

急性盐度胁迫对红耳龟肌肉中 游离氨基酸水平的影响

江爱萍^① 张珂^① 洪美玲^{①*} 史海涛^{①②}

① 海南师范大学生命科学学院 海口 571158; ② 中国科学院成都生物研究所 成都 610041

摘要: 设置 3 个盐度处理组 (5‰盐度组、10‰盐度组和 15‰盐度组, 后面简称盐度 5 组、盐度 10 组和盐度 15 组) 和一个对照组 (以等体积经曝晒处理的自来水作为对照组) 研究红耳龟 (*Trachemys scripta elegans*) 肌肉中游离氨基酸以及血液和肝中可溶性蛋白含量在急性盐度胁迫 0 h、24 h 和 96 h 的变化情况。结果显示, 在 24 h 和 96 h 时, 盐度组红耳龟肌肉中总游离氨基酸含量显著高于对照组 ($P < 0.05$), 并且在红耳龟肌肉中天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、谷氨酰胺和谷氨酸含量最为丰富。在不同取样时间下, 谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、色氨酸、缬氨酸和甲硫氨酸的含量在 3 个盐度处理组间均没有显著差异 ($P > 0.05$); 但在不同盐度组中天冬酰胺、丙氨酸、精氨酸、脯氨酸和天冬氨酸含量随着时间的延长均上升。通过主成分分析发现, 起主要作用的游离氨基酸是丝氨酸、丙氨酸、精氨酸、脯氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸和甘氨酸。方差分析发现, 丝氨酸、丙氨酸、精氨酸、脯氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和组氨酸对盐度和时间均响应显著 ($P < 0.05$), 且盐度和时间之间存在显著的交互作用 ($P < 0.05$)。在 24 h 和 96 h 时, 盐度 10 组和盐度 15 组血液中可溶性蛋白含量均显著低于对照组 ($P < 0.05$); 而盐度 5 组肝中可溶性蛋白含量在 24 h 时显著高于对照组 ($P < 0.05$), 在 96 h 时显著低于对照组 ($P < 0.05$)。结果表明, 在急性盐度胁迫下, 红耳龟可以通过肌肉中氨基酸的代谢以及血液和肝中可溶性蛋白的分解, 产生游离氨基酸进入到血液中以维持机体的渗透压平衡。研究结果为红耳龟外来入侵生理适应机制的研究提供了重要参考, 并进一步完善了对龟类渗透压调节机制的认识。

关键词: 盐度胁迫; 红耳龟; 渗透压调节; 游离氨基酸

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2017) 03-485-12

Effect of Acute Salinity Stress on Free Amino Acids in the Red-eared Slider (*Trachemys scripta elegans*)

JIANG Ai-Ping^① ZHANG Ke^① HONG Mei-Ling^{①*} SHI Hai-Tao^{①②}

① College of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou 571158; ② Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31360642, 31372228);

* 通讯作者, E-mail: meilinghong_ecnu@aliyun.com;

第一作者介绍 江爱萍, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物学; E-mail: aiping-jiang@foxmail.com.

收稿日期: 2016-07-15, 修回日期: 2016-12-10 DOI: 10.13859/j.cjz.201703015

Abstract: According to field surveys, the Red-eared Slider (*Trachemys scripta elegans*) can survive in brackish water although it generally lives in fresh water. In order to understand protein utilization under acute salinity stress, the changes of free amino acids in muscle and soluble protein content in blood and liver at salinity 5, 10 and 15 (that is 5‰, 10‰ and 15‰ salinity) and control group at 0 h, 24 h and 96 h were studied. As shown in Table 1, total free amino acid contents in the muscle of Red-eared Slider in three salinity groups were significantly higher than in the control group at 24 h and 96 h ($P < 0.05$). The contents of asparagine, histidine, alanine, glutamine and glutamic acid were rich. There was no significant difference in the contents of glutamine, glutamic acid, glycine, leucine, tryptophan, valine and methionine at different sampling time points ($P > 0.05$). However, the contents of asparagine, alanine, arginine, proline and aspartic acid increased with the extension of sampling time in salinity groups. Principal component analysis showed that serine, alanine, arginine, proline, tyrosine, isoleucine, phenylalanine, lysine, aspartic acid, histidine, glutamine and glutamic acid and glycine play a major role in osmotic regulation as shown in Table 2. According to analysis of two-way ANOVA, there were significant differences and interaction effect of salinity and sampling time in the content of serine, alanine, arginine, proline, tyrosine, isoleucine, phenylalanine, lysine, aspartic acid and histidine as shown in Table 3 ($P < 0.05$). The contents of soluble proteins in the blood of the salinity groups decreased with ambient salinity increase, and those in salinity 10 and 15 were significantly lower than the control group at 24 h and 96 h in Fig. 1 ($P < 0.05$). However, the content of soluble proteins in the liver in salinity 5 was significantly higher than that of the control group at 24 h, while significantly lower than that of the control group at 96 h (Fig. 2, $P < 0.05$). Therefore, we conclude that the Red-eared Slider can produce free amino acids which are released into the blood to maintain osmotic balance through the metabolism of amino acids in the muscle and decomposition of soluble protein in the blood and liver. These results will provide an important reference for the study of physiological invasive mechanism in the Red-eared Slider and improve the osmoregulatory mechanism of the turtles.

Key words: Salinity stress; Red-eared Slider, *Trachemys scripta elegans*; Osmotic adjustment; Free amino acids

红耳龟 (*Trachemys scripta elegans*) 又名巴西龟, 原产于美国东部伊利诺斯州到墨西哥东北部的密西西比河沿岸 (Ernst 1990, Semenov 2010), 以其性成熟早、繁殖力强、食性杂、生存耐受力强、对食物和生存空间占有力强等生物学特性, 导致入侵地生物多样性和生态系统被破坏, 被世界自然保护联盟 IUCN 列为全球最危险的 100 种外来入侵物种之一 (ISSG/SSC 2001), 现已在除南极洲以外的世界五大洲的很多国家成功入侵 (Newbery 1984, O'Keeffe 2005), 在我国大部分地区也发现有红耳龟的野生种群 (刘丹等 2011)。

大多数淡水龟鳖类对盐度的耐受能力较

弱。适应能力较强的中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 在 50‰ 的海水中 (盐度 17‰ 左右) 也只能存活 7 d (Lee et al. 2006)。一般认为红耳龟生活在湖泊、沼泽、池塘及小溪等植被丰富的淡水环境中 (Gibbons 1990)。但 Gibbons (1990) 在美国南卡罗来纳州基洼和刺山柑群岛盐度小于 10‰ 的盐池里发现红耳龟可以生存。近期的野外研究表明, 红耳龟在我国海南南渡江入海口的半咸水环境中分布 (刘丹等 2011, 李闯 2013), 甚至在半咸水中能产卵并成功孵化 (杨江波 2014); 室内的养殖实验亦表明, 红耳龟在 15‰ 盐度时至少可存活 3 个月以上 (Hong et al. 2014)。这些研究说明, 红耳

龟对环境盐度的耐受性较强,可以在半咸水环境中存活。地球上全部水体总量为 13.86×10^9 亿 m^3 ,其中含盐量小于 1%的淡水仅占 2.5%,剩下 97.5%属于咸水和半咸水资源(栾远新 1994)。因此,红耳龟的入侵形势将变得更加严峻。

目前对红耳龟盐度耐受性相关机理的研究较少,主要集中在盐度胁迫下渗透压的离子和尿素调节方面(舒超华等 2012,张珂等 2014)。但除离子和尿素以外,研究发现游离氨基酸也是水产动物渗透压调节的重要效应物之一(黄凯等 2010),然而,游离氨基酸是否也参与龟类的渗透压调节,至今仍未见相关报道。因此,本研究将通过测量肌肉中游离氨基酸以及血液和肝中可溶性蛋白含量,来了解游离氨基酸在红耳龟盐度胁迫过程中的动态变化,进一步理解红耳龟的渗透压调节机制,并为红耳龟外来入侵生理适应机制的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物的驯化、分组与处理

实验所用红耳龟个体均购买于海南省海口鸿旺龟鳖养殖场。在实验室驯养 10 d 使其适应实验室条件后,挑选体重 (100.97 ± 12.44) g ($n = 110$)的健康个体,进行急性盐度胁迫实验。设计 4×3 的因子实验,4 为 4 个处理组,即 5‰、10‰、15‰盐度组和对照组,3 为 3 个时间点,即 0 h、24 h 和 96 h,检验急性盐胁迫下红耳龟肌肉中游离氨基酸以及血液和肝中可溶性蛋白含量的变化情况。将红耳龟随机分为 4 组(每组 26 只),分别饲养在龟类养殖室的水泥池中(长 \times 宽 \times 高为 190 cm \times 65 cm \times 32 cm),以海龙牌速溶海水晶配制盐度为 5‰、10‰和 15‰的水体,对照组是等体积经曝晒的自来水,水深 5 cm。每个水池中放数个倒置的瓦盆作为红耳龟隐蔽、晒背及摄食的场所。光照为自然光。每天采用成都泰华光学有限公司的 WYY-II 手持盐度计测量养殖水的盐度,并及时以海水晶(速溶)或水控制为所需的盐度;

每次换水后立即测量盐度并及时调整。实验总时间为 96 h,实验期间不投喂食物。

1.2 样品制备及分析方法

经海南省生态环境教育中心动物伦理委员会批准(HNECEE-2016-001),在急性盐度胁迫 0 h、24 h 和 96 h 时,从每组随机取出 6 只红耳龟,经 -20°C 低温冷冻麻醉 35 ~ 45 min 后,断颈处死并取肌肉以及血液和肝组织分别用于游离氨基酸和可溶性蛋白含量的检测分析。

1.2.1 肌肉游离氨基酸含量的检测分析 肌肉中游离氨基酸含量在北京艾米诺医学研究有限公司进行检测,液相色谱仪采用日本岛津公司 LC20A,质谱仪为美国 Applied Biosystem 公司的 4000 QQQ。本研究采用 6-氨基喹啉-N-羧基琥珀酰亚胺基-氨基甲酸酯(6-aminoquinoline N hydroxysuccinimido carbamate, AQC) 衍生法和液相色谱-串联质谱技术(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 外标定量进行检测。具体步骤如下:将质控血浆(quality control plasma, QC)和混合外标配置的肌肉组织液样本分别置于不同的 1.5 ml EP 管中。向 EP 管中加入 120 μl 蛋白沉淀剂,涡旋 1 min,高速离心 2 min,取蛋白沉淀后的上清 50 μl ,之后加缓存液 120 μl 和溶解后的 AQC 衍生溶液 30 μl ,涡旋 1 min,瞬时离心后放到 55°C 水浴锅中,衍生 15 min 后取出放到冰箱中冷却,然后瞬时离心,备测。液相色谱柱为 AAA C18 5 μm 150 \times 4.6 mm,流动相为水(含有 0.01%七氟丁酸、0.1%甲酸)和乙腈(含有 0.01%七氟丁酸、0.1%甲酸),流速是 0.8 ml/min,柱温为 50°C ,进样量为 5 μl ;质谱电离模式 ESI+、扫描模式 MRM、电喷雾电压 5 500 V、离子源温度 550°C 、雾化器电压 55 psi、辅助气流速 60 psi、气帘气压力 20 psi、碰撞气 6 psi、碰撞室入口电压 10 V、碰撞室出口电压 12 V。

1.2.2 血液和肝可溶性蛋白含量的测定 采用南京建成考马斯亮蓝试剂盒测定。所用仪器

主要为北京普析通用仪器有限责任公司的 TU-1901 双光束紫外可见分光光度计。取血清, 按血清与生理盐水的体积比为 1:49 稀释, 待测; 将肝与生理盐水按重量 (g) 体积 (ml) 比为 1:9 混合之后进行冰水浴机械匀浆, 2 500 r/min 离心 10 min, 取上清液用生理盐水按 1:9 稀释成 1% 的肝匀浆, 待测; 将蒸馏水、0.563 g/L 标准液和待测样品分别与考马斯亮兰显色剂混匀作为空白管 (调零)、标准管和测定管, 静置 10 min, 在分光光度计 595 nm 处 1 cm 光径下测量各管吸光度值 (A)。计算公式如下: 蛋白浓度 (g/L) = $[(A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})] \times \text{标准品浓度} (0.563 \text{ g/L})$ 。

1.3 数据处理

数据用 Excel 2003 和 SPSS 16.0 统计软件进行处理和分析, 所有数据以平均值 \pm 标准误 (Mean \pm SE) 表示。采用双因素方差分析比较不同时间和盐度处理组各检测指标含量的变化, 而同一取样时间不同盐度处理组之间的比较和同一盐度组不同取样时间之间的比较用 Duncan 法进行; 采用主成分分析法提取对盐度胁迫响应较大的游离氨基酸, 并归纳到各个主成分上。各差异显著临界值 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 急性盐度胁迫对肌肉中游离氨基酸含量的影响

急性盐度胁迫下红耳龟肌肉中游离氨基酸的含量见表 1。肌肉中总游离氨基酸含量随着盐度的增加呈现上升趋势, 并且在 24 h 和 96 h, 盐度组红耳龟肌肉总游离氨基酸含量显著高于对照组 ($P < 0.05$)。在盐度胁迫 24 h 时, 盐度 5 组红耳龟肌肉总游离氨基酸含量显著低于盐度 15 组 ($P < 0.05$); 在盐度胁迫 96 h 时, 各盐度组肌肉总游离氨基酸含量差异显著 ($P < 0.05$)。在急性盐度胁迫下红耳龟肌肉中各个游离氨基酸含量随着盐度的升高大体也呈现上升的变化趋势, 并且含量最为丰富的游离氨基酸是天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、谷氨酰胺和谷

氨酸。其中, 红耳龟肌肉中游离丙氨酸含量约占总游离氨基酸的 11%, 仅次于天冬酰胺和组氨酸。在盐度胁迫 24 h 时, 丙氨酸含量在盐度 10 组和盐度 15 组显著高于对照组和盐度 5 组 ($P < 0.05$); 在盐度胁迫 96 h 时, 丙氨酸含量在盐度组均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且盐度 15 组显著高于盐度 5 组和盐度 10 组 ($P < 0.05$)。除此之外, 在 24 h 和 96 h 时, 谷氨酰胺和谷氨酸含量在盐度组和对对照组之间均相对稳定, 没有显著差异 ($P > 0.05$)。

表 2 是红耳龟肌肉中游离氨基酸的主成分分析表。根据特征值大于 1 的原则, 获得 5 个主成分, 并且这 5 个主成分的累积贡献率达到了 79.383%, 说明这 5 个主成分基本包含了表 1 中游离氨基酸所具有的相关信息, 因此将原来的 19 种游离氨基酸转化为 5 个主成分。第 1 主成分能解释所有红耳龟中游离氨基酸含量变异的 50.083%, 其中正交主因子大于 0.7 的游离氨基酸分别是丝氨酸、丙氨酸、精氨酸、脯氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和组氨酸; 第 2 主成分能解释 8.610%, 其中正交主因子大于 0.7 的游离氨基酸只有谷氨酰胺; 第 3 主成分可解释 7.974%, 其中正交主因子大于 0.7 的游离氨基酸只有谷氨酸; 第 4 主成分可解释 6.881%, 其中正交主因子大于 0.7 的游离氨基酸只有甘氨酸; 第 5 主成分可解释 5.835%。

经双因素方差分析, 在不同时间和盐度下存在显著交互作用的游离氨基酸见表 3。其中, 丝氨酸、赖氨酸和组氨酸的含量在不同盐度差异均显著 ($P < 0.05$)。丙氨酸和天冬氨酸的含量仅在盐度 5 组和盐度 10 组间无显著差异 ($P > 0.05$), 酪氨酸和苯丙氨酸的含量仅在盐度 10 组和盐度 15 组间无显著差异 ($P > 0.05$), 其他盐度组均差异显著 ($P < 0.05$)。丝氨酸、脯氨酸和天冬氨酸的含量在不同时间下差异均显著 ($P < 0.05$), 其余游离氨基酸的含量在 24 h 和 96 h 差异不显著 ($P > 0.05$)。因此, 丝氨酸在不同盐度和胁迫时间下差异均显著 ($P < 0.05$)。

表 1 急性盐度胁迫下红耳龟肌肉中游离氨基酸的含量

Table 1 Free amino acids in the muscle of Red-eared Slider under acute salinity stress

游离氨基酸 Free amino acid (mg/L)	时间 Time (h)	盐度 Salinity (‰)			
		0	5	10	15
总游离氨基酸 Total free amino acid	0	198.90 ± 12.46	198.90 ± 12.46	198.90 ± 12.46	198.90 ± 12.46
	24	213.71 ± 22.27 ^a	252.81 ± 4.15 ^b	266.78 ± 9.59 ^{bc}	278.59 ± 5.62 ^c
	96	193.75 ± 4.26 ^a	263.27 ± 5.46 ^b	280.64 ± 5.68 ^c	312.37 ± 15.99 ^d
天冬酰胺 Asparaginate	0	53.47 ± 5.43	53.47 ± 5.43	53.47 ± 5.43	53.47 ± 5.43
	24	52.44 ± 4.16	57.79 ± 6.89	56.12 ± 6.91	56.47 ± 2.31
	96	49.70 ± 7.14 ^a	64.40 ± 1.55 ^b	60.01 ± 2.36 ^a	74.43 ± 7.98 ^b
组氨酸 Histidine	0	30.93 ± 3.55	30.93 ± 3.55	30.93 ± 3.55	30.93 ± 3.55
	24	33.17 ± 1.76 ^a	69.67 ± 3.12 ^b	79.21 ± 6.42 ^c	85.23 ± 2.10 ^c
	96	30.37 ± 4.30 ^a	67.57 ± 4.00 ^b	80.97 ± 9.49 ^c	87.33 ± 4.05 ^c
丙氨酸 Alanine	0	22.43 ± 2.42	22.43 ± 2.42	22.43 ± 2.42	22.43 ± 2.42
	24	25.68 ± 1.20 ^a	26.69 ± 1.28 ^a	28.88 ± 0.55 ^b	29.59 ± 1.16 ^b
	96	21.90 ± 1.85 ^a	27.13 ± 0.91 ^b	28.97 ± 0.32 ^b	33.97 ± 1.52 ^c
谷氨酰胺 Glutamine	0	23.33 ± 0.55	23.33 ± 0.55	23.33 ± 0.55	23.33 ± 0.55
	24	22.41 ± 1.74	22.67 ± 2.00	24.52 ± 3.63	23.91 ± 4.95
	96	22.87 ± 2.06	22.67 ± 2.90	26.77 ± 3.44	24.60 ± 4.71
谷氨酸 Glutamic acid	0	22.43 ± 2.42	22.43 ± 2.42	22.43 ± 2.42	22.43 ± 2.42
	24	20.40 ± 3.92	22.52 ± 2.89	21.29 ± 1.04	20.86 ± 3.88
	96	21.90 ± 1.85	25.13 ± 4.36	22.30 ± 5.98	22.97 ± 2.91
甘氨酸 Glycine	0	8.71 ± 0.70	8.71 ± 0.70	8.71 ± 0.70	8.71 ± 0.70
	24	8.65 ± 0.46	9.22 ± 0.70	9.09 ± 0.37	9.23 ± 0.29
	96	9.15 ± 0.31	9.20 ± 0.76	9.52 ± 0.52	9.42 ± 0.83
丝氨酸 Serine	0	7.08 ± 0.75	7.08 ± 0.75	7.08 ± 0.75	7.08 ± 0.75
	24	6.87 ± 0.46 ^a	8.26 ± 0.86 ^b	8.13 ± 0.61 ^b	9.88 ± 0.29 ^c
	96	6.66 ± 0.63 ^a	7.83 ± 0.81 ^b	10.60 ± 0.17 ^c	11.65 ± 0.48 ^c
赖氨酸 Lysine	0	6.00 ± 0.22	6.00 ± 0.22	6.00 ± 0.22	6.00 ± 0.22
	24	6.20 ± 0.49 ^a	9.00 ± 0.72 ^b	10.65 ± 0.73 ^c	12.76 ± 0.78 ^d
	96	6.77 ± 0.78 ^a	9.49 ± 0.43 ^b	10.53 ± 0.11 ^b	13.64 ± 0.70 ^c
苏氨酸 Threonine	0	5.63 ± 0.41	5.63 ± 0.41	5.63 ± 0.41	5.63 ± 0.41
	24	5.28 ± 0.68 ^a	6.13 ± 0.46 ^{ab}	6.03 ± 0.58 ^{ab}	6.32 ± 0.34 ^b
	96	5.73 ± 0.64	6.15 ± 0.95	5.84 ± 0.44	6.31 ± 1.16
精氨酸 Arginine	0	4.14 ± 0.61	4.14 ± 0.61	4.14 ± 0.61	4.14 ± 0.61
	24	4.17 ± 0.67 ^a	4.94 ± 0.65 ^a	4.87 ± 0.36 ^a	5.26 ± 0.43 ^b
	96	3.95 ± 0.37 ^a	5.74 ± 0.80 ^b	5.65 ± 0.25 ^b	7.05 ± 1.11 ^c
脯氨酸 Proline	0	2.63 ± 0.22	2.63 ± 0.22	2.63 ± 0.22	2.63 ± 0.22
	24	3.08 ± 0.53 ^a	2.66 ± 0.45 ^a	3.29 ± 0.34 ^a	3.63 ± 0.34 ^{ab}
	96	2.68 ± 0.24 ^a	3.74 ± 0.24 ^b	4.13 ± 0.15 ^b	4.75 ± 0.69 ^c

续表 1

游离氨基酸 Free amino acid (mg/L)	时间 Time (h)	盐度 Salinity (%)			
		0	5	10	15
酪氨酸 Tyrosine	0	1.95 ± 0.03	1.95 ± 0.03	1.95 ± 0.03	1.95 ± 0.03
	24	2.11 ± 0.25 ^a	2.45 ± 0.27 ^a	3.29 ± 0.36 ^b	3.02 ± 0.24 ^b
	96	1.82 ± 0.12 ^a	2.44 ± 0.25 ^b	3.01 ± 0.22 ^c	3.13 ± 0.17 ^c
天冬氨酸 Aspartic acid	0	1.51 ± 0.02	1.51 ± 0.02	1.51 ± 0.02	1.51 ± 0.02
	24	1.55 ± 0.06 ^a	1.92 ± 0.14 ^{ab}	1.96 ± 0.23 ^b	2.49 ± 0.34 ^c
	96	1.56 ± 0.06 ^a	2.65 ± 0.32 ^b	2.68 ± 0.21 ^b	2.90 ± 0.53 ^b
异亮氨酸 Isoleucine	0	1.75 ± 0.13	1.75 ± 0.13	1.75 ± 0.13	1.75 ± 0.13
	24	1.67 ± 0.10 ^a	1.84 ± 0.02 ^a	1.81 ± 0.21 ^a	2.44 ± 0.24 ^b
	96	1.74 ± 0.12 ^a	1.92 ± 0.08 ^{ab}	2.12 ± 0.21 ^b	2.22 ± 0.26 ^b
苯丙氨酸 Phenylalanine	0	1.34 ± 0.01	1.34 ± 0.01	1.34 ± 0.01	1.34 ± 0.01
	24	1.31 ± 0.05 ^a	1.55 ± 0.11 ^b	1.77 ± 0.08 ^c	1.83 ± 0.09 ^c
	96	1.39 ± 0.02 ^a	1.58 ± 0.06 ^{ab}	1.72 ± 0.15 ^{ab}	1.80 ± 0.35 ^b
亮氨酸 Leucine	0	1.86 ± 0.12	1.86 ± 0.12	1.86 ± 0.12	1.86 ± 0.12
	24	1.79 ± 0.15	1.95 ± 0.08	2.15 ± 0.37	1.99 ± 0.48
	96	1.97 ± 0.21	1.99 ± 0.17	1.92 ± 0.31	2.29 ± 0.33
色氨酸 Tryptophan	0	1.87 ± 0.02	1.87 ± 0.02	1.87 ± 0.02	1.87 ± 0.02
	24	1.75 ± 0.11	1.72 ± 0.14	1.73 ± 0.16	1.70 ± 0.16
	96	1.77 ± 0.09	1.77 ± 0.01	1.87 ± 0.15	1.78 ± 0.07
缬氨酸 Valine	0	1.31 ± 0.03	1.31 ± 0.03	1.31 ± 0.03	1.31 ± 0.03
	24	1.31 ± 0.04	1.25 ± 0.11	1.42 ± 0.12	1.38 ± 0.15
	96	1.29 ± 0.10	1.28 ± 0.04	1.44 ± 0.12	1.51 ± 0.27
甲硫氨酸 Methionine	0	0.53 ± 0.01	0.53 ± 0.01	0.53 ± 0.01	0.53 ± 0.01
	24	0.54 ± 0.04	0.57 ± 0.04	0.59 ± 0.08	0.61 ± 0.05
	96	0.54 ± 0.03	0.59 ± 0.03	0.59 ± 0.04	0.61 ± 0.06

表中同一行不同上标字母代表各盐度组之间差异显著。

Different superscript letters in the same row represent significant difference between the salinity groups.

2.2 急性盐度胁迫对红耳龟血液和肝中可溶性蛋白含量的影响

图 1 表示急性盐度胁迫下红耳龟血液中可溶性蛋白的含量。在盐度胁迫 24 h 时, 盐度 10 组和盐度 15 组中血液可溶性蛋白显著低于对照组和盐度 5 组 ($P < 0.05$), 且盐度 10 组和盐度 15 组之间具有显著差异 ($P < 0.05$)。在 96 h 时, 盐度 10 组和盐度 15 组中血液可溶性蛋白含量显著低于对照组和盐度 5 组 ($P < 0.05$), 而对照组和盐度 5 组以及盐度 10 组和盐度 15 组之间没有显著差异 ($P > 0.05$)。

图 2 表示急性盐度胁迫下红耳龟肝中可溶

性蛋白的含量。在盐度胁迫 24 h 时, 仅盐度 5 组肝可溶性蛋白含量显著高于对照组 ($P < 0.05$); 在胁迫 96 h 时, 也仅只有盐度 5 组显著低于对照组和另两个高盐处理组 ($P < 0.05$), 而盐度 10 组和盐度 15 组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

游离氨基酸的积累能够调节细胞体积并维持细胞中大分子的稳定 (Hochachka et al. 2002)。肌肉是主要的氨基酸库, 大多数氨基酸代谢都发生在这个组织中。当水环境的盐度发

表 2 红耳龟肌肉中游离氨基酸的主成分分析

Table 2 The principal component analysis of free amino acids in the muscle of Red-eared Slider

游离氨基酸 Free amino acid	主成分 Principal component				
	1	2	3	4	5
天冬酰胺 Asparaginate	0.675	0.081	0.053	- 0.230	0.586
丝氨酸 Serine	0.899	0.063	- 0.003	0.094	0.090
甘氨酸 Glycine	0.436	- 0.261	- 0.042	0.726	0.046
谷氨酰胺 Glutamine	0.254	0.772	- 0.080	0.016	- 0.372
丙氨酸 Alanine	0.898	0.079	0.086	- 0.210	- 0.015
谷氨酸 Glutamic acid	- 0.010	0.378	0.766	- 0.262	0.147
精氨酸 Arginine	0.802	0.108	- 0.036	- 0.164	0.228
脯氨酸 Proline	0.858	0.042	- 0.173	0.092	0.252
甲硫氨酸 Methionine	0.687	0.325	- 0.080	0.024	- 0.395
酪氨酸 Tyrosine	0.874	- 0.146	- 0.204	- 0.134	- 0.105
异亮氨酸 Isoleucine	0.715	- 0.232	0.352	0.033	0.042
亮氨酸 Leucine	0.450	0.124	- 0.586	0.108	0.311
苯丙氨酸 Phenylalanine	0.855	- 0.193	0.010	0.078	- 0.310
色氨酸 Tryptophan	- 0.290	0.504	0.258	0.635	0.211
赖氨酸 Lysine	0.960	- 0.030	0.055	- 0.067	- 0.117
缬氨酸 Valine	0.517	0.460	- 0.125	0.150	0.057
天冬氨酸 Aspartic acid	0.876	- 0.070	0.238	0.056	0.062
组氨酸 Histidine	0.944	- 0.078	0.017	- 0.069	- 0.199
苏氨酸 Threonine	0.448	- 0.297	0.471	0.309	- 0.112
特征值 Eigenvalue	9.516	1.636	1.515	1.307	1.109
贡献率 Variance (%)	50.083	8.610	7.974	6.881	5.835
累积贡献率 Cumulative (%)		58.693	66.667	73.548	79.383

生变化时, 肌肉中游离氨基酸会释放到血液, 进行渗透压调节 (Cuzon et al. 2004)。从本研究中发现, 盐度组红耳龟肌肉总游离氨基酸含量在 24 h 和 96 h 时相对于对照组均显著增加 ($P < 0.05$), 这与 Tok 等 (2009) 研究的黄鳝 (*Monopterus albus*) 和王悦如 (2012) 研究的中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 结果一致, 由此可见游离氨基酸在红耳龟中也起到了渗透压调节的作用。

不同物种在渗透压调节过程中起主要调节作用的游离氨基酸不同。McNamara 等 (2004) 在对淡水沼虾 (*Macrobrachium olfersii*) 的研究

中发现, 在长期盐度胁迫下, 其肌肉中游离甘氨酸、精氨酸、丙氨酸和脯氨酸的含量较高; Wang 等 (2004) 对日本沼虾 (*M. nipponense*) 的研究中发现, 盐度胁迫下肌肉中主要的游离氨基酸是甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸; 王悦如 (2012) 在对中华绒螯蟹的研究中发现, 在盐度胁迫下其肌肉中游离精氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、谷氨酸和牛磺酸的含量在总游离氨基酸中所占比例较高。因此, 丙氨酸和脯氨酸这两个游离氨基酸在渗透调节过程中是十分重要的。在本研究中, 丙氨酸和脯氨酸在贡献率达到 50.083% 的第一主成分中正交主因

表 3 不同盐度和胁迫时间下交互作用显著的游离氨基酸的主效应分析表
Table 3 The main effect analysis of amino acid content in the muscle under different salinities and stress time points

	丝氨酸 Serine	丙氨酸 Alanine	精氨酸 Arginine	脯氨酸 Proline	酪氨酸 Tyrosine	异亮氨酸 Isoleucine	苯丙氨酸 Phenylalanine	赖氨酸 Lysine	天冬氨酸 Aspartic acid	组氨酸 Histidine	总游离氨基酸 Total free amino acid
0	7.08 ^a	22.43 ^a	4.14 ^a	2.63 ^a	1.95 ^a	1.75 ^a	1.34 ^a	6.00 ^a	1.51 ^a	30.93 ^a	198.90 ^a
24	8.28 ^b	27.71 ^b	4.81 ^b	3.17 ^b	2.72 ^b	1.94 ^b	1.61 ^b	9.65 ^b	1.98 ^b	66.82 ^b	252.97 ^b
96	9.19 ^c	27.99 ^b	5.60 ^b	3.83 ^c	2.60 ^b	2.00 ^b	1.62 ^b	10.11 ^b	2.45 ^c	66.56 ^b	262.51 ^b
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.003	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
0	6.87 ^a	23.34 ^a	4.08 ^a	2.80 ^a	1.96 ^a	1.72 ^a	1.34 ^a	6.32 ^a	1.54 ^a	31.49 ^a	202.12 ^a
5	7.72 ^b	25.42 ^b	4.94 ^b	3.01 ^a	2.28 ^b	1.84 ^{ab}	1.49 ^b	8.16 ^b	2.03 ^b	56.06 ^b	238.33 ^b
10	8.60 ^c	26.76 ^b	4.89 ^b	3.35 ^b	2.75 ^c	1.90 ^b	1.61 ^c	9.06 ^c	2.05 ^b	63.70 ^c	248.77 ^c
15	9.54 ^d	28.66 ^c	5.48 ^{bc}	3.67 ^b	2.70 ^c	2.14 ^c	1.66 ^c	10.80 ^d	2.30 ^c	67.83 ^d	263.29 ^d
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
时间 × 盐度 <i>P</i> 值 Time × Salinity <i>P</i> -value	< 0.001	< 0.001	0.014	0.001	< 0.001	0.003	0.014	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

同一列中上标不同字母 (a, b, c, d) 间表示差异显著 ($P < 0.05$); *P* 值分别表示双因素分析中主效应及交互效应结果。

Different letters (a, b, c, d) in the same column showed significant differences ($P < 0.05$). *P*-values denote the result of main effect and interaction effect by two-way ANOVA analysis.

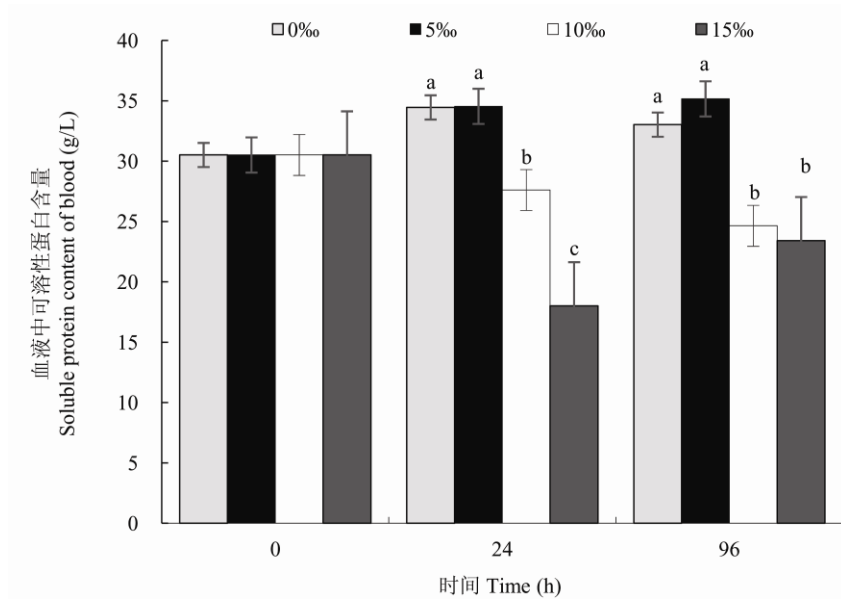


图 1 急性盐度胁迫下红耳龟血液中可溶性蛋白的含量

Fig. 1 The content of soluble proteins in the blood of Red-eared Slider under acute salinity stress

图中同一取样时间柱形图上不同上标字母代表有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Different superscripts above bars at the same time are significantly different ($P < 0.05$).

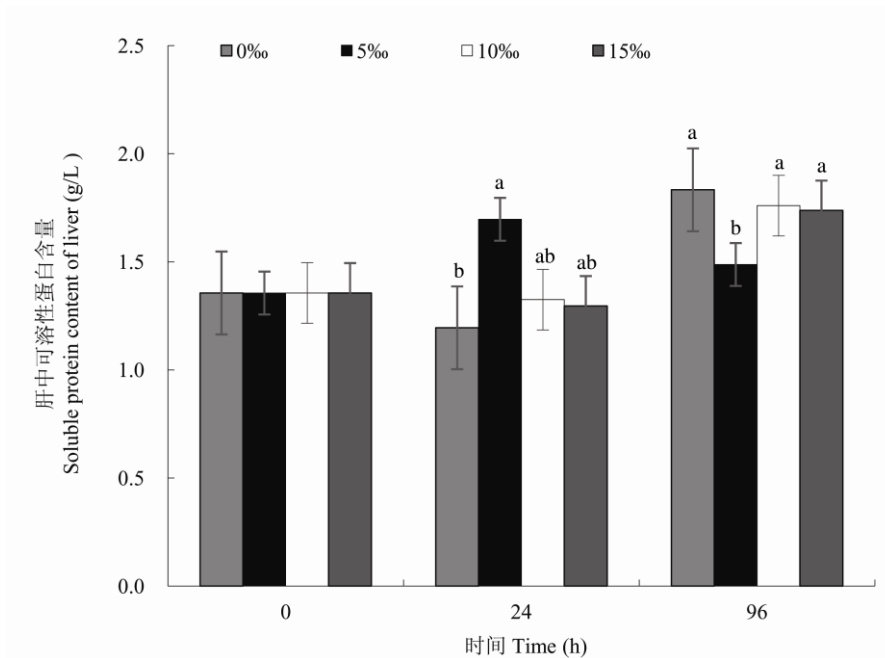


图 2 急性盐度胁迫下红耳龟肝可溶性蛋白的含量

Fig. 2 The content of soluble proteins in the liver of Red-eared Slider under acute salinity stress

图中同一取样时间柱形图上不同上标字母代表有显著性差异 ($P < 0.05$)。

Different superscripts above bars at the same time are significantly different ($P < 0.05$).

子分别为 0.898 和 0.858, 这表明在盐度胁迫下, 红耳龟肌肉中丙氨酸和脯氨酸在渗透压调节方面同样发挥着重要的作用。谷氨酸是丙氨酸和脯氨酸的合成前体 (刘纯洁等 1988), 通过谷氨酸的合成可以促进丙氨酸和脯氨酸以及其他游离氨基酸的合成。但在本研究中发现, 谷氨酸含量一直保持相对稳定, 这与黄凯等 (2010) 研究盐度对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 肌肉中游离氨基酸含量的影响结果相一致, 说明红耳龟机体可能具有保持谷氨酸含量恒定的调节机制。

丝氨酸是一种非必需氨基酸, 它处于氨基酸代谢的中间位置, 所以丝氨酸可以参与甲硫氨酸和甘氨酸等物质的合成, 除此之外, 丝氨酸可以参与免疫血球素和抗体的产生, 以及促进细胞膜、肌肉组织和神经细胞鞘的合成 (齐国山 2012)。在本研究中通过主效应分析发现, 只有丝氨酸的含量在不同时间和盐度下均具有显著差异 ($P < 0.05$), 而具有保护细胞、抗炎和免疫调节作用 (杜瑞平等 2015) 的甘氨酸和甲硫氨酸的变化并不显著 ($P > 0.05$), 表明丝氨酸在该研究中可能主要是参与机体的渗透压调节, 并对盐度的变化响应显著 ($P < 0.05$)。

蛋白质是生命活动的主要承担者, 在动物生理生化过程中起着重要的作用 (孔祥会等 2005)。在缺少外源氨基酸时, 氨基酸代谢会引起血液中游离氨基酸含量的降低, 为了维持血液中游离氨基酸水平的恒定就需要机体分解各组织中的蛋白质以释放游离氨基酸, 使氨基酸水平升高 (游文章等 2007, 蒋焕超等 2011)。本研究发现, 除了肌肉中游离氨基酸含量升高之外, 盐度组红耳龟血液中可溶性蛋白含量均是随着盐度的增加而减少, 这可能是因为盐度胁迫下血液中可溶性蛋白被分解为游离氨基酸用于作为渗透压效应物 (Gilles 1997)。这与中华绒螯蟹 (王悦如 2012) 和罗氏沼虾 (*M. rosenbergii*) (Huong et al. 2001) 在进入盐环境后, 血淋巴中可溶性蛋白含量随着盐度的增加而减少的结果相一致。除此之外, 有研究发现

在低盐状态下, 机体需要积累足够的蛋白质才能维持正常生理功能 (李二超等 2009), 并且在低盐状态下机体蛋白酶活性受到的抑制较小 (刘伟等 2010)。在本研究中盐度 5 组红耳龟肝中可溶性蛋白含量在 24 h 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而在 96 h 时显著低于对照组 ($P < 0.05$), 表明盐度 5 组红耳龟在 24 h 之前为了维持机体的正常运行积累了足够的蛋白质, 在 96 h 时由于蛋白酶活性高, 肝中的可溶性蛋白被分解成游离氨基酸进入到血液中, 以维持机体的渗透压平衡。

对于在高渗环境下, 机体组织中游离氨基酸含量的升高主要有两种观点, 一是在高渗胁迫下, 组织中游离氨基酸的升高主要是因为降低了机体蛋白质从头合成途径的效率 (Hochachka et al. 2002), 而另一种观点认为, 高渗胁迫下, 机体中游离氨基酸含量的升高主要是由于蛋白质的分解 (Geoffrion et al. 1986)。在本研究中, 由于盐度组血液可溶性蛋白含量均是随着盐度的增加而减少, 并且在 96 h 时, 盐度 5 组肝中可溶性蛋白含量显著低于对照组 ($P < 0.05$), 所以初步认为红耳龟在盐度胁迫下是通过机体蛋白质的分解来获得游离氨基酸, 进而调节渗透压, 维持机体的渗透压平衡。

因此, 在急性盐度胁迫下, 红耳龟机体中的游离氨基酸和可溶性蛋白在机体渗透调节过程中起着重要的作用。并且红耳龟可以通过肌肉中氨基酸代谢以及血液和肝中可溶性蛋白质的分解, 来提高血液中游离氨基酸的浓度, 从而提高机体的渗透压。研究结果可进一步解释红耳龟对环境盐度的强适应性, 同时也为红耳龟生态危害的评估提供了新的参考依据。

参 考 文 献

- Cuzon G, Lawrence A, Gaxiola G, et al. 2004. Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture*, 235(1/4): 513–551.
- Ernst C H. 1990. Systematics, taxonomy, variation, and geographic

- distribution of the slider turtle // Gibbons J W. Life History and Ecology of the Slider Turtle. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 57–67.
- Geoffrion Y, Guderley H, Larochelle J. 1986. The effect of oxygen availability on the osmoregulatory contribution of free amino acids in *Acanthamoeba castellanii*. Canadian Journal of Zoology, 64(7): 1430–1435.
- Gibbons W J. 1990. Life History and Ecology of the Slider Turtle. Washington, DC: Smithsonian Institution Press.
- Gilles R. 1997. “Compensatory” organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: history and perspectives. Comparative Biochemistry and Physiology A, 117(3): 279–290.
- Hochachka P W, Somero G N. 2002. Biochemical Adaptation. New York: Oxford University Press.
- Hong M L, Zhang K, Shu C H, et al. 2014. Effect of salinity on the survival, ions and urea modulation in Red-eared Slider (*Trachemys scripta elegans*). Asian Herpetological Research, 5(2): 128–136.
- Huong D T T, Yang W J, Okuno A, et al. 2001. Changes in free amino acids in the hemolymph of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* exposed to varying salinities: relationship to osmoregulatory ability. Comparative Biochemistry and Physiology A, 128(2): 317–326.
- ISSG/SSC. 2001. 100 of the worlds worst invasive species. Species, 35: 5.
- Lee S M L, Wong W P, Hiong K C, et al. 2006. Nitrogen metabolism and excretion in the aquatic Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*, exposed to a progressive increase in ambient salinity. Journal of Experimental Zoology A, 305 (12): 995–1009.
- McNamara J C, Rosa J C, Greene L J, et al. 2004. Free amino acid pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during long-term salinity acclimation. Marine Behaviour and Physiology, 37(3): 193–208.
- Newbery R. 1984. The American red-eared terrapin in South Africa. African Wildlife, 385: 186–189.
- O’Keeffe S. 2005. Investing in conjecture: eradicating the red-eared slider in Queensland // Te Papa Wellington. Proceedings of 13th Australasian Vertebrate Pest Conference. Lincoln 8152, New Zealand: Landcare Research, 169–176.
- Semenov D V. 2010. Slider Turtle, *Trachemys scripta elegans*, as invasion threat (Reptilia; Testudines). Russian Journal of Biological Invasion, 1(4): 296–300.
- Tok C Y, Chew S F, Peh W Y X, et al. 2009. Glutamine accumulation and up-regulation of glutamine synthetase activity in the swamp eel, *Monopterus albus* (Zuiew), exposed to brackish water. Journal of Experimental Biology, 212(9): 1248–1258.
- Wang W N, Wang A L, Bao L, et al. 2004. Changes of protein-bound and free amino acids in the muscle of freshwater prawn *Macrobrachium nipponense* in different salinities. Aquaculture, 233(1/4): 561–571.
- 杜瑞平, 张兴夫, 高民, 等. 2015. 甘氨酸的免疫调节作用及其分子机制. 动物营养学报, 27(3): 663–670.
- 黄凯, 焕超, 吴宏玉, 等. 2010. 盐度对凡纳滨对虾肌肉中游离氨基酸含量的影响. 海洋渔业, 32(4): 422–426.
- 蒋焕超, 黄凯, 杨淇龄, 等. 2011. 禁食状态下凡纳滨对虾游离氨基酸的降解代谢. 渔业科学进展, 32(3): 69–75.
- 孔祥会, 边中春, 王桂忠, 等. 2005. 温度骤降对锯缘青蟹可溶性蛋白与可溶性糖含量的影响. 河南师范大学学报: 自然科学版, 33(3): 98–101.
- 李闯. 2013. 海南万泉河红耳龟 (*Trachemys scripta elegans*) 野外繁殖研究. 海口: 海南师范大学硕士学位论文.
- 李二超, 陈立侨, 曾增, 等. 2009. 盐度对凡纳滨对虾体组织蛋白质积累、氨基酸组成和转氨酶活性的影响. 水生生物学报, 33(3): 532–538.
- 刘纯洁, 张娟婷. 1988. 食品添加剂手册. 北京: 中国展望出版社, 157–160.
- 刘丹, 史海涛, 刘宇翔, 等. 2011. 红耳龟在我国分布现状的调查. 生物学通报, 46(6): 18–21.
- 刘伟, 支兵杰, 战培荣, 等. 2010. 盐度对大麻哈鱼幼鱼血液生化指标及肝组织的影响. 应用生态学报, 21(9): 2411–2417.
- 梁远新. 1994. 世界水资源及其分布. 东北水利水电, (10): 22–24.
- 齐国山. 2012. 饲料中牛磺酸、蛋氨酸、胱氨酸、丝氨酸和半胱胺

- 对大菱鲜生长性能及牛磺酸合成代谢的影响. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文.
- 舒超华, 张珂, 洪美玲, 等. 2012. 盐度胁迫对红耳龟生长与血液生化指标的影响. *四川动物*, 31(6): 912-915.
- 王悦如. 2012. 中华绒螯蟹对急性盐度胁迫的生理响应研究. 上海: 华东师范大学硕士学位论文.
- 杨江波. 2014. 红耳龟 (*Trachemys scripta elegans*) 在海南南渡江半咸水区域的生态适应性研究. 海口: 海南师范大学硕士学位论文.
- 游文章, 文华, 马琳. 2007. 饥饿对草鱼血清游离氨基酸的影响. *淡水渔业*, 37(3): 26-29.
- 张珂, 洪美玲, 史海涛, 等. 2014. 盐度胁迫对红耳龟 Na^+/K^+ -ATP 酶及消化酶活性的影响. *水产科学*, 33(8): 520-524.