

急性和慢性低氧胁迫对卵形鲳鲹幼鱼 肝组织损伤和抗氧化的影响

陈世喜^{①②} 王鹏飞^① 区又君^{①*} 温久福^① 李加儿^①
王雯^{①②} 谢木娇^{①②}

① 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室 广州 510300;

② 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306

摘要: 自然海域和养殖水体环境频现低氧, 本研究针对卵形鲳鲹 (*Trachinotus ovatus*) 不耐低氧的特性, 将 (31.59 ± 3.01) g ($n = 30$) 的卵形鲳鲹在 (23 ± 0.7) °C 下进行 3、6、12 和 24 h 的急性和 14 d 的慢性低氧[溶解氧为 (1.55 ± 0.20) mg/L]胁迫。运用光学和电子显微技术, 比较急、慢性低氧胁迫对卵形鲳鲹肝组织显微和超微结构的影响。通过测定肝组织中的丙二醛 (MDA) 含量及过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽还原酶 (GSH) 的活性, 分析低氧胁迫对卵形鲳鲹肝是否造成氧化损伤。急性低氧胁迫下, 卵形鲳鲹肝组织间出现空泡、小叶结构破坏, 细胞内线粒体数量减少, 出现过氧化物酶体, 肝细胞间血窦剧烈扩张。这些病理损伤随胁迫时间延长更趋严重, 24 h 时甚至出现局部肝细胞融合、坏死, 慢性低氧胁迫 14 d 时, 肝细胞局部坏死, 细胞膜溶解, 细胞核破裂分解, 胞质内细胞器不明显, 只可分辨粗面内质网, 细胞内空泡体积大, 细胞结构松散, 血窦扩张。急性低氧胁迫下丙二醛 (MDA) 含量随时间先上升后下降, 慢性低氧胁迫 14 d 时丙二醛 (MDA) 则显著增加。急性低氧胁迫下超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽还原酶 (GSH) 上升后恢复, 过氧化氢酶 (CAT) 则持续上调, 慢性低氧胁迫下超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽还原酶 (GSH) 显著上调, 过氧化氢酶 (CAT) 活性下降。结果表明, 卵形鲳鲹幼鱼肝组织在低氧胁迫下病理变化明显, 氧化损伤严重, 且慢性低氧胁迫比急性更甚。

关键词: 卵形鲳鲹; 低氧胁迫; 肝; 氧化应激

中图分类号: S917.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2016) 06-1049-10

The Effect of Acute and Chronic Hypoxia Stress on Liver Tissue Structure and Oxidation in Juvenile Golden Pompano (*Trachinotus ovatus*)

CHEN Shi-Xi^{①②} WANG Peng-Fei^① OU You-Jun^{①*} WEN Jiu-Fu^① LI Jia-Er^①
WANG Wen^{①②} XIE Mu-Jiao^{①②}

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (No. 2014TS26), 广东省自然科学基金项目 (No. 2015A030310253), 广东省科技计划项目 (No. 2016A0303029);

* 通讯作者, E-mail: ouyoujun@126.com;

第一作者介绍 陈世喜, 男, 硕士研究生; 研究方向: 鱼类繁育与基础生物学; E-mail: saihei@foxmail.com。

收稿日期: 2016-01-05, 修回日期: 2016-05-02 DOI: 10.13859/j.cjz.201606013

① Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510300; ② College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Hypoxia occurs in the natural and aquaculture water environment frequently. Golden Pompano (*Trachinotus ovatus*) is a hypoxia-sensitive fish, so we employed (31.59 ± 3.01g) juvenile golden pompano to study the effect of acute and chronic hypoxia stress on the liver by physiological and histological methods. Individuals were exposed to 3 - 24 h of acute or 14 d of chronic hypoxia stress at room temperature. The histological changes in the liver were observed to analyze the tissue injury. Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) and malonic dialdehyde (MDA) activities were measured to determine the antioxidant effects in the liver tissue. Data were statistically analyzed. The liver tissue gradually showed vacuoles, expanded blood sinus, and blurred hepatic lobule structure during acute hypoxia. At 24 h acute hypoxia, liver tissue even showed cell fusion and local cell necrosis (Fig. 1e). At 14 d chronic hypoxia, liver tissue showed local cell necrosis and vacuolation inside the cells (Fig. 1f). Cell structure was decentralized, intercellular connection was divided, cell membrane was dissolved, organelles were disrupted, nucleus was decomposed, blood sinus was enlarged, while only rough endoplasmic reticulum was evidently observed (Fig. 2c, d). In acute hypoxia, CAT activity was continuously increased, SOD and GSH activities was recovered after increase ($P < 0.05$). In chronic hypoxia stress, SOD, GSH activities were significantly increased ($P < 0.05$), while CAT activity was significantly decreased ($P < 0.05$) (Fig. 3a - c). MDA activity firstly was increased and then recovered in acute hypoxia, but increased significantly ($P < 0.05$) at 14 d of hypoxia (Fig. 3d). The results show that golden pompano liver tissue structure is seriously damaged and is in severe oxidative stress under hypoxia stress. Hypoxia stress in chronic hypoxia is more serious than that in acute hypoxia.

Key words: Golden Pompano, *Trachinotus ovatus*; Hypoxia; Liver; Oxidative stress

鱼类的生长和发育不仅由内分泌系统调控, 还受到外部环境, 如溶氧、温度、盐度、光照、pH 等的影响。相对于其他脊椎动物, 水环境作为鱼类生活的介质, 水体中的溶氧对鱼类的影响更加显著(王刚等 2010)。溶氧影响着鱼类摄食、生长、免疫、繁殖等一切生命活动, 适宜的溶氧水平是鱼类生存的基础, 是保证鱼类正常生长的重要条件, 低氧环境易使鱼类正常的呼吸、代谢紊乱, 导致鱼类摄食量下降、食物转化效率降低、生长缓慢, 甚至影响鱼类的行为、形态学特征及生存策略。极端天气变化、富营养化和人为因素都会造成养殖水体低氧, 苗种运输作为鱼类养殖过程重要的一部分, 长途运输过程也面临低氧(Nordlie

2014)。卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)隶属鲈形目(Perciformes)鲳科(Carangidae)鲳属, 其在人工养殖条件下生长速度快, 养殖生产经济效益显著, 是中国南方重要的海水养殖鱼类(区又君等 2011), 而卵形鲳鲹的生长对养殖水体中溶氧水平的要求较高(区又君等 2014)。肝作为鱼体内最大的腺体, 在物质代谢、解毒、凝血和防御等生命活动过程中起着至关重要的作用(苏慧等 2012)。本实验室前期的研究发现, 卵形鲳鲹在急性低氧胁迫后肝的谷丙转氨酶和谷草转氨酶含量显著升高, 提示低氧胁迫对卵形鲳鲹肝造成损伤(区又君等 2014), 而低氧胁迫后卵形鲳鲹肝的组织学变化尚未确定。

细胞内氧化与抗氧化间的平衡是动物细胞正常存活的必要条件, 当细胞内产生大量自由基且未及时清除即会造成机体处于氧化应激状态, 细胞内过多的自由基会攻击各种生物膜中所含的不饱和脂肪酸, 发生脂质过氧化反应, 产生大量过氧化产物脂质过氧化物, 对机体造成损伤, 同时机体抗氧化酶的缺乏会导致体内原有自由基代谢平衡遭到破坏(尹飞等 2011, 李卫芬等 2012)。丙二醛(malonic dialdehyde, MDA)含量是衡量机体脂质过氧化反应速率和强度的重要指标, 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)是生物体清除体内多余自由基的重要抗氧化酶类, 与鱼类的免疫能力有着密切关系(初晓红 2009, 刘旭佳等 2014)。水生动物抗氧化系统的研究主要包括水体低氧环境、维生素类饲料添加剂及水体中的烃类、重金属和残留农药对水生生物抗氧化系统的影响(顾孝连 2009), 低氧胁迫后的欧洲鲷(*Solea solea*)肝组织中乳酸含量上升(李洁 2011), 叉尾石首鱼(*Leiostomus xanthurus*)鳃组织中乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)和超氧化物歧化酶(SOD)低氧胁迫后显著增(Hermes-Lima et al. 2001), 类似结果均表明低氧环境对鱼类的抗氧化系统有显著影响。

本研究通过对比急性和慢性低氧胁迫对卵形鲳鲹幼鱼肝组织和抗氧化酶活力影响, 旨在比较急性和慢性低氧胁迫方式对卵形鲳鲹肝组织生理的影响, 为卵形鲳鲹的组织学和生理学研究提供基础资料, 为卵形鲳鲹的种苗生产、运输提供指导, 为卵形鲳鲹健康养殖等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验选择当年人工繁育的卵形鲳鲹幼鱼, 体长(10.3 ± 1.2) cm, 体重(31.59 ± 3.01) g ($n = 30$), 室内恒温循环水系统暂养两周, 暂

养水温(23 ± 0.7) °C, pH(7.76 ± 0.02), 光照 136.6 ~ 177.8 lx, 盐度(20 ± 0.5) g/L, 溶氧(6.82 ± 0.45) mg/L。每天分别在 9:00 时和 16:30 时按照体重的 3% 进行投喂, 饲料为浮水性鱼用膨化配合饲料(全兴水产饲料有限公司), 粗蛋白含量不低于 34%, 粗脂肪含量不低于 5%, 投喂后及时清除残饵和粪便, 实验前一天停止投喂。

1.2 实验方法

1.2.1 低氧胁迫 实验所用卵形鲳鲹分 4 组, 急性实验组和慢性实验组, 及各自的对照组, 每组 3 个平行, 低氧水平的设置参照王刚等(2010)关于卵形鲳鲹耗氧率和窒息点的数据, 及卵形鲳鲹幼鱼在预实验中的窒息点(1.09 ± 0.10) mg/L 和临界氧压(1.98 ± 0.40) mg/L, 选择窒息点与临界氧压之间, 溶解氧为(1.55 ± 0.20) mg/L 的低氧水平。各实验组分别养殖在体积 0.43 m³ 玻璃钢大桶中, 密度 30 尾/桶, 溶氧条件同暂养水平。实验依据 YSI-55 溶氧仪的实时读数, 通过调节充入水中的氮气和空气的速率控制溶氧, 急性实验组在 30 min 内将溶氧降至(1.55 ± 0.10) mg/L, 实验开始计时。慢性实验组第 1 天以平均 0.13 mg/(L h) 的速率将溶氧水平缓慢降低至(3.6 ± 0.20) mg/L, 第 2 天以 0.085 mg/(L h) 的速率从(3.60 ± 0.20) mg/L 缓慢降低至(1.55 ± 0.20) mg/L, 开始实验。对照组养殖条件与暂养条件一致。实验过程中对照组和急性实验组实验鱼的健康状况良好, 无死亡, 慢性实验组死亡率为 67%。急性和慢性低氧胁迫对照组的饲养条件与暂养条件一致。

急性实验组分别在 3、6、12 和 24 h 时取样, 且同时取急性对照组, 慢性实验组在低氧胁迫 14 d 时取样, 且同时取慢性对照组。取样时将实验鱼用适量 MS-222 溶液麻醉, 在灭菌操作台上解剖后取肝, 组织切片样本用生理盐水冲洗, Bouin's 液固定, 透射电镜所用组织在冰盘上切成 1 cm³ 小块, 0.1 mol/L 预冷 PBS 缓冲液冲洗后, 2.5% 的戊二醛溶液固定, 各平行

每次取样 6 尾鱼, 肝超微结构的对比, 参考该研究中抗氧化酶活性变化, 选择酶活性变化最显著的急性低氧胁迫 6 h 和慢性低氧胁迫 14 d 的样本作对比, 急性和慢性对照组无显著差异, 选择急性对照组作为对照组。

1.2.2 肝组织显微和超微结构观察 组织切片样本固定后流水冲洗 24 h, 经 80%、95%、100% 的梯度酒精溶液逐级脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 后用切片机 (Leica RM 2135) 5 μm 连续超薄切片, 苏木精-伊红染色, 晾干后在光学显微镜 (ZEISS-Scope A 型) 下观察, 使用软件 (Qcaptor Pro 6.0) 观察、拍照。

透射电镜所用组织固定后, 使用 80%、95%、100% 梯度酒精溶液逐级脱水, 1% 锇酸溶液固定 1 h, 再用 PBS 缓冲液冲洗, 用梯度酒精溶液脱水后用纯树脂包埋, 超薄切片机切片, 醋酸铀和柠檬酸染色后在透射电子显微镜 (JEM-100CXII 型) 下观察并拍照。

1.2.3 酶活性测定 每组选择 5 尾鱼的肝作为重复, 将 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的肝组织冰上解冻, 称量装有组织的离心管和空离心管的质量差为组织的质量, 加入组织质量 9 倍体积的预冷生理盐水, 用 180 $^{\circ}\text{C}$ 高温灭菌的预冷研钵充分研磨后转移至 1.5 ml 离心管, 4 $^{\circ}\text{C}$, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液分装后 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱暂存, 用于测定酶活力和蛋白浓度。丙二醛 (MDA)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽还原酶 (GSH) 和蛋白 (total protein, TP) 的测定均使用南京建成生物工程研究所试剂盒, 分别为丙二醛 (MDA) 测定试剂盒 (A003-1)、过氧化氢酶 (CAT) 测定试剂盒 (A007-1)、超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒 (A001-3)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 测定试剂盒 (A006-2) 和总蛋白 (TP) 测定试剂盒 (A045-2), 由佑科 722s 型可见光分光光度计 (上海精学科学仪器有限公司) 和 xMark 酶标仪 (Bio-Rad) 测定吸光值, 换算获得上述测定指标的数据。丙二醛 (MDA) 含量的测定使用硫代巴比妥酸法, 单位为 g/L。超氧化物歧化

酶 (SOD) 活力的测定采用黄嘌呤氧化酶法, 单位为 U/mg。过氧化氢酶 (CAT) 使用可见光法测定, 单位为 U/mg。谷胱甘肽还原酶 (GSH) 活力使用微板法测定, 单位为 U/mg。总蛋白 (TP) 含量的测定采用考马斯亮蓝法, 单位为 g/L, 该数据为丙二醛 (MDA)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽还原酶 (GSH) 的换算公式中的基础数据。

1.2.4 统计分析 统计数据采用“平均数 \pm 标准差”表示, 使用软件 SPSS 20 进行单因素方差分析, 结合 Duncan 法进行多重比较, 使用软件 Sigma Plot 12.5 作图。

2 结果

2.1 低氧胁迫后卵形鲳鲹幼鱼肝显微结构的变化

光学显微镜下卵形鲳鲹肝上皮由梭形单层扁平上皮细胞以及极薄的结缔组织构成, 肝细胞胞质均匀, 胞质内含物丰富, 细胞呈卵圆形或多边形, 细胞核清晰, 明显位于肝细胞中央, 肝细胞以中央静脉为中心, 呈放射状排列, 形成分支吻合状肝细胞索, 肝细胞间同时分布有肝血窦、中央静脉分支、胰腺组织等结构, 肝血窦较为狭窄, 由血窦内皮细胞构成, 迂回分布于肝细胞之间 (图 1a)。

急性低氧胁迫 3 h 时卵形鲳鲹幼鱼肝出现肝细胞无序, 肝细胞内出现空泡 (图 1b), 6 h 时肝细胞间空泡以及无序更加明显, 细胞胞质减少, 空泡化增加, 同时肝细胞脂肪小泡发生轻微变性 (图 1c); 12 h 时肝细胞无序, 空泡化更加显著 (图 1d), 24 h 时出现血窦扩张, 局部肝细胞坏死, 肝细胞融合, 肝细胞细胞质网状纤维增加, 肝细胞脂肪小泡变性明显, 空泡界限模糊 (图 1e)。慢性低氧胁迫 14 d 时, 肝局部坏死, 血窦扩张, 细胞融合更加明显, 肝小叶结构不明显, 肝细胞萎缩, 核明显, 出现坏死肝实质, 肝血窦出现明显拥堵, 肝血窦血细胞数目增加, 血窦内皮细胞不明显, 与低氧胁迫 6 h 相比, 14 d 时肝胆管立方上皮细胞

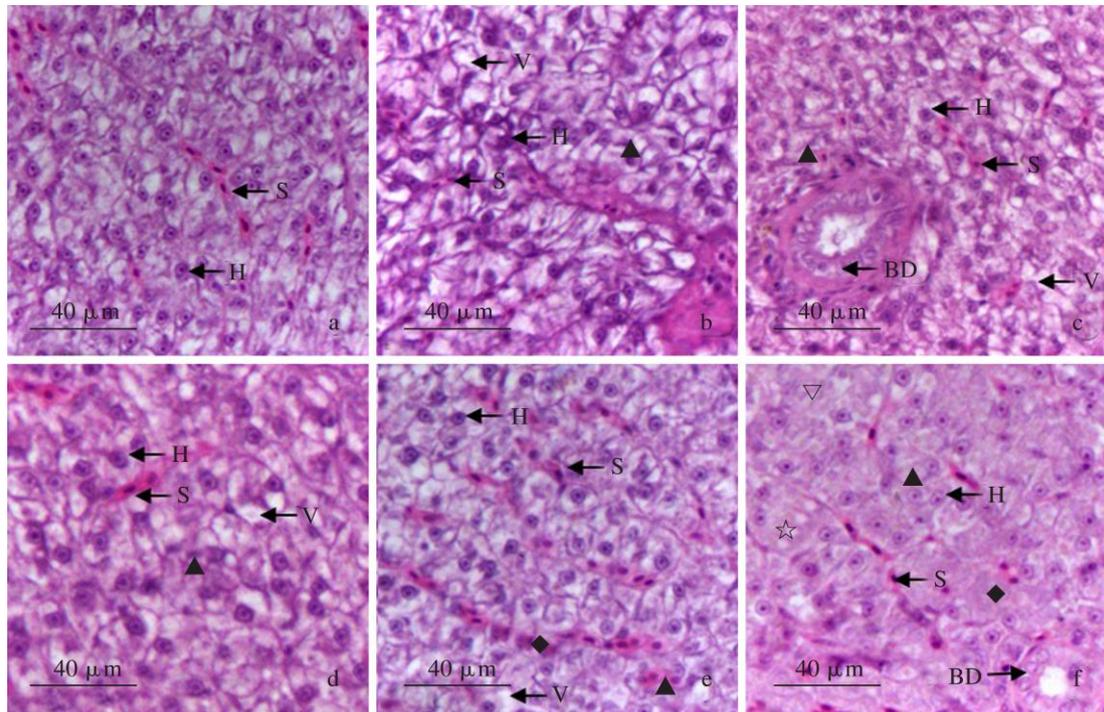


图 1 低氧胁迫后卵形鲳鲹幼鱼肝显微结构变化 (H.E 染色, $\times 400$)

Fig. 1 Histology of juvenile Golden Pompano liver after hypoxia (H.E, $\times 400$)

a. 对照; b. 低氧 3 h; c. 低氧 6 h; d. 低氧 12 h; e. 低氧 24 h; f. 低氧 14 d。急性对照组与慢性对照组无差异。

a. Control; b. 3 h hypoxia; c. 6 h hypoxia; d. 12 h hypoxia; e. 24 h hypoxia; f. 14 d hypoxia. No difference in acute and chronic control group.

BD. 胆小管; H. 肝细胞; S. 血窦; V. 空泡; ▲. 肝细胞无序; ◆. 扩张血窦; ☆. 细胞融合; ▽. 局部坏死。

BD. Biliary ductile; H. Hepatocyte; S. Sin sinusoid; V. Vacuolation; ▲. Epatocellular disarray; ◆. Sinusoidal dilatation; ☆. Cellular fusion; ▽. Focal necrosis.

变大, 数目减少, 外层肌肉层变薄 (图 1f)。

2.2 低氧胁迫后卵形鲳鲹幼鱼肝超微结构的变化

透射电镜下卵形鲳鲹幼鱼典型的肝细胞核偏于细胞一侧, 圆形、核大, 核膜清晰, 核孔不明显, 有双核肝细胞出现; 细胞质内有丰富细胞器和包涵物, 线粒体数量多, 电子密度高, 大小形态各异, 内嵴管状, 呈梳齿状排列, 长短差异小, 线粒体周围分布有滑面内质网, 同时有少量粗面内质网; 肝细胞内同时有随机分布、大小不一的脂肪滴; 肝血窦较为狭窄, 内有红细胞, 红细胞内含有丰富的溶酶体和发达的线粒体, 以及一些小吞噬泡 (图 2a, b)。

急性低氧胁迫 6 h 时, 肝细胞内线粒体数

量减少, 小体积的线粒体消失, 细胞质内主要分布大体积的线粒体; 滑面内质网减少, 细胞核周围出现粗面内质网, 同时出现明显过氧化物酶体; 肝细胞间出现剧烈扩张的血窦, 血窦中同时出现 9 个红细胞, 细胞间空泡体积变大 (图 2c, d)。慢性低氧胁迫 14 d 时, 肝细胞膜溶解, 细胞结构不完整, 部分细胞核破裂、分解, 细胞器不明显, 看不到线粒体, 只能分辨内质网; 细胞结构松散, 细胞质固缩, 电子密度高, 细胞间连接不紧密, 细胞间布满空隙, 界限不明显; 细胞内空泡多, 体积大; 未见明显脂肪颗粒 (图 2e, f), 表明慢性低氧胁迫下卵形鲳鲹幼鱼肝严重受损。

2.3 低氧胁迫后卵形鲳鲹幼鱼肝抗氧化酶活

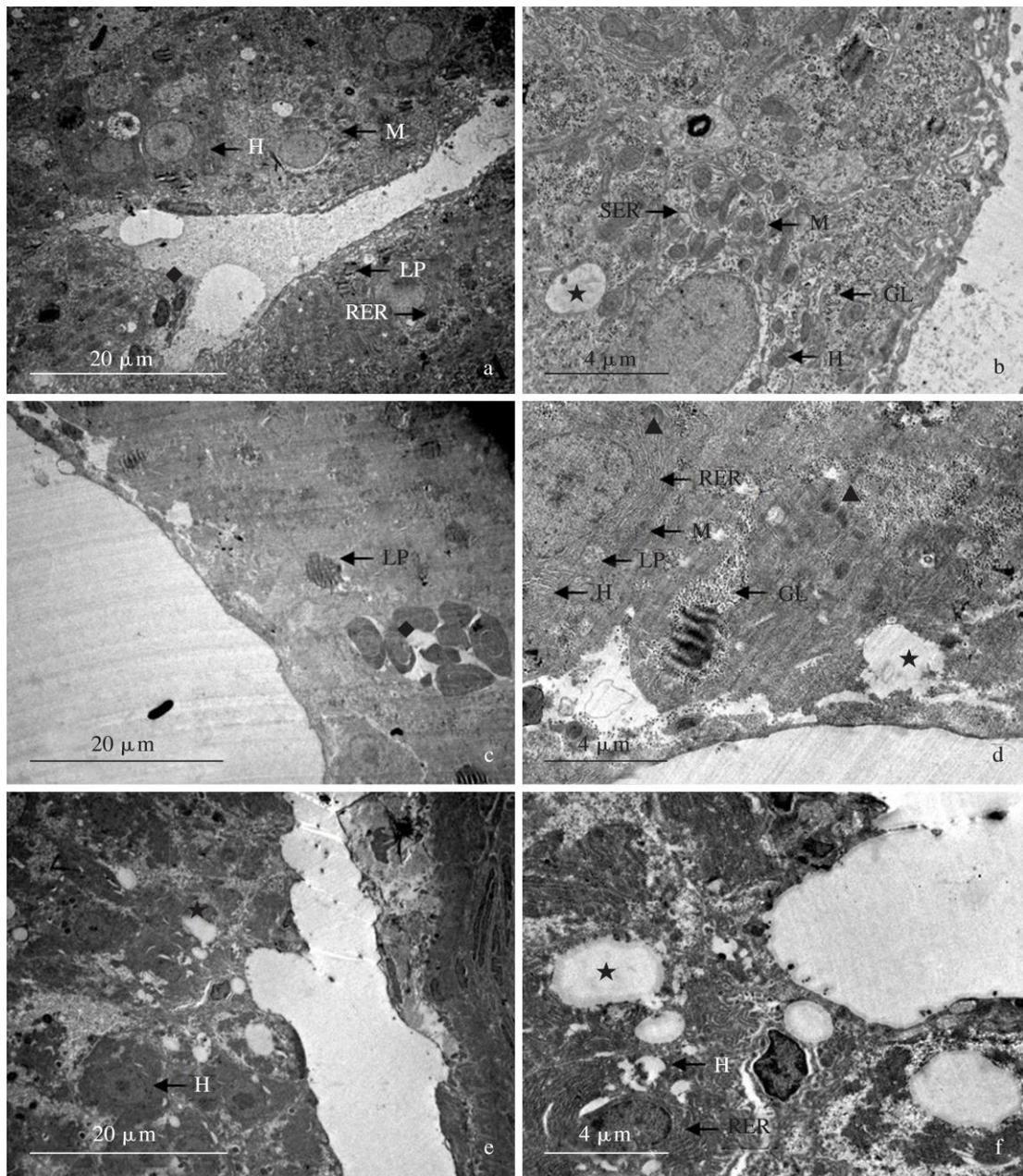


图 2 低氧胁迫后卵形鲳鲹幼鱼肝超微结构变化

Fig. 2 Ultrastructure of juvenile Golden Pompano liver under hypoxia

a, b. 对照组; c, d. 低氧 6 h; e, f. 低氧 14 d; 急性对照组与慢性对照组无差异。a, c, e, ×2 700; b, d, f, ×8 000.

a, b. Control; c, d. 6 h hypoxia; e, f. 14 d hypoxia; No difference in acute and chronic control groups. a, c, e, ×2 700; b, d, f, ×8 000.

GL. 糖原; H. 肝细胞; LP. 脂滴; M. 线粒体; RER. 粗面内质网; SER. 滑面内质网; ★. 空泡; ◆. 扩张血窦; ▲. 过氧化物酶体。

GL. Glycogen; H. Hepatocyte; LP. Lipid droplet; M. Mitochondrion; RER. Rough endoplasmic reticulum; SER. Smooth endoplasmic reticulum;

★. Vacuolation; ◆. Sinusoidal dilatation; ▲. Peroxisome.

力的变化

2.3.1 低氧胁迫后卵形鲳鲹幼鱼肝抗氧化酶活力的变化 低氧胁迫时卵形鲳鲹幼鱼肝组织抗氧化酶活性变化显著。急性低氧胁迫中, 随低氧胁迫时间延长过氧化氢酶 (CAT) 活性升高, 6 h 时酶活性已显著高于对照组 ($P < 0.05$), 之后持续保持较高水平; 慢性低氧胁迫后, 过氧化氢酶 (CAT) 活性与对照组相比显著降低 ($P < 0.05$), 是对照组的 0.76 倍 (图 3a)。谷胱甘肽还原酶 (GSH) 活性随急性低氧胁迫的持续先上升后恢复至正常水平, 12 h 时到最大

值, 24 h 时恢复至正常水平, 与对照组差异不显著; 慢性低氧胁迫后, 谷胱甘肽还原酶 (GSH) 活性则显著升高 ($P < 0.05$), 其活性为对照组的 2.59 倍 (图 3b)。超氧化物歧化酶 (SOD) 活性在急性低氧胁迫中持续增加, 3 h 时最大, 后逐渐降低, 24 h 时恢复至正常水平, 变化趋势与谷胱甘肽还原酶 (GSH) 活性相同; 慢性低氧胁迫下, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性则显著升高 ($P < 0.05$), 活性为对照组的 1.13 倍 (图 3c)。

2.3.2 低氧胁迫后卵形鲳鲹幼鱼肝丙二醛 (MDA)

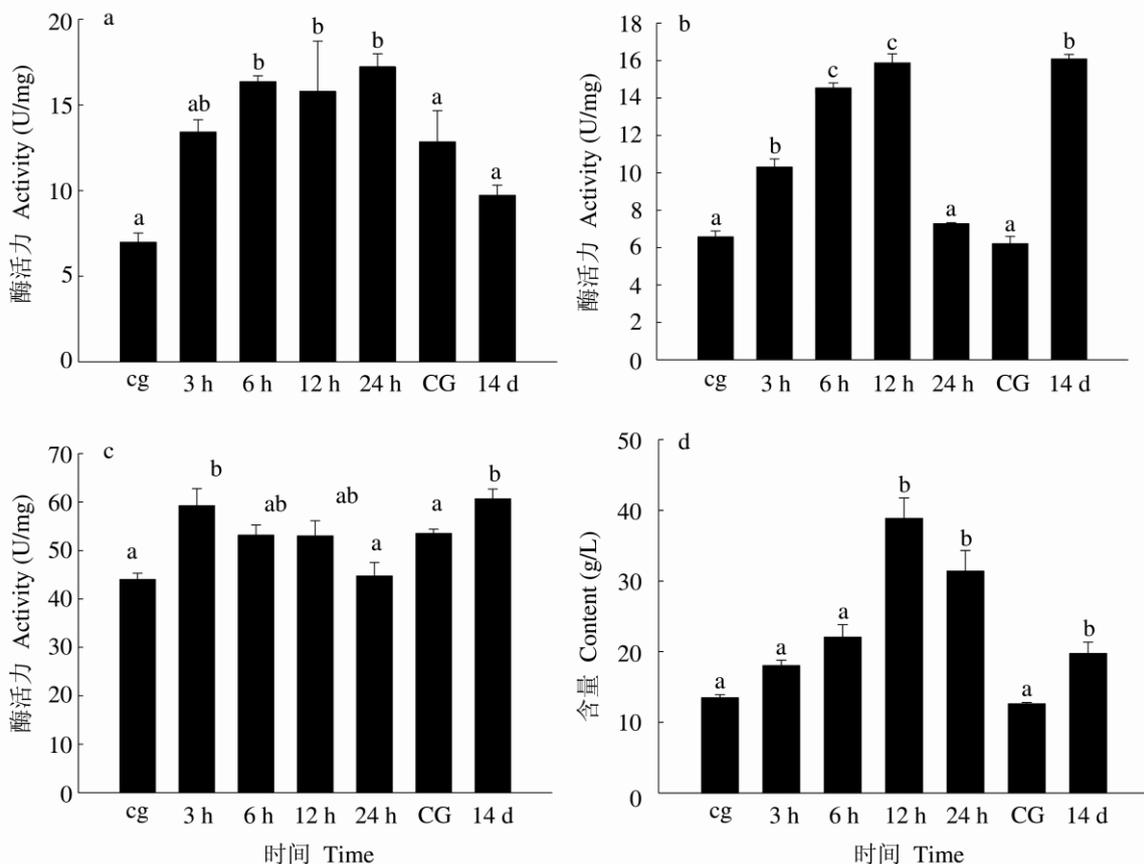


图 3 低氧胁迫后卵形鲳鲹幼鱼肝抗氧化活力的变化

Fig. 3 Anti-oxidation enzyme activities of juvenile Golden Pompano liver under hypoxia

a. 过氧化氢酶 (CAT); b. 谷胱甘肽还原酶 (GSH); c. 超氧化物歧化酶 (SOD); d. 丙二醛 (MDA)。各图中 cg 及 CG 分别代表急性对照组和慢性对照。n = 5, 柱上标注不同字母组间差异显著 ($P < 0.05$)。

a. Catalase (CAT); b. Glutathione (GSH); c. Dsuperoxide dismutase (SOD); d. Malonic dialdehyde (MDA). cg and CG represent acute and chronic control group. n = 5, values with different letters mean significant differences between different treatments ($P < 0.05$).

水平的变化 急性低氧胁迫下, 卵形鲳鲹肝丙二醛 (MDA) 含量随低氧持续逐渐增加, 12 h 达到最高值后下降, 24 h 时未降至对照组水平, 与对照依然有显著差异。慢性低氧胁迫下卵形鲳鲹幼鱼肝丙二醛 (MDA) 含量显著升高 ($P < 0.05$), 丙二醛 (MDA) 含量是对照组的 1.56 倍 (图 3d)。

3 讨论

3.1 卵形鲳鲹幼鱼肝低氧胁迫后的组织学变化

肝是鱼类能量代谢的中心, 同时也是排泄的重要器官 (Camargo et al. 2007, 王静香等, 2010, 蔡文超等 2012)。大鼠 (*Rattus norvegicus*) 缺血供体热 (缺血后导致急性组织缺氧) 后进行肝超微结构观察发现, 肝线粒体肿胀, 内质网扩张, 糖原吸收, 导致肝组织出现空泡变性 (马毅等 2006)。本研究中, 随着低氧胁迫时间持续, 卵形鲳鲹幼鱼肝组织空泡化变性加剧, 急性低氧胁迫出现空泡体积变大是由于肝糖原的分解 (区又君等 2014); 慢性低氧胁迫 14 d 时出现比急性低氧更剧烈的空泡化, 主要是因为长时间的低氧胁迫对肝的组织氧化损伤, 生理实验中卵形鲳鲹幼鱼肝的氧化应激状态确证了这一结果。

小鼠 (*Mus musculus*) 的肝在低氧胁迫后, 部分肝细胞出现细胞质空泡、坏死 (林卡莉等 2005), 慢性间歇性低氧则可造成包括肝组织纤维化、肝硬化的肝组织损伤, 低氧不仅造成肝细胞损伤, 也会抑制肝组织再生 (Savransky et al. 2007, Li et al. 2009, Paternostro 2010, Cannito et al. 2014), 类似研究均表明低氧胁迫对肝组织可造成严重的影响。在本研究中, 随着低氧时间延长, 卵形鲳鲹幼鱼肝出现肝细胞无序, 肝细胞间血窦扩张, 肝细胞融合, 慢性低氧时甚至出现局部肝细胞坏死, 说明低氧胁迫使卵形鲳鲹肝出现病理学组织损伤变化, 且损伤随低氧时间的持续逐渐增强。研究中也发现随低氧的持续, 肝细胞间胆管立方上皮细

胞数量减少、体积增大, 类似结果还未见报道, 有待进一步研究。

3.2 卵形鲳鲹幼鱼低氧后肝线粒体和内质网的变化

线粒体和内质网是肝细胞应激时较敏感的细胞器。线粒体是细胞代谢的能量来源 (Zhu et al. 2016), 机体生命活动 80% 的能量来自线粒体 (闫玉莲等 2012), 肝线粒体的变化反映细胞的能量需求和细胞状态, 因此线粒体会影响到整个肝细胞功能, 同时线粒体在细胞生长、凋亡和衰老等生理、病理过程中也扮演着重要的作用 (Kriváková et al. 2005)。本实验中卵形鲳鲹幼鱼随低氧胁迫时间延长, 肝线粒体数量下降, 而外界水体环境中的低氧条件将造成有氧呼吸水平下降, 为提供足够能量, 线粒体功能应该是增强, 研究中肝组织的超微结构发现, 肝细胞内线粒体体积是增大的, 但增大体积的线粒体呼吸功能是否增强则有待进一步确证。

内质网对应激极为敏感, 内质网对应激细胞应对如抵抗、适应、损伤或凋亡有重要作用, 内质网应激引起细胞死亡 (李载权等 2004)。滑面内质网是细胞内外糖类和脂质合成及转运场所 (Fu et al. 2011), 粗面内质网是合成膜蛋白和分泌蛋白场所, 酶类、激素、抗体等分泌蛋白的合成主要在粗面内质网上完成, 滑面内质网则主要合成磷脂与胆固醇 (林丽等 2003, 殷帅文 2008)。内质网是细胞内蛋白质与脂质的合成基地 (Zhang et al. 2015), 几乎所有脂质和重要的蛋白质都在内质网上合成, 而且内质网也参与细胞解毒过程, 因此内质网的变化可以指示肝机能的变化 (刘晓晖 2006)。本研究发现, 急性低氧胁迫 6 h, 卵形鲳鲹幼鱼肝滑面内质网数量降低, 粗面内质网数量增加, 说明由于氧气不足, 代谢不充分, 能量物质积累减少, 需合成分泌酶和蛋白的量增加, 以抵御低氧胁迫对机体的危害, 低氧胁迫下卵形鲳鲹肝抗氧化酶活性的变化也说明此结果。低氧胁迫 14 d 时其他细胞器在透射电镜下极难分辨,

但是粗面内质网还明显存在, 表明卵形鲳鲹幼鱼肝受到严重的氧化损伤, 且粗面内质网仍分泌蛋白, 对抗机体的氧化应激状态。

3.3 急性低氧胁迫中卵形鲳鲹幼鱼肝出现的过氧化物酶体

过氧化物酶体通过过氧化氢酶将对细胞有害的代谢产物分解成水和氧, 防止堆积的 H_2O_2 毒害细胞, 保护细胞并利用 H_2O_2 氧化分解多种有害底物, 使之成为无毒性物质 (Gavrilova et al. 2003)。本研究中, 急性低氧胁迫 6 h 时肝出现过氧化物酶体, 是由于急性低氧造成较多细胞内氧化性物质, 过氧化物酶体参与分解有毒物质, 同时也说明机体受到氧化损伤。

3.4 卵形鲳鲹幼鱼肝低氧胁迫下氧化水平的变化

褐牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 幼鱼在低氧胁迫后肌肉中丙二醛 (MDA) 含量增加, 表明低氧胁迫使其处于氧化应激态 (李洁 2011)。本研究中急性和慢性低氧胁迫后肝丙二醛 (MDA) 水平均升高, 表明不论急性或慢性低氧胁迫均使卵形鲳鲹幼鱼肝处于氧化应激状态。研究发现低氧胁迫 21 d 后小鼠的肝丙二醛 (MDA) 水平显著增加 (Nakanishi et al. 1995)。本研究中, 慢性低氧胁迫下丙二醛 (MDA) 活性显著高于对照组, 低于活性最高组 12 h, 与急性低氧胁迫 6 h 对应的活性值相当, 说明随低氧胁迫的持续, 卵形鲳鲹幼鱼肝始终处于氧化应激状态, 且慢性低氧胁迫的氧化应激状态处于急性低氧胁迫与正常溶氧水平之间。

超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽还原酶 (GSH) 是生物体内清除体内多余自由基的重要抗氧化酶类, 与鱼类的免疫能力有着密切关系 (初晓红 2009, 刘旭佳等 2014)。Lushchak 等 (2006) 研究发现金鱼 (*Carassius auratus*) 无氧条件下肝过氧化氢酶 (CAT) 活性增加, Pan 等 (2010) 研究发现低氧胁迫使得艳鲃脂鲤 (*Hyphessobrycon callistus*) 血清中超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽还原酶 (GSH) 的活

力增加, 抗氧化能力增加可以保护肝免受低氧胁迫的伤害。本研究中, 急性低氧胁迫下过氧化氢酶 (CAT) 活性随低氧胁迫持续先上升后稳定在较高水平, 超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽还原酶 (GSH) 活性随低氧胁迫的持续先上升后下降, 慢性低氧胁迫 14 d 时过氧化氢酶 (CAT) 活性显著降低, 谷胱甘肽还原酶 (GSH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性均随低氧显著升高, 说明机体始终处于氧化应激状态, 过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽还原酶 (GSH) 持续清除卵形鲳鲹幼鱼肝因受到低氧胁迫产生的抗氧化物质。

由于慢性低氧胁迫与急性低氧胁迫环境条件一致, 且目前无急性和慢性低氧胁迫酶活性变化趋势的参考对比文献, 依据本实验中急性和慢性胁迫后各种抗氧化酶的变化趋势推测: 过氧化氢酶 (CAT) 是急性低氧胁迫中机体调节抗氧化水平的主要因子, 过氧化氢酶 (CAT) 持续调节机体的抗氧化水平, 超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽还原酶 (GSH) 辅助急性调节机体的氧化水平; 慢性低氧胁迫 14 d 时过氧化氢酶 (CAT) 活性降低是由于负责急性胁迫中氧化水平调节的过氧化氢酶 (CAT) 超过调节极限; 谷胱甘肽还原酶 (GSH) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 主要参与慢性低氧胁迫中机体的抗氧化水平调节。

参 考 文 献

- Camargo M M P, Martinez C B R. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5(3): 327–336.
- Cannito S, Paternostro C, Busletta C, et al. 2014. Hypoxia, hypoxia-inducible factors and fibrogenesis in chronic liver diseases. *Histology & Histopathology*, 29(1): 33–44.
- Fu S, Yang L, Li P, et al. 2011. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature*, 473(7348): 528–531.
- Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, et al. 2003. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass.

- The Journal of Biological Chemistry, 278(36): 34268–34276.
- Hermes-Lima M, Storey J M, Storey K B, et al. 2001. Chapter 20 Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. *Cell & Molecular Response to Stress*, 2(1): 263–287.
- Kriváková P, Cervinková Z, Lotková H, et al. 2005. Mitochondria and their role in cell metabolism. *Acta Medica Supplementum Universitatis Carolinae Facultas Medica Hradec Králové* 48(2): 57–67.
- Li R, *Gastroenterology* D O. 2009. High-altitude hypoxia and liver injury. *World Chinese Journal of Digestology*, 17(21): 2176–2178.
- Lushchak V I, Bagnyukova T V. 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 144(3): 283–289.
- Nakanishi K, Tajima F, Nakamura A, et al. 1995. Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats. *The Journal of Physiology*, 489(3): 869–876.
- Nordlie F G. 2014. Influences of body mass, temperature, oxygen tension, and salinity on respiratory oxygen consumption of cyprinodontoid fishes of three families. *Reviews in Fish Biology & Fisheries*, 24(1): 269–315.
- Pan C H, Chien Y H, Wang Y J. 2010. The antioxidant capacity response to hypoxia stress during transportation of characins (*Hyphessobrycon callistus* Boulenger) fed diets supplemented with carotenoids. *Aquaculture Research*, 41(7): 973–981.
- Paternostro C. 2010. Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis in the progression of chronic liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 16(3): 281.
- Savransky V, Nanayakkara A, Vivero A, et al. 2007. Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. *Hepatology*, 45(4): 1007–1013.
- Zhang N, Lu Y, Shen X, et al. 2015. Fenofibrate treatment attenuated chronic endoplasmic reticulum stress in the liver of nonalcoholic fatty liver disease mice. *Pharmacology*, 95(3/4): 173–180.
- Zhu X, Xiao Z, Xu Y, et al. 2016. Differential impacts of soybean and fish oils on hepatocyte lipid droplet accumulation and endoplasmic reticulum stress in primary rabbit hepatocytes. *Gastroenterology Research & Practice*, 2016(6): 1–10.
- 蔡文超, 区又君, 李加儿, 等. 2012. 卵形鲳鲹免疫器官的早期发育. *南方水产科学*, 8(5): 39–45.
- 初晓红. 2009. 斑马鱼肝脏微细结构及胆管系统的研究. 南京: 南京农业大学硕士学位论文.
- 顾孝连, 徐兆礼. 2009. 河口及近岸海域低氧环境对水生动物的影响. *海洋渔业*, 31(4): 426–437.
- 李洁. 2011. 限制溶解氧供应对褐牙鲂幼鱼生长的影响及其机制的实验研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文.
- 李卫芬, 张小平, 宋文辉, 等. 2012. 养殖水体中添加芽孢杆菌对草鱼免疫和抗氧化功能的影响. *中国水产科学*, 19(6): 1027–1033.
- 李载权, 周爱儒, 唐朝枢. 2004. 内质网应激反应分子机理研究进展. *中国生物化学与分子生物学报*, 20(3): 283–288.
- 林卡莉, 钟瑞冲. 2005. 缺氧对小鼠肝细胞的影响. *赣南医学院学报*, 25(6): 753–754.
- 林丽, 唐朝枢, 袁文俊. 2003. 内质网应激. *生理科学进展*, 34(4): 333–335.
- 刘晓晖. 2006. 温度和铜对鲤鱼肝脏细胞超微结构的影响. 长春: 东北师范大学硕士学位论文.
- 刘旭佳, 黄国强, 李洁, 等. 2014. 梭鱼幼鱼肝脏和肌肉氧化应激指标对溶解氧含量变动的响. *水产科学*, 33(6): 344–349.
- 马毅, 胡瑞德, 梁英杰, 等. 2006. 大鼠无心跳供体热缺血损伤后供肝组织学与超微结构的动态变化. *中华普通外科杂志*, 21(11): 788–791.
- 区又君, 范春燕, 李加儿, 等. 2014. 急性低氧胁迫对卵形鲳鲹选育群体血液生化指标的影响. *海洋学报: 中文版*, 36(4): 126–131.
- 区又君, 罗奇, 李加儿. 2011. 卵形鲳鲹碱性磷酸酶和酸性磷酸酶的分布及其低温保存. *南方水产科学*, 7(2): 49–54.
- 苏慧, 区又君, 李加儿, 等. 2012. 饥饿对卵形鲳鲹幼鱼不同组织抗氧化能力、Na⁺/K⁺-ATP 酶活力和鱼体生化组成的影响. *南方水产科学*, 8(6): 28–36.
- 王刚, 李加儿, 区又君, 等. 2010. 卵形鲳鲹胚胎及早期仔鱼耗氧量的研究. *生态科学*, 29(6): 518–523.
- 王静香, 李加儿, 区又君, 等. 2010. 驼背鲈肝脏结构的光镜和透射电镜观察. *海洋渔业*, 32(4): 388–394.
- 闫玉莲, 谢小军. 2012. 鱼类适应环境温度的代谢补偿及其线粒体水平调节机制. *水生生物学报*, 36(3): 532–540.
- 殷帅文, 林学群, 陈洁辉. 2008. 鲮鱼肝细胞超微结构研究. *水生生态学杂志*, 1(2): 85–89.
- 尹飞, 孙鹏, 彭士明, 等. 2011. 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. *应用生态学报*, 22(4): 1059–1066.