

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200811002

http://www.yykxjz.cn/

曾梦妮, 李磊, 马丽艳, 王翠华, 张璇, 黄冬梅, 蒋玫. 菲在厚壳贻贝体内的富集与释放及其对 HSP70 mRNA 表达的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(6): 93–101

ZENG M N, LI L, MA L Y, WANG C H, ZHANG X, HUANG D M, JIANG M. Enrichment and release of phenanthrene in mussels (*Mytilus coruscus*) and its effect on HSP70 mRNA expression. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(6): 93–101

菲在厚壳贻贝体内的富集与释放及其对 HSP70 mRNA 表达的影响*

曾梦妮^{1,2} 李磊² 马丽艳² 王翠华² 张璇² 黄冬梅² 蒋玫^{2①}

(1. 上海海洋大学海洋生态与环境学院 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090)

摘要 以厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)为研究对象,开展不同暴露浓度(4、20 和 100 $\mu\text{g/L}$)菲(phenanthrene, PHE)的富集(10 d)和释放(5 d)实验,分别利用高效液相色谱法和荧光定量 qPCR 法分析了厚壳贻贝内脏团、外套膜、闭壳肌对 PHE 的富集和释放实验及 HSP70 mRNA 表达量的变化。结果显示,在 10 d 的富集阶段,厚壳贻贝 3 个组织对 PHE 的富集能力大小表现为内脏团>外套膜>闭壳肌;3 个组织对 PHE 的富集含量随时间的增加而增加,同时,也随暴露浓度的增加而增加;在释放实验阶段,厚壳贻贝 3 个组织中 PHE 含量在释放前期迅速下降,但在 15 d 时,3 个组织中 PHE 残留量仍均高于对照组;PHE 对厚壳贻贝体内 HSP70 mRNA 诱导表达具有组织特异性,其中外套膜中 HSP70 mRNA 表达量最高。研究结果可为 PHE 在贝类体内的富集动力学及致毒机制研究提供参考依据。

关键词 菲;厚壳贻贝;生物富集;HSP70

中图分类号 S968 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)06-0093-09

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是由 2 个及 2 个以上的苯环以稠环或非稠环的形式相互连接成的有机化合物,其主要通过高分子有机化合物的不完全燃烧而产生(贾双琳等, 2020)。研究证明,PAHs 具有致癌性、致突变性和致畸性,可以通过食物链作用在生物体内累积,对环境造成严重污染的同时,也对人类的健康产生危害(杨帆等, 2013; Zheng *et al*, 2016; Yin *et al*, 2017)。

16 种优控多环芳烃一直受到广泛关注,其中,

菲(phenanthrene, PHE)是具有代表性的低分子量多环芳烃,是水生生态系统中含量最丰富的一种(Shirmohammadi *et al*, 2017),通常作为研究 PAHs 的模型(Rabodonirina *et al*, 2019; Sun *et al*, 2019a)。PHE 的化学结构稳定,有较强的疏水性,常吸附在水中的沉积物和悬浮颗粒上,在水体中可长距离迁移(Gu *et al*, 2016)。PHE 对水生动物包括贝类、鱼类、水生昆虫等都具有潜在的毒性(武江越等, 2018)。李磊等(2015)、Yakan 等(2013)、Mokkongpai 等(2010)和 Keshavarzifard 等(2017)分别研

*国家重点研发科技计划项目(2017YFC1600705)、中央公益科研机构基础研究基金(2020TD14)和国家贝类产业体系建设项目(CARS-49)共同资助 [This work was supported by National Key Research and Development Project (2017YFC1600705), the Earmarked Fund for CARS (CARS-49), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD14)]. 曾梦妮, E-mail: 2731238959@qq.com

① 通讯作者: 蒋玫, 研究员, E-mail: jiangrose73@163.com

收稿日期: 2020-08-11, 收修改稿日期: 2020-09-07

究了 PHE 在缢蛭(*Sinonovacula constricta*)、地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、青口贝(*Perna viridis*)、短颈蛤(*Paphia undulata*)等体内的富集动力学特征,均表明 PHE 在贝类体内有较强的富集能力,但关于比较单一多环芳烃在贝类不同组织富集及释放的特性和差异性的研究不多。PHE 对水生生物基因表达也会产生影响,Peng 等(2019)研究发现,PHE 对斑马鱼(*Barchydanio rerio var*)雌鱼下丘脑-垂体-性腺轴的 GnRH2 和 CYP11A1 等基因的转录造成了明显的特异性改变,对斑马鱼繁殖造成不利的影 响。Piazza 等(2016)研究发现,圆吻扇贝(*Nodipecten nodosus*)暴露在 PHE 水溶液中,其体内 CYP2U1、CYP2D20 和 CYP3A11 等基因的转录水平增加。Karami 等(2016)将非洲鲶(*Glarias gariepinus*)幼仔三倍体暴露于 76 mg/L PHE 浓度水溶液中;结果显示,鱼体 *fushi tarazu-factor 1(ftz-fl)* 的 mRNA 水平增加。热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是一类应激蛋白,其中,HSP70 是研究比较深入的一种 HSPs,参与到各种保护机体和细胞机制中,通常作为环境应激和毒性的生物标志物(许高鹏等, 2015; Mayer *et al*, 2005; Voisine *et al*, 1999)。研究表明,HSP70 在有机体受到环境、生理或病理胁迫时会被诱导表达(曲凌云, 2004; 周朝伟等, 2018; Sun *et al*, 2019b)。目前,已有许多学者选择贝类完成对水体中有机物的富集及对贝类基因影响的研究,杨丹丹等(2019)利用高效液相色谱法检测厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)体内 16 种 PAHs 的含量。Murray 等(1991)通过田间实验测定紫贻贝(*Mytilus edulis*)中 PAHs 的生物富集因子。王淑红等(2005)研究了翡翠贻贝外套膜、鳃、内脏团对 16 种 PAHs 的蓄积特征。刘娜(2012)研究了菲律宾蛤仔(*Venerupis philippinarum*)在苯并[a]芘胁迫下 3 种(芳烃受体蛋白、芳烃受体核转位因子和热休克蛋白 90)基因表达分析。卢玮筱(2018)研究了在苯并[a]芘刺激下厚壳贻贝组织中 RACK1 基因的表达。

海洋双壳贝类分布广泛,营固着生活,是滤食性动物,对水体中有机污染物的积累性强,常作为监测海洋环境污染的指示生物。目前,关于贝类组织对 PAHs 蓄积规律的研究多集中于各组织对总 PAHs 的蓄积含量比较,如刘童(2015)比较了菲律宾蛤仔消化盲囊、鳃、闭壳肌、软体部对 PAHs 的蓄积含量规律。李天云等(2007)比较了河蚬(*Corbicula fluminea*)鳃、内脏团、肌肉对 PAHs 的蓄积含量关系。关于贝类体内 HSP70 mRNA 诱导表达的研究,其研究的诱导因子多为盐度、温度、重金属等,如 Franzellitti 等(2005)分别研究了热休克和汞对地中海贻贝体内 HSP70 mRNA

表达的影响,而对于单一多环芳烃 PHE 在贝类组织的蓄积规律研究以及 PHE 对贝类不同组织 HSP70 mRNA 表达影响的研究较少。

本研究选择厚壳贻贝为对象,通过对厚壳贻贝进行在不同浓度 PHE 溶液中的富集-释放实验,获得厚壳贻贝内脏团、外套膜及闭壳肌对 PHE 的富集和释放规律及 HSP70 mRNA 表达影响,为 PHE 在贝类体内的富集动力学及致毒机制提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验海水为海水晶人工配制的海水,盐度为 26,水温为(23±2)℃。厚壳贻贝为浙江省枸杞岛采集的人工养殖厚壳贻贝,平均壳长为(84.6±5.2) cm,壳宽为(40.9±2.5) cm,体重为(40.2±6.2) g。实验前将厚壳贻贝暂养 7 d,期间连续充气,并投喂螺旋藻粉后选取健康个体进行实验,实验容器容积为 20 L 的玻璃缸体,装入海水 14 L。

1.2 PHE 的富集和释放

1.2.1 富集和释放实验 实验分为富集和清水恢复 2 个阶段,分别进行 10 d 和 5 d。以丙酮作为助溶剂,在预实验的基础上设置 PHE 分别为 4、20、100 μg/L 的实验组和人工海水对照组(加入 0.01%丙酮),每组设 3 个平行。每组放入 16 只厚壳贻贝,每 24 h 换水 1 次,换水率 100%,昼夜充气,每天定时投喂螺旋藻粉。分别于 1、3、6、10、12 和 15 d 随机取 2 只厚壳贻贝,分离其内脏团、外套膜、闭壳肌组织于-80℃保存,待检测分析。

1.2.2 组织中的 PHE 含量测定 分别测定厚壳贻贝内脏团、外套膜和闭壳肌中的 PHE 含量,测定步骤如下:称取 5.0 g 湿样加入 5 mL 超纯水混合振荡,再加入 15 mL 乙腈剧烈振荡,以 100 Hz 30℃超声 5 min 后加入 1.5 g 无水乙酸钠和 6.0 g 无水硫酸镁剧烈振荡,以 4000 r/min 离心 5 min,取上清液;先用 5 mL 乙腈预淋洗 Florisil/C₁₈ 层析柱,再移取 5 mL 上清液通过层析柱过滤,再用 15 mL 乙腈继续洗脱,收集全部流出液于梨形瓶中,40℃旋转蒸发至约 0.5 mL,用乙腈定容至 1 mL,13,000 r/min 离心 6 min,上清液过滤膜,移至进样瓶中,供高效液相色谱分析。

1.2.3 色谱条件 Thermo SCIENTIFIC HYPERSIL Green PAH 色谱柱(4.6 mm×150.0 mm, 5 μm);柱温位 30℃;进样量为 25 μL;流速为 1.0 mL/min;紫外检测波长为 245 nm;50%乙腈梯度洗脱。配制浓度分别

为 5、25、50、125 和 250 ng/mL 的 PHE 标准液, 绘制标准曲线。

1.3 HSP70 mRNA 实验方法

1.3.1 样本准备及总 RNA 提取 每个实验组取 50 mg 的厚壳贻贝内脏团、外套膜和闭壳肌加入 1 mL Trizol, 使用匀浆器进行匀浆处理; 转移至 RNase-free 的离心管中, 进行 RNA 的抽提。室温放置 5 min, 向离心管中加入预冷的氯仿(200 μ L 氯仿/1 mL Trizol), 剧烈振荡 15 s, 室温放置 10 min, 离心(4 $^{\circ}$ C, 12,000 r/min) 15 min; 小心析出上层水相约 500 μ L, 转移至无 RNA 酶的离心管中, 加入等体积(500 μ L)的异丙醇, 颠倒混匀 6~8 次, -20 $^{\circ}$ C 冰箱放置 30 min; 再以 10,000 r/min 低温离心 15 min, 可见 RNA 沉淀; 弃上清液, 加入 650 μ L 75%乙醇(75%乙醇的配制: 1 倍的 DEPC 处理水加 3 倍的无水乙醇)洗涤沉淀, 8000 r/min 低温离心 5 min, 弃上清液; 重复上个步骤 1 遍, 弃上清液, 吸净残存乙醇, 自然干燥 5~10 min; 加入适量的 RNase-free H₂O 溶解 RNA, -20 $^{\circ}$ C 冰箱, 保存, 待用。实验过程中, 采用核酸蛋白测定仪检测 RNA 的纯度和浓度, 以保证总 RNA 纯度较高、完整性较好, 可直接用于后续的反转录以及荧光定量的研究。

1.3.2 反转录 cDNA 采用第一链 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA, 配制逆转录反应体系, 0.2 mL PCR 管中加入以下试剂, 混匀逆转录反应体系(总 RNA、Random Primer p(dN)₆、Rnase-free ddH₂O、Reaction Buffer、dNTP Mix、Rnase inhibitor、AMV Reverse Transcriptase) (Thermo, #K1622)后 37 $^{\circ}$ C 温浴 5 min; 再以 42 $^{\circ}$ C 温浴 60 min, 最后 70 $^{\circ}$ C 温浴 10 min, 终止反应。

1.3.3 Real-time PCR 扩增 根据 Real-time PCR 反应体系配制反应液。在 PCR 反应管中分别加入 ddH₂O、SybrGreen qPCR Master Mix(Thermo, F-415XL)、Forward primer、Reverse primer、cDNA 模板, 充分混匀; 反应体系按照表 1 配制。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 10 min, (94 $^{\circ}$ C 20 s, 55 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s) 40 个循环。

表 1 荧光定量 PCR 分析基因表达所用到的引物
Tab.1 Sequences of primers used in gene expression analyses by real-time fluorescence quantitative PCR

引物 Primer	引物序列 Primer sequence
HSP70-RT-F	GGAGTGATGGTTCGGTATGGGACAGA
HSP70-RT-R	TCTGTCCCATAACCGACCATCACTCC
β -actin-RT-F	GGAGTGAGGGTTCGGTATGGGACAGA
β -actin-RT-R	TCTGTCCCATAACCGACCATCACTCC

1.4 样品检测方法

1.4.1 标准曲线和回收率 用乙腈稀释 PHE 标准溶液, 配制浓度分别为 5、25、50、125 和 250 ng/mL 的标准溶液, 经 1.2.3 的色谱条件进行测定。PHE 在 0.2~20.0 ng/mL 范围内, 标准曲线线性回归方程为 $y=1.4057x+0.4438$, 相关系数 $r=0.9996$; 以信噪比 $S/N=3$, 求得 PHE 检出限为 0.1 μ g/kg。

检测贻贝体内 PHE 含量为(4.040 3 \pm 0.596 0) μ g/kg, 用加标后测得的含量扣除本底值, 计算得平均回收率为 103.03%, RSD 为 5.6%, 符合本实验方法要求。

1.4.2 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法 Real-time PCR 数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析目的基因在对照组和各浓度组之间的表达差异, 计算公式如下: $\Delta Ct=Ct_{\text{目的基因}}-Ct_{\text{内参}}$, 再求得对照组 $\Delta Ct_{\text{对照平均}}$, 用各组的 ΔCt 分别减去 $\Delta Ct_{\text{对照}}$, 求得 $\Delta\Delta Ct$ 值, 即 $\Delta\Delta Ct=\Delta Ct_{\text{样本}}-\Delta Ct_{\text{对照平均}}$, 再计算各组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值, 即为各组中基因的相对表达量。

1.5 数据统计分析

所有数据结果采用 SPSS 24.0 软件进行统计学处理, 使用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan's 多重比较判断组间差异的显著性, 显著性水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 丙酮作为助溶剂的可行性

为了验证 0.01%丙酮作为 PHE 的助溶剂的可行性, 在实验过程中, 对 PHE 的对照组和 0.01%丙酮处理组中贻贝 3 种组织的 PHE 含量进行统计学检验。结果表明, 对照组贻贝内脏团、外套膜和闭壳肌的 PHE 含量分别为(4.43 \pm 0.48)、(3.89 \pm 0.32)和(3.79 \pm 0.23) μ g/kg, 0.01%丙酮处理组贻贝内脏团、外套膜和闭壳肌的 PHE 含量分别为(4.43 \pm 0.54)、(3.97 \pm 0.27)和(3.92 \pm 0.22) μ g/kg, 二者相比无显著性差异($P>0.05$), 说明 0.01%丙酮作为 PHE 的助溶剂是可行的。

2.2 厚壳贻贝 3 种组织对 PHE 的富集和释放规律

厚壳贻贝内脏团、外套膜和闭壳肌在 4、20 和 100 μ g/L PHE 海水溶液中对 PHE 的富集和释放情况如图 1、图 2 和图 3 所示。厚壳贻贝 3 个组织对 PHE 的吸收速率和释放速率如表 2 所示。在厚壳贻贝对 PHE 的富集阶段, 内脏团、外套膜和闭壳肌中 PHE 富集量随时间的增加而增加。同时, 也随 PHE 暴露浓度的增加而增加。内脏团在 1、3、6 和 10 d 时, 3 个浓度组之间 PHE 含量变化呈显著增加($P<0.05$)。

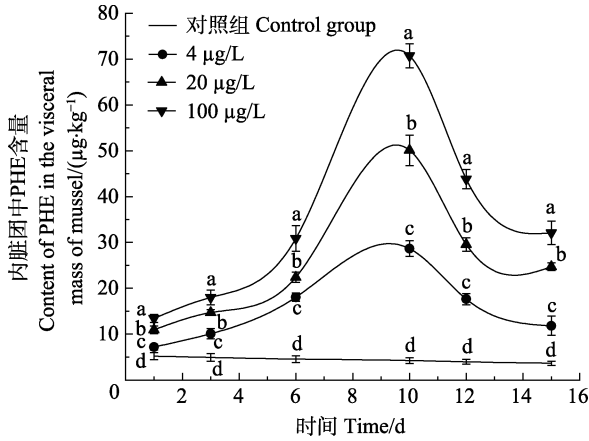


图 1 贻贝内脏团对 PHE 的富集和释放情况
Fig.1 Enrichment and release of phenanthrene (PHE) in the visceral mass of mussel

a、b、c 和 d 为各浓度组对照组之间
相比差异显著($P<0.05$), 下同

Single asterisk (a, b, c, and d) indicates significant difference among treatment groups and control group ($P<0.05$), the same as below

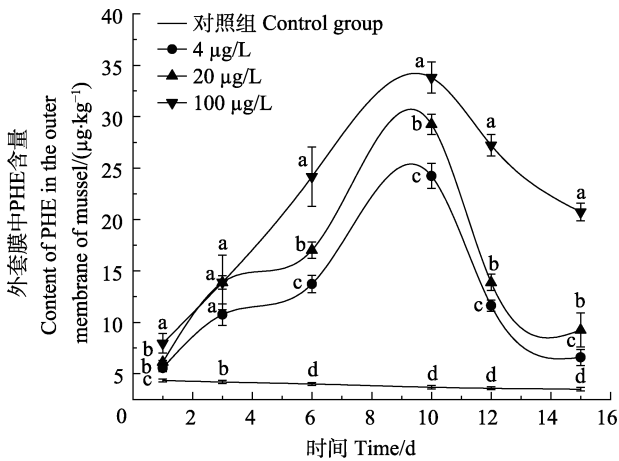


图 2 贻贝外套膜对 PHE 的富集和释放情况
Fig.2 Enrichment and release of phenanthrene (PHE) in the outer membrane of mussel

外套膜在 1 d 时, 4 和 20 $\mu\text{g/L}$ 浓度组 PHE 含量无显著差异($P>0.05$); 在 3 d 时, 3 个浓度组 PHE 含量无显著差异($P>0.05$); 在 6 和 10 d 时, 3 个浓度组

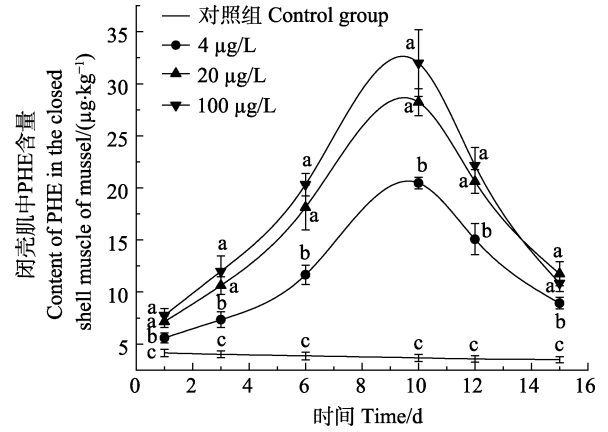


图 3 贻贝闭壳肌对 PHE 的富集和释放情况
Fig.3 Enrichment and release of phenanthrene (PHE) in the closed shell muscle of mussel

PHE 含量呈显著增加的趋势($P<0.05$)。闭壳肌在 1、3、6 和 10 d 时, 20 和 100 $\mu\text{g/L}$ 浓度组 PHE 含量无显著差异($P>0.05$), 同时, 4 $\mu\text{g/L}$ 浓度组 PHE 含量呈显著增加的趋势($P<0.05$)。厚壳贻贝 3 个组织对 PHE 的富集含量和富集速度表现为内脏团>外套膜>闭壳肌。

在 5 d 的释放阶段, 厚壳贻贝 3 个组织对 PHE 的释放速率规律不同。其中, 内脏团对 PHE 的释放速率随暴露浓度变化不大, 外套膜对 PHE 的释放速率随暴露浓度的增加而降低, 闭壳肌对 PHE 的释放速率随暴露浓度的增加而升高。内脏团 PHE 释放速率分别为 58.72% (4 $\mu\text{g/L}$)、50.71%(20 $\mu\text{g/L}$)和 54.60% (100 $\mu\text{g/L}$); 外套膜 PHE 释放速率分别为 72.82% (4 $\mu\text{g/L}$)、68.35% (20 $\mu\text{g/L}$)和 38.65% (100 $\mu\text{g/L}$); 闭壳肌 PHE 释放速率分别为 56.41% (4 $\mu\text{g/L}$)、58.35% (20 $\mu\text{g/L}$)和 66.11% (100 $\mu\text{g/L}$)。在释放前期, 厚壳贻贝 3 个组织内的 PHE 含量急剧下降, 在清水恢复的第 4、5 天, 3 个组织内 PHE 浓度释放速度减慢。

2.3 PHE 诱导厚壳贻贝 3 种组织中 HSP70 mRNA 的表达分析

暴露在 PHE 浓度溶液中厚壳贻贝 3 种组织 HSP70 mRNA 水平变化如图 4、图 5 和图 6 所示。厚壳贻贝内脏团、外套膜和闭壳肌中 HSP70 mRNA 的表达均

表 2 厚壳贻贝 3 个组织对 PHE 的吸收速率和释放速率
Tab.2 Enrichment and release rates of PHE in three tissues of mussels

实验组 Experimental group	吸收速率 Enrichment rate / $[\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d}^{-1})]$			释放速率 Release rate / $[\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d}^{-1})]$		
	内脏团 Visceral mass	外套膜 Outer membrane	闭壳肌 Closed shell muscle	内脏团 Visceral mass	外套膜 Outer membrane	闭壳肌 Closed shell muscle
4 $\mu\text{g/L}$	2.15±0.16	1.87±0.08	1.49±0.04	3.37±0.39	3.53±0.26	2.31±0.09
20 $\mu\text{g/L}$	3.92±0.33	2.31±0.07	2.11±0.10	5.08±0.40	4.00±0.43	3.29±0.39
100 $\mu\text{g/L}$	5.73±0.28	2.58±0.10	2.43±0.23	7.72±0.77	2.61±0.39	4.23±0.42

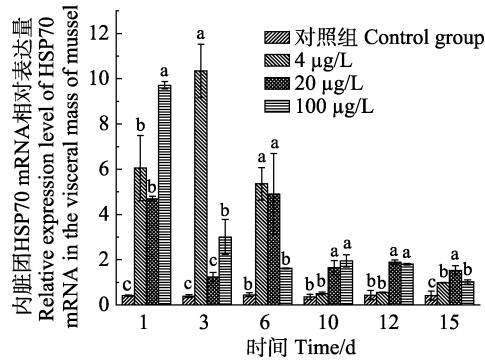


图 4 菲暴露及释放下厚壳贻贝内脏团中 HSP70 的相对表达量

Fig.4 Relative expression of HSP70 in the visceral mass of mussel exposed and released by PHE

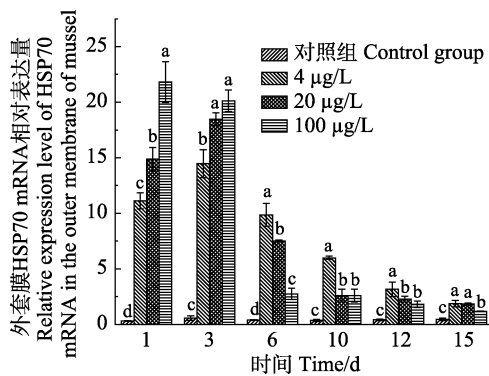


图 5 菲暴露及释放下厚壳贻贝外套膜中 HSP70 的相对表达量

Fig.5 Relative expression of HSP70 in the outer membrane of mussel after exposure and release of PHE

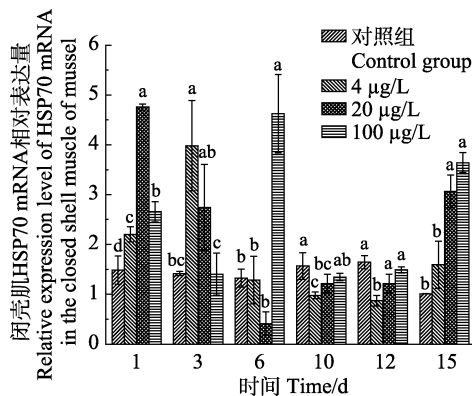


图 6 菲暴露及释放下厚壳贻贝闭壳肌中 HSP70 的相对表达量

Fig.6 Relative expression of HSP70 in the closed shell muscle of mussel exposed and released by PHE

有变化。在富集阶段,厚壳贻贝外套膜 HSP70 mRNA 表达量明显高于内脏团和闭壳肌,其中,在 PHE 低、中和高浓度溶液暴露下,外套膜中 HSP70 mRNA 表达量均在第 1 天时达到最高值,分别是对照组的 35.7 倍(4 μg/L)、47.8 倍(20 μg/L)和 70.1 倍(100 μg/L);内脏

团中 HSP70 mRNA 表达量分别在第 3、6 和 1 天时达到最高值,分别是对照组的 26.3 倍(4 μg/L)、10.9 倍(20 μg/L)和 23 倍(100 μg/L);闭壳肌中 HSP70 mRNA 表达量分别在第 3、1 和 6 天时达到最高值,分别是对照组的 2.8 倍(4 μg/L)、3.2 倍(20 μg/L)和 3.5 倍(100 μg/L)。

厚壳贻贝在 PHE 的整个富集释放过程中,3 个组织中 HSP70 mRNA 表达量的变化规律各不相同。从图 4 可以看出,3 个浓度 PHE 对厚壳贻贝内脏团中 HSP70 mRNA 诱导表达,4 μg/L 浓度组在 1 d 时,HSP70 mRNA 表达量较对照组显著增加($P < 0.05$);在 3 d 时,HSP70 mRNA 表达量达到最高值;随后随着时间增加,HSP70 mRNA 表达量逐渐降低。20 μg/L 浓度组在 1 d 时,HSP70 mRNA 表达量较对照组显著增加($P < 0.05$);在 3 d 时,HSP70 mRNA 表达量降低且较对照组无显著差异($P > 0.05$);在 6 d 时,HSP70 mRNA 表达量达到最高值;后随时间的增加,HSP70 mRNA 表达量逐渐降低。100 μg/L 浓度组在 1 d 时,HSP70 mRNA 表达量为最高值;随后随时间的增加,HSP70 mRNA 表达量逐渐降低,但都较对照组显著增加($P < 0.05$)。

从图 5 可以看出,3 个浓度 PHE 对厚壳贻贝外套膜 HSP70 mRNA 诱导表达,4、20 和 100 μg/L 浓度组在 1 d 时,HSP70 mRNA 表达量较对照组呈极显著增加($P < 0.01$);在 3 d 时,各浓度组 HSP70 mRNA 表达量达到最高值;随后随时间的增加,各浓度组 HSP70 mRNA 表达量逐渐降低,但都较对照组显著增加($P < 0.05$)。

3 个浓度 PHE 对厚壳贻贝闭壳肌 HSP70 mRNA 诱导表达情况见图 6。4 μg/L 浓度组在 1 d 时,HSP70 mRNA 表达量较对照组显著增加($P < 0.05$);在 3 d 时 HSP70 mRNA 表达量达到最高值;后随时间的增加,HSP70 mRNA 表达量逐渐降低,在 10 和 12 d 时,HSP70 mRNA 表达量较对照组显著降低($P < 0.05$),呈抑制表达状态;在 15 d 时,HSP70 mRNA 表达量较对照组无显著差异($P > 0.05$)。20 μg/L 浓度组在 1 d 时,HSP70 mRNA 表达量达最高值;后随时间增加,HSP70 mRNA 表达量逐渐降低,直至第 6 天时,HSP70 mRNA 表达量达最低值;之后 HSP70 mRNA 表达量又随时间的增加而增加。100 μg/L 浓度组在 1 d 时,HSP70 mRNA 表达量较对照组显著增加($P < 0.05$);在 3 d 时,HSP70 mRNA 表达量较对照组无显著差异($P > 0.05$);在 6 d 时,HSP70 mRNA 表达量增加至最高值;在 10 和 12 d 时,HSP70 表达量较对照组无显

著差异($P>0.05$); 在 15 d 时, HSP70 mRNA 表达量较对照组显著增加($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 厚壳贻贝 3 种组织对 PHE 的富集和释放规律

PHE 作为低分子量 PAHs 的典型代表, 在水中溶解度较大, 且具有高亲脂性、易渗透生物膜、在水生生物体内快速富集的特点(Ademollo *et al.*, 2017)。本研究表明, 在同一时间、同一暴露浓度下, 厚壳贻贝 3 个组织对 PHE 的富集含量规律为内脏团>外套膜>闭壳肌。3 个组织对 PHE 的富集含量随时间的增加而增加, 同时, 也随 PHE 暴露浓度的增加而增加。其原因主要有以下几个, 首先, PHE 自身具有较高的正辛醇/水分配系数, 脂溶性较强, 实验中使用丙酮作为助溶剂, 提高了 PHE 的生物利用性, 使 PHE 通过细胞的被动扩散作用与脂肪组织相结合, 提高了厚壳贻贝的富集作用; 其次, 厚壳贻贝主要是通过过滤海水摄食, 海水在经过鳃的过滤后, 较大颗粒物质沉淀在外套膜上, 较小颗粒物质进入内脏团的消化器(王淑红等, 2005)。本研究中, PHE 随水流进入厚壳贻贝各组织并迅速溶于脂肪, 由于 PHE 具有脂溶性, 易在各组织中累积; 最后, PAHs 在生物组织内的累积程度与脂肪含量有关, 脂肪含量高的组织更容易富集 PAHs (Wang *et al.*, 2011)。贝类各湿样组织脂肪含量比较, 内脏团的脂肪含量最大(杨慧赞, 2008)。外套膜作为与水体直接接触的组织, 能吸附或吸收水体中的 PHE。因此, 比闭壳肌富集 PHE 的含量要高, 这与宫向红等(2017)报道 PAHs 在海湾扇贝不同组织中富集规律一致。

当厚壳贻贝开始处于清水释放状态时, 各组织对 PHE 的释放主要受控于热力学驱动的扩散、酶系统调控的新陈代谢活动和排泄作用(Baussant *et al.*, 2001), 这 2 种作用使厚壳贻贝各组织内的 PHE 含量在释放阶段前期开始迅速降低, 随着释放时间的延长, 厚壳贻贝各组织内 PHE 含量逐渐降低, 经过 5 d 的释放, 厚壳贻贝内脏团 PHE 释放速率在 50%~60%之间, 外套膜 PHE 释放速率随暴露浓度的升高逐渐降低, 闭壳肌 PHE 释放速率随暴露浓度的升高逐渐升高, 这与组织特异性有关。与外套膜、闭壳肌相比, 内脏团中存在大量酶系参与 PHE 的代谢过程, 使 3 个浓度组内脏团的释放速率相差不大; 而外套膜中 PHE 的排出则主要是通过血细胞渗出, 这种作用相对酶的作用来说较弱, 导致外套膜中 PHE 的释放速率随暴露浓度升高逐渐降低。

3.2 PHE 诱导厚壳贻贝 3 种组织中 HSP70 mRNA 的表达分析

热休克蛋白 70 (HSP70) 是一类应激蛋白, 常在细胞受到外界环境胁迫时应激表达, 与许多信号转导途径的关键调节因子相互作用, 控制细胞的稳态、增殖、分化和细胞死亡(Mayer *et al.*, 2005)。从本研究可以看出, 3 个组织 HSP70 mRNA 表达的剂-效关系随时间变化规律不同。本研究中, 在 PHE 暴露初期, 厚壳贻贝内脏团、外套膜和闭壳肌 HSP70 mRNA 表达量都较对照组显著增加, 这是由于机体受到 PHE 胁迫时, 为防止细胞内蛋白凝聚或变性, 维持细胞内环境稳定, HSP70 mRNA 被诱导表达来增强机体抗刺激及生存能力。随着暴露在 PHE 水溶液中时间的增加, 厚壳贻贝体内对 PHE 的富集量逐渐增加, 内脏团、外套膜及闭壳肌中 HSP70 mRNA 表达量在 1、3 或 6 d 时达到最高值, 这可能是由于不同组织其 HSP70 mRNA 表达具有差异性。内脏团和外套膜中 HSP70 mRNA 表达量达最高值后, HSP70 mRNA 表达量开始逐渐降低, 可能是由于细胞中 PHE 浓度超过阈值时, 机体细胞的生物合成能力遭到破坏, HSP70 mRNA 的表达量将会降低或者被抑制, 说明热休克蛋白 70 的表达对细胞的保护是有一定范围的(Eckwert *et al.*, 1997)。这与荆圆圆等(2019)研究不同盐度下, 镉对太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)不同组织 HSP70 mRNA 表达影响结果一致。而闭壳肌中, HSP70 mRNA 在 6、10 和 12 d 受到抑制表达后, 在第 15 天时仍能恢复正常表达量, 这可能是由于闭壳肌中, HSP70 mRNA 表达量随 PHE 含量降低至一定值后, 将不受抑制表达。由于 HSP70 mRNA 在厚壳贻贝内脏团、外套膜和闭壳肌中是组成性表达(程培周等, 2007), PHE 对厚壳贻贝 3 个组织中 HSP70 诱导表达量高低排序为外套膜>内脏团>闭壳肌。

4 结论

在富集阶段, 厚壳贻贝 3 个组织对 PHE 的富集能力大小表现为内脏团>外套膜>闭壳肌。同时, 3 个组织对 PHE 的富集含量随时间的增加而增加, 也随 PHE 暴露浓度的增加而增加。在清水恢复前期, 厚壳贻贝 3 个组织中 PHE 含量迅速下降; 在第 15 天时, 厚壳贻贝内脏团 3 个浓度组 PHE 释放速率在 50%~60%之间, 外套膜 PHE 释放速率随暴露浓度的升高逐渐降低, 闭壳肌 PHE 释放速率随暴露浓度的升高逐渐升高。PHE 对厚壳贻贝内脏团、外套膜和闭壳肌的 HSP70 mRNA 诱导表达具有组织特异性, 其中,

外套膜中 HSP70 mRNA 表达量最高。

参 考 文 献

- ADEMOLLO N, PATROLECCO L, MATOZZO V, *et al.* Clam bioaccumulation of alkylphenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in the Venice lagoon under different pressures. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 124(1): 121–129
- BAUSSANT T, SANNI S, JONSSON G, *et al.* Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 1. Bioconcentration in two marine species and in semipermeable membrane devices during chronic exposure to dispersed crude oil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20(6): 1175–1184
- CHENG P Z, LIU X, ZHANG G F, *et al.* Fluorescence quantitative PCR analysis of HSP70 expression in *Haliotis discus hannai* Ino under temperature stress. *Marine Sciences*, 2007, 31(10): 77–81 [程培周, 刘晓, 张国范, 等. 荧光定量 PCR 方法分析皱纹盘鲍 HSP70 在温度胁迫下的表达. *海洋科学*, 2007, 31(10): 77–81]
- ECKWERT H, ALBERTI G, KOHLER H R. The induction of stress proteins (hsp) in *Oniscus asellus* (Isopoda) as a molecular marker of multiple heavy metal exposure: I. Principles and toxicological assessment. *Ecotoxicology*, 1997, 6(5): 249–262
- FRANZELLITTI S, FABBRI E. Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 336(4): 1157–1163
- GONG X H, SUN S, LIU X J, *et al.* Accumulation and elimination of diesel in scallop *Argopecten irradians*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(4): 811–823 [宫向红, 孙珊, 刘小静, 等. 海湾扇贝对柴油的富集与消除规律. *中国水产科学*, 2017, 24(4): 811–823]
- GU Y G, KE C L, LIU Q, *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of Zhelin Bay, the largest mariculture base on the eastern Guangdong coast, South China: Characterization and risk implications. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 110(1): 603–608
- JIA S L, ZHENG S, LONG J Q, *et al.* Research progress on polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Guizhou Science*, 2020, 38(2): 21–30 [贾双琳, 郑松, 龙纪群, 等. 水中多环芳烃分析技术研究进展. *贵州科学*, 2020, 38(2): 21–30]
- JING Y Y, ZHANG T W, LIU E F, *et al.* Effects of cadmium on heat shock protein 70 gene expression in different tissues of *Crassostrea gigas* under different salinity. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2019, 35(4): 332–336 [荆圆圆, 张天文, 刘恩孚, 等. 不同盐度下镉对太平洋牡蛎不同组织热休克蛋白 70 基因表达的影响. *广西科学院学报*, 2019, 35(4): 332–336]
- KARAMI A, ROMANO N, HAMZAH H, *et al.* Acute phenanthrene toxicity to juvenile diploid and triploid African catfish (*Clarias gariepinus*): Molecular, biochemical, and histopathological alterations. *Environmental Pollution*, 2016, 212(55): 155–165
- KESHAVARZIFARD M, ZAKARIA M P, SHARIFI R. Ecotoxicological and health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in short-neck clam (*Paphia undulata*) and contaminated sediments in Malacca Strait, Malaysia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2017, 73(3): 474–487
- LI L, SHENG X Q, LI C, *et al.* Bioaccumulation-depuration kinetics of benzo [a] pyrene and phenanthrene in *Sinonovacula constricta*. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(7): 998–1004 [李磊, 沈新强, 李超, 等. 苯并[a]芘、菲在缢蛭体内的生物富集与释放. *水产学报*, 2015, 39(7): 998–1004]
- LI T Y, SUN F, HUANG S B, *et al.* The concentration and tissues accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine pesticides (OCPs) in *Corbicula fluminea* of Minjiang River. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science)*, 2007, 32(6): 72–77 [李天云, 孙凡, 黄圣彪, 等. 闽江某河段河蚬组织中多环芳烃和有机氯农药的蓄积特征. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2007, 32(6): 72–77]
- LIU N. Selection of differential expression genes and study of molecular biomarkers of clam *Venerupis philippinarum* exposed to Benzo (a) pyrene. Master's Thesis of Ocean University of China, 2012 [刘娜. 菲律宾蛤仔(*Venerupis philippinarum*) 在苯并(a)芘胁迫下差异基因的筛选与分子标志物的研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2012]
- LIU T. Biological monitoring technology research of offshore PAHs in the clam *Ruditapes philippinarum*. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2015 [刘童. 基于菲律宾蛤仔的近海多环芳烃生物监测技术的研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2015]
- LU W X. Effects of unialgal diets on the biological characteristics of *Eurytemora pacifica* and transcriptome analysis. Master's Thesis of Zhejiang Ocean University, 2018 [卢玮筱. 厚壳贻贝 RACK1 基因在脂多糖、铜离子、苯并芘刺激下的表达. 浙江海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]
- MAYER M P, BUKAU B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005, 62(6): 670–684
- MOKKONGPAI P, KANCHANOPAS-BARNETT P, SAWANGWONG P. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in green mussels (*Perna viridis*) collected from the east coast of Chon Buri Province, Thailand. *Journal of Science Technology and Humanities*, 2010, 8(1): 13–23
- MURRAY A P, RICHARDSON B J, GIBBS C F. Bioconcentration factors for petroleum hydrocarbons, PAHs, LABs and biogenic hydrocarbons in the blue mussel. *Marine Pollution Bulletin*, 1991, 22(12): 595–603
- PENG X D, SUN X X, YU M, *et al.* Chronic exposure to environmental concentrations of phenanthrene impairs

- zebrafish reproduction. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 182: 109376
- PIAZZA R S, TREVISAN R, FLORES-NUNES F, *et al.* Exposure to phenanthrene and depuration: Changes on gene transcription, enzymatic activity and lipid peroxidation in gill of scallops *Nodipecten nodosus*. *Aquatic Toxicology*, 2016, 177(25): 146–155
- QU L Y. Expression under adversity and cloning analysis of a heat shock protein70 (HSP70) in three species of cultured scallop. Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2004 [曲凌云. 三种养殖扇贝热休克蛋白 HSP70 在逆境因子下的表达和相关基因的克隆. 中国科学院海洋研究所博士研究生学位论文, 2004]
- RABODONIRINA S, RASOLOMAMPINANINA R, KRIER F, *et al.* Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from oil spill sites. *Journal of Environmental Management*, 2019, 232(5): 1–7
- SHIRMOHAMMADI M, CHUPANI L, SALAMAT N. Responses of immune organs after single-dose exposure to phenanthrene in yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*): CYP1A induction and oxidative stress. *Chemosphere*, 2017, 186(51): 686–694
- SUN M, LIU G, LIN H, *et al.* Effect of feeding strategies on molecular responses of biotransformation genes in *Crassostrea gigas* exposed to cadmium. *Journal of Ocean University of China*, 2019a, 18(4): 883–888
- SUN T, WANG D, TANG Y, *et al.* Fabric-phase sorptive extraction coupled with ion mobility spectrometry for on-site rapid detection of PAHs in aquatic environment. *Talanta*, 2019b, 195(18): 109–116
- VOISINE C, CRAIG E A, ZUFALL N, *et al.* The protein import motor of mitochondria: Unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell*, 1999, 97(5): 565–574
- WANG L, PAN L Q, LIU N, *et al.* Biomarkers and bioaccumulation of clam *Ruditapes philippinarum* in response to combined cadmium and benzo[a]pyrene exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(12): 3407–3417
- WANG S H, WANG X H, HONG H S. Specific characteristic of tissue bioaccumulation of PAHs in green lipped mussels (*Perna viridis*) at different growth stages. *Marine Environmental Science*, 2005, 24(3): 29–32 [王淑红, 王新红, 洪华生. 不同生长期翡翠贻贝(*Perna viridis*)体内多环芳烃富集的组织特异性研究. *海洋环境科学*, 2005, 24(3):29–32]
- WU J Y, XU G D, LIN Y F, *et al.* Development of freshwater aquatic life water quality criteria for phenanthrene in China. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2018, 38(1): 399–406 [武江越, 许国栋, 林雨霏, 等. 我国淡水生物非水质基准研究. *环境科学学报*, 2018, 38(1): 399–406]
- XU G P, JIANG M, LI L, *et al.* Effect of benzo [a] pyrene on the P4501A1, P-glycoprotein and HSP70 expression in *Portunus trituberculatus*. *Marine Environmental Science*, 2015, 34(5): 647–653 [许高鹏, 蒋玫, 李磊, 等. 苯并[a]芘(BaP)暴露对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) P4501A1, P-gp, HSP70 基因表达的影响. *海洋环境科学*, 2015, 34(5): 647–653]
- YAKAN S D, HENKELMANN B, SCHRAMM K W, *et al.* Bioaccumulation-depuration kinetics and effects of phenanthrene on Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Journal of Environmental Science and Health*, 2013, 48(9): 1037–1046
- YANG D D, HAN F, SHI Y F, *et al.* Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in shellfish by high performance liquid chromatography with UV/fluorescence detection. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2019, 38(7): 828–833 [杨丹丹, 韩峰, 史永富, 等. 高效液相色谱-紫外/荧光测定贝类体内 16 种多环芳烃. *分析试验室*, 2019, 38(7): 828–833]
- YANG F, ZHAI Y X, REN D D, *et al.* Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments by high performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet detection. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(5): 104–111 [杨帆, 翟毓秀, 任丹丹, 等. 高效液相色谱-荧光/紫外串联测定海洋沉积物 16 种多环芳烃. *渔业科学进展*, 2013, 34(5): 104–111]
- YANG H Z. Toxicokinetics and toxicodynamics for benzo[a]pyrene in *Chlamys farreri*. Master's Thesis of Ocean University of China, 2008 [杨慧赞. 苯并[a]芘在栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)体内的毒代与毒效动力学研究. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2008]
- YIN S S, TANG M L, CHEN F F, *et al.* Environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): The correlation with and impact on reproductive hormones in umbilical cord serum. *Environmental Pollution*, 2017, 220(90): 1429–1437
- ZHENG B H, WANG L P, LEI K, *et al.* Distribution and ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, suspended particulate matter and sediment from Daliao River estuary and the adjacent area, China. *Chemosphere*, 2016, 149(39): 91–100
- ZHOU C W, HU X W, LEI L, *et al.* Effects of heat stress on biochemical indices and HSP70 mRNA expression in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 65–71 [周朝伟, 胡续雯, 雷骆, 等. 热应激对银鲫生化指标和 HSP70 mRNA 表达的影响. *渔业科学进展*, 2018, 39(6): 65–71]

(编辑 陈 辉)

Enrichment and Release of Phenanthrene in Mussels (*Mytilus coruscus*) and Its Effect on HSP70 mRNA Expression

ZENG Mengni^{1,2}, LI Lei², MA Liyan², WANG Cuihua², ZHANG Xuan², HUANG Dongmei², JIANG Mei^{2①}

(1. School of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. East China Sea Fisheries Research Institute, Shanghai 200090, China)

Abstract Phenanthrene (PHE) is one of the most abundant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aquatic ecosystems. It has strong hydrophobicity and is often adsorbed on sediment and suspended particles in water, which has potential toxicity to aquatic organisms. Mussels (*Mytilus coruscus*) are widely distributed in the ocean and live in a fixed environment. They are filter feeders and have a strong accumulation of organic pollutants in water. They are often used as indicator organisms in monitoring marine environmental pollution. In this study, enrichment (10 d) and release (5 d) tests of PHE with different exposure concentrations were carried out. Three groups of PHE (4 µg/L, 20 µg/L, and 100 µg/L) and artificial seawater group (control group: 0.01% acetone) were set up. Three parallel experimental replicates were set up in each group, and 16 mussels were placed in each group. Two mussels were randomly selected on the 1st, 3rd, 6th, 10th, 12th, and 15th day. Their visceral mass, outer membrane, and closed shell muscle tissue were separated and stored at -80°C for identification and analysis. Enrichment and release of PHE and the change in HSP70 gene expression in visceral mass, outer membrane, and closed shell muscle tissue were analyzed using HPLC and qPCR, respectively. Results showed that the concentration of PHE in the three tissues of mussels was in this order: visceral mass > outer membrane > closed shell muscle at the same time and concentration. The enrichment content of PHE in the three tissues increased with an increase in time and concentration, owing to the higher *n*-octanol/water partition coefficient and fat solubility of PHE, filter feeding life of mussels, and the fact that tissues with high fat content are more likely to enrich PHE. For the release test, the PHE content in the three tissues of mussels decreased rapidly in the early stage of release; however, on the 15th day, the residual amount of PHE in the three tissues was still higher than that in the control group. This is because the release of PHE in different tissues was mainly controlled by diffusion driven by thermodynamics, metabolic activity regulated by enzyme system, and excretion when mussels were in the state of water release. In addition, PHE content in mussel tissues began to decrease rapidly in the early stage of release and gradually decreased with the extension of release time. Furthermore, HSP70 was induced to enhance the anti-stimulation and survival ability of the organism under PHE stress; the expression of HSP70 mRNA in mussels was tissue-specific, and the expression level of HSP70 in the outer membrane was the highest. These results provide a reference for the study of enrichment kinetics and toxic mechanisms of PHE in shellfish.

Key words Phenanthrene; *Mytilus coruscus*; Bioconcentration; HSP70

① Corresponding author: JIANG Mei, E-mail: jiangrose73@163.com