

文章编号:1001-5132 (2010) 04-0010-05

低氧胁迫对真鲷()与黑鲷()杂交 子一代体内酶活力的影响

姜景腾^{1,2}, 吴雄飞^{1*}, 蒋宏雷¹

(1.宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315012; 2.宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 通过分析低氧环境下真鲷(*P. major*)×黑鲷(*S. macrocephalus*)杂交子一代体内酶活性的变化评价其耐低氧能力. 将杂交子一代置于溶氧量为 (1.83 ± 0.27) mg·L⁻¹的水体中, 胁迫 0、6、12 和 24 h 后, 取其肝脏、鳃和肌肉检测乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和总抗氧化能力(T-AOC). 结果显示: 低氧胁迫后 LDH 活性在肌肉和肝脏中分别升高 25.7% 和 17.6%; 脏中 SOD 活性升高 20.2%, 随胁迫时间延长活性下降至初始水平; CAT 活性下降 44.3%~62.4%; T-AOC 活力也呈先升后降趋势. 说明杂交子一代具有一定的低氧耐受能力, 但长时间低氧胁迫会对其造成氧化损伤.

关键词: 真鲷; 黑鲷; 杂交; 低氧胁迫; 抗氧化酶

中图分类号: S965

文献标识码: A

鱼类是水生低等变温脊椎动物, 容易受外界环境的影响. 在养殖过程中温度、盐度、溶解氧和氨氮等因素是影响鱼类生长的主要胁迫因子^[1-3], 其中溶解氧对鱼类的影响最为普遍和直接^[4-6].

鱼类除了能通过主动回避和生理调节来适应低氧环境外, 还能通过改变与代谢相关酶活性来适应低氧环境^[7-9]. 乳酸脱氢酶(LDH, 无氧代谢指标)是能量代谢中参与糖酵解的一种重要酶, 可在缺氧条件下为生命活动提供能量, 在生物适应低氧环境方面发挥重要作用^[10-11]. 超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)能够有效地清除机体内活性氧自由基, 是生物抗氧化体系中的关键酶, 已有关于抗氧化酶与生物耐低氧方面的报道^[12].

宁波市海洋与渔业研究院自 2004 年成功培养出以真鲷为母本, 黑鲷为父本的杂交鱼苗^[13], 经初步研究杂交子一代具有生长速度快, 适温盐广, 营养价值高等特点^[14]. 鱼类的低氧耐受水平作为抗逆性重要指标, 在养殖生产中具有重要意义. 笔者通过在实验室条件下测定低氧胁迫后杂交鲷体内代谢酶和抗氧化酶活力的变化, 分析评价杂交鲷耐低氧能力, 进而评价其抗逆性.

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验鱼(真鲷 × 黑鲷 杂交子一代)体长 10.6~

收稿日期: 2010-06-10. 宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 国家科技支撑计划专题项目(2007BAD43B05).

第一作者: 姜景腾(1984-), 男, 山东威海人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 鱼类生物学. E-mail: jjt969@163.com

*通讯作者: 吴雄飞(1963-), 男, 浙江宁波人, 研究员, 主要研究方向: 水产养殖生态及海水鱼类繁殖育种. E-mail: wxiongfei@hotmail.com

13.4 cm, 体重 24.2~36.7 g, 暂养于 1 m³ 的水池中 2 周, 海水盐度 26, 水温(18.3±0.5), 自然光照, 连续充气.

1.2 低氧环境设计

实验装置在文献^[15]报道的基础上加以修改(图 1). 储水桶体积为 800 L, 放于较高位置. 实验桶体积为 160 L, 放于较低位置. 每个实验桶放 8 尾幼鱼. 用氮气把水中的氧排出, 加液体石蜡封闭. 实验组和对照组氧浓度分别为(1.83±0.24) mg·L⁻¹ 和 (9.08±0.37) mg·L⁻¹ (Winkler 碘量法), 每隔 1 h 测定氧浓度, 根据需要调节水流速度. 低氧胁迫 0、6、12 和 24 h 后取肝脏、鳃和肌肉组织, 液氮保存(肝 0.282~0.531 g, 肌肉 0.310~0.637 g, 鳃 0.185~0.315 g).

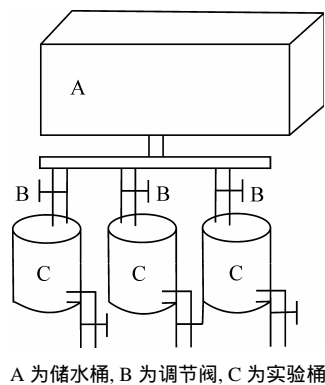


图 1 实验装置

1.3 组织匀浆

将组织放入研磨器中加对应比例(W:V=1:9 (肝脏); 1:4 (肌肉); 1:2 (鳃)) 4 预冷匀浆液(pH=7.4, 0.01 mg·L⁻¹ Tris-HCL, 0.000 1 mg·L⁻¹ EDTA-2Na, 0.01 mg·L⁻¹ 蔗糖, 0.8%的 NaCL)在冰浴条件下匀浆, 2 离心机中 12 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液, 置于 -70 备用.

1.4 酶活力测定

乳酸脱氢酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、总抗氧化能力和组织蛋白含量均采用南京建成试剂盒测定, 方法和酶活力单位定义参见其说明书.

1.5 数据分析

所得数据用 Excel 和 SPSS 17.0 软件进行相关性检验、方差分析, 组间差异进行多重比较, $P <$

0.05 为差异显著.

2 实验结果

2.1 死亡率

实验结束后实验组和对照组实验鱼均无死亡.

2.2 酶活

实验数据显示杂交子一代体内各种酶活性具有明显的组织特异性, 对照组间酶活差异不显著. 低氧胁迫后糖酵解酶和抗氧化酶活力有变化.

2.2.1 乳酸脱氢酶活力变化

如图 2 所示, 低氧胁迫 6 h 肌肉和肝脏中 LDH 活性分别上升 25.7%和 17.6%, 而鳃中活性下降了 8.1%. 随着胁迫时间延长肌肉和鳃中 LDH 活性逐渐恢复至初始水平, 而肝脏中则保持较高活性.

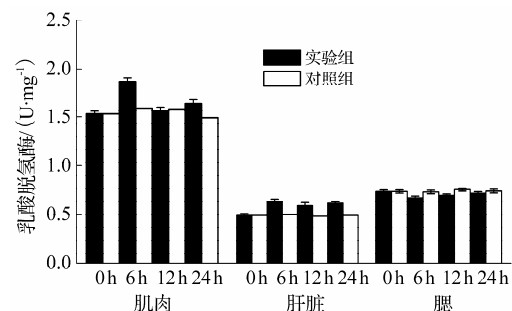


图 2 溶氧胁迫对杂交鲷体内乳酸脱氢酶活力的影响

2.2.2 超氧化物歧化酶活力变化

图 3 显示, 低氧胁迫 6 h 后肝脏中 SOD 活性上升 20.2%, 随后下降至初始水平. 肌肉中 SOD 活性呈下降趋势, 24 h 活力最低, 为对照组的 69.7%. 鳃组织中 SOD 含量低于检测范围.

2.2.3 过氧化氢酶活力变化

低氧胁迫使肝脏中 CAT 活性迅速下降, 为对照组的 44.3%~62.4%. 鳃组织中 CAT 活性变化范围较小. 肌肉中 CAT 含量低于检测范围(图 4).

2.2.4 总抗氧化能力变化

低氧胁迫使肝脏和鳃中 T-AOC 活性分别上升 33.8%~54.1%和 239%, 24 h 后肝脏中活性降至初始水平, 而鳃中活性显著下降, 为对照组的 55%. 肌

肉中 T-AOC 活性持续下降(图 5)。

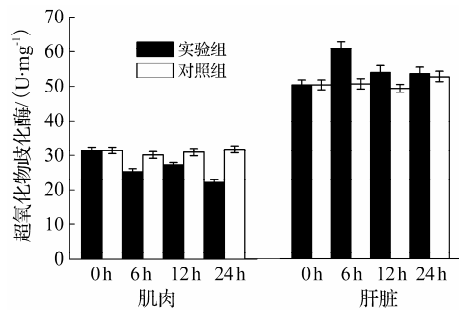


图 3 溶氧胁迫对杂交鲷体内超氧化物歧化酶活力的影响

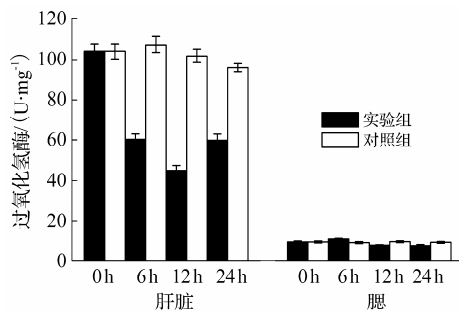


图 4 溶氧胁迫对杂交鲷体内过氧化氢酶活力的影响

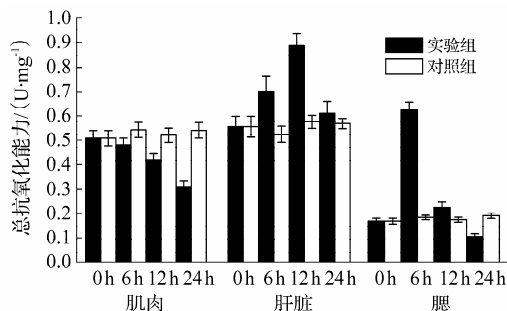


图 5 溶氧胁迫对杂交鲷体内总抗氧化能力的影响

3 讨论

生物在低氧环境下可依靠无氧代谢作为补充途径为生命活动提供能量,某些耐低氧生物可以完全依靠无氧代谢为生命提供能量^[10],所以生物的无氧代谢能力可以反映其耐低氧能力.乳酸脱氢酶可催化乳酸转化成丙酮酸为生命活动提供能量,是无氧代谢的指示酶.鲫鱼对低氧具有极强的耐受性,低氧环境下其体内 LDH 活性上升 115%~156%^[16].叉尾石斑鱼在 10% (0.8 mg·L⁻¹)溶解氧饱和度下,体内 LDH 活性上升 70.5%^[17].本实验中对

杂交鲷低氧胁迫后其体内 LDH 活性上升 17.6%~25.7%,与鲫鱼等耐低氧鱼类相比其无氧代谢能力较弱,但随着胁迫时间延长,肝脏中 LDH 活性仍保持较高水平($P < 0.05$),说明杂交鲷在低氧环境下可以较长时间利用无氧代谢为生命活动提供能量,具有一定的低氧耐受能力.

低氧环境会加速生物体内活性氧(ROS)的产生,包括超氧阴离子(O²⁻),过氧化氢(H₂O₂),羟基(·OH)等.这些活性物质会对生物造成氧化胁迫,导致细胞膜流动性降低和透性增加、蛋白质功能丧失及 DNA 的损伤与突变,从而造成细胞死亡和异常蛋白质形成.因此生物能否快速有效地清除这些活性物质是其能否能在低氧环境下生存的关键^[18].

超氧化物歧化酶是生物体中首先对氧自由基作出反应的抗氧化酶^[19],并且对氧化胁迫反应最为强烈.许多研究表明生物在面对胁迫时会增高其体内 SOD 活力来抵抗不良环境^[20-21].图 3 显示,低氧环境下 SOD 活性在肝脏中显著上升,随后恢复至初始水平,而在肌肉中呈下降趋势,说明杂交鲷在低氧环境下首先保证肝脏等重要器官免受损伤,并能够较快地通过自身调节来适应环境变化,达到新陈代谢的平衡,保持机体内环境的稳态.

过氧化氢酶可以催化过氧化氢分解成氧和水,从而使细胞免于遭受 H₂O₂ 的毒害,是过氧化物酶的标志酶.本实验中 CAT 活性在肝脏中显著下降(图 4),与预期结果相反^[22-23].而与葛氏鲈塘鳢(*Perccottus glenii*)低氧胁迫后得到的结果相同,并认为是脂类氧化所产生的大量 ROS 抑制了 CAT 活性^[24-25].对金鱼和鲤鱼低氧胁迫研究结果显示 CAT 活性不变,说明 CAT 具有较强的物种特异性,其在生物耐低氧方面作用有待进一步研究.

总抗氧化能力是机体内抗氧化酶体系和抗氧化物体系抗氧化能力的总和,其活性是反映机体抗氧化能力的重要指标之一.低氧胁迫后肝脏和鳃中 T-AOC 活性在短时间内迅速上升(54.1%和 239%),说明杂交鲷能够快速对低氧胁迫作出反应,

并能有效地清除活性氧。随着胁迫时间的延长杂交鲷体内 T-AOC 活性逐渐下降, 并低于对照组, 说明长时间的低氧胁迫会超过机体本身调控的阈值, 抑制其体内酶活性造成氧化损伤^[26]。

笔者从无氧代谢能力和抗氧化酶 2 个方面来说明杂交鲷对低氧环境有一定的适应能力, 但长时间的低氧胁迫会对其造成氧化损伤。生物的生理调节在生物适应低氧环境下发挥着重要作用, 所以下一步工作是研究低氧胁迫下杂交鲷体内红细胞数目、血红蛋白含量和代谢水平等指标的变化, 以此来进一步评价杂交鲷的耐低氧能力。

参考文献:

- [1] 洪磊, 张秀梅. 环境胁迫对鱼类生理机能的影响[J]. 海洋科学进展, 2004, 22(1):114-121.
- [2] Niklitschek E J, Secor D H. Dissolved oxygen, temperature and salinity effects on the ecophysiology and survival of juvenile Atlantic sturgeon in estuarine waters: I. Laboratory results[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2009, 381:150-160.
- [3] 刘伟成, 单乐州, 谢起浪, 等. 温度对条石鲷摄食率、产卵量和受精率的影响[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2008, 21(3):314-318.
- [4] Filho D W, Torres M A, Zaniboni-Filho E, et al. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847)[J]. Aquaculture, 2005, 244:349-357.
- [5] Landry C A, Steele S L, Manning S, et al. Long term hypoxia suppresses reproductive capacity in the estuarine fish, *Fundulus grandis*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 2007, 148:317-323.
- [6] Hassell K L, Coutin P C, Nugegoda D. Hypoxia impairs embryo development and survival in black bream (*Acanthopagrus butcheri*)[J]. Marine Pollution Bulletin, 2008, 57:302-306.
- [7] 林浩然. 鱼类生理学[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1998.
- [8] Pihl L, Baden S P, Diaz R J. Effects of periodic hypoxia on distribution of demersal fish and crustaceans[J]. Marine Biology, 1991, 108:349-360.
- [9] Frey B J, Weber R E, Aan Aardt W J, et al. The haemoglobin system of the mudfish, *Labeo capensis*: Adaptations to temperature and hypoxia[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 1998, 120:735-742.
- [10] Storey K B. Metabolic adaptations supporting anoxia tolerance in reptiles: Recent advances[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 1996, 113(1):23-35.
- [11] Almeida Val V M F, Val A L, Duncan W P, et al. Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): Contribution of tissue enzyme levels[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 2000, 125:219-226.
- [12] Hermes L M, Storey J M, Storey K B. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress[J]. Cell and Molecular Responses to Stress, 2001, 2:263-287.
- [13] 蒋宏雷, 吴雄飞, 石刚德, 等. 真鲷与黑的杂交子一代的胚胎发育[J]. 河北渔业, 2007, 2:40-42.
- [14] 邱新志, 吴雄飞. 盐度对真鲷()×黑鲷()杂交子一代仔鱼活力的影响[J]. 河北渔业, 2008, 35(4):41-43.
- [15] Chen J, Mai K, Ma H, et al. Effects of dissolved oxygen on survival and immune response of scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2007, 22:272-281.
- [16] Johnston I A. Anaerobic metabolism in the carp (*Carassius carassius* L)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 1975, 51:235-241.
- [17] Cooper R U, Clough L M, Farwell M A, et al. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2002, 279: 1-20.
- [18] Storey K B. Oxidative stress: Animal adaptations in nature[J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 1996, 29:1715-1733.
- [19] Jm M C, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein)[J]. Journal of Experimental Biology, 1969, 244(6):49-55.
- [20] 江天久, 牛涛. 重金属 Cu²⁺, Pb²⁺和 Zn²⁺胁迫对近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*) SOD 活性影响研究[J]. 生态环境, 2006, 15(2):289-294.
- [21] 马广智, 唐玫, 徐军. 低 pH 值对草鱼鳃和肝组织超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响[J]. 中国水产科学, 2001, 8(1):23-25.

- [22] 王春琳, 吴丹华, 董天野, 等. 曼氏无针乌贼耗氧率及溶氧胁迫对其体内酶活力的影响[J]. 应用生态学报, 2008, 19(11):2420-2427.
- [23] Lushchak V I, Bagnyukova T V. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby the rotan *Perccottus glenii*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 2007, 148:390-397.
- [24] Lushchak V I, Bagnyukova T V, Husak V V, et al. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005, 37:1670-1680.
- [25] Lushchak V I, Bagnyukova T V, Lushchak O V. Hypoxia and recover pertub free radical processess and anti-oxidant potential in commom carp (*Cyprinus carpio*) tissues[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005, 37:1319-1330.
- [26] Ishioka H. Live fish transportation, series of fisheries book 39[M]. Tokyo: Kosesha Kosehaku, 1982.

Hypoxia-induced Metabolic and Antioxidant Enzymatic Activies in the *P. major* × *S. macrocephalus* F1

JIANG Jing-teng^{1,2}, WU Xiong-fei^{1*}, JIANG Hong-lei¹

(1.Ningbo Academy of Ocean and Fishery, Ningbo 315012, China;

2.Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: To examine hypoxia-induced stress at metabolic and antioxidant enzyme levels, we exposed the *P. major* × *S. macrocephalus* F1 to $(1.83 \pm 0.27) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ to the dissolved oxygen. After 0, 6, 12 and 24 h exposure, samples of liver, gill, and muscle tissue are extracted and subsequently analyzed to determine the lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and total anti-oxidative capability (T-AOC). Hypoxia facilitates increasing the LDH content in the muscle (25.7%) and liver (17.6%). The activity of SOD returns to control level after an initial increase (20.2%) in liver. Hypoxia decreases the CAT content in the liver (44.3%~62.4%). T-AOC activity significantly increases in the liver (33.8%~54.1%) and gill (239%), but decreases during longer hypoxia exposure. The results show that the hybrid has a certain degree of hypoxia tolerance, but its long hypoxia stress may cause oxidative damage.

Key words: *Pagrosomous major*; *Spraus macrocephalus*; hybrid; hypoxia; antioxidant enzymes

CLC number: S965

Document code: A

(责任编辑 史小丽)