

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16369

高碱环境下青海湖裸鲤氮废物排泄及相关基因的表达规律

衣晓飞^{1,2}, 来琦芳¹, 史建全³, 高鹏程¹, 周凯¹, 祁洪芳³, 王慧¹, 么宗利¹

1. 中国水产科学研究院 东海水产研究所, 盐碱水域渔业工程技术研究中心(上海), 上海 200090;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

3. 青海湖裸鲤救护中心, 青海 西宁 810016

摘要: 采用个体生理学及定量 PCR 方法, 研究了青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)在 32 mmol/L (CA32)和 64 mmol/L (CA64)碳酸盐碱度胁迫下氮废物排泄规律及鳃和肾组织中 Rhesus type b glycoproteins (*Rhbg*)、Rhesus type c2 glycoproteins (*Rhcg2*)与 urea transporter (*Ut*)基因的表达规律。结果显示, 在 32 mmol/L 碱度胁迫整个过程中及 64 mmol/L 碱度胁迫初期裸鲤氨氮排泄率显著降低, 但在 64 mmol/L 碱度胁迫 8~20 h、24~72 h 时氨氮排泄率基本恢复到胁迫前水平, 在 32 mmol/L 碱度胁迫 12~16 h、20~24 h 及 64 mmol/L 碱度胁迫 16~48 h 时尿素氮排泄率显著升高。定量 PCR 结果显示, *Rhbg*、*Rhcg2*、*Ut* 基因在胁迫过程中都有表达上调趋势, 其中 32 mmol/L 碱性环境下鳃组织中 *Rhbg* 基因在胁迫 12 h 时表达明显上调; 64 mmol/L 碱性环境下鳃组织中 *Rhcg2* 基因在胁迫 6 h、48 h、72 h 表达明显上调, *Ut* 基因在胁迫 6 h 表达明显上调, 肾组织中 *Rhcg2* 基因在胁迫 6 h 表达明显上调。以上结果表明, 裸鲤在高碱环境下虽然前期氮废物排泄受到抑制, 但后期会通过启动 *Rh* 基因高表达恢复氨氮排泄, 同时启动 *Ut* 高表达来增加尿素氮排泄来进行氮废物排泄。这一特殊氮废物排泄策略有助于裸鲤更好地适应高碱性环境。

关键词: 青海湖裸鲤; 碳酸盐碱度; 氮废物排泄; *Rh* 基因; *Ut* 基因

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)04-0681-09

青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)俗称湟鱼(下简称裸鲤), 属鲤形目(Cypriniformes), 鲤科(Cyprinidae), 裂腹鱼亚科(Schizothoracinae), 裸鲤属(*Gymnocypris*), 是青海湖中重要的经济鱼类, 在青海湖生态系统中占据核心地位^[1]。青海湖裸鲤是溯河性产卵鱼类, 性成熟裸鲤每年4—7月从青海湖溯游到淡水支流泉吉河和布哈河等河道, 完成产卵繁殖后, 亲鱼及孵化后的幼体再洄游到青海湖。青海湖盐度 13~15, 碱度 26~32 mmol/L, pH 9.1~9.5, 且由于蒸发和灌溉等因素, 湖水碱度逐年升高^[2-3]。生活在湖水中的裸鲤面临着诸多环境胁迫, 碳酸盐碱度胁迫是其中的主要胁迫之一。高碳酸盐碱度导致的血氨升高进而引起的氨中毒是鱼类在碱性环境中面临的主要威胁之一^[4], 但由于长期生活在盐碱水环境中, 裸鲤已进化出

适应盐碱环境的多种机制, 如低耗能状态下的渗透调节和离子调控^[5], 应激因子超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)的抗氧化和磷酸化应激调节^[6], 肠道 HCO₃⁻的分泌调节^[7]以及代谢性碱中毒时碳酸酐酶的补偿性表达机制等^[2], 但关于裸鲤在氮废物排泄方面的适应机制的研究较少。

研究发现, 鱼类主要以氨(NH₃ 和 NH₄⁺)和尿素的形式进行氮废物排泄^[7]。大部分硬骨鱼在水中以氨氮形式排泄氮废物, 氨氮占总氮废物排泄的 60%~95%, 其余大多以尿素氮形式排出^[9-10]。氨排泄的主要器官是鳃, 80%~90%的氨通过鳃进行排泄, 只有少量氨通过肾脏以尿液形式排出^[9]。最初人们认为鱼体内的氨仅依靠鳃中血液-水的氨分压梯度(ΔP_{NH_3})进行自由扩散排出体外^[11]。Rh

收稿日期: 2016-12-19; 修订日期: 2017-03-15.

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目(14ZR1449800); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(中国水产科学研究院东海水产研究所) (2012M05).

作者简介: 衣晓飞(1990-), 女, 硕士研究生, 主要从事分子生物学和鱼类生理研究. E-mail: xfyiyi@126.com

通信作者: 么宗利, 副研究员, 从事鱼类生理生态学研究. Tel: 021-65664854; E-mail: zlyao@126.com

血型相关蛋白家族(Rhesus (*Rh*) blood group-associated glycoprotein family)及 4 种 Rh 蛋白(Rhag, Rhbg, Rhcg1, Rhcg2)的定位表明鱼类需要在 Rh 蛋白的协助下进行氨排泄^[12-15]。尿素主要依靠尿素转运蛋白 Ut 从鳃中排出,少量以尿液形式从肾脏排出^[16]。近年来,有些许关于鱼类在碱性环境中氮废物排泄的研究报道,如马加迪湖罗非鱼(*Alcolapia grahami*)^[17]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[18]、达里湖雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)^[19]、青海湖裸鲤^[20]等,也有学者提出了鱼类应对碱性环境的氮废物排泄策略,如转变氮代谢产物(将氨转变为尿素或氨基酸)、重建氨分压梯度及高氨耐受能力等^[21-22]。截止目前关于裸鲤的氮废物排泄鲜有报道,仅 Wang 等^[20]初步研究了青海湖裸鲤氮排泄情况,文章在氮废物排泄方面测定了湖水和河水中裸鲤在 36 h 内的氨氮和尿素氮排泄率,发现湖水组裸鲤在实验时间内较河水组氨氮排泄显著降低,但关于裸鲤在碱性环境下氮废物排泄的补偿或恢复机制有待进一步研究。而鱼类氨氮排泄受到抑制主要是由碱度因素造成的,因此本研究主要通过高碱度胁迫探究裸鲤在碱性环境的氮废物排泄机制。

基于对裸鲤碳酸盐碱度急性胁迫半致死率的研究^[23],本实验通过设定不同碳酸盐碱度,将裸鲤在不同碱度胁迫及不同胁迫时间长度的氮废物排泄变化(氨氮排泄率、尿素氮排泄率)与可能参与氮废物排泄的基因表达情况进行关联分析,试图阐明裸鲤在高碱环境中的氮废物排泄规律及分子机制,为裸鲤的耐盐碱机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试青海湖裸鲤幼鱼由青海湖裸鲤救护中心提供,实验开始前在室内暂养 1 个月以上,暂养期间每天饱食投喂两次,投喂量为体重的 5%,每天换水,不间断充气。暂养用水为过滤自来水(开能 AC/KDF150-1-300),pH (7.63±0.05),温度(17.0±0.5)°C,溶氧(9.14±0.03) mg/L,氨氮(0.01±0.01) mmol/L。实验选取大小一致、体重为(1.39±0.09) g、体长为(5.12±0.07) cm 的健康幼鱼,实验前 48 h 停止投喂。

1.2 实验方法

1.2.1 碳酸盐碱度设置 根据青海湖裸鲤生活史(性成熟裸鲤每年 4~7 月从青海湖溯游到淡水河道,完成产卵繁殖后,亲鱼及孵化后幼体再洄游到青海湖)^[2]、青海湖湖水碱度(32 mmol/L)及裸鲤碱度急性胁迫实验结果(在碱度 64 mmol/L 的水环境中,裸鲤 96 h 内的存活率为 100%)^[23],实验设置了 32 mmol/L (CA32)和 64 mmol/L (CA64) 2 个碳酸盐碱度组和一个淡水对照组(表 1)。实验用水均采用过滤自来水,用 Na₂CO₃ (AR)和 NaHCO₃ (AR)按比例配制成相应的碱度,全部溶解后稳定 24 h 使用。实验中全程监测 pH 和碳酸盐碱度。pH 测定采用 DELTA320 型精密 pH 计(METTLER TOLEDO),碳酸盐碱度测定采用酸碱滴定法^[24]。

表 1 预设与实测的碱度值
Tab. 1 Designed and measured alkalinity

碱度和 pH alkalinity and pH	n=9; $\bar{x} \pm SD$; mmol/L		
	分组 group		
	对照组 control	CA32	CA64
碱度预设值 designed carbonate alkalinity	0.00	32.00	64.00
碱度实测值 measured carbonate alkalinity	1.50±0.05	31.42±0.38	60.12±0.42
pH	8.04±0.12	9.51±0.09	9.60±0.21

注: CA32 表示 32 mmol/L 碱度组; CA64 表示 64 mmol/L 碱度组。
Note: CA32 means group of 32 mmol/L carbonate alkalinity water; CA64 means group of 64 mmol/L carbonate alkalinity water.

1.2.2 碳酸盐碱度胁迫下裸鲤氨氮及尿素氮排

泄实验 本实验设置 32 mmol/L (CA32)和 64 mmol/L (CA64) 2 个碳酸盐碱度组和一个淡水对照组。实验水体 600 mL, 每组设置 3 个重复, 每个重复 6 尾鱼。胁迫前将每尾鱼分别独立放在盛有 600 mL 淡水的聚乙烯缸中, 稳定 6 h 后分别换同体积淡水、32 mmol/L 碱水和 64 mmol/L 碱水开始胁迫, 胁迫周期 96 h, 之后进行 24 h 的淡水恢复实验。实验期间每 24 h 换水一次。分别于淡水稳定阶段 0、6 h (以下用-6, 0 h 表示), 胁迫时间段 6 h、12 h、18 h、24 h、48 h、72 h、96 h 及淡水恢复 24 h (以下用 120 h)取水样 3 mL, 冻存于-20°C, 待检测。实验结束后称量鱼体重和体长。

氨(NH₃和NH₄⁺)氮浓度的测定参考 Verdouw 等^[25]的水杨酸钠法并加以改进,使其适用于微孔板检测。将水样在室温下解冻,涡旋混匀。分别用无氨水配制水杨酸钠溶液(试剂 A)、柠檬酸钠和硝普钠混合溶液(试剂 B)、次氯酸钠溶液(试剂 C)及硫酸铵标准溶液。测定时每个水样做3个平行,依次加入试剂 A、B、C,室温下暗反应处理1 h后在650 nm波长下检测吸光值并根据标准曲线换算成浓度后按下列公式计算氨氮排泄率。

$$A_{ER} = \frac{[T_{amm}]_f - [T_{amm}]_i \times V}{\Delta t \times m}$$

式中, A_{ER} 为氨氮排泄率[$\mu\text{mol(N)}/(\text{kg}\cdot\text{h})$]; $[T_{amm}]_i$ 和 $[T_{amm}]_f$ 分别为初始和结束总氨氮浓度[$\mu\text{mol(N)}/\text{L}$]; V 为水体体积(L); Δt 为排泄初始和结束时间差; m 为体重(kg)。

尿素氮浓度的测定参考 Rahmatullah^[26]的颜色反应法,并改进使其适用于微孔板检测。分别用无尿素水配制铁的酸溶液(磷酸、浓硫酸、氯化铁)、二乙酰一肟和氨基硫脲混合溶液以及尿素标准溶液。测定时每个水样做3个平行,540 nm波长下检测吸光值并根据标准曲线换算成浓度后按下列公式计算尿素氮排泄率。

$$U_{ER} = \frac{[\text{Urea-N}]_f - [\text{Urea-N}]_i \times V}{\Delta t \times m}$$

式中, U_{ER} 为尿素氮排泄率[$\mu\text{mol(N)}/(\text{kg}\cdot\text{h})$]; $[\text{Urea-N}]_i$ 和 $[\text{Urea-N}]_f$ 为初始和结束时的尿素氮浓度($\mu\text{mol N}/\text{L}$); V 为水体体积(L); Δt 为初始和结束时间差; m 为体重(kg)。

1.2.3 碳酸盐碱度胁迫下裸鲤氨氮和尿素氮排泄相关基因表达实验 与氨氮和尿素氮排泄实验设计类似,设置 CA32、CA64 和淡水对照组,实验水体 150 L,每组设置3个重复,每个重复25尾鱼,连续充气,24 h后换水进行胁迫,胁迫周期为96 h,每24 h换水一次。取样时间设定为0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h。取样时分别从各实验组取9尾鱼,用浓度为0.5 g/L的MS-222麻醉后在冰上迅速分离鳃和肾组织,用编好号的锡箔纸包好,在液氮中速冻,转入-80℃冰箱中保存备测。

根据裸鲤的转录组测序设计目的基因(表2) *Rhcg2*、*Rhbg*、*Ut*引物,内参基因 *EF1 α* 采用 Yao

等^[2]发表的引物。用 Trizol (Invitrogen)提取总 RNA 后用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,用 Epoch Multi Volume Spectrophotometer System 酶标仪(BioTek)测定总 RNA 的浓度和纯度,用 ReverTra Ace- α (TOYOBO)试剂盒反转录合成 cDNA。用 SYBR Premix Ex Taq III (TaKaRa)试剂盒在 LightCycler 1.2 (Roche)上进行荧光定量 PCR 分析:总反应体系为 20 μL ,包括 10 μL SYBR Premix Ex Taq、0.4 μL 上游引物、0.4 μL 下游引物(上下游引物的终浓度均为 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、2 μL cDNA 模板、7.2 μL ddH₂O。扩增程序如下:95℃ 30 s,1个循环;95℃ 5 s,60℃ 20 s,40个循环。每个样品3个重复,以 *EF1 α* 作为内参基因,基因的相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[27]计算。目的基因在裸鲤组织中的表达量以0 h样品为参照。

表2 定量 PCR 引物序列
Tab. 2 Primer sequences used in real-time PCR assays

引物名称 primer name	序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
<i>EF1αF</i>	GTATTACCATTGACATTGC
<i>EF1αR</i>	CTGAGAAGTACCAGTGAT
<i>RhbgF</i>	TCCGCCCTAGTCAACC
<i>RhbgR</i>	GAGCCAAACGCAGTCAG
<i>Rhcg2F</i>	GAATCAGTCTCCCAGCAGT
<i>Rhcg2R</i>	TGTTTCGATCCAGTGAGTGTC
<i>UtF</i>	CATACACAGACATCGCCTTGAG
<i>UtR</i>	GCCAGCAACAGCATCAGC

1.2.4 数据分析 统计数据表达为重复样本数据的平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)。数据处理使用 SigmaPlot 11.0 软件,不同时间节点的氨氮和尿素氮排泄率及基因相对表达量数据用方差分析(one-way ANOVA)进行显著性检验,如果方差分析差异显著,再用 LSD 法进行多重比较,显著水平 P 为 0.05。

2 结果与分析

2.1 碳酸盐碱度胁迫下裸鲤的氮废物排泄

实验期间对照组和胁迫组裸鲤体态正常,未出现死亡现象。对照组实验期间氨氮和尿素氮排泄率均无显著性差异($P > 0.05$)。

32 mmol/L 碱度组中裸鲤在各胁迫时间段的

氨氮排泄率均显著低于胁迫前水平($P<0.05$)。胁迫 0~4 h 裸鲤氨氮排泄受抑制最为明显, 氨氮排泄率最低, 仅为胁迫前的 27.27%。胁迫 4~20 h 排氮率有回升趋势, 在 16~20 h 达到胁迫前的 58.74%, 仍显著低于胁迫前($P<0.05$)。胁迫 96~120 h 裸鲤转移至淡水后, 排氮率明显恢复, 达到胁迫前的 64.61%, 但仍显著低于胁迫前水平($P<0.05$) (图 1); 尿素氮排泄率在各胁迫时间段有升高的趋势, 在 12~16 h 和 20~24 h 两个胁迫时间段排泄率显著高于胁迫前($P<0.05$) (图 1)。总氮废物排泄情况与氨氮排泄趋势一致, 各胁迫时间段均显著低于胁迫前($P<0.05$)。胁迫前裸鲤的氨氮和尿素氮分别占总氮废物排泄的 85.72%和 14.28%, 胁迫开始后的各时间段氨氮占总氮废物排泄比例有降低趋势, 而尿素氮比例有升高趋势, 二者所占比例均与胁迫前差异显著($P<0.05$), 其中 20~24 h 比例差异最大, 氨氮和尿素氮分别占总氮排泄的 53.11%和 46.88%。

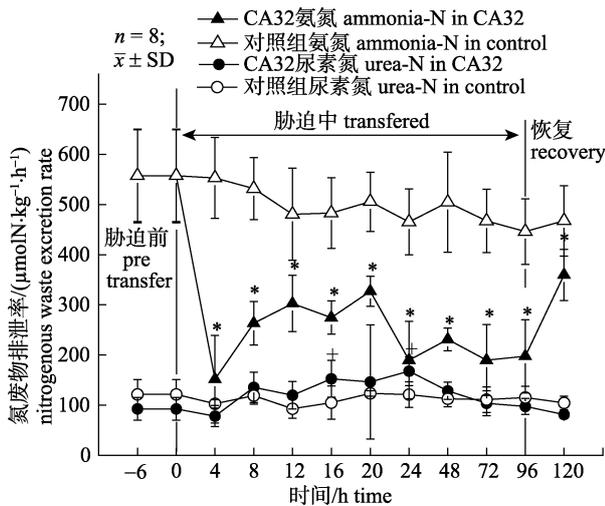


图 1 碳酸盐碱度(32 mmol/L)对青海湖裸鲤幼鱼氮废物排泄率的影响

CA32 表示 32 mmol/L 碱度组.

“*”、“+”表示氮废物排泄率与胁迫前具有显著差异($P<0.05$).

Fig. 1 Nitrogenous waste excretion rate of the juvenile *Gymnocypris przewalskii* exposed to 32 mmol/L carbonate-alkalinity water

CA32 means group of 32 mmol/L carbonate alkalinity water; “*” and “+” indicate significant difference compared with pre transfer, respectively.

64 mmol/L 碱度组, 与 32 mmol/L 碱度组类似, 氨氮排泄率在胁迫初期受到碳酸盐碱度的抑制。

胁迫 0~4 h 氨氮排泄率达到最低值, 为胁迫前的 42.68%, 0~8 h、20~24 h、72~96 h 胁迫时间段氨氮排泄率均显著低于对照组($P<0.05$)。与 32 mmol/L 碱度组不同的是 64 mmol/L 碱度组裸鲤氨氮排泄率在 4~20 h 和 24~48 h 回升更加明显, 因此在 8~20 h 和 24~72 h 胁迫时间段裸鲤氨氮排泄率与胁迫前已无显著差异($P>0.05$)。至 96~120 h 恢复期裸鲤转移到淡水后, 氨氮排泄率恢复到胁迫前水平; 此外, 尿素氮排泄率也存在升高趋势, 且在 16~48 h 胁迫时间段显著高于胁迫前($P<0.05$)。与 32 mmol/L 碱度组不同, 总氮废物排泄率仅在胁迫 0~4 h、20~24 h、48~96 h 3 个时间段显著低于胁迫前($P<0.05$), 氨氮和尿素氮的比例在 0~4 h 和 16~72 h 与胁迫前存在显著差异($P<0.05$), 其他时间段无显著差异($P>0.05$)。

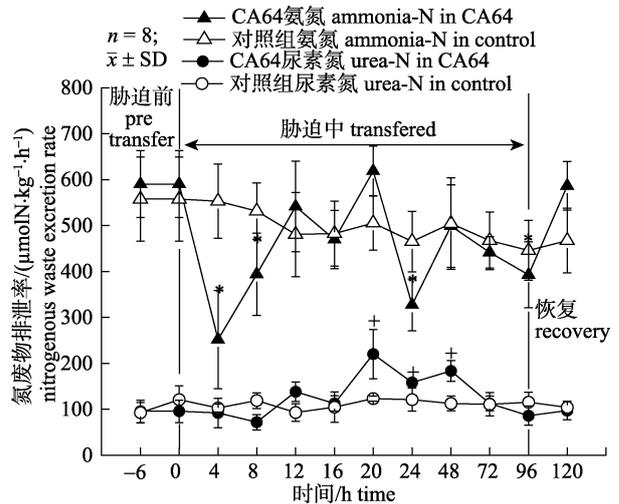


图 2 碳酸盐碱度(64 mmol/L)对青海湖裸鲤幼鱼氮废物排泄率的影响

CA64 表示 64 mmol/L 碱度组; “*”、“+”表示氮废物排泄率与胁迫前具有显著差异($P<0.05$).

Fig. 2 Nitrogenous waste excretion rate of the juvenile *Gymnocypris przewalskii* exposed to 64 mmol/L carbonate-alkalinity water

CA64 means group of 64 mmol/L carbonate alkalinity water; “*” and “+” indicate significant difference compared with pre transfer, respectively.

2.2 碳酸盐碱度胁迫下裸鲤氮废物排泄相关基因表达

对照组裸鲤在实验过程中鳃和肾组织中 *Rhcg2*、*Rhbg* 和 *Ut* 基因表达均无显著性差异($P>0.05$)。

32 mmol/L 碱度组中裸鲤鳃组织 *Rhbg* 基因在胁迫 12 h 后较胁迫前表达量显著上调($P<0.05$), *Rhcg2* 基因表达量则无显著变化($P>0.05$), *Ut* 表达量有增加趋势, 但未达到显著水平($P>0.05$) (图 3)。肾组织中 3 个基因的表达量在胁迫过程中较胁迫前无显著性差异($P>0.05$) (图 4)。

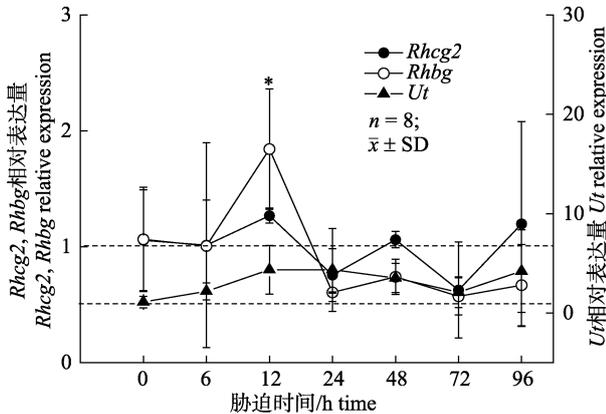


图 3 碳酸盐碱度(32 mmol/L)对青海湖裸鲤鳃组织中 3 种氮排泄相关基因相对表达量影响

“----”表示对照组 *Rhcg2*、*Rhbg* 和 *Ut* 基因相对表达量; “*”表示相对表达量与胁迫前具有显著差异($P<0.05$)。

Fig. 3 *Rhcg2*, *Rhbg*, *Ut* expression levels in gill of the juvenile *Gymnocypris przewalskii* exposed to 32 mmol/L carbonate-alkalinity water

“----” respectively represent *Rhcg2*, *Rhbg* and *Ut* expression levels in control; “*” indicates significant difference compared with pre transfer.

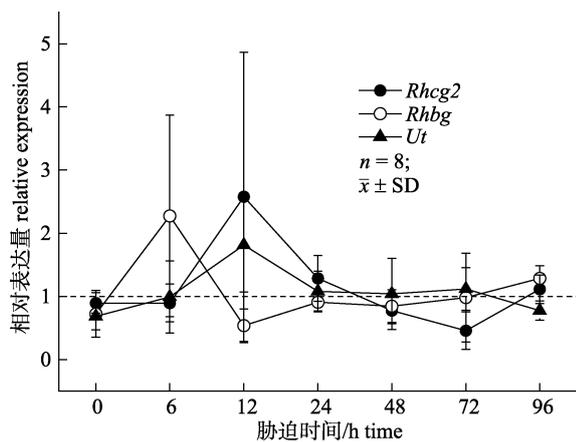


图 4 碳酸盐碱度(32 mmol/L)对青海湖裸鲤肾组织中 3 种氮排泄相关基因相对表达量影响

“----”表示对照组 *Rhcg2*、*Rhbg* 和 *Ut* 基因相对表达量。

Fig. 4 *Rhcg2*, *Rhbg*, *Ut* expression levels in kidney of the juvenile *Gymnocypris przewalskii* exposed to 32 mmol/L carbonate-alkalinity water

“----” represents *Rhcg2*, *Rhbg* and *Ut* expression levels in control.

64 mmol/L 碱度组中裸鲤鳃组织 *Rhcg2* 基因在胁迫 6 h、48 h 和 72 h 后表达量显著增加($P<0.05$), 分别为胁迫前的 6.4 倍、6.3 倍和 11.3 倍。*Ut* 基因在胁迫 6 h 后表达量显著增加($P<0.05$), 为胁迫前的 12.4 倍, 其他时间点无显著性差异($P>0.05$)。*Rhbg* 基因在各胁迫时间点均无明显变化($P>0.05$) (图 5)。肾组织中, *Rhcg2* 基因在胁迫 6 h 后表达量显著增加($P<0.05$), 约为胁迫前的 15.3 倍, 其他时间点无显著变化($P>0.05$); *Rhbg* 和 *Ut* 基因在胁迫各时间点与胁迫前均无显著差异($P>0.05$) (图 6)。

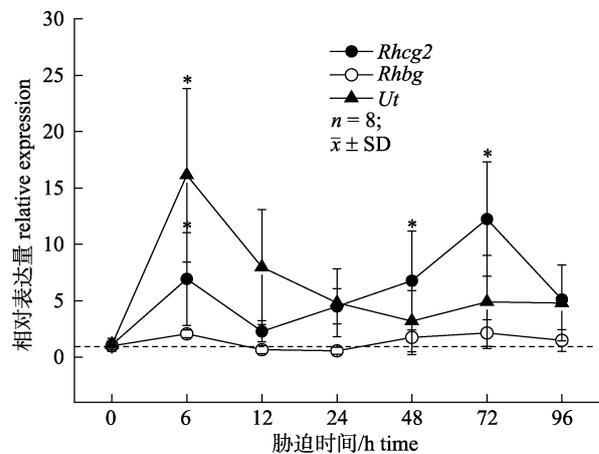


图 5 碳酸盐碱度(64 mmol/L)对青海湖裸鲤鳃组织中 3 种氮排泄相关基因相对表达量影响

“----”表示对照组 *Rhcg2*、*Rhbg* 和 *Ut* 基因相对表达量; “*”表示相对表达量与胁迫前具有显著差异($P<0.05$)。

Fig. 5 *Rhcg2*, *Rhbg*, *Ut* expression levels in gill of the juvenile *Gymnocypris przewalskii* exposed to 64 mmol/L carbonate-alkalinity water

“----” represents *Rhcg2*, *Rhbg* and *Ut* expression levels in control; “*” indicates significant difference compared with pre transfer.

3 讨论

3.1 高碱环境下裸鲤氮废物排泄规律

鱼类氨氮排泄主要依赖鳃两侧的 ΔP_{NH_3} 分压并在位于鳃上皮细胞基底膜和顶膜上的 Rh 蛋白的协助下运输到体外^[15], ΔP_{NH_3} 降低易导致氨氮排泄受到抑制^[28]。本研究中, 32 mmol/L 碱度组整个胁迫过程及 64 mmol/L 碱度组胁迫初期裸鲤的氨氮排泄都呈现降低趋势, 而尿素氮排泄率呈升高趋势, 但依然以氨氮排泄为主。因此, 裸鲤在高碱度环境下氨氮排泄受到抑制的主要原因是高碱度

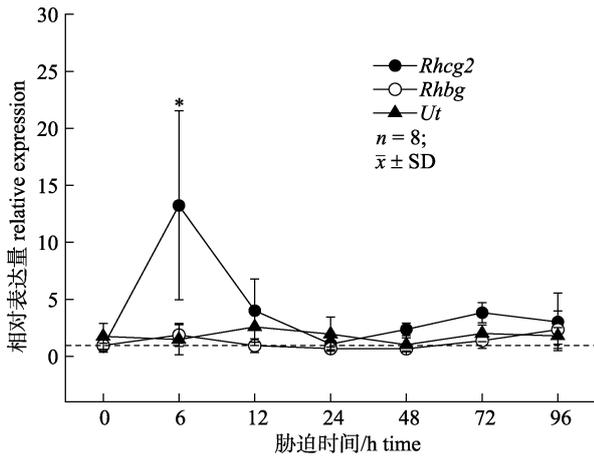


图 6 碳酸盐碱度(64 mmol/L)对青海湖裸鲤肾组织中 3 种氮排泄相关基因相对表达量影响

“----”表示对照组 *Rhcg2*、*Rhbg*、*Ut* 基因相对表达量; “*”表示相对表达量与胁迫前具有显著差异($P < 0.05$)。

Fig. 6 *Rhcg2*, *Rhbg*, *Ut* expression levels in kidney of the juvenile *Gymnocypris przewalskii* exposed to 64 mmol/L carbonate-alkalinity water

“----” represents *Rhcg2*, *Rhbg*, *Ut* expression levels in control; “*” indicates significant difference compared with pre transfer.

使鳃边界层水中用于捕获 NH_3 合成 NH_4^+ 的 H^+ 减少, 导致鳃中血液与鳃边界层水的 ΔP_{NH_3} 降低引起氨氮排泄受阻。与氨氮排泄不同, 尿素氮排泄呈略升高趋势, 这可能是裸鲤在碱性环境中的一种氮废物排泄补偿机制。在碱性环境抑制氨排泄的情况下, 裸鲤的呼吸耗氧率没有变化^[5]说明其在碱性环境中代谢产生的氮废物总量不变, 因此裸鲤可能将一部分氨转变为尿素氮排泄, 这与碱性环境中斑马鱼氨氮排泄减少, 尿素氮排泄增加的结果类似^[18]。虽然裸鲤在碱性环境中尿素氮排泄增加, 但总氮废物排泄率仍呈下降趋势, 表明尿素氮排泄的增加并没有完全补偿碱性环境对氨氮排泄的抑制。未排泄的氮废物导致血浆中氨浓度升高^[20], 而裸鲤能在青海湖高碱性的湖水中正常生活说明在裸鲤已经进化出对高氨的耐受能力。

值得关注的是 64 mmol/L 碱度组胁迫 0~8 h、20~24 h、72~96 h 氨氮排泄率显著降低, 但在 8~20 h、24~72 h 胁迫时间段其氨氮排泄率恢复到胁迫前水平, 总氮废物排泄率也呈现类似趋势。本课题组前期研究表明, 在碱性环境中裸鲤血浆 P_{CO_2} 降低导致裸鲤血浆 pH 升高^[2], 且血浆氨浓度在碱性环境中升高^[19]。据此推测在 64 mmol/L 高

碱度胁迫下裸鲤启动了特殊的排氨机制, 碱性环境使裸鲤血液中的 pH 及氨浓度升高, 进而促使血液的 P_{NH_3} 升高, 从而帮助其在鳃组织中重新建立血液-水 ΔP_{NH_3} , 因此在胁迫一段时间后恢复正常氨氮排泄^[22, 29-30]。

3.2 高碱环境下裸鲤氮废物排泄相关基因表达规律

高碱环境下裸鲤通过上调 *Rh*、*Ut* 基因表达协助氮废物从血液运输到体外。对 *Rhcg2*、*Rhbg* 及 *Ut* 基因的荧光定量分析发现, 在 32 mmol/L 碱度组裸鲤鳃组织中 *Rhbg* 表达上调, 64 mmol/L 碱度组中鳃和肾组织中 *Rhcg2* 表达均上调, *Ut* 在鳃组织中表达上调。硬骨鱼类氨的主要排泄部位是鳃^[14], 位于鳃上皮细胞顶膜的 *Rhcg2* 蛋白和基底膜的 *Rhbg* 蛋白参与氨转运排泄^[13]。鳃上皮中, *Rhbg* 负责沿 ΔP_{NH_3} 将 NH_3 从血浆中运载到鳃上皮细胞中, 然后顶膜上的 *Rhcg2* 将上皮细胞中的 NH_3 运载到水环境中。 NH_3 进入到水中后会立即与 H^+ -ATPase 或 Na^+/H^+ 交换子泵出的 H^+ 结合生成 NH_4^+ ^[15]。 *Rhbg* 基因在 32 mmol/L 碱度组表达上调提示裸鲤在该碱度条件下通过启动 *Rhbg* 的高表达来促进氨从血液进入到上皮细胞以降低血氨浓度, 避免氨中毒。64 mmol/L 碱度组中裸鲤鳃组织 *Rhcg2* 在胁迫 6 h、48 h、72 h 后表达上调, 这与 4~8 h、24~48 h 氨氮排泄率上升一致。胁迫初期, 氨氮排泄明显受到抑制, 随着胁迫时间延长裸鲤通过启动 *Rhcg2* 的高表达来促进氨从上皮细胞运输到鳃边界层水中, 使该碱度条件下裸鲤在 8~20 h、24~72 h 的氨氮排泄恢复至胁迫前水平。有研究发现, 在不利于氨氮排泄的碱性环境中鱼类会将氮废物以尿素形式排泄, 如马加迪湖罗非鱼在高碱性环境中甚至以尿素形式排泄所有氮废物^[17], 这是其能生活在碱性环境中的一种应对策略。鱼类体内的尿素在肝中合成, 在 *Ut* 蛋白的协助下从鳃组织排出体外^[16]。本研究中, 裸鲤在碱性环境中 *Ut* 基因表达有上调趋势, 与尿素氮排泄率增加相吻合, 即裸鲤在氨氮排泄受抑制的情况下, 可以将部分氮废物转化为尿素进行排泄, 但裸鲤将氨转变为尿素的过程还需进一步研究。

本研究结果表明, 在高碱性环境下裸鲤的氨

氮排泄虽然在初期受到抑制,但随胁迫时间推移其可以通过重建氨分压梯度、启动 *Rh*、*Ut* 基因高表达的同时增加尿素排泄来进行氮废物排泄。对于 *Rh* 蛋白在裸鲤组织和细胞中的分布规律以及蛋白水平的表达规律还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Shi J Q. Study on current situation and countermeasures of resource protection of Qinghai Lake naked carp[J]. Qinghai Science and Technology, 2008, 15(5): 13–16. [史建全. 青海湖裸鲤研究现状与资源保护对策[J]. 青海科技, 2008, 15(5): 13–16.]
- [2] Yao Z L, Guo W F, Lai Q F, et al. *Gymnocypris przewalskii*, decreases cytosolic carbonic anhydrase expression to compensate for respiratory alkalosis and osmoregulation in the saline-alkaline lake Qinghai[J]. J Comp Physiol B, 2016, 186(1): 83–95.
- [3] Shi J Q, Qi H F, Yang J X, et al. Resource Monitoring and Artificial Freshwater Aquaculture Technology of Qinghai Lake Naked Carp[M]. Xining: Qinghai Nationalities Publishing House, 2012: 75–84. [史建全, 祁洪芳, 杨建新, 等. 青海湖裸鲤资源监测与淡水全人工养殖技术[M]. 西宁: 青海民族出版社, 2012: 75–84.]
- [4] Wilson J M, Iwata K, Iwama G K, et al. Inhibition of ammonia excretion and production in rainbow trout during severe alkaline exposure[J]. Comp Biochem Phys B, 1998, 121(1): 99–109.
- [5] Liu J Y, Yao Z L, Lai Q F, et al. Effects of saline-alkali stress on the oxygen consumption and plasma osmolality and ion concentrations of *Gymnocypris przewalskii*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(3): 664–669. [刘济源, 么宗利, 来琦芳, 等. 盐碱胁迫对青海湖裸鲤耗氧率、血浆渗透浓度和离子浓度的影响[J]. 生态学杂志, 2012, 31(3): 664–669.]
- [6] Wang Z, Yao Z L, Lin T T, et al. Effects of carbonate alkalinity stress on SOD, ACP, and AKP activities in the liver and kidney of juvenile *Gymnocypris przewalskii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(6): 1212–1218. [王卓, 么宗利, 林听听, 等. 碳酸盐碱度对青海湖裸鲤幼鱼肝和肾 SOD、ACP 和 AKP 酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(6): 1212–1218.]
- [7] Wang P, Lai Q F, Yao Z L, et al. Differential expressions of genes related to HCO_3^- secretion in the intestine of *Gymnocypris przewalskii* during saline-alkaline water transfer[J]. Marine Fisheries, 2015, 37(4): 341–348. [王萍, 来琦芳, 么宗利, 等. 盐碱环境下青海湖裸鲤肠道 HCO_3^- 分泌相关基因表达差异[J]. 海洋渔业, 2015, 37(4): 341–348.]
- [8] Weihrauch D, Wilkie M P, Walsh P J. Ammonia and urea transporters in gills of fish and aquatic crustaceans[J]. J Exp Biol, 2009, 212(11): 1716–1730.
- [9] Evans D H, Cameron J N. Gill ammonia transport[J]. J Exp Zool, 1986, 239(1): 17–23.
- [10] Wood C M. Ammonia and Urea Metabolism and Excretion[M]//Evans D H (eds). The Physiology of Fishes. Boca Raton: CRC Press. 1993, 77: 1–20.
- [11] Wright P A, Wood C M, Wright P A, et al. An analysis of branchial ammonia excretion in the freshwater rainbow trout: effects of environmental pH change and sodium uptake blockade[J]. J Exp Biol, 1985(1): 329–353.
- [12] Hung C Y C, Tsui K N T, Wilson J M, et al. Molecular cloning, characterization and tissue distribution of the Rhesus Glycoproteins RhBG, RhCG1 and RhCG2 in the Mangrove killifish *Rivulus marmoratus* exposed to elevated environmental ammonia levels[J]. J Biol Chem, 2007, 282(19): 2419–2429.
- [13] Nakada T, Westhoff C M, Kato A, et al. Ammonia secretion from fish gill depends on a set of Rh glycoproteins[J]. FASEB J, 2007, 21(4): 1067–1074.
- [14] Nawata C M, Hung C C, Tsui T K, et al. Ammonia excretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence for Rh glycoprotein and H^+ -ATPase involvement[J]. Physiol Genomics, 2007, 31(3): 463–474.
- [15] 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(15): 2303–2312.
- [16] Braun M H, Perry S F. Ammonia and urea excretion in the Pacific hagfish *Eptatretus stoutii*: evidence for the involvement of Rh and UT proteins[J]. Comp Biochem Phys A, 2010, 157(4): 405–415.
- [17] Wood C M, Nawata C M, Wilson J M, et al. Rh proteins and NH_4^+ -activated Na^+ -ATPase in the Magadi tilapia (*Alcolapia grahami*), a 100% ureotelic teleost fish[J]. J Exp Biol, 2013, 216(16): 2998–3007.
- [18] Kumai Y, Harris J, Alrewashdy H, et al. Nitrogenous waste handling by larval zebrafish *Danio rerio* in alkaline water[J]. Physiol Biochem Zool, 2015, 88(2): 137–145.
- [19] He Q, Chang Y M, Su B F, et al. Effects of carbonate alkalinity on oxygen consumption, ammonia excretion and ammonia excretion gene expression in *Leuciscus waleckii* Dybowski[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(4): 551–558. [何强, 常玉梅, 苏宝锋, 等. 碳酸盐碱度对达里湖瓦氏雅罗鱼耗氧率、氨氮排泄和排氨基因表达的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(4): 551–558.]
- [20] Wang Y S, Gonzalez R J, Patrick M L, et al. Unusual physi-

- ology of scale-less carp, *Gymnocypris przewalskii*, in Lake Qinghai: a high altitude alkaline saline lake[J]. *Com Biochem Phys A*, 2003, 134(2): 409–421.
- [21] Wilkie M P, Wood C M. The adaptations of fish to extremely alkaline environments[J]. *Com Biochem Phys B*, 1996, 113(4): 665–673.
- [22] Wilkie M P, Wood C M. Recovery from high pH exposure in the rainbow trout: white muscle ammonia storage, ammonia washout, and the restoration of blood chemistry[J]. *Physiol Zool*, 1995, 68(3): 379–401.
- [23] Liu J Y. Effect of saline-alkali stress on oxygen consumption, osmoregulation and ionic regulation of *przewalskii*'s naked carp, *Gymnocypris przewalskii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012. [刘济源. 盐碱胁迫对青海湖裸鲤呼吸耗氧、渗透和离子调节的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.]
- [24] Lei Y Z. *Water Chemistry in Freshwater Aquaculture*[M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Publishing House, 1993: 65–7, 114–116, 164–166. [雷衍之. 淡水养殖水化学[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 1993: 65–67, 114–116, 164–166.]
- [25] Verdouw H, Echteld C J A V, Dekkers E M J, et al. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate[J]. *Water Res*, 1978, 12(6): 399–402.
- [26] Rahmatullah M, Boyde T R C. Improvements in the determination of urea using diacetyl monoxime; methods with and without deproteinisation[J]. *Clin Chim Acta*, 1980, 107(1–2): 3–9.
- [27] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101–1108.
- [28] Salama A, Morgan I J, Wood C M. The linkage between Na⁺ uptake and ammonia excretion in rainbow trout: kinetic analysis, the effects of (NH₄)₂SO₄ and NH₄HCO₃ infusion and the influence of gill boundary layer pH[J]. *J Exp Biol*, 1999, 202(6): 697–709.
- [29] Yesaki T Y, Iwama G K. Survival, acid-base regulation, ion regulation, and ammonia excretion in rainbow trout in highly alkaline hard water[J]. *Physiol Zool*, 1992, 65(4): 763–787.
- [30] Thomsen J, Himmerkus N, Holland N, et al. Ammonia excretion in mytilid mussels is facilitated by ciliary beating[J]. *J Exp Biol*, 2016, 219(15): 2300–2310.

Nitrogenous waste excretion and gene expression of nitrogen transporter in *Gymnocypris przewalskii* in high alkaline environment

YI Xiaofei^{1,2}, LAI Qifang¹, SHI Jianquan³, GAO Pengcheng¹, ZHOU Kai¹, QI Hongfang³, WANG Hui¹, YAO Zongli¹

1. Engineering Research Center for Saline-alkaline Fisheries, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Shanghai 200090, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Rescue Center for Naked Carp of Lake Qinghai, Xining 810016, China

Abstract: Saline-alkaline water bodies are widely distributed in China. High alkalinity is one of the main stressors for the survival of aquatic animals in saline-alkaline water. Previous studies have established that ammonia excretion is inhibited when fish are acutely exposed to alkaline water. *Przewalskii*'s naked carp, also known as *Gymnocypris przewalskii* or the scale-less carp, is endemic to the austere environment of Lake Qinghai. Lake Qinghai has a high salinity (13 ppt) and a strong alkalinity (carbonate alkalinity approximately 29 mmol/L, pH 9.1–9.5). Due to high evaporative water loss and extensive water diversion for agricultural use, the water level of the lake is decreasing by 10 cm per year and the salinity and alkalinity levels are increasing by 7% and 0.5% per year, respectively. Some studies showed that *G. przewalskii* had evolved a variety of mechanisms, such as osmoregulation and ion regulation with low energy consumption, regulation of HCO₃⁻ secretion in intestines, and compensatory carbonic anhydrase expression mechanism under metabolic alkalosis, to adapt to saline-alkaline environments. However, the mechanism of nitrogenous waste excretion is less well studied. In order to evaluate the effect of

carbonate alkalinity stress on nitrogenous waste excretion in *G. przewalskii*, we exposed juvenile *G. przewalskii* to 32 mmol/L and 64 mmol/L carbonate alkalinity water and measured ammonia and urea excretion rate after -6 h (pre-transfer), 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, and 120 h (recovery) after initial exposure. We also measured Rhesus type b glycoproteins (*Rhbg*), Rhesus type c2 glycoproteins (*Rhcg2*), and urea transporter (*Ut*) expression in gill and kidney of *G. przewalskii* by real-time PCR. The results showed that *G. przewalskii* in alkaline water reduced ammonia excretion but increased urea excretion. Ammonia excretion rate decreased significantly over the entire exposure period in 32 mmol/L carbonate alkalinity water and the initial exposure period in 64 mmol/L carbonate alkalinity water. Ammonia excretion is expected to be inhibited when fish are subjected to alkaline water because of a decrease in the extent of the protonation of NH_3 to NH_4^+ . Consequently, at high pH water caused by high carbonate alkalinity, the partial pressure of NH_3 (PNH_3) is predicted to rise in water adjacent to the gill, thus reducing the PNH_3 gradient that drives NH_3 diffusion. However, in the 64 mmol/L group, the ammonia excretion rate recovered to the level of pre-transfer after 24–72 h and 8–20 h. This indicated that *G. przewalskii* may excrete ammonia by re-establishing a favorable NH_3 partial pressure gradient under high carbonate alkalinity. Urea excretion rate increased significantly after 12–16 h and 20–24 h in 32 mmol/L carbonate alkalinity water and 16–48 h in 64 mmol/L carbonate alkalinity water. The real-time PCR results showed that *Rhbg*, *Rhcg2*, and *Ut* genes were up-regulated under carbonate alkalinity stress. The expression of *Rhbg* in gills was significantly up-regulated after 12 h in 32 mmol/L carbonate alkalinity water, while *Rhcg2* was significantly up-regulated in gills after 6 h, 48 h, and 72 h and in kidneys at 6 h in 64 mmol/L carbonate alkalinity water. *Ut* expression in gills was significantly up-regulated after 6 h in the 64 mmol/L carbonate alkalinity group. These results revealed that although ammonia excretion was inhibited in highly alkaline environments, *G. przewalskii* could excrete nitrogen waste by up-regulating *Rh* and *Ut* expression, recovering ammonia excretion, and excreting more urea. This study provided evidence of the nitrogenous waste excretion mechanism in *G. przewalskii* in high alkaline environments. We speculate that the special mechanism of nitrogenous waste excretion facilitate the adaptation of *G. przewalskii* to highly alkaline environments. Nonetheless, these findings raise more questions than answers, and further studies are needed to clarify the distribution and expression level of Rh protein in cells and tissues.

Key words: *Gymnocypris przewalskii*; carbonate alkalinity; nitrogenous waste excretion; Rhesus glycoproteins (*Rh*) gene; urea transporter (*Ut*) gene

Corresponding author: Yao Zongli. E-mail: zlyao@126.com