

主持人: 李秀保, 郭志强

Open Access

镉、菲暴露对文蛤的氧化损伤及解毒代谢的影响

刘雪^{1,2#}, 荆圆圆², 孙铭², 胡凡光², 张天文², 刘广斌², 高菲^{1*}

(1. 海南大学海洋生物与水产学院南海海洋资源利用国家重点实验室, 海南海口 570228 中国; 2. 山东省海洋科学研究院青岛市浅海底栖渔业增殖重点实验室, 山东青岛 266000 中国)

摘要: 为了探讨镉和菲暴露对文蛤 (*Meretrix meretrix*) 氧化应激反应及解毒代谢的影响, 测定了镉单一暴露、菲单一暴露和镉-菲联合暴露下文蛤外套膜超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)的活性变化和丙二醛(MDA)的含量变化, 以及金属硫蛋白基因(metallothionein, *MT*)和热休克蛋白70 (heat shock protein70, *hsp70*)基因表达量的变化情况。研究表明, 实验过程中各处理组 SOD 活性和 GST 活性大部分较对照组显著性升高 ($P < 0.05$), 除了菲单一处理组, CAT 活性和 MDA 含量大部分较对照组显著性升高 ($P < 0.05$)。各处理组 *MT* 基因均被显著诱导 ($P < 0.05$), 除镉单一处理组, *hsp70* 基因均较对照组被显著性诱导 ($P < 0.05$)。暴露 3 d 时, 除 *hsp70* 基因的表达, 镉和菲联合暴露对其他指标均存在显著交互作用 ($P < 0.05$); 暴露 7 d 时, 除 CAT 酶活性和 MDA 含量, 镉和菲联合暴露对其他指标均存在显著交互作用 ($P < 0.05$)。结果表明, 大部分处理组中镉和菲显著提高文蛤氧化应激相关酶活性, *MT* 基因和 *hsp70* 基因被诱导对机体进行解毒和调节, 提高机体抗刺激和生存能力。

关键词: 镉; 菲; 文蛤; 氧化损伤; 解毒代谢**中图分类号:** S917.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054(2026)02-0265-09

刘雪, 荆圆圆, 孙铭, 等. 镉、菲暴露对文蛤的氧化损伤及解毒代谢的影响[J]. 热带生物学报 (中英文), 2026, 17(2): 265–273. DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240157 CSTR: 32425.14.j.cnki.rdswwb.20240157



随着工农业的发展, 城市生活污水、工业废水及矿山开采和金属冶炼等所产生的有机和无机污染物通过不同方式排入水体中。菲和镉作为有机和无机污染的典型污染物, 在渤海湾天津海域都有较高的检出率^[1-2], 对实验动物染毒和人类暴露的研究表明可产生严重的毒性效应^[3-4], 已引起国内外学者的广泛关注。调查表明, 镉在锦州湾、渤海等水域均有分布, 质量浓度分别为 $1.65 \sim 2.01 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[5] 和 $0.007 \sim 5.000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[6]。之前的研究报道发现, 太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的外套膜、消化腺和闭壳肌中镉 (Cd) 的背景值为 (0.75 ± 0.07) 、 (1.50 ± 0.26) 和 $(0.45 \pm 0.06) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[7]。镉对太平洋牡蛎的急性和慢性毒性已有研究^[8]。镉对太平洋牡蛎胚胎的半数效应浓度 (median effect concentration, EC_{50}) 为 $272.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 对幼体的 96 h 半数致死浓度

(median lethal concentration, LC_{50}) 为 $353.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。镉暴露下, 太平洋牡蛎组织病理学发生显著变化, 如血细胞鳃部可见浸润和丝状肿胀, 消化腺小管浸润、变薄。此外, 环渤海地区所有养殖水产品中多环芳烃的污染状况特别普遍, 其中, 菲 (phenanthrene, *Phe*) 的检出率和平均含量最高, 分别为 88.5% 和 $6.53 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[9]。水环境中的菲可以在鱼类、贝类等体内富集^[10-11], 可对鱼^[10]、太平洋牡蛎^[12]、扇贝 (*Nodipecten nodosus*)^[13]、厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*)^[14] 等产生毒理效应。研究发现, 扇贝暴露在菲水溶液中, 其体内 *CYP2U1*、*CYP2D20*、*CYP3A11* 等基因的转录水平增加^[13]; 菲对厚壳贻贝 *Hsp70* mRNA 诱导表达具有组织特异性, 在外套膜中表达最高^[14]。

水生动物体内镉和菲的积累会催化活性氧



收稿日期: 2024-10-21

修回日期: 2025-03-20

基金项目: 山东省贝类产业技术体系养殖岗位项目 (SDAIT-14)

*第一作者: 刘雪 (2001—), 女, 海南大学海洋生物与水产学院 2023 级硕士研究生。E-mail: 1504350650@qq.com

*通信作者: 高菲 (1981—), 女, 教授, 博士生导师。研究方向: 大型底栖动物生理生态学。E-mail: gaofeicas@126.com

(ROS)的产生,从而产生氧化应激。在各种抗氧化机制中,超氧化物歧化酶(SOD)是第一个对抗ROS产生的氧化应激防御系统。SOD将超氧阴离子转化为过氧化氢^[15]。过氧化氢酶(CAT)通过将 H_2O_2 分解成水来保护细胞免受 H_2O_2 的毒性作用^[16]。在CAT不存在的情况下, H_2O_2 会积累,导致羟基自由基的产生增加。谷胱甘肽S-转移酶(GST)是一种抗氧化剂和Ⅱ相解毒酶,是水生动植物氧化损伤的可靠生物标志物^[17]。丙二醛(MDA)是脂质过氧化的分解产物,也常被用作分析镉暴露后脂质过氧化自由基反应的常见指标^[18]。Macías-Mayorga等^[19]设置了3种镉浓度(0.088、0.440、2.220 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对牡蛎暴露28 d的毒性效应,发现高浓度镉(2.220 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)能够抑制SOD酶和CAT酶活性,对抗氧化系统具有不利影响。Benali等^[20]用紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)作为指示生物,测定了镉对CAT酶和GST酶活性的影响,发现CAT酶活性与Cd浓度呈负相关。将海洋腹足类生物(*Morula granulata*)暴露于不同浓度的非污染时,能明显诱导机体产生氧化应激,导致DNA损伤,研究者也报道谷胱甘肽硫转移酶(GST)可作为检测非污染的有效氧化应激指标^[21]。Bhuyan等^[22]也报道一定浓度的非污染胁迫可以改变蝌蚪的氧化应激指标,并诱导其产生遗传毒性。镉和非对动物应氧化应激反应都是通过催化活性氧(ROS)而产生的^[23-24],存在部分一致性,但在关键生物标志物和时相上是否表现出显著差异性犹未可知。

在机体的解毒过程中,金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类富含半胱氨酸的小分子蛋白质,参与机体重金属解毒和金属元素代谢等生理过程^[25-26]。MT基因在水生无脊椎动物中既参与必需金属的代谢稳态调节,也通过结合非必需金属发挥解毒功能^[27]。热休克蛋白(heat shock protein, Hsp)的表达被用作动物细胞应激的指标,其参与维持蛋白质完整性,以及校正细胞内蛋白质的折叠^[28]。珍珠贝海洋热浪的响应通过hsp70在急性热浪中快速上调,长期重复暴露可缓解热应激,为贝类适应气候变化提供分子证据^[29]。

在海洋环境中,多种污染物共存会对海洋生物产生复合污染和联合毒性。单一机制较难解释

多种污染物共存时的联合效应,有必要开展多种污染物复合污染条件下对生物体的联合作用。目前关于镉和非联合暴露对生物体影响的研究还较少,仅在毛蚶(*Scapharca subcrenata*)上有报道^[30-31]。文蛤(*Meretrix meretrix*)是广泛生长在滩涂与浅海水域的双壳贝类,其滤食特性使其较易富集海洋环境中的污染物。文蛤作为一种经济贝类,因肉质鲜美、营养丰富,含有人体所需多种营养成分,其安全性与人类健康息息相关。本研究的主要目的是研究镉和非单一作用和联合作用下,文蛤体内氧化应激相关酶与解毒代谢基因的变化情况,以期掌握海洋重金属与多环芳烃复合污染的生态毒理效应,并为贝类的健康养殖提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 实验用文蛤捕捞自山东东营市河口区近海,选择活力好、大小均匀的个体进行实验,规格为壳长(30±2) mm。实验前暂养7 d,暂养期间海水盐度(32±2),每日换水1次,持续充氧,定时投喂角毛藻,投喂量为 5×10^8 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,及时拣出死亡、活力差(用玻璃棒碰触外套膜边缘时无收缩反应)的个体。

实验用试剂:氯化镉(CdCl_2)为分析纯级别,购自阿拉丁公司;非购自美国Sigma公司,粉末状,纯度>98%。SOD、CAT、GST酶活性及MDA含量的检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。试剂还包括RNA提取液、三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇、HyPure™ Molecular Biology Grade Water、Servicebio® RT First Strand cDNA Synthesis Kit、2×SYBR Green qPCR Master Mix (None ROX)。

实验仪器:匀浆器台式高速冷冻型微量离心机、荧光定量PCR仪、超微量分光光度计。

1.2 实验设计 镉与非的富集实验在塑料水槽中进行,养殖水体为80 L。共设置3个实验组,分别为10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉单一处理组、100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 非单一处理组、10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 镉+100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 非联合处理组,设空白对照组。其中,非用二甲基亚砜溶解。镉和菲的暴露浓度根据文献报道来设置^[32-35]。实验组和对照组均设置3个平行,每水槽放入100粒文蛤。实验持续7 d,每24 h 全量更换实验溶液,其他管理与暂养期间一致^[36]。第3天和第7天从每

个平行随机取 6 粒文蛤, 各取 3 粒分别用于酶活测定与基因表达测定。

1.3 测定方法

1.3.1 酶活含量测定方法 快速取文蛤外套膜, 用滤纸吸去表面水分, 称质量后剪碎, 放入玻璃匀浆器中, 按照质量(g): 体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍的生理盐水, 在冰浴中制备成 10% 的组织匀浆, 经冷冻离心机(0~4 °C, 3 500 r·min⁻¹)离心 15 min 后, 取上清液, 置于-20 °C 下待测。SOD、CAT、GST 酶活性及 MDA 含量的测定均按照试剂盒说明进行。

1.3.2 基因表达测试方法 总 RNA 提取。称取 0.1 g 外套膜置于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL TriPure Isolation Reagent, 振荡混匀, 在冰上裂解 5 min 后, 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min; 取上清 850 μL 置于新离心管中, 加入 200 μL 三氯甲烷, 剧烈震荡 15 s, 冰上静置 2 min, 于 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min; 取上清 350 μL 置于新离心管中, 再加入 200 μL 三氯甲烷, 震荡混匀, 冰上静置

5 min 后, 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min; 取上清 250 μL 置于新离心管中, 加入等体积异丙醇, 上下颠倒混匀, 室温静置 10 min(出现絮状沉淀); 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 弃上清后加入 1 mL 75% 乙醇洗沉淀; 4 °C、7 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 室温风干去除乙醇后加入 100 μL DEPC 处理水, 溶解 RNA, -80 °C 保存。

RNA 质量检测。采用 Nanodrop 2000 检测 RNA 的纯度。实时荧光定量 PCR (qPCR) 参照 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) 的说明, 内参基因使用文蛤 β-actin rRNA 基因。20 μL 扩增体系为: SYBR® Premix Ex Taq™ II 10 μL; PCR Forward Primer (10 μmol·L⁻¹) 0.8 μL; PCR Reverse Primer (10 μmol·L⁻¹) 0.8 μL; ROX Reference Dye II (50X) 0.4 μL; cDNA 模板 2.0 μL; DEPC 水 6.0 μL。反应程序为 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。qPCR 所用引物见表 1。

表 1 qPCR 所用引物

Tab. 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因名称 Gene	基因库号 Gene bank number	引物序列 (5'—3') Primer sequences (5'—3')	扩增片段大小/bp Amplified fragment size
<i>MT</i>	KU301770.1	F: CGAGGACTGTTCATCAACCACTG R: GCAAACAACCTTTACACCCTGGAC	629
<i>Hsp70</i>	HQ256748.1	F: GGACCACATACTCCTGCGTTG S: CTGGGTCATCAAACCTTCCTTCC	210
<i>Actin</i>	JN084197.1	F: TGTCCCTATCTACGAAGGTTACGC R: CTCGGTCAGGATCTTCATCAAGTA	1 259

1.4 数据统计分析 根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算目标基因的相对表达量^[37]。实验结果均采用平均值±标准差 (mean±S.D.) 表示, 采用 Microsoft Excel 2016 对数据进行作图。运用 SPSS16.0 对数据进行分析, 用单因素方差分析法分析同一时间点不同处理组之间的差异, 用独立样本 *t* 检验分析不同时间点相同处理组之间的差异, 用双重分析法分析镉和菲单一与联合处理后的交互作用, 以 $P<0.05$ 作为显著差异性的标准。

2 结果与分析

2.1 镉、菲单一与联合暴露对文蛤外套膜抗氧化酶活性与 MDA 含量的影响 镉暴露对文蛤外套膜 SOD 活性的影响如图 1 所示。暴露 3 d 时,

镉单一处理组和菲单一处理组的文蛤外套膜 SOD 活性均显著高于空白对照组 ($P<0.05$), 镉-菲联合暴露组显著低于空白对照组 ($P<0.05$)。暴露 7 d 时, 镉单一处理组显著低于空白对照组 ($P<0.05$), 菲单一处理组和镉-菲联合暴露组均显著高于空白对照组, 其中菲单一处理组 SOD 活性最高。

镉暴露对文蛤外套膜 CAT 活性的影响如图 2 所示。暴露 3 d 时, 镉单一处理组 CAT 活性显著低于空白对照组 ($P<0.05$), 镉-菲联合暴露组显著高于空白对照组 ($P<0.05$)。暴露 7 d 时, 镉单一处理组显著高于空白对照组 ($P<0.05$), 菲单一处理组显著低于空白对照组 ($P<0.05$), 镉-菲联合暴露组中 CAT 活性与空白对照组比较无显著性差异。

镉暴露对文蛤外套膜 GST 活性的影响如图 3

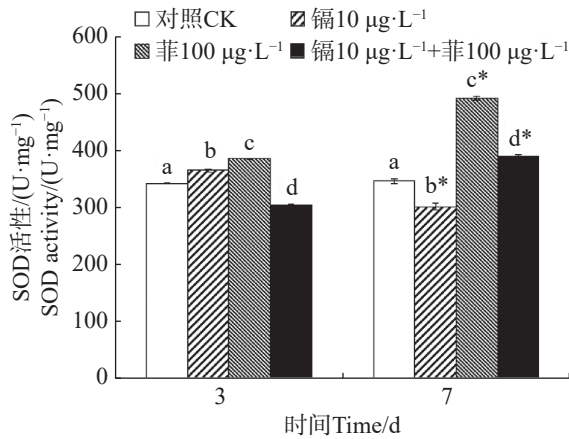


图1 镉、菲对文蛤外套膜 SOD 活性的影响

Fig. 1 Effect of cadmium and phenanthrene on SOD activities in the mantle of *Meretrix meretrix*

注: 不同上标小写字母表示同一时间点不同处理组之间差异显著 ($P < 0.05$); *表示同一处理组不同时间点之间具有显著性差异; 垂直柱状图数据以(均值±标准差)表示($n=3$); 下同。

Note: Values with different superscript letters (a, b, c) are significantly different in different treatments at the same sampling point ($P < 0.05$); * represents significant difference in the same treatment at different sampling points; Vertical bars represent mean \pm S.D ($n = 3$); similarly hereinafter.

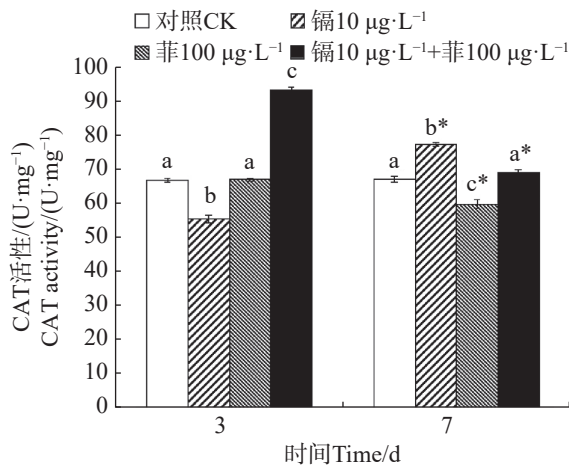


图2 镉、菲对文蛤外套膜 CAT 活性的影响

Fig. 2 Effect of cadmium and phenanthrene on CAT activities in the mantle of *Meretrix meretrix*

所示。暴露 3 d 时, 3 个处理组文蛤外套膜 GST 活性均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 其中, 镉单一处理组 GST 活性最高。暴露 7 d 时, 菲单一处理组和镉-菲联合暴露组 GST 活性均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 其中镉-菲联合暴露组 GST 活性最高。

镉暴露对文蛤外套膜 MDA 含量的影响如图 4 所示。暴露 3 d 时, 镉-菲联合暴露组 MDA 含量显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 镉单一处理组和菲单一处理组 MDA 含量与空白对照组差异不显著

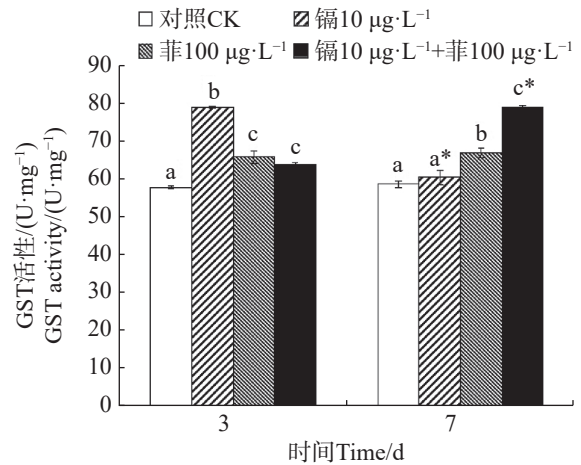


图3 镉、菲对文蛤外套膜 GST 活性的影响

Fig. 3 Effect of cadmium and phenanthrene on GST activities in the mantle of *Meretrix meretrix*

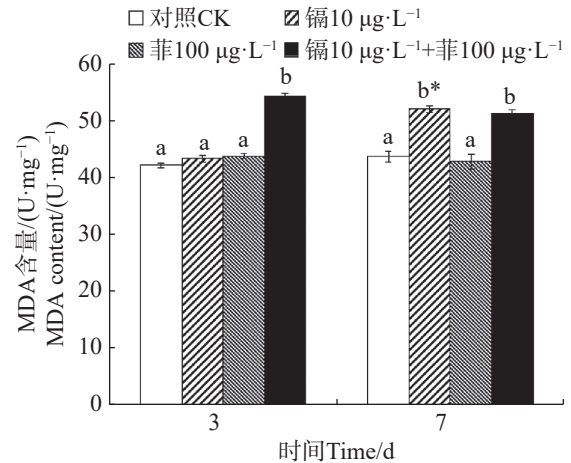


图4 镉、菲对文蛤外套膜 MDA 含量的影响

Fig. 4 Effect of cadmium and phenanthrene on MDA content in the mantle of *Meretrix meretrix*

($P > 0.05$)。暴露 7 d 时, 镉单一处理组 MDA 含量与空白对照组差异不显著 ($P > 0.05$), 菲单一处理组和镉-菲联合暴露组 MDA 含量显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)。

2.2 镉、菲单一与联合暴露对文蛤外套膜 MT 基因和 hsp70 基因表达的影响 镉暴露对文蛤外套膜 MT 基因表达的影响如图 5 所示。暴露 3 d 时, 3 个处理组 MT 基因表达量均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)。暴露 7 d 时, 3 个处理组 MT 基因表达量也均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 其中菲单一处理组和镉-菲联合暴露组 MT 基因被诱导程度较高。

镉暴露对文蛤外套膜 hsp70 基因表达的影响如图 6 所示。暴露 3 d 时, 菲单一处理组 hsp70 基

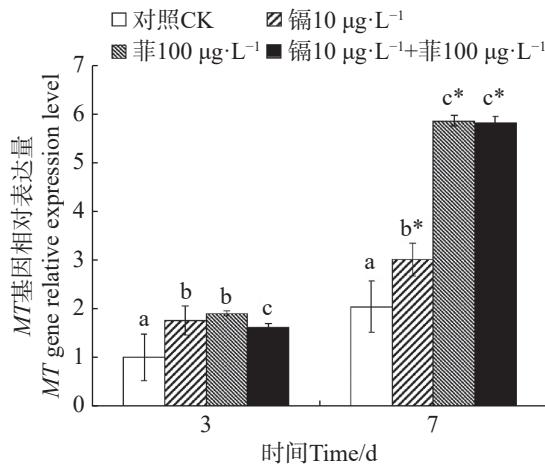


图 5 镉、菲对文蛤外套膜 *MT* 基因表达的影响
Fig. 5 Effect of cadmium and phenanthrene on *MT* gene relative expression level in mantle of *Meretrix meretrix*

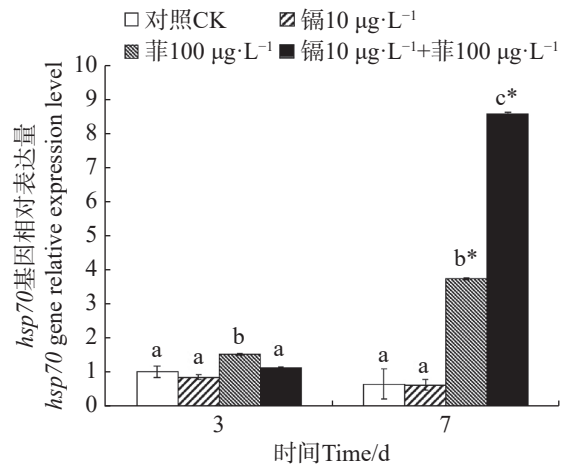


图 6 镉、菲对文蛤外套膜 *hsp70* 基因表达的影响
Fig. 6 Effect of cadmium and phenanthrene on *hsp70* gene relative expression level in the mantle of *Meretrix meretrix*

因表达量显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)。暴露 7 d 时, 菲单一处理组和镉-菲联合暴露组显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 其中镉-菲联合暴露组 *hsp70* 基因表达量最高。

2.3 镉和菲的交互作用 双因素方差分析表明, 3 d 时, 镉单一暴露和菲单一暴露均可显著影响抗氧化酶(SOD、CAT、GST)酶活性、MDA 含量, 以及

MT、*Hsp70* 的表达水平 ($P < 0.05$), 且除了 *hsp70* 基因的表达, 对其他指标均存在显著交互作用 ($P < 0.05$)。7 d 时, 镉单一暴露均可显著影响各指标的变化 ($P < 0.05$); 菲单一暴露组, 除了 *MT* 基因的表达, 可显著影响其他各指标的变化 ($P < 0.05$); 除了 CAT 酶活性及 MDA 含量, 对其他指标均存在显著交互作用 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 镉和菲的交互作用

Tab. 2 The interaction between Cd and Phe

胁迫时间Stress time/d	处理Treatment		SOD	CAT	GST	MDA	<i>MT</i>	<i>hsp70</i>
3	镉单一	<i>F</i>	102.615	2 007.000	49.054	513.311	17.538	29.439
		<i>P</i>	0	0	0	0	0.003	0.001
	菲单一	<i>F</i>	1 067.000	313.415	371.224	436.282	6.425	13.250
		<i>P</i>	0	0	0	0	0.035	0.007
	镉菲联合	<i>F</i>	3 276.000	1 971.000	524.489	280.220	32.842	2.495
		<i>P</i>	0	0	0	0	0	0.153
7	镉单一	<i>F</i>	1 914.000	217.771	339.240	2.495	231.134	1 733.000
		<i>P</i>	0	0	0	0.153	0	0
	菲单一	<i>F</i>	715.713	340.473	88.964	261.199	4.575	327.583
		<i>P</i>	0	0	0	0	0.065	0
	镉菲联合	<i>F</i>	110.628	0.787	49.734	0.013	5.396	333.065
		<i>P</i>	0	0.401	0	0.911	0.049	0

3 讨论

3.1 镉、菲单一与联合暴露对文蛤外套膜氧化损伤和抗氧化防御系统的影响 重金属和多环芳烃

暴露对贝类体内 SOD 和 CAT 活性有直接影响。太平洋牡蛎在葱的胁迫下, SOD 和 CAT 活性出现先诱导后抑制的动态变化过程^[38]。在镉和菲单一和联合作用下, 毛蚶体内 SOD 和 CAT 活力呈现

被诱导的趋势^[28]。文蛤鳃组织 SOD 活性在 0.41 和 0.82 mg·L⁻¹ 镉胁迫下, 试验前期(0~48 h)呈现诱导效应, 试验后期(48~96 h)呈现抑制效应; CAT 活性在低质量浓度(0.41 mg·L⁻¹)镉胁迫下出现阶段性抑制效应, 接着呈现诱导-抑制过程^[39]。本研究中, 镉单一暴露下, SOD 活性先被显著性诱导又被显著性抑制, 而 CAT 活性先被显著性抑制, 后被显著性诱导; 菲单一暴露下, SOD 活性均被显著诱导, CAT 活性与对照组无显著性变化, 镉-菲联合暴露下, SOD 活性先被显著抑制, 后被显著诱导, 而 CAT 活性均被显著诱导。500 μg·L⁻¹ 镉和 50 μg·L⁻¹ 菲单一和联合暴露 9 d, 毛蚶体内 SOD 活性和 CAT 活性均呈现出被诱导的趋势^[28], 与本实验结果有差异, 可能与镉-菲的暴露浓度、染毒时间及生物体的敏感性等多种因素的差异有关。本实验中, 镉-菲单一与联合暴露组中实验过程中, SOD 活性均较对照组有显著增高, 说明暴露过程中可导致自由基产生。CAT 活性在镉-菲联合暴露组最高, 这可能与 CAT 酶的功能有关。CAT 酶利用铁或锰作为辅助因子, 可以催化过氧化氢(H₂O₂)降解或者还原为水和分子氧, 从而完成 SOD 代谢的解毒过程^[40-41], 因此, SOD 酶和 CAT 酶通过共同作用清除多余的 ROS 来解毒。在有机体中, SOD 将 O²⁻ 转化为 O² 和 H₂O₂, 然后 CAT 将 H₂O₂ 转化为 H₂O。暴露 3 d 时, 镉和菲的联合暴露对文蛤 SOD 酶和 CAT 酶具有交互作用, 说明其共存对于文蛤体内自由基的产生具有协同作用; 暴露 7 d 时, 镉和菲的联合暴露对文蛤 SOD 酶表现出交互作用, 而对 CAT 酶的交互作用不明显, 说明暴露时间是决定混合污染物对机体免疫毒性的的重要因素。镉和菲联合暴露的交互作用在蚯蚓中也有报道, 结果表明镉和菲联合暴露对 SOD 酶不存在显著交互作用^[42], 而对 CAT 酶具有显著交互作用, 该结果与本研究结果的差异, 推测与物种差异有关。SOD 和 CAT 的协同作用通过清除超氧阴离子(O₂⁻)和过氧化氢(H₂O₂)减轻氧化损伤, 其活性的阶段性抑制可能暗示抗氧化系统超负荷, 导致机体修复能力衰退, 这直接威胁底栖生物的生存适应性, 进而影响其在生态系统中的功能角色。

GST 是一种重要的生物转移酶, 它可以在 GSH 参与下催化分解氧化应激过程中产生的脂质过氧化产物, 修复或缓解机体细胞的氧化损伤^[17]。作为

第二阶段解毒酶, 又可以催化污染物与 GST 结合, 生成水溶性的 GSH 硫结合物, 起到解毒作用。研究报道紫贻贝暴露于六价铬中 GST 活性显著增加^[43]; Cd 或苯并芘可分别诱导梨型环棱螺(*Bellamya purificata*)和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的鳃、消化盲囊 GST 活性升高^[44-45]。本研究中, 镉和菲联合暴露在 3 d 和 7 d 时对文蛤 GST 酶活性均具有交互作用。这表明镉和菲暴露造成的氧化应激可以使机体通过反馈调节提高 GST 活性, 通过结合谷胱甘肽(GSH)加速污染物代谢, 以对抗氧化损伤, 降低镉和菲的细胞毒性^[17,46], 同时也是一种机体的保护性反应, 将外源污染物排出体外, 减少在机体中的蓄积, 这一机制在贝类应对复合污染时具有关键作用。镉和菲联合暴露对 GST 的影响在贝类中未见报道, 但菲和微塑料联合暴露对四角蛤蜊 GST 酶活性的影响已有研究, 研究发现高质量浓度的菲(50 μg·L⁻¹)与小粒径微塑料(17 μm)复合可以显著诱导四角蛤蜊 GST 酶活性, 而高质量浓度的菲(50 μg·L⁻¹)与大粒径微塑料(150 μmol·L⁻¹)复合可以显著抑制四角蛤蜊 GST 酶活性^[18]。

当机体受到氧化应激产生的大量自由基与细胞膜上的多不饱和脂肪酸发生过氧化反应时, 产生的过氧化物进一步分解成具有细胞毒性的 MDA。因此, MDA 质量浓度上升往往代表着机体受到了氧化损伤^[18]。研究表明, 紫贻贝暴露于镉时 MDA 含量会增加^[47]。96 h 的镉胁迫试验后, 各胁迫组文蛤鳃组织中 MDA 含量显著上升, Cd 对 MDA 的诱导作用显著且存在剂量-效应关系^[39]。本研究中, 镉单一处理组在 7 d 时 MDA 含量较对照组显著增加, 镉-菲联合暴露组在 3 d 和 7 d 时均较对照组显著增加, 说明文蛤体受到严重的氧化损伤, 而相比单一菲暴露, 镉单一处理组及镉-菲联合暴露组造成更严重的氧化损伤。MDA 含量的升高反映了脂质过氧化损伤的累积, 降低了文蛤的抗逆能力, 若自然界或养殖水域内镉、菲超标, 则会导致此类生理损伤长期存在, 可能导致种群衰退, 并通过食物链传递给更高营养级, 加剧生态风险。

3.2 镉-菲单一与联合暴露对文蛤外套膜解毒代谢的影响 MT 是一种富含半胱氨酸(Cys)且广泛存在于生物体内的小分子蛋白, 有结合金属离子的能力, 也有效调节生物体细胞内的金属离子平衡的能力, 具有重金属解毒、清除自由基等的功能。有关贝类 MT 基因作为环境污染物的分子标

记物一直以来是研究重点,但是关于有机污染物对贝类体内 *MT* 基因表达影响的相关报道还较少。目前仅见苯并芘对毛蚶体内 *MT* 基因具有诱导作用^[48]。本研究中,文蛤受到水环境中镉和菲的胁迫,外套膜中 *MT* 基因在不同的处理组均被显著性诱导,说明外套膜中产生大量的金属硫蛋白来对污染物进行解毒代谢。菲对 *MT* 基因的诱导程度比镉对 *MT* 基因的诱导程度高,可能与暴露浓度有关,高浓度的菲刺激了文蛤启动解毒代谢机制。有研究报道,牡蛎(*Crassostrea brasiliana*)中与解毒代谢有一定关联的基因,如 *CYP2-like1* 和 *CYP2A1* 基因也会被菲激活^[49,35]。在其他有机污染物的报道中也发现相似的研究结果。苯并芘暴露下,厚壳贻贝鳃和消化腺中与解毒代谢相关的基因 *McCYP3A1* 被诱导,栉孔扇贝中 *CYP3A-like* 基因表达量显著上升^[50]。

Hsp70 是一类应激蛋白,在结构上高度保守。在细胞受到外界环境胁迫时应激表达,帮助变性蛋白复性和清除永久性变性蛋白,在污染物刺激下,其表达量会显著增加。本研究中,暴露 7 d 时,与对照组相比,镉单一处理组 *hsp70* 表达量无显著性差异,而菲单一处理组及镉-菲联合暴露组 *hsp70* 基因均被显著性诱导,且镉-菲联合暴露组 *hsp70* 表达量是菲单一处理组 *hsp70* 表达量的 3.12 倍。双因素方差分析表明,暴露 7 d 时,镉菲联合暴露对文蛤 *hsp70* 表达量具有显著的交互作用,说明镉-菲联合暴露下,文蛤受到胁迫时,为防止细胞内蛋白凝聚或变性,维持细胞内环境稳定,*hsp70* mRNA 被诱导表达来增强机体抗刺激及生存能力。

本研究中,*MT* 的长期诱导可能反映重金属在食物网中的潜在累积风险^[48],*hsp70* 的高表达可能预示生态系统面临持续污染压力^[14,22,28]。当污染物浓度超过阈值时,抗氧化系统可能暂时崩溃,但通过基因调控(如 *MT* 基因和 *hsp70* 的诱导)可实现长期耐受。这种耐受性对维持潮间带贝类种群的稳定性至关重要,尤其在渤海湾等镉-菲复合污染频发的区域,文蛤可能通过此类机制成为生态系统的“缓冲物种”,延缓污染物向高营养级的传递^[51]。

4 结 论

研究镉菲单一与联合暴露对文蛤外套膜抗氧

化酶及解毒代谢基因的影响,结果表明,文蛤具有较好的抗氧化性和解毒代谢功能。实验结果表明,镉和菲联合暴露对文蛤的氧化胁迫大于菲和镉单独作用。说明抗氧化酶和解毒代谢基因等指标可以作为镉和菲污染的早期预警分子,外套膜可以作为合适的材料。

参考文献:

- [1] 程远梅,祝凌燕,田胜艳,等. 海河及渤海表层沉积物中多环芳烃的分布与来源[J]. 环境科学学报, 2009, 29(11): 2420-2426. <https://doi.org/10.13671/j.hjkxxb.2009.11.022>
- [2] 彭士涛,胡焱弟,白志鹏. 渤海湾底质重金属污染及其潜在生态风险评估[J]. 水道港口, 2009, 30(1): 57-60. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-8443.2009.01.011>
- [3] Benavides M P, Gallego S M, Tomaro M L. Cadmium toxicity in plants [J]. Brazilian Journal of Plant Physiology, 2005, 17(1): 21-34. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100003>
- [4] Nordberg G F. Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China [J]. Toxicology Letters, 2010, 192(1): 45-49. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.06.859>
- [5] Wan L, Wang N B, Li Q B, et al. Distribution of dissolved metals in seawater of Jinzhou Bay, China [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008, 27(1): 43-48. <https://doi.org/10.1897/07-155.1>
- [6] Gao X L, Zhou F X, Chen C T A. Pollution status of the Bohai Sea: an overview of the environmental quality assessment related trace metals [J]. Environment International, 2014, 62: 12-30. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.09.019>
- [7] Sun M, Liu G B, Lin H, et al. Effect of salinity on the bioaccumulation and depuration of cadmium in the pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2018, 62: 88-97. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.05.018>
- [8] Xie J, Yang D L, Sun X. Combined toxicity of cadmium and lead on early life stages of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* [J]. Invertebrate Survival Journal, 2017, 14(1): 210-220.
- [9] 郑关超,郭萌萌,赵春霞,等. 环渤海地区养殖水产品中多环芳烃(PAHs)污染残留及健康风险评估[J]. 中国渔业质量与标准, 2015, 5(6): 20-26.
- [10] 吴玲玲,明玺,陈玲,等. 长江口水域菲含量及对斑马鱼组织结构的影响[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(7): 13-15. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1003-6504.2007.07.005>
- [11] 刘宪斌,陈楠,田胜艳,等. 天津高沙岭潮间带泥螺对多环芳烃菲的累积特征[J]. 生态环境学报, 2009, 18(4): 1241-1246. <https://doi.org/10.16258/j.cnki.1674-5906.2009.04.018>
- [12] Lima D, Zacchi F L, Mattos J J, et al. Molecular and cellular effects of temperature in oysters *Crassostrea brasiliana* exposed to phenanthrene [J]. Chemosphere, 2018, 209: 307-318. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.094>

- [13] Piazza R S, Trevisan R, Flores-Nunes F, et al. Exposure to phenanthrene and depuration: changes on gene transcription, enzymatic activity and lipid peroxidation in gill of scallops *Nodipecten nodosus* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 177: 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.025>
- [14] 曾梦妮, 李磊, 马丽艳, 等. 菲在厚壳贻贝体内的富集与释放及其对 HSP70 mRNA 表达的影响 [J]. *渔业科学进展*, 2021, 42(6): 93–101. <https://doi.org/10.19663/j.issn2095-9869.20200811002>
- [15] Sui Y, Huang X Z, Kong H, et al. Physiological responses to salinity increase in blood parrotfish (*Cichlasoma synspilum* ♀ × *Cichlasoma citrinellum* ♂) [J]. *SpringerPlus*, 2016, 5(1): 1246. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2930-x>
- [16] Kirkman H N, Gaetani G F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2007, 32(1): 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.003>
- [17] Srikanth K, Pereira E, Duarte A C, et al. Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish: a review [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(4): 2133–2149. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1459-y>
- [18] Farombi E O, Adelowo O A, Ajimoko Y R. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2007, 4(2): 158–165. <https://doi.org/10.3390/ijerph2007040011>
- [19] Macías-Mayorga D, Laiz I, Moreno-Garrido I, et al. Is oxidative stress related to cadmium accumulation in the mollusc *Crassostrea angulata*? [J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 161: 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.02.007>
- [20] Benali I, Boutiba Z, Grandjean D, et al. Spatial distribution and biological effects of trace metals (Cu, Zn, Pb, Cd) and organic micropollutants (PCBs, PAHs) in mussels *Mytilus galloprovincialis* along the Algerian west coast [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 115(1/2): 539–550. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.028>
- [21] Bhagat J, Sarkar A, Ingole B S. DNA damage and oxidative stress in marine gastropod *Morula granulata* exposed to phenanthrene [J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2016, 227(4): 114. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2815-1>
- [22] Bhuyan K, Patar A, Singha U, et al. Phenanthrene alters oxidative stress parameters in tadpoles of *Euphlyctis cyanophlyctis* (Anura, *Dicroglossidae*) and induces genotoxicity assessed by micronucleus and comet assay [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(17): 20962–20971. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08609-3>
- [23] 张燕. 低剂量镉及其与菲复合污染 Hormesis 效应的氧化应激机制 [D]. 上海: 上海交通大学, 2010.
- [24] 杨惠珍. 镉对背角无齿蚌外套膜、鳃和肝脏的氧化损伤研究 [D]. 太原: 山西大学, 2015.
- [25] Margoshes M, Vallee B L. A cadmium protein from equine kidney cortex [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1957, 79(17): 4813–4814. <https://doi.org/10.1021/ja01574a064>
- [26] Miles A T, Hawksworth G M, Beattie J H, et al. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 35(1): 35–70. <https://doi.org/10.1080/10409230091169168>
- [27] Amiard J C, Amiard-Triquet C, Barka S, et al. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 76(2): 160–202. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015>
- [28] Mukhopadhyay I, Nazir A, Saxena D K, et al. Heat shock response: *hsp70* in environmental monitoring [J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2003, 17(5): 249–254. <https://doi.org/10.1002/jbt.10086>
- [29] Xu Y, Lian G J, He G X, et al. Responses of pearl oysters to marine heatwaves as indicated by HSP70 [J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 847585. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2022.847585>
- [30] 阎波, 谭送琴, 马晓芳, 等. 菲和镉单一及复合污染条件下在毛蚶体内的富集动力学研究 [J]. *生态毒理学学报*, 2017, 12(3): 572–578. <https://doi.org/10.7524/AJE.1673-5897.20160927001>
- [31] 阎波, 李英, 高楠, 等. 菲-Cd 单一与联合作用对毛蚶的氧化胁迫及损伤 [J]. *海洋环境科学*, 2015, 34(6): 858–864. <https://doi.org/10.13634/j.cnki.mes.2015.06.010>
- [32] Jo P G, Choi Y K, Choi C Y. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2008, 147(4): 460–469. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.02.001>
- [33] Gueguen Y, Denis S, Adrien S, et al. Response of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* to cadmium and chromium: identification of molecular biomarkers [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 118(1/2): 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.03.012>
- [34] Lüchmann K H, Mattos J J, Siebert M N, et al. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliiana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 105(3/4): 652–660. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.09.003>
- [35] Lüchmann K H, Dafre A L, Trevisan R, et al. A light in the darkness: new biotransformation genes, antioxidant parameters and tissue-specific responses in oysters exposed to phenanthrene [J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 152: 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.021>
- [36] 孔志明. 环境毒理学 [M]. 6 版. 南京: 南京大学出版社, 2017: 339.
- [37] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- [38] 朱道玉, 张培玉. 蕙对太平洋牡蛎不同发育时期抗氧化酶活性差异性影响 [J]. *动物学杂志*, 2006, 41(4): 6–9. <https://doi.org/10.3969/j.issn.0250-3263.2006.04.002>
- [39] 张宜奎, 宋秀凯, 刘爱英, 等. Cd²⁺胁迫对文蛤鳃组织 SOD、CAT 活性及 MDA 含量的影响 [J]. *安全与环境*

- 学报, 2011, 11(6): 19–23. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1009-6094.2011.06.005>
- [40] Chelikani P, Fita I, Loewen P C. Diversity of structures and properties among catalases [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, 61(2): 192–208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
- [41] Marklund S L. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species [J]. *Biochemical Journal*, 1984, 222(3): 649–655. <https://doi.org/10.1042/bj2220649>
- [42] 赵作媛. 镉-菲复合污染对蚯蚓的急性毒性效应及抗氧化酶的影响[D]. 上海: 上海交通大学, 2007.
- [43] Ciacci C, Barmo C, Gallo G, et al. Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 120-121: 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.04.015>
- [44] 侯建军, 张清顺, 熊邦喜, 等. 二价镉对梨形环棱螺毒理效应的研究[J]. *中国农业大学学报*, 2009, 14(3): 54–62. <https://doi.org/10.3321/j.issn:1007-4333.2009.03.011>
- [45] 任加云, 潘鲁青, 苗晶晶. 苯并(a)芘和苯并(k)荧蒹混合物对栉孔扇贝毒理学指标的影响[J]. *环境科学学报*, 2006, 26(7): 1180–1186. <https://doi.org/10.3321/j.issn:0253-2468.2006.07.023>
- [46] 柏世军. 水环境镉对罗非鱼的毒性作用和机理探讨[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [47] Vlahogianni T H, Valavanidis A. Heavy-metal effects on lipid peroxidation and antioxidant defence enzymes in mussels *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Chemistry and Ecology*, 2007, 23(5): 361–371. <https://doi.org/10.1080/02757540701653285>
- [48] 董文强. 毛蚶三种抗氧化应急类蛋白基因的鉴定及其在苯并芘与镉单一及复合胁迫下的表达[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019. <https://doi.org/10.27747/d.cnki.gzjhy.2019.000143>
- [49] Zacchi F L, De Lima D, Flores-Nunes F, et al. Transcriptional changes in oysters *Crassostrea brasiliensis* exposed to phenanthrene at different salinities [J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 183: 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.016>
- [50] Yadetie F, Butcher S, Førde H E, et al. Conservation and divergence of chemical defense system in the tunicate *Oikopleura dioica* revealed by genome wide response to two xenobiotics [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 55. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-55>
- [51] Rainbow P S. Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and toxicity [J]. *Environment International*, 2007, 33(4): 576–582. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.007>

Effects of phenanthrene and cadmium on oxidative stress and detoxification in *Meretrix meretrix*

Liu Xue^{1,2#}, Jing Yuanyuan², Sun Ming², Hu Fanguang², Zhang Tianwen²,
Liu Guangbin², Gao Fei^{1*}

(1. State Key Laboratory of Marine Resources Utilization in South China Sea, College of Marine Biology and Fisheries, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Qingdao Key Laboratory of Benthic Fisheries Aquaculture and Enhancement, Marine Science Research Institute of Shandong Province (National Oceanographic Center Qingdao), Qingdao, Shandong 266000, China)

Abstract: In order to understand the effects of cadmium and phenanthrene on the oxidative stress and detoxification in the mantle of *Meretrix meretrix*, the SOD, CAT, GST activities and MDA content were detected under single and combined exposure to cadmium and phenanthrene. The metallothionein (*MT*) and heat shock protein (*hsp70*) gene expressions were also measured. The results showed that the SOD activity and GST activity in all the treatments were significantly increased compared with those in the control group ($P < 0.05$), that the CAT activity and MDA content were significantly increased compared with that in the control group ($P < 0.05$) except for the group exposed to Cd. *MT* gene expression was significantly induced in all treatments, and that the *hsp70* gene expression was significantly induced except for the group exposed to Phe. At the 3 d of exposure, interactive effects were observed in all the indexes except for *hsp70*; at the 7 d of exposure, interactive effects were observed in all the indexes except for CAT activity and MDA content. It is indicated that Cd and Phe have significant effects on the oxidative stress responses in *M. meretrix*. The *MT* gene and *hsp70* gene are induced to detoxify and regulate the body, improving its ability to resist stimuli and survive.

Keywords: cadmium; phenanthrene; *Meretrix meretrix*; oxidative stress; detoxification

(责任编辑: 钟云芳)