

李洪娟, 陈刚, 郭志雄, 等. 军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 幼鱼对环境低氧胁迫氧化应激与能量利用指标的响应[J]. 海洋学报, 2020, 42(4): 12–19, doi:10.3969/j.issn.0253–4193.2020.04.002

Li Hongjuan, Chen Gang, Guo Zhixiong, et al. Oxidative stress and energy utilization responses of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) to environmental hypoxia stress[J]. Haiyang Xuebao, 2020, 42(4): 12–19, doi:10.3969/j.issn.0253–4193.2020.04.002

军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 幼鱼对环境低氧胁迫氧化应激与能量利用指标的响应

李洪娟¹, 陈刚^{1*}, 郭志雄¹, 王维政¹, 黄建盛^{1*}, 曾泽乾¹

(1. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524088)

摘要: 本文探究环境低氧对军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 氧化应激和能量利用指标的影响, 为军曹鱼的健康养殖提供参考依据。通过设置低氧胁迫-恢复实验, 将军曹鱼幼鱼 (平均体质量 (220.67±20.73)g) 在低氧 ((2.64±0.25)mg/L) 胁迫 3 h 及复氧 ((6.34±0.15)mg/L) 8 h、24 h 和 48 h 后, 测定其肝脏和肌肉组织的氧化应激与能量利用指标。结果显示, 低氧胁迫后, 肝脏中丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 和谷胱甘肽还原酶 (Glutathione Reductase, GR) 活力均显著低于对照组 ($p < 0.05$), 乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH) 活性显著高于对照组 ($p < 0.05$); 肌肉中 MDA 和脂质过氧化物 (Lipid Peroxidase, LPO) 活性均显著低于对照组 ($p < 0.05$), 超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 和 LDH 活性均显著高于对照组 ($p < 0.05$); 肌糖原和肝糖原含量极显著低于对照组 ($p < 0.01$)。复氧过程中, 肝脏和肌肉中 MDA、LPO、SOD、CAT、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione Peroxidase, GPx) 和 GR 含量均出现不同程度的升高; 肝糖原在复氧 24 h 后显著高于对照组 ($p < 0.05$), 复氧 48 h 后显著低于对照组 ($p < 0.05$); 肌糖原在复氧 8 h、24 h 和 48 h 后均显著低于对照组 ($p < 0.05$)。研究表明, 低氧胁迫能够对军曹鱼幼鱼机体造成一定的氧化损伤, 肝脏和肌肉组织的酶活力和能量供应发生变化; 低氧胁迫后的再复氧环境, 对机体造成更为强烈的氧化损伤, 可通过自身生理调节逐渐恢复到正常水平。

关键词: 军曹鱼; 低氧胁迫; 氧化应激; 能量利用

中图分类号: P714⁺.5; S917.4

文献标志码: A

文章编号: 0253–4193(2020)04–0012–08

1 引言

鱼类的生命活动易受到各种环境因子的影响, 水体溶解氧含量是其中重要的影响因子之一^[1]。溶解氧作为维持水生动物生存的基本条件, 它主要影响水生动物的生长、呼吸、物质和能量代谢等各种生理生化指标^[2–4]。在自然因素和人为因素的影响下, 近岸海

域缺氧现象呈现出不断上升的趋势, 造成水体周期性和连续性低氧的现象, 且部分近岸海域在夏、秋季大多处在低氧状态 (溶解氧含量大约为 3 mg/L), 从而导致了大量鱼类和海洋无脊椎动物的死亡, 成为名副其实的“死水区”^[5–8]。水生动物在低氧环境下, 容易引起机体的应激反应, 尤其是低氧胁迫后的复氧阶段更加剧了应激反应, 导致机体氧化损伤, 产生大量的活性

收稿日期: 2019–06–28; 修订日期: 2019–10–17。

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金资助 (CARS-47); 广东海洋大学大学生创新创业训练计划项目 (CXXL2018131); 南方海洋科学与工程广东省实验室 (湛江) (ZJW-2019-06); 2018 年广东海洋大学起航计划项目 (QHJZR201818)。

作者简介: 李洪娟 (1993—), 女, 河南省商丘市人, 主要研究方向为海水鱼类养殖生理生态学。E-mail: 1316437678@qq.com

* 通信作者: 陈刚, 教授, 博士生导师, 主要从事海水鱼类养殖生理生态学方向的研究。E-mail: cheng@gdou.edu.cn。黄建盛, 副教授, 主要从事海水鱼类养殖生理生态学方向的研究。E-mail: huangjs@gdou.edu.cn

氧(Reactive Oxygen Species, ROS), 最终影响其生理功能^[9]。为了降低ROS对机体的损伤, 生物体通过抗氧化酶体系来发挥抗氧化应激作用。同时, 低氧会导致有氧代谢降低和无氧代谢增加, 随之能量代谢系统也会受到影响^[10-11]。近年来研究表明, 鱼类通过增加呼吸效率、增加血氧亲和力、改变代谢效率以及降低能量消耗等方式来应对低氧环境^[9]。因此, 研究低氧胁迫下鱼类的氧化应激水平及其能量利用不仅为鱼类适应低氧环境提供参考依据, 还可以探讨其在水产健康养殖中的意义。

军曹鱼(*Rachycentron canadum*)亦称海鲷、海龙鱼, 隶属于鲈形目(Perciformes)、军曹鱼科(Rachycentridae)、军曹鱼属(*Rachycentron*), 为海产名贵鱼类, 是南方沿海海水网箱养殖产业的重要组成部分, 且对水体溶氧要求很高, 一旦缺氧, 将造成巨大经济损失^[12-13]。近年来, 由于风和潮汐的作用, 受水温、季节、养殖密度等因素的影响, 在军曹鱼养殖海区经常出现低氧现象。溶解氧的变化会引起机体氧化应激水平的改变, 肝脏是机体对外界刺激反应最早、最敏感的组织之一, 也是最早出现损伤的组织, 严重时则会使鱼类肝脏的解毒功能处于超负荷状态^[14]。同时, 鱼类为了延长自身的生存时间, 会降低其运动能力, 因此肝脏和肌肉组织的代谢情况也备受关注^[15]。本实验室已研究了急性低氧对军曹鱼大规格幼鱼血液生化指标的影响^[16], 而关于低氧及复氧对其氧化应激水平的影响尚未开展研究。为此, 本实验以军曹鱼幼鱼为对象, 研究低氧胁迫与复氧对其肝脏和肌肉组织氧化应激水平与能量利用的影响, 探讨军曹鱼对低氧环境的适应性, 以期为军曹鱼的健康养殖提供参考资料。

2 材料与方法

2.1 实验材料

实验鱼来源于广东海洋大学水产学院鱼类种子工程与养殖团队在东海岛生物研究基地繁育的幼鱼, 随机选取健康、活力好的个体200尾用专用鱼苗运输车运回实验室, 幼鱼的体质量为 (220.67 ± 20.73) g, 全长为 (29.37 ± 3.76) cm。实验在自制的室内循环水养殖系统中进行, 水体交换量为90 L/h, 水槽的长、宽、高分别为70 cm、50 cm和60 cm, 每个水槽放20尾幼鱼。暂养期间, 通过调节水槽内的充气量大小, 保持水中溶解氧在6 mg/L以上, 水温为 (26.3 ± 2.5) ℃, 盐度为 27.8 ± 0.47 , 总氨氮含量为 (0.17 ± 0.03) mg/L。每日投喂石斑鱼专用配合饲料2次(广东越群海洋生物研究开发有限公司), 及时清理粪便。实验开始前一天停止

投食。

2.2 实验设计

实验在循环水养殖系统中的6个水槽中进行, 分为实验组和对照组, 各3个重复。对照组采用循环水养殖并始终保持持续充气及流水状态, 用溶氧仪(台湾衡欣, AZ8403)每隔10 min监测溶氧量的变化, 对照组的溶氧量为 (6.64 ± 0.35) mg/L; 实验组通过调节循环水的流量、关闭充气及水槽上方覆盖薄膜的方法来降低水体溶解量, 并用溶氧仪实时监测。当溶解氧为 (2.64 ± 0.25) mg/L条件下低氧胁迫维持3 h, 取样后, 立即恢复常氧状态, 复氧后溶氧量为 (6.34 ± 0.15) mg/L, 在复氧8 h, 24 h和48 h后取样, 实验组和对照组取样时间一致。

2.3 样品采集与制备

实验处理后, 实验组在低氧胁迫与常氧恢复的各个时间点取样, 常氧对照组在实验结束后取样, 每个时间点每桶各取3尾鱼, 将实验鱼用适量的200 mg/L间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(MS-222)海水溶液快速麻醉, 用纱布擦干解剖, 取其肌肉和肝脏组织, 放置于1.50 mL冻存管中, 迅速放于液氮中速冻, 之后转移至 -80 ℃超低温冰箱, 保存待测。取肝脏和肌肉各0.60 g, 按1:9加入0.90%生理盐水, 在冰水浴中用匀浆机(IKA)匀浆5 min, 制成10%匀浆液; 之后在温度4℃、转速2 000 r/min的条件下, 离心15 min; 取上清液分装后, 置于 -80 ℃保存, 用于各酶活指标的测定。

2.4 酶活力测定

采用南京建成生物工程研究所检测试剂盒测定组织中氧化应激和能量利用指标, 包括丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、脂质过氧化物(Lipid Peroxide, LPO)、谷胱甘肽还原酶(Glutathione Reductase, GR)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxidase, GPx)、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)以及乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase, LDH)和糖原。MDA采用硫代巴比妥酸(TBA)法, 反应体系产生红色产物, 在532 nm波长处测其吸光度, 计算转换为MDA含量; GR采用紫外比色法, 定义1 g组织蛋白1 min使反应体系中底物还原型辅酶II(Triphosphopyridine Nucleotide, NADPH)的浓度改变1 mmol/L所需的酶量为一个酶活力单位; CAT采用钼酸铵法, 定义1 mg组织蛋白1 s分解1 μ mol的 H_2O_2 的量为一个活力单位; GPx采用比色法, 定义1 mg蛋白质, 1 min扣除非酶反应的作用, 使反应体系中谷胱甘肽(Glutathione, GSH)浓度降低1 μ mol/L为一个酶活力单位; SOD采用羟胺法, 定义

1 mg 组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率 50% 时所对应的 SOD 量为一个活力单位(单位 U); 蛋白质浓度测定采用考马斯亮蓝法; LDH 采用微板法, 定义 1 g 组织蛋白 37°C 与基质作用 15 min, 反应体系中产生 1 μmol 丙酮酸为 1 单位; 糖原采用比色法, 利用糖原在浓硫酸的作用下可脱水生成糖醛衍生物, 后者再与蒽酮作用形成蓝色化合物, 与同法处理的标准葡萄糖溶液比色定量。相应的操作步骤参照试剂盒说明书。

2.5 数据处理

实验所得数据用平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。采用配对 *t* 检验方法分析对照组和低氧胁迫后的数据差异显著性, 以 $p < 0.05$ 表示差异显著, 以 $p < 0.01$ 表示差异极显著; 采用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析对照组与恢复常氧不同时间点的数据差异显著性, 并用 Duncan 检验进行多重比较。

3 结果

3.1 低氧胁迫对军曹鱼幼鱼氧化应激指标的影响

低氧胁迫对军曹鱼幼鱼肝脏和肌肉的氧化应激指标的影响见图 1。由图 1 可知, 低氧胁迫 3 h 后, 肝脏 MDA 含量与对照组的差异具有统计学意义($t=6.675$, $df=2$, $p=0.022 < 0.05$), 肌肉 MDA 含量与对照组的差异具有统计学意义($t=4.352$, $df=2$, $p=0.049 < 0.05$)(图 1a); 肝脏 LPO 活性与对照组无显著性差异($p > 0.05$), 肌肉 LPO 活性比对照组降低了 0.08 $\mu\text{mol/g}$, 差异具有统计学意义($t=3.482$, $df=2$, $p=0.037 < 0.05$)(图 1b); 肝脏 CAT 活性比对照组降低了 4.81 U/mg, 差异具有统计学意义($t=8.715$, $df=2$, $p=0.013 < 0.05$), 肌肉 CAT 活性

与对照组无显著性差异($p > 0.05$)(图 1c); 肝脏和肌肉 GPx 活性均与对照组无显著性差异($p > 0.05$)(图 1d); 肝脏 SOD 活性与对照组无显著性差异($p > 0.05$), 而肌肉 SOD 活性与对照组差异具有统计学意义($t=5.027$, $df=2$, $p=0.037 < 0.05$)(图 1e); 肝脏 GR 活性与对照组差异具有统计学意义($t=4.428$, $df=2$, $p=0.047 < 0.05$), 肌肉 GR 活性与对照组无显著性差异($p > 0.05$)(图 1f)。

3.2 低氧胁迫对军曹鱼幼鱼能量利用指标的影响

低氧胁迫对军曹鱼幼鱼肝脏和肌肉的能量利用指标的影响见图 2。由图 2 可知, 低氧胁迫 3 h 后, 肝脏 LDH 活性比对照组升高了 169.80 U/g, 差异具有统计学意义($t=4.816$, $df=2$, $p=0.020 < 0.05$), 肌肉 LDH 活性比对照组升高了 177.90 U/g, 差异具有统计学意义($t=3.845$, $df=2$, $p=0.031 < 0.05$)(图 2a); 肝糖原含量比对照组降低了 8.51 mg/g, 差异具有统计学意义($t=22.14$, $df=2$, $p=0.002 < 0.01$), 肌糖原含量比对照组降低了 1.41 mg/g, 差异具有统计学意义($t=13.13$, $df=2$, $p=0.006 < 0.01$)(图 2b)。

3.3 复氧过程对军曹鱼幼鱼氧化应激指标的影响

复氧过程对军曹鱼幼鱼肝脏和肌肉氧化应激指标的影响见表 1。由表 1 结果显示, 肝脏组织中, MDA 含量恢复常氧 8 h 后与对照组无显著差异($p > 0.05$), 24 h 和 48 h 后显著高于对照组($p < 0.05$); LPO 活性在复氧 8 h、24 h 和 48 h 后显著高于对照组($p < 0.05$); 在复氧 8 h、24 h 和 48 h 过程中, CAT 活性显著高于对照组($p < 0.05$), 并且在 24 h 时 CAT 活性达到最大; 复氧 8 h、24 h 和 48 h 后, GPx 活性显著高于对照组($p < 0.05$), 呈逐步增加趋势, 且在复氧 24 h 后达到最

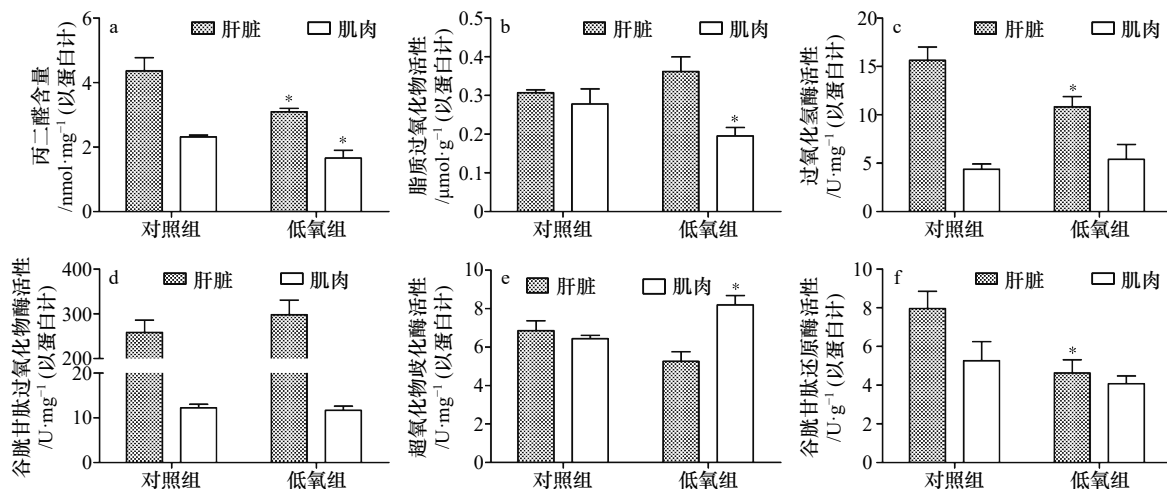


图 1 低氧胁迫对军曹鱼幼鱼肝脏和肌肉氧化应激指标的影响

Fig. 1 Effects of hypoxic stress on oxidative stress indicator of liver and muscle of juvenile cobia

*表示差异显著($p < 0.05$)

* shows significant difference ($p < 0.05$)

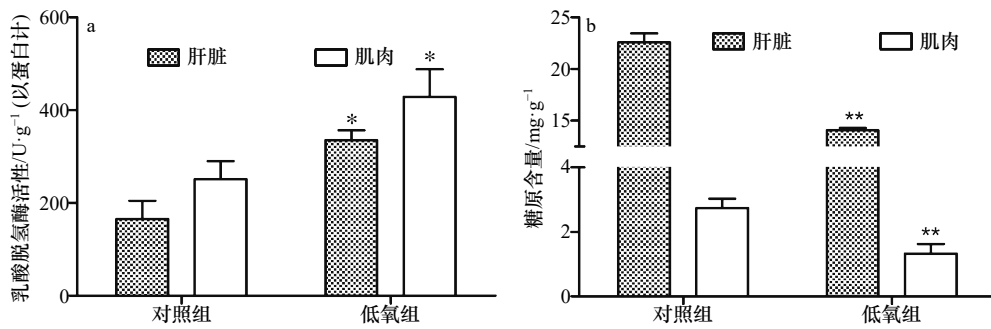


图2 低氧胁迫对军曹鱼幼鱼肝脏和肌肉的乳酸脱氢酶活性、糖原含量的影响

Fig. 2 Effects of hypoxia stress on lactate dehydrogenase activity and glycogen content in liver and muscle of juvenile cobia

*表示差异显著($p<0.05$), **表示差异极显著($p<0.01$)* shows significant difference ($p<0.05$), ** shows extremely significant difference ($p<0.01$)

表1 复氧过程对军曹鱼幼鱼肝脏和肌肉氧化应激指标的影响

Table 1 Effects of reoxygenation on oxidative stress indicator of liver and muscle of juvenile cobia

氧化应激指标	复氧时间/h	肝脏	肌肉
丙二醛/nmol·mg ⁻¹ (以蛋白计)	对照组	4.36±0.41 ^a	2.31±0.06 ^a
	8 h	4.37±0.57 ^a	3.49±0.16 ^b
	24 h	8.24±0.27 ^c	4.95±0.58 ^c
	48 h	6.46±0.25 ^b	2.52±0.11 ^a
脂质过氧化物/μmol·g ⁻¹ (以蛋白计)	对照组	0.31±0.01 ^a	0.28±0.04 ^a
	8 h	1.19±0.27 ^b	2.07±0.31 ^c
	24 h	1.96±0.65 ^{bc}	1.71±0.18 ^{bc}
	48 h	2.29±0.26 ^c	1.40±0.14 ^b
过氧化氢酶/U·mg ⁻¹ (以蛋白计)	对照组	15.64±1.36 ^a	4.38±0.54 ^a
	8 h	26.58±4.02 ^b	7.83±2.38 ^{ab}
	24 h	38.45±3.65 ^c	9.08±2.02 ^b
	48 h	27.51±1.25 ^b	6.83±3.18 ^{ab}
谷胱甘肽过氧化物酶 /U·mg ⁻¹ (以蛋白计)	对照组	258.50±27.57 ^a	12.21±0.81 ^a
	8 h	352.38±16.26 ^b	25.99±2.10 ^c
	24 h	429.41±23.61 ^c	24.23±1.07 ^{bc}
	48 h	424.53±21.03 ^c	21.73±1.82 ^b
超氧化物歧化酶/U·mg ⁻¹ (以蛋白计)	对照组	6.86±1.76 ^a	6.44±0.17 ^a
	8 h	9.23±1.56 ^{ab}	11.02±1.28 ^b
	24 h	11.63±1.58 ^b	12.57±1.83 ^b
	48 h	9.62±2.27 ^{ab}	12.64±1.44 ^b
谷胱甘肽还原酶/U·g ⁻¹ (以蛋白计)	对照组	7.96±0.89 ^a	5.27±0.98 ^a
	8 h	48.91±22.04 ^b	38.73±15.49 ^b
	24 h	42.96±1.50 ^b	40.07±16.66 ^b
	48 h	43.42±12.63 ^b	22.58±9.64 ^{ab}

注: 同一列中不同字母上标的数值互相之间差异显著($p<0.05$)。

大值; 在复氧 8 h 和 24 h 的过程中, SOD 含量逐渐升高, 且在复氧 24 h 后显著高于对照组 ($p<0.05$); 在复氧 8 h、24 h 和 48 h 过程中 GR 活性显著高于对照组 ($p<0.05$)。肌肉组织中, MDA 含量在复氧 8 h 和 24 h 后显著高于对照组 ($p<0.05$), 且逐渐升高, 48 h 与对照组无显著性差异; LPO 活性在复氧 8 h、24 h 和 48 h 后显著高于对照组 ($p<0.05$), 且在复氧 8 h 时达到最大值, 随后逐渐降低; CAT 活性在复氧 24 h 后显著高于对照组 ($p<0.05$); GPx 活性在复氧 8 h、24 h 和 48 h 后显著高于对照组 ($p<0.05$), 呈逐步下降趋势, 但未能降低到正常水平; SOD 活性在复氧 8 h、24 h 和 48 h 后显著高于对照组 ($p<0.05$); GR 活性在复氧 8 h 和 24 h 后显著高于对照组 ($p<0.05$), 且在复氧 24 h 后, GR 活性达到最大值, 复氧 24~48 h 阶段 GR 活性逐渐下降, 在复氧 48 h 后无显著性差异。

3.4 复氧过程对军曹鱼幼鱼能量利用指标的影响

复氧过程对军曹鱼幼鱼肝脏和肌肉能量利用指标的影响见表 2。表 2 结果显示, 肝脏组织中, LDH 活性在复氧 8 h、24 h 和 48 h 后, 与对照组无显著性差异 ($p>0.05$), 随着复氧时间的增加活性逐步降低, 且恢复到正常水平; 肝糖原含量在恢复氧气 24 h 后显著高于对照组 ($p<0.05$), 复氧 48 h 后显著低于对照组 ($p<0.05$)。肌肉组织中, LDH 活性在复氧 8 h、24 h 和 48 h 后无显著性差异 ($p>0.05$); 肌糖原含量在复氧 8 h、24 h 和 48 h 后显著低于对照组 ($p<0.05$)。

4 讨论

正常状态下, 机体内的 ROS 处于一种不断产生又不断被清除的动态平衡状态, 而过多的 ROS 便会对机体造成一定的毒害, 如 MDA 和 LPO 含量的变化。机体的抗氧化系统作为 ROS 的清除系统, 主要包括 SOD、CAT、GPx 和 GR, 参与 ROS 的清除以及

表 2 复氧过程对军曹鱼幼鱼肝脏和肌肉
能量利用指标的影响

Table 2 Effects of reoxygenation on energy utilization indicator
of liver and muscle of juvenile cobia

能量利用指标	复氧时间/h	肝脏	肌肉
乳酸脱氢酶/ $U \cdot g^{-1}$ (以蛋白计)	对照组	165.37±39.61 ^{ab}	251.12±39.10 ^a
	8 h	193.32±2.58 ^b	320.55±101.18 ^a
	24 h	149.39±18.28 ^{ab}	331.92±38.58 ^a
	48 h	140.87±11.27 ^a	372.32±67.30 ^a
糖原/ $mg \cdot g^{-1}$	对照组	22.57±0.89 ^b	2.74±0.03 ^b
	8 h	19.82±1.10 ^{ab}	1.82±0.48 ^a
	24 h	33.28±1.73 ^c	1.90±0.42 ^a
	48 h	18.81±1.94 ^a	1.55±0.18 ^a

注:同一列中不同字母上标的数值互相之间差异显著($p < 0.05$)。

在机体的保护性防御反应中发挥巨大作用^[1]。糖原是机体内最为重要的功能物质,对维持机体的能量代谢有重要作用。因此,实验将从以下 3 个方面进行讨论。

4.1 低氧胁迫与恢复对军曹鱼组织 MDA 和 LPO 含量的影响

机体受到低氧胁迫后,体内的 ROS 含量发生变化,从而引起机体抗氧化系统的变化^[17]。MDA 和 LPO 作为脂质过氧化的一种指标,其含量增加表明低氧胁迫对鱼体产生了氧化损伤,影响鱼类的生理功能^[8]。本实验中,在低氧胁迫 3 h 后,肝脏和肌肉中 MDA 含量显著降低,肌肉 LPO 含量也显著降低,这是因为在低氧胁迫下军曹鱼供氧受到限制,使氧气经过线粒体呼吸链相应减少,那么线粒体产生的 ROS 也相应减少,这与对瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)的研究结果相似^[1]。肝脏 MDA 含量在复氧 24 h 和 48 h 后显著升高,且肌肉 MDA 含量在复氧 8 h 和 24 h 后显著升高;肝脏和肌肉 LPO 活性在复氧 8 h、24 h 和 48 h 后均出现不同程度的升高,说明恢复溶氧后军曹鱼氧化应激反应较为强烈。这与对瓦氏黄颡鱼和花鲈(*Lateolabrax maculatus*)的研究结果相似^[1,9]。分析其原因可能由于军曹鱼在复氧过程中由于大量氧气的导入,机体补偿代谢更加剧了氧化应激胁迫,使得 ROS 的浓度迅速升高,导致生物大分子过氧化,如 LPO 和 MDA 含量升高,因而出现了复氧过程中更为强烈的氧化应激现象。

4.2 低氧胁迫与恢复对军曹鱼组织抗氧化酶活性的影响

低氧能够影响鱼体抗氧化防护能力,从而引起鱼

类产生氧化应激,其与抗氧化酶活性密切相关^[19]。酶类抗氧化剂(如 CAT、SOD、GPx 和 GR)可清除细胞内多余的氧自由基,来预防氧化应激对组织或细胞的损伤,从而维持机体的 ROS 平衡^[20]。本研究中,肝脏和肌肉中 GPx 活力在低氧胁迫 3 h 后无显著性差异,而肝脏 CAT 和 GR 活力显著降低,肌肉 SOD 活力显著升高,这与对细鳞肥脂鲤(*Piaractus mesopotamicus*)和葛氏鲈塘鳢(*Perccottus glenii*)的研究结果相似^[21-22]。说明低氧胁迫 3 h 时,机体抗氧化酶体系未被完全激活,机体线粒体仍然可以在静止状态下呼吸,在一定程度上抵抗低氧胁迫或产生较少的 ROS 或存在代谢减痕作用,导致线粒体有氧呼吸减弱,减少了电子传递链上电子逃逸的几率,以致氧携带电子减少,从而减少了 ROS 的生成,主要的原因可能是低氧胁迫下鱼类的耐受性较高,且低氧胁迫的时间较短^[23]。在复氧 8 h、24 h 和 48 h 阶段,肝脏和肌肉中 CAT、SOD、GPx 和 GR 活性均出现不同程度的升高。肝脏 CAT、SOD 和 GPx 活性在复氧 24 h 后达到最大值,而在复氧 24~48 h 阶段,其活性逐渐下降,但未能恢复到正常水平;在复氧过程中,肌肉 SOD 和 GPx 活力没能恢复到正常水平,这与花鲈和鲮鱼(*Mugil cephalus*)的研究结果相似,恢复溶氧后其氧化应激反应仍然较为强烈^[9,14],说明在缺氧后再复氧的过程中,ROS 在组织或细胞内快速蓄积,过量的 ROS 造成鱼体氧化应激和抗氧化体系的紊乱,从而使军曹鱼体内的抗氧化防御机制在缺氧后再复氧的过程中被完全激活。综上所述,鱼类在低氧胁迫下氧化应激参数变化各异,表明机体能够提高自身的抗氧化潜能,从而为解决再氧化后体内的氧化应激做好准备^[1]。本研究中氧化损伤指标(MDA 和 LPO)和能量利用指标(LDH 和糖原)也证实了这一结论。

4.3 低氧胁迫与恢复对军曹鱼能量利用的影响

机体正常生命活动的运行需要能量来维持。糖原是机体内最为重要的供能物质,对维持机体的能量代谢有重要作用^[24]。而 LDH 可以催化丙酮酸和乳酸之间的相互转化,为生命活动提供能量,是鱼类机体无氧代谢的标志酶,其活力大小在一定程度上反映了无氧代谢能力的高低^[25]。

本实验中,在急性低氧胁迫 3 h 后,肝脏和肌肉中糖原含量急剧下降,LDH 含量急剧上升,表明机体由于氧气不足进行了无氧代谢,动用糖原中贮存的能源物质来维持其基本代谢,同时 LDH 活力升高,将更多的丙酮酸转化为乳酸,乳酸浓度升高表示厌氧糖酵解反应加剧,以应对突然出现的低氧环境^[14,26],与对白鲢

(*Hypophthalmichthys molitrix*)和卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)的研究结果一致^[24,27]。复氧过程中,肝脏和肌肉LDH含量呈现相反的变化趋势,但在复氧48 h后,其LDH含量均与对照组无显著性差异;肌糖原含量显著降低。这说明尽管机体的代谢水平随着复氧时间的增加而逐渐恢复,但仍需部分厌氧糖酵解产生ATP为机体供能,这与大弹涂鱼(*Boleophthalmus boddarti*)和梭鱼(*Liza haematocheila*)的研究结果相似^[28-29]。已有研究显示,鱼类的白肌组织是乳酸产生和清除的主要部位^[30],本实验说明军曹鱼肌肉具备一定的厌氧代谢能力,可以通过厌氧代谢提供能量,从而使LDH和糖原含量维持在一定的范围内,有利于减少肝脏等重要器官的损伤,也有利于提高军曹鱼适应低氧环境的能力。

参考文献:

- [1] 张国松. 瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)应对低氧胁迫的分子机制研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2017.
Zhang Guosong. Study on the molecular mechanism of *Pelteobagrus vachelli* in response to hypoxia stress[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2017.
- [2] Wu R S S. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45(1-12): 35-45.
- [3] Buentello J A, Gatlin III D M, Neill W H. Effects of water temperature and dissolved oxygen on daily feed consumption, feed utilization and growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. *Aquaculture*, 2000, 182(3/4): 339-352.
- [4] 李洁. 限制溶解氧供应对褐牙鲆幼鱼生长的影响及其机制的实验研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
Li Jie. Effects of restricted the supply of dissolved oxygen on the growth of juvenile brown flounder, (*Paralichthys olivaceus*) and the mechanism[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011.
- [5] Lai Kengpo, Li J W, Tse A C K, et al. Hypoxia alters steroidogenesis in female marine medaka through miRNAs regulation[J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 172: 1-8.
- [6] 穆景利, 靳非, 赵化德, 等. 水体低氧的早期暴露对青鳉(*Oryzias latipes*)后期的生长、性别比和繁殖能力的影响[J]. *生态毒理学报*, 2017, 12(2): 137-146.
Mu Jingli, Jin Fei, Zhao Huade, et al. Early-life exposure to hypoxia altered growth, sex ratio, and reproduction in medaka (*Oryzias latipes*)[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2017, 12(2): 137-146.
- [7] Diaz R J. Overview of hypoxia around the world[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2001, 30(2): 275-281.
- [8] Dybas C L. Dead zones spreading in world oceans[J]. *BioScience*, 2005, 55(7): 552-557.
- [9] 常志成, 温海深, 张美昭, 等. 溶解氧水平对花鲈幼鱼氧化应激与能量利用的影响及生理机制[J]. *中国海洋大学学报*, 2018, 48(7): 20-28.
Chang Zhicheng, Wen Haishen, Zhang Meizhao, et al. Effects of dissolved oxygen levels on oxidative stress response and energy utilization of juvenile Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and associate physiological mechanisms[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2018, 48(7): 20-28.
- [10] 王永红, 张建设, 曾霖. β -葡聚糖对低氧胁迫下大黄鱼幼鱼的保护作用及其机理[J]. *水产学报*, 2018, 42(6): 828-837.
Wang Yonghong, Zhang Jianshe, Zeng Lin. β -glucan decreases intensity of hypoxia-induced oxidative stress in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and its corresponding mechanisms[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(6): 828-837.
- [11] 张晓梅, 王春琳, 李来国, 等. 耗氧率及溶氧胁迫对长蛸体内酶活力的影响[J]. *水生态学杂志*, 2010, 3(2): 72-79.
Zhang Xiaomei, Wang Chunlin, Li Laiguo, et al. Oxygen consumption rate and effect of hypoxia stress on enzyme activity of *Octopus variabilis*[J]. *Journal of Hydroecology*, 2010, 3(2): 72-79.
- [12] 陈刚, 张健东, 吴灶和. 军曹鱼幼鱼耗氧率与窒息点的研究[J]. *水产养殖*, 2005, 26(1): 1-4.
Chen Gang, Zhang Jiandong, Wu Zaohe. Study on the oxygen consumption rate and the asphyxiated point of *Rachycentron canadum*[J]. *Journal of Aquaculture*, 2005, 26(1): 1-4.
- [13] 陈强, 刘泓宇, 谭北平, 等. 饲料胆固醇对军曹鱼幼鱼生长、血液生化指标及脂代谢的影响[J]. *广东海洋大学学报*, 2016, 36(1): 35-43.
Chen Qiang, Liu Hongyu, Tan Beiping, et al. Effects of dietary cholesterol level on growth performance, blood biochemical parameters and lipid metabolism of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2016, 36(1): 35-43.

5 结论

低氧胁迫与恢复对军曹鱼机体的氧化应激和能量利用有显著的影响。在低氧胁迫阶段,军曹鱼幼鱼抗氧化酶活力存在显著差异,无氧代谢增加;在复氧阶段,不同组织的抗氧化应激能力不同,且肝脏在抗氧化应激防御体系中发挥重大作用。随着复氧时间的增加,机体能量供应能够通过自身的生理调节逐渐恢复到正常水平,说明军曹鱼具有一定的抗逆性。

致谢: 感谢广东海洋大学水产学院2017级曹勤、曹丹煜及2018级邝杰华、蔡润佳、黄宝松、毛非凡、邓文鑫在样品采集中给予的帮助。

- [14] 熊向英, 黄国强, 彭银辉, 等. 低氧胁迫对鲮鱼生长、能量代谢和氧化应激的影响[J]. 水产学报, 2016, 40(1): 73–82.
Xiong Xiangying, Huang Guoqiang, Peng Yinhui, et al. Effect of hypoxia on growth performance, energy metabolism and oxidative stress of *Mugil cephalus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(1): 73–82.
- [15] 王健伟. 低氧对鳊鱼幼鱼临界游泳和匀加速游泳能力的影响及其生化机制[D]. 重庆: 重庆师范大学, 2015.
Wang Jianwei. The effects of hypoxia on critical swimming and constant accelerate swimming performance and biochemical mechanism in juvenile *Parabramis pekinensis*[D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2015.
- [16] 黄建盛, 陆枝, 陈刚, 等. 急性低氧胁迫对军曹鱼大规格幼鱼血液生化指标的影响[J]. 海洋学报, 2019, 41(6): 76–84.
Huang Jiansheng, Lu Zhi, Chen Gang, et al. Acute hypoxia stress on blood biochemical indexes of large-sized juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. Haiyang Xuebao, 2019, 41(6): 76–84.
- [17] Lushchak V I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals[J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 101(1): 13–30.
- [18] Victor V M, Esplugues J V, Hernandez-Mijares A, et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants[J]. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 2009, 9(4): 376–389.
- [19] Ortuño J, Esteban M A, Meseguer J. Lack of effect of combining different stressors on innate immune responses of seabream (*Sparus aurata* L.)[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2002, 84(1/2): 17–27.
- [20] Lushchak V I, Bagnyukova T V, Lushchak O V, et al. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005, 37(6): 1319–1330.
- [21] Sampaio F G, de Lima Boijink C, Oba E T, et al. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2008, 147(1): 43–51.
- [22] Lushchak V I, Bagnyukova T V. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Perccottus glenii*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 148(4): 390–397.
- [23] 张志伟. 鲢低氧应激相关基因的克隆与表达分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
Zhang Zhiwei. Molecular cloning and differential expression patterns of hypoxic stress related genes in silver carp[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011.
- [24] 何伟, 曹振东, 付世建. 温度和低氧对白鲢乳酸与糖水平的影响[J]. 重庆师范大学学报: 自然科学版, 2013, 30(5): 27–31.
He Wei, Cao Zhendong, Fu Shijian. Effects of temperature and hypoxia on lactate and carbohydrate level in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. Journal of Chongqing Normal University: Natural Science, 2013, 30(5): 27–31.
- [25] 揭小华, 彭雄, 黄波, 等. 乳酸脱氢酶编码基因在肿瘤中表达及其转录调控机制的研究进展[J]. 肿瘤, 2015, 35(11): 1271–1277.
Jie Xiaohua, Peng Xiong, Huang Bo, et al. Progress in research on expression and transcriptional regulation of lactate dehydrogenase coding genes in cancer[J]. *Tumor*, 2015, 35(11): 1271–1277.
- [26] Vagner M, Lefrançois C, Ferrari R S, et al. The effect of acute hypoxia on swimming stamina at optimal swimming speed in flathead grey mullet *Mugil cephalus*[J]. *Marine Biology*, 2008, 155(2): 183–190.
- [27] 区又君, 陈世喜, 王鹏飞, 等. 低氧环境下卵形鲳鲹的氧化应激响应与生理代谢相关指标的研究[J]. 南方水产科学, 2017, 13(3): 120–124.
Ou Youjun, Chen Shixi, Wang Pengfei, et al. Study on oxidative stress response and physiological metabolism related indices of *Trachinotus ovatus* under hypoxia stress[J]. *South China Fisheries Science*, 2017, 13(3): 120–124.
- [28] Chew S F, Ip Y K. Biochemical adaptations of the mudskipper *Boleophthalmus boddarti* to a lack of oxygen[J]. *Marine Biology*, 1992, 112(4): 567–571.
- [29] 彭银辉, 黄国强, 李洁, 等. 溶氧水平对梭鱼幼鱼能量代谢与氧化应激的影响[J]. 广西科学, 2013, 20(4): 294–298.
Peng Yinhui, Huang Guoqiang, Li Jie, et al. Energy metabolism and oxidative stress of juvenile *Liza haematocheila* as dissolved oxygen decline[J]. *Guangxi Sciences*, 2013, 20(4): 294–298.
- [30] Sharpe R L, Milligan C L. Lactate efflux from sarcolemmal vesicles isolated from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* white muscle is via simple diffusion[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2003, 206(3): 543–549.

Oxidative stress and energy utilization responses of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) to environmental hypoxia stress

Li Hongjuan¹, Chen Gang¹, Guo Zhixiong¹, Wang Weizheng¹, Huang Jiansheng¹, Zeng Zeqian¹

(1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: This study investigated the oxidative stress and energy utilization responses of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) to environmental hypoxia stress, and provided reference for the healthy cultivation of cobia. Through the hypoxia stress-reoxygenation test, the oxidative stress and energy utilization indexes of liver and muscle tissues were measured after hypoxia ((2.64±0.25)mg/L) stress for 3 h and reoxygenation ((6.34±0.15)mg/L) stress for 8 h, 24 h and 48 h. The results showed that after hypoxia stress, the activity of malondialdehyde (MDA), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) in the liver were significantly lower than that in the control group ($p<0.05$), and the activity of lactate dehydrogenase (LDH) was significantly higher than that in the control group ($p<0.05$). MDA and lipid peroxidase (LPO) activities in muscle were significantly lower than those in control group ($p<0.05$), and superoxide dismutase (SOD) and LDH activities were significantly higher than those in control group ($p<0.05$). The contents of muscle glycogen and liver glycogen were significantly lower than those of control group ($p<0.01$). During reoxygenation, the contents of MDA, LPO, SOD, CAT, glutathione peroxidase (GPx) and GR in liver and muscle all increased differentially. Liver glycogen content was significantly higher than that of the control group 24 h after reoxygenation ($p<0.05$), and significantly lower than that of the control group 48 h after reoxygenation ($p<0.05$). Muscle glycogen content was significantly lower than that of control group after reoxygenation for 8 h, 24 h and 48 h ($p<0.05$). In conclusion, hypoxia stress can cause some oxidative damage to the body of cobia, and the enzyme activity and energy supply of liver and muscle tissues change. The reoxygenation environment after hypoxia stress causes more severe oxidative damage to the body, which can be gradually restored to the normal level through physiological regulation.

Key words: *Rachycentron canadum*; hypoxia stress; oxidative stress; energy utilization