

低温胁迫对克氏原螯虾抗氧化与非特异性免疫能力的影响

沙文彬^{1,2,3,4}, 刘 闯^{1,2,3,4}, 孙云飞^{1,2,3,4}, 成永旭^{1,2,3,4}

(1. 上海海洋大学 农业农村部稻渔综合种养生态重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业农村部鱼类营养和环境生态研究中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 4. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘 要: 为研究低温胁迫对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)抗氧化与非特异性免疫能力的影响, 本实验设置4个温度组(对照组: 23 °C, 低温组: 9 °C、5 °C、1 °C), 在各个温度组采集肝胰腺、鳃和血淋巴, 并测定抗氧化与免疫相关酶活性和基因表达。抗氧化与免疫酶结果显示, 低温胁迫下克氏原螯虾肝胰腺和血淋巴中总抗氧化能力(T-AOC)活性逐渐上升。肝胰腺和血淋巴中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)活性均先上升后下降。丙二醛(MDA)含量均逐渐增加, 在1 °C时达到最高。肝胰腺中过氧化氢酶(CAT)逐渐下降, 血淋巴中先上升后下降。基因表达结果显示, 低温胁迫下克氏原螯虾鳃和肝胰腺组织中SOD、CAT、甲壳素(*Crustin*)基因mRNA表达量随温度降低先上升后下降, 热休克蛋白70(*HSP70*)基因mRNA表达量在鳃中无显著变化, 在肝胰腺中先上升后下降。综上所述, 低温胁迫下克氏原螯虾的机体会发生氧化应激反应, 抗氧化与免疫系统调节提高抗氧化与免疫酶活性, 且诱导抗氧化与免疫基因高表达, 以此来应对低温造成的氧化损伤, 保护细胞活性维持正常生命活动。研究结果为克氏原螯虾稻渔综合种养模式下冬季健康养殖和耐低温品系的选育提供一定的理论基础。

关键词: 克氏原螯虾; 低温; 抗氧化; 非特异性免疫; 基因表达

中图分类号: S 966.12 **文献标志码:** A

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*), 隶属节肢动物门(Arthropoda)甲壳纲(Crustacea)十足目(Decapoda)螯虾科(Cambaridae)。2022年我国克氏原螯虾养殖面积187万hm²、产量达到289万t, 养殖业产值为960亿元, 是重要的淡水经济物种^[1]。克氏原螯虾养殖地区主要集中在长江中下游和淮河流域^[2], 新疆和黑龙江省2022年产量仅有979 t和701 t^[1]。克氏原螯虾的最适温度为21~30 °C, 最佳温度约为23 °C^[3]。克氏原螯虾在10 °C以下时, 摄食量减少, 对克氏原螯虾的生长极其不利^[4-5]。在5 °C时, 开始不摄食, 且处于不动状态^[6]。当水温降低至1 °C时, 克氏原螯虾幼体不久就会死亡^[7]。克氏原螯虾养殖主要以稻虾种养为主, 占养殖面积的83.93%^[1], 这种养殖模式下克氏原螯虾幼体在环沟内冬季极易遭受持

续性低温胁迫的影响。且在全球气候变暖背景下, 寒潮和持续性极端低温事件频繁出现^[8-12], 对水产动物造成严重的冷冻损伤, 严重制约着稻虾综合种养模式中克氏原螯虾产量的提高。因此, 了解克氏原螯虾在低温胁迫下的适应机制, 培育出耐低温的克氏原螯虾新品系具有一定的理论与产业意义。

低温会导致甲壳动物体内发生氧化应激反应, 活性氧累积, 造成细胞氧化损伤^[13-18]。为维持细胞活性, 甲壳动物机体抗氧化与非特异性免疫系统调节酶活性和基因表达水平来应对低温胁迫, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)在低温胁迫下丙二醛(MDA)含量增加^[13-15], 超氧化物歧化酶(SOD)^[13]、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)^[13]活性先上升后下降, 过氧化氢酶(CAT)基

收稿日期: 2024-05-14 修回日期: 2024-08-04

基金项目: 国家重点研发计划(2023YFD2401802)

作者简介: 沙文彬(1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为克氏原螯虾生理生态学。E-mail: 1435274822@qq.com

通信作者: 孙云飞, E-mail: yfsun@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>

因^[13,16]mRNA 表达量上升;斑节对虾(*Penaeus monodon*)在低温胁迫下 SOD、GSH-PX 活性先上升后下降^[17];锯缘青蟹(*Scylla serrata*)在低温胁迫下 CAT^[18]、酸性磷酸酶(ACP)^[19]活性先上升后下降,热休克蛋白 70(HSP70)基因^[20]mRNA 表达量上升;日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)在低温胁迫下 SOD 基因^[21]mRNA 表达量上升。这些研究结果表明抗氧化与非特异性免疫系统在甲壳动物对低温胁迫的适应过程中发挥关键作用,而研究水生生物适应低温胁迫的生理机制相关变化,能够为水生生物耐低温品系的选育提供理论基础^[22]。作为重要的淡水经济物种,低温胁迫对克氏原螯虾抗氧化与非特异性免疫系统的影响还不清楚。

本研究以克氏原螯虾为实验材料,通过测定对照组和低温组克氏原螯虾抗氧化与免疫相关指标,包括总抗氧化能力(T-AOC)、SOD、CAT、GSH-PX、ACP、碱性磷酸酶(AKP)活性和MDA含量,以及测定抗氧化与免疫相关基因 SOD、CAT、甲壳素(*Crustin*)以及 HSP70 基因 mRNA 表达量。本实验目的在于研究低温胁迫对克氏原螯虾抗氧化与免疫能力的影响,为进一步研究克氏原螯虾对低温胁迫的应答机制提供新的见解,并为克氏原螯虾耐低温苗种的选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物来源与养殖管理

实验所用克氏原螯虾来自江苏宿迁霸王蟹产业发展中心(34°3'54"N, 118°4'60"E)。挑选活力较强、体表完好无损的克氏原螯虾共 120 尾作为实验用虾,体长(62.07±4.26)mm,体质量(9.70±2.13)g。饲养于容量为 300 L(119 cm×89 cm×32 cm)的水族箱中。克氏原螯虾在室内循环水养殖系统暂养 14 d 后进行正式试验,实验前 48 h 停止喂食。暂养期间,温度保持在(23±0.5)°C,pH 7.5±0.5,光周期为光照 12 h:黑暗 12 h。每天早晚投喂商品饲料 2 次,日投喂量为虾体质量的 3%。饲喂 2 h 后及时用虹吸管吸出残饵和粪便,日换水量为 1/2。

1.2 实验设计与样品采集

暂养结束后,在 119 cm×89 cm×32 cm 水族箱

中,通过冷暖机(森森 HYH-1.5DR-B 1.5 匹,天津锐景环保设备有限公司)调节水温。每个温度组各 30 尾实验虾。在 23 °C(克氏原螯虾最佳温度^[3],对照组)恒温之后,以 2 °C/d 的速度进行降温,从 23 °C 降至 9 °C(克氏原螯虾此温度下开始摄食量减少,活动能力下降^[4]),并维持水温稳定(±0.5°C),维持 24 h 后取样,然后采用相同的方法,分别在降至 5 °C(克氏原螯虾此温度下开始不摄食、不活动^[6])、1 °C(克氏原螯虾幼体此温度下死亡^[7])时进行取样。实验期间无克氏原螯虾死亡。取样点见图 1。在每个温度取样点下随机挑选 12 尾虾,采集虾的血淋巴、鳃和肝胰腺。血淋巴样品加入含有抗凝剂(抗凝剂的配制:NaCl 0.2 g,柠檬酸 0.8 g,柠檬酸二钠 7.65g,葡萄糖 2.05 g,双蒸水定容至 100 mL,pH 调至 4.6,121.3 °C,灭菌 20 min)的离心管中,在超低温冷冻离心机中 4 °C,3 000 r/min 离心 10min,离心后取上清液于-20 °C 保存;将采集后的血浆和肝胰腺生理样品置于-20 °C 冰箱中保存。其中用于 RNA 提取的鳃和肝胰腺组织样品置于无 RNA 酶的离心管中,液氮冷冻后-80 °C 保存。

1.3 克氏原螯虾肝胰腺及血淋巴抗氧化与免疫相关酶活力测定

将采集的克氏原螯虾肝胰腺样品按质量体积比 1:9 加入预冷的 0.9% 生理盐水,用冷冻研磨仪进行研磨,频率 30 次/s,3 min 研磨充分后取出。再于超低温冷冻离心机中 4 °C,2 500 r/min 离心 20 min,取中间清液再次离心制成 10% 的组织匀浆待测。血浆样品测定前于冰上解冻,待测。利用南京建成生物工程研究所的试剂盒分别检测血淋巴及肝胰腺组织匀浆液中 T-AOC、SOD、CAT、GSH-PX、AKP、ACP 活性及 MDA 含量,使用酶标仪[Spectra Max iD3,美谷分子仪器(上海)有限公司]进行测定,具体方法参照说明书,组织蛋白质量浓度采用考马斯亮蓝法。

1.4 克氏原螯虾抗氧化酶及免疫基因的表达分析

1.4.1 引物设计

从 NCBI 数据库中获取克氏原螯虾抗氧化酶及免疫基因序列,使用 Primer 6.0 软件设计克氏原螯虾基因引物如表 1 所示,以 β -actin 作为内参基因,送上海生工生物工程有限公司进行引物合成。

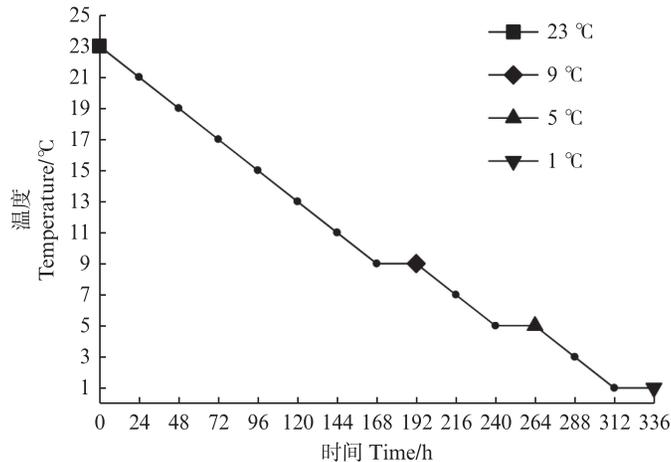


图1 低温取样时间点示意图

Fig. 1 Schematic diagram of sample collection under low temperature

表1 实验所用抗氧化酶及免疫基因引物序列

Tab. 1 Antioxidant enzymes and immunity gene primer sequence used in laboratory

基因 Gene	引物序列 Primer sequences (5'-3')	基因序列号 GenBank accession number
<i>SOD-F</i>	CGCCGATGTAAGACTGGGACG	TRINITY-DN63424-c1-g1
<i>SOD-R</i>	CTCCAGGTAACACGGCTTCCAT	
<i>CAT-F</i>	TCCTGTGAAGTGTCCCTATCGTG	TRINITY-DN27834-c0-g1
<i>CAT-R</i>	AACCCAGTCTTCTTACAATCAACG	
<i>Crustin-F</i>	CTCTGACTGCCAGGTGTTT	NW-020872843.1
<i>Crustin-R</i>	TGCGAGCTGTGATGGTTAG	
<i>HSP 70-F</i>	GTTGACCAAGATGAAGGAGAC	DQ-301506.1
<i>HSP 70-R</i>	CTGACGCTGAGAGTCGTTG	
<i>β-actin-F</i>	GTCAGGTCATCACCATCGGCA	HQ-414542.1
<i>β-actin-R</i>	CGGTCTCGTGAACACCAGCA	

1.4.2 总RNA提取和定量 RT-qPCR

使用RNAiso Plus (TaKaRa)试剂对采集的克氏原螯虾鳃和肝胰腺组织样本进行提取总RNA,用移液枪吸取3 μL样品使用酶标仪超微量检测板[Spectra Max iD3,美谷分子仪器(上海)有限公司]测定提取的RNA浓度。根据PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa)试剂盒说明书将总RNA反转录合成cDNA。使用qPCR仪(qotwer3G,耶拿)进行荧光定量PCR分析。PCR反应结束后,进行溶解曲线的扩增。以 β -actin为内参基因,使用内参基因的 C_t 值来归一化目标基因的 C_t 值,然后使用将归一化的数值进行比较得出差异倍数,将对照组(23 °C组)的归一化后基因表达量设置为“1”,实验组的归一化后基因表达量以对比对照组增加或降低来表示,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算克氏原螯虾目的基因mRNA的相对表达量。每个实验设置3个生物学重复。

1.5 统计分析

实验所得数据使用SPSS 27软件进行分析,克氏原螯虾抗氧化与免疫相关酶活力和基因相对表达量均采用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差分析前先进行方差齐性检验,并使用Fisher法进行多重比较检验差异显著性大小,使用Duncan氏法多重比较为实验作图进行差异性标注。实验所得数据均以平均数±标准差(Mean±SD)表示,设置显著水平为 $P<0.05$ 。采用R 4.3.1软件绘图并标注差异性。

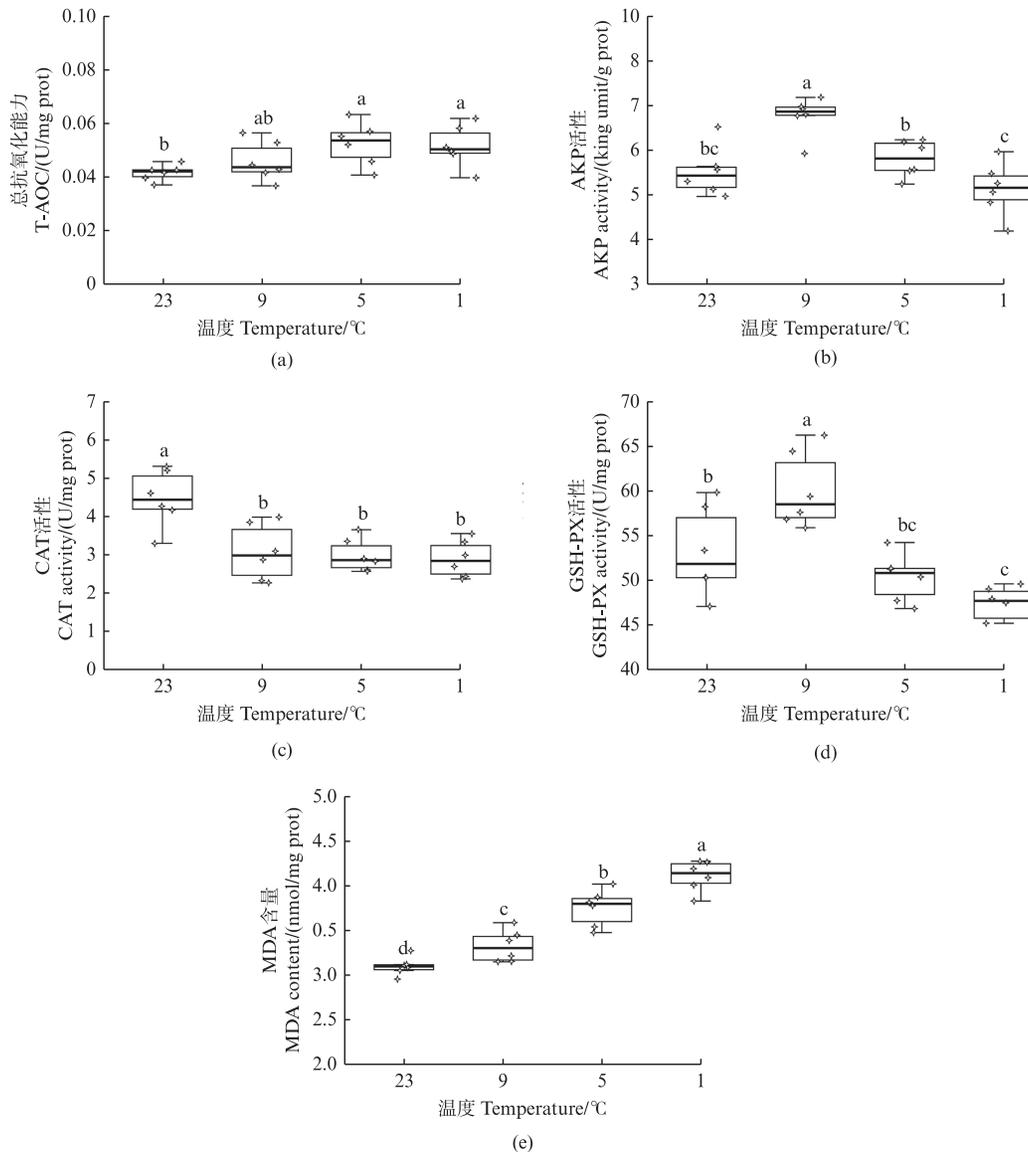
2 结果

2.1 低温对克氏原螯虾抗氧化相关酶活性的影响

低温对克氏原螯虾肝胰腺抗氧化酶活性的影响如图2所示。在实验温度范围内,T-AOC随着温度的下降,呈现逐渐上升的趋势,在5 °C时达到最大值,为对照组23 °C的1.26倍($P=0.013$,

图2a)。SOD酶活性随着温度的下降,呈现先上升后下降的趋势,在9℃时达到最大值,为对照组23℃的1.22倍($P<0.001$,图2b)。CAT酶活性随温度的下降逐渐下降,在1℃时达到最小值,为对照组23℃的0.65倍($P<0.001$ 图2c)。GSH-PX活性随温度的降低,呈现先上升后下降的趋势,

在9℃时达到最大值,为对照组23℃的1.12倍($P=0.007$),在1℃时达到最小值,为对照组23℃的0.88倍($P=0.009$,图2d)。MDA含量随温度降低不断升高,在1℃时达到最大值,为对照组23℃的1.32倍($P<0.001$,图2e)。



箱线图盒子上下底代表分位数,盒子内的线代表中位数。箱须代表每个数据集的最小值和最大值。箱须上方的不同小写字母表示在Duncan氏法多重检验中,这些组间存在显著差异($P<0.05$)。

Boxplot boxes on top and bottom represent quantiles, and the lines within the boxes represent the median. Whiskers describe the minimum and maximum values for each dataset. The different lowercase letters above the box whiskers indicate that there were significant differences in the Duncan's multiple test between these groups ($P<0.05$).

图2 低温对克氏原螯虾肝胰腺抗氧化酶活性的影响

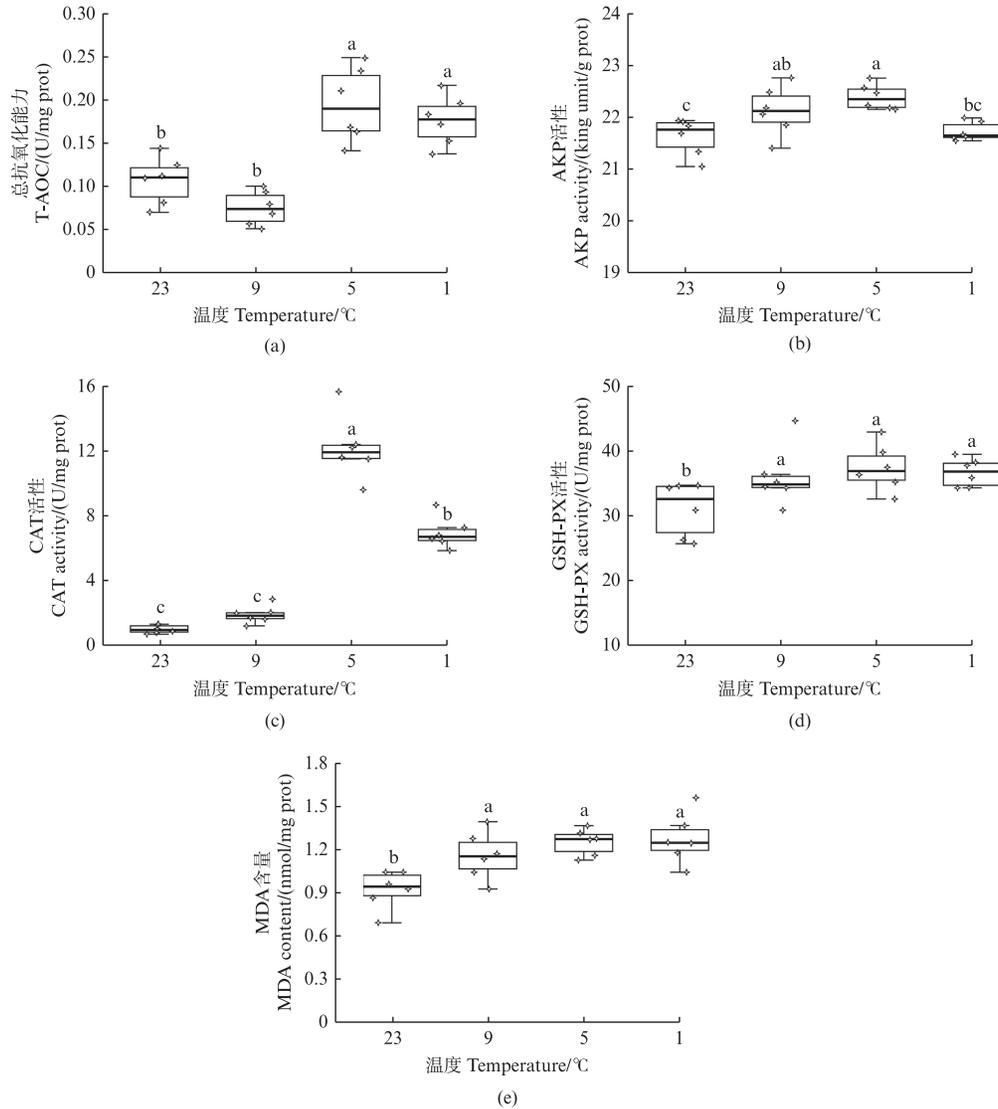
Fig. 2 Effect of low temperature on antioxidant enzyme activity in hepatopancreas of *P. clarkii*

低温对克氏原螯虾血浆中抗氧化酶活性的影响如图3所示。在实验温度范围内,T-AOC随着温度的下降,呈现先下降后上升再下降的趋

势,在5℃时达到最大值,为对照组23℃的1.81倍($P<0.001$,图3a)。SOD酶活性随着温度的下降,呈现先上升后下降的趋势,在5℃时达到最

大值 22.39 U/mL ($P < 0.001$, 图 3b)。CAT 酶活性在 23 °C 到 9 °C 时无显著差异 ($P = 0.187$), 但在 5 °C 时, CAT 酶活性显著增加达到最大值 12.14 U/mL, 为对照组 23 °C 的 12.06 倍 ($P < 0.01$), 在 1 °C 时酶活性又降低至 6.93 U/mL (图 3c)。

GSH-PX 活性随温度的降低, 呈现上升趋势, 在 5 °C 时达到最大值, 为对照组 23 °C 的 1.20 倍 ($P = 0.009$, 图 3d)。MDA 含量随温度降低在不断累积升高, 在 1 °C 时达到最大值, 为对照组 23 °C 的 1.38 倍 ($P < 0.001$, 图 3e)。



箱线图盒子上下底代表分位数, 盒子内的线代表中位数。箱须代表每个数据集的最小值和最大值。箱须上方的不同小写字母表示在 Duncan 氏法多重检验中, 这些组间存在显著差异 ($P < 0.05$)。Boxplot boxes on top and bottom represent quantiles, and the lines within the boxes represent the median. Whiskers describe the minimum and maximum values for each dataset. The different lowercase letters above the box whiskers indicate that there were significant differences in the Duncan's multiple test between these groups ($P < 0.05$).

图 3 低温对克氏原螯虾血浆抗氧化酶活性的影响

Fig. 3 Effect of low temperature on antioxidant enzyme activity in haemolymph of *P. clarkii*

2.2 低温对克氏原螯虾免疫相关酶活性的影响

低温对克氏原螯虾肝胰腺中免疫酶活性的影响如图 4 所示。在实验温度范围内, ACP 酶活性随温度下降, 呈现先上升后下降的趋势, 在 9 °C 时达到最大值, 为对照组 23 °C 的 1.11 倍 ($P =$

0.034), 1 °C 时达到最小值, 为对照组 23 °C 的 0.89 倍 ($P = 0.039$, 图 4a)。AKP 酶活性随温度下降, 呈现先上升后下降的趋势, 在 9 °C 时达到最大值, 为对照组 23 °C 的 1.81 倍 ($P < 0.001$, 图 4b)。

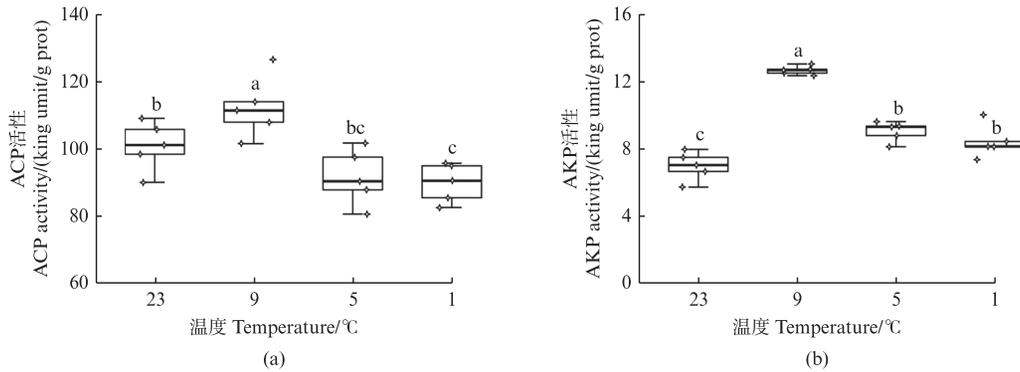


图4 低温对克氏原螯虾肝胰腺磷酸酶活性的影响

Fig. 4 Effect of low temperature on phosphatase enzyme activity in hepatopancreas of *P. clarkii*

低温对克氏原螯虾血浆中磷酸酶活性的影响如图5所示。在实验温度范围内,ACP酶活性随温度下降,呈现先上升后下降的趋势,在5°C时达到最大值,为对照组23°C的1.76倍($P < 0.001$),1°C时达到最小值0.64 king unit/(100 mL)

(图5a)。AKP酶活性随温度下降,呈现先上升后下降的趋势,在9°C时达到最大值,为对照组23°C的1.59倍($P = 0.002$),1°C时达到最小值0.094 king unit/(100 mL)(图5b)。

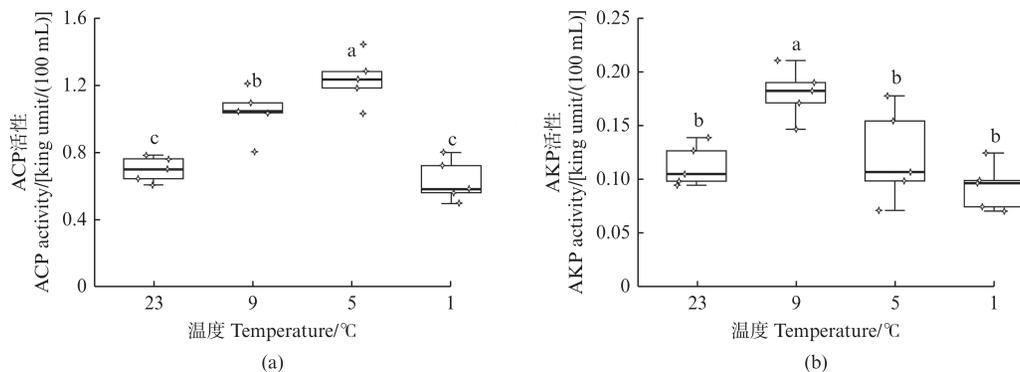


图5 低温对克氏原螯虾血浆磷酸酶活性的影响

Fig. 5 Effect of low temperature on phosphatase enzyme activity in haemolymph of *P. clarkii*

2.3 低温对克氏原螯虾抗氧化酶及免疫相关基因相对表达量的影响

克氏原螯虾的SOD基因mRNA表达量随着温度的降低先上升后下降,鳃中9°C时显著提高达到最大值,为对照组23°C的2.03倍($P = 0.031$),肝胰腺中5°C时显著提高达到最大值,为对照组23°C的4.04倍($P < 0.001$,图6a)。鳃中CAT基因mRNA表达量随温度的降低先显著上升在9°C时达到最大值,为对照组23°C的7.54倍($P < 0.001$),后下降,肝胰腺中CAT基因mRNA表达量在5°C时显著增加且达到最大值,为对照组23°C的5.37倍($P < 0.001$),随后下降(图6b)。鳃中Crustin基因mRNA表达量随温度的降低先显著上升,在9°C时达到最大值,为对照组23°C的7.02倍($P < 0.001$),随后下降,但在1°C时又显著增加,为对照

组23°C的4.68倍($P = 0.005$),肝胰腺中Crustin基因mRNA表达量随温度的降低先显著上升在5°C时达到最大值,为对照组23°C的12.49倍($P < 0.001$),后下降(图6c)。HSP70基因mRNA表达量在鳃中无显著差异($P = 0.259$),在肝胰腺中随温度降低先上升后下降,5°C时达到最大值,为对照组23°C的1.58倍($P = 0.002$,图6d)。

3 讨论

在正常环境下,甲壳动物都有一套比较完善的抗氧化系统,分为酶类抗氧化系统和非酶类抗氧化系统,这是机体的一种保护机制,来抵抗活性氧对机体的氧化损伤^[23-24]。T-AOC是评估体内抗氧化酶系统及非酶系统能力总和大小的指标^[25-26]。在本研究中,克氏原螯虾在低温胁迫下,

肝胰腺和血浆内 T-AOC 含量升高。魏克强等^[27]研究发现,克氏原螯虾在受到 Cu^{2+} 胁迫时,肝胰腺中的 T-AOC 含量增加。在氨氮胁迫研究中也发现 T-AOC 含量增加^[28]。这与本实验得到的结果一致,说明外界环境胁迫可能会提高虾类 T-AOC 含量。克氏原螯虾在 23 °C 下不处于胁迫状态,体内的 T-AOC 处于较低水平,随着温度的下降,克氏原螯虾处于低温胁迫状态,体内的抗氧化系

统被激活,T-AOC 开始提高,以清除低温胁迫下克氏原螯虾代谢活动产生的活性氧,来保护自身适应低温刺激。随着温度的持续降低,体内的 T-AOC 含量继续增加,这说明克氏原螯虾体内的抗氧化防御系统应对能力不断加强。当温度降低至 1 °C 时,体内的 T-AOC 含量降低,可能是温度过低已经超出克氏原螯虾的耐受范围,机体抗氧化系统受到破坏。

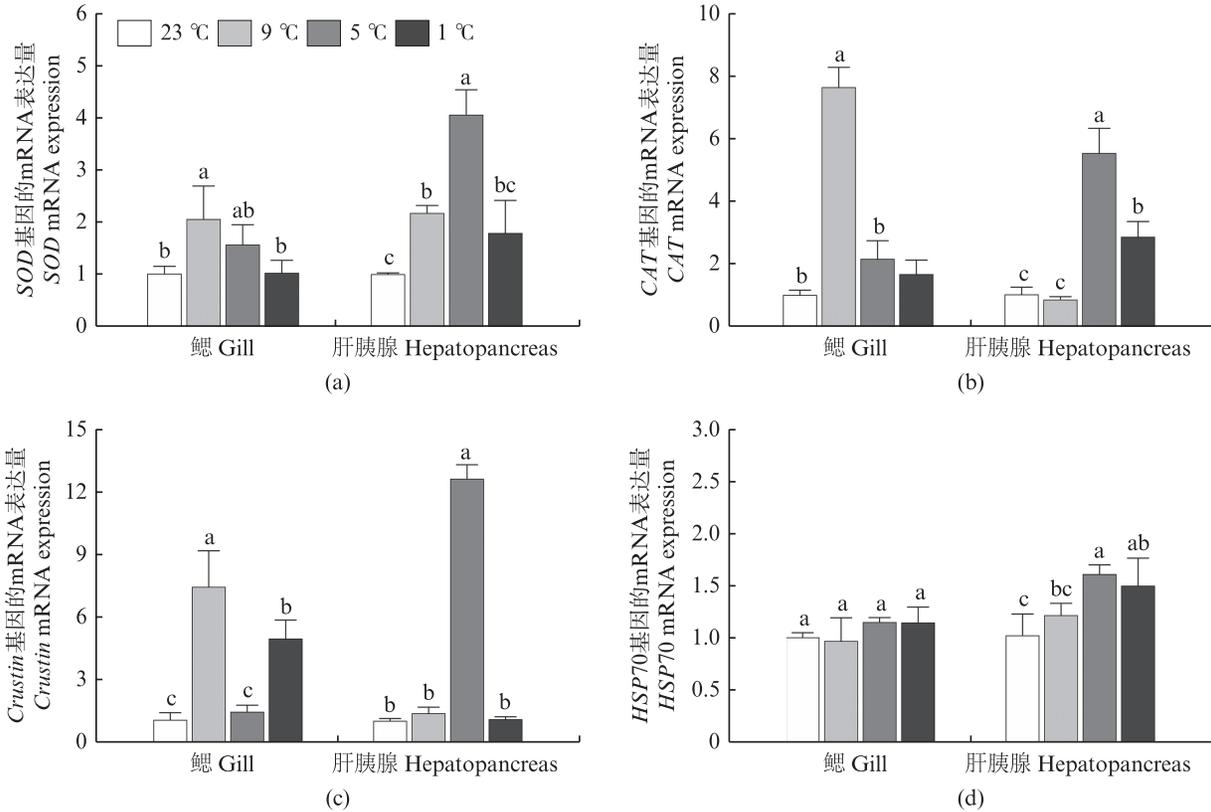


图 6 低温对克氏原螯虾 SOD、CAT、Crustin 和 HSP70 基因 mRNA 表达量的影响

Fig. 6 Effects of low temperature on SOD, CAT, Crustin and HSP70 mRNA expression in *P. clarkii*

SOD、CAT 和 GSH-PX 是生物机体内最主要的抗氧化酶^[29-30]。SOD 催化 O_2^- 自由基生成 H_2O_2 和分子氧 O_2 , CAT 进一步催化 H_2O_2 产生水和氧气, GSH-PX 则是催化还原型谷胱甘肽能够清除体内活性氧,减少机体氧化损伤^[31-33]。在本研究中,克氏原螯虾随温度的下降,体内 SOD、CAT 和 GSH-PX 活性先上升后下降。在朱孟凯等^[15]对凡纳滨对虾低温胁迫研究中发现,15 °C 时肝胰腺中 CAT 活性相比于对照组显著增加了 3.23 倍。在 MENG 等^[34]的实验中发现,三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 从 22 °C 下降到 9 °C 时,其肝胰腺 CAT 活性随温度下降而增加,温度继续下降至 6 或 3 °C 时, CAT 活性显著下降至 0.9 U/

(mg prot)。以上实验结果的变化趋势与本实验类似,说明低温胁迫会诱导甲壳动物激活抗氧化酶系统来应对低温环境,使抗氧化酶活性增加。克氏原螯虾在受到低温胁迫时,体内需要代偿性提高抗氧化酶活性来保护自身免受氧化损伤。随着温度的持续降低,克氏原螯虾体内的抗氧化酶活性开始降低,可能是因为温度已经超出克氏原螯虾的低温耐受范围,抗氧化酶系统受到破坏,造成机体发生不可逆损伤。肝胰腺内抗氧化酶活性在 9 °C 后下降,血浆中抗氧化酶活性在 5 °C 后下降,这可能是因为克氏原螯虾不同组织对低温胁迫的耐受性不同,肝胰腺对低温胁迫更为敏感。MDA 是机体发生氧化应激后的产物,

其含量可以反映出机体的氧化损伤程度^[35-36]。本研究中,克氏原螯虾在慢性低温胁迫下,肝胰腺和血浆中的MDA含量在不断增加。JIE等^[37]研究发现,慢性低氧胁迫下拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)肝胰腺MDA含量不断升高。这说明环境胁迫会诱导甲壳动物体内ROS的积累,机体受到氧化损伤,使MDA含量上升。克氏原螯虾在低温下发生氧化应激反应,机体诱导抗氧化酶活性增加,但仍无法及时清除体内的ROS,使肝胰腺和血浆中ROS在代谢活动中慢慢累积,且随着温度的持续降低,温度低于克氏原螯虾的低温耐受范围,ROS累积过多造成机体内细胞膜、组织等发生不可逆损伤。

ACP和AKP是溶酶体中主要的水解酶^[38],这两种酶可以共同作用形成水解酶体系,对胁迫产生的自由基进行溶解达到防御作用,在甲壳动物免疫反应中发挥重要作用^[39-40]。其活性大小可以用来评估虾的免疫状态^[40]。本实验中,克氏原螯虾体内ACP和AKP活性都随着温度的下降,呈现先上升后下降的趋势。大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)低温胁迫研究中发现,从21℃下降到15℃期间,血清中ACP和AKP活性随着温度的降低先升高后降低^[41]。在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)低温实验中,血清中AKP活性也随着温度的下降先增加后减少,在12℃时取得最大值7.62 U/L^[42]。上述结果与本实验一致,这说明低温胁迫会刺激水生动物产生非特异性免疫应答,使磷酸酶活性增加。克氏原螯虾在低温胁迫下,通过提高ACP和AKP活力来应对短期低温压力,但随着温度的持续下降,低温超过克氏原螯虾的耐受范围且可能长时间的低温对克氏原螯虾机体造成不可逆的损伤,使ACP和AKP活性也随之降低,这与抗氧化酶响应规律一致。

SOD和CAT基因mRNA表达量会受到外界环境的影响而改变^[43],如温度胁迫^[44]。本实验中,克氏原螯虾SOD和CAT基因mRNA表达量在低温胁迫后都显著增加。日本对虾在10℃低温胁迫24h后,鳃和肝胰腺中SOD基因mRNA表达量分别显著增加了1.6倍和3.6倍($P<0.05$)^[21]。皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)在低温胁迫下,肌肉中SOD基因mRNA表达量出现升高^[45]。这些结果与本实验类似,说明低温胁迫诱导了水生

动物抗氧化酶基因表达水平提高。克氏原螯虾通过机体抗氧化酶基因高表达,来抵御低温环境带来的氧化应激,保护机体免受氧化损伤。克氏原螯虾SOD、CAT基因mRNA表达量在鳃中在9℃时达到最大值,肝胰腺中在5℃时取得最大值,说明不同器官对低温胁迫的耐受能力不同,肝胰腺对低温响应较早。Crustin是一种抗菌肽,参与甲壳动物机体内的免疫反应,其表达水平可以反映虾的免疫情况^[46]。本实验中,随着温度的降低,克氏原螯虾鳃和肝胰腺中Crustin基因均有显著表达。研究发现,低氧胁迫会提高克氏原螯虾肝胰腺Crustin基因表达量,且提升幅度随胁迫强度提高而提高^[47],氨氮胁迫下斑节对虾肌肉Crustin基因表达量显著上升^[48]。这说明外界环境胁迫会改变甲壳动物Crustin表达量,从而调节体内的免疫能力。低温胁迫下克氏原螯虾免疫基因表达水平提高,说明免疫系统对低温胁迫产生了应答,克氏原螯虾通过提高Crustin基因表达量来提高免疫力,以抵御低温环境。且克氏原螯虾鳃组织中Crustin基因mRNA表达量在9℃时显著增加,肝胰腺中Crustin基因mRNA表达量在5℃时显著增加,再次说明不同器官对低温胁迫的耐受能力不同。HSP70参与机体内免疫反应,且还可以监测甲壳动物是否处于应激状态。本实验中,随着温度的降低,鳃中HSP70基因mRNA表达量无显著变化,肝胰腺中HSP70基因mRNA表达量先上升后下降。研究发现,中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)在低温胁迫后,肝胰腺HSP70基因mRNA表达量在48h时显著上升,且达到最大值($P<0.05$),随后逐渐下降,在7d后恢复到正常水平^[49]。大菱鲆在低温胁迫时,鳃和肝脏中HSP70基因mRNA表达量随温度下降也先上升后下降,分别在5℃和3℃时取得最大值^[50]。这些研究结论与本实验基本一致也存在细微区别,可能是由于克氏原螯虾、中华绒螯蟹和大菱鲆的低温耐受性有差异导致。低温胁迫下,克氏原螯虾确实受到了氧化应激,诱导抗氧化酶及免疫基因高表达,但不同组织在低温应激下表达不同,可能是不同组织对低温耐受性范围不同导致。

4 结论

本文对低温胁迫下克氏原螯虾抗氧化与非

特异性免疫能力进行测定,目的是找出克氏原螯虾对低温的适应机制。在低温应激下,抗氧化与非特异性免疫系统被激活,抗氧化与免疫酶活性提高,且低温诱导体内抗氧化与免疫基因表达水平提高,以此来应对低温造成的氧化损伤,保护细胞活性维持正常生命活动;但随着温度持续下降,克氏原螯虾抗氧化与免疫能力降低。

作者声明本文无利益冲突

参考文献:

- [1] 于秀娟,郝向举,杨霖坤,等. 中国小龙虾产业发展报告(2023)[J]. 中国水产, 2023(7): 26-31.
YU X J, HAO X J, YANG L K, et al. China crayfish industry development report (2023) [J]. China Fisheries, 2023(7): 26-31.
- [2] YUE G H, FENG J B, XIA J H, et al. Inferring the invasion mechanisms of the red swamp crayfish in China using mitochondrial DNA sequences[J]. Aquaculture and Fisheries, 2021, 6(1): 35-41.
- [3] YU J X, REN Y, XU T, et al. Physicochemical water quality parameters in typical rice-crayfish integrated systems (RCIS) in China [J]. International Journal of Agricultural and Biological Engineering, 2018, 11(3): 54-60.
- [4] 韩晓磊,李小蕊,程东成,等. 温度对克氏原螯虾交配、抱卵、孵化和幼体生长发育的影响[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(10): 2078-2080.
HAN X L, LI X R, CHENG D C, et al. Effect of temperature on mating, oogenesis, hatching and larvae development of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, 50(10): 2078-2080.
- [5] 王天神,周鑫,赵朝阳,等. 不同温度条件下克氏原螯虾免疫酶活性变化[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(12): 239-241.
WANG T S, ZHOU X, ZHAO C Y, et al. Changes in immunity activities of crayfish (*Procambarus clarkii*) under different temperature conditions [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2012, 40(12): 239-241.
- [6] 倪静静,魏万红,郑友,等. 不同水温对克氏原螯虾食性影响的研究[J]. 水产养殖, 2015, 36(10): 11-14.
NI J J, WEI W H, ZHENG Y, et al. Research on feeding effect of *Procambarus clarkii* under different water temperature [J]. Journal of Aquaculture, 2015, 36(10): 11-14.
- [7] 李铭,董卫军,邢迎春,等. 温度对克氏原螯虾幼虾发育和存活的影响[J]. 水利渔业, 2006(2): 36-37.
LI M, DONG W J, XING Y C, et al. Influence of temperature on the development and survival of crayfish larvae [J]. Journal of Hydroecology, 2006(2): 36-37.
- [8] 陈颖,江远安,毛炜峰,等. 气候变化背景下新疆北部2009/2010年冬季雪灾[J]. 气候变化研究进展, 2011, 7(2): 104-109.
CHEN Y, JIANG Y A, MAO W Y, et al. 2009/2010 winter snow disaster in northern Xinjiang under global warming [J]. Advances in Climate Change Research, 2011, 7(2): 104-109.
- [9] 刘艳,郑育琳,刘精,等. 增暖背景下2023年4-5月新疆低温维持机制分析[J]. 沙漠与绿洲气象, 2023, 17(6): 60-66.
LIU Y, ZHENG Y L, LIU J, et al. Mechanisms for maintenance of low temperature in Xinjiang in April-May 2023 under the background of climate warming [J]. Desert and Oasis Meteorology, 2023, 17(6): 60-66.
- [10] 王晓娟,龚志强,任福民,等. 1960—2009年中国冬季区域性极端低温事件的时空特征[J]. 气候变化研究进展, 2012, 8(1): 8-15.
WANG X J, GONG Z Q, REN F M, et al. Spatial/temporal characteristics of China regional extreme low temperature events in winter during 1960-2009 [J]. Climate Change Research, 2012, 8(1): 8-15.
- [11] 李尚锋,廉毅,陈圣波,等. 东北初夏极端低温事件的空间分布特征及其成因机理分析[J]. 地理科学, 2012, 32(6): 752-758.
LI S F, LIAN Y, CHEN S B, et al. Distribution of extreme cool events over Northeast China in early summer and the related dynamical processes [J]. Scientia Geographica Sinica, 2012, 32(6): 752-758.
- [12] 李言蹊,陈海山. 冬季亚洲中纬度极端低温事件与巴伦支-喀拉海异常增暖的关系及联系机制[J]. 大气科学, 2021, 45(4): 889-900.
LI Y X, CHEN H S. The relationship between winter extremely low temperature events in mid-latitude Asia and abnormal warming over Barents-Kara Seas and associated mechanism [J]. Chinese Journal of Atmospheric Sciences, 2021, 45(4): 889-900.
- [13] XU Z H, REGENSTEIN J M, XIE D D, et al. The oxidative stress and antioxidant responses of *Litopenaeus vannamei* to low temperature and air exposure [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 72: 564-571.
- [14] QIU J, WANG W N, WANG L J, et al. Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2011, 154(1): 36-41.
- [15] 朱孟凯,姚翠鸾. 温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺氧代谢及能量代谢的影响[J]. 水产学报, 2015, 39(5): 669-678.
ZHU M K, YAO C L. The impact of temperature stress

- on the oxygen metabolism and energy metabolism in the hepatopancreas of shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(5): 669-678.
- [16] ZHOU J, WANG L, XIN Y, et al. Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Thermal Biology, 2010, 35(6): 284-289.
- [17] 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) [J]. Pakistan Journal of Zoology, 2018, 51(1): 141-148.
- [18] KONG X H, WANG G Z, LI S J. Seasonal variations of ATPase activity and antioxidant defenses in gills of the mud crab *Scylla serrata* (Crustacea, Decapoda) [J]. Marine Biology, 2008, 154(2): 269-276.
- [19] 丁小丰, 杨玉娇, 金珊, 等. 温度变化对锯缘青蟹免疫因子的胁迫影响[J]. 水产科学, 2010, 29(1): 1-6.
- DING X F, YANG Y J, JIN S, et al. The stress effects of temperature fluctuation on immune factors in crab *Scylla serrata*[J]. Fisheries Science, 2010, 29(1): 1-6.
- [20] FU W D, ZHANG F J, LIAO M F, et al. Molecular cloning and expression analysis of a cytosolic heat shock protein 70 gene from mud crab *Scylla serrata*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(5): 1306-1314.
- [21] 于振兴, 任宪云, 邵慧鑫, 等. 低温胁迫对日本对虾抗氧化系统和细胞凋亡的影响[J]. 渔业科学进展, 2022, 43(2): 157-166.
- YU Z X, REN X Y, SHAO H X, et al. Effect of low temperature stress on antioxidant system and apoptosis of *Marsupenaeus japonicus* [J]. Progress in Fishery Sciences, 2022, 43(2): 157-166.
- [22] 郭红会, 胡振, 张金刚, 等. 鱼类环境耐受性与抗逆性育种研究进展[J]. 水产学报, 2023, 47(1): 68-93.
- GUO H H, HU Z, ZHANG J G, et al. Advances in environmental tolerance and resistance breeding in fish [J]. Journal of Fisheries of China, 2023, 47(1): 68-93.
- [23] CHENG S Y, HSU S W, CHEN J C. Effect of sulfide on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(1/2): 16-26.
- [24] YANG S P, WU Z H, JIAN J C, et al. Effect of marine red yeast *Rhodospiridium paludigenum* on growth and antioxidant competence of *Litopenaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 2010, 309(1/4): 62-65.
- [25] APAK R, ÖZYÜREK M, GÜÇLÜ K, et al. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(5): 997-1027.
- [26] 贾月, 郝振林, 丁君, 等. 高温对虾夷扇贝体腔液免疫酶活性的影响[J]. 水产学报, 2013, 37(6): 858-863.
- BEN Y, HAO Z L, DING J, et al. Effects of high temperature on the immuno-enzymetic activity in coelomic fluid of *Mizuhopecten yessoensis* [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(6): 858-863.
- [27] 魏克强, 庞胜喜, 赵辉, 等. Cu^{2+} 对克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 肝胰腺的蛋白质氧化损伤效应 [J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(7): 1310-1315.
- WEI K Q, PANG S X, ZHAO H, et al. Oxidative damages of proteins in hepatopancreas of *Procambarus clarkii* exposed to Cu^{2+} [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2014, 33(7): 1310-1315.
- [28] 王芸, 李健, 何玉英, 等. 氨氮胁迫对中国明对虾血淋巴氨氮、尿素氮含量和抗氧化能力的影响[J]. 中国水产科学, 2017, 24(1): 180-189.
- WANG Y, LI J, HE Y Y, et al. Effects of ambient ammonia-N exposure on hemolymph nitrogen metabolism and antioxidant capacity of *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(1): 180-189.
- [29] WINSTON G W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 1991, 100(1/2): 173-176.
- [30] IGHODARO O M, AKINLOYE O A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid [J]. Alexandria Journal of Medicine, 2018, 54(4): 287-293.
- [31] GUO H, XIAN J A, LI B, et al. Gene expression of apoptosis-related genes, stress protein and antioxidant enzymes in hemocytes of white shrimp *Litopenaeus vannamei* under nitrite stress [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2013, 157(4): 366-371.
- [32] ORINO K, LEHMAN L, TSUJI Y, et al. Ferritin and the response to oxidative stress [J]. The Biochemical Journal, 2001, 357: 241-247.
- [33] CHIARADIA E, AVELLINI L, RUECA F, et al. Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1998, 119(4): 833-836.
- [34] MENG X L, LIU P, LI J, et al. Physiological responses of swimming crab *Portunus trituberculatus* under cold acclimation: antioxidant defense and heat shock proteins [J]. Aquaculture, 2014, 434: 11-17.
- [35] SHI H H, SUI Y X, WANG X R, et al. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium

- and naphthalene in liver of *Carassius auratus* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2005, 140(1): 115-121.
- [36] 解伟, 郭冉, 夏辉, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 对凡纳滨对虾幼虾肝胰腺抗氧化酶的损伤机制[J]. 水产学报, 2017, 41(3): 448-455.
- XIE W, GUO R, XIA H, et al. Damage mechanism of aflatoxin B₁ on antioxidant enzyme in hepatopancreas of juvenile *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(3): 448-455.
- [37] JIE Y K, CHENG C H, WANG L C, et al. Hypoxia-induced oxidative stress and transcriptome changes in the mud crab (*Scylla paramamosain*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2021, 245: 109039.
- [38] HAN M M, GAO T H, LIU G X, et al. The effect of a polystyrene nanoplastic on the intestinal microbes and oxidative stress defense of the freshwater crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. Science of the Total Environment, 2022, 833, 155722.
- [39] 刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 278-283.
- LIU S Q, JIANG X L, MOU H J, et al. Effects of immunopolysaccharide on LSZ, ALP, ACP and POD activities of *Penaeus chinensis* serum [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1999, 30(3): 278-283.
- [40] 陈永康, 陈泽恩, 梁武辉, 等. 酵母水解物对低盐胁迫凡纳滨对虾非特异性免疫及抗氧化能力的影响[J]. 水产学报, 2021, 45(12): 2061-2071.
- CHEN Y K, CHEN Z E, LIANG W H, et al. Effect of yeast hydrolysate on non-specific immunity and antioxidant ability of *Litopenaeus vannamei* under low salinity stress [J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(12): 2061-2071.
- [41] 李文龙, 梁兴明, 梁萌青, 等. 温度对大菱鲆幼鱼生长及免疫相关酶活性的影响[J]. 水产科学, 2017, 36(3): 311-316.
- LI W L, LIANG X M, LIANG M Q, et al. Effects of temperature on growth and enzyme activity related to immunity in Juvenile turbot *Scophthalmus maximus* [J]. Fisheries Science, 2017, 36(3): 311-316.
- [42] 彭婷, 胡庭俊, 林勇, 等. 低温胁迫对罗非鱼血液生化、免疫及抗氧化指标的影响[J]. 水产科学, 2012, 31(5): 259-263.
- PENG T, HU T J, LIN Y, et al. Effects of low temperature stress on indices of biochemistry, immunity and antioxidation in Nile Tilapia [J]. Fisheries Science, 2012, 31(5): 259-263.
- [43] GUO K, RUAN G L, FAN W H, et al. The effect of nitrite and sulfide on the antioxidant capacity and microbial composition of the intestines of red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 96: 290-296.
- [44] PERERA N C N, GODAHEWA G I, LEE J. Copper-zinc-superoxide dismutase (CuZnSOD), an antioxidant gene from seahorse (*Hippocampus abdominalis*); molecular cloning, sequence characterization, antioxidant activity and potential peroxidation function of its recombinant protein [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 57: 386-399.
- [45] 姜妮妮, 方建光, 李加琦, 等. 温度胁迫对皱纹盘鲍生理和生化活动的影响[J]. 中国水产科学, 2017, 24(2): 220-230.
- JIANG W W, FANG J G, LI J Q, et al. Effects of temperature change on physiological and biochemical activities of *Haliotis discus hannai* Ino [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(2): 220-230.
- [46] 焦厚琪, 霍诗天, 闫黎明, 等. 克氏原螯虾一种新型甲壳素基因的鉴定和抑菌功能研究[J]. 水生生物学报, 2022, 46(2): 248-256.
- JIAO H Q, HUO S T, YAN L M, et al. Identification of a new Crustin and study of its antibacterial function from *Procambarus clarkii* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2022, 46(2): 248-256.
- [47] ZENG Q H, LUO M Z, QIN L R, et al. Effects of hypoxia stress on survival, antioxidant and anaerobic metabolic enzymes, and related gene expression of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* [J]. Biology, 2024, 13(1): 33.
- [48] YANG L S, YANG Q B, JIANG S G, et al. Metabolic, immune responses in prawn (*Penaeus monodon*) exposed to ambient ammonia [J]. Aquaculture International, 2015, 23(4): 1049-1062.
- [49] LI Z Q, ZHAO Z G, LUO L, et al. Immune and intestinal microbiota responses to heat stress in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Aquaculture, 2023, 563: 738965.
- [50] JI L Q, JIANG K Y, LIU M, et al. Low temperature stress on the hematological parameters and HSP gene expression in the turbot *Scophthalmus maximus* [J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2016, 34(3): 430-440.

Effect of low temperature on antioxidant and non-specific immunity of *Procambarus clarkii*

SHA Wenbin^{1,2,3,4}, LIU Chuang^{1,2,3,4}, SUN Yunfei^{1,2,3,4}, CHENG Yongxu^{1,2,3,4}

(1. Key Laboratory of Integrated Rice-Fish Farming Ecosystem, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Shanghai Aquaculture Engineering and Technology Research Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To investigate the effects of low-temperature stress on the antioxidant and non-specific immune capacity of crayfish (*Procambarus clarkii*), we collected hepatopancreas, gills and haemolymph at 4 temperature levels (control: 23 °C, experimental group: 9 °C, 5 °C, 1 °C), then measured antioxidant and immune-related enzyme activities and gene expression. The results of antioxidant and immunoenzymatic activities showed a gradual increase in total antioxidant capacity (T-AOC) activity in hepatopancreas and haemolymph of *P. clarkii* under low temperature stress. The trend of increasing and then decreasing activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), acid phosphatase (ACP) and alkaline phosphatase (AKP) was observed in hepatopancreas and haemolymph. Both malondialdehyde (MDA) contents increased gradually, peaking at 1 °C. Catalase (CAT) decreased gradually in the hepatopancreas with an increase followed by a decrease in the haemolymph. Gene expression results showed that mRNA expression of *SOD*, *CAT*, and *Crustin* genes in gills and hepatopancreas of *P. clarkii* increased and then decreased with decreasing temperatures under low-temperature stress, and the heat shock protein 70 (*HSP70*) gene mRNA expression does not change significantly in gills with an increase followed by a decrease in hepatopancreas. In summary, oxidative stress occurred in *P. clarkii* under low-temperature stress, and the antioxidant and immune system responded to low-temperature oxidative damage by increasing the activity of antioxidant and immune enzymes and inducing the high expression of antioxidant and immune genes, to protect cellular activity and maintain normal life activities. The results of this study provide a theoretical basis for the selection and breeding of low temperature resistant strains of *P. clarkii* under the integrated rice-crayfish aquaculture model.

Key words: *Procambarus clarkii*; low temperature; antioxidant; non-specific immunity; gene expression