

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20191127001

陈佳伟, 邵向阳, 黄天科, 等. 背角无齿蚌超氧化物歧化酶基因的克隆及多溴联苯醚-47 和多溴联苯醚-209 对其表达的影响[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(6): 195-204

Chen J W, Shao X Y, Huang T K, et al. Effects of PBDE-47 and PBDE-209 on the *AwSOD* expression in freshwater bivalve *Anodonta woodiana* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(6): 195-204 (in Chinese)

背角无齿蚌超氧化物歧化酶基因的克隆及多溴联苯醚-47 和多溴联苯醚-209 对其表达的影响

陈佳伟, 邵向阳, 黄天科, 李媛, 张龙慧, 董艳美, 王梦琪, 张科, 齐金旭, 夏西超*, 邱茂林

平顶山学院医学院, 平顶山 476000

收稿日期: 2019-11-27 录用日期: 2020-01-04

摘要: 超氧化物歧化酶(SOD)是机体防御和氧化应激损伤的关键酶之一。为了探讨多溴联苯醚 PBDE-47 和 PBDE-209 对背角无齿蚌的胁迫效应,本研究克隆出 *AwSOD* 全基因序列,分析 PBDE-47 和 PBDE-209 对 *AwSOD* 表达的影响。背角无齿蚌 *AwSOD* cDNA 全长由 949 个核苷酸组成,开放阅读框包含 465 bp 核苷酸,编码 155 个氨基酸。*AwSOD* 包含 Cu/ZnSOD 家族 GKHGFHVHEFGDNT 和 GNAGARSACGVI 这 2 个特征性标签序列。*AwSOD* 氨基酸序列与 Cu/ZnSOD 具有较高的同源性。*AwSOD* 与淡水贝类亲缘关系最近,其次海洋双壳类,最后是脊椎动物、腹足类和甲壳类。*AwSOD* 在肝胰脏中表达水平较高,在鳃和斧足为中等水平,在外套膜、闭壳肌和心脏中表达水平较低。与对照组相比,PBDE-47 和 PBDE-209 处理对肝胰脏中 *AwSOD* mRNA 水平具有显著的诱导作用。PBDE-47 处理对鳃中 *AwSOD* mRNA 水平在早期具有显著诱导作用,高剂量组在后期呈现下调效应;PBDE-209 处理后鳃中 *AwSOD* mRNA 水平显著增加。结果表明,PBDE-47 和 PBDE-209 对背角无齿蚌 *AwSOD* 表达水平诱导作用与增强机体抗氧化能力和胁迫效应有关。

关键词: 多溴联苯醚-47;多溴联苯醚-209;背角无齿蚌;胁迫效应; *AwSOD*

文章编号: 1673-5897(2020)6-195-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of PBDE-47 and PBDE-209 on the *AwSOD* Expression in Freshwater Bivalve *Anodonta woodiana*

Chen Jiawei, Shao Xiangyang, Huang Tianke, Li Yuan, Zhang Longhui, Dong Yanmei, Wang Mengqi, Zhang Ke, Qi Jinxu, Xia Xichao*, Qiu Maolin

College of Medicine, Pingdingshan University, Pingdingshan 476000, China

Received 27 November 2019 accepted 4 January 2020

Abstract: The superoxide dismutases (SODs) play a key role against oxidative stress. In order to explore the stress of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) on the bivalve *Anodonta woodiana*, one complete Cu/ZnSOD sequence was isolated and named *AwSOD* in the current study. The full-length cDNA of *AwSOD* had an open reading frame (ORF) of 465 bp encoding 155 amino acids. The deduced amino acid sequence of *AwSOD* has high identity with

基金项目:河南省高等学校重点研究项目(20A330002,19B330002);河南省联合基金资助项目(182300410123)

第一作者:陈佳伟(1998—),男,本科,研究方向为环境健康学,E-mail: 626189846@qq.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: xiaxichao8336@163.com

the Cu/ZnSODs. The most relationship of evolution of AwSOD was that of freshwater bivalve, next was marine bivalve, last was vertebrate, gastropods and crustacean. In selected tissues, the highest expression of AwSOD mRNA was observed in the hepatopancreas, intermediate ones in the foot, adductor muscle, and gill, lower ones in heart and mantle. Compared with that of control group, AwSOD mRNA level of hepatopancreas was significantly induced by PBDE-47 and PBDE-209. AwSOD expression of gill was significantly up-regulated at early stage in the PBDE-47 treated groups, and down-regulated at later stage in the high-dose groups in contrasted with that of control group. AwSOD mRNA level of gill was significantly increased in the PBDE-209 treated groups. These results indicate that up-regulations of AwSOD expression of hepatopancreas and gill contributed to elimination of stress derived from PBDE-47 and PBDE-209 challenge in the freshwater bivalve *A. woodiana*.

Keywords: polybrominated diphenyl ethers-47; polybrominated diphenyl ethers-209; *Anodonta woodiana*; stress; AwSOD

多溴联苯醚(PBDEs)是一类广泛应用于电子设备、塑料、纺织品和建筑材料中的阻燃剂,已被列入具有生态风险性的持久性有机污染物^[1-2]。随其应用不断增加,PBDEs 在环境中呈现持久性累积和生物体内大量蓄积的趋势,已成为威胁淡水生物的重要有机污染物^[3]。PBDEs 很难被环境中微生物所降解,容易在脂肪组织中累积下来,并且随整个食物链出现放大效应^[3]。PBDEs 在生物体中能够催化活性氧(ROS)生成,干扰线粒体呼吸作用,导致 ROS 过量生成,三磷酸腺苷(ATP)合成减少,最终导致细胞死亡^[3]。在 PBDEs 家族中,PBDE-47 和 PBDE-209 应用较为广泛,在鳗鲡(*Anguilla japonica*)、海鲢(*Salmo trutta*)和贻贝(*Mytilus edulis*)等多种水生生物中被广泛检测到^[4]。

超氧化物歧化酶(SOD)是生物机体防御过氧化损伤系统的关键酶之一,将氧自由基快速歧化为普通分子氧和过氧化氢,是一类敏感的分子生态毒理学指标^[5]。按其所含金属辅基不同,SOD 可分为铜/锌 SOD(Cu/ZnSOD)、锰 SOD(MnSOD)、铁 SOD(Fe-SOD)和镍 SOD(NiSOD)^[6]。Cu/ZnSOD 和 MnSOD 主要存在于原核生物、甲壳动物、鱼类和哺乳动物,其中,Cu/ZnSOD 与机体正常生理功能实现和疾病发生有密切关系,也是为揭示机体氧化应激过程而研究最多的一种酶^[7]。Cu/ZnSOD mRNA 表达和酶活性常被用作环境污染潜在标志物,尤其对重金属、杀虫剂和持久性有机污染物等环境应激改变比较敏感^[8-9]。

双壳类是软体动物一个重要类群,常年栖息在海洋、河流和湖泊底部,以滤食生活为主,是检测环境污染的重要生物标志物^[10-11]。相对于海洋双壳类动物而言,淡水贝类用于环境检测和毒理学研究的步伐较为滞后。背角无齿蚌是双壳类软体动物主要

成员之一,在多氯酚、重金属和多氟烷基化合物等检测中发挥积极作用,常作为淡水污染的指示性生物^[12-13]。为了更好揭示 PBDEs 环境毒性,保护淡水资源和淡水生物,本研究以背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)为研究对象,克隆出 AwSOD 全基因序列,分析 PBDE-47 和 PBDE-209 对 AwSOD 时空表达的影响,为揭示 PBDEs 毒理效应提供理论参考。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 材料

背角无齿蚌购自南阳市水产市场,PBDE-47、PBDE-209 和二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自 Sigma-Aldrich 公司,PBDE-47 和 PBDE-209 溶解于 DMSO 中以制备储备液。TRIzol 试剂、M-MLV 反转录酶、菌株 DH5 α 、克隆载体 pMD19-T、连接酶、PCR 产物回收纯化试剂盒和 RACE 试剂盒均购自 TaKaRa 公司,其余常规药品均为进口或国产分析纯。

背角无齿蚌壳长(6.5 ± 0.5) cm, PBDE-47 和 PBDE-209 染毒之前,动物置于实验室自动水循环系统中适应养殖 2 周,期间停止进食。随后,动物处理实验在长方形的塑料盒(40 cm $\times$ 25 cm;10 cm 高)中进行,每个盒子里面 8 只河蚌,饲养采用人工模拟池塘水(每 1 L 去离子水中含 48 mg NaHCO₃、33 mg CaCl₂·2H₂O、60 mg MgSO₄·7H₂O 和 0.5 mg KCl),喂食小球藻(*Chlorella vulgaris*)。为了确定 AwSOD 基因的组织分布,对来自同一塑料盒内 5 只动物进行解剖,取斧足、鳃、肝胰脏、闭壳肌、心脏、血淋巴和外套膜等组织。参考 PBDE-47 和 PBDE-209 对淡水生物水蚤毒性效应研究结果^[14],动物处理实验过程中,动物分为对照组、PBDE-47 处理组(6.25、12.5、25、50 和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)和 PBDE-209 处理组(10、20、

40、80 和 160 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 对照组用同体积 DMSO 处理, 水中 DMSO 浓度不超过 3%^[12]。分别在 0、6、12、24 和 48 h 每组中取出 5 只河蚌, 解剖肝胰脏、鳃和血淋巴, 液氮速冻, 于 -80 °C 保存。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 模板制备

按照试剂盒说明书的要求, 使用 TRIzol 法 (Takara, 大连) 提取总 RNA。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。用 M-MLV 第一链 cDNA 合成试剂盒 (Takara, 大连) 合成第一链 cDNA, 作为 PCR 扩增反应的模板。

1.3 *AwSOD* 全基因序列的克隆

根据双壳纲、腹足纲、昆虫纲、甲壳纲和脊椎动物在内其他物种的 *Cu/ZnSOD* 保守区域设计简并引物 SOD1 和 SOD2, 用于扩增 *AwSOD* cDNA 片段, 将 PCR 产物克隆到 pMDT-19 (Takara, 大连)、采用双向测序, 鉴定为 *Cu/ZnSOD* 部分序列。以部分 cDNA 序列中设计特异引物 (表 1), 根据 RACE 试剂盒说明书, 采用巢式 PCR 方法扩增 *AwSOD* cDNA 的 5' 和 3' 区域。扩增产物克隆载体、双向测序、序列比对和拼接。

1.4 序列与系统发育的分析

在 GenBank 数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) 中用 BLAST 方法对 *AwSOD* 序列进行了比对和分析; 采用 DANMEN 软件对 *AwSOD* 基因进行多序列比对; 采用信号肽预测数据库 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 对 *AwSOD* 信号肽序列进行预

测; 采用 SMART 数据库 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 对 *AwSOD* 蛋白质二级结构域进行预测; 采用 SWISS 模型 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 对 *AwSOD* 的三维结构进行预测; 用 MEGA 5.0 邻位连接方法, 构建 *AwSOD* 系统进化树。

1.5 real-time PCR 定量检测 *AwSOD* 的表达

为了确定 *AwSOD* 转录水平, 采用 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒并按照说明书的要求进行定量分析。根据已有贝类内参基因研究结果^[15-16], 选取 β -actin 作为内参基因, 根据内参基因和 *AwSOD* 特异引物分别分离对应序列 (表 1), 琼脂糖凝胶电泳仅检测出一个扩增条带, PCR 产物回收、测序和鉴别; 结合溶解曲线和扩增曲线结果确定内参基因和目的基因表达的特异性和高效性。使用 ABI7500 实时检测系统 (Applied Biosystems, 美国), 采用两步法, 进行 real-time PCR, 构建标准曲线, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 分析 *AwSOD* 表达水平。

1.6 统计学处理

PBDE-47 和 PBDE-209 处理后 *AwSOD* 的表达水平的显著性差异采用单向方差分析 (analysis of variance, ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果 (Results)

2.1 背角无齿蚌 *AwSOD* 分子结构

背角无齿蚌 *AwSOD* cDNA 全长由 949 个核苷酸组成 (GenBank No., KU363382), 包含一个 83 bp

表 1 本研究中使用的引物的描述
Table 1 Description of the primes used in this study

引物 Primes	序列(5' ~ 3') Sequences (5' ~ 3')	扩增长度/bp Length/bp
SOD1	CATANCTGGTNAGATANCTGGC	380
SOD2	CAACTCANTCCAATTNCGANATTC	
5' Race Innerprimer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	
5' Race Outerprimer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	
AwSOD-5-1	GCTTGCTAGGGTTGAAGTGG	140
AwSOD-5-2	GTGTTATCTCCAAATTCATGG	
3' Race Outerprimer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	
3' Race Innerprimer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG	
AwSOD-3-1	CATGGTGATTCATGCGGATG	180
AwSOD-3-2	GGACATGAGTTGAGCAAGAC	
AwSOD-F	GGAGATGATGGAGTGGCCCA	
AwSOD-R	GTCTTGCTCAACTCATGTCC	
β -F	CATCCCTTGCTCCTCCAATATG	180
β -R	CTGGAAGGTAGAGAGAGAAGCCAAG	

的5'非翻译区(UTR)、401 bp的3'UTR。开放阅读框由465 bp核苷酸组成,编码155个氨基酸的多肽链,分子量为15.78 kDa,理论等电点为30.22(图1)。终止信号(AATAAA)位于3'UTR的891~896处。AwSOD与其他的细胞质Cu/ZnSOD序列比对表明,AwSOD包含Cys-7、Cys-57和Cys-146这3个半胱氨酸,其中Cys-57和Cys-146在所有Cu/ZnSOD中都是保守的,证实与分子内二硫键的形成有关(图2)。在AwSOD中,铜结合保守氨基酸残基分别为His-46、His-48、His-64和His-120,锌结合保守氨基酸残基分别为His-64、His-72和His-81及Asp-8。

AwSOD氨基酸序列中存在2个高度保守Cu/Zn-SOD标签序列,分别为GKHGFHVHEFGDNT和GNAGARSACGVI(图2)。

AwSOD二级结构和三级结构与Cu/ZnSOD具有较高的相似性,二级结构包含9个 β -折叠和2个 α -螺旋,其中有Cys-57和Cys-146形成二硫键(图3)。

2.2 AwSOD系统发育分析

BLAST分析表明,AwSOD氨基酸序列与Cu/ZnSOD具有较高的同源性,与褶纹冠蚌的同源性为97.42%,与海兔的同源性为61.39%,与斑马鱼的同源性为64.10%,与人的同源性为62.18%。为了研

GACTACAGCAGCGTCATGATAGCTACGGTCATTCCACTCTTTTAAATAACCGATAACGC	60
AAGTTAGACCTGCATAAATCACCATGTCCATTAAGGCTGTTTGCCTACTGAGGGGTGACA	120
M S I K A V C V L R G D	12
GTGAAGTTAAAGGAAGTCAAGTTTTTACAAGAGGGAAGTGGTGCAGTGAACATAACTG	180
S E V K G T V K F L Q E G S G A V N I T	32
GTGAGATAACTGGCCTGGCTGCAGAAAGCATGGATTCCATGTCCATGAATTGGAGATA	240
G E I T G L A A G K H <u>G F H V H E F G D</u>	52
ACACTAATGGCTGTACTAGTGCTGGGGCCCACTTCAACCCTAGCAAGCAGGAACATGCAG	300
<u>N T N G</u> C T S A G A H F N P S K Q E H A	72
GACCCGAAGATGCCTCCAGACATGCTGGTGACCTGGGTAATGTCGTAGCTGGAGATGATG	360
G P E D A S R H A G D L G N V V A G D D	92
GAGTGGCCACGTCAACATCAAGGACAGCGTGATCTCACTTACAGGACCAATTCCATCA	420
G V A H V N I K D S V I S L T G P N S I	112
TTGGCAGAACCATGGTGATTTCATGCGGATGAAGATGACCTTGGCAGGGGTGGACATGAGT	480
I G R T M V I H A D E D D L G R G G H E	132
TGAGCAAGACAAGTGGCAATGCTGGTGCACGTTTCGGCATGTGGTATTGGAATTTTGA	540
L S K T T <u>G N A G A R S A</u> C G V I G I S	152
AATTGGATTGAGTTGAATCATTGCTTGTGATACTTTTATAATGTTCTGTTGTAATTTG	600
K L D *	155
CAGAAATTATGTTTCGTATTTATCCTGTTGCTTACAAAATAGTTTTTGAATATTTTTTTT	600
TTACATTTTATTGAGGAAGAGAACTAAGAATGATTTTGTGTCTTTTGTATGATTTTCA	720
TTTATTCAAGGCTAACATTTCAAGTATTCTTTTCGAAAACAAATGCCTAGTGTAACCCAG	780
AGTTTTGATAGGAAGCAAGCTGTGAACAGTGGAATATACTTGAGTCCTTAGTATGTGTTA	840
CGGCCAGAATGTAGTGCGAGATTAAGCAATAACAAATGTAATGTAAATATAAAACC	900
AGTTTGGTAATTTTGTCTATTTAAGGAGTTATGAAAAAAAAAAAAA	949

图1 背角无齿蚌AwSOD基因的cDNA序列和推导的氨基酸序列

注:粗体标示起始(ATG)和终止(TAA)密码;波浪线标示终止信号“AATAAA”;下划线标示AwSOD标签序列;

灰色阴影标示Cu和Zn结合保守位点;方框标示半胱氨酸残基(Cys-57和Cys-146)。

Fig. 1 The cDNA nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of AwSOD gene of *Anodonta woodiana*

Note: The start codon (ATG) and stop codon (TAA) are indicated in bold; putative polyadenylation signal “AATAAA” is showed with wavy line; the signal sequences of AwSOD are underlined; the binding residues of Cu and Zn are marked with shadow; two cysteines (Cys-57 and Cys-146) formed a disulphide bond are marked with boxes.

<i>Anodonta woodiana</i>	MSIAVCVLRGDSEV--KGTVKFLQEGSGA-VNITGEITGLAAGKHGFHVHEFGDNTNGC	57
<i>Aplysia californica</i>	-MVKAVCVLAAGSSTSITGTTITFTQEGPADSTIVTGEVKGLAPGKHGFHIHQFGDYTNGC	59
<i>Danio rerio</i>	MVNKAVCVLKGTEV--TGTVYFNQEGEKKPVKVTGEITGLTPGKHGFHVHAFGDNTNGC	58
<i>Xenopus laevis</i>	-MVKAVCVLAGSGDV--KGVVHFEQQDE-GAVSVEGKIEGLTDGLHGFHIHVFGDNTNGC	57
<i>Mus musculus</i>	MAMKAVCVLKGDPV--QGTIHFEQKASGEPVVLSGQITGLTEGQHGFHVHQYGDNTQGC	58
<i>Homo sapiens</i>	MATKAVCVLKGDPV--QGIINFEQKESNGPVKVGSIKGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGC	58
<i>Anodonta woodiana</i>	TSAGAHFNPSKQEHAGPEDASRHAGDLGNVVAGDDGVAHVNTKDSVISLTGPNSTIGRTM	117
<i>Aplysia californica</i>	MSAGGHFNPLGATHGGPDDAVRHAGDLGNTIAGDDGVAKVEIKDPQVPLIGENSIVGRSL	119
<i>Danio rerio</i>	ISAGPHFNPHDKTHGGPTDSVRHVGD LGNVTADASGVAKIEIEDAMLTLSGGHSIIGRTM	118
<i>Xenopus laevis</i>	MSAGSHFNPENKNHAGPDTDRHVGD LGNVTAE--GVAQFKITDSLISLKGPNSTIGRTA	117
<i>Mus musculus</i>	TSAGPHFNPHSKKHGGPADEERHVGD LGNVTAGKDGVANVSTIEHRVISLSGEHSIIGRTM	118
<i>Homo sapiens</i>	TSAGPHFNPLSRKHGGPKDEERHVGD LGNVTADKDGVDVSIEDSVISLSGDHCLIGRTL	118
<i>Anodonta woodiana</i>	VIHAEDDLGRGGHELSKTTGNAGARSACGVITGISKLD	155
<i>Aplysia californica</i>	VVHEKEDDLGKGGNEESLKTGNAGPRVACGVITGITK--	155
<i>Danio rerio</i>	VIHEKEDDLGKGGNEESLKTGNAGGRLACGVITGITQ--	151
<i>Xenopus laevis</i>	VVHEKADDLGKGGNDESLKTGNAGGRLACGVITGYSP--	151
<i>Mus musculus</i>	VVHEKQDDLKGGNEESTKTGNAGSRLACGVITGIAQ--	151
<i>Homo sapiens</i>	VVHEKADDLGKGGNEESTKTGNAGSRLACGVITGIAQ--	151

图 2 背角无齿蚌 AwSOD 与其他物种 SOD 序列多重比对

注:红色边框标示 CuZnSOD 标签序列;阴影标示 Cu(His-46, His-48, His-64 和 His-120)和 Zn(His-64, His-72, His-81 和 Asp-84)结合保守位点;下划线标示半胱氨酸残基(Cys-57 和 Cys-146)。

Fig. 2 Multiple alignment of AwSOD of *Anodonta woodiana* with other species SODs

Note: Two signature motifs sequences of CuZnSOD are marked as red box; the amino acids required for Cu (His-46, His-48, His-64, and His-120) and Zn (His-64, His-72 and His-81 and Asp-84) binding are shaded; two cysteines (Cys-57 and Cys-146) formed a disulphide bond are showed with double lines.

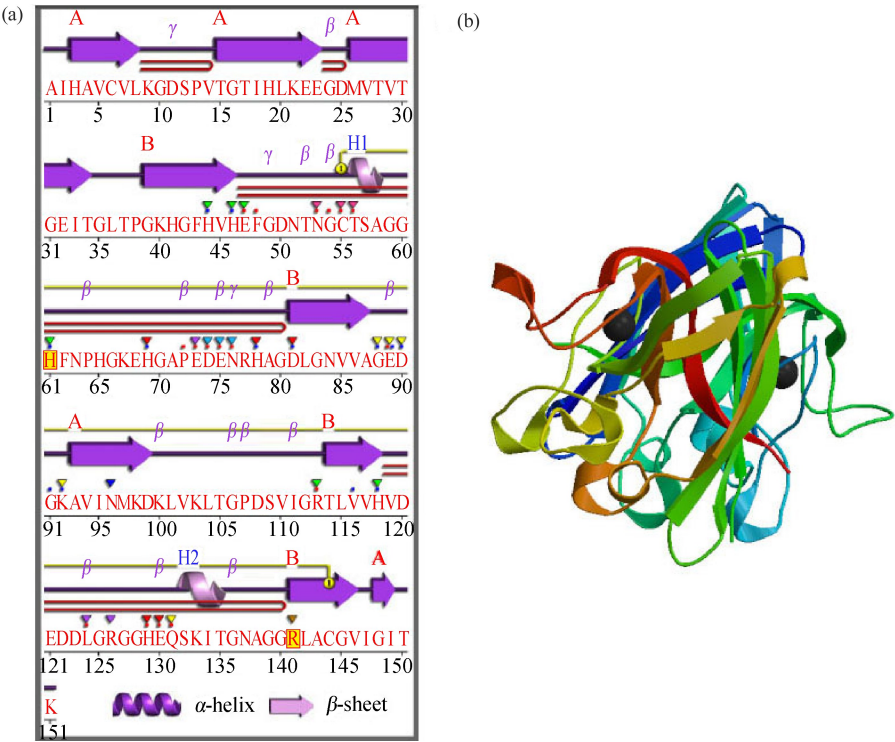


图 3 背角无齿蚌 AwSOD 二级和三级结构预测

注:(a) AwSOD 二级结构;(b) AwSOD 的三级结构。

Fig. 3 Predicted secondary and tertiary structures of AwSOD deduced amino acids of *Anodonta woodiana*

Note: (a) the secondary structure of AwSOD; (b) the tertiary structure of AwSOD.

究 AwSOD 与其他物种 Cu/ZnSOD 之间亲缘关系,采用 MEGA 5.0 近邻连接法构建系统进化树,分别从不同脊椎动物和无脊椎动物中选出了多个 Cu/ZnSOD 序列,其中包括人、家鼠、非洲爪蟾、斑马鱼、凡纳滨对虾、果蝇、光滑双脐螺和牡蛎等。AwSOD 与淡水贝类亲缘关系最近,其次海洋双壳类,最后是脊椎动物、腹足类和甲壳类(图 4)。

2.3 AwSOD 的组织分布

Real-time PCR 结果显示,背角无齿蚌 AwSOD 在斧足、鳃、肝胰脏、闭壳肌、外套膜和心脏壳中广泛表达(图 5)。AwSOD 在肝胰脏中的 mRNA 表达水平较高,在鳃和斧足为中等水平,在外套膜、闭壳肌和心脏中表达水平较低(图 5)。

2.4 PBDE-47 和 PBDE-209 对肝胰腺 AwSOD 表达的影响

在浓度 6.25、12.5、25、50 和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBDE-47 处理组中,肝胰腺中 AwSOD mRNA 水平显著增加,这种上调效应在浓度 6.25、12.5 和 25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PBDE-47 处理组呈现时间和剂量依赖模式;与对照组相比,整个实验过程中, AwSOD mRNA 水平

在 6.25、12.5 和 25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PBDE-47 处理组中分别增加了 70.58% ($P < 0.05$)、2.10 倍 ($P < 0.01$) 和 2.61 倍 ($P < 0.01$) 以上(图 6)。12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBDE-47 处理组中 AwSOD mRNA 水平分别增加了 3.57 倍 ($P < 0.01$) 和 2.56 倍 ($P < 0.01$) (图 6)。

与对照组相比, PBDE-209 处理后肝胰腺中 AwSOD mRNA 水平随时间和剂量呈现增加趋势。在 10、20、40、80 和 160 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理组中, AwSOD 表达水平分别增加了 1.03%、77.08% ($P < 0.05$)、91.66% ($P < 0.05$)、1.33 倍 ($P < 0.05$) 和 2.60 倍 ($P < 0.01$) (图 7)。

2.5 PBDE-47 和 PBDE-209 对鳃 AwSOD 表达的影响

在浓度 6.25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBDE-47 处理组中,鳃中 AwSOD mRNA 水平显著增加;与对照组相比,整个实验过程中 AwSOD mRNA 水平在 6.25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBDE-47 处理组中分别增加了 1.23 倍 ($P < 0.05$) 和 1.64 倍 ($P < 0.05$) 以上(图 8)。25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBDE-47 处理组中,鳃中 AwSOD mRNA 水平在 24 h 和 48 h 降至正常水平。25、

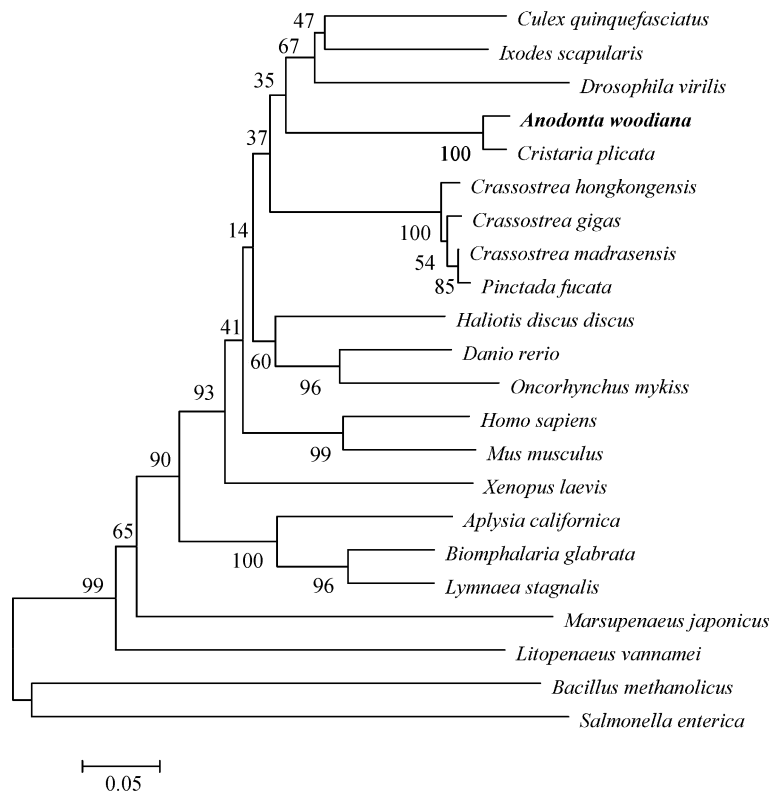


图 4 根据背角无齿蚌 AwSOD 氨基酸序列使用邻接法构建的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic relationship of AwSOD amino acid sequence between *Anodonta woodiana* and other organisms according to neighbor-joining method

50 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBDE-47 处理组中,鳃中 *AwSOD* mRNA 水平在 24 h 和 48 h 低于正常水平,分别减少了 46.96% 和 72.61% ($P<0.05$) (图 8)。

与对照组相比, PBDE-209 处理组鳃中 *AwSOD* mRNA 水平显著增加。在 10、20、40、80 和 160 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

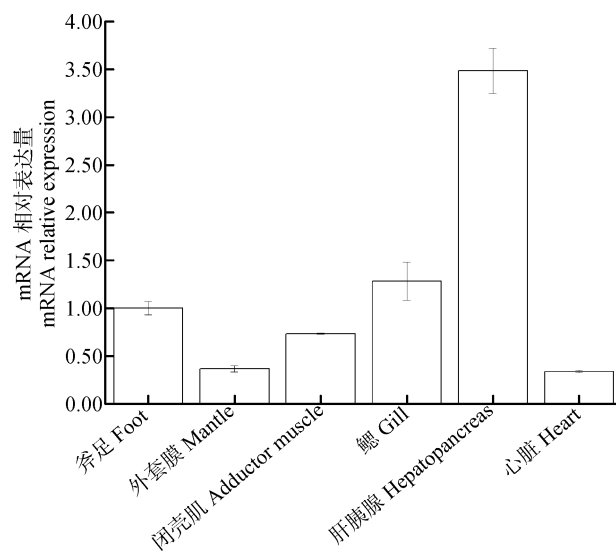


图5 背角无齿蚌不同组织中 *AwSOD* 基因的表达($n=5$)

Fig. 5 Real-time PCR analysis of *AwSOD* transcript from different tissues of *Anodonta woodiana* ($n=5$)

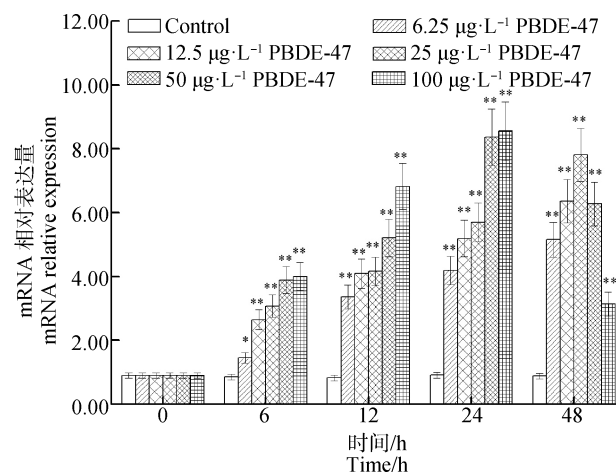


图6 PBDE-47 对背角无齿蚌肝胰腺 *AwSOD* 基因表达的影响

注:每处理组的每个时间点 $n=5$; *、**表示与相应对照组相比有显著差异 ($P<0.05$ 、 $P<0.01$);下同。

Fig. 6 Temporal expression of *AwSOD* in the hepatopancreas of *Anodonta woodiana* after PBDE-47 challenge as measured by quantitative real-time PCR

Note: Data are expressed as means $\pm$ SE; $n=5$ in each group at each time point; *, ** represent $P<0.05$, $P<0.01$, compared with control group at the same time.

的处理组中, *AwSOD* 表达水平分别增加了 68.68% ($P<0.05$)、86.87% ($P<0.05$)、1.28 倍 ($P<0.05$)、1.54 倍 ($P<0.01$) 和 1.75 倍 ($P<0.01$) (图 9)。

3 讨论 (Discussion)

本研究结果显示, *AwSOD* 中未发现信号肽序列,提示 *AwSOD* 属于胞质 Cu/ZnSOD 家族成员,已经过加工并具备了成熟模式。*AwSOD* 氨基酸序列与其他 Cu/ZnSODs 序列多重比对表明,2 个半胱氨酸残基 Cys-57 和 Cys-146 与 CuZnSODs 氨基酸残基

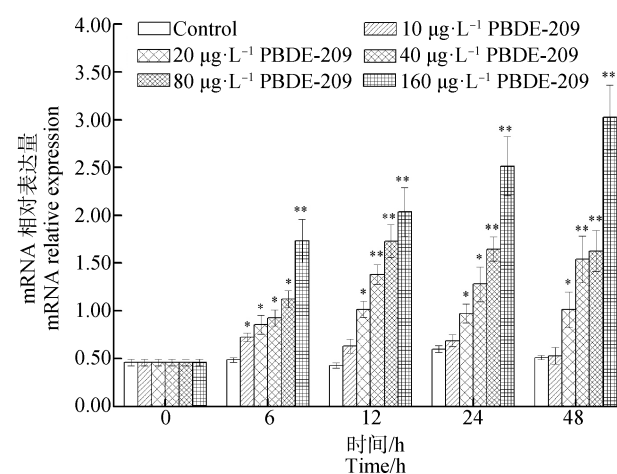


图7 PBDE-209 对背角无齿蚌肝胰腺 *AwSOD* 基因表达的影响

Fig. 7 Temporal expression of *AwSOD* in the hepatopancreas of *Anodonta woodiana* after PBDE-209 challenge as measured by quantitative real-time PCR

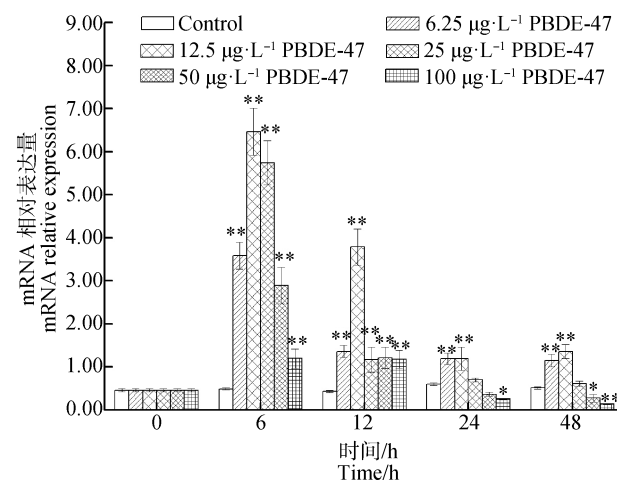


图8 PBDE-47 对背角无齿蚌鳃 *AwSOD* 基因表达的影响

Fig. 8 Temporal expression of *AwSOD* in the gill of *Anodonta woodiana* after PBDE-47 challenge as measured by quantitative real-time PCR

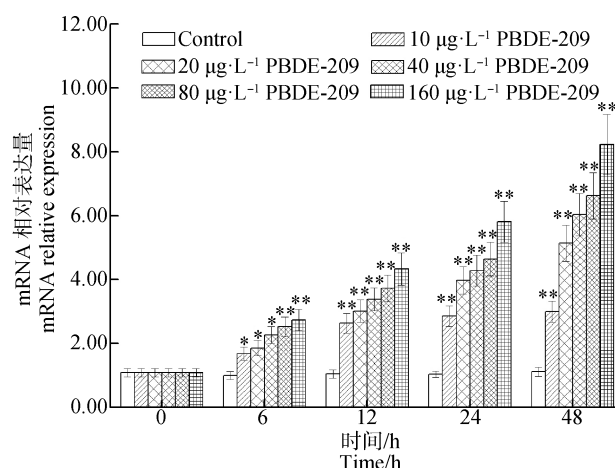


图9 PBDE-209对背角无齿蚌鳃AwSOD基因表达的影响

Fig. 9 Temporal expression of AwSOD in the gill of *Anodonta woodiana* after PBDE-209 challenge as measured by quantitative real-time PCR

具有高度保守性,可能与二级结构中二硫键的形成有关^[17-18]。在AwSOD和其他Cu/ZnSODs序列中,Cu和Zn结合氨基酸残基相对比较保守,这些保守的氨基酸有助于AwSOD结构稳定性和催化的作用^[19]。同时,在相对恶劣环境条件下,这些氨基酸残基对稳定Cu/ZnSODs构象具有潜在作用,有助于Cu和Zn稳定Cu/ZnSOD三级结构^[20]。

AwSOD在不同组织中呈现不同的表达模式,其中,在肝胰腺组织中AwSOD mRNA的表达水平最高,这与肝胰腺作为主要代谢组织和主要防御器官有关。相同的现象在南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)和拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)中也被发现^[21-22]。相当于哺乳动物的肝脏和昆虫的脂肪体而言,水生无脊椎动物肝胰腺具有肝脏和胰腺双重功能,不仅是重要的消化器官,而且在非特异性免疫中发挥着重要的作用^[21-22]。肝胰腺具有较高的代谢活性,水体中污染物进入机体后通过代谢过程会产生大量的ROS。AwSOD基因高表达提示其可作为一种重要的肝脏解毒酶。其他组织中AwSOD的广泛分布有助于将氧自由基快速转化为普通分子氧(O₂)和过氧化氢(H₂O₂)。

研究发现,PBDE-47和PBDE-209处理后背角无齿蚌肝胰腺和鳃AwSOD表达水平显著升高,提示这可能与增强机体ROS清除能力和提高胁迫耐受性有关。伴随PBDE-47和PBDE-209在机体中的不断累积,细胞中ROS生成增加,诱发细胞氧化应激,线粒体出现呼吸爆发,细胞出现功能性受损。

在胁迫条件下,生物本身SOD、过氧化氢酶、谷胱甘肽S转移酶和硫过氧化物酶表达水平提升,以提高机体清除ROS能力,维持机体稳态。长时间Cd暴露后,非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)和青鳉(*Oryzias latipes*)Cu/ZnSOD mRNA表达水平显著上调^[23]。白斑杆状病毒感染后,日本囊对虾(*Penaeus japonicus*)鳃和血淋巴中Cu/ZnSOD表达水平显著升高^[24]。乳球菌处理后,罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)血淋巴中Cu/ZnSOD表达水平显著增加^[25]。马拉硫磷、硫丹和二者混合物处理后,南美白对虾(*L. vannamei*)血淋巴中Cu/ZnSOD表达水平显著增加^[26]。Cd²⁺胁迫后,褶纹冠蚌(*Cristaria plicata*)Cu/ZnSOD基因mRNA水平和酶活性迅速升高,并在72 h和48 h达到峰值,提示Cu/ZnSOD是用于监测早期水体重金属污染的重要靶分子^[27]。由此可见,Cu/ZnSOD在维持机体氧自由基代谢平衡、免受氧化损伤、ROS清除和机体保护性防御中起着重要作用。PBDE-47和PBDE-209处理后背角无齿蚌肝胰腺和鳃AwSOD表达水平显著升高与增强机体抗氧化能力和耐受性有关。

与对照组相比,不同浓度PBDE-47暴露后,肝胰腺中AwSOD在高剂量组出现先升高后降低的现象,而在鳃中,AwSOD表达水平在6 h显著上调,后期出现下调现象,提示这种表达模式与PBDE-47毒性效应和剂量效应有关。正常情况下,动物体内ROS保持相对较低的水平,ROS生成后将迅速被一系列抗氧化酶迅速清除,以维持ROS水平与抗氧化酶活性之间的平衡^[28-29]。抗氧化酶是机体内稳态的重要标志之一。鳃作为贝类重要免疫器官,鳃丝直接接触PBDE-47和PBDE-209,并通过鳃丝呼吸作用迅速进入机体,产生大量ROS,相对于肝胰腺而言,PBDE-47对鳃氧化应激效应更为直接和明显。持续高剂量长时间的PBDE-47暴露,导致进入体内PBDE-47超过鳃的解毒极限,则鳃会受到损伤,大量鳃组织中细胞凋亡,处理后期出现表达水平下调现象^[30]。相同现象在褶纹冠蚌中也被发现,Pb²⁺胁迫后,褶纹冠蚌Cu/ZnSOD mRNA的表达先升高后降低,在48 h达到最大值^[27]。在PBDE-209处理组中,AwSOD的表达呈时间和剂量依赖性,与所选择的浓度未达到临界值,动物在这种浓度可以产生足够的抗氧化能力,从而保持机体PBDE-209氧化和抗氧化酶还原作用之间的平衡;实验中选定浓度未检测到PBDE-209半数致死浓度进一步证实了这一

现象。

研究显示,地表水中 PBDE-47 含量为 $0.25 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, PBDE-209 含量为 $1.0 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[31]。软体动物调查结果显示, PBDE-47、PBDE-99、PBDE-154 和 PBDE-153 含量为 $0.39 \sim 3.65 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, PBDE-209 作为主要持久性有机污染物含量为 $10.2 \sim 284 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[32]。PBDE-47 和 PBDE-209 对淡水资源的负面效应和水生生物的累积效应已成为不可忽视的问题。PBDE-47 和 PBDE-209 对背角无齿蚌机体氧化应激作用是一个综合的效应,其产生氧化应激后抗氧化系统启动,涉及多种抗氧化酶的参与。从 *AwSOD* 组织特异性表达及 PBDE-47 和 PBDE-209 对其表达的诱导作用,背角无齿蚌是用于淡水污染监测的重要生物之一。

通讯作者简介:夏西超(1977—),男,博士,教授,主要研究方向为环境毒理学。

参考文献 (References):

- [1] Fromme H, Becher G, Hilger B, et al. Brominated flame retardants—Exposure and risk assessment for the general population [J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2016, 219(1): 1-23
- [2] Roberts S C, Noyes P D, Gallagher E P, et al. Species-specific differences and structure-activity relationships in the debromination of PBDE congeners in three fish species [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(5): 1999-2005
- [3] Zhang R Q, Guo J Y, Wu F C, et al. Toxicity reference values for polybrominated diphenyl ethers: Risk assessment for predatory birds and mammals from two Chinese lakes [J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2014, 229: 111-137
- [4] Li Z H, Panton S, Marshall L, et al. Spatial analysis of polybrominated diphenylethers (PBDEs) and polybrominated biphenyls (PBBs) in fish collected from UK and proximate marine waters [J]. *Chemosphere*, 2018, 195: 727-734
- [5] Tan K, Zhang B, Ma H Y, et al. Oxidative stress responses of golden and brown noble scallops *Chlamys nobilis* to acute cold stress [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 95: 349-356
- [6] Umasuthan N, Bathige S D, Revathy K S, et al. A manganese superoxide dismutase (MnSOD) from *Ruditapes philippinarum*: Comparative structural- and expressional-analysis with copper/zinc superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) and biochemical analysis of its antioxidant activities [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(4): 753-765
- [7] Che M X, Wang R, Li X X, et al. Expanding roles of superoxide dismutases in cell regulation and cancer [J]. *Drug Discovery Today*, 2016, 21(1): 143-149
- [8] Yang W Y, Liu W X, Wen C G, et al. A superoxide dismutase (MnSOD) with identification and functional characterization from the freshwater mussel *Cristaria plicata* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 91: 180-187
- [9] Zhou Z, Liu Z Q, Wang L G, et al. Oxidative stress, apoptosis activation and symbiosis disruption in giant clam *Tridacna crocea* under high temperature [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 451-457
- [10] Kim U J, Jo H, Lee I S, et al. Investigation of bioaccumulation and biotransformation of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated and methoxylated derivatives in varying trophic level freshwater fishes [J]. *Chemosphere*, 2015, 137: 108-114
- [11] Soo P, Todd P A. The behaviour of giant clams (Bivalvia: Cardiidae) [J]. *Marine Biology*, 2014, 161(12): 2699-2717
- [12] Xia X C, Yu R X, Li M B, et al. Molecular cloning and characterization of two genes encoding peroxiredoxins from freshwater bivalve *Anodonta woodiana*: Antioxidative effect and immune defense [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 82: 476-491
- [13] Jing W X, Lang L, Lin Z G, et al. Cadmium bioaccumulation and elimination in tissues of the freshwater mussel *Anodonta woodiana* [J]. *Chemosphere*, 2019, 219: 321-327
- [14] Davies R, Zou E M. Polybrominated diphenyl ethers disrupt molting in neonatal *Daphnia magna* [J]. *Ecotoxicology*, 2012, 21(5): 1371-1380
- [15] Wang C, Huan P, Yue X, et al. Molecular characterization of a glutathione peroxidase gene and its expression in the selected *Vibrio*-resistant population of the clam *Meretrix meretrix* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(6): 1294-1302
- [16] Li C H, Ni D J, Song L S, et al. Molecular cloning and characterization of a catalase gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(1): 26-34
- [17] Bao Y B, Li L, Wu Q, et al. Cloning, characterization, and expression analysis of extracellular copper/zinc superoxide dismutase gene from bay scallop *Argopecten irradians* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(1): 17-25
- [18] Xu H H, Ma H, Hu B Q, et al. Molecular cloning, identification and functional characterization of a novel intracellular Cu-Zn superoxide dismutase from the freshwater

- mussel *Cristaria plicata* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(4): 615-622
- [19] Atli G, Canli E G, Eroglu A, et al. Characterization of antioxidant system parameters in four freshwater fish species [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 126: 30-37
- [20] Park H, Ahn I Y, Lee J K, et al. Molecular cloning, characterization, and the response of manganese superoxide dismutase from the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* to PCB exposure [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(3): 522-528
- [21] Lyu K, Zhu X X, Chen R, et al. Molecular cloning of manganese superoxide dismutase gene in the cladoceran *Daphnia magna*: Effects of microcystin, nitrite, and cadmium on gene expression profiles [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 148: 55-64
- [22] Gómez-Anduro G A, Ascencio-Valle F, Peregrino-Uriarte A B, et al. Cytosolic manganese superoxide dismutase genes from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* are differentially expressed in response to lipopolysaccharides, white spot virus and during ontogeny [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry & Molecular Biology, 2012, 162(4): 120-125
- [23] Woo S, Yum S, Park H S, et al. Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology, 2009, 149(3): 289-299
- [24] Hung M N, Shiomi R, Nozaki R, et al. Identification of novel copper/zinc superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) genes in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 40(2): 472-477
- [25] Cheng W, Tung Y H, Liu C H, et al. Molecular cloning and characterisation of copper/zinc superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 21(1): 102-112
- [26] Bautista-Covarrubias J C, Aguilar-Juárez M, Voltolina D, et al. Immunological response of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to sublethal concentrations of malathion and endosulfan, and their mixture [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020, 188: 109893
- [27] 郑双艳, 孟超, 刘清, 等. 重金属对褶纹冠蚌 Cu/ZnSOD 基因 mRNA 表达和酶活性的影响 [J]. 南昌大学学报: 理科版, 2018, 42(1): 67-71
- Zheng S Y, Meng C, Liu Q, et al. Effects of heavy metal on mRNA expression and enzymatic activity of Cu/Zn superoxide dismutase in *Cristaria plicata* [J]. Journal of Nanchang University: Natural Science, 2018, 42(1): 67-71 (in Chinese)
- [28] Wollenberger L, Dinan L, Breitholtz M. Brominated flame retardants: Activities in a crustacean development test and in an ecdysteroid screening assay [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2005, 24(2): 400-407
- [29] de Andrade K Q, Moura F A, dos Santos J M, et al. Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: Therapeutic possibilities of N-acetylcysteine [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16 (12): 30269-30308
- [30] Hallmann A, Konieczna L, Swiezak J, et al. Aromatisation of steroids in the bivalve *Mytilus trossulus* [J]. PeerJ, 2019, 7: e6953
- [31] Hou L, Jiang J Y, Gan Z W, et al. Spatial distribution of organophosphorus and brominated flame retardants in surface water, sediment, groundwater, and wild fish in Chengdu, China [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2019, 77(2): 279-290
- [32] Fu L F, Pei J, Zhang Y Y, et al. Polybrominated diphenyl ethers and alternative halogenated flame retardants in mollusks from the Chinese Bohai Sea: Levels and interspecific differences [J]. Marine Pollution Bulletin, 2019, 142: 551-558