

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00556

pH 胁迫对中国明对虾抗氧化系统酶活力及基因表达的影响

王芸^{1,2}, 李健², 李吉涛², 何玉英², 常志强², 刘德月²

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

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

摘要: 研究了 pH 胁迫对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)抗氧化系统的影响, 将中国明对虾暴露于 pH7.0、9.0 的水体中 148 h, 于胁迫后 0、3、12、24、48、72、96、120、148 h 测定鳃、肝胰腺、肌肉和血淋巴总抗氧化活力(T-AOC)、抗超氧阴离子活力、过氧化氢酶(CAT)活力和 CAT、过氧化物还原酶(Prx)基因表达的影响, 以 pH8.2 作为对照。结果显示, pH 胁迫 12~24 h, 对虾各组织 T-AOC、抗超氧阴离子、CAT 酶活力及 CAT 基因表达均增加, pH 胁迫 120~148 h 上述指标受到抑制。对虾肝胰腺和肌肉 Prx 基因表达随胁迫时间增加逐渐升高, 鳃和血淋巴 Prx 基因表达随胁迫时间增加呈下降趋势。高 pH(9.0)胁迫时, 对虾鳃抗氧化系统酶活力及基因表达水平达峰时间较其他 3 个组织明显缩短; 而低 pH(7.0)胁迫时, 对虾肝胰腺抗氧化系统酶活力比其他组织变化快。实验结果表明, pH 胁迫 3~24 h 对中国明对虾抗氧化系统酶活力及相关基因表达有一定的诱导效果, 但胁迫 120~148 h 则抑制其抗氧化系统功能, 可能会导致中国明对虾机体的氧化损伤; 中国明对虾鳃和肝胰腺分别对高、低 pH 胁迫较敏感。

关键词: 中国明对虾; pH 胁迫; 总抗氧化能力; 抗超氧阴离子能力; 过氧化氢酶; 过氧化物还原酶

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)03-0556-09

pH 值是一种易于变化的养殖水环境因子, 对水质及水生生物有多方面的影响, 如 pH 值的剧烈变化可抑制对虾免疫系统功能, 降低对虾的抗感染能力^[1-2]。研究认为环境胁迫因子(如水体 pH、温度、盐度等)变化诱导的生理效应可能经由氧化还原途径实现^[3-5], 即环境胁迫因子造成生物体内有氧代谢异常, 活性氧自由基大量积累而引起机体氧化损伤^[6]。由此可将抗氧化系统作为评估 pH 胁迫对生物体产生氧化胁迫效应的一类生物标志物。pH 胁迫对水生生物抗氧化系统有较明显的影响。高 pH 值胁迫显著增加海洋卡盾藻(*Chattonella marina*)和栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)体内活性氧自由基含量^[7-8]; 高、低 pH 胁迫均导致背角无齿蚌(*Anodonta woodiana* Lea)抗氧化酶活

性降低^[9], 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)血淋巴活性氧含量、肝胰腺抗氧化酶、铁蛋白基因表达水平的升高及血淋巴细胞的 DNA 损伤^[10-11]。

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)是中国重要的经济养殖虾类之一^[12], 与其他水生生物一样, 中国明对虾养殖过程中亦面临众多环境胁迫因子的威胁, 目前已证实 pH 胁迫对扇贝、凡纳滨对虾等生长、免疫功能均有不同程度影响, 但 pH 胁迫对中国明对虾特别是对其抗氧化系统的影响目前尚缺乏相应的基础数据, 本研究通过分析 pH 胁迫对中国明对虾体内总抗氧化活力(T-AOC)、抗超氧阴离子、CAT 活力及 CAT、Prx 基因表达的变化情况, 从体内抗氧化系统酶活力和基因表达的角度, 探讨不同时间段内中国明对

收稿日期: 2010-11-06; 修订日期: 2011-01-22.

基金项目: 国家自然科学基金项目(40706052); 农业部公益性行业专项(200803012, 201103034); 国家虾产业技术体系项目(CARS-47); 国家 863 计划项目(2010AA10A401); 科技部农业科技成果转化资金项目(2010GB23260589).

作者简介: 王芸 (1981-), 女, 博士研究生, 主要从事环境毒理学研究. Tel: 0532-85826690; E-mail: wangyun088@tom.com

通信作者: 李健, 研究员. E-mail: Tel: 0532-85830183; lijian@ysfri.ac.cn

虾应对 pH 胁迫的反应机制, 以期为健康养殖和抗逆品种选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中国明对虾购自山东青岛宝荣水产科技发展有限公司, 体长(11.2 ± 0.4) cm, 体质量(17.6 ± 1.9) g, 暂养于 PVC 桶(容积 200 L)中, 每日投喂蛤肉 4 次, 连续充气, 1 周后开始试验。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设置 实验共设 3 组, 分别为对照组(pH 8.2)、低 pH 胁迫组(pH 7.0)、高 pH 胁迫组(pH 9.0), 每组 8 个平行, 每个平行 10 尾对虾。分别使用 HCl 和 NaOH 调整 pH 值至 7.0 和 9.0 (METTLER TOLEDO SG2 型 pH 计测定)。实验期间水温($27 \sim 30$) $^{\circ}\text{C}$, 盐度(19)相对稳定。pH 胁迫后第 0、3、12、24、48、72、96、120 和 148 h 分别从每个实验组随机挑选 6 尾对虾取样。

1.2.2 样品处理 用 1 mL 一次性注射器吸取 0.5 mL 预冷(4°C)的抗凝剂^[13], 从对虾的围心腔抽取 0.5 mL 的血淋巴液, 混合均匀后加入 1 mL 无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中, 离心(4°C , 800 g, 15 min), 取上清(抗氧化酶活性测定)置 -80°C 冰箱保存; 血淋巴细胞(总 RNA 提取)加入 0.5 mL 的 TRIzol(Invitrogen), 置 -80°C 冰箱保存。鳃、肝胰腺、肌肉加液氮研磨成粉末, 取 50 mg 样品迅速转至 1.5 mL 离心管(内含 1 mL TRIzol 液), 置 -80°C 冰箱保存用于总 RNA 提取; 剩余组织样品(肝、鳃和肌肉), 按照 1:10(W/V)加入预冷 PBS 缓冲溶液(pH 6.4)放置冰上以玻璃匀浆器匀浆, 离心(4°C , 800 g, 10 min)取上清液置 -80°C 冰箱保存用于组织抗氧化酶活测定。

1.2.3 抗氧化酶活性的测定 T-AOC、抗超氧阴离子能力、CAT 活性测定均根据试剂盒说明书进行(试剂盒购自南京建成生物工程研究所)。其中 37°C 时, 每分钟每毫克组织蛋白使反应体系的吸光度(OD)值每增加 0.01 时, 定义为 1 个总抗氧化能力(T-AOC)单位; 每克组织蛋白在 37°C 反应 40

min 所抑制的超氧阴离子自由基相当于 1 mg 的维生素 C 所抑制的超氧阴离子自由基的变化值为 1 个活力单位; 每毫克组织蛋白每秒钟分解 $1 \mu\text{mol}$ 的 H_2O_2 的量为 1 个 CAT 活力单位。组织蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定^[14]。

1.3 抗氧化酶基因的表达分析

1.3.1 引物设计 根据中国明对虾 CAT、过氧化物还原酶(Prx)cDNA 序列, 以 Primer Primer 5.0 设计 Real-time PCR 扩增特异性引物, 中国明对虾 18S rRNA 扩增引物参照文献[15], 引物序列详见表 1。引物合成和 cDNA 序列测定委托上海生工生物工程有限公司完成。

1.3.2 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 将保存于 -80°C 冰箱的样品取出后于冰上融化, 并按照 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA, RNA 沉淀用 DEPC 水溶解, 用核酸定量仪(Thermo Scientific)测定 260 nm 和 280 nm 处的吸收值, 检测 RNA 的产量和纯度, 并使用 1%琼脂糖凝胶进行 RNA 非变性电泳检测 RNA 的完整性。取等量($2 \mu\text{g}$)的 RNA, 按照 M-MLV(Promega)说明书反转录各组织的总 RNA, 合成 cDNA 第一链。

1.3.3 Real-time PCR 扩增 采用 Real-time PCR (SYBR Green) $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量方法, 按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa)试剂盒说明书进行操作, 反应体系如下: 反应总体积共 $20 \mu\text{L}$, SYBR® Premix Ex Taq™ II ($2\times$) $10.0 \mu\text{L}$, Rox reference Dye II ($50\times$) $0.4 \mu\text{L}$, Forward primer ($10 \mu\text{mol/L}$) $0.8 \mu\text{L}$, Reverse primer ($10 \mu\text{mol/L}$) $0.8 \mu\text{L}$, cDNA $1.0 \mu\text{L}$, dd H_2O $7 \mu\text{L}$ 。将样品在 PCR 管内混匀后分装入 96 孔 PCR 板(Axygen)中, 瞬时离心后放入 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪中进行 PCR 扩增, 反应程序为: 95°C 预变性 30 s; 循环条件为 95°C 5 s, 60°C 34 s, 共 40 个循环; 熔解曲线条件为 95°C 15 s, 60°C 1 min, 95°C 15 s, 60°C 15 s。反应完成后, 用 ABI 7500 system 分析软件分析结果。

1.3 统计分析

所得数据均以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示, 用 SPSS 16.0 进行方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 pH 胁迫对中国明对虾抗氧化酶活力的影响

2.1.1 pH 胁迫对中国明对虾 T-AOC 的影响 正常 pH 条件下, 中国明对虾各组织总抗氧化活力(T-AOC)存在组织差异性, 由大到小依次为肝胰腺、鳃、肌肉、血淋巴。pH 胁迫后对虾各组织 T-AOC 整体呈现先升高后降低的变化趋势, 其中 pH7.0 胁迫组, 中国明对虾肝胰腺 T-AOC 在胁迫后 3 h 即达峰值, 肌肉和血淋巴 T-AOC 均在胁迫后 24 h 达最大值($P<0.05$), 之后逐渐降低; pH 9.0 胁迫组, 中国明对虾鳃、肌肉 T-AOC 活力达

峰时间分别为 12 h 和 3 h, 早于肝胰腺和血淋巴(图 1)。

2.1.2 pH 胁迫对中国明对虾抗超氧阴离子活力的影响 正常 pH 条件下对虾各组织抗超氧阴离子能力从大到小依次为鳃、肝胰腺、肌肉、血淋巴。pH 胁迫后中国明对虾各组织抗超氧阴离子活力整体呈现先升高后降低的变化趋势。pH7.0 胁迫条件下, 中国明对虾肝胰腺、肌肉和血淋巴抗超氧阴离子活力均在 24 h 最高($P<0.05$); pH9.0 胁迫组, 中国明对虾鳃、肝胰腺、肌肉组织和血淋巴抗超氧阴离子活力分别于 12 h、24 h、72 h 和 48 h 达峰值($P<0.05$), 之后逐渐降低(图 2)。

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

基因名称 gene	正向引物(5'-3') forward primer(5'-3')	反向引物(5'-3') reverse primer(5'-3')	产物大小/bp size of production
CAT	ACTCCCATGTGCTGTTCTG	ATCCCAATTCCTTCTTCTG	114
Prx	CACCTTTGTCTGCCCCACT	GCAACCACTTCGCATCCA	219
18S rRNA	AGTAGCCGCCCTGGTTGTAGAC	TTCTCCATGTCGTCCCAGT	218

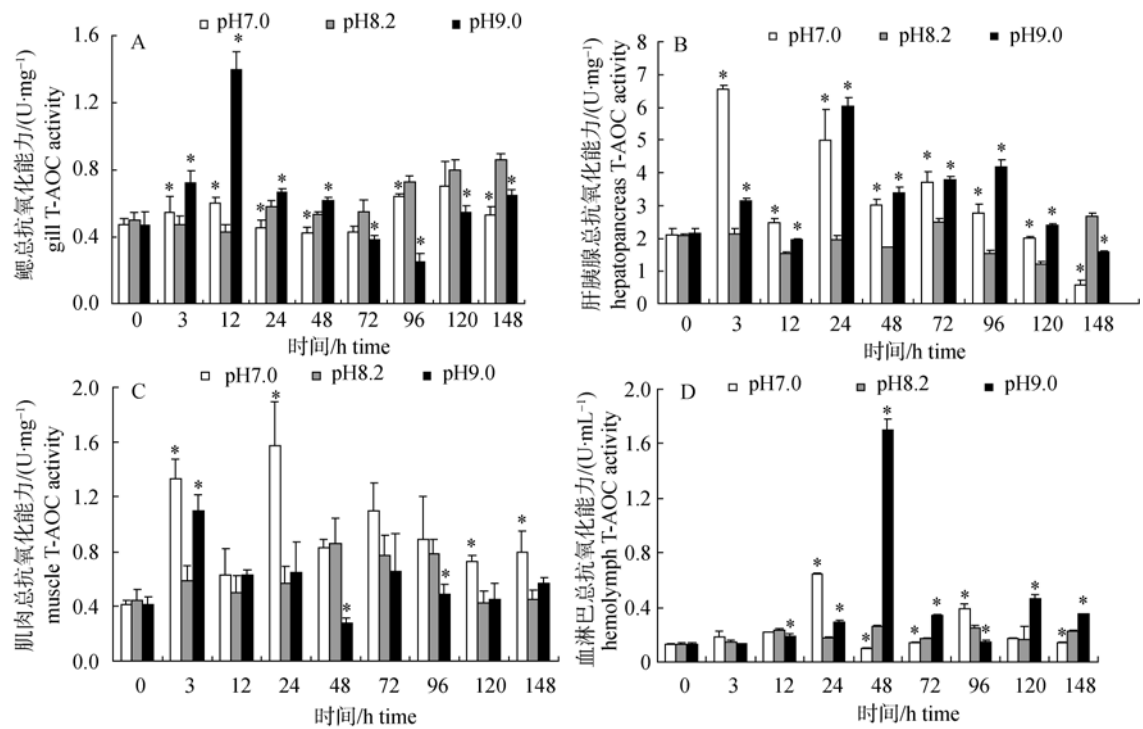


图 1 中国明对虾不同组织总抗氧化能力(T-AOC)随 pH 胁迫时间的变化情况

A. 鳃; B. 肝胰腺; C. 肌肉; D. 血淋巴. *表示与对照组(pH8.2)相比差异显著($P<0.05$).

Fig. 1 Changes of total antioxidation activity (T-AOC) in different *Fenneropenaeus chinensis* tissues after exposure to pH stress
A. gill; B. hepatopancreas; C. muscle; D. haemocyte. *means significant difference between pH stress groups and control group (pH8.2) at 0.05 level.

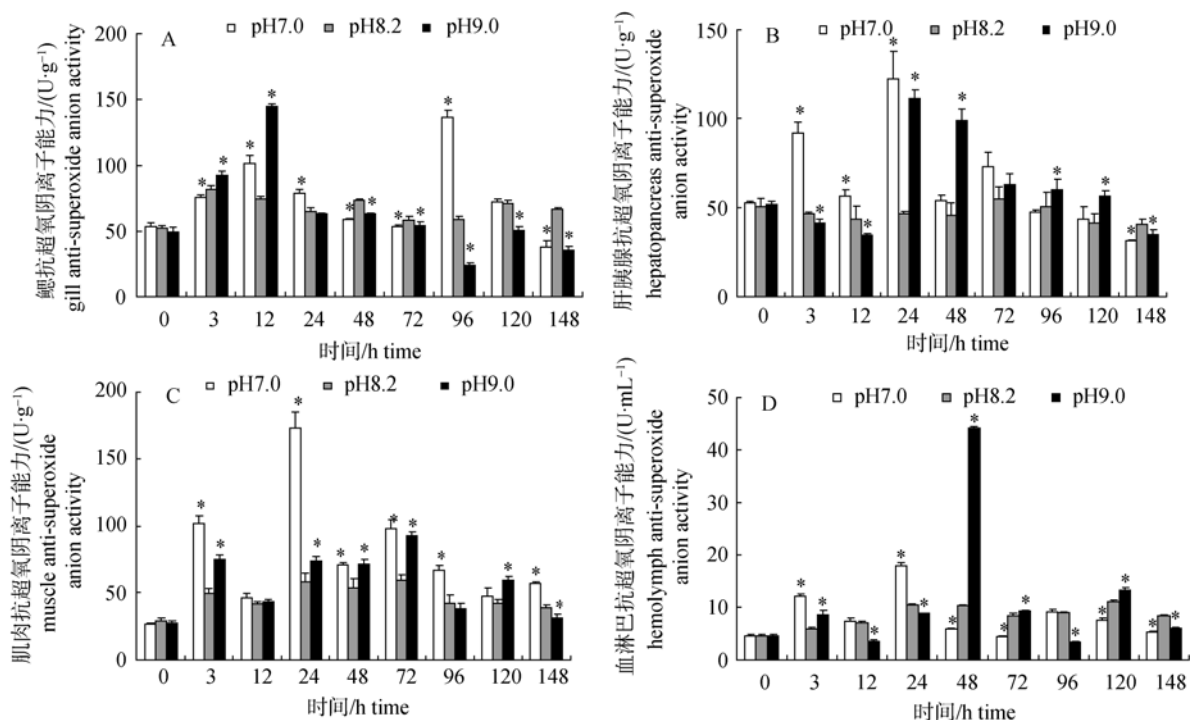


图 2 中国明对虾不同组织抗超氧阴离子能力随 pH 胁迫时间的变化情况

A. 鳃; B. 肝胰腺; C. 肌肉; D. 血淋巴。*表示与对照组(pH8.2)相比差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 2 Changes of anti-superoxide anion activity in different *Fenneropenaeus chinensis* tissues after exposure to pH stress A. gill; B. hepatopancreas; C. muscle; D. haemocyte. *means significant difference between pH stress groups and control group (pH8.2) at 0.05 level.

2.1.3 pH 胁迫对中国明对虾 CAT 活力的影响

正常 pH 条件下, 中国明对虾各组织 CAT 活力从大到小依次为肝胰腺、鳃、肌肉、血淋巴。pH 胁迫后, 中国明对虾各组织 CAT 活性整体呈现先升高后降低的变化趋势。pH7.0 胁迫组, 中国明对虾鳃、肝胰腺、肌肉组织和血淋巴 CAT 活力分别于 96 h、12 h、24 h 和 24 h 达峰值($P < 0.05$), 之后逐渐降低; pH9.0 胁迫组, 中国明对虾鳃、肌肉组织 CAT 活力均在 3 h 最高, 而肝胰腺和血淋巴 CAT 活力则在 24 h 达峰值($P < 0.05$), 之后逐渐降低(图 3)。

2.2 pH 胁迫对中国明对虾抗氧化酶基因表达的影响

2.2.1 pH 胁迫对中国明对虾 CAT 基因表达的影响

pH7.0 胁迫条件下, 中国明对虾鳃、肌肉和血淋巴 CAT 基因表达整体呈现先升高、后降低、再升高、再降低的波浪式变化趋势, 均在 72 h 达峰值($P < 0.05$), 肝胰腺 CAT 基因表达水平均显著高于对照组($P < 0.05$), 且于 12 h 达峰值($P < 0.05$); pH9.0 胁迫组, 中国明对虾鳃、肝胰腺、肌肉组织和血

淋巴 CAT 基因表达水平整体呈现先升高、后降低、再升高的变化趋势, 分别于 3 h、72 h、24 h 和 24 h 达峰值($P < 0.05$, 图 4)。

2.2.2 pH 胁迫对中国明对虾 Prx 基因表达的影响

pH7.0 胁迫组, 中国明对虾鳃和肝胰腺 Prx 基因表达呈现先降低、后升高的变化趋势, 均在 120 h 达峰值($P < 0.05$), 肌肉 Prx 基因表达水平基本显著高于对照组($P < 0.05$), 且于 72 h 达峰值($P < 0.05$), 血淋巴 Prx 基因表达水平 12 h 达峰值($P < 0.05$), 之后逐渐降低; pH9.0 胁迫组, 中国明对虾鳃和肌肉组织 Prx 基因表达水平基本呈现先升高、后降低的变化趋势, 分别于 3 h 和 120 h 达峰值($P < 0.05$), 肝胰腺和血淋巴 Prx 基因表达水平呈现先降低后升高的变化趋势, 分别于 148 h 和 96 h 达峰值($P < 0.05$, 图 5)。

3 讨论

活性氧(氧自由基)主要包括超氧阴离子(O_2^-)、羟自由基和 H_2O_2 , 其中超氧阴离子的寿命最长^[16],

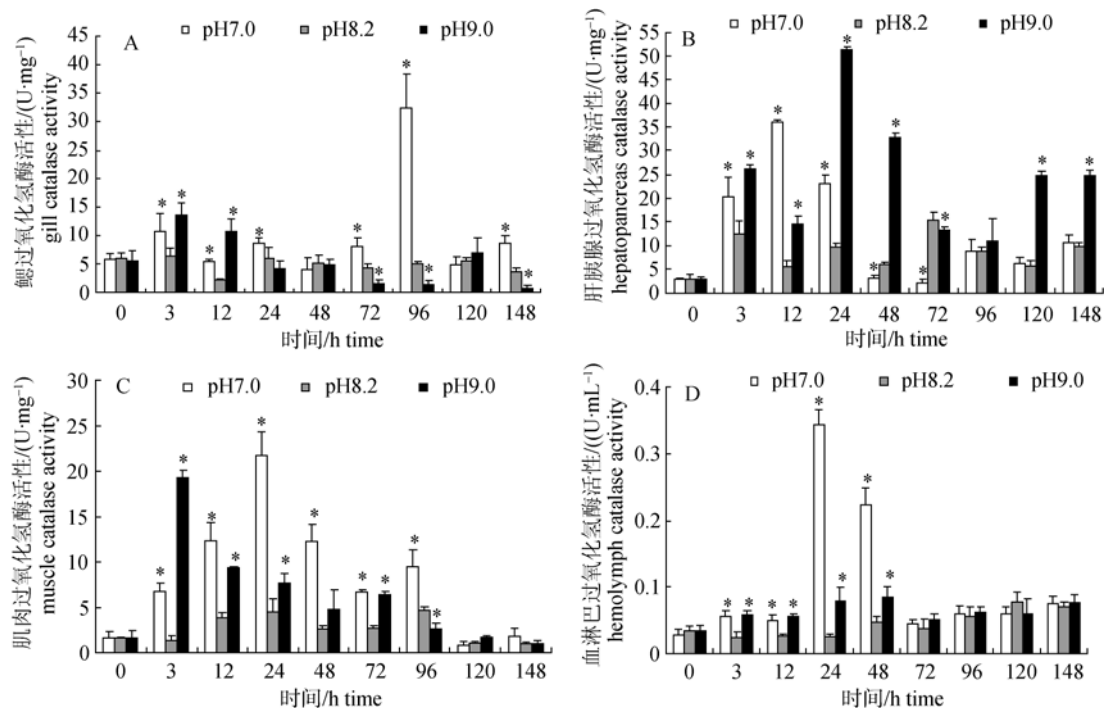


图 3 中国明对虾不同组织 CAT 活性随 pH 胁迫时间的变化情况

A. 鳃; B. 肝胰腺; C. 肌肉; D. 血淋巴. *表示与对照组(pH8.2)相比差异显著($P<0.05$).

Fig. 3 Changes of catalase activity in different *Fenneropenaeus chinensis* tissues after exposure to pH stress
A. gill; B. hepatopancreas; C. muscle; D. haemocyte. *means significant difference between pH stress groups and control group (pH8.2) at 0.05 level.

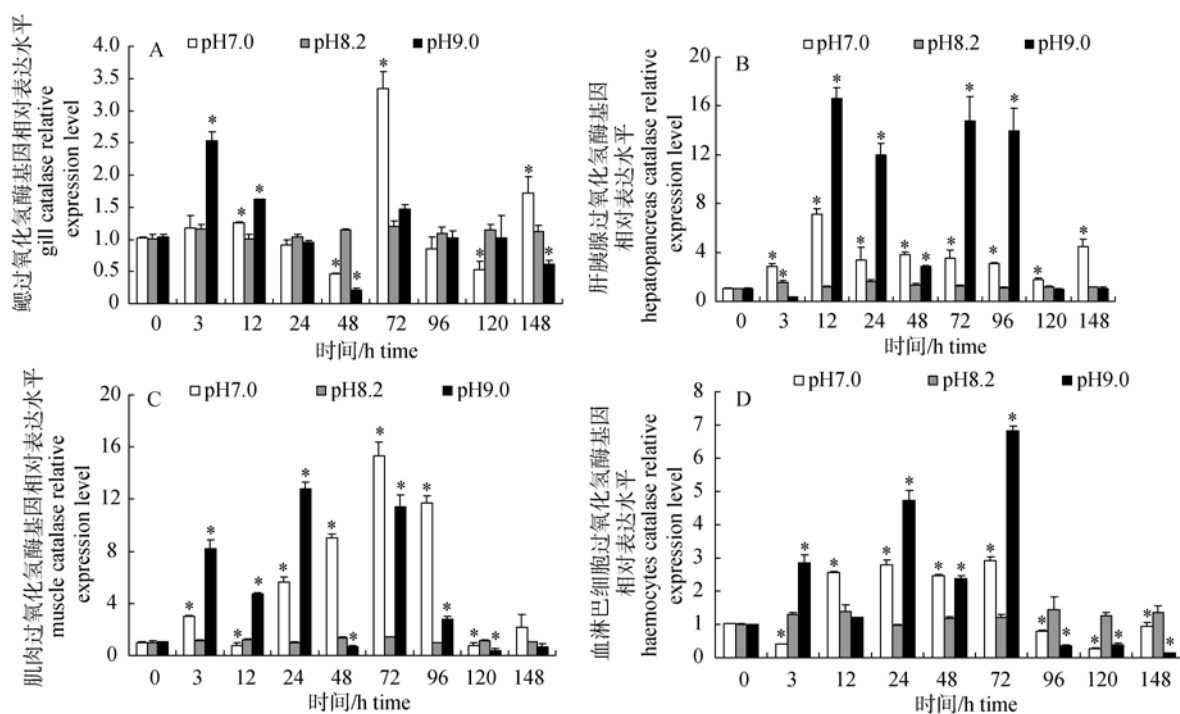


图 4 中国明对虾不同组织 CAT 基因相对表达水平随 pH 胁迫时间的变化情况

A. 鳃; B. 肝胰腺; C. 肌肉; D. 血淋巴. *表示与对照组(pH8.2)相比差异显著($P<0.05$).

Fig. 4 Relative expression of catalase gene in different *Fenneropenaeus chinensis* tissues after exposure to pH stress
A. gill; B. hepatopancreas; C. muscle; D. haemocyte. *means significant difference between pH stress groups and control group (pH8.2) at 0.05 level.

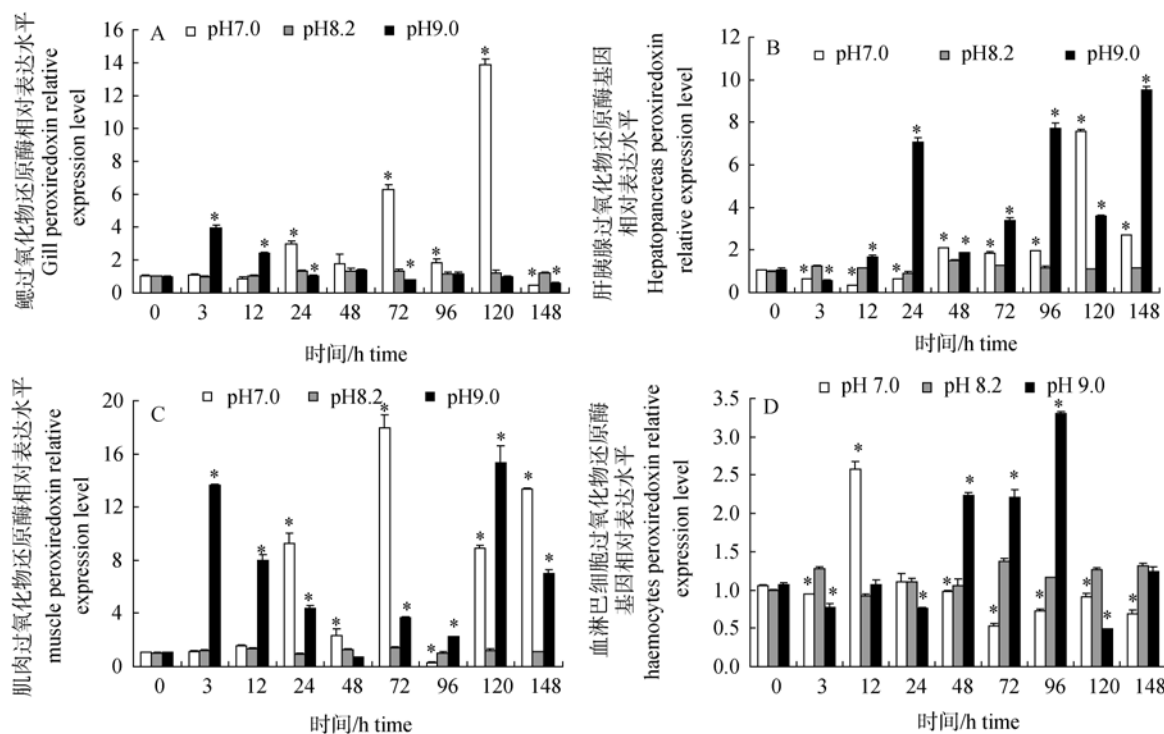


图 5 中国明对虾不同组织 *Prx* 基因相对表达水平随 pH 胁迫时间的变化情况

A. 鳃; B. 肝胰腺; C. 肌肉; D. 血淋巴. *表示与对照组(pH8.2)相比差异显著($P < 0.05$).

Fig. 5 Relative expression of peroxidase gene in different *Fenneropenaeus chinensis* tissues after exposure to pH stress
A. gill; B. hepatopancreas; C. muscle; D. haemocyte. *means significant difference between pH stress groups and control group (pH8.2) at 0.05 level.

可从产生位置扩散至较远的靶位置^[17]。适量的活性氧对机体具有一定的保护作用,但过量的活性氧可导致氧化胁迫^[18]。体内抗氧化系统由非酶类及酶促体系组成,后者包括过氧化氢酶、过氧化物还原酶等,机体通过抗氧化系统清除过量的活性氧,保护各组织免受氧化损伤^[19]。

3.1 pH 胁迫对中国明对虾 T-AOC、抗超氧阴离子和 CAT 活力的影响

本实验发现中国明对虾抗氧化酶活力存在组织差异性,肝胰腺 T-AOC 和 CAT 活力明显高于其他 3 个组织,与三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)的研究报道相一致^[20]。这可能与不同组织的功能定位有关。由于活性氧伴随物质代谢过程而产生,因此代谢强度愈大,产生的活性氧越多。肝胰腺作为对虾蛋白质、脂类等营养物质的代谢中心,需要更强的抗氧化体系清除肝胰腺中的多余活性氧。

pH 胁迫 3 h 后对虾各组织 T-AOC、抗超氧阴离子和 CAT 活力升高,可能是 pH 的突然变化诱

导中国明对虾体内活性氧增加,对虾组织反馈性增强抗氧化系统酶活力,以清除多余的活性氧;各项指标基本在 12~24 h 达峰值,这与 Stebbing 提出的“毒物兴奋效应”表现类似^[21]。但 pH 胁迫中国明对虾 148 h,各组织 T-AOC、抗超氧阴离子和 CAT 活力均低于对照组,说明长时间 pH 胁迫抑制了对虾抗氧化系统酶活力。据报道,活性氧过度积累可破坏细胞电子传递链、线粒体膜电位及 ATP 能量产生,进而导致细胞的呼吸障碍,严重时甚至引起细胞的凋亡或者坏死,机体抗氧化能力明显降低^[22-23]。但长时间 pH 胁迫是否造成中国明对虾各组织细胞凋亡或坏死,仍需通过组织切片证实。

实验还发现,中国明对虾肝胰腺和鳃抗氧化系统酶活力分别在低 pH(7.0)和高 pH(9.0)胁迫时最先达到峰值,说明对虾不同组织对 pH 胁迫的敏感程度存在差异。低 pH 环境下,对虾血淋巴 pH 降低,血蓝蛋白与氧气的结合能力下降^[24],可

能引起组织缺氧,进而导致参与电子转运的黄素二核腺苷酸(FADH)、半醌辅酶 I(NADH)得不到氧化而堆积,而 NADH 是有效的电子供体,可使溶解在脂膜中的氧分子单价还原,导致活性氧的大量产生^[25],由此推测作为能量与物质代谢中心的肝胰腺,在低 pH 导致的缺氧条件下可能较其他组织产生更多的活性氧,因而对低 pH 胁迫比较灵敏。鳃具有呼吸、渗透和酸碱平衡等重要功能^[26],甲壳动物 40%~90%的含氮分泌物以氨氮形式通过鳃排出^[27],pH 值升高使水体 OH^- 增多,促使 NH_4^+ 向毒性更强的 NH_3 转化, NH_3 可直接进入鳃上皮细胞,一方面影响体内氨氮通过鳃排出;另一方面直接对鳃组织造成损伤^[28-29]。这可能是中国明对虾鳃组织对高 pH 胁迫敏感的原因之一。

3.2 pH 胁迫对中国明对虾 CAT 和 Prx 基因表达的影响

CAT 通过还原 H_2O_2 发挥抗氧化作用。pH 胁迫初期对虾各组织 CAT 基因表达量增加,分别在 24~72 h 达最高值,但肝胰腺(pH 7.0)和鳃(pH 9.0)CAT 基因表达量分别在 12 h 和 3 h 达峰值,这与 CAT 酶活性变化特性比较吻合,推测 pH 胁迫后 3~12 h 对虾肝胰腺和鳃产生大量 H_2O_2 。Wang 等^[10]研究发现,高 pH(9.3)胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺 CAT 基因表达无明显影响,但本实验发现高 pH 胁迫可显著改变中国明对虾 CAT 基因表达水平,原因可能与实验动物品种及胁迫水平不同有关。

Prx 具有分解 H_2O_2 和过氧化物的作用,并间接调节细胞内的信号传递^[30-31]。实验结果表明,pH 胁迫后,中国明对虾各组织 Prx 基因表达水平 72~148 h 达到峰值,比 CAT 基因表达达峰时间延后 24~72 h,推测长期 pH 胁迫后各组织积累了大量的 H_2O_2 ,当细胞内 H_2O_2 浓度较高时,部分 Prx 就形成没有过氧化酶活性的环状十聚体,而是作为分子伴侣保护其他功能蛋白分子^[32-33]。为了降低 pH 胁迫对中国明对虾造成的氧化损伤,各组织 Prx 基因转录要保持在一定水平内,所以 pH 胁迫中国明对虾 148 h 后各组织 Prx 基因表达仍然处于较高水平。

综上所述,高、低 pH 胁迫均影响中国明对虾抗氧化系统酶活力及基因表达水平,并表现出一定的时间规律性。pH 胁迫 3~24 h 能够诱导抗氧化系统的功能,增强机体对活性氧的清除,短期 pH 胁迫可能具有一定的积极作用,如 pH 周期性向碱性环境方向波动能促进凡纳滨对虾的生长^[35]。但长时间 pH 胁迫则会抑制中国明对虾抗氧化系统功能,可能是 pH 胁迫导致机体产生的活性氧超出了抗氧化系统所能调节的范围,由此造成各组织器官的氧化损伤。因此在实际养殖生产中要避免中国明对虾长期处于 pH 胁迫环境。

参考文献:

- [1] Bachère E. Shrimp immunity and disease control[J]. Aquaculture, 2000, 191(1): 3-11.
- [2] Li C C, Chen J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress[J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25(6): 701-709.
- [3] Ryter S W, Kim H P, Hoetzel A, et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress[J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9(1): 49-89.
- [4] Assefa Z, Laethem A V, Garmyn M, et al. Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: on the role of cytosolic factors[J]. Biochim Biophys Acta: Rev Cancer, 2005, 1775(2): 90-106.
- [5] Richier S, Sabourault C, Courtiade J, et al. Oxidative stress and apoptotic events during thermal stress in the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*[J]. FEBS J, 2006, 273(18): 4186-4198.
- [6] Ranby B, Rabek J E. Singlet oxygen[M]. England: In Wiley, 1978: 331.
- [7] Liu W H, Au D W T, Anderson D M, et al. Effects of nutrients, Salinity, pH and light: dark cycle on the production of reactive oxygen species in the alga *Chattonella marina*[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2007, 346(1-2): 76-86.
- [8] 樊甄姣, 杨爱国, 刘志鸿, 等. pH 对栉孔扇贝体内几种免疫因子的影响[J]. 中国水产科学, 2006, 13(4): 650-654.
- [9] 文春根, 张丽红, 胡宝庆, 等. pH 对背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)5 种免疫因子的影响[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2009, 33(2): 173-176.
- [10] Wang W N, Zhou J, Wang P, et al. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to

- acute pH stress[J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2009, 150(4): 428–435.
- [11] Zhou J, Wang W N, Ma G Z, et al. Gene expression of ferritin in tissue of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* after exposure to pH stress[J]. *Aquaculture*, 2008, 275(1-4): 356–360.
- [12] 邓景耀, 叶昌臣, 刘永昌. 渤黄海的对虾及其资源管理[M]. 北京: 海洋出版社, 1990: 36–164.
- [13] Bachère E, Chagot D, Grizel H. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation[J]. *Dev Comp Immunol*, 1988, 12(2): 549–559.
- [14] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 42–47.
- [15] Li F H, Luan W, Zhang C S, et al. Cloning of cytoplasm heat shock protein 90 (*FcHSP90*) from *Fenneropenaeus chinensis* and its expression response to heat shock and hypoxia[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2009, 14(2): 161–172.
- [16] 文春根, 代功园, 谢彦海, 等. 铅对背角无齿蚌抗超氧阴离子能力与抑制羟自由基的影响以及可溶性蛋白分析[J]. *南昌大学学报: 理科版*, 2009, 33(4): 380–384.
- [17] 张庆利. 中国明对虾免疫系统中抗氧化相关基因的克隆与表达分析[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2007: 13–14.
- [18] Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes E M, et al. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à trois[J]. *Mutat Res: Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2009, 674(1-2): 3–22.
- [19] Mathew S, Ashok Kumar K, Anandan R, et al. Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*[J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2007, 145(3): 315–320.
- [20] 陈萍, 李吉涛, 李健, 等. 溶藻弧菌对三疣梭子蟹抗氧化酶系统的影响[J]. *海洋科学*, 2009, 33(5): 59–63.
- [21] Stebbing A R D. Hormesis the stimulation of growth by low levels of inhibition[J]. *Sci Total Environ*, 1982, 22(1): 213–234.
- [22] Dandapat J, Chainy G B N, Rao K J. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2003, 136(3): 221–233.
- [23] Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, et al. Mitochondria, oxidative stress and cell death[J]. *Apoptosis*, 2007, 12(5): 913–922.
- [24] 潘鲁青, 金彩霞. 甲壳动物血蓝蛋白研究进展[J]. *水产学报*, 2008, 32(3): 484–491.
- [25] 陈丽芬, 柳君泽, 李兵. 低压缺氧对大鼠脑线粒体腺苷酸转运体特性的影响[J]. *生理学报*, 2006, 58(1): 29–33.
- [26] Evans D H, Piermarini P M, Choe K P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste[J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(1): 97–177.
- [27] Weihrauch D, Becker W, Postel U, et al. Active excretion of ammonia across the gills of the shore crab *Carcinus maenas* and its relation to osmoregulatory ion uptake[J]. *J Comp Physiol B*, 1998, 168(5): 364–376.
- [28] 肖涛. 环境应激对两种养殖虾能量代谢的影响[D]. 广州: 华南师范大学, 2006: 50.
- [29] Wang C, Zhang S H, Wang P F, et al. Metabolic adaptations to ammonia-induced oxidative stress in leaves of the submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* (Lour.) Hara[J]. *Aquat Toxicol*, 2008, 87(2): 88–98.
- [30] Rhee S G, Kang S W, Jeong W, et al. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17(2): 183–189.
- [31] Wood Z A, Schröder E, Robin H J, et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins[J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(1): 32–40.
- [32] Lehtonen S T, Markkanen P M, Peltoniemi M, et al. Variable overoxidation of peroxiredoxins in human lung cells in severe oxidative stress[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 288(5): 997–1001.
- [33] Jang H H, Kim S Y, Park S K, et al. Phosphorylation and concomitant structural changes in human 2-Cys peroxiredoxin isotype-I differentially regulate its peroxidase and molecular chaperone functions[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(1): 351–355.
- [34] 郑振华, 董双林, 田相利. pH不同处理时间的周期性变动对凡纳滨对虾生长的影响[J]. *中国海洋大学学报*, 2008, 38(1): 45–51.

Effects of pH stress on antioxidant system enzyme activities and gene expression of *Fenneropenaeus chinensis*

WANG Yun^{1,2}, LI Jian², LI Jitao², HE Yuying², CHANG Zhiqiang², LIU Deyue²

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

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

Abstract: Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*, is an important mariculture species in China. Recently deteriorated pond environment due to intensive culture caused increased incidence of stress-induced diseases. It is well known that environmental stress can induce oxidative stress. However, there is little information about the effects of pH changes on antioxidant system of Chinese shrimp. In this study, Chinese shrimps were exposed to water of pH 7.0 and 9.0 for 148 h and pH 8.2 was set as control. Total antioxidation activity (T-AOC), anti-superoxide anion activity, catalase (CAT) activity and the expression *CAT*, peroxiredoxin (*Prx*) gene were analyzed in gill, hepatopancreas, muscle and haemocytes of Chinese shrimp after 0 h, 3 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h and 148 h exposure. The T-AOC, anti-superoxide anion activity, CAT activity and the gene expression of *CAT* in different tissues increased within 12–14 h of pH stress. However, they were inhibited in the extending periods of pH stress time. The *Prx* gene expression in hepatopancreas and muscle gradually increased, but decreased in gill and haemocytes with pH stress time prolonging. The enzyme activities and gene expression of antioxidant system in gills first reached its highest level in pH 9.0 group, faster than other tissues in 9.0 group. And the antioxidant enzyme activities in hepatopancreas in pH 7.0 group changed faster than in other tissues. The results indicate that the antioxidant enzyme activities and gene expression of Chinese shrimp were induced by short-term pH stress which is the response to oxidative stress, while they were inhibited with pH stress time prolonging. It was shown that long time neutral and alkaline-induced oxidative stress probably caused the antioxidant defense system injury in Chinese shrimp. Gills and hepatopancreas could be the sensitive tissues to high and low pH stress, respectively.

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; pH stress; total antioxidation activity (T-AOC); anti-superoxide anion; catalase (CAT); peroxiredoxin (*Prx*)

Corresponding author: LI Jian. Tel: 0532-85830183; E-mail: lijian@ysfri.ac.cn