



皱纹盘鲍稚鲍对海水酸化与溴氰菊酯复合胁迫的响应

邓钦有^{1,2,3}, 杨顶珑^{1,2,3,4*}, 何金霞³, 刘相全³, 陈丽竹³

(1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306;

2. 上海海洋大学上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306;

3. 山东省海洋资源与环境研究院, 山东省海洋生态修复重点实验室, 山东 烟台 264006;

4. 中国科学院烟台海岸带研究所, 海岸带生物资源高效利用研究与发展中心, 山东 烟台 264003)

摘要: 为探究海水酸化与溴氰菊酯 (DM) 复合暴露对皱纹盘鲍稚鲍的毒性效应, 采用 3 个 pH 值 (8.1、7.7 和 7.4) 和 3 个溴氰菊酯浓度 (0、0.6 和 6.0 $\mu\text{g/L}$) 对稚鲍进行复合胁迫, 并对贝壳微观结构与硬度、组织中抗氧化酶活性以及应激、凋亡相关基因表达量进行了检测。结果显示, 经过海水酸化与溴氰菊酯复合暴露 31 d 后稚鲍贝壳 CaCO_3 晶体沉积困难, 文石板片变小并形成分散的板层堆叠, 文石板片之间孔隙增大, 并且伴随着贝壳硬度的显著降低。同时, 海水酸化与溴氰菊酯能够引起稚鲍组织抗氧化酶活性的改变, 其中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性随着 $p\text{CO}_2$ 与溴氰菊酯浓度的上升而持续降低, 并且在海水酸化与溴氰菊酯复合暴露下稚鲍 SOD 活性明显低于单一暴露物, 说明海水酸化与溴氰菊酯对稚鲍 SOD 活性的影响具有明显交互作用。在相同 pH 暴露下, 溴氰菊酯能够使稚鲍过氧化氢酶 (CAT) 与谷胱甘肽-S 转移酶 (GST) 活性显著上升。此外, 实验还观察到了稚鲍组织中应激基因与凋亡相关基因表达量随着 $p\text{CO}_2$ 与溴氰菊酯浓度的上升均有提高, 并且海水酸化与溴氰菊酯暴露在 HSP70、HSP90、Caspase-3 以及 FADD 等基因表达量上具有明显协同作用。研究表明, 海水酸化与溴氰菊酯暴露能够对稚鲍产生明显毒害效应, 并且在引起稚鲍组织氧化应激与细胞凋亡的反应中具有一定交互作用。

关键词: 皱纹盘鲍稚鲍; 贝壳硬度; 酸化; 溴氰菊酯; 扫描电镜**中图分类号:** S 966.2**文献标志码:** A

自工业革命以来, 人类大量使用化石燃料以及森林砍伐等活动导致大气中 CO_2 浓度不断上升。据统计, 大气中的 CO_2 浓度已从工业革命前的 504 mg/m^3 增长了约 40%, 目前已达到了 720 mg/m^3 ^[1-2]。因为海洋与大气间持续不断的发生气体交换, 大气中的 CO_2 不断溶入海洋, 从而造成海水 pH 降低, 这一过程被称为“海水酸化”现象^[3]。根据联合国政府间气候变化专门委员会 (Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC) 预测,

如果不能有效减少 CO_2 排放, 全球表层海水 pH 会在 21 世纪末降至 7.7, 而这一数值将在 2300 年持续下降至 7.4^[3]。海水酸化因其能够通过直接 (如生理过程的干扰) 和间接 (如生态条件的改变) 的方式对海洋生物产生有害影响, 从而正成为一个日益令人担忧的问题^[4-8]。此外, 海水酸化不是单独发生的, 通常与其他环境压力因素 (如全球变暖、低氧和沿海地区的重金属污染或农药污染) 一起发生。

收稿日期: 2021-04-24 修回日期: 2021-05-30

资助项目: 山东省农业良种工程 (2017LZGC009); 国家自然科学基金 (41806196); 山东省自然科学基金 (ZR2020QD097)

第一作者: 邓钦有 (照片), 从事贝类遗传育种研究, E-mail: 1045090835@qq.com

通信作者: 杨顶珑, 从事贝类免疫学与渔业投入品研发等, E-mail: dlyang@yic.ac.cn



溴氰菊酯因其对害虫的高活性和光稳定性, 成为世界上使用最广泛的拟除虫菊酯杀虫剂之一^[9-11]。拟除虫菊酯类杀虫剂与有机磷和氨基甲酸酯类化合物相比, 具有高效、低毒等优点^[12]。与其他传统农药相比, 拟除虫菊酯类农药对环境污染潜力较小, 但可以通过食物链进入生物体, 对水生生物产生很强的毒性, 并可能对水环境造成长期的不良影响。由于其广泛使用, 在福建与浙江沿海已分别检测出了 6.36 和 16.2 $\mu\text{g/L}$ 的拟除虫菊酯类农药的残留^[13-14]。溴氰菊酯属神经性毒剂, 其对高等动物毒性较小, 但对水生动物为高毒性^[15]。目前关于溴氰菊酯对海洋生物的毒性研究主要集中在其对鱼、虾类的急性和亚急性毒性实验^[16-18], 而对贝类的毒性及作用机制研究较少。

皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) 是我国沿海地区重要的经济贝类, 幼鲍多栖息于沿海低潮线下浅水区, 该区域容易受到人类活动影响, 其栖息地 pH 和其他污染变化大且复杂。本实验对皱纹盘鲍稚鲍进行了海水酸化与溴氰菊酯的复合暴露, 通过检测稚鲍贝壳的微观结构、硬度和组织中抗氧化酶反应以及应激、凋亡相关基因表达, 以评估海水酸化与溴氰菊酯对稚鲍的毒害作用。

1 材料与方法

1.1 供试生物

皱纹盘鲍稚鲍购自山东省威海市, 共 1000 只, 平均壳长 (0.67 ± 0.07) cm。实验开始前使用白色塑料养殖箱 (200 L 水体) 进行为期 14 d 的暂养。暂养期间保持充气, 每天傍晚投喂藻粉 (50 g/kg 稚鲍), 藻粉主要原料为海带 (*Laminaria japonica*), 每天上午更换半量海水并清除残饵。实验海水为山东省牟平近海环境考察站采集的天然海水 [盐度 (31.2 ± 0.5) , pH 值 (8.12 ± 0.03) , 温度 $(22.6 \pm 0.2)^\circ\text{C}$], 经过沉淀, 砂滤和紫外照射处理后, 符合国家海水养殖水质标准 NY 5002—2001。

1.2 暴露实验方法

暂养结束后, 选择健康、活力好的稚鲍用于暴露实验。将溴氰菊酯 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司) 原药 (纯度 98%) 溶于丙酮配成母液 (4.2 g/L), 避光保存于 4°C 冰箱, 实验时按浓度要求进行稀释。而模拟酸化的情景是通过向海水中通入不同但恒定百分比的干燥空气和二氧化碳混合气体来实现。

以普通海水 (pH 为 8.1) 作为对照, 配制 2 种酸化海水 (pH 为 7.7 和 7.4), 并将溴氰菊酯设置成 3 个浓度, 分别为 0、0.6 和 6.0 $\mu\text{g/L}$, 共计设置 9 个处理组。2 种酸化海水的设置分别参照政府间气候变化专门委员会 (IPCC) 对 2100 年和 2300 年海水表面海水 pH 的预测^[3]。溴氰菊酯暴露浓度则参照在我国福建沿海一带对拟除虫菊酯类农药的检测报告^[13]。暴露实验持续 31 d, 每个处理组设置 3 个重复水箱 (70 L 水体), 每个水箱随机养殖 30 只稚鲍。实验开始后, 保持持续充气, 每 24 h 使用预平衡海水进行换水, 换水量为 35 L。更换海水后重新注入溴氰菊酯, 使浓度恢复到实验设定值, 同时用 pH 电极 (德国萨托利斯仪器公司的 PB-10 型 pH 计) 校准并测量 pH。暴露于特定实验条件下 31 d 后进行取样分析。

1.3 取样方法

暴露实验结束后, 从每个水箱随机选取 10 只稚鲍, 收集贝壳和组织。贝壳用磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.4) 仔细清洗, 存放于 2.5% 戊二醛中。随后采集稚鲍除贝壳外所有组织, 用 PBS 清洗后置于液氮中速冻, 储存于 -80°C 备用。

1.4 扫描电镜观察

从 2.5% 戊二醛溶液中取出稚鲍贝壳, 并用蒸馏水冲洗, 室温下晾干, 备用。贝壳珍珠层面喷金处理, 并采用扫描电镜观察 (日本日立, S-4800)。

1.5 贝壳硬度检测

用质构仪 (美国 FTC 公司, TMS-TOUCH) 对贝壳硬度进行测量。将贝壳样品清洗并放置在圆形探头下进行硬度测试。实验模式为加压, 预压速度为 400 mm/s, 下压速度为 100 mm/s, 压后上行速度为 100 mm/s, 触发力为 0.3 N。

1.6 抗氧化酶活性测定

将适量稚鲍组织样品加入 PBS 匀浆缓冲液中, 制成 10% 匀浆液, 4°C , 3 500 r/min 离心 10 min, 吸取上层匀浆液备用。采用南京建成生物研究所试剂盒, 分别测定超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽-S 转移酶 (GST) 和过氧化氢酶 (CAT) 等抗氧化酶活性及脂质过氧化物产物丙二醛 (MDA) 水平。

1.7 RNA 提取和 qRT-PCR

使用 Trizol 试剂 (Invitrogen, 美国), 提取稚

鲍组织的总 RNA, 并根据 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa, 北京) 进行实时荧光定量 PCR 反应。本研究测定了不同处理条件下的应激基因 (HSP70、HSP90) 和凋亡相关基因 (Caspase-3, Bcl-2, Bax1、FADD、IAP) 的 mRNA 表达情况, 并结合 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析上述基因的相对表达水平^[19]。具体引物信息见表 1。

表 1 本实验所用引物序列		
Tab. 1 Primers used in this study		
基因名称 genes		引物序列 primer sequence (5'-3')
HSP70	forward	AGGAGGAGATAGAGCGTAT
	reverse	TCGGTGATGGTCTTCTTG
HSP90	forward	GTCTTCCCATCGTACTCTT
	reverse	AAGCAAGGACTCTGTTC
Caspase3	forward	TCATGGCGCTACACACGAAA
	reverse	GGTCATCAGGTCAAGGGTCG
Bcl-2	forward	TGGTCGCTTTGTTACTTTCGG
	reverse	AGGGTTCTCGTTTCGTTCTC
BAX	forward	CGGAGCACATTCTCAACGTA
	reverse	AAGTAAAAGAGGGCAACCAC
FADD	forward	CAGCCGCAGGATGAAGTAATGGAC
	reverse	GCCTCACAAAGAACCGCCAGTC
IAP	forward	AAGAACATGATCCTGTGGCCGAAC
	reverse	CCGAGTTGGTTCAGGTCTGTCTTG
β -actin	forward	CACGGGTATTGTTCTGGACTCTG
	reverse	ATGAGGTAGTCTGTGAGGTCACGTC

1.8 数据分析

采用统计软件 SPSS 21.0 软件对所有数据进行双因素方差分析 (ANOVA)。显著性水平为 $P<0.05$; 采用 Tukey 氏 (方差齐性) 检测方法, 比较各实验组之间的差异。使用 Origin 2018 软件进行主成分分析 (PCA) 及绘图。

2 结果

2.1 贝壳珍珠层微观结构

稚贝在不同 pH 和溴氰菊酯暴露 31 d 后, 观察贝壳珍珠层的微观结构 (图版 I)。低 pH 与高浓度的溴氰菊酯使贝壳碳酸钙晶体的沉积和生长发生困难, 文石板越来越小或难以形成 (图版 I-7、9)。文石板的缓慢生长也延缓了文石板的熔融, 导致了分散孤立板层的堆积 (图版 I-5), 并且随

着 pH 的下降和溴氰菊酯浓度的增加, 文石板片之间的孔隙越来越大 (图版 I-9)。结果表明, 海水酸化和溴氰菊酯能够明显影响皱纹盘鲍稚鲍贝壳的生长, 进而影响皱纹盘鲍稚鲍的正常发育。

2.2 贝壳硬度

随着海水中二氧化碳分压 ($p\text{CO}_2$) 和溴氰菊酯浓度增加, 贝壳硬度总体呈下降趋势。当溴氰菊酯浓度为 0 时, 降低海水 pH 能够使贝壳硬度显著降低。当溴氰菊酯浓度为 $6.0\text{ }\mu\text{g/L}$ 时, pH 为 7.4 暴露下的皱纹盘鲍稚鲍贝壳硬度也显著低于其他处理组 (图 1)。但在相同 pH, 不同浓度溴氰菊酯暴露下贝壳硬度均未呈现出显著性差异。双因素方差分析结果显示, pH 和溴氰菊酯对皱纹盘鲍稚鲍贝壳硬度没有交互作用 (表 2)。

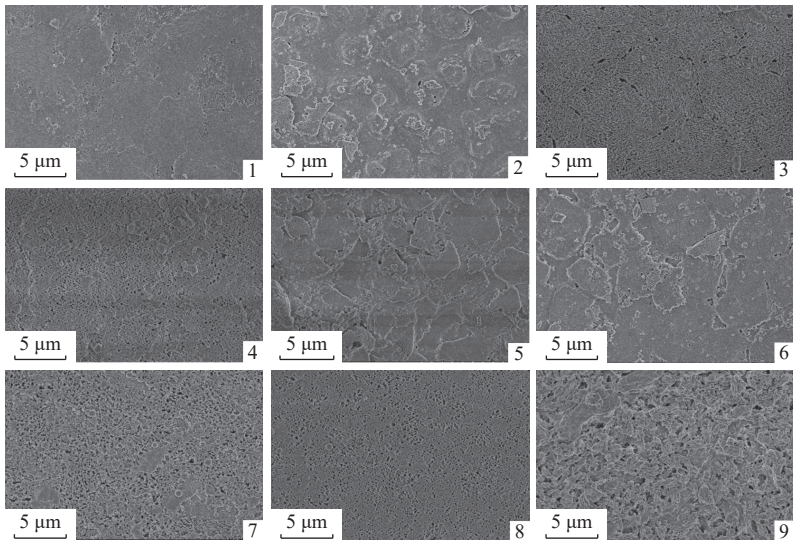
2.3 抗氧化酶活性

海水酸化和溴氰菊酯暴露提高了皱纹盘鲍稚鲍组织中丙二醛 (MDA) 水平 (图 2)。随着 $p\text{CO}_2$ 和溴氰菊酯浓度的增大, 皱纹盘鲍稚鲍 SOD 活性显著降低 (图 2-a)。双因素分析结果显示, pH 的降低与溴氰菊酯暴露对皱纹盘鲍稚鲍 SOD 活性具有明显的交互作用。同时, 当 pH 为 8.1 时, 增加溴氰菊酯暴露和溴氰菊酯浓度为 0, 使 pH 降低为 7.7 时均可使 CAT 活性显著上升 (图 2-d)。同样, GST 活性在 pH 为 7.4, 溴氰菊酯浓度为 $6.0\text{ }\mu\text{g/L}$ 暴露下显著高于其他处理组 (图 2-c)。

主成分分析 (PCA) 验证了皱纹盘鲍稚鲍经海水酸化和溴氰菊酯暴露后与对照组之间的差异 (图 3), 其中 PC1 和 PC2 占总方差的 89.2% (PC1, 58.4%; PC2, 30.8%)。同时, 各项指标在非暴露条件下与海水酸化和溴氰菊酯暴露后显著分离, 进一步验证了皱纹盘鲍稚鲍在海水酸化与溴氰菊酯暴露下具有显著的抗氧化响应 (表 3)。

2.4 应激与细胞凋亡相关基因的表达

在没有溴氰菊酯暴露的情况下, 海水 pH 的下降显著增加了皱纹盘鲍稚鲍 HSP70 的表达。但当 pH 为 7.4 时, 加入溴氰菊酯暴露后 HSP70 的表达受到了抑制 (图 4-a)。同时, 当 pH 为 7.7, 溴氰菊酯浓度为 $6.0\text{ }\mu\text{g/L}$ 时, HSP90 的表达量明显上升 (图 4-b)。海水酸化和溴氰菊酯暴露还能够显著激发内源性凋亡基因中的 Caspase-3 的表达 (图 4-d)。此外, 当溴氰菊酯浓度为 $6.0\text{ }\mu\text{g/L}$, pH 为 7.7 时, FADD 和 IAP 表达水平显著高于其他处理组 (图 4-c、



图版 I 海水酸化和溴氰菊酯暴露后皱纹盘鲍稚鲍贝壳珍珠层扫描电镜照片

1. pH 8.1, DM: 0 µg/L; 2. pH 8.1, DM: 0.6 µg/L; 3. pH 8.1, DM: 6.0 µg/L; 4. pH 7.7, DM: 0 µg/L; 5. pH 7.7, DM: 0.6 µg/L; 6. pH 7.7, DM: 6.0 µg/L; 7. pH 7.4, DM: 0 µg/L; 8. pH 7.4, DM: 0.6 µg/L; 9. pH 7.4, DM: 6.0 µg/L。放大倍数×5 000

Plate I Seawater acidification and deltamethrin exposure by scanning electron microscopy (SEM) of nacreous layer of juvenile *H. discus hannai* shell

1. pH 8.1, DM: 0 µg/L; 2. pH 8.1, DM: 0.6 µg/L; 3. pH 8.1, DM: 6.0 µg/L; 4. pH 7.7, DM: 0 µg/L; 5. pH 7.7, DM: 0.6 µg/L; 6. pH 7.7, DM: 6.0 µg/L; 7. pH 7.4, DM: 0 µg/L; 8. pH 7.4, DM: 0.6 µg/L; 9. pH 7.4, DM: 6.0 µg/L.×5 000

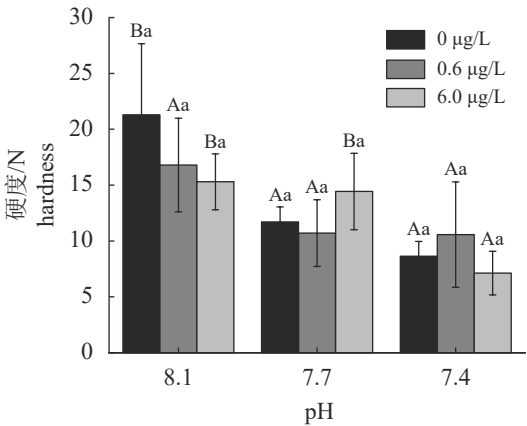


图 1 海水酸化和溴氰菊酯暴露下各处理组皱纹盘鲍稚鲍贝壳硬度

不同大写字母表示在相同浓度溴氰菊酯暴露下，不同 pH 处理间存在显著差异 ($P<0.05$)；不同小写字母表示在相同 pH 暴露下，不同浓度溴氰菊酯处理间存在显著差异 ($P<0.05$)($n=3$)

Fig. 1 Seawater acidification and deltamethrin exposure to the hardness of juvenile *H. discus hannai* shells in each treatment group

Different capital letters indicate significant differences between different pH treatments at the same concentration of deltamethrin exposure; different lowercase letters indicate significant differences between deltamethrin treatments at different concentrations at the same pH exposure ($P<0.05$) ($n=3$)

表 2 皱纹盘鲍稚鲍贝壳硬度在海水酸化和溴氰菊酯暴露下的双因素方差分析

Tab. 2 Two-Way ANOVA of the hardness of juvenile *H. discus hannai* shells under seawater acidification and deltamethrin exposure

组别 group	df	平方和 sum of squares	均方 mean square	F	P
pH	2	372.436	186.218	14.642	0.000
溴氰菊酯 deltamethrin	2	12.294	6.147	0.483	0.625
pH*溴氰菊酯	4	86.390	21.598	1.698	0.194

注：*表示不同的pH值与溴氰菊酯浓度暴露对贝壳硬度的交互作用
Notes: “*” represents the interaction of different pH values and deltamethrin concentration exposure on shell hardness

e)。然而，增加 $p\text{CO}_2$ 和溴氰菊酯暴露对鲍鱼稚鲍 Bcl-2, Bax1 表达无明显影响。双因素方差分析结果表明，海水酸化与溴氰菊酯暴露对皱纹盘鲍稚鲍 HSP70、HSP90 和 Caspase-3 具有显著交互作用(表 4)。

3 讨论

3.1 皱纹盘鲍稚鲍在不同暴露条件下贝壳的微观结构与硬度变化

实验观察了海水酸化和溴氰菊酯暴露对皱纹盘鲍稚鲍贝壳微观结构的影响，发现海水酸化能

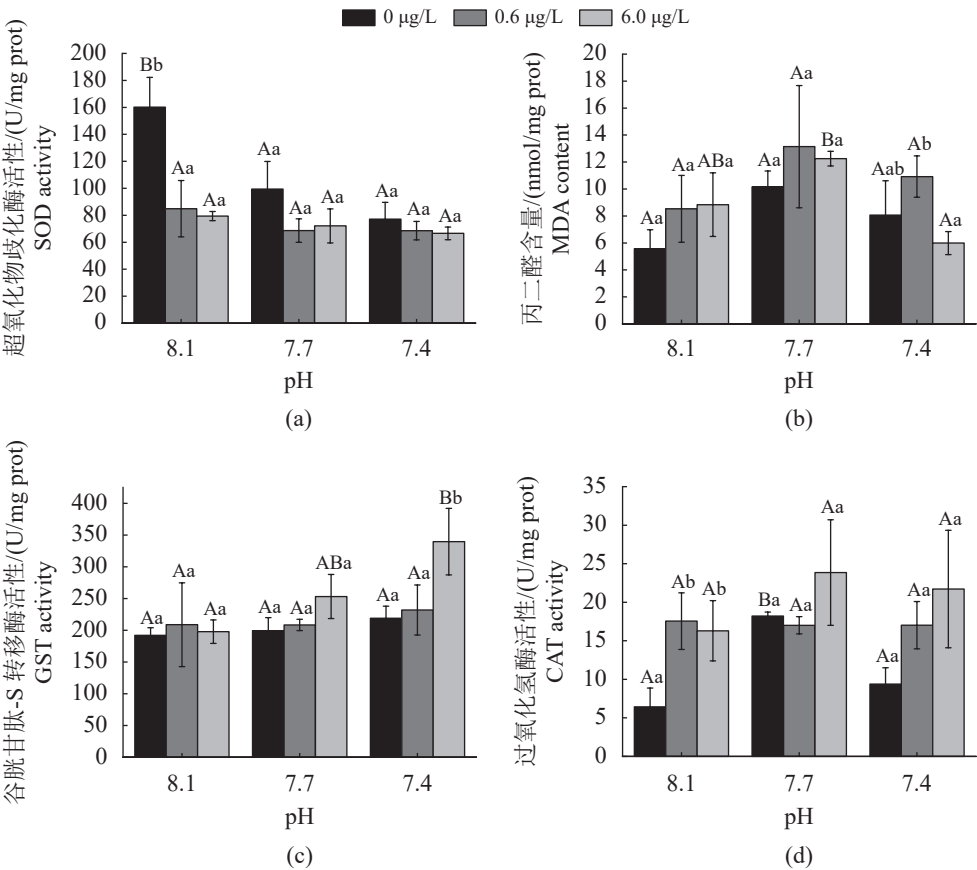


图 2 海水酸化与溴氰菊酯暴露对皱纹盘鲍稚鲍抗氧化酶活性与 MDA 水平的影响

不同大写字母表示在相同浓度溴氰菊酯暴露下, 不同 pH 处理间存在显著差异 ($P<0.05$); 不同小写字母表示在相同 pH 暴露下, 不同浓度溴氰菊酯处理间存在显著差异 ($P<0.05$)($n=3$)

Fig. 2 Antioxidant enzyme activities and the level of MDA in the juvenile abalone of *H. discus hannai* after elevated $p\text{CO}_2$ and deltamethrin exposure

Different capital letters indicate significant differences between different pH treatments at the same concentration of deltamethrin exposure; different lowercase letters indicate significant differences between deltamethrin treatments at different concentrations at the same pH exposure ($P<0.05$)($n=3$)

表 3 双因素方差分析: 海水酸化和溴氰菊酯暴露对皱纹盘鲍稚鲍抗氧化酶和 MDA 水平的影响

Tab. 3 Two-way ANOVA: Effects of seawater acidification and deltamethrin exposure on antioxidant enzyme activities and the level of MDA in juvenile abalone of *H. discus hannai*

抗氧化指标 antioxidant indices	环境因子/交互作用 environmental factors/Interaction		
	海水酸化 seawater acidification	溴氰菊酯 deltameth- rin	海水酸化×溴氰菊酯 seawater acidification× deltamethrin
SOD	$f=12.31$ $P<0.0001$	$f=11.603$ $P=0.001$	$f=4.858$ $P=0.008$
MDA	$f=6.053$ $P=0.01$	$f=2.608$ $P=0.101$	$f=1.021$ $P=0.423$
GST	$f=5.127$ $P=0.017$	$f=4.818$ $P=0.021$	$f=1.838$ $P=0.166$
CAT	$f=2.311$ $P=0.128$	$f=6.165$ $P=0.009$	$f=1.496$ $P=0.245$

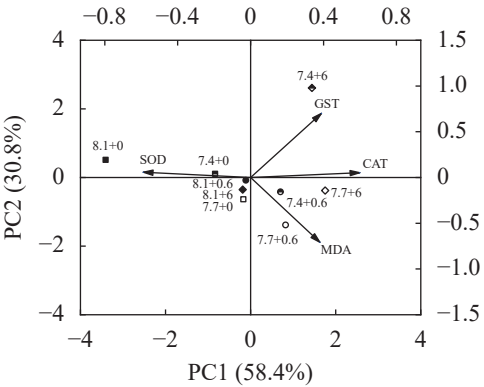


图 3 海水酸化与溴氰菊酯暴露后皱纹盘鲍稚鲍抗氧化指标的主成分分析

Fig. 3 Principal component analysis of the antioxidant indices in the juvenile abalone of *H. discus hannai* after seawater acidification and deltamethrin exposure

使贝壳文石板片变小或堆叠不规则,珍珠层缺失,中间出现孔隙。这些结果归因于 CaCO_3 矿化物的不饱和和低 pH 的海水对贝壳造成的腐蚀^[20]。海水 pH 的下降导致贝壳溶解速度高于矿化速度,因此文石很难沉积和积累。这一现象在香港牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*) 和紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 等贝类中也已被发现^[20-22]。此结果证实了皱纹盘鲍在受到 pH 降低干扰时,其贝壳也表现出与双壳贝类相似的微观结构的变化。而溴氰菊酯是一种神经性毒药,它能够作用于生物膜上的钠通道,

使钠道关闭延缓,从而形成钠离子内流,神经传导受到抑制,并且能够抑制 ATP 酶的活性^[23]。而稚鲍在生长过程中需要消耗大量能量以抵抗溴氰菊酯带来的不利影响,这可能成为稚鲍贝壳质量下降的主要原因。此外,贝壳的钙化速率与微观结构的变化能够使贝壳力学性能发生改变^[24]。贝壳珍珠层具有极其优异的力学性能,与地质文石相比,其强度增加两倍,韧性增加了 1000 多倍,断裂功增加了 3000 多倍。因此,珍珠层微观结构的变化将严重影响贝壳的力学性能。在本实验中,

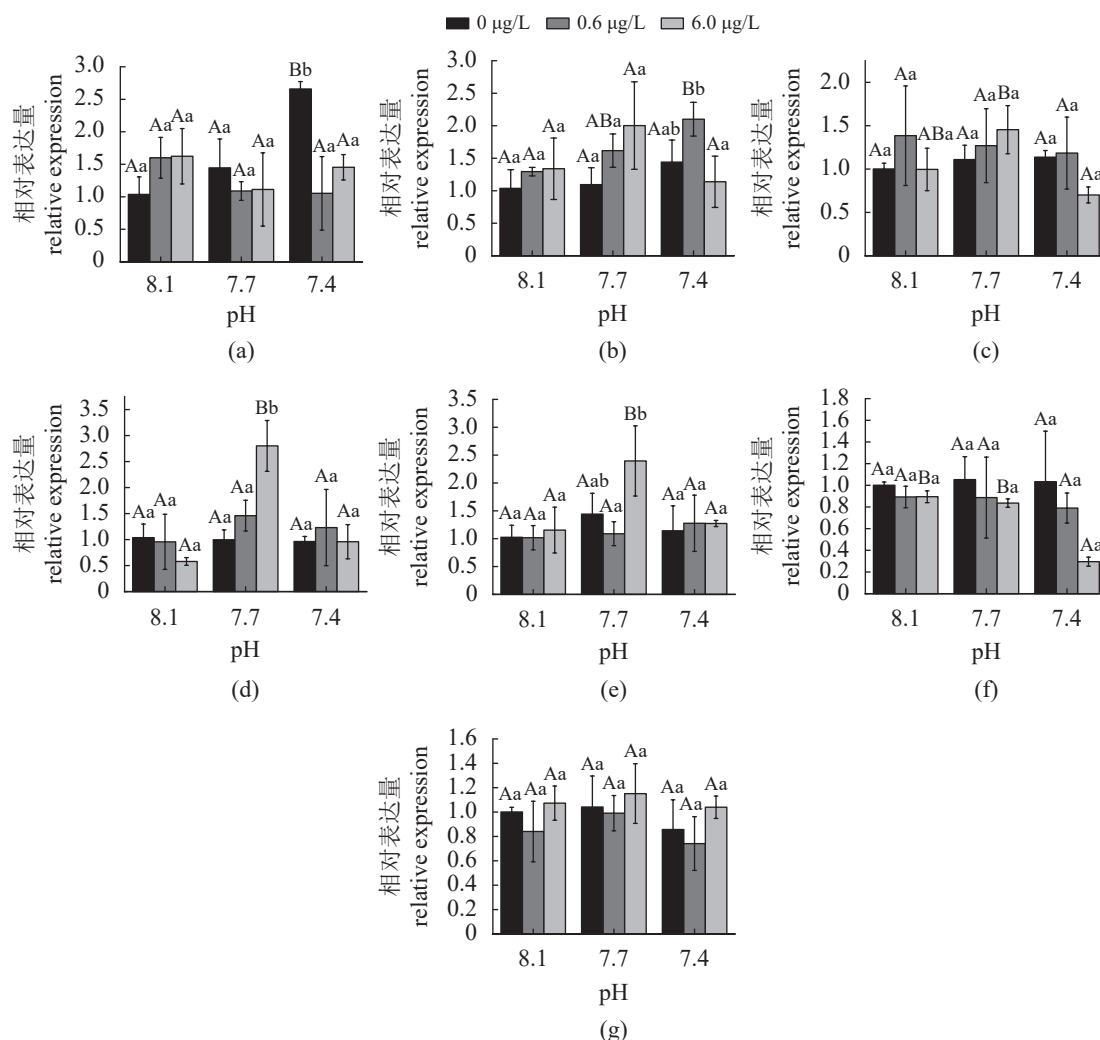


图4 海水酸化与溴氰菊酯暴露对皱纹盘鲍稚鲍应激和凋亡相关基因 mRNA 表达的影响

(a) HSP70, (b) HSP90, (c) FADD, (d) Caspase-3, (e) IAP, (f) Bcl-2, (g) Bax1。不同大写字母表示在相同浓度溴氰菊酯暴露下,不同 pH 处理间存在显著差异 ($P < 0.05$); 不同小写字母表示在相同 pH 暴露下,不同浓度溴氰菊酯处理间存在显著差异 ($P < 0.05$) ($n=3$)

Fig. 4 mRNA expression profiles of stress and apoptosis-related genes in the juvenile abalone of *H. discus hannai* after elevated pCO_2 and deltamethrin exposure

(a) HSP70, (b) HSP90, (c) FADD, (d) Caspase-3, (e) IAP, (f) Bcl-2, (g) Bax1. Different capital letters indicate significant differences between different pH treatments at the same concentration of deltamethrin exposure; different lowercase letters indicate significant differences between deltamethrin treatments at different concentrations at the same pH exposure ($P < 0.05$) ($n=3$)

表 4 双因素方差分析: 海水酸化和溴氰菊酯暴露对皱纹盘鲍稚鲍应激与凋亡相关基因表达的影响

Tab. 4 Two-Way ANOVA: effects of seawater acidification and deltamethrin exposure on the expression of apoptosis and stress-related genes in juvenile abalone of *H. discus hannai*

基因名称 genes	环境因子×交互作用 environmental factors/Interaction		
	海水酸化 seawater acidification	溴氰菊酯 deltamethrin	海水酸化×溴氰菊酯 seawater acidification× deltamethrin
HSP70	$f=2.786$	$f=2.437$	$f=24.856$
	$P=0.088$	$P=0.116$	$P=0.008$
HSP90	$f=1.521$	$f=3.085$	$f=2.419$
	$P=0.245$	$P=0.07$	$P=0.086$
BAX1	$f=1.297$	$f=2.079$	$f=0.095$
	$P=0.298$	$P=0.154$	$P=0.983$
Bcl-2	$f=1.515$	$f=2.915$	$f=1.000$
	$P=0.246$	$P=0.08$	$P=0.433$
Caspase3	$f=8.423$	$f=2.148$	$f=5.125$
	$P=0.003$	$P=0.146$	$P=0.006$
FADD	$f=1.136$	$f=0.958$	$f=1.083$
	$P=0.343$	$P=0.402$	$P=0.394$
IAP	$f=3.651$	$f=2.753$	$f=1.852$
	$P=0.047$	$P=0.091$	$P=0.163$

随着 $p\text{CO}_2$ 与溴氰菊酯浓度的增加, 贝壳珍珠层出现了不规则的文石板的堆叠和空间腐蚀的孔洞, 这可能是导致贝壳硬度降低的主要原因。贝壳强度的弱化和易损性增加了两个隐患。首先, 它能够增加贝壳断裂的风险; 同时, 它能够改变侵蚀和生长之间的动态平衡。这将成为影响各种钙化生物正常发育的重要问题^[25]。

3.2 皱纹盘鲍稚鲍在不同暴露条件下的抗氧化酶活性变化

MDA 作为脂质过氧化物 (LPO) 的主要产物, 它的变化能够直观反映氧化应激和细胞损伤^[26]。SOD 是一种天然的超氧阴离子自由基 (O_2^-) 清除剂, 它将 O_2^- 作为底物转化为 H_2O_2 ^[27], 而 CAT 将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 , 以彻底清除过量的自由基。谷胱甘肽系统在将 H_2O_2 还原为 H_2O 和将脂质过氧化物还原为醇的过程中发挥至关重要的作用^[28]。本研究表明, 海水酸化与溴氰菊酯暴露对皱纹盘鲍稚鲍抗氧化酶以及 MDA 水平具有显著影响。CAT、GST 活性与 MDA 水平随着海水 pH 下降与溴氰菊酯浓度的增加而显著上升, 而 SOD 活性显著下降, 这可能是由于稚鲍组织中 ROS 超过了体

内抗氧化系统的清除能力, 进而对抗氧化系统造成了破坏^[29]。这与 Hong 等^[30] 使用溴氰菊酯暴露中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 和 Cao 等^[31] 使用海水酸化与重金属复合暴露长牡蛎 (*Crassostrea giga*) 的研究结果相似。而 CAT 活性显著上升, 这可能是由于组织中的 SOD 将 ROS 分解为 H_2O_2 , 导致因 H_2O_2 浓度大增, 诱导 CAT 活性的上升。Marine 等^[32] 认为 GST 在污染物的代谢中扮演重要角度, 在污染物的影响下华贵栉孔扇贝 (*Mimachlamys varia*) 体内 GST 活性也显著升高。本研究中, 海水酸化与溴氰菊酯暴露使皱纹盘鲍稚鲍 GST 活性上升, 说明了皱纹盘鲍稚鲍启动了抗氧化系统抵抗不利环境因素带来的影响。

3.3 皱纹盘鲍稚鲍在不同暴露条件下应激基因与凋亡相关基因表达

当软体动物暴露于不利环境中, 细胞凋亡是消除受损细胞的有效途径^[33]。目前, 在软体动物中发现了两种主要的凋亡通路: 外源性通路 (死亡受体通路) 和内源性通路 (线粒体通路)^[34-36]。在本实验中, 当 pH 值为 7.7 时, 皱纹盘鲍稚鲍在 0.6 $\mu\text{g/L}$ 的溴氰菊酯暴露下, FADD 的表达量有明显的上升。而 FADD 可以通过与 Fas 蛋白的死亡结构域相互作用, 从而在外源性凋亡通路中发挥作用, 并启动凋亡程序^[37]。而 Caspase-3 是一种半胱氨酸蛋白酶, 它在细胞凋亡阶段发挥着核心作用^[38]。Bcl-2 作为作用在线粒体膜的细胞凋亡抑制分子^[38], 在海水酸化与溴氰菊酯暴露下有明显的下降趋势。在本研究中, 海水酸化与溴氰菊酯复合暴露使皱纹盘鲍稚鲍组织中的外源性与内源性凋亡通路均被激活。

在正常和胁迫情况下, 生物有机体的热休克蛋白 (HSP) 均发挥着重要生物学功能, 包括新生蛋白质的折叠、变性蛋白质的重折叠和受损蛋白质的降解等, 这对于生物体迅速适应外界环境的改变发挥着重要作用^[39-41]。在本研究中, 海水酸化与溴氰菊酯胁迫下皱纹盘鲍稚鲍组织中 HSP70、HSP90 表达量均显著性上升。HSP70 与 HSP90 的过表达意味着细胞正在遭受压力, 需要更多的分子伴侣以抵抗不利环境。

4 结论

本研究表明, 海水酸化与溴氰菊酯复合暴露对皱纹盘鲍稚鲍产生了毒性效应, 将严重影响皱

纹盘鲍种群的生存与发展。在海水酸化与溴氰菊酯复合暴露下, 贝壳珍珠层微观结构发生改变, 文石板片变小且堆叠不规则, 文石板片之间出现孔隙, 贝壳硬度明显下降。同时, SOD 活性随着 $p\text{CO}_2$ 与溴氰菊酯浓度的增加而受到一定抑制, 而 CAT 与 GST 活性随着 $p\text{CO}_2$ 与溴氰菊酯浓度的增加而升高, 说明海水酸化与溴氰菊酯复合暴露能够使皱纹盘鲍稚鲍产生氧化应激效应; 而应激基因与凋亡相关基因表达量随着 $p\text{CO}_2$ 与溴氰菊酯浓度的增加而上升, 证明细胞凋亡通路被激活。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Caldeira K, Wickett M E. Anthropogenic carbon and ocean pH[J]. *Nature*, 2003, 425(6956): 365-365.
- [2] IPCC. Climate change 2014: Synthesis report[M]//Pachauri R K, Meyer L A. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Switzerland: IPCC, 2014: 60-70.
- [3] Orr J C, Fabry V J, Aumont O, *et al.* Anthropogenic ocean acidification over the Twenty-first century and its impact on calcifying organisms[J]. *Nature*, 2005, 437(7059): 681-686.
- [4] Liu S X, Shi W, Guo C, *et al.* Ocean acidification weakens the immune response of blood clam through hampering the NF-kappa β and toll-like receptor pathways[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 54: 322-327.
- [5] Duquette A, Mcclintock J B, Amsler C D, *et al.* Effects of ocean acidification on the shells of four Mediterranean gastropod species near a CO₂ seep[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 124(2): 917-928.
- [6] Zhao X, Shi W, Han Y, *et al.* Ocean acidification adversely influences metabolism, extracellular pH and calcification of an economically important marine bivalve, *Tegillarca granosa*[J]. *Marine Environmental Research*, 2017, 125: 82-89.
- [7] Rodriguez-Dominguez A, Connell S D, Baziret C, *et al.* Irreversible behavioural impairment of fish starts early: Embryonic exposure to ocean acidification[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2018, 133: 562-567.
- [8] Cattano C, Agostini S, Harvey B P, *et al.* Changes in fish communities due to benthic habitat shifts under ocean acidification conditions[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 725: 138501.
- [9] Kumar A, Sasmal D, Sharma N. Immunomodulatory role of piperine in deltamethrin induced thymic apoptosis and altered immune functions[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2015, 39(2): 504-514.
- [10] Lu Q R, Sun Y Q, Ares I, *et al.* Deltamethrin toxicity: A review of oxidative stress and metabolism[J]. *Environmental Research*, 2019, 170: 260-281.
- [11] Ullah S, Li Z Q, Arifeen M Z U, *et al.* Multiple biomarkers based appraisal of deltamethrin induced toxicity in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. *Chemosphere*, 2019, 214: 519-533.
- [12] Yoo M, Lim Y H, Kim T, *et al.* Association between urinary 3-phenoxybenzoic acid and body mass index in Korean adults: 1st Korean National Environmental Health Survey[J]. *Annals of Occupational and Environmental Medicine*, 2016, 28(1): 2.
- [13] 汪霞霞, 庄婉娥, 姚文松, 等. 河口及近岸海水中20种农药的固相萃取小柱富集-气相色谱测定方法研究[J]. *分析仪器*, 2010(6): 64-71.
- Wang X X, Zhuang W E, Yao W S, *et al.* Determination of 20 pesticides in estuarine and coastal seawater by SPE column enrichment-gas chromatography[J]. *Analytical Instrumentation*, 2010(6): 64-71 (in Chinese).
- [14] 赵新娜. 环境基质中多环芳烃和拟除虫菊酯的分析技术研究及应用 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2009.
- Zhao X N. The analytical technique and its application of pyrethroid and polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental matrices[D]. Wuhan: Central China Normal University, 2009 (in Chinese).
- [15] 陈家长, 吴伟, 瞿建宏, 等. 溴氰菊酯胁迫下罗非鱼组织中过氧化氢酶和单胺氧化酶的变化[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(6): 1441-1445.
- Chen J Z, Wu W, Qu J H, *et al.* Activities of catalase and monoamine oxidase in different tissues of tilapia under stress of deltamethrin[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(6): 1441-1445 (in Chinese).
- [16] 夏伟. 溴氰菊酯对鲫鱼的分子毒理效应研究 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2008: 1-44.
- Xia W. Molecular toxicology of deltamethrin to *Carassius auratus*[D]. Wuhan: Central China Normal University, 2008: 1-44 (in Chinese).
- [17] 周志刚, 王明学, 吕敢堂, 等. 溴氰菊酯对草鱼种脑 AchE 及 ATP 酶活性的影响[J]. *华中农业大学学报*, 1999, 18(2): 176-179.
- Zhou Z G, Wang M X, Lu G T, *et al.* The effects of decamethrin on brain AchE and ATPase activities of grass carp (*Ctenopharygodon idellus*) fingerlings[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1999, 18(2): 176-179 (in Chinese).
- [18] 魏华, 吴楠, 沈屹, 等. 溴氰菊酯对克氏原螯虾的氧化

- 胁迫效应[J]. *水产学报*, 2010, 34(5): 733-739.
- Wei H, Wu N, Shen H, *et al.* Oxidative stress of deltamethrin to the liver of crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(5): 733-739 (in Chinese).
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] Meng Y, Guo Z B, Yao H M, *et al.* Calcium carbonate unit realignment under acidification: a potential compensatory mechanism in an edible estuarine oyster[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 139: 141-149.
- [21] Fitzer S C, Cusack M, Phoenix V R, *et al.* Ocean acidification reduces the crystallographic control in juvenile mussel shells[J]. *Journal of Structural Biology*, 2014, 188(1): 39-45.
- [22] Meng Y, Guo Z B, Fitzer S C, *et al.* Ocean acidification reduces hardness and stiffness of the Portuguese oyster shell with impaired microstructure: A hierarchical analysis[J]. *Biogeosciences*, 2018, 15(22): 6833-6846.
- [23] 童英. 农药溴氰菊酯毒理学研究[J]. *南京医学院学报*, 1984(3): 210-214.
- Tong Y. Toxicological study of deltamethrin[J]. *Journal of Nanjing Medical College*, 1984(3): 210-214 (in Chinese).
- [24] 梁艳. 几种腹足纲贝壳的结构和性能 [D]. 大连: 大连理工大学, 2008.
- Liang Y. The microstructure and properties of several gastropoda shells[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2008 (in Chinese).
- [25] Bednaršek N, Tarling G A, Bakker D C E, *et al.* Description and quantification of pteropod shell dissolution: a sensitive bioindicator of ocean acidification[J]. *Global Change Biology*, 2012, 18(7): 2378-2388.
- [26] Storey K B. Oxidative stress: animal adaptations in nature[J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1996, 29(12): 1715-1733.
- [27] Mccord J M. The evolution of free radicals and oxidative stress[J]. *The American Journal of Medicine*, 2000, 108(8): 652-659.
- [28] Birben E, Sahiner U M, Sackesen C, *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense[J]. *World Allergy Organization Journal*, 2012, 5(1): 9-19.
- [29] Geret F, Serafim A, Barreira L, *et al.* Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*[J]. *Marine Environmental Research*, 2002, 54(3-5): 413-417.
- [30] Hong Y H, Yang X Z, Huang Y, *et al.* Oxidative stress and genotoxic effect of deltamethrin exposure on the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2018, 212: 25-33.
- [31] 曹瑞文. 海水酸化和痕量金属 (Cd^{2+} 和 Cu^{2+}) 对经济贝类的复合毒性效应研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2019.
- Cao R W. Combined toxic effects of seawater acidification and trace metals (Cd^{2+} , Cu^{2+}) on economic shellfish[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2019 (in Chinese).
- [32] Breitwieser M, Viricel A, Graber M, *et al.* Short-term and long-term biological effects of chronic chemical contamination on natural populations of a marine bivalve[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150184.
- [33] Romero A, Novoa B, Figueras A. The complexity of apoptotic cell death in mollusks: an update[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(1): 79-87.
- [34] Kiss T. Apoptosis and its functional significance in molluscs[J]. *Apoptosis*, 2010, 15(3): 313-321.
- [35] Sokolova I M. Apoptosis in molluscan immune defense[J]. *Invertebrate Survival Journal*, 2009, 6(1): 49-58.
- [36] Terahara K, Takahashi K G. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs[J]. *Current Pharmaceutica Design*, 2008, 14(2): 131-137.
- [37] Eicher T, Ma Q, Kelly C, *et al.* Single and combination toxic metal exposures induce apoptosis in cultured murine podocytes exclusively via the extrinsic caspase 8 pathway[J]. *Toxicological Sciences*, 2006, 90(2): 392-399.
- [38] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, *et al.* Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1999, 15: 269-290.
- [39] Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2002, 2(3): 185-194.
- [40] Żmijewski M A, Macario A J L, Lipińska B. Functional similarities and differences of an archaeal HSP70(DnaK) stress protein compared with its homologue from the bacterium *Escherichia coli*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 336(2): 539-549.
- [41] Dong Y W, Dong S L. Induced thermotolerance and expression of heat shock protein70 in sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Fisheries Science*, 2008, 74(3): 573-578.

Response of juvenile abalone of *Haliotis discus hannai* to the combined stress of ocean acidification and deltamethrin

DENG Qinyou^{1,2,3}, YANG Dinglong^{1,2,3,4*}, HE Jinxia³, LIU Xiangquan³, CHEN Lizhu³

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Shandong Marine Resource and
Environment Research Institute, Yantai 264006, China;

4. Key Laboratory of Coastal Biology and Biological Resources Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research,
Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Abstract: Since the industrial revolution, the concentration of CO₂ in the atmosphere has been rising due to the heavy use of fossil fuel and deforestation. As the oceans and atmosphere exchange gases, the pH of seawater decreases. According to the IPCC, if CO₂ emissions are not effectively reduced, the global surface seawater pH will fall to 7.7 by the 21st century and 7.4 by 2300. Acidification is a growing concern because of the damage it can cause to marine life. In addition, ocean acidification often does not occur in isolation, but often acts on marine life in concert with other stressors. Deltamethrin is one of the most widely used pyrethroid insecticides in the world because of its high activity and photostability to pests. Pyrethroid pesticides have little potential to pollute the environment, but they can enter organisms through the food chain and produce toxicity to aquatic organisms. Previously, pyrethroid residues of 6.36 µg/L and 16.2 µg/L were detected in coastal areas of Fujian and Zhejiang, respectively. At present, studies on deltamethrin toxicity to aquatic organisms mainly focus on acute and subacute toxicity tests of fish and shrimp, but few studies on shellfish. In order to investigate the toxic effects of seawater acidification and deltamethrin (DM) combined exposure on juvenile of *Haliotis discus hannai*, three pH values (pH 8.1, pH 7.7 and pH 7.4) and three deltamethrin concentrations (0, 0.6 and 6.0 µg/L) were used to stress juvenile of *H. discus hannai*. The microstructures and hardness of the shells, the activity of antioxidant enzymes and the expression levels of genes related to stress and apoptosis in the tissues of juvenile of *H. discus hannai* were detected. The results showed that after the combined exposure of seawater acidification and deltamethrin for 31 days, the CaCO₃ crystal deposition of juvenile abalone shells was difficult, the aragonite became smaller and formed scattered lamellar stacking, the pores between the aragonite increased, and the hardness of the shells decreased significantly. Meanwhile, seawater acidification and deltamethrin could change the activity of antioxidant enzymes in juvenile abalone. When the pH of seawater was 7.7 and 7.4 or the concentration of deltamethrin was 0.6 and 6, the SOD activity of juvenile abalone was lower than that of the control group, and the SOD activity of juvenile abalone under the combined exposure of seawater acidification and deltamethrin was significantly lower than that of single exposure, indicating that there was an obvious interaction between seawater acidification and deltamethrin on the SOD activity of juvenile abalone. However, deltamethrin significantly increased the activities of CAT and GST in juvenile abalone under the same pH exposure. In addition, this study also observed that the expression levels of stress genes and apoptotic genes in the tissues of juvenile abalone were increased with the increase of pCO₂ and deltamethrin concentration, and there was a significant synergistic effect between seawater acidification and deltamethrin exposure on the expression levels of *HSP70*, *HSP90*, *Caspase-3* and *FADD*. In conclusion, seawater acidification and deltamethrin exposure can produce significant toxic effects on juvenile abalone and play a certain interactive role in the reaction of tissue oxidative stress and cell apoptosis in juvenile abalone.

Key words: juvenile *Haliotis discus hannai*; shell hardness; acidification; deltamethrin; scanning electron microscopy

Corresponding author: YANG Dinglong. E-mail: dlyang@yic.ac.cn

Funding projects: Shandong Provincial Thoroughbred Project (2017LZGC009); National Natural Science Foundation of China (41806196); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2020QD097)