

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18302

池塘工业化跑道式循环水高密度应激对团头鲂组织抗氧化酶及其 Nrf2-Keap1 信号通路的影响

杨震飞¹, 刘波^{1,2}, 徐跑^{1,2}, 徐钢春², 孙存鑫², 宋长友¹, 张慧敏¹, 单凡¹, 熊哲¹, 刘博¹

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, 江苏 无锡 214081

摘要: 为研究池塘跑道式循环水高密度应激对团头鲂肠道、肌肉及脑组织中 Nrf2-Keap1 信号通路的影响, 以体重为(2.33±0.13) g 的团头鲂幼鱼为实验对象, 分别在高低两种密度(低密度组, 平均 534 尾/m³; 高密度组, 平均 1073 尾/m³)下饲养, 养殖周期为 90 d。结果表明: 与低密度组相比, 30 d 时, 高密度组肌肉中 *Keap1*、*Bach1*, 脑中 *Bach1* 和肠道中 *Cu-Zn SOD* 的 mRNA 表达水平显著升高($P<0.05$), 肠道中 *NOX2*、*Nrf2*、*Keap1*, 脑中 *NOX2* 以及肌肉中 *NOX2*、*Nrf2*、*Cu-Zn SOD*、*CAT* 的 mRNA 水平显著降低($P<0.05$); 60 d 时, 与低密度组相比, 高密度组肠道中 *NOX*、*Nrf2*、*Cu-Zn SOD*、*CAT*, 肌肉中 *NOX2*、*Cu-Zn SOD* 及脑中 *NOX2*、*Nrf2*、*Keap1*、*Bach1*、*Cu-Zn SOD*、*CAT* mRNA 的表达水平显著升高($P<0.05$), 而肠道中 *Bach1* mRNA 的表达水平显著降低($P<0.05$); 90 d 时, 高密度组肠道中 *Nrf2*, 肌肉中 *NOX2*、*Nrf2*、*Bach1*、*Cu-Zn SOD*、*CAT* 及脑中 *Nrf2*、*Keap1*、*Cu-Zn SOD* 的 mRNA 水平显著升高($P<0.05$), 而肠道中 *Keap1*、*Bach1*、*Cu-Zn SOD* mRNA 的表达水平显著降低($P<0.05$)。由此可见, 池塘工业化循环水高密度养殖 60 d 可通过提高肌肉和脑中 *NOX2* mRNA 表达量激活 Nrf2-Keap1 抗氧化信号通路, 并诱导 Nrf2 下游抗氧化酶(SOD、CAT)基因表达, 以保护组织氧化应激损伤。而高密度养殖 90 d 会降低 *Cu-Zn SOD* mRNA 表达量, 导致肠道氧化应激损伤, 影响鱼体的生长。

关键词: 池塘跑道式循环水系统; Nrf2 信号通路; 抗氧化; 团头鲂

中图分类号: S965; S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)02-0232-10

池塘工业化跑道式循环水养殖系统(in-pond raceway aquaculture systems, IRAS)是一种新型的水产养殖系统^[1-3]。该系统利用占池塘面积 2%~5%的水面建设具有气提推水增氧、集污设备的系列水槽作为养殖区, 其余 95%~98%的水面作为净化区, 实现养殖周期内养殖用水的循环利用^[4-6]。作为一种新型的养殖模式, 高密度是该养殖系统的重要特点。高密度可引起个体间拥挤胁迫, 影响鱼类生理功能, 降低鱼体对饲料的消化和吸收,

并且, 高密度会造成大量氮、磷等养殖废弃物排放, 影响鱼类的生长^[7-9]。因此, 团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)等淡水养殖鱼类在池塘跑道式循环水养殖系统中的适宜养殖密度还有待探索。

Nrf2/ARE 信号通路是大多数生物体抗氧化应激反应的重要应答机制之一^[10]。在正常环境条件下, 细胞质内核转录因子 NF-E2 相关因子-2 (NF-E2-related factor 2, Nrf2)与负调控因子 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Kelch-like epichloro-

收稿日期: 2018-09-02; 修订日期: 2018-11-12.

基金项目: 江苏省农业科技自主创新项目[CX(16)1004]; 现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-45); 江苏省水产三新工程项目(D2016-18); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2017JBFZ04); 国家自然科学基金项目(31772867)。

作者简介: 杨震飞(1993-), 男, 硕士研究生, 从事水产健康养殖研究. E-mail: 17315039396@163.com

通信作者: 刘波, 研究员, 从事水产动物营养与饲料研究. E-mail: liub@ffrc.cn

hydrin-associated protein1, Keap1)相结合。当机体受到氧化应激时, Nrf2 被激活, 启动多种抗氧化酶消除体内过多的氧自由基, 使细胞内氧化—抗氧化系统处于平衡状态^[11-14]。在对鲤(*Cyprinus carpio*)的研究中发现, 拥挤胁迫后, 血液皮质醇、葡萄糖、溶菌酶和肝丙二醛含量升高, 肝过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性显著降低^[15]。拥挤胁迫会提高虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)鳃和肾糖原磷酸化酶基因(PYGM)的表达, 上调缺氧诱导因子-1 α (HIF1 α)信号通路^[16]。

团头鲂是中国大宗淡水鱼类之一, 因其肉质细嫩、味美, 深受消费者欢迎^[17]。但团头鲂在养殖中极易受到外界因素影响而产生应激反应, 如应激性出血、体表黏液减少、摄食量下降等^[18]。有关池塘工业化跑道式循环水养殖系统下高密度胁迫对团头鲂的影响未见报道。鉴于此, 本文主要探讨了池塘工业化跑道式循环水养殖系统下高密度应激对团头鲂生长性能、肠道、肌肉、脑等组织 Nrf2-Keap1 信号通路表达的影响, 了解高密度应激激活抗氧化防御机制, 为团头鲂幼鱼的科学放养提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验地点为盐城正荣生态渔业有限公司, 实验团头鲂幼鱼为江苏省盐城市建湖县渔场同一批孵化鱼苗, 用含 32%蛋白质和 6%粗脂肪的商品膨化饲料(直径 1.0 mm, 大丰通威饲料有限公司)驯化 2 周。驯化结束后, 选择健康无损伤的团头鲂幼鱼 390000 尾, 体重(2.33 ± 0.15) g, 随机分配到 6 个规格相同的水槽(22 m $\times$ 5 m $\times$ 2.5 m), 低密度组(LD)与高密度组(HD)每组 3 个重复, 其中 LD 组每个水槽饲养 130000 尾(平均 537 尾/m³), HD 组每个水槽饲养 260000 尾(平均 1073 尾/m³)。

1.2 池塘跑道式循环水槽

该池塘工业化循环水养殖系统建设在江苏省盐城市建湖县, 池塘面积为 400 亩, 养殖区由 50 个长、宽、高分别为 22 m、5 m、2.5 m 的长方体水泥槽相连组成, 水槽内平均水深为 2.2 m, 该系统采用循环水养殖原理, 包括集污区、植物净化

区和滤食性鱼类养殖区。采用气提推水的方法推进水体流动, 确保各养殖水槽内溶氧充足。粪便由污水处理设施集中处理。具体见图 1。

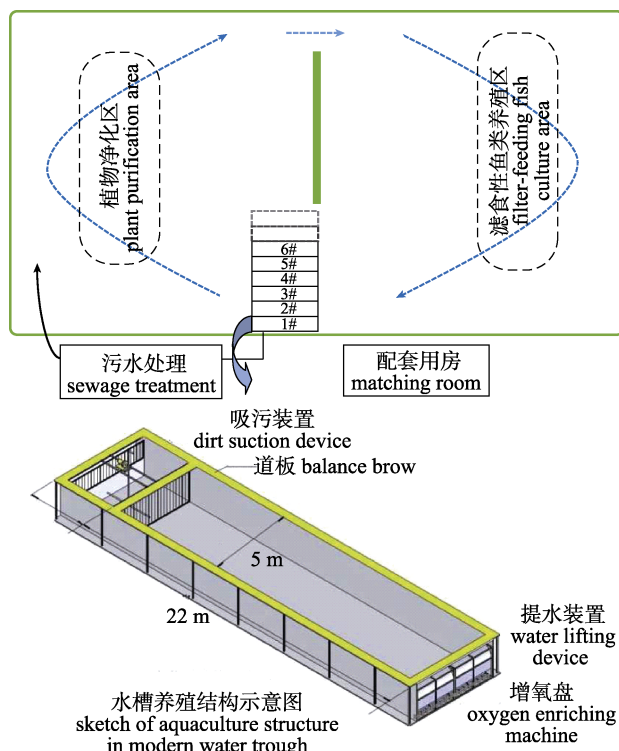


图 1 池塘工业化生态养殖系统流水槽结构示意图

Fig. 1 IRAS structure sketch map

1.3 饲养管理

饲料采用商品膨化颗粒饲料(直径 1.0~2.0 mm, 盐城大丰通威饲料), 含粗蛋白 32%, 粗脂肪 6%。以鱼体重的 2.0%~4.0%投喂。每日投喂 3 次(7:00、12:00、17:00), 尽量饱食投喂。每周调整投喂量以适应鱼体重变化。每天记录饲料消耗量和死鱼的数量和重量, 并进行吸污处理。日夜连续充气增氧, 采用自动水质监测器(中国烟台东润有限公司)监测亚硝酸盐、氨氮、溶解氧、温度等指标, 水流速度由多普勒剖面流速仪(Nortek, 挪威)测定。在实验期间各水槽平均水流速度为 0.08~0.1 m/s, 温度保持在 26~31℃, pH 为 7.4~7.8, 溶解氧 ≥ 5 mg/L, 氨氮 <0.1 mg/L。正式养殖 90 d 后, 量取鱼体长、体重并采样等。

1.4 样品采集

分别在养殖 30 d、60 d 和 90 d 后采集样品, 高

密度组与低密度组每组随机选取 9 尾体重(3 尾/槽)相近的鱼进行采样。鱼体用浓度为 100 mg/L 的 MS-222 做快速深度麻醉,剖开腹部,剥离出内脏和肝胰脏,随后取肠道、脑、背部肌肉(去鳞),并用液氮速冻后于 -80°C 保存,用于分子生物学测定。

1.5 抗氧化应激相关基因表达的测定

根据 Zhao 等^[19]方法,按照 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 试剂盒说明书提取肝脏总 RNA,通过电泳检测 RNA 的完整性,一般 $\text{OD}_{260/280}$ 为 1.8~2.0。并以 DNAase I 处理过的 RNA 以及 RT 液为模板,确定处理过的样品 RNA 无 DNA 污染。最后,采用 TaKaRa Prime Script[®] RT reagent Kit 反转录试剂盒合成 cDNA,并置于 -20°C 保存待用。应用 PrimerPremier 5.0 设计引物,根据实验室获得的团头鲂转录组数据及其相关基因的全长序列设计特异性引物^[20],所有引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成,扩增片段长度为 100~150 bp (表 1)。

表 1 实时定量 PCR 引物

Tab. 1 Gene-specific real-time quantitative PCR primers

基因 gene	引物序列(5'-3') primer sequence	片段长度/bp fragment length
β -actin	(F) TCTGCTATGTGGCTCTTGACTTCG (R) CCTCTGGGCACCTGAACCTCT	132
Cu-Zn SOD	(F) AGTTGCCATGTGCACTTTTCT (R) AGGTGCTAGTCGAGTGTTAGG	137
CAT	(F) ACCGAGGTGCTGAACGAAGC (R) GAACGGCCATCAGGTTTTGC	126
NOX2	(F) TCACTGGATGGGACCAGAGT (R) CCAGTTCGGTCGGCCATAAT	122
Nrf2	(F) CTTTGATGGATGCCTTCGGC (R) TCTGGGTAACGGGTGAATGC	150
Keap1	(F) TGAGGAGATCGGCTGCACTG (R) TGGCAATGGGACAAGCTGAA	104
Bach1	(F) TTACAGCAGCGAAGTGAGCA (R) CGGGCTGCAATACGGTTTTT	127

Nrf2、*Keap1*、*Bach1*、*NADPH* 氧化酶 2 (*NOX2*)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和 β -actin 相对量采用 SYBR PrimeScriptTM

RT-PCR Kit (TaKaRa 公司)使用说明,进行 RT 反应,然后采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时定量 PCR 扩增反应,荧光定量 PCR 反应条件为: 95°C 10 s; 然后 44 个循环: 95°C 5 s, 60°C 15 s, 72°C 10 s, 80°C 1 s; 读板记录荧光量, 72°C 3 min; 溶解的反应条件为 65°C 到 92°C , 每升高 0.2°C 保持 1 s 读板记录荧光量。以 β -actin 为内参,对得到的各样品 C_t 值进行均一化处理,以低密度组各基因的 mRNA 水平为基准,应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法确定高密度组相对应 mRNA 的相对表达量。

1.6 数据统计与分析

实验数据用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,同一时间点高与低密度组之间采用独立样本 t 检验进行检验,同一密度组不同时间点采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行检验,不同的小写字母表示各组之间差异显著($P<0.05$)。实验结果以平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x}\pm\text{SE}$)表示。此外,用 R 语言绘制 heatmap 热图来展示各组织中六种主要基因表达情况。

2 结果与分析

2.1 高密度胁迫对团头鲂肠道抗氧化酶基因及 Nrf2-Keap1 信号通路相关基因的影响

由图 2 可知,与 LD 组相比,30 d 时,HD 组团头鲂肠道 *NOX2*、*Nrf2*、*Keap1*、*Bach1* 及 *CAT* 基因的表达水平显著降低($P<0.05$), *Cu-Zn SOD* 基因的表达水平显著升高($P<0.05$); 60 d 时,HD 组团头鲂肠道 *NOX2*、*Nrf2*、*Cu-Zn SOD* 及 *CAT* 基因的表达水平显著升高($P<0.05$), *Keap1*、*Bach1* 基因的表达水平显著降低($P<0.05$); 90 d 时, *Nrf2* 基因的表达水平显著升高, *Keap1*、*Bach1* 及 *Cu-Zn SOD* 基因的表达水平显著下调($P<0.05$)。

在 LD 组中,肠道 *Nrf2* 及 *CAT* 基因表达水平在 60 d 时比 30 d、90 d 时显著降低($P<0.05$)。肠道 *Keap1*、*Bach1* 呈上升趋势,并在 90 d 达到最高,其值显著高于 30 d、60 d ($P<0.05$)。

在 HD 组中,肠道 *NOX2* 和 *Cu-Zn SOD* 呈先上升后下降趋势,60 d 时达到最高,并显著高于 30 d、90 d 两个时间点($P<0.05$)。HD 组肠道 *Nrf2*、

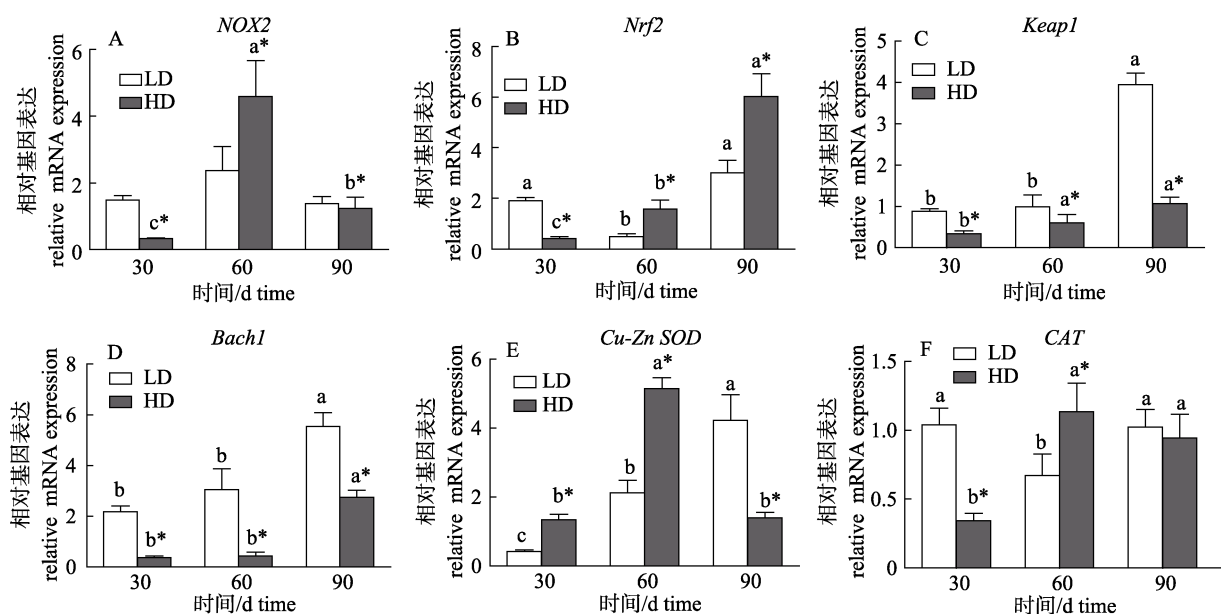


图2 不同养殖密度对团头鲂肠道 Nrf2-Keap1 信号通路相关基因的影响

LD: 低密度; HD: 高密度; *表示同一时间点高密度与低密度之间差异显著($P<0.05$);

柱状图上方不同的小写字母表示同一组在不同时间点差异显著($P<0.05$).

Fig. 2 Effects of stocking density on Nrf2-Keap1 signaling pathway in the intestine of blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* in IRAS

LD, low density; HD, high density; * indicates significant difference between HD and LD group at the same time point ($P<0.05$); different small letters mean significant differences in the same group with different time points ($P<0.05$).

Keap1、*Bach1* 及 *CAT* 基因表达在 30 d、60 d、90 d 中呈上升趋势, 其中肠道 *Nrf2*、*Keap1*、*CAT* 基因表达水平在 30 d 时比 60 d、90 d 时显著降低($P<0.05$); *Bach1* 基因表达水平在 90 d 时比 30 d、60 d 时显著升高($P<0.05$).

2.2 高密度胁迫对团头鲂肌肉抗氧化酶基因及 Nrf2-Keap1 信号通路相关基因的影响

由图 3 可知, 与对照组相比, 30 d 时, HD 组团头鲂肌肉 *Keap1*、*Bach1* 基因表达水平显著升高, *NOX2*、*Nrf2*、*Cu-Zn SOD* 及 *CAT* 基因表达水平显著降低($P<0.05$); 60 d 时, HD 组团头鲂肌肉 *NOX2*、*Cu-Zn SOD* 基因表达水平显著升高($P<0.05$), 其他基因表达没有显著影响; 90 d 时, HD 组团头鲂肌肉 *NOX2*、*Nrf2*、*Bach1*、*Cu-Zn SOD* 及 *CAT* 基因表达水平显著升高($P<0.05$).

在 LD 组中, 肌肉 *Nrf2* 基因表达水平呈现下降趋势, 在 90 d 时比 30 d、60 d 时显著降低($P<0.05$), 肌肉 *Bach1*、*CAT* 基因表达水平呈现相反趋势, 在 60 d、90 d 时比 30 d 时显著增加($P<0.05$). 肌肉 *Keap1* 基因表达水平在 60 d 时比

30 d、90 d 时显著增加($P<0.05$). 肌肉 *NOX2*、*Cu-Zn SOD* 在 LD 组不同时间点没有显著影响。

在 HD 组中, 肌肉 *NOX2*、*Bach1*、*Cu-Zn SOD* 及 *CAT* 基因表达呈上升趋势, 其中肌肉 *NOX2*、*Cu-Zn SOD*、*CAT* 基因表达水平在 30 d 时比 60 d、90 d 时显著降低($P<0.05$), 肌肉 *Bach1* 基因表达水平在 90 d 时比 30 d、60 d 时显著增加($P<0.05$). 肌肉 *Keap1* 基因表达呈降低趋势, 其中肌肉 *Keap1* 基因表达水平在 90 d 时比 30 d、60 d 时显著降低($P<0.05$). 肌肉 *Nrf2* 在 HD 组不同时间点没有显著影响。

2.3 高密度胁迫对团头鲂脑抗氧化酶基因及 Nrf2-Keap1 信号通路相关基因的影响

由图 4 可知, 与 LD 组相比, 30 d 时, HD 组团头鲂脑 *NOX2* 基因表达水平显著降低($P<0.05$), *Bach1* 基因表达水平显著升高($P<0.05$), *Nrf2*、*Keap1*、*Cu-Zn SOD*、*CAT* 没有显著影响; 60 d 时, HD 组团头鲂脑 *NOX2*、*Nrf2*、*Keap1*、*Bach1*、*Cu-Zn SOD* 及 *CAT* 基因表达水平显著升高($P<0.05$); 90 d 时, HD 组团头鲂脑 *Nrf2*、*Keap1* 及 *Cu-Zn SOD* 基

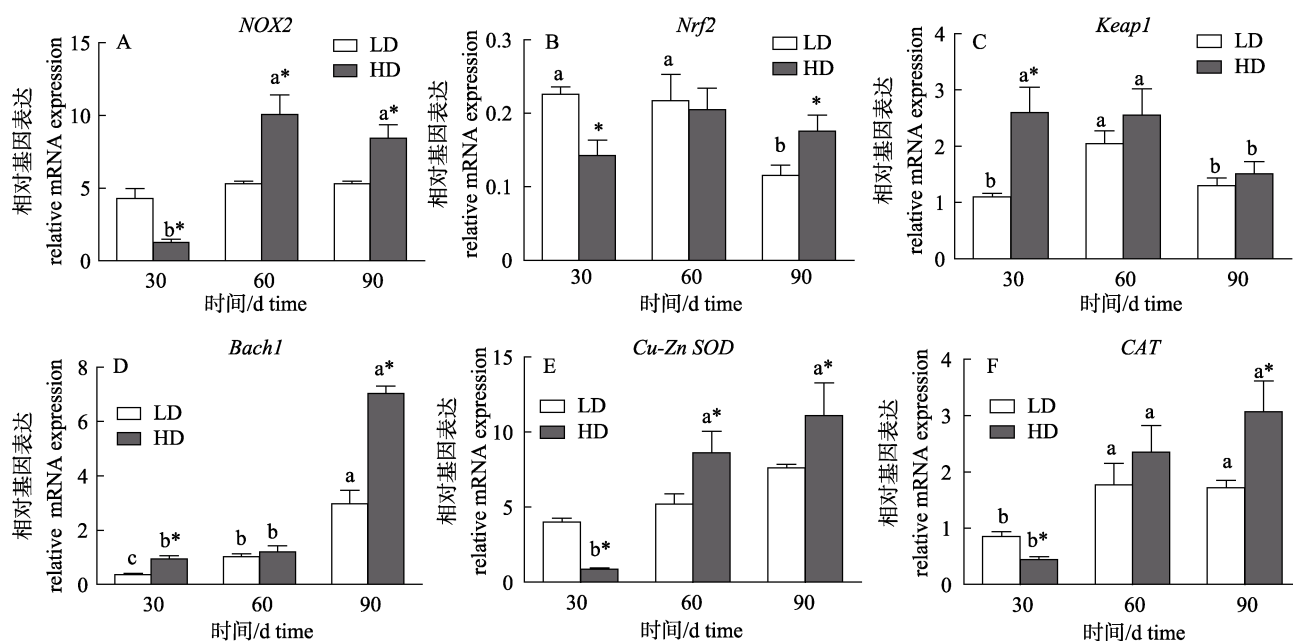


图 3 不同养殖密度对团头鲂肌肉 Nrf2-Keap1 信号通路相关基因的影响

LD: 低密度; HD: 高密度; *表示同一时间点高密度与低密度之间差异显著 ($P < 0.05$);

柱状图上方不同的小写字母表示同一组在不同时间点差异显著。

Fig. 3 Effects of stocking density on Nrf2-Keap1 signaling pathway in the muscle of blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* in IRAS

LD, low density; HD, high density; * indicates significant difference between HD and LD group at the same time point ($P < 0.05$); different small letters mean significant differences in the same group with different time points ($P < 0.05$).

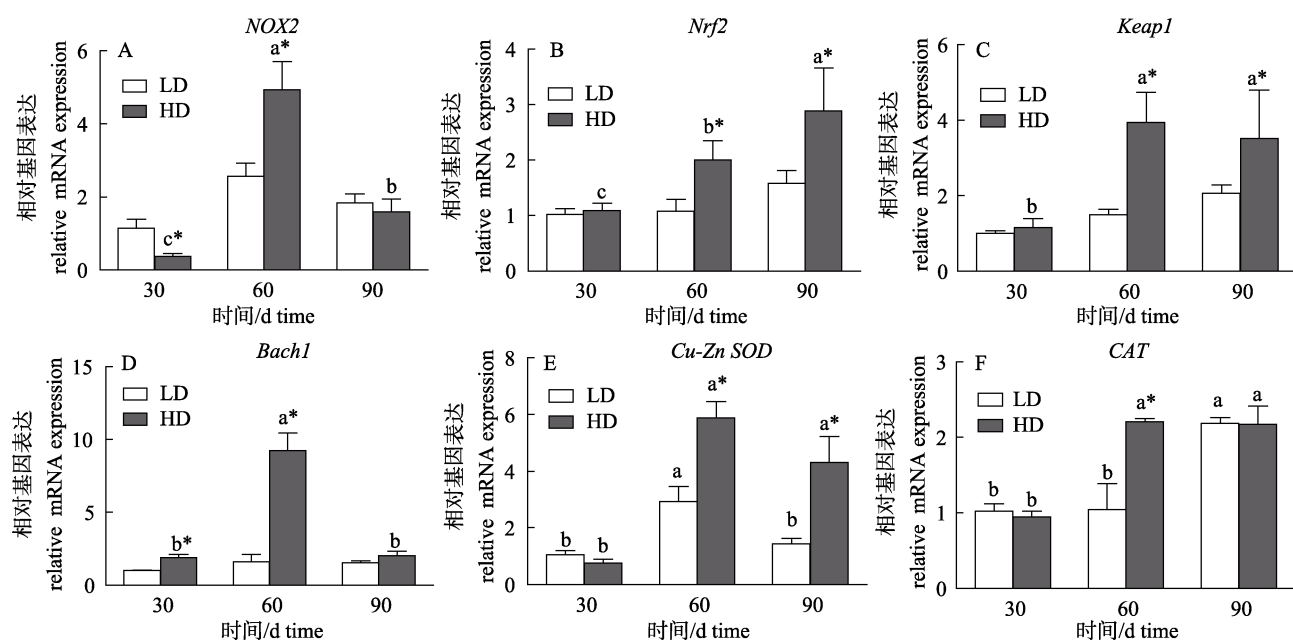


图 4 不同养殖密度对团头鲂脑 Nrf2-Keap1 信号通路相关基因的影响

LD: 低密度; HD: 高密度; *表示同一时间点高密度与低密度之间差异显著 ($P < 0.05$);

柱状图上方不同的小写字母表示同一组在不同时间点差异显著。

Fig. 4 Effects of stocking density on Nrf2-Keap1 signaling pathway in the brain of blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* in IRAS

LD, low density; HD, high density; * indicates significant difference between HD and LD group at the same time point ($P < 0.05$); different small letters mean significant differences in the same group with different time points ($P < 0.05$).

因表达水平显著升高($P<0.05$), 而对脑 *NOX2*、*Bach1*、*CAT* 没有显著影响。

在 LD 组中, 脑 *Cu-Zn SOD* 基因表达水平在 60 d 时比 30 d、90 d 时显著增加($P<0.05$), 脑 *CAT* 基因表达水平在 90 d 时比 30 d、60 d 时显著增加($P<0.05$)。脑 *NOX2*、*Nrf2*、*Keap1*、*Bach1* 等在 LD 组不同时间点没有显著影响。

在 HD 组中, 脑 *NOX2* 和 *Bach1* 呈先上升后下降趋势, 60 d 时达到最高, 并显著高于 30 d、90 d 两个时间点($P<0.05$)。脑 *Nrf2*、*Keap1*、*Cu-Zn SOD* 及 *CAT* 基因表达呈现增加趋势, 在 60 d、90 d 时显著高于 30 d 时($P<0.05$)。

2.4 高密度胁迫对团头鲂肠道、肌肉、脑相关基因热图的影响

如图 5 所示, 通过热图展现了团头鲂肠道、肌肉、脑三种组织在三个时间点不同养殖密度条件下 Nrf2-Keap1 信号通路相关 *NOX2*、*Nrf2*、*Keap1*、*Bach1*、*Cu-Zn SOD* 及 *CAT* 等 6 种关键基因表达的情况。如图 5A 所示, 肠道中出现两个聚类组: HD 90 和 LD 90 聚在一起, 并与 HD 60 聚为一类; LD 30 和 LD 60 聚在一起, 并与 HD 30 聚为一类, 这表明养殖高密度组 60 d、90 d 及低密度组 90 d 上调了肠道 *NOX2*、*Nrf2*、*Cu-Zn SOD*、*Keap1*、*Bach1* 等基因 mRNA 的表达水平($P<0.05$)。如图 5B 所示, 肌肉中也出现两个聚类组: LD 90 和 HD 90 聚在一起, 并与 HD 60 聚为一类; LD 30 和 LD 60 聚在一起, 并与 HD 30 聚为一类, 这表明高密度组 60 d、90 d 及低密度组 90 d 显著上调了肌肉 *NOX2*、*Bach1*、*Cu-Zn SOD* 及 *CAT* mRNA 的表达水平($P<0.05$)。如图 5C 所示, 脑在所有处理组中也出现两个聚类组: HD 60 和 HD 90 聚为一类; LD 30 和 HD 30 聚在一起, 并与 LD 60 聚类, 之后与 LD 90 聚为一类, 这表明高密度组 60 d 及 90 d 显著上调了脑 *NOX2*、*Nrf2*、*Keap1*、*Bach1*、*Cu-Zn SOD* 及 *CAT* 基因的表达水平($P<0.05$)。

2.5 高密度胁迫对团头鲂肠道、肌肉、脑 Nrf2-Keap1 信号通路的影响

为了进一步探索高密度胁迫可能影响的团头鲂肠道、肌肉、脑 Nrf2-Keap1 信号通路及基因, 相关的调控网络见图 6。结果表明了高密度氧化应

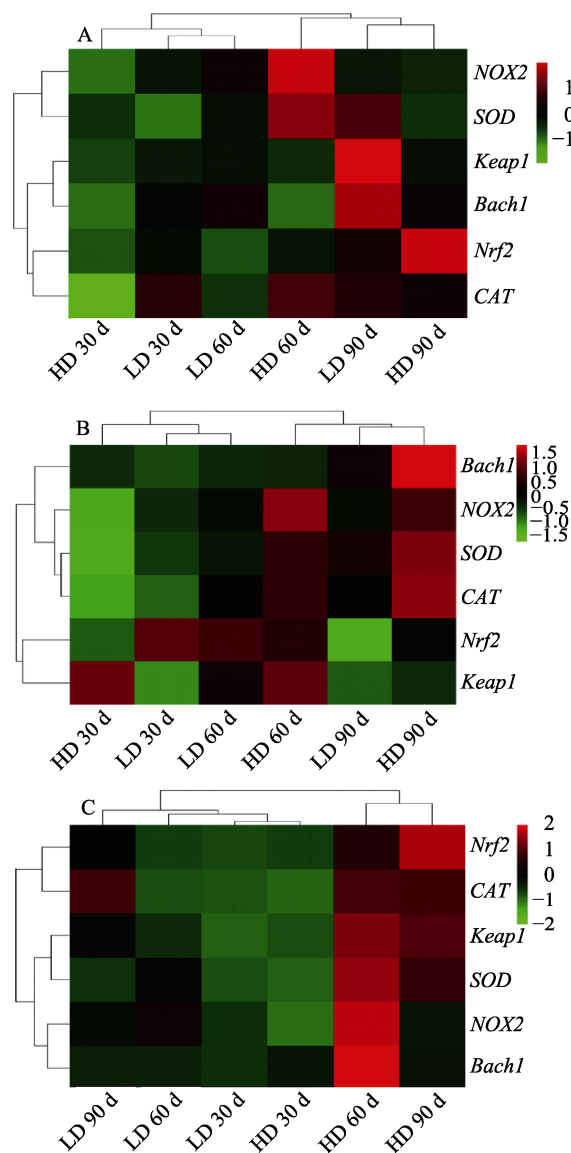


图 5 不同密度对团头鲂肠道(A), 肌肉(B), 脑(C)组织中 *CAT*、*Nrf2*、*NOX2*、*SOD*、*Keap1* 和 *Bach1* 基因表达热图的影响

低密度 30 d (LD 30 d); 低密度 60 d (LD 60 d); 低密度 90 d (LD 90 d); 高密度 30 d (HD 30 d); 高密度 60 d (HD 60 d); 高密度 90 d (HD 90 d); 颜色代表基因表达情况, 颜色越红代表基因表达量高, 越绿代表基因表达量低; 图上方和左侧系统树图表示基因聚类情况。

Fig. 5 The heatmap of different key gene expression (*CAT*, *Nrf2*, *NOX2*, *SOD*, *Keap1* and *Bach1*) with the different stocking density for blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* 30 days of LD group (LD 30 d); 60 days of LD group (LD 60 d); 90 days of LD group (LD 90 d); 30 days of HD group (HD 30 d); 60 days of HD group (HD 60 d); 90 days of HD group (HD 90 d); colors indicate the levels of different gene expression; the redder colors mean the higher gene expression levels, and the greener colors mean the lower gene expression levels; the dendrogram for strain clustering is shown on the up and left sides of the heatmap.

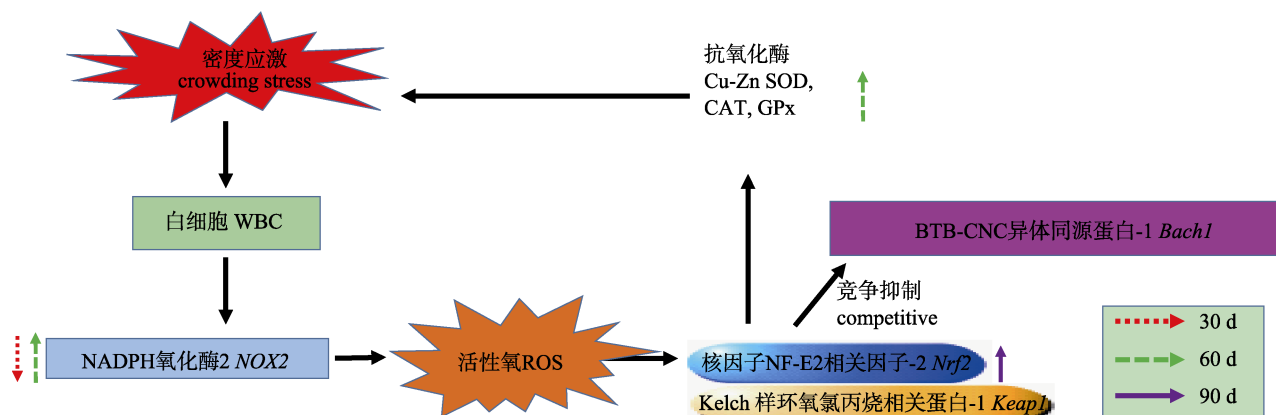


图 6 池塘工业化跑道式循环水槽高密度应激对团头鲂 Nrf2-Keap1 抗氧化应激调节通路图

A. 红色箭头代表 30 d, 绿色箭头代表 60 d, 紫色箭头代表 90 d; B. 箭头向上表示上调, 箭头向下表示下调。

Fig. 6 Different regulation of antioxidant defenses of Nrf2-Keap1 on *Megalobrama amblycephala*

exposed to high density under the pond raceway aquaculture system

A. the red, green, purple arrow mean the result of day 30, 60, 90 stocking density, respectively; B. the upward arrow is representative of gene expression activation and the downward arrow means the inhibition of gene expression.

激过程 Nrf2-Keap1 和抗氧化酶基因表达水平呈现正相关性。高密度应激 60 d 可增加肌肉、脑 NOX2, 激活 Nrf2-Keap1 抗氧化信号通路, 诱导 Nrf2 下游抗氧化酶(Cu-Zn SOD、CAT)基因表达, 以保护肌肉、脑氧化应激损伤。但是高密度应激 90 d 会降低肠道 Cu-Zn SOD mRNA 表达量, 可能导致肠道氧化应激损伤。

3 讨论

高密度胁迫可直接或间接促进生物体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成, 而 ROS 可与组织的细胞膜、蛋白质及核酸分子发生氧化还原反应, 发挥杀菌作用, 参与宿主细胞的免疫。在这过程中细胞质中的 NADPH 氧化酶(NOX)会转移到细胞膜, 与膜上的 NADPH 结合产生超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$), 最后转换成 ROS^[21-22]。然而, 过量的 ROS 会引发细胞的氧化损伤, 阻碍生物体的生长和发育^[23]。本研究中, 在养殖 30 d 时, HD 组显著降低了肠道、肌肉、脑中的 NOX2, 说明此时 NOX2 未被激活。但是与 LD 组相比, HD 组肠道、肌肉、脑组织在 60 d 以及肌肉中 90 d 时 NOX2 mRNA 表达量均显著升高, 这表明长时间(60~90 d)高密应激可激活 NADPH 氧化酶。

当细胞内产生大量的 ROS 时, Nrf2 转录因子被激活, 与 Keap1 分离进入到细胞核内^[24], 然后

通过与细胞核内抗氧化反应元件(ARE)结合后激活启动多种抗氧化酶及 II 相解毒酶, 如超氧化物歧化酶(Cu-Zn SOD)、过氧化氢酶(CAT), 从而消除过多的 ROS, 使细胞内氧化-抗氧化系统处于平衡状态。在本研究中, 与对照组相比, Nrf2 mRNA 表达量在肠道组织中 60 d 和 90 d、肌肉组织中 90 d、脑组织中 60 d 及 90 d 均显著升高。在大黄鱼(*Larimichthys crocea*)的汞诱导氧化应激实验中, 过量的汞可诱导大黄鱼肝脏组织中 Nrf2 表达量升高^[25]。养殖水环境中添加不同浓度的双氯芬酸也可以激活食蚊鱼(*Gambusia affinis*)抗氧化防御系统, 促进 Nrf2 基因的表达^[13]。同时本研究也表明 HD 组肠道 Keap1 基因表达量在 90 d 显著降低, 肠道组织中 60 d、肌肉组织中 60 d、90 d 均没有显著变化, 但是 HD 组显著增加了脑组织中 Keap1 基因在 60 d、90 d 的表达量。因此不同组织其 Keap1 的表达量不一致, 并且 Keap1 在细胞质还是细胞核中表达有待进一步研究。

Nrf2 的激活会逐渐增加细胞质内核 Nrf2 含量, 在细胞核内 Nrf2 与 BTB-CNC 异体同源蛋白-1 (Bach1)存在竞争, 导致 Nrf2 与结合因子 Maf 和抗氧化反应元件进行解离, 移出到胞质, 使细胞质和细胞核内各自的 Nrf2 恢复到正常水平^[14]。本研究也表明 HD 组相比于 LD 组在 60 d、90 d 显著地降低了肠道 Bach1 基因的表达量, 并且在脑组

织 60 d、肌肉组织 90 d 时, *Bach1* 基因的表达量显著增加, 说明机体一直处于氧化应激的动态平衡之中, 促使机体 Nrf2 恢复到正常水平。但是在脑组织 90 d 肌肉组织 60 d 时均没有显著变化, 这说明不同组织其 *Bach1* 的表达量不一致, 并且 *Bach1* 在细胞质, 还是细胞核中表达也还待进一步研究。

Nrf2 激活会进一步导致多种抗氧化酶的提高, 如 Cu-Zn SOD、CAT 等, 而其中 Cu-Zn SOD 和 CAT 是最主要, 也是最具代表性的两种抗氧化酶^[26]。Cu-Zn SOD 酶可通过歧化反应将超氧自由基转变为 H_2O_2 和 H_2O , 之后 CAT 将 H_2O_2 转化为 H_2O , 从而保护细胞免受氧化应激损伤^[27]。本研究中, 与 LD 组相比, HD 组中 Cu-Zn SOD mRNA 表达量在各组织中及 CAT mRNA 表达量在肠道、脑组织中均有上调的趋势。这也说明高密度应激诱导了 Nrf2 抗氧化应激通路, 并激活下游靶基因 Cu-Zn SOD 和 CAT 的表达以保护机体氧化应激损伤。

值得一提的是高密度胁迫 30 d 时, HD 组脑组织中 Nrf2 mRNA 表达量没有出现上调, 然而在肌肉、肠道组织中 Nrf2 mRNA 表达量显著下调。在食蚊鱼的研究中应激初期也有同样类似的结果^[13]。在大黄鱼锌的急性氧化应激初期实验中, *Nrf2* 基因的表达同样没有显著上调^[28]。并结合 *NOX2*、*Keap1*、*Bach1*、*Cu-Zn SOD*、*CAT* 来看, 在养殖 30 d 时, HD 组显著降低了肠道、肌肉、脑组织中的 *NOX2* 基因表达, 说明此时并未能激活 *NOX2*。与 LD 组相比, HD 组对不同组织肠道、肌肉、脑的 *Keap1*、*Bach1*、*Cu-Zn SOD*、*CAT* 的基因表达影响不一致。这表明池塘工业化循环水养殖模式可能在短期的高密度应激(30 d)时应激强度较小, 并未对团头鲂抗氧化防御系统造成大的影响, 机体还处于可调节的动态平衡中。但是长期的高密度应激(90 d), HD 组比 LD 组显著地降低了肠道 Cu-Zn SOD mRNA 表达量, 并且未影响肠道、脑 90 d 时的 *CAT* 基因表达。可能长期的高密度胁迫会影响抗氧化应激能力, 导致氧化应激损伤, 降低鱼体的生长。

综上所述, 池塘跑道式循环水养殖模式下高

密度应激 60 d 可增加肌肉、脑 *NOX2*, 激活 Nrf2-Keap1 抗氧化信号通路, 诱导 Nrf2 下游抗氧化酶(Cu-Zn SOD、CAT)基因表达, 以保护肌肉、脑氧化应激损伤。但是高密度应激 90 d 会降低肠道 Cu-Zn SOD mRNA 表达量, 可能导致肠道氧化应激损伤, 影响鱼体的生长。

参考文献:

- [1] Stockton K A, Moffitt C M, Watten B J, et al. Comparison of hydraulics and particle removal efficiencies in a mixed cell raceway and burrows pond rearing system[J]. *Aquacultural Engineering*, 2016, 74: 52-61.
- [2] Brown T W, Hanson T R, Chappell J A, et al. Economic feasibility of an in-pond raceway system for catfish production in west Alabama[J]. *North American Journal of Aquaculture*, 2014, 76(1): 79-89.
- [3] Brown T W, Boyd C E, Chappell J A. Approximate water and chemical budgets for an experimental, in-pond raceway systems[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2012, 43(4): 526-537.
- [4] Vulsteke E, Van Den Hende S, Bourez L, et al. Economic feasibility of microalgal bacterial floc production for wastewater treatment and biomass valorization: a detailed up-to-date analysis of up-scaled pilot results[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 224: 118-129.
- [5] Brown T W, Chappell J A, Boyd C E. A commercial-scale, in-pond raceway system for ictalurid catfish production[J]. *Aquacultural Engineering*, 2011, 44(3): 72-79.
- [6] Liu X G, Xu H, Wang X D, et al. An ecological engineering pond aquaculture recirculating system for effluent purification and water quality control[J]. *Clean-Soil, Air, Water*, 2014, 42(3): 221-228.
- [7] Vijayan M M, Leatherland J F. Effect of stocking density on the growth and stress-response in brook charr, *Salvelinus Fontinalis*[J]. *Aquaculture*, 1988, 75(1-2): 159-170.
- [8] Jørgensen E H, Christiansen J S, Jobling M. Effects of stocking density on food intake, growth performance and oxygen consumption in arctic charr (*Salvelinus Alpinus*)[J]. *Aquaculture*, 1993, 110(2): 191-204.
- [9] Cheng J J, Li J F, Wen H S, et al. Effect of stocking density on growth, muscle composition and blood parameters of hybrid sturgeon juveniles[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2015, 22(3): 433-441. [程佳佳, 李吉方, 温海深, 等. 养殖密度对杂交鲟幼鱼生长、肌肉组分和血液生理生化指标的影响[J]. *中国水产科学*, 2015, 22(3): 433-441.]

- [10] Ahmed S M U, Luo L, Namani A, et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2017, 1863(2): 585-597.
- [11] Na H K, Surh Y J. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46(4): 1271-1278.
- [12] Wang H D, Pan L Q, Si L J, et al. The role of Nrf2-Keap1 signaling pathway in the antioxidant defense response induced by PAHs in the clam *Ruditapes philippinarum*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 80: 325-334.
- [13] Danielli N M, Trevisan R, Mello D F, et al. Upregulating Nrf2-dependent antioxidant defenses in pacific oysters *Crassostrea gigas*: Investigating the Nrf2/Keap1 pathway in bivalves[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2017, 195: 16-26.
- [14] Nguyen T, Nioi P, Pickett C B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(20): 13291-13295.
- [15] Xie J, Liu B, Zhou Q L, et al. Effects of anthraquinone extract from rhubarb *Rheum officinale* Bail on the crowding stress response and growth of common carp *Cyprinus Carpio* var. *Jian*[J]. *Aquaculture*, 2008, 281(1-4): 5-11.
- [16] Rebl A, Zebunke M, Borchel A, et al. Microarray-predicted marker genes and molecular pathways indicating crowding stress in rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*)[J]. *Aquaculture*, 2017, 473: 355-365.
- [17] 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[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(3): 549-559. [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.]
- [18] Zhang W X, Sun S M, Ge X P, et al. Acute effects of ammonia exposure on the plasma and haematological parameters and histological structure of the juvenile blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*, and post-exposure recovery[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(2): 1008-1019.
- [19] Zhao Z X, Xie J, Liu B, et al. The effects of emodin on cell viability, respiratory burst and gene expression of Nrf2-Keap1 signaling molecules in the peripheral blood leukocytes of blunt snout bream (*Megalobrama Amblycephala*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 62: 75-85.
- [20] Cui Y T, Liu B, Xie J, et al. The effect of emodin on cytotoxicity, apoptosis and antioxidant capacity in the hepatic cells of grass carp (*Ctenopharyngodon Idellus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 38(1): 74-79.
- [21] Wang Y J, Jiang Z D, Kim D, et al. Stimulatory effect of the sulfated polysaccharide ascophyllan on the respiratory burst in RAW264.7 macrophages[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 52: 164-169.
- [22] Copple I M, Goldring C E, Kitteringham N R, et al. The Nrf2-Keap1 defence pathway: Role in protection against drug-induced toxicity[J]. *Toxicology*, 2008, 246(1): 24-33.
- [23] Kobayashi M, Itoh K, Suzuki T, et al. Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nrf2-Keap1 system[J]. *Genes to Cells*, 2010, 7(8): 807-820.
- [24] Kang M I, Kobayashi A, Wakabayashi N, et al. Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(7): 2046-2051.
- [25] Zeng L, Zheng J L, Wang Y H, et al. The role of Nrf2/Keap1 signaling in inorganic mercury induced oxidative stress in the liver of large yellow croaker *Pseudosciaena Crocea*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 132: 345-352.
- [26] Nordberg J, Arnér E S J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, 31(11): 1287-1312.
- [27] Liao Y L, Zhang C J, Peng S M, et al. Effects of salinity on activities of liver antioxidant enzymes and plasma lysozyme of *Epinehelus moara*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(2): 169-176. [廖雅丽, 张晨捷, 彭士明, 等. 盐度对云纹石斑鱼抗氧化酶及溶菌酶活性的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(2): 169-176.]
- [28] Zheng J L, Zeng L, Shen B, et al. Antioxidant defenses at transcriptional and enzymatic levels and gene expression of Nrf2-Keap1 signaling molecules in response to acute zinc exposure in the spleen of the large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 52: 1-8.

Effects of crowding stress on gene expression of antioxidant enzymes and Nrf2-Keap1 signaling pathway in different tissues of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) for in-pond raceway aquaculture systems

YANG Zhenfei¹, LIU Bo^{1,2}, XU Pao^{1,2}, XU Gangchun², SUN Cunxin², SONG Changyou¹, ZHANG Huimin¹, SHAN Fan¹, XIONG Zhe¹, LIU Bo¹

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

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

Abstract: We evaluated the effects of high-density stress on gene expression in the intestine, muscle, and brain by measuring Nrf2-Keap1 signaling pathway signaling molecules following different exposure times (30, 60, 90 days) of *Megalobrama amblycephala* to in-pond raceway aquaculture systems (IRAS). *Megalobrama amblycephala* (average initial weight 2.33 g±0.13 g) were reared at two different initial densities (low density group [LD], 534 fish/m³ and high-density group [HD], 1073 fish/m³) for 90 days. At the end of the trial, the results showed that the HD group exhibited increased mRNA levels of Keap1 and Bach1 in the muscle, Bach1 mRNA in the brain, and SOD mRNA in the intestines on day 30 compared to in the LD group. However, the HD group showed significantly decreased mRNA levels of NOX2, Nrf2, and Keap1 in the intestines, NOX2 in the brain, and NOX2, Nrf2, SOD, and CAT in the muscle compared to the LD group. On day 60, the HD group showed increased mRNA levels of NOX, Nrf2, SOD, and CAT in the intestines, NOX and SOD in the muscle, and NOX2, Nrf2, Keap1, Bach1, SOD, and CAT in the brain, but significantly decreased mRNA levels of Bach1 compared to the LD group. On day 90, the HD group showed increased mRNA levels of Nrf2 in the intestines, NOX, Nrf2, Bach1, SOD, and CAT in the muscle, and Nrf2, Keap1, and SOD in the brain, but significantly decreased mRNA levels of Keap1, Bach1, and SOD in the intestines compared to the LD group. Thus, the HD group (1073 fish/m³) in IRAS exhibited increased expression of various stress-related genes in the muscle and brain on day 60. Crowding induced the expression of antioxidant Nrf2-Keap1 signaling molecules to protect the tissues from oxidative stress. However, on day 90, high-density (1073 fish/m³) stress may reduce the mRNA levels of SOD, causing oxidative stress in the intestine and affecting fish growth.

Key words: IRAS; Nrf2 signaling pathway; antioxidant; *Megalobrama amblycephala*

Corresponding author: LIU Bo. E-mail: liub@ffrc.cn