

## 氨氮急性胁迫及其毒后恢复对红螯光壳螯虾幼虾 相关免疫和代谢指标的影响

蒋琦辰<sup>1</sup>, 顾曙余<sup>1</sup>, 张文逸<sup>1</sup>, 张呈祥<sup>2</sup>, 冯晓庆<sup>1</sup>,  
谭红月<sup>1</sup>, 杨家新<sup>1\*</sup>, 黄文婷<sup>1</sup>, 李 枫<sup>3</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023;

2. 江阴市水产指导站, 江苏 江阴 214400;

3. 浙江省淡水水产研究所, 浙江 湖州 313001)

**摘要:** 应用实时荧光定量 PCR 技术, 结合生物酶和代谢产物测定, 研究了氨氮急性胁迫对红螯光壳螯虾幼虾代谢及免疫系统的毒性影响及其毒后恢复情况。实验首先进行 3 d 的氨氮胁迫, 取样后剩余虾移入曝气自来水进行 7 d 的毒后恢复实验。结果表明, 3 d 氨氮胁迫后, 肌肉 ACP、AKP、SOD 活性表达均受到显著影响, 随着氨氮浓度的升高酶活性分别降低, 最高浓度组 (16 mg/L) 降低为对照组的 76%、68% 和 62%。线粒体 MnSOD、胞外 Cu/ZnSOD 的 mRNA 表达量也随着氨氮浓度增加而下降, 最高浓度组降低至对照组的 69% 和 68%。CAT、GPX 活性以及 GPX 和 GST 的 mRNA 表达量变化不显著。肝胰腺中可溶性蛋白和甘油三酯含量随着氨氮浓度升高而降低, 最高浓度组分别降低至对照组的 72% 和 59%, AST 活性在 12 mg/L 浓度组显著升高至对照组的 134%。7 d 恢复期过后, ACP 和 AKP 活性以及各代谢指标恢复到正常水平; 而 SOD 和 GPX 活性高于对照组。各抗氧化基因的表达量都不同程度高于对照组。实验表明, 高浓度氨氮胁迫能抑制部分免疫相关酶的活性及基因表达, 对免疫系统造成损害。氨氮胁迫下, 红螯光壳螯虾动员蛋白质和脂肪来供能应对胁迫。7 d 的恢复时间不足以让红螯光壳螯虾从胁迫中完全恢复, 其肌肉仍处于轻度氧化应激状态。

**关键词:** 红螯光壳螯虾; 氨氮; 胁迫; 免疫; 基因表达; 代谢

**中图分类号:** Q 178.1; S 917.4

**文献标志码:** A

红螯光壳螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 原产于澳大利亚, 俗称澳洲淡水龙虾, 隶属于甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、拟螯虾科 (Parastacidae)、光壳虾属 (*Cherax*)。红螯光壳螯虾个体大, 生长快, 当年苗种人工养殖 4~6 个月即可达到 60~180 g, 同时肉质鲜美、出肉率高, 因此具有广泛的养殖前景<sup>[1]</sup>。

氨氮是水产养殖系统中最常见的污染物。养殖密度过大, 投饵过多, 滥用杀菌剂等问题都易使水体中的代谢产物、有机物含量剧增, 造成氨氮的不断累积, 进而对水生动物产生毒害作用<sup>[2-3]</sup>。

已有大量研究证实, 氨氮胁迫能致使水生动物免疫力下降, 代谢机能紊乱, 病原的敏感性提高, 直接或间接地影响其生长, 并最终影响产量<sup>[2,4]</sup>。研究氨氮对水产动物的胁迫及其毒后恢复情况, 有助于预防氨氮毒性作用对产量的负面影响。目前研究氨氮胁迫对甲壳动物免疫和代谢系统的影响已有不少文献报道, 但大都侧重于免疫系统相关酶活性的影响, 有关氨氮对甲壳动物免疫基因转录水平的毒性影响以及氨氮胁迫后的恢复情况, 国内外报道较少。因此, 实验以红螯光壳螯虾为实验对象, 研究了氨氮急性胁迫及毒后恢复对

收稿日期: 2013-01-25 修回日期: 2013-03-31

资助项目: 江苏省水产三项工程项目 (K2007-4); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目 (CXZZ11\_0885, CXZZ11\_0887); 国家基础科学人才培养基金 (J1103507)

通信作者: 杨家新, E-mail: yangjx@njnu.edu.cn

其免疫和代谢相关指标及免疫基因表达的影响,旨在探讨氨氮对红螯光壳螯虾的毒害机制,为红螯光壳螯虾的健康养殖提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验用虾购自浙江省湖州淡水水产研究所,在室内可控水循环系统(由大连汇新设备开发有限公司制造)中驯养 3 周,24 h 不间断微充氧,循环过滤,紫外杀菌,水温(26 ± 0.5)℃。每日日投饵为虾体质量的 5%,9:00 和 17:00 分别投喂当日投饵量的 40% 和 60%。驯养结束后,挑选个体健康,附肢完整且反应灵敏的红螯光壳螯虾幼虾,体质量(15 ± 2)g。正式实验开始前 24 h 停止喂食,实验过程中不进行任何投喂。在玻璃缸水槽中养殖实验,每组 3 个平行,每个平行放入 9 只虾。所用水为 2 d 曝气自来水,不进行充气,溶解氧浓度 5.0 mg/L 左右,水温(26 ± 0.5)℃,pH 为 7.5 ± 0.5。氨氮质量浓度通过 10 g/L NH<sub>4</sub>Cl 母液进行调节。根据 96 h 半致死浓度<sup>[5]</sup>,实验共设置 4 个浓度组(总氨氮 TAN = 4、8、12 和 16 mg/L)和 1 个对照组。在实验过程中,每隔 8 小时用奈氏试剂法测定并调整氨氮浓度,每隔 24 小时更新全部实验溶液。3 d 后每组各取出 3 只虾,冰上解剖,取其腹部肌肉存于 -70℃ 冰箱备用。同时各组溶液都更换为曝气自来水,并恢复投饵。7 d 后,再次取样,方法同上。

### 1.2 免疫和代谢相关酶活和物质含量的测定

取出冰冻肌肉,按照 1:10 的比例与生理盐水混合匀浆,3 500 r/min 离心后取上清,进行酶活和代谢产物测定。酸性磷酸酶 ACP(U/mg prot)、碱性磷酸酶 AKP(U/mg prot)、总超氧化物歧化酶 SOD(U/mg prot)、过氧化氢酶 CAT(U/mg prot)、谷胱甘肽过氧化物酶 GPX(U/mg prot)、谷丙转氨酶 ALT(U/mg prot)、谷草转氨酶 AST(U/mg prot)活力及甘油三酯(mg/L)、胆固醇(mg/L)、尿素(mg/L)、蛋白质含量(mg/L)用南京建成公司试剂盒测定,测定方法及单位参照试剂盒说明书。

### 1.3 RNA 的提取

用 RNAiso Plus(TaKaRa)提取红螯光壳螯虾肌肉部分的 RNA,以生物分光光度计测定 RNA 浓度,以总 RNA 为模板,应用 PrimeScript™ RT

试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA,合成的 cDNA 存于 -20℃ 备用。

### 1.4 免疫相关基因的表达分析

根据红螯光壳螯虾免疫相关基因的 cDNA 设计目的基因引物和内参基因引物(表 1),按照 SYBR Premix Ex Taq™(TaKaRa)试剂盒进行 Real-time PCR 分析,20 μL 体系中包括:SYBR Green 10 μL、上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL、ddH<sub>2</sub>O 8 μL。反应条件为 95℃ 30 s 1 循环,95℃ 5 s,50℃ 30 s 40 循环,每个样品重复 3 次。结果采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>计算方法<sup>[6]</sup>。

表 1 实验中用到的引物及其序列  
Tab.1 Primers used in the present study

引物 gene	引物序列(5'-3') sequences
<i>β-actin</i>	F: ATCACTGCTCTGGCTCCTGCTACC R: CGGACTCGTCGTACTCCTCCTTGG
cMnSOD (胞质)	F: CTGCAGCCAGTGTGGAGTGAA R: AAGGGAATCAGACCGTGAGTGATC
mMnSOD (线粒体)	F: CGCTCGCTCCGCGATTGGTTG R: TGGTGGTGTGGAGTGATGCAGTTG
exCu/ZnSOD (胞外)	F: GTTAGCGGCAGACTGGAACCTCTAC R: CAGCGTGGCGTTCTAAGTCATAGG
GPX	F: GTGAACGGCATCAATGAGAACAA R: GGCTTGCCATTCTACCGATTA
GST	F: GATTATGATGAGCCATTCGG R: CGCCTTCTGTTCCTGCGTTA

### 1.5 数据分析

实验数据用 Microsoft Excel 作初步处理,SPSS 软件包(版本 16.0)进行处理。单因素方差分析(One-Way ANOVA)后,采用 Duncan 氏多重比较法检验组间差异( $P < 0.05$ )。所测结果以 3 个平行组数据的平均值 ± 标准误(mean ± SE)表示。

## 2 结果

### 2.1 氨氮急性胁迫及其毒后恢复对红螯光壳螯虾免疫相关酶活的影响

氨氮胁迫 3 d 后,肌肉 ACP 和 AKP 活性发生显著变化( $P < 0.05$ )。ACP 和 AKP 随着氨氮浓度的升高而降低。在 12 mg/L 浓度组,ACP 显著低于对照组( $P < 0.05$ );在 16 mg/L 浓度组,ACP 和 AKP 活性均显著降低为对照组的 76% 和 68% ( $P < 0.05$ )。经过 7 d 的恢复时间,各浓度组肌肉中 ACP 和 AKP 活性都恢复到正常水平。3 d 后,

氨氮胁迫对肌肉总 SOD 活性具有显著影响 ( $P < 0.05$ )。8、12 和 16 mg/L 浓度组的总 SOD 活性显著低于 4 mg/L 浓度组和对照组 ( $P < 0.05$ )。氨氮胁迫对 CAT 和 GPX 的活性影响不显著。

7 d 恢复后,受过氨氮胁迫的各组,总 SOD 活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),GPX 活性也有一定程度升高 ( $P < 0.05$ ),CAT 依然没有显著变化(表 2)。

表 2 氨氮急性胁迫及其毒后恢复对红螯光壳蟹相关免疫酶活性的影响  
Tab.2 Acute effect of ammonia exposure and its post-exposure recovery on the activities immune-related enzymes in *C. quadricarinatus*

酶 enzyme	处理 treatment	总氨氮浓度/(mg/L) concentration of total ammonia				
		0	4	8	12	16
ACP	3 d 胁迫	15.74 ± 0.94 <sup>ab</sup>	16.04 ± 0.61 <sup>b</sup>	14.44 ± 0.39 <sup>ab</sup>	13.60 ± 0.86 <sup>ac</sup>	12.03 ± 0.48 <sup>c</sup>
	3 d 胁迫 + 7 d 恢复	15.28 ± 0.35	15.81 ± 1.00	16.39 ± 0.50	16.03 ± 0.68	16.66 ± 0.74
AKP	3 d 胁迫	11.58 ± 0.65 <sup>a</sup>	12.13 ± 0.94 <sup>a</sup>	10.90 ± 0.21 <sup>a</sup>	8.20 ± 0.80 <sup>b</sup>	7.89 ± 0.39 <sup>b</sup>
	3 d 胁迫 + 7 d 恢复	11.45 ± 0.37	11.13 ± 0.46	12.04 ± 0.59	10.82 ± 0.34	12.60 ± 0.81
SOD	3 d 胁迫	13.00 ± 0.90 <sup>a</sup>	13.60 ± 0.91 <sup>a</sup>	9.95 ± 0.87 <sup>b</sup>	9.65 ± 0.40 <sup>b</sup>	8.03 ± 0.59 <sup>b</sup>
	3 d 胁迫 + 7 d 恢复	12.61 ± 0.86 <sup>a</sup>	14.36 ± 0.74 <sup>ab</sup>	15.79 ± 0.52 <sup>b</sup>	16.39 ± 0.40 <sup>b</sup>	15.31 ± 0.42 <sup>b</sup>
CAT	3 d 胁迫	4.18 ± 0.44	3.52 ± 0.44	3.92 ± 0.45	3.18 ± 0.36	3.26 ± 0.39
	3 d 胁迫 + 7 d 恢复	3.97 ± 0.33	4.57 ± 0.43	3.83 ± 0.35	4.40 ± 0.34	5.05 ± 0.52
GPX	3 d 胁迫	3.70 ± 0.27	4.29 ± 0.62	3.43 ± 2.10	4.42 ± 3.41	4.38 ± 4.44
	3 d 胁迫 + 7 d 恢复	3.90 ± 0.34 <sup>a</sup>	4.51 ± 0.23 <sup>ab</sup>	4.95 ± 0.20 <sup>b</sup>	4.69 ± 0.24 <sup>ab</sup>	5.19 ± 0.23 <sup>b</sup>

注:表中同行数据后标注不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。以下同此。

Notes: Means with different superscripts within the same line are significantly different ( $P < 0.05$ ). The same as the following.

## 2.2 氨氮急性胁迫及其毒后恢复对红螯光壳蟹抗氧化基因表达的影响

3 d 氨氮胁迫对实验组中肌肉各抗氧化基因的表达均有显著影响 ( $P < 0.05$ )。4 mg/L 浓度组的 cMnSOD 表达显著升高 ( $P < 0.05$ ),其他各组差异不显著。各氨氮处理组的 mMnSOD 表达

显著降低 ( $P < 0.05$ ),exCu/ZnSOD 的表达也随着氨氮浓度的升高而下降 ( $P < 0.05$ )。GPX 和 GST 的表达受到氨氮胁迫的影响不显著。7 d 恢复后,各抗氧化酶的基因表达量都有不同程度的升高 ( $P < 0.05$ ,表 3)。

表 3 氨氮急性胁迫及其毒后恢复对红螯光壳蟹免疫基因 mRNA 相对表达量的影响  
Tab.3 Acute effect of ammonia exposure and its post-exposure recovery on the mRNA expression of immune-related genes in *C. quadricarinatus*

基因 gene	处理 treatment	总氨氮浓度/(mg/L) concentration of total ammonia				
		0	4	8	12	16
cMnSOD	3 d 胁迫	1.01 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.66 ± 0.12 <sup>b</sup>	1.42 ± 0.17 <sup>ab</sup>	1.40 ± 0.10 <sup>ab</sup>	1.19 ± 0.07 <sup>a</sup>
	3 d 胁迫 + 7 d 恢复	1.00 ± 0.15	1.17 ± 0.02	1.23 ± 0.13	0.86 ± 0.03	0.92 ± 0.01
mMnSOD	3 d 胁迫	1.01 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.72 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.62 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.69 ± 0.06 <sup>b</sup>
	3 d 胁迫 + 7 d 恢复	1.01 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.52 ± 0.03 <sup>bc</sup>	2.82 ± 0.16 <sup>cd</sup>	2.34 ± 0.14 <sup>b</sup>	2.92 ± 0.11 <sup>d</sup>
exCu/ZnSOD	3 d 胁迫	1.01 ± 0.08 <sup>ab</sup>	1.17 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.80 ± 0.11 <sup>ac</sup>	0.69 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.68 ± 0.08 <sup>c</sup>
	3 d 胁迫 + 7 d 恢复	1.01 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.16 <sup>ab</sup>	1.45 ± 0.13 <sup>abc</sup>	1.60 ± 0.24 <sup>bc</sup>	1.88 ± 0.19 <sup>c</sup>
GPX	3 d 胁迫	1.01 ± 0.09	0.95 ± 0.08	0.76 ± 0.12	0.83 ± 0.10	1.24 ± 0.13
	3 d 胁迫 + 7 d 恢复	1.01 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.24 ± 0.35 <sup>b</sup>	1.90 ± 0.08 <sup>b</sup>	3.90 ± 0.38 <sup>c</sup>	2.49 ± 0.17 <sup>b</sup>
GST	3 d 胁迫	1.01 ± 0.07	1.21 ± 0.43	0.86 ± 0.12	1.05 ± 0.13	1.75 ± 0.20
	3 d 胁迫 + 7 d 恢复	1.02 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.49 ± 0.24 <sup>a</sup>	2.96 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.71 ± 0.12 <sup>a</sup>	3.41 ± 0.52 <sup>b</sup>

### 2.3 氨氮急性胁迫及其毒后恢复对红螯光壳螯虾代谢相关指标的影响

3 d 氨氮胁迫后,肝胰腺中可溶解蛋白的含量随着氨氮浓度的升高而下降,最高浓度组显著低于对照组( $P < 0.05$ )。肝胰腺甘油三酯的含量也是最高浓度组显著降低。AST 活性在 12 mg/L

浓度组显著升高至对照组的 134% ( $P < 0.05$ )。尿素含量随着氨氮浓度的增加而升高,但差异尚不显著( $P = 0.06$ )。其他各指标的变化受氨氮影响不显著(表 4)。经过 7 d 恢复后,所有所测代谢指标在各处理组及对照组之间均无显著差异。

表 4 氨氮急性胁迫及其毒后恢复对红螯光壳螯虾代谢相关指标的影响  
Tab. 4 Acute effect of ammonia exposure and its post-exposure recovery on metabolic parameters in *C. quadricarinatus*

代谢 metabolism	处理 treatment	总氨氮浓度/(mg/L) concentration of total ammonia				
		0	4	8	12	16
可溶解蛋白 DP	3 d 胁迫	7.87 ± 0.32 <sup>ab</sup>	8.10 ± 0.21 <sup>a</sup>	6.43 ± 0.71 <sup>bc</sup>	7.00 ± 0.40 <sup>abc</sup>	5.70 ± 0.60 <sup>c</sup>
	3 d 胁迫 + 7 d 恢复	7.60 ± 0.32	6.67 ± 0.45	7.23 ± 0.23	7.47 ± 0.46	7.83 ± 0.29
甘油三酯 TG	3 d 胁迫	0.22 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>b</sup>
	3 d 胁迫 + 7 d 恢复	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.03
胆固醇 CHO	3 d 胁迫	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.11 ± 0.00
	3 d 胁迫 + 7 d 恢复	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.01
尿素 BUN	3 d 胁迫	0.96 ± 0.13	1.01 ± 0.11	1.06 ± 0.25	1.46 ± 0.12	1.55 ± 0.10
	3 d 胁迫 + 7 d 恢复	0.79 ± 0.08	0.78 ± 0.06	0.91 ± 0.10	0.65 ± 0.07	0.59 ± 0.05
ALT	3 d 胁迫	70.31 ± 7.65	71.15 ± 5.85	87.67 ± 8.75	101.71 ± 11.90	75.06 ± 6.46
	3 d 胁迫 + 7 d 恢复	72.98 ± 5.97	81.80 ± 6.01	76.17 ± 2.54	73.72 ± 8.96	66.83 ± 5.48
AST	3 d 胁迫	186.91 ± 12.08 <sup>a</sup>	190.24 ± 5.61 <sup>a</sup>	215.23 ± 12.03 <sup>ab</sup>	249.65 ± 13.34 <sup>b</sup>	224.84 ± 14.62 <sup>ab</sup>
	3 d 胁迫 + 7 d 恢复	213.38 ± 7.67	185.18 ± 10.44	186.91 ± 11.44	199.26 ± 10.44	210.99 ± 15.34

### 3 讨论

ACP 是在酸性条件下催化磷酸单酯水解的酶,在免疫防御中可作为细胞吞噬作用的重要组成部分,破坏和消除侵入体内的异物;AKP 是一种膜结合蛋白,它在机体的骨化过程,营养物质的消化、吸收和转运过程中以及细胞调控过程中起重要作用。因此这两种酶的活性变化能够一定程度指示机体的免疫状况<sup>[7-8]</sup>。实验中,3 d 胁迫后随着氨氮浓度的升高,其活性的变化相似,高浓度组 ACP 及 AKP 的浓度都有显著降低,与吕晓燕等<sup>[9]</sup>关于亚硝酸盐对红螯光壳螯虾肌肉的影响结果相似。而在 7 d 恢复后,ACP 和 AKP 的都恢复到正常水平,表明氨氮对红螯光壳螯虾磷脂酶的毒性作用具有可恢复性。

由于甲壳动物缺乏特异性免疫,所以其抗氧化系统显得尤为重要。生物在受到外界胁迫时,可促使机体细胞内线粒体、微粒体和胞浆的酶系统和非酶系统反应,还原产生活性氧和氧自由基,不及时清除会造成生物体活性氧损伤<sup>[10]</sup>。SOD 和 CAT 是生物体内两种相互关联的抗氧化酶,可

联合清除活性氧自由基<sup>[11]</sup>。SOD 分布广泛,根据所结合金属离子的不同,可将 SOD 分为 6 种,甲壳动物体内已发现的共 3 种:两种 MnSOD(线粒体型 mMnSOD、胞质型 cMnSOD)和胞外型的 exCu/ZnSOD<sup>[12]</sup>。已有研究表明,氨氮胁迫能够导致水生动物体内自由基的生成<sup>[13-14]</sup>。实验中,在氨氮胁迫下 4 mg/L 浓度组胞质 MnSOD 的表达显著升高,这可能体现了“毒物兴奋效应”,是机体对外界胁迫的主动调节机制<sup>[15]</sup>。肌肉中的总 SOD 活性在高浓度组显著降低。而与此同时,线粒体 MnSOD 和胞外 Cu/ZnSOD 的 mRNA 表达也都有不同程度的降低,表明氨氮胁迫对细胞造成的氧化损伤,使其基因表达量下降。值得注意的是,自由基的性质极为活泼,过多的自由基将会攻击各种生物大分子,引起 DNA 损伤、蛋白变性、脂质过氧化等一系列氧化损伤<sup>[16]</sup>,因此酶活水平降低幅度可能将进一步大于其基因表达水平。CAT 的活性在本实验中变化不显著,可能其活性对于氨氮不敏感。经过 7 d 恢复后,氨氮胁迫组的 SOD 活性高于正常水平,表明肌肉中依然存在着未被清除的自由基。同时 mMnSOD 表达

水平较高,这可能是由于线粒体更多的参与了机体氧化损伤的修复。GPX 则是机体内广泛存在的另一种重要的催化过氧化氢分解的酶<sup>[17]</sup>。经过 7 d 的恢复后,各组 GPX 基因表达都高于对照组,GPX 的活性也高于对照组。表明机体处于轻度的应激状态,GPX 与 SOD 协同作用清理依然存在的自由基。GST 能够通过催化谷胱甘肽与一些外源化合物结合,降低其毒性<sup>[18]</sup>。本实验中,GST 活性及其基因表达的变化规律与 GPX 相似,与 Hegazi 等<sup>[14]</sup>报道的氨氮对罗非鱼的影响一致,表明 GST 也参与了氨氮的解毒作用。

蛋白质和脂类是生物体内两种重要的能源物质<sup>[19]</sup>。3 d 氨氮胁迫后,肝胰腺中甘油三酯的含量在不断减少,这说明机体还通过加速脂肪分解来满足能量需要,已有部分研究也表明虾类在应对氨氮胁迫时可通过提高脂肪的分解来满足机体的能量需要<sup>[20-21]</sup>。本实验结果表明,红螯光壳螯虾还可通过蛋白质的分解来供能应对氨氮胁迫。ALT 和 AST 是机体中较为典型的两种转氨酶,其活性高低一定程度反映机体氨基的转移活力<sup>[22]</sup>。实验中肝胰腺 AST 胁迫后有一定程度升高,提示蛋白质分解后伴随着的氨基酸代谢的增强。7 d 恢复时间后,代谢指标均恢复到正常水平,说明评价氨氮的毒后恢复情况,免疫相关指标可能优于代谢指标。实验表明,高浓度氨氮胁迫还能抑制部分免疫相关酶的活性及基因表达,对免疫系统造成损害。氨氮胁迫下,红螯光壳螯虾能够动员蛋白质和脂肪来供能应对胁迫,但 7 d 的恢复时间不足以让红螯光壳螯虾从胁迫中完全恢复,即便在低浓度组,其肌肉也处于轻度氧化应激状态。由于红螯光壳螯虾对氨氮毒性较为敏感,生产中应当注意水质监测和管理,防范低浓度氨氮的毒性影响。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Hernandez-Vergara M P, Rouse D B, Olvera-Novoa M A, *et al.* Effects of dietary lipid level and source on growth and proximate composition of juvenile redclaw (*Cherax quadricarinatus*) reared under semi-intensive culture conditions [ J ]. *Aquaculture*, 2003, 223(1-4):107-115.
- [ 2 ] Camargo J A, Alonso A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment [ J ]. *Environment International*, 2006, 32(6):831-849.
- [ 3 ] Ackerman P A, Wicks B J, Iwama G K, *et al.* Low levels of environmental ammonia increase susceptibility to disease in Chinook salmon smolts [ J ]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2006, 79(4):695-707.
- [ 4 ] Sung Y Y, MacRae T H, Sorgeloos P, *et al.* Stress response for disease control in aquaculture [ J ]. *Reviews in Aquaculture*, 2011, 3(3):120-137.
- [ 5 ] Jiang Q C, Lv L L, Jiang G Z, *et al.* Acute effects of ammonia on antioxidative response and gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity of juvenile Australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) [ J ]. *Journal of Freshwater Ecology*, 2012, 27(4):551-560.
- [ 6 ] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> method [ J ]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [ 7 ] Hose J E, Martin G G, Nguyen V A, *et al.* Cytochemical features of shrimp hemocytes [ J ]. *The Biological Bulletin*, 1987, 173(1):178-187.
- [ 8 ] Matozzo V, Marin M G. The role of haemocytes from the crab *Carcinus aestuari* (Crustacea, Decapoda) in immune responses: A first survey [ J ]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(4):534-541.
- [ 9 ] 吕晓燕, 李嘉尧, 方燕, 等. 亚硝酸盐对红螯光壳螯虾不同组织免疫相关酶活性及超微结构的影响 [ J ]. *水产学报*, 2010, 34(12):1812-1820.
- [ 10 ] Johansson M W, Holmblad T, Thornqvist P O, *et al.* A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell-adhesive peroxidase in crayfish [ J ]. *Journal of Cell Science*, 1999, 112(6):917-925.
- [ 11 ] Sies H. Strategies of antioxidant defense [ J ]. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 215(2):213-219.
- [ 12 ] Plantivaux A, Furla P, Zoccola D, *et al.* Molecular characterization of two CuZn-superoxide dismutases in a sea anemone [ J ]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, 37(8):1170-1181.
- [ 13 ] Yang W, Xiang F H, Liang L G, *et al.* Toxicity of ammonia and its effects on oxidative stress mechanisms of juvenile crucian carp (*Carassius auratus*) [ J ]. *Journal of Freshwater Ecology*, 2010, 25(2):297-302.
- [ 14 ] Hegazi M M, Attia Z I, Ashour O A. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of

- Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 99(2): 118 – 125.
- [15] Stebbing A R. Hormesis-the stimulation of growth by low levels of inhibitors[J]. *The Science of the Total Environment*, 1982, 22(3): 213 – 234.
- [16] Sanders B M. Stress proteins in aquatic organisms; an environmental perspective[J]. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 1993, 23(1): 49 – 75.
- [17] Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1985, 240(2): 500 – 508.
- [18] Hayes J D, Strange R C. Invited commentary potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress[J]. *Free Radical Research*, 1995, 22(3): 193 – 207.
- [19] Meier U, Gressner A M. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin [J]. *Clinical Chemistry*, 2004, 50(9): 1511 – 1525.
- [20] Racotta I S, Hernandez-Herrera R. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: molecular & Integrative Physiology*, 2000, 125(4): 437 – 443.
- [21] Racotta I S, Palacios E. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei* [J]. *Journal of The World Aquaculture Society*, 1998, 29(3): 351 – 356.
- [22] Dewes L J, Sandrini J Z, Monserrat J M, *et al.* Biochemical and physiological responses after exposure to microcystins in the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Brachyura) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, 65(2): 201 – 208.

**Acute effects of ammonia exposure on selected immunological and metabolic parameters in juvenile red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) and the post-exposure recovery**

JIANG Qichen<sup>1</sup>, GU Shuyu<sup>1</sup>, ZHANG Wenyi<sup>1</sup>, ZHANG Chengxiang<sup>2</sup>, FENG Xiaoqing<sup>1</sup>, TAN Hongyue<sup>1</sup>, HUANG Wenting<sup>1</sup>, YANG Jiaxin<sup>1\*</sup>, LI Feng<sup>3</sup>

(1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China;

2. Spread Station of Aquiculture Technology of Jiangyin, Jiangyin 214400, China;

3. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

**Abstract:** The acute effects of ammonia exposure on selected immunological and metabolic parameters in juvenile red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* as well as the post-exposure recovery were studied by using Real-time PCR technique and biochemical assays. The crayfish were first exposed to ammonia for 3 d, then half of them were sampled and the other half were moved into aerated tap water for a 7 d post-exposure recovery. The results showed that a 3 d ammonia exposure had significant impact on the activities of ACP, AKP and SOD in the muscle of juvenile *C. quadricarinatus*. As ammonia concentration increased, the activities of these enzymes significantly decreased. At the highest concentration (16 mg/L), they decreased to 76%, 68% and 62% of the control, respectively. The mRNA expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase (mMnSOD), cytosolic MnSOD (cMnSOD), extracellular copper/zinc SOD (exCu/ZnSOD) also showed a decreasing trend following increased ammonia concentration. In contrast, the mRNA expression of catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and glutathione transferase (GST) in muscle remained unchanged compared to the control. Dissolved protein and triglycerides in hepatopancreas significantly decreased as ammonia concentration increased. At the highest concentration, they decreased to 72% and 59% of the control. AST showed a noble elevation which was 134% of the control in 12 mg/L group. After a 7 d post-exposure recovery, ACP and AKP activities returned to the normal level in ammonia treatments. On the contrary, the activities of SOD and GPX in all ammonia treatments were significantly higher than the control. The expression of antioxidant genes was higher than the control in all ammonia treatments. Metabolic parameters showed no differences between all groups. The results indicate that high levels of ammonia might suppress activities and gene expression patterns of immune-related enzymes, leading to a loss of defence mechanism. The crayfish which had been exposed to ammonia for 3 d could not fully recover after a 7 d post-exposure recovery and oxidative stress still existed in the muscle in *C. quadricarinatus*.

**Key words:** *Cherax quadricarinatus*; ammonia; stress; immune; gene expression; metabolism

**Corresponding author:** YANG Jiaxin. E-mail: yangjx@njnu.edu.cn