

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210711001

http://www.yykxjz.cn/

许中天, 董震宇, 李继姬, 祁鹏志, 郭宝英. 苯并[a]芘(BaP)急性暴露对泥蚶消化腺的毒性效应及其应对机制初探. 渔业科学进展, 2023, 44(1): 169–180

XU Z T, DONG Z Y, LI J J, QI P Z, GUO B Y. Toxic effects of acute benzo[a]pyrene exposure on blood clam *Tegillarca granosa* and its potential coping mechanism. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(1): 169–180

苯并[a]芘(BaP)急性暴露对泥蚶消化腺的 毒性效应及其应对机制初探*

许中天 董震宇 李继姬 祁鹏志 郭宝英^①

(浙江海洋大学 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 浙江 舟山 316022)

摘要 本文研究了苯并[a]芘(benzo[a]pyrene, BaP)急性暴露对泥蚶(*Tegillarca granosa*)的毒性效应,并以泥蚶的消化腺为目标组织,对泥蚶抵抗 BaP 毒性的机制进行了初步探究。对样本进行 HE 染色并对所采集的图像进行分析处理,结果发现,暴露于 BaP 导致泥蚶消化腺组织出现坏死。对样本进行脂质过氧化并进行 DNA 氧化损伤测定的结果显示,暴露于 BaP 导致泥蚶消化腺氧化压力增加,进而导致脂质过氧化以及 DNA 氧化损伤等细胞层面的损伤。抗氧化酶活性测定结果显示, BaP 胁迫诱导泥蚶产生氧化应激反应,抗氧化防御体系积极参与 BaP 诱导的氧化应激调控过程。神经毒性指标测定结果显示, BaP 胁迫可能影响泥蚶神经冲动的传导而具有神经毒性。此外, DNA 甲基化水平测定及抗氧化酶基因表达测定的结果显示,泥蚶可能通过降低 DNA 甲基化水平来激活抗氧化系统以对抗 BaP 毒性。综上所述,急性 BaP 暴露会对泥蚶产生显著的毒性效应,以组织损伤、氧化应激反应和神经毒性为主要表征;泥蚶可能通过调整自身 DNA 甲基化水平来对抗 BaP 毒性效应。通过本研究,有望为深入探索双壳贝类应对石油污染物胁迫的内在调控机制提供新思路,同时为石油污染威胁下泥蚶的生物资源保护提供参考。

关键词 苯并[a]芘;泥蚶;组织损伤;氧化应激;神经毒性;DNA 甲基化

中图分类号 P76 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)01-0169-12

海上石油运输导致的溢油污染是当前全球海洋重大环境问题之一,多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是环境毒性作用最为显著的一类石油污染物,受到广泛关注(Renault, 2015; 杨帆等, 2013; 徐勇等, 2015)。PAHs 在海洋中分布广泛,一般情况下,其在近海的浓度大于远海,表层的浓度大于深层,沉积物中的浓度大于水体。早在 2005 年,东海海域近岸泥质区沉积物中 PAHs 含量就达到 180.3~424.8 ng/g (张宗雁, 2005); 2013 年,东海海域

近岸表层沉积物中 PAHs 的平均含量已达到 771 ng/g (邓伟, 2013); 2020 年,舟山海域近岸沉积物中的 PAHs 平均含量达到 2000 ng/g 左右(Cao *et al.*, 2020)。苯并[a]芘(benzo[a]pyrene, BaP)是最早被发现的 PAHs 之一,广泛分布于各种环境中且具有较强的稳定性和致癌性,被认为是 PAHs 的主要代表(李玉, 2018)。BaP 具有疏水亲脂性的特点,水环境中的 BaP 会以食物链或直接接触的方式富集到双壳贝类的体内,不仅对双壳贝类产生强烈的毒性效应,而且威胁到食品安全和

* 舟山市科技局科技计划项目浙江海洋大学专项(2018C21015)资助。许中天, E-mail: xuzhongtian2020@163.com

① 通信作者: 郭宝英, 教授, E-mail: guobaoying@zjou.edu.cn

收稿日期: 2021-07-11, 收修改稿日期: 2021-08-08

人类健康,因而被国内外学者广泛研究(杨慧赞, 2008; Banni *et al.*, 2010; Speciale *et al.*, 2018; Chen H *et al.*, 2018)。

双壳贝类具有较高经济价值,其大多数种类运动缓慢,滤食水中的浮游生物,营固着、匍匐、底栖或埋栖生活。PAHs 极易被水中的悬浮固体颗粒吸附并随着固体颗粒的沉降而进入沉积物,从而导致 PAHs 在沉积物中的含量远高于水体中的含量(朱樱等, 2009)。相比在水中能自由活动的其他动物,双壳贝类更易受到环境中 PAHs 的影响。近年来,有许多学者探究了 PAHs 对海洋双壳贝类的氧化毒性和免疫毒性效应,包括厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*) (Qu *et al.*, 2019; Chen S *et al.*, 2018)、栉孔扇贝(*Chlamys ferrari*) (Tian *et al.*, 2020; Cai *et al.*, 2016; Xiu *et al.*, 2014)、菲律宾帘蛤(*Ruditapes philippinarum*) (Jiang *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018)、文蛤(*Meretrix meretrix*) (Wang *et al.*, 2012)、大海扇蛤(*Pecten maximus*) (Hannam *et al.*, 2010) 和长牡蛎(*Crassostrea gigas*) (Geffard *et al.*, 2003) 等常见的具有较高经济价值的贝类。泥蚶(*Tegillarca granosa*) 作为我国传统四大养殖贝类(蛏、蛤、蚶和蛎)之一,有非常高的经济价值,但目前关于泥蚶响应 PAHs 污染的研究尚不多见。Su 等(2017、2019)发现,泥蚶在 pH 为 7.8 和 7.4 的 CO₂ 酸化海水中暴露 4 周后,其体内 BaP 的积累量会显著高于对照组。Tang 等(2020)则研究了 BaP 和微塑料联合作用对泥蚶产生的免疫毒性。

本研究以泥蚶的消化腺为目标组织,检测其在 BaP 急性暴露下的组织学变化、氧化应激状态、神经毒性以及 DNA 甲基化水平,旨在全面评估 BaP 对泥蚶的毒性效应,为深入探索双壳贝类应对石油污染物胁迫的内在调控机制提供新思路,同时为石油污染威胁下泥蚶的生物资源保护提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验所需的泥蚶采自浙江省舟山市东极岛,平均壳长为(32.3±1.8) mm,壳宽为(22.5±3.7) mm,壳高为(24.6±2.1) mm,购回后,小心刷洗表壳至无明显污物,置于经二氧化氯消毒并晾晒后的 300 L 方形塑料桶中暂养 1 周以适应环境。在灭菌并曝气 48 h 的纯水中加入人工海盐提前配制所需海水,其盐度为 25±1,温度为(24±2)℃,pH 为 8.1±0.4。暂养期间,保持自然光照周期,使用气泵持续充气供氧,使用具有良好适应性和增殖能力且被广泛用作双壳贝类饲料的亚心型扁藻(*Platymonas subcordiformis*) 投喂泥蚶,早晚

各 1 次,每次约 5% 组织干重(Zhao *et al.*, 2017)。每 24 h 完全换水 1 次,取出泥蚶并彻底清洗缸底桶壁。

1.2 实验设计

Su 等(2017)将泥蚶暴露于 5 μg/L 的 BaP 中长达 28 d,其结果表明 BaP 的亚慢性暴露对泥蚶具有免疫毒性。本实验为了探究 BaP 急性暴露对泥蚶多方面的毒性效应,提高 BaP 浓度,设计为期 4 d 的急性暴露实验:取暂养后仍保持健康有活力的泥蚶若干,随机分为 4 组,分别为海水组(对照组)、DMSO 组(BaP 载体溶剂对照组,0.01% V_{DMSO}/V_{海水})、10 μg/L BaP 浓度组和 100 μg/L BaP 浓度组,每组设 3 个平行,每个平行包含 40 个个体。使用 Agilent 5975 GC-MS 系统测定实验前后水体中的 BaP 浓度。实验前水体中 BaP 浓度为 8.26 μg/L (10 μg/L 组)和 92.47 μg/L (100 μg/L 组),而实验结束时的 BaP 浓度为 5.58 μg/L (10 μg/L 组)和 77.39 μg/L (100 μg/L 组)。暴露实验使用单独的玻璃水族缸养殖每个平行中的所有个体,共 96 h,分别在暴露后的 0、24、48、96 h 从每个浓度组的每个平行随机选取 3 只泥蚶,置于冰上解剖后立即用无菌镊子和眼科剪迅速分离消化腺组织,并将其混合以减少个体差异对实验的影响,随后置于-80℃超低温冰箱保存备用。暂养淘汰缺乏活力和不健康的个体。在暴露期间,泥蚶的存活率为 96.46%。

1.3 组织切片与 HE 染色

取出保存的组织,解冻后用 4%多聚甲醛溶液在室温固定 24 h。用 70%乙醇洗掉残留的固定液并修剪组织,随后进行逐级脱水、透明、透蜡、包埋、切片、脱蜡复水、HE 染色、封片、扫描与图像采集。使用 CaseViewer 软件对图像进行处理与分析。

1.4 脂质过氧化与 DNA 氧化损伤测定

取 0.2 g 组织,按照 1:9 比例加入 1.8 mL 现配的生理盐水,置于冰上用电动研磨器充分研磨,4℃ 3000 r/min 离心 15 min 后取上清液,得到 10%组织匀浆,使用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测定丙二醛(MDA)含量。另取 0.2 g 组织,使用预冷的 PBS 缓冲液(pH=7.4)按照相同的方法取上清液,用酶联免疫吸附法测定 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)的含量。操作步骤参照各试剂盒的说明书。

1.5 抗氧化酶活性和基因表达测定

用生理盐水制备 10%的组织匀浆,使用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测定超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和谷胱

甘肽硫转移酶(GST)的活性, 操作步骤参考各试剂盒的说明书。另取少量组织, 用北京索莱宝科技有限公司提供的总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 随后用 TaKaRa 公司提供的反转录试剂盒进行反转录合成 cDNA 第一链。选取 SOD、CAT 和 GST 作为目标基因, 18S rRNA 作为内参基因(Tang *et al*, 2020; Volland

et al, 2017), 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)实验。从 NCBI 数据库中查找目标基因的全长序列并用 Primer-BLAST 在线设计引物(表 1), 委托华大基因合成引物。qRT-PCR 实验所用的 TB Green[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus)试剂盒购自 TaKaRa 公司, 根据说明书进行实验操作。

表 1 用于实时荧光定量 PCR 的引物

Tab.1 Primer pairs used in quantitative real-time PCR

基因 Gene	引物 Primer (5'~3')	NCBI No.	产物长度 Length of product/bp
SOD-F	GATTAGCACCAGGCCAGCAT	KT452784.1	173
SOD-R	GCCACACCATCTGCATTAGC		
CAT-F	ACGATAATCAAGGCGGTGCT	KT285172.1	155
CAT-R	GAAGGTGGTGACTIONTGCAGAGA		
GST-F	GCGACGCACCAGAATACAGT	MG281839.1	190
GST-R	ACGTCAACATTTACCCGCTCT		
18S rRNA-F	CTTTCAAATGTCTGCCCTATCAACT	JN974506.1	195
18S rRNA-R	TCCCGTATTGTTATTTTCGTCCT		

1.6 神经毒性指标测定

用生理盐水制备 10%的组织匀浆, 使用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测定乙酰胆碱酯酶(AChE)和胆碱乙酰转移酶(ChAT)的活性, 操作步骤参考各试剂盒的说明书。

1.7 DNA 甲基化水平测定和相关性分析

取少量组织, 使用盐析法提取组织 DNA, 随后根据 EpiGentek 试剂盒说明书, 使用间接 ELISA 法对泥蚶组织的 DNA 甲基化水平(5-mC 含量)进行测定。使用 R 软件(V4.0.2)内的 corrplot 包进行 DNA 甲基化水平、抗氧化酶活性及基因表达量、AChE 和 ChAT 活性、MDA 和 8-OHdG 含量的 Spearman 相关性分析, 并进行图形化展示。

1.8 数据分析

所有实验都包含 3 个平行, 数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示。采用 SPSS 19.0 软件对各组数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Tukey 多重比较检验, $P < 0.05$ 时, 为存在显著差异。

2 结果

2.1 BaP 急性暴露与组织损伤

在非胁迫的状态下, 泥蚶的消化腺由许多圆形或椭圆形的消化小管组成, 其最外层有一层膜包裹, 膜的内侧是紧密排列分布的消化腺上皮细胞和泡状的

消化细胞, 上皮细胞和消化细胞共同围成了内部的消化管腔(图 1)。

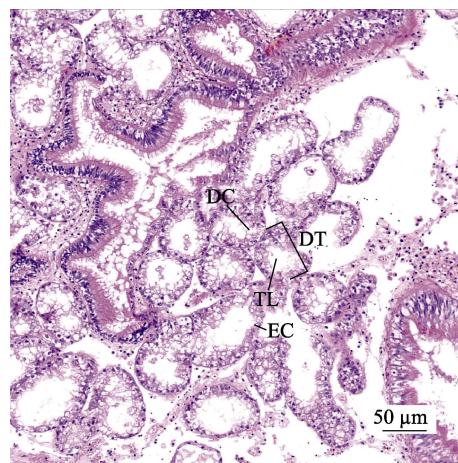


图 1 BaP 暴露前的消化腺组织结构

Fig.1 The digestive gland structure before BaP exposure

TL: 管腔; DT: 消化小管; EC: 上皮细胞; DC: 消化细胞
TL: Tubular lumen; DT: Digestive tubule;
EC: Epithelial cell; DC: Digestive cell

10 μg/L 的 BaP 暴露下, 泥蚶消化腺组织受损程度随着时间延长而增加。在 24 h, 泥蚶消化腺受损较轻, 结构仍然较为完整, 仅有个别消化小管轻微变形(黄箭头)(图 2A)。暴露 48 h 后, 可以观察到明显的血细胞浸润和少量的褐脂素聚集, 消化细胞正从管壁上脱落, 部分消化小管聚集在一起, 变形较为严重且有萎缩的初步迹象(图 2B)。到 96 h, 出现大规模的消化

小管萎缩,其管腔内的消化细胞基本消失(图 2C)。

100 $\mu\text{g/L}$ 的 BaP 暴露也会导致泥蚶的消化腺组织受损程度随时间而增加,但各阶段的损伤状况较 10 $\mu\text{g/L}$ 组更为明显,有个别消化小管趋于解体(蓝箭头)(图 2D 和图 2E)。尤其是在暴露后 96 h,泥蚶消化小管扎堆聚集,出现明显损伤,消化管腔界限模糊,有弥漫性的血细胞浸润,表明已经存在一定程度的坏死(图 2F)。

2.2 BaP 急性暴露与氧化损伤

在暴露于 10 $\mu\text{g/L}$ 的 BaP 24 h 后,泥蚶消化腺中的 MDA 含量显著增加,但在 48 h 回落到对照组水平,随后急剧升高,于 96 h 达到峰值。在 100 $\mu\text{g/L}$ 的 BaP 暴露下,MDA 含量在 24 h 达到峰值,随后略有下降(图 3A)。8-OHdG 含量的变化趋势在初期与 MDA 类似,均在 BaP 暴露后显著增加。与 MDA 不同的是,8-OHdG 含量在 2 个浓度组均呈现时间依赖性增加,

于暴露后 96 h 达到峰值(图 3B)。

2.3 BaP 急性暴露对泥蚶抗氧化防御系统的影响

BaP 急性暴露会引起泥蚶体内的氧化应激反应,从而诱导抗氧化防御系统的启动。由图 4 可见,消化腺中抗氧化酶活性基本呈现持续上升的趋势。在 100 $\mu\text{g/L}$ BaP 暴露下,所有检测的抗氧化酶活性均稳定且持续上升,且都于 96 h 达到峰值。

在 10 $\mu\text{g/L}$ BaP 暴露下,虽然每种抗氧化酶的活性在任一时间点都显著高于对照组,但各自的活性变化情况不同。SOD 活性在 48 h 前显著增加,尽管在 96 h 达到峰值,但比 48 h 仅有轻微上升(图 4A)。CAT 活性在 24 h 达到峰值,随后有所回落,48 h 后趋于稳定(图 4B)。POD 活性则呈现出持续增加的趋势(图 4C)。GST 活性表现为先上升后下降再上升的趋势,在 24 h 相对对照组显著增加,随后出现显著下降,实验后期又陡然增加直至 96 h 出现最高值(图 4D)。

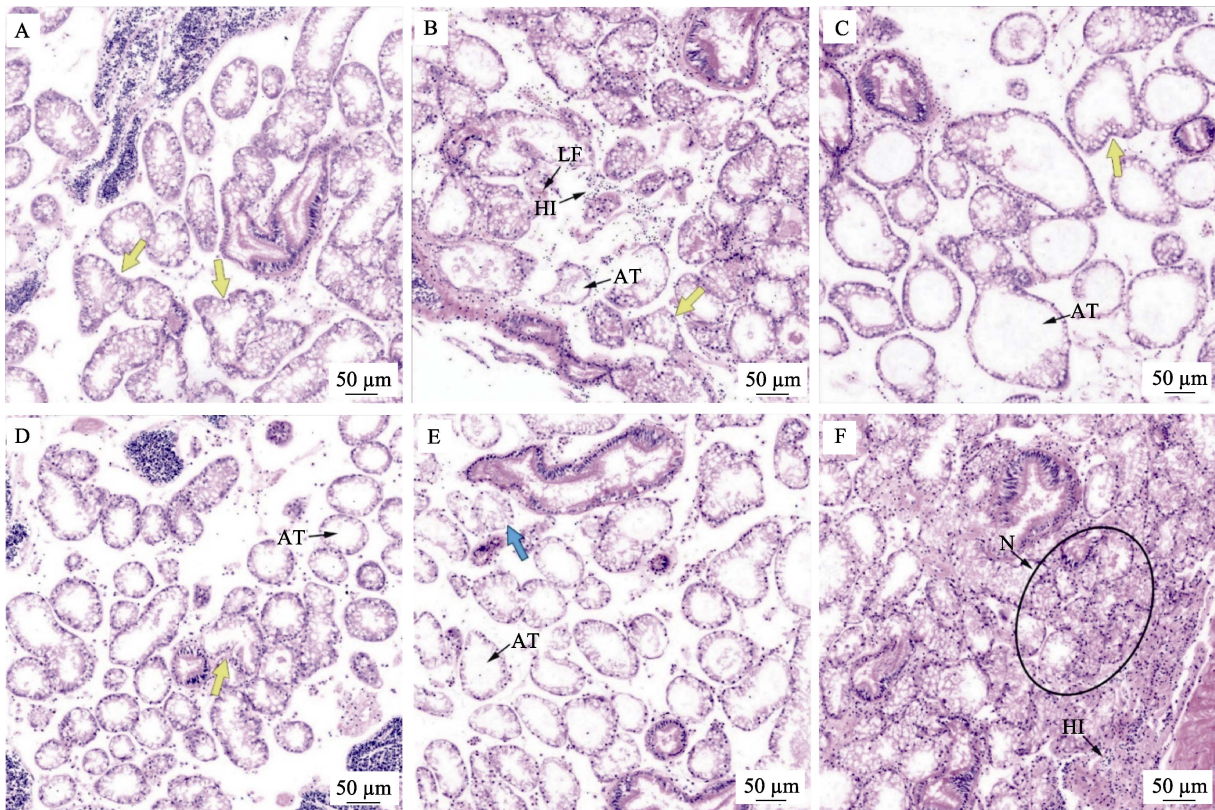


图 2 BaP 暴露后的消化腺组织结构

Fig.2 The digestive gland structure after BaP exposure

A、B 和 C 图分别为 10 $\mu\text{g/L}$ BaP 暴露 24 h、48 h 和 96 h

D、E 和 F 图分别为 100 $\mu\text{g/L}$ BaP 暴露 24 h、48 h 和 96 h

AT: 萎缩的消化小管; LF: 褐脂素; HI: 血细胞浸润; N: 坏死

A, B, and C figures show 10 $\mu\text{g/L}$ BaP exposure for 24 h, 48 h, and 96 h, respectively, and D, E, and F figures show 100 $\mu\text{g/L}$ BaP exposure for 24 h, 48 h, and 96 h, respectively

AT: Atrophied tubules; LF: Lipofuscin; HI: Hemocyte infiltration; N: Necrosis

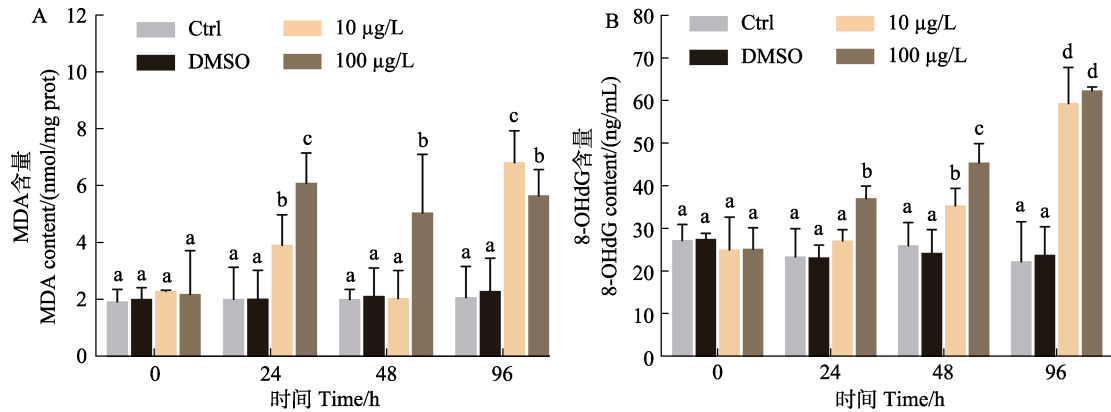


图 3 BaP 暴露下泥蚶消化腺中 MDA (A)和 8-OHdG (B)的含量

Fig.3 The MDA (A) and 8-OHdG (B) content in the digestive gland of blood clams exposed to BaP

数值表示为平均值±标准差(n=3)。不同字母表示组间存在显著差异(P<0.05)。下同。

Values presented as Mean±SD (n=3). Groups with different letters are significantly different (P<0.05). The same as below.

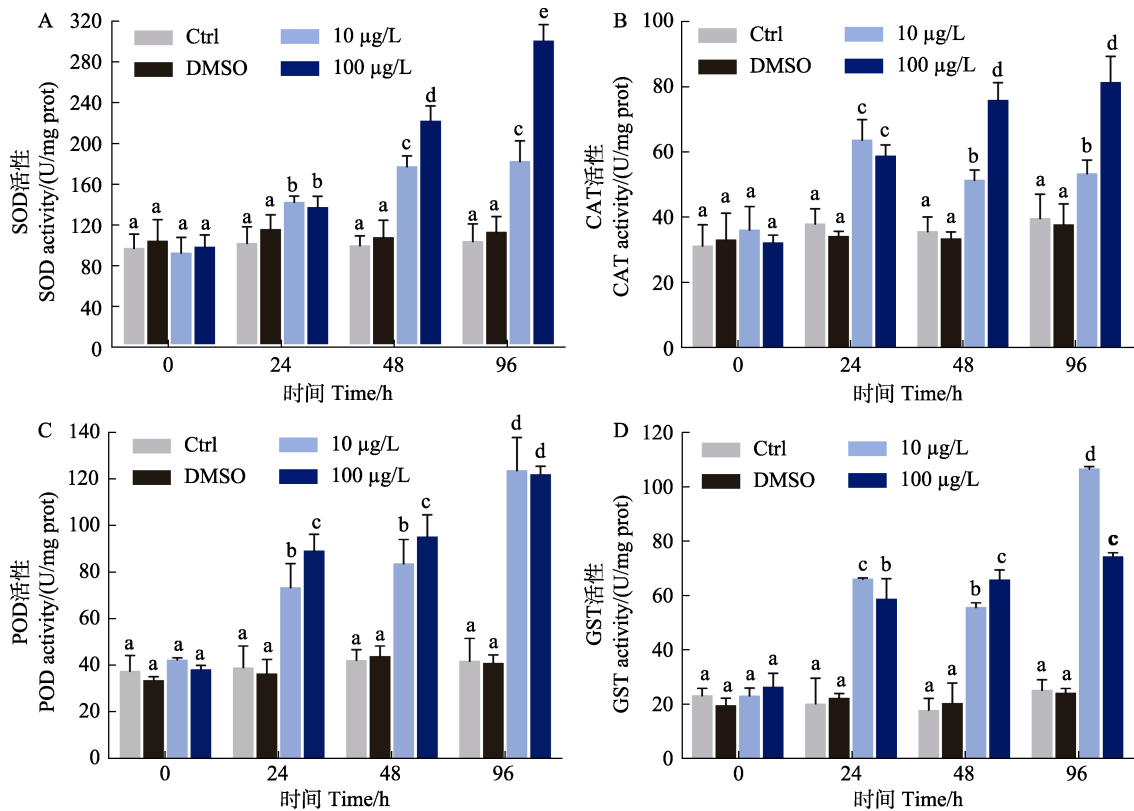


图 4 BaP 暴露对泥蚶消化腺中 SOD (A)、CAT (B)、POD (C)和 GST (D)活性的影响

Fig.4 Effects of BaP exposure on activities of SOD (A), CAT (B), POD (C), and GST (D) in digestive glands of blood clams

抗氧化酶的基因表达量与其活性有较好的一致性。在 100 µg/L BaP 暴露下, SOD、CAT 和 GST 的表达量均持续上升, 直至实验结束时出现峰值。在 10 µg/L BaP 暴露下, 这 3 种抗氧化酶的基因表达量先在 24 h 出现显著上升, 随后的变化趋势各不相同。其中, SOD 基因在 48 h 及之后出现高表达, 96 h 比 48 h 仅有略微降低(图 5A)。CAT 基因的表达量则在 48 h 及之后迅速降低至对照组水平(图 5B)。GST 基因在

48 h 的表达量基本与 24 h 相同, 但在 96 h 显著上升, 出现峰值且高于 100 µg/L 组的表达量(图 5C)。

2.4 BaP 急性暴露对泥蚶神经系统的影响

AChE 和 ChAT 是胆碱能系统中起着重要作用的 2 种酶, 在神经系统中广泛分布并参与神经冲动的传导。在 BaP 急性暴露下, 2 种酶活性都受到了显著抑制。AChE 活性在 10 µg/L 组持续降低, 而在 100 µg/L

组只在 24 h 出现显著降低, 随后基本保持不变, 实验结束时的活性反而高于 10 $\mu\text{g/L}$ 组(图 6A)。ChAT 的变化趋势与 AChE 类似, 只是 100 $\mu\text{g/L}$ 组在 48 h 出现显著降低(图 6B)。

2.5 BaP 急性暴露对泥蚶 DNA 甲基化水平的影响

在 2 种浓度 BaP 的暴露下, 泥蚶消化腺组织的 DNA 甲基化水平在 24 h 出现显著降低, 随后呈现时间依赖性下降, 在实验结束时出现最低值(图 7)。

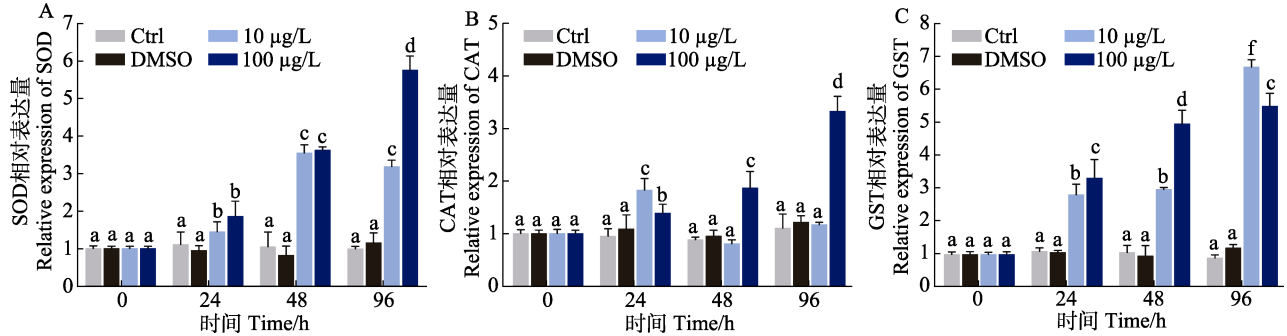


图 5 BaP 暴露对泥蚶消化腺中 SOD (A)、CAT (B)和 GST (C)基因表达的影响

Fig.5 Effects of BaP exposure on gene expression of SOD (A), CAT (B) and GST (C) in the digestive gland of blood clams

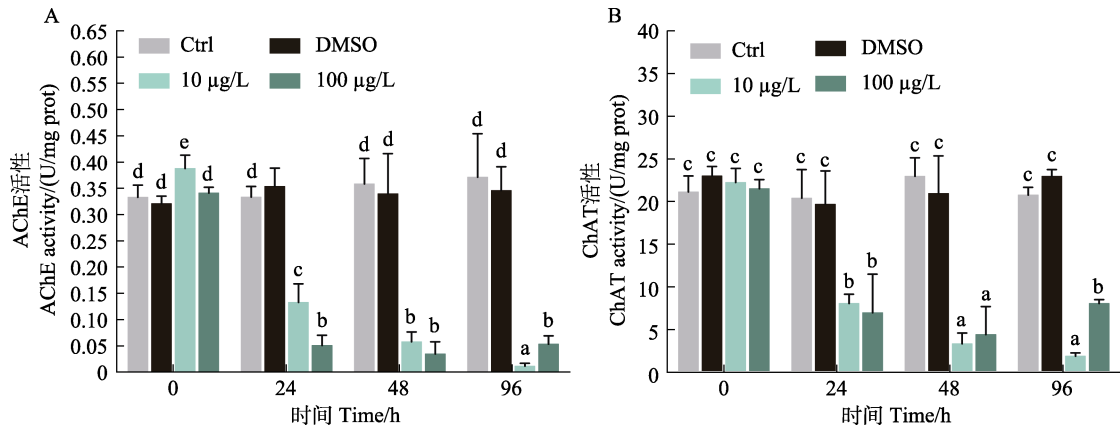


图 6 BaP 暴露对泥蚶消化腺中 AChE (A)和 ChAT (B)活性的影响

Fig.6 Effects of BaP exposure on activities of AChE (A) and ChAT (B) in the digestive gland of blood clams

2.6 相关性分析

由图 8 可见, 泥蚶消化腺组织中各个抗氧化酶活性及其基因表达量之间基本为显著的正相关, 表明基因表达和酶活性的一致性。而 DNA 甲基化水平与各抗氧化酶活性及其基因表达量之间则呈显著的负相关。此外, 由于 BaP 暴露导致了神经系统关键酶 AChE 和 ChAT 活性的降低, 因此, 它们也与其他酶活性呈负相关, 而与 DNA 甲基化水平呈正相关。

3 讨论

泥蚶作为一种滤食性双壳贝类, 在滩涂里营埋栖生活, 移动能力差, 特别容易受到 BaP 等环境污染物的影响。消化腺作为双壳贝类的重要器官, 不仅参与营养物质的消化, 也是有机污染物聚集和解毒的重要

细胞器, 广泛参与抗氧化防御过程(Marigómez *et al*, 2002; Pagano *et al*, 2016)。当泥蚶受到 BaP 胁迫时,

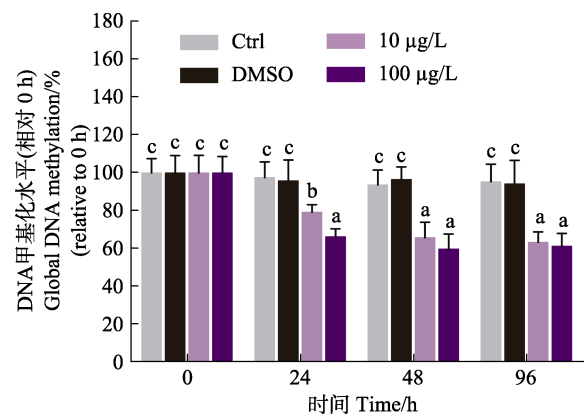


图 7 BaP 暴露下泥蚶消化腺中的 DNA 甲基化水平变化

Fig.7 Changes of global DNA methylation level in the digestive gland of blood clams exposed to BaP



图 8 泥蚶消化腺各项指标的斯皮尔曼等级相关性分析结果

Fig.8 Spearman rank correlation results for all biomarkers in the digestive gland of blood clams

圆的大小表示相关程度, 与斯皮尔曼等级相关系数成正比。红色代表正相关, 蓝色代表负相关。

*表示存在显著相关($P < 0.05$), **表示存在极显著相关($P < 0.01$)。

The circle size is proportional to the correlation value (Spearman rank correlation coefficient), which represents correlation level. Red represents positive correlation and blue represents negative correlation.

*: Significant difference ($P < 0.05$), **: Highly significant difference ($P < 0.01$).

消化腺的受损程度随时间增加而加重, 表现为消化细胞脱落, 消化小管萎缩、变形、破碎, 以及部分区域坏死。此外, 在 BaP 暴露期间, 泥蚶消化小管之间出现了血细胞浸润, 如 10 $\mu\text{g/L}$ BaP 暴露 48 h 后出现轻度的血细胞浸润, 但该情况在暴露后 96 h 明显缓解, 而 100 $\mu\text{g/L}$ 浓度组在暴露前期和中期均未出现明显的血细胞浸润, 但在暴露 96 h 之后出现大规模的弥漫性血细胞浸润和组织坏死。不同于脊椎动物, 双壳贝类的血细胞在免疫方面有着重要作用(Canesi *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2018), 行使着脊椎动物炎细胞类似的功能, 因此, 出现血细胞浸润往往代表炎症的存在, 有诸多研究从分子层面表明, BaP 暴露会在鸡帘蛤 (*Chamelea gallina*) (Matozzo *et al.*, 2009)、菲律宾蛤仔 (*Venerupis philippinarum*) (Liu *et al.*, 2014) 等双壳贝类中引发炎症反应, 本研究借助组织切片技术, 切实观察到了炎症反应的存在, 证明了 BaP 急性暴露也会导致泥蚶出现炎症反应。

氧化压力是指细胞内活性氧簇(ROS)水平增加导致的脂质、蛋白质和 DNA 的损伤(Schieber *et al.*, 2014),

它已经被证明是 BaP 导致软体动物中毒的主要毒性机制(Livingstone, 2001)。ROS 会导致生物膜发生脂质过氧化, 而 MDA 则是脂质过氧化的重要产物之一。MDA 因其检测方便的特点, 被广泛用于脂质过氧化程度的判定。8-OHdG 常因其在体外 DNA 模板的修饰和相邻碱基中的误导作用而被广泛研究(Kuchino *et al.*, 1987), 是另一种非常重要的损伤性生物标志物。本研究通过测定 MDA 和 8-OHdG 含量探究了 BaP 对泥蚶造成的氧化损伤。结果显示, MDA 含量随暴露时间延长而显著增加, 表明 BaP 暴露可使泥蚶的脂质过氧化水平的时间依赖性升高, 从而导致细胞毒性。在栉孔扇贝中也发现类似结果, MDA 随着暴露时间的增加而增加, 且 MDA 含量与 BaP 浓度呈正相关(Pan *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2013)。Sifi 等(2019)的研究也证明了这一点, 在被 BaP 等污染的海域中, 截形斧蛤 (*Donax trunculus*)体内的 MDA 含量会显著增加。Qi 等(2020)关于厚壳贻贝的研究和 Jiang 等(2019)关于菲律宾蛤仔的研究也都表明了 BaP 暴露和双壳贝类体内 MDA 含量的关联性。在 BaP 暴露下, 另一个指

标 8-OHdG 的含量在消化腺中的时间依赖性增加,表明 DNA 氧化损伤的存在。在相近物种中也有类似的研究,当地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)暴露于含有一系列不同浓度 BaP 的海水时,其鳃和消化腺中均检测到 8-OHdG 含量的显著增加,但并未观察到明显的剂量-效应关系(Canova *et al.*, 1998)。

Al-Subiai 等(2011)研究表明,氧化压力的增加是诱导组织损伤和 DNA 损伤的原因之一。抗氧化防御系统作为机体的重要组成部分,在应对氧化压力方面有重要作用。在这个系统中,起关键作用的是其中的抗氧化酶,如 SOD、CAT、POD 和 GST 等。SOD 能清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受 ROS 损伤,在机体的氧化与抗氧化平衡中发挥主要作用。CAT 和 POD 同属于过氧化物酶系,主要负责清理 SOD 酶促反应生成的过氧化氢。消化腺作为泥蚶抵御有机污染物的重要器官,其 SOD 和 CAT 活性及表达量在 10 $\mu\text{g/L}$ BaP 暴露 48 h 后不再有显著上涨,而在 100 $\mu\text{g/L}$ BaP 暴露下则持续显著上涨至实验结束出现峰值;POD 的活性一直持续增长;而 GST 的活性及表达量随时间出现波动。由此可见,该实验结果未能反映出消化腺对 BaP 的处理能力上限,但消化腺在实验结束时已受到了较严重的损伤,对其行使抗氧化功能也有一定的影响。相似的结果在菲律宾帘蛤(Wang *et al.*, 2011)、缢蛭(*Sinonovacula constricta*) (Li *et al.*, 2016)、不等壳毛蚶(*Scapharca inaequivalvis*) (Monari *et al.*, 2007)等海洋双壳贝类中也有报道。

BaP 作为一种高毒性物质,除了具有氧化毒性外,还具有神经毒性(Chepelev *et al.*, 2015)。然而,关于 BaP 神经毒性的研究,大多集中在脊椎动物及部分模式生物,很少涉及双壳贝类。AChE 和 ChAT 作为一对控制乙酰胆碱(Ach)含量的神经系统关键酶,能标明胆碱能神经功能状态,在神经系统中有着非常重要的作用。其中,ChAT 主要负责合成 Ach,而 AChE 则将其分解为胆碱和乙酸盐。在斑节对虾(*Penaeus monodon*)和黑海胆(*Arbacia lixula*)等水生无脊椎动物(Eamkamon *et al.*, 2012; Maisano *et al.*, 2015),这些酶活性的改变可能表明胆碱功能受损,因此,也指示了神经毒性的存在与否(Fulton *et al.*, 2001; Lavado *et al.*, 2006; Jebali *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2018)。在本研究结果中,10 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 的 BaP 急性暴露都会使泥蚶消化腺中 AChE 和 ChAT 的酶活性显著下降,实验结束时这 2 种酶的活性已处于非常低的水平,表明 BaP 对泥蚶可能具有神经毒性。

DNA 甲基化已经被证明参与哺乳动物和模式生

物暴露于 BaP 时的应激反应。在斑马鱼(*Danio rerio*)中, BaP 暴露会导致基因特异性甲基化和整体 DNA 甲基化水平的降低,从而打开基因启动子的开关,诱导环境胁迫相关基因表达以减弱 BaP 带来的影响(Fang *et al.*, 2013; Corrales *et al.*, 2014)。在泥蚶中,观察到 BaP 暴露下的消化腺组织中出现 DNA 甲基化水平显著下降,且在 48 h 之后基本保持稳定。鉴于目前尚无关于 BaP 暴露下软体动物 DNA 甲基化水平变化的研究,因此,未能对当前实验结果进行平行比较分析。然而,研究发现,在其他有毒物质暴露软体动物时,会降低其 DNA 甲基化的水平(Akcha *et al.*, 2021; Bal *et al.*, 2017)。这些现象与本研究观察到的结果基本一致,至少表明泥蚶的 DNA 甲基化水平变化参与了 BaP 暴露引起的应激反应。

相关性分析显示, DNA 甲基化水平和抗氧化酶基因表达之间呈显著或极显著的负相关,结合其他学者的相关研究(Fang *et al.*, 2013; Corrales *et al.*, 2014)和 DNA 甲基化的作用机制,推测 DNA 甲基化水平的降低可能在一定程度上促进了抗氧化酶基因的表达,从而对抗 BaP 的毒性。SOD、CAT 和 GST 在 BaP 暴露下不同时间点的基因表达情况则证明了这点,这 3 种抗氧化酶基因的表达量在暴露 24 h 后都出现显著增加。虽然在某些时间点上,基因的表达水平和相应抗氧化酶活性之间并不总是一致,这可能与蛋白质的翻译后修饰有关(Regoli *et al.*, 2011),但从整体上看,这些基因的表达量相较暴露前确实有所增长。因此, DNA 甲基化水平的降低可能是泥蚶抵御 BaP 胁迫的重要机制之一。通过测定抗氧化酶基因的表达量以及相关分析,从侧面印证了该机制的合理性,但未来仍需进行更多、更深入的实验和分析,以挖掘更多信息,进一步扩展对于 BaP 暴露泥蚶产生的毒性效应以及泥蚶自身在此情况下产生应激反应的理解。

综上所述, BaP 急性暴露泥蚶会给她带来多种毒性效应,主要表现为几乎不可逆的组织损伤;氧化损伤指标如 MDA 和 8-OHdG 的含量随暴露时间增长呈显著增加;神经传导关键酶 AChE 和 ChAT 活性被显著抑制。在这个过程中,抗氧化防御系统会积极响应,以求尽量降低 BaP 对机体的影响,但长时间高浓度的 BaP 暴露会加重抗氧化防御系统的负担,从而导致不可逆转的损伤,而 DNA 甲基化水平的显著降低,可能是泥蚶应对 BaP 暴露的潜在机制之一。

参 考 文 献

AKCHA F, BARRANGER A, BACHÈRE E. Genotoxic and

- epigenetic effects of diuron in the Pacific oyster: *In vitro* evidence of interaction between DNA damage and DNA methylation. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(7): 8266–8280
- AL-SUBIAI S N, MOODY A J, MUSTAFA S A, *et al.* A multiple biomarker approach to investigate the effects of copper on the marine bivalve mollusc, *Mytilus edulis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011, 74(7): 1913–1920
- BAL N, KUMAR A, NUGEGODA D. Assessing multigenerational effects of prednisolone to the freshwater snail, *Physa acuta* (Gastropoda: Physidae). *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 339: 281–291
- BANNI M, NEGRI A, DAGNINO A, *et al.* Acute effects of benzo[a]pyrene on digestive gland enzymatic biomarkers and DNA damage on mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, 73(5): 842–848
- CANESI L, BETTI M, CIACCI C, *et al.* Cell signaling in the immune response of mussel hemocytes. *Invertebrate Survival Journal*, 2006, 3(1): 40–49
- CAI Y, PAN L, MIAO J. *In vitro* study of the effect of metabolism enzymes on benzo(a)pyrene-induced DNA damage in the scallop *Chlamys farreri*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2016, 42: 92–98
- CANOVA S, DEGAN P, PETERS L D, *et al.* Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A-immunopositive proteins in mussels exposed to waterborne benzo[a]pyrene. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1998, 399(1): 17–30
- CAO Y, XIN M, WANG B, *et al.* Spatiotemporal distribution, source, and ecological risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the urbanized semi-enclosed Jiaozhou Bay, China. *Science of the Total Environment*, 2020, 717: 137224
- CHEN H, DIAO X, ZHOU H. Tissue-specific metabolic responses of the pearl oyster *Pinctada martensii* exposed to benzo[a]pyrene. *Marine Pollution Bulletin*, 2018, 131: 17–21
- CHEN S, QU M, DING J, *et al.* BaP-metals co-exposure induced tissue-specific antioxidant defense in marine mussels *Mytilus coruscus*. *Chemosphere*, 2018, 205: 286–296
- CHEPELEV N L, MOFFAT I D, BOWERS W J, *et al.* Neurotoxicity may be an overlooked consequence of benzo[a]pyrene exposure that is relevant to human health risk assessment. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 2015, 764: 64–89
- CORRALES J, FANG X, THORNTON C, *et al.* Effects on specific promoter DNA methylation in zebrafish embryos and larvae following benzo[a]pyrene exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2014, 163: 37–46
- DENG W. A preliminary study on the composition, distribution and source apportionment of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from the South Yellow Sea and East China Sea. Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2013 [邓伟. 南黄海、东海表层沉积物中脂肪烃与多环芳烃的分布特征及来源初步研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2013]
- EAMKAMON T, KLINBUNGA S, THIRAKHUPT K, *et al.* Acute toxicity and neurotoxicity of chlorpyrifos in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Environment Asia*, 2012, 5(1): 26–31
- FANG X, THORNTON C, SCHEFFLER B E, *et al.* Benzo[a]pyrene decreases global and gene-specific DNA methylation during zebrafish development. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2013, 36(1): 40–50
- FU H, XIA Y, CHEN Y, *et al.* Acetylcholinesterase is a potential biomarker for a broad spectrum of organic environmental pollutants. *Environmental Science and Technology*, 2018, 52(15): 8065–8074
- FULTON M H, KEY P B. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20(1): 37–45
- GEFFARD O, GEFFARD A, HIS E, *et al.* Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Marine Pollution Bulletin*, 2003, 46(4): 481–490
- HANNAM M L, BAMBER S D, GALLOWAY T S, *et al.* Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus*. *Chemosphere*, 2010, 78(7): 779–784
- HUANG J, LI S, LIU Y, *et al.* Hemocytes in the extrapallial space of *Pinctada fucata* are involved in immunity and biomineralization. *Scientific Reports*, 2018, 8: 4657
- JEBALI J, KHEDHER S B, SABBAGH M, *et al.* Cholinesterase activity as biomarker of neurotoxicity: Utility in the assessment of aquatic environment contamination. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*, 2013, 13(4): 525–537
- JIANG W, FANG J, GAO Y, *et al.* Biomarkers responses in Manila clam, *Ruditapes philippinarum* after single and combined exposure to mercury and benzo[a]pyrene. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2019, 220: 1–8
- KUCHINO Y, MORI F, KASAI H, *et al.* Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature*, 1987, 327(7): 77–79
- LAVADO R, UREÑA R, MARTIN-SKILTON R, *et al.* The combined use of chemical and biochemical markers to

- assess water quality along the Ebro River. *Environmental Pollution*, 2006, 139(2): 330–339
- LI Y. Effects of benzo(a)pyrene on the liver, gill, sexual gland structure and main biomarkers of *Cyprinus carpio*. Master's Thesis of Qufu Normal University, 2018 [李玉. 苯并(a)芘对鲤鱼肝脏、鳃、性腺组织结构及主要生物标志物的影响. 曲阜师范大学硕士研究生学位论文, 2018]
- LI L, JIANG M, SHEN X. Variability in antioxidant/detoxification enzymes of *Sinonovacula constricta* exposed to benzo[a]pyrene and phenanthrene. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 109(1): 507–511
- LIU N, PAN L, GONG X, *et al.* Effects of benzo(a)pyrene on differentially expressed genes and haemocyte parameters of the clam *Venerupis philippinarum*. *Ecotoxicology*, 2014, 23(2): 122–132
- LIVINGSTONE D R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 2001, 42(8): 656–666
- MAISANO M, CAPPELLO T, CATANESE E, *et al.* Developmental abnormalities and neurotoxicological effects of CuO NPs on the black sea urchin *Arbacia lixula* by embryotoxicity assay. *Marine Environmental Research*, 2015, 111: 121–127
- MARIGÓMEZ I, SOTO M, CAJARAVILLE M P, *et al.* Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique*, 2002, 56(5): 358–392
- MATOZZO V, MONARI M, FOSCHI J, *et al.* First evidence of altered immune responses and resistance to air exposure in the clam *Chamelea gallina* exposed to benzo(a)pyrene. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2009, 56(3): 479–488
- MONARI M, CATTANI O, SERRAZANETTI G, *et al.* Effect of exposure to benzo[a]pyrene on SODs, CYP1A1/1A2-and CYP2E1 immunopositive proteins in the blood clam *Scapharca inaequivalvis*. *Marine Environmental Research*, 2007, 63(3): 200–218
- PAGANO M, CAPILLO G, SANFILIPPO M, *et al.* Evaluation of functionality and biological responses of *Mytilus galloprovincialis* after exposure to quaternium-15 (methenamine 3-chloroallylochloride). *Molecules*, 2016, 21(2): 144
- PAN L, REN J, ZHENG D. Effects of benzo(a)pyrene exposure on the antioxidant enzyme activity of scallop *Chlamys farreri*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009, 27(1): 43–53
- QI P, TANG Z. The Nrf2 molecule trigger antioxidant defense against acute benzo(a)pyrene exposure in the thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Aquatic Toxicology*, 2020, 226: 105554
- QU C, LIU S, TANG Z, *et al.* Response of a novel selenium-dependent glutathione peroxidase from thick shell mussel *Mytilus coruscus* exposed to lipopolysaccharide, copper and benzo[a]pyrene. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 89: 595–602
- REGOLI F, GIULIANI M E, BENEDETTI M, *et al.* Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquatic Toxicology*, 2011, 105(3): 56–66
- RENAULT T. Immunotoxicological effects of environmental contaminants on marine bivalves. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 46(1): 88–93
- SCHIEBER M, CHANDEL N S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, 2014, 24(10): R453–R462
- SIFI K, SOLTANI N. Seasonal changes of two biomarkers of oxidative stress (LDH, MDA) in the edible mollusc *Donax trunculus* (Mollusca: Bivalvia) from the Gulf of Annaba (Algeria): Correlation with carbohydrate and lipid contents. *Molluscan Research*, 2019, 39(1): 44–52
- SPECIALE A, ZENA R, CALABRO C, *et al.* Experimental exposure of blue mussels (*Mytilus galloprovincialis*) to high levels of benzo[a]pyrene and possible implications for human health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 150: 96–103
- SU W, SHI W, HAN Y, *et al.* The health risk for seafood consumers under future ocean acidification (OA) scenarios: OA alters bioaccumulation of three pollutants in an edible bivalve species through affecting the *in vivo* metabolism. *Science of the Total Environment*, 2019, 650: 2987–2995
- SU W, ZHA S, WANG Y, *et al.* Benzo[a]pyrene exposure under future ocean acidification scenarios weakens the immune responses of blood clam, *Tegillarca granosa*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 63: 465–470
- TIAN S, PAN L, SUN X. An investigation of endocrine disrupting effects and toxic mechanisms modulated by benzo[a]pyrene in female scallop *Chlamys farreri*. *Aquatic Toxicology*, 2013, 144: 162–171
- TIAN Y, LIU J, PAN L. The mechanism of mitogen-activated protein kinases to mediate apoptosis and immunotoxicity induced by benzo[a]pyrene on hemocytes of scallop *Chlamys farreri in vitro*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 102: 64–72
- TANG Y, RONG J, GUAN X, *et al.* Immunotoxicity of microplastics and two persistent organic pollutants alone or in combination to a bivalve species. *Environmental Pollution*, 2020, 258: 113845
- VOLLAND M, BLASCO J, HAMPEL M. Validation of reference genes for RT-qPCR in marine bivalve ecotoxicology: Systematic review and case study using copper treated primary *Ruditapes philippinarum* hemocytes. *Aquatic Toxicology*, 2017, 185: 86–94
- WANG H, PAN L, SI L, *et al.* The role of Nrf2-Keap1 signaling pathway in the antioxidant defense response induced by

- PAHs in the clam *Ruditapes philippinarum*. Fish and Shellfish Immunology, 2018, 80: 325–334
- WANG L, PAN L, 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 Q, YANG H, LIU B, *et al.* Toxic effects of benzo[a]pyrene (Bap) and Aroclor1254 on embryogenesis, larval growth, survival and metamorphosis of the bivalve *Meretrix meretrix*. Ecotoxicology, 2012, 21(6): 1617–1624
- XIU M, PAN L, JIN Q. Bioaccumulation and oxidative damage in juvenile scallop *Chlamys farreri* exposed to benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene and chrysene. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2014, 107: 103–110
- XU Y, ZHU J X, JIANG T, *et al.* The acute toxicity of dispersant and chemically dispersed oil on the *Argopecten irradians*. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(6): 121–126 [徐勇, 朱建新, 江涛, 等. 消油剂对海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 的急性毒性效应. 渔业科学进展, 2015, 36(6): 121–126]
- 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中 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]
- ZHANG Z Y. Distributions and sedimentary records of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in the mud areas of the East China Sea. Master's Thesis of Ocean University of China, 2008 [张宗雁. 持久性有机污染物在东海泥质区的分布与沉积记录. 中国海洋大学硕士研究生学位论文, 2005]
- ZHAO X, SHI W, HAN Y, *et al.* Ocean acidification adversely influences metabolism, extracellular pH and calcification of an economically important marine bivalve, *Tegillarca granosa*. Marine Environmental Research, 2017, 125: 82–89
- ZHU Y, WU W J, WANG J J, *et al.* Distribution, sources and ecological risks of polycyclic aromatic hydrocarbons in water-sediment system in Lake Small Baiyangdian. Journal of Lake Science, 2009, 21(5): 637–646 [朱樱, 吴文婧, 王军军, 等. 小白洋淀水-沉积物系统多环芳烃的分布、来源与生态风险. 湖泊科学, 2009, 21(5): 637–646]

(编辑 冯小花)

Toxic Effects of Acute Benzo[a]pyrene Exposure on Blood Clam *Tegillarca granosa* and Its Potential Coping Mechanism

XU Zhongtian, DONG Zhenyu, LI Jiji, QI Pengzhi, GUO Baoying^①

(Zhejiang Ocean University, National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhoushan, Zhejiang 316022, China)

Abstract Spilled petroleum pollution caused by seaborne oil transportation is a major marine environmental problem in the world. Petroleum pollutants contain significant amounts of low-molecular-weight alkanes and aromatics that induce toxic effects once taken up by marine organisms. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a class of organic compounds with the most significant toxic environmental effects. As bivalves, which have a strong enrichment and tolerance capacity for PAHs in water, are widely distributed and easy to obtain, they are often used as model organisms for monitoring and evaluating offshore marine pollution. The blood clam (*Tegillarca granosa*), a bivalve with high economic value, is widely distributed in mudflats along the coast of Zhejiang Province. Blood clams have characteristics of benthic life, making them more likely to be exposed to petroleum pollutants. At present, there are few studies on the toxic effects of PAH exposure on blood clams. Herein, we chose benzo[a]pyrene (BaP), a typical PAH congener, as a contaminant,

① Corresponding author: GUO Baoying, E-mail: guobaoying@zjou.edu.cn

and investigated the toxic effects of acute BaP exposure on blood clams and their potential coping mechanisms.

Blood clams required for the experiment were collected from Dongji Island and acclimated for a week in the laboratory. After acclimation, several healthy blood clams were randomly divided into the artificial sea water (ASW) (control group), dimethyl sulfoxide (DMSO) (solvent control group, 0.01% $V_{\text{DMSO}}/V_{\text{ASW}}$), 10 $\mu\text{g/L}$ BaP exposure group, and 100 $\mu\text{g/L}$ BaP exposure groups based on the previous studies of our research group combined with the literature. Each group was set up with three replicates, each containing 40 individuals. The experiment lasted 96 h, and separate glass tanks were used to place all individuals in each replicate. One blood clam was randomly selected from each replicate of each concentration group at 0, 24, 48, and 96 h of exposure. After dissection on ice, the digestive gland was immediately separated using sterile forceps and scissors and stored at -80°C . The paraffin section was then used to observe the lesions of the digestive gland. A colorimetric assay was used to determine the activities of antioxidant enzymes and key enzymes involved in neurotransmission at different time points. The cell damage degree was also determined by measuring the levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and malondialdehyde (MDA). In addition, enzyme-linked immunosorbent assays were used to determine DNA methylation levels. Finally, we measured the relative mRNA expression of antioxidant enzymes and performed a correlation analysis.

Results showed prominent hemocyte infiltration and necrotic areas in the digestive gland of the blood clam after a total of 96 h of exposure to 10 and 100 $\mu\text{g/L}$ BaP, indicating inflammation. The sloughing of digestive cells from the inner wall of the digestive tubule led to atrophy. Increased oxidative stress was indicated by elevated MDA and 8-OHdG content, leading to damage at the cellular level, such as lipid peroxidation and oxidative DNA damage. The activities of antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), and glutathione-S-transferase (GST), increased significantly 24 h post-exposure. This phenomenon further indicated that BaP exposure induced oxidative stress in the blood clam, with the antioxidant defense system actively regulating BaP-induced oxidative stress. The activities of two key neurotransmitter enzymes, acetylcholinesterase and acetylcholine transferase, were significantly reduced, indicating that the stress caused by BaP may induce neurotoxicity in the blood clam. In addition, we analyzed the changes in DNA methylation levels and gene expression of antioxidant enzymes in the blood clam under acute BaP exposure, finding that the DNA methylation levels were significantly decreased compared to pre-exposure, while the mRNA expression of SOD, CAT, and GST was significantly increased. Correlation analysis showed a negative correlation between DNA methylation and the gene expression of antioxidant enzymes, implying that blood clams may activate the antioxidant systems to fight against BaP toxicity by reducing DNA methylation levels. In conclusion, acute BaP exposure exerts a significant toxic effect on the blood clam, primarily characterized by histological damage, oxidative stress, and neurotoxicity. Moreover, changes in DNA methylation levels in the blood clam may be involved in the regulatory process of BaP toxic effects. This study is expected to provide new ideas for the in-depth exploration of the intrinsic regulatory mechanisms of bivalves in response to petroleum pollutant stress, and will be beneficial for resource conservation of the blood clam under the threat of petroleum pollution.

Key words Benzo[a]pyrene; *Tegillarca granosa*; Tissue damage; Oxidative stress; Neurotoxicity; DNA methylation