

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210125002

http://www.yykxjz.cn/

周钱森, 任宪云, 徐垚, 刘萍, 李健. 氨氮胁迫对锦绣龙虾代谢酶和抗氧化酶活力的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 147-156

ZHOU Q S, REN X Y, XU Y, LIU P, LI J. Effects of ammonia stress on metabolic and antioxidant enzyme activities in *Panulirus ornatus*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 147-156

氨氮胁迫对锦绣龙虾代谢酶和 抗氧化酶活力的影响*

周钱森^{1,2} 任宪云^{2,3} 徐垚^{2,4} 刘萍^{2,3} 李健^{2,3①}

(1. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306;

2. 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;

3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071;

4. 江苏海洋大学 江苏省海洋生物资源与环境重点实验室/江苏省海洋生物技术重点实验室 江苏 连云港 222005)

摘要 为了研究急性氨氮胁迫对锦绣龙虾(*Panulirus ornatus*)抗氧化系统及氨氮代谢机制的影响,通过设置对照[(0.24±0.07) mg/L]、低浓度[(1.04±0.08) mg/L]、中浓度[(9.75±0.21) mg/L]和高浓度[(19.87±0.46) mg/L]氨氮胁迫方法对锦绣龙虾进行 48 h 急性实验,测定鳃与肝胰腺中抗氧化及氨氮代谢酶的活性,同时测定相关基因 mRNA 的相对表达变化情况。结果显示,氨氮胁迫下锦绣龙虾鳃和肝胰腺组织总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化(SOD)活力有不同程度的升高,6~12 h 均显著高于对照组($P<0.05$);高浓度组胁迫 48 h 时 T-AOC、SOD 活力则均被抑制;过氧化脂质(LPO)含量随胁迫时间的延长逐渐增加,48 h 均显著高于对照组($P<0.05$)。氨代谢相关酶谷氨酰胺合成酶(GS)、谷氨酸脱氢酶(GDH)、谷草转氨酶(GOT)、黄嘌呤氧化还原酶(XOD)的酶活在氨氮胁迫下与对照组相比均有不同程度的上调,表明其共同参与离子氨的代谢转运。肝胰腺中 GDH、GOT 基因表达量在 12~24 h 显著高于对照组($P<0.05$),在鳃组织中变化趋势基本相同。由此可见,不同浓度的氨氮胁迫会对锦绣龙虾抗氧化酶活性造成不同程度的诱导;锦绣龙虾主要通过肝胰腺 GS、GDH 等代谢相关酶的共同作用下合成无毒的谷氨酰胺以避免氨在体内过量积累。本研究结果可为锦绣龙虾氨解毒代谢机制的深入研究提供理论依据。

关键词 锦绣龙虾; 氨氮胁迫; 抗氧化; 氨代谢酶

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2022)02-0147-10

近年来,随着养殖技术的快速发展及市场需求的增加,高密度集约化养殖已成为主流养殖模式,水体中残饵和排泄物使得氨氮超标成为一种常态化的环境

问题(Zhang *et al*, 2018)。水体中氨氮以非离子氨(NH₃)和铵离子(NH₄⁺)形式存在的氮,二者动态平衡,受水质的温度、盐度和 pH 等参数影响可相互转换(周平,

* 国家重点研发计划课题(2019YFD0900403)和中国水产科学研究院院级基本科研业务费(2020TD46)共同资助 [This work was supported by projects of the National Key R&D Program of China (2019YFD0900403), and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD46)]. 周钱森, E-mail: qiansenzhou@126.com

① 通讯作者: 李健, 研究员, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-01-25, 收修改稿日期: 2021-02-25

2013; 蔡真珍等, 2015)。氮主要是以 NH_3 形式经鳃组织进入甲壳动物机体(Roumieh *et al.*, 2013)。氨氮中毒会导致甲壳动物免疫低下、生长迟缓, 同时伴随炎症反应和氧化应激等(Koo *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 2002)。研究发现, 由于环境胁迫因子改变诱导的生理效应可能经氧化还原途径实现(Romano *et al.*, 2007), 当机体受到氨氮胁迫且超出自身调节阈值时, 抗氧化系统被破坏, 机体清除活性自由基(reactive oxygen species, ROS)能力下降, 脂质过氧化物增加, 导致机体氧化损伤(Reinehr *et al.*, 2007)。

目前, 关于水产动物氨氮转运代谢机制的研究已有一定基础, 主要通过以下代谢途径减少生物体内氨氮的积累, 从而降低毒性: (1)通过谷氨酰胺合成途径, 如斑节对虾(*Penaeus monodon*) (周发林等, 2016)、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) (熊大林等, 2019)等可通过谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)、谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)等合成谷氨酰胺实现机体内氨的转运; (2)通过氨基酸代谢途径, 如大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*) (杨洋等, 2019)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*) (Chew *et al.*, 2001)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (孟振等, 2020)等通过相关转氨酶脱氢酶将氨转化为自由氨基酸储存; (3)通过鸟氨酸循环途径, 如中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) (李少飞等, 2014)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*) (刘胜男等, 2015)等通过鸟氨酸氨甲酰基转移酶(OTC)结合精氨酸酶(arginase)等形成尿素; (4)通过嘌呤核苷酸分解途径, 如挪威海螯虾(*Nephrops norvegicus*) (Bernasconi *et al.*, 2011)等可经黄嘌呤氧化还原酶(xanthine oxidoreductase, XOD)等形成尿酸。

锦绣龙虾隶属于十足目(Decapoda)、腹胚亚目(Pleocyemata)、龙虾科(Palinoidea)、龙虾属(*Panulirus*) (梁华芳等, 2012)。锦绣龙虾(*Panulirus ornatus*)作为我国主要龙虾养殖品种之一, 经济价值高, 但其人工繁育尚未突破, 主要依靠捕捞野生苗种(Liu *et al.*, 2016; 梁华芳等, 2012), 利用适温的地下海水进行陆基工厂化流水养殖和循环水集约化养殖。高密度的养殖条件下, 氨氮已成为影响虾类正常生理代谢的重要环境因素之一。氨氮胁迫下, 甲壳动物解毒代谢机制方面的研究主要集中在谷氨酰胺合成酶、谷氨酸脱氢酶、谷草转氨酶(glutamic oxalacetic transaminase, GOT)等(赵海涛, 2006; Qiu *et al.*, 2018; Geng *et al.*, 2020)。本研究侧重于锦绣龙虾的解毒代谢途径在氨氮胁迫下的响应机制, 测定了氨氮胁迫下锦绣龙虾鳃及肝胰腺组中代谢关键酶GS、GDH、GOT、XOD活性和GDH、

GOT 基因 mRNA 表达量、抗氧化酶总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化(SOD)活性及过氧化脂质(LPO)含量, 旨在为锦绣龙虾氨解毒代谢机制的深入研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用锦绣龙虾购于海南省琼海市永贺生物科技有限公司, 平均体长为(15.6±0.2) cm, 平均体重为(187.0±0.5) g, 暂养于黑色PVC桶中, 实验用水为过滤净化后的天然海水, 盐度为32.57, 水温为23.7℃, pH为8.14, 每日07:00更换砂滤海水, 连续充气, 10 d后开始正式实验。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计 实验浓度设置参考Chen (1988)和钟硕良等(1997)测定海水养殖池塘底层水的氨氮浓度(0~46 mg/L和0.01~29.3 mg/L)、Zhao(2020)关于氨氮对虾类生理免疫影响的汇总以及预实验结果, 选用 NH_4Cl (分析纯, $\text{RG} \geq 99.5\%$)配置不同实验组的氨氮浓度, 分别为对照组(0.24±0.07) mg/L、低浓度组(1.04±0.08) mg/L、中浓度组(9.75±0.21) mg/L和高浓度组(19.87±0.46) mg/L。采用奈氏试剂法测定各实验组实际氨氮浓度。每组3个平行, 每天07:00和17:00按照对应浓度梯度进行全换水, 实验期间不投饵。

1.2.2 样品采集和处理 在胁迫0、6、12、24和48 h时, 从每组的每个平行中随机挑选3尾龙虾, 快速解剖取得鳃、肝胰腺组织, 分别称取0.2 g, 剪碎后加入1:9的预冷生理盐水, 超声波冰浴破碎, 4℃低温4000 r/min离心20 min, 取上清液, 置于-80℃冰箱保存, 用于酶活测定。剩余组织放于1.5 mL EP管投入液氮中储存, 用于基因mRNA表达量分析。

1.2.3 氧化酶与氨氮代谢相关酶活性测定 按照南京建成生物工程研究所试剂盒说明书测定T-AOC、SOD、GS、GDH、GOT、XOD酶活力和LPO含量。

1.3 基因mRNA的表达分析

1.3.1 引物设计 根据锦绣龙虾目的基因cDNA序列, 利用引物设计软件Primer Premier 5.0设计qRT-PCR引物, 上述引物由生工生物工程(上海)有限公司合成, 其序列见表1。

1.3.2 RNA提取 使用总RNA提取试剂盒提取处理后组织RNA, 核酸定量仪检测RNA浓度, 1.5%非变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

表 1 本研究所用引物
Tab.1 Primers used in this study

基因 Gene	正反向引物 Forward and reverse primers (5'~3')
<i>GDH</i>	F: ACATTAACGCTGGAGGTGTGACTG R: CGAATCGCCGCTCAAGAGACTC
<i>GOT</i>	F: GTCTTGAATCTCCTCGGGCAGAAC R: CATCTCCACGCCATTCCACCAC
β -actin	F: TTCCTCATGCTATCCTCCGTCTGG R: GCTCGGCGGTGGTTGTGAAG

1.3.3 cDNA 第一链的合成 组织 RNA 经过 RNA-free 的 DNA 酶消化后, 使用 HiScript® II Q RT superMix for qPCR(+g DNA wiper)试剂盒进行反转录合成 cDNA 第一链, -20℃ 保存备用。

1.3.4 荧光定量 PCR 扩增 按照 ChamQ™ SYBR® Color qPCR master mix 说明书进行 PCR 扩增。反应体积 10 μ L: 5.0 μ L SYBR color qPCR master mix (2 \times), 4.0 μ L cDNA, 0.2 μ L Rox reference dye II (50 \times), 上下游引物各 0.4 μ L (10 μ mol/L), 将上述试剂在 1.5 mL 离心管内混匀后, 分装入 96 孔 PCR 板中。反应程序: 95℃ 30 s; 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 40 个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s。每个样品 3 个重复,

加样完成后瞬时离心, 收集液体在管底, 在 ABI 7500 Fast 荧光定量 PCR 仪进行扩增, 使用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算目的基因 *GDH*、*GOT* 的相对表达量。

1.4 数据分析

所有分析采用 SPSS 18.0.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 使用 OriginPro 2016 软件作图。

2 结果与分析

2.1 氨氮胁迫对锦绣龙虾氨氮代谢相关酶活性的影响

2.1.1 对锦绣龙虾鳃和肝胰腺 GS 活性的影响 如图 1 所示, 对照组谷氨酰胺合成酶(GS)活性变化不显著($P>0.05$), 各时间低、中浓度组鳃和肝胰腺 GS 活力点均显著高于对照组($P<0.05$), 高浓度组 GS 活力在 48 h 受到显著抑制($P<0.05$)。不同浓度组鳃组织 GS 活性呈先升高后降低的变化趋势, 除 24 h 高浓度组与对照组无显著差异外($P>0.05$), 其他时间点均有显著差异($P<0.05$)。不同浓度组肝胰腺 GS 活力均在 12 h 达到最大值, 随后低浓度组无明显变化趋势, 中、高浓度组呈下降趋势。

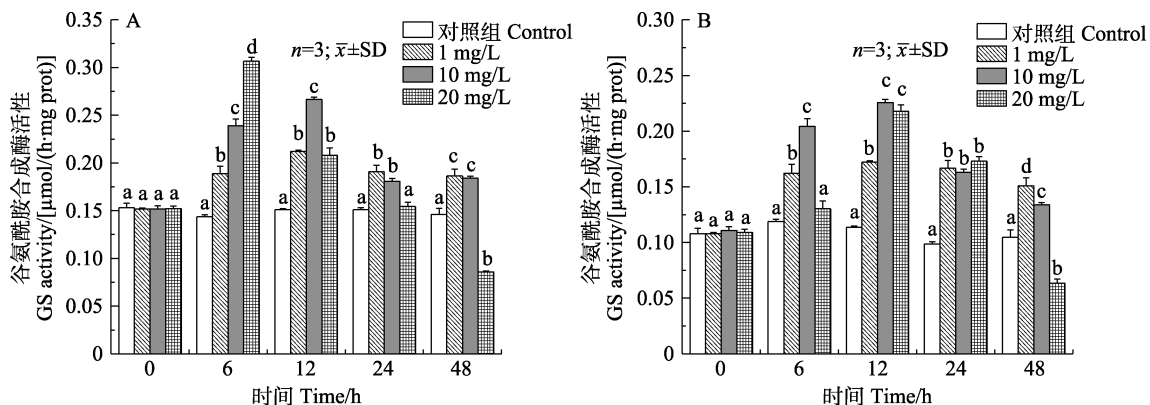


图 1 锦绣龙虾不同组织谷氨酰胺合成酶活性随氨氮胁迫时间的变化
Fig.1 Change of GS activity in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

A: 鳃; B: 肝胰腺。不同字母表示不同组之间差异显著($P<0.05$)。下同

A: Gill; B: Hepatopancreas. Different letters indicate significant difference in different groups ($P<0.05$). The same as below

2.1.2 对锦绣龙虾鳃和肝胰腺 GDH 活性的影响 如图 2 所示, 随着胁迫时间的延长, 中、高浓度组鳃和肝胰腺中的谷氨酸脱氢酶(GDH)活力呈先升高后降低的变化趋势。中浓度组鳃 GDH 活力在 12 h 达到最大值且显著高于其他组($P<0.05$), 高浓度组在 48 h 时显著低于对照组($P<0.05$)。中、高浓度组肝胰腺 GDH 活力最大值分别出现在 6 h 和 12 h, 与对照组相比具有显著差异($P<0.05$)。

2.1.3 对锦绣龙虾鳃和肝胰腺 GOT 活性的影响 如图 3 所示, 低浓度组鳃谷草转氨酶(GOT)活力在 6~48 h 变化规律不明显, 但与对照组均有显著差异($P<$

0.05)。中浓度组呈先升高后下降的趋势, 高浓度组出现先降低后升高再降低的波浪式变化, 最大值均出现在 12 h 且显著高于对照组($P<0.05$)。48 h 高浓度组鳃 GOT 活力受到显著抑制($P<0.05$)。中浓度组肝胰腺 GOT 活力出现先升高后降低再升高的波浪式变化, 高浓度组呈先升高后下降的变化趋势。

2.1.4 对锦绣龙虾鳃和肝胰腺 XOD 活性的影响 如图 4 所示, 随着胁迫时间的延长, 各浓度组鳃黄嘌呤氧化酶(XOD)活力呈先上升后下降的变化趋势, 中、高浓度组 XOD 活力显著升高, 分别在 12、24 h 均达

到最大值且显著高于对照组($P < 0.05$)。低、中浓度组各时间点肝胰腺 XOD 活力均显著高于对照组($P < 0.05$)。

而高浓度组 6~24 h 均显著高于对照组($P < 0.05$)，48 h 肝胰腺 XOD 活力受到显著抑制($P < 0.05$)。

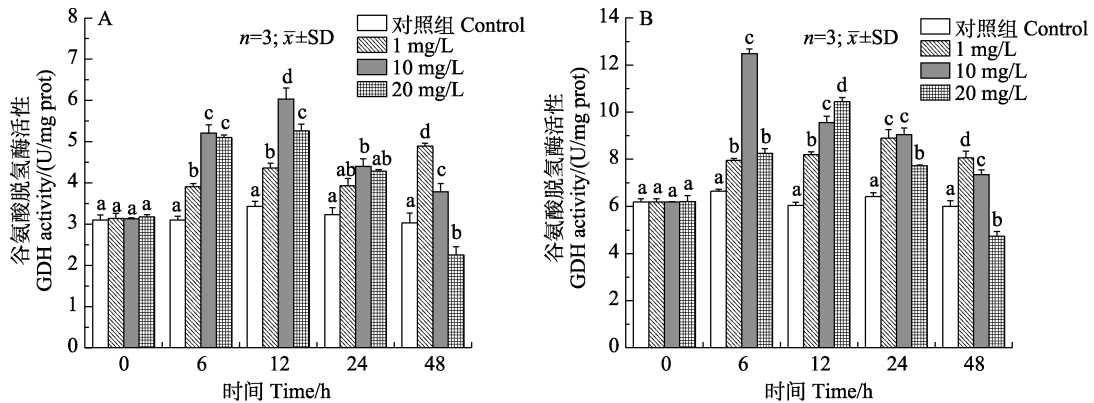


图 2 锦绣龙虾不同组织谷氨酸脱氢酶活性随氨氮胁迫时间的变化
Fig.2 Change of GDH activity in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

A: 鳃; B: 肝胰腺
A: Gill; B: Hepatopancreas

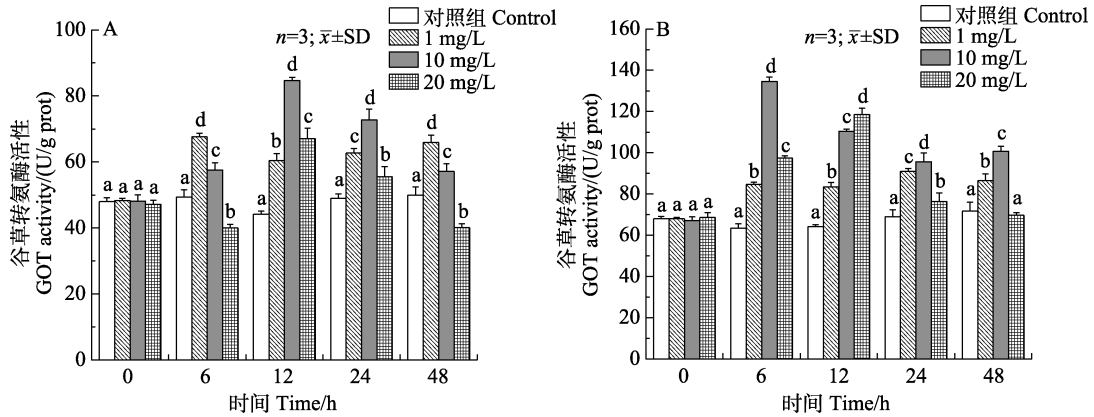


图 3 锦绣龙虾不同组织 GOT 活性随氨氮胁迫时间的变化
Fig.3 Change of GOT activity in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

A: 鳃; B: 肝胰腺
A: Gill; B: Hepatopancreas

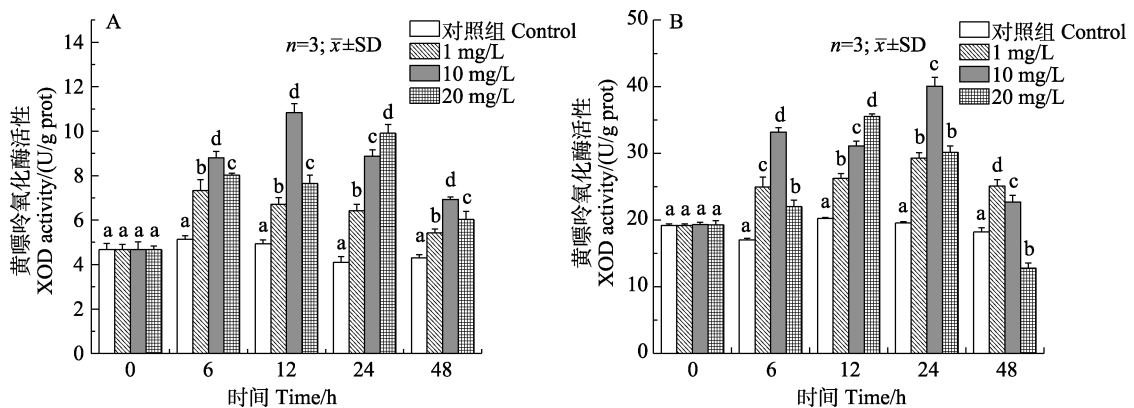


图 4 锦绣龙虾不同组织黄嘌呤氧化酶活性随氨氮胁迫时间的变化
Fig.4 Change of XOD activity in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

A: 鳃; B: 肝胰腺
A: Gill; B: Hepatopancreas

2.2 氨氮胁迫对锦绣龙虾氨氮代谢相关基因表达的影响

2.2.1 对锦绣龙虾鳃和肝胰腺中 GDH 基因表达的影响 如图 5 所示,各浓度组鳃和肝胰腺谷氨酸脱氢酶(GDH)基因相对达量表现出明显的时效性。低、中浓度组鳃组织 GDH 相对表达量呈现先上升后下降再上升的变化趋势,除 6 h 外,各时间点均显著高于对照组($P<0.05$)。而高浓度组鳃组织 GDH 相对表达量则呈先上升后下降的趋势。不同浓度组肝胰腺 GDH 相对表达量均呈先上升后下降的变化趋势,除 48 h

外,各时间点均与对照组有显著差异($P<0.05$)。
2.2.2 对锦绣龙虾鳃和肝胰腺中 GOT 基因表达的影响 如图 6 所示,低、中浓度组鳃谷草转氨酶(GOT)基因的相对表达量呈先升高后降低再升高的波浪式变化,高浓度组则出现先升高后下降的变化趋势,除 6 h 外,其余各时间点鳃 GOT 相对表达量均显著高于对照组($P<0.05$)。随着胁迫时间的延长,中、高浓度组肝胰腺 GOT 相对表达量最大值均出现在 12 h,与对照组相比具有显著差异($P<0.05$),除 48 h 外,各时间点均与对照组有显著差异($P<0.05$)。

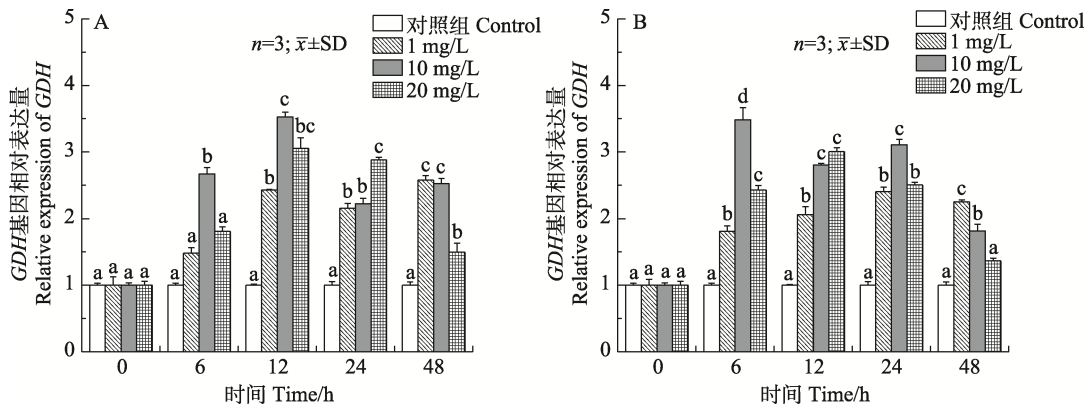


图 5 锦绣龙虾不同组织 GDH 基因相对表达量随氨氮胁迫时间的变化
 Fig.5 Relative gene expression of GDH in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

A: 鳃; B: 肝胰腺
 A: Gill; B: Hepatopancreas

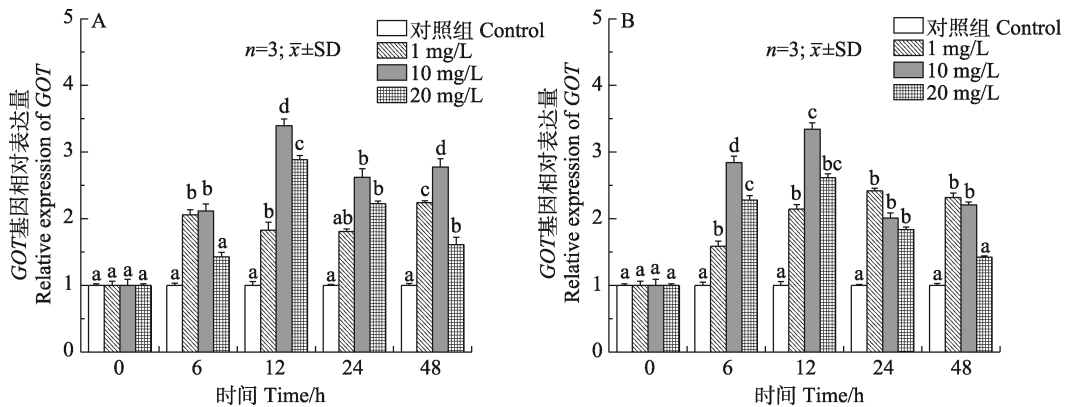


图 6 锦绣龙虾不同组织 GOT 基因相对表达量随氨氮胁迫时间的变化
 Fig.6 Relative gene expression of GOT in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

A: 鳃; B: 肝胰腺
 A: Gill; B: Hepatopancreas

2.3 氨氮胁迫对锦绣龙虾抗氧化酶活性的影响

2.3.1 对锦绣龙虾鳃和肝胰腺 T-AOC 活性的影响 如图 7 所示,随着胁迫时间的延长,低浓度组鳃 T-AOC 活力呈持续升高的趋势,而中、高浓度组均呈先升高后下降的变化趋势,最大值均出现在 12 h 且显著高于对照组($P<0.05$)。中、高浓度组肝胰腺 T-AOC 活性

最大值分别出现在 12 h 和 6 h,与对照组相比差异显著($P<0.05$)。低、中浓度组 48 h T-AOC 活性仍显著高于对照组($P<0.05$),高浓度组则被显著抑制($P<0.05$)。
2.3.2 对锦绣龙虾鳃和肝胰腺 SOD 活性的影响 如图 8 所示,在胁迫过程中,各浓度组 SOD 活性随胁迫时间的延长均呈先上升后下降的趋势。低、中浓度

组鳃 SOD 活性最高值均出现在 12 h, 高浓度组则在 6 h, 且均显著高于对照组($P<0.05$)。低、中浓度组肝胰腺 SOD 活性最大值均出现在 12 h, 与对照组相比有显著差异($P<0.05$)。高浓度组 SOD 活性在 48 h 被显著抑制($P<0.05$)。

2.4 氨氮胁迫对锦绣龙虾 LPO 的影响

锦绣龙虾肝胰腺中脂质过氧化物(LPO)含量明显高于鳃组织(图 9)。低、中浓度组鳃和肝胰腺 LPO 含量逐步提升, 高浓度组呈先升高后下降的变化趋势, 不同浓度组在 48 h 均与对照组有显著差异($P<0.05$)。

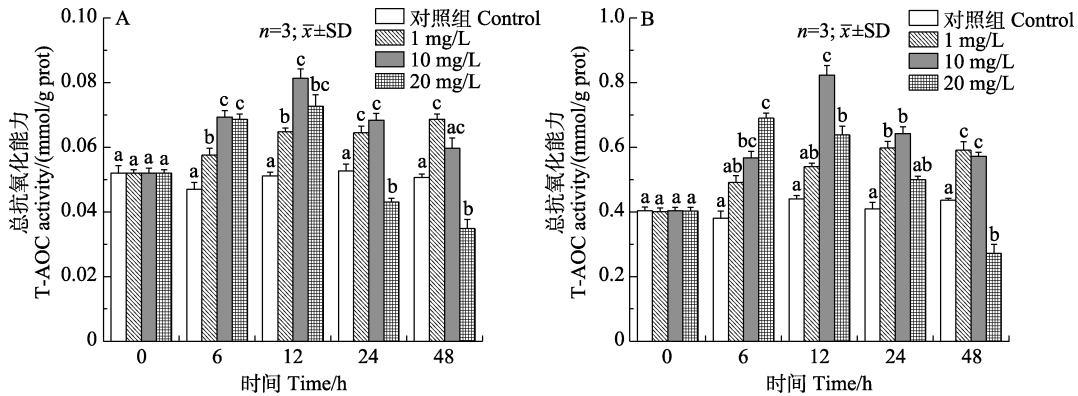


图 7 锦绣龙虾不同组织 T-AOC 活性随氨氮胁迫时间的变化
Fig.7 Change of T-AOC activity in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

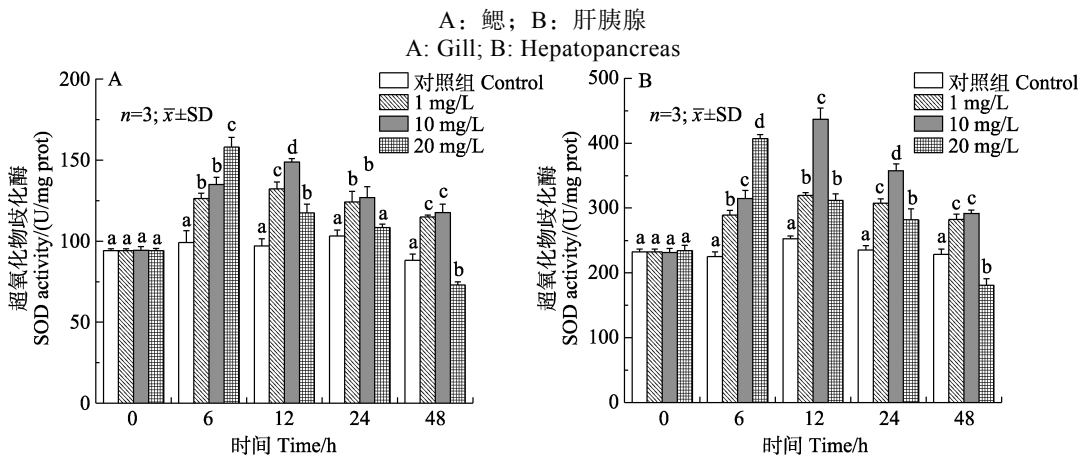


图 8 锦绣龙虾不同组织 SOD 活性随氨氮胁迫时间的变化
Fig.8 Change of SOD activity in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

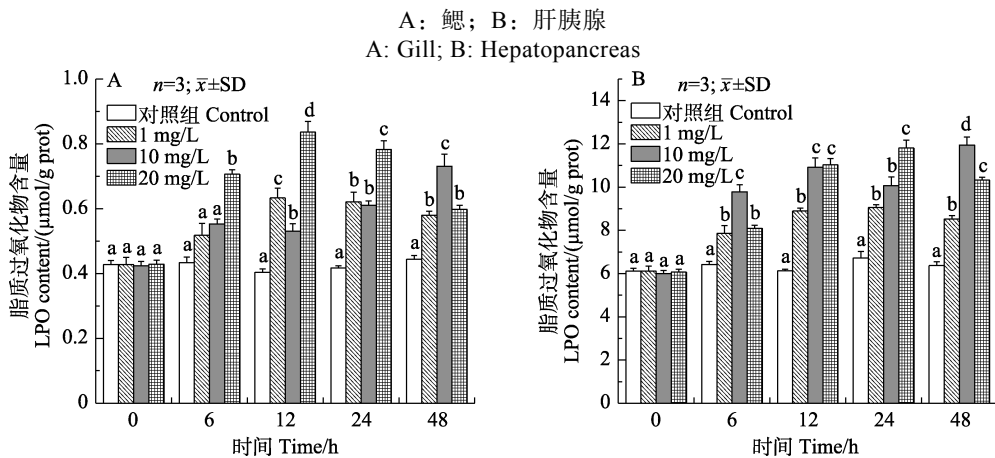


图 9 锦绣龙虾不同组织脂质过氧化物含量随氨氮胁迫时间的变化
Fig.9 Change of LPO content in different *P. ornatus* tissues after acute ammonia stress

A: 鳃; B: 肝胰腺
A: Gill; B: Hepatopancreas

3 讨论

3.1 氨氮胁迫对锦绣龙虾代谢机制的影响

研究表明, 当水体环境中氨氮含量发生改变时, 水生生物排泄方式也会发生变化, 尿素排泄量增加(Chen *et al*, 1995)。在浓度为 25 mmol/L 氨氮胁迫下, 砂栖胡鲶(*Clarias magur*)谷氨酰胺和尿素含量显著增加, 认为其在高氨水平下可诱导鸟氨酸-尿素循环将氨解毒为谷氨酰胺和进一步转化为尿素排泄来缓解氨氮毒性(Bodhisattwa *et al*, 2018)。金鱼(*Carassius auratus*)在浓度为 3.6 mmol/L 的高氨水平下, 脑中谷氨酰胺增加 4 倍(Wilkie *et al*, 2015)。本研究结果显示, 氨氮胁迫下, 低、中浓度组 GS 酶活在氨氮胁迫 12 h 内急速升高, 随后在 24 h 显著下降, 为了降低氨氮在体内的积累, 机体可能通过主动运输或者被动扩散的方式消除多余的氨氮, 同时启动解毒代谢机制, 表明锦绣龙虾具有一定的氨氮耐受能力。但 48 h 时, 高浓度组 GS 酶活受到抑制, 长时间氨氮胁迫使机体调节能力越来越弱, 龙虾体内会出现过多的自由基而抑制相关酶活力, 相关研究还见于中华乌塘鳢(*Bostrichthys sinensis*) (Anderson *et al*, 2002)、三疣梭子蟹(刘胜男等, 2015)等。氨氮胁迫组 GDH 活力的显著上调与周发林等(2016)的实验结果基本一致, 表明在氨氮胁迫下将氨合成中性、无毒的谷氨酰胺是锦绣龙虾重要的氨代谢途径。随着胁迫时间的延长, 锦绣龙虾体内氨氮逐渐积累, 其排泄方式发生改变, 6 h 后 GOT 表达量显著上调, 推测是其催化转氨反应生成天门冬氨酸参与尿素形成的缘故。虽然然而尿素形成十分消耗能量, 甲壳动物的主要排氨途径仍是合成谷氨酰胺, GOT 表达量再次下调。氨氮胁迫下, 各浓度组 XOD 活性显著高于对照组, 并表现出一定的剂量效应, 24 h 后, XOD 活性显著下调, 可能是胁迫前期产生的尿酸使 XOD 活性受到抑制。不同处理组 48 h XOD 活性具有显著差异, 在肝胰腺组织中尤为明显。高浓度组 XOD 活性呈逐渐下降状态, 且显著低于对照组。可能是由于水体中氨氮浓度过大, 肝细胞遭到破坏的缘故。张克俭(1993)发现, 当氨氮浓度高于 10.44 mg/L 时, 中国明对虾肝胰腺中的吸收细胞部分转化为分泌细胞, 并逐渐解体, 解体后的细胞碎片及大量的溶酶体等结构堆积于肝管部位。推测氨氮胁迫下锦绣龙虾会通过嘌呤核苷酸分解代谢途径将氨转化为尿酸。

GDH 是一种需借助辅酶实现谷氨酸生物合成的线粒体酶, 作为动物获得能量腺嘌呤核苷三磷酸

(adenosinetriphosphate, ATP)的重要途径, GDH 催化反应连接着三羧酸循环与谷氨酸, 在氨氮代谢过程中发挥重要作用(王秋菊等, 2011)。GOT 作为转氨反应的高效催化剂, 主要通过辅酶在磷酸吡哆胺(pyridoxamine photophate, PMP)和磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP)之间的相互转换实现氨基的转运(严明等, 2004)。本研究发现, 氨氮胁迫下各浓度组与对照组目的基因表达量具有明显差异, 高浓度组与低、中组相比, *GDH* 和 *GOT* 基因的相对表达量后期下降明显, 可能是由于长时间高浓度的胁迫打破了体内平衡, 导致锦绣龙虾组织细胞受到损伤。研究结果显示, 各处理组 *GOT* 和 *GDH* 基因表达量与酶活性的变化趋势有部分不同, 考虑从基因表达达到蛋白合成是一个复杂的修饰加工过程, 蛋白活化会受到磷酸化等不定因素的影响, 酶的活性也会受活性位点识别及激活因子浓度等多方面的影响, 因此, 表现出基因表达量与酶活性不一致的现象。这也说明基因的 mRNA 丰度与翻译产物的表达量不一定具有线性关系(Martin *et al*, 2008)。

3.2 氨氮胁迫对锦绣龙虾抗氧化系统的影响

当机体受到胁迫时, 体内 ROS 含量迅速增加, 未被抗氧化系统及时清除的 ROS 逐渐积累, 促使细胞膜脂质过氧化物形成, 从而造成氧化损伤(段亚飞等, 2014; Sun *et al*, 2011)。本研究中, 氨氮胁迫初期, 锦绣龙虾体内抗氧化酶活力显著升高。强俊等(2011)认为, 抗氧化酶活力提升可视为生物体对 ROS 的适应, 从而减轻脂质过氧化损伤。由于毒性效应, 低、中浓度组 T-AOC、SOD 活性于胁迫 12 h 内呈短暂升高趋势, 但随胁迫时间延长, 6 h 后逐渐受到抑制, 高浓度组 T-AOC、SOD 活性在 12 h 后呈显著下降趋势。原因可能与氨氮胁迫过程中有毒物质(如 LPO)积累量超过机体的耐受上限有关。胁迫初期, 较低浓度的氨氮对机体抗氧化酶具有诱导作用, 这种诱导作用是由于 ROS 增加引起的机体代偿。一定时间后, 由于歧化反应产生超出了其承受量的 H_2O_2 , 导致其活力受到抑制(王贞杰等, 2017)。洪美玲等(2007)认为, 随着氨氮胁迫时间的延长氨氮的增益效应消失, 导致机体抗氧化酶活性下降, 与任海等(2014)报道的氨氮胁迫对脊尾白虾抗氧化系统酶活力的影响以及强俊等(2011)报道的氨氮与密度胁迫对罗非鱼幼鱼肝脏抗氧化指标的联合影响结果相似。结合本研究高浓度组鳃和肝胰腺 T-AOC 和 SOD 活力在 48 h 时显著低于对照组, 也说明较高浓度的氨氮胁迫对机体产生了一定程度的毒害作用。

LPO 作为脂质过氧化反应产生的细胞毒性物质,

其含量一定程度反映机体脂质过氧化水平和细胞损伤程度,同时间接反映生物体内 ROS 含量(何吉祥等, 2016)。本研究发现,不同浓度氨氮胁迫后,肝胰腺 LPO 含量明显大于鳃组织,可能由于肝胰腺是锦绣龙虾主要的代谢组织。胁迫前期生物体内抗氧化系统被激活,但 LPO 含量仍在显著上升,说明机体仍然处于脂质过氧化状态。各浓度组鳃和肝胰腺 LPO 含量均有不同程度的升高,推测由于水中氨氮浓度的升高,导致脂质过氧化作用增强,也进一步提示氨氮胁迫下 LPO 积累可能是氨氮对锦绣龙虾产生毒害作用的主要原因之一。

参 考 文 献

- ANDERSON P M, BRODERIUS M, FONG K C, *et al.* Glutamine synthetase expression in liver, muscle, stomach and intestine of *Bostrichthys sinensis* in response to a high exogenous ammonia concentration. *Journal of Experimental Biology*, 2002, 205(14): 2053–2053
- BERNASCONI C J, UGLOW R F. Purineolytic capacity response of *Nephrops norvegicus* to prolonged emersion: An ammonia detoxification process. *Aquatic Biology*, 2011, 11(3): 263–270
- BODHISATTWA B, DEBAPRASAD K, GITALEE B, *et al.* Differential expression of multiple glutamine synthetase genes in air-breathing magur catfish, *Clarias magur* and their induction under hyper-ammonia stress. *Gene*, 2018, 671: 85–95
- CAI Z Z, ZHENG S H, WANG X. The relationship between NO_3^- -N, NH_4^+ -N and environmental factors in coastal aquaculture water. *Journal of Quanzhou Normal University*, 2015, 33(6): 45–50 [蔡真珍, 郑盛华, 王宪. 近海养殖水体中 NO_3^- -N、 NH_4^+ -N 和环境因子的关系. *泉州师范学院学报*, 2015, 33(6): 45–50]
- CHEN J C, LIN C Y. Responses of oxygen consumption, ammonia-N excretion and urea-N excretion of *Penaeus chinensis* exposed to ambient ammonia at different salinity and pH levels. *Aquaculture*, 1995, 136(3/4): 243–255
- CHEN J C, LIU P C, LIN Y T, *et al.* Super intensive culture of red-tailed shrimp *Penaeus penicillatus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1988, 19(3): 127–131
- CHENG W, CHEN J C. The virulence of enterococcus to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 2002, 12(2): 97–109
- CHEW S F, JIN Y, IP Y K. The loach *Misgurnus anguillicaudatus* reduces amino acid catabolism and accumulates alanine and glutamine during aerial exposure. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2001, 74(2): 226–237
- DUAN Y F, ZHANG J S, DONG H B, *et al.* The non-specific immune response of *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1557–1564 [段亚飞, 张家松, 董宏标, 等. 副溶血弧菌对斑节对虾非特异性免疫酶活性的影响. *水产学报*, 2014, 38(9): 1557–1564]
- GENG Z, LIU Q, WANG T, *et al.* Changes in physiological parameters involved in glutamine and urea synthesis in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed *Ampithoe* sp. meal and exposed to ammonia stress. *Aquaculture Research*, 2020, 51(7): 2725–2734
- HE J X, PAN T S, JIANG Y Y, *et al.* Effects of dietary carbohydrate to protein ratios and feeding rate on growth and lipid metabolism index of *Carassius auratus gibelio*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(2): 198–206 [何吉祥, 潘庭双, 蒋阳阳, 等. 饲料糖蛋白质比和投喂率对异育银鲫生长及脂质代谢指标的影响. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(2): 198–206]
- HONG M L, CHEN L Q, GU S Z, *et al.* Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(3): 412–418 [洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响. *中国水产科学*, 2007, 14(3): 412–418]
- KOO J G, KIM S G, JEE J H, *et al.* Effects of ammonia and nitrite on survival, growth and moulting in juvenile tiger crab, *Orithya sinica* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 2005, 36(1): 79–85
- LI S F, HE Y Y, LI J T, *et al.* Cloning and expression analysis of aspartate aminotransferase cDNA in *Fenneropenaeus chinensis* following ambient ammonia stresses. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(6): 1125–1133 [李少飞, 何玉英, 李吉涛, 等. 中国明对虾天门冬氨酸转氨酶基因的克隆及氨氮胁迫对其时空表达的影响. *中国水产科学*, 2014, 21(6): 1125–1133]
- LIANG H F, HE J G. Growth model for one-year old *Panulirus ornatus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(2): 364–370 [梁华芳, 何建国. 实验条件下 1 龄锦绣龙虾的生长特性. *中国水产科学*, 2012, 19(2): 364–370]
- LIANG H F, HE J G. Study on the artificial propagation and embryonic development of *Panulirus ornatus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(2): 236–245 [梁华芳, 何建国. 锦绣龙虾人工繁殖和胚胎发育的研究. *水生生物学报*, 2012, 36(2): 236–245]
- LIU L, YANG X L, LIU C W. Eleven novel polymorphic microsatellite loci in the ornate spiny lobster *Panulirus ornatus* (Decapoda: Palinuridae). *Journal of Genetics*, 2016, 93(2): 65–67
- LIU S N, PAN L Q, LIU M Q. Effects of ammonia exposure on key detoxification metabolism associated genes expression in swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Transactions of*

- Oceanology and Limnology, 2015(2): 97–104 [刘胜男, 潘鲁青, 刘茂琪. 氨氮胁迫对三疣梭子蟹解毒代谢关键基因表达的影响. 海洋湖沼通报, 2015(2): 97–104]
- MARTIN R G, BARTLETT E S, ROSNER J L, *et al.* Activation of the *Escherichia coli* marA/soxS/rob regulon in response to transcriptional activator concentration. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 380(2): 278–284
- MENG Z, ZHANG H L, LIU X F, *et al.* Toxic effects of acute ammonia stress on young turbot *Scophthalmus maximus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 51–60 [孟振, 张鸿丽, 刘新富, 等. 氨氮急性胁迫对大菱鲆幼鱼的毒性效应. 渔业科学进展, 2020, 41(2): 51–60]
- QIANG J, XU P, HE J, *et al.* The combined effects of external ammonia and crowding stress on growth and biochemical activities in liver of (GIFT) Nile tilapia juvenile (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(12): 1837–1848 [强俊, 徐跑, 何杰, 等. 氨氮与拥挤胁迫对吉富品系尼罗罗非鱼幼鱼生长和肝脏抗氧化指标的联合影响. 水产学报, 2011, 35(12): 1837–1848]
- QIU L, SHI X, YU S, *et al.* Changes of ammonia-metabolizing enzyme activity and gene expression of two strains in shrimp *Litopenaeus vannamei* under ammonia stress. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 211
- REINEHR R, GÖRG B, BECKER S, *et al.* Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia*, 2007, 55(7): 758–771
- REN H, LI J, LI J T, *et al.* Effects of acute ammonia stresses on antioxidant enzyme activities and GPx gene expression in *Exopalaemon carinicauda*. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(4): 647–655 [任海, 李健, 李吉涛, 等. 急性氨氮胁迫对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)抗氧化系统酶活力及 GPx 基因表达的影响. 农业环境科学学报, 2014, 33(4): 647–655]
- ROMANO N, ZENG C. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. *Aquaculture*, 2007, 266(1/2/3/4): 246–254
- ROUMIEH R, BARAKAT A, ABDELMEGUID N E, *et al.* Acute and chronic effects of aqueous ammonia on marbled spinefoot rabbitfish, *Siganus rivulatus* (Forsskål 1775). *Aquaculture Research*, 2013, 44(11): 1777–1790
- SUN H, YANG W, CHEN Y, *et al.* Effect of purified microcystin on oxidative stress of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* larvae under different ammonia concentrations. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2011, 39(4/5/6): 536–543
- WANG Q J, XU L, FAN M Z. Recent advances in transport systems of glutamate and glutamine. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23(6): 901–907 [王秋菊, 许丽, 范明哲. 谷氨酸和谷氨酰胺转运系统的研究进展. 动物营养学报, 2011, 23(6): 901–907]
- WANG Z J, CHEN S Q, CAO D Z, *et al.* Effects of acute ammonia nitrogen stress on histopathology of gill and liver and enzyme activities of juvenile *Verasper variegatus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2017, 38(2): 59–69 [王贞杰, 陈四清, 曹栋正, 等. 急性氨氮胁迫对圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)幼鱼鳃和肝组织结构及相关酶活性的影响. 渔业科学进展, 2017, 38(2): 59–69]
- WILKIE M P, STECYK J A W, COUTURIER C S, *et al.* Reversible brain swelling in crucian carp (*Carassius carassius*) and goldfish (*Carassius auratus*) in response to high external ammonia and anoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Molecular and Integrative Physiology*, 2015, 184: 65–75
- XIONG D L, DUAN Y F, XU J M, *et al.* Physiological responses in gills of *Litopenaeus vannamei* exposed to the combined stress of temperature and ammonia. *Journal of Southern Agriculture*, 2020, 51(9): 2296–2303 [熊大林, 段亚飞, 徐敬明, 等. 凡纳滨对虾鳃组织对高温和氨氮胁迫的生理响应. 南方农业学报, 2020, 51(9): 2296–2303]
- YAN M, XU W, CHEN F. Advances in structure and function of *E. coli* AspAT. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2004, 2(3): 14–18 [严明, 许伟, 陈菲. *E. coli* 天冬氨酸转氨酶结构与功能关系的研究进展. 生物加工过程, 2004, 2(3): 14–18]
- YANG Y, MENG F X, WANG R X. On the detoxification metabolic pathways of *Boleophthalmus pectinirostris* exposed to acute ammonia-nitrogen stress. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(11): 72–81 [杨洋, 孟繁星, 王日昕. 急性氨氮胁迫下大弹涂鱼解毒代谢途径的研究. 生物技术通报, 2019, 35(11): 72–81]
- ZHANG K J. Toxication of Zn²⁺ and NH₃-N on hepatopancreas of *Penaeus orientalis*. *Journal of Fisheries of China*, 1993, 17(1): 52–59 [张克俭. 锌和氨氮对对虾肝胰腺的毒性作用. 水产学报, 1993, 17(1): 52–59]
- ZHANG L, XU E G, LI Y, *et al.* Ecological risks posed by ammonia nitrogen (AN) and unionized ammonia (NH₃) in seven major river systems of China. *Chemosphere*, 2018, 202(1): 136–144
- ZHAO H T. Effects of ammonia on haematological and immune parameters of juvenile Southern catfish (*Silurus meridionalis* Chen). Master's Thesis of Southwest University, 2006 [赵海涛. 氨氮对南方鲶(*Silurus meridionalis* Chen)幼鱼血液生理, 生化及非特异性免疫指标的影响. 西南大学硕士学位论文, 2006]
- ZHAO M M, YAO D F, LI S K, *et al.* Effects of ammonia on shrimp physiology and immunity: A review. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(4): 2194–2211
- ZHONG S L, CHEN Y Z, LIN K B, *et al.* Studies on variations of contents of NH₄⁺-N, S²⁻ and heterotrophic bacteria in substrate of shrimp ponds and their correlations. *Journal of Applied Oceanography*, 1997, 16(4): 449–454 [钟硕良, 陈

月忠, 林克冰, 等. 虾池底质中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 S^{2-} 和异养细菌含量的变化及其相关性研究. 台湾海峡, 1997, 16(4): 449–454]

ZHOU F L, CHEN J S, HUANG J H, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of glutamate dehydrogenase (GDH) in *Penaeus monodon* under ammonia nitrogen stress. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(6):

1236–1246 [周发林, 陈劲松, 黄建华, 等. 斑节对虾谷氨酸脱氢酶基因克隆及氨氮胁迫对其时空表达的影响. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1236–1246]

ZHOU P. The harm of ammonia nitrogen to aquaculture and its prevention measures. China Fisheries, 2013(8): 63–64 [周平. 氨氮对水产养殖的危害及防治措施. 中国水产, 2013(8): 63–64]

(编辑 冯小花)

Effects of Ammonia Stress on Metabolic and Antioxidant Enzyme Activities in *Panulirus ornatus*

ZHOU Qiansen^{1,2}, REN Xianyun^{2,3}, XU Yao^{2,4}, LIU Ping^{2,3}, LI Jian^{2,3①}

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 4. Bioresources and Environment/Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang, Jiangsu 222005, China)

Abstract In this study, in order to explore the effects of acute ammonia stress on the antioxidant and ammonia-nitrogen metabolism systems of *Panulirus ornatus*, lobsters were exposed to different concentrations of ammonia (0.24±0.07, 1.04±0.08, 9.75±0.21, and 19.87±0.46 mg/L) for up to 48 h. The activity of antioxidant and ammonia-nitrogen metabolizing enzymes and related gene expression were assessed in the gills and hepatopancreas at 0, 6, 12, 24, and 48 h after ammonia stress. From 6 to 12 h, total antioxidant capacity (T-AOC) and superoxide dismutase (SOD) activity in the gills and hepatopancreas of *P. ornatus* under ammonia nitrogen stress increased to varying degrees, and was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). In the high-concentration group, T-AOC and SOD activity was inhibited for 48 h. The LPO content gradually increased with prolonged stress and was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$) at 48 h. The activities of the ammonia metabolism enzymes glutamine synthetase (GS), glutamate dehydrogenase (GDH), glutamic-oxalacetic transaminase (GOT), and xanthine oxidoreductase (XOD) were all up-regulated to varying degrees under ammonia stress compared with those of the control group, indicating that they are jointly involved in the metabolic transport of NH_4^+ . Additionally, from 12 to 24 h, the expression of GDH and GOT genes in the hepatopancreas was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$); the same trend was identified in gill tissue. In brief, different concentrations of ammonia stress induce different levels of antioxidant enzyme activity. *Panulirus ornatus* mainly synthesizes glutamine under the combined action of hepatopancreas GS, GDH, and other metabolic enzymes to avoid excessive ammonia in the body.

Key words *Panulirus ornatus*; Ammonia nitrogen stress; Antioxidant; Ammonia metabolic enzyme

① Corresponding author: LI Jian, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn