# 海水酸化和甲基汞胁迫条件下文蛤免疫应答和生物矿化响应

杨建朋<sup>1,2</sup>,曹 亮<sup>1</sup>,董玉国<sup>3</sup>,刘金虎<sup>1</sup>,窦硕增<sup>1,2</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3.华能霞浦核电有限公司, 福建 宁德 355100)

摘要:海洋酸化背景下重金属对海洋生物的毒性效应是一个重要的生态毒理学研究问题。海洋酸化不 仅直接影响海洋贝类的生理过程,也通过改变重金属的存在形式和生物可利用性进而影响其生物毒 性。为研究海洋酸化背景下甲基汞(MeHg)对海洋贝类免疫和生物矿化的毒理效应,本研究将采集于野 外的文蛤(Meretrix petechialis)置于不同 pH 水平(二氧化碳分压; pH 8.10/背景水平、7.70/中度酸化和 7.30/高度酸化)和甲基汞质量浓度(对照、溶剂对照、0.1,1和 5 µg/L)的海水中共同暴露 21 d,研究文蛤 内脏团和鳃组织内免疫应答和生物矿化相关的生物标志物对海水酸化和 MeHg 共同胁迫的响应。结果 表明,海水酸化和 MeHg 均显著影响其免疫应答策略,不同胁迫水平对各类生物标志物具有组织差异 性。具体而言, MeHg 暴露诱导内脏团中碱性磷酸酶(AKP)和溶菌酶(LZM)活性,表明 MeHg 对免疫解 毒机制有刺激作用,在一定程度上提高了其免疫应答。海水酸化抑制了鳃和内脏团中 AKP 活性,抑制 其免疫应答。在生物矿化相关酶中,在海水酸化和 MeHg 共同胁迫下钙-ATP 酶(Ca<sup>2+</sup>-ATP)活性显著下 降,干扰其离子平衡和生物矿化。海水酸化加剧了 MeHg 胁迫对文蛤免疫应答和生物矿化的毒理作用。 相关系数分析和主成分分析表明这些生物标志物可以协同防御环境胁迫对免疫应答和生物矿化策略的 毒理作用。这些生物酶对海水酸化和 MeHg 胁迫响应比较敏感,可以作为评价海洋酸化背景下 MeHg 对文蛤两种生物组织免疫功能毒性效应的潜在生物标志物。研究结果为理解海洋酸化和重金属胁迫对 贝类生理功能的影响提供新见解,为评估海洋酸化背景下贝类种群变动和资源管理提供科学依据。

关键词:海水酸化;甲基汞; 文蛤(Meretrix petechialis); 生理响应; 生物标志物
中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2023)7-0022-13
DOI: 10.11759/hykx20230411001

自工业革命以来,海洋作为最大的碳汇大量地 吸收大气中的 CO<sub>2</sub>,导致海水 pH 降低和碳酸盐平衡 体系发生变化即海洋酸化<sup>[1-3]</sup>。根据预测,2100 年和 2300 年末海水 pH 将分别降至 7.7~7.8 和 7.3~7.4<sup>[4]</sup>。 海洋酸化对海洋生物尤其钙化生物的生物过程如生 长发育、繁殖、免疫应答和生物矿化等有着负面影 响<sup>[5-7]</sup>。海洋贝类缺少高效的酸碱平衡调节机制,对 海洋酸化更为敏感<sup>[8]</sup>。

人类活动等导致污染物(重金属)不断地进入近 岸海域中,与海洋酸化共同作用,对海洋生态系统 产生影响<sup>[9]</sup>。海洋酸化可以造成海洋生物的生理生化 功能的改变,导致它们消耗更多的能量来应对环境 胁迫压力,降低了其对重金属毒性的抵御能力。同时, 重金属污染会引起海洋生物受到体内的氧化胁迫, 造成 DNA 损伤和脂质过氧化等伤害<sup>[10]</sup>。例如,海水 中 CO<sub>2</sub>含量升高能促进 Cd 和 Cu 在贝类中的生物积 累,产生高碳酸血症和金属应激对能量状态的负面 影响,进一步影响重金属对海洋双壳贝类的毒性和 生物种群的持续繁衍<sup>[11]</sup>。

汞在大气中的寿命长,并随大气运输和沉降, 因此,汞污染具有区域性和全球性的环境影响<sup>[12-13]</sup>。 甲基汞(MeHg)是汞在水生生物中的主要存在形式, 因其高生物利用性和神经毒性等特征备受研究者的 关注<sup>[14-15]</sup>。文蛤(*Meretrix petechialis*)是中国近海重要 经济贝类之一。文蛤体内生理指标对多种污染物胁迫 响应比较敏感,是近海环境质量状况的指示物种<sup>[16]</sup>。

收稿日期: 2023-04-11; 修回日期: 2023-05-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(42176107)

<sup>[</sup>Foundation: Nature Science Foundation of China, No. 42176107] 作者简介:杨建朋(1997—),男,河南范县人,硕士研究生,主要从事海洋 生物资源与环境研究, E-mail: yangjp@qdio.ac.cn; 窦硕增(1967—),男,通 信作者,山东沂源人,研究员,主要从事海洋生物资源与环境研究, E-mail: szdou@qdio.ac.cn

贝类可以通过溶菌酶(LZM)、酸性磷酸酶(ACP)和碱 性磷酸酶(AKP)等多种水解酶类,进行免疫调节,避 免生物体受到外源物质的危害<sup>[17]</sup>;热休克蛋白(HSP) 能够保护细胞免受高温、重金属和海水酸化等多种应 激源的伤害,修复受损蛋白<sup>[18]</sup>。碳酸酐酶(CA)、钙-ATP 酶(Ca<sup>2+</sup>-ATPase)和钠/钾-ATP 酶(Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase)维持 细胞内酸碱平衡、离子稳态和生物矿化<sup>[19]</sup>。文蛤受 到海洋酸化、重金属等多种胁迫时,这些酶与非酶蛋 白会协同作用,帮助生物机体应对毒性损伤,维持 免疫功能和矿化作用的稳态。海洋双壳类在海洋生 境中提供重要的生态服务,并且在沿海地区具有重要 的社会经济意义,因此,本文研究了不同海水酸化条 件下甲基汞暴露对文蛤免疫和生物矿化相关酶活性 的作用机制,为评估海洋酸化情景下重金属污染对贝 类生理过程和种群数量变动的影响提供科学依据。

# 1 材料与方法

# 1.1 实验设计

文蛤(壳长 43.7±6.8 mm)取自渤海莱州湾(山东 潍坊)滩涂海域。自然条件下,将文蛤置于养殖池中 (3 m×3 m×1 m)驯化 1 周,所用自然海水经过砂滤(平 均温度 17.0℃,盐度 32.5, pH 8.07)引入驯化水槽。驯 化过程中,每日定期投喂定量小球藻(*Chlorella* sp.), 并更新海水。

本研究设计 5 个甲基汞(MeHg)浓度和 3 种海水 pH 水平的交互实验, 解析文蛤免疫功能与生物矿化 对两种胁迫因素共同暴露的响应。

参照 IPCC 海水酸化预测情景, 以自然海水(pH 8.10)为对照, 设置 pH 7.7/中度酸化和 7.30/高度酸化 水平<sup>[4,20]</sup>。利用 CO<sub>2</sub>分压法维持 SA 水平<sup>[19]</sup>, 即通过 一种 CO<sub>2</sub>自动控制系统将海水 pH 稳定控制至各标定 pH 水平。对照组仅通入空气, 酸化组通入空气-CO<sub>2</sub> 混合气体。实验过程中每两天使用 pH 计(PB-10; Sartorius Instruments, Germany)校对控制系统的 pH 探头精度。

使用氯化甲基汞(纯度≥99.5%; Sigma-Aldrich Chemical Co., USA), 甲醇助溶, 用去离子水溶解, 配 制 MeHg 母液。参考贝类亚致死浓度剂量<sup>[21-22]</sup>, 设置 浓度梯度: 空白、溶剂对照(甲醇)、0.1(低)、1(中)和 5(高)µg/L MeHg<sup>+</sup>。每组暴露处理水平设置4个重复。

实验开始前,每组处理选取20只健康文蛤个体, 置于30L透明聚乙烯水槽中(25L过滤海水),持续 充气。在室温、适量通风条件下,为避免其他因素如 光照的影响,实验水槽随机放置在实验架上。每日定 量添加新配置甲基汞母液,维持更新的海水达到标 定浓度。每日更新海水前清洗水箱,以防止残饵、粪 便等碎屑的积累或细菌增殖影响文蛤的代谢或对 MeHg 的生物利用度<sup>[23]</sup>。实验暴露持续 21 d。

## 1.2 实验水体理化参数测定

实验过程中,每天使用水质参数仪(YSI, Yellow Spring, OH, USA)测定实验水体 *p*CO<sub>2</sub> 相关的理化参数 和 pH 水平,每周测水体的总碱度 1 次,并依据各实验 水体的温度、盐度、pH<sub>NBS</sub> 和碱度等参数,利用 CO<sub>2</sub>SYS 系统计算其碳酸盐参数、碳酸钙饱和度和 *p*CO<sub>2</sub> 值。

# 1.3 文蛤生化指标测定

实验暴露结束时,从每个实验水槽中选取 3~4 只文蛤个体进行解剖,采集鳃和内脏团,分别合并 为一个生物组织样品储存于液氮中至生化分析,即 每个水槽的文蛤个体组成 5~6 个生物组织样本。

以溶菌酶(LZM)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸 酶(AKP)、热休克蛋白(HSP 70)作为文蛤免疫应答的 生物标志物;以碳酸酐酶(CA)、钠/钾-ATP 酶 (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase)和钙-ATP 酶(Ca<sup>2+</sup>-ATPase)作为生物 矿化过程的生物标志物。利用相关试剂盒(南京建成 生物工程研究所,南京,中国)测定各组织样本中目 标生物标志物的活性或表达量<sup>[19]</sup>。

## 1.4 数据分析

生物标志物数据均以各处理的平均值±标准差 (SD)表示。利用 Kolmogorov-Smirnov test 和 Levene's test 分别检验生物标志物数据的正态性和方差齐性。 在数据满足上述假设条件下,利用双因素方差分析 (two-way ANOVA)检验 MeHg 浓度和 SA 水平对生物 标志物影响的显著性,并利用 Duncan test 检验处理 水平间的差异显著性。利用皮尔逊相关系数 (Pearson's correlation coefficient)检验各 SA 水平上生 物标志物之间的相关性,利用相关系数图可视化相 关性指数<sup>[24]</sup>。

在本研究中, pH 对照是指在每个 MeHg 浓度下 在 pH 8.10 水平上的处理, MeHg 对照组是指在每个 pH 水平下无溶剂(甲醇)处理的 MeHg 处理组。各生 物标志物的组间差异性比较指同一 MeHg 浓度下 SA 处理组与 pH 对照组之间的比较, 或同一 pH 水平上 MeHg 处理组与 MeHg 对照组之间的比较。 统计差异显著性设置在 P<0.05 水平上。统计分 析在 Excel(office 2019, USA)、SPSS(IBM Statistics SPSS 26 for Windows, USA)和 R 3.6.2(R Foundation, Vienna, Austria)上进行。

# 2 结果

## 2.1 实验水体的理化参数

实验过程中,各标定 pH 处理组的实测海水 pH 值 平均分别为 8.06±0.02、7.72±0.03 和 7.29±0.02,对应 *p*CO<sub>2</sub>为 492.4±23.1、1165.3±48.3 和 3267.1±131.7 μatm。 相同 pH 值处理水平上各水槽内海水实测 pH 值在 MeHg 处理组之间无显著差异 (one-way ANOVA, *P*>0.05)。

实验过程中,所有实验水槽内海水的平均水温和

盐度为 16.2±1.5(12.9~18.8℃)和 32.8±0.2(32.4~33.1)。 在不同水槽或处理中,水温和盐度均无显著差异(P> 0.05)。

# 2.2 不同组织中免疫应答酶对海水酸化和 甲基汞胁迫的响应

## 2.2.1 内脏团

甲基汞(MeHg)与海水酸化(SA)胁迫均显著影响内脏团组织中免疫相关生物标志物的应答(ACP、AKP和LZM活性和HSP70表达量),两种应激源的交互作用均显著影响其活性或表达量(two-way ANOVA *P*<0.05)。

各 pH处理水平上4个生物标志物在溶剂组与相应的对照组之间均无显著性差异(Duncan test, P< 0.05, 图 1)。



图 1 海水酸化和甲基汞胁迫对文蛤内脏团内免疫应答生物标志物的影响

Fig. 1 Effects of seawater acidification and methylmercury exposure on immune response biomarkers in the visceral mass of the clam

注: 不同小写字母表示同一 pH 水平下, MeHg 质量浓度处理组与 MeHg 对照组之间差异显著(P<0.05); 不同大写字母表示所有 MeHg 浓度

下,不同 pH 处理组之间差异显著(P<0.05);\*.同一 MeHg 质量浓度下,海水酸化处理组与 pH 对照组之间差异显著(P<0.05),图 2、图 4 同

# 研究论文 • Linn → ARTICLE

未海水酸化(pH 8.10)和中度 SA(7.70)条件下, 相对于 MeHg 对照组(0 μg/L), 低质量浓度 MeHg (0.1 μg/L)暴露组的 ACP 活性被显著抑制; 高度 SA 水平(pH 7.30)上, 与 MeHg 对照组相比, ACP 活性在 各 MeHg 浓度组中显著升高。在各 MeHg 浓度组中, 相较于 pH 对照组, 中、高度 SA 均显著提高 ACP 活 性(*P*<0.05, 图 1)。

未海水酸化条件下,低、中 MeHg 质量浓度组 (1 μg/L)中的 AKP 活性显著降低,但高 MeHg 质量浓 度(5 μg/L)对 AKP 活性无显著影响;而在中、高度酸 化水平下,AKP 活性在各 MeHg 质量浓度组中均显著 降低。在各 MeHg 质量浓度组中,除在中度 SA-低 MeHg 质量浓度处理组外,中、高度 SA 均显著抑制 AKP 活性(*P*<0.05,图 1)。

未海水酸化条件下,低质量浓度 MeHg 显著抑制 LZM 活性。中、高质量浓度 MeHg 处理显著诱导 LZM 活性。在各 MeHg 质量浓度组中,中、高度 SA 均显著提高 LZM 活性(*P*<0.05,图 1)。

未海水酸化条件下, HSP 70 表达量在低 MeHg

质量浓度组中显著降低,中质量浓度 MeHg 显著促进 HSP 70 产生;中度 SA 水平上,中、高质量浓度 MeHg 显著诱导 HSP 70 表达量;高度 SA 水平上,低、中质量浓度 MeHg 显著抑制 HSP 70 表达量,而高质量浓度 MeHg 则显著提高 HSP 70 表达量。各 MeHg 质量浓度中,高度 SA 显著诱导 HSP 70 产生 (*P*<0.05,图 1)。

甲基汞和海水酸化对内脏团中免疫应答相关酶的作用依赖于二者的暴露水平。总体而言,海水酸化显著诱导 ACP 和 LZM 活性以及 HSP 70 表达量,但显著抑制 AKP 活性(图 1)。

### 2.2.2 鳃

海水酸化显著影响鳃组织中 ACP、AKP 和 LZM 活性及 HSP 70 表达量,甲基汞显著影响 ACP 和 AKP 活性,二者的交互作用显著影响 ACP、AKP 和 LZM 活性(two-way ANOVA, *P*<0.05)。

各 pH 处理水平上 4 个生物标志物在溶剂组与 相应的对照组之间均无显著性差异(Duncan test, *P*< 0.05, 图 2)。



Fig. 2 Effects of seawater acidification and methylmercury exposure on immune response biomarkers in the gill of the clam

未海水酸化条件下, ACP 活性被 MeHg 显著抑制; SA 下, 低质量浓度 MeHg 显著诱导但高质量浓度 MeHg 显著抑制 ACP 活性。低、中质量浓度 MeHg 组中, 中、高度 SA 显著诱导 ACP 活性(P<0.05, 图 2)。

未海水酸化条件下,低、高质量浓度 MeHg 显著 诱导 AKP 活性;中度 SA 水平上,AKP 活性在低、中 MeHg 质量浓度组分别被显著升高和抑制;高度 SA 水平上,中质量浓度 MeHg 显著诱导 AKP 活性。在 高质量浓度 MeHg 组中,中、高度 SA 均显著降低 AKP 活性(*P*<0.05,图 2)。

未海水酸化和中度 SA 条件下,中质量浓度 MeHg 显著诱导 LZM 活性。各 MeHg 质量浓度中,中度 SA 显著诱导 LZM 活性(P<0.05,图 2)。

HSP 70 表达量在中度 SA-高 MeHg 质量浓度

处理组中被显著提高(P<0.05)。各 MeHg 质量浓度 下,海水酸化对 HSP 70 表达量影响不显著(P>0.05, 图 2)。

总体而言,海水酸化显著诱导 ACP 和 HSP 70 表达量,但显著抑制 AKP 活性(图 2)。

2.2.3 免疫相关生物标志物对共同胁迫响应的相关性

皮尔逊相关系数分析表明,内脏团中,未酸化 海水条件下,ACP活性与HSP 70表达量和LZM活性 显著负相关,LZM活性与AKP活性和HSP 70表达量 显著正相关(图 3 A);中度 SA 使 ACP活性与 AKP 活性显著正相关,而与LZM活性显著负相关(图 3 B); 高度 SA 条件下,ACP活性与LZM活性显著正相关, 而与 HSP 70表达量显著负相关(Pearson's correlation coefficient, P<0.05,图 3 C)。



图 3 海水酸化和甲基汞胁迫下对文蛤内脏团(A、B、C)和鳃(D、E、F)内免疫应答相关生物标志物间的相关系数图 Fig. 3 Correlation coefficient maps of immune response biomarkers to methylmercury in the visceral mass (A, B, and C) and gill (D, E, and F) of the clam under seawater acidification conditions

注: 生物标志物之间相关关系: 未海水酸化(A、D)、中度海水酸化(B、E)和高度海水酸化(C、F); 正负相关系数(r 值)分别对应正、负 线性关系; \*表示生物标志物之间的线性相关性显著(P<0.05), 图 5 同

鳃中,未海水酸化和中度 SA 条件下,各免疫相 关生物标志物之间无显著相关性(图 3 D, E);高度 SA 条件下,AKP 活性和 LZM 活性显著负相关,而与 HSP 70 表达量显著正相关(*P*<0.05,图 3 F)。

# 2.3 海水酸化与甲基汞胁迫对文蛤生物矿 化相关生物标志物的作用

## 2.3.1 内脏团

海水酸化和甲基汞胁迫对 Na+/K+-ATPase 和

研究论文 • ∭ ARTICLE

Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性均有显著影响, CA 表达量仅受 SA 水平影响, 3 种生物标志物均受两种胁迫交互作用的 影响(two-way ANOVA, *P*<0.05)。

各 pH 处理水平上 3 个生物标志物在溶剂组与 相应的对照组之间均无显著性差异(Duncan test, *P*> 0.05, 图 4)。



图 4 海水酸化和甲基汞胁迫对文蛤内脏团和鳃内生物矿化生物标志物的影响

Fig. 4 Effects of seawater acidification and methylmercury exposure on biomineralization biomarkers in the visceral mass and gill of the clam

未海水酸化条件下,中质量浓度 MeHg 显著提高 CA 表达量;中度 SA 水平上,各 MeHg 质量浓度组间 的 CA 表达量无显著变化;高度 SA 水平上,高质量浓 度 MeHg 显著降低 CA 表达量。各 MeHg 质量浓度组 中,中度酸化显著降低 CA 表达量(*P*<0.05,图 4)。 未海水酸化条件下,高质量浓度 MeHg 显著诱导 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 活性;高度 SA 水平上,低质量浓度 MeHg 显著降低 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 活性。在中、高质量 MeHg 浓度中,中、高度 SA 显著降低 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 活性(*P*<0.05,图 4)。 未海水酸化条件下,中、高质量浓度 MeHg 显著 抑制 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 的活性;在中、高度 SA 水平上,各 MeHg 质量浓度组的 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性无显著变化 (*P*>0.05)。低 MeHg 质量浓度组中,中度、高度酸化 显著降低 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性(*P*<0.05,图 4)。

甲基汞和海水酸化对内脏团中生物矿化相关酶的作用依赖于二者的暴露水平。总体上,海水酸化显 著抑制 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 活性(图 4)。

#### 2.3.2 鳃

海水酸化和甲基汞显著影响鳃组织中 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 和 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 的活性, 二者的交互作仅显 著影响 CA 表达量(two-way ANOVA, *P*<0.05)。

各 pH 处理水平上 3 个生物标志物在溶剂组与 相应的对照组之间均无显著性差异(Duncan test, *P*< 0.05, 图 4)。

未海水酸化条件下,高质量浓度 MeHg 显著提高 CA 表达量;中度 SA 水平上,低质量浓度 MeHg 显著促进;高度酸化水平上,低质量浓度 MeHg 显著提高 CA 表达量。高 MeHg 质量浓度组中,高度 SA

显著降低 CA 表达量(P<0.05, 图 4)。

未海水酸化和中度 SA 条件下,中质量浓度
MeHg 显著抑制 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 活性;高度 SA 水平
上,低质量浓度 MeHg 显著抑制 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 活
性。未 MeHg 暴露组中,中、高度 SA 水平均显著抑制 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 活性(*P*< 0.05,图 4)。</li>

各 pH 水平上,高质量浓度 MeHg 显著抑制 Ca<sup>2+</sup>-ATPase活性。除了在低质量浓度 MeHg 组外,高 度 SA 显著降低 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性(*P*< 0.05,图 4)。

总体上,海水酸化总体上显著抑制 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 活性(图 4)。

2.3.3 生物矿化生物标志物对共同胁迫响应的相关性

用皮尔逊相关系数对内脏团和鳃中生物矿化相关生物标志物参数之间进行线性相关分析,解析两种组织的 生物矿化作用在海水酸化和甲基汞共同胁迫下的响应。

内脏团中, 非酸化和中度 SA 条件下, 矿化相关 生物标志物之间无显著影响(图 5A, B); 高度 SA 海 水使得 CA 表达量与 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性显著负相关 (Pearson's correlation coefficient, P<0.05, 图 5C)。



图 5 海水酸化和甲基汞胁迫下对文蛤内脏团(A、B、C)和鳃(D、E、F)内生物矿化相关生物标志物间的相关系数图 Fig. 5 Pearson correlation coefficient maps of biomineralization to methylmercury in the visceral mass (A, B, and C) and gill (D, E, and F) of the clam under seawater acidification conditions

 鰓中,非海水酸化条件下,CA 表达量与 Ca<sup>2+</sup> ATPase 活性显著负相关(图 5D);中度 SA 条件下, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 活性和 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性显著正相关 (图 5E); 高度 SA 条件下, 矿化相关生物标志物之间无显著相关性(Pearson's correlation coefficient, *P*< 0.05, 图 5F)。



# 2.4 免疫功能和矿化作用对共同胁迫的整 合响应

分别对内脏团和鳃中免疫功能和生物矿化相关的所有生物标志物进行主成分分析,解析两种组织的两个生理功能对海水酸化(SA)和甲基汞(MeHg)共同胁迫的整合响应。

内脏团中的 3 个 PCs 解释了 86.55%的总方差:

PC1-52.45%, PC2-23.22%, PC3-10.88%。PC1 和 PC2 有效地将 3 个 pH 组分离(图 6A), PC1 和 PC3 将高度 SA 与未海水酸化组分开(图 6B),显示了生物标志物 整体上对海水酸化的敏感性。PC1 轴分离主要由 ACP、LZM、HSP 70、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 表达决定; PC2 轴分离主要由 AKP、Ca<sup>2+</sup>-ATPase 表达决定; PC3 轴 分离主要由 CA 表达决定(图 6A, B)。



图 6 海水酸化和甲基汞胁迫下文蛤内脏团(A、B)和鳃(C、D)内免疫应答和生物矿化相关生物标志物的整合响应 Fig. 6 Integrative responses of immune and biomineralization related biomarkers to the co-exposure of seawater acidification and MeHg in the visceral mass (A, B) and gill (C, D) of the clam

鳃中的 3 个 PCs 解释了 68.21%的总方差: PC1-26.87%, PC2-25.68%, PC3-15.65%。其中, PC1 和 PC3 能有效地将未海水酸化组与中、高度 SA 组分开。PC1 轴分离主要由 ACP、LZM、HSP 70、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 表达决定; PC2 轴分离主要由 AKP、Ca<sup>2+</sup>-ATPase 表 达决定; PC3 轴分离主要由 CA 表达决定(图 6 C, D)。

这些结果表明, ACP、LZM、HSP 70、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 等对海水酸化响应比较敏感,可以作为评价 海水酸化对文蛤内脏团和鳃组织免疫功能和矿化作 用影响的潜在生物标志物。

3 讨论

# 3.1 海水酸化条件下文蛤对 MeHg 胁迫的 免疫应答的响应

海洋贝类具有开放的循环系统,其生理功能易 受环境污染的直接或间接作用,包括免疫系统在内

的稳态机制的改变等,影响免疫应答<sup>[25]</sup>。贝类一般通 过细胞免疫和多种体液免疫因子的协同作用来对抗 污染物影响,并将其排出体外<sup>[17, 26]</sup>。贝类受到海水酸 化和甲基汞胁迫时会产生大量的 ROS,影响其吞噬 作用和体液免疫因子如凝集素、溶菌酶(LZM)、酸性 磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)等的表达。此外, 大多数免疫酶类存在于细胞溶酶体中,甲基汞与其 膜蛋白上的-SH 结合,导致膜通透性增加甚至裂解 和酶的释放<sup>[27-28]</sup>。研究表明,海水酸化和重金属单一 胁迫或共同胁迫会抑制贝类的吞噬作用,同时改变 体液免疫相关酶的活性,导致生物体免疫抑制或免 疫刺激<sup>[29-31]</sup>。

甲基汞胁迫产生过量 ROS 引起细胞膜脂质过氧 化,破坏了免疫细胞的结构和功能,阻碍 LZM 的分 泌;另一方面,ROS 引起免疫细胞内 DNA 损伤,干 扰与 LZM 产生过程相关基因的转录和表达,阻碍 LZM 的合成<sup>[32-33]</sup>。此外,Cd 和海水酸化暴露下,褐 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的一些免疫因子特别是 溶菌酶水平被诱导以调动自身的免疫系统来补偿免 疫力下降<sup>[19]</sup>。中度海水酸化(pH 7.60)则显著促进了 硬壳蛤(*Mercenaria mercenaria*)血细胞中 LZM 的产 生<sup>[29]</sup>。本研究中,海水酸化显著诱导 LZM 的活性; 在未酸化海水中,甲基汞胁迫显著促进了内脏团 LZM 的活性,这与汞暴露诱导鱼类的溶菌酶活性一 致<sup>[33-34]</sup>。因此,文蛤通过调动通过免疫应答,刺激 LZM 生成以提高自身免疫力,应对外源胁迫带来的 免疫毒性。

ACP和AKP分布于海洋生物溶酶体内,可以用 作评估双壳贝类重金属污染的免疫应答生物标志 物<sup>[35]</sup>。ACP可以经由水解作用破坏病原体内的磷酸 酯键,分解入侵的病原体,起到免疫的功能;AKP存 在于细胞质膜上,其免疫功能主要是改变或修饰入 侵异物表面的分子结构,增加免疫细胞对异物的识 别能力<sup>[36-37]</sup>。本研究中,海水酸化胁迫显著诱导了文 蛤鳃和内脏团中的ACP活性,同时提高了LZM活性 和HSP 70表达量的增加,协同提高文蛤体内的免疫 防御。但是,海水酸化抑制了AKP活性,表现出ACP 和AKP两种磷酸酶出对海水酸化胁迫响应的组织差 异性。

热休克蛋白(HSP)是具有高度保守性的热应激 蛋白,生物体在受到物理或化学应激源(如高温、海 水酸化或者重金属)胁迫时可通过调节体内的HSP表 达应对毒性损伤<sup>[18,38]</sup>。HSP 70 作为分子伴侣在促进

贝类蛋白质折叠、膜转运、错误折叠蛋白的降解和 维持细胞内稳态等过程中起着重要作用、可以调节 细胞内体液免疫因子的生成和分泌[38-39]。甲基汞易 形成亲水复合物进行跨细胞膜运输,并可能被富含 半胱氨酸的蛋白质或谷胱甘肽螯合在 HSP 中<sup>[40]</sup>,因 此, HSP 70 具有较高的生物标志物潜能<sup>[41]</sup>。本研究 中,未酸化与中度海水酸化海水中,甲基汞胁迫未 显著影响文蛤鳃中 HSP 70 的表达, 共同胁迫对文蛤 鳃内蛋白质的损伤较小,生物体不需要额外生成 HSP 70 来修复和清除受损蛋白。而在高甲基汞胁迫 下, 文蛤内脏团诱导 HSP 70 产生, 而且其表达量在高 度海水酸化条件下随甲基汞浓度升高而升高, 这有助 于文蛤及时应对蛋白质损伤,减缓免疫应答损伤。类 似结果也出现在海水酸化(pH 7.80)和 Cd(10 μg/L)胁 迫下长牡蛎(Crassostrea gigas)中,即消化腺和鳃内 HSP 70 的表达量被显著上调,促进受损蛋白的修复 和清除[7]。

# 3.2 MeHg 和海水酸化共同胁迫对文蛤生 物矿化相关酶的影响

贝类通过生物矿化作用构建碳酸钙保护贝壳。研 究表明,海水酸化和重金属暴露会影响贝类壳生长和 性能. 降低贝壳结构完整性和生物矿化能力[42-44]。其 中,碳酸酐酶(CA)在无脊椎动物的矿化如贝壳的发育 生长中起着重要作用、而 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶和 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶是重要的跨膜蛋白,参与调节生物体的呼吸、离子 转运、酸碱调节和钙化等多种生理功能[45-46]。本研 究中, 文蛤内脏团内 CA 表达, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶的活性未受中度海水酸化和甲基汞共同胁迫 的影响;在此胁迫条件下,内脏团中的 CO<sub>2</sub>、HCO<sub>3</sub> 和 H<sup>+</sup>浓度以及甲基汞蓄积量的增加未超出文蛤自身 的酸碱调节能力和解毒能力,因而未引起这些酶的 显著变化<sup>[47]</sup>。高海水酸化胁迫下,内脏团 CA 对甲基 汞胁迫的敏感性增加,其表达被抑制,干扰了文蛤 的酸碱调节能力, CO2不能及时被转化或清除, 对生 物矿化作用产生负面影响<sup>[5, 47-49]</sup>. 这与 Cd 胁迫显著 抑制了紫贻贝(Mytilus galloprovincialis)体内 CA 表 达这一现象一致<sup>[42]</sup>。此外, 文蛤鳃和内脏团中 Na+/  $K^+$ -ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶对高度海水酸化更为敏感, 海水酸化引起的碳酸盐平衡的变化一定程度上抑制 了两种 ATP 酶的活性, 进而干扰能量供给和 Ca<sup>2+</sup>吸 收、转运过程,影响生物矿化作用[50],这与海水酸化 (pH≤7.80)显著抑制缢蛏(Sinonovacula constricta)的 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶的活性类似<sup>[51]</sup>。在文蛤鳃中,海水

酸化和甲基汞共同胁迫未显著影响 CA 表达量的变化。但是,海水酸化和砷胁迫显著抑制了长牡蛎 (C. gigas)和福建牡蛎(Crassostrea angulata)体内 CA 表达<sup>[5]</sup>,说明二者共同胁迫对 CA 表达的影响在物种 或金属之间存在差异。另一方面,文蛤鳃内 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶的活性相较于 CA 对甲基汞胁 迫更为敏感。甲基汞胁迫导致文蛤鳃内 ROS 和重金 属蓄积,会破坏酶的结构和功能并抑制其活性,阻 碍能量供给和 Ca<sup>2+</sup>吸收、转运过程,最终可能影响文 蛤的生物矿化作用<sup>[47]</sup>。高度海水酸化的作用下,高浓 度甲基汞胁迫显著抑制 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶的活性,表示海水酸化能潜在地加剧甲基汞对文 蛤生物矿化作用的毒性效应。

总体而言,海水酸化和甲基汞胁迫显著影响文 蛤内脏团和鳃免疫应答和生物矿化作用,并表现出 组织差异性。相较于单一生物标志物评价法,综合生 物标志物评价能够更加客观地评估受试生物的整体 生理响应。ACP、LZM、HSP 70、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 等 生物标志物对二者共同胁迫的响应比较敏感,在评 价海洋酸化背景下甲基汞对文蛤的毒性效应中具有 潜在的生物指示能力。

### 参考文献:

- SABINE C L, FEELY R A, GRUBER N, et al. The oceanic sink for anthropogenic CO<sub>2</sub>[J]. Science, 2004, 305: 367-371.
- [2] 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(29): 681-686.
- [3] STOCKDALE A, TIPPING E, LOFTS S, et al. Effect of ocean acidification on organic and inorganic speciation of trace metals[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(4): 1906-1913.
- [4] CALDEIRA K, WICKETT M E. Oceanography: Anthropogenic carbon and ocean pH[J]. Nature, 2003, 425: 365.
- [5] MOREIRA A, FIGUEIRA E, SOARES A M. The effects of arsenic and seawater acidification on antioxidant and biomineralization responses in two closely related *Crassostrea* species[J]. Science of the Total Environment, 2016, 545-546: 569-581.
- [6] SILVA C S, NOVAIS S C, LEMOS M F, et al. Effects of ocean acidification on the swimming ability, development and biochemical responses of sand smelt larvae[J]. Science of the Total Environment, 2016, 563-564: 89-98.
- [7] CAO R W, LIU Y L, WANG Q, et al. The impact of ocean acidification and cadmium on the immune re-

sponses of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 81: 456-462.

- [8] WITTMANN A C, PORTNER H O. Sensitivities of extant animal taxa to ocean acidification[J]. Nature Climate Change, 2013, 3(11): 995-1001.
- [9] ZENG X F, CHEN X J, ZHUANG J. The positive relationship between ocean acidification and pollution[J]. Marine Pollution Bulletin, 2015, 91(1): 14-21.
- [10] AHMAD I, MOHMOOD I, MIEIRO C L, et al. Lipid peroxidation vs. antioxidant modulation in the bivalve *Scrobicularia plana* in response to environmental mercury—organ specificities and age effect[J]. Aquatic Toxicology, 2011, 103(3/4): 150-158.
- [11] GOETZE S, MATOO O B, BENIASH E, et al. Interactive effects of CO<sub>2</sub> and trace metals on the proteasome activity and cellular stress response of marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*[J]. Aquatic Toxicology, 2014, 149: 65-82.
- [12] ALAVA J J, CISNEROS-MONTEMAYOR A M, SUMAILA U R, et al. Projected amplification of food web bioaccumulation of MeHg and PCBs under climate change in the Northeastern Pacific[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 13460.
- [13] RODRIGUES P D, FERRARI R G, DOS SANTOS L N, et al. Mercury in aquatic fauna contamination: A systematic review on its dynamics and potential health risks[J]. Journal of Environmental Sciences, 2019, 84: 205-218.
- [14] BURGER J, GOCHFELD M. Mercury and selenium levels in 19 species of saltwater fish from New Jersey as a function of species, size, and season[J]. Science of the Total Environment, 2011, 409(8): 1418-1429.
- [15] CAMACHO C, MAULVAULT A L, SANTOS M T, et al. Mercury in juvenile *Solea senegalensis*: Linking bioaccumulation, seafood safety, and neuro-oxidative responses under climate change-related stressors[J]. Applied Sciences, 2020, 10(6): 1993.
- [16] KUMAR M R, KRISHNAN K A, VIMEXEN V. Effect of trace metal contamination in sediments on the bioaccumulation of bivalve *Meretrix meretrix*[J]. Marine Pollution Bulletin, 2022, 176: 113422.
- [17] WANG L, PAN L Q, LIU N, et al. Biomarkers and bioaccumulation of clam *Ruditapes philippinarum* in response to combined cadmium and benzo[a]pyrene exposure[J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49: 3407-3417.
- [18] RAJESHKUMAR S, MUNUSWAMY N. Impact of metals on histopathology and expression of HSP 70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattuppalli Island, South East Coast, India[J]. Chemosphere, 2011, 83(4): 415-421.

研究论文 · ┃:□□□ ARTICLE

- [19] CUI W T, LIU J H, CAO L, et al. Toxicological effects of cadmium on the immune response and biomineralization of larval flounder *Paralichthys olivaceus* under seawater acidification[J]. Chemosphere, 2022, 291: 132919.
- [20] IPCC. Climate change 2014: Synthesis report. Contribution of working groups I; II and III to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change[R]. Switzerland: IPCC Geneva, 2014.
- [21] CANESI L, VIARENGO A, LEONZIO C, et al. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues[J]. Aquatic Toxicology, 1999, 46(1): 67-76.
- [22] FARIA M, CARRASCO L, DIEZ S, et al. Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 149(3): 281-288.
- [23] BELIVERMIS M, WARNAU M, METIAN M, et al. Limited effects of increased CO<sub>2</sub> and temperature on metal and radionuclide bioaccumulation in a sessile invertebrate, the oyster *Crassostrea gigas*[J]. ICES Journal of Marine Science, 2016, 73(3): 753-763.
- [24] XIAO Z T, CAO L, LIU J H, et al. pCO<sub>2</sub>-driven seawater acidification affects aqueous-phase copper toxicity in juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*: Metal accumulation, antioxidant defenses and detoxification in livers[J]. Science of the Total Environment, 2023, 858: 160040.
- [25] THIAGARAJAN R, GOPALAKRISHNAN S, THILAGAM H. Immunomodulation the marine green mussel *Perna viridis* exposed to sub-lethal concentrations of Cu and Hg[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2006, 51(3): 392-399.
- [26] MATOZZO V, BALLARIN L, PAMPANIN D M, et al. Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2001, 41: 163-170.
- [27] SHARMA M K, KUMAR M, KUMAR A. Protection against mercury-induced renal damage in Swiss albino mice by *Ocimum sanctum*[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2005, 19(1): 161-167.
- [28] KONG X H, WANG S P, JIANG H X, et al. Responses of acid/alkaline phosphatase, lysozyme, and catalase activities and lipid peroxidation to mercury exposure during the embryonic development of goldfish *Carassius auratus*[J]. Aquatic Toxicology, 2012, 120-121: 119-125.
- [29] IVANINA A V, HAWKINS C, SOKOLOVA I M. Immunomodulation by the interactive effects of cadmium and hypercapnia in marine bivalves *Crassostrea vir*-

ginica and Mercenaria mercenaria[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 37(2): 299-312.

- [30] LIU S, SHI W, GUO C, et al. Ocean acidification weakens the immune response of blood clam through hampering the NF-kappa  $\beta$  and toll-like receptor pathways[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 54: 322-327.
- [31] LU Z, WANG S, SHAN X J. Differential biological effects in two pedigrees of clam *Ruditapes philippinarum* exposed to cadmium using iTRAQ-based proteomics[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2019, 65: 66-72.
- [32] KIM J H, KANG J C. Oxidative stress, neurotoxicity, and non-specific immune responses in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, exposed to different waterborne selenium concentrations[J]. Chemosphere, 2015, 135: 46-52.
- [33] REN Z H, LIU J H, HUANG W, et al. Antioxidant defenses and immune responses of flounder *Paralichthys olivaceus* larvae under methylmercury exposure[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2019, 225: 108589.
- [34] SUN Y L, LI Y W, RAO J D, et al. Effects of inorganic mercury exposure on histological structure, antioxidant status and immune response of immune organs in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. Journal of Applied Toxicology, 2018, 38(6): 843-854.
- [35] RAJALAKSHMI S, MOHANDAS A. Impact of mercury on the activity pattern of a marker enzyme in a freshwater bivalve[J]. The Environmentalist, 2008, 28(3): 249-252.
- [36] BLASCO J, PUPPO L, SARASQUETE M C. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Ruditapes philippinarum*[J]. Marine Biology, 1993, 115: 113-118.
- [37] MAZORRA M T, RUBIO J A, BLASCO J. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 131: 241-249.
- [38] MORAGA D, MEISTERTZHEIM A L, TANGUY-ROYER S. Stress response in Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> exposed oysters (*Crassostrea gigas*): an immunohistochemical approach[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C Comparative Pharmacology & Toxicology, 2005, 141(1): 151-156.
- [39] SOKOŁOWSKI A, BRULIŃSKA D. The effects of low seawater pH on energy storage and heat shock protein 70 expression in a bivalve *Limecola balthica*[J]. Marine Environmental Research, 2018, 140: 289-298.
- [40] SIMMONS-WILLIS T A, KOH A S, CLARKSON T W, et al. Transport of a neurotoxicant by molecular mim-



icry: the methylmercury-L-cysteine complex is a substrate for human L-type large neutral amino acid transporter (LAT) 1 and LAT 2[J]. Biochemical Journal, 2002, 367: 239-246.

- [41] DANG F, WANG W X. Subcellular controls of mercury trophic transfer to a marine fish[J]. Aquatic Toxicology, 2010, 99(4): 500-506.
- [42] LIONETTO M G, CARICATO R, ERROI E, et al. Potential application of carbonic anhydrase activity in bioassay and biomarker studies[J]. Chemistry and Ecology, 2006, 22(S1): 119-125.
- [43] FITZER S C, TORRES GABARDA S, DALY L, et al. Coastal acidification impacts on shell mineral structure of bivalve mollusks[J]. Ecology and Evolution, 2018, 8(17): 8973-8984.
- [44] ZHENG X N, LEI S S, ZHAO S X, et al. Temperature elevation and acidification damage microstructure of abalone via expression change of crystal induction genes[J]. Marine Environmental Research, 2020, 162: 105114.
- [45] SOYUT H, BEYDEMIR Ş AND HISAR O. Effects of Some Metals on Carbonic Anhydrase from Brains of Rainbow Trout[J]. Biological Trace Element Research, 2008, 123(1): 179-190.
- [46] KREISS C M, MICHAEL K, LUCASSEN M, et al. Ocean warming and acidification modulate energy budget and gill ion regulatory mechanisms in Atlantic cod (*Gadus*

*morhua*) [J]. Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, 2015, 185(7): 767-781.

- [47] IVANINA A V, JARRETT A, BELL T. Effects of seawater salinity and pH on cellular metabolism and enzyme activities in biomineralizing tissues of marine bivalves[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 2020, 248: 110748.
- [48] MICHAELIDIS B, OUZOUNIS C, PALERAS A, et al. Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels *Mytilus galloprovincialis*[J]. Marine Ecology Progress Series, 2005, 293: 109-118.
- [49] THOMSEN J, HAYNERT K, WEGNER K M, et al. Impact of seawater carbonate chemistry on the calcification of marine bivalves[J]. Biogeosciences, 2015, 12: 4209-4220.
- [50] LI J Q, MAO Y Z, JIANG Z J, et al. Impact of seawater carbonate variables on post-larval bivalve calcification[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2018, 36(2): 405-413.
- [51] PENG C, ZHAO X G, LIU S X, et al. Ocean acidification alters the burrowing behaviour, Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity, metabolism, and gene expression of a bivalve species, *Sinonovacula constricta*[J]. Marine Ecology Progress Series, 2017, 575: 107-117.



# Immune response and biomineralization in the gills and visceral mass of the clam, *Meretrix petechialis*, to methylmercury toxicity under ocean acidification conditions

YANG Jian-peng<sup>1, 2</sup>, CAO Liang<sup>1</sup>, DONG Yu-guo<sup>3</sup>, LIU Jin-hu<sup>1</sup>, DOU Shuo-zeng<sup>1, 2</sup> (1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Huaneng Xiapu Nuclear Co. Ltd., Ningde 355100, China)

**Received:** Apr. 11, 2023

Key words: seawater acidification; methylmercury; Meretrix petechialis; physiological response; biomarkers

Abstract: The toxic effects of heavy metals on marine organisms are an important topic within the field of ecotoxicology. Ocean acidification affects physiological processes, such as the formation of the calcium carbonate shell of marine shellfish and the form and bioavailability of pollutants, particularly heavy metals, and thus their biological toxicity. Marine shellfish have an open circulatory system, so their physiology is vulnerable to environmental change. To investigate the toxic effects of methylmercury (MeHg) on the immune response and biomineralization of marine bivalves under seawater acidification (SA) conditions, wild-caught clams (Meretrix petechialis) were exposed to seawater of different pH levels (CO<sub>2</sub> partial pressure; pH 8.10/no SA, 7.70/moderate SA, and 7.30/extreme SA) and MeHg concentrations (control, solvent and control: 0.1, 1, and 5 ug/L, respectively) for 21 days. The responses of biomarkers related to immune function and biomineralization in the visceral mass and gill tissues of the clam to the combined stress were bioassayed after the exposure. The immune-related biomarkers included lysozyme (LZM), acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), and heat shock protein 70 (HSP70). The biomineralization-related biomarkers included Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Ca<sup>2+</sup>-ATPase, and carbonic anhydrase. Principal component analysis (PCA) and correlation coefficient analysis were employed to evaluate the collective effects of the combined stressors on the two physiological processes. The results showed that SA and MeHg significantly affected the immune response, and various biomarkers exhibited tissue-specific responses to different levels of stress. Specifically, MeHg exposure induced AKP and LZM activities in the visceral mass, indicating that MeHg stimulated immune detoxification mechanisms and enhanced the immune response. SA inhibited AKP activity in the gill and visceral mass, thus suppressing the immune response. Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity decreased significantly under the combined SA and MeHg stress, which disrupted ion balance and biomineralization. SA exacerbated the toxic effects of MeHg on the immune response and biomineralization. Correlation analysis and PCA indicated that these biomarkers worked together to defend against the toxic effects of co-occurring environmental stressors on the immune response and biomineralization strategy. ACP, LZM, HSP70, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, and AKP were sensitive to MeHg exposure under SA conditions and could be potential biomarkers of SA and MeHg co-exposure. The present study provides new insights into the effects of ocean acidification and heavy metal stress on the physiology of bivalves and offers a scientific basis for evaluating changes in bivalve populations and resource management under ocean acidification scenarios.