

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.19138

急性铜胁迫对暗纹东方鲀组织铜积累、氧化应激、消化酶、组织病变及脂代谢相关基因表达的影响

王涛^{1,2}, 王玮², 陈同庆², 夏小雨², 缪金晗², 张红燕², 尹绍武^{1,2}

1. 南京师范大学, 海洋科学与工程学院, 江苏 南京 210023;

2. 南京师范大学, 生命科学学院, 江苏 南京 210023

摘要: 通过 96 h 急性毒性实验研究水体铜暴露对暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)生理生化及脂代谢相关基因表达的影响。实验设置对照组、0.1 mg/L 和 0.2 mg/L (96-h LC₅₀) 3 个铜处理组。结果表明, 铜在暗纹东方鲀肝、肌肉和全鱼中的积累量随着处理浓度的提高而提高。同等浓度处理下, 铜的积累量为肝脏>全鱼>肌肉。随着铜处理浓度的提高, 肝脏中丙二醛(MDA)含量及抗氧化酶活性[谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX), 总超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)]显著上升。急性铜暴露诱发肝脏血细胞沉积以及血窦扩张的症状。在鳃中, 诱发上皮细胞增生, 顶部棒状以及产生动脉瘤等症状。急性铜胁迫后, 暗纹东方鲀肠道中的淀粉酶活性显著上升, 但脂肪酶活性显著下降。在肝脏中, 随着处理浓度的提高, 淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶活性显著降低。在 0.1 mg/L 处理组, 脂肪合成相关基因(*G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*Fas* 和 *Acc*)的表达量最高。但在 0.2 mg/L 处理组中, 脂肪分解相关基因(*HSL* 和 *CPT 1*)的表达最高。急性铜胁迫后对转运因子 *PPARα* 的影响不显著, 但转运因子 *PPARγ* 的表达量显著上升。本实验表明铜对暗纹东方鲀生理生化指标及脂代谢相关基因的表达均产生显著影响, 本研究为暗纹东方鲀养殖过程中铜的合理使用提供有益的指导价值, 也为生产中更好地监控重金属污染提供一定的技术指标参考。

关键词: 暗纹东方鲀; 铜; 积累; 氧化应激; 消化酶; 组织病变; 脂代谢

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)06-1144-09

暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)俗称河鲀, “长江三鲜”之一, 是一种营养丰富、经济价值很高的硬骨鱼类, 在中国主要分布于渤海、东海、黄海及通海的江河中下游^[1-5]。暗纹东方鲀在中国养殖和食用广泛, 其养殖基地主要分布在江苏、广东、上海、福建等一些省份^[6]。根据河鲀产业调研报告(2017), 我国暗纹东方鲀的养殖年产量超过 5 万 t, 河鲀养殖年产值在 10 亿~20 亿元^[7]。暗纹东方鲀作为中国重要的养殖鱼类之一, 具有广阔的开发和利用前景。

目前, 随着工农业大量的污染物排放到海洋和河口中之含铜药物在水产养殖过程中大量

的不规范使用, 致使养殖水体铜污染现象时有发生, 且已经严重威胁了水产养殖业的健康可持续发展^[7-8]。研究表明铜是鱼类所必须的微量元素之一, 可作为细胞色素氧化酶、过氧化物歧化酶等酶的辅助因子广泛参与到鱼体内的许多生理生化过程中^[9-10], 但过量的铜会对鱼类产生毒害作用。当前, 国内外有关水体铜暴露对鱼类的毒性作用及其机理已成为许多学者研究的重点和热点之一, 而且也已取得了诸多的研究成果。如华中农业大学的罗智教授系统地研究了铜暴露对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)脂代谢的影响, 揭示了铜对黄颡鱼脂质代谢的调控机制以及内质网对于脂肪

收稿日期: 2019-05-07; 修订日期: 2019-06-14.

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金(BK20180728); 国家自然科学基金青年基金(31800436).

作者简介: 王涛(1989-), 男, 博士, 讲师, 主要从事鱼类逆境机制研究. E-mail: seawater88@126.com

通信作者: 尹绍武, 教授, 博士生导师, 主要从事鱼类遗传育种研究. E-mail: yinshaowu@163.com

代谢的重要作用^[11]。杨志彪等^[12]以中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)为实验对象探究水体铜对中华绒螯蟹消化酶的影响,得出水体铜对脂肪酶有诱导作用,对类胰蛋白酶/胃蛋白酶/淀粉酶和纤维素酶活力有抑制作用。近年来国外学者也相继研究了铜暴露对鱼类的毒性作用,总体归纳为铜暴露能够抑制鱼类的生长、激活抗氧化及免疫系统、诱导细胞凋亡等方面^[9, 13-14]。在暗纹东方鲀养殖业中,铜作为饲料添加剂、杀菌藻剂等被广泛使用,但铜暴露对暗纹东方鲀毒性作用的研究还未见报道。本研究通过急性毒性实验研究水体铜暴露对暗纹东方鲀组织铜积累、氧化应激、消化酶、组织病变及脂代谢相关基因表达的影响,通过本实验揭示铜对暗纹东方鲀的毒性作用,确定铜对暗纹东方鲀的安全浓度,为暗纹东方鲀养殖过程中铜的合理使用提供指导,也为生产中更好地监控重金属污染提供一定的技术指标参考。

1 材料与方法

1.1 水体铜暴露处理

实验用鱼采购自江之源渔业科技有限公司(江苏,镇江)。正式实验之前将其饲养于南京师范大学的自动循环水系统中 14 d,进行驯化。驯化之后,选择生理状态良好、统一规格的暗纹东方鲀 225 尾,进行正式实验。鱼体重为 (7.8 ± 0.4) g,体长为 (6.7 ± 0.1) cm。将其随机平均分配到 9 个缸中(25 尾/缸,100 L)。根据前期预实验水体铜对暗纹东方鲀的 96 h 的半数致死浓度(96-h LC_{50})为 0.2 mg/L。实验设置对照组、0.1 mg/L (50% 96-h LC_{50})和 0.2 mg/L (96-h LC_{50})3 个处理组,每个处理组设 3 个重复。本实验以硫酸铜($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 分析纯)作为铜源,溶解在超纯水中配置成浓度为 1 g Cu/L 的母液,通过准确加入适当体积的母液到养殖水体中,使离子铜的终浓度分别达到设置水平。实验进行 96 h,每天每缸换 100%预配好的含离子铜的水。养殖期间水体温度为 $(27.3 \pm 0.8)^\circ C$,pH 7.2,持续曝气使水体中溶解氧 >5 mg/L。

1.2 样品采集

取样前每缸随机选取 3 条活鱼,用 10 mg/L MS-222 进行麻醉,迅速在冰上解剖,取出肝和肠

组织,并用生理盐水(0.8%, 4℃)冲净血渍。将肝和肠的样本放置于 $-80^\circ C$ 冰箱保存,用于酶活及脂代谢相关基因表达的测定。实验结束后,每缸再取 3 尾鱼,取出肝、肌肉及剩余组织保存于 $-20^\circ C$ 冰箱用于铜积累分析。将每缸剩余的鱼取出,迅速在冰上解剖,剪下肝小叶、左二鳃弓,并用 4% 多聚甲醛固定液进行固定,放置于 4℃ 保存,用于组织切片等分析。

1.3 组织铜含量的测定

将冷冻样品取出,烘干至恒重。准确称取干重 0.1 g,加 2 mL 浓硝酸(优级纯),采用微波消解法消解,消化条件为 $220^\circ C$, 30 min,消化完全后定容至 10 mL。电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-OES, Optima 7000, PerkinElmer, 美国)测定不同组织中铜含量,结果以每克组织干重所含铜的微克数表示($\mu g/g$)。

1.4 组织切片的病理学观察

病理学观察采用苏木精—伊红染色法(HE 染色法)观察。将固定好的组织在乙醇中脱水,经二甲苯透明后,将组织用石蜡包埋,并使之冷却凝固成块,在切片机上进行切片,切片厚度为 5~7 μm 。切片用苏木精溶液、酒精伊红染料进行染色,染色后切片经酒精脱水,再经二甲苯使切片透明,最后用树胶封片。在光学显微镜(Nikon Eclipse TE2000-U, NIKON, Japan)下拍照观察组织结构和细胞形态。

1.5 酶活性测定

1.5.1 抗氧化酶活性测定 准确称取适量的组织,按重量体积比加入 9 倍体积的浓度为 8.6 g/L 的生理盐水(经 4℃ 预冷)后立即进行冰浴匀浆。匀浆结束后,将匀浆液于 4℃ 下 850 g 离心 10 min,收集上清液。上清液收集完毕后,测定肝中的丙二醛(MDA)含量,以及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、总超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性。

氧化指标 MDA、GSH-PX、SOD 和 CAT 的测定采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定^[15]。具体方法见试剂盒说明书。MDA 单位定义为:每毫克组织蛋白中含 MDA 的纳摩尔数。GSH-PX 酶活力定义为:每毫克蛋白质,每分钟扣除非酶反应的作用,使反应体系中 GSH 浓度降低 1 $\mu mol/L$

为 1 个酶活力单位。SOD 酶活力定义为: 每毫克组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为 1 个酶活力单位。CAT 酶活力定义为: 每毫克组织蛋白酶分解 1 μmol H_2O_2 的量为 1 个酶活力单位。匀浆液蛋白含量的测定采用 Bradford 的方法^[16]。

1.5.2 消化酶活性测定 蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活性的测定均采用试剂盒的方法(购自南京建成生物工程研究所, 江苏, 南京)。具体方法见试剂盒说明书。蛋白酶活力单位定义: 在 37℃, pH 为 8.0 条件下, 每毫克蛋白中含有的胰蛋白酶每分钟使吸光度变化 0.003, 即为 1 个酶活力单位。脂肪酶活力单位定义为: 在 37℃条件下, 每毫升酶液在反应体系中与底物反应 1 min, 每消耗 1 mmol 底物为 1 个酶活力单位。淀粉酶活力单位定义: 组织中每毫克蛋白在 37℃, pH 为 7.0 条件下与底物作用 30 min, 水解 10 mg 淀粉定义为 1

个淀粉酶活力单位。蛋白含量的测定采用 Bradford 的方法^[16]。

1.6 肝脏脂代谢相关基因的表达

参照我们近期发表的文章^[17], 采用实时荧光定量 PCR (qPCR)方法检测, 荧光定量引物见表 1。qPCR 反应体系为 20 μL , 其中上下游引物各 1 μL , cDNA 4 μL , SYBR Green 10 μL , RNase free H_2O 4 μL 。反应参数为: 95℃预变性 30 s, 95℃变性 5 s, 62℃变性 20 s, 40 个循环。选用 18S RNA 作为内参基因进行标准化, 相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算^[18]。

1.7 数据分析

实验数据采用 Microsoft Excel 2016 进行统计和作图, 采用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析和 Tukey 多重比较检验不同处理的均值差异, 显著水平为 $P<0.05$ 。数据以平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SE, $n=3$)表示。

表 1 暗纹东方鲀脂代谢相关基因的荧光定量 PCR 引物
Tab. 1 Primers used for qPCR analysis of genes related to lipid metabolism

基因 genes	正向引物(5'-3') forward primer	反向引物(5'-3') reverse primer
<i>6PGD</i>	CGGGAGAGCCTTGTTGTGAT	CCGTCTTGTTCCAGTCGTCA
<i>G6PD</i>	CTCACCTTCAAGGAGCCGTT	GGGCTATACGCTTCAGGACC
<i>Fas</i>	GCAGCTTCTTTGGCGTTCA	TCTGATCCACTCACCCCGAT
<i>Acc</i>	GTGAAAATCCCGACGAGGGT	CCACGAGAAACAGTGTCCGA
<i>LPL</i>	CCTGCTGGGTTACAGTCTGG	CCCCGTTGGGGTAAATGTCA
<i>HSL</i>	CGTGTGTGAGGAAAATGCCG	ACCACCTTGACTAACGAGCG
<i>CPT 1</i>	CTTCATCCAGATTGCGCTGC	AACAAACGCCTGCACACATC
<i>PPAR α</i>	GTCAATGACTACCCGCCCTC	AGCTTCAGACGGATAGTGCG
<i>PPAR γ</i>	GTAACCAGGACTCGGTGTGG	GATCTCCGATTGGTTCGCTGT
<i>18s RNA</i>	AGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTC	AGTGGGGTTTCAGCGGGTTAC

2 结果与分析

2.1 铜积累

如表 2 所示, 随着铜处理浓度的提高, 铜在暗纹东方鲀肝、肌肉和全鱼中的积累量也提高。同等浓度处理下, 铜在暗纹东方鲀组织中的积累量为肝脏>全鱼>肌肉。

2.2 氧化胁迫

急性铜胁迫对暗纹东方鲀抗氧化系统产生了显著的影响。随着铜处理浓度的提高, 肝脏中 MDA 含量及抗氧化酶活性(GSH-PX, SOD 和 CAT)

总体呈显著上升趋势(图 1)。

表 2 急性铜胁迫 96 h 后对暗纹东方鲀组织铜积累的影响
Tab. 2 Effects of acute Cu stress on tissues
Cu accumulation in *Takifugu fasciatus*

$n=3$; $\bar{x}\pm\text{SE}$; $\mu\text{g/g}$, 干重 dry weight

处理 treatment	对照 control	0.1 mg/L	0.2 mg/L
肝 liver	1.9 $\pm$ 0.2 ^c	13.9 $\pm$ 1.6 ^b	39.4 $\pm$ 2.3 ^a
肌肉 muscle	0.2 $\pm$ 0.1 ^c	2.5 $\pm$ 0.3 ^b	8.6 $\pm$ 1.2 ^a
全鱼 whole body	1.3 $\pm$ 0.1 ^c	8.4 $\pm$ 0.8 ^b	25.9 $\pm$ 1.9 ^a

注: 含相同字母者表示差异不显著。
Note: The treatment with the same letter indicated that the difference is not significant.

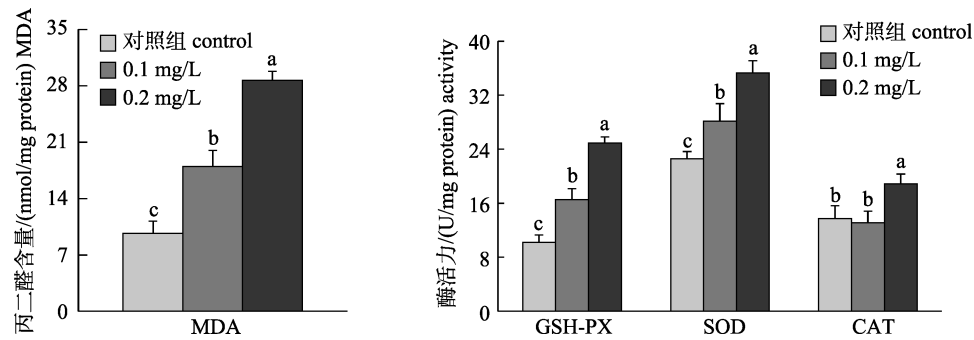


图 1 急性铜胁迫 96 h 后对暗纹东方鲀肝脏中丙二醛(MDA)含量及抗氧化酶活性[谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX), 超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)]的影响

不同处理中含相同字母者表示差异不显著($P>0.05$).

Fig. 1 Effects of 96 h acute Cu stress on malondialdehyde (MDA) concentration and antioxidant enzyme activity (GSH-PX, SOD and CAT) in liver of *Takifugu fasciatus*

The treatment with the same letter indicated that the difference is not significant ($P>0.05$).

2.3 组织切片

经过 96 h 的水体铜急性暴露后, 暗纹东方鲀的肝脏和鳃从外观上具有明显的病变特征。对照组的肝细胞结构和形态规则, 水体铜急性暴露诱

发肝脏有血细胞沉积以及血窦扩张的症状。在鳃中, 水体铜急性暴露也诱发鳃上皮细胞增生, 顶部棒状以及产生动脉瘤等。随着处理浓度的提高, 这些症状愈加明显(图 2)。

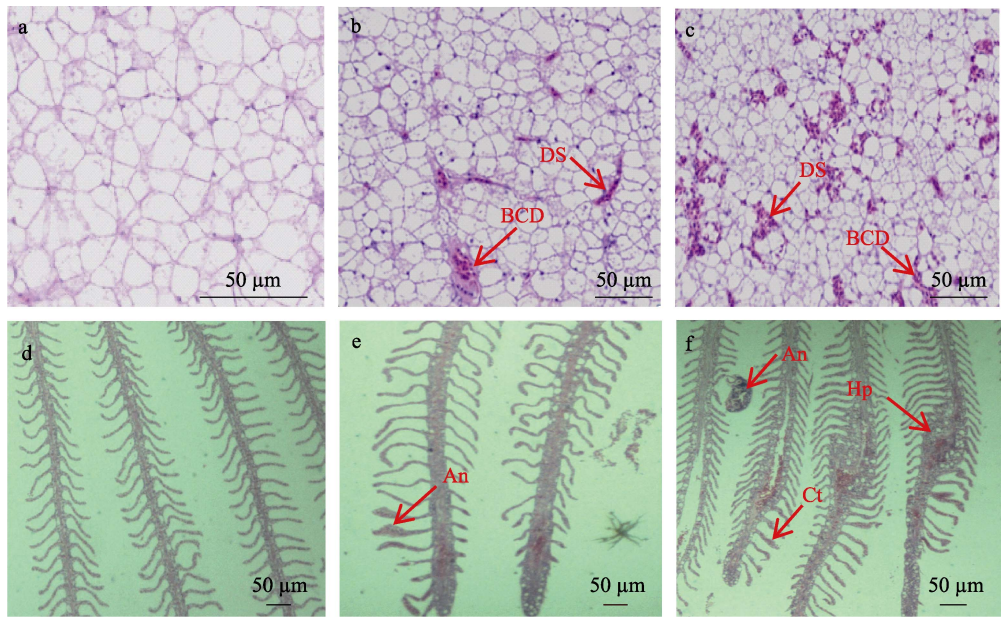


图 2 暗纹东方鲀经 96 h 的水体铜急性暴露后肝脏和鳃的显微结构

a-c 肝脏, d-f 鳃。a、d: 对照组; b、e: 0.1 mg/L 铜处理; c、f: 0.2 mg/L 铜处理。An 表示动脉瘤, BCD 表示血细胞沉积, Ct 表示顶部棒状, DS 表示血窦扩张, Hp 表示上皮细胞增生。切片厚度为 5~7 μm 。切片用苏木精和伊红染料进行染色(HE 染色)。

Fig. 2 Effects of acute Cu stress on liver and gills morphology of *Takifugu fasciatus* after 96 h exposure

a-c liver, d-f gills. a, d: control; b, e: 0.1 mg/L Cu treatment; c, f: 0.2 mg/L Cu treatment.

An: aneurism, BCD: blood cell deposition in veins, Ct: clubbed tips, DS: dilatation of sinusoids, Hp: hyperplasia. Sections were 5-7 μm thick and stained with haematoxylin and eosin (HE).

2.4 消化酶

如表 3 所示, 急性铜胁迫 96 h 后, 暗纹东方

鲀肠道中的淀粉酶活性显著上升, 但脂肪酶活性显著下降。在 0.1 mg/L 处理组, 肠道中的蛋白酶

活力显著高于对照组和 0.2 mg/L 处理组。在暗纹东方鲀肝脏中,急性铜胁迫 96 h 后,随着处理浓度的提高,淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶活性显著降低。

表 3 急性铜胁迫对暗纹东方鲀肠道中
消化酶活性的影响
Tab. 3 Effect of acute Cu stress on digestive enzyme
activities in gut and liver of *Takifugu fasciatus*

n=3; $\bar{x}\pm\text{SE}$				
组织 tissue	处理 treatment	淀粉酶/ (U/mg prot) amylase	蛋白酶/ (U/mg prot) trypsin	脂肪/ (U/g prot) lipase
肠道 gut	对照组 control	0.3±0.1 ^b	1905.2±70.3 ^b	1414.1±82.1 ^a
	0.1 mg/L	1.1±0.1 ^a	2124.5±64.1 ^a	582.2±56.2 ^b
	0.2 mg/L	1.0±0.1 ^a	896.3±44.2 ^c	322.2±42.6 ^c
肝脏 liver	对照组 control	2.0±0.2 ^a	190.3±24.5 ^a	62.2±10.4 ^a
	0.1 mg/L	1.4±0.1 ^b	88.8±12.1 ^b	50.2±8.8 ^{ab}
	0.2 mg/L	0.5±0.1 ^c	55.9±9.8 ^b	30.2±5.6 ^b

注: 含相同字母者表示差异不显著($P>0.05$).
Note: The treatment with the same letter indicated that the difference is not significant ($P>0.05$).

2.5 肝脏脂代谢相关基因的表达

急性铜胁迫 96 h 后对暗纹东方鲀脂代谢相关基因的表达产生了显著影响。在 0.1 mg/L 处理组,脂肪合成相关基因(*G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*Fas* 和 *Acc*)的表达高于对照组和 0.2 mg/L 处理组,其中 0.2 mg/L 处理组中脂肪合成基因表达量最低。但在 0.2 mg/L 处理组中,脂肪分解相关基因(*HSL* 和 *CPT1*)的表达显著高于对照组和 0.1 mg/L 处理组。急性铜胁迫 96 h 后对转运因子 *PPAR α* 的影响不显著,但转运因子 *PPAR γ* 的表达量显著上升,在 0.1 mg/L 处理组中有着最大的表达量(图 3)。

3 讨论

3.1 急性条件下铜能够积累在暗纹东方鲀组织中

为了解铜在暗纹东方鲀体内的积累情况,我们分析了肝脏、肌肉和全鱼中的铜的含量。在本研究中,铜在肝脏、肌肉和全鱼中的积累量随着处理浓度的提高而提高,说明铜在暗纹东方鲀体内的积累具有剂量依赖效应。此外,96 h 急性铜暴露之后,肝中积蓄着最高浓度的铜,这说明了肝

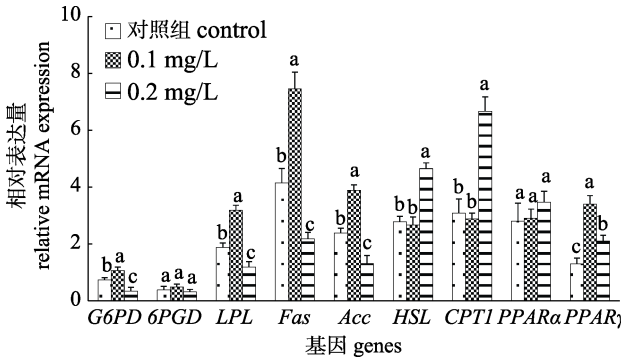


图 3 急性铜暴露 96 h 后对暗纹东方鲀肝脏中
脂代谢相关基因表达的影响
脂肪合成相关基因(*G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*Fas* 和 *Acc*),
脂肪分解相关基因(*HSL* 和 *CPT1*)以及脂肪转运因子
(*PPAR α* 和 *PPAR γ*)。不同处理中含相同字母者
表示差异不显著($P>0.05$).

Fig. 3 Effects of acute Cu stress on the mRNA expression
of genes involved in lipid metabolism in the
liver of *Takifugu fasciatus*
The genes involved in lipogenesis (*G6PD*, *6PGD*, *LPL*, *Fas* and
Acc), lipolytic (*HSL* and *CPT1*) and transcription factors
(*PPAR α* and *PPAR γ*). The treatment with the same letter indi-
cated that the difference is not significant ($P>0.05$).

是铜积累的靶器官。这些与 Wang 等^[15]和 Al-Bairuty 等^[19]研究结果一致。值得注意的是,在肌肉中铜的积累量最低,可能是由于铜在进入肌肉之前被首要的吸收和转运到其他组织,例如肝。有研究表明,肌肉中缺少铜结合蛋白^[20]。因此,肌肉不是主要的器官来存储铜,这对人类食物安全至关重要。

3.2 急性铜暴露诱导暗纹东方鲀氧化应激

动植物细胞在代谢过程中不断产生的自由基会被细胞本身具有的防御体系所清除,在正常的生理条件下二者之间始终处于动态平衡,一旦平衡状态被打破,组织内的活性氧自由基会不断的聚积,导致组织代谢出现异常并发生组织过氧化现象,从而诱导产生一系列的病理及生理变化^[21]。因此,抗氧化酶系统对维持机体正常代谢和功能有着非常重要的作用^[22]。铜在鱼类生理代谢过程中起着重要的作用,然而,当铜含量过高时会引起鱼体氧化胁迫和脂质过氧化作用^[14]。鱼类抗氧化系统对水环境污染反应灵敏;重金属与其他环境污染物类似,通过氧化胁迫驱动毒性效应^[13]。MDA 被普遍用来评估脂质过氧化程度^[23]。在本

研究中, 肝脏中的 MDA 含量随着铜处理浓度的升高而升高, 说明了铜处理能够诱导暗纹东方鲀肝中的脂质过氧化作用, 引起组织损伤(图 2)。研究表明铜通过 Fenton-type 反应能够产生 ROS, 从而诱导产生氧自由基激活抗氧化防御系统^[24]。SOD 酶和 GSH 能够转化超氧离子成为毒性较低的过氧化氢和水, 因此能够维持细胞内适当浓度的超氧离子, 从而保护细胞免受损伤^[25]。Almeida 等^[26]报道镉离子能够提高大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)肌肉中的 GSH-PX 和 SOD 活性。Sanchez 等^[13]报道铜离子能够诱导三棘鱼(*Gasterosteus aculeatus*)中的 SOD 和 CAT 活性提高。本研究显示在肝脏中, SOD、CAT 和 GSH-PX 活性随着铜处理浓度的升高而升高, 说明了铜处理能够引起暗纹东方鲀肝脏的氧化胁迫, 激活体内的抗氧化防御系统, 但这种防御作用似乎弱于铜诱导的机体损伤, 对暗纹东方鲀产生了毒害作用。

3.3 急性铜暴露诱导暗纹东方鲀组织病变

肝脏是鱼体代谢铜的中心组织, 并且肝组织损伤已经被作为一种参考来分析环境的污染程度^[27]。在本研究中, 急性铜暴露 96 h 后, 肝组织显示出不同程度的损伤。这些损伤主要包括: 血窦扩张和血细胞沉积在静脉中。有研究表明血窦扩张是铜诱导肝损伤的有力信号^[9]。Al-Bairuty 等^[19]研究表明 100 $\mu\text{g/L}$ 离子铜诱导虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)肝细胞坏死、血窦扩张及血细胞的沉积。王海涛等^[28]研究表明 0.88 mg/L 铜诱导细鳞鲈(*Brachymystax lenok*)幼鱼肝脏血窦扩张, 这些与本研究结果类似, 说明铜诱导不同品种鱼类肝组织损伤的症状大体一致。

鳃是鱼类呼吸和渗透调节的器官, 重金属离子主要是由鳃吸收进入血淋巴, 其对鱼类的损害首先是从鳃开始的。已有的研究表明, 离子铜能对虹鳟的鳃造成严重的伤害, 并且能引起鳃生理功能的改变^[19]。在本研究中, 离子铜处理诱导鳃上皮细胞增生, 二次片层顶部棒状, 鳃丝上动脉瘤。随着处理浓度的提高, 鳃的损伤程度越明显。这些结果和 Al-Bairuty 等^[19]和 Gomes 等^[23]报道一致。Griffitt 等^[29]认为二次片层基部增生增加了气体传送的距离, 甚至很小的增生都会影响氧气

穿过鳃进入到体内的效率。因此, 本研究中离子铜处理可能会引起暗纹东方鲀的缺氧症状。Lappivaara 等^[30]认为这种缺氧根据鳃的损伤程度是可以恢复的。关于鳃的病变引起的游泳行为的改变需要进一步的研究。

3.4 急性铜暴露扰乱了暗纹东方鲀消化系统

消化酶由消化腺和消化系统分泌, 主要功能是将食物分解成可吸收的小分子, 进而为机体的生理活动提供物质与能量。消化酶的活性会直接影响机体的消化能力以及对环境适应的能力, 同时也能直观的反映机体的生理状态。目前已发现重金属离子会影响到鱼类的消化酶活性。崔丽丽等^[31]发现过量的铜离子对无齿相手蟹(*Sesarma dehaani*)的肝胰腺中的蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和类胰蛋白酶四种消化酶酶活表现出不同程度的抑制作用。铜离子浓度越高, 对酶的抑制作用越明显。陈肖肖等^[8]利用不同浓度铜离子对泥蚶(*Tegillarca granosa*)进行处理, 表明实验后期内脏团消化酶活力与重金属浓度呈现负相关性。在本研究中, 急性铜胁迫 96 h 后, 随着处理浓度的提高, 暗纹东方鲀肝脏中的淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶活性显著降低, 说明水体铜暴露抑制了暗纹东方鲀肝脏中的消化酶的分泌能力和消化能力。但是, 在暗纹东方鲀肠道中, 随着铜离子处理浓度的提高, 淀粉酶和蛋白酶活性呈先升高再下降的趋势, 此结果与张华等^[32]报道铜离子对杂交鲟肠组织的消化酶影响的结果一致。这些结果表明(1)铜诱导的蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的变化具有组织特异性; (2)在低浓度胁迫下, 铜对暗纹东方鲀肠道中淀粉酶和蛋白酶活性表现为诱导作用, 当铜离子达到一定浓度时又对消化酶产生抑制作用, 会影响鱼类的摄食和对食物的消化。因此在水产养殖过程中, 一定要注意重金属离子的浓度。具体的 0.1 mg/L 铜处理组显著提高肠道淀粉酶和蛋白酶活性的原因还有待进一步研究, 比如: 肠道微生物的作用。

3.5 急性铜暴露扰乱了暗纹东方鲀肝脏脂肪代谢

脂类是鱼类主要的能源物质, 在生长、发育和繁殖的过程中发挥重要的作用。肝脏是脂类代谢最主要的部位, 脂肪的合成代谢与分解代谢的

失衡会导致肝脏病变^[7, 33]。大量的研究表明, 水体重金属暴露能够诱导鱼类脂代谢的失衡^[9, 10, 33], 这些与本研究中的结果一致。但在本研究中发现, 在 0.1 mg/L 处理组, 脂肪合成相关基因(*G6PD*、*6PGD*、*LPL*、*Fas* 和 *Acc*)的表达显著高于对照组和 0.2 mg/L 处理组, 同时脂肪分解(*HSL* 和 *CPT 1*)相关基因的表达在 0.1 mg/L 处理组与对照组间差异不显著, 说明 0.1 mg/L 铜处理能够诱导暗纹东方鲀肝脏脂肪沉积。有关研究表明, 黄颡鱼肝脏中脂肪生成相关基因(*6PGD*、*G6PD* 和 *Fas*)的表达随着水体铜浓度的升高而逐渐降低^[34], 这与本研究结果有些差异, 可能是由物种不同造成的。值得注意的是, 在 0.2 mg/L 铜处理组中, 暗纹东方鲀肝脏中脂肪合成基因的表达量最低, 并且脂肪分解相关基因的表达显著高于 0.1 mg/L 处理组和对照组。这些结果暗示着暗纹东方鲀可能通过分解脂肪提供能量来抵御高浓度铜的胁迫, 这与 Wang 等^[15]和 O'Brien 等^[35]研究结果一致。Chen 等^[34]通过慢性铜毒性实验研究表明, 与对照组比较摄食量差异是黄颡鱼脂代谢合成基因表达下降的一个重要因素, 但在本实验 96 h 急性铜胁迫过程中, 暗纹东方鲀未经投喂(摄食量无差异), 但与对照组比 0.2 mg/L 铜处理仍显著抑制脂肪合成基因的表达。这些结果的差异可能是由急性毒性实验和慢性毒性实验的差异造成的。在本实验中, 急性铜胁迫 96 h 后对转运因子 *PPAR α* 的影响不显著, 但转运因子 *PPAR γ* 的表达量显著上升。研究表明, 动物的体脂沉积及脂类代谢受 *PPAR α* 和 *PPAR γ* 的调控。其中, *PPAR α* 主要通过诱导脂肪酸氧化基因的表达从而调控脂肪的分解代谢; 而 *PPAR γ* 主要调节脂类的合成代谢, 促进体脂沉积。这与 Zheng 等^[33]对黄颡鱼进行锌暴露后的研究结果相似。相关研究认为 *PPAR α* 基因的表达水平并没有显著变化, 但这并不足以排除其可能参与铜暴露影响鱼类脂类代谢的过程^[33-34]。

4 小结

急性铜暴露条件下, 离子铜能够积累在暗纹东方鲀组织中, 肝脏是铜积累的靶器官。急性铜胁迫能够诱导暗纹东方鲀肝脏氧化应激以及肝和

鳃中的组织病变。同时暗纹东方鲀体内的消化酶活性及肝脂代谢相关基因的表达也被急性铜胁迫所扰乱。

参考文献:

- [1] Dai Y H, Zhan C F, Zhu A Q. Healthy and efficient culture experiment of *Siniperca chuatsi* in *Takifugu obscurus* scorpion[J]. Scientific Fish Farming, 2013(5): 34-35. [戴玉红, 展翠芬, 朱爱琴. 暗纹东方鲀套养鳊鱼健康高效养殖试验[J]. 科学养鱼, 2013(5): 34-35.]
- [2] Cheng C H, Zhang M Y, Xu D P, et al. Analysis of genetic diversity in four *Takifugu obscurus* populations[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2012, 31(5): 634-640. [程长洪, 张敏莹, 徐东坡, 等. 4 个暗纹东方鲀群体的遗传多样性分析[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(5): 634-640.]
- [3] Yang Z, Chen Y F. Induced ovulation in obscure puffer *Takifugu Obscurus* by injections of LHRH-A[J]. Aquaculture International, 2004, 12(2): 215-223.
- [4] Shi Y H, Zhang G Y, Zhu Y Z, et al. Effects of photoperiod, temperature, and salinity on growth and survival of obscure puffer *Takifugu obscurus* larvae[J]. Aquaculture, 2010, 309(1-4): 103-108.
- [5] Yang Z, Chen Y F. Length-weight relationship of obscure puffer (*Takifugu Obscurus*) during spawning migration in the Yangtze River, China[J]. Journal of Freshwater Ecology, 2003, 18(3): 349-352.
- [6] Wen X, Zhang X Y, Hu Y D, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of *Takifugu fasciatus* liver in response to low-temperature stress[J]. Journal of Proteomics, 2019, 201: 27-36.
- [7] Wang T, Wei X Z, Chen T Q, et al. Studies of the mechanism of fatty liver formation in *Takifugu fasciatus* following copper exposure[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 181: 353-361.
- [8] Chen X X. Effects of heavy metal Cd and Cu on toxicity of *Tegillarca granosa*[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2013. [陈肖肖. 重金属 Cd 和 Cu 对泥蚶(*Tegillarca granosa*)的毒理学效应[D]. 上海: 华东理工大学, 2013.]
- [9] Shaw B J, Handy R D. Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions[J]. Environment International, 2011, 37(6): 1083-1097.
- [10] Chen Q L, Luo Z, Pan Y X, et al. Differential induction of enzymes and genes involved in lipid metabolism in liver and visceral adipose tissue of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* exposed to copper [J]. Aquatic Toxicology, 2013, 136-137: 72-78.

- [11] Song, Y F, Luo Z, Zhang L H, et al. Endoplasmic reticulum stress and disturbed calcium homeostasis are involved in copper-induced alteration in hepatic lipid metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Chemosphere, 2016, 144: 2443-2453.
- [12] Yang Z B. Studies on the toxic mechanism of water-borne Cu^{2+} on *Eriocheir sinensis*[D]. Shanghai: East China Normal University, 2005. [杨志彪. 水体 Cu^{2+} 对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 毒性作用机制的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2005.]
- [13] Sanchez W, Palluel O, Meunier L, et al. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2005, 19(1): 177-183.
- [14] Adeyemi J A, Klerks P L. Occurrence of copper acclimation in the least killifish *Heterandria formosa*, and associated biochemical and physiological mechanisms[J]. Aquatic Toxicology, 2013, 130-131: 51-57.
- [15] Wang T, Long X H, Cheng Y Z, et al. The potential toxicity of copper nanoparticles and copper sulphate on juvenile *Epinephelus coioides*[J]. Aquatic Toxicology, 2014, 152: 96-104.
- [16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [17] Wang T, Wen X, Hu Y D, et al. Copper nanoparticles induced oxidation stress, cell apoptosis and immune response in the liver of juvenile *Takifugu fasciatus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 84: 648-655.
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [19] Al-Bairuty G A, Shaw B J, Handy R D, et al. Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Aquatic Toxicology, 2013, 126: 104-115.
- [20] Zhao J, Wang Z Y, Liu X Y, et al. Distribution of CuO nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and their potential toxicity[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 197: 304-310.
- [21] Griffith R J, Weil R, Hyndman K A, et al. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(23): 8178-8186.
- [22] Hao L H, Wang Z Y, Xing B S. Effect of sub-acute exposure to TiO_2 nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Journal of Environmental Sciences, 2009, 21(10): 1459-1466.
- [23] Gomes T, Pinheiro J P, Cancio I, et al. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(21): 9356-9362.
- [24] Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, et al. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO_2 to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*[J]. Chemosphere, 2008, 71(7): 1308-1316.
- [25] Cao J L, Chen J J, Wang J D, et al. Effects of fluoride on liver apoptosis and Bcl-2, Bax protein expression in freshwater teleost, *Cyprinus carpio*[J]. Chemosphere, 2013, 91(8): 1203-1212.
- [26] Almeida J A, Diniz Y S, Marques S F G, et al. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination[J]. Environment International, 2002, 27(8): 673-679.
- [27] Amaral A F, Alvarado N, Marigomez I, et al. Autometallography and metallothionein in immunohistochemistry in hepatocytes of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) after exposure to cadmium and depuration treatment[J]. Biomarkers, 2002, 7(6): 491-500.
- [28] Wang H T, Xu G F, Tang S Z. Acute toxicity of copper to gill and liver of Juvenile *Brachymystax lenok*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2017, 30(2): 22-25. [王海涛, 徐革锋, 汤施展. 铜对细鳞鲴幼鱼鳃和肝组织的急性毒性[J]. 水产学杂志, 2017, 30(2): 22-25.]
- [29] Griffith R J, Weil R, Hyndman K A, et al. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(23): 8178-8186.
- [30] Lappivaara J, Nikinmaa M, Tuurala H. Arterial oxygen tension and the structure of the secondary lamellae of the gills in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to zinc and during recovery[J]. Aquatic Toxicology, 1995, 32(4): 321-331.
- [31] Cui L L. Studies on the toxic mechanism of water-borne Cu^{2+} on *Sesarma dehaani*[D]. Shanghai: East China Normal University, 2008. [崔丽丽. 水体 Cu^{2+} 对无齿相手蟹 (*Sesarma dehaani*) 毒性作用机制的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2008.]
- [32] Zhang H. Effect of four kinds of heavy metal ions on the behavioral and physiological index of hybrid sturgeon[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2014. [张华. 四种重金属离子对杂交鲟行为及生理指标的影响[D]. 保定:

- 河北农业大学, 2014.]
- [33] Zheng J L, Luo Z, Liu C X, et al. Differential effects of acute and chronic zinc (Zn) exposure on hepatic lipid deposition and metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Aquatic Toxicology, 2013, 132-133: 173-181.
- [34] Chen Q L, Gong Y, Luo Z, et al. Differential effect of waterborne cadmium exposure on lipid metabolism in liver and muscle of yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. Aquatic Toxicology, 2013, 142-143: 380-386.
- [35] O'Brien A J, Villani L A, Broadfield L A, et al. Salicylate activates AMPK and synergizes with metformin to reduce the survival of prostate and lung cancer cells *ex vivo* through inhibition of *de novo* lipogenesis[J]. Biochemical Journal, 2015, 469(2): 177-187.

Effects of acute copper stress from copper accumulation, oxidative stress, digestive enzymes, tissue lesions, and gene expression related to lipid metabolism in *Takifugu fasciatus*

WANG Tao^{1,2}, WANG Wei², CHEN Tongqing², XIA Xiaoyu², MIAO Jinhan², ZHANG Hongyan², YIN Shaowu^{1,2}

1. College of Marine Science and Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China;

2. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China

Abstract: The study was conducted to determine the effects of waterborne Cu exposure on physiological, biochemical, and gene expression related to lipid metabolism in *Takifugu fasciatus* via a 96 h acute toxicity experiment. In the present study, *T. fasciatus* were respectively exposed to 0 (control), 0.1 mg Cu/L, and 0.2 mg Cu/L (96-h LC₅₀). The results showed that Cu accumulation in liver, muscle, and whole fish increased with increasing Cu concentration. The order of Cu accumulation was liver>whole body>muscle at the same Cu dose. With the increase in Cu concentration, malondialdehyde (MDA) content and activities of antioxidant enzymes [glutathione peroxidase (GSH-PX), total superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT)] increased in the liver. Acute Cu exposure induced blood cells deposition in veins and dilatation of sinusoids in the liver, and also induced epithelial hyperplasia, clubbed tips, and aneurysms in gills. In the gut, amylase activity increased significantly, yet the lipase activity decreased after acute Cu stress in *T. fasciatus*. In the liver, activities of amylase, protease, and lipase decreased significantly with the increase in Cu concentration. The expression of genes involved in lipogenesis (*G6PD*, *6PGD*, *LPL*, *Fas*, and *Acc*) under 0.1 mg Cu/L exposure was the highest. However, the expression of genes involved in lipolysis (*HSL* and *CPT 1*) was the highest in the 0.2 mg Cu/L treatment group. Acute Cu stress had no significant influence on transfer factor *PPAR α*, but the expression of *PPAR γ* was significantly up-regulated relative to that of the control. This study revealed the significant effects of Cu exposure on physiological, biochemical, and gene expression related to lipid metabolism in *T. fasciatus*, which provides beneficial guidance for the rational use of Cu in the production process of *T. fasciatus*, and also provides beneficial references to technical indicators for better monitoring of heavy metal pollution in fish production.

Key words: *Takifugu fasciatus*; copper; accumulation; oxidative stress; digestive enzymes; tissue lesion; lipid metabolism

Corresponding author: YIN Shaowu. E-mail: yinshaowu@163.com