

溶解氧水平对青海湖裸鲤体肾组织结构及抗氧化酶活性的影响

陈付菊 赵宇田 付生云 李雪源

DISSOLVED OXYGEN LEVEL ON THE BODY KIDNEY STRUCTURE AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES OF QINGHAI LAKE SCALELESS CARP, *GYMNOCYPRIS PRZEWALSKII*

CHEN Fu-Ju, ZHAO Yu-Tian, FU Sheng-Yun, LI Xue-Yuan

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2021.2021.011>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

光强对菹草生长及抗氧化酶活性的影响

EFFECTS OF LIGHT INTENSITY ON GROWTH AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITY OF *POTAMOGETON CRISPUS*
水生生物学报. 2018, 42(4): 846–853 <https://doi.org/10.7541/2018.104>

人工模拟产卵环境中青海湖裸鲤的繁殖行为

REPRODUCTIVE BEHAVIORS OF *GYMNOCYPRIS PRZEWALSKII* IN ARTIFICIAL MIMIC SPAWNING ENVIRONMENTS
水生生物学报. 2021, 45(5): 1120–1128 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.031>

青海湖裸鲤和黄河裸裂尻鱼感染多子小瓜虫的病理学比较研究

THE DIFFERENT PATHOLOGY OF *GYMNOCYPRIS PRZEWALSKII* AND *SCHIZOPYGOPSIS PYLZOWI* INFECTED WITH *ICHTHYOPHTHIRIUS MULTIFILIIS*
水生生物学报. 2019, 43(5): 1081–1091 <https://doi.org/10.7541/2019.127>

青海湖裸鲤舌状绦虫裂头蚴的分子鉴定及系统发育研究

MOLECULAR IDENTIFICATION AND PHYLOGENETIC STUDY OF *LIGULA INTESTINALIS* PLEROCEROID IN *GYMNOCYPRIS PRZEWALSKII* FROM THE QINGHAI LAKE, CHINA
水生生物学报. 2018, 42(1): 33–38 <https://doi.org/10.7541/2018.005>

饲料碳水化合物水平对拟穴青蟹稚蟹生长、体成分和消化酶活性的影响

EFFECTS OF DIETARY CARBOHYDRATE LEVEL ON GROWTH PERFORMANCE, BODY COMPOSITION AND DIGESTIVE ENZYME ACTIVITIES OF JUVENILE CRAB, *SCYLLA PARAMAMOSAIN*
水生生物学报. 2019, 43(2): 252–258 <https://doi.org/10.7541/2019.031>

三种不同的铜源对珍珠龙胆石斑鱼生长、抗氧化酶活性及肠道形态的影响

EFFECTS OF THREE KIND CU SOURCES ON GROWTH PERFORMANCE, ANTIOXIDANT ENZYMES AND INTESTINAL MORPHOLOGY OF JUVENILE PEARL GENTIAN GROUPER (*EPINEPHELUS LANCELATUS* ♂ × *EPINEPHELUS FUSCOCUTTATUS* ♀)
水生生物学报. 2019, 43(4): 739–747 <https://doi.org/10.7541/2019.087>

doi: 10.7541/2021.2021.011

溶解氧水平对青海湖裸鲤体肾组织结构及抗氧化酶活性的影响

陈付菊¹ 赵宇田¹ 付生云² 李雪源¹

(1. 青海大学农牧学院, 西宁 810016; 2. 青海省裸鲤救助中心, 西宁 810003)

摘要: 为研究溶解氧水平对青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)体肾组织结构及抗氧化酶活性的影响, 选择平均体重为(97.68±0.12) g的青海湖裸鲤, 随机分为三组: 中度低氧组(3.0±0.1) mg/L、重度低氧组(0.7±0.1) mg/L和常氧组(8.4±0.1) mg/L, 于低氧胁迫8h和24h, 观察体肾显微结构和线粒体超微结构并检测线粒体膜电位及抗氧化酶活性。结果显示, 中度和重度低氧胁迫对体肾显微结构和线粒体超微结构未造成损伤, 但中度和重度低氧胁迫24h时体肾杆状线粒体比例增加($P<0.05$), 且中度和重度低氧胁迫使体肾线粒体膜电位降低($P<0.05$)。中度低氧胁迫对体肾超氧化物歧化酶(SOD)活性和过氧化氢(H₂O₂)含量无影响($P>0.05$), 但重度低氧胁迫使SOD活性和H₂O₂含量增加($P<0.05$)。中度和重度低氧胁迫使体肾总抗氧化能力(T-AOC)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)和丙二醛(MDA)含量增加($P<0.05$)。推测为适应不同低氧环境, 青海湖裸鲤体肾在线粒体形态和相关抗氧化酶活性方面做出适应性调整。研究结果为揭示青海湖裸鲤低氧适应机制提供了一定的理论依据。

关键词: 溶解氧水平; 体肾; 显微和超微结构; 抗氧化酶活性; 青海湖裸鲤

中图分类号: Q178.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2022)05-0679-08



水体中溶解氧(Dissolved oxygen, DO)作为影响鱼类生命活动的重要指标, 与鱼类的生长^[1]、生殖^[2]和能量代谢^[3]等生命活动密切相关。然而水体环境中的DO水平常随地理位置、季节、水流状态和水体环境等变化而呈现出一定的波动性(4.0—7.4 mg/L)^[4]。当水体中DO含量低于2.0 mg/L时, 鱼会因低氧或缺氧表现出浮头现象, 当DO含量低于1.0 mg/L时, 鱼会出现严重浮头甚至因缺氧而致死^[5]。缺氧会影响鱼类生理机能和器官形态结构^[6], 而缺氧对其生理状态和器官形态结构的影响与其体内活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS)的累积密切相关。

线粒体被认为是氧浓度感受器, 也是产生ROS的重要细胞器^[7]。当机体面临急性或严峻缺氧时, 细胞线粒体发生损伤, 线粒体蛋白质合成受阻, 数目减少, 嵴消失, 氧化力下降, 进而使线粒体产生过量的ROS^[8], 过多的ROS会攻击生物膜、蛋白质和核酸, 导致DNA、蛋白质和脂质的氧化损伤, 引发生物体生理机能改变、组织损伤及代谢紊乱等^[9-11]。

然而, 细胞内存在ROS清除系统如超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPX)和过氧化氢酶(Catalase, CAT)等能够清除过量ROS使细胞内ROS的产生与清除处于动态平衡状态^[12]。研究表明, 在低氧环境下, 线粒体通过ROS信号间接激活低氧诱导因子(HIF)而介导机体对低氧的适应^[13]。因此, 以线粒体ROS为切入点研究细胞低氧应对对揭示高原土著动物低氧适应机制具有重要意义。

青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)作为青海湖中唯一的经济鱼类, 在青海湖整个生态系统中居于核心地位。自20世纪60年代初至90年代末, 由于自然环境的破坏和人为过度的捕捞, 导致青海湖裸鲤资源急剧下降。自21世纪开始, 青海省通过封湖育渔、增殖放流和修设洄游通道等资源保护措施使其数量恢复至8800万千克, 但与原始蕴藏量的32万吨仍有较大差距。2009年, 青海湖裸鲤在《中国物种红色名录》脊椎动物篇中被列为国家二级保护濒危物种, 2010年被列为世界濒危物种之一^[14]。

收稿日期: 2021-02-04; 修订日期: 2021-06-24

基金项目: 青海省科技厅应用基础研究项目(2018-ZJ-729)资助 [Supported by the Basic Research Project of Science and Technology Department of Qinghai Province (2018-ZJ-729)]

通信作者: 陈付菊(1979—), 女; 博士; 研究方向为土著动物低氧适应机制。E-mail: chenfuju79@126.com

因此,保护青海湖裸鲤资源具有非常重要的意义。

青海湖裸鲤长期生活在高海拔(3200 m)的低氧(溶解氧约6 mg/L)环境中,对于环境溶解氧的波动表现出较强的耐受能力^[15],是研究低氧耐受机制的理想动物模型。然而,截至目前对青海湖裸鲤的研究主要集中在盐度适应特性^[16-18]、繁殖特性^[19]和肠道菌群^[20,21]等方面,而对其低氧耐受的研究较少见,仅见低氧胁迫对青海湖裸鲤鳃组织结构的影响^[15]。

肾作为鱼类的主要排泄器官,在清除鱼类体内有害代谢产物过程中发挥重要的作用^[22]。黄建盛等^[23]和区又君等^[24]发现,急性低氧胁迫会造成军曹鱼(*Rachycentron canadum*)和卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)肾损伤,提示肾对低氧敏感。因此,本研究以青海湖裸鲤体肾为研究对象,通过研究青海湖裸鲤在低氧胁迫下体肾线粒体超微结构及相关抗氧化酶活性的变化规律,以期探讨青海湖裸鲤低氧的适应能力,为青海湖裸鲤的资源保护提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

性成熟的青海湖裸鲤取自青海湖黑马河,体长(24.11±0.12) cm,体重(97.68±0.12) g。正式实验前在室内暂养1周,暂养水温(14.5±0.7)℃,水体DO维持在(8.4±0.1) mg/L(自然水体中的DO值),即本实验中为常氧,正式实验前1天停止进食。丙二醛(MDA)测定试剂盒(A003-1)、过氧化氢(H₂O₂)测定试剂盒(A064-1)、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(A001-3)、谷胱甘肽过氧化物(GPX)测定试剂盒(A005-1)和总蛋白测定试剂盒(A045-2)均购自南京建成生物工程研究所;组织线粒体分离试剂盒(C3606)、JC-1线粒体膜电位检测试剂盒(C2006)、Bradford蛋白浓度试剂盒(P0006C)均购自中国碧云天生物公司;詹纳斯绿B(J8020)购自北京索莱宝科技有限公司;氯仿、无水乙醇等均购自天津市富宇精细化工有限公司。

1.2 试验设计

青海湖裸鲤中度和重度低氧胁迫均采用自制水族箱顶部覆盖塑料膜,水体充氮除氧方法而获得。维持低氧期间,利用AZ8402溶解氧测定仪定期监控水体溶解氧浓度,参见文献^[25]。

实验鱼分成3组,重度低氧组、中度低氧组和常氧组,每组设置3个平行,每组20尾。重度低氧组在1h内将DO从(8.4±0.1)降至(0.7±0.1) mg/L,并维持24h;中度低氧组在1h内将DO从(8.4±0.1)降至(3.0±0.1) mg/L,并维持24h;常氧组用氧泵将水体DO维持在(8.4±0.1) mg/L。在低氧胁迫结束后,分

别在中度低氧24h及重度低氧8h和24h时,将鱼用适量MS-222溶液麻醉,迅速解剖后取体肾(1对),用生理盐水冲洗,取左侧体肾并提取线粒体用于膜电位的检测(8尾/组);取右侧前1/3体肾,4%多聚甲醛缓冲液(pH=7.4)固定用于组织结构的观察(4尾/组);取右侧后1/3体肾,2.5%戊二醛固定用于线粒体超微结构的观察(4尾/组);取左侧和右侧结合处体肾,储存于液氮用于抗氧化酶活性的检测(8尾/组)。

1.3 试验方法

体肾组织显微结构的观察 用4%多聚甲醛固定后的体肾组织,经50%、75%、85%、95%和100%的梯度酒精逐级脱水后,二甲苯透明,石蜡包埋,用切片机(Leica RM 2135)切6 μm厚连续切片,脱蜡以及梯度乙醇脱水,苏木精-伊红(HE)染色,自来水返蓝、脱水、透明、封片,光学显微镜下观察。

线粒体超微结构的观察 用2.5%戊二醛固定的体肾组织,用0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH=7.4)洗涤3次,每次5min。1%四氧化锇固定1h,梯度酒精脱水,环氧树脂包埋,定位、超薄切片,经醋酸铀及柠檬酸铅双重染色,透射电镜下观察、拍照,并统计杆状线粒体比例(杆状线粒体数/圆形线粒体数×100%)。

体肾抗氧化酶活性的测定 将液氮保存的肾脏组织冰上解冻,称量,按重量体积比1:9 (g/mL)向样品中加入生理盐水,并振荡混匀后4℃离心10min(2500 r/min),取上清液,保存于-80℃冰箱暂存,用于检测抗氧化指标和蛋白浓度。

体肾线粒体的分离和线粒体膜电位的检测

按试剂盒说明进行线粒体分离,取新鲜体肾组织(90 mg),于预冷离心管(1.5 mL)内用剪刀剪碎后,加入900 μL预冷的线粒体分离试剂A,冰浴匀浆10次左右,4℃离心5min(600 r/min),将上清转移到另一离心管中,4℃离心(11000 r/min) 10min,小心去除上清,获得沉淀物即线粒体,用线粒体储存液制备线粒体悬液并用Bradford蛋白浓度试剂盒检测蛋白浓度和詹纳斯绿B检测线粒体活性。以上步骤均在冰上进行,且不超过1h。

根据线粒体膜电位检测试剂盒说明书进行线粒体膜电位的检测,在配置好的JC-1染色工作液中加入纯化的线粒体,用荧光酶标仪检测线粒体膜电位的变化,并计算相对荧光强度。相对荧光强度=绿色荧光强度/红色荧光强度。检测JC-1单体时,激发光波长490 nm,发射光波长530 nm;检测JC-1聚合物时,激发光波长525 nm,发射光波长590 nm。

1.4 统计分析

结果均采用平均值±标准误(mean±SEM)表示,

采用SPSS 17.0软件对实验数据进行单因素方差分析, 不同时间点的数据进行Duncan检验进行多重比较, 以 $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 溶解氧水平对青海湖裸鲤体肾显微结构的影响

在光学显微镜下青海湖裸鲤体肾由肾小球、第一近曲小管、第二近曲小管、集合管和远曲小管组成。常氧组体肾显微结构正常, 肾小球和肾小管结构完整。第一近曲小管上皮细胞呈单层柱状, 管腔小而规则, 第二近曲小管上皮细胞呈单层柱状, 管腔呈圆形, 集合管上皮细胞呈单层立方形, 管腔不规则, 远曲小管上皮细胞呈单层立方上皮, 管腔呈圆形, 管径相对较大, 血管内含有红细胞(图 1A)。重度低氧8h(图 1B)和24h(图 1C)及中度低氧24h(图 1D)胁迫对肾小球、近曲小管、远曲小管及集合管结构均没有影响。

2.2 溶解氧水平对青海湖裸鲤体肾线粒体超微结构的影响

透射电镜观察发现青海湖裸鲤常氧组体肾肾小管上皮细胞线粒体多呈圆形和椭圆形, 偶见有杆状线粒体, 内有嵴, 线粒体膜完整(图 2A); 重度低氧

胁迫8h时线粒体多呈圆形和椭圆形, 偶见有细长的杆状线粒体, 线粒体膜完整(图 2B); 重度低氧胁迫24h时线粒体多呈杆状和椭圆形, 线粒体膜和嵴完整(图 2C); 中度低氧胁迫24h时线粒体多呈长杆状, 线粒体膜完整(图 2D)。

通过统计杆状线粒体比例后发现, 重度低氧胁迫8h时体肾杆状线粒体比例与常氧组差异不显著($P>0.05$); 中度和重度低氧胁迫24h时体肾杆状线粒体比例显著增加($P<0.05$; 图 3)。

2.3 溶解氧水平对青海湖裸鲤体肾线粒体膜电位的影响

由图 4可见, 体肾线粒体绿色荧光与红色荧光强度比值在重度低氧胁迫8h时升至最大($P<0.05$), 24h时降低($P<0.05$), 但重度低氧8h和24h时其比值均高于常氧组($P<0.05$); 中度低氧24h时体肾线粒体绿色荧光与红色荧光强度比值显著高于常氧组($P<0.05$), 但与重度低氧24h时差异不显著($P>0.05$)。这表明重度低氧胁迫使体肾线粒体膜电位呈先降低后增加的变化趋势, 中度低氧使体肾线粒体膜电位降低。

2.4 溶解氧水平对青海湖裸鲤体肾抗氧化酶活性的影响

由图 5可知, 体肾 H_2O_2 含量在重度低氧胁迫

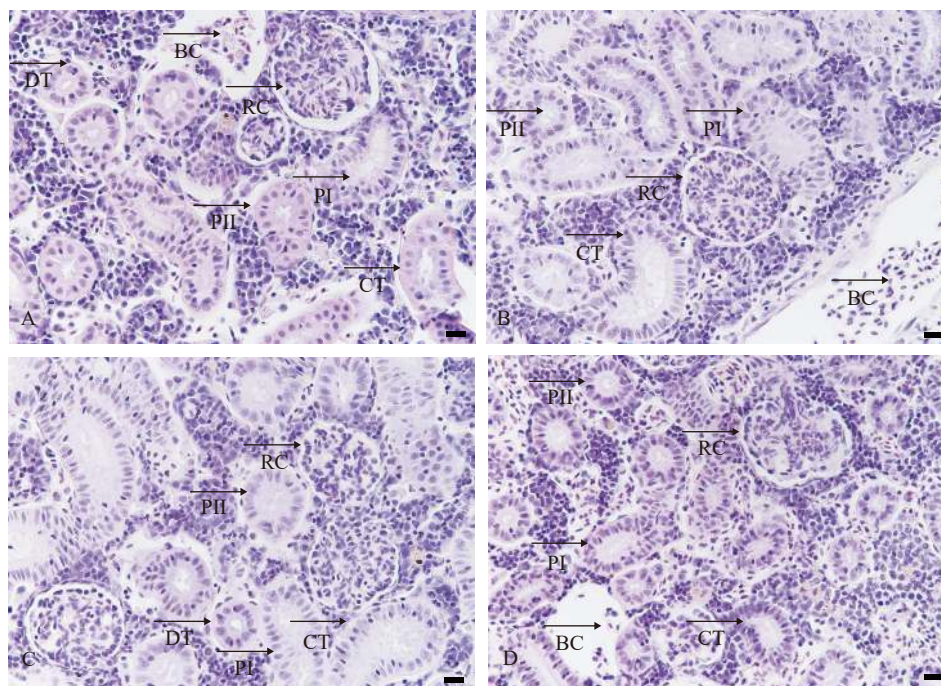


图 1 溶解氧水平对青海湖裸鲤体肾显微结构的影响

Fig. 1 Effects of dissolve oxygen level on the body kidney microstructure of *Gymnocypris przewalskii*

A. 常氧; B. 重度低氧8h; C. 重度低氧24h; D. 中度低氧24h; 比例尺50 μm ; BC. 红细胞; RC. 肾小体; PI. 第一近曲小管; PII. 第二近曲小管; CT. 集合管; DT. 远曲小管

A. normoxia; B. severe hypoxia 8h; C. severe hypoxia 24h; D. moderate 24h; Bar=50 μm ; BC. Blood cell; RC. Renal corpuscle; PI. Frist proximal convoluted tubule; PII. Second proximal convoluted tubule; CT. Collecting tubule; DT. Distal tubule

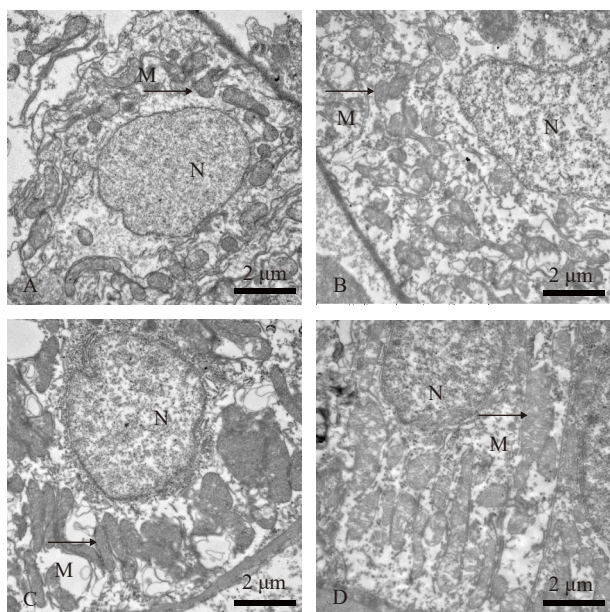


图2 溶解氧水平对青海湖裸鲤体肾线粒体超微结构的影响
Fig. 2 Effects of dissolve oxygen level on the body kidney mitochondrial ultrastructure of *Gymnocypris przewalskii*

A. 常氧; B. 重度低氧8h; C. 重度低氧24h; D. 中度低氧24h; 比例尺2 μm; N. 细胞核; M. 线粒体

A. normoxia; B. severe hypoxia 8h; C. severe hypoxia 24h; D. moderate 24h; Bar=2 μm; N. Nucleus; M. Mitochondria

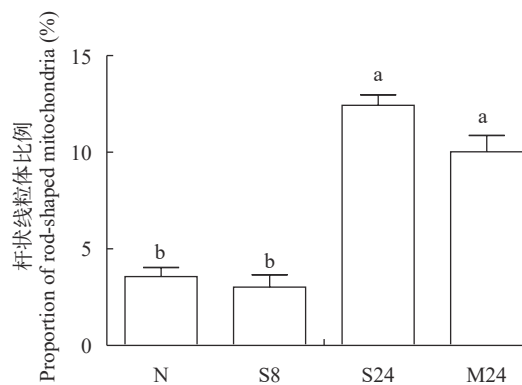


图3 溶解氧水平对青海湖裸鲤体肾杆状线粒体比例的影响
Fig. 3 Effects of dissolve oxygen level on proportion of rod-shaped mitochondria in the body kidney of *Gymnocypris przewalskii*

柱形图上方不同小写字母表示不同处理组之间差异显著 ($P<0.05$); N代表常氧组; S8和S24分别代表重度低氧胁迫8h和24h; M24代表中度低氧胁迫24h; 下同

Different lowercases letters above the bar graph indicate significant difference ($P<0.05$) among different groups; N indicate normoxia; S8 and S24 indicate severe hypoxia 8h and 24h; M24 indicate moderate hypoxia 24h. The same applies below

8h时最大($P<0.05$), 24h时降低($P>0.05$), 且重度低氧24h时其含量与常氧组间差异不显著($P>0.05$); 中度低氧胁迫24h时 H_2O_2 含量升高, 但与常氧组间差异不显著($P>0.05$; 图5A)。体肾MDA含量在重度低

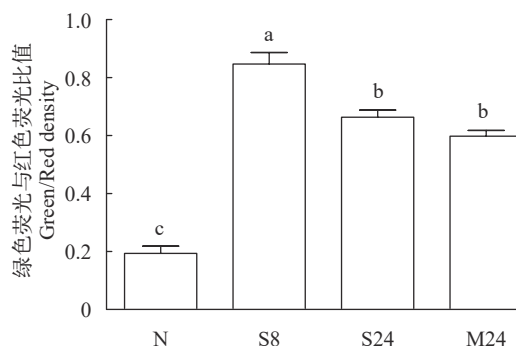


图4 溶解氧水平对青海湖裸鲤体肾线粒体膜电位的影响

Fig. 4 Effects of dissolve oxygen level on the body kidney mitochondrial membrane potential of *Gymnocypris przewalskii*

氧胁迫8h时最大($P<0.05$), 24h时降低($P>0.05$), 且重度低氧8h和24h时其含量均高于常氧组($P<0.05$); 中度低氧胁迫24h时MDA含量显著高于常氧组($P<0.05$), 但与重度低氧8h和24h时差异不显著($P>0.05$; 图5B)。

体肾SOD活性在重度低氧胁迫8h时最大($P<0.05$), 24h时降低($P>0.05$), 且重度低氧8h和24h时其活性均高于常氧组($P<0.05$); 中度低氧胁迫24h时SOD活性与常氧组间差异不显著($P>0.05$; 图5C)。体肾T-AOC在重度低氧胁迫后持续增加, 且均高于常氧组($P<0.05$), 但重度低氧8h和24h间T-AOC差异不显著($P>0.05$); 中度低氧胁迫24h时T-AOC显著高于常氧组($P<0.05$; 图5D)。体肾GPX活性在重度低氧8h时最大, 24h时稍降低, 但重度低氧8h和24h时其活性均高于常氧组($P<0.05$); 中度低氧胁迫24h时GPX显著高于常氧组($P<0.05$), 但与重度低氧8h和24h间其活性差异不显著($P>0.05$; 图5E)。

3 讨论

3.1 溶解氧水平对青海湖裸鲤体肾显微结构的影响

鱼类的窒息点可以反映鱼类对DO的最低需求量。刘济源等^[16]研究显示, 4龄性成熟青海湖裸鲤的窒息点为0.14—0.17 mg/L, 除鲫(*Carassius auratus*)的窒息点(0.11—0.13 mg/L)外, 其他鲤科鱼类的窒息点均大于青海湖裸鲤。Matey等^[15]研究显示, 青海湖裸鲤在急性低氧(0.3 ± 0.1 mg/L)可存活24h, 说明青海湖裸鲤具有很强的低氧耐受能力。本研究发现, 青海湖裸鲤在低氧(0.3 ± 0.1 mg/L)胁迫8h后其死亡率高达40%, 但在低氧(0.7 ± 0.1 mg/L)胁迫8h后其死亡率降至15%以下, 低氧(3.0 mg/L)胁迫可存活数天。故本研究采用0.7 mg/L为重度低氧胁迫浓度, 3.0 mg/L为中度低氧胁迫浓度。

体肾作为鱼类的主要排泄器官,在清除鱼类体内有害代谢产物过程中发挥重要的作用^[22]。黄建盛等^[23]和区又君等^[24]发现,急性低氧胁迫会造成军曹鱼(*Rachycentron canadum*)和卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)肾损伤,使其机能紊乱。邵川等^[26]研究显示,慢性间歇性低氧可导致大鼠肾脏组织细胞水肿变性和超微结构异常。戴玉等^[27]研究显示,急性低压缺氧导致大鼠肾脏功能和结构造成损伤,表明肾脏也是一个对缺氧十分敏感的器官,很容易受到缺氧性损伤。组织和器官的结构变化被认为是病理损伤的最初表现,也是快速检测生物机体应激反应的方法之一^[28]。在本研究中,重度(0.7 ± 0.1) mg/L和重度(3.0 ± 0.1) mg/L低氧胁迫对青海湖裸鲤体肾组织结构没有影响,表明重度和中度低氧并未造成体肾组织结构的损伤。目前无低氧胁迫后鱼类体肾组织结构变化的参考对比文献,本实验室前期研究结果显示,重度低氧使肝细胞出现空泡化,且随低氧胁迫时间延长肝细胞空泡变性更严重,且部分线粒体出现空泡化。作者认为,青海湖裸鲤长期生活在高海拔的低氧环境中,经过长期的自然适应,对高原低氧水环境具有较强的耐受潜力,但不同组织对低氧的耐受性及响应时间可能不同。

3.2 溶解氧水平对青海湖裸鲤体肾线粒体超微结构和膜电位的影响

线粒体是细胞利用氧并合成ATP的主要场所,对缺氧最敏感。缺氧可导致组织、细胞发生一系列结构改变。研究显示,缺氧情况下最敏感的是线粒体和内质网^[29]。在本研究中,重度和中度低氧胁迫

对青海湖裸鲤体肾小管上皮细胞线粒体超微结构没有影响,但低氧胁迫后线粒体形态以杆状居多,其原因不明。陈世喜等^[30]认为,在低氧胁迫后,水体环境中的低DO水平将导致有氧呼吸水平下降,为提供足够能量,线粒体功能应该增强。本研究中,低氧胁迫后杆状线粒体的增多是否与增加其呼吸功能有关则有待进一步研究探讨。

线粒体氧的生成和利用首先通过线粒体呼吸链复合体形成跨内膜两侧的膜电位,后者通过复合体V转化为ATP。因而线粒体膜电位是衡量线粒体健康水平的重要标准^[31]。在急性肾损伤时,肾脏组织由于供氧不足,从而使线粒体ROS清除能力显著下降,导致细胞和线粒体发生氧化应激^[32],过量的ROS沉积可导致线粒体膜电位的丧失^[33]。本研究中,重度低氧胁迫8h时青海湖裸鲤体肾线粒体膜电位急剧降低,24h时膜电位又升高。本试验结果表明,低氧胁迫下,青海湖裸鲤体肾线粒体膜电位应激性下降,但随着低氧胁迫时间的延长,体肾线粒体膜电位逐渐升高,可能与增加其呼吸功能有关。低氧胁迫后体肾线粒体膜电位的急剧降低可能与低氧应激导致的体肾ROS增加有关。

3.3 溶解氧水平对青海湖裸鲤体肾组织氧化应激水平的影响

机体受到低氧胁迫后线粒体内ROS产生迅速增加,而未被及时清除的过量ROS容易导致机体氧化应激损伤,故线粒体内ROS的水平能够反映细胞内的氧化应激水平,但因ROS寿命短暂,并且缺乏足够敏感的技术直接检测生物体内的ROS,通常通

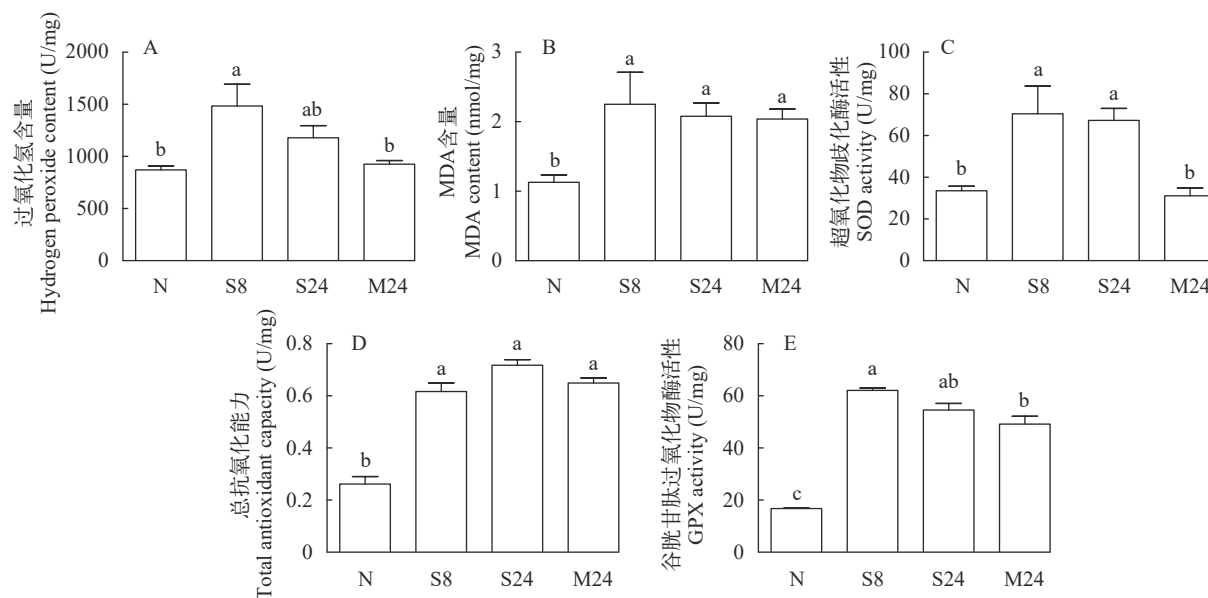


图5 溶解氧水平对青海湖裸鲤体肾 H_2O_2 (A)、MDA (B)、SOD (C)、T-AOC (D)和GPX (E)活力的影响

Fig. 5 Effects of dissolve oxygen level on H_2O_2 (A), MDA (B), SOD (C), T-AOC (D) and GPX (E) activities in the body kidney of *Gymnocypris przewalskii*

过检测体内 H_2O_2 含量来间接反映细胞发生脂质氧化的程度^[34]。在本研究中,体肾 H_2O_2 含量在重度低氧胁迫8h时显著增加,24h时降至正常水平,表明水环境中DO骤然降低后对青海湖裸鲤产生胁迫,从而导致ROS大量产生,裸鲤可通过自身调节能在24h内使体肾ROS恢复到原来的水平。研究表明,在低氧环境下,线粒体通过ROS信号间接激活低氧诱导因子(HIF)而介导机体对低氧的适应^[13],低氧胁迫后青海湖裸鲤ROS信号通路有待进一步研究。

MDA是自由基和多不饱和脂肪酸反应产生的环氧化合物,可作为氧化的一个指标,反映机体脂质过氧化程度^[35]。在本研究中,低氧胁迫使体肾组织MDA含量增加,且随低氧胁迫时间延长MDA含量呈降低趋势。这与陈世喜等^[30]对卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)幼鱼肝的研究结果相似。本试验结果表明,在低氧胁迫初期,青海湖裸鲤体肾内ROS应激性增加,从而使MDA含量升高,但随着低氧胁迫时间的延长,体内抗氧化酶持续清除ROS,进而使MDA含量降低,从而避免低氧胁迫对体肾组织造成损伤,这与低氧胁迫并未造成青海湖裸鲤体肾组织结构和线粒体超微结构损伤的结果相吻合。

3.4 溶解氧水平对青海湖裸鲤体肾抗氧化能力的影响

过量ROS容易导致机体氧化应激损伤,但线粒体内存在ROS清除系统能够清除过量的ROS,从而避免ROS累积造成的机体损伤。SOD、GPX和T-AOC是清除体内多余自由基的重要抗氧化酶,代表和反映机体抗氧化酶系统和非酶系统的代偿能力及机体自由基的代谢状态^[36]。在本研究中,体肾中T-AOC和GPX在低氧胁迫后显著增加,这与贾秀琪等^[37]对河川沙塘鳢(*Odontobutis potamophila*)肾的研究结果一致。本试验结果表明,当裸鲤受到低氧胁迫时,体肾中ROS应激性增高,T-AOC和GPX响应性增高以清除过多的ROS,从而保护体肾免受ROS损伤。在本研究中,重度低氧胁迫后体肾中SOD活性呈先增加后降低的趋势,中度低氧胁迫后SOD活性与常氧组差异不显著。陈世喜等^[30]研究发现,卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)幼鱼肝组织SOD活性在急性低氧胁迫3h时最大,后逐渐降低,8h和24h时降至正常水平,这与本研究的变化趋势相似。本试验结果表明,在低氧胁迫早期,体肾中ROS含量应激性增高,SOD活性响应性增强以清除过多的ROS,但随着体肾内ROS含量的降低,SOD活性也随之降低。

综上所述,中度低氧(3.0 ± 0.1) mg/L和重度低氧(0.7 ± 0.1) mg/L胁迫引起青海湖裸鲤体肾组织发生

氧化应激反应,但并未造成体肾组织结构和线粒体结构的损伤,低氧胁迫下体肾线粒体形态和抗氧化酶活性发生明显变化,推测体肾可能通过调整线粒体形态及相关抗氧化酶活性来更好地应对溶氧变化。本研究为探讨青海湖裸鲤裸鲤低氧适应机制提供理论依据。

参考文献:

- [1] Magnoni L J, Eding E, Leguen I, *et al.* Hypoxia, but not an electrolyte-imbalanced diet, reduces feed intake, growth and oxygen consumption in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Scientific Reports*, 2018, **8**(1): 1-14.
- [2] Lai K P, Wang S Y, Li J W, *et al.* Hypoxia causes trans-generational impairment of ovarian development and hatching success in fish [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, **53**(7): 3917-3928.
- [3] Wang W Z, Zeng Z Q, Huang J S, *et al.* Effects of hypoxia stress on antioxidation, immunity and energy metabolism of juvenile cobia, *Rachycentron canadum* [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, **40**(5): 12-18. [王维政, 曾泽乾, 黄建盛, 等. 低氧胁迫对军曹鱼幼鱼抗氧化、免疫能力及能量代谢的影响 [J]. *广东海洋大学学报*, 2020, **40**(5): 12-18.]
- [4] Qi D, Chao Y, Zhao Y, *et al.* Molecular evolution of myoglobin in the Tibetan Plateau endemic schizothoracine fish (Cyprinidae, Teleostei) and tissue-specific expression changes under hypoxia [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2018, **44**(50): 557-571.
- [5] Richards J G. Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2011, **214**(2): 191-199.
- [6] Xu H, Chen X M, Wang G Q, *et al.* Research progress of hypoxia on aquaculture [J]. *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 [J]. *饲料工业*, 2016, **37**(2): 33-37.]
- [7] Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-biomembranes*, 2018, **1859**(9): 940-950.
- [8] Zorov D B, Juhaszova M, Sollott S J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release [J]. *Physiological Reviews*, 2014, **94**(3): 909-950.
- [9] Di Meo S, Reed T T, Venditti, *et al.* Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(1245049): 1-44.
- [10] Diaz J M, Plummer S. Production of extracellular reactive oxygen species by phytoplankton: past and future directions [J]. *Journal of Plankton Research*, 2018, **40**(6): 20-26.
- [11] Yu N, Shi Y Y, Ye Y T. Oxidative damage of soybean aqueous extract and soybean meal aqueous extract to grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) primary hepato-

- cytes [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, **45**(4): 709-721. [郁浓, 石瑶瑶, 叶元土. 大豆和豆粕水提物致草鱼原代肝细胞损伤作用的研究 [J]. 水生生物学报, 2021, **45**(4): 709-721.]
- [12] Wu J Q, Kosten T R, Zhang X Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia [J]. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2013(46): 200-206.
- [13] Sinha N, Dabla P K. Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review [J]. *Current Hypertension Reviews*, 2015, **11**(2): 132-142.
- [14] Xiong F, Chen D H, Duan X B. Threatened fishes of the world: *Gymnocypris przewalskii*; (Kessler, 1876) (Cyprinidae: Schizothoracinae) [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2010, **87**(4): 351-352.
- [15] Matey V, Richards J G, Wang Y, *et al.* The effect of hypoxia on gill morphology and ionoregulatory status in the Lake Qinghai scaleless carp, *Gymnocypris przewalskii* [J]. *Journal of Experimental Biology*. 2008, 211(Pt 7): 1063-1074.
- [16] Liu J Y, Yao Z L, Lai Q F, *et al.* Effects of saline-alkali stress on oxygen consumption and plasma osmolality and ion concentration of *Gymnocypris przewalskii* [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2012, **31**(3): 664-669. [刘济源, 么宗利, 来琦芳, 等. 盐碱胁迫对青海湖裸鲤耗氧率、血浆渗透浓度和离子浓度的影响 [J]. 生态学杂志, 2012, **31**(3): 664-669.]
- [17] Zhang R, Ludwig A, Zhang C, *et al.* Local adaptation of *Gymnocypris przewalskii* (Cyprinidae) on the Tibetan Plateau [J]. *Scientific Reports*, 2015, **6**(5): 1-10.
- [18] Wang Z, Yao Z L, Lin T T, *et al.* Effects of carbonate alkalinity stress on SOD, ACP, and AKP activities in the liver and kidney of juvenile *Gymnocypris przewalskii* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, **20**(6): 1212-1218. [王卓, 么宗利, 林听听, 等. 碳酸盐碱度对青海湖裸鲤幼鱼肝和肾SOD、ACP和AKP酶活性的影响 [J]. 中国水产科学, 2013, **20**(6): 1212-1218.]
- [19] Xie Z H, Lü H J, Fu M, *et al.* A comparative study of reproductive characteristics among different spawning stocks of naked carp *Gymnocypris przewalskii* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, **42**(1): 84-91. [谢振辉, 吕红健, 付梅, 等. 青海湖裸鲤不同繁殖群体繁殖特性的比较研究 [J]. 渔业科学进展, 2021, **42**(1): 84-91.]
- [20] Zhou Y H, Wu Y H, Zhang P M, *et al.* Reproductive behaviors of *Gymnocypris przewalskii* in artificial mimic spawning environments [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, **45**(5): 1120-1128. [周杨浩, 吴艳红, 张平梅, 等. 人工模拟产卵环境中青海湖裸鲤的繁殖行为 [J]. 水生生物学报, 2021, **45**(5): 1120-1128.]
- [21] Wang L Y, Qi B W, Zhao C X, *et al.* Research of Lactobacillus diversity and antibiotic resistance in the intestine of Qinghai Lake naked carp [J]. *Dairy Industry*, 2018, **46**(8): 9-12. [王露莹, 齐博文, 赵晨曦, 等. 青海湖裸鲤肠道乳酸菌多样性与抗生素抗性的研究 [J]. 中国乳品工业, 2018, **46**(8): 9-12.]
- [22] Lin H R. Fish Physiology [M]. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press, 2007, 117-123. [林浩然. 鱼类生理学 [M]. 广州: 广东高等教育出版社, 2007: 117-123.]
- [23] Huang J S, Lu Z, Chen G, *et al.* Acute hypoxia stress on blood biochemical indexes of large-sized juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2019, **41**(6): 76-84. [黄建盛, 陆枝, 陈刚, 等. 急性低氧胁迫对军曹鱼大规格幼鱼血液生化指标的影响 [J]. 海洋学报, 2019, **41**(6): 76-84.]
- [24] Ou Y J, Fan C Y, Li J E, *et al.* Acute hypoxia stress on blood biochemical indexes in selective group of *Trachinotus ovatus* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, **36**(4): 126-131. [区又君, 范春燕, 李加儿, 等. 急性低氧胁迫对卵形鲳鲅选育群体血液生化指标的影响 [J]. 海洋学报, 2014, **36**(4): 126-131.]
- [25] Chao Y, Xia M, Wu R, *et al.* Molecular characterization and expression changes of cytoglobin genes in response to hypoxia in a Tibetan schizothoracine fish, *Schizopygopsis pylzovi* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2019, **45**(3): 863-872.
- [26] Shao C, Lu S Y, Li W J, *et al.* Influences of chronic intermittent hypoxia on morphology and ultra-structure of renal tissue in the rats [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2011, **31**(21): 4175-4177. [邵川, 鲁沈源, 励雯静, 等. 慢性间歇低氧对大鼠肾脏组织细胞形态和超微结构的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2011, **31**(21): 4175-4177.]
- [27] Chhabra V, Anand A S, Baidya A K, *et al.* Hypobaric hypoxia induced renal damage is mediated by altering redox pathway [J]. *PLoS One*, 2018, **13**(7): 1-31.
- [28] Silva A G, Martinez C B R. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2007, **23**(2): 185-192.
- [29] Singh-Mallah G, Nair S, Sandberg M, *et al.* The Role of mitochondrial and endoplasmic reticulum reactive oxygen species production in models of perinatal brain injury [J]. *Antioxidants Redox Signaling*, 2019, **31**(9): 643-663.
- [30] Chen S X, Wang P F, Ou Y J, *et al.* The effect of acute and chronic hypoxia stress on liver tissue structure and oxidation in juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*) [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2016, **51**(6): 1049-1058. [陈世喜, 王鹏飞, 区又君, 等. 急性和慢性低氧胁迫对卵形鲳鲅幼鱼肝组织损伤和抗氧化的影响 [J]. 动物学杂志, 2016, **51**(6): 1049-1058.]
- [31] Pires J, Haynes C M. Mitochondrial biogenesis: MitoC-PR resuscitates import-defective mitochondria [J]. *Current Biology*, 2018, **28**(11): 669-671.
- [32] Li J Y, Lu L M. Mitochondrial dysfunction and acute renal injury [J]. *Advances in Physiological Sciences*, 2020, **51**(6): 448-452. [李景瑶, 陆利民. 线粒体功能异常与急性肾损伤 [J]. 生理科学进展, 2020, **51**(6): 448-452.]

- [33] Wang S Y, Cai G Y, Chen X M. Energy restriction in renal protection [J]. *British Journal of Nutrition*, 2018, **120**(10): 1149-1158.
- [34] Yang M, Sun S M, Fu H T, *et al.* Hypoxia and reoxygenation on antioxidant enzyme activities and histological structure of *Macrobrachium nipponense* [J]. *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 [J]. *中国水产科学*, 2019, **26**(3): 493-503.]
- [35] Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges [J]. *Analytical Biochemistry*, 2017(524): 13-30.
- [36] Snezhkina A V, Kudryavtseva A V, Kardymon O L, *et al.* ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019(6175804): 1-17.
- [37] Jia X Q, Zhang H Y, Wang L, *et al.* Effect of hypoxia stress on the antioxidant enzyme and ATP enzyme activity in tissues of *Odontobutis potamophila* [J]. *Marine Fisheries*, 2017, **39**(3): 306-313. [贾秀琪, 张宏叶, 王丽, 等. 低氧胁迫对河川沙塘鳢抗氧化酶及ATP酶活性的影响 [J]. *海洋渔业*, 2017, **39**(3): 306-313.]

DISSOLVED OXYGEN LEVEL ON THE BODY KIDNEY STRUCTURE AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES OF QINGHAI LAKE SCALELESS CARP, *GYMNOCYPRIS PRZEWALSKII*

CHEN Fu-Ju¹, ZHAO Yu-Tian¹, FU Sheng-Yun² and LI Xue-Yuan¹

(1. *Veterinary Medicine Department of Agricultural and Animal Husbandry College, Qinghai University, Xining 810016, China;*
2. *Qinghai Naked Carp Rescue Center, Xining 810016, China*)

Abstract: To investigate the effect of dissolved oxygen (DO) on the tissue structure and activities of the antioxidant enzyme in the body kidney of the Qinghai Lake scaleless carp, *Gymnocypris przewalskii*, with an average weight of (97.68 ± 0.12) g, were randomly divided into three groups with moderate hypoxia (3.0 ± 0.1) mg/L, severe hypoxia (0.7 ± 0.1) mg/L, and normal oxygen level (8.4 ± 0.1) mg/L for 8h and 24h. The structure of the body kidney and the ultrastructure of the body kidney mitochondria were observed, and the membrane potential of mitochondria and the activities of antioxidant enzymes were assayed. The results showed that moderate and severe hypoxia did not damage the structure of the body kidney and ultrastructure of the mitochondria. However, moderate and severe hypoxia significantly increased the ratio of renal rod mitochondria at 24h with markedly decreased membrane potential of the mitochondria. Severe hypoxia but not moderate hypoxia significantly increased the activity of SOD and the concentration of H_2O_2 . Furthermore, both severe and moderate hypoxia markedly increased the concentrations of total antioxidant capacity (T-AOC), glutathione peroxidase (GPX), and malondialdehyde (MDA) in the body kidney of the scaleless carp. These results indicate that the body kidney of the scaleless carp adapt to environments via regulating mitochondrial morphology and antioxidant enzymes. This study provides a theoretical basis for understanding the hypoxia adaptation mechanism of Qinghai Lake scaleless carp.

Key words: Dissolved oxygen level; Body kidney; Microstructure and ultrastructure; Antioxidant enzyme activity; *Gymnocypris przewalskii*