

文章编号: 1000-0615(2018)08-1199-10

DOI: 10.11964/jfc.20170410780

花鲈等渗点分析及海水淡化对 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 浓度、 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性及基因表达的影响

张晓燕¹, 温海深¹, 张凯强¹, 刘阳¹, 方秀², 李昀^{1*}

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 福建省花鲈育种重点实验室, 福建 福鼎 355200)

摘要: 广盐性鱼类有着较为复杂的渗透调节机制, 能够在较大盐度范围内存活并生长。通常认为鱼类在等渗环境下用于渗透调节的代谢能量最少, 有利于鱼类生长。本实验首先根据不同盐度下花鲈血清渗透压对应水体渗透压的变化, 计算得到花鲈的等渗点为11.4。而后进行海水淡化和淡水适应两个阶段的盐度实验, 通过对花鲈两个阶段中血清渗透压、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 浓度、 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶($\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$, NKA)活性及其基因表达的测定, 探讨了海水淡化对花鲈的生理影响与分子响应机制。在盐度实验中, Na^+ 和 Cl^- 浓度变化和血清渗透压变化趋势一致, 在淡化阶段显著下降, 在淡水适应阶段逐渐恢复稳定, 但仍低于起始水平。鳃组织中 NKA 基因表达结果显示, $\text{NK}\alpha 1a$ 和 $\text{NK}\alpha 1b$ 的变化趋势与 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性变化趋势基本一致, 在淡化阶段显著下降, 随后回升至稳定, 不同的是, 淡水适应后花鲈 $\text{NK}\alpha 1a$ 表达量与盐度30组无显著性差异, 而 $\text{NK}\alpha 1b$ 表达量显著低于盐度30; $\text{NK}\alpha 3$ 在淡化第1天, 表达量显著降低, 且在淡水(盐度0)环境下一直处于较低水平; $\text{NK}\beta$ 在淡水适应过程中的表达量总体高于淡化过程。相关性分析中, 海水淡化阶段, $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶和 $\text{NK}\alpha 1a$ 呈极显著相关。本研究通过对花鲈等渗点以及海水淡化和淡水适应阶段相关离子、酶、基因表达的测定, 弥补有关花鲈等渗点研究的空白, 同时为花鲈的淡化养殖提供一定的理论指导。

关键词: 花鲈; 等渗点; 盐度; 淡化; 渗透生理

中图分类号: Q 786; S 965

文献标志码: A

花鲈(*Lateolabrax maculatus*)隶属于鲈形目(Perciformes)、鲈科(Serranidae)、花鲈属(*Lateolabrax*), 俗名七星鲈、鲈鱼、海鲈、寨花等, 广泛分布于我国沿海, 属于浅海近岸中下层经济鱼类, 由于对水温、盐度和饲料营养的适应性强, 目前已成为南北方海水网箱养殖和淡化养殖的主要对象^[1]。

无论是生活在淡水还是海水中的硬骨鱼类, 其体液的渗透浓度是比较稳定的, 鱼体渗透压随外界环境盐度的波动变化不大^[2]。当广盐性鱼类进入淡水或者海水环境中后, 机体必须

克服渗透压力而主动从水体中吸收/分泌离子或者水分以维持体液的稳态, 此过程就会产生能量消耗。研究表明, 渗透调节消耗的能量占鱼体总耗能的20%~50%^[3]。等渗点是机体渗透压等于外界水体渗透压的特殊的盐度。在近等渗点时, 机体用于渗透调节的耗能最小, 因此有助于鱼类生长速率的提高^[4]。对鱼类等渗点的研究, 有利于探索机体最适的生长盐度。到目前为止, 尚未发现对花鲈等渗点的研究报道。

广盐性鱼类具有较强的渗透调控能力来适应盐度的变化。鳃是广盐性鱼类执行渗透调节

收稿日期: 2017-04-06 修回日期: 2017-10-13

资助项目: 现代农业产业技术体系专项(CARS-47); 山东省自然科学基金(ZR2016CQ21)

通信作者: 李昀, E-mail: yunli0116@ouc.edu.cn

功能的主要器官^[5], 鱼体可以通过鳃上皮细胞基底膜上的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, NKA)活性及 NKA 不同亚基 $[\alpha(\alpha1, \alpha2, \alpha3), \beta]$ 的表达变化来适应外界盐度的变化^[6]。 NKA 是为鳃提供离子运输动力的一个主要的活跃泵, 在维持细胞内环境稳定和持续的能量供应中发挥重要的作用, 是研究广盐性鱼类渗透调控能力的一个重要指标^[7]。

我国沿海花鲈产量有限, 且南方花鲈养殖群体种质退化, 品质和抗病力下降。同时, 近年来全球变暖现象导致海平面上升, 江河入口附近的湖泊沼泽等低盐水域扩大化^[8], 因而开展花鲈的淡化养殖研究具有生产上的实际意义。本研究测定了花鲈的等渗点, 为探索花鲈的最适养殖盐度提供了理论基础。并且通过花鲈在海水淡化及淡水适应过程中血清渗透压、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 浓度和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性的测定及基因表达分析, 初步探讨了花鲈渗透调节机制和盐度适应的生理响应, 为花鲈的淡化养殖提供一定的理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验在东营利津双赢水产苗种有限责任公司进行。实验对象为1龄花鲈, 体质量为 $(100.00 \pm 2.34)\text{g}$, 暂养在盐度为30的水池 $(5\text{ m} \times 5\text{ m} \times 1\text{ m})$ 中, 各理化指标均控制在适宜花鲈生长的条件下: 温度为 $(21.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, pH值为7.98~8.04, 溶解氧含量为6.90~8.54 mg/L, 亚硝酸盐 $<0.1\text{ mg/L}$, 光照周期14L:10D。

1.2 等渗点测定

实验设置5个盐度(0、10、20、30、40), 30为当地海水盐度, 实验开始前, 随机挑选养殖盐度为30的花鲈30尾, 直接转入各盐度组, 每个盐度设置3个平行, 实验进行10 d。实验结束时, 每个盐度组取3尾鱼的血清, 用于血清渗透压测定及等渗点的计算。

1.3 海水淡化实验

起始盐度为30, 淡化采取盐度每天下降10的方法, 3 d后盐度降为0。每天上午9:00降盐, 降盐前进行取样。取样时间点为淡化期的0、1、2和3 d以及淡化后的1、3、5和7 d。实验设置3个

重复, 实验用桶为3个300 L的长方体水族箱, 每桶养15尾花鲈, 实验共进行11 d。

实验期间的日常管理: 每天选择在2个摄食高峰期(8:00~9:00、15:00~16:00)进行投饵, 投喂前0.5 h停止充氧, 清理粪便并适当换水、投饵并记录投饵量, 0.5 h后清除残饵并开始充氧。实验用海水为砂滤海水, 淡水为曝气后自来水, 高盐度组用水为海水与海水晶配置而成, 其他各组盐度由上海水和淡水配置。

1.4 样品采集、处理及测定

实验结束后使用MS-222进行麻醉, 麻醉后先进行尾静脉采血, 然后解剖进行鳃组织的取样。血液于 4°C 冰箱静置3 h自然分层后, 4000 r/min离心10 min抽取上层血清, 用于血清渗透压及 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 浓度测定。鳃组织经液氮速冻后于 -80°C 超低温冰箱保存, 用于鳃丝 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性测定及基因表达分析。血清渗透压采用露点渗透压仪(Vapro-5520, 美国)进行测定, 用质量渗透浓度来表示, 定义为1 kg溶剂中1 mmol溶质为一个渗透压单位(mOsm/kg)。鳃丝 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性的测定采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行检测, 用定磷法测定酶活性, 具体测定方法参照说明书进行。血清等渗点的计算参考已有文献^[9], 即实验第10天时, 各盐度条件下所测得的花鲈血清渗透压和对应盐度水体渗透压间建立直线回归方程, 该直线与等渗点直线的交点对应的自变量即为血清等渗点。

根据花鲈的 NKA ($\text{NKA}\alpha1a$, $\text{NKA}\alpha1b$, $\text{NKA}\alpha3$, $\text{NKA}\beta$)基因序列, 设计实时荧光定量PCR(RT-PCR)引物(表1)。以18S $rRNA$ 为内参基因, 采用SYBR Green Premix Ex TaqTM (TliRNaseH Plus) 试剂盒, 在Applied Biosystems StepOneTM Plus Real-Time PCR仪上进行 NKA 基因在花鲈鳃组织中表达量的测定。RT-PCR反应程序: 95°C , 2 min; 95°C , 15 s; 退火15 s; 72°C , 15 s; 共40个循环, 获得 C_T 值后运用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 来分析荧光定量数据。

1.5 数据处理

所得数据均使用平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 采用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)及Duncan多重比较, 并对各项指标进行相关性分析, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平。

表 1 RT-PCR分析的引物序列

基因 genes	引物 (5'-3') primers (5'-3')
<i>NKAα1a</i>	F: ACGCCTGAATGGGTCAAGT
	R: TGGATACCGTAAGCGAGGAA
<i>NKAα1b</i>	F: CACAATGGCTCCCTGTCT
	R: CATCCCATCAACGAAGT
<i>NKAα3</i>	F: GGC GGGTCAATGAAGAAA
	R: GGAGGTTGGGTGGAAAGG
<i>NKAβ</i>	F: GGCATCTTCATCGGAACCAT
	R: GCCCACTTCGGATTTGTCTG
18S <i>rRNA</i>	F: GGGTCCGAAGCGTTTACT
	R: TCACCTCTAGCGGCACAA

2 结果

2.1 花鲈在盐度实验中的渗透压变化及等渗点

花鲈在盐度实验中的渗透压变化 盐度实验分2个阶段: 一个是从盐度30逐渐降到盐度0的淡化阶段(0、1、2和3分别对应的盐度为30、20、10和0); 另一个是花鲈在淡水中的适应阶段(4、6、8和10分别对应的是盐度降为0后的第1、3、5和7天)。盐度淡化及适应过程中, 花鲈血清渗透压变化结果显示, 血清渗透压随着盐度的降低而降低, 降到0时其值最低。在适应期中, 适应1 d后的渗透压要显著高于适应0 d时的值($P<0.05$), 但与盐度为10的血清渗透压值无显著性差异, 而后血清渗透压虽有下降, 但差异不显著(图1)。

花鲈等渗点的计算 线性回归分析表明, 血清渗透压和水质渗透压之间呈线性相关($R^2=0.9421, P=0.007$), 回归直线与等渗线的交点对应的渗透压为0.343 Osm/kg, 所对应的盐度即为等渗点, 为11.4(图2)。

2.2 盐度淡化实验中Na⁺、K⁺、Cl⁻浓度

盐度实验中, 花鲈血清离子浓度变化结果显示, 血清Na⁺、Cl⁻浓度和渗透压变化趋势相似, 随着盐度的降低而降低, 盐度降到0后的适应阶段又有所回升。Na⁺浓度在盐度为0组最低, 随后又恢复到盐度30的水平。在适应期内, Na⁺浓度与盐度30差异不显著。Cl⁻浓度在盐度10最低, 显著低于盐度30时的浓度($P<0.05$), 而

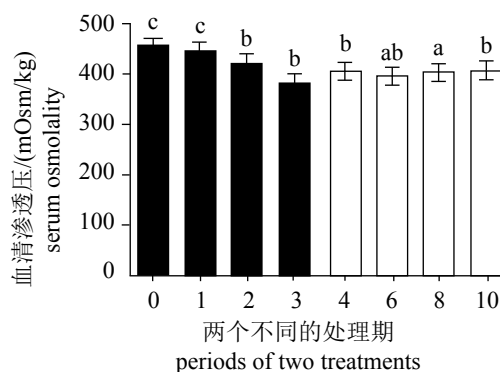


图 1 盐度对花鲈血清渗透压的影响

不同字母表示不同天数间血清渗透压有显著性差异($P<0.05$), 下同

Fig. 1 Effect of salinity on osmolality in serum of *L. maculatus*

Different letters indicate significant differences in serum osmolality between different days ($P<0.05$), the same below

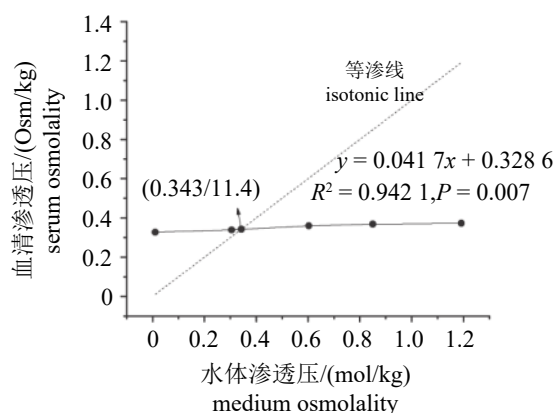


图 2 花鲈血清渗透压和水质渗透压之间的关系

Fig. 2 Relationship between serum osmolality and medium osmolality in *L. maculatus*

与盐度0无显著差异。盐度降到0后的适应阶段Cl⁻浓度各天数间无显著性差异, 且与盐度30间也无显著差异。K⁺浓度在盐水淡化阶段出现先下降后升高的趋势, 在盐度20组最低, 在盐度0组出现最高值, 在适应期的K⁺浓度均高于盐度30组, 且适应期的第1、4天显著高于盐度30组的K⁺浓度($P<0.05$)。从血清各离子的浓度变化幅度分析, 血清Na⁺变化最大(101.8~163.8 mmol/L)(图3)。

2.3 花鲈鳃组织Na⁺-K⁺-ATP酶活性

盐度实验中, 花鲈鳃组织Na⁺-K⁺-ATP酶活性变化结果显示, 盐水淡化及淡水适应过程对花鲈的Na⁺-K⁺-ATP酶活性影响明显。在淡化阶段, 鳃组织中Na⁺-K⁺-ATP酶活性呈现先降低后升

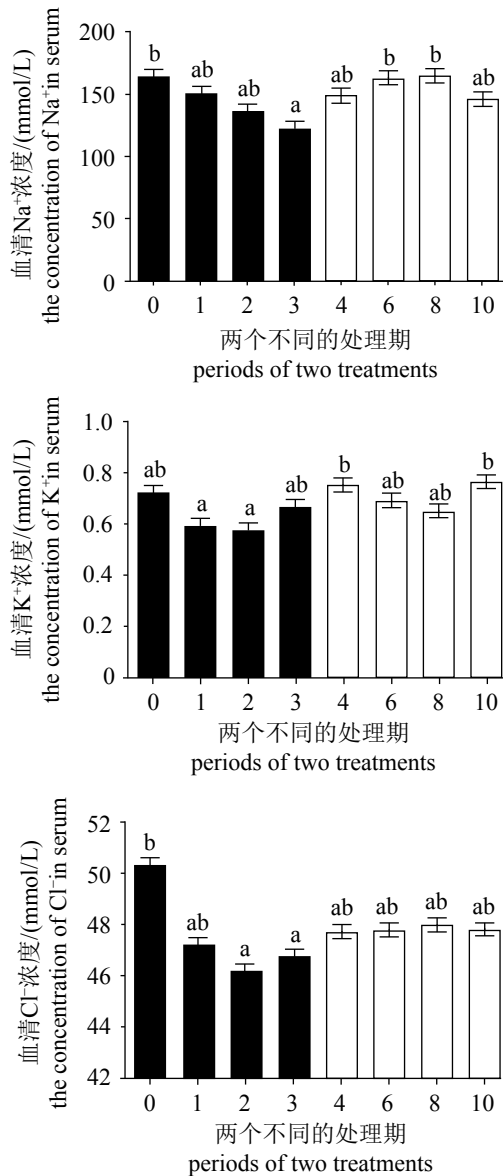


图3 盐度对花鲈血清离子浓度的影响

Fig. 3 Effects of different salinities on serum ion concentration in *L. maculatus*

高趋势, 盐度10的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性最低, 显著低于各盐度组($P<0.05$); 在盐度降到0之后的适应阶段, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性缓慢回升并趋于稳定, 但均显著低于盐度30组($P<0.05$)(图4)。

2.4 盐度实验花鲈鳃组织中NKA基因表达

盐度变化对花鲈鳃组织NKA基因家族表达影响结果显示, 盐水淡化及淡水适应过程对NKA基因家族的NK α 1a、NK α 1b、NK α 3和NK β 的mRNA表达都有不同程度的影响。NK α 1a和NK α 1b在盐度实验过程中均呈现先降低后升高的趋势。其中NK α 1a的表达量在盐度10时呈现

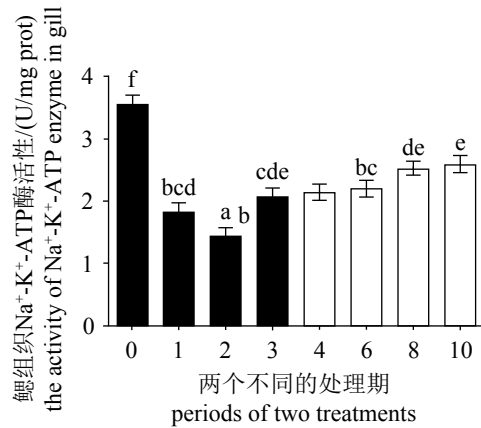


图4 盐度对花鲈鳃组织 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性的影响

Fig. 4 Effect of salinity on $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ enzyme activity in gill tissue of *L. maculatus*

最低水平, 随后逐渐升高, 并在适应期的第3天其表达水平显著升高而后保持稳定表达。NK α 1b表达量在淡化阶段均显著低于盐度30($P<0.05$)。在淡水适应期的第1天出现最低值, 第2天其表达量显著升高并保持稳定直至实验结束, 最终仍显著低于盐度30。NK α 3在盐度30的表达量显著高于其他组, 在其他各时间点表达差异不显著。NK β 在淡水适应过程中的表达量总体高于淡化过程表达量, 分别在两个阶段中的各时间点表达差异不显著(图5)。

2.5 花鲈淡化阶段各指标间的相关性

对花鲈盐度淡化阶段各指标间进行相关性分析, 结果显示, Na^+ 浓度和血清渗透压的相关系数为0.972, 呈显著正相关($P<0.05$), 表明花鲈血清渗透压主要受 Na^+ 浓度的影响; $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性变化和NK α 1a基因表达的相关系数为0.991, 呈极显著正相关关系($P<0.01$), 推测NK α 1a基因是调控 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性的主要功能单位(表2)。

3 讨论

广盐性鱼类有着较为复杂的盐度调控机制, 能够在较大盐度范围内存活并生长。当广盐性鱼类处于淡水环境时, 鱼体需要抵抗体内离子、矿物质的流失; 当处于海水环境中, 则需要抵御外界高渗环境引起的机体脱水状态, 这就需要广盐性鱼类有较强的盐度调控能力来适应外界环境的盐度变化。本实验从花鲈血清渗透压、离子变化以及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性和

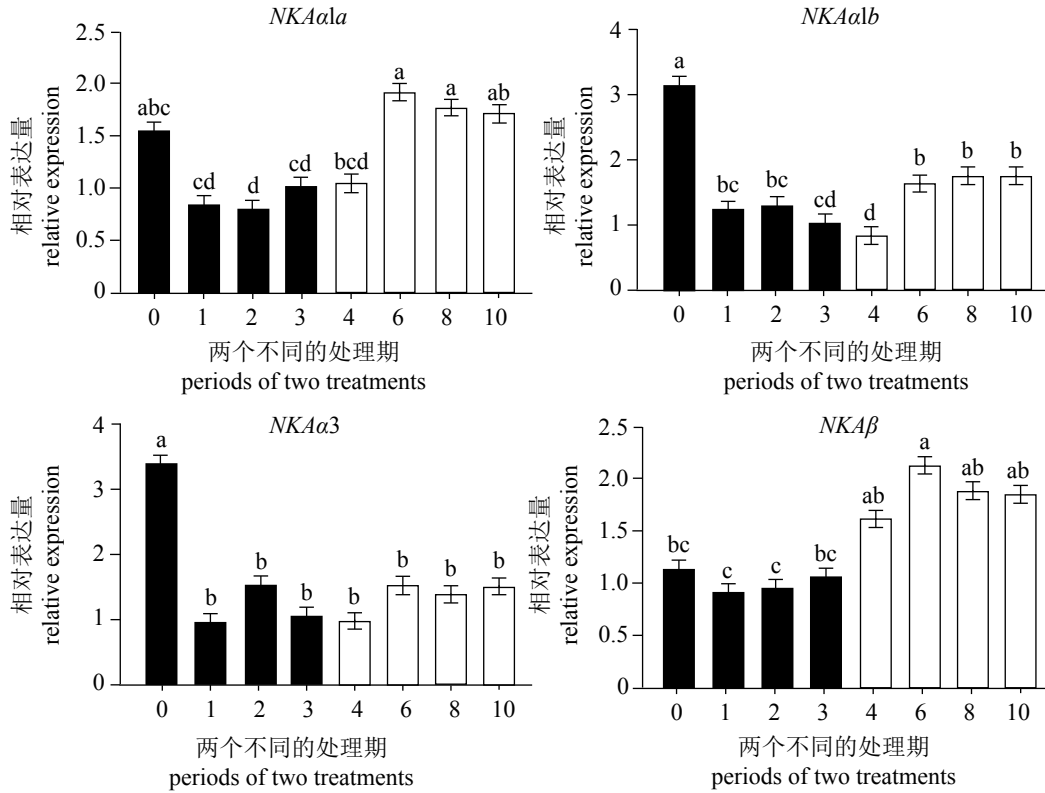


图 5 盐度对花鲈鳃组织NKA基因表达的影响

Fig. 5 Effects of different salinities on the expression of NKA genes in gill

表 2 花鲈淡化阶段鱼体内各指标间的相关性分析

Tab. 2 The correlation analysis between the various indicators of *L. maculatus* in the phases of sea water desalination

血清渗透压 osmolality in serum	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	
	0.972*	-0.513	0.751	
Na ⁺ -K ⁺ -ATP酶活 Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	NKAα1a	NKAα1b	NKAα3	NKAβ
	0.991**	0.921	0.885	0.863

注: “*”表示显著相关 ($P < 0.05$); “**”表示极显著相关 ($P < 0.01$)
 Notes: “*” significant positive correlations ($P < 0.05$); “**” extreme significant positive correlations ($P < 0.01$)

NKA基因表达变化趋势探讨盐度渐变对花鲈的影响。

3.1 盐度胁迫对花鲈血清渗透压、离子浓度的影响

无论生活在淡水还是海水, 广盐性鱼类的血清渗透压通常维持在相对稳定的范围内^[10]。在盐度胁迫后, 广盐性鱼类会进行主动的盐度适应性调节, 通过机体的渗透调控机制, 对离子和水分的吸收、分泌实现内环境的稳定^[5]。在本研究中, 盐度实验可分为两个阶段: 一个是从

盐度30逐渐降到盐度0的淡化阶段; 另一个是花鲈在盐度0的淡水中的适应阶段。结果显示, 在淡化阶段, 花鲈血清渗透压和Na⁺、Cl⁻浓度都随着盐度的降低而呈下降趋势, 并在淡水适应阶段逐渐回升, 趋于相对稳定。这一结果与税春等^[11]对斑尾复虾虎鱼 (*Synechogobius ommaturus*) 的研究相似, 在盐度0~50范围内, 其血清渗透压和离子含量与盐度变化呈正相关, 本研究中在花鲈的盐度淡化阶段, Na⁺浓度和血清渗透压的相关性分析呈显著相关。对多数广盐性鱼类的研究发现, 高盐胁迫能造成血清中离子的浓缩、渗透压的升高, 如牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[12]、莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)^[13]、点篮子鱼 (*Siganus guttatus*)^[14]、闪光鲟 (*Acipenser stellatus*)^[15]等。在本实验中, 花鲈在淡水条件下的第2天, 血清渗透压和各离子浓度就趋于稳定, 说明花鲈有着较强的盐度适应能力, 但盐度适应能力的大小与物种、发育时期以及盐度变化范围的不同而呈现一定的差异。牙鲆成鱼^[12]和银鲟 (*Pampus argenteus*) 幼鱼^[16]血浆渗透压及离子浓度都在低盐胁迫后的第2~3天趋于稳定, 卵形鲳

鲈(*Trachinotus ovatus*)^[17]在盐度胁迫后的第4天, 血浆渗透压趋于稳定。在整个盐度实验过程中, K^+ 的变化与盐度的波动并没有显著的相关性, 推断花鲈在盐度适应过程中, 维持其离子平衡的主要是 Na^+ , 其次是 Cl^- 。

3.2 等渗点及盐度胁迫对花鲈 Na^+-K^+-ATP 酶活性的影响

鳃是硬骨鱼类最主要的渗透调节器官, 鳃中 Na^+-K^+-ATP 酶是参与渗透调控最重要的代谢酶之一, 其主要功能是参与细胞内外 Na^+ 与 K^+ 的主动跨膜转运, 并且通过ATP的水解为各种离子的转运提供动力^[18]。在本实验中, Na^+-K^+-ATP 酶活性受盐度变化影响显著, 在对中吻鲟(*A. medirostris*)^[10]、银鲳幼鱼^[19]、金头鲷(*Sparus aurata*)^[20]、大西洋鲑(*Gadus morhua*)^[21]等多种硬骨鱼类的研究中都发现, Na^+-K^+-ATP 酶与盐度的波动变化呈现一定的相关性。对广盐性鱼类来说, 等渗状态是一种特殊的生理状态。有学者认为, 当鱼体处于等渗环境下, 机体的代谢耗能最少, 代谢水平最低, Na^+-K^+-ATP 酶活性也呈最低值^[18]。范春燕等^[17]在对卵形鲳鲹幼鱼的研究中发现, 与正常海水组(30)相比, 低盐组(5、10、15、20、25)和高盐组(35)的鳃丝 Na^+-K^+-ATP 酶活性随着盐度梯度呈“U”型分布, 在盐度35最高, 20最低。条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)盐度胁迫实验结果显示, 对比正常海水盐度组(28), 低盐组(8)和高盐组(38)的 Na^+-K^+-ATP 酶活性都显著升高^[22]。许多研究发现, 广盐性鱼类在低盐度环境中的生长水平较海水更有优势^[23-25], 这可能是因为在低盐度范围内, 鱼体的渗透代谢水平较低、耗能较少, 更多能量用于鱼体的生长。杜涛等^[26]在研究不同盐度对养殖I龄花鲈的生长特性差异中发现, 在盐度为12~18时花鲈生长速率、成活率和特定生长率较高。在本实验中, 测得花鲈等渗点对应的盐度为11.4, 更接近于淡盐水。本实验结果同样显示, 在盐度为10的环境中 Na^+-K^+-ATP 酶活性最低, 且在淡水适应后中的酶活性显著低于盐度30的水平, 从一定程度上说明, 相对于海水, 花鲈在偏淡水环境中的渗透代谢耗能相对较少, 可能更加有利于花鲈的生长, 但是这仅仅是从渗透代谢水平的研究推断, 还需要综合免疫、营养等多方面对花鲈的生长、代谢进行最适盐度的研究。

3.3 盐度胁迫对花鲈NKA基因表达的影响

NKA是由 α 和 β 2个亚单位形成的异四聚体组成的跨膜P型ATP酶, 其由分子量约100 ku的催化性 α 亚基和分子量约为55 ku的糖基化 β -亚基组成^[27]。研究表明NKA的活性通过NKA α 亚基和NKA β 亚基的转换来调节^[28-30]。 α 亚基包含 Na^+ 、 K^+ 和ATP的结合位点, 负责NKA的主要催化和离子转运工作, 而 β 亚基对稳定 α 亚基的折叠有重要作用^[31]。目前已经在许多物种的mRNA和蛋白质水平上进行了NKA各亚基对盐度调节与适应性的研究^[29, 32-33], 并推断NKA α 亚基表达量的改变可能是鱼类适应各种环境盐度的关键因素^[33]。在硬骨鱼中已经鉴定出 α 亚基的3种亚型($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$)^[29, 34]。在花鲈的转录组中, 本研究鉴定出NKA $\alpha 1$ 的两个拷贝(NKA $\alpha 1a$ 、NKA $\alpha 1b$)以及NKA $\alpha 3$, 并在本实验中检测了以上基因在淡水淡化及淡水适应过程中的表达变化情况。NKA $\alpha 1a$ 、NKA $\alpha 1b$ 和NKA $\alpha 3$ 在盐度实验的表达趋势不尽相同, 但是都在降盐过程中的表达量出现下降, 其中NKA $\alpha 1a$ 和NKA $\alpha 1b$ 在盐度适应期又有所回升, 且NKA $\alpha 1a$ 在淡水中的表达量要高于在海水中的表达量, 而NKA $\alpha 1b$ 和NKA $\alpha 3$ 在淡水中适应后的表达量显著低于开始的海水组。NKA β 最初受盐度胁迫影响不显著, 但是在降到0后的适应期, 其表达水平慢慢上升并高于海水组。可见, 盐度变化能够引起花鲈NKA不同亚型在鳃组织中的差异表达, 且不同亚型受盐度影响的表达水平和表达趋势也不同。在对大西洋鲑(*Salmo salar*)的研究中同样发现, 不同亚型NKA $\alpha 1a$ 和NKA $\alpha 1b$ 在淡水和海水中的作用有差异, 盐度变化能够诱导NKA不同亚型的表达^[35]。此外, 不同物种、不同组织器官中亚型的表达也存在差异^[36]。日本鳗鲡(*Anguilla japonicus*)在海水环境中, 鳃组织中NKA α 的表达量显著升高, 而NKA α 在肾脏中的表达水平在淡水中较高^[37]。学者通过免疫组织化学的方法检测, 发现在中华鲟(*A. sinensis*)鳃组织中, NKA广泛分布于鳃丝和鳃小叶上, 相对比淡水组, 盐度组细胞荧光强度和免疫阳性细胞数目要显著增强、增多。大量硬骨鱼类的研究均表明, NKA与鱼类的盐度适应性调节密切相关, NKA活性与其mRNA表达都有一定的相关性, 且具有物种、组织特异性。本实验中, NKA $\alpha 1a$ 和NKA $\alpha 1b$ 的表达水平与NKA酶活性及渗

透压变化趋势相似,且 Na^+/K^+ -ATP酶活性和 NKAA1a 基因表达呈极显著相关,推断 NKAA1 是影响NKA酶活性的关键基因,在花鲈渗透调控及盐度适应中起重要作用。

本实验通过对花鲈淡化及适应过程中的血清渗透压、离子浓度和 Na^+/K^+ -ATP酶活性及其基因表达综合分析,推断花鲈在接近等渗点(11.4)的盐度环境中耗能最少,利于花鲈生长。NKA酶活性与其mRNA表达变化说明了NKA基因在花鲈的渗透调控中的重要作用,且不同的基因亚型的差异表达说明了其在盐度适应中的功能差异,各亚型的功能还需要深入研究。总之,本研究测得了花鲈的等渗点并结合生理生化指标及基因表达情况,探讨了花鲈的盐度调控及适应性机制,为花鲈的淡化养殖提供一定的理论指导。

参考文献:

- [1] 温海深,张美昭,李吉方,等.我国花鲈养殖产业现状与种子工程研究进展[J].渔业信息与战略,2016,31(2):105-111.
Wen H S, Zhang M Z, Li J F, et al. Research progress of aquaculture industry and its seed engineering in spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) of China[J]. Fishery Information & Strategy, 2016, 31(2): 105-111(in Chinese).
- [2] 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.
Pan L Q, Tang X M, Liu H Y, et al. Effects of salinity on plasma osmolality and gill Na^+/K^+ -ATPase activity of juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2006, 37(1): 1-6(in Chinese).
- [3] Bœuf G, Payan P. How should salinity influence fish growth?[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2001, 130(4): 411-423.
- [4] 房子恒.不同盐度对半滑舌鳎幼鱼生长的影响及其生理生态学机制的研究[D].青岛:中国海洋大学,2013.
Fang Z H. Effects of salinity on the growth of juvenile tongue sole and its eco-physiological mechanisms[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013 (in Chinese).
- [5] 蒋玫,李磊,沈新强,等.鲮鱼鳃组织 $14-3-3a$ 、 NKCCla 、 Apo-14 和 Na^+/K^+ -ATPase β 基因表达对盐度变化的响应[J].生态学杂志,2014,33(9):2429-2435.
Jiang M, Li L, Shen X Q, et al. Effects of abrupt salinity stress on gill $14-3-3a$, NKCCla , Apo-14 and Na^+/K^+ -ATPase β expression of *Mugil cephalus*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2014, 33(9): 2429-2435(in Chinese).
- [6] Evans D H, Piermarini P M, Choe K P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste[J]. Physiological Reviews, 2005, 85(1): 97-177.
- [7] 区又君,范春燕,李加儿,等.盐度对卵形鲳鲹幼鱼渗透压调节和饥饿失重的影响[J].生态学报,2014,34(24):7436-7443.
Ou Y J, Fan C Y, Li J E, et al. Effects of salinity on the osmoregulation and weight loss from starvation in *Trachinotus ovatus* juvenile[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(24): 7436-7443(in Chinese).
- [8] 王友绍.海洋生态系统多样性研究[J].中国科学院院刊,2011,26(2):184-189.
Wang Y S. Research on the diversity of marine ecosystems[J]. Bulletin of Chinese Academy of Sciences, 2011, 26(2): 184-189(in Chinese).
- [9] 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.
Qu L, Zhuang P, Zhang L Z, et al. Influence of salinity change on serum osmolality, ions and gill Na^+/K^+ -ATPase activity in juvenile Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(2): 243-251(in Chinese).
- [10] Allen P J, Cech Jr J J, Kültz D. Mechanisms of seawater acclimation in a primitive, anadromous fish, the green sturgeon[J]. Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, 2009, 179(7): 903-920.
- [11] 税春,施永海,华雪铭,等.盐度渐变对斑尾复鰕虎鱼幼鱼血清渗透压和离子浓度及鳃丝 Na^+/K^+ -ATP酶活力的影响[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2014,40(1):67-71.
Shui C, Shi Y H, Hua X M, et al. Effects of gradual salinity change on plasma osmolality, ions and gill Na^+/K^+ -ATPase activity of goby (*Synechogobius ommaturus* Richardson) young fish[J]. Journal of Hunan Agricultural

- al University (Natural Science Edition), 2014, 40(1): 67-71(in Chinese).
- [12] 贾倩倩, 吕为群. 低盐胁迫对褐牙鲈成鱼血浆渗透压、皮质醇、生长激素和催乳素的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2016, 25(1): 71-77.
- Jia Q Q, Lü W Q. Effects of low salinity stress on plasma osmolality, cortisol, prolactin and growth hormone of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(1): 71-77(in Chinese).
- [13] Sardella B A, Brauner C J. The effect of elevated salinity on 'California' Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *O. urolepis hornorum*) metabolism[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2008, 148(4): 430-436.
- [14] 章龙珍, 罗集光, 赵峰, 等. 盐度对点篮子鱼血清渗透压、离子含量及鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase酶活力的影响[J]. *海洋渔业*, 2015, 37(5): 449-456.
- Zhang L Z, Luo J G, Zhao F, *et al.* Influence of salinity on serum osmolality, ion content and gill Na^+ , K^+ -ATPase activity of *Siganus guttatus*[J]. *Marine Fisheries*, 2015, 37(5): 449-456(in Chinese).
- [15] Krayushkina L S, Semenova O G, Vyushina A V, *et al.* Morphofunctional remodelling of the osmoregulatory system in starred sturgeon *Acipenser stellatus* (Acipenseridae) during transition from hyperosmotic to hypoosmotic regulation[J]. *Journal of Ichthyology*, 2015, 55(2): 259-272.
- [16] 施兆鸿, 张晨捷, 彭士明, 等. 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[J]. *水产学报*, 2013, 37(11): 1697-1705.
- Shi Z H, Zhang C J, Peng S M, *et al.* Effects of salinity on serum osmolality, catalase and gill ion-regulatory enzyme activities in silver pomfret[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(11): 1697-1705(in Chinese).
- [17] 范春燕, 区又君, 李加儿, 等. 急性盐度胁迫对卵形鲳鲹幼鱼 Na^+/K^+ -ATPase酶活性和渗透压的影响[J]. *台湾海峡*, 2012, 31(2): 218-224.
- Fan C Y, Ou Y J, Li J E, *et al.* Effects of acute salinity stress on Na^+/K^+ -ATPase and osmotic pressure of juvenile *Trachinotus ovatus*[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2012, 31(2): 218-224(in Chinese).
- [18] Gaumet F, Boeuf G, Severe A, *et al.* Effects of salinity on the ionic balance and growth of juvenile turbot[J]. *Journal of Fish Biology*, 1995, 47(5): 865-876.
- [19] 郭勤单, 徐国成, 王有基, 等. 急性盐度应激对银鲳(*Pampus argenteus*)幼鱼耐受水平评价[J]. *海洋环境科学*, 2013, 32(4): 560-564.
- Guo Q D, Xu G C, Wang Y J, *et al.* Evaluate of tolerance to acute salinity stress in juvenile silver pomfret *Pampus argenteus*[J]. *Marine Environmental Science*, 2013, 32(4): 560-564(in Chinese).
- [20] Fielder D S, Allan G L, Pepperall D, *et al.* The effects of changes in salinity on osmoregulation and chloride cell morphology of juvenile Australian snapper, *Pagrus auratus*[J]. *Aquaculture*, 2007, 272(1-4): 656-666.
- [21] Kreiss C M, Michael K, Lucassen M, *et al.* Ocean warming and acidification modulate energy budget and gill ion regulatory mechanisms in Atlantic cod (*Gadus morhua*)[J]. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 2015, 185(7): 767-781.
- [22] Sun P, Peng S M, Yin F, *et al.* Effects of salinity on activity of Na^+/K^+ -ATPase in juvenile *Oplegnathus fasciatus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(8): 1204-1209.
- [23] Lambert Y, Dutil J D, Munro J. Effects of intermediate and low salinity conditions on growth rate and food conversion of Atlantic cod (*Gadus morhua*)[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1994, 51(7): 1569-1576.
- [24] Imsland A K, Foss A, Gunnarsson S, *et al.* The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Aquaculture*, 2001, 198(3-4): 353-367.
- [25] Woo N Y S, Kelly S P. Effects of salinity and nutritional status on growth and metabolism of *Spams sarba* in a closed seawater system[J]. *Aquaculture*, 1995, 135(1-3): 229-238.
- [26] 杜涛, 黄洋, 覃雪迎, 等. 不同盐度养殖 I 龄花鲈(*Lateolabrax japonicus*)的生长特性差异分析[J]. *海洋与湖泊*, 2013, 44(2): 337-341.
- Du T, Huang Y, Tan X Y, *et al.* Difference analysis on growth characteristic of one year old *Lateolabrax japonicus* cultured at different salinity[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(2): 337-341(in Chinese).
- [27] Blanco G, Mercer R W. Isozymes of the Na^+/K^+ -ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function[J]. *The*

- American Journal of Physiology, 1998, 275(5 Pt 2): F633-F650.
- [28] Blanco G. Na, K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation[J]. *Seminars in Nephrology*, 2005, 25(5): 292-303.
- [29] Yang W K, Chung C H, Cheng H C, *et al.* Different expression patterns of renal Na^+/K^+ -ATPase α -isoform-like proteins between tilapia and milkfish following salinity challenges[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 202: 23-30.
- [30] Takei Y, Hiroi J, Takahashi H, *et al.* Diverse mechanisms for body fluid regulation in teleost fishes[J]. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2014, 307(7): R778-R792.
- [31] Suhail M. Na^+/K^+ -ATPase: ubiquitous multifunctional transmembrane protein and its relevance to various pathophysiological conditions[J]. *Journal of Clinical Medicine Research*, 2010, 2(1): 1-17.
- [32] Richards J G, Semple J W, Bystriansky J S, *et al.* Na^+/K^+ -ATPase alpha-isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2003, 206(Pt 24): 4475-4486.
- [33] Tang C H, Chiu Y H, Tsai S C, *et al.* Relative changes in the abundance of branchial Na^+/K^+ -ATPase α -isoform-like proteins in marine euryhaline milkfish (*Chanos chanos*) acclimated to environments of different salinities[J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: C*, 2009, 311A(7): 521-529.
- [34] Armesto P, Campinho M A, Rodríguez-Rúa A, *et al.* Molecular characterization and transcriptional regulation of the Na^+/K^+ ATPase α subunit isoforms during development and salinity challenge in a teleost fish, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 175: 23-38.
- [35] McCormick S D, Regish A M, Christensen A K. Distinct freshwater and seawater isoforms of Na^+/K^+ -ATPase in gill chloride cells of Atlantic salmon[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(24): 3994-4001.
- [36] 封苏娅. 长江口中华鲟幼鱼鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase基因克隆、表达和酶的定位[D]. 上海: 华东理工大学, 2012. Feng S Y. Gene clone and expression, protein location of Na^+/K^+ -ATPase in gills of juvenile *Acipenser sinensis* from Yangtze River Estuary[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2012 (in Chinese).
- [37] Tang C H, Lai D Y, Lee T H. Effects of salinity acclimation on Na^+/K^+ -ATPase responses and *FXFD11* expression in the gills and kidneys of the Japanese eel (*Anguilla japonicus*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2012, 163(3-4): 302-310.

Analysis of the isotonic point and effects of seawater desalination on the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ concentration, $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ activity and relative gene expressions in *Lateolabrax maculatus*

ZHANG Xiaoyan¹, WEN Haishen¹, ZHANG Kaiqiang¹, LIU Yang¹, FANG Xiu², LI Yun^{1*}

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ocean University of China, Ministry of Education, Qingdao 266003, China;

2. Key Laboratory of Breeding *Lateolabrax Japonicus* in Fujian, Fuding 355200, China)

Abstract: Euryhaline fish, which can survive and grow in a wide range of salinity environment, have a complex mechanism to deal with salinity change. It is generally believed that at the isotonic environment, the energy consumption of fish used for osmotic regulation is the least, which was beneficial to fish growth. No previous study has reported about the isotonic point in *Lateolabrax maculatus*. Therefore, in this study, the blood osmotic pressure, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ concentration, $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ activity and relative gene expressions were detected during the periods of water desalination and freshwater adaptation. Result showed that the isotonic point of *L. maculatus* was 11.4 according to the changing characteristics of the osmotic pressure in fish plasma and the corresponding osmotic pressure of different water salinities. During the experiment of water desalination, both the concentrations of Na^+ , K^+ and Cl^- and serum osmotic pressure were decreased significantly, with a slow recovery after freshwater adaptation. The results of mRNA expression of *NKA* genes in gill showed that the change trend of *NKA α 1a* and *NKA α 1b* was similar to $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ activity, except that the expression of *NKA α 1a* in fresh water was not significantly different from that of the 30 seawater group, but the expression level of *NKA α 1b* in fresh water was lower than 30 seawater group. After 1 day's water desalination, the expression level of *NKA α 3* decreased significantly, and remained low expression during fresh water adaptation. This study provided theoretical basis for desalination culture of *L. maculatus*.

Key words: *Lateolabrax maculatus*; isotonic point; salinity; desalination; osmotic physiology

Corresponding author: LI Yun. E-mail: yunli0116@ouc.edu.cn

Funding projects: Agriculture Research System of China (CARS-47); Natural Science Foundation of Shandong Province, China (ZR2016CQ21)