

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210930002

http://www.yykxjz.cn/

吴丽娜, 吴彪, 刘志鸿, 于涛, 孙秀俊, 周丽青, 郑言鑫, 王振原. 低氧预适应对魁蚶在低氧胁迫下生理生化指标的影响. 渔业科学进展, 2023, 44(2): 98–106

WU L N, WU B, LIU Z H, YU T, SUN X J, ZHOU L Q, ZHENG Y X, WANG Z Y. Effects of hypoxic preconditioning on the physiological and biochemical characteristics of *Scapharca broughtonii* under hypoxia stress. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(2): 98–106

低氧预适应对魁蚶在低氧胁迫下 生理生化指标的影响*

吴丽娜^{1,2,3} 吴彪^{2,3①} 刘志鸿^{2,3} 于涛⁴
孙秀俊^{2,3} 周丽青^{2,3} 郑言鑫⁴ 王振原^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心 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. 中国水产科学研究院长岛增殖实验站 山东 烟台 265800)

摘要 本研究以未进行低氧预适应的魁蚶(*Scapharca broughtonii*)为对照组(C组), 分析了2次低氧预适应(H₂组)和4次低氧预适应(H₄组)的魁蚶在溶解氧(DO)约为2.0 mg/L低氧胁迫48 h内的摄食、呼吸代谢和酶活力的变化规律。结果显示, 3组魁蚶的摄食率(IR)在胁迫初期急剧下降, 后期均随时间的延长逐渐恢复, 至48 h时, H组恢复程度显著高于C组($P < 0.05$); C组、H₂组和H₄组魁蚶的耗氧率(OR)随时间变化呈逐渐升高的趋势, 48 h比0 h分别提高了1.15、1.08、0.73倍; 3组排氮率(NR)表现出不同的变化趋势, 至48 h时, C组、H₂组和H₄组分别为0 h的1.67、1.30、0.97倍; C组的氧氮比(O/N)相对平稳, H组的变化范围相对较大。3组的细胞色素C氧化酶(COX)随着低氧胁迫时间的延长呈逐渐降低的趋势, 乳酸脱氢酶(LDH)活力和还原型谷胱甘肽酶(GSH)含量整体呈上升趋势, 与对照组相比, 预低氧组的酶活力在低氧胁迫期间变化相对平稳, 应激反应小。研究表明, 魁蚶经低氧预适应后再次受到低氧胁迫时, IR升高, OR降低, 酶活性相对稳定, 低氧预适应能提高魁蚶的耐低氧能力。本研究丰富了魁蚶低氧耐受相关研究的基础数据, 为进一步探讨魁蚶低氧耐受机制和创制耐低氧新种质提供了参考资料。

关键词 魁蚶; 低氧预适应; 低氧胁迫; 生理生化指标

中图分类号 S917.4 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)02-0098-09

溶解氧(DO)是水生物赖以生存的必要条件之一, 影响其生长存活、繁殖、发育等生理过程。水体中DO含量常随环境变化发生波动, 近年来, 随着全球环境变化和人类活动的影响, 水体低氧现象频发,

给水产养殖产业造成严重影响。研究表明, 鱼类、甲壳类、贝类、棘皮类等许多水产养殖动物的爆发性死亡均与低氧环境相关(Wilhelm *et al.*, 2005; 周作强等, 2013; 刘国山等, 2014; 孙盛明等, 2020)。当DO浓度 < 2 mg/L

* 国家重点研发计划项目(2018YFD0900304-4)和山东省重大科技创新工程项目(2019JZZY020706)共同资助。

吴丽娜, E-mail: 905261379@qq.com

① 通信作者: 吴彪, 研究员, E-mail: wubiao@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-09-30, 收修改稿日期: 2021-11-11

时,水生生物即处于低氧环境,其活动行为、呼吸和能量代谢、生理生化等会因低氧胁迫发生一系列复杂的改变,甚至死亡(Wannamaker *et al.*, 2000; 徐贺等, 2016; 宋银都等, 2021; 吴碧银等, 2022)。当虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)受到低氧环境刺激时,会紧闭双壳,适应一段时间后,双壳慢慢打开,在 DO 浓度 ≤ 2 mg/L 时,随着胁迫时间的延长,会出现外套膜萎缩、鳃丝黏连等现象,导致死亡率显著升高(夏玉莹等, 2021);当 DO 浓度 < 2 mg/L 时,厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)可能仅以蛋白质代谢提供能量,当 DO 浓度 < 1 mg/L 时,厚壳贻贝无法再维持正常的代谢水平,会通过关闭贝壳、降低滤水率来减少摄食活动的能量消耗,维持机体的基础能量代谢水平(江天棋等, 2021)。在低氧胁迫下,酶活力的研究多集中在呼吸代谢酶以及抗氧化酶。呼吸代谢酶包括琥珀酸脱氢酶(SDH)、细胞色素 C 氧化酶(COX)、乳酸脱氢酶(LDH)等,其活性的变化是代谢能力变化的直接反映;抗氧化酶的研究多为能在保护细胞免受氧化应激中发挥重要作用的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)等(王盼等, 2021)。

低氧预适应(hypoxic preconditioning)是指机体受到多次短暂、非致死性的低氧刺激后产生内源性保护机制,适度的低氧胁迫训练可以降低动物机体对低氧或缺氧的应激反应,对机体组织产生保护作用,进而提高机体耐受能力(张世纪等, 2021)。目前,低氧预适应的研究多集中在对小鼠(*Mus musculus*)等高等动物的研究,低氧预适应可有效提高小鼠有氧运动能力及心肌丙二醛(MDA)水平,而且对长期低氧暴露的小鼠心肌损伤有一定的保护作用(孔海军等, 2020);还可以通过激活 BDNF/TrkB 信号通路对小鼠产生神经保护作用(吴晓东等, 2019)。低氧预适应在水产中的报道相对较少,主要集中于鱼类、虾类和蟹类的低氧-复氧对机体生理生化指标的影响方面。Volodymyr 等(2001)研究发现,低氧胁迫能够使金鱼(*Carassius auratus*)通过抗氧化系统调节机体获得一定的适应性,进而构成一种生化保护机制,使得复氧后的金鱼低氧应激最小。在贝类中,除了头足类可以利用较强的游泳能力躲避低氧环境外,移动能力差的种类只能通过机体调节来适应低氧环境的胁迫(陈峰等, 2021)。因此,探讨低氧预适应对贝类机体生理生化特性、组织等方面的影响,对贝类耐低氧研究、耐低氧新品种培育等方面的工作均具有重要意义。

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)俗称赤贝、血贝、大毛蛤,是具有较高经济价值的大型蚶科贝类,因个体

大,富含蛋白质、维生素、血红素等物质,在中国、韩国、日本等市场上深受欢迎(吴彪等, 2010; 赵庆等, 2019; 周建聪等, 2021)。目前,魁蚶已成为我国北方贝类苗种繁育、池塘养殖的重要种类之一,但低氧仍是魁蚶面临的一个重要胁迫。当自然海水中 DO 浓度 < 2.5 mg/L 时,魁蚶即会出现大量死亡(Senbokuya *et al.*, 2019)。赵庆等(2018)、张高伟等(2019)分别研究了低氧胁迫下魁蚶的存活、酶活变化以及 *HIF-1 α* 基因的变化特征,发现魁蚶对于短暂的低氧胁迫具有较强的耐受能力。然而,经过低氧预适应的魁蚶再次受低氧胁迫后,其机体在生理生化指标的变化特征有待研究。本研究对低氧预适应魁蚶的摄食率(ingestion rate, IR)、耗氧率(oxygen rate, OR)、排氮率(ammonia excretion rate, NR)、酶活等生理生化指标进行比较分析,以期对魁蚶低氧适应机制研究提供资料,同时为产业中提高魁蚶耐低氧能力策略的制定提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验魁蚶于 2021 年 4 月取自山东东营养殖池塘,选择壳形完整的健康个体用于实验,壳长为 (38.13 ± 1.13) mm。实验前,魁蚶于温度为 (17.6 ± 1.0) °C 的充气过滤海水中暂养 7 d,实验期间,每 24 h 换 1/2 体积海水,并投喂小新月菱形藻(*Nitzschia closterium minutissima*)。

1.2 低氧预适应魁蚶模型的建立及实验组设置

魁蚶低氧预适应模型建立:将纯度为 99.9% 的 N_2 通入养殖槽的海水中,通过调整充气量,将海水 DO 浓度维持在 (2.5 ± 0.3) mg/L。将魁蚶置于此环境中 24 h 后转移至常氧[DO 浓度为 (7.5 ± 0.3) mg/L]海水中恢复 48 h,此为低氧预适应 1 次的魁蚶模型。

实验共设置 3 组:未进行低氧预适应的为对照组(C 组),低氧预适应 2 次为 H_2 组,低氧预适应 4 次为 H_4 组,每组设置 3 个平行。魁蚶低氧预适应模型建立后,测定低氧胁迫(DO 约为 2.0 mg/L) C 组、 H_2 组和 H_4 组 3 组魁蚶在 0、8、16、24 和 48 h 时的 IR、OR、NR 以及酶活力,分析其变化特征。

1.3 摄食实验

摄食实验在直径为 10.5 cm、高为 12.0 cm 的养殖桶中进行。低氧预处理后,分别从 C 组、 H_2 组和 H_4 组中随机取 3 只魁蚶置于盛有海水(DO 约为 2.0 mg/L)的养殖桶中,10 min 后向桶内投入球等鞭金藻

(*Isochrysis galbana*) (终浓度为 65×10^4 cells/L), 最终海水体积为 1 L, 摄食时间为 2 h。摄食结束后, 利用血球计数板测定实验前后水体中球等鞭金藻的密度, 同时, 取魁蚶软体部于 60°C 烘干 48 h 至恒重, 称重。每组设置 3 个平行, 不加魁蚶的为空白组。参照薛素燕等(2020)的方法:

$$IR = V(C_0 - C_t) / (N \times t \times W)$$

式中, V 为实验海水体积, C_0 和 C_t 分别为实验开始和结束时的饵料浓度, N 为实验魁蚶数量, t 为实验时间(h), W 为软组织干重(g)。

1.4 呼吸实验

实验前停食 24 h, 从 C 组、H₂ 组和 H₄ 组中随机取 3 只魁蚶放入盛有 3 L 海水的呼吸瓶中, 放入魁蚶 10 min 后为实验起始时间, 实验持续 2 h。分别采用碘量法和次溴酸钠氧化法测定实验前后海水中的 DO 和氨氮(NH₄⁺-N), 计算 OR 和 NR。每组设 3 个平行, 不加魁蚶的为空白组。实验结束后, 同 1.3 方法获取魁蚶软体部干重。OR、NR 以及氧氮比(O/N)计算参照薛素燕等(2020)的方法。

$$OR = (D_0 - D_t) \times V / (W \times t)$$

式中, D_0 和 D_t 为实验空白对照组和实验组水中 DO 的含量(mg/L), V 为呼吸瓶容积(L), W 为软组织干重(g), t 为实验持续时间(h)。

$$NR = [(N_t - N_0) \times V] / (1000 \times W \times t)$$

式中, N_0 和 N_t 为实验空白对照组和实验组水中 NH₄⁺-N 的浓度(mg/L), V 为呼吸瓶容积(L), W 为软组织干重(g), t 为实验持续时间(h)。

$$O/N = (OR/16) / (NR/14)$$

式中, O/N 为魁蚶 OR 和 NR 之间的比值; 16 为氧原子的摩尔质量(g/mol); 14 为氮原子的摩尔质量(g/mol)。

1.5 酶活力实验

分别于低氧胁迫 0、8、16、24 和 48 h 后各取 C 组、H₂ 组和 H₄ 组的 3 个个体的鳃组织, 液氮冻存后放入 -80°C 冰箱保存, 用于后续酶活力的测定。按 1:9 质量体积比混合鳃组织和 0.9% NaCl 溶液, 于冰浴下匀浆, 离心后取上清液, 用于酶活力测定。酶活力单位以 U/mg prot 表示, 代表每毫克蛋白含有的酶活力单位数。测定方法参照试剂盒使用说明书, 蛋白质浓度测定试剂盒、微量还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒均购于南京建成生物公司; 细胞色素 C 氧化酶(COX)试剂盒购于上海纪宁生物公司。

1.6 数据分析

使用 SPSS 统计软件进行数据分析, 结果使用平均值±标准差(Mean±SD)表示, 使用 GraphPad Prism 软件作图, 采用单因素方差分析(one-way, ANOVA)比较不同数据之间的差异性, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 摄食率的变化

C 组、H₂ 组、H₄ 组魁蚶受低氧胁迫不同时间的 IR 见图 1。从图 1 可以看出, 3 组魁蚶受到低氧胁迫后, 其 IR 的变化趋势基本一致, 总体上呈先下降后恢复的变化过程。C 组、H₂ 组、H₄ 组魁蚶的 IR 均在受低氧胁迫 8 h 最低, 分别为 0 h 的 39.51%、36.31% 和 45.96%; 16 和 24 h 时, 3 组魁蚶 IR 都逐渐提高; 至 48 h 时, C 组和 H₂ 组与 24 h 相比有所回落, 但未达到显著水平($P > 0.05$), 而 H₄ 组则继续升高; 但在实验取样时间点内, 3 组魁蚶的 IR 都没有恢复到低氧胁迫处理前的水平。在多数的取样点, H₂ 组和 H₄ 组的 IR 比 C 组更高, 且其恢复程度也普遍高于 C 组, 说明低氧预适应提高了魁蚶的 IR。

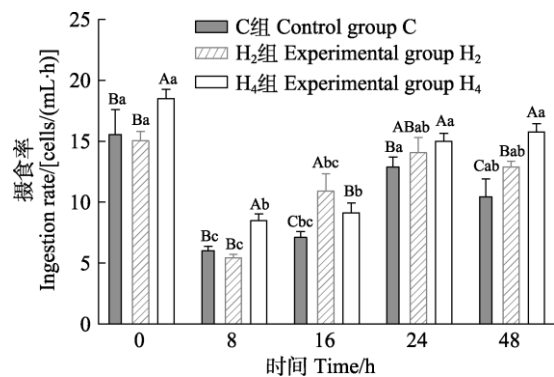


图 1 低氧预适应对魁蚶 IR 的影响

Fig.1 Effects of hypoxic preconditioning on the IR of *S. broughtonii*

不同大写字母表示同一时间不同实验组间的差异显著 ($P < 0.05$); 不同小写字母表示同一实验组不同时间的差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Different uppercase letters represent significant differences between different groups at the same time ($P < 0.05$), and different lowercase letters represent significant differences of the same group at different time ($P < 0.05$). The same as below.

2.2 耗氧率和排氨率的变化

在低氧胁迫阶段, C 组、H₂ 组、H₄ 组 OR 变化趋势见图 2a。从图 2a 可以看出, C 组和 H₂ 组的魁蚶

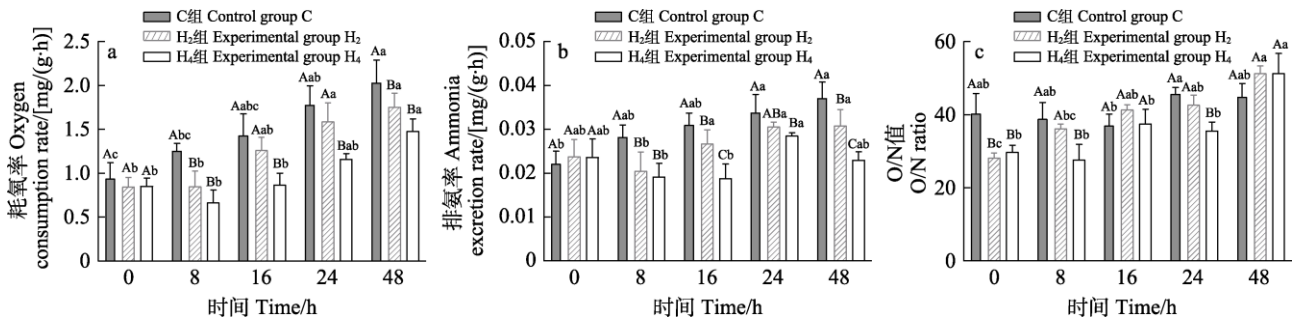


图2 低氧预适应对魁蚶 OR、NR 和 O/N 值的影响

Fig.2 Effects of hypoxic preconditioning on the OR, NR and O/N of *S. broughtonii*

受低氧胁迫后,其 OR 均表现出逐渐升高的趋势,而 H₄ 组受低氧胁迫 8 h 时呈先下降而后逐渐升高的趋势;3 组魁蚶在低氧胁迫 48 h 时达到最大值,分别为 (2.04±0.22)、(1.75±0.18)和(1.48±0.09) mg/(g·h)。低氧胁迫 0~16 h 时,3 组的 OR 相对平稳,未达到显著水平($P > 0.05$)。48 h 时,H₂ 组、H₄ 组的 OR 与 C 组相比升高趋势较小,与低氧胁迫 0 h 时相比分别提高了 1.15、1.08、0.73 倍。在低氧胁迫后的各时间点,3 组魁蚶的 OR 呈相同的趋势,即 C 组 > H₂ 组 > H₄ 组。在 8 和 48 h 时,C 组和 H₂ 组 OR 相比差异显著($P < 0.05$),H₂ 组和 H₄ 组 OR 相比无显著差异($P > 0.05$);16 和 24 h 时,C 组和 H₂ 组 OR 相比差异不显著($P > 0.05$),而 H₂ 组显著高于 H₄ 组。结果表明,低氧预适应降低了魁蚶在受低氧胁迫时的 OR。

3 组魁蚶受低氧胁迫后,NR 的变化特征见图 2b。从图 2b 可以看出,C 组受低氧胁迫后,其 NR 的变化规律呈逐步升高的趋势,至 48 h 时,其 NR 是 0 h 的 1.67 倍,而 H₂ 组表现出先下降再升高的趋势,H₄ 组则呈先下降再升高再降低的趋势;至 48 h 时,H₂ 组和 H₄ 组的 NR 分别为 0 h 的 1.30 倍和 0.97 倍;在各取样时间点,H₂ 组和 H₄ 组魁蚶的 NR 均低于 C 组,其中,除 24 h 时,H₂ 组与 C 组差异未达到显著水平外,其余时间其差异均达到显著水平($P < 0.05$);与 H₂ 组相比,H₄ 组在 16 和 48 h 均显著低于 H₂ 组($P < 0.05$),8 和 24 h 时也低于 H₂ 组,但两组相比差异不显著($P > 0.05$)。这说明经过低氧预适应后的魁蚶,再次受到低氧胁迫时其 NR 有所降低。

O/N 值是体现生物对环境适应程度以及确定适宜条件的重要指标之一,与环境对机体的压力密切相关。低氧胁迫 48 h 内,C 组、H₂ 组、H₄ 组的 O/N 值范围在 27.61~51.28 之间(图 2c)。C 组的 O/N 值在低氧胁迫期间变化平稳,最小值为 16 h 的 37.34,最大值为 24 h 的 46.02,只有这 2 个时间点具有显著差异($P < 0.05$),其他时间点均无显著差异($P > 0.05$);与 C

组相比,H 组的变化范围相对较大,基本表现出随胁迫时间延长而升高的趋势,H₂ 组和 H₄ 组的 O/N 最小值分别在 0 和 8 h,为 28.17 和 27.61,最大值均在 48 h,分别为 51.28 和 51.30。

2.3 低氧预适应对魁蚶酶活力的影响

C 组、H₂ 组、H₄ 组的 COX、LDH 酶活力和 GSH 含量变化趋势见图 3。从图 3 可以看出,在低氧条件下,3 组魁蚶的酶活力均随着胁迫时间的延长发生了变化,其中,COX 活力呈逐渐降低的趋势,GSH 含量逐渐升高;而 LDH 活力在胁迫初期极低,8 h 时酶活力突增。

从图 3a 可以看出,3 组魁蚶的 COX 活力呈逐渐降低的趋势,最大值均出现在胁迫初期的 0 h,至受低氧胁迫 48 h 时最低,分别为 0 h 的 18.96%、26.52% 和 41.58%。在各取样点内,C 组的 COX 活力均 < H 组,且在 16 h 后,C 组与 H₄ 组 COX 活力相比差异显著($P < 0.05$)。H₂ 组除 0 h 外,在其余取样点的 COX 活力均 < H₄ 组,且在 16 h 后,H₂ 组 COX 活力显著 < H₄ 组($P < 0.05$)。48 h 内,3 组魁蚶的 COX 活力的变化趋势为 C 组 > H₂ 组 > H₄ 组。

LDH 活力变化见图 3b。从图 3b 可以看出,0 h 时,3 组魁蚶的 LDH 活力显著低于其他时间点($P < 0.05$),低氧胁迫 8 h,3 组 LDH 活力突然升高。C 组 LDH 活力除 24 h 时略有下降,整体呈逐渐升高的趋势,且 48 h 时达到最大值,此时 LDH 活力为 0 h 的 12.17 倍。H 组的最大值出现在 16 h,其中,H₂ 组 LDH 活力在 16 h 后趋于稳定,变化范围极小;H₄ 组 LDH 活力在 16 h 后逐渐下降并低于 H₂ 组,且在 48 h 时与 H₂ 组相比差异显著($P < 0.05$)。到 48 h 时,H₂ 组与 H₄ 组的 LDH 活力分别为 0 h 的 8.25 倍和 6.34 倍。

3 组魁蚶低氧胁迫后,GSH 含量的变化趋势见图 3c。从图 3c 可以看出,总体表现出逐渐升高的变化过程。H 组的 GSH 含量在各取样点内均高于 C 组;H₄ 组的 GSH

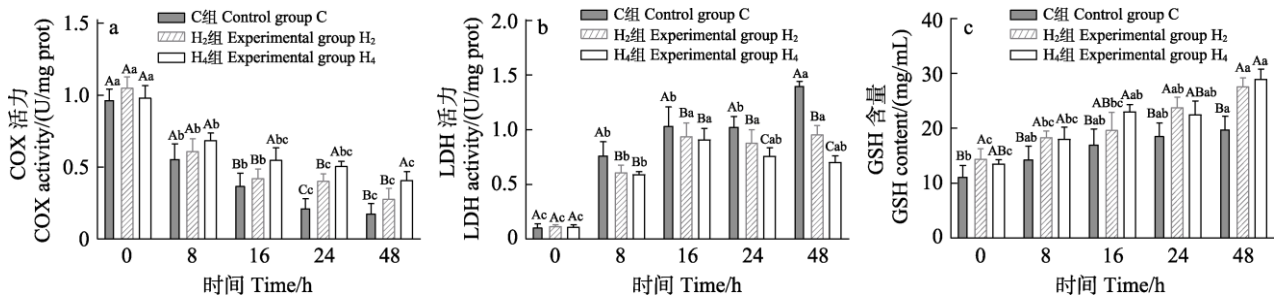


图3 低氧预适应对低氧胁迫下魁蚶酶活力的影响

Fig.3 Effects of hypoxic preconditioning on activity of *S. broughtonii* under hypoxia stress

含量在 16 h 和 48 h 时高于 H₂ 组。低氧胁迫进行到 48 h 时,为各组的最大值。此时,C 组、H₂ 组和 H₄ 组的 GSH 含量分别为 0 h 的 1.76、1.92 和 2.15 倍。48 h 内,3 组魁蚶的 GSH 含量变化趋势为 H₄ 组 > H₂ 组 > C 组。

3 讨论与结论

低氧是一种严重的环境胁迫(夏丹阳等, 2020),水生生物的生存和生长发育均与水体中的 DO 息息相关。水体中 DO 含量只有空气的 3%,相比之下,水生生物对 O₂ 的利用率比陆地生物更重要(Rytkonen *et al.*, 2007)。动物可以通过进行一系列训练来对自身机体进行调节,继而适应环境带来的胁迫。刘云(2009)通过对瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)幼鱼进行 14 d 力竭性追赶训练,发现该训练能显著提高黄颡鱼幼鱼的游泳能力。适当强度的运动训练对紫红笛鲷(*Lutjanus argentimaculatus*)鱼体内的抗氧化能力和免疫水平有提高作用,其酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)、溶菌酶(LZY)等在训练后与未训练组相比均差异显著(范雯等, 2020)。而关于低氧预适应相关的研究在水产动物的研究中较少见。本研究首次对魁蚶进行低氧预适应训练,训练过程中的 DO 浓度为(2.5±0.3) mg/L,预低氧次数分别为 0、2 和 4 次,结果表明,进行预低氧 4 次的魁蚶其耐低氧能力更强。

在胁迫初期,3 组魁蚶的 IR 均显著下降,这可能是魁蚶对外界环境的骤变而做出的应激反应。随着低氧胁迫时间的延长,魁蚶对胁迫环境逐渐产生了一定的适应性,3 组魁蚶的 IR 均有所回升;胁迫后期,随着对低氧的进一步适应,魁蚶壳口张开并主动摄食以获取食物来维持机体行使功能。另外,动物可以通过相关训练来调节自身摄食能力,马壮等(2019)对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)幼鱼进行游泳训练,发现适当训练可以一定程度上提高鱼体的摄食能力。本研究中,经过低氧预适应的魁蚶在低氧胁迫后期,其 IR 明显高于未进行预适应的魁蚶,且恢复能力更高,这

说明低氧预适应对魁蚶在低氧胁迫下的摄食能力具有积极促进作用,增强了魁蚶对低氧胁迫的适应性,且预适应 4 次的魁蚶 IR 更高,适应性更强。

代谢活动反映的是贝类在一定生理水平下的特定状态,在胁迫条件下,因应激反应需要消耗更多的能量来维持内环境的稳态,从而影响贝类的摄食、代谢及免疫等功能(魏伟, 2016)。美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)长期固着于潮间带的礁石上,涨潮期与低潮期的交替造成美洲牡蛎间断性地暴露于空气中形成 O₂ 差,类似于多次“训练”,这可能驯化出了牡蛎更强的低氧耐受能力(Greenway *et al.*, 2000)。本研究中,3 组魁蚶在低氧胁迫下,OR 和 NR 都有显著变化。随着低氧胁迫时间的延长,各组魁蚶的 OR 逐渐升高,对 O₂ 需求增大,其中,对照组 OR 升高趋势尤为明显。预适应组与对照组的 NR 也表现出显著差异(P < 0.05),其变化趋势与 OR 一致。预适应组经过低氧训练后,呼吸代谢变化较为平稳,且低氧预适应 4 次比低氧预适应 2 次更为稳定,表现出对低氧胁迫更强的适应性。

O/N 值是研究水产动物生长代谢的一个重要参数,其大小表示该生物体内蛋白质、脂肪和碳水化合物分解代谢的比率(周建聪等, 2021)。O/N 值 < 7 时,生物体内的能量完全由蛋白质提供;O/N 值约为 7~24 时,生物体所需要的能量由蛋白质和脂肪提供;当供能物质主要为碳水化合物或脂肪时,O/N 值将会无穷大(Conover *et al.*, 1968; Mayzald *et al.*, 1976; Ikeda, 1974)。本研究中,3 组魁蚶在低氧胁迫下,O/N 平均值为 39.5, H₄ 组在 8 h 的 O/N 值最小,为 27.61,此时的 O/N 值大于由蛋白质和脂肪提供生物体所需要能量的 O/N 值,说明本研究中的魁蚶耗能主要由碳水化合物和脂肪提供,48 h 的低氧胁迫在魁蚶的承受范围之内,表明魁蚶的耐低氧能力较强。

当水生生物受到低氧胁迫后,机体会产生过量的活性氧(ROS),并产生超氧自由基(O₂⁻),同时,机体会启动抗氧化防御体系来清除 O₂ 以减少氧化损

伤, 酶活力是体现机体生理状态的重要指标。其中, COX 活性是评价不同组织有氧呼吸产生能量的重要指标(Hu *et al.*, 2018); LDH 活力是生物体内参加无氧代谢的关键酶(杨明等, 2019); GSH 含量在维持细胞生理功能方面起到重要作用。本研究中, 低氧胁迫使魁蚶的生理生化指标发生改变, 整体趋势表现为 COX 活力逐渐降低, LDH 活力逐渐升高, GSH 含量逐渐升高, 表明魁蚶的有氧呼吸能力逐渐降低, 无氧呼吸能力逐渐升高。从 COX 与 LDH 活力实验可以看出, 相对低氧预适应组, 对照组的酶活力变化趋势明显, 存在更强烈的应激反应; 经过低氧预适应, 机体酶活力变化趋势相对较小, 同时, 与呼吸代谢趋势一致, 低氧预适应 4 次比预适应 2 次变化小, 表明低氧预适应降低了机体内一些酶的应激反应。GSH 含量作为维持细胞生理功能的重要酶, 随着低氧胁迫时间延长, 实验组 GSH 含量显著高于对照组($P < 0.05$), 体现出更强的维持机体稳定的能力。王定康等(2021)研究表明, 经过高盐预适应的鲁氏酵母菌(*Zygosaccharomyces rouxii*)在高盐胁迫下的存活率、pH、酶活力及多种游离氨基酸含量显著提高, 与本研究结果相似, 表明生物机体抗性在预适应后可以得到提高。

本研究分析了低氧预适应对魁蚶的 IR、呼吸代谢和酶活力等生理生化指标的影响, 发现预适应可有效提高魁蚶在低氧胁迫时机体的反应能力, 研究结果丰富了低氧适应相关的研究资料, 为探讨魁蚶逆境适应机制提供了数据。

参 考 文 献

- CHEN F, LI N, FANG Z, *et al.* Habitat distribution change pattern of *Uroteuthis edulis* during spring and summer in the coastal waters of Zhejiang Province. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2021, 30(5): 847–855 [陈峰, 李楠, 方舟, 等. 浙江近岸海域春夏季剑尖枪乌贼栖息地分布变化规律. *上海海洋大学学报*, 2021, 30(5): 847–855]
- CONOVER R J, CORNER E D S. Respiration and nitrogen excretion by some marine zooplankton in relation to their life cycles. *Marine Biology*, 1968, 48: 49–75
- FAN W, LIU Y, WEI X L, *et al.* Effects of exercise intensity and time on the serology of juvenile *Lutjanus argentimaculatus*. *Marine Fisheries*, 2020, 42(5): 618–633 [范雯, 刘永, 魏小岚, 等. 不同运动强度和训练时间对紫红笛鲷幼鱼血清生理生化指标的影响. *海洋渔业*, 2020, 42(5): 618–633]
- GREENWAY S C, STOREY K B. Seasonal change and prolonged anoxia affect the kinetic properties of phosphofructokinase and pyruvate kinase in oysters. *Journal of Comparative Physiology*, 2000, 170(4): 285–293
- HU Y C, CHUNG M H, LEE T H. An assay of optimal cytochrome c oxidase activity in fish gills. *Analytical Biochemistry*, 2018, 38: 553
- IKEDA T. Nutrition ecology of marine zooplankton. *Memoirs of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, 1974, 22: 1–97
- JIANG T Q, ZHANG Y, JIANG Y Z, *et al.* Shell valve opening behavior and metabolism of *Mytilus coruscus* under different oxygen concentrations. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(10): 1329–1336 [江天祺, 张杨, 姜亚洲, 等. 不同溶解氧水平下厚壳贻贝的贝壳开放行为和呼吸代谢. *中国水产科学*, 2021, 28(10): 1329–1333]
- KONG H J, LI Z Y, ZHOU X, *et al.* Hypoxic preconditioning alleviates myocardial injury in hypoxic-exhaustive exercise mice by regulating PKA/CREB and AK1/STAT3 signaling pathway. *Space Medicine and Medical Engineering*, 2020, 33(6): 484–490 [孔海军, 李赵越, 周霞, 等. 低氧预处理通过调控 PKA/CREB 及 JAK1/STAT3 信号通路减轻低氧暴露力竭运动小鼠心肌损伤. *航天医学与医学工程*, 2020, 33(6): 484–490]
- LIU G S, CAI X Y, TONG F, *et al.* Investigation of massive death of sea cucumber in artificial reef zone of Shuangdao Bay, Weihai. *Fishery Information and Strategy*, 2014, 29(2): 122–129 [刘国山, 蔡星媛, 佟飞, 等. 威海双岛湾人工鱼礁区刺参大面积死亡原因初探. *渔业信息与战略*, 2014, 29(2): 122–129]
- LIU Y. Effects of exercise intensity and time on the serology of juvenile *Lutjanus argentimaculatus*. Master's Thesis of Chongqing Normal University, 2009 [刘云. 力竭性追赶训练和停训对瓦氏黄颡鱼幼鱼游泳能力的影响. 重庆师范大学硕士研究生学位论文, 2009]
- MA Z, XI Y, ZHANG Z P, *et al.* Effects of swimming training on the growth, feeding, respiratory excretion and non-specific immunity of juvenile larvae. *Chinese Fisheries Association: Marine Pasture Research Association of Chinese Fisheries Association*, 2019, 1 [马壮, 席杨, 张泽鹏, 等. 游泳训练对牙鲆幼鱼生长、摄食、呼吸排泄及非特异性免疫的影响. *中国水产学会. 第三届现代海洋(淡水)牧场学术研讨会摘要集. 中国水产学会: 中国水产学会海洋牧场研究会*, 2019, 1]
- MAYZALLD P. Respiration and nitrogen excretion of zooplankton IV: The influence of starvation on the metabolism and biochemical composition of some species. *Marine Biology*, 1976, 37: 47–58
- RYTKONEN K T, VUORI K A M, PRIMMER C R, *et al.* Comparison of hypoxia-inducible factor-1 alpha in hypoxia-sensitive and hypoxia-tolerant fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D: Genomics and Proteomics*, 2007, 2(2): 177–186
- SENBOKUYA K, KOBAYASHI S, OOKI N, *et al.* Impact of nighttime hypoxia on ark shell *Scapharca broughtonii* mortality on a semi-enclosed embayment seabed. *Fisheries*

- Science, 2019, 85(2): 369–377
- SONG Y D, ZENG M D, ZHOU H T, *et al.* Effects of respiratory metabolism and related gene expression in *Siniperca chuatsi* under different dissolved oxygen levels. *Fisheries Science*, 2021, 37(5): 1–8 [宋银都, 曾萌冬, 周昊天, 等. 不同溶解氧水平对鳊呼吸代谢酶及其基因表达量的影响. *水产科学*, 2021, 37(5): 1–8]
- SUN S M, ZHU M R, PAN F Y, *et al.* Research progress on the effects of hypoxia stress on crustacean and its molecular regulation. *Journal of Fisheries of China*, 2020, 44(4): 690–704 [孙盛明, 祝孟茹, 潘方艳, 等. 低氧对甲壳动物的影响及其分子调控研究进展. *水产学报*, 2020, 44(4): 690–704]
- VOLODYMYR, LUDMYLA P, ALICE A, *et al.* Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative*, 2001, 280: 100–107
- WANG D K, ZHANG L, ZOU J P, *et al.* Effect of salt preadaptation on high salinity stress resistance of *Zygosacchomyces rouxi*. *Journal of Food Science and Technology*, 2021, 39(3): 73–79 [王定康, 张良, 邹江鹏, 等. 盐预适应对鲁氏酵母菌高盐胁迫抗性的影响. *食品科学技术学报*, 2021, 39(3): 73–79]
- 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*. *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. *渔业科学进展*, 2021, 42(4): 106–115]
- WANNAMAKER C M, RICK J A. Effects of hypoxia on movements and behavior of selected estuarine organisms from the south eastern United States. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2000, 249(2): 145–163
- WEI W. Study on feeding and metabolism of *Meretrix meretrix* under environmental stress. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2016 [魏伟. 环境胁迫对文蛤摄食和代谢的影响研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2016]
- WILHELM D, FILHOA M. A, TORRESA E, *et al.* Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture*, 2005, 244(1/2/3/4): 349–357
- WU B Y, XU J, CAO D C, *et al.* Genome-wide association analysis of hypoxia adaptation traits in common carp (*Cyprinus carpio*). *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(2): 1–10 [吴碧银, 许建, 曹顶臣, 等. 鲤低氧适应性状的全基因组关联分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(2): 1–10]
- WU B, YANG A G, LIU Z H, *et al.* The relationship between morphometric traits and body weight of *Scapharca broughtonii* in two different populations. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(6): 54–59 [吴彪, 杨爱国, 刘志鸿, 等. 魁蚶两个不同群体形态性状对体质量的影响效果分析. *渔业科学进展*, 2010, 31(6): 54–59]
- WU X D, YANG J, JIA X E, *et al.* The expression and function of BDNF and its receptor TrkB in hypoxic preconditioned mice. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2019, 29(1): 47–53 [吴晓东, 杨锦, 贾小娥, 等. BDNF 及其受体 TrkB 在低氧预适应小鼠中的表达变化和作用. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(1): 47–53]
- XIA D Y. The relationship between metabolic characteristics and swimming performance, hypoxia tolerance and growth performance in common carp. Master's Thesis of Southwest University, 2020 [夏丹阳. 鲤的代谢特征与游泳能力、低氧耐受及生长性能的关联. 西南大学硕士研究生学位论文, 2020]
- XIA Y Y, ZHANG J H, LIU Y, *et al.* Behavioral characteristics and physiological responses to hypoxic stress in *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(10): 1319–1328 [夏玉莹, 张继红, 刘毅, 等. 低氧胁迫下虾夷扇贝的行为特征及生理生化响应. *中国水产科学*, 2021, 28(10): 1319–1328]
- XU H, CHEN X M, WANG G Q, *et al.* Research progress of hypoxia on aquaculture. *Feed Industry*, 2016, 37(2): 33–37 [徐贺, 陈秀梅, 王桂芹, 等. 低氧胁迫在水产养殖中的研究进展. *饲料工业*, 2016, 37(2): 33–37]
- XUE S Y, LI J Q, LI Y, *et al.* Effects of short-term acidification on feeding, respiratory metabolism, and energy budget of *Scapharca broughtonii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(5): 127–133 [薛素燕, 李加琦, 李阳, 等. 短期酸化对魁蚶摄食、呼吸代谢及能量收支的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(5): 127–133]
- YANG M, SUN S M, FU H T, *et al.* Hypoxia and reoxygenation on antioxidant enzyme activities and histological structure of *Macrobrachium nipponense*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(3): 493–503 [杨明, 孙盛明, 傅洪拓, 等. 低氧和复氧对日本沼虾抗氧化酶活力及组织结构的影响. *中国水产科学*, 2019, 26(3): 493–503]
- ZHANG G W, WU B, LIU Z H, *et al.* Structural characteristics of *HIF-1 α* from *Scapharca broughtonii* and expression analysis under hypoxia. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(4): 646–656 [张高伟, 吴彪, 刘志鸿, 等. 魁蚶 *HIF-1 α* 基因结构特征及对低氧胁迫的响应. *中国水产科学*, 2019, 26(4): 646–656]
- ZHANG S J, FU W, XIE Y B, *et al.* Advances in DNA methylation regulating BDNF and TrkB receptor under hypoxic preconditioning. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2021, 37(5): 951–955 [张世纪, 付翁, 谢雅彬, 等. 低氧预适应下 DNA 甲基化调控 BDNF 和 TrkB 受体的研究进展. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(5): 951–955]
- ZHAO Q, WU B, LIU Z H, *et al.* Cloning and expression analysis of hemoglobin gene I of *Scapharca broughtonii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 84–91 [赵庆, 吴彪, 刘志鸿, 等. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)血红蛋白 I 基因克隆及表达特征. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 84–91]

ZHAO Q. Molecular cloning and functional analysis of hemoglobin genes from ark shell *Scapharca broughtonii*. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2018 [赵庆. 魁蚶血红蛋白基因的克隆及功能分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2018]

ZHOU J C, CAI L, YANG J R, *et al.* Effects of temperature and ammonia on oxygen consumption and ammonia excretion rates of *Cherax quadricarinatus* with different sizes. Progress

in Fishery Sciences, 2022, 43(3): 1–9 [周建聪, 蔡利, 杨静茹, 等. 温度和氨氮对不同规格红螯螯虾耗氧率与排氨率的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(3): 1–9]

ZHOU Z Q, DING Q Q, LIU Q G, *et al.* Stresses of hypoxia and its effects on immune system of bivalve. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(3): 324–330 [周作强, 丁晴晴, 刘其根, 等. 缺氧对贝类的胁迫效应及其免疫系统的影响. 生态毒理学报, 2013, 8(3): 324–330]

(编辑 陈 严)

Effects of Hypoxic Preconditioning on the Physiological and Biochemical Characteristics of *Scapharca broughtonii* under Hypoxia Stress

WU Li'na^{1,2,3}, WU Biao^{2,3①}, LIU Zhihong^{2,3}, YU Tao⁴, SUN Xiujun^{2,3},
ZHOU Liqing^{2,3}, ZHENG Yanxin⁴, WANG Zhenyuan^{1,2,3}

(1. Shanghai Ocean University, National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, 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, Qingdao Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 4. Changdao Enhancement and Experiment Station, Chinese Academy of Fishery Sciences, Yantai, Shandong 265800, China)

Abstract Dissolved oxygen (DO) is one of essential factor for the survival of aquatic organisms, affecting many physiological processes including growth, survival, reproduction and development. Due to the change of global environment and the influence of human activities, hypoxia often occurs in both natural and cultured water bodies. Studies showed that water is in a hypoxic state when DO is lower than 2 mg/L, and aquatic animals in this condition may often suffer from hypoxic stress. The blood clam *Scapharca broughtonii* is an important economic bivalve because of its delicious taste and rich protein, vitamins and hemoglobin. At present, the *S. broughtonii* has become an important species in Northern China, and the better economic benefit of breeding drives the rapid development of seedling production and culture. However, hypoxia often threatens the cultivation of *S. broughtonii*. Hypoxic preconditioning refers to the endogenous protective mechanism generated after the body is stimulated by multiple transient and non-fatal hypoxic stimuli, which can protect the body tissues and improve the tolerance of the body. To explore the effects of hypoxic preconditioning on the physiological and biochemical characteristics of *S. broughtonii* under hypoxia stress, the clams were divided into three groups containing H₂ (hypoxic preconditioning for two times), H₄ (hypoxic preconditioning for four times) and C (no hypoxic preconditioning, as control group). And then, we analyzed the feeding rate (IR), energy metabolism and three enzymes activity of three groups during the process of hypoxia stress for 48 hours with DO concentration of ~2.0 mg/L. The first item we explored was changes in feeding rates. During hypoxia stress, the IR of the three groups showed a tendency of decreasing first and then increasing. At the late stage of stress, the feeding rate of the three groups recovered to some extent, and the recovery degree of groups H₄ and H₂ were better than that of group C. The energy metabolism we studied contains the oxygen consumption rate (OR) and the ammonia excretion rate (NR). The results showed that the OR

① Corresponding author: WU Biao, E-mail: wubiao@ysfri.ac.cn

of the three groups increased gradually under hypoxia stress and reached the maximum value at 48 h after treatment. The OR of group C, H₂ and H₄ increased by 1.15, 1.08 and 0.73 times, respectively, after 48 hours of treatment. The trends in NR were that the NR in group C gradually increased during treatment, while that in group H reduced first followed by increasing and then decreased. The NR of group C, H₂ and H₄ showed different trends during the stress period which were 1.67, 1.30 and 0.97 times of 0 h at 48 h, respectively. And the ratio of oxygen to nitrogen in group C was relatively stable, while that in group H was relatively wide. The following are the experimental results of enzyme activity changes, which include cytochrome c oxidase (COX), lactate dehydrogenase (LDH) and glutathione (GSH). The COX of the three groups decreased gradually with the extension of hypoxia stress time. LDH activity and GSH enzyme content all showed an upward tendency. Compared with the control group C, the enzyme activity of the pre-hypoxic group H₂ and H₄ were relatively stable during the hypoxic stress. In total, the results showed that *S. broughtonii* pretreated with hypoxia had higher feeding rate, lower oxygen consumption rate and relatively stable enzyme activity compared with the control group, which revealed hypoxia pretreatment could improve its ability of hypoxia tolerance. It showed that hypoxia preconditioning had a more positive effect on the hypoxia tolerance of *S. broughtonii*. In this study, the effects of hypoxic preconditioning on physiological and biochemical of *S. broughtonii* under hypoxia stress including feeding rate, respiratory metabolism and enzyme activity were studied for the first time. It was found that hypoxic training could effectively improve the body's response to hypoxic stress, enriching the research data related to hypoxic adaptation, and providing data for exploring the stress adaptation mechanism of *S. broughtonii*.

Key words *Scapharca broughtonii*; Hypoxic preconditioning; Hypoxia stress; Physiological and biochemical characteristics