



亚硝态氮胁迫对斑节对虾 (非洲群体) 氧化应激、 能量代谢和渗透调节的影响

刘吉丹¹, 刘洪军^{2*}, 樊英^{2*}, 唐学玺¹, 王晓璐²,
王友红², 盖春蕾², 叶海斌²

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266100;

2. 山东省海洋科学研究院 (青岛国家海洋科学研究中心), 山东省海水养殖
病害防治重点实验室, 山东 青岛 266104)

摘要: 为研究亚硝态氮 ($\text{NO}_2\text{-N}$) 对斑节对虾 (非洲群体) 氧化应激、能量代谢和渗透平衡的影响, 实验选取体长 (3.0 ± 0.5) cm 的斑节对虾, 设置 0 (对照组)、5、10 和 15 mg/L (3 个胁迫组) 的亚硝态氮浓度梯度, 进行了为期 72 h 的急性胁迫。实验结果显示, 肝胰腺氧化应激因子活性 (或含量) 随着胁迫时间发展而变化。超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT) 以及一氧化氮合酶 (NOS) 活性先升高后下降, 24 h, SOD 和 GSH-Px、NOS 活性达到最大值, 10 mg/L 胁迫组的 SOD、GSH-Px 活性和 15 mg/L 胁迫组的 NOS 活性显著高于其他 3 组; 丙二醛 (MDA) 含量变化相反, 24 h 胁迫组的 MDA 含量最小, 其中 10 mg/L 胁迫组显著低于其他 3 组; 48 h, CAT 活性达到最大值, 10 mg/L 胁迫组显著高于其他 3 组; 一氧化氮 (NO) 含量随着胁迫时间的延长而逐渐升高, 72 h, NO 含量最高, 15 mg/L 胁迫组显著高于其他 3 组。血清能量代谢指标中脂肪酶 (LPS) 活性先上升后下降, 48 h, LPS 活性达到最大值, 其中 10 mg/L 胁迫组显著高于其他 3 组; 而已糖激酶 (HK)、磷酸果糖激酶 (PFK)、丙酮酸激酶 (PK) 活性和甘油三酯 (TG) 含量明显下降, 72 h, HK、PFK、PK 活性和 TG 含量达到最小值, 15 mg/L 胁迫组显著低于其他 3 组。鳃丝中渗透调节参数—— Na^+ 、 K^+ -ATP 酶 (Na^+ 、 K^+ -ATPase) 活性在胁迫过程中始终下降, 经过 72 h 的亚硝态氮胁迫, Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性达到最小值, 15 mg/L 胁迫组显著低于其他 3 组。研究表明, 斑节对虾可通过提高抗氧化能力, 增强对脂质吸收和利用, 调节原有渗透平衡来应对亚硝态氮胁迫, 这种作用的发挥具有一定的时间和浓度限制。本实验将为进一步探索亚硝态氮胁迫的分子机制提供数据支持。

关键词: 斑节对虾 (非洲群体); 亚硝态氮; 抗氧化应激; 能量代谢; 离子渗透

中图分类号: S 968.22

文献标志码: A

斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 属于节肢动物门 (Arthropoda) 软甲纲 (Malacostraca) 十足目 (Decapoda) 对虾科 (Penaeidae) 对虾属 (*Penaeus*),

本实验采用的斑节对虾 (非洲群体) 亲本来源于非洲, 因其具有体型较大、生长迅速、抗逆性好、肉质鲜美、营养丰富、效益优良等优点^[1], 被水

收稿日期: 2021-05-07 修回日期: 2021-08-15

资助项目: 山东省 2018 年度农业重大应用技术创新项目; 山东省虾蟹产业技术体系 (SDAIT-13); 国家虾蟹产业技术体系青岛实验站 (CARS-48); 优质高抗对虾突破性新品种选育 2019LZGC014

第一作者: 刘吉丹 (照片), 从事水产动物健康养殖研究, E-mail: liujidan@stu.ouc.edu.cn

通信作者: 刘洪军, 从事对虾健康养殖研究, E-mail: hongjunl@126.com;

樊英, 从事水产动物健康养殖及病害防治研究, E-mail: fy_fy123@126.com



产养殖企业引进作为新兴养殖品种。其适应于多种工厂化养殖模式^[2-3], 越来越受到养殖人员的青睐, 也逐渐引起科研人员的重视。

水质恶化是对虾集约化养殖模式病害频发的主要原因之一, 亚硝态氮是养殖水体中常见的污染物^[4]。亚硝态氮作为硝酸盐和氨氮转换的中间产物, 来源主要是食物残饵和动物粪便^[5-6]。养殖水体中过量的亚硝态氮会导致呼吸损害^[7]、渗透失衡^[8]、代谢紊乱^[9]并加强动物的易感性^[10]等。根据已有的研究成果, 为期 72 h 的实验足以观察斑节对虾应对亚硝态氮胁迫的基本生理变化。

一般来说, 沿海海水中的亚硝态氮浓度约为 0.14~0.21 mg/L^[11], 国家标准 GB 7493—1987 将水体中亚硝态氮的检出上限设定为 0.2 mg/L, 在零水交换系统养殖中后期亚硝态氮浓度可达到 20 mg/L^[12]。本实验选取了 4 个亚硝态氮浓度进行胁迫实验, 最大约为斑节对虾半数致死浓度 (LC₅₀) 的一半^[13], 囊括了工厂化养殖最有可能出现的亚硝态氮浓度^[14]。实验从抗氧化、代谢和渗透方面阐述了斑节对虾在应对亚硝态氮胁迫时发生的变化, 为探究亚硝态氮胁迫机制提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物的养殖管理

选取生长状态一致且良好的斑节对虾 (非洲群体), 体长 (3.0±0.5) cm, 随机放入养殖桶 (直径 1.5 m, 水深 60 cm) 中, 进行暂养实验, 500 尾/桶。实验期间连续充气, 溶氧量 5.5~6.5 mg/L, 氨氮含量小于 0.2 mg/L。水温 (26±1) °C, pH7.2~7.8。养殖期间, 每天定时 4 次投喂 (6:00、11:00、17:00 和 22:00), 日投喂量约为体重的 8%, 根据天气等条件调节饲喂量, 以饱食投喂为目的。每天上午定时换水 (6:00), 日换水量接近全部体积的 50%。

1.2 亚硝态氮胁迫实验

暂养结束后, 随机捞取 1 200 尾虾, 分成 4 组 (3 组胁迫组和 1 组对照组), 每组 3 个平行, 每个平行 100 尾虾。在养殖箱 (长 80 cm、宽 60 cm、高 70 cm, 水体积约 200 L) 中进行亚硝态氮胁迫实验, 参考罗静波等^[15]和钟君伟等^[16]的方法。以亚硝酸钠 (NaNO₂) 作为亚硝态氮来源, 通过向海水中添加准确称量的 NaNO₂ (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 将胁迫组亚硝态氮浓度分别调整至 5、10 和 15 mg/L, 另外设置一组不添加 NaNO₂ 的正常海水作为对照 (亚硝态氮浓度为 0

mg/L)。实验期间正常投喂, 及时捞出死亡个体并清污。每 12 小时对实验组进行浓度调整, 以维持设定的亚硝态氮浓度。实验周期为 72 h, 取样时间分别为 0、24、48、72 h。

1.3 样品采集及检测方法

肝胰腺样品采集及氧化应激因子测定 在每个取样时间点随机捞取每个平行组的 6 尾虾, 摘取肝胰腺装入标记好的取样管中封存, 立即置于液氮中。每个实验组取 0.5 g 肝胰腺样品, 按 1:9 (质量体积比) 比例加入 4.5 mL 预冷的 1% 磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 冰浴匀浆后离心 30 min (4 °C, 4 000 r/min), 取其上清液测定。除加样时间以外, 样品均放置在低温冰箱中以免酶活丧失, 下面实验同样处理方式。氧化应激因子包括超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT)、一氧化氮合酶 (NOS)、丙二醛 (MDA) 和一氧化氮 (NO)。测定试剂盒均来自南京建成生物工程研究所。

血清样品采集及能量代谢指标测定 在每个取样时间点随机捞取每个平行组的 10 尾虾, 从心脏处用无菌注射器抽取血液样本 (约 0.2 mL/尾), 将收集的血液样品进行混合, 低温条件下离心 (4 °C, 3 500 r/min, 30 min) 以充分去除杂质, 取上清液于液氮中冷冻保存备用。能量代谢指标主要包括己糖激酶 (HK)、磷酸果糖激酶 (PFK)、丙酮酸激酶 (PK)、脂肪酶 (LPS) 和甘油三酯 (TG)。测定试剂盒均来自北京索莱宝科技有限公司和南京建成生物工程研究所。

鳃丝样品采集及渗透调节参数测定 在每个取样时间点随机捞取每个平行组的 6 尾虾, 摘取 2 瓣鳃放入样品管中, 密封好置于液氮中冷冻保存。每组取 1 g 鳃丝, 与 9 mL 预冷 1% PBS 溶液进行混合, 冰浴匀浆后离心取上清液, 用于渗透酶活的测定。渗透调节参数主要包括 Na⁺、K⁺-ATP 酶 (Na⁺、K⁺-ATPase) 活性。测定试剂盒均来自南京建成生物工程研究所。

实验过程中操作人员严格遵守山东省水产动物相关伦理规范, 并按照伦理委员会制定的规章制度执行。

1.4 数据统计分析

实验数据均采用平均值±标准误 (mean±SE) 的形式表示, 使用 SPSS Statistics 26 软件进行数据分析, 以 $P<0.05$ 表示组间存在显著性差异, 本实验用图均采用 Sigmaplot 14 软件绘制。

2 结果

2.1 斑节对虾肝胰腺中氧化应激因子的相关变化

各胁迫组的肝胰腺 SOD、GSH-Px 以及 CAT 活性随胁迫时间大致呈现先上升后下降的变化趋

势 (图 1-a-c), MDA 含量与以上抗氧化酶活性变化趋势相反 (图 1-d)。24 h, 各胁迫组的 MDA 含量达到最小值, 以 10 mg/L 胁迫组最小 ($P<0.05$); 胁迫组的 SOD 和 GSH-Px 活性最高, 显著高于对照组 ($P<0.05$), 其中 10 mg/L 胁迫组均显著高于其

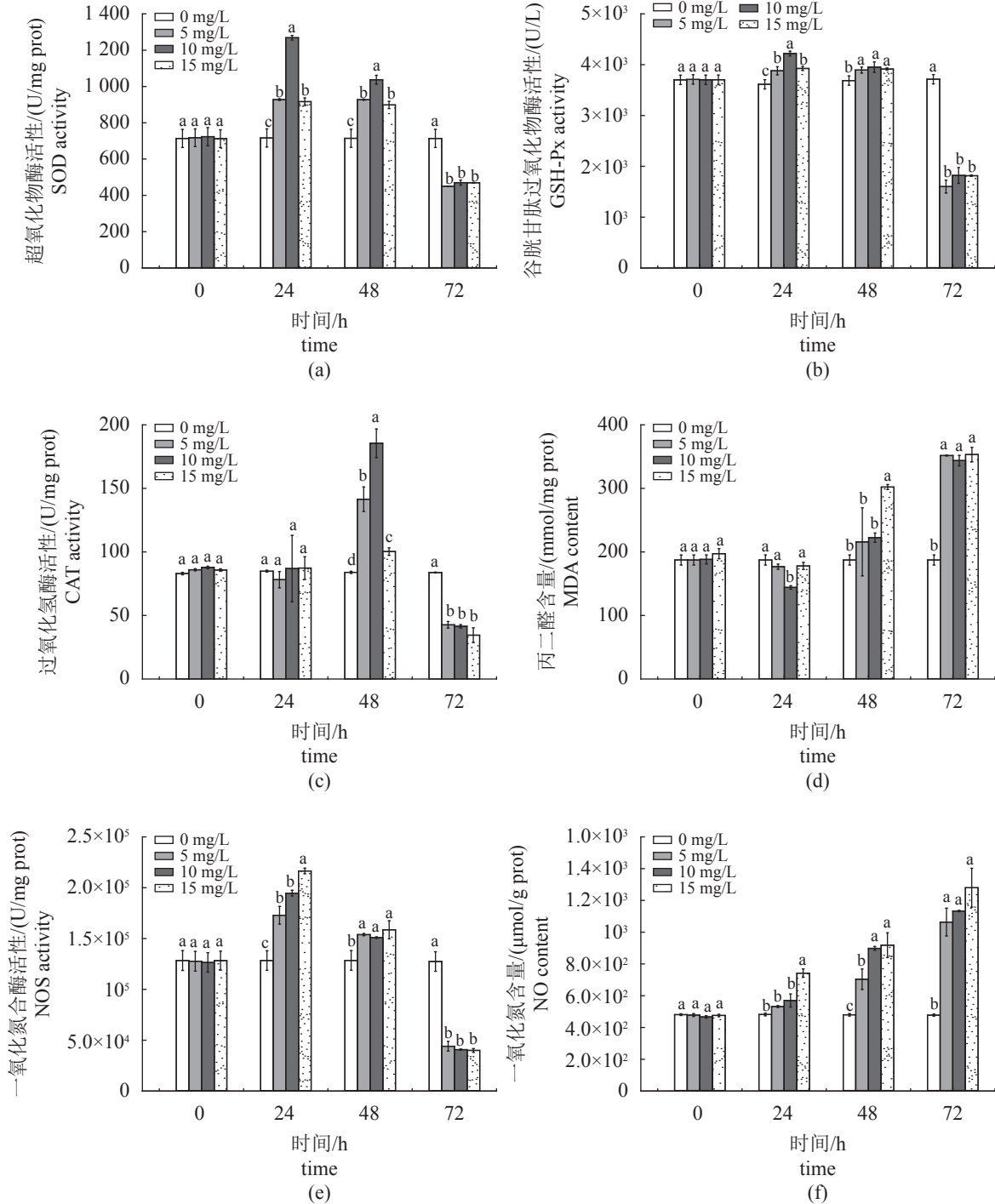


图 1 不同浓度亚硝态氮胁迫对斑节对虾氧化应激因子的影响

同一时间点, 不同字母表示处理组间存在显著性差异 ($P<0.05$)。

Fig. 1 Effects of nitrite stress at different concentrations on antioxidant factors of *P. monodon*

At each time-point, means with different letters are significantly different ($P<0.05$).

他胁迫组 ($P < 0.05$)。48 h, 胁迫组 CAT 活性达到最大值, 以 10 mg/L 胁迫组最大, 各组之间均存在显著性差异 ($P < 0.05$)。72 h, 各胁迫组的 SOD、GSH-Px、CAT 活性均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 胁迫组 MDA 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 胁迫组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

胁迫组肝胰腺中 NOS 活性在胁迫过程中先升高后降低 (图 1-e), NO 含量在整个过程中持续增加 (图 1-f)。24 h, 胁迫组肝胰腺的 NOS 活性最高, 其中以 15 mg/L 胁迫组最高, 显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$)。48 h 胁迫组 NOS 活性下降, 胁迫组间无显著性差异 ($P > 0.05$); 胁迫组肝胰腺的 NO 含量增加, 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。72 h, 各胁迫组的 NOS 活性下降, 显著低于对照组 ($P < 0.05$); 胁迫组的 NO 含量增加, 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。72 h 胁迫组间均不存在 NOS 活性和 NO 含量的显著差异 ($P > 0.05$)。

2.2 斑节对虾血清中能量代谢指标的相关变化

各胁迫组血清中 HK、PFK、PK 活性和 TG 含量明显下降 (图 2-a-c, e), LPS 活性则随时间延长表现出先上升后下降的变化趋势 (图 2-d)。24 h, 胁迫组的 HK、PFK、PK 活性和 TG 含量下降低于对照组 ($P < 0.05$), EMP 途径各组的酶活存在显著性差异 ($P < 0.05$)。48 h, 胁迫组的 LPS 活性达到最大, 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其中以 10 mg/L 胁迫组最高, 与其他胁迫组之间存在显著差异 ($P < 0.05$)。72 h, 各胁迫组的 LPS 活性、HK、PFK、PK 活性和 TG 含量均显著低于对照组 ($P < 0.05$), 且胁迫组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.3 斑节对虾鳃丝中离子渗透参数的相关变化

斑节对虾鳃组织中的 Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性随时间延长呈现下降趋势 (图 3)。24 h, 15 mg/L 胁迫组的 Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性显著低于其他 3 组 ($P < 0.05$)。48 h, 10 和 15 mg/L 胁迫组的 Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性显著低于 5 mg/L 胁迫组和对照组 ($P < 0.05$)。72 h, 各胁迫组的 Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性显著低于对照组 ($P < 0.05$), 胁迫组间不具有显著差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 亚硝态氮胁迫对斑节对虾氧化应激的影响

甲壳类属于无脊椎动物, 抗氧化应激在机体

免疫过程中发挥重要作用^[17]。亚硝态氮作为一种环境胁迫因子, 会对生物体产生毒害影响^[18]。肝胰腺作为对虾最大的代谢和解毒器官, 是亚硝态氮攻击的主要部位之一^[19]。因此, 本实验中检测了肝胰腺中的抗氧化因子, 用以反映对虾的抗氧化活性。

甲壳动物体内, SOD 作为一种重要的抗氧化酶, 是清除活性氧自由基 (ROS) 的第一道屏障^[20], 可以将超氧阴离子转换为过氧化氢 (H_2O_2), 避免 ROS 对机体的损害。因此, SOD 活性在一定程度上可以作为反映对虾应激状态和免疫水平的指标^[21]。本实验结果显示, 经过 72 h 的亚硝态氮胁迫, 斑节对虾肝胰腺中 SOD 活性先上升后下降, 暗示水体中的亚硝态氮作为一种环境胁迫因子, 诱导斑节对虾产生大量的 ROS, 为消除过量的 ROS, 机体产生更多的抗氧化酶^[22-23]。但是过高的胁迫浓度会造成抗氧化系统的不可逆损伤, 从而机体产生 SOD 等抗氧化酶活性降低。随着胁迫时间的延长, SOD 活性受到抑制, 这是斑节对虾的抗氧化体系遭到破坏 (导致细胞凋亡) 的结果^[24]。Cheng 等^[25]的研究表明, 亚硝态氮破坏拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 的抗氧化系统, 可能是通过诱导氧化应激、DNA 损伤和细胞凋亡来实现的。Guo 等^[26]将克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 暴露于 60 mg/L 亚硝态氮和 18 mg/L 硫化物 72 h 后, 发现动物肠道 SOD 活性在 6 h 时达到最高水平。本实验中斑节对虾肝胰腺 SOD 活性于 24 h 达到最大, 究其原因, 可能是选择的胁迫浓度与实验物种不同。此外, 实验的时间间隔选取相对较大, 所以得出的酶活最大时间只是大致时刻, 后续研究正基于此进一步细化。

以上步骤产生的 OH^\cdot 是最活泼的自由基, 几乎与体内的每一类有机物发生反应^[27]。CAT 和 GSH-Px 接力这一连锁反应, 过氧化物或 H_2O_2 被彻底分解为 H_2O 。GSH-Px 活性在胁迫过程中呈现先上升后下降的趋势 (24 h 出现峰值), 且同一时刻 GSH-Px 活性随胁迫浓度增加表现先上升后下降的发展趋势。由此我们推测 GSH-Px 仅在短期低浓度胁迫时发挥较好的自由基清除作用。CAT 与 GSH-Px 活性具有相同的变化趋势, 只是其达峰值的时间偏向于胁迫后段 (48 h)。胁迫组斑节对虾的 GSH-Px 和 CAT 在受到亚硝态氮胁迫后被显著诱导, 只是不同时间应对同一条件时的敏感度不同, 表明它们在抵抗环境压力时存在一定的协

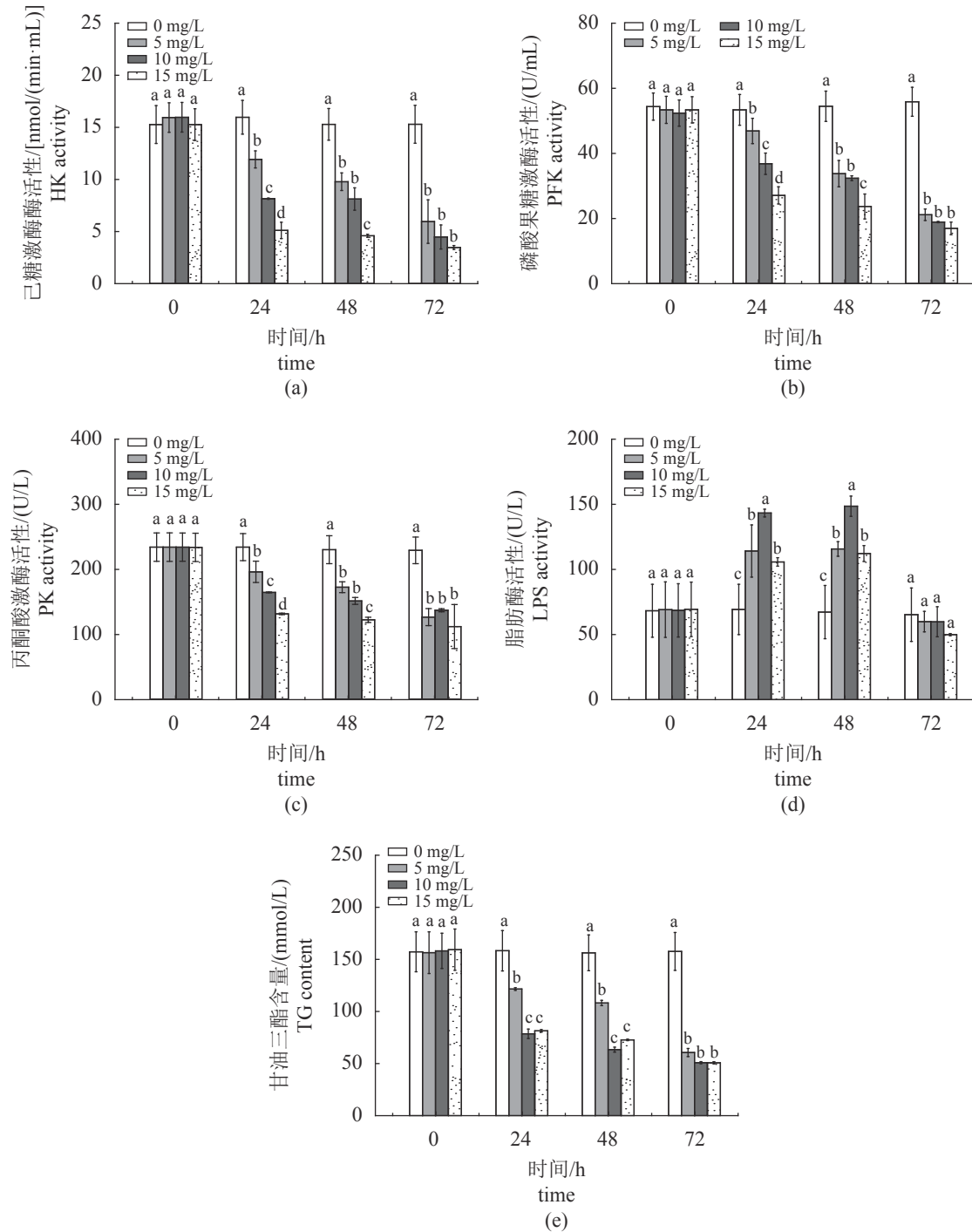


图 2 不同浓度亚硝态氮胁迫对能量代谢 (EMP 途径和脂肪代谢) 指标的影响

Fig. 2 Effects of nitrite stress at different concentrations on the indexes related to metabolism (EMP pathway and lipid metabolism)

同作用^[28-29]。Guo 等^[30]在基因水平上证明了这一结论, *GSH-Px* 的表达水平在 8 和 12 h 时升高, 而 *CAT* 的表达水平则在 24 和 48 h 升高, 不同的抗氧化酶发挥作用的时间可能不同, *GSH-Px* 可能在胁迫前期发挥作用, *CAT* 则在胁迫后期发挥作用。

ROS 使脂膜中的多不饱和脂肪酸发生氧化, 可加重组织细胞的损伤^[31]。MDA 作为脂质过氧化作用的产物, 其含量高低反映了 ROS 对组织细胞的攻击程度^[32]。亚硝态氮作为一种胁迫因子, 大量存在于水体会造成机体的活性氧爆发^[33]。过剩的 ROS 攻击对虾细胞膜的脂质, 引起肝胰腺中的

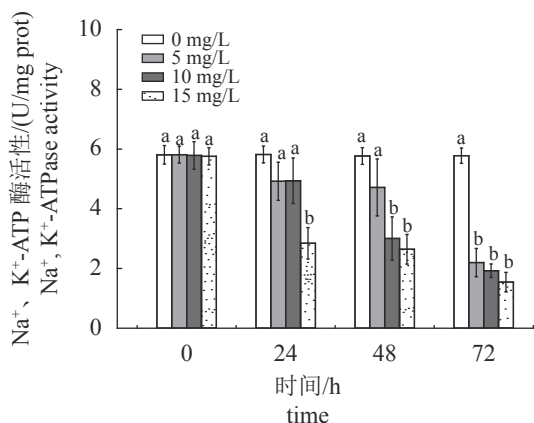


图3 不同浓度亚硝态氮胁迫对斑节对虾 Na⁺, K⁺-ATPase 活性的影响

Fig. 3 Effects of nitrite stress at different concentrations on the activity of Na⁺, K⁺-ATPase in *P. monodon*

MDA 含量上升^[34]。Guo 等^[26]曾报道经过短期的亚硝态氮和硫化物胁迫后, 虾肝胰腺和肠道中的氧化应激参数——MDA 浓度显著增加。随着斑节对虾体内的抗氧化系统受到激活, 过剩的脂质过氧化物得到及时清除, 至 24 h 时肝胰腺的 MDA 含量表现为下降趋势。机体通过提高 MDA 的清除能力可以应对一定浓度范围的亚硝态氮胁迫, 高浓度或长时间的胁迫却会造成组织缺氧从而破坏细胞, 使得机体的 MDA 清除能力降低。因此, 本实验随时间延长或随浓度升高, 胁迫组肝胰腺 MDA 含量呈现先下降后上升的趋势。

在动物体内, NOS 是机体氧化应激的重要指标。NOS 通过催化 L-精氨酸与 O₂ 结合生成 L-瓜氨酸和一氧化氮 (NO)^[35-36]。而 NO 作为第二信使分子, 与机体的免疫信号传导密切相关。NOS 的启动子上有多个 NF-κB 的接合元件^[37], NF-κB 作为 NOS 表达的主要信号通路, 多种细胞因子如氧化应激、LPS 等^[38-39]可以促进其激活。在本实验中, 前期各组的 NOS 活性迅速增加, 且随浓度升高呈现一定的增长梯度, 推测这是受到了以氧化应激为主多种因素在内的复合作用。NO 可以通过浓度依赖的方式调节 NOS 的表达: NO 少量存在时促进 NOS 表达, NO 大量存在时则抑制 NOS 表达^[40-41]。当实验后期 NO 积累到一定程度, 引起 NOS 的表达水平降低, 继而引发肝胰腺 NOS 活性下降。与 NOS 活性的变化趋势不一致, NO 含量在整个胁迫反应中始终增加, 对此比较合理的解释是 NOS 促进 NO 的产生, NOS 活性和 NO 含量的变化存在一定的时间延迟, 推测如果延长

胁迫时间, 胁迫组斑节对虾的 NO 含量将在某一时刻发生下降, 后续验证实验将在围绕这一推测展开。此外, NO 可以通过多种途径引起细胞凋亡, 结合以上抗氧化酶活性降低和 MDA 含量升高的描述, 72 h 的急性亚硝态氮胁迫可能已经导致斑节对虾的肝胰腺细胞发生凋亡。

3.2 亚硝态氮胁迫对斑节对虾能量代谢的影响

一般而言, 糖类是生物首选的供能物质, EMP 途径是糖类主要代谢通路之一。EMP 关键酶包括 HK、PFK 和 PK, 其活性可作为该通路活跃程度的衡量指标。在亚硝态氮胁迫条件下, 斑节对虾血清中的 HK、PFK 和 PK 活性减少, 且 3 种酶活随亚硝态氮浓度上升呈现显著下降趋势 ($P < 0.05$), 表明斑节对虾减少了对糖类的利用。当环境条件发生变化时, 水生动物对营养物质的利用具有不同的倾向性, 这取决于机体在应对不同压力条件下供能方式的转换。

脂肪酶在脂质代谢方面发挥重要作用, 其活性在一定程度上能够反映脂类代谢的情况。本研究数据显示, 斑节对虾血清中的 LPS 活性有所提升, 提示机体在应对亚硝态氮胁迫时加强了对脂质的分解利用。在一定范围内 LPS 活性随亚硝态氮浓度上升而升高, 超过这个范围 LPS 活性反而随胁迫浓度上升而降低, 这表明处于较低浓度的亚硝态氮胁迫时, 增强斑节对虾对脂质的吸收利用; 处于较高浓度的亚硝态氮胁迫时, 脂质的代谢吸收反而受到影响。根据胡静等^[42]的报道, 当尖吻鲈 (*Lates calcarifer*) 稚鱼经过中低浓度的亚硝态氮处理, LPS 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$); 而当个体经过高浓度的亚硝态氮胁迫, LPS 活性显著低于对照组 ($P < 0.05$), 这一实验现象与本实验结果相符。

作为血脂的重要组分, 甘油三酯能够分解成甘油和脂肪酸, 这个过程伴随着能量的释放^[43]。在亚硝态氮胁迫下, 本研究发现胁迫组斑节对虾血清中 TG 降低, 由此推断斑节对虾通过分解脂质提供能量。Li 等^[44]发现凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 在 92.4 或 138.6 mg/L 的亚硝态氮处理过程中, 在 48 至 96 h 期间, 亚硝态氮应激组中凡纳滨对虾的 TG 含量均高于对照组, 这与本实验的研究结果不符。究其原因, 主要是由于 2 个实验的亚硝态氮浓度设定与物种的差异性导致。据此推测, 当应对较低浓度的亚硝态氮, 斑

节对虾通过转换供能物质, 消耗代谢脂质; 较高浓度的亚硝态氮促使缺氧环境形成, 扰乱脂质氧化。当然, 本实验只分析了脂质代谢中脂肪代谢以及糖类代谢中的糖酵解途径, 并不能完全明确亚硝态氮胁迫条件下斑节对虾的能量代谢。下一步研究可从蛋白质代谢方面或脂质和糖类代谢的其他方面展开, 结合基因表达、改造以及沉默等技术, 从而获得应对亚硝态氮胁迫时能量代谢的更多信息。

3.3 亚硝态氮对斑节对虾渗透调节的影响

水生生物的鳃丝直接浸泡于水体, 这使得其成为亚硝态氮胁迫主要的受损器官之一^[45-46]。鳃丝作为对虾重要的渗透器官, Na^+ 、 K^+ -ATPase 是组织中重要的离子转运酶(钠钾泵)。细胞通过 Na^+ 、 K^+ -ATPase 将钠离子 (Na^+) 由细胞内泵出细胞外, 并将细胞外的钾离子 (K^+) 泵入细胞内。因此, 研究斑节对虾的 Na^+ 、 K^+ -ATPase 活性对于了解其鳃丝的渗透平衡具有重要意义^[47]。本实验中, 72 h 后斑节对虾鳃中 Na^+ 、 K^+ -ATPase 的活性明显下调, 表明亚硝态氮胁迫能干扰斑节对虾离子代谢。Jensen 等^[48] 认为 $\text{NO}_2\text{-N}$ 降低了机体的渗透调控能力, 导致 K^+ 和 Na^+ 浓度发生显著改变。根据胡贤德等^[49] 的研究表明, $\text{NO}_2\text{-N}$ 与 Cl^- 存在吸收路径上的竞争, 能够干扰 Na^+ 、 K^+ -ATPase 介导的 Na^+ 和 K^+ 的主动扩散, 使得 K^+ 产生反渗透现象, K^+ 又通过渗透压竞争引起 Na^+ 浓度的降低, 加剧了竞争现象。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 胡蝶, 刘丽燕, 郑丽明, 等. 金刚虾养殖现状及存在的问题分析[J]. 广东饲料, 2021, 30(1): 45-46.
Hu D, Liu L Y, Zheng L M, et al. Analysis of the status of *Penaeus monodon* farming and existing problems[J]. Guangdong Feed, 2021, 30(1): 45-46 (in Chinese).
- [2] 樊英, 王晓璐, 刘吉丹, 等. 盐度胁迫对非洲斑节对虾生理特征的影响[J]. 广西科学院学报, 2021, 37(2): 123-132.
Fan Y, Wang X L, Liu J D, et al. Effects of salinity stress on physiological characteristics of *Penaeus monodon*[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2021, 37(2): 123-132 (in Chinese).
- [3] 王晓璐, 李乐, 王友红, 等. 南非斑节对虾肠道组织结构及菌群特征、代谢活性研究[J]. 广西科学院学报, 2019, 35(4): 325-331.
Wang X L, Li L, Wang Y H, et al. Research on organization structure, micro-flora characteristics and metabolic activity of *Penaeus monodon*[J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2019, 35(4): 325-331 (in Chinese).
- [4] 汪家鑫, 张钊, 胡盼, 等. 亚硝酸氮对红鳍东方鲀的毒性效应[J]. 广东海洋大学学报, 2013, 33(6): 52-56.
Wang J X, Zhang Z, Hu P, et al. Effect of nitrite on hepatic antioxidant enzymes and acute toxicity in juvenile *Takifugu rubripe*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2013, 33(6): 52-56 (in Chinese).
- [5] 寇红岩, 洗健安, 郭慧, 等. 亚硝酸盐对虾类毒性影响的研究进展[J]. 海洋科学, 2014, 38(2): 107-115.
Kou H Y, Xian J A, Guo H, et al. Research progress of toxic effects of nitrite on shrimp[J]. Marine Sciences, 2014, 38(2): 107-115 (in Chinese).
- [6] Wang X D, Shen Z H, Wang C L, et al. Dietary supplementation of selenium yeast enhances the antioxidant capacity and immune response of juvenile *Eriocheir sinensis* under nitrite stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 87: 22-31.
- [7] Cheng S Y, Chen J C. Accumulation of nitrite in the tissues of *Penaeus monodon* exposed to elevated ambient nitrite after different time periods[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2000, 39(2): 183-192.
- [8] 李忠帅, 马甦, 单洪伟, 等. 亚硝态氮胁迫下凡纳滨对虾体内亚硝态氮的积累与能量代谢响应[J]. 水产学报, 2021, 45(11): 1825-1834.
Li Z S, Ma S, Shan H W, et al. Accumulation of nitrite and responses of energy metabolism exposed to nitrite stress in *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(11): 1825-1834 (in Chinese).
- [9] Jiang Q C, Dilixiati A, Zhang W Y, et al. Effect of nitrite exposure on metabolic response in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*[J]. Central European Journal of Biology, 2013, 9(1): 86-91.
- [10] 黄翔鹤, 李长玲, 郑莲, 等. 亚硝酸盐氮对凡纳滨对虾毒性和抗病相关因子影响[J]. 水生生物学报, 2006, 30(4): 466-471.
Huang X H, Li C L, Zheng L, et al. The toxicity of $\text{NO}_2\text{-N}$

- N on *Litopenaeus vannamei* and effects of NO₂-N on factors relating to the anti-disease ability[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(4): 466-471 (in Chinese).
- [11] Kieber R J, Seaton P J. Determination of subnanomolar concentrations of nitrite in natural waters[J]. *Analytical Chemistry*, 1995, 67(18): 3261-3264.
- [12] Tacon A G J, Cody J J, Conquest L D, *et al.* Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2002, 8(2): 121-137.
- [13] 孙苗苗, 黄建华, 杨其彬, 等. 13个斑节对虾家系的生长及抗氨氮特性比较[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(4): 510-516.
- Sun M M, Huang J H, Yang Q B, *et al.* Comparison on characteristics of growth and resistance to ammonia among 13 families of *Penaeus monodon*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, 20(4): 510-516 (in Chinese).
- [14] Tseng I T, Chen J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 17(4): 325-333.
- [15] 罗静波, 曹志华, 蔡太锐, 等. 氨氮对克氏原螯虾幼虾的急性毒性研究[J]. 长江大学学报(自科版), 2006, 3(4): 183-185.
- Luo J B, Cao Z H, Cai T R, *et al.* Acute toxic research of ammonia nitrogen on *Procambarus clarkii* juvenile[J]. *Journal of Yangtze University (Natural Science Edition)*, 2006, 3(4): 183-185 (in Chinese).
- [16] 钟君伟, 朱永安, 孟庆磊, 等. 氨氮对2种规格克氏原螯虾的急性毒性研究[J]. 长江大学学报(自科版), 2013, 10(23): 55-59.
- Zhong J W, Zhu Y A, Meng Q L, *et al.* Acute toxicity of ammonia-N to two specifications of *Procambarus clarkii* adult[J]. *Journal of Yangtze University (Natural Science Edition)*, 2013, 10(23): 55-59 (in Chinese).
- [17] 孙国铭, 汤建华, 仲霞铭. 氨氮和亚硝酸盐对南美白对虾的毒性研究[J]. *水产养殖*, 2002(1): 22-24.
- Sun G M, Tang J H, Zhong X M. Toxicity research of ammonia nitrogen and nitrite nitrogen to *Penaeus vannamei*[J]. *Journal of Aquaculture*, 2002(1): 22-24 (in Chinese).
- [18] 栗志民, 钱佳慧, 刘建勇, 等. 亚硝酸盐对墨吉明对虾的毒性及其免疫因子的影响[J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(21): 160-163.
- Su Z M, Qian J H, Liu J Y, *et al.* Effects of nitrite on the toxicity and immune parameters of *Fenneropenaeus merguensis*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(21): 160-163 (in Chinese).
- [19] 潘训彬, 张秀霞, 鲁耀鹏, 等. 氨氮和亚硝酸盐对红螯螯虾幼虾和亚成虾的急性毒力[J]. *生物安全学报*, 2017, 26(4): 316-322.
- Pan X B, Zhang X X, Lu Y P, *et al.* Acute toxicity of ammonia and nitrite on juvenile and subadult redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*)[J]. *Journal of Biosafety*, 2017, 26(4): 316-322 (in Chinese).
- [20] Ighodaro O M, Akinloye O A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid[J]. *Alexandria Journal of Medicine*, 2018, 54(4): 287-293.
- [21] 熊大林, 段亚飞, 王芸, 等. 氨氮胁迫对凡纳滨对虾肠道免疫相关指标的影响[J]. *海洋渔业*, 2020, 42(1): 53-60.
- Xiong D L, Duan Y F, Wang Y, *et al.* Response of non-specific immune related indexes in intestines of *Litopenaeus vannamei* under ammonia-N stress[J]. *Marine Fisheries*, 2020, 42(1): 53-60 (in Chinese).
- [22] 徐胜威, 杨程, 斯烈钢, 等. 亚硝酸盐对携带虾肝肠胞虫的凡纳滨对虾的影响分析[J]. 杭州师范大学学报(自科版), 2019, 18(5): 510-515, 528.
- Xu S W, Yang C, Si L G, *et al.* On the effect of nitrite on *Litopenaeus vannamei* carrying *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP)[J]. *Journal of Hangzhou Normal University (Natural Science Edition)*, 2019, 18(5): 510-515, 528 (in Chinese).
- [23] 洗健安, 张秀霞, 郭慧, 等. 亚硝酸盐胁迫对罗氏沼虾血细胞及其抗氧化酶活力的影响[J]. *生物安全学报*, 2016, 25(4): 300-307.
- Xian J A, Zhang X X, Guo H, *et al.* Effects of nitrite on haemocyte and antioxidant enzyme activity in *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Journal of Biosafety*, 2016, 25(4): 300-307 (in Chinese).
- [24] 于振兴, 任宪云, 邵慧鑫, 等. 低温胁迫对日本对虾抗氧化系统和细胞凋亡的影响[J]. *渔业科学进展*, 2022, 43(2): 157-166.
- Yu Z X, Ren X Y, Shao H X, *et al.* Effect of low temper-

- ature stress on antioxidant system and apoptosis of *Mar-supenaesus japonicus* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(2): 157-166. (in Chinese).
- [25] Cheng C H, Su Y L, Ma H L, *et al.* Effect of nitrite exposure on oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. *Chemosphere*, 2020, 239: 124668.
- [26] Guo K, Ruan G L, Fan W H, *et al.* The effect of nitrite and sulfide on the antioxidant capacity and microbial composition of the intestines of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 96: 290-296.
- [27] 贾旭颖, 国先涛, 王芳, 等. 非离子氨胁迫对淡水和海水养殖凡纳滨对虾呼吸代谢酶活力影响的比较[J]. *水产学报*, 2014, 38(11): 1837-1846.
- Jia X Y, Guo X T, Wang F, *et al.* Comparison of the effect of nonionic ammonia stress on respiratory metabolic enzyme of *Litopenaeus vannamei* in seawater and freshwater[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(11): 1837-1846 (in Chinese).
- [28] Wang W N, Zhou J, Wang P, *et al.* Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2009, 150(4): 428-435.
- [29] 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.
- [30] Guo H, Xian J A, Li B, *et al.* Gene expression of apoptosis-related genes, stress protein and antioxidant enzymes in hemocytes of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under nitrite stress[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2013, 157(4): 366-371.
- [31] 刘莎, 黄小丽, 李良玉, 等. 氨氮、亚硝酸盐胁迫对小龙虾的影响[J]. *水产养殖*, 2021, 42(1): 56-57.
- Liu S, Huang X L, Li L Y, *et al.* Effects of ammonia nitrogen and nitrite stress on crayfish[J]. *Journal of Aquaculture*, 2021, 42(1): 56-57 (in Chinese).
- [32] 刘晓华, 曹俊明, 杨大伟, 等. 氨氮胁迫前后凡纳滨对虾组织中抗氧化酶和脂质过氧化产物的分布[J]. *水利渔业*, 2007, 27(6): 24-26.
- Liu X H, Cao J M, Yang D W, *et al.* Distribution of anti-oxidation enzyme and lipid peroxidation in the tissues of *Litopenaeus vannamei* before and after ammonia stress[J]. *Reservoir Fisheries*, 2007, 27(6): 24-26 (in Chinese).
- [33] 余苗苗, 江敏, 吴昊, 等. 亚硝酸盐和氨对日本沼虾肝胰腺代谢的影响[J]. *生态毒理学报*, 2019, 14(3): 99-111.
- Yu M M, Jiang M, Wu H, *et al.* Effects of nitrite and ammonia on the hepatopancreas metabolism of *Macrobrachium nipponensis*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2019, 14(3): 99-111 (in Chinese).
- [34] 郭慧, 谭翠婷, 游林玉, 等. 亚硝酸盐胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化酶、热休克蛋白和组织蛋白酶B基因表达量的影响[J]. *广东海洋大学学报*, 2017, 37(3): 117-122.
- Guo H, Tan C T, You L Y, *et al.* Effects of nitrite stress on gene expression of antioxidant enzymes, heat shock protein and cathepsin B in hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2017, 37(3): 117-122 (in Chinese).
- [35] 朱孟凯. 凡纳滨对虾 NOS 及相关因子的研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2015.
- Zhu M K. The study on the NOS and related factors of shrimp *Litopenaeus vannamei* [D]. Xiamen: JiMei University, 2015(in Chinese).
- [36] Chen T, Wong N K, Jiang X, *et al.* Nitric oxide as an antimicrobial molecule against *Vibrio harveyi* infection in the hepatopancreas of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 42(1): 114-120.
- [37] Taylor B S, De Vera M E, Ganster R W, *et al.* Multiple NF- κ B enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(24): 15148-15156.
- [38] Kolyada A Y, Madias N F. Transcriptional regulation of the human *iNOS* gene by IL-1 β in endothelial cells[J]. *Molecular Medicine*, 2001, 7(5): 329-343.
- [39] Kristof A S, Marks-Konczalik J, Moss J. Mitogen-activated protein kinases mediate activator protein-1-dependent human inducible nitric-oxide synthase promoter activation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(11): 8445-8452.

- [40] Sheffler L A, Wink D A, Melillo G, *et al.* Exogenous nitric oxide regulates IFN-gamma plus lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in mouse macrophages[J]. *Journal of Immunology*, 1995, 155(2): 886-894.
- [41] 肖杰. 凡纳滨对虾氨氮和亚硝酸氮应激和耐受机制的初步研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
Xiao J. Stress responses and tolerance mechanisms of ammonia and nitrite in *Litopenaeus vannamei* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020(in Chinese).
- [42] 胡静, 周胜杰, 杨蕊, 等. 亚硝酸盐胁迫对尖吻鲈稚鱼消化酶活性的影响[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2020, 41(1): 31-38.
Hu J, Zhou S J, Yang R, *et al.* Effect of acute nitrite on digestive enzymes in juvenile *Lates calcarifer*[J]. *Journal of Jinan University (Natural Science & Medicine Edition)*, 2020, 41(1): 31-38 (in Chinese).
- [43] Racotta I S, Hernández-Herrera R. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2000, 125(4): 437-443.
- [44] Li Z S, Ma S, Shan H W, *et al.* Responses of hemocyanin and energy metabolism to acute nitrite stress in juveniles of the shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Eco-toxicology and Environmental Safety*, 2019, 186: 109753.
- [45] 曹伏君, 陈思, 梁华芳, 等. 氨氮和亚硝酸盐对龙虎斑的急性毒性研究[J]. 水产科技情报, 2018, 45(5): 259-262.
- Cao F J, Chen S, Liang H F, *et al.* Acute toxicity of ammonia and nitrite nitrogen on grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀)[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2018, 45(5): 259-262 (in Chinese).
- [46] 李忠帅, 马甦, 单洪伟, 等. 亚硝态氮胁迫下凡纳滨对虾体内亚硝态氮的积累与能量代谢响应 [J]. 水产学报, 2021, 45(11): 1825-1834.
Li Z S, Ma S, Shan H W, *et al.* Accumulation of nitrite and responses of energy metabolism exposed to nitrite stress in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Fisheries of China*: 2021, 45(11): 1825-1834(in Chinese).
- [47] 潘鲁青, 栾治华. 盐度对日本囊对虾仔虾生长发育和 Na⁺、K⁺-ATPase活力的影响[J]. *水生生物学报*, 2005, 29(6): 699-703.
Pan L Q, Luan Z H. The effects of salinity on development and Na⁺-K⁺-ATPase activity of *Marsupenaeus japonicus* postlarvae[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29(6): 699-703 (in Chinese).
- [48] Jensen F B, Andersen N A, Heisler N. Effects of nitrite exposure on blood respiratory properties, acid-base and electrolyte regulation in the carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 1987, 157(5): 533-541.
- [49] 胡贤德, 孙成波, 王平, 等. 不同盐度条件下亚硝酸氮对斑节对虾的毒性影响[J]. *沈阳农业大学学报*, 2009, 40(1): 103-106.
Hu X D, Sun C B, Wang P, *et al.* Toxicity of nitrite nitrogen to *Penaeus monodon* under the different salinities conditions[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2009, 40(1): 103-106 (in Chinese).

Effects of acute nitrite stress on oxidative stress, energy metabolism and osmotic regulation of *Penaeus monodon*

LIU Jidan¹, LIU Hongjun^{2*}, FAN Ying^{2*}, TANG Xuexi¹, WANG Xiaolu²,
WANG Youhong², GAI Chunlei², YE Haibin²

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266100, China;

2. Shandong Key Laboratory of Disease Control in Mariculture, National Oceanographic Center, Qingdao, Marine Science Research Institute of Shandong Province, Qingdao 266104, China)

Abstract: *Penaeus monodon* (African group) accommodates industrial aquaculture and has promising market prospects. But the deterioration of water quality causes frequent occurrence of diseases. Nitrite is a common pollutant, and the experiment was conducted to observe its effect on oxidative stress, energy metabolism and osmotic regulation. Four gradients of nitrite concentrations (0.1, 5, 10 and 15 mg/L) were set for 4 groups, and three parallels were set for each group. After the acute stress experiment for 72 hours, enzyme activities or substance content were assayed. ① As for oxidative stress factors in gill, activities of SOD, GSH-Px, CAT and NOS increased initially and decreased subsequently. At 24 h, the activities of SOD, GSH-Px and NOS reached maximum. The activities of SOD and GSH-Px in the 10 mg/L group and NOS activity in 15 mg/L group were significantly higher than other groups. On the contrary, MDA content in stress groups was the lowest at 24 h, and the 10 mg/L group was significantly lower than other groups. At 48 h, CAT activity reached the maximum, and the CAT activity of 10 mg/L group was significantly higher than other groups. At 72 h, the NO content reached maximum, and 15 mg/L group was significantly higher than other groups. ② The indicator of serum energy metabolism, LPS, increased at first and decreased then. The activities of HK, PFK, PK or TG content, decreased obviously during stress process. At 48 h, LPS activity reached maximum, and 10 mg/L group was significantly higher than other groups. At 72 h, the activities of HK, PFK, PK and TG content reached minimum, 15 mg/L group were significantly lower than those of other groups. ③ The gill osmotic regulation parameters, Na⁺, K⁺-ATPase, decreased during whole process. At 72 h, the Na⁺, K⁺-ATPase activity reached the minimum, and the 15 mg/L stress group was significantly lower than other groups. Results showed that *P. monodon* could improve antioxidant capacity, enhance lipid absorption and utilization, and disturb osmotic balance when exposed to acute nitrite stress. But only within certain concentration or time limits can it come into play. The result will provide data support for the further exploration of molecular mechanisms and also provide theory support for healthy prawn farming.

Key words: *Penaeus monodon* (African group); nitrite; antioxidant stress; energy metabolism; osmotic regulation

Corresponding authors: LIU Hongjun. E-mail: hongjunl@126.com;

FAN Ying. E-mail: fy_fy123@126.com

Funding projects: 2018 Shandong Agricultural Application Technology and Innovation Project; Shrimp and Crab Research System of Shandong Province (SDAIT-13); Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-48); Breeding of Breakthrough New Prawn Varieties with High Quality and Resistance (2019LZGC014)