



低氧胁迫和恢复对长吻鲩脑组织低氧应答基因、生理生化指标和食欲的影响

李 瑶¹, 杨智茹¹, 程景颢¹, 李 杰¹, 宁先会¹, 王 涛¹,
张 凯¹, 暨 杰¹, 张国松^{2*}, 尹绍武^{1*}

(1. 南京师范大学海洋科学与工程学院, 江苏省特色水产育种与绿色高效养殖技术工程研究中心, 江苏 南京 210023;

2. 菏泽学院, 山东省“十三五”高校生理生化及应用重点实验室, 山东 菏泽 274015)

摘要: 为了解长吻鲩脑组织应对低氧胁迫的调控机制, 实验运用酶活性测定、H.E 染色、qRT-PCR 和 TUNEL 检测等方法, 分析比较了低氧胁迫 [(0.8±0.1) mg/L] 0、2、4、6 h (标示为 H0、H2、H4 和 H6) 和恢复 [(7.3±0.5) mg/L] 2、4、6 h (标示为 R2、R4 和 R6) 下长吻鲩脑组织低氧应答基因、生理生化指标和食欲基因的变化。结果显示, 在低氧胁迫和恢复下, 长吻鲩脑组织氧传感蛋白相关基因 (*HIFs*、*PHDs* 和 *Vhl*) 表达量整体呈现出先上升后下降趋势; 呼吸代谢酶 (*HK*、*PK* 和 *LDH*) 活性在 H0 时显著升高, *SDH* 和 *MDH* 活性在 H6 时显著降低, 恢复溶解氧后, 代谢模式由无氧呼吸逐渐转变为有氧呼吸; 抗氧化酶 (*GSH-Px*、*CAT* 和 *SOD*) 和应激指标 (*MDA* 和 *LPO*) 在低氧 2 h 后逐渐升高, 恢复溶解氧后氧化应激现象仍然存在。观察脑组织形态发现, 在低氧胁迫下长吻鲩脑组织出现了神经细胞肿胀、空泡等受损现象, 恢复溶解氧 6 h 后脑组织受损并未得到有效改善。随着低氧时间延长, 脑组织细胞凋亡程度不断增加, 凋亡相关基因 (*Bax*、*Caspase-3* 和 *p53*) 表达量显著升高, 而 *Bcl-2* 基因表达量降低, 恢复溶解氧后较对照组仍有显著差异。另外, 在低氧胁迫 0 h 和 2 h 时, 长吻鲩摄食率分别下降 54% 和 98%, 检测到低氧胁迫能显著抑制促食基因 (*NPY*) 和诱导抑食基因 (*PYY*、*CCK* 和 *NUCB2*) 表达。研究表明, 低氧胁迫和恢复对长吻鲩脑组织氧传感蛋白、呼吸代谢、氧化应激、结构形态、细胞凋亡以及食欲等指标均具有显著影响。本研究结果为阐明低氧胁迫和恢复下长吻鲩脑组织分子调控机制提供一定的理论依据, 对今后开展该鱼集约化健康养殖和耐低氧新品种选育工作具有指导意义。

关键词: 长吻鲩; 低氧胁迫; 脑组织; 低氧应答基因; 食欲

中图分类号: S 965

文献标志码: A

在水生生态系统中, 鱼类所处水环境中的溶解氧 (DO) 含量波动较大, 一天甚至几个小时内就可使得水体 DO 含量降低至 0.33~1.27 mg/L^[1]。在

连续阴雨、高温以及高密度养殖等所造成的低氧环境中, 易导致鱼类食欲减退, 摄食率降低, 生长缓慢^[2]。鱼类为了维持正常的生命活动, 进化

收稿日期: 2022-01-14 修回日期: 2022-08-25

资助项目: 江苏省种业振兴“揭榜挂帅”项目 (JBGS [2021] 034); 国家自然科学基金青年基金 (32102754, 32102760); 江苏省研究生科研与实践创新计划 (SJCX22_0605)

第一作者: 李瑶 (照片), 从事鱼类种质资源与遗传育种研究, E-mail: 2409509422@qq.com

通信作者: 张国松, 从事鱼类种质资源与遗传育种研究, E-mail: zhangguosong@hezeu.edu.cn;

尹绍武, 从事鱼类种质资源与遗传育种研究, E-mail: yinshaowu@163.com



出了多种氧气水平的适应策略, 如改变代谢途径、呼吸方式、呼吸器官结构等^[3], 并通过增强糖酵解和无氧呼吸来应对 ATP 紧缺, 最大限度延长其在低氧环境中的存活时间^[4]。在常氧环境中, 线粒体进行正常的有氧呼吸会产生较少的活性氧 (ROS), 随着低氧时间的延长机体内 ROS 逐渐积累, 导致脂质过氧化、DNA 损伤等, 对机体产生不利影响^[5]。尽管鱼类可通过一些急性应激反应来应对水体短期低氧, 以维持其正常生理活动, 但当水体出现严重低氧时, 仍会引起鱼类瞬间大量窒息死亡。有研究表明在低氧胁迫下鱼类脑组织细胞的凋亡, 是导致“泛池”的主要原因之一^[6], 阐明低氧环境下鱼类脑组织的低氧应答机制具有重要的意义。

长吻鲢 (*Leiocassis longirostris*) 是我国特色经济鱼类, 主要分布于中国东部的长江、辽河、淮河、闽江至珠江等水系, 具有肉质鲜美, 营养丰富, 生长速率较快等特点^[7], 据《中国渔业统计年鉴》统计, 2020 年与 2021 年其养殖产量均超过 2 万 t, 且 2021 年比 2020 年增产 4.91%^[8]。目前国内外对长吻鲢的研究主要集中在其繁殖技术、疾病防治等方面^[9], 关于该鱼脑组织对低氧胁迫的应答机制未见报道。因此, 对长吻鲢开展低氧胁迫研究有助于揭示该鱼脑组织的低氧响应机制, 为后续开展该鱼集约化健康养殖和耐低氧新品种选育提供一定的理论依据, 促进长吻鲢产业可持续发展。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用长吻鲢采自江苏省南京市水产科学研究所禄口基地, 选取健康的长吻鲢[(12±1.1) cm, (30±2.3) g] 1 500 尾, 随机分配到 30 个具有生物过滤装置的水循环养殖玻璃缸 (长×宽×高为 1.2 m×0.85 m×0.55 m) 中, 每个玻璃缸 50 尾, 饲养条件为: 水流速率为 5 L/min, 温度为 (27±1) °C, pH 为 7.5±0.2, 溶解氧含量 (DO) 维持在 (7.3±0.5) mg/L, 每天 9:00 和 17:00 投喂人工配合饲料, 驯养 14 d, 实验前禁食 24 h。

1.2 浮头点测定

选用 3 个玻璃缸, 使用溶解氧测定仪 (LDO101, 上海鑫嵩公司) 检测水体中 DO。低氧胁迫开始前水中的 DO 为 (7.3±0.5) mg/L。低氧实验开始后, 停止曝气和进水, 整个玻璃缸用透明膜密封并充

入氮气。实验过程中, 观察长吻鲢的活动, 当所有鱼开始因 DO 降低而浮上水面吞食水体表面的空气时, 则到达“浮头点”。当 DO 降到 0.64 mg/L 时, 浮头现象明显。本实验为了使长吻鲢获得一个不影响其正常生存的低氧环境, 因此, 选择 0.8 mg/L 作为低氧胁迫的条件。

1.3 实验设计与样品采集

实验设置低氧组 [(0.8±0.1) mg/L] 和常氧恢复组 [(7.3±0.5) mg/L], 每组 3 个重复。低氧组: 直接充入氮气约 30 min, 使 DO 从 (7.3±0.5) mg/L 降至 (0.8±0.1) mg/L, 之后调节氮气充入量使 DO 维持在 (0.8±0.1) mg/L 持续 6 h。常氧恢复组: 在低氧胁迫 6 h 后停止充入氮气开始充入空气, 使 DO 恢复至 (7.3±0.5) mg/L 维持 6 h。在正式低氧处理前, 首先从常氧状态 [(7.3±0.5) mg/L] 的 3 个玻璃缸中随机各取出 4 尾长吻鲢脑组织作为常氧对照 (标示为 C), 共计 12 尾, 待 DO 降至 (0.8±0.1) mg/L 后的 0、2、4 和 6 h 和 DO 恢复至 (7.3±0.5) mg/L 后的 2、4 和 6 h 进行低氧组和常氧恢复组取材 (标示为 H0、H2、H4、H6 和 R2、R4、R6), 每个时间点解剖 12 尾长吻鲢脑组织并用生理盐水 (0.8%, 4 °C) 润洗, 放置于 1.5 mL 冻存管中, 经液氮处理后 -80 °C 保存; 其中 9 尾鱼的脑组织 (同 1 个缸的 3 尾鱼脑组织混为 1 个样本) 用于检测基因表达量和生理生化指标, 另外 3 尾鱼脑组织保存于多聚甲醛离心管中, 用于苏木精-伊红 (H.E) 染色切片和 TUNEL 检测。实验过程中使用溶解氧测定仪 (LDO101, 上海鑫嵩公司) 每 5 min 检测 1 次水体中 DO。

此外, 另选用 12 个玻璃缸, 分别测定低氧胁迫 [DO: (0.8±0.1) mg/L] 后 0、2、4 和 6 h 长吻鲢的摄食率, 计算公式:

$$\text{摄食率}(\%) = \frac{\text{总投饵量}(\text{g}) - \text{总余饵量}(\text{g})}{\text{实验喂养时长}(\text{h}) \times \text{平均体重}(\text{g})}$$

式中, 平均体重=(实验前初始体重+实验结束体重)/2。

1.4 脑组织氧传感蛋白、细胞凋亡和食欲相关基因表达量检测

从本课题组所测得的转录组序列中获取相关基因 CDs 序列片段, 使用 Premier 5.0 软件分别设计基因的荧光定量 PCR(qRT-PCR) 上下游引物 (表 1), 其中 β -actin 为内参基因。采用 qRT-PCR 检测氧传感蛋白相关基因: 低氧诱导因子 (*HIF-1 α* 、*HIF-2 α*)、脯氨酸羟化酶 (*PHD1*、*PHD2*、*PHD3*)

和 Hippel-Lindau 肿瘤抑制因子 (*Vhl*); 凋亡相关基因: BCL2-Associated x 的蛋白质 (*Bax*)、半胱氨酸蛋白酶-3(*Caspase-3*)、B 淋巴细胞瘤-2(*Bcl-2*) 和肿瘤抑制基因 53(*p53*); 食欲相关基因: 神经肽 Y (*NPY*)、肽 YY(*PYY*)、胆囊收缩素 (*CCK*) 和人核连蛋白 2(*NUCB2*) 的 mRNA 在脑组织中的表达情况。qRT-PCR 反应体系为正、反向引物各 0.45 μ L, Mix 10 μ L, ddH₂O 7.1 μ L, 模板 cDNA 2 μ L, 总体积为 20 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 计

表 1 引物列表

基因 gene	引物 primer	引物序列 primer sequence (5'-3')	长度/bp length
<i>HIF-1α</i>	<i>HIF-1α-F</i>	CTGGAAAGAGGGCTAAGGTG	20
	<i>HIF-1α-R</i>	AGTGACGGTCTCTGAATAGGG	20
<i>HIF-2α</i>	<i>HIF-2α-F</i>	AAAAGCCCAGTGGATGAC	18
	<i>HIF-2α-R</i>	TGGCGATGTTGCTGAAGT	18
<i>PHD1</i>	<i>PHD1-F</i>	AGCAATGGTGGCTTGTAC	19
	<i>PHD1-R</i>	TCAAATAAGGGCTCAATGTC	20
<i>PHD2</i>	<i>PHD2-F</i>	AGCCTGGATGTGAGAAGATAGC	22
	<i>PHD2-R</i>	CCGTCTCCGTTAGGGTTGT	19
<i>PHD3</i>	<i>PHD3-F</i>	CTGTTGATCGACTCCTGCTT	21
	<i>PHD3-R</i>	TGTGGTGTGCTTTGTGAA	19
<i>Vhl</i>	<i>Vhl-F</i>	AGACGGATGACCCGATGTTG	20
	<i>Vhl-R</i>	GCACACTAGCTTCTCACCA	20
<i>Bax</i>	<i>Bax-F</i>	TGACCGTGGCAAAGAGCA	18
	<i>Bax-R</i>	GATCCAGCGGAAATGTG	18
<i>Caspase-3</i>	<i>Caspase-3-F</i>	GGGAAACTGGGCTACAAA	18
	<i>Caspase-3-R</i>	CTCAGCAACACGCAAACA	18
<i>Bcl-2</i>	<i>Bcl-2-F</i>	CGTAGCCTCGCTTCAAAA	18
	<i>Bcl-2-R</i>	CGCGTCAGATCAATCACA	19
<i>p53</i>	<i>p53-F</i>	CGTCGTAGCAGTGCTAAAGT	21
	<i>p53-R</i>	GACCCTCTGTCCATTGTG	19
<i>NPY</i>	<i>NPY-F</i>	CACGACGCACAGCATCAC	18
	<i>NPY-R</i>	AGCACAAACACGCCACAA	18
<i>PYY</i>	<i>PYY-F</i>	CTTTACCCTGTCTCTGTGC	19
	<i>PYY-R</i>	TCCCTGGTTGTGGTCATT	18
<i>CCK</i>	<i>CCK-F</i>	ACACGATGCCAACACCCG	18
	<i>CCK-R</i>	TCCAGCCCAAGTAGTCCC	18
<i>NUCB2</i>	<i>NUCB2-F</i>	AATCAATCATCCTGGCAGTC	20
	<i>NUCB2-R</i>	CGTTCGTTGGGTCGTAGA	18
β -actin	β -actin-F	TGCTGCCTCTTCTCTCTCTC	20
	β -actin-R	GGACACCTGAACCTCTCATTCG	22

算基因的相对表达量。

1.5 脑组织酶活性检测

称取 0.1 g 脑组织, 用 0.9% 生理盐水冲洗后, 放入置于冰盒内的 1.5 mL 离心管中, 按照重量 (g): 体积 (mL) = 1:9 的比例加入 0.9 mL 的生理盐水, 冰水浴条件下进行机械匀浆, 将匀浆好的 10% 匀浆用低温离心机 3000 r/min 离心 10 min, 取其上清制成 10% 的组织匀浆液, 分装保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱。脑组织蛋白浓度 (TP)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、己糖激酶 (HK)、丙酮酸激酶 (PK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、琥珀酸脱氢酶 (SDH) 和苹果酸脱氢酶 (MDH) 的活性, 丙二醛 (MDA) 和脂质过氧化物 (LPO) 的含量采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测定。

1.6 脑组织 H.E 染色切片

用 4% 多聚甲醛对脑组织进行固定, 以防止细胞死亡后自融或分解, 操作步骤如下: 石蜡切片包埋经过脱水, 再经脱蜡、H.E 染色, 脱水中性树胶封片, 光学显微镜下观察显微结构, 图像采集分析。呈蓝色的为细胞核, 呈红色的为细胞质。

1.7 脑组织 TUNEL 切片检测

将保存在 4% 多聚甲醛溶液中的脑组织进行常规石蜡包埋并切片, 操作步骤如下: 石蜡切片脱蜡至水, 蛋白酶 K 修复后破膜, 双氧水阻断内源性过氧化物酶, 室温平衡, 加混合反应液, DAB 显色, 苏木素复染细胞核, 脱水中性树胶封片。细胞核经苏木素着色变蓝, DAB 显出来的阳性凋亡细胞核为棕黄色。

1.8 数据分析

使用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析, 对对照组和低氧组表达模式的数据采用双尾 *t*-test 检验统计差异, 当 $P < 0.05$ 时认为差异显著 (标为*), $P < 0.01$ 认为差异极显著 (标为**), P 值均采用实验组与对照组相比得出, 结果用平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。

2 结果

2.1 低氧胁迫和恢复对长吻鲈脑组织氧传感蛋白的影响

在低氧胁迫下, *HIF-1 α* 和 *PHD2* 基因表达量

在 H4 时达到峰值, 恢复溶解氧后逐渐下降。*HIF-2 α* 、*PHD1* 和 *PHD3* 基因在低氧胁迫后表达量显著升高, 在 H2 达到峰值, 随后呈现下降趋势, 在 R2 时表达量仍显著高于对照组 ($P<0.05$)。 *Vhl* 基因表达量分别在 H6 时达到最高, 在 R6 时表达量与对照组仍有显著差异 ($P<0.05$)(图 1)。

2.2 低氧胁迫和恢复对长吻鲢脑组织呼吸代谢和氧化应激的影响

低氧胁迫和恢复下长吻鲢脑组织呼吸代谢相关酶活性分析 HK 活性在低氧胁迫 6 h 后达到最高点, 恢复溶解氧后呈下降趋势。PK 和 LDH 活性在 H2 时达到顶峰, 恢复溶解氧后仍高于对照组 ($P<0.05$)。SDH 和 MDH 活性在 H6 时达到最低, 恢复溶解氧过程中酶活性逐渐上升(图 2)。

低氧胁迫和恢复下长吻鲢脑组织氧化应激参数与酶活性分析 在低氧胁迫下, 长吻鲢脑组织 GSH-Px 活性在 H2 时达到峰值, 随后逐渐恢复至对照水平。SOD 和 CAT 活性在低氧胁迫下显著升高, 在 H4 时达到最高。MDA 和 LPO 含量分别在 H4 和 H6 时达到峰值, 恢复溶解氧后呈下降趋势(图 3)。

2.3 低氧胁迫和恢复对长吻鲢脑组织结构的影响

对照组中长吻鲢脑组织具有正常的形态结构,

神经细胞排列有序。低氧胁迫开始后出现神经细胞肿大, 在 H2~H6 时, 肿大细胞数量逐渐增加。恢复溶解氧 6 h 后, 低氧引起的脑组织形态变化未得到改善并伴有细胞核固缩现象发生(图版 I)。

2.4 低氧胁迫和恢复对长吻鲢脑组织细胞凋亡的影响

脑组织 TUNEL 检测结果分析 TUNEL 切片检测结果显示, 低氧胁迫开始前长吻鲢脑组织细胞凋亡现象较少, 随着低氧时间的延长细胞出现不同程度的凋亡。进一步统计分析显示, 在低氧胁迫下长吻鲢脑组织凋亡指数显著升高, H6 时达到最大值, 恢复溶解氧后细胞凋亡指数仍显著高于对照组 ($P<0.05$)(图版 II)。

低氧胁迫和恢复对长吻鲢脑组织 *Bax*、*Caspase-3*、*Bcl-2* 和 *p53* 的影响 在低氧胁迫下长吻鲢脑组织 *Bax* 和 *Caspase-3* 基因表达量分别在 R2 和 H4 达到峰值, 随后表达量逐渐降低。*Bcl-2* 基因表达量在低氧胁迫下不断降低, 在 H6 时达到最低值, 恢复溶解氧后逐渐上升。*p53* 基因表达量在 H6 时达到峰值, R6 与对照组相比仍有显著差异 ($P<0.05$)(图 4)。

2.5 低氧胁迫和恢复对长吻鲢脑组织食欲的影响

低氧胁迫下, 长吻鲢摄食率在 0 和 2 h 时分

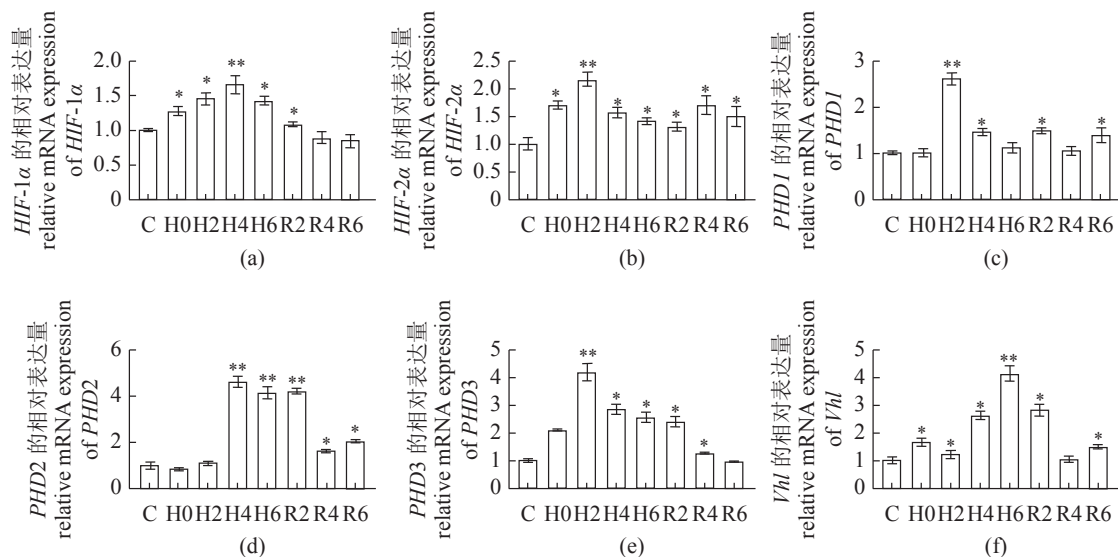


图 1 低氧胁迫和恢复下长吻鲢脑组织氧传感蛋白基因的表达

*表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$ 。对照组, 低氧胁迫组(0, 2, 4, 6 h)和常氧恢复组(2, 4, 6 h)分别以 C, H0, H2, H4, H6, R2, R4 和 R6 表示

Fig. 1 Temporal expression of oxygen sensor related genes in the brain tissue of *L. longirostris* under acute hypoxia and reoxygenation conditions

* at $P<0.05$ and ** at $P<0.01$. Control, hypoxia (0, 2, 4, 6 h) and reoxygenation (2, 4, 6 h) were respectively shown as bars C, H0, H2, H4, H6, R2, R4 and R6

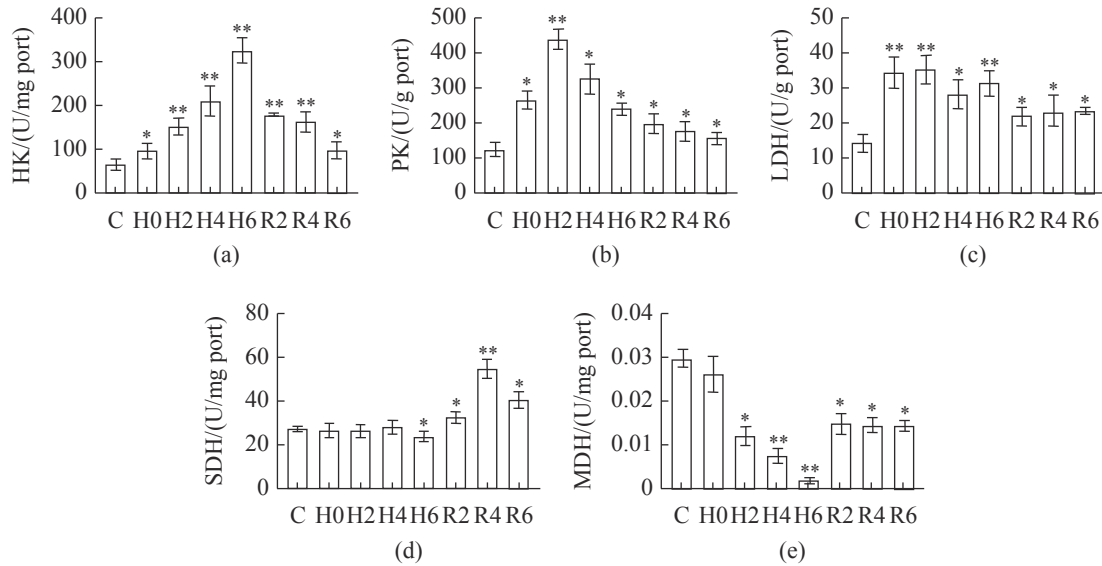


图2 低氧胁迫与恢复对长吻鲢脑组织HK、PK、LDH、SDH和MDH活性的影响

*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。对照组, 低氧胁迫组(0, 2, 4, 6 h)和常氧恢复组(2, 4, 6 h)分别以C, H0, H2, H4, H6, R2, R4和R6表示

Fig. 2 Effects of hypoxia stress and recovery on HK, PK, LDH, SDH and MDH enzyme activities in the brain tissue of *L. longirostris*

* at $P < 0.05$ and ** at $P < 0.01$. Control, hypoxia (0, 2, 4, 6 h) and reoxygenation (2, 4, 6 h) were respectively shown as bars C, H0, H2, H4, H6, R2, R4 and R6

别下降54%和98%, 4和6h时不再摄食。脑组织NPY基因表达量呈下降趋势, 在H6时达到最低, 随后逐渐上升。PYY和CCK基因的表达量在H6达到峰值, 恢复溶解氧后表达量逐渐降低。NUCB2基因的表达量在H0达到峰值, 恢复溶解氧后6h与对照组间无显著差异(图5)。

3 讨论

3.1 低氧胁迫和恢复对长吻鲢脑组织氧传感蛋白的影响

在自然水体中, 鱼类不可避免的面临水体中氧气含量剧烈变化, 为此演化出了复杂的低氧应激反应响应机制^[10], 与哺乳动物相似, HIF信号通路在鱼类低氧应答中扮演重要的角色, 如HIFs、PHDs和Vhl等作为低氧反应的核心调节因子, 充当细胞氧气水平的直接感受器, 激活参与氧气传感、氧气运输和新陈代谢变化等过程中的基因表达^[11]。本研究结果显示在低氧胁迫下长吻鲢脑组织氧传感蛋白相关基因(HIF-1 α 、HIF-2 α 、PHDs和Vhl)的基因表达量显著升高, 恢复溶解氧后表达量逐渐降低, 与印度鲃(*Silurus asotus*)^[12]、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[13]、海鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[14]和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[15]

的表达模式类似, 此表达模式说明了不同鱼类氧传感蛋白的功能具有相似性, 进化具有保守性。HIF- α 可以在常氧条件下被PHDs羟基化以限制积累^[16], 本研究中PHDs和Vhl上调可能作为一种反馈机制来终止低氧反应, 避免长吻鲢脑组织一直处于低氧应激状态。尤其值得注意的是, 恢复溶解氧6h后HIF-2 α 、PHD1、PHD2和Vhl基因表达量与对照组仍有显著差异($P < 0.05$), 在瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)脑组织中也有类似现象^[17], 推测这可能是由于脑组织是鱼体的重要器官, 在恢复溶解氧过程中, 需要通过持续高表达来补偿或缓冲低氧过程造成的影响, 使机体尽快恢复到稳定状态并发挥正常的生理功能。

3.2 低氧胁迫和恢复对长吻鲢脑组织呼吸代谢和氧化应激的影响

在面对低氧胁迫时, 生物体可通过改变代谢方式和激活抗氧化防御系统等来减轻低氧对生物机体的影响^[18]。已有研究表明, SDH和MDH是TCA循环的重要组成部分, 其活性可作为评价TCA循环运行程度的指标^[19]。本研究结果显示长吻鲢在低氧下SDH和MDH活性显著降低, 恢复溶解氧后其活性逐渐升高, 类似的结果在杂交黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*♂ \times *Pelteobagrus fulvidraco*♀)^[20]和大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[21]中也有报道。

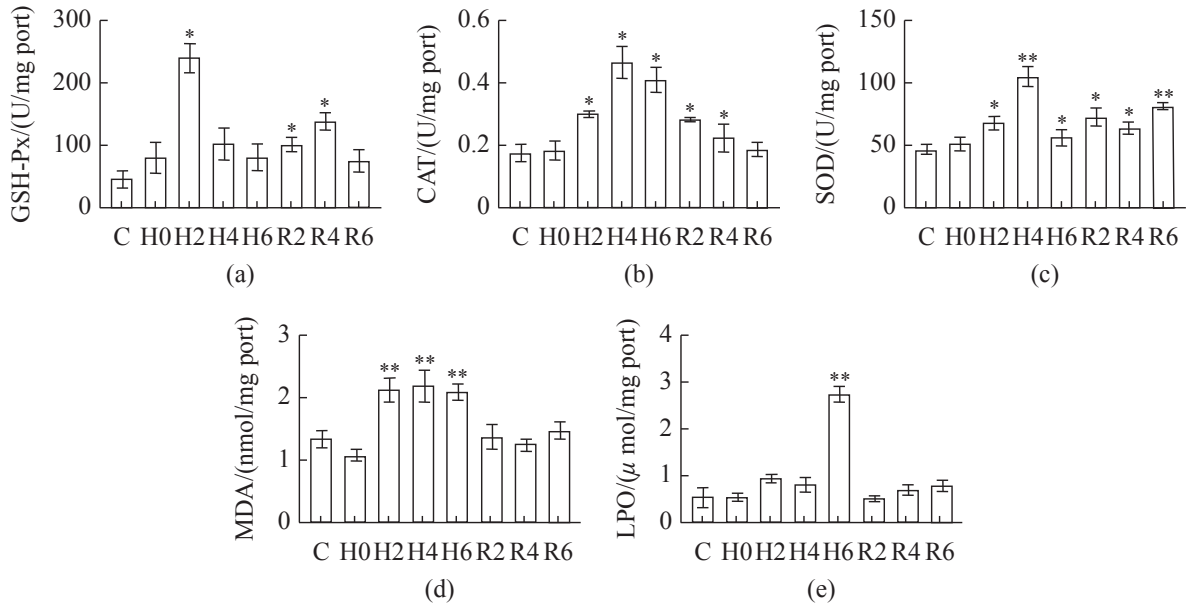
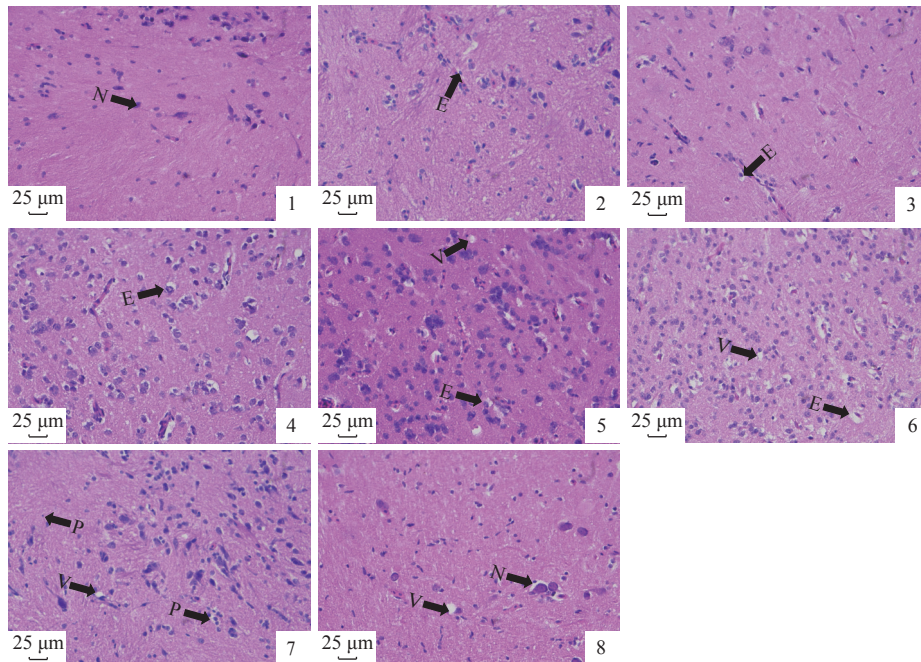


图3 低氧胁迫与恢复对长吻鲢脑组织 GSH-Px、CAT、SOD、MDA 和 LPO 活性的影响

*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。对照组, 低氧胁迫组 (0, 2, 4, 6 h) 和常氧恢复组 (2, 4, 6 h) 分别以 C, H0, H2, H4, H6, R2, R4 和 R6 表示

Fig. 3 Effects of hypoxia stress and recovery on GSH-Px, CAT, SOD, MDA and LPO enzyme activities in the brain tissue of *L. longirostris*

* at $P < 0.05$ and ** at $P < 0.01$. Control, hypoxia (0, 2, 4, 6 h) and reoxygenation (2, 4, 6 h) were respectively shown as bars C, H0, H2, H4, H6, R2, R4 and R6

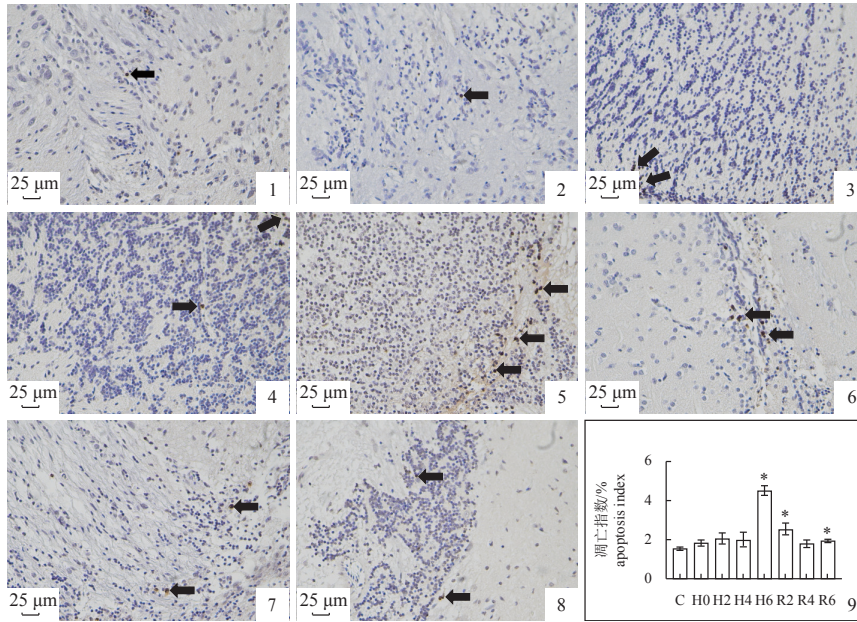


图版 I 低氧胁迫和恢复下长吻鲢脑组织形态变化

1. C, 2. H0, 3. H2, 4. H4, 5. H6, 6. R2, 7. R4, 8. R6, 下同。N.正常的神经细胞, E.神经细胞增大, P.细胞核固缩, V.空泡。切片放大倍数: 400×

Plate I Brain tissue morphology changes of *L. longirostris* under acute hypoxia and reoxygenation conditions

1. C, 2. H0, 3. H2, 4. H4, 5. H6, 6. R2, 7. R4, 8. R6, the same below. N. normal histology of nerve cell, E. enlarged nerve cells, P. occasional pyknotic nuclei, V. vacuoles in the lamina propria. Magnification: 400×



图版 II 脑组织 TUNEL 切片检测

黑色箭头代表凋亡细胞(棕黄色)。放大倍数: 400×

Plate II Atistical results of brain tissue TUNEL section and apoptosis index

Black arrows mean apoptotic cells (brown), magnification: 400×

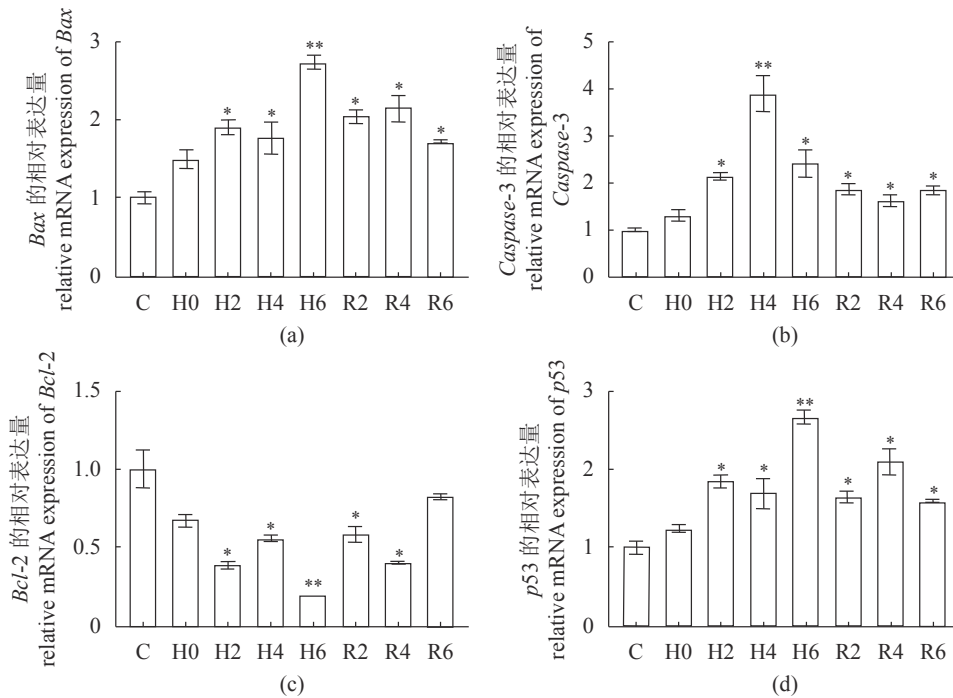


图 4 低氧胁迫和恢复下长吻鲈脑组织凋亡相关基因的表达模式

*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。对照组, 低氧胁迫组 (0, 2, 4, 6 h) 和常氧恢复组 (2, 4, 6 h) 分别以 C, H0, H2, H4, H6, R2, R4 和 R6 表示

Fig. 4 Temporal expression of apoptosis-related genes in the brain tissue of *L. longirostris* under acute hypoxia and reoxygenation conditions

* at $P < 0.05$ and ** at $P < 0.01$. Control, hypoxia (0, 2, 4, 6 h) and reoxygenation (2, 4, 6 h) were respectively shown as bars C, H0, H2, H4, H6, R2, R4 and R6

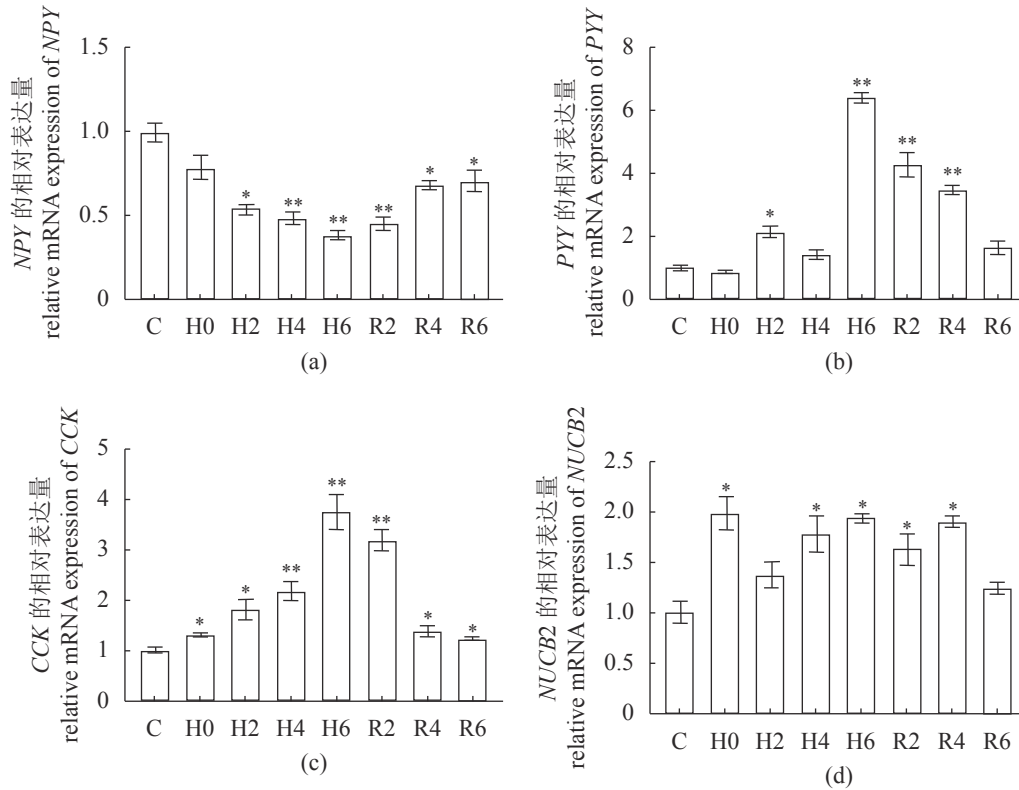


图5 低氧胁迫和恢复下长吻鲮脑组织食欲相关基因的表达模式

*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。对照组, 低氧胁迫组(0, 2, 4, 6 h)和常氧恢复组(2, 4, 6 h)分别以 C, H0, H2, H4, H6, R2, R4 和 R6 表示

Fig. 5 Temporal expression of appetite related genes in the brain tissue of *L. longirostris* under acute hypoxia and reoxygenation conditions

* at $P < 0.05$ and ** at $P < 0.01$. Control, hypoxia (0, 2, 4, 6 h) and reoxygenation (2, 4, 6 h) were respectively shown as bars C, H0, H2, H4, H6, R2, R4 and R6

HK 和 PK 是糖酵解过程中的限速酶, 它们活性增加表明糖酵解通路活性也增加, LDH 是无氧呼吸的指示剂, 具有调节机体能量供应及酸碱平衡的积极作用, 低氧胁迫下长吻鲮脑组织中 HK、PK、LDH 活性均明显高于对照组 ($P < 0.05$), 同样在军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 幼鱼^[22]、印度鲷^[23]、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)^[24]、豹纹脂身鲷 (*Hypostomus plecostomus*)^[25] 和暗纹东方鲀 (*Takifugu fasciatus*)^[26] 中也有类似的报道。因此推测, 在低氧胁迫下, 长吻鲮线粒体有氧呼吸中 TCA 循环途径被抑制, 而糖酵解和无氧代谢途径成为应对低氧环境下的重要 ATP 供给来源。

在正常条件下, 生物体内 ROS 常处于动态平衡状态, 而多种形式的胁迫会导致机体内 ROS 水平变化, 使机体产生氧化应激^[27], 机体可以通过提高抗氧化酶 (GSH-Px、SOD、CAT) 和抗氧化剂的表达来增加抗氧化能力^[28]。本研究显示在低氧胁迫下长吻鲮脑组织中 MDA 和 LPO 的含量均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 与本研究结果相似的

是军曹鱼^[29]、鲮幼鱼 (*Mugil cephalus*)^[30] 和大盖巨脂鲤 (*Piaractus brachyomus*)^[31] 在低氧胁迫下体内 MDA 和 LPO 的含量显著增加。另外, 低氧胁迫下长吻鲮脑组织 GSH-Px、SOD 和 CAT 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$), 在鲫 (*Carassius auratus*)^[32]、青田田鱼 (*Cyprinus carpio* var. *qingtianensis*) 幼鱼^[33]、卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 幼鱼^[34] 和鲤 (*Cyprinus carpio*)^[35] 中也有类似报道。然而, SOD 的活性在恢复过程中保持较高水平, 出现这种现象的原因可能是在恢复溶解氧过程中摄入氧气使得长吻鲮大量进行有氧呼吸导致 ROS 浓度迅速升高, 从而造成恢复溶解氧过程中同样出现强烈的氧化应激现象。本研究进一步证实了低氧胁迫和恢复均能使长吻鲮发生氧化应激反应, 而抗氧化系统的持续激活可以清除细胞内产生过量的 ROS 以保护脑组织。

3.3 低氧胁迫和恢复对长吻鲮细胞凋亡的影响

氧化应激使机体处于易损状态, 同时能增强

致病因素毒性, 导致基因突变等, 不仅与多种疾病的发生发展有关, 也与细胞凋亡存在密切的关系。在本研究中, 低氧胁迫下长吻鮠脑组织细胞出现了凋亡现象, 进一步统计分析显示随着低氧时间的延长, 凋亡细胞数目逐渐增加, 恢复溶解氧 6 h 后仍与对照组有显著差异 ($P < 0.05$), 此结果与团头鲂^[36]和鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)^[37]在低氧胁迫下的研究结果相似。*Bcl-2* 和 *Bax* 是鱼类细胞凋亡过程中起着关键调控作用的 2 个基因, 二者的比值在一定程度上决定了细胞的发展方向^[38]。本研究发现, 低氧胁迫下长吻鮠脑组织中 *Bcl-2* 基因的表达量显著低于对照组 ($P < 0.05$), 而 *Bax* 基因的表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 同样在斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*)^[39]中也出现了类似的结果, 这可能是由于在低氧胁迫下, *Bcl-2* 基因被抑制 *Bcl-2/Bax* 的值逐渐减小, 从而诱导了细胞凋亡的产生^[40]。*Caspase-3* 是线粒体凋亡途径和死亡受体途径中的常见效应子, 当其受到凋亡信号刺激后可以裂解特异性的蛋白质底物导致细胞凋亡, *p53* 是一种常见的肿瘤抑制因子, 与负生长调节和细胞凋亡作用有关, 本研究结果显示低氧胁迫下 *Caspase-3* 和 *p53* 基因表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 在中华鲟 (*Acipenser sinensis*)^[41]、斑马鱼 (*Danio rerio*)^[42]和杂交黄颡鱼^[20]中也有类似的研究结果, 说明在低氧胁迫下长吻鮠脑组织细胞凋亡反应剧烈。此外, 恢复溶解氧 6 h 后 *Bcl-2*、*Bax*、*Caspase-3* 和 *p53* 基因的表达量与对照组相比仍有显著差异 ($P < 0.05$), 表明抗氧化防御系统没有有效的保护长吻鮠机体免受氧化应激损伤, 从而促使机体启动了细胞凋亡程序, 这也是鱼类应对低氧的策略之一。

3.4 低氧胁迫和恢复对长吻鮠食欲的影响

Matu 等^[43]研究发现, 低氧胁迫可以通过减少饥饿和控制能量摄入来影响鱼类的食欲。但迄今为止, 有关鱼类低氧胁迫抑制食欲和能量摄入的机制尚不清楚。*NPY* 是一种内源性促食因子, *CCK*、*PYY* 和 *NUCB2* 是一类调控摄食的抑食因子, 其中 *CCK* 主要通过作用于 *NPY* 受体, 特别是 *Y2* 受体来减少食欲^[44]。本研究通过 qRT-PCR 检测长吻鮠脑组织 *NPY*、*CCK*、*PYY* 和 *NUCB2* 基因发现, 在低氧胁迫下 *NPY* 基因表达量显著低于对照组 ($P < 0.05$), *CCK*、*PYY* 和 *NUCB2* 基因表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$)。此外, 在恢复溶解氧 6 h

后 *NPY*、*CCK* 的表达量与对照组相比仍有显著差异 ($P < 0.05$), 出现这种现象的原因可能是低氧对鱼类食欲的影响在复氧过程中并没有完全消除。结果表明, 低氧胁迫可通过调控 *NPY*、*CCK*、*PYY* 和 *NUCB2* 等摄食因子的表达来调控长吻鮠的摄食。

4 结论

综上所述, 低氧胁迫和恢复对长吻鮠脑组织中氧传感蛋白、呼吸代谢、氧化应激、结构形态、细胞凋亡以及食欲等指标均具有显著影响, 长吻鮠脑组织 *HIF-1 α* 通路在急性低氧胁迫后快速启动, *PHDs* 和 *Vhl* 通过高表达来进行低氧反应的反馈调节, 防止脑组织一直处于低氧应激状态。机体为了补偿供氧不足所导致的 ATP 供应紧缺, 呼吸代谢模式由有氧呼吸转变为无氧呼吸。然而随着低氧时间的延长, 神经细胞肿胀、空泡等脑组织结构受损现象逐渐加剧, 氧化应激损伤逐渐增大, 细胞凋亡现象产生, 机体通过激活抗氧化系统维持体内稳态, 此外在低氧胁迫下, 长吻鮠食欲也逐渐降低。本研究结果为阐明低氧胁迫和恢复下长吻鮠脑组织分子调控机制提供一定的理论依据, 对今后开展该鱼集约化健康养殖和耐低氧新品种选育工作具有指导意义。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 黄慧君, 王永平, 徐安伦. 云南大理洱海溶解氧日变化特征分析[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(S2): 245-248. Huang H J, Wang Y P, Xu A L. Diurnal variation of dissolved oxygen in Erhai Lake of Dali[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 34(S2): 245-248 (in Chinese).
- [2] Wannamaker C M, Rice J A. Effects of hypoxia on movements and behavior of selected estuarine organisms from the southeastern United States[J]. Journal of Experimental Marine Biology & Ecology, 2000, 249(2): 145-163.
- [3] Zhu C D, Wang Z H, Yan B. Strategies for hypoxia adaptation in fish species: A review[J]. Journal of Comparative Physiology B, 2013, 183(8): 1005-1013.
- [4] 李昕, 谢胜男, 殷娟娟, 等. 急性重复低氧对小鼠脑组织中糖酵解和线粒体氧化磷酸化以及能量负荷的影响[J]. 基础医学与临床, 2009, 29(12): 1254-1257.

- Li X, Xie S N, Yin J J, *et al.* Effects of repeated hypoxic exposures on glycolysis, mitochondrial oxidative phosphorylation and energy charge in mouse brain[J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2009, 29(12): 1254-1257 (in Chinese).
- [5] Kulisz A, Chen N F, Chandel N S, *et al.* Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes[J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2002, 282(6): L1324-L1329.
- [6] Richards J G. Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2011, 214(2): 191-199.
- [7] Yang G, Xiao M S, Yu Y Y, *et al.* Genetic variation at mtDNA and microsatellite loci in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris*)[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(4): 4605-4617.
- [8] 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. 中国渔业统计年鉴-2022[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022.
- Fishery and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook 2022[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022 (in Chinese).
- [9] 刘康, 何金钊. 投喂频率和投喂水平对长吻鮠幼鱼生长和免疫的影响[J]. *渔业现代化*, 2019, 46(1): 1-5.
- Liu K, He J Z. Effects of feeding frequency and feeding level on growth and immunity of juvenile *Leiocassis longirostris*[J]. *Fishery Modernization*, 2019, 46(1): 1-5 (in Chinese).
- [10] Chapman L J, Chapman C A, Nordlie F G, *et al.* Physiological refugia: Swamps, hypoxia tolerance and maintenance of fish diversity in the Lake Victoria region[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 133(3): 421-437.
- [11] 肖武汉. 低氧信号传导途径与鱼类低氧适应[J]. *中国科学: 生命科学*, 2015, 58(2): 148-155.
- Xiao W H. The hypoxia signaling pathway and hypoxic adaptation in fishes[J]. *Science China Life Sciences*, 2015, 58(2): 148-155 (in Chinese).
- [12] Mohindra V, Tripathi R K, Singh R K, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of three hypoxia-inducible factor alpha subunits, *HIF-1 α* , *-2 α* and *-3 α* in hypoxia-tolerant Indian catfish, *Clarias batrachus* [Linnaeus, 1758][J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(10): 5805-5815.
- [13] Yang S, Yan T, Wu H, *et al.* Acute hypoxic stress: Effect on blood parameters, antioxidant enzymes, and expression of *HIF-1 α* and *GLUT-1* genes in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 449-458.
- [14] Terova G, Rimoldi S, Corà S, *et al.* Acute and chronic hypoxia affects HIF-1 α mRNA levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Aquaculture*, 2008, 279(1-4): 150-159.
- [15] Wang H J, Huang C X, Chen N, *et al.* Molecular characterization and mRNA expression of HIF-prolyl hydroxylase-2 (*phd2*) in hypoxia-sensing pathways from *Megalobrama amblycephala*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2015, 186: 28-35.
- [16] So J H, Kim J D, Yoo K W, *et al.* FIH-1, a novel Interactor of mindbomb, functions as an essential anti-angiogenic factor during zebrafish vascular development[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109517.
- [17] 张国松. 瓦氏黄颡鱼 (*Pelteobagrus vachelli*) 应对低氧胁迫的分子机制研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2017.
- Zhang G S. Molecular mechanism of *Pelteobagrus vachelli* in response to hypoxia stress[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2017 (in Chinese).
- [18] Cohen E B, Geck R C, Toker A. Metabolic pathway alterations in microvascular endothelial cells in response to hypoxia[J]. *PLoS One*, 2020, 15(7): e0232072.
- [19] Kim S Y, Choi J S, Park C, *et al.* Ethyl pyruvate stabilizes hypoxia-inducible factor 1 alpha via stimulation of the TCA cycle[J]. *Cancer Letters*, 2010, 295(2): 236-241.
- [20] Pei X Y, Chu M X, Tang P, *et al.* Effects of acute hypoxia and reoxygenation on oxygen sensors, respiratory metabolism, oxidative stress, and apoptosis in hybrid yellow catfish "Huangyou-1"[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2021, 47(5): 1429-1448.
- [21] Zeng L, Wang Y H, Ai C X, *et al.* Effects of β -glucan on ROS production and energy metabolism in yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) under acute hypoxic stress[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2016, 42(5): 1395-1405.
- [22] 郭志雄, 曾泽乾, 黄建盛, 等. 急性低氧胁迫对大规模

- 军曹鱼幼鱼肝脏氧化应激、能量利用及糖代谢的影响[J]. *广东海洋大学学报*, 2020, 40(3): 134-140.
- Guo Z X, Zeng Z Q, Huang J S, *et al.* Effects of acute hypoxia on oxidative stress, energy utilization and carbohydrate metabolism in liver of large-sized juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, 40(3): 134-140 (in Chinese).
- [23] Kumar A, Gopesh A. Effect of hypoxia and energy conservation strategies in the air-breathing indian catfish, *Clarias batrachus*[J]. *National Academy Science Letters*, 2015, 38(2): 135-137.
- [24] Li M X, Wang X D, Qi C L, *et al.* Metabolic response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute and chronic hypoxia stress[J]. *Aquaculture*, 2018, 495: 187-195.
- [25] Treberg J R, MacCormack T J, Lewis J M, *et al.* Intracellular glucose and binding of hexokinase and phosphofructokinase to particulate fractions increase under hypoxia in heart of the Amazonian armored catfish (*Liposarcus pardalis*)[J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2007, 80(5): 542-550.
- [26] Li X R, Wang T, Yin S W, *et al.* The improved energy metabolism and blood oxygen-carrying capacity for pufferfish, *Takifugu fasciatus*, against acute hypoxia under the regulation of oxygen sensors[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, 45(1): 323-340.
- [27] Zhou B S, Wu R S S, Randall D J, *et al.* Metabolic adjustments in the common carp during prolonged hypoxia[J]. *Journal of Fish Biology*, 2000, 57(5): 1160-1171.
- [28] 薛红强, 康汇. 红景天提取物提高高强度跑台运动小鼠的抗氧化能力[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(2): 955-960.
- Xue H Q, Kang H. *Rhodiola rosea* extract improves the antioxidant capacity of high-intensity treadmill mice[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(2): 955-960 (in Chinese).
- [29] 李洪娟, 陈刚, 郭志雄, 等. 军曹鱼(*Rachycentron canadum*)幼鱼对环境低氧胁迫氧化应激与能量利用指标的响应[J]. *海洋学报*, 2020, 42(4): 12-19.
- Li H J, Chen G, Guo Z X, *et al.* Oxidative stress and energy utilization responses of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) to environmental hypoxia stress[J]. *Haiyang Xuebao*, 2020, 42(4): 12-19 (in Chinese).
- [30] 熊向英, 黄国强, 彭银辉, 等. 低氧胁迫对鲢幼鱼生长、能量代谢和氧化应激的影响[J]. *水产学报*, 2016, 40(1): 73-82.
- Xiong X Y, Huang G Q, Peng Y H, *et al.* Effect of hypoxia on growth performance, energy metabolism and oxidative stress of *Mugil cephalus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(1): 73-82 (in Chinese).
- [31] Castro J S, Braz-Mota S, Campos D F, *et al.* High temperature, pH, and hypoxia cause oxidative stress and impair the spermatid performance of the Amazon fish *Colossoma macropomum*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 772.
- [32] 张倩, 黄进强, 权金强, 等. 急性低氧胁迫和复氧对鲫鱼氧化应激的影响[J]. *水产科学*, 2020, 39(5): 649-656.
- Zhang Q, Huang J Q, Quan J Q, *et al.* Effects of acute hypoxia and reoxygenation on oxidative stress in crucian carp *Carassius auratus*[J]. *Fisheries Science*, 2020, 39(5): 649-656 (in Chinese).
- [33] 刘韬, 齐明, 高阳, 等. 青田田鱼幼鱼脑组织在急性低氧胁迫、复氧恢复的转录组分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2023, 32(1): 79-88.
- Liu T, Qi M, Gao Y, *et al.* Transcriptome analysis of brain tissue of Qingtian Paddy Field carp (*Cyprinus carpio* var. *qingtianensis*) during acute changes in dissolved oxygen[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2023, 32(1): 79-88 (in Chinese).
- [34] 陈世喜, 王鹏飞, 区又君, 等. 急性和慢性低氧胁迫对卵形鲳鲹幼鱼肝组织损伤和抗氧化的影响[J]. *动物学杂志*, 2016, 51(6): 1049-1058.
- Chen S X, Wang P F, Ou Y J, *et al.* The effect of acute and chronic hypoxia stress on liver tissue structure and oxidation in juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2016, 51(6): 1049-1058 (in Chinese).
- [35] Lushchak V I, Bagnyukova T V, Lushchak O V, *et al.* Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005, 37(6): 1319-1330.
- [36] 吴鑫杰, 陈楠, 黄春筱, 等. 低氧对团头鲂心肌细胞凋亡及抗氧化酶活性的影响[J]. *华中农业大学学报*, 2016, 35(3): 108-113.
- Wu X J, Chen N, Huang C X, *et al.* Effects of hypoxia on cardiomyocyte apoptosis and activity of antioxidant enzymes in *Megalobrama amblycephala* heart[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2016, 35(3): 108-113 (in Chinese).

- [37] 丁晨雨, 胡利双, 李云, 等. 低氧胁迫对鲢心肌细胞凋亡及其调控基因*Bax*、*Bcl-2*表达的影响[J]. *淡水渔业*, 2018, 48(2): 10-15.
Ding C Y, Hu L S, Li Y, *et al.* Effects of hypoxia stress on cardiomyocyte apoptosis and the control for *Bax*, *Bcl-2* expressions in *Hypophthalmichthys molitrix*[J]. *Fresh-water Fisheries*, 2018, 48(2): 10-15 (in Chinese).
- [38] Li D D, Luo Z, Chen G H, *et al.* Identification of apoptosis-related genes *Bcl2* and *Bax* from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and their transcriptional responses to waterborne and dietborne zinc exposure[J]. *Gene*, 2017, 633: 1-8.
- [39] Yuan Z H, Liu S K, Yao J, *et al.* Expression of *Bcl-2* genes in channel catfish after bacterial infection and hypoxia stress[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 65: 79-90.
- [40] Cao J L, Chen J J, Wang J D, *et al.* Effects of fluoride on liver apoptosis and *Bcl-2*, *Bax* protein expression in freshwater teleost, *Cyprinus carpio*[J]. *Chemosphere*, 2013, 91(8): 1203-1212.
- [41] Lu G, Mak Y T, Wai S M, *et al.* Hypoxia-induced differential apoptosis in the central nervous system of the sturgeon (*Acipenser shrenckii*)[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2005, 68(5): 258-263.
- [42] 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 R N Q H, Lin F, Xu Q H. 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 (in Chinese).
- [43] Matu J, Gonzalez J T, Ispoglou T, *et al.* The effects of hypoxia on hunger perceptions, appetite-related hormone concentrations and energy intake: A systematic review and meta-analysis[J]. *Appetite*, 2018, 125: 98-108.
- [44] Kietzmann T, Mäkelä V H. The hypoxia response and nutritional peptides[J]. *Peptides*, 2021, 138: 170507.

Effects of hypoxia stress and reoxygenation on appetite, hypoxic response genes and physiological and biochemical indexes in the brain tissues of *Leiocassis longirostris*

LI Yao¹, YANG Zhiru¹, CHENG Jinghao¹, LI Jie¹, NING Xianhui¹, WANG Tao¹,
ZHANG Kai¹, JI Jie¹, ZHANG Guosong^{2*}, YIN Shaowu^{1*}

(1. Jiangsu Province Engineering Research Center for Aquatic Animals Breeding and Green Efficient Aquacultural Technology, College of Marine Science and Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China;
2. Heze University, Key Laboratory of Physiology, Biochemistry and Application in Universities of Shandong Province during the 13th Five-Year Plan, Heze 274015, China)

Abstract: Affected by natural factors such as temperature, season and weather, or human factors such as eutrophication and high stocking density, oxygen concentration in the water environment where fish live is unpredictable, and they are often faced with a low-oxygen environment. Studies have found that fish have evolved a complex physiological and biochemical system to adapt to the stress response caused by hypoxia in the water environment. However, severe and acute hypoxia can cause a large number of fish to suffocate and die in a short period of time. Because of its delicious taste, no intermuscular spines and high nutritional value, the *L. longirostris* has become one of the important freshwater aquaculture species in China. Currently, studies have been carried out at home and abroad on the growth characteristics, product processing and nutritional evaluation of this fish. There are few reports on its important ecological impact factor "hypoxia". In order to understand the regulatory mechanism of the brain tissue in response to hypoxic stress. In this study, enzyme activity determination, H.E staining, qRT-PCR, TUNEL detection and other methods were used. Changes in brain tissue of *L. longirostris* hypoxia response genes, physiological and biochemical indicators and appetite genes were analyzed and compared under hypoxic stress [(0.8±0.1) mg/L] 0, 2, 4 and 6 hour (labeled as H0, H2, H4 and H6) and recovery [(7.3±0.5) mg/L] 2,4 and 6 hour (labeled as R2, R4 and R6). The results showed that: Under hypoxic stress and recovery, the expression levels of oxygen-sensing protein-related genes (*HIFs*, *PHDs* and *Vhl*) in the brain tissue of *L. longirostris* showed a trend of first rising and then falling as a whole. Respiratory metabolic enzymes (HK, PK and LDH) activities were significantly increased at H0, SDH and MDH activities were significantly reduced at H6. After reoxygenation, the metabolic mode gradually changes from anaerobic respiration to aerobic respiration. Antioxidative enzymes (GSH-Px, CAT and SOD) and stress indicators (MDA and LPO) gradually increased after 2 h of hypoxia, and oxidative stress persists after the recovery of dissolved oxygen. Through the observation of brain tissue morphology, it was found that under hypoxia stress, neuronal cell swelling and vacuoles were damaged in the brain tissue of *L. longirostris*, which were not effectively improved after 6 hours of reoxygenation with dissolved oxygen. However, with the prolongation of hypoxia time, the degree of apoptosis of brain tissue cells increased, and the expression of apoptosis-related genes (*Bax*, *Caspase-3* and *p53*) increased significantly, while the expression of *Bcl-2* gene decreased, there are still significant differences in expression compared with the control group after the recovery of dissolved oxygen. In addition, it was found that the feeding rate of *L. longirostris* decreased by 54% and 98% at 0 h and 2 h of hypoxia stress, respectively. Hypoxic stress was detected to significantly inhibit the expression of appetite-promoting genes (*NPY*) and inducible food-suppressive genes (*PYY*, *CCK* and *NUCB2*). This experiment shows that hypoxic stress and reoxygenation have significant effects on oxygen sensor proteins, respiratory metabolism, oxidative stress, structural morphology, apoptosis and appetite in the brain tissues of *L. longirostris*. The results of this study provide a theoretical basis for elucidating the molecular regulation mechanism of *L. longirostris* brain tissues under hypoxia stress and reoxygenation, it has guiding significance for the intensive and healthy breeding of this fish and the selection and breeding of new hypoxia-tolerant species in the future.

Key words: *Leiocassis longirostris*; hypoxia stress; brain tissue; hypoxic response gene; appetite

Corresponding authors: ZHANG Guosong. E-mail: zhangguosong@hezeu.edu.cn;

YIN Shaowu. E-mail: yinshaowu@163.com

Funding projects: The "JBGS" Project of Seed Industry Revitalization in Jiangsu Province (JBGS[2021]034) ; Supported by the National Natural Science Foundation of China (32102754, 32102760); Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (SJCX22_0605)