

文章编号: 1000-0615(2018)11-1704-07

DOI: 10.11964/jfc.20170610858

## 急性氨氮暴露对大弹涂鱼炎性反应相关基因表达的影响

宋美泽<sup>1</sup>, 黎明<sup>2</sup>, 李健<sup>1</sup>, 袁莉霞<sup>2</sup>, 王日昕<sup>2</sup>, 石戈<sup>1\*</sup>

(1. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 浙江舟山 316000;

2. 宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

**摘要:** 为研究急性氨氮胁迫对大弹涂鱼炎性反应相关基因表达的影响, 实验挑选初始体质量为(15.14±0.05) g的健康大弹涂鱼幼鱼180尾, 进行96 h的急性氨氮胁迫实验。结果显示, 大弹涂鱼96 h氨氮半致死浓度为8.99 mg/L总氨氮(0.11 mg/L非离子氨, T-AN); 氨氮胁迫后*TNF*基因的mRNA表达量分别于12和96 h时显著上调, 96 h时表达量达到0 h时的2倍; *IL-1*基因的mRNA表达量12 h时显著上调, 为0 h时表达量的6倍; 氨氮胁迫后*IL-6*基因的mRNA表达量分别于12和96 h时显著上调, 表达量达到0 h时的1.5倍; 氨氮胁迫后*IL-8*基因的mRNA表达量在24 h时出现显著下调。研究表明, 大弹涂鱼96 h氨氮半致死浓度为8.99 mg/L总氨氮; 半致死浓度的氨氮胁迫48 h后, *TNF*、*IL-1*、*IL-6*和*IL-8*基因的mRNA表达量持续升高, 推测过度炎性应激可能是导致鱼类氨中毒死亡的原因之一。

**关键词:** 大弹涂鱼; 氨氮; 基因; 促炎性因子

**中图分类号:** Q 786; S 965.3

**文献标志码:** A

鱼类氨中毒与哺乳动物肝性脑病的致病机制相同, 都是因为大脑中高含量的非离子态氨氮(NH<sub>3</sub>) 在谷氨酰胺合成酶(GS)催化下合成大量的谷氨酰胺, 使得星状胶质细胞肿胀引起颅内高压导致死亡<sup>[1]</sup>, 长期以来, 该假说得到大多数学者的认可。但近年来, Van Der Linden等<sup>[2]</sup>针对这一观点提出了质疑, 他们发现鲤(*Cyprinus carpio*) 受到氨氮胁迫后, 谷氨酰胺积累量远超过哺乳类的致死浓度, 大脑体积扩大了6.5%却未发现动物死亡, 组织学证据表明, 鱼类颅骨结构较之哺乳类具有更多的颅内间隙, 能够耐受更强的颅内压, 因此推测颅内压升高可能并不是导致鱼类氨中毒死亡的主要原因。

有研究表明, 向大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*) 腹腔中注射不同浓度的醋酸铵后, 其大脑中氨氮和谷氨酰胺含量在胁迫初期经历快速升高后, 由于受到机体适应性调节机制的调控, 能够达到饱和状态。然而, 机体适应性调节过程产生的代谢产物却能够诱发某些生理

应激反应(或病理过程), 如氧化损伤、炎性过激等, 可能才是导致鱼类死亡的真正原因<sup>[3]</sup>。长期以来, 受到技术条件限制, 鱼类氨中毒致死机制并不十分清楚。近年来, 随着水生动物研究手段的不断革新, 有新的证据表明, 鱼类氨中毒与机体过度的炎性反应有关。参与炎性反应各阶段的基因受到NF-κB信号通路的调控, 包括*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6*、*IL-8*、*iNOS*、*COX2*、趋化因子、黏附分子及集落刺激因子等, NF-κB信号通路能够激活线粒体自噬及细胞凋亡, 推测这可能是鱼类氨中毒致死的主要原因之一<sup>[4]</sup>。

大弹涂鱼隶属于弹涂鱼科(Periophthalmidae), 为暖水广温、广盐两栖性鱼类, 在中国福建、浙江、江苏、台湾等地沿海分布较为广泛<sup>[5]</sup>。由于大弹涂鱼具有较强氨氮耐受能力的特质, 使其成为开展本研究绝佳的实验对象。本实验评估了急性氨氮胁迫对大弹涂鱼炎性反应相关基因表达的影响, 以期查明炎性反应与鱼类氨中毒致死之间可能的联系。

收稿日期: 2017-06-05 修回日期: 2017-07-26

资助项目: 国家自然科学基金(31472279; 31502176); 宁波市自然科学基金(2016A610083)

通信作者: 石戈, E-mail: sg2610105@126.com

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 96 h氨氮半致死浓度(LC<sub>50</sub>)确定

随机挑选180尾体质量为(12.58±0.12) g的健康活泼的大弹涂鱼, 分配到18个100 L塑料养殖桶中( $n=10$ )(93 cm×60 cm×25 cm)。设置6个氨氮浓度处理组(每个处理设置3个重复): 0(对照)、3、6、9、12和15 mg/L NH<sub>4</sub>Cl。实验过程中, 每隔24 h更换1次处理液, 每隔7 h用YSI ProPlus多参数水质测量仪(美国金泉公司, 美国)分别测定各桶中的氨氮浓度, 用10 g/L的NH<sub>4</sub>Cl母液调节至设定的表观浓度, 观察实验鱼的中毒症状并记录死亡数目(用玻棒触动无任何反应即为死亡), 及时去除死亡动物。

### 1.2 实验管理及取样

大弹涂鱼(15.14±0.05) g购自浙江宁波, 毒性实验在宁波大学校内基地进行。暂养30 d后, 挑选大小均匀、体格健壮鱼, 随机分配到6个300 L塑料养殖桶中(每个处理设置3个重复), 每桶30尾鱼。氨氮处理组总氨氮(TA-N)浓度为96 h LC<sub>50</sub> (8.99 mg/L TA-N), 对照组总氨氮浓度为0.01 mg/L (非离子氨<0.001 mg/L, UIA-N), 胁迫周期为96 h。期望氨氮浓度通过预配NH<sub>4</sub>Cl (10 g/L)母液每隔7 h进行调整, 总氨氮浓度测定采用YSI ProPlus多参数水质测量仪, 通过计算获得非离子氨浓度。毒性实验过程中, 海水盐度为16, 日换水量为总体积的1/3, 水温24~26 °C, 溶解氧(7.81±0.13) mg/L, 亚硝酸盐<0.5 mg/L, 保持自然光照。整个毒性实验过程中, 不投喂食物。

实验结束后, 每桶随机挑选5尾实验鱼, MS-222麻醉后解剖获得肝脏, 液氮保存, 用于分析炎症反应相关基因mRNA表达。

### 1.3 总RNA提取和cDNA合成

取0.5 g肝脏组织于RNAiso Plus (大连宝生物工程amp;有限公司)中匀浆, 加入匀浆液1/5体积的氯仿, 12 000 r/min, 4 °C离心15 min, 取上清液加入到等体积的异丙醇中, 12 000 r/min, 4 °C离心10 min, 弃上清液, 加入75 %乙醇清洗2遍, 弃上清液, 干燥后溶于适量DEPC水中。采用Nanadrop 2000(赛默飞世尔科技amp;有限公司, 美国)测定RNA浓度和纯度, 琼脂糖凝胶电泳分析RNA完整性。取1 μL总RNA, 使用TransScript All-in-one First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for

qPCR (One-Step gDNA Removal)试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)进行第一链cDNA的合成。

### 1.4 mRNA组织表达量测定

基于前期工作获得的大弹涂鱼转录组数据库中tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1(IL-1), IL-6和IL-8序列片段, 以β-肌动蛋白为内参基因(β-actin), 采用Primer 5.0 软件设计引物, 引物序列见表1, 所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。实时荧光定量PCR反应体系(20 μL): 10 μL TransStart Tip Green qPCR Super-Mix (2×)、0.4 μL正向引物、0.4 μL反向引物、0.4 μL cDNA模板、8.8 μL无菌水。反应条件为94 °C, 2 min, 1个循环; 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 30 s, 40个循环; 72 °C, 10 min, 1个循环, 每个反应进行3次重复。将cDNA模板以5为单位进行6个梯度的稀释, 用于制作目的基因和内参基因的标准曲线。采用相对定量2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法<sup>[6]</sup>计算目的基因的相对表达量。

表1 本研究用到的引物序列

Tab. 1 Sequence of primers used in this study		
引物名称 primer	引物序列 sequence (5'-3')	大小/bp size
TNF-F	CTAATGGACAAGGCGTGGAC	224
TNF-R	GTGTCTGTGGAGAGCGTTGA	
IL1-F	TGTCACAAACCTCGCTTCTAC	160
IL1-R	TTCCCATCATCTCTAACCAT	
IL6-F	GATACACTCTGCCGAGGTGAG	236
IL6-R	CCTGGAGCAAGCACTATTGG	
IL8-F	GTCTGCACAGCCACATCAGT	256
IL8-R	GCGATGACGTCTGGAGAGTT	
β-actin-F	GAGCGTGGCTACTCTTTCA	200
β-actin-R	GGAGGCAGCAGTGTTCAT	

### 1.5 统计分析

大弹涂鱼96 h氨氮半致死浓度(LC<sub>50</sub>)计算采用Probit分析法; 不同氨氮浓度(C)处理组之间的mRNA表达差异采用t检验进行统计学处理; 不同取样时间(t)之间的mRNA表达差异采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 如果F检验呈显著性, 随后采用Tukey氏多重比较进行差异分析, 差异显著性设置P<0.05。所有分析均采用SPSS 18.0.0软件在Windows操作系统中进行。

安全浓度(C)=0.1×96 h LC<sub>50</sub>

非离子氨(NH<sub>3</sub>)=[NH<sub>4</sub><sup>+</sup>+NH<sub>3</sub>]/[10<sup>(pKa-pH)</sup>+1]

式中, pKa=0.090 18+2 729.92/T(开氏温度)

### 2 结果

大弹涂鱼中毒后, 运动减少, 反应迟钝, 身体翻转并伴有抽搐等行为, 用玻棒触动无任何反应即认定为死亡。大弹涂鱼在氨氮中暴露24、48、72和96 h后, 其总氨氮的LC<sub>50</sub>值分别为18.92、16.36、11.73和8.99 mg/L, 而非离子氨的LC<sub>50</sub>值分别为0.21、0.19、0.17和0.11 mg/L(表2)。随着暴露时间的延长, LC<sub>50</sub>值不断减少, 24 h LC<sub>50</sub>值是96 h LC<sub>50</sub>值的2倍多。

表 2 急性氨氮胁迫下大弹涂鱼的半致死浓度

Tab. 2 LC<sub>50</sub> of *B. pectinirostris* in acute ammonia exposure

胁迫时间/h exposure time	氨氮 ambient ammonia	
	mg/L	
	总氨氮 TA-N	非离子氨 UIA-N
24	18.92±1.35	0.21±0.04
48	16.36±0.98	0.19±0.05
72	11.73±0.74	0.17±0.02
96	8.99±1.03	0.11±0.04

对照组实验鱼肝脏中TNF基因的mRNA表达量在96 h处理时间内无显著性变化(P>0.05, 图1)。氨氮组实验鱼肝脏中TNF基因的mRNA表达量受到氨氮毒性的影响。氨氮胁迫后TNF基因的mRNA表达量分别于12和96 h时显著上调, 96 h时表达量达到0 h时的2倍(P<0.05)。

对照组实验鱼肝脏中IL-1基因的mRNA表达量在96 h处理时间内无显著性变化(P>0.05, 图2)。氨氮组实验鱼肝脏中IL-1基因的mRNA表达量受到氨氮毒性的影响。0~6 h时表达量无显著性差异(P>0.05)。12 h时表达量显著上调, 为0 h时表达量的6倍(P<0.05)。随后, 表达量逐渐降低, 但96 h时, 表达量再次升高至0 h时表达量的2倍(P<0.05)。

对照组实验鱼肝脏中IL-6基因的mRNA表达量在96 h处理时间内无显著性变化(P>0.05, 图3)。氨氮组实验鱼肝脏中IL-6基因的mRNA表达量受到氨氮胁迫后IL-6基因的mRNA表达量呈下降趋势, 最低值出现在24 h时(P<0.05)。然而, IL-6基因的mRNA表达量分别于12和96 h时出现2次显著性上调, 表达量达到0 h时的1.5倍。

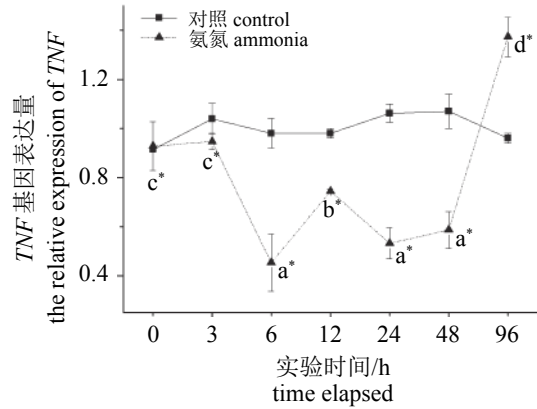


图 1 氨氮暴露对大弹涂鱼肝脏TNF基因相对表达量的影响

不同字母表示氨氮暴露时间的影响存在显著性差异(P<0.05); 星号(\*)表示氨氮水平的影响存在显著性差异(P<0.05); 下同

Fig. 1 Effects of ammonia exposure on the expression of TNF in *B. pectinirostris*

Different letters indicate a significant effect of ammonia exposure time (P<0.05); asterisk (\*) indicate a significant effect of ammonia levels (P<0.05); the same below

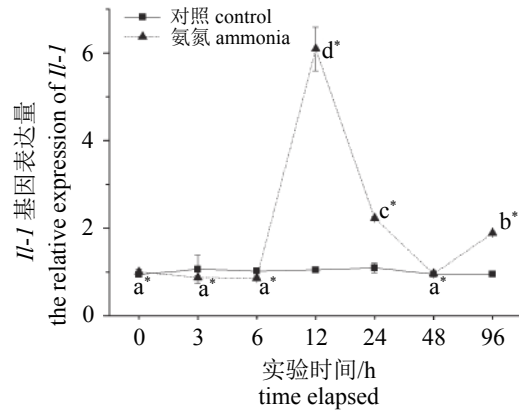


图 2 氨氮暴露对大弹涂鱼肝脏IL-1基因相对表达量的影响

Fig. 2 Effects of ammonia exposure on the expression of IL-1 in *B. pectinirostris*

对照组实验鱼肝脏中IL-8基因的mRNA表达量在96 h处理时间内无显著性变化(P<0.05, 图4)。氨氮组实验鱼肝脏中IL-8基因的mRNA表达量受到氨氮胁迫后IL-8基因的mRNA表达量呈上升趋势。但在24 h时出现显著下调, 表达量仅为0 h时的1/3(P<0.05)。

### 3 讨论

鱼类对于氨氮胁迫的耐受性差异较大, 尤其是一些能够排泄尿素的鱼类, 对氨氮的耐受

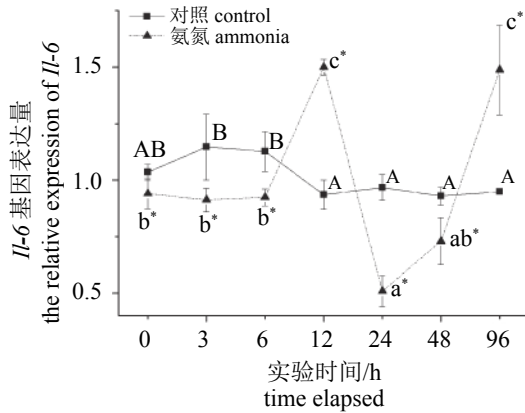


图3 氨氮暴露对大弹涂鱼肝脏IL-6基因相对表达量的影响

Fig. 3 Effects of ammonia exposure on the expression of IL-6 in *B. pectinirostris*

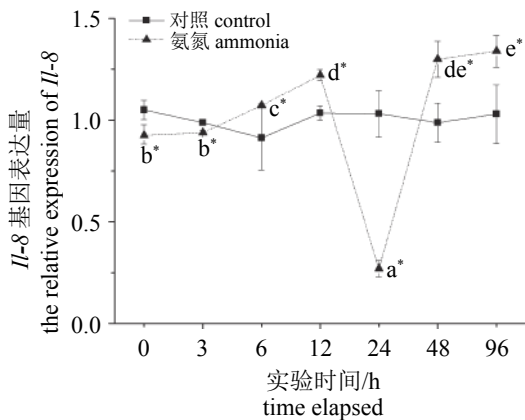


图4 氨氮暴露对大弹涂鱼肝脏IL-8基因相对表达量的影响

Fig. 4 Effects of ammonia exposure on the expression of IL-8 in *B. pectinirostris*

强度达到哺乳动物致死浓度4倍以上, 它们可以通过鸟氨酸循环(ornithine cycle)将体内多余的尿素排出体外, 也能够通过谷氨酰胺合成酶合成谷氨酰胺等途径代谢出多余的氨氮。本研究发现, 大弹涂鱼96 h氨氮半致死浓度(LC<sub>50</sub>)为8.99 mg/L T-AN。与以往的研究进行比较发现, 大弹涂鱼对氨氮的耐受力低于史氏鲟(*Acipenser schrencki*) 10.2 mg/L T-AN (体质量3.60 g)<sup>[7]</sup>、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)12.45 mg/L T-AN (体质量31.54 g)<sup>[8]</sup>、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)56.49 mg/L T-AN (体质量14.27 g)<sup>[9]</sup>、中华鲟(*A. sinensis*)0.39 mg/L UIA-N (体质量0.07 g)<sup>[10]</sup>和暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)0.46 mg/L UIA-N (体质量0.11 g)<sup>[11]</sup>; 但高

于鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)0.35 mg/L T-AN (体质量1.96 g)、鳙(*Aristichthys nobilis*)0.33 mg/L T-AN (体质量1.96 g)、鲫(*Carassius auratus*)0.73 mg/L T-AN (体质量1.96 g)<sup>[12]</sup>、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)3.19 mg/L T-AN (体质量7.30 g)<sup>[13]</sup>和斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)5.13 mg/L T-AN (体质量19.30 g)<sup>[14]</sup>。大弹涂鱼较高的氨氮耐受力, 可能与其栖息于滩涂的特殊生活方式有关。尽管在进行鱼类氨氮半致死浓度研究时, 不同的种类、大小、实验管理条件及操作严谨程度等, 都可能造成结果的差异, 但是从已有研究来看, 海水鱼类对氨氮的耐受能力要强于淡水鱼类<sup>[15]</sup>。

已有资料表明, 由于受到生理适应性机制的调节, 哺乳类大脑星状胶质细胞和小神经胶质细胞肿胀产生的代谢物, 会大量释放促炎性细胞因子, 如白细胞介素-1、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和干扰素 $\gamma$ 等, 诱发炎症反应甚至免疫抑制, 损伤大脑血管内皮细胞和神经胶质细胞, 导致肝肾功能衰竭, 机体死亡<sup>[16]</sup>。相比之下, 鱼类由氨氮刺激引起炎症反应的研究较少, 仅有的研究表明, 急性或周期性氨氮刺激能够诱发虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋比目鱼(*Hippoglossus hippoglossus*)和瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)的炎症反应, 主要表现为血液中白细胞数骤升, 并伴有溶菌酶活性下降和免疫球蛋白含量减少等免疫抑制现象<sup>[17-19]</sup>。本研究发现, 大弹涂鱼肝脏中TNF、IL-1、IL-6和IL-8基因的mRNA表达量均在氨氮胁迫后12 h时显著上调, 这与毒性兴奋效应(hormesis)有关。氨氮胁迫发生后, 大弹涂鱼体内血氨含量处于持续升高的趋势, 在胁迫初期, 低剂量氨氮对鱼体内稳态的微干扰作用, 启动了一系列修复和维持机制, 如转录因子和激酶的激活, 增加细胞保护和修复性蛋白的表达(如抗氧化酶、伴侣蛋白、生长因子、免疫因子等), 也就是说, 低剂量致毒因素对生物体是有益的<sup>[20]</sup>。在本研究中, 氨氮胁迫12 h后, 大弹涂鱼肝脏中TNF、IL-1、IL-6和IL-8基因的mRNA表达量显著下调。Li等<sup>[21]</sup>提出, 在毒性胁迫初期, 为了防止过度炎症反应对细胞或组织造成伤害, 鱼类往往能够通过“生理适应性调节机制”调控促炎性因子(如TNF和IL等)的释放, 同时, 他们还发现免疫抑制是一个逐渐积累的过程, 可能与促炎性因子的过度积累有关。Ip等<sup>[22]</sup>发现, 氨氮胁迫持续发生时, 外源性NH<sub>3</sub>浓度梯

度经鳃和皮肤大量涌入,在组织中(如血液、肝脏、大脑)过度积累会破坏血脑屏障(blood brain barrier),从而导致星状胶质细胞肿胀(astrocyte swelling)及生理代谢紊乱等,这与本实验结果一致,大弹涂鱼肝脏中*TNF*、*IL-1*和*IL-6*基因的mRNA表达量分别在氨氮胁迫24和48 h后出现明显的持续上调趋势。这也解释了Li等<sup>[21]</sup>提出的“氨氮胁迫下免疫抑制是由于促炎性因子过度积累导致”的假说,必须指出,促炎性因子是诱发线粒体自噬和细胞凋亡的重要诱因。在高等动物研究中发现,静息状态下,p50与p65结合成二聚体,当受到促炎性因子信号持续刺激时,在I- $\kappa$ B催化下,p50/p65二聚体通过核转位直接转移定位到线粒体上,与Bcl-2家族中含有多个结构域的蛋白结合后,使促凋亡蛋白Bax和Bak游离下来并活化,Bcl-2家族蛋白能控制线粒体膜的通透性,从而调节细胞色素c使其从线粒体中释放出来,诱导Caspases级联反应,触发细胞凋亡<sup>[23]</sup>。本研究结果提示,受到*TNF*、*IL-1*、*IL-6*和*IL-8*等促炎性因子持续的信号刺激,可能诱发细胞凋亡,甚至机体死亡。本研究还发现,大弹涂鱼肝脏中*TNF*、*IL-1*和*IL-6*基因的mRNA表达量在氨氮胁迫96 h时仍显著高于对照组,该结果与Li等<sup>[21]</sup>观察到的瓦氏黄颡鱼溶菌酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶活性及呼吸爆发在氨氮暴露第7天时才出现显著下降一致。

本实验结果表明,大弹涂鱼96 h氨氮半致死浓度为8.99 mg/L T-AN。半致死浓度的氨氮胁迫48 h后,*TNF*、*IL-1*、*IL-6*和*IL-8*基因的mRNA表达量持续升高,推测过度炎症应激可能是导致鱼类氨中毒死亡的主要原因之一。

#### 参考文献:

- [1] Smart G R. Investigations of the toxic mechanisms of ammonia to fish-gas exchange in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to acutely lethal concentrations[J]. *Journal of Fish Biology*, 2010, 12(1): 93-104.
- [2] Van Der Linden A, Verhoye M, Nilsson G E. Does anoxia induce cell swelling in carp brains? *In vivo* MRI measurements in crucian carp and common carp[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2001, 85(1): 125-133.
- [3] Ip Y K, Leong M W, Sim M Y, et al. Chronic and acute ammonia toxicity in mudskippers, *Periophthalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti*: Brain ammonia and glutamine contents, and effects of methionine sulfoximine and MK801[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2005, 208(Pt 10): 1993-2004.
- [4] Cheng C H, Yang F F, Ling R Z, et al. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 164: 61-71.
- [5] 曹伏君, 罗杰, 刘楚吾. 大弹涂鱼性腺发育的组织学观察[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(2): 418-425.
- Cao F J, Luo J, Liu C W. Observation on the ovary development of *Boleophthalmus pectinirostris*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(2): 418-425(in Chinese).
- [6] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [7] 刘建魁, 刘立志, 赵文, 等. 非离子氨和氨氮对不同规格史氏鲟幼鱼的急性毒性及安全浓度评价[J]. *大连海洋大学学报*, 2014, 29(2): 175-178.
- Liu J K, Liu L Z, Zhao W, et al. Acute toxicity and safe concentration of non-ionic ammonia and ammonia nitrogen to juvenile Amur sturgeon *Acipenser schrencki* with different sizes[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2014, 29(2): 175-178(in Chinese).
- [8] 阮成旭, 袁重桂, 吴德峰, 等. 氨氮和亚硝态氮对大黄鱼幼鱼的急性毒性效应[J]. *福州大学学报(自然科学版)*, 2014, 42(2): 333-336.
- Ruan C X, Yuan C G, Wu D F, et al. Acute toxic effects of ammonia and nitrite on juvenile *Pseudosciaena crocea*[J]. *Journal of Fuzhou University (Natural Science Edition)*, 2014, 42(2): 333-336(in Chinese).
- [9] 张武肖, 孙盛明, 戈贤平, 等. 急性氨氮胁迫及毒后恢复对团头鲂幼鱼鳃、肝和肾组织结构的影响[J]. *水产学报*, 2015, 39(2): 233-244.
- Zhang W X, Sun S M, Ge X P, et al. Acute effects of ammonia exposure on histopathology of gill, liver and kidney in juvenile *Megalobrama amblycephala* and the post-exposure recovery[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(2): 233-244(in Chinese).
- [10] 杜浩, 危起伟, 刘鉴毅, 等. 苯酚、 $\text{Cu}^{2+}$ 、亚硝酸盐和总氨氮对中华鲟稚鱼的急性毒性[J]. *大连水产学院学报*, 2007, 22(2): 118-122.
- Du H, Wei Q W, Liu J Y, et al. Acute toxicity of phenol, copper, nitrite and total ammonia to juvenile Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*[J]. *Journal of Dalian Fisher-*

- ies University, 2007, 22(2): 118-122(in Chinese).
- [11] 孙侦龙, 朱永祥, 刘大勇, 等. 非离子氨氮和亚硝酸盐氮对暗纹东方鲀稚鱼的急性毒性试验[J]. 水产科学, 2015, 34(3): 135-139.  
Sun Z L, Zhu Y X, Liu D Y, *et al.* Acute toxicity of non-ionized ammonia and nitrite to postlarva puffer *Takifugu fasciatus*[J]. Fisheries Science, 2015, 34(3): 135-139(in Chinese).
- [12] Wang H J, Xiao X C, Wang H Z, *et al.* Effects of high ammonia concentrations on three cyprinid fish: Acute and whole-ecosystem chronic tests[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 598: 900-909.
- [13] 刘义, 谢刚, 焦万明. 氨氮对泥鳅的急性毒性试验[J]. 天津农业科学, 2012, 18(3): 141-143.  
Liu Y, Xie G, Jiao W M. Acute toxic effect of ammonia nitrogen on loach[J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2012, 18(3): 141-143(in Chinese).
- [14] 郑乐云. 氨氮和亚硝酸盐对斜带石斑鱼苗的急性毒性效应[J]. 海洋科学, 2012, 36(5): 81-86.  
Zheng L Y. Acute toxic effects of ammonia and nitrite on *Epinephelus coioides* fry[J]. Marine Sciences, 2012, 36(5): 81-86(in Chinese).
- [15] Bobermin L D, Quincozes-Santos A, Guerra M C, *et al.* Resveratrol prevents ammonia toxicity in astroglial cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52164.
- [16] Bémeur C, Qu H, Desjardins P, *et al.* IL-1 or TNF receptor gene deletion delays onset of encephalopathy and attenuates brain edema in experimental acute liver failure[J]. *Neurochemistry International*, 2010, 56(2): 213-215.
- [17] Vedel N E, Korsgaard B, Jensen F B. Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on electrolyte status, blood respiratory properties and brain glutamine/glutamate concentrations[J]. *Aquatic Toxicology*, 1998, 41(4): 325-342.
- [18] Paust L O, Foss A, Imsland A K. Effects of chronic and periodic exposure to ammonia on growth, food conversion efficiency and blood physiology in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)[J]. *Aquaculture*, 2011, 315(3-4): 400-406.
- [19] Li M, Yu N, Qin J G, *et al.* Effects of ammonia stress, dietary linseed oil and *Edwardsiella ictaluri* challenge on juvenile darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 38(1): 158-165.
- [20] Xing X D, Li M, Yuan L X, *et al.* The protective effects of taurine on acute ammonia toxicity in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 56: 517-522.
- [21] Li M, Lai H, Li Q, *et al.* Effects of dietary taurine on growth, immunity and hyperammonemia in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* fed all-plant protein diets[J]. *Aquaculture*, 2016, 450: 349-355.
- [22] Ip Y K, Chew S F, Wilson J M, *et al.* Defences against ammonia toxicity in tropical air-breathing fishes exposed to high concentrations of environmental ammonia: a review[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2004, 174(7): 565-575.
- [23] Zhivotovsky B, Kroemer G. Apoptosis and genomic instability[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5(9): 752-762.

## Effects of acute ammonia exposure on gene involved in inflammation of mudskipper

SONG Meize<sup>1</sup>, LI Ming<sup>2</sup>, LI Jian<sup>1</sup>, YUAN Lixia<sup>2</sup>, WANG Rixin<sup>2</sup>, SHI Ge<sup>1\*</sup>

(1. Marine Sciences Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China;

2. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** A study was carried out to test the effects of acute ammonia exposure on gene involved in inflammation of mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*. The mudskipper (15.14±0.05) g were randomly allocated to 2 groups (control group and exposure group) in triplicate for 96 h ammonia exposure. The 96 h lethal concentration 50 (LC<sub>50</sub>) of ammonia in mudskipper is 8.99 mg/L total ammonia nitrogen (TAN; 0.11 mg/L non-ionic ammonia); Fish exposed to ammonia showed the mRNA expression of *TNF* increased significantly by 2-fold for 96 h; The mRNA expression of *IL-1* increased significantly by 6-fold for 12 h; And the mRNA expression of *IL-6* increased significantly by 1.5 fold for 12 h and 96 h; however, the mRNA expression of *IL-8* decreased significantly for 24 h. This study indicated that the 96 h LC<sub>50</sub> of ammonia in mudskipper is 8.99 mg/L TAN; The mRNA expression of *TNF*, *IL-1*, *IL-6*, *IL-8* increased significantly after fish exposed to ammonia for 48 h; The inflammation is considered as one of major causes of fish ammonia poisoning.

**Key words:** *Boleophthalmus pectinirostris*; ammonia; gene; inflammatory factor

**Corresponding author:** SHI Ge. E-mail: sg2610105@126.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31472279; 31502176); Natural Science Foundation of Ningbo City (2016A610083)