

微塑料对近江牡蛎免疫力的影响

牟红莉^{1,4}, 王瑞旋², 王 俊³, 林小植², 王江勇⁵

(1. 上海海洋大学 海洋科学学院, 上海 201306; 2. 韩山师范学院, 广东 潮州 521041; 3. 华南农业大学, 广东 广州 510642; 4. 中国水产科学研究院南海水产研究所/农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300; 5. 惠州学院, 广东 惠州 516007)

摘要: 为探究微塑料对牡蛎免疫力的影响, 该研究对近江牡蛎(平均壳长: 6.6 cm)采用壳内推注的方式注入不同浓度的聚苯乙烯微塑料(0.05、0.5、5 mg·L⁻¹, 以无菌生理盐水为稀释液), 分别胁迫 24 h、48 h 和 72 h 后, 检测分析牡蛎鳃组织的免疫指标(碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、一氧化氮合成酶(NOS)和乙酰胆碱酯酶(AChE))的变化。结果显示, 在胁迫 24 h 后, 微塑料浓度对 AKP 的活力有显著影响($P<0.05$)。SOD、AKP 和结构型一氧化氮合成酶的活性呈现明显的先升后降的趋势。在胁迫 48 h 后, 微塑料浓度上升导致 A-chE 活力显著下降($P<0.05$), CAT、SOD 和 AKP 呈现先升后降的趋势。在胁迫 72 h 后, 微塑料浓度的升高, AKP 和 AChE 的活力呈现先降后升的趋势, 而 SOD、CAT 和诱导型一氧化氮合成酶的活力与之呈现相反的趋势, 显示先升后降的趋势。随时间和浓度的增长, MDA 处于一直上升的趋势。以上结果表明, 微塑料可使牡蛎产生免疫应激反应, 且胁迫时间越长, 牡蛎免疫应激反应越剧烈。

关键词: 近江牡蛎; 微塑料; 酶活力; 免疫指标

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2023)9-0053-08

DOI: 10.11759/hyhx20210810002

微塑料通常指上限为 5 mm 的塑料纤维、颗粒或薄膜等^[1-2]。据估计, 微塑料正以每年 $4.8\times 10^6\sim 12.7\times 10^6$ t 的速度增长^[3]。统计显示, 2014 年全球海洋环境中微塑料总量大概在 $7\times 10^3\sim 35\times 10^3$ t 之间^[4], 塑料垃圾达到海洋垃圾总量的 80%~85%^[5]。海洋环境中的微塑料主要来自陆源塑料垃圾的输入及海上塑料垃圾的分解^[6]。陆源塑料垃圾进入海洋环境后在物理(风、环流等)、化学(光氧化、自然老化)和生物等共同作用下, 裂解成更多更小的塑料碎片, 由于塑料材质轻盈, 可以随水流扩散到世界各地^[7]。因此, 在世界各地的海岸滩涂, 表层海水及海底沉积物和海洋生物中均能发现微塑料的存在^[8-9]。自然界中微塑料往往与环境污染共存, 一方面由于微塑料具有高比表面积, 能吸附环境中的重金属抗生素等有毒有害物质, 进一步导致生物产生氧化应激反应和能量代谢紊乱^[10-11]。另一方面, 微塑料在老化过程中能释放出其加工过程中添加的塑化剂、阻燃剂、颜料等化学物质, 海洋生物在摄入微塑料后可能直接暴露于浸出的添加剂。这种添加剂和单体可能会导致生物体内分泌紊乱, 影响生物体繁殖发育^[12-14]。已有

研究表明, 一次性聚乙烯塑料袋中的沥出液可以显著影响文蛤(*Meretrix meretrix*)的仔体发育^[15]。

由于微塑料尺寸较小, 加上海洋贝类的特殊生活习性, 致使大多数海洋贝类可通过海水滤食作用直接或者间接摄入微塑料, 从而导致微塑料进入贝类消化组织^[16], 而且微塑料还会通过贝类机体细胞的吞噬作用转移到贝体内血淋巴、肌肉等组织器官中^[17]。有报道显示, 中国沿海 25 个沿海城市的贻贝和 17 个城市的养殖牡蛎体内均发现微塑料, 其中 50%以上以纤维形状存在^[18-19]。在世界范围内, 出售

收稿日期: 2021-08-10; 修回日期: 2021-11-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31902416); 水生细菌的耐药性传递规律及主要机制研究(2022ZDX4029); 水生弧菌多重耐药性的传递机制研究(2021ZDJS041)

[Foundation: National Natural Science Foundation Program, No. 31902416; Research Project on Drug Resistance Transmission Patterns and Main Mechanisms of Aquatic Bacteria, No. 2022ZDX4029; Research Project on the Transmission Mechanism of Multiple Drug Resistance in Aquatic Vibrio, No. 2021ZDJS041]

作者简介: 牟红莉 (1996—), 女, 汉族, 四川眉山人, 硕士研究生, 主要从事微塑料对贝类的污染研究, E-mail: 2797678008@qq.com; 王瑞旋(1979—), 通信作者, 女, 汉族, 广东揭阳人, 副研究员, 主要从事贝类微生态研究, E-mail: wangruixuan@scafsri.ac.cn

的养殖贝类体内均发现微塑料^[20-21]。研究发现微塑料会堵塞贝类肠道(即肝胰脏),影响贝类的生殖、免疫和神经等系统^[22-23],贝类体内的微塑料还可以发生营养级的传递,可通过食物链的传递直接或间接进入人体,从而对人类的健康造成严重的威胁^[24]。

近江牡蛎(*Crassostrea ariakensis*)是中国重要经济贝类之一,分布广泛,主要生长于中国河口水域。近江牡蛎通常是固着生长,不能自主移动,常年通过滤食水体中的有机或无机碎屑生存,对外界环境的变化较为敏感,其健康水平与水体环境息息相关^[25-26]。因此本研究为探究微塑料对牡蛎免疫力的影响,选用近江牡蛎作为分析对象,以不同浓度的聚苯乙烯微塑料进行胁迫,检测分析鳃组织中的免疫指标(碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、一氧化氮合成酶(NOS)和乙酰胆碱酯酶(AChE))的变化,为微塑料对滤食性生物的潜在风险评估提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

受试生物:健康的近江牡蛎(壳长:6.6 cm),采自广东省惠州市惠东县铁涌镇(盐度:15~35, pH:7.76~7.82, 水温:25.8 °C)。

养殖条件:将牡蛎置于玻璃缸中暂养7 d,以适应实验室条件。暂养期间的养殖用水盐度为20,连续曝气1 d后使用,水温控制在(24±1) °C左右,暂养期间在每只牡蛎侧边开一小孔以便后期推注微塑料溶液。

实验所用微塑料(聚苯乙烯, PS)购于上海麦克林生化科技有限公司,粒径为4 μm,颜色为红色,形状为球状。

1.2 方法

1.2.1 实验设计

实验设置3个聚苯乙烯成分的微塑料浓度梯度:0.05、0.5、5 mg·L⁻¹(以无菌生理盐水为稀释液),每个浓度设置3个平行。因牡蛎壳厚且附着物较多会影响微塑料的作用效果及浓度的准确计算,同时利用牡蛎阴干情况下数天不死亡的特性,因此采用向壳内推注微塑料液体的方式。通过牡蛎侧边的小孔,用5 mL一次性注射针管推注聚苯乙烯悬液到近江牡蛎体腔,推注时勿伤及肌肉组织。实验共有120只健康牡蛎,聚苯乙烯微塑料的推注剂量为1 mL/只。每个实验容器(容积为120 L的玻璃缸内)中放入10只

牡蛎干露,室温为(25±1) °C,同步设对照组(3个平行),推注无菌生理盐水。分别在注射24 h、48 h和72 h后,在每个缸内随机取样3只测定其酶活力。每隔12 h清理缸内排泄物和死亡牡蛎。

1.2.2 样品采集

胁迫实验结束后,将牡蛎解剖,取鳃组织,用预冷的PBS缓冲液清洗后移至冻存管中,液氮速冻后转移到-80 °C冰箱保存,用于相关酶活力的检测。

1.2.3 酶活力测定

准确称取鳃组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9的比例加入9倍体积的匀浆介质(生理盐水),制成10%的匀浆,3 500 r·min⁻¹离心10 min取上清。采用试剂盒(南京建成生物工程研究所)分别检测近江牡蛎的总蛋白和 AKP、MDA、SOD、CAT、NOS 和 AChE 活力,实验操作均按照试剂盒说明书进行。

1.3 数据处理与分析

用SPSS 22.0对数据进行统计分析。数据以平均值±标准偏差(x±SD)表示。微塑料浓度对牡蛎各指标的影响采用单因素方差(One-way ANOVA)和LSD多重比较进行统计学分析,以P<0.05作为差异显著的标志,以P<0.01作为差异极显著的标志。

2 结果

2.1 微塑料对近江牡蛎碱性磷酸酶(AKP)活力的影响

不同浓度的微塑料对近江牡蛎鳃组织的AKP活力有影响(图1)。微塑料胁迫24 h和48 h后,微塑料浓度升高使AKP活力呈先增加后降低的趋势,但仍高于对照组。当微塑料浓度增加到0.5 mg·L⁻¹,其AKP活力与对照组有显著差异(P<0.05)。胁迫72 h的趋势与胁迫24 h和48 h相反,AKP活力呈先降低后增加的趋势,但仍显著低于对照组(P<0.05)。从整体来看,AKP的活力随时间变化呈现先增加后降低的趋势,对AKP活力的影响显著(P<0.05)。

2.2 微塑料对近江牡蛎超氧化物歧化酶(SOD)活力的影响

微塑料浓度对牡蛎鳃组织的SOD活力影响不显著(P>0.05,图2)。随着微塑料浓度的升高,SOD活力呈先增加后降低的趋势,尤其是微塑料浓度达到5 mg·L⁻¹时,SOD活力显著降低(P<0.05)。从胁迫时间长短来看,SOD的活力随时间变化呈现先增加后降低的趋势,对SOD活力的影响显著(P<0.05)。

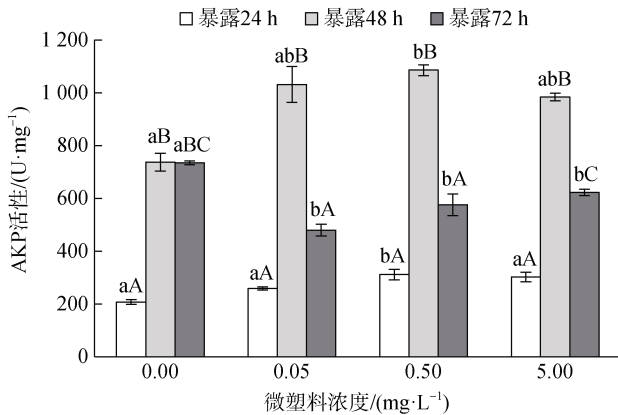


图 1 微塑料对近江牡蛎碱性磷酸酶(AKP)活力的影响
Fig. 1 Effect of microplastics on alkaline phosphatase (AKP) activity in *C. ariakensis*

注: 字母(a、b)表示不同微塑料浓度对酶活力(x±SD)存在的显著性差异, 字母(A、B)表示不同时间对酶活力(x±SD)存在的显著性差异。

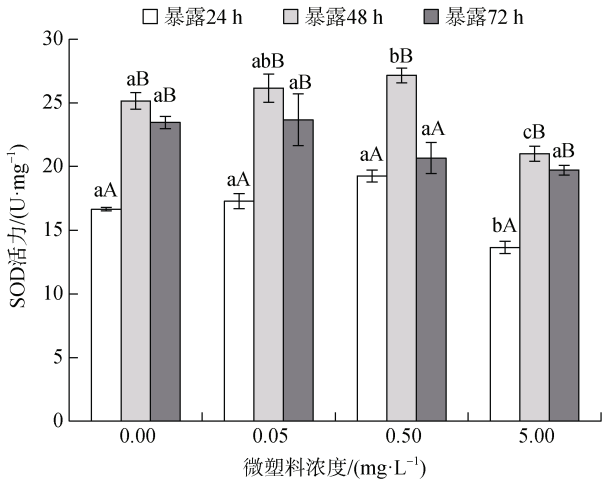


图 2 微塑料对近江牡蛎中总超氧化物歧化酶(SOD)活力的影响
Fig. 2 Effect of microplastics on superoxide dismutase (SOD) activity in *C. ariakensis*

2.3 微塑料对近江牡蛎过氧化氢酶(CAT)活力的影响

微塑料浓度对牡蛎鳃组织的 CAT 活力影响不显著($P>0.05$, 图 3)。微塑料胁迫 24 h 后, CAT 活力无明显变化; 胁迫 48 h 后, CAT 活力呈现先增加后降低的趋势, 微塑料质量浓度达到 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, CAT 变化达到显著($P<0.05$)。胁迫时间长短来看, CAT 的活力随时间变化呈现先增加后降低的趋势。

2.4 微塑料对近江牡蛎丙二醛(MDA)的影响

微塑料浓度对牡蛎鳃组织的 MDA 浓度影响不显著($P>0.05$, 图 4)。随着微塑料浓度的升高, MDA 浓

度呈现递增趋势。当微塑料质量浓度达到 $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 与对照组之间存在显著差异($P<0.05$), 同时 MDA 达到最大值 $13.26 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。微塑料胁迫时间的长短对牡蛎体内 MDA 浓度变化影响不显著($P>0.05$), 随胁迫时间的延长, MDA 浓度上升。

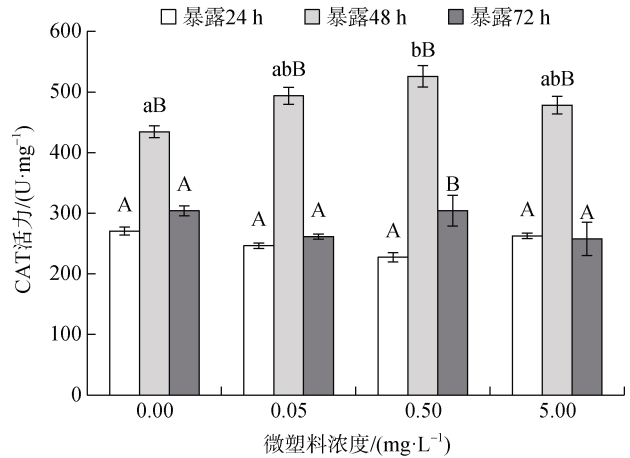


图 3 微塑料对近江牡蛎过氧化氢酶(CAT)活力的影响
Fig. 3 Effect of microplastics on catalase (CAT) activity in *C. ariakensis*

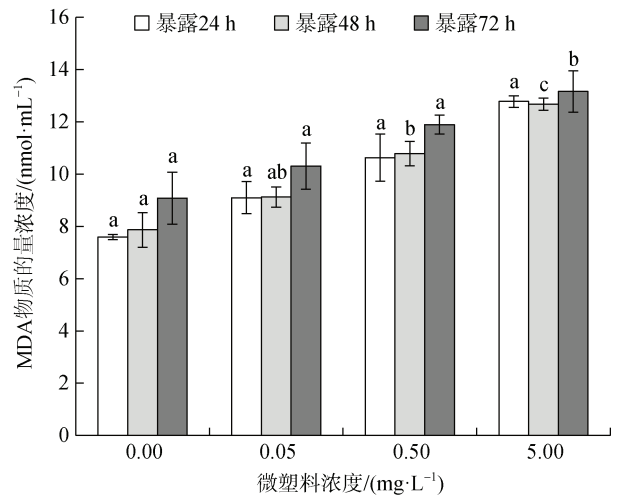


图 4 微塑料对近江牡蛎丙二醛(MDA)浓度的影响
Fig. 4 Effect of microplastics on malonaldehyde (MDA) content in *C. ariakensis*

2.5 微塑料对近江牡蛎乙酰胆碱酯酶(AChE)活力的影响

微塑料浓度对牡蛎鳃组织的 AChE 活力影响不显著($P>0.05$, 图 5)。当微塑料胁迫牡蛎 24 h 后, 微塑料浓度的升高, AChE 活力呈现先降低后增加的趋势, 但仍小于对照组, 对照组的 AChE 活力最高为 $0.48 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。微塑料作用于牡蛎 48 h 后, 微塑料浓度上升

导致 AChE 活力显著下降($P < 0.05$)。随暴露时间的延长, A-chE 的活力持续降低。

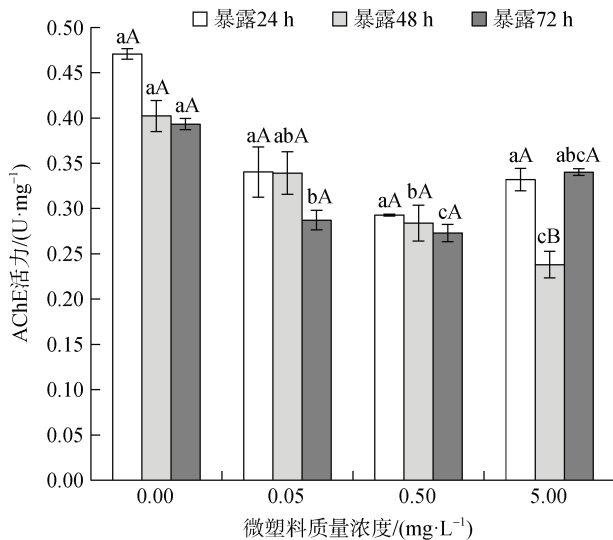


图 5 微塑料对近江牡蛎乙酰胆碱酯酶(AChE)活力的影响
Fig. 5 Effect of microplastics on acetylcholinesterase (AChE) activity in *C. ariakensis*

2.6 微塑料对近江牡蛎一氧化氮合成酶(NOS)活力的影响

微塑料浓度对牡蛎鳃组织 NOS 的影响见图 6。本次实验主要检测诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和结构型一氧化氮合成酶(structural nitric oxide synthase, cNOS)。在微塑料作用牡蛎 24 h 之后, 随着微塑料浓度的升高, iNOS

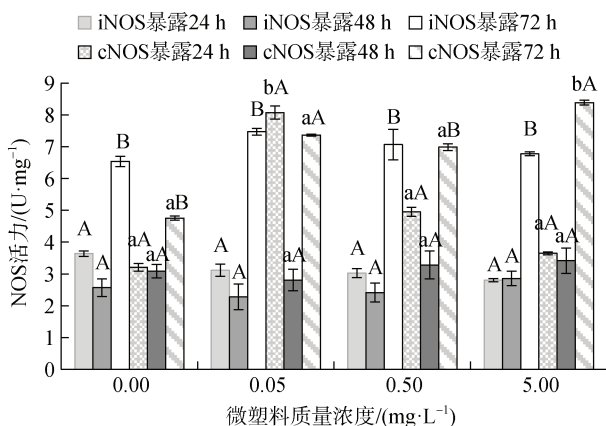


图 6 微塑料对近江牡蛎一氧化氮合成酶(NOS)活力的影响
Fig. 6 Effect of microplastics on nitric oxide synthetase (NOS) activity in *C. ariakensis*

注: 诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和结构型一氧化氮合成酶(structural nitric oxide synthase, cNOS)都属于一氧化氮合成酶(NOS)

活力无显著变化($P > 0.05$), cNOS 活力均大于对照组。在微塑料作用牡蛎 72 h 后, 微塑料浓度升高, iNOS 活力无显著变化($P > 0.05$), cNOS 活力在微塑料浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 有显著变化($P < 0.05$)。微塑料胁迫时间的长短对 iNOS 活力有显著影响($P < 0.05$), 对 cNOS 活力无显著影响($P > 0.05$)。这两种不同分型的 NOS 活力均符合一个趋势, 即胁迫 72 h 的牡蛎具有更高的 NOS 活力。

3 讨论

贝类属于滤食性生物, 环境海域中大量海水不断被牡蛎的鳃组织过滤, 鳃组织会多次聚集积累污染物, 因此周围环境的任何不利变化都可在鳃组织中得到体现^[27]。当微塑料作用于贝类时, 可以损伤牡蛎正常细胞结构, 尤其是牡蛎配子和胚胎^[28]。此外还导致牡蛎产生氧化应激反应, 产出活性氧、自由基等有害物质, 机体调节 CAT、SOD 和 AKP 等抗氧化酶清除有害物质, 减少微塑料对牡蛎的氧化损害^[29]。AChE 可通过乙酰胆碱影响免疫活性因子的活性进而影响活性氧的生成, NOS 控制一氧化氮活力帮助机体清除氧自由基, 降低微塑料对牡蛎的氧化损伤^[30-31], 而 MDA 可表示微塑料对牡蛎的氧化损伤程度。

AKP 是一种磷酸单酯酶, 通常用于评估生物体免疫状态^[32]。AKP 参与多种代谢过程, 如解毒、大分子的代谢和生物合成, 调节膜运输, 参与转磷酸作用, 促进体内的钙磷代谢, 维持体内适宜的钙磷比例, 同时也是海洋无脊椎动物的重要溶酶体酶^[33-34]。在本实验中, 聚苯乙烯微塑料浓度对鳃组织的 AKP 影响表现为“先升后降”的趋势。陈梦玲等^[35]将黑海参(*Holothuria atra*)暴露于聚苯乙烯环境下也出现相同的结果。本研究中, 当胁迫时间达到 72 h 时, 实验组的 AKP 活性均低于对照组, 初步推测是牡蛎机体降低 AKP 的活性以维持组织细胞正常的生理活动或因溶酶体膜受损, 使得渗透性改变, 导致 AKP 活性受到限制, 而目前已有研究证明微塑料能影响溶酶体膜的稳定性^[36], 破坏细胞膜的完整性^[37], 从而导致本研究中 AKP 活性随胁迫时间和浓度的增长而呈现先增后减的趋势。

SOD 是生物体清除氧自由基的抗氧化酶, 可以催化超氧阴离子歧化为分子氧和过氧化氢, 是机体抗氧化防御的第一道防线^[38]。有报道显示, 斑马贻贝(*Dreissena polymorpha*)的 SOD 活性随着微塑料浓度的增加呈现先增加后降低的趋势^[39]。同样的, 本研究中 SOD 活性呈现先增加后降低的趋势, 这表明聚苯

乙烯微塑料胁迫可诱导牡蛎产生氧化应激反应, 从而刺激 SOD 活性提升, 有助于清除生物体内的自由基。但高浓度微塑料和长时间暴露使牡蛎体内吞噬活性、呼吸暴发活性增强而持续产生的大量活性氧自由基得不到及时有效地清除有关, 活性氧自由基对机体造成了氧化损伤, 削弱了机体内 SOD 的免疫应答能力^[40-41], 故 SOD 的活力呈现先增加后降低的趋势。

CAT 是贝类氧化应激通路中防止活性氧形成必不可少的酶^[42], 存在于红细胞及某些组织内的过氧化体中, 它的主要作用是催化过氧化氢分解成氧和水, 阻止其转化为活性更高的羟自由基($\cdot\text{OH}$)^[43-45]。已有研究表明贝类 CAT 和 SOD 等抗氧化酶的表达量随着聚苯乙烯的持续时间和微塑料浓度而增加^[46], 而 SOD 和 CAT 能有效地影响活性氧浓度^[31]。因此, 本研究中牡蛎鳃组织 CAT 活力随着微塑料浓度的增加有上升的趋势, 表明聚苯乙烯塑料使近江牡蛎的细胞内氧自由基增加, 机体协调 CAT 的活力来维持体内抗氧化系统的动态平衡。

MDA 是脂质过氧化作用的产物。当生物体受到污染物胁迫时, 会诱发机体产生活性氧, 过多的活性氧将引发脂质过氧化, 产生大量脂质过氧化代谢产物^[47-48]。通过本研究发现, 随着微塑料浓度的升高, 近江牡蛎鳃组织中的 MDA 也逐渐增加, 这与 Teng 等人^[30]研究长牡蛎(*C. gigas*)暴露于聚对苯二甲酸乙二醇酯和聚乙烯的结果一致。同时本研究显示随着暴露时间的延长, 同一浓度下的牡蛎鳃组织中的 MDA 浓度呈上升趋势, 提示在微塑料的胁迫下, 近江牡蛎很可能产生大量的活性氧, 从而造成牡蛎脂质过氧化, 且暴露时间越长, 氧化损伤越严重。

AChE 是乙酰胆碱代谢酶, 可催化分解乙酰胆碱成为胆碱和乙酸的水解反应, 也是生物神经传导中的一种关键酶。乙酰胆碱一般通过与免疫细胞表面上的乙酰胆碱受体结合, 通过抑制细胞因子的合成来实现免疫调节的目的^[49]。AChE 活性易受到外源化合物(如有机磷、氨基甲酸酯农药、多环芳烃、重金属和表面活性剂)的抑制^[50-52]。截形斧蛤(*Donax trunculus*) 在聚乙烯和聚丙烯的联合暴露下, 其鳃、消化腺以及肌肉中的 AChE 活力显著下降^[53]。本研究结果与之相同, 初步确定牡蛎在微塑料胁迫下, AChE 活性受到抑制, 导致体内乙酰胆碱的浓度升高。

NOS 能专一催化 L-精氨酸转化为 L-瓜氨酸和一氧化氮(nitric oxide, NO)。NO 是一种信号传递分子和活性

因子, 可与体内的氧自由基结合, 生成强氧化基, 对机体起保护作用, 同时 NO 对许多病原体有毒, 具有抑制脂质过氧化和清除自由基的作用, 被认为是先天免疫反应的重要组成部分^[54]。由于 NO 半衰期短, 所以体内 NO 的生物作用完全依赖于 NOS。NOS 根据不同的组织分布和催化活性可分为神经型一氧化氮合酶、内皮型一氧化氮合酶和 iNOS。其中神经型和内皮型一氧化氮合酶为 cNOS, 其催化活性需要高浓度的 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 才可合成少量的 NO, 而 iNOS 主要由巨噬细胞在炎症因子和细胞因子的刺激下, 产生相对高浓度的 NO, 发挥巨噬细胞的功能^[55]。NO 的作用与其浓度相关, 低浓度下发挥往往促进细胞增殖和抗凋亡作用, 而高浓度时不利于细胞生长而诱导细胞凋亡^[56]。在微塑料作用 24 h 后, 仅 cNOS 的活力增加, iNOS 的活力基本与对照组一致, 表明此时牡蛎机体仅产生少量的 NO 减弱自由基的伤害。当微塑料作用 72 h 后, iNOS 显著增加($P < 0.05$), 产生了大量的 NO 参与贝类的免疫防御过程。

4 结论

本研究表明, 不同浓度的微塑料对近江牡蛎免疫相关指标(SOD、CAT、MDA、AKP、NOS、AChE) 具有不同程度的影响, 尤其对 AKP、AChE 和 NOS 的影响显著($P < 0.05$), 证实了成分为聚苯乙烯的微塑料胁迫会引起近江牡蛎的免疫应答, 且微塑料胁迫时间越长, 近江牡蛎的免疫应激反应越剧烈。

参考文献:

- [1] MOORE C J. Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat[J]. Environmental Research, 2008, 108(2): 131-139.
- [2] RICHARD C, THOMPSON Y O R P. Lost at sea where is all the plastic[J]. Science, 2004, 304(5672): 838.
- [3] ERIKSEN M, LEBRETON L C M, CARSON H S, et al. Plastic Pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250, 000 tons afloat at sea[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e111913.
- [4] COZAR A, ECHEVARRIA F, GONZALEZ-GORDILLO J I, et al. Plastic debris in the open ocean[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(28): 10239-10244.
- [5] AUTA H S, EMENIKE C U, FAUZIAH S H. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: A review of the sources, fate, effects, and potential solutions[J]. Environment International, 2017, 102: 165-176.
- [6] 孙承君, 蒋风华, 李景喜, 等. 海洋中微塑料的来源、分布及生态环境影响研究进展[J]. 海洋科学进展,

- 2016, 34(4): 449-461.
- SUN Chengjun, JIANG Fenghua, LI Jingxi, et al. The research progress in source, distribution and ecological environmental effects of marine microplastics[J]. *Advances in Marine Science*, 2016, 34(4): 449-461.
- [7] ANDRADY A L. Microplastics in the marine environment[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62(8): 1596-1605.
- [8] WANG J, WANG M, RU S, et al. High levels of microplastic pollution in the sediments and benthic organisms of the South Yellow Sea, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 651(Pt 2): 1661-1669.
- [9] ANDERSON P J, WARRACK S, LANGEN V, et al. Microplastic contamination in Lake Winnipeg, Canada[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 225: 223-231.
- [10] CANESI L, CIACCI C, BERGAMI E, et al. Evidence for immunomodulation and apoptotic processes induced by cationic polystyrene nanoparticles in the hemocytes of the marine bivalve *Mytilus*[J]. *Marine Environmental Research*, 2015, 111: 34-40.
- [11] FRERE L, MAIGNIEN L, CHALOPIN M, et al. Microplastic bacterial communities in the Bay of Brest: Influence of polymer type and size[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 242(Pt A): 614-625.
- [12] LORENA M, RIOS A P R J. Quantitation of persistent organic pollutants adsorbed on plastic debris from the Northern Pacific Gyre's "eastern garbage patch"[J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2010, 12(12): 2226-2236.
- [13] LITHNER D, DAMBERG J, DAVE G, et al. Leachates from plastic consumer products - Screening for toxicity with *Daphnia magna*[J]. *Chemosphere*, 2009, 74(9): 1195-1200.
- [14] LITHNER D, LARSSON Å, DAVE G. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition[J]. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(18): 3309-3324.
- [15] KE A, CHEN J, ZHU J, et al. Impacts of leachates from single-use polyethylene plastic bags on the early development of clam *Meretrix meretrix* (Bivalvia: Veneridae) [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 142: 54-57.
- [16] BIRNSTIEL S, SOARES-GOMES A, DA GAMA B A P. Depuration reduces microplastic content in wild and farmed mussels[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 140: 241-247.
- [17] AROSSA S, Martin C, Rossbach S, et al. Microplastic removal by Red Sea giant clam (*Tridacna maxima*) [J]. *Environmental Pollution*, 2019, 252 (Pt B): 1257-1266.
- [18] 曲晓芸. 我国沿海贻贝与水体中微塑料的污染特征及其相关性研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2018.
- QU Xiaoyun. Uptake and Effects of Microplastics on Cells and Tissue of the Blue Mussel[D]. Shanghai: East China Normal University, 2018.
- [19] TENG J, WANG Q, RAN W, et al. Microplastic in cultured oysters from different coastal areas of China[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 653: 1282-1292.
- [20] GRAHAM P, PALAZZO L, ANDREA DE LUCIA G, et al. Microplastics uptake and egestion dynamics in Pacific oysters, *Magallana gigas* (Thunberg, 1793), under controlled conditions[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 252(Pt A): 742-748.
- [21] YONG C, VALIYAVEETILL S, TANG B L. Toxicity of microplastics and nanoplastics in mammalian systems[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2020, 17(5): 1509.
- [22] VON MOOS N, BURKHARDT-HOLM P, KOHLER A. Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* (L.) after an experimental exposure[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(20): 11327-11335.
- [23] CANESI L, CIACCI C, FABBRI R, et al. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity[J]. *Marine Environmental Research*, 2012, 76: 16-21.
- [24] FARRELL P, NELSON K. Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.) [J]. *Environmental Pollution*, 2013, 177: 1-3.
- [25] 刘惠茹. 近江牡蛎 YB-1 对 *Hsc70* 的转录调控及两基因对热激、污染物的响应模式[D]. 广州: 暨南大学, 2018.
- LIU Huiru. The *Crassostrea hongkongensis* YB-1 positively regulating *Hsc70* transcription expression and the transcriptional expression patterns of YB-1 and *Hsc-70* triggered by heat shock or chemical pollutants[D]. Guangzhou: Jinan University, 2018.
- [26] 张玲丽. 近江牡蛎 Gnaq 对 *Hsc70* 基因的转录调控及其对温度和污染物的响应模式[D]. 广州: 暨南大学, 2018.
- ZHANG Lingli. The transcription regulation of *ChHsc70* by Gnaq and the expression patterns of the two genes of *Crassostrea hongkongensis* in response to physico-chemical stressors[D]. Guangzhou: Jinan University, 2018.
- [27] RAJALAKSHMI S, MOHANDAS A. Copper-induced changes in tissue enzyme activity in a freshwater mussel[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2005, 62(1): 140-143.
- [28] TALLEC K, HUVET A, DI POI C, et al. Nanoplastics impaired oyster free living stages, gametes and embryos[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 242(Pt B): 1226-1235.
- [29] 张克烽, 张子平, 陈芸, 等. 动物抗氧化系统中主要抗氧化酶基因的研究进展[J]. *动物学杂志*, 2007, 42(2): 153-160.
- ZHANG Kefeng, ZHANG Ziping, CHEN Yun, et al. Antioxidant defense system in animals[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2007, 42(2): 153-160.
- [30] TENG J, ZHAO J, ZHU X, et al. Oxidative stress bio-

- markers, physiological responses and proteomic profiling in oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to microplastics with irregular-shaped PE and PET microplastic[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 786: 147425.
- [31] SHI X, WANG L, ZHOU Z, et al. Acetylcholine modulates the immune response in Zhikong scallop *Chlamys farreri*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 38(1): 204-210.
- [32] MA Y, LIU Z, YANG Z, et al. Effects of dietary live yeast *Hanseniaspora opuntiae* C21 on the immune and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(1): 66-73.
- [33] SUZUKI T, MORI K. Hemolymph lectin of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*: a possible non-selfrecognition system[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1990, 14(2): 161-173.
- [34] RAHMAN M F, SIDDIQUI M K J. Biochemical effects of vepacide (from *Azadirachta indica*) on Wistar rats during subchronic exposure[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 59(3): 332-339.
- [35] 陈孟玲, 高菲, 王新元, 等. 微塑料对黑海参(*Holothuria atra*)免疫和消化生理的影响[J]. *海洋科学*, 2021, 45(4): 126-135.
- CHEN Mengling, GAO Fei, WANG Xinyuan, et al. Effects of microplastics on immunity and digestion of sea cucumber, *Holothuria atra*[J]. *Marine Sciences*, 2021, 45(4): 126-135.
- [36] SIKDOKUR E, BELIVERMIS M, SEZER N, et al. Effects of microplastics and mercury on manila clam *Ruditapes philippinarum*: Feeding rate, immunomodulation, histopathology and oxidative stress[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 262: 114247.
- [37] TENG J, ZHAO J, ZHU X, et al. Toxic effects of exposure to microplastics with environmentally relevant shapes and concentrations: Accumulation, energy metabolism and tissue damage in oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 269: 116169.
- [38] YANG S, WU Z, JIAN J, et al. Effect of marine red yeast *Rhodospiridium paludigenum* on growth and antioxidant competence of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 2010, 309(1/4): 62-65.
- [39] MAGNI S, GAGNE F, ANDRE C, et al. Evaluation of uptake and chronic toxicity of virgin polystyrene microbeads in freshwater zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Mollusca: Bivalvia) [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 631/632: 778-788.
- [40] SUN J H, XIA S D, NING Y, et al. Effects of microplastics and attached heavy metals on growth, immunity, and heavy metal accumulation in the yellow seahorse, *Hippocampus kuda* Bleeker[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 149: 110510.
- [41] DING J, ZHANG S, RAZANAJATOVO R M, et al. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Environmental Pollution*, 2018, 238: 1-9.
- [42] 李晓梅, 郭体环, 张来军, 等. 海水酸化条件下铅胁迫对近江牡蛎过氧化氢酶活性的影响[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(7): 165-168.
- LI Xiaomei, GUO Tihuan, ZHANG Laijun, et al. Effects of lead stress on catalase activity of *Crassostrea gigas* under acidification of seawater[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(7): 165-168.
- [43] LEIEINIO S, LEHTONEN K K. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2005, 140(3/4): 408-421.
- [44] CAMPILLO J A, ALBENTOSA M, VALDES N J, et al. Impact assessment of agricultural inputs into a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain) on transplanted clams (*Ruditapes decussatus*) by biochemical and physiological responses[J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 142/143: 365-379.
- [45] VIARENGO A, LOWE D, BOLOGNESI C, et al. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2007, 146(3): 281-300.
- [46] SONG J A, CHOI C Y, PARK H. Exposure of bay scallop *Argopecten irradians* to micro-polystyrene: bioaccumulation and toxicity[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Toxicology & Pharmacology*, 2020, 236: 108801.
- [47] DAMIENS G, GNASSIA-BARELLI M, LOQUES F, et al. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels[J]. *Chemosphere*, 2007, 66(3): 574-583.
- [48] TURJA R, SOIRINSUO A, BUDZINSKI H, et al. Biomarker responses and accumulation of hazardous substances in mussels (*Mytilus trossulus*) transplanted along a pollution gradient close to an oil terminal in the gulf of finland (Baltic Sea) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2013, 157(1): 80-92.
- [49] 刘兆群. 长牡蛎神经内分泌免疫系统调节机制的初步研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2017.
- LIU Zhaoqun. The neuroendocrine immunomodulatory network in oyster *Crassostrea gigas*[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2017.
- [50] LIONETTO M G, CARICATO R, GIORDANO M E, et al. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and an-

- tioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area[J]. Marine Pollution Bulletin, 2003, 46(3): 324-330.
- [51] SOLE M, SHAW J P, FRICKERS P E, et al. Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 396(2): 649-656.
- [52] GONZALEZ-REY M, BEBIANNO M J. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. Aquatic Toxicology, 2014, 148: 221-230.
- [53] TLILI S, JEMAI D, BRINIS S, et al. Microplastics mixture exposure at environmentally relevant conditions induce oxidative stress and neurotoxicity in the wedge clam *Donax trunculus*[J]. Chemosphere, 2020, 258: 127344.
- [54] SHI X, WANG L, ZHOU Z, et al. The arginine kinase in Zhikong scallop *Chlamys farreri* is involved in immunomodulation[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2012, 37(2): 270-278.
- [55] 张千兵. 一氧化氮合酶通过 PTEN/PI3K/AKT 信号通路调控鼻咽癌干细胞[D]. 广州: 南方医科大学, 2014. ZHANG Qianbing. Nitric oxide synthases regulate cancer stem cells through PTEN/PI3K/AKT pathway in nasopharyngeal carcinoma[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2014.
- [56] CHEN C, WANG Y, GOH S S L, et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity promotes migration of human-induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells toward cancer cells[J]. Journal of Neurochemistry, 2013, 126(3): 318-330.

Effect of polystyrene microplastics on oyster immunity

MOU Hong-li^{1, 4}, WANG Rui-xuan², WANG Jun³, LIN Xiao-zhi², WANG Jiang-yong⁵

(1. Shanghai Ocean University, College of Marine Science, Shanghai 201306, China; 2. Hanshan Normal University, Chaozhou 521041, China; 3. South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 4. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300, China; 5. Huizhou University, Huizhou 516007, China)

Received: Aug. 10, 2021

Key words: oyster; microplastics; enzyme activity; immune index

Abstract: We aimed to study the effect of microplastics on oyster immunity by injecting oysters (average shell length: 6.6 cm) with different concentrations of polystyrene microplastics (0.05, 0.5, and 5 mg·L⁻¹, with sterilized saline water as diluent) via intrashell injection (without damaging the soft tissue of oyster). The gills were sampled at 24, 48, and 72 h, respectively, and the activities of six immune-related indices, including alkaline phosphatase (AKP), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), nitric oxide synthase (NOS), and acetylcholinesterase (AChE), were determined. After 24 h of treatment, the concentration of microplastics had a significant effect on gill AKP activity in the oysters ($P < 0.05$). AKP, SOD, and structural NOS initially increased and subsequently decreased. After 48 h of treatment, increasing the microplastic concentration led to a significant decrease in AChE activity ($P < 0.05$), and CAT, SOD, and AKP initially increased and subsequently decreased. After 72 h of microplastic exposure, the activities of AKP and AChE initially decreased and then increased with an increase in microplastic concentration, whereas the activities of SOD, CAT, and inducible NOS initially increased and subsequently decreased. The MDA content increased with time and concentration of microplastics. These results show that microplastics induce an immune stress response in oysters, and longer stress time causes a more intense immune stress response.

(本文编辑: 杨悦)