

DOI: 10.12264/JFSC2023-0009

铜驯化改善大黄鱼低温耐受性的作用机制

曾霖^{1,4}, 李文成⁴, 宋炜^{2,4}, 谢正丽³, 张惠⁴

1. 蚌埠学院食品与生物工程学院, 安徽 蚌埠 233030;
2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090;
3. 中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所, 上海 200090;
4. 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: 为了探讨铜驯化改善大黄鱼(*Larimichthys crocea*)低温耐受性的作用机制, 将大黄鱼幼鱼放入含 Cu 20 μg/L 的水体中驯化 7 d, 然后暴露在 10 °C 的水体中 6 h 和 24 h, 检测其抗氧化能力、能量代谢和非特异性免疫力指标的变化。结果表明, 低温胁迫增加了大黄鱼的活性氧(ROS)含量, 加重了肝细胞畸形, 表明低温胁迫对机体产生了氧化损伤。与低温胁迫相比, 铜驯化+低温胁迫提高了谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶、ATP 合成酶、琥珀酸脱氢酶、碱性磷酸酶和溶菌酶的活性, 增加了谷胱甘肽和 ATP 含量, 降低了 ROS、乳酸含量和肝细胞空泡率, 表明铜驯化通过改善大黄鱼的抗氧化能力、能量代谢效率和非特异性免疫力来缓解低温胁迫对机体的损伤。结论认为, 铜驯化通过产生适应性反应来提高大黄鱼的低温胁迫耐受性, 表现了毒物兴奋效应作用。

关键词: 大黄鱼; 低温胁迫; 耐受; 铜驯化; 毒物兴奋效应

中图分类号: S965 文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)05-0595-09

受人类活动的影响, 寒潮、寒流等极端气候频繁发生。低温对鱼类的生长、繁殖、抗氧化、免疫和能量代谢等方面均产生影响^[1]。在自然界中, 鱼类还常遭受金属污染物的影响。其中, 铜是鱼类的必需微量元素, 但过量时易对鱼类产生毒害效应, 金属铜对鱼类影响的两面性受到广泛关注^[2]。在自然界中, 铜和低温应激可能同时或先后作用于鱼类。目前, 相关研究多聚集于单因子(铜或低温应激)对鱼类生理功能的影响, 而有关铜暴露后的鱼类对低温胁迫的响应鲜有报道。

低温和铜胁迫诱导鱼类产生活性氧族(reactive oxygen species, ROS)。若过量的 ROS 得不到有效控制, 将引起氧化应激反应, 影响鱼类生理功能。为了抑制 ROS 对机体的损伤, 鱼类可以通过抗氧化系统来维持细胞的氧化还原平衡^[3]。超氧化物

歧化酶(superoxide dismutase, SOD)可以将 H⁺和 O²⁻催化成 H₂O₂, 随后 H₂O₂ 被谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)和过氧化氢酶(catalase, CAT)还原成无毒的 H₂O, 因此, SOD、GPx 和 CAT 被称为抗氧化系统的第一道防线^[4]。铜是必需微量元素, 可充当金属硫蛋白(metallothionein, MTs)和 SOD 的辅助因子^[2], 参与抗氧化反应。另外, 笔者基于转录组学发现铜驯化可以提高低温胁迫下大黄鱼谷胱甘肽(glutathione, GSH)和过氧化物酶体合成的基因表达^[5], 推测铜驯化可能通过提高鱼类的抗氧化能力来改善低温胁迫耐受性。

胁迫(包括铜和低温)可诱导线粒体膜超极化, 抑制线粒体呼吸链三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)合成^[6-7]。线粒体是 ROS 和 ATP 产生的主要场所, 因此抗氧化能力和能量代谢相互影响, 相

收稿日期: 2023-02-20; 修订日期: 2023-03-31.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD2401102); 国家重点研发计划项目(2019YFDO900904); 财政部和农业农村部现代
农业产业技术体系资助项目(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: 曾霖(1983-), 男, 博士, 研究方向为养殖生理生态学. E-mail: zenglin615@126.com

通信作者: 宋炜, 研究员, 研究方向为水产养殖. E-mail: songw@ecsf.ac.cn

互作用^[8-9]。铜可以充当铜氧化酶和细胞色素 C 氧化酶的辅酶, 参与氧气运输和线粒体电子传递等生理活动^[2]。笔者基于转录组学发现铜驯化可以改变低温胁迫下大黄鱼(*Larimichthys crocea*)氧气运输和糖酵解相关基因的表达^[5]。氧气运输在一定程度上决定了有氧代谢(三羧酸循环)效率。ATP 合成酶(ATP synthase, F-ATP 酶)、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)和苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)是线粒体内生成 ATP 的重要有氧代谢酶^[10-11], 丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)是糖酵解关键酶, 它们共同维持机体的能量平衡。铜可以充当辅酶, 参与氧气运输和线粒体电子传递, 从而影响能量代谢^[12]。铜驯化能否影响低温胁迫下鱼类能量代谢酶的活性, 值得进一步研究。

非特异性免疫系统是鱼类另一种抵御环境胁迫的生理机制, 在适应环境变化过程中具有重要作用。低温和铜胁迫均可激活非特异性免疫系统^[13]。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)是重要的炎症反应生物标志物。溶菌酶(lysozyme, Lzm)具有抗炎、抗病毒和增强机体非特异性免疫力等生理功能^[14]。已有研究表明, 斑马鱼(*Danio rerio*)可以通过增加 AKP 和 Lzm 表达来应对胁迫应激^[15]。低温和铜暴露均可影响 AKP 和 Lzm 的表达。但有关铜和低温相互作用对 AKP 和 Lzm 影响的研究未见相关报道。

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)是我国网箱养殖数量最多的海水鱼类, 养殖区域主要分布在福建、浙江和广东等沿海水域^[16]。大黄鱼秋季常因感染刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*, 俗称白点病)而大量死亡。CuSO₄ 可高效抑制刺激隐核虫繁殖, 被广泛用于“白点病”防治, 但易造成养殖水体铜污染^[17]。另外, 大黄鱼对低温较敏感, 越冬期间常因低温胁迫而大量死亡, 尤其是在东海海域^[18]。目前, 研究低温胁迫对大黄鱼机体损伤时, 常忽略了鱼类的铜暴露史。本研究在基因组学的研究基础上, 研究铜驯化对大黄鱼低温胁迫耐受性的影响^[5]。先将大黄鱼幼鱼暴露在含 Cu 20 μg/L (与铜污染海区的浓度相近)水体中 7 d, 然后在 10 °C 的水体中再暴露 6 h 和 24 h, 分析抗氧化能

力、能量代谢和非特异性免疫力等相关指标。研究成果为准确评估低温胁迫对铜暴露后的大黄鱼机体损伤提供科学依据, 同时为陆基养殖水体温度调节方案制定提供基础资料, 具有重要的理论意义和广阔的应用前景。

1 材料与方法

1.1 实验动物及驯化

体重(3.0±0.3) g 的大黄鱼幼鱼放在 9 个 100 L 的钢化玻璃桶中暂养 2 周, 每桶 60 尾。水质参数如下: 温度(18.53±0.54) °C、pH(7.42±0.28)、溶解氧(7.46±0.38) mg/L、总氨氮(0.13~0.23) mg/L。暂养结束后, 实验分 2 个阶段进行: (1) 将 3 桶鱼放入含 Cu 20 μg/L 的水体中驯化 7 d, 剩余 6 桶鱼放入自然海水中养殖。(2) 将 Cu 驯化后的鱼暴露在 10 °C 水体中(Cu+L 组); 另外 6 桶鱼分为 2 组, 保持水温不变(C 组)或将水温降至 10 °C (L 组), 每组 3 个重复(图 1)。根据 Zeng 等^[19]的方法, 将 CuSO₄·5H₂O (AR, 中国上海国药集团)溶于双蒸水作为铜源原液, 然后向贮水桶水体中加入一定量的铜源原液, 24 h 后采用电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS, Thermo Jarrel Ash Corporation, USA)测量水体中铜的含量, 使铜含量保持在(18.89±0.26) μg/L。暂养和铜驯化期间, 每天过饱和投喂商业饲料 2 次(8:00 和 17:00), 换水率 100%。低温暴露 6 h 和 24 h 后, 每桶随机取 4 尾鱼的肝脏样本存于液氮中用于生化指标测定; 低温暴露

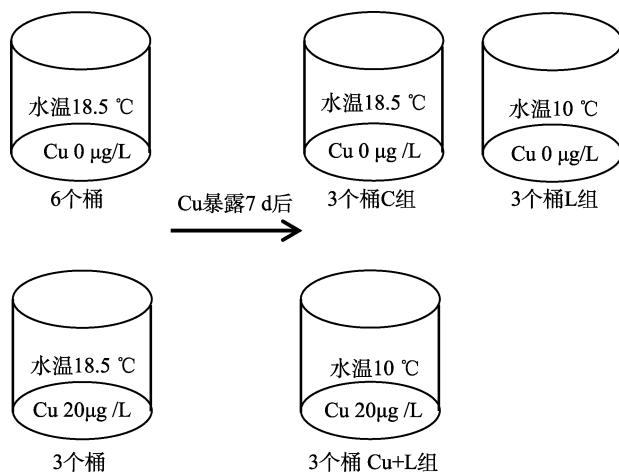


图 1 实验分组示意图

Fig. 1 Schematic diagram of experimental groups

24 h 后, 每桶随机取 4 尾鱼的肝脏左叶样本, 固定在 4% 多聚甲醛溶液中用于组织学分析。

1.2 组织切片

根据 Yuan 等^[20]的方法进行组织学分析。先将固定在 4% 多聚甲醛的样本通过增加乙醇浓度来进行梯度脱水, 石蜡包埋, 切片(约 6 μm 厚), 然后用苏木精-伊红(H&E)染色, 再用光学显微镜观察组织切片。随机观察 H&E 中的 6 个显微镜视野, 计算空泡的相对面积(%), 然后将这 6 次空泡相对面积的平均值作为该样本的空泡率。

1.3 生化指标分析

根据 Zeng 等^[19]的方法对肝脏样本进行匀浆: 向肝脏中加入 9 倍重量的 PBS 缓冲液(pH7.4), 研磨匀浆后获得 10% 组织匀浆液, 4 °C, 900 r/min, 离心 10 min, 取上清液用于生化指标测定。

根据 Zeng 等^[19]的方法, 采用 ICP-MS 方法测量肝脏样本中铜的含量。应用南京建成生物工程研究所的试剂盒, 采用化学荧光法测量 ROS 含量, 分光光度法测量 GSH、ATP 和乳酸含量, 抗氧化

酶(SOD、GPx 和 CAT)、能量代谢酶(F-ATP、SDH、MDH 和 PK)和非特异性免疫酶(LZM 和 AKP)的活性。应用碧云天生物技术研究所的试剂盒, 采用 Bradford 法测量酶蛋白的浓度。

1.4 数据处理

实验结果以平均值±标准误($\bar{x} \pm \text{SE}$)表示, 采用 SPSS 19.0 软件对 C 组、L 组和 Cu+L 组之间的差异进行双因素(低温和铜暴露)方差统计分析(two-way analysis of variance), 当差异显著时($P < 0.05$), 再进行 Tukey 多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 组织学特征

在 C 组中观察到正常的肝细胞和细胞核; 在 L 组中观察到邻近细胞膜边缘模糊, 出现严重的核固缩和空泡; 在 Cu+L 组中观察到较严重的空泡(图 2)。与 C 组相比, L 组的空泡率显著增加($P < 0.05$); 与 L 组相比, Cu+L 组的空泡率显著降低($P < 0.05$)(图 3)。

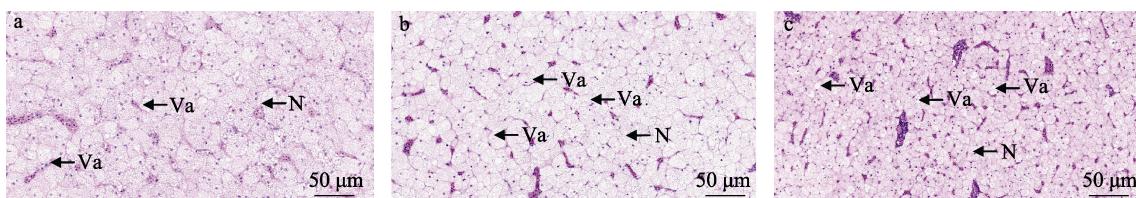


图 2 暴露于铜和低温的大黄鱼肝脏组织学

a. 对照组(C 组), 正常的肝细胞和细胞核. b. 低温暴露组(L 组), 边缘模糊, 细胞核凝聚, 严重空泡出现. c. Cu + 低温暴露组(Cu+L 组), 较严重空泡出现. Va: 液泡; N: 细胞核.

Fig. 2 Liver histology of *Larimichthys crocea* exposed to Cu and cold stress

a. Control group (C group), normal hepatocytes and hepatocyte nucleus. b. Cold stress group (L group), edge indistinction, severe pyknotic nuclei and vacuoles appeared. c. Cu and cold stress group (Cu+L group), less serious vacuoles appeared. Va: vacuole; N: nucleus.

2.2 Cu 含量

如图 4 所示, 与 C 组相比, L 组的肝脏 Cu 含量无显著差异, 但 Cu+L 组的 Cu 含量显著增加($P < 0.05$); 与 L 组相比, Cu+L 组的 Cu 含量显著增加($P < 0.05$)。

2.3 抗氧化能力

如图 5 所示, 与 C 组相比, L 组在 6 h 时 ROS 含量和 CAT 活力显著增加; 在 24 h 时 ROS 含量显著增加, GPx 和 CAT 活力显著降低。与 L 组相比, Cu+L 组在 6 h 时 GSH 含量显著增加($P < 0.05$), 在 24 h 时 ROS 含量显著减少($P < 0.05$), GSH 含量、

GPx 和 CAT 活力均显著增加($P < 0.05$)。

2.4 能量代谢指标

如图 6 所示, 与 C 组相比, L 组在 6 h 时 F-ATP 和 MDH 活力显著增加($P < 0.05$), SDH 活力显著降低($P < 0.05$); 在 24 h 时乳酸含量和 PK 活力显著增加($P < 0.05$), F-ATP 活力显著降低($P < 0.05$)。与 L 组相比, Cu+L 组在 6 h ATP 含量、F-ATP、SDH 和 PK 活力均显著增加($P < 0.05$), 乳酸含量显著降低($P < 0.05$); 24 h 时 ATP 含量、SDH 和 PK 活力显著增加($P < 0.05$), 乳酸含量显著降低($P < 0.05$)。

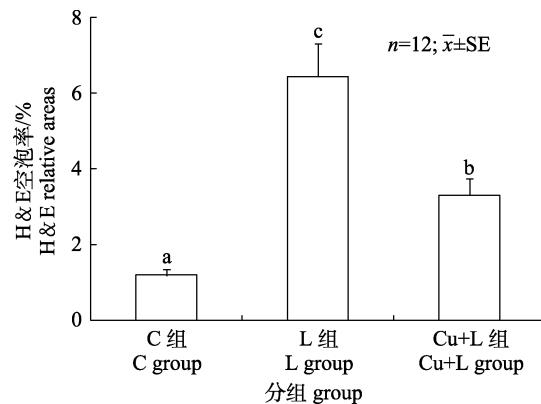


图3 暴露于铜和低温的大黄鱼肝脏组织空泡率
不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$)。

Fig. 3 Relative areas of hepatic vacuoles in *Larimichthys crocea* exposed to Cu and cold stress
Different letters indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

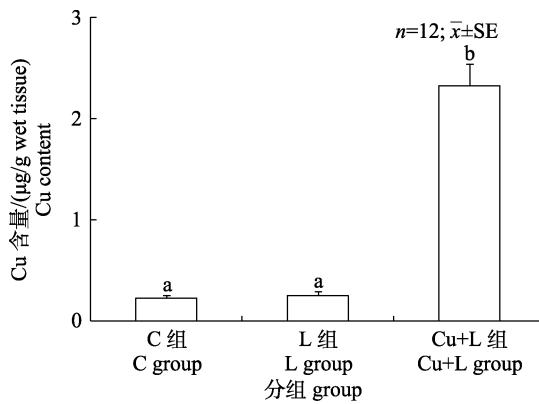


图4 铜和低温对大黄鱼肝脏铜含量的影响
不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$)。

Fig. 4 Effects of Cu and low temperature on Cu contents in the liver of *Larimichthys crocea*
Different letters indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

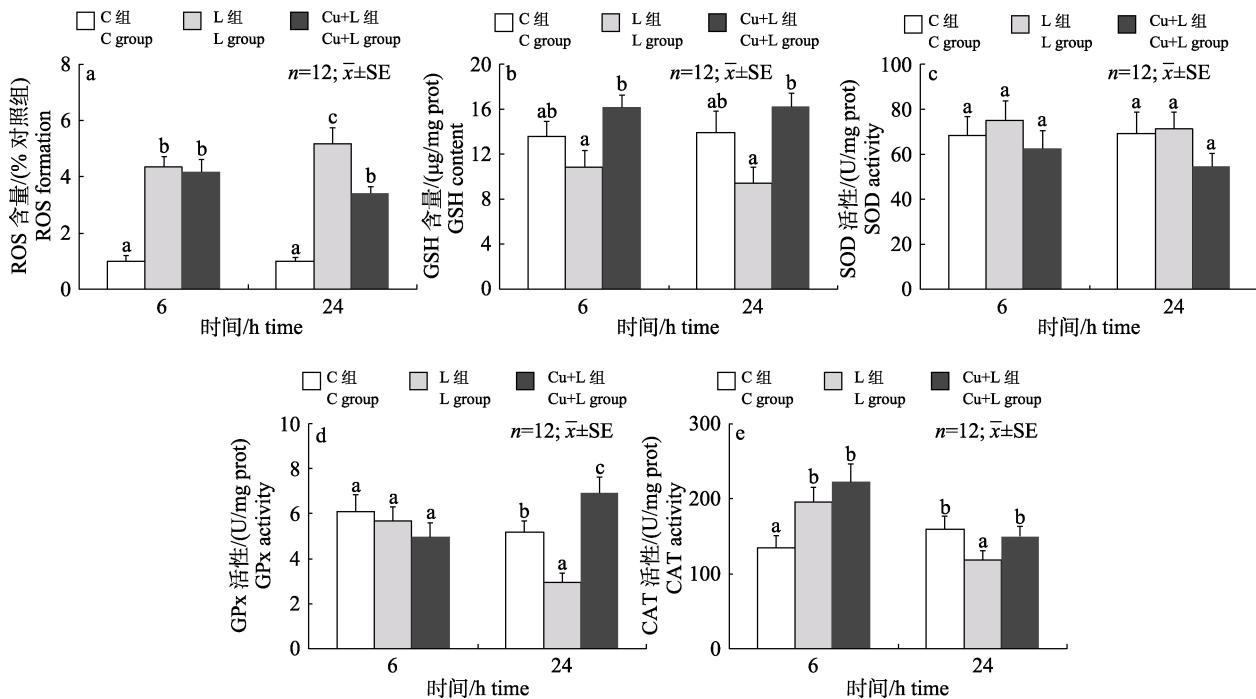


图5 铜和低温对大黄鱼肝脏抗氧化相关指标的影响
不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$)。

Fig. 5 Effects of Cu and low temperature on antioxidant-related indicators in the liver of *Larimichthys crocea*
Different letters indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

2.5 非特异免疫指标

如图7所示,与C组相比,L组在6 h和24 h时AKP和LZM活性均显著增加($P<0.05$);与L组相比,Cu+L组在6 h时AKP活性显著增加($P<0.05$),在24 h时AKP和LZM活性均显著增

加($P<0.05$)。

3 讨论

ROS作为氧化应激标志物,可用来评估胁迫对鱼类的氧化损伤,并以此判断鱼类的胁迫耐受

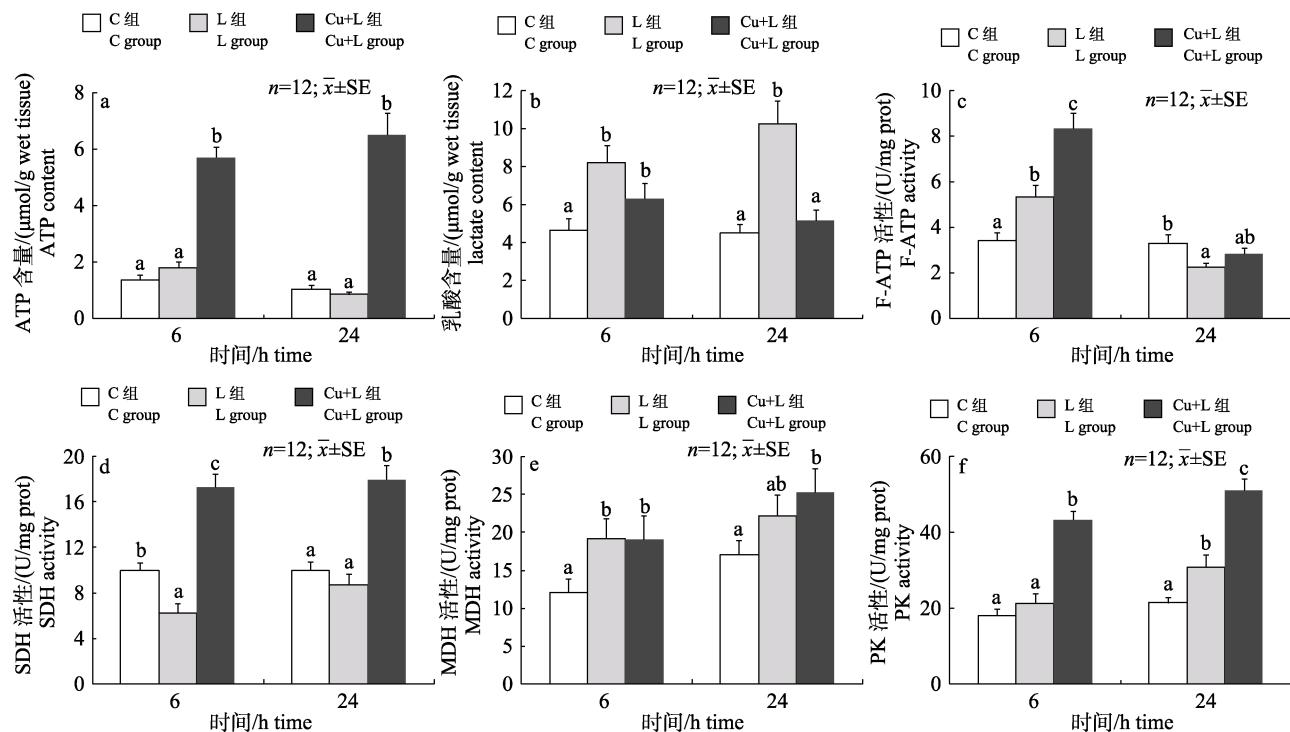


图 6 铜和低温对大黄鱼肝脏能量代谢指标的影响
不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$)。

Fig. 6 Effects of Cu and low temperature on energy metabolism-related indicators in the liver of *Larimichthys crocea*
Different letters indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

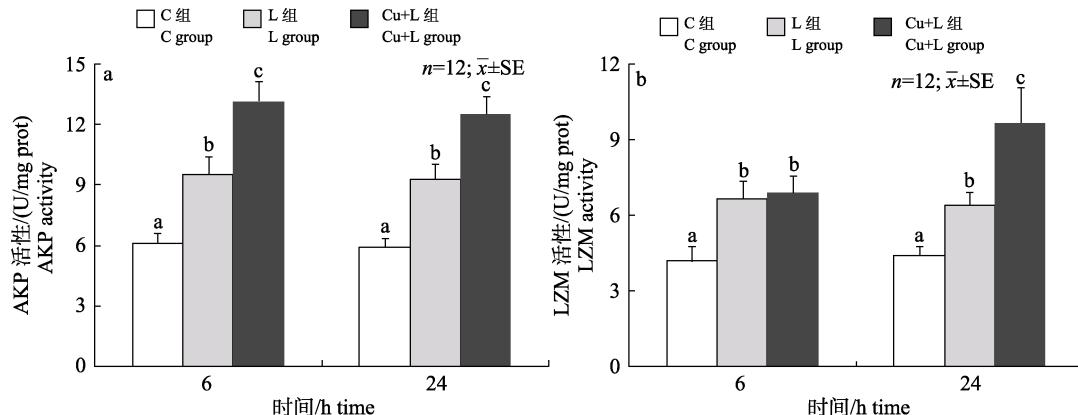


图 7 铜和低温对大黄鱼肝脏非特异免疫指标的影响
不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$)。

Fig. 7 Effects of Cu and low temperature on inflammation-related indicators in the liver of *Larimichthys crocea*
Different letters indicate significant differences between groups ($P<0.05$).

性^[21]。在本研究中,与C组相比,L组在6 h和24 h时均显著增加了ROS含量(图5),表明10 °C的低温环境超过了大黄鱼的耐受性,导致细胞内的氧化还原平衡被破坏,与笔者最近的研究结果相似^[22]。已有研究表明,斑马鱼体内的ROS含量与其低温胁迫耐受性密切相关^[23]。大黄鱼对环境变化非常

敏感,越冬期间易遭受低温胁迫损伤^[24]。若机体内过量的ROS不能被及时清除,将会导致脂质过氧化和蛋白质羰基化等氧化损伤,肝脏空泡率增加证实了上述观点(图3)。与L组相比,Cu+L组的ROS含量在6 h时与对照差异不显著,但在24 h时显著降低(图5),同时显著减少了肝脏组织中的

空泡率, 表明铜驯化能够抑制 ROS 过度积累, 从而缓解低温胁迫对机体的氧化损伤。低剂量应激因子暴露会提高机体对随后相同或不同高剂量胁迫因子的耐受性, 这种毒物兴奋效应现象在自然界中广泛存在, 如低氧驯化提高了银鮈(*Rhamdia quelen*)对锰胁迫的耐受性^[25]; 低氧驯化可以通过改善大黄鱼能量代谢、抗氧化能力和自噬来抑制铜的毒害效应^[26]。基于毒物兴奋效应原理可知, 铜驯化对大黄鱼机体内稳态进行了微干扰, 启动一系列维持和修复机制来提高机体的低温胁迫耐受性^[27]。本研究将从抗氧化、能量代谢和非特异性免疫等方面解析铜驯化缓解低温胁迫对大黄鱼氧化损伤的作用机制。

ROS 可充当信号分子来激活抗氧化系统, 保护细胞免受氧化损伤^[28]。在本研究中, 与 C 组相比, L 组在 6 h 时增加了 CAT 酶的活性, 但在 24 h 时显著降低了 GPx 和 CAT 活性(图 5)。其主要原因是当低温胁迫诱导鱼类产生大量 ROS 时, 鱼类在胁迫初期可以通过提高抗氧化能力来迅速清除机体内过量的 ROS, 从而维持细胞内氧化还原平衡。但随着胁迫时间的延长, 当机体内过量的 ROS 无法及时清除时, 将会对机体产生氧化损伤, 破坏细胞的结构和功能, 导致抗氧化系统的部分甚至全部功能丧失。这样降低了 ROS 清除效率, 导致机体氧化损伤加重, 进而形成恶性循环^[29]。另一方面, SOD 可以将低温胁迫所诱导的活性氧如 O²⁻转化为 H₂O₂, 但过量的 H₂O₂将会抑制 GPx 和 CAT 活性, 这与汞胁迫降低大黄鱼抗氧化酶的活性相似^[30]。与 L 组相比, Cu+L 组在 6 h 时增加了 GSH 含量, 在 24 h 时增加了 GSH 含量以及 GPx 和 CAT 酶的活性, 但对 SOD 的活性不产生影响(图 5), 表明铜驯化提高了大黄鱼的抗氧化能力, 这也解释了铜驯化可以降低机体内 ROS 含量, 以及缓解低温胁迫对机体的氧化损伤。铜作为必需金属元素, 可充当 MTs 和 Cu/Zn-SOD 的辅因子。笔者以前的研究表明, 铜驯化可以提高大黄鱼肝脏 Cu/Zn-SOD 酶的活性^[26], 与本研究的研究结果不一致(图 5)。其主要原因可能是鱼类为了迅速清除过量的 ROS, 导致 SOD 酶消耗过快。

鱼类在应对胁迫应激过程中需要消耗大量的能量^[31]。以往研究主要集中于胁迫对鱼类 ROS 或能量代谢的影响, 而忽略了 ROS 含量与能量代谢之间的关系。F-ATP、MDH 和 SDH 位于线粒体膜内, 通过三羧酸循环参与有氧代谢^[10-11]。它们可以有效地利用线粒体呼吸链上的质子梯度来生成 ATP, 同时保持线粒体膜去极化, 这有助于抑制 ROS 生成^[32]。PK 是糖酵解途径的限速酶, 可以通过无氧代谢产生能量^[12]。笔者最近的研究表明, 大黄鱼可以通过提高有氧代谢酶(F-ATP、MDH 和 SDH)的活性和抑制无氧代谢(PK)酶的活性来改善能量代谢, 从而提高低氧胁迫耐受性^[32]。在本研究中, 与 C 组相比, L 组在 6 h 时提高了 F-ATP 和 MDH 酶活性, 24 h 时降低了 F-ATP 酶活性, 提高了 PK 酶活性(图 6), 表明大黄鱼在低温适应过程中, 能量供应由有氧代谢逐渐转化为无氧代谢, 机体内乳酸含量增多证实了这一观点(图 6)。另一方面, 低温胁迫抑制了线粒体呼吸链的电子传递效率, 导致线粒体膜超极化, 从而诱导 ROS 大量产生(图 5)。与 L 组相比, Cu+L 组在 6 h 时提高了 F-ATP、SDH 和 PK 酶的活性, 24 h 时增加了 SDH 和 PK 酶活性, 并伴随着 ATP 含量增加和乳酸含量降低, 表明在整个低温胁迫应激过程中, 铜驯化增加了大黄鱼机体的能量代谢速度, 尤其是改善了有氧代谢效率, 可为机体提供更多的能量, 从而增强了低温胁迫耐受性。铜可以充当铜蓝蛋白和细胞色素 C 氧化酶(即线粒体复合物 IV)的辅酶, 参与氧气运输和线粒体电子传递等功能^[33]。因此, 笔者推测铜驯化可能提高了低温胁迫下大黄鱼的氧气运输和线粒体电子传递效率, 这有待进一步研究。

ROS 还可以充当信号分子激活鱼类非特异性免疫系统来提高抗应激能力, 保护机体免受胁迫损伤。但过量的 ROS 将会损伤机体的非特异性免疫功能^[34]。在本研究中, 与 C 组相比, L 组在 6 h 和 24 h 时均增加了 AKP 和 LZM 酶的活性(图 7), 表明低温胁迫提高了大黄鱼的炎症反应。李文成等^[22]的研究表明, 低温(12 °C)抑制到大黄鱼仔鱼的 AKP 和 LZM 基因表达水平, 导致机体 ROS 含量

增加^[22]。研究结果不一致的主要原因是低温胁迫耐受性与鱼类的大小相关。大黄鱼仔鱼的非特异性免疫功能尚未完善,且对环境变化较敏感,从而导致仔鱼易受低温胁迫损伤。L组的ROS显著高于C组(图5),表明大黄鱼所激活的非特异性免疫反应不足以保护机体免受氧化损伤。与L组相比,Cu+L组在6 h和24 h时均显著增加了AKP和LZM酶的活性,表明铜驯化改善了非特异性免疫功能,从而缓解低温胁迫对机体的损伤。这与铜可以通过增强免疫应答来提高凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)低温胁迫耐受性的研究结果相似^[13]。

4 结论

低温胁迫对大黄鱼产生了氧化损伤,铜驯化通过改善抗氧化能力、能量代谢和非特异性免疫力来提高机体的低温胁迫耐受性。本研究结果强调在评估低温胁迫对鱼类生理功能影响时,需要考虑鱼类的铜暴露经历。

参考文献:

- [1] Jiao S, Nie M M, Song H B, et al. Physiological responses to cold and starvation stresses in the liver of yellow drum (*Nibea albiflora*) revealed by LC-MS metabolomics[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 715: 136940.
- [2] Antony Jesu Prabhu P, Schrama J W, Kaushik S J. Mineral requirements of fish: A systematic review[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2016, 8(2): 172-219.
- [3] D'Autréaux B, Toledano M B. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8(10): 813-824.
- [4] 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.
- [5] Zeng L, Wang Y H, Song W, et al. Effects of Cu acclimation on oxidative damage in the large yellow croaker under cold stress based on transcriptome analysis[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(10): 1425-1436. [曾霖, 王永红, 宋炜, 等. 基于转录组解析铜驯化对低温胁迫下大黄鱼氧化损伤的影响[J]. 中国水产科学, 2022, 29(10): 1425- 1436.]
- [6] Hosseini M J, Shaki F, Ghazi-Khansari M, et al. Toxicity of copper on isolated liver mitochondria: Impairment at complexes I, II, and IV leads to increased ROS production[J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2014, 70(1): 367-381.
- [7] Sappal R, Fast M, Purcell S, et al. Copper and hypoxia modulate transcriptional and mitochondrial functional-biochemical responses in warm acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 211: 291-306.
- [8] Wang T, Wen X, Hu Y D, et al. Copper nanoparticles induced oxidation stress, cell apoptosis and immune response in the liver of juvenile *Takifugu fasciatus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 84: 648-655.
- [9] 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.
- [10] Nesci S, Trombetti F, Ventrella V, et al. From the Ca²⁺-activated F1FO-ATPase to the mitochondrial permeability transition pore: An overview[J]. *Biochimie*, 2018, 152: 85-93.
- [11] Omini J, Wojciechowska I, Skirycz A, et al. Association of the malate dehydrogenase-citrate synthase metabolon is modulated by intermediates of the Krebs tricarboxylic acid cycle[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 18770.
- [12] Wu Z, Wu J, Zhao Q, et al. Emerging roles of aerobic glycolysis in breast cancer[J]. *Clinical and Translational Oncology*, 2020, 22(5): 631-646.
- [13] Yang J Z, Zhang Z H, Lin G, et al. Organic copper promoted copper accumulation and transport, enhanced low temperature tolerance and physiological health of white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 132: 108459.
- [14] Liu X M, Xu Z, Chang X Q, et al. Enhanced immunity and hemocytes proliferation by three immunostimulants in tri-spine horseshoe crab *Tachypleus tridentatus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2021, 115: 112-123.
- [15] Cao J L, Feng C P, Xie L T, et al. Sesamin attenuates histological alterations, oxidative stress and expressions of immune-related genes in liver of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to fluoride[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 106: 715-723.
- [16] Liu Q H, Lin H, Chen J, et al. Genetic variation and population genetic structure of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) based on genome-wide single nucleotide polymorphisms in farmed and wild populations[J]. *Fisheries Research*, 2020, 232: 105718.
- [17] Yin F, Gong H, Ke Q Z, et al. Stress, antioxidant defence and mucosal immune responses of the large yellow croaker

- Pseudosciaena crocea* challenged with *Cryptocaryon irritans*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 47(1): 344-351.
- [18] Liu C, Ding J, Gao X M, et al. Effects of acute low temperature stress on the hormones and gene expression of glucocorticoid receptor of large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. Journal of Thermal Biology, 2021, 99: 103018.
- [19] Zeng L, Zhang J S, Zheng J L, et al. Pre-acclimation to low copper mitigated immunotoxic effects in spleen and head-kidney of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) when exposed subsequently to high copper[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 144: 54-61.
- [20] Yuan S S, Lv Z M, Zhu A Y, et al. Negative effect of chronic cadmium exposure on growth, histology, ultrastructure, antioxidant and innate immune responses in the liver of zebrafish: Preventive role of blue light emitting diodes[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 139: 18-26.
- [21] Umeno A, Biju V, Yoshida Y. In vivo ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes[J]. Free Radical Research, 2017, 51(4): 413-427.
- [22] Li W C, Zhao X M, Zhang Y J, et al. Effects of small peptides on growth and intestine development of larval large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) under low-temper and its anti-oxidative stress effect unature stress[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2021, 33(1): 572-583. [李文成, 赵旭民, 张延军, 等. 小肽对大黄鱼仔鱼生长和小肠发育的影响及其在低温胁迫下的抗氧化应激效应[J]. 动物营养学报, 2021, 33(1): 572-583.]
- [23] Lu D L, Ma Q, Sun S X, et al. Reduced oxidative stress increases acute cold stress tolerance in zebrafish[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2019, 235: 166-173.
- [24] Ao J Q, Mu Y N, Xiang L X, et al. Genome sequencing of the perciform fish *Larimichthys crocea* provides insights into molecular and genetic mechanisms of stress adaptation[J]. PLoS Genetics, 2015, 11(4): e1005118.
- [25] Dolci G S, Vey L T, Schuster A J, et al. Hypoxia acclimation protects against oxidative damage and changes in prolactin and somatolactin expression in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to manganese[J]. Aquatic Toxicology, 2014, 157: 175-185.
- [26] 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.
- [27] Costantini D, Monaghan P, Metcalfe N B. Early life experience primes resistance to oxidative stress[J]. The Journal of Experimental Biology, 2012, 215(Pt 16): 2820-2826.
- [28] Archer S L, Gomberg-Maitland M, Maitland M L, et al. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: A mitochondria-ROS-HIF-1alpha-Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer[J]. American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology, 2008, 294(2): H570-H578.
- [29] Morcillo P, Esteban M Á, Cuesta A. Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line[J]. Chemosphere, 2016, 144: 225-233.
- [30] 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.
- [31] Petitjean Q, Jean S, Gandar A, et al. Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes[J]. The Science of the Total Environment, 2019, 684: 371-380.
- [32] Zeng L, Wang Y H, Ai C X, et al. Effects of β-glucan on ROS production and energy metabolism in yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) under acute hypoxic stress[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2016, 42(5): 1395-1405.
- [33] Mandil R, Prakash A, Rahal A, et al. *In vitro* and *in vivo* effects of flubendiamide and copper on cyto-genotoxicity, oxidative stress and spleen histology of rats and its modulation by resveratrol, catechin, curcumin and α-tocopherol[J]. BMC Pharmacology and Toxicology, 2020, 21(1): 29.
- [34] Sareila O, Kelkka T, Pizzolla A, et al. NOX2 complex-derived ROS as immune regulators[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2011, 15(8): 2197-2208.

The mechanism of Cu pre-exposure in improving cold tolerance of large yellow croaker, *Larimichthys crocea*

ZENG Lin^{1,4}, LI Wencheng⁴, SONG Wei^{2,4}, XIE Zhengli³, ZHANG Hui⁴

1. School of Food and Biological Engineering, Bengbu University, Bengbu 233030, China;
2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
3. Fishery Machinery and Instrument Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200092, China;
4. National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China

Abstract: The large yellow croaker *Larimichthys crocea*, is a commercially important marine fish species that is susceptible to *Cryptocaryon irritans* in summer and mass mortality due to cold stress during overwintering. CuSO₄ is an effective and affordable treatment for *C. irritans*, but it causes Cu pollution in aquaculture water. This study investigated the effects of Cu acclimation on the antioxidant capacity, energy metabolism, and non-specific immunity of large yellow croaker under cold stress. Fish were pre-acclimated to 0 and 20 µg Cu/L for 7 d, and subsequently exposed to cold stress (10 °C) for 6 and 24 h. The results showed that compared to the control group, the cold stress group showed oxidative damage via changes in the antioxidant system, energy metabolism, and immune system, as evidenced by increased reactive oxygen species (ROS), vacuolation rate of hepatocytes, chromosome coagulation, anaerobic metabolism, and reduced antioxidant capacity. Cu acclimation with low temperature stress alleviated cold stress-induced oxidative damage by improving antioxidant capacity, energy metabolism efficiency, and non-specific immunity, as evidenced by decreased vacuolation rates of hepatocytes, ROS, and lactic acid contents, and increased activities of glutathione peroxidase, catalase, ATP synthetase, succinate dehydrogenase, alkaline phosphatase, lysozyme, and contents of glutathione and ATP. Cu pre-acclimation can generate adaptive responses that enhance tolerance to low temperature stress, emphasizing the central role of hormesis.

Key words: *Larimichthys crocea*; cold stress; tolerance; Cu acclimation; hormesis

Corresponding author: SONG Wei. E-mail: songw@ecsf.ac.cn