

DOI: 10.12264/JFSC2022-0401

溶氧变化模式对菲律宾蛤仔鳃组织和血淋巴液氧化应激及生理代谢的影响

周丽青^{1,2}, 井浩², 葛广玉³, 吴宙³, 孙秀俊¹, 李家乐², 吴彪¹, 刘志鸿¹, 杨金龙²

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

3. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院, 浙江 舟山 316000

摘要: 为了探究菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)鳃组织和血淋巴液响应溶氧变化的氧化应激反应和生理代谢情况, 并筛选出蛤仔响应溶氧变化的标志性物质, 设置 3 种溶氧变化模式, 分别为一直维持正常溶氧(C)处理、正常溶氧-急性低氧-急性复氧(AHR)处理、正常溶氧-慢性低氧-慢性复氧(CHR)处理。用酶标仪微板法 96 样检测 3 种溶氧变化模式下血淋巴液和鳃组织的超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)活性、丙二醛(MDA)含量、丙酮酸激酶(PK)活性、己糖激酶(HK)活性、乳酸脱氢酶(LDH)活性、ATP 酶(ATPase)活性、脯氨酸氨基化酶(PHD)活性和脂质过氧化物(LPO)含量。结果发现菲律宾蛤仔最先响应溶氧变化的是鳃组织, 其氧化-抗氧化酶体系、代谢相关酶活性和相关产物的含量及变化幅度均明显高于血淋巴液; 鳃组织和血淋巴液中氧化-抗氧化酶体系变化趋势一致, SOD 和 CAT 作为最重要的抗氧化酶能在一定程度上缓解溶氧变化对蛤仔机体的损伤; 氧化应激和能量利用体系在鳃和血淋巴液中的变化趋势也一致, 其中 PK 和 HK 随溶氧变化调节糖酵解代谢效率, LDH 主要调节无氧代谢的效率, MDH 含量能真实反映溶氧变化对蛤仔机体的损伤; 这些参与生理代谢的酶或产物可作为监测菲律宾蛤仔响应环境溶氧变化的有效指标; ATPase 活性、PHD 活性和 LPO 含量变化仅表现出个体间差异, 不同溶氧变化模式之间差异不明显。研究表明, 菲律宾蛤仔机体能迅速调整氧化应激反应和生理代谢反应来响应急性溶氧变化, 慢性溶氧变化会导致蛤仔机体受到持续性损伤。

关键词: 菲律宾蛤仔; 溶氧变化; 鳃; 血淋巴; 抗氧化酶; 代谢酶

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)03-0361-10

溶氧是影响贝类生长、存活和代谢最重要的因素之一。水体溶氧变动又受水温、水流、气象、水体垂直分层、富营养化、藻类光合作用速率和有机物呼吸强度变化等诸多因素影响, 在生物量较大的养殖水体中, 溶解氧含量日变化有时也很显著。滤食性的双壳贝类对滩涂生态系统有净化和修复作用, 是海洋生态系统重要组成部分。滩涂贝类养殖是我国海水养殖业发展历史最长、技

术最成熟的行业, 在日益集约化的养殖环境中, 贝类更易受到各种不利环境因子胁迫而增加病害暴发的风险。近年来, 全球气候变化和近岸海水富营养化使滩涂生态系统的低氧区不断扩大, 低氧的严重程度和持续时间又会因为富营养化而加剧, 并可能随着气候变化而恶化, 长期缺氧可以杀死包括贝类在内的大量海洋生物, 短期的缺氧也会对贝类造成亚致死性影响, 如繁殖力、生长

收稿日期: 2022-11-15; 修订日期: 2022-11-29.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0900702); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022022001).

作者简介: 周丽青(1974-), 女, 博士研究生, 研究方向为贝类遗传育种. E-mail: zhoulq@ysfri.ac.cn

通信作者: 李家乐, 教授, 研究方向为贝类遗传育种, E-mail: jlli@shou.edu.cn; 杨金龙, 教授, 研究方向为贝类遗传育种. E-mail: jlyang@shou.edu.cn

速率、免疫力降低等^[1], 这对我国沿海经济发展和生态系统维护十分不利。

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)属于软体动物门(Mollusea), 双壳纲(Bivalvia), 帘蛤科(Veneridae), 蛤仔属(*Ruditapes*), 广泛分布于我国南北沿海, 俗称花蛤、蚬子、蛤蜊等, 味道鲜美, 营养丰富, 与缢蛏、泥蚶和牡蛎有四大传统养殖贝类之称^[2]。蛤仔肉可食部占总重 20%左右, 软体粗蛋白质含量为 29.19%~43.46%^[3], 是一种深受广大消费者喜爱的大宗海产贝类。近年来, 在菲律宾蛤仔在我国年产量约 300 万 t, 成为我国单种产量最高的养殖贝类^[4], 市场份额占比大。长期处于低氧环境中, 菲律宾蛤仔的组织结构异常, 活力下降^[5], 新陈代谢效率受抑制^[6]。水生动物正常细胞呼吸过程中, O₂ 消耗量的 0.1%~0.2%会转化为活性氧(ROS), 包括超氧自由基(O₂⁻)、过氧化氢(H₂O₂)、羟基自由基(OH⁻)等, 是具有未配对电子的高活性氧^[7], 能够氧化细胞成分, 少量 ROS 对于动物抵御病原微生物的感染具有重要作用^[8]; 当生物体受到低氧胁迫时, 细胞线粒体形态改变出现功能异常, 产生大量 ROS, 过多的 ROS 会损害细胞大分子, 如核酸、蛋白质和膜脂, 必将引起氧化应激反应, 导致 DNA 合成障碍, 脂质过氧化物(LPO)及蛋白质羰基(protein carbonyl, PC)含量升高, 进而影响生物体的生理功能^[9]。丙二醛(MDA)是抗氧化损伤的标志性产物, 其含量增加表明生物体出现了氧化损伤^[10]。鳃是呼吸器官, 血液则承担了氧气和营养物质的运输, 溶氧变动直接影响鳃组织和血细胞中的氧化应激指标含量。糖酵解是生物界普遍存在的供能途径, 己糖激酶(HK)和丙酮酸激酶(PK)是糖酵解过程中的 2 种重要的限速酶^[11]; 乳酸脱氢酶(LDH)是生物体内参加无氧代谢的关键酶^[12], 因此 HK、PK 和 LDH 在水生生物遭遇溶氧变化时发挥代谢效率调节的重要作用。在抗氧化酶中, 超氧化物歧化酶(SOD)可以催化 O₂⁻和 H⁺生成 O₂和 H₂O₂, 然后 H₂O₂ 被过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(缩写为 GSH-px 或 GPx)还原成 H₂O, 因此 SOD-CAT 和 SOD-GPx 被认为是抗氧化系统的第

一防线^[13]。

有关溶氧变化对贝类氧化应激反应和生理代谢的研究报道不多。为探究不同溶氧变动模式对菲律宾蛤仔鳃组织和血淋巴液的氧化应激及生理代谢的影响, 笔者设计 3 种溶氧变动模式, 分别为一直维持正常溶氧(C)处理、正常溶氧-急性低氧-急性复氧(AHR)处理、正常溶氧-慢性低氧-慢性复氧(CHR)处理。然后测定 3 种溶氧变动模式下血淋巴液和鳃组织的 SOD 活性、CAT 活性、GSH-px 活性、MDA 含量、PK 活性、HK 活性、LDH 活性、ATP 酶(ATPase)活性、脯氨酸羟化酶(PHD)活性和脂质过氧化物(LPO)含量。以期筛选出菲律宾蛤仔规模化养殖过程中出现响应溶氧变化的标志性物质, 研究结果也将为双壳贝类养殖模式调整和病害防治提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

1~2 龄个体大小均匀的菲律宾蛤仔 6 kg 采自山东省青岛市红岛海滩, 约 500 只, 壳长(36.49±2.72) mm, 壳高(25.45±2.65) mm, 壳宽(15.71±1.24) mm, 体重(9.13±2.04) g。蛤仔采回后于实验室暂养 1 周左右, 用于实验, 暂养水温控制在 19~21 °C。暂养期间投喂实验室培植的硅藻、扁藻和金藻, 每天换水 1 次。实验前 24 h 停喂单胞藻。

1.2 实验设计

设置 3 种溶氧变动模式, 分别为一直维持正常溶氧(C)处理(7.0 mg/L)、急性低氧 24 h-急性复氧 4 h (AHR)处理、缓慢低氧 48 h-缓慢复氧 8 h (CHR)处理。正常溶氧(C)处理作为对照组, 维持溶氧 7.0 mg/L, 每个槽中投入菲律宾蛤仔 60 粒; AHR 处理流程为, 每个槽中投入 60 粒菲律宾蛤仔, 先用充氮气的方法 4 h 内控制溶氧从 7.0 mg/L 降至 0.5 mg/L, 开始计时, 急性低氧胁迫 24 h, 然后立即曝气使溶氧在 4 h 内快速从 0.5 mg/L 升高至 7 mg/L, 即急性复氧 4 h; CHR 处理流程为: 将 60 粒菲律宾蛤仔投入到溶氧 7 mg/L 的水槽中, 用充氮气的方法控制溶氧在 8 h 内缓慢降低至 0.5 mg/L, 随后这种低氧胁迫持续 48 h, 再逐步曝

气使溶氧在 8 h 内缓慢升高至 7 mg/L, 复氧过程持续 8 h。3 个模式均设立 3 个重复, 每个重复分别为 30 L 塑料槽, 各投 60 粒蛤仔。塑料方槽的排列采用完全随机化区组设计。每隔 2 h 进行溶氧测定和死亡统计。处理期间不喂食不换水。

1.3 样品采集与预处理

样品采集时间及命名: 正常溶氧(C)处理 24 h 时采集, 命名为 CG, 并作为对照组; 急性低氧胁迫 24 h 取样, 命名为 AH24h; 再急性复氧 4 h 取样, 命名为 AH24hAR4h; 缓慢低氧 48 h 取样, 命名为 CH48h; 再缓慢复氧 8 h, 命名为 CH48hCR8h。

血淋巴液样品采集: 用 1 mL 无菌注射器快速从 4 粒蛤仔前闭壳肌(预先用老虎钳或解剖刀将闭壳肌附近的壳沿刻出一个可供针头插入的小孔)中抽取约 1 mL 血淋巴液放入冰上放置的 1.5 mL 离心管中, 再立刻投入液氮中, 15 min 之后液氮中取出放入 -80°C 超低温冰箱中冻存。

鳃组织样品采集: 采血后的蛤仔, 用消毒的解剖刀剖开, 消毒的解剖剪剪取鳃丝, 对应的 4 粒蛤仔同一侧鳃丝混入 1 个 1.5 mL 冰上放置的离心管中, 再用解剖剪在管中把鳃丝剪碎混匀, 迅速投入液氮中, 15 min 之后液氮中取出放入 -80°C 超低温冰箱中冻存。

1.4 样品分析与测试

冻存的血淋巴液和鳃组织, 用干冰包装运送至青岛科创质量检测有限公司, 进行超氧化物歧化酶(SOD)活力、过氧化氢酶(CAT)活力、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px/GPx)活力、丙二醛(MDA)含量、丙酮酸激酶(PK)活力、己糖激酶(HK)活力、乳酸脱氢酶(LDH)活力、ATP 酶(ATPase)活力、脯氨酸羟化酶(PHD)和脂质过氧化物(LPO)的含量的检测和分析。以上指标均使用酶标仪微板法 96 样检测。

1.5 数据统计分析

采用 SPSS26.0 软件对所有实验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 并进行不同处理组数据之间 Duncan 多重比较检验, 以 $P<0.05$ 作为差异显著的标准, 用 GraphPad Prism 8 作图; 同时用 SPSS26.0 对不同溶氧变动模式下独立样本平均值进行差异显著性检验, 以 $P<0.05$ 作为差

异显著的标准, $P<0.01$ 作为差异极显著的标准, 结果列表显示。

2 结果与分析

从表 1 和图 1 中均可以看出, 除了 ATPase、PHD 和 LPO 外, 氧化-抗氧化酶体系如 SOD、CAT、GSH-px, 氧化应激和能量利用体系如 LDH、PK、HK、MDA 等均在正常溶氧变化模式中发生了显著变化, 而且在血淋巴液和鳃组织中的变化趋势基本一致, 对 24 h 急性低氧响应迅速, 且都是鳃组织中成分含量或活性极显著高于血淋巴液。

SOD 在正常溶氧条件下, 维持稳定活性, 不同个体急性低氧胁迫 24 h 会引起 SOD 活性整体稍微升高, 急性复氧 4 h, SOD 活性又迅速恢复至正常状态; 慢性低氧胁迫 48 h, SOD 活性基本维持不变, 但慢性复氧 8 h, SOD 活性逐渐降低, 显著低于正常值。

CAT 在正常溶氧条件下, 维持稳定活性, 急性低氧胁迫 24 h, 血淋巴液和鳃组织中的 CAT 活性急剧升高, 急性复氧 4 h CAT 活性能快速恢复至正常状态; 慢性低氧胁迫 48 h, 血淋巴液和鳃组织中的 CAT 活性缓慢升高, 缓慢复氧 8 h, CAT 活性逐渐恢复到正常状态。

GSH-px/GPx 在正常溶氧状态下, 维持稳定活性, 急性低氧胁迫 24 h, 血淋巴液中的 GSH-px 活性迅速下降, 鳃组织中 GSH-px 活性没有太大变化, 但急性复氧 4 h, GSH-px 活性不升高, 反而快速降低; 慢性低氧胁迫 48 h, 血淋巴液和鳃组织中的 GSH-px 活性均明显降低, 再慢性复氧 8 h, GSH-px 活性降低极显著, 远低于正常值。

整体上, 菲律宾蛤仔氧化-抗氧化酶体系, 在 24 h 急性低氧胁迫时, 机体低氧应激反应响应迅速, SOD 首当其冲, 迅速升高, CAT 紧随其后响应更为剧烈, 极显著升高, 紧接着 GSH-px 活性下降; 4 h 急性复氧, 菲律宾蛤仔机体响应依然迅速, SOD 活性迅速恢复至正常水平, CAT 跟随者 SOD 回落接近正常水平, 但 GSH-px 持续下降; 慢性低氧胁迫 48 h, 菲律宾蛤仔机体低氧应激反应相对迟钝, SOD 活性基本没有太大变化, CAT 活性的响应也不是很剧烈, 但呈下降趋势, GSH-px 仍持

续降低; 缓慢复氧 8 h 对菲律宾蛤仔机体不仅没有起到缓解低氧胁迫症状的作用, 反而使机体组织各种抗氧化酶过度反应, 出现明显的损伤延迟现象, SOD 活性明显降低, CAT 活性虽然恢复正常情况, 但 GSH-px 迅速降低。SOD 和 CAT 作为最重要的抗氧化酶能在一定程度上缓解溶氧变化对蛤仔机体的损伤。

丙二醛(MDA)含量、丙酮酸激酶(PK)活力和己糖激酶(HK)活力在血淋巴液和鳃组织中的变化趋势相像, 都是在正常溶氧状态下维持稳定含量

或活性, 急性低氧 24 h, 除血淋巴液中 MDA 含量不变外, 无论在血淋巴液还是鳃组织中, 都表现出显著或极显著降低; 急性复氧 4 h, 3 种成分在血淋巴液和鳃组织中都是显著或极显著升高; 缓慢低氧 48 h 对 3 种成分含量或活性影响不同, MDA 含量在血淋巴液和鳃组织中均显著高于正常值, PK 在鳃组织中维持正常值, 在血淋巴液中高于正常值, HK 在血淋巴液和鳃组织中均维持正常值不变; 慢性复氧 8 h, 3 种成分的含量和活性均显著或极显著升高。

表 1 菲律宾蛤仔血淋巴液和鳃组织在不同溶氧变化模式下氧化应激反应和生理代谢反应指标平均值比较

Tab. 1 Comparison of mean values of oxidative stress response and physiological metabolic response indexes in hemolymph and gill tissues of *Ruditapes philippinarum* under different modes of dissolved oxygen change

$n=4; \bar{x} \pm SD$

样品 sample	检测指标 test index	溶氧模式 dissolved oxygen change mode				
		CG	AH24h	AH24hAR4h	CH48h	CH48hCR8h
血淋巴液 haemolymph	SOD/(U/mL)	106.32±5.50 ^{ab}	115.02±22.39 ^a	108.66±13.83 ^{ab}	102.79±9.47 ^{ab}	79.64±9.40 ^c
	CAT/(U/g)	131.19±7.70 ^{cd}	164.21±5.63 ^A	140.08±6.78 ^{bc}	148.03±5.54 ^b	131.67±352 ^{cd}
	GSH-px/(U/L)	170.87±13.52 ^a	144.04±13.28 ^b	125.85±9.08 ^c	126.87±17.37 ^{bc}	94.76±5.65 ^D
	MDA/(nmol/mL)	1.23±0.06 ^d	1.24±0.07 ^d	1.53±0.09 ^b	1.45±0.04 ^{bC}	1.80±0.04 ^A
	HK/(U/mL)	9.48±0.65 ^C	6.99±0.60 ^D	11.46±0.73 ^b	8.74±0.72 ^C	12.89±0.80 ^A
	PK/(U/mL)	32.35±2.66 ^{ac}	26.82±2.36 ^{ad}	36.46±1.35 ^{ab}	32.99±5.04 ^{ab}	43.06±2.60 ^a
	LDH/(U/mL)	2.80±0.02 ^{ab}	2.68±0.04 ^e	2.75±0.04 ^{bc}	2.81±0.03 ^{ab}	2.83±0.03 ^a
	ATPase/(U/L)	2489.85±411.21	2513.01±489.21	2578.20±601.94	2814.68±567.80	2679.29±244.57
	PHD/(U/L)	59.96±11.33	57.60±12.19	70.95±3.38	60.48±13.43	64.28±7.51
	LPO/(nmol/L)	80.33±18.16	82.18±14.65	72.34±6.69	86.01±13.94	74.67±5.26
鳃 gill	SOD/(U/g)	1242.37±118.03 ^{ab}	1307.86±170.63 ^a	1106.22±118.38 ^{ab}	1010.02±183.49 ^{ab}	934.91±98.75 ^{bc}
	CAT/(U/g)	1381.86±56.35 ^d	1687.97±52.32 ^A	1505.06±24.11 ^{bc}	1522.26±57.05 ^b	1351.16±45.57 ^d
	GSH-px/(U/g)	1794.19±145.47 ^a	1626.56±80.67 ^{ab}	1403.85±97.88 ^c	1516.73±42.65 ^{bc}	1118.28±71.89 ^D
	MDA/(nmol/g)	11.34±0.38 ^D	9.88±0.27 ^c	14.04±0.30 ^B	12.58±0.55 ^C	16.40±0.68 ^A
	HK/(U/g)	79.02±4.11 ^C	59.16±4.47 ^D	105.14±7.89 ^b	77.17±5.88 ^C	120.78±5.44 ^a
	PK/(U/g)	311.90±27.45 ^c	237.30±23.33 ^c	371.39±24.36 ^{Bc}	322.35±28.41 ^c	404.19±18.50 ^a
	LDH/(U/g)	26.93±0.13 ^{Bc}	26.23±0.31 ^{Dc}	26.64±0.25 ^{cc}	27.74±0.18 ^a	27.60±0.29 ^a
	ATPase/(U/g)	549.11±56.45	504.09±35.25	463.72±93.58	523.58±91.10	500.95±42.18
	PHD/(nmol/g)	12.46±2.32	12.01±2.57	11.29±2.62	11.07±0.95	11.90±1.89
	LPO/(nmol/g)	15.60±3.17	13.77±1.75	14.07±2.54	13.79±1.78	15.68±2.58

注: SOD: 超氧化物歧化酶; CAT: 过氧化氢酶; GSH-px: 谷胱甘肽过氧化物酶; MDA: 丙二醛; PK: 丙酮酸激酶; HK: 己糖激酶; LDH: 乳酸脱氢酶; ATPase: ATP 酶; PHD: 脯氨酸羟化酶; LPO: 脂质过氧化物; CG: 正常溶氧组; AH24h: 急性低氧胁迫 24 h; AH24hAR4h: 急性低氧胁迫 24 h-急性复氧 4 h; CH48h: 缓慢低氧 48 h; CH48hCR8h: 缓慢低氧 48 h-缓慢复氧 8 h; 数据上标大写字母表示不同处理平均值间差异极显著 ($P<0.01$), 小写字母则表示不同处理平均值间差异显著 ($P<0.05$).

Notes: SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; GSH-px: glutathione peroxidase; MDA: malondialdehyde; PK: pyruvate kinase; HK: hexokinase; LDH: lactic dehydrogenase; ATPase: ATPase; PHD: proline hydroxylase; LPO: lipid peroxide; CG: control group; AH24h: acute hypoxia stress 24 h; AH24hAR4h: acute hypoxia stress 24 h then acute reoxygenation 4 h; CH48h: chronic hypoxia 48 h; CH48hCR8h: chronic hypoxia 48 h then chronic reoxygenation 8 h; The superscript capital letters showed extremely significant differences among the average values of different treatments ($P<0.01$), while lowercase letters showed significant difference among the average values of different treatments ($P<0.05$).

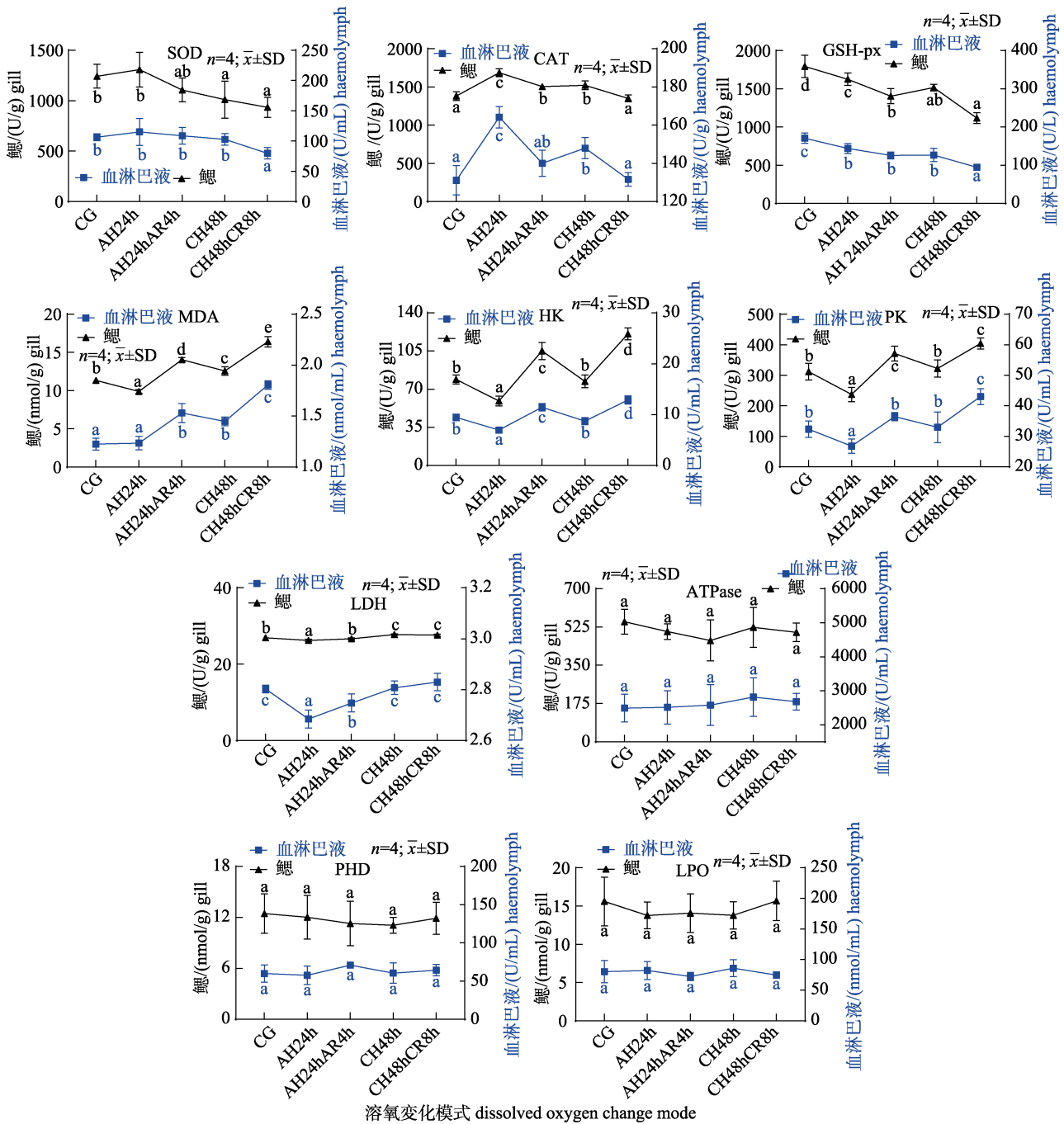


图 1 菲律宾蛤仔血淋巴液和鳃组织响应不同溶氧变化模式的氧化应激反应和生理代谢反应

SOD: 超氧化物歧化酶; CAT: 过氧化氢酶; GSH-px: 谷胱甘肽过氧化物酶; MDA: 丙二醛; PK: 丙酮酸激酶; HK: 己糖激酶; LDH: 乳酸脱氢酶; ATPase: ATP 酶; PHD: 脯氨酸羟化酶; LPO: 脂质过氧化物; CG: 正常溶氧组; AH24h: 急性低氧胁迫 24 h; AH24hAR4h: 急性低氧胁迫 24 h-急性复氧 4 h; CH48h: 缓慢低氧 48 h; CH48hCR8h: 缓慢低氧 48 h-缓慢复氧 8 h; 不同字母表明不同处理平均值间差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 1 Oxidative stress and physiological metabolic of hemolymph and gill tissue of *Ruditapes philippinarum* in response to different modes of dissolved oxygen change

SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; GSH-px: glutathione peroxidase; MDA: malondialdehyde; PK: pyruvate kinase; HK: hexokinase; LDH: lactic dehydrogenase; ATPase: ATPase; PHD: proline hydroxylase; LPO: lipid peroxide; CG: control group; AH24h: acute hypoxia stress 24 h; AH24hAR4h: acute hypoxia stress 24 h then acute reoxygenation 4 h; CH48h: chronic hypoxia 48 h; CH48hCR8h: Chronic hypoxia 48 h then chronic reoxygenation 8 h; Different letter markers indicate significant difference between different treatment groups ($P < 0.05$).

LDH 在正常溶氧状态下, 维持稳定活性, 急性低氧胁迫 24 h, LDH 活性在鳃组织和血淋巴液中均极显著降低, 急性复氧 4 h, 基本能快速回升接近正常水平; 慢性低氧胁迫 48 h, 鳃组织 LDH 活性极显著升高, 但血淋巴液中 LDH 活性基本维持不变, 慢性复氧 8 h, 血淋巴液和鳃组织的 LDH 活性维持正常水平。

ATPase 活性、PHD 活性和 LPO 含量都是血淋巴液中显著高于鳃组织。ATPase、PHD 和 LPO 的活性或含量在 3 种溶氧变化模式中基本没有显著变化, 但溶氧变化过程中不同个体表现出不同的响应状态, 差异显著。

菲律宾蛤仔氧化应激和能量利用体系中, 代谢相关酶及产物在响应不同溶氧变化模式中的反应大多数是一致的, 从 MDA 含量可以看出, 24 h 急性低氧对鳃组织造成明显损伤, 对血淋巴的损伤延迟尚未显现; 急性复氧 4 h, 前期低氧对鳃组织造成的损伤依旧持续, 血淋巴液开始显现出低氧的损伤; 慢性低氧 48 h 对鳃组织和血淋巴液的伤害迟缓, 但都是持续性的; 慢性复氧 8 h 并不能缓解长时间低氧对鳃组织和血淋巴液造成的损伤, 反而极显著加重。作为糖酵解有氧呼吸重要的代谢酶 PK 和 HK, 在低氧时活性降低, 在复氧时, 酶活性升高, 说明 PK 和 HK 随溶氧变化调节糖酵解代谢效率; 而作为参加无氧代谢的关键酶, LDH 在急性低氧时, 酶活性暂时降低, 当蛤仔急性复氧时, 酶活性迅速升高, 而蛤仔慢性低氧 48 h 及慢性复氧 8 h, LDH 活性逐渐升高, 说明 LDH 可调节无氧代谢的效率。PK、HK、LDH 3 种代谢酶在鳃组织中变化响应都要早于血淋巴液, 而且也都较血淋巴液中响应剧烈, 这与菲律宾蛤仔机体结构相一致, 鳃组织能迅速感知溶氧变化, 而血淋巴液感知溶氧变化需要一段时间。

3 讨论

菲律宾蛤仔是世界范围内广泛在海洋潮间带养殖的贝类, 移动能力弱使其在沿海生境中经常面临各种溶氧变化胁迫的巨大风险。前期为了揭示急性缺氧对蛤仔代谢变化的影响, 笔者进行了转录组学和代谢组学的综合分析, 转录组比较分

析表明, 蛤仔在缺氧条件下的代谢率、神经元活性、生物矿化活性、细胞增殖和分化等生物学性能表现出明显的抑制作用, 代谢组学分析还揭示了代谢变化的几个重要生物标志物, 如参与能量代谢的关键物质膜 Na^+/K^+ -ATPase 和 AMPK, 以及一些游离氨基酸等, 为研究蛤仔如何应对急性缺氧提供了新的见解^[14], 所以本研究关注了不同溶氧变化模式下鳃组织和血淋巴液中 ATPase 活性变化, 不同个体间差异显著, 使得不同处理组间差异不显著, 从而导致变化趋势不明显, 也有可能 ATPase 活性基数大或者 ATPase 种类多样, 些许变化或者不同类型的 ATPase 变化响应不同导致差异显示不出来, 不过依然可以看出不同溶氧变化模式会影响蛤仔机体尤其是血淋巴液的能量代谢水平。有研究使用核磁共振波谱检测了长期暴露于缺氧的菲律宾蛤仔鳃组织代谢组学的显著变化^[15], 发现缺氧对菲律宾蛤仔的渗透平衡和能量代谢有显著影响, 长期缺氧还会引起蛤仔鳃和肝胰脏中显著的组织病理学变化, 产生明显的组织损伤, 并认为菲律宾蛤仔可作为海岸生态毒理学的敏感生物指示剂。缺氧对长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 鳃和血细胞活性氧(ROS)生成、线粒体电位水平、CAT 和 SOD 酶活性及其基因表达水平也会产生影响, 24 h 缺氧可促进粒细胞线粒体膜电位的升高, 并诱导粒细胞内 ROS 的积累^[16]。ROS 的大量累积刚开始时诱导厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 鳃组织 SOD 活性发生代偿性上升来清除 ROS, 但随后各实验组鳃组织 SOD 活性呈下降趋势, 李磊等^[17]认为 ROS 的大量累积如果超出 SOD 抗氧化能力, 就会对鳃组织造成一定的损伤。CAT 与 SOD 功能相关, 在抗氧化过程中启动响应仅次于 SOD^[18], 这在本研究中也得到了印证。当 ROS 累积超过抗氧化防御系统的能力时, 会引起脂质过氧化^[19], 脂质过氧化程度可用 MDA 含量代表^[20], 本研究中 LPO 变化不明显, 但血淋巴液中 LPO 与 MDA 含量变化趋势相似, 且血淋巴液和鳃组织中 MDA 含量变化与菲律宾蛤仔 HK 和 PK 氧化应激反应相一致。低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)是调控低氧适应的核心转录因子, 而调节 HIF 的氧感应信号主

要由脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylase domain, PHD)组成, HIF-PHD 是动物中的低氧信号感知通路^[21], PHD 根据溶氧变化迅速启动低氧信号感知通路, 激活下游的 HK、乳酸脱氢酶 A (LDHA) 等^[22], 魏雯璐等^[23]发现干露敏感组(S)和耐受组(T)的 PHD 含量变化是不一样的, 而且马氏珠母贝(*Pinctada fucata martensii*)在高温环境下干露耐受能力降低, 本研究中, 也存在个体间 PHD 的明显差异, 估计也和温度有关, 因为实验是在夏末秋初开展的。

菲律宾蛤仔移动能力弱, 生活在复杂多变的潮间带, 更容易受到溶氧变化的胁迫, 而且菲律宾蛤仔已经进化出强大的机制以耐受低氧环境。大量研究资料表明, 低氧胁迫或干露胁迫均对生物体的生理代谢有不良影响, 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)在低氧胁迫下有氧代谢能力逐渐降低, 无氧代谢能力逐渐升高; 复氧后有氧代谢能力逐渐升高, 无氧代谢能力逐渐下降, 直至恢复正常, 说明脊尾白虾能通过代谢水平调控来适应水体环境中溶氧变化^[24]。鱼类可以通过降低代谢速率、改变脑和心脏血流速率和能量有效代谢途径等一系列的生理活动来适应低氧环境^[25]。张扬等^[26]研究干露对毛蚶(*Scapharca kagoshimensis*)稚贝生理代谢的影响时, 发现 PK 随着干露时间的延长, 活力呈现先升高后下降的趋势, 在干露 24 h 达到最大值; SOD 和 HK 的活力则分别在干露 6~24 h、6~12 h 显著低于对照组; 组织 ATP 酶含量在干露后迅速升高, 12 h 后降至对照组, 认为稚贝可能由有氧代谢转为无氧代谢, 并认为干露 12~24 h 是毛蚶稚贝代谢和相关酶活力变化较大的时期。Li 等^[27]认为菲律宾蛤仔可能有不同的糖酵解调节策略, 因为长期严重缺氧后(DO 0.5 mg/L 10 d 和 20 d), 闭壳肌中 PK 的活性显著上升, LDH 活性明显偏低。王钰等^[28]从抗氧化体系重要成员——一氧化氮(nitric oxide, NO)含量的变化推测蛤仔鳃组织在干露和恢复培养过程中发挥重要作用, 认为干露 48 h 恢复海水培养过程中, 鳃逐渐恢复呼吸作用承担起部分抗氧化功能, 使机体迅速恢复到正常生理状态。本研究结果与国内外相关研究基本一致, 菲律宾蛤仔机体

在应对水体中溶氧变化时生理代谢均会在一定范围内做出适应性调整, 短时间内(24 h)急性低氧和 4 h 的急性复氧, 菲律宾蛤仔低氧应激反应和生理代谢相关酶都能做出迅速调整, 因此机体组织细胞损伤相对较轻, 有修复的可能性; 而菲律宾蛤仔对 48 h 慢性低氧和 8 h 慢性复氧的低氧应激反应相对迟钝, 生理代谢相关酶的响应也较迟缓, 导致机体组织细胞遭受的损伤加剧, 其损伤修复可能需要时间; 海水中的菲律宾蛤仔最先响应溶氧变化的是鳃组织, 响应及时而且激烈, 血淋巴液的响应则相对晚且平缓。

综上所述, 生活在复杂多变潮间带的菲律宾蛤仔机体已进化出响应溶氧变化的能力, 但长期慢性低氧胁迫对菲律宾蛤仔机体组织细胞的损伤不容小觑, 短时间的复氧并不能使蛤仔机体损伤得到有效恢复。本研究发现无论是鳃组织还是血淋巴液的 SOD 活性、CAT 活性、GSH-px 活性、MDA 含量、PK 活性、HK 活性、LDH 活性均可作为监测菲律宾蛤仔响应生活环境溶氧变化的有效指标。本研究结果将为双壳贝类养殖模式调整和病害防治提供科学依据。

参考文献:

- [1] Barnett A F, Gledhill J H, Griffitt R J, et al. Combined and independent effects of hypoxia and tributyltin on mRNA expression and physiology of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*)[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 1-13.
- [2] Mu J J, Zhao Q C, Cui X Y, et al. Research on antioxidant activity of *Ruditapes philippinarum* protein hydrolysates[J]. Modern Food, 2020(7): 83-86. [穆姣姣, 赵前程, 崔相勇, 等. 菲律宾蛤仔蛋白酶解物的抗氧化活性研究[J]. 现代食品, 2020(7): 83-86.]
- [3] Zhang L, Liu J R, Tian Y Y, et al. Composition and distribution of nitrogenous compounds in soft body of *Ruditapes philippinarum*[J]. Food Science, 2015, 36(24): 95-100. [张龙, 刘俊荣, 田元勇, 等. 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)软体部位含氮物的组成及其分布[J]. 食品科学, 2015, 36(24): 95-100.]
- [4] Jin W N, Xu Y F, Li H D. Research progress on new varieties of *Ruditapes philippinarum*[J]. Hebei Fisheries, 2022(10): 40-44. [金万年, 许云枫, 李宏达. 菲律宾蛤仔新品种研究进展[J]. 河北渔业, 2022(10): 40-44.]
- [5] Zhang W B, Lü Z B, Zhang Y, et al. Influence of hypoxia

- stress on physiological metabolism of *Ruditapes philippinarum*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2014, 33(9): 2448-2453. [张文斌, 吕振波, 张莹, 等. 缺氧胁迫对菲律宾蛤仔(*Ruditapes Philippinarum*)生理代谢的影响[J]. 生态学杂志, 2014, 33(9): 2448-2453.]
- [6] Nie H T, Lu C W, Chai C L, et al. Response of the Manila clam antioxidant enzyme to hypoxia stress under experimental conditions[J]. Marine Sciences, 2017, 41(11): 32-37. [聂鸿涛, 卢长炜, 柴成林, 等. 低氧胁迫对菲律宾蛤仔抗氧化酶的影响[J]. 海洋科学, 2017, 41(11): 32-37.]
- [7] Zenteno-Savín T, Saldierna R, Ahuejote-Sandoval M. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2006, 142(3-4): 301-308.
- [8] Wang H M, Ding J F, Yang D M, et al. Comparison of hypoxia stress tolerance among Manila clam *Ruditapes philippinarum* with four shell-colors[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2018, 33(2): 181-189. [王化敏, 丁鉴锋, 杨东敏, 等. 4种壳色菲律宾蛤仔在低氧胁迫下的耐受能力比较研究[J]. 大连海洋大学学报, 2018, 33(2): 181-189.]
- [9] Du S N N, Mahalingam S, Borowiec B G, et al. Mitochondrial physiology and reactive oxygen species production are altered by hypoxia acclimation in killifish (*Fundulus heteroclitus*)[J]. The Journal of Experimental Biology, 2016, 219(Pt 8): 1130-1138.
- [10] Wang X Y, Yang H S, Liu G B, et al. Enzyme responses and lipid peroxidation in gills and hepatopancreas of clam *Macra veriformis*, following cadmium exposure[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2011, 29(5): 981-989.
- [11] Wang J Y, Zhu S G, Xu C F. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education press. 2002, Third Edition, Volume II, 83-85. [王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002, 第三版, 下册, 83-85.]
- [12] Sun S M, Fu H T, Zhu J, et al. Molecular cloning and expression analysis of lactate dehydrogenase from the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* in response to hypoxia[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(7): 1990.
- [13] Winston G W, Di Giulio R T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms[J]. Aquatic Toxicology, 1991, 19(2): 137-161.
- [14] Sun X J, Tu K, Li L, et al. Integrated transcriptome and metabolome analysis reveals molecular responses of the clams to acute hypoxia[J]. Marine Environmental Research, 2021, 168: 105317.
- [15] Zhang Y, Wu H F, Wei L, et al. Effects of hypoxia in the gills of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using NMR-based metabolomics[J]. Marine Pollution Bulletin, 2017, 114(1): 84-89.
- [16] Andreyeva A Y, Gostyukhina O L, Kladchenko E S, et al. Acute hypoxic exposure: Effect on hemocyte functional parameters and antioxidant potential in gills of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Marine Environmental Research, 2021, 169: 105389.
- [17] Li L, Ping X Y, Song W, et al. Toxic effects of copper ion in *Mytilus coruscus*: An integrated biomarker approach[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(3): 32-39. [李磊, 平仙隐, 宋炜, 等. 基于IBR模型的Cu²⁺对厚壳贻贝的毒性效应研究[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(3): 32-39.]
- [18] Velisek J, Stara A, Li Z H, et al. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout[J]. Aquaculture, 2011, 310(3-4): 369-375.
- [19] Stara A, Machova J, Velisek J. Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2012, 33(2): 334-343.
- [20] Thomas J P, Maiorino M, Ursini F, et al. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides[J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(1): 454-461.
- [21] Wang L, Cui S, Ma L, et al. Current advances in the novel functions of hypoxia-inducible factor and prolyl hydroxylase in invertebrates[J]. Insect Molecular Biology, 2015, 24(6): 634-648.
- [22] Wang T. The molecular mechanism of hypoxia signal pathway in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*)[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2017. [王婷. 长牡蛎低氧信号通路分子作用机制研究[D]. 青岛: 中国科学院大学(中国科学院海洋研究所), 2017.]
- [23] Wei W L, Liu Q, Zhang C S, et al. Changes of tolerance of air exposure and immune-related gene expression of *Pinctada fucata martensii* at different temperatures[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2021, 41(2): 69-75. [魏雯璐, 刘琪, 张丞澍, 等. 不同温度下马氏珠母贝干露耐受能力及其免疫相关基因表达的变化[J]. 广东海洋大学学报, 2021, 41(2): 69-75.]
- [24] Wang P, Shi W J, Wan X H, et al. Effects of hypoxia and reoxygenation on respiratory metabolism enzyme and antioxidant enzyme activities in *Exopalaemon carinicauda*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 106-115. [王盼,

- 史文军, 万夕和, 等. 低氧-复氧对脊尾白虾呼吸代谢和抗氧化酶活力的影响[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 106-115.]
- [25] Nilsson G E, Renshaw G M C. Hypoxic survival strategies in two fishes: Extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark[J]. The Journal of Experimental Biology, 2004, 207(Pt 18): 3131-3139.
- [26] Zhang Y, Jiang T Q, Jiang Y Z, et al. Effects of air exposure on enzyme activity related to physiological metabolism in juvenile *Scapharca kagoshimensis*[J]. Marine Fisheries, 2022, 44(2): 219-227. [张扬, 江天棋, 姜亚洲, 等. 干露胁迫对毛蚶稚贝生理代谢相关酶活力的影响[J]. 海洋渔业, 2022, 44(2): 219-227.]
- [27] Li Q, Sun S, Zhang F, et al. Effects of hypoxia on survival, behavior, metabolism and cellular damage of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*)[J]. PLoS One, 2019, 14(4): e0215158.
- [28] Wang Y, Wang W W, Xie S H, et al. The effects of air exposure and recovery on immune parameters of *Ruditapes philippinarum*[J]. Journal of Agriculture, 2021, 11(4): 38-43. [王钰, 王文文, 谢深涵, 等. 干露及恢复过程中菲律宾蛤仔免疫指标的变化[J]. 农学学报, 2021, 11(4): 38-43.]

Effects of three dissolved oxygen modes on oxidative stress and physiological metabolism in *Ruditapes philippinarum* gill tissue and hemolymph

ZHOU Liqing^{1,2}, JING Hao², GE Guangyu³, WU Zhou³, SUN Xiujun¹, LI Jiale², WU Biao¹, LIU Zhihong¹, YANG Jinlong²

1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Marine Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China

Abstract: *Ruditapes philippinarum* is one of the most important shellfish species cultured on the beach in China. In recent years, global climate change and coastal seawater eutrophication have expanded the hypoxic area of the tidal flat ecosystem. The severity and duration of hypoxia will be exacerbated by eutrophication and may deteriorate with climate change. Long term hypoxia can kill a large number of marine organisms, including clams. Clams are more vulnerable to various adverse environmental factors in an increasingly intensive breeding environment, which increases the risk of disease outbreaks. This is unfavorable for coastal economic development and ecosystem maintenance in China. The respiratory organ of the clam is the gill, and haemolymph transports oxygen and nutrients in the clam. The change in dissolved oxygen directly affects the oxidative stress response and metabolic index in the gill tissue and blood cells. We set up three modes of dissolved oxygen changes to investigate the oxidative stress response and physiological metabolism of *R. philippinarum* gill tissue and hemolymph in response to dissolved oxygen changes, namely, maintaining normal dissolved oxygen (C treatment), normal dissolved oxygen-acute hypoxia-acute reoxygenation (AHR treatment), and normal dissolved oxygen-chronic hypoxia-chronic reoxygenation (CHR treatment). The superoxide dismutase (SOD) activity, catalase (CAT) activity, glutathione peroxidase (GSH-px) activity, malondialdehyde (MDA) content, pyruvate kinase (PK) activity, hexokinase (HK) activity, lactic dehydrogenase (LDH) activity, ATPase activity, proline hydroxylase (PHD) activity, and lipid peroxide (LPO) content of hemolymph and gill tissue under the three modes of dissolved oxygen change were measured using the microplate method with 96 samples. The results showed that the gill tissue of *R. philippinarum* was the first to respond to the change in dissolved oxygen, and the response was immediate and

intense, whereas the response of the haemolymph was delayed and moderate. The oxidation-antioxidant enzyme system of gill tissue and hemolymph changed in a consistent manner, with SOD, CAT, and GSH-px being the most important antioxidative enzymes. SOD and CAT can help to mitigate the damage of dissolved oxygen change on the clam body. The changing trend in oxidative stress and energy utilization systems such as LDH, PK, HK, and MDA is also consistent in gill tissue and hemolymph; PK and HK regulate the efficiency of glycolysis as the dissolved oxygen changes, whereas LDH primarily regulates the efficiency of anaerobic metabolism, and the MDH content reflects the extent of the dissolved oxygen damage to the clam. The enzymes and products involved in physiological metabolism can be used as effective indicators to monitor the response of *R. philippinarum* to the changes in dissolved oxygen in the living environment. The changes in ATPase activity, PHD activity, and LPO content only show differences among individuals, while the differences are not obvious among different dissolved oxygen modes. The body of *R. philippinarum* can quickly adjust the oxidative stress and physiological metabolic responses to acute changes in dissolved oxygen, but the response to the chronic changes in dissolved oxygen is slow, resulting in long-term damage to the clam body that is difficult to detect. The results of this study will provide a scientific foundation for adjusting bivalve culture methods and disease prevention methods.

Key words: *Ruditapes philippinarum*; dissolved oxygen change; gill; haemolymph; antioxidant enzyme; metabolic enzymes

Corresponding author: LI Jiale, E-mail: jlli@shou.edu.cn; YANG Jinlong, E-mail: jlyang@shou.edu.cn