

DOI: 10.12264/JFSC2024-0033

水中添加柠檬酸对大口黑鲈耐低氧能力的影响

刘佳林^{1,2}, 于浩东^{1,2}, 陈菲菲^{1,2}, 张学振^{1,2}

- 华中农业大学水产学院, 长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心, 湖北省池塘养殖工程实验室, 湖北 武汉 430070;
- 湖北洪山实验室, 湖北 武汉 430070

摘要: 为探究在水中添加柠檬酸(citric acid, CA)对处于急性低氧胁迫下的大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)耐低氧能力的影响, 以平均体重(18.53 ± 0.43) g 的大口黑鲈幼鱼为研究对象, 向养殖水体中添加柠檬酸至终浓度分别为 0 (T0)、0.01‰ (T1)、0.05‰ (T2)和 0.10‰ (T3), 在初始溶解氧浓度(DO)为 7.5 mg/L 的水体中停止充氧, 进行 2.5 h 的急性低氧胁迫, 每 0.5 h 测定水中 DO, 对照组 DO 为(7.5 ± 0.2) mg/L。胁迫结束后测定抗应激能力、机体损伤与死亡率。结果显示, 与对照组相比, T0 组大口黑鲈血浆中应激相关指标皮质醇(COR)与乳酸(LD)含量显著升高($P < 0.05$), 表征机体氧化损伤的丙二醛(MDA)含量显著升高, 肝脏凋亡相关基因半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 基因转录水平显著升高($P < 0.05$); 与 T0 组相比, T3 组死亡率显著降低, 血浆中 COR、LD 与 H_2O_2 含量显著降低($P < 0.05$), 肝脏中 caspase-3 基因转录水平显著降低($P < 0.05$)。综上所述, 急性低氧胁迫导致大口黑鲈产生氧化应激与机体损伤, 甚至大量死亡; 0.1‰ CA 可提高大口黑鲈抗急性低氧胁迫能力, 缓解急性低氧胁迫对机体的损伤并降低死亡率。

关键词: 柠檬酸; 缓解; 大口黑鲈; 急性低氧胁迫; 机体损伤; 死亡率

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)05-0576-12

鱼类养殖、捕捞和运输过程中常遇急性低氧胁迫的情况, 会导致鱼类因缺氧而大面积死亡。因此, 如何缓解急性低氧胁迫对养殖鱼类的危害并降低死亡率, 提高水产养殖的经济效益是当前研究的热点。目前, 抗应激研究多集中在饲料添加剂上, 而以水体添加剂缓解鱼类应激反应的研究较少。研究表明, 在运输过程中, 向水中添加 1%氯化钠(NaCl)可提高条纹鲈(*Morone saxatilis*)的存活率, 抑制其血浆中皮质醇和葡萄糖浓度的升高, 并降低其渗透调节功能障碍^[1]。在水中添加维生素 C (vitamin C, Vc)可以缓解鲤(*Cyprinus carpio*)氨氮急性毒性和运输应激反应, 缓解因氨氮胁迫和运输应激引起的氧化应激反应, 降低

其死亡率^[2]。在水中添加 0.9‰的 Vc 可显著延缓麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)在缺氧环境下的死亡时间^[3]。在水中添加 0.5%或 1%的牛磺酸, 可以显著提高麦穗鱼应对急性低氧胁迫的能力, 延缓其在缺氧环境下的死亡时间^[4]。

有研究表明, 配合饲料中加入柠檬酸(citric acid, CA)不仅可以提高养殖鱼类的食欲, 提高养殖鱼类对配合饲料的采食量, 促进养殖鱼类机体对配合饲料中营养物质的消化吸收和利用率, 促进肠道菌群的健康发展, 而且可以增强机体的抗应激能力和免疫能力^[5-9]。柠檬酸广泛地分布在自然界中。工业生产柠檬酸的技术也非常成熟, 因此用柠檬酸作抗应激剂具有成本低廉且容易获得的

收稿日期: 2024-02-05; 修订日期: 2024-03-24.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0900303); 中央级高校基本科研业务费专项资金项目(2662019FW013).

作者简介: 刘佳林(1998-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料. E-mail: liujialin100000@163.com

通信作者: 张学振, 教授, 研究方向水产健康养殖. E-mail: xuezhen@mail.hzau.edu.cn

优势。本研究以大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)为实验对象,将柠檬酸添加入水中作为抗应激剂,研究在水中添加柠檬酸对处于急性低氧胁迫下的大口黑鲈抗应激能力与机体损伤的影响,探究水中添加柠檬酸提升大口黑鲈耐低氧能力的作用机制,以期柠檬酸抗应激剂应用于水产养殖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

本研究所使用的大口黑鲈均来自中国水产科学研究院长江水产研究所梁子湖试验场。在试验开始前,所有大口黑鲈在养殖系统中暂养3周以适应养殖环境。在此期间,水温为 (20.0 ± 0.5) ℃,pH为6.7~7.5,DO浓度高于87% DO饱和度,总氨氮为0.005~0.009 mg/L,光周期为12 L:12 D。每天2次饱食投喂(10:00和17:00)。

1.2 实验设计

挑选375条体型均匀、平均体重为 (18.53 ± 0.43) g的健康大口黑鲈幼鱼。将其平均放养在15个圆形水箱(200 L)中,每个水箱25条,控制总重量一致,暂养7 d。暂养期间控制每缸摄食饲料重量一致。将暂养7 d的大口黑鲈停食24 h后,分别转移至初始DO为7.5 mg/L,柠檬酸浓度(质量分数)分别为0、0.01‰、0.05‰、0.10‰的30 L白色长方体水箱中(分别命名为T0、T1、T2、T3组),每组3缸,一共15缸。停止充氧(模拟池塘捕捞与高密度运输时的急性低氧胁迫),进行急性低氧胁迫实验。在此期间每0.5 h测定1次水体DO浓度并记录死亡条数。

根据上述实验结果确定急性低氧胁迫取样时间为2.5 h(此时T0组水体溶氧量为1.5 mg/L,达到窒息点与死亡点)。挑选375条平均体重为 (18.53 ± 0.43) g、体型均匀的健康大口黑鲈幼鱼,将其平均放养在15个圆形水箱中,每个水箱25条,控制总重量一致,暂养7 d,暂养期间控制每缸摄食饲料重量一致。将暂养7 d的大口黑鲈停食24 h后,分别转移至初始DO为7.5 mg/L,柠檬酸浓度(质量分数)分别为0、0.01‰、0.05‰和0.10‰的30 L白色长方形水箱中,每组3缸,一共12缸,并立

即停止充氧,进行2.5 h的急性低氧胁迫后取样。对照组DO (7.5 ± 0.2) mg/L,3缸直接取样。

1.3 样品采集

在暂养7 d后,取样前大口黑鲈停食24 h。每个缸随机取6尾,即每个处理组取18尾。取经过MS-222麻醉后的大口黑鲈,血液使用预先用肝素钠润洗过的无菌注射器自尾静脉抽取1 mL血液。将血液注入装有微量肝素钠的离心管中,血液样品的其中一半立即用于测定血液常规指标;另一半4℃静置0.5 h,3500 g离心15 min后取上层血浆保存于-80℃超低温冰箱,用于后续氧化状态及抗氧化机能分析等。抽血后将鱼置于冰上迅速解剖取其内脏,先在预冷的生理盐水中洗净血液,并用滤纸吸干水分。取肝脏组织放入离心管中,迅速置于液氮中速冻,用于后续抗氧化酶活性、免疫酶活性和基因转录水平测定。取样完成后,将肝脏保存于-80℃超低温冰箱。

1.4 指标测定

1.4.1 溶氧量测定 水体中DO浓度与pH用便携式水质检测仪(EW-PC19-IV)测定:

死亡率=死亡条数/总条数 $\times 100\%$;总耗氧量=水体初始含氧量-测定含氧量。

1.4.2 血液指标测定 红细胞(RBC)计数使用经过逐级稀释的200倍稀释血液,用Neubauer血细胞计数器在显微镜下计数。血红蛋白(Hb)测定使用血红蛋白测试盒(南京建成生物工程研究所,中国),测定方法按照说明书进行。

1.4.3 血浆和肝脏生化指标测定 血浆经逐级解冻后直接用于后续测定。肝脏样品以10倍体积(W/V)生理盐水匀浆3 min,随后以4000 g(4℃)离心15 min后取上清进行后续测定。使用商业试剂盒检测天门冬氨酸氨基转移酶(GOT)、丙氨酸氨基转移酶(GPT)、过氧化氢(H_2O_2)、丙二醛(MDA)、总蛋白(TP)、皮质醇(COR)、乳酸(LD)和葡萄糖(GLU)的含量(南京建成生物工程研究所,中国)。

1.4.4 实时荧光定量PCR 使用TRIzol® Reagent试剂(Aidlab, 中国)提取总RNA。RNA提取方法参考本实验室的方法^[10]。相关基因的转录水平由

实时荧光定量 PCR (qPCR)检测,使用的试剂盒为 Hieff® qPCR® SYBR Green Master Mix (上海翊圣生物科技股份有限公司)。所有基因的引物均根据 NCBI 网站上已公布的大口黑鲈相关基因全序

列,利用 NCBI 网站和 Primer 6.0 设计(表 1)。以 β -actin 为内参基因,检测大口黑鲈肝脏和肠道基因的表达。按照 Livak 等^[11]的方法分析靶基因的相对定量。

表 1 本研究所用 qPCR 引物
Tab. 1 Oligonucleotide primers for qPCR assays in this study

基因 gene	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	长度/bp size	来源 source
β -actin	F: CATGCCATCCTGCGTCTTGA R: ATGTCACGCACGATTTCCT	119	XM_038695351.1
<i>hif-1α</i>	F: AGGAAGCCGACAAACCTCAG R: TCCTCGTCCGGTTATGAGT	97	XM_038693142.1
<i>glut-1</i>	F: AATCGCTTTGGAAGGAGGA R: CACCCACATACATTGGCACA	175	KY_952765
caspase-3	F: GCTTCATTCTGTCTGTGTTTC R: CGAAAAAGTGATGTGAGGTA	98	XM_038713063.1
caspase-8	F: TGTTACCCACCTTGCTTTT R: CCCTTCCGCTGAGGTCTTTT	90	XM_038718636.1

注: F 表示正向引物; R 表示反向引物。
Note: F indicates forward primer; R indicates reverse primer.

1.5 数据处理

所有数据采用 SPSS 26.0 统计软件处理(IBM, USA)。在进行统计分析前,采用 Shapiro-Wilk 检验数据的正态性,采用 Levene 检验方差的齐性。对服从正态分布且方差齐性的数据进行单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)并以 Duncan's test 进行多重比较。对不服从正态分布的数据或方差不齐的数据进行 Kruskal-Wallis 非参数检验并以 Dunn-Bonferroni post-hoc test 进行多重比较。本研究中所有数据均表示为均值±标准误($\bar{x}\pm\text{SE}$),所有结果统计分析均以 $P<0.05$ 为显著性水平。

2 结果与分析

2.1 血液氧运输能力相关指标

水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫下血液中红细胞数量和血红蛋白含量的影响如图 1 所示。与对照组相比, T0 组大口黑鲈血液中 RBC 和 Hb 有所下降,但差异不显著($P>0.05$)。与 T0 组相比, T2 组大口黑鲈血液中 Hb 含量显著升高($P<0.05$); T3 组大口黑鲈血液中 RBC 的数量和 Hb

的含量显著升高($P<0.05$),并与对照组无显著差异($P>0.05$)。

2.2 血浆中应激相关指标与肝脏低氧相关基因的表达

水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫下血浆中皮质醇、葡萄糖、乳酸含量的影响如图 2 所示。与对照组相比, T0 组、T1 组与 T2 组大口黑鲈血浆中 COR、LD 和 GLU 的含量均显著升高($P<0.05$)。与 T0 组相比, T2 和 T3 组大口黑鲈血浆中 LD 的含量显著降低($P<0.05$); T3 组大口黑鲈血浆中 COR 的含量显著降低($P<0.05$),并与对照组无显著差异($P>0.05$)。

水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫下肝脏中低氧诱导因子 1 α 和葡萄糖转运蛋白 1 基因转录水平的影响如图 3 所示。与对照组相比, T0 组大口黑鲈肝脏中低氧诱导因子 1 α 与葡萄糖转运蛋白 1 转录水平均无显著影响($P>0.05$)。与 T0 组相比, T3 组大口黑鲈肝脏中低氧诱导因子 1 α 的转录水平显著提高($P<0.05$)。与对照组相比, T2 和 T3 组大口黑鲈肝脏中葡萄糖转运蛋白 1 的转录水平显著升高($P<0.05$)。

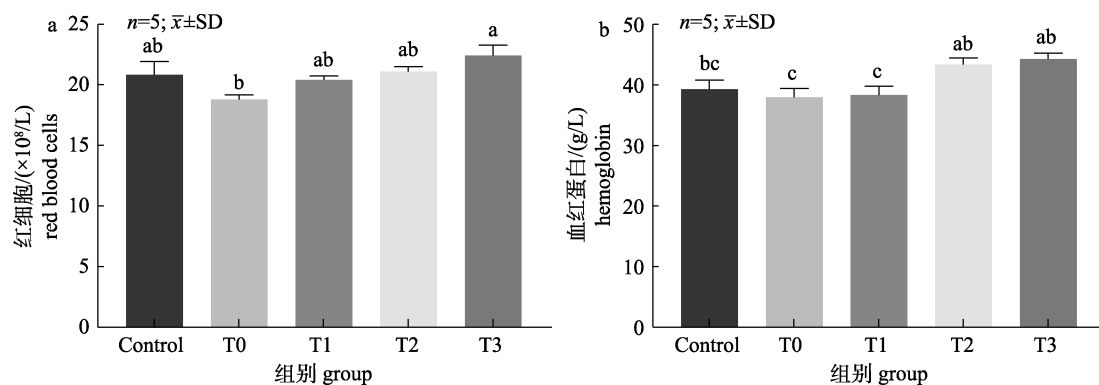


图 1 水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫下血液中红细胞数量(a)和血红蛋白含量(b)的影响
不同小写字母表示处理组间存在显著差异($P<0.05$).

Fig. 1 Effect of citric acid addition to water on the number of red blood cell (a) and hemoglobin content (b) in the blood of *Micropterus salmoides* under acute hypoxic stress
Different lowercase letters indicate significant difference among groups ($P<0.05$).

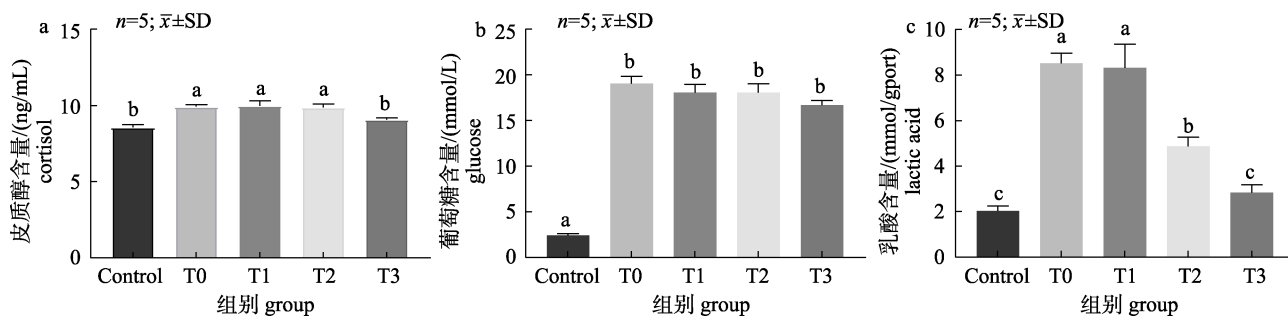


图 2 水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫下血浆中皮质醇(a)、葡萄糖(b)、乳酸(c)含量的影响
不同小写字母表示处理组间存在显著差异($P<0.05$).

Fig. 2 Effects of citric acid addition to water on cortisol (a), glucose (b), lactic acid (c) levels in the plasma of *Micropterus salmoides* under acute hypoxic stress
Different lowercase letters indicate significant difference among groups ($P<0.05$).

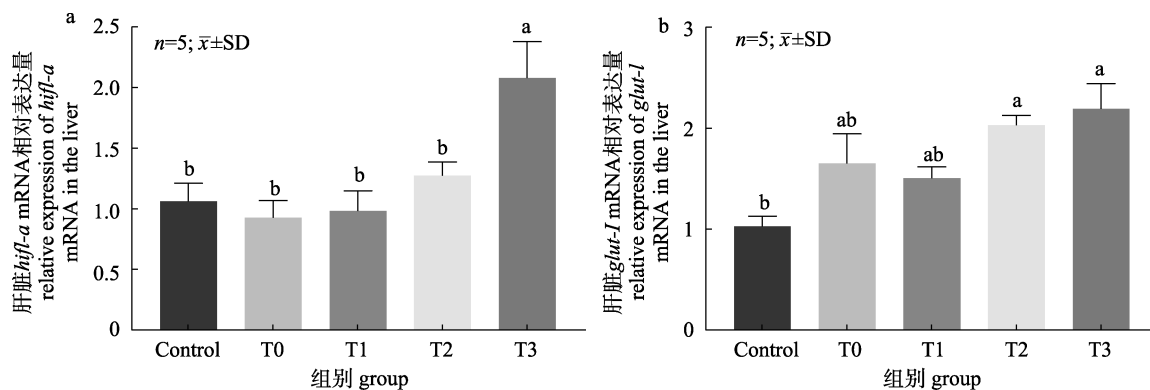


图 3 水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫下肝脏中低氧诱导因子 1α (a)和葡萄糖转运蛋白 1 (b)基因转录水平的影响

不同小写字母表示处理组间存在显著差异($P<0.05$).

Fig. 3 Effects of citric acid addition to water on the transcription levels of hypoxia inducible factor-1α (a) and glucose transporter-1 (b) genes in the liver of the *Micropterus salmoides* under acute hypoxic stress
Different lowercase letters indicate significant difference among groups ($P<0.05$).

2.3 血浆和肝脏氧化状态

水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫

下血浆中过氧化氢和丙二醛含量的影响如图 4 所示。与对照组相比, T0 组大口黑鲈血浆中 H_2O_2 与

MDA 的含量显著升高($P<0.05$)。与 T0 组相比, T1、T2 和 T3 组大口黑鲈血浆中 MDA 的含量有所降低, 但差异不显著($P>0.05$); T2 和 T3 组大口黑鲈血浆中 H_2O_2 含量显著降低($P<0.05$)。

水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫

下肝脏中过氧化氢和丙二醛含量的影响如图 5 所示。与对照组相比, T0 组大口黑鲈肝脏中 MDA 的含量显著升高($P<0.05$)。与 T0 组相比, T3 组大口黑鲈肝脏中 MDA 的含量显著降低($P<0.05$), 并与对照组无显著差异($P>0.05$)。

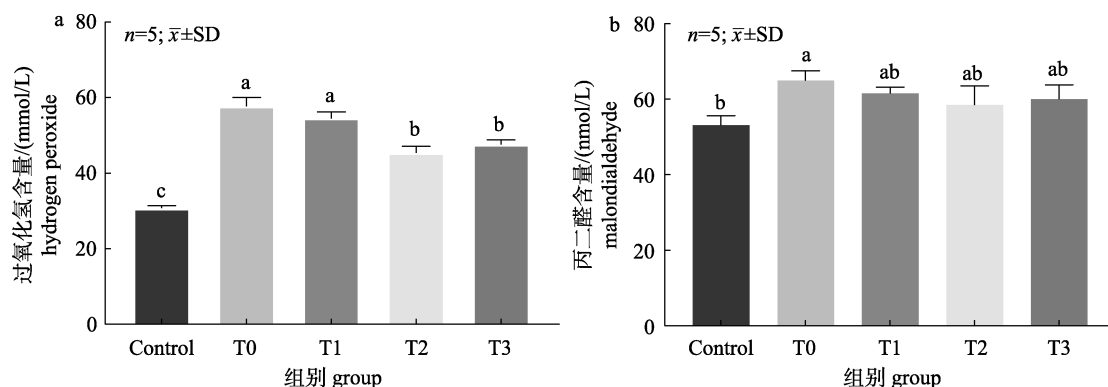


图 4 水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫下血浆中过氧化氢(a)和丙二醛(b)含量的影响
不同小写字母表示处理组间存在显著差异($P<0.05$)。

Fig. 4 Effect of citric acid addition to water on hydrogen peroxide (a) and malondialdehyde (b) content in the plasma of *Micropterus salmoides* under acute hypoxic stress
Different small letters indicate significant difference among groups ($P<0.05$).

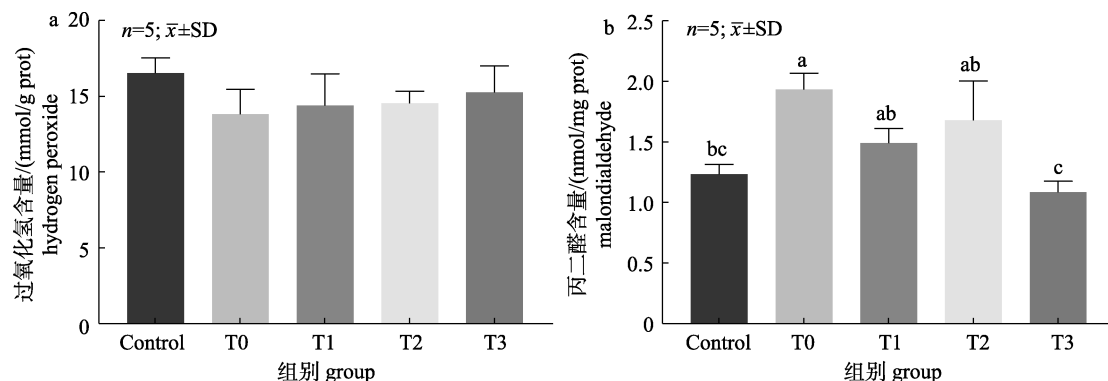


图 5 水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫下肝脏中过氧化氢(a)和丙二醛(b)含量的影响
不同小写字母表示处理组间存在显著差异($P<0.05$)。

Fig. 5 Effects of citric acid addition to water on hydrogen peroxide (a) and malondialdehyde (b) content in the liver of *Micropterus salmoides* under acute hypoxic stress
Different lowercase letters indicate significant difference among groups ($P<0.05$).

2.4 血浆中机体损伤相关指标与肝脏中细胞凋亡相关基因表达

水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫下血浆中谷丙转氨酶(a)和谷草转氨酶(b)活性的影响如图 6 所示。与对照组相比, 急性低氧胁迫导致 T0 组和 T1 组大口黑鲈血浆中 GPT 与 GOT 的活性显著升高($P<0.05$)。与 T0 组相比, T2 和 T3 组大口黑鲈血浆中 GPT 和 GOT 的活性显著降低

($P<0.05$), 并与对照组无显著差异($P>0.05$)。

水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫下肝脏中半胱氨酸蛋白水解酶 3 和半胱氨酸蛋白水解酶 8 基因转录水平的影响如图 7 所示。与对照组相比, 急性低氧胁迫导致 T0 组大口黑鲈肝脏中 cysteinyl aspartate specific proteinase-3 和 cysteinyl aspartate specific proteinase-8 基因转录水平显著升高($P<0.05$)。与 T0 组相比, T1、T2 和 T3 组大口

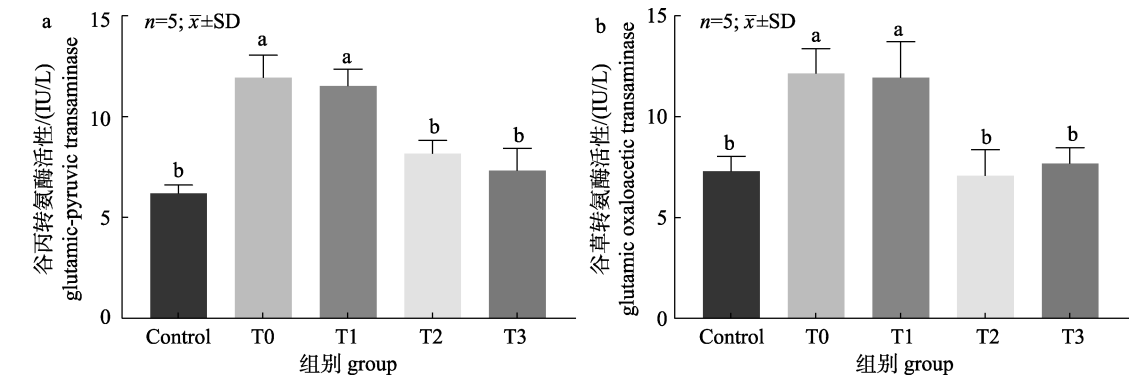


图 6 水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫下血浆中谷丙转氨酶(a)和谷草转氨酶(b)活性的影响
不同小写字母表示处理组间存在显著差异($P<0.05$).

Fig. 6 Effects of citric acid addition to water on glutamic-pyruvic transaminase (a), and glutamic oxaloacetic transaminase (b) activity in plasma of *Micropterus salmoides* under acute hypoxic stress
Different lowercase letters indicate significant difference among groups ($P<0.05$).

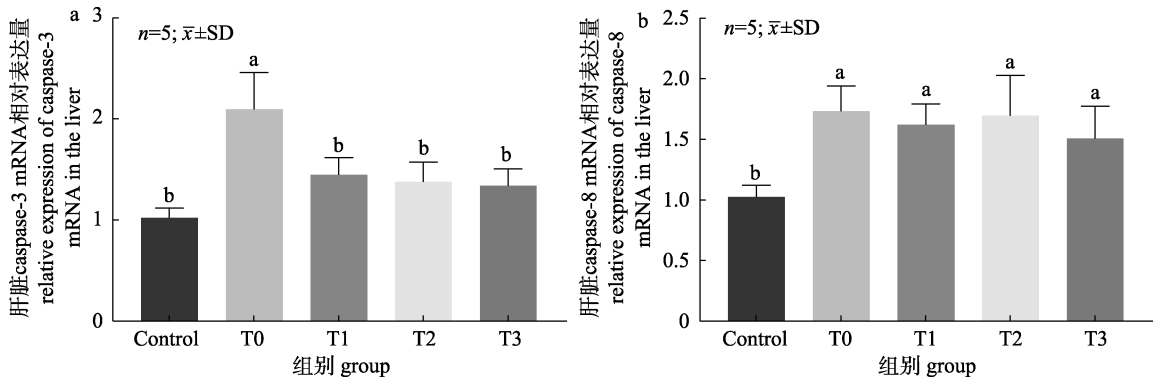


图 7 水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫下肝脏中半胱氨酸蛋白水解酶 3 (a)和
半胱氨酸蛋白水解酶 8 (b)基因转录水平的影响
不同小写字母表示处理组间存在显著差异($P<0.05$).

Fig. 7 Effects of citric acid addition to water on the transcription levels of cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (a) and cysteinyl aspartate specific proteinase-8 (b) genes in the liver of *Micropterus salmoides* under acute hypoxic stress
Different lowercase letters indicate significant difference among groups ($P<0.05$).

黑鲈肝脏中 cysteinyl aspartate specific proteinase-3 的转录水平显著降低($P<0.05$), 并与对照组无显著差异($P>0.05$)。

2.5 耗氧量与死亡率

水体实时溶氧检测如表 2 所示, 水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫下总耗氧量的影响如表 3 所示, 水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫下死亡率的影响如表 4 所示。T0 与 T1 组均在急性低氧胁迫的 2.5 h 时达到窒息点与死亡点, T3 组在急性低氧胁迫的 3.5 h 时达到窒息点与死亡点。与 T0 组相比, T1 组总耗氧量和死亡率无显著变化($P>0.05$); T2 组在急性低氧胁迫过程中的前 2.5 h 大口黑鲈的耗氧量显著降低, 前

3.5 h 死亡率显著降低($P<0.05$); T3 组耗氧量和死亡率显著降低, 死亡时间点延缓($P<0.05$)。

表 2 各试验组养殖水体实时溶氧检测
Tab. 2 Real time dissolved oxygen detection in water bodies of each treatment group

<i>n</i> =25; $\bar{x} \pm SE$; mg/L				
时间/h time	T0	T1	T2	T3
0	7.5±0.0	7.5±0.0	7.5±0.0	7.5±0.0
0.5	5.5±0.1	5.5±0.0	5.7±0.2	7.0±0.1
1.0	3.3±0.1	3.2±0.1	3.9±0.1	6.0±0.1
1.5	2.3±0.2	2.1±0.3	2.6±0.0	4.2±0.0
2.0	1.5±0.0	1.6±0.1	1.8±0.2	3.7±0.1
2.5	1.5±0.0	1.5±0.0	1.7±0.2	3.0±0.0
3.0	1.5±0.0	1.5±0.0	1.6±0.1	2.4±0.1
3.5	1.5±0.0	1.5±0.0	1.5±0.1	1.8±0.0

表 3 水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫下总耗氧量的影响

Tab. 3 Effects of citric acid addition to water on total oxygen consumption of *Micropterus salmoides* under acute hypoxic stress

n=25; $\bar{x} \pm SE$; mg/L

时间/h time	T0	T1	T2	T3
0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
0.5	2.0±0.1 ^a	2.0±0.0 ^a	1.8±0.2 ^a	0.5±0.1 ^b
1.0	4.2±0.1 ^a	4.3±0.1 ^a	3.6±0.1 ^b	1.5±0.1 ^c
1.5	5.2±0.2 ^{ab}	5.4±0.3 ^a	4.9±0.0 ^b	3.3±0.0 ^c
2.0	6.0±0.0 ^a	5.9±0.1 ^{ab}	5.7±0.2 ^b	3.8±0.1 ^c
2.5	6.0±0.0 ^a	6.0±0.0 ^a	5.8±0.2 ^b	4.5±0.0 ^c
3.0	6.0±0.0 ^a	6.0±0.0 ^a	5.9±0.1 ^a	5.1±0.1 ^b
3.5	6.0±0.0 ^a	6.0±0.0 ^a	6.0±0.1 ^a	5.7±0.0 ^b

注：同一行中不同的上标字母表示处理组间存在显著差异 ($P<0.05$)。

Note: In the same row, different superscript lettes indicate significant difference among groups ($P<0.05$).

表 4 水中添加柠檬酸对大口黑鲈在急性低氧胁迫下死亡率的影响

Tab. 4 Effects of citric acid addition to water on mortality of *Micropterus salmoides* under acute hypoxic stress

n=25; $\bar{x} \pm SE$; %

时间/h time	T0	T1	T2	T3
2.50	8.00±4.00 ^a	8.00±0.00 ^a	6.67±2.30 ^a	0.00±0.00 ^b
2.75	18.67±2.30 ^a	16.00±4.00 ^a	6.67±2.30 ^b	0.00±0.00 ^c
3.00	28.00±4.00 ^a	25.33±2.30 ^a	14.67±4.62 ^b	0.00±0.00 ^c
3.25	34.47±4.62 ^a	30.66±4.62 ^a	20.00±4.00 ^b	0.00±0.00 ^c
3.50	36.00±4.00 ^a	33.33±2.30 ^{ab}	28.00±4.00 ^b	1.33±2.30 ^c

注：同一行中不同的上标字母表示处理组间存在显著差异 ($P<0.05$)。

Note: In the same row, different superscript lettes indicate significant difference among groups ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 水中添加柠檬酸对处于急性低氧胁迫下大口黑鲈抗应激能力的影响

在生物体中, RBC 数量的增加可以有效地提高血液携带氧的能力^[12], Hb 的增加有助于肺以及肺周围组织含氧量升高^[13]。有研究表明, 在低氧环境条件下, 鱼类机体可能会通过增加 RBC 数量来获得更多的氧和增强氧运输能力^[14]。鲫(*Carassius auratus*)通过增加血液中 RBC 数量以适应低氧环

境^[15]。本研究结果显示, 急性低氧胁迫导致大口黑鲈发生红细胞破裂, 所以血液中 RBC 数量和 Hb 含量减少, RBC 数量和 Hb 含量的减少使大口黑鲈运输氧和二氧化碳的能力减弱。而添加 0.1‰ CA 可有效缓解由于急性低氧胁迫而导致的 RBC 数量和 Hb 含量减少, 从而缓解急性低氧胁迫应激。

血液中 COR 和 GLU 的含量是反映鱼类应激程度的重要指标, 当鱼类受到应激源的刺激, 产生强烈的应激反应时, 血液 COR 和 GLU 含量将显著升高^[16]。有研究表明, 斑点叉尾鲴(*Ictalurus punctatus*)在运输应激胁迫过程中的前 1 h 内血液中 COR 含量显著升高, 前 6 h 内血液中 GLU 含量显著升高^[17]; 鲤遭受氧化应激后, 血清中 GLU、COR 和 LD 含量显著升高^[18]。在运输应激胁迫后, 银鲌(*Pampus argenteus*)COR 和 GLU 含量显著升高, 尖吻鲈(*Lates calcarifer*)血液中 COR 显著升高^[19-20]。草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)和青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)在捕捞应激后血浆中 COR、GLU 和 LD 含量均显著升高^[21]。鲤在运输应激胁迫后, 血清中 COR 和 GLU 含量显著升高, 而在浸泡 25 mg/L Vc 后可以显著降低血清中 COR 和 GLU 的含量^[2]。本研究结果显示, 急性低氧胁迫导致大口黑鲈出现了严重的应激反应, 添加 0.01‰ CA 与 0.05‰ CA 无显著效果; 添加 0.1‰ CA 可以有效缓解大口黑鲈因急性低氧胁迫而导致的应激反应。

当鱼类处于低氧环境时, 鱼类机体代谢可以从有氧代谢向无氧代谢转变以提供能量。LD 是无氧呼吸的代谢产物, 机体在处于低氧环境中或剧烈运动时会产生大量的 LD, 使血液和组织中 LD 含量升高。有研究表明, 黄带拟鲮(*Pseudocaranx dentex*)在无氧运动后血浆 GLU 和 LD 含量显著升高^[22]。青田田鱼(*Cyprinus carpio var qingtianensis*)在急性低氧胁迫后期血浆中 GLU 和 LD 含量显著升高^[23]。本研究结果显示, 与对照组相比, T0 组血浆中 LD 含量显著升高, 与 Yang 等^[24]和 Zhao 等^[25]在大口黑鲈上的研究结果一致; 急性低氧胁迫使大口黑鲈处于以无氧呼吸代谢为主的状态,

添加 0.01% CA 无显著效果; 添加 0.05% 和 0.1% CA 可使大口黑鲈在急性低氧胁迫过程的前中期处于以有氧呼吸代谢为主的状态下, 0.1% CA 效果更好。

在水中 DO 浓度较低的情况下, 鱼类低氧诱导因子 α 被激活, 在低氧环境下低氧诱导因子-1 α 有着重要的调节功能^[26]; 低氧诱导因子-1 α 的激活会促进糖酵解, 抑制柠檬酸循环和氧化磷酸化反应; 低氧诱导因子-1 α 可以调节机体促红细胞生成素编码基因与血管内皮生长因子编码基因, 促进红细胞生成和血管形成, 维持机体细胞在低氧环境下内环境的稳定; 低氧诱导因子-1 α 的积累亦可激活其他低氧反应基因, 如葡萄糖转运蛋白-1^[27-28]; 低氧诱导因子-1 α 可与葡萄糖转运蛋白-1 的启动子区域相结合, 同时诱导葡萄糖转运蛋白-1 mRNA 水平和蛋白水平的表达增加^[29]; 葡萄糖转运蛋白-1 在鱼类机体缺氧反应中起着重要的作用, 可增强鱼类机体 GLU 转运能力。本研究结果显示, 在急性低氧胁迫下添加 0.10% CA 使大口黑鲈肝脏中低氧诱导因子-1 α 基因大量转录, 促进葡萄糖转运蛋白-1 的转录水平, 增强大口黑鲈的 GLU 转运能力; 同时低氧诱导因子-1 α 的大量转录能使机体在低氧环境下维持内环境的稳定。推测低氧诱导因子-1 α 的大量转录可促进大口黑鲈机体糖酵解能力的增强, 抑制柠檬酸循环和氧化磷酸化反应, 减少机体能量消耗。

3.2 水中添加柠檬酸对处于急性低氧胁迫下大口黑鲈机体损伤的影响

血液中 GPT 与 GOT 活性异常升高表明鱼类机体肝脏受损, 导致肝脏中 GPT 与 GOT 流向血液。血浆中 GPT、GOT 与 AKP 的活性被作为反应机体肝脏损伤的重要指标^[30]。有研究表明, 鲫经历运输胁迫后血清中 AKP 活性显著升高, 浸泡 γ -氨基丁酸可显著缓解血清中 AKP 活性升高^[31]。本研究结果显示, 急性低氧胁迫导致大口黑鲈肝脏受损, 添加 0.01% CA 无显著效果; 添加 0.05% 和 0.10% CA 可缓解急性低氧胁迫对大口黑鲈肝脏的损伤, 添加 0.1% CA 效果更好。

低氧条件往往会对鱼类造成显著的氧化应

激^[32], 扰乱电子传递链, 使鱼类从好氧代谢切换到厌氧代谢, 导致 ROS 大量产生, 这可能会导致养殖鱼类机体造成脂质过氧化损伤, 并且形成 MDA 等损害机体的氧化产物^[33], MDA 含量可作为 ROS 自由基引起的对生物机体造成负面影响和细胞损伤的重要指标^[34], 产生的 MDA 还会加剧机体细胞膜的损伤。在正常状态下, 鱼体内 MDA 的含量始终维持在一个相对稳定的状态, 但如果鱼体受到严重的应激源刺激, 机体 MDA 含量就会显著升高。H₂O₂ 作为 ROS 自由基链的中间产物, 其含量变化可直接反映出鱼类机体内 ROS 自由基的含量变化趋势, 间接地反映出鱼类机体遭受氧化应激的程度。有研究表明, 在低氧胁迫后, 团头鲂心脏线粒体中 MDA 含量显著升高^[35]; 褐牙鲮幼鱼肌肉中 MDA 含量显著增加^[36]; 大口黑鲈血浆中 MDA 含量显著升高^[37]。本研究结果显示, 急性低氧胁迫导致大口黑鲈机体产生严重的氧化应激反应, 对大口黑鲈机体造成严重的脂质过氧化损伤; 添加 0.1% CA 显著缓解了急性低氧胁迫对大口黑鲈的影响, 减轻了急性低氧胁迫导致的机体氧化损伤。

凋亡蛋白酶(cysteiny aspartate specificproteinase)活性是检测鱼类早期应激诱导的细胞凋亡的重要指标之一。细胞凋亡有两种途径, 内源性线粒体途径和外源性死亡受体途径。内源性线粒体途径是由线粒体释放细胞色素 C 引发的。细胞色素 C 可以通过形成含有细胞色素 C 与 cysteiny aspartate specificproteinase-3 的细胞凋亡体来激活下游效应 cysteiny aspartate specificproteinase-1 和 cysteiny aspartate specificproteinase-9。cysteiny aspartate specificproteinase-3 的活化会导致一系列蛋白质的切割, 导致机体细胞的凋亡, 外源性死亡受体途径通过识别具有跨膜受体的细胞外配体来调节, 其直接激活引发剂为 cysteiny aspartate specificproteinase-8^[38]。本研究显示, 急性低氧胁迫导致大口黑鲈肝脏细胞凋亡, 这与 Zhao 等^[25]在大口黑鲈上的研究结果一致; 水中添加柠檬酸可缓解急性低氧胁迫对大口黑鲈肝脏细胞凋亡的影响。

3.3 水中添加柠檬酸对处于急性低氧胁迫下大口黑鲈耗氧量与死亡率的影响

鱼类在面对急性低氧胁迫环境时,最开始鱼类会加快鳃与水体氧的交换速率或者游动到水体上层呼吸空气中的氧,通常表现为鱼类鳃的运动速率加快以及浮头等现象^[39]。有些鱼类通过减少活动量来降低对氧消耗的需求量,有些鱼类通过调节血液参数如红细胞和血红蛋白的浓度来维持低氧下的供氧,有些鱼类可以通过调整鳃丝的总面积,以此提高鳃丝与水接触的总面积,从而提高鱼类鳃丝与水的氧交换速率。鱼类通过这些方式来响应急性低氧胁迫,从而达到维持机体的正常生理活动的目的。但在这个过程中,鱼类不可避免地会出现死亡的情况。在低氧胁迫环境下,鱼类的机体细胞将出现不同程度的细胞凋亡,从而导致鱼类的死亡^[40-41]。有研究表明,在水中添加 0.9‰ 的 Vc 可显著延缓麦穗鱼在缺氧环境下的死亡时间^[3]。水中添加 0.5% 或 1% 的牛磺酸,可以显著提高麦穗鱼应对急性低氧胁迫的能力,延缓其在缺氧环境下的死亡时间^[4]。本研究结果显示,水中添加 0.05% 和 0.10% 的 CA 可以提高大口黑鲈抗急性低氧胁迫能力,降低氧消耗量与死亡率。

4 结论

本研究结果表明,急性低氧胁迫使大口黑鲈处于以无氧呼吸代谢为主的状态,导致大口黑鲈出现氧化应激反应,机体出现严重脂质过氧化损伤;添加 0.01% CA 对缓解急性低氧胁迫无显著效果,添加 0.05% CA 可使大口黑鲈在急性低氧胁迫过程的前中期,处于以有氧呼吸代谢为主的状态,在一定程度上缓解急性低氧胁迫对大口黑鲈产生的不利影响并降低死亡率;添加 0.1% CA 可显著提高大口黑鲈抗应激能力,使大口黑鲈处于以有氧呼吸代谢为主的状态,缓解大口黑鲈氧化应激反应,减少脂质过氧化损伤,有效缓解急性低氧胁迫所导致的机体损伤并降低大口黑鲈耗氧量和死亡率。

参考文献:

[1] Mazik P M, Simco B A, Parker N C. Influence of water

hardness and salts on survival and physiological characteristics of striped bass during and after transport[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1991, 120(1): 121-126.

- [2] Li Y N. Study on alleviation of transport stress in *Cyprinus carpio* by adding vitamin C to water[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016. [李勇男. 水中添加维生素 C 缓解鲤鱼运输应激的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.]
- [3] Lü G Q, Wei H. Influence of vitamin C and taurine on the anti-hypoxic capacity of *Pseudorasbora parva*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2015, 471(3): 194-196. [吕广祺, 魏华. 维生素 C 和牛磺酸对麦穗鱼抗缺氧能力的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015, 471(3): 194-196.]
- [4] Wei Z Q, Yu H C, Wu R. Effect of taurine on anti-anoxia capacity of *Pseudorasbora parva*[J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2004, 26(1): 27-29. [魏智清, 于洪川, 吴润. 牛磺酸对麦穗鱼抗缺氧能力的影响[J]. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(1): 27-29.]
- [5] Yu M M, Li W Y, Yan B L. Research progress of citric acid as feed additive in aquaculture[J]. Journal of Aquaculture, 2021, 42(12): 25-29. [于淼淼, 李婉莹, 阎斌伦. 柠檬酸作为饲料添加剂在水产养殖中的应用进展[J]. 水产养殖, 2021, 42(12): 25-29.]
- [6] Miyake M, Kozai Y, Sakurai T, et al. Effects of citric acid administration on femoral trabecular structures in ovariectomized mice[J]. Oral Radiology, 2007, 23(2): 34-41.
- [7] Zhang L, Zhang P J, Xia C G, et al. Effects of malic acid and citric acid on growth performance, antioxidant capacity, haematology and immune response of *Carassius auratus gibelio* [J]. Aquaculture Research, 2020, 51(7): 2766-2776.
- [8] Khajepour F, Hosseini S A. Citric acid improves growth performance and phosphorus digestibility in Beluga (*Huso huso*) fed diets where soybean meal partly replaced fish meal[J]. Animal Feed Science and Technology, 2012, 171(1): 68-73.
- [9] Khajepour F, Hosseini S A. Calcium and phosphorus status in juvenile Beluga (*Huso huso*) fed citric acid-supplemented diets[J]. Aquaculture Research, 2012, 43(3): 407-411.
- [10] Zhang F, Teng Z L, Wang L, et al. Dietary selenium deficiency and excess accelerate ubiquitin-mediated protein degradation in the muscle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) via akt/FoxO3a and NF- κ B signaling pathways[J]. Biological Trace Element Research, 2022, 200(3): 1361-1375.
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method [J]. methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [12] Murad A, Houston A H, Samson L. Haematological response to reduced oxygen-carrying capacity, increased temperature and hypoxia in goldfish, *Carassius auratus* L.[J]. Journal of

- Fish Biology, 1990, 36(3): 289-305.
- [13] Zhu X J, Guan Y Y, Lei F M. Hemoglobins and high-altitude adaptive evolution in vertebrates[J]. *Scientia Sinica (Vita)*, 2016, 46(1): 84-102. [朱筱佳, 管玉艳, 雷富民. 血红蛋白与脊椎动物高海拔适应进化[J]. *中国科学(生命科学)*, 2016, 46(1): 84-102.]
- [14] Wu Z H, You F, Wen A Y, et al. Physiological and morphological effects of severe hypoxia, hypoxia and hyperoxia in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. *Aquaculture Research*, 2016, 47(1): 219-227.
- [15] Roesner A, Mitz S A, Hankeln T, et al. Globins and hypoxia adaptation in the goldfish, *Carassius auratus*[J]. *The FEBS Journal*, 2008, 275(14): 3633-3643.
- [16] Acerete L, Balasch J C, Espinosa E, et al. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling[J]. *Aquaculture*, 2004, 237(1/4): 167-178.
- [17] Tian X. The effect of transport stress on flesh quality and blood biochemical parameters of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and channel catfish *Ictalurus punctatus*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016. [田兴. 运输应激对黄颡鱼和斑点叉尾鲷血液生化指标和肌肉品质的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.]
- [18] He Q, Jia R, Cao L P, et al. Antioxidative status and immune response in common carp (*Cyprinus carpio*) under oxidative stress[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(1): 33-43. [何勤, 贾睿, 曹丽萍, 等. 氧化应激对鲤抗氧化状态和免疫功能的影响[J]. *水产学报*, 2021, 45(1): 33-43.]
- [19] Peng S M, Shi Z H, Li J, et al. Effect of transportation stress on serum cortisol, glucose, tissue glycogen and lactate of juvenile silver pomfret (*Pampus argenteus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(6): 831-837. [彭士明, 施兆鸿, 李杰, 等. 运输胁迫对银鲷血清皮质醇、血糖、组织中糖元及乳酸含量的影响[J]. *水产学报*, 2011, 35(6): 831-837.]
- [20] Zuo T. Study on the effects of transport stress on the immunity of *Lates calcarifer*[D]. Tianjin: Tianjin Agricultural University, 2020. [左涛. 运输胁迫对尖吻鲈免疫影响研究[D]. 天津: 天津农学院, 2020.]
- [21] Jiang D L, Lin Y Y, Wu Y B, et al. Stress response of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), prussian carp (*Carassius auratus gibelio*) and black carp (*Mylopharyngodon piceus*) to handling[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(9): 1479-1485. [姜丹莉, 林雅云, 吴玉波, 等. 草鱼、银鲫和青鱼捕捞后的应激反应[J]. *水产学报*, 2016, 40(9): 1479-1485.]
- [22] Wells R M, Baldwin J. Plasma lactate and glucose flushes following burst swimming in silver trevally (*Pseudocaranx dentex*: *Carangidae*) support the "releaser" hypothesis[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2006, 143(3): 347-352.
- [23] Qi M, Hou Y L, Liu T, et al. The effects of acute hypoxia stress and re-oxygenation on oxidative stress and energy metabolism of juvenile *Cyprinus carpio* var *qingtianensis*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2020, 50(6): 92-98. [齐明, 侯懿玲, 刘韬, 等. 急性低氧胁迫和复氧恢复对青田田鱼幼鱼氧化应激和能量代谢的影响[J]. *淡水渔业*, 2020, 50(6): 92-98.]
- [24] Yang S, Wu H, He K, et al. Response of AMP-activated protein kinase and lactate metabolism of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) under acute hypoxic stress[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 666: 1071-1079.
- [25] Zhao L L, Cui C, Liu Q, et al. Combined exposure to hypoxia and ammonia aggravated biological effects on glucose metabolism, oxidative stress, inflammation and apoptosis in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2020, 224: 105514.
- [26] Tanaka Y, Hosoyama T, Mikamo A, et al. Hypoxic preconditioning of human cardiosphere-derived cell sheets enhances cellular functions via activation of the PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α pathway[J]. *American Journal of Translational Research*, 2017, 9(2): 664-673.
- [27] Weidemann A, Johnson R S. Biology of HIF-1 α [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2008, 15(4): 621-627.
- [28] Shen R J, Jiang X Y, Pu J W, et al. HIF-1 α and -2 α genes in a hypoxia-sensitive teleost species *Megalobrama amblycephala*: cDNA cloning, expression and different responses to hypoxia[J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2010, 157(3): 273-280.
- [29] Kihira Y, Yamano N, Izawa-Ishizawa Y, et al. Basic fibroblast growth factor regulates glucose metabolism through glucose transporter 1 induced by hypoxia-inducible factor-1 α in adipocytes[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2011, 43(11): 1602-1611.
- [30] Frankič T, Pajk T, Rezar V, et al. The role of dietary nucleotides in reduction of DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in chicken leukocytes[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2006, 44(11): 1838-1844.
- [31] Yan F B, Dong T C, Lu Y Y, et al. Effects of γ -aminobutyric acid on blood biochemical parameters in *Carassius auratus* under transportation stress[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(20): 127-130. [闫峰宾, 董天成, 卢媛媛, 等. γ -氨基丁酸对鲫鱼运输应激后血液生化指标的影响[J]. *广东农业科学*, 2014, 41(20): 127-130.]
- [32] Lushchak V I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals[J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 101(1): 13-30.
- [33] Del Rio D, Stewart A J, Pellegrini N. A review of recent

- studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress[J]. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 2005, 15(4): 316-328.
- [34] Sun Y Y, Yin Y, Zhang J F, et al. Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius auratus* liver, exposed to pyrene[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 71(2): 446-453.
- [35] Wu X J. The effects of hypoxia on cell apoptosis and the activity of antioxidant enzymes in *Megalobrama amblycephala* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015. [吴鑫杰. 低氧对团头鲂细胞凋亡及抗氧化酶活性的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.]
- [36] Li J. Effects of restricted the supply of dissolved oxygen on the growth of juvenile brown flounder, *Paralichthys olivaceus* and the mechanism[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011. [李洁. 限制溶解氧供应对褐牙鲆幼鱼生长的影响及其机制的试验研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.]
- [37] Sun J L, Zhao L L, Liao L, et al. Interactive effect of thermal and hypoxia on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) gill and liver: Aggravation of oxidative stress, inhibition of immunity and promotion of cell apoptosis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 923-936.
- [38] Cheng C H, Yang F F, Ling R Z, et al. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 164: 61-71.
- [39] Dhillon R S, Yao L L, Matey V, et al. Interspecific differences in hypoxia-induced gill remodeling in carp[J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2013, 86(6): 727-739.
- [40] Feng X, Liu X, Zhang W, et al. p53 directly suppresses BNIP3 expression to protect against hypoxia-induced cell death[J]. *The EMBO Journal*, 2011, 30(16): 3397-3415.
- [41] Braga M M, Rico E P, Córdova S D, et al. Evaluation of spontaneous recovery of behavioral and brain injury profiles in zebrafish after hypoxia[J]. *Behavioural Brain Research*, 2013, 253: 145-151.

Effects of citric acid addition to water on the hypoxia tolerance of largemouth bass (*Micropterus salmoides*)

LIU Jialin^{1,2}, YU Haodong^{1,2}, CHEN Feifei^{1,2}, ZHANG Xuezheng^{1,2}

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University; Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education; Hubei Provincial Engineering Laboratory for Pond Aquaculture, Wuhan 430070, China;
2. Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China

Abstract: During the fishing and transportation processes of farmed fish, they are stimulated by various stressors, such as high density, hypoxia, vibration, and sound, which can damage the fish body or cause rapid death. Carboxylic acid (CA) is an important edible organic acid that is easily soluble in water, inexpensive, and readily available. CA is often added as a feed additive in formula feed to improve the growth performance of farmed fish, maintain intestinal health, and enhance immune and stress resistance. However, there have been few reports on the use of CA in water to enhance the ability of fish to resist acute stress. Largemouth bass (*Micropterus salmoides*) is a widely cultivated and economically important fish in China; however, it is not tolerant of low oxygen levels. Largemouth bass will surface and die when dissolved oxygen (DO) is below 2 mg/L. Deaths caused by acute hypoxic stress during fishing and transportation have attracted considerable attention. To investigate the effects of CA added to water on the hypoxia tolerance of largemouth bass under acute hypoxia stress, using juvenile largemouth bass [mean weight: (18.53±0.43) g] as the study subject, CA was added to the culture water to a final concentration of 0 (T0), 0.01‰ (T1), 0.05‰ (T2), and 0.10‰ (T3), respectively, and oxygenation was stopped in the water with an initial dissolved oxygen concentration of 7.5 mg/L. Acute hypoxic stress was applied for 2.5 h, and the DO in the water was measured every 0.5 h. The DO concentration in the control group was (7.5±0.2) mg/L. At the end of the stress period, stress tolerance, body damage, and mortality were assessed. The results showed

that, compared with the T0 group, the oxygen consumption of the T2 group during the first 2.5 h of acute hypoxic stress significantly decreased. The T3 group had significantly reduced oxygen consumption and mortality rates of largemouth bass under acute hypoxic stress ($P<0.05$). Compared with the control group, the stress-related indicators of cortisol (COR), lactate (LD), and glucose (GLU) in the plasma of largemouth bass in the T0 group were significantly increased, and the levels of malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H_2O_2), which characterize oxidative damage in the body, were significantly increased. The activities of glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT), which characterize liver damage, were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the T0 group, there were no significant differences in various indicators in the plasma of the T1 group of largemouth bass ($P>0.05$). The hemoglobin (Hb) content in the blood of the T2 group significantly increased, while the LD content and GOT and GPT activities in the plasma significantly decreased ($P<0.05$). The number of red blood cells (RBC) and Hb content in the blood of the T3 group significantly increased, while the levels of COR, LD, and H_2O_2 in plasma significantly reduced, and the activities of GOT and GPT significantly decreased ($P<0.05$). Compared to the control group, the transcription levels of the cysteine proteolytic enzyme 3 (*caspase-3*) and cysteine proteolytic enzyme 8 (*caspase-8*) genes related to liver apoptosis in the T0 group of largemouth bass were significantly higher ($P<0.05$). Compared with the T0 group, the transcription level of the *caspase-3* gene in the liver of the T1 group significantly decreased ($P<0.05$). The transcription level of the glucose transporter-1 (*glut-1*) gene in the liver of the T2 group of largemouth bass significantly increased, while the transcription level of the *caspase-3* gene significantly decreased ($P<0.05$). The transcription level of hypoxia-inducible factor 1 (*hif-1 α*) and *glut-1* gene in the liver of the T3 group significantly increased, while the transcription level of the *caspase-3* gene was significantly reduced ($P<0.05$). In summary, acute hypoxic stress caused oxidative stress, body damage, and even mass mortality in largemouth bass; 0.10‰ CA could improve the ability of largemouth bass to resist acute hypoxic stress, alleviate the damage caused by acute hypoxic stress on the body, and reduce mortality. This study provides the data and a reference for solving the problem of acute hypoxic stress in fish during fishing and transportation.

Key words: citric acid; mitigation; *Micropterus salmoides*; acute hypoxic stress; body injury; mortality

Corresponding author: ZHANG Xuezheng. E-mail: xuezheng@mail.hzau.edu.cn