

急性低温对黑鲟抗氧化酶活性和热休克蛋白含量的影响

陈自强^{①②} 张志勇^② 祝斐^② 贾超峰^② 孟乾^②
曹广勇^{①②} 林志杰^{①②} 张志伟^{②*}

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 江苏省海洋水产研究所 南通 226007

摘要: 为探究急性低温胁迫对黑鲟 (*Acanthopagrus schlegelii*) 生理机能的影响, 以 1 龄黑鲟作为实验鱼, 以 15 °C 为对照组, 设置 10 °C 和 5 °C 作为低温胁迫组, 处理 24 h 后再转入 15 °C 的水体中进行恢复实验, 测定不同温度、不同时间点下 1 龄黑鲟肝的抗氧化酶活性以及热休克蛋白 (Hsp) 含量的变化。研究结果显示, 低温胁迫实验中, 低温处理组 (10 °C 和 5 °C) 在急性低温胁迫的 24 h 内, 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活性和热休克蛋白含量均呈现先上升后下降的趋势。10 °C 处理组上述三种抗氧化酶活性皆在 12 h 达到最大值, 超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活性 24 h 恢复到对照水平, 而谷胱甘肽过氧化物酶在 18 h 已经恢复到正常水平; 在 5 °C 处理组, 超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性在 6 h 达到最大值, 谷胱甘肽过氧化物酶在 18 h 达到最大值, 且在 24 h 都仍与对照组有极显著差异, 超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性分别在恢复实验的 12 h、12 h 和 6 h 恢复到对照水平。10 °C 和 5 °C 两个处理组的热休克蛋白含量皆在胁迫 18 h 达到最大, 10 °C 处理组在 24 h 恢复到正常水平, 但 5 °C 处理组的热休克蛋白含量直到恢复实验结束仍与对照组存在差异。本实验结果表明, 急性低温胁迫对超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶和热休克蛋白具有显著影响, 其均呈现有规律的变化趋势, 说明上述酶和蛋白参与了黑鲟的低温胁迫应答过程, 通过协同调节黑鲟的生理机能使其适应环境变化, 减少急性低温对鱼体的损伤并使其能够在环境骤变情况下存活下来。只有在自我调节范围内, 黑鲟随着胁迫时间的延长, 其体内才能够建立新的生理平衡来适应低温, 因此在黑鲟养殖过程中, 应当注意水温不宜低于 5 °C, 水温过低时, 应尽快将其移入室内, 避免水温骤降对鱼体造成损伤。

关键词: 黑鲟; 急性低温胁迫; 抗氧化酶; 热休克蛋白

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2020) 06-784-09

The Effects of Acute Low Temperature Stress on Activities of Antioxidant Enzymes and Heat Shock Protein Content in *Acanthopagrus schlegelii*

CHEN Zi-Qiang^{①②} ZHANG Zhi-Yong^② ZHU Fei^② JIA Chao-Feng^② MENG Qian^②
CAO Guang-Yong^{①②} LIN Zhi-Jie^{①②} ZHANG Zhi-Wei^{②*}

基金项目 江苏省第五期“333 工程”科研项目 (BRA2020372), 江苏省农业重大新品种创制项目 (No. PZCZ201744), 南通市基础科学研究计划项目 (No. JC2019056), 江苏省自然科学基金项目 (No. BK20181202), 江苏省水产良种保种及更新项目 (No. 2019-SJ-006-3);

* 通讯作者, E-mail: zhzhwei2005@126.com;

第一作者简介 陈自强, 男, 硕士研究生; 研究方向: 遗传育种; E-mail: 810780548@qq.com。

收稿日期: 2020-01-20, 修回日期: 2020-08-31 DOI: 10.13859/j.cjz.202006012

① National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

② Jiangsu Marine Fisheries Research Institute, Nantong 226007, China

Abstract: In order to investigate the effects of acute low temperature stress on physiological functions of Black Porgy (*Acanthopagrus schlegelii*), one-year-old black porgies were used in the experiment. With 15 °C as the control group, 10 °C and 5 °C as the low temperature stress test groups, all test groups were moved to 15 °C water for recovering after 24 h treatment. We measured the activities of antioxidant enzymes and heat shock protein content in the liver of Black Porgy at different temperatures. The results show that under the low temperature stress, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-PX) and heat shock protein content gradually increased in the beginning and then decreased. The antioxidant enzyme activity of the 10 °C test group reached the maximum at 12 h, the SOD and CAT activities returned to the normal level after 24 h, and GSH-PX returned to the normal level at 18 h ($P > 0.05$). In the 5 °C test group, the SOD and CAT activities reached the maximal value at 6 h, GSH-PX reached the maximal value at 18h, but there were still significant differences between the test group and the control group at 24 h ($P < 0.01$). The activities of SOD, CAT and GSH-PX were respectively back to the control group level at 12 h, 12 h and 6 h of recovery (Fig. 1 - 3). The heat shock protein content of the two test groups reached the maximum at 18 h, and the 10 °C test group returned to a normal level at 24 h ($P > 0.05$), but the heat shock protein content of the 5 °C test group didn't return to a normal level until the end of the recovery experiment ($P < 0.05$, Fig.4). The results of this experiment show that the activities of SOD, CAT, GSH-PX and content of heat shock protein are largely affected by the acute low temperature stress, and the regular changes of the above enzymes and protein show that they are involved in low temperature stress response and physiological function adjustment to adapt to environmental changes, reducing the acute low temperature damage to the fish body, which also enables the fish to survive during sudden environmental changes. Only within the range of self-regulation, the Black Porgy can make a new physiological balance to adapt to the low temperature with the extension of stress time. Therefore, during the Black Porgy breeding process, it should be noted that the water temperature should not be lower than 5 °C; when the water temperature is too low, it should be moved into the room as soon as possible to avoid the damage of sudden water temperature drop.

Key words: Black Porgy, *Acanthopagrus schlegelii*; Acute low temperature stress; Antioxidant enzymes; Heat shock protein

黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*), 隶属鲈形目 (Perciformes) 鲷科 (Sparidae) 棘鲷属 (吴仁协等 2011), 是暖温性底栖鱼类, 广泛分布在我国沿海, 喜栖息于砂泥底或多岩礁的环境, 是我国沿海养殖的重要海水经济鱼类 (徐恭昭等 1987)。在养殖过程中, 由于季节更替、气候异常变化如冬季寒潮等多种原因导致水温出现季节性或突发性的温度骤变, 而水温的骤降 (急性低温) 使鱼体内环境的稳态被打破, 对

黑鲷造成一定程度上的低温胁迫, 甚至导致养殖黑鲷的大量死亡, 造成巨大的经济损失 (Engelsma et al. 2003)。同时, 由于黑鲷生长速度慢且不耐低温, 在江苏地区养殖需要进行两次室内越冬, 提高了养殖成本, 限制黑鲷养殖产业发展。因此, 解析急性低温对黑鲷生理机能的影响和选育耐低温的养殖黑鲷品种具有重要意义。

鱼类作为变温动物, 水温对其有直接或间

接作用,影响鱼类生理活动和行为特征等。低温刺激将引起机体的冷应激,低温胁迫下,鱼类通过不同的生理调节方式来适应低温环境,一旦自身的调节系统不足以使机体的内环境再一次达到平衡,将造成鱼类自身调节系统衰竭,从而引起致死性损伤(宁军号等 2017)。冷应激和不能适应是导致鱼类越冬死亡的主要原因之一,每年冬季都有大量的养殖鱼类死亡(Cheng et al. 2005, Fetzer et al. 2011)。从生理生化层次上探究低温胁迫下鱼类应答标志物的变化并解析其低温适应机制,是研究鱼类耐低温机制的重要手段之一,而其中的抗氧化酶和热休克蛋白(heat shock protein, Hsp)常被作为鱼类低温胁迫应答的标志物。如宋志明等(2015)发现,低温胁迫使点篮子鱼(*Siganus guttatus*)幼鱼肝抗氧化酶活性上调;罗胜玉等(2017)对黄姑鱼(*Nibea albiflora*)的低温应答机制研究中发现,抗氧化酶和 Hsp70 蛋白含量均显著上升;刘奇奇(2017)在急性低温对四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)幼鱼抗氧化系统影响的研究中也出现了相同的结果。

关于黑鲟对急性低温胁迫适应机制的研究涉及较少,因此本文通过研究急性低温胁迫下,黑鲟肝的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)三种抗氧化酶和热休克蛋白的变化趋势,探究急性低温处理对黑鲟生理机能的影响,为探究黑鲟对急性低温的适应机制和科学养殖提供必要的理论依据与数据支持,为黑鲟的耐低温品种选育奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用鱼来源于 2019 年 3 月江苏省海洋水产研究所吕四养殖基地,为 1 龄黑鲟,体长为 (15.5 ± 1.4) cm、体重 (105.31 ± 13.15) g,共计 300 条。暂养在长 \times 宽 \times 高为 $3.9 \text{ m} \times 2.6 \text{ m} \times 0.9 \text{ m}$ 的长条水泥池中,暂养水温为

$15 \text{ }^\circ\text{C}$,溶氧 $\geq 6 \text{ mg/L}$,24 h 连续充氧,2 d 换水一次,换水量为 1/2,每日饱食投喂一次。实验开始前 1 d 停止投喂。暂养两周后,随机挑选健康黑鲟 270 尾进行实验。

1.2 实验方法

在预实验中发现,黑鲟从 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 转移至 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 后,在短时间内出现死亡,而移至 $5 \text{ }^\circ\text{C}$ 的黑鲟并未出现死亡,实验时正常水温为 $15 \text{ }^\circ\text{C}$,因此设置 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $10 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 个水温梯度,每个梯度设 3 个平行组。每个平行组为一个实验桶,实验桶容积 300 L,每组放置黑鲟 30 尾。先将黑鲟用网拦截在暂养池角落,待水温用循环水系统的制冷机调节至预设温度后,迅速将黑鲟从暂养池中转入实验桶,通过水温的骤降对其进行急性低温胁迫,并在 1 h、6 h、12 h、18 h、24 h 时取样。低温胁迫 24 h 后,分别转入水温 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 的不同实验桶中进行恢复,并在恢复 1 h、6 h、12 h、24 h、48 h 时取样,每个平行组各取样 1 尾。 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 为对照组,虽然在实验过程中水温没有变化,为了避免人为操作对实验造成误差,对照组与实验组同时进行转鱼的操作过程。实验期间,水温温差维持在 $\pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$,24 h 连续充气。取样前先用 MS-222 将黑鲟快速麻醉后解剖,取其肝放置于 1.5 ml 离心管中,液氮快速冷冻,然后置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

1.3 样品测定

蛋白含量、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性测定均使用南京建成生物工程研究所的试剂盒,热休克蛋白含量采用江苏晶美生物科技有限公司的试剂盒,测定具体操作步骤参照说明书。

超氧化物歧化酶活力单位定义:在本反应体系中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的酶量为一个 SOD 活力单位(U)。

过氧化氢酶活力单位定义:每毫克组织蛋白每秒钟分解 $1 \text{ } \mu\text{mol}$ 的 H_2O_2 的量为一个活力单位(U)。

谷胱甘肽过氧化物酶活力单位定义:每毫

克蛋白质, 每分钟扣除非酶反应的作用, 使反应体系中的还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)浓度降低 $1 \mu\text{mol/L}$ 为一个酶活力单位 (U)。

热休克蛋白含量单位为 ng/L 。

1.4 数据分析

实验数据采用 SPSS22.0 中的单因素方差分析 (One-way-ANOVA) 和 Duncan 检验, 进行多重比较和显著性分析, 设置 $P < 0.05$ 时为差异显著。Excel 2010 软件进行作图, 结果均以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 黑鲷肝抗氧化酶活力变化

胁迫实验和恢复实验过程中的超氧化物歧化酶活力变化见图 1, 胁迫温度和胁迫持续时间对超氧化物歧化酶活性有显著影响。15 °C 对照组的超氧化物歧化酶活性在不同时间波动, 且各个时间点之间无显著差异 ($P > 0.05$)。5 °C

和 10 °C 处理组均呈现先上升后下降的趋势。10 °C 处理组在 12 h 达到最大值, 在 24 h 基本与对照组相同, 在 12 h 和 18 h, 10 °C 处理组的超氧化物歧化酶活性略高于 5 °C 处理组, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。5 °C 处理组在 6 h 达到最大值, 但直到胁迫实验结束, 仍高于 15 °C 对照组, 且与 15 °C 和 10 °C 处理组均有显著差异 ($P < 0.05$)。在恢复实验中, 10 °C 和 5 °C 处理组的超氧化物歧化酶活力与胁迫 24 h 时相比, 在恢复 1 h 均显著上升且为最大值, 5 °C 处理组的超氧化物歧化酶活性远高于 15 °C 和 10 °C 组, 且逐渐下降至恢复 12 h 后与对照组相同, 10 °C 则在 6 h 已经与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。

黑鲷肝在不同处理组中的过氧化氢酶活性变化见图 2。在胁迫实验和恢复实验中, 15 °C 对照组呈现无显著性差异的波动变化 ($P > 0.05$), 而 10 °C 和 5 °C 处理组的过氧化氢酶活

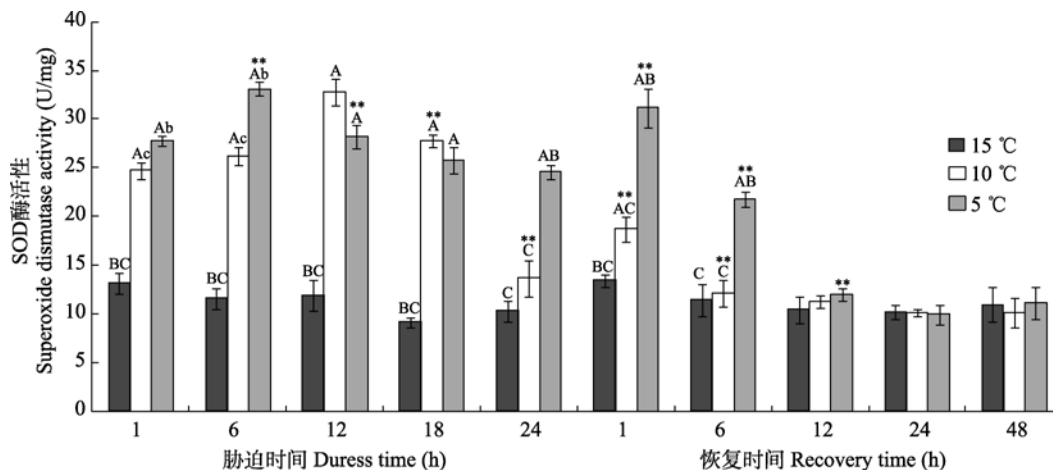


图 1 低温胁迫对黑鲷肝超氧化物歧化酶 (SOD) 活力的影响

Fig. 1 The effects of low temperature stress on activities of superoxide dismutase (SOD) in liver of black porgy

字母表示在相同时间的不同处理组之间存在显著差异, 字母 A 表示是与 15 °C 处理组比较的结果, 字母 B 表示是与 10 °C 处理组比较的结果, 字母 C 表示是与 5 °C 处理组比较的结果, 差异显著为小写 ($P < 0.05$), 差异极显著为大写 ($P < 0.01$); 星号表示同一处理组, 不同时间点与其上一时间点之间酶活性比较结果, * 为显著性差异 ($P < 0.05$), ** 为极显著性差异 ($P < 0.01$)。

Different letters indicate significant differences at the same time of different temperature groups. The letter A indicates the comparison with the 15 °C group, the letter B indicates the comparison with the 10 °C group, and the letter C indicates the comparison with the 5 °C group. The lower case show significant difference ($P < 0.05$), and the upper case shows extremely significant difference ($P < 0.01$). The asterisk means the comparison of enzyme activity between different time points and the previous time point in the same treatment group. The * shows significant difference ($P < 0.05$), and the ** shows extremely significant difference ($P < 0.01$).

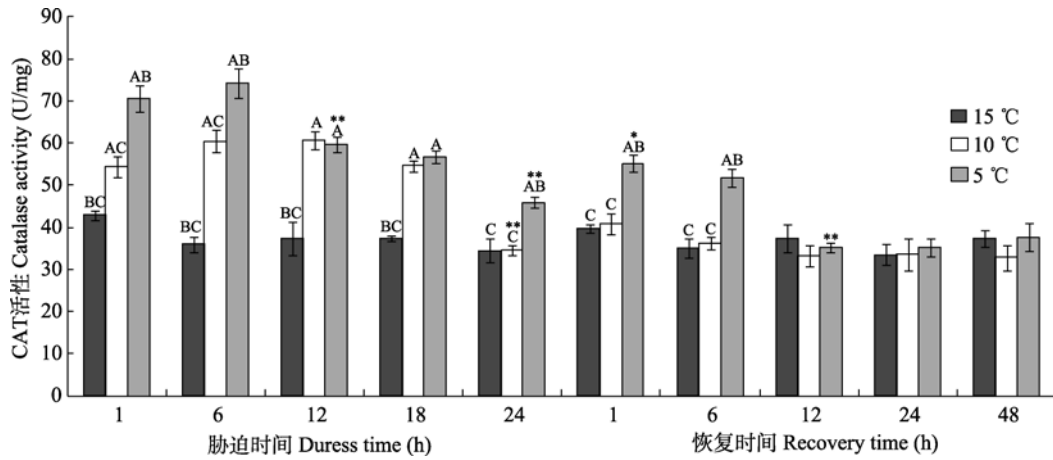


图2 低温胁迫对黑鲷肝过氧化氢酶（CAT）活力的影响

Fig. 2 The effects of low temperature stress on activities of catalase (CAT) in liver of black porgy

字母表示在相同时间的不同处理组之间存在显著差异，字母 A 表示是与 15 °C 处理组比较的结果，字母 B 表示是与 10 °C 处理组比较的结果，字母 C 表示是与 5 °C 处理组比较的结果，差异显著为小写 ($P < 0.05$)，差异极显著为大写 ($P < 0.01$)；星号表示同一处理组，不同时间点与其上一时间点之间酶活性比较结果，* 为显著性差异 ($P < 0.05$)，** 为极显著差异 ($P < 0.01$)。

Different letters indicate significant differences at the same time of different temperature groups. The letter A indicates the comparison with the 15 °C group, the letter B indicates the comparison with the 10 °C group, and the letter C indicates the comparison with the 5 °C group. The lower case shows significant difference ($P < 0.05$), and the upper case shows extremely significant difference ($P < 0.01$). The asterisk means the comparison of enzyme activity between different time points and the previous time point in the same treatment group. The * shows significant difference ($P < 0.05$), and the ** show extremely significant difference ($P < 0.01$).

性整体上皆呈现先上升后下降的趋势。10 °C 处理组在胁迫 12 h 达到最高值，但与胁迫 6 h 的过氧化氢酶活性基本相同，在胁迫 24 h 时，过氧化氢酶活性与对照组一致；而 5 °C 处理组的过氧化氢酶活性在胁迫 6 h 达到最大，且在胁迫 12 h 和胁迫 18 h 与 10 °C 处理组的酶活值在同一水平，但在胁迫实验结束时，过氧化氢酶活性仍显著高于 15 °C 和 10 °C 组 ($P < 0.05$)。在恢复实验中，10 °C 处理组虽然在恢复 12 h 和恢复 48 h 低于对照组，但仍在同一水平；而 5 °C 处理组在恢复 1 h 的过氧化氢酶活性也远高于 15 °C 和 10 °C 组 ($P < 0.05$) 且为最大值，在解除胁迫 12 h 恢复对照组水平但略低于对照组。

经过不同处理后，15 °C、10 °C 和 5 °C 处理组的谷胱甘肽过氧化物酶的活力变化见图 3。在胁迫与恢复实验中，对照组的谷胱甘肽过氧化物酶的活性在波动变化但无差异 ($P >$

0.05)，而 10 °C 和 5 °C 处理组的谷胱甘肽过氧化物酶与超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性相似，趋势均为单峰。在胁迫实验中，10 °C 和 5 °C 处理组的谷胱甘肽过氧化物酶活性与对照组相比，均在胁迫 6 h 开始显著上升，但 10 °C 处理组在胁迫 12 h 的谷胱甘肽过氧化物酶活性已经恢复在对照组的水平 ($P > 0.05$)，而 5 °C 处理组直到胁迫结束，仍与 15 °C 和 10 °C 组有较大差异 ($P < 0.05$)；而在恢复实验中，10 °C 处理组的谷胱甘肽过氧化物酶活性也呈波动变化，且与对照组无差异；5 °C 处理组的谷胱甘肽过氧化物酶的活性在恢复 1 h 时达到最高，且比胁迫 24 h 活性高，但在 6 h 已经恢复到对照组水平。

2.2 黑鲷肝热休克蛋白含量变化

不同低温胁迫强度对黑鲷肝热休克蛋白含量的影响见图 4。在胁迫实验和恢复实验中，对照组的热休克蛋白含量无显著性差异 ($P > 0.05$)。在胁迫实验中，10 °C 和 5 °C 处理组的

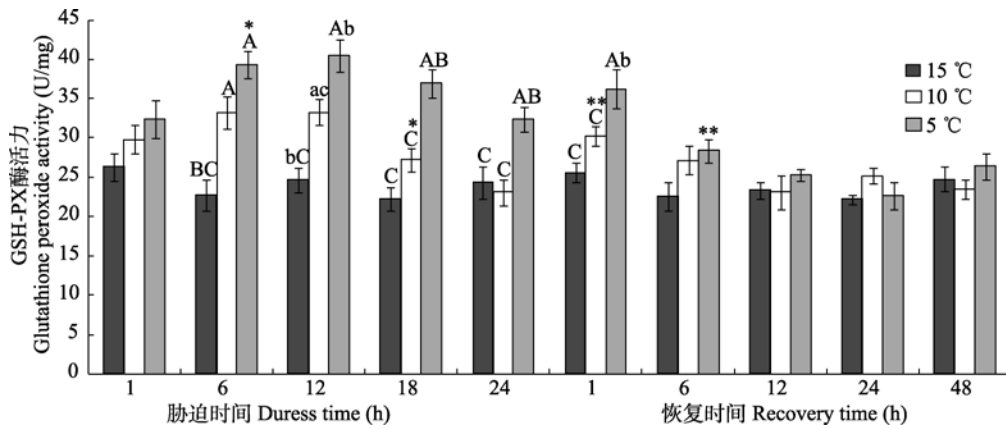


图 3 低温胁迫对黑鲷肝谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活力的影响

Fig. 3 The effects of low temperature stress on activities of glutathione peroxidase (GSH-PX) in liver of black porgy

字母表示在相同时间的不同处理组之间存在显著差异, 字母 A 表示是与 15 °C 处理组比较的结果, 字母 B 表示是与 10 °C 处理组比较的结果, 字母 C 表示是与 5 °C 处理组比较的结果, 差异显著为小写 ($P < 0.05$), 差异极显著为大写 ($P < 0.01$); 星号表示同一处理组, 不同时间点与其上一时间点之间酶活性比较结果, * 为显著性差异 ($P < 0.05$), ** 为极显著差异 ($P < 0.01$).

Different letters indicate significant differences at the same time of different temperature groups. The letter A indicates the comparison with the 15 °C group, the letter B indicates the comparison with the 10 °C group, and the letter C indicates the comparison with the 5 °C group. The lower case shows significant difference ($P < 0.05$), and the upper case shows extremely significant difference ($P < 0.01$). The asterisk means the comparison of enzyme activity between different time points and the previous time point in the same treatment group. The * shows significant difference ($P < 0.05$), and the ** shows extremely significant difference ($P < 0.01$).

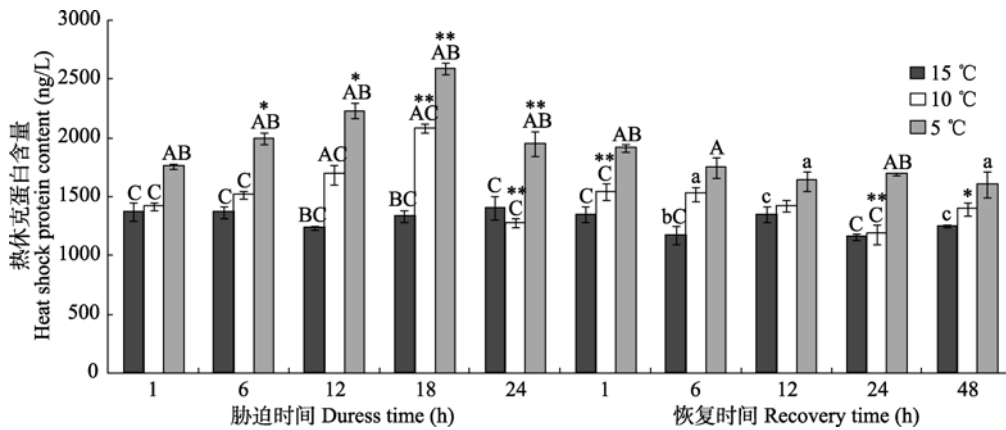


图 4 低温胁迫对黑鲷肝热休克蛋白含量的影响

Fig. 4 The effects of low temperature stress on the content of heat shock protein in liver of black porgy

字母表示在相同时间的不同处理组之间存在显著差异, 字母 A 表示是与 15 °C 处理组比较的结果, 字母 B 表示是与 10 °C 处理组比较的结果, 字母 C 表示是与 5 °C 处理组比较的结果, 差异显著为小写 ($P < 0.05$), 差异极显著为大写 ($P < 0.01$); 星号表示同一处理组, 不同时间点与其上一时间点之间热休克蛋白含量比较结果, * 为显著性差异 ($P < 0.05$), ** 为极显著差异 ($P < 0.01$).

Different letters indicate significant differences at the same time of different temperature groups. The letter A indicates the comparison with the 15 °C group, the letter B indicates the comparison with the 10 °C group, and the letter C indicates the comparison with the 5 °C group. The lower case shows significant difference ($P < 0.05$), and the upper case shows extremely significant difference ($P < 0.01$). The asterisk means the content of heat shock protein between different time points and the previous time point in the same treatment group. The * shows significant difference ($P < 0.05$), and the ** shows extremely significant difference ($P < 0.01$).

热休克蛋白含量均逐渐上升到 18 h 后开始下降, 到 24 h 时, 10 °C 处理组已经与对照组无差异 ($P > 0.05$), 而 5 °C 处理组仍显著高于 15 °C 和 10 °C 组 ($P < 0.05$)。在恢复实验中, 10 °C 处理组的热休克蛋白含量略有上升后, 在 12 h 时恢复到正常水平后波动变化但无显著性差异 ($P > 0.05$), 5 °C 处理组的热休克蛋白含量下降缓慢至 12 h 后在同一水平波动变化 ($P > 0.05$), 但直到恢复实验结束, 仍与显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 低温胁迫对黑鲟抗氧化酶活性的影响

在正常生命活动中, 虽然鱼类的体内持续不断产生少量自由基, 但不会导致活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 过多, 而引起脂膜过氧化反应, 因为体内的抗氧化酶系统亦不停将其清除, 会使其维持在一个较低的水平, 避免自由基对鱼体组织造成损伤 (Pascual et al. 2003, Martínez-Álvarez et al. 2005)。在抗氧化酶系统中, 超氧化物歧化酶和过氧化氢酶是抗氧化酶系统清除自由基的关键酶类物质 (Parihar et al. 1997)。过量的自由基在超氧化物歧化酶催化作用下转化为 O_2 和 H_2O_2 , 过氧化氢酶接下来进一步处理, 将 H_2O_2 还原成 O_2 和 H_2O , 从而将体内过量的自由基清除。而谷胱甘肽过氧化物酶作为抗氧化性系统的一部分, 其功能类似于过氧化氢酶, 通过特异性催化还原型谷胱甘肽与 H_2O_2 反应, 将 H_2O_2 转化为无害的 H_2O (Nordberg et al. 2001)。有研究表明, 谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶以相互补充和存在一定竞争关系共同在抗氧化酶系统中发挥作用 (Wang et al. 2008)。本研究中, 超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性在胁迫实验中急剧上升, 与四指马鲛 (刘奇奇 2017)、驼背鲈 (*Cromileptes altivelis* ♀) × 鞍带石斑鱼 (*Epinephelus lanceolatus* ♂) 杂交子代 (刘玲等 2018)、齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*) (郭鹤 2019)

等的研究结果一致。说明低温胁迫会刺激鱼体产生大量自由基, 抗氧化酶系统随即参与到黑鲟适应急性低温的过程中, 随着体内自由基数量的变化发生相应的变化, 减少自由基对组织的损伤, 尽可能使其在适应急剧的环境变化之前能存活。低温胁迫的温度越低胁迫压力越大, 黑鲟所产生的反应越剧烈, 需要的适应时间越长。5 °C 和 10 °C 组的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性从一开始就显著上升, 且 5 °C 组的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性上升的速度与幅度明显高于对照组和 10 °C 组。在胁迫 12 h 和胁迫 18 h 时超氧化物歧化酶活力 5 °C 组低于 10 °C 组, 其原因是 5 °C 组的拐点早于 10 °C 组, 当其处于下降趋势时, 10 °C 组仍是上升, 说明 5 °C 组较 10 °C 组更早出现开始适应低温胁迫的迹象。10 °C 处理组在胁迫结束前的抗氧化酶活性已经恢复到对照组水平, 说明该处理组的黑鲟通过自身调节, 体内的新陈代谢已经再次平衡, 适应了环境的变化。而 5 °C 处理组的抗氧化酶活性在胁迫实验中虽然未恢复到对照组水平, 但已经明显呈现出缓慢下降的趋势, 说明 5 °C 组黑鲟逐步适应该温度, 但由于胁迫的压力较 10 °C 组大, 因此需要更多的时间。

3 个温度组在恢复 1 h 时, 超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性均有不同幅度上升, 应当是由于转鱼操作引起的应激, 但由于 5 °C 组和 10 °C 组转鱼前后的水温差不同, 应激程度比 15 °C 对照组更大, 温差越大应激反应越大, 适应环境变化所需要的时间更长, 随后 3 组黑鲟再次重新适应当前环境, 抗氧化酶系统也先后恢复到正常水平。在恢复实验中, 5 °C 组的超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活力拐点滞后于 10 °C 组, 也说明了这一情况, 这一结果与管敏等 (2018) 对史氏鲟 (*Acipenser schrenckii*) 的研究结果相似。直到实验结束, 3 组黑鲟都没有出现死亡, 且 3 种抗氧化酶都恢复正常水平, 说明 5 °C 和 10 °C 的低温胁迫没有对黑鲟组织造成不可逆的损伤。

3.2 低温胁迫对热休克蛋白含量的影响

热休克蛋白又称应激蛋白, 当生物体对外界刺激产生应激时, 各种应激均会诱导热休克蛋白产生 (Bond et al. 1987)。应激状态引起的自由基增多可作为应激原, 诱导鱼体产生热休克蛋白, 热休克蛋白水平的上调可以提高抗氧化酶水平, 清除鱼体内因应激产生的过量自由基, 应对应激对机体产生的不利影响, 从而达到保护鱼体的目的 (Yamamoto et al. 1998)。因此, 热休克蛋白也常作为检测指标, 其反映了机体产生应激反应时自身的抗应激能力及细胞功能的状态。在本研究测定了黑鲷在急性低温胁迫与解除胁迫后的热休克蛋白含量, 其含量随着低温胁迫温度和胁迫时间显著变化, 胁迫强度越大, 热休克蛋白含量增加越明显, 表明低温胁迫诱导黑鲷的热休克蛋白产生 (Kai et al. 2017)。5 °C 和 10 °C 两个胁迫组的黑鲷肝中的热休克蛋白含量均在胁迫 18 h 内迅速上升, 与罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) (王美垚 2009)、达氏鳢 (*Huso dauricus*) (彭国干 2015)、黄姑鱼 (罗胜玉等 2017) 等的研究结果一致。黑鲷肝热休克蛋白含量的提高, 可能与黑鲷受低温刺激诱导热休克蛋白合成来提高鱼体的耐受能力有关, 是当外界环境变化时, 黑鲷在生理上的一种自主适应调节方式。随着胁迫时间的延长, 10 °C 胁迫组在胁迫 24 h 下降到正常水平, 表明鱼体在受到低温刺激后, 在 24 h 内能建立起新的代谢平衡。5 °C 胁迫组虽然未能在 24 h 内恢复到正常水平, 但有明显的下调趋势, 说明该组黑鲷开始初步适应环境的变化, 但由于胁迫压力较大, 因此需要更多的时间调节与平衡体内的代谢活动。

解除胁迫后, 由于转鱼操作和水温的变化双重作用, 胁迫组的热休克蛋白含量略有上升, 随即重新调整体内的代谢平衡, 重新适应新环境后恢复正常水平, 与吉富罗非鱼的研究结果一致 (王美垚 2009)。由于机体的内环境是动态平衡的, 所以 5 °C 胁迫组在恢复实验的热休克蛋白含量下降趋势较平缓时, 在体内热休克

蛋白含量波动下调的影响下, 导致个别时间点的热休克蛋白含量稍高于前一个时间点。因此, 在解除胁迫 6 h 后热休克蛋白含量变化未能明显表现出下降趋势。但 5 °C 胁迫组的超氧化物歧化酶、过氧化氢酶与谷胱甘肽过氧化物酶在恢复 12 h 都已经恢复到正常水平, 而热休克蛋白仍与对照组有显著性差异 ($P < 0.05$), 可能是因为热休克蛋白除了可以调节抗氧化酶外, 还存在其他调节机体适应环境变化的途径 (樊欣等 2019)。但是本研究仅从急性低温胁迫对黑鲷的热休克蛋白含量的影响进行了探究, 因此对低温胁迫下, 黑鲷热休克蛋白的全面调节方式还需要进一步的研究。

参 考 文 献

- Bond U, Schlesinger M J. 1987. Heat shock Proteins and development. *Advance in Genetics*, 24: 1–29.
- Cheng H L, Xia D Q, Wu T T. 2005. Advancement in research one effect of nutrition on cold resistance in fish. *Fisheries Science*, 24(9): 41–44.
- Engelsma M Y, Hougee S, Nap D, et al. 2003. Multiple acute temperature stress affects leucocyte population and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish & Shellfish Immunology*, 15(5): 397–410.
- Fetzer W W, Brooking T E, Jackson J R, et al. 2011. Overwinter mortality of gizzard shad: Evaluation of starvation and cold temperature stress. *Transactions American Fisheries Society*, 140(6): 1460–1471.
- Kai L, Xia C, Liu W, et al. 2017. Characterization of heat shock protein 70 transcript from *Nilaparvata lugens* (Stål): Its response to temperature and insecticide stresses. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 142: 102–110.
- Martínez-Álvarez R M, Morales A E, Sanz A. 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15(1): 75–88.
- Nordberg J, Arnér E S J. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11): 1287–1312.
- Parihar M S, Javeri T, Hemnani T, et al. 1997. Responses of

- superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *Journal of Thermal Biology*, 22(2): 151–156.
- Pascual P, Pedrajas J R, Toribio F, et al. 2003. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chemico-Biological Interactions*, 145(2): 191.
- Wang W N, Wu J, Su S J. 2008. Effects of salinity stress on antioxidant enzymes of *Penaeus monodon* of two different life stages. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 148(4): 466.
- Yamamoto Y, Kume M, Yamaoka Y. 1998. Implications of heat shock proteins during liver surgery and liver perfusion. *Recent Results in Cancer*, 147: 157–172.
- 管敏, 张厚本, 王龙, 等. 2018. 急性低温胁迫对史氏鲟幼鱼抗氧化和免疫指标的影响. *淡水渔业*, 48(6): 17–22.
- 郭鹤. 2019. 温度驯化对齐口裂腹鱼热耐受和生长代谢的影响. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 13–22.
- 樊欣, 彭仁. 2019. 热休克蛋白 70: 生物学功能与作用机制研究进展. *生命科学*, 31(3): 270–278.
- 刘奇奇. 2017. 操作及低温胁迫对四指马鲛幼鱼组织结构和抗氧化系统的影响. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 41–58.
- 罗胜玉, 徐冬冬, 楼宝, 等. 2017. 低温胁迫对黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 抗氧化酶、Na⁺/K⁺-ATP 酶及 Hsp70 蛋白含量的影响. *海洋通报*, 36(2): 189–194.
- 刘玲, 陈超, 李炎璐, 等. 2018. 短期温度胁迫对驼背鲈(♀) × 鞍带石斑鱼(♂) 杂交子代幼鱼抗氧化及消化酶活性的影响. *渔业科学进展*, 39(2): 59–66.
- 宁军号, 秦宇博, 胡伦超, 等. 2017. 水温骤降和缓降胁迫对褐篮子鱼血液生理生化指标的影响. *大连海洋大学学报*, 32(3): 294–301.
- 彭国干. 2015. 达氏鳢热休克蛋白 70 和 90 基因的克隆及其对温盐胁迫的响应. 大连: 大连海洋大学硕士学位论文, 50–53.
- 宋志明, 刘鉴毅, 庄平, 等. 2015. 低温胁迫对点篮子鱼幼鱼肝脏抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响. *海洋渔业*, 37(2): 142–150.
- 王美垚. 2009. 急性低温胁迫及恢复对吉富罗非鱼血清生化、免疫以及应激蛋白 Hsp70 基因表达的影响. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 32–40.
- 吴仁协, 刘静, 樊冀蓉, 等. 2011. 黑棘鲷的命名和分类地位探究. *海洋科学*, 35(5): 117–119.
- 徐恭昭, 郑澄伟. 1987. 海产鱼类养殖与增殖. 济南: 山东科学技术出版社, 348–350.