

温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺氧代谢及能量代谢的影响

朱孟凯, 姚翠鸾*

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 为探究温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺氧代谢和能量代谢的影响,本研究采用生物化学方法分析了低温及高温胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺中超氧阴离子($O_2^- \cdot$)产生,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活力及谷胱甘肽(GSH)含量,一氧化氮合酶(NOS)活力及其催化的一氧化氮(NO)生成量,以及对三磷酸腺苷(ATP)含量的影响。结果表明,15℃低温及31℃与35℃的高温胁迫均会导致 $O_2^- \cdot$ 显著增加,在15~31℃内,SOD活力与 $O_2^- \cdot$ 含量变化趋势相似,低温胁迫导致CAT活力升高更为显著,低温与高温胁迫后,GSH含量均显著增加;高温胁迫会引起NOS活力及其催化的NO生成量显著增加;低温与高温胁迫均会引起ATP含量显著增加,但是随着温度回复至对照水平,ATP含量也回复至对照水平。结论:低温和高温胁迫均会引起凡纳滨对虾肝胰腺组织中氧代谢失衡,SOD、CAT及GSH在机体应对低温及高温胁迫导致的氧化损伤中可能扮演不同角色,NO介导的信号传导可能在应对高温胁迫中起着重要作用;低温及高温均会导致ATP含量增加,提示对虾在应对温度胁迫的过程中可能需要更多能量。推测环境温度过低或者过高时,可能由于超出凡纳滨对虾氧-温度忍受极限(OCLTT)而导致氧代谢失衡,并对凡纳滨对虾的能量代谢及其他生理活动产生重要影响。

关键词: 凡纳滨对虾; 温度胁迫; 氧代谢; 能量代谢

中图分类号: S 917.3

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是世界上养殖量最大的对虾品种,已经在30多个国家实现人工养殖,也是我国最重要的水产经济养殖品种之一^[1]。凡纳滨对虾适应能力强,养殖范围分布较广,但是养殖环境恶化是近年来困扰对虾养殖业发展的主要瓶颈之一^[2-3]。

凡纳滨对虾属于变温动物,环境温度变化会对其产生巨大影响。不适温度可能导致对虾处于胁迫状态、生理状态剧变、以及机体不能适应环境变化而直接死亡,也可能导致机体免疫力下降、感染病原几率增加而造成对虾大量死亡^[4-5]。

研究表明,对虾的氧代谢与能量代谢及生长与温度密切相关^[6-7],在一定温度范围内,中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)体质量及能量物质随温度升高而增加^[8],凡纳滨对虾的生长代谢

也与温度密切相关^[9]。此外,过高或过低温度不仅使对虾生长减缓、抗病力下降,还可以直接导致对虾死亡。例如,对虾在高温季节的患病及死亡率明显增加^[4];2009年初寒潮直接导致珠三角地区凡纳滨对虾大量死亡,给养殖业带来重大损失^[5]。

当温度变化超过动物体的氧和热耐受极限(OCLTT, oxygen and capacity limited thermal tolerance)时,动物体可能从有氧代谢转变为缺氧代谢^[10],并对机体多种生理活动产生重大影响^[11]。虽然前期的研究表明,温度与对虾的生长密切相关,但是,对虾代谢过程中对氧的需求旺盛,对缺氧十分敏感,因此环境温度与对虾氧代谢及能量代谢之间的关系需要深入研究。肝胰腺是对虾最重要的器官之一,是众多生命大分子的主

收稿日期:2014-11-29 修回日期:2015-02-19

资助项目:国家自然科学基金(41276178);海洋经济发展区域示范项目(14PYY050SF03)

通信作者:姚翠鸾, E-mail: clyao@jmu.edu.cn

要合成场所,在合成及分解代谢等方面具有重要功能^[12]。但是,作为对虾重要的代谢器官,温度胁迫与凡纳滨对虾肝胰腺氧代谢及能量代谢的关系还不清楚。

因此,本研究以凡纳滨对虾为研究对象,探讨了温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺中 O_2^- 的产生及 SOD、CAT 等抗氧化酶活力和谷胱甘肽 (GSH) 含量,一氧化氮合酶 (NOS) 活力及其催化的 NO 生成量,以及 ATP 含量变化的影响,旨在深入了解温度胁迫对凡纳滨对虾氧代谢与能量代谢的影响,为凡纳滨对虾健康养殖提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验用 虾

凡纳滨对虾体长 (11 ± 1.3) cm, 体质量 (9.5 ± 1.0) g, 购自厦门市海沧区对虾养殖厂, 实验前充氧驯养 3 d 以上, 密度为 1 尾对虾/L。驯养期间每天更换 1/2 体积新鲜海水, 定时投喂适量饵料, 及时清除死虾、残饵及排泄物, 实验前 12 h 停止喂食。海水盐度为 26, 对照组海水温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, pH 为 8.1。

1.2 温度胁迫及取 样

选取驯养后凡纳滨对虾用于温度胁迫实验。温度设置为 15, 19, 25 (对照), 31 和 35 $^\circ\text{C}$ 5 组。温度胁迫采用线性升温或者线性降温, 在 4 h 内达到设定温度, 达到实验设定温度后维持水温恒定 ($\pm 0.5^\circ\text{C}$), 胁迫后 6 h 取样; 随后撤去升温和降温实验装置, 缓慢恢复至对照组温度, 24 h 后取样。每个取样时间点分别取 5 尾对虾的肝胰腺, 在冰上将其剪成碎块混匀后合并为 1 个样本, 迅速放入液氮罐中, 转移至 -80°C 冰箱保存备用。每个温度组共 15 尾对虾, 分为 3 个平行组 ($n=3$)。

1.3 上清液制备

取肝胰腺组织 100 mg, 按组织质量, 匀浆缓冲液 = 1:9 (W/V) 比例加入 pH 7.4, 50 mmol/L Tris-HCl 匀浆缓冲液^[13], 匀浆后于 4°C , 12 500 r/min 离心 15 min, 上清液分别稀释至合适浓度, 用于测定各项生理生化指标。

1.4 总蛋白含量测定

采用 Bradford 法测定组织匀浆上清液中总蛋白含量^[14], 以牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准品构建蛋白标准曲线。

1.5 超氧阴离子 O_2^- 含量测定

样品中 O_2^- 含量测定依据 Drossos 描述的实验方法^[15], 并稍作修改, 待测样本置于 Krebs 缓冲液, 冰浴, 加入 15 $\mu\text{mol/L}$ CytC (Sigma, C2506), 37°C 水浴反应 15 min, 4°C , 12 500 r/min 离心 10 min, 上清液立即加入 100 μL 3 mmol/L N-ethylmaleimide (Sigma, E3876) 终止反应, 测定 550 nm 波长下光吸收强度 (A_{550})。对照组为先加入 N-ethylmaleimide 最后再加入 CytC。超氧阴离子含量根据高铁细胞色素 c 和亚铁细胞色素 c 之间的摩尔消光系数的变化来定量^[15]:

$$\text{超氧阴离子生成量 (nmol/min} \cdot \text{mg)} =$$

$$\frac{21}{\Delta OD_{550\text{nm}} \times \text{反应时间} \times \text{总蛋白浓度}}$$

1.6 SOD 活力测定

SOD 活力测定采用超氧化物歧化酶 (SOD) WST-1 法^[16]。依据南京建成 (A001-3) 试剂盒说明书, 上清液稀释一定倍数后用于 SOD 活力测定。

酶活力定义为反应体系中 SOD 抑制率达到 50% 时所对应的酶量为一个 SOD 活力单位。计算公式:

$$\text{SOD 抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{实验}} - A_{\text{实验空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}} \right) \times 100\%$$

$$\text{SOD 比活力 (U/mg)} = (\text{SOD 抑制率}/50\%) \times \text{稀释倍数}/[\text{待测样本蛋白浓度 (mg/mL)}]$$

1.7 CAT 活力测定

CAT 活力测定依据 Johansson 等^[17] 和 Trasviña 等^[18] 描述的方法并稍做改动: CAT 催化甲醇生成甲醛, 用 4-氨基-3-胍基-5-巯基-1,2,4-苯三唑 (AHMT) 显色生成的甲醛, 绘制甲醛标准曲线定量 CAT 活力。取 20 μL 待测样本, 加入 150 μL 缓冲液 [66.7% 100 mmol/L KH_2PO_4 (pH 7.0), 20% 甲醇, 13.3% 4.2 mmol/L H_2O_2], 恒速振动 20 min 后加入 30 μL 10 mol/L KOH 终止反应, 立即加入 30 μL 0.5% 的 4-氨基-3-胍基-5-巯基-1,2,4-苯三唑室温静置 20 min, 加入 10 μL 高碘酸钾 (65.2 mmol/L IKO_4 , 0.5 mol/L KOH) 氧化 5 min, 检测 550 nm 波长下光吸收值 (A_{550}), 以 2 500 U/mg 牛肾过氧化氢酶作为阳性对照。根据标准曲线, 计算 CAT 活力。

1.8 GSH 含量测定

GSH 含量测定依据 Sedlak 等^[19] 描述的方法并稍作修改: 取 400 μL 待测样本, 加入 320 μL

ddH₂O, 80 μL 50% (W/V) 三氯乙酸到 1.5 mL EP 管中, 室温 3 000 r/min 离心 15 min。取 400 μL 上清液, 加入 800 μL Tris 缓冲液 (0.4 mol/L, pH 8.9) 和 20 μL 0.01 mmol/L 5,5-dithio-bis (BBI, DB0113), 摇匀 3 min 后, 检测 412 nm 波长下光吸收值 (A₄₁₂)。以 GSH 标准品 (Amresco) 绘制标准曲线, 计算单位质量总蛋白质中 GSH 含量 (mg/mL)。

1.9 NOS 活力测定

总 NOS 活力测定采用 NOS 测定试剂盒 (南京建成, A014-2), 测定方法参照说明书。根据 NOS 催化生成 NO 量计算 NOS 活力。

$$\text{总 NOS 活力 (U/mg)} = \frac{A_{\text{实验}} - A_{\text{对照}}}{38.3 \times 10^{-6} \times \text{总蛋白浓度}} \times \frac{2.41 + a^*}{a^*} \times \frac{1}{1 \times 15}$$

式中: 38.3 × 10⁻⁶ 为呈色物纳摩尔消光系数, 2.41 为反应试剂总体积 (mL), a* 为加样量 (mL), 1 为比色光径 (cm), 15 为反应时间 (min)

1.10 NO 含量测定

NO 含量测定依据 Griess 法, 并稍作改动^[20]。取 100 μL 待测样本加入 96 孔板, 加入 50 μL 1% sulphanimide (溶剂为 2.5% H₃PO₄) (Sigma, S9251) 和 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (溶剂为 2.5% H₃PO₄) (Sigma, N9125) 1:1 混合液并混匀, 室温反应 15 min, 读取 540 nm 波长下光吸收值 (A₅₄₀)。将标准品亚硝酸钠配制成不同浓度标准品溶液, 绘制标准曲线, 计算单位质量总蛋白质中 NO 含量。

1.11 ATP 含量测定

ATP 含量测定采用肌酸激酶 (CK) 法^[21], 并稍作修改, 样本 100 °C 水浴 10 min, 立即置于冰中冷却, 4 °C, 12 500 r/min 离心 15 min, 取上清液待测。测定管 (U)、对照管 (U_B) 各加样品 50 μL, 标准管 (S)、标准对照管 (S_B) 各加 0.5 mmol/L ATP 标准液 50 μL, 每管加入 0.2 mol/L 肌酸 100 μL, pH 9.0 Tris-HCl 缓冲液 (0.125 mol/L Tris, 0.0125 mol/L HCl, 1.36 mmol/L 乙酸镁, 0.25% 巯基乙醇) 50 μL。分别加入 10 μL 250 U/mL CK 酶液混匀后 37 °C 水浴 30 min, 每管加显色剂 (A 液: 27.5% H₂SO₄, 0.064 mol/L 钼酸铵, 4.8 mmol/L 亚硫酸氢钠, 14.64 mmol/L 邻苯二

胺盐酸盐; B 液: 2.1% 聚乙烯吡咯烷酮, 0.1% TritonX-100; 临用前 A 液和 B 液按照 1:5 比例混匀) 1.5 mL, 37 °C 水浴 20 min, 测定 700 nm 波长下光吸收值。ATP 含量定义为单位质量总蛋白中 ATP 含量 (mmol/g)。

$$\text{ATP (mmol/g)} = \frac{A_{700} U - A_{700} U_B}{(A_{700} S - A_{700} S_B) \times \text{总蛋白浓度}} \times 5 \times 10^5$$

1.12 数据分析

实验数据均用平均数 ± 标准差 (mean ± SD, n = 3) 表示, 利用 SPSS 15.0 对实验数据进行统计分析, 采用独立样品 t 检验 (independent-samples t test) 对 SOD、CAT、NOS 活力及 GSH、O₂⁻·、NO、ATP 含量进行组间差异显著性分析, 设定 P < 0.05 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺 O₂⁻· 产生及抗氧化酶活力的影响

温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺组织中 O₂⁻· 含量的影响如图 1-a 所示, 15 °C 胁迫引起 O₂⁻· 含量显著增加, 胁迫 6 h 达到对照组的 1.54 倍 (P < 0.05), 温度回复后 24 h, 其含量也恢复至对照组水平; 19 °C 胁迫导致 O₂⁻· 含量显著降低, 胁迫 6 h 后, 其含量仅为对照组的 35% (P < 0.05), 恢复至对照温度 24 h 后 O₂⁻· 含量仍然显著低于对照组 (P < 0.05)。31 °C 刺激引起 O₂⁻· 含量显著增加, O₂⁻· 含量在刺激后 6 h 达到对照组的 2.58 倍 (P < 0.05), 而温度恢复 24 h 后回复至对照组水平; 35 °C 高温胁迫后 6 h, O₂⁻· 含量未发生显著变化, 但是回复至对照组 24 h 后, 其含量约为对照组的 1.55 倍, 显著高于对照组 (P < 0.05)。

温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺组织中 SOD 活力的影响如图 1-b 所示。15 °C 低温胁迫会导致肝胰腺 SOD 活力显著增加, 胁迫后 6 h 达到对照组的 1.84 倍 (P < 0.05), 随着温度上升, SOD 活力也随之恢复; 19 °C 胁迫 6 h, SOD 活力略微上升, 但是温度回复至对照组后, SOD 活力却显著降低, 仅为对照组的 55% (P < 0.05); 31 °C 高温胁迫导致 SOD 活力显著增加, 胁迫后 6 h 达到对照组的 2.63 倍 (P < 0.05), 但是随着温度回复至对照组温度, 其活力也恢复至对照组水平; 35 °C 胁迫 6 h 后, SOD 活力是对照组的 2.05 倍 (P <

0.05),但是温度回复后24 h,SOD活力却显著降低,仅为对照组的51% ($P < 0.05$)。

温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺组织中CAT活力的影响如图1-c所示。15℃低温胁迫6 h CAT活力显著增加,为对照组的3.23倍 ($P < 0.05$),温度上升后CAT活力也随之恢复;CAT活力在19℃胁迫后6 h达到对照组的2.65倍 ($P < 0.05$),但是温度回复至对照组水平后24 h,活力却显著降低,仅为对照组的43% ($P < 0.05$);31℃实验组CAT活力在胁迫6 h显著增加,为对照组的1.88倍 ($P < 0.05$),但是回复到对照组温度24 h后,其活力却显著下降,仅为对照组的35% ($P < 0.05$);35℃高温胁迫6 h后CAT活力

是对照组的1.38倍,温度回复24 h后,CAT活力却下降,仅为对照组的69%。

温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺组织中GSH含量的影响如图1-d所示。15℃胁迫后6 h,实验组GSH含量显著增加,为对照组的2.13倍 ($P < 0.05$);当温度回复后24 h,其含量也恢复;19℃胁迫未引起GSH含量的显著变化;31℃胁迫6 h,GSH含量显著增加,是对照组的2.22倍 ($P < 0.05$),但是随着温度的降低,其含量也恢复;35℃胁迫6 h,实验组GSH含量与对照组相比无显著差异,但是回复至对照温度过程中其含量逐渐升高,至24 h时GSH含量达到对照组1.97倍 ($P < 0.05$)。

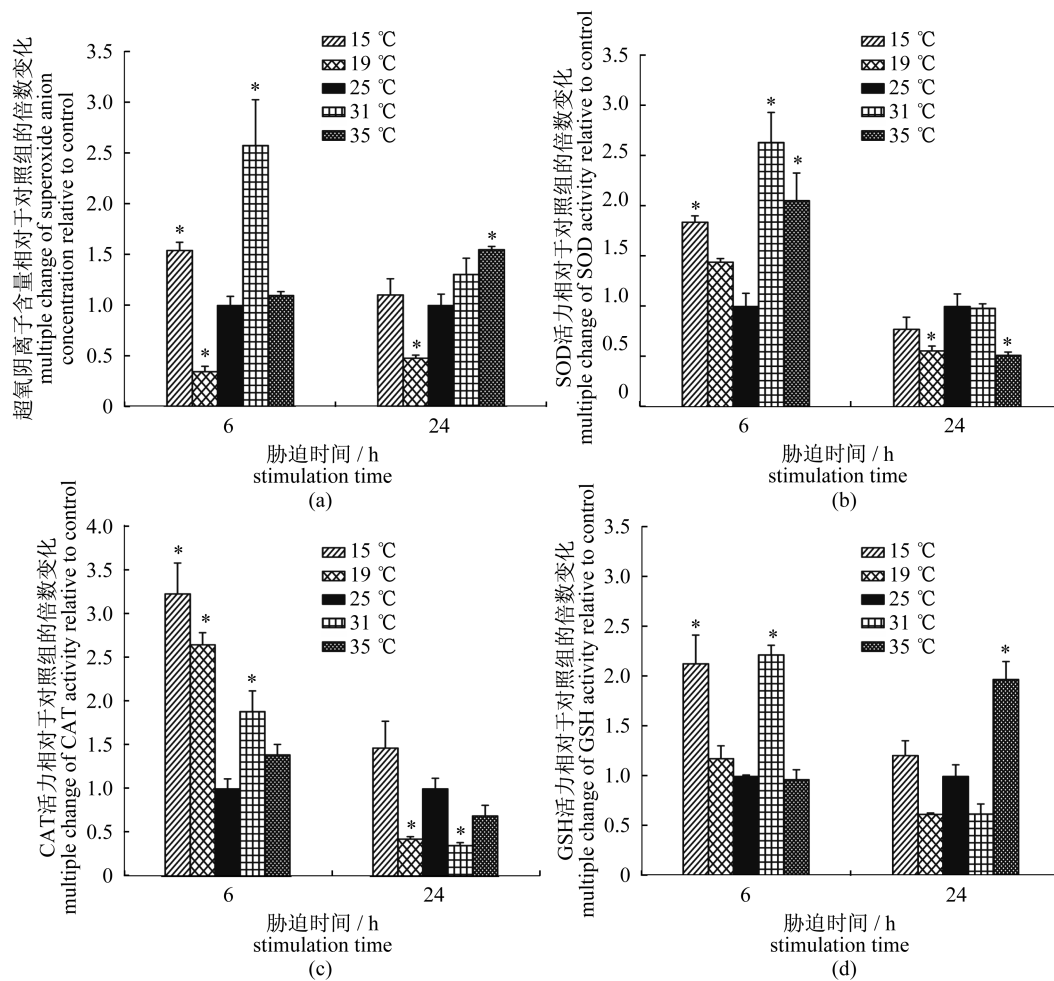


图1 不同温度对凡纳滨对虾肝胰腺 $O_2^- \cdot$ 含量(a),SOD活力(b),CAT活力(c)和GSH含量(d)变化的影响 ($n = 3$)

*表示实验组数据与对照组数据具有显著性差异 ($P < 0.05$),下同

Fig.1 The change of $O_2^- \cdot$ concentration (a), SOD activity (b), CAT activity (c) and GSH concentration (d) in the hepatopancreas of *L. vannamei* after exposure to different temperature ($n = 3$)

Asterisk presents the significant difference ($P < 0.05$), the same as below

2.2 温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺 NOS 活力及 NO 含量的影响

温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺组织中 NOS 活力的影响如图 2-a 所示。15 °C 胁迫 6 h, NOS 活力与对照组无显著差异,但是水温回复至对照水平 24 h 后, NOS 活力增加,达到对照组的 1.60 倍 ($P < 0.05$); 19 °C 胁迫后 6 h, NOS 活力降低,仅为对照

组的 57% ($P < 0.05$),但是随着温度恢复 NOS 活力也恢复; 31 °C 高温胁迫引起 NOS 活力下降,胁迫 6 h 后其活力为对照组的 76%,但是随着温度恢复, NOS 活力显著上升, 24 h 时达到对照组的 1.74 倍 ($P < 0.05$); 35 °C 胁迫导致 NOS 活力在 6 h 时增加,为对照组的 1.22 倍,并且在温度恢复 24 h 后, NOS 活力为对照组的 2.59 倍 ($P < 0.05$)。

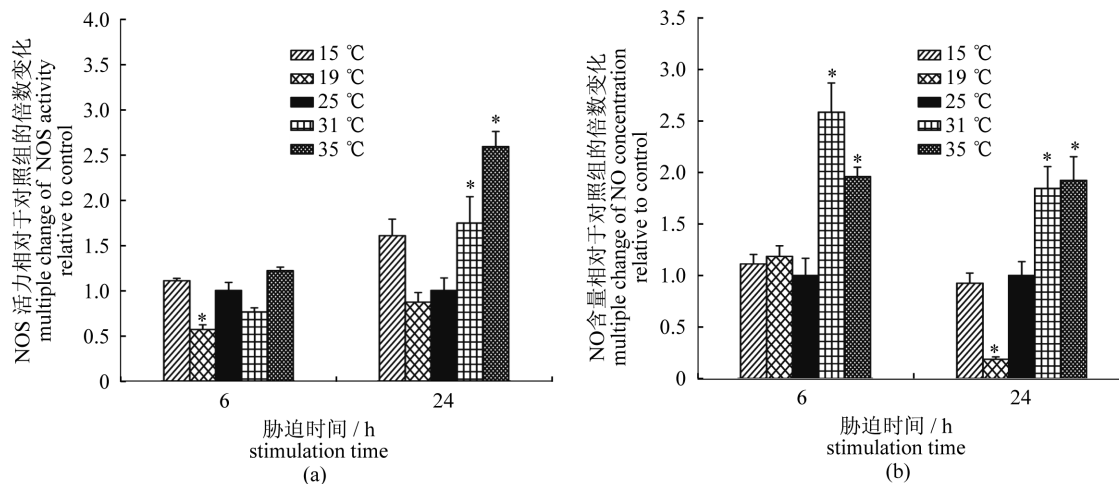


图 2 不同温度对凡纳滨对虾肝胰腺 NOS (a) 活力和 NO (b) 生成量的影响 ($n = 3$)

Fig. 2 The change of NOS activity (a) and NO concentration (b) in the hepatopancreas of *L. vannamei* after exposure to different temperature ($n = 3$)

温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺组织中 NO 含量的影响如图 2-b 所示, 15 与 19 °C 低温胁迫 6 h 时, 实验组 NO 含量与对照组相比无显著差异, 当回复至对照温度 24 h 后, 19 °C 胁迫实验组 NO 含量显著降低, 仅为对照组的 20% ($P < 0.05$); 31 和 35 °C 胁迫 6 h 后, NO 含量均显著增加, 分别达到对照组的 2.58 倍 ($P < 0.05$) 和 1.96 倍 ($P < 0.05$); 当温度回复至对照水平 24 h 后, NO 含量仍然维持在较高水平, 分别为对照组的 1.84 倍 ($P < 0.05$) 和 1.92 倍 ($P < 0.05$)。

2.3 温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺 ATP 含量的影响

温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺组织中 ATP 含量的影响如图 3 所示, 15 °C 胁迫 6 h 后 ATP 含量显著高于对照组, 为对照组的 1.57 倍 ($P < 0.05$), 但是温度回复至对照水平 24 h 后, ATP 含量回复至对照组水平; 19 °C 胁迫 6 h 也会引起 ATP 含量上升, 为对照组的 1.40 倍, 但是随着温度的回复, ATP 含量也下降, 回复至对照温度 24 h 后, ATP 含量仅为对照组的 60% ($P < 0.05$); 无论是胁迫过程中或者温度回复后, 31 °C 的高温

均未引起 ATP 含量的显著变化; 35 °C 胁迫后 6 h, ATP 含量显著增加, 达到对照组的 1.69 倍 ($P < 0.05$), 而温度回复至对照水平 24 h 后, ATP 含量也回复至对照组水平。

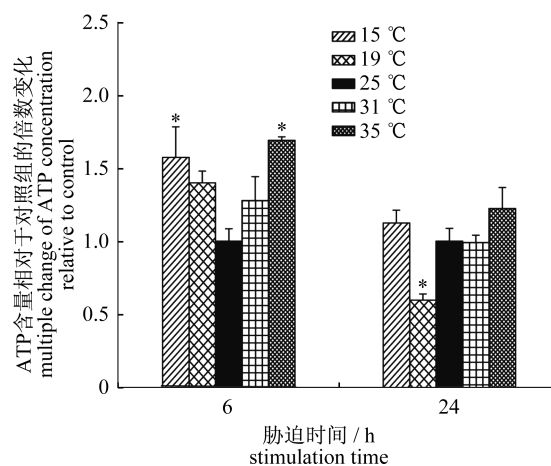


图 3 不同温度对凡纳滨对虾肝胰腺 ATP 含量的影响 ($n = 3$)

Fig. 3 The changes of ATP concentration in the hepatopancreas of *L. vannamei* after exposure to different temperature ($n = 3$)

3 讨论

变温动物机体内一系列的生理生化及代谢变化与环境温度变化密切相关,特别是低等水生动物,通过启动机体的代偿适应功能以抵抗和适应各种应激。当应激反应超过机体所能适应的限度时,机体组织结构就会发生应激损伤。温度是影响对虾等海洋生物生存和生长的最重要非生物因素之一^[22]。

Wyban等^[23]研究表明,凡纳滨对虾的适温范围是23~30℃,当水温降至15~22℃或者升至30~32℃时,就会感受到来自环境的胁迫。多项研究表明,对虾在受到温度胁迫后,机体健康状况恶化,可能与其处于胁迫状态,生理机能改变有关。但是,肝胰腺作为对虾重要的合成、代谢器官,温度胁迫对其影响还不清楚。

尽管温度上升时,由于 Q_{10} 效应,机体的新陈代谢速率加快。但是一些研究表明,随着环境温度上升,一些海洋低等生物的新陈代谢速率会减慢。这可能是由于高温导致细胞内代谢元件损伤。海水温度升高往往伴随溶解氧浓度的下降,因此,氧代谢和温度之间的联系已经成为许多高温胁迫生理学研究的重点。对鱼类、贝类、刺参(*Apostichopus japonicus*)等海洋变温动物的研究发现,温度升高会导致动物体的低氧胁迫及代谢改变,并提出了OCLTT定律^[10-11]。

机体正常有氧代谢和防御反应过程中会产生活性氧(ROS)及活性氧中间体(ROI),正常生理条件下多余的活性氧会被抗氧化酶类快速清除。当ROS产生和消耗的平衡被打破,则会导致氧化应激。超氧阴离子(O_2^-)是活性氧中最常见的一种, O_2^- 可以进一步生成其他类型的活性氧^[24]。本研究发现,15℃胁迫会导致凡纳滨对虾肝胰腺中 O_2^- 含量显著增加。对虾是对环境氧含量十分敏感的动物,推测低温胁迫可能是通过氧代谢平衡的改变导致肝胰腺中超氧阴离子含量显著增加。Zenteno等^[25]研究也发现,凡纳滨对虾低氧刺激后再复氧,在最初4h内 O_2^- 含量上升。随着温度的回复, O_2^- 含量也回复至对照组水平,但是这种回复是由于代谢恢复还是短暂应激之后的忍耐还不清楚。

高温条件下,对虾呼吸作用加快,ROS生成量也相应增加,可能会导致机体氧化应激。本研

究中,高温实验组 O_2^- 含量均高于对照组,尤其是31℃胁迫6h实验组 O_2^- 含量达到对照组的2.58倍,揭示高温胁迫会诱导 O_2^- 含量增加,但是随着温度的上升, O_2^- 含量并未相应增加,符合OCLTT定律^[10]。

SOD是生物体抗氧化系统中的关键酶,可以直接清除机体内多余自由基。本研究中,温度胁迫6h,低温与高温实验组SOD活力均显著高于对照组($P < 0.05$),且高温实验组SOD活力高于低温实验组,其中31℃实验组SOD活力是对照组的2.63倍($P < 0.05$)。提示SOD可能在凡纳滨对虾应对高温胁迫中发挥更重要功能,也与 O_2^- 含量增加一致。35℃胁迫后,SOD活力在温度回复至对照组后显著降低,可能是由于35℃高温对对虾造成的损伤较为严重,短期内难以恢复。周鲜娇等^[26]研究也表明,温度剧烈变化导致对虾代谢紊乱和组织抗氧化酶活性下降,使对虾易受到氧化损伤,抗病力下降,容易患病死亡。

CAT在细胞氧化还原平衡中发挥重要功能,催化 H_2O_2 发生歧化反应生成 H_2O 和 O_2 ,是一个不可或缺的抗氧化酶。CAT的表达和活力可能与生理功能和氧敏感性有关。本研究中,15℃胁迫实验组CAT活力达到对照组的3.23倍($P < 0.05$),CAT对低温胁迫响应更强烈。研究表明,低温胁迫诱导对虾CAT活力上升更为显著,推测这可能是对虾肝胰腺器官应对温度变化的一种保护性反应,随着胁迫时间延长,CAT活力降低,对虾体内 H_2O_2 积累增多,使机体细胞容易遭受 H_2O_2 毒害^[26]。而CAT对高温胁迫响应不强烈,可能是因为超氧化物自由基抑制了CAT活力^[27]。

GSH是机体组织中重要的非蛋白质巯基化合物,可以与自由基、重金属等结合,保护巯基酶和血红蛋白等免受氧化损伤,缺乏或者耗竭GSH后,机体会发生中毒或者中毒程度加重,这些毒害作用可能与氧化损伤相关,因此GSH含量是衡量机体抗氧化能力大小的重要因素。GSH水平被认为是受非生物因素影响最明显的生物标记^[28]。本研究发现,15℃低温与31℃高温胁迫6h后对虾肝胰腺GSH含量显著增加($P < 0.05$),推测可能是由于温度胁迫导致代谢改变,产生更多活性氧,从而导致更高的抗氧化应激,机体产生更多GSH用于保护其免受氧化应激损伤。其他研究

也表明高温胁迫会导致对虾多种组织 GSH 含量增加,推测 GSH 在保护机体应对缺氧或者低氧造成的氧化损伤过程中发挥重要功能^[29-31]。

NO 是第二信使分子,具有多种生理功能,其表达变化与机体的免疫信号传导、肌肉收缩、神经信号传递等多种重要生理过程密切相关,并能够与氧化代谢过程中产生的 $O_2 \cdot$ 结合产生过氧化一氮发挥杀菌功能^[32]。NOS 可以通过催化 L-精氨酸(L-Arg)与 O_2 生成 NO^[33]。因此 NOS 活力及 NO 的产生成为动物体内氧化代谢的一项重要指标^[34]。本研究发现 31 与 35 °C 胁迫均可导致凡纳滨对虾肝胰腺中 NOS 活力及其催化生成的 NO 含量显著增加,温度胁迫,特别是高温胁迫可以诱导 NOS 活力增加并催化 NO 合成增加,NO 的增加可能与其参与更多的信号传递,应对温度胁迫有关。

ATP 作为最重要的能量分子在细胞的各种生理和病理过程中均发挥重要作用。温度作为重要的环境因子能够显著影响生物体新陈代谢速率,进而影响生物体内能量代谢水平。本研究发现低温和高温胁迫后凡纳滨对虾肝胰腺中 ATP 含量显著增加,并且温度变化越大,ATP 含量增加越显著。Wang 等^[35]发现 12 °C 低温刺激后,凡纳滨对虾肝胰腺中 V-H ATPase 和 $Na^+ - K^+$ ATPase 在 mRNA 水平表达量均上调。推测在低温下,对虾可能需要合成更多的 ATP 来维持机体代谢的进行,在极端高温条件下,一方面可能是高温会加速 ATP 的合成,另一方面,凡纳滨对虾可能要消耗更多能量维持机体内稳态平衡。

综上所述,本实验检测了低温及高温胁迫后凡纳滨对虾肝胰腺中 $O_2 \cdot$ 含量、SOD 及 CAT 抗氧化酶活力, GSH 含量, NOS 活力及其催化的 NO 生成量,以及 ATP 含量的变化,结果表明,低温及高温胁迫均会引起凡纳滨对虾肝胰腺内活性氧增加以及与之相应的抗氧化酶活力增加,但是不同类型的抗氧化酶可能在对虾抵抗低温或高温胁迫中扮演不同角色;高温胁迫会导致 NOS 活力显著增强,NO 产生也明显增加,可能与机体需要更多的 NO 参与胁迫导致的信号传递相关;低温及高温胁迫均会诱导 ATP 含量的显著增加,可能与机体需要更多能量维持机体代谢、应对温度胁迫以及修复温度胁迫产生的损伤相关。当温度超过一定范围后,可能导致机体产生更大损伤,而代

谢水平并未随着胁迫温度上升而增加,可能与氧和热耐受极限相关。

参考文献:

- [1] Gao W H, Tan B P, Mai K S, *et al.* Identification of differentially expressed genes in hepatopancreas of white shrimp *Litopenaeus vannamei* induced by long-term low-salinity stress [J]. Periodical of Ocean University of China: Natural Science edition, 2013, 43 (9): 39 - 46. [郜卫华, 谭北平, 麦康森, 等. 长期低盐胁迫诱导凡纳滨对虾肝胰腺差异表达基因的研究. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2013, 43 (9): 39 - 46.]
- [2] Lei J L. Strategy consideration for industry construction of Chinese marine culture [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (3): 600 - 609. [雷霖. 中国海水养殖大产业架构的战略思考. 中国水产科学, 2010, 17 (3): 600 - 609.]
- [3] Dong S L. High efficiency with low carbon: The only way for China aquaculture to develop [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35 (10): 1595 - 1600. [董双林. 高效低碳——中国水产养殖业发展的必由之路. 水产学报, 2011, 35 (10): 1595 - 1600.]
- [4] Jing F T, Pan L Q, Hu F W. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to the change of temperature [J]. Periodical of Ocean University of China: Natural science edition, 2006, 36 (B05): 40 - 44. [景福涛, 潘鲁青, 胡发文. 凡纳滨对虾对温度变化的免疫响应. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2006, 36 (B05): 40 - 44.]
- [5] Li S D, He J G, Zhang C S, *et al.* The impact of cold temperature on *Litopenaeus vannamei* [J]. Scientific Fish Farming, 2010 (1): 24 - 25. [李色东, 何建国, 张存善, 等. 寒流对凡纳滨对虾养殖的影响及防范措施探讨. 科学养鱼, 2010 (1): 24 - 25.]
- [6] Zhou J, Wang L, Xin Y, *et al.* Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Thermal Biology, 2010, 35 (6): 284 - 289.
- [7] Wang W N, Wang A L, Liu Y, *et al.* Effects of temperature on growth, adenosine phosphates, ATPase and cellular defense response of juvenile shrimp *Macrobrachium nipponense* [J]. Aquaculture, 2006, 256 (1 - 4): 624 - 630.
- [8] Tian X L, Dong S L, Wang F. Effects of different temperatures on the growth and energy budget of

- Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15(4): 678-682. [田相利,董双林,王芳.不同温度对中国对虾生长及能量收支的影响.应用生态学报,2004,15(4):678-682.]
- [9] Yang Z W, Lu X N, Zheng Y Y, *et al.* Effect of temperature on the growth, development and survival rate of *Litopenaeus vannamei* larvae [J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2011, 30(1): 81-85. [杨章武,卢小宁,郑雅友,等.温度对凡纳滨对虾幼体生长,变态和存活率的影响.台湾海峡,2011,30(1):81-85.]
- [10] Anestis A, Pörtner H O, Lazou A, *et al.* Metabolic and molecular stress responses of sublittoral bearded horse mussel *Modiolus barbatus* to warming sea water; Implications for vertical zonation [J]. Journal of Experimental Biology, 2008, 211(17): 2889-2898.
- [11] Yao C L, Somero G N. The impact of ocean warming on marine organisms [J]. Chinese Science Bulletin, 2014, 59(5-6): 468-479.
- [12] Dall W, Moriarty D J W. Functional aspects of nutrition and digestion [J]. The Biology of Crustacea: Functional Aspects of Nutrition and Digestion, 1983, 5: 215-261.
- [13] Almeida E A, Bainy A C D, Dafre A L, *et al.* Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2005, 318(1): 21-30.
- [14] 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): 248-254.
- [15] Drossos G, Lazou A, Panagopoulos P, *et al.* Deferoxamine cardioplegia reduces superoxide radical production in human myocardium [J]. The Annals of Thoracic Surgery, 1995, 59(1): 169-172.
- [16] Liu X L, Xi Q Y, Yang L, *et al.* The effect of dietary Panax ginseng polysaccharide extract on the immune responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(2): 495-500.
- [17] Johansson L H, Borg L A. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples [J]. Analytical Biochemistry, 1988, 174(1): 331-336.
- [18] Trasviña Arenas C H, Garcia Triana A, Peregrino Uriarte A B, *et al.* White shrimp *Litopenaeus vannamei* catalase: Gene structure, expression and activity under hypoxia and reoxygenation [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2013, 164(1): 44-52.
- [19] Sedlak J, Lindsay R H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent [J]. Analytical Biochemistry, 1968, 25(1): 192-205.
- [20] Ding A H, Nathan C F, Stuehr D J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production [J]. The Journal of Immunology, 1988, 141(7): 2407-2412.
- [21] Chen Z R, Sun C H. Content of ATP in RBC Detect by CPK [J]. Journal of Practical Medical Techniques, 2002, 9(12): 908-909. [陈载融,孙春洪.肌酸激酶法测定红细胞中ATP含量.实用医技杂志,2002,9(12):908-909.]
- [22] Lutterschmidt W I, Hutchison V H. The critical thermal maximum: History and critique [J]. Canadian Journal of Zoology, 1997, 75(10): 1561-1574.
- [23] Wyban J, Sweeney J N. Intensive shrimp production technology: The Oceanic Institute shrimp manual [M]. Honolulu: The Oceanic Institute, 1991.
- [24] Halliwell B, Gutteridge J M. Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage [J]. The Lancet, 1984, 324(8411): 1095.
- [25] Zenteno Savín T, Saldierna R, Ahuejote Sandoval M. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2006, 142(3-4): 301-308.
- [26] Zhou X J, Qiu D Q, Liu W Z. Effect of temperature on the heart rate and antioxidant enzyme activities in hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* [J]. Fishery Modernization, 2007, 34(5): 5-7. [周鲜娇,邱德全,刘文珍.温度变化对凡纳滨对虾心率和肝胰腺抗氧化酶活性的影响.渔业现代化,2007,34(5):5-7.]
- [27] Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase [J]. Journal of Biological Chemistry, 1982, 257(10): 5751-5754.
- [28] Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, *et al.* The changing faces of glutathione, a cellular protagonist

- [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2003, 66(8): 1499 – 1503.
- [29] Hermes L M, Zenteno S T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2002, 133(4): 537 – 556.
- [30] Rajagopal S, Van der Gaag M, Van der Velde G, *et al.* Upper temperature tolerances of exotic brackish-water mussel, *Mytilopsis leucophaeata* (Conrad): An experimental study [J]. *Marine Environmental Research*, 2005, 60(4): 512 – 530.
- [31] Tu H T, Silvestre F, Meulder B D, *et al.* Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Chemosphere*, 2012, 86(1): 83 – 91.
- [32] Söderhäll K. Invertebrate immunity [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1999, 23(4 – 5): 263 – 266.
- [33] Mayer B, Andrew P. Nitric oxide synthases: Catalytic function and progress towards selective inhibition [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1998, 358(1): 127 – 133.
- [34] Yao C L, Ji P F, Wang Z Y, *et al.* Molecular cloning and expression of NOS in shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(3): 453 – 460.
- [35] Wang L, Wang W N, Liu Y, *et al.* Two types of ATPases from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to environmental stress [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(6): 6427 – 6438.

The impact of temperature stress on the oxygen metabolism and energy metabolism in the hepatopancreas of shrimp *Litopenaeus vannamei*

ZHU Mengkai, YAO Cuiluan *

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The aim of this paper is to investigate the impact of temperature stress on the oxygen and energy metabolism in hepatopancreas of shrimp *Litopenaeus vannamei*. In the present study, the impact of low and high temperature on the superoxide anion ($O_2^- \cdot$) production, superoxide dismutase (SOD) activity, catalase (CAT) activity and glutathione (GSH) concentration, and the nitric oxide synthase (NOS) activity and the synthesis of nitric oxide (NO) was detected by their corresponding biochemical methods. In addition, the concentration of adenosine triphosphate (ATP) was also examined. The results showed that $O_2^- \cdot$ production could be induced significantly after cold stress at 15 °C and heat stress at 31 and 35 °C. SOD activity was showed a similar changing profile with the concentration of $O_2^- \cdot$ after thermal stress between 15 and 31 °C. Compared with heat stress, CAT activity was enhanced more significantly after cold stress. However, GSH concentration increased significantly after high temperature stress. The NOS activity and NO concentration increased significantly after heat stress. However, ATP concentration increased significantly after both low temperature and high temperature stress, and it returned to the control level after 24 h recovery. Conclusion: Thermal stress could lead to oxygen metabolism disorder in the hepatopancreas of shrimp *L. vannamei*, which might induce antioxidant enzymes response. Our findings suggested that SOD, CAT and GSH might play different roles in shrimp response to thermal stress. Also, NO might play an important role in induction of many signaling pathways to response to thermal stress. In addition, more ATP was produced after cold and heat stress. Our findings indicated that thermal stress lead to oxygen metabolism disorder, which might be due to the temperature stress beyond the oxygen and capacity limited thermal tolerance (OCLTT) of *L. vannamei*. The disorder of oxygen metabolism might have an important impact on energy metabolism and other physiological activities of *L. vannamei*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; temperature stress; oxygen metabolism; energy metabolism

Corresponding author: YAO Cuiluan. E-mail: clyao@jmu.edu.cn