

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210108001

http://www.yykxjz.cn/

于振兴, 任宪云, 邵慧鑫, 刘萍, 李健. 低温胁迫对日本对虾抗氧化系统和细胞凋亡的影响. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 157-166

YU Z X, REN X Y, SHAO H X, LIU P, LI J. Effect of low temperature stress on antioxidant system and apoptosis of *Marsupenaeus japonicus*. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 157-166

## 低温胁迫对日本对虾抗氧化系统和 细胞凋亡的影响\*

于振兴<sup>1,2</sup> 任宪云<sup>2,3</sup> 邵慧鑫<sup>1,2</sup> 刘萍<sup>2,3①</sup> 李健<sup>2,3</sup>

(1. 水产科学国家级实验教学示范中心 上海海洋大学 上海 201306;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071;

3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东 青岛 266071)

**摘要** 日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)适宜生长温度为23℃~32℃, 由于北方地区冬季温度较低, 严重影响日本对虾养殖周期, 因此, 培育耐低温的新品种非常重要。将(14.24±1.12) g 的日本对虾暴露于10℃、16℃、22℃水体中72 h, 以28℃水体中的对虾为对照组。结果显示, 对虾鳃和肝胰腺的总抗氧化能力、超氧化物歧化酶(SOD)活性、还原型谷胱甘肽含量总体分别呈先下降后升高再降低的变化趋势, 而丙二醛含量、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3 (Caspase-3)活性一直呈上升趋势; SOD和Caspase-3基因的相对表达量分别呈先下降后升高再降低和持续升高的趋势, 与各自对应的酶活变化趋势相似。TUNEL检测发现, 随胁迫时间的延长, 机体细胞凋亡率显著增加, 其中, 对照组、3 h 10℃组和72 h 10℃组鳃组织细胞凋亡率分别为2.03%、6.20%和26.27%, 肝胰腺细胞凋亡率分别为1.06%、25.65%和42.33%。综上所述, 低温胁迫降低了日本对虾的抗氧化能力, 破坏了内环境原有的平衡, 进而导致机体出现氧化损伤。本研究可为耐低温新品种的培育提供参考。

**关键词** 日本对虾; 低温胁迫; 总抗氧化能力; 细胞凋亡; TUNEL检测

**中图分类号** S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2022)02-0157-10

日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)食性杂、生长快、离水不易死亡, 适于活虾上市和长途运输, 是我国海水养殖的重要虾类之一(赵先银等, 2006)。

日本对虾适宜生长温度为23℃~32℃, 最适温度为25℃~30℃, 在8℃~10℃出现倒伏现象并停止摄

食, 5℃以下死亡(李凤晨等, 2006; 宋晓红等, 2014)。北方地区冬季温度过低, 严重影响日本对虾养殖周期。有研究表明, 低温胁迫诱导斑节对虾(*Penaeus monodon*)活性氧的产生, 导致体内氧化代谢紊乱(Jiang *et al*, 2019)。细胞凋亡是受基因调控、主动的

\* 山东省农业良种工程重大课题(2019LZGC014号)、农业农村部农业国际合作交流项目“一带一路”热带国家水产养殖科技创新合作和中国水产科学研究院基本科研业务费(2020TD46)共同资助 [This work was supported by Major Project of Agricultural Improved Variety Project in Shandong Province (2019LZGC014), Projects of International Exchange and Cooperation in Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China-Science, Technology and Innovation Cooperation in Aquaculture with Tropical Countries along the Belt and Road, and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD46)]. 于振兴, E-mail: 1149330153@qq.com

① 通讯作者: 刘萍, 研究员, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2021-01-08, 收修改稿日期: 2021-01-22

生理性细胞自杀行为,当机体受到外来刺激时,通过细胞凋亡来清除体内受损伤、衰老和多余的细胞,以保持机体内环境平衡和维持正常生理活动(董自梅等, 2020)。Caspase (cysteinyI aspartate specific proteinase) 又称天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶,是执行动物细胞凋亡的主要蛋白酶家族,通常情况下以无活性的酶原形式存在于活细胞中,当受到凋亡刺激时,被激活成具有活性的 Caspase,在不同的凋亡阶段发挥重要作用(Wang *et al*, 2020)。其中以 Caspase-3 最为重要, Caspase-3 是细胞凋亡的参与者之一,它的激活标志着细胞凋亡进入不可逆转的阶段(Scatena *et al*, 2007)。TUNEL (原位末端切口标记法)为一种新型的细胞凋亡检测方法,其原理是在脱氧核糖核苷酸末端转移酶作用下将脱氧核糖核苷酸和荧光素、过氧化物酶、碱性磷酸酶或生物素形成的衍生物标记到凋亡细胞中断裂 DNA 形成的 3-OH 末端游离羟基上,进行原位凋亡细胞的检测,而正常细胞几乎无断裂 DNA (李进军等, 2017)。有关低温对日本对虾抗氧化及凋亡影响的研究尚未见报道,本研究通过 TUNEL 检测直观地呈现出低温胁迫下对日本对虾细胞凋亡率,并通过检测低温胁迫对日本对虾抗氧化系统及凋亡通路的影响,从体内抗氧化酶活力、凋亡通路酶活力、脂质过氧化产物以及基因表达水平探讨了日本对虾对低温胁迫的生理应答反应,以期耐低温新品种的培育提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验所用日本对虾均取自中国水产科学研究院黄海水产研究所实验基地山东省昌邑市海丰水产养殖有限责任公司,湿体重为(14.24±1.12) g 的健康虾。对虾于 200 L 的 PVC 桶中暂养 3 d,暂养期间,持续

充氧,每天早晚投喂蛤蜊肉并更换 30%的水,以保持水质良好,保持水温为(28±2)℃、盐度为 30、pH=8.2。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 实验设计** 本实验使用冷水机(GRTE-HXB10N, 格瑞特节能设备有限公司)对日本对虾所生存的水域进行降温。设置 10℃ (不摄食温度)、16℃、22℃和 28℃(对照组) 4 个温度梯度,采用调节冷水机自动降温,使 4 个温度组均在 12 h 时由 28℃同时降至所设置的温度,每组 3 个平行,每个平行 20 尾虾。开始降温时的样品为 0 h 样品(对照组),在降至所设置 28℃、22℃、16℃和 10℃后,分别于 3、24、72 h 取部分虾的鳃和肝胰腺,分别放入 4%甲醛固定液中保存,最后进行 TUNEL 检测。剩余鳃和肝胰腺放入液氮中速冻,测定其酶活和基因表达。

**1.2.2 样品处理** 将鳃和肝胰腺加液氮研磨成粉末,取 50 mg 样品迅速转至已加入 1 mL TRIzol 的 1.5 mL 离心管中,于-80℃保存,用于总 RNA 提取;剩余样品,称取 1 g 组织(鳃和肝胰腺),加入 9 mL (pH 7.2)预冷的 PBS 缓冲液,用匀浆器将标本匀浆充分。离心(4℃, 2000 g, 20 min),收集上清液。分装 1 份用于组织抗氧化酶活测定,其余置于-80℃冰箱备用。

**1.2.3 酶活性的测定** 总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、Caspase-3 活性、还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量测定均根据试剂盒说明书进行(上海酶联生物科技有限公司)。

### 1.2.4 SOD 和 Caspase-3 基因的表达分析

**1.2.4.1 引物设计** 根据日本对虾 SOD 和 Caspase-3 基因 cDNA 序列,通过 Primer Premier 5.0 设计 Real-time PCR 扩增特异性引物,引物合成和 cDNA 序列测定委托上海生工生物工程有限公司完成,序列详见表 1。

表 1 本研究所用引物

Tab.1 Primers used in this study

基因 Gene	正向引物 Forward primer (5'~3')	反向引物 Reverse primer (5'~3')
SOD	TCAATCCTCTCCCACACA	CACAGACAGGCAGAGCAGT
Caspase-3	CTCTCACGACGCCTACAT	TTCCCTGTTGTTCTGTTT
$\beta$ -actin	TCCACGAGACCACATACAAC	CACTTCCTGAACGATTGA

**1.2.4.2 RNA 提取及 cDNA 合成** 按照 TRIzol 法提取总 RNA,使用核酸定量仪(Thermo Scientific)检测 RNA 含量和纯度,1%非变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。使用 M-MLV(AG)试剂盒进行反转录合成 cDNA 第一链,-20℃保存备用。

**1.2.4.3 实时定量 PCR 扩增** 采用 Real-time PCR

(SYBR Green)相对定量法,按照 SYBR Green Pro Taq HS II (AG)试剂盒说明书,在 ABI 7500 Fast 荧光定量 PCR 仪中进行扩增。反应体系为 10  $\mu$ L: 5.0  $\mu$ L SYBR Green Pro Taq HS premix (2 $\times$ ), 3.0  $\mu$ L RNA-free 水, 0.2  $\mu$ L Rox 参比染料,上、下游引物各 0.4  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L),模板 cDNA 1.0  $\mu$ L。每个样品设 3 个重

复,加完样品瞬时离心将液体集中在管底。反应程序:扩增曲线,95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 34 s,40个循环;熔解曲线,95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 SOD 和 Caspase-3 基因的相对表达量,使用 Origin Pro 2016 软件绘制柱状图。

**1.2.5 TUNEL 检测** 将固定在 4%甲醛固定液中的鳃和肝胰腺分别进行石蜡包埋,然后按照 4~5  $\mu\text{m}$  厚度进行连续切片。

将石蜡切片脱蜡至水,稍甩干后用蛋白酶 K 工作液覆盖组织,37℃ 孵育 25 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。切片稍甩干后用破膜工作液覆盖组织,室温孵育 20 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。采用 TUNEL 试剂盒(罗氏公司)内适量试剂 1 (TdT)和试剂 2 (dUTP)按 1:9 混合覆盖组织,切片平放于湿盒内,37℃ 恒温箱孵育 2 h,盒内加少量水保持湿度。孵育后的切片 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。甩干后滴加 DAPI 染液,避光室温孵育 10 min。PBS 洗涤 3 次,

每次 5 min。甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。切片于荧光显微镜下观察并采集图像。

**1.2.6 数据统计** 所得实验数据均用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和邓肯(Duncan's)多重比较, $P<0.05$ 为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 低温胁迫对日本对虾鳃和肝胰腺抗氧化系统影响

**2.1.1 低温胁迫对日本对虾 T-AOC 的影响** 如图 1 所示,低温组(10℃和 16℃)日本对虾鳃和肝胰腺 T-AOC 整体呈先降低后升高再降低的变化趋势,在 3 h 时达到最低点( $P<0.05$ ),然后逐渐升高,在 24 h 时达到最高点( $P<0.05$ ),在 72 h 时低于对照组( $P<0.05$ );22℃ 组鳃组织和肝胰腺 T-AOC 呈先升高再降低的变化趋势,分别在 3 h 和 72 h 达到最高点和最低点( $P<0.05$ )。

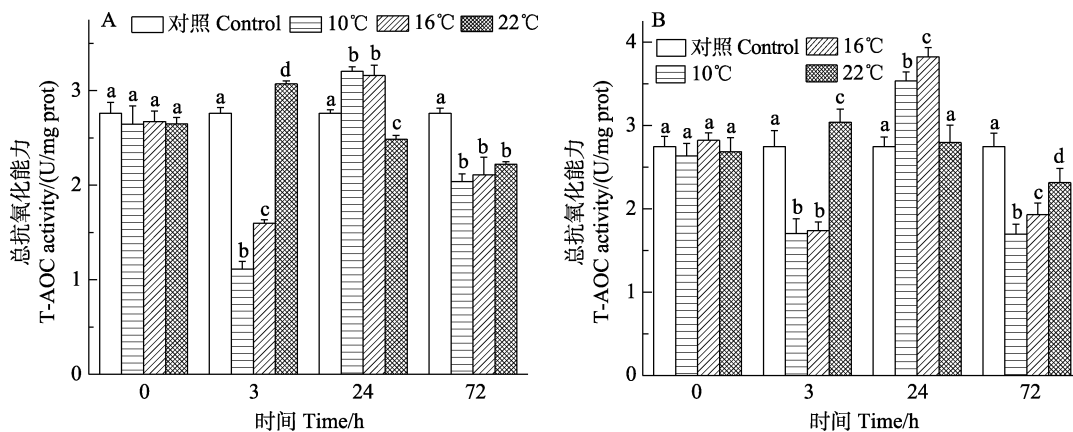


图 1 日本对虾鳃(A)和肝胰腺(B) T-AOC 随低温胁迫时间的变化

Fig.1 Changes of T-AOC in the gill (A) and hepatopancreas (B) of *M. japonicus* under low temperature stress

不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同

Different superscript indicated significant difference ( $P<0.05$ ). The same as below

**2.1.2 低温胁迫对日本对虾 SOD 的影响** 如图 2 所示,低温(10℃和 16℃)组日本对虾鳃和肝胰腺 SOD 活性整体呈先降低后升高再降低的变化趋势,在 3 h 时达到最低点( $P<0.05$ ),然后逐渐升高,在 24 h 时达到最高点( $P<0.05$ ),在 72 h 时低于对照组( $P<0.05$ );22℃ 组鳃组织和肝胰腺 SOD 活性呈先升高再降低的变化趋势,分别在 3 h 和 72 h 达到最高点和最低点( $P<0.05$ ),72 h 肝胰腺 22℃ 组 SOD 活性与对照组相比差异不显著。

**2.1.3 低温胁迫对日本对虾 GSH 的影响** 如图 3 所示,低温(10℃和 16℃)组日本对虾鳃和肝胰腺 GSH

含量整体呈先降低后升高再降低的变化趋势,在 3 h 时达到最低点( $P<0.05$ ),然后逐渐升高,在 24 h 时达到最高点( $P<0.05$ ),在 72 h 时低于对照组( $P<0.05$ );

22℃ 组鳃组织和肝胰腺 GSH 含量呈先升高再降低的变化趋势,在 3 h 和 72 h 达到最高点和最低点( $P<0.05$ )。

**2.1.4 低温胁迫对日本对虾 MDA 含量的影响** 如图 4 所示,3 个实验组 MDA 含量都呈上升趋势,在 72 h 达到最大值( $P<0.05$ )。低温组(10℃和 16℃)日本对虾鳃和肝胰腺 MDA 含量在各时间点变化趋势明显,且显著高于对照组( $P<0.05$ );22℃ 组各组织在 0 和 3 h MDA 含量与对照组相比差异均不显著。

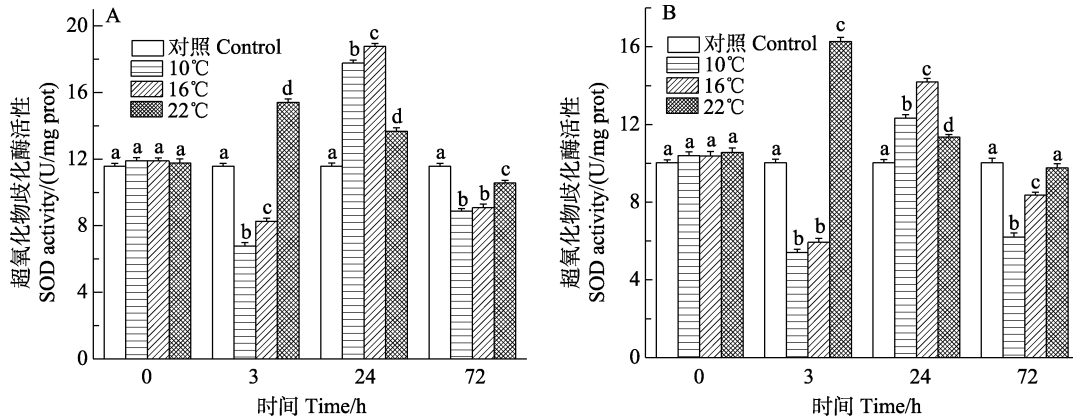


图2 日本对虾鳃(A)和肝胰腺(B) SOD 随低温胁迫时间的变化

Fig.2 Changes of SOD activity in the gill (A) and hepatopancreas (B) of *M. japonicus* under low temperature stress

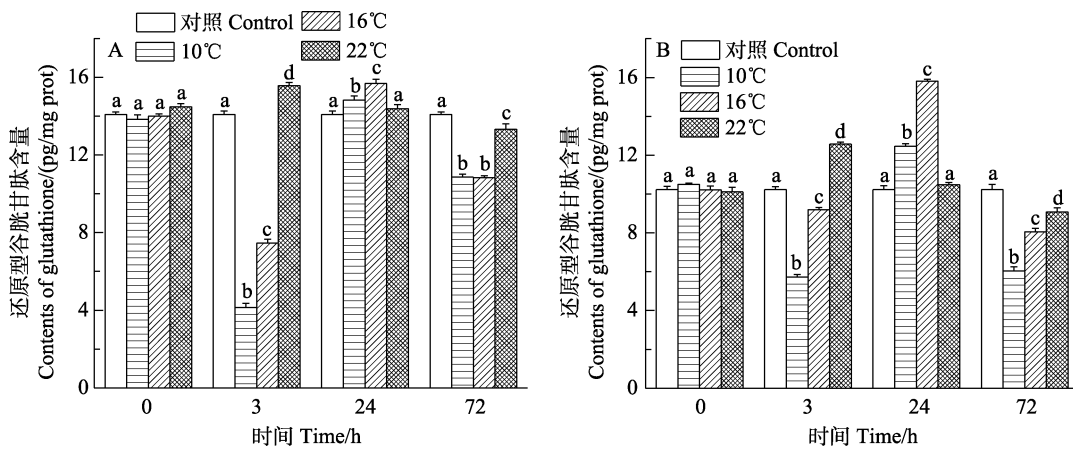


图3 日本对虾鳃(A)和肝胰腺(B) GSH 随低温胁迫时间的变化

Fig.3 Changes of GSH activity in the gill (A) and hepatopancreas (B) of *M. japonicus* under low temperature stress

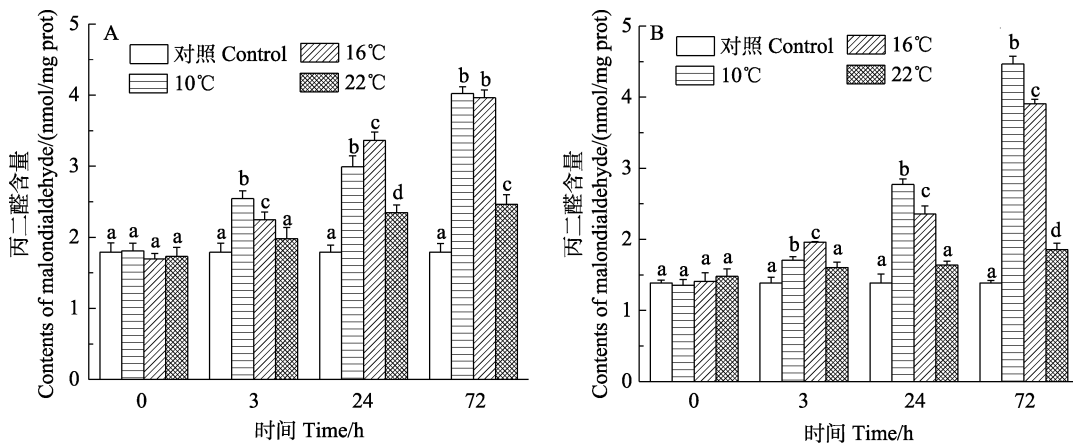


图4 日本对虾鳃(A)和肝胰腺(B) MDA 含量随低温胁迫时间的变化

Fig.4 Changes of MDA content in the gill (A) and hepatopancreas (B) of *M. japonicus* under low temperature stress

2.1.5 低温胁迫对日本对虾 Caspase-3 活性的影响

如图5所示,低温组(10°C和16°C)日本对虾鳃和肝胰腺 Caspase-3 活性变化呈上升趋势,72 h 达到峰值,在各时间点变化趋势明显,且显著高于对照组 ( $P < 0.05$ );22°C 鳃和肝胰腺 Caspase-3 活性变化呈上升

趋势,在72 h 达到峰值,与对照组相比差异不显著。

2.2 低温胁迫对 SOD 和 Caspase-3 表达量的影响

2.2.1 低温胁迫对日本对虾 SOD 基因相对表达量的影响 10°C 和 16°C 低温胁迫组日本对虾鳃和肝胰

腺 *SOD* 基因相对表达量呈先降低后上升再降低的变化趋势(图 6), 均在 24 h 达到峰值, 且显著高于对照组( $P<0.05$ ); 22℃实验组 *SOD* 基因相对表达量在各个时间点与对照组相比无显著差异。

**2.2.2 低温胁迫对日本对虾 *Caspase-3* 基因表达量的影响** 如图 7 所示, 10℃和 16℃低温胁迫组日本对虾鳃和肝胰腺 *Caspase-3* 基因相对表达量呈上升趋势, 72 h 达到峰值, 在各时间点均显著高于对照组( $P<0.05$ ); 22℃实验组 *Caspase-3* 基因相对表达量在各时间点均与对照组相比无显著差异。

**2.3 TUNEL 检测结果**

为了更直观地表现低温对日本对虾机体的影响, 取 10℃低温胁迫 3 h 和 72 h 的日本对虾鳃和肝胰腺进行 TUNEL 检测, 将室温 28℃水温中的日本对虾作为对照。分析发现, 对照组中只有少量凋亡细胞, 而随 10℃低温胁迫时间的增加, 凋亡细胞数量不断增加(图 8A、B)。图 8C、D 分别为鳃和肝胰腺细胞凋亡率统计结果, 其中, 鳃对照组、3 h 10℃组和 72 h 10℃组的细胞凋亡率分别为 2.03%、6.20%和 26.27%, 肝胰腺细胞凋亡率分别为 1.06%、25.65%和 42.33%。

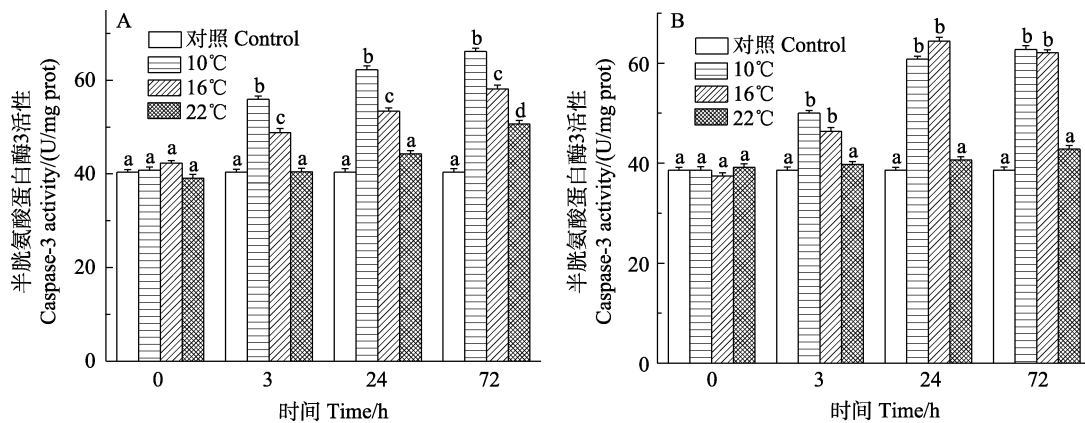


图 5 日本对虾鳃(A)和肝胰腺(B) Caspase-3 活力随低温胁迫时间的变化

Fig.5 Changes of Caspase-3 activity in the gill (A) and hepatopancreas (B) of *M. japonicus* under low temperature stress

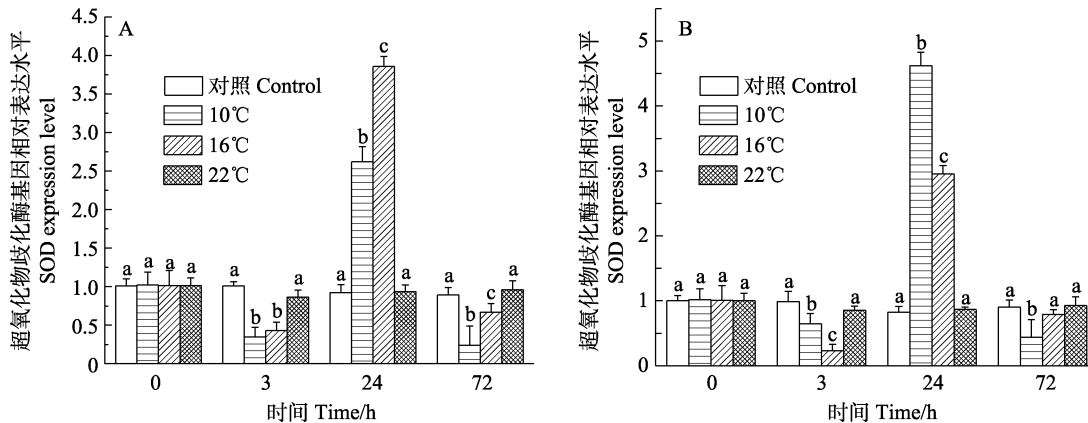


图 6 日本对虾鳃(A)和肝胰腺(B) *SOD* 基因相对表达水平随低温胁迫时间的变化

Fig.6 Relative expression of *SOD* gene in gill (A) and hepatopancreas (B) of *M. japonicus* under low temperature stress

**3 讨论**

温度是甲壳动物常见的非生物应激源, 几乎影响甲壳类所有生理生化过程(Huang *et al*, 2017)。例如, 对冷应激反应的热休克蛋白(Meng *et al*, 2019)、蜕皮和存活率都受到水温变化的影响(Hewitt *et al*, 2001)。环境因子(如低温、盐度和 pH 等)变化引发的生理效

应可能经由氧化还原途径实现(Assefa *et al*, 2005; Richier *et al*, 2006; Ryter *et al*, 2007), 即环境胁迫因子造成活性氧自由基大量积累(Lushchak *et al*, 2006), 从而影响抗氧化系统的功能。低温胁迫导致凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肝胰腺总抗氧化能力下降(吴萌, 2017)。冷应激可以抑制红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)的新陈代谢, 引起氧化损伤和免疫

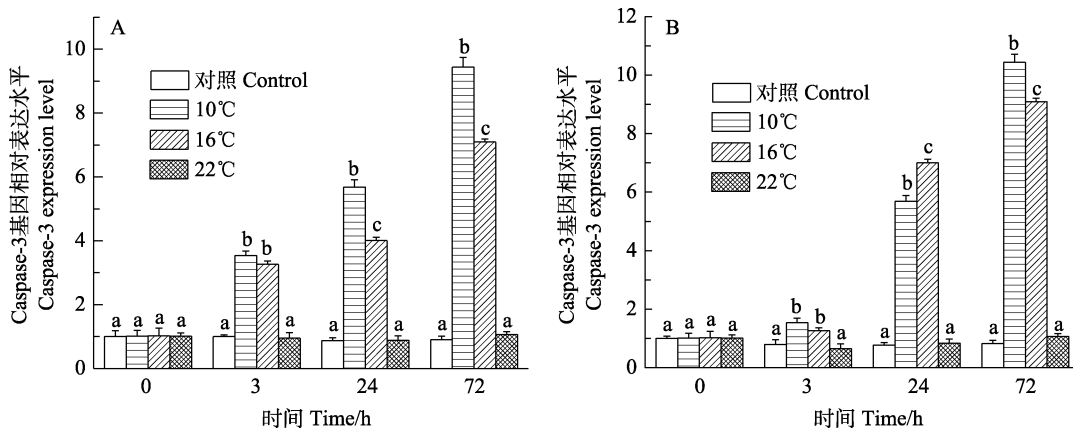


图 7 日本对虾鳃(A)和肝胰腺(B) Caspase-3 基因相对表达水平随低温胁迫时间的变化

Fig.7 Relative expression of Caspase-3 gene in gill (A) and hepatopancreas (B) of *M. japonicus* under low temperature stress

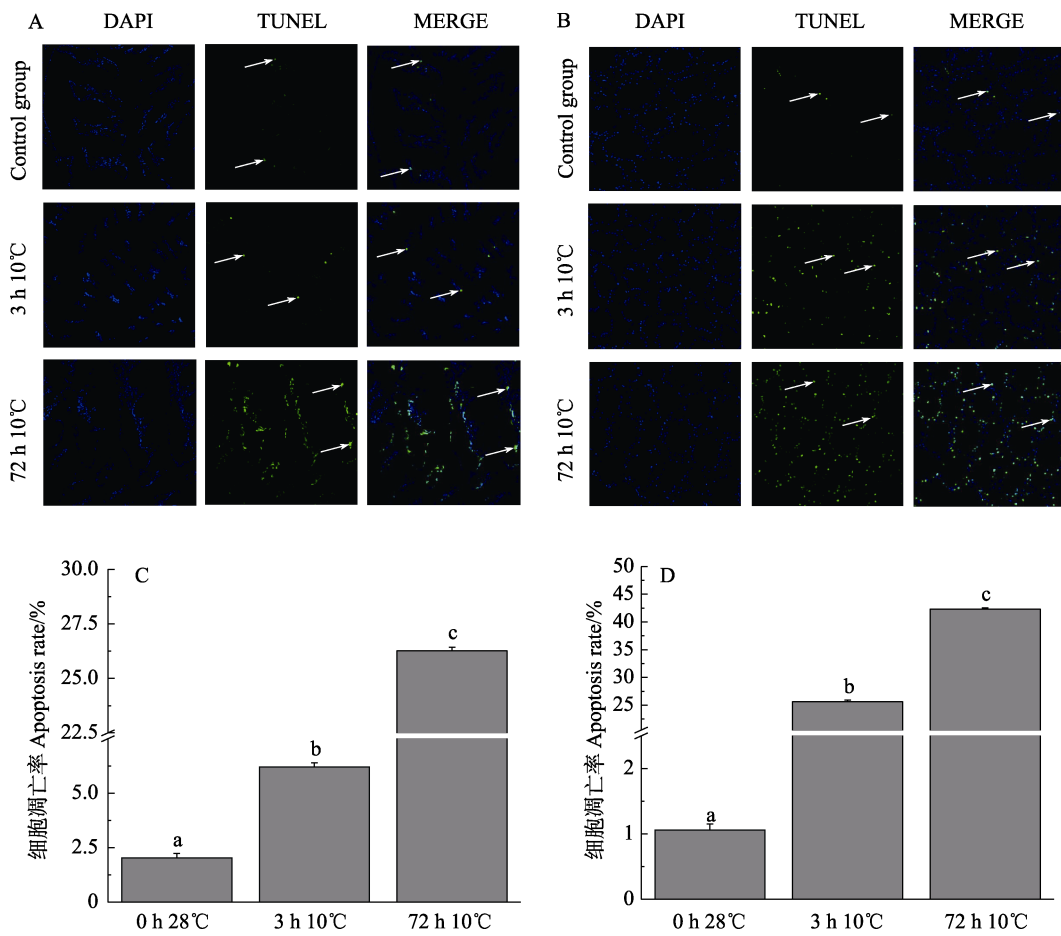


图 8 细胞凋亡检测结果

Fig.8 Cell apoptosis detection result

A: 鳃检测结果; B: 肝胰腺检测结果; C: 鳃统计结果; D: 肝胰腺统计结果

A: Gill detection result; B: Hepatopancreas detection result; C: Gill statistical results; D: Hepatopancreas statistical results

缺陷(Wu *et al*, 2019)。低温胁迫导致点篮子鱼(*Siganus guttatus*)幼鱼肝脏抗氧化酶活性下降(宋志明等, 2015)。岩扇贝(*Crassadoma gigantea*)在低温胁迫下,

T-AOC 显著下降(王潇等, 2018)。过量的活性氧也会影响 ATP 的产生, 破坏线粒体膜电位以及细胞电子传递链, 从而影响机体呼吸作用, 最终导致细胞凋亡

(Dandapat *et al.*, 2003; Ott *et al.*, 2007)。

### 3.1 低温胁迫对日本对虾抗氧化系统的影响

抗氧化系统由酶促体系及非酶类组成, 其中, 酶促体系包括过氧化物还原酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶等, 由抗氧化系统清除体内过量的活性氧, 保护机体不受氧化损伤(Mathew *et al.*, 2007; 陈梓聪等, 2020)。SOD 活性可以反映机体清除氧自由基的能力(李彦等, 2008)。GSH 能将脂质过氧化物还原成醇, 减少脂类被氧化的机率及 MDA 对细胞的损伤(李勇等, 2008)。本研究中, 低温胁迫 3 h 后, 日本对虾鳃和肝胰腺 T-AOC、SOD 活力和 GSH 含量下降, 可能是组织中抗氧化酶活性储备减弱。随着胁迫时间的延长, 各指标基本在 24 h 达到峰值, 说明低温胁迫导致机体中的活性氧自由基大量增加, 进而启动日本对虾抗氧化系统, 生成大量 SOD, 以清除体内多余的活性氧。这与 Stebbing (1982)提出的“毒物兴奋效应”相似。胁迫后期, 日本对虾 T-AOC、SOD 活性、GSH 含量下降, 可能是长时间低温胁迫打破了体内平衡, 导致肝胰腺受到损伤而不能及时恢复, 这与张德康等(2020)的研究结果相似。而 22℃组实验结果与低温组相反, 在 3 h 达到峰值, 随后逐渐下降, 接近对照组, 28℃为日本对虾最适生长温度, 22℃虽然不属于其最适生长温度, 但也处于日本对虾可生长温度范围内, 当水温由 28℃降至 22℃时, 日本对虾可以通过提高 SOD 活性来应对低温应激反应对虾体的影响; 但当水温降至 10℃和 16℃时, 虾体抗氧化酶活性受到显著抑制, 使得低温组 SOD 活性显著低于 22℃组, 而随着时间的延长, 抗氧化能力最终不如对照组, 各项指标逐渐下降, 这与管敏等(2018)的研究结果相似。

MDA 是一种脂质过氧化产物, 可以反映机体脂质过氧化速率和强度, 也能间接反映组织过氧化损伤程度(刘晓华等, 2007)。低温组日本对虾鳃和肝胰腺中 MDA 含量随胁迫时间的延长大幅增加, 且显著高于对照组, 这与孙学亮等(2010)的研究结果基本一致。MDA 主要在肝胰腺中分解, 随着胁迫时间的延长, 肝胰腺中 MDA 含量不断增加(王奇等, 2010), 这也表明低温胁迫下, MDA 的增加可能是低温对日本对虾机体产生危害的主要原因之一。TUNEL 检测也证明低温胁迫确实对鳃和肝胰腺产生损伤, 造成细胞凋亡。

### 3.2 低温胁迫对日本对虾细胞凋亡的影响

Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用, 而 Caspase-3 作为关键的执行分子, 它

在凋亡信号传导途径中发挥主导功能, 因此, 细胞或组织中 Caspase-3 基因的表达量是检测细胞是否发生凋亡的重要方法(Zvereva *et al.*, 2003)。本研究中, 低温胁迫后, 鳃和肝胰腺中 Caspase-3 基因的相对表达量随胁迫时间的增加而不断上升, 显著高于对照组, 并且 Caspase-3 活性随胁迫时间的延长显著升高, 说明低温胁迫激活细胞凋亡的执行因子—Caspase-3, 进而引发细胞凋亡。这与贾旭颖等(2014)报道的温度突变后凡纳滨对虾 Caspase-3 活性显著升高的结果相似。生物体受到逆境胁迫时, 体内活性氧代谢的平衡被打破, 如不及时消除就会造成生物体活性氧伤害(West, 2000), 同时, 会导致细胞组分变成异物或者机体生物合成机制被破坏, 进而诱发细胞凋亡的发生。推测是低温胁迫过程细胞不断受到氧化损伤, 进而诱导细胞凋亡。

组织动力学研究表明, 如果只能观察到少量的凋亡细胞, 就意味着有大量的凋亡细胞已经被清除。一旦这种识别机制受损, 凋亡细胞不能被吞噬细胞及时清除, 就会导致凋亡细胞大量积累, 最终引起组织结构和功能的损害(彭黎明, 1999)。本研究中, 低温胁迫后, 日本对虾鳃和肝胰腺中的凋亡细胞数量随低温胁迫时间的延续而大幅度增加, 可能是低温胁迫导致上述组织动力学研究中的识别机制受损, 进而导致凋亡细胞不能及时清除, 在组织内不断积累。

## 4 结论

低温(10℃和 16℃)胁迫能影响日本对虾抗氧化酶、细胞凋亡酶活力及其基因表达水平, 导致脂质过氧化产物 MDA 含量的增加, 最终诱导细胞凋亡, 并表现出一定的时间量效关系。低温胁迫前期能诱导机体抗氧化酶活力增加, 进而促进机体清除过多的活性氧自由基, 短期内表现出积极的作用, 但随胁迫时间的延长, 低温抑制了抗氧化系统, 导致脂质过氧化加剧, 细胞凋亡率大幅增加, 最终造成各组织器官受损。因此, 在实际养殖过程中, 要尽量避免日本对虾长期处于 16℃以下低温环境中。

## 参 考 文 献

- ASSEFA Z, AN V L, GARMYN M, *et al.* Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes: On the role of cytosolic factors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, 1755(2): 90–106
- CHEN Z C, CHEN P M, YUAN H R, *et al.* Effect of recovery time on antioxidant capacity of juvenile *Penaeus*

- monodon* after exhaustive exercise. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 41(6): 58–65 [陈梓聪, 陈丕茂, 袁华荣, 等. 恢复时间对力竭训练后的斑节对虾幼虾的抗氧化功能的影响. *渔业科学进展*, 2020, 41(6): 58–65]
- DANDAPAT J, CHAINY G B N, RAO K J. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2003, 135(3): 221–233
- DONG Z M, WANG J, GAO S, *et al.* Apoptosis in the regeneration of animal. *Journal of Henan Normal University (Natural Science)*, 2020, 48(2): 87–93 [董自梅, 王静, 高帅, 等. 细胞凋亡与动物再生. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2020, 48(2): 87–93]
- GUAN M, ZHANG H B, WANG L, *et al.* The effects of acute low temperature stress on antioxidative and immune indices of juvenile Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(6): 17–22 [管敏, 张厚本, 王龙, 等. 急性低温胁迫对史氏鲟幼鱼抗氧化和免疫指标的影响. *淡水渔业*, 2018, 48(6): 17–22]
- HEWITT D R, DUNCAN P F. Effect of high water temperature on the survival, moulting and food consumption of *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* (Bate, 1888). *Aquaculture Research*, 2001, 32(4): 305–313
- HUANG W, REN C, LI H, *et al.* Transcriptomic analyses on muscle tissues of *Litopenaeus vannamei* provide the first profile insight into the response to low temperature stress. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178604
- JIA X Y, ZHANG D, LU Y L, *et al.* Effects of abrupt change in temperature and non-ionic ammonia on the cyt-C and caspase-3 of *Litopenaeus vannamei* in freshwater. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 700–710 [贾旭颖, 张丹, 路允良, 等. 温度突变和非离子氨胁迫对淡水养殖凡纳滨对虾 cyt-C 和 caspase-3 的影响. *中国水产科学*, 2014, 21(4): 700–710]
- JIANG S, ZHOU F L, YANG Q B, *et al.* Impact of temperature stress on oxygen and energy metabolism in the hepatopancreas of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Pakistan Journal of Zoology*, 2019, 51(1): 141–148
- LI F C, GONG C G, SU L. Low temperature resistance test of *Marsupenaeus japonicus*. *Reservoir Fisheries*, 2006, 26(4): 35–48 [李凤晨, 宫春光, 苏利. 日本对虾耐低温试验. *水利渔业*, 2006, 26(4): 35–48]
- LI J J, DU Y, PANG P, *et al.* Lymphocyte apoptosis in PCV2-infected piglets was detected by TUNEL assay. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2017(5): 7–9 [李进军, 杜耀, 庞培, 等. TUNEL 法检测 PCV2 感染仔猪的淋巴细胞凋亡. *上海畜牧兽医通讯*, 2017(5): 7–9]
- LI Y, KONG L Q, GAO H, *et al.* Progress on free radical and diseases. *Progress in Veterinary Medicine*, 2008, 29(4): 85–88 [李勇, 孔令青, 高洪, 等. 自由基与疾病研究进展. *动物医学进展*, 2008, 29(4): 85–88]
- LI Y, YANG Z B, YANG W R, *et al.* Effects of different supplemental levels of vitamin A and vitamin E in diets on antioxidation and immune performance in broilers. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2008, 20(4): 417–422 [李彦, 杨在宾, 杨维仁, 等. 日粮维生素 A 和维生素 E 水平对肉鸡抗氧化和免疫性能的影响. *动物营养学报*, 2008, 20(4): 417–422]
- LIU X H, CAO J M, YANG D W, *et al.* Distribution of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in the tissues of *Litopenaeus vannamei* before and after ammonia nitrogen stress. *Reservoir Fisheries*, 2007, 27(6): 24–26 [刘晓华, 曹俊明, 杨大伟, 等. 氨氮胁迫前后凡纳滨对虾组织中抗氧化酶和脂质过氧化产物的分布. *水利渔业*, 2007, 27(6): 24–26]
- LUSHCHAK V I, BAGNYUKOVA T V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. I. Indices of oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2006, 143(1): 30–35
- MATHEW S, KUMAR K A, ANANDAN R, *et al.* Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2007, 145(3): 315–320
- MENG X H, DONG L J, SHI X L, *et al.* Screening of the candidate genes related to low-temperature tolerance of *Fenneropenaeus chinensis* based on high-throughput transcriptome sequencing. *PLoS One*, 2019, 14(4): e0211182
- OTT M, GOGVADZE V, ORRENIUS S, *et al.* Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 2007, 12(5): 913–922
- PENG L M. Recognition and phagocytosis of apoptotic cells by phagocytes. *Chinese Journal of Pathology*, 1999, 28(4): 304–306 [彭黎明. 吞噬细胞对凋亡细胞的识别与吞噬. *中华病理学杂志*, 1999, 28(4): 304–306]
- RICHER S, SABOURAULT C, COURTIADÉ J, *et al.* Oxidative stress and apoptotic events during thermal stress in the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*. *FEBS Journal*, 2010, 273(18): 4186–4198
- RYTER S W, KIM H P, HOETZEL A, *et al.* Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2007, 9(1): 49–89
- SCATENA R, BOTTONI P, BOTTA G, *et al.* The role of mitochondria in pharmacotoxicology: A reevaluation of an old, newly emerging topic. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*, 2007, 293(1): 12–21



- SONG X H, MAO Y, DONG H B, *et al.* The thermotolerance of the two morphologically similar varieties of juvenile kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(1): 84–90 [宋晓红, 毛勇, 董宏标, 等. 两种形态变异类型日本囊对虾稚虾高温耐受性的比较. *水产学报*, 2014, 38(1): 84–90]
- SONG Z M, LIU J Y, ZHUANG P. Influence of low-temperature stress on the antioxidant enzymes activities and malondialdehyde contents in liver of juvenile *Siganus guttatus*. *Marine Fisheries*, 2015, 37(2): 142–150 [宋志明, 刘鉴毅, 庄平. 低温胁迫对点篮子鱼幼鱼肝脏抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响. *海洋渔业*, 2015, 37(2): 142–150]
- STEBBING A R D. Hormesis: The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of the Total Environment*, 1982, 22(3): 213–234
- SUN X L, XING K Z, CHEN C X, *et al.* The effects of acute temperature stress on blood parameters in half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fisheries Science*, 2010, 29(7): 387–392 [孙学亮, 邢克智, 陈成勋, 等. 急性温度胁迫对半滑舌鳎血液指标的影响. *水产科学*, 2010, 29(7): 387–392]
- WANG Q, FAN C P, CHEN K C, *et al.* Effects of three kinds of sulfa drugs on the glutathione transferase (GST) and malondialdehyde (MDA) in the liver tissues of tilapia. *Ecological and Environmental Sciences*, 2010, 19(5): 1014–1019 [王奇, 范灿鹏, 陈锬慈, 等. 三种磺胺类药物对罗非鱼肝脏组织中谷胱甘肽转移酶(GST)和丙二醛(MDA)的影响. *生态环境学报*, 2010, 19(5): 1014–1019]
- WANG X, CAO S M, LIU G, *et al.* Effects of temperature on keeping-alive without water and antioxidant enzyme of the rock scallop *Crassadoma gigantea*. *Marine Science Bulletin*, 2018, 20(1): 1–20 [王潇, 曹善茂, 刘钢, 等. 温度对岩扇贝无水保活及抗氧化酶活力的影响. *海洋通报(英文版)*, 2018, 20(1): 1–20]
- WANG Y N, HU S M, TUERDI M, *et al.* Initiator and executioner caspases in salivary gland apoptosis of *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Parasites and Vectors*, 2020, 13(1): 288
- WEST I C. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Medicine*, 2000, 17(3): 171–180
- WU D L, HUANG Y H, CHEN Q, *et al.* Effects and transcriptional responses in the hepatopancreas of red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* under cold stress. *Journal of Thermal Biology*, 2019, 85(1): 102404
- WU M. Effect of low temperature stress on respiratory performance and antioxidant capacity of *Litopenaeus vannamei*. Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2017 [吴萌. 低温胁迫对凡纳滨对虾呼吸性能及抗氧化能力的影响. 华中农业大学硕士研究生学位论文, 2017]
- ZHANG D K, GAO J C, WANG Y Y, *et al.* Influences of low temperature stress on antioxidant status and expression of stress-related genes of American shad, *Alosa sapidissima*. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2020, 173(2): 146–153 [张德康, 高建操, 王裕玉, 等. 低温胁迫对美洲鲥抗氧化状态及应激相关基因表达的影响. *海洋湖沼通报*, 2020, 173(2): 146–153]
- ZHAO X Y, LI J, LI J T, *et al.* Effects of pH stress on non-specific immune factors and RNA/DNA ratio of *Marsupenaeus japonicus*. *Progress in Fishery Sciences*, 2011, 32(1): 60–66 [赵先银, 李健, 李吉涛, 等. pH胁迫对日本对虾非特异性免疫因子及RNA/DNA比值的影响. *渔业科学进展*, 2011, 32(1): 60–66]
- ZVEREVA E, SEREBROV V, GLUPOV V, *et al.* Activity and heavy metal resistance of non-specific esterases in leaf beetle *Chrysomela lapponica* from polluted and unpolluted habitats. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Toxicology and Pharmacology*, 2003, 135(4): 383–391

(编辑 冯小花)

## Effect of Low Temperature Stress on Antioxidant System and Apoptosis of *Marsupenaeus japonicus*

YU Zhenxing<sup>1,2</sup>, REN Xianyun<sup>2,3</sup>, SHAO Huixin<sup>1,2</sup>, LIU Ping<sup>2,3</sup><sup>①</sup>, LI Jian<sup>2,3</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao, Shandong 266071, China; 3. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

**Abstract** *Marsupenaeus japonicus* is an important cultured species of marine shrimp in China. Its characteristics include a varied diet, fast growth, and tolerating periods out of water, as well as being suitable for live shrimp marketing and long-distance transportation. The suitable growth temperature of *M. japonicus* is 23°C~32°C. The culture cycle of *M. japonicus* is seriously affected by low winter temperatures in northern China, which increases the costs of parent shrimp overwintering. Therefore, it is necessary to breed new varieties with low temperature tolerances. *M. japonicus* was exposed to water at 10°C, 16°C, and 22°C for 72 h, with *M. japonicus* exposed to water at 28°C used as the control group. The results showed that the total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD) enzyme activity, and GSH content in the gill and hepatopancreas decreased first, then increased and then decreased, while the MDA content and caspase-3 enzyme activity increased over time. The relative expression of the *SOD* and *Caspase-3* genes decreased first, then increased, then decreased, and continued to increase, which was similar to their corresponding changes in enzyme activity. In order to prove that low temperature stress caused damage to the body of *M. japonicus*, a TUNEL test was performed. It was found that the apoptosis rate increased significantly with the extension of the stress time. The apoptotic rates of the gill control group, 3 h at 10°C, and 72 h at 10°C were 2.03%, 6.20%, and 26.27%, respectively. The apoptotic rates of the hepatopancreas cells were 1.06%, 25.65%, and 42.33% for these exposure times, respectively. In conclusion, low temperature stress reduced the antioxidant capacity of *M. japonicus*, destroyed the original balance of the internal environment, and then led to oxidative damage. In this study, the changes in cell apoptosis and the antioxidant status of *M. japonicus* under low temperature conditions provided data that support the need to cultivate new varieties with low temperature tolerances.

**Key words** *Marsupenaeus japonicus*; Low temperature stress; T-AOC; Apoptotic; TUNEL

① Corresponding author: LIU Ping, E-mail: liuping@ysfri.ac.cn