

DOI: 10.11964/jfc.20230614048

# 急性碱度胁迫对中华绒螯蟹抗应激、抗氧化能力和肌肉组织结构的影响

陈 涵<sup>1</sup>, 邱启勇<sup>1</sup>, 王美垚<sup>1,2\*</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

## 摘要:

**【目的】**探究急性碱度胁迫对中华绒螯蟹生理代谢的影响机制。

**【方法】**设立对照组 (0 mmol/L) 和碱度组 (60 mmol/L) 以及 4 个处理时间 (0、6、12 和 24 h), 研究急性碱度胁迫对中华绒螯蟹肝胰腺抗应激及发育关键调控基因 *mTOR* 和 *AKT* 基因的 mRNA 表达、抗氧化能力指示酶过氧化氢酶 (CAT)、总抗氧化能力 (T-AOC)、丙二醛 (MDA) 以及能量代谢关键组织肌肉组织结构的影响。

**【结果】**碱度胁迫 6 h 后, *AKT* 基因的表达先升后降, 但 24 h 时仍显著高于对照组; 胁迫 6 h 后, *mTOR* 表达显著升高, 且持续高表达。胁迫 6 h 时, 中华绒螯蟹肝胰腺 CAT 活性显著降低, 随着胁迫时间的延长, CAT 活性并无显著变化。碱度胁迫 24 h 时肝胰腺 T-AOC 水平显著上升。随着胁迫时间的延长, 肝胰腺 MDA 含量显著上升, 胁迫 24 h 时达到峰值。碱度胁迫 6 h 时, 中华绒螯蟹肌肉组织结构无显著变化。

**【结论】**6 h 急性碱度胁迫未对肌肉组织结构产生显著影响, 抗氧化酶 T-AOC 含量升高、抗应激及发育相关基因 (*AKT*、*mTOR*) 出现上调表达以积极应对碱度胁迫。本研究旨在为今后探讨中华绒螯蟹盐碱环境抗逆机制, 进而更好地开展中华绒螯蟹盐碱地养殖提供理论指导。

**关键词:** 中华绒螯蟹; 碱度胁迫; 肝胰腺; 抗氧化能力; 抗应激

第一作者: 陈涵, 从事河蟹发育调控机制研究, E-mail: 1617162225@qq.com



通信作者: 王美垚, 从事水生动物遗传育种及分子生物学研究, E-mail: wangmeiyao@ffrc.cn

资助项目: 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目 [JBGS(2021)031]; 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2023TD39); 国家重点研发计划 (2022YFD2400702); 淡水渔业研究中心基本科研业务费专项 (2023JBFM05)

收稿日期: 2023-06-19  
修回日期: 2024-03-20

文章编号: 1000-0615(2025)05-059605-08  
中图分类号: S 966.16  
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)

盐碱水是分布于陆地区域的非海洋性咸水资源<sup>[1]</sup>, 但由于盐碱度和 pH 较高, 离子组成成分复杂, 盐碱水既不能为人畜饮用, 也不能直接应用于农业生产。我国盐碱水资源丰富, 遍及 19 个省市和自治区<sup>[2]</sup>, 大力开展盐碱水养殖是有效利用我国丰富盐碱水资源的重要途径。现今已有成功利用盐碱地开展水产养殖的事例, 如张浩铤等<sup>[3]</sup>在库尔勒垦区通过盐碱水无害化处理技术将盐碱水处理转化为渔业用水, 成功养殖尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)。么宗利等<sup>[4]</sup>研究表明经过从低盐度到高盐度的梯度驯化, 尼罗罗非鱼和以色列红罗非鱼 (*Oreochromis spp.*) 均可适应一定盐度的咸水, 且以色列红罗非鱼在咸水中的养殖性能较佳。冯广朋等<sup>[5]</sup>研究表明史氏鲟 (*Acipenser schrenckii*) 经海水驯养后可进行海水养殖。王建钢等<sup>[6]</sup>研究表明点带石斑鱼



(*Epinephelus malabaricus*) 对盐度变化具有很强的适应能力, 不仅能在海水中养殖而且也可在河口及低盐地区进行养殖。郝俊等<sup>[7]</sup>在天津地区推广盐碱水凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 健康养殖技术。王慧等<sup>[8]</sup>研究表明中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 可移植到内陆咸水水域进行养殖。杨富亿等<sup>[9]</sup>研究表明凡纳滨对虾可在吉林省西部 32 mmol/L 的盐碱水中养殖。方伟等<sup>[10]</sup>研究表明盐碱水养殖拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 的生长速率、肥满度、氨基酸和脂肪酸含量与正常海水养殖相比无显著差异。

碱度作为盐碱水养殖过程中重要水质参数, 对水产动物生长发育、生理代谢、组织功能等方面有着重要影响<sup>[11]</sup>。现今已有一些甲壳动物碱度胁迫研究报道, 如张秀红等<sup>[1]</sup>研究表明脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 可以在低于 8 mmol/L 的碳酸盐碱度中生长发育, 但高碳酸盐碱度可能会造成脊尾白虾鳃和肝胰腺组织损伤, 导致其生长受到影响。房文红等<sup>[12]</sup>研究表明, 随着碱度、pH 的升高, 中国明对虾幼虾的存活率下降。柳飞等<sup>[13]</sup>研究表明随着碱度的升高, 脊尾白虾的抱卵率、孵化率和幼体成活率都会降低。魏威等<sup>[14]</sup>研究表明在碳酸盐碱度胁迫下, 中国明对虾中 *Fc ATG5* 基因表达量均有所升高, 在碱度胁迫后 12 h 达到最高。

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 属十足目 (Decapoda) 方蟹科 (Grapsidae) 绒螯蟹属 (*Eriocheir*), 因其味道鲜美、营养丰富而深受人们的喜爱, 是我国重要的经济水产动物<sup>[15]</sup>。目前有关碳酸盐碱度对中华绒螯蟹的影响研究较少, 仅见有关中华绒螯蟹盐碱耐受性及盐碱胁迫对其渗透调控关键组织的影响研究<sup>[15-16]</sup>。

本研究开展了 24 h 急性碱度胁迫对中华绒螯蟹抗应激及发育关键调控基因 *mTOR*、*AKT* 表达、抗氧化酶 CAT 活性以及抗氧化指标 T-AOC、MDA 和能量代谢关键组织 (肝胰腺) 的影响研究, 旨在探讨中华绒螯蟹应对碱度胁迫的应答机制, 为今后进一步揭示盐碱条件下中华绒螯蟹机体调控机制提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象

实验所用中华绒螯蟹来自江苏好润集团河蟹养殖基地, 选取体质健壮、规格整齐、附肢

完整的中华绒螯蟹作为实验用蟹, 体重为 (54.48±7.01) g。实验开始前在玻璃水缸中暂养, 暂养期间每日早晚投喂中华绒螯蟹专用饲料, 投喂量为蟹体重的 5%, 持续充氧, 每日换水 1/2, 每日吸污 1 次。实验全程采用充分曝气的自来水, 水温为 (22±1) °C, pH 为 7.8。实验前 1 天停止投喂。本研究获得了中国水产科学研究院淡水渔业研究中心实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守中国水产科学研究院淡水渔业研究中心伦理规范, 并按照中国水产科学研究院淡水渔业研究中心伦理委员会制定的规章制度执行。

### 1.2 实验设计与样品采集

正式实验时挑选规格基本一致的健康中华绒螯蟹 120 只, 设立对照组和碱度组, 每组设定 3 个平行, 每个平行放养 20 只。碱度组添加 NaHCO<sub>3</sub>, 达到碱度 60 mmol/L, 实验期间不投喂饲料。在碱度胁迫 0、6、12 和 24 h 时, 各胁迫时间点每组采集 3 只蟹的肝胰腺组织, 迅速置于液氮冷冻, 于 -80 °C 冰箱备用, 测定抗应激关键调控基因的表达。采集各组蟹的肝胰腺组织, 迅速置于冰上保存, 于 -20 °C 冰箱备用, 测定抗氧化酶活性。采集胁迫 0 和 6 h 蟹的步足肌肉组织, 用 Bouin 氏液固定, 制作苏木精伊红 (H.E) 染色石蜡切片。

### 1.3 抗应激及发育关键调控基因表达的测定

用 RNAiso plus 试剂 [宝日生物技术 (北京) 有限公司] 提取中华绒螯蟹肝胰腺总 RNA。提取的 RNA 使用超微量分光光度计 NanoPhotometer N50 (IMPLEN, 德国) 测量吸光度 OD<sub>260/280</sub> 的比值及 RNA 浓度, OD<sub>260/280</sub> 比值均为 1.80~2.00, RNA 可用于 cDNA 反转录反应。

cDNA 的合成按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) [宝日生物技术 (北京) 有限公司] 说明书进行两步反应: 首先去除基因组 DNA, 反应体系: 5 × gDNA Eraser Buffer 2.0 μL、gDNA Eraser 1.0 μL、Total RNA 1 μL、补 RNA Free dH<sub>2</sub>O 至 10 μL, 反应条件为 42 °C 2 min, 然后进行反转录反应, 反应体系: PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μL、RT Primer Mix 1.0 μL、5 × PrimeScript Buffer 2 (for Real Time) 4.0 μL、RNase Free

dH<sub>2</sub>O 4  $\mu$ L、步骤 1 反应液 10  $\mu$ L, 反应条件为 37  $^{\circ}$ C 15 min, 85  $^{\circ}$ C 5 s, 4  $^{\circ}$ C。

实验所用引物根据 NCBI 公布的中华绒螯蟹相关基因, 利用 Primer Premier 5 软件设计引物 (表 1)。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物  
Tab. 1 Primers for qRT-PCR

基因 gene	引物 primer	序列(5'→3') sequence(5'→3')
AKT	qAKT-F	GAGCACATCAAGAACTGGCGAC
	qAKT-R	CAGACTCCGTAGCCCCACCAG
mTOR	qmTOR-F	GGTCTGAATCAGAGGAACAGTCG
	qmTOR-R	CAGAATGGAGATGGCATGTCC
$\beta$ -actin	q $\beta$ -actin-F	GTACCACCGGCATCGTGCTC
	q $\beta$ -actin-R	GATGTCTCGCACGATTCTCGC

采用嵌合荧光法进行实时荧光定量 PCR 扩增反应, 按照 PrimeScript<sup>TM</sup> RT Master Mix (Perfect Real Time) [宝日医生物技术(北京)有限公司]说明书进行操作。总反应体系 25  $\mu$ L, 其中 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$ )12.5  $\mu$ L、PCR Forward Primer (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L、PCR Reverse Primer (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L、RT 反应液 (cDNA 溶液) 2  $\mu$ L、灭菌水 8.5  $\mu$ L。反应条件: 预变性 95  $^{\circ}$ C 30 s; PCR 反应 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 循环 40 次。以  $\beta$ -actin 为内参, 对各样品  $C_t$  值进行均一化处理, 用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算不同应激时间点目的基因相对表达量。

#### 1.4 抗氧化酶活性的测定

采集碱度胁迫各时间点中华绒螯蟹肝胰腺组织, 测定 CAT 的活性、MDA 的含量和 T-AOC。酶活性的测定均采用南京建成生物工程研究所试剂盒进行测定, 其中总蛋白的测定采用考马斯亮蓝法。

#### 1.5 肌肉 H.E 染色石蜡切片的制作

采集各胁迫时间点中华绒螯蟹步足肌肉组织, 固定于 Bouin 氏液中, 以制作 H.E 石蜡切片: 梯度酒精脱水 $\rightarrow$ 石蜡包埋 $\rightarrow$ 切片 (厚度约为 5  $\mu$ m) $\rightarrow$ 展片 $\rightarrow$ H.E 染色 $\rightarrow$ 中性树胶封片 $\rightarrow$ 过夜干燥 $\rightarrow$ 显微镜观察 $\rightarrow$ 拍照。依据基因荧光定量分析结果, 选择相应胁迫时间点进行组织学分析。

#### 1.6 数据分析

所得数据以平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, 采用 SPSS Statistics 20.0 软件对数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 采用 Duncan 氏法进行多重比较分析, 采用双因素方差分析 (Two-Way ANOVA) 探讨胁迫时间和碱度对中华绒螯蟹抗氧化能力及发育相关基因的影响, 以  $P < 0.05$  为显著差异水平。

## 2 结果

### 2.1 急性碱度胁迫下中华绒螯蟹抗应激及发育关键基因的表达

碱度胁迫 6 h, 与对照组相比, AKT 基因的表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 胁迫 12 和 24 h 后显著降低 ( $P < 0.05$ ), 但仍显著高于对照组水平 ( $P < 0.05$ )。碱度胁迫 6 h, 与对照组相比, mTOR 基因的表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 并且在 12、24 h 均持续高表达, 均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。双因素方差分析结果显示, 胁迫时间和碱度对 AKT、mTOR 基因表达的影响均显著 ( $P < 0.05$ ), 且交互作用对 AKT、mTOR 基因表达的影响也显著 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

### 2.2 急性碱度胁迫对中华绒螯蟹抗氧化酶活性的影响

碱度胁迫 6 h 中华绒螯蟹 CAT 活性显著降低 ( $P < 0.05$ ), 随着胁迫时间的延长, CAT 活性并无显著变化 ( $P > 0.05$ ), 均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。碱度胁迫 6 和 12 h, 与对照组相比, T-AOC 无显著变化 ( $P > 0.05$ ), 胁迫 24 h 时 T-AOC 显著上升 ( $P < 0.05$ )。碱度胁迫 6 h 后 MDA 的含量无显著变化 ( $P > 0.05$ ), 碱度胁迫 12 h, 随着胁迫时间的延长, MDA 含量显著上升 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。双因素方差分析结果显示, 碱度对 CAT 活性的影响显著, 但胁迫时间对 CAT 活性的影响不显著 ( $P > 0.05$ ), 二者的交互作用也不显著 ( $P > 0.05$ )。胁迫时间和碱度对 T-AOC、MDA 含量的影响均显著, 且交互作用也显著 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。

### 2.3 急性碱度胁迫对中华绒螯蟹肌肉组织结构的影响

荧光定量分析结果显示, 碱度胁迫 6 h 时差异显著。对 0 和 6 h 中华绒螯蟹的步足肌肉进行组织学分析 (图版), 发现其步足肌肉为



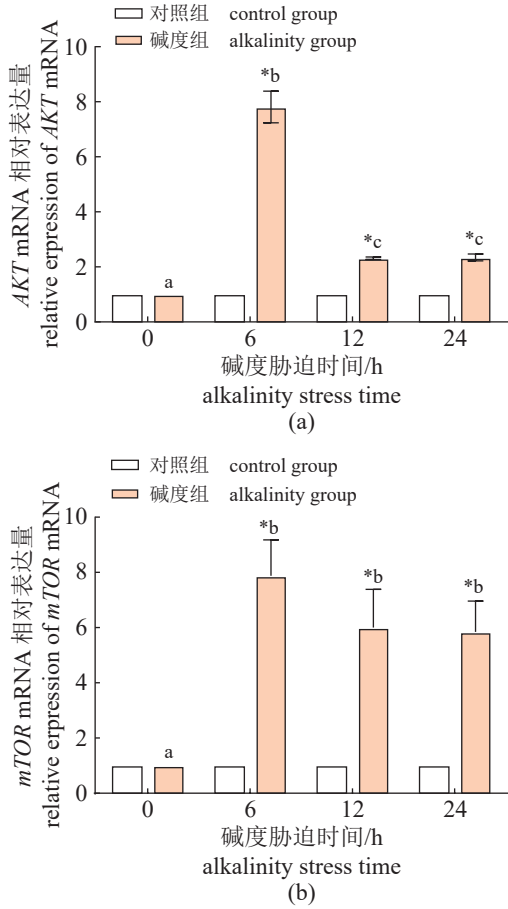


图 1 急性碱性胁迫对中华绒螯蟹发育相关基因表达的影响

不同的小写字母表示不同胁迫时间下差异显著 ( $P < 0.05$ ), “\*”表示对照组与碱性组在同一胁迫时间点差异显著 ( $P < 0.05$ ), 下同。

Fig. 1 Effect of acute alkalinity stress on expression of anti-stress and development related genes in *E. sinensis*

Different lowercase letters in the figure indicate significant differences under different stress times ( $P < 0.05$ ), “\*” indicates significantly difference between control group and alkalinity group at the same stress time point ( $P < 0.05$ ), the same below.

表 2 碱度和胁迫时间对 AKT、mTOR 基因表达影响的双因素方差分析

Tab. 2 Two-Way ANOVA on the effects of alkalinity and stress time on AKT and mTOR gene expression

变异来源 source of variation	自由度 degree of freedom	AKT		mTOR	
		F	P	F	P
碱度 alkalinity	1	773.674	<0.001	173.545	<0.001
时间 time	3	316.089	<0.001	21.402	<0.001
碱度×时间 alkalinity × time	3	316.089	<0.001	21.402	<0.001

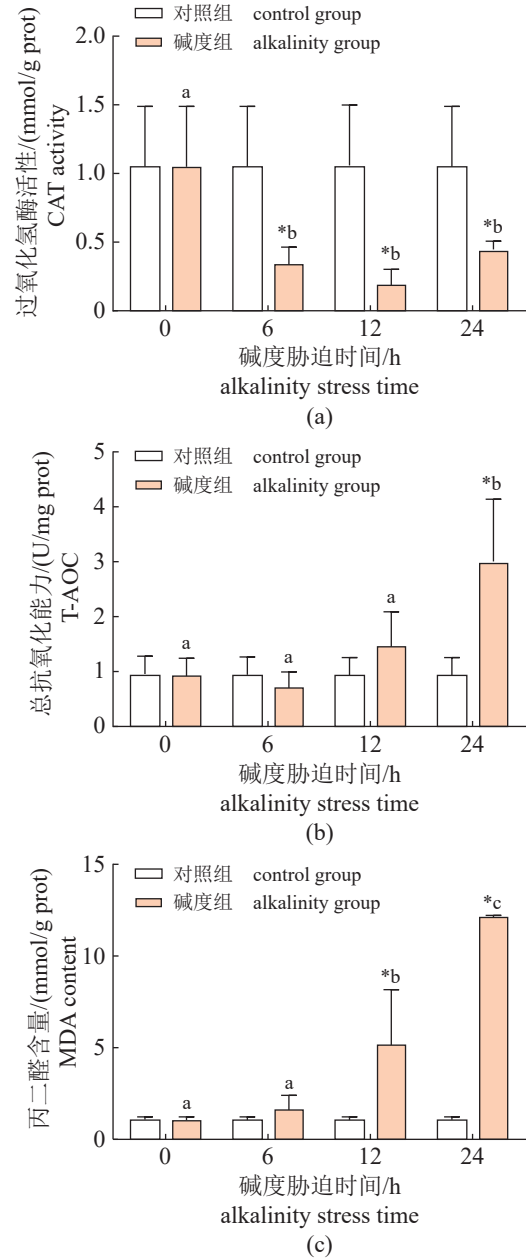


图 2 急性碱性胁迫对中华绒螯蟹抗氧化酶活性的影响  
Fig. 2 Effect of acute alkalinity stress on the activities of antioxidant enzymes in *E. sinensis*

横纹肌, 对照组步足肌细胞核呈圆形或梭形, 位于细胞的边缘, 肌纤维排列整齐、横纹清晰(图版-1), 碱性组中华绒螯蟹肌肉未出现明显变化(图版-2)。

### 3 讨论

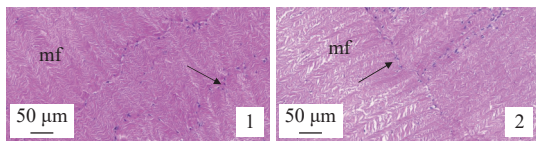
#### 3.1 急性碱性胁迫对中华绒螯蟹抗应激关键调控基因的影响

mTOR-AKT 信号通路是细胞内重要信号转

表 3 碱度和胁迫时间对中华绒螯蟹抗氧化能力影响的双因素方差分析

Tab. 3 Two-Way ANOVA on the effects of alkalinity and stress time on the antioxidant capacity of *E. sinensis*

变异来源 source of variation	自由度 degree of freedom	CAT		T-AOC		MDA	
		F	P	F	P	F	P
碱度 alkalinity	1	14.239	0.002	7.290	0.016	76.100	<0.001
时间 time	3	1.706	0.206	5.425	0.009	31.648	<0.001
碱度×时间 alkalinity × time	3	1.706	0.206	5.425	0.009	31.648	<0.001



图版 中华绒螯蟹肌肉组织切片

1 和 2 分别为中华绒螯蟹对照组、碱度组肌肉组织切片。箭头表示细胞核, mf 肌纤维。

Plate Muscle tissue section of *E. sinensis*

1 and 2 show the muscle tissue sections of the control group and alkalinity group of *E. sinensis*, respectively. The arrow represents the nucleus, mf represents muscle fiber.

导通路之一, 在维持细胞增殖、存活和凋亡中发挥关键作用<sup>[17]</sup>。AKT 作为 *mTOR*-AKT 信号通路中的关键基因, 能够通过磷酸化其他蛋白质的方式传导多种信号产生的刺激, 参与细胞增殖、细胞代谢等多种细胞过程, 在生物的生长发育、抗应激及免疫应答过程中均发挥重要调控作用<sup>[18]</sup>。在本研究中, 碱度胁迫 6 h 后 AKT 的表达水平显著上调, 以发挥积极的抗应激调控作用。在 12 及 24 h 后其表达出现下调但仍显著高于对照组水平 ( $P < 0.05$ ), 这是机体逐渐适应外界环境刺激的结果。Zhou 等<sup>[19]</sup>对罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 的研究表明, AKT 在氨基氮或亚硝酸盐过程中持续高表达, 有先升后降的趋势。迟艳红等<sup>[20]</sup>对中国明对虾的研究发现, 对虾经过溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 刺激后 1 h, AKT 表达明显上调, 刺激 3 和 6 h 后表达下调, 在 24 h 后表达量与对照组无显著差异, 上述研究结果与本研究结果相似, 体现了 AKT 在抗应激及免疫应答中的一种迅速的响应模式。

在机体细胞中, *mTOR* 信号通路接收来自

于营养、生长因子或者环境胁迫等信号, 通过调控细胞的合成代谢和分解代谢, 实现对细胞生长和生理活动的精确调控<sup>[21]</sup>。当细胞处于营养充足的良好环境中时, *mTOR* 被激活以抑制自噬的发生; 当细胞饥饿或经历恶劣条件时, *mTOR* 被抑制, 增强细胞自噬<sup>[22]</sup>。本研究结果显示, 碱度胁迫 6 h 后, *mTOR* 表达显著上调, 且持续高表达, 这是机体为了减少因细胞自噬导致的损伤, 应对外界碱度应激的结果。在本研究中, *mTOR* 与 AKT 的表达变化大致相似, 均为胁迫 6 h 后显著上调, 在 12 及 24 h 时表达有所下调, 但显著高于对照组, 两种基因在碱度胁迫过程中发挥协同作用, 对于中华绒螯蟹抗碱度胁迫共同发挥正向调控作用。Su 等<sup>[23]</sup>研究表明, 在高碱度 (47 mmol/L) 胁迫过程中, 中华绒螯蟹鳃中的信号转导和调节途径, 包括 *mTOR* 信号通路得到了富集, 与本研究结果一致, 体现了 *mTOR* 通路基因在应对碱度等外界因子应激时的重要调控作用。

### 3.2 急性碱度胁迫对中华绒螯蟹抗氧化酶活性的影响

在环境胁迫条件下, 生物体会产生过量的活性氧, 从而引起氧化应激, 机体通过抗氧化体系清除过多的氧自由基<sup>[24]</sup>。CAT 是生物体内抗氧化系统中非常重要的酶, 可将  $H_2O_2$  转化成  $H_2O$  和  $O_2$ , 减少  $H_2O_2$  对组织的损伤, 在生物体抵御因外界不利因素而引起的氧化损伤中发挥重要作用<sup>[25]</sup>。细胞膜脂质过氧化过程是氧化损伤的主要机制之一, MDA 是脂质过氧化发生的产物, 可以在一定程度上反映机体的氧化损伤<sup>[14]</sup>。T-AOC 能够反映机体自由基的代谢状态和抗氧化系统的工作能力, 可作为反映体内组织抗氧化功能的良好指标<sup>[26]</sup>。

在本研究中, 碱度胁迫 24 h 内, 中华绒螯蟹肝胰腺中的 CAT 及 MDA 分别出现了显著下调和上调的表达模式, 体现了碱度胁迫对其肝胰腺的影响。另一方面, 反映中华绒螯蟹肝胰腺整体抗氧化功能的 T-AOC 酶在 6 及 12 h 未出现显著下调表达, 而在 24 h 时出现了显著上调表达, 体现了中华绒螯蟹在应对碱度胁迫时, 在抗氧化调控上做出的积极应答。Zhang 等<sup>[27]</sup>的研究表明, 在不同浓度盐碱胁迫下, 中华绒螯蟹 T-AOC 呈上升趋势且显著高于对照组。Li

等<sup>[28]</sup>的研究也表明, 在 96 h 内, 处于碱度为 18.25 和 35.41 mmol/L 的中华绒螯蟹 T-AOC 水平均呈先升高后降低的趋势。本研究结果与上述研究结果相似, 在胁迫初期, 中华绒螯蟹 T-AOC 无显著变化, 表明开始胁迫时, 机体产生大量 ROS, 相关抗氧化酶活性被抑制, 24 h 后机体逐渐适应环境变化, 相关抗氧化酶活性恢复, T-AOC 显著上升, 体现了中华绒螯蟹肝胰腺在应对碱度胁迫引起的氧化应激中发挥的正向调控作用。

### 3.3 急性碱度胁迫对中华绒螯蟹肌肉组织结构的影响

骨骼肌是生物体内重要的肌肉组织, 是机体最大的糖原储存器官, 也是胰岛素刺激条件下处理葡萄糖的主要部位。肌肉收缩将葡萄糖转运体从细胞内转运到质膜和 T 小管, 增加骨骼肌葡萄糖摄取, 进而控制体内血糖和代谢稳态, 在机体能量代谢中发挥重要作用<sup>[29]</sup>。本研究中, 碱度胁迫 6 h 后, 许多机体抗应激、抗氧化等基因与酶均出现显著上调表达, 以利于发挥维护机体内稳态的作用。采集的 6 h 时肌肉组织切片也表明, 胁迫后对组织结构无显著影响, 体现了肌肉组织对中华绒螯蟹抗碱度胁迫的积极应答作用。

## 4 结论

研究表明, 在 24 h 内的急性碱度胁迫中, 中华绒螯蟹抗氧化系统作出了积极应答, 与此同时, 肝胰腺中抗应激相关基因 *AKT* 和 *mTOR* 等显著上调表达以应对碱度胁迫。6 h 的急性碱度胁迫并未对中华绒螯蟹肌肉组织结构产生显著影响。本研究揭示了中华绒螯蟹对于 24 h 急性碱度胁迫具有一定的耐受性, 为今后深入开展中华绒螯蟹碱度胁迫应答机制提供了理论参考。今后可继续开展中华绒螯蟹的慢性碱度以及盐碱胁迫应激应答研究, 为促进中华绒螯蟹盐碱地养殖业的发展提供理论参考。

### 参考文献 (References):

[1] 张秀红, 李吉涛, 王佳佳, 等. 长期碳酸盐碱度胁迫对脊尾白虾生长及卵巢发育的影响 [J]. 水产学报, 2024, 48(4): 136-146.  
Zhang X H, Li J T, Wang J J, et al. Effects of long-term saline-alkaline stress on growth and ovary development of *Exopala-*

*mon carinicauda*[J]. Journal of Fisheries of China, 2024, 48(4): 136-146 (in Chinese).

- [2] 陈学洲, 来琦芳, 么宗利, 等. 盐碱水绿色养殖技术模式 [J]. 中国水产, 2020(9): 61-63.  
Chen X Z, Lai Q F, Mo Z L, et al. Green aquaculture technology model for saline alkali water[J]. China Fisheries, 2020(9): 61-63 (in Chinese).
- [3] 张浩钿, 陈生熬, 葛建民, 等. 尼罗罗非鱼高位池盐碱水养殖技术 [J]. 现代畜牧科技, 2023(3): 45-47.  
Zhang H D, Chen S A, Ge J M, et al. Technology of *Oreochromis niloticus* saline-alkali aquaculture in elevation pool[J]. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 2023(3): 45-47 (in Chinese).
- [4] 么宗利, 李思发, 李学军, 等. 尼罗罗非鱼和以色列罗非鱼耐盐驯化初步报告 [J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(2): 97-101.  
Mo Z L, Li S F, Li X J, et al. A primary study on the acclimation to salt-water of Nile tilapia and Israel strain red tilapia[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2003, 12(2): 97-101 (in Chinese).
- [5] 冯广朋, 庄平, 赵峰, 等. 不同盐度海水驯养中史氏鲟血清激素浓度的变化 [J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(4): 317-322.  
Feng G P, Zhuang P, Zhao F, et al. Changes of serum hormone levels during seawater acclimation in Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*)[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2007, 16(4): 317-322 (in Chinese).
- [6] 王建钢, 乔振国, 于忠利. 点带石斑鱼对盐度适应性的初步研究 [J]. 现代渔业信息, 2009, 24(6): 23-24.  
Wang J G, Qiao Z G, Yu Z L. Elementary study on *Epinephelus malabaricus* to salinity adaption[J]. Modern Fisheries Information, 2009, 24(6): 23-24 (in Chinese).
- [7] 郝俊, 张振奎, 邵蓬, 等. 北方地区南美白对虾人工繁育技术要点 [J]. 河北渔业, 2017(7): 40-42,56.  
Hao J, Zhang Z K, Shao P, et al. Key points of artificial breeding technology for *Litopenaeus vannamei* in northern regions[J]. Hebei Fisheries, 2017(7): 40-42,56 (in Chinese).
- [8] 王慧, 耿隆坤, 房文红, 等. 中国对虾往西北内陆咸水水域移植的生产性试养研究 [J]. 海洋渔业, 1997, 19(1): 9-12.  
Wang H, Geng L K, Fang W H, et al. Studies on the commercially experimental culture of penaeid shrimp, *Penaeus chinensis*, transplanted to the northwest inland salt waters[J]. Marine Fisheries, 1997, 19(1): 9-12 (in Chinese).
- [9] 杨富亿, 李秀军, 孙丽敏, 等. 凡纳滨对虾对吉林西部盐碱水的适应性 [J]. 应用生态学报, 2006, 17(2): 315-319.  
Yang F Y, Li X J, Sun L M, et al. Adaptability of *Litopenaeus vannamei* to saline-alkali water in west Jilin Province[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2006, 17(2): 315-319 (in Chinese).
- [10] 方伟, 刘磊, 常雯, 等. 盐碱水和海水养殖条件下的拟穴青蟹生长和营养成分比较分析 [J]. 水产学报, 2022, 46(11): 2143-2157.

- Fang W, Liu L, Chang W, *et al.* Comparative analysis of growth and nutritional components of *Scylla paramamosain* cultured in saline-alkali water and marine water[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(11): 2143-2157 (in Chinese).
- [11] 党云飞, 徐伟, 耿龙武, 等. 盐碱和 pH 对鱼类生长和发育的影响 [J]. *水产学杂志*, 2012, 25(2): 62-64.
- Dang Y F, Xu W, Geng L W, *et al.* A review of effects of saline-alkalinity and pH on growth and development in fish[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2012, 25(2): 62-64 (in Chinese).
- [12] 房文红, 王慧, 来琦芳. 碳酸盐碱度、pH 对中国对虾幼虾的致毒效应 [J]. *中国水产科学*, 2000, 7(4): 78-81.
- Fang W H, Wang H, Lai Q F. Toxicity of carbonate-alkalinity and pH to larval *Penaeus chinensis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2000, 7(4): 78-81 (in Chinese).
- [13] 柳飞, 李健, 李吉涛, 等. 碳酸盐碱度对脊尾白虾生存、生长、繁殖及免疫酶活性的影响 [J]. *中国水产科学*, 2016, 23(5): 1137-1147.
- Liu F, Li J, Li J T, *et al.* Effects of carbonate alkalinity stress on the survival, growth, reproduction, and immune enzyme activities of *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(5): 1137-1147 (in Chinese).
- [14] 魏威, 何玉英, 李朝霞, 等. 中国对虾 *ATG5* 基因的克隆及其在 pH、碳酸盐碱度胁迫下的表达分析 [J]. *渔业科学进展*, 2022, 43(3): 84-94.
- Wei W, He Y Y, Li C X, *et al.* Cloning of *ATG5* gene of *Fenneropenaeus chinensis* and expression analysis under pH and carbonate alkalinity stress[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 43(3): 84-94 (in Chinese).
- [15] 杨雨虹, 李明帅, 罗亮, 等. 盐碱胁迫对中华绒螯蟹毒性作用研究 [J]. *东北农业大学学报*, 2022, 53(2): 36-41.
- Yang Y H, Li M S, Luo L, *et al.* Study on toxicity of salinity and alkalinity on *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2022, 53(2): 36-41 (in Chinese).
- [16] Zhang R, Zhao Z G, Li M S, *et al.* Metabolomics analysis reveals the response mechanism to carbonate alkalinity toxicity in the gills of *Eriocheir sinensis*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2023, 263: 109487.
- [17] Hinzn N, Jücker M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review[J]. *Cell Communication and Signaling*, 2019, 17(1): 154.
- [18] 刘丽, 孙景贤, 常亚青, 等. 水产动物 *Akt* 基因研究进展 [J]. *大连海洋大学学报*, 2019, 34(4): 602-609.
- Liu L, Sun J X, Chang Y Q, *et al.* Research progress on *AKT* gene in aquatic animals: a review[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2019, 34(4): 602-609 (in Chinese).
- [19] Zhou T T, Liu J H, Chan S M, *et al.* Molecular characterization and expression dynamics of three key genes in the PI3K-AKT pathway reveal its involvement in the immunotoxicological responses of the giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii* to acute ammonia and nitrite stress[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 208: 111767.
- [20] 迟艳红, 李诗豪, 王冬冬, 等. 中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)Akt/PKB 基因在病原刺激下的表达和功能分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(3): 611-617.
- Chi Y H, Li S H, Wang D D, *et al.* Expression and function analysis of Akt/PKB in pathogens-challenged Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(3): 611-617 (in Chinese).
- [21] 辛芳, 王雷, 刘梅, 等. 水产动物雷帕霉素受体信号通路的研究进展 [J]. *海洋科学*, 2016, 40(1): 147-154.
- Xin F, Wang L, Liu M, *et al.* Mechanistic target of rapamycin signaling in aquatic animals[J]. *Marine Sciences*, 2016, 40(1): 147-154 (in Chinese).
- [22] Jung H J, An H J, Gwon M G, *et al.* Anti-fibrotic effect of synthetic noncoding oligodeoxynucleotide for inhibiting mTOR and STAT3 via the regulation of autophagy in an animal model of renal injury[J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 766.
- [23] Su H H, Ma D M, Fan J J, *et al.* Metabolism response mechanism in the gill of *Oreochromis mossambicus* under salinity, alkalinity and saline-alkalinity stresses[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2023, 251: 114523.
- [24] Mathew S, Kumar K A, Anandan R, *et al.* Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2007, 145(3): 315-320.
- [25] 姚翠鸾, 王志勇, 相建海. 甲壳动物血细胞及其在免疫防御中的功能 [J]. *动物学研究*, 2006, 27(5): 549-557.
- Yao C L, Wang Z Y, Xiang J H. Crustacean haemocytes and their function in immune responses[J]. *Zoological Research*, 2006, 27(5): 549-557 (in Chinese).
- [26] 王卓, 么宗利, 林听听, 等. 碳酸盐碱度对青海湖裸鲤幼鱼肝和肾 SOD、ACP 和 AKP 酶活性的影响 [J]. *中国水产科学*, 2013, 20(6): 1212-1218.
- Wang Z, Yao Z L, Lin T T, *et al.* Effects of carbonate alkalinity stress on SOD, ACP, and AKP activities in the liver and kidney of juvenile *Gymnocypris przewalskii*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(6): 1212-1218 (in Chinese).
- [27] Zhang R, Zhao Z G, Li M S, *et al.* Effects of saline-alkali stress on the tissue structure, antioxidation, immunocompetence and metabolomics of *Eriocheir sinensis*[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 871: 162109.
- [28] Li M S, Wang S H, Zhao Z G, *et al.* Effects of alkalinity on the antioxidant capacity, nonspecific immune response and tissue structure of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Fishes*, 2022, 7(4): 206.
- [29] Goodyear L J, Kahn B B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity[J]. *Annual Review of Medicine*, 1998, 49: 235-261.



## Effects of acute alkalinity stress on anti-stress, antioxidant capacity and muscle tissue structure of *Eriocheir sinensis*

CHEN Han<sup>1</sup>, QIU Qiyong<sup>1</sup>, WANG Meiyao<sup>1,2\*</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

**Abstract:** China possesses abundant saline-alkali water resources that are currently underutilized. Developing saline-alkali water aquaculture could transform these abandoned resources into valuable assets and enhance fishery production. This study aimed to investigate the effects of acute alkalinity stress on the physiological metabolism of *Eriocheir sinensis*. A control group (0 mmol/L) and an alkalinity group (60 mmol/L) were established, with four treatment times (0, 6, 12, and 24 h) to examine the impacts of acute alkalinity stress on the mRNA expression of anti-stress and developmental regulatory genes (*mTOR* and *AKT*) in the hepatopancreas of *E. sinensis*, as well as antioxidant capacity indicators [catalase (CAT), total antioxidant capacity (T-AOC), malondialdehyde (MDA)] and muscle tissue structure, which are key tissues for energy metabolism. Results showed that after 6 h of alkalinity stress, *AKT* gene expression increased and then decreased, but remained significantly higher than the control group at 24 h ( $P < 0.05$ ). *mTOR* expression significantly increased after 6 h of stress ( $P < 0.05$ ) and remained highly expressed. CAT enzyme activity in the hepatopancreas of *E. sinensis* significantly decreased after 6 h of stress ( $P < 0.05$ ). T-AOC levels in the hepatopancreas significantly increased after 24 h of alkalinity stress ( $P < 0.05$ ), while MDA content significantly increased with prolonged stress, peaking at 24 h ( $P < 0.05$ ). Muscle tissue structure in *E. sinensis* was not significantly affected by 6 h of alkalinity stress. The observed increases in antioxidant enzyme activity (T-AOC) and upregulation of stress-resistant and developmental genes (*AKT* and *mTOR*) indicated that *E. sinensis* actively responded to alkalinity stress. This study provides theoretical guidance for elucidating the anti-stress mechanisms of *E. sinensis* in saline-alkali environments and for the future development of *E. sinensis* aquaculture.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; alkalinity stress; hepatopancreas; antioxidant capacity; anti-stress

**Corresponding author:** WANG Meiyao. E-mail: [wangmeiyao@ffrc.cn](mailto:wangmeiyao@ffrc.cn)

**Funding projects:** Jiangsu Revitalization of Seed Industry (JBGS (2021) 031); Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2023TD39); National Key R & D Program of China (2022YFD2400702); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, Freshwater Fisheries Research Center, CAFS (2023JBFM05)