

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.16047

高碳酸盐碱胁迫对尼罗罗非鱼氨代谢基因表达变化的影响

吴俊伟, 赵金良, 赵岩, 罗明坤, 王燕, 赵永华

农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海海洋大学, 上海 201306

摘要: 为了解尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)在碱环境适应过程中氨代谢调节途径, 本研究选取了5个氨代谢相关酶: 谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)、碳酸酐酶5A(carbonic anhydrase 5A, CA-5A)、谷氨酰胺酶(glutaminase 2, GLS2)、氨甲酰磷酸合成酶(carbamyl phosphate synthetase 1, CPS1)、氨转运蛋白(ammonium transporter Rh type C-2 like, Rhcg12), 研究了急性碳酸盐碱度胁迫条件下, 尼罗罗非鱼血氨浓度变化、氨代谢相关酶基因表达水平及其酶活性变化。结果表明, 随碳酸盐碱度胁迫浓度升高, 尼罗罗非鱼血氨浓度上升, 随时间推移呈先上升后下降的变化趋势, 在胁迫后12 h达到峰值。氨代谢相关基因在不同碱度下、不同组织中均有不同程度的上调表达, 随着胁迫时间推移呈先上升后下降的变化趋势, 胁迫后12~24 h各基因表达水平显著升高, 随后逐渐恢复到稳定水平; 氨代谢相关基因具有一定的组织表达差异: 氨转运蛋白基因(Rhcgl2)主要在鳃中表达, 碳酸酐酶5A基因(CA-5A)、谷氨酰胺合成酶基因(GS)、氨甲酰磷酸合成酶基因(CPS1)主要在肝中表达, 谷氨酰胺酶基因(GLS2)主要在肾和鳃中表达。碳酸酐酶和谷氨酰胺合成酶活性随胁迫碱度的升高而上升, 碳酸酐酶、谷氨酰胺酶活性变化分别在鳃、肝中最为显著。研究结果表明, 碱度胁迫会引起尼罗罗非鱼血氨水平升高, 随着时间推移血氨水平下降, 推测鳃、肝、肾中不同氨代谢基因共同参与调节氨代谢, 在鳃中通过直接排氨, 在肝中通过合成谷氨酰胺、尿素途径, 共同调节降低血氨水平。

关键词: 尼罗罗非鱼; 碳酸盐碱度; 血氨浓度; 氨代谢基因; 酶活性

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)06-1290-10

中国内陆约有0.46亿hm²低洼盐碱水资源, 根据其主要离子组成特征, 分为碳酸盐、硫酸盐、氯化盐型等不同类型^[1-2]。CO₃²⁻、HCO₃⁻是碳酸盐碱水环境中构成水环境碱度的主要离子成分, 直接或间接影响水生生物生存与生长^[3]。碱胁迫对鱼类的毒性作用机理较为复杂, 当鱼类暴露在高碱环境中时, 碱性水环境中的HCO₃⁻、CO₃²⁻等离子可直接腐蚀鱼鳃、皮肤表面, 造成器质性损伤, 破坏离子交换体系, 从而影响鱼的存活^[4-5]; 在高碳酸盐碱环境中时, 外界水体中CO₃²⁻、HCO₃⁻含量较高, 会导致鱼体内摄入过多的HCO₃⁻, 同时外界环境的高pH会抑制鳃的一些离子交换(如

Na⁺/H⁺、Cl⁻/HCO₃⁻等), HCO₃⁻大量累积, 血浆pH上升, 体内酸碱平衡遭到破坏, 导致碱中毒^[6]。氨中毒是碱中毒的一种, 体内pH的上升导致可利用的H⁺大量减少, 使得NH₃与NH₄⁺平衡被破坏, 造成氨(NH₃)的积累, 引起血氨浓度升高。血氨积累不仅会严重降低血液的载氧能力、使呼吸机能下降, 还会破坏神经系统、肝肾代谢系统, 导致氨中毒^[7-8]。

碱环境适应过程中, 鱼类可通过不同调节策略来降低体内氨含量, 主要分为以下几类: (1)直接通过鳃以非离子态氨(NH₃)和离子态铵(NH₄⁺)的形式直接排出。研究表明, 鳃丝上皮细胞中含有许多离子转运蛋白, 在其他蛋白载体的协助下, 氨

收稿日期: 2016-02-04; 修订日期: 2016-04-12.

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

作者简介: 吴俊伟(1992-), 男, 硕士研究生, 从事动物遗传育种与繁殖研究. E-mail:jarvis0803@163.com

通信作者: 赵金良, 博士, 教授, 从事水产动物遗传育种与繁殖研究. E-mail: jlzhao@shou.edu.cn

转运蛋白(ammonium transporter Rh type C-2 like, *Rhcg12*)能够运输氨(NH₃)和甲胺^[9]。另外, 水通道蛋白(aquaporin, AQP)家族蛋白不仅是水和甘油的主要转运通道, 也可以转运氨^[10]。研究表明, 青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)即通过排氨方式适应高碱环境^[11-12]。(2) 将氨合成无毒中间产物。肝中谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)可催化 NH₃ 和谷氨酸合成谷氨酰胺, 谷氨酰胺是中性无毒物质; 或将谷氨酰胺运送至氨排泄部位, 经谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS)分解产生氨, 再借助转运蛋白等载体排出体外^[13-14]。(3) 将氨合成尿素, 以尿素形式代谢。在氨甲酰磷酸合成酶(carbamyl phosphate synthetase, CPS)催化下, 氨与碳酸(CO₂ 的水合形式)先合成氨甲酰磷酸, 再经过各种酶(鸟氨酸氨甲酰基转移酶、精氨基琥珀酸合成酶、精氨基琥珀酸酶、精氨酸酶)催化依次形成瓜氨酸、精氨基琥珀酸、精氨酸, 最终产生尿素, 经血循环到达肾或鳃排出体外^[15]。非洲马加迪湖罗非鱼(*Alcaticus grahami*)就是通过这种方式降低体内氨含量^[16]。也有些鱼类采用多种方式适应碱环境, 如钩吻鱈(*Oncorhynchus clarki henshawi*)一方面通过合成尿素排出体外加快氨代谢, 另一方面通过离子转运、利用氨合成其他物质降低氨(NH₃)积累^[17-18]。

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生长速度快、环境耐受性强, 可耐受一定范围的盐碱度^[19-21]。因此, 尼罗罗非鱼不仅是鱼类碱环境适应生物学研究的重要材料, 同时, 对耐盐碱水产养殖种类开发也具有重要现实意义。此前, 通过转录组测序技术筛选了碱度胁迫下尼罗罗非鱼鳃组织差异表达基因, 发现氨代谢途径是其碱胁迫过程中重要应答通路之一^[22]。为进一步了解尼罗罗非鱼碱环境适应中氨代谢调节途径, 本研究测定了不同碳酸盐碱度胁迫后尼罗罗非鱼血氨浓度变化, 并用荧光定量 PCR 方法检测氨代谢途径相关基因 *GS*、*GLS2*、*CA-5A*、*CPS1*、*Rhcg12* 在不同组织胁迫过程中的表达变化及 GS、CA 酶活性变化, 为尼罗罗非鱼碱环境适应生理机理研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

尼罗罗非鱼取自于上海海洋大学罗非鱼种质资源试验站, 运回实验室后, 在室内控温循环水族箱中(0.6 m×0.5 m×0.4 m)淡水暂养 2 周以适应新环境(25.3℃±0.8℃)。暂养期间, 每天投喂充足饲料, 及时清理残饵和粪便。选取规格均匀(106.4 g±5.5 g)、健康活泼的个体进行碱度胁迫实验。

Trizol 购自 Invitrogen 公司; PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser、SYBR Premix ExTaq 购自 TaKaRa 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自 Thermo 公司。所用引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 急性胁迫实验 根据预试验结果, 设置了 3 个碳酸盐碱度实验组(2 g/L、4 g/L、6 g/L), 以淡水作为对照组, 每组 30 尾, 3 个重复。碱度组实验用水是通过直接向淡水中加入 NaHCO₃(分析纯)配制而成, 曝气 48 h 以上备用。实验开始后, 将实验鱼从淡水中取出后直接放入不同碱度组中。实验期间保持水温在 25℃左右, pH 在 8.5 左右。

1.2.2 样品采集 分别于胁迫 0 h、2 h、4 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 采样, 每次每组随机取 3 尾鱼。用无菌注射器从尾静脉处抽血, 放入 1.5 mL 离心管中, 于 4℃冰箱中静置 12 h 后离心(5000 r/min, 4℃, 10 min), 取上清液(血清)保存于-20℃冰箱中备用。抽血之后, 快速解剖, 取出鳃、肝、肾, 于-80℃超低温冰箱保存备用。

1.2.3 血氨浓度测定 血氨浓度采用南京建成公司的血氨测定试剂盒进行测定, 具体操作参照说明书, 用 Synergy H1 酶标仪(Bio-tek, USA)检测其吸光值。

1.2.4 *GS*、*GLS2*、*CA-5A*、*CPS1*、*Rhcg12* 基因 mRNA 表达 参照 GenBank 中尼罗罗非鱼的 *GS*、*GLS2*、*CA-5A*、*CPS1*、*Rhcg12* 基因 cDNA 序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计特异扩增引物(表 1)。鳃、肝、肾组织在液氮中研成粉末, 用 Trizol 提取总 RNA, 用 RNase free ddH₂O 溶解, 检测 RNA 浓度和 *A*₂₆₀/*A*₂₈₀ 值。取 1 μL 各组织的总 RNA 为

表 1 本研究所用引物的信息

Tab. 1 The information of the primers used in this study

引物 primer	核酸序列(5'-3') sequence (5'-3')	用途 usage	退火温度/℃ annealing temperature
GS F	AGATAAGGCATACGGACGAG	GS 基因荧光定量 PCR	57.8
GS R	AAGGATGAAGCGAGCAA		57.6
CA-5A F	GACAAGTCCACGCTACAAG	CA-5A 基因荧光定量 PCR	57.6
CA-5A R	ATCCTCCATCACTGCCTC		57.3
GLS2 F	ATCTGGCGTTTCAGGTGC	GLS2 基因荧光定量 PCR	57.3
GLS2 R	TCTTCTTGGGTCTGTGTT		57.3
CPS1 F	GGGGACAGCAGCAGAGTT	CPS1 基因荧光定量 PCR	61.9
CPS1 R	TACGAAGGCCACCGAGCAT		61.9
Rhcg12 F	GAAAGAACATTACGAGCATAGCG	Rhcg12 基因荧光定量 PCR	57.8
Rhcg12 R	CTCACCAAGCCTGACCAAT		57.3
β-actin F	CAGCAGATGTGGATCAGCAAGC		61.9
β-actin R	TGAAGTTGTTGGCGTTGG	内参引物	57.8

模板, 按 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser 说明书操作反转录合成第一链 cDNA。实时荧光定量 PCR 扩增参照 SYBR Premix ExTaq 说明书进行, 扩增程序为: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 58~62℃(不同基因引物的退火温度不同)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%。扩增程序与标准曲线的扩增程序相同。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对不同基因的表达量进行比较分析。

1.2.5 CA、GS 酶活性测定 分别取鳃、肝、肾组织, 称重(0.5~1 g), 按质量(g): 体积(mL)1:9 比例加入生理盐水, 冰浴匀浆, 4℃条件下离心(4000 r/min, 15 min), 吸取上清液, 用于蛋白含量、CA、GS 酶活性的测定。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 ELISA Kit)测定, GS 活性采用南京建成生物公司的谷氨酰胺合成酶检测试剂盒测定, 用 Synergy H1 酶标仪读取吸光值, 计算其含量。

2 结果与分析

2.1 碱胁迫下血氨浓度变化

除 6 g/L 碱度胁迫下, 72 h 内有少量鱼死亡外, 其他各组中实验鱼均表现为行为正常。随碳酸盐碱浓度升高, 血氨浓度也随之升高; 在各碱度胁迫下, 随着胁迫时间推移, 血氨浓度呈现先上升、后下降的趋势, 胁迫 6 h 后迅速上升, 12 h 达到最大值, 之后缓慢下降。胁迫 24~72 h 后, 血氨浓度开始维持在相对稳定水平, 但均高于其初始水平(图 1)。

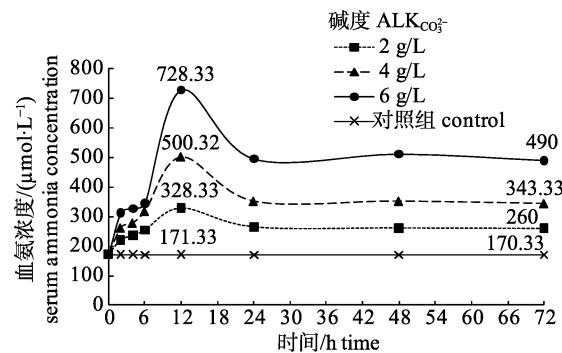


图 1 碱度胁迫下尼罗罗非鱼血氨浓度的变化

Fig. 1 Change of serum ammonia concentration of Nile tilapia under carbonate alkalinity stress

2.2 碱度胁迫下各基因在不同组织中的表达变化

2.2.1 Rhcg12 基因 mRNA 的相对表达变化 鳃和肾中, *Rhcgl2* 基因相对表达量随碱度升高显著上调($P<0.05$), 随着时间的推移呈现出先上升后下降的变化趋势, 胁迫后 24 h 达到最高值, 此后逐渐下降至稳定水平。肝中, *Rhcgl2* 基因相对表达量随碱度升高而上调, 随时间推移变化趋向平缓, 上调下调变化均不显著($P>0.05$)(图 2)。

2.2.2 CA-5A 基因 mRNA 的相对表达变化 鳃和肝中, *CA-5A* 基因相对表达量随着碱度的升高而上调, 但不显著($P>0.05$), 在 2 g/L、4 g/L 碱度胁迫下, *CA-5A* 基因的相对表达量随时间的推移变化比较平缓; 6 g/L 碱度胁迫下, *CA-5A* 基因的相对表达量呈现先上升后下降的趋势, 在 12 h 达到最高值, 显著高于其他时间点($P<0.05$)。肾中, 随着碱度升高 *CA-5A* 基因的相对表达量变化不显著($P>0.05$), 随着时间的推移相对表达量变化平缓(图 3)。

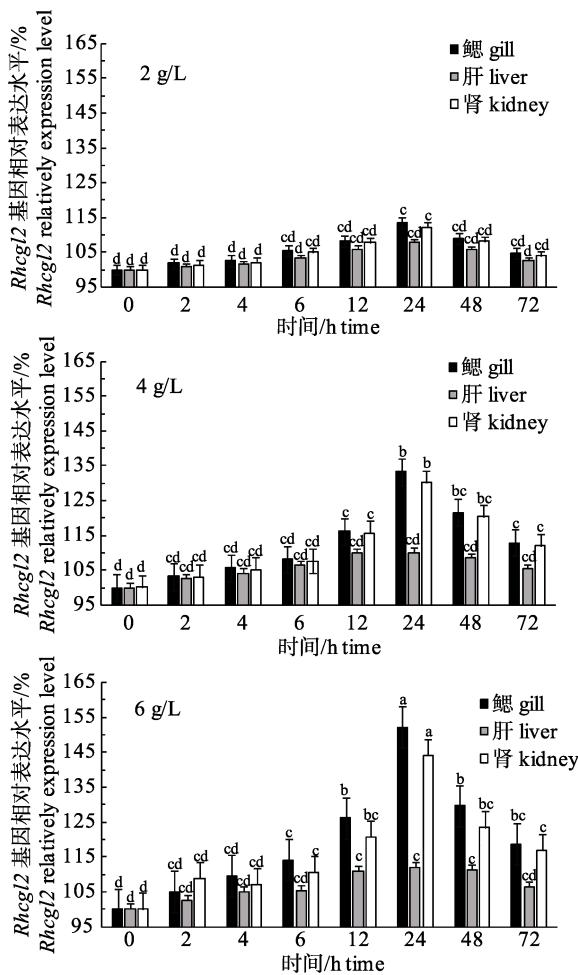


图2 碱度胁迫下尼罗罗非鱼 *Rhcgl2* 基因相对表达水平变化

图中字母相同者表示差异不显著($P>0.05$), 不同字母者表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 2 Change of relative expression of *Rhcgl2* gene of Nile tilapia under carbonate alkalinity stress
Bars with the same superscript letters are not significantly different ($P>0.05$), while those with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

2.2.3 CPS1 基因 mRNA 的相对表达变化 肝中, *CPS1* 基因的相对表达量随碱度的升高显著上调 ($P<0.05$), 随时间的推移呈现先上升后下降的变化趋势, 24 h 表达量达到最高值, 此后逐渐下降至稳定水平。鳃和肾中, *CPS1* 基因的相对表达量随时间推移没有显著性变化($P>0.05$), 随碱度的升高有所升高, 但不显著($P>0.05$)(图 4)。

2.2.4 GS 基因 mRNA 的相对表达变化 肝中, 随着碱度的升高, *GS* 基因相对表达量显著上调 ($P<0.05$), 随时间的推移, 呈现先上升后下降的变

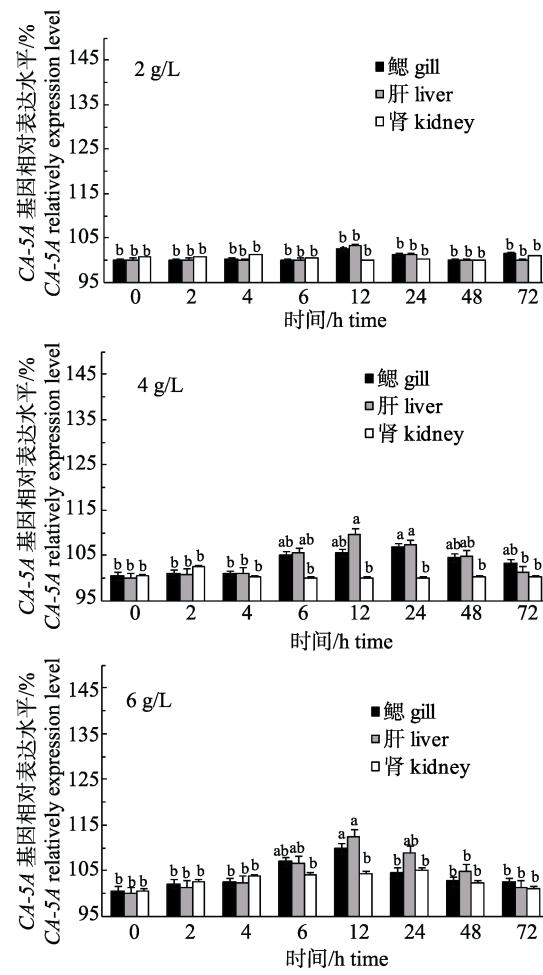


图3 碱度胁迫下尼罗罗非鱼 *CA-5A* 基因的相对表达水平变化

图中字母相同者表示差异不显著($P>0.05$), 不同字母者表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 3 Change of relative expression of *CA-5A* gene of Nile tilapia under carbonate alkalinity stress
Bars with the same superscript letters are not significantly different ($P>0.05$), while those with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

化趋势, 6 h 前相对表达量变化比较平缓, 随后快速上升, 胁迫后 24 h 表达量达到峰值。鳃和肾中, 随着碱度的升高, *GS* 基因的相对表达量上调但不显著($P>0.05$), 随着时间的推移, *GS* 基因相对表达量的变化较为平缓(图 5)。

2.2.5 GLS2 基因 mRNA 的相对表达变化 鳃中, 随着碱度的升高, *GLS2* 基因的相对表达量上调。2 g/L 碱度胁迫下, *GLS2* 基因的相对表达量随时间的推移变化比较平缓; 4 g/L、6 g/L 碱度胁迫下, *GLS2* 基因的相对表达量呈现先上升后下降的趋

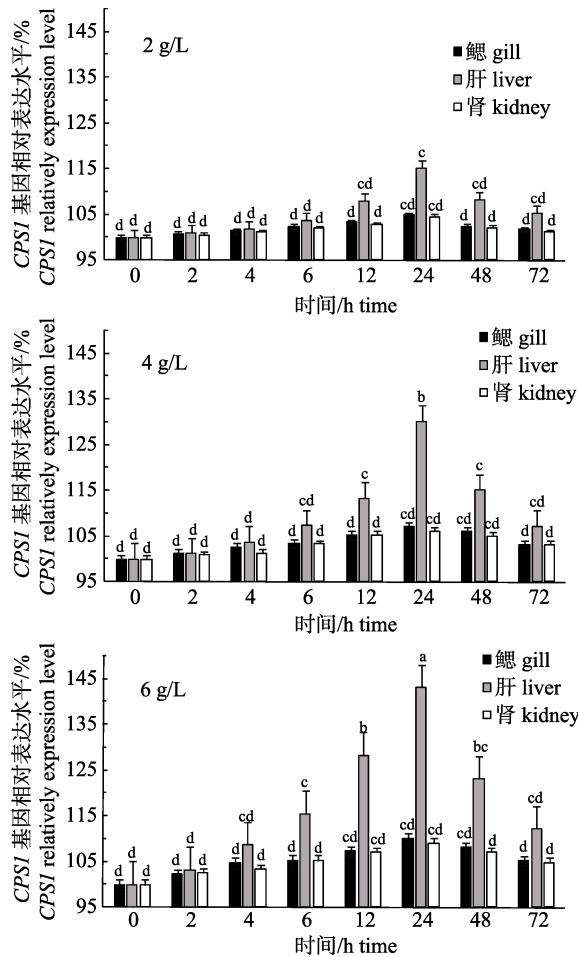


图4 碱度胁迫下尼罗罗非鱼CPSI基因的相对表达水平变化

图中字母相同者表示差异不显著($P>0.05$), 不同字母者表示差异显著($P<0.05$).

Fig. 4 Change of relative expression of CPSI gene of Nile tilapia under carbonate alkalinity stress
Bars with the same superscript letters are not significantly different ($P>0.05$), while those with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

势, 24 h时达到最高值。肾中, 随着碱度的升高, GLS2基因的相对表达量显著上调($P<0.05$), 随着时间的推移, GLS2基因的相对表达量呈现先上升后下降的趋势; 2 g/L、4 g/L胁迫下24 h时达到最高值, 6 g/L胁迫下12 h达到最高值。肝中, 随着碱度的升高, GLS2基因相对表达量上调, 但差异不显著($P>0.05$); 胁迫72 h内, 随时间的推移GLS2基因的相对表达量变化比较平缓(图6)。

2.3 碱度胁迫下CA和GS活性变化

2.3.1 CA活性 鳃中, CA活性随碱度增大而显著上调($P<0.05$)。2 g/L碱度下, 随时间推移变化

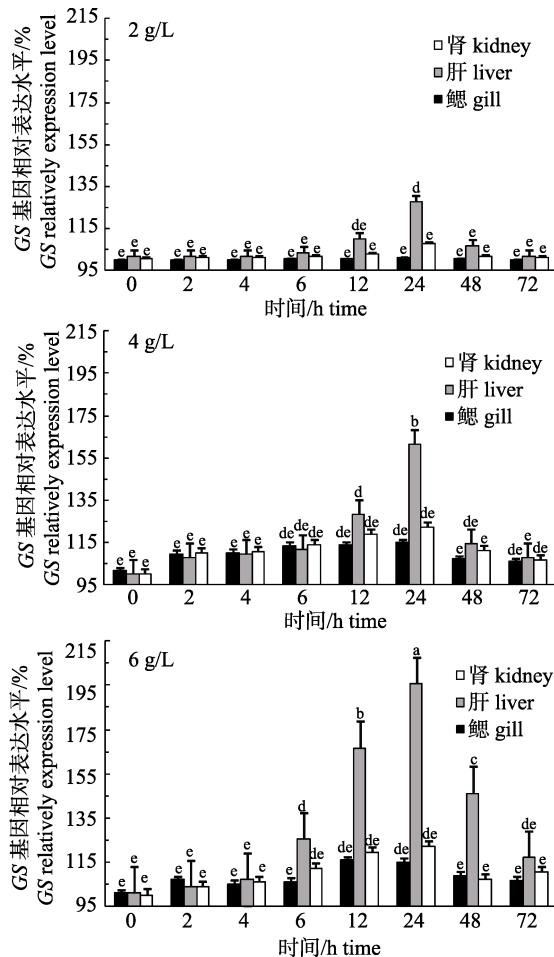


图5 碱度胁迫下尼罗罗非鱼GS基因的相对表达水平变化

图中字母相同者表示差异不显著($P>0.05$), 不同字母者表示差异显著($P<0.05$).

Fig. 5 Change of relative expression of GS gene of Nile tilapia under carbonate alkalinity stress
Bars with the same superscript letters are not significantly different ($P>0.05$), while those with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

趋势不显著($P>0.05$); 4 g/L、6 g/L组随时间推移呈先上升后下降的趋势, 在12~24 h处CA活性达到最高值, 随后逐渐下降至稳定水平(图7)。在肝和肾中, CA活性随碱度增大而升高, 但是差异不显著($P>0.05$), 随着时间的推移变化趋向平缓。

2.3.2 GS活性 鳃和肾中, GS活性随碱度的增大而上调, 但并不显著($P>0.05$), 随时间推移GS活性变化趋势比较平缓, 变化不显著。肝中, GS活性随碱度的增大显著上调($P<0.05$), 随时间的推移呈现先上升后下降的趋势, 胁迫24 h达到最高值(图8)。

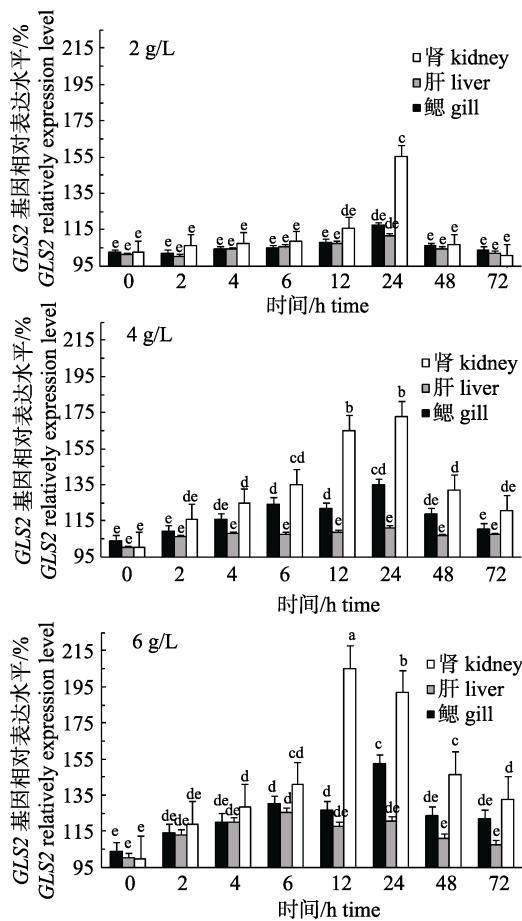


图 6 碱度胁迫下尼罗罗非鱼 GLS2 基因的相对表达水平变化
图中字母相同者表示差异不显著($P>0.05$), 不同字母者表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 6 Change of relative expression of GLS2 gene of Nile tilapia under carbonate alkalinity stress
Bars with the same superscript letters are not significantly different ($P>0.05$), while those with different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

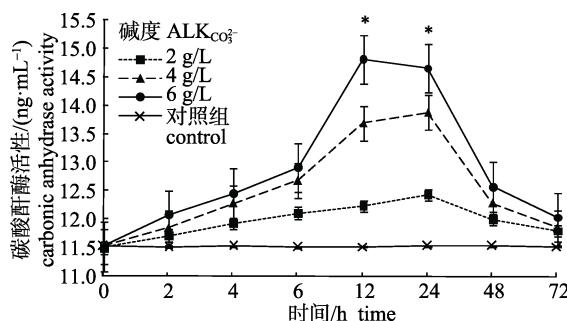


图 7 碱度胁迫下尼罗罗非鱼鳃组织中碳酸酐酶活性变化
*表示组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 7 Change of carbonic anhydrase activity in gill of Nile tilapia under carbonate alkalinity stresses
* means significantly different ($P<0.05$) among different groups.

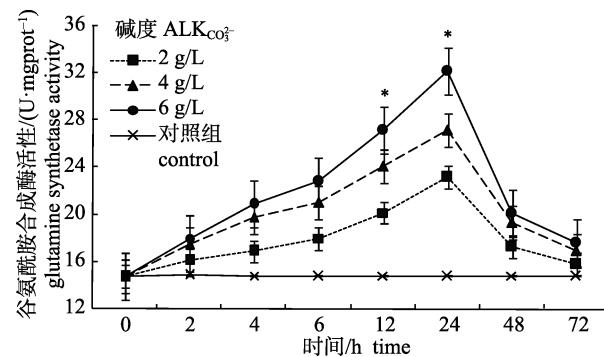


图 8 碱度胁迫下尼罗罗非鱼肝组织中谷氨酰胺合成酶活性变化

*表示组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 8 Change of glutamine synthetase activity in liver of Nile tilapia under carbonate alkalinity stresses

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

3 讨论

3.1 不同碳酸盐碱度胁迫对血氨浓度变化的影响

本研究表明,与对照组相比,碱度胁迫组中血氨浓度都有显著的提升($P<0.05$),且随着碳酸盐碱度的升高而升高,随着时间的推移呈现先上升后下降的变化趋势,在胁迫后12 h达到峰值。本胁迫实验中所用的碳酸盐碱主要成分为 NaHCO_3 ,水体中 HCO_3^- 浓度较高。短时间内,由于体内外渗透平衡作用,大量 HCO_3^- 进入到鱼体内,使得鱼体内pH上升,体内酸碱平衡遭到破坏;体内pH过高还会引起 H^+ 含量减少,致使机体代谢产生的氨排泄受到抑制,造成氨积累^[18]。而随着碱度的升高, HCO_3^- 浓度会更高,渗透进入到鱼体内的 HCO_3^- 也会增多,因此血氨积累水平也随之提高。在12 h之前血氨积累快速上升,随着时间的推移,12 h之后血氨浓度缓慢下降恢复至稳定水平,表明尼罗罗非鱼具有一定的碱环境适应能力,通过体内的碱性胁迫应答机制调节,有效地降低了血氨含量。

在6 g/L碱度胁迫下,尼罗罗非鱼血氨浓度最高值达到728.33 $\mu\text{mol/L}$,在此浓度胁迫过程中已经有少量鱼出现致死现象。此前有学者对尼罗罗非鱼耐盐碱性能进行过研究,急性胁迫试验发现,在6 g/L的时候就会出现胁迫致死^[23]。推测未经驯化的尼罗罗非鱼,在正常养殖中最高可耐受

的碱度为 6 g/L, 血氨耐受浓度为 730 $\mu\text{mol/L}$ 左右。

3.2 不同碳酸盐碱度胁迫对各基因 mRNA 表达变化的影响

与淡水组相比较, 5 个基因在各组织中的相对表达量随碳酸盐碱度的升高均有不同程度的上调, 此结果与碱度胁迫下鳃组织差异表达基因的转录组测序结果一致^[22]。这些基因表达存在着组织差异, *Rhcgl2* 主要在鳃中表达, *CA-5A*、*GS*、*CPSI* 主要在肝中表达, *GLS2* 主要在肾、鳃中表达。

Rhcgl2 基因主要在鳃中表达, 其相对表达量随碳酸盐碱浓度的升高而显著上调($P<0.05$), 随着时间的推移, 相对表达量持续上升, 在 12 h 时已经开始显著上调($P<0.05$), 胁迫后 24 h 达到峰值, 随后逐渐下降。本研究中, 尼罗罗非鱼血氨浓度在 12 h 处达到峰值后开始下降, 结合 *Rhcgl2* 基因的加速上调变化, 推测其阻止了血氨浓度的继续上升, 当血氨浓度下降至趋于稳定时, *Rhcgl2* 基因的表达量也下调, 进一步推测其参与了尼罗罗非鱼血氨调节过程。Mak 等^[24]、Maloy 等^[25]研究发现, 鱼类 Rhcg 蛋白是 NH₃ 的主要转运通道; Wright 等^[26]、Rodela 等^[27]研究发现, 海湾豹蟾鱼 (*Opsanus beta*) 在受到胁迫条件下可通过调节 Rh 基因的表达, 增加 Rh 蛋白合成, 直接将氨转出体外。推测在碱度胁迫下, *Rhcgl2* 基因参与了尼罗罗非鱼碱环境的适应调节过程。

CA-5A 基因主要在鳃和肝中表达, 相对表达量随着碱度的升高而上调, 但变化差异不显著($P>0.05$); 随着时间的推移, 在 2 g/L、4 g/L 碱度下变化平缓, 在 6 g/L 碱度下呈先上升后下降的趋势, 12 h 达到峰值($P<0.05$)。从 3 组不同碱度胁迫下 *CA-5A* 基因的表达变化看, *CA-5A* 基因可能参与了高碱环境适应调节。CA-5A 是一类线粒体内的碳酸酐酶, 主要存在于肝中, 可参与调节肝细胞代谢、尿素循环等^[28-30]。推测在高碱度环境下 *CA-5A* 间接参与尼罗罗非鱼氨代谢调节。

CPSI 基因在肝中的相对表达量随碱度的提升显著上调($P<0.05$), 随时间的推移先上升后下降, 24 h 达到峰值, 上调下调变化差异显著($P<0.05$); 在鳃和肾中都没有显著性变化($P>0.05$)。*CPSI* 基因相对表达量的变化, 表明其可能直接参与了碱环

境适应调节。*CPSI* 酶主要存在于肝中, 可催化 NH₃ 和 HCO₃⁻ 及磷酸基团合成氨甲酰磷酸, 而氨甲酰磷酸是尿素循环必需的中间代谢产物^[31], 这一代谢过程可有效降低氨含量。研究表明, 马加迪湖罗非鱼 (*Alcaticus grahami*) 在适应高碱环境中, 主要通过合成尿素调节, 防止氨的积累, *CPSI* 即是参与其尿素合成的关键酶之一^[32]。本研究中, 尼罗罗非鱼 *CPSI* 基因可能参与尿素循环中间代谢产物的合成, 协同其他氨代谢途径降低血氨浓度。

GS 基因在肝中的相对表达量显著高于鳃和肾($P<0.05$), 随碱度的升高而显著上调($P<0.05$), 随时间的推移先上升后下降, 在 12~24 h 相对表达量显著上升($P<0.05$), 24 h 达到最高值; 在鳃和肾中的表达变化均不显著($P>0.05$)。相对表达量的显著上调下调变化表明, *GS* 参与尼罗罗非鱼对碱环境的适应调节过程, 当血氨浓度恢复至正常水平, *GS* 基因相对表达量也恢复平缓。研究表明, 青海湖裸鲤在盐碱胁迫下 *GS* 基因表达量升高, 通过将氨和谷氨酸合成谷氨酰胺来降低机体内氨含量^[6]。将氨合成谷氨酰胺是实现氨代谢、降低血氨水平的调节途径之一。

GLS2 基因主要在肾和鳃中表达, 显著高于肝($P<0.05$), 随着碱度的升高而上调, 随着时间的推移先上升后下降, 从 12 h 开始表达显著提高($P<0.05$), 24 h 达到最高值。研究表明, *GLS2* 可将谷氨酰胺分解产生 NH₃, 再借助转运蛋白将其扩散出体外^[33]。*GLS2* 基因的表达上调也印证了肝中利用 *GS* 合成谷氨酰胺的氨代谢途径。

3.3 不同碳酸盐碱度胁迫对 CA、GS 酶活性变化的影响

在碱度胁迫下, 鳃 CA 酶活性明显升高, 随着时间先上升, 24 h 达到最高值, 之后缓慢恢复到稳定水平; 在肝和肾中变化平缓。CA 主要催化可逆反应 $\text{H}^++\text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{CO}_2+\text{H}_2\text{O}$ ^[34-36], 由于碱性胁迫下鱼体内 HCO₃⁻ 浓度升高, 在 CA 作用下可将部分 HCO₃⁻ 迅速转化为 CO₂, 并从鳃中直接排出体外, 防止体内 HCO₃⁻ 快速积累引起酸碱平衡失调。梁从飞等^[37]研究发现尼罗罗非鱼在 1.5 g/L、3 g/L 碱度胁迫下, CA 酶活性呈现先上升后下降的趋势, 在 12~24 h 显著升高, 表明 CA 是参与尼罗罗非鱼

碱环境适应过程的重要调节酶。

碱度胁迫下, 肝中 GS 酶活水平随碱度提高而显著升高($P<0.05$); 随时间推移呈先上升后下降的变化趋势, 在 24 h 达到最高值, 这与 GS 基因的相对表达变化基本一致。GS 酶是参与氨同化过程的关键酶, 在机体供能的情况下, GS 将 NH_3 和谷氨酸合成谷氨酰胺, 谷氨酰胺是中性无毒物质, 可储存在体内参加某些代谢、酸碱平衡、免疫调节等^[38]; 同时, 谷氨酰胺容易透过细胞膜运输到鳃、肾等排泄组织, 再经过其他代谢途径排泄氨, 如在谷氨酰胺酶(GLS2)作用下分解产生氨, 通过离子转运蛋白将氨排出体外。

以上研究结果表明, 氨代谢是尼罗罗非鱼碱环境适应中的重要调节途径之一。基于碱度胁迫下血氨浓度、不同基因 mRNA、蛋白活性在不同组织中的表达变化特征, 推测尼罗罗非鱼是通过鳃、肝和肾等器官, 采用不同调节方式, 在鳃中借助转运蛋白直接排出氨, 在肝中通过合成无毒代谢产物或合成尿素等代谢途径, 从而有效降低血氨含量。

参考文献:

- [1] He Z H, Zhao W. Biological resource in inland waters in North China[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2002, 17(3): 157–166. [何志辉, 赵文. 三北地区内陆盐水生物资源及其渔业利用[J]. 大连水产学院学报, 2002, 17(3): 157–166.]
- [2] 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.]
- [3] 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.]
- [4] Zhao L, Xu P, Sun X W. Ammonia excretion related genes expression of common carp under the stress of carbonate alkalinity[J]. Biotechnology Bulletin, 2013(4): 185–193. [赵兰, 徐鹏, 孙晓文. 碳酸盐碱度胁迫下鲤鱼氨排泄相关基因的差异表达[J]. 生物技术通报, 2013(4): 185–193.]
- [5] Zheng W G, Zhang Z Q, Zhang M Z, et al. Toxicity of salinity and alkalinity to *Lateolabrax japonicus* fingerlings[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2005, 13(3): 116–118. [郑伟刚, 张兆琪, 张美昭, 等. 盐度与碱度对花鲈幼鱼的毒性研究[J]. 中国生态农业学报, 2005, 13(3): 116–118.]
- [6] Guo W F, Yao Z L, Lai Q F, et al. Differential gene expression of *Gymnocypris przewalskii* under saline-alkali stress[J]. Marine Fisheries, 2012, 34(2): 137–144. [郭雯斐, 么宗利, 来琦芳, 等. 盐碱胁迫下青海裸鲤基因表达差异[J]. 海洋渔业, 2012, 34(2): 137–144.]
- [7] Wood C M, Perry S F, Wright P A, et al. Ammonia and urea dynamics in the Lake Magadi tilapia, a ureotelic teleost fish adapted to an extremely alkaline environment[J]. Resp Physiol, 1989, 77(1): 1–20.
- [8] Qiao S F, Li H S. The causes and control technology of acute ammonia poisoning of water organisms[J]. Hebei Fisheries, 2005(2): 27–29. [乔顺风, 李红顺. 水体生物急性氨中毒的成因和调控技术[J]. 河北渔业, 2005(2): 27–29.]
- [9] Randall D J, Wood C M, Perry S F, et al. Urea excretion as a strategy for survival in a fish living in a very alkaline environment[J]. Nature, 1989, 337: 165–166.
- [10] Mommsen T P, Walsh P J. Biochemical and environmental perspectives on nitrogen metabolism in fishes[J]. Experientia, 1992, 48: 583–593.
- [11] Wang Y S, Richard J G, Marjorie L P, et al. Unusual physiology of scale-less carp, *Gymnocypris przewalskii*, in Lake Qinghai: a high altitude alkaline saline lake[J]. Comp Biochem Physiol A, 2003, 134(2): 409–421.
- [12] Wilkie M P, Wood C M. Nitrogenous waste excretion, acid-base regulation, and ionoregulation in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to extremely alkaline water[J]. Physiol Zool, 1991, 64(6): 1069–1086.
- [13] Bolner K, Baldissarotto B. Water pH and urinary excretion in silver catfish *Rhamdia quelea*[J]. J Fish Biol, 2007, 70: 50–64.
- [14] Xu Y Q, Li W F, Ding Z K. Glutamine on immunity of aquatic animals: effect and mechanisms[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2012, 24(3): 406–410. [许友卿, 李伟峰, 丁兆坤. 谷氨酰胺对水生动物免疫的影响及机理[J]. 动物营养学报, 2012, 24(3): 406–410.]
- [15] Wood C M. Toxic Response of the Gill[M]// Schlenk D, Benson W H. Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts. London: Taylor & Francis, 2001: 1–89.
- [16] Walsh P J, Bergman H L, Narahara A, et al. Effects of ammonia on survival, swimming and activities of enzymes of nitrogen metabolism in the Lake Magadi Tilapia *Oreochromis alcalicus grahami*[J]. J Exp Biol, 1993, 180: 323–387.
- [17] Wilkie M P, Wright P A, Iwama G K, et al. The physiologi-

- cal responses of the Lahontan cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki henshawi*), a resident of highly alkaline Pyramid Lake (pH 9.4), to challenge at pH 10[J]. *J Exp Biol*, 1993, 175: 173–194.
- [18] Wilkie M P, Wood C M. The adaptations of fish to extremely alkaline environments[J]. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol*, 1996, 113(4): 665–673.
- [19] Fan W J, Li S F, Meng Q H, et al. Saltwater tolerance of *Oreochromis niloticus* (NEW GIFTs), *Sarotherodon melanotheron*, and their F₁ and F₂ hybrids[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(3): 430–435. [范武江, 李思发, 孟庆辉, 等. 4种遗传型罗非鱼的耐盐慢性驯化表现[J]. 中国水产科学, 2012, 19(3): 430–435.]
- [20] Wu J W, Liang C F, Jia J H, et al. The salinity-alkalinity tolerance of second selected generation of *Oreochromis niloticus*[J]. *Hebei Fisheries*, 2015(7): 11–13. [吴俊伟, 梁从飞, 筵金华, 等. 尼罗罗非鱼盐碱选育二代幼鱼耐受性研究[J]. 河北渔业, 2015(7): 11–13.]
- [21] Zhao L H, Zhao J L, Thammaratsuntorn J, 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, Thammaratsuntorn Jeerawat, 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.]
- [22] Zhao Y, Wang J, Thammaratsuntorn J, et al. Comparative transcriptome analysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to alkalinity stress[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 17916–17926.
- [23] Liang C F, Zhao L H, Jia J H, et al. The salinity-alkalinity tolerance of base population and first selected generation of *Oreochromis niloticus*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2014, 42(8): 227–231. [梁从飞, 赵丽慧, 筵金华, 等. 尼罗罗非鱼基础群体与选育一代幼鱼盐碱度耐受性比较[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 227–231.]
- [24] Mak D O, Dang B, Weiner I D, et al. Characterization of transport by the kidney Rh glycoproteins, RhBG and RhCG[J]. *Am J Physiol*, 2006, 290: 297–305.
- [25] Maloy G M O, Lykkeboe G, Johansen K, et al. Osmoregulation in *Tilapia grahami*: a fish in extreme alkalinity. In: Schmidt-Nielsen K, Bolis L, Maddrell S H P, eds. *Comparative Physiology: Water, Ions and Fluid Mechanics*[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1978: 229–238.
- [26] Wright P A, Wood C M. A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: role of Rhesus (Rh) glycoproteins[J]. *J Exp Biol*, 2009, 212: 2303–2312.
- [27] Rodela T M, Ebsaugh A J, Weihrauch D, et al. Revisiting the effects of crowding and feeding in the gulf toadfish, *Opsanus beta*: the role of Rhesus glycoproteins in nitrogen metabolism and excretion[J]. *J Exp Biol*, 2012, 215: 301–313.
- [28] Shah G N, Hewett-Emmett D, Grubb J H, et al. Mitochondrial carbonic anhydrase CA VB: Differences in tissue distribution and pattern of evolution from those of CA VA suggest distinct physiological roles[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(4): 1677–1682.
- [29] Shah G N, Rubbelke T S, Hendin J, et al. Targeted mutagenesis of mitochondrial carbonic anhydrases VA and VB implicates both enzymes in ammonia detoxification and glucose metabolism[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(18): 7423–7428.
- [30] van Karnebeek C D, Sly W S, Ross C J, et al. Mitochondrial carbonic anhydrase VA deficiency resulting from *CA5A* alterations presents with hyperammonemia in early childhood[J]. *Am J Hum Genet*, 2014, 94(3): 453–461.
- [31] Tetsuo M, Masataka M, Fumiaki I, et al. Tatibana transport of carbamyl phosphate synthetase I and ornithine transcarbamylase into mitochondria[J]. *J Biol*, 1982, 257(18): 10547–10550.
- [32] Wood C M, Bergman H L, Laurent P, et al. Urea production, acid base regulation and their interactions in the Lake Magadi tilapia, a unique teleost adapted to highly alkaline environment[J]. *J Exp Biol*, 1994, 189(1): 13–36.
- [33] Sawako S, Tomoaki T, Masha V P, et al. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(16): 7461–7466.
- [34] Zimma 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, 122–123: 172–180.
- [35] 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: Mol Integr Physiol*, 2007, 147(2): 404–411.
- [36] Dodgson S J, Forster R E, Storey B T. The role of carbonic anhydrase in hepatocyte metabolism[J]. *Ann NY Acad Sci*, 1984, 429: 516–524.
- [37] Liang C F, Zhao J L, Gan Y D, et al. Effects of salinity and alkalinity on mRNA expression of Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter and carbonic anhydrase genes from *Oreochromis niloticus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(2): 274–283. [梁从飞, 赵金良, 甘远迪, 等. 盐碱胁迫对尼罗罗非鱼Na⁺/HCO₃⁻共转运子、碳酸酐酶基因表达的影响[J]. 中国水

- 产科学, 2016, 23(2): 274–283.]
- [38] Chen S Y, Li G K, Wang Y, et al. The research progress of glutamine synthetase[J]. Chinese Agricultural Science Bulle-
- tin, 2010, 26(22): 45–49. [陈胜勇, 李观康, 汪云, 等. 谷氨酰胺合成酶的研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(22): 45–49.]

Change in ammonia metabolism gene expression of *Oreochromis niloticus* under the stress of high carbonate alkalinity

WU Junwei, ZHAO Jinliang, ZHAO Yan, LUO Mingkun, WANG Yan, ZHAO Yonghua

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

Abstract: We investigated the ammonia metabolism pathway of *Oreochromis niloticus* after acute carbonate alkalinity gradient stresses, and studied several ammonia metabolism-related genes: glutamine synthetase (GS), carbonic anhydrase 5A(CA-5A), glutaminase 2(GLS2), carbamyl phosphate synthetase 1(CPS1) and ammonium transporter Rh type C-2 like (*Rhcg12*); serum ammonia concentration; gene expression; and enzyme activity. The serum ammonia concentration increased as the carbonate alkalinity gradient rose, and showed a trend to increase and then decrease, with the greatest at 12 h. Ammonia metabolism-related genes in different tissues were up regulated to various degrees after different alkalinity stresses. The expression change trends showed an increase and then a decrease over time; their expression increased significantly at 12–24 h, then recovered gradually to stable levels. *Rhcg12* was mainly expressed in the gill; CA-5A, GS and CPS1 were mainly expressed in the liver; and GLS2 was mainly expressed in the kidney and gill. Enzyme activity results showed that CA and GS activities increased along with increased alkalinity, and that CA acted most significantly in the gill and GS in the liver. Overall, the results showed that carbonate alkalinity stress can result in the raising of serum ammonia concentrations, and that ammonia metabolism-related genes in the gill, liver and kidney played different roles in adjusting to ammonia metabolism: excreting the ammonia directly in the gill, producing glutamine and urea in the liver, and decreasing the serum ammonia concentration.

Key words: *Oreochromis niloticus*; carbonate alkalinity stress; serum ammonia concentration; ammonia metabolism genes; enzyme activity

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