

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897-20150208001

蒋玫, 李磊, 沈新强, 等. 苯并[a]芘和非对缢蛏血细胞 DNA 损伤的研究[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(3): 281-287

Jiang M, Li L, Shen X Q, et al. Effects of benzo[a]pyrene and phenanthrene on DNA damage of hemolymph Cell in *Sinonovacula constricta* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(3): 281-287 (in Chinese)

苯并[a]芘和菲对缢蛏血细胞 DNA 损伤的研究

蒋玫^{1,*}, 李磊¹, 沈新强¹, 许高鹏², 杨杰青²

1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090

2. 上海海洋大学, 上海, 203360

收稿日期: 2015-02-08 录用日期: 2015-03-08

摘要: 为研究苯并[a]芘和菲对缢蛏的毒性效应, 将缢蛏(*Sinonovacula constricta*) 分别暴露于浓度为 0.45 mg·L⁻¹、0.15 mg·L⁻¹、0.05 mg·L⁻¹ 苯并[a]芘溶液和 0.45 mg·L⁻¹、0.15 mg·L⁻¹、0.05 mg·L⁻¹ 菲的溶液中, 采用单细胞凝胶电泳实验(彗星实验)技术检测不同暴露时间缢蛏血淋巴细胞的 DNA 损伤程度, 对照组为清洁海水。结果显示, 高浓度(0.45 mg·L⁻¹) 苯并[a]芘溶液和(0.45 mg·L⁻¹) 菲溶液在短期(7 d) 内即可导致缢蛏血细胞显著的 DNA 损伤, 并且随苯并[a]芘和菲浓度的增大和暴露时间的延长, DNA 损伤程度增加。21 d 恢复实验后, 各浓度组 DNA 损伤又均有不同程度的恢复, 但中高浓度组(0.45 mg·L⁻¹ 和 0.15 mg·L⁻¹) 与对照组仍显著性差异。两种多环芳烃物质对缢蛏血细胞的 DNA 损伤作用均存在较显著时间-剂量-效应关系。其中, 苯并[a]芘对缢蛏血细胞的 DNA 损伤作用要高于菲。

关键词: 苯并[a]芘和菲; 缢蛏; 血细胞; DNA 损伤; 单细胞凝胶电泳; 彗星实验

文章编号: 1673-5897(2015)3-281-07 中图分类号: X820.4 文献标识码: A

Effects of Benzo[a]pyrene and Phenanthrene on DNA Damage of Hemolymph Cell in *Sinonovacula constricta*

Jiang Mei^{1,*}, Li Lei¹, Shen Xinqiang¹, Xu Gaopeng², Yang Jie qing²

1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China

2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Received 8 February 2015 accepted 8 March 2015

Abstract: The paper reported the DNA damage effect of Benzo[a]pyrene(BaP) and phenanthrene (PHE) on the calm *Sinonovacula constricta* under different concentration conditions with the single cell microgel electrophoresis (SCGE) technique. The calm were treated with concentrations (BaP: 0.45, 0.15, 0.05 mg·L⁻¹ and PHE: 0.45, 0.15, 0.05 mg·L⁻¹) in control group was 0.00 mg·L⁻¹ for 15 days and were removed pollution for 6 days. The result showed the tail DNA percentage (DNA%) and TL/D of the 0.45 mg·L⁻¹ groups were significantly different from the control group ($P < 0.05$) after 7 days exposure period. Furthermore, the damage intensity of treated groups increased gradually with respect to the increasing of BaP and PHE. Under the same concentration, the tail DNA% and TL/D increased gradually with the time

基金项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费(2014A02XK01); 农业部应对溢油关键技术专项(2012-2014); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2014T06); 国家现代农业产业技术体系建设项目(CARS-48)

作者简介: 蒋玫(1973-), 女, 研究员, 研究方向为海洋生态环境和渔业生态学, E-mail: jiangrose73@163.com

of exposure. The DNA damage induced by BaP and PHE was very serious under the concentration of $0.45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. There was significant time-nd dose-dependent damage to the hemolymph cells. In addition, the toxic effect of BaP was much more than PHE. The comet assay was proven to be a useful tool for detecting DNA damage induced by PAH in marine hemolymph cells. DNA damage in hemolymph cells of could indicate the effects of BaP and PHE in marine environment as a good biomarker to be used in early warning and monitoring.

Keywords: benzo[a]pyrene and phenanthrene; *Sinonovacula constricta*; DNA damage; single cell gel electrophoresis (SCGE); Comet assay;

多环芳烃 (polycyclicaromatic hydrocarbons, PAHs) 是一类典型的疏水性有机污染物^[1], 主要来源于生物燃料和与化石燃料的不完全燃烧^[2-3]。多环芳烃广泛存在于环境介质中, 含量水平较低, 但是可通过大气、土壤、水、食物等多种途径进入人体并富集, 是诱导人类癌症的重要环境污染物质之一^[4-5]。其中苯并[a]芘 (Benzo[a] pyrene, BaP) 的致癌性是多环芳烃中最强的^[6]。由于 BaP 分布广泛, 性质稳定, 常被视为 PAHs 研究的指示物^[7]。菲 (phenanthrene, PHE) 是一种具有三个苯环的, 低分子量的最简单化学结构的多环芳经, 对水生生物也有很大毒性, 菲在污染场地的浓度水平也较高^[8]。因而, 菲常用作模式化合物研究相关的科学问题^[9-10]。

双壳贝类由于分布广泛, 移动能力弱, 对污染物具有很强生物富集作用, 常被作为海区污染监测的指示生物^[11]。PAHs 污染物通过贝类摄入的水流进入鳃丝, 在经血淋巴循环到达各组织器官 (主要是消化盲囊); 贝类因代谢 PAHs 而产生大量的活性中间产物和活性氧类, 这些活性物质会对生物大分子和组织结构造成损伤, 影响细胞的微核率、肝脏功能和 DNA 修复能力^[12-13]。贝类细胞分子毒理学 (DNA 损伤) 对于解析污染物的致毒机理和毒性评定具有非常重要的意义。目前针对多环芳烃对水生生物 DNA 损伤的研究也开始逐渐得到关注^[14-17], 张晓勇等将马氏珠母贝暴露于苯并芘[a]中得出血淋巴细胞 DNA 受到一定的损伤, 血细胞的损伤程度随苯并芘[a]浓度增加而增加^[18], 但关于苯并[a]芘和菲对贝类的 DNA 损伤遗传毒性研究还相对较少。

彗星试验又名单细胞凝胶电泳 (SCGE) 被认为是一种简便、快速、敏感性高的 DNA 损伤与修复的检测技术^[14]。本研究以缢蛏为实验材料, 采用单细胞凝胶电泳实验 (彗星实验) 的方法检测了苯并[a]芘和菲胁迫对缢蛏血细胞的遗传损伤, 探讨了 DNA 损伤作为多环芳烃污染暴露生物标记的可行性, 同

时为贝类养殖环境毒理学研究和近岸海区 PAHs 的污染监测提供科学依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

实验用缢蛏取自启东市黄海滩涂公司缢蛏养殖区, 实验前暂养一周, 贝体平均壳长 (5.90 ± 0.31) cm, 壳宽为 (1.99 ± 0.11) cm, 体重 (14.60 ± 2.62) g。实验用水来自经过滤的天然海水, 盐度为 20~21, pH 为 8.10~8.40。

实验所用苯并[a]芘和菲为 Sigma 公司产品, 采用丙酮作为助溶剂溶解 BaP 和 PHE 配成储备液。海水中苯并[a]芘和菲浓度的测定采用气相色谱法^[19]。

1.2 实验方法

随机选取缢蛏分为 4 组, 对照组 (天然海水、低浓度组、中浓度组和高浓度组 (苯并芘[a]和菲溶液))。苯并[a]芘和菲的溶液实验浓度梯度分别为: $0.45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每集约 40 只缢蛏, 置于含 14 L 沙滤海水的玻璃箱 (容积 30 L) 中, 24 h 连续充氧, 实验期间水温为 $23.60 \sim 25.40$ °C。每日 100 % 换水一次, 更换相同浓度的实验液, 及时清除排泄物和活力不好的贝体, 贝类饵料为单独培养扁藻, 每天定时定量喂食二次, 藻液体积为 80 mL, 扁藻密度为 $2 \times 10^4 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。胁迫实验进行 15 d, 15 d 后将实验液全部换成清洁沙滤海水进行为期 6 d 的恢复实验。分别于实验开始后的第 0、3、7、15 d 和 21 d, 每个实验组采集 2 只贝类样品。选取活力好的缢蛏, 以洁净海水洗净外壳。先用 75 % 的酒精棉球消毒闭壳肌, 再用预先吸入已消毒的预冷抗凝剂 ($8.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸三钠、 $20.80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖、 $22.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $3.36 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2EDTA 、pH= 7.5) 的无菌注射器, 按抗凝剂: 血淋巴为 2:1 的比例由闭壳肌处抽取血淋巴, 在无菌的试管内用 5 mL PBS 将 $50 \mu\text{L}$ 血样稀释, 调节细胞浓度为 $1.4 \times 10^7 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$, 取此单细胞悬液 1 mL 加入灭菌 eppendorf 管, 放入冰盒内

备用。

1.3 彗星实验

彗星实验方法参照 Singh 等^[20]的实验方法并略加改进,应用细胞培养板板盖铺单层胶的彗星实验检测方式,对电泳条件进行了摸索。制片前用台酚蓝染色法测定细胞存活率。25 μL 受检细胞与 8 % 的 75 μL 低熔点琼脂糖(LMA)混合,铺于细胞培养板板盖的小圆凹槽中,每个样品平均加入 3 个圆凹槽中作为 3 个重复。待胶凝固后加入 4 $^{\circ}\text{C}$ 新配制细胞裂解液(2.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA、0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris、1% 肌氨酸钠、pH 10、1% 曲拉通 X-100、10 % 二甲亚砜),浸泡 2 h 之后用磷酸缓冲液(pH 7.0)浸洗 2 次,再置于有新配置的碱性电泳缓冲液(0.3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH > 13)的水平电泳槽中,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光解旋 20 min。调节电泳液面高度,在 300 mA、25 V 电压下电泳 5 min。然后用 pH 7.5、0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 浸洗 2 次,每次 10 min。加 50 μL 的 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EB 水溶液染色 30 min。置荧光显微镜下观察,拍照后进行分析。

1.4 数据处理

用 Scion Image Beta 4.0.2 图像软件进行分析计算出尾长、头长、尾长/头长、尾矩、尾 DNA 含量(Tail DNA%)等项 DNA 损伤指标。Tail DNA% 是国际上普遍采用的评价指标,不受单位影响,因此本实验利用它作为 DNA 损伤的评价指标。以彗尾长度/核直径(TL/D)值衡量损伤程度,比值小于 0.3 为 1 级损伤或轻微损伤,0.3~0.6 为 2 级损伤或中级损伤,0.6 以上为 3 级损伤或严重损伤^[21]。用 SPSS 9.0 对数据处理分析,用单因素方差分析进行显著性检验, q 检验进行两两比较。

2 结果(Results)

2.1 DNA 损伤指标的统计

随着处理时间的延长,各浓度苯并[a]芘和非处理组血细胞彗尾核 DNA 百分率均呈持续上升的趋势,比较各浓度染毒组与对照组发现(图 1 和图 2):实验初期第 3 天,各浓度组尾核 DNA 百分率均与对照组无显著差异,到了实验第 7 天后,至染毒时间末期第 15 天,中、高浓度组(0.15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.45 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)对血细胞 DNA 损伤效果显著($P<0.05$),低浓度组对 DNA 损伤均不显著。恢复试验期,各浓度组 DNA

百分率仍高于对照组,中、高浓度组与对照组依然差异性显著($P<0.05$)。

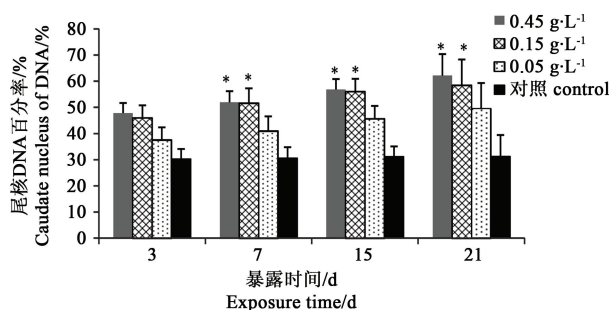


图1 苯并[a]芘处理组带彗尾核 DNA 百分率

注: * 为与对照组相比显著性差异 $P<0.05$

Fig. 1 Percentage of damaged DNA with tail treated by benzo[a]pyrene

Note: significant differences from control at the same sampling time are indicated with an asterisk at $P<0.05$

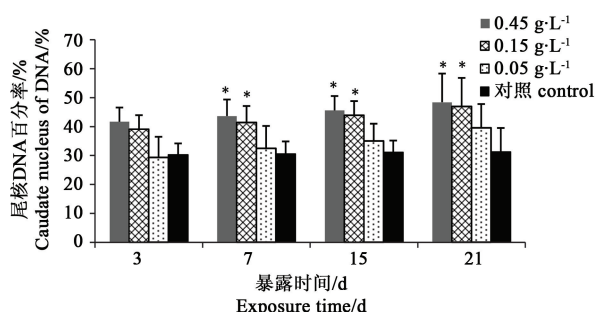


图2 菲处理组带彗尾核 DNA 百分率

注: * 为与对照组相比显著性差异 $P<0.05$

Fig. 2 Percentage of damaged DNA with tail treated by phenanthrene

Note: significant differences from control at the same sampling time are indicated with an asterisk at $P<0.05$

2.2 DNA 损伤程度

在苯并[a]芘和非染毒下的缙蛭血细胞 DNA 损伤程度来看(表 1),随着处理时间延长,3 d 时中、低浓度(0.15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)苯并[a]芘和非处理组 DNA 损伤程度以 2 级为主(均小于 0.6),高浓度组则以 3 级损伤为主(大于 0.6),损伤率超过 80%; 15 d 后除低浓度组外,其他各处理组 DNA 损伤程度呈现继续上升的趋势,造成 DNA 损伤严重级别(大于 0.6)。与对照组差异性显著($P<0.05$),21 d 恢复实验以后,各处理组 DNA 损伤程度均有所缓解,但中、高浓度组(0.15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.45 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)与对照组差异性仍十分显著($P<0.05$)。

表 1 处理受损 DNA 的 TL/D 值

Table 1 The TL/ D value of damaged DNA treated by benzo[a]pyrene and phenanthrene (n= 6)

组别 Item	PAH	3 d	7 d	15 d	21 d
对照组 control group		0.14±0.05	0.14±0.07	0.15±0.08	0.16±0.05
0.05 mg•L ⁻¹	苯并[a]芘 BaP	0.38±0.16	0.51±0.22	0.57±0.29	0.59±0.18
	菲 PHE	0.37±0.31	0.41±0.02	0.52±0.04	0.49±0.14
0.15 mg•L ⁻¹	苯并[a]芘 BaP	0.58±0.25	0.79±0.13 [*]	1.29±0.33 ^{* a}	1.08±0.28 ^{* c}
	菲 PHE	0.45±0.17	0.74±0.06 [*]	0.95±0.15 ^{* a}	0.64±0.14 ^{* c}
0.45 mg•L ⁻¹	苯并[a]芘 BaP	0.98±0.14	1.93±0.34 [*]	3.81±0.37 ^{* b}	3.12±0.178 ^{* d}
	菲 PHE	0.77±0.36	1.69±0.01 [*]	1.74±0.03 ^{* b}	1.13±0.06 ^{* d}

注: * 为与对照组相比显著性差异 $P<0.05$, a,b,c,d 分别为各纵列相比显著性差异 $P<0.05$ 。

Note: significant differences from control at the same sampling time are indicated with an asterisk at $P<0.05$, a, b, c, d for each column compared with the significant difference in $P<0.05$, respectively.

2.3 损伤检测指标间的相关性

损伤检测指标间的相关系数列于表 2。从表 2 可见,尾长、TDNA 含量、尾长/核直径(TL/D)各指标间的相关系数均有显著性($P<0.05$)。说明在本实验室条件下应用 Scion Image Beta 4.0.2 图像软件进行分析所得的尾长、TDNA 含量、尾长/核直径(TL/D)3 个指标值用来衡量血细胞 DNA 损伤具有较好的有效性。

表 2 彗星实验检测指标间的相关系数

Table 2 The correlation coefficients among comet assay indexes

PAH	TDNA/%	尾长 Tail length	TL/D
BaP	$R= 0.92 P<0.01$	$R= 0.83 P<0.05$	$R= 0.94 P<0.05$
PHE	$R= 0.91 P<0.01$	$R= 0.82 P<0.05$	$R= 0.94 P<0.05$

2.4 DNA 分子形态学的影响

在苯并[a]芘和菲染毒 15 d 后,缢蛭血细胞核 DNA 单细胞凝胶电泳结果如图 1 所示。图 1a 和图 1d 显示对照组的血细胞核大小比较均一,为圆形荧光团,荧光强度均匀,边缘光滑,无拖尾现象,表明细胞没有断裂。中浓度(0.15 mg•L⁻¹)组的苯并[a]芘和菲染毒后,断片离头部向阳极方向迁移,形成一个紧连荧光头部的尾部,缢蛭血细胞 DNA 发生断裂(图 1b 和图 1e)。高浓度组(0.45 mg•L⁻¹)的菲染毒后,出现一定数量的凋亡细胞,彗星头部很小,尾巴很大且偏圆,如同松鼠尾巴(图 1f)。高浓度组的苯并[a]芘染毒后,出现分散暗淡的尾部,损伤更为严重(图 1f)。

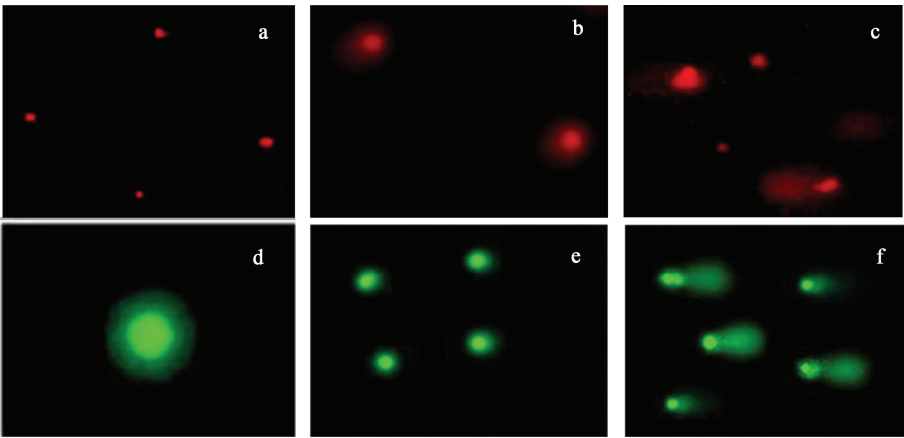


图 1 苯并芘[a]和菲暴露后第 15 天分别对缢蛭血细胞的 DNA 损伤作用

注: a. 对照组 b. BaP (0.15 μg•L⁻¹)染毒后 15 d c. BaP (0.45 μg•L⁻¹)染毒后 15 d
d. 对照组 e. PHE(0.15 μg•L⁻¹)染毒后 15 d f. PHE(0.45 μg•L⁻¹)染毒后 15 d

Fig. 1 The DNA damage of hemolymph cell exposed to benzo[a]pyrene and phenanthrene at the fifteenth day

Note: a. The DNA damage of hemolymph cell exposed to solvent control group; b. The DNA damage of hemolymph cell exposed to benzo[a]pyrene (0.15 μg•L⁻¹); c. The DNA damage of hemolymph cell exposed to benzo[a]pyrene (0.45 μg•L⁻¹); d. The DNA damage of hemolymph cell exposed to solvent control group; e. The DNA damage of hemolymph cell exposed to phenanthrene (0.15 μg•L⁻¹); f. The DNA damage of hemolymph cell exposed to phenanthrene (0.45 μg•L⁻¹)

3 讨论 (Discussion)

大量研究证明持久性有机污染物进入生物体内经过 I 相细胞色素 P450 酶系代谢转化为更具极性的代谢中间产物,这些代谢产物在 II 相代谢酶谷胱甘肽-S-转移酶等催化下与内源物质分子结合,加速了代谢产物排出体外的速度;另一方面在代谢过程中产生大量的自由基,可被体内抗氧化防御系统所清除同时,这些自由基和活性中间产物超过一定限度时,可分别与分子发生反应,产生氧化性损伤和生成加合物,最终导致 DNA 链断裂和损伤^[22-24]。

苯并[a]芘进入动物体后被转化成大量的代谢产物,其亲水性比苯并[a]芘更强^[25],而这些代谢产物在生物体内经过代谢后产生致癌性物质——苯并(a)芘二氢二醇(BPDE),它与 DNA 共价结合形成稳定的加合物,从而导致 DNA 损伤。国内学者针对苯并[a]芘对生物遗传物质 DNA 的影响做了广泛的研究。周海龙等以及 Liu 等^[26-27]的研究结果也显示,3 种典型持久性有机污染物(多氯联苯 Aroclor1254、苯并[a]芘和滴滴涕)对紫贻贝(*Mytilus edulis*)的鳃、性腺和消化腺各组织细胞以及栉孔扇贝血细胞的 DNA 损伤作用均存在明显的时间-效应和剂量-效应关系。PAHs 代谢过程中产生的活性氧自由基能攻击 DNA,导致 DNA 单链断裂或形成不稳定的无嘌呤的加合物^[28]。菲能通过降低细胞膜的稳定性和吞噬能力,继而对大海扇蛤(*Pecten maximus*)的遗传和免疫造成不利影响^[29]。Oliveria 等曾将金梭 *Liza aurata* 短期暴露于菲溶液中,发现菲溶液浓度由 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 提高到 $0.9 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时其对肝脏 DNA 的完整性显著低于对照组^[30]。本次实验亦发现经不同浓度的苯并[a]芘和菲溶液染毒下,缢蛏血细胞 DNA 受到了一定程度的链断裂损伤,其损伤效应表现出随苯并[a]芘和菲浓度的升高,损伤的细胞数量增多和损伤程度加重的现象(图 1~图 3)。从表 3 可见,实验第 3d,对照组的血细胞未检测到 DNA 损伤;而中低浓度处理组实验检测到 DNA 损伤程度集中在 2 级;高浓度处理组检测到 DNA 损伤程度则在 3 级以上,损伤率超过 80%;而且随着处理时间的延长,带彗尾核 DNA 百分率和 TL/D 值均呈上升趋势,DNA 损伤级别也逐步升高。王春光等报道的苯并[a]芘可对马氏珠母贝(*Pinctada martensi*)血细胞 DNA 的损伤效应也与本实验相一致^[14]。

DNA 损伤是评价环境毒物遗传毒性的一个重要参数。本研究中,随着苯并[a]芘和菲暴露时间的

增加,两种污染物在缢蛏体内逐渐累积,组织解毒代谢酶受到抑制,诱导大量自由基产生,同时代谢形成的极性化合物与 DNA 发生反应,导致 DNA 链断裂和损伤,从而引发遗传毒性。从图 3 和表 1 可见,缢蛏血细胞暴露于高浓度苯并[a]芘和菲溶液中 DNA 损伤严重,均表现出不可逆转的遗传毒性,而中浓度处理组虽启动了 DNA 损伤修复功能,但仍造成损伤效应,在实验恢复期(21 d),DNA 损伤性指标与对照组仍有显著差异。由此贝类 DNA 损伤可作为多环芳烃污染评价的毒性效应指标,亦作为海洋环境污染的潜在生物标志物。

此外,实验中也发现相同浓度作用下,苯并[a]芘和非对缢蛏血细胞 DNA 损伤效应趋势虽然相同,但相较而言,苯并[a]芘对缢蛏血细胞 DNA 链断裂更为明显(表 1),表明其对缢蛏血细胞的遗传毒性更显著。造成这种毒性的差异可能与两者之间的分子结构及毒性作用机制有一定关系,其机理还需待进一步验证和研究。

致谢:本实验得到了江苏省启东市金海岸水产研究所朱善央老师的大力支持和帮助。

参考文献 (References):

- [1] Menzie C A, Potocki B B, Santodonato J. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment [J]. *Environmental Science & Technology* 1992, 26: 1278—1284
- [2] 秦宁, 何伟, 孔祥臻, 等. 中国水生生态系统中多环芳烃的生态毒性与生态风险研究进展 [J]. *中国科技论文*, 2013, 8(12): 1209—1218
Qin N, He W, Kong X Z, et al. Research progress in ecotoxicity and eco-risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in China's aquatic ecosystems [J]. *China Science Paper*, 2013, 8(12): 1209—1218 (in Chinese)
- [3] 袁馨, 潘声旺, 陈勇, 等. 蚯蚓对土壤—植物系统中菲, 芘降解的强化效应研究 [J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(5): 904—911
Yuan X, Pan S W, Chen Y, et al. Enhancing effects of earthworms on the degradation of phenanthrene and pyrene in soil—plant system [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(5): 904—911 (in Chinese)
- [4] 杨涛. 菲、苯并(b)荧蒽胁迫对翡翠贻贝、红鳍笛鲷和紫红笛鲷的毒性效应 [M]. 上海海洋大学. 2011
Yang T. Effects of Phenanthrene, benzo[b]fluoranthene on *Perna Viridis*, *Lutjanus Erythropterus* and *Lutjanus Argenteimaculatus* [M]. Shanghai Ocean University, 2011 (in Chinese)

- [5] Zhang J, Yang J, Wang R, et al. Effects of pollution sources and soil properties on distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and risk assessment [J]. *Science of The Total Environment*, 2013, (463): 1–10
- [6] 岳敏, 谷学新, 邹洪. 多环芳烃的危害与防治[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2003, 24(3): 40–44
Yue M, Gu X X, Zhou H. The analysis quantitatively the grating diffraction of electron probability wave [J]. *Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition)*, 2003, 24(3): 40–44 (in Chinese)
- [7] 骆苑蓉, 胡忠, 郑天凌, 等. 红树林沉积物中的微生物对苯并[a]芘的降解研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2005, 44: 75–79
Luo F R, Hu Z, Zhen T L, et al. Biodegradation of benzo[a]pyrene by mangrove microbial consortium [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2005, 44: 75–79 (in Chinese)
- [8] Hwang S, Cutright T. Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil [J]. *Chemosphere*, 2002, 47: 891–899
- [9] Cheema S A, Imran Khan M, Shen C, et al. Degradation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by single and combined plants cultivation [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 177: 384–389
- [10] Khan M, Cheema S, Shen C, et al. Assessment of phenanthrene bioavailability in aged and imaged soils by mild extraction [J]. *Environment Monitoring and Assessment*, 2012, 184: 549–559
- [11] 苗晶晶, 潘鲁青, 王静. 苯并[a]芘对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)组织显微和超微结构的影响[J]. 环境科学学报, 2007, 27(9): 1497–1503
Miao J J, Pan L Q, Wang J. Effects of B[a]P on micro and ultrastructure of gill and digestive gland of *Chlamys farreri* [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(9): 1497–1503 (in Chinese)
- [12] Ching E W K, Siu W H L, Lam P K S, et al. DNA Adduct formation and DNA strand breaks in greenlipped mussels (*Perna viridis*) exposed to benzo[a]pyrene: Dose and time-dependent relationships [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2000, 42: 603–610
- [13] Deena M, Wassenberg E, Swails E, et al. Effects of single and combined exposures to benzo (a) pyrene and 3, 3', 4, 5-pentachlorobiphenyl on EROD activity and development in *Fundulus heteroclitus* [J]. *Marine Environmental Research*, 2002, 54: 279–283
- [14] 王春光, 李裕红, 林志勇, 等. 苯并[a]芘对真鲷(*Pagrosomus major*)血细胞 DNA 损伤的彗星实验研究[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(6): 1446–1449
Wang C G, Li Y H, Lin Z Y, et al. DNA Damage in blood cells of *Pagrosomus major* exposed to benzo[a]pyrene (BaP) by the comet assay [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(6): 1446–1449 (in Chinese)
- [15] 王晓艳, 蒋风华, 冯丽娟, 等. 石油烃对栉孔扇贝血淋巴细胞 DNA 损伤的初步研究[J]. 生态毒理学报, 2012, 7(3): 305–311
Wang X Y, Jiang F H, Fen L J, et al. Effect of petroleum hydrocarbons on DNA damage of hemolymph cells scallop *Chlamys farreri*: A preliminary research [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2012, 7(3): 305–311 (in Chinese)
- [16] Hamoutene D, Payne J F, Rahimtula A, et al. Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons [J]. *Marine Environmental Research*, 2002, 54(3–5): 471–474
- [17] 郁昂, 陈荣, 王重刚, 等. 柴油水溶性成分对僧帽牡蛎 DNA 损伤的初步研究[J]. 海洋科学, 2004, 28(11): 10–14
Yu A, Chen R, Wang C G, et al. DNA damage in oyster (*Ostrea cucullata*) exposed to water-soluble fraction of 0# diesel fuel [J]. *Marine Sciences*, 2004, 28(11): 10–14 (in Chinese)
- [18] 张先勇, 刁晓平, 杨宝, 等. 苯并[a]芘对马氏珠母贝血淋巴细胞 DNA 损伤的研究[J]. 生态环境学报, 2011, 20(6–7): 1107–1110
Zhang X Y, Diao X P, Yang B, et al. Effect of benzo[a]pyrene on DNA damage of hemolymph cells in *Pinctada martensi* [J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2011, 20(6–7): 1107–1110 (in Chinese)
- [19] 国家质量监督检验检疫总局. GB 17378–2007 海洋监测规范[S]. 北京, 2008
- [20] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. *Experimental Cell Research*, 1988, 175: 184–191
- [21] 张迎梅, 王叶菁, 虞闰六, 等. 重金属 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 对泥鳅 DNA 损伤的研究[J]. 水生生物学报, 2006, 30(4): 399–403
Zhang Y M, Wang Y J, Yu R L, et al. Effects of heavy metals Cd^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} on DNA damage of loach *Misgurnus anguillicandatus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(4): 399–403 (in Chinese)
- [22] Walker C H. Avian forms of cytochrome P450 [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1998, 106(52): 613–620
- [23] 朱琳, 钱芸, 刘广良, 等. 细胞色素 P450 酶系及其在毒理学上的应用[J]. 上海环境科学, 2001, 20(2): 88–91
Zhu L, Qian Y, Liu G L, et al. Cytochrome P450 enzyme

- family and its application to toxicology [J]. Shanghai Environmental Sciences, 2001, 20(2): 88—91 (in Chinese)
- [24] Goldstone J V, Goldstone H M. Cytochrome P450 genes in early deuterostomes (tunicates and sea urchins) and vertebrates (chicken and frog): Origin and diversification of the CYP1 gene family [J]. Molecular biology and evolution, 2007, 24(12): 2619—2631
- [25] Baumann P C, Harshbarger J C. Decline in liver neoplasms in wild brown bullhead catfish after Coking plant closes and environmental PAHs plummet [J]. Environmental Health perspectives, 1995, 103(2): 168—170
- [26] 周海龙, 张林宝, 曲莹, 等. 三种典型 POP 对紫贻贝不同组织损伤的比较研究[J]. 海洋科学, 2011, 35(2): 32—37
- Zhou H L, Zhang L B, Qu Y, et al. Comparative study of the DNA damage in three tissues of blue mussel (*Mytilus edulis*) after exposure to three typical POPs [J]. Marine Science, 2011, 35(2): 32—37 (in Chinese)
- [27] Liu J, Pan L Q, Zhang L, et al. Immune responses, ROS generation and the haemocyte damage of scallop *Chlamys farreri* exposed to Aroclor 1254 [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(3): 422—428
- [28] 蒋闰兰, 肖佰财, 禹娜, 等. 多环芳烃对水生动物毒性效应的研究进展[J]. 海洋渔业, 2014, 36(4): 372—384
- Jiang R L, Xiao B C, Yu N, et al. Research advance in toxic effects of PAHs on aquatic animals [J]. Marine Fisheries, 2014, 36(4): 372—384
- [29] Hannam M L, Bamber S D, Galloway T S, et al. Effects of the model PAH phenanthrene on immune function and oxidative stress in the haemolymph of the temperate scallop *Pecten maximus* [J]. Chemosphere, 2010, 78: 779—784
- [30] Olivera M, Pacheco M, Santos M A, et al. Cytochrome P4501A, genotoxic and stress responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following short-term exposure to phenanthrene [J]. Chemosphere, 2007, 66: 1287—1291
- ◆