

DOI: 10.12264/JFSC2021-0100

扑草净对四角蛤蜊抗氧化酶活性及组织细胞的影响

黄会¹, 王共明¹, 任利华¹, 官向红¹, 彭中校², 徐英江¹, 刘慧慧¹, 王玮云¹,
张秀珍¹

1. 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;

2. 上海海洋大学, 上海 201306

摘要: 为探讨扑草净胁迫对四角蛤蜊(*Macraa veneriformis*)的毒性效应, 开展了不同质量浓度扑草净(0.2 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$)对四角蛤蜊 21 d 胁迫及 15 d 净水释放实验, 测定不同时间点鳃、消化腺中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)等抗氧化酶活性, 观察鳃组织细胞形态学变化。结果表明, 扑草净对四角蛤蜊 SOD、CAT、GPx 均有一定的诱导或抑制作用, 0.2 $\mu\text{g/L}$ 对其氧化胁迫小于其他两组; 净水释放阶段, 1.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 组酶活性不能完全恢复甚至活性丧失, 10.0 $\mu\text{g/L}$ 扑草净对四角蛤蜊有不可逆氧化损伤。扑草净可引起鳃上皮细胞萎缩、纤毛脱落, 鳃丝内腔隙变大。随着扑草净浓度增高或胁迫时间延长, SOD、CAT 及鳃组织细胞形态变化存在明显浓度效应和时间效应, 高浓度扑草净对四角蛤蜊有明显毒性效应。本研究结论认为, 四角蛤蜊鳃中 GPx 可作为扑草净污染的潜在生物标志物, 为海洋生态环境污染做出预警。

关键词: 扑草净; 四角蛤蜊; 抗氧化酶活性; 组织细胞; 毒性效应

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)11-1457-09

扑草净(prometryn)是一种高效低毒的内吸型除草剂, 除了在农业用于防除一年生禾本科及阔叶草外, 也被广泛用于水产养殖、河道以及水库除藻, 尤其用于虾类、海参、贝类等养殖中清池和大型藻类去除^[1]。未吸收的扑草净随废水排入河流、湖泊或海洋^[2-3]。中国黄渤海^[4]、海南八门湾^[5]、莱州湾^[6]等水域中均有扑草净检出, 国外海洋环境中也多次扑草净检出^[7-8]。山东沿岸贝类中也有不同程度检出扑草净^[9], 近年来中国多批次出口日本贝类被查出扑草净残留超标, 严重影响了我我国水产品对外贸易^[10]。扑草净具有类似于苯环的结构, 化学性质较稳定, 有一定的残效期, 易被双壳贝类等海洋水产动物富集, 进而造成生

态风险、影响水产品的质量安全。

目前, 国内外关于贝类中扑草净的研究多集中于局部地区污染调查及急性毒性方面, 对贝类抗氧化酶系统及组织细胞的影响报道较少。四角蛤蜊(*Macraa veneriformis*)是中国沿海常见的滩涂经济贝类, 以辽宁、山东为最多, 主要栖息于潮间带中下区及浅海的泥沙滩中^[11], 由于生长位置比较固定, 受扑草净污染的风险相对更高。有研究指出, 扑草净可引起生物体内超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)等抗氧化酶活性显著变化, 产生一系列应激反应, 从而导致氧化损伤^[12-13]。海洋生物

收稿日期: 2021-03-21; **修订日期:** 2021-03-31.

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2018GHY115041); 山东省海洋生态修复重点实验室开放课题资助项目(201906); 山东省贝类产业技术体系项目.

作者简介: 黄会(1985-), 女, 硕士, 工程师, 主要从事水产品质量安全研究. E-mail: hh57319@126.com

通信作者: 张秀珍, 研究员, 主要从事水产品质量安全研究. E-mail: zxz0535501@126.com

的抗氧化酶系统与其免疫力密切相关,其各成分的活性或含量的变化可作为机体受到氧化胁迫的生物标志物^[14]。扑草净对四角蛤蜊抗氧化酶系统及组织细胞的影响目前尚未见报道。

本研究以中国沿海常见滩涂贝类四角蛤蜊为研究对象,通过分析扑草净胁迫与净水释放条件下四角蛤蜊鳃和消化腺 SOD、CAT、GPx 等抗氧化酶的活性变化,观察胁迫阶段鳃丝组织形态学改变,从氧化损伤及组织病理学角度探讨扑草净对四角蛤蜊的毒性效应,旨在为寻找扑草净污染的潜在生物标志物和滩涂贝类健康增殖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:酶标仪(Bio-RAD,中国上海美谷分子仪器有限公司)、紫外可见分光光度计(U-2900,日本日立有限公司)、显微镜(DM500,德国徕卡有限公司)、全自动组织脱水机(TP1020,德国徕卡有限公司)、石蜡包埋机、旋转式切片机、全自动染色机、展片机、超净工作台、手提式高速分散器匀浆机、高速离心机。

试剂:扑草净标准品(纯度>98.0%,Dr. Ehrenstorfer,德国);考马斯亮蓝蛋白测定、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)试剂盒(均购自南京建成生物工程研究所,中国);苦味酸;切片石蜡;化学试剂均为色谱纯和优级纯。

1.2 实验材料

四角蛤蜊取自黄河口潮间带,体重(8.38 ± 0.51) g,壳长(4.10 ± 0.38) cm;小新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)藻种来自山东省海洋资源与环境研究院藻种室。实验用海水取自烟台近海,水温(15 ± 1) °C。

1.3 实验方法

扑草净胁迫、释放实验参考刘丽娟等^[15]。实验采用半静态水质接触染毒法,每个水箱中注入清洁海水 100 L,实验期间连续充气,每 24 h 通过虹吸作用排除粪便,随后换 1/2 (以体积计)相同扑草净质量浓度的海水。设置 3 个染毒组和 1 个对照组,3 个染毒组扑草净质量浓度分别为 0.2 μg/L、

1.0 μg/L、10 μg/L,对照组扑草净质量浓度为 0,仅加相同体积的助溶剂乙醇,染毒组和对照组各设 3 个平行。胁迫实验共持续 21 d,实验期间保持染毒组海水中扑草净质量浓度基本恒定。胁迫实验结束后开始净水释放实验,所有实验水箱中海水均换成清洁海水,换水及投喂方法与胁迫实验一致,净水释放实验共持续 15 d。用于检测酶活性样品在胁迫实验第 1、2、4、6、10、15、21 天和释放实验第 1、3、6、10、15 天取样;每组随机取 3~5 只四角蛤蜊,放于冰盘上解剖、迅速取鳃丝、消化腺放入标记好的 1.5 mL 离心管,−80 °C 保存。用于组织切片样品分别在胁迫实验第 15、21 天取样,每次从每个水箱内随机取四角蛤蜊 3 只。

酶活性测定时,取四角蛤蜊鳃、消化腺组织按照体积比 1:9 加入预冷 0.86% 的生理盐水,冰浴匀浆,4 °C 3000 r/min 离心 10 min 后取上清液,按照考马斯亮蓝蛋白测定, SOD、CAT、GPx 试剂盒的说明测定蛋白含量和酶活。

每只贝切取鳃丝组织,经 Bouin's 液固定、梯度乙醇脱水、石蜡包埋、切片、染色并封片后,光学显微镜下观察并拍照记录样品。

1.4 数据处理

实验结果采用平均值±标准差($\bar{x}\pm SD$)表示,用统计分析软件 SPSS 20.0 对酶活性进行单因素方差分析(one-way ANOVA),使用 *T* 检验对不同处理组之间进行差异性检测, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著;用 Origin 2018 软件作图。

2 结果与分析

2.1 扑草净胁迫浓度设定依据

本课题组曾经分别于 2018 年 4 月、7 月、10 月开展了对黄河口贝类增殖区海水中除草剂污染特征调查。结果显示,该海域海水中扑草净检出率为 100%,平均检出质量浓度为 0.24 μg/L,最高检出质量浓度 1.09 μg/L。本研究依据该调查结果,设置扑草净胁迫质量浓度为 0.2 μg/L、1.0 μg/L、10.0 μg/L。

2.2 扑草净对四角蛤蜊 SOD 的影响

扑草净胁迫和释放条件下四角蛤蜊鳃 SOD

活性的影响见图 1。胁迫阶段, 随着扑草净胁迫时间的延长和浓度的升高, 鳃 SOD 时间效应、浓度效应较明显。0.2 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 两组四角蛤蜊鳃中 SOD 活性一直处于被诱导状态, 第 1 天被明显诱导($P<0.01$), 第 2 天后活性有所降低, 呈现先升高后降低趋势, 两组均在第 10 天达到较高诱导率($P<0.05$), 分别为 52.5%、50.1%。10.0 $\mu\text{g/L}$ 组酶活性先被抑制再被诱导, 整体呈现先升高后降低的趋势, 第 1 天被抑制($P<0.01$), 第 4 天起被诱导, 第 10 天达到最高诱导率 65.4% ($P<0.05$); 第 15 天后酶活性逐渐降低, 第 21 天接近对照组。净水释放阶段, 0.2 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 两组 SOD 在第 1 天均有所回升, 至第 7 天达到最高值($P<0.05$), 随后逐渐降低并接近对照组。10.0 $\mu\text{g/L}$ 组酶活性先上升后下降, 至第 15 天明显低于对照组($P<0.05$), 不能恢复至对照水平, 且变化不稳定。

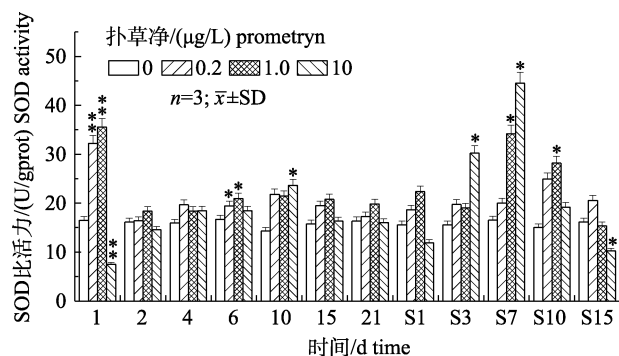


图 1 不同浓度扑草净对四角蛤蜊鳃 SOD 活性的影响
*表示与对照组比较有显著性差异($P<0.05$), **表示与对照组比较有极显著性差异($P<0.01$).

Fig. 1 Effect of different concentrations of prometryn on SOD activity in gills of *Mactra veneriformis*
* indicates a significant difference compared with the control group ($P<0.05$);
** indicates a extremely significant difference compared with the control group ($P<0.01$).

扑草净胁迫和释放条件下四角蛤蜊消化腺 SOD 活性的影响见图 2。胁迫阶段, 0.2 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 两组 SOD 活性均处于被诱导状态, 整体呈现先升高后降低的趋势, 两组 SOD 活性分别在第 4 天、第 6 天达到最高诱导率($P<0.05$), 分别为 29.0%、34.9%; 10 $\mu\text{g/L}$ 组表现为先被抑制后被诱导的趋势, 第 1 天起被抑制至第 4 天达到较低值, 第 6 天起被诱导至第 15 天达到最高值(诱导率 8.3%),

浓度效应较明显。净水释放阶段, 0.2 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 两组 SOD 在第 1 天、第 3 天均有所回升($P<0.05$), 10 $\mu\text{g/L}$ 组在第 1 天持续降低, 可能由于胁迫产生过多的活性氧, 抑制 SOD 的活性, 第 3 天达到最高值, 随后逐渐接近对照组。

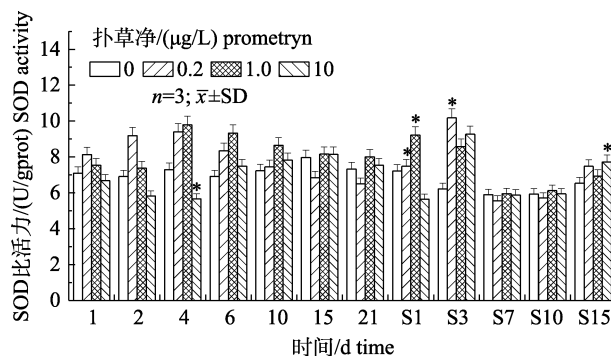


图 2 不同浓度扑草净对四角蛤蜊消化腺 SOD 活性的影响

*表示与对照组比较有显著性差异($P<0.05$).

Fig. 2 Effect of different concentrations of prometryn on SOD activity in digest gland of *Mactra veneriformis*
* indicates a significant difference compared with the control group ($P<0.05$).

2.3 扑草净对四角蛤蜊 CAT 的影响

扑草净胁迫和释放条件下四角蛤蜊鳃中 CAT 活性的影响见图 3。胁迫阶段, 0.2 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 两组四角蛤蜊鳃中 CAT 活性均表现为第 1 天先被诱导($P<0.01$), 第 2 天被抑制, 两组趋势略有不同, 0.2 $\mu\text{g/L}$ 组第 6 天、第 10 天诱导率分别为 38.1%、34.8%, 与对照组相比差异不显著($P>0.05$)。1.0 $\mu\text{g/L}$ 组在第 4 天、第 6 天被诱导并在第 4 天达到最高诱导率($P<0.05$), 分别为 72.6%、42.8%, 第 10 天酶活性被抑制且逐渐降低, 并低于对照组, 时间效应较明显。10.0 $\mu\text{g/L}$ 组酶活性整体趋势为先升高后降低, 第 1 天开始先被抑制($P<0.05$), 至第 4 天、第 6 天达到较高诱导率, 分别为 29.6%、25.0%, 第 10 天后被抑制, 1.0 $\mu\text{g/L}$ 组和 10.0 $\mu\text{g/L}$ 组 CAT 受影响更明显, 浓度效应和时间效应明显。净水释放阶段, 0.2 $\mu\text{g/L}$ 组 CAT 活性趋于接近对照组($P>0.05$), 可见该浓度扑草净对 CAT 活性影响不大。1.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 两组酶活性无明显变化规律, 先处于被抑制状态, 但活性趋于升高, 1.0 $\mu\text{g/L}$ 组在第 7 天被诱导显著高于对照组($P<$

0.05), 第 10 天被抑制($P<0.05$), 而 10.0 $\mu\text{g/L}$ 组在第 15 天被极显著诱导($P<0.01$)。

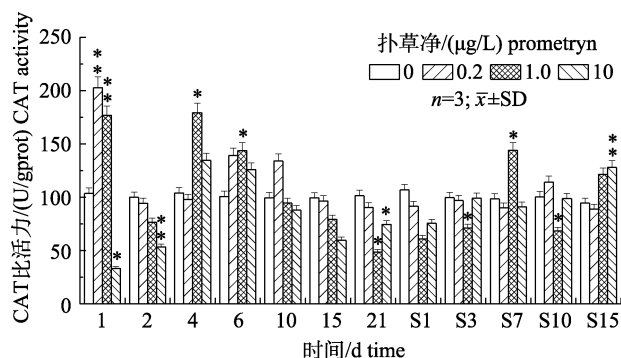


图 3 不同浓度扑草净对四角蛤蜊鳃 CAT 活性的影响

*表示与对照组比较有显著性差异($P<0.05$),

**表示与对照组比较有极显著性差异($P<0.01$).

Fig. 3 Effect of different concentrations of prometryn on CAT activity in gills of *Mactra veneriformis*

* indicates a significant difference compared with the control group ($P<0.05$);

** indicates a extremely significant difference compared with the control group ($P<0.01$).

扑草净胁迫和释放条件下四角蛤蜊消化腺 CAT 活性的影响见图 4。胁迫阶段, 相同暴露时间内, 消化腺中 CAT 呈现较明显的浓度效应。3 个实验组整体呈现先升高后降低的趋势, 0.2 $\mu\text{g/L}$ 组酶活性接近对照组($P>0.05$), 第 4 天达到最高诱导率 29.5%; 1.0 $\mu\text{g/L}$ 组从第 2 天起被诱导并在第 4 天达到最高诱导率 56.4%($P<0.01$); 10.0 $\mu\text{g/L}$ 组基本处于被诱导状态($P<0.05$), 从第 2 天至第 15 天被显著诱导($P<0.05$), 在第 4 天达到最高诱导率 103.5% ($P<0.01$)。净水释放阶段, 0.2 $\mu\text{g/L}$ 组酶活性接近对照组, 可见, 0.2 $\mu\text{g/L}$ 扑草净胁迫对四角蛤蜊消化腺中 CAT 活性影响不大。1.0 $\mu\text{g/L}$ 组在第 3 天($P<0.05$)、第 7 天处于被诱导状态且活性有所回升, 第 10 天后活性被抑制并低于对照组; 10 $\mu\text{g/L}$ 组表现为趋于降低, 第 1 天至第 7 天继续被诱导并达到较高值($P<0.05$), 第 10 天后活性明显被抑制, 显著低于对照组($P<0.05$)。

2.4 扑草净对四角蛤蜊 GPx 的影响

扑草净胁迫和释放条件下四角蛤蜊鳃 GPx 活性的影响见图 5。胁迫阶段, 0.2 $\mu\text{g/L}$ 组一直处于被诱导状态, 第 1 天被显著诱导($P<0.05$), 第 2 天起活性呈降低趋势, 第 10 天时又被诱导至较高值,

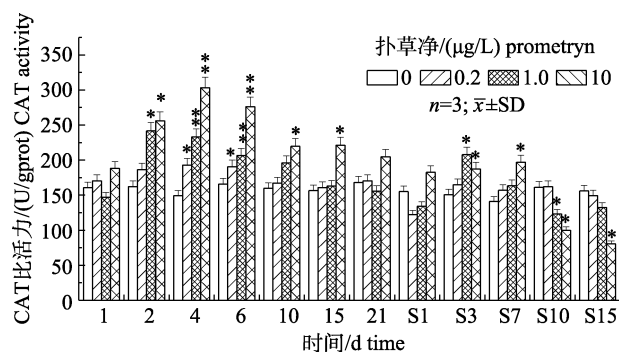


图 4 不同浓度扑草净对四角蛤蜊消化腺 CAT 活性的影响

*表示与对照组比较有显著性差异($P<0.05$),

**表示与对照组比较有极显著性差异($P<0.01$).

Fig. 4 Effect of different concentrations of prometryn on CAT activity in digest gland of *Mactra veneriformis*

* indicates a significant difference compared with the control group ($P<0.05$);

** indicates a extremely significant difference compared with the control group ($P<0.01$).

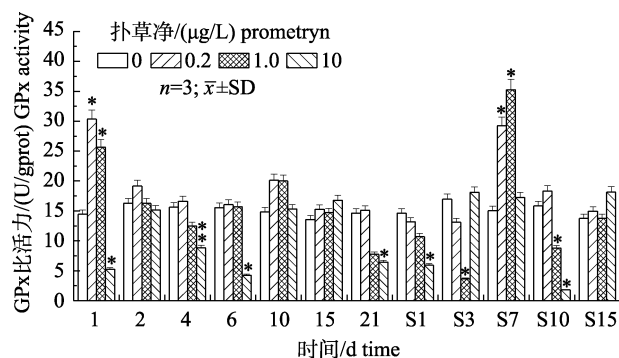


图 5 不同浓度扑草净对四角蛤蜊鳃 GPx 活性的影响

*表示与对照组比较有显著性差异($P<0.05$),

**表示与对照组比较有极显著性差异($P<0.01$).

Fig. 5 Effect of different concentrations of prometryn on GPx activity in gills of *Mactra veneriformis*

* indicates a significant difference compared with the control group ($P<0.05$);

** indicates a extremely significant difference compared with the control group ($P<0.01$).

诱导率为 35.8%, 之后趋于接近对照组水平($P>0.05$), 可见, 低浓度扑草净作用会诱导 GPx 活性, 对四角蛤蜊产生一定氧化胁迫。1.0 $\mu\text{g/L}$ 组变化趋势与 0.2 $\mu\text{g/L}$ 组基本一致, 第 2 天后酶活性先降低后升高, 在第 10 天时被诱导至较高值, 诱导率为 34.3%; 而 10.0 $\mu\text{g/L}$ 组受到抑制较明显, 与对照组差异显著($P<0.05$), 第 1 天、第 4 天及第 6 天受到显著抑制($P<0.05$), 酶活性无明显变化规律。净水释放阶段, 0.2 $\mu\text{g/L}$ 组酶活力表现为先升

高又降低,最后趋于对照水平;1.0 μg/L 和 10.0 μg/L 组 GPx 活性变化趋势不明显或呈现紊乱状态,酶活性失调。

扑草净胁迫和释放条件下四角蛤蜊消化腺 GPx 活性的影响见图 6。胁迫阶段,3 个实验组均表现为第 1 天先被诱导($P<0.05$),后略有降低,0.2 μg/L、1.0 μg/L 两组在第 10 天达到较高值,诱导率分别

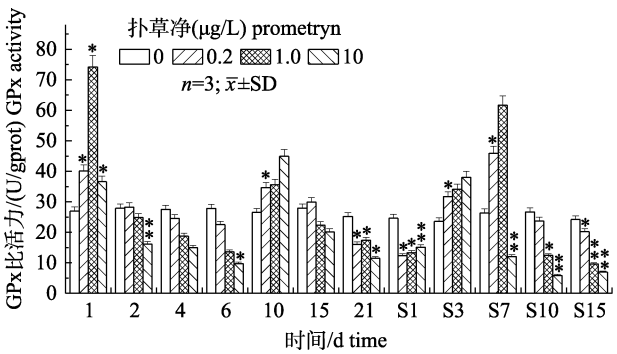


图 6 不同浓度扑草净对四角蛤蜊消化腺 GPx 活性的影响

*表示与对照组比较有显著性差异($P<0.05$),
**表示与对照组比较有极显著性差异($P<0.01$).

Fig. 6 Effect of different concentrations of prometryn on GPx activity in digest gland of *Mactra veneriformis*
* indicates a significant difference compared with the control group ($P<0.05$);
** indicates a extremely significant difference compared with the control group ($P<0.01$).

为 30.6%、34.3%,10.0 μg/L 组酶活性变化与对照组差异显著($P<0.05$),在第 1 天、第 10 天被诱导诱导率达到 69.3%,在第 6 天被显著抑制($P<0.05$),抑制率为 64.9%,随后 3 个组均呈降低趋势。净水释放阶段,0.2 μg/L、1.0 μg/L 两组在第 7 天诱导率分别为 74.4% ($P<0.05$)、134.1%,10.0 μg/L 组在第 3 天达到最高值,第 7 天后 3 个组趋于降低,0.2 μg/L 组与对照组差异不明显,1.0 μg/L、10.0 μg/L 两组明显低于对照组($P<0.05$),没有恢复活性。

2.5 扑草净对四角蛤蜊鳃组织形态的影响

扑草净胁迫条件下,在第 15 天、第 21 天时四角蛤蜊鳃丝组织切片样本见图 7。第 15 天时,对照组鳃上皮细胞排列规则、形态正常,可见较完整的纤毛层,鳃丝腔结缔组织充盈、无异物(图 7a);0.2 μg/L 组鳃丝黏膜略有肿胀,边缘稍模糊(图 7b),1.0 μg/L 组鳃丝扭曲,鳃隔膜呈圆形(图 7c);10 μg/L 组鳃丝紧缩,纤毛明显变少(图 7d),浓度效应明显。21 d 时,对照组鳃上皮细胞略有紧缩(图 7e);0.2 μg/L 组鳃丝黏膜层变薄(图 7f),随着浓度的增高,鳃丝进一步变细,上皮细胞紧缩,纤毛脱落,鳃丝内开始出现腔隙并逐渐变大(图 7g-h),10 μg/L 组鳃丝变异程度高于 1.0 μg/L 组,时间效应和浓度效应明显。

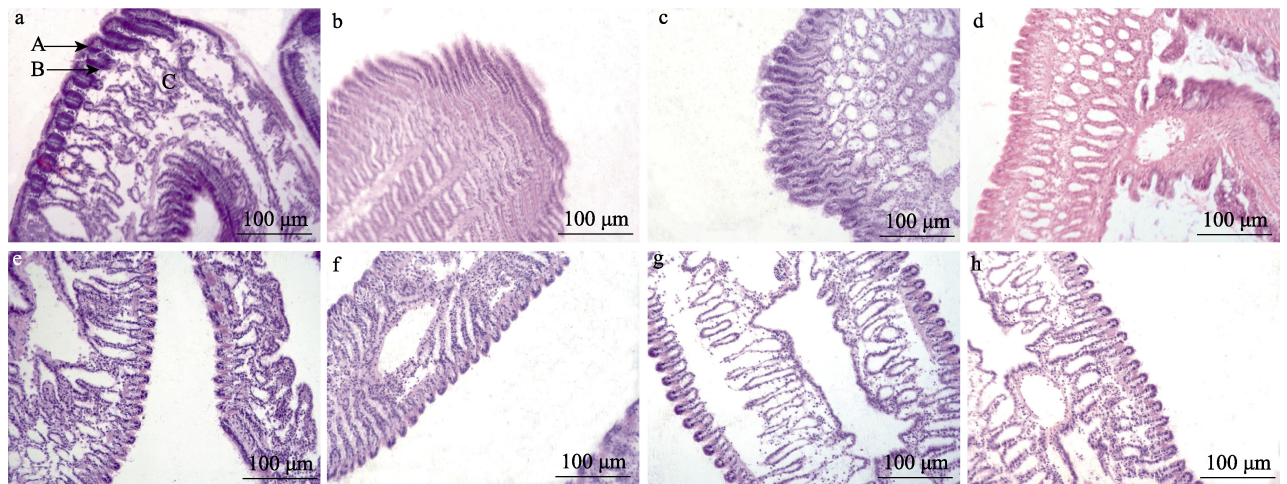


图 7 扑草净胁迫对四角蛤蜊鳃组织的影响

a~d: 15 d 时对照组、0.2 μg/L 组、1 μg/L 组、10 μg/L 组; e~h: 21 d 时对照组、0.2 μg/L 组、1 μg/L 组、10 μg/L 组。A: 鳃丝, B: 结缔组织, C: 鳃隔膜。

Fig. 7 Effect of prometryn on Pathological changes of gills of *Mactra veneriformis*
a~d: control group, 0.2 μg/L group, 1 μg/L group, 10 μg/L group on the 15th day; e~h: control group, 0.2 μg/L group, 1 μg/L group, 10 μg/L group on the 21st day. A: gill filament, B: connective tissue, C: gill diaphragm.

3 讨论

抗氧化酶系统是生物体受到胁迫时重要的代谢调节机制, SOD 作为基本的抗氧化酶, 能将超氧阴离子(O_2^-)自由基歧化为 H_2O_2 和 O_2 ; H_2O_2 在 CAT 和 GPx 的作用下转化为 H_2O 和 O_2 。CAT 在清除超氧自由基、 H_2O_2 和过氧化物以及阻止或减少羟基自由基形成等方面发挥重要作用。GPx 可清除机体内的 H_2O_2 及脂类氢过氧化物, 抑制脂质过氧化, 防止细胞膜和组织受过氧化损伤^[16]。SOD、CAT 和 GPx 之间相互协同, 在清除活性氧、控制脂质过氧化水平以及减少对膜的伤害起到重要作用, 三者酶活性之间的平衡是确定超氧阴离子和 H_2O_2 等活性氧稳态水平的关键^[17]。SOD、CAT 和 GPx 等抗氧化酶作为灵敏的生物标志物指标, 在生态毒理学及环境污染预警研究中应用较为广泛。

国内外在扑草净对贝类抗氧化酶系统毒性效应研究方面鲜有报道, 但大量研究证明, 除草剂影响水生动物的抗氧化酶系统的正常生理机能。10 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 剂量阿特拉津处理太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)消化腺, 其 SOD 和 CAT 活性受到显著诱导^[18]; 阿特拉津等 4 种除草剂混合后处理尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肝脏, 其 GST 和 CAT 活性明显受到诱导或抑制^[19]; 2.5 mg/L 草甘膦胁迫虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)12 h 后, 可显著诱导其肝脏 CAT、GPx 活性^[20]; 丁草胺处理牙鲆(*Paralichthys solivaceus*)后, 其鳃细胞 SOD、CAT 和 GPx 的酶活性受到明显抑制^[21]; 0.51 $\mu\text{g/L}$ 扑草净胁迫可引起克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)组织抗氧化酶活性的改变, 抗氧化机制受到损伤^[22]。本研究中, 四角蛤蜊受到 0.2 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 高中低 3 个质量浓度的扑草净胁迫时, 鳃和消化腺抗氧化酶系统被诱导或抑制, 其 SOD、CAT 和 GPx 活性均发生改变。

随着胁迫时间的延长, 0.2 $\mu\text{g/L}$ 扑草净对四角蛤蜊鳃和消化腺酶活性影响小于 1.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 组, 低浓度扑草净对四角蛤蜊产生一定的氧化胁迫, 诱导抗氧化酶活性升高, 且影响相对较小, 这与长时间低浓度扑草净暴露可引起克氏原螯虾

不明显氧化损伤^[22]的研究结果一致。国内外许多研究都发现, 当生物体受到轻度逆境胁迫时, 机体会做出相应的反应以适应环境变化, 酶活力往往会升高^[23-24]。本研究中, 四角蛤蜊在 0.2 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度扑草净作用下, 体内活性氧增多, 诱导抗氧化酶的合成, SOD、CAT 和 GPx 酶活力变强, 与胁迫产生的活性氧达到动态平衡, 说明当机体受到污染物胁迫时, 机体抗氧化酶系统发挥保护作用, 抵御环境对机体的伤害, 这是贝类为了适应外界环境而调节自身生理状态的结果^[25]。10.0 $\mu\text{g/L}$ 组随着胁迫时间延长各酶活性明显受到抑制, 可能是由于扑草净在四角蛤蜊体内不断积累, 高浓度刺激下机体产生过多的超氧阴离子, 不能被 SOD 等抗氧化酶及时清除, 机体所受胁迫超出了自身的防御能力, 抑制了 3 种酶的活性^[26]。另外, SOD 歧化产生的 H_2O_2 不能被及时分解, 也会抑制抗氧化酶活性^[27]。GPx 活性变化不稳定, 受抑制较其他浓度明显, 其活性下降也会导致 H_2O_2 的累积, 加剧了对抗氧化酶活性的抑制, 进而对细胞造成氧化损伤^[28], 机体随之发生生理和病理改变, 这与溴氰菊酯对菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)体内酶活性变化规律的影响^[29]一致。CAT 和 GPx 同为清除 H_2O_2 的重要抗氧化酶, 两种酶对刺激的响应力度略有不同, 可能与二者对 H_2O_2 亲和力不同有关^[30]。鳃、消化腺中 SOD、CAT 和 GPx 对胁迫的敏感性均表现为鳃>消化腺, 可能由于鳃直接与扑草净接触, 受到直接作用, 而贝类消化腺是双壳贝类主要解毒器官, 抗氧化酶含量比较丰富, 受到外界刺激初期, 对刺激的响应机制比鳃相对稳定^[17]。随着扑草净浓度的升高、胁迫时间的延长, 酶活性受到的影响越来越明显, 呈现明显时间效应和浓度效应, 这与邻苯二甲酸二丁酯对厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)鳃和内脏团 SOD、CAT^[14], 以及 PFOS 对翡翠贻贝(*Perna viridis*)外套膜抗氧化酶^[31]的影响的研究结果一致。

净水释放阶段, 0.2 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 组 SOD、CAT 和 GPx 活性部分回升或恢复, 可能随着扑草净胁迫消除, 四角蛤蜊体内扑草净得到释放, 刺激源减少, 酶活力略有恢复。但 10.0 $\mu\text{g/L}$ 组 GPx、

CAT 活性呈现紊乱、失调状态, 无明显规律。结合扑草净胁迫与释放的养殖过程, 随着实验时间的延长, 10 $\mu\text{g/L}$ 组贝类个体普遍对外界刺激反应不灵敏, 推测四角蛤蜊在胁迫阶段受到高浓度扑草净的刺激, 经过一定时间的积累, 过多的活性氧不能被 SOD、CAT、GPx 及时清除, SOD 产生的 H_2O_2 超出 CAT、GPx 的消除能力, 机体受到的胁迫超出了自身的防御能力, 抗氧化酶系统受到破坏, CAT 和 GPx 活性降低或散失, 进而造成不可逆的氧化损伤^[28], 释放阶段酶活性也不能恢复至对照水平。1.0 $\mu\text{g/L}$ 组、10 $\mu\text{g/L}$ 组四角蛤蜊鳃中 GPx 活性均无明显变化规律, 酶活性紊乱, 且在释放阶段均未完全恢复活性。该结果可更确切地反映扑草净对四角蛤蜊的毒性效应, 说明相对于 SOD、CAT 而言, GPx 对扑草净胁迫表现得更敏感, 可作为扑草净污染的潜在生物标志物。

鳃是四角蛤蜊的呼吸、滤食器官, 由外套膜的内侧壁延伸形成, 起始于外套膜与内脏囊后方, 具有气体交换和调节离子平衡的重要作用。鳃的损坏会破坏贝类呼吸作用, 影响其摄食行为, 影响贝类生长发育, 甚至导致生物体的死亡^[32]。丁草胺可引起牙鲆鳃细胞水肿、板层上皮的抬升和脱离、支柱细胞破裂、损害其呼吸功能, 急性致命性极高^[21]。本研究结果表明, 扑草净胁迫可引起鳃丝上皮细胞的形态变化, 随着染毒浓度的升高, 细胞损伤逐渐加重, 鳃丝表现为上皮细胞萎缩、纤毛脱落, 鳃丝内腔隙变大, 10.0 $\mu\text{g/L}$ 扑草净可导致鳃组织损伤。这与溴氰菊酯染毒菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)导致其鳃丝上皮细胞纤毛层萎缩、纤毛脱落^[29]、草甘膦引起鱼鳃细胞间隙变大^[33]的结论一致。

4 结论

随着扑草净浓度增高或胁迫时间延长, 四角蛤蜊抗氧化酶 SOD、CAT 及鳃组织细胞形态变化存在明显浓度效应和时间效应, 高浓度扑草净对四角蛤蜊造成明显氧化损伤, 引起组织细胞形态学变化, 对其有明显的毒性效应。扑草净对 SOD、CAT、GPx 均有一定的诱导或抑制作用, 0.2 $\mu\text{g/L}$ 扑草净可诱导四角蛤蜊抗氧化酶活性, 对其造成

一定的氧化胁迫, 但影响小于 1.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 两组。净水释放阶段, 1.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 组酶活性不能完全恢复甚至活性丧失, 10.0 $\mu\text{g/L}$ 扑草净对四角蛤蜊抗氧化酶系统造成不可逆氧化损伤。扑草净胁迫可引起鳃上皮细胞萎缩、纤毛脱落, 鳃丝内腔隙变大。

综上, 四角蛤蜊鳃中 GPx 可作为扑草净污染的潜在生物标志物, 用来反映扑草净对海水养殖环境的污染, 并为海洋环境中扑草净污染作出预警。

参考文献:

- [1] Fu X P, Liu Q R, Xu Y Y, et al. Safety assessment of prometryn on human health and aquatic environment[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(35): 49-57. [付晓苹, 刘巧荣, 许玉艳, 等. 扑草净对人体健康及水生环境的安全性评价[J]. 中国农学通报, 2015, 31(35): 49-57.]
- [2] Vonk J A, Kraak M H S. Herbicide exposure and toxicity to aquatic primary producers[M]//Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Cham: Springer, 2020: 119-171.
- [3] Zhang Q Y, Wu W. Research advance in eco-toxical effects and microbial degradation of prometryne in aquaculture water[J]. Biological Disaster Science, 2014, 37(1): 64-69. [张骞月, 王伟. 扑草净在养殖水体中的生态毒理效应及其微生物降解的研究进展[J]. 生物灾害科学, 2014, 37(1): 64-69.]
- [4] Yang L Q, Li H M, Zhang Y Y, et al. Environmental risk assessment of triazine herbicides in the Bohai Sea and the Yellow Sea and their toxicity to phytoplankton at environmental concentrations[J]. Environment International, 2019, 133: 105175.
- [5] Dsikowitzky L, Iveta Nguyen T M, Konzer L, et al. Occurrence and origin of triazine herbicides in a tropical coastal area in China: A potential ecosystem threat[J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2020, 235: 106612.
- [6] Xu Y J, Liu H H, Ren C B, et al. Distributions of the triazine herbicides in the surface seawater of Laizhou Bay[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(3): 34-39. [徐英江, 刘慧慧, 任传博, 等. 莱州湾海域表层海水中三嗪类除草剂的分布特征[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(3): 34-39.]
- [7] Munaron D, Tapie N, Budzinski H, et al. Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters: Results from a pilot survey using passive samplers[J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2012, 114: 82-92.
- [8] Mai C, Theobald N, Lammel G, et al. Spatial, seasonal and vertical distributions of currently-used pesticides in the marine boundary layer of the North Sea[J]. Atmospheric Environment, 2013, 75: 92-102.
- [9] Qiao D, Liu X J, Zhang H W, et al. Pollution characteristics and risk assessment of herbicide residues in shellfish from

- Shandong coastal area[J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2017, 7(3): 22-29. [乔丹, 刘小静, 张华威, 等. 山东沿海贝类中除草剂污染特征及风险评价[J]. 中国渔业质量与标准, 2017, 7(3): 22-29.]
- [10] Li Q P, Qin D, Cui W H, et al. Warning analysis on excess prometryne residues of aquatic products in China[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2014, 5(1): 108-112. [李庆鹏, 秦达, 崔文慧, 等. 我国水产品中农药扑草净残留超标的警示分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(1): 108-112.]
- [11] Liu Q, Zhang S H, Liu Y F, et al. Survey and analysis of *Macra veneriformis* resources in intertidal zone of the Yellow River Delta[J]. Marine Fisheries, 2018, 40(2): 163-170. [刘强, 张士华, 刘艳芬, 等. 黄河三角洲潮间带四角蛤蜊资源调查分析[J]. 海洋渔业, 2018, 40(2): 163-170.]
- [12] Song X Y, Wu P F, Wu B, et al. The activities of superoxide dismutase and acetyl cholinesterase *in vivo* earthworm affected by glyphosate and prometryn[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2018, 40(2): 371-377. [宋欣媛, 吴培福, 吴博, 等. 草甘膦和扑草净对蚯蚓体内 SOD 和 AChE 酶活性的影响[J]. 江西农业大学学报, 2018, 40(2): 371-377.]
- [13] Xie J, Dai X L, Zang W L, et al. The toxicity of prometryne on two varieties of shrimp and two varieties of aquatic-weed [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2010(23): 147-150. [谢剑, 戴习林, 臧维玲, 等. 扑草净对两种虾和两种水草的毒性研究[J]. 湖南农业科学, 2010(23): 147-150.]
- [14] Xu C N, Zeng J, Yuan Q, et al. Effect of dibutyl phthalate on the antioxidant and epidemic prevention systems of *Mytilus coruscus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(8): 934-942. [许彩娜, 曾皎, 袁骥, 等. 邻苯二甲酸二丁酯对厚壳贻贝抗氧化防疫系统的影响[J]. 中国水产科学, 2020, 27(8): 934-942.]
- [15] Liu L J, Wang W Y, Zhang H W, et al. Accumulation and elimination of prometryn in *Ruditapes philippinarum*[J]. Food Science, 2016, 37(21): 252-256. [刘丽娟, 王玮云, 张华威, 等. 菲律宾蛤仔对扑草净的生物富集与消除规律[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 252-256.]
- [16] Hiramatsu M, Edamatsu R, Mori A. Free radicals, lipid peroxidation, SOD activity, neurotransmitters and choline acetyltransferase activity in the aged rat brain[J]. Free Radicals and Aging, 1992, 62: 213-218.
- [17] Jiang X Y, Huang M, Yang X G, et al. Antioxidant enzyme activities of juvenile rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to acute high-temperature stress[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(1): 57-65. [姜旭阳, 黄铭, 杨小刚, 等. 急性高温胁迫对虹鳟和硬头鳟幼鱼抗氧化酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2021, 28(1): 57-65.]
- [18] Lee D H, Rhee Y J, Choi K S, et al. Sublethal concentrations of atrazine promote molecular and biochemical changes in the digestive gland of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Toxicology and Environmental Health Sciences, 2017, 9(1): 50-58.
- [19] Jonsson C M, Arana S, Ferracini V L, et al. Herbicide mixtures from usual practice in sugarcane crop: Evaluation of oxidative stress and histopathological effects in the tropical fish *Oreochromis niloticus*[J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2017, 228(9): 332.
- [20] Topal A, Atamanalp M, Uçar A, et al. Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 111: 206-214.
- [21] Guo H R, Yin L C, Zhang S C, et al. The toxic mechanism of high lethality of herbicide butachlor in marine flatfish flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Ocean University of China, 2010, 9(3): 257-264.
- [22] Stará A, Kouba A, Velišek J. Effect of chronic exposure to prometryne on oxidative stress and antioxidant response in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. BioMed Research International, 2014, 2014: 680131.
- [23] Sagan L A. What is hormesis and why haven't we heard about it before?[J]. Health Physics, 1987, 52(5): 521-525.
- [24] Liu H M, Dong Y H, Huo L H, et al. Acute toxicity of Cu^{2+} and its effects on antioxidant enzymes in *Sinonovacula constricta* juveniles[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(1): 182-187. [刘浩明, 董迎辉, 霍礼辉, 等. Cu^{2+} 对缢蛏稚贝的急性毒性及对抗氧化酶活力和丙二醛含量的影响[J]. 中国水产科学, 2012, 19(1): 182-187.]
- [25] Bayne B L. The physiology of suspension feeding by bivalve molluscs: An introduction to the Plymouth "TROPHEE" workshop[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1998, 219(1-2): 1-19.
- [26] Wyrwicka A, Skłodowska M. Influence of repeated acid rain treatment on antioxidative enzyme activities and on lipid peroxidation in cucumber leaves[J]. Environmental and Experimental Botany, 2006, 56(2): 198-204.
- [27] Gabara B, Skłodowska M, Wyrwicka A, et al. Changes in the ultrastructure of chloroplasts and mitochondria and antioxidant enzyme activity in *Lycopersicon esculentum* Mill. leaves sprayed with acid rain[J]. Plant Science, 2003, 164(4): 507-516.
- [28] Giaquinto P C, de Sá M B, Sugihara V S, et al. Effects of glyphosate-based herbicide sub-lethal concentrations on fish feeding behavior[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2017, 98(4): 460-464.
- [29] Xu Y B, Zheng H D, Chen Y F, et al. Preliminary exploration on the effects of deltamethrin on enzyme activity and organs injury in *Ruditapes philippinarum*[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(6): 206-212. [许贻斌, 郑惠东, 陈宇锋, 等. 溴氰菊酯对菲律宾蛤仔体内酶活性和组织损伤的初步探索[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(6): 206-212.]
- [30] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress toler-

- ance[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(9): 405-410.
- [31] Wang H W, Ma S W, Zhang Z, et al. Effects of perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure on antioxidant enzymes of *Perna viridis*[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2012, 7(5): 508-516. [王贺威, 马胜伟, 张喆, 等. 全氟辛烷磺酸盐 (PFOS)胁迫对翡翠贻贝抗氧化酶的影响[J]. 生态毒理学报, 2012, 7(5): 508-516.]
- [32] Chen C F, Shen W L, Huo L H, et al. Effects of cadmium on the microstructure and ultrastructure of gill and hepatopancreas in *Tegillarca granosa*[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(4): 522-528. [陈彩芳, 沈伟良, 霍礼辉, 等. 重金属离子 Cd^{2+} 对泥蚶鳃及肝脏细胞显微和超微结构的影响[J]. 水产学报, 2012, 36(4): 522-528.]
- [33] Ortiz-Ordoñez E, Uriá-Galicia E, Ruiz-Picos R A, et al. Effect of yerbimat herbicide on lipid peroxidation, catalase activity, and histological damage in gills and liver of the freshwater fish *Goodea atripinnis*[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2011, 61(3): 443-452.

Effect of prometryn on the antioxidant enzyme activities and histopathology of *Macra veneriformis*

HUANG Hui¹, WANG Gongming¹, REN Lihua¹, GONG Xianghong¹, PENG Zhongxiao², XU Yingjiang¹, LIU Huihui¹, WANG Weiyun¹, ZHANG Xiuzhen¹

1. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Shandong Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Yantai 264006, China;
2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Prometryn, a type of herbicide with high efficiency and low toxicity, is used to remove algae in agricultural weeding and aquaculture, as well as in rivers, and reservoirs. Shrimp, sea cucumber, and shellfish are widely used in aquaculture. Prometryn is frequently detected in domestic and foreign marine environments and export marine products, causing ecological risks to fishery breeding environments and affecting the quality and safety of aquatic products. *Macra veneriformis* is a common economic shellfish on the coast of China. Owing to its fixed growth position, the risk of net pollution by prometryn is relatively higher. Prometryn can cause changes in the antioxidant enzyme system of marine organisms, thereby affecting their immune mechanisms. Changes in the activity or content of its components can be used as biomarkers of oxidative stress. At present, domestic and foreign studies on prometryn in shellfish primarily focus on the investigation of local contamination and acute toxicity, and the effects on the antioxidant enzyme system and tissue cells of *M. veneriformis* have not been reported. To investigate the toxicological effect of prometryn stress on *M. veneriformis*, the 21-day stress and 15-day net water release experiments of different concentrations of prometryn (0.2 $\mu\text{g/L}$, 1.0 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$) on *M. veneriformis* were carried out. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) in gills and digestive glands at different time points were determined, and the morphological changes of gills tissues were observed. Results showed that prometryn had certain induction or inhibition on SOD, CAT, and GPx in *M. veneriformis*. Moreover, 0.2- $\mu\text{g/L}$ prometryn had less oxidative stress than that of the 1.0- $\mu\text{g/L}$ and 10.0- $\mu\text{g/L}$ groups. The enzyme activity of the 1.0- $\mu\text{g/L}$ and 10.0- $\mu\text{g/L}$ groups could not be restored entirely or even lost in the water purification release stage. Additionally, the 10.0- $\mu\text{g/L}$ prometryn had irreversible oxidative damage to *M. veneriformis*. Prometryn could cause atrophy of gill epithelial cells, shedding of cilia, and enlargement of gill filament space. With the increase of prometryn concentration or the prolongation of stress time, there were significant SOD, CAT, and changes of gill tissue cells concentration and time effects. Furthermore, high concentrations of prometryn had considerable toxic effects on *M. veneriformis*. GPx in gills of *M. veneriformis* can be used as a potential biomarker for assessing prometryn pollution and providing an early warning for marine ecological environment pollution.

Key words: prometryn; *Macra veneriformis*; antioxidant enzyme activity; tissue cell; toxicological effect

Corresponding author: ZHANG Xiuzhen. E-mail: zxz0535501@126.com