

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20180723002

杨占宁, 丁光辉, 于源志, 等. 单壁碳纳米管对太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的毒性效应及生物体防御机制研究[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(1): 90-98

Yang Z N, Ding G H, Yu Y Z, et al. Study on toxicity of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) to Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the defense mechanism involved [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(1): 90-98 (in Chinese)

单壁碳纳米管对太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 的毒性效应及生物体防御机制研究

杨占宁¹, 丁光辉^{1,*}, 于源志², 李西山¹, 张楠楠¹, 李瑞娟¹, 张晶³, 崔福旭³

1. 大连海事大学 环境科学与工程学院, 大连 116026

2. 武汉大学 生命科学学院, 武汉 430072

3. 大连大学 环境与化工学院, 大连 116622

收稿日期: 2018-07-23

录用日期: 2018-09-03

摘要: 碳纳米管的生态安全和健康风险日益受到人们的广泛关注。本文采用典型的海洋底栖生物——太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*, *C. gigas*)作为受试生物,研究了单壁碳纳米管(Single-Walled Carbon Nanotubes, SWCNTs)暴露对其造成的毒性效应及牡蛎自身的防御机制,以期对碳纳米管的海洋生态风险评价提供科学依据。在 0.1 ~ 10 mg·L⁻¹ 的 SWCNTs 暴露 96 h 后,太平洋牡蛎鳃和消化腺中的丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量显著增加($P \leq 0.05$),总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性呈现显著的剂量依赖性升高($P \leq 0.05$), *cat*、*hsp70*、*aox* 及 *caspase-7* 等基因的相对表达量显著上调($P \leq 0.05$)。相比于单独暴露, P-gp 蛋白抑制剂 Tariquidar 与 SWCNTs 的复合暴露显著增加了鳃和消化腺中 MDA 含量,产生了更严重的氧化损伤。这些结果表明, SWCNTs 暴露对太平洋牡蛎的鳃和消化腺造成了一定程度的氧化损伤,而牡蛎体内的抗氧化系统和多外源性物质抗性机制在防御 SWCNTs 的过程中起到了至关重要的作用。

关键词: 单壁碳纳米管; 太平洋牡蛎; 毒性效应; 防御机制

文章编号: 1673-5897(2019)1-090-09

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Study on Toxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes (SWCNTs) to Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and the Defense Mechanism Involved

Yang Zhanning¹, Ding Guanghui^{1,*}, Yu Yuanzhi², Li Xishan¹, Zhang Nannan¹, Li Ruijuan¹, Zhang Jing³, Cui Fuxu³

1. College of Environmental Science and Engineering, Dalian Maritime University, Dalian 116026, China

2. School of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China

3. College of Environment and Chemical Technology, Dalian University, Dalian 116622, China

Received 23 July 2018

accepted 3 September 2018

Abstract: The ecological and health risks of carbon nanotubes are receiving more attention. In this study, Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), a kind of typical marine benthic organism, was exposed to single-walled carbon nano-

基金项目: 国家自然科学基金(51479016, 51308083); 辽宁省博士科研启动基金(20170520368)

作者简介: 杨占宁(1995-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为海洋生态毒理学, E-mail: wecenh@dlmu.edu.cn

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: guanghuiding@dlmu.edu.cn

tubes (SWCNTs) to investigate the toxicity induced by SWCNTs and the defense mechanism of *C. gigas*. After 96-h exposure to $0.1\text{--}10\text{ mg L}^{-1}$ SWCNTs, the content of malondialdehyde (MDA) in gills and digestive glands increased significantly ($P\leq 0.05$), the activities of total superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) showed the significant dose-dependent increase ($P\leq 0.05$), and the relative expressions of genes, i.e., *cat*, *hsp70*, *aox* and *caspase-7*, were significantly up-regulated ($P\leq 0.05$). The co-exposure of Tariquidar (P-gp protein inhibitor) and SWCNTs induced the significant increase of the MDA content in gills and digestive glands ($P\leq 0.05$), indicating that more serious oxidative damage were caused by the mixture. The results revealed that the antioxidant system and Multi-xenobiotic Resistance Mechanism played vital roles in the defense system of Pacific oyster against the SWCNTs exposure.

Keywords: SWCNTs; *Crassostrea gigas*; toxicity; the defense mechanism

单壁碳纳米管(Single-Walled Carbon Nanotubes, SWCNTs)是一种典型的碳纳米材料,其几何结构可以视为由单层石墨烯卷曲而成。SWCNTs 具有巨大的比表面积和优异的电子、机械、力学等性能,在电子、化工、医学以及环境保护等方面展现出巨大的应用价值^[1]。随着碳纳米科技领域的迅速发展,在其生产、使用和处置等过程中不可避免地产生环境排放,其潜在的生态安全及健康风险日益受到研究者的重视^[2]。

海洋是地球上位势最低的地方,也是污染物的汇聚地,能够通过废水排放、地表径流、大气沉降等多种方式汇聚各种污染物。受海水高离子强度和碳纳米材料易团聚性质的共同作用,沿海地区将成为碳纳米材料的最终聚集地和高暴露风险区域。细菌、藻类、甲壳类动物及鱼类的急性毒性实验数据表明,纳米颗粒(nanometer particles, NPs)对水生生物具有一定的毒性效应^[3-5]。已有的毒理学研究表明,碳纳米材料暴露能够在生物体内形成超氧阴离子等氧自由基^[6],进而发生歧化反应产生额外的活性氧(reactive oxygen species, ROS),致使生物体内抗氧化系统失衡,引起生理生化过程的异常^[7],即所谓的氧化应激。Canesi 等^[8]发现富勒烯(C_{60})和纳米 TiO_2 暴露导致海洋贻贝消化腺中的溶酶体膜失衡及脂褐质的堆积。Ringwood 等^[9]将美洲牡蛎暴露于 C_{60} ,发现牡蛎的肝胰腺组织中出现大量的溶酶体,并产生较高的内吞作用。

海洋双壳贝类具有高度发达的微纳米级颗粒的细胞内化系统,其强大的吞噬作用可以滤过大量的水、微藻、细菌及沉积物,使得其组织中累积大量的纳米颗粒^[10]。太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)是一种典型的海洋底栖双壳类生物,其运动能力较弱,沿海分布广泛,对盐度的适应性较强,易受水体中碳纳米颗粒的暴露影响,是研究 NPs 毒性效应的理想模式生物。因此,本研究采用太平洋牡蛎作为受试生物,

研究 SWCNTs 暴露对其造成的毒性效应以及牡蛎自身的防御行为,以期碳纳米管的海洋生态风险评估提供科学依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

实验用太平洋牡蛎购于大连环洲水产市场。实验前,筛选体长 $5\sim 8\text{ cm}$ 、健康的牡蛎于实验室海水循环养殖系统中驯养一周以适应实验环境。驯养条件为:温度 $17\sim 18\text{ }^{\circ}\text{C}$;盐度 34 PSU;驯养期间定时投喂单胞藻粉。

SWCNTs(Purity: $>95\text{ wt}\%$, OD: $<2\text{ nm}$, Length: $1\sim 3\text{ }\mu\text{m}$)购自中国科学院成都有机化学有限公司。

实验用总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒以及总蛋白定量试剂盒均购自南京建成生物有限公司;P-gp 蛋白抑制剂 Tariquidar(XR9576)购自 MedChem Express (MCE)公司;总 RNA 提取试剂(RNAiso Plus)和反转录试剂盒(PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser)购自宝生物工程有限公司;荧光定量 PCR 染料(SYBR Green)购于罗氏(Roche)诊断产品有限公司。

1.2 实验方法

SWCNTs 采用混酸(硫酸:硝酸=3:1)酸化 24 h,超声分散于天然海水中。SWCNTs 的暴露浓度设为 $0, 0.1, 1$ 及 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。每个浓度组 3 只牡蛎,暴露于 2 L 的 SWCNTs 海水溶液中,暴露时长设为 48 h 和 96 h。

为分析 P-gp 蛋白抑制剂在牡蛎防御外源污染物的毒性效应中的作用,开展了 P-gp 蛋白抑制剂 Tariquidar 和 SWCNTs 复合暴露的实验。该部分实验设置空白对照组(CK)、 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tariquidar 暴露组、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 SWCNTs 暴露组、以及 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 SWCNTs 和 $0.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tariquidar 复合暴露

组,暴露时长为 96 h。

暴露终点时,分别解剖并采集牡蛎的鳃和消化腺组织样品进行抗氧化酶活性测定、氧化损伤和基因相对表达量分析。采用试剂盒测定牡蛎鳃和消化腺中 SOD 和 CAT 抗氧化酶活性及脂质过氧化物

MDA 含量的变化。采用实时荧光定量 PCR(q-PCR)测定 *cat* 基因、热休克蛋白 70(heat shock protein 70, *hsp70*)基因、交替氧化酶(alternative oxidase, *aox*)基因及细胞凋亡基因(*caspase-7*)的相对表达量变化。相关基因的引物设计信息如表 1 所示。

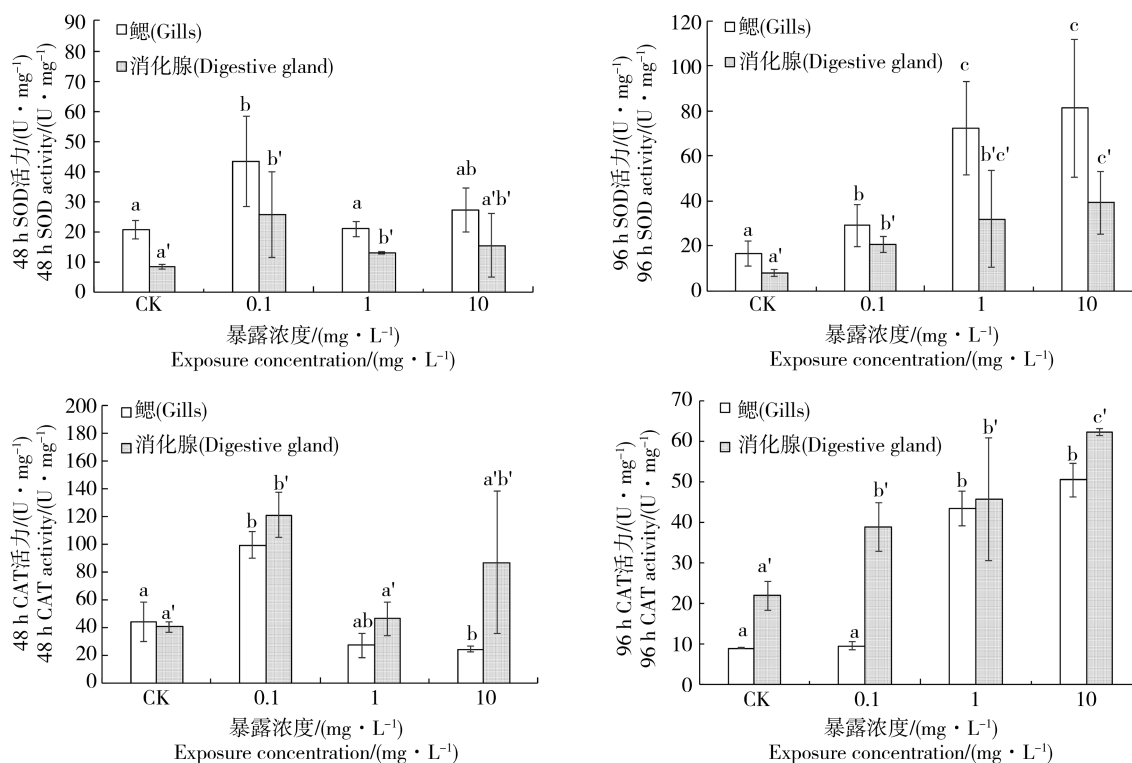


图 1 太平洋牡蛎组织中抗氧化酶活性变化

注:字母相同表示没有显著性差异,字母不同表示差异显著, $P \leq 0.05$ 。

Fig. 1 Changes of activities of antioxidant enzyme in *Crassostrea gigas* tissues

Note: The same letters mean no significant difference; the different letters indicate significant difference, $P \leq 0.05$.

表 1 相关基因的引物设计信息

Table 1 The primer information of genes studied

基因 Gene	基因序列号 Gene ID	正/反向引物 Forward/reverse	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>actin</i>	NM_001308859.1	F'	AGGGTGTGATGGTTGGTATGG
		R'	TGGTGACGATGCCGTGTT
<i>cat</i>	EF_687775.2	F'	AGGTCGGGAAGATGGTGCT
		R'	ACGGGGATTGTAGGTAGTTGG
<i>caspase-7</i>	NM_001305322.1	F'	CGATGAGCCCAGAGTGTGTTT
		R'	CGGTCGCTGTCTGTATTGTAGTG
<i>aox</i>	NM_001305360.1	F'	CACTGCCCCACCCAATATG
		R'	GACCCATTCTCTCCGTTCTTT
<i>hsp70</i>	AF_144646.1	F'	TGACGAGGCTGTTGCTTATGG
		R'	GTTTGGTTGGAATGGTGGTGT
<i>p-gp</i>	AJ_422120.1	F'	GAGGAAGGGCAGTTGAGTGTG
		R'	GATGTTCTCGGCGATGGTG

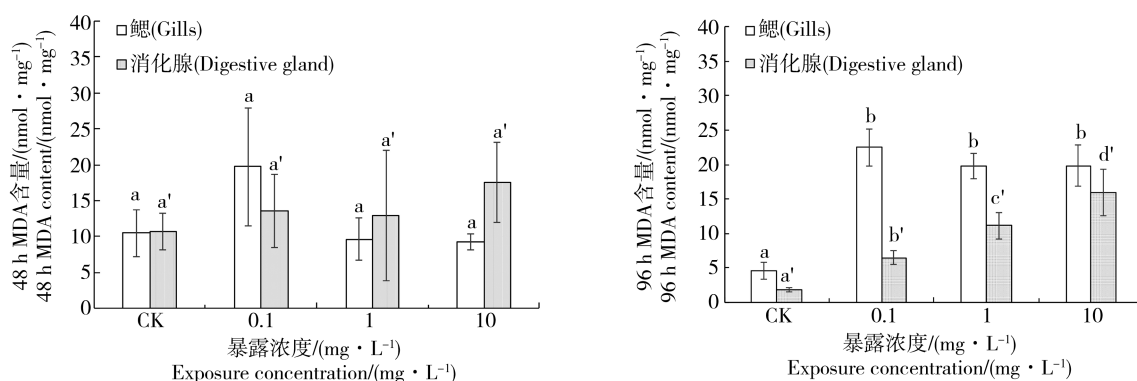


图 2 太平洋牡蛎组织中 MDA 含量变化

注:字母相同表示没有显著性差异,字母不同表示差异显著, $P \leq 0.05$ 。

Fig. 2 Changes in the MDA content in tissues of *C. gigas*

Note: The same letters mean no significant difference; the different letters indicate significant difference, $P \leq 0.05$.

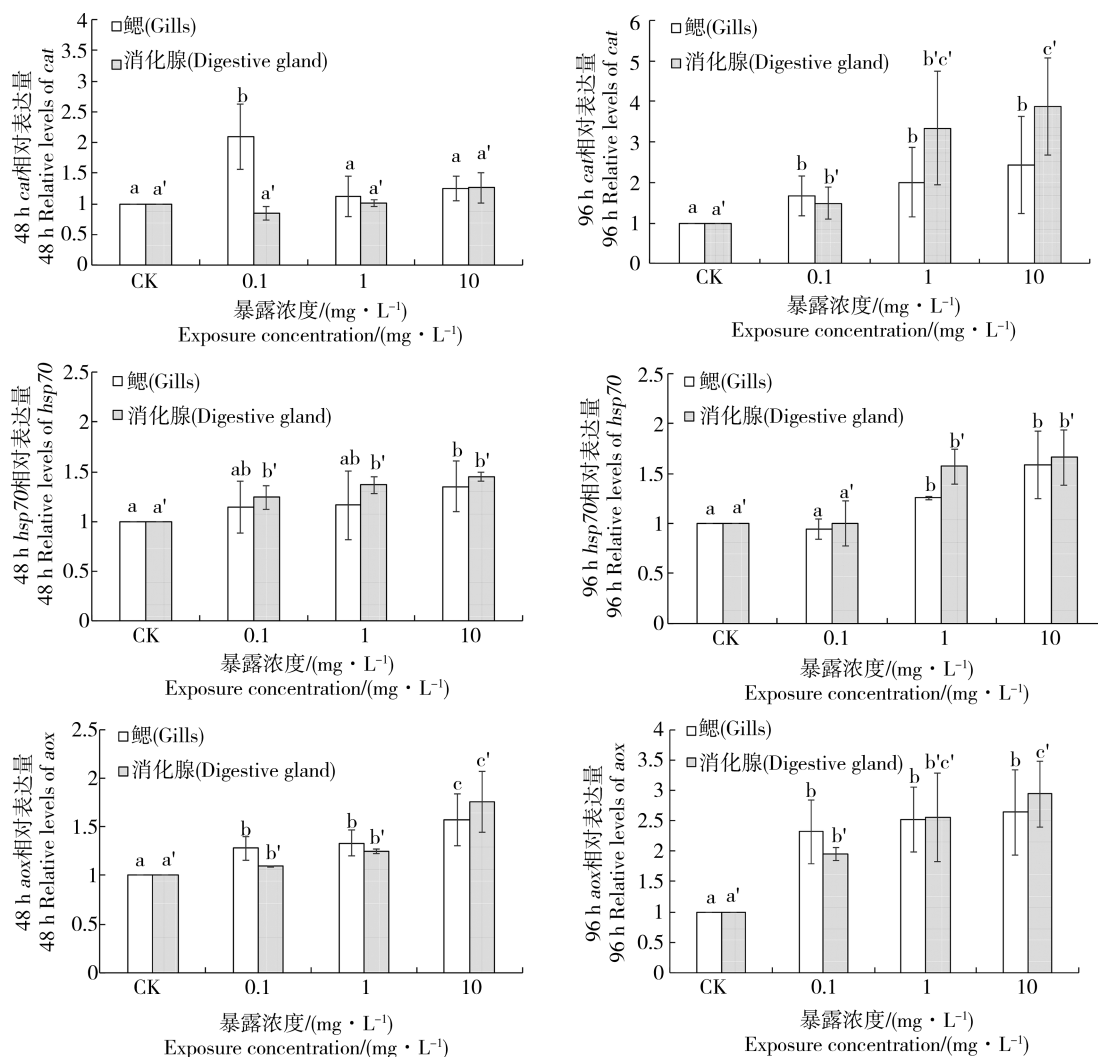


图 3 太平洋牡蛎组织中抗氧化基因相对表达量变化

注:字母相同表示没有显著性差异,字母不同表示差异显著, $P \leq 0.05$ 。

Fig. 3 The relative expression of antioxidant genes in *C. gigas* tissues

Note: The same letters mean no significant difference; the different letters indicate significant difference, $P \leq 0.05$.

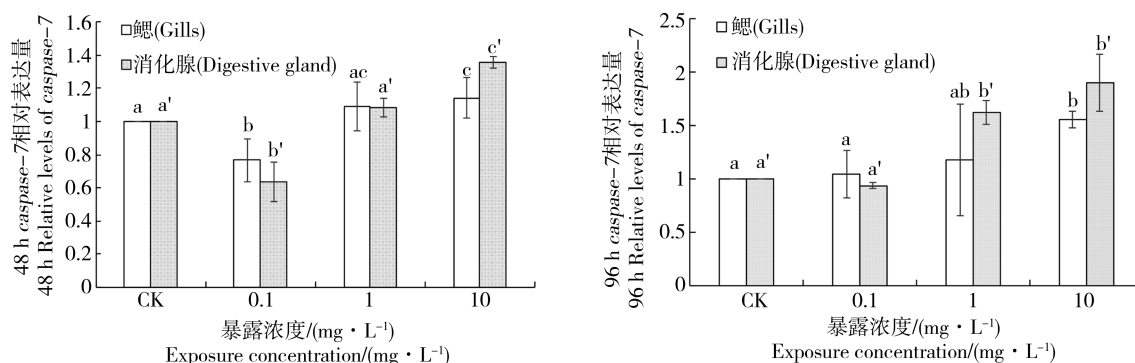


图4 太平洋牡蛎组织中 *caspase-7* 相对表达量的变化

注:字母相同表示没有显著性差异,字母不同表示差异显著, $P \leq 0.05$ 。

Fig. 4 The relative expression of *caspase-7* in *C. gigas* tissues

Note: The same letters mean no significant difference; the different letters indicate significant difference, $P \leq 0.05$.

本研究采用 SPSS 13.0 软件(SPSS Inc.)对实验数据进行统计学分析。不同处理组间的比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析 (Results and analysis)

2.1 SWCNTs 暴露对太平洋牡蛎的氧化损伤

2.1.1 太平洋牡蛎鳃和消化腺中抗氧化酶活性变化

SWCNTs 暴露后,太平洋牡蛎鳃和消化腺中 SOD 和 CAT 酶活性变化如图 1 所示。暴露 48 h 后,暴露组牡蛎组织中抗氧化酶活性与对照组相比,并没有显著性差异($P > 0.05$);但在暴露 96 h 后,暴露组牡蛎的 2 种组织中抗氧化酶活性较对照组均有显著性升高($P \leq 0.05$),且呈现出随暴露浓度升高而升高的剂量-效应关系。鳃是牡蛎首先暴露于 SWCNTs 的器官,其 SOD 活性变化较消化腺明显;抗氧化系统中 CAT 是 SOD 的后续酶,其在消化腺中的酶活性变化较鳃中更明显。

2.1.2 太平洋牡蛎鳃和消化腺中 MDA 含量的变化

SWCNTs 暴露后,太平洋牡蛎鳃和消化腺中 MDA 含量变化如图 2 所示。暴露 48 h 后,暴露组太平洋牡蛎组织中 MDA 含量与对照组并没有显著性差异($P > 0.05$);但是在暴露 96 h 后,暴露组牡蛎的 2 种组织中的 MDA 含量较对照组均有显著性升高($P \leq 0.05$),且在消化腺中呈现出随暴露浓度升高而升高的剂量-效应关系。在鳃中,MDA 含量即使在低剂量($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)下,也与对照产生显著性差异,表明 SWCNTs 暴露在太平洋牡蛎鳃组织中容易产生氧化损伤。

2.2 太平洋牡蛎鳃和消化腺中相关基因相对表达量的变化

2.2.1 太平洋牡蛎鳃和消化腺中抗氧化系统相关基因相对表达量的变化

SWCNTs 暴露后,太平洋牡蛎鳃和消化腺中 *cat*、*hsp70*、*aox* 基因相对表达量变化如图 3 所示。太平洋牡蛎鳃和消化腺中 *cat* 基因的相对表达量呈现出与 CAT 活性相似的变化趋势。*hsp70* 基因的相对表达量在暴露 48 h 和 96 h 后呈现相似的变化趋势,即在低浓度($0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时与对照组没有显著性差异($P > 0.05$),而在相对较高的浓度($1 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)下呈现出显著的上调($P \leq 0.05$)。*aox* 基因的相对表达量呈现出随暴露浓度升高而显著上调的趋势,而且随暴露时间增长,*aox* 基因的相对表达量上调越显著($P \leq 0.05$)。这些基因表达的变化与抗氧化酶活性的变化相一致。

2.2.2 太平洋牡蛎鳃和消化腺中 *caspase-7* 基因相对表达量的变化

如图 4 所示,SWCNTs 暴露 48 h 后,牡蛎 2 种组织中 *caspase-7* 基因的相对表达量在 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的暴露浓度下呈现显著的下调($P \leq 0.05$)。随着暴露浓度的升高,*caspase-7* 基因的相对表达量持续升高,在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的暴露浓度下呈现出显著的上调($P \leq 0.05$)。随暴露时间延长到 96 h,*caspase-7* 基因的相对表达量呈现出单调上升的剂量-效应关系。

2.3 太平洋牡蛎对 SWCNTs 的防御机制

2.3.1 太平洋牡蛎鳃和消化腺中 *p-gp* 蛋白基因相对表达量的变化

经过 96 h 的 SWCNTs 暴露,太平洋牡蛎鳃和消

化腺中 *p-gp* 蛋白基因相对表达量呈现出随暴露浓度升高而逐渐升高的剂量-效应关系,且消化腺中的表达量略高于鳃(图5)。这一方面表明随外源污染物暴露浓度的增加,牡蛎的外排机制不断增强;另一方面也表明,即使在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的暴露浓度下,太平洋牡蛎防御机制还在起积极作用,能够耐受较高浓度的 SWCNTs 的暴露。

2.3.2 复合暴露下太平洋牡蛎鳃和消化腺中 MDA 含量的变化

复合暴露实验中,太平洋牡蛎鳃和消化腺中 MDA 含量变化如图6所示。 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SWCNTs 和 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tariquidar 单独暴露均导致太平洋牡蛎组织中 MDA 的含量显著升高($P \leq 0.05$)。 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SWCNTs 和 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tariquidar 的复合暴露使 MDA 含量相对于空白和单独暴露均产生显著性升高($P \leq 0.05$)。这表明 Tariquidar 的加入显著抑制了 P-gp 蛋白活性,导致太平洋牡蛎排出外源污染物的能力降低,致使更多的 SWCNTs 富集于组织细胞内,进而造成更严重的氧化损伤。

3 讨论 (Discussion)

3.1 SWCNTs 暴露对太平洋牡蛎的损伤作用

目前,关于 SWCNTs 的毒理学研究多集中于陆生哺乳生物及淡水生物,对海洋生物研究较少,其毒性作用机制也尚未明确^[11]。已有毒理学研究表明,SWCNTs 所产生毒性主要表现为:①氧化损伤:由于材料表面的电子活性位点(给电子或受电子基团)能

与氧分子发生作用,生成大量的 ROS,这些 ROS 作用于细胞膜表面的多不饱和脂肪酸,产生脂质过氧化,进而引起细胞膜结构和功能受损;②蛋白及 DNA 损伤:当机体氧化损伤程度严重时,细胞膜被破坏,大量的纳米颗粒侵入细胞内,造成严重的蛋白质变性及 DNA 损伤。

MDA 含量可以作为机体受到氧化损伤程度的一个指标^[12]。SWCNTs 暴露 48 h 后,太平洋牡蛎鳃和消化腺内未产生显著性的 MDA 含量增加。而在暴露 96 h 后,2 个组织中的 MDA 含量均显著升高。这表明,在本研究的暴露剂量下,短期 48 h 的暴露

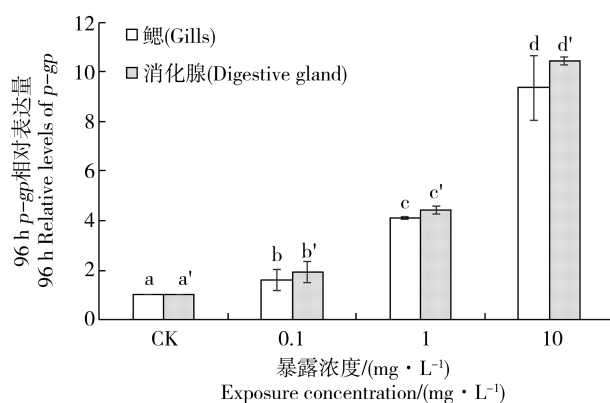


图5 太平洋牡蛎组织中 *p-gp* 相对表达量的变化

注:字母相同表示没有显著性差异,字母不同表示差异显著, $P \leq 0.05$ 。

Fig. 5 The relative expression of *p-gp* in tissues of *C. gigas*

Note: The same letters mean no significant difference; the different letters indicate significant difference, $P \leq 0.05$.

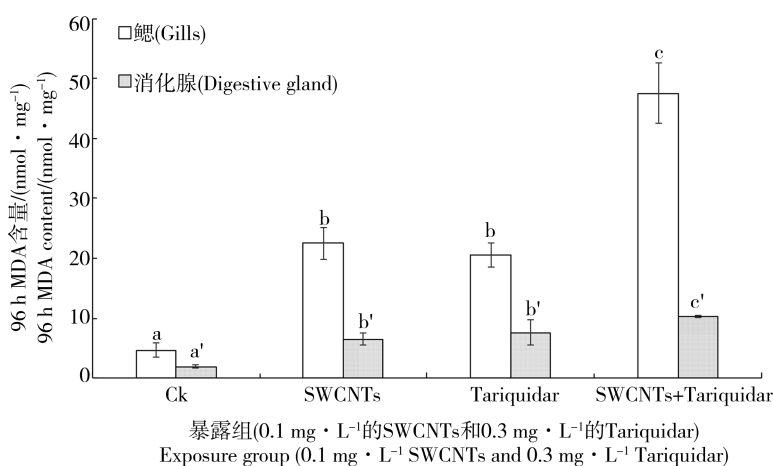


图6 太平洋牡蛎组织中 MDA 含量变化

注:字母相同表示没有显著性差异,字母不同表示差异显著, $P \leq 0.05$ 。SWCNTs 表示单壁碳纳米管。

Fig. 6 Changes in the MDA content in tissues of *C. gigas*

Note: The same letters mean no significant difference; the different letters indicate significant difference, $P \leq 0.05$. SWCNTs stands for single-walled carbon nanotubes.

并未产生明显的氧化损伤,但是随着暴露时间延长到 96 h,SWCNTs 暴露在牡蛎鳃和消化腺中产生了一定程度的氧化损伤,且鳃和消化腺的损伤程度表现出一定的差异。当暴露对太平洋牡蛎产生效应时,鳃所受到的氧化损伤程度明显高于消化腺;随暴露浓度升高,消化腺所受到的氧化损伤随之显著升高,而鳃所受到的损伤已经达到了较高水平,并未随暴露浓度升高而升高。导致这种现象的主要原因是由于鳃是牡蛎首先暴露于污染物的器官,SWCNTs 最先在鳃中诱导氧化应激。随着 SWCNTs 逐渐被消化腺所吸收和富集,才逐渐在消化腺中造成氧化损伤。Trevisan 等^[13]的研究结果表明短期暴露于纳米氧化锌的太平洋牡蛎并没有表现出明显的氧化应激,但是在相对长时间的暴露下,牡蛎体内的抗氧化酶水平显著升高;而且鳃是纳米氧化锌产生毒性效应的初始靶器官,而消化腺则呈现出延迟的毒性效应。D'Agata 等^[14]的研究则表明贝类消化腺中纳米二氧化钛的累积量是鳃中的 10 倍以上。因此,随着暴露时间的延长,消化腺可能成为纳米颗粒暴露的主要靶器官。

细胞凋亡是一种细胞程序性死亡,是生物体对各种应激源反应的重要防御机制^[15]。通过对太平洋牡蛎细胞凋亡基因家族中 *caspase-7* 相对表达量的测定发现相对长时间和较高浓度的 SWCNTs 暴露诱导太平洋牡蛎组织产生显著性的细胞凋亡($P \leq 0.05$),表明 SWCNTs 暴露已经对太平洋牡蛎产生了一定的毒性效应,诱导机体通过调控细胞凋亡基因的表达以清除受到损伤的细胞^[16]。

3.2 太平洋牡蛎对 SWCNTs 的防御机制

太平洋牡蛎体内有多种抗氧化酶类可以清除 ROS,如 SOD、CAT 和谷胱甘肽等。这些酶的活性可以反映机体受到的氧化损伤程度^[17]。SOD 可以将体内的 ROS 催化生成 H_2O_2 ,CAT 则能够清除过量的 H_2O_2 ^[18],从而降低 SWCNTs 诱导产生的 ROS。本研究结果表明,牡蛎在受到 SWCNTs 的刺激下,体内的 SOD 和 CAT 活性增加以帮助其防御氧化损伤,牡蛎鳃作为最先接触 SWCNTs 的组织,为了清除过量的 ROS,SOD 活性相应的上调;SWCNTs 被吸收进入消化腺需要一定的时间,因此消化腺中 SOD 活性相对于鳃中偏低。在暴露 96 h 后,鳃和消化腺内 CAT 活性显著升高($P \leq 0.05$)。Tedesco 等^[19]的研究发现纳米金颗粒可诱导贻贝体内抗氧化酶活性增加。Canesi 等^[20]报道纳米二氧化钛和 nC_{60} 使

紫贻贝消化腺中 CAT 等一系列抗氧化酶活性升高。Pan 等^[21]的研究结果也证实纳米颗粒可以在贝类体内诱导抗氧化酶活性增加,从而更加有效地清除过多的 ROS。

根据 Michaelis-Menten 方程,在一定条件下,酶促反应速度与酶分子的浓度成正比。暴露 96 h 后,CAT 活性与 *cat* 的相对表达量都随着 SWCNTs 暴露浓度的升高而升高。由于 *cat* 的表达调控着机体内 CAT 的含量,因此太平洋牡蛎体内 CAT 作用的底物,即 H_2O_2 的浓度足够大。这也间接证实了太平洋牡蛎在受到 SWCNTs 的暴露后,机体产生了氧化应激。

AOX 是线粒体交替途径末端的氧化酶^[22],可以使分子氧和还原醌发生相互作用,从而降低生物体内 ROS 含量^[23],起到防御氧化损伤的作用。本研究结果表明,当 SWCNTs 的暴露浓度升高时,*aox* 的相对表达量随之升高,调控 AOX 含量升高以帮助其抵御氧化损伤。Maxwell 等^[24]的研究表明,当 *aox* 超量表达以应对氧化胁迫时,体内 ROS 的含量随之降低,反之则 ROS 升高。Zhou 等^[25]也发现 AOX 在抗氧呼吸途径中起到了清除 ROS 的重要作用。

热休克蛋白家族(HSPs)是生物体内广泛存在的应激蛋白^[26],能够抑制产生 ROS 的关键酶(还原型辅酶 II, NADPH)以及增强抗氧化酶的代谢水平^[27],在受到环境胁迫时起到保护机体的重要作用。HSP70 是热休克蛋白家族中一种被广泛认为是各种水体污染物的高效生物标志物^[28]。太平洋牡蛎在高浓度 SWCNTs 的刺激下调控 *hsp70* 超量表达,表明此暴露条件下的 SWCNTs 对牡蛎造成了一定程度的氧化胁迫,诱导牡蛎细胞调节 *hsp70* 的表达来维稳机体相关蛋白的合成。Hamdoun 等^[29]的研究表明,太平洋牡蛎发生氧化应激时 *hsp70* 的表达水平会显著提高。Cicchetti 等^[30]也发现 HSP70 能够保护口腔细胞防御 SWCNTs 的侵害。

3.3 P-gp 蛋白的清除功能

多外源性物质抗性机制(Multixenobiotic Resistance Mechanism, MXR)是双壳贝类体内的一种重要的防御机制,是其对抗外源污染物时的“第一道防线”^[31]。P-gp 蛋白是贝类 MXR 系统中重要的跨膜转运蛋白,它通过 ATP 供能将各种异物排出细胞^[32]。通过对 *p-gp* 的测定,发现鳃和消化腺中 *p-gp* 的相对表达量都随着 SWCNTs 暴露浓度的升高而升高。Huang 等^[33]在研究利马原甲藻(*Prorocentrum*

lima)对翡翠贻贝的 MXR 系统的调控机制时也发现,*p-gp* 的表达量会显著的升高以清除毒素;当加入 Tariquidar 抑制剂之后,*P-gp* 蛋白受到抑制,牡蛎所受到的氧化损伤程度显著升高。这表明太平洋牡蛎能够通过 *P-gp* 蛋白将部分 SWCNTs 排出体外,从而降低牡蛎所受到的氧化损伤,这与 Palace 等^[34]的研究结果相一致。

本文研究了 SWCNTs 对太平洋牡蛎的毒性效应及太平洋牡蛎的防御机制。实验结果表明,在本研究的暴露条件下,SWCNTs 对太平洋牡蛎所造成的毒性效应主要为氧化损伤,而牡蛎体内的抗氧化系统和多外源性物质抗性机制系统在防御 SWCNTs 的过程中起到了至关重要的作用。鳃作为太平洋牡蛎先接触 SWCNTs 的器官,最先受到 SWCNTs 暴露的胁迫,诱导产生氧化应激;消化腺逐渐吸收并累积 SWCNTs,其所产生的氧化应激随暴露时长和暴露浓度的升高而升高。太平洋牡蛎多外源性物质抗性机制系统中的 *P-gp* 蛋白在 SWCNTs 的细胞外排过程中起重要作用,因此在太平洋牡蛎的防御系统中起到至关重要的作用。

致谢:感谢国家自然科学基金(51479016; 51308083),辽宁省博士科研启动基金(20170520368)对本研究的资助。

通讯作者简介:丁光辉(1977-),男,副教授,博士生导师,主要研究方向为污染生态化学。

参考文献 (References):

- [1] Arun A B. Toxicology of carbon nanotubes—A review [J]. International Journal of Applied Engineering Research, 2016, 11(1): 159-168
- [2] Zhao F, Meng H, Yan L, et al. Nanosurface chemistry and dose govern the bioaccumulation and toxicity of carbon nanotubes, metal nanomaterials and quantum dots *in vivo* [J]. Science Bulletin, 2015, 60(1): 3-20
- [3] Smith C J, Shaw B J, Handy R D. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects [J]. Aquatic Toxicology, 2007, 82 (2): 94-109
- [4] Thakkar M, Mitra S, Wei L. Effect on growth, photosynthesis, and oxidative stress of single walled carbon nanotubes exposure to marine alga *Dunaliella tertiolecta* [J]. Journal of Nanomaterials, 2016(10): 1-9
- [5] Lovren S B, Klaper R. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C₆₀) nanoparticles [J]. Environmental Toxicology & Chemistry, 2010, 25(4): 1132-1137
- [6] Zhang H, Slutsky A S, Vincent J L. Oxygen free radicals in ARDS, septic shock and organ dysfunction [J]. Intensive Care Medicine, 2000, 26(4): 474-476
- [7] Sies H. Biological redox systems and oxidative stress [J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2007, 64(17): 2181-2188
- [8] Canesi L, Ciacci C, Fabbri R, et al. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity [J]. Marine Environmental Research, 2012, 76(4): 16-21
- [9] Ringwood A H, Levipolyachenko N, Carroll D L. Fullerene exposures with oysters: Embryonic, adult, and cellular responses [J]. Environmental Science & Technology, 2009, 43(18): 7136-7141
- [10] Dagnino A, Allen J I, Moore M N, et al. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index [J]. Biomarkers, 2007, 12(2): 155-172
- [11] Poland C A, Duffin R, Kinloch I, et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study [J]. Nature Nanotechnology, 2008, 3(7): 423-428
- [12] Ringwood A H, Connors D E, Dinovo A. The effects of copper exposures on cellular responses in oysters [J]. Marine Environmental Research, 1998, 46(1-5): 591-595
- [13] Trevisan R, Delapiedra G, Mello D F, et al. Gills are an initial target of zinc oxide nanoparticles in oysters *Crassostrea gigas*, leading to mitochondrial disruption and oxidative stress [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 153(8): 27-38
- [14] D'Agata A, Fasulo S, Dallas L J, et al. Enhanced toxicity of 'bulk' titanium dioxide compared to 'fresh' and 'aged' nano-TiO₂ in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*) [J]. Nanotoxicology, 2014, 8(5): 549-558
- [15] Hughes F M, Foster B, Grewal S, et al. Apoptosis as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus marinus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(2): 247-257
- [16] Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis [J]. Genes & Development, 2001, 15(22): 2922-2933
- [17] 葛春梅, 黄茜枝, 林道辉, 等. 人工纳米材料对贝类生态毒理效应的研究进展 [J]. 生态毒理学报, 2015, 10 (4): 1-16
- Ge C M, Huang X Z, Wang Y J, et al. Research progress in ecotoxic effects of manufactured nanomaterials on shellfish [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(4): 1-16

- 1-16 (in Chinese)
- [18] Gong N, Shao K S, Li G Y, et al. Nickel oxide nanoparticles induce oxidative stress and morphological changes on marine *Chlorella vulgaris* [J]. Advanced Materials Research, 2014, 955-959(11): 956-960
- [19] Tedesco S, Doyle H, Redmond G, et al. Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis* [J]. Marine Environmental Research, 2008, 66(1): 131-133
- [20] Canesi L, Fabbri R, Gallo G, et al. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C₆₀ fullerene, Nano-TiO₂, Nano-SiO₂) [J]. Aquatic Toxicology, 2010, 100(2): 168-177
- [21] Pan J F, Buffet P E, Poirier L, et al. Size dependent bioaccumulation and ecotoxicity of gold nanoparticles in an endobenthic invertebrate: The Tellinid clam *Scrobicularia plana* [J]. Environmental Pollution, 2012, 168(3): 37-43
- [22] Yip J Y, Vanlerberghe G C. Mitochondrial alternative oxidase acts to dampen the generation of active oxygen species during a period of rapid respiration induced to support a high rate of nutrient uptake [J]. Physiologia Plantarum, 2010, 112(3): 327-333
- [23] Purvis A C, Shewfelt R L. Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? [J]. Physiologia Plantarum, 1993, 88(4): 712-718
- [24] Maxwell D P, Wang Y, McIntosh L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(14): 8271-8276
- [25] Zhou G, Kong Y, Bi Y, et al. Possible participation of active oxygen species in the induction of cyanide-resistant pathway at the initial senescence of tobacco callus [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2001, 48(5): 588-594
- [26] Park C J, Seo Y S. Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones for plant immunity [J]. Plant Pathology Journal, 2015, 31(4): 323-333
- [27] Clegg J S, Uhlinger K R, Jackson S A, et al. Induced thermotolerance and the heat shock protein-70 family in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* [J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1998, 7(1): 21-30
- [28] Mukhopadhyay I, Nazir A, Saxena D K, et al. Heat shock response: Hsp70 in environmental monitoring [J]. Journal of Biochemical & Molecular Toxicology, 2003, 17(5): 249-254
- [29] Hamdoun A M, Cheney D P, Cherr G N. Phenotypic plasticity of HSP70 and *hsp70* gene expression in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): Implications for thermal limits and induction of thermal tolerance [J]. Biological Bulletin, 2003, 205(2): 160-169
- [30] Cicchetti R, Divizia M, Valentini F, et al. Effects of single-wall carbon nanotubes in human cells of the oral cavity: Genotoxic risk [J]. Toxicology in Vitro, 2011, 25(8): 1811-1819
- [31] Epel D. Use of multidrug transporters as first lines of defense against toxins in aquatic organisms [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 1998, 120(1): 23-28
- [32] Ambudkar S V, Dey S, Hrycyna C A, et al. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter [J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 1999, 39(1): 361-398
- [33] Huang L, Wang J, Chen W C, et al. P-glycoprotein expression in *Perna viridis* after exposure to *Prorocentrum lima*, a dinoflagellate producing DSP toxins [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 39(2): 254-262
- [34] Palace V P, Evans R E, Wautier K G, et al. Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake [J]. Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, 2009, 66(11): 1920-1935
- ◆