

林毅, 陈强, 周思顺, 等. CO₂ 驱动的海水酸化对菲律宾蛤仔组织、免疫和抗氧化酶活及转录水平的影响[J]. 海洋学报, 2024, 46(1): 88–100, doi:10.12284/hyxb2024010

Lin Yi, Chen Qiang, Zhou Sishun, et al. Effects of CO₂-driven seawater acidification on tissue, immune and antioxidant enzyme activity and transcription levels of *Ruditapes philippinarum*[J]. Haiyang Xuebao, 2024, 46(1): 88–100, doi:10.12284/hyxb2024010

CO₂ 驱动的海水酸化对菲律宾蛤仔组织、免疫和抗氧化酶活及转录水平的影响

林毅^{1,2}, 陈强^{1,2*}, 周思顺^{1,2}, 孔鲁闽^{1,2}, 黄张帆^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省海洋渔业资源与生态环境重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要: 随着 CO₂ 的大量排放, 海洋酸化效应不断加重, 为探究未来海水酸化情况对菲律宾蛤仔产生的影响, 设置对照组 (pH 为 8.1) 和酸化组 (pH 为 7.7、7.1 和 6.4), 研究周期为 42 d, 测定菲律宾蛤仔在酸化条件下组织结构、免疫和抗氧化酶活性的变化情况, 以及在分子水平上产生的影响。结果表明: 菲律宾蛤仔置于酸化海水环境中, 鳃丝间距随 pH 的降低而扩大, 鳃丝纤毛黏合, 水管和外套膜外表皮褶皱逐渐加深; 鳃组织中酸性磷酸酶 (ACP) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性变化情况为先降后升, 碱性磷酸酶 (AKP) 活性各组变化趋势不同, 总抗氧化能力 (T-AOC)、过氧化氢酶 (CAT) 和溶菌酶 (LZM) 活性趋势为先升后降; 鳃和内脏团谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性变化规律皆为持续上升; 内脏团组织中 LZM 活性变化趋势各不相同, ACP 活性变动趋势为先降后升, AKP、SOD 和 CAT 活性变化规律为先升后降, T-AOC 趋势为持续下降; 通过转录组分析得到, 鳃组织 GO 功能主要富集在 DNA 整合、膜的组成部分和 RNA 定向 DNA 聚合酶活性等条目中, KEGG 通路主要富集在吞噬体和与蛋白合成的相关通路中。海水酸化使菲律宾蛤仔组织呈现不同程度的损伤, 破坏其内环境稳态, 改变其代谢水平和与免疫相关基因表达, 引发菲律宾蛤仔染病乃至死亡的风险上升。

关键词: 二氧化碳; 菲律宾蛤仔; 免疫; 抗氧化; 转录水平

中图分类号: P714⁺.5; S944.4⁺7

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2024)01-0088-13

1 引言

随着人类活动排放大量 CO₂, 空气中 CO₂ 的占比在不断升高, 海洋被迫吸收了 1/4~1/3 的 CO₂^[1], 导致海水 pH 下降, 这种因海水被迫吸收大量 CO₂ 降低 pH 的过程被称为海洋酸化^[2]。自工业革命后, CO₂ 急剧增长的排放量已经大幅度超过了海洋碳循环的自我平衡调节能力, 目前海洋表层海水的 pH 已经比工业革命前下降了 0.1^[3]。Calderia 和 Wickett^[4] 根据政府间气候变化专门委员会 (Intergovernmental Panel on

Climate Change, IPCC) 发表的评估报告, 预测在 21 世纪末海水 pH 可能会下降 0.3~0.4, 如果 CO₂ 排放量还未得到控制, 到 2300 年 pH 可能下降到 7.1~7.2, 到 2500 年 pH 将会下降到 6.4~6.5。海洋酸化会影响海洋生态系统的平衡, 对各级海洋生物产生影响, 大多数软体动物依赖碳酸盐形成贝壳保护自身, 因此海洋酸化对软体动物的生理活动将造成严重的影响。

菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*), 隶属于软体动物门, 双壳纲, 帘蛤目, 帘蛤科, 蛤仔属, 在我国广泛分布于辽宁大连, 福建厦门, 广东海门, 山东青

收稿日期: 2023-05-20; 修订日期: 2023-10-09。

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2020J01668)。

作者简介: 林毅 (1999—), 男, 福建省永安市人, 主要从事贝类养殖研究。E-mail: 202111908039@jmu.edu.cn

* 通信作者: 陈强, 博士, 硕士生导师, 主要从事生态环境修复研究。E-mail: ahcq@jmu.edu.cn

岛、烟台等地,是我国四大传统养殖贝类之一^[5],《2022 中国渔业统计年鉴》^[6]显示,到 2021 年,我国蛤养殖产量已到 428.9 万 t。目前关于海洋酸化对贝类的研究主要是在贝壳的形成、生长和酶活性的影响上,海洋酸化会减缓贝类贝壳的形成^[7],抑制贝类的生长^[8],限制贝类的免疫力^[9]等,严重影响贝类的生存,进而影响贝类养殖业的发展。本文研究了 CO₂ 驱动酸化对菲律宾蛤仔不同组织结构、免疫酶活性、抗氧化酶活性和转录水平的影响,探讨菲律宾蛤仔对海水酸化的响应,期望在日益酸化的水环境中为菲律宾蛤仔的养殖提供参考。

2 材料与方 法

2.1 材 料

菲律宾蛤仔(之后统称“蛤仔”)购自厦门市高崎水产批发市场,选取活泼健康无损伤个体,测得蛤仔平均壳长为(3.3 ± 0.2) cm,平均壳宽为(2.1 ± 0.1) cm,平均壳高为(1.8 ± 0.2) cm,平均湿重为(8.5 ± 0.5) g。实验开始前蛤仔均在水箱(200 L)中暂养 1 周,暂养期间保持连续充氧,每日定时投喂足量小球藻(*Chlorella* sp.) 1 次,每天 100% 换水 1 次,暂养用水温度为(25 ± 1) °C,盐度为(31 ± 2),pH 为 8.1 ± 0.1。

2.2 实 验 设 计

模拟 2100 年、2300 年和 2500 年海洋将到达的海水 pH,将实验 pH 设置为:8.1 ± 0.1(DD 组)对照组、7.7 ± 0.1(CC 组)、7.1 ± 0.1(BB 组)和 6.4 ± 0.1(AA 组);每组 3 个重复。将暂养 7 d 的蛤仔随机分组,每组 50 个,随机放入装有 20 L 配置海水的玻璃缸中。通过控制 CO₂ 通入量的方法降低水体 pH。实验在室内进行,共进行 42 d,每天定时投喂小球藻,1 h 后换水 1/3,在实验的第 14 天、第 28 天和第 42 天采样。

2.3 样 品 采 集

用已灭菌剪刀和镊子在冰盒中快速取蛤仔的内脏团和鳃组织,用预冷的生理盐水(0.9%)冲洗,滤纸吸干水分,每组分别取 6 个蛤仔,3 个蛤仔的鳃组织分装放入冻存管中,用于后续的转录组分析。此外,每组取 3 个蛤仔的鳃、外套膜和水管样本放置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,用于组织形态观察分析。

2.4 切 片 制 作

将组织样品迅速取材成规定大小后放入多聚甲醛中,固定 24 h。水洗后脱水:75% 乙醇 2 h,85% 乙醇 2 h,90% 乙醇 2 h,100% 乙醇 45 min,乙醇+二甲苯(1:1)10 min,二甲苯 8 min,石蜡 3 h。脱水后进行包埋,经室温冷却后切片,最后使用苏木精伊红染色。

使用显微镜观察切片,用 WT-1000GM 软件拍照记录。

2.5 生 理 生 化 指 标 分 析

酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)活性均采用微量酶标法检测,通过比浊法检测溶菌酶(LZM)活性,总抗氧化能力(T-AOC)通过 ABTS 法检测,过氧化氢酶(CAT)活性使用钼酸铵法检测,超氧化物歧化酶(SOD)活性通过 WST-1 检测。测定使用的试剂盒购自南京建成生物工程研究所,具体操作按试剂盒说明书进行。

2.6 RNA 提取及建库

采用 TRIzol 试剂提取第 28 天鳃组织的总 RNA;使用 Nanodrop2000(赛默飞 Nanodrop2000)对于提取的 RNA 进行浓度检测,并使用 Agilent2100 和 LabChip GX 对 RNA 完整性进行检测,为后续建库和质量检测做准备。使用 NEBNext®Ultra™ RNA 文库制备试剂盒为 Illumina®(美国 NEB)生成测序文库,即使用聚 T 寡核苷酸附着磁珠从总 RNA 中纯化 mRNA。cDNA 经过纯化、加尾和富集后,在北京百迈客生物有限公司的 Illumina NovaSeq6000 测序平台上对文库进行测序。

2.7 微 量 表 达 及 功 能 富 集 分 析

Illumina 高通量测序平台对 cDNA 文库进行测序,产出大量的原始数据(Raw reads),去除原始数据含接头和低质量碱基($Q < 10$, Q 为碱基质量分值)的数据,获得高质量数据(Clean reads)进行组装。使用 DESeq2^[10] 软件包对两个条件组进行差异表达分析,使用 Benjamini 和 Hochberg 控制错误发现率的方法得到了矫正后的 p 值,即错误发现率(False Discovery Rate, FDR)值。以基因差异表达信数值(Fold Change) ≥ 2 且 $FDR < 0.01$ 作为筛选标准,对筛选得到的差异表达基因(Differential Expressed Genes, DEGs)进行 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析,富集分析使用 cluster Profiler^[11] 软件完成。

2.8 实 时 荧 光 定 量 PCR 验 证

随机选取 24 个 DEGs,通过实时荧光定量 PCR(qPCR)对转录组测序结果进行验证。以 18S 为参考基因^[12],利用软件 Primer Premier 5 设计 DEGs 的特异性引物。先将所有引物进行普通 PCR 扩增后,选取特异性强的引物进行后续 qPCR 验证。所有引物序列由福州瑞真生物技术有限公司合成。

2.9 数 据 处 理

实验数据于 EXCEL 中进行数据统计,之后使用 SPSS 19.0 软件进行方差分析。运用 Duncan test 对数据进行显著性检验,显著性水平为 0.05。实验数据以平均值 ± 标准差表示。

3 结果

3.1 组织切片观察

通过组织切片观察经过 42 d 酸化胁迫的蛤仔的鳃组织的主要结构,发现酸化组中鳃丝间距扩大(图 1B 中 a 处),鳃丝纤毛紊乱(图 1C 中 b 处),鳃丝

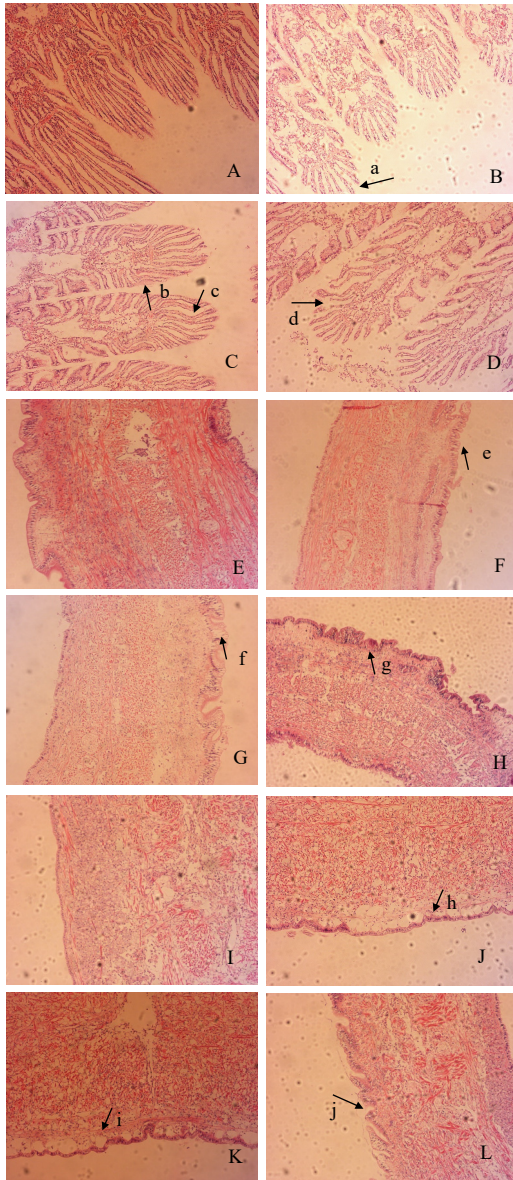


图 1 海水酸化对菲律宾蛤仔不同组织结构的影响
Fig. 1 Effects of seawater acidification on different organization structure of *Ruditapes philippinarum*

A. DD 组鳃; B. CC 组鳃; C. BB 组鳃; D. AA 组鳃; E. DD 组水管;
F. CC 组水管; G. BB 组水管; H. AA 组水管; I. DD 组外套膜;
J. CC 组外套膜; K. BB 组外套膜; L. AA 组外套膜
A. Group DD gill; B. Group CC gill; C. Group BB gill; D. Group AA gill;
E. Group DD pipe; F. Group CC pipe; G. Group BB pipe; H. Group AA pipe;
I. Group DD mantle; J. Group CC mantle; K. Group BB mantle;
L. Group AA mantle

出现弯曲(图 1C 中 c 处),在极端酸化时鳃丝出现断裂(图 1D 中 d 处)。水管的内外表皮由单层柱状上皮细胞、少量杯状细胞组成,表皮下的结缔组织中含有大量的黏液细胞。正常海水时,蛤仔水管外表皮的柱状细胞排列紧密且表皮褶皱较少;当蛤仔处于酸化条件时,柱状细胞间出现间隙(图 1F 中 e 处),表皮凹陷增多(图 1G 中 f 处);极端酸化下蛤仔水管外表皮柱状细胞和黏液细胞开始混合(图 1H 中 g 处),且黏液细胞数量和肌纤维变少。正常海水中外套膜的外表皮为水平状,细胞排列整齐;酸化组中外表皮开始出现不规则的褶皱(图 1J 中 h 处),肌纤维间出现空泡(图 1K 中 i 处),结缔组织紊乱;随着酸化的加重,外表皮的褶皱逐渐明显(图 1L 中 j 处)。

3.2 酸化胁迫对免疫酶活性的影响

由图 2 可知,经 42 d 酸化胁迫后鳃组织 LZM 活性趋势为先升后降;第 14 天 AA 组显著低于 CC 组、DD 组($p < 0.05$),BB 组显著低于 DD 组($p < 0.05$),CC 组显著低于 DD 组($p < 0.05$);第 28 天 AA 组显著低于其他组($p < 0.05$),BB 组、CC 组和 DD 组间无显著差异;第 42 天各组间无显著差异。第 14 天与第 0 天相比,AA 组与第 0 天初始组无显著差异,其他组显著高于第 0 天初始组($p < 0.05$);第 28 天与第 0 天相比,AA 组显著低于第 0 天初始组($p < 0.05$),BB 组、DD 组显著高于第 0 天初始组($p < 0.05$),CC 组与第 0 天初始组无显著差异;第 42 天与第 0 天相比,BB 组、DD 组显著高于第 0 天初始组($p < 0.05$),AA 组、CC 组与第 0 天初始组无显著差异。

ACP 活性趋势为先降后升;第 14 天各组间无显著差异;第 28 天 AA 组显著低于 BB 组和 DD 组($p < 0.05$),BB 组和 DD 组间无显著性,BB 组显著高于 CC 组($p < 0.05$),CC 组与 DD 组差异不显著($p > 0.05$);第 42 天 AA 组显著高于 CC 组和 DD 组($p < 0.05$),BB 组与 CC 组、DD 组差异不显著($p > 0.05$),CC 组、DD 组间无显著差异。第 14 天与第 0 天相比,各组与第 0 天初始组无显著差异;第 28 天与第 0 天相比,AA 组显著低于第 0 天初始组($p < 0.05$),其他组与第 0 天初始组无显著差异;第 42 天与第 0 天相比,AA 组、BB 组显著高于第 0 天初始组($p < 0.05$),DD 组显著低于第 0 天初始组($p < 0.05$),CC 组与第 0 天初始组无显著差异。

AKP 活性趋势各组不相同;第 14 天 AA 组显著低于其他组($p < 0.05$),BB 组显著低于 CC 组、DD 组($p < 0.05$),CC 组、DD 组间无显著差异;第 28 天 AA 组与 BB 组差异不显著($p > 0.05$),显著低于

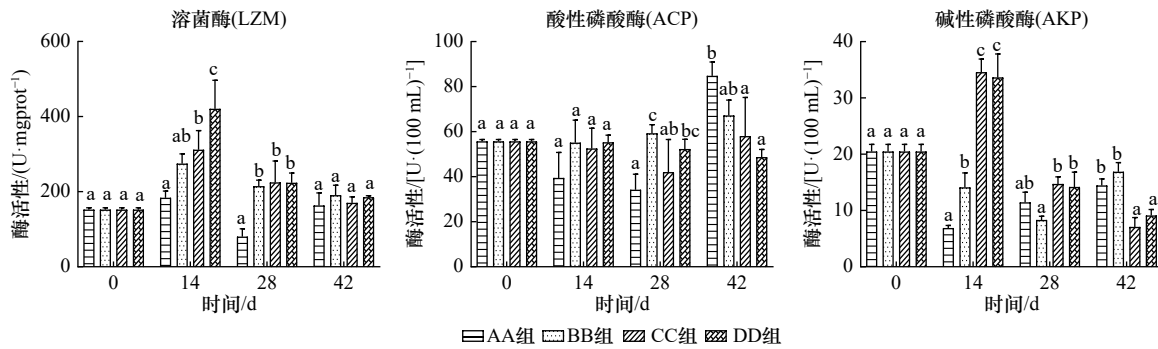


图2 海水酸化对鳃组织免疫酶活性的影响

Fig. 2 The immunoenzyme activity of gill stressed by ocean acidification

上标不同小写字母表示各组之间差异显著($p < 0.05$)Different superscript lowercase letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$)

CC组、DD组($p < 0.05$), CC组、DD组间无显著差异;第42天AA组、BB组间无显著差异,且皆显著高于CC组、DD组($p < 0.05$),CC组、DD组间无显著差异。第14天与第0天相比,AA组、BB组显著低于第0天初始组($p < 0.05$),CC组显著高于第0天初始组($p < 0.05$),DD组与第0天初始组无显著差异;第28天与第0天相比,其他组显著低于第0天初始组($p < 0.05$),DD组与第0天初始组无显著差异;第42天与第0天相比,其他组显著低于第0天初始组($p < 0.05$),BB组与第0天初始组间无显著差异。

由图3可知,内脏团LZM活性趋势各组不相同;第14天酸化组间无显著差异,且皆显著低于DD组($p < 0.05$);第28天AA组显著低于BB组($p < 0.05$),BB组与CC组、DD组差异不显著($p > 0.05$),CC组、DD组间无显著差异;第42天各组间无显著差异。第14天与第0天相比,DD组显著高于第0天初始组($p < 0.05$);其他组与第0天初始组无显著性差异;第28天和42天与第0天相比,各组与第0天初始组间无显著性差异。

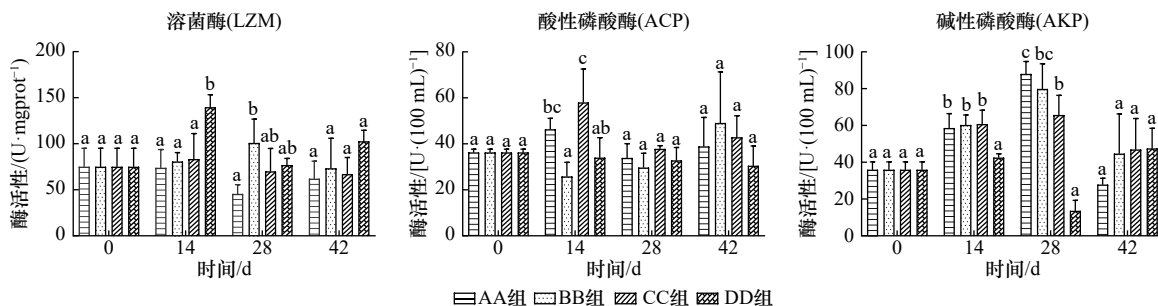


图3 海水酸化对内脏团免疫酶活性的影响

Fig. 3 The immunoenzyme activity of visceral mass stressed by ocean acidification

上标不同小写字母表示各组之间差异显著($p < 0.05$)Different superscript lowercase letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$)

ACP活性趋势为先降后升;第14天AA组显著高于BB组($p < 0.05$),BB组显著低于AA组和CC组($p < 0.05$);第28天、第42天各组间无显著差异。第14天与第0天相比,AA组显著高于第0天初始组($p < 0.05$),BB组显著低于第0天初始组($p < 0.05$),其他组与第0天初始组无显著差异;第28天第0天相比,各组间无显著差异。

AKP活性趋势为先升后降;第14天酸化组间无显著差异,且皆显著高于DD组($p < 0.05$);第28天酸化组显著高于DD组($p < 0.05$),AA组显著高于CC组($p < 0.05$),BB组与CC组无显著差异($p > 0.05$);第42天各组间无显著差异。第14天、第28天与第0天相比,DD组与第0天初始组无显著差异,其他组显著高于第0天初始组($p < 0.05$);第42天与第0天相比,AA组显著低于第0天初始组($p < 0.05$),其他组与第0天初始组无显著差异。

3.3 酸化胁迫对抗氧化酶活性的影响

由图4可知,鳃组织SOD活性趋势为先降后升;第14天AA组活性显著低于DD组($p < 0.05$),AA组

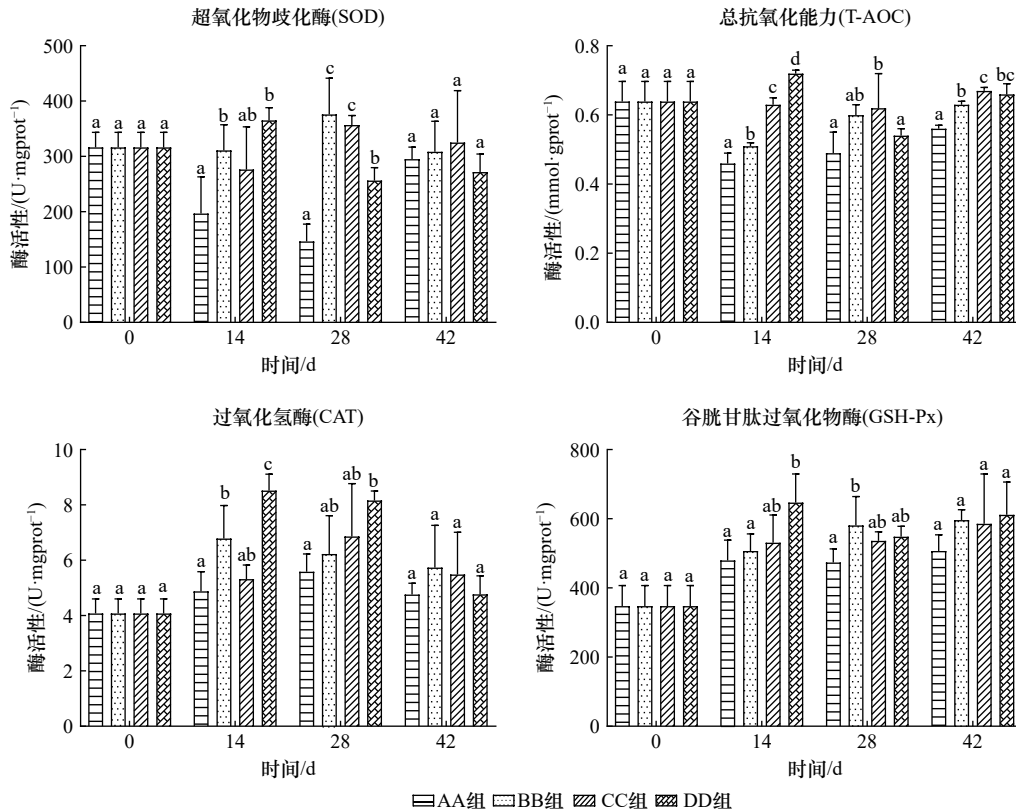


图 4 海水酸化对鳃组织抗氧化酶活性的影响

Fig. 4 The antioxidant enzyme activity of gill stressed by ocean acidification

上标不同小写字母表示各组之间差异显著 ($p < 0.05$)

Different superscript lowercase letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$)

显著低于 BB 组 ($p < 0.05$), BB 组与 CC 组间无显著差异 ($p > 0.05$); 第 28 天 AA 组显著低于其他组 ($p < 0.05$), BB 组、CC 组间无显著差异, 且皆显著高于 DD 组 ($p < 0.05$); 第 42 天各组间无显著差异。第 14 天、第 28 天与第 0 天相比, AA 组显著低于第 0 天初始组 ($p < 0.05$), 其他组与第 0 天初始组无显著差异; 第 42 天与第 0 天相比, 各组间无显著差异。

T-AOC 趋势为先升后降; 第 14 天酸化组显著低于 DD 组 ($p < 0.05$), AA 组显著低于 BB 组、CC 组 ($p < 0.05$), BB 组显著低于 CC 组 ($p < 0.05$); 第 28 天 AA 组、DD 组间无显著差异, 且皆显著低于 BB 组 ($p < 0.05$), BB 组与 CC 组差异不显著 ($p > 0.05$); 第 42 天 AA 组显著低于其他组 ($p < 0.05$), BB 组显著低于 CC 组 ($p < 0.05$), CC 组与 DD 组差异不显著 ($p > 0.05$)。第 14 天与第 0 天相比, AA 组显著低于第 0 天初始组 ($p < 0.05$), 其他组与第 0 天初始组无显著差异; 第 28 天、第 42 天与第 0 天相比, 各组间无显著差异。

CAT 活性趋势为先升后降; 第 14 天酸化组显著低于 DD 组 ($p < 0.05$), AA 组显著低于 BB 组和 DD 组 ($p < 0.05$), CC 组与 BB 组差异不显著 ($p > 0.05$); 第

28 天酸化组低于 DD 组 ($p < 0.05$), AA 组显著低于 DD 组 ($p < 0.05$), BB 组、CC 组间无显著差异; 第 42 天各组间无显著差异。第 14 天与第 0 天相比, BB 组、DD 组显著高于第 0 天初始组 ($p < 0.05$), AA 组、CC 组与第 0 天初始组无显著差异; 第 28 天与第 0 天相比, AA 组、DD 组显著高于第 0 天初始组 ($p < 0.05$), BB 组、CC 组与第 0 天初始组无显著差异。第 42 天与第 0 天相比, 各组间无显著差异。

GSH-Px 活性趋势为持续上升; 第 14 天 AA 组和 BB 组活性显著低于 DD 组 ($p < 0.05$), AA 组、BB 组、CC 组间无显著差异, AA 组、BB 组显著低于 DD 组 ($p < 0.05$); 第 28 天 AA 组显著低于 BB 组 ($p < 0.05$), BB 组与 CC 组、DD 组差异不显著 ($p > 0.05$), CC 组、DD 组间无显著差异; 第 42 天各组间无显著差异。第 14 天、第 28 天与第 0 天相比, AA 组与第 0 天初始组无显著差异, 其他组显著高于第 0 天初始组 ($p < 0.05$); 第 42 天与第 0 天相比, 其他组显著高于第 0 天初始组 ($p < 0.05$), CC 组与第 0 天初始组无显著差异。

由图 5 可知, 内脏团 SOD 活性趋势为先升后降; 第 14 天 AA 组显著高于其他组 ($p < 0.05$), BB 组、

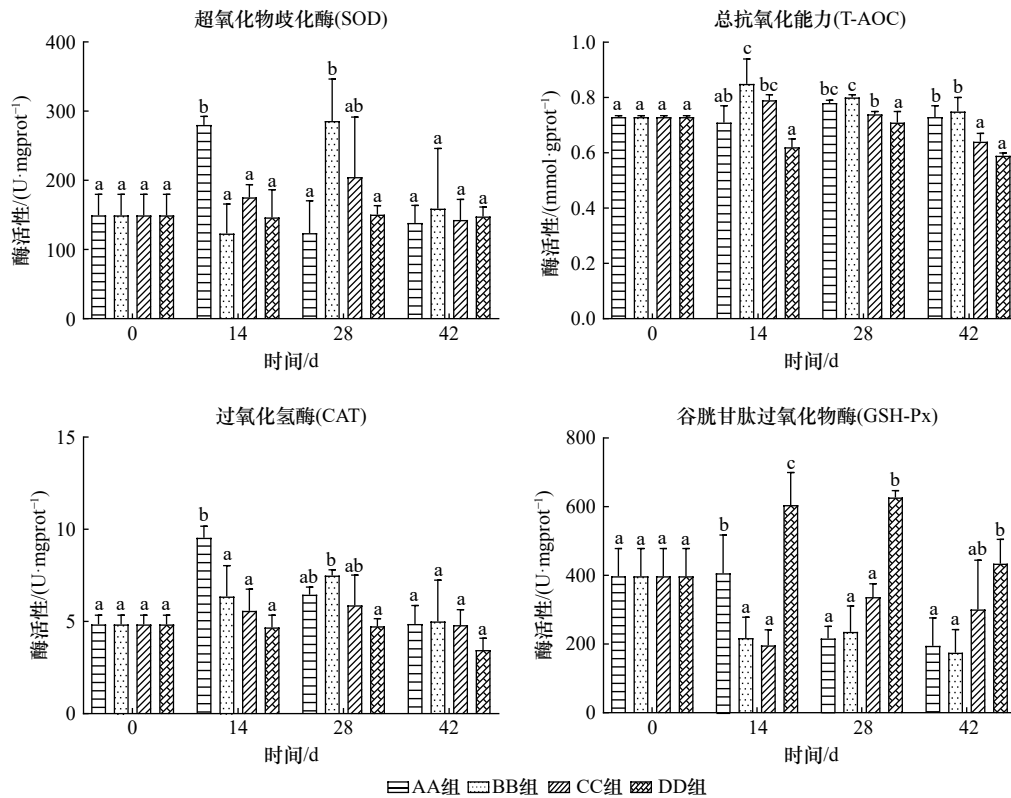


图5 海水酸化对内脏团抗氧化酶活性的影响

Fig. 5 The antioxidant enzyme activity of visceral mass stressed by ocean acidification

上标不同小写字母表示各组之间差异显著 ($p < 0.05$)Different superscript lowercase letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$)

CC组和DD组间无显著差异;第28天AA组、DD组间无显著差异,且皆显著低于BB组、CC组($p < 0.05$),BB组与CC组差异不显著($p > 0.05$);第42天各组间无显著差异。第14天与第0天相比,AA组显著高于第0天初始组($p < 0.05$),其他组与第0天初始组无显著差异;第28天与第0天相比,BB组显著高于第0天初始组($p < 0.05$),其他组与第0天初始组无显著差异;第42天与第0天相比,各组间无显著差异。

T-AOC趋势为先升后降;第14天BB组和CC组皆显著高于DD组($p < 0.05$),AA组显著低于BB组($p < 0.05$),BB组与CC组差异不显著($p > 0.05$);第28天酸化组皆显著高于DD组($p < 0.05$),酸化组之间无显著差异($p > 0.05$);第42天AA组、BB组间无显著差异,且皆显著高于CC组、DD组($p < 0.05$)。第14天与第0天相比,AA组、BB组与第0天初始组无显著差异,CC组显著高于第0天初始组($p < 0.05$),DD组显著低于第0天初始组($p < 0.05$);第28天与第0天相比,AA组、BB组显著高于第0天初始组($p < 0.05$),CC组、DD组与第0天初始组无显著差异;第42天与第0天相比,CC组、DD组显著低于第

0天初始组($p < 0.05$),AA组、BB组与第0天初始组无显著差异。

CAT活性趋势为先升后降;第14天AA组显著高于其他组($p < 0.05$),BB组、CC组和DD组间无显著差异;第28天BB组显著高于DD组($p < 0.05$),AA组、CC组和DD组间无显著差异($p > 0.05$);第42天各组间无显著差异。第14天与第0天相比,AA组显著高于第0天初始组($p < 0.05$),其他组与第0天初始组无显著差异;第28天与第0天相比,AA组、BB组显著高于第0天初始组($p < 0.05$),CC组、DD组与第0天初始组无显著差异;第42天与第0天相比,各组间无显著差异。

GSH-Px活性趋势为持续上升;第14天酸化组皆显著低于DD组($p < 0.05$),AA组显著高于BB组、CC组($p < 0.05$),BB组、CC组间无显著差异;第28天酸化组显著低于DD组($p < 0.05$),各酸化组间无显著差异;第42天酸化组低于DD组,AA组、BB组和CC组无显著差异($p > 0.05$)。第14天与第0天相比,各组间无显著差异;第28天与第0天相比,AA组显著低于第0天初始组($p < 0.05$),其他组与第0天初始

组无显著差异;第42天与第0天相比, BB组显著低于第0天初始组($p < 0.05$),其他组与第0天初始组无显著差异。

3.4 转录组数据统计分析

4组鳃组织的cDNA文库经Illumina测序质控后共产生77.10 Gb高质量数据,各样品高质量数据均达到5.75 Gb, Q30碱基百分比在90.69%及以上, GC含量平均值为36.86%(表1)。

3.5 差异表达基因

将AA组、BB组和CC组的鳃表达基因与DD组表达基因进行差异分析(图6)。结果显示:在AA vs.

DD组中DEGs共有7 053个,其中上调基因3 906个,下调基因3 147个;BB vs. DD组中DEGs共有5 690个,上调基因2 534个,下调基因3 156个;CC vs. DD组中DEGs共有5 543个,上调基因2 619个,下调基因2 924个;AA vs. BB组中DEGs共有7 070个,上调基因3 876个,下调基因3 194个;AA vs. CC组中DEGs共有7 250个,上调基因3 941个,下调基因3 194个;BB vs. CC组中DEGs共有5 157个,上调基因2 466个,下调基因2 691个。

3.6 差异表达基因GO功能富集分析

在差异表达基因GO功能分析中, AA vs. DD组

表1 菲律宾蛤仔鳃组织文库测序数据统计分析

Table 1 Statistical analysis of sequencing data of gill library of *Ruditapes philippinarum*

样品	序列数	质控数据总碱基数/bp	GC含量/%	Q20/%	Q30/%
AA1	19 805 256	5 921 771 252	36.81	97.42	92.53
AA2	21 015 864	6 280 860 796	36.94	97.54	92.78
AA3	19 731 774	5 901 090 298	37.18	97.5	92.68
BB1	20 674 908	6 180 447 036	37.45	97.76	93.27
BB2	20 510 382	6 131 925 988	37.4	96.53	90.69
BB3	20 992 198	6 275 544 498	35.81	97.11	91.92
CC1	21 890 314	6 542 576 532	36.44	97.11	91.92
CC2	26 002 371	7 775 975 502	36.79	97.55	92.78
CC3	19 225 650	5 747 607 418	36.92	97.76	93.31
DD1	26 236 765	7 799 003 780	37.5	97.66	93.08
DD2	21 474 785	6 390 329 892	36.4	97.52	92.79
DD3	20 597 574	6 154 866 696	36.74	97.27	92.24

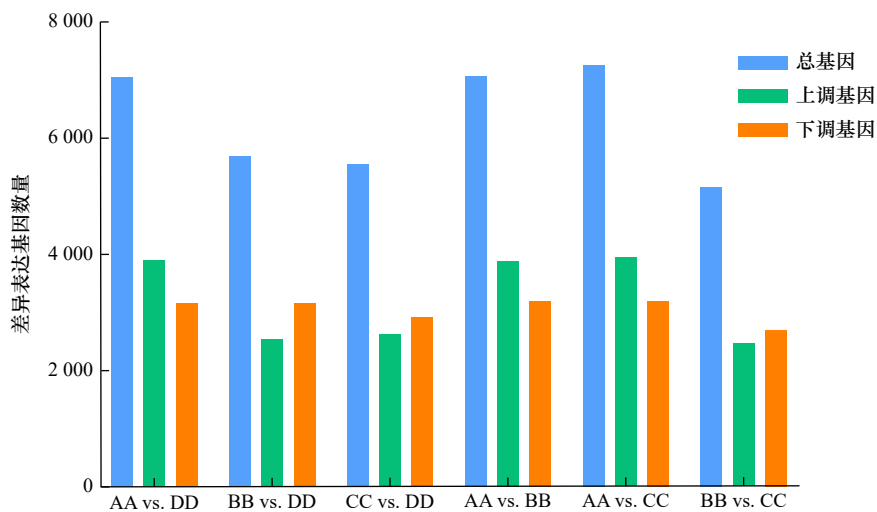


图6 差异表达基因数目统计

Fig. 6 Statistics of the number of differentially expressed genes

中 AA 组上调表达基因富集到 35 个 GO 条目中, 下调表达基因富集到 34 个 GO 条目中; BB vs. DD 组中 BB 组上调表达基因富集到 37 个 GO 条目中, 下调表达基因富集到 35 个 GO 条目中; CC vs. DD 组中 CC 组上调表达基因富集到 37 个 GO 条目中, 下调表达基因富集到 33 个 GO 条目中; AA vs. BB 组中 AA 组上调表达基因富集到 50 个 GO 条目中, 下调表达基因富集到 51 个 GO 条目中; AA vs. CC 组中 AA 组上调表达基因富集到 50 个 GO 条目中, 下调表达基因富集到 53 个 GO 条目中; BB vs. CC 组中 BB 组上调表达基因富集到 49 个 GO 条目中, 下调表达基因富集到 51 个 GO 条目中。选取每组前 20 个最显著富集的 GO 条目, 发现其生物学过程类别主要富集在 DNA 整合、包涵体组装的负调节和蛋白水解, 细胞组分类别主要富集在膜的组成部分、核糖体、细胞外区域和细胞外空间, 分子功能类别主要富集在 RNA 定向 DNA 聚合酶活性和内肽酶抑制剂活性 (表 2)。

3.7 差异表达基因 KEGG 信号通路富集分析

通过对各组 DEGs 的 KEGG 通路富集分析, 确定了蛤仔在酸化胁迫的过程中显著富集的代谢途径和信号转导途径, 在所有组中并未发现有显著富集的 KEGG 通路。在 AA vs. DD 组中 AA 组差异基因主要富集在吞噬体和核糖体等通路; 在 BB vs. DD 组中 BB 组差异基因主要富集在吞噬体、泛素介导的蛋白水解和 Notch 信号传导途径等通路中; 在 CC vs. DD 组中 CC 组主要富集在泛素介导的蛋白水解等通路; AA vs. BB 组中 AA 组差异基因主要富集在泛素

介导的蛋白水解和内质网中的蛋白加工等通路; AA vs. CC 组中 AA 组差异基因主要富集在核糖体等通路; BB vs. CC 组中 BB 组差异基因主要富集在吞噬体、核糖体和泛素介导的蛋白水解等通路 (表 3)。

3.8 实时荧光定量 PCR 分析

为证明转录组测序结果的准确性, 随机选取 24 个 DEGs 使用 qPCR 方法对测序结果进行验证。结果表明: 运用 2^{-ΔΔCt} 方法对不同组中的 DEGs 进行相对表达水平定量分析, qPCR 与 RNA-seq 获得的差异基因表达量趋势一致 (图 7)。以上结果说明, qPCR 验证结果与转录组测序结果一致, 本次转录组测序结果可信度高。

4 讨论

4.1 海水酸化对菲律宾蛤仔组织的影响

鳃是贝类的呼吸和摄食器官, 本研究通过组织学观察发现, 经过 42 d 海水酸化胁迫后, 蛤仔鳃丝间距扩大、鳃丝弯曲, 严重的还导致鳃丝断裂。宋晓楠等^[13]研究盐度骤降对蛤仔胁迫时发现蛤仔鳃丝间连接被破坏, 鳃表面无法形成褶皱; 梁健等^[14]研究海洋酸化对缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 的影响发现, 鳃组织表现出鳃丝间隔扩大, 鳃丝纤毛变短等问题。海水酸化会影响蛤仔鳃丝和纤毛的变化从而造成对摄食的影响。外套膜是贝类背侧一部分皮肤褶皱形成, 起到保护内脏器官、分泌贝壳成分、辅助呼吸和形成外套腔的作用。一般情况下外套膜外表皮平整, 能更好地包裹器官, 在本研究中随着酸化的加深, 蛤仔外表皮褶皱明显, 出现脱离现象, 周瑶等^[15]对皱纹冠蚌

表 2 差异表达基因 GO 功能富集

Table 2 GO functional enrichment of differentially expressed genes

差异表达基因类型	GO 条目	p 值					
		AA vs. DD	BB vs. DD	CC vs. DD	AA vs. BB	AA vs. CC	BB vs. CC
上调基因	DNA 整合	1.48 × 10 ⁻⁵	1.61 × 10 ⁻¹⁰	1.84 × 10 ⁻⁴	3.79 × 10 ⁻⁵	5.59 × 10 ⁻⁵	5.03 × 10 ⁻⁹
	膜的组成部分	1.85 × 10 ⁻²	5.85 × 10 ⁻⁴	0.43	1.13 × 10 ⁻²	5.07 × 10 ⁻⁴	1.04 × 10 ⁻²
	核糖体	5.99 × 10 ⁻⁵	0.92	1.37 × 10 ⁻²	1.49 × 10 ⁻²	1.54 × 10 ⁻⁴	0.14
	RNA 定向 DNA 聚合酶活性	0.59	1.24 × 10 ⁻²	1.17 × 10 ⁻⁴	1.93 × 10 ⁻⁵	7.16 × 10 ⁻²	1.52 × 10 ⁻⁴
下调基因	包涵体组装的负调节	4.74 × 10 ⁻⁵	0.70	0.34	4.79 × 10 ⁻⁵	3.45 × 10 ⁻⁴	0.68
	蛋白水解	5.32 × 10 ⁻⁵	3.70 × 10 ⁻⁷	6.20 × 10 ⁻⁶	2.48 × 10 ⁻²	5.14 × 10 ⁻²	9.56 × 10 ⁻²
	细胞外区域	1.61 × 10 ⁻¹¹	8.53 × 10 ⁻¹²	1.83 × 10 ⁻⁴	2.79 × 10 ⁻¹²	4.18 × 10 ⁻¹⁴	1.55 × 10 ⁻⁹
	细胞外空间	1.56 × 10 ⁻⁸	1.57 × 10 ⁻⁵	2.52 × 10 ⁻²	5.41 × 10 ⁻⁷	1.36 × 10 ⁻⁵	2.79 × 10 ⁻⁴
	内肽酶抑制剂活性	2.06 × 10 ⁻⁷	7.27 × 10 ⁻⁸	1.16 × 10 ⁻⁷	6.57 × 10 ⁻²	0.29	2.26 × 10 ⁻³

表 3 差异表达基因 KEGG 信号通路富集
Table 3 KEGG pathways enriched for differentially expressed genes

差异表达基因类型	通路名称	基因数目					
		AA vs. DD	BB vs. DD	CC vs. DD	AA vs. BB	AA vs. CC	BB vs. CC
上调基因	真核生物中的核糖体生物发生	41	6	1	33	45	6
	核糖体	85	25	42	57	76	33
	Notch信号传导途径通路	18	21	15	17	15	15
	NOD-like受体信号通路	13	16	13	17	19	15
	泛素介导的蛋白水解	32	21	20	44	43	26
下调基因	吞噬体	41	25	20	42	35	20
	内质网中的蛋白加工	12	7	8	21	14	2
	细胞外基质受体作用	17	16	10	23	16	8
	C-型凝集素受体信号通路	14	7	9	13	19	14

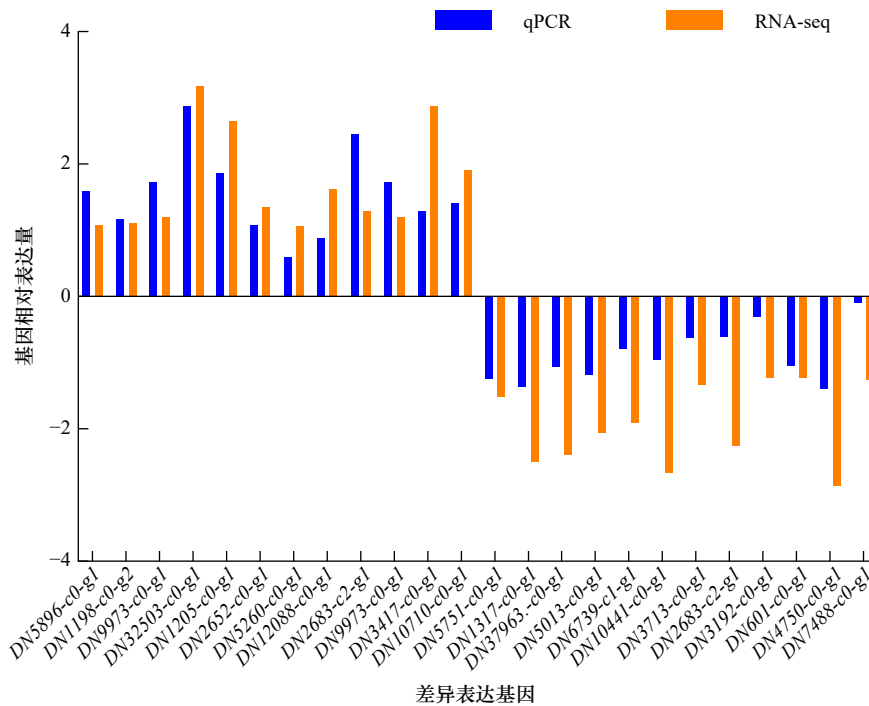


图 7 差异基因 qPCR 和 RNA-seq 验证

Fig. 7 The qPCR and RNA-seq validation of differentially expressed genes

(*Cristaria plicata*) 的研究发现, 煤矸石使褶纹冠蚌外套膜外表皮出现组织间空泡和肌纤维的变化, 严重影响了外套膜的作用。

4.2 海水酸化胁迫对菲律宾蛤仔酶活性的影响

ACP、AKP 和 LZM 是溶酶体参与体液免疫的水解酶^[16]。本研究中 ACP 活性呈先降后升的趋势, 郑萍萍等^[17] 研究发现低盐胁迫下锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 血清中 ACP 活性也呈相同趋势, 推测酸化胁迫下蛤仔组织产生损伤致使 ACP 活性降低, 而随着对酸化

条件的适应, AKP 活性升高。鳃组织 AKP 活性呈不同的变化趋势, 但极端酸化中 AKP 活性持续上升, 房子恒等^[18] 研究发现淡水至盐度 20 范围内, 半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 幼鱼肝脏中 AKP 活性随盐度升高而升高, AKP 活性升高可能是为了提高膜运输能力来维持内环境稳定^[19]。刘璐等^[20] 研究发现, 随酸化时间的延长, 拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 血清中 AKP 活性呈先升后降的趋势, 本文内脏团中 AKP 的变化趋势与其相似, 推测酸化胁迫前期蛤仔的免疫

系统被激活, AKP 活性升高来应对机体对能量的需求, 后期 AKP 活性降低是组织适应了环境变化不再需要额外的调控^[21]。鳃组织 LZM 活性趋势为先升后降, 后期可能是随着胁迫时间延长, 蛤仔体内多种生理功能紊乱, 降低了自身的免疫力^[22], 导致 LZM 活性下降, 本研究对鳃组织的研究结果与姜令绪等^[23]的研究结果相似。

鳃组织中 SOD 活性趋势为先降后升, 水体 pH 下降导致机体内的 H⁺ 升高, 破坏机体内的活性氧平衡使 SOD 活性下降^[24]。在内脏团中 SOD 活性趋势为先升后降, 猜测水体环境变化使机体内活性氧突增, 蛤仔通过提高 SOD 活性抵御活性氧的增多^[25]。pH 对日本三角涡虫 (*Dugesia japonica*) 影响的研究发现, pH 在 6.5~7.5 之间 SOD 活性变化与本研究相似^[26]。CAT 活性变化总体先升后降, 本文研究结果与李晨辉等^[27]研究结果相似。CAT 活性决定了体内 O₂ 的产生速率^[28], 推测前期蛤仔在酸化条件下对能量代谢的需求较高, 需加大 O₂ 的利用率, 后期活性降低可能是机体对能量的分配完成不再需要大量的 O₂。鳃组织中 GSH-Px 活性趋势为持续上升, 与 Tiedke 等^[29]研究酸化胁迫对斑马鱼 (*Danio rerio*) 鳃影响结果一致, GSH-Px 活性上升是为了加快对过氧化物的清除, 减少细胞在不良环境下的损伤^[30-31]。

4.3 海水酸化胁迫对菲律宾蛤仔鳃组织基因通路的影响

通过 GO 富集分析显示, 上调基因主要富集在 DNA 整合、膜组分、蛋白活性和与凋亡相关酶活性等相关的条目中。上调基因富集在膜的组成部分可能会提高膜的通透性, 对某些离子的吸收产生影响, 引起蛤仔机体的渗透压改变。凋亡与维持内环境稳定和多个系统的发育有着密切的关系, 在极端环境下细胞受到损伤, 而细胞损伤会启动与凋亡相关的基因上调, 可能是鳃组织在维持细胞的内环境稳定, 不使机体受到损伤。下调基因主要富集在包涵体的组装调节、细胞外基质反应和代谢相关的条目中。下调基因富集在包涵体的组装过程中, 对包涵体的组装产生了抑制作用, 有利于蛋白的表达, Villar-Piqué 和 Ventura^[32]的研究发现蛋白质聚集会引发疾病, 所以抑制包涵体的组装有利于机体健康。细胞外基质是由细胞周围的大分子组成的复杂网络, 在组织细胞的结构和功能上起到了重要的作用, 本研究下调基因富集在细胞外基质, 原因可能是酸化胁迫对蛤仔鳃组织细胞的代谢活动产生负面影响^[33], 与之不同, Wang 等^[34]的研究发现海水酸化会使鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 幼鱼鳃组

织中与代谢途径相关基因上调。

通过 KEGG 富集分析显示, 富集到上调基因数目较多的 KEGG 通路为: 核糖体、Notch 信号通路、NOD-like 受体信号通路和泛素介导的蛋白水解等, 下调基因主要富集到: 吞噬体、细胞外基质受体作用和 C-型凝集素受体 (CLRs) 信号通路等。酸化胁迫下与核糖体相关的通路富集表达, 机体需要合成大量的蛋白质以维持各类生理机能来适应酸化条件^[35], 与本研究相同的是, 在低氧胁迫下斑马鱼鳃组织中核糖体蛋白基因显著上调^[36]。Notch 信号通路通过相邻细胞间的“对接”来调节细胞分化、增殖、凋亡等细胞行为^[37], Notch 信号通路相关基因上调说明在外界环境变化时会通过调节此信号通路以维持组织的稳定。细胞内 NOD-like 受体能使机体受到病原体侵入或处于极端环境时启动炎症反应或免疫应答^[38], 本研究中 NOD-like 受体信号通路富集基因上调表达, 与 Johnson 和 Hofmann^[39]的研究结果相似。泛素-蛋白酶体途径能降解机体因刺激产生的异常蛋白质^[40], 本研究中泛素介导的蛋白水解通路上调, 说明鳃组织在积极适应环境的变化, 维持体内内环境的稳态^[41-42]。细胞外基质 (Extra Cellular Matrix, ECM) 指的是组织中细胞以外的部分, 在他人研究中发现 ECM 与免疫细胞相互依赖^[43], ECM 能调节免疫细胞的生存和功能, 而本研究中的 ECM 基因下调, 可能会导致免疫反应的减弱。CLRs 可以被自身损伤信号激活, CLRs 与其各自的配体结合后能够导致几种细胞反应和炎症反应的启动^[44], CLRs 在机体的免疫反应和对外界病原的侵袭中起到重要作用, 而在本研究中 CLRs 基因下调表达, 可能是机体受到酸化损伤导致。在抗氧化相关通路中, 酸化下调了 CAT 基因表达量, 上调了 SOD、过氧化物氧化还原蛋白 6 (Prdx6) 基因表达量。Prdx6 在抗氧化防御 (基于其减少过氧化膜磷脂的能力) 和磷脂稳态 (基于其产生溶血磷脂底物以重塑磷脂合成途径的能力) 中具有重要作用, 能使谷胱甘肽 (GSH) 含量上升增加鳃组织的抗氧化作用。磷酸肌醇-3-激酶 (PI3K) 调节亚基 p85 和催化亚基 p110 构成二聚体, PI3K 一般与 AKT 组成信号通路激活相关的免疫通路。本研究结果显示, 酸化使 PI3K 基因表达量下调, 由此影响 NF- κ B 通路, 使鳃组织免疫能力下降。通过对鳃组织转录组的分析发现酸化下调了 CAT、PI3K 基因表达, 上调了 SOD、Prdx6 基因表达, 提高了 SOD 活性和 GSH 含量, 降低了 CAT 和免疫酶活性。综上所述, 机体能够通过调节相关基因的表达来适应水环境 pH 的变化。

5 结论

经过 42 d 酸化胁迫后, 菲律宾蛤仔鳃组织出现不同程度的损伤, 随着酸化程度的加深损伤也逐渐严重。在酸化胁迫下, 菲律宾蛤仔的免疫和抗氧化酶活

性都受到了不同程度的刺激, 随着酸化时间加长, 代谢水平被打破, 机体内的离子交换平衡紊乱, 进一步使免疫系统受损, 最终可能会导致蛤仔死亡。通过 GO 功能分类和 KEGG 信号通路分析筛选到的相关通路大部分与免疫相关。

参考文献:

- [1] Sabine C L, Feely R A, Gruber N, et al. The oceanic sink for anthropogenic CO₂[J]. *Science*, 2004, 305(5682): 367–371.
- [2] 石莉, 桂静, 吴克勤. 海洋酸化及国际研究动态 [J]. *海洋科学进展*, 2011, 29(1): 122–128.
Shi Li, Gui Jing, Wu Keqin. Developments in international studies on ocean acidification[J]. *Advances in Marine Science*, 2011, 29(1): 122–128.
- [3] Orr J C, Fabry V J, Aumont O, et al. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms[J]. *Nature*, 2005, 437(7059): 681–686.
- [4] Caldeira K, Wickett M E. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean[J]. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 2005, 110(C9): C09S04.
- [5] 常亚青. 贝类增殖学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
Chang Yaqing. *Science of Shellfish Cultivation*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007.
- [6] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2022 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2022.
Fisheries and Fisheries Administration Bureau of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2022 China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022.
- [7] Gazeau F, Quiblier C, Jansen J M, et al. Impact of elevated CO₂ on shellfish calcification[J]. *Geophysical Research Letters*, 2007, 34(7): L07603.
- [8] Talmage S C, Gobler C J. Effects of past, present, and future ocean carbon dioxide concentrations on the growth and survival of larval shellfish[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(40): 17246–17251.
- [9] Bibby R, Widdicombe S, Parry H, et al. Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis*[J]. *Aquatic Biology*, 2008, 2(1): 67–74.
- [10] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550.
- [11] Yu Guangchuan, Wang Ligen, Han Yanyan, et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 2012, 16(5): 284–287.
- [12] 徐宏超, 邢荣莲, 李源美, 等. 氨氮胁迫下菲律宾蛤仔胰腺内参基因的筛选 [J]. *生态毒理学报*, 2021, 16(3): 218–226.
Xu Hongchao, Xing Ronglian, Li Yuanmei, et al. Screening of reference genes in hepatopancreas of clam *Ruditapes philippinarum* exposed to ammonia nitrogen[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2021, 16(3): 218–226.
- [13] 宋晓楠, 马峻峰, 秦艳杰, 等. 盐度骤降对菲律宾蛤仔抗氧化酶活力及组织结构的影响 [J]. *农学学报*, 2013, 3(1): 50–56, 70.
Song Xiaonan, Ma Junfeng, Qin Yanjie, et al. Effects of abrupt decline in salinity on the antioxidant enzyme activities and histological structure in *Ruditapes philippinarum*[J]. *Journal of Agriculture*, 2013, 3(1): 50–56, 70.
- [14] 梁健, 朱飞霞, 刘宇航, 等. 海洋酸化对缢蛏鳃组织结构的影响 [J]. *经济动物学报*, 2022, 26(4): 299–303.
Liang Jian, Zhu Feixia, Liu Yuhang, et al. Effects of ocean acidification on gill structure of razor clams *Simonovacula constricta*[J]. *Journal of Economic Animal*, 2022, 26(4): 299–303.
- [15] 周瑶, 刘丽丹, 孙庆业. 煤矸石对褶纹冠蚌斧足和外套膜重金属含量及组织结构的影响 [J]. *西南农业学报*, 2022, 35(1): 250–256.
Zhou Yao, Liu Lidan, Sun Qingye. Effects of coal gangue on heavy metal content and tissue structure of foot and mantellum of *Cristaria plicata*[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 35(1): 250–256.
- [16] 孙虎山, 李光友. 脂多糖对栉孔扇贝血清和血细胞中 7 种酶活力的影响 [J]. *海洋科学*, 1999, 23(4): 54–58.
Sun Hushan, Li Guangyou. Effects of lipopolysaccharide on enzymes in serum and haemocytes of *Chlamys farreri*[J]. *Marine Sciences*, 1999, 23(4): 54–58.
- [17] 郑萍萍, 王春琳, 宋微微, 等. 盐度胁迫对三疣梭子蟹血清非特异性免疫因子的影响 [J]. *水产科学*, 2010, 29(11): 634–638.
Zheng Pingping, Wang Chunlin, Song Weiwei, et al. Effect of salinity stress on serum non-specific immune factors in swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. *Fisheries Science*, 2010, 29(11): 634–638.
- [18] 房子恒, 田相利, 董双林, 等. 不同盐度下半滑舌鳎幼鱼非特异性免疫酶活力分析 [J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2014, 44(5): 46–53.
Fang Ziheng, Tian Xiangli, Dong Shuanglin, et al. Analysis of the activity of non-specific immune enzymes of juvenile tongue soles cultured in various salinities[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2014, 44(5): 46–53.
- [19] 谢莉萍, 林静瑜, 肖锐, 等. 合浦珠母贝碱性磷酸酶的分离纯化与性质研究 [J]. *海洋科学*, 2000, 24(10): 37–40.

- Xie Liping, Lin Jingyu, Xiao Rui, et al. Purification and characterization of alkaline phosphatase from *Pinctada fucata*[J]. *Marine Sciences*, 2000, 24(10): 37–40.
- [20] 刘璐, 杨玉娇, 王国良. pH 突变对拟穴青蟹免疫因子的胁迫影响 [J]. 宁波大学学报 (理工版), 2009, 22(4): 484–489.
Liu Lu, Yang Yujiao, Wang Guoliang. Effect of sudden changes in pH on the immune factors of *Scylla paramamosain*[J]. *Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition)*, 2009, 22(4): 484–489.
- [21] 刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用 [J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 278–283.
Liu Shuqing, Jiang Xiaolu, Mou Haijin, et al. Effects of immunopolysaccharide on LSZ, ALP, ACP and POD activities of *Penaeus chinensis* serum[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, 30(3): 278–283.
- [22] 赵丹, 周丽青, 吴彪, 等. 魁蚶各组织溶菌酶活性对鳃弧菌感染的响应 [J]. 水产学报, 2020, 44(3): 480–486.
Zhao Dan, Zhou Liqing, Wu Biao, et al. Response of lysozyme activity to *Vibrio anguillarum* infection in different tissues of *Scapharca broughtonii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(3): 480–486.
- [23] 姜令绪, 潘鲁青, 肖国强. 氨氮对凡纳对虾免疫指标的影响 [J]. 中国水产科学, 2004, 11(6): 537–541.
Jiang Lingxu, Pan Luqing, Xiao Guoqiang. Effects of ammonia-N on immune parameters of white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(6): 537–541.
- [24] 孙敬锋, 吴信忠. 贝类血细胞及其免疫功能研究进展 [J]. 水生生物学报, 2006, 30(5): 601–607.
Sun Jingfeng, Wu Xinzong. The progress of studies on molluscan hemocyte and its immunological function[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(5): 601–607.
- [25] 樊甄姣, 杨爱国, 刘志鸿, 等. pH 对栉孔扇贝体内几种免疫因子的影响 [J]. 中国水产科学, 2006, 13(4): 650–654.
Fan Zhenjiao, Yang Aiguo, Liu Zhihong, et al. Effect of pH on the immune factors of *Chlamys farreri*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(4): 650–654.
- [26] 潘红春, 范杰, 王芳芳, 等. pH 值对日本三角涡虫种群增长、无性生殖及 6 种酶活力的影响 [J]. 水生生物学报, 2008, 32(3): 339–344.
Pan Hongchun, Fan Jie, Wang Fangfang, et al. Effect of medium pH on population growth, asexual reproduction and activity of six enzymes of *Dugesia japonica*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(3): 339–344.
- [27] 李晨辉, 王梦杰, 彭艳青, 等. 海洋酸化对脊尾白虾抗氧化酶活性的影响 [J]. 淮海工学院学报 (自然科学版), 2018, 27(4): 78–83.
Li Chenhui, Wang Mengjie, Peng Yanqing, et al. Effect of ocean acidification on activities of antioxidant enzyme in *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Journal of Jiangsu Ocean University (Natural Science Edition)*, 2018, 27(4): 78–83.
- [28] Gaetani G F, Ferraris A M, Rolfo M, et al. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes[J]. *Blood*, 1996, 87(4): 1595–1599.
- [29] Tiedke J, Cubuk C, Burmester T. Environmental acidification triggers oxidative stress and enhances globin expression in zebrafish gills[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 441(3): 624–629.
- [30] Apel K, Hirt H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 373–399.
- [31] Warner H R. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1994, 17(3): 249–258.
- [32] Villar-Piqué A, Ventura S. Protein aggregation propensity is a crucial determinant of intracellular inclusion formation and quality control degradation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2013, 1833(12): 2714–2724.
- [33] Theocharis A D, Skandalis S S, Gialeli C, et al. Extracellular matrix structure[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 97: 4–27.
- [34] Wang Le, Sun Fei, Wen Yanfei, et al. Effects of ocean acidification on transcriptomes in Asian seabass juveniles[J]. *Marine Biotechnology*, 2021, 23(3): 445–455.
- [35] 周岳华, 黄勇, 翟玲, 等. 真核生物核糖体和 mRNA 翻译的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(24): 11946–11948.
Zhou Yuehua, Huang Yong, Zhai Ling, et al. Research progress in eukaryotic ribosome and mRNA translation[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(24): 11946–11948.
- [36] 贾若南, 林枫, 许强华. 低氧胁迫下斑马鱼鳃中核糖体蛋白基因家族的表达分析 [J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31(2): 318–327.
Jia Ruonan, Lin Feng, Xu Qianghua. Differential expression analysis of the ribosomal protein gene family in zebrafish gills under hypoxia stress[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, 31(2): 318–327.
- [37] Henrique D, Schweisguth F. Mechanisms of Notch signaling: a simple logic deployed in time and space[J]. *Development*, 2019, 146(3): dev172148.
- [38] Zheng Chunfu. The emerging roles of NOD-like receptors in antiviral innate immune signaling pathways[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 169: 407–413.
- [39] Johnson K M, Hofmann G E. A transcriptome resource for the Antarctic pteropod *Limacina helicina antarctica*[J]. *Marine Genomics*, 2016, 28: 25–28.
- [40] 刘俊文, 杨向东. 泛素-蛋白酶体途径介导的细胞周期调节蛋白的水解 [J]. 国外医学·老年医学分册, 2005, 26(1): 30–34.
Liu Junwen, Yang Xiangdong. Ubiquitin-proteasome pathway mediated hydrolysis of cell cycle regulatory proteins[J]. *International Journal of Geriatrics*, 2005, 26(1): 30–34.
- [41] Zhang Dongsheng, Yu Mengchao, Hu Peng, et al. Genetic adaptation of Schizothoracine fish to the phased uplifting of the Qinghai-

- Tibetan Plateau[J]. *G3-Genes Genomes Genetics*, 2017, 7(4): 1267–1276.
- [42] Todgham A E, Crombie T A, Hofmann G E. The effect of temperature adaptation on the ubiquitin-proteasome pathway in notothenioid fishes[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2017, 220(3): 369–378.
- [43] Sutherland T E, Dyer D P, Allen J E. The extracellular matrix and the immune system: a mutually dependent relationship[J]. *Science*, 2023, 379(6633): eabp8964.
- [44] Hatinguais R, Willment J A, Brown G D. C-type lectin receptors in antifungal immunity: current knowledge and future developments[J]. *Parasite Immunology*, 2023, 45(2): e12951.

Effects of CO₂-driven seawater acidification on tissue, immune and antioxidant enzyme activity and transcription levels of *Ruditapes philippinarum*

Lin Yi^{1,2}, Chen Qiang^{1,2}, Zhou Sishun^{1,2}, Kong Lumin^{1,2}, Huang Zhangfan^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Marine Fishery Resources and Eco-environment, Xiamen 361021, China)

Abstract: The ocean acidification effect is increasing with the large amount of CO₂ emissions. To investigate the effects of future seawater acidification on *Ruditapes philippinarum*, a control group (pH = 8.1) and acidification group (pH = 7.7, 7.1 and 6.4) were set up for 42 days. The changes in tissue structure, immune and antioxidant enzyme activities of *Ruditapes philippinarum* under acidification conditions were measured, as well as the effects produced at the molecular level. The results show that when *Ruditapes philippinarum* are placed in an acidified seawater environment, gill filament spacing expands with decreasing pH, gill filament cilia adhere, and the pipes and outer epidermal folds of the mantle gradually deepen. The activities of acid phosphatase (ACP) and superoxide dismutase (SOD) in gill tissues show a pattern of decreasing followed by increasing. Alkaline phosphatase (AKP) activities exhibit different trends in each group. Total antioxidant capacity (T-AOC), catalase (CAT), and lysozyme (LZM) activities show a pattern of increasing followed by decreasing. Glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in gill and visceral masses show a continuous increase. LZM activity in the viscera group displays varying trends, while ACP activity shows a decreasing and then increasing pattern. AKP, SOD, and CAT activities exhibited an increasing and then decreasing pattern, while T-AOC activity shows a continuous decrease. Analysis of the transcriptome reveals that the GO functions in gill tissue are mainly enriched in DNA integration, integral components of the membrane, and RNA-directed DNA polymerase activity, among others. The KEGG pathway analysis shows enrichment in the phagosome pathway and pathways related to protein processing in the endoplasmic reticulum. The acidification of seawater caused varying degrees of damage to the tissues of *Ruditapes philippinarum*, disrupting its internal environmental homeostasis and altering metabolic levels and immune-related gene expression, and led to an increased risk of disease and even death in *Ruditapes philippinarum*.

Key words: carbon dioxide; *Ruditapes philippinarum*; immunity; antioxidant; transcript levels