

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19349

邻苯二甲酸二丁酯对厚壳贻贝抗氧化防疫系统的影响

许彩娜^{1,2}, 曾姣^{1,2}, 袁骥², 隋延鸣², 迟海², 王翠华²

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. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业农村部东海渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090

摘要: 邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)作为增塑剂, 已被中国列入优先控制的污染物名单, 其对海洋生物的影响已引起人们的广泛关注。为研究邻苯二甲酸酯类化合物(phthalic acid esters, PAEs)对海洋贝类抗氧化防疫系统的影响, 本文以厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)为受试生物, 研究了不同质量浓度 DBP (0 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、280 mg/L、360 mg/L)胁迫以及清水释放对其鳃和内脏团中抗氧化系统相关指标超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性以及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量变化的情况。结果表明: 厚壳贻贝鳃和内脏团 SOD、CAT 活性以及 MDA 含量呈现不完全相同的变化规律。DBP 胁迫阶段, 鳃和内脏团中 SOD 活性基本呈先诱导后抑制再诱导的趋势, CAT 活性则先抑制后诱导, MDA 含量基本呈不断升高趋势; 清水释放阶段, 鳃和内脏团中 SOD 活性基本呈先抑制后诱导的趋势, CAT 活性基本处于诱导状态, 之后内脏团 CAT 活性被抑制, MDA 含量处于先升高, 之后内脏团 MDA 含量出现降低的趋势, 浓度-效应和时间-效应较为明显。研究表明, 在 DBP 胁迫下, 厚壳贻贝鳃和内脏团产生了氧化损伤, 可诱导机体产生脂质过氧化现象, 且 15 d 清水释放期间不足以让厚壳贻贝恢复到正常水平。本研究旨在为海洋贝类的健康养殖和风险评估提供科学依据。

关键词: 邻苯二甲酸二丁酯; 厚壳贻贝; 抗氧化指标; 内脏团; 鳃

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)08-0934-09

邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)是一种非常重要的邻苯二甲酸酯类化合物(phthalic acid esters, PAEs), 被广泛用作增塑剂, 已被中国和美国列为重点控制的有害物质^[1], 被欧洲化学品管理局列为高度关注的物质^[2]。中国地下水规定 DBP 含量不得超过 3 $\mu\text{g/L}$ ^[3]。近年来, 随着塑料制品使用率的剧增, 直接导致中国泉州湾水域^[4]、长江流域^[5]、巢湖^[6]等水体, 南黄海^[7]、东海^[8-9]等海域沉积物^[10-11], 以及藻类^[12]、鱼类^[13-14]、贝类^[15]等海洋生物中均含有一定浓度的 DBP, 部分污染严重的区域, 如渤海海域 PAEs 含量高达 5.11 $\mu\text{g/L}$ ^[16]、松花江水体中相关浓度高达 5.62 mg/L ^[17], DBP 含量已经严重超标。因 DBP 具有三致(致癌、致畸、

致突变)毒性, 对海洋生态系统存在潜在危害。

目前, 国内外有关 DBP 对海洋生物影响的研究主要集中在浮游生物、甲壳动物、鱼类等生长、繁殖和发育等方面, 对贝类抗氧化防疫指标影响的研究尚少。海洋生物抗氧化防疫等生化指标作为反应污染物胁迫程度的重要指标, 在生态毒理学研究中应用广泛。厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)作为中国海水贝类养殖的主要种类之一, 在海洋环境中具有较强的生物富集能力, 可作为指示生物监测环境指标^[18]。为探究 PAEs 对海洋贝类抗氧化防疫系统的影响, 本研究以 DBP 为研究对象, 东海常见底栖生物厚壳贻贝作为受试生物, 针对 DBP 胁迫与清水释放两个阶段, 研究了厚壳贻贝

收稿日期: 2019-11-21; 修订日期: 2020-01-02.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0900603); 国家自然科学基金青年科学基金项目(41706142); 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(1968-2017).

作者简介: 许彩娜(1994-), 女, 硕士研究生, 从事海洋生态学与生物毒理学研究. E-mail: 18621836352@163.com

通信作者: 王翠华, 副研究员, 主要从事海洋科学研究. E-mail: wangch@ecsfa.ac.cn

鳃和内脏团中抗氧化酶活性[超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)]和脂质过氧化物丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的变化,以探讨 DBP 胁迫对厚壳贻贝生化指标的影响以及能否通过清水释放来恢复机体功能,相关研究成果可为海洋贝类的健康养殖和风险评估提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:酶标仪、组织破碎仪、TG16-WS 台式离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司)、电子天平。

试剂:邻苯二甲酸二丁酯标准品(99.4%,德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)和蛋白质测试试剂盒(南京建成生物工程研究所)、丙酮(色谱纯,美国 Tedia 公司)等。

1.2 实验材料

实验所用厚壳贻贝购于上海华伟生物有限公司,每只体重(80.23 ± 3.47) g,暂养 7 d 后选取健康、大小均匀的个体进行实验。DBP 浓度组为 100 mg/L、200 mg/L、280 mg/L、360 mg/L 以及溶剂对照组(丙酮<0.001%),DBP 的暴露溶液量为 8 L,每组放入 15 个厚壳贻贝。设置 3 个平行,每次从每个缸里取 2 个厚壳贻贝进行重复实验。实验水温(20.1 ± 1.2) °C,盐度 25.0 ± 1.3 ,pH 7.0~7.8,昼夜连续充气,每 2 d 更换实验用水以保证稳定的实验浓度,实验期间每天 9:00 和 16:00 分别投喂 1 次一定量的小球藻。

1.3 实验方法

分别于 DBP 胁迫的第 3 天、第 7 天、第 11 天、第 15 天和释放第 3 天(S3)、第 7 天(S7)、第 15 天(S15)进行取样,每组随机取 2 个厚壳贻贝进行实验,置于冰盘上用解剖刀快速取出鳃和内脏团,−80 °C 冷冻保存。实验时,用 0.86% 的预冷生理盐水进行淋洗,滤纸吸附后用组织破碎仪进行匀浆,比例为 1/9 [组织质量(g)/缓冲液体积(mL)],3000 r/min 离心 10 min 后,立即取上清液进行蛋白质含量和酶活力测定,脂质过氧化水平以 MDA 含量进行测定,蛋白质和酶活性(SOD、CAT 活性)

测定方法按照相关试剂盒使用说明操作。

1.4 数据处理

实验结果采用平均数±标准差($\bar{x} \pm SD$)进行表示,用统计分析软件 SPSS 25.0 在溶剂对照组(CK)和各 DBP 染毒组间进行单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用最小显著差异法(LSD), $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著,并用 ORIGIN 8.6 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 DBP 对厚壳贻贝鳃和内脏团 SOD 活性的影响

2.1.1 DBP 胁迫期间 SOD 活性的影响 DBP 胁迫和释放下厚壳贻贝鳃和内脏团中 SOD 酶活性的变化如图 1 所示。由图可知,DBP 胁迫阶段,暴露时间相同,随着 DBP 浓度的增加,鳃和内脏团中 SOD 活性基本呈先诱导后抑制的趋势,浓度-效应较明显。如鳃在胁迫第 3 天时,相对于溶剂对照组,各浓度组处于显著诱导状态($P < 0.05$);第 7 天时,各浓度组基本处于抑制状态,360 mg/L 浓度组处于诱导状态;胁迫后期各浓度组基本呈先抑制后诱导的趋势,而 200 mg/L 浓度组呈先诱导后抑制的趋势;内脏团各浓度组在胁迫前期呈诱导状态($P < 0.01$),浓度越高,诱导程度越大,浓度-效应明显;第 11 天时,各浓度组基本呈极显著抑制状态($P < 0.01$),浓度-效应较明显,而 280 mg/L 浓度组处于诱导状态,可能是由于胁迫期间,该浓度下内脏团受污染较严重,产生过多的超氧阴离子自由基,导致 SOD 活性出现诱导现象;第 15 天时,100 mg/L、200 mg/L 浓度组处于抑制状态,280 mg/L、360 mg/L 浓度组处于诱导状态($P < 0.05$)。这与 Huang 等^[19]研究 DBP 胁迫下,金鱼(*Carassius auratus*) SOD 活性出现的结果类似,说明 DBP 胁迫期间,可诱导产生活性氧自由基,造成厚壳贻贝的氧化损伤。

暴露浓度相同,随着胁迫时间的延长,鳃和内脏团中 SOD 活性基本呈先诱导后抑制再诱导的趋势,时间-效应较明显。鳃组织中 200 mg/L 浓度组在第 15 天时呈抑制状态,而内脏团 100 mg/L、200 mg/L、360 mg/L 浓度组基本呈先诱导后抑制的趋势,360 mg/L 在第 15 天时又呈诱导状态,

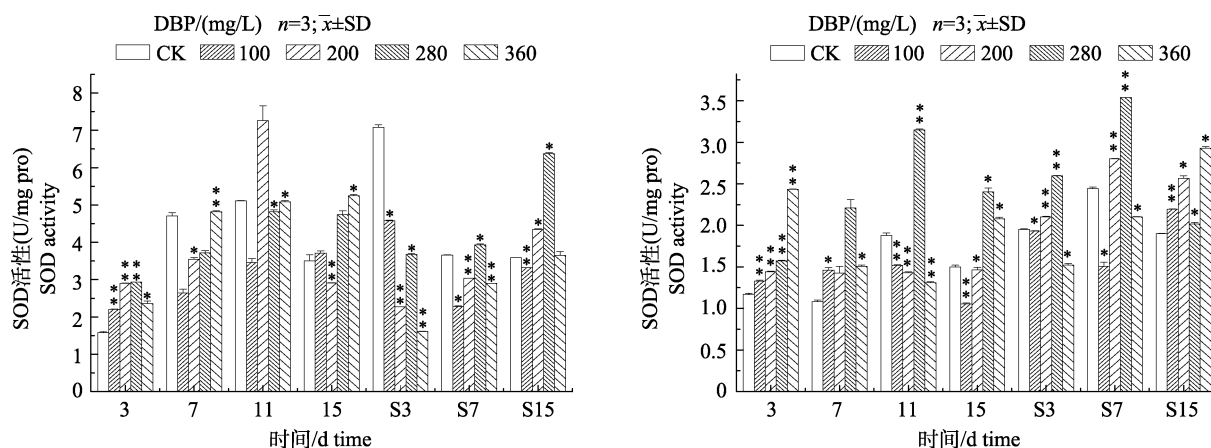


图 1 不同浓度 DBP 对厚壳贻贝(左)和内脏团(右)SOD 活性的影响

CK 为溶剂对照组, *表示与溶剂对照组比较有显著性差异($P<0.05$), **表示与溶剂对照组相比有极显著差异($P<0.01$).

Fig. 1 Effect of different concentrations of DBP on SOD activity in gill (left) and visceral mass (right) of *Mytilus coruscus*

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

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

280 mg/L 浓度组则一直处于诱导状态, 诱导程度先升高后降低。这与秦洁芳^[20]研究邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯(DEHP)胁迫下翡翠贻贝(*Perna viridis*)内脏团 SOD 活性先诱导后抑制的结果类似。可能是各浓度 DBP 在胁迫前期产生了超氧阴离子自由基, 诱导机体 SOD 的活性, 随着暴露时间的延长, 超氧阴离子自由基超过了抗氧化酶的自我清除能力, 导致细胞受到损伤, 进而造成 SOD 活性的降低^[21]。

2.1.2 清水释放期间 SOD 活性的影响 清水释放阶段, 暴露时间相同, 随着 DBP 浓度的增加, 鳃和内脏团中 SOD 活性基本呈先抑制后诱导的趋势。当释放第 3 天和第 7 天时, 鳃各浓度组基本处于显著抑制状态($P<0.05$), 但第 3 天时 100 mg/L 浓度组和第 7 天的 280 mg/L 浓度组的 SOD 活性呈诱导趋势; 第 15 天时, 各浓度组基本呈诱导状态, 而 100 mg/L 浓度组处于极显著抑制状态($P<0.01$); 而对于内脏团, 当释放第 3 天和第 7 天时, 100 mg/L、360 mg/L 浓度组 SOD 活性处于抑制状态, 200 mg/L、280 mg/L 浓度组处于极显著诱导状态($P<0.01$); 第 15 天时, 各浓度组均处于显著诱导状态($P<0.05$)。

暴露浓度相同, 随着释放时间的延长, 鳃和内脏团中 SOD 活性基本呈先抑制后诱导的趋势, 时间-效应较明显, 但鳃组织的 100 mg/L 浓度组

一直处于抑制状态($P<0.05$); 内脏团中 100 mg/L、360 mg/L 浓度组基本呈先抑制后诱导的趋势, 200 mg/L 浓度组一直处于诱导状态, 280 mg/L 浓度组呈先诱导后抑制的趋势。且鳃组织在第 15 天时, 360 mg/L 浓度组基本恢复至对照组水平, 其他浓度仍处于显著抑制或诱导的状态($P<0.05$)。而内脏团第 15 天时, 各浓度组都处于诱导状态, 这与黄志斐等^[22]研究一溴联苯醚胁迫解除后对翡翠贻贝外套膜和内脏团中 SOD 活性的影响一致, 表明仅个别浓度组抗氧化指标能恢复至对照组水平, 大多数指标均出现诱导-抑制的波动状态, 可能由于持续胁迫已经对机体造成了损伤。

2.2 DBP 对厚壳贻贝鳃和内脏团 CAT 活性的影响

2.2.1 DBP 胁迫期间 CAT 活性的影响 DBP 胁迫和释放阶段下对厚壳贻贝鳃和内脏团 CAT 活性的影响如图 2 所示。DBP 胁迫阶段, 暴露时间相同, 随着 DBP 浓度的增加, 鳃和内脏团中 CAT 活性基本呈先抑制后诱导的趋势, 浓度-效应较明显; 鳃在胁迫第 3 天和 7 天时, 相对于溶剂对照组, 各浓度组基本呈显著抑制状态($P<0.05$), 但 200 mg/L 浓度组呈先诱导后抑制的状态($P<0.01$), 浓度-效应明显; 第 11 天时, 各浓度组呈显著诱导状态, 基本表现为浓度越高, 诱导程度越大; 第 15 天时, 100 mg/L、200 mg/L 浓度组处于诱导状态, 而 280 mg/L、360 mg/L 浓度组处于显著抑

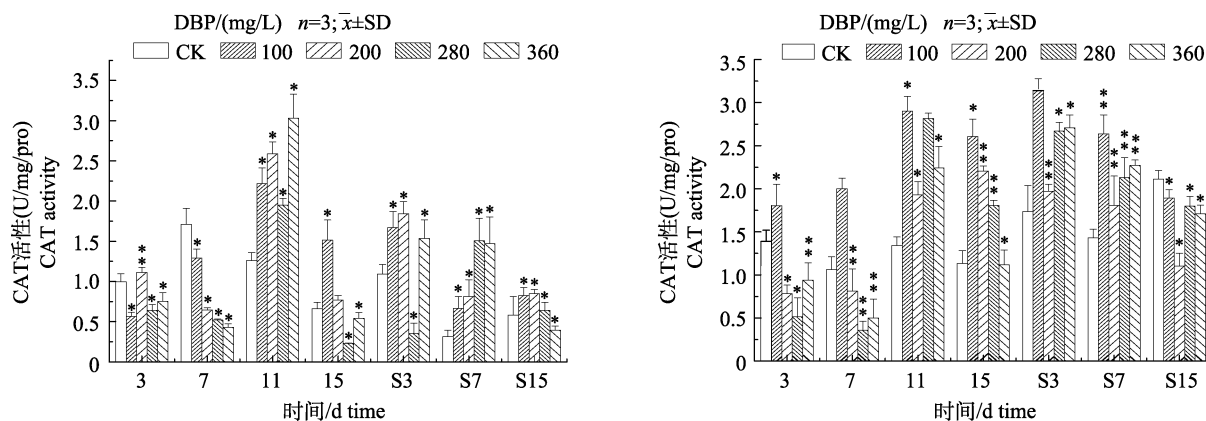


图 2 不同浓度 DBP 对厚壳贻贝鳃(左)和内脏团(右)CAT 活性的影响

CK 为溶剂对照组, *表示与溶剂对照组比较有显著性差异($P<0.05$), **表示与溶剂对照组相比有极显著差异($P<0.01$).

Fig. 2 Effect of different concentrations of DBP on CAT activity in gill (left) and visceral mass (right) of *Mytilus coruscus*

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

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

制状态,基本表现为浓度越高,抑制程度越大;内脏团在胁迫第 3 天时,各浓度组基本处于抑制状态($P<0.05$),100 mg/L 浓度组处于显著诱导状态($P<0.05$);第 7 天时,基本表现为浓度越高,抑制程度越大,浓度-效应明显;胁迫后期,各浓度组均处于显著诱导状态($P<0.05$),基本表现为浓度越高,诱导程度越小,浓度-效应明显。

暴露浓度相同,随着胁迫时间的延长,鳃和内脏团中 CAT 活性基本呈先抑制后诱导的趋势,时间-效应较明显;鳃中 100 mg/L、280 mg/L、360 mg/L 浓度组呈先抑制后诱导的趋势,而 280 mg/L、360 mg/L 浓度组在第 15 天时又出现抑制状态,200 mg/L 浓度组则处于先诱导后抑制再诱导的趋势;内脏团中 200 mg/L、280 mg/L、360 mg/L 浓度组处于先抑制后诱导的趋势,360 mg/L 浓度组在第 15 天时出现抑制状态,100 mg/L 浓度组一直处于诱导状态,诱导程度先增大后减小,该结果可能是由于自由基蓄积导致的,这与 Gao 等^[23]研究 DBP 胁迫下,小麦(*Triticum aestivum* L.)幼苗 CAT 活性的变化类似,胁迫造成机体明显的氧化损伤。

2.2.2 清水释放期间 CAT 活性的影响 清水释放阶段,暴露时间相同,随着 DBP 浓度的升高,鳃的 CAT 活性基本呈诱导状态,而内脏团 CAT 活性基本上呈先诱导后抑制的趋势,浓度-效应较明显;当释放第 3 天,鳃各浓度组基本呈显著诱

导状态($P<0.05$),280 mg/L 浓度组则处于抑制状态,随着浓度的升高,诱导程度先增大后减小;第 7 天时,各浓度组均处于诱导状态($P<0.05$),浓度越高,诱导程度越大,浓度-效应较明显;第 15 天时,浓度越高,诱导程度越小,360 mg/L 浓度组处于显著抑制状态($P<0.05$);而内脏团 CAT 活性基本呈先诱导后抑制的趋势。当释放第 3 天与第 7 天时,各浓度基本处于诱导状态,浓度越高,诱导程度越小,200 mg/L 浓度组则呈先诱导后抑制的趋势;第 15 天时,各浓度组均处于显著抑制状态($P<0.05$),浓度越高,抑制程度越大。

暴露浓度相同,随着释放时间的延长,鳃和内脏团中 CAT 活性基本呈诱导状态,之后内脏团 CAT 活性被抑制,时间-效应较明显;鳃各浓度组基本处于诱导状态,释放时间越长,诱导程度越小,360 mg/L 浓度组在第 15 天时又出现抑制状态,280 mg/L 浓度组则处于先抑制后诱导的状态;内脏团各浓度组均呈先诱导后抑制的趋势,基本表现为浓度越大,诱导程度越小,到第 15 天时各浓度处于抑制状态,并且部分浓度接近对照组水平。这与黄周英等^[24]研究三丁基锡胁迫解除 20 d 后,文蛤(*Meretrix meretrix*)鳃 CAT 活性基本上能恢复至对照组水平以及杨涛等^[25]研究菲对翡翠贻贝(*Perna viridis*)内脏团胁迫解除后, CAT 活性表现出一定程度恢复的结果类似,表明厚壳贻贝鳃和内脏团虽承受能力存在差异,应激反应不

尽相同,但能对一定程度 DBP 胁迫带来的氧化损伤进行自我修复。

2.3 DBP 对厚壳贻贝鳃和内脏团 MDA 含量的影响

2.3.1 DBP 胁迫期间 MDA 含量的影响 图 3 为 DBP 胁迫和释放阶段下对厚壳贻贝鳃和内脏团 MDA 含量的影响。DBP 胁迫阶段,暴露时间相同,随着 DBP 浓度的增加,鳃基本呈升高状态,而内脏团基本呈升高降低交替出现,浓度-效应较明显;鳃胁迫第 3 天和第 7 天时,MDA 含量相对于溶剂对照组显著升高($P<0.05$),随着浓度的升高,升高程度先增大后减小再增大,但第 7 天时 360 mg/L 浓度组呈极显著降低($P<0.01$)。胁迫后期,各浓度组基本呈极显著升高的趋势,但第 15 天时 200 mg/L、360 mg/L 浓度组呈显著降低的趋势($P<0.05$);内脏团各浓度组在胁迫前期,随着浓度的升高,MDA 含量基本逐渐升高,浓度-效应较明显,但第 3 天的 200 mg/L 和第 7 天的 100 mg/L 浓度组则呈降低状态($P<0.05$);第 11 天时,100 mg/L、280 mg/L 浓度组处于极显著降低状态($P<0.01$),200 mg/L、360 mg/L 浓度组处于升高状态;第 15 天时,随着浓度的升高,MDA 含量升高程度减小,100 mg/L 浓度组已基本恢复到溶剂对照组水平,而 360 mg/L 浓度组处于降低状态。

暴露浓度相同,随着胁迫时间的延长,鳃和内脏团中 MDA 含量呈不断升高的趋势,时间-效

应明显;鳃组织的 100 mg/L、280 mg/L 浓度组处于升高状态,第 15 天时,100 mg/L 浓度组处于降低趋势,200 mg/L、360 mg/L 浓度组则先降低后升高再降低;而内脏团中各浓度组基本呈先升高后降低的趋势,200 mg/L、280 mg/L 浓度组在第 15 天时又出现升高的趋势,100 mg/L 浓度组则先降低后升高。这说明 DBP 胁迫期间,诱导机体产生了活性氧自由基,激活了厚壳贻贝体内的抗氧化酶系统,但自由基无法及时清除,导致 MDA 含量升高,脂质过氧化水平也相应升高。

2.3.2 清水释放期间 MDA 含量的影响 清水释放阶段,暴露时间相同,随着 DBP 浓度的增加,鳃和内脏团 MDA 含量基本呈先升高状态,之后内脏团出现降低的趋势,时间-效应较明显;当释放第 3 天时,鳃各浓度组 MDA 含量呈极显著升高($P<0.01$),随着浓度的升高,升高程度先增大后减小再增大;第 7 天和第 15 天时,各浓度组呈显著升高状态($P<0.01$),360 mg/L 浓度组则呈降低状态,随着浓度的升高,MDA 含量基本处于先升高后降低的趋势;内脏团在释放第 3 天时,各浓度组基本处于升高状态($P<0.05$),随着浓度的升高,升高程度先增大后减小再增大,100 mg/L 浓度组处于降低状态;第 7 天时,100 mg/L、200 mg/L 浓度组出现极显著升高($P<0.01$),280 mg/L、360 mg/L 浓度组和对照组水平接近,说明在海水释放阶段厚壳贻贝的抗氧化防御能力表现出一定

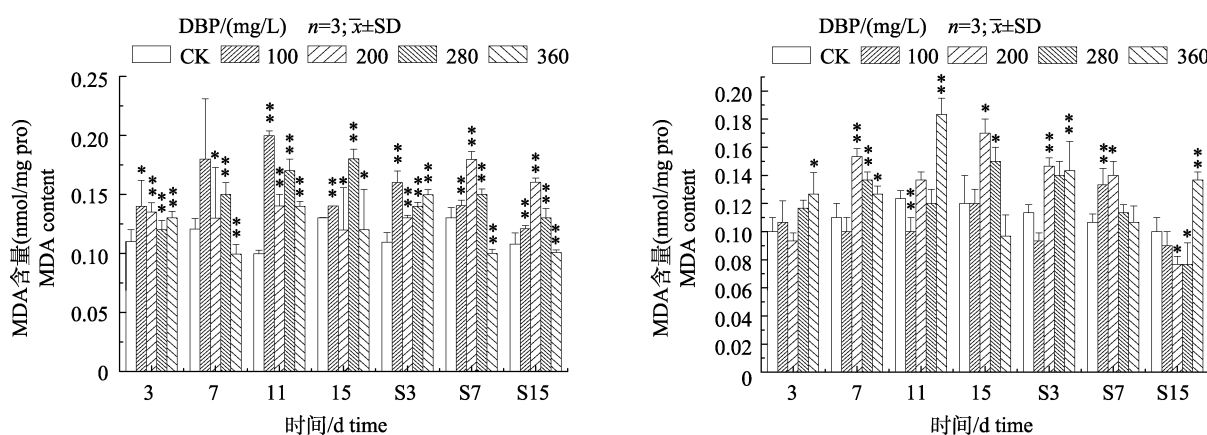


图 3 不同浓度 DBP 对厚壳贻贝鳃(左)和内脏团(右)MDA 含量的影响

CK 为溶剂对照组,*表示与溶剂对照组比较有显著性差异($P<0.05$),**表示与溶剂对照组相比有极显著差异($P<0.01$).

Fig. 3 Effect of different concentrations of DBP on MDA content in gill (left) and visceral mass (right) of *Mytilus coruscus*

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

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

程度的恢复能力。第15天时,各浓度组呈显著降低状态($P<0.05$),360 mg/L 浓度组则处于极显著升高状态($P<0.01$)。

暴露浓度相同,随着释放时间的延长,鳃和内脏团中 MDA 含量变化趋势不尽相同,鳃中 MDA 含量呈先升高后降低的趋势,而内脏团基本呈降低的趋势;鳃中各浓度组基本呈先升高后降低的趋势,280 mg/L 浓度组则呈先降低后升高再降低的趋势;而内脏团中 MDA 含量基本呈降低的趋势,其中 100 mg/L 浓度组呈先降低后升高再降低的趋势,200 mg/L、280 mg/L 浓度组呈不断降低的趋势,360 mg/L 浓度组呈先升高后降低再升高的趋势。可见 DBP 胁迫下,厚壳贻贝鳃和内脏团的过氧化损伤明显,脂质过氧化水平明显升高。

3 讨论

3.1 DBP 胁迫阶段厚壳贻贝抗氧化防疫系统的响应机制

贝类的抗氧化防疫系统是抵御外界环境污染侵害的重要防御手段,环境污染物对防疫系统的干扰可能会对预防感染的能力产生负面影响,并影响生物体的健康。其中 SOD 是抗氧化防疫系统的第一道防线,可清除体内过多的超氧阴离子;CAT 则能将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 ,清除机体过多的 H_2O_2 ;MDA 是当机体受到污染物胁迫时,体内积累的自由基攻击不饱和脂肪酸,导致脂质过氧化而形成的最终产物,其含量可用于反应机体的损伤程度。

本研究中,DBP 胁迫下,厚壳贻贝鳃和内脏团中 SOD、CAT 活性基本呈先诱导状态,MDA 含量呈升高的状态,具有一定的浓度-时间效应。胁迫第3天,鳃和内脏团中 SOD 活性被显著诱导,同时鳃组织的 200 mg/L 浓度组以及内脏团的 100 mg/L 浓度组 CAT 活性也处于诱导状态,说明 DBP 胁迫下,诱导机体产生了活性氧自由基,以减少自由基对细胞的损害。随着胁迫时间的延长和浓度的升高,机体大部分浓度组 SOD、CAT 活性又表现为抑制-诱导的趋势,可能是由于厚壳贻贝体内抗氧化系统不能及时清除过量的氧自由基,当 DBP 胁迫超过了机体所承受的范围,即对

细胞造成了一定的氧化损伤,致使 SOD、CAT 活性受到抑制,之后再被诱导升高可能与 DBP 的代谢消耗和厚壳贻贝的自我修复调节有关。这与秦洁芳^[20]研究 DBP 持续胁迫下,翡翠贻贝内脏团中 SOD、CAT 活性变化趋势类似。同时也与纪红蕊等^[26]研究 DBP 胁迫下,显著降低小鼠(*Mus musculus*)肝脏 CAT 活性,诱发脂质过氧化,引起肝脏损伤的结果一致。但本研究中 CAT 活性未和 SOD 活性表现完全的同步性,主要原因一方面可能是生物体存在 CAT 的代偿机制^[27], H_2O_2 不仅来源于活性氧自由基的歧化反应,还可由氨基酸或细胞色素 P450 氧化酶催化产生^[28];另一方面 SOD 活性升高,催化分解 H_2O_2 的浓度短时间突然升高,抑制了 CAT 的活性^[29],进而导致此现象的发生,但符合生物体抗氧化酶响应机制。

而 DBP 胁迫下,鳃和内脏团中 MDA 含量虽波动较大,但相对于对照组均有所上升,这与 Xu 等^[30]发现 DBP 胁迫导致斑马鱼(*Brachy danio rerio*)胚胎发生氧化应激,MDA 含量显著增加的结果类似。表明 DBP 胁迫下,机体的抗氧化系统功能受到抑制,无法及时清除体内积累的自由基,导致脂质过氧化发生,引起 MDA 含量升高,从而造成细胞凋亡。随着胁迫时间的延长和浓度的升高,鳃和内脏团中 MDA 含量基本呈升高降低交替出现,这与 DMP 胁迫下,蚯蚓(*Eisenia fetida*)MDA 含量先升高后降低再增加的趋势类似^[31]。说明不同浓度 DBP 处理下 MDA 含量存在差异,机体受到氧化损伤的程度可能与 DBP 浓度密切相关,抗氧化系统能出现反复,说明机体处于不断调整中。但不同组织之间,变化存在差异,这可能与组织吸收代谢过程中产生的延迟效应有关^[20]。

3.2 释放阶段厚壳贻贝抗氧化防疫系统的响应机制

一般生物体胁迫产生的应激效应会随着释放而逐渐恢复。本研究中,在清水释放阶段,鳃和内脏团 SOD 活性的变化基本呈先诱导后抑制再诱导的趋势;鳃和内脏团 CAT 活性的变化则基本处于先诱导的状态,之后随着释放时间的延长,内脏团的 CAT 活性又出现抑制的趋势;而 MDA 含量基本表现为先升高后降低的趋势。

DBP 胁迫解除后, SOD、CAT 活性出现诱导的原因可能是由于 DBP 被代谢排出后的恢复性上升, 存在反应过激效应, 从而导致脂质过氧化加剧, MDA 含量升高。随着释放时间的延长, 鳃组织 SOD 活性中 360 mg/L 浓度组在第 15 天时基本恢复至对照组水平, 内脏团 100 mg/L 浓度组在第 3 天时基本恢复至对照组水平, 280 mg/L 浓度组在第 15 天时基本恢复至对照组水平。造成此现象的原因还可能与两种组织在机体内的功能不同有关, 这与董冉等^[32]发现 0#柴油水溶性成分胁迫解除后, 黑鲷(*Sparus macrocephalus*)肝脏和鳃中的 SOD、CAT 活性表现存在差异结果类似。内脏团是主要的代谢器官, 而鳃的主要功能是进行气体交换, 内脏团的解毒能力要强于鳃, 所以内脏团 SOD 活性基本恢复至对照组的速度要强于鳃。之后 SOD、CAT 活性诱导程度逐渐降低, 甚至出现抑制状态, 可能是由于厚壳贻贝将 DBP 转化为脂溶性物质排出体外, 从而使体内的自由基减少, 脂质过氧化程度减弱, MDA 含量降低。但部分浓度组 SOD 和 CAT 活性已接近对照组水平, MDA 含量仍处于升高状态, 这可能是由于 DBP 胁迫对其造成了一定的氧化损伤。这与蔡文贵等^[33]发现 DEHP 胁迫解除后, 翡翠贻贝内脏团的低浓度组 SOD 和 CAT 活性逐渐恢复到对照组水平, 但 MDA 含量仍处于升高状态的现象一致。简而言之, 海洋生物体中抗氧化酶活性的变化是一个动态过程, 其可能受环境、浓度、生物个体、组织差异等多因素的影响, 因此需综合考虑其响应机制。

4 结论

本文从氧化损伤的角度评价了 DBP 对厚壳贻贝鳃和内脏团的影响, 研究表明: DBP 胁迫阶段, SOD、CAT 活性以及 MDA 含量在胁迫初期基本处于诱导升高的状态, 之后又处于抑制降低再诱导升高的状态, 浓度-效应及时间-效应均较为明显; 而清水释放期间, 部分指标能接近对照组水平, 但多数仍处于诱导或抑制的状态, 说明 DBP 胁迫期间产生的氧化损伤, 在短时间内较难恢复, 此结果为海洋贝类的健康养殖、风险评价和海洋生物的生态毒理学提供理论依据。

参考文献:

- [1] Singh N, Dalal V, Kumar P. Structure based mimicking of Phthalic acid esters (PAEs) and inhibition of hACMSD, an important enzyme of the tryptophan kynurenine metabolism pathway[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 108: 214-224.
- [2] Salaudeen T, Okoh O, Agunbiade F, et al. Fate and impact of phthalates in activated sludge treated municipal wastewater on the water bodies in the Eastern Cape, South Africa[J]. Chemosphere, 2018, 203: 336-344.
- [3] Bureau of National Standar. GB 3838-2002, Surface water environmental quality standards[S]. Beijing: Standards Press of China, 2002. [国家标准局. GB 3838-2002, 地表水环境质量标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.]
- [4] Hu H M, Li T J, Zhang L, et al. Determination and ecological risk assessment of phthalic acid esters in marine sediments[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2019, 45(3): 365-375. [胡红美, 李铁军, 张露, 等. 海洋沉积物中邻苯二甲酸酯类环境激素的测定及其生态风险评估[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2019, 45(3): 365-375.]
- [5] Dong M T, Luo Z J, Ye Z H, et al. Contamination and ecological risk of phthalate acid esters in sediments around wasted plastic processing and recycling industries[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2019, 39(5): 1607-1616. [董明潭, 罗泽娇, 叶志航, 等. 废塑料再生企业排污河道沉积物酞酸酯污染特征与生态风险评价[J]. 环境科学学报, 2019, 39(5): 1607-1616.]
- [6] Kang L, Wang Q M, He Q S, et al. Current status and historical variations of phthalate ester (PAE) contamination in the sediments from a large Chinese lake (Lake Chaohu)[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(11): 10393-10405.
- [7] Li M F, Zhang D H, Duan X Y, et al. Distribution of phthalic acid esters (PAEs) in surface sediments of the Southern Yellow Sea[J]. Marine Environmental Science, 2014, 33(5): 682-687. [李孟芳, 张大海, 段晓勇, 等. 南黄海表层沉积物中邻苯二甲酸酯的分布特征[J]. 海洋环境科学, 2014, 33(5): 682-687.]
- [8] Yang D D, Feng L J, Li M F, et al. Occurrence and distribution characteristics of phthalic acid esters (PAEs) in surface sediments of the East China Sea[J]. Periodical of Ocean University of China, 2016, 46(3): 74-81. [杨丹丹, 冯丽娟, 李孟芳, 等. 东海表层沉积物中邻苯二甲酸酯的分布特征[J]. 中国海洋大学学报, 2016, 46(3): 74-81.]
- [9] Cao L, Zhang C S, Chen Q L, et al. Progress in the study of environmental pollution and ecological behavior and toxicological effects of phthalate ester[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(2): 34-46. [曹龙, 张朝升, 陈秋丽, 等. 邻苯二甲酸酯的环境污染和生态行为及毒理效应研究进展[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(2): 34-46.]
- [10] Chen H, Mao W, Shen Y Q, et al. Distribution, source, and environmental risk assessment of phthalate esters (PAEs) in water, suspended particulate matter, and sediment of a typical Yangtze River Delta City, China[J]. Environmental Sci-

- ence and Pollution Research, 2019, 26: 24609-24619.
- [11] Wang H, Liang H, Gao D W. Occurrence and distribution of phthalate esters (PAEs) in wetland sediments[J]. Journal of Forestry Research, 2017, 28(6): 1241-1248.
- [12] Babu B, Wu J T. Production of phthalate esters by nuisance freshwater algae and cyanobacteria[J]. Science of the Total Environment, 2010, 408(21): 4969-4975.
- [13] Li L, Jiang M, Wang Y L. Toxic effects of DBP and DOP on early life stage of *Pseudosciaena crocea*[J]. Marine Fisheries, 2019, 41(3): 346-353. [李磊, 蒋玫, 王云龙. 邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二辛酯对大黄鱼受精卵及仔鱼的急性毒性效应[J]. 海洋渔业, 2019, 41(3): 346-353.]
- [14] Zhou J, Cai Z H, Xing K Z. Potential mechanisms of phthalate ester embryotoxicity in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. Environmental Pollution, 2011, 159(5): 1114-1122.
- [15] Su H B, Wang X Q, Cao M, et al. Effects of PAEs on the toxicity and immunity of *Macraa veneriformis*[J]. Journal of Huaihai Institute of Technology (Natural Science Edition), 2015, 24(4): 83-86. [苏洪波, 王兴强, 曹梅, 等. PAEs 对四角蛤蜊毒性和免疫的影响[J]. 淮海工学院学报(自然科学版), 2015, 24(4): 83-86.]
- [16] Zhang Z M, Zhang H H, Zou Y W, et al. Distribution and ecotoxicological state of phthalate esters in the sea-surface microlayer, seawater and sediment of the Bohai Sea and the Yellow Sea[J]. Environmental Pollution, 2018, 240: 235-247.
- [17] Zeng T, Wang C Y, Zhang Y, et al. Study on mechanism for photolysis and photocatalysis of DBP[J]. Journal of Jiangxi University of Science and Technology, 2019, 40(3): 56-61. [曾婷, 王春英, 张阳, 等. 典型邻苯二甲酸酯 DBP 光解及光催化降解机制研究[J]. 江西理工大学学报, 2019, 40(3): 56-61.]
- [18] Qu C K, Liu S B, Tang Z R, et al. Response of a novel selenium-dependent glutathione peroxidase from thick shell mussel *Mytilus coruscus* exposed to lipopolysaccharide, copper and benzo[α]pyrene[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 89: 595-602.
- [19] Huang B Y, Feng M B, Li D L, et al. Antagonistic joint toxicity assessment of two current-use phthalates with water-borne copper in liver of *Carassius auratus* using biochemical biomarkers[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 116: 107-112.
- [20] Qin J F. The effects of phthalate acid esters (PAEs) on green mussel (*Perna viridis*), crimson snapper (*Lutjanus erythropterus*) and river snapper (*Lutianus argentimaculatus*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011: 1-60. [秦洁芳. 邻苯二甲酸酯类化合物对翡翠贻贝、红鳍笛鲷和紫红笛鲷的毒性效应[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011: 1-60.]
- [21] Stebbing A R D. Hormesis—The stimulation of growth by low levels of inhibitors[J]. Science of the Total Environment, 1982, 22(3): 213-234.
- [22] Huang Z F, Ma S W, Zhang J, et al. Effects of BDE3 on SOD, MDA and GSH of *Perna viridis*[J]. South China Fisheries Science, 2012, 8(5): 25-30. [黄志斐, 马胜伟, 张喆, 等. BDE3 胁迫对翡翠贻贝(*Perna viridis*) SOD、MDA 和 GSH 的影响[J]. 南方水产科学, 2012, 8(5): 25-30.]
- [23] Gao M L, Dong Y M, Zhang Z, et al. Growth and antioxidant defense responses of wheat seedlings to di-n-butyl phthalate and di (2-ethylhexyl) phthalate stress[J]. Chemosphere, 2017, 172: 418-428.
- [24] Huang Z Y, Wang C G, Zuo Z H, et al. Effects of tributyltin on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in the gill of hard clam *Meretrix meretrix*[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2005, 25(10): 1408-1413. [黄周英, 王重刚, 左正宏, 等. 三丁基锡对文蛤鳃的抗氧化酶活性及脂质过氧化的影响[J]. 环境科学学报, 2005, 25(10): 1408-1413.]
- [25] Yang T, Chen H G, Cai W G, et al. Effects of phenanthrene on antioxidant defense system of viscera in green-lipped mussel (*Perna viridis*)[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2011, 17(4): 504-508. [杨涛, 陈海刚, 蔡文贵, 等. 翡翠贻贝内脏团抗氧化防御系统对非胁迫的生物响应[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(4): 504-508.]
- [26] Ji H R, Du X, Song Y B, et al. Toxic effect and mechanisms of dibutyl phthalate[J]. Journal of Shenyang University of Technology, 2017, 39(2): 230-235. [纪红蕊, 杜霞, 宋永彬, 等. 邻苯二甲酸二丁酯的毒性作用及机制[J]. 沈阳工业大学学报, 2017, 39(2): 230-235.]
- [27] Ramaprasad T R, Baskaran V, Krishnakantha T P, et al. Modulation of antioxidant enzyme activities, platelet aggregation and serum prostaglandins in rats fed spray-dried milk containing n-3 fatty acid[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2005, 280(1-2): 9-16.
- [28] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [29] Zhang Y K, Song X K, Liu A Y, et al. Effects of Cd^{2+} on SOD activity CAT activity, and MDA content in the gill of *Meretrix meretrix*[J]. Journal of Safety and Environment, 2011, 11(6): 19-23. [张宜奎, 宋秀凯, 刘爱英, 等. Cd^{2+} 胁迫对文蛤鳃组织 SOD、CAT 活性及 MDA 含量的影响[J]. 安全与环境学报, 2011, 11(6): 19-23.]
- [30] Xu H, Shao X L, Zhang Z, et al. Oxidative stress and immune related gene expression following exposure to di-n-butyl phthalate and diethyl phthalate in zebrafish embryos[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2013, 93: 39-44.
- [31] Song P P, Gao J P, Li X X, et al. Phthalate induced oxidative stress and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*)[J]. Environment International, 2019, 129: 10-17.
- [32] Dong R, Jiang M, Li L, et al. Effects of water-soluble fraction in No.0 diesel oil exposure on the antioxidase activities in liver, gill and muscle of *Sparus microcephalus*[J]. Marine Fisheries, 2016, 38(2): 190-197. [董冉, 蒋玫, 李磊, 等. 0# 柴油水溶性成分对黑鲷肝脏、鳃、肌肉组织中抗氧化酶活性的影响[J]. 海洋渔业, 2016, 38(2): 190-197.]
- [33] Cai W G, Qin J F, Jia X P, et al. Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on the biochemical indices of green mussel (*Perna viridis*)[J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(1): 100-105. [蔡文贵, 秦洁芳, 贾晓平, 等. 邻苯二甲酸二乙基己酯对翡翠贻贝(*Perna viridis*)生化指标的影响[J]. 生态学杂志, 2012, 31(1): 100-105.]

Effect of dibutyl phthalate on the antioxidant and epidemic prevention systems of *Mytilus coruscus*

XU Caina^{1,2}, ZENG Jiao², YUAN Qi², SUI Yanming², CHI Hai², WANG Cuihua²

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

2. Key Laboratory of East China Sea Fishery Resource Exploitation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China

Abstract: Dibutyl phthalate (DBP), a kind of plasticizer, had been included in the priority control pollutants list in China. The impact on marine organisms has caused widespread concern. At present, the research on the impact of DBP on marine organisms focuses on the growth, reproduction, and development of plankton, crustaceans, and fish. There are limited studies on the effects of antioxidant indicators in shellfish. Biochemical indicators such as antioxidants and disease resistance of organisms are important indicators of the degree of stress in response to pollutants and are widely used in ecotoxicology research. As one of the main varieties of seawater shellfish cultured in China, *Mytilus coruscus* has a strong bioaccumulation in the marine environment and can be used as a biomonitoring species for environmental pollution. To study the changes of the antioxidant defense system, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity, and malondialdehyde (MDA) content in the gills and visceral mass of *M. coruscus* at five concentrations of DBP (0 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 280 mg/L, and 360 mg/L), with two stages of clear water flushes, were measured. This was to explore the effect of DBP stress on the biological indicators of *M. coruscus* and to determine whether the function of the body could be restored by the flushes of clear water. The experimental results show that the activities of SOD, CAT, and MDA content in gills and visceral mass of *M. coruscus* were not identical. Under DBP stress, SOD activity in gills and visceral mass was basically increased, then decreased, and then increased; CAT activity was decreased first and then increased; MDA content generally increased. When they were transferred to clean seawater, the activity of SOD in the gills and visceral mass of *M. coruscus* showed a trend of decreasing first and then increasing, and CAT activity was increased first. After CAT activity in the visceral mass decreased, and the MDA content in the gills increased, the visceral mass showed a trend of increasing CAT activity first and then decreasing, and the concentration-effect and time-effect were more obvious. This indicated that, under DBP stress, the body was induced to produce reactive oxygen free radicals to reduce the damage of free radicals to cells. With the prolongation of stress time and the increase in concentration, the activity of SOD and CAT in most concentration groups showed a trend of decreasing first and then increasing, which may be because of the inability of the antioxidant system in *M. coruscus* to remove excess oxygen free radicals in time. When the DBP stress exceeds the capacity of the body (which causes a certain amount of oxidative damage to the cells), SOD and CAT activity is inhibited, and the tendency to increase may be related to the metabolic consumption of DBP and the self-repairing regulation of *M. coruscus*. It can induce the body to perform lipid peroxidation, which will cause the increase in MDA content. This damage is difficult to return to normal with a release of clean seawater. Although SOD and CAT activity did not show complete synchronization, this phenomenon is consistent with the organism's antioxidant enzyme response mechanism. In short, the change of antioxidant enzyme activity in marine organisms is a dynamic process, which may be affected by many factors such as environment, concentration, biological individual, and tissue differences. Therefore, it is necessary to comprehensively consider the response mechanism. The results of this paper evaluated the effect of DBP on *M. coruscus* from the perspective of oxidative damage, and provided reference data for the comprehensive understanding of the mechanism of DBP on marine organisms in the future, and provides a scientific basis for aquaculture health and risk assessment of marine shellfish.

Key words: dibutyl phthalate; *Mytilus coruscus*; antioxidant indexes; visceral mass; gill

Corresponding author: WANG Cuihua. E-mail: wangch@ecsf.ac.cn