

文章编号: 1000-0615(2018)06-0828-10

DOI: 10.11964/jfc.20170610877

β-葡聚糖对低氧胁迫下大黄鱼幼鱼的保护作用及其机理

王永红, 张建设, 曾霖*

(浙江海洋大学国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316000)

摘要: 为探讨β-葡聚糖对低氧胁迫下大黄鱼幼鱼肝脏中丙二醛(MDA)、抗氧化酶(Cu/Zn-SOD、CAT、GPx和GR)活性和基因水平及核转录因子*Keap1*和*Nrf2*基因水平的影响, 将平均体质量为(76.53±0.74) g的大黄鱼幼鱼腹腔注射浓度为0或5 mg/kg体质量的β-葡聚糖0.1 mL, 再暴露在溶解氧浓度为1.5或7.0 mg/L的水体中24 h。结果显示, β-葡聚糖在常氧环境下对MDA不产生影响, 但β-葡聚糖可减少低氧胁迫下大黄鱼幼鱼MDA的含量, 表明β-葡聚糖可缓解低氧胁迫对大黄鱼幼鱼的氧化损伤。*Nrf2*基因水平与抗氧化酶基因水平成正相关, 表明*Nrf2*参与了低氧胁迫下大黄鱼幼鱼抗氧化反应。*Nrf2*基因水平与*Keap1*基因水平成负相关, 表明*Keap1*在调节*Nrf2*参与抗氧化反应方面发挥重要作用。研究表明, β-葡聚糖可缓解大黄鱼幼鱼低氧胁迫诱导的氧化损伤, 核转录因子*Nrf2*在这一过程中发挥重要作用。

关键词: 大黄鱼; β-葡聚糖; 氧化应激; *Keap1-Nrf2*信号通路

中图分类号: S 965.322

文献标志码: A

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)被誉为“中国国鱼”, 其肉质细嫩、味道鲜美、营养丰富、经济价值高, 备受国内外消费者的青睐。由于过度捕捞, 野生大黄鱼资源基本枯竭。自从20世纪80年代大黄鱼人工育苗获得成功以来, 其养殖业得到了迅速发展, 2015年全国养殖产量已达到14.9万t, 被农业部列为最具优势的8大出口水产品之一^[1]。大黄鱼对水环境中溶解氧的要求较高^[2]。目前大黄鱼主要养殖于避风条件较好的内湾。然而, 受短期经济利益的驱动, 养殖网箱高密度无序布局导致水流不畅, 水体交换差, 再加上残饵、鱼类代谢物长年累月地在养殖区域内积累, 造成大黄鱼缺氧浮头事件频发, 最终导致大黄鱼生长缓慢、抗病力低下^[3]。因此, 水体溶解氧含量低已成为大黄鱼养殖业可持续发展的最主要制约因素之一。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是需氧生物机体正常的代谢产物。线粒体是ROS的主要

产生场所, 1%~2%氧气在线粒体呼吸链中将被还原为ROS。低水平的ROS可通过磷酸酶或磷酸激酶参与细胞的信号传导, 维持细胞的正常生理功能^[4]。然而, 当生物体受到胁迫时, 将导致细胞线粒体形态改变及功能异常, 产生大量的ROS^[5-6]。若过量的ROS得不到有效控制, 将引起氧化应激反应, 导致DNA合成障碍、脂质过氧化物(lipid peroxidation, LPO)及蛋白质羰基(protein carbonyl, PC)含量增加, 最终影响鱼类的生理功能^[7]。为了降低ROS对机体的损伤, 生物体通过抗氧化酶体系(酶促和非酶促两种途径)来发挥抗氧化应激作用。酶抗氧化剂包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, EC 1.15.1.1)、过氧化氢酶(catalase, CAT, EC 1.11.1.6)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR, EC 1.6.4.2)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx, EC 1.11.1.9)等^[8]; 非酶抗氧化剂如谷胱甘肽(glutathione, GSH)^[9]。这些抗氧化剂协同作用, 共同维

收稿日期: 2017-06-16 修回日期: 2017-10-10

资助项目: 浙江省自然科学基金(LY18D060008)

通信作者: 曾霖, E-mail: zenglin615@126.com

持机体的ROS平衡。

抗氧化应激调节是一种复杂的生理过程,是多种因素相互作用的结果。首先,抗氧化酶基因的表达水平在一定程度上决定了酶的活性。许多研究表明,处于胁迫状态的鱼类,抗氧化酶活性与其基因表达水平存在正相关^[10-11]。其次,抗氧化酶基因表达水平主要受转录因子的调节。在哺乳动物中,NF-E2相关因子2(NF-E2-related nuclear factor 2,*Nrf2*)能被ROS激活,激活的核转录因子结合到目的基因的顺式作用原件,启动相关基因的表达^[12-13]。*Nrf2*在细胞抗氧化反应中发挥重要作用。正常生理状态下,*Nrf2*与Kelch样ECH相关蛋白1(Kelch-like-ECH-associated protein 1,*Keap1*)大量结合并在细胞质中快速降解^[14]。一旦细胞受到应激,*Nrf2*与*Keap1*分离,进入细胞核中调节抗氧化酶相关基因的表达。在鱼类中,核转录因子在氧化应激中的作用仅有少量报道^[10, 15]。目前,绝大部分关于鱼类氧化应激的研究仅停留在基因表达或酶活性水平,缺少科学证据从不同的层次(基因水平、酶活水平和信号通路水平)来揭示这些现象的机理。有关氧化应激调节机理方面的研究,鱼类与哺乳动物还存在很大的差距。

β-葡聚糖是一种免疫增强剂^[16],能够提高鱼类机体免疫力^[17-18],从而提高其对各种胁迫的耐受性。胁迫耐受性与抗氧化反应密切相关^[19]。尽管已有研究表明,β-葡聚糖能够对水生动物的脂质过氧化物、抗氧化酶活性和基因表达产生影响^[20-22],但β-葡聚糖对鱼类抗氧化反应的影响机理并未见相关报道。

本实验将大黄鱼幼鱼腹腔注射β-葡聚糖(剂量为5 mg/kg体质量)后,再在1.5 mg/L溶解氧水体中暴露24 h,以探讨β-葡聚糖对低氧胁迫下大黄鱼幼鱼脂质过氧化物、抗氧化酶活性和基因表达水平及核转录因子*Nrf2*表达水平的影响。研究成果可为β-葡聚糖缓解大黄鱼幼鱼低氧胁迫损伤提供重要的理论支撑,同时为科学制定养殖水体溶解氧调节方案提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及驯化

实验用的大黄鱼幼鱼取自浙江裕洋水产有限公司,体质量为(76.53±0.74) g ($n=360$)的健康个

体。在12个容积为800 L的钢化玻璃桶中暂养1周,30尾/桶,采用静水充气养殖,每天过饱和和投食商业饲料2次(08:30和16:30),换水率为100%。低氧胁迫前第6、4和2天,鱼体麻醉后,6桶鱼腹腔注射剂量为5 mg/kg体质量的β-葡聚糖0.1 mL,剩余6桶鱼注射等体积的PBS缓冲液,具体操作步骤参照文献^[23]。然后,实验鱼在溶解氧浓度为1.5或7.0 mg/L(对照组)养殖水体中暴露24 h,每个处理组设3个重复。通过调节水体中O₂和N₂的比例将溶解氧浓度降低至1.5 mg/L,具体操作步骤参照文献^[24]。使用便携式溶解氧测量仪(YSI-550A)测量低氧组和对照组的实际溶解氧浓度分别为(1.67±0.31) mg/L和(6.84±0.34) mg/L ($n=6$)。实验期间水温为(23.6±3.2) °C, pH值为(7.72±0.23),盐度为(25.73±0.35)。总氨氮为(0.14±0.01)~(0.18±0.02) mg/L,各实验组之间无显著性差异($P>0.05$)。

1.2 样品采集和分析

实验结束后,实验鱼麻醉后每桶随机抽取6尾鱼,于3、6、12和24 h取肝脏样本贮存于液氮中用于脂质过氧化物、抗氧化酶活性和基因表达水平测定。

脂质过氧化物和抗氧化酶活性测定 向肝脏中加9倍体积4 °C缓冲液[80 mmol Tris、5 mmol EDTA、2 mmol DTT、1 mmol苯甲脒、1 mmol 4-(2-氨基甲基)苯磺酰氟盐酸, pH=7.6],在玻璃匀浆器中匀浆(冰浴),制成10%匀浆液。4 °C, 900 r/min,离心10 min,取上清液。通过测量丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量来间接测定脂质过氧化物含量。

MDA、SOD、CAT、GR和GPx等采用南京建成生物工程研究所的试剂盒,用分光光度法进行测量。酶蛋白含量采用碧云天生物技术研究室的蛋白浓度测定试剂盒,用Bradford法进行测定。

RT-PCR实时荧光定量检测 按照Trizol (Invitrogen)试剂盒说明书进行肝脏总RNA提取。1%琼脂糖凝胶电泳检测样品的完整性,用超微量分光光度计(Thermo Scientific)测定样品在260和280nm的吸收值来检测RNA的浓度和质量,样品保存于-80 °C备用。以肝脏总RNA为模板,按照RevertAid-TM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)说明书合成第一链cDNA。根据

大黄鱼基因组数据库中的基因序列设计引物^[25], 以 β -actin为内参基因(表1), 使用2×QuantiFast SYBR Green Master Mix (Qiagen)试剂盒, 在实时荧光定量PCR仪(Applied Biosystems Prism 7500 Sequence Detection System)上进行PCR反应, 每个反应设2个重复。总反应体系为20 μ L: 10 μ L SY-

BR®Premix Ex Taq Master Mix (TaKaRa), 2.0 μ L cDNA稀释液, 上游引物0.2 μ mol, 下游引物0.2 μ mol, 剩余体积用ddH₂O补充。按照以下程序进行PCR反应: 95 °C, 1 min; 45个循环(95 °C, 5 s; 57 °C, 10 s); 72 °C, 30 s。按照 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法进行数据处理。

表1 大黄鱼实时荧光定量PCR引物

Tab. 1 Primers used for real-time PCR analysis from *L. crocea*

基因名称 gene name	正向引物 forward primer (5'-3')	反向引物 reverse primer (5'-3')	PCR扩增效率 PCR efficiencies
铜锌超氧化物歧化酶 <i>Cu/Zn-SOD</i>	GAGACAATACAAACGGGTGC	CAATGATGGAAATGGGGC	0.97
锰超氧化物歧化酶 <i>Mn-SOD</i>	ATCGCCGCTTGTGCTAATC	CTCCCAGTTGATGACGTTCC	1.02
过氧化氢酶 <i>CAT</i>	ATTATGCCATCGGAGACTTG	GCACCATTTGCCACAG	0.98
谷胱甘肽过氧化物酶-1a <i>GPx1a</i>	ATGCCCATCCCCTGTTG	CCTCCTGCTGTAACGCTTG	0.96
谷胱甘肽过氧化物酶-1b <i>GPx1b</i>	TGGCTGGAGCGTGAAA	AGAATAACGAGTCCCTTGGC	1.03
谷胱甘肽还原酶 <i>GR</i>	AGCCAAAACAGCCGTGAT	CGGCTAACATAAGCATCCC	0.98
NF-E2相关因子2 <i>Nrf2</i>	CCCTCAAAATCCCTTCACT	GCTACCTTGTCTTGCCGC	0.96
Kelch样ECH相关蛋白1 <i>Keap1</i>	CGGGGAGTCTCACAGCATT	CTTCCAACATAATCCAAACACC	1.02
真核延伸因子1a <i>EF 1a</i>	CTCTGCTCTAAATCAGGGACG	CGCATTGTAGATCAGGTGG	1.04
β -肌动蛋白 <i>β-actin</i>	TCGTCCGTCGTCAGGCAT	ATGGCGTGGGCAGAGCGT	0.99
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 <i>GAPDH</i>	GACAACGAGTTCGGATACAGC	CAGTTGATGGCTTGTGG	1.01
次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 <i>HPRT</i>	CAGTGGACTTCATCCGCT	GTCTTCATTGCTTCCCCGT	1.03

1.3 数据处理

实验所得数据用平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 采用SPSS 16.0软件进行双因素方差统计分析(Two-Way ANOVA), 当差异显著时($P < 0.05$), 再进行Tukey多重比较分析。对不同参数之间的相关性采用SPSS 16.0软件进行Spearman相关性分析。

2 结果

2.1 存活率和MDA含量

各处理组存活率均为100%。与对照组相比, 低氧组的MDA含量在3和24 h时显著增加, 6 h时显著降低。尽管 β -葡聚糖组的MDA含量与对照组之间无显著性差异, 但 β -葡聚糖+低氧组的MDA含量显著低于对照组。与低氧组相比, β -葡聚糖+低氧组的MDA含量显著降低(图1-a)。与对照组相比, 低氧组的GSH含量在3 h时显著降低, 6 h时显著增加; β -葡聚糖组和 β -葡聚糖+低

氧组的GSH含量显著增加(图1-b)。与低氧组相比, β -葡聚糖+低氧组的GSH含量在3 h和12~24 h时显著增加。

2.2 抗氧化酶活性

与对照组相比, 低氧组的SOD、GPx和GR活性分别在3~6 h、3 h和6 h时显著增加(图2-a, 图2-c, 图2-d); SOD、CAT和GR活性分别在24 h、3 h和3 h时显著降低(图2-b)。与对照组相比, β -葡聚糖组的SOD和CAT活性显著提高, 但GPx和GR活性无显著差异。与对照组相比, β -葡聚糖+低氧组的SOD、CAT、GPx和GR活性分别在6和24 h、24 h、3和24 h及3和12~24 h时显著提高。与低氧组相比, β -葡聚糖+低氧组的SOD、CAT、GPx和GR活性分别在6和24 h、3和24 h、24 h及3 h和12~24 h时显著提高。

2.3 抗氧化酶和转录因子基因表达水平

与对照组相比, 低氧组的*Cu/Zn-SOD*(图3-a)、

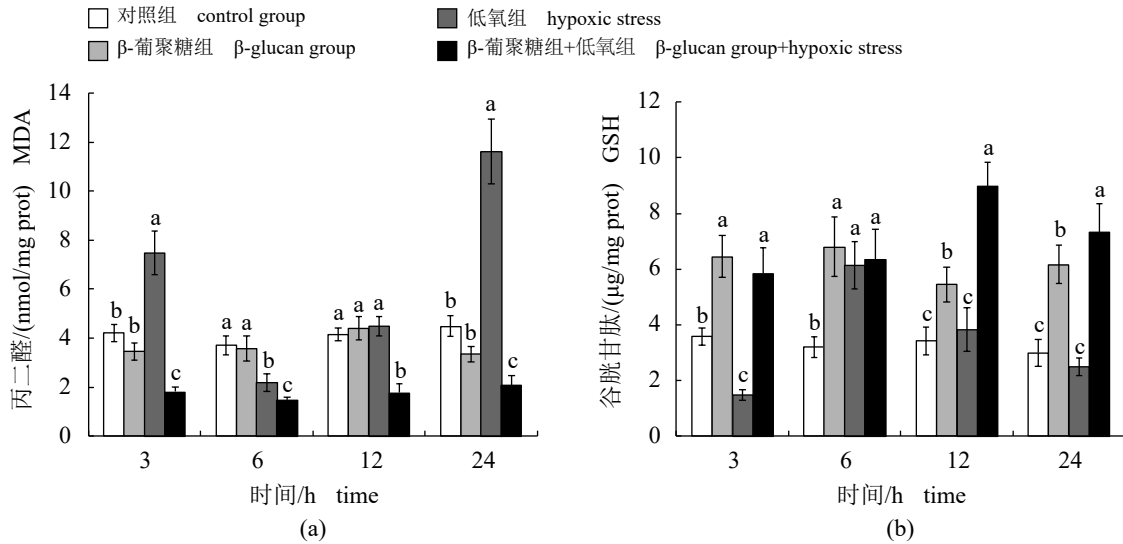


图 1 β -葡聚糖对低氧胁迫下大黄鱼肝脏MDA和GSH含量的影响

不同字母表示存在显著差异($P < 0.05$), $n=3$, 下同

Fig. 1 Effects of β -glucan on MDA and GSH content in the liver of *L. crocea* under hypoxic stress

Different letters denote significant differences ($P < 0.05$), $n=3$, the same below

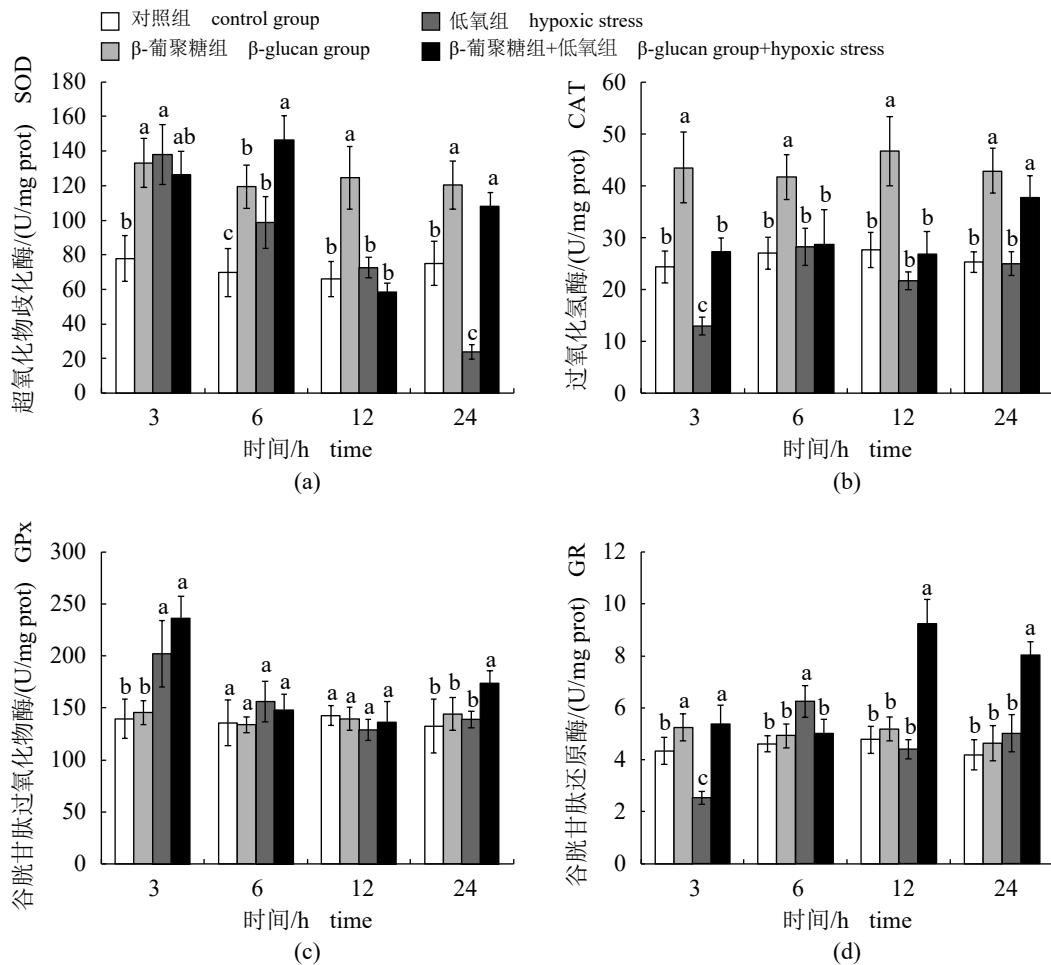
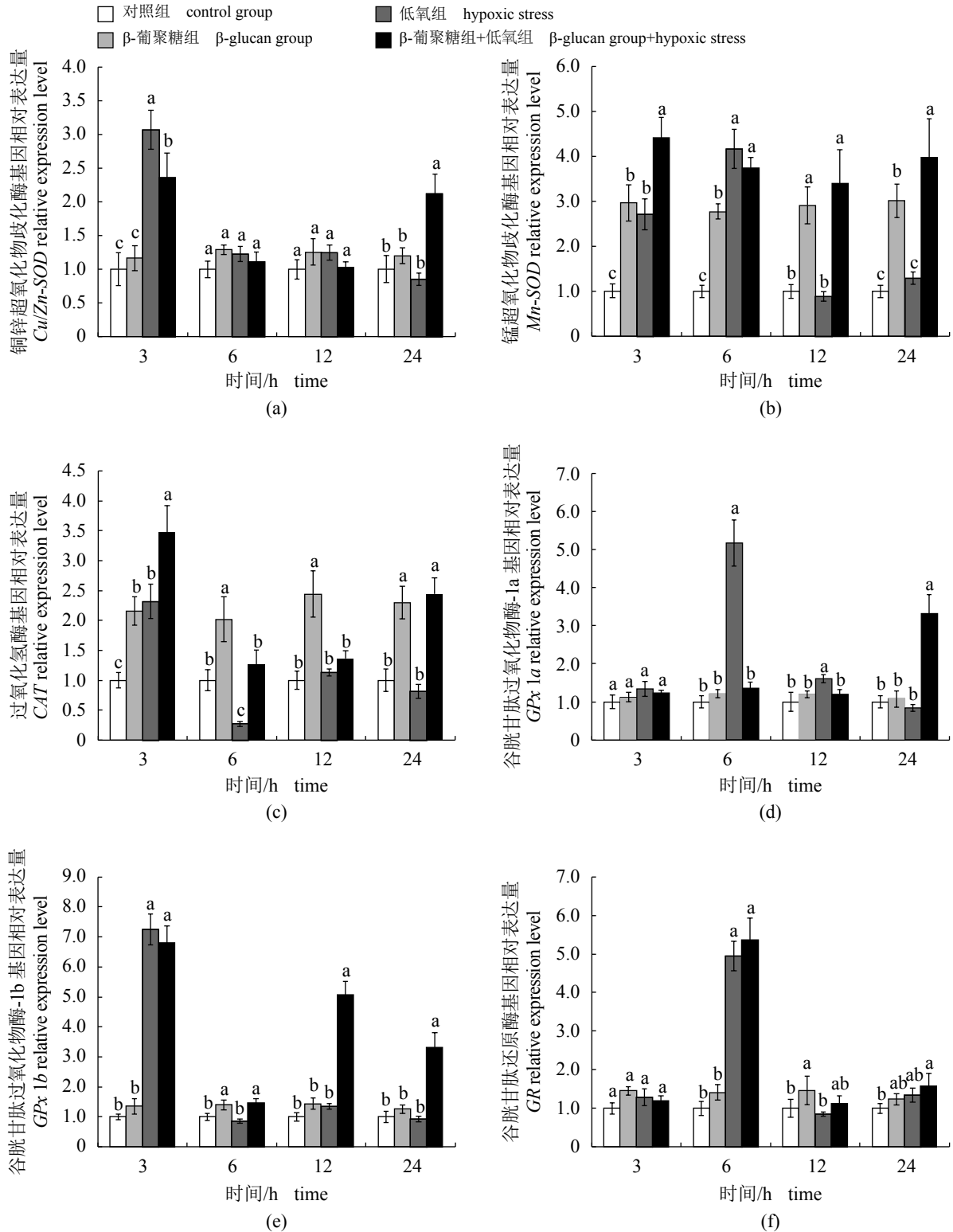


图 2 β -葡聚糖对低氧胁迫下大黄鱼肝脏抗氧化酶活性的影响

Fig. 2 Effects of β -glucan on activities of antioxidant enzymes in the liver of *L. crocea* under hypoxic stress

Mn-SOD (图3-b)、*CAT* (图3-c)、*GPx1a* (图3-d)、*GPx1b* (图3-e)、*GR* (图3-f)、*Nrf2* (图3-g)和*Keap1* (图3-h)基因表达水平分别在3 h、3~6 h、3 h、6~12 h、3 h、6 h、3~6 h和12~24 h时显著提高；*CAT*和*Keap1*基因表达水平分别在6 h和3~6 h时显

著降低。与对照组相比，β-葡聚糖组的*Mn-SOD*、*CAT*和*Nrf2*基因表达水平显著提高，*Keap1*基因表达水平显著降低。与对照组相比，β-葡聚糖+低氧组的*Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD*、*CAT*、*GPx1a*、*GPx1b*、*GR*和*Nrf2*基因表达水平



(图3 Fig.3)

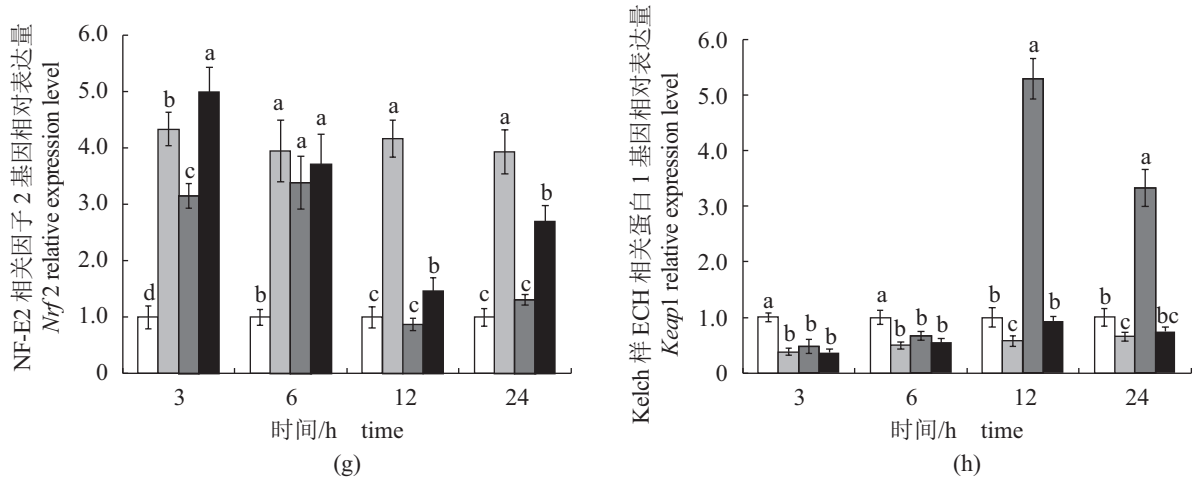


图3 β -葡聚糖对低氧胁迫下大黄鱼肝脏抗氧化酶和 *Keap1-Nrf2* 信号分子基因表达水平的影响
 Fig. 3 Effects of β -glucan on mRNA levels of antioxidant enzymes and *Keap1-Nrf2* signaling molecules in the liver of *L. crocea* under hypoxic stress

分别在3和24 h、3~24 h、3和24 h、24 h、3~24 h、6和24 h、3~24 h时显著提高, *Keap1*基因表达水平在3~6 h时显著降低。与低氧组相比, β -葡聚糖+低氧组的 *Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD*、*CAT*、*GPx1a*、*GPx1b*和 *Nrf2*基因表达水平分别在24 h、3 h和12~24 h、3~6 h和24 h、24 h、6~24 h、3和12~24 h时显著提高; *Cu/Zn-SOD*、*GPx1a*和 *Keap1*基因表达水平分别在3 h、6~12 h和12~24 h时显著降低。

2.4 相关性分析

MDA含量与SOD、CAT和GR活性成负相关(表2)。抗氧化酶基因表达水平与酶活性和核转录因子 *Nrf2* 基因表达水平之间的相关性见表3。SOD活性与 *Cu/Zn-SOD* 和 *Mn-SOD* 基因表达水平、CAT活性与基因表达水平、GPx活性与 *GPx1b* 基因表达水平成正相关。但GPx活性与 *GPx1a* 基因表达水平、GR活性与 *GR* 基因表达水平之间的相

表2 MDA含量与抗氧化酶活性之间的相关性分析

Tab. 2 Pearson's correlation coefficients between MDA content and antioxidant enzyme activities

因素 factor		超氧化物歧化酶 SOD	过氧化氢酶 CAT	谷胱甘肽过氧化物酶 GPx	谷胱甘肽还原酶 GR
丙二醛	<i>R</i>	-0.416	-0.296	-0.090	-0.442
MDA	<i>P</i>	0.000	0.003	0.386	0.000

注: 当*R*为正数且*P*小于0.05时, 二者成正相关; 当*R*为负数且*P*小于0.05时, 二者成负相关; 当*P*大于0.05时, 二者相关性不显著, 下同
 Notes: positive *R* and *P*<0.05 meant the positive correlation between the two variables, negative *R* and *P*<0.05 meant the negative correlation between the two variables, and *P*>0.05 meant that there was no significant relationship between the two variables, the same below

表3 抗氧化酶基因表达水平与酶活性和核转录因子 *Nrf2* 基因表达水平之间的相关性分析

Tab. 3 Pearson's correlation coefficients between enzymatic activities and mRNA levels of according gene and between transcription factor *Nrf2* and mRNA levels of antioxidant genes

因素 factor		铜锌超氧化物歧化酶 <i>Cu/Zn-SOD</i>	锰超氧化物歧化酶 <i>Mn-SOD</i>	过氧化氢酶 <i>CAT</i>	谷胱甘肽过氧化物酶-1a <i>GPx1a</i>	谷胱甘肽过氧化物酶-1b <i>GPx1b</i>	谷胱甘肽还原酶 <i>GR</i>	Kelch样ECH相关蛋白1 <i>Keap1</i>
酶活性 enzymatic activity	<i>R</i>	0.490	0.588	0.327	0.123	0.687	0.117	
	<i>P</i>	0.000	0.000	0.001	0.232	0.000	0.225	
NF-E2相关因子	<i>R</i>	0.397	0.745	0.662	0.152	0.296	0.327	-0.533
2基因表达水平 <i>Nrf2</i> mRNA level	<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.140	0.003	0.001	0.000

关性不显著。*Nrf2*基因表达水平与*Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD*、*CAT*、*GPx1b*和*GR*基因表达水平成正相关，与*Keap1*基因表达水平成负相关。

3 讨论

抗氧化系统在抵御环境胁迫、维持细胞氧化还原平衡等方面发挥重要作用^[19]。然而，有关低氧胁迫对鱼类抗氧化酶活性及其分子机理的影响仅有少量报道。已有研究表明， β -葡聚糖能够提高水生生物的抗氧化酶活性从而增强对各种胁迫的耐受性^[20, 26-27]。本实验研究了 β -葡聚糖对低氧胁迫状态下大黄鱼抗氧化能力的影响及其分子机理。

MDA作为抗氧化损伤的标志性产物^[28]，其含量增加表明低氧胁迫对大黄鱼产生了氧化损伤。尽管 β -葡聚糖对常氧环境中MDA含量不产生影响，但 β -葡聚糖降低了低氧胁迫状态下大黄鱼的MDA含量，表明 β -葡聚糖能够缓解低氧胁迫下的氧化损伤。GSH作为非酶抗氧化剂，在降低机体内MDA含量的作用上发挥重要作用^[29]。 β -葡聚糖能够提高大黄鱼在低氧和常氧状态下的GSH，表明 β -葡聚糖能够提高大黄鱼的抗氧化能力。大黄鱼在低氧胁迫下未出现死亡，与Gu等^[30]的观点不一致，其主要原因是低氧胁迫下鱼类的耐受性与其发育阶段和胁迫时间等因素密切相关。

目前，低氧胁迫对鱼类的氧化损伤机理的研究较缺乏，但其与抗氧化酶活性密切相关^[19]。在抗氧化酶中，SOD可以催化 O_2^- 和 H^+ 生成 O_2 和 H_2O_2 ，然后 H_2O_2 被CAT和GPx还原成 H_2O ，SOD-CAT和SOD-GPx被认为是抗氧化系统的第一防线^[31]。在本研究中，低氧胁迫初期，大黄鱼SOD和GPx一起激活，共同保护细胞免受氧化损伤。然而，CAT活性降低，与葛氏鲈塘鳢(*Perccottus glenii*)研究结果相似^[32]。CAT活性降低可能与SOD生成大量的 H_2O_2 产物密切相关，并且GPx比CAT更能有效地清除 H_2O_2 ^[33]。GR能够将GSSG转换成GSH从而维持细胞内GSH平衡，GSH可以充当GPx的反应底物。GR减少可以降低GSH含量，而GSH含量降低与GPx活性增加密切相关。当抗氧化系统不能有效清除或中和机体内ROS时，MDA将不断在机体内积累，从而对机体产生氧化损伤。反过来，脂质过氧化物将

会降低甚至降解抗氧化酶活性^[19]。低氧胁迫下大黄鱼MDA增加同时SOD降低的现象支持上述观点。本研究中， β -葡聚糖提高了SOD和CAT活性，这部分解释了 β -葡聚糖可降低低氧胁迫下大黄鱼的MDA含量。尽管 β -葡聚糖对GPx和GR活性不产生影响，但可提高低氧胁迫下大黄鱼的GPx和GR活性。上述研究结果解释了 β -葡聚糖可提高大黄鱼的抗氧化酶活性从而降低机体内MDA含量。

本研究中，低氧胁迫提高了大黄鱼*Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD*、*CAT*和*GRx1b*基因表达水平，从而增加了相对应的抗氧化酶活性。然而，低氧胁迫下大黄鱼的*GRx1a*和*GR*基因表达水平提高，但酶活性不变。基因表达水平与酶活性不相一致的原因主要有以下几方面：① GPx活性由它的2个亚基共同决定，而*GRx1a*基因只编码GPx酶的一个亚基；②这些酶基因可能存在翻译后水平的调控^[34]；③抗氧化酶基因表达水平只代表某一短暂时间段的表达量，而转录和翻译之间存在时间间隔^[35]。 β -葡聚糖提高低氧胁迫下大黄鱼的抗氧化酶基因表达水平，从而提高抗氧化酶活性，这表明抗氧化酶基因存在翻译前水平的调控。

抗氧化酶基因表达水平由转录因子和细胞信号通路调控^[36]。核转录因子*Nrf2*通过*Keap1-Nrf2*信号通路调控细胞的抗氧化反应^[37]。*Nrf2*缺乏将导致肝脏细胞脂质过氧化反应，因此，*Nrf2*在肝脏细胞抗氧化系统中发挥着重要作用^[38]。本研究中，低氧胁迫增加大黄鱼幼鱼*Nrf2*基因表达水平，这与鱼类遭受其他环境胁迫的研究结果相似^[39-40]。*Nrf2*基因表达水平与其目的基因(抗氧化酶基因)表达水平成正相关，表明*Nrf2*参与大黄鱼抗氧化反应。 β -葡聚糖能够诱导*Nrf2*基因表达，表明 β -葡聚糖可通过上调*Nrf2*基因表达水平来提高抗氧化酶基因表达水平。然而，细胞核内*Nrf2*持续积累将会对细胞产生氧化损伤和凋亡等负面影响^[14, 41]。但提高*Keap1*表达水平将会加速*Nrf2*降解，从而调节*Nrf2*含量^[14]。*Nrf2*表达水平与*Keap1*表达水平成负相关验证了这一观点。

研究表明， β -葡聚糖可通过提高抗氧化酶活性和基因表达水平来缓解低氧胁迫诱导的氧化损伤。在这一过程中，*Keap1-Nrf2*信号通路在调节抗氧化酶基因表达方面发挥重要作用。

参考文献:

- [1] 倪伟锋, 李可心. 宁德大黄鱼产业发展情况浅析[J]. 中国水产, 2015, (5): 22-25.
Ni W F, Li K X. Analysis on the development of large yellow croaker industry in Ningde[J]. China Fisheries, 2015, (5): 22-25(in Chinese).
- [2] Ao J Q, Mu Y N, Xiang L X, *et al.* Genome sequencing of the perciform fish *Larimichthys crocea* provides insights into molecular and genetic mechanisms of stress adaptation[J]. PLoS Genetics, 2015, 11(4): e1005118.
- [3] 刘家富. 大黄鱼养殖与生物学[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2013: 8-14.
Liu J F. Culture and Biology of Large Yellow Croaker[M]. Xiamen: Xiamen University Press, 2013: 8-14 (in Chinese).
- [4] Meng T C, Fukada T, Tonks N K. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases *in vivo*[J]. Molecular Cell, 2002, 9(2): 387-399.
- [5] Park J, Lee J, Choi C. Mitochondrial network determines intracellular ROS dynamics and sensitivity to oxidative stress through switching inter-mitochondrial messengers[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23211.
- [6] Du S N N, Mahalingam S, Borowiec B G, *et al.* Mitochondrial physiology and reactive oxygen species production are altered by hypoxia acclimation in killifish (*Fundulus heteroclitus*)[J]. Journal of Experimental Biology, 2016, 219(8): 1130-1138.
- [7] Víctor V M, Esplugues J V, Hernández-Mijares A, *et al.* Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants[J]. Infectious Disorders Drug Targets, 2009, 9(4): 376-389.
- [8] Halliwell B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view[J]. Nutrition Reviews, 2012, 70(5): 257-265.
- [9] Srikanth K, Pereira E, Duarte A C, *et al.* Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish—a review[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2013, 20(4): 2133-2149.
- [10] Zeng L, Zheng J L, Wang Y H, *et al.* The role of Nrf2/Keap1 signaling in inorganic mercury induced oxidative stress in the liver of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 132: 345-352.
- [11] Yuan S S, Lv Z M, Zhu A Y, *et al.* Negative effect of chronic cadmium exposure on growth, histology, ultrastructure, antioxidant and innate immune responses in the liver of zebrafish: preventive role of blue light emitting diodes[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 139: 18-26.
- [12] Li N X, Karin M. Is NF- κ B the sensor of oxidative stress?[J]. The FASEB Journal, 1999, 13(10): 1137-1143.
- [13] Ohtsu A, Tanaka H, Seno K, *et al.* Palmitic acid stimulates interleukin-8 via the TLR4/NF- κ B/ROS pathway and induces mitochondrial dysfunction in bovine oviduct epithelial cells[J]. American Journal of Reproductive Immunology, 2017, 77(6): e12642.
- [14] Katoh Y, Iida K, Kang M I, *et al.* Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, 433(2): 342-350.
- [15] Jiang W D, Liu Y, Jiang J, *et al.* Copper exposure induces toxicity to the antioxidant system via the destruction of Nrf2/ARE signaling and caspase-3-regulated DNA damage in fish muscle: amelioration by myo-inositol[J]. Aquatic Toxicology, 2015, 159: 245-255.
- [16] Meena D K, Das P, Kumar S, *et al.* Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2013, 39(3): 431-457.
- [17] Sirimanapong W, Thompson K D, Ooi E L, *et al.* The effects of feeding β -glucan to *Pangasianodon hypophthalmus* on immune gene expression and resistance to *Edwardsiella ictaluri*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 47(1): 595-605.
- [18] Miest J J, Arndt C, Adamek M, *et al.* Dietary β -glucan (MacroGard[®]) enhances survival of first feeding turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae by altering immunity, metabolism and microbiota[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 48: 94-104.
- [19] Lushchak V I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals[J]. Aquatic Toxicology, 2011, 101(1): 13-30.
- [20] Kim Y S, Ke F, Zhang Q Y. Effect of β -glucan on activity of antioxidant enzymes and Mx gene expression in virus infected grass carp[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 48: 94-104.

- logy, 2009, 27(2): 336-340.
- [21] Pacheco R, Ascencio F, Zarain M, *et al.* Enhancement of superoxide dismutase and catalase activity in juvenile brown shrimp, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900), fed β -1,3 glucan vitamin E, and β -carotene and infected with white spot syndrome virus[J]. Latin American Journal of Aquatic Research, 2011, 39(3): 534-543.
- [22] Guzmán-Villanueva L T, Ascencio-Valle F, Macías-Rodríguez M E, *et al.* Effects of dietary β -1,3/1,6-glucan on the antioxidant and digestive enzyme activities of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) after exposure to lipopolysaccharides[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2014, 40(3): 827-837.
- [23] 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.
- [24] Gracey A Y, Troll J V, Somero G N. Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(4): 1993-1998.
- [25] Wu C W, Zhang D, Kan M Y, *et al.* The draft genome of the large yellow croaker reveals well-developed innate immunity[J]. Nature Communications, 2014, 5: 5227.
- [26] Barros M M, Falcon D R, De Oliveira Orsi R, *et al.* Non-specific immune parameters and physiological response of Nile tilapia fed β -glucan and vitamin C for different periods and submitted to stress and bacterial challenge[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 39(2): 188-195.
- [27] Dawood M A O, Koshio S, Ishikawa M, *et al.* Dietary supplementation of β -glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*[J]. Aquaculture Nutrition, 2017, 23(1): 148-159.
- [28] Farombi E O, Adelowo O A, Ajimoko Y R. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2007, 4(2): 158-165.
- [29] 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.
- [30] Gu X L, Xu Z L. Effect of hypoxia on the blood of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2011, 29(3): 524-530.
- [31] Winston G W, Di Giulio R T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms[J]. Aquatic Toxicology, 1991, 19(2): 137-161.
- [32] Lushchak V I, Bagnyukova T V. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Perccottus glenii*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 148(4): 390-397.
- [33] Kang S W, Rhee S G, Chang T S, *et al.* 2-Cys peroxidase function in intracellular signal transduction: therapeutic implications[J]. Trends in Molecular Medicine, 2005, 11(12): 571-578.
- [34] Sadi G, Bozan D, Yildiz H B. Redox regulation of antioxidant enzymes: post-translational modulation of catalase and glutathione peroxidase activity by resveratrol in diabetic rat liver[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2014, 393(1-2): 111-122.
- [35] Nam Y K, Cho Y S, Choi B N, *et al.* Alteration of antioxidant enzymes at the mRNA level during short-term starvation of rockbream *Oplegnathus fasciatus*[J]. Fisheries Science, 2005, 71(6): 1385-1387.
- [36] 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.
- [37] Dodson M, Redmann M, Rajasekaran N S, *et al.* KEAP1-NRF2 signalling and autophagy in protection against oxidative and reductive proteotoxicity[J]. Biochemical Journal, 2015, 469(3): 347-355.
- [38] Gong P F, Cederbaum A I. Nrf2 is increased by CYP2E1 in rodent liver and HepG2 cells and protects against oxidative stress caused by CYP2E1[J]. Hepatology, 2006, 43(1): 144-153.
- [39] Giuliani M E, Regoli F. Identification of the Nrf2-Keap1 pathway in the European eel *Anguilla anguilla*: role for a transcriptional regulation of antioxidant genes in aquatic organisms[J]. Aquatic Toxicology, 2014, 150: 117-123.

- [40] Almroth B C, Asker N, Wassmur B, *et al.* Warmer water temperature results in oxidative damage in an Antarctic fish, the bald notothen[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2015, 468: 130-137.
- [41] Kensler T W, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2007, 47: 89-116.

β -glucan decreases intensity of hypoxia-induced oxidative stress in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and its corresponding mechanisms

WANG Yonghong, ZHANG Jianshe, ZENG Lin*

(National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China)

Abstract: The aim of the present study was to evaluate the effects of β -glucan on acute hypoxia-induced oxidative stress by determining lipid peroxidation, activities and mRNA levels of antioxidant enzymes (Cu/Zn-SOD, CAT, GPx and GR), and gene expressions of the *Keap1-Nrf2* signaling molecules in the liver of large yellow croaker *Larimichthys crocea*. Fish were injected with β -glucan at a dose of 0 or 5 mg/kg body weight on 6, 4 and 2 days before being exposed to 1.5 and 7.0 DO mg/L for 24 h. The results showed that normoxia with β -glucan had no effect on lipid peroxidation compared with the normoxic control, and hypoxic stress with β -glucan remarkably reduced lipid peroxidation during the whole experiment compared with hypoxic stress, indicating that β -glucan could ameliorate hypoxia-induced lipid peroxidation. Obtained results also showed a coordinated transcriptional regulation of antioxidant genes, suggesting that *Nrf2* was required for regulating these genes. Furthermore, a negative relationship between the mRNA levels of *Nrf2* and *Keap1* indicated that *Keap1* plays an important role in switching off the *Nrf2* response. In conclusion, β -glucan could alleviate acute hypoxia-induced oxidative stress in large yellow croaker, emphasizing a central role of transcription factor *Nrf2* in the process.

Key words: *Larimichthys crocea*; β -glucan; oxidative stress; *Keap1-Nrf2* signaling pathway

Corresponding author: ZENG Lin. E-mail: zenglin615@126.com

Funding projects: Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY18D060008)