

低氧胁迫和恢复对杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道组织的影响

程景颖 李瑶 沈铭浩 杨智茹 张伟健 张凯 王涛 张国松 尹绍武

HYPOXIA STRESS AND RECOVERY ON INTESTINAL TISSUE OF HYBRID YELLOW CATFISH “HUANGYOU-1” (*PELTEOBAGRUS VACHELLI* ♂ × *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO* ♀)

CHENG Jing-Hao, LI Yao, SHEN Ming-Hao, YANG Zhi-Ru, ZHANG Wei-Jian, ZHANG Kai, WANG Tao, ZHANG Guo-Song, YIN Shao-Wu

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2023.2021.0342>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

黄颡鱼和杂交黄颡鱼“黄优1号”形态及性腺发育的比较

THE MORPHOLOGY AND GONAD DEVELOPMENT OF *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO* AND ITS INTERSPECIFIC HYBRID “HUANGYOU NO. 1” WITH *PELTEOBAGRUS VACHELLI*

水生生物学报. 2019, 43(6): 1231–1238 <https://doi.org/10.7541/2019.146>

壳寡糖对杂交黄颡鱼“黄优1号”(黄颡鱼♀ × 瓦氏黄颡鱼♂)生长性能与免疫机能的影响

EFFECTS OF DIETARY CHITOSAN OLIGOSACCHARIDE ON GROWTH PERFORMANCE AND IMMUNITY OF HYBRID YELLOW CATFISH “HUANGYOU NO. 1” *TACHYSURUS FULVIDRACO* ♀ × *TACHYSURUS VACHELLI* ♂

水生生物学报. 2020, 44(4): 707–716 <https://doi.org/10.7541/2020.085>

杂交黄颡鱼与普通黄颡鱼幼鱼生长性能及耐低氧能力的比较

THE GROWTH CHARACTERISTICS AND HYPOXIA TOLERANT ABILITY OF YELLOW CATFISH AND HYBRID CATFISH

水生生物学报. 2019, 43(6): 1271–1279 <https://doi.org/10.7541/2019.151>

血红素加氧酶1在斑马鱼低氧应激中的保护作用研究

STUDIES ON THE PROTECTIVE ROLE OF ZEBRAFISH HO1 IN RESPONSE TO HYPOXIA

水生生物学报. 2017, 41(1): 43–49 <https://doi.org/10.7541/2017.6>

镉暴露诱导黄颡鱼鳃的组织学损伤、氧化应激和免疫反应

CADMIUM EXPOSURE INDUCES HISTOLOGICAL DAMAGE, OXIDATIVE STRESS AND IMMUNE RESPONSE IN YELLOW CATFISH

水生生物学报. 2019, 43(2): 340–347 <https://doi.org/10.7541/2019.042>

哈尼梯田稻-渔共作模式下杂交黄颡鱼肠道微生物研究

MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE OF HYBRID YELLOW CATFISH IN RICE-FISH CO-CULTURE SYSTEM IN HANI TERRACE

水生生物学报. 2021, 45(6): 1232–1242 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.179>



doi: 10.7541/2023.2021.0342

低氧胁迫和恢复对杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道组织的影响

程景颢¹ 李 瑶¹ 沈铭浩¹ 杨智茹¹ 张伟健¹ 张 凯¹
王 涛¹ 张国松^{1,2*} 尹绍武^{1*}

(1. 南京师范大学海洋科学与工程学院, 江苏省特色水产育种与绿色高效养殖技术工程研究中心, 南京 210023;

2. 菏泽学院, 山东省“十三五”高校生理生化及应用重点实验室, 菏泽 274015)

摘要: 为探究低氧胁迫和恢复对杂交黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)“黄优1号”肠道组织的影响, 研究运用酶活测定、HE染色、qRT-PCR、TUNEL检测及16S rRNA测序技术等方法, 分析低氧胁迫[(1.0±0.1) mg/L]和恢复下[(7.0±0.5) mg/L]该鱼肠道氧化应激指标、组织结构形态、细胞凋亡及微生物组成变化。结果显示: (1)在低氧胁迫下肠道中抗氧化酶活性(SOD、CAT、GSH-Px)、能量代谢酶活性(LDH)、丙二醛(MDA)和脂质过氧化物(LPO)含量显著升高, 恢复溶氧后氧化应激反应也比较剧烈。(2)低氧胁迫阶段, 肠道组织受损现象逐渐加剧, 杯状细胞肿胀、黏膜层被侵蚀, 恢复溶氧24h后, 缺氧引起的生理变化并未得到明显改善。(3)肠道组织细胞凋亡程度随着低氧时间的延长而加剧, 凋亡相关基因(*bax*、*caspase9*和*p53*)的表达量显著升高, *bcl-2*基因的表达量则减少。(4)低氧胁迫阶段肠道微生物相对丰度降低, 低氧胁迫72h的处理组中以厚壁菌门(Firmicutes)(47.8%)和拟杆菌门(Bacteroidetes)(40.6%)的丰度最为优势, 恢复溶氧后肠道菌群数量有所增加; KEGG功能预测显示, 多数肠道微生物与代谢通路相关。研究结果可为解析低氧和恢复下杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道组织内环境稳态调控机制提供理论依据。

关键词: 低氧; 肠道; 氧化应激; 细胞凋亡; 微生物组成; 杂交黄颡鱼“黄优1号”

中图分类号: S965.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2022)11-1598-11



黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)隶属于鲇形目、鲿科、黄颡鱼属, 广泛分布于我国长江、黄河、松花江及珠江等水系^[1], 因其肉质细嫩、蛋白丰富和肌间刺少等优点受到广大消费者青睐。据《中国渔业统计年鉴》统计, 2019和2020年黄颡鱼的养殖产量均超过 5×10^8 kg, 年均增幅为5.31%^[2]。瓦氏黄颡鱼(*P. vachelli*)俗称江黄颡鱼、硬角黄辣丁、郎丝, 与黄颡鱼同为一属, 具有生长周期短、食性杂和适温性广等优点^[3]。本研究团队以二代选育的瓦氏黄颡鱼为父本、三代选育的黄颡鱼为母本, 获得杂交黄颡鱼“黄优1号”(GS-02-001-2018), 其生长速度和

成活率均高于母本黄颡鱼, 且抗病力强, 与父本瓦氏黄颡鱼相比, 可食用部分多, 更耐运输^[4], 受到广大养殖户和消费者的喜爱, 目前已成为我国重要的优质养殖水产品种, 具有推动黄颡鱼产业升级的潜力^[5]。

水体中的溶解氧是影响水生生物生存的一个重要生态因子^[6], 低溶解氧对于鱼类而言是一种常见的现象。鱼类呼吸作用所吸收的一部分氧元素在生物体中转化为活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS), 少量的ROS参与细胞信号通路, 调控不同的细胞活性和基因表达, 而在低氧或恢复过程中ROS过量产生, 致使鱼类产生氧化应激反应^[7]。如在杂交黄颡鱼

收稿日期: 2021-11-22; 修订日期: 2022-07-18

基金项目: 国家自然科学基金(32102754和32102760); 江苏省农业科技自主创新项目[CX(19)2034]; 江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201742); 江苏现代农业(特色水产)产业技术体系项目[JATS(2021)417]; 2021年江苏省研究生实践创新计划(SJCX21_0587); 山东省自然科学基金(ZR2019QC002); 山东省高等学校青创科技支持计划资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (32102754 and 32102760); Jiangsu Agriculture Science and Technology Innovation Fund [CX(19)2034]; the Creation Project of Major New Species of Agriculture in Jiangsu Province (PZCZ201742); Jiangsu Modern Agriculture (Special Aquatic Products) Industrial Technology System Funding Project [JATS(2021)417]; 2021 Jiangsu Province Graduate Student Practice Innovation Program Project (SJCX21_0587); Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2019QC002); Shandong Provincial Colleges and Universities Youth Innovation and Technology Support Program]

作者简介: 程景颢(1997—), 男, 硕士研究生; 主要从事鱼类种质资源与遗传育种研究。E-mail: 1186982976@qq.com

通信作者: 张国松, 副教授; E-mail: hzyzgs@163.com 尹绍武, 教授; E-mail: yinshaowu@163.com *共同通信作者

的低氧胁迫研究中, Pei等^[8]发现肝脏组织抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-Px)和氧化应激参数(MDA)显著上调, 同样在多种硬骨鱼类如暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)^[9]、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[10]、葛氏鲈塘鳢(*Perccottus glenii*)^[11]和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[12]等, 在低氧胁迫下均激活抗氧化系统抵抗过量产生的ROS和氧化应激损伤。

尽管鱼类可通过一些急性应激反应来应对水体短期缺氧, 以维持其正常生理活动, 但是水体的严重低氧往往引起鱼类瞬间大量窒息死亡。研究表明, 鱼类大脑和心肌细胞在低氧状态下的凋亡, 是导致“泛塘”的主要原因之一^[13]。然而, 目前关于鱼类低氧胁迫诱导细胞凋亡的分子调控机制研究仍处于初步阶段。王鹏飞等^[14]通过对鳊(*Siniperca chuatsi*)肝脏转录组测序分析, 发现该鱼在低氧胁迫下**bax**和**caspase8**等促凋亡基因上调; 在长期低氧胁迫中, 鲤(*Cyprinus carpio*)^[15]肝脏中**bcl-2**基因表达量显著上调; 丁晨雨等^[16]发现低氧胁迫可诱导鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)心肌细胞发生凋亡。

肠道是鱼类消化吸收营养物质的场所和器官, 大量微生物寄居其中。微生物菌群可以调控上百个基因的表达, 参与促使肠道细胞增殖、提高吸收能力和调节免疫应答等^[17], 其组成变化与环境因子及宿主个体间关系密切, 当环境应激作用于鱼类个体时, 常常伴随着肠道环境的改变, 影响微生物数量和结构, 进而影响宿主的健康^[18]。已有研究报道, 日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)^[19]、花鲈(*Lateolabrax Maculatus*)^[20]和瓦氏黄颡鱼^[21]等水生动物在低氧胁迫下肠道组织结构受损, 肠道微生物多样性显著下降, 致病菌数量显著增加。

目前, 国内外学者对鱼类肠道组织的环境胁迫研究逐渐重视, 而杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道组织在低氧胁迫下的研究未见报道。鉴于近年来全国各地养殖户对杂交黄颡鱼“黄优1号”的需求扩大, 了解其在低氧胁迫下的生理响应机制有助于推动黄颡鱼产业绿色发展。本文以杂交黄颡鱼“黄优1号”为研究对象, 探讨低氧胁迫对该鱼肠道的氧化应激、组织形态、细胞凋亡及肠道微生物组成的影响, 初步揭示低氧胁迫下杂交黄颡鱼的肠道组织内环境稳态的调控机制, 有助于更好地了解杂交黄颡鱼肠道的低氧响应机制, 可为后续开展鱼类耐低氧新品种选育提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用杂交黄颡鱼“黄优1号”取自江苏省南

京市水产科学研究所, 饲养条件为: 水温(27±1.0)℃, pH 7.5—8.0, 以人工配合饲料投喂幼鱼, 每天喂食两次。挑选180尾无伤无病、体质健壮的杂交黄颡鱼(15.5±1.3)g随机平均分配于6个玻璃缸中(30尾/缸, 100 L), 在水流量5 L/min, 溶解氧浓度(Dissolved Oxygen, DO)6.8 mg/L条件下驯养14d, 正式实验前禁食24h。

1.2 实验设计与方法

实验设置对照组(7.0±0.5) mg/L和低氧组(1.0±0.1) mg/L, 每个处理组设3个重复, 实验过程中使用溶氧测定仪(LDO101, 上海鑫嵩公司)检测水体中DO值。对照组: 玻璃缸水体中始终充入空气将DO维持在(7.0±0.5) mg/L, 持续96h; 低氧组: 直接充入氮气25—30min使DO由(7.0±0.5)降至(1.0±0.1) mg/L, 之后调节氮气充入量维持72h, 在低氧胁迫72h后停止充入氮气, 并充入30min空气使DO恢复至(7.0±0.5) mg/L, 维持24h^[22]。在实验0、24h、48h、72h和恢复溶氧24h(记为H0、H24、H48、H72和R24), 每个时间点对照组和低氧组分别解剖12尾鱼(每个缸随机选取4尾鱼)取中肠组织, 其中9尾鱼用于获取3个生物学重复样本, 经液氮处理后放置-80℃保存, 用于后续酶活、凋亡相关基因表达及肠道微生物的测定; 另外3尾鱼的中肠保存于4%多聚甲醛固定液中, 备用于切片检测。

1.3 肠道酶活性检测

称取0.1 g肠组织放入1.5 mL离心管中, 离心管置于冰盒中, 按照重量(g): 体积(mL)=1:9的比例加入0.9 mL的生理盐水, 冰水浴条件下进行机械匀浆, 将所得到的组织匀浆液分装保存于-20℃冰箱。肠组织的蛋白浓度(TP)、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)和乳酸脱氢酶(LDH)的活性, 丙二醛(MDA)和脂质过氧化物(LPO)的含量测定采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒进行操作。

1.4 肠道组织苏木精-伊红(HE)染色切片

用4%多聚甲醛对肠组织进行固定, 以防止细胞死亡后的自融或分解, 固定成功后进行流水冲洗, 随后使用不同浓度的酒精(75%、85%和95%)进行脱水处理, 再将组织放置在石蜡的透明剂二甲苯中透明, 将组织放入融蜡箱中保温, 待石蜡完全浸没组织块进行包埋处理。接着对石蜡切片脱蜡水化, 并进行苏木素和伊红染色。最后脱水封片, 并将切片置于显微镜下观察。

1.5 肠道组织TUNEL切片检测

将保存在4%多聚甲醛溶液中的肠组织进行常规石蜡包埋并切片, 石蜡切片脱蜡至水: 依次将切

片放入二甲苯 I 20min-二甲苯 II 20min-酒精 I 5min-酒精 II 5min-85%酒精5min-75%酒精5min-蒸馏水洗。切片稍甩干后滴加蛋白酶K工作液覆盖组织, 37℃温箱孵育20min。将玻片置于PBS(pH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤3次, 每次5min。切片稍甩干后在圈内滴加新鲜配制的DAB显色液, 显微镜下控制显色时间。细胞核经苏木素着色变蓝, DAB显出来的阳性凋亡细胞核为棕黄色。

1.6 肠道组织细胞凋亡相关基因的时序表达分析

采用荧光定量PCR(qRT-PCR)检测凋亡相关基因(*bax*、*bcl-2*、*p53*和*caspase 9*)mRNA的表达情况。首先从课题组测得的转录组序列中获取相关基因序列, 使用Premier 5.0软件设计基因特异性上下游引物, 如表1所示, 其中 β -actin为内参基因。qRT-PCR反应的反应体系为正、反向引物各1 μ L, Mix 10 μ L, ddH₂O 4 μ L, 模板cDNA 4 μ L, 总体积为20 μ L。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算基因的相对表达量。

1.7 肠道微生物分析

对照组和低氧组的肠道组织在取材完毕后置于-80℃冰箱中保存, 送至武汉菲沙基因公司进行测序。采用Illumina公司的TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit制备测序文库。通过质量初筛的原始序列按照Index和Barcode信息, 进行文库和样本划分, 去噪或OTU(Operational Taxonomic Units)聚类。根据ASV/OTU在不同样本中的分布, 评估每个样本的物种丰度、Alpha多样性水平。根据高通量测序结果, 预测各样本的菌群代谢功能, 找出差异通路, 并获得特定通路的物种组成。

1.8 数据统计分析

使用SPSS 22.0软件进行数据统计分析。数据采用One-way analysis进行方差检验, 分析同一时间点对对照组和低氧组表达模式的数据采用*t*-test检验

统计差异, 当 P -value<0.05时认为差异显著(标为*), 结果用平均值±标准差(mean±SD)表示。

2 结果

2.1 低氧胁迫和恢复对杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道氧化应激的影响

杂交黄颡鱼在低氧胁迫和恢复下肠道组织中的4种酶活性和MDA、LPO变化见图1。SOD和LDH酶活性在低氧胁迫下显著升高, 在H72达到最大, 恢复溶氧24h后仍与对照组有显著差异(P <0.05); CAT和GSH-Px酶活在H24出现显著差异(P <0.05), 恢复溶氧过程中酶活性下降, 在R24与对照组无显著差异(P >0.05); 在低氧胁迫下MDA和LPO较对照组均显著上升(P <0.05), 并在H72达到峰值, 恢复氧含量后逐渐下降, R24仍与对照组有显著差异(P <0.05)。

2.2 低氧胁迫和恢复对杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道组织结构的影响

如图2所示, H0中杂交黄颡鱼的肠道组织具有正常的形态结构, 单层柱状上皮细胞排列有序, 固有层紧密纤长, 杯状细胞饱满。胁迫开始后低氧组出现不同程度的损伤, H24杯状细胞肿胀, H48肠黏膜出现坏死并有空泡结构, H72肠道组织空泡数量增多, 绒毛侵蚀情况进一步加剧, 恢复溶氧24h后, 低氧引起的肠道组织生理变化并未得到改善, 肠绒毛出现糜烂。

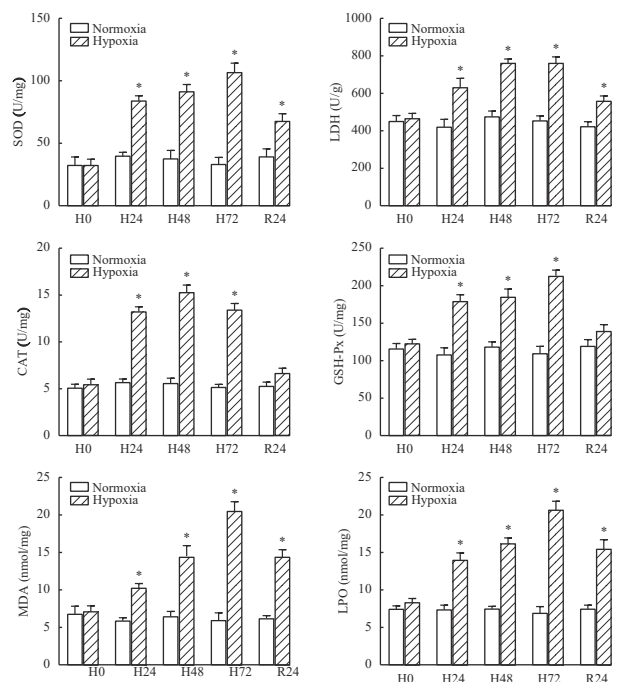


图1 杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道氧化应激指标变化

Fig. 1 Effects of index activities related to oxidative stress in the intestine of hybrid yellow catfish “Huangyou-1”

表1 引物列表

Tab. 1 Description of primers used in this study

基因 Gene	引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'—3')	长度 Length (bp)
<i>bax</i>	<i>bax</i> -F	GAAAGGAAATAGGCTCAA	18
	<i>bax</i> -R	ATGCCAGAATGATAGTAAAG	20
<i>bcl-2</i>	<i>bcl-2</i> -F	CGTAGCCTCGCTTCAAAA	18
	<i>bcl-2</i> -R	CGCGTCAGATCAATTACACA	19
<i>p53</i>	<i>p53</i> -F	CTTCCTACAGGCTTTAGACAA	21
	<i>p53</i> -R	GTAAGAAATCCAAGAACACCA	21
<i>caspase9</i>	<i>caspase 9</i> -F	TGGAGGATGCGGGAATAG	18
	<i>caspase 9</i> -R	TTGTGGAGGAGGCGAGAC	18
β -actin	β -actin-F	CACTGCTGCCTCTTCCTC	18
	β -actin-R	ATCCACATCGCACTTCAT	18

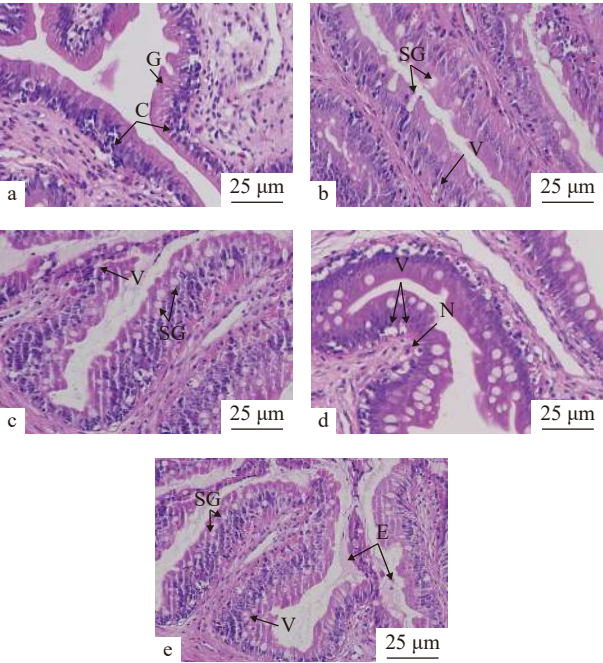


图2 低氧胁迫和恢复下杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道组织形态
Fig. 2 Intestinal tissue morphology of of hybrid yellow catfish “Huangyou-1” under acute hypoxia and reoxygenation conditions
a. H0; b. H24; c. H48; d. H72; e. R24; C. 柱状细胞; G. 杯状细胞; SG. 杯状细胞肿胀; V. 空泡; N. 黏膜层坏死; E. 肠绒毛糜烂
a. H0; b. H24; c. H48; d. H72; e. R24; C. columnar cells; G. goblet cells; SG. swelling of goblet cells; V. vacuoles in the lamina propria; N. necrosis in the mucosal layer; E. erosion of villi

2.3 低氧胁迫和恢复对杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道细胞凋亡的影响

肠道组织TUNEL检测结果 TUNEL切片的检测结果显示, 低氧胁迫开始时杂交黄颡鱼肠道组织细胞凋亡现象较少, 而在低氧组中均检测到不同程度的细胞凋亡(图3)。进一步统计分析显示(表2), 低氧可显著促进肠道组织发生凋亡, 随着低氧时间的延长, 各处理组之间的凋亡指数显著增加($P<0.05$); R24的细胞凋亡指数与H48无显著差异($P>0.05$)。

低氧胁迫和恢复下杂交黄颡鱼“黄优1号”*bax*、*bcl-2*、*caspase9*和*p53*基因的时序表达分析 在低氧胁迫下杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道中*bax*和*p53*基因的表达量显著升高, 在H72达到峰值, 恢复溶氧后表达量下降。*bcl-2*基因的表达量在低氧胁迫下不断降低, 恢复溶氧后表达量上升, R24仍与对

照组差异显著($P<0.05$)。*caspase9*基因的表达量在低氧胁迫下显著升高, 恢复溶氧后表达量降低, R24仍与对照组有显著差异($P<0.05$; 图4)。

2.4 低氧胁迫和恢复对杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道微生物的影响

肠道微生物组间差异分析 通过序列比对和注释, 选取每个处理组在门(Phylum)水平上占比较大的物种, 生成相对丰度柱形图(图5), 以便直观查看各处理组在门水平上相对丰度较高的物种及其比例。杂交黄颡鱼肠道菌群相对丰度较大的主要集中在变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁杆菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)。H72中变形菌门丰度较对照组明显下降(由32.53%下降到8.89%), 厚壁杆菌门和拟杆菌门则明显增多(由19.56%增加到42.38%, 由11.25%增加到32.58%)。且在H72的处理组中, 除拟

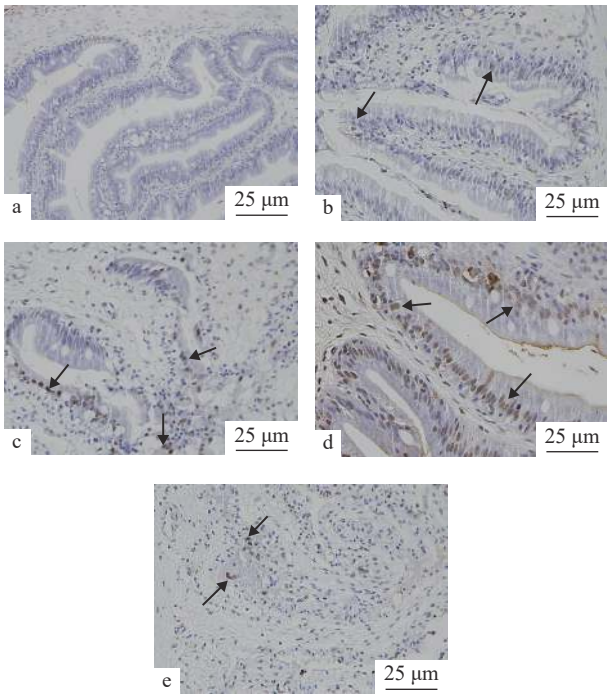


图3 肠道组织Tunel切片检测结果
Fig. 3 Results of intestinal Tunel detection
a. H0; b. H24; c. H48; d. H72; e. R2; 黑色箭头代表凋亡细胞
a. H0; b. H24; c. H48; d. H72; e. R24. Black arrows mean apoptotic cells

表2 肠道组织凋亡指数

Tab. 2 Apoptosis index of intestinal tissue

	H0	H24	H48	H72	R24
凋亡指数Apoptosis index (%)	2.35±0.78 ^a	11.26±2.80 ^b	22.11±2.24 ^c	36.5±3.72 ^d	24.03±1.55 ^c

注: 数据采用LSD多重比较检验显著性差异, 同行上标字母不同表示组间差异显著($P<0.05$)
Note: Data use LSD multiple comparison test for significant difference, different superscript letters in the same industry indicate significant differences between treatments ($P<0.05$)

杆菌门外,厚壁菌门占据绝对优势。恢复溶氧后肠道菌群数量进一步丰富和增加,这也表明低氧胁迫

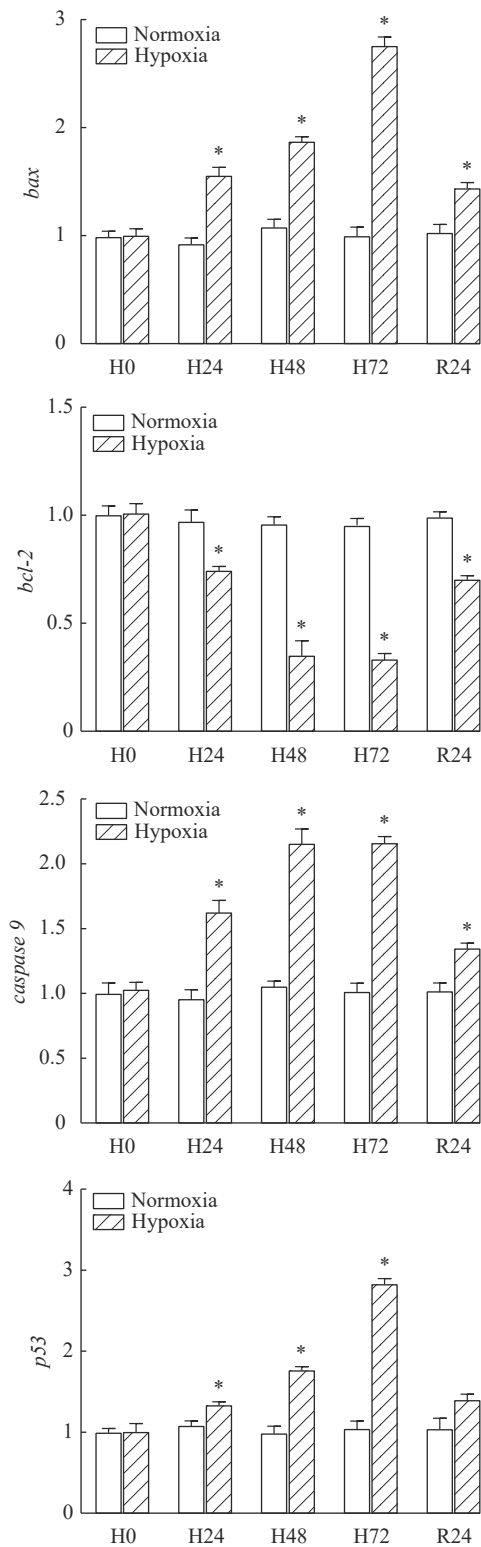


图4 低氧胁迫和恢复下杂交黄颡鱼“黄优1号”的肠道组织凋亡相关基因的表达模式

Fig. 4 Temporal expression of apoptosis-related genes in the intestinal of hybrid yellow catfish “Huangyou-1” under acute hypoxia and reoxygenation conditions

对杂交黄颡鱼肠道微生物的组成具有重要影响。

对各处理组的肠道微生物Alpha多样性进行统计分析(图6),以Chao1和Observed species指数表征丰富度,以Shannon和Simpson指数表征多样性,以Faith’s PD指数表征基于进化的多样性,以Pielou’s evenness指数表征均匀度,以Good’s coverage指数表征覆盖度。由图6可知,Chao1和Observed species指数随着低氧胁迫时间的延长而降低,R24微生物菌群丰富度增加。Shannon指数在H48达到最低,R24指数有所增加,同样Simpson指数在R24较低氧组有所回升。Faith’s PD和Pielou’s evenness的指数均在H48达到最低。在低氧组中Good’s coverage指数较对照组均略微升高,表明微生物的均匀度也进一步增加。

低氧胁迫和恢复对肠道优势菌群变化的影响

统计结果表明,低氧胁迫影响了杂交黄颡鱼肠道微生物菌群的变化,具体体现在数量和种群丰富度上,在属水平上对优势群落的丰度进行统计(表3)。由表3可知,低氧造成厌氧致病菌的大量繁殖,具体表现在葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)和霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)等致病菌数量的增加,乳酸菌属(*Lactobacillus*)、罗斯氏菌属(*Roseburia*)和双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)等有益菌数量的减少。

肠道微生物功能预测 基于肠道微生物测序结果对低氧胁迫下杂交黄颡鱼的代谢通路进行统计和KEGG功能预测(图7)。结果显示,肠道微生物在细胞进程(Cellular processes)、环境信息处理(Environmental information processing)、遗传信息处理(Genetic information processing)、人类疾病(Human diseases)、代谢(Metabolism)和生物体系统(Organismal systems)六大类代谢通路中均有分布,与代谢通路相关的微生物占大多数,与疾病相关的也占有一定比例。

3 讨论

3.1 低氧胁迫和恢复对杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道氧化应激的影响

在鱼类受到胁迫后,体内ROS含量会发生变化,尤其低氧胁迫导致的机体补偿代谢加剧了氧化应激反应^[23]。据报道,当细胞中ROS的产生速率快于氧自由基的清除速率时,生物体内的抗氧化防御系统便会被激活^[24],如鲤^[25]和青田田鱼(*Cyprinus carpio var qingtianensis*)^[26]的大脑和肝脏暴露在急性低氧下,LDH、SOD、CAT和GSH-Px酶活性显著增加;团头鲂幼体^[27]在低氧胁迫过程中血清中

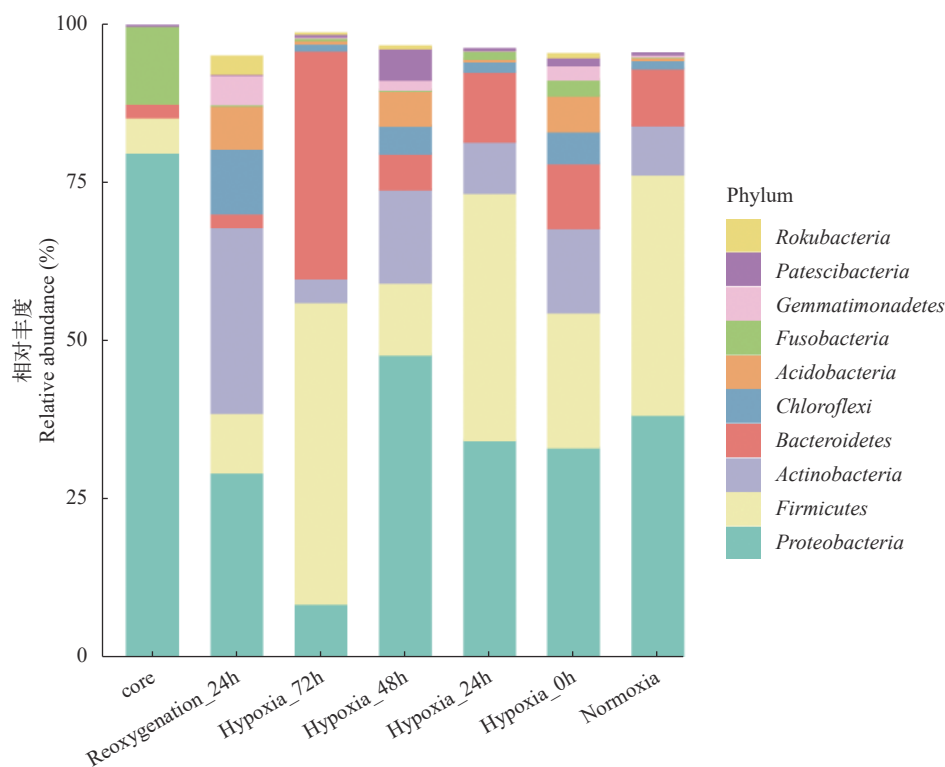


图5 杂交黄颡鱼“黄优1号”门水平上肠道微生物菌群组成

Fig. 5 Composition of intestinal microbial at phylum level of hybrid yellow catfish “Huangyou-1”

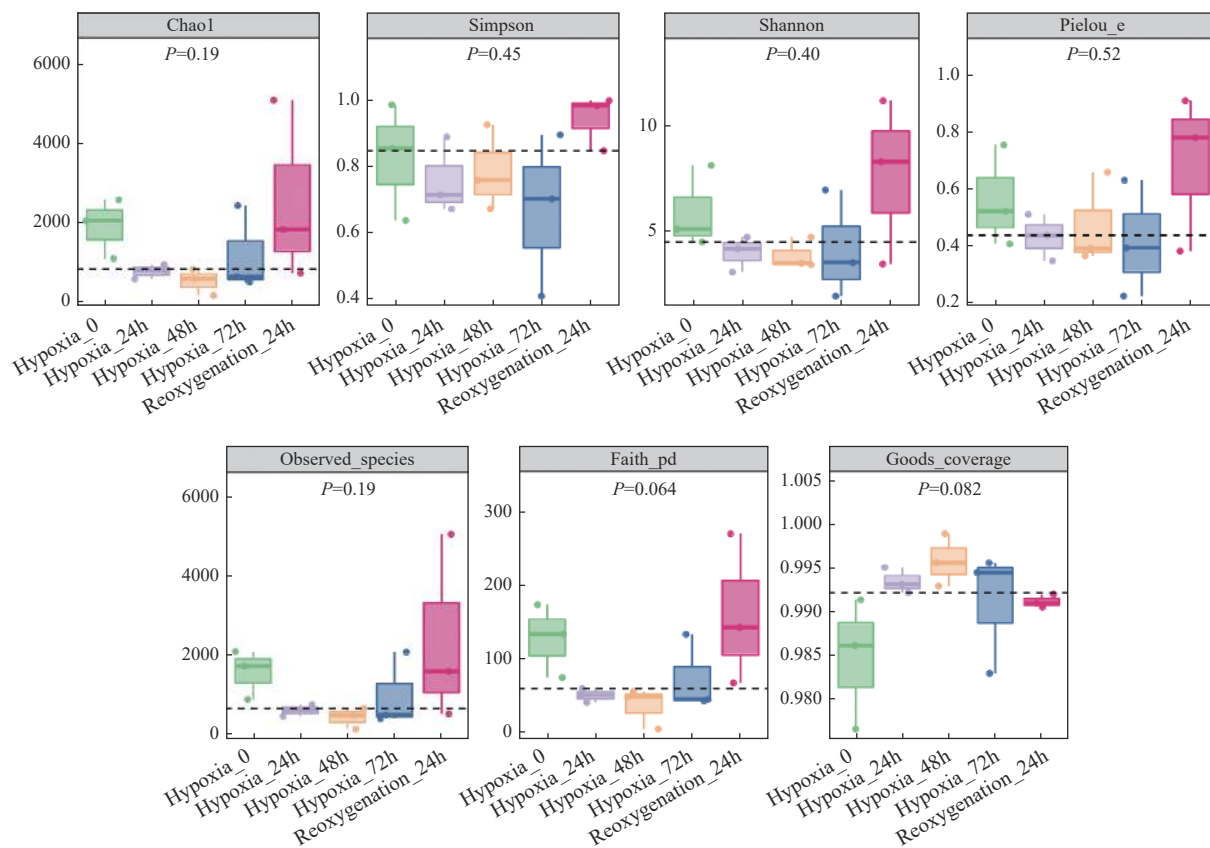


图6 Alpha多样性指数的分组箱线图

Fig. 6 Block boxplot of Alpha diversity index

LDH和肝脏中GSH-Px、MDA含量均显著增加。在本研究中发现, 杂交黄颡鱼在低氧胁迫下肠道组织的SOD、CAT和GSH-Px活性水平较对照组均显著上升, 表明低氧胁迫使得杂交黄颡鱼肠道内抗氧化防御功能被激活, 以应对机体产生过量ROS引起的氧化损伤, 这与花鲈^[28]的低氧胁迫研究结果一致。与对照组相比, LDH在低氧胁迫下显著升高, 表明杂交黄颡鱼肠道中有氧利用得到限制导致

ATP产生不足, 需通过无氧呼吸来弥补氧气不足所带来的机体能量供应紧缺, 这与李欣茹^[9]对暗纹东方鲀在低氧胁迫下肝脏中LDH活力的研究结果相似。MDA和LPO被认为是反映生物体内氧化应激水平的标志物^[29], 两者含量的变化能够反映出机体和细胞的损伤程度。在本研究中发现MDA和LPO的含量在低氧胁迫下不断升高, 表明杂交黄颡鱼体内的抗氧化物酶可能难以迅速清除大量脂质过氧

表 3 低氧胁迫下杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道组织致病菌和益生菌的相对丰度

Tab. 3 Relative abundance of pathogenic and probiotics bacteria in intestinal tissues of hybrid yellow catfish “Huangyou-1” under hypoxia stress (%)

属Genus	类型Type	时间Time				
		H0	H24	H48	H72	R24
<i>Staphylococcus</i>	Pathogenic	0.62±0.03 ^a	0.78±0.1 ^b	0.85±0.05 ^b	0.81±0.03 ^b	0.76±0.08 ^b
<i>Streptococcus</i>	Pathogenic	0.45±0.02 ^a	0.62±0.02 ^b	0.75±0.15 ^c	0.72±0.11 ^c	0.73±0.07 ^c
<i>Vibrio cholerae</i>	Pathogenic	0.14±0.05 ^a	0.22±0.05 ^b	0.26±0.08 ^b	0.39±0.02 ^c	0.23±0.02 ^b
<i>Lactobacillus</i>	Probiotics	0.82±0.08 ^a	0.75±0.1 ^a	0.6±0.08 ^b	0.56±0.03 ^b	0.79±0.02 ^a
<i>Roseburia</i>	Probiotics	0.28±0.06 ^a	0.12±0.11 ^b	0.1±0.03 ^b	0.08±0.01 ^b	0.11±0.01 ^b
<i>Bifidobacterium</i>	Probiotics	0.33±0.02 ^a	0.24±0.02 ^b	0.23±0.05 ^b	0.18±0.06 ^b	0.26±0.07 ^b

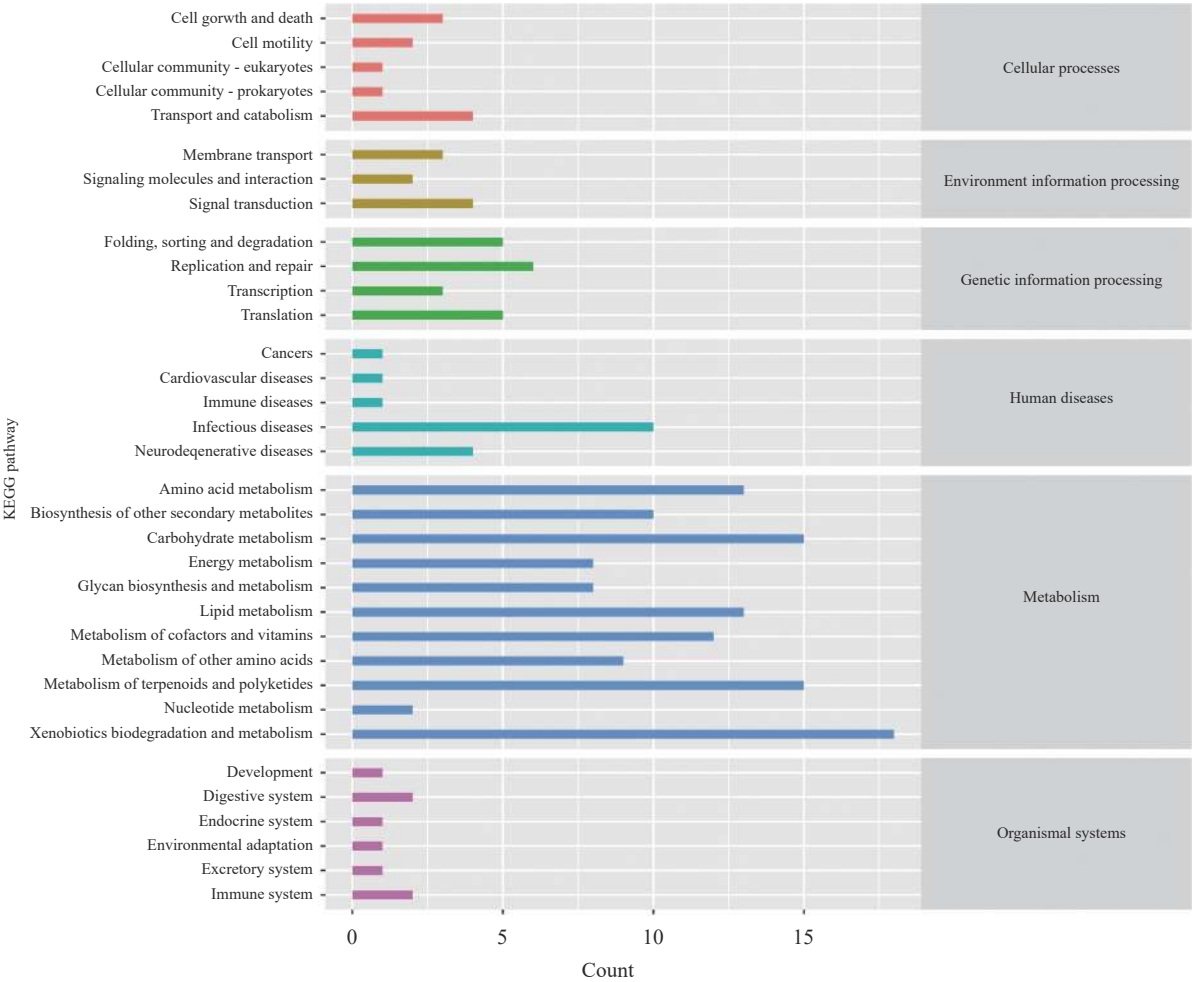


图 7 肠道微生物的KEGG功能预测图

Fig. 7 KEGG function prediction of intestinal microbial

化物, 从而导致二者含量迅速增加, 类似结果在鲢幼鱼(*Mugil cephalus*)^[30]也有报道。

Lushchak等^[31]认为鱼类在低氧条件下可提高自身抗氧化能力, 从而为应对复氧后的再次氧化应激做准备, 在本研究中可以发现杂交黄颡鱼的抗氧化防御系统在低氧24h就已全部启动, 这也进一步印证了上述观点。在恢复溶氧过程中抗氧化酶(SOD)、能量代谢酶(LDH)活性和氧化应激参数(MDA、LPO)含量略有下降, 但是较对照组仍有显差, 表明氧化应激在氧气恢复过程中也同样存在, 这可能是由于氧浓度的恢复使细胞进行大量有氧呼吸产生过量ROS导致; 值得注意的是, CAT和GSH-Px的活性在恢复溶氧24h后与对照组并无显著差异, 这可能是因为鱼体内的超氧自由基(O_2^-)经SOD先还原为过氧化氢, GSH-Px与CAT之间存在代偿互补效应, 可以将过氧化氢转化成水, 彼此之间削弱活性^[32]。上述研究结果证实了低氧和恢复均会对杂交黄颡鱼“黄优1号”造成氧化损伤, 而抗氧化防御系统的激活可以保护细胞并减少氧化应激对鱼体带来的损伤。

3.2 低氧胁迫和恢复对杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道细胞凋亡和组织结构的影响

研究表明, 鱼类在低氧下不仅会产生过量的ROS导致氧化应激反应, 还会引起细胞发生凋亡^[33], 本研究采用TUNEL染色法对杂交黄颡鱼肠道组织进行观察, 结果显示, 低氧胁迫加重了肠组织细胞的凋亡现象, 且随着低氧时间的延长, 凋亡细胞数目也在增加, 与团头鲂^[10]和鲢^[16]的心肌细胞在低氧胁迫下的研究结果相似。

低氧胁迫下杂交黄颡鱼肠道中caspase9基因的表达式较对照组显著增加, 推测可能是细胞色素C通过凋亡小体来激活下游的Caspase家族, caspase9的激活使胞膜内陷, 通过促使胞内蛋白降解, 诱导细胞发生凋亡^[34]。p53是一种肿瘤抑制基因, 在本研究中p53的表达式在低氧胁迫下不断增加, 并在H72达到最高, 表明p53在低氧条件下对细胞凋亡信号具有一定的促进作用。有研究认为, bcl-2和bax是鱼类细胞凋亡过程中起着关键调控作用的两个基因, 二者的比值在一定程度上决定了细胞的发展方向^[35]。在我们的研究中发现, 杂交黄颡鱼肠道中bax和bcl-2的表达式随着低氧时间的延长分别上升和下降, bcl-2/bax的值逐渐减小, 显著促进了肠道细胞的凋亡。恢复溶氧后bax的表达式减少, 而bcl-2的表达式增加, 这可能是由于在细胞中形成了稳定的bcl-2/bax异源二聚体, “中和”了bax/bax同源二聚体诱导细胞凋亡的作用^[36]。此外, 恢复溶氧24h

后bax、bcl-2和caspase9的表达式与对照组仍有显著差异, 这可能是因为恢复过程中氧气的重新导入会使得鱼体产生氧化应激现象, 而这种氧化应激程度过强时, 机体同样会自发启动细胞凋亡程序。

研究报道, 高温^[37]、摄食^[38]和细菌感染^[39]等常常引起鱼类肠上皮组织和细胞结构发生功能性变化, 在本研究中我们通过HE染色切片观察发现, 低氧胁迫下杂交黄颡鱼肠道组织中的杯状细胞数量显著减少、空泡数量增多, 且随着低氧时间的延长, 肠绒毛排列杂乱, 出现糜烂现象, 在恢复溶氧后, 低氧引起的肠道组织生理变化并未得到改善; 表明低氧亦可改变杂交黄颡鱼肠道正常的组织形态, 此结果与大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[40]和日本沼虾^[41]的低氧胁迫研究结果一致。

3.3 低氧胁迫和恢复对杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道微生物的影响

肠道是鱼类体内重要的消化吸收器官, 生存着结构复杂且数量庞大的微生物菌群, 这些微生物菌群不仅与其营养代谢、免疫防御和能量传递有着密切联系, 还在维持肠道内环境稳态中起着重要作用, 它们与宿主的健康生长息息相关^[42]。有研究认为, 放线菌的丰度代表着肠道的健康状况, 放线菌丰度越高说明肠道健康状况越好^[43], 在H72的处理组中放线菌的数量显著低于对照组, 并且通过HE切片也可观察到H72中的肠道组织受损严重, 这也进一步印证了上述观点。肠道微生物丰度柱形图显示杂交黄颡鱼肠道核心菌群是变形菌门, 此结论印证了Harris^[44]提出的水生动物存在固有的肠道微生物群落的观点。此外, 在门水平上肠道菌群组成差异较大, 说明低氧影响了杂交黄颡鱼肠道菌群的数量和结构。通过Alpha多样性分组箱线图, 我们发现在低氧胁迫过程中, 杂交黄颡鱼肠道中的Shannon和Simpson指数较对照组下降, 也说明了其微生物丰富度随着低氧时间的延长而降低。

水生动物在不同的水体环境下会产生应激反应, 进而使肠道内环境平衡受到冲击, 宿主的正常防御系统被破坏, 致病菌会转移、定植甚至侵袭鱼体组织器官^[45]。Suo等^[46]对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)研究发现, 长期暴露在亚致死浓度的硫化物水体中, 肠道组织结构受损, 梭杆菌数量显著增多。Kan等^[47]发现五氯苯酚胁迫使得金鱼(*Carassius auratus*)肠道内大量积累这种物质, 导致其肠道内菌群数量发生改变。在我们的研究中发现随着低氧时间的延长一些厌氧菌得到大量繁殖, 其中不乏有致病菌(葡萄球菌、链球菌)的侵入及益生菌群(乳酸菌、双歧杆菌)数量的降低, 这与日本沼虾^[19]和瓦氏黄颡鱼^[21]的研究结果一致。通过绘制低氧

胁迫下样本的KEGG功能预测图,发现肠道微生物主代谢功能,但是在细胞进程和生物体系统等方面同样发挥着独特的功能,值得注意的是,在本次功能预测中,与疾病相关的微生物也占有一定比例,说明低氧胁迫下杂交黄颡鱼的免疫防御系统会遭到损害,从侧面揭示了低氧、肠道微生物和宿主免疫之间的复杂关系。

4 结论

综上所述,低氧和恢复会诱导杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道抗氧化酶(SOD、CAT和GSH-Px)、能量相关酶(LDH)活性和应激指标(MDA和LPO)含量显著升高,凋亡指数及凋亡相关基因(*bax*、*p53*和*caspase9*)表达量显著升高,*bcl-2*基因的表达量则减少,表明随着低氧时间的延长,杂交黄颡鱼的肠道氧化应激损伤逐渐加大,恢复溶氧后这种现象仍然存在,这可能是肠道产生细胞凋亡的诱因之一。此外,随着低氧时间的延长,黏膜层坏死、空泡和绒毛侵蚀等肠道组织结构受损现象逐渐加剧,葡萄球菌和链球菌等厌氧菌数量增多,使肠道内环境稳态遭到破坏,进而影响肠道功能。本研究结果为阐明低氧和恢复下杂交黄颡鱼“黄优1号”肠道组织内环境稳态调控机制提供理论依据。

参考文献:

- [1] Li M F. Progress on study on biology of *Pelteobagrus fulvidraco* (Richardson) [J]. *Modern Fisheries Information*, 2010, **25**(9): 16-22. [李明峰. 黄颡鱼生物学研究进展 [J]. 现代渔业信息, 2010, **25**(9): 16-22.]
- [2] Fishery and Fishery Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Areas, National Aquatic Technology Promotion Terminal, China Society of Fisheries. China Fishery Statistics Yearbook [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2021: 24-25. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2021: 24-25.]
- [3] Zhang G S. Research on the molecular mechanism of *Pelteobagrus vachelli* in coping with hypoxic stress [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2017: 10-13. [张国松. 瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)应对低氧胁迫的分子机制研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2017: 10-13.]
- [4] Xiong Y, Wang S, Dan C, *et al.* The role of antimicrobial peptide hbb-c in *Ichthyophthirius multifiliis* resistance in all-male and hybrid yellow catfish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, **45**(5): 975-985. [熊阳, 王帅, 丹成, 等. 抗菌肽HBB-C在全雄和杂交黄颡鱼对多子小瓜虫抗性差异中的作用 [J]. 水生生物学报, 2021, **45**(5): 975-985.]
- [5] Sun J X, Han G K, Liu Y, *et al.* The growth characteristics and hypoxia tolerant ability of yellow catfish and hybrid catfish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(6): 1271-1279. [孙俊霄, 韩广坤, 刘娅, 等. 杂交黄颡鱼与普通黄颡鱼幼鱼生长性能及耐低氧能力的比较 [J]. 水生生物学报, 2019, **43**(6): 1271-1279.]
- [6] Rosenberger A E, Chapman L J. Hypoxic wetland tributaries as faunal refugia from an introduced predator [J]. *Ecology of Freshwater Fish*, 1999, **8**(1): 22-34.
- [7] Kuang X Y. Effect of high dissolved oxygen on growth, oxidative stress, and immune capacity of *Acipenser baerii* and hybrid sturgeon [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2016: 3-6. [况新宇. 高溶氧对西伯利亚鲟、杂交鲟生长、氧化应激及免疫功能的影响 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2016: 3-6.]
- [8] Pei X Y, Chu M X, Tang P, *et al.* Effects of acute hypoxia and reoxygenation on oxygen sensors, respiratory metabolism, oxidative stress, and apoptosis in hybrid yellow catfish “Huangyou-1” [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2021, **47**(5): 1429-1448.
- [9] Li X R. Effects of hypoxia stress on energy metabolism, blood indices and gene expression of *Takifugu fasciatus* [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2018: 33-40. [李欣茹. 低氧胁迫对暗纹东方鲀能量代谢、血液指标及基因表达的影响 [D]. 南京: 南京师范大学, 2018: 33-40.]
- [10] Wu X J. The effects of hypoxia on cell apoptosis and the activity of antioxidant enzymes in *Megalobrama amblycephala* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015: 27-32. [吴鑫杰. 低氧对团头鲂细胞凋亡及抗氧化酶活性的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015: 27-32.]
- [11] Lushchak V I, Bagnyukova T V. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Perccottus glenii* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, **148**(4): 390-397.
- [12] Welker A F, Campos E G, Cardoso L A, *et al.* Role of catalase on the hypoxia/reoxygenation stress in the hypoxia-tolerant Nile tilapia [J]. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2012, **302**(9): R1111-R1118.
- [13] Richards J G. Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2011, **214**(2): 191-199.
- [14] Wang P F. Cloning and expression analysis of heat shock protein and hypoxia responsive genes in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [D]. Guangzhou: Sun Yat-sen University, 2014: 137-141. [王鹏飞. 鳊热休克蛋白和低氧反应基因的克隆和表达研究 [D]. 广州: 中山大学, 2014: 137-141.]
- [15] Poon W L, Hung C Y, Nakano K, *et al.* An in vivo study of common carp (*Cyprinus carpio* L.) liver during prolonged hypoxia [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2007, **2**(4): 295-302.
- [16] Ding C Y, Hu L S, Li Y, *et al.* Effects of hypoxia stress on cardiomyocyte apoptosis and the control for *Bax*, *Bcl-2* expressions in *Hypophthalmichthys molitrix* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2018, **48**(2): 10-15. [丁晨雨, 胡利双, 李云, 等. 低氧胁迫对鲢心肌细胞凋亡及其调控基因*Bax*、*Bcl-2*表达的影响 [J]. 淡水渔业, 2018, **48**(2): 10-15.]
- [17] Clarke T B, Davis K M, Lysenko E S, *et al.* Recognition

- of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity [J]. *Nature Medicine*, 2010, **16**(2): 228-231.
- [18] Meng X L, Li W J, Nie G X. Effect of different factors on the fish intestinal microbiota [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, **43**(1): 143-155. [孟晓林, 李文均, 聂国兴. 鱼类肠道菌群影响因子研究进展 [J]. 水产学报, 2019, **43**(1): 143-155.]
- [19] Yang M. Effects of hypoxia stress on enzyme activities, histological structure and intestinal microorganisms of *Macrobrachium nipponense* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019: 31-37. [杨明. 低氧胁迫对青虾酶活、组织结构及肠道微生物的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2019: 31-37.]
- [20] Sun Y X. Protection of teprenone against hypoxia stress in intestine of *Lateolabrax maculatus* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019: 13-22. [孙永旭. 替普瑞酮对花鲈肠道缺氧应激的损伤防护研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019: 13-22.]
- [21] Zheng X, Fu D Y, Cheng J H, *et al.* Effects of hypoxic stress and recovery on oxidative stress, apoptosis, and intestinal microorganisms in *Pelteobagrus vachelli* [J]. *Aquaculture*, 2021(543): 736945.
- [22] Zhang G S, Mao J Q, Liang F F, *et al.* Modulated expression and enzymatic activities of Darkbarbel catfish, *Pelteobagrus vachelli* for oxidative stress induced by acute hypoxia and reoxygenation [J]. *Chemosphere*, 2016(151): 271-279.
- [23] Xiao W H. The hypoxia signaling pathway and hypoxic adaptation in fishes [J]. *Science China Life Sciences*, 2015, **58**(2): 148-155.
- [24] Zhou B S, Wu R S S, Randall D J, *et al.* Metabolic adjustments in the common carp during prolonged hypoxia [J]. *Journal of Fish Biology*, 2000, **57**(5): 1160-1171.
- [25] Lushchak V I, Bagnyukova T V, Lushchak O V, *et al.* Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005, **37**(6): 1319-1330.
- [26] Qi M, Hou Y L, Liu T, *et al.* The effects of acute hypoxia stress and re-oxygenation on oxidative stress and energy metabolism of juvenile *Cyprinus carpio* var *qingtianensis* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2020, **50**(6): 92-98. [齐明, 侯懿玲, 刘韬, 等. 急性低氧胁迫和复氧恢复对青田田鱼幼鱼氧化应激和能量代谢的影响 [J]. 淡水渔业, 2020, **50**(6): 92-98.]
- [27] Wang Y W. Effects of hypoxia and culture density on physiological and biochemical indexes and tissue structure of *Megalobrama amblycephala* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019: 29-37. [王焱纬. 低氧、养殖密度对团头鲂生理生化指标和组织结构的影响 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019: 29-37.]
- [28] Chang Z C, Wen H S, Zhang M Z, *et al.* Effects of dissolved oxygen levels on oxidative stress response and energy utilization of juvenile Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*) and associate physiological mechanisms [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2018, **48**(7): 20-28. [常志成, 温海深, 张美昭, 等. 溶解氧水平对花鲈幼鱼氧化应激与能量利用的影响及生理机制 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, **48**(7): 20-28.]
- [29] Liu X L, Xi Q Y, Yang L, *et al.* The effect of dietary *Panax ginseng* polysaccharide extract on the immune responses in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, **30**(2): 495-500.
- [30] Xiong X Y, Huang G Q, Peng Y H, *et al.* Effect of hypoxia on growth performance, energy, metabolism and oxidative stress of *Mugil cephalus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, **40**(1): 73-82. [熊向英, 黄国强, 彭银辉, 等. 低氧胁迫对鲢幼鱼生长、能量代谢和氧化应激的影响 [J]. 水产学报, 2016, **40**(1): 73-82.]
- [31] Lushchak V I, Bagnyukova T V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, **144**(3): 283-289.
- [32] Tang G. The discuss on the relationship among reactive oxygen species, antioxidant enzyme and antioxidant [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, **38**(33): 18619-18621. [唐功. 活性氧·抗氧化酶及抗氧化剂之间关系的探讨 [J]. 安徽农业科学, 2010, **38**(33): 18619-18621.]
- [33] Sun J L, Zhao L L, Liao L, *et al.* Interactive effect of thermal and hypoxia on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) gill and liver: Aggravation of oxidative stress, inhibition of immunity and promotion of cell apoptosis [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020(98): 923-936.
- [34] Bratton, S B, Walker G, Srinivasula S M, *et al.* Recruitment, activation and retention of caspases-9 and-3 by Apaf-1apoptosome and associated XIAP complexes [J]. *The EMBO Journal*, 2001, **20**(5): 998-1009.
- [35] Li D D, Luo Z, Chen G H, *et al.* Identification of apoptosis-related genes Bcl2 and Bax from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and their transcriptional responses to waterborne and dietborne zinc exposure [J]. *Gene*, 2017(633): 1-8.
- [36] Cao J, Chen J, Wang J, *et al.* Effects of fluoride on liver apoptosis and Bcl-2, Bax protein expression in freshwater teleost, *Cyprinus carpio* [J]. *Chemosphere*, 2013, **91**(8): 1203-1212.
- [37] Xie J, Wang G J, Deng Y S, *et al.* Effects of feeding thermostability enzyme (JM301) preparations on the immunity and microvilli lying the gut of Tilapia [J]. *Fishery Modernization*, 2008, **35**(3): 27-30. [谢骏, 王广军, 邓岳松, 等. 耐高温酶制剂对奥尼罗非鱼免疫和肠道结构的影响 [J]. 渔业现代化, 2008, **35**(3): 27-30.]
- [38] Zhu H J, Qiang J, He J, *et al.* Physiological parameters and gut microbiome associated with different dietary lipid levels in hybrid yellow catfish (*Tachysurus fulvidraco* ♀ × *Pseudobagrus vachellii* ♂) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2021(37): 100777.
- [39] Xia Y J, Huang W Q, Jiang G L. Histopathology and immunohistochemistry of flounder infected by *Vibrio anguillarum* [J]. *Marine Sciences*, 2000, **24**(10): 41-44. [夏永娟, 黄威权, 姜国良. 鳃弧菌感染牙鲆的组织学和免疫组织化学观察 [J]. 海洋科学, 2000, **24**(10): 41-44.]

- [40] Chen Q L. Effect of the main mucosal immunity organization and cell in largemouth bass under acute hypoxic exposure [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2017: 29-50. [陈侨兰. 大口黑鲈主要粘膜免疫组织和细胞的研究及低氧对其的影响 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2017: 29-50.]
- [41] Sun S M, Yang M, Fu H T, *et al.* Altered intestinal microbiota induced by chronic hypoxia drives the effects on lipid metabolism and the immune response of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* [J]. *Aquaculture*, 2020(526): 353-361.
- [42] Zhuo L X, Zhao H X, Huang Y H, *et al.* Influence of oxidized fish oil on the intestinal health of juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) and the use of arginine as an intervention measure [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, **42**(1): 100-111. [卓丽欣, 赵红霞, 黄燕华, 等. 氧化鱼油对黄颡鱼幼鱼肠道健康的影响及精氨酸的干预作用 [J]. 水产学报, 2018, **42**(1): 100-111.]
- [43] Xing W, Luo L. Effects of Raffinose on intestinal structure and microflora of hybrid sturgeon [J]. *China Fisheries*, 2020(7): 84-87. [邢薇, 罗琳. 棉籽糖对杂交鲟肠道结构及肠道菌群影响的研究 [J]. 中国水产, 2020(7): 84-87.]
- [44] Harris J M. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis [J]. *Microbial Ecology*, 1993, **25**(3): 195-231.
- [45] Van D H, Doolgindachbaporn S, Suksri A. Effects of low molecular weight agar and *Lactobacillus plantarum* on growth performance, immunity, and disease resistance of Basa fish (*Pangasius bocourti*, Sauvage 1880) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, **41**(2): 340-345.
- [46] Suo Y, Li E, Li T, *et al.* Response of gut health and microbiota to sulfide exposure in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017(63): 87-96.
- [47] Kan H, Zhao F, Zhang X X, *et al.* Correlations of gut microbial community shift with hepatic damage and growth inhibition of *Carassius auratus* induced by pentachlorophenol exposure [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, **49**(19): 11894-11902.

HYPOXIA STRESS AND RECOVERY ON INTESTINAL TISSUE OF HYBRID YELLOW CATFISH “HUANGYOU-1” (*PELTEOBAGRUS VACHELLI* ♂ × *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO* ♀)

CHENG Jing-Hao¹, LI Yao¹, SHEN Ming-Hao¹, YANG Zhi-Ru¹, ZHANG Wei-Jian¹, ZHANG Kai¹,
WANG Tao¹, ZHANG Guo-Song^{1,2} and YIN Shao-Wu¹

(1. Jiangsu Province Engineering Research Center for Aquatic Animals Breeding and Green Efficient Aquacultural Technology, College of Marine Science and Engineering, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China; 2. Key Laboratory of Physiology, Biochemistry and Application in Universities of Shandong Province During the 13th Five-Year Plan Period, Heze University, Heze 274015, China)

Abstract: At present, the research on environmental stress of fish intestinal tissues has attracted the attention of scholars. In order to explore the effects of hypoxia (1.0±0.1) mg/L and recovery (7.0±0.5) mg/L on the intestinal tissues of hybrid yellow catfish “Huangyou-1”, the changes of intestinal oxidative stress index, histological morphology, cell apoptosis and microbial composition were analyzed by enzyme activity determination and H & E staining, qRT-PCR, TUNEL detection and 16S rRNA sequencing technology. The results showed that: (1) Antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, GSH-Px), energy metabolism enzyme activity (LDH), malondialdehyde (MDA) and lipid peroxide (LPO) of intestine increased significantly under hypoxia stress, and the oxidative stress reaction was also severe after the recovery of dissolved oxygen. (2) After hypoxia stress, the intestinal tissue damage gradually intensified, the goblet cells were swelled and the mucosal layer was eroded. The physiological changes caused by hypoxia were not significantly improved after 24h oxygen recovery. (3) The degree of intestinal cell apoptosis intensified with the prolongation of hypoxia, and the expression levels of apoptosis-related genes (*bax*, *caspase9* and *p53*) increased significantly, while the mRNA expression levels of *bcl-2* decreased. (4) The relative abundance of intestinal microbes were reduced in the hypoxic stress stage. Among 72h hypoxic stress, Firmicutes (47.8%) and Bacteroidetes (40.6%) had the most dominant abundances, and the number of intestinal flora increased after the recovery of dissolved oxygen, KEGG function prediction showed that most of the intestinal microbes were related to metabolic pathways. The research results can provide a theoretical basis for analyzing the physiological regulation mechanism of hybrid yellow catfish “Huangyou-1” in response to hypoxia stress and recovery.

Key words: Hypoxia stress; Intestine; Oxidative; Apoptosis; Microorganisms; Hybrid yellow catfish “Huangyou-1”