

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15144

盐碱胁迫对尼罗罗非鱼鳃 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共转运子、碳酸酐酶基因表达的影响

梁从飞, 赵金良, 甘远迪, 王飞, Thammaratsuntorn Jeerawat, 伍勇, 李传阳, 罗明坤

上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306

摘要: 为了探讨盐碱胁迫条件下鱼类渗透生理调节机制, 以尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)为实验材料, PCR 扩增得到了 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共转运子(*NBCe1*)基因 cDNA 部分序列, 比较了单盐(盐度 10、盐度 15)、单碱(1.5 g/L、3 g/L NaHCO_3)、盐碱混合(盐度 10, 碱度 1.5 g/L; 盐度 15, 碱度 3 g/L)胁迫后不同时间(0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h)血清渗透压、离子浓度(Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+})以及鳃碳酸酐酶(CA)活性、CA 与 *NBCe1* 基因 mRNA 表达变化。结果显示, 不同胁迫条件下, 血清渗透压、离子浓度、鳃组织 CA 酶活、CA 与 *NBCe1* 基因 mRNA 表达变化均与胁迫强度呈正相关。随时间推移, 血清渗透压、离子浓度呈现先上升后下降的变化趋势, 单盐、盐碱混合组血清渗透压值较单碱组高。单盐、单碱、盐碱混合组中, *NBCe1* 基因 mRNA 在鳃中均呈略微上调, 但不显著($P>0.05$)。单碱组和盐碱混合组鳃 CA 活性较单盐组高, 低盐碱胁迫(盐度 10, 碱度 1.5 g/L)下 CA 活性较晚达最高值; 不同胁迫条件下, CA 基因 mRNA 表达均表现上调, 单碱、盐碱混合组更为显著($P<0.05$), 推测 CA 较 *NBCe1* 对体内 HCO_3^- 转运作用更为显著。研究结果为尼罗罗非鱼盐碱适应生理调节提供了基础资料。

关键词: 尼罗罗非鱼; 盐碱胁迫; $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共转运子; 碳酸酐酶; 酶活性; mRNA 表达

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)02-0274-10

广盐性硬骨鱼类具有较强的离子与渗透压调节能力, 可以适应更广的水环境, 渗透调节机能主要依靠鳃、肠道、肾等器官的共同作用实现的。鳃是鱼类特有的渗透调节器官, 鳃上皮组织中含有大量的离子细胞, 内含有许多膜结构, 其顶部、基底部装配有不同离子通道、转运子以及转运酶等, 共同参与离子的转运过程^[1-3]。目前, 有关鱼类耐盐的细胞与分子机理相对成熟, 参与的主要转运子包括 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ (NKA)、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ 共转运蛋白(NKCC)和囊性纤维化跨膜传导调节因子(CTFR)等^[4-7]。

盐碱水域是内陆水域的一种特殊类型, 不仅盐度高、离子复杂, 同时具有高碱、高 pH 等特点, 不利于鱼类等水生生物生存^[8]。在碳酸盐型碱水中, HCO_3^- 不仅引起体内离子浓度过高、还会引起酸碱平衡, 导致碱中毒^[9], 因此, HCO_3^- 离子转运对鱼类碱环境适应至关重要。现有研究资料表明, 参与 HCO_3^- 离子转运的蛋白包括 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共转运蛋白(*NBCe1*)、碳酸酐酶(CA)^[10-11]等。*NBCe1* 是 SLC4 家族中最主要的 HCO_3^- 跨膜转运体之一, 在各种组织中有着广泛表达, 在细胞内 pH 调控以及上皮细胞对 HCO_3^- 吸收或分泌过程中起着重

收稿日期: 2015-04-09; 修订日期: 2015-06-02.

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD16B03); 现代农业产业技术体系专项(CARS-49); 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心项目(ZF1206).

作者简介: 梁从飞(1989-), 男, 硕士研究生, 从事动物遗传育种与繁殖研究. E-mail: lcf_2012@163.com

通信作者: 赵金良, 博士, 教授, 从事水产动物遗传与育种研究. E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

要作用, 在人肾脏近端肾小管中, NBCe1 负责 85% 以上的 HCO_3^- 的重吸收, 以维持机体的酸碱平衡^[12-13]。在酸性水体中, 未观察到莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)鳃 NBCe1 mRNA 表达水平明显变化^[14]; 而在呼吸性酸中毒期间, 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)鳃、肾 NBCe1 mRNA 均呈现高表达, 这与鳃中 pH 调节、肾脏 HCO_3^- 重吸收活动相关^[15]。CA 是一组含锌金属酶, 广泛分布机体各组织中, 主要参与胞内 CO_2 水合过程的可逆催化反应($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$), 还可为 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 、 Na^+/H^+ 离子交换子及 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 离子共转运子等提供 H^+ 和 HCO_3^- ^[16-17], 在离子转运、酸碱平衡、维持内环境稳定方面发挥重要作用^[18-20]。目前, 有关鱼类在碱、盐碱环境中 HCO_3^- 转运机制的研究尚不充分。

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)为广盐性种类, 不仅对盐度有一定的耐受性^[21], 还具有耐高 pH 和高碱度的能力^[22-23], 可作为鱼类耐盐碱研究的重要对象。为此, 本研究选取了尼罗罗非鱼作为实验材料, 比较观察了单盐、单碱及盐碱混合胁迫 96 h 内血清渗透压、血清离子浓度的变化特征, 鳃 CA 活性变化以及鳃中 NBCe1、CA mRNA 表达水平变化, 旨在为鱼类碱相环境适应中 HCO_3^- 离子转运机理提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料及实验用水

尼罗罗非鱼于 2014 年 9 月取自上海海洋大学罗非鱼种质资源试验站, 运回实验室后, 在养殖中心控温循环水族箱中淡水暂养 1 周以适应新环境(25.0 ± 0.8) $^{\circ}\text{C}$ 。暂养期间, 每天投喂充足饵料, 及时清理残饵和粪便。选取规格均匀(47.8 ± 3.5) g、健康的个体进行盐碱胁迫实验。

单盐组配制是在淡水中加入相应量的海水晶, 单碱组直接在淡水中加入相应质量的 NaHCO_3 (分析纯), 盐碱混合组则是先在淡水中加入相应量的海水晶, 配置成盐碱梯度所需的盐度, 再加入相应质量的 NaHCO_3 (分析纯) 配置而成。各组实验用水配制后曝气 48 h 以上备用。各组盐、碱度测定调节时所用仪器分别为 SG7 便携式盐度计和 HI

83200 多参数水质分析仪。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设置及采样步骤 根据预实验不同浓度水体中鱼体死亡结果, 设置了 6 个实验组: 单盐(盐度 10、15), 单碱(碱度 1.5 g/L, 3 g/L), 盐碱混合[(盐度 10, 碱度 1.5 g/L)、(盐度 15, 碱度 3 g/L)], 对照组为淡水组。实验前一天停止喂食, 实验开始时将鱼从淡水中直接移至各浓度实验组中, 每组放鱼 30 尾, 设 3 个重复。试验期间水温保持在 (25.0 ± 0.8) $^{\circ}\text{C}$, 溶解氧 (5.7 ± 0.5) mg/L, pH 8.4 ± 0.3 。胁迫后 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 分别采样, 每组随机选取 6 尾。

用无菌注射器从尾静脉处抽血, 放入 1.5 mL 离心管, 4°C 冰箱中静置 12 h 左右, 分层后离心 (5000 r/min , 4°C , 10 min), 取上清液保存于 -20°C 冰箱中。抽血结束后, 快速解剖取出鳃, 放入 -80°C 超低温冰箱保存。

1.2.2 NBCe1 基因片段扩增与测序 将鳃放在液氮中研成粉末, 用 Trizol (Invitrogen) 提取总 RNA, 用 RNase free ddH₂O 溶解, 检测 RNA 浓度和 A_{260}/A_{280} 值。按 PrimeScript RTreagent Kit With gDNA Eraser 说明书操作, 取 1 μL 总 RNA 为模板, 反转录合成第一链 cDNA。参照 GenBank 中莫桑比克罗非鱼的 NBCe1 基因 cDNA 序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计特异扩增引物, 由生工生物工程(上海)有限公司合成(表 1)。以鳃 cDNA 为模板, 参照 Premix TaqTM (TaKaRa TaqTM Version 2.0 plus dye) 说明书进行 NBCe1 基因片段 PCR 扩增。扩增产物回收纯化后送生工生物工程(上海)有限公司进行测序。

1.2.3 血清渗透压和血清 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 浓度测定 取 10 μL 血清样品, 采用 WESCORV APRO5520 渗透压仪(Logan, USA)测定血清渗透压值。血清 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 浓度采用南京建成生物公司的相应离子检测试剂盒测定, 具体操作参照说明书进行, 使用 Synergy H1 酶标仪(Bio-tek, USA)检测其吸光值。

1.2.4 CA 酶活测定 CA 活性采用上海研谨生物公司的酶联免疫(ELISA)检测试剂盒(Fish CA

表 1 *NBCe1* 基因扩增引物及 *NBCe1*、*CA* 基因荧光定量 PCR 引物
Tab. 1 Primers used for *NBCe1* cDNA sequencing and *NBCe1*, *CA* qRT-PCR

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	用途 usage
NBCe1-dF2	TGGCAACTCGTCAGAACTCT	cDNA 部分序列扩增
NBCe1-dR2	AATGATGGCAGCAACAGTAGAT	cDNA partial sequence amplification
reNBCe1-F	CGCTCAATGGTGTCCAGTTC	<i>NBCe1</i> 基因荧光定量 PCR
reNBCe1-R	CCTGGATGAAAGTAAAGAGGTG	<i>NBCe1</i> qRT-PCR
CA-4 F	AGCATACAGTGGATGGAAAGCG	<i>CA</i> 基因荧光定量 PCR
CA-4 R	GACCAGTTGAGTTGCCTGACATT	<i>CA</i> qRT-PCR
β -actin F	CAGCAGATGTGGATCAGCAAGC	内参引物
β -actin R	TGAAGTTGTTGGGCGTTTGG	internal control primers

ELISA Kit)测定,使用 Synergy H1 酶标仪读取 450 nm 波长的吸光值,并计算其含量。

1.2.5 鳃中 *NBCe1*、*CA* 基因 mRNA 表达 各实验组不同时间样品 cDNA 转录合成同上,产物于 -20℃ 冰箱中保存备用。引物设计分别参照莫桑比克罗非鱼 *NBCe1*(GenBank 登录号: AB562944), *CA*-4(XM_003460163) cDNA 序列,合成步骤同 1.2.2(表 1)。cDNA 用 RNase free ddH₂O 做 5 个 3 倍梯度稀释,各设 3 个重复,参照 SYBR Premix ExTaq 说明书进行实时荧光定量 PCR 扩增,扩增程序为: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 39 个循环; 95℃ 10 s。根据结果调整扩增体系,使目的基因和内参基因扩增效率都接近 100%。标准曲线扩增与上述扩增程序相同。结果采用 2^{-ΔΔC_t} 法对不同基因的表达量进行比较分析。

1.2.6 数据分析 实验数据利用 SPSS 19.0 统计软件分析,单因素方差分析进行显著性检验, Duncan 多重比较检测各测量指标的差异,以 *P*<0.05 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 *NBCe1* 基因 cDNA 部分序列

PCR 扩增得到 *NBCe1* 基因 cDNA 片段长度为 1000 bp(图 1),与莫桑比克罗非鱼的 *NBCe1* 基因序列同源性达 99.9%以上。用 DNAMAN 软件推导氨基酸序列,共编码 333 个氨基酸, Blastp 检索其与斑马鱼(*Danio rerio*)、伯氏朴丽鱼(*Haplochromis burtoni*) Na⁺/HCO₃⁻ 协同转运蛋白的氨基酸序列同源性均达到 99%。

2.2 血清渗透压

单盐组中,血清渗透压变化随盐度增加而升高,随时间推移呈现先上升后下降的趋势,24 h 时达到最高值。单碱组中血清渗透压随碱度、胁迫时间变化趋势不明显。盐碱混合组中血清渗透压随盐碱浓度增加而升高,随时间推移也呈现先上升后下降的趋势,24 h 达到最高值。盐碱混合组中血清渗透压值较单盐组和单碱组高(*P*<0.05)。各实验组 96 h 血清渗透压值均高于其初始值(图 2)。

2.3 血清离子浓度

单盐组中,血清 Na⁺、K⁺、Cl⁻ 浓度随盐度增加而上升,随时间推移呈先上升后下降的趋势,24 h 时达到最高值, Ca²⁺ 浓度变化不明显。单碱组中 Ca²⁺、Na⁺ 浓度随时间推移呈先上升后下降趋势,24 h 达最高值, K⁺、Cl⁻ 浓度变化趋势不明显。盐碱混合组 Na⁺、K⁺、Cl⁻、Ca²⁺ 浓度均随盐碱混合浓度增加而上升,随时间推移呈先上升后下降的趋势,24 h 时达最高值(图 3)。

2.4 鳃 CA 活性

单盐组中,鳃组织 CA 活性变化趋势不明显。单碱组鳃 CA 活性随碱度上升而增大,随时间推移呈先上升后下降的趋势。盐碱混合组鳃 CA 活性随盐碱浓度增加而升高,随时间推移呈现先上升后下降的趋势,12 h 达最高值(图 4)。

2.5 *NBCe1* 和 *CA* 基因 mRNA 表达变化

单盐组、单碱组和盐碱混合组中, *NBCe1* 基因 mRNA 表达均随水体浓度升高而上调,随时间推移,均呈先上调、后下调的趋势,但变化趋势不明显(*P*>0.05)(图 5)。

1	TGGCAACTCGTCAGAACTCTTTGATCTATCTGCCCTGACAAACAGTACTGGTCTGCCAGT
1	G N S S E L F D L S A L T N S T G L P V
61	AAATGCTACCTGGGCATCTCTGACCAAGGAGCAGTGTATGAAGTATGGAGGACAGTTAGT
21	N A T W A S L T K E Q C M K Y G G Q L V
121	TGGACAAAGCTGTGGCTACATGCCTGACATCACCTGATGTCTTTTCATTTTGTTCCTTGG
41	G Q S C G Y M P D I T L M S F I L F L G
181	GACCTACACCTGCTCCATGTCTCTGAAGAAGTTCAAGACCAGCCGCTTCTTCCCCACCCA
61	T Y T C S M S L K K F K T S R F F P T Q
241	AGTGAGGAAGCTCATCAGTGACTTTGCGATCATCTTGCCATCCTCCTCTTCTGCGGCGT
81	V R K L I S D F A I I L A I L L F C G V
301	GGATGCCCTTAGTTGGTGTGGAGACTCCAAAGCTCTTAGTGCCAAGTGAATTCAGCCAC
101	D A L V G V E T P K L L V P S E F K P T
361	AAGTCCACTGAGGGGCTGGTTTGTTCCTCCTTTTGGAGGAAACCCTTGGTGGGTGTACCT
121	S P L R G W F V P P F G G N P W W V Y L
421	AGCAGCTGCACCTTCCTGCTCTGGTTGTCACCATCTGATATTCATGGACCAACAGATCAC
141	A A A L P A L V V T I L I F M D Q Q I T
481	CGCTGTAATTGTCAACAGGAAAGAGCACAACCTTAAGAAAGGGCAGGTTATCACTTGA
161	A V I V N R K E H K L K K G A G Y H L D
541	CCTGTTCTGGGTGGCCATCCTGATAGTATCTGCTCTTTCATGGGCTGCCATGGTATGT
181	L F W V A I L I V I C S F M G L P W Y V
601	GGCTGCCACTGTCAATTCATCGCCACATCGACTCTCTGAAAATGGAGACTCAGACTTC
201	A A T V I S I A H I D S L K M E T Q T S
661	TGCTCCCGAGAGCAGCCTAAATTCCTGGGTGTCAGGGAACAGCGAGTCACTGGTATCTT
221	A P G E Q P K F L G V R E Q R V T G I F
721	CGTGTTCATCTTGACGGGACTCTCTGTCTTCATGGCTCCTATCCTCAAGTTCATTCCTCAT
241	V F I L T G L S V F M A P I L K F I P M
781	GCCAGTGTCTATGGTGTGTCTCTACATGGGTGTGGCATCGCTCAATGGTGTCCAGTT
261	P V L Y G V F L Y M G V A S L N G V Q F
841	CATGGATCGCTTGACAGTGTCTCTCATGCCTGCCAAGCACCAGCCGACCTGATCTACCT
281	M D R L Q L L L M P A K H Q P D L I Y L
901	GCGGCACGTTCTCAGAGACGCATCCACCTCTTTACTTTTCATCCAGGCCCTGTGCTTGGC
301	R H V P Q R R I H L F T F I Q A L C L A
961	CTTCTGTGGGTCTCAAACTACTGTGTGCTGCCATCATT
321	F L W V L K S T V A A I I

图 1 尼罗罗非鱼 *NBCe1* 基因 cDNA 部分序列及其推导氨基酸序列Fig. 1 cDNA and deduced amino acid sequences of *Oreochromis niloticus* *NBCe1* gene

单盐组 *CA* 基因 mRNA 表达随盐度、时间推移变化均不明显($P>0.05$)。单碱组 *CA* mRNA 表达随碱度升高而升高, 随时间推移呈先上升后下降

的趋势, 24 h 达最高值。盐碱混合组 *CA* mRNA 表达随盐碱度升高而升高, 随时间推移呈先上升后下降的趋势, 24 h 达最高值(图 6)。

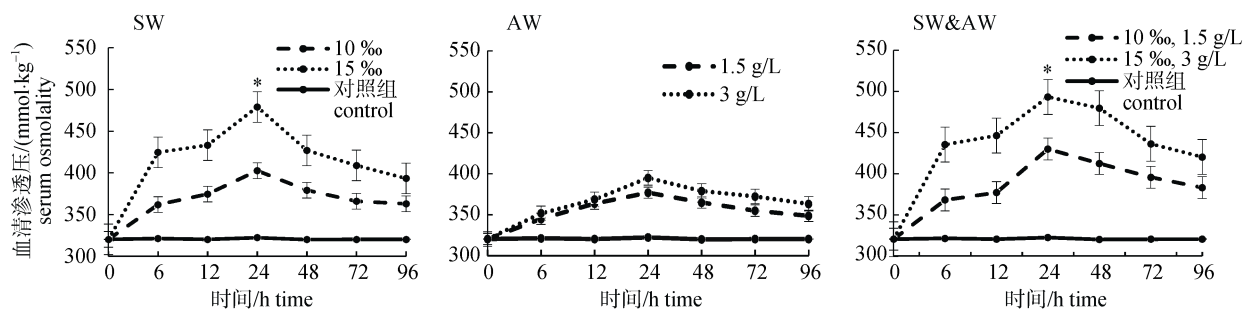


图 2 盐碱度对尼罗罗非鱼血清渗透压影响

SW 表示单盐组, AW 表示单碱组, SW&AW 表示盐碱混合组。*表示组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 2 Effects of salinity and alkalinity on serum osmolality of *Oreochromis niloticus*

SW refers to the saline water group; AW refers to the alkaline water group; SW&AW refers to the saline-alkaline water group;

* means significant difference ($P<0.05$) among different groups.

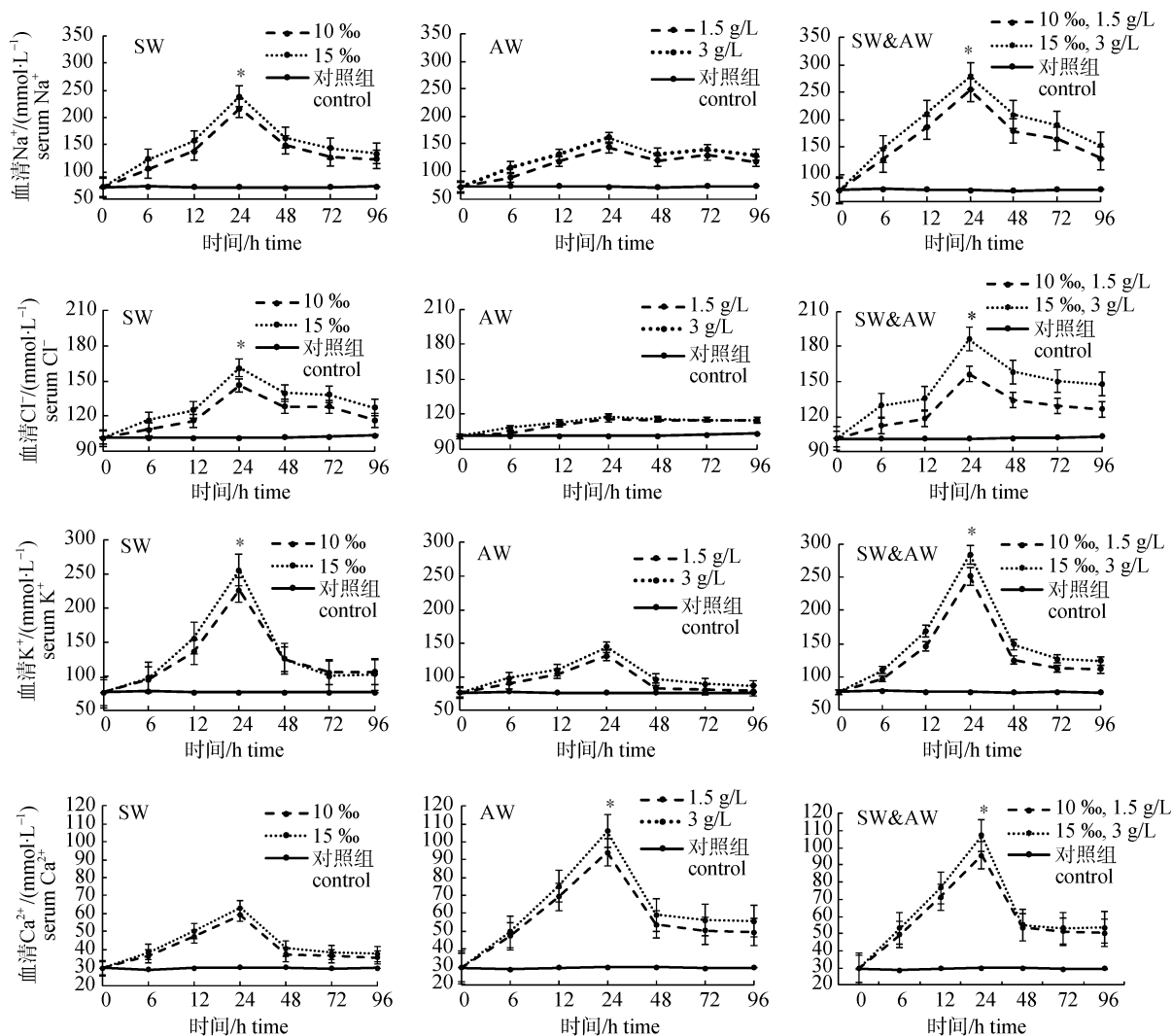


图 3 盐碱度对尼罗罗非鱼血清离子浓度影响

SW 表示单盐组, AW 表示单碱组, SW&AW 表示盐碱混合组。*表示组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 3 Effects of salinity and alkalinity on serum ion concentrations of *Oreochromis niloticus*

SW refers to the saline water group; AW refers to the alkaline water group; SW&AW refers to the saline-alkaline water group.

* means significant difference ($P<0.05$) among different groups.

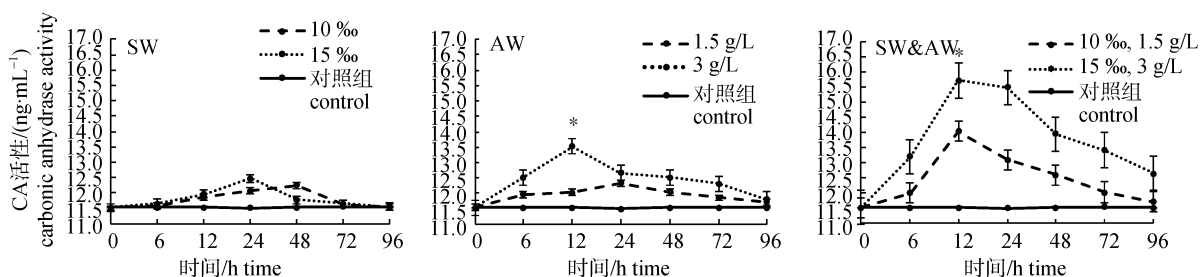


图4 盐碱度对尼罗罗非鱼鳃组织 CA 活性影响

SW 表示单盐组, AW 表示单碱组, SW&AW 表示盐碱混合组。*表示组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 4 Effects of salinity and alkalinity on gill carbonic anhydrase activity of *Oreochromis niloticus*
SW refers to the saline water group; AW refers to the alkaline water group; SW&AW refers to the saline-alkaline water group.
* means significant difference ($P<0.05$) among different groups.

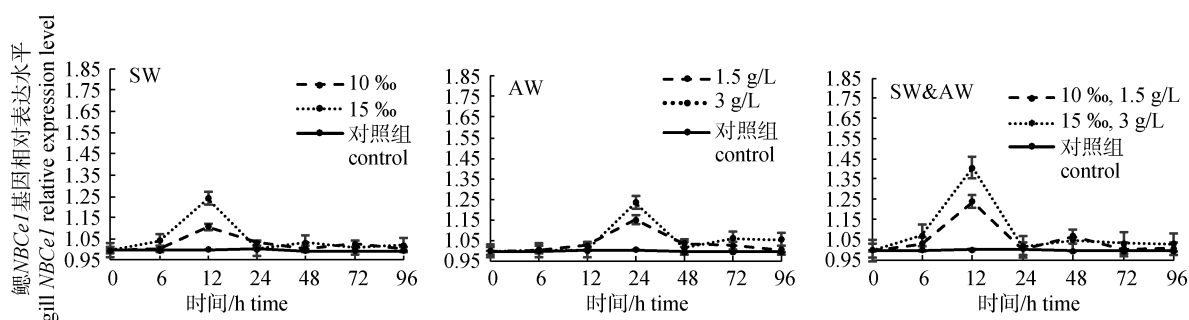


图5 盐碱度对尼罗罗非鱼鳃组织 NBCe1 基因 mRNA 表达影响

SW 表示单盐组, AW 表示单碱组, SW&AW 表示盐碱混合组。

Fig. 5 Effects of salinity and alkalinity on gill NBCe1 relative expression level of *Oreochromis niloticus*
SW refers to the saline water group; AW refers to the alkaline water group; SW&AW refers to the saline-alkaline water group.

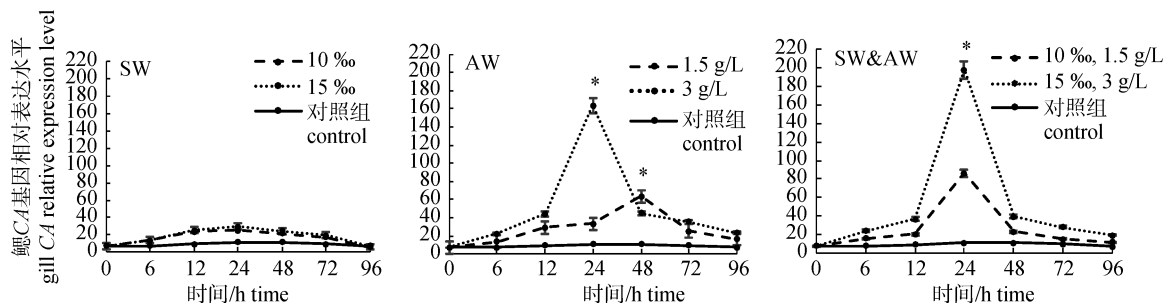


图6 盐碱度胁迫对尼罗罗非鱼鳃组织 CA 基因 mRNA 表达影响

SW 表示单盐组, AW 表示单碱组, SW&AW 表示盐碱混合组。*表示组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 6 Effects of salinity and alkalinity on gill CA relative expression level of *Oreochromis niloticus*
SW refers to the saline water group; AW refers to the alkaline water group; SW&AW refers to the saline-alkaline water group.
* means significant difference ($P<0.05$) among different groups.

3 讨论

3.1 不同环境胁迫对血清渗透压及离子浓度变化的影响

本研究中, 单盐、单碱、盐碱混合胁迫条件下, 尼罗罗非鱼血清渗透压值均随胁迫浓度上升

而增加, 这主要是由于随着浓度升高, 水环境中离子浓度增高, 相应地进入鱼体内的离子增加累积所造成的。由于不同环境中的离子组成不同, 单盐、单碱、盐碱混合组中血清渗透压变化趋势也不相同。由于硬骨鱼类渗透压维持主要涉及 Na^+ 、 K^+ 和 Cl^- 等离子流^[24], 与大多数鱼类一致,

盐度增加引起尼罗罗非鱼血清渗透压的显著变化;单碱组中,血清渗透压变化趋势不甚明显,推测碱度对鱼类影响不完全是影响鱼类体内血清渗透压平衡, HCO_3^- 进入鱼体内,还可能通过破坏体内酸碱平衡来影响鱼类;盐碱混合组中血清渗透压变化较单盐、单碱组高,这可能由于盐、碱中不同离子间存在协同作用,导致渗透压变化更为显著^[9]。

在单盐、单碱、盐碱混合组中, Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 浓度变化趋势有所不同。单盐组中,血清 Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 浓度均随盐度升高而升高,呈现正相关变化。这与在其他鱼类盐度渗透调节中, Na^+ 、 Cl^- 浓度与渗透压变化间明显关联一致^[25], K^+ 浓度是否明显关联渗透压变化,不同研究者的结论并不一致^[26-29]。单碱组中,血清 Na^+ 、 Ca^{2+} 浓度随碱度升高而升高,由于单碱水体中主要离子是 Na^+ 、 HCO_3^- , 胁迫后会引引起血清 Na^+ 浓度累积升高, Ca^{2+} 浓度升高的原因尚不清楚。盐碱混合组中, Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 、 Ca^{2+} 变化也随浓度升高而升高,随时间推移先上升后下降的趋势,这与赵丽慧等^[25]的研究结果基本一致。在不同环境(单盐、单碱、盐碱混合)胁迫下,尼罗罗非鱼血清离子变化与渗透压变化呈现正相关,但不同离子(Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 、 Ca^{2+})浓度应答变化表现并不一致,表明它们在不同环境胁迫中对血清渗透压变化的影响作用并不相同。

3.2 不同环境胁迫对鳃 CA 活性的影响

本研究中,鳃 CA 活性在单盐下变化不明显,而在碱度组(3 g/L NaHCO_3)、盐碱混合组下变化明显,因此,认为 CA 在碱、盐碱混合水体中发挥重要离子调控作用。单盐组中,鱼体内的主要负荷离子为 Na^+ 、 Cl^- , 可通过 NKA、NKCC、CRTR 等离子通道进行有效转运^[4-5, 7]。碱度组中,水体中均含有较高的 HCO_3^- , 导致鱼体内摄入过多 HCO_3^- 。由于 CA 主要催化可逆反应 $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ^[16], 鳃中 CA 酶活性增强可将 HCO_3^- 迅速转化为 CO_2 , 并从鳃中直接排出,可防止体内 HCO_3^- 积累引起酸碱平衡失调,产生碱中毒。研究表明,盐碱混合组中盐度提升会导致 $\text{CO}_3^{2-} +$

HCO_3^- 显著增加,碱度同时升高^[9],本实验中盐碱混合组 CA 活性较单碱组变化更高,推测盐碱混合组中 HCO_3^- 浓度高于单碱组 HCO_3^- 浓度,因此导致 CA 酶活需求最高。

3.3 不同环境胁迫对 NBCe1、CA 基因 mRNA 表达的影响

单盐组中,尼罗罗非鱼鳃 NBCe1 基因 mRNA 表达随盐度、时间增加表现上调,表明 NBCe1 基因参与了盐度胁迫下的离子转运。研究发现,在淡水 + NaCl、酸性淡水 + NaCl 中,莫桑比克罗非鱼鳃 NBCe1 基因表达有上调但并不显著($P > 0.05$)^[14],这可能是鱼类盐度适应过程中, Na^+ 及 Cl^- 转运主要是依靠其他途径如 NKA、NKCC 及 CFTR 等进行的^[4-5, 7], NBCe1 不是主要的离子转运蛋白,可能在离子转运中起一定的协同作用。在单碱、盐碱混合组中, NBCe1 基因 mRNA 随浓度增加、时间推移,表达水平也有上调。研究发现,斑马鱼在 5% $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 浓度碱水体中,鳃部 NBCe1 基因 mRNA 表达上调^[30];虹鳟在酸性碳酸盐环境中鳃 NBCe1 基因 mRNA 表达在前 3 h 显著上调,6 h 后恢复到对照组水平^[15],表明 NBCe1 参与体内 Na^+ 、 HCO_3^- 的转运过程。由于 NBCe1 在碱、盐碱混合组中表达上调均不显著($P > 0.05$),推测在碱、盐碱混合条件下,鱼体内 HCO_3^- 的转运可能主要通过其他离子转运通道实现^[17, 31]。

本研究中,单盐组鳃 CA mRNA 表达变化不明显,单碱、盐碱混合组中表达变化趋势显著,盐碱组 CA mRNA 表达变化趋势与前期研究结果一致^[25]。由于盐、碱、盐碱混合组中鳃 CA mRNA 表达与 CA 活性变化规律一致,这也从基因表达水平验证了 CA 在碱、盐碱混合水体中离子调控发挥重要作用。碱、盐碱混合组中,鳃 CA mRNA 表达最高值出现时间(24 h)较 CA 酶活最高值时间(12 h)滞后,推测胁迫前期,机体可能利用先前自身合成存储的 CA,随着体内 CA 不断消耗, CA 基因进行转录、翻译,因而 mRNA 水平响应出现延迟现象。鳃 CA mRNA 表达最高量时间与血清中 Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 离子浓度达到峰值时间点一致,表明盐碱胁迫后 24 h 时,尼罗罗非鱼体内的离子压

力与转运能力均处于高峰状态^[32-33]。

上述结果表明, 碱度胁迫的产生机理与盐度胁迫不同, 表现在血清渗透压、离子浓度变化趋势不一。在单碱、盐碱混合胁迫下, 尼罗罗非鱼鳃 *NBCe1*、*CA* 均参与了 HCO_3^- 的转运过程, 但应答程度不一, *NBCe1* 转运作用可能相对较弱, 而 *CA* 在 HCO_3^- 代谢与转运过程中作用更为明显。

参考文献:

- [1] Marshall W S, Grosell M. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance[M]//Evans D H, Claiborne J B. The Physiology of Fishes. Boca Raton: CRC Taylor and Francis, 2006: 177-230.
- [2] Kaneko T, Watanabe S, Lee K M. Functional morphology of mitochondrion-rich cells in euryhaline and stenohaline teleosts[J]. Aqua-Biosci Monogr, 2008, 1(1): 1-62.
- [3] Hiroi J, McCormick S D. New insights into gill ionocyte and ion transporter function in euryhaline and diadromous fish[J]. Respir Physiol Neuro, 2012, 184(3): 257-268.
- [4] Hirose S, Kaneko T, Naito N, et al. Molecular biology of major components of chloride cells[J]. Comp Biochem Physiol B, 2003, 136(4): 593-620.
- [5] Evans D H, Piermarini P M, Choe K P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste[J]. Physiol Rev, 2005, 85(1): 97-177.
- [6] Cutler C P, Cramb G. Two isoforms of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter are expressed in the European eel (*Anguilla anguilla*)[J]. Biochim Biophys Acta-Biomembr, 2002, 1566(1-2): 92-103.
- [7] Bodinier C, Boulo V, Lorin-Nebel C, et al. Influence of salinity on the localization and expression of the CFTR chloride channel in the ionocytes of *Dicentrarchus labrax* during ontogeny[J]. J Anat, 2009, 214(3): 318-329.
- [8] Wang H, Geng L K, Fang W H, et al. Studies on the commercially experimental culture of penaeid shrimp, *Peneaus chinensis*, transplanted to the northwest inland salt waters[J]. Marine Fisheries, 1997, 19(1): 9-12. [王慧, 耿隆坤, 房文红, 等. 中国对虾往西北内陆咸水水域移植的生产性试养研究[J]. 海洋渔业, 1997, 19(1): 9-12.]
- [9] Yang F Y, Li X J, Zhao C S, et al. Composition feature of CO_3^{2-} , HCO_3^- and their toxic effect on shrimp in Jilin western waters[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2007, 113(3): 107-109. [杨富亿, 李秀军, 赵春生, 等. 吉林西部盐碱水域 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 组成特征及其对对虾的毒性效应[J]. 现代农业科技, 2007, 113(3): 107-109.]
- [10] Romero M F, Fulton C M, Boron W F. The SLC4 family of HCO_3^- transporters[J]. Pflügers Arch, 2004, 447(5): 495-509.
- [11] Purkerson J M, Schwartz G J. The role of carbonic anhydrases in renal physiology[J]. Kidney Int, 2007, 71(2): 103-115.
- [12] Liu Y, Lu Q W, Chen L M. Physiology and pathophysiology of $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter NBCe1[J]. Acta Physiologica Sinica, 2012, 64(6): 729-740. [刘颖, 卢群伟, 陈历明. $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共转运体 NBCe1 的生理及病理学作用[J]. 生理学报, 2012, 64(6): 729-740.]
- [13] Romero M F, Boron W F. Electrogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporters: cloning and physiology[J]. Annu Rev Physiol, 1999, 61(1): 699-723.
- [14] Furukawa F, Watanabe S, Inokuchi M, et al. Responses of gill mitochondria-rich cells in Mozambique tilapia exposed to acidic environments (pH 4.0) in combination with different salinities[J]. Comp Biochem Physiol A, 2011, 158(4): 468-476.
- [15] Perry S F, Furimsky M, Bayaa M, et al. Integrated Responses of $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporters and V-type H^+ -ATPases in the fish gill and kidney during respiratory acidosis[J]. Biochim Biophys Acta-Biomembr, 2003, 1618(2): 175-184.
- [16] Marshall W S. Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} and Zn^{2+} transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis[J]. J Exp Zool, 2002, 293(3): 264-283.
- [17] Hwang P P, Lee T H, Lin L Y. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms[J]. Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol, 2011, 301(1): R28-R47.
- [18] Hwang P P, Lee T H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells[J]. Comp Biochem Physiol A, 2007, 148(3): 479-497.
- [19] Roy L A, Davis D A, Saoud I P, et al. Branchial carbonic anhydrase activity and ninhydrin positive substances in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, acclimated to low and high salinities[J]. Comp Biochem Physiol A, 2007, 147(2): 404-411.
- [20] Zimmera A M, Barcarolli I F, Wood C M, et al. Waterborne copper exposure inhibits ammonia excretion and branchial carbonic anhydrase activity in euryhaline guppies acclimated to both freshwater and seawater[J]. Aquat Toxicol, 2012, 122: 172-180.
- [21] Suresh A V, Lin C K. Tilapia culture in saline waters: a review[J]. Aquaculture, 1992, 106(3): 201-226.
- [22] Lei Y Z, Dong S L, Shen C G. Study on the toxicity of carbonate-alkaline to fishes[J]. Journal of Fisheries of China, 1985, 9(2): 171-183. [雷衍之, 董双林, 沈成钢. 碳酸盐碱

- 度对鱼类毒性作用的研究[J]. 水产学报, 1985, 9(2): 171–183.]
- [23] Zhao L H, Jia J H, Zhao J L, et al. Growth comparison among three strains of *Oreochromis niloticus* juvenile in net cage under different salinity-alkalinity waters[J]. South China Fisheries Science, 2013, 9(4): 1–7. [赵丽慧, 笄金华, 赵金良, 等. 不同盐、碱度下 3 品系尼罗罗非鱼幼鱼网箱养殖的生长比较[J]. 南方水产科学, 2013, 9(4): 1–7.]
- [24] Zhang C J, Shi Z H. On salinity-related effects on osmoregulation mechanism in marine teleost[J]. Marine Fisheries, 2013, 35(1): 108–116. [张晨捷, 施兆鸿. 盐度影响海水硬骨鱼类渗透压调节机理的研究与展望[J]. 海洋渔业, 2013, 35(1): 108–116.]
- [25] Zhao L H, Zhao J L, Zhao Y, et al. Effects of salinity-alkalinity on serum osmolality, ion concentration and mRNA expression of ion transport enzymes of *Oreochromis niloticus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(10): 1696–1704. [赵丽慧, 赵金良, 赵岩, 等. 盐碱胁迫对尼罗罗非鱼血清渗透压、离子浓度及离子转运酶基因表达的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(10): 1696–1704.]
- [26] Wang X H, Lin Y H, Jiang Q L, et al. Effects of NaCl on concentration of serum ions, cortisol and activities of Na^+ , K^+ -ATPase on tissue in *Chalcalburnus chalcooides aralensis*[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2007, 29(5): 576–580. [王信海, 蔺玉华, 姜秋俚, 等. NaCl 对威海卡拉白鱼血清离子、皮质醇和组织 Na^+ / K^+ -ATP 酶活性的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2007, 29(5): 576–580.]
- [27] Zhao F, Zhuang P, Zhang L Z, et al. The influence of salinity acclimation on activity of Na^+ / K^+ -ATPase in branchial epithelium, concentration of ions and osmolality in serum of *Acipenser schrenckii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(4): 444–449. [赵峰, 庄平, 章龙珍, 等. 盐度驯化对史氏鲟鳇丝 Na^+ / K^+ -ATP 酶活力、血清渗透压及离子浓度的影响[J]. 水产学报, 2006, 30(4): 444–449.]
- [28] Sampaio L A, Bianchinia A. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2002, 269(2): 187–196.
- [29] Geng L W, Xu W, Li C T, et al. Influence of salinity and alkalinity on serum ion concentrations, serum osmosis and gill Na^+ / K^+ -ATPase activity of *Barbus capito*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 458–465. [耿龙武, 徐伟, 李池陶, 等. 盐碱对大鳞鲃血清渗透压、离子含量及鳃丝 Na^+ / K^+ -ATP 酶活力的影响[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 458–465.]
- [30] Sussman C R, Zhao J H, Plata C, et al. Cloning, localization, and functional expression of the electrogenic Na^+ bicarbonate cotransporter (*NBCe1*) from zebrafish[J]. Am J Physiol-Cell Physiol, 2009, 297(4): C865–C875.
- [31] Tresguerres M, Katoh F, Orr E, et al. Chloride uptake and base secretion in freshwater fish: a transepithelial ion-transport metabolon?[J]. Physiol Biochem Zool, 2006, 79(6): 981–996.
- [32] Gilmour K M. New insights into the many functions of carbonic anhydrase in fish gills[J]. Respir Physiol Neuro, 2012, 184(3): 223–230.
- [33] Velan A, Hulata G, Ron M, et al. Comparative time course study on pituitary and branchial response to salinity challenge in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and Nile tilapia (*O. niloticus*)[J]. Fish Physiol Biochem, 2011, 37(4): 863–873.

Effects of salinity and alkalinity on mRNA expression of $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter and carbonic anhydrase genes from *Oreochromis niloticus*

LIANG Congfei, ZHAO Jinliang, GAN Yuandi, WANG Fei, Thammaratsuntorn Jeerawat, WU Yong, LI Chuanyang, LUO Mingkun

Laboratory of Freshwater Fisheries Germplasm Resource, Ministry of Agriculture; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: To understand fish osmotic adjustment mechanisms in saline and alkaline water, the partial cDNA sequence was obtained from gills of *Oreochromis niloticus*. Physiological changes in serum osmolality, ion concentration (Na^+ , K^+ , Cl^- and Ca^{2+}), and gill carbonic anhydrase (CA) activities were determined, and *CA* and *NBCe1* mRNA gene expressions under saline (10 g/L, 15 g/L NaCl), alkaline (1.5 g/L and 3 g/L NaHCO_3), and saline-alkaline (salinity 10, 15 g/L NaCl; salinity 1.5, 3 g/L NaHCO_3) conditions at different times (0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h) were compared. The results showed that serum osmolality, ion concentration, gill CA activity, *CA* and *NBCe1* mRNA gene expression correlated positively with the strength of saline, alkaline and saline-alkaline stress. Over time, serum osmolality and ion concentration trends increased and then decreased. Osmotic pressure in saline and saline-alkaline water was higher than that in alkaline water. Gill CA activity in alkaline and saline-alkaline water was higher than that in saline water. Under low concentrations of stressors, CA activity reached its highest level at a later time. Slightly higher *NBCe1* gene mRNA expression was detected in gills under high concentrations of stressors ($P>0.05$). Gill *CA* mRNA expression in saline, alkaline and saline-alkaline water was increased, but the increase was more evident in alkaline and saline-alkaline water ($P<0.05$). The results showed that CA and *NBCe1* in Nile tilapia are involved in salinity and alkalinity regulation under osmotic stress. The results provide a basic understanding of the physiological regulation during salinity-alkalinity adaptation.

Key words: *Oreochromis niloticus*; salt and alkline stress; $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter; carbonic anhydrase; enzyme activity; mRNA expression

Corresponding author: ZHAO Jinliang. E-mail: jlzha@shou.edu.cn