

铜在虾夷扇贝鳃和肝胰腺中的累积及 对抗氧化酶、脂代谢的影响

孟晓林, 田 雪, 郭倩倩, 黄建蓉, 卢荣华,
梁俊平, 李学军, 孔祥会, 聂国兴*

(河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 为了解铜在虾夷扇贝鳃和肝胰腺中的累积规律及对抗氧化酶、脂代谢的影响, 以不同浓度的铜分别对虾夷扇贝暴露 0、1、3、6、10 及 14 d, 检测铜在鳃、肝胰腺组织中的累积量及对抗氧化酶 SOD、CAT 及 GPx 活性的影响, 并通过高通量测序手段, 分析 72 h 胁迫时, 高浓度铜对肝胰腺组织脂代谢关键调控因子的影响。结果表明: 0.025 mg/L 胁迫组在鳃中的最高累积出现在第 14 天 (347.55 $\mu\text{g/g}$), 0.05 和 0.10 mg/L 胁迫组最高累积均出现在第 6 天 (340.72 和 302.30 $\mu\text{g/g}$), 整体随时间呈曲线变化关系, 而肝胰腺组织中, 高浓度 (0.10 mg/L) 组累积随时间呈线性关系, 最高为第 14 天 (60.88 $\mu\text{g/g}$), 中低浓度 (0.025 和 0.05 mg/L) 组随暴露时间的延长均呈曲线变化关系; 鳃组织各抗氧化酶在胁迫期内均被显著性抑制, 肝胰腺组织中, 除 0.05 mg/L 胁迫组对 GPx 酶活性 24 h 时显著抑制外, 0.025 和 0.05 mg/L 胁迫浓度在 24 h 内均可诱导抗氧化酶显著表达, 但随胁迫期的延长逐渐降低, 0.10 mg/L 胁迫组各酶活性在胁迫期内被显著性抑制; 高浓度组 (0.10 mg/L) 胁迫 72 h 后, 虾夷扇贝肝胰腺脂代谢关键调控因子 PPARs- γ 2、6PGD、G6PD、FAS、LDH 与对照组相比均显著上调, 而 ACC、CPT1 与对照组相比, 虽然存在差异表达, 但不显著。实验表明, 鳃是虾夷扇贝铜的主要蓄积部位, 肝胰腺组织对铜的累积不存在浓度依赖性关系, 对高铜胁迫累积反应较为敏感, 同时与镉对虾夷扇贝的毒性相比, 铜的毒性作用更强, 对虾夷扇贝抗氧化防御系统的破坏性更大, 并且在高浓度急性胁迫条件下, 铜可以促进肝胰腺的脂质合成代谢, 诱发脂肪的累积。

关键词: 虾夷扇贝; 铜; 抗氧化酶; 脂代谢

中图分类号: Q 597; S 968.3

文献标志码: A

虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 隶属于软体动物门 (Mollusca), 瓣鳃纲 (Lamellibranchiata), 珍珠贝目 (Pterioidea), 扇贝科 (Pectinidae)^[1]。由于其重要的商业价值, 20 世纪 80 年代初被引入我国, 并迅速在我国北部沿海地区大面积养殖^[2]。但由于种群资源的退化、夏季高温、环境污染等因素的影响, 虾夷扇贝的养殖已面临着极大的威胁^[3-5]。

随着工农业的发展, 水生态环境中重金属污

染已成为最为严重的问题之一^[6]。同时, 伴随着我国水产养殖量的不断增长, 由水环境污染而导致的养殖动物的免疫力下降、营养代谢失调等问题也日益突出。在众多的重金属环境污染因子中, 铜作为矿物营养素、除藻剂或病原抑制药物被广泛应用于水产养殖领域^[7-8], 当其以自由金属离子形式达到一定浓度时就会对水产养殖动物的发育、生长、繁殖、免疫功能及营养代谢造成影响^[7,9-11]。因此, 开展重金属铜对虾夷扇贝的毒

收稿日期: 2015-01-14 修回日期: 2015-03-31

资助项目: 国家自然科学基金青年基金 (31402311); 河南省高校科技创新团队支持计划 (14IRTSTHN013); 河南省科技创新杰出青年支持计划 (154100510010)

通信作者: 聂国兴, E-mail: niegx@htu.cn

性作用机制研究具有重要的实践意义。

抗氧化酶类的活性是反映机体健康与否的重要指标,主要包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、溶菌酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)等,当有机体受到污染物胁迫并产生细胞内活性氧产物(ROS)时,这些酶类的活性就会发生改变以应对氧化胁迫^[12],保护大分子物质如蛋白质、脂肪和核酸。营养代谢紊乱同样是重金属胁迫下引起的机体代谢障碍,可以使水产动物出现脂肪蓄积、脂滴增大、肝功能下降等问题^[8,11,13-14]。本实验通过在不同胁迫时间下,研究铜在虾夷扇贝鳃、消化腺的沉积规律及对抗氧化酶活性、肝胰腺脂代谢调节关键基因的表达影响,揭示铜对虾夷扇贝的毒性作用,以期为生产中更好地监控重金属污染提供一定的技术指标参考。

1 材料与方 法

1.1 虾夷扇贝的来源及养殖条件

成体虾夷扇贝购自大连獐子岛渔业公司。挑选健康及壳高大小为(9.390 ± 0.273) cm (mean ± SD, n = 30)的虾夷扇贝作为实验贝。将扇贝在实验条件下养殖于温度为(16 ± 1) °C及盐度为30的过滤海水中,所用海水引自青岛第一海水浴场。暂养及实验期间以螺旋藻(*Spirulina*)作为饵料,24 h不间断充氧,每天换水1/2,所换海水损失Cu²⁺以等浓度含铜海水补充,暂养期为7 d。

1.2 实验设计

实验共分4组(1个对照组及3个胁迫组),每组设3个重复,每重复随机放养25只实验贝。所用化学试剂为CuCl₂ · 2H₂O(Sigma,美国),加入海水使Cu²⁺终浓度分别为0、0.025、0.05及0.1 mg/L。Cu的含量分别为中国渔业水质标准(GB 11607-89)的0、2.5、5及10倍。实验期为14 d,分别在0、1、3、6、10和14 d随机选取3只虾夷扇贝,并对鳃、肝胰腺组织取样,冻存于-80 °C冰箱供测试分析备用。

1.3 组织Cu含量的测定

取0、3、6、10和14 d的虾夷扇贝鳃、肝胰腺样品,生理盐水冲洗后于60 °C烘箱中48 h烘干至恒重,取0.5 g鳃或0.2 g肝胰腺,加入30 mL的特氟龙管中,并加入6 mL HNO₃,在室温下放置1 h。将溶液在100 °C条件下煮沸6 h至澄清,

将剩余物在100 °C条件下溶解于6 mL 1%的HNO₃溶液中。Cu含量采用电感耦合等离子质谱仪(ICP-MS, Elan6100,美国)测定。

1.4 SOD、CAT、GPx活力测定

取Cu胁迫后0、1、3、6、10和14 d的鳃、肝胰腺样品,准确称量后加入10倍体积比的预冷组织裂解液,在匀浆器上匀浆,匀浆液于4 °C条件下10 000 g/min离心20 min,取上清液待测。

总超氧化物歧化酶(SOD)测定方法基于Marklund法^[15]基础上修改完善后进行。过氧化氢酶(CAT)活力测定方法基于Greenwald^[16]法改进后进行。谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性测定基于夏亦明等^[17]及Pan等^[18]方法改进后进行。

1.5 肝胰腺脂代谢相关基因差异表达分析

取0和0.1 mg/L铜胁迫组胁迫72 h的肝胰腺样品,分别提取总RNA(Invitrogen,美国)并检测RNA质量(Agilent2100,美国)。采用RNA-Seq(Quantification)策略构建文库,在Illumina HiSeq™2000平台上进行高通量测序(测序数据已上传至NCBI SRA数据库,登录号:SRR736121)。将测序数据与虾夷扇贝转录组数据(SRR653778、SRA027310),通过SOAP2软件进行比对,将唯一比对到参考基因的序列进行基因表达丰度计算,并通过RPKM进行标准化,筛选出差异表达基因,以FDR < 0.001且差异倍数不低于2定义为差异显著性标准。进一步利用GO功能显著富集性分析和通路显著性富集分析筛选出与脂代谢相关的差异表达基因。

2 结 果

2.1 Cu在虾夷扇贝鳃、肝胰腺组织中的累积

在鳃中,0.025 mg/L胁迫组对Cu的累积表现出随暴露时间的延长而呈现线性增加关系,最高累积出现在第14天[(347.55 ± 12.12) μg/g, P < 0.05],而0.05和0.10 mg/L胁迫组对Cu的累积与时间的关系表现出曲线性的先增加后下降的趋势,两组最高铜累积均出现在第6天,分别为(340.72 ± 17.62)和(302.30 ± 11.80) μg/g (P < 0.05)(图1-a)。

在肝胰腺中,0.10 mg/L胁迫组对Cu的累积表现出随暴露时间的延长而线性增加,最高累积出现在第14天(60.88 ± 1.88) μg/g(图1-b),与对照组相比差异显著(P < 0.05),并且6和10 d

肝胰腺的 Cu 累积量与 14 d 相差不大,分别为 (56.20 ± 3.53) 和 $(59.75 \pm 4.35) \mu\text{g/g}$ 。0.025 与 0.05 mg/L 组随暴露时间均表现出曲线变化关系,其中,0.025 mg/L 胁迫组呈现出先下降后上升趋势,最低铜含量出现在第 3 天 $[(6.52 \pm$

$0.44) \mu\text{g/g}$, ($P < 0.05$)] ; 0.05 mg/L 胁迫组呈现出先升高再下降再上升的趋势,最高铜含量在第 3 天出现 $[(31.02 \pm 1.30) \mu\text{g/g}$, ($P < 0.05$)]。总体而言,虾夷扇贝鳃对 Cu 的累积量显著高于肝胰腺。

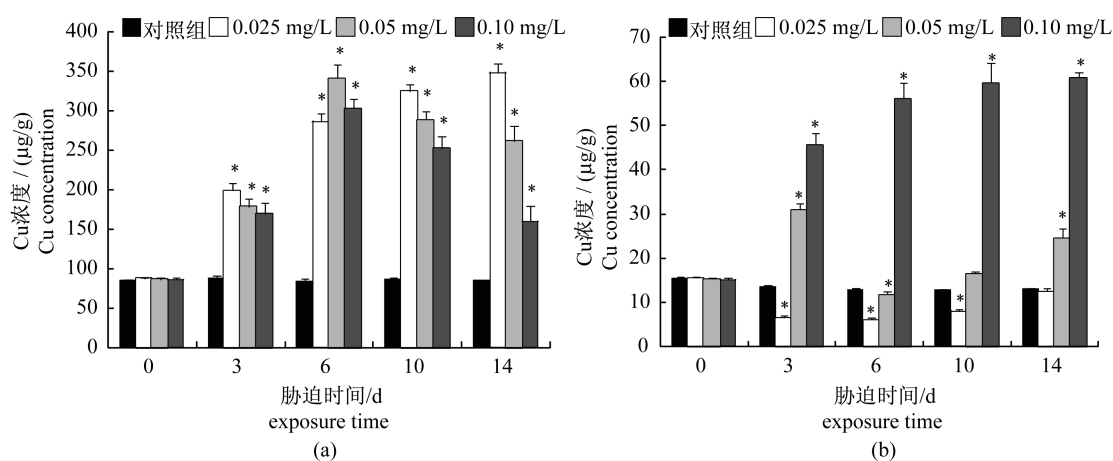


图 1 铜在虾夷扇贝鳃 (a)、肝胰腺组织 (b) 中的累积

* 表示实验组与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Fig. 1 Accumulation of Cu in the gill (a) and hepatopancreas (b) of *M. yessoensis*

* indicate significant differences ($P < 0.05$) between the treated and control groups, the same as below

2.2 Cu 对虾夷扇贝鳃、肝胰腺组织 SOD 活性的影响

不同浓度铜胁迫虾夷扇贝鳃组织对 SOD 活性均起到抑制作用,0.05 和 0.10 mg/L 胁迫组随胁迫时间的延长呈现先降低后升高再降低的变化

趋势,而 0.025 mg/L 组随时间延长表现出先降低后升高趋势。低中高浓度胁迫组的最低 SOD 活性分别出现在第 6 天 $[(44.52 \pm 8.23) \text{U}]$ 、第 1 天 $[(41.18 \pm 7.5) \text{U}]$ 和第 3 天 $[(23.04 \pm 3.44) \text{U}]$, 差异性均显著 ($P < 0.05$) (图 2-a)。

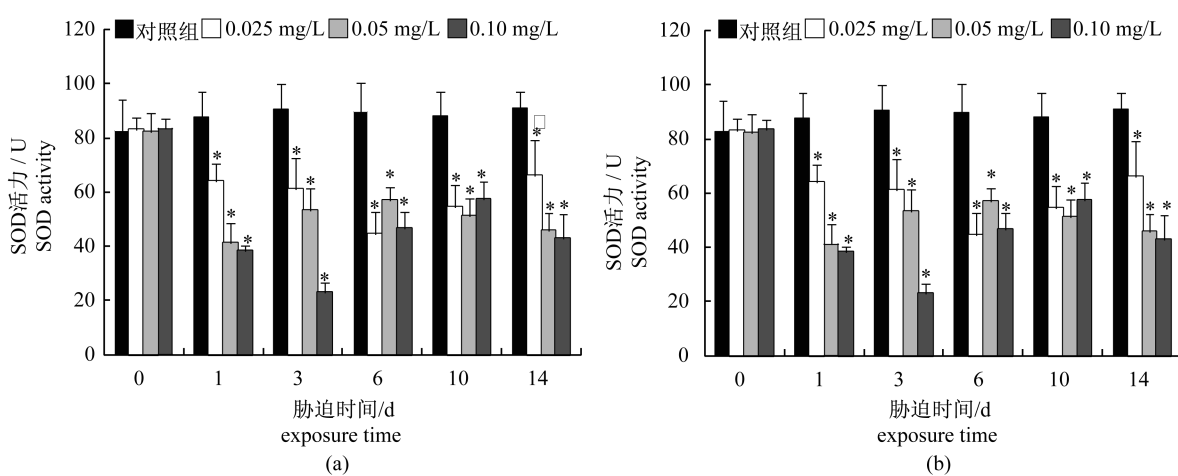


图 2 铜对虾夷扇贝鳃 (a)、肝胰腺 (b) SOD 活性的影响

Fig. 2 Effect of Cu on SOD activity of gill (a) and hepatopancreas (b)

不同的铜胁迫浓度对肝胰腺 SOD 活性的影响表现出不同的趋势,0.025 和 0.05 mg/L 胁迫

组 SOD 活性表现出短时间内 (24 h) 上升,后开始下降至最低后又开始上升的趋势,而 0.10 mg/L

胁迫组则直接表现出对 SOD 活性的抑制作用,后又逐渐升高。0.025 和 0.05 mg/L 胁迫组 SOD 在第 1 天时,活性最高分别为 (73.25 ± 6.62) 和 (79.45 ± 3.45) U ($P < 0.05$);最低均出现在第 6 天,分别为 (36.72 ± 3.48) 和 (23.49 ± 4.63) U,此时显著低于对照组 ($P < 0.05$)。0.10 mg/L 胁迫组 SOD 活性最低出现在第 3 天,为 (22.62 ± 2.63) U,之后开始上升(图 2-b)。

2.3 Cu 对虾夷扇贝鳃、肝胰腺组织 CAT 活性的影响

不同浓度铜胁迫对虾夷扇贝鳃 CAT 活性均起到了显著性抑制作用,总体呈现先下降后上升

的趋势。各实验组均在胁迫 3 d 时达到最低值,分别为 (1.37 ± 0.14) 、 (1.12 ± 0.12) 和 (0.64 ± 0.07) U,与对照组均存在显著性差异 ($P < 0.05$)。胁迫 3 d 后,中低浓度胁迫组 CAT 活性显著回升,而高浓度胁迫组无显著性变化(图 3-a)。

0.025 和 0.05 mg/L 胁迫组在胁迫 1 d 时,肝胰腺 CAT 活性有显著性上升,但随即开始下降,至第 6 天时达最低值,后 CAT 活性开始恢复。而高浓度胁迫组 CAT 活性则在胁迫期内受到显著性抑制作用 ($P < 0.05$),呈现先下降,后上升,再下降的变化趋势(图 3-b)。

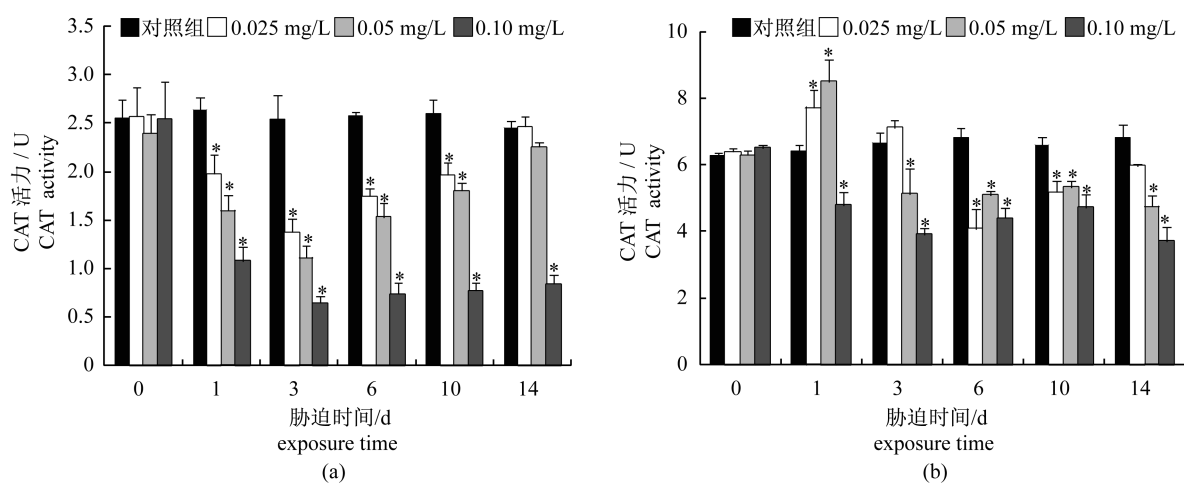


图 3 铜对虾夷扇贝鳃 (a)、肝胰腺 (b) CAT 活性的影响

Fig. 3 Effects of Cu on CAT activity of gill (a) and hepatopancreas (b)

2.4 Cu 对虾夷扇贝鳃、肝胰腺组织 GPx 活性的影响

不同浓度铜对虾夷扇贝鳃 GPx 的活性均表现为显著性的抑制作用 ($P < 0.05$),0.10 mg/L 胁迫组的抑制作用最大,最低活性出现在第 3 天,为 (0.72 ± 0.03) U,此后随胁迫时间的延长活性变化不大。0.025 和 0.05 mg/L 胁迫组 GPx 活性分别于第 3 天 [(1.11 ± 0.16) U] 和第 1 天 [(0.97 ± 0.05) U] 达到最低值,随后 GPx 活性有所增加(图 4-a)。

0.025 mg/L 铜胁迫浓度对消化腺 GPx 活性影响不大,在 1 d 时显著增加 ($P < 0.05$),胁迫 3 d 时相对对照组有所降低,随胁迫时间延长与对照组不存在显著性差异 ($P > 0.05$)。0.10 mg/L 胁迫组,GPx 活性表现出显著性抑制作用,最低出现

在第 1 天 [(1.36 ± 0.20) U],此后随暴露时间延长,活性变化不大。0.05 mg/L 胁迫组则表现出先显著性抑制,后逐步升高的趋势,最低 GPx 活性出现在第 1 天 [(2.15 ± 0.11) U](图 4-b)。

2.5 Cu 对虾夷扇贝肝胰腺脂肪代谢相关基因表达的影响

基于高通量测序数据,筛选出铜胁迫条件下虾夷扇贝肝胰腺与脂代谢相关酶及调控因子差异表达基因(表 1),过氧化物酶体增殖因子活化受体- $\gamma 2$ (PPARs- $\gamma 2$)、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGD)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)、脂肪酸合成酶(FAS)、乳酸脱氢酶(LDH)与对照组相比均显著上调 ($P < 0.05$),而乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)、肉毒碱棕榈酰转移酶(CPT1)与对照组相比,虽然存在差异表达,但不显著 ($P > 0.05$)。

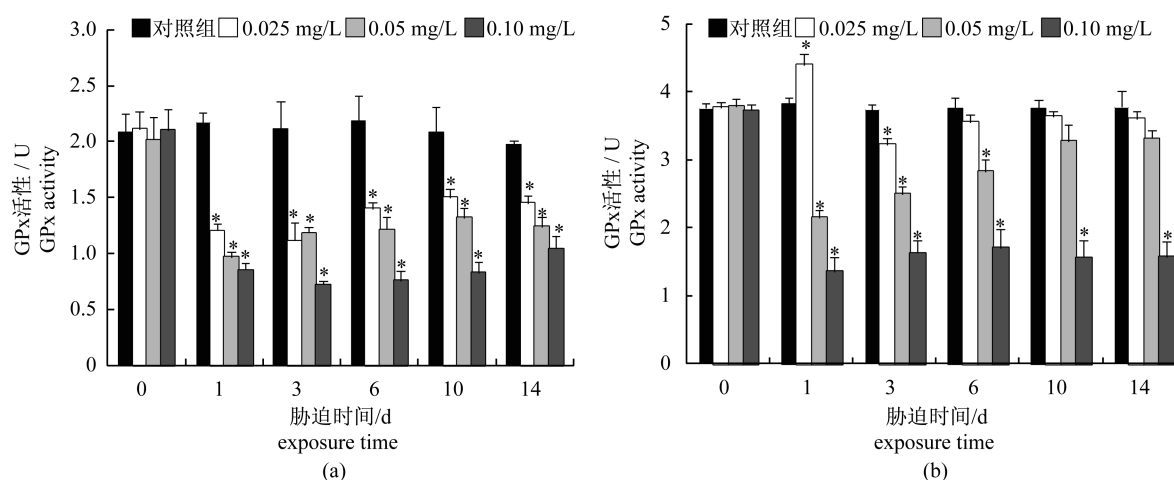


图4 铜对虾夷扇贝鳃(a)、肝胰腺(b) GPx 活性影响

Fig. 4 Effects of Cu on GPx activity of gill (a) and hepatopancreas (b)

表1 肝胰腺脂代谢相关酶及调控因子差异表达

Tab. 1 Different expression of enzymes or transcriptional factors related to lipid metabolism in hepatopancreas

基因名称 name of gene	数据库基因名称 name of gene in database	相对表达量/倍 abundance of expression	上调或下调 up/down
过氧化物酶体增殖因子活化受体- γ 2 peroxisome proliferator activated receptors, PPARs- γ 2	Locus_67434	10.518	上调
6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 6-phosphogluconate dehydrogenase, 6PGD	DRR00112.180457	10.296	上调
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD	Locus_4091	2.496	上调
脂肪酸合成酶 fatty acid synthetase, FAS	Locus_29734	2.734	上调
乳酸脱氢酶 lactic dehydrogenase, LDH	Locus_30862	4.274	上调
乙酰辅酶 A 羧化酶 acetyl-CoA carboxylase, ACC	Locus_1139	0.088	上调
肉毒碱棕榈酰转移酶 carnitine palmitoyltransferase 1, CPT1	Locus_579	0.733	上调

3 讨论

3.1 铜在虾夷扇贝鳃、肝胰腺组织中的累积规律

由于海洋底栖动物生活习性及其环境的特殊性,使其成为极易富集重金属的一类生物。本实验中高浓度胁迫组鳃组织在第6天对铜的累积量达到最高,然后出现下降的趋势,这可能是由于鳃组织在高浓度铜胁迫下线粒体受到损伤所致,这与镉(Cd)胁迫对鳃组织的影响结果是一致的^[1]。而低浓度铜胁迫对鳃组织刺激性不大,线粒体可持续地摄入铜离子,因而铜的累积量随时间不断增加。肝胰腺组织中,在低浓度铜胁迫时,出现了铜含量与对照组相比下降的现象,分析原因可能是在低浓度胁迫时,并没有有效诱导肝胰腺的解毒机制,而同时其他组织器官如性腺减少了铜在肝胰腺中的累积有关。肝胰腺是双壳贝类主要的解毒器官,当高浓度胁迫时,其解毒机制被充分调动,如诱导金属硫蛋白的表达、被膜所包裹而形成颗粒物等,从而

导致铜浓度的迅速升高,这与郭远明等^[19]的研究结果一致。同时,本实验结果还显示,铜在虾夷扇贝不同组织中的累积表现出显著性的组织特异性,鳃组织对铜的吸收显著高于肝胰腺组织。Romeo等^[20]以亚致死浓度的铜胁迫蛤仔(*Ruditapes decussates*)也发现了同样的结果。王军等^[21]对虾夷扇贝的研究也表明,除内脏团外,鳃在各测试组织中对铜的富集程度最高。因此,鳃组织可能是虾夷扇贝主要的铜富集器官。这可能因为鳃是水生动物体内环境与外界环境最直接的接触器官,拥有很大的接触表面积,并且异源物质由鳃进入血液的距离也很短,因此鳃组织表面对铜离子的吸收和结合将增加组织中铜的含量^[22]。而且鳃组织拥有非常庞大的血管分布系统,这使得血液中易与金属结合的蛋白增加了结合机会。

3.2 铜对虾夷扇贝抗氧化酶活性的影响

有报道指出,双壳贝类对水体中铜污染采取的调节反应是将壳紧闭,但随着胁迫浓度的不同,闭

壳的时间有所差异^[23]。在铜胁迫的起始阶段,贝类除摄食和呼吸需要,能够保持双壳关闭,这可能是抗氧化酶在起始 24 h 时表现出与其他阶段不同反应的原因之一。在此阶段,少量进入虾夷扇贝肝胰腺的铜离子引起氧化自由基的产生,诱导了抗氧化酶的表达。而高浓度的铜胁迫,在短时间内就已经对肝胰腺组织造成了一定程度的氧化损伤,破坏了抗氧化酶系统,因此呈现显著性抑制。24 h 后,中低浓度胁迫组各抗氧化酶活性也出现了降低,可能是由于铜可以参加机体的氧化还原反应,如芬顿反应,诱导氧自由基的产生,Cu²⁺可与 ROOH 反应生成 ROO·和 Cu⁺,而 Cu⁺可以与过氧化氢反应生成羟基自由基。同时,过氧化氢又是 CAT 和谷胱甘肽过氧化物酶的底物。当大量铜离子被鳃或肝胰腺吸收后,SOD 诱导产生的过氧化氢与 Cu⁺发生氧化还原反应,而不足以 CAT 或 GPx 提供底物,因此 CAT 和 GPx 酶活性均显著性降低^[24]。此外,诱导产生的 MT 与铜离子的结合速度显著快于 SOD,也会导致 SOD 活性的降低,进而导致 CAT 和 GPx 活性的减弱。

鳃组织中各抗氧化酶活性对不同浓度的铜胁迫均表现出显著性抑制反应,可能是鳃对铜胁迫敏感所致。在胁迫 24 h 之内已经对鳃组织细胞造成了严重的氧化损伤,各酶活性均表现低下。但随着胁迫期的延长,结果显示,除高浓度胁迫组外,中低浓度胁迫组各抗氧化酶活性均逐步升高,这可能是由于扇贝已逐步适应了铜胁迫的环境,通过调节抗氧化系统以保护机体免受氧化损伤。

两种重金属对虾夷扇贝抗氧化系统的影响截然不同^[25],镉是机体的非必需金属,不参与氧化还原反应,而铜是机体的必需元素,参与机体的氧化还原反应,这导致机体对不同浓度胁迫的两种重金属敏感度不同。相比较而言,铜对虾夷扇贝的毒性更大,对抗氧化防御系统的破坏性更强,虾夷扇贝反应更强烈,这与铜在三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)中的研究结果相吻合^[26]。在养殖实验中,通过行为学观察也发现虾夷扇贝对中高浓度铜胁迫表现出呼吸频率加快,分泌物增多等现象。并且当胁迫浓度提高至 0.2 mg/L 时,胁迫 24 h 后就会出现部分死亡,这也印证了铜对虾夷扇贝的毒性。

3.3 铜对虾夷扇贝肝胰腺脂质代谢的影响

对高通量测序数据进行分析,结果表明,在

72 h、0.1 mg/L 的急性毒性胁迫条件下,铜显著诱导了虾夷扇贝肝胰腺组织脂质代谢相关基因的表达,这与 Chen 等^[6]在黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)中的研究结果一致,但以镉、锌或铜对黄颡鱼^[13-14]、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)^[27]、矛尾复鰕虎鱼(*Synechogobius hasta*)^[8,11]、波纹龙虾(*Panulirus homarus*)^[28]进行急慢性暴露,结果却显示在慢性暴露条件下,肝脏脂肪发生累积,与脂肪合成密切相关的 6PGD、G6PD、LPL、ACC 等酶基因表达增加,而与脂肪分解相关的 CPT1 及 PPAR α 表达显著下调;但在急性胁迫条件下,结果刚好相反。这与本研究结果存在差异。重金属对机体脂代谢的影响不仅与重金属的种类、胁迫时间、浓度存在着一定的相关性,而且对不同的养殖动物、组织部位也存在着不同的作用效应,这可能是造成研究结果存在差异的原因,具体作用机制尚需要进一步的研究。

本研究得到了中国科学院海洋研究所王雷课题组的大力协助,在此予以感谢。

参考文献:

- [1] Meng X L, Liu M, Wang B J, et al. Cadmium specific accumulation and its effect on the activity of GPx, GST in *Mizuhopecten yessoensis* [J]. Journal of Shanxi Agricultural University: Natural Science, 2012, 32(6): 548 - 552. [孟晓林,刘梅,王宝杰,等.镉在虾夷扇贝的沉积及对 GPx, GST 的影响.山西农业大学学报:自然科学版,2012,32(6): 548 - 552.]
- [2] Li C Y, Ding J, Chang Y Q, et al. Isolation of microsatellite markers in Japanese scallop and its application in genetic structure analysis [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(1): 39 - 46. [李春艳,丁君,常亚青,等.虾夷扇贝微卫星标记的分离及其养殖群体的遗传结构分析.中国水产科学,2009,16(1): 39 - 46.]
- [3] Nagashima K, Sato M, Kawamata K, et al. Genetic structure of Japanese scallop population in Hokkaido, analyzed by mitochondrial haplotype distribution [J]. Marine Biotechnology, 2005, 7(1): 1 - 10.
- [4] Liu W D, He C B, Li W J, et al. Discovery of host defence genes in the Japanese scallop *Mizuhopecten yessoensis* Jay by expressed sequence tag analysis of kidney tissue [J]. Aquaculture Research, 2010, 41(11): 1602 - 1613.

- [5] Ben Y, Hao Z L, Ding J, *et al.* Effects of high temperature on the immuno-enzymetic activity in coelomic fluid of *Mizuhopecten yessoensis* [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37 (6): 858 – 863. [贲月, 郝振林, 丁君, 等. 高温对虾夷扇贝体腔液免疫酶活力的影响. 水产学报, 2013, 37 (6): 858 – 863.]
- [6] Chen Q L, Luo Z, Pan Y X, *et al.* Differential induction of enzymes and genes involved in lipid metabolism in liver and visceral adipose tissue of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* exposed to copper [J]. Aquatic Toxicology, 2013, 136 – 137: 72 – 78.
- [7] Meng X, Tian X, Liu M, *et al.* The transcriptomic response to copper exposure by the gill tissue of Japanese scallops (*Mizuhopecten yessoensis*) using deep-sequencing technology [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 38 (2): 287 – 293.
- [8] Liu X, Luo Z, Xiong B, *et al.* Effect of waterborne copper exposure on growth, hepatic enzymatic activities and histology in *Synechogobius hasta* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2010, 73 (6): 1286 – 1291.
- [9] Carreau N D, Pyle G G. Effect of copper exposure during embryonic development on chemosensory function of juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2005, 61 (1): 1 – 6.
- [10] Chen Q L, Luo Z, Zheng J L, *et al.* Protective effects of calcium on copper toxicity in *Pelteobagrus fulvidraco*: Copper accumulation, enzymatic activities, histology [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012, 76 (2): 126 – 134.
- [11] Chen Q L, Luo Z, Liu X, *et al.* Effects of waterborne chronic copper exposure on hepatic lipid metabolism and metal-element composition in *Synechogobius hasta* [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2013, 64 (2): 301 – 315.
- [12] Geret F, Serafim A, Bebianno M J. Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*? [J]. Ecotoxicology, 2003, 12 (5): 417 – 426.
- [13] Chen Q L, Gong Y, Luo Z, *et al.* Differential effect of waterborne cadmium exposure on lipid metabolism in liver and muscle of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. Aquatic Toxicology, 2013, 142 – 143: 380 – 386.
- [14] Zheng J, Luo Z, Liu C X, *et al.* Differential effects of acute and chronic zinc (Zn) exposure on hepatic lipid deposition and metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. Aquatic Toxicology, 2013, 132 – 133: 173 – 181.
- [15] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase [J]. European Journal of Biochemistry, 1974, 47 (3): 469 – 474.
- [16] Greenwald R A. Handbook of methods for oxygen radical research [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1987, 3 (2): 161.
- [17] Xia Y, Zhu L. Measurement method of glutathione peroxidase activity in blood and tissue [J]. Journal of Hygiene Research, 1987, 16 (4): 29 – 33. [夏亦明, 朱莲珍. 血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定方法 I: DTNB 直接法. 卫生研究, 1987, 16 (4): 29 – 33.]
- [18] Pan L, Zhang H. Metallothionein, antioxidant enzymes and DNA strand breaks as biomarkers of Cd exposure in a marine crab, *Charybdis japonica* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2006, 144 (1): 67 – 75.
- [19] Guo Y M, Liu Q, Gu J, *et al.* The research of copper enrichment in four types of shellfish [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36 (5): 708 – 713. [郭远明, 刘琴, 顾捷, 等. 4 种海洋贝类对海水中铜 (Cu) 的富集能力. 水产学报, 2012, 36 (5): 708 – 713.]
- [20] Roméo M, Gnassia-Barelli M. Metal distribution in different tissues and in subcellular fractions of the Mediterranean clam *Ruditapes decussatus* treated with cadmium, copper, or zinc [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 1995, 111 (3): 457 – 463.
- [21] Wang J, Zhai L X, Ning J S, *et al.* Heavy metal distribution in different tissues of *Patinopecten yessoensis* [J]. Marine Sciences, 2009 (8): 44 – 47. [王军, 翟毓秀, 宁劲松, 等. 养殖虾夷扇贝不同组织中重金属含量的分布. 海洋科学, 2009 (8): 44 – 47.]
- [22] Stagg R, Shuttleworth T. The accumulation of copper in *Platichthys flesus* L. and its effects on plasma electrolyte concentrations [J]. Journal of Fish Biology, 1982, 20 (4): 491 – 500.
- [23] Akberali H B, Black J E. Behavioural responses of the bivalve *Scrobicularia plana* (da Costa) subjected to short-term copper (Cu II) concentrations [J].

- Marine Environmental Research, 1980, 4 (2): 97 - 107.
- [24] Geret F, Serafim A, Barreira L, *et al.* Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussatus* [J]. Marine Environmental Research, 2002, 54(3) : 413 - 417.
- [25] Meng X, Liu M, Wang B, *et al.* Cadmium Bioaccumulation and its Effect on Antioxidant Defense System of Japanese Scallop *Mizuhopecten yessoensis* [J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2013, 12(1) : 10 - 16.
- [26] Xiao Y Q, Shi A J. Toxicity of copper sulfate to liver and gill of *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Fisheries of China, 1999, 23(3) : 308 - 312. [肖永清,石安静. 硫酸铜对三角帆蚌肝脏和鳃的毒害. 水产学报, 1999, 23(3) : 308 - 312.
- [27] Zhu Q L, Luo Z, Zhuo M Q, *et al.* *In vitro* exposure to copper influences lipid metabolism in hepatocytes from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2014, 40 (2): 595 - 605.
- [28] Maharajan A, Rajalakshmi S, Vijayakumaran M. Effect of copper in protein, carbohydrate and lipid contents of the juvenile lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758) [J]. Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences, 2014, 17: 19 - 34.

Copper specific accumulation and its effect on the activity of antioxidant enzymes and metabolism of lipid in gill or hepatopancreas of *Patinopecten yessoensis*

MENG Xiaolin, TIAN Xue, GUO Qianqian, HUANG Jianrong, LU Ronghua,
LIANG Junping, LI Xuejun, KONG Xianghui, NIE Guoxing*
(College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: In this study, the toxic mechanism of *Patinopecten yessoensis* responding to copper exposure was investigated through analyzing the effect of copper on bioaccumulation, activity of antioxidant enzymes and lipid metabolism in the gill or hepatopancreas. The results showed that the maximum accumulation of copper (0.025, 0.05 and 0.10 mg/L) in gill occurred at 14 d (347.55 $\mu\text{g/g}$), 6 d (340.72 $\mu\text{g/g}$) and 6 d (302.30 $\mu\text{g/g}$) respectively. With the time extension, accumulation of copper has a curvilinear relationship except 0.10 mg/L group. However, concentration of copper in 0.10 mg/L group of hepatopancreas presented liner changes with exposure time and the peak occurred at 14 d (60.88 $\mu\text{g/g}$). The corresponding changes in 0.025 and 0.05 mg/L were curvilinear and even decreased. Also, SOD, CAT and GPx activities were significantly suppressed in gill following copper exposure. However, in hepatopancreas, 0.025 mg/L and 0.05 mg/L groups could induce the expression of antioxidant enzymes in 24 h except GPx in 0.05 mg/L group. The activities of all the three enzymes in 0.10 mg/L group were suppressed during all the experiment. Furthermore, the key regulation factors related to lipid metabolism including PPARs- γ 2, 6PGD, G6PD, FAS, LDH were found significantly up-regulated in the hepatopancreas, except ACC, CPT1 by using next generation sequencing technology. These results suggest that gill was the main accumulation tissue of copper in *P. yessoensis*, while the hepatopancreas was more sensitive to higher concentration. Also, the toxicity of copper was more serious than cadmium for *P. yessoensis* by damaging the activity of antioxidant enzymes in both tissues and inducing the accumulation of lipid in hepatopancreas.

Key words: *Patinopecten yessoensis*; copper; antioxidant enzymes; lipid metabolism

Corresponding author: NIE Guoxing. E-mail: niegx@htu.cn