

盐度对银鲳血清渗透压、过氧化氢酶及 鳃离子调节酶活力的影响

施兆鸿^{1,2*}, 张晨捷^{1,2}, 彭士明¹, 王建钢¹, 高权新¹

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所,农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室,上海 200090;

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

摘要: 将银鲳幼鱼置于盐度 14、25、36 的海水中 96 h,检测不同盐度下银鲳幼鱼血清渗透压、过氧化氢酶(CAT)以及鳃泡膜质子泵(VHA)、Ca²⁺-ATP 酶、碳酸酐酶(CA)活力随着时间推移而变化的情况。结果显示,血清渗透压变化和盐度呈正相关,并出现波动变化,变化范围为 271 ~ 379 mOsm/kg,96 h 时各盐度组血清渗透压均有恢复正常的趋势。高盐度(36)和低盐度(14)组 CAT 活力都显著升高而后逐渐恢复($P < 0.05$),盐度 36 组 8 h 时为各值中的最高点。鳃 VHA 活力变化:盐度 14 组先上升后回落,对照组基本保持平稳,盐度 36 组先下降而后恢复。盐度改变后,Ca²⁺-ATP 酶活力都出现显著增强($P < 0.05$),盐度 14 组比盐度 36 组的变化趋势更明显。盐度 14 和 36 组 CA 活力都出现显著增强($P < 0.05$),其中盐度 36 组 24 h 时为最高值。分析实验数据发现,血清渗透压与鳃 VHA 活力呈极显著负相关,与 CA 活力在低盐度适应时呈极显著负相关($P < 0.01$),而盐度 14 组血清渗透压与 Ca²⁺-ATP 酶的变化呈基本相反趋势。结果表明,银鲳幼鱼在适应不同盐度时,血清渗透压会伴随盐度升降而改变,并激活 CAT,而鳃 VHA、Ca²⁺-ATP 酶、CA 在渗透压调节过程中有重要作用。

关键词: 银鲳; 盐度; 渗透压; ATP 酶; 碳酸酐酶

中图分类号: Q 591.9; S 965

文献标志码: A

鱼类的鳃是呼吸系统中连通外部水体并调节体内离子水平的重要器官,其主要功能为气体交换,调控体内外离子和酸碱平衡^[1-2]。作为特化型离子转运细胞的氯细胞(chloride cells,由于内部存在大量线粒体,近年来也称 mitochondria-rich cells)位于鳃小片基底部,是硬骨鱼类调控离子水平的主要功能区域^[3]。氯细胞中含有大量泡膜质子泵(vacuolar type proton pump 或 V-H⁺-ATPase 或 VHA)和 Na⁺/K⁺-ATP 酶(NKA),两者是硬骨鱼类最重要的离子调节酶,不仅能转运特定的离子,还能为整个离子转运机制提供动力,例如:Na⁺与Cl⁻的共转运,Na⁺与H⁺的交换^[1,3-4]。Cl⁻的摄入部分依靠Cl⁻与HCO₃⁻交换,而Na⁺与H⁺的交换也与HCO₃⁻有关,其转运

机制则由VHA与碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)驱动^[3,5]。另外,鱼类的鳃还存在Ca²⁺与Na⁺的交换,依靠质膜Ca²⁺-ATP 酶(plasma membrane Ca²⁺-ATPase)提供能量^[3-4,6]。

在研究硬骨鱼类体内渗透压时,血清渗透压和过氧化氢酶(CAT)是二个重要的指标,前者可评价鱼类渗透压的调节能力;后者则是催化过氧化氢分解成氧和水的酶,能防止代谢和超氧化物歧化酶(SOD)转化的过氧化氢对机体造成伤害,以抵御盐度胁迫,防止生理应激^[7]。因此,血清渗透压和CAT与VHA、CA、Ca²⁺-ATPase、NKA等指标一样,在研究鱼类受盐度胁迫下渗透压调节机制和生理变化的过程中,同样具有重要的意义。

分布于中国的银鲳(*Pampus argenteus*)在河

收稿日期:2013-06-14 修回日期:2013-08-30

资助项目:国家科技支撑计划(2011BAD13B01);中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(东2011M09号)

通信作者:施兆鸿,E-mail:shizhh@sh163.net

口入海处咸淡水混合区域繁殖,在暖流经过的外海过冬,具有洄游的习性^[8]。不同水域盐度差距很大,为应对外界复杂多变的环境,银鲳必须具备高效的渗透压调节机制,以维持体内离子的动态平衡。低盐度胁迫下,银鲳肝、肾和肌肉中抗氧化酶、鳃和肾中NKA的活力变化已有报道^[7,9],而对其它离子调节酶的研究则较少。本实验试图通过检测银鲳鳃部离子调节酶:VHA、Ca²⁺-ATP酶、CA活力变化,并结合血清渗透压和CAT活力情况,对其渗透压调节机制进行探究。旨在明确银鲳对盐度胁迫的渗透压调节响应和生理生化反应情况,为养殖生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验在浙江省温州市洞头县浙江省海洋水产养殖研究所洞头试验基地进行。供试用鱼为90日龄人工授精孵化子一代银鲳幼鱼,平均体质量为(7.28 ± 2.31) g,平均叉长为(7.11 ± 0.72) cm,实验在2 m³圆形玻璃钢实验桶中进行。实验用水为净化处理的天然海水(盐度25),加海水精配置高盐度海水(盐度36),或与曝气后自来水配置低盐度海水(盐度14)。实验用水配制后稳定48 h后使用。每日8:00饱食投喂一次配合饲料,期间水温保持在(27 ± 1.0) °C,不间断充气,每日换同盐同温的实验用水25%,同时吸去底部污物及残饵,及时捞出死鱼,统计死亡情况。

1.2 实验设计和取样

盐度梯度设为14、25、36,每个盐度梯度设3个平行,共9个桶,以盐度25的天然海水为对照组。随机从养殖银鲳群体中抽取个体放入实验桶中,先暂养稳定48 h,放养密度为每缸33尾。实验开始后通过换水逐步调节盐度,在24 h内同时达到设计水平。当盐度达到设计水平后,从对照组取样以表示调节盐度前的情况,记为0 h,并开始计时,在8、24、48、96 h各梯度分别取样,每平行每次取3尾。

取样前停喂饲料一次,用MS222(200 mg/L)将鱼麻醉后,用预冷1 mL注射器从尾部动脉抽取血液,4 °C下静置12 h,2 500 r/min离心5 min,取上清液,置于1.5 mL离心管中-20 °C保存,用以检测血清渗透压和CAT活力。取完血样后将鱼置于冰盘上解剖,取出组织用4 °C的生理盐水冲洗干净。取左右全鳃,用滤纸吸干,置于1.5

mL离心管中-20 °C保存,在30 d内检测VHA、CA和Ca²⁺-ATP酶活力。

1.3 指标检测

血清渗透压与CAT活力检测:取10 μL血清用蒸汽压渗透压计(Vapro5520)测定血清渗透压,单位为mOsm/kg。取50 μL血清采用CAT试剂盒(南京建成)检测活力,采用比色法,按说明书要求操作并计算,酶活单位为U/mL,U为每毫升血清每秒钟分解1 μmol量的H₂O₂。

鳃组织处理 将鳃瓣在匀浆介质(pH 7.4, 0.01 mol/L Tris-HCl, 0.000 1 mol/L EDTA-2Na, 0.01 mol/L 蔗糖, 0.8% NaCl)中剪碎,用匀浆机15 000 r/min研磨制成匀浆。用低温离心机4 °C下2 500 r/min,离心5 min,取上清液检测酶活。

VHA与Ca²⁺-ATP酶活力以ATP酶分解ATP生成ADP和无机磷,测定无机磷含量来判断ATP酶活力高低。无机磷测定采用钼蓝法,同时用考马斯亮蓝法测定蛋白含量,以计算ATP酶比活力,ATP酶活力单位为μmol Pi/(mg protein · h)。Ca²⁺-ATP活力采用Ca²⁺-ATP酶活试剂盒(南京建成)检测,按说明书和上述原理操作。

VHA活力测定 参考Huang等^[1]和Zare等^[10]的方法,略作改变:在两支1.5 mL离心管中加入847 μL培养液(34.8 mmol/L Hepes, 173.9 mmol/L KCl, 6.95 mmol/L MgCl₂, 0.01 mmol/L 正钒酸钠,用HCl调到pH 7.4),加入组织液前灭菌,然后加37 μL组织液,混匀平衡到37 °C。分别加入16 μL二甲基亚砜(DMSO)(0.16 μmol/L)和16 μL Bafilomycin A1,培养10 min后加入0.1 mL 30 mmol/L Na₂ATP,混匀反应15 min后,加入0.15 mL 40%三氯乙酸(TCA)终止反应,取上清液定磷。

CA活力测定 参考Henry^[11]、潘爱军等^[12]和Zimmer等^[5]的方法稍作调整:取100 μL组织匀浆液,用预冷Tris缓冲液(225 mmol/L 甘露醇, 75 mmol/L 蔗糖, 10 mmol/L Tris, NaH₂PO₄调节pH至7.4)稀释至6 mL,充分混匀,插入pH计电极(PHS-3C),监测反应缓冲体系pH值,待起始pH值稳定,加入150 μL 0 °C饱和CO₂水溶液,即刻计时,记录下降0.20 pH所用的时间(t_{en})。酶活力单位计算公式: $U = t_0/t_{en} - 1$,酶活力单位(U):在反应体系4 °C,起始pH值为7.4,添加150 μL 0 °C饱和CO₂水溶液,pH值下降0.20所用时间(t_{en})为空白对照反应时间(t_0)的一

半时所需的酶量。CA 比活力单位为 U/mg prot, 用考马斯亮蓝法测定蛋白含量,并计算酶比活力。

1.4 数据统计与分析

实验结果用 SPSS 19.0 软件进行统计与分析。运用单因素方差分析,先进行方差齐性检验,不满足方差齐性时,对数据进行自然对数或平方根转换,然后采用 Duncan 氏检验进行多重比较, $P < 0.05$ 为有显著性差异,数据以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示。指标间的关联性采用 Pearson 相关性检验,显著性水平为 $P < 0.05$ 。用 Excel 2007 绘制图表。

2 结果

2.1 血清渗透压

不同盐度条件下银鲳幼鱼血清渗透压随时间变化情况如图 1 所示。盐度 14 组血清渗透压从 0 h 至 24 h 时显著减小 ($P < 0.05$),而后基本保持稳定,其中 24 h 时为本实验最低值 [(270.7 \pm 11.0) mOsm/kg],显著低于初始值和同时间其它盐度组 ($P < 0.05$);盐度 25 对照组血清渗透压除在 48 h 有跃升外,总体上保持平稳;盐度 36 组血清渗透压呈上升而后恢复的波动变化,其 48 h 时为各组中最高点 [(379.3 \pm 20.8) mOsm/kg],且与其它值间存在显著差异 ($P < 0.05$)。随着时间延长,盐度 36 组始终高于盐度 14 和对照组,且都显著高于盐度 14 组 ($P < 0.05$);盐度 25 对照组始终处于中间位置,并显著高于盐度 14 组 ($P < 0.05$),在 8 h 和 48 h 时显著低于盐度 36 组 ($P < 0.05$);盐度 14 组血清渗透压一直显著低于

其它盐度组 ($P < 0.05$)。

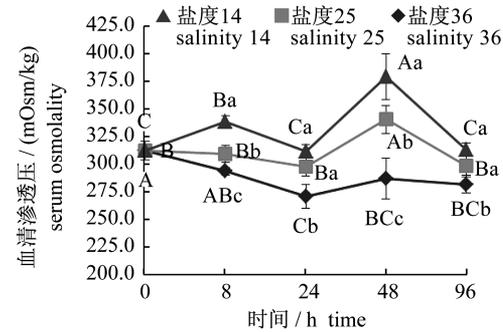


图 1 盐度对银鲳幼鱼血清渗透压的影响

不同大写字母表示同一组中显著差异 ($P < 0.05$),不同小写字母表示同一时间点中显著差异 ($P < 0.05$)。下同

Fig.1 The effects of salinity on the serum osmolality of juvenile silver pomfret

Different uppercase letters indicate significant difference from each other in the same salinity group ($P < 0.05$). Different lowercase letters indicate significant difference from each other in the same time ($P < 0.05$). The same as the followings

2.2 血清过氧化氢酶活力

不同盐度条件下银鲳幼鱼血清 CAT 活力变化情况见图 2。盐度 14 组 CAT 活力呈上升后恢复的趋势,8 h 即出现峰值且显著高于初始值 ($P < 0.05$);盐度 25 对照组 CAT 活力变化不显著 ($P > 0.05$),一直处于较低水平;盐度 36 组 CAT 活力峰值出现在 8 h,此时为各值中的最高点,8 h 时与初始值和 48 h 时存在显著差异 ($P < 0.05$)。随着时间推移,对照组 CAT 活力始终低于盐度 14 和 36 组,但除 8 h 峰值外,三者差异并不显著 ($P > 0.05$)。

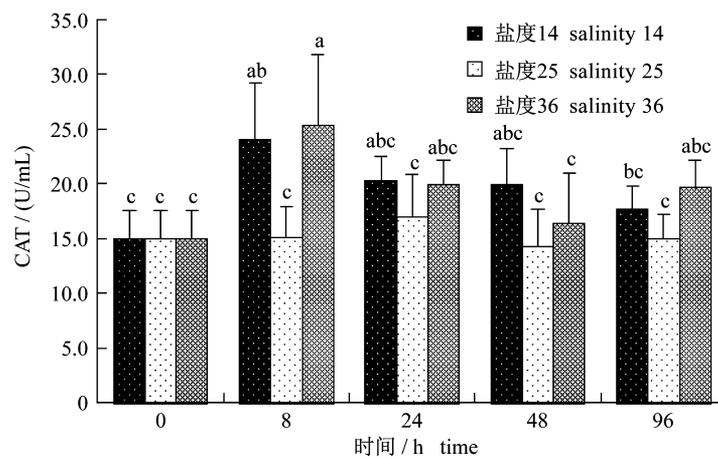


图 2 盐度变化对银鲳幼鱼血清 CAT 活力的影响

Fig.2 The effects of salinity on the serum CAT activities of juvenile silver pomfret

2.3 鳃 V-H⁺-ATP 酶活力

随着时间推移,不同盐度下银鲳幼鱼鳃 VHA 活力变化情况如图 3 所示。盐度 14 组 VHA 活力呈现上升后回落的变化,在 48 h 时出现峰值,且是各组中的最高值,与其它值差异显著 ($P < 0.05$);盐度 25 对照组 VHA 活力变化不显著 ($P > 0.05$),基本上保持平稳;盐度 36 组 VHA 活力变化呈下降而后恢复的趋势,8 h 出现谷值且为本实验最低值,8、24 和 48 h 时显著低于 96 h 时 ($P < 0.05$)。在各时间点中,盐度 14 组 VHA 活力始终最大,在 8 和 48 h 时显著高于其它组 ($P < 0.05$),24 h 时盐度 36 组 VHA 活力显著低于盐度 14 组 ($P < 0.05$)。

2.4 鳃 Ca²⁺-ATP 酶活力

随时间推移,不同盐度下银鲳幼鱼鳃 Ca²⁺-ATP 酶活力变化情况参见图 4。盐度 14 组 Ca²⁺-ATP 酶活力先上升后回落,峰值出现于 24 h,显著高于初始值和 48、96 h 时 ($P < 0.05$),且是各组中的最高值;盐度 25 对照组 Ca²⁺-ATP 酶活力呈波动变化,但各值间没有显著差异 ($P > 0.05$);盐度 36 组 Ca²⁺-ATP 酶活力呈先上升后下降的变化,在 24 h 出现最高点,96 h 为最低点,两者间有显著差异 ($P < 0.05$)。各时间点中,8 和 24 h 时盐度 14 和 36 组 Ca²⁺-ATP 酶活力显著高于对照组 ($P < 0.05$);48 和 96 h 时对照组与高、低盐度组间没有显著差异 ($P > 0.05$)。

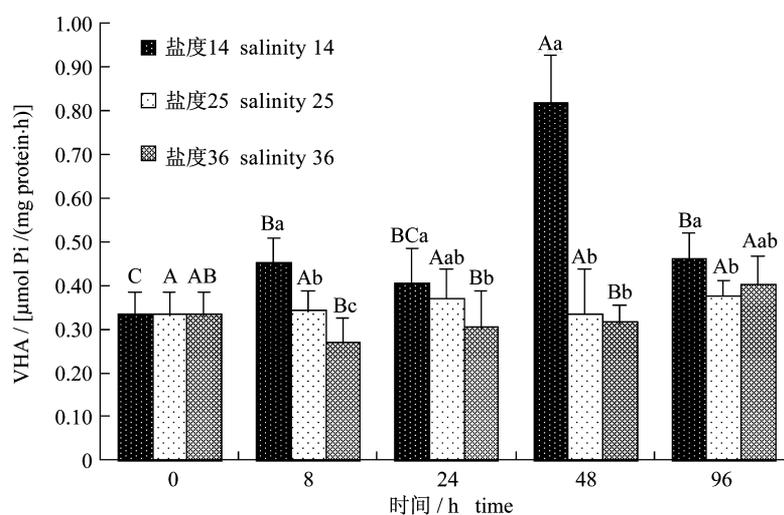


图 3 盐度对银鲳幼鱼鳃 VHA 活力的影响

Fig. 3 The effects of salinity on the gill VHA activities of juvenile silver pomfret

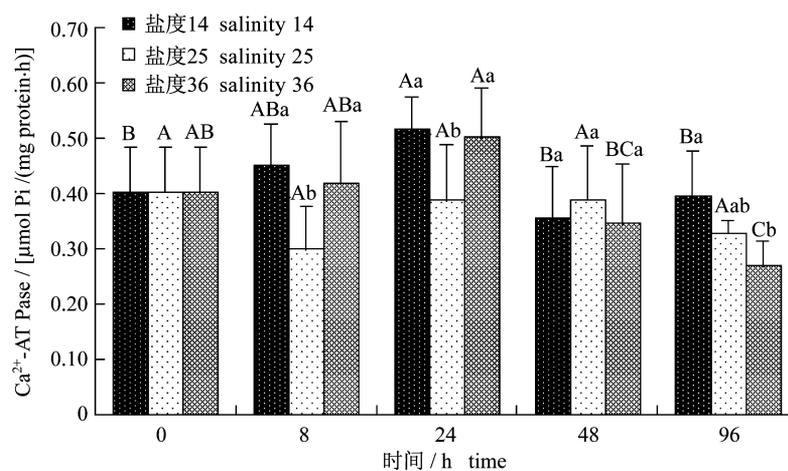


图 4 盐度对银鲳幼鱼鳃 Ca²⁺-ATP 酶活力的影响

Fig. 4 The effects of salinity on the gill Ca²⁺-ATPase activities of juvenile silver pomfret

2.5 鳃碳酸酐酶活力

随着时间变化,不同盐度下银鲟幼鱼鳃 CA 活力情况如图 5 所示。盐度 14 组 CA 活力呈波动变化,在 24 和 96 h 时出现两个峰值,且两者显著高于其它时间点 ($P < 0.05$);盐度 25 对照组 CA 活力变化比较平稳,仅 8 和 96 h 值间有显著

差异 ($P < 0.05$);盐度 36 组 CA 活力变化较为显著,在 24 和 96 h 出现两个峰值,其中 24 h 值为各组中的最高值,两个峰值都显著高于其它值 ($P < 0.05$)。在不同时间点中,对照组一直处于最低位置,在 8、24 和 96 h 时,3 个盐度组互相间都存在显著差异 ($P < 0.05$)。

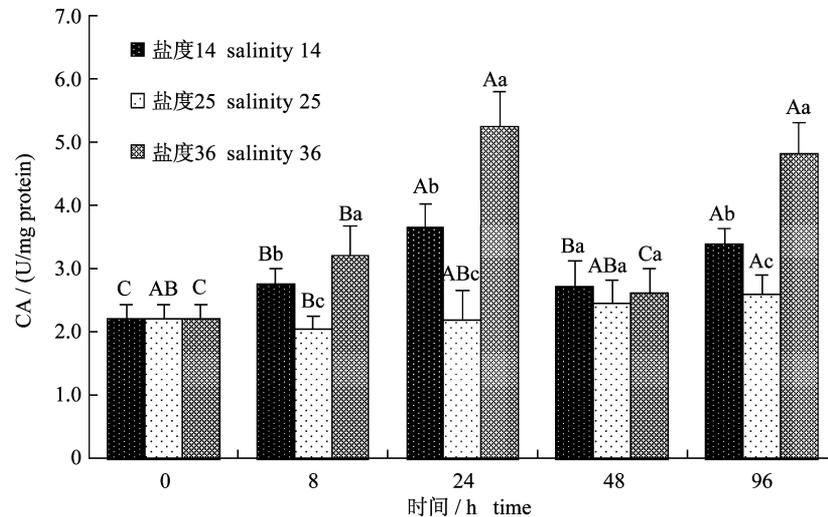


图 5 盐度对银鲟幼鱼鳃 CA 活力的影响

Fig. 5 The effects of salinity on the gill CA activities of juvenile silver pomfret

2.6 血清渗透压与离子调节酶的相关性

血清渗透压与鳃 VHA 活力的相关性参见图 6-a。血清渗透压与 VHA 活力的相关性公式为 $y = -2.1318x + 1.0593$, x 为血清渗透压, y 为 VHA 活力,可靠性 $R^2 = 0.2126$, R (Pearson correlation) = -0.462 , P (2-tailed) = $0.003 < 0.01$,可见两者呈极显著的负相关性。其中,低盐

度适应(盐度 14 ~ 25)时,血清渗透压与 VHA 活力相关性检验: R (Pearson correlation) = -0.392 , P (2-tailed) = $0.043 < 0.05$,呈显著负相关;高盐度适应(盐度 25 ~ 36)时,相关性检验: R (Pearson correlation) = -0.370 , P (2-tailed) = $0.057 > 0.05$,相关性不显著。

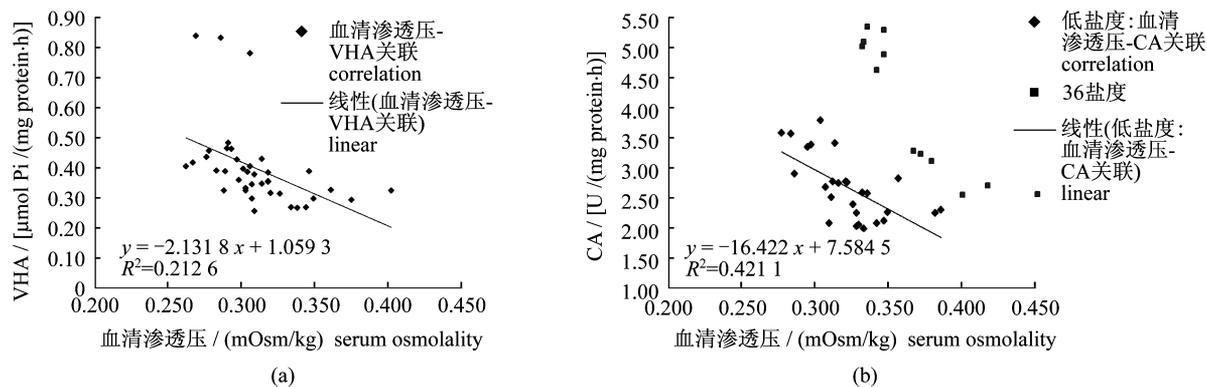


图 6 银鲟幼鱼血清渗透压调节与离子调节酶活力的相关性

(a) 血清渗透压与鳃 VHA 活力的相关性; (b) 盐度 14 和 25 组血清渗透压与鳃 CA 活力的相关性

Fig. 6 The correlations among serum osmolality and ion-regulatory enzyme activity of juvenile silver pomfret

(a) The correlation between serum osmolality and gill VHA activity; (b) The correlation between gill serum osmolality and gill CA activity in salinity 14 and 25 groups

血清渗透压与 CA 活力的相关性如图 6-b 所示。低盐度适应(盐度 14 ~ 25)时,血清渗透压与 CA 活力的相关性公式为: $y = -16.422x + 7.5845$, x 为血清渗透压, y 为 CA 活力, 可靠性 $R^2 = 0.4211$, R (Pearson correlation) = -0.649 , P (2-tailed) = $0.00025 < 0.01$, 两者呈极显著负相关。而高盐度适应(盐度 25 ~ 36)时,血清渗透压与 CA 活力的相关性检验: R (Pearson correlation) = -0.090 , P (2-tailed) = $0.656 > 0.05$, 两者相关性不成立。另外,两个指标的总体相关性 ($R = -0.126$, $P = 0.446 > 0.05$) 也不成立。

分析实验数据,未得出血清渗透压与 Ca^{2+} -ATP 酶活力的相关性 ($P = 0.215 > 0.05$), 其中低盐度适应 $R = -0.280$, $P = 0.158 > 0.05$; 高盐度适应 $R = 0.091$, $P = 0.652 > 0.05$ 。在此绘出低盐度组(14)血清渗透压与 Ca^{2+} -ATP 酶活力随时间变化的趋势(图 7)。在盐度 14 组中,血清渗透压先下降而后恢复平稳,谷值出现于 24 h, Ca^{2+} -ATP 酶活力则是先上升而后下降,峰值也出现于 24 h,从图 7 可知,两者的变化趋势基本相反。

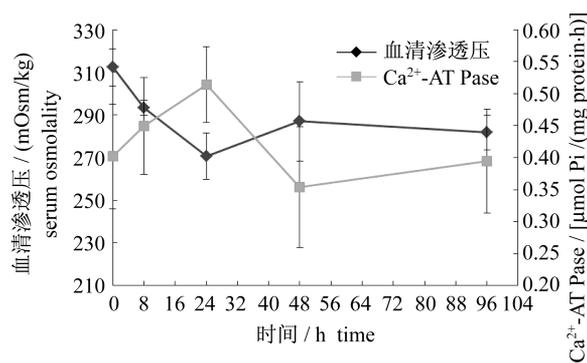


图 7 银鲳幼鱼盐度 14 组血清渗透压与 Ca^{2+} -ATP 酶活力对比

Fig. 7 The contrast between serum osmolality and Ca^{2+} -ATPase activity of juvenile silver pomfret treated with salinity 14

3 讨论

硬骨鱼类在渗透压调节和离子调控中,鳃的作用是独一无二的,而其中离子调控的主要功能区为氯细胞。氯细胞中存在着不同种类的离子调控系统,离子的运转则依靠几种主要离子调节酶^[3]。

3.1 盐度与血清渗透压、CAT 活力

硬骨鱼类在对盐度适应过程中,血清渗透压

会随盐度呈正相关的变化,即随刺激渗透压调节机制运行,将渗透压变化控制在一定范围内,然后逐渐恢复^[13]。例如,褐牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*)、军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 和半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 幼鱼血清渗透压随盐度降低而出现不同程度下降,并有波动变化,6 d 后趋于稳定^[13-15]。本实验中,银鲳幼鱼血清渗透压变化也和盐度呈正相关,并出现波动变化,96 h 时各盐度组血清渗透压均有恢复正常的趋势,与上述海水鱼类结果类似。盐度胁迫下,银鲳幼鱼血清渗透压变化范围为 271 ~ 379 mOsm/kg, 而河海洄游鱼类俄罗斯鲟 (*Acipenser gueldenstaedtii*) 幼鱼渗透压变化范围为 248 ~ 354 mOsm/kg^[16]; 海水广盐性鱼类军曹鱼幼鱼为 293 ~ 399 mOsm/kg^[15], 银鲳是河口洄游性鱼类,血清渗透压变化介于两者之间。

CAT 是抗氧化防御系统的重要组成部分,主要存在于肝脏和红细胞中。研究显示,银鲳幼鱼在低盐度胁迫下肝脏 CAT 活力略有上升而后降低,肌肉和肾脏 CAT 活力则呈升高后恢复的趋势^[7,9]。本实验中,无论高盐度还是低盐度组 CAT 活力都出现了显著升高而后逐渐恢复,与上述研究相符合,说明盐度变化能激活银鲳的抗氧化防御系统,并与渗透压调节系统协同作用,以应对环境变化对机体的伤害。

3.2 盐度与鳃离子调节酶类的活力

在硬骨鱼类渗透压调节中,VHA 是仅次于 NKA 的主要离子调节酶,通过排出质子为钠离子和氯离子的摄入提供动力,在低渗环境中其作用尤为重要^[3-4,17]。研究显示,去离子水和盐度 10 水体中培养的一种丝足鲈 (*Trichogaster microlepis*) VHA 蛋白表达量显著高于淡水对照,VHA 活力则是去离子水组显著高于淡水和盐度 10 水组^[11]。尖吻鲈 (*Lates calcarifer*) 淡水适应时 VHA 蛋白表达显著高于海水,且淡水中 H^+ 转运效率最高^[18]。本实验银鲳幼鱼鳃 VHA 活力在盐度 14 下显著高于对照组和盐度 36 组,结果与上述研究相符,说明 VHA 在银鲳对低渗环境的适应中具有重要作用。

Ca^{2+} -ATP 酶是另一种重要的离子调节酶,为 Na^+ 和 Ca^{2+} 交换提供动力。Tsai 等^[19] 认为 Ca^{2+} 对维持渗透压调节的离子流和细胞离子浓度有重要影响。氯细胞中 NKA 对离子的调控机制也涉

及细胞对 Ca^{2+} 的吸收^[17]。在本实验中,盐度变化时,银鲳幼鱼鳃 Ca^{2+} -ATP 酶活力都出现显著增强,而盐度 14 比 36 的变化趋势更明显。

渗透压调节中的 HCO_3^- 和 H^+ 是由 CA 水解细胞中的碳酸产生, HCO_3^- 可与 Cl^- 发生交换,也可与 Na^+ 共同转运,而 H^+ 可与 Na^+ 交换,其运转机制可能由 VHA 和 CA 共同驱动^[3-4]。无论在淡水还是海水中 CA 在硬骨鱼类渗透压调节中都具有重要作用^[20]。Zimmer 等^[5] 将胎花鲳 (*Poecilia vivipara*) 从淡水转入海水中驯化,其鳃 CA 活力出现显著增高。适应淡水、半咸水、海水或高盐水的莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*),其对应鳃的碳酸酐酶活力随盐度增高而显著增强^[21]。将海湾豹蟾鱼 (*Opsanus beta*) 从海水(盐度 35)转移至高盐水(盐度 60)后,各组织中 CA 蛋白表达和活力都有显著增强^[20]。海水驯化的舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 鳃 CA 基因表达显著高于淡水^[22]。本实验中,盐度 14 和 36 组银鲳幼鱼鳃 CA 活力在 24 和 96 h 时都出现了显著增强,而盐度 36 的 CA 活力增强更为显著。说明在银鲳的低渗调节中 CA 的作用更为重要。

3.3 银鲳血清渗透压与离子调节酶的关联

硬骨鱼类具有高效的渗透压、离子调控机制,以维持体内水分及液体动态平衡,其渗透压调节分为两种截然不同的模式:高渗调节和低渗调节^[3]。血清渗透压代表着硬骨鱼类内部渗透压情况,在外界盐度变化时,起初血清渗透压会随之迅速升高或降低,然后逐渐向初始状态恢复,整个生理过程受渗透压调节机制的影响^[23]。

研究发现,银鲳幼鱼血清渗透压与鳃 VHA 活力呈极显著负相关,其中低盐度适应(盐度 25~14)的相关性要优于高盐度适应(盐度 25~36)。对斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎发育的研究发现离子运输细胞按转运因子划分,可包括 H^+ -ATPase-rich、 Na^+ - K^+ -ATPase-rich 等型,其中 H^+ -ATPase-rich 型富含 VHA,在低渗环境下具有吸收 Na^+ 的能力^[17,24]。本实验 VHA 的相关结果与之相符。 Na^+ - K^+ -ATPase-rich 型细胞中有 20%~30% 具有 Ca^{2+} 通道的表达,显示 Ca^{2+} 的转运在渗透压调节中也具有一定作用^[24]。本实验未得出高盐度或低盐度适应时血清渗透压与 Ca^{2+} -ATP 酶的相关性,但 Ca^{2+} -ATP 酶活力在盐

度改变时都出现了增强,盐度 14 时血清渗透压与 Ca^{2+} -ATP 酶的变化呈基本相反趋势,说明 Ca^{2+} -ATP 酶在高渗和低渗调节中都发挥作用,且两者的调节机制不同。

另外,低渗环境下,硬骨鱼类需要从水体中摄入 Na^+ 并排出 H^+ ,同时摄入 Cl^- 排出 HCO_3^- ,此过程需要 CA 与 VHA 协同驱动;高渗环境下,对于 Na^+ 的排出, Na^+ / HCO_3^- 共转运子也起到一定作用,其动力则来源于 CA 和 NKA^[3,24]。本实验中 CA 活力与血清渗透压在低盐度适应时呈极显著负相关,高盐度适应时相关性不成立。可见当盐度降低,血清渗透压下降时 CA 活力会随之增强,而盐度升高时,影响 CA 活力变化的因素则较为复杂。

本实验通过检测不同盐度下银鲳血清渗透压、CAT 以及鳃 VHA、 Ca^{2+} -ATP 酶、CA 活力随时间变化的情况,对其渗透压调节机制的进行了初步研究,结果证明银鲳在适应不同盐度时血清渗透压会随环境而改变,并激活抗氧化系统抵御胁迫,而后由 NKA、VHA、 Ca^{2+} -ATP 酶和 CA 驱动渗透压调节系统,以维持体内离子动态平衡。渗透压调节机制还涉及许多种离子转运蛋白和通道,以及细胞的结构变化,需要结合蛋白与分子表达的手段进一步进行探究。

参考文献:

- [1] Huang C Y, Chao P L, Lin H C. Na^+ / K^+ -ATPase and vacuolar-type H^+ -ATPase in the gills of the aquatic air-breathing fish *Trichogaster microlepis* in response to salinity variation [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A*, 2010, 155 (3): 309-318.
- [2] Rombough P. The functional ontogeny of the teleost gill: Which comes first, gas or ion exchange? [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A*, 2007, 148 (4): 732-742.
- [3] Hwang P P, Lee T H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2007, 148 (3): 479-497.
- [4] Shigehisa H, Toyoji K, Nobuko N, et al. Molecular biology of major components of chloride cells [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 136 (4):

- 593 - 620.
- [5] Zimmer A M, Barcarolli I F, Wood C M, *et al.* Waterborne copper exposure inhibits ammonia excretion and branchial carbonic anhydrase activity in euryhaline guppies acclimated to both fresh water and seawater [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 122 - 123 (15): 172 - 180.
- [6] 肖平, 张旭家, 沈昕. 质膜 Ca^{2+} -ATPase 的结构与功能 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2008, 24 (6): 496 - 504.
- [7] 尹飞, 孙鹏, 彭士明, 等. 低盐度胁迫对银鲳幼鱼肝脏抗氧化酶、鳃和肾脏 ATP 酶活力的影响 [J]. *应用生态学报*, 2011, 22 (4): 1059 - 1066.
- [8] 刘静, 李春生, 李显森. 中国鲳属鱼类的分类研究 [J]. *海洋科学集刊*, 2002, 40: 240 - 252.
- [9] Yin F, Peng S M, Sun P, *et al.* Effects of low salinity on antioxidant enzymes activities in kidney and muscle of juvenile silver pomfret *Pampus argenteus* [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31 (1): 55 - 60.
- [10] Zare S, Greenaway P. The effect of moulting and sodium depletion on sodium transport and the activities of Na^+/K^+ -ATPase, and V-ATPase in the freshwater crayfish *Cherax destructor* (Crustacea; Parastacidae) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A*, 1998, 119 (3): 739 - 745.
- [11] Henry R P. Techniques for measuring carbonic anhydrase activity *in vitro*: The electrometric deltapH method and the pH stat method [M] // Dodgson S J, Tashian R E, Gros G, *et al.* ed. *The carbonic anhydrases: cellular physiology and molecular genetics*. New York: Plenum, 1991: 119 - 125.
- [12] 潘爱军, 来琦芳, 王慧, 等. 盐度突变对凡纳滨对虾组织碳酸酐酶活性的影响 [J]. *上海水产大学学报*, 2006, 15 (1): 47 - 51.
- [13] 田相利, 王国栋, 董双林, 等. 盐度突变对半滑舌鳎血浆渗透压和鳃丝 Na^+/K^+ -ATP 酶活性的影响 [J]. *海洋科学*, 2011, 35 (2): 27 - 31.
- [14] 潘鲁青, 唐贤明, 刘泓宇, 等. 盐度对褐牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 幼鱼血浆渗透压和鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力的影响 [J]. *海洋与湖沼*, 2006, 37 (1): 1 - 6.
- [15] 徐力文, 刘广锋, 王瑞旋, 等. 急性盐度胁迫对军曹鱼稚鱼渗透压调节的影响 [J]. *应用生态学报*, 2007, 18 (7): 1597 - 1600.
- [16] 屈亮, 庄平, 章龙珍, 等. 盐度对俄罗斯鲟幼鱼血清渗透压、离子含量及鳃丝 Na^+/K^+ -ATP 酶活力的影响 [J]. *中国水产科学*, 2010, 17 (2): 243 - 251.
- [17] Masahiro E, Kazuyuki H, Nobuhiro N, *et al.* Mechanism of development of ionocytes rich in vacuolar-type H^+ -ATPase in the skin of zebrafish larvae [J]. *Developmental Biology*, 2009, 329 (1): 116 - 129.
- [18] Weakley J C, Claiborne J B, Hyndman K A, *et al.* The effect of environmental salinity on H^+ efflux in the euryhaline barramundi (*Lates calcarifer*) [J]. *Aquaculture*, 2012, 338 - 341: 190 - 196.
- [19] Tsai J C, Hwang P P. Effects of wheat germ agglutinin and colchicines on microtubules of the mitochondria-rich cells and Ca^{2+} uptake in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larvae [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1998, 201: 2263 - 2271.
- [20] Sattin G, Mager E M, Beltrami M, *et al.* Cytosolic carbonic anhydrase in the Gulf toadfish is important for tolerance to hypersalinity [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2010, 156 (2): 169 - 175.
- [21] Kultz D, Bastrop R, Jürss K, *et al.* Mitochondria-rich (MR) cells and the activities of the Na^+/K^+ -ATPase and carbonic anhydrase in the gill and opercular epithelium of *Oreochromis mossambicus* adapted to various salinities [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1992, 102 (2): 293 - 301.
- [22] Boutet I, Long C L, Bonhomme F. A transcriptomic approach of salinity response in the euryhaline teleost, *Dicentrarchus labrax* [J]. *Gene*, 2006, 379: 40 - 50.
- [23] Handeland S O, Björnsson B T, Arnesen A M, *et al.* Seawater adaptation and growth of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) of wild and farmed strains [J]. *Aquaculture*, 2003, 220: 367 - 384.
- [24] Hwang P P, Chou M Y. Zebrafish as an animal model to study ion homeostasis [J]. *European Journal of Physiology*, 2013, 465 (9): 1233 - 1247.

Effects of salinity on serum osmolality, catalase and gill ion-regulatory enzyme activities in silver pomfret

SHI Zhaohong^{1,2*}, ZHANG Chenjie^{1,2}, PENG Shiming¹, WANG Jiangang¹, GAO Quanxin¹

(1. Key Laboratory of East China Sea & Oceanic Fishery Resources Exploitation and Utilization, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The juvenile silver pomfret were cultured in water with salinity 14, 25 and 36, respectively, for 96 h. And their serum osmolality, catalase (CAT) and gill V-H⁺-ATPase (VHA), Ca²⁺-ATPase, carbonic anhydrase (CA) activities were tested in different salinity over time in this experiment. In this study, the serum osmolality which fluctuated was positively correlated to salinity, and its variation range is 271 – 379 mOsm/kg. The serum osmolality of different salinity would return to normal at 96 h. CAT activities of salinity 36 and 14 returned to normal after they rose significantly ($P < 0.05$); the highest point of them was salinity 36 at 8 h. VHA activities rose, then recovered in salinity 14, kept stable in control salinity, fell down then recovered in salinity 36. Ca²⁺-ATPase activities increased significantly when salinity changed ($P < 0.05$), and the variation trend in salinity 14 was more identifiable than that in salinity 36. CA activities in salinity 14 and 36 both increased significantly ($P < 0.05$), and the highest point was found in salinity 36 at 24 h. Through analysis of the data, the serum osmolality was significantly negatively correlated to gill VHA activity ($P < 0.01$), and it was significantly negatively correlated to CA activity ($P < 0.01$) in low salinity adaptation (14 and 25). It also illustrated a contrary trend between serum osmolality and Ca²⁺-ATPase activity in salinity 14. This research proved that serum osmolality which changes with salinity, will activate CAT when silver pomfret adapts to different salinity. And VHA, Ca²⁺-ATPase and CA are playing important roles in osmoregulation.

Key words: silver pomfret; salinity; osmolality; ATPase; carbonic anhydrase

Corresponding author: SHI Zhaohong. E-mail: shizhh@sh163.net