



溶解氧变化对菲律宾蛤仔鳃组织结构的影响

周丽青^{1,2}, 葛广玉³, 井浩², 吴宙³, 孙秀俊¹, 李家乐^{2*},
吴彪¹, 刘志鸿¹, 杨金龙^{2*}

- (1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;
3. 浙江海洋大学, 国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022)

摘要: 为探讨溶解氧变化对菲律宾蛤仔鳃组织结构的影响, 实验设计 3 种溶解氧变动模式, 分别为一直维持正常溶解氧 C 处理、正常溶解氧-快速低氧 24 h-快速复氧 4 h AHR 处理、正常溶解氧-缓慢低氧 48 h-缓慢复氧 8 h CHR 处理, 然后采用组织切片和免疫组化方法分析了溶解氧变化对鳃组织结构的影响。组织切片结果显示, 溶解氧变化会影响到菲律宾蛤仔鳃组织的形态结构, 低氧使鳃丝变宽, 表层上皮细胞破损, 纤毛脱落, 海绵状血管组织变得松散, 鳃小腔空隙变大, 内有细胞残片; 低氧再复氧明显改变鳃叶鳃小瓣的形态, 外鳃叶鳃小瓣组织细胞受损程度比内鳃叶鳃小瓣严重; 缓慢低氧 48 h 和缓慢复氧 8 h 对鳃组织结构损伤较快速低氧 24 h 和快速复氧 4 h 严重。免疫组化结果显示, 快速低氧 24 h 和缓慢低氧 48 h 均使鳃组织 ROS 水平提高, 复氧仅降低鳃组织的 ROS 水平, 短时间内对低氧造成的损伤无明显修复作用, 缓慢低氧 48 h 和复氧 8 h 破损的鳃组织细胞多且弥散, 细胞核质边界不清晰, 鳃组织细胞受损程度高于快速低氧 24 h 和复氧 4 h。研究表明, 无论缓慢低氧 48 h 还是快速低氧 24 h 均会对鳃组织的细胞结构造成损伤, 短时间内复氧, 组织细胞损伤得不到修复, 缓慢低氧 48 h 对鳃组织结构损伤较快速低氧 24 h 严重, 且组织细胞损伤在缓慢复氧 8 h 时还持续加重。本研究可为双壳贝类养殖模式调整提供参考。

关键词: 菲律宾蛤仔; 鳃; 形态结构; 低氧; 活性氧

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 为双壳纲 (Bivalvia) 帘蛤目 (Veneroida) 帘蛤科 (Veneridae) 双壳贝类, 是世界性自然分布的养殖种类, 具有养殖周期短、适应性强的特点, 也是我国的传统养殖贝类之一。作为许多沿海地区常见优势物种, 菲律宾蛤仔是这些海洋生态系统中食物网

和生物地球化学循环的关键成员, 然而在严重缺氧情况下由于新陈代谢被抑制, 其生长、繁殖和存活均受到影响^[1]。菲律宾蛤仔主要栖息于河口、内湾和沿海的滩涂, 受潮汐、降雨和季节等影响, 其生存的环境条件经常发生较大变化, 环境胁迫所导致的贝类免疫力低下是诱发贝类大规模死亡

收稿日期: 2023-11-01 修回日期: 2024-01-18

资助项目: 中国水产科学研究院基本科研业务费 (2023TD30); 崂山实验室科技创新项目 (LSKJ202203803); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费 (20603022022001); 青岛市市南区科技计划 (2022-2-026-ZH); 莆田市科技计划 (2021NJ002)

第一作者: 周丽青 (照片), 从事贝类遗传育种研究, E-mail: zhouliq@ysfri.ac.cn

通信作者: 李家乐, 从事贝类遗传育种研究, E-mail: jlli@shou.edu.cn;

杨金龙, 从事贝类遗传育种研究, E-mail: jlyang@shou.edu.cn



的一个重要原因。近年来, 全球气候变化和近岸海水富营养化使滩涂生态系统的低氧区不断扩大, 低氧的严重程度和持续时间又会因为富营养化而加剧, 并可能随着气候变化而恶化, 长期缺氧可以杀死包括贝类在内的大量海洋生物, 短期的缺氧也会对贝类造成亚致死性影响, 如繁殖力、生长速率、免疫力降低等^[2], 这对我国沿海经济发展和生态系统维护十分不利。

菲律宾蛤仔的鳃既是呼吸器官, 也是摄食器官, 其滤食功能主要由鳃丝和鳃丝表皮细胞纤毛的规则摆动带动水流来完成。鳃直接暴露在海水中, 是贝类的重要防御器官, 紫彩血蛤 (*Nuttallia olivacea*) 的鳃丝内、丝间联系、鳃间隔及结缔组织中含有大量的吞噬细胞, 这些吞噬细胞与血细胞具有相似的结构与功能, 成为紫彩血蛤重要的防御屏障^[3]。宋晓楠等^[4]发现低盐环境下菲律宾蛤仔鳃丝遭到破坏, 连接松散, 纤毛运动逐渐停止, 呼吸和滤食受阻。Zhang 等^[5]使用核磁共振波谱检测了长期缺氧胁迫下的菲律宾蛤仔鳃组织代谢组学的显著变化, 发现缺氧对菲律宾蛤仔鳃的渗透平衡和能量代谢有显著影响, 也发现低氧胁迫可导致鳃组织畸形。然而, 关于溶解氧变化对菲律宾蛤仔鳃组织结构的影响尚未见更多报道。在预实验中, 发现当溶解氧在 0.5 mg/L 下, 菲律宾蛤仔存活率在胁迫 24 h 时开始下降, 8 h 时能量代谢相关基因、免疫基因 NF- κ B 及低氧诱导因子基因 HIF-1 α 在鳃组织中的表达即明显改变^[6]。另外, 菲律宾蛤仔最先响应溶解氧变化的是鳃组织, 急性复氧 4 h 和慢性复氧 8 h 均对鳃组织和血淋巴的氧化-抗氧化酶体系以及能量利用体系产生明显影响^[7]。为进一步探讨溶解氧变化对菲律宾蛤仔鳃组织结构的影响, 实验设计 3 种溶解氧变动模式, 分别为一直维持正常溶解氧 C 处理、正常溶解氧-快速低氧 24 h-快速复氧 4 h AHR 处理、正常溶解氧-缓慢低氧 48 h-缓慢复氧 8 h CHR 处理, 然后采用组织切片和免疫组化技术研究溶解氧变化对菲律宾蛤仔鳃组织结构的影响, 以期解析菲律宾蛤仔在溶解氧条件不佳时组织细胞学反应机制, 为双壳贝类养殖模式调整提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验对象

1~2 龄个体大小均匀菲律宾蛤仔 6 kg 采自

山东省青岛市红岛海滩, 约 500 只, 壳长 (36.49 \pm 2.72) mm, 壳高 (25.45 \pm 2.65) mm, 壳宽 (15.71 \pm 1.24) mm, 体重 (9.13 \pm 2.04) g。蛤仔采回后于实验室暂养 1 周左右, 吐尽泥沙, 用于实验, 暂养水温控制在 19~21 °C。暂养期间定量投喂实验室培植的硅藻、扁藻和金藻 (20 L 水体投喂 1 L 鲜藻液), 每天换水 1 次, 每次换 1 半海水, 并吸除残饵和粪便 1 次, 实验和暂养均采用 30 L 塑料槽, 无底质。实验前 24 h 停喂单胞藻。实验过程中操作人员严格遵守实验动物伦理规范。

1.2 实验设计

设置 3 种溶解氧变动模式, 分别为一直维持正常溶解氧 C 处理 (7.0 mg/L)、快速低氧 24 h-快速复氧 4 h AHR 处理、缓慢低氧 48 h-缓慢复氧 8 h CHR 处理。正常溶解氧 C 处理作为对照组, 维持溶解氧 7.0 mg/L, 每个槽中投入菲律宾蛤仔 60 粒; AHR 处理, 每个槽中投入 60 粒菲律宾蛤仔, 先用充氮气的方法 4 h 内控制溶解氧从 7.0 mg/L 降至 0.5 mg/L, 开始计时, 低氧胁迫 24 h, 然后立即曝气, 使溶解氧在 4 h 内快速从 0.5 mg/L 升高至 7.0 mg/L, 即快速复氧 4 h; CHR 处理, 将 60 粒菲律宾蛤仔投入到溶解氧 7.0 mg/L 的水槽中, 用充氮气的方法控制溶解氧在 8 h 内缓慢降低至 0.5 mg/L, 随后这种低氧胁迫持续 48 h, 再逐步曝气, 使溶解氧在 8 h 内缓慢升高至 7.0 mg/L, 复氧过程持续 8 h。3 种模式均设立 3 个重复, 每个重复都在 30 L 塑料槽内各投 60 粒蛤仔。塑料方槽的排列采用完全随机化区组设计。每隔 2 h 进行溶解氧测定和死亡统计。处理期间不喂食不换水。

1.3 样品采集时间与命名

C 处理组 24 h 时取样, 命名为 CG, 并作为对照组。AHR 组 24 h 时取样, 命名为 AH24h; 再快速复氧 4 h 取样, 命名为 AH24hAR4h。CHR 组 48 h 时取样, 命名为 CH48h; 再缓慢复氧 8 h 取样, 命名为 CH48hCR8h。

1.4 鳃组织切片样品采集及组织切片观察

4 粒蛤仔同一侧两鳃叶平整放入装有 1.5 mL Bouin 氏液离心管中, 固定 4~24 h, 用 70% 乙醇反复漂洗 3~4 遍, 直至黄色苦味酸颜色脱尽, 保存至 70% 乙醇中, 送武汉赛维尔生物科技有限公司制备组织切片, 按照鳃叶组织纹理居中向两端横截切片, 苏木精-伊红染色, 切片使用 Pannoramic MIDI (匈牙利 3DHISTECH) 扫描成像, 供

鳃组织结构参数测量分析。

1.5 鳃组织结构参数及测量

菲律宾蛤仔左右两侧有内鳃叶和外鳃叶各一

片, 鳃叶都由紧贴的鳃小瓣并列构成, 每个鳃小瓣由鳃丝呈辐射状围成, 菲律宾蛤仔鳃瓣形态的测量指标见图 1。

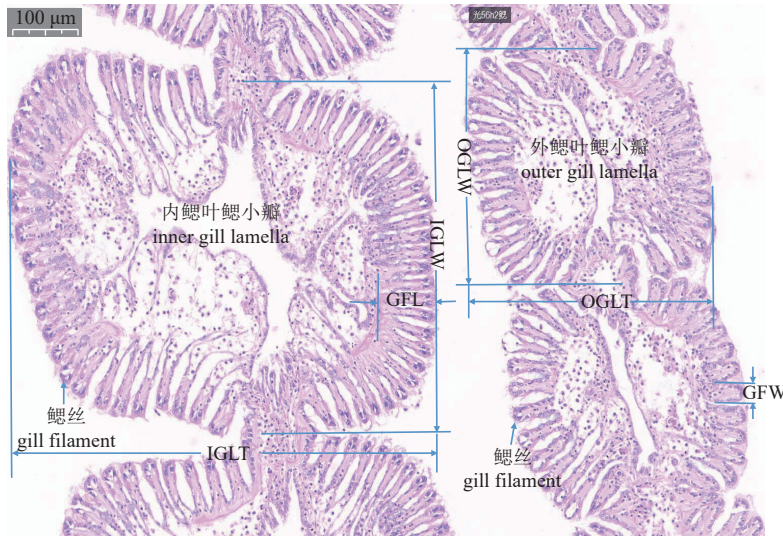


图 1 菲律宾蛤仔内鳃叶鳃小瓣和外鳃叶鳃小瓣横切面

IGLT. 内鳃叶鳃小瓣厚, OGLT. 外鳃叶鳃小瓣厚, IGLW. 内鳃叶鳃小瓣宽, OGLW. 外鳃叶鳃小瓣宽, GFL. 鳃丝长, GFW. 鳃丝宽。

Fig. 1 Cross section of the inner and outer gill flaps of *R. philippinarum*

IGLT. thickness of inner gill lamella, OGLT. thickness of outer gill lamella, IGLW. width of inner gill lamella, OGLW. width of outer gill lamella, GFL. length of gill filament, GFW. width of gill filament.

1.6 鳃组织冰冻切片 ROS 免疫荧光染色观察

参照 Feng 等^[8]的方法, 用荧光染料 CY3 替代 DHE。4 粒蛤仔同一侧两片鳃叶平整贴壁放入冻存管中, 迅速投入液氮中, 15 min 之后从液氮中取出, 放入 -80°C 超低温冰箱中冻存。Cryotome E (Thermo) 冰冻切片机切片, 装在载玻片上, 冰冻切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈 (防止抗体流走), 在圈内滴加 ROS 染液进行染色, 避光恒温箱 37°C 孵育 30 min。然后玻片置于 PBS (pH 7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加 DAPI 染液, 避光室温孵育 10 min, 进行 DAPI 复染细胞核。然后玻片置于 PBS (pH 7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min, 切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。最后切片于荧光显微镜下观察并采集图像。DAPI 紫外激发波长 330~380 nm, 发射波长 420 nm, 发蓝光, 显示细胞核; CY3 激发波长 510~560 nm, 发射波长 590 nm, 发红光, 显示活性氧 ROS, 颜色越亮表示活性氧含量越高。

1.7 数据分析

采用 SPSS 26.0 软件对鳃组织切片形态参数

的数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 及 Duncan 氏多重比较检验, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著的标准, 用 GraphPad Prism 8 软件作图。

2 结果

2.1 溶解氧变化对外鳃瓣和内鳃瓣形态结构指标参数的影响

实验期间, 实验组个别槽内出现 1~2 只死亡的情况, 与低氧或复氧的强度及时间无明显相关性, 估计是随机采样中存在个别不健康的个体。菲律宾蛤仔左右两侧有内、外鳃叶各 1 片, 每片鳃叶由鳃小瓣如书页般紧密贴着串联组成, 内鳃叶较外鳃叶厚且大, 内鳃叶鳃小瓣和外鳃叶鳃小瓣的横切面见图 1 (CH48hCR8h 例), 内鳃叶鳃小瓣也较外鳃叶鳃小瓣厚且大。内鳃叶由 27~30 片鳃小瓣组成, 外鳃叶由 20~23 片鳃小瓣组成; 鳃小瓣由切面像手指一样的鳃丝向外周放射状围成, 内鳃叶鳃小瓣的横切面近似矩形, 外鳃叶鳃小瓣的横切面近似椭圆形; 每个鳃丝由具有纤毛的单层上皮细胞及其围绕的血腔组成; 鳃丝基部的血腔是相通的, 汇聚成海绵状组织, 正常情况下,

海绵状组织形态不是很规则, 但内缘边界清晰, 内缘边界围成鳃小腔, 受溶解氧变化的影响, 海绵状组织会膨胀或萎缩, 边界甚至会出现损伤而变得模糊。

实验结果显示, 除外鳃叶鳃小瓣宽变化不明显外, 其他形态指标数值均有明显改变, 4个形态指标参数是相互影响的, 一般鳃丝变宽, 鳃丝长相应变小, 导致鳃小瓣宽或厚发生改变(图2)。内鳃叶厚(即鳃小瓣厚)在AH24h明显降低, 相应的内鳃叶鳃小瓣宽AH24h明显增大, 而AH24hAR4h内鳃叶鳃小瓣宽略微变窄但不能恢复至正常宽度(图2-b); CH48h内鳃叶鳃小瓣的宽和厚均有降低, CH48hCR8h内鳃叶鳃小瓣反而较正常溶解氧时明

显变宽(图2-b)。外鳃叶厚变化较内鳃叶厚变化明显, 尤其AH24hAR4h外鳃叶厚明显较正常溶解氧状态时变薄, CH48hCR8h外鳃叶厚度也变薄(图2-a, e); 外鳃叶鳃丝宽变化也较内鳃叶鳃丝宽变化明显, CH48hCR8h内外鳃丝宽都不能恢复至正常(图2-c, g); CH48hCR8h外鳃叶鳃丝长由正常值变小, 而内鳃叶鳃丝却能由低氧导致的变小恢复至正常长度(图2-d, h)。外鳃叶和内鳃叶的鳃丝宽都是CH48h时最大, 而CH48hCR8h时都明显变窄, 但CH48hCR8h时外鳃叶鳃丝长因变宽而变短, 内鳃叶鳃丝长却能恢复至正常值(图2-c~d, g~h)。说明外鳃叶形态对快速低氧和快速复氧响应迅速, 对缓慢低氧后缓慢复氧响应延迟(图2-e,

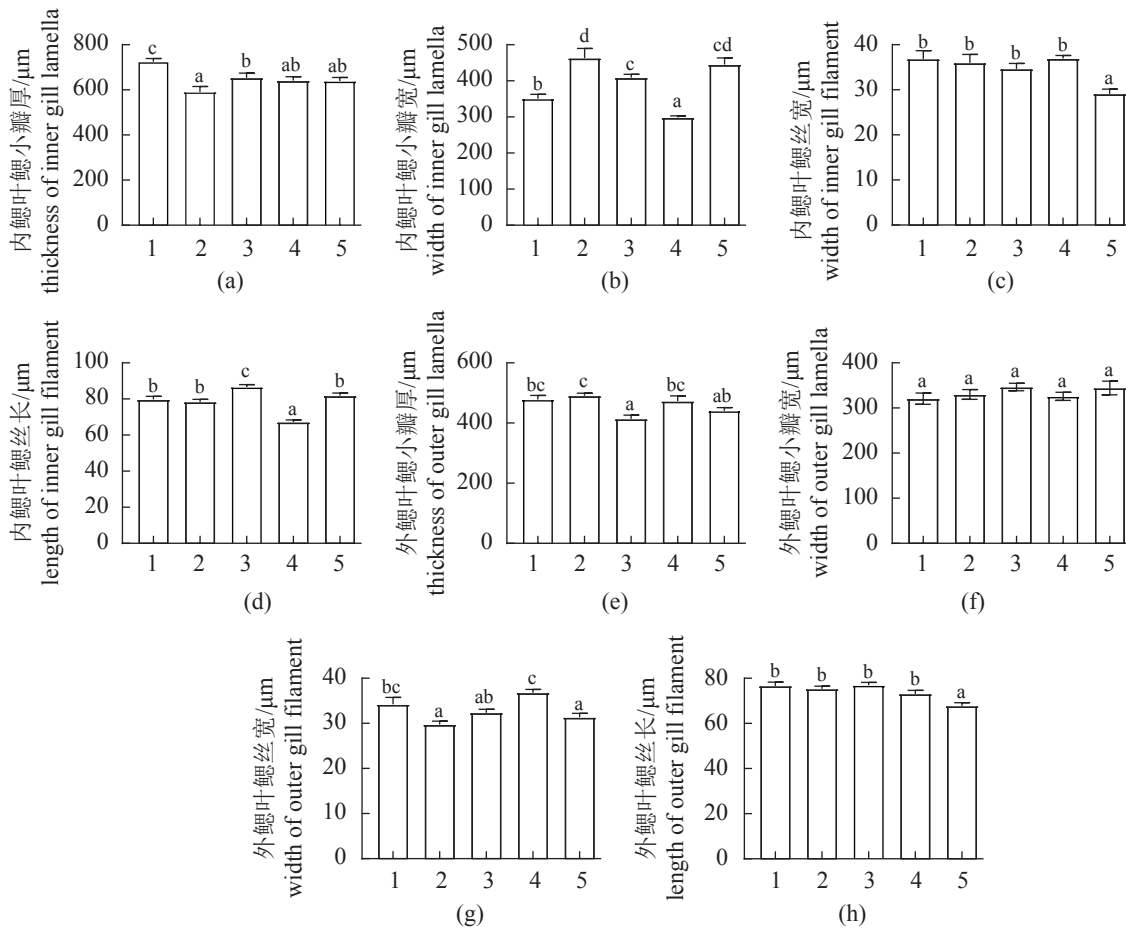


图2 溶解氧变化对外鳃叶和内鳃叶形态结构指标参数的影响

CG. 正常溶解氧组, AH24h. 快速低氧胁迫 24 h, AH24hAR4h. 快速低氧胁迫 24 h 快速复氧 4 h, CH48h. 缓慢低氧 48 h, CH48hCR8h. 缓慢低氧 48 h 缓慢复氧 8 h. 不同字母表明不同处理平均值间差异显著 ($P < 0.05$). 1. CG, 2. AH24h, 3. AH24hAR4h, 4. CH48h, 5. CH48hCR8h, 下同。

Fig. 2 Effect of dissolved oxygen changes on the morphological and structural parameters of the outer and inner gill flaps

CG. control group, AH24h. quick hypoxia stress 24 h, AH24hAR4h. quick hypoxia stress 24 h then quick reoxygenation 4 h, CH48h. slow hypoxia 48 h, CH48hCR8h. slow hypoxia 48 h then slow reoxygenation 8 h. Different letter markers indicated that there was a significant difference between the two averages ($P < 0.05$). 1. CG, 2. AH24h, 3. AH24hAR4h, 4. CH48h, 5. CH48hCR8h, the same below.

g), 内鳃叶形态受缓慢低氧和缓慢复氧的影响要明显大于外鳃叶, 但响应也延迟 (图 2-a~d)。

外鳃叶和内鳃叶形态变化有很多相似之处, 对照组 (CG) 鳃小瓣轮廓周正饱满, 鳃丝横切面上上下粗细基本一致呈直柱状, 排列紧凑, 鳃丝表层上皮细胞的纤毛完整自然伸展, 鳃丝之间的纤毛相互穿插, 均匀排布; 海绵状血腔的组织细胞排布整齐, 细胞边界和组织边界都很清晰; 鳃小腔宽窄适度, 腔边界清晰可辨 (图 3 和 图 4)。AH24h 时鳃丝宽或游离端变大或基部扩大, 相应的, 鳃丝之间的间隙变大; 海绵状血腔的组织变得松散, 细胞排布凌乱, 或聚集或散乱, 空隙明显增大; 整个鳃小瓣形态轮廓变得松散。AH24hAR4h 时, 鳃丝宽度进一步被拉伸, 尤其是鳃丝基部, 导致鳃丝之间的间隙缩小, 表层上皮细胞的纤毛相互勾连缠绕, 海绵状血腔虽稍有恢复, 但低氧造成的结构损伤依然可见。CH48h 时, 内鳃叶和外鳃叶组织结构均明显受到不可逆的破坏, 鳃丝极度

膨胀, 表层上皮细胞有破损和纤毛掉落的情况; 鳃小腔空隙都很大, 内有不少细胞残片; 海绵状血腔边界不清晰; 鳃小瓣形态不周正, 甚至局部塌陷, 鳃丝间隔疏密不一, 有些鳃丝东倒西歪。CH48hCR8h 时, 内鳃叶组织结构稍有恢复, 外鳃叶除了鳃小腔空隙恢复至正常外, 其他损伤性变化都不可逆转, 外鳃叶鳃小瓣严重变形。复氧时内鳃瓣海绵状血腔形态略有恢复, 但外鳃瓣海绵状血腔的损伤基本维持现状。

2.2 鳃组织 ROS 变化

鳃叶组织冰冻切片容易造成组织松散, 出现损伤的鳃叶组织冰冻切片后形态更散乱。对照组 (CG) 鳃叶组织和细胞核的轮廓都很清晰, 细胞之间排列紧凑, 生成的 ROS 少 (红色亮度低), 表明鳃叶组织细胞损伤小或者无 (图 5)。AH24h 时, 局部鳃叶组织凌乱, 细胞边界不清晰, 细胞核之间黏连较多, 生成的 ROS 多 (红色亮度高), 表明

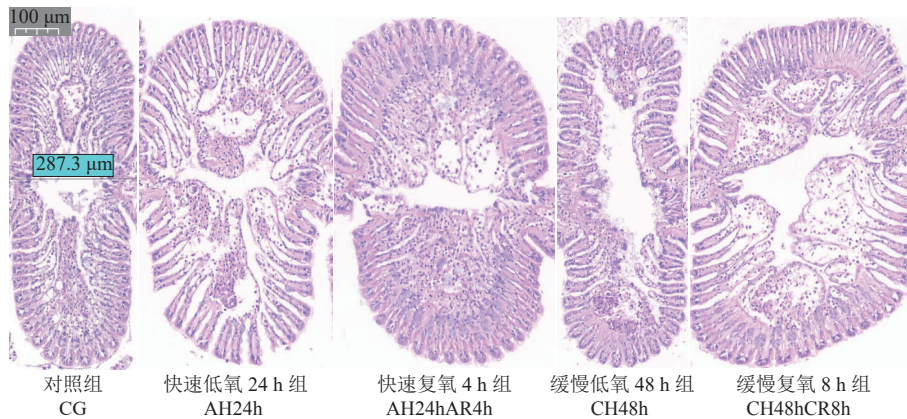


图 3 溶解氧变化对菲律宾蛤仔内鳃叶鳃小瓣形态结构的影响

Fig. 3 Effects of hypoxia stress and reoxygenation on the tissue structure of the inner gill lamella of *R. philippinarum*

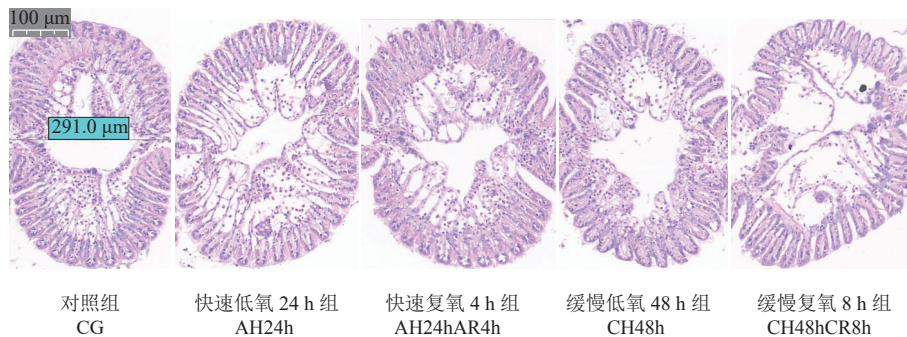


图 4 溶解氧变化对菲律宾蛤仔外鳃叶鳃小瓣形态结构的影响

Fig. 4 Effects of hypoxia stress and reoxygenation on the tissue structure of the outer gill lamella of *R. philippinarum*

鳃叶组织细胞损伤明显。AH24hAR4h 时, 尽管生成的 ROS 减少, 但细胞核和细胞质出现明显的分离现象, 即细胞破损严重, 表明鳃叶组织细胞的损伤已经造成。CH48h 时, 局部鳃叶组织形态较 AH24h 维持得好, 但组织细胞破损程度要高于

AH24h, 破损组织细胞弥散状, 产生的 ROS 最多(红色亮度最高)。CH48hCR8h 时, 生成的 ROS 有所减少, 但鳃叶组织细胞的损伤并没有得到恢复, 反而持续加重, 鳃组织整体散乱, 细胞核质边界不清晰。

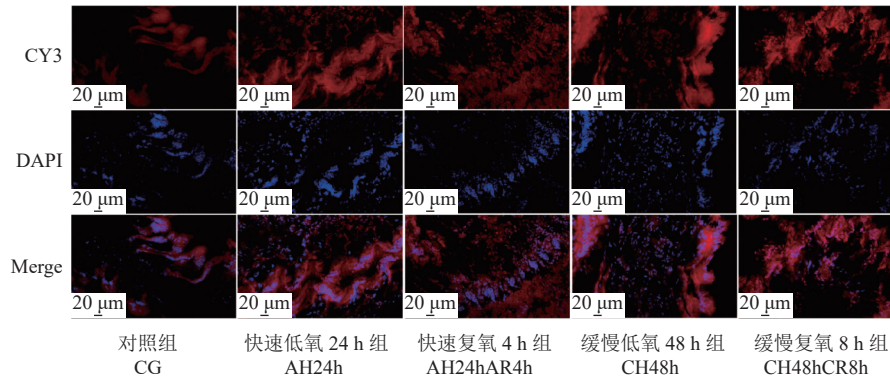


图 5 溶解氧变化与鳃组织 ROS 变化 (400×)

Fig. 5 Changes in dissolved oxygen and ROS in the gill tissue (400×)

综上, 慢性低氧 48 h 和复氧 8 h 对鳃组织结构损伤较急性低氧 24 h 和急性复氧 4 h 严重。

3 讨论

ROS 是一种具有高度活性的分子, 能氧化细胞成分, 对于生物体抵御病原微生物的感染具有重要作用^[9]。不过, 生物机体产生过多的 ROS 又会促使细胞膜脂质过氧化、蛋白质羰基化、DNA 和蛋白质发生交联, 从而使细胞 ATP 酶活性受抑制, 能量代谢紊乱, 最终导致细胞凋亡, 甚至出现组织细胞结构的损伤^[10]。贝类的鳃尽管被外套膜包裹在外套腔中, 得到很好的保护, 但作为呼吸器官和滤食器官, 仍直接暴露于海水中, 很容易受到水体环境因子变化的影响。贝类鳃组织属于细胞分裂旺盛的部位, 鳃细胞分生较快, 老化也较快, 能在较短的时间内适应各种环境因子变化^[11]。各种环境因子变化也会引起鳃组织产生一系列 ROS 生成和清除的氧化应激反应, 低氧可以导致生物体内电子蓄积, 产生较高水平的 ROS。尽管贝类鳃组织抗氧化防御系统有响应, 甚至响应增强, 也无法保护鳃组织免受 ROS 介导的损伤^[12]。长牡蛎鳃组织抗氧化状态 (SOD、CAT、GSH 基因表达) 在缺氧 24~72 h 发生了总体变化, 影响细胞内 ROS 水平, 短期缺氧 (24 h) 能维持氧化还原稳态, 但缺氧 72 h 鳃中 SOD 活性降低, 可能代表蛋白质合成的普遍抑制, 代谢速率降低, 鳃组织势必受损^[13]。本研究中鳃组织样品冰冻切

片 ROS 免疫荧光染色结果表明, 无论快速低氧还是缓慢低氧均会导致鳃组织 ROS 水平升高, 对鳃组织造成不可逆的损伤, CH48h 时, 有些鳃组织形态维持较好, 而有些组织结构损伤严重, 推测是内鳃瓣受损程度较外鳃瓣低的缘故。ROS 介导的鳃组织损伤并不会因为复氧时 ROS 生成减少而有所改观。因此, 低氧对菲律宾蛤仔这类双壳贝类鳃组织的损伤是比较严重的, 如果鳃组织得不到及时修复, 势必造成大规模的危害而蒙受经济损失。溶解氧是滩涂埋栖型贝类养殖需要重视的环境条件之一, 潮间带溶解氧是时刻发生改变的, SOD 和 CAT 等抗氧化酶活性调整以暂时抵御 ROS 介导的组织损伤是有限的^[14], 因此菲律宾蛤仔养殖管理需要考量溶解氧的控制。

国内外有关双壳贝类鳃组织结构观察的报道不多, 尽管和合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 一样属于典型的滤食性瓣鳃类贝类, 菲律宾蛤仔左右两侧各有 2 片鳃叶 (内鳃叶和外鳃叶), 而合浦珠母贝左右两侧各有两个鳃瓣, 每个鳃瓣由内鳃瓣和外鳃瓣组成^[15], 二者的组织形态结构差别非常大, 但基本组成单位鳃丝的结构却十分相似。正是借助鳃丝及上皮细胞表面纤毛的摆动, 菲律宾蛤仔和合浦珠母贝的鳃既是气体交换场所, 又是摄取营养的滤食器官, 能较早感应环境变化, Zhang 等^[5]研究发现, 缺氧环境会使菲律宾蛤仔鳃组织的结构出现明显的病理性破坏, 如鳃丝上皮不完整, 层间结构消失, 鳃丝间连接不规则。虾夷扇

贝 (*Patinopecten yessoensis*) 在溶解氧低于 2 mg/L 时, 随着时间增加, 行为评分为 0 (状态极差和死亡) 的比例明显增加, 出现了外套膜萎缩, 鳃丝黏连等现象, 说明严重的低氧胁迫会影响虾夷扇贝的行为特征, 并导致死亡率显著升高^[16]。低氧胁迫 5 d 后, 雌性三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 外鳃侧纤毛较对照组增宽了 79.58%, 外鳃小水管较对照组增宽了 248.73%^[17]。香螺 (*Nepitunea cumingii*) 在缺氧初始阶段, 通过改变鳃丝形态, 扩大鳃丝表面积, 进而增大鳃与水的接触面积, 加大对氧的吸收, 以满足机体所需, 当持续低氧时, 香螺的鳃组织结构遭到严重破坏, 致使其相关功能丢失, 最终导致其死亡^[18]。低氧环境下采集的两种蛤 *Tapes decussatus* 和 *T. laeta* 鳃丝上皮都表现出严重的变化, 前者表现出上皮细胞增生、融合丝和大量血细胞浸润的现象, 后者表现出细丝变薄和顶端纤毛系统受损的情况^[19]。Hao 等^[20]用独特的视角, 使用实时多普勒超声仪监测华贵栉孔扇贝 (*Chlamys nobilis*) 器官 (鳃、外套膜和闭壳肌) 在缺氧和高温胁迫下的循环生理指标如心率 (HR)、血流量 (FV)、血流速度 (PS 和 ED)、阻力指数 (RI) 和 S/D 比值, 结果发现严重缺氧会引起 PS 变化, 鳃的 RI 和 S/D 比值逐渐增加, 以确保鳃的血流量稳定供应, 并发现鳃的整体循环生理指标对环境的反应比外套膜和闭壳肌都更积极, 因此认为鳃对缺氧和高温胁迫的抵抗力是最强的。等边浅蛤 (*Gomphina veneriformis*) 埋栖 8 d 后, 鳃和肝胰腺的 SOD 和 CAT 活性在 30 cm 的埋栖深度内均表现出显著的上调, 而鳃中的酶活性高于肝胰腺。Li 等^[14]认为鳃比肝胰腺更容易受到埋栖效应低氧的影响。本研究发现, 两种溶解氧变化均对菲律宾蛤仔鳃组织结构造成不可逆的损伤, 损伤情况与前文提及的物种大同小异, 如鳃丝宽度变大、表层上皮细胞有破损和纤毛掉落、鳃小腔空隙变大并有细胞残片、海绵状血腔边界不清晰等, 即便复氧也无法在短时间内使损伤得到修复; 外鳃瓣因为直接感受海水溶解氧变化, 受损伤程度要比内鳃瓣严重。本研究揭示了菲律宾蛤仔在低氧胁迫下鳃组织形态结构变化特征, 为及时诊断该物种低氧胁迫状况提供了有效的数据和技术支持, 可为双壳贝类养殖模式调整提供参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Li Q, Sun S, Zhang F, *et al.* Effects of hypoxia on survival, behavior, metabolism and cellular damage of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*)[J]. *PLoS ONE*, 2019, 14 (4): e0215158.
- [2] Barnett A F, Gledhill J H, Griffitt R J, *et al.* Combined and independent effects of hypoxia and tributyltin on mRNA expression and physiology of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*)[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 10605.
- [3] 孙虎山, 王晓安. 紫彩血蛤鳃的组织化学和扫描电镜研究 [J]. *动物学杂志*, 1999, 34 (4): 9-12.
Sun H S, Wang X A. Histochemical and electron scanning microscopic studies on the gills of *Nuttallia olivacea*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1999, 34 (4): 9-12 (in Chinese).
- [4] 宋晓楠, 马峻峰, 秦艳杰, 等. 盐度骤降对菲律宾蛤仔抗氧化酶活力及组织结构的影响 [J]. *农学学报*, 2013, 3 (1): 50-56.
Song X N, Ma J F, Qin Y J, *et al.* Effects of abrupt decline in salinity on the antioxidant enzyme activities and histological structure in *Ruditapes philippinarum*[J]. *Journal of Agriculture*, 2013, 3 (1): 50-56 (in Chinese).
- [5] Zhang Y, Wu H F, Wei L, *et al.* Effects of hypoxia in the gills of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using NMR-based metabolomics[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 114: 84-89.
- [6] Jing H, Liu Z H, Wu B, *et al.* Physiological and molecular responses to hypoxia stress in Manila clam *Ruditapes philippinarum*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2023, 257: 106428.
- [7] 周丽青, 井浩, 葛广玉, 等. 溶解氧变化模式对菲律宾蛤仔鳃组织和血淋巴液氧化应激及生理代谢的影响 [J]. *中国水产科学*, 2023, 30 (3): 361-370.
Zhou L Q, Jing H, Ge G Y, *et al.* Effects of three dissolved oxygen modes on oxidative stress and physiological metabolism in *Ruditapes philippinarum* gill tissue and hemolymph[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2023, 30 (3): 361-370 (in Chinese).
- [8] Feng H M, Chen H Z, Qiang J C, *et al.* Mechanisms regarding respiratory toxicity triggered by accumulation of ROS in carp exposed to difenoconazole[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2023, 191: 105343.
- [9] 王化敏, 丁鉴锋, 杨东敏, 等. 4 种壳色菲律宾蛤仔在低氧胁迫下的耐受能力比较研究 [J]. *大连海洋大学学报*, 2018, 33 (2): 181-189.
Wang H M, Ding J F, Yang D M, *et al.* Comparison of hypoxia stress tolerance among Manila clam *Ruditapes philippinarum* with four shell-colors[J]. *Journal of*

- Dalian Ocean University, 2018, 33 (2): 181-189 (in Chinese).
- [10] 王进华, 柏彬彬, 邓婉菲, 等. 镉诱导文蛤鳃细胞凋亡和抗氧化生物标志物的响应 [J]. 生态毒理学报, 2022, 17 (2): 413-423.
Wang J H, Bai B B, Deng W F, *et al.* Apoptosis of *Meretrix meretrix* gill cell and response of antioxidative biomarkers induced by cadmium[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17 (2): 413-423 (in Chinese).
- [11] 孙振兴, 张暉, 郝丽红, 等. 菲律宾蛤仔鳃组织的原代培养 [J]. 水产科学, 2004, 23 (2): 12-14.
Sun Z X, Zhang L, Hao L H, *et al.* Primary culture of gill tissue of *Ruditapes philippinarum*[J]. Fisheries Science, 2004, 23 (2): 12-14 (in Chinese).
- [12] Company R, Serafim A, Cosson R, *et al.* Temporal variation in the antioxidant defence system and lipid peroxidation in the gills and mantle of hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*[J]. Deep-Sea Research Part I, 2006, 53: 1101-1116.
- [13] Andreyeva A Y, Gostyukhina O L, Kladchenko E S, *et al.* Acute hypoxic exposure: effect on hemocyte functional parameters and antioxidant potential in gills of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Marine Environmental Research, 2021, 169: 105389.
- [14] Li X J, Chen L L, Zhou Z Q, *et al.* The behavioral and antioxidant response of the bivalve *Gomphina veneriformis* to sediment burial effect[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2021, 40 (6): 75-82.
- [15] 陈飞飞, 黄桂菊, 油九菊, 等. 合浦珠母贝鳃的显微与超微结构 [J]. 动物学杂志, 2012, 47 (6): 78-84.
Chen F F, Huang G J, You J J, *et al.* Microstructure of the gill in the pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. Chinese Journal of Zoology, 2012, 47 (6): 78-84 (in Chinese).
- [16] 夏玉莹, 张继红, 刘毅. 低氧胁迫下虾夷扇贝的行为特征及生理生化响应 [J]. 中国水产科学, 2021, 28 (10): 1319-1328.
- Xia Y Y, Zhang J H, Liu Y. Behavioral characteristics and physiological responses to hypoxic stress in *Patinopecten yessoensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28 (10): 1319-1328 (in Chinese).
- [17] 郭思鹏, 汪桂玲, 白志毅, 等. 雌性三角帆蚌外鳃组织形态周年变化及低氧胁迫对外鳃组织形态和酶活性影响 [J]. 上海海洋大学学报, 2022, 31 (4): 865-872.
Guo S P, Wang G L, Bai Z Y, *et al.* Annual changes of outer gill tissue morphology and effects of hypoxia stress on outer gill tissue morphology and enzyme activities in female *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2022, 31 (4): 865-872 (in Chinese).
- [18] 张倩鸿, 王绍军, 田莹, 等. 溶解氧对香螺行为、抗氧化酶活性及组织结构的影响 [J]. 大连海洋大学学报, 2022, 37 (4): 643-649.
Zhang Q H, Wang S J, Tian Y, *et al.* Effects of dissolved oxygen concentration on behavior, antioxidant enzyme activities and tissue structure of whelk *Nepitunea cumingii* Crosse[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2022, 37 (4): 643-649 (in Chinese).
- [19] Maisano M, Natalotto A, Cappello T, *et al.* Influence of environmental variables on neurotransmission, oxidative system, and hypoxia signaling on two clam species from a Mediterranean coastal lagoon[J]. Journal of Shellfish Research, 2016, 35 (1): 41-49.
- [20] Hao Y, Sun C Y, Rong Y, *et al.* Circulatory and metabolic physiology disorder in different organs of the subtropical scallop species *Chlamys nobilis* under thermal and hypoxia stress, revealed by doppler ultrasonography technique[J]. Frontiers in Marine Science, 2022, 9: 880112.

Effects of dissolved oxygen changes on the gill tissue structure of *Ruditapes philippinarum*

ZHOU Liqing^{1,2}, GE Guangyu³, JING Hao², WU Zhou³, SUN Xiujun¹, LI Jiale^{2*},
WU Biao¹, LIU Zhihong¹, YANG Jinlong^{2*}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. National Engineering Research Center For Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract: The *Ruditapes philippinarum* mainly inhabits estuaries, inner bays and coastal mudflat. Affected by tides, rainfall and seasons, the dissolved oxygen in their living environment is prone to change, which will affect their growth, survival and metabolism. The gills of bivalves are both respiratory organs and feeding organs used for filtering food. In order to investigate the effect of dissolved oxygen changes on the gill tissue structure of *R. philippinarum* and provide parameters for their aquaculture management, we designed three modes of dissolved oxygen changes, namely, continuous maintenance of regular dissolved oxygen C treatment, regular dissolved oxygen-rapid hypoxia for 24 h-rapid reoxygenation for 4 h AHR treatment, and regular dissolved oxygen-slow hypoxia for 48 h-slow reoxygenation for 8 h CHR treatment. Then tissue sections and immunohistochemistry methods were used to analyze the effect of dissolved oxygen changes on the gill tissue structure. The results of tissue sectioning showed that dissolved oxygen changes would affect the morphology and structure of gill tissue in *R. philippinarum*. Hypoxia caused gill filaments to widen, surface epithelial cells to damage, cilia to fall off, the sponge like blood cavity tissue to become loose, gill lumen gaps to become larger, and there were cell fragments inside. Hypoxia reoxygenation significantly changed the morphology of the gill flap, and the damage to the tissue cells of the outer gill flap was more severe than that of the inner gill flap. Slow hypoxia for 48 h and slow reoxygenation for 8 h caused more severe damage to the gill tissue structure than quick hypoxia for 24 h and quick reoxygenation for 4 h. The immunohistochemical results showed that both rapid hypoxia for 24 h and slow hypoxia for 48 h increase the ROS level in the gill tissue, while reoxygenation only reduced the ROS level a little in the gill tissue. There was no significant repair effect on the damage caused by hypoxia in a short period of time. The gill tissue cells damaged by slow hypoxia for 48 h and reoxygenation for 8 h were numerous and diffuse, with unclear nuclear cytoplasmic boundaries, the degree of damage to gill tissue cells was higher than that of rapid hypoxia for 24 h and reoxygenation for 4 h. In summary, this experiment found that both slow hypoxia for 48 h and rapid hypoxia for 24 h could cause damage to the cellular structure of the gill tissue. The damage to reoxygenated tissue cells could not be repaired in a short period of time. Slow hypoxia for 48 h caused more severe damage to gill tissue structure than fast hypoxia for 24 h. The tissue cell damage continues to worsen even after 8 hours of slow reoxygenation. The results of this study suggested that the management of *R. philippinarum* farming need to consider the stable control of dissolved oxygen, and efforts should be made to avoid changes in dissolved oxygen, especially the damage to the gill tissue of clams caused by long-term chronic hypoxia stress. This study provides parameters for dissolved oxygen control in the process of *R. philippinarum* aquaculture.

Key words: *Ruditapes philippinarum*; gill; morphological structure; hypoxia; ROS

Corresponding authors: LI Jiale. E-mail: jlli@shou.edu.cn;

YANG Jinlong. E-mail: jlyang@shou.edu.cn

Funding projects: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2023TD30); Technology Innovation Program of the Laoshan Laboratory (LSKJ202203803); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022022001); Science and Technology Plan Project of Shinan District, Qingdao (2022-2-026-ZH); Putian Science and Technology Plan Project (2021NJJ002)