

DOI: 10.12131/20230068

文章编号: 2095-0780-(2023)06-0142-08

• 研究简报 •

pH 和菲协同效应对中华绒螯蟹幼蟹的毒性效应

杨志刚^{1,2,3}, 江青青^{1,2,3}, 房余程^{1,2,3}, 陈阿琴^{1,2,3}, 成永旭^{1,2,3}, 王爱民⁴

1. 上海海洋大学/农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306
2. 上海海洋大学/农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306
3. 上海海洋大学/水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306
4. 盐城工学院 海洋与生物工程学院, 江苏 盐城 224000

摘要: 为探究酸化以及环境污染物菲 (Phenanthrene, PHE) 协同效应对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 的影响, 开展了不同 pH (5.5、6.5、7.8) 和 PHE 质量浓度 (0、50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 对中华绒螯蟹 [(15.0 \pm 2.3) g] 的联合暴露实验 (为期 14 d)。结果发现: 1) 中华绒螯蟹在 pH 5.5 \times PHE 50 的协同处理下, 肝胰腺和鳃组织出现严重病理损伤, 肝胰腺小管形状改变, 肝管细胞萎缩出现大量空泡, 鳃轴肿大, 鳃丝角质层表皮破损, 局部基膜破裂; 而 pH 6.5 \times PHE 50 对中华绒螯蟹肝胰腺和鳃组织的损伤并不显著。2) PHE 处理引起中华绒螯蟹幼蟹肝胰腺糖原 (Gly) 以及低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 浓度显著降低, 表明 PHE 会导致中华绒螯蟹能量代谢水平下降; 相较于对照组, pH 5.5 \times PHE 50 对甘油三酯 (TG)、Gly、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 和 LDL-C 浓度均有抑制效果, 而 pH 6.5 \times PHE 50 使得中华绒螯蟹 TG 浓度较对照组显著升高。3) 实时荧光定量 PCR 结果表明, 多环芳烃受体 (*ahr*)、芳香烃受体核转位因子 (*arnt*) 和细胞色素 p450 1A1 (*cyp1a1*) 基因的表达量均随 pH 的降低而升高, 并在 pH 5.5 时达到最高。以上结果表明, 酸化和 PHE 的联合作用改变了中华绒螯蟹的能量代谢, 其中 pH 5.5 时显著加剧了 PHE 对其肝胰腺组织结构的毒性作用以及对能量代谢的影响。

关键词: 中华绒螯蟹; 酸化; 菲; 能量代谢

中图分类号: S 966.16

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Synergistic effects of pH and phenanthrene on toxicity of juvenile Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

YANG Zhigang^{1,2,3}, JIANG Qingqing^{1,2,3}, FANG Yucheng^{1,2,3}, CHEN Aqin^{1,2,3}, CHENG Yongxu^{1,2,3}, WANG Aimin⁴

1. Shanghai Ocean University/Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China
2. Shanghai Ocean University/Center for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition (CREEFN) of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China
3. Shanghai Ocean University/National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai 201306, China
4. College of Marine and Bioengineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224000, China

Abstract: In order to explore the synergistic effects of acidification and environmental pollutant phenanthrene (PHE) on Chi-

收稿日期: 2023-04-04; 修回日期: 2023-06-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32273154); 上海市自然科学基金项目 (22ZR1427300); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-48); 上海市研究生教育学会研究课题 (ShsgeG202215); 黄河三角洲人才工程 (DYRC20190210)

作者简介: 杨志刚 (1973—), 男, 教授, 博士, 研究方向为甲壳类动物营养调控及环境毒理学。E-mail: zgyang@shou.edu.cn

通信作者: 陈阿琴 (1977—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为水产动物生殖生理学及应激适应生理学。E-mail: aqchen@shou.edu.cn

nese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*), we carried out a 14-day joint exposure experiment of *E. sinensis* [(15.0±2.3) g] to different pH (5.5, 6.5, 7.8) and PHE (0, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). The results show that: 1) Under the synergistic treatment of pH 5.5×PHE 50 on *E. sinensis*, the hepatopancreas and gill tissues were severely damaged; the shape of the hepatopancreatic tubules changed; a large number of vacuoles appeared in the atrophy of the hepatic duct cells. The gill axis was enlarged; the cuticle of the gill filament was damaged; the local basement membrane was ruptured. However, pH 6.5×PHE 50 did not significantly damage the hepatopancreas and gill tissues of *E. sinensis*. 2) PHE treatment significantly reduced the contents of Gly and LDL-C in hepatopancreas of juvenile *E. sinensis*, indicating that PHE could decrease the energy metabolism level of *E. sinensis*. Compared with the control group, pH 5.5×PHE 50 inhibited the contents of TG, Gly, HDL-C and LDL-C, while pH 6.5×PHE 50 significantly increased TG content. 3) Real-time fluorescent quantitative PCR experiment shows that *AHR*, *ARNT* and *CYP1A1* increased significantly with the decrease of pH, and reached the highest values at pH 5.5. The results reveal that the combining effect of acidification and PHE changes the energy metabolism of *E. sinensis*, and pH 5.5 significantly aggravates the toxic effect of PHE on the hepatopancreas tissue structure of *E. sinensis*, as well as its energy metabolism.

Keywords: *Eriocheir sinensis*; Acidification; Phenanthrene; Energy metabolism

水体 pH 是水生动植物生长存活的重要环境因子^[1], 其波动可以对水生生物的组织形态、代谢及基因表达产生直接影响^[2]。相关研究指出鱼类长时间暴露于低 pH 水体, 会造成糖原分解变慢、糖异生途径降低及肝糖原得不到及时补充^[3]。

多环芳烃化合物 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是水环境中广泛存在的持久性污染物^[4]。其在水体环境、河口沉积物中, 甚至水生生物中已被大量检出^[5], 如太湖 (877~5 730 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) 和鸭绿江沉积物 (68~1 500 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)。高度城市化和工业化地区的 PAHs 污染水平较高, 例如珠江 (1 434~10 811 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) 和澳门内港 (294~12 714 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)^[6-8]。已有研究证实 PAHs 对多种水生生物具有明确的毒性作用^[9-10]。菲 (Phenanthrene, PHE) 等 PAHs 污染物进入机体后, 可直接作用于多环芳烃受体 (AHR), 进而转移至细胞核, 与芳香烃受体核转位因子 (ARNT) 结合, AhR/ARNT 的复合物进而促进细胞色素 p450 1A1 (*cyp1a1*) 基因的表达^[11], 产生一些高度致癌性中间产物, 最终导致细胞凋亡等^[12-13]。

对于甲壳动物而言, 其脂肪常常存储在肝胰腺的 R 细胞中^[14]。中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 是一种主要在长江流域养殖的重要经济品种, “蟹黄”的质量是消费者重点关注的食用品质, 其中含有大量的脂肪和胆固醇^[15-16], 而脂肪是重要的能量物质, 因此能量代谢对于中华绒螯蟹而言十分重要。在现代养殖条件下, 水生生物由于环境因素的变化更容易发生脂质代谢的变化^[17]。随着天气和养殖密度等因素的变化, 水体 pH 也会随时发生改变, 且中华绒螯蟹作为典型的底栖生物, 其生活在水体地表沉积物表面, 非常容易接触到 PHE 和低 pH 环境, 在生产中若发生两者联合作用, 会对养殖造成损失。为探究 pH 和 PHE 复合胁迫的毒性作用机制, 本实验测定了不同 pH 下 PHE 进入中华绒螯蟹机体后, 对其重要的呼吸器官鳃和代谢器官

肝胰腺的损伤情况, 以及对能量代谢主要场所肝胰腺中相关生化指标及基因表达的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

中华绒螯蟹 [(15.0±2.3) g] 采集自上海崇明, 运送到上海海洋大学实验基地进行相关实验。实验开始前, 所有的蟹均在含有碳过滤自来水 [溶解氧质量浓度 8.0~8.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 7.8、温度 (20±2) $^{\circ}\text{C}$] 的脱氯水族箱 (100 $\text{cm}\times 60\text{ cm}\times 50\text{ cm}$) 中进行为期 1 周的驯化适应, 水箱中间均放置几个长形拱状瓦片作为隐蔽物。期间每 2 d 投喂 1 次商业饲料 (浙江澳华公司), 每天用虹吸法吸取多余饵料, 每 2 d 进行 1 次水体更新。

1.2 pH 和 PHE 暴露实验建立

为研究低 pH 和 PHE 的联合效应, 建立了阶乘设计: 3 个 pH 分别为 5.5、6.5 和 7.8 (5.5 为重度酸化, 6.5 为中度酸化, 7.8 为对照), 2 个 PHE 质量浓度 (0 和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 分别为对照组 pH 7.8×PHE 0, 处理组 pH 7.8×PHE 50、pH 6.5×PHE 0、pH 6.5×PHE 50、pH 5.5×PHE 0、pH 5.5×PHE 50。酸化条件根据有关的研究和整个酸化环境的预测^[15,18]设定。将 PHE 按照 0.02% (质量分数) 溶解在二甲亚砜 (DMSO) 中, 配制成 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, 在 DMSO 体积分数为 0.01% 的情况下, 向 PHE 处理组中加入适量 PHE 母液以达到目标 PHE 质量浓度 (50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。实验中 PHE 质量浓度 (50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的设置是参考虾蟹相关实验^[18]和中国湖泊环境中的实际浓度^[19], pH 的设定是基于本实验室的研究基础以及深度酸化的探讨^[17]。健康蟹随机分组 (每组 3 个重复, 每个重复 10 只蟹)。实验期间, 使用便携式 pH 计 (HQ40D, 美国 Hach) 每 4 h 检测 1 次水体 pH, 用 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 和 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 调节 pH。每 2 d 更换 1 次胁迫水

体, 以保持实验性 PHE 浓度。实验持续 14 d, 期间持续充氧, 每周饲喂 2 次商业饲料。

1.3 样品采集

实验 14 d 后, 对中华绒螯蟹进行 4 °C 低温麻醉, 而后每池取 3 只蟹解剖采集鳃和肝胰腺, 分别置于固定液中保存用于显微结构的观察, 另外再采集 3 只中华绒螯蟹肝胰腺置液氮速冻, -80 °C 保存待测。

1.4 实验方法

1.4.1 组织染色与观察

从不同的实验组中各采集 3 只中华绒螯蟹, 迅速取出肝胰腺和鳃组织, 样品置于 Bouin 氏液里固定 24 h, 经体积分数为 70%、80%、95%、100% 梯度乙醇脱水, 然后用二甲苯透明, 石蜡包埋, 使用手摇式切片机制片, 厚度约为 5 μm, 最后用苏木精和伊红进行常规 HE 染色, 显微镜

观察并拍照 (Leica TCS SP8, 德国)。

1.4.2 能量代谢指标的测定

肝胰腺样品以无水乙醇作为匀浆介质, 经冰浴匀浆, 离心提取上清后按试剂盒 (南京建成) 说明书测定甘油三酯 (TG)、糖原 (Gly)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)。

1.4.3 基因表达的测定

使用 TRIzol 法对肝胰腺样本进行 RNA 的提取, 使用 HiScript[®] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) (南京诺唯赞) 对 RNA 进行反转录生成 cDNA, 根据已报道的相关基因序列设计引物 (表 1) 用于荧光定量 PCR 检测。SYBR[®] PCR Kit (南京诺唯赞) 用于荧光定量 PCR 反应, 反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。基于 2^{-ΔΔCt} 方法, 分析基因的相对表达水平^[20]。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primer names and sequences

基因 Gene	对应蛋白 Corresponding protein	引物序列 (5'—3') Primer sequence (5'—3')
<i>ahr</i>	多环芳烃受体 Polycyclic aromatic hydrocarbon receptor	F: GGCGGTAACACCAAGTGAAGAGTC R: TGGAGATTGTAGGAGGCGAGAAGT
<i>arnt</i>	芳香烃受体核转位因子 (ARNT) 重组蛋白 Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocation factor (ARNT) recombinant protein	F: CCAACCTTCATGCGGCAGATGAAC R: ACACAGGAGCCAGCCAACCAAG
<i>cyp1a1</i>	细胞色素 Cytochrome P1A1	F: ATTCGTGCTGGTTTGGC R: GGAGTTGCTGCGTATTGGT

1.5 数据处理

数据采用 Levene 检验法检测方差齐次性, pH 和 PHE 2 个因素共同胁迫采用 SPSS 22.0 软件进行双因素方差分析 (Two-way ANOVA), 同一因素胁迫采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 最后对实验结果采用 Duncan's 法进行多重比较, 采用 *t* 检验法检测同一 pH 下 PHE 的毒性。实验结果以“平均值±标准差 ($\bar{x}\pm s$)”表示, $P < 0.05$ 为统计学差异显著。

2 结果

2.1 中华绒螯蟹肝胰腺和鳃组织结构

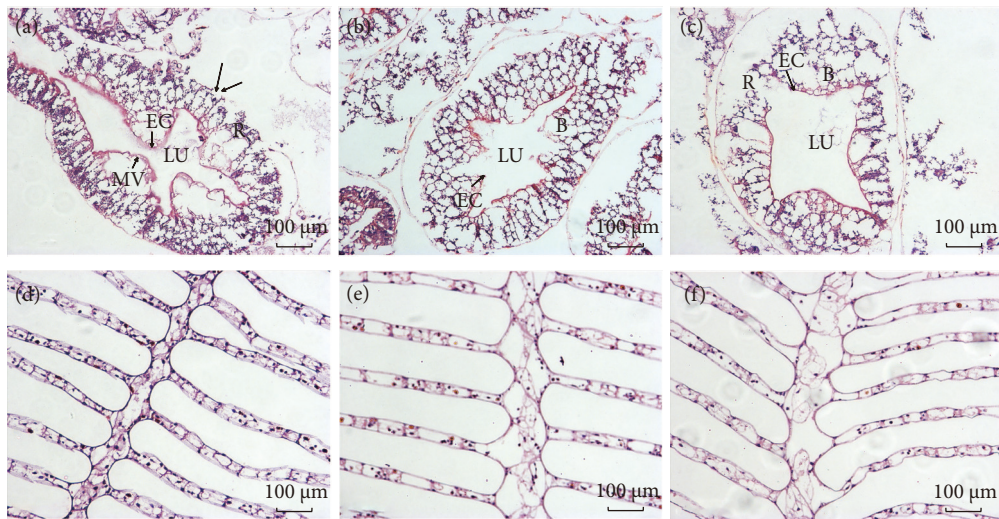
中华绒螯蟹肝胰腺由柱状上皮 (即肝小管) 构成, 管腔 (Lumen, Lu) 结构呈星型。PHE 胁迫下, pH 7.8 时肝胰腺星型结构稍有改变, 且基膜脱落, 细胞顶端微绒毛 (Microvilli, MV) 部分脱落、微绒毛黏膜 (Enteric coat, EC) 完整但 R 细胞处出现空泡 (图 1-a)。在 pH 6.5 条件下, 肝胰腺管腔扩张, 但基膜没有明显脱落, 微绒毛黏膜部分破损、B 细胞部分破损 (图 1-b)。在 pH 5.5 下, 管腔结构明显扩张, 部分柱状上皮细胞解体, 细胞核固缩破碎, R 细胞出现萎缩、胞质空泡化, 微绒毛黏膜破损 (图 1-c)。

中华绒螯蟹幼蟹的鳃由数条形状规整的鳃丝以及一条鳃轴组成。鳃叶分为上皮层和血管, 而上皮层主要由角质层、上皮细胞层以及基膜组成。通过 HE 染色法对中华绒螯蟹鳃组织的形态结构变化进行观察, 所有处理组肝胰腺结构均有不同程度的改变 (图 1)。PHE 胁迫下, pH 7.8 时鳃丝厚度变薄, 局部基膜出现脱落, 部分角质层表皮分离, 近鳃腔部分有血细胞存在 (图 1-d)。而在 pH 6.5 条件下, 鳃轴厚度变厚, 但鳃丝的基膜完整, 角质层表皮平整 (图 1-e)。在 pH 5.5 下, 鳃丝形状扭曲, 部分角质层表皮破损, 基膜脱落, 鳃轴出现空泡化 (图 1-f)。

2.2 中华绒螯蟹肝胰腺能量代谢指标

如图 2-a 所示, 在 PHE 0 μg·L⁻¹ 组中, 中华绒螯蟹 TG 浓度随着 pH 降低而显著降低 ($P < 0.05$)。而在 PHE 50 μg·L⁻¹ 组中, pH 6.5 处理时, TG 浓度最高, 且显著高于单独 pH 6.5 处理 ($P < 0.05$); pH 5.5 时, TG 浓度最低, 且低于 pH 7.8 条件下的 TG 浓度。pH 和 PHE 的交互作用对中华绒螯蟹 TG 浓度有显著影响 ($P < 0.05$, 表 2)。

与对照组 (pH 7.8×PHE 0) 相比, PHE 使得 Gly 浓度显著降低 ($P < 0.05$), 在 PHE 0 μg·L⁻¹ 组中, Gly 浓度也随着 pH 的降低而显著下降 ($P < 0.05$, 图 2-b)。pH 和 PHE 的交互



EC. 微绒毛黏膜; MV. 细胞顶端微绒毛; LU. 管腔; R. R 细胞; B. B 细胞。
EC. Enteric coat; MV. Microvilli; LU. Lumen; R. R cells; B. B cells.

图1 中华绒螯蟹肝胰腺和鳃组织暴露在 PHE ($50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 pH (7.8、6.5 和 5.5) 中 14 d 后的病理变化
注: a. pH 7.8×PHE 50 组肝胰腺; b. pH 6.5×PHE 50 组肝胰腺; c. pH 5.5×PHE 50 组肝胰腺; d. pH 7.8×PHE 50 组鳃;
e. pH 6.5×PHE 50 组鳃; f. pH 5.5×PHE 50 组鳃。

Fig. 1 Pathological changes of hepatopancreas and gill tissues of *E. sinensis* after exposure to PHE ($50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and pH (7.8, 6.5 and 5.5) for 14 d

Note: a. Hepatopancreas in pH 7.8×PHE 50 group; b. Hepatopancreas in pH 6.5×PHE 50 group; c. Hepatopancreas in pH 5.4×PHE 50 group;
d. Gill in pH 7.8×PHE 50 group; e. Gill in pH 6.5×PHE 50 group; f. Gill in pH 5.5×PHE 50 group.

作用对中华绒螯蟹 Gly 浓度变化有显著影响 ($P<0.05$, 表 2)。在 PHE $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组中, Gly 浓度随着 pH 降低而显著下降 ($P<0.05$), 在 pH 5.5 时达到最低, 为所有实验组中的最低值 ($P<0.05$, 图 2-b)。

HDL-C 也有相似的结果, 无论是否存在 PHE, pH 的降低均可导致中华绒螯蟹 HDL-C 浓度显著降低 ($P<0.05$, 图 2-c), 且 pH 和 PHE 的交互作用也对中华绒螯蟹 HDL-C 浓度有显著影响 ($P<0.05$, 表 2)。

pH 和 PHE 的交互作用对中华绒螯蟹的 LDL-C 浓度也有显著影响 ($P<0.05$, 表 2)。在 PHE $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组中, 与 pH 7.8 相比, pH 6.5 及 pH 5.5 条件下 LDL-C 浓度均出现了显著降低 ($P<0.05$), 且 pH 5.5 组显著低于 pH 6.5 组 ($P<0.05$)。在 PHE $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组中, pH 6.5 及 pH 5.5 条件下 LDL-C 浓度也出现显著下降 ($P<0.05$), 但两组间无显著性差异 ($P>0.05$, 图 2-d)。

2.3 中华绒螯蟹肝胰腺中 *ahr*、*arnt*、*cyp1a1* 基因表达水平

实时荧光定量 PCR 检测了 pH 和 PHE 对中华绒螯蟹肝胰腺中的 *ahr*、*arnt*、*cyp1a1* 基因相对表达量的影响 (图 3)。在 PHE $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组中, 与 pH 7.8 组相比, pH 6.5 组 *ahr* 基因表达量显著降低 ($P<0.05$), 而 pH 5.5 组的 *ahr* 基因表达量则显著升高 ($P<0.05$)。在 PHE $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组中, 随着 pH 的降低, *ahr* 基因表达量显著升高 ($P<0.05$),

且在 pH 6.5 及 pH 5.5 条件下, 均显著高于 PHE $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 ($P<0.05$, 图 3-a)。pH 5.5×PHE 50 组的 *ahr* 基因表达量为所有组中最高。pH 与 PHE 的交互作用对 *ahr* 基因的表达量具有显著影响 ($P<0.05$, 表 3)。

PHE $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组中, 与对照组相比, pH 5.5 和 pH 6.5 处理均未使 *arnt* 基因表达量出现显著性变化 ($P>0.05$, 图 3-b)。而在 PHE $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组中, 随着 pH 的降低, *arnt* 基因的表达量随之显著升高 ($P<0.05$), 且在 pH 5.5 和 pH 6.5 下, 均显著高于 PHE $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 ($P<0.05$, 图 3-b)。同样, pH 与 PHE 的交互作用对 *arnt* 基因的表达量也有显著性影响 ($P<0.05$, 表 3)。pH 5.5×PHE 50 组的 *arnt* 基因表达量也为所有组中的最大值。

对于 *cyp1a1* 基因而言, 在 PHE $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组中, 与 pH 7.8 组相比, pH 6.5 使 *cyp1a1* 基因的表达量显著降低 ($P<0.05$), 而 pH 5.5 处理使 *cyp1a1* 基因的表达量显著升高 ($P<0.05$, 图 3-c)。在 PHE $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组中, pH 的降低使得 *cyp1a1* 基因的表达量显著升高 ($P<0.05$, 图 3-c), 在 pH 5.5 条件下, *cyp1a1* 的基因表达量最高。pH 和 PHE 对 *cyp1a1* 基因的表达量有显著的交互作用 ($P<0.05$, 表 3)。

3 讨论

鳃是甲壳动物重要的呼吸器官, 也是重要的渗透压和离子调节器官^[21], 肝胰腺是中华绒螯蟹的主要消化腺, 因

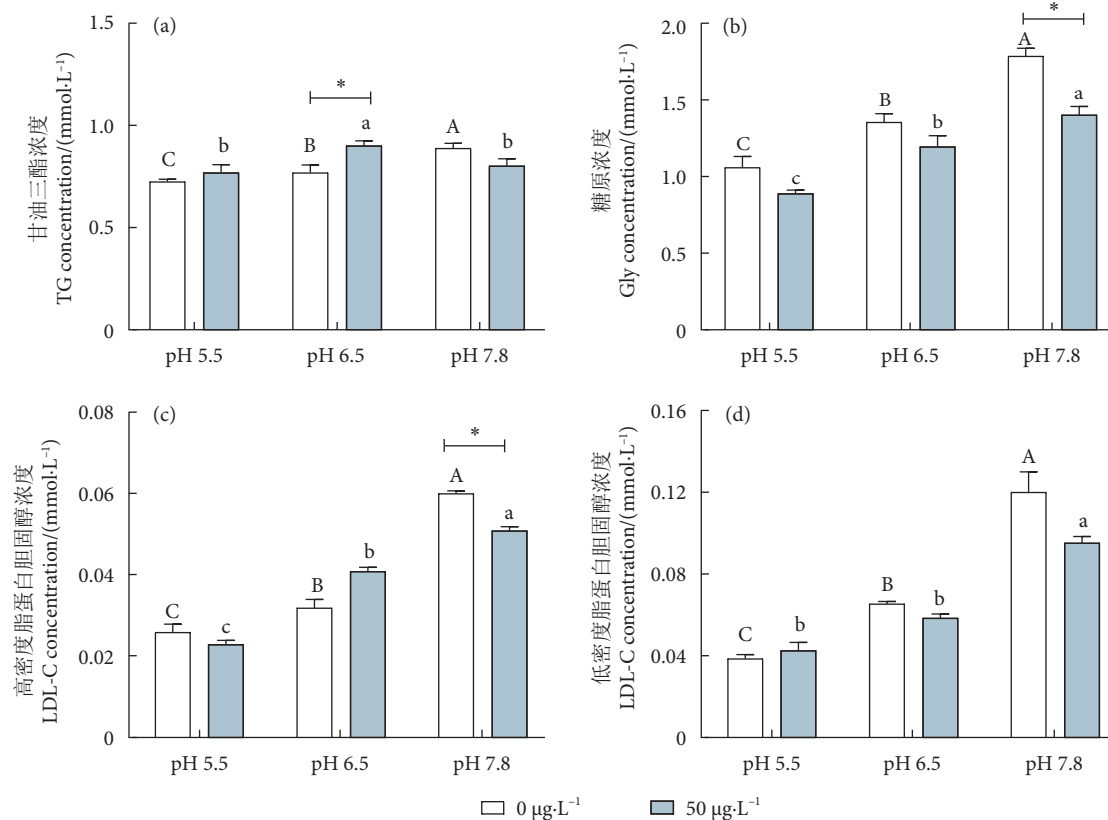


图2 不同 pH 条件下 PHE 浓度对中华绒螯蟹能量代谢指标的影响

注: 数值表示为“平均值±标准误”(n=3); 方柱上方不同大写字母表示在 PHE 0 µg·L⁻¹ 下差异显著 (P<0.05); 不同小写字母表示在 PHE 50 µg·L⁻¹ 下差异显著 (P<0.05); *表示相同 pH 下组间差异显著 (P<0.05)。图 3 同此。

Fig. 2 Effect of PHE concentration on energy metabolism indexes of *E. sinensis* under different acidification conditions

Note: Values are represented as Mean±SE (n=3); different uppercase letters above the columns represent significant differences at PHE 0 µg·L⁻¹ (P<0.05); different lowercase letters represent significant differences at PHE 50 µg·L⁻¹ (P<0.05); * represents significant differences between the two groups at the same pH values (P<0.05). The same case in Fig. 3.

而环境污染物很可能对中华绒螯蟹的鳃和肝胰腺造成组织损伤。本研究中, PHE 对中华绒螯蟹的鳃和肝胰腺均造成了一定程度的损伤, 这与一些污染物造成中华绒螯蟹组织损伤的研究相一致^[15]。肝胰腺作为甲壳类动物的重要多功能器官, 不仅参与食物消化吸收相关的消化酶的合成和分泌, 且在能量代谢中具有重要作用^[22]。中华绒螯蟹肝胰腺小管的 R 细胞以及 B 细胞顶端的微绒毛和微绒毛表面的黏膜对物质转运具有重要作用^[14]。本研究中, 不同 pH 与 PHE 联合作用均对其造成不同程度的损伤, 说明 PHE 对中华绒螯蟹呼吸和消化系统产生了影响, 从而影响其能量代谢。同时 R 细胞是重要的脂肪和糖原贮藏场所, 且能量的消耗往往会导致细胞收缩和萎缩^[23]。本研究中, 在 pH 7.8 及 5.5 下, PHE 不仅使得肝小管细胞顶端的微绒毛和微绒毛表面的黏膜脱落破损, 而且使得肝小管 R 细胞萎缩、空泡化, 说明在 pH 7.8 及 5.5 下, PHE 对中华绒螯蟹的糖代谢和脂代谢均产生了一定影响。因而相较于正常的 pH, pH 6.5 在一定程度上缓解了 PHE 对中华绒螯蟹的组织损伤, 而 pH 5.5 则加剧了 PHE 对中华绒螯蟹肝胰腺的组织损

伤, 这也表明在极端环境下, 生物体可能通过大量的能量消耗以抵御外界压力^[24]。

此外, 肝胰腺还被认为是多种环境应激的关键靶器官^[17]。研究表明, 当受到环境压力时, 甲壳类动物需要额外的能量来维持体内平衡^[25]。pH 作为水生动物生长发育重要的环境因子^[26], 其异常变化往往导致动物机体代谢失调, 能量消耗增加^[27]。TG、Gly、HDL-C、LDL-C 等物质的动态平衡对机体健康至关重要, 它们在机体的免疫反应和抗氧化能力中发挥着重要作用^[28-29]。本研究中, 在 pH 7.8 条件下, PHE 导致 Gly 浓度显著降低, 说明糖类是中华绒螯蟹遭受环境压力时优先利用的物质之一, 这与对一些鱼类的研究相一致^[30]。与中华绒螯蟹暴露于苯并芘 (Bap) 中的研究结果也类似^[31], 说明 PAHs 会引起中华绒螯蟹的能量消耗。而不同的 pH 与 PHE 的联合作用均使中华绒螯蟹肝胰腺 Gly 显著降低, 尤其在 pH 5.5 条件下, PHE 对 Gly 的影响最为显著, 说明机体抵御环境压力时会产生能量损耗^[24]。

对于 TG 而言, 单独的 PHE 处理并未使中华绒螯蟹肝

表2 pH 和 PHE 对中华绒螯蟹肝胰腺甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和糖原含量影响的双因素方差分析

Table 2 Two-way analysis of variance for influence of pH and PHE on contents of TG, HDL-C, LDL-C and Gly in *E. sinensis* hepatopancreas

能量代谢指标 Energy metabolism index	处理组别 Group	自由度 DF	均方差 MS	F	P
甘油三酯 TG	PHE	1	0.009	6.591	<0.001
	pH	2	0.025	17.585	<0.001
	PHE×pH	2	0.018	12.798	<0.001
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C	PHE	1	0.000 2	0.301	0.593
	pH	2	0.002	201.824	<0.001
	PHE×pH	2	0.000 1	18.863	<0.001
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C	PHE	1	0.000 1	9.378	0.010
	pH	2	0.008	145.710	<0.001
	PHE×pH	2	0.001	10.200	0.003
糖原 Gly	PHE	1	0.240	39.171	0.020
	pH	2	0.677	110.327	<0.001
	PHE×pH	2	0.043	6.952	0.010

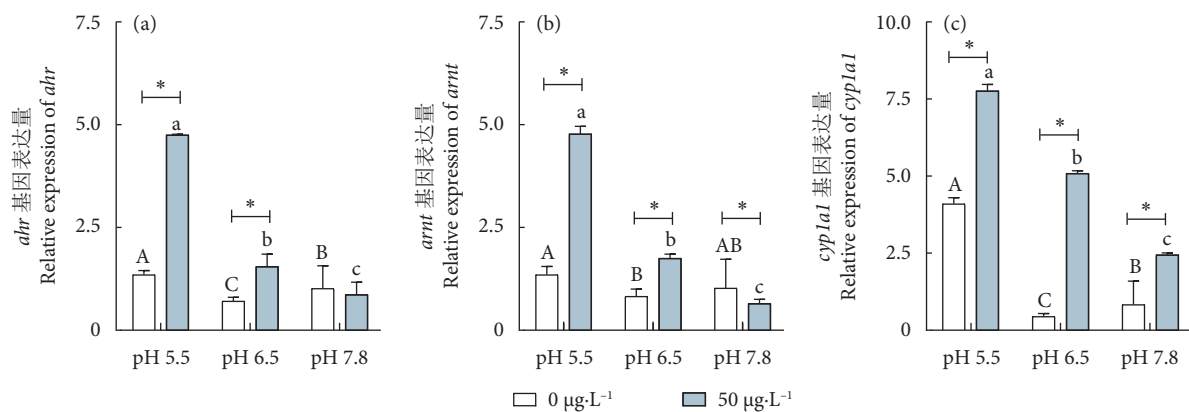


图3 不同 pH 条件下 PHE 浓度对中华绒螯蟹肝胰腺基因表达量的影响

Fig. 3 Effect of different PHE concentrations on expression of hepatopancreas genes in *E. sinensis* under acidification conditions

表3 pH 和 PHE 对中华绒螯蟹 ahr、arnt、cyp1a1 基因表达量影响的双因素方差分析

Table 3 Two-way analysis of variance for effects of pH and PHE on ahr, arnt and cyp1a1 gene expression of *E. sinensis*

基因 Gene	处理组别 Group	自由度 DF	均方差 MS	F	P
ahr	PHE	1	7.889	204.860	<0.001
	pH	2	7.760	208.258	<0.001
	PHE×pH	2	5.111	134.930	<0.001
arnt	PHE	1	8.133	314.861	<0.001
	pH	2	8.276	320.375	<0.001
	PHE×pH	2	5.697	220.565	<0.001
cyp1a1	PHE	1	51.122	1 643.494	<0.001
	pH	2	28.965	931.189	<0.001
	PHE×pH	2	4.721	151.787	<0.001

胰腺 TG 发生显著改变,甚至在 pH 6.5 下, PHE 诱导 TG 浓度较单独 PHE 处理组显著升高,这可能是中度的酸化诱导了中华绒螯蟹对外界环境的积极响应,某种程度上减轻了 PHE 的毒性,降低了脂质的消耗^[32]。但 pH 5.5 与 PHE 联合胁迫时, TG 浓度为所有组中最低,表明重度酸化加剧了 PHE 对中华绒螯蟹糖代谢和脂代谢的影响。而 HDL-C 和 LDL-C 在胆固醇向组织运输的过程中起着重要作用^[33-34], 在其他动物上的研究往往与“疾病”因素呈现负向关系^[35]。本研究中,单独 PHE 处理使得中华绒螯蟹肝胰腺 HDL-C 浓度较对照组显著降低,表明低浓度的 PHE 对中华绒螯蟹存在潜在风险。而不同程度 pH 与 PHE 的联合作用均对中华绒螯蟹 HDL-C 产生了显著影响,尤其是 pH 5.5×PHE 50 组,肝胰腺 HDL-C 浓度为所有组中最低,表明酸化和 PHE 协同处理对中华绒螯蟹能量代谢具有显著影响。与之相似,酸化和 PHE 的联合作用也会使得 LDL-C 浓度显著降低。

pH 和 PHE 的联合作用导致 TG、Gly、HDL-C、LDL-C 浓度的显著变化,尤其在 pH 5.5 的重度酸化条件下, PHE 显著影响了中华绒螯蟹的能量代谢平衡。由此可见,不同环境应激源可能会产生协同效应,从而影响甲壳动物的能量代谢过程,这与铜 (Cu) 和土霉素 (Oxytetracycline) 协同效应诱导了草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 的脂质代谢的研究结果相一致^[36]。

本研究中, PHE 显著促进了 *arnt* 和 *cyp1a1* 基因的表达,且酸化条件显著提高了 *ahr* 和 *arnt* 基因的表达,并最终导致 *cyp1a1* 基因表达量的显著升高。Holen 和 Olsvik^[37] 同样发现 PHE 对大西洋鳕 (*Gadus morhua*) *cyp1a1* 基因表达的诱导,同时还发现脂多糖 (Lipopolysaccharide) 和 PHE 的交互作用对 *cyp1a1* 基因的显著诱导。Guo 等^[38] 报道了 PAHs 可以诱导菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 中 *ahr* 基因的表达; Liu 等^[39] 发现苯并芘 (BaP) 可显著诱导栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 中 *ahr* 基因的表达; 低浓度 BaP 可诱导栉孔扇贝中 *ahr* 和 *arnt* 基因的表达^[40]; Lima 等^[41] 在牡蛎 (*Crassostrea gasar*) 中也发现 pH 和 PHE 协同效应对 *cyp* 家族基因的诱导。这与本研究结果一致,本实验也发现 pH 与 PHE 协同作用可诱导中华绒螯蟹 *cyp1a1* 基因的表达。

ahr 基因与脂类代谢以及能量代谢有重要关联,有研究指出 *ahr* 对哺乳动物脂质代谢具有调控作用^[42], 多氯联苯或 *ahr* 配体暴露导致鱼类肝糖原浓度降低的研究也有相关报道^[43]。本研究也阐明了 PHE 对中华绒螯蟹脂代谢产生影响的重要原因,而过度的酸化与 PHE 产生交互效应,显著影响了中华绒螯蟹的能量代谢。相关研究指出,在无脊椎动物中, PAHs 的解毒代谢经由 I 相的 AHR-ARNT 信号通路以及 II 相的谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 代谢进行,期间

产生大量的活性中间体和活性氧 (Reactive oxygen species, ROS), 干扰水生生物的正常生理功能^[44]。因此, pH 和 PHE 协同作用可能对中华绒螯蟹能量代谢及抗氧化系统产生影响。

本研究结果表明,从组织结构方面, pH 6.5 可以缓解 PHE 的毒性作用; 从能量代谢、基因表达方面,随着 pH 的降低, PHE 毒性的影响也随之增强。

参考文献:

- [1] 么宗利,王慧,周凯,等. 碳酸盐碱度和 pH 对凡纳滨对虾仔虾存活率的影响 [J]. 生态学杂志, 2010(5): 945-950.
- [2] HU M H, LI L S, SUI Y M, et al. Effect of pH and temperature on antioxidant responses of the thick shell mussel *Mytilus coruscus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2015, 46: 573-583.
- [3] WANG J L, LU R H, SUN J J, et al. Differential expression of lipid metabolism-related genes and miRNAs in *Ctenopharyngodon idella* liver in relation to fatty liver induced by high non-protein energy diets [J]. Aquac Res, 2017, 48: 4070-4085.
- [4] WU Y, ZHANG J, ZHU Z J. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the Yalujiang Estuary, North China [J]. Mar Pollut Bull, 2003, 46(5): 619-625.
- [5] LIU G Q, ZHANG G, JIN Z, et al. Sedimentary record of hydrophobic organic compounds in relation to regional economic development: a study of Taihu Lake, East China [J]. Environ Pollut, 2009, 157(11): 2994-3000.
- [6] ZHANG G, PARKER A, HOUSE A, et al. Sedimentary records of DDT and HCH in the Pearl River Delta, South China [J]. Environ Sci Technol, 2002, 36(17): 3671-3677.
- [7] ZHANG Z L, HONG H S, ZHOU J L, et al. Phase association of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Minjiang River Estuary, China [J]. Sci Total Environ, 2004, 323(1/2/3): 71-86.
- [8] HARITASH A K, KAUSHIK C P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review [J]. J Hazard Mater, 2009, 169(1/2/3): 1-15.
- [9] 吕晏锋, 赵晓祥, 王俊锋. 菲胁迫对鲤鱼的急性毒性和抗氧化酶响应 [J]. 东华大学学报 (自然科学版), 2018, 44(2): 309-316.
- [10] CORREIA A D, GONFALVES R, SCHOLZE M, et al. Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2007, 347(1): 109-122.
- [11] ENDLER A, CHEN L, SHIBASAKI F. Coactivator recruitment of AhR/ARNT1 [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(6): 11100-11110.
- [12] SOGAWA K, FUJII-KURIYAMA Y. Ah receptor, a novel ligand-activated transcription factor [J]. J Biochem, 1997, 122(6): 1075-1079.
- [13] FUJII-KURIYAMA Y, MIMURA J. Molecular mechanisms of AHR functions in the regulation of cytochrome P450 genes [J]. Biochem Bioph Res Co, 2005, 338(1): 311-317.
- [14] 常国亮, 成永旭, 于智勇, 等. 脂类营养对中华绒螯蟹肝胰腺超微结构的影响 [J]. 河南师范大学学报 (自然科学版), 2011, 39(4): 108-111.
- [15] ZHAO X J, YANG Z G, CHENG Y X. Effects of cadmium alone

- and in combination with pH on bioaccumulation, tissue structure, and enzyme activity of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Comp Biochem Phys C*, 2021, 245(3): 109025.
- [16] PAN Z H, SONG X H, HU X L, et al. Pathological changes and risk factors of hepatopancreas necrosis disease of mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Fish Aquac J*, 2017, 8(3): 220-225.
- [17] ROSZER T. The invertebrate midintestinal gland ("hepatopancreas") is an evolution-ary forerunner in the integration of immunity and metabolism[J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 358: 685-695.
- [18] JAWARD F M, ALEGRIA H A, GALINDO REYES J G, et al. Levels of PAHs in the waters, sediments, and shrimps of Estero de Urias, an estuary in Mexico, and their toxicological effects[J]. *Sci World J*, 2012: 687034. DOI: 10.1100/2012/687034.
- [19] FILLMANN G, WATSON G M, HOWSAM M, et al. Urinary PAH metabolites as biomarkers of exposure in aquatic environments[J]. *Environ Sci Technol*, 2004, 38(9): 2649.
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] BAINY A, SAITO E, CARVALHO P, et al. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site[J]. *Aquat Toxicol*, 1996, 34(2): 151-162.
- [22] 陶易凡, 强俊, 王辉, 等. 低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃和肝胰腺酶活力及组织结构的影响 [J]. *中国水产科学*, 2016, 23(6): 1279-1289.
- [23] 于智勇, 吴旭干, 常国亮, 等. 中华绒螯蟹第二次卵巢发育期间卵巢和肝胰腺中主要生化成分的变化 [J]. *水生生物学报*, 2007, 31(6): 799-806.
- [24] WANG X D, HUANG Z P, WANG C L, et al. A comparative study on growth and metabolism of *Eriocheir sinensis* juveniles under chronically low and high pH stress[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 00885.
- [25] CHEN L Q, LI E, CHEN L Q. A review of carbohydrate nutrition and metabolism in crustaceans[J]. *N Am J Aquaculture*, 2016, 78(2): 178-187.
- [26] KWONG R, KUMAI Y, PERRY S F. The physiology of fish at low pH: the zebra fish as a model system[J]. *J Exp Biol*, 2014, 217: 651-662.
- [27] ESTHER L, BEGONA F D, RAUL G, et al. Stress-induced effects on feeding behavior and growth performance of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a self-feeding approach[J]. *J Comp Physiol B*, 2011, 181(8): 1035-1044.
- [28] 付慧, 汪秋宽, 何云海, 等. 多肋藻渣膳食纤维对小鼠降血脂作用的研究 [J]. *大连海洋大学学报*, 2012, 27(3): 200-204.
- [29] 吴清和, 邢燕红, 荣向路, 等. 褐藻糖胶 (FPS) 对高脂血症大鼠肝脏 LDL-RmRNA 表达的影响 [J]. *中药材*, 2007, 30(8): 968-970.
- [30] LI M X, WANG X D, QI C L, et al. Metabolic response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute and chronic hypoxia stress[J]. *Aquaculture*, 2018, 495: 187-195.
- [31] YU N, DING Q Q, LI E C, et al. Growth, energy metabolism and transcriptomic responses in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) to benzo[α]pyrene (BaP) toxicity[J]. *Aquat Toxicol*, 2018, 203: 150-158.
- [32] KHAN F U, CHEN H, GU H X, et al. Antioxidant responses of the mussel *Mytilus coruscus* co-exposed to ocean acidification, hypoxia and warming[J]. *Mar Pollut Bull*, 2020, 162(1): 111869.
- [33] MILLER G J, MILLER N E. Plasma high density lipoprotein concentration and development of ischaemic heart disease[J]. *Lancet*, 1975, 305(7897): 16-19.
- [34] YANG Q, YANG R, LI M, et al. Effects of dietary fucoidan on the blood constituents, anti-oxidation and innate immunity of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 41(2): 264-270.
- [35] 刘小红. 水体镉暴露对稀有鮰鲫肝脏毒性及脂代谢影响的初步研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2017: 104-108.
- [36] XU Y H, HOGSTRANG C, XU Y C, et al. Environmentally relevant concentrations of oxytetracycline and copper increased liver lipid deposition through inducing oxidative stress and mitochondria dysfunction in grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Environ Pollut*, 1987, 283: 117079.
- [37] HOLEN E, OLSVIK P A. Aryl hydrocarbon receptor protein and *CYP1A1* gene induction by LPS and phenanthrene in Atlantic cod (*Gadus morhua*) head kidney cells[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2014, 40(2): 384-391.
- [38] GUO R M, PAN L Q, LIN P F. The detoxification responses, damage effects and bioaccumulation in the scallop *Chlamys farreri* exposed to single and mixtures of benzo[α]pyrene and chrysene [J]. *Comp Biochem Phys C*, 2017, 191: 36-51.
- [39] LIU N, PAN L Q, MIAO J J, et al. Molecular cloning and sequence analysis and the response of a aryl hydrocarbon receptor homologue gene in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo[α]pyrene[J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2010, 152(3): 279-287.
- [40] TIAN S M, PAN L Q, SUN X H. An investigation of endocrine disrupting effects and toxic mechanisms modulated by benzo[α]pyrene in female scallop *Chlamys farreri*[J]. *Aquat Toxicol*, 2013, 144/145: 162-171.
- [41] LIMA D, MATTOS J J, PIAZZA R S, et al. Stress responses in *Crassostrea gasar* exposed to combined effects of acute pH changes and phenanthrene[J]. *Sci Total Environ*, 2019, 678: 585-593.
- [42] QUABIUS E S, NOLAN D T, BONGA S. Influence of dietary exposure to PCB 126 and nutritional state on stress response in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2000, 19(12): 2892-2899.
- [43] WANG B L, ZHANG C W, WANG L, et al. Lipidomics reveal aryl hydrocarbon receptor (Ahr)-regulated lipid metabolic pathway in alpha-naphthyl isothiocyanate (ANIT)-induced intrahepatic cholestasis[J]. *Xenobiotica*, 2019, 49(5): 591-601.
- [44] VOGEL C FA, VAN WINKLE L S, ESSER C, et al. The aryl hydrocarbon receptor as a target of environmental stressors implication for pollution mediated stress and inflammatory responses[J]. *Redox, Biol*, 2020, 34: 101530.