

高密度和高盐度对缢蛏渗透调节和抗氧化水平的影响

陶亮, 王艺臻, 陈宇宽, 陈义华, 牛东红

Effects of high density and high salinity on osmotic regulation and antioxidant level of *Sinonovacula constricta*

TAO Liang, WANG Yizhen, CHEN Yukuan, CHEN Yihua, NIU Donghong

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20211203666>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

高盐对缢蛏生长存活、 Na^+/K^+ -ATPase活性及能量代谢相关指标的影响

Effects of high salinity on growth and survival, Na^+/K^+ -ATPase activity and energy metabolism related indexes of razor clam *Sinonovacula constricta*

上海海洋大学学报. 2022, 31(4): 831 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210303356>

急性低盐度对缢蛏存活率、 Na^+/K^+ -ATPase活性以及血淋巴细胞吞噬能力的影响

Effects of acute low salinity on *Sinonovacula constricta* survival rate, Na^+/K^+ -ATPase activity and phagocytosis of hemocytes

上海海洋大学学报. 2020, 29(4): 489 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190802771>

缢蛏扰动及排氨作用对上覆水氮营养盐含量和通量的影响

Effects of *Sinonovacula constricta* bioturbation and ammonia excretion on the content and flux of nitrogen nutrients in overlying water

上海海洋大学学报. 2021, 30(1): 113 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191002828>

水解单宁对副溶血弧菌感染凡纳滨对虾血液及血细胞免疫指标的影响

Effect of Hydrolyzable Tannins on Hemolymph and Cellular Immunological Responses of *Litopenaeus vannamei* Challenged by *Vibrio parahaemolyticus*

上海海洋大学学报. 2021, 41(3): 12 <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-9159.2021.03.002>

缢蛏在急性温度胁迫下的氧化应激响应及生理代谢变化

Study on oxidative stress response and physiological metabolism of *Sinonovacula constricta* under acute temperature stress

上海海洋大学学报. 2021, 30(2): 214 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191102847>

文章编号: 1674-5566(2023)02-0275-08

DOI:10.12024/jsou.20211203666

高密度和高盐度对缢蛏渗透调节和抗氧化水平的影响

陶亮¹, 王艺臻¹, 陈宇宽¹, 陈义华¹, 牛东红^{1,2}

(1. 上海海洋大学 上海市水产动物良种创制与绿色养殖协同创新中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产种质资源开发与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 以缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 为实验对象, 研究密度 (60 和 120 粒/m²) 和盐度 (20 和 30) 对缢蛏渗透调节和抗氧化水平的影响, 实验持续 72 h, 检测了缢蛏血淋巴 Na⁺ 浓度和 K⁺ 浓度, 肝胰腺组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量, 以及鳃组织中 Na⁺/K⁺-ATPase 活性、钠氢逆向转运蛋白 (Na⁺/H⁺ antiporter) 和膜泡质子泵 (V-ATPase) 基因表达水平。结果显示: 密度和盐度对缢蛏血淋巴 Na⁺ 浓度、K⁺ 浓度无显著交互影响作用, 高盐组 Na⁺ 浓度、K⁺ 浓度显著高于对照组; 在实验 12 h 和 24 h 时, 密度和盐度对 Na⁺/K⁺-ATPase 活性的影响具有显著交互作用, 并且高盐度组和高密度组 Na⁺/K⁺-ATPase 活性均显著高于对照组; 在各时间点, 各实验组 SOD 活性和 MDA 含量显著高于对照组, 且密度和盐度对 SOD 活性和 MDA 含量均有显著的交互作用; 高盐度组和高密度组 Na⁺/H⁺ antiporter 基因和 V-ATPase 基因的表达均显著高于对照组。由此可见, 高密度和高盐度对缢蛏的渗透调节能力和抗氧化水平具有显著交互作用, 研究结果对进一步探究海水贝类对密度和盐度变化的响应机制提供了理论参考。

关键词: 缢蛏; 密度; 盐度; 离子浓度; 抗氧化水平; 渗透调节

中图分类号: S 968.31

文献标志码: A

海水贝类按盐度耐受性可分为广盐性和狭盐性贝类, 而大多数河口滩涂贝类都具有一定耐盐能力^[1]。盐度是影响海洋动物生长和生存的重要因素^[2], 当盐度变化超出海洋动物的适宜范围时, 需要消耗自身能量进行渗透调节以维持机体渗透压的稳定^[3]。渗透调节的能量转换机制涉及水和离子交换的生物膜和耦合的离子和穿过上皮的水通量^[4]。鳃是海洋双壳贝类进行渗透调节的主要器官之一, 能够吸收或分泌各种离子, 以调节体内的离子浓度, 高盐环境会导致动物体内过量盐分的持续被动增加和水分流失, 多余的盐主要通过鳃中特殊的富含线粒体的细胞排出, 而这些细胞中含有丰富的膜泡质子泵 (V-ATPase)、钠钾泵 (Na⁺/K⁺-ATPase) 等, 在离子转运过程中起重要作用^[5-6]。

密度也是影响海洋生物生长和生存的重要因素。养殖密度是决定水产养殖产量的关键因

素之一, 同时水产养殖集约化也导致病害问题的增加^[7-8]。过度拥挤不仅会影响养殖动物的生长率^[9]和大小规格的均匀性^[10], 而且会对其非表现的生理性状造成负面影响, 如影响其肉质^[11]、激素水平^[12]、代谢水平^[13]和免疫系统^[14]。

缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 是我国重要的经济养殖贝类, 密度和盐度是养殖过程中的重要因子。目前密度或盐度单因子对缢蛏的影响主要集中在对其生长生理变化及最适密度、盐度的探索上, 盐度过高或过低均会引起缢蛏 Na⁺/K⁺-ATPase 活性的升高, 另外缢蛏在高密度的养殖环境中, 生长率显著下降^[15-17], 但还未见密度和盐度双因子条件下的互作效应。本研究探究了密度与盐度双因子对缢蛏渗透调节能力以及抗氧化水平的影响, 对进一步研究养殖条件对缢蛏生理和免疫影响提供了理论参考。

收稿日期: 2021-12-30

修回日期: 2022-10-15

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0900400); 国家自然科学基金 (31472278)

作者简介: 陶亮 (1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为贝类种质资源遗传育种。E-mail: 522770101@qq.com

通信作者: 牛东红, E-mail: dhniu@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用缢蛏为浙江省台州市三门县本地群体,挑选规格均匀,体色正常,壳质完好无损,体质健康的个体,平均体长为(3.30 ± 0.35) cm。

1.2 方法

1.2.1 对缢蛏的采集与处理

实验设置2个密度组:对照组(60粒/m²)和高密度组(120粒/m²)与2个盐度组:对照组(20)和高盐组(30),共4个处理组,分别记为A(60粒/m²、盐度20)、B(60粒/m²、盐度30)、C(120粒/m²、盐度20)、D(120粒/m²、盐度30),其中A组为对照组,每组设置3个重复。实验开始后,将缢蛏直接由暂养条件转入各实验处理密度和盐度环境中,实验期间不喂食,保持水温为20~22℃,且连续充气,每天换水50%,并去除动物排泄物。分别在第6、12、24、48、72小时进行血淋巴、鳃和肝胰腺的取样,每个重复组中分别取3只缢蛏进行采样,进行血淋巴Na⁺、K⁺浓度的测定、鳃Na⁺/K⁺-ATPase活性的测定、肝胰腺SOD活性和MDA含量的测定以及Na⁺/H⁺ antiporter基因和V-ATPase基因在鳃组织中的表达量测定。

1.2.2 血淋巴液Na⁺、K⁺浓度的测定

在缢蛏围心腔处取血淋巴,置于1.5 mL离心管中。100 μL血淋巴液加入900 μL无水乙醇,充分混匀,10 000 r/min,4℃,离心10 min,取上清液待测血钠浓度。50 μL血淋巴液加入450 μL血钾浓度测定工作液,充分混匀后室温(25℃左右),8 000 r/min,离心10 min,取上清液待测血钾浓度。按照索莱宝血钠浓度检测试剂盒和血钾浓度检测试剂盒说明书操作(北京索莱宝科技有限公司)进行缢蛏在胁迫后血淋巴Na⁺、K⁺浓

度的检测。

1.2.3 鳃Na⁺/K⁺-ATPase活性的测定

鳃组织样品匀浆,8 000 × g,4℃离心10 min,取上清液,按照索莱宝Na⁺/K⁺-ATPase活性检测试剂盒说明书操作(北京索莱宝科技有限公司),规定每小时每毫克组织蛋白中Na⁺/K⁺-ATPase分解ATP产生1 μmol无机磷的量为1个酶活力单位。

1.2.4 肝胰腺SOD活性和MDA含量的测定

肝胰腺组织样品匀浆,8 000 × g,4℃离心10 min,取上清液,按索莱宝SOD活性和MDA含量检测试剂盒说明书操作(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2.5 Na⁺/H⁺ antiporter基因和V-ATPase基因的表达

Trizol法提取鳃组织总RNA,使用TaKaRa Prime Script^{RT} reagent Kit反转录成cDNA,产物于-20℃冰箱中保存备用。Na⁺/H⁺ antiporter基因和V-ATPase基因序列来自于缢蛏转录组文库,利用Primer Premier 5.0软件设计引物Na⁺/H⁺ antiporter-F和Na⁺/H⁺ antiporter-R、V-ATPase-F和V-ATPase-R,采用cDNA 1.6 μL,2 × SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa,日本)10 μL,每个引物0.8 μL(10 μmol/L)和ddH₂O 6.8 μL。实时荧光定量PCR反应结果采用2^{-ΔΔC_t}法进行比较分析。

1.3 数据处理

实验数据使用IBM SPSS Statistics 26进行双因素方差分析(Two-Way ANOVA),若出现显著交互作用,则固定其中1个因素做单因素方差分析(One-Way ANOVA),多重比较进行各组间测量指标的差异显著性检验,以P < 0.05为差异显著。使用SIGMAPLOT 12.3软件作图。

表1 实验所用的引物及序列

Tab.1 Primers and the sequences used in the experiment

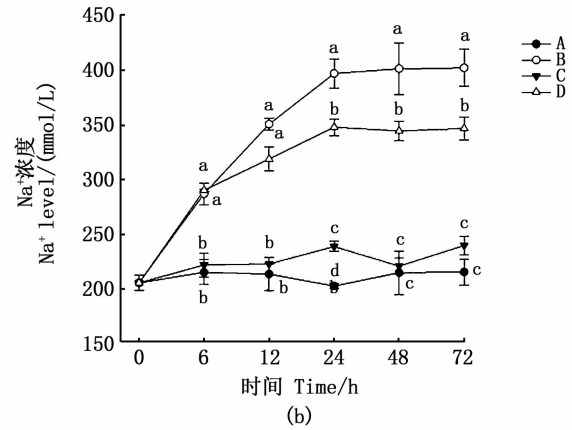
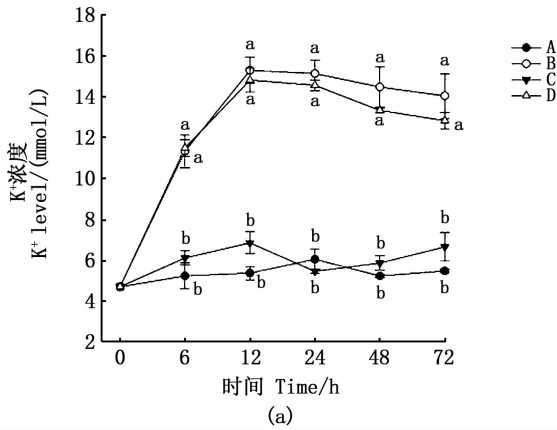
引物 Primer	引物序列(5'-3')Primer sequence(5'-3')	用途 Usage
Na ⁺ /H ⁺ antiporter-F	GCTACGGTCTCAACAAAG	qRT-PCR
Na ⁺ /H ⁺ antiporter-R	CCAGTGACAGTTCATAGACGA	qRT-PCR
V-ATPase-F	TACCTACGAATCTTGCCCC	qRT-PCR
V-ATPase-R	ACGGGGATGATGTTACGC	qRT-PCR
18S-F	TCGGTCTATTGCGTTGGTTTT	内参
18S-R	CAGTTGGCATCGTTTATGGTCA	内参

2 结果与分析

2.1 盐度和密度对缢蛏血淋巴离子浓度的影响

双因素方差分析密度和盐度对缢蛏血淋巴 K^+ 浓度的影响,结果显示,密度和盐度对缢蛏血淋巴 K^+ 浓度无交互影响作用($P > 0.05$)。密度一定时,不同盐度组之间差异显著,A 组(对照

组)和 C 组缢蛏的血淋巴 K^+ 浓度始终处于稳定,B 组和 D 组血淋巴 K^+ 浓度呈逐渐升高趋势,在第 12 小时达到最高并随后趋于平稳。盐度一定时,A 组和 C 组、B 组和 D 组之间无显著差异($P > 0.05$)。在 72 h 时,B 组 K^+ 浓度比 A 组增加了 155.9%,D 组比 C 组增加了 133.8%。见图 1(a)。



相同小写字母表示差异不显著($P > 0.05$),不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);A(60 粒/ m^2 、盐度 20)、B(60 粒/ m^2 、盐度 30)、C(120 粒/ m^2 、盐度 20)、D(120 粒/ m^2 、盐度 30)。

Values marked with the same lowercase letter mean no significant difference ($P > 0.05$), while with different lowercase letter mean significant difference ($P < 0.05$); A (60 individuals/ m^2 , salinity 20), B (60 individuals/ m^2 , salinity 30), C (120 individuals/ m^2 , salinity 20), D (120 individuals/ m^2 , salinity 30).

图 1 不同密度和盐度对缢蛏血淋巴 K^+ 浓度和 Na^+ 浓度的影响

Fig. 1 Effects of different density and salinity on K^+ and Na^+ levels in hemolymph of *S. constricta*

双因素方差分析密度和盐度对缢蛏血淋巴 Na^+ 浓度的影响,结果显示,密度和盐度对缢蛏血淋巴 Na^+ 浓度无显著交互作用($P > 0.05$)。密度一定时,不同盐度组之间差异显著,A 组(对照组)和 C 组缢蛏的血淋巴 Na^+ 浓度始终处于平稳,B 组和 D 组的 Na^+ 浓度呈逐渐升高的趋势,在第 24 小时达到最高,并随后逐渐趋于稳定。盐度一定时,同为盐度 30 环境下,B 组 Na^+ 浓度高于 D 组。盐度 20 环境下,A 组和 C 组无显著差异。在 72 h 时,B 组 Na^+ 浓度比 A 组增加了 96.1%,D 组比 C 组增加了 69.1%。见图 1(b)。

2.2 盐度和密度对缢蛏 Na^+/K^+ -ATPase 和抗氧化水平的影响

以 A 组为对照组, Na^+/K^+ -ATPase 活性变化在 B 组和 D 组中呈先升高后下降的趋势,且都在 24 h 达到最大值,而在 C 组中呈现整体下降趋势[图 2(a)]。双因素方差分析结果显示:密度和盐度对 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响在 12 h 和 24

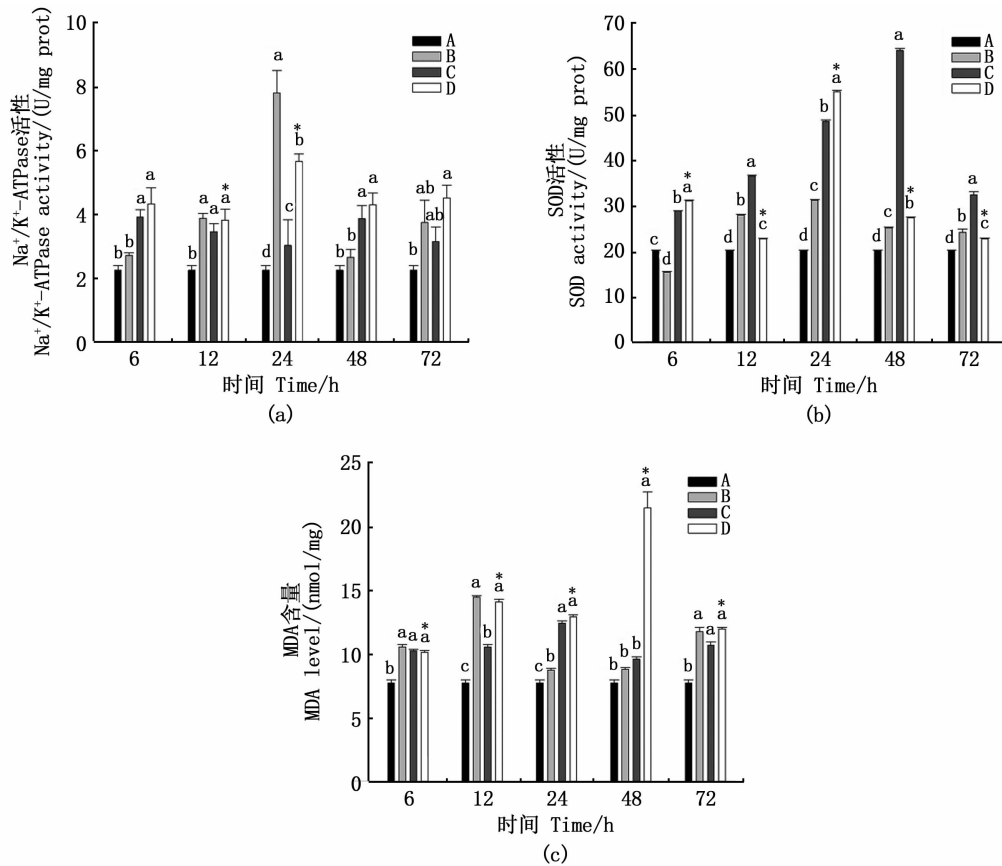
h 具有显著的交互效应($P < 0.05$);SOD 活性和 MDA 含量变化在 B 组、C 组、D 组中均整体呈现先升高后下降的趋势;盐度 20 环境下,B 组 SOD 活性和 MDA 含量均显著高于 A 组,而在盐度 30 环境下,C 组和 D 组的 MDA 含量无显著差异[图 2(b)、(c)]。双因素方差分析结果显示,密度和盐度对 SOD 活性和 MDA 含量有极显著的交互效应($P < 0.01$)。

2.3 鳃组织 Na^+/H^+ antiporter 基因和 V-ATPase 基因表达变化

各实验组 Na^+/H^+ antiporter 基因的表达在环境突变 6 h 时显著高于对照组 A 组($P < 0.05$),随后逐渐降低[图 3(a)],在 72 h 时盐度 20 的 C 组、A 组之间和盐度 30 的 B 组、D 组之间无显著差异($P > 0.05$)。V-ATPase 基因的表达在各实验组中呈先升高后下降的趋势,B 组、C 组、D 组 V-ATPase 基因表达量均在 24 h 达到最高[图 3(b)],在相同密度条件下,B 组 V-ATPase

基因表达量显著高于 A 组, D 组显著高于 C 组 ($P < 0.05$)。双因素方差分析结果显示, 密度和

盐度对 Na^+/H^+ antiporter 基因和 V-ATPase 基因的表达有显著的交互效应 ($P < 0.05$)。



相同小写字母代表差异不显著 ($P > 0.05$), 不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。* 表示密度和盐度存在显著的交互作用。A (60 粒/ m^2 、盐度 20)、B (60 粒/ m^2 、盐度 30)、C (120 粒/ m^2 、盐度 20)、D (120 粒/ m^2 、盐度 30)。

Values marked with the same lowercase letter mean no significant difference ($P > 0.05$), while with different lowercase letter mean significant difference ($P < 0.05$). * indicates significant interaction. A (60 individuals/ m^2 , salinity 20), B (60 individuals/ m^2 , salinity 30), C (120 individuals/ m^2 , salinity 20), D (120 individuals/ m^2 , salinity 30).

图 2 不同密度和盐度对缢蛏鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性、SOD 活性和 MDA 含量的影响

Fig. 2 Effects of different density and salinity on Na^+/K^+ -ATPase, SOD activity and MDA level in gill of *S. constricta*

3 讨论

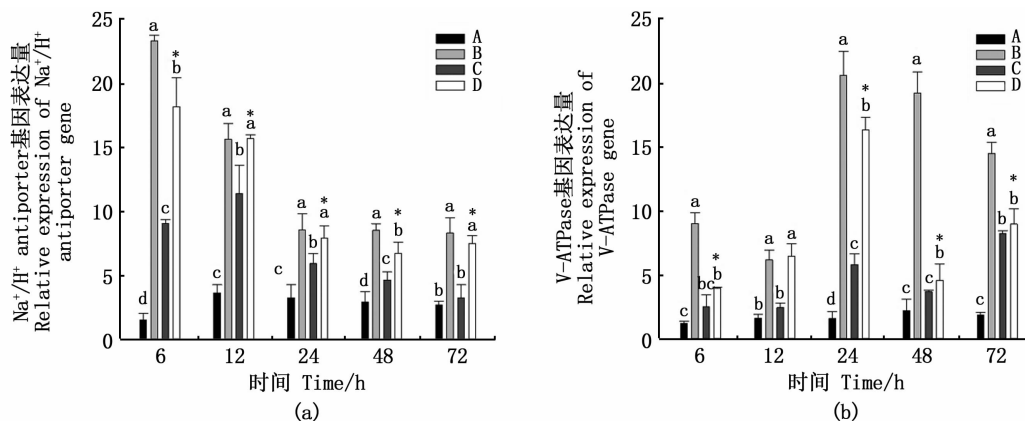
3.1 密度和盐度对缢蛏血淋巴离子浓度的影响

在水产养殖中, 非生物环境因素 (即温度、盐度、光周期等) 的变化, 以及与养殖相关的操作 (如运输、饲养密度) 会引发多种生理反应, 并影响其代谢、渗透调节等功能^[18]。离子浓度是海洋生物渗透调节研究的重要评价指标, 海洋生物可以通过离子调节适应水环境的变化, 当环境胁迫压力超出自身调节的能力则会引起死亡, 鳃是调节渗透压的重要器官, 其中含有大量的氯细胞,

氯细胞是海洋生物体内过量离子的主要排泄部位^[19]。在高渗环境中, 缢蛏血淋巴渗透压低于水体渗透压, 机体被动失水, 为补偿失水, 缢蛏开始大量吸收海水并摄入大量 NaCl , 血淋巴中 Na^+ 迅速升高, 在低渗环境中则反之^[20]。在本研究中, 水环境盐度突变后, 缢蛏通过提高体内相应的离子转运酶活力进行主动渗透调节, 血淋巴中 Na^+ 和 K^+ 浓度迅速升高, 而短时间内逐渐趋于稳定。由此可见, 缢蛏具有一定的渗透压平衡调节能力, 能适应一定范围内的盐度变化。盐度和密度对缢蛏血淋巴离子浓度无显著交互作用, 在相同

盐度环境下,高密度组和对照组之间 Na^+ 、 K^+ 浓度均无显著差异,表明密度对缢蛏血淋巴离子浓

度没有影响。



相同小写字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。* 表示密度和盐度存在显著的交互作用。A (60 粒/ m^2 、盐度 20)、B (60 粒/ m^2 、盐度 30)、C (120 粒/ m^2 、盐度 20)、D (120 粒/ m^2 、盐度 30)。

Values marked with the same lowercase letter mean no significant difference ($P > 0.05$), while with different lowercase letters mean significant difference ($P < 0.05$). * indicates significant interaction. A (60 individuals/ m^2 , salinity 20), B (60 individuals/ m^2 , salinity 30), C (120 individuals/ m^2 , salinity 20), D (120 individuals/ m^2 , salinity 30).

图 3 不同密度和盐度下缢蛏鳃中 Na^+/H^+ antiporter 基因和 V-ATPase 基因的表达

Fig. 3 Expression of Na^+/H^+ antiporter gene and V-ATPase gene in gill at different salinity and density

3.2 密度和盐度对缢蛏 Na^+/K^+ -ATPase 活性和抗氧化水平的影响

渗透调节是一个需要能量的过程,等渗盐度使渗透调节压力和渗透调节成本最小化,并增加可用于生长或生存的能量^[21]。 Na^+/K^+ -ATPase 是一种离子转运酶,是调节渗透压非常重要的一种酶,在鳃等离子转运组织中有极高的表达水平^[22]。当介质的盐度接近或略高于血淋巴的盐度时,鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性最低,鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性被用作渗透调节能量学的指标^[23]。在本研究中,盐度 30 组 Na^+/K^+ -ATPase 活性显著高于盐度 20 组,这与凡纳滨对虾高盐胁迫后的结果^[24]类似。另外,在盐度 20 环境中,高密度组 Na^+/K^+ -ATPase 活性显著高于低密度组,并且双因素方差分析结果显示,在环境突变 12 h 和 24 h 密度和盐度对 Na^+/K^+ -ATPase 活性具有互作效应,表明高密度也对渗透调节有影响,这与高密度饲养的巴塔哥尼亚鲑鱼 (*Eleginops maclovinus*) 结果^[25]类似。

本研究发现,高密度和高盐度均会引起缢蛏的氧化应激反应,并且两种因子对某些生理生化指标具有显著的交互作用。氧化应激反应是指

氧自由基反应和脂质过氧化反应,是机体新陈代谢活动重要的组成部分^[26]。超氧化物歧化酶 (SOD) 具有将超氧化物快速转化为过氧化氢的能力,因此它在细胞内信号传导和氧化应激调节中都至关重要^[27]。MDA 是氧化应激反应中的一种过氧化产物,氧自由基作用于脂质的不饱和脂肪酸生成过氧化脂质,后者分解形成 MDA^[28]。SOD 活性和 MDA 含量的变化可以准确地反映机体内自由基的代谢情况,对判断机体的健康状况及抗氧化防御能力具有重要意义^[29]。在本研究中,高密度组的 SOD 活性和 MDA 含量显著高于对照组,说明密度达到 120 粒/ m^2 时对缢蛏产生了拥挤胁迫,并且密度和盐度对 SOD 活性和 MDA 含量具有显著交互影响作用,本实验中 D 组的 SOD 活性和 MDA 含量显著高于其他 3 组,说明在高密度和高盐度双因素影响下会引起缢蛏更强烈的氧化应激反应。相关研究^[30]表明,随着养殖密度的升高,虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 的耗氧率、排氨率逐渐升高,生长率逐渐下降,即高密度增加了虾夷扇贝呼吸、排泄的能量消耗。牙鲆幼鱼 (*Paralichthys olivaceus*) 在高饲养密度下,胰蛋白酶活性和免疫参数水平显著

升高^[31]。凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 在高盐胁迫下存活率显著降低, T-SOD 和 CAT 活性随盐度升高均呈现出先升高后降低的趋势^[32]。

3.3 密度和盐度对 Na⁺/H⁺ antiporter 基因和 V-ATPase 基因表达的影响

Na⁺/H⁺ antiporter 是一种普遍存在的跨膜蛋白, 在从细菌到人类等几乎所有生物体内都发挥着重要的生理作用^[33]。这些反转运体介导单价阳离子(主要是 Na⁺、Li⁺, 有时是 K⁺)与质子穿过细胞膜的交换, 因此在维持细胞 pH 稳态和挤出单价阳离子(主要是 Na⁺)方面具有普遍的生理作用^[34]。V-ATPase 通过水解 ATP 产生的能量将 H⁺ 泵出膜外, 在顶部质膜外形成电势差, 促进 Na⁺ 通过 Na⁺ 通道等进入膜内以完成离子交换。在本研究中, Na⁺/H⁺ antiporter 基因和 V-ATPase 基因表达在环境突变后迅速上升, 可能是盐度突变后, 缢蛭需要调节体内离子平衡, 随着体内各种离子浓度相对稳定, Na⁺/H⁺ antiporter 和 V-ATPase 基因表达量也逐渐下调并恢复至稳定, 这与三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 在盐度变化后 Na⁺/H⁺ antiporter 和 V-ATPase 基因表达量的变化基本相似^[35], 说明 Na⁺/H⁺ antiporter 和 V-ATPase 可以帮助离子转运进而调节渗透平衡。另外, 高密度同样引起了 Na⁺/H⁺ antiporter 和 V-ATPase 基因表达量的上升, 并且双因素方差分析结果显示, 密度和盐度对 2 个基因均有互作效应, 进一步证明了密度过高也会影响缢蛭的渗透调节。

综上所述, 本研究测定了缢蛭在密度和盐度双因素条件下的血淋巴离子浓度、Na⁺/K⁺-ATPase、SOD 活性、MDA 水平以及 Na⁺/H⁺ antiporter 和 V-ATPase 基因表达。结果揭示了随着盐度升高, 缢蛭血淋巴离子浓度显著升高, 而密度对其无显著影响。同时, 密度和盐度对缢蛭的渗透调节和抗氧化水平具有显著的交互影响, 其中机体对盐度变化的应激反应较密度更为显著。研究结果为进一步探究缢蛭对密度和盐度变化的响应机制以及缢蛭适宜养殖条件提供了一定的理论参考。

参考文献:

[1] 蔡星媛, 张秀梅, 田璐, 等. 盐度胁迫对魁蚶稚贝血淋巴渗透压及鳃 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力的影响[J]. 南方水产科学, 2015, 11(2): 12-19.

- CAI X Y, ZHANG X M, TIAN L, et al. Effect of salinity stress on hemolymph osmolality and gill Na⁺/K⁺-ATPase activity of juvenile ark shell (*Anadara broughtonii*) [J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(2): 12-19.
- [2] 孟玮, 徐开达, 李振华, 等. 急性盐度胁迫对日本黄姑鱼肌肉组织转录组的影响[J]. 水产学报, 2021, 45(5): 649-660.
- MENG W, XU K D, LI Z H, et al. Transcriptome analysis of *Nibea japonica* under acute salinity stress[J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(5): 649-660.
- [3] 展文豪, 周书洪, 袁春营, 等. 盐度对凡纳滨对虾血细胞吞噬与免疫相关因子基因表达的影响[J]. 水产学杂志, 2021, 34(1): 18-22.
- ZHAN W H, ZHOU S H, YUAN C Y, et al. Effect of salinity on lymphocytes phagocytosis and expression of immune-related factor genes in pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2021, 34(1): 18-22.
- [4] LARSEN E H, DEATON L E, ONKEN H, et al. Osmoregulation and excretion[J]. Comprehensive Physiology, 2014, 4(2): 405-573.
- [5] 章龙珍, 罗集光, 赵峰, 等. 盐度对点篮子鱼血清渗透压、离子含量及鳃 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力的影响[J]. 海洋渔业, 2015, 37(5): 449-456.
- ZHANG L Z, LUO J Q, ZHAO F, et al. Influence of salinity on serum osmolality, ion content and gill Na⁺, K⁺-ATPase activity of *Siganus guttatus*[J]. Marine Fisheries, 2015, 37(5): 449-456.
- [6] 吴贝贝, 赵峰, 张涛, 等. 中华鲟幼鱼鳃上氯细胞的免疫定位研究[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(1): 20-27.
- WU B B, ZHAO F, ZHANG T, et al. Immunolocalization of chloride cells on the gills of juvenile *Acipenser sinensis* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(1): 20-27.
- [7] ENGLE C R, MCNEVIN A, RACINE P, et al. Economics of sustainable intensification of aquaculture: evidence from shrimp farms in Vietnam and Thailand [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2017, 48(2): 227-239.
- [8] BONDAD-REANTASO M G, SUBASINGHE R P, ARTHUR J R, et al. Disease and health management in Asian aquaculture[J]. Veterinary Parasitology, 2005, 132(3/4): 249-272.
- [9] LIU B L, LIU Y, SUN G X. Effects of stocking density on growth performance and welfare-related physiological parameters of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in recirculating aquaculture system [J]. Aquaculture Research, 2017, 48(5): 2133-2144.
- [10] GARCIA F, ROMERA D M, GOZI K S, et al. Stocking density of Nile tilapia in cages placed in a hydroelectric reservoir [J]. Aquaculture, 2013, 410-411: 51-56.
- [11] SUÁREZ M D, GARCÍA-GALLEGO M, TRENZADO C E, et al. Influence of dietary lipids and culture density on

- rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) flesh composition and quality parameter[J]. *Aquacultural Engineering*, 2014, 63: 16-24.
- [12] BARTON B A. Stress in fishes; a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids [J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2002, 42(3): 517-525.
- [13] DE LAS HERAS V, MARTOS-SITCHA J A, YÚFERA M, et al. Influence of stocking density on growth, metabolism and stress of thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*) juveniles[J]. *Aquaculture*, 2015, 448: 29-37.
- [14] YARAHMADI P, MIANDARE H K, FAYAZ S, et al. Increased stocking density causes changes in expression of selected stress- and immune-related genes, humoral innate immune parameters and stress responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 48: 43-53.
- [15] 李智, 彭茂潇, 叶博, 等. 急性低盐度对缢蛏存活率、 Na^+/K^+ -ATPase 活性以及血淋巴细胞吞噬能力的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2020, 29(4): 489-495.
- LI Z, PENG M X, YE B, et al. Effects of acute low salinity on *Sinonovacula constricta* survival rate, Na^+/K^+ -ATPase activity and phagocytosis of hemocytes [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2020, 29(4): 489-495.
- [16] CHEN Y H, LI H Y, DING H B, et al. Heritability estimation and path analysis for growth traits of the razor clam *Sinonovacula constricta* under high salinity[J]. *Aquaculture*, 2021, 545: 737175.
- [17] 赵悦, 孙大川, 刘文畅, 等. 低盐度对澳洲龙纹斑生长、血液及非特异性免疫酶的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2021, 30(3): 435-441.
- ZHAO Y, SUN D C, LIU W C, et al. Effects of low salinity on the growth, blood and non-specific immune enzymes of *Maccullochella peelii peelii* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2021, 30(3): 435-441.
- [18] BONGA S E W. The stress response in fish[J]. *Physiological Reviews*, 1997, 77(3): 591-625.
- [19] 陈铭, 林志华, 徐娟, 等. 盐度胁迫对缢蛏血液离子浓度及碳酸酐酶基因表达的影响[J]. *生物学杂志*, 2021, 38(1): 83-87.
- CHEN M, LIN Z H, XU X, et al. Effects of salinity stress on blood ion concentration and Carbonic anhydrase gene expression in *Sinonovacula constricta* [J]. *Journal of Biology*, 2021, 38(1): 83-87.
- [20] 赵峰, 张涛, 侯俊利, 等. 长江口中华鲟幼鱼血液水分、渗透压及离子浓度的变化规律[J]. *水产学报*, 2013, 37(12): 1795-1800.
- ZHAO F, ZHANG T, HOU J L, et al. Changes in blood moisture, osmolality and ion concentration of juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) in the Yangtze Estuary [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(12): 1795-1800.
- [21] IMANPOOR M R, NAJAFI E, KABIR M. Effects of different salinity and temperatures on the growth, survival, haematocrit and blood biochemistry of Goldfish (*Carassius auratus*) [J]. *Aquaculture Research*, 2012, 43(3): 332-338.
- [22] 丁红兵, 李浩宇, 陈义华, 等. 高盐对缢蛏生长存活、 Na^+/K^+ -ATPase 活性及能量代谢相关指标的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2022, 31(4): 831-838.
- DING H B, LI H Y, CHEN Y H, et al. Effects of high salinity on growth and survival, Na^+/K^+ -ATPase activity and energy metabolism related indexes of razor clam *Sinonovacula constricta* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, 31(4): 831-838.
- [23] IMSLAND A K, GUNNARSSON S, FOSS A, et al. Gill Na^+ , K^+ -ATPase activity, plasma chloride and osmolality in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) reared at different temperatures and salinities [J]. *Aquaculture*, 2003, 218(1/4): 671-683.
- [24] 李娜, 王仁杰, 赵玉超, 等. 高盐胁迫对凡纳滨对虾生长指标、血浆渗透压及 Na^+/K^+ -ATP 酶活力的影响[J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2017, 36(3): 196-201.
- LI N, WANG R J, ZHAO Y C, et al. Effects of high salinity on growth index, plasma osmotic pressure and Na^+/K^+ -ATPase activities of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2017, 36(3): 196-201.
- [25] VARGAS-CHACOFF L, MARTÍNEZ D, OYARZÚN R, et al. Combined effects of high stocking density and *Piscirickettsia salmonis* treatment on the immune system, metabolism and osmoregulatory responses of the Sub-Antarctic Notothenioid fish *Eleginops maclovinus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(2): 424-434.
- [26] 郭勤单, 王有基, 吕为群. 温度和盐度对褐牙鲆幼鱼渗透生理及抗氧化水平的影响[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(1): 58-67.
- GUO Q D, WANG Y J, LYU W Q. Combined effects of temperature and salinity on the physiological osmotic induction and antioxidant responses in the juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(1): 58-67.
- [27] ANJU A, JESWIN J, THOMAS P C, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of cytoplasmic Cu/Zn-superoxid dismutase (SOD) from pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(3): 946-950.
- [28] MENG L X, LI Q, XU C X, et al. Hybridization improved stress resistance in the Pacific oyster: evidence from physiological and immune responses [J]. *Aquaculture*, 2021, 545: 737227.
- [29] 吴仓仓, 付占斐, 王芳, 等. 温度和盐度胁迫下虹鳟和硬头鳟抗应激能力的比较[J]. *中国海洋大学学报*, 2019, 49(3): 96-109.
- WU C C, FU Z F, WANG F, et al. Comparisons of anti-

- stress abilities of rainbow trout and steelhead trout under temperature and salinity stresses [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2019, 49(3): 96-109.
- [30] 车建锋, 王晓辉, 肖露阳, 等. 不同养殖密度对虾夷扇贝生长、耗氧率和排氨率的影响[J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(17): 179-183.
- CHE J F, WANG X H, XIAO L Y, et al. Influences of stocking density on growth, oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of scallops (*Patinopecten yessoensis*) [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2020, 48(17): 179-183.
- [31] BOLASINA S, TAGAWA M, YAMASHITA Y, et al. Effect of stocking density on growth, digestive enzyme activity and cortisol level in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. *Aquaculture*, 2006, 259(1/4): 432-443.
- [32] 赵玉超, 王仁杰, 沈敏, 等. 高盐对凡纳滨对虾仔虾生长、渗透调节及免疫相关酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2019, 43(4): 833-840.
- ZHAO Y C, WANG R J, SHEN M, et al. Effects of high-salt stress on daily weight gain, osmoregulation and immune related enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* postlarvae [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(4): 833-840.
- [33] SHAO L, XU T, ZHENG X T, et al. A novel three-TMH Na^+/H^+ antiporter and the functional role of its oligomerization [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2021, 433(2): 166730.
- [34] PADAN E, TZUBERY T, HERZ K, et al. NhaA of *Escherichia coli*, as a model of a pH-regulated Na^+/H^+ antiporter [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2004, 1658(1/2): 2-13.
- [35] 马金武. 三疣梭子蟹不同盐度下血淋巴理化指标分析及 Na^+/H^+ -exchanger 和 V-ATPase 基因的克隆和功能研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2016.
- MA J W. Physicochemical index analysis of haemolymph and cloning and functional study of Na^+/H^+ -exchanger and V-ATPase genes in swimming crab (*Portunus trituberculatus*) under different salinity [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016.

Effects of high density and high salinity on osmotic regulation and antioxidant level of *Sinonovacula constricta*

TAO Liang¹, WANG Yizhen¹, CHEN Yukuan¹, CHEN Yihua¹, NIU Donghong^{1,2}

(1. Shanghai Collaborative Innovation Center for Cultivating Elite Breeds and Green-culture of Aquaculture Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In the present research, the effects of density (60 and 120 individuals/m²) and salinity (20 and 30) are examined on osmotic regulation and antioxidant responses of *Sinonovacula constricta*. The experiment lasted 72 hours. The concentration of Na^+ and K^+ in the hemolymph, the activity of SOD and MDA in liver, the activity of Na^+/K^+ -ATPase, and the expression of Na^+/H^+ antiporter and V-ATPase genes in gill were measured. The results showed that density and salinity had no significant interaction on Na^+ and K^+ concentration of the hemolymph. Na^+ and K^+ concentrations in high-salinity group were significantly higher than those in control group. The effects of density and salinity on Na^+/K^+ -ATPase activity had significant interaction at 12 h and 24 h. Na^+/K^+ -ATPase activity in high-salinity group and high-density group was significantly higher than that in control group. SOD activity and MDA content in all experimental groups were significantly higher than those in control group, and density and salinity had significant interaction on SOD activity and MDA content. The expression of Na^+/H^+ antiporter and V-ATPase genes in high-salinity group and high-density groups were significantly higher than those in control group. Therefore, high density and salinity performed significant interactive effect on osmotic regulation and antioxidant level of *S. constricta*. The results provided a theoretical reference for further exploring the response mechanism of marine shellfish to density and salinity.

Key words: *Sinonovacula constricta*; density; salinity; ion concentration; antioxidant level; osmotic regulation