

DOI: 10.12264/JFSC2022-0384

盐度驯化改善大黄鱼盐度胁迫耐受性的作用机制

张惠^{1,2}, 曾霖^{1,3}, 熊逸飞², 宋炜^{1,2}

1. 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;

2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090;

3. 蚌埠学院食品与生物工程学院, 安徽 蚌埠 233030

摘要: 为探讨盐度驯化改善大黄鱼(*Larimichthys crocea*)盐度胁迫耐受性的作用机制, 将大黄鱼暴露在盐度为 25 或 20 的水体中 7 d, 再暴露在盐度为 12 或 40 的水体中 24 h, 分为对照组(25)、低盐组(25+12)、高盐组(25+40)、低盐驯化组(20)、低盐驯化+低盐组(20+12)和低盐驯化+高盐组(20+40) 6 个处理组, 分别记为 C 组、CL 组、CH 组、A 组、AL 组、AH 组。结果显示, CL vs C 中大黄鱼肝脏的丙二醛(MDA)和脂质过氧化物(LPO)含量显著上升, 超氧化物歧化酶(SOD)和溶菌酶(LZM)活性显著上升, 过氧化氢酶(CAT)活性显著降低($P<0.05$), 碱性磷酸酶(AKP)的活性变化不显著($P>0.05$)。CH vs C 中 MDA 和 LPO 含量显著上升, SOD 和 LZM 的活性显著上升, CAT 和 AKP 显著降低($P<0.05$)。A vs C 中 MDA 和 LPO 含量显著上升($P<0.05$), SOD、LZM 和 AKP 的活性未发生显著变化($P>0.05$), CAT 活性显著降低($P<0.05$)。AL vs CL 与 AH vs CH 中 MDA 和 LPO 含量显著降低, SOD、CAT、LZM 和 AKP 的活性显著上升($P<0.05$)。铜锌超氧化物歧化酶(*Cu/Zn-SOD*)、锰超氧化物歧化酶(*Mn-SOD*)、CAT、非特异性免疫酶[c 型溶菌酶(*c-type LZM*)、g 型溶菌酶(*g-type LZM*)和 AKP]基因表达水平与其酶活呈正相关; 核转录因子 NF-E2 相关因子 2 (*Nrf2*)和核转录因子- κ B (*NF- κ B*)基因表达水平平均分别与其目的基因(抗氧化酶基因和非特异性免疫酶基因)表达水平呈正相关($P<0.05$), 表明 *Nrf2* 和 *NF- κ B* 可能分别参与了抗氧化和非特异性基因表达调控。综上所述, 盐度驯化过程中, 可以通过提高大黄鱼抗氧化和非特异性免疫能力来缓解盐度胁迫所带来的氧化损伤, 从而改善大黄鱼的盐度耐受性。

关键词: 大黄鱼; 盐度驯化; 抗氧化; 非特异性免疫

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2023)03–0334–10

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 属硬骨鱼纲 (Osteichthys), 鲈形目 (Perciformes), 石首鱼科 (Sciaenidae), 黄鱼属 (*Larimichthys*), 其味道鲜美, 营养与经济价值极高, 是我国养殖产量最高的海水鱼类单一品种^[1]。伴随着大黄鱼养殖业的迅速发展, 养殖区域有限、寄生虫病害侵染、网箱养殖密度过高和养殖水体易污染等一系列问题呈现出来^[2]。将大黄鱼养殖区域从内海港湾扩展到外海海域是解决上述问题的有效途径。然而各海域的盐度存在差

异的显著, 大黄鱼的盐度驯化研究亟待开展。

盐度是影响鱼类生长的重要环境因子, 盐度的变化会破坏鱼体的渗透压平衡^[3], 引起鱼类发生应激反应^[4], 同时活性氧分子 (ROS) 会大量产生。为防止过量的 ROS 对机体造成的损害, 维持内环境与渗透压的平衡, 机体通过引起抗氧化系统中的超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性的变化, 来抵御盐度胁迫^[5]。在应对盐度变化时, 鱼类的非

收稿日期: 2022-11-08; **修订日期:** 2022-11-29.

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新专项”(2019YFDO900904); 青岛海洋科学与技术试点国家实验室山东省专项经费(2022QNL30001); 国家海水鱼产业技术体系项目(CARS-47); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2020TD76).

作者简介: 张惠(1997–), 硕士研究生, 研究方向为海水鱼类养殖生理生态学. E-mail: 1347965353@qq.com

通信作者: 曾霖, 副教授, E-mail: zenglin615@126.com; 宋炜, 研究员, E-mail: songw@ecsf.ac.cn

特异性免疫系统也发挥着重要的作用, 其中溶菌酶 (lysozyme, LZM)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 是鱼类非特异性免疫相关的蛋白酶。LZM 是能够溶解革兰氏阴性细菌的细胞壁脂多糖的体液免疫因子, 可破坏真菌、寄生虫以及病毒, 是研究鱼类受盐度胁迫后免疫反应的重要指标^[6]。AKP 是能直接参与生物体内磷酸基团的转移、钙代谢的免疫调控酶^[7]。丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 与脂质过氧化物 (lipid oxidation, LPO) 作为氧化应激的标志物, 常被用来衡量机体抗氧化防御体系的作用大小, 可间接反映自由基造成侵害的程度、抗氧化能力及其生物活性^[2,8]。核转录因子 NF-E2 相关因子 2 (NF-E2-related factor 2, *Nrf2*) 和核转录因子- κ B (nuclear transcription factor- κ B, *NF- κ B*) 在抗氧化反应和非特异性免疫反应中发挥着重要作用。*Nrf2* 和 *NF- κ B* 分别结合抗氧化酶和非特异性免疫酶相关基因的顺式作用元件, 从而调控相关基因的表达^[9-10]。*Nrf2* 在调控细胞抗氧化防御和维持细胞内环境稳定过程中发挥重要作用^[11], *NF- κ B* 是免疫和炎症反应的重要调节因子, 广泛存在于不同类型细菌的胞质中^[12]。

研究表明, 低浓度铜驯化可通过改善非特异性免疫和能量代谢来提高大黄鱼对铜胁迫的耐受性^[13], 因而铜驯化会减轻大黄鱼中高铜诱导的免疫毒性效应^[14]。高温驯化能够提高虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 对高盐胁迫的耐受性^[15]。目前, 有关盐度驯化改善鱼类盐度胁迫耐受性的作用机制研究尚未见报道。本研究从转录因子 *Nrf2* 和 *NF- κ B* 入手, 通过对脂质过氧化物、抗氧化、非特异性免疫系统相关基因以及酶活性的变化分析, 探讨盐度驯化改善大黄鱼盐度胁迫耐受性的作用机制, 研究结果有助于揭示大黄鱼对盐度变化的响应机制, 为大黄鱼健康养殖提供相关的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验设计及样品采集

体重为 (53.46 ± 1.47) g 的实验大黄鱼购自福建宁德富发水产有限公司。将实验鱼放入 18 个容积为 400 L 的钢化玻璃桶中暂养 2 周, 20 尾/桶。然

后, 将实验鱼随机分为两组 (9 桶/组), 分别采用盐度为 25 和 20 的养殖水体暴露 7 d。低盐水体由过滤天然海水 (盐度为 25) 加入适量的淡水调配而成, 水体盐度以 1.0/d 的速率降至 20。暂养和低盐驯化期间, 每天过饱和投喂商业饲料 2 次 (10:00 和 19:00), 换水率为 100%。水质参数: 温度 (21.47 ± 1.58) °C、pH (7.57 ± 0.35) 、溶解氧 (7.38 ± 0.24) mg/L、总氨氮为 0.14~0.25 mg/L。驯化结束后, 饥饿 24 h, 将盐度 20 和 25 的 3 个养殖桶的水体盐度维持不变, 3 个养殖桶的水体盐度以 2.5/h 的速率降至 12, 另外 3 个养殖桶的水体盐度以 2.5/h 的速率升至 40, 水体盐度用海水晶进行调节。此时, 实验鱼可分为对照组 (C 组)、低盐组 (CL 组)、高盐组 (CH 组) 和低盐驯化组 (A 组)、低盐驯化+低盐组 (AL 组)、低盐驯化+高盐组 (AH 组) 6 个实验组, 每组 3 个平行 (图 1)。盐度胁迫 24 h 后, 每桶随机取 4 尾大黄鱼肝脏用于生化指标和基因表达测定。

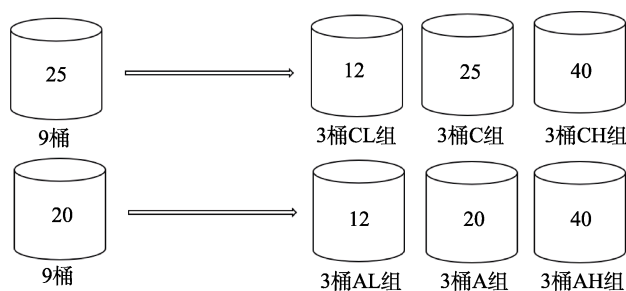


图 1 实验分组示意图

Fig. 1 Schematic diagram of experimental groups

1.2 酶活性测定

用分析天平准确称取肝脏组织重量, 以重量 (g): 体积 (cm^3) = 1:9 的比例, 加入 9 倍体积的 PBS 盐溶液, 研磨机匀浆 20 s, 制成 10% 的肝脏组织匀浆液, 在 4 °C, 12000 r/min 条件下离心 25 min 后取上清, 按需求用 PBS 盐溶液稀释后, 使用碧云天 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白测定, 南京建成试剂盒进行酶活性测定。其中, MDA 采用 TBA 法, 使用分光光度计, 在 532 nm 下测量样品吸光值; LPO 在 586 nm 下, 使用酶标仪测量样品吸光值; 定义反应体系中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的酶量为 1 个 SOD 活性单位 (U);

定义每毫克组织蛋白每秒分解 1 μmol 的 H_2O_2 的量为 1 个 CAT 活性单位(U); 定义每克组织蛋白在 37 $^{\circ}\text{C}$ 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 7.14 个 AKP 活性单位(U); 采用自身对照法对肝脏中 LZM 进行测定, 以 530 nm 处双蒸水调透光度为 100%, 测定各样品的透光度。

1.3 RT-qPCR

选择相关的 9 个基因, 参照 Zeng 等^[16]的方法进行 RT-qPCR 检测。使用 TRIzol (Invitrogen)试剂

盒提取肝脏总 RNA, 使用 first-strand cDNA synthesis kit (Fermentas)反转录成 cDNA。依据大黄鱼基因组数据库中的基因序列设计实时荧光定量引物(表 1)。在荧光定量 PCR 仪上(Applied Biosystems Prism 7500 Sequence Detection System)使用 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)进行 PCR 反应。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法对目的基因表达水平进行分析^[17]。使用 SPSS 24.0 软件进行单因素方差分析($P<0.05$)。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物
Tab. 1 Primers used for real-time PCR analysis

基因名称 gene name	正向引物(5'-3') forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') reverse primer (5'-3')
<i>GAPDH</i>	ACAACGAGTTCGGATACAGCAACC	GGTAGCAGGACAATGTGGGTGATG
<i>Cu/Zn-SOD</i>	GAGACAATACAAACGGGTGC	CAATGATGGAAATGGGGC
<i>Mn-SOD</i>	ATCGCCGCTTGTGCTAATC	CTCCCAGTTGATGACGTTCC
<i>CAT</i>	ATTATGCCATCGGAGACTTG	GCACCATTTTGCCACAG
<i>c-type LZM</i>	CCAGAGCCATCAACCACAACACT	GATCGCCACGCTGACATCATC
<i>g-type LZM</i>	TCAGCCAAGGCACCGACAT	GCATCCACCGCTTCATAGCA
<i>AKP</i>	TCAGCAGACTCCCGTCCCTC	GTTGTCCAGTTCGCAGTTCTCATAG
<i>Nrf2</i>	CCCTCAAAATCCCTTCACT	GCTACCTTGTTCTTGCCGC
<i>NF-κB</i>	TGCGGCTCGTGCGGATA	GCGGCTCAACTGGACTGC

1.4 数据分析

实验数据表示为平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x}\pm\text{SE}$)。采用 SPSS 24.0 统计软件进行分析, 实验结果经单因素方差分析(one-way ANOVA)后, 若存在显著差异, 再采用 Duncan 氏法进行多重比较。以 $P<0.05$ 为差异显著标准。应用 Excel 2019 作图。

2 结果与分析

2.1 MDA 和 LPO 含量

从图 2 可以看出, 低盐组与对照组相比(CL vs C), MDA 含量显著升高; 在 CH vs C 中, MDA 含量显著升高($P<0.05$)。与 C 组相比, A 组的 MDA 含量显著升高($P<0.05$)。在 AL vs CL 中, MDA 含量显著降低; 在 AH vs CH 中, MDA 含量显著降低($P<0.05$)。

从图 3 可以看出, 在 CL vs C 中, LPO 含量显著升高; 在 CH vs C 中, LPO 含量显著升高($P<0.05$)。与 C 组相比, A 组的 LPO 含量显著升高($P<0.05$)。在 AL vs CL 中, LPO 含量显著降低; 在 AH vs CH 中, LPO 含量显著降低($P<0.05$)。

2.2 抗氧化酶活性

从图 4 可以看出, 在 CL vs C 中, SOD 酶活性

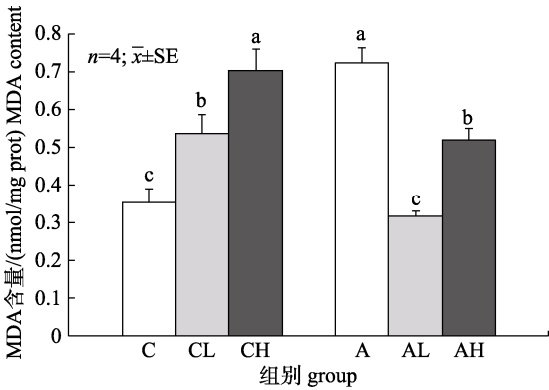


图 2 盐度变化对大黄鱼肝脏 MDA 含量的影响
C: 对照组, CL: 低盐组, CH: 高盐组, A: 低盐驯化组,
AL: 低盐驯化+低盐组, AH: 低盐驯化+高盐组。
不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$)。

Fig. 2 Effect of salinity change on MDA content in the liver of *Larimichthys crocea*
C: control group, CL: low-salt group, CH: high-salt group, A: low-salt acclimation group, AL: low-salt acclimation+low-salt group, AH: low-salt acclimation+high-salt group.
Different letters indicate significant differences between different groups ($P<0.05$).

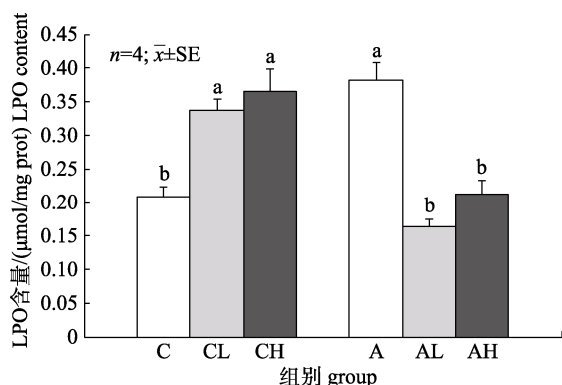


图3 盐度变化对大黄鱼肝脏 LPO 含量的影响

C: 对照组, CL: 低盐组, CH: 高盐组, A: 低盐驯化组, AL: 低盐驯化+低盐组, AH: 低盐驯化+高盐组. 不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$).

Fig. 3 Effect of salinity change on LPO content in the liver of *Larimichthys crocea*

C: control group, CL: low-salt group, CH: high-salt group, A: low-salt acclimation group, AL: low-salt acclimation+low-salt group, AH: low-salt acclimation+high-salt group.

Different letters indicate significant differences between different groups ($P<0.05$).

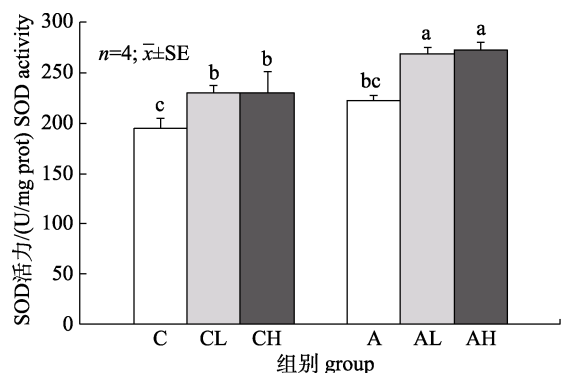


图4 盐度变化对大黄鱼肝脏 SOD 活性的影响

C: 对照组, CL: 低盐组, CH: 高盐组, A: 低盐驯化组, AL: 低盐驯化+低盐组, AH: 低盐驯化+高盐组. 不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$).

Fig. 4 Effect of salinity change on SOD activity in the liver of *Larimichthys crocea*

C: control group, CL: low-salt group, CH: high-salt group, A: low-salt acclimation group, AL: low-salt acclimation+low-salt group, AH: low-salt acclimation+high-salt group.

Different letters indicate significant differences between different groups ($P<0.05$).

显著升高;在 CH vs C 中, SOD 酶活性显著升高($P<0.05$)。与 C 组相比, A 组的 SOD 酶活性不发生显著变化($P>0.05$)。在 AL vs CL 中, SOD 酶活性显著升高;在 AH vs CH 中, SOD 酶活性显著升高($P<0.05$)。

从图 5 可以看出,在 CL vs C 中, CAT 酶活性

显著降低;在 CH vs C 中, CAT 酶活性显著降低($P<0.05$)。与 C 组相比, A 组的 CAT 酶活性显著降低($P<0.05$)。在 AL vs CL 中, CAT 酶活性显著升高;在 AH vs CH 中, CAT 酶活性显著升高($P<0.05$)。

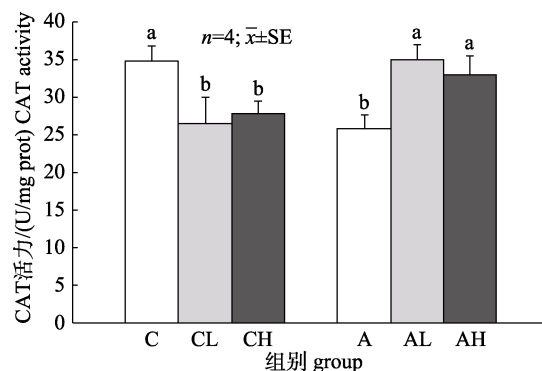


图5 盐度变化对大黄鱼肝脏 CAT 活性的影响

C: 对照组, CL: 低盐组, CH: 高盐组, A: 低盐驯化组, AL: 低盐驯化+低盐组, AH: 低盐驯化+高盐组.

不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$).

Fig. 5 Effect of salinity change on CAT activity in the liver of *Larimichthys crocea*

C: control group, CL: low-salt group, CH: high-salt group, A: low-salt acclimation group, AL: low-salt acclimation+low-salt group, AH: low-salt acclimation+high-salt group.

Different letters indicate significant differences between different groups ($P<0.05$).

2.3 非特异性免疫酶活性

从图 6 可以看出,在 CL vs C 中, LZM 酶活性显著升高;在 CH vs C 中, LZM 酶活性显著升高($P<0.05$)。与 C 组相比, A 组的 LZM 酶活性不发生显著变化($P>0.05$)。在 AL vs CL 中, LZM 酶活性显著升高;在 AH vs CH 中, LZM 酶活性显著升高($P<0.05$)。

从图 7 可以看出,在 CL vs C 中, AKP 酶活性不显著变化($P>0.05$);在 CH vs C 中, AKP 酶活性显著降低($P<0.05$)。与 C 组相比, A 组的 AKP 酶活性不发生显著变化($P>0.05$)。在 AL vs CL 中, AKP 酶活性显著升高;在 AH vs CH 中, AKP 酶活性显著升高($P<0.05$)。

2.4 抗氧化酶基因表达

由表 2 可知,与 C 组相比, CL 组 *Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD*、*Nrf2* 的基因表达显著增加, *CAT* 基因表达显著降低($P<0.05$);与 C 组相比, CH 组 *Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD* 基因表达增加、*Nrf2*、*CAT* 基

因表达显著降低($P<0.05$)。与 C 组相比, A 组的 *Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD*、*CAT*、*Nrf2* 的基因表达均不发生显著变化($P>0.05$)。与 CL 组相比, AL 组的 *Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD*、*CAT*、*Nrf2* 的基因表达显著增加($P<0.05$)。与 CH 组相比, AH 组的 *Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD*、*CAT*、*Nrf2* 的基因表达显著增加($P<0.05$)。

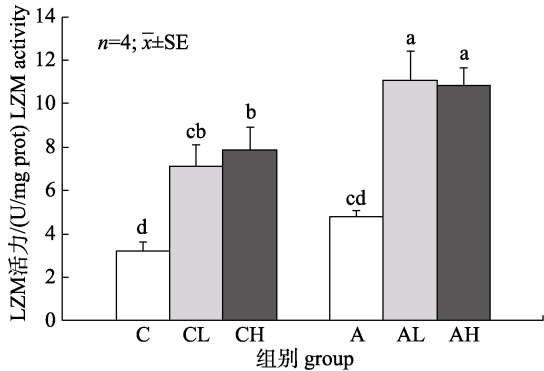


图 6 盐度变化对大黄鱼肝脏 LZM 活性的影响
C: 对照组, CL: 低盐组, CH: 高盐组, A: 低盐驯化组,
AL: 低盐驯化+低盐组, AH: 低盐驯化+高盐组。
不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$)。

Fig. 6 Effect of salinity change on LZM activity in the liver of *Larimichthys crocea* C: control group, CL: low-salt group, CH: high-salt group, A: low-salt acclimation group, AL: low-salt acclimation+low-salt group, AH: low-salt acclimation+high-salt group. Different letters indicate significant differences between different groups ($P<0.05$).

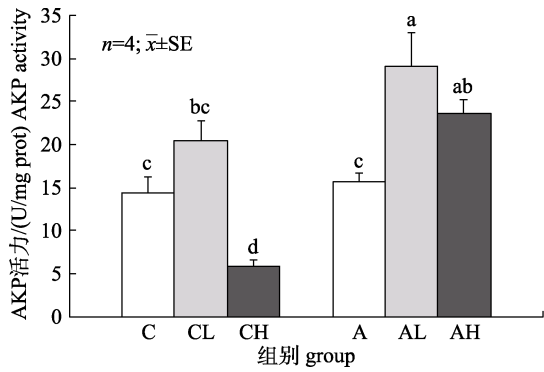


图 7 盐度变化对大黄鱼肝脏 AKP 活性的影响
C: 对照组, CL: 低盐组, CH: 高盐组, A: 低盐驯化组,
AL: 低盐驯化+低盐组, AH: 低盐驯化+高盐组。
不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$)。

Fig. 7 Effect of salinity change on AKP activity in the liver of *Larimichthys crocea* C: control group, CL: low-salt group, CH: high-salt group, A: low-salt acclimation group, AL: low-salt acclimation+low-salt group, AH: low-salt acclimation+high-salt group. Different letters indicate significant differences between different groups ($P<0.05$).

表 2 盐度变化下大黄鱼肝脏抗氧化相关
基因表达水平的影响

Tab. 2 Effects of salinity change on the expression levels of antioxidant-related genes in the liver of *Larimichthys crocea*

组别 group	铜锌超氧化物 歧化酶 <i>Cu-Zn-SOD</i>	锰超氧化物 歧化酶 <i>Mn-SOD</i>	过氧 化氢酶 <i>CAT</i>	NF-E2 相关 因子 2 <i>Nrf2</i>
C	0.85±0.24 ^d	1.03±0.10 ^d	1.00±0.17 ^b	0.99±0.07 ^c
CL	1.27±0.20 ^{bc}	1.63±0.14 ^b	0.77±0.15 ^c	1.42±0.21 ^b
CH	1.23±0.21 ^c	1.33±0.19 ^c	0.60±0.08 ^c	0.54±0.03 ^d
A	1.12±0.18 ^{cd}	1.01±0.15 ^d	1.01±0.05 ^b	0.93±0.15 ^c
AL	1.70±0.25 ^a	2.11±0.37 ^a	1.31±0.22 ^a	1.72±0.22 ^a
AH	1.61±0.31 ^{ab}	1.85±0.14 ^{ab}	1.29±0.11 ^a	1.20±0.26 ^{bc}

注: 同列不同字母表示存在显著差异($P<0.05$).
Note: Different letters in the same column indicate significant differences between different groups ($P<0.05$).

2.5 非特异性免疫酶基因表达

由表 3 可知, 与 C 组相比, CL 组 *c-type LZM*、*g-type LZM*、*AKP*、*NF-κB* 的基因表达显著增加($P<0.05$); 与 C 组相比, CH 组 *c-type LZM* 的基因表达显著上升, *g-type LZM*、*AKP*、*NF-κB* 的基因表达显著下降($P<0.05$)。与 C 组相比, A 组的 *c-type LZM* 的基因表达不发生显著变化($P>0.05$), *g-type LZM* 的基因表达显著降低, *AKP*、*NF-κB* 的基因表达显著增加($P<0.05$)。与 CL 组相比, AL 组 *c-type LZM*、*g-type LZM*、*AKP*、*NF-κB* 的基因表达显著

表 3 盐度变化下大黄鱼肝脏非特异性免疫
相关基因表达水平的影响

Tab. 3 Effects of salinity changes on the expression levels of non-specific immune-related genes in the liver of *Larimichthys crocea*

组别 group	c 型溶菌酶 <i>c-type LZM</i>	g 型溶菌酶 <i>g-type LZM</i>	碱性磷酸酶 <i>AKP</i>	核转录因子 κB <i>NF-κB</i>
C	0.84±0.14 ^d	1.34±0.30 ^c	0.72±0.17 ^d	0.92±0.15 ^d
CL	1.13±0.09 ^{bc}	1.76±0.21 ^b	1.08±0.07 ^c	1.32±0.11 ^{bc}
CH	1.11±0.06 ^{bc}	0.80±0.15 ^d	0.26±0.06 ^c	0.55±0.07 ^c
A	0.94±0.14 ^{cd}	0.89±0.18 ^d	1.21±0.13 ^c	1.15±0.07 ^c
AL	1.44±0.26 ^a	2.11±0.34 ^a	2.63±0.37 ^a	1.87±0.26 ^a
AH	1.37±0.24 ^{ab}	1.28±0.12 ^c	1.66±0.24 ^b	1.44±0.17 ^b

注: 同列不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$).
Note: Different letters in the same column indicate significant differences between different groups ($P<0.05$).

增加($P<0.05$)。与 CH 组相比, AH 组 *g-type LZM*、*AKP*、*NF- κ B* 的基因表达显著增加($P<0.05$), *c-type LZM* 的基因表达略有增加, 但差异不显著($P>0.05$)。

2.6 相关性分析

由表 4 可知, *Nrf2* 基因表达与抗氧化酶(*Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD*、*CAT*)基因表达呈显著正

相关($P<0.05$)。*NF- κ B* 基因表达与非特异性免疫酶(*c-type LZM*、*g-type LZM*、*AKP*)基因表达呈显著正相关($P<0.05$)。抗氧化酶(*Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD*、*CAT*)与非特异性免疫酶(*c-type LZM*、*g-type LZM*、*AKP*) 的基因表达与其酶活呈显著正相关($P<0.05$)。

表 4 大黄鱼肝脏参数之间的相关性分析
Tab. 4 Correlation coefficient of parameters in the the liver of *Larimichthys crocea*

自变量 independent parameter	因变量 dependent parameter	相关系数 correlation coefficient	<i>P</i>
<i>Nrf2</i> 基因表达量 <i>Nrf2</i> level	<i>Cu/Zn-SOD</i> 基因表达量 <i>Cu/Zn-SOD</i> level	0.437	0.033
<i>Nrf2</i> 基因表达量 <i>Nrf2</i> level	<i>Mn-SOD</i> 基因表达量 <i>Mn-SOD</i> level	0.593	0.002
<i>Nrf2</i> 基因表达量 <i>Nrf2</i> level	<i>CAT</i> 基因表达量 <i>CAT</i> level	0.528	0.008
<i>NF-κB</i> 基因表达量 <i>NF-κB</i> level	<i>c-type LZM</i> 基因表达量 <i>c-type LZM</i> level	0.530	0.008
<i>NF-κB</i> 基因表达量 <i>NF-κB</i> level	<i>g-type LZM</i> 基因表达量 <i>g-type LZM</i> level	0.727	0.000
<i>NF-κB</i> 基因表达量 <i>NF-κB</i> level	<i>AKP</i> 基因表达量 <i>AKP</i> level	0.897	0.000
<i>Cu/Zn-SOD</i> 基因表达量 <i>Cu/Zn-SOD</i> level	SOD 酶活 SOD activity	0.678	0.000
<i>Mn-SOD</i> 基因表达量 <i>Mn-SOD</i> level	SOD 酶活 SOD activity	0.573	0.003
<i>CAT</i> 基因表达量 <i>CAT</i> level	CAT 酶活 CAT activity	0.470	0.021
<i>c-type LZM</i> 基因表达量 <i>c-type LZM</i> level	LZM 酶活 LZM activity	0.692	0.000
<i>g-type LZM</i> 基因表达量 <i>g-type LZM</i> level	LZM 酶活 LZM activity	0.409	0.047
<i>AKP</i> 基因表达量 <i>AKP</i> level	AKP 酶活 AKP activity	0.833	0.000

3 讨论

MDA 与 LPO 的含量是在盐度胁迫下反映机体脂质过氧化程度与抗氧化性能的重要指标, 能间接地反映细胞受到自由基攻击的严重程度^[18-19]。盐度变化会使鱼体产生应激反应, 导致机体内 ROS 的过量产生, 过量的 ROS 会攻击生物膜磷脂中不饱和脂肪酸双键而导致脂质发生过氧化反应, 生成 LPO, 并最终分解成 MDA, 使得二者的含量升高^[20-21]。低盐与高盐组与对照组相比(CL vs C、CH vs C) MDA 与 LPO 的含量显著增加, 表明低盐与高盐胁迫对大黄鱼机体造成了氧化损伤。低盐驯化与对照组相比(A vs C), MDA 与 LPO 的含量显著增加, 表明从 25 到 20 的低盐驯化也对大黄鱼机体造成氧化损伤, 大黄鱼体内发生了脂质过氧化反应。这与吴庆元等^[20]、郭勤单等^[21]的研究结果相似, 盐度变化会导致 MDA 与 LPO

含量显著上升。低盐驯化+低盐组比较低盐组(AL vs CL)、低盐驯化+高盐组比较高盐组(AH vs CH), MDA 与 LPO 的含量显著降低, 低盐驯化+低盐组与低盐驯化+高盐组有效地降低 MDA 和 LPO 的含量, 这表明大黄鱼在经历低盐驯化后, 可能通过一系列的生理生化反应来维持机体平衡, 缓解盐度变化对大黄鱼机体的造成的氧化损伤, 从而提高了对盐度胁迫的耐受性。

在面对盐度环境的改变, 大黄鱼体内会产生大量的 ROS。为调节渗透压平衡, 维持内环境稳态与机体的平衡, 抗氧化系统发挥着重要作用。SOD 酶与 CAT 酶作为生物体内抗氧化系统的第一道防线, 在清除活性氧自由基方面具有重要意义^[22]。低盐与高盐胁迫下(CL vs C、CH vs C) SOD 酶活性显著增加, CAT 酶活性显著降低。这与何亮银等^[6]、张晨捷等^[23]的研究结果相同。而导致这种状况的原因可能是两种酶的作用机制不同。

SOD 催化超氧阴离子自由基的产生,而超氧自由基则会直接抑制 CAT 酶的活性^[24]。低盐驯化与对照组相比(A vs C),SOD 酶活性无显著变化,CAT 酶活性显著降低,这表明大黄鱼可能已经开始适应盐度的变化,大黄鱼对盐度的适应性较强。低盐驯化+低盐组与低盐组(AL vs CL)、低盐驯化+高盐组与高盐组(AH vs CH)的 SOD 酶与 CAT 酶活性显著增加。可以推测大黄鱼通过提高两种抗氧化酶活性缓解盐度变化带来的氧化损伤,从而改善对盐度胁迫的耐受性。尹飞等^[25]研究结果表明,适当降低水体盐度可以激活和增强银鲈(*Pampus argenteus*)幼鱼肝脏抗氧化酶活性以消除机体中过多的活性氧自由基。

LZM 分布在鱼体的黏液、血清和某些淋巴组织中,是非特异性免疫系统的重要组成部分,其活性越强,表示机体的非特异性免疫能力越强^[26]。AKP 是机体内能直接参与代谢调控的酶,其活性可作为判别机体免疫能力的指标^[27]。盐度变化显著影响了两种酶活性。低盐与高盐组(CL vs C、CH vs C) LZM 酶活性显著增加。暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)^[7]在经历盐度胁迫后 LZM 活性呈现显著上升变化。魏然等^[28]研究发现牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)在盐度为 40 的环境胁迫下,LZM 活性呈现显著上升的变化趋势。冯娟等^[29]研究发现适当降低盐度可使军曹鱼(*Rachycentron canadum*) LZM 活性显著升高,这表明 LZM 酶在免疫系统中具有重要的作用。低盐驯化与对照组相比(A vs C),LZM 与 AKP 酶活性无显著性变化,表明大黄鱼可能已经适应盐度的变化。低盐组(CL vs C) AKP 酶活性升高,而高盐组(CH vs C) AKP 酶活性显著降低。这与李培伦等^[27]研究结果相符,盐度的升高可能会抑制 AKP 酶的活性。曹丹煜等^[30]研究发现,当养殖盐度超出鱼类的最适盐度时,军曹鱼幼鱼对高盐环境更为敏感。低盐驯化+低盐组比较低盐组(AL vs CL)、低盐驯化+高盐组比较高盐组(AH vs CH)的 LZM 与 AKP 酶活性显著增加,其原因为盐度环境的改变使大黄鱼需要消耗大量的 ATP 来调节渗透压适应盐度,机体主要通过提高 LZM 与 AKP 的活性来提高溶菌和转移磷

酸基团的能力进而增强机体免疫防御能力。曾霖等^[2]研究发现,低盐驯化可通过提高大黄鱼的非特异性免疫能力来增强大黄鱼对盐度的耐受性。低盐驯化后的大黄鱼通过提高 LZM 与 AKP 酶活性调控自身非特异性免疫系统,缓解盐度变化带来的氧化损伤,提高盐度胁迫的耐受性。

抗氧化酶基因(*Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD*、*CAT*)与非特异性免疫基因(*c-type LZM*、*g-type LZM*、*AKP*)的表达与 SOD、CAT、LZM、AKP 活性呈正相关,表明大黄鱼可以通过提高抗氧化酶和非特异性免疫酶的基因表达来增加酶的活性,从而提高抗氧化能力和非特异性免疫力。核转录因子调控基因的表达,Nrf2 转录调控因子与 NF- κ B 转录调控因子分别在抗氧化系统、非特异性免疫反应过程中起着重要的作用^[31-32]。Nrf2 转录调控因子与抗氧化酶基因(*Cu/Zn-SOD*、*Mn-SOD*、*CAT*)表达呈显著正相关,表明这些抗氧化酶基因相关基因受到 Nrf2 转录调控因子的调控。NF- κ B 转录调控因子与非特异性免疫酶基因(*c-type LZM*、*g-type LZM*、*AKP*)表达呈显著正相关,表明这些抗氧化酶基因相关基因受到 NF- κ B 转录调控因子的调控。

4 结论

盐度变化会使大黄鱼机体产生氧化应激反应,诱导机体产生丙二醛和脂质过氧化物。大黄鱼可以通过改变超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、溶菌酶、碱性磷酸酶的基因表达和活性来适应盐度胁迫。有趣的是,盐度驯化后的大黄鱼可以分别通过核转录因子 *Nrf2* 与 *NF- κ B* 调控抗氧化酶基因和非特异性免疫酶基因的表达及其酶活性,改善抗氧化能力和非特异性免疫力来提高盐度胁迫耐受性。

参考文献:

- [1] Fisheries and fisheries administration of the ministry of agriculture and rural affairs, national fisheries technology promotion station, China fisheries society. 2020 China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2020, 22. [农业农村部渔业渔政管理局,全国水产技术推广总站,中国水产学会. 2020 中国渔业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社,2020,22.]

- [2] Zeng L, Zhang H, Song W, et al. Effects of low-salt acclimation on the transcriptome of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under hypo-saline stress[J/OL]. Journal of Fisheries of China, 2022/[2022-10-28]. [曾霖, 张惠, 宋炜, 等. 低盐驯化对低盐胁迫下大黄鱼转录组的影响[J/OL]. 水产学报, 2022/[2022-10-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1283.S.20220804.1820.008.html>]
- [3] Boeuf G, Payan P. How should salinity influence fish growth?[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology: CBP, 2001, 130(4): 411-423.
- [4] Choi C Y, An K W, An M I. Molecular characterization and mRNA expression of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase during osmotic stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2008, 149(3): 330-337.]
- [5] Liu L, Chen C, Li Y L, et al. Effects of short-term salinity stress on antioxidant and digestive physiology of hybrid progeny (*Cromileptes altivelis* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)[J]. Marine Sciences, 2018, 42(2): 78-87. [刘玲, 陈超, 李炎璐, 等. 短期低盐度胁迫对驼背鲈(♀) × 鞍带石斑鱼(♂)杂交子代幼鱼抗氧化及消化生理的影响[J]. 海洋科学, 2018, 42(2): 78-87.]
- [6] He L Y, Shi X L, Zhou F F, et al. Effect of low salinity stress on non-specific immunity enzymatic activity of *Larimichthys crocea*[J]. Journal of Applied Oceanography, 2022, 41(2): 347-354. [何亮银, 史晓丽, 周逢芳, 等. 低盐胁迫对大黄鱼非特异性免疫酶活力的影响[J]. 应用海洋学学报, 2022, 41(2): 347-354.]
- [7] Bian P J, Qiu C G, Xu S L, et al. Effects of salinity on growth, activity of non-specific immune and antioxidant enzymes in obscure puffer *Takifugu obscurus*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(1): 108-114. [边平江, 邱成功, 徐善良, 等. 盐度对暗纹东方鲀生长、非特异性免疫和抗氧化酶活力的影响[J]. 水生生物学报, 2014, 38(1): 108-114.]
- [8] Zhang C J, Zhang Y L, Gao Q X, et al. Effect of low salinity stress on antioxidant function in liver of juvenile *Nibea albiglora*[J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(4): 59-64. [张晨捷, 张艳亮, 高权新, 等. 低盐胁迫对黄姑鱼幼鱼肝脏抗氧化功能的影响[J]. 南方水产科学, 2015, 11(4): 59-64.]
- [9] Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF-κB signaling[J]. Annual Review of Biophysics, 2013, 42: 443-468.
- [10] Sant K E, Hansen J M, Williams L M, et al. The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of glutathione and redox dynamics in the developing zebrafish embryo[J]. Redox Biology, 2017, 13: 207-218.
- [11] Vomund S, Schäfer A, Parnham M J, et al. Nrf2, the master regulator of anti-oxidative responses[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(12): 2772.
- [12] Lasar A, Marienfeld R, Wirth T, et al. NF-κB: Critical Regulator of Inflammation and the Immune Response[M]//Gossen M, Kaufmann J, Triezenberg S J. Transcription Factors. Berlin, Heidelberg: Springer, 2004: 325-376.
- [13] Zeng L, Ai C X, Zheng J L, et al. Cu pre-exposure alters antioxidant defense and energy metabolism in large yellow croaker *Larimichthys crocea* in response to severe hypoxia[J]. Science of the Total Environment, 2019, 687: 702-711.
- [14] Zeng L, Ai C X, Zhang J S, et al. Pre-hypoxia exposure inhibited copper toxicity by improving energy metabolism, antioxidant defence and mitophagy in the liver of the large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. Science of the Total Environment, 2020, 708: 134961.
- [15] Niu C J, Rummer J L, Brauner C J, et al. Heat shock protein (Hsp70) induced by a mild heat shock slightly moderates plasma osmolarity increases upon salinity transfer in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2008, 148(4): 437-444.
- [16] Zeng L, Li W C, Zhang H, et al. Hypoxic acclimation improves mitochondrial bioenergetic function in large yellow croaker *Larimichthys crocea* under Cu stress[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 224: 112688.
- [17] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(9): e45.
- [18] Liu W, Zhang G L, Chen H Y. Effects of adding oxidized oil to feed on lipid peroxidation and blood indexes of common carp[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1997, 4(1): 94-96. [刘伟, 张桂兰, 陈海燕. 饲料添加氧化油脂对鲤体内脂质过氧化及血液指标的影响[J]. 中国水产科学, 1997, 4(1): 94-96.]
- [19] Liao Y L, Zhang C J, Peng S M, et al. Effects of salinity on activities of liver antioxidant enzymes and plasma lysozyme of *Epinephelus 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.]
- [20] Wu Q Y, Jiang M, Li L, et al. Effects of chronic stress of lower salinity on activity of Na⁺-K⁺-ATPase and content of MDA in branchial filament, muscle, intestine of juvenile mullet (*Mugil cephalus*)[J]. Journal of Ecology and Rural

- Environment, 2014, 30(4): 481-487. [吴庆元, 蒋玫, 李磊, 等. 低盐度胁迫对鲮鱼(*Mugil cephalus*)幼鱼鳃丝、肌肉、肠 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性和 MDA 含量的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2014, 30(4): 481-487.]
- [21] Guo Q D, Wang Y J, Lü W Q. Combined effects of temperature and salinity on the physiological osmotic induction and antioxidant responses in the juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(1): 58-67. [郭勤单, 王有基, 吕为群. 温度和盐度对褐牙鲆幼鱼渗透生理及抗氧化水平的影响[J]. 水生生物学报, 2014, 38(1): 58-67.]
- [22] Ighodaro O M, Akinloye O A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid[J]. Alexandria Journal of Medicine, 2018, 54(4): 287-293.
- [23] Zhang C J, Gao Q X, Shi Z H, et al. The effects of low Salinity and different CuSO₄ concentrations on gill ion-regulatory enzyme activities and liver antioxidant function in silver pomfret[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(4): 711-719. [张晨捷, 高权新, 施兆鸿, 等. 低盐度和不同硫酸铜浓度对银鲷鳃离子调节酶和肝抗氧化功能的影响[J]. 中国水产科学, 2014, 21(4): 711-719.]
- [24] Zeng L, Ai C X, Wang Y H, et al. Abrupt salinity stress induces oxidative stress via the Nrf2-Keap1 signaling pathway in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2017, 43(4): 955-964.
- [25] Yin F, Sun P, Peng S M, et al. Effects of low salinity stress on the antioxidant enzyme activities in juvenile *Pampus argenteus* liver and the APTase activities in its gill and kidney[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2011, 22(4): 1059-1066. [尹飞, 孙鹏, 彭士明, 等. 低盐度胁迫对银鲷幼鱼肝脏抗氧化酶、鳃和肾脏 ATP 酶活性的影响[J]. 应用生态学报, 2011, 22(4): 1059-1066.]
- [26] Wang X W, Zhu H, Kuang X Y, et al. Effect of salinity stress on physiological status and survival in hybrid sturgeon[J]. Fisheries Science, 2015, 34(10): 597-602. [王晓雯, 朱华, 况新宇, 等. 盐度胁迫对杂交鲟生理及存活的影响[J]. 水产科学, 2015, 34(10): 597-602.]
- [27] Li P L, Liu W, Wang J L, et al. Salinity and juvenile chum salmon (*Oncorhynchus keta*): Effects on liver histomorphology, non-specific immune and digestive enzymes[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(19): 145-151. [李培伦, 刘伟, 王继隆, 等. 盐度对大麻哈鱼幼鱼肝脏组织学、非特异性免疫酶及消化酶活性的影响[J]. 中国农学通报, 2020, 36(19): 145-151.]
- [28] Wei R, Zhang S C, Wang C F, et al. Effects of changes in salinity on nonspecific immune function of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Advances in Marine Science, 2003, 21(2): 209-213. [魏然, 张士璠, 王长法, 等. 盐度对牙鲆非特异性免疫功能的影响[J]. 海洋科学进展, 2003, 21(2): 209-213.]
- [29] Feng J, Xu L W, Lin H Z, et al. Effects of salinity on growth and several immune parameters of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(1): 120-125. [冯娟, 徐力文, 林黑着, 等. 盐度变化对军曹鱼稚鱼相关免疫因子及其生长的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(1): 120-125.]
- [30] Cao D Y, Liu F B, Zhang Y, et al. Study on adaptability of juvenile of *Rachycentron canadum* to salinity[J]. Journal of Jinan University (Natural Science & Medicine Edition), 2020, 41(3): 283-288. [曹丹煜, 刘付柏, 张野, 等. 军曹鱼幼鱼盐度适应性研究[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2020, 41(3): 283-288.]
- [31] Yan X J, Qi P Z, Guo B Y, et al. The advances in research of nrf2 pathway involved in oxidative stress regulation in aquatic animals[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2021, 52(4): 799-812. [严小军, 祁鹏志, 郭宝英, 等. Nrf2 参与水生动物氧化应激调控的研究进展[J]. 海洋与湖沼, 2021, 52(4): 799-812.]
- [32] Dodson M, Redmann M, Rajasekaran N S, et al. KEAP1-NRF₂ signalling and autophagy in protection against oxidative and reductive proteotoxicity[J]. The Biochemical Journal, 2015, 469(3): 347-355.

Mechanism of salinity acclimation in *Larimichthys crocea* improving tolerance to salinity stress

ZHANG Hui^{1,2}, ZENG Lin^{1,3}, XIONG Yifei², SONG Wei^{1,2}

1. National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;
2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
3. School of Food and Biological Engineering, Bengbu University, Bengbu 233030, China

Abstract: To explore the mechanism of salinity acclimation that improves the salinity stress tolerance of large yellow croakers (*Larimichthys crocea*), fish were exposed to water with salinity of 25 or 20 for 7 days and then exposed to water with a salinity of 12 or 40 for 24 hours. At this time, the fish were divided into six treatment groups [Control group (25), low-salt group (25+12), high-salt group (25+40), low-salt acclimation group (20), low-salt acclimation+low-salt group (20+2), low-salt acclimation+high-salt group (20+40)], which were denoted as groups C, CL, CH, A, AL, and AH, respectively. The results showed that when the CL group was compared to the C group (CL vs C), malondialdehyde (MDA) and lipid peroxide (LPO) contents were significantly increased, superoxide dismutase (SOD) and lysozyme (LZM) activities were significantly increased, and catalase (CAT) activity was significantly decreased ($P<0.05$). Alkaline phosphatase (AKP) activity showed no significant change ($P>0.05$). Comparing the CH group to the C group (CH vs C), the MDA and LPO contents and SOD and LZM activities significantly increased, while CAT and AKP activities significantly decreased ($P<0.05$). When group A was compared to group C (A vs C), the MDA and LPO contents significantly increased, SOD, LZM, and AKP activities had no significant change ($P>0.05$), but CAT activity significantly decreased ($P<0.05$). For the comparisons of group AL with group CL (AL vs CL) and group AH with group CH (AH vs CH), MDA, and LPO contents decreased significantly, and SOD, CAT, LZM, and AKP activities increased significantly ($P<0.05$). The gene expression levels of *Cu/Zn-SOD*, *Mn-SOD*, *CAT*, *c-type LZM*, *g-type LZM*, and *AKP* were positively correlated with their respective enzyme activities. The gene expression levels of nuclear transcription factor NF-E2 related factor 2 (*Nrf2*) and nuclear transcription factor- κ B (*NF- κ B*) were positively correlated with their target genes (antioxidant enzyme gene and non-specific immune enzyme gene, respectively), at $P<0.05$, indicating that *Nrf2* and *NF- κ B* may be involved in the regulation of antioxidant and non-specific gene expression. In conclusion, salinity acclimation can alleviate the oxidative damage caused by salinity stress by enhancing the antioxidant and non-specific immune capacities, thereby improving the salinity tolerance of *L. crocea*.

Key words: *Larimichthys crocea*; salinity acclimation; anti oxidation; non-specific immunity

Corresponding author: ZENG Lin. E-mail: zenglin615@126.com; SONG Wei. E-mail: songw@ecsf.ac.cn