

低氧环境下poly I:C刺激对淇河鲫肝胰脏抗氧化防护的影响

赵燕静, 狄桂兰, 孔祥会*, 张杰,
李莉, 聂国兴, 李学军

(河南师范大学水产学院, 河南新乡 453007)

摘要: 明确低氧环境下poly I:C刺激对淇河鲫抗氧化水平的影响, 对于理解低氧环境下鱼类对病原类似物的应激反应及免疫能力具有重要的意义。本实验选择体质量为(23±2) g, 体长为(11±1) cm的健康淇河鲫, 不同溶解氧含量[(1.0±0.2)、(2.0±0.2)、(4.0±0.2)和(6.0±0.2) mg/L]下饲养7 d后, 实验组每尾鱼腹腔注射2 mg/mL poly I:C 100 μL, 对照组每尾注射0.75% NaCl溶液100 μL, 分别在注射后12、24、48、96和168 h时测定肝胰脏超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活性; 分析*Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD*、*CAT*和*GPx*基因的mRNA表达变化, 同时检测丙二醛(MDA)含量。结果显示, 低氧暴露7 d后, 亚低氧水平(DO 4 mg/L)时淇河鲫肝胰脏抗氧化酶活性和mRNA表达量均显著高于正常溶氧组6 mg/L, 说明在亚低氧条件下, 淇河鲫通过抗氧化酶活性增加, 在一定程度上降低了低氧的不利影响。低氧(DO 1和2 mg/L)时, 抗氧化酶活性和mRNA表达量均显著低于6 mg/L, 显示低氧条件下淇河鲫肝胰脏抗氧化防护能力降低, 脂质过氧化产物MDA含量随着溶解氧含量的降低而升高。低氧环境下利用poly I:C刺激鱼体, 抗氧化酶活性和mRNA表达量在48、96和168 h时显著低于对照组, 显示低氧环境下病原类似物poly I:C刺激进一步加剧了鱼体抗氧化防护能力的下降, 从而导致严重的氧化应激胁迫。注射poly I:C后MDA的含量显著高于对照组, 说明低氧条件下注射poly I:C加剧了淇河鲫肝胰脏氧化应激程度。研究表明, 低氧环境下鱼类抗氧化防护能力下降, 产生氧化应激胁迫; 低氧环境下病原类似物poly I:C刺激可加剧鱼体抗氧化防护水平的下降, 从而减弱对外界病原的防御能力。

关键词: 淇河鲫; 低氧; poly I:C; 氧化应激; 抗氧化防护

中图分类号: S 965

文献标志码: A

水体溶解氧(DO)含量变化是水体理化性质和生物学过程的综合反映, 不仅受藻类光合作速率和有机物呼吸强度变化的影响, 也受水温、盐度、水流速度、昼夜变化等的影响^[1-2]。溶解氧含量是水产健康养殖的关键因子之一。若溶解氧含量低于正常水平, 则造成鱼缺氧浮头, 甚至泛池, 从而影响鱼类的摄食和免疫水平, 引起鱼体氧化应激反应、抗病力和免疫力下降, 增加对病菌的易感性^[3-4]。同时, 溶解氧的季节

性变动和人类活动造成的水体富营养化, 也会使水生生物频繁遭受低氧环境的胁迫, 对一系列的生理、生化、生长发育、行为代谢等过程产生不利影响^[5-6]。

近年来, 随着养殖密度的增加, 投饵量的增大, 水体富营养化严重, 缺氧现象发生频繁, 因缺氧产生的问题日益增多^[7]。低氧环境下鱼类有氧呼吸速率下降, 氧化磷酸化作用降低, 使呼吸链的电子流到达复合体IV时停止, 引发电

收稿日期: 2016-01-19 修回日期: 2016-06-18

资助项目: 河南省高校科技创新团队支持计划(15IRTSTHN018); 河南省国际合作与人才项目(144300510017)

通信作者: 孔祥会, E-mail: xhkong@htu.cn

子流返回到复合体 III/I, 导致产生的活性氧自由基(ROS)如超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)和羟基自由基($\cdot OH$)增加^[8]。当 ROS 产生过多, 超过鱼体自身的清除能力时, 多余的 ROS 便会氧化生物大分子, 如蛋白、核酸、类固醇及细胞膜中的不饱和脂肪酸等, 产生不稳定的过氧化物, 破坏细胞结构的完整性, 造成氧化损伤, 使其功能紊乱, 导致多种病理条件的发生^[9-10]。为积极应对氧化压力, 生物体在长期的进化过程中形成了一套完整的且能够进行自我保护的抗氧化体系——内源性抗氧化防御系统, 主要由抗氧化酶和小分子抗氧化剂组成。抗氧化酶主要有超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx), 小分子抗氧化剂主要包括类胡萝卜素、维生素、谷胱甘肽和硫氧还原蛋白等。该系统可以减少 ROS 的积累, 在保护细胞免受氧化应激方面起着至关重要的作用^[11-13]。

淇河鲫(*Carassius auratus*)是一种重要的鲤科经济鱼类, 主要分布于豫北鹤壁淇河水域, 为天然三倍体鱼类。淇河鲫生活于水体中下层, 水体富营养化条件下, 较易受到低氧胁迫。本实验以淇河鲫为对象, 分析低氧环境下病毒类似物聚肌胞苷酸(polyinosinic-polycytidylic acid, poly I:C)应激对鱼类肝胰脏抗氧化防护水平的影响, 以了解低氧环境下淇河鲫对病原的防御水平。

1 材料与方法

1.1 实验材料

淇河鲫购自河南淇县淇河鲫原种场, 暂养于河南师范大学水产养殖基地。实验前, 选择体质量为(23±2) g, 体长为(11±1) cm的健康鱼, 随机分组, 分别在24个200 L塑料水箱中驯养, 40尾/箱。驯养期间采用曝气3 d的地下水, 每周换水2次, 换水量为总体积的1/3。水温为(25±2) °C, pH为(7.0±0.2), 溶解氧浓度为(6.0±0.2) mg/L, 自然光照周期, 每天适量投喂。

1.2 实验设计

采用静水装置, 设置4个溶解氧浓度, 分别为(1.0±0.2)、(2.0±0.2)、(4.0±0.2)和(6.0±0.2) mg/L, 其中(6.0±0.2) mg/L作为正常溶氧组, 通过控制充氧泵的充气量调控溶解氧水平, 并维持溶氧浓度的相对稳定。实验过程中, 采用便携式测氧仪AZ8403(中国台湾恒鑫仪器厂)每2 h测定1次, 以保障溶解氧含量相对稳定。低氧暴露7 d

后取样(该取样时间点定义为poly I:C刺激0 h), 不同溶解氧条件下鱼类腹腔注射2 mg/mL poly I:C 100 μL, 对照组注射0.75% NaCl溶液100 μL, 分别于注射后12、24、48、96和168 h时取样, 每个时间点取6尾, 实验设3个平行。实验过程中不换水, 不投喂, 其他管理条件与驯养时相同。同时, 实验过程中观察并记录淇河鲫的死亡情况。

1.3 酶粗提液的制备和活性测定

酶粗提液的制备 取样时, 用MS-222将淇河鲫麻醉后, 迅速解剖鱼体, 取出部分肝胰脏(样品分成2份, 1份用于酶活测定, 1份用于基因表达分析), 放入预冷生理盐水中洗去浮血, 剔除脂肪及结缔组织, 滤纸吸干后, 称取适量组织, 按质量体积比1:9(g/mL)加0.75%预冷生理盐水, 冰浴中匀浆。4 °C, 12 000 r/min离心15 min, 取上清液, 置于-20 °C保存, 用于测定抗氧化酶活性和丙二醛含量。

酶活性测定方法 SOD活性测定采用黄嘌呤氧化酶法^[14]; CAT活性测定采用紫外分光光度法^[15]; GPx活性测定采用Haffeman的方法^[16]; 丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法^[17]; 蛋白质含量测定采用Bradford方法^[18], 以牛血清白蛋白(Bovineserum albumin, BSA购于AMRESCO公司)作为标准蛋白。

1.4 基因相对表达量分析

样品采集与处理 实验鱼用MS-222麻醉后, 迅速解剖, 取出部分肝胰脏, 放入用DEPC(二乙基焦磷酸酰胺)水处理过的1.5 mL Ep管中, 内含0.4 mL RNA提取试剂RNAiso(TaKaRa公司)。样品置于-80 °C冰箱保存待测。

引物设计与合成 *Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD*和 β -*actin*的实时荧光定量RT-qPCR引物基于已知序列^[19], *CAT*和*GPx*的引物是参考GenBank中斑马鱼(*Danio rerio*)和鲤(*Cyprinus carpio*)的基因序列, 用Primer 5.0软件设计而成, 序列待提交GenBank。本研究所用引物见表1, 由上海生工生物技术股份有限公司合成。

组织RNA提取和c-DNA合成 按照RNAiso试剂说明书提取肝胰脏组织总RNA, 用无RNase水(上海生工生物技术股份有限公司)溶解, 超微量分光光度计NANODROP200(Thermo公司)测定总RNA浓度和纯度($OD_{260}/OD_{280}=1.8\sim 2.0$), 1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA质量。按照反转录试剂盒(TaKaRa公司)说明书对总RNA进行

表1 用于RT-qPCR的抗氧化酶基因引物序列

Tab. 1 The primers to amplify the antioxidant enzyme genes for RT-qPCR

目的基因 target gene	登录号 accession no.	引物序列 primer sequence
<i>β-actin</i>	AY690421.1	F: 5'-TCACACCTTCTACAACGAGCTGCG-3' R: 5'-GAAGCTGTAGCTCTCTCGGTCAG-3'
<i>Cu/Zn-SOD</i>	KR080191	F: 5'-GGTCCGCACTACAACCCCTCATA-3' R: 5'-GCCTCCTTTACCCAAGTCATCC-3'
<i>Mn-SOD</i>	KM065388	F: 5'-GGCTTTGATAAAGGACAGTGGAA-3' R: 5'-CAGTTTATTTCTTGGCGGCTTG-3'
<i>CAT</i>		F: 5'-CCCATCTGGACTTCTACAT-3' R: 5'-AATTGACAGGGTTTCGGTTC-3'
<i>GPx</i>		F: 5'-TGAACGGTGTGAACGCC-3' R: 5'-TGTTCAACGGACTCCAGAT-3'

反转录,反应体系为20 μL,反转录产物置于-20 °C保存备用。

RT-qPCR检测抗氧化酶基因相对表达量采用SYBR Green荧光定量PCR试剂盒(诺唯赞公司)和LightCycler® 96实时荧光定量PCR仪(瑞士/Roche公司)进行荧光定量PCR检测。反应条件和反应体系依照荧光定量PCR试剂盒说明书。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

1.5 统计分析

实验数据以平均值±标准差(mean±SD)($n=6$)表示,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA) Tukey氏方法,利用SPSS 20.0软件进行统计分析,显著性水平设为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 低氧环境下poly I:C刺激后淇河鲫肝胰脏抗氧化酶活性变化

低氧暴露7 d后(poly I:C刺激时间点为0 h),淇河鲫肝胰脏SOD、CAT和GPx活性变化趋势相似,酶活性均随着溶解氧含量的降低先升高后降低。DO 4 mg/L时酶活性显著高于其他溶解氧含量组($P<0.05$); DO 1和2 mg/L时,肝胰脏抗氧化酶活性下降,并显著低于正常溶解氧组6 mg/L;随溶解氧含量的下降,抗氧化酶活性显著降低,1 mg/L溶解氧组显著低于2 mg/L溶解氧组($P<0.05$)。

低氧条件下poly I:C刺激后,对照组(注射生理盐水)不同时间点肝胰脏SOD活性随着溶解氧含量的降低均显示先升高后降低的趋势,DO 4 mg/L时活性升高,DO 1和2 mg/L时活性下降,且不同溶解氧组间SOD活性具有显著性差异($P<0.05$)(图1)。处理组(注射poly I:C)不同时间点肝胰脏SOD活性在不同溶解氧组间变化各异。处理组和对照组之间比较,12和24 h时SOD活性大多显著

高于对照组;但随着时间的延长,在96和168 h时,处理组SOD活性显著低于对照组($P<0.05$)。

低氧环境下poly I:C刺激后不同时间点的对照组肝胰脏CAT活性变化与SOD活性变化相似,随着溶解氧降低,CAT活性先升高后降低,且不同溶解氧组间CAT活性具有显著性差异($P<0.05$)(图2)。处理组不同时间点肝胰脏CAT活性尽管在不同溶解氧组间变化各异,但DO 1和2 mg/L组CAT活性显著低于DO 4和6 mg/L组($P<0.05$)。处理组和对照组相比,12和24 h时CAT活性变化显示无规律;但随着时间的延长,在48、96和168 h时,处理组CAT活性显著低于对照组($P<0.05$)。

对照组中不同时间点GPx活性随溶解氧含量降低大体上显示先升高后降低的趋势(48 h例外,6与4 mg/L溶解氧组间无显著性变化); DO 1和2 mg/L时GPx活性显著低于正常溶解氧组($P<0.05$)。处理组在不同时间点GPx活性总体上随溶解氧含量降低而降低,48、96和168 h时随溶解氧含量降低逐渐下降,不同溶解氧水平间具有显著性差异($P<0.05$)。处理组和对照组之间比较,12和24 h时变化复杂;但随着时间延长,48、96和168 h时,处理组GPx活性显著低于对照组($P<0.05$)(图3)。

2.2 低氧环境下poly I:C刺激后淇河鲫肝胰脏抗氧化酶基因相对表达量变化

本研究中 β -actin、Cu/Zn-SOD、Mn-SOD、CAT和GPx基因的扩增效率分别为100.8%、102.6%、96.6%、104.1%和104.2%,均在90%~110%之间,可以用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

低氧暴露7 d后,Cu/Zn-SOD、Mn-SOD和GPx基因在DO 4 mg/L时显著高于正常溶解氧组6 mg/L($P<0.05$); Cu/Zn-SOD和GPx在DO 1和2 mg/L时表达量显著低于正常溶解氧组($P<0.05$),Mn-SOD和CAT仅在DO 1 mg/L时显著低于正常溶解氧组($P<0.05$)(图4)。

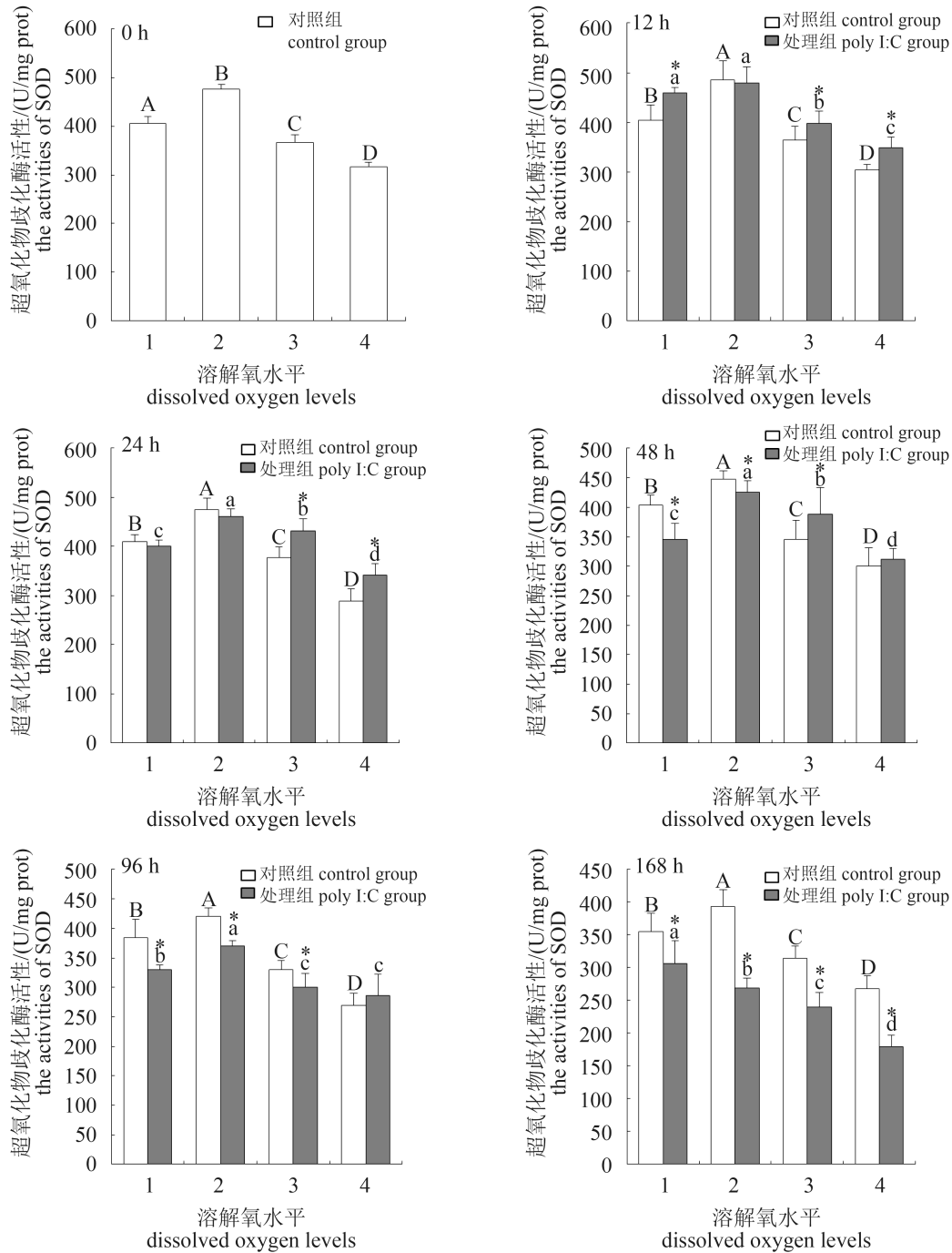


图 1 低氧环境下poly I:C刺激后淇河鲫鱼肝脏SOD活性变化

1.6 mg/L, 2.4 mg/L, 3.2 mg/L, 4.1 mg/L; *相同溶解氧浓度和时间点处理组(注射poly I:C)与相应对照组(注射0.75%NaCl)之间有显著性差异(P<0.05); 不同大写字母表示对照组在同一时间点不同溶解氧浓度间存在显著差异(P<0.05); 不同小写字母表示处理组在同一时间点不同溶解氧浓度间存在显著差异(P<0.05), 下同

Fig. 1 The changes of SOD activities in hepatopancreas of C. auratus after poly I: C injection in hypoxia

1.6 mg/L, 2.4 mg/L, 3.2 mg/L, 4.1 mg/L, *.significant differences in SOD activities between the infected and control groups at the same time point and same dissolved oxygen level (P<0.05); significantly different between the different dissolved oxygen levels at the same time point present with different capital letters in the control and with different lowercase letters in the infected groups (P< 0.05), the same below

低氧环境下poly I:C刺激后不同时间点淇河鲫鱼肝脏抗氧化酶基因Cu/Zn-SOD、CAT和GPx mRNA相对表达量随着溶解氧含量降低而降低(图5)。

Cu/Zn-SOD mRNA表达量在12 h时, 6和4 mg/L溶解氧组均显著高于2和1 mg/L溶解氧组(P<0.05); 在24、48、96和168 h时随溶解氧含量降低依次

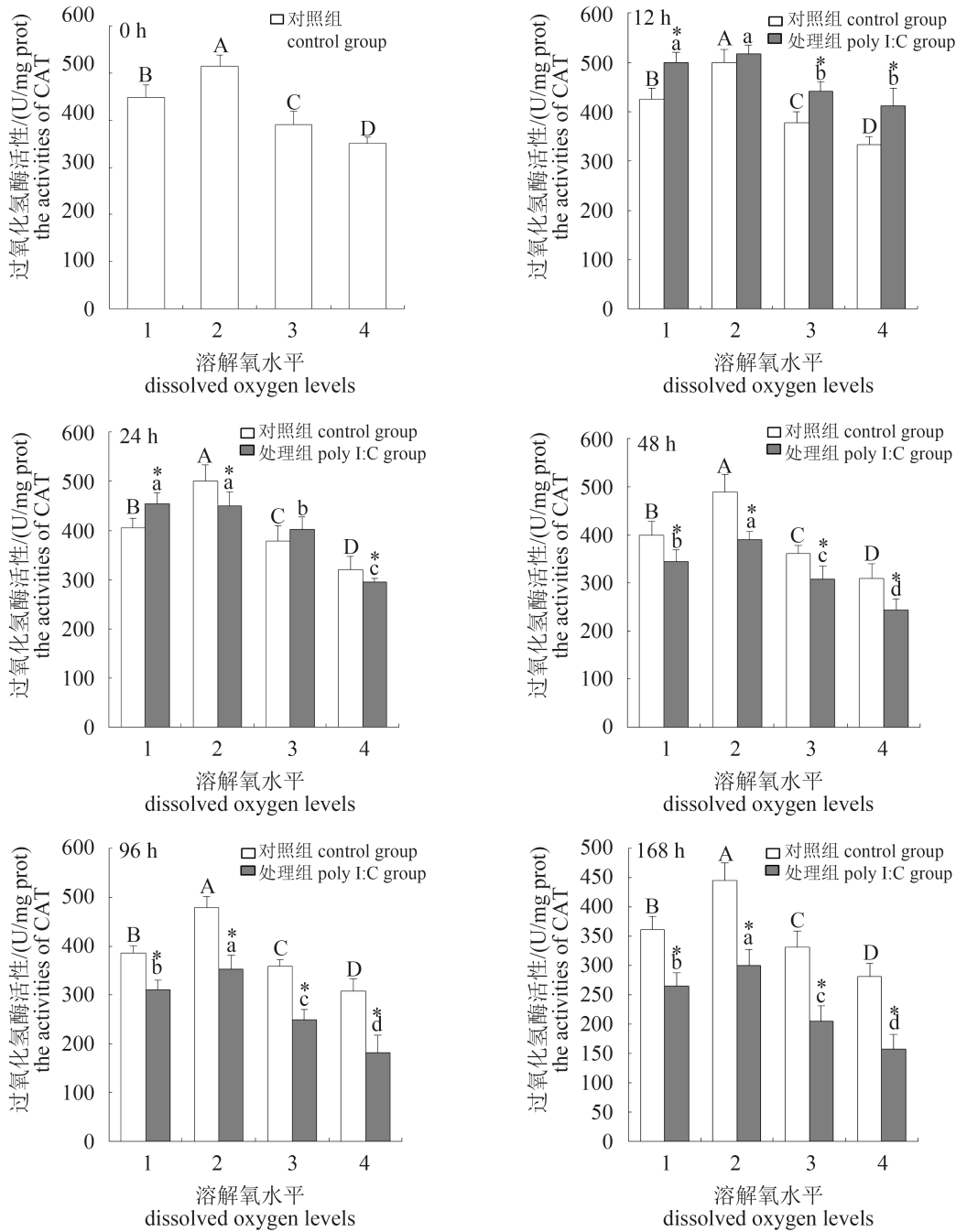


图 2 低氧环境下poly I:C刺激后淇河鲫肝胰脏CAT活性变化

Fig. 2 The changes of CAT activities in hepatopancreas of *C. auratus* after poly I:C infection in hypoxia

显著降低($P < 0.05$)。与对照组相比, 12、24和48 h时DO 6和4 mg/L组显著升高($P < 0.05$), 24、48、96和168 h时DO 1 mg/L组显著降低($P < 0.05$)。不同时间点Mn-SOD表达量在DO 6和4 mg/L组均显著高于DO 1 mg/L组($P < 0.05$); 与对照组相比, 相似于Cu/Zn-SOD, 12、24和48 h时DO 6和4 mg/L组显著升高($P < 0.05$), 24、48、96和168 h时DO 1 mg/L组显著降低($P < 0.05$)。

CAT mRNA表达量随溶解氧含量降低逐渐下降。与对照组相比, 12、24和48 h时DO 6 mg/L组显著升高($P < 0.05$), 24、48、96和168 h时DO 1 mg/L组显著降低($P < 0.05$)。

GPx mRNA表达量随溶解氧含量降低呈现下降趋势。与对照组相比, 12、24、48和96 h时DO 6 mg/L组显著升高($P < 0.05$), 24、48、96和168 h时DO 1和2 mg/L组均显著低于对照组($P < 0.05$)。

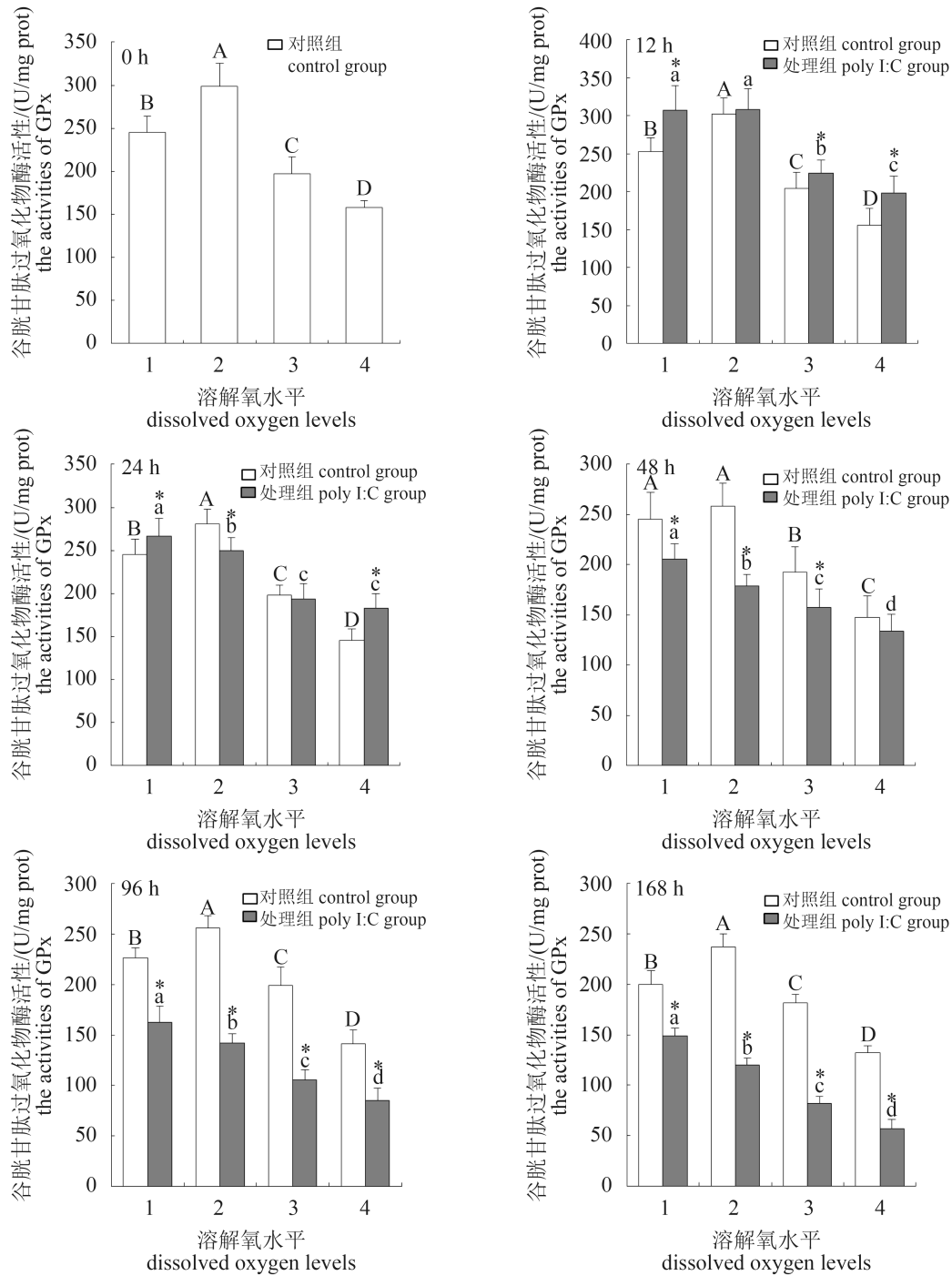


图3 低氧环境下poly I:C刺激后淇河鲫肝胰脏GPx活性变化

Fig. 3 The changes of GPx activities in hepatopancreas of *C. auratus* after poly I:C infection in hypoxia

2.3 低氧环境下poly I:C刺激后淇河鲫肝胰脏丙二醛含量变化

淇河鲫肝胰脏MDA含量随溶解氧含量降低依次显著升高($P<0.05$)。低氧环境下poly I:C刺激后不同时间点淇河鲫肝胰脏MDA含量随溶解氧含量降低依次显著升高($P<0.05$)(图6)。同一时间点同一溶解氧条件下poly I:C处理组肝胰脏MDA

含量均显著高于对照组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 低氧环境下poly I:C刺激对淇河鲫肝胰脏抗氧化防护的影响

低氧可影响鱼体抗氧化防护能力, 从而引

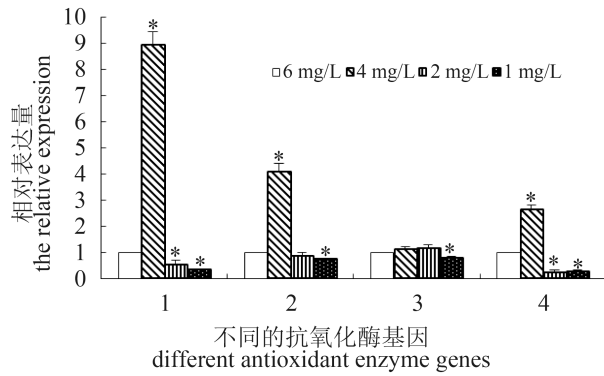


图4 低氧环境下淇河鲫肝胰脏抗氧化酶基因 mRNA 相对表达量

1. *Cu/Zn-SOD*, 2. *Mn-SOD*, 3. *CAT*, 4. *GPx*. * 与正常溶解氧组 (6 mg/L) 相比, mRNA 相对表达水平具有显著性差异 ($P < 0.05$)

Fig. 4 The mRNA relative expression levels of antioxidant enzyme genes in hepatopancreas of *C. auratus* in hypoxia

1. *Cu/Zn-SOD*, 2. *Mn-SOD*, 3. *CAT*, 4. *GPx*. * represents the significant difference ($P < 0.05$), compared with the average expression level at 6 mg/L

起鱼类产生氧化应激^[3]。内源性抗氧化酶(如SOD、CAT、GPx)可清除细胞内多余的氧自由基,以预防氧化应激对细胞的损伤^[13]。本研究中,淇河鲫肝胰脏抗氧化酶活性随着溶解氧含量的降低呈现先升高后降低的趋势;在亚低氧水平(DO 4 mg/L),肝胰脏抗氧化酶活性显著高于正常溶解氧组,显示亚低氧水平可诱导抗氧化酶活性升高,以清除多余的氧自由基,从而降低氧化应激造成的危害;在低氧水平(DO 1和2 mg/L),抗氧化酶活性显著低于正常溶解氧组,抗氧化酶活性的降低显示肝胰脏清除ROS的能力下降,产生氧化应激,从而造成MDA积累。本研究中低氧环境下MDA含量显著高于正常溶解氧组也证实了这一结论。以往研究发现低氧环境下大头兔脂鲤(*Leporinus macrocephalus*)^[20]肝胰脏SOD活性和CAT活性显著降低;低氧环境下细鳞肥脂鲤(*Piaractus mesoootamicus*)^[21]和葛氏鲈塘鳢(*Perccottus glenii*)^[22]肝胰脏CAT活性和GPx活性显著降低,这些研究结果与本研究结果相似。本

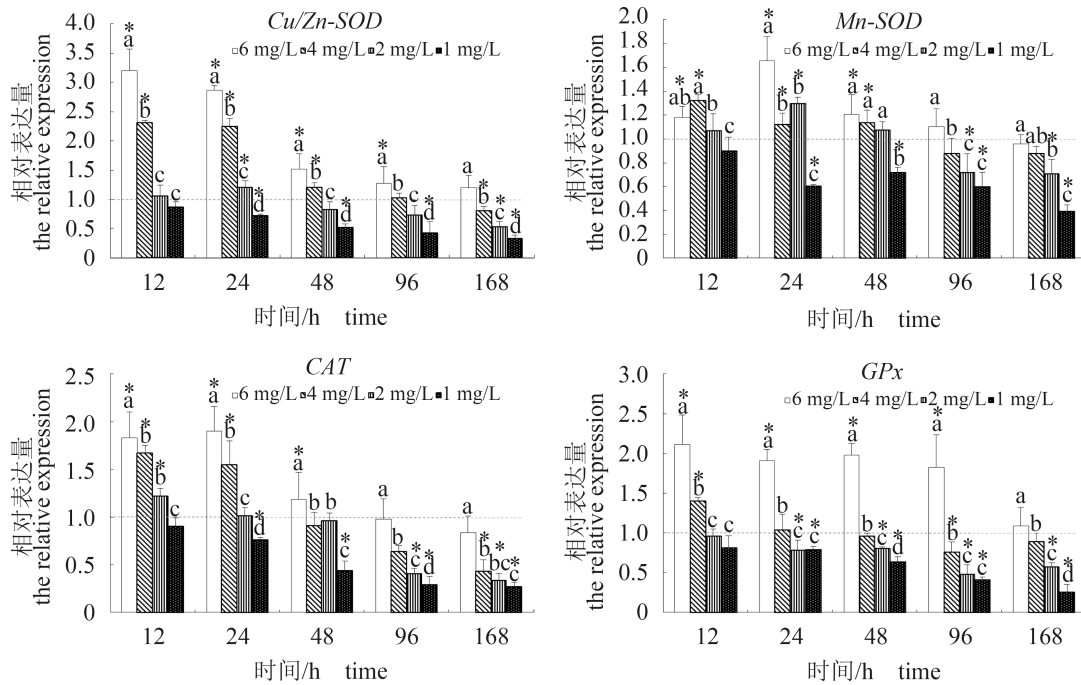


图5 低氧环境下poly I:C刺激后淇河鲫肝胰脏抗氧化酶基因表达变化

同一时间点和同一溶解氧含量下对照组肝胰脏mRNA表达量定义为1。*表示处理组与相应对照组间具有显著性差异 ($P < 0.05$); 同一时间点不同溶解氧浓度间具有显著性差异用不同小写字母表示 ($P < 0.05$)

Fig. 5 The expression changes of antioxidant enzyme genes in hepatopancreas of *C. auratus* after poly I:C infection in hypoxia

The average mRNA expression level in the control at same time point and at same dissolved oxygen level was defined as 1. *represents significant difference in expression levels between the infected group and the control ($P < 0.05$); significant differences in the expression between the different dissolved oxygen levels at the same time point are indicated with different lowercase letters ($P < 0.05$)

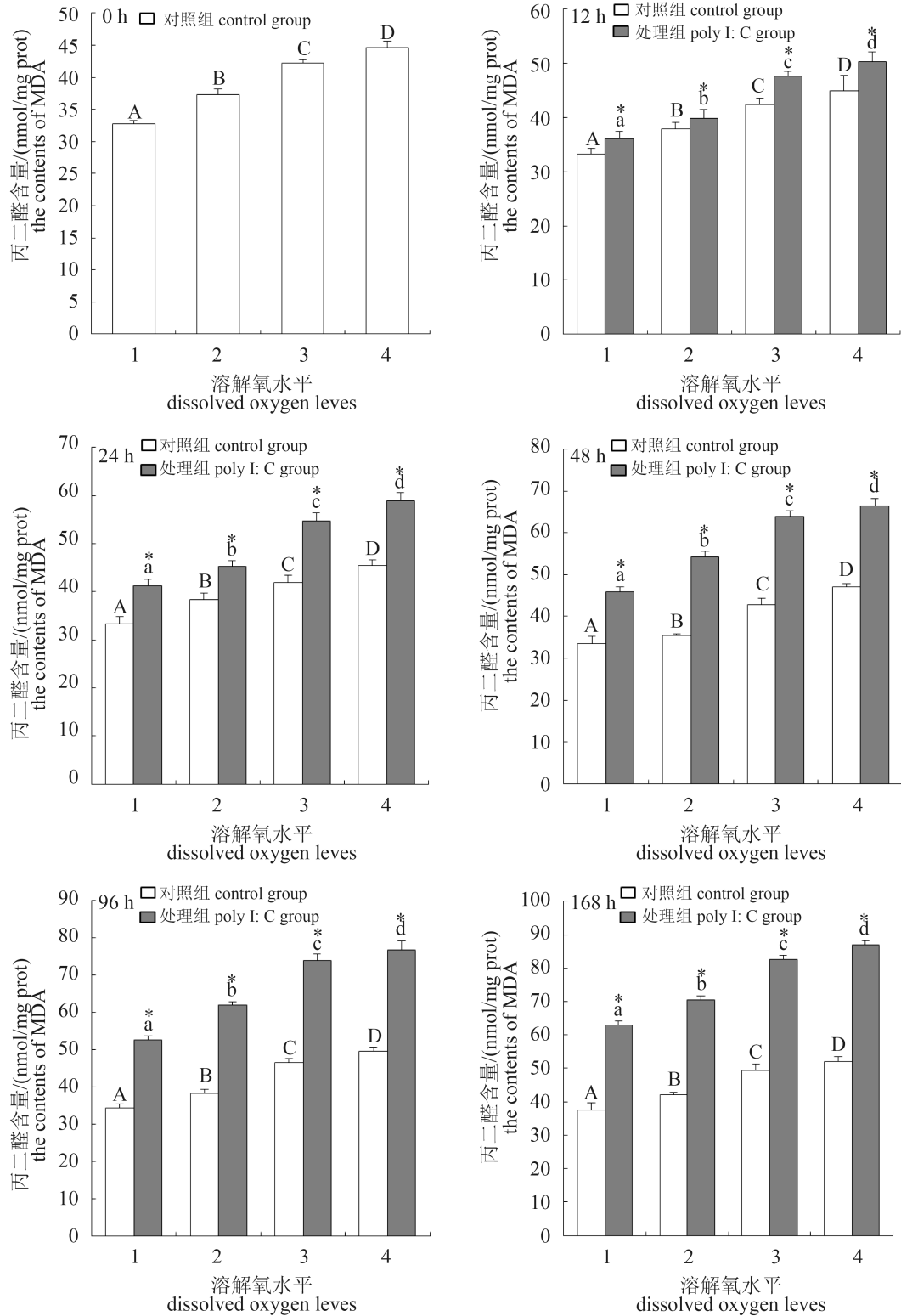


图 6 低氧环境下 poly I:C 刺激后淇河鲫肝胰脏丙二醛含量变化

Fig. 6 The changes of MDA contents in hepatopancreas of *C. auratus* after poly I:C infection in hypoxia

实验中, 低氧暴露 7 d 后淇河鲫肝胰脏抗氧化酶相关基因 *Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD*、*CAT* 和 *GPx* 的 mRNA 相对表达量呈现随溶解氧含量降低而下降

的趋势, 这一变化与不同溶解氧含量条件下抗氧化酶活性的变化相似, 表明抗氧化酶在 mRNA 水平和蛋白质水平受低氧环境影响呈现相似变化,

从而推测本研究中抗氧化酶活性升高,是由于mRNA表达水平增加,酶合成增多所致。

低氧环境下注射poly I:C后淇河鲫肝胰脏抗氧化酶活性在早期(12和24 h)大多高于对照组,随时间延长逐渐下降,在48、96和168 h时显著低于对照组,表明poly I:C刺激后早期可引发淇河鲫肝胰脏产生氧化应激,诱导抗氧化酶活性升高,以减轻poly I:C造成的氧化应激胁迫;但随着时间的延长,淇河鲫肝胰脏清除ROS能力减弱,ROS积累增加,破坏抗氧化酶系统,导致抗氧化酶活性降低,氧化应激终产物MDA含量增加。

低氧环境下poly I:C刺激后淇河鲫肝胰脏抗氧化酶基因的mRNA相对表达量呈现随溶解氧含量降低而降低的趋势。本研究中,DO 6 mg/L(正常氧含量)和4 mg/L(亚低氧水平)组Cu/Zn-SOD mRNA表达量显著高于2和1 mg/L(低氧)组, Mn-SOD mRNA表达量也有相似趋势。研究发现低氧环境下鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)^[23]肝胰脏Cu/Zn-SOD和Mn-SOD mRNA表达量显著降低,与本研究结果一致。注射poly I:C后DO 6 mg/L(正常氧含量)组,肝胰脏抗氧化酶基因mRNA表达量高于对照组;DO 1和2 mg/L(低氧)组中抗氧化酶基因mRNA表达量显著低于对照组,说明正常溶解氧下注射poly I:C后抗氧化酶基因mRNA相对表达量升高,抗氧化酶的合成增多,抗氧化酶活性提高,以抵抗病毒类似物的刺激;低氧环境下注射poly I:C后抗氧化酶mRNA表达量降低,显示poly I:C可加剧低氧环境下抗氧化酶mRNA表达量的下降,这一变化与低氧环境下poly I:C注射组抗氧化酶活性的变化趋势一致。表明低氧环境下淇河鲫肝胰脏对病毒类似物poly I:C刺激的抗氧化防护能力下降。

3.2 低氧环境下poly I:C刺激对淇河鲫肝胰脏MDA的影响

低氧环境下,细胞有氧呼吸减弱,氧化磷酸化作用突然降低使呼吸链电子流到达复合体IV时停止,引发电子流返回到复合体III/I,导致ROS产生增加,引发氧化应激反应^[24]。如果ROS产生过多,超过自身清除能力,多余的ROS便会氧化细胞膜的磷脂成分,破坏细胞完整性,导致多种病理现象的发生^[9-10];MDA是ROS攻击生物膜中多不饱和脂肪酸引发脂质过氧化反应而生成的终产物,其含量可直接反映组织器官中

细胞氧化损伤的程度^[25]。

本研究中,淇河鲫肝胰脏MDA含量随着溶解氧含量的降低而升高,表明低氧环境下MDA产生增多,并且随低氧程度的加剧,MDA积累逐渐增加,显示肝胰脏细胞遭受较严重的氧化损伤。研究报道低氧条件下葛氏鲈塘鳢^[22]肝胰脏脂质过氧化物产生增加,与本实验结果一致。低氧环境下,注射病毒类似物poly I:C后肝胰脏MDA含量明显高于对照组(注射生理盐水),表明低氧环境下注射poly I:C可引起淇河鲫肝胰脏发生严重的氧化胁迫,加剧其氧化损伤的程度。

4 结论

低氧对淇河鲫肝胰脏抗氧化防护水平产生重要影响。亚低氧水平(DO 4 mg/L)下,淇河鲫肝胰脏抗氧化酶活性和mRNA相对表达量增加可适度降低低氧所致的不利影响。低氧水平(DO 1和2 mg/L)下,抗氧化酶活性和mRNA表达量降低,显示抗氧化防护水平下降,从而导致氧化应激反应,脂质过氧化产物MDA明显增多。低氧环境下病原类似物poly I:C刺激后淇河鲫肝胰脏抗氧化酶活性和mRNA表达量显著低于对照组,丙二醛含量显著高于对照组,说明低氧环境下注射poly I:C显著降低了淇河鲫肝胰脏抗氧化防护能力,加剧了其氧化损伤程度,表明低氧可降低淇河鲫对病原的防御能力,增加对病原的易感性。基于本研究结论,当溶解氧低于4 mg/L时,尽管此时未出现鱼类浮头现象,但低氧可诱导鱼类发生氧化应激胁迫,使鱼体肝胰脏产生氧化损伤,从而降低鱼类的免疫能力并减弱对病原的防御能力。因此,在水产养殖实际生产过程中,当溶解氧低于4 mg/L时要及时开动增氧机,增加溶解氧。

参考文献:

- [1] Lushchak V I, Bagnyukova T V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 144(3): 283-289. DOI: 10.1016/j.cbpb.2006.02.014.
- [2] 刘旭佳, 黄国强, 彭银辉. 不同溶氧变动模式对鲮生长、能量代谢和氧化应激的影响[J]. *水产学报*, 2015, 39(5): 679-690.

- Liu X J, Huang G Q, Peng Y H. Effect of variation of different dissolved oxygen on the growth, energy metabolism and oxidative stress of *Mugil cephalus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(5): 679-690 (in Chinese).
- [3] Ortuño J, Esteban M A, Meseguer J. Lack of effect of combining different stressors on innate immune responses of seabream (*Sparus aurata* L.)[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2002, 84(1-2): 17-27. DOI: 10.1016/S0165-2427(01)00387-7.
- [4] Welker T L, McNulty S T, Klesius P H. Effect of sublethal hypoxia on the immune response and susceptibility of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, to enteric septicemia[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2007, 38(1): 12-23. DOI: 10.1111/j.1749-7345.2006.00069.x.
- [5] Nikinmaa M. Oxygen-dependent cellular functions—why fishes and their aquatic environment are a prime choice of study[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2002, 133(1): 1-16. DOI: 10.1016/S1095-6433(02)00132-0.
- [6] Wu R S S. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses[J]. Marine Pollution Bulletin, 2002, 45(1-12): 35-45. DOI: 10.1016/S0025-326X(02)00061-9.
- [7] 周劲风, 温琰茂. 珠江三角洲基塘水产养殖对水环境的影响[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2004, 43(5): 103-106.
- Zhou J F, Wen Y M. Effects of fish aquaculture on water environment in the Zhujiang River delta[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2004, 43(5): 103-106 (in Chinese).
- [8] Hoffman D L, Salter J D, Brookes P S. Response of mitochondrial reactive oxygen species generation to steady-state oxygen tension: implications for hypoxic cell signaling[J]. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2007, 292(1): H101-H108. DOI: 10.1152/ajpheart.00699.2006.
- [9] Halliwell B, Gutteridge J M C. Free radicals in biology and medicine[J]. Journal of Free Radicals in Biology & Medicine, 1985, 1(4): 331-332. DOI: 10.1016/0748-5514(85)90140-0.
- [10] Martínez-Álvarez R M, Morales A E, Sanz A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors[J]. Reviews in Fish biology and Fisheries, 2005, 15(1-2): 75-88. DOI: 10.1007/s11160-005-7846-4.
- [11] Lesser M P. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology[J]. Annual Review of Physiology, 2006, 68(1): 253-278. DOI: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001.
- [12] Leveelahti L, Rytönen K T, Renshaw G M C, et al. Revisiting redox-active antioxidant defenses in response to hypoxic challenge in both hypoxia-tolerant and hypoxia-sensitive fish species[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2014, 40(1): 183-191. DOI: 10.1007/s10695-013-9835-1.
- [13] 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. DOI: 10.1016/j.biocel.2005.01.006.
- [14] 徐东, 赵建, 黄汉昌, 等. 改良的黄嘌呤氧化酶法测定动植物组织中SOD比活力[J]. 食品科学, 2011, 32(6): 237-241.
- Xu D, Zhao J, Huang H C, et al. Determination of SOD specific activity in animal and plant tissues by improved xanthine oxidase method[J]. Food Science, 2011, 32(6): 237-241 (in Chinese).
- [15] 徐镜波, 袁晓凡, 郎佩珍. 过氧化氢酶活性及活性抑制的紫外分光光度测定[J]. 环境化学, 1997, 16(1): 73-76.
- Xu J B, Yuan X F, Lang P Z. The determination of enzymic activity and its inhibition on catalase by ultraviolet spectrophotometry[J]. Environmental Chemistry, 1997, 16(1): 73-76(in Chinese).
- [16] Hafeman D G, Sunde R A, Hoekstra W G. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat[J]. The Journal of Nutrition, 1974, 104(5): 580-587.
- [17] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction[J]. Analytical Biochemistry, 1979, 95(2): 351-358. DOI: 10.1016/0003-2697(79)90738-3.
- [18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1-2): 248-256. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [19] 乔丹. 淇河鲫CuZnSOD和MnSOD基因的克隆及其对

- 嗜水气单胞菌的响应[D]. 新乡: 河南师范大学, 2015.
- Qiao D. The copper zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase from Qihe crucian carp *Carassius auratus*: molecular cloning, characterization and response to *Aeromonas hydrophila* infection[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2015 (in Chinese).
- [20] Riffel A P K, Garcia L O, Finamor I A, *et al.* Redox profile in liver of *Leporinus macrocephalus* exposed to different dissolved oxygen levels[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2011, 38(3): 797-805. DOI: 10.1007/s10695-011-9563-3.
- [21] Sampaio F G, de Lima Boijink C, Oba E T, *et al.* Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2008, 147(1): 43-51. DOI: 10.1016/j.cbpc.2007.07.009.
- [22] Lushchak V I, Bagnyukova T V. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Percottus glenii*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 148(4): 390-397. DOI: 10.1016/j.cbpb.2007.07.007.
- [23] Zhang Z W, Li Z, Liang H W, *et al.* Molecular cloning and differential expression patterns of copper/zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in *Hypophthalmichthys molitrix*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(2): 473-479. DOI: 10.1016/j.fsi.2010.11.003.
- [24] Lushchak V I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals[J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 101(1): 13-30. DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.10.006.
- [25] Gül S, Belge-Kurutaş E, Yildiz E, *et al.* Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (*Cyprinidae*) living in Seyhan Dam Lake, Turkey[J]. *Environment International*, 2004, 30(5): 605-609. DOI: 10.1016/s0160-4120(03)00059-x.

Effect on antioxidant defense in hepatopancreas of *Carassius auratus* after poly I:C injection under hypoxia

ZHAO Yanjing, DI Guilan, KONG Xianghui*, ZHANG Jie,
LI Li, NIE Guoxing, LI Xuejun

(College of Fisheries, Henan Normal University, Xixiang 453007, China)

Abstract: A natural triploid Qihe crucian carp, *Carassius auratus*, is an important commercial fish, with the twice thickness of common crucian carp in the back. Hypoxia always produces the important effects on fish physiological and biochemical function and immune protection, and assessing the effect of poly I: C stimulation on antioxidant defense in fish under hypoxia is helpful to understand the oxidative stress and immune ability, as well as the susceptibility to pathogen in fish under hypoxia. The experimental fish, with the body weight of (23±2) g, and the body length of (11±1) cm were cultivated at different dissolved oxygen levels (6, 4, 2 and 1 mg/L) respectively for 7 days. Then, each fish was injected 2 mg/mL poly I: C 100 μL in the treated group and was injected 0.75% NaCl 100μL in the control group. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and the mRNA relative expression of *Cu/Zn-SOD*, *Mn-SOD*, *CAT* and *GPx*, as well as the content of malondialdehyde (MDA), were measured after injection at 0, 12, 24, 48, 96 and 168 h. The activities of antioxidant enzymes and the levels of mRNA expression in hepatopancreas of fish, under hypoxia for 7 days, were more significantly increased at DO 4 mg/L than at the normal DO 6 mg/L. It implies that fish can reduce the adverse effects at low oxygen level to a certain degree. The activities and the mRNA relative expression of SOD, CAT, GPx in hepatopancreas were more significantly decreased at DO 1 and 2 mg/L than at 6 mg/L. It was suggested that the capacities of antioxidant defense decreased under hypoxia and showed that oxidative stress occurred when the generation rate of ROS exceeded the removal rate, and lead to the accumulation of MDA, a lipid peroxidation product, in hepatopancreas. Therefore, the content of MDA increased with the decreasing of dissolved oxygen concentration. After poly I: C stimulation in hypoxia, antioxidant enzyme activities and mRNA relative expression levels were significantly reduced, compared to the corresponding control, at 48, 96 and 168 h. It is indicated that antioxidant defense ability was reduced in hepatopancreas of *C. auratus* after poly I: C infection in hypoxia and then caused serious oxidative stress. MDA content was significantly higher in the treated group than that in the control group. It was implied that oxidative stress was intensified in hepatopancreas of *C. auratus* after poly I: C injection in hypoxia. In this study, it is demonstrated that the antioxidant defense ability decreased under hypoxia and caused oxidative stress. Pathogenic analogues poly I: C stimulation under hypoxia condition could further weaken antioxidant defense ability and aggravate the degree of oxygen stress. In the cultivation of *C. auratus*, when DO decreased to less than 4 mg/L, dissolve oxygen should be supplemented and increased to maintain the normal level of antioxidant defense in fish.

Key words: *Carassius auratus*; hypoxia; poly I: C; oxidative stress; antioxidant defense

Corresponding author: KONG Xianghui. E-mail: xhkong@htu.cn

Funding projects: Innovative Research Team (in Science and Technology) in University of Henan Province (15IRTSTHN018); International Cooperation and Talent in Henan Province (144300510017)