

DOI: 10.12264/JFSC2023-0141

不同盐胁迫对鳊渗透压、离子转运系统和免疫基因的影响

李帅帅^{1,2,3}, 王艳玲^{1,2,3}, 姚晓丽^{1,2,3}, 赵金良^{1,2,3}, 赵岩^{1,2,3}

1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;
2. 上海海洋大学, 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306;
3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306

摘要: 为研究不同盐对鳊(*Siniperca chuatsi*)的毒害作用, 在阳离子浓度相等($\text{Na}^+=210 \text{ mmol/L}$)的情况下, 对鳊进行 NaCl 、 Na_2SO_4 和 NaHCO_3 急性胁迫。在 NaCl 和 Na_2SO_4 胁迫后 0、12、24 h 和淡水恢复后 24 h 和 72 h, 以及在 NaHCO_3 胁迫后 0、0.5 h 和淡水恢复后 2 h 和 4 h, 取血液和鳃组织, 检测血清渗透压、离子浓度和鳃 Na^+/K^+ -ATP 酶(NKA)、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ 协同转运蛋白(NKCC)、 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共转运体(SLC4A4)和 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 离子交换体(SLC26A6)酶活性、免疫相关基因(*Ccl20*、 γ -*IFN*、*Dapk2*)表达量。结果表明, 在 210 mmol/L Na^+ 胁迫下, 3 种盐胁迫组中鳊血清 Na^+ 浓度波动显著, Cl^- 和 K^+ 浓度变化幅度小, 鳃组织 NKA 酶活性上调, NKCC 和 SLC26A6 酶活性受抑制, γ -*IFN* 和 *Dapk2* 表达均下调。与 NaCl 和 Na_2SO_4 胁迫组不同, NaHCO_3 胁迫组中鳊应激反应强烈, 且血清渗透压在转入淡水后不能恢复, SLC4A4 酶活性受抑制, *Ccl20* 表达量下调。综上, 在 210 mmol/L Na^+ 下, NaCl 和 Na_2SO_4 胁迫抑制部分免疫机能, 可通过部分离子转运酶活性来响应环境变化, 使其血清渗透压能在转入淡水后接近初始水平, NaHCO_3 胁迫对鳊毒害影响强于 NaCl 和 Na_2SO_4 胁迫, NaHCO_3 胁迫严重抑制免疫机能, 且对大部分离子转运酶活性的抑制作用显著, 导致渗透压不能恢复。研究结果对根据不同盐碱水类型制定合理的鳊盐碱驯化、筛选方案具有实践和指导意义。

关键词: 鳊; 盐胁迫; 渗透压; 血清离子; 离子转运; 免疫

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)08-0942-11

盐碱水是指矿化度为 1000~50000 mg/L 的非海洋性咸水资源, 具有离子成分复杂和类型多样等特点。我国的盐碱水主要类型有华北滨海复合型、西北硫酸盐型和东北碳酸盐型^[1], 造成其差别的离子成分主要是 Cl^- 、 SO_4^{2-} 和 HCO_3^- 。研究不同类型的盐胁迫对水生生物毒性及危害的差异对开发利用盐碱水域资源、有效拓展水产养殖空间有重要意义。对小麦(*Triticum aestivum*)^[2]、高粱(*Sorghum bicolor*)^[3]和紫花苜蓿(*Medicago sativa*)^[4]等的研究表明, 不同类型盐(NaCl 、 Na_2SO_4 、 Na_2CO_3 和 NaHCO_3)对植物的毒害存在差异, 进而可以根据盐碱土类型选择培育和种植作物。而鱼类中类似

的比较研究很少, 鲫(*Carassius auratus*)的急性应激实验表明, NaHCO_3 的毒性作用大于 NaCl ^[5], 杂交罗非鱼的转录组测序分析显示, 与 NaCl (25‰)相比, NaHCO_3 (4‰)胁迫后相关通路对病原体感染反应存在差异^[6]。上述研究涉及的盐的种类、鱼的种类、测定指标等都有限, 不同盐胁迫对鱼类的毒害作用, 以及鱼类对不同盐胁迫的生理响应、适应机制尚缺乏深入研究。

当所在环境渗透压发生变化时, 鱼类主要通过鳃丝上皮细胞在离子转运交换体的运作下吸收和排出 Na^+ 、 Cl^- 等离子, 维持渗透压平衡^[7]。离子转运交换体有钠钾泵(Na^+/K^+ -ATPase, NKA),

收稿日期: 2023-06-14; 修订日期: 2023-07-14.

基金项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-46).

作者简介: 李帅帅(1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鱼类遗传育种. E-mail: 736416599@qq.com

通信作者: 赵岩, 副教授, 研究方向为水产种质资源与遗传育种. E-mail: y_zhao@shou.edu.cn

钠钾氯共转运蛋白($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter, NKCC)^[8]、 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 共转运体(Na^+ -coupled HCO_3^- transporter, SLC4A4)^[9]、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 离子交换体($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger, SLC26A6)^[10]等。这些离子转运交换体在鱼类应答某一类盐胁迫过程中的作用机制比较清楚,但在应答不同盐胁迫过程中的作用机制差异尚无比较研究。环境胁迫对鱼类免疫系统的影响存在多样性,也可以用来衡量对鱼的毒害作用。盐胁迫会抑制鱼类免疫机能,如在高盐胁迫下施氏鲃(*Acipenser schrenckii*)幼鱼的非特异性免疫降低^[11],青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)免疫相关基因表达下调^[12],也有研究表明适当的盐胁迫会增进鱼类免疫功能,如尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)在1 g/L的碳酸盐水体中长期饲养,可以促进免疫防御,降低对嗜水气单胞菌感染的死亡率^[13]。前期转录组测序表明,趋化因子配体20(C-C motif chemokine ligand 20, *Ccl20*)、死亡相关凋亡诱导蛋白激酶2(death associated protein related apoptotic kinase 2, *Dapk2*)、 γ -干扰素(interferon-gamma, γ -IFN)等免疫相关基因在盐胁迫鳊(*Siniperca chuatsi*)后表达变化(未发表),但不同盐胁迫对鳊免疫机能的影响有待验证和比较。鳊属于硬骨鱼纲(Osteichthyes),鲈形目(Perciformes),鲈科(Serranidae),鳊亚科(Sinipercinae),鳊属,自古就是我国淡水名贵鱼类。在盐碱水域中推广鳊养殖,能丰富盐碱水域鱼类多样性并提高盐碱水域经济效益。实验室前期研究发现鳊可以在103 mol/L NaCl或42 mmol/L Na_2SO_4 的水体中长期生存,且鳊在pH 5~9范围具有一定耐受性^[14]。尽管如此,关于鳊盐碱耐受性的研究较少,也不够系统,更缺乏不同盐对鳊毒害作用差异的研究。

本研究依据我国盐碱水的主要类型,以中性盐(NaCl、 Na_2SO_4)和碱性盐(NaHCO_3)配制胁迫环境溶液对鳊进行210 mmol/L Na^+ 急性胁迫,并在胁迫后转入淡水恢复,分析鳊在3种盐胁迫下血清渗透压、血清离子(Na^+ 、 Cl^- 和 K^+)浓度以及鳃组织离子转运酶(NKA、NKCC、SLC4A4和SLC26A6)活性、免疫基因(*Ccl20*、 γ -IFN和*Dapk2*)表达的变化,来阐述不同盐胁迫的毒害作用差异,

为在不同盐碱地区筛选养殖鳊及生产布局提供理论基础,也为进一步研究鳊对NaCl、 Na_2SO_4 和 NaHCO_3 的耐受机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用鳊体重(5.8 ± 1.3) g,均选自上海海洋大学滨海养殖基地,暂养于室内水泥池中。暂养期间,每天投活饵1次,投饵充足保证所有鳊可以吃到,养殖用水为曝气48 h以上的自来水,水温保持在(24.6 ± 0.5) °C, pH为 7.5 ± 0.1 ,溶解氧保持在5.0~6.0 mg/L。定时检查网箱水体充氧情况,待鱼完全适应环境后开展胁迫实验。实验前24 h停止喂食。

1.2 实验方法

前期鳊[体重(1.76 ± 0.31) g]盐胁迫实验表明,NaCl、 Na_2SO_4 和 NaHCO_3 胁迫96 h半致死浓度分别为 $\text{LC}_{50}=210$ mmol/L、 $\text{LC}_{50}=81.6$ mmol/L和 $\text{LC}_{50}=5.89$ mmol/L。为比较不同盐对鳊的毒害作用,根据上述半致死浓度设定胁迫浓度。NaCl和 NaHCO_3 的半致死浓度相差较大,给胁迫浓度的设定带来很大困难。本研究中,在阳离子浓度($\text{Na}^+=210$ mmol/L)相等的情况下,设NaCl浓度210 mmol/L (pH 7.4)、 Na_2SO_4 浓度105 mmol/L (pH 7.5)和 NaHCO_3 浓度210 mmol/L (pH 8.5)进行胁迫。实验在透明水箱(45 L)中进行。将实验鱼从淡水直接放入提前配好盐溶液的水箱内,每个箱内放30尾,每种盐设置3个重复。实验期间不投喂饵料,定期调整各水箱中的盐度至胁迫浓度,并保证氧气充足和温度恒定。NaCl组和 Na_2SO_4 组在胁迫后0、12、24 h和淡水恢复24 h、72 h采集实验样本,预实验中在210 mmol/L NaHCO_3 胁迫后1 h内全部死亡,因此, NaHCO_3 组胁迫后0、0.5 h和淡水恢复2 h、4 h(恢复时间约按胁迫时间的3倍以上)采集实验样本。取样时,每个平行重复组中随机取3尾鱼抽取血液和鳃组织用于测定渗透压、离子浓度、酶活性及基因表达,测定方法如下。

1.2.1 渗透压测定 使用尾部静脉采血法抽取实验鱼0.5~1.0 mL血液,在1.5 mL离心管内静置12 h。

分层后的血液离心(3000 r/min, 4 °C, 5 min)后, 提取上清液(血清), 使用渗透压仪(Logan, UT, USA)检测实验鱼血清渗透压。血清离子(Na^+ 、 K^+ 和 Cl^-)浓度使用南京建成生物公司生产的离子检测试剂盒测定, 使用 Synergy H1 酶标仪(Bio-tek, USA)检测样本吸光值。

1.2.2 鳃组织酶活性检测 抽血后的实验鱼, 快速取出鳃组织。按质量和体积 1:9 的比例加入生理盐水, 高速冰水浴匀浆(2000 r/min), 组织匀浆液在 Thermo 高速冷冻离心机中离心 5 min (12000 r/min)。吸取上清液, 采用上海邦景生物公司的酶联免疫(ELISA)检测试剂盒(Fish NKA、NKCC、SLC4A4、SLC26A6 ELISA Kit), 通过 Synergy H1 酶标仪读取 450 nm 波长的吸光值, 计算各组织中 NKA、NKCC、SLC4A4、SLC26A6 酶活性。

1.2.3 荧光定量 选取基因 *Ccl20*、 γ -*IFN* 和 *Dapk2*, 使用 β -actin 作为内参基因。引物信息见表 1。采用 SYBR Green 逆转录 PCR 试剂盒, 按照说明书进行 PCR 检测。在 CFX96 Real time PCR 体系中进行 PCR 反应。PCR 条件为 50 °C 持续 2 min, 95 °C 持续 10 min, 然后在 95 °C 持续 15 s 和 60 °C 持续 1 min 的 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。

表 1 用于验证实验的 qRT-PCR 引物
Tab. 1 Primers for qRT-PCR validation of experimental genes

基因 gene	引物序列(5'-3') sequence of primers (5'-3')
<i>Ccl20</i>	F: TGGCAATCAGCAAAGTGTGTC R: CCCTGGAATGTGGAAGATAACA
γ - <i>IFN</i>	F: CGAGGGCAGTGGTCTGTCTA R: CACCATCTTTGCCTCGGTTT
<i>Dapk2</i>	F: TTGGTGAAGAGTTGGGAAGTGG R: TGCTCTGCCGTTTCTTGATGA
β -actin	F: GTGCGTGACATCAAGGAGAAG R: GGAAGGAAGGCTGGAAGAGG

1.3 综合生物标志物响应

综合生物标志物响应指数(integrated biomarker response index, IBR)由法国海洋开发研究院的 Beliaeff 等^[15]于 2002 年建立, 用于海洋环境质量评价。选择生物标志物, 包括鳃组织 NKA、NKCC、SLC4A4 和 SLC26A6 酶活性, 取不同盐

胁迫下酶活性的峰值。对鳃组织不同酶活性数据进行均一化, 并将其绘制为星状图中的向量。IBR 值是通过连接生物标志物的端点形成的多边形的面积, 并且可以根据如下公式计算:

$$IBR = \sum_{i=1}^n \frac{1}{2} \sin\left(\frac{2\pi}{n}\right) S_i S_{i+1} \quad (1)$$

式中, S_i 和 S_{i+1} 表示均一化后的相邻生物标志物值, n 表示生物标志物的数量。

1.4 数据分析

实验数据利用 SPSS 26.0 统计软件分析, 单因素方差分析进行显著性检验, Duncan 多重比较检测各测量指标的差异, 以 $P < 0.05$ 为差异显著。使用 Graphpad Prism 8 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 不同盐胁迫后鱼的状态

NaCl 和 Na_2SO_4 胁迫 24 h 过程中实验鱼并没有出现过激的行为, 在 NaHCO_3 胁迫的 0.5 h 内实验鱼出现狂游乱窜, 鳃部不断扩张, 体表分泌大量黏液, 实验液出现持续的泡沫。在淡水恢复阶段, 经 NaCl 和 Na_2SO_4 胁迫后实验鱼状态无明显变化, NaHCO_3 胁迫后实验鱼处于濒死状态。

2.2 不同盐胁迫对血清渗透压的影响

NaCl 胁迫后鳃血清渗透压在胁迫 24 h 内持续上升($P < 0.05$), 在淡水恢复阶段鳃血清渗透压出现下降趋势, 淡水恢复 72 h 血清渗透压下降趋势明显但仍高于胁迫初始阶段(图 1a)。 Na_2SO_4 胁迫后, 鳃血清渗透压胁迫 12 h 内持续下降($P < 0.05$), 之后又出现血清渗透压上升趋势($P < 0.05$), 胁迫 24 h 内持续上升; 淡水恢复阶段, 血清渗透压在恢复 24 h 恢复到胁迫起始水平, 在持续恢复 72 h 内血清渗透压出现了轻微上升(图 1b)。 NaHCO_3 胁迫后, 0.5 h 内渗透压未出现明显的上升趋势, 但是在淡水恢复阶段渗透压下降严重(图 1c)($P < 0.05$)。

2.3 不同盐胁迫对血清离子浓度的影响

在 NaCl 胁迫 12 h 时 Na^+ 含量显著上升($P < 0.05$), 持续胁迫 24 h Na^+ 含量持续上升, 在进行淡水恢复 24 h、72 h 后 Na^+ 含量呈现下降趋势,

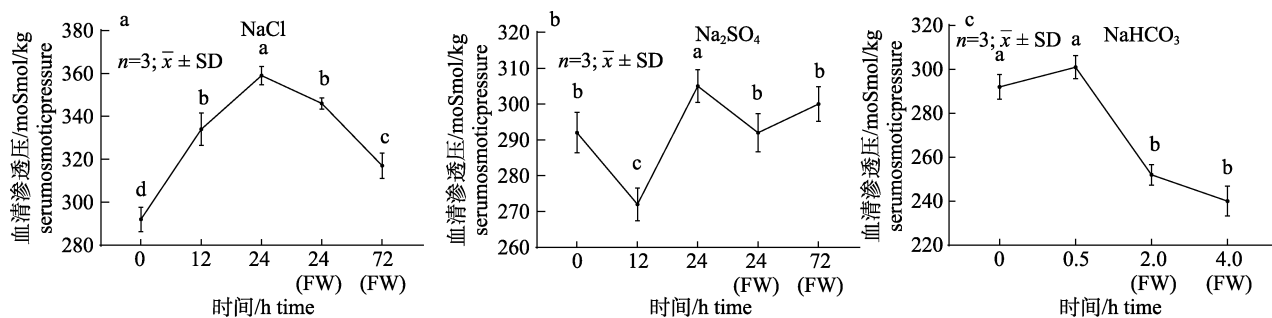


图 1 不同盐胁迫后鳊血清渗透压变化

FW 表示淡水恢复阶段; 不同字母表示差异有统计学意义 ($P<0.05$).Fig. 1 Changes in serum osmolarity of *Siniperca chuatsi* under different salt stressesFW represents freshwater recover. Different letters indicates statistically significant differences ($P<0.05$).

且高于胁迫初始阶段; 血清 Cl^- 含量在胁迫阶段少量上升, 淡水恢复阶段又逐渐恢复至胁迫初始阶段; 血清 K^+ 含量胁迫阶段并未有显著变化, 而在恢复阶段出现上升趋势 (图 2a)。 Na_2SO_4 胁迫后, 血清 Na^+ 在 12 h 显著上升 ($P<0.05$), 随后 12~24 h 之间上升缓慢, 在恢复阶段 24 h 内显著下降 ($P<0.05$), 最终恢复至胁迫初始阶段; 血清 Cl^- 含量在胁迫和恢复过程中并没有显著的变化; 血清 K^+ 浓度在胁迫 12 h 时并未变化, 12~24 h 有上升趋势, 在淡水恢复阶段血清 K^+ 浓度在恢复 72 h 内有上升趋势, 但上升趋势不明显 (图 2b)。 NaHCO_3 胁迫后, 0.5 h 内血清 Na^+ 含量有上升趋势, 随着恢复阶段的开始, 恢复 2 h 和 4 h 后血清 K^+ 浓度显著下降 ($P<0.05$), 最终低于胁迫初始水平; 血清 Cl^- 浓度在胁迫 0.5 h 并无显著变化, 胁迫结束后, 在恢复阶段中 Cl^- 浓度 2~4 h 内显著上升, 高于胁迫初始阶段; 血清 K^+ 浓度, 在胁迫 0.5 h 内上升不明显, 淡水恢复阶段 K^+ 含量无明显变化, 恢复结

束后血清 K^+ 含量略高于胁迫初始水平 (图 2c)。

2.4 不同盐胁迫对离子转运相关酶活性的影响

2.4.1 NKA 酶活性 不同盐胁迫对鳊组织 NKA 酶活性的影响见图 3。 NaCl 胁迫 24 h 过程中鳊组织 NKA 酶活性持续显著上升 ($P<0.05$), 当进入淡水恢复后 NKA 酶活性逐渐下降, 最终降至胁迫起始阶段。 Na_2SO_4 胁迫 12 h 时, 鳊组织 NKA 酶活性显著上升 ($P<0.05$), 胁迫 12~24 h 上升缓慢, 淡水恢复后鳊组织酶活性恢复至胁迫初始阶段。 NaHCO_3 胁迫 0.5 h 时 NKA 酶活性显著上升 ($P<0.05$), 进入淡水恢复过程中酶活性持续降低, 最终低于胁迫起始水平。

2.4.2 NKCC 酶活性 不同盐胁迫对鳊组织 NKCC 酶活性的影响见图 4。 NaCl 胁迫 12 h 时鳊组织 NKCC 酶活性最低 ($P<0.05$), 随着胁迫时间的继续, 胁迫 24 h 时鳊组织 NKCC 酶活性呈现上升的趋势 ($P<0.05$); 淡水恢复阶段鳊组织 NKCC 酶活性无明显变化。 Na_2SO_4 胁迫 12 h 内鳊组织

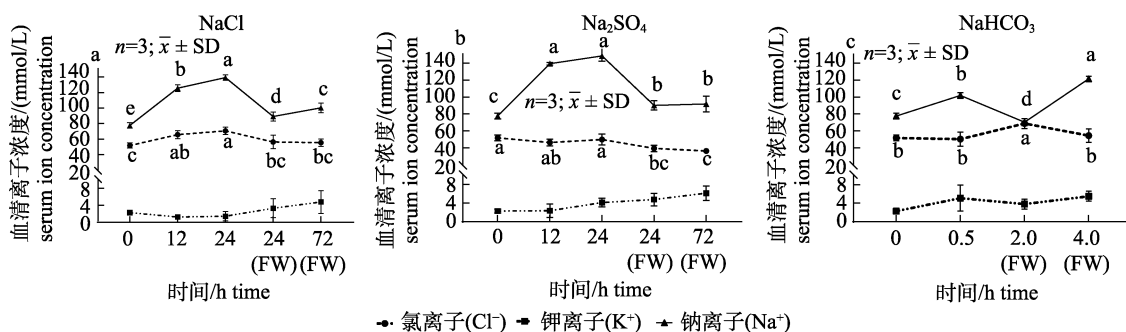


图 2 不同盐胁迫后鳊血清离子浓度变化

FW 表示淡水恢复阶段; 不同字母表示不同时间差异显著 ($P<0.05$).Fig. 2 Changes of serum ion concentrations of *Siniperca chuatsi* under different salt stressesFW represents freshwater recovery. Different letters indicates significant differences among different time ($P<0.05$).

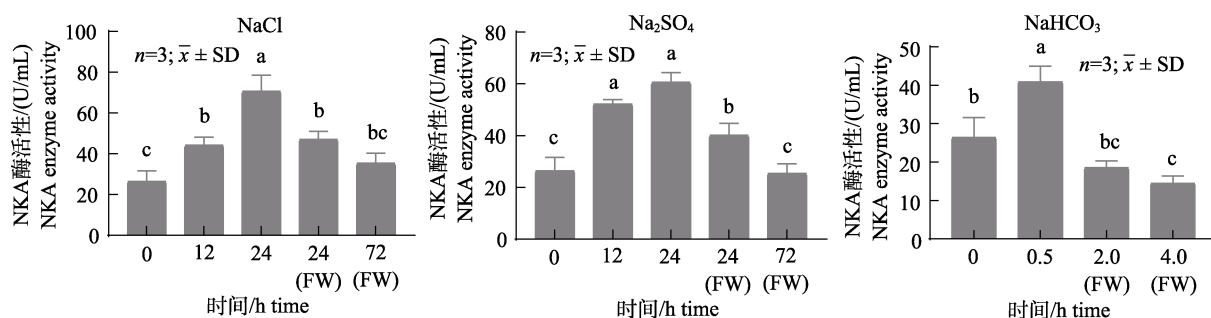


图 3 不同盐胁迫后鳃组织 Na^+/K^+ -ATP 酶(NKA)活性变化

FW 表示淡水恢复阶段; 不同字母表示差异有统计学意义($P<0.05$).

Fig. 3 Changes of Na^+/K^+ -ATPase (NKA) activity in *Siniperca chuatsi* gill under different salt stresses FW represents freshwater recovery. Different letters indicates statistically significant differences ($P<0.05$).

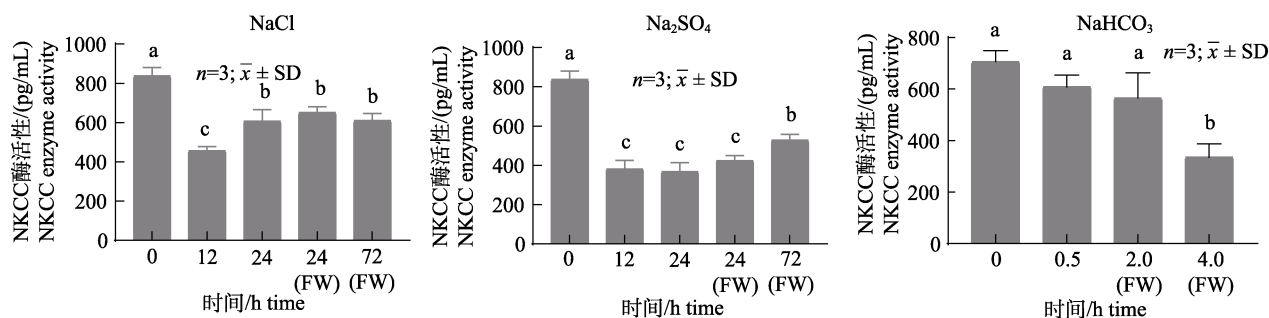


图 4 不同盐胁迫后鳃组织 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 协同转运蛋白(NKCC) 酶活性变化

FW 表示淡水恢复阶段; 不同字母表示差异有统计学意义($P<0.05$).

Fig. 4 Changes of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter (NKCC) enzyme activity in *Siniperca chuatsi* gill under different salt stresses FW represents freshwater recovery. Different letters indicates statistically significant differences ($P<0.05$).

NKCC 酶活性显著下降($P<0.05$), 随着胁迫继续鳃组织 NKCC 酶活性稳定; 淡水恢复阶段鳃组织 NKCC 酶活性有上升的趋势, 恢复结束后鳃组织 NKCC 酶活性仍低于胁迫起始水平。碳酸钠胁迫 0.5 h 时鳃组织 NKCC 酶活性有下降的趋势, 放入淡水后鳃组织 NKCC 酶活性仍显著下降($P<0.05$)。

2.4.3 SLC4A4 酶活性 不同盐胁迫对鳃组织 SLC4A4 酶活性的影响见图 5。NaCl 胁迫 24 h 鳃组织 SLC4A4 酶活性下降不明显, 在淡水恢复 24 h 时鳃组织酶活性有上升趋势, 淡水恢复结束后鳃组织 SLC4A4 酶活性与胁迫起始阶段无显著变化。Na₂SO₄ 胁迫 12 h 内鳃组织 SLC4A4 酶活性有上升的趋势, 随着胁迫的继续, 胁迫 24 h 鳃组织 SLC4A4 酶活性趋势稳定; 淡水恢复 24 h 时鳃组织 SLC4A4 酶活性升高, 恢复结束后鳃组织 SLC4A4 酶活性下降至胁迫起始阶段。NaHCO₃ 胁迫 0.5 h 时鳃组织 SLC4A4 酶活性显著下降($P<0.05$), 进入淡水恢复 2 h 后鳃组织 SLC4A4 酶

活性恢复至胁迫起始阶段。

2.4.4 SLC26A6 酶活性 不同盐胁迫对鳃组织 SLC26A6 酶活性的影响见图 6。NaCl 胁迫后, 鳃组织 SLC26A6 酶活性下降($P<0.05$), 经过淡水恢复后 SLC26A6 酶活性停止了下降趋势, 但仍保持低于胁迫起始水平($P<0.05$)。Na₂SO₄ 胁迫后, 鳃组织 SLC26A6 酶活性 12 h 显著下降($P<0.05$), 在淡水恢复阶段鳃组织 SLC26A6 酶活性无显著变化, 恢复结束后酶活性低于胁迫初始阶段。NaHCO₃ 胁迫 0.5 h 后, 鳃组织 SLC26A6 酶活性下降, 随着淡水恢复的开始酶活性始终下降($P<0.05$)。

2.5 不同盐胁迫对免疫基因表达的影响

不同盐胁迫后鳃组织免疫基因表达见图 7。*Ccl20* 在 NaCl 和 Na₂SO₄ 胁迫 24 h 后表达量显著升高($P<0.05$), 而在 NaHCO₃ 胁迫过程中 *Ccl20* 表达量下降。*Dapk2* 表达量在 NaCl 和 NaHCO₃ 胁迫后显著下降($P<0.05$), Na₂SO₄ 胁迫后 *Dapk2* 表达量尽管也下降, 但并不显著。 γ -IFN 表达量在 NaCl

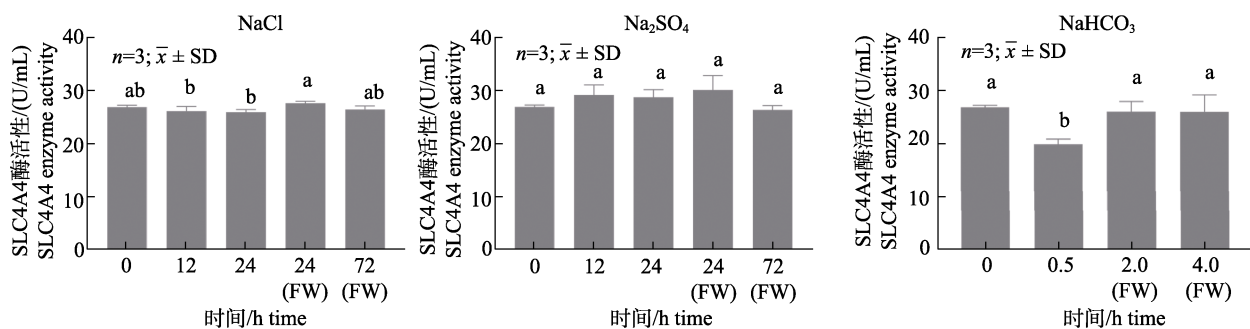


图 5 不同盐胁迫后鳊鳃组织 SLC4A4 酶活性变化

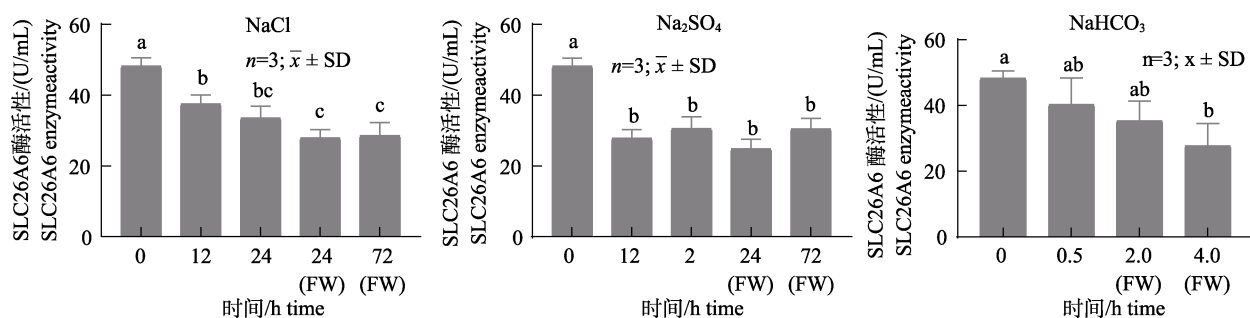
FW 表示淡水恢复阶段; 不同字母表示差异有统计学意义 ($P < 0.05$).Fig. 5 Changes of SLC4A4 enzyme activity in *Siniperca chuatsi* gill under different salt stresses
FW represents freshwater recovery. Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

图 6 不同盐胁迫对后鳊鳃组织 SLC26A6 酶活性变化

FW 表示淡水恢复阶段; 不同字母表示差异有统计学意义 ($P < 0.05$).Fig. 6 Changes of SLC26A6 enzyme activity in *Siniperca chuatsi* gill under different salt stresses
FW represents freshwater recovery. Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

胁迫 24 h 后显著下降 ($P < 0.05$), Na_2SO_4 和 NaHCO_3 胁迫后表达量下降不显著。

2.6 生物标志物响应

鳃组织不同酶活性综合生物标志物响应指数分析结果见图 8。 NaCl 、 Na_2SO_4 和 NaHCO_3 的 IBR 值分别为 3.03、10.39 和 0.95, 其中 Na_2SO_4 对 4 种酶的综合响应最大, NaHCO_3 对 4 种酶的综合响应最小。

3 讨论

当淡水鱼转入高渗环境中, 鱼体初期会出现脱水现象, 当适应环境后, 鱼体渗透压和离子浓度会趋于稳定, 但过高的环境压力会引发病变甚至死亡^[16]。在本研究中, 不同盐胁迫引起鳊血清渗透压的变化存在差异, 在 NaCl 胁迫及淡水恢复过程中, 渗透压先升高后降低, 最终表现出接近初始水平的趋势; 在 Na_2SO_4 胁迫及淡水恢复过程中, 渗透压变化有两次波动, 大致为先下降后

上升, 最终稳定在初始水平; 在 NaHCO_3 胁迫及淡水恢复过程中, 渗透压略有升高后迅速下降, 最终显著低于初始水平。结果表明, 在 210 mmol/L Na^+ 胁迫下, NaHCO_3 胁迫对鳊渗透压的影响强于 NaCl 和 Na_2SO_4 。此外, NaCl 和 Na_2SO_4 胁迫组中实验鱼并没有出现过激的行为, 而 NaHCO_3 胁迫组中实验鱼出现剧烈的应激反应, 如狂游乱窜并伴随着鳃部扩张, 体表分泌大量黏液, 也说明 NaHCO_3 对鳊的毒害作用强于 NaCl 和 Na_2SO_4 。其中可能的原因是, NaCl 和 Na_2SO_4 是中性盐, 水体 pH 在 7.5 左右, NaHCO_3 是碱性盐, 水体 pH 较高 (8.5), 增加了其对水生生物的毒性, 如 pH 升高会使得鱼体内代谢的氨氮 (NH_3) 不能有效地转换为 NH_4^+ 的形式排出体外, 造成氨中毒^[17]。此外, HCO_3^- 也会引起淡水鱼类体表溃烂、烂鳃以及瞎眼等。

在由淡水转入海水 (盐度 35‰, NaCl 浓度 > 500 mmol/L) 及淡水恢复过程中, 广盐性鱼类如莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)^[18]、黑鲷

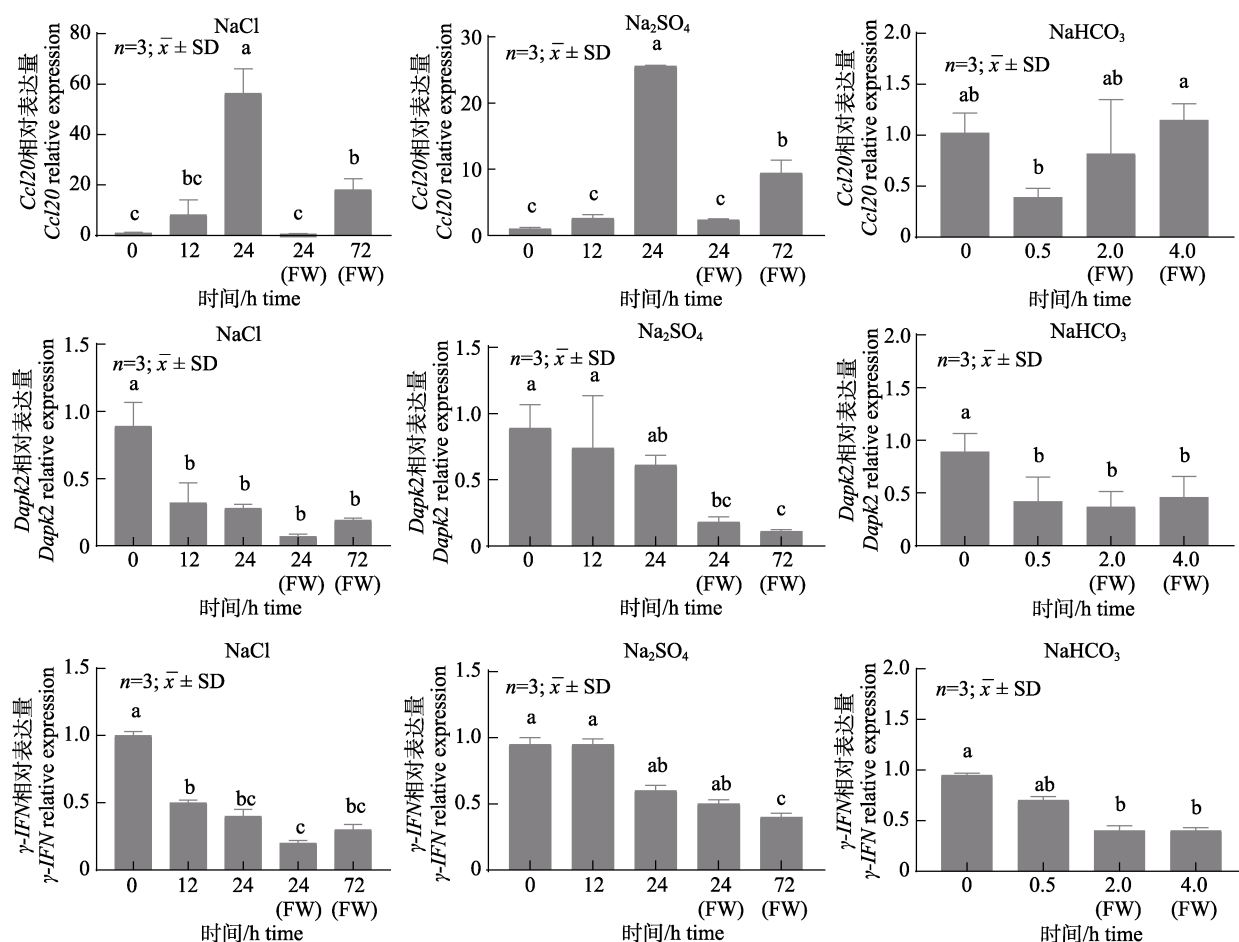


图 7 不同盐胁迫后鳃组织 *Ccl20*, *Dapk2* 和 γ -IFN 基因表达

FW 表示淡水恢复阶段; 不同字母表示差异有统计学意义 ($P < 0.05$).

Fig. 7 Expression of *Ccl20*, *Dapk2*, and γ -IFN genes in *Siniperca chuatsi* gill under different saline stresses
FW represents freshwater recovery. Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

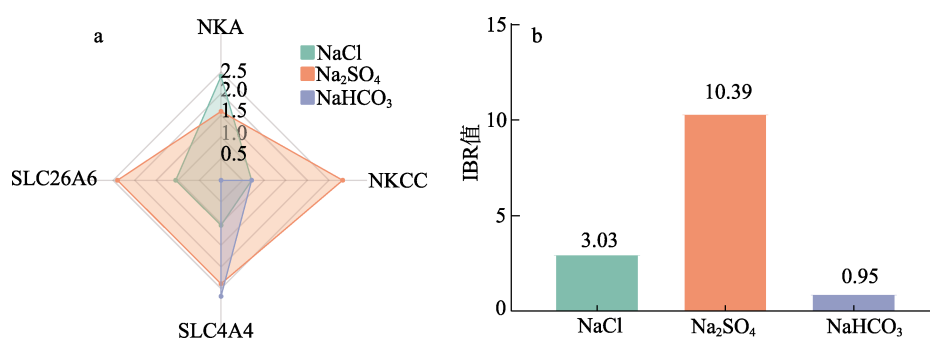


图 8 不同盐胁迫下鳃组织综合生物标志物响应评价

a. IBR 指数的星状图; b. IBR 柱状图.

Fig. 8 Evaluation of integrated biomarker response of *Siniperca chuatsi* gill tissue under different salt stresses
a. Star plot of IBR index; b. IBR histogram.

(*Acanthopagrus schlegelii*)^[19]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[18]、茉莉花鲈(*Poecilia latipinna*)^[20]等的血清渗透压先上升, 然后短期内显著下降至胁迫

初始水平, 与此不同, 在本研究的 NaCl 胁迫及淡水恢复过程中, 鳃血清渗透压虽然显著下降但仍高于胁迫初始水平, 推测鳃对渗透压改变的适应

能力弱于广盐性鱼。本研究中, 在 NaCl 与 Na_2SO_4 胁迫过程中, 鳊血清 Na^+ 浓度随着胁迫时间增加而上升, 转入淡水恢复后 Na^+ 浓度降低至胁迫初始水平, 在 NaHCO_3 胁迫过程中, Na^+ 浓度上升, 转入淡水恢复后 Na^+ 浓度仍然上升, 而在不同盐胁迫及淡水恢复过程中, 鳊血清 Cl^- 、 K^+ 浓度并无显著的变化。由此表明在 210 mmol/L Na^+ 胁迫下, Na^+ 是造成鳊血清离子浓度变化的主要离子, 这一点和其他鱼类在盐胁迫下血清中 Na^+ 和 Cl^- 同时发生显著变化不同^[21]。

在盐胁迫过程中鱼类的 NKA、NKCC、SLC4A4 和 SLC26A6 活性通常有升高的趋势^[22-24]。NKA 在胁迫过程中不仅可以维持细胞内外的离子平衡, 也为细胞各种活动提供能量, 这些能量可以维持 NKCC、SLC4A4 和 SLC26A6 正常工作。本实验中, 鳊鳃组织 NKA 酶活性在不同盐胁迫及淡水恢复过程中均显著先上升后下降, 这与广盐性鱼类类似; NKCC 和 SLC26A6 酶活性在 NaCl 和 Na_2SO_4 胁迫后显著下降, 在转入淡水阶段有一定恢复, 但仍处于较低的水平。NKCC 和 SLC26A6 酶活性在 NaHCO_3 胁迫后开始下降, 在转入淡水阶段后显著下降。SLC4A4 酶活在 NaCl 和 Na_2SO_4 胁迫后无显著变化, 在 NaHCO_3 胁迫后显著下调。由此推测 210 mmol/L Na^+ 胁迫对鱼体产生较强的毒害, 会抑制部分离子转运酶表达。进一步对星状图每个站位上不同生物标志物(NKA、NKCC、SLC4A4 和 SLC26A6)的测定结果进行赋值, 计算星状图的面积得出不同盐胁迫后的 IBR 值, 可以更好地区分不同盐胁迫的差异影响。本研究中 NaHCO_3 胁迫组的 IBR 值最小, 表明酶的活性较低, 即 NaHCO_3 胁迫对离子转运酶活性的抑制作用明显。同为中性盐的 Na_2SO_4 胁迫组 IBR 值显著高于 NaCl 胁迫组, 推测和鱼类缺乏吸收或调节硫酸盐的主动机制有关, 有待深入研究。

Ccl20 是一种重要的免疫调节因子, 有重要的免疫调节作用, 是先天性免疫和适应性免疫之间的桥梁^[25]。*Dapk2* 是一种钙/钙蛋白调节的 Ser/Thr 激酶, 可以调节自噬细胞死亡、促进炎症期间的细胞募集^[26-27]。 γ -IFN 是参与辅助性 T 淋巴细胞 1 (Th1) 免疫反应中的关键细胞因子之一。

虹鳊(*Oncorhynchus mykiss*) *Ccl20* 基因的表达分析表明, *Ccl20* 在黏膜免疫中起重要作用^[28]。徐等^[29]发现比目鱼(*Paralichthys olivaceus*)感染迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)后 *Dapk* 表达上调。接种 γ -IFN 的大菱鲈(*Scophthalmus maximus*)与未接种的鱼相比, 在细菌感染后, γ -IFN 和促炎症细胞因子的表达增加^[30]。免疫反应是鱼类应对环境变化的重要机制。本研究中, 在 3 种盐胁迫后 *Dapk2*、 γ -IFN 表达均下调, 说明 3 种盐胁迫使得鳊鳃组织炎症的调节受到抑制, 也在一定程度上降低了免疫机能。在 NaCl 、 Na_2SO_4 胁迫 24 h 时 *Ccl20* 表达量最高, 说明机体免疫反应正在进行, *Ccl20* 指引免疫细胞到达组织各个位置, 而在 NaHCO_3 胁迫中, *Ccl20* 表达始终受到了抑制, 也反映了 NaCl 、 Na_2SO_4 胁迫与 NaHCO_3 胁迫的差异。

本研究首次报道了不同盐(NaCl 、 Na_2SO_4 和 NaHCO_3)对鳊的毒害作用, 但实验中也存在不足之处: 210 mmol/L Na^+ 相对于 NaHCO_3 胁迫的半致死浓度而言浓度较高, 预实验中在 210 mmol/L NaHCO_3 胁迫后 1 h 内全部死亡, 也体现了该浓度胁迫的生物学意义, 即造成严重的损伤。不同规格的鱼对环境的耐受性也存在差异, 今后应补充低浓度胁迫和不同规格鱼的实验, 以全面评价不同盐胁迫对鳊的毒性影响。实际的盐碱水域中离子成分复杂, 实验中以单一盐胁迫也不能准确模拟自然盐碱水体, 需进一步考量混合离子成分的作用。

4 结论

在 210 mmol/L Na^+ 胁迫下, 3 种盐均对鳊产生明显的毒害作用。 NaHCO_3 胁迫引起鳊应激反应强烈, 严重抑制免疫机能, 降低炎症的调节功能, 且对大部分离子转运酶(NKCC、SLC4A4 和 SLC26A6)活性的抑制作用明显, 即离子转运酶活性的综合响应最小, 导致血清渗透压在转入淡水后不能恢复。 NaCl 和 Na_2SO_4 胁迫对鳊毒害影响弱于 NaHCO_3 胁迫, 免疫机能尚未完全抑制, 可通过部分离子转运酶活性(NKA 和 SLC4A4)来响应环境变化, 从而使其血清渗透压能接近初始水平, 其中 Na_2SO_4 胁迫下离子转运酶活性的综合响应最大。

参考文献:

- [1] Hu Y, Yang F, Yang N, et al. Analysis and prospects of saline-alkali land in China from the perspective of utilization[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2023, 54(2): 489-494. [胡炎, 杨帆, 杨宁, 等. 盐碱地资源分析及利用研究展望[J]. 土壤通报, 2023, 54(2): 489-494.]
- [2] Wang W W, Zhao Y, Wang W, et al. Evaluation of salt tolerance mechanism and study on salt tolerance relationship of different salt-tolerant wheat varieties[J]. Computational Intelligence and Neuroscience, 2022, 2022: 2395568.
- [3] Niu J S, Li Z J, Zhu J R, et al. Genome-wide identification and characterization of the C2 domain family in *Sorghum bicolor* (L.) and expression profiles in response to saline-alkali stress[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants: an International Journal of Functional Plant Biology, 2022, 28(9): 1695-1711.
- [4] Zhang J L, Li J Y, Wang Y C, et al. Identification and analysis of differentially-expressed genes under salt stress in leaves of southern type alfalfa (*Medicago sativa* Millennium) salt tolerant mutant[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2017, 25(10): 1588-1599. [张婧蕾, 李佳赟, 王依纯, 等. 南方型紫花苜蓿耐盐突变体叶片盐胁迫应答差异基因鉴定与分析[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(10): 1588-1599.]
- [5] Zhou W J, Chang Y M, Liang L Q, et al. Toxic effects of salinity (NaCl) and alkalinity (NaHCO₃) on crucian carp *Carassius auratus* Linnaeus in Dali Lake[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28(4): 340-346. [周伟江, 常玉梅, 梁利群, 等. 氯化钠盐度和碳酸氢钠碱度对达里湖鲫毒性影响的初步研究[J]. 大连海洋大学学报, 2013, 28(4): 340-346.]
- [6] Su H H, Ma D M, Zhu H P, et al. Transcriptomic response to three osmotic stresses in gills of hybrid tilapia (*Oreochromis mossambicus* female $\times$ *O. urolepis hornorum* male)[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 110.
- [7] Mi R F. Determination of hematological indexes of grass carp, carp and silver carp[J]. Freshwater Fisheries, 1982, 12(4): 10-16. [米瑞芙. 草鱼、鲤和鲢血液学指标的测定[J]. 淡水渔业, 1982, 12(4): 10-16.]
- [8] Hebert S C, Mount D B, Gamba G. Molecular physiology of cation-coupled Cl⁻ cotransport: The SLC12 family[J]. Pflügers Archiv: European Journal of Physiology, 2004, 447(5): 580-593.
- [9] Parks S K, Tresguerres M, Goss G G. Interactions between Na⁺ channels and Na⁺-HCO₃⁻ cotransporters in the freshwater fish gill MR cell: A model for transepithelial Na⁺ uptake[J]. American Journal of Physiology Cell Physiology, 2007, 292(2): C935-C944.
- [10] Wilson J M, Laurent P, Tufts B L, et al. NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: An immunological approach to ion-transport protein localization [J]. The Journal of Experimental Biology, 2000, 203(Pt 15): 2279-2296.
- [11] Tong Y, Chen L Q, Zhuang P, et al. Cortisol, metabolism response and osmoregulation of juvenile *Acipenser schrenckii* to ambient salinity stress[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(S1): 38-44. [童燕, 陈立侨, 庄平, 等. 急性盐度胁迫对施氏鲟的皮质醇、代谢反应及渗透调节的影响[J]. 水产学报, 2007, 31(S1): 38-44.]
- [12] Ma Q H, Chen X Y, Wei W, et al. Cloning and expression analysis of AP-1 gene in *Gymnocypris przewalskii*[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(7): 2964-2971. [马清花, 陈雪妍, 卫唯, 等. 青海湖裸鲤 AP-1 基因的克隆与表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(7): 2964-2971.]
- [13] Zhao Y, Wang Y L, Song L Y, et al. Effects of chronic alkalinity stress on immune response in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Aeromonas hydrophila* [J]. Aquaculture, 2022, 561: 738599.
- [14] Zhang C S, Zhou H T, Zeng M D, et al. Effects of pH stress on serum pH, oxygen consumption rate and detoxification-related gene expression of *Siniperca chuatsi*[J]. Freshwater Fisheries, 2020, 50(5): 31-38. [张成硕, 周昊天, 曾萌冬, 等. 酸碱胁迫对鳊血清 pH、耗氧率及解毒相关基因表达的影响[J]. 淡水渔业, 2020, 50(5): 31-38.]
- [15] Beliaeff B, Burgeot T. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2002, 21(6): 1316-1322.
- [16] Ran F X, Jin W J, Huang S, et al. Research progress on the effects of salinity change on fish[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2020, 48(8): 10-18. [冉凤霞, 金文杰, 黄岫, 等. 盐度变化对鱼类影响的研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, 48(8): 10-18.]
- [17] Wilkie M P, Wood C M. The adaptations of fish to extremely alkaline environments[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1996, 113(4): 665-673.
- [18] Breves J P, Hasegawa S, Yoshioka M, et al. Acute salinity challenges in Mozambique and Nile tilapia: Differential responses of plasma prolactin, growth hormone and branchial expression of ion transporters[J]. General and Comparative Endocrinology, 2010, 167(1): 135-142.
- [19] Choi C Y, An K W. Cloning and expression of Na⁺/K⁺ - ATPase and osmotic stress transcription factor 1 mRNA in

- black porgy, *Acanthopagrus schlegelii* during osmotic stress[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, Biochemistry & Molecular Biology, 2008, 149(1): 91-100.
- [20] Yang W K, Hseu J R, Tang C H, et al. Na^+/K^+ -ATPase expression in gills of the euryhaline sailfin molly, *Poecilia latipinna*, is altered in response to salinity challenge[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2009, 375(1-2): 41-50.
- [21] Wang Y, Zhao J L, Zhao Y, et al. Influence of alkalinity on serum osmolality, ion concentration and ion transport enzymes activity of *Oreochromis niloticus*[J]. Ecological Science, 2017, 36(4): 12-20. [王燕, 赵金良, 赵岩, 等. 碱度对尼罗罗非鱼血清渗透压、离子浓度及离子转运酶活力的影响[J]. 生态科学, 2017, 36(4): 12-20.]
- [22] Wang Z L, Liu F B, Huang B S, et al. Cloning and expression analysis of *NHE3* and *NKA α 1a* in cobia (*Rachycentron canadum*) and targeted regulation of related miRNAs[J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(5): 41-54. [王忠良, 刘付柏, 黄宝松, 等. 军曹鱼 *NHE3* 和 *NKA α 1a* 基因克隆、表达模式及相关 miRNA 的靶向调控[J]. 水产学报, 2023, 47(5): 41-54.]
- [23] Tipsmark C K, Luckenbach J A, Madsen S S, et al. Osmoregulation and expression of ion transport proteins and putative claudins in the gill of southern flounder (*Paralichthys lethostigma*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology, 2008, 150(3): 265-273.
- [24] 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.]
- [25] Liu F G, Wang T Y, Hu Y, et al. Expansion of fish CCL20-like chemokines by genome and local gene duplication: Characterisation and expression analysis of 10 CCL20-like chemokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2020, 103: 103502.
- [26] Ber Y, Shiloh R, Gilad Y, et al. DAPK2 is a novel regulator of mTORC1 activity and autophagy[J]. Cell Death and Differentiation, 2015, 22(3): 465-475.
- [27] Geering B, Stoeckle C, Rozman S, et al. DAPK2 positively regulates motility of neutrophils and eosinophils in response to intermediary chemoattractants[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2014, 95(2): 293-303.
- [28] Liu F G, Wang T Y, Secombes C, et al. Characterization of ten CCL20-like chemokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Sequence and expression analysis[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 91: 446.
- [29] Xu Y Q, Feng Y, Li S, et al. Identification and characterization of apoptosis-related gene serine/threonine kinase 17A (STK17A) from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2020, 98: 1008-1016.
- [30] Pereiro P, Forn-Cuni G, Figueras A, et al. Pathogen-dependent role of turbot (*Scophthalmus maximus*) interferon-gamma[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 59: 25-35.

Effects of different salt stress on osmolality, ion transport system, and immune-related genes in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)

LI Shuaishuai^{1,2,3}, WANG Yanling^{1,2,3}, YAO Xiaoli^{1,2,3}, ZHAO Jinliang^{1,2,3}, ZHAO Yan^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Freshwater Fishery Germplasm Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: China has abundant saline-alkaline water resources, mainly including the North China coastal composite type, Northwest sulfate type, and Northeast carbonate type, which differ in their ion composition, being mainly composed of Cl^- , SO_4^{2-} , and HCO_3^- . The toxic effects of saline-alkaline water on aquatic organisms are mainly caused by factors such as high ionic concentration, osmotic effect, and high pH. Simulating the saline-alkaline habitat in the laboratory has practical and guiding significance for the rational development of corresponding taming and screening schemes based on the toxic effects of different saline-alkaline water types. To investigate the toxic effects of different salts on mandarin fish (*Siniperca chuatsi*), acute stress tests were conducted with NaCl, Na_2SO_4 , and NaHCO_3 at equal cation concentrations ($\text{Na}^+=210$ mmol/L). Blood and gill tissues were collected at 0, 12, and 24 hours after the NaCl and Na_2SO_4 stress tests, and at 24 and 72 hours after freshwater recovery. Blood and gill tissues were also collected at 0.5 hours after the NaHCO_3 stress test and at 2 and 4 hours after freshwater recovery. The serum osmotic pressure, electrolyte concentrations, and enzyme activities of Na^+/K^+ -ATPase (NKA), $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter (NKCC), $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter (SLC4A4), and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ion exchanger (SLC26A6) were analyzed. The expression levels of immune-related genes (*Ccl20*, γ -*IFN*, *Dapk2*) were also examined. The results showed that under 210 mmol/L Na^+ stress, the Na^+ concentration in the serum of the mandarin fish fluctuated significantly in all the three salt stress groups, while the changes in Cl^- and K^+ concentration were weak. The NKA enzyme activity in gill tissues was upregulated, and the NKCC and SLC26A6 enzyme activities were inhibited. Further, γ -*IFN* and *Dapk2* were downregulated. Unlike the fish in the NaCl and Na_2SO_4 stress test groups, the mandarin fish had a stronger stress response in the NaHCO_3 stress test group, and the serum osmotic pressure could not be restored after transferring to freshwater. The SLC4A4 enzyme activity was inhibited, and the expression levels of *Ccl20* were downregulated. Therefore, the NaHCO_3 stress had a stronger toxic effect on mandarin fish than either NaCl or Na_2SO_4 stress. NaHCO_3 stress inhibited immune function and significantly inhibited the activity of most ion transporters, leading to the failure of serum osmotic regulation after being transferred to fresh water, while the osmotic regulation was functional under NaCl and Na_2SO_4 stress. The research results have practical significance for the rational development of taming and screening schemes of mandarin fish for different saline-alkaline water types.

Key words: mandarin fish; salt stress; osmolality; serum ions; ion transport; immunity

Corresponding author: ZHAO Yan. E-mail: y_zhao@shou.edu.cn