

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15080

碳酸盐碱度胁迫下瓦氏雅罗鱼血浆游离氨基酸水平的变化

常玉梅¹, 何强^{1,2}, 孙言春¹, 梁利群¹, 孙效文¹

1. 淡水鱼类育种国家地方联合工程实验室, 农业部淡水水产生物技术与遗传育种重点实验室, 中国水产科学研究院特殊生境鱼类种质特性与抗逆育种重点实验室, 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070;
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 为了从不同层面解析达里湖瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)耐高碱的生理机制, 本研究对达里湖瓦氏雅罗鱼在 2 个时间段(22 d 和 60 d)和 3 个不同浓度碳酸盐碱度(18 mmol/L、30 mmol/L 和 50 mmol/L)胁迫下的 15 种血浆游离氨基酸(PFAAs)含量的变化趋势进行了分析。结果显示, 血浆 PFAAs 总量随着碱度的上升而显著增加, 而且随着胁迫时间的延长, 由必需氨基酸增量为主转向非必需氨基酸增量为主; 作为能量代谢的主要底物, 非必需氨基酸中的脯氨酸(Pro)和缬氨酸(Val)含量随着碱度的增加而显著增加($P<0.05$), 尤其是 Pro 在碱度胁迫组中的含量增幅为对照组的 23 倍。本研究结果表明, 达里湖瓦氏雅罗鱼在高碱环境胁迫下, 提高血浆中非必需氨基酸的含量作为能量来源, 可能是其适应高碱环境的主要策略之一。同时, 初步探讨了发生显著变化的游离氨基酸可能参与的生理过程, 为从氨基酸代谢组学角度解析瓦氏雅罗鱼耐高碱的生理和分子机制提供了科学依据。

关键词: 瓦氏雅罗鱼; 耐盐碱; 代谢组学; 血浆游离氨基酸; 能量代谢

中图分类号: S965

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)01-0117-08

瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)隶属鲤形目鲤科雅罗鱼亚科, 在中国三北地区天然水域中普遍存在, 其品质优异, 是产区的名特优产品。此外, 该物种对高盐碱水质具有极强的耐受能力, 能够适应内蒙古达里湖碱度 53.57 mmol/L, pH 9.6 的水域条件^[1]。这些优良特性使其成为开展鱼类盐碱适应性进化及耐盐碱分子生理机制研究的理想材料。

近期中国学者已分别从生理生化^[2-3]、群体遗传学^[4-5]和转录组学^[6-8]等方面对其耐高碱的分子生理机制进行了一系列探索性研究。特别是近期利用二代测序技术(RNA-seq), 发现瓦氏雅罗鱼在盐碱胁迫下, 基因组中大量参与渗透压调节、酸碱平衡、氨氮排泄等生理过程的基因表达量显著提高^[6-8]。这些基因或蛋白的显著高表达, 必然

引起鱼体整体代谢水平发生变化。在应答和适应盐碱胁迫的过程中, 瓦氏雅罗鱼如何调节自身代谢网络系统, 保持机体生理稳态成为有待回答的问题。而代谢组学技术的出现和发展为揭示鱼类对环境因子或胁迫的应答机制研究提供了一个全新的研究平台。

氨基酸是最适合进行代谢组学研究的候选组分。氨基酸可外源摄取或内源性生成, 其在机体基础代谢调节方面发挥非常重要的生理作用^[9]。血浆游离氨基酸(plasma free amino acids, PFAAs)含量由于测定操作简便、检测灵敏度高等特点, 被广泛用作人类特殊疾病的诊断依据^[9-10]。在水生动物方面, 研究发现, PFAAs 作为重要的细胞渗透调节物(osmolytes), 参与海水无脊椎动物和

收稿日期: 2015-02-26; 修订日期: 2015-06-23.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31461163004); 黑龙江省科技攻关项目(GC12B307).

作者简介: 常玉梅(1978-), 女, 副研究员, 专业方向为鱼类分子生物学与基因工程育种. Tel: 0451-84861434; E-mail: chym_0124@163.com

通信作者: 梁利群(1963-), 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向为水产动物基因工程育种. Tel: 0451-84861434; E-mail: llq-1019@163.com

海水鱼类的渗透压形成和调节过程^[11-12]；另外，作为重要的能量供给源，直接氧化产生 ATP，激活离子转运系统，使一些物种如鳉(*Rivulus marmoratus*)比其他广盐性鱼类 (0~34)能够耐受更广的盐度范围(0~114)^[13]。

为了从不同层面解读瓦氏雅罗鱼耐高碱的生理机制，了解其在高碱环境中体内 PFAAs 含量变化动态，以及在高碱适应过程中发生显著变化的氨基酸可能参与的生理过程，本研究对达里湖瓦氏雅罗鱼进行了 2 个时间段(22 d 和 60 d)3 个不同浓度的碳酸盐碱度(18 mmol/L, 30 mmol/L 和 50 mmol/L)的胁迫处理，分析瓦氏雅罗鱼体内 PFAAs 的变化水平及趋势，为今后深入开展高碱环境下鱼类血浆中氨基酸的代谢调控机制奠定基础。同时，为全面解析鱼类耐盐碱的分子生理机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验鱼来自本课题组肇东盐碱鱼繁育基地，体长(12.2±0.3) cm，体重(35±5) g，1 龄健康的达里湖瓦氏雅罗鱼自交 F₂ 80 尾，放入循环可控水族箱系统(96.5 cm×52.5 cm×45.5 cm)暂养 1 周。实验用水为过滤、曝气 24 h 的地下井水，水温(13±2)℃，pH 7.25，溶解氧 3.38 mg/L，氨氮 0.48 mg/L，盐度 0.1 g/L，总碱度 2.45 mmol/L，总硬度 80.08 mg/L。

1.2 碳酸盐碱度耐受实验

本实验设定 3 个碳酸盐碱度(C_A)，分别为 18 mmol/L (C_A18)、30 mmol/L (C_A30)和 50 mmol/L (C_A50)，同时设立 1 个对照组 C_A2.45。采用 4 套独立水族箱循环系统进行碱度耐受实验。每套系统均含上下 4 个大小均一的小水缸(25 cm×30 cm×25 cm)，这样既可以保证实验的重复性，又可以保证后续样本量的一致性。首先按照设定浓度加入 NaHCO₃，并进行过夜循环，翌日用标定好的 HCl 进行浓度标定，通过添加少量 NaHCO₃ 使每套水族箱系统的 C_A 值分别达到设定标准。然后将暂养 1 周的鱼种，等量放入每套系统的 4 个小水缸中(5 尾)。实验开始第一周不投饵，后续每天定量投饵，采样前 1 天停食。水温控制在(13±2)℃，

不同碱度水体配置相应体积碱度的更换水体，每天更换 1/2，并进行碱度测定，pH 值参考池柄杰等^[14]报道的方法进行调节，控制在 8.5~9.0。

1.3 样品采集

当 3 个碱度实验组鱼暴露 22 d 后，用浸润肝素钠(50 μL)的 2 mL 注射器，从实验鱼尾静脉采集实验鱼血液 0.5 mL 左右，置于洁净的 1.5 mL 离心管中，以常温 4000 r/min 离心 8 min (Sigma 1-14)，取上层血浆于-40℃冰箱保存备用。每组采集 6~8 尾实验鱼血样(保证每组至少有 5 尾合格的血液样品)；剩余个体进行二次分配，以保证每套循环体系内的两个水缸具有相同的个体数。之后继续耐受，至第 60 天后，用相同的方法对实验鱼进行血液样品的采集和处理；对照组在第 60 天后采集血液 1 次。

1.4 血浆游离氨基酸的测定

1.4.1 AQC 衍生溶液及氨基酸标准品的配制 向 AQC 粉末(Waters)瓶中加入 1.0 mL 乙腈，涡轮混合 15 s，然后放入 55℃恒温干燥箱内加热 5 min，获得 AQC 衍生溶液。将 17 种氨基酸[天门冬氨酸(Asp)、精氨酸(Arg)、谷氨酸(Glu)、脯氨酸(Pro)、丝氨酸(Ser)、甘氨酸(Gly)、苏氨酸(Thr)、组氨酸(His)、丙氨酸(Ala)、酪氨酸(Tyr)、缬氨酸(Val)、半胱氨酸(Cys)、蛋氨酸(Met)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、苯丙氨酸(Phe)和赖氨酸(Lys)]的混合标准品溶液(2.5 μmol/mL, Sigma)用超纯水配制成浓度分别为 5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L、500 μmol/L、1000 μmol/L 的标准溶液。

1.4.2 样品预处理及衍生化 取 100 μL 血浆于 1.5 mL 离心管中，加入等体积的乙腈，涡轮震荡 1 min，以常温 10000 r/min 速度离心 8 min。取上清液 100 μL 于最大回收率自动进样瓶中，向其中加入 80 μL 的硼酸盐缓冲液，涡轮震荡 30 s 后，加入 20 μL 衍生化试剂，涡轮振荡 15 s 后，放入 55℃烘箱内加热 10 min，使其充分反应。

1.4.3 血浆中游离氨基酸的检测 氨基酸标准品的衍生化、标准品衍生化空白的制备、UPLC 色

谱分离条件均按照孙言春等^[15]报道的方法进行。采用 CQUITYTM UPLC 色谱仪(Waters)检测待测样品的 PFAAs。

1.5 数据处理

所测定的实验鱼血浆氨基酸数值以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)的形式给出。采用 SPSS 软件中的单因素方差分析进行显著性检验, Duncan's 多重比较检验不同组间的显著性差异, 检验水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 不同碱度暴露下血浆游离氨基酸总量的变化

由于 Arg 和 Gly 含量非常低, 检测峰值不明显, 故本研究后续数据分析均以其他 15 种氨基酸的含量变化为测算依据, 其中必需氨基酸 7 种(Thr、Lys、Met、Val、Ile、Leu 和 Phe), 非必需

氨基酸 8 种(Ser、His、Asp、Glu、Ala、Pro、Cys 和 Tyr)。总体来看, 随着水体碱度的增加, 瓦氏雅罗鱼 PFAAs 的含量呈上升趋势。碱度胁迫 22 d, 鱼体内血浆必需氨基酸含量高于非必需氨基酸含量(图 1), 其中高碱度组(50 mmol/L)与对照组及低碱度组(18 mmol/L)相比差异显著($P < 0.05$); 不同碱度实验鱼的血浆非必需氨基酸含量明显高于对照组($P < 0.05$), 但不同碱度组差异不显著($P > 0.05$)。碱度胁迫 60 d, 血浆非必需氨基酸含量明显高于必需氨基酸含量(图 2), 而且随着碱度的上升, 含量呈明显上升趋势, 其中高碱度组(C_A 50)非必需氨基酸含量显著高于对照组($P < 0.05$)。

2.2 不同碱度暴露下血浆必需氨基酸含量的变化

瓦氏雅罗鱼在不同碱度下胁迫 22 d, 除 Thr 含量无明显变化外, 其他 6 种必需氨基酸在不

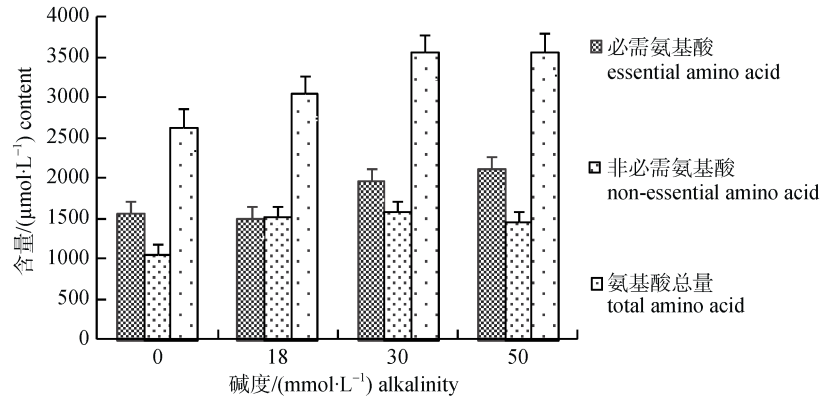


图 1 瓦氏雅罗鱼在不同碱度暴露 22 d 血浆游离氨基酸(PFAAs)总量的变化

Fig.1 Plasma concentrations of total free amino acids (PFAAs) in *Leuciscus waleckii* exposed to different alkalinities for 22 days

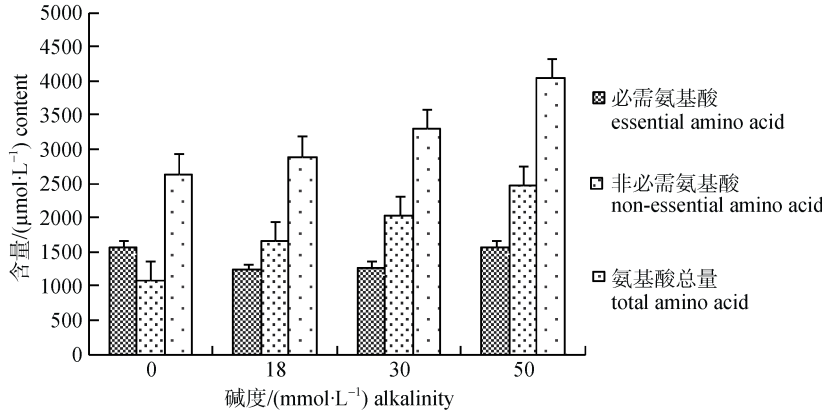


图 2 瓦氏雅罗鱼在不同碱度暴露 60 d 血浆游离氨基酸(PFAAs)总量的变化

Fig.2 Plasma concentrations of total free amino acids (PFAAs) in *Leuciscus waleckii* exposed to different alkalinities for 60 days

同碱度处理条件下均发生了明显变化($P<0.05$, 表 1)。其中 3 种支链氨基酸(branched-chain amino acid) Val、Ile 和 Leu 在中(30 mmol/L)、高(50 mmol/L)碱度组含量明显增加; Met 在不同碱度组的含量明显低于对照组($P<0.05$); Lys 含量与水体碱度呈现“U”形关系, 这与 Aragão 等^[16]的报道结果是一致的, 即低(18 mmol/L)、中(30 mmol/L)碱度组含量低于对照组和高碱度组(50 mmol/L)。碱度胁迫 60 d, 血浆各必需氨基酸含量趋于稳定, 只有 Lys 含量与水体碱度仍呈现“U”形关系, 但碱度组的 Lys 含量明显低于对照组($P<0.05$, 表 1)。

2.3 不同天数不同碱度血浆非必需氨基酸含量的变化

瓦氏雅罗鱼在不同碱度下胁迫 22 d, 除 Ser、Asp 和 Cys 含量无明显变化外, 其余 5 种非必需氨基酸随着碱度的增加含量发生了明显变化($P<0.05$, 表 2)。与对照组相比, Ala 和 Pro 含量随着碱度升高含量明显增加, Glu 和 His 含量则明显下降。瓦氏雅罗鱼在不同碱度下胁迫 60 d, 非必需氨基酸的含量变化与胁迫 22 d 基本相似, 有 4 种氨基酸含量变化明显($P<0.05$, 表 2)。其中 Ala 和 Pro 含量随着碱度的升高明显增加, 尤其是 Pro, 3 个碱度组的含量是其对照组的 23 倍多; Glu 含量明显下降, 而 His 含量则有所上升。

表 1 不同碱度下暴露不同时间瓦氏雅罗鱼血浆必需氨基酸含量的变化

Tab.1 Plasma concentrations of essential amino acids in *Leuciscus waleckii* exposed to different alkalinities for 22 days and 60 days

氨基酸 amino acid	22 d				60 d			
	2.45 mmol·L ⁻¹	18 mmol·L ⁻¹	30 mmol·L ⁻¹	50 mmol·L ⁻¹	2.45 mmol·L ⁻¹	18 mmol·L ⁻¹	30 mmol·L ⁻¹	50 mmol·L ⁻¹
Ser	17.95±2.59	21.26±2.88	16.65±3.96	16.43±3.16	17.95±2.59	22.40±4.15	13.23±2.64	27.68±6.00
Thr	23.75±2.76	33.37±2.06	25.59±2.07	24.04±2.43	23.75±2.76	19.96±1.70	20.07±1.77	31.52±8.09
Lys	110.38±9.49 ^c	71.54±5.34 ^a	94.56±11.63 ^{ab}	125.97±14.09 ^b	110.38±9.49 ^c	41.63±4.93 ^a	55.82±7.95 ^{ab}	79.55±11.24 ^b
Met	16.06±0.73 ^c	8.43±1.00 ^a	11.03±1.85 ^b	10.99±0.90 ^b	16.06±0.73	16.70±2.57	16.15±2.74	16.35±2.60
Val	70.05±2.67 ^a	88.02±7.02 ^a	121.55±6.35 ^c	99.11±7.29 ^b	70.05±2.67	56.68±9.96	67.28±3.49	76.38±8.46
Ile	43.82±1.55 ^b	37.4±2.98 ^a	67.71±3.76 ^d	58.21±5.19 ^c	43.82±1.55	22.04±4.16	27.91±2.69	44.35±3.11
Leu	72.61±2.55 ^b	56.44±5.09 ^a	111.67±7.55 ^c	97.36±8.77 ^b	72.61±2.55	46.88±9.00	64.57±4.87	78.71±6.75
Phe	22.21±1.83 ^a	25.55±1.72 ^a	37.91±5.87 ^b	26.27±1.80 ^a	22.21±1.83	30.10±7.57	28.97±1.38	38.21±10.49

注: 不同字母代表在相同暴露时间不同碱度组间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters denote significant differences between different alkalinity groups for 22 d or 60 d ($P<0.05$).

表 2 不同碱度下暴露不同时间瓦氏雅罗鱼血浆非必需氨基酸含量的变化

Tab.2 Plasma concentrations of non-essential amino acids in *Leuciscus waleckii* exposed to different alkalinities for 22 days and 60 days

氨基酸 amino acid	22 d				60 d			
	2.45 mmol·L ⁻¹	18 mmol·L ⁻¹	30 mmol·L ⁻¹	50 mmol·L ⁻¹	2.45 mmol·L ⁻¹	18 mmol·L ⁻¹	30 mmol·L ⁻¹	50 mmol·L ⁻¹
Ser	17.95±2.59	21.26±2.88	16.65±3.96	16.43±3.16	17.95±2.59	22.40±4.15	13.23±2.64	27.68±6.00
His	10.21±1.21 ^b	5.70±0.25 ^a	5.00±0.70 ^a	5.30±0.45 ^a	10.21±1.21 ^b	8.97±1.60 ^a	14.22±2.00 ^c	11.71±1.73 ^c
Asp	51.65±3.28	74.61±8.37	61.30±12.68	54.15±4.38	51.65±3.28	56.86±6.71	49.40±4.94	79.31±15.81
Glu	14.45±2.45 ^b	4.76±0.62 ^a	9.92±1.27 ^a	8.67±0.99 ^a	14.45±2.45 ^b	6.64±1.69 ^a	8.43±1.81 ^{ab}	7.42±2.26 ^a
Ala	112.06±7.57 ^a	129.63±9.14 ^a	177.38±8.35 ^{ab}	188.11±17.03 ^b	112.06±7.57 ^{ab}	94.95±5.92 ^a	138.46±16.84 ^{ab}	180.53±32.97 ^b
Pro	11.17±1.42 ^a	93.75±17.25 ^b	75.50±20.54 ^c	47.26±14.21 ^a	11.17±1.42 ^a	266.3±49.89 ^b	228.21±38.13 ^b	280.18±157.88 ^b
Cys	19.47±2.00	32.16±2.78	24.20±1.82	30.65±1.19	19.47±2.00	27.29±5.13	25.95±3.46	22.51±3.21
Tyr	36.70±4.01 ^{ab}	21.73±3.23 ^a	38.96±8.35 ^b	21.74±1.97 ^a	36.70±4.01	19.47±4.40	24.75±2.78	32.54±6.66

注: 不同字母代表在相同暴露时间不同碱度组间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters denote significant differences between different alkalinity groups for 22 d or 60 d ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 瓦氏雅罗鱼对高碱环境的适应性机制

大多数盐碱湖泊属于碳酸盐型湖泊($\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$), 包括我国的达里湖。近期, Wood 等^[17]研究发现, 来自马加迪湖(200 mmol/L)的马加迪罗非鱼(*Alcolapia graham*)体内的跨膜电势与人工配置的 NaHCO_3 水体中检测到的跨膜电势相同($\sim +7$ mV)。该报道提供了两个重要信息: 一是可以利用 NaHCO_3 人工模拟自然环境; 再者, 跨膜电势为正值, 表明鱼体对 Na^+ 的吸收速率远大于 HCO_3^- 。该报道与笔者近期所测定的达里湖瓦氏雅罗鱼血清中的研究结果是吻合的, 即在高碱胁迫下(60 mmol/L), 其血清中的 Na^+ 迅速增加, 直至 24 h 有所回落, 但仍高于淡水对照组, 而 HCO_3^- 则无明显变化(数据待发表)。另外, 周伟江等^[18-19]和郑伟刚等^[20]在进行达里湖鲫(*Carassius auratus linnaeus*)和银鲫(*Carassius auratus gibelio*)的急性毒理研究中发现, 相对于高盐条件下的急剧死亡, 高碱环境对鱼体的致死作用随着暴露时间的增加, 毒性作用由不显著到显著。上述研究可以看出, HCO_3^- 对鱼体的毒性作用可能是一个缓慢积累的过程, 鱼类对高碱环境的适应期可能更长。因此, 本研究选用了 22 d 和 60 d 两个时间段来观察瓦氏雅罗鱼 PFAAs 含量的变化趋势。根据 2 个时间段 PFAAs 的变化数量和类型来看, 胁迫 22 d, 瓦氏雅罗鱼对水体碱度的响应仍处于动态调整期, 15 种 PFAAs 有 11 种氨基酸含量都发生了明显变化, 其中体内不能自主合成的必需氨基酸含量增幅占主导(图 1)。持续胁迫至 60 d, 瓦氏雅罗鱼开始适应高碱水体, 15 种 PFAAs 中有 5 种氨基酸含量发生明显变化, 而且非必需氨基酸含量增幅占主导(图 2), 该研究结果与其他鱼类在高盐、高氨等逆境条件下的研究结果是一致的, 即通过增加体内非必需氨基酸的含量来响应水体高碱度的刺激^[21-22]。达里湖瓦氏雅罗鱼长期生活在高碱水体中, 通过提高 PFAAs 的含量和改变氨基酸组成结构逐渐达到对高碱环境的适应。

一般认为, 鱼类在高碱度高 pH 条件下, 是不

利于排氨的。氨中毒已经被证明是一些鱼类无法适应高盐碱环境的主要原因^[23]。因此, 进化出高效排氨机制是一些高盐碱环境适应性鱼类的重要生存策略。研究发现, 马加迪湖的马加迪罗非鱼将氨完全转化为尿素, 解决了其在高盐碱环境下的排氨难题^[24]。然而, 其他高盐碱水域的鱼类, 如达里湖的瓦氏雅罗鱼^[3]、凡湖的卡拉白(*Chalcalburnus tarichi*)^[25]和青海湖的湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)^[26]则依然采用普通的排氨方式消耗体内的氮废物。根据上述研究推测, 这些排氨的耐盐碱鱼类可能通过降低体内的氨氮排泄速率或将积累的氨转化成无毒的氨基酸或尿素达到对高盐碱高 pH 环境的适应^[3, 24-25]。其中, 将氨转化成谷氨酸或谷氨酸盐是一些鱼类氨解毒的重要途径, 即, 在不利环境下提高谷氨酸含量降低体内氨的积累^[27-28]。但本研究并未发现谷氨酸含量在不同碱度组呈上升趋势、而且显著低于对照组, 说明达里湖瓦氏雅罗鱼并未采取此策略解毒, 该结果与安晓萍等^[3]的报道结果是吻合的。根据雅罗鱼转录组数据, 我们发现雅罗鱼鳃组织中的 Rh 排氨基因家族(*Rhag*, *Rhbg*, *Rhcg1* 和 *Rhcg2*)全部富集上调表达^[8], 其是否参与瓦氏雅罗鱼在高碱胁迫下的排氨机制, 尚需进一步的实验验证。

3.2 瓦氏雅罗鱼 PFAAs 在高碱胁迫下的生理作用

生活在逆境水体中的鱼类, 需要消耗大量的体能抵御不良环境对机体的迫害。已有研究证明, 在鱼类渗透压调节适应过程中, 氨基酸作为能量代谢底物发挥非常重要的作用, 而且非必需氨基酸似乎是能量代谢的首选氨基酸^[29]。作为能量代谢底物的氨基酸包括: 骨骼肌中的支链氨基酸^[30]、谷氨酸家族中的成员, 如 Pro、Glu 等^[31]以及肝脏糖异生反应的主要底物 Ala^[32]。本研究通过检测 2 个时间段 PFAAs 含量的变化, 发现上述参与能量代谢底物的氨基酸含量, 在不同碱度组均发生了明显变化(表 1, 表 2)。我们推测瓦氏雅罗鱼在抵抗碱胁迫过程中, 通过调控骨骼肌、肝中氨基酸的氧化、转氨等作用释放游离氨基酸至血液中, 以供给其他组织维持生理稳态所需的能量来源。而且, 随着碱度的升高, 消耗的能量也越大。因此,

本研究高碱度组(50 mmol/L)的 PFAAs 总量显著高于低碱度组(18 mmol/L)(图 1, 图 2)。这与广盐性鱼类塞内加尔鲷(*Solea senegalensis*)^[16]和金头鲷(*Sparus aurata*)^[33]从低盐水体(5 g/L)转入高盐水体(55 g/L)的研究结果是一致的。在发生显著变化的氨基酸中, 非必需氨基酸中的 Pro 和 Ala 含量与对照组相比, 含量增加明显, 尤其是 Pro, 胁迫 60 d, 碱度组含量增加了 23 倍多(表 2)。该研究结果与植物在盐碱胁迫下、水生动物在海洋酸化条件下积累 Pro 的研究结果是一致的^[34](曾镛哲, 个人通讯)。但是, 碱胁迫下植物或鱼类积累 Pro 的作用机制目前还不清楚。

总之, 通过检测不同天数不同碱度条件下瓦氏雅罗鱼 PFAAs 的含量变化, 发现鱼体对碱度刺激的应答是一个缓慢调节自主适应的过程。在这个过程中, PFAAs 含量随着碱度的增加而显著增加, 其中提高非必需氨基酸的含量, 作为抵御不良环境的能量供给来源可能是瓦氏雅罗鱼适应高碱环境的主要策略之一。同时, 发生显著变化的氨基酸, 如 Pro、Val、Glu 等, 可能作为重要的渗透调节物, 在鱼类的渗透压调节和离子调节等过程中发挥重要作用。利用已有的转录组和基因组数据, 有望对这些显著变化的氨基酸调控通路展开进一步的深入研究, 为从氨基酸代谢组学角度解析瓦氏雅罗鱼耐高碱的生理和分子机制提供科学依据。

参考文献:

- [1] An X P, Meng H P, Du Z H, et al. Study on growth, mortality and life-history pattern of *Leuciscus waleckii* in Dali Lake[J]. Freshwater Fisheries, 2008, 38(6): 3–7.[安晓萍, 孟和平, 杜昭宏, 等. 达里湖东北雅罗鱼的生长、死亡和生活史类型的研究[J]. 淡水渔业, 2008, 38(6): 3–7.]
- [2] Zhang J M, Zhang Y, Liu H T. Study of isoenzymes of *Leuciscus waleckii* in Dalinor & Ganggeng Lake[J]. Reservoir Fisheries, 2010, 3(6): 79–86.[张建明, 张玉, 刘海涛. 达里诺尔湖和岗更湖瓦氏雅罗鱼同工酶的研究[J]. 水生态学杂志, 2010, 3(6): 79–86.]
- [3] An X P, Qi J W, Luo X G, et al. Ammonia excretion rates and contents in blood and other tissues in *Leuciscus waleckii* from different water systems[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2014(4): 244–245, 247.[安晓萍, 齐景伟, 罗旭光, 等. 不同水体中瓦氏雅罗鱼的氨氮排泄率以及血液和组织中氨氮含量研究[J]. 现代农业科技, 2014(4): 244–245, 247.]
- [4] Chi B J, Chang Y M, Yan X C, et al. Genetic variability and genetic structure of *Leuciscus waleckii* Dybowski in Wusuli River and Dali Lake[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(2): 228–235.[池炳杰, 常玉梅, 闫学春, 等. 瓦氏雅罗鱼达里湖群体和乌苏里江群体的遗传多样性和遗传结构分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 228–235.]
- [5] Chang Y M, Tang R, Sun X W, et al. Genetic analysis of population differentiation and adaptation in *Leuciscus waleckii*[J]. Genetica, 2013, 141(10): 417–429.
- [6] Xu J, Li Q, Xu L M, et al. Gene expression changes leading extreme alkaline tolerance in Amur ide (*Leuciscus waleckii*) inhabiting soda lake[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 682.
- [7] Xu J, Ji P F, Wang B S, et al. Transcriptome sequencing and analysis of wild Amur ide (*Leuciscus waleckii*) inhabiting an extreme alkaline-saline lake reveals insights into stress adaptation[J]. PLoS ONE, 2013, 8(4): e59703.
- [8] Chang Y M, Tang R, Dou X J, et al. Transcriptome and expression profiling analysis of *Leuciscus waleckii*: an exploration of the alkali-adapted mechanisms of a freshwater teleost[J]. Mol Biosyst, 2014, 10: 491–504.
- [9] Zhao Q H, Cao Y, Wang Y, et al. Plasma and tissue free amino acid profiles and their concentration correlation in patients with lung cancer[J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2014, 23(3): 429–436.
- [10] Nakamura H, Jinzu H, Nagao K, et al. Plasma amino acid profiles are associated with insulin, C-peptide and adiponectin levels in type 2 diabetic patients[J]. Nutr Diabetes, 2014, 4: e133.
- [11] Pierce S K. Invertebrate cell volume control mechanisms: A coordinated use of intracellular amino acids and inorganic ions as osmotic solute[J]. Biol Bull, 1982, 163(3): 405–419.
- [12] Hegab S A, Hanke W. The significance of the amino acids during osmotic adjustment in teleost fish—II. Changes in the stenohaline *Cyprinus carpio*[J]. Comp Biochem Physiol A: Physiol, 1983, 74(3): 537–543.
- [13] Frick N T, Wright P A. Nitrogen metabolism and excretion in the mangrove killifish *Rivulus marmoratus* II. Significant ammonia volatilization in a teleost during air-exposure[J]. J Exp Biol, 2002, 205: 91–100.
- [14] Chi B J, Liang L Q, Liu C L, et al. Adaptability of *Tribolodon brandti* (Dybowski) to NaCl concentration and alkalinity[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(3): 689–694.[池炳杰, 梁利群, 刘春雷, 等. 滩头雅罗鱼幼鱼对 NaCl 浓度和碱度的适应性分析[J]. 中国水产科学,

- 2011, 18(3): 689–694.]
- [15] Sun Y C, Xu X Z, Xu Y L, et al. Determination of 17 amino acids in fish eggs by ultra performance liquid chromatography coupled with precolumn derivatization[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2013, 31(3): 275–280.[孙言春, 许宪祝, 徐衍岭, 等. 柱前衍生-超高效液相色谱法测定鱼卵中的 17 种氨基酸[J]. 色谱, 2013, 31(3): 275–280.]
- [16] Aragão C, Costas B, Vargas-Chacoff L, et al. Changes in plasma amino acid levels in a euryhaline fish exposed to different environmental salinities[J]. Amino Acids, 2010, 38(1): 311–317.
- [17] Wood C M, Bergman H L, Bianchini A, et al. Transepithelial potential in the Magadi tilapia, a fish living in extreme alkalinity[J]. J Comp Physiol B, 2012, 182(2): 247–258.
- [18] 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.]
- [19] Zhou W J, Liang L Q, Chang Y M, et al. The tolerance of Dali *Carassius auratus* juvenile on acute and gradient toxicity of salinity and alkalinity[J]. Freshwater Fisheries, 2013, 43(5): 14–20.[周伟江, 梁利群, 常玉梅, 等. 达里湖鲫对盐度和碱度突变和渐变的耐受性[J]. 淡水渔业, 2013, 43(5): 14–20.]
- [20] Zheng W G, Zhang Z Q, Zhang M Z, et al. Toxicity of salinity and alkalinity to *C. auratus* fingerlings[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2001, 31(4): 513–517.[郑伟刚, 张兆琪, 张美昭, 等. 盐碱水 NaCl 浓度和碱度对银鲫 (*Carassius auratus* Gibelio) 幼鱼毒性的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(4): 513–517.]
- [21] Saha N, Dutta S, Häussinger D. Changes in free amino acid synthesis in the perfused liver of an air-breathing walking catfish, *Clarias batrachus* infused with ammonium chloride: a strategy to adapt under hyperammonia stress[J]. J Exp Zool, 2000, 286(1): 13–23.
- [22] Aragão C, Costas B, Vargas-Chacoff L, et al. Changes in plasma amino acid levels in a euryhaline fish exposed to different environmental salinities[J]. Amino Acids, 2010, 38(1): 311–317.
- [23] Wilkie M P, Wright P A, Iwama G K, et al. The physiological responses of the Lahontan cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki henshawi*), a resident of highly alkaline Pyramid Lake (pH 9.4), to challenge at pH 10[J]. J Exp Biol, 1993, 175(1): 173–194.
- [24] Randall D J, Wood C M, Perry S F, et al. Urea excretion as a strategy for survival in a fish living in a very alkaline environment[J]. Nature, 1989, 337(6203): 165–166.
- [25] Wilkie M P, Wood C M. The adaptations of fish to extremely alkaline environments[J]. Comp Biochem Physiol B, 1996, 113(4): 665–673.
- [26] Wang Y S, Gonzalez R J, Patrick M L, et al. Unusual physiology of scale-less carp, *Gymnocypris przewalskii*, in Lake Qinghai: a high altitude alkaline saline lake[J]. Comp Biochem Physiol A, 2003, 134(2): 409–421.
- [27] Scott D M, Lucas M C, Wilson R W. The effect of high pH on ion balance, nitrogen excretion and behaviour in freshwater fish from an eutrophic lake: A laboratory and field study[J]. Aquat Toxicol, 2005, 73(1): 31–43.
- [28] Ip Y K, Chew S F. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review[J]. Front Physiol, 2010, 1: 134.
- [29] Wilson R P. Amino Acids and Proteins[M]//Fish Nutrition. Elsevier, 2003: 143–179.
- [30] Van Waarde A. Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production[J]. Comp Biochem Physiol B, 1988, 91(88): 207–228.
- [31] Bender D A. Amino Acids Synthesized from Glutamate: Glutamine, Proline, Ornithine, Citrulline and Arginine[M]//Amino Acid Metabolism. Chichester: Chichester John Wiley & Sons, 2012: 157–223.
- [32] Ballantyne J S. Amino acid metabolism[M]//Nitrogen Excretion. Elsevier. 2001: 77–107.
- [33] Sangiao-Alvarellos S, Arjona F J, Martín del Río M P, et al. Time course of osmoregulatory and metabolic changes during osmotic acclimation in *Sparus auratus*[J]. J Exp Biol, 2005, 208: 4291–4304.
- [34] Yang C W, Chong J N, Li C Y, et al. Osmotic adjustment and ion balance traits of an alkali resistant halophyte *Kochia sieversiana* during adaptation to salt and alkali conditions[J]. Plant Soil, 2007, 294(1–2): 263–276.

Changes in plasma free amino acid levels in *Leuciscus waleckii* exposed to different environmental alkalinity levels

CHANG Yumei¹, HE Qiang^{1,2}, SUN Yanchun¹, LIANG Liquan¹, SUN Xiaowen¹

1. National & Local United Engineering Laboratory of Freshwater Fish Breeding; Key Laboratory of Freshwater Aquatic Biotechnology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Fish Stress Resistance Breeding and Germplasm Characteristics on Special Habitats, Chinese Academy of Fishery Sciences; Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: *Leuciscus waleckii* is a cyprinid in the subfamily Leuciscinae and is distributed widely in rivers and lakes of Northeast, Northwest, and Northern China. A unique feature of this species is its resistance to high alkalinity, which allows it to survive and adapt to the extreme environment of Lake Dali, Inner Mongolia, with carbonate alkalinity > 53.57 mmol/L (pH 9.6). Previous studies have explored the mechanisms of the extreme alkaline tolerance using physiological, chemical, population genetics, and transcriptomics methods. We assessed the effects of acclimating *L. waleckii* to different environmental alkalinity levels and exposure times on plasma free amino acids levels. *L. waleckii* juveniles were acclimated to alkalinities of 18 mmol/L, 30 mmol/L, and 50 mmol/L for 22 d and 60 d, and plasma levels of 15 free amino acids were examined and compared between the different alkalinity groups and the control. The results showed that total plasma free amino acid contents increased with alkalinity and exposure time, and that the levels of nonessential amino acids changed the most. Among the nonessential amino acids, proline and valine contents increased significantly with increasing alkalinity ($P < 0.05$); proline increased 23 times more than the control in the 50 mmol/L alkalinity group. These results suggest that amino acids play an important role as an energy source during acclimation of *L. waleckii* to high alkalinity conditions.

Key words: *Leuciscus waleckii*; alkaline tolerance; metabolomics; plasma free amino acid; energy metabolism

Corresponding author: LIANG Liquan. E-mail: llq-1019@163.com