

碱度胁迫对尼罗罗非鱼鳃离子细胞形态以及鳃、肾和肠中 HCO_3^- 转运因子的影响

王 燕 赵金良* 吴俊伟 Thammaratsuntorn Jeerawat

岳蒙蒙 赵 岩

上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室 上海 201306

摘要: 采用扫描电镜观察了不同碱度 (0、2、4 g/L NaHCO_3) 胁迫对尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 鳃离子细胞形态变化的影响, 并采用免疫组化技术观察了鳃、肾、肠中 4 个 HCO_3^- 转运因子碳酸酐酶 (CA II、CA IV)、碳酸氢钠协同转运载体 (SLC4A4)、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 离子交换体 (SLC26A6) 的阳性反应变化。扫描电镜结果表明, 鳃离子细胞分布在鳃小片基部。根据其表面开孔形状和尺寸, 可分为 I 型、II 型、III 型和 IV 型 4 种亚型, 各亚型离子细胞的开孔尺寸随碱度胁迫强度增高呈正比增大, III 型离子细胞开孔尺寸变化最明显 ($P < 0.01$); 离子细胞总数目也随碱度升高而增加, III 型离子细胞数目上升最为显著 ($P < 0.01$)。免疫组化结果表明, 在淡水、碱水组中, CA II、CA IV、SLC4A4、SLC26A6 在鳃小片基部和肾中均有阳性反应, 且随着碱度升高, 阳性反应增强, 但在肠道中未观察到阳性反应。本研究结果初步表明, 尼罗罗非鱼可通过鳃离子细胞形态和数量调节适应碱度变化, 鳃和肾为主要应答调节器官。

关键词: 尼罗罗非鱼; 碱度胁迫; 离子细胞; 碳酸酐酶 (CA II、CA IV); 碳酸氢钠协同转运载体 (SLC4A4); $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 离子交换体 (SLC26A6)

中图分类号: Q955 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2016) 06-1027-11

Effects of Alkalinity on Morphology of Gill Ionocytes and HCO_3^- Transporters in Gill, Kidney and Intestine of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

WANG Yan ZHAO Jin-Liang* WU Jun-Wei Thammaratsuntorn JEERAWAT
YUE Meng-Meng ZHAO Yan

Laboratory of Freshwater Fisheries Germplasm Resource, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

基金项目 国家科技支撑计划项目 (No. 2012BAD16B03), 现代农业产业技术体系专项 (No. CARS-49), 水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心项目 (No. ZF1206);

* 通讯作者, E-mail: jlzhao@shou.edu.cn;

第一作者介绍 王燕, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物遗传育种与繁殖; E-mail: 13052372508@163.com。

收稿日期: 2016-01-05, 修回日期: 2016-04-18 DOI: 10.13859/j.cjz.201606011

Abstract: The effect of alkalinity (0, 2 and 4 g/L NaHCO₃) stress on morphology of gill ionocytes in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) was studied by scanning electron microscopy, and four HCO₃⁻ transporters including carbonic anhydrase (CA II, CAIV), Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter (SLC4A4), and Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger (SLC26A6) in gill, kidney and intestine were also observed by immunohistochemistry. The surface scanning of the gills showed that ionocytes cells were distributed close to the inter-lamellar regions of gill filaments (Fig. 1). According to the apical shape and size, the ionocytes cells could be divided into four subtypes, subtype I, subtype II, subtype III and subtype IV (Fig. 2). The apical size of each subtype of ionocytes was positively correlated with the alkalinity stress strength, and the size of subtype III cells was changed most obviously ($P < 0.01$) (Table 1); The ionocytes number increased significantly with the increase of alkalinity stress strength, and the number of subtype III cells was increased most significantly ($P < 0.01$) (Table 1). The results of immunohistochemistry showed that CA II, CAIV, SLC4A4 and SLC26A6 were expressed in gill and kidney of *O. niloticus* at fresh water and alkaline water (Fig. 3, Fig. 4). With the increase of alkalinity, the positive reactions became stronger (Table 2). However, no positive reaction was detected in intestinal at fresh water and alkaline water (Fig. 5). This result suggest that *O. niloticus* may change the quantity and morphological structure of ionocytes to adapt to alkaline environment, and that gill and kidney may play a key role in alkalinity regulation.

Key words: Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*; Alkalinity stress; Gill ionocytes; Carbonic anhydrase (CA II, CAIV); Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter (SLC4A4); Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger (SLC26A6)

我国有着丰富的盐碱水域资源,但由于盐碱水域中矿化度高、盐碱度大、水体离子组成复杂,导致淡水经济养殖品种无法生存(章征忠等 1998)。盐碱池塘或盐湖内,由于水体蒸发浓缩,水体中碱度逐渐升高,从而引起鱼类死亡。在高碱度水体环境中,鱼类除了维持渗透压调节外,还面临着酸碱平衡调节的压力,需要多个器官协同配合,鳃、肾和肠是主要调节器官。通常认为,碳酸盐型碱水对鱼类生存影响主要通过干扰其血液缓冲系统。其中, HCO₃⁻是血液中最重要缓冲系统,其变化必将引起血液离子浓度、pH 发生改变,从而干扰血液缓冲系统的调节能力(丁海荣等 2010)。研究表明,碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)、碳酸氢钠协同转运载体(Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter, Solute Carrier4A4, SLC4A4)和 Cl⁻/HCO₃⁻离子交换体(Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger, Solute Carrier26A6, SLC26A6) SLC26 等离子转运蛋白家族成员,能特异性介导 HCO₃⁻转运,是鱼类耐受高碱环境,排出体内 HCO₃⁻的重要

机制之一(Romero et al. 2004, Purkerson et al. 2007)。碳酸酐酶(CA)是一组参与体内酸碱平衡调节及离子交换过程的含锌金属酶,共有 8 种同工酶,CA II、CAIV 分布比较广泛。CA II、CAIV 主要参与 CO₂ 水合过程的可逆催化反应 H₂O + CO₂ ⇌ H₂CO₃ ⇌ H⁺ + HCO₃⁻, CA II 主导 H₂CO₃ 分解成 HCO₃⁻, CAIV 主要促进生成 CO₂ (Marshall 2002, Hwang et al. 2011)。SLC4 家族的 SLC4A4 是一个生电型的 Na⁺/HCO₃⁻ 共转运体,在各种组织中有着非常广泛的表达,在鳃中分布于离子细胞基底膜侧,可同时转运 Na⁺ 及 HCO₃⁻ (Romero et al. 1997, Hirata et al. 2003, Parks et al. 2007)。在肾近端肾小管中, SLC4A4 负责 80% 以上 HCO₃⁻ 的重吸收,对于维持机体酸碱平衡极其重要。SLC26A6 主要介导上皮顶膜 Cl⁻/HCO₃⁻ 交换, Cl⁻/HCO₃⁻ 交换是 HCO₃⁻ 分泌的主要途径之一 (Wilson et al. 2000)。

尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 以其生长快、易繁殖、适应性强等优点,成为世界

主要淡水养殖鱼类之一,是联合国粮农组织向全世界推广的优良养殖鱼类(么宗利等 2003)。早期研究表明,尼罗罗非鱼耐碱能力较强,96 h 半致死碱度低于青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii*)、瓦氏雅罗鱼 (*Leuciscus waleckii*) 和鲫 (*Carassius auratus*),但显著高于鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙 (*Aristichthys nobilis*) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 等(雷衍之等 1985)。经慢性驯化后,尼罗罗非鱼在一定浓度盐碱范围内仍能保持较好的养殖生长性能(赵丽慧等 2013)。然而,关于尼罗罗非鱼碱度耐受与适应机制尚未明确。因此,本实验通过研究碱度胁迫对尼罗罗非鱼鳃离子细胞变化的影响以及鳃、肾和肠中 CA II、CA IV、SLC4A4、SLC26A6 的组织分布,以期为理解罗非鱼碱度调节器官与调节机制,并开展耐盐碱品种驯化和选育工作提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

尼罗罗非鱼于 2015 年 9 月 20 日取自上海海洋大学罗非鱼种质资源试验站,体重 50.8 ~ 72.3 g。运回实验室后,在室内控温循环水族箱中饲养,每天投喂罗非鱼专用颗粒饲料(广东旺海饲料实业有限公司) 1~2 次,投喂量约为鱼体重的 3%,定时检查鱼的活动情况并清除粪便,完全适应新环境后开展碱度胁迫实验。碱度通过在淡水中添加 NaHCO₃ 调节,设置了 0 g/L、2 g/L 和 4 g/L NaHCO₃ 三个梯度组,0 g/L 组即为淡水组。实验用水配制后曝气 48 h 以上备用。利用 HI 83200 多参数水质分析仪(哈纳仪器公司,意大利)测定水体碱度,实验期间水体温度控制在 25.6 ~ 26.4℃。实验鱼在各碱度水体胁迫 7 d 后,分别取鳃、肾和肠组织,每组取 5~6 尾。

CA II、CA IV、SLC4A4、SLC26A6 抗体购自 Developmental Studies Hybridoma Bank,为兔抗鼠单克隆抗体。Cell & Tissue Staining Kit (含二抗和显色剂)购自 R&D Systems,抗

体稀释液及防脱玻片购自武汉博士德公司和上海威奥生物科技有限公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 扫描电镜 分别取右侧第一鳃弓上一半鳃片,经生理盐水漂洗(洗尽血污和黏液),然后放入预先配制好的 4% 多聚甲醛 (pH 7.2, 4℃) 中固定 12~16 h。用 1×PBS 缓冲液冲洗 2~3 次,每次 15 min;再经 50%~100% 乙醇逐级脱水,每次 10~15 min;常规临界干燥,真空离子镀膜(日立 E-1010 离子溅射仪),在 Hitachi S-3400NII 型扫描电镜下观察和拍照。在 Olympus 显微镜下,用 Image-ProPlus 图像分析软件统计离子细胞的孔径和数量,利用 ANOVA 分析处理数据。

1.2.2 免疫组化 取上述同批实验鱼右侧第一鳃弓另一半鳃片、肾和肠,经生理盐水漂洗后,放入 4% 多聚甲醛 (pH 7.2, 4℃) 中固定 12~16 h,用 1×PBS 冲洗若干次,30%~100% 乙醇逐级脱水,然后经二甲苯透明,石蜡包埋,常规切片,厚度为 5~8 μm。60℃ 烘片 1~2 h,常规脱蜡至水。热抗原修复,3% H₂O₂ 去离子水室温孵育 10 min 左右,以灭活内源性酶,10% 山羊血清封闭 30 min。其他步骤按 Cell & Tissue Staining Kit 说明书进行,添加 1:50 稀释的一抗,4℃ 孵育过夜,然后用 1×PBS 漂洗 3 次,每次 15 min。添加二抗(鼠二抗)室温孵育 30 min,1×PBS 漂洗 3 次。添加辣根过氧化物酶标记的高灵敏度链霉亲和素 (high sensitivity streptavidin-horseradish peroxidase, HSS-HRP) 室温 30 min,水洗后 DAB 显色 5~10 min,苏木精复染,常规乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。阴性对照组除不添加一抗外,其他步骤同上。不同碱度组各组织随机选取 5 个 40 倍视野,在显微镜下进行拍照,并对 CA II、CA IV、SLC4A4 和 SLC26A6 阳性细胞进行计数,结果以平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示。

2 结果与分析

2.1 扫描电镜观察

尼罗罗非鱼具有 4 对鳃弓，每对鳃弓上有 2 个大小相同鳃片，每一鳃片由大量鳃丝紧密连续排列而成，鳃丝两侧鳃小片呈栅栏状平行排列（图 1a）。尼罗罗非鱼鳃丝表面由扁平上皮细胞、黏液细胞和离子细胞组成。扁平上皮细胞呈多边形，排列紧密，表面微嵴形成密集指纹状回路。相邻扁平上皮细胞之间呈圆形或卵圆形开孔的细胞为离子细胞，离子细胞仅分布在鳃小片基部，鳃小片上未观察到离子细胞分布（图 1b）。

根据离子细胞开孔形状，可分为 4 种亚型：波状突起型（I 型）、浅碟型（II 型）、深孔型（III 型）和波状凹陷型（IV 型）（图 2）。其中，I 型离子细胞的开孔直径 $3.9 \sim 6.1 \mu\text{m}$ ，开孔向外突起，形状似网状结构（图 2a）。II 型离子细胞开孔比较浅，呈浅碟状，开孔尺寸约为 $3.0 \sim 5.2 \mu\text{m}$ （图 2b）。III 型离子细胞开孔呈椭圆形，并且开孔很深，尺寸较小，约为 $0.8 \sim 3.2 \mu\text{m}$ ，内部结构难以观察（图 2c）。IV 型离子细胞开孔尺寸 $4.0 \sim 6.3 \mu\text{m}$ ，开孔向内凹陷，形状似网状结构（图 2d）。

不同碱度下离子细胞的开孔尺寸和单位面

积中数目见表 1。在淡水中，III 型离子细胞开孔尺寸最小，IV 型开孔尺寸最大。随着碱度上升，4 种亚型离子细胞的开孔尺寸均成正比增大，其中，III 型离子细胞开孔尺寸变化最为显著 ($P < 0.01$)，2 g/L 碱度组中，开孔尺寸为淡水组 1.87 倍，4 g/L 碱度组中，开孔尺寸为淡水组 2.87 倍。

离子细胞总数目也是随着碱度增加而增多。在淡水中，I 型离子细胞数目最多，III 型离子细胞数目最少。随着碱度上升，各亚型离子细胞数目均表现升高，其中，III 型离子细胞数目上升最为显著 ($P < 0.01$)，在 2 g/L 碱度组中，III 型离子细胞数量超过 II 型和 IV 型，在 4 g/L 碱度组中，III 型离子细胞数目最多，约为淡水的 4.72 倍。

2.2 免疫组化

免疫组化结果显示，在淡水和碱水组中，鳃和肾中均检测到了 CA II、CA IV、SLC4A4 和 SLC26A6 免疫阳性反应（图 3，4），且随着碱度升高，阳性反应增强（表 2），阴性对照组均未发现免疫阳性细胞（图 3m ~ o，图 4 m ~ o）。在鳃中，免疫阳性细胞主要分布在鳃小片基部（图 3）；在肾中，免疫阳性细胞主要分

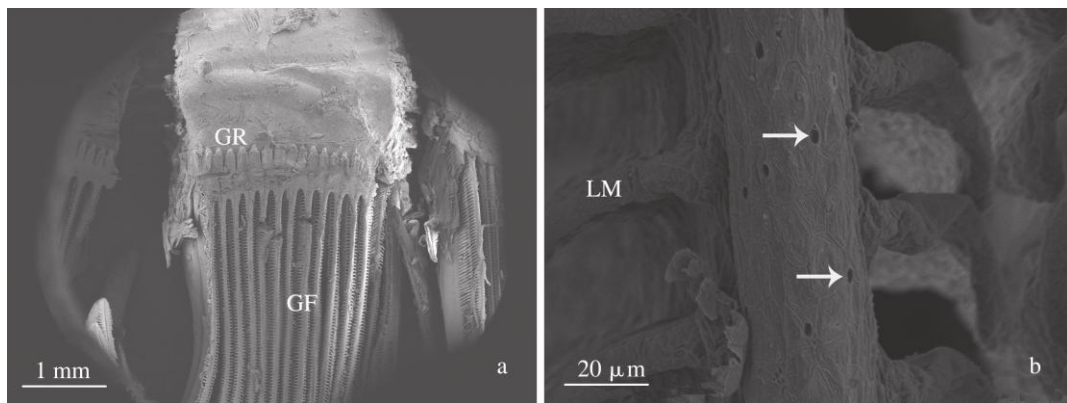


图 1 扫描电镜下尼罗罗非鱼鳃丝表面结构和离子细胞分布

Fig. 1 Gill structure of Nile Tilapia and location of ionocytes identified by scanning electron microscopy

a. 尼罗罗非鱼鳃丝表面结构 (400 ×); b. 离子细胞分布 (1 000 ×)。

a. Gill structure of Nile Tilapia (400 ×); b. Location of ionocytes (1 000 ×).

GR. 鳃弓; GF. 鳃丝; LM. 鳃小片; 箭头表示离子细胞。

GR. Gill arch; GF. Gill filament; LM. Lamella; Ionocytes were showed by arrow.

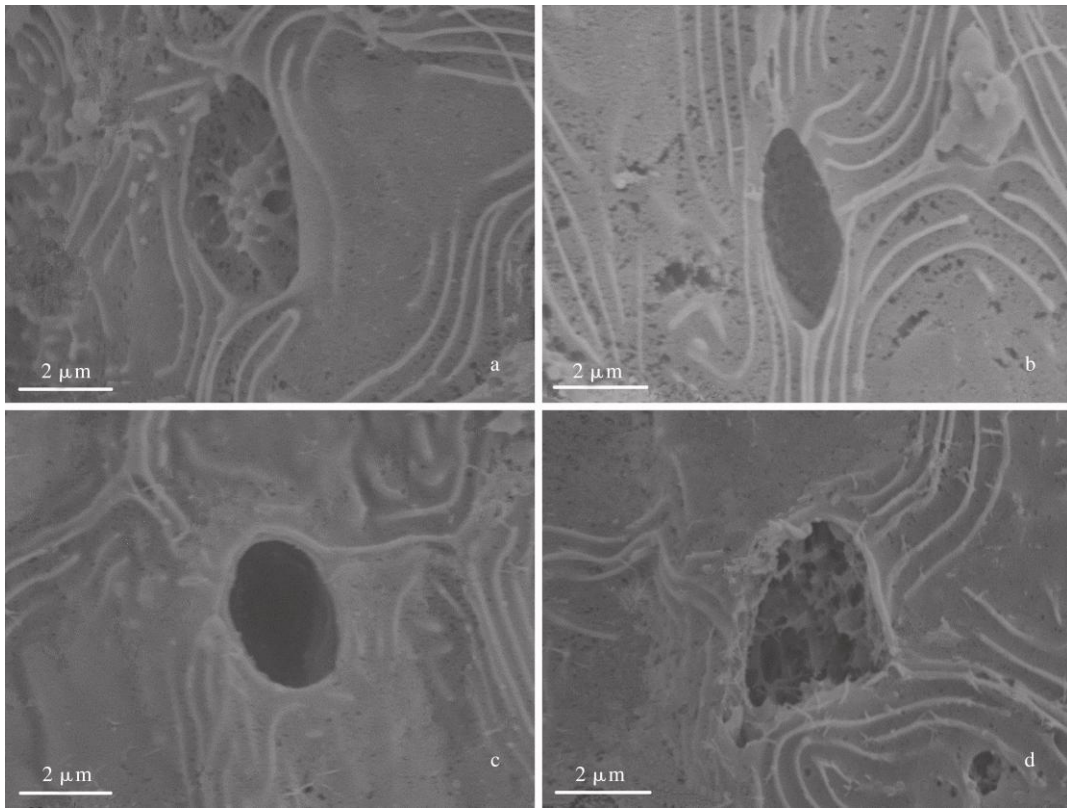


图 2 碱胁迫下尼罗罗非鱼鳃中 4 种亚型离子细胞

Fig. 2 Four types of gill ionocytes in Nile Tilapia under alkalinity stress

a. 波状凸起型 (I 型); b. 浅碟型 (II 型); c. 深孔型 (III 型); d. 波状凹陷型 (IV 型); ×11 000。

a. Convex (I); b. Shallow-basin (II); c. Deep-hole (III); d. Concave (IV); ×11 000.

表 1 碱度胁迫下尼罗罗非鱼鳃 4 种亚型离子细胞数目和孔径大小

Table 1 The mean size and density of four types of gill ionocytes in Nile Tilapia under alkalinity stress

碱度 Alkalinities (g/L)		数目 Density (10 ³ 个/mm ²)			孔径 Size (μm)		
		0	2	4	0	2	4
离子细胞类型 Types of ionocytes	I	2.14 ± 0.18	3.36 ± 0.23	5.52 ± 0.29**	4.07 ± 0.11	4.76 ± 0.19	5.69 ± 0.37*
	II	1.48 ± 0.24	2.37 ± 0.17	3.36 ± 0.21*	3.28 ± 0.22	4.12 ± 0.16	4.98 ± 0.20*
	III	1.24 ± 0.06	2.87 ± 0.31*	5.85 ± 0.32**	1.06 ± 0.27	1.98 ± 0.18*	3.04 ± 0.14**
	IV	1.85 ± 0.25	2.67 ± 0.14	4.15 ± 0.16*	4.23 ± 0.23	5.05 ± 0.10	5.96 ± 0.27*

* 表示与对照组 (碱度 0 g/L) 差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示与对照组 (碱度 0 g/L) 差异极显著 ($P < 0.01$)。

* Indicates significant difference compared with control (alkalinity 0 g/L) ($P < 0.05$), ** indicates extremely significant difference compared with control (alkalinity 0 g/L) ($P < 0.01$).

布在肾小管中 (图 4)。但在肠道中, 均未观察到 CA II、CA IV、SLC4A4 和 SLC26A6 阳性反应 (图 5)。

3 讨论

3.1 碱度胁迫下尼罗罗非鱼鳃离子细胞形态适应变化

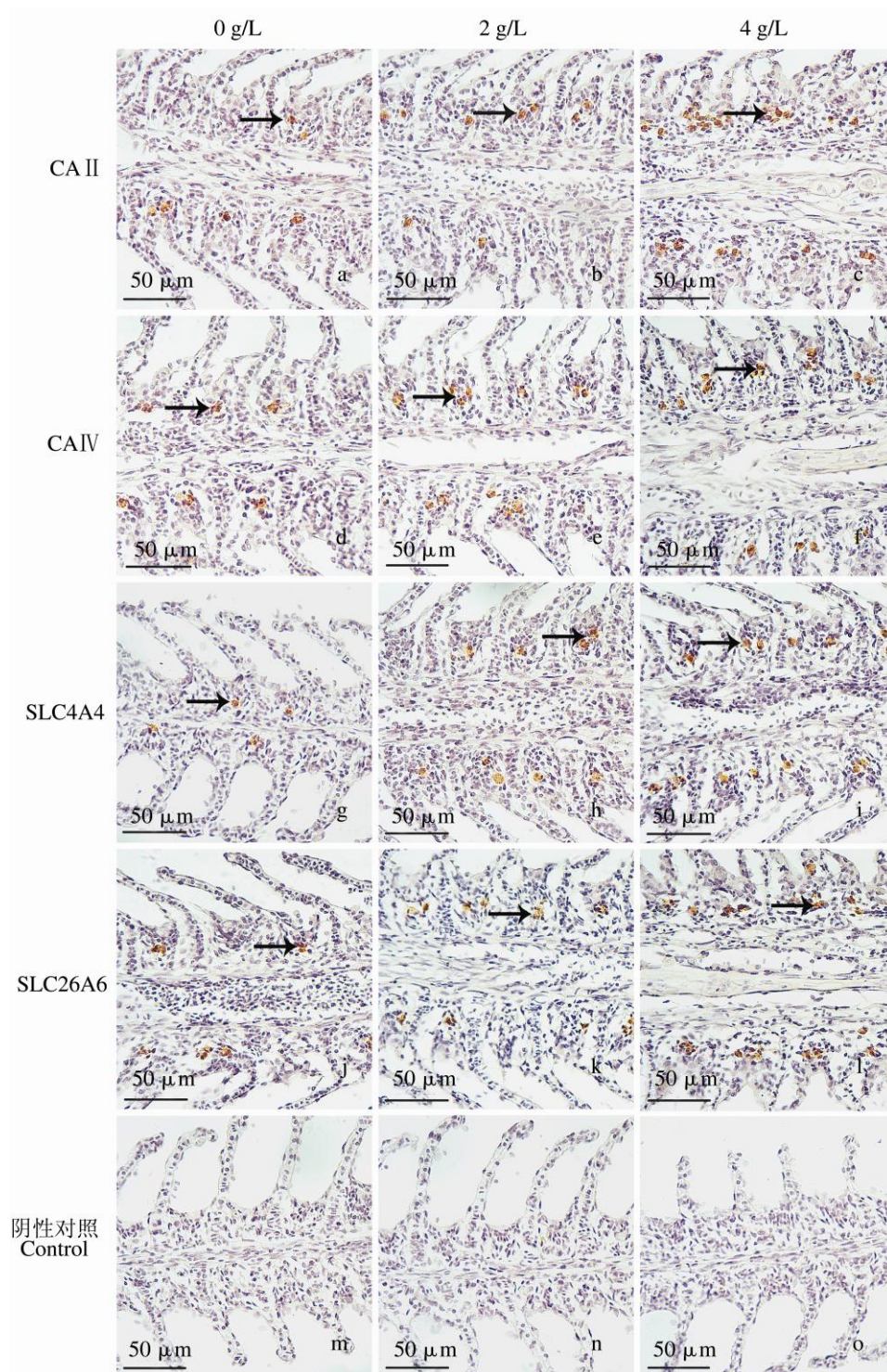


图 3 不同碱度下尼罗罗非鱼鳃免疫组化 (40 ×)

Fig. 3 Immunohistochemistry of gill of Nile Tilapia under different alkalinities (40 ×)

箭头表示免疫反应阳性细胞。Arrows indicate positive cells.

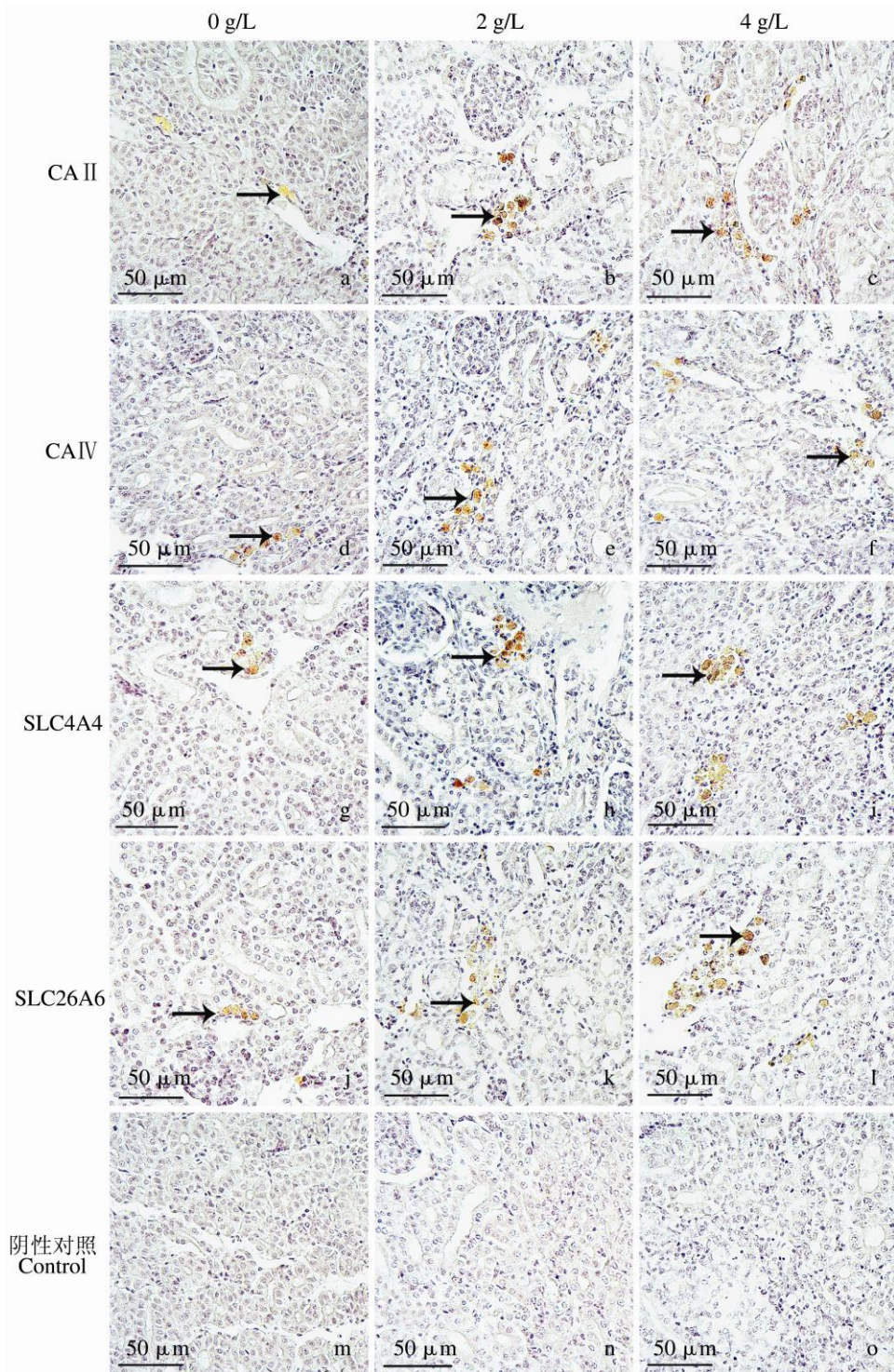


图 4 不同碱度下尼罗罗非鱼肾免疫组化 (40 ×)

Fig. 4 Immunohistochemistry of kidney of Nile Tilapia under different alkalinities (40 ×)

箭头表示免疫反应阳性细胞。Arrows indicate positive cells.

表 2 碱度胁迫下尼罗罗非鱼鳃和肾 4 种阳性细胞分布密度

Table 2 The distribution density of four types of positive cells in gill and kidney of Nile Tilapia under alkalinity stress

类型 Types	碱度 Alkalinities (g/L)	鳃 Gill			肾 Kidney		
		0	2	4	0	2	4
CA II CA IV SLC4A4 SLC26A6	CA II	6.67 ± 0.47	12.33 ± 0.62	18.33 ± 0.29**	3.14 ± 0.26	7.36 ± 0.48	11.52 ± 0.39*
	CA IV	6.10 ± 0.16	12.34 ± 0.35*	15.67 ± 0.21*	4.26 ± 0.31	6.37 ± 0.17	12.36 ± 0.28*
	SLC4A4	5.33 ± 0.42	9.67 ± 0.38	14.00 ± 0.49*	3.25 ± 0.37	8.27 ± 0.33*	15.85 ± 0.34**
	SLC26A6	6.68 ± 0.42	12.01 ± 0.60	17.35 ± 0.49**	4.05 ± 0.25	7.67 ± 0.29	13.15 ± 0.41*

* 表示与对照组 (碱度 0 g/L) 差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示与对照组 (碱度 0 g/L) 差异极显著 ($P < 0.01$)。

* Indicates significant difference compared with control (alkalinity 0 g/L) ($P < 0.05$), ** indicates extremely significant difference compared with control (alkalinity 0 g/L) ($P < 0.01$).

鱼类的鳃是一种具有多种功能的器官，鳃中的离子细胞能够帮助鱼类维持体内离子平衡，是重要的渗透调节位点。本实验通过扫描电镜观察了尼罗罗非鱼在不同碱度 (0、2、4 g/L NaHCO_3) 胁迫下鳃中离子细胞的变化，发现离子细胞仅分布在鳃小片基部，这与尼罗罗非鱼盐度胁迫条件下 (庄青青等 2012) 和红罗非鱼 (*O. niloticus* ♀ × *O. mossambicus* ♂) 碱度胁迫条件下 (Thammaratsuntorn 2015) 观察到的鳃中离子细胞分布位置相同。早期在莫桑比克罗非鱼 (*O. mossambica*) 盐度驯化下鳃扫描电镜实验中也得到类似结果 (Lee et al. 1996, 2003)。

在高渗和低渗环境中，离子细胞可能发挥不同的作用，参与不同的离子运输过程 (Wang et al. 2009)。早期研究表明，淡水中莫桑比克罗非鱼鳃离子细胞存在 3 种类型：波状突起型 (wavy-convex) 或 I 型、浅碟型 (shallow-basin) 或 II 型、深孔型 (deep-hole) 或 III 型。Cl⁻ 流动生理研究表明，波状突起型离子细胞 (I 型) 的主要作用是负责 Cl⁻ 的吸收，而深孔型 (III 型) 的主要作用是负责 Cl⁻ 的分泌，浅碟型 (II 型) 负责 Ca²⁺ 的吸收 (Chang et al. 2001)。最新研究发现，莫桑比克罗非鱼从淡水到 70% 海水的驯化过程中，显示了 4 种不同形态的离子细胞：深孔型 (pit)、凸起型 (convex)、凹陷型 (concave) 和火山口型 (transitory)，前 3

种类型的离子细胞在淡水中出现，进入 70% 海水时，凸起型离子细胞消失，火山口型离子细胞出现 (Choi et al. 2011)。本研究中，在不同碱度胁迫下，观察到尼罗罗非鱼鳃离子细胞 4 种亚型：波状凸起型 (I 型)、浅碟型 (II 型)、深孔型 (III 型) 和凹陷型 (IV 型)。这与莫桑比克罗非鱼的研究结果基本相似，在碱度条件下并未发现离子细胞新的亚型。

随着碱度增加，离子细胞开孔尺寸也发生增大变化。这与施氏鲟 (*Acipenser schrenckii*) 幼鱼 (侯俊利等 2006) 和蓝非鲫 (*Oreochromis aureus*) (姜明等 1998) 在盐度驯化下，鳃中离子细胞开孔尺寸随盐度升高而增大的结果相似；在碱度胁迫下，红罗非鱼鳃中离子细胞开孔尺寸也随碱度上升而增大 (Thammaratsuntorn 2015)。推测碱度胁迫后，尼罗罗非鱼可能通过扩大离子细胞开孔尺寸来提高其离子转运能力，以维持体内渗透压平衡。深孔型 (III 型) 离子细胞可能起到主导作用。在淡水中，深孔型 (III 型) 离子细胞开孔尺寸相对最小，随着碱度升高，4 种亚型离子细胞的开孔尺寸均增大，其中，深孔型 (III 型) 离子细胞开孔尺寸增大最明显。

不同碱度胁迫下，鳃离子细胞数目也是随着碱度增加而增多。这表明，碱度胁迫后，尼罗罗非鱼还需通过增加离子细胞数量，参与维持体内离子平衡和渗透压稳态。在莫桑比克罗

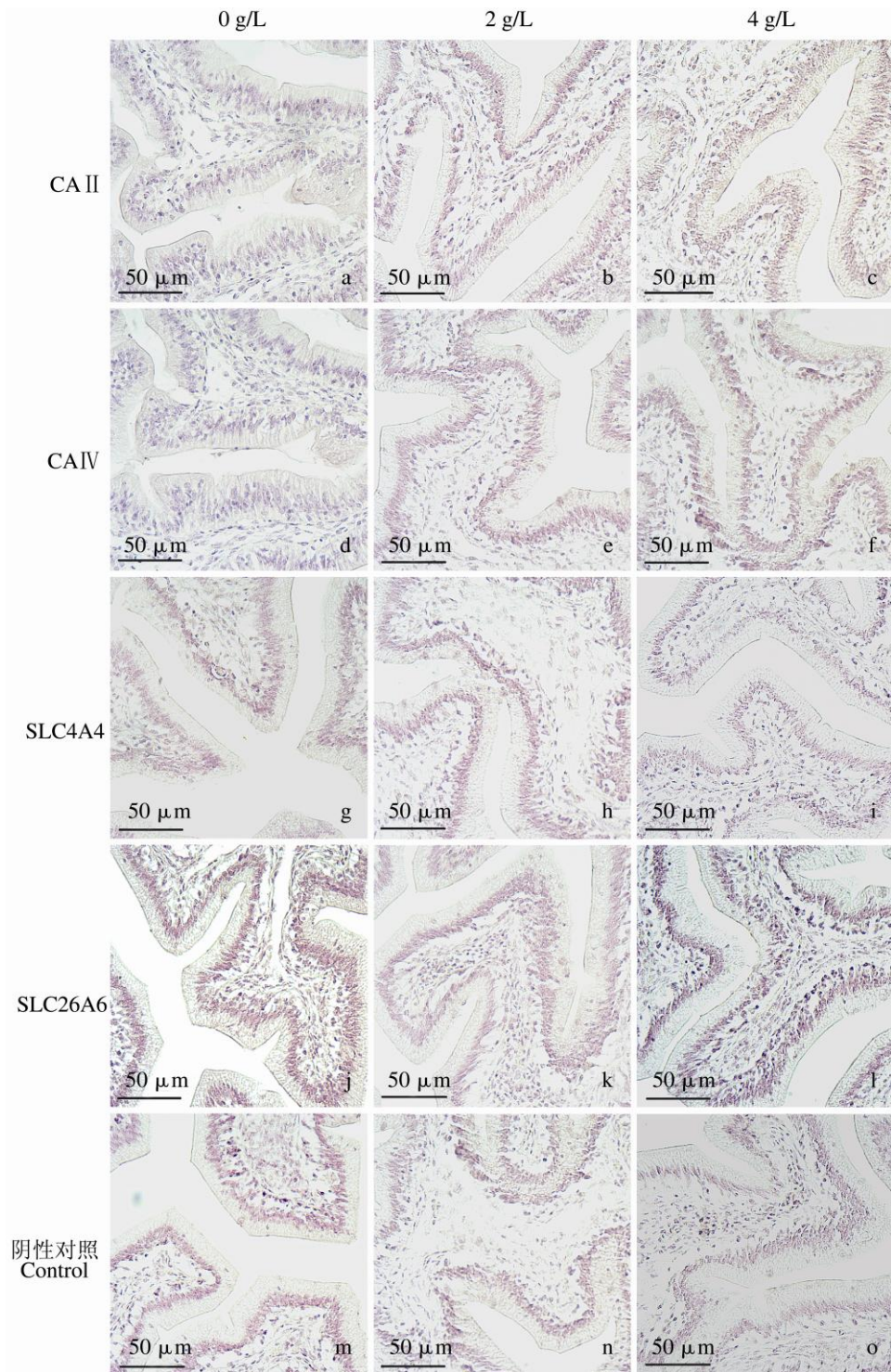


图 5 不同碱度下尼罗罗非鱼肠免疫组化 (40 ×)

Fig. 5 Immunohistochemistry of intestine of Nile Tilapia under different alkalinities (40 ×)

非鱼和尼罗罗非鱼盐度驯化过程中, 同样发现鳃中离子细胞数目随盐度升高呈现上升趋势 (Lee et al. 1996, 2003, 庄青青等 2012)。比较不同离子细胞亚型数目变化趋势, I 型离子细胞在淡水中数量最多, 推测 I 型离子细胞是尼罗罗非鱼淡水中离子细胞的主要形态类型, 与淡水低渗适应有关。莫桑比克罗非鱼从淡水转移到淡咸水和海水中, 也发现 I 型离子细胞在淡水中数量最多 (丁海荣等 2010)。III 型离子细胞在碱度升高时变化最为显著, 淡水中其数量相对最少, 4 g/L 碱水中其数量最多, 推测 III 型离子细胞为碱水中离子细胞的主要形态类型, 与碱水高渗适应有关。这也与在高碱度水体中红罗非鱼 III 型离子细胞数量最多的结果一致 (Thammaratsuntorn 2015)。

3.2 碱度胁迫下 HCO_3^- 离子转运的应答器官

免疫组化结果表明, 在淡水组和碱水组中, CA II、CA IV、SLC4A4 和 SLC26A6 在尼罗罗非鱼鳃和肾中均有免疫阳性反应, 且随着碱度升高, 阳性反应增强, 但在肠道中未检测到免疫阳性细胞表达。

鳃中免疫反应位于鳃丝鳃小片基部, 这与鳃丝表面离子细胞分布的扫描电镜观察结果一致。早期研究发现, 鳃上皮细胞胞浆中有碳酸酐酶 (CA) 的存在 (Dimberg et al. 1981, Rahim et al. 1988), 当血液中的 HCO_3^- 流经鳃部时, CA IV 会催化 HCO_3^- 通过脱水反应转变成 CO_2 , 然后被排出体外; 同时, CA II 还可促进 H_2CO_3 分解成 HCO_3^- , 维持一定的离子平衡。在高盐碱胁迫下, 也观察到尼罗罗非鱼鳃中碳酸酐酶 (CA) mRNA 水平显著增高 (赵丽慧等 2014), 进一步证实了碳酸酐酶 (CA) 可能在酸碱平衡调节中起重要作用。SLC4A4 定位于离子细胞基底侧膜上, 可以协调向细胞内转运 Na^+ 和 HCO_3^- (Hirata et al. 2003), 而位于上皮顶膜的 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交换子 (SLC26) 则直接促进 HCO_3^- 的分泌 (Wilson et al. 2000)。

肾维持机体酸碱平衡主要体现在对 HCO_3^- 的重吸收作用, 肾小管中的 HCO_3^- 和 H^+

结合, 在 CA IV 的催化作用下生成 CO_2 , CO_2 通过自由扩散进入肾小管上皮细胞, 与 H_2O 结合生成 H_2CO_3 , 在 CA II 的作用下再次转化为 H^+ 和 HCO_3^- , HCO_3^- 通过基底侧膜的 SLC4A4 被转运至组织间隙, 然后被进一步回收至血液中 (郭义敏等 2014)。研究表明, 在盐碱环境下青海湖裸鲤肾中 SLC4A4 和 SLC26A6 mRNA 高度表达 (王萍等 2015)。而在青海湖裸鲤肠道中, SLC4A4 和 SLC26A6 mRNA 也高度表达, 且肠道中 SLC26A6 mRNA 表达量显著高于鳃。本研究中, 肠道中均未能检测到这几个转运因子的阳性反应, 可能由于本实验是在胁迫 7 d 后采样, 肠道中的 SLC4A4 和 SLC26A6 的表达水平或已回落, 或与免疫组化技术检测灵敏度有关, 有待进一步验证。

本研究初步表明, 尼罗罗非鱼在适应碱环境过程中, 多个器官参与了机体渗透和酸碱平衡调节过程, 且涉及了多个相关转运蛋白或代谢因子。在鳃中, 可通过调节离子细胞类型、数量变化来适应碱度胁迫, III 型离子细胞在碱度胁迫中的作用更为显著。

参 考 文 献

- Chang I C, Lee T H, Yang C H, et al. 2001. Morphology and function of gill mitochondria-rich cells in fish acclimated to different environments. *Physiological and Biochemical Zoology*, 74(1): 111–119.
- Choi J H, Lee K M, Inokuchi M, et al. 2011. Morphofunctional modifications in gill mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia transferred from freshwater to 70% seawater, detected by dual observations of whole-mount immunocytochemistry and scanning electron microscopy. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A*, 158(1): 132–142.
- Dimberg K, Hoglund L B, Knutsson P G, et al. 1981. Histochemical localization of carbonic anhydrase in gill lamellae from young salmon (*Salmo salar* L) adapted to fresh and salt water. *Acta Physiologica Scandinavica*, 112(2): 218–220.
- Hirata T, Kaneko T, Ono T, et al. 2003. Mechanism of acid adaptation of a fish living in a pH 3.5 lake. *American Journal of*

- Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 53(5): 1199–1212.
- Hwang P P, Lee T H, Lin L Y. 2011. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 301(1): 28–47.
- Lee T H, Feng S H, Lin C H, et al. 2003. Ambient salinity modulates the expression of sodium pumps in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. Zoological Science, 20(1): 29–36.
- Lee T H, Hwang P P, Lin H C, et al. 1996. Mitochondria-rich cells in the branchial epithelium of the teleost, *Oreochromis mossambicus*, acclimated to various hypotonic environments. Fish Physiology and Biochemistry, 15(6): 513–523.
- Marshall W S. 2002. Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} and Zn^{2+} transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. Journal of Experimental Zoology, 293(3): 264–283.
- Parks S K, Tresguerres M, Goss G G. 2007. Interactions between Na^+ channels and $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporters in the freshwater fish gill MR cell: a model for transepithelial Na^+ uptake. American Journal of Physiology: Cell Physiology, 61(2): 935–944.
- Purkerson J M, Schwartz G J. 2007. The role of carbonic anhydrases in renal physiology. Kidney International, 71(2): 103–115.
- Rahim S M, Delaunoy J P, Laurent P. 1988. Identification and immunocytochemical localization of two different carbonic anhydrase isoenzymes in teleostean fish erythrocytes and gill epithelia. Histochemistry, 89(5): 451–459.
- Romero M F, Fulton C M, Boron W F. 2004. The SLC4 family of HCO_3^- transporters. Pflügers Archiv: European Journal of Physiology, 447(5): 495–509.
- Romero M F, Hediger M A, Boulpaep E L, et al. 1997. Expression cloning and characterization of a renal electrogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter. Nature, 387(6631): 409–413.
- Thammaratsuntorn J. 2015. Biochemical, Cellular and Molecular Responses of Red Tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. mossambicus* ♂) to Salinity and Alkalinity Stresses. Shanghai: Shanghai Ocean University Doctoral Dissertation, 23–37.
- Wang P J, Lin C H, Hwang L Y, et al. 2009. Differential responses in gills of euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to various hyperosmotic shocks. Comparative Biochemistry and Physiology: Part A, 152(4): 544–551.
- Wilson J M, Laurent P, Tufts B L, et al. 2000. NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: An immunological approach to ion-transport protein localization. The Journal of Experimental Biology, 203(15): 2279–2296.
- 丁海荣, 洪立洲, 杨智青, 等. 2010. 盐碱地及其生物措施改良研究现状. 现代农业科技, (6): 299–300.
- 郭义敏, 刘颖, 陈历明. 2014. 近端肾小管碳酸氢根重吸收的分子机制及代谢性酸中毒. 生理学报, 66(4): 398–414.
- 侯俊利, 陈立侨, 庄平, 等. 2006. 不同盐度驯化下施氏鲟幼鱼鳃泌氯细胞结构的变化. 水产学报, 30(3): 316–322.
- 姜明, 汝少国, 刘晓云. 1998. 不同盐度下蓝非鲫鳃泌氯细胞的结构变化. 青岛海洋大学学报, 28(4): 603–608.
- 雷衍之, 董双林, 沈成钢. 1985. 碳酸盐碱度对鱼类毒性作用的研究. 水产学报, 9(2): 171–183.
- 么宗利, 李思发, 李学军, 等. 2003. 尼罗罗非鱼和以色列红罗非鱼耐盐驯化初步报告. 上海水产大学学报, 12(2): 97–101.
- 王萍, 来琦芳, 么宗利, 等. 2015. 盐碱环境下青海湖裸鲤肠道 HCO_3^- 分泌相关基因表达差异. 海洋渔业, 37(4): 341–348.
- 章征忠, 张兆琪, 董双林. 1998. 淡水白鲟对盐碱耐受性的初步研究. 青岛海洋大学学报, 28(3): 393–398.
- 赵丽慧, 笄金华, 赵金良, 等. 2013. 不同盐、碱度下 3 品系尼罗罗非鱼幼鱼网箱养殖的生长比较. 南方水产科学, 9(4): 1–7.
- 赵丽慧, 赵金良, Thammaratsuntorn Jeerawat, 等. 2014. 盐碱胁迫对尼罗罗非鱼血清渗透压、离子浓度及离子转运酶基因表达的影响. 水产学报, 38(10): 1696–1704.
- 庄青青, 赵金良, 赵丽慧, 等. 2012. 盐度胁迫对尼罗罗非鱼鳃氯细胞调节变化的影响. 生态学杂志, 31(10): 2619–2624.