

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.20212

软骨藻酸对海湾扇贝(*Argopecten irradians*)血淋巴免疫力和抗氧化力的影响研究

迟骋, 张彩艳, 刘佳岱, 叶明文, 于夏玮

南京农业大学动物科技学院, 江苏省水产动物营养重点实验室, 江苏 南京 210095

摘要: 软骨藻酸是一种神经性贝类毒素, 大多数研究只报道了对陆生动物神经系统的毒性和在贝类组织内累计的软骨藻酸的浓度, 而对软骨藻酸对贝类自身的免疫及抗氧化系统的毒性作用相关的研究不足。扇贝作为无脊椎动物, 缺乏适应性免疫, 主要依靠先天免疫系统进行防御。因此, 本研究以海湾扇贝(*Argopecten irradians*)为研究对象, 在 0、10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 软骨藻酸浸泡 6 h、12 h 和 24 h 后通过测定扇贝血淋巴中超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶(LZM)活性和谷胱甘肽(GSH)含量以及免疫、抗氧化相关基因(*Cu/ZnSOD*、*MnSOD*、*GST* 和 *ACP*)相对表达量来研究其对扇贝免疫力及抗氧化系统的影响。结果发现, LZM 活性在 10 ng/mL 和 50 ng/mL 软骨藻酸处理后显著提高; *ACP* 基因表达量在 6 h 和 12 h 内表达量受到上调, 而在 24 h 表达量显著下调; 10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 软骨藻酸浸泡扇贝 6~24 h 后 SOD 活性受到抑制, 并且 *Cu/ZnSOD* 和 *MnSOD* 基因表达受到调控; GSH 含量显著提高, 并且 *GST* 基因表达量显著上调。以上结果表明软骨藻酸处理虽然会抑制抗氧化酶 SOD 活性, 并且高浓度长时间处理会造成免疫疲劳现象, 但机体可通过提高血淋巴 GSH 水平和 *GST* 基因的表达量来抵抗软骨藻酸的毒性。因此, 本研究初步揭示了软骨藻酸对扇贝等双壳类免疫力、抗氧化力和解毒力的影响。

关键词: 软骨藻酸; 免疫力; 抗氧化力; 海湾扇贝

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)11-1371-08

由于环境不断变化和水环境的污染, 导致赤潮不断爆发, 对包括人类在内的各种物种都产生了有害影响, 不仅影响沿海生态, 还会造成严重的经济损失^[1], 一个重要的潜在原因是赤潮爆发时产生了大量的藻毒素和其他代谢物^[2]。软骨藻酸(domoic acid, DA)是一种神经性贝类毒素, 主要是由海洋中拟菱形藻属(*Pseudo-nitzschia*)和菱形藻属(*Nitzschia*)的某一些种的硅藻产生的。软骨藻酸是一种氨基酸, 有三个羧基和一个亚胺基, 结构类似于谷氨酸和红藻氨酸(kainic acid)^[3]。谷氨酸是脊椎动物中枢神经系统公认的兴奋性神经递质^[4], 由于这种结构上的相似性, 软骨藻酸与谷氨酸受体家族结合, 产生神经兴奋性和神经毒

性效应^[5]。目前, 对于软骨藻酸的毒性大多数报道集中于小鼠、人类、鸟类和其他动物身上, 揭示了软骨藻酸在陆地动物中引起的神经毒性^[6-8], 包括脑损伤、急性视网膜损伤以及年龄和性别敏感性。虽然对包括鱼类和海洋哺乳动物等海洋生物有少量研究, 但只揭示了在海洋哺乳动物和鱼类的大脑中软骨藻酸对它们的敏感性(ED₅₀/LD₅₀)、攻击行为、游泳行为和代谢活动的影响^[3]。软骨藻酸是一种典型的神经毒素, 其免疫毒性尚未被充分研究, 尤其是对海洋生物的免疫毒性研究较少。前期小鼠实验结果表明软骨藻酸可能通过影响单核细胞吞噬直接或间接地发挥其免疫毒性作用^[4]。尽管有一些关于无脊椎动物的研究, 但大多

收稿日期: 2020-05-11; 修订日期: 2020-10-04.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31802347); 中央高校基本科研业务费专项(KJQN201937).

作者简介: 迟骋, 男, 博士, 讲师, 从事水生毒理学研究. E-mail: chicheng@njau.edu.cn

数研究只报道了作为顶级捕食者重要的贝类体内各个组织内累计的软骨藻酸的浓度,而软骨藻酸暴露对这些贝类自身的毒性及分子机制相关的研究仍然较少^[9],因此,进一步开展软骨藻酸暴露对贝类毒性的相关研究将有助于进一步揭示软骨藻酸的毒性。

扇贝等双壳类在中国、韩国和日本是重要的海洋渔业资源,具有重要的经济意义。双壳类是滤食性物种,因此赤潮产生的生物毒素会积聚在其体内、组织中^[10]。在自我防御系统方面,脊椎动物和无脊椎动物有很大的生理差异。扇贝作为无脊椎动物,缺乏适应性免疫,主要依靠先天免疫系统进行防御,体液成分主要通过血淋巴介导先天免疫。在贝类简单的免疫系统中,酸性磷酸酶(ACP)和溶菌酶(LZM)均为溶酶体酶,与吞噬细胞对异物的消灭和清除密切相关^[9,11]。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)能够催化超氧阴离子自由基歧化生成转化为 H_2O_2 及 O_2^- 以防止脂质过氧化,在生物体的自我保护系统中起着极为重要的作用^[12]。常见的 3 种 SOD 基因型中, Cu/ZnSOD 是含量最多的,定位于细胞质, MnSOD 主要定位于线粒体内^[13]。另外, 谷胱甘肽(glutathione, GSH)作为一种抗氧化剂,可以清除活性氧(ROS),保护生物大分子的巯基(-SH),具有抗氧化作用^[14-15]; 半胱氨酸上的巯基为谷胱甘肽活性基团,易与毒素等结合,把机体内有害的毒物转化为无害的物质而具有整合解毒作用^[16-17]。谷胱甘肽 S-转移酶(GST)是谷胱甘肽结合反应的关键酶,可催化 GSH 与亲电中间代谢物的结合,从而解除内源性或外源性毒物的毒性,在解毒系统中起重要作用^[18]。因此, GSH 和 GST 能帮助扇贝维持机体的正常生理机能。

因此,本研究以海湾扇贝(*Argopecten irradians*)为对象,通过测定 SOD、LZM 酶活性和 GSH 含量以及相关基因(Cu/ZnSOD、MnSOD、GST 和 ACP)相对表达量,以探讨不同浓度软骨藻酸在不同时间点对扇贝抗氧化力和解毒力的影响,以进一步补充软骨藻酸对扇贝等双壳类抗氧化系统的影响。

1 材料和方法

1.1 软骨藻酸

软骨藻酸(20 mg, 粉末, 纯度 90%~100%), 购自 Sigma-ldrich 公司(美国)于 4 °C 冰箱保存至使用。

1.2 试验动物

在中国江苏省南京市众彩水产市场共购买 360 个海湾扇贝(*Argopecten irradians*)。扇贝平均壳长 59~70 mm; 平均重量(45.32±2.43) g。试验前, 将扇贝置于挂起的笼网中, 置于一个 800 L 的容器中, 加入经过滤的充气的海水, 以适应实验室条件[温度: (10±1) °C; 盐度: (30±0.1)‰]。以 1.2×10^{10} 个海藻细胞/扇贝的量投喂商业贝类饲料(Reed Mariculture, 菲律宾)饲养。每天更换一半的海水。

将海湾扇贝分为 4 组: 对照组和 3 个处理组(DA 处理组)。每组 30 只扇贝, 3 个重复。将软骨藻酸溶于蒸馏水中制备软骨藻酸原液, 等量的蒸馏水作为对照。根据之前研究所报道的不同浓度软骨藻酸浸泡幼贝体的浓度及其产生的毒性^[19], 进而确定对试验组分别用 4 种浓度软骨藻酸(0、10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL)进行处理。为了保持软骨藻酸浓度恒定不变, 在试验期间不进行换水或清洗水箱。在软骨藻酸处理 6 h、12 h 和 24 h 后, 每个海湾扇贝采集 1 mL 的血淋巴。每组 3 只扇贝作为一个生物样本, 每 3 个生物样本作为一个重复。每组的血淋巴样品分成两份: 一份(100 μ L)用于提取 RNA, 另一份 12000 r/min 离心 3 min 并储存在-80 °C 下以供测定抗氧化相关指标。

1.3 免疫、抗氧化指标的测定

本试验测定 SOD、LZM 活性和 GSH 含量所用的试剂盒选购于南京建成生物工程研究所, 具体操作步骤参照说明书进行^[20-21]。SOD 活性单位定义: 在反应体系中 SOD 抑制率达到 50% 时所对应的酶量为一个 SOD 活力单位(U)。

1.4 基因表达量分析

用 TRIzol 试剂从血淋巴样品中提取总 RNA。根据 OD 值 260/280 (1.8~2.0), 用分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度。cDNA 的合成是利用 PrimeScript™ RT 试剂盒(TaKaRa, 日本)按照制造

商说明进行合成的,并储存在-80℃用于实时定量 PCR (qPCR)。

qPCR 使用 SYBR Premix Ex Taq™试剂盒 (TaKaRa, 日本)在 RT-PCR 检测系统(Qiagen, 德国)上进行。参考基因为 β -actin, 目标和参考基因的引物序列(*Cu/ZnSOD*、*MnSOD*、*GST*、*ACP* 和 β -actin)列入表 1。反应体系为 12 μ L, 其中包含 6.25 μ L SYBR 预混料 Taq™, 1 μ L 正向引物, 1 μ L 反向引物和 1 μ L cDNA 和超纯水。反应条件如下: 95℃下 10 min, 然后 40 个循环: 95℃ 45 s, 56℃ 45 s, 72℃ 30 s。扩增结束后,对熔点曲线进行了分析。mRNA 相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行计算^[20]。所有样品均进行了 3 次 PCR 重复。

表 1 mRNA 实时定量分析 PCR 引物特征

Tab. 1 Primers used for the analysis of mRNA expression by qRT-PCR

基因 gene	引物序列 primer sequence
β -actin	F: 5'-CAAACAGCAGCCTCCTCGTCA-3' R: 5'-CTGGGCACCTGAACCTTTTCGTT-3'
<i>MnSOD</i>	F: 5'-AATAGGGATTTTGGCTCGTTTG-3' R: 5'-TGGTTGAAGTGGGTCCTGGTTA-3'
<i>Cu/ZnSOD</i>	F: 5'-GTATTGAAAAGGTGATTTCGGAGG-3' R: 5'-ATGCACATGAAAGCCATGTAGG-3'
<i>GST</i>	F: 5'-GACGAAAAGATGAGCACGGT-3' R: 5'-CCAGCAAGAAAGGTTGGCACT-3'
<i>ACP</i>	F: 5'-AGACAGAACCCGACAATC-3' R: 5'-GCTATGAGGCTGATTAGAAGG-3'

1.5 数据分析

使用 Kolmogorov-Smirnov 和 Cochran 检验对数据进行正态性和方差齐性检验。数据分析采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。数据以均数±标准差($\bar{x}\pm SD$)表示。采用 SPSS 19.0 软件(IBM, 美国)LSD 检验, $P<0.05$ 为具有统计学意义的显著性差异。

2 试验结果

2.1 软骨藻酸对扇贝抗氧化反应的影响

如图 1 所示,海湾扇贝血淋巴 SOD 酶活性在低浓度(10 ng/mL)的软骨藻酸处理后 6~24 h 均低于对照组,并且在 6 h 显著($P<0.05$)低于对照组,在 12 h 和 24 h 时虽然差异不显著($P<0.05$),但仍

低于对照组;在中浓度处理组(50 ng/mL)中, SOD 酶活性表现出一定波动性,在 6 h 时显著低于对照组,在 12 h 时恢复到与对照组同等水平,然而在 24 h 时又显著低于对照组;在高浓度处理组(100 ng/mL)中,在 6 h 时 SOD 活性处稍低于对照组但差异不显著,然而在 12~24 h 时均显著低于对照组。

如图 2 所示,海湾扇贝血淋巴中 GSH 的含量在 3 种浓度软骨藻酸处理后 6~24 h 内,均显著($P<0.05$)高于对照组。

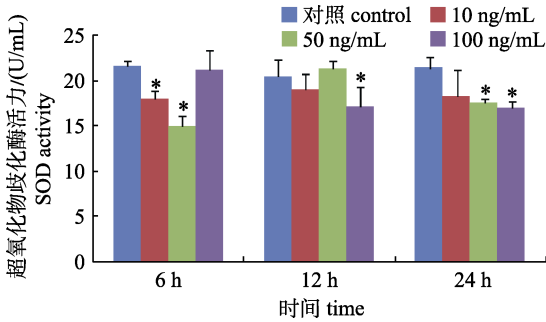


图 1 不同浓度软骨藻酸在不同时间点对海湾扇贝血淋巴超氧化物歧化酶活性的影响
柱状图上方的“*”表示和对照组相比具有显著性差异($P<0.05$)

Fig. 1 Effect of different concentrations of DA on the activity of SOD in the hemolymph of the *Argopecten irradians* at different time intervals
“*” denotes significant differences between the treatments and the control at each exposure time ($P<0.05$).

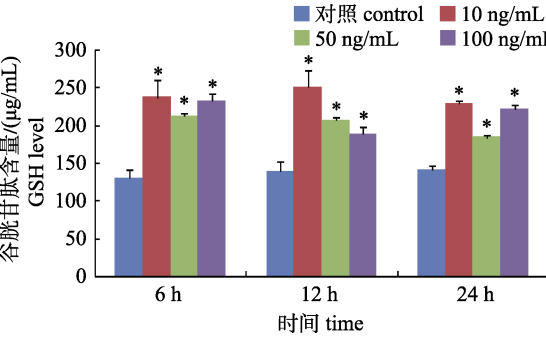


图 2 不同浓度软骨藻酸在不同时间点对海湾扇贝血淋巴谷胱甘肽含量的影响
柱状图上方的“*”表示和对照组相比具有显著性差异($P<0.05$)

Fig. 2 Effect of different concentrations of DA on the content of GSH in the hemolymph of the *Argopecten irradians* at different time intervals
“*” denotes significant differences between the treatments and the control at each exposure time ($P<0.05$).

如图 3 所示,低浓度处理组的扇贝血淋巴溶菌酶活性在 6 h 显示出明显的提高($P<0.05$),而在 12 h 和 24 h 与对照组差异不显著;然而,中等浓度处理组的菌酶活性在处理后的 6 h、12 h 和 24 h 均表现出显著提高;在高浓度处理组中 6~24 h 之间均未表现出显著差异。

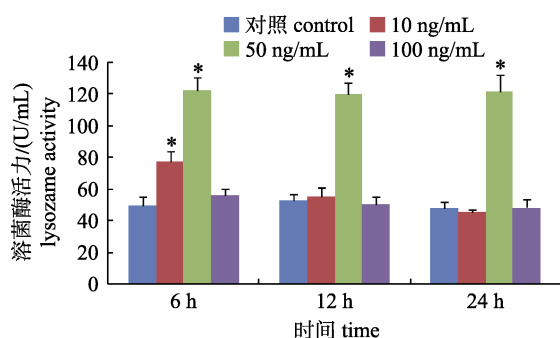


图 3 不同浓度软骨藻酸在不同时间点对海湾扇贝血淋巴溶菌酶活性的影响
柱状图上方的“*”表示和对照组相比具有显著性差异($P<0.05$)

Fig. 3 Effect of different concentrations of DA on the content of lysozyme activity in the hemolymph of the *Argopecten irradians* at different time intervals
“*” denotes significant differences between the treatments and the control at each exposure time ($P<0.05$).

2.2 软骨藻酸对扇贝 *CuSOD*、*MnSOD*、*GST* 和 *ACP* 基因表达量的影响

如图 4 所示, *Cu/ZnSOD* 基因相对表达量在低浓度软骨藻酸处理后 6 h 后显著($P>0.05$)低于对照组,随着处理时间延长到 12 h 时,其表达量仍低于对照组但差异不显著($P>0.05$);当处理时间延长到 24 h 时,其表达量与对照组比较恢复至正常水平; *Cu/ZnSOD* 基因相对表达量在中浓度处理组中随时间表现出了强烈的波动性,在 6 h 时表达量显著低于对照组,而在 12 h 时表达量恢复到对照组相同水平,在 24 h 时又显著低于对照组; *Cu/ZnSOD* 基因相对表达量在高浓度软骨藻酸处理后 6 h 显著低于对照组,然而在 12~24 h 内恢复到与对照组同等水平。

MnSOD 基因相对表达量如图 5 所示,在低浓度和中间浓度软骨藻酸处理后 6~24 h 内 *MnSOD* 基因表达量相对于对照组均显著上调,并且低浓度处理组随着时间延长逐渐上调,中间浓度处理

组在 12 h 表达量达到顶峰后,在 24 h 时相对于 12 h 稍有回调,然而相对于对照组表达量显著上调;但是,在高浓度处理组中, *MnSOD* 基因表达量在 6 h 时相对于对照组是显著下调的,随着处理时间延长在 12~24 h 显著上调。

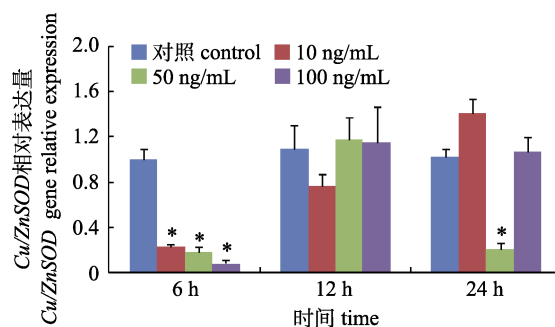


图 4 不同浓度软骨藻酸在不同时间点对海湾扇贝血淋巴 *Cu/ZnSOD* 基因相对表达量的影响
柱状图上方的“*”表示和对照组相比具有显著性差异($P<0.05$)

Fig. 4 Effect of different concentrations of DA on the related expression of *Cu/ZnSOD* in the hemolymph of the *Argopecten irradians* at different time intervals
“*” denotes significant differences between the treatments and the control at each exposure time ($P<0.05$).

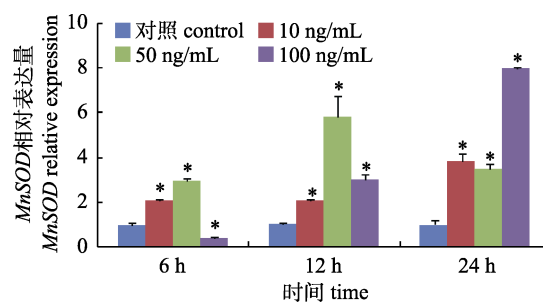


图 5 不同浓度软骨藻酸在不同时间点对海湾扇贝血淋巴 *MnSOD* 基因相对表达量的影响
柱状图上方的“*”表示和对照组相比具有显著性差异($P<0.05$)

Fig. 5 Effect of different concentrations of DA on the related expression of *MnSOD* in the hemolymph of the *Argopecten irradians* at different time intervals
“*” denotes significant differences between the treatments and the control at each exposure time ($P<0.05$).

GST 基因相对表达量如图 6 所示,在 10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 软骨藻酸的处理 6 h 后, *GST* 基因表达量相对于对照组显著上调;然而在 12 h 时低浓度处理组的基因表达量相对于对照组恢复到正常水平,而中间浓度和高浓度处理组的

基因表达量仍然显著高于对照组; 在 24 h 时, 10 ng/mL 处理组出现波动, *GST* 基因表达量再次显著上调, 50 ng/mL 处理组继续上调, 100 ng/mL 软骨藻酸处理组稍有回调, 但仍然显著高于对照组。

ACP 基因相对表达量如图 7 所示, 在低、中、高浓度软骨藻酸处理后的 6 h 和 12 h, *ACP* 基因相对表达量相对于对照组显著上调, 然而 12 h 时的表达量相对 6 h 呈现出一定下降趋势; 当处理时间达到 24 h 后, 低浓度处理组的 *ACP* 基因表达量稍高于对照组, 但差异不显著($P>0.05$), 中等浓度处理组恢复到与对照组类似的水平, 而

高浓度处理组的表达量显著下调($P<0.05$)。

3 讨论

软骨藻酸是一种记忆丧失性贝类毒素, 可在鱼类和贝类体内积累。虽然持续高水平的 100 ng/mL 软骨藻酸暴露对扇贝在自然栖息地是不可能的, 但是, 由于藻类具有一定的流动性, 自然海水环境中的藻毒素含量呈现一定波动性, 因此本研究使用的相对较高的软骨藻酸浓度有助于了解扇贝在自然栖息环境中可能的、多次的软骨藻酸暴露所产生的影响。在自然环境中, 扇贝有可能自然暴露于浓度为 10 ng/mL 和 50 ng/mL 的软骨藻酸中, 并且当大亚湾拟菱形藻(*Pseudo-nitzschia* spp.) 爆发时偶尔还会发现高达 100 nmol/L (=331 ng/mL) 的软骨藻酸^[19]。先前的研究中报道了软骨藻酸对扇贝生理和免疫相关反应的影响, 评估了暴露于不同浓度(10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL)软骨藻酸对扇贝的一些非特异性免疫反应和免疫相关基因在血淋巴中的表达的影响^[9], 然而并没有对软骨藻酸对扇贝抗氧化相关酶和相关基因表达的影响进行研究。因此, 本研究报道了不同浓度的软骨藻酸对扇贝免疫、抗氧化力的影响, 以初步揭示软骨藻酸对贝类免疫毒性及其毒性作用机制。

在贝类先天免疫系统中, LZM 是一种可水解致病菌黏多糖的碱性酶, 并将其释放形成水解酶系统以清除入侵的异物, 因此具有机体免疫防御的功能^[22]。*ACP* 是溶酶体的标记酶, 表面上的磷酸酯能通过酸性水解破坏、修饰或改变外源物质表面分子组成以防止对机体的侵害^[23]。在本研究中, 低浓度和中等浓度的软骨藻酸显著提高了 LZM 的活性, 由此可以推断, LZM 可能参与了软骨藻酸的清除作用; 然而, 高浓度软骨藻酸处理后, LZM 活性没有显著变化, 这个现象可能是在软骨藻酸处理后的 6 h 以内 LZM 酶就已经达到了承受临界点, 无法进一步参与机体软骨藻酸的清除作用。在之前的研究中, 扇贝血清 *ACP* 酶活性在不同浓度软骨藻酸处理后显著提高, 但随着时间延长而活性逐渐下降至对照组相同水平^[9], 该结果与本研究结果类似, *ACP* 基因表达量在不同

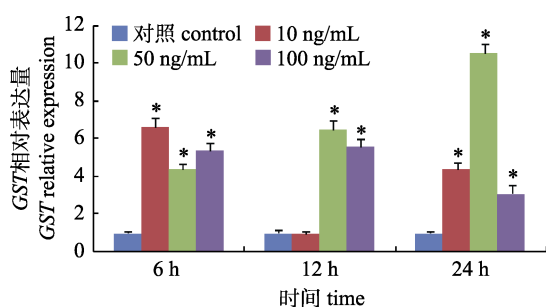


图 6 不同浓度软骨藻酸在不同时间点对海湾扇贝血淋巴 *GST* 基因相对表达量的影响
柱状图上方的“*”表示和对照组相比具有显著性差异($P<0.05$)

Fig. 6 Effect of different concentrations of DA on the related expression of *GST* in the hemolymph of the *Argopecten irradians* at different time intervals
“*” denotes significant differences between the treatments and the control at each exposure time ($P<0.05$).

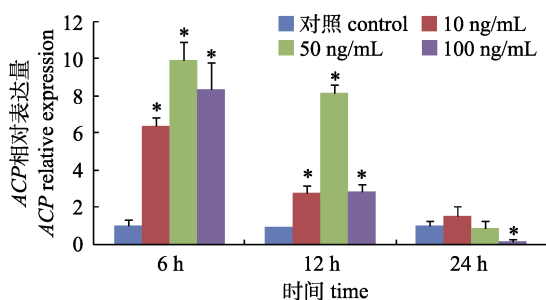


图 7 不同浓度软骨藻酸在不同时间点对海湾扇贝血淋巴 *ACP* 基因相对表达量的影响
柱状图上方的“*”表示和对照组相比具有显著性差异($P<0.05$)

Fig. 7 Effect of different concentrations of DA on the related expression of *ACP* in the hemolymph of the *Argopecten irradians* at different time intervals
“*” denotes significant differences between the treatments and the control at each exposure time ($P<0.05$).

浓度软骨藻酸处理后显著上调,但随着处理时间达到 24 h 后,表达量逐渐恢复至正常水平。由此,表明软骨藻酸可通过调控 ACP 基因表达量来影响 ACP 酶活性。随处理浓度的提高和时间的延长, LZM 活性和 ACP 表达量均在 24 h 时高浓度处理组恢复至对照组水平或显著下降,这一现象暗示可能已接近扇贝免疫酶承受临界点或超出机体免疫酶的承受限度。

在自然界中,一个物种对环境中的应激刺激的适应能力取决于其抗氧化能力^[24]。超氧化物歧化酶(SOD)催化脂质过氧化引发剂歧化和超氧化物自由基转化为 H_2O_2 和 O^{2-} ,防止脂质过氧化^[6]。本研究中,各浓度软骨藻酸在不同时间点降低了 SOD 活性,并且在不同浓度和不同时间点表现出一定的波动性,可能是由于机体对于较低浓度软骨藻酸的短时间暴露最先表现出 SOD 活性被抑制的表现,然而随着暴露时间延长和浓度增加机体抗氧化系统被短暂刺激以抵抗氧化应激反应,但是随着暴露时间和浓度的持续增加,过度的暴露使 SOD 活性被再次抑制,抗氧化力受到削弱。的在基因水平上, *Cu/ZnSOD* 基因表达量在不同的时间点和不同浓度处理组中表达量受到抑制,并随着暴露时间的延长而表现出一定波动性,表明软骨藻酸在基因水平上可以对 SOD 产生影响,并且扰乱了基因正常的表达; *MnSOD* 基因相对表达量除了最高浓度在 6 h 被抑制外均显著上调,表明了机体应对软骨藻酸暴露产生的氧化应激时所进行的抵抗, *Cu/ZnSOD* 和 *MnSOD* 基因的表达量也揭示了 SOD 酶活性在不同时间点和不同浓度软骨藻酸暴露下所表现出的差异。

谷胱甘肽是一种由半胱氨酸、谷氨酸和甘氨酸组成的三肽,其活性基团以半胱氨酸残基的巯基(-SH)为代表的参与抗氧化细胞防御的主要非蛋白硫醇,对过氧化氢、其他过氧化物和自由基的解毒作用。GSH 还具有解毒作用,已有报道表明 GSH 在体内能与微囊藻毒素结合排出体外从而进行解毒^[25]。本研究中,扇贝血淋巴中 GSH 含量在软骨藻酸处理后显著提高,表明机体通过提高 GSH 水平来对软骨藻酸进行解毒作用。谷胱甘肽 S-转移酶(GST)是谷胱甘肽结合反应的关键

酶,可催化 GSH 与体内外来有害物质结合成为没有毒性的衍生物后进一步清除^[16]。在本研究中,除低浓度软骨藻酸处理组在 12 h 外, *GST* 基因相对表达量均显著上调,表明软骨藻酸处理可促使扇贝 *GST* 表达量提高,进而增强机体解毒能力。

综上所述,软骨藻酸处理虽然会抑制抗氧化酶 SOD 活性,并且低浓度短时间的处理可刺激机体免疫应答,然而高浓度长时间处理会造成免疫疲劳现象,但机体可通过提高血淋巴 GSH 水平和 *GST* 基因的表达量来抵抗软骨藻酸的毒性。因此,本研究初步揭示了软骨藻酸对扇贝免疫力、抗氧化力和解毒力的影响,初步揭示了贝类神经毒素对贝类的免疫毒性,为进一步阐明其毒性机理提供了一定研究基础。不仅如此,谷胱甘肽系统对软骨藻酸解毒作用也将成为下一步研究的重点。

参考文献:

- [1] Mazmancı B, Çavaş T. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and gill tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following *in vivo* exposure to domoic acid [J]. *Toxicon*, 2010, 55(4): 734-738.
- [2] Lopes V M, Lopes A R, Costa P, et al. Cephalopods as vectors of harmful algal bloom toxins in marine food webs[J]. *Marine Drugs*, 2013, 11(9): 3381-3409.
- [3] Lefebvre K A, Robertson A. Domoic acid and human exposure risks: A review[J]. *Toxicon*, 2010, 56(2): 218-230.
- [4] Lefebvre K A, Tilton S C, Bammler T K, et al. Gene expression profiles in zebrafish brain after acute exposure to domoic acid at symptomatic and asymptomatic doses[J]. *Toxicological Sciences*, 2009, 107(1): 65-77.
- [5] Nogueira I, Lobo-da-Cunha A, Afonso A, et al. Toxic effects of domoic acid in the seabream *Sparus aurata*[J]. *Marine Drugs*, 2010, 8(10): 2721-2732.
- [6] Burbacher T M, Grant K S, Petroff R, et al. Effects of oral domoic acid exposure on maternal reproduction and infant birth characteristics in a preclinical nonhuman primate model [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2019, 72: 10-21.
- [7] Gill S, Kumara V. Detecting neurodevelopmental toxicity of domoic acid and ochratoxin A using rat fetal neural stem cells[J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(10): 566.
- [8] Kosenkov A M, Teplov I Y, Sergeev A I, et al. Domoic acid suppresses hyperexcitation in the network due to activation of kainate receptors of GABAergic neurons[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2019, 671: 52-61.

- [9] Chi C, Zhang C Y, Liu J D, et al. Effects of marine toxin domoic acid on innate immune responses in bay scallop *Argopecten irradians*[J]. Journal of Marine Science and Engineering, 2019, 7(11): 407.
- [10] Pazos A J, Ventoso P, Martínez-Escauriaza R, et al. Transcriptional response after exposure to domoic acid-producing *Pseudo-nitzschia* in the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. Toxicon, 2017, 140: 60-71.
- [11] Hu Y M, Li Q, Liu S K, et al. Effects of acute temperature and salinity stress on the survival and immune indexes of Iwagaki oysters, *Crassostrea nippona*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(3): 286-294. [胡益鸣, 李琪, 刘士凯, 等. 温度和盐度急性胁迫对岩牡蛎存活及免疫指标的影响[J]. 中国水产科学, 2020, 27(3): 286-294.]
- [12] Stonik V A, Stonik I V. Toxins produced by marine microorganisms: A short review[M]// Marine and Freshwater Toxins. Dordrecht: Springer, 2016: 3-21.
- [13] Long M, Hou J, Su Y J, et al. Effects of dietary selenium yeast and tea polyphenols on the activities and mRNA levels of antioxidant enzymes in the liver of juvenile Wuchang bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(2): 259-268. [龙萌, 侯杰, 苏玉晶, 等. 日粮添加酵母硒和茶多酚对团头鲂幼鱼肝抗氧化酶活性及其基因表达的影响[J]. 中国水产科学, 2015, 22(2): 259-268.]
- [14] Liu J D, Chi C, Zheng X C, et al. Effect of dietary glutathione supplementation on the immune responses and the fatty acid and amino acid composition in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Aquaculture Reports, 2019, 15: 100217.
- [15] Viña J, Perez C, Furukawa T, et al. Effect of oral glutathione on hepatic glutathione levels in rats and mice[J]. British Journal of Nutrition, 1989, 62(3): 683-691.
- [16] Liu J D, Liu W B, Zhang C Y, et al. Dietary glutathione supplementation enhances antioxidant activity and protects against lipopolysaccharide-induced acute hepatopancreatic injury and cell apoptosis in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 97: 440-454.
- [17] Wingate V P M, Lawton M A, Lamb C J. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes[J]. Plant Physiology, 1988, 87(1): 206-210.
- [18] Booth J, Boyland E, Sims P. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione[J]. The Biochemical Journal, 1961, 79(3): 516-524.
- [19] Liu H, Kelly M S, Campbell D A, et al. Accumulation of domoic acid and its effect on juvenile king scallop *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758)[J]. Aquaculture, 2008, 284(1-4): 224-230.
- [20] Xu J J, Geng Z, Feng G P, et al. Effects of salinity on osmotic pressure and nonspecific immune enzymes in juvenile *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(6): 1252-1259. [徐静静, 耿智, 冯广朋, 等. 盐度对中华绒螯蟹仔蟹渗透压和非特异性免疫酶的影响[J]. 中国水产科学, 2018, 25(6): 1252-1259.]
- [21] Chen Y L, Li E C, Yu N, et al. Effect of replacing dietary fish oil with soybean oil on growth, non-specific immune response, and resistance to *Aeromonas hydrophila* challenge in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(3): 511-521. [陈彦良, 李二超, 禹娜, 等. 豆油替代鱼油对中华绒螯蟹幼蟹生长、非特异性免疫和抗病力的影响[J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 511-521.]
- [22] Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs[J]. Physiological Reviews, 1979, 59(3): 527-605.
- [23] Cheng T C. The role of lysosomal hydrolases in molluscan cellular response to immunologic challenge[M]// Invertebrate Models for Biomedical Research. Boston: Springer, 1978: 59-71.
- [24] Xu C Y, Chi C, Zheng X C, et al. Effects of fermented feed on the growth performance, oxidation resistance, immune function and protein metabolism of juvenile Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(10): 2209-2217. [许晨远, 迟骋, 郑肖川, 等. 发酵饲料对中华绒螯蟹幼蟹生长、抗氧化、免疫和蛋白代谢的影响[J]. 水产学报, 2019, 43(10): 2209-2217.]
- [25] Liu J D, Liu W B, Zhang C Y, et al. Dietary glutathione supplementation enhances antioxidant activity and protects against lipopolysaccharide-induced acute hepatopancreatic injury and cell apoptosis in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 97: 440-454.

Effects of domoic acid on immunity and antioxidant capacity in the hemolymph of the bay scallop (*Argopecten irradians*)

CHI Cheng, ZHANG Caiyan, LIU Jiadai, YE Mingwen, YU Xiawei

Key Laboratory of Aquatic Nutrition and Feed Science of Jiangsu Province, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Domoic acid (DA) is a shellfish neurotoxin mainly produced by the diatoms of some species of *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia* in the ocean. To date, most reports on DA have focused on its effects on mice, humans, birds, and other animals, and have revealed that DA causes neurotoxicity in mammals. Although some studies on invertebrates have been reported, most have only reported the concentration of DA in various tissues of shellfish, which are important top predators. Few studies have reported the toxicological effects of DA on the shellfish themselves. Scallops, as invertebrates, lack adaptive immunity and mainly rely on an innate immune system for defense. Acid phosphatase (ACP) and lysozyme (LZM) are important lysosomal enzymes that are involved in humoral immune responses. Superoxide dismutase (SOD) catalyzes the dismutation of superoxide anions into H_2O_2 and O_2^- (disproportionation) to prevent lipid peroxidation. This process plays a very important role in biological defense. Glutathione, as an antioxidant, exhibits antioxidant effects by scavenging reactive oxygen species and protecting the sulfhydryl (-SH) group in bio-macromolecules. Glutathione S-transferase (GST) can catalyze the binding of GSH to electrophilic intermediate metabolites, thus reducing the toxicity associated with endogenous or exogenous poisons. This process plays an important role in the detoxification system. Therefore, in this study, in order to reveal DA exposure-induced toxicity on the immune and antioxidant system of scallops, the bay scallop (*Argopecten irradians*) was exposed to different concentrations (0, 10, 50, and 100 ng/mL) of DA and the SOD activity and GSH content in its hemolymph, and the relative expression levels of related genes (*Cu/ZnSOD*, *MnSOD*, *GST*, and *ACP*), were measured. The results showed that LZM activity significantly increased in the 10 and 50 ng/mL DA-treatment groups. The expression of *ACP* was upregulated at 6 and 12 h and was significantly downregulated at 24 h. These results suggest that low and medium concentrations of DA could momentarily stimulate the immune responses of the bay scallop. However, SOD activity was inhibited after exposure to 10, 50, and 100 ng/mL of DA (6–24 h exposure), and the relative mRNA expression of *Cu/ZnSOD* and *MnSOD* were also regulated. DA may inhibit SOD activity and affect it by disturbing the related mRNA expression at the gene level. Moreover, the GSH content significantly increased, and *GST* was significantly upregulated following DA exposure, indicating that the glutathione system was involved in resistance against DA toxicity. Generally, DA exposure could inhibit SOD activity. Short-term treatment with a lower concentration can stimulate the immune responses, while long-term treatment at high concentrations would cause immune fatigue. However, the bay scallop could resist the toxicity of DA by increasing the level of GSH in its hemolymph and by expressing *GST*. Thus, this study preliminarily revealed the effects of DA on immunity, antioxidant capacity, and the detoxification mechanisms of bivalves such as scallops.

Key words: domoic acid; immunity; antioxidant capacity; *Argopecten irradians*

Corresponding author: CHI Cheng. E-mail: chicheng@njau.edu.cn