

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16268

氨和空气暴露对大鳞副泥鳅组织中谷氨酰胺含量的影响

张云龙¹, 张海龙², 王凌宇², 顾贝易², 樊启学²

1. 安徽农业大学 动物科技学院, 安徽 合肥 230036;

2. 华中农业大学 水产学院, 农业部淡水生物繁育重点实验室, 湖北 武汉 430070

摘要: 为研究氨对大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)(体重 18~25 g)生理指标的影响, 将其暴露于 30 mmol/L NH₄Cl 溶液和空气中 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 以研究体外和体内氨对其体组织中谷氨酰胺含量、谷氨酰胺合成酶和谷氨酸脱氢酶活性的影响。研究发现, 氨和空气暴露下, 随着暴露时间的延长, 大鳞副泥鳅肝脏和肌肉组织中谷氨酰胺含量有明显累积的趋势, 脑、肝脏和肠道组织中谷氨酰胺合成酶活性均显著上升。氨和空气暴露显著影响大鳞副泥鳅脑和肠道组织中谷氨酸脱氢酶活性, 但对肝脏组织中谷氨酸脱氢酶活性并没有显著性影响。结果表明, 大鳞副泥鳅可通过体组织中累积谷氨酰胺来应对体外或体内氨浓度的上升, 氨暴露和空气暴露可刺激体内谷氨酰胺的合成, 将氨转化为无毒性的谷氨酰胺。肠道中谷氨酸脱氢酶活性显著上升, 可能在鱼类应对氨氮毒性中, 肠道谷氨酸脱氢酶比谷氨酰胺合成酶有更重要的作用。而大鳞副泥鳅肝脏组织中谷氨酸脱氢酶活性并不受氨和空气暴露的影响, 这可能是由于肝脏组织中转氨酶催化生成了足量的谷氨酸。

关键词: 大鳞副泥鳅; 谷氨酰胺; 氨暴露; 空气暴露

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)05-1115-08

氨由动物机体代谢氨基酸生产, 而且具有较强的毒性, 因此动物体内的氨必须被排出体外或者降解为其他低毒性的物质^[1-2]。大多数硬骨鱼类在水体中都是排氨的, 而且氮代谢废物也多以氨的形式排泄, 但是当鱼类处于高氨、碱性水体或者空气暴露条件下, 氨排泄会受到很大程度的抑制。在这种情况下, 鱼类必须发展出合适的耐氨策略。对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)后期仔鱼的研究发现, 其最主要的氨解毒策略为通过谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)将氨和谷氨酸合成谷氨酰胺^[3]。GS一般在脑组织中的活性较其他组织中高^[4-5], 而其主要的生理功能可能就是保护脑组织免于氨氮毒性^[6]。

已有研究表明, 一些鱼类在氨暴露条件下其脑组织中 GS 活性^[4, 7]及 GS mRNA 水平^[5]显著上升。而且, 无论 GS 活性的变化如何, 鱼类暴露于

氨氮中其脑组织谷氨酰胺含量普遍上升^[4, 7-10], 并伴随着谷氨酸含量的下降^[7, 9]。因此, 在一些鱼类中, 氨会被过量激活的 *N*-甲基-*D*-天门冬氨酸型谷氨酸(*N*-methyl-*D*-aspartate-type glutamate, NMDA)受体中和一部分^[11]。谷氨酰胺在鱼类大脑降解氨氮毒性中起到了重要的作用, 如海湾豹蟾鱼(*Opsanus beta*)、尖齿胡鲶(*Clarias gariepinus*)、虹鳟及黄鳝(*Monopterus albus*)等^[5, 9-10, 12-13], 会以合成无毒的谷氨酰胺的方式从脑组织中将氨释放到血液中, 最后进入肝脏。谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)是氨基酸代谢分解的关键酶之一, 在水生动物体内氨代谢过程中发挥着重要的作用^[14]。

大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)是一种淡水杂食性鱼类, 在东亚地区是一种重要的经济品种, 尤其是在中国和韩国, 其市场需求量一

收稿日期: 2016-09-05; 修订日期: 2016-11-30.

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD25B08, 201BAD25B00); 安徽省高等学校自然科学研究重点项目(KJ2017A130).

作者简介: 张云龙(1989-), 男, 讲师, 博士, 主要从事鱼类增殖研究. E-mail: zhangyunlong@ahau.edu.cn

通信作者: 樊启学(1962-), 教授, 主要从事鱼类增殖及水域生态学研究. E-mail: fanqixue@mail.hzau.edu.cn

直很高^[15-16]。其外形和生态习性均与泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)非常相似,也是一种典型的气呼吸型鱼类,以后肠作为主要的辅助呼吸器官^[17]。在干旱季节,大鳞副泥鳅会钻入湿润的泥土中,可存活数月之久。在这种缺水的情况下,将体内氨排泄至周围水体中将会受到极大限制,必然会造成体内氨含量显著上升。已有研究表明,大鳞副泥鳅在氨或空气暴露下,体组织中可累积相当高浓度的氨,具有很高的氨耐受性^[18],大鳞副泥鳅应对高环境氨(氨暴露)以及体内氨(空气暴露)机制有待进一步研究。因此,本研究旨在确定空气和氨氮暴露条件下大鳞副泥鳅体内 GS、GDH 及谷氨酰胺含量的变化,为大鳞副泥鳅的耐氨机制的研究提供研究资料。

1 材料方法

1.1 实验鱼

实验用大鳞副泥鳅(18~25 g)由武汉市周边的水产市场购买而来。实验鱼运至实验室后暂养于 60 L 的水族箱中,实验开始前暂养 7 d 以上,温度控制为(25.5±1.0)℃。暂养期间内,每天换水,换水量为 30%左右,每个水族箱放置 3 个充氧气石,每天投喂两次商品饲料(粗蛋白 35%,粗脂肪 7%)。实验开始前,实验鱼饥饿 24 h,实验期间不投饵。

1.2 实验设计

1.2.1 氨氮暴露 实验鱼暴露于 30 mmol/L 的 NH₄Cl 溶液中,溶液体积为 10 L,置于体积约为 15 L 的塑料盒(36.5 cm×25.5 cm×16.7 cm)中,以 4 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 为 7.2,实验期间控制温度为(25±1)℃(以实验室中央空调控制室温,实验用水取自 5 个 60 L 的塑料盒中,在室内稳定 24 h 左右,水温与室温基本一致)。实验分别持续 6 h, 12 h, 24 h, 48 h 及 72 h。实验用 NH₄Cl 溶液每隔 24 h 彻底更换 1 次以避免氨挥发造成的影响。以实验开始时(0 h)的大鳞副泥鳅作为对照组。每个暴露时间设置 3 组平行,每个平行 4 尾实验鱼。

1.2.2 空气暴露 将大鳞副泥鳅放置于塑料盒中(36.5 cm×25.5 cm×16.7 cm)作为空气暴露组,塑料盒中装有很薄的一层蒸馏水(100 mL)以保持大

鳞副泥鳅体表湿润,实验期间控制温度为(25±1)℃(以实验室中央空调控制室温)。实验分别持续 6 h, 12 h, 24 h, 48 h 及 72 h。塑料盒中的 100 mL 蒸馏水每隔 8 h 彻底更换 1 次,以确保整个空气暴露阶段的湿度。以实验开始时(0 h)的大鳞副泥鳅作为对照组。每个暴露时间设置 3 组平行,每个平行 4 尾实验鱼。

1.3 取样

每个暴露时间点结束,用 MS-222 彻底麻醉实验鱼之后,每个平行中的所有实验鱼均通过敲击头部致死。随后解剖实验鱼以取得脑、肝脏、肠道及背部肌肉。样品由平行中的 4 尾实验鱼合并而来,样品均保存于-80℃的冰箱中待测。

1.4 样品测定

用于测定 GS 活性的样品解冻后称重,按质量体积比 1:4 加入配置好的提取缓冲液,以玻璃匀浆器在 4℃ 条件下匀浆。随后在 4℃ 下,离心力 10000 g 离心 20 min,取上清液,即为粗酶液。GS 测定方法如下:1.6 mL 反应混合液 B,加入 0.7 mL 粗酶液和 0.7 mL ATP 溶液,混匀,于 37℃ 下保温 30 min,加入显色剂 1 mL,摇匀并放置片刻后,于 5000 g 下离心 10 min,取上清液测定 540 nm 处的吸光值,以加入 1.6 mL 反应混合液 A 的为对照。GS 活性= $A/(P \times V \times T)$,单位为 μmol/min g 组织。以新配置的谷氨酸单异羟肟酸溶液作为标准品制备标准曲线。其中, A 为 540 nm 吸光度下谷氨酸单异羟肟酸的含量(μmol), P 为粗酶液中组织含量(g/mL), V 为反应体积(mL), T 为反应时间(min)。

其中各种试剂配置方法如下。提取缓冲液:0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 内含 2 mmol/L Mg²⁺, 2 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT), 0.4 mol/L 蔗糖。称取 Tris 1.5295 g, 0.1245 g MgSO₄·7H₂O, 0.1543 g DTT 和 34.25 g 蔗糖,去离子水溶解后,用 0.05 mol/L HCl 调至 pH 8.0,最后定容至 250 mL; 反应混合液 A: 内含 80 mmol/L Mg²⁺, 20 mmol/L 谷氨酸钠盐, 20 mmol/L 半胱氨酸和 2 mmol/L EGTA, 称取 3.0590 g Tris, 4.9795 g MgSO₄·7H₂O, 0.8628 g 谷氨酸钠盐, 0.6057 g 半胱氨酸, 0.1920 g EGTA, 去离子水溶解后,用 0.1 mol/L HCl 调至 pH 7.4, 定容至 250 mL; 反应混合液 B: 反应混合液 A 的成分

再加入 80 mmol/L 盐酸羟胺, pH 7.4; 显色剂: 3.3176 g TCA, 10.1021 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 去离子水溶解后, 加 5 mL 浓盐酸, 定容至 100 mL; ATP 溶液: 0.1210 g ATP 溶于 5 mL 去离子水中(临用前配制)。

GDH 活性通过商业试剂盒(no. A125, 南京建成生物工程研究所)测定, 定义每克组织每分钟消耗 1 μmol 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(reduced form of nicotinamide-adenine dinucleotide, NADH) 为一个酶活力单位, 反应温度为常温, 检测波长为 340 nm。组织谷氨酰胺含量也以商业试剂盒(no. A073, Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, China)测定, 反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 630 nm, 单位为 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 。

1.5 数据分析

所有数据均以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示, 数据分析以 SPSS 18.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA)进行。Levene's 检验进行方差同质性检验,

单因素方差分析结果显著性, 如果显著则进行 Duncan's 多重比较。显著性水平为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 组织谷氨酰胺含量

不同时间氨氮和空气暴露后, 大鳞副泥鳅肌肉和肝脏组织中谷氨酰胺含量的变化如图 1 所示。从图中可看出大鳞副泥鳅暴露于 30 mmol/L NH_4Cl 溶液和空气中时, 暴露时间均显著影响其肌肉组织中谷氨酰胺含量。与对照组相比, 暴露 12 h 后, 大鳞副泥鳅肌肉组织中的谷氨酰胺含量有明显累积的趋势($P<0.05$)。大鳞副泥鳅在 30 mmol/L NH_4Cl 溶液中暴露 48 h 后, 其肌肉组织中谷氨酰胺含量上升为对照组的 2.5 倍; 空气暴露 48 h 后, 大鳞副泥鳅肌肉组织中谷氨酰胺含量上升为对照组的 3.0 倍。不同时间氨和空气暴露后, 大鳞副泥鳅肝脏组织中谷氨酰胺含量也表现出与肌肉中相似的变化趋势。随着暴露时间的延长, 大鳞副泥鳅肝

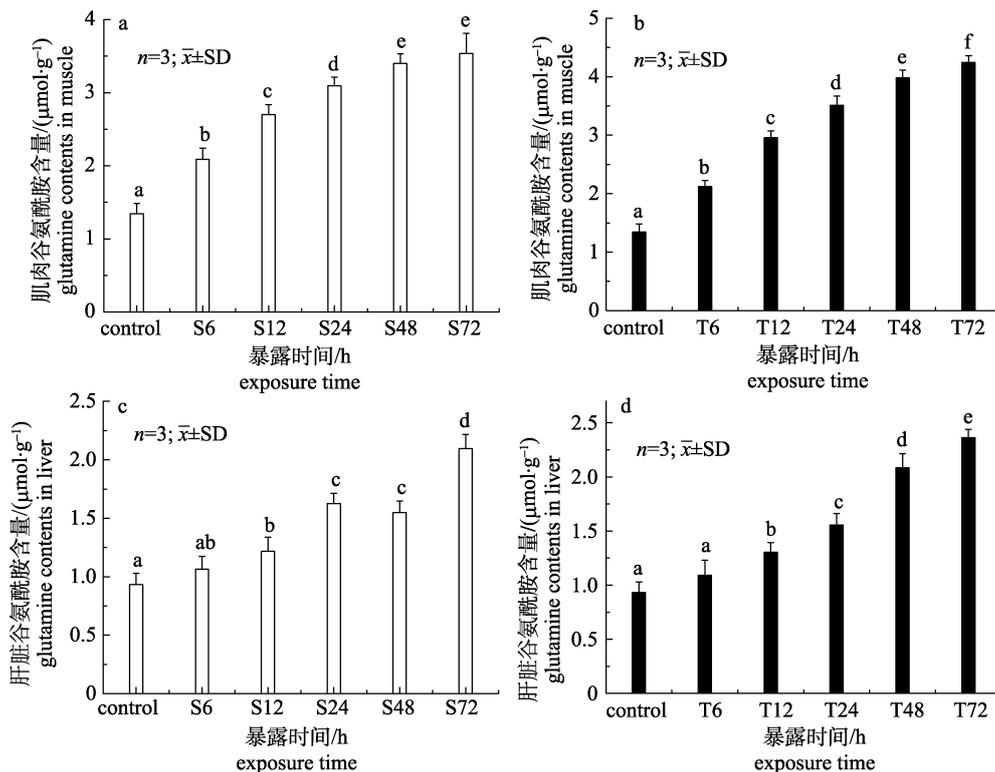


图 1 大鳞副泥鳅暴露于 30 mmol/L NH_4Cl 溶液(a, c)和空气(b, d)中肌肉(a, b)和肝脏(c, d)组织中谷氨酰胺含量变化不同上标表示显著差异($P<0.05$). S: 氨氮暴露; T: 空气暴露。

Fig. 1 Glutamine contents in muscle (b, d) and liver (c, d) of *Paramisgurnus dabryanus* exposed to 30 mmol/L NH_4Cl solution (a, c) and air (b, d)

The different superscripts are statistical difference ($P<0.05$). S: submerged in 30 mmol/L NH_4Cl solution; T: terrestrial exposure.

脏组织中的谷氨酰胺含量也显著升高($P<0.05$), 30 mmol/L NH_4Cl 溶液暴露大鳞副泥鳅 72 h 后, 其肝脏组织中谷氨酰胺含量上升为对照组的 2.2 倍, 空气暴露 72 h 后, 大鳞副泥鳅肌肉组织中谷氨酰胺含量上升为对照组的 2.5 倍。由此可见, 空气和氨暴露会导致大鳞副泥鳅组织中谷氨酰胺的累积。

2.2 组织谷氨酰胺合成酶活性变化

图 2 表示大鳞副泥鳅暴露于氨和空气中不同时间后, 其脑、肝脏和肠道组织中谷氨酰胺合成酶活性的变化。大鳞副泥鳅暴露于 30 mmol/L NH_4Cl 溶液中时, 暴露时间显著影响其脑组织中

谷氨酰胺合成酶活性, 暴露 48 h 后, 谷氨酰胺合成酶活性上升比较明显, 在 72 h 时达到最大值, 为对照组的 2.6 倍(图 2a)。大鳞副泥鳅暴露于空气中时也具有相类似的变化趋势, 空气暴露大鳞副泥鳅 6 h, 12 h 以及 24 h 后, 其脑组织中谷氨酰胺合成酶活性虽然显著高于对照组($P<0.05$), 但不同暴露时间之间却并没有显著性差异($P>0.05$), 直至暴露 48 h 后才显著上升($P<0.05$), 暴露 72 h 后谷氨酰胺合成酶活性上升为对照组的 2.7 倍($P<0.05$)。大鳞副泥鳅暴露于 30 mmol/L NH_4Cl 溶液和空气中, 其肝脏组织谷氨酰胺合成酶活性的变化趋势非常类似, 大鳞副泥鳅在氨氮和空气暴露

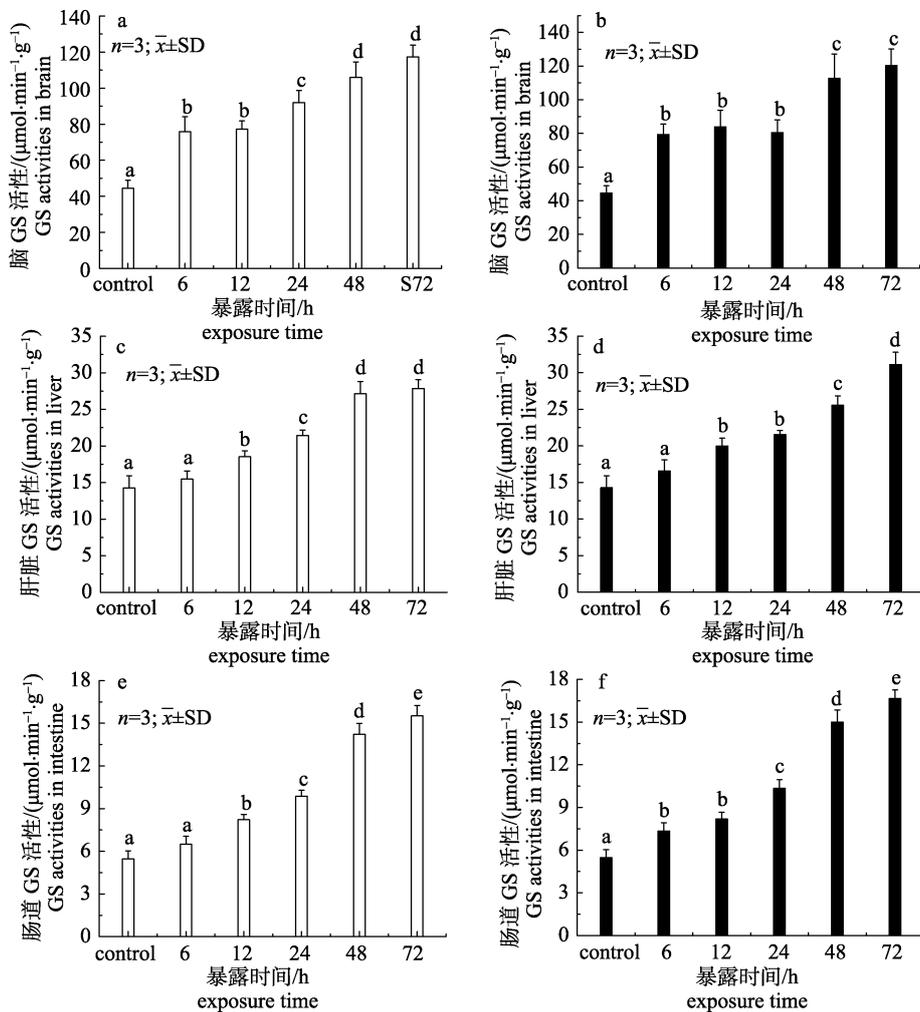


图 2 大鳞副泥鳅暴露于 30 mmol/L NH_4Cl 溶液(a, c, e)和空气(b, d, f)中 0 h (control), 6 h, 12 h, 24 h, 48 h 及 72 h 后脑(a, b)、肝脏(c, d)和肠道(e, f)组织中谷氨酰胺合成酶活性的变化
不同上标表示显著差异($P<0.05$)。

Fig. 2 Glutamine synthetase activities in brain (a, b), liver (c, d) and intestine (e, f) of *Paramisgurnus dabryanus* exposed to 30 mmol/L NH_4Cl solution (a, c, e) and air (b, d, f) for 0 (control), 6, 12, 24, 48 and 72 h
The different superscripts are statistical difference ($P<0.05$).

的前 24 h 内均表现为缓慢增加的趋势, 在暴露 48 h 后开始显著上升, 30 mmol/L NH_4Cl 溶液和空气暴露 72 h 后大鳞副泥鳅肝脏组织谷氨酰胺合成酶活性分别上升为对照组的 2.0 和 2.2 倍(图 2c, 2d)。而大鳞副泥鳅暴露于 30 mmol/L NH_4Cl 溶液和空气中, 其肠道组织谷氨酰胺合成酶活性的变化趋势也与肝脏中较为类似, 暴露 24 h 后, 暴露时间显著影响大鳞副泥鳅肠道组织中谷氨酰胺合成酶的活性($P < 0.05$), 大鳞副泥鳅在氨氮和空气暴露的前 24 h 内均表现为缓慢增加的趋势, 在暴露 48 h 后开始显著上升, 30 mmol/L NH_4Cl 溶液和空气暴露 72 h 后大鳞副泥鳅肠道组织谷氨酰胺合成酶活性分别上升为对照组的 2.8 和 3.0 倍(图 2e, 2f)。

2.3 组织谷氨酰胺脱氢酶活性变化

大鳞副泥鳅暴露于氨和空气中不同时间后, 其脑、肝脏和肠道组织中谷氨酰胺脱氢酶活性的变化见表 1。大鳞副泥鳅暴露于 30 mmol/L NH_4Cl 溶液中时, 暴露时间(24 h 后)对其脑组织中谷氨酰胺脱氢酶活性具有显著影响, 暴露 24 h 后, 大鳞副泥鳅脑组织中谷氨酰胺脱氢酶活性显著高于其他组($P < 0.05$), 上升为对照组的 1.7 倍。相似地, 暴

露于空气中时, 暴露时间(24 h 之后)也对大鳞副泥鳅脑组织中谷氨酰胺脱氢酶活性具有显著影响。暴露的前 48 h 内, 随着暴露时间的延长, 其脑组织中谷氨酰胺脱氢酶活性也上升, 并且在暴露 48 h 后达到最大值, 为对照组的 1.5 倍。然而, 暴露时间却对暴露于 30 mmol/L NH_4Cl 溶液和空气中大鳞副泥鳅肝脏组织中谷氨酰胺脱氢酶活性并没有显著性影响($P > 0.05$)。暴露于 30 mmol/L NH_4Cl 溶液和空气中大鳞副泥鳅肠道组织中谷氨酰胺脱氢酶活性随着暴露时间的延长具有相似的变化趋势, 均随着暴露时间的延长缓慢上升, 而且均在暴露 24 h 后达到最大值, 分别为对照组的 1.27 倍和 1.31 倍。

3 讨论

在鱼体内, GS 可催化谷氨酸和 NH_4^+ 合成谷氨酰胺, 而谷氨酸则是由 GDH 催化 α -酮戊二酸和 NH_4^+ 合成的。而谷氨酰胺的合成来源于谷氨酸还是 α -酮戊二酸主要是由细胞内 GS 活性决定的^[2]。通常来说, 鱼类肌肉中 GS 活性是很低的^[19], 但对于一些气呼吸型鱼类, 在空气暴露或氨暴露条件下, 却可在大脑、肝脏及肌肉中将氨代谢为谷氨酰胺。这些气呼吸型鱼类的肝脏、肌肉及肠道组织中均可检出较高的 GS 活性^[20]。以谷氨酰胺的形式应对较高的体内氨氮含量具有其特定的优势, 谷氨酰胺可贮存于机体中, 当环境条件改善后, 这些谷氨酰胺可用于合成嘌呤、嘧啶及黏多糖等用于机体生理活动^[2]。

本研究中, 大鳞副泥鳅暴露于 30 mmol/L NH_4Cl 溶液和空气, 随着暴露时间的延长, 大鳞副泥鳅肝脏和肌肉组织中的谷氨酰胺含量有明显累积的趋势, 说明大鳞副泥鳅可通过体组织中累积谷氨酰胺来应对体内氨浓度的上升。随着水生动物体内氨浓度的上升, 谷氨酰胺在体内累积的现象是非常常见的。如云斑尖塘鳢(*Oxyeleotrisma-rnorata*)在空气中暴露 72 h 后, 其体内氨排泄速率明显降低, 而肌肉中谷氨酰胺含量却上升为对照组的 3 倍^[21]。空气暴露黄鳝 72 h 后, 其肌肉中谷氨酰胺含量上升为对照组的 4.5 倍, 肝脏中上升为对照组的 36 倍, 脑组织中上升为对照组的 4

表 1 氨和空气暴露对大鳞副泥鳅体组织中谷氨酰胺脱氢酶活性的影响

Tab. 1 Effect of ammonia and aerial exposure on tissue glutamate dehydrogenase activities in *Paramisgurnus dabryanus*
 $n = 3; \bar{x} \pm \text{SD}$

处理 treatment	暴露时间/h exposure time	GDH 活性/ $[\mu\text{mol}(\text{NADH}) \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}]$ GDH activity		
		脑 brain	肝脏 liver	肠道 intestine
氨暴露 ammonia exposure	0	8.39±0.50 ^a	6.58±0.45	1.06±0.07 ^a
	6	8.55±0.43 ^a	6.53±0.51	1.19±0.08 ^{ab}
	12	10.08±1.27 ^a	6.62±0.58	1.28±0.07 ^b
	24	13.92±1.91 ^b	6.55±0.52	1.35±0.09 ^b
	48	10.14±1.30 ^a	6.52±0.40	1.31±0.13 ^b
	72	9.47±0.82 ^a	6.65±0.41	1.32±0.09 ^b
空气暴露 aerial exposure	0	8.39±0.50 ^{ab}	6.58±0.45	1.06±0.07 ^a
	6	8.08±0.61 ^a	6.52±0.47	1.23±0.08 ^b
	12	9.52±0.48 ^{abc}	6.59±0.62	1.33±0.05 ^{bc}
	24	10.47±1.27 ^c	6.62±0.52	1.39±0.09 ^c
	48	12.74±1.72 ^d	6.60±0.44	1.34±0.12 ^{bc}
	72	10.06±0.83 ^{bc}	6.65±0.55	1.35±0.08 ^{bc}

注: 同列不同上标表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different superscripts in same column are statistical difference ($P < 0.05$).

倍^[22]。空气暴露 48 h 后泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)大脑、肌肉以及肝脏中谷氨酰胺含量也显著增加^[23]。类似的现象还可见于多种水生动物中,如中华乌塘鳢(*Bostrychus sinensis*)^[24]、虹鳟^[13]、仿刺参(*Apostichopus japonicus*)^[25]等,这些结果表明,以谷氨酰胺形式应对体内氨累积似乎在水生动物中普遍存在。本研究结果表明,大鳞副泥鳅在体外氨(氨暴露)或体内氨(空气暴露)累积的情况下可刺激体内谷氨酰胺的合成,将氨转化为无毒性的谷氨酰胺。

一些鱼类在高氨环境下,其脑组织中 GS 活性^[4]以及其 mRNA^[5, 20]表达量会显著增加。这与本研究结果类似,本研究中,随着暴露时间的延长,暴露于 30 mmol/L NH_4Cl 溶液和空气中的大鳞副泥鳅脑、肝脏和肠道组织中 GS 活性均显著上升。GS 可催化谷氨酸和 NH_4^+ 合成谷氨酰胺,这也解释了本研究中谷氨酰胺含量和 GS 活性同时上升的现象。通常来说,鱼类肌肉中 GS 活性是很低的^[19],但其在鱼类大脑降解氨氮毒性中起到了重要的作用,如海湾豹蟾鱼、尖齿胡鲶、虹鳟及黄鳝等^[5, 9-10, 12-13],谷氨酰胺合成后会从各组织中作为一种无毒的氨代谢物释放到血液中,最后进入肝脏中。

GDH 可催化 α -酮戊二酸和 NH_4^+ 合成谷氨酸,肝脏是谷氨酸代谢的主要场所,因此肠道通过 GDH 胺化作用合成谷氨酰胺转运至肝脏中是非常必要的^[26]。此外,过量的游离氨基酸并不会用于合成蛋白质,且会在一些必要的生理活动中代谢产生氨。因此,肠道和肝脏在鱼类以谷氨酰胺形式进行氨氮解毒的过程中是互相协作的关系。本研究中,30 mmol/L NH_4Cl 溶液和空气暴露显著影响大鳞副泥鳅脑和肠道组织中 GDH 活性,但对肝脏组织中 GDH 活性并没有显著性影响。在云斑尖塘鳢^[27]和中华乌塘鳢^[28]中,也在氨暴露和空气暴露下肠道中 GDH 活性显著上升的报道,其结果认为肠道 GDH 在鱼类应对氨氮毒性中起到了比肠道 GS 更加重要的作用。而大鳞副泥鳅肝脏组织中 GDH 活性并不受氨氮和空气暴露的影响,也并未因为肝脏组织中 GS 活性和谷氨酰胺含量上升而变化,这可能是由于肝脏组织中转

氨酶催化生成了足量的谷氨酸,如谷丙转氨酶和谷草转氨酶等^[25, 29]。

随着 NH_4Cl 溶液和空气暴露时间的延长,大鳞副泥鳅肝脏和肌肉组织中的谷氨酰胺含量有明显累积的趋势,脑、肝脏和肠道组织中谷氨酰胺合成酶活性均显著上升,说明了大鳞副泥鳅可通过体组织累积无毒性的谷氨酰胺来应对体内有毒的氨浓度的上升。30 mmol/L NH_4Cl 溶液和空气暴露显著影响大鳞副泥鳅脑和肠道组织中 GDH 活性,但对肝脏组织中 GDH 活性并没有显著性影响。肠道中 GDH 活性显著上升,可能其在鱼类应对氨氮毒性中起到了比肠道 GS 更加重要的作用。而大鳞副泥鳅肝脏组织中 GDH 活性并不受氨氮和空气暴露的影响,这可能是由于肝脏组织中转氨酶催化生成了足量的谷氨酸。本研究提供了氨和空气暴露下大鳞副泥鳅体组织中谷氨酰胺含量,GS、GDH 活性的变化,丰富了大鳞副泥鳅耐氨机制研究的基础资料,后续的研究应该从更深入的角度(分子和细胞水平)探讨其特定的耐氨策略及相关作用机制。

参考文献:

- [1] Ip Y K, Chew S F. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review[J]. *Front Physiol*, 2010, 1(1): 134.
- [2] Chew S F, Ip Y K. Excretory nitrogen metabolism and defence against ammonia toxicity in air-breathing fishes[J]. *J Fish Biol*, 2014, 84(3): 603-638.
- [3] Randall D J, Tsui T K N. Ammonia toxicity in fish[J]. *Mar Pollut Bull*, 2002, 45(1/12): 17-23.
- [4] Wang X, Walsh P J. High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididea (Toadfish and Midshipmen)[J]. *Aquat Toxicol*, 2000, 50(3): 205-219.
- [5] Wright P A, Steele S L, Hvittema A, et al. Introduction of four glutamine synthetase genes in brain of rainbow trout in response to elevated environmental ammonia[J]. *J Exp Biol*, 2007, 210(16): 2905-2911.
- [6] Suárez I, Bodega G, Fernández B. Glutamine synthetase in brain: effects of ammonia[J]. *Neurochem Int*, 2002, 41(2/3): 123-142.
- [7] Wicks B J, Randall D J. The effect of sub-lethal ammonia exposure on fed and unfed rainbow trout: the role of glutamine in regulation of ammonia[J]. *Comp Biochem Physiol A*,

- 2002, 132(2): 275–285.
- [8] Ip Y K, Tay A S L, Lee K H, et al. Strategies for surviving high concentrations of environmental ammonia in the swamp eel *Monopterus albus*[J]. *Physiol Biochem Zool*, 2004, 77(3): 390–405.
- [9] Veauvy C M, McDonald M D, van Audekerke J, et al. Ammonia affects brain nitrogen metabolism but not hydration status in the Gulf toadfish (*Opsanus beta*)[J]. *Aquat Toxicol*, 2005, 74(1): 32–46.
- [10] Wee N L J, Tng Y Y M, Cheng H T, et al. Ammonia toxicity and tolerance in the brain of the African sharptooth catfish, *Clarias gariepinus*[J]. *Aquat Toxicol*, 2007, 82(3): 204–213.
- [11] Walsh P J, Veauvy C M, McDonald M D, et al. Piscine insights into comparisons of anoxia tolerance, ammonia toxicity, stroke, and hepatic encephalopathy[J]. *Comp Biochem Physiol A*, 2007, 147(2): 332–343.
- [12] Tng Y Y M, Chew S F, Wee N L J, et al. Acute ammonia toxicity and the protective effects of methionine sulfoximine on the swamp eel, *Monopterus albus*[J]. *J Exp Zool A*, 2009, 311(9): 676–688.
- [13] Sanderson L A, Wright P A, Robinson J W, et al. Inhibition of glutamine synthetase during ammonia exposure in rainbow trout indicates a high reserve capacity to prevent brain ammonia toxicity[J]. *J Exp Biol*, 2010, 213(13): 2343–2353.
- [14] Zhou F L, Chen J S, Huang J H, et al. Molecular cloning and expression analysis of glutamate dehydrogenase (*GDH*) in *Penaeus monodon* under ammonia nitrogen stress[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(6): 1236–1246. [周发林, 陈劲松, 黄建华, 等. 斑节对虾谷氨酸脱氢酶基因克隆及氨氮胁迫对其时空表达的影响[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(6): 1236–1246.]
- [15] Zhang Y L, Hu W H, Wu Q W, et al. Ontogenetic changes in RNA, DNA and protein contents of Chinese loach, *Paramisgurnus dabryanus* (Dabry de Thiersant, 1872), larvae and juveniles[J]. *J Appl Ichthyol*, 2015, 31(5): 876–882.
- [16] Zhang Y L, Wu Q W, Hu W H, et al. Changes in digestive enzyme activities during larval development of Chinese loach *Paramisgurnus dabryanus* (Dabry de Thiersant, 1872) [J]. *Fish Physiol Biochem*, 2015, 41(6): 1577–1585.
- [17] Zhang Y, Wu Q, Hu W, et al. Morphological changes and allometric growth in hatchery-reared Chinese loach *Paramisgurnus dabryanus* (Dabry de Thiersant, 1872)[J]. *Chin J Oceanol Limnol*, 2016, 34(4): 757–762.
- [18] Zhang Y L, Zhang H L, Wang L Y, et al. Changes of ammonia, urea contents and transaminase activity in the body during aerial exposure and ammonia loading in Chinese loach *Paramisgurnus dabryanus*[J]. *Fish Physiol Biochem*, 2017, 43(2): 631–340.
- [19] Mommsen T P, Walsh P J. Biochemical and environmental perspectives on nitrogen metabolism in fishes[J]. *Experientia*, 1992, 48(6): 583–593.
- [20] Anderson P M, Broderius M A, Fong K C, et al. Glutamine synthetase expression in liver, muscle, stomach and intestine of *Bostrichyths sinensis* in response to exposure to a high exogenous ammonia concentration[J]. *J Exp Biol*, 2002, 205(14): 2053–2065.
- [21] Jow L Y, Chew S F, Lim C B, et al. The marble goby *Oxyeleotris marmorata* activates hepatic glutamine synthetase and detoxifies ammonia to glutamine during air exposure[J]. *J Exp Biol*, 1999, 202(3): 237–245.
- [22] Tay A S L, Chew S F, Ip Y K. The swamp eel *Monopterus albus* reduces endogenous ammonia production and detoxifies ammonia to glutamine during 144 h of aerial exposure[J]. *J Exp Biol*, 2003, 206(14): 2473–2486.
- [23] Chew S F, Jin Y, Ip Y K. The loach *Misgurnus anguillicaudatus* reduces amino acid catabolism and accumulates alanine and glutamine during aerial exposure[J]. *Physiol Biochem Zool*, 2001, 74(2): 226–237.
- [24] Ip Y K, Chew S F, Leong I W A, et al. The sleeper *Bostrichyths sinensis* (Family Eleotridae) stores glutamine and reduces ammonia production during aerial exposure[J]. *J Comp Physiol B*, 2001, 171(5): 357–367.
- [25] Wang G, Pan L, Ding Y. Defensive strategies in response to environmental ammonia exposure of the sea cucumber *Apostichopus japonicus*: Glutamine and urea formation[J]. *Aquaculture*, 2014, 432(20): 278–285.
- [26] Campbell J W. Excretory nitrogen metabolism[M]//Prosser C L. *Environmental and Metabolic Animal Physiology. Comparative Animal Physiology*. 4th ed. New York: Wiley-Interscience, 1991: 277–324.
- [27] Tng Y Y M, Wee N L J, Ip Y K, et al. Postprandial nitrogen metabolism and excretion in juvenile marble goby, *Oxyeleotris marmorata* (Bleeker, 1852)[J]. *Aquaculture*, 2008, 284(1/4): 260–267.
- [28] Peh W Y X, Chew S F, Ching B Y, et al. Roles of intestinal glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in environmental ammonia detoxification in the euryhaline four-eyed sleeper, *Bostrychus sinensis*[J]. *Aquat Toxicol*, 2010, 98(1): 91–98.
- [29] Sinha A K, Giblen T, Abdelgawad H, et al. Regulation of amino acid metabolism as a defensive strategy in the brain of three freshwater teleosts in response to high environmental ammonia exposure[J]. *Aquat Toxicol*, 2013, 130/131(15): 86–96.

Changes to tissue glutamine content, glutamine synthetase, and glutamate dehydrogenase activities during ammonia and aerial exposure in Chinese loach (*Paramisgurnus dabryanus*)

ZHANG Yunlong¹, ZHANG Hailong², WANG Lingyu², GU Beiyi², FAN Qixue²

1. College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

2. College of Fishery, Huazhong Agricultural University; Key Lab of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Wuhan 430070, China

Abstract: Chinese loaches (body weight: 18–25 g) were exposed to 30 mmol/L NH₄Cl solution and air (exposure time: 0, 6, 12, 24, 48, 72 h) to assess changes in tissue glutamine content, glutamine synthetase (GS) activity, and glutamate dehydrogenase (GDH) activity during ammonia loading and aerial exposure. Glutamine accumulation in liver and muscle, as well as GS activity in the brain, liver, and intestine, were observed with increasing duration of ammonia and aerial exposure. In all analyzed tissue except the liver, GDH activity was significantly affected by ammonia and aerial exposure. Our results suggested that Chinese loaches respond to internal ammonia increase through glutamine accumulation. Glutamine synthetase then stimulates the glutamine formation pathway and converts ammonia into non-toxic glutamine. The marked increase of GDH activity in the intestines demonstrated that intestinal GDH is more important than intestinal GS in the overall defense against ammonia toxicity. Across the exposure period, variation in liver GDH activity was not affected by ammonia and air, nor associated with a concomitant increase in GS activity and glutamine content that probably occurred due to efficient glutamine replenishment via transaminase action.

Key words: *Paramisgurnus dabryanus*; glutamine; ammonia exposure; aerial exposure

Corresponding author: FAN Qixue. E-mail: fanqixue@mail.hzau.edu.cn