

菲和 Cd^{2+} 单一及复合污染对毛蚶氧化胁迫效应的比较

阎波^{1,2,3}, 张欣¹, 张轲¹, 陈莉¹, 田丹¹

(1. 天津科技大学 海洋与环境学院, 天津 300457; 2. 天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津 300457; 3. 天津市海洋环境保护与修复技术工程中心, 天津 300457)

摘要: 采用半静态染毒实验研究了菲和 Cd^{2+} 单一及复合污染下胁迫 9 d 和清水释放 2 d 过程中毛蚶体内活性氧(ROS)、谷胱甘肽(GSH)含量和谷胱甘肽硫转移酶(GST)活性的变化。结果表明, 菲和 Cd^{2+} 单独胁迫能诱导毛蚶体内 ROS 含量的增加及 GSH 含量、GST 活性的降低, 且随染毒浓度的增加, 对各指标影响愈明显, 存在剂量-效应关系。毛蚶体内 GSH 和 GST 的变化趋势具有一致性。菲和 Cd^{2+} 复合污染对毛蚶体内的氧化胁迫效应整体大于二者单独污染。在清水释放阶段, 单一及复合污染胁迫组各指标均能恢复至对照组水平。表明毛蚶体内抗氧化系统适合作为监测海洋多环芳烃和重金属复合污染的生物标志物。

关键词: 菲; Cd^{2+} ; 复合污染; 氧化胁迫; 毛蚶

中图分类号: Q178.53 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2021)01-0044-10

DOI: 10.11759/hyxx20200720006

我国沿海地区的环境污染主要表现为有机物和重金属污染, 多环芳烃(PAHs)菲和 Cd^{2+} 作为有机物和重金属污染的典型代表, 在渤海湾海域的生物体内均有较高浓度的检出^[1-3]。如郑关超等^[4]采用高效液相色谱法分析环渤海地区养殖水产品中 PAHs 含量, 其中菲的平均含量最高为 $6.53 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 检出率高达 88.5%。庞艳华等^[5]采用电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)分析大连近岸海域双壳经济贝类体内重金属的含量, 并采用单因子评价模式对重金属蓄积程度进行评价, 发现部分样品 Cd^{2+} 含量超标。已有大量研究表明, 菲和 Cd^{2+} 污染会对海洋生物产生一系列有害的化学作用, 包括通过增加生物体内活性氧或自由基类物质的浓度^[6], 导致机体氧化系统和抗氧化防御系统失衡, 从而使之产生氧化应激反应, 甚至造成显著的毒性影响^[7-8]。目前, 单一污染物或同种污染物在海洋生物体内的富集及毒性机理研究已较为深入^[9-10], 但随着环境毒理学研究的不断深化, 传统的作用机制不能用于解释多种污染物的复合作用, 对于多种污染物的影响研究愈加引起广泛关注, 阎波等^[7]通过室内半静态双箱动力学模型研究了菲和 Cd^{2+} 单一和复合污染条件下在毛蚶体内的富集动力学, 发现在两种污染物同时暴露时, 毛蚶对菲和 Cd^{2+} 的吸收富集均有所增强。李定龙等^[11]认为四溴双酚 A(TBBPA)和镉对蚯蚓和斑马鱼的死

亡率均表现为协同作用。由此可见, 复合污染有其特殊的毒性机制。并且复合污染模式的研究更能解决实际环境问题, 广泛地开展这方面的研究是大势所趋。

毛蚶(*Anadara subcrenata*)是重要的海产经济贝类, 普遍生活在我国渤海海域潮间带地区。因其生活在沙质淤泥底部、移动性差、特殊的滤食特性使它们易受污染物的长期影响, 并能有效富集海洋中的污染物, 是一种监测海洋污染物生物有效性的指示生物^[12]。而毛蚶作为一种美味的海产品, 其生物安全性与人类健康息息相关。本实验选用毛蚶为研究对象, 通过半静态染毒实验, 观察不同浓度菲和 Cd^{2+} 单一污染和复合污染情况下毛蚶体内活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)、谷胱甘肽(Glutathione, GSH)含量和谷胱甘肽硫转移酶(Glutathione-S-transferase, GST)活性的变化规律。以期揭示海洋生物暴露于复合污染中而导致的氧化应激毒性提供线索, 并为生态风险评估提供科学依据。

收稿日期: 2020-07-20; 修回日期: 2020-08-21

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术计划资助项目(15JCYBJC23200)
[Foundation: The Natural Science Foundation of Tianjin, People's Republic of China as a key basic research development and planning project, No. 15JCYBJC23200]

作者简介: 阎波(1973-), 女, 河南省安阳人, 副教授, 博士, 主要从事环境污染效应研究, 022-60602701, E-mail: yanbo@tust.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 实验材料

毛蚶购于天津市滨海新区金元宝大型海鲜市场, 在实验室中用海水晶配制的人工海水(盐度为 26)驯养 7 d 以上用于染毒实验。驯养在水族箱(60 cm×30 cm×35 cm)中进行, 间断性曝气充氧, 水温控制在(18.0 ± 0.5℃), 用虹吸法每日更换一次养殖用水, 并定时投喂角毛藻作为食物来源。驯养期间及时检查毛蚶的生命状态, 取出死亡个体。毛蚶死亡标准: 两壳长久张开、用探针多次刺激无张合反应。驯养结束后选择个体健康、大小均匀的毛蚶进行正式实验, 本次实验选用的毛蚶壳长 3±1 cm、壳高 2±1 cm、软组织湿重 5.00±1.00 g。

菲(Phenanthrene)为分析纯(购于美国 Sigma 公司, 纯度>98%), 用 N, N-二甲基甲酰胺(DMF)溶解, 配制浓度为 5 g·L⁻¹ 的储备液。重金属镉为 CdCl₂·2.5 H₂O 固体, 分析纯(购于天津市风船化学试剂科技有限公司), 配制浓度为 50 g·L⁻¹ 的镉储备液。DMF 为分析纯(购于天津市风船化学试剂科技有限公司), 蛋白质、ROS、GSH 和 GST 测试试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 半静态染毒实验

本实验分为染毒(9 d)和清水释放(2 d)两个阶段。染毒阶段将配制的菲和 Cd²⁺储备液分别稀释成浓度为菲 50 mg·L⁻¹ 和 Cd²⁺ 500 mg·L⁻¹ 的使用液。各染毒实验组的浓度设置如表 1 所示, 包括空白对照组和 DMF(最大体积比 0.01%)对照组各 1 组, 菲和 Cd²⁺的单一染毒共 4 组, 菲和 Cd²⁺复合染毒 1 组。实验在 2 L 的玻璃烧杯中进行, 不同染毒组均设置 3 个平行。实验期间每 24 h 更换一次实验用水(按照设置浓度),

表 1 半静态染毒实验设计表

Tab. 1 The design table of semi-static infected experiment

组别	组号	菲浓度/(μg·L ⁻¹)	Cd ²⁺ 浓度/(μg·L ⁻¹)
空白对照组	1	0	0
DMF 对照组	2	0	0
	3	10	0
	4	50	0
单一染毒组	5	0	100
	6	0	500
	7	50	500

定时定量投喂角毛藻。释放阶段将配制的染毒溶液换成未染毒的人工海水进行 2 d 的清水恢复实验。

为确定半静态染毒实验的本底值以及染毒溶液的工作浓度, 分别对所配制的人工海水及各染毒组溶液中菲和 Cd²⁺的含量进行测定, 其中菲的浓度采用 GB/T26411-2010 气相色谱法-质谱法进行测定, Cd²⁺的含量参照 GB17378.4-2007 火焰原子吸收分光光度法进行测定。

1.2.2 毛蚶生理指标的测定

在半静态染毒实验的第 1、3、5、7、9 d 和清水恢复阶段的第 2 d 采集毛蚶样品。从各染毒组随机取出至少 2 只毛蚶, 迅速剥除外壳, 取出全部组织, 用生理盐水(0.86%)除去表层血渍, 沥干后称重、剪碎, 移至玻璃匀浆器中, 按质量(g): 体积(mL)=1:9 的比例加入 4℃预冷的生理盐水, 在冰浴中充分匀浆制备成 10%的组织匀浆液。经冷冻离心机在 4℃、3500 r·min⁻¹ 下低温离心 10 min, 取上清液置于-20℃待测。

蛋白质含量、ROS、GSH 和 GST 的测定均参照试剂盒说明书进行。其中总蛋白质含量采用考马斯亮兰法进行测定; ROS 含量通过加入 DCFH-DA(2, 7-dishlorofluorescein diacetate)荧光探针测得, 用各样品的荧光度值与其蛋白含量的比值表示, 单位为 FI·(mg·prot)⁻¹。荧光度值由 Synergy 4 多功能微孔板检测仪(美国伯腾仪器有限公司)测定; GSH 含量通过采用二硫代二硝基苯甲酸与巯基化合物反应产生的黄色化合物比色测得, 单位为 mg·(g·prot)⁻¹; GST 活性通过 1-氯-2, 4-二硝基苯(CDNB)法测得, 以每毫克组织蛋白反应 1 min 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μmol·L⁻¹ 的量为一个 GST 活力单位(U), 单位为 U·(mg·prot)⁻¹。吸光度值由 752 型紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司)测定。

1.3 数据分析

实验测定数据以平均数 ± 标准偏差(Mean ± SD)表示, 采用 IBM SPSS Statistics 25 统计软件对数据进行统计学分析, 采用单因素方差分析法(One-way ANOVA)和 LSD 法对不同染毒组和组间的平均值进行多重比较, 认为 P<0.05 时存在显著性差异。用 Origin 2018 软件对所有统计结果进行绘图。

2 结果

2.1 各染毒组菲和 Cd²⁺工作浓度测定结果

所配置的人工海水中均未检出菲和 Cd²⁺污染。各

染毒组溶液中菲或 Cd²⁺的工作浓度测定结果见表 2。将表中各浓度组菲和 Cd²⁺的测定浓度与设计浓度进行比较, 其回收率均大于 80%, 符合质量控制的要求。

表 2 半静态染毒实验各组测定浓度

Tab. 2 The measured concentration of the designed semi-static infected experiment groups

组号	菲浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Cd ²⁺ 浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
3	8.33±0.86	0
4	48.08±1.46	0
5	0	97.50±6.10
6	0	477.33±22.59
7	44.76±0.94	472.18±12.59

表 3 空白组(1)和 DMF 组(2)毛蚶体内各指标比较

Tab. 3 Comparison of the results of biomarkers in *Anadara subcrenata* between (1) seawater blank group and (2) N, N-Dimethylformamide (DMF) group

暴露阶段/d	浓度组	ROS/(mg·prot)	GSH 含量/[mg·(g·prot) ⁻¹]	GST 活性/[U·(mg·prot) ⁻¹]
1	1	159.84±25.24	7.92±0.38	7.79±1.37
	2	144.13±16.79	5.96±1.02	8.39±1.51
3	1	205.56±14.16	9.01±1.00	12.12±2.00
	2	211.11±6.50	8.87±0.80	13.50±1.12
5	1	224.33±3.62	10.66±0.40	8.73±1.06
	2	212.78±19.29	10.35±0.38	7.00±0.37
7	1	196.57±76.39	6.86±1.62	6.36±0.74
	2	179.88±39.07	5.07±0.81	3.87±0.53
9	1	241.02±38.82	7.21±0.66	5.89±1.60
	2	266.47±78.99	6.64±0.03	3.55±0.62
2*	1	205.01±61.26	7.37±2.78	6.80±0.64
	2	176.08±24.98	6.46±1.77	7.80±0.48

注: 2*代表清水恢复阶段第 2 d。

2.3 菲和 Cd²⁺对毛蚶 ROS 含量的影响

菲与 Cd²⁺单一及复合污染下毛蚶体内 ROS 含量的变化如图 1 所示。对照组毛蚶体内 ROS 含量呈波动变化, 范围为 159.84~241.02 FI·(mg·prot)⁻¹。在菲单独胁迫下(图 1-a), 除染毒第 7 d 外, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (低)浓度组毛蚶体内 ROS 含量均高于对照组, 且第 1、5 d 差异显著($P<0.05$), 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (高)浓度组 ROS 含量均显著高于对照组水平($P<0.05$)。清水释放阶段, 不同浓度组 ROS 含量均降至对照组水平。在 Cd²⁺单独胁迫下(图 1-b), 染毒期间, 各浓度组毛蚶体内 ROS 含量均高于对照组。100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (低)浓度组于染毒第 5 d 时升至最大值, 高于对照组 41.62%。500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (高)浓度组于第 1 d 时显著升高($P<0.05$), 并随时间的延长 ROS 含量的增加愈明显, 第 5 d 后, ROS 含量降低,

因此, 我们按照菲和 Cd²⁺的设计浓度来进行后续的分析与讨论。

2.2 空白组和 DMF 组差异性分析

对实验期间所有采样时间点空白对照组与 DMF 对照组毛蚶体内各指标测定结果进行比较, 发现在胁迫实验和清水释放实验结束后, 空白对照组和 DMF 对照组之间的 ROS 含量、GSH 含量和 GST 活性均无显著性差异($P>0.05$, 表 3), 表明实验中用作助溶剂的 DMF 加入量对实验结果没有影响, 为保证数据的统一性, 因此我们仅采用空白对照组进行后续的分析。

虽和对照组相比无显著性差异, 但从数值上仍高于对照组。清水释放阶段, 不同浓度组 ROS 含量均与对照组无显著性差异。在菲和 Cd²⁺复合胁迫下(图 1-c), 复合胁迫组 ROS 含量变化随染毒时间的增加而逐渐上升并显著高于对照组($P<0.05$), 第 5 d 时达到最大值, 随后略有下降直至对照组水平。我们将单一污染物胁迫组视为阳性对照, 比较发现, 除染毒第 9 d 外, 复合胁迫组 ROS 含量在数值上均高于菲和 Cd²⁺单独胁迫组, 但差异性不显著。清水释放阶段, 单一和复合胁迫组 ROS 含量均降至低于对照组水平, 且各组之间无显著性差异。

2.4 菲和 Cd²⁺对毛蚶 GSH 含量的影响

菲与 Cd²⁺单一及复合污染下毛蚶体内 GSH 含量的变化如图 2 所示。对照组毛蚶体内 GSH 含量

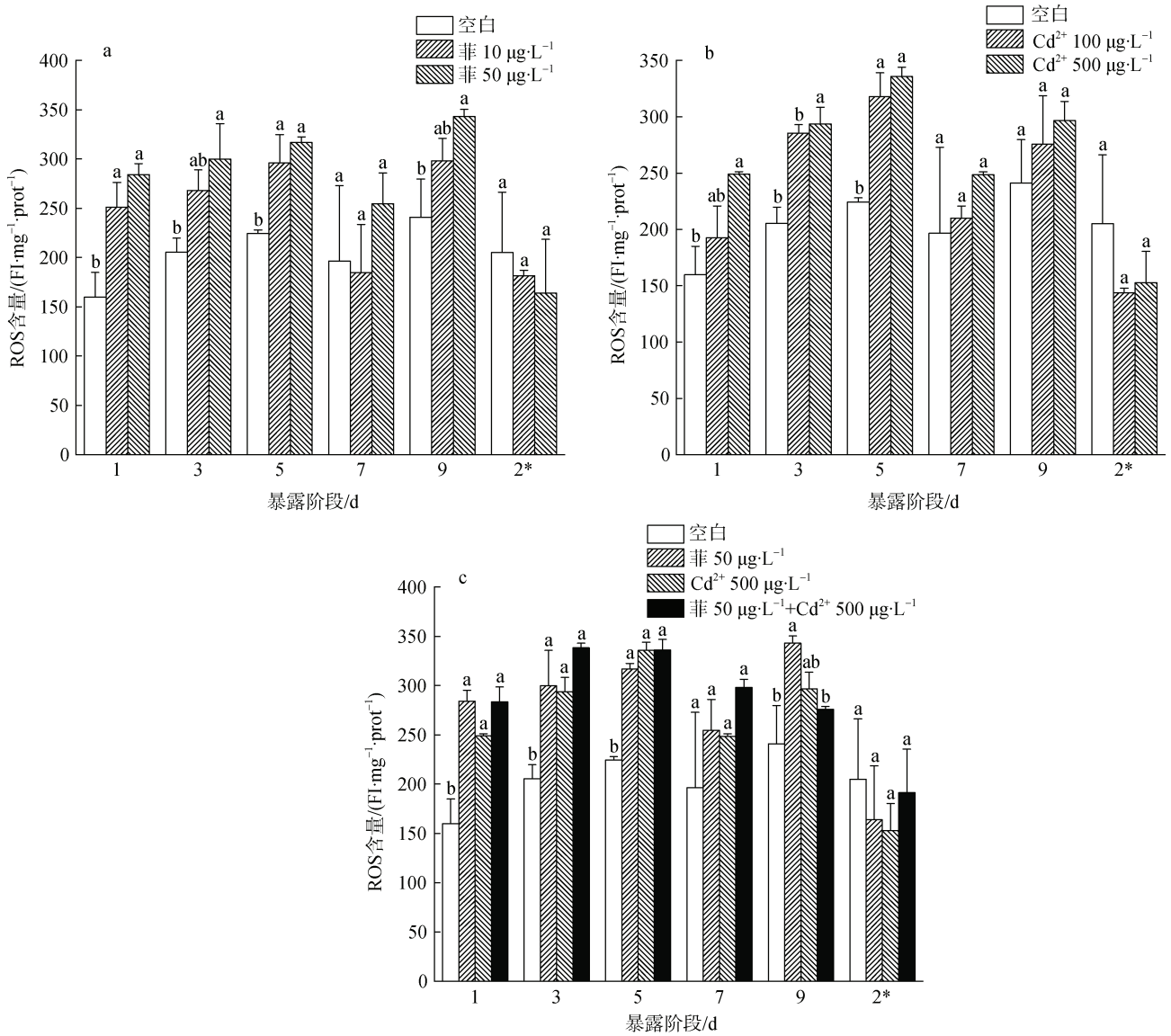


图 1 菲和 Cd²⁺对毛蚶 ROS 含量的影响

Fig. 1 Effect of phenanthrene and Cd²⁺ on the ROS content in *Anadara subcrenata*

注: 不同小写字母为同一胁迫时间内各浓度组间生化指标的多重比较结果($P < 0.05$); 2*代表清水恢复阶段第 2 d, 下同。

呈波动变化, 范围为 $6.86 \sim 10.66 \text{ mg} \cdot (\text{g} \cdot \text{prot})^{-1}$ 。在菲单独胁迫下(图 2-a), 染毒初期, 低浓度组毛蚶体内 GSH 含量稍低于对照组, 且无显著性差异 ($P > 0.05$)。随染毒时间的延长, GSH 含量先升高后降低, 在第 9 d 时降至最小值, 为对照组的 57.65%。高浓度组 GSH 含量均显著低于对照组, 且在染毒第 3 d 时, 下降最为明显, 仅为对照组的 32.24%。清水释放阶段, 各浓度组 GSH 含量与对照组相比均略有升高但无显著性差异 ($P > 0.05$)。在 Cd²⁺单独胁迫下(图 2-b), 各浓度 Cd²⁺染毒组 GSH 含量均低于对照组。染毒第 7 d 时, 低浓度组诱导

毛蚶体内 GSH 含量最低 ($P < 0.05$), 为对照组的 51.30%。高浓度组 GSH 含量在染毒前 5 d 均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 随后毛蚶体内 GSH 含量略有升高, 与对照组无显著性差异。清水释放阶段, 各浓度组毛蚶体内 GSH 含量与对照组相比无显著性差异。在菲和 Cd²⁺复合胁迫下(图 2-c), 毛蚶体内 GSH 含量在染毒初期即受到显著影响, 显著低于对照组 ($P < 0.05$)并持续至染毒期结束。与菲和 Cd²⁺单独胁迫组相比, 复合胁迫组毛蚶体内 GSH 含量在第 1 d 显著降低 ($P < 0.05$)。随染毒时间的延长呈先增加后降低的趋势, 但与单独胁迫组无显

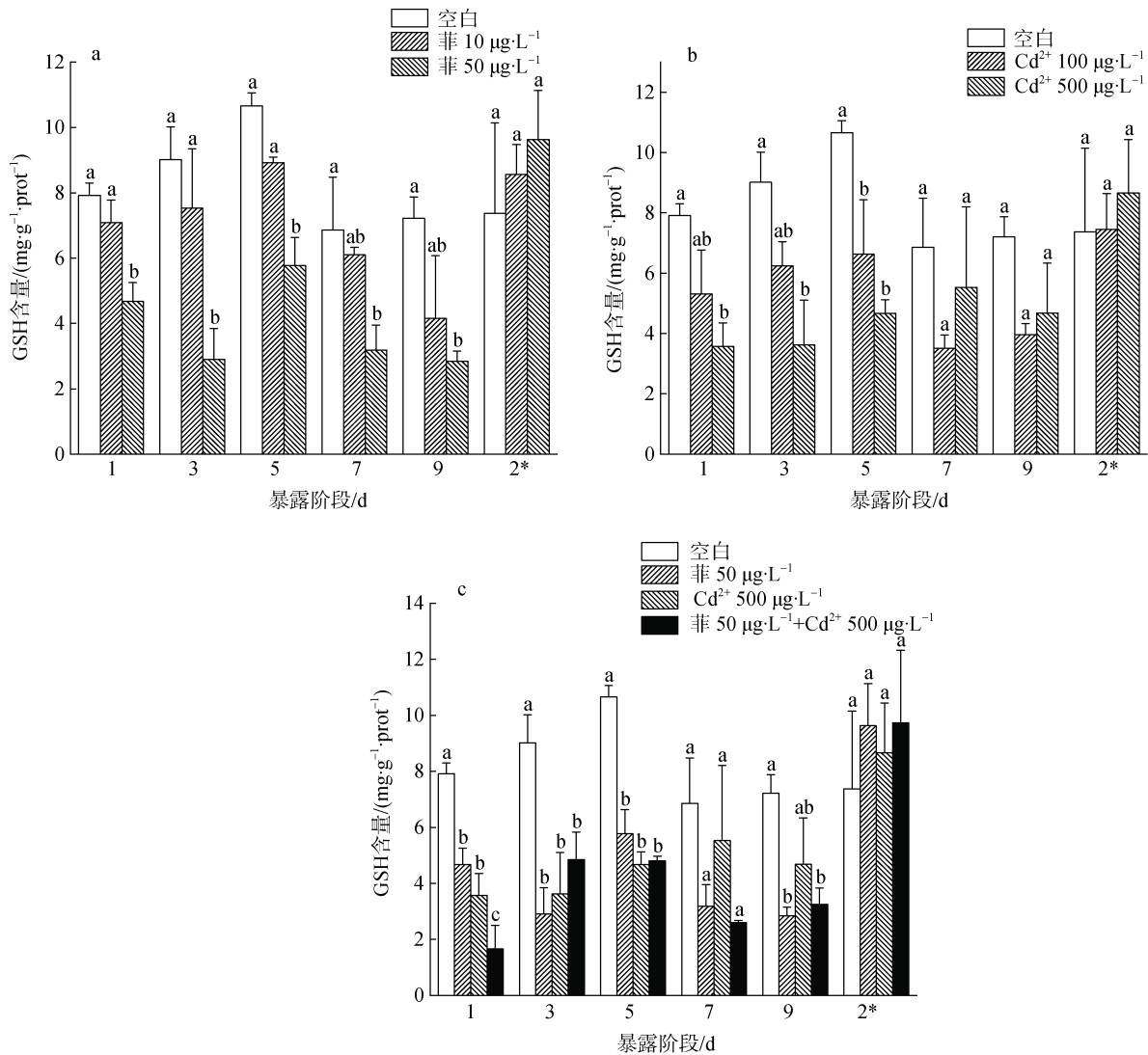


图 2 菲和 Cd²⁺对毛蚶 GSH 含量的影响

Fig. 2 Effect of phenanthrene and Cd²⁺ on the GSH content in *Anadara subcrenata*

显著性差异。清水释放阶段，单一和复合胁迫组毛蚶体内 GSH 含量均升至对照组水平。

2.5 菲和 Cd²⁺对毛蚶 GST 活性的影响

菲与 Cd²⁺单一及复合污染下毛蚶体内 GST 活性的变化如图 3 所示。对照组毛蚶体内 GST 活性呈波动变化，范围为 5.89~10.62 U·(mg·prot)⁻¹。在菲单独胁迫下(图 3-a)，低浓度组毛蚶体内 GST 活性从数值上均低于对照组，但差异不显著(P>0.05)，只有染毒第 7 d 差异显著(P<0.05)，为对照组的 56.82%。高浓度组 GST 活性在染毒第 3、5、9 d 时显著低于对照组(P<0.05)，在染毒末期(9 d)时降至最小值，仅为对照组的 45.80%。清水释放阶段，各浓度组毛蚶体内 GST 活性与对照组之间无显著性差异。在 Cd²⁺单独

胁迫下(图 3-b)，低浓度组仅在染毒初期(1 d)时对毛蚶体内 GST 活性有明显影响，显著低于对照水平(P<0.05)。并随染毒时间的延长，GST 活性呈先增大后降低的趋势。与对照组相比，高浓度组毛蚶体内 GST 活性在染毒第 3、7 d 时显著降低(P<0.05)，分别为对照组的 54.39%和 41.82%，并在第 5 d 时稍高于对照组。清水释放阶段，高浓度组毛蚶体内 GST 活性低于对照水平，但无显著性差异。在菲和 Cd²⁺复合胁迫下(图 3-c)，与对照组相比，复合胁迫组在染毒开始时就对 GST 活性有显著影响(P<0.05)，并随染毒时间的延长，下降愈加显著，一直持续至染毒期结束。复合组在染毒第 3 d 时 GST 活性显著低于菲单一胁迫组(P<0.05)，在染毒第 5、9 d 时显著低于 Cd²⁺

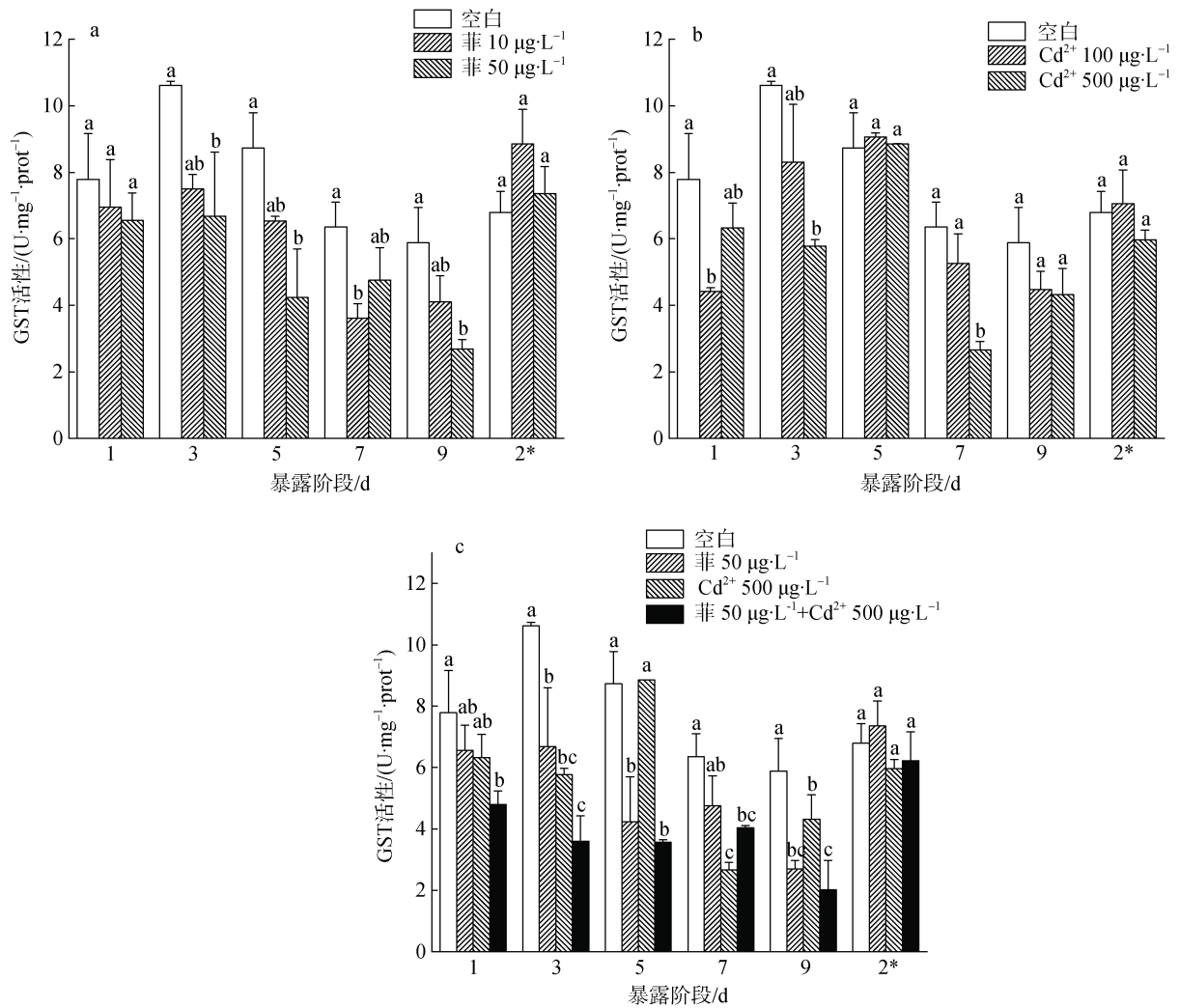


图 3 菲和 Cd²⁺对毛蚶 GST 活性的影响

Fig. 3 Effect of phenanthrene and Cd²⁺ on the GST activity in *Anadara subcrenata*

单独胁迫组($P < 0.05$)。清水释放阶段, 单一、复合污染胁迫组与对照组 GST 活性之间无显著性差异。

3 讨论

当生物体处于多环芳烃、重金属污染等胁迫环境时, 机体可通过产生活性氧, 如 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 、 $NO\cdot$ 等代谢外源伤害, 此过程会伴随产生由未成对电子构成的自由基, 过量的游离自由基会造成机体的过氧化胁迫, 进而诱发氧化损伤, 甚至造成毒性影响^[13-14]。Odzak 等^[15]研究了金属对斑马鱼胚胎的毒性, 推测出 ROS 含量的增加会造成细胞膜的损伤, 引起机体抗氧化酶活性的变化。Kang 等^[16]发现 ROS 的含量增加和氧化应激作用有关。因此 ROS 生成和氧化应激可作为解释机体受毒性作用的最佳模式^[17]。实

验中菲单独胁迫使毛蚶体内的 ROS 含量升高, 高浓度组 ROS 增量整体显著高于对照组, 且存在剂量-效应关系, 展现了较明显的毒性影响潜力。吕晏锋等^[18]人进行的不同浓度菲对鲤鱼的胁迫实验也发现 ROS 增加引起了抗氧化酶活性的变化, 即生物体肝脏组织酶活性表现出低浓度诱导, 高浓度抑制的效应。在不同浓度 Cd²⁺胁迫下, 毛蚶对高浓度 Cd²⁺污染更加敏感, 在染毒初期生物体内 ROS 含量就已出现显著增加。一方面可能与浓度设置、生物体的敏感性等多种原因造成有关; 另一方面可能与重金属污染物对生物体的制毒机理有关, 具有氧化还原性的重金属可通过 Fenton 反应直接产生活性氧自由基, 无中间代谢过程, 从而导致染毒初期 ROS 含量的明显增长^[19]。在复合胁迫染毒期间, ROS 增量在数值上均高

于菲或 Cd^{2+} 单独胁迫组, 但无显著性差异。一定程度上表明, 在菲和 Cd^{2+} 复合染毒胁迫下更加强烈的诱导了毛蚶自身的氧化反应, 但无明显的协同效应。染毒第 9 d 时 ROS 含量明显降低, 这可能是由于生物体逐渐适应外界刺激, 体内自我调节发挥作用, 损伤有所恢复, 从而达到一种动态平衡的结果。综上所述, 在本实验中, 菲和 Cd^{2+} 单一及复合胁迫均能引发毛蚶体内 ROS 含量的升高。ROS 含量的升高会进一步触发需氧生物体内的抗氧化防御系统, 来防止活性氧对机体的氧化损伤, 这个系统主要包含一些能够被应激诱导的酶类, 如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、GSH 和酚氧化酶(PO)等^[20]。

生物体中的水溶性抗氧化剂(如: GSH)、抗氧化酶(如: GST)对外源性毒物具有一定的防御和调节能力。其中 GSH 是一种低分子的抗氧化和自由基清除剂^[21], 可以直接清除 ROS^[22], 同时也是抗氧化酶 GST 的底物^[23], 其含量的多少常用于衡量机体抗氧化能力的大小^[20, 24]。如计勇等^[25]分析了复合污染物对鲫鱼体内 GSH 含量的影响, 发现指标变化存在时间-效应关系, 证明 GSH 对外界污染物的生物影响具有敏感性。已有研究表明, 当生物体暴露于污染物时, 体内自由基增多, 从而消耗 GSH, 导致 GSH 值降低, 如果机体自身调节能力不足导致 GSH 耗尽时, 会产生中毒效应^[26]。GST 是谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)的一种, 是生物体对有毒物质进行 II 相生物转化的转化酶之一^[27], 通过消除脂质过氧化物 ROOH 来降低自由基对机体的破坏作用^[20]。污染物质进入生物体后通过 I 相生物转化反应形成亲水性中间产物, 而后通过 II 相代谢酶(如 GST 酶)进行内源性分子结合, 转化为低毒代谢产物排出体外^[28]。GST 作为抗氧化酶不仅能够清除有机过氧化物, 在肝脏解毒方面也发挥着极其重要的作用^[20, 29-30]。由于在肝细胞中分布广泛, 当机体受到损伤时, GST 能很快的被释放, 其活性的变化常作为解毒能力的敏感指标。如张燕宁等^[31]研究了厦门海域石油烃对僧帽牡蛎体内 GST 活性的影响, 发现在体外染毒情况下牡蛎与指标 GST 之间相关性显著, 可通过检测生物体内 GST 指标的变化来衡量机体的抗氧化能力。王素敏等^[32]在进行体外有机污染物暴露实验时发现 GST 对外界胁迫比较敏感, 可作为污染物早期预警的生物标志物。

在本实验中, 在菲和 Cd^{2+} 的单独胁迫下, 毛蚶

体内 GSH 含量和 GST 活性整体变化趋势一致, 均出现了不同程度的降低, 这种降低趋势与 ROS 的间接作用有关^[33], 说明毛蚶在菲或 Cd^{2+} 的胁迫下大量消耗体内 GSH 和 GST, 从而诱发了机体产生强烈的抗氧化反应。菲和 Cd^{2+} 高浓度胁迫时, 对毛蚶体内 GSH 和 GST 值影响更为明显。说明随着污染物浓度的增加, 毛蚶自身调节能力愈发不足, 导致机体氧化胁迫作用增强, 进一步加深毒性影响。另外, GSH 含量和 GST 活性变化趋势的一致性在一定程度上意味着毛蚶体内 GSH 主要用作底物诱导 GST 表达, 而不是用来直接清除 ROS, 另一方面也表示毛蚶体内这些非酶抗氧化剂和抗氧化酶被共同调动用于抵抗菲和 Cd^{2+} 暴露带来的氧化损伤。我们之前对菲和 Cd^{2+} 单一及复合胁迫对毛蚶体内 SOD、CAT 活性和总抗氧化能力(TAOC)水平的影响进行过研究^[34-35], 结果表明在污染胁迫条件下, 这些抗氧化指标均不同程度地被诱导, 证明了当毛蚶在菲和 Cd^{2+} 单一及复合胁迫作用下产生了 ROS 对机体造成的损伤时, 可通过激活体内抗氧化酶(SOD、CAT)的活性来消除过量的自由基对机体的伤害。用于衡量机体抗氧化系统功能状况, 既包括酶促系统, 如 SOD、CAT 等, 又包括非酶促系统, 如 GSH 等的综合性指标, TAOC 水平的诱导也支持了这一现象。结合本研究结果, 充分说明毛蚶在受到菲和 Cd^{2+} 单一及复合胁迫后, 在抗氧化剂和多种抗氧化酶上均可表现出明显的应激反应。清水释放阶段, 这种应激反应有所缓解, 菲和 Cd^{2+} 单一及复合污染胁迫组各抗氧化指标均能恢复至对照组水平, 这一方面是由于生物体的抗氧化防御系统在发挥功能, 消除了多余的活性氧; 另一方面可能是由于外源污染物菲和 Cd^{2+} 经代谢逐渐释放到清水中从而使其毒性作用降低。因此, 毛蚶体内的抗氧化系统对菲和 Cd^{2+} 污染具有良好的应激反应敏感性。

同时, 本实验结果表明, 在菲和 Cd^{2+} 复合污染胁迫作用下, 毛蚶体内 GSH 含量和 GST 活性在染毒期间整体低于单独胁迫组, 我们之前对毛蚶体内 SOD 和 CAT 指标的研究结果也表明, 菲和 Cd^{2+} 复合污染对毛蚶的氧化胁迫作用大于二者单独胁迫^[35]。说明在复合污染条件下, 毛蚶不足以调节外源污染损伤, 导致抗氧化能力下降, 从而使生物体遭受到较为严重的毒性影响。此研究结果在非酶氧化剂和多种抗氧化酶方面进一步支持了我们先前的研究成果。

综上所述, 菲和 Cd^{2+} 单独胁迫下, 毛蚶体内 ROS 含量均高于对照组, 整体呈现出不断增加趋势,

GSH 含量和 GST 活性均低于对照组, 整体呈现出先增加后降低的趋势, 且随着污染物浓度的增加, 对各指标的影响愈明显, 存在剂量-效应关系。毛蚶体内 GSH 含量和 GST 活性整体变化趋势具有一致性, 在一定程度上意味着 GSH 作为底物大量参与诱导 GST 的表达。对比单一及复合污染的结果发现, 菲和 Cd²⁺ 复合污染增强了二者单独污染对毛蚶的氧化胁迫效应, 表现出更强的氧化损伤。清水恢复阶段结束后, 单一及复合污染胁迫组各指标均能恢复至对照组水平。表明毛蚶体内抗氧化系统适合作为监测海洋多环芳烃和重金属复合污染的生物标志物。

参考文献:

- [1] 王丽平, 雷坤, 乔艳珍. 天津渤海湾近岸海域沉积物中 4 种常见重金属的分布及其风险分析[J]. 海洋环境科学, 2017, 36(5): 693-698.
Wang Liping, Lei Kun, Qiao Yanzhen. Distribution and ecological risk assessment of four common metals in coastal sediment of Bohai Bay along Tianjin city, China[J]. Marine Environmental Science, 2017, 36(5): 693-698.
- [2] 严志宇, 刘慧, 孙冰, 等. 渤海海域表层沉积物中的多环芳烃综述[J]. 海洋开发与管理, 2019, 36(10): 27-29.
Yan Zhiyu, Liu Hui, Sun Bing, et al. A summary of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of Bohai Sea[J]. Ocean Development and Management, 2019, 36(10): 27-29.
- [3] 隋茜茜, 余金橙, 朱金艳, 等. 秦皇岛海域食用贝类重金属污染情况分析[J]. 食品工业科技, 2020, 41(10): 196-202.
Sui Qianqian, Yu Jincheng, Zhu Jinyan, et al. Analysis of heavy metal pollution of edible shellfish in Qinhuangdao[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(10): 196-202.
- [4] 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.
Zheng Guanchao, Guo Mengmeng, Zhao Chunxia, et al. Residue levels of PAHs in aquaculture products from Bohai Bay and their health risk assessment[J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2015, 5(6): 20-26.
- [5] 庞艳华, 隋凯, 王秋艳, 等. 大连近岸海域双壳贝类重金属污染调查与评价[J]. 海洋环境科学, 2012, 31(3): 410-413.
Pang Yanhua, Sui Kai, Wang Qiuyan, et al. Investigation and assessment on heavy metals in bivalve seashells of Dalian coastline[J]. Marine Environmental Science, 2012, 31(3): 410-413.
- [6] 卓艺蓉. 基于双壳贝类的多环芳烃生物标志物检测技术的研究[J]. 渔业研究, 2018, 40(4): 268-278.
Zhuo Yirong. The study on identification of PAHs bio-markers on the basis of bivalve[J]. Journal of Fisheries Research, 2018, 40(4): 268-278.
- [7] 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.
Yan Bo, Tan Songqin, Ma Xiaofang, et al. Kinetics of bioconcentrations of phenanthrene and cadmium in tissues of *Anadara subcrenata* under single and joint exposures[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(3): 572-578.
- [8] 于淑池, 符修正, 王昌昊, 等. 镉对波纹巴非哈(*Paphia undulata*)的急性毒性及组织蓄积性研究[J]. 琼州学院学报, 2016, 23(2): 35-39.
Yu Shuchi, Fu Xiuzheng, Wang Changhao, et al. Cadmium's acute toxicity and accumulation on *Paphia undulata*[J]. Journal of Qiongzhou University, 2016, 23(2): 35-39.
- [9] Sarnowski P, Witeska M. The effects of copper and cadmium in single exposure or co-exposure on growth of common carp (*Cyprinus Carpio* L.) Larvae[J]. Polish Journal of Environmental Studies, 2008, 17(5): 791-796.
- [10] Canesi L, Lorusso L C, Ciacci C, et al. Effects of the brominated flame retardant tetrabromobisphenol-A (TBBPA) on cell signaling and function of *Mytilus* hemocytes: Involvement of MAP kinases and protein kinase C[J]. Aquatic Toxicology, 2005, 75(3): 277-287.
- [11] 李定龙, 李晓芳, 李敏, 等. 四溴双酚 A 和镉联合暴露对蚯蚓和斑马鱼毒性作用特征研究[J]. 环境与健康杂志, 2016, 33(7): 577-584.
Li Dinglong, Li Xiaofang, Li Min, et al. Joint toxic effect of tetrabromobisphenol A and cadmium on *Eisenia foetida* and zebrafish[J]. Journal Environment Health, 2016, 33(7): 577-584.
- [12] 贺广凯. 黄渤海沿岸经济贝类体中重金属残留量水平[J]. 中国环境科学, 1996, 16(2): 96-100.
He Guangkai. Levels of heavy metals in molluscs from the coastal region of Bohai Sea and Huanghai Sea[J]. China Environmental Science, 1996, 16(2): 96-100.
- [13] Yin Y, Jia J, Guo H Y, et al. Pyrene-stimulated reactive oxygen species generation and oxidative damage in *Carassius auratus*[J]. Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 2014, 49(2): 162-170.
- [14] Ryu W I, Park Y H, Bae H C, et al. ZnO nanoparticle induces apoptosis by ROS triggered mitochondrial pathway in human keratinocytes[J]. Molecular & Cellular Toxicology, 2014, 10(4): 387-391.
- [15] Odzak N, Kistler D, Behra R, et al. Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in aqueous media[J].

- Environmental Pollution, 2014, 191: 132-138.
- [16] Kang T S, Guan R F, Song Y J, et al. Cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles and silver nanoparticles in human epithelial colorectal adenocarcinoma cells[J]. *Lwt-Food Science and Technology*, 2015, 60(2): 1143-1148.
- [17] Kappus H, Sies H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation[J]. *Experientia*, 1981, 37(12): 1233-1241.
- [18] 吕晏锋, 赵晓祥, 王俊锋. 菲胁迫对鲤鱼的急性毒性和抗氧化酶响应[J]. *东华大学学报(自然科学版)*, 2018, 44(2): 309-316.
- Lv Yanfeng, Zhao Xiaoxiang, Wang Junfeng. Acute toxicity and response of antioxidant enzymes of phenanthrene stress on carp[J]. *Journal of Donghua University (Natural Science)*, 2018, 44(2): 309-316.
- [19] Formigari A, Irato P, Santon A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects[J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part C*, 2007, 146(4): 443-459.
- [20] 高惠滢, 胡薇. 生物体的抗氧化酶系统概述[J]. *生物学教学*, 2018, 43(10): 3-5.
- Gao Huiying, Hu Wei. An overview of the antioxidant enzyme system in organisms[J]. *Biology Teaching*, 2018, 43(10): 3-5.
- [21] Xiang N, Zhao C F, Diao X P, et al. Dynamic responses of antioxidant enzymes in pearl oyster *Pinctada martensii* exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2017, 54: 184-190.
- [22] Nardi A, Mincarelli L F, Benedetti M, et al. Indirect effects of climate changes on cadmium bioavailability and biological effects in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Chemosphere*, 2017, 169: 493-502.
- [23] Shenai-Tirodkar P S, Gauns M U, Mujawar M W A, et al. Antioxidant responses in gills and digestive gland of oyster *Crassostrea madrasensis* (Preston) under lead exposure[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 142: 87-94.
- [24] Liu H, Weisman D, Ye Y B, et al. An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Science*, 2009, 176(3): 375-382.
- [25] 计勇, 陆光华, 张洁, 等. 太湖复合污染胁迫下生物体抗氧化标志物的响应[J]. *生态环境学报*, 2009, 18(5): 1655-1658.
- Ji Yong, Lu Guanghua, Zhang Jie, et al. Responses of antioxidation biomarkers in muscle microsome of *Carassius auratus* under integrated pollution stress of Tai Lake[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2009, 18(5): 1655-1658.
- [26] 田文静, 白伟, 赵春禄, 等. 纳米 ZnO 对斑马鱼胚胎抗氧化酶系统的影响[J]. *中国环境科学*, 2010, 30(5): 705-709.
- Tian Wenjing, Bai Wei, Zhao Chunlu, et al. Effects of ZnO nanoparticles on antioxidant enzyme system of zebrafish embryos[J]. *China Environmental Science*, 2010, 30(5): 705-709.
- [27] Vidal-Linan L, Bellas J, Etxebarria N, et al. Glutathione S-transferase, glutathione peroxidase and acetylcholinesterase activities in mussels transplanted to harbour areas[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 470: 107-116.
- [28] Giessing A M B, Mayer L M, Forbes T L. 1-hydroxypyrene glucuronide as the major aqueous pyrene metabolite in tissue and gut fluid from the marine deposit-feeding polychaete *Nereis diversicolor*[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, 22(5): 1107-1114.
- [29] 方春华, 乔琨, 刘智禹, 等. 海洋生物中抗氧化酶的研究进展[J]. *渔业研究*, 2016, 38(4): 331-342.
- Fang Chunhua, Qiao Kun, Liu Zhiyu, et al. The research progress of antioxidant enzymes in marine organisms[J]. *Journal of Fisheries Research*, 2016, 38(4): 331-342.
- [30] Gadagbui B K M, James M O. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine[J]. *Aquatic Toxicology*, 2000, 49(1-2): 27-37.
- [31] 张燕宁, 张兰, 毛连纲, 等. 多效唑对斑马鱼体内解毒代谢酶和抗氧化酶活性的影响[J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(27): 124-127.
- Zhang Yanning, Zhang Lan, Mao Liangang, et al. Effects of paclobutrazol on metabolic detoxification enzyme and antioxidant enzyme activities in zebrafish (*Brachydanio rerio*)[J]. *Journal of Anhui Agriculture*, 2017, 45(27): 124-127.
- [32] 王素敏, 王海燕, 韩大雄. 三种持久性有机污染物对罗非鱼肝脏抗氧化系统的体外影响[J]. *海洋环境科学*, 2013, 32(2): 216-220.
- Wang Sumin, Wang Haiyan, Han Daxiong. In vitro effects of three persistent organic pollutants on antioxidant defense system in *Mossambica tilapia* liver[J]. *Marine Environmental Science*, 2013, 32(2): 216-220.
- [33] Ahn J M, Eom H J, Yang X Y, et al. Comparative toxicity of silver nanoparticles on oxidative stress and DNA damage in the nematode, *Caenorhabditis elegans*[J]. *Chemosphere*, 2014, 108: 343-352.
- [34] 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.
- Yan Bo, Li Ying, Gao Nan, et al. Single and combined

effects of oxidative pressure and damages of phenanthrene and cadmium on *Anadara Subcrenata*[J]. Marine Environmental Science, 2015, 34(6): 858-864.

[35] Yan B, Liu X B, Zhao X G, et al. Single and joint oxi-

date stress of cadmium and phenanthrene on the Bivalve *Anadara subcrenata*[J]. Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 2020, 55(4): 448-456.

Comparison of single and combined pollution effect of phenanthrene and cadmium on the oxidative pressure of *Anadara Subcrenata*

YAN Bo^{1, 2, 3}, ZHANG Xin¹, ZHANG Ke¹, CHEN Li¹, TIAN Dan¹

(1. College of Marine and Environmental Science, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. Tianjin Key Lab of Marine Resource and Chemistry, Tianjin 300457, China; 3. Tianjin Marine Environmental Protection and Restoration Technology Engineering Center, Tianjin 300457, China)

Received: Jul. 20, 2020

Key words: phenanthrene (Phe); cadmium (Cd); combined pollution; oxidative stress; *Anadara subcrenata*

Abstract: We conducted a semi-static infected experiment to investigate the reactive oxygen species (ROS) content, glutathione (GSH) content, and glutathione-S-transferase (GST) activities of *Anadara subcrenata* after being exposed to single and combined pollution of phenanthrene (Phe) and cadmium (Cd). The exposure experiment lasted for nine days in pollution media and for two days in clean seawater. The results showed that single exposure of Phe or Cd lead to an increase in the ROS content of *A. subcrenata*, whereas the GSH content and GST activity followed a decreasing trend for the same. Moreover, the impact on biomarkers became more significant with the exposure concentration, thereby indicating a dose-dependent effect. The overall changing trends of GSH and GST of *A. subcrenata* remained consistent. Additionally, the oxidative stress of combined effect of Phe and Cd on *A. subcrenata* was higher than the single effect. Furthermore, these biomarkers of *A. subcrenata* in different exposure groups returned to the control level after the organisms were transferred to the clean seawater for two days. The study results indicated that the antioxidant defense system of *A. subcrenata* can act as a suitable biomarker for indicating the combined pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in the marine ecosystem.

(本文编辑: 赵卫红)