



## 氧化应激对鲤抗氧化状态和免疫功能的影响

何勤<sup>1</sup>, 贾睿<sup>2,3</sup>, 曹丽萍<sup>2,3</sup>, 杜金梁<sup>2,3</sup>, 顾郑琰<sup>1</sup>,  
JENEY Galina<sup>3,4</sup>, 徐跑<sup>1,2,3</sup>, 殷国俊<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,

农业农村部淡水渔业与种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 鱼类免疫药理国际联合实验室, 江苏 无锡 214081;

4. 匈牙利水产与渔业研究所, 国家农业研究中心, 匈牙利, 索尔沃什 5440)

**摘要:** 为探讨氧化应激对鲤抗氧化状态和免疫功能的影响, 本实验以  $H_2O_2$  作为活性氧自由基 (ROS), 将鲤暴露于不同浓度的  $H_2O_2$  (0、0.25、0.50 和 1.00 mmol/L) 中, 诱导鲤产生氧化应激反应。连续暴露 7 d 后, 采集鲤血液和肝组织, 以检测相关生化指标以及基因表达量的变化。结果显示, 与空白对照组 (0 mmol/L) 相比, 随着  $H_2O_2$  浓度的升高, 血清葡萄糖 (GLU)、皮质醇 (cortisol) 和乳酸 (LA) 含量显著升高; 而碱性磷酸酶 (AKP) 和酸性磷酸酶 (ACP) 活性仅在 1.00 mmol/L  $H_2O_2$  处理组中显著高于其他实验组。氧化应激参数显示, 与空白对照组 (0 mmol/L) 相比, 0.50 和 1.00 mmol/L  $H_2O_2$  处理显著降低血清过氧化氢酶 (CAT) 活性, 而提高还原型谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 和总抗氧化能力 (T-AOC) 水平; 在肝脏组织中, 1.00 mmol/L  $H_2O_2$  处理显著降低了 GSH 含量, 促进了 MDA 生成。基因表达结果显示, 与空白对照组相比, 1.00 mmol/L  $H_2O_2$  处理组显著上调了肝脏组织中 *cyp1a* 表达, 而下调了 *cyp1b* 表达; 同时 0.50 和 1.00 mmol/L  $H_2O_2$  处理显著上调了 *hsp70*、*hsp90*、*c3*、*c-lyz* 和 *hep* 的表达。研究表明, 氧化应激暴露可诱导鲤产生明显应激反应和脂质过氧化, 降低机体抗氧化能力并激发免疫应答反应。

**关键词:** 鲤; 过氧化氢; 氧化应激; 抗氧化能力; 免疫应答; 基因表达

**中图分类号:** Q 786; S 917.4

**文献标志码:** A

在集约化养殖条件下, 鱼类不可避免的受到多种应激因子的胁迫, 从而导致应激反应。氧化应激为应激反应中最重要的应激方式, 是由内源性和 (或) 外源性刺激使机体内活性氧自由基 (ROS) 的生成与清除失衡引起的, 同时任何较强的应激反应均伴随着氧化应激<sup>[1]</sup>。养殖环境中的多种因子, 如养殖密度、温度、盐度、重

金属、微生物和寄生虫等均能诱导机体 ROS 过度生成, 引起氧化应激<sup>[2]</sup>。氧化应激状态下, 过多的 ROS 破坏抗氧化系统, 攻击生物膜、蛋白质和核酸, 导致机体脂质、DNA、蛋白质和其他生物大分子产生氧化损伤, 进而使机体的抵抗能力下降, 诱发各种疾病<sup>[3]</sup>。目前, 在哺乳动物中, 国内外学者对氧化应激及氧化损伤已开

收稿日期: 2020-02-20 修回日期: 2020-06-05

资助项目: 国家自然科学基金 (31702318); 江苏省自然科学基金 (BK20170218); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2019JBFM10, 2019JBFM11)

第一作者: 何勤, 从事鱼类免疫药理学研究, E-mail: 495385720@qq.com

通信作者: 殷国俊 (照片), E-mail: yingji@ffrc.cn



展了广泛的研究。然而在鱼类中, 尽管已有研究表明氧化应激与多种疾病的产生及发展密切相关, 但其致病机制尚未完全阐明。

过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 是一种主要的 ROS, 在机体内易代谢形成羟基自由基, 可直接氧化蛋白质、脂质、碳水化合物和核酸等, 对机体造成严重的氧化损伤<sup>[4]</sup>。因此,  $H_2O_2$  被广泛用于构建体内和体外氧化应激或氧化损伤实验模型<sup>[5-6]</sup>。此外研究显示, 有机物含量较少的水体中,  $H_2O_2$  浓度在 1 h 内未有明显改变, 12 h 后浓度衰减为一半<sup>[7]</sup>, 因此本实验将  $H_2O_2$  暴露时间定为 1 h。

鲤 (*Carassius auratus*) 是我国重要的经济鱼类, 也是鱼类生理学、病理学、免疫学和毒理学研究中常使用的模式生物<sup>[8]</sup>。鲤养殖环境中多种因素均能诱导体内 ROS 生成, 引起氧化应激反应<sup>[9]</sup>。而过度或长期的氧化应激可导致机体免疫力下降, 诱发多种疾病甚至死亡, 不利于水产养殖业的健康发展。因此, 本实验以鲤为研究对象, 以  $H_2O_2$  作为氧化应激诱导剂, 探索氧化应激对鱼类免疫和抗氧化能力的影响, 为缓解鱼类氧化应激反应及预防相关疾病提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

$H_2O_2$  (30%, 分析纯) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司; 总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、葡萄糖 (GLU)、酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和总抗氧化能力 (T-AOC) 试剂盒购自于南京建成生物工程研究所; 丙二醛 (MDA) 和过氧化氢酶 (CAT) 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; 皮质醇 (cortisol) 和乳酸 (LA) 试剂盒购自于上海酶联生物科技有限公司。

### 1.2 实验设计及饲养管理

实验所用鲤 [平均体质量 ( $50 \pm 3$ )g] 由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心提供, 在循环水养殖系统中暂养 2 周以适应实验环境 [鱼缸体积 250 L, 水温 ( $26 \pm 2$ ) °C, pH 6.8~7.5, 溶解氧 > 6.0 mg/L]。暂养期间, 投喂商业鱼饲料 (28.0% 蛋白质、6.0% 脂肪、12.0% 纤维和 15.0% 灰分), 每天 2 次。

将鲤随机分成 4 组, 分别暴露于不同浓度的  $H_2O_2$  中, 浓度分别为 0 (空白对照组)、0.25、

0.50 和 1.00 mmol/L, 每天暴露 1 h (9:00—10:00), 连续 7 d, 每组 30 尾鱼, 2 个重复。暴露期间投喂适量饲料避免鱼体饥饿产生应激反应。7 d 后, 每组随机捞取 10 尾实验鱼, 麻醉后采集血液和肝脏组织, 分离血清、制备肝脏匀浆, 储存在 -80 °C 备用。

### 1.3 生化指标测定

生化指标 TC、TG、GLU、MDA、AKP、ACP、CAT、GSH、SOD 和 T-AOC 等使用相应的检测试剂盒测定, 测定方法参照试剂盒操作说明。皮质醇 (cortisol) 和乳酸 (LA) 通过酶联免疫 (ELISA) 法测定, 先用鱼皮质醇和乳酸抗体包被微孔, 然后依次加入样品、标准品以及 HRP 标记的抗体, 37 °C 温育 1 h, 洗涤 5 次后进行显色, 在 450 nm 波长下测定其吸光度并计算其浓度。

### 1.4 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测

取鲤肝脏组织约 100 mg, 使用 RNAiso Plus (TaKaRa, 大连) 试剂提取总 RNA。测定其  $OD_{260/280}$  值 (1.8~2.1), 并计算其 RNA 浓度。取 1  $\mu$ g RNA, 利用 PrimeScript™ RT 试剂 (TaKaRa) 进行反转录, 并合成 cDNA, 其操作方法按照试剂盒说明。

根据试剂盒操作说明, 利用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) 进行 qPCR 反应。反应体系为 25.0  $\mu$ L: TB Green™ Premix Ex Taq™ II 12.5  $\mu$ L, 上、下游引物各 1.0  $\mu$ L, dd  $H_2O$  8.5  $\mu$ L, cDNA 模板 2.0  $\mu$ L。反应条件: 预变性 95 °C 30 s; 变性 95 °C 5 s, 退火延伸 60 °C 30 s, 40 个循环。以  $\beta$ -actin 作为内参, 使用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法<sup>[10]</sup> 计算目标基因的相对表达量。目标基因特异性引物见表 1。

### 1.5 数据分析

所有实验数据使用 SPSS 20.0 软件包进行分析, 各组间数据差异使用单因素方差分析 (ANOVA) 处理, 并进行 Duncan 氏多重检验, 显著性水平设为 0.05, 所有实验结果用平均值  $\pm$  标准误 (mean  $\pm$  SE) 表示。

## 2 结果

### 2.1 氧化应激对血清生化指标的影响

$H_2O_2$  暴露 7 d 后, 0.25、0.50 和 1.00 mmol/L  $H_2O_2$  处理组鲤血清 GLU、皮质醇和 LA 含量均显著高于空白对照组 ( $P < 0.05$ ), 并呈线性升高趋

表 1 荧光定量引物

Tab. 1 The primers sequences used in qRT-PCR

引物名称 primers	引物序列(5'-3') primer sequences(5'-3')	基因序列号 GenBank no.
<i>c-lzm-F</i>	ATGAAGGTGACTATTGCTGTCTTG	AB027305.1
<i>c-lzm-R</i>	GCCAACTGAGAATCCCTCAAAG	
<i>c3-F</i>	GATTGCTATGCAGGAGGCCA	AB016215
<i>c3-R</i>	TCATCGCAACAGCGTAAGGA	
<i>hep-F</i>	GTTCCCTTCACACAGCAGACT	KC795559.1
<i>hep-R</i>	ATGCCAGGGGATTGGTTTGT	
<i>hsp70-F</i>	GTATCAGGGAGGGATGCCAG	JN544930.1
<i>hsp70-R</i>	ATGAAAGACAAAAGTGACAAGTCCA	
<i>hsp90-F</i>	GGATGGTCTGGCAACATGGAA	KT985294.1
<i>hsp90-R</i>	AAGAGCACCCAGGCTAAATCT	
<i>cyp1a-F</i>	AGATCGGAATGGACCGAACG	AB048939.1
<i>cyp1a-R</i>	GAAGGACGAATGGCGGAAGA	
<i>cyp3a-F</i>	ACAATCTGGCAACCAACCCA	GU046696.1
<i>cyp3a-R</i>	CTTCATAGTCCACCGGAGCC	
<i>cyp1b-F</i>	CATGACCCGACCAAATGGGA	AB048942.2
<i>cyp1b-R</i>	CCAGCAAGGAGGTGAAGAGG	
<i><math>\beta</math>-actin-F</i>	TTGCTCCCTCCACCATGAAG	M24113.1
<i><math>\beta</math>-actin-R</i>	ACTCCTGCTTGCTGATCCAC	

势。TG 含量仅在 0.50 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组中显著高于空白组 ( $P < 0.05$ )。TC 含量在各组间均无显著差异 (图 1)。

## 2.2 氧化应激对血清磷酸酶活性的影响

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暴露 7 d 后, 鲤血清磷酸酶活性均有不同程度升高。与空白对照组相比, 1.00 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理显著提高鲤血清 ACP 和 AKP 活性 ( $P < 0.05$ ), 而 0.25 和 0.50 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组无显著差异 (图 2)。

## 2.3 氧化应激对鲤血清抗氧化能力的影响

随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的升高, 血清中 CAT 活性呈下降趋势, 而 GSH、T-AOC 和 MDA 含量呈上升趋势。其中 CAT 活性在 0.50 和 1.00 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组中显著降低 ( $P < 0.05$ ); GSH 含量在 1.00 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组中显著升高 ( $P < 0.05$ ); MDA 含量在 0.50 和 1.00 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组中显著升高 ( $P < 0.05$ ); T-AOC 含量在 0.25、0.50 和 1.00 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组中显著升高 ( $P < 0.05$ ); 而 SOD

活性在各处理组中未出现明显变化 (图 3)。

## 2.4 氧化应激对鲤肝脏抗氧化能力的影响

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暴露 7 d 后, 与空白对照组相比, 肝脏中 CAT 活性在 3 个 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组中均未出现显著变化, 但 0.25 和 0.50 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组中 CAT 活性显著低于 1.00 mmol/L 组 ( $P < 0.05$ )。与空白对照组相比, 0.50 和 1.00 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组显著降低了鲤肝脏组织中 GSH 含量 ( $P < 0.05$ ); 而 1.00 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组显著升高了鲤肝脏组织中 MDA 含量 ( $P < 0.05$ )。此外肝脏组织中 T-AOC 水平仅在 0.25 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组显著高于空白对照组 ( $P < 0.05$ ); 而 SOD 活性在各浓度组中均未出现显著差异 (图 4)。

## 2.5 氧化应激对肝细胞色素 P450 酶 (CYP) 以及热休克蛋白 (HSPs) 相关基因的影响

氧化应激明显地影响鲤应激相关基因 (*cyp1a*、*cyp1b*、*cyp3a*、*hsp70* 和 *hsp90*) 的表达。随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度升高, *cyp1a* 表达呈线性上调趋势, 并在

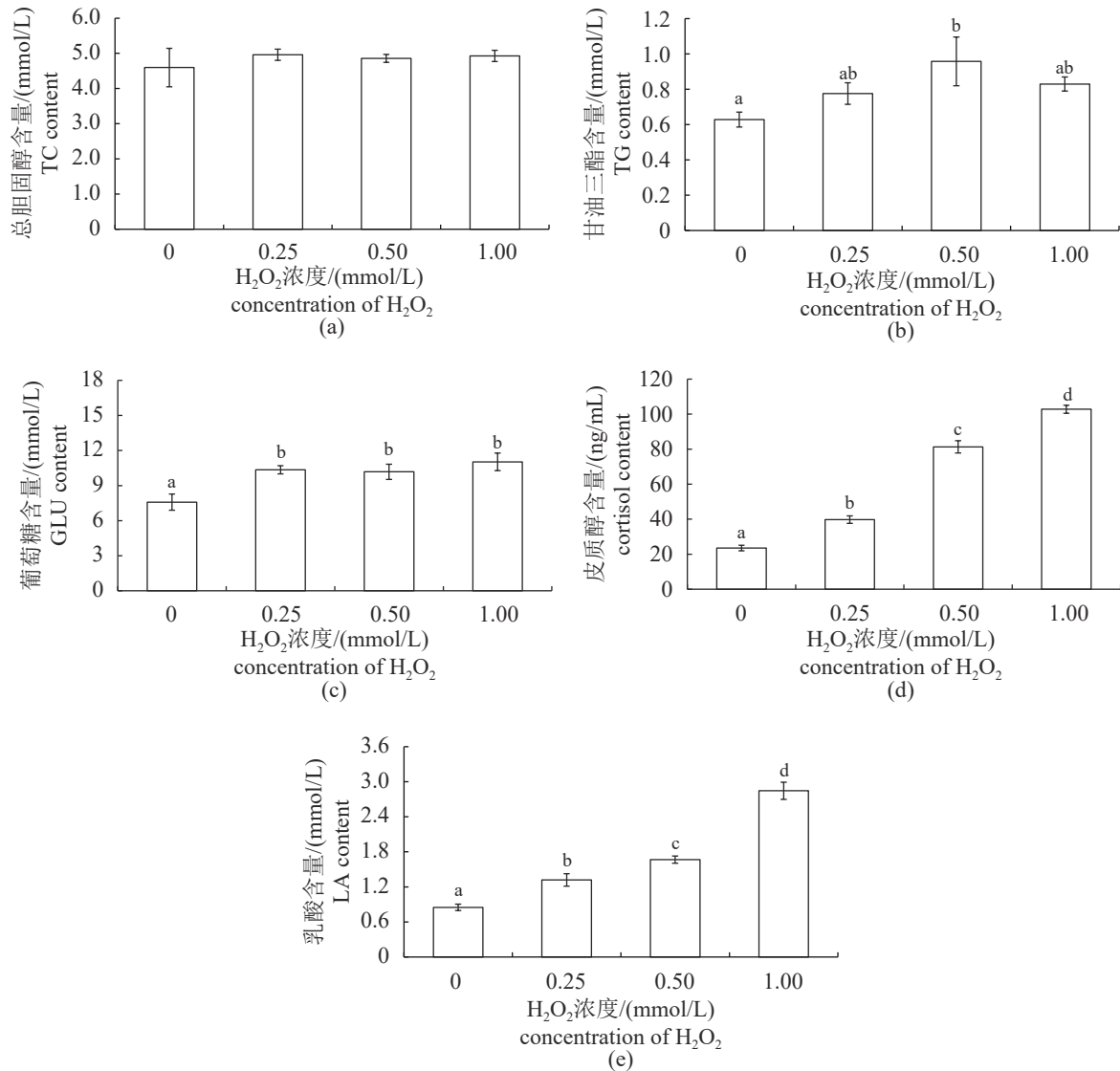


图 1 不同浓度  $H_2O_2$  对鲤血清生化指标的影响

不同字母代表组间差异显著 ( $P < 0.05$ ); 下同

Fig. 1 Effects of different  $H_2O_2$  concentrations on serum biochemical parameters of *C. carpio*

Different small letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ), the same below

1.00 mmol/L 组显著高于空白对照组 ( $P < 0.05$ ); 而 *cyp1b* 表达量呈相反的趋势, 在 1.00 mmol/L 组处出现显著降低 (图 5-a, c) ( $P < 0.05$ )。 *cyp3a* 表达量呈现先上升后下降的趋势, 但与空白对照组相比无显著差异 (图 5-b)。 *hsp70* 和 *hsp90* 表达量在 0.50 和 1.00 mmol/L  $H_2O_2$  组显著高于空白对照组 ( $P < 0.05$ ), 同时 *hsp70* 表达量在 0.25 mmol/L  $H_2O_2$  组也显著上调 (图 5-d, e) ( $P < 0.05$ )。

## 2.6 氧化应激对鲤免疫相关基因表达的影响

$H_2O_2$  暴露 7 d 后, 鲤免疫相关基因明显表达上调。与空白对照组相比, 肝脏杀菌肽基因

(*hep*) 相对表达量在 0.50 和 1.00 mmol/L  $H_2O_2$  处理组显著上调 (图 6-a) ( $P < 0.05$ ); 补体 3 基因 (*c3*) 相对表达量在 3 个  $H_2O_2$  处理组均显著上调 (图 6-b) ( $P < 0.05$ ); 溶菌酶基因 (*c-lyz*) 相对表达量在 0.25 和 1.00 mmol/L  $H_2O_2$  处理组显著升高 (图 6-c) ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 氧化应激对鲤生理应激状态的影响

血清生化指标可以反映鱼体的健康状况, 其中血糖、血脂、LA 和皮质醇被认为是判断鱼

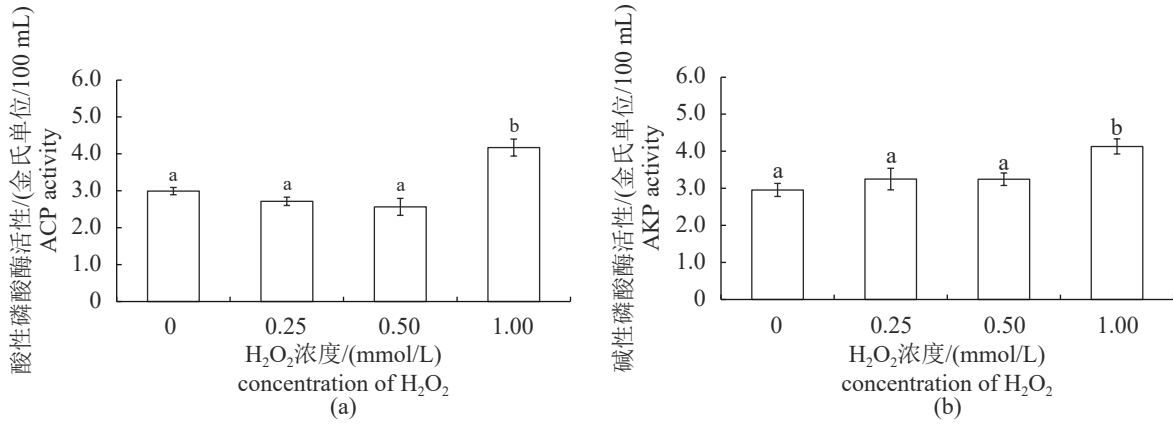


图2 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对鲤血清磷酸酶活性的影响

Fig. 2 Effects of different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations on serum phosphatase activities in *C. carpio*

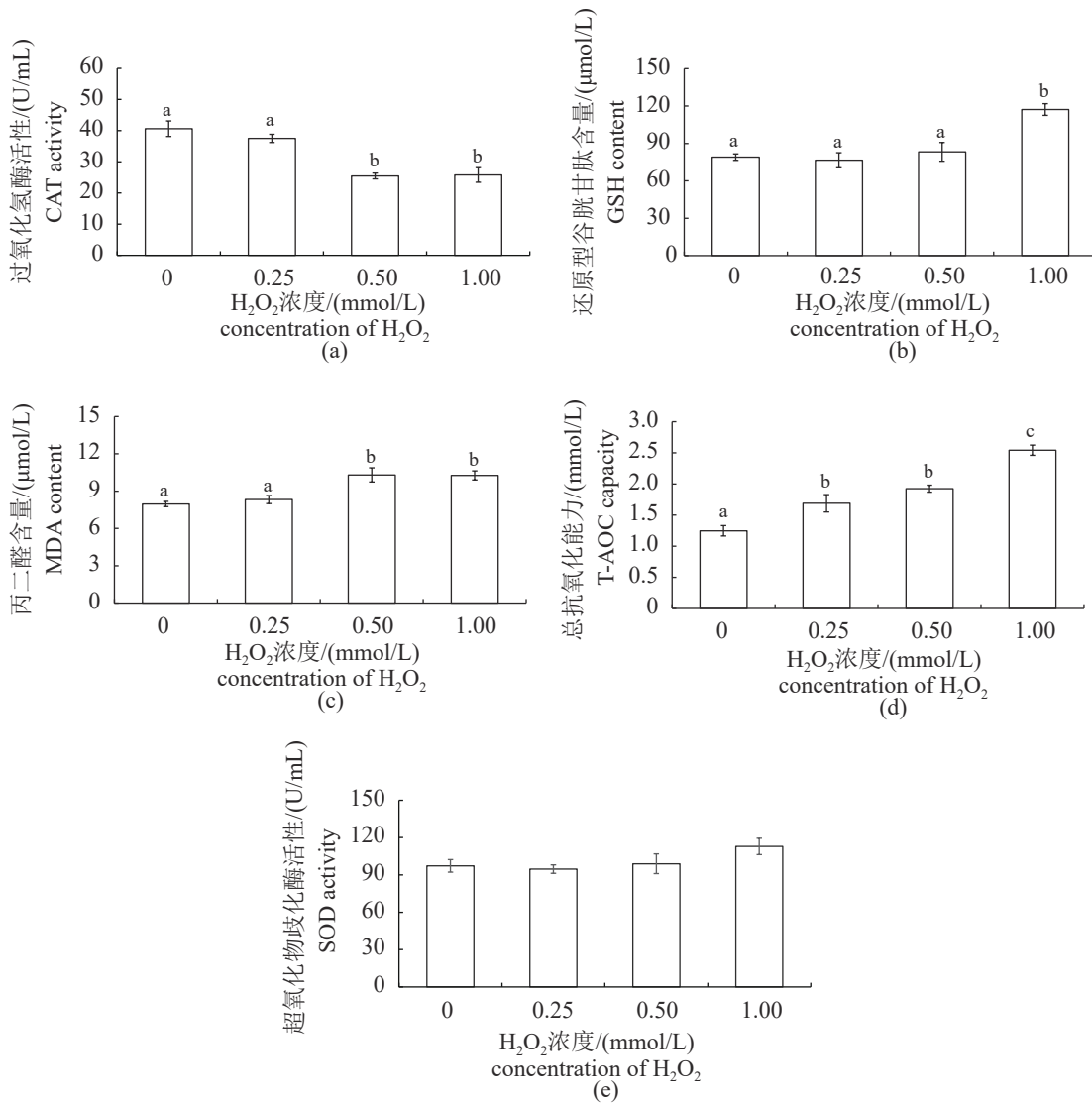


图3 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对鲤血清抗氧化能力的影响

Fig. 3 Effects of different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations on serum antioxidative capacity in *C. carpio*

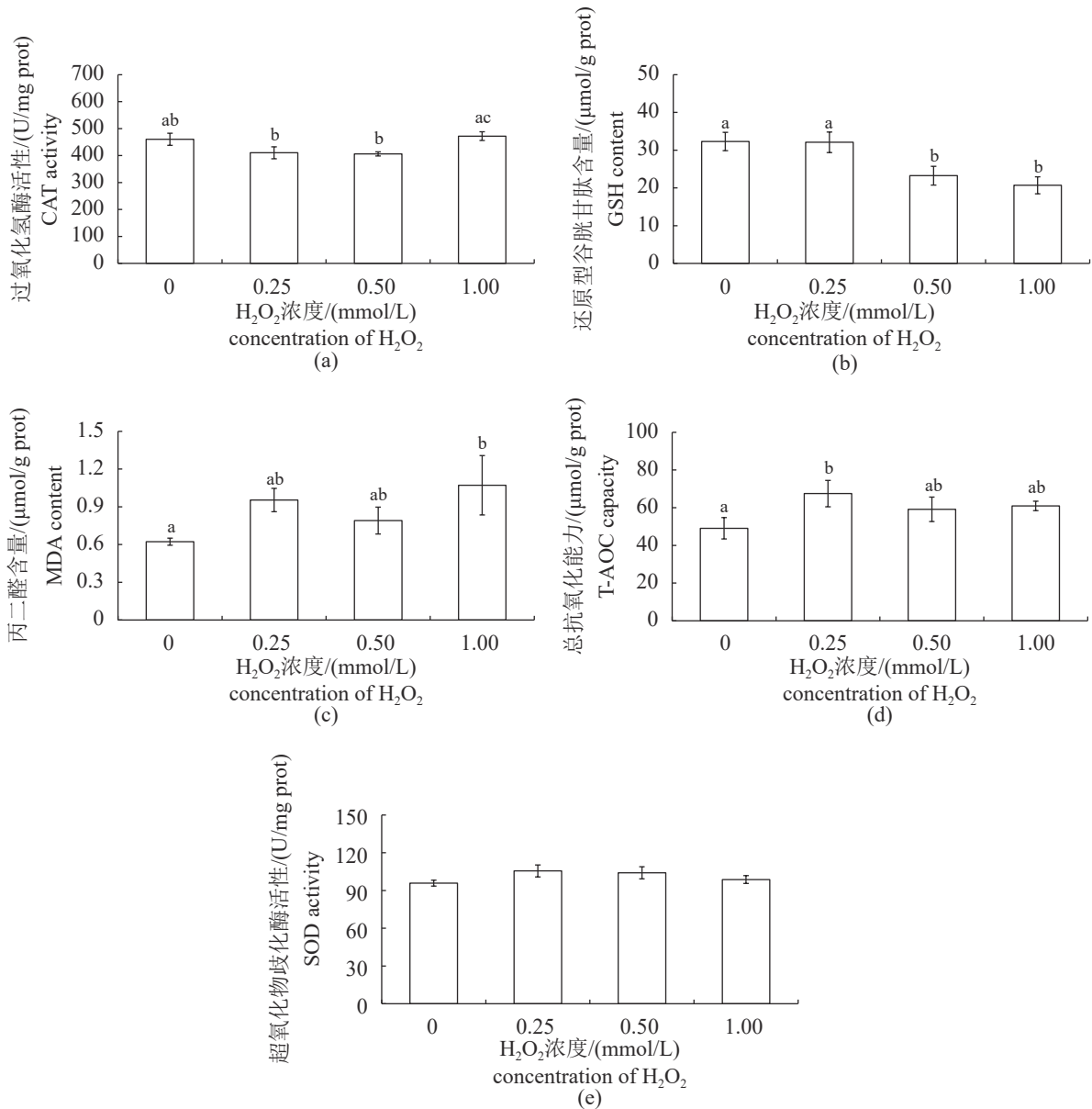


图 4 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对鲤肝脏抗氧化能力的影响

Fig. 4 Effects of different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations on liver antioxidative capacity in *C. carpio*

类应激水平的可靠指标<sup>[11-12]</sup>。研究发现,持续应激可引起机体皮质醇和 LA 等代谢产物长期升高,从而抑制机体免疫功能,对机体造成严重的损伤<sup>[13]</sup>。在鱼类中,长期的拥挤胁迫可导致血糖、皮质醇、LA、TC 和 TG 的升高<sup>[14-15]</sup>。本研究结果显示,不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暴露条件下,鲤血清中 TG、GLU、LA 和皮质醇均显著升高,表明氧化应激使机体产生显著的应激反应,血糖和血脂的升高表明机体在应激状态下需要消耗大量的能量物质,以维持正常生理状态。

应激反应常伴随着各种应激蛋白的变化,包括 CYPs 和 HSPs。CYPs 是一种多功能氧化酶,CYP1a、CYP3a 和 CYP1b 是其中主要的 3 个亚族,在生物代谢、转化和生物活性分子的合成中起关键作用<sup>[16]</sup>。已有研究表明,许多外源性污染物如重金属、塑料和农药等均可诱导鱼类 CYP1a 活性,使 *cyp1a* 表达上调<sup>[17]</sup>。大量研究表明,细胞色素 CYP1b 与体内 ROS 的产生与转化密切相关,*cyp1b* 表达上调可引起 ROS 的积累,反之抑制 *cyp1b* 的表达则可减轻机体产生氧化应激反

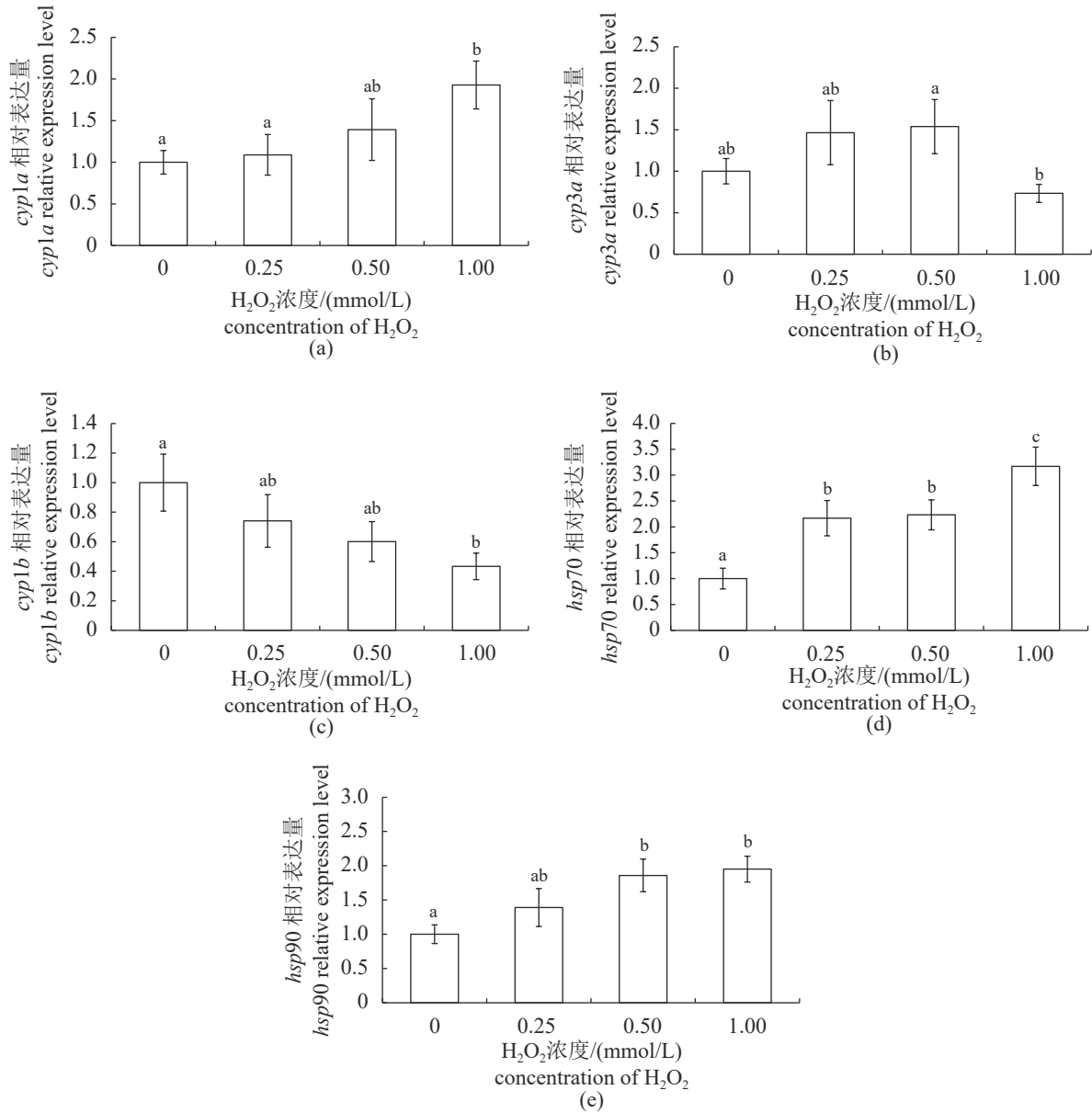


图 5 不同浓度  $H_2O_2$  对鲤肝脏应激相关基因表达的影响

Fig. 5 Effects of different  $H_2O_2$  concentrations on the mRNA levels of stress related genes in the liver of *C. carpio*

应<sup>[18-19]</sup>。本实验结果显示, 随着  $H_2O_2$  浓度升高, *cyp1a* 表达量被显著诱导, 而 *cyp1b* 表达量显著下降, 表明氧化应激引起鲤 CYPs 的不利改变。

HSPs 作为一种分子伴侣蛋白, 可以重新回收变性蛋白以及促进蛋白质的合成, 可缓解由外界刺激引起的细胞损伤<sup>[20]</sup>。Cheng 等<sup>[21]</sup>研究表明, 当机体处于应激反应时, 组织中 HSPs 参与免疫应答和氧化还原调控, *hsp70* 和 *hsp90* 的表达量会显著升高。本研究结果显示, 随着  $H_2O_2$  暴露浓度的升高, *hsp70* 和 *hsp90* 的表达量均显著升高, 其升高有利于机体应对外界不

利刺激, 是一种适应性响应机制, 所得结果与尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 中的研究结果相似<sup>[22]</sup>。

### 3.2 氧化应激对鲤抗氧化状态的影响

MDA 水平间接反映了鱼体受自由基攻击的严重程度, 是反映细胞膜氧化损伤的重要指标<sup>[23]</sup>。SOD 和 CAT 是机体内重要的抗氧化酶, 可将细胞内氧自由基 ( $\cdot O_2^-$ ) 转化成分子氧 ( $O_2$ ), 以降低其毒性, 维持细胞氧化还原平衡<sup>[24]</sup>。GSH 是存在于肝脏组织中的最丰富的非酶类生物抗氧化

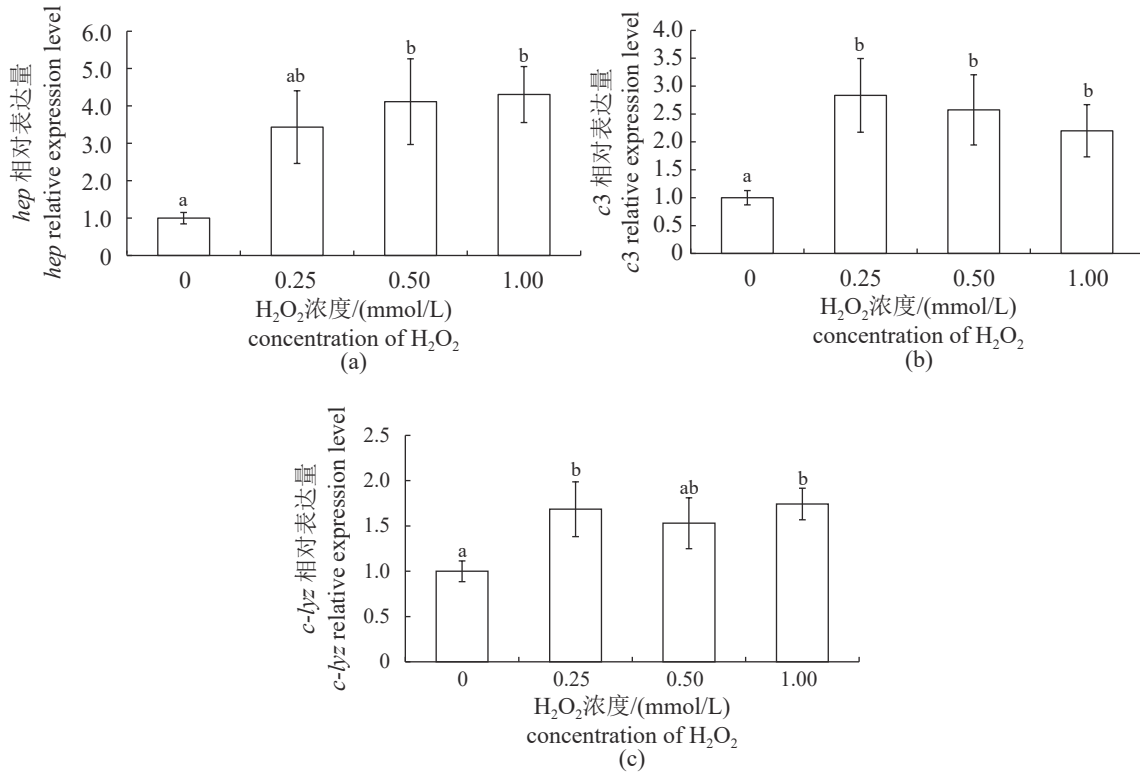


图 6 不同浓度  $H_2O_2$  对鲤肝脏免疫相关基因表达的影响

Fig. 6 Effects of different  $H_2O_2$  concentrations on the relative expression levels of immune related genes in the liver of *C. carpio*

剂之一，是整个抗氧化防御系统的关键组成部分，可保护细胞免受活性氧的损伤<sup>[25]</sup>。Jia 等<sup>[26]</sup>在对尼罗罗非鱼的研究中发现，腹腔注射  $H_2O_2$  后可引起血清和肝脏组织中 MDA 含量升高，CAT、SOD 和 GSH 水平下降。本研究结果显示，随着  $H_2O_2$  浓度的升高，血清和肝脏中 MDA 含量均高于空白对照组，表明长期的  $H_2O_2$  暴露可导致鲤机体内积累过量氧自由基，从而引起脂质过氧化生成 MDA。同时肝脏中的 CAT 活性和 GSH 含量均显著降低，表明机体内  $H_2O_2$  和羟基自由基过量产生，大量消耗 CAT 和 GSH，降低机体抗氧化能力。类似的结果在其他氧化损伤研究中也有报道<sup>[27-28]</sup>。此外，本研究发现，血清和肝脏中 SOD 活性和 T-AOC 含量出现不同程度的升高，可能是由于本实验中  $H_2O_2$  浓度较低，应激强度未超出机体自我修复调节能力<sup>[29]</sup>。

### 3.3 氧化应激对鲤免疫应答的影响

众多研究表明，氧化应激与机体免疫功能密切相关，鱼体长期处于氧化应激状态下，机体的免疫器官会受到不同程度的损伤，从而导

致机体免疫力下降，造成疾病或死亡的发生<sup>[30]</sup>。ACP 和 AKP 是鱼类重要的非特异性免疫因子，能破坏和消除侵入体内的异物，在免疫反应中起极为重要的作用<sup>[31-32]</sup>。徐杨<sup>[33]</sup>研究发现，长期氨氮胁迫会导致尼罗罗非鱼体内 ACP 和 AKP 活性呈不同程度的上升趋势。本研究结果显示，1.00 mmol/L  $H_2O_2$  处理组显著提高了鲤血清 ACP 和 AKP 活性，表明一定强度的氧化应激会使机体产生免疫应答，同时机体可能通过增强非特异性免疫功能以抵抗氧化应激所导致的炎症反应。

HEP、C-lyz 和 C3 为常见的先天性免疫分子，广泛存在于多个组织中，可保护鱼体免受有害微生物和其他环境因素的危害<sup>[34]</sup>。已有研究表明，低浓度的  $H_2O_2$  处理会诱导尼罗罗非鱼肝脏中 hep、c-lyz 和 c3 表达上调，而高浓度的  $H_2O_2$  处理则显著抑制上述基因的表达<sup>[26]</sup>。从本实验结果发现，鲤暴露于不同  $H_2O_2$  浓度 (0.25、0.50、1.00 mmol/L) 的条件下，肝组织中 hep、c-lyz 和 c3 表达量均上调，表明氧化应激诱导了鲤的免疫反应，机体可能通过上调 hep、c-lyz 和 c3 的表达以适应不利



的环境。

综上所述, 氧化应激可显著影响鲤抗氧化能力和免疫功能。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为 ROS, 可消耗机体的抗氧化物质, 进一步损坏抗氧化系统, 并导致脂质过氧化。同时, 机体可通过增强磷酸酶活性, 上调热休克蛋白基因 (*hsp70* 和 *hsp90*) 以及免疫相关基因 (*hep*、*c3* 和 *c-lyz*) 的表达, 以减少氧化应激对机体造成的损伤。

### 参考文献 (References):

- [1] 王秋举, 鞠雪, 王清滨, 等. 养殖水体中氧化应激产生机理的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(6): 144-149.
- Wang Q J, Ju X, Wang Q B, *et al.* Research progress on mechanisms of oxidative stress generation in water body[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(6): 144-149(in Chinese).
- [2] Jia R, Cao L P, Du J L, *et al.* Effects of carbon tetrachloride on oxidative stress, inflammatory response and hepatocyte apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 152: 11-19.
- [3] Suzuki H, Yanaka A, Shibahara T, *et al.* Ammonia-induced apoptosis is accelerated at higher pH in gastric surface mucous cells[J]. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2002, 283(4): G986-G995.
- [4] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(9): 405-410.
- [5] Kalpana K B, Srinivasan M, Menon V P. Evaluation of antioxidant activity of hesperidin and its protective effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative damage on pBR322 DNA and RBC cellular membrane[J]. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 2009, 323(1): 21-29.
- [6] 韩飞, 周孟良. 过氧化氢诱导HepG2细胞产生氧化应激细胞模型的建立[J]. 食品科学, 2011, 32(5): 55-57.
- Han F, Zhou M L. An experimental HepG2 cell model of hydrogen peroxide induced DNA oxidative injury[J]. *Food Science*, 2011, 32(5): 55-57(in Chinese).
- [7] Arvin E, Pedersen L F. Hydrogen peroxide decomposition kinetics in aquaculture water[J]. *Aquacultural Engineering*, 2015, 64: 1-7.
- [8] Rombout J H W M, Taverne N, van de Kamp M, *et al.* Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1993, 17(4): 309-317.
- [9] Tort L. Stress and immune modulation in fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1366-1375.
- [10] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [11] 常玉梅, 匡友谊, 曹鼎臣, 等. 低温胁迫对鲤血液学和血清生化指标的影响[J]. 水产学报, 2006, 30(5): 701-706.
- Chang Y M, Kuang Y Y, Cao D C, *et al.* Effects of cooling temperature stress on hematology and serum chemistry values of *Cyprinus carpio*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(5): 701-706(in Chinese).
- [12] Roque A, Yildiz H Y, Carazo I, *et al.* Physiological stress responses of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) exposure[J]. *Aquaculture*, 2010, 304(1-4): 104-107.
- [13] Fevolden S E, Røed K H, Fjalestad K. A combined salt and confinement stress enhances mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high stress responsiveness[J]. *Aquaculture*, 2003, 216(1-4): 67-76.
- [14] 遼尚尉, 刘兆普, 余燕. 密度胁迫对点带石斑鱼幼鱼生长、代谢的影响[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 322-328.
- Lu S W, Liu Z P, Yu Y. Effects of density stress on growth and metabolism of juvenile *Epinephelus malabaricus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(2): 322-328(in Chinese).
- [15] Ruane N M, Komen H. Measuring cortisol in the water as an indicator of stress caused by increased loading density in common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Aquaculture*, 2003, 218(1-4): 685-693.
- [16] Guengerich F P. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity[J]. *The AAPS Journal*, 2006, 8(1): E101-E111.
- [17] Moore M J, Mitrofanov I V, Valentini S S, *et al.* Cytochrome P450 1A expression, chemical contaminants and histopathology in roach, goby and sturgeon and chemical contaminants in sediments from the Caspian Sea, Lake Balkhash and the Ily River Delta, Kazakhstan[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2003, 46(1): 107-119.
- [18] Jennings B L, Anderson L J, Estes A M, *et al.* Involvement of cytochrome P-450 1B1 in renal dysfunction,

- injury, and inflammation associated with angiotensin II-induced hypertension in rats[J]. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2012, 302(4): F408-F420.
- [19] Bansal S, Leu A N, Gonzalez F J, *et al.* Mitochondrial targeting of cytochrome P450 (CYP) 1B1 and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon- induced mitochondrial dysfunction[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(14): 9936-9951.
- [20] Jiang J L, Shi Y, Shan Z J, *et al.* Bioaccumulation, oxidative stress and HSP70 expression in *Cyprinus carpio* L. exposed to microcystin-LR under laboratory conditions [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2012, 155(3): 483-490.
- [21] 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.
- [22] 强俊, 杨弘, 王辉, 等. 急性温度应激对吉富品系尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼生化指标和肝脏 HSP70 mRNA表达的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(5): 943-953.
- Qiang J, Yang H, Wang H, *et al.* The effect of acute temperature stress on biochemical indices and expression of liver HSP70 mRNA in GIFT Nile Tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(5): 943-953(in Chinese).
- [23] 邓冬富. 水体中铅的浓度对胭脂鱼的生理生态学影响[D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- Deng D F. Ecophysiological effects of the water-borne lead (Pb) concentrations on Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*)[D]. Chongqing: Southwest University, 2012 (in Chinese).
- [24] Parimoo H A, Sharma R, Patil R D, *et al.* Hepatoprotective effect of *Ginkgo biloba* leaf extract on lantadenes-induced hepatotoxicity in guinea pigs[J]. *Toxicol*, 2014, 81: 1-12.
- [25] Yang J Y, Li Y, Wang F, *et al.* Hepatoprotective effects of apple polyphenols on CCl<sub>4</sub>-induced acute liver damage in mice[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2010, 58(10): 6525-6531.
- [26] Jia R, Du J L, Cao L P, *et al.* Antioxidative, inflammatory and immune responses in hydrogen peroxide-induced liver injury of tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 894-905.
- [27] Ahmed-Farid O A, Rizk H A, Shehata A M. Hydrogen peroxide modulates redox status, energy metabolism, and gene expression in a dose- and time-dependent manner in rat liver[J]. *Journal of Biochemical & Molecular Toxicology*, 2018, 32(10): e22199.
- [28] 乔洪金, 胡冬雪, 胡文靖, 等. 饲料中添加鼠尾藻粉对大菱鲆幼鱼生长、体成分、抗氧化和非特异免疫参数的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2019, 28(1): 109-116.
- Qiao H J, Hu D X, Hu W J, *et al.* Effects of dietary *Sargassum thunbergii* powder on growth performance, body composition, antioxidation and non-specific immune parameters of juvenile turbot[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(1): 109-116(in Chinese).
- [29] Rahal A, Kumar A, Singh V, *et al.* Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay[J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 761264.
- [30] 赵建华, 杨德国, 陈建武, 等. 鱼类应激生物学研究与应用[J]. *生命科学*, 2011, 23(4): 394-401.
- Zhao J H, Yang D G, Chen J W, *et al.* Research and application on the biology of fish stress[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(4): 394-401(in Chinese).
- [31] 唐首杰, 刘辛宇, 吴太淳, 等. 慢性氨氮胁迫对“新吉富”罗非鱼幼鱼生长及血清生化指标的影响[J]. *水产科学*, 2019, 38(6): 741-748.
- Tang S J, Liu X Y, Wu T C, *et al.* Effects of chronic exposure to ammonia on growth and serum biochemical indices in juvenile new GIFT strain of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. *Fisheries Science*, 2019, 38(6): 741-748(in Chinese).
- [32] Zhao L L, Yang X Z, Cheng Y X, *et al.* Effects of histamine on survival and immune parameters of the Chinese mitten crab, *Eriocheir Sinensis*[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2014, 31(3): 827-834.
- [33] 徐杨. 尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 对氨氮和亚硝酸盐氮胁迫的生理响应 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- Xu Y. Physiological response to stress of ammonia and nitrite in tilapia, *Oreochromis niloticus*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [34] Saurabh S, Sahoo P K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system[J]. *Aquaculture Research*, 2008, 39(3): 223-239.

## Antioxidative status and immune response in common carp (*Cyprinus carpio*) under oxidative stress

HE Qin<sup>1</sup>, JIA Rui<sup>2,3</sup>, CAO Liping<sup>2,3</sup>, DU Jinliang<sup>2,3</sup>, GU Zhengyan<sup>1</sup>,  
JENEY Galina<sup>3,4</sup>, XU Pao<sup>1,2,3</sup>, YIN Guojun<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. International Joint Research Laboratory for Fish Immunopharmacology, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

4. National Agricultural Research Center, Research Institute for Fisheries and Aquaculture, Szarvas 5440, Hungary)

**Abstract:** In aquaculture, fish inevitably suffers from a variety of stressors, leading to stress response, especially oxidative stress. In fish, oxidative stress is related to the occurrence and progress of many diseases, but it is in the absence of direct evidences regarding pathogenic mechanism of oxidative stress. Therefore, the aim of this study was to investigate the antioxidative status and immune responses in common carp (*Cyprinus carpio*) under oxidative stress. The fish were exposed to four concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 0.25, 0.50 and 1.00 mmol/L) for 1 h per day for 7 days. After 7 days of exposure, we collected the blood and liver tissues to determine biochemical parameters and genes expression. The data showed that the levels of cortisol and lactic acid (LA) in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments were significantly higher than those of the control group. The activities of alkaline phosphatase (AKP) and acid phosphatase (ACP) were also significantly increased in 1.00 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group. In serum, 0.50 and 1.00 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure markedly enhanced the levels of malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (T-AOC), but decreased the levels of catalase (CAT) and glutathione (GSH). In liver, 1.00 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure obviously decreased the level of GSH, but enhanced MDA formation. Meanwhile, the genes expression data showed that 1.00 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure up-regulated the cytochrome p450 (*cyp1a*) transcription and down-regulated the *cyp1b* transcription in the liver. Additionally, the mRNA levels of *c3*, *c-lyz*, *hep* and heat shock proteins (*hsp70* and *hsp90*) in the liver were significantly up-regulated by 0.50 and 1.00 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exposure. In conclusion, oxidative stress can induce stress response and lipid peroxidation, impair antioxidant ability, and initiate immune response in *C. carpio*. These data might contribute to understanding pathogenic mechanism of oxidative stress, and provide theoretical reference for the prevention of diseases associated with oxidative stress in fish.

**Key words:** *Cyprinus carpio*; hydrogen peroxide; oxidative stress; antioxidative capacity; immune responses; gene expression

**Corresponding author:** YIN Guojun. E-mail: yingj@ffrc.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31702318); Jiangsu Provincial Natural Science Foundation of China (BK20170218); Special Scientific Research Funds for Central Nonprofit Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (CAFS) (2019JBFM10, 2019JBFM11)