHX-R 5'-ACGGGACAATCGAGATTTCAG สำหรับใช้ศึกษาในครั้งนี้

2. ตัวอย่างหอยแมลงภู่

เก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่ จากแหล่งทำการประมง หมู่ที่ 1 ตำบลอ่างศิลา อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี ในเดือนมิถุนายน ปี พ.ศ. 2557 โดยใช้ระยะตัวเต็มวัย ขนาดความยาวเปลือก 5.0 ± 0.5 เซนติเมตร น้ำหนักแห้งไม่รวมเปลือกเฉลี่ย 1.03 ± 0.04 กรัม (g dry weight) นำตัวอย่างมาพักและเลี้ยงในน้ำทะเลสังเคราะห์ความเค็ม 30 ppt เป็นระยะเวลา 3 วันเพื่อปรับสภาพ จากนั้นนำมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด $20 \times 32 \times 20$ cm³ ที่บรรจุน้ำทะเลสังเคราะห์ความเค็ม 30 ppt 20 ลิตร ตู้ละ 20 ตัว (แยกเป็นเพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว และไม่แยกเพศ 10 ตัว) แบ่งกลุ่มทดลองเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมไม่ฉีดสาร BPA และกลุ่มควบคุมที่ฉีดสารละลาย DMSO 0.3% (ตัวทำละลายของสาร BPA) ในน้ำทะเลสังเคราะห์ 100 μ L และกลุ่มทดสอบฉีดสารละลาย BPA จำนวน 10 ng g⁻¹ dw/ตัว (BPA 10 ng ละลายในน้ำทะเลสังเคราะห์ 100 μ L และ DMSO 0.3%) จากนั้นทำการสุ่มเก็บหอยแมลงภู่ในแต่ละช่วงเวลาที่ได้รับสาร BPA คือ ที่เวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง (ทำ 3 ซ้ำ) โดยวัดขนาดและชั่งน้ำหนักจากนั้นแยกเนื้อเยื่อ digestive gland แล้วนำมาสกัด Total RNA ด้วย TRIzol reagent (Invitrogen, USA) และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด DNase I, RNase-free Kit ตามวิธีที่แนะนำโดย Thermo Scientific (USA) จากนั้นนำ Total RNA 1,000 ng มาสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ในปริมาตรสุทธิ 20 μ L โดยใช้ชุดสำเร็จ iScript

Reverse Transcription Super-Mix for RT-qPCR Kit (Bio Rad Laboratories, USA)

3. การเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบยีน *DHX38* โดยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank

นำ cDNA ของตัวอย่างหอยแมลงภู่ปริมาตร 4 μ L มาเพิ่มจำนวนในบริเวณยีน *DHX38* ปฏิกิริยา PCR ทำในปริมาตรสุทธิ 20 μ L โดยมีขั้นตอนทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ คือ ก่อนเข้ารอบที่อุณหภูมิ 94°C 3 นาทีและทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 35 รอบที่ 94°C 30 วินาที, 55°C 50 วินาที และ 72°C 40 วินาที และที่ 72°C 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และยืนยันว่าเป็นยีนดังกล่าวโดยการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี direct sequencing และเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank จากนั้นนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ PRP16 ที่แปลรหัสมาจากยีน *DHX 38* รวมถึงเอนไซม์ในกลุ่มเดียวกัน คือ PRP4 ของสัตว์กลุ่มมอลลัสก์และสิ่งมีชีวิตอื่นเพื่อทำ multiple sequence alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalX (Larkin et al., 2007) และ BioEdit (Hall, 1999) และเลือกใช้ลำดับกรดอะมิโนของยีน *actin* ของหอยแมลงภู่เป็น outgroup การสร้าง phylogenetic tree ทำเพื่อยืนยันว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลผลิต PCR เป็นยีน *DHX38* โดยใช้โปรแกรม MEGA7 (Kumar et al., 2016) วิธี Maximum Likelihood เลือกใช้โมเดลที่มีค่า BIC ต่ำสุด (LG) โดยสับเปลี่ยนข้อมูล (bootstrap) จำนวน 1,000 ครั้ง

4. การวัดระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR

สำหรับการวัดระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* เทียบกับยีน 18S *rRNA* ซึ่งใช้เป็นยีนอ้างอิงใน

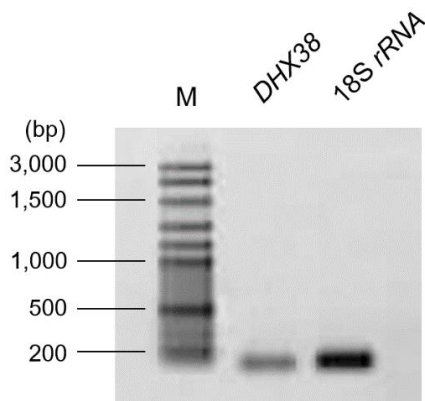
เทคนิค semi-quantitative RT-PCR นั้น ยีน 18S *rRNA* จัดเป็น housekeeping gene ที่สังเคราะห์โปรตีนที่มีความจำเป็นในสิ่งมีชีวิต มีการแสดงออกที่คงที่สม่ำเสมอในทุกเนื้อเยื่อและทุกสภาวะ และนิยมใช้เป็นยีนอ้างอิงในการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน (Pfaffl, 2001; Canesi et al., 2007) โดยการเพิ่มจำนวน cDNA ในปฏิกิริยา PCR ของตัวอย่างหอยแมลงภู่นับแต่ละกลุ่มการทดลองมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการตรวจสอบยีน *DHX38* แต่ทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 28 รอบ จากนั้นนำผลผลิต PCR มาวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจล 1% ใน Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer ความต่างศักย์ 70 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที แล้วย้อมเจลด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.001% นาน 20 นาที บันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และวัดความเข้มของแถบ DNA ด้วยโปรแกรม GeneTools บริษัท Syngene (USA) ซึ่งระดับการแสดงออกของยีนคำนวณได้จากสัดส่วนความเข้มของแถบ DNA ของยีน *DHX38* ต่อความเข้มของแถบ DNA ของยีน 18S *rRNA* จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยโปรแกรมทางสถิติวิธี ANOVA

ผลการวิจัย

1. การยืนยันการเพิ่มจำนวนยีน *DHX38* อย่างจำเพาะ

เมื่อทำการวิเคราะห์ผลผลิต PCR โดยวิธีอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนบางส่วน

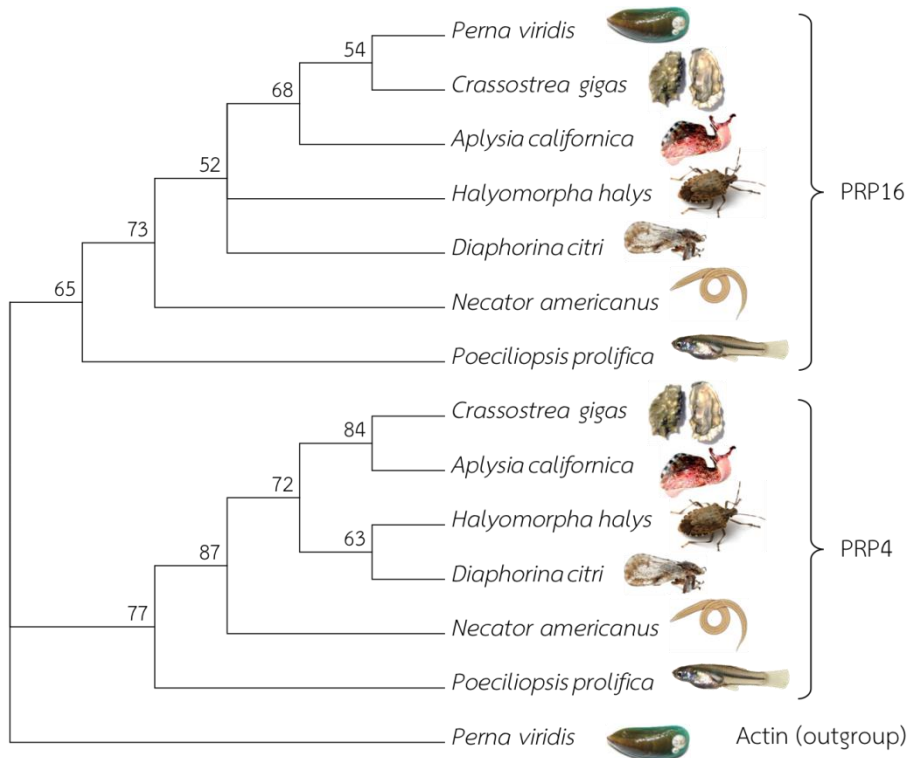
ของยีน *DHX38* ในหอยแมลงภู่น้ำจืด มีขนาดเท่ากับ 143 คู่เบส และยีน 18S *rRNA* มีขนาดเท่ากับ 157 คู่เบส (รูปที่ 1) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *DHX38* ที่ได้ไปเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank (กรกฎาคม 2559) ไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น และเมื่อนำไปแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน (เอนไซม์ PRP16) ได้ขนาด 41 กรดอะมิโน (รูปที่ 2) และเมื่อนำไปเทียบเคียงกับของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นด้วยโปรแกรม BLASTX พบว่ามีความเหมือนสูงสุดที่ 81% กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ PRP16 ของหอยนางรม Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) GenBank accession no. EKC28349 และยืนยันว่าเป็นยีน *DHX38* โดยการทำให้ phylogenetic tree ซึ่งพบว่าถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกันกับลำดับกรดอะมิโนของ PRP16 ของมอลลัสก์สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นและปลาที่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank (เช่น *Crassostrea gigas*, *Aplysia californica*, *Diaphorina citri*, *Halyomorpha halys*, *Necator americanus* และ *Poeciliopsis prolifica* เป็นต้น) และพบว่าลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากยีน *DHX38* ของหอยแมลงภู่น้ำจืด อยู่ในคลัด (clade) ย่อยเดียวกันกับเอนไซม์ PRP16 ของมอลลัสก์ (*C. gigas* และ *A. californica*) และต่างคลัดย่อยกับของปลา *Poeciliopsis prolifica* โดยทั้งหมดแยกออกจากคลัดของเอนไซม์ PRP4 (pre-mRNA processing factor 4) ของสัตว์ชนิดเดียวกันที่นำมาสร้าง phylogenetic tree (รูปที่ 3)



รูปที่ 1 ผลผลิต PCR ของยีน *DHX38* และยีนอ้างอิง *18S rRNA* ของหอยแมลงภู่มิ (*Perna viridis*) ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน TAE buffer ที่ความต่างศักย์ 70 โวลต์ เวลา 50 นาที (M = GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder บริษัท Thermo Scientific, USA)

	10	20	30	40	50	
<i>Perna viridis</i>	RDN	RSER	RRDY--TSR	SSR	RREWDETP-----RFRD	SP---ATPNIHVKEHHPE
<i>Crassostrea gigas</i>	. . D . S . RSH . SD . . R . DR . A K D . R . . DT	PSR				
<i>Aplysia californica</i>	. GSER . . . HSH . GDF . ER . N DTG VNKDEMP . . . K . . DT	PSH				
<i>Necator americanus</i>	. . RER . S . DDQR	DTRN . KDD . RRS . RRDRD . . . EK . SRKD . YE . . . FK . PFT	PSR			
<i>Halyomorpha halys</i>	. NDDRND . . S . R . . SYN	R . Q . S . S . S K . E . . . L . . MFS . . DT	PSR			
<i>Diaphorina citri</i>	K . KSK HIK . . SE . K . E . . L . T	PS . I K . E . . . M . . DFRI . GT	PSR			
<i>Poeciliopsis prolifica</i>	KGSQLV	RKH . EQKERKKAQHKH . ELAGTKLGDIMG	IKKKED . . EE . GGK . VG	EDGK		

รูปที่ 2 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *DHX38* ของหอยแมลงภู่มิ (*Perna viridis*) และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ PRP16 ของสิ่งมีชีวิตอื่นในฐานข้อมูล GenBank (*Crassostrea gigas*; EKC28349, *Aplysia californica*; XM_013083998, *Necator americanus*; ETN76566, *Halyomorpha halys*; XP_014279344, *Diaphorina citri*; XP_017301698, *Poeciliopsis prolifica*; JAO79659) โดยใช้โปรแกรม ClustalX และ BioEdit



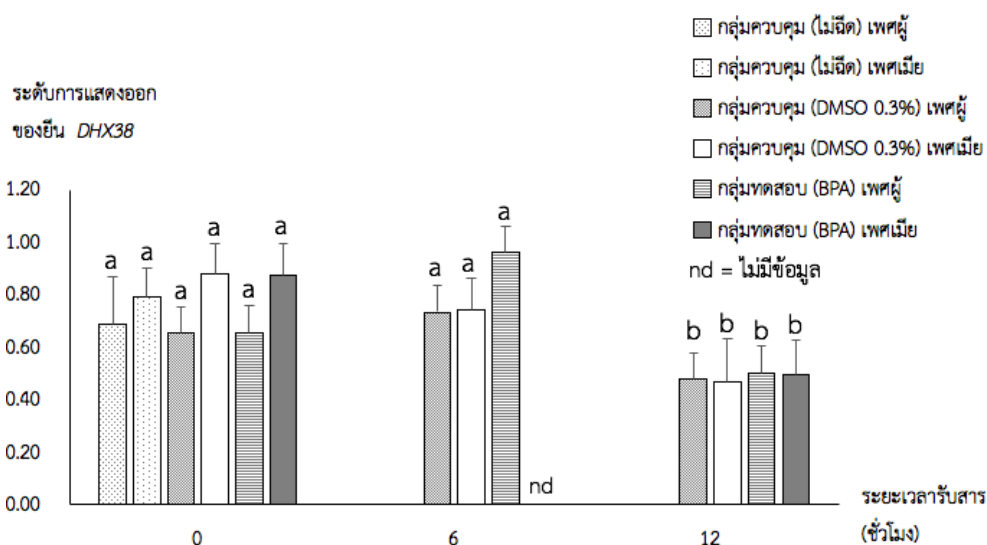
รูปที่ 3

Phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *DHX38* ของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) และลำดับกรดอะมิโนของแอนไซม์ PRP16 และ PRP4 ของสิ่งมีชีวิตอื่นในฐานข้อมูล GenBank (PRP16 = *Crassostrea gigas*; EKC28349, *Aplysia californica*; XM_013083998, *Halyomorpha halys*; XP_014279344, *Diaphorina citri*; XP_017301698, *Necator americanus*; ETN76566, *Poeciliopsis prolifica*; JAO79659; PRP4 = *Crassostrea gigas*; XP_011432602, *Aplysia californica*; XP_012942697, *Halyomorpha halys*; XP_014276302, *Diaphorina citri*; XP_017299113, *Necator americanus*; ETN73061, *Poeciliopsis prolifica*; JAO43397) โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน actin ของหอยแมลงภู่ (Actin = *P. viridis*; AGZ84260) เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) สร้างด้วยโปรแกรม MEGA7 วิธี Maximum Likelihood โดยสับเปลี่ยนข้อมูล (bootstrap) 1,000 ครั้ง

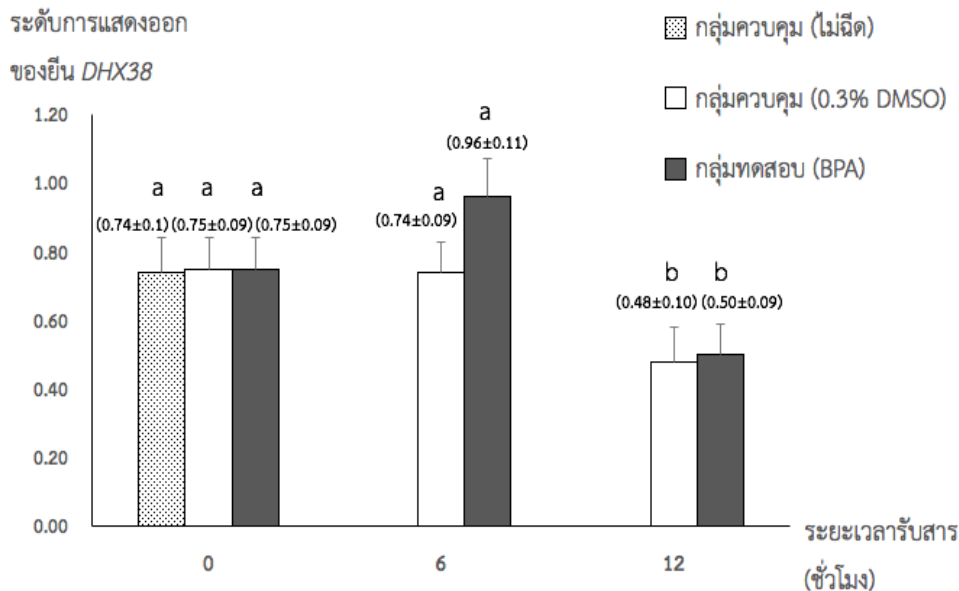
2. การแสดงออกของยีน *DHX38*

เมื่อทำการทดสอบหอยแมลงภู่เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร BPA และกลุ่มทดสอบที่ได้รับสาร BPA ด้วยวิธีการฉีดในปริมาณ 10 ng g⁻¹dw ที่เวลาเริ่มต้น (0), 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ระหว่างหอยแมลงภู่ที่ได้รับสาร DMSO 0.3% และไม่ได้รับสาร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ทั้งแบบพิจารณาแยกเพศและไม่แยกเพศ (รูปที่ 4 และรูปที่ 5) และระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ระหว่างหอยแมลงภู่เพศผู้และเพศเมีย ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ที่เวลา 0 และ 12 ชั่วโมง (ที่ 6 ชั่วโมงของกลุ่มทดสอบ ไม่มีตัวอย่างหอยแมลงภู่เพศเมีย) (รูปที่ 4) ดังนั้นในการวัดระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* จึงใช้หอยแมลงภู่

ไม่แยกเพศศึกษา พบว่าเมื่อหอยแมลงภู่ได้รับสาร BPA ปริมาณ 10 ng g⁻¹dw นาน 6 ชั่วโมง ระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* มีแนวโน้มสูงมากกว่าที่เวลาอื่น ๆ (0.96 ± 0.11) โดยมากกว่ากลุ่มควบคุม (0.74 ± 0.09) แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เช่นเดียวกับการแสดงออกของยีนที่เวลา 0 และ 12 ชั่วโมง พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาที่เวลา 12 ชั่วโมง ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบมีระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* (0.48 ± 0.10 และ 0.50 ± 0.09 ตามลำดับ) น้อยกว่าที่เวลาเริ่มต้น (0.75 ± 0.09 และ 0.75 ± 0.09 ตามลำดับ) และที่ 6 ชั่วโมง (0.74 ± 0.09 และ 0.96 ± 0.11 ตามลำดับ) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 ระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ของหอยแมลงภู่เพศผู้และเพศเมีย ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร BPA (กลุ่มที่ไม่ได้ฉีดสาร และกลุ่มที่ฉีด DMSO 0.3%) และกลุ่มทดสอบที่ได้รับสาร BPA ปริมาณ 10 ng g⁻¹dw เป็นเวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง (ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)



รูปที่ 5 ระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ของหอยแมลงภู่ (ไม่แยกเพศ) ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร BPA (กลุ่มที่ไม่ได้ฉีดสารและกลุ่มที่ฉีด DMSO 0.3%) และกลุ่มทดสอบที่ได้รับสาร BPA ปริมาณ 10 ng g⁻¹ dw เป็นเวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง (ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%)

วิจารณ์ผลการวิจัย

ยีน *DHX38* เป็นยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ PRP16 ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม และมีความเกี่ยวข้องกับอัตราเมแทบอลิซึมของร่างกาย พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูคาริโอต ปัจจุบันมีการศึกษาลำดับเบสของยีนดังกล่าวในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) แมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) หนูบ้าน (*Mus musculus*) ปลา (*Platichthys flesus*) รวมถึงมนุษย์ ส่วนในสัตว์กลุ่มมอลลัสก์พบในหอยนางรม Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) โดยมีลำดับกรดอะมิโน PRP16 ที่สมบูรณ์เท่ากับ 752 กรดอะมิโน (Zhang et al., 2012) ในการศึกษานี้เป็นครั้งแรกที่พบและสามารถโคลนบางส่วนของยีน *DHX38* ในหอยแมลงภู่ได้อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่พบรายงานการศึกษาถึง

กลไกและหน้าที่ของยีนนี้ในสัตว์กลุ่มมอลลัสก์ ดังเช่นที่มีผลการศึกษาแล้วในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ปลา *P. flesus* ที่ถูกนำมาทดสอบให้ได้รับสัมผัสสาร E₂ และพบว่า E₂ สามารถชักนำการแสดงออกของยีน *DHX38* ได้เพิ่มขึ้น (Williams et al., 2007) ในการศึกษาครั้งนี้จึงทดสอบเพื่อใช้ยีน *DHX38* เป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนสาร BPA ในแหล่งน้ำโดยเลือกใช้หอยแมลงภู่ตัวเต็มวัยซึ่งเกาะนิ่งอยู่กับที่ และเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีแหล่งเพาะเลี้ยงในภาคตะวันออกของประเทศไทย และเป็นต้นแบบสำหรับการทดสอบผลของสาร BPA ที่มีต่อการแสดงออกของยีน *DHX38* โดยใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR เช่นเดียวกับที่ณัฐกานต์ และคณะ (2555) วัดระดับการแสดงออกของเครื่องหมาย 217_AFLP ที่คาดว่าเป็นยีน *transposase* ของหอยเจดีย์ (*Cerithyidea*

cingulate) บ่งชี้การปนเปื้อนของสาร E_2 ในแหล่งน้ำ ผลการทดลองพบว่าเทคนิค semi-quantitative RT-PCR มีความไวต่อการตรวจวัดระดับการแสดงออกของเครื่องหมายทางชีวภาพดังกล่าวได้ เทคนิคนี้จึงมีความเหมาะสมในการใช้ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน รวมถึงเป็นเทคนิคที่ประหยัดค่าใช้จ่ายได้มากกว่าเทคนิคการวัดผลเชิงปริมาณวิธีอื่น

การวิจัยในครั้งนี้เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* หอยแมลงภู่ตัวเต็มวัยพิจารณาทั้งแยกเพศและไม่แยกเพศศึกษา ระหว่างกลุ่มทดสอบที่ได้รับสาร BPA ปริมาณ $10 \text{ ng g}^{-1}\text{dw}$ และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร BPA ที่เวลาเริ่มต้น (0), 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่าภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมงของการทดสอบ ปัจจัยเพศไม่ได้มีอิทธิพลต่อระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวดังที่ปรากฏว่าระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ของหอยเพศผู้และเพศเมียที่เวลา 0 และ 12 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน สอดคล้องกับรายงานของ Canesi et al. (2007) ที่พบว่าเมื่อหอยกะพงเมดิเตอร์เรเนียน (*M. galloprovincialis*) ได้รับสาร BPA ปริมาณ $15 \text{ ng g}^{-1}\text{dw}$ มีผลทำให้ยีน *catalase* และ *MT20* มีระดับการแสดงออกลดลงต่ำกว่าหอยที่ไม่ได้รับสาร BPA ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ดังนั้นการใช้หอยแมลงภู่ไม่แยกเพศศึกษา จึงเป็นการสะดวกต่อการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* อีกประการหนึ่ง เนื่องจากการแยกเพศของหอยแมลงภู่จะทำได้เมื่อสิ้นสุดการทดลองโดยวิเคราะห์จากลักษณะของเนื้อเยื่อที่แกะเปลือกหุ้มออก แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการวิจัยเป็นจำนวนมากที่วิเคราะห์ยีนอื่นในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังและพบว่าการได้รับสาร BPA ส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์เพศใดเพศหนึ่งเท่านั้นเช่น กระตุ้นให้มีการสังเคราะห์โปรตีน vitellogenin (VTG) เพิ่มมากขึ้น ซึ่ง VTG เป็นโปรตีน

ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเซลล์ไข่ของปลาเพศเมียหลายชนิด เช่น ปลา Atlantic cod (*Gadus morhua*), ปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*), ปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), ปลา European seabass (*Dicentrarchus labrax*) รวมถึงในกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก เช่น African clawed frog (*Xenopus laevis*) เป็นต้น รวมถึงมีรายงานว่าสาร BPA ส่งผลกระทบต่อสัตว์เพศผู้เท่านั้น เช่น ลดการสร้างสเปิร์มในปลา fathead minnow (*Pimephales promelas*) และปลา guppy (*Poecilia reticulata*) นอกจากนี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมยังพบว่าสาร BPA ทำให้หนู field vole (*Microtus agrestis*) สร้างฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) ได้น้อยกว่าสภาวะปกติ (Flint et al., 2012 and references cited therein)

เมื่อพิจารณาผลการทดลองไม่แยกเพศศึกษา ระหว่างหอยแมลงภู่กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร BPA และกลุ่มทดสอบที่ได้รับสาร BPA $10 \text{ ng g}^{-1}\text{dw}$ ที่เวลาเริ่มต้น (0), 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงเวลา แต่ระดับการแสดงออกของยีนในกลุ่มทดสอบที่เวลา 6 ชั่วโมง มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุม (0.96 ± 0.11 และ 0.74 ± 0.09 ตามลำดับ) อาจเป็นไปได้ว่าระยะเวลาที่ทำการทดสอบนาน 12 ชั่วโมงนั้นยังสั้นเกินไป ดังรายการการศึกษาในสัตว์กลุ่มมอลลัสก์ที่พบว่า เมื่อฉีดสาร BPA ในระดับความเข้มข้นต่ำเข้าสู่ตัวสัตว์ทดลอง โดยใช้ระยะเวลาในการทดสอบต่อเนื่องยาวนานขึ้น สัตว์สามารถตอบสนองต่อสาร BPA ได้อย่างชัดเจน เช่น รายงานของ Duft et al. (2003) ทำการฉีดสาร BPA ปริมาณ $0.19 \text{ ng g}^{-1}\text{dw}$ เข้าสู่หอยทาก New Zealand mud snail (*Potamopyrgus*

antipodarum) เป็นระยะเวลาสั้น 9 สัปดาห์ พบว่า หอยเพชเมียบีการสร้างเซลล์ไข่มุเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่การทดลองของ Jobling et al. (2003) ใช้วิธีเลี้ยงหอยทากชนิดเดียวกันในน้ำทะเลที่มีสาร BPA ความเข้มข้น $5,000 \text{ ng L}^{-1}$ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้ผลการทดลองสอดคล้องกันคือหอยเพชเมียบีการสร้างเซลล์ไข่มุมากกว่าสภาวะปกติ รวมถึงรายงานของ Aarab et al. (2006) พบว่าหอยแมลงภู่ blue mussel (*Mytilus edulis*) ที่ได้รับสัมผัสสาร BPA ความเข้มข้น $50,000 \text{ ng L}^{-1}$ เป็นเวลาต่อเนื่อง 3 สัปดาห์ ทั้งหอยเพศผู้และเพศเมียมีการสร้างเซลล์ไข่มุเพิ่มขึ้น แต่เซลล์ไข่มุจะถูกทำลายได้เร็วกว่าปกติ และยังส่งผลทำให้การสังเคราะห์โปรตีนจำพวก phosphoproteins ในหอยเพชเมียบีลดลง

อนึ่ง เป็นที่น่าสนใจว่าผลการทดลองในครั้งนี้ เมื่อให้หอยแมลงภู่ได้รับสาร BPA นาน 12 ชั่วโมง ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบมีระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* (0.48 ± 0.10 และ 0.50 ± 0.09 ตามลำดับ) แตกต่างจากที่เวลาเริ่มต้น (0.75 ± 0.09 และ 0.75 ± 0.09 ตามลำดับ) และที่เวลา 6 ชั่วโมง (0.74 ± 0.09 และ 0.96 ± 0.11 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยวงจรรนาฬิกาชีวภาพ (circadian rhythm) ในสัตว์ทดลอง ดังมีรายงานในทากทะเล California sea hare (*Aplysia californica*) ซึ่งเป็นกลุ่มมอลลัสก์เดียวกันกับหอยแมลงภู่ มีการสร้างฮอโรโมนเซโรโทนิน (serotonin) ขึ้นในปมประสาทสมอง ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมพฤติกรรมกรรมการพักผ่อนหรือออกหาอาหารในรอบวัน (Kupfermann and Weiss, 1981) ดังนั้นการทดลองครั้งนี้ ที่ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่หลังได้รับสาร 12 ชั่วโมง เป็นเวลากลางคืน (21.00 น.) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นช่วงพักของหอยแมลงภู่

กระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกายจึงลดลงและอาจส่งผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ได้

ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ของหอยแมลงภู่ในตัวเต็มวัยในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ นับว่าเป็นการวิจัยนำร่องที่จะสามารถนำไปขยายผลการศึกษามากขึ้นทั้งความรู้พื้นฐานและประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในแหล่งน้ำต่อไป ทั้งนี้ควรทำการทดสอบเพิ่มเติมให้หอยแมลงภู่ได้รับสาร BPA ในระยะเวลาสั้นมากกว่า 12 ชั่วโมง ซึ่งคาดว่าจะเห็นแนวโน้มของระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ชัดเจนมากขึ้นและเป็นการวัดในระดับ messenger RNA ที่สังเคราะห์เป็น PRP16 ซึ่งโปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมและการเจริญเติบโตของร่างกายของสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ควรเพิ่มเติมการทดสอบในหอยแมลงภู่วัยอ่อนร่วมด้วย ซึ่งร่างกายมีอัตราเมแทบอลิซึมสูงกว่าระยะตัวเต็มวัย อาจตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ที่ตอบสนองต่อสาร BPA ได้ไวกว่าระยะตัวเต็มวัย

สรุปผลการวิจัย

1. ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *DHX38* ในหอยแมลงภู่ตัวเต็มวัย มีขนาดเท่ากับ 143 คู่เบส โดยยีน *DHX38* ที่พบในสัตว์ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ PRP16 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม และพบว่าลำดับกรดอะมิโนของ PRP16 ในบริเวณที่ศึกษาของหอยแมลงภู่มีความแตกต่างจากของสัตว์มีกระดูกสันหลัง

2. ระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ในหอยแมลงภู่ตัวเต็มวัยแยกเพศศึกษา เปรียบเทียบระหว่างเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสาร BPA ปริมาณ $10 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$ ที่เวลาเริ่มต้น (0) และ 12 ชั่วโมง พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

3. ระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ในหอยแมลงภู่วัดตัวเต็มวัยไม่แยกเพศศึกษา เมื่อได้รับสาร BPA ปริมาณ $10 \text{ ng g}^{-1}\text{dw}$ นาน 6 ชั่วโมง มีแนวโน้มสูงกว่าที่เวลาเริ่มต้น (0) และ 12 ชั่วโมง แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และระดับความเข้มข้นของ BPA และระยะเวลาที่หอยแมลงภู่วัดตัวเต็มวัยได้รับสัมผัสสาร BPA ในการทดลองครั้งนี้ ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน *DHX38* ทั้งนี้ยีน *DHX38* ในหอยแมลงภู่วัดตัวเต็มวัยหรือของสัตว์ในกลุ่มมอลลัสก์อาจมีกลไกที่แตกต่างไปจากยีน *DHX38* ของกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาเป็นลำดับต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา และภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ทำการวิจัย และเงินทุนวิจัยส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อมและพิษวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล การวิจัยนี้ได้รับการรับรองให้ดำเนินการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ ID #15/2558 และใบอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ เลขที่คำขอ U1-03819-2559

เอกสารอ้างอิง

ณัฐกานต์ โฟโพจิตร, ชูตา บุญภักดี และรุ่งวิทย์ ชัยจิรวงศ์. (2555). เครื่องหมายชีวโมเลกุลในหอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) เพื่อบ่งชี้การปนเปื้อนของสาร 17β -estradiol (E_2) ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ. Thai Journal of Genetics 5(2): 159–165.

Arab, N., Lemaire-Gony, S., Unruh, E., Hansen, P.D., Larsen, B.K., Andersen, O.K. and Narbonne, J.F. (2006). Preliminary study of responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to bis-

phenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether. Aquatic Toxicology 78 (Suppl. 1): S86–S92.

Alonso-Magdalena, P., Ropero, A.B., Soriano, S., Garcia-Arévalo, M., Ripoll, C., Fuentes, E., Quesada, I. and Nadal, Á. (2012). Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. Molecular and Cellular Endocrinology 355: 201–207.

Canesi, L., Borghi, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Vergani, L. and Gallo, G. (2007). Bisphenol-A alters gene expression and functional parameters in molluscan hepatopancreas. Molecular and Cellular Endocrinology 276(1-2): 36–44.

Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Weltje, L., Tillmann, M. and Oehlmann, J. (2003). Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. Aquatic Toxicology 64: 437–449.

Duong, C.N., Ra, J.S., Cho, J., Kim, S.D., Choi, H.K., Park, J.H., Kim, K.W., Inam, E. and Kim, S.D. (2010). Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. Chemosphere 78: 286–293.

Flint, S., Markle, T., Thompson, S. and Wallace, E. (2012). Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. Environmental Management 104: 19–34.

Food and Agriculture Organization. (2014). Global Aquaculture Production 1950-2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations, URL:<http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>. Retrieved July 26, 2016.

Freitas, A.T.A.G., Ribeiro, M.A., Pinho, C.F., Peixoto, A.R., Domeniconi, R.F. and Scarano, W.R. (2016). Regulatory and junctional proteins of the

- blood-testis barrier in human Sertoli cells are modified by monobutyl phthalate (MBP) and bisphenol A (BPA) exposure. *Toxicology in Vitro* 34: 1–7.
- Hall, T.A. (1999). Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Helmestam, M., Davey, E., Stavreus-Evers, A. and Olovsson, M. (2014). Bisphenol A affects human endometrial endothelial cell angiogenic activity *in vitro*. *Reproductive Toxicology* 46: 69–76.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P. and Tyler, C.R. (2003). Comparative responses of mollusks and fish to environmental estrogens and estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology* 65: 205–220.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7): 1870–1874.
- Kupfermann, I. and Weiss, K.R. (1981). The role of serotonin in arousal of feeding behavior of *Aplysia*. In *Serotonin Neurotransmission and Behavior*. Cambridge: MIT Press. pp. 255–287.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947–2948.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45
- Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Viñas, L., Besada, V., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P. and Prada-Rodríguez, D. (2016). Occurrence of alkylphenols and bisphenol A in wild mussel samples from the Spanish Atlantic coast and Bay of Biscay. *Marine Pollution Bulletin* 106: 360–365.
- Schwer, B. and Guthrie, C. (1991). Prp16 in an RNA-dependent ATPase that interacts transiently with the spliceosome. *Nature* 349: 494–499.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. and Rozen, S.G. (2012). Primer 3 –new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15): e115.
- Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S. and Soto, A.M. (2009). Bisphenol-A and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews* 30(1): 75–95.
- Williams, T.D., Diab, A.M., George, S.G., Sabine, V. and Chipman, J.K. (2007). Gene expression responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to 17 β -estradiol. *Toxicology Letters* 168: 236–248.
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P. W. H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L.,

She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S.,
Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G.,
Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C. E. W., Wang,
H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H.,

Liu, X., Wang, J., Yin, Y. and Wang, J. (2012).
The oyster genome reveals stress
adaptation and complexity of shell
formation. *Nature* 490: 49–54.

