

DOI: 10.12264/JFSC2021-0308

## 异丙甲草胺对四角蛤蜊和肝胰腺抗氧化酶系和组织结构的影响

彭中校<sup>1,2</sup>, 黄会<sup>1</sup>, 王玮云<sup>1</sup>, 任利华<sup>1</sup>, 刘鸽<sup>1,2</sup>, 赵军强<sup>1,2</sup>, 官向红<sup>1</sup>, 张秀珍<sup>1</sup>

1. 山东省海洋资源与环境研究院, 山东 烟台 264006;

2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

**摘要:** 除草剂污染对海洋环境以及水产品质量安全的影响已引起广泛关注。为探究异丙甲草胺污染对黄河三角洲滩涂贝类养殖的影响, 本研究以四角蛤蜊(*Macra veneriformis*)为实验对象, 探讨不同质量浓度异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊和肝胰腺抗氧化酶活性和组织结构的影响, 测定胁迫阶段和净水消除阶段不同时间点各组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量变化, 观察其组织的显微结构变化。结果显示, 不同浓度的异丙甲草胺胁迫对抗氧化酶活性表现出诱导或抑制作用, 0.5  $\mu\text{g/L}$ 、2.5  $\mu\text{g/L}$  异丙甲草胺可对鳃 SOD 活性、CAT 活性造成不可逆的抑制, 而 10  $\mu\text{g/L}$  质量浓度组鳃 SOD、CAT 活性在净水消除阶段可恢复至对照组水平。3 个浓度组的肝胰腺 SOD、CAT 活性和 MDA 含量在净水消除阶段可恢复至(或接近)对照组水平。同时异丙甲草胺胁迫造成了鳃丝肿大、纤毛脱落、上皮细胞受损以及消化管破损。结论认为, 异丙甲草胺对四角蛤蜊的肝胰腺和鳃均具有明显的剂量效应与时间效应。

**关键词:** 异丙甲草胺; 四角蛤蜊; 抗氧化酶活性; 组织结构

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)04-0574-11

随着现代农业的发展, 除草剂已成为农业生产中广泛使用的一类农药。农药在田间使用后, 只有少量停留在作物上发生效用, 大部分则残留在土壤或漂浮于大气中, 通过降雨、淋溶等途径进入水体<sup>[1]</sup>, 对环境、农作物和非靶标生物造成一定的污染, 从而降低水生生态环境的质量, 影响水生生态系统的结构和功能, 对人体健康存在潜在的危害<sup>[2]</sup>。异丙甲草胺(metolachlor)为一种常用的酰胺类除草剂, 被广泛应用于蔬菜作物、水稻移栽田等, 国内外均有报道在河流、海域中检测出异丙甲草胺<sup>[3-4]</sup>。

本项目组对黄河三角洲贝类增养殖产业调研时发现, 近年来贝类肥满度降低, 死亡率增高, 因此有必要探究其原因。四角蛤蜊(*Macra veneriformis*)是黄河三角洲滩涂贝类养殖的重要物种

之一, 主要栖息在滩涂区域的泥沙中<sup>[5]</sup>, 活动范围有限, 受海域中除草剂污染的风险较大。已有研究报道异丙甲草胺对水生动物的毒害作用, 如异丙甲草胺诱导太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*) D 型幼体发生畸变<sup>[6]</sup>, 降低大理石纹螯虾(*Procambarus virginalis*)超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽 s-转移酶活性<sup>[7]</sup>, 抑制斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎孵化率<sup>[8]</sup>等。目前国内外关于酰胺类除草剂对贝类的影响多集中于急性毒性方面, 从生理学、组织病理学、酶学等多角度、系统研究农药胁迫对贝类的影响研究甚少, 除草剂的污染状况、生态风险、对滩涂贝类质量安全的影响尚不明确。

本研究以我国滩涂贝类常见种类四角蛤蜊为研究对象, 通过研究在异丙甲草胺胁迫与净水消

收稿日期: 2021-07-08; 修订日期: 2021-08-18.

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2018GHY115041).

作者简介: 彭中校(1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产品质量与安全. E-mail: 1578800380@qq.com

通信作者: 张秀珍, 研究员, 研究方向为水产品质量安全与标准化. E-mail: zxz0535501@126.com

除条件下, 四角蛤蜊鳃和肝胰腺超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量变化, 在胁迫条件下鳃和肝胰腺组织显微结构的变化, 从氧化胁迫和组织病理学的角度, 分析异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊的毒性效应, 阐述药物剂量、胁迫时间和贝类受损程度的相关性, 为实现滩涂贝类养殖质量可控化发展提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验生物

四角蛤蜊购自山东省东营市, 选取健康、完整、无病害、规格一致的四角蛤蜊, 冲刷掉表面污物及附着物, 体重( $7.26 \pm 0.43$ ) g, 壳长( $3.21 \pm 0.50$ ) cm。实验前将四角蛤蜊在实验条件下暂养7 d, 连续充氧, 每天定时换海水1次、投喂金藻(Chrysophyta)硅藻(Bacillariophyta)混合物1次, 死亡率低于5%后进行实验, 实验前一天停止投饵, 选择健康、反应灵敏的四角蛤蜊随机分组进行实验。

### 1.2 实验条件

实验用容器为60 L长方体玻璃水缸, 实验用海水为新鲜、清洁海水, 水温( $20 \pm 1$ ) °C, pH 7.8~8.0, 实验期间持续微量充气, 实验前在实验室内预存放3 d, 以保持相应的理化因子稳定。实验前四角蛤蜊和海水需经检测, 确定不含异丙甲草胺。

### 1.3 仪器与试剂

主要仪器: 匀浆机、离心机、酶标仪(MULTISKAN FC, 赛默飞公司, 美国)、紫外可见分光光度计(U-2900, 日本日立有限公司)、恒温水浴锅、恒温孵育箱、切片机、自动染色机、光学显微镜(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)、包埋机。

试剂与药品: 异丙甲草胺(河南瀚斯作物保护有限公司), 纯度 $\geq 95\%$ 。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)生化检测试剂盒及考马斯亮蓝试剂盒(以上均购自南京建成生物研究所), Bouin's 液, 苏木精-伊红染色液。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 亚慢性毒性实验** 设置3个异丙甲草胺浓

度组, 分别为0.5  $\mu\text{g/L}$ 、2.5  $\mu\text{g/L}$ 、10  $\mu\text{g/L}$ , 并设置1个溶剂(丙酮)对照组, 每组3个平行。实验水缸中注入30 L海水, 加入异丙甲草胺储备液, 使其达到预设的除草剂浓度, 并待稳定后随机放入100只经过暂养的四角蛤蜊。采用半静态水质接触染毒法, 每隔24 h换1/2海水, 投喂金藻硅藻混合物, 并补充相应体积的药物储备液, 控制海水中的药物浓度。实验期间连续充气, 及时捞出死亡个体。富集实验持续21 d, 富集实验结束后, 将剩余四角蛤蜊转入清洁海水中, 进行消除实验, 持续15 d。

**1.4.2 抗氧化酶指标的测定** 分别在富集阶段的第1、2、4、7、10、15、21天和消除阶段的第1、3、6、10、15天, 每个水缸每次随机取四角蛤蜊2只, 放于冰槽上解剖, 取鳃和肝胰腺, 按组织分别放入已标记的1.5 mL冻存管中并于液氮罐中冷冻24 h, 转移至-80 °C冰箱保存待测。指标测定时准确称取组织样品于离心管中, 按重量与体积之比为1:9加入冷生理盐水, 冰水浴条件下, 用匀浆机制成浓度10%的组织匀浆, 离心机2000 r/min离心10 min, 取上清液。用生理盐水稀释成相应的最佳样品浓度, 用于抗氧化酶指标的测定。组织蛋白定量测定采用考马斯亮蓝法, SOD活性测定采用黄嘌呤氧化法, CAT活性测定采用紫外比色法, MDA定量测定采用硫代巴比妥酸法, 具体实验操作参照试剂盒说明书。

**1.4.3 组织结构的观察** 分别在富集阶段第0、11、21天, 每个水缸每次随机取四角蛤蜊3只, 取鳃和肝胰腺, Bouin's 液固定12~24 h, 转移到70%乙醇保存。经梯度乙醇(体积分数70%、80%、95%、100%)脱水、二甲苯透明、软蜡透蜡、硬蜡包埋, 德国Leicar切片机切成6  $\mu\text{m}$ 的连续切片, 然后贴片, 37 °C烤片, 苏木精-伊红染色, 中性树胶封片, 最后在光学显微镜下观察并拍照记录。

### 1.5 数据处理

亚慢性毒性实验数据利用SPSS26.0软件进行分析处理, 结果用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )表示, 采用单因素方差分析法(one-way, ANOVA)分析统计四角蛤蜊受胁迫产生的差异, 并用LSD法比较组间差异,  $P < 0.05$ 表示差异显著,  $P < 0.01$ 表示差异

极显著。用 Origin Pro 8.0 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊鳃和肝胰腺 SOD 活性影响

异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊鳃 SOD 活性影响见图 1。0.5  $\mu\text{g/L}$  浓度组 SOD 活性在富集阶段前 4 d 比对照组稍低, 差异不显著, 第 7 天后活性继续降低, 与对照组相比差异显著; 在消除阶段, SOD 活性有所上升, 在第 10 天恢复到接近对照组的水平。2.5  $\mu\text{g/L}$  浓度组 SOD 活性在富集阶段前 4 d 比对照组稍低, 在第 7 天升高并达到峰值, 然后下降并趋于稳定且始终低于对照组, 在第 21 天后以及净水消除阶段与对照组相比差异显著。10  $\mu\text{g/L}$  浓度组变化大致呈上升-下降趋势, 在富集第 1 天高于对照组且差异极显著, 然后逐渐下降; 在 15 d 有所升高并高于对照组, 然后再次下降, 整个消除阶段始终低于对照组。

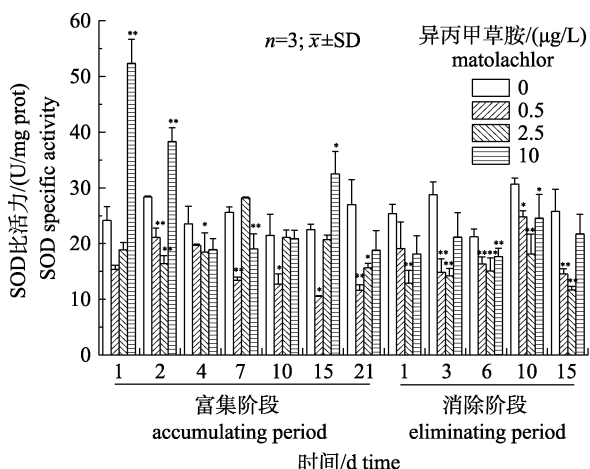


图 1 不同浓度异丙甲草胺对四角蛤蜊鳃 SOD 活性的影响

“\*”: 与对照组相比差异显著 ( $P<0.05$ );

“\*\*\*”: 与对照组相比差异极显著 ( $P<0.01$ ).

Fig. 1 Effect of different concentrations of metolachlor on SOD activity in gills of *Mactra veneriformis*

“\*”: significant difference compared with control group ( $P<0.05$ ); “\*\*\*”: indicates extremely significant difference compared with control group ( $P<0.01$ ).

异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊肝胰腺 SOD 活性影响见图 2。3 个浓度组在胁迫第 1 天肝胰腺 SOD 活性均高于对照组, 且 0.5  $\mu\text{g/L}$ 、2.5  $\mu\text{g/L}$  浓度组差异显著。之后各浓度组 SOD 活性均下降,

并在第 7 天恢复至对照组水平。各浓度组 SOD 活性自第 7 天后变化不明显。

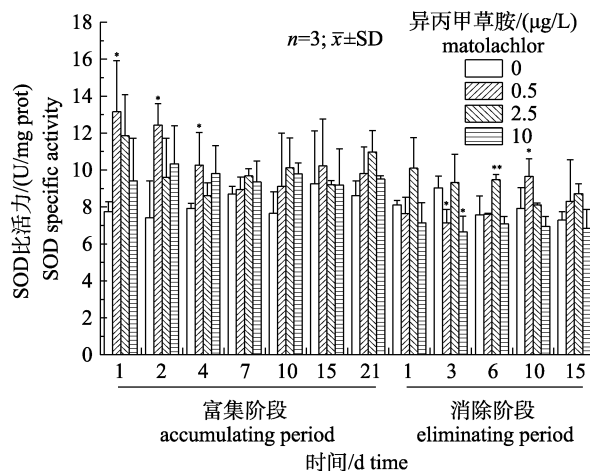


图 2 不同浓度异丙甲草胺对四角蛤蜊肝胰腺 SOD 活性的影响

“\*”: 与对照组相比差异显著 ( $P<0.05$ );

“\*\*\*”: 与对照组相比差异极显著 ( $P<0.01$ ).

Fig. 2 Effects of metolachlor on SOD activity in hepatopancreas of *Mactra veneriformis*

“\*”: significant difference compared with control group ( $P<0.05$ ); “\*\*\*”: indicates extremely significant difference compared with control group ( $P<0.01$ ).

### 2.2 异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊鳃和肝胰腺 CAT 活性影响

异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊鳃 CAT 活性影响见图 3。0.5  $\mu\text{g/L}$ 、2.5  $\mu\text{g/L}$  浓度组鳃组织 CAT 活性在整个实验过程中始终低于对照组, 且变化趋势相似, 在胁迫阶段呈上升一下降趋势, 两个浓度组分别在第 4 天和第 10 天恢复至与对照组接近的水平, 然后在胁迫的后半阶段下降, 与对照组差异显著 ( $P<0.05$ ); 在消除阶段, 两个浓度组 CAT 活性上升, 但未恢复至对照组水平。10  $\mu\text{g/L}$  浓度组 CAT 活性在胁迫阶段被显著抑制, 在消除阶段逐步恢复至对照组水平。

异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊肝胰腺 CAT 活性影响见图 4。3 个浓度组肝胰腺 CAT 活性在胁迫第 1 天被显著抑制 ( $P<0.05$ )。0.5  $\mu\text{g/L}$  浓度组 CAT 活性在胁迫第 7 天恢复至对照组水平, 然后再下降并逐步上升, 在整个消除阶段波动不大, 未能恢复至对照组水平。2.5  $\mu\text{g/L}$  浓度组 CAT 活性除了在胁迫第 15 天稍有升高外, 整个胁迫阶段被显

著抑制( $P<0.05$ ); 在消除第 1 天上升至显著高于对照组水平, 然后逐步恢复至对照组水平( $P<0.05$ )。10  $\mu\text{g/L}$  浓度组 CAT 活性在胁迫阶段被显著抑制( $P<0.05$ ), 在消除阶段恢复至接近于对照组水平。

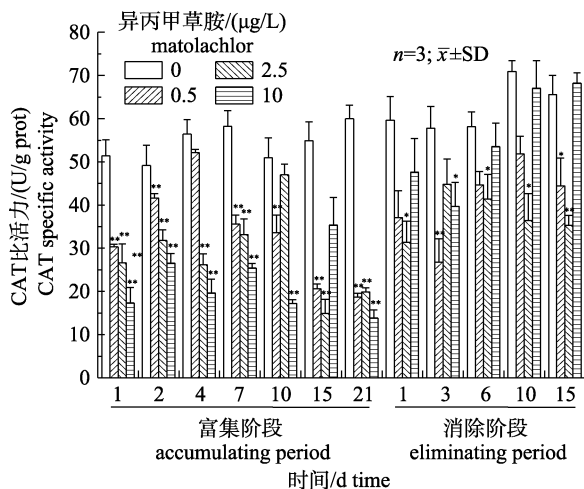


图 3 不同浓度异丙甲草胺对四角蛤蜊鳃 CAT 活性的影响

“\*\*”: 与对照组相比差异显著( $P<0.05$ );

“\*\*\*”: 与对照组相比差异极显著( $P<0.01$ ).

Fig. 3 Effect of different concentrations of metolachlor on CAT activity in gills of *Mactra veneriformis*  
“\*\*”: significant difference compared with control group ( $P<0.05$ ); “\*\*\*”: indicates extremely significant difference compared with control group ( $P<0.01$ ).

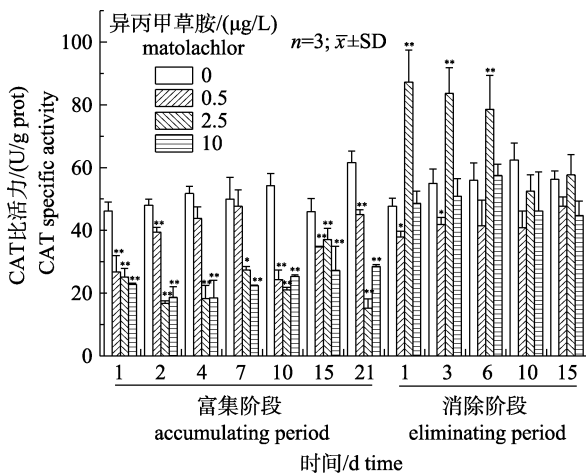


图 4 不同浓度异丙甲草胺对四角蛤蜊肝胰腺 CAT 活性的影响

“\*\*”: 与对照组相比差异显著( $P<0.05$ );

“\*\*\*”: 与对照组相比差异极显著( $P<0.01$ ).

Fig. 4 Effect of different concentrations of metolachlor on CAT activity in hepatopancreas of *Mactra veneriformis*  
“\*\*”: significant difference compared with control group ( $P<0.05$ ); “\*\*\*”: indicates extremely significant difference compared with control group ( $P<0.01$ ).

### 2.3 异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊鳃和肝胰腺 MDA 含量影响

异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊鳃 MDA 含量影响见图 5。0.5  $\mu\text{g/L}$  浓度组 MDA 含量在胁迫第 1 天显著升高( $P<0.05$ ), 之后逐渐下降, 在第 10 天下降到最低水平并维持稳定。2.5  $\mu\text{g/L}$  浓度组 MDA 含量在胁迫第 1 天显著下降( $P<0.05$ ); 在消除阶段, 0.5  $\mu\text{g/L}$  和 2.5  $\mu\text{g/L}$  浓度组 MDA 含量恢复至对照组水平。10  $\mu\text{g/L}$  浓度组 MDA 含量在胁迫第 1 天显著升高( $P<0.05$ ), 在胁迫阶段第 2 天到第 10 天降低至对照组水平以下, 第 15 天和第 21 天恢复至对照组水平; 消除阶段第 1 天 MDA 含量高于对照组且差异极显著( $P<0.05$ ), 第 3 天降至极低水平并保持稳定。

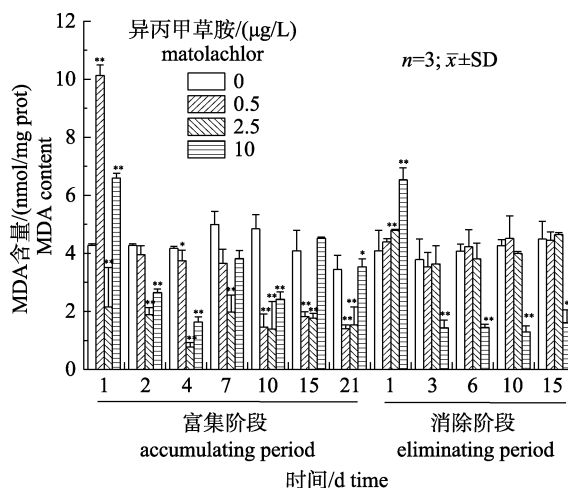


图 5 不同浓度异丙甲草胺对四角蛤蜊鳃 MDA 含量的影响

“\*\*”: 与对照组相比差异显著( $P<0.05$ );

“\*\*\*”: 与对照组相比差异极显著( $P<0.01$ ).

Fig. 5 Effect of different concentrations of metolachlor on MDA content in gills of *Mactra veneriformis*  
“\*\*”: significant difference compared with control group ( $P<0.05$ ); “\*\*\*”: indicates extremely significant difference compared with control group ( $P<0.01$ ).

异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊肝胰腺 MDA 含量影响见图 6。在胁迫阶段, 0.5  $\mu\text{g/L}$  浓度组 MDA 含量除了在第 2 天稍低于对照组外, 其余时间均高于对照组, 在第 15 天达到峰值, 显著高于对照组( $P<0.05$ ); 在消除阶段逐渐恢复至对照组水平。2.5  $\mu\text{g/L}$  浓度组 MDA 含量在胁迫阶段始终显著高于对照组, 在第 1 天到达峰值; 在消除阶段降低

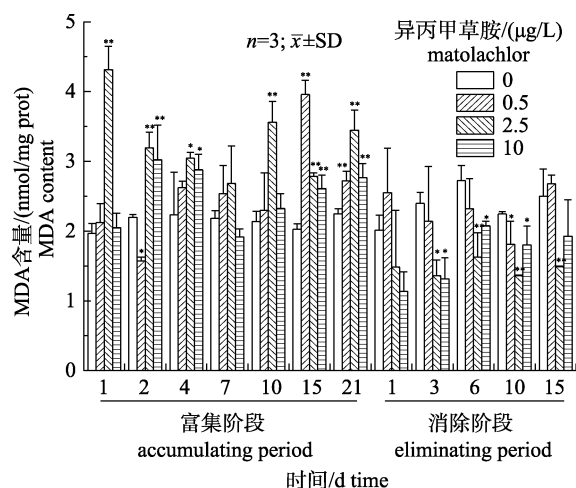


图 6 不同浓度异丙甲草胺对四角蛤蜊肝胰腺 MDA 含量的影响

“\*”: 与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ );

“\*\*\*”: 与对照组相比差异极显著 ( $P < 0.01$ ).

Fig. 6 Effect of different concentrations of metolachlor on MDA content in hepatopancreas of *Mactra veneriformis*

“\*”: significant difference compared with control group ( $P < 0.05$ ); “\*\*\*”: indicates extremely significant difference compared with control group ( $P < 0.01$ ).

至低于对照组水平并保持稳定。10 µg/L 浓度组 MDA 含量除了在第 7 天稍低于对照组外, 其余时

间稍高于对照组, 在第 2 天达到峰值; 在消除阶段第 1、3 天降至显著低于对照组水平 ( $P < 0.05$ ), 然后上升至稍低于对照组水平并保持稳定。

## 2.4 异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊鳃和肝胰腺组织结构的影响

对照组鳃丝组织结构完整, 鳃丝无肿胀, 无纤毛脱落等损伤现象。0.5 µg/L 胁迫 11 d 后鳃丝结构变化不明显。2.5 µg/L 胁迫 11 d 后, 鳃丝变短、肿胀, 出现血细胞堆积, 部分血细胞出现破损现象(图 7)。

10 µg/L 胁迫 11 d 后, 鳃丝除了肿胀之外, 与 2.5 µg/L 相比, 鳃丝之间的排列也变得更加松散, 鳃丝上皮细胞脱落。胁迫实验的第 11 天, 对照组的鳃丝结构完整(图 8)。

0.5 µg/L 胁迫 21 d, 部分鳃丝变短并出现肿胀, 上皮细胞变得粗糙。2.5 µg/L 胁迫 21 d, 鳃丝损伤状况与 10 µg/L 胁迫 11 d 相近, 鳃丝变得肿胀且松散。10 µg/L 胁迫 21 d, 鳃丝的损伤状况更加严重, 鳃丝形状变异明显, 并伴随有纤毛脱落。21 d 的对照组鳃丝结构仍然完整(图 9)。

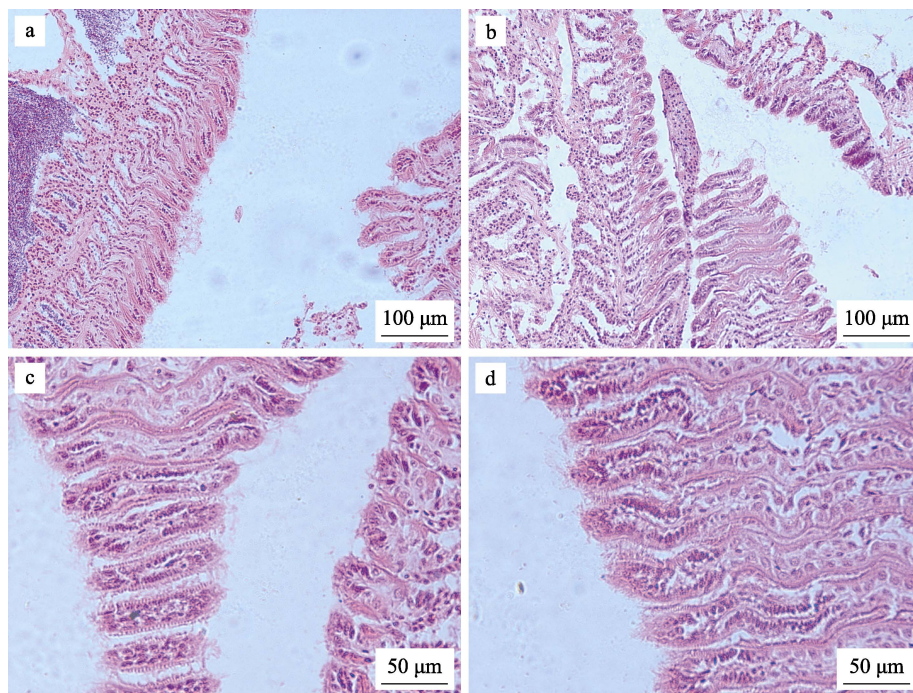


图 7 0.5 µg/L、2.5 µg/L 异丙甲草胺胁迫 11 d 对四角蛤蜊鳃组织的影响

a: 对照组; b: 0.5 µg/L 组; c-d: 2.5 µg/L 组.

Fig. 7 Effects of 0.5 µg/L and 2.5 µg/L metolachlor on *Mactra veneriformis* gill tissue under 11 d stress

a: control group; b: 0.5 µg/L group; c-d: 2.5 µg/L group.

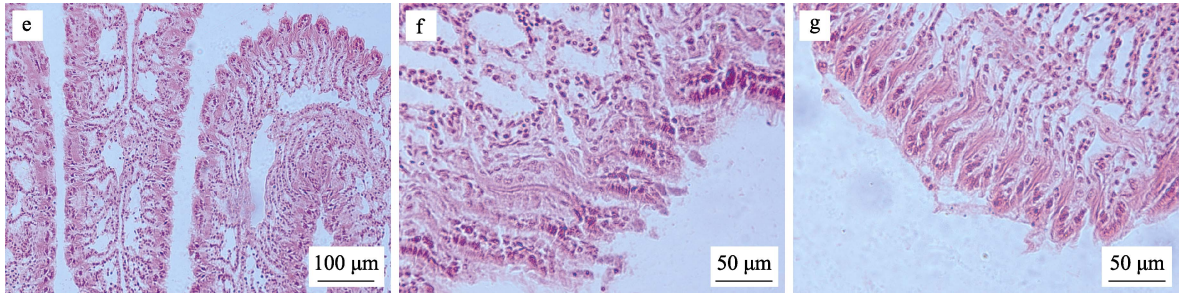


图 8 10  $\mu\text{g/L}$  异丙甲草胺胁迫 11 d 对四角蛤蜊鳃组织的影响  
e-f: 10  $\mu\text{g/L}$  组; g: 对照组.  
Fig. 8 Effects of metolachlor at 10  $\mu\text{g/L}$  on *Mactra veneriformis* gill tissue under 11 d stress  
c-f: 10  $\mu\text{g/L}$  group; g: control group.

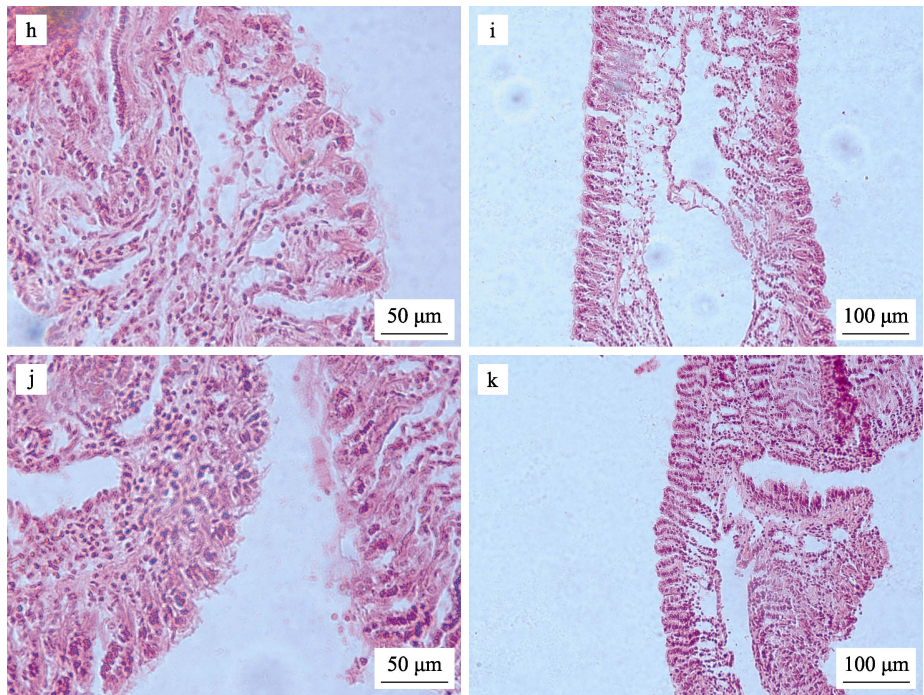


图 9 异丙甲草胺胁迫 21 d 对四角蛤蜊鳃组织影响  
h: 0.5  $\mu\text{g/L}$ ; i: 2.5  $\mu\text{g/L}$ ; j: 10  $\mu\text{g/L}$ ; k: 对照组.  
Fig. 9 Effects of metolachlor stress on *Mactra veneriformis* gill tissue for 21 d  
h: 0.5  $\mu\text{g/L}$ ; i: 2.5  $\mu\text{g/L}$ ; j: 10  $\mu\text{g/L}$ ; k: control group.

异丙甲草胺胁迫对肝胰腺显微结构的影响如下。对照组消化管呈圆形或椭圆形, 消化管之间排列紧密有序, 无松散或脱落现象。消化管内间质结构呈星形或椭圆形, 间质结构与上皮组织结合紧致。0.5  $\mu\text{g/L}$  胁迫 11 d, 消化管出现明显融解现象。另有个别消化管变得松散, 但间质结构损伤不明显。2.5  $\mu\text{g/L}$  胁迫 11 d, 消化管之间稍有松散, 消化管内间质结构损伤明显, 伴有融解现象。10  $\mu\text{g/L}$  胁迫 11 d 与 2.5  $\mu\text{g/L}$  胁迫损伤相近, 对照组第 11 天无明显损伤(图 10)。

0.5  $\mu\text{g/L}$  胁迫 21 d 比 11 d 的损伤情况稍有加重, 部分消化管出现破裂, 间质结构脱落; 2.5  $\mu\text{g/L}$  胁迫 21 d, 大部分消化管变形、破裂, 变得十分紊乱; 10  $\mu\text{g/L}$  胁迫 21 d, 消化管破损凌乱; 对照组结构完整(图 11)。

3 讨论

活性氧(ROS)是需氧生物在正常生命活动中通过有氧代谢产生的, 其含量在正常情况下处于平衡状态。当生物体所处环境因子改变或者受到

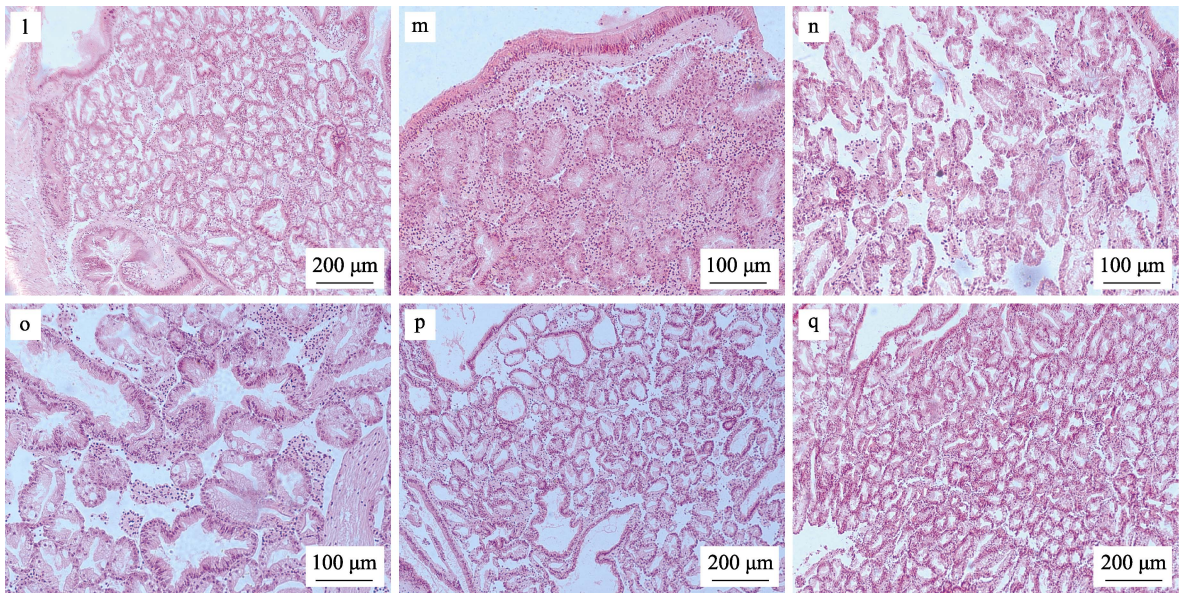


图 10 不同浓度异丙甲草胺胁迫 11 d 对四角蛤蜊肝胰腺组织的影响

l: 对照组; m、n: 0.5 µg/L; o: 2.5 µg/L; p: 10 µg/L; q: 11 d 对照组

Fig. 10 Effects of metolachlor stress at different concentrations on *Mactra veneriformis* hepatopancreas for 11 d  
l: control group; m, n: 0.5 µg/L; o: 2.5 µg/L; p: 10 µg/L; q: 11 d control.

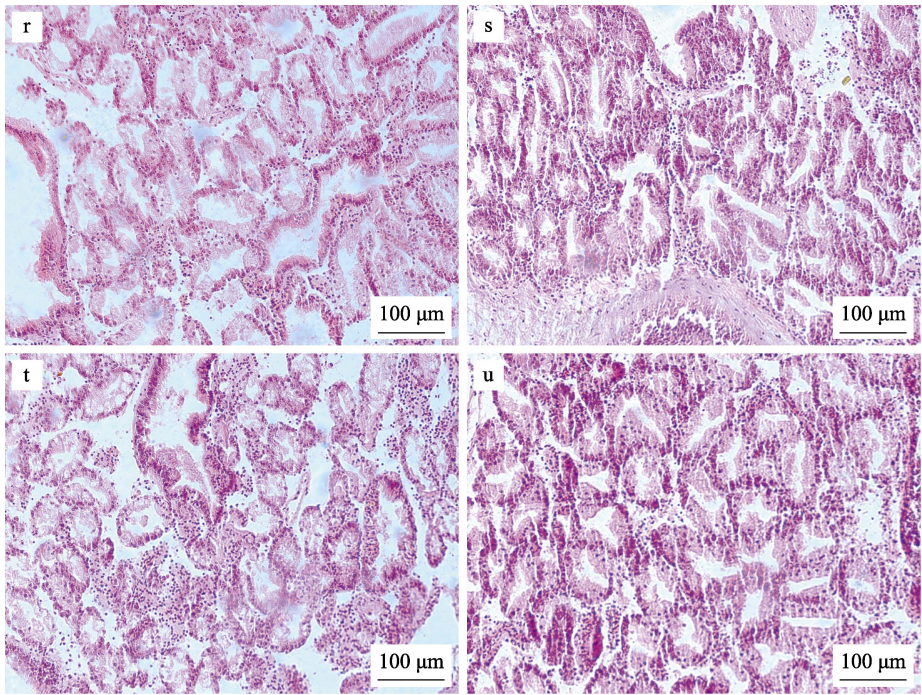


图 11 不同浓度异丙甲草胺胁迫 21 d 对四角蛤蜊肝胰腺组织的影响

r: 0.5 µg/L; s: 2.5 µg/L; t: 10 µg/L; u: 21 d 对照组.

Fig. 11 Effects of metolachlor stress at different concentrations on *Mactra veneriformis* hepatopancreas for 21 d  
r: 0.5 µg/L; s: 2.5 µg/L; t: 10 µg/L; u: 21 d control group.

外源物胁迫时，机体会因呼吸爆发产生过量的 ROS，引发氧化应激加剧<sup>[9]</sup>。此时生物体的抗氧化酶系统发挥作用，抵御氧化应激<sup>[10]</sup>，减少机体损

伤。SOD 是机体清除其中一种 ROS，即超氧阴离子自由基  $O_2^-$  的专一酶<sup>[11]</sup>，是重要的抗氧化酶之一。CAT 的功能是分解另一种 ROS，即过氧化氢( $H_2O_2$ )，

过量的  $H_2O_2$  会还原为各种自由基, 氧化细胞的蛋白质、DNA 等成分, 使细胞发生病变<sup>[12]</sup>。MDA 是脂质过氧化的代谢产物, 是机体受到氧化应激产生的自由基引发脂质过氧化生成的。MDA 会与细胞蛋白质、DNA 等成分发生交联反应, 使细胞损伤<sup>[13]</sup>。SOD、CAT 活性和 MDA 含量常作为评价生物抗氧化酶系状态的生物标志物指标, 在环境污染研究与生态毒理研究中应用广泛。

国内外关于异丙甲草胺对贝类的生理影响研究与报道较少, 但不乏有学者证明酰胺类除草剂会对水生生物产生毒性效应。如金鱼(*Carassius auratus*)在 1.5 mL/L 和 2.0 mL/L 的丁草胺水环境中, 血清过氧化物酶和酯酶活性降低或消失, 酶活性与丁草胺浓度存在剂量效应关系<sup>[14]</sup>; 曝露于 S-异丙甲草胺与甲草胺草酸后, 大理石纹螯虾(*Procambarus virginalis*)的血淋巴、肝胰腺和鳃的生化指标明显不同于控制组, 即使在 28 天恢复期后, 抗氧化生物标志物水平与控制组仍有明显不同<sup>[15]</sup>; 牙鲆(*Paralichthys solivaceus*)受丁草胺胁迫后, 鳃细胞 SOD、CAT 活性受到明显抑制<sup>[16]</sup>。本研究中, 3 个胁迫组的鳃和肝胰腺的 SOD、CAT 活性和 MDA 含量与对照组相比均呈现出差异性, 表明异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊的抗氧化酶系统产生了影响。

本研究中, 低浓度的异丙甲草胺胁迫始终抑制四角蛤蜊鳃的 SOD 活性, 而 10  $\mu\text{g/L}$  浓度组在胁迫初期则呈现出显著诱导作用( $P<0.05$ ), 从胁迫第 4 天后, 各个浓度组的 SOD 活性整体上都被抑制, 并且在净水消除阶段也未能恢复到对照组水平。肝胰腺的 SOD 活性则呈现出相反的变化趋势, 在胁迫阶段 3 个浓度组的 SOD 活性均被诱导, 且在胁迫初期诱导作用明显, 表明抗氧化防御系统发挥作用, 提升抗氧化酶活性, 维持机体生理功能稳定。在净水消除阶段, 胁迫组均恢复到对照组水平, 这与扑草净对四角蛤蜊肝胰腺 SOD 活性影响结果一致<sup>[17]</sup>。异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊鳃和肝胰腺 CAT 活性均表现出明显抑制作用, 且呈现较为明显的剂量-效应, 这与氯霉素胁迫对菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)内脏团<sup>[18]</sup>,

丙草胺胁迫对斑马鱼肝脏 CAT 活性<sup>[19]</sup>影响结果一致。在消除阶段, 0.5  $\mu\text{g/L}$ 、2.5  $\mu\text{g/L}$  浓度组鳃 CAT 活性始终显著低于对照组( $P<0.05$ ), 表现出不可逆的损伤, 但 10  $\mu\text{g/L}$  浓度组却逐渐恢复到对照组水平, 并不表现出剂量效应; 而胁迫组肝胰腺 CAT 活性大致能恢复到对照组水平。

从以上结果得出, CAT 与 SOD 相比, 其活性更容易受到外源物刺激并处于被抑制状态, 这可能与两种酶的敏感性和作用机制有关。SOD 作用于  $O_2$  产生的代谢物之一是  $H_2O_2$ , 过量的  $H_2O_2$  可能使 CAT 的抗氧化机制负荷过重, 抑制了 CAT 的抗氧化作用, 但 CAT 并不是生物体内唯一分解  $H_2O_2$  的酶, 因此这一推论有待验证。分析鳃和肝胰腺的抗氧化酶活性变化趋势得知, 当机体受到外源物刺激时, 鳃的抗氧化酶反应更敏感, 也更容易受到不可逆的损伤, 这可能与鳃和肝胰腺在机体中的生理功能有关。鳃作为双壳贝类的呼吸滤食器官<sup>[20]</sup>, 水环境中的外源物可与之直接作用, 因此受到的刺激强烈, 损伤的可能性大。肝胰腺是双壳贝类的消化腺, 主要参与机体的解毒与排泄过程<sup>[21]</sup>, 因此其抗氧化系统相对稳定。

MDA 常作为衡量生物体内脂质过氧化程度的一个指标, 研究机体或细胞受损伤程度<sup>[13]</sup>。本研究中, 0.5  $\mu\text{g/L}$  和 10  $\mu\text{g/L}$  浓度组鳃 MDA 在胁迫第 1 天迅速升高并达到峰值。从胁迫阶段第 2 天后, 3 个胁迫组鳃 MDA 水平均降至对照组或以下水平, 但 SOD、CAT 活性整体被抑制, 推测是由于生物体为了维持抗氧化防御系统稳定, 机体中其他的抗氧化酶被激活并消除 MDA。肝胰腺 MDA 含量呈现不规则的变化趋势, 但整体而言高于对照组, 表明药物胁迫对肝胰腺脂质过氧化产生了不利的影响。净水消除第 1 天, 3 个胁迫组鳃 MDA 均上升, 推测是由于胁迫消除后, 药物对抗氧化酶活力的诱导作用减缓, 残留的药物仍对鳃组织产生影响, 导致 MDA 含量上升; 第 3 天后, 10  $\mu\text{g/L}$  浓度组 MDA 含量降至极低水平, 这与 CAT 活性显著恢复相对应。药物胁迫消除后, 各浓度组鳃与肝胰腺 MDA 含量均恢复到或低于对照组水平, 表明异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊鳃和

肝胰腺脂质过氧化作用的影响可能是可逆的。

鳃作为贝类的呼吸滤食器官,在贝类的滤水、摄食行为中具有重要作用,肝胰腺作为贝类的解毒排泄器官,参与多种生理代谢功能,鳃或肝胰腺的损伤可直接影响贝类的生长发育。本研究中,异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊鳃组织显微结构的损伤主要表现为鳃丝肿大、纤毛脱落、上皮细胞受损以及血细胞堆积,这与  $\text{Cd}^{2+}$  胁迫对泥蚶 (*Tegillarca granosa*) 鳃丝<sup>[21]</sup>, 溴氰菊酯胁迫对菲律宾蛤仔鳃丝显微结构的影响<sup>[22]</sup> 结果相似; 对肝胰腺显微结构的损害主要表现为消化管破损变形、间质组织脱落, 这与  $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  单一及复合暴露对长牡蛎消化腺组织结构的影响<sup>[23]</sup> 结果相似。两种组织的受损情况表现出来的剂量-时间-效应较明显。

综上所述可知, 异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊组织中 SOD、CAT 活力以及 MDA 含量的影响并不呈现出明显的剂量效应, 这与组织结构的损伤并不是对应的关系, 推测可能是由于药物胁迫带来的损伤不足以使抗氧化酶系统崩溃, 不同浓度的药物胁迫使不同的抗氧化酶激活以维持机体生理平衡, 这有待更进一步的研究。

#### 4 结论

异丙甲草胺胁迫对四角蛤蜊鳃和肝胰腺抗氧化酶系统以及显微结构可造成明显影响。不同浓度的异丙甲草胺胁迫对抗氧化酶活性表现出诱导或抑制作用, 在胁迫阶段, 0.5  $\mu\text{g/L}$  和 2.5  $\mu\text{g/L}$  的药物胁迫对鳃 SOD 活性的影响为抑制作用, 10  $\mu\text{g/L}$  浓度组在胁迫初期表现为诱导作用, 3 个浓度胁迫对鳃和肝胰腺 CAT 活性均表现为抑制作用; 净水消除阶段, 0.5  $\mu\text{g/L}$ 、2.5  $\mu\text{g/L}$  异丙甲草胺对鳃 SOD、CAT 造成不可逆的氧化损伤, 3 个浓度组的肝胰腺 SOD、CAT 活性可恢复至或接近于对照组水平。胁迫组鳃和肝胰腺 MDA 含量在净水消除阶段可恢复至或低于对照组水平, 异丙甲草胺胁迫对鳃和肝胰腺脂质过氧化作用的影响可能是可逆的。异丙甲草胺可造成鳃丝肿大、纤毛脱落、上皮细胞受损以及消化管破损。本研究结果可为海洋生态环境风险评估和实现滩涂贝类养殖

质量可控化发展提供参考。

#### 参考文献:

- [1] Gu B G, Cheng Y, Zhou J Y, et al. Review on USA pesticide ecological risk assessment techniques[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2009, 11(3): 283-290. [顾宝根, 程燕, 周军英, 等. 美国农药生态风险评估技术[J]. 农药学报, 2009, 11(3): 283-290.]
- [2] Ojemaye C Y, Onwordi C T, Petrik L. Herbicides in the tissues and organs of different fish species (Kalk Bay harbour, South Africa): Occurrence, levels and risk assessment[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2020, 17(3): 1637-1648.
- [3] Song N H, Bu Y Q, Shan Z J. A review of studies on pesticide pollution in surface water[J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2010, 26(S1): 49-57. [宋宁慧, 卜元卿, 单正军. 农药对地表水污染状况研究概述[J]. 生态与农村环境学报, 2010, 26(S1): 49-57.]
- [4] Öllers S, Singer H P, Fässler P, et al. Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 911(2): 225-234.
- [5] 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.]
- [6] Mai H, Gonzalez P, Pardon P, et al. Comparative responses of sperm cells and embryos of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to exposure to metolachlor and its degradation products[J]. Aquatic Toxicology, 2014, 147: 48-56.
- [7] Velisek J, Stara A, Zuskova E, et al. Effects of s-metolachlor on early life stages of marbled crayfish[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2019, 153: 87-94.
- [8] Quintaneiro C, Patricio D, Novais S C, et al. Endocrine and physiological effects of linuron and S-metolachlor in zebrafish developing embryos[J]. Science of the Total Environment, 2017, 586: 390-400.
- [9] Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2006, 64(2): 178-189.
- [10] Kim B M, Rhee J S, Park G S, et al. Cu/Zn- and Mn-superoxide dismutase (SOD) from the copepod *Tigriopus japonicus*: Molecular cloning and expression in response to environmental pollutants[J]. Chemosphere, 2011, 84(10): 1467-1475.
- [11] Wei J, Xu C, Li K X, et al. Progress on superoxide dismutase

- and plant stress resistance[J]. *Plant Physiology Journal*, 2020, 56(12): 2571-2584. [魏婧, 徐畅, 李可欣, 等. 超氧化物歧化酶的研究进展与植物抗逆性[J]. *植物生理学报*, 2020, 56(12): 2571-2584.]
- [12] Kirkman H N, Gaetani G F. Mammalian catalase: A venerable enzyme with new mysteries[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2007, 32(1): 44-50.
- [13] Zhang Q P, Wu X H, Zheng J H, et al. Progress of researches on methods for determination of malondialdehyde in biological samples[J]. *Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis)*, 2016, 52(8): 979-985. [张秋萍, 吴霞红, 郑剑恒, 等. 生物样本中丙二醛测定方法的研究进展[J]. *理化检验-化学分册*, 2016, 52(8): 979-985.]
- [14] Zhang X H. Effect of butachlor on the isozymes expression in goldfish serum[J]. *Journal of Shanxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2010, 24(1): 81-84. [张晓红. 丁草胺对金鱼血清同工酶表达的影响[J]. *山西师范大学学报(自然科学版)*, 2010, 24(1): 81-84.]
- [15] Stara A, Kubec J, Zuskova E, et al. Effects of S-metolachlor and its degradation product metolachlor OA on marbled crayfish (*Procambarus virginalis*)[J]. *Chemosphere*, 2019, 224: 616-625.
- [16] 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.
- [17] Huang H, Wang G M, Ren L H, et al. Effect of prometryn on the antioxidant enzyme activities and histopathology of *Macra veneriformis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(11): 1457-1465. [黄会, 王共明, 任利华, 等. 扑草净对四角蛤蜊抗氧化酶活性及组织细胞的影响[J]. *中国水产科学*, 2021, 28(11): 1457-1465.]
- [18] Hu Y Y, Li A, Ye S, et al. The acute and subacute toxicity action of chloramphenicol on *Ruditapes philippinarum*[J]. *China Environmental Science*, 2006, 26(S1): 125-128. [胡莹莹, 李爱, 叶赛, 等. 氯霉素对菲律宾蛤仔的急性和亚急性毒性作用[J]. *中国环境科学*, 2006, 26(S1): 125-128.]
- [19] Liu Y, Jiang L, Pan B, et al. Effects of pretilachlor on the antioxidant enzyme system of zebrafish[J]. *Agrochemicals*, 2017, 56(4): 285-287. [刘迎, 姜蕾, 潘波, 等. 丙草胺对斑马鱼抗氧化酶系统的影响[J]. *农药*, 2017, 56(4): 285-287.]
- [20] Ghate H V, Mulherkav L. Histological changes in the gills of two freshwater prawn species exposed to copper sulphate[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1979, 17(8): 838-840.
- [21] 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  $\text{Cd}^{2+}$  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.]
- [22] 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.]
- [23] Xie J. Combined toxic effects of heavy metals ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) and organic pollutants (BaP, BDE-47) on the oyster *Crassostrea gigas*[D]. Yantai: Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, 2017: 69-70. [谢嘉. 典型重金属( $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ )和有机污染物(BaP、BDE-47)对长牡蛎的复合毒性效应研究[D]. 烟台: 中国科学院烟台海岸带研究所, 2017: 69-70.]

## Effects of metolachlor on the antioxidant enzyme system and histological structure in the gills and hepatopancreas of *Macra veneriformis*

PENG Zhongxiao<sup>1,2</sup>, HUANG Hui<sup>1</sup>, WANG Weiyun<sup>1</sup>, REN Lihua<sup>1</sup>, LIU Ge<sup>1,2</sup>, ZHAO Junqiang<sup>1,2</sup>, GONG Xianghong<sup>1</sup>, ZHANG Xiuzhen<sup>1</sup>

1. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** The effects of herbicide pollution on the marine environment and aquatic product quality and safety has been of great concern. To explore the effects of metolachlor pollution on shellfish cultivation in the Yellow River Delta, the effects of different mass metolachlor concentrations on gill and hepatopancreas antioxidant enzyme activities and tissue structure of *Macra veneriformis* were investigated. Additionally, the tissues at different times during the exposure and elimination phases were determined. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) activity, variations in malondialdehyde (MDA) content, and changes to the microstructure of tissues were observed. The results showed that metolachlor induced or inhibited anti-oxidase activity under differing metolachlor concentrations. It was found that 10 µg/L of metolachlor significantly increased SOD activity in gill tissue, and different concentrations of metolachlor inhibited CAT activity in the gill and hepatopancreas. Metolachlor at 0.5 and 2.5 µg/L caused irreversible oxidative damage to SOD and CAT in the gills; the SOD and CAT activities in the gills of the 10 µg/L metolachlor concentration group was restored to the level of the control group during the elimination phase. The SOD and CAT activities in the hepatopancreas of the three concentrations groups were restored to or close to the level of the control group during elimination phase. Compared with SOD, the CAT activity was more susceptible to exogenous stimulation and was inhibited; this may be related to the sensitivity and mechanism of action of the two enzymes. After eliminating drug stress, the MDA content in the gills and hepatopancreas of all concentration groups had returned to or was lower than that of the control group. This suggests that the effects of metolachlor stress on lipid peroxidation in the gills and hepatopancreas of *Macra veneriformis* may be reversible. Metolachlor stress induced gill filament enlargement, ciliary shedding, epithelial cell damage, and digestive canal damage; the dose-time effect of two types of tissue damage was evident. However, the effect of drug stress on antioxidant enzymes in tissues did not exhibit a significant dose-effect; this does not correspond to tissue structure damage. It is speculated that there was insufficient damage caused by drug stress to breakdown the antioxidant enzyme system. Different concentrations of drug stress activated various antioxidant enzymes to maintain the physiological balance of the body; this aspect requires further investigation. The results of this study offers a reference for the risk assessment of marine ecosystems and achieving a controllable level of quality in shellfish aquaculture in tidal areas.

**Key words:** metolachlor; *Macra veneriformis*; antioxidant enzyme activity; tissue structure

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