

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16066

氨氮胁迫对中国明对虾血淋巴氨氮、尿素氮含量和抗氧化能力的影响

王芸¹, 李健², 何玉英², 段亚飞¹, 张喆¹, 李吉涛²

1. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 农业部水产品加工重点实验室, 广东 广州 510300;

2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 将 600 尾体重为(5.0 ± 1.2) g 的健康中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)随机分为 5 组, 每组 6 个重复, 每个重复 20 尾虾, 分别暴露于不同氨氮质量浓度(0 mg/L、2 mg/L、4 mg/L、6 mg/L 和 8 mg/L)海水中, 于胁迫后 6 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 测定血淋巴氨氮、尿素氮含量、总抗氧化能力(T-AOC)、抗超氧阴离子活力和血淋巴细胞过氧化氢酶(CAT)基因、过氧化物还原酶(Prx)基因和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)基因的相对表达量, 以 0 mg/L 氨氮组作为对照。结果显示, 随着氨氮胁迫时间的延长, 中国明对虾血淋巴氨氮含量逐渐积累, 以 8 mg/L 组对虾血淋巴氨氮含量最高, 是对照组的 5.85 倍。氨氮胁迫 6 h, 胁迫组中国明对虾血淋巴尿素氮含量显著高于对照组($P<0.05$), 其中 6 mg/L 组对虾血淋巴尿素氮含量最高, 是对照组的 2.22 倍。氨氮胁迫下中国明对虾血淋巴 T-AOC、Prx mRNA 相对表达量随着取样时间推移先升高后降低, 而血淋巴抗超氧阴离子活力、CAT 和 caspase mRNA 相对表达量随时间增加呈现先上升后下降再上升的变化过程。氨氮胁迫下中国明对虾血淋巴抗氧化能力被显著诱导, 这可能破坏机体的氧化-抗氧化系统的平衡, 从而导致 caspase mRNA 相对表达量的上调。

关键词: 氨氮胁迫; 中国明对虾; 抗氧化能力; 血淋巴

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)01-0180-10

对虾养殖业是我国海水养殖的支柱产业, 中国明对虾是我国重要的经济渔业资源, 是黄渤海重要的经济虾类^[1]。高密度集约化养殖过程中, 由于残饵、浮游动植物和养殖动物排泄物等有机物的分解, 使得养殖水体产生大量的氨氮^[2], 因此氨氮已经成为影响对虾养殖业的主要环境胁迫因子之一。另外环境理化因子(天气、水环境因子和饵料等)的改变, 引起了水体氨氮浓度的不平衡波动, 也会造成养殖动物摄食率、生长率以及免疫功能降低^[3-5], 增加了养殖动物对于养殖环境中病原体的易感性^[6-7]。已有研究表明高浓度的氨氮长时间作用下, 中国明对虾的抗病力明显降低, 间接增加了对虾对病原菌的易感性^[8-9]。

甲壳类动物的氮排泄受到内源性和外源性多

种因素的影响, 内源性因子包括蜕皮周期、营养水平、个体发育等, 外源性因子包括水体氨氮水平、温度、盐度和 pH 等^[10]。其中, 氨氮是对水产动物具有毒性的主要环境污染因子, 能够对多种器官造成损伤^[11]。对虾长时间处于高氨氮浓度的养殖水体中, 对体内氮废物的排泄及氨代谢将产生不利影响。若 NH₃ 从水体渗入组织液内, 就会造成对虾血氨中毒^[12]。同时氨氮胁迫容易导致机体的氧化损伤, 使体内活性氧自由基(ROS)的浓度增加^[13]。过量的 ROS 能够损伤机体重要的生物分子, 如 DNA、蛋白质和脂类^[14]。因此机体的抗氧化防御系统在保护或者修护细胞免受氧化损伤, 维持细胞的氧化还原平衡状态方面发挥着重要作用。本研究通过分析氨氮胁迫后, 中国明对

收稿日期: 2016-03-03; 修订日期: 2016-04-14.

基金项目: 国家虾产业技术体系项目(CARS-47); 国家自然科学基金项目(31172401); 公益性行业(农业)科研专项(201103034).

作者简介: 王芸(1981-), 女, 副研究员, 从事水产健康养殖研究. E-mail: wangyun@scsfri.ac.cn

通信作者: 李健, 研究员. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

虾血淋巴中氨氮、尿素氮含量, 总抗氧化活力(T-AOC)和抗超氧阴离子能力, 以及血细胞中过氧化氢酶(CAT)、过氧化物还原酶(Prx)和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase) mRNA 表达的变化情况, 从体内氮代谢和抗氧化系统两个方面探讨氨氮对中国明对虾的胁迫机制, 为健康养殖和抗逆品种选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用中国明对虾购自山东青岛荣水产科技发展有限公司, 体质健康, 平均体长(7.8 ± 0.6) cm, 体重(5.0 ± 1.2) g, 饲养于 PVC 桶(容积 200 L)中, 投饵量按照每桶对虾总初体重的 6%, 并观察投饵台中的饲料情况调整投喂量, 连续充气, 驯养 1 周后开始实验。整个实验期间温度(30.0 ± 1.1)℃, pH 8.23 ± 0.08 , 溶氧 7.0 mg/L 以上, 盐度 18。

1.2 实验设计

选择健康、规格整齐的中国明对虾 600 尾, 随机将对虾分为 5 个实验组, 分别为对照组(0 mg/L)、低浓度氨氮胁迫组(2 mg/L)、中浓度氨氮胁迫组(4 mg/L)、中高浓度氨氮胁迫组(6 mg/L)和高浓度氨氮胁迫组(8 mg/L)。本研究氨氮浓度的设置参考文献[15]。每组 6 个平行, 每桶放 20 尾对虾, 每桶水体积为 150 L。10 g/L 的 NH₄Cl 用于调整各实验组的氨氮浓度。实验期间每日定时更换新鲜海水 1 次, 每次换水 1/3, 氨氮胁迫组换水后连续补充 NH₄Cl, 使采样组水体氨氮浓度保持稳定, 胁迫期间连续投喂。氮胁迫后的 0 h、6 h、24 h、48 h、72 h、96 h 分别从每个实验组随机挑取 8 尾对虾取样, 并同时取各 PVC 桶中的水样, 用于水体氨氮浓度的测定, 取样当天水体样本氨氮浓度全部测定完毕。

1.3 养殖水体氨氮浓度的测定

养殖水体氨氮浓度的测定使用奈氏试剂法^[16], 并做相应改进, 测定方法参照文献[17]。分子氨浓度的计算方法参照文献[18]。计算公式如下:

$$\begin{aligned}\% \text{NH}_3 &= 100 / [1 + 10^{(\lg K_e - \text{pH})}] \\ \lg K_e &= -0.467 + 0.00113 \times S + 2887.9 / T \\ T &= (273 + t) K\end{aligned}$$

$$\text{NH}_3 = \% \text{NH}_3 \cdot \text{TAN}$$

式中, K_e 代表平衡常数^[19], S 代表盐度, T 代表绝对温度, TAN 代表用奈氏试剂法测定的实际氨氮浓度。

1.4 样品处理

用 1 mL 注射器吸取 0.5 mL 预冷(4℃)的抗凝剂^[20], 从围心腔抽取 0.5 mL 的血淋巴液, 混匀后离心(4℃, 800 g, 15 min), 取上清液用于抗氧化酶活性的测定; 血淋巴细胞沉淀于离心管管底, 加入 0.5 mL 的 TRIzol(Invitrogen), 使用移液器反复吸打混匀, 在室温静置 10 min 用于后续的 RNA 提取。

1.5 氨代谢指标的测定

采用南京建成生物工程研究所研制的试剂盒进行血氨和血尿素氮的测定, 其中血淋巴尿素氮测定采用二乙酰-肟法。

1.6 抗氧化指标的测定

使用南京建成生物工程研究所试剂盒, 测定对虾血淋巴 T-AOC 和抗超氧阴离子自由基活力。

1.7 抗氧化酶 mRNA 和 caspase mRNA 的表达水平分析

1.7.1 样品制备 将上述血淋巴细胞样品于室温静置, 根据 TRIzol 的说明书提取血淋巴细胞总 RNA, 提取获得的总 RNA, 用 RQ1 RNase-Free DNase(Promega)去除残留的 DNA, 用核酸定量仪(Thermo Scientific, 型号 NanoDrop ND-1000)测定 260 nm 和 280 nm 处的吸收值, 检测 RNA 的产量和纯度, 并使用 1% 琼脂糖凝胶进行 RNA 非变性电泳, 检测 RNA 的完整性。提取获得的总 RNA, 用 RQ1 RNase-Free DNase(Promega)去除样品中残留的 DNA, 然后使用反转录酶 M-MLV(Promega)将 RNA 反转录成 cDNA。

1.7.2 引物设计 根据中国明对虾过氧化氢酶(CAT)(EU102287)、过氧化物还原酶(Prx)(DQ20-5423)和 caspase(GU597089)cDNA 序列, 以 Primer Premier 5.0 设计 Real-time PCR 扩增特异性引物, 中国明对虾 18S rRNA 扩增引物参照文献[21], 引物序列详见表 1。引物合成和 cDNA 序列测定委托上海生工生物工程有限公司完成。

1.7.3 Real-time PCR 扩增 采用 Real-time PCR (SYBR Green) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量方法, 按照 SYBR[®]

表 1 Real-time PCR 扩增的特异性引物
Tab. 1 Primers used for real-time PCR amplification

cDNA	正向引物(5'-3') forward primer(5'-3')	反向引物(5'-3') reverse primer(5'-3')	产物大小/bp size of production
CAT	ACTCCCATTGCTGTTCTG	ATCCCAATTTCCTTCTTCTG	114
Prx	CACCTTGCTGCCCACT	GCAACCACCTCGCATCCA	219
caspase	CGGAGGAAGTTGCGAAGAA	TTGGAATGAGCGAAGATGAGAG	127
18S rRNA	AGTAGCCGCCCTGGTTGTAGAC	TTCTCCATGTCGTCCCAGT	218

Premix Ex TaqTM II (TaKaRa)试剂盒说明书进行操作, 反应体系如下: 反应总体积共 20 μL, SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (2×) 10.0 μL, Rox reference Dye II (50×) 0.4 μL, Forward primer (10 μmol/L) 0.8 μL, Reverse primer (10 μmol/L) 0.8 μL, cDNA 1.0 μL, dd H₂O 7 μL。将样品在 PCR 管内混匀后分装入 96 孔 PCR 板(Axygen)中, 瞬时离心后放入 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪中进行 PCR 扩增, 反应程序为: 95℃ 预变性 30 s; 循环条件为 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 共 40 个循环; 熔解曲线条件为 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 97℃ 15 s。反应完成后, 用 ABI 7500 system 软件分析结果。

1.8 统计分析

所得数据均以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 用 SPSS 16.0 统计分析软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), Duncan's 检测法进行多重比较, $P<0.05$ 认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 各组水体中 NH₄⁺和 NH₃浓度的变化情况

对照组(0 mg/L)水体中的实际 NH₄⁺和 NH₃浓度在整个实验过程中均处于较低水平, 分别为 0.126~0.303 mg/L 和 0.016~0.032 mg/L; 而各胁迫组水体中实际的 NH₄⁺和 NH₃浓度呈现先升高后降低的变化趋势, 其中 72 h 2 mg/L、4 mg/L、6 mg/L 和 8 mg/L 组水体的实际 NH₄⁺质量浓度分别为 (8.068±1.114) mg/L、(10.649±2.290) mg/L、(12.399±2.190) mg/L 和 (13.843±2.227) mg/L, NH₃质量浓度分别为 (1.558±0.175) mg/L、(2.038±0.412) mg/L、(2.247±1.013) mg/L 和 (2.332±0.125) mg/L(图 1)。

2.2 氨氮胁迫对中国明对虾血淋巴含氮代谢的影响

血淋巴氨氮含量的变化如图 2A 所示。随着时间的延长, 各组血淋巴氨氮含量呈现先升高后

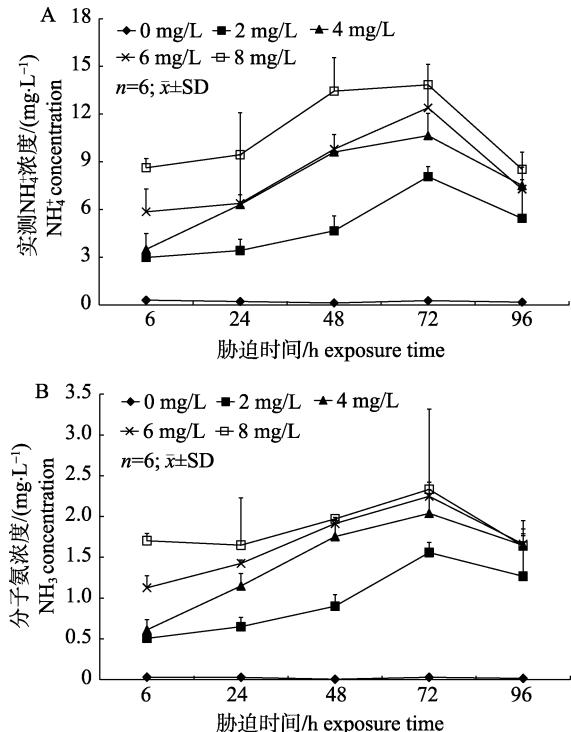


图 1 各组水体中实际 NH₄⁺(A) 和 NH₃ 质量浓度(B) 的变化情况

Fig. 1 Actual NH₄⁺ (A) and NH₃ concentration (B) in each treatment throughout the experiment

降低再升高的变化过程。整个实验过程中, 各氨氮胁迫组对虾血淋巴氨氮含量均显著高于对照组($P<0.05$)。2 mg/L 和 4 mg/L 组中国明对虾血淋巴氨氮含量在 96 h 和 72 h 达最高值, 分别是其对照组的 4.67 倍和 7.38 倍($P<0.05$)。6 mg/L 和 8 mg/L 组中国明对虾血淋巴氨氮含量均在 96 h 时达到最高值, 分别是其对照组的 5.42 倍和 5.85 倍($P<0.05$)。由此可见, 各氨氮胁迫组血淋巴氨氮含量均在胁迫后期达到最高值, 这说明在同浓度氨氮胁迫下, 氨氮含量随着胁迫时间的增加而逐渐在血淋巴液中蓄积(图 2A)。

血淋巴尿素氮含量随环境氨氮浓度的变化如

图 2B 所示。随着时间的延长, 各氨氮胁迫组血淋巴尿素氮浓度呈现先升高后降低再升高的变化过程。各胁迫组血淋巴尿素氮含量均在 6 h 达最高值, 分别是其对照组的 1.31 倍、1.21 倍、2.22 倍和 1.98 倍, 且 2 mg/L、6 mg/L 和 8 mg/L 组中国明对虾血淋巴尿素氮含量均显著高于对照组($P<0.05$)。胁迫 24 h, 各胁迫组血淋巴尿素氮含量均显著低于对照组($P<0.05$), 且 2 mg/L 和 6 mg/L 组对虾血淋巴尿素氮含量达最低值。由此可见, 氨氮胁迫初期中国明对虾体内尿素氮含量快速达到最高值。

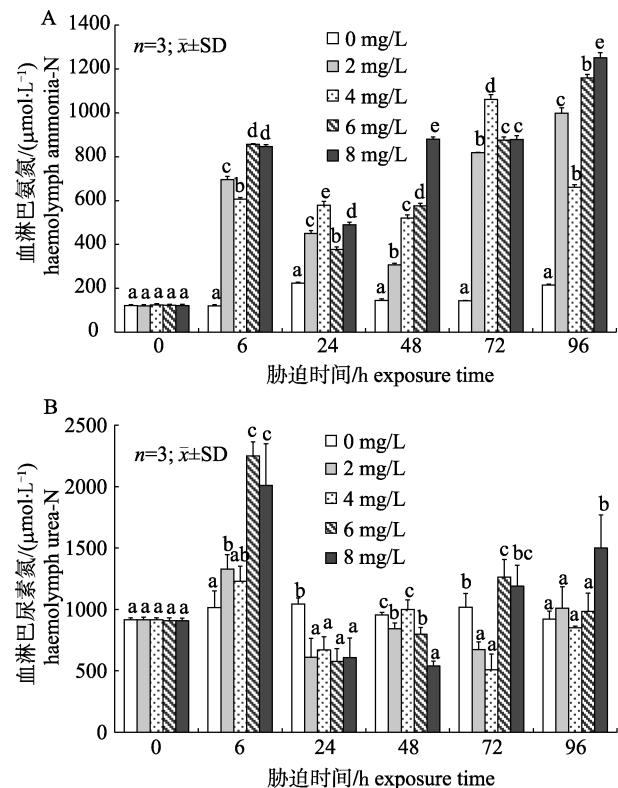


图 2 氨氮胁迫对中国明对虾血淋巴氨氮(A)和尿素氮(B)含量的影响
同一个时间点字母不同表示具有显著差异($P<0.05$)。

Fig. 2 Effects of ammonia-N exposure on haemolymph ammonia nitrogen (A) and urea (B) content of *Fenneropenaeus Chinensis*
Treatment bars with different letters in the same time are significantly different ($P<0.05$).

2.3 氨氮胁迫对中国明对虾血淋巴抗氧化指标的影响

结果如图 3A 所示, 各胁迫组中国明对虾血淋巴 T-AOC 呈现先升高后降低的变化趋势。氨氮

胁迫 6 h, 4 mg/L 和 8 mg/L 组中国明对虾血淋巴 T-AOC 活力达到最高值, 分别是对照组的 1.85 倍和 6 倍, 均显著高于对照组($P<0.05$)。氨氮胁迫 24 h, 各氨氮胁迫组对虾血淋巴 T-AOC 活力均显著高于对照组($P<0.05$), 且 6 mg/L 组对虾 T-AOC 活力达最高值, 是对照组的 2.14 倍。氨氮胁迫 72~96 h, 2 mg/L 组对虾 T-AOC 活力显著高于对照组($P<0.05$), 其他各氨氮胁迫组对虾 T-AOC 均显著低于对照组($P<0.05$)。

随着氨氮胁迫时间的延长, 各胁迫组中国明对虾血淋巴抗超氧阴离子活力逐渐升高。氨氮胁迫 72~96 h, 各胁迫组对虾血淋巴抗超氧阴离子活力均显著高于对照组($P<0.05$)。各胁迫组的最高抗超氧阴离子活力分别为对照组的 3.09 倍、1.77 倍、1.98 倍和 5.23 倍(图 3B)。

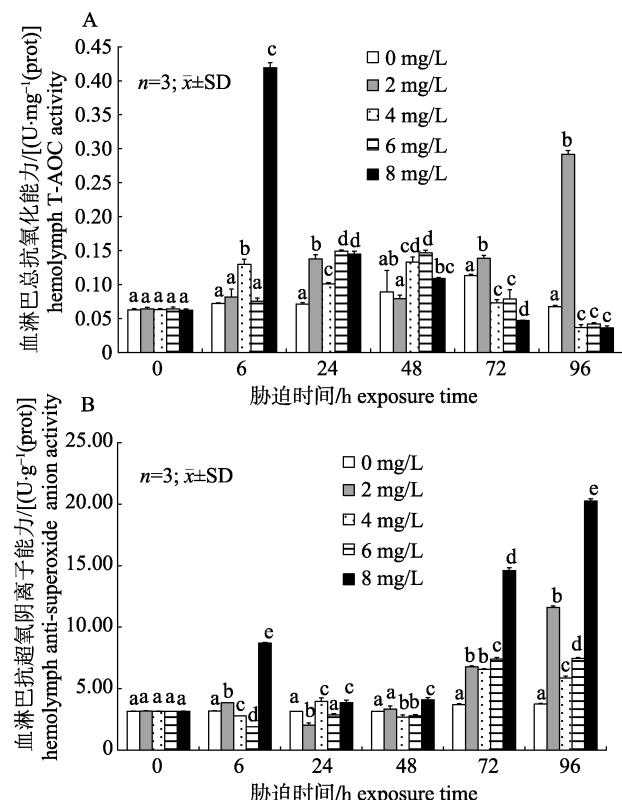


图 3 氨氮胁迫对中国明对虾血淋巴抗氧化功能的影响

Fig. 3 Effects of ammonia-N exposure on haemolymph anti-oxidant capacity of *Fenneropenaeus chinensis*

以上结果表明, 氨氮胁迫下 T-AOC 活力在多数时段显著高于对照组($P<0.05$), 但高浓度氨氮长时间胁迫则抑制中国明对虾血淋巴 T-AOC 活

力；氨氮胁迫后期中国明对虾血淋巴抗超氧阴离子能力均显著高于对照组。

2.4 氨氮胁迫对中国明对虾血淋巴细胞抗氧化酶和 caspase mRNA 表达水平的影响

各氨氮胁迫组中国明对虾血淋巴细胞 *CAT* mRNA 表达水平呈现升高→降低→升高→降低波浪式变化过程。氨氮胁迫 6~48 h, 各胁迫组血淋巴细胞 *CAT* mRNA 表达水平均显著高于对照组($P<0.05$), 且在 48 h 达最高表达水平, 分别为对照组的 2.67 倍、2.04 倍、2.45 倍和 3.44 倍; 之后 *CAT* mRNA 表达水平降低, 在 72~96 h 达最低表达水平(图 4A)。

各氨氮胁迫组中国明对虾血淋巴细胞 *Prx* mRNA 表达水平呈现先升高后降低的变化趋势(图 4B)。氨氮胁迫 6 h, 6 mg/L 和 8 mg/L 组对虾血淋巴细胞 *Prx* mRNA 表达水平显著高于对照组($P<0.05$), 且达到最高值, 分别为对照组的 1.48 倍和 2.06 倍。氨氮胁迫 24 h, 各胁迫组对虾血淋巴细胞 *Prx* mRNA 表达水平均显著高于对照组($P<0.05$), 4 mg/L 组 *Prx* mRNA 表达水平达最高值, 为对照组 1.20 倍。氨氮胁迫 72~96 h, 各胁迫组对虾血淋巴细胞 *Prx* mRNA 表达水平均显著低于对照组($P<0.05$)。

各氨氮胁迫组中国明对虾血淋巴细胞 caspase mRNA 表达水平呈现先升高后降低再升高的变化过程。氨氮胁迫 6 h, 6 mg/L 和 8 mg/L 氨氮组对虾血淋巴细胞 caspase mRNA 水平均显著高于对照组($P<0.05$)。氨氮胁迫 24~48 h, 各胁迫组 caspase mRNA 表达水平显著降低, 且在 24 h 均显著低于对照组($P<0.05$)。氨氮胁迫 72~96 h, 各胁迫组中国明对虾血淋巴细胞 caspase mRNA 表达水平均显著高于对照组($P<0.05$), 且达到最高值, 分别为对照组的 2.49 倍、1.77 倍、2.95 倍和 3.34 倍(图 4C)。

综上所述, 氨氮胁迫对中国明对虾血淋巴细胞抗氧化酶和 caspase mRNA 表达有以下特点: (1) 氨氮胁迫初期 *CAT*、*Prx* 和 caspase mRNA 表达水平显著高于对照组($P<0.05$), 且氨氮胁迫组对虾血淋巴细胞 *CAT* 和 *Prx* mRNA 表达水平在 24~48 h 达最高值; (2) 氨氮胁迫后期 *Prx* mRNA 表达水平被显著抑制, 而各氨氮胁迫组对虾血淋巴细胞 caspase mRNA 表达水平显著高于对照组($P<0.05$)。

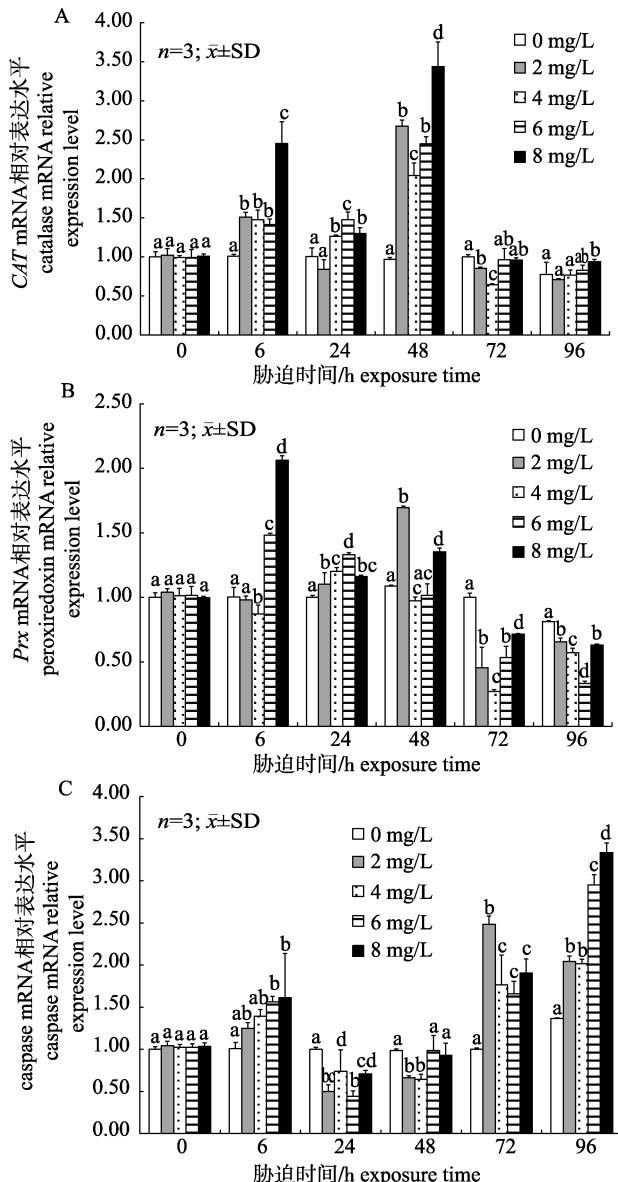


图 4 氨氮胁迫对中国明对虾血淋巴细胞抗氧化酶和 caspase mRNA 表达水平的影响

Fig. 4 Effects of ammonia-N exposure on mRNA expression levels of haemocytes antioxidant gene and caspase in *Fenneropenaeus chinensis*

3 讨论

由计算公式可以看出, 水体氨氮浓度与水体的盐度、温度及 pH 都有密切的关系。哈承旭等^[22]研究了不同 NH₄Cl 浓度对中国明对虾‘黄海 1 号’群体和中国明对虾野生群体的影响, 研究发现‘黄海 1 号’72 h NH₄Cl 的半致死浓度为 17.8 mg/L, 中国明对虾野生群体 72 h NH₄Cl 的半致死浓度为 16.0 mg/L。何玉英等^[15]比较了中国明对虾家系幼

体对不同浓度 NH_4Cl 的耐受性, 认为中国明对虾幼体 72 h NH_4Cl 的半数致死浓度为 15.6 mg/L。本实验胁迫初期, 各组设计氨氮浓度与实测氨氮浓度基本相近, 但随着胁迫时间的延长, 各胁迫组的实测氨氮浓度逐渐升高。本实验中设计氨氮浓度为 8 mg/L 组, 实测水体最高值为 13.84 mg/L, 远远高于 8 mg/L。原因可能有以下两个方面: (1) 本实验使用的对虾配合饲料, 粗蛋白含量高达 40% 以上, 过量的残饵在充气的水体中营养成分流失^[23], 容易造成水体实测氨氮浓度高于实验设计的浓度。(2) 对虾的排泄物是富含氮的有机物, 在充气的水中分解可能产生了大量的氨氮。对照组氨氮浓度在 0.180~0.272 mg/L 之间波动, 符合低于 0.6 mg/L 的标准^[24]。

氨氮是动物体内氨基酸分解代谢、酰胺的脱氨基作用及嘌呤核苷酸循环中的腺苷酸脱氨基作用的代谢产物^[25], 氨氮的排泄既受到内部因素如蜕皮周期、营养状态等影响, 同时也受外部因素如温度、盐度和环境氨氮等影响。血淋巴的氨氮含量主要是水环境中的氨氮, 或者是代谢产物氨氮通过扩散进入血液, 该指标是评估生理功能的重要指标。本实验研究结果表明, 中国明对虾血淋巴氨氮含量随水体氨氮浓度的升高而升高, 且随胁迫时间呈现先升高后降低再升高的变化过程。甲壳动物正常的血淋巴氨氮含量一般为 0.033~0.950 mmol/L^[26~31]。本研究中氨氮胁迫 72~96 h, 各氨氮胁迫组(2~8 mg/L)中国明对虾血淋巴氨氮含量均高于正常的甲壳动物, 该研究结果与 Chen 等^[31]的报道相一致, 即水体氨氮浓度增加时对虾血淋巴氨氮含量显著增加。Chen 等^[32]研究认为当水体氨氮浓度从 0 mg/L 增加至 5 mg/L, 斑节对虾的氨排泄也随之增加, 但是水体氨氮浓度从 5 mg/L 增加至 20 mg/L 则抑制对虾的氨氮排泄。但也有研究学者认为, 当水体氨氮浓度由 28 mg/L 增加到 1218 mg/L 时并不影响对虾的氨代谢^[24]。本研究中氨氮胁迫中国明对虾 6 h, 水体氨氮浓度从 0.303 mg/L(对照组)增加至 8.625 mg/L(高氨氮胁迫组), 对虾血淋巴氨氮含量从 0.12 mmol/L 增加至 0.85 mmol/L, 增加了大约 6 倍。说明当中国明对虾暴露于氨氮胁迫条件下, 水体中的 NH_3 可

以通过自由扩散的方式进入血淋巴中, 导致血淋巴氨氮含量的逐渐升高。当血淋巴氨氮含量过高的时候, 对虾激活体内氨代谢途径, 降低分子氨的毒性。鱼类和甲壳动物消除氨氮主要有以下 3 个途径: (1) 通过扩散作用使 NH_3 从血液扩散进入水体; (2) 通过 NH_4^+ 与 Na^+ 的离子交换作用; (3) 转化成为毒性较小的化合物如尿素氮^[33]。Kinne^[34]研究认为, NH_3 的自由扩散是消除体内氨氮的主要途径, 因为通常血液中的氨含量要高于水环境中的氨浓度。8 mg/L 组水体氨氮浓度 NH_4^+ 高达 13.843 mg/L(约 0.99 mmol/L), 仍然小于此时对虾血淋巴氨氮含量(1.25 mmol/L), 中国明对虾血淋巴 NH_3 很可能是通过自由扩散的方式排放至水体, 从而降低了体内的 NH_3 浓度。

甲壳类的尿素氮生成主要来源于鸟氨酸循环和尿酸的分解, 而后者的形成主要源于核苷酸的降解。鸟氨酸循环的关键酶——精氨酸酶活性在多种甲壳类鳃、肝胰腺和肌肉中被检测出来^[35]。实验结果表明, 水体氨氮浓度与中国明对虾血淋巴尿素氮的变化趋势一致, 当氨氮浓度从 0.220 mg/L 升高到 9.446 mg/L 时, 中国明对虾血淋巴氨氮含量增加。为了降低氨氮在体内的积累, 机体可能通过主动运输或者被动扩散的方式消除多余的氨氮, 同时机体启动解毒机制, 将毒性较强的分子氨转化为相对较弱的尿素氮, 从而造成血淋巴尿素氮水平的升高^[10]。但是氨氮浓度从 9.446 mg/L 升高到 13.449 mg/L(即 24~48 h)时, 血淋巴尿素氮含量降低, 此时, 尿素的形成主要依赖于鸟氨酸循环, 该循环的起始直接由 NH_3 和 HCO_3^- 作为底物, 在一系列酶的催化作用下, 最终形成鸟氨酸和尿素。由此看来尿素浓度直接与体内 NH_4^+ 和 CO_2 水平息息相关。本研究表明 24~48 h 对虾血淋巴氨氮含量较 6 h 有所降低, 所以 NH_4^+ 供给浓度降低, 导致血淋巴尿素氮含量降低。但胁迫 72~96 h, 6 mg/L 和 8 mg/L 组血淋巴尿素氮含量仍然显著高于对照组, 说明随着水环境氨氮浓度的升高, 对虾血淋巴尿素氮含量逐渐增加。类似的结果见于斑节对虾^[32]和日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)^[36]。

Zhang 等^[37]研究表明随着水体氨氮浓度的升

高, 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)血细胞 ROS 含量升高。本研究发现实测氨氮浓度从 0.303 mg/L 升至 8.625 mg/L 时, 血淋巴 T-AOC 和抗超氧阴离子活力显著升高, 推测氨氮胁迫诱导对虾体内活性氧含量升高, 血淋巴抗氧化能力反馈性增强, 以清除多余的活性氧。但当氨氮浓度达到 10.649~13.843 mg/L 时, T-AOC 能力受到抑制, 与栉孔扇贝和牡蛎在氨氮和不同机械刺激下活性氧含量的变化趋势相一致^[38~39]。CAT 和 Prx 具有分解 H₂O₂ 的能力而发挥抗氧化作用。CAT 基因表达在氨氮胁迫 48 h 达到最高值, 这与 Wang 等^[40]和 Zhang 等^[41]的研究结果相一致, 即胁迫可以引起对虾组织 CAT 基因的表达水平升高。氨氮胁迫 6 h, 6 mg/L 和 8 mg/L 组对虾血淋巴细胞 Prx 基因表达水平最高, 说明高浓度氨氮胁迫瞬时诱导血淋巴细胞 Prx 基因表达, 这与上述血淋巴中 T-AOC 和抗超氧阴离子活力结果相一致。Caspase (cysteinylaspartate specific proteinases) 是一类具有天冬氨酸特性的半胱氨酸蛋白酶, 存在于细胞液中, 是调节细胞凋亡通路中的关键蛋白^[42]。有研究表明 caspase mRNA 表达水平与呼吸暴发和活性氧自由基的产生有关^[43]。本研究发现氨氮胁迫 6 h, 6 mg/L 和 8 mg/L 组 caspase mRNA 表达水平显著高于对照组, 此时中国明对虾 T-AOC 活力也显著高于对照组, 说明 caspase 与抗氧化能力存在相关性。氨氮胁迫 24~48 h, caspase 基因表达水平显著降低, 这可能是 caspase 活性增加的一种反馈性调控^[44]。已有研究表明细胞凋亡系统被激活用以清除不需要或者有害的细胞, 此过程在脊椎动物和无脊椎动物的正常生长发育和维持生物的动态平衡中起到至关重要的作用^[45]。氨氮胁迫 72~96 h, 各胁迫组 caspase 基因表达水平显著高于对照组, 与梁忠秀等^[46]研究塔玛亚历山大藻诱导中国明对虾鳃 caspase 基因表达上调相一致, 表明氨氮胁迫可能诱导中国明对虾血淋巴细胞凋亡。所以作者推测水环境氨氮浓度的剧变, 激活细胞凋亡通路因子 caspase, 以清除不必要的或者有害的细胞, 从而节省能量以应对氨氮胁迫^[47], 对于这个假说需要进一步证实。

综上所述, 氨氮胁迫打破了中国明对虾氧化-

抗氧化系统的动态平衡, 诱导血淋巴抗氧化能力的升高(T-AOC、抗超氧阴离子活力、CAT 和 Prx mRNA 表达水平), 造成血淋巴氨氮和尿素氮含量的增加, 从而诱导细胞凋亡相关基因 caspase 表达, 但这有待于进一步的组织学的研究证实。

参考文献:

- [1] Deng J Y, Ye C C, Liu Y C. Shrimps in the Yellow Sea and Bohai Sea and Its Resource Management[M]. Beijing: Ocean Press, 1990: 36~164. [邓景耀, 叶昌臣, 刘永昌. 渤黄海的对虾及其资源管理[M]. 北京: 海洋出版社, 1990: 36~164.]
- [2] Jiang L X, Pan L Q, Xiao G Q. Effects of ammonia-N on immune parameters of white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2004, 11(6): 537~541. [姜令绪, 潘鲁青, 肖国强. 氨氮对凡纳滨对虾免疫指标的影响[J]. 中国水产科学, 2004, 11(6): 537~541.]
- [3] Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea[J]. Aquaculture, 2000, 191(1~3): 121~131.
- [4] Han C Y, Zheng Q M, Chen G D, et al. Effect of ammonia-N stress on non-specific immunity of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. areus*)[J]. South China Fisheries Science, 2014, 10(3): 47~52. [韩春艳, 郑清梅, 陈桂丹, 等. 氨氮胁迫对奥尼罗非鱼非特异性免疫的影响[J]. 南方水产科学, 2014, 10(3): 47~52.]
- [5] Xiao W, Li D Y, Xu Y, et al. Effects of chronic external ammonia stress on growth, immunity and metabolism of juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(4): 81~87. [肖炜, 李大宇, 徐杨, 等. 慢性氨氮胁迫对吉富罗非鱼幼鱼生长、免疫及代谢的影响[J]. 南方水产科学, 2015, 11(4): 81~87.]
- [6] Qiu D Q, Zhou X J, Qiu M S. Study on anti-disease ability of *Litopenaeus vannamei* and the biological control of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage under stresses of ammonia nitrogen[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(4): 455~461. [邱德全, 周鲜娇, 邱明生. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾抗病力和副溶血弧菌吞噬体防病效果研究[J]. 水生生物学报, 2008, 32(4): 455~461.]
- [7] Huang J H, Li Y, Yang Q B, et al. Comparison of tolerance to ammonia-N in *Penaeus monodon* families[J]. South China Fisheries Science, 2012, 8(6): 37~43. [黄建华, 李永, 杨其彬, 等. 斑节对虾家系氨氮耐受性的比较[J]. 南方水产科学, 2012, 8(6): 37~43.]
- [8] Sun J J, Ding M L. Effect of ammonia-N on anti-disease ability of *Penaeus chinensis*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1999, 30(3): 267~272. [孙舰军, 丁美丽. 氨氮对中

- 国对虾抗病力的影响[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 267–272.]
- [9] Liu C H, Chen J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 16(3): 321–334.
- [10] Yu M, Wang S C, Lu Y. Ammonia excretion and haemolymph nitrogenous contents of mitten crab (*Eriocheir Sinensis*) at different environmental pH[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2008, 32(1): 62–67. [于敏, 王顺昌, 卢韫. 中华绒螯蟹在不同 pH 下氨氮排泄和血淋巴含氮成分的变化[J]. 水生生物学报, 2008, 32(1): 62–67.]
- [11] Li J, He Y Y, Wang Q Y, et al. Selective breeding of fast-growing and ammonia toxicity-resistant Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(1): 61–66. [李健, 何玉英, 王清印, 等. 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) “黄海 3 号”新品种的培育[J]. 渔业科学进展, 2015, 36(1): 61–66.]
- [12] Qiao S F, Liu H Y, Jin X Y. Hazard and biological utilization of ammonia nitrogen accumulation in aquaculture water[J]. 2006(1): 20–22. [乔顺风, 刘恒义, 谌秀云. 养殖水体氨氮积累危害与生物利用[J]. 河北渔业, 2006(1): 20–22.]
- [13] Ching B, Chew S, Wong W, et al. Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (Mudskipper)[J]. Aquat Toxicol, 2009, 95(3): 203–212.
- [14] Cheng C, Yang F, Ling R, et al. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*)[J]. Aquat Toxicol, 2015, 164: 61–71.
- [15] He Y Y, Li J, Liu P, et al. Comparison of the resistance to pH value and ammonia in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) families[J]. Periodical of Ocean University of China, 2008, 38(5): 761–765. [何玉英, 李健, 刘萍, 等. 中国对虾家系幼体对氨氮和 pH 的耐受性比较[J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(5): 761–765.]
- [16] Chen J R. The Instruction of Water Chemistry Experiment[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996: 136–139. [陈佳蓉. 水化学实验指导书[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 136–139.]
- [17] Wang Y, Li J, Zhang Z, et al. Effects of pH and ammonia-N stresses on *HSP90* gene expression of *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(5): 44–45. [王芸, 李健, 张喆, 等. pH、氨氮胁迫对中国对虾 *HSP90* 基因表达的影响[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(5): 44–45.]
- [18] Bower C E, Bidwell J P. Ionization of ammonia in sea water effects of temperature, pH, and salinity[J]. J Fish Res Board Can, 1978, 35(7): 1012–1016.
- [19] Johansson O, Wdborg M. The ammonia-ammonium equilibrium in the water at temperature between 5 and 25°C[J]. J Solution Chem, 1980, 9(1): 37–43.
- [20] Bachère E, Chagot D, Grizel H. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation[J]. Dev Comp Immunol, 1988, 12(2): 549–559.
- [21] Li F H, Luan W, Zhang C S, et al. Cloning of cytoplasmic heat shock protein 90 (*FcHSP90*) from *Fenneropenaeus chinensis* and its expression response to heat shock and hypoxia[J]. Cell Stress Chaper, 2009, 14(2): 161–172.
- [22] Ha C X, Liu P, He Y Y, et al. Effect of ammonium chloride on immunity-related enzymes of “Huanghai No. 1” population of shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(1): 34–40. [哈承旭, 刘萍, 何玉英, 等. 氯化铵对“黄海 1 号”中国对虾免疫相关酶类的影响[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(1): 34–40.]
- [23] Chen S Q, Li X C, Li Z X, et al. The loss of nutrients of shrimp formulated diet soaked in water and its effects on the water environment[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1995, 2(4): 40–47. [陈四清, 李晓川, 李兆新, 等. 中国对虾配合饲料入水后营养成分的流失及其对水环境的影响[J]. 中国水产科学, 1995, 2(4): 40–47.]
- [24] Wang K X. Mariculture and Proliferation of Shrimp and Crab[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1997: 172. [王克行. 虾蟹增养殖学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 172.]
- [25] Regnault M. Nitrogen excretion in marine and fresh-water crustacean[J]. Biol Rev, 1987, 62(1): 1–24.
- [26] Binns R. The physiology of the antennal gland of *Carinus maenas* (L.) V: some nitrogenous constituents in the blood and urine[J]. J Exp Biol, 1969, 51(1): 41–51.
- [27] Chen J C, Kou Y Z. Accumulation of ammonia in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia[J]. Dis Aquat Organ, 1991, 11(3): 187–191.
- [28] Harris R R, Andrews M B. Total NPS pool and ammonia net efflux rate change in *Carcinus maenas* during acclimation to low environmental salinity[J]. Comp Biochem Physiol A, 1985, 82(2): 301–308.
- [29] Hagerman L, Sondergaard T, Weile K, et al. Aspects of blood physiology and ammonia excretion in *Nephrops norvegicus* under hypoxia[J]. Comp Biochem Physiol A, 1990, 97(1): 51–55.
- [30] Mangum C M, Silverthorne S U, Harris J L, et al. The relationship between blood pH, ammonia excretion and adapta-

- tion to low salinity in the blue crab *Callinectes sapidus*[J]. *J Exp Biol*, 1976, 195(1): 129–136.
- [31] Chen J C, Nan F H, Cheng S Y, et al. Effects of ambient ammonia on ammonia-N and protein concentrations in hemolymph and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis*[J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1993, 98(1–2): 203–208.
- [32] Chen J C, Chen C T, Cheng S Y. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels[J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1994, 110: 85–94.
- [33] Campbell J W. Comparative Animal Physiology—Nitrogen Excretion[M]. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1973, 1: 279–316.
- [34] Kinne O. Cultivation of marine organism: water quality management and technology[J]. *Mar Ecol*, 1976, 3(part 1): 79–300.
- [35] Hanlon D P. The distribution of arginase and urease in marine invertebrates[J]. *Comp Biochem Phys B*, 1975, 52(2): 261–264.
- [36] Chen J C, Chen J M. Arginase specific activity and nitrogenous excretion of *Penaeus japonicus* exposed to elevated ambient ammonia[J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1997, 153: 197–202.
- [37] Zhang Y, Ye C, Wang A, et al. Isolated and combined exposure to ammonia and nitrite in giant freshwater pawn (*Macrobrachium rosenbergii*): effects on the oxidative stress, antioxidant enzymatic activities and apoptosis in haemocytes[J]. *Ecotoxicology*, 2015, 24: 1601–1610.
- [38] Fan Z J, Liu Z H, Yang A G. Effect of ammonia-N on the content of ROIs and the activities of antioxidant enzyme in the haemolymph of *Chlamys farreri*[J]. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(1): 23–27. [樊甄娇, 刘志鸿, 杨爱国. 氨氮对栉孔扇贝血淋巴活性氧含量和抗氧化酶活性的影响[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(1): 23–27.]
- [39] Arnaud L, Shelagh K M. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Dev Comp Immunol*, 2002, 26(1): 1–9.
- [40] Wang W N, Zhou J, Wang P, et al. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress[J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2009, 150(4): 428–435.
- [41] Zhang Q L, Li F H, Zhang X J, et al. cDNA cloning, characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene, catalase of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 24(5): 584–591.
- [42] Danial N N, Korsmeyer S J. Cell death: critical control points[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 205–219.
- [43] Wang W N, Zhou J, Wang P, et al. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute stress[J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2009, 150(4): 428–435.
- [44] White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis[J]. *Gene Dev*, 1996, 10(1): 1–15.
- [45] Raff M C. Social controls on cell survival and cell death[J]. *Nature*, 1992, 356(6368): 397–400.
- [46] Liang Z X, Li J, Ren H, et al. Toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* induces oxidative stress and up-regulate Caspase gene (*FcCasp*) expression in gills of Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(1): 153–160. [梁忠秀, 李健, 任海, 等. 塔玛亚历山大藻对中国明对虾鳃组织的氧化胁迫和对 Caspase 基因(*FcCasp*)表达的影响[J]. 中国水产科学, 2014, 21(1): 153–160.]
- [47] Wang Y, Li J, Liu P, et al. The responsive expression of a caspase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* against pH stress[J]. *Aquac Res*, 2011, 42(8): 1214–1230.

Effects of ambient ammonia-N exposure on hemolymph nitrogen metabolism and antioxidant capacity of *Fenneropenaeus chinensis*

WANG Yun¹, LI Jian², HE Yuying², DUAN Yafei¹, ZHANG Zhe¹, LI Jitao²

1. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*, is widely cultured in China for its high economic value. However, farming yields of *F. chinensis* have decreased in the past few decades. The decreases in yield has been attributed to disease, as environmental deterioration due to poor management has resulted in an increased incidence of stress-induced disease. Environmental stressors, such as ammonia, have a significant effect on the antioxidant system of shrimp. However, little information is available about the effects of changes in ambient ammonia-N on hemolymph nitrogen content and antioxidant capability of Chinese shrimp. Therefore, 600 shrimps [initial body weight, (5.0±1.2) g] were divided randomly into five groups and exposed to water containing different concentrations of ambient ammonia-N (0 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L, 6 mg/L, and 8 mg/L). Each group had six replicates of 20 shrimp each. Total antioxidant capacity (T-AOC), antisuperoxide anions, relative expression of catalase (CAT), peroxiredoxin (Prx), and caspase mRNA in hemocytes and hemolymph ammonia, and urea content were analyzed in hemolymph after exposing shrimp to different concentrations of ambient ammonia-N for 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h. Shrimp cultured in filtered seawater were used as the control. The results showed that ammonia accumulated gradually in the hemolymph as exposure time increased. Hemolymph ammonia content of shrimp in the 8 mg/L group was the highest compared with that in the other groups and was 5.85 times higher than that in the control group. Hemolymph urea contents of shrimp in the ammonia-N exposed groups were higher than that in the control group after 6 h of ammonia-N exposure. The hemolymph urea of shrimp in the 6 mg/L group was the highest after 6 h and was 2.22-times higher than that in the control group. Hemolymph T-AOC and Prx mRNA expression in hemocytes of shrimp exposed to ambient ammonia-N increased initially and then decreased as exposure time increased. However, anti-superoxide anions in hemolymph and relative CAT and caspase mRNA expression levels in hemocytes increased, decreased, and then increased again as exposure time increased. The antioxidant capacity of shrimp was significantly higher after exposure to ammonia-N than that in the control. These findings demonstrate that the oxidation-antioxidant balance system in shrimp may be damaged after exposure to ammonia-N, resulting in upregulation of caspase mRNA expression.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; ammonia-N exposure; antioxidant capacity; hemolymph

Corresponding author: LI Jian. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn