

DOI: 10.11964/jfc.20211113140

低氧胁迫对瘤背石磺能量代谢、氧化应激和免疫功能的影响

张小明^{1,2,3}, 土志涵^{1,2,3}, 肖海明^{1,2,3}, 饶榕城^{1,2,3}, 陈锡林^{1,2,3},
钱畅^{1,2,3}, 沈和定^{1,2,3*}

1. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学, 海洋动物系统分类与进化上海高校重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学, 上海市水产动物良种创制与绿色养殖协同创新中心, 上海 201306

摘要:

【目的】探究低氧胁迫对瘤背石磺能量代谢、氧化应激和免疫功能的影响。

【方法】本实验在低氧条件[DO为(2.0±0.2) mg/L]下分别测定了0、4、8、12和24 h时血清和肝胰腺生化指标的变化及肝胰腺相关基因的表达情况。

【结果】在能量代谢指标中, 血清血糖、肝糖原、血清和肝胰腺乳酸含量随着低氧胁迫时间的推移均显著上升。在抗氧化指标中, 过氧化氢酶(CAT)活性和还原型谷胱甘肽(GSH)含量呈先上升后下降趋势, 均在8 h时达到最大值, 显著高于对照组; 丙二醛(MDA)含量随着低氧胁迫时间的推移呈上升趋势, 显著高于对照组。在免疫指标中, 谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)呈波动上升趋势, 均显著高于对照组, 从8 h开始血清ALT和AST开始高于肝胰腺。低氧胁迫下, 瘤背石磺肝胰腺糖原磷酸化酶(GP)mRNA表达量显著上升; 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)mRNA和热休克蛋白70(Hsp70)mRNA表达量呈先上升后下降趋势, 均在8 h时达到最大值, 与对照组相比差异显著。

【结论】瘤背石磺为适应低氧环境主要进行无氧代谢, 而且低氧胁迫影响机体的抗氧化能力和免疫功能。

关键词: 瘤背石磺; 低氧胁迫; 能量代谢; 氧化应激; 免疫

第一作者: 张小明, 从事贝类生理生态学研究, E-mail: 17863202797@163.com



通信作者: 沈和定, 从事海洋贝类系统进化研究, E-mail: hdshen@shou.edu.cn

资助项目: 上海市协同创新中心任务团队项目(A1-3605-21-000202)

收稿日期: 2021-11-05

修回日期: 2021-11-29

文章编号:

1000-0615(2025)06-069108-12

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

作者声明本文无利益冲突

©《水产学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)
Copyright © Editorial Office of Journal of Fisheries of China (CC BY-NC-ND 4.0)

氧气是水生生物赖以生存的重要环境因子。水体中溶解氧含量低于2.0 mg/L时, 水生生物会处于低氧状态^[1]。Ito等^[2]对世界范围内沿海区溶解氧进行监测, 发现低溶解氧的区块数量不断增加, 且水体溶解氧含量呈下降趋势。在低氧环境下, 水生生物为了维持机体的正常生理功能, 通常会启动无氧代谢为机体提供能量, 降低代谢率, 减少能量消耗^[3-4]。同时, 低氧环境易诱导水生生物产生氧化应激, 在氧化代谢过程中产生的活性氧(ROS)会破坏细胞结构, 影响机体的生理功能^[5-6]。机体可通过调节抗氧化系统降低氧化应激损伤。当环境压力超出机体自身的调节能力时, 机体非特异性免疫防御系统就会受到影响, 导致免疫力下降^[7-8]。此外, 低氧会导致机体的存活率降低, 影响机



体生长发育。在长牡蛎 (*Crassostrea gigas*)^[9]、栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)^[10]、军曹鱼 (*Rachycentron canadum*)^[11] 等水生动物中均有所报道。

瘤背石磺 (*Onchidium reevesii*) 是一种生活在潮间带的两栖性海洋贝类, 主要分布在我国沿海的潮上带滩涂, 其矿物质元素和脂溶性维生素含量丰富, 具有较高的药用和食用价值^[12]。瘤背石磺受潮汐的影响, 极易受到低氧威胁。为了适应这种特殊的生存环境, 瘤背石磺逐渐进化出“肺囊”作为摄取氧气的器官^[13]。实验室在前期的研究中发现, 溶解氧含量为 (2.0 ± 0.2) mg/L 时低氧信号通路相关基因 (*hif-1 α* 和 *glut-1*)、糖酵解相关基因 (*hk* 和 *pk*) 的表达均有不同程度的上调。但目前关于低氧胁迫对瘤背石磺生理生化 and 免疫方面的研究相对匮乏。因此, 本实验以瘤背石磺为研究对象, 开展低氧胁迫对瘤背石磺血清和肝胰腺能量代谢、抗氧化和免疫功能的研究, 为探究低氧胁迫下潮间带动物的生理和免疫机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

瘤背石磺采集于上海市崇明岛的潮上带滩涂。将采集到的瘤背石磺运回实验室后放置于塑料箱(长 80 cm, 宽 58 cm, 高 45 cm)中暂养 1 周。暂养期间, 每天定期投喂并清理排泄物, 喷洒适量海水保持箱体内湿度。实验过程中操作人员严格遵守动物伦理规范, 并按照相关规章制度执行。

1.2 样品采集

实验根据低氧胁迫时间设计 5 个组: 0 (对照组)、4、8、12 和 24 h 低氧胁迫组, 每组 9 个生物学重复。挑选健康活泼、大小均一的瘤背石磺共 45 只 [体重 (14.65 ± 0.63) g], 随机放入 5 个大小相同的集气瓶 (2 L) 中。低氧胁迫组的水体溶解氧含量为 $[(2.0 \pm 0.2)$ mg/L]。将 5 个集气瓶中各装入 2/3 体积的海水, 向水体中持续通入氮气, 使用溶氧仪实时测定水体溶解氧含量。当溶解氧含量达 (2.0 ± 0.2) mg/L 时停止通气, 立即将用干净纱布包裹的瘤背石磺放入集气瓶, 用保鲜膜封住瓶口。在实验过程中间隔 1 h 使用溶氧仪检测水体溶解氧含量, 维持溶解氧含量在 (2.0 ± 0.2) mg/L 水平。在低氧胁迫过程中, 分别

于 0、4、8、12 和 24 h 时采集样品, 每次从集气瓶中取出 9 只。使用一次性无菌注射器在瘤背石磺腹部抽取 1 mL 血淋巴于离心管中, 随后使用无菌器械进解剖取肝胰腺于离心管中。所有样品立即放入液氮速冻后转至 -80°C 冰箱保存备用。

1.3 测定指标与方法

生化指标的测定 取 0.1 g 肝胰腺组织加入 1 mL 提取液, 冰浴条件下机械匀浆, $8\,000 \times g$ 4°C 离心 10 min, 取上清液置于冰上待测。取 500 μL 血淋巴样品, $1\,800\text{ r/min}$ 4°C 离心 10 min, 取上清液置于冰上待测。

总蛋白含量的测定根据 BCA 法微量蛋白质浓度测定试剂盒说明书进行操作 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司], 使用酶标仪 (Synergy 2, 美国) 测定吸光度; 血糖、肝糖原、乳酸、过氧化氢酶 (CAT)、丙二醛 (MDA) 采用比色法, 根据试剂盒说明书进行操作 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司], 使用分光光度计测定吸光度; 还原型谷胱甘肽 (GSH)、谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) (南京建成生物工程研究所) 采用酶标法, 根据试剂盒说明书进行操作, 通过酶标仪测定吸光度。

RNA 提取和 cDNA 合成 采用 TRIzol 法提取肝胰腺总 RNA。经琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的质量, 使用 NanoDrop 2000 检测其浓度。选择 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值为 1.8~2.0, 凝胶电泳条带单一、清晰的样本为模板, 置于 -80°C 保存备用。使用 Primer Script RT 试剂盒合成 cDNA, 置于 -20°C 保存备用。

实时荧光定量 PCR 在本实验室已有的瘤背石磺转录组数据库中获得糖原磷酸化酶 (GP)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和热休克蛋白 70 (Hsp70) 基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 (表 1)。采用 SYBR premix Ex

表 1 实验所用的引物序列

Tab. 1 Sequences of primers used in this study		
引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence(5'-3')	用途 application
β -actin	F: GTCCACCGCAAGTGCTTCT R: CGGTCGTGGTTGTTTCATT	实时荧光定量
GP	F: GTTGCTCTCTGTGCTGATTTC R: GTTTGCTCTCTGTGCTGATTTC	实时荧光定量
GSH-Px	F: GTCGATCCTGTGACAATAGTTAGG R: GTCTAGGTCTGCTGGTTTCATC	实时荧光定量
Hsp70	F: GTTACTACAGCTCACTCCCTTG R: GGCGCTCAGCTAGAAAGAATA	实时荧光定量

Taq TM II 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 进行实时荧光定量 PCR (RT-PCR)。实验反应体系为 20 μ L: Premix Ex *Taq* TM (2 $\times$) 10 μ L、ddH₂O 7.2 μ L、上下游引物 (10 mol/L) 各 0.4 μ L、cDNA 模板 2 μ L。

1.4 数据分析

所有数据用平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, 用 SPSS 26.0 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 Duncan 氏多重比较进行差异显著性检验, $P < 0.05$ 表示具有显著差异。

使用 GraphPad Prism 8 软件进行作图。

2 结果

2.1 低氧胁迫对瘤背石鲷能量代谢的影响

在低氧胁迫过程中, 血清血糖含量呈上升趋势, 在 24 h 时达到最大值, 与对照组 0 h 相比差异显著 ($P < 0.05$); 在 8 h 时血糖含量最低, 但仍显著高于对照组 (图 1-a)。肝糖原含量呈先下降后上升再逐渐下降的变化趋势, 在 8 h 时

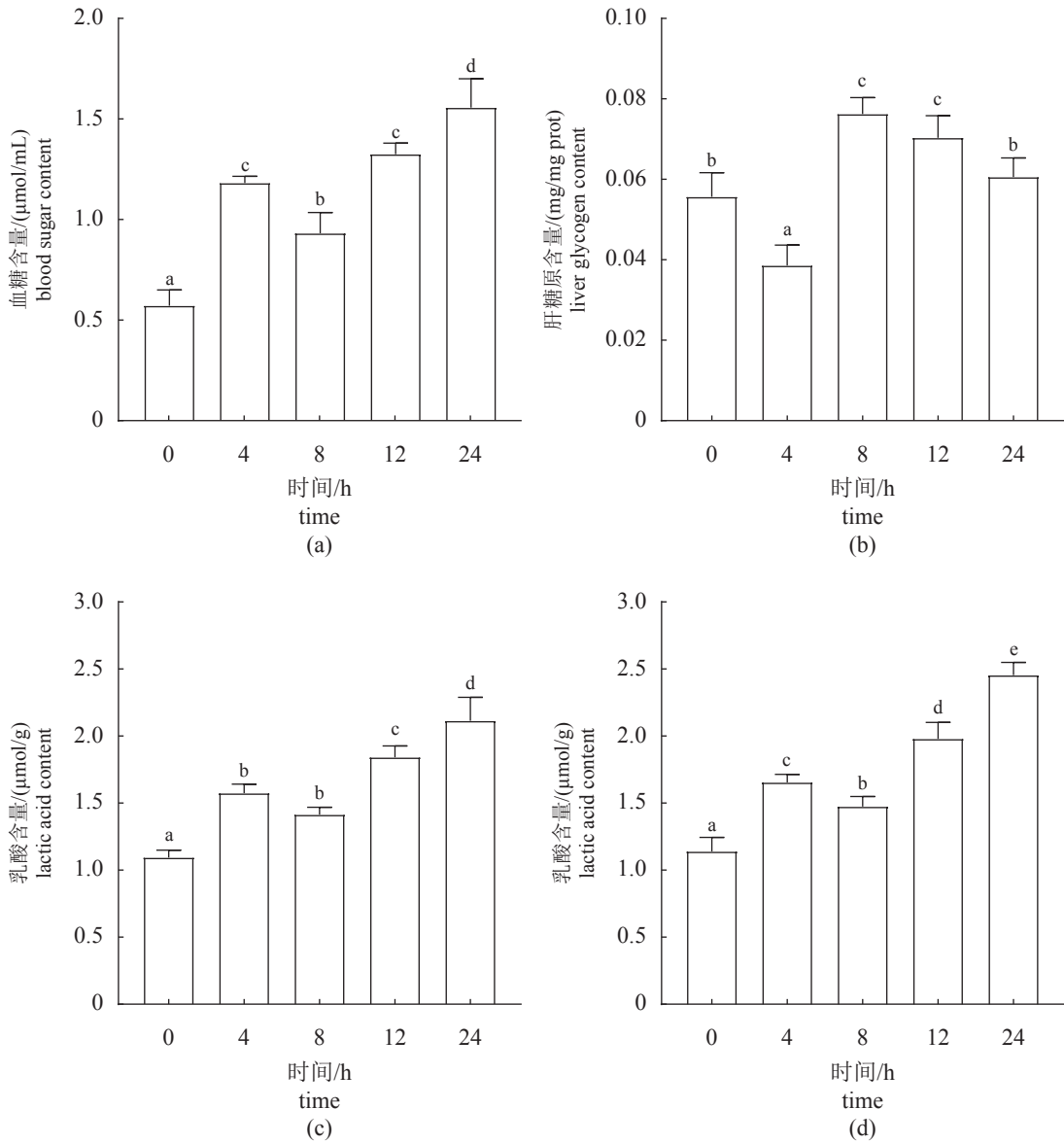


图 1 低氧胁迫对瘤背石鲷能量代谢的影响

(a) (c) 血清, (b) (d) 肝胰腺; 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

Fig. 1 Effects of hypoxic stress on energy metabolism of *O. reevesii*

(a) (c) serum, (b) (d) hepatopancreas; different letters indicate significant differences ($P < 0.05$), the same below.

达到最大值, 与对照组相比差异显著 ($P<0.05$), 在 4 h 时最低并显著低于对照组 ($P<0.05$) (图 1-b)。血清和肝胰腺中乳酸含量均呈上升趋势, 在 24 h 时达到最大值, 其中低氧胁迫组与对照组相比差异显著 ($P<0.05$) (图 1-c~d)。

2.2 低氧胁迫对瘤背石磺血清和肝胰腺抗氧化能力的影响

瘤背石磺在低氧胁迫过程中, 血清和肝胰腺 CAT 活性和 GSH 含量均呈先上升后下降的变化趋势, 在 8 h 时达到最大值, 与对照组相比差异显著 ($P<0.05$) (图 2-a~d)。与对照组相比, 血清和肝胰腺 MDA 含量呈上升趋势, 在 24 h 时达到峰值 ($P<0.05$) (图 2-e~f)。

2.3 低氧胁迫对瘤背石磺血清和肝胰腺免疫酶活性的影响

瘤背石磺在低氧胁迫过程中, 血清和肝胰腺 ALT 在 8 h 时达到最大值, 与对照组相比差异显著 ($P<0.05$)。血清 ALT 在 8 h (375 U/g prot)、12 h (271 U/g prot)、24 h (333 U/g prot) 时的活性高于肝胰腺 ALT 在 8 h (318 U/g prot)、12 h (225 U/g prot) 和 24 h (266 U/g prot) 时的活性 (图 3-a, b)。血清和肝胰腺 AST 活性在 24 h 时达到最大值, 与对照组相比差异显著 ($P<0.05$)。血清 AST 在 8 h (3.97 U/g prot)、12 h (2.65 U/g prot)、24 h (4.74 U/g prot) 时的活性高于肝胰腺 AST 在 8 h (3.44 U/g prot)、12 h (2.07 U/g prot) 和 24 h (4.16 U/g prot) 时的活性 (图 3-c, d)。

2.4 低氧胁迫对瘤背石磺肝胰腺 GP、GSH-Px 和 Hsp70 基因表达的影响

低氧胁迫期间, 瘤背石磺肝胰腺 GP mRNA 表达量呈上升趋势, 24 h 时达到最大值, 显著高于对照组 ($P<0.05$) (图 4-a)。GSH-Px 和 Hsp70 mRNA 表达量呈先上升后下降趋势, 在 8 h 时达到最大值, 与对照组相比差异显著 ($P<0.05$) (图 4-b, c)。

3 讨论

3.1 低氧胁迫对瘤背石磺能量代谢的影响

在低氧环境下, 水生生物的有氧代谢途径会受到抑制, 为了保证正常的生理过程, 机体启动无氧代谢途径提供能量需求^[14]。无氧代谢

分解葡萄糖的重要途径是糖酵解代谢。而糖酵解代谢是需氧生物适应低氧环境的重要生理机制^[15]。乳酸作为糖酵解代谢的终产物之一, 是评估水生生物低氧耐受性的重要指标。糖原作为储能物质存在于肝脏和肌肉中, 对维持血糖相对平衡十分重要。军曹鱼在低氧条件下为了满足机体自身的能量需求会对肝糖原进行分解, 导致血糖含量显著上升^[11]。大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 在低氧环境中主要进行无氧代谢, 表现为肝糖原含量下降, 血乳酸增加^[16]。凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 在低氧胁迫下血糖含量显著上升, 并通过糖酵解代谢生成大量乳酸^[17]。有研究发现, 低氧胁迫会导致栉孔扇贝死亡, 推测其死亡的重要原因是乳酸的大量堆积造成^[10]。本实验发现, 与对照组相比, 血清血糖、肝糖原与血清和肝胰腺乳酸呈上升趋势, 说明低氧胁迫促进肝糖原分解, 导致血糖升高, 而维持血糖平衡则为糖酵解提供反应产物。乳酸含量升高表明需要糖酵解代谢满足机体能量需求。在实验过程中, 瘤背石磺在 24 h 时出现了死亡现象, 这可能与乳酸大量积累有关, 具体原因需要进一步探究。

3.2 低氧胁迫对瘤背石磺氧化应激的影响

活性氧 (ROS) 是氧分子正常代谢的天然副产物, 其产生于 O_2 在线粒体电子传递链的还原过程, 部分 O_2 被还原形成 O_2^- 或 H_2O_2 ^[18]。当环境胁迫强度超过机体的承受能力时, ROS 的产生与清除即会失去平衡, 导致 ROS 大量积累。ROS 会严重破坏细胞结构, 造成组织损伤, 进而影响机体的免疫功能^[19-20]。为了降低 ROS 对机体的伤害, 水生动物在进化过程中形成了一套抗氧化防御系统, 包括抗氧化酶 (CAT 等) 和非酶性抗氧化剂 (GSH 等)^[21]。其中抗氧化酶是无脊椎动物非特异性免疫的重要组成部分, 在增强机体免疫功能方面起重要作用^[22-23]。CAT 和 GSH 可以清除细胞内的过氧化物和自由基, 对于维持细胞稳态发挥重要作用^[23-25]。ROS 作用于生物膜中的不饱和脂肪酸会生成过氧化脂质产物 MDA, 其含量可以反映机体脂质过氧化的程度, 间接反映细胞的损伤程度^[19, 26-27]。

低氧诱导的氧化应激是无脊椎动物的普遍反应^[28]。研究表明, 在低氧胁迫过程中, 中国

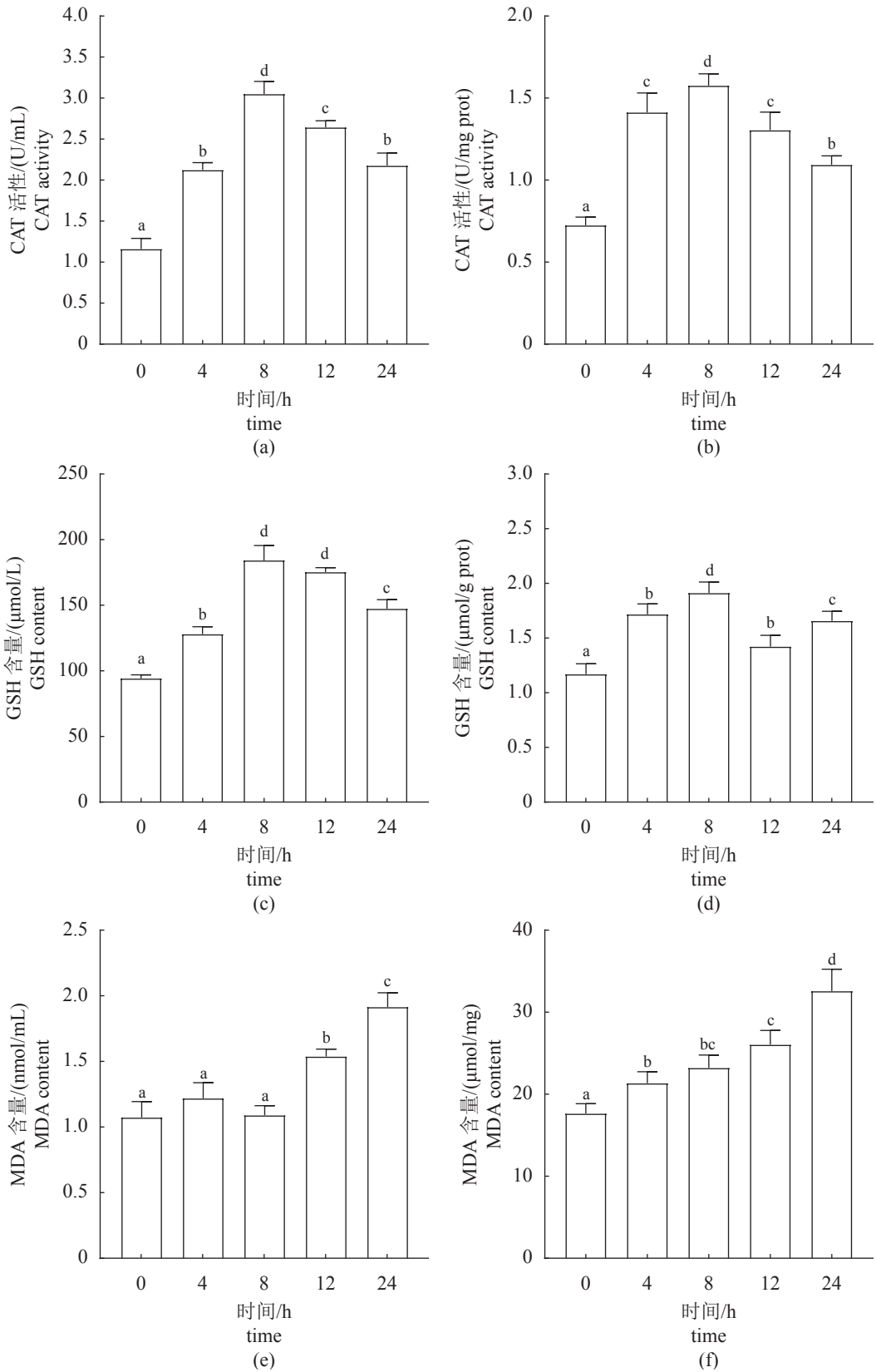


图 2 低氧胁迫对瘤背石磺抗氧化能力的影响

(a) (c) (e) 血清, (b) (d) (f) 肝胰腺。

Fig. 2 Effects of hypoxic stress on antioxidant capacity in *O. reevesii*

(a) (c) (e) serum, (b) (d) (f) hepatopancreas.

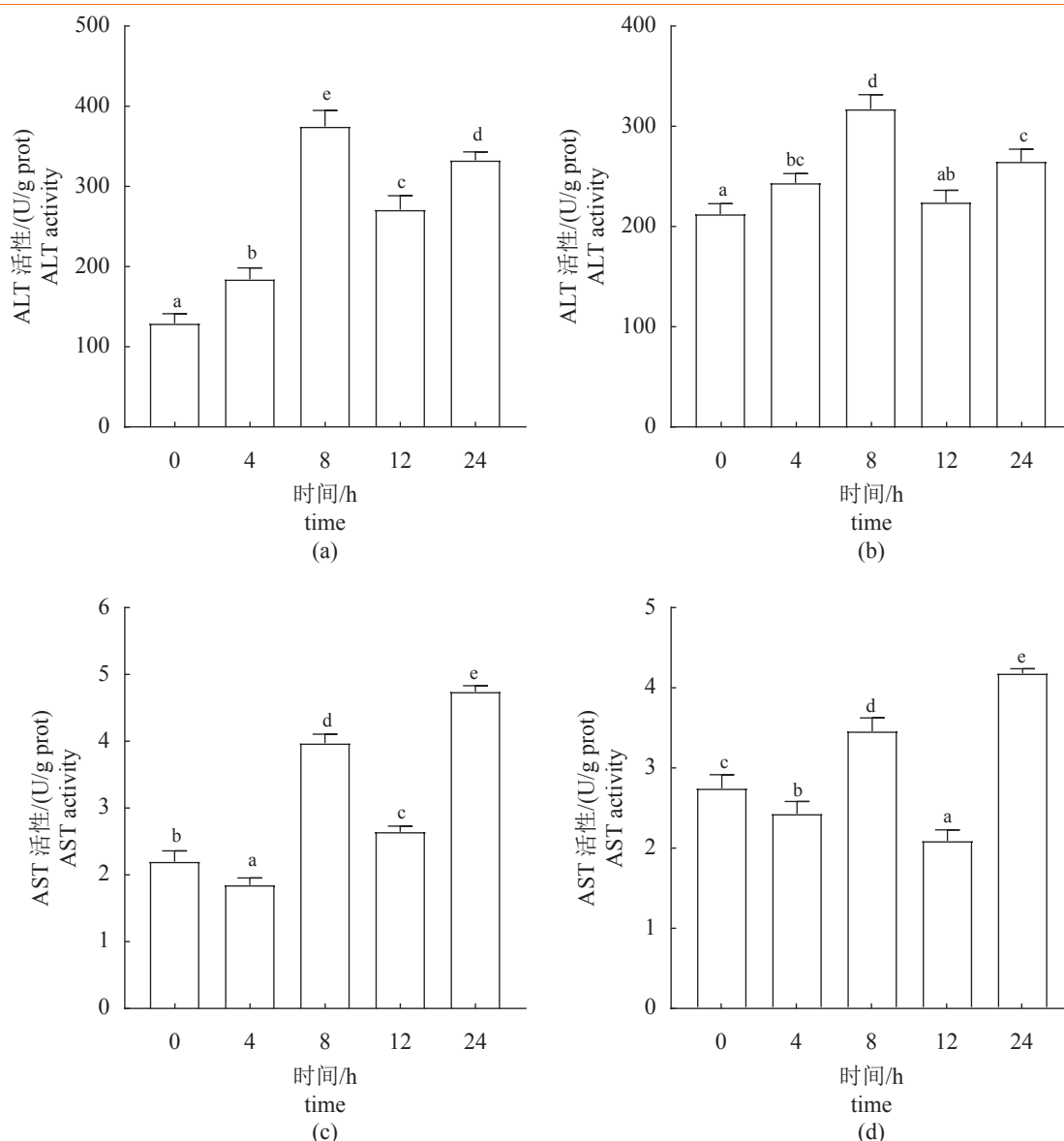


图3 低氧胁迫对瘤背石磺免疫酶活性的影响

(a) (b) 血清, (c) (d) 肝胰腺。

Fig. 3 Effects of hypoxic stress on immune enzyme activity in *O. reevesii*

(a) (b) serum, (c) (d) hepatopancreas.

花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 肝脏的抗氧化酶活性显著上升^[29]。日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 肝脏的总抗氧化能力在低氧胁迫后出现显著上升^[30]。同时, 也有研究表明随着低氧胁迫时间的推移会出现抗氧化酶活性和抗氧化剂含量下降的变化趋势。在对皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai*) CAT 活性的研究中发现, 低氧处理 2 h 后其 CAT 基因表达量出现下降的变化趋势, 说明低氧刺激对抗氧化基因表达具有抑制作用^[31]。鳊 (*Siniperca chuatsi*) 在受到低氧胁迫后, 其肝脏 CAT 活性和 GSH 含量均呈先

上升后下降的变化趋势, 表明低氧使鳊产生了氧化应激, 机体产生的大量 ROS 触发了抗氧化系统, 并使其发挥作用对 ROS 进行清除。但胁迫后期鳊体内过量的 ROS 超出了机体抗氧化系统的清除能力, 从而导致抗氧化酶活性和抗氧化剂含量降低^[32]。MDA 含量越高, 代表机体所承受的氧化应激压力越大。在溶解氧含量为 (1.85 ± 0.11) mg/L 的低氧条件下, 军曹鱼幼鱼肝脏中 MDA 含量显著升高, 说明随着低氧胁迫时间的延长, 机体受到了持续的氧化损伤^[33]。在对淇河鲫 (*Carassius auratus*) 的研究中发现,

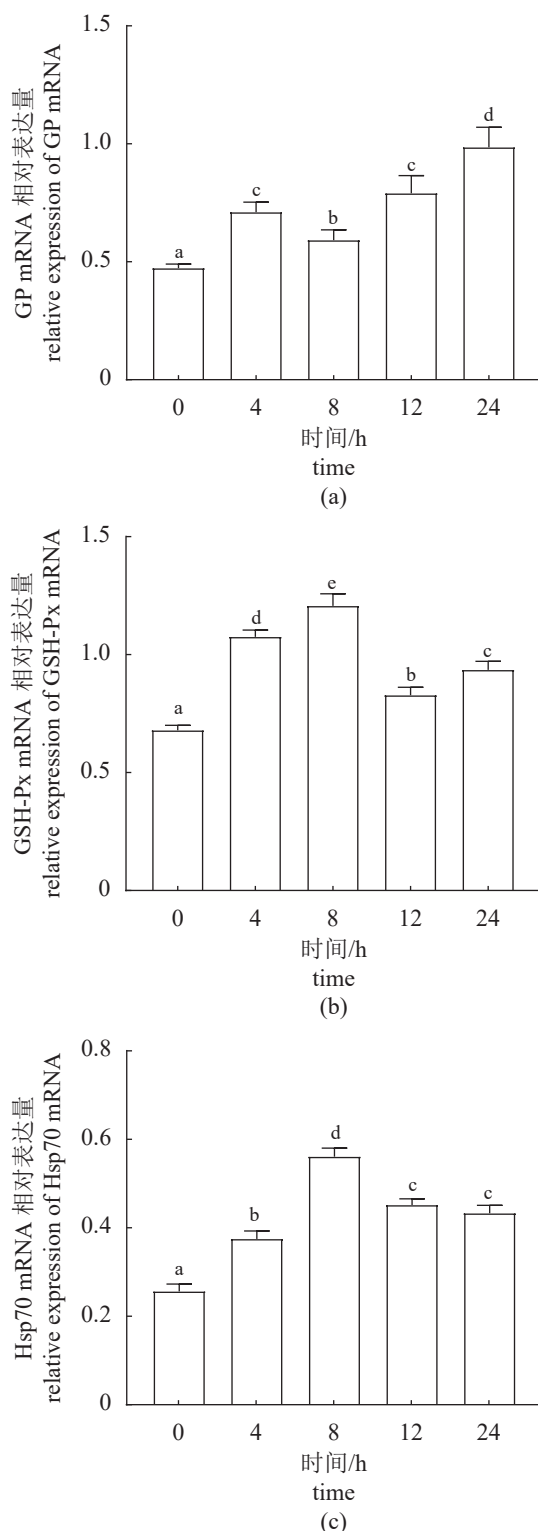


图4 低氧胁迫对瘤背石磺肝胰腺 GP、GSH-Px 和 Hsp70 基因表达的影响

Fig. 4 Effects of hypoxic stress on gene expression of GP, GSH-Px and Hsp70 in *O. reevesii*

肌肉和鳃中的 MDA 含量在低氧胁迫期间显著上升, 说明机体承受着巨大的应激压力, 过量

的 ROS 导致机体脂质过氧化程度升高^[34], 这与赵燕静等^[35]对低氧胁迫下淇河鲫肝脏 MDA 含量上升的研究结果一致。在本实验中, CAT 活性和 GSH 含量以 8 h 为转折点呈先上升后下降的变化趋势, MDA 含量持续上升, 说明低氧胁迫使瘤背石磺产生了持续性的氧化应激。实验推测, 低氧胁迫下瘤背石磺体内产生了大量的 ROS, 既可以诱导抗氧化系统发挥积极作用, 也可以反作用于抗氧化系统, 导致抗氧化酶活性和抗氧化剂含量下降。同时 MDA 含量的持续上升说明瘤背石磺的血清和肝胰腺均受到持续性的脂质过氧化损伤。

3.3 低氧胁迫对瘤背石磺免疫功能的影响

贝类作为一种海洋软体动物, 不具备特异性免疫, 因此体内的非特异性免疫机制对环境因子的刺激具有高度敏感性^[36]。大量研究表明, 低氧胁迫会导致贝类免疫力下降。Cheng 等^[37]在对九孔鲍 (*Haliotis diversicolor supertexta*) 的研究中发现, 低氧会抑制九孔鲍的免疫系统, 增加机体感染副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 的机率。肝胰腺中含有大量的免疫细胞, 因此肝胰腺中免疫酶的变化可以作为评定机体免疫力的指标^[38]。AST 和 ALT 是机体氨基酸代谢过程中重要的转移酶, 属于非特异性免疫功能酶, 在肝脏细胞中含量较多^[39-40]。正常状态下, 血清中的这两种酶活性低于肝脏, 当机体受到侵害时, 肝脏细胞内的 AST 和 ALT 会释放进入血液, 导致血清中这两种酶的活性升高^[41]。因此, 可以通过 AST 和 ALT 活性的变化分析低氧胁迫对机体免疫系统的影响。

本实验中, 瘤背石磺在低氧胁迫过程中, 血清和肝胰腺 ALT 和 AST 呈波动上升趋势并在 24 h 时显著高于对照组, 这种现象在其他水生生物中也有报道。为了研究低氧胁迫对军曹鱼幼鱼非特异性免疫酶的影响, 检测胁迫后血清 AST 和 ALT 的活性变化, 结果发现与对照组相比实验组持续升高^[11]。在刘盼等^[42]对西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*) 转氨酶活性的研究中发现, 机体受药物刺激后可导致血清 ALT 和 AST 活性显著高于肝脏。谢雨欣等^[43]对黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 幼鱼在氨氮胁迫下进行饥饿胁迫, 发现饥饿状态下实验组血清 ALT 和 AST 活性显著高于对照组, 同时免疫应答受到抑制;

恢复投喂后, 实验组 ALT 和 AST 的活性显著低于对照组, 免疫指标恢复正常水平, 该实验结果表明, 饥饿胁迫导致黄颡鱼幼鱼免疫力下降。本实验结果显示, 血清中 ALT 和 AST 的活性从 8 h 时起高于肝胰腺, 这说明瘤背石磺肝胰腺受到损伤。结合抗氧化指标 CAT、GSH 和 CAT 的变化趋势, 随着氧化应激程度的加剧, 抗氧化能力下降, 血清 ALT 和 AST 活性显著上升, 说明低氧胁迫对瘤背石磺的免疫系统造成了一定压力。

3.4 低氧胁迫对瘤背石磺肝胰腺 GP、GSH-Px 和 Hsp70 基因表达的影响

GP 是一种参与糖原分解的关键酶。血糖降低时, GP 会促进肝糖原分解为葡萄糖, 为糖酵解代谢提供反应产物, 因此经常在低氧环境中被转录激活^[44-45]。有研究发现, 长牡蛎在低氧环境中 24 h 后, GP mRNA 表达上调, 表明该酶的激活和转录的目的是为机体在低氧胁迫中的提供能量^[9]。在本实验中, GP mRNA 表达量在肝胰腺中显著上升, 表明瘤背石磺在低氧环境可以通过调控 GP 基因的表达分解肝糖原为机体提供能量。

GSH-Px 是一种含硒酶, 在抗氧化防御中发挥着重要作用^[25]。GSH 在 GSH-Px 的作用下可以与细胞内的 H₂O₂ 和脂质过氧化物发生反应, 从而发挥抗氧化作用^[46]。由于 O₂ 是氧化代谢的基础, 因此参与细胞氧化应激调节的酶的基因表达会受到低氧环境影响。本实验发现, 低氧胁迫下 GSH-Px mRNA 在肝胰腺中的表达量显著上升, 这与厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*)^[47]、长牡蛎^[48] 和皱纹盘鲍^[49] 中的研究结果一致, 说明低氧胁迫可以诱导该酶的激活和转录, 使其发挥抗氧化作用。随着低氧胁迫时间的推移, 肝胰腺 GSH-Px mRNA 表达量以 8 h 为转折点开始下降, 这表明低氧胁迫抑制了 GSH-Px 基因的表达。

Hsp70 是一种对外界环境变化十分敏感的应激蛋白。在生物体内被广泛诱导, 发挥保护机体和细胞、降低机体应激损伤的作用^[50-53]。当生物体受环境胁迫时, Hsp70 基因的表达可以提高细胞的氧化应激能力^[54-55]。本实验中, 低氧胁迫使肝胰腺中 Hsp70 mRNA 表达量显著升高, 这与长牡蛎对低氧胁迫的响应结果一致^[9],

说明 Hsp70 在低氧胁迫下被诱导表达。随着低氧胁迫时间的推移, 瘤背石磺肝胰腺 Hsp70 mRNA 表达量以 8 h 为转折点开始下降, 表明低氧胁迫对 Hsp70 具有诱导和抑制双重影响。

4 结论

综上所述, 瘤背石磺在低氧胁迫下, 通过调节生理代谢及肝胰腺相关基因表达应对低氧环境压力。机体倾向于无氧糖酵解途径满足能量需求, 可以主动调节抗氧化系统应对氧化应激压力。但长时间的低氧胁迫会对瘤背石磺造成一定程度的负面影响, 免疫相关指标发生显著变化, 免疫功能受到影响。

参考文献 (References):

- [1] 刘凯凯, 唐君玮, 袁廷柱, 等. 缺氧胁迫及对贝类免疫系统的影响[J]. 广西科学院学报, 2020, 36(2): 124-130.
- Liu K K, Tang J W, Yuan T Z, *et al.* Hypoxia stress and its effects on immune system of shellfish[J]. *Journal of Guangxi Academy of Sciences*, 2020, 36(2): 124-130 (in Chinese).
- [2] Ito T, Minobe S, Long M C, *et al.* Upper ocean O₂ trends: 1958-2015[J]. *Geophysical Research Letters*, 2017, 44(9): 4214-4223.
- [3] Larade K, Storey K B. A profile of the metabolic responses to anoxia in marine invertebrates[J]. *Cell and Molecular Response to Stress*, 2002, 3: 27-46.
- [4] 王永红, 张建设, 曾霖. β-葡聚糖对低氧胁迫下大黄鱼幼鱼的保护作用及其机理[J]. 水产学报, 2018, 42(6): 828-837.
- Wang Y H, Zhang J S, Zeng L. β-glucan decreases intensity of hypoxia-induced oxidative stress in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and its corresponding mechanisms[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(6): 828-837 (in Chinese).
- [5] Chen J H, Mai K S, Ma H M, *et al.* Effects of dissolved oxygen on survival and immune responses of scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(3): 272-281.
- [6] Burnett L E, Burnett K G. The effects of hypoxia and hypercapnia on cellular defenses of oysters, shrimp, and fish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 126(1): S20.
- [7] Cheng W, Li C H, Chen J C. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Aquaculture*,

- 2004, 232(1-4): 103-115.
- [8] 周作强, 丁晴晴, 刘其根, 等. 缺氧对贝类的胁迫效应及其对免疫系统的影响[J]. *生态毒理学报*, 2013, 8(3): 324-330.
Zhou Z Q, Ding Q Q, Liu Q G, *et al.* Stresses of hypoxia and its effects on immune system of bivalve[J]. *Asian Journal of Eco-toxicology*, 2013, 8(3): 324-330 (in Chinese).
- [9] David E, Tanguy A, Pichavant K, *et al.* Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions[J]. *FEBS Journal*, 2005, 272(21): 5635-5652.
- [10] 李屹. 经济贝类对低氧耐受性的研究——以菲律宾蛤仔和栉孔扇贝为例 [D]. 青岛: 中国科学院大学 (中国科学院海洋研究所), 2019.
Li Q. The tolerance of commercial bivalves to hypoxia-taking the *Ruditapes philippinarum* and the *Chlamys farreri* as examples[D]. Qingdao: University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2019 (in Chinese).
- [11] 王维政, 曾泽乾, 黄建盛, 等. 低氧胁迫对军曹鱼幼鱼生长、血清生化和非特异性免疫指标的影响[J]. *海洋学报*, 2021, 43(2): 49-58.
Wang W Z, Zeng Z Q, Huang J S, *et al.* Hypoxia stress on growth, serum biochemical and non-specific immune indexes of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Haiyang Xuebao*, 2021, 43(2): 49-58 (in Chinese).
- [12] 吴旭峰, 沈和定, 吴文健, 等. 我国华东沿海4种石磺形态学比较[J]. *动物学杂志*, 2010, 45(6): 92-100.
Wu X F, Shen H D, Wu W J, *et al.* Comparison on morphology of Onchidiidae in eastern coast of China[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2010, 45(6): 92-100 (in Chinese).
- [13] 杨铁柱. 瘤背石磺潮汐感知的分子机制探究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
Yang T Z. Molecular mechanism of tidal sensing in *Onchidium reevesii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020 (in Chinese).
- [14] Wu R S S. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45(1-12): 35-45.
- [15] Kierans S J, Taylor C T. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology[J]. *The Journal of Physiology*, 2021, 599(1): 23-37.
- [16] Rios F S A, Moraes G, Oba E T, *et al.* Mobilization and recovery of energy stores in traíra, *Hoplias malabaricus* Bloch (Teleostei, Erythrinidae) during long-term starvation and after re-feeding[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2006, 176(7): 721-728.
- [17] Mehrani H, Storey K B. Enzymatic control of glycogenolysis during anoxic submergence in the freshwater turtle *Trachemys scripta*[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1995, 27(8): 821-830.
- [18] Lushchak V I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals[J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 101(1): 13-30.
- [19] 王国骄, 唐亮, 范淑秀, 等. 抗氧化机制在作物对非生物胁迫耐性中的作用[J]. *沈阳农业大学学报*, 2012, 43(6): 719-724.
Wang G J, Tang L, Fan S X, *et al.* Role of antioxidant machinery on crop plants in abiotic stress tolerance[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2012, 43(6): 719-724 (in Chinese).
- [20] Malhotra J D, Kaufman R J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword?[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2007, 9(12): 2277-2294.
- [21] 亢玉静, 郎明远, 赵文. 水生生物体内抗氧化酶及其影响因素研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2013, 33(3): 75-80.
Kang Y J, Lang M Y, Zhao W. Advance in antioxidant enzymes and its effect factors in aquatic organisms[J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 33(3): 75-80 (in Chinese).
- [22] 张勇, 徐钢春, 杜富宽, 等. 急性操作胁迫对美洲鲟亲鱼血清生化指标及HSP70基因表达的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(5): 652-658.
Zhang Y, Xu G C, Du F K, *et al.* Effects of acute handling stress on serum biochemical parameters and HSP70 gene expression in *Alosa sapidissima* broodstocks[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(5): 652-658 (in Chinese).
- [23] 王好, 庄平, 章龙珍, 等. 盐度对点篮子鱼的存活、生长及抗氧化防御系统的影响[J]. *水产学报*, 2011, 35(1): 66-73.
Wang Y, Zhuang P, Zhang L Z, *et al.* Effects of salinity on survival, growth and antioxidant defense system of *Siganus guttatus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(1): 66-73 (in Chinese).
- [24] Ceriello A. Hyperglycaemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in the pathogenesis of diabetic complications[J]. *Diabetes, Nutrition & Metabolism*, 1999, 12(1): 42-46.
- [25] 王楠. 谷胱甘肽相关酶的性质及其在贝类方面的研究[J]. *生命科学仪器*, 2008, 6(3): 31-33.
Wang N. The functions and the researches of shellfish aspects of glutathione and correlation enzymes[J]. *Life Science Instruments*, 2008, 6(3): 31-33 (in Chinese).

- [26] 赵艳民, 王新华, 秦延文, 等. 水体 Hg^{2+} 对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 血淋巴抗氧化酶活力和丙二醛含量的影响[J]. 海洋与湖泊, 2011, 42(3): 436-442.
- Zhao Y M, Wang X H, Qin Y W, *et al.* Effects of Hg^{2+} on antioxidant enzymatic activities and malondialdehyde content in the haemolymph of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(3): 436-442 (in Chinese).
- [27] Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes E M, *et al.* Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois[J]. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2009, 674(1-2): 3-22.
- [28] Gorr T A, Wichmann D, Hu J, *et al.* Hypoxia tolerance in animals: biology and application[J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2010, 83(5): 733-752.
- [29] 常志成, 温海深, 张美昭, 等. 溶解氧水平对花鲈幼鱼氧化应激与能量利用的影响及生理机制[J]. 中国海洋大学学报, 2018, 48(7): 20-28.
- Chang Z C, Wen H S, Zhang M Z, *et al.* Effects of dissolved oxygen levels on oxidative stress response and energy utilization of juvenile Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and associate physiological mechanisms[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2018, 48(7): 20-28 (in Chinese).
- [30] 李利. 低氧胁迫对日本沼虾呼吸代谢、能量代谢和抗氧化能力的影响 [D]. 保定: 河北大学, 2010.
- Li L. Effects of hypoxia on respiratory metabolism, energy metabolism and antioxidant capability of *Macrobrachium nipponense*[D]. Baoding: Hebei University, 2010 (in Chinese).
- [31] Zoysa M D, Whang I, Lee Y, *et al.* Transcriptional analysis of antioxidant and immune defense genes in disk abalone (*Haliotis discus discus*) during thermal, low-salinity and hypoxic stress[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 154(4): 387-395.
- [32] 徐畅, 丁炜东, 曹哲明, 等. 急性低氧胁迫对翘嘴鲌抗氧化酶、呼吸相关酶活性及相关基因表达的影响[J]. 南方农业学报, 2020, 51(3): 686-694.
- Xu C, Ding W D, Cao Z M, *et al.* Effects of acute hypoxia stress on antioxidant enzymes, respiratory related enzymes and expression of related genes in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2020, 51(3): 686-694 (in Chinese).
- [33] 郭志雄, 曾泽乾, 黄建盛, 等. 急性低氧胁迫对大规格军曹鱼幼鱼肝脏氧化应激、能量利用及糖代谢的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2020, 40(3): 134-140.
- Guo Z X, Zeng Z Q, Huang J S, *et al.* Effects of acute hypoxia on oxidative stress, energy utilization and carbohydrate metabolism in liver of large-sized juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, 40(3): 134-140 (in Chinese).
- [34] 张倩, 黄进强, 权金强, 等. 急性低氧胁迫和复氧对鲫鱼氧化应激的影响[J]. 水产科学, 2020, 39(5): 649-656.
- Zhang Q, Huang J Q, Quan J Q, *et al.* Effects of acute hypoxia and reoxygenation on oxidative stress in crucian carp *Carassius auratus*[J]. *Fisheries Science*, 2020, 39(5): 649-656 (in Chinese).
- [35] 赵燕静, 狄桂兰, 孔祥会, 等. 低氧环境下poly I: C刺激对淇河鲫肝胰脏抗氧化防护的影响[J]. 水产学报, 2016, 40(12): 1830-1841.
- Zhao Y J, Di G L, Kong X H, *et al.* Effect on antioxidant defense in hepatopancreas of *Carassius auratus* after poly I: C injection under hypoxia[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(12): 1830-1841 (in Chinese).
- [36] 吴宁, 陈梦玫, 王素芳. 贝类免疫机制的研究进展[J]. 药物生物技术, 2017, 24(1): 68-71.
- Wu N, Chen M M, Wang S F. Research progress of shellfish immune mechanism[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2017, 24(1): 68-71 (in Chinese).
- [37] Cheng W, Liu C H, Cheng S Y, *et al.* Effect of dissolved oxygen on the acid-base balance and ion concentration of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. *Aquaculture*, 2004, 231(1-4): 573-586.
- [38] 赵盼月, 卢俊姣, 翟少伟. 原花青素对饲料镉胁迫下吉富罗非鱼肝胰脏健康状况有关指标的影响[J]. 饲料工业, 2016, 37(24): 19-23.
- Zhao P Y, Lu J J, Zhai S W. Effects of oligomeric proanthocyanidins supplementation on some parameters related to hepatopancreas health of GIFT tilapia exposed to dietary cadmium stress[J]. *Feed Industry*, 2016, 37(24): 19-23 (in Chinese).
- [39] 郑永华, 蒲富永. 汞对鲤鱼组织转氨酶活性的影响[J]. 西南农业大学学报, 1997, 19(1): 41-45.
- Zheng Y H, Pu F Y. Effect of mercury on transaminase activities of tissues in *Cyprinus carpio* & *Carassius auratus*[J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 1997, 19(1): 41-45 (in Chinese).
- [40] 赵维信, 魏华, 贾江, 等. 镉对罗氏沼虾组织转氨酶活性及组织结构的影响[J]. 水产学报, 1995, 19(1): 21-27.

- Zhao W X, Wei H, Jia J, *et al.* Effects of cadmium on transaminase activities and structures of tissues in freshwater giant prawn (*Macrobrachium Rosenbergii*)[J]. Journal of Fisheries of China, 1995, 19(1): 21-27 (in Chinese).
- [41] 廖英杰, 刘波, 任鸣春, 等. 精氨酸对团头鲂幼鱼生长、血清游离精氨酸和赖氨酸、血液生化及免疫指标的影响[J]. 中国水产科学, 2014, 21(3): 549-559.
- Liao Y J, Liu B, Ren M C, *et al.* Effects of dietary arginine level on growth performance, free essential amino acids, hematological characteristics, and immune response in juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(3): 549-559 (in Chinese).
- [42] 刘盼, 杨慕, 贾成霞, 等. 恩诺沙星对西伯利亚鲟血清和肝脏中转氨酶活性的影响 [J]. 水产科学, 2022, 41 (2): 273-279.
- Liu P, Yang M, Jia C X, *et al.* Effects of enrofloxacin on transaminase activity in serum and liver of sturgeon *Acipenser baeri*[J]. Fisheries Science, 2022, 41 (2): 273-279 (in Chinese).
- [43] 谢雨欣, 张木子, 黎明, 等. 氨氮胁迫下饥饿和再投喂对黄颡鱼幼鱼生长性能、血液健康、抗氧化能力及免疫应答的影响[J]. 动物营养学报, 2018, 30(8): 3073-3081.
- Xie Y X, Zhang M Z, Li M, *et al.* Effects of starvation and refeeding on growth performance, blood health, antioxidant capacity and immune response of juvenile yellow catfish under ammonia stress[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(8): 3073-3081 (in Chinese).
- [44] Pichavant K, Maxime V, Thébault M T, *et al.* Effects of hypoxia and subsequent recovery on turbot *Scophthalmus maximus*: hormonal changes and anaerobic metabolism[J]. Marine Ecology Progress Series, 2002, 225(1): 275-285.
- [45] Soñanez-Organis J G, Peregrino-Uriarte A B, Gómez-Jiménez S, *et al.* Molecular characterization of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and tissue-specific expression under hypoxia[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 150(3): 395-405.
- [46] Kunnula V L, Grapo J D, Raivio K O. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung[J]. Laboratory Investigation, 1995, 73(1): 3-19.
- [47] Qu C K, Liu S B, Tang Z R, *et al.* Response of a novel selenium-dependent glutathione peroxidase from thick shell mussel *Mytilus coruscus* exposed to lipopolysaccharide, copper and benzo[α]pyrene[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 89: 595-602.
- [48] Jo P G, Choi Y K, Choi C Y. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 2008, 147(4): 460-469.
- [49] Wu C L, Mai K S, Zhang W B, *et al.* Molecular cloning, characterization and mRNA expression of selenium-dependent glutathione peroxidase from abalone *Haliotis discus hannai* Ino in response to dietary selenium, zinc and iron[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 2010, 152(2): 121-132.
- [50] Wegele H, Müller L, Buchner J. Hsp70 and Hsp90-a relay team for protein folding[M]//Amara S G. Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology. Berlin: Springer, 2004: 1-44.
- [51] Ip Y K, Tay A S L, Lee K H, *et al.* Strategies for surviving high concentrations of environmental ammonia in the swamp eel *Monopterus albus*[J]. Physiological and Biochemical Zoology, 2004, 77(3): 390-405.
- [52] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology[J]. Annual Review of Physiology, 1999, 61(1): 243-282.
- [53] Snyder M J, Girvetz E, Mulder E P. Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2001, 41(1): 22-29.
- [54] Liu T E, Daniels C K, Cao S S. Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2012, 136(3): 354-374.
- [55] Gullo C A, Teoh G. Heat shock proteins: to present or not, that is the question[J]. Immunology Letters, 2004, 94(1-2): 1-10.

Effects of hypoxic stress on energy metabolism, oxidative stress and immune function in *Onchidium reevesii*

ZHANG Xiaoming^{1,2,3}, TU Zhihan^{1,2,3}, XIAO Haiming^{1,2,3}, RAO Rongcheng^{1,2,3},
CHEN Xilin^{1,2,3}, QIAN Chang^{1,2,3}, SHEN Heding^{1,2,3*}

1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Universities Key Laboratory of Marine Animal Taxonomy and Evolution,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai Collaborative Innovation Center for Cultivating Elite Breeds and
Green-culture of Aquaculture animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: This study explored the effects of hypoxic stress on energy metabolism, oxidative stress and immune function of *Onchidium reevesii*. In this experiment, under hypoxic conditions [DO = (2.0 ± 0.2) mg/L], the changes of serum and hepatopancreatic biochemical indexes and the expression of hepatopancreas-related genes at 0, 4, 8, 12, and 24 h were measured. The results showed that among the energy metabolism indexes, serum blood glucose, liver glycogen, serum and hepatopancreas lactic acid levels all increased significantly with the passage of hypoxic stress. Among the antioxidant indicators, catalase (CAT) activity and reduced glutathione (GSH) content showed an upward trend and then a downward trend. All reached the maximum at 8 h, which were significantly higher than the control group. The content of malondialdehyde (MDA) showed an upward trend with the passage of hypoxic stress and was significantly higher than that of the control group. Among the immune indicators, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) showed a fluctuating upward trend, and both were significantly higher than the control group. And serum ALT and AST were higher than hepatopancreas from 8 h. The expression of glycogen phosphorylase (GP) mRNA in hepatopancreas increased significantly under hypoxic stress. The expression of glutathione peroxidase (GSH-Px) mRNA and heat shock protein 70 (Hsp70) mRNA showed an upward trend and then a downward trend, and all reached the maximum at 8 h, which was significantly different from the control group. Research showed that *O. reevesii* mainly carries out anaerobic metabolism in order to adapt to the hypoxic environment, and hypoxic stress affects the antioxidant capacity and immune function of the body.

Key words: *Onchidium reevesii*; hypoxic stress; energy metabolism; oxidative stress; immunity

Corresponding author: SHEN Heding. E-mail: hdshen@shou.edu.cn

Funding projects: Shanghai Collaborative Innovation Center Team Project (A1-3605-21-000202)