亚硝酸盐暴露对星突江鲽幼鱼免疫反应和脂质代谢的影响

李云婷， 于佳辰， 曹 梅， 翁美其， 王兴强， 杨 波，
刘鹏飞， 杨传正

（江苏海洋大学 海洋科学与水产学院, 江苏 连云港 222005）

摘 要: 将星突江鲽幼鱼暴露于不同浓度的 $NaNO_2$, 在 0 h、24 h、48 h 和 96 h 后测定组织学损伤、抗氧化酶活性、免疫和脂质代谢基因表达水平。结果表明, 幼鱼肝组织出现空泡变性和肝窦扩张等病理变化; 增加了血液热休克蛋白（HSPs）、补体成分 3、补体成分 4 和溶菌酶的浓度及降低了免疫球蛋白 M 浓度, 同时上调了肝脏肿瘤坏死因子 TNF-α、白介素 IL-10 和 IL-1β、Toll 样受体 TLR-7 和 Hsp90 及下调了转化生长因子 TGF-β 的表达水平; 降低了肝脏和血液中总抗氧化能力、谷胱甘肽浓度及超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性, 而丙二醛显著生成; 上调了肝脏中肉碱棕榈酰转移酶、过氧化物酶体增殖物激活受体-α、载脂蛋白 B、法尼醇 X 受体和胆固醇羟化酶及下调了过氧化物酶体增殖物激活受体-γ 的表达水平。

关键词: 亚硝酸盐; 星突江鲽; 免疫反应; 氧化应激; 脂质代谢
中图分类号: S917.4; X171.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-6336(2025)06-0893-11

The effect of nitrite exposure on immune response and lipid metabolism of juvenile *Platichthys stellatus*

LI Yunting, YU Jiachen, CAO Mei, WENG Meiqi, WANG Xingqiang, YANG Bo, LIU Pengfei, YANG Chuanzheng

(College of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

Abstract: *Platichthys stellatus* juveniles were exposed to different concentrations of $NaNO_2$ and histological damage, antioxidant enzyme activity, immune and lipid metabolism gene expression levels at 0 h, 24 h, 48 h, and 96 h were measured. The results showed pathological changes such as vacuolar degeneration and sinusoidal dilation in the liver tissue of *P. stellatus* juveniles. The concentrations of heat shock proteins (HSPs), complement components 3 and 4, and lysozyme in the blood were increased, while the concentration of immunoglobulin M was reduced. At the same time, the expression levels of liver tumor necrosis factor TNF-α, interleukin IL-10 and IL-1β, Toll like receptor TLR-7 and Hsp90 were upregulated, and the expression level of transforming growth factor TGF-β was downregulated. The total antioxidant capacity, glutathione concentration, and activities of superoxide dismutase and catalase in the liver and blood were reduced, while malondialdehyde was produced significantly. The expression levels of carnitine palmitoyltransferase, peroxisome proliferator activated receptor-α, apolipoprotein B, farnesol X receptor, and cholesterol hydroxylase in the liver were upregulated, and the expression level of peroxisome proliferator activated receptor-γ was

收稿日期: 2024-11-16, **修订日期:** 2025-01-21
基金项目: 国家自然科学基金项目(32202963); 江苏省自然科学基金项目(BK20220681)
作者简介: 李云婷(1993—), 女, 江苏连云港人, 硕士, 主要研究方向为海洋生态学, E-mail: liyuntingjou@126.com
通信作者: 王兴强(1975—), 男, 山东济宁人, 教授, 博士, 主要研究方向为水产养殖生态学, E-mail: wangxingqiang@jou.edu.cn

downregulated.

Key words: nitrite; *Platichthys stellatus*; immune response; oxidative stress; lipid metabolism

亚硝酸盐(NO_2^-)为氮循环的中间产物，是养殖水环境中最常见的污染物之一[1]。在天然水体中，NO_2^-浓度通常低于 1 μM，而在集约化水产养殖系统中，特别是再循环水产养殖系统(RAS)中，由于高蛋白饲料的过度使用、饲养密度的增加与细菌硝化和反硝化之间的失衡，亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)和硝化杆菌属(*Nitrobacter*)可以使NO_2^-浓度升高到 1 mM 或更高[2]。

鱼类的免疫系统由多种防御机制组成，对水体环境污染物非常敏感[3]。许多研究表明，NO_2^-对鱼类具有毒害作用，NO_2^-的毒性会增加鱼类活性氧(ROS)的产生，并诱导氧化应激反应[4]。过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶(SOD)是必需的抗氧化剂，可清除细胞内过量的 ROS 以保护细胞[5]。热休克蛋白(HSPs)是各种应激源诱导的与应激相关的蛋白分子，结构高度保守，在暴露于不同应激条件下的鱼类组织中的表达水平较高，可作为鱼类暴露于NO_2^-的灵敏性应激指标[6]。炎症是由细胞因子介导的免疫反应，氧化应激可能与炎症反应的激活有关；NO_2^-暴露下鱼类促炎细胞因子水平的升高可能反映了细胞抗氧化损伤能力的增强[7]。肝脏是鱼类的主要解毒器官，可转化或排泄异物，在维持鱼类免疫功能稳定性方面发挥着重要作用[8]。NO_2^-诱导的氧化应激也会攻击多不饱和脂肪酸，这是脂质过氧化物形成的启动剂，导致膜功能和结构完整性受损[9]。肝损伤会直接造成脂质代谢失衡，引发多种疾病。我们推测NO_2^-暴露可能会改变鱼类的免疫调节和脂质代谢过程。

星突江鳕(*Platichthys stellatus*)肉质洁白、细嫩，味道鲜美，肌肉弹性比牙鲆(*Parallichthys olivaceus*)高出 1.7 倍，不饱和脂肪酸含量也是牙鲆的 1.6 倍，是做生鱼片的好材料，在我国有良好的市场前景[10]。星突江鳕具有很强的环境适应性，盐度耐受范围广，可以采用多种模式进行养殖，包括工厂化养殖、土池粗放式养殖和半粗放式养殖等，是最具养殖潜力的海水鱼类之一[10]。以往的研究主要集中在大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)在高浓度NO_2^-暴露下的应激反应、组织受损程度等相关领域，而对江鳕幼鱼的研究尚未开始。本研究以江鳕幼鱼为研究对象，通过设置不同浓度NO_2^-暴露处理，探讨NO_2^-暴露对江鳕幼鱼组织结构及抗氧化、炎症和代谢等生理和免疫指标的影响，以期为江鳕幼鱼健康养殖条件下水体NO_2^-安全阈值的建立提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验设计和样品采集

实验用 4 月龄的 700 尾江鳕幼鱼 [平均体质量(75.83±2.17)g，体长(16.17±0.36)cm] 取自连云港海洋源水产开发有限公司。实验前江鳕幼鱼在圆形饲养池中驯化 14 d，盐度 19 ~ 20，水温 1.1 ℃ ~ 20 ℃，溶解氧 6 ~ 7 mg/L，氨氮(NH_4-N) 0.19 mg/L，硝酸盐氮(NO_3-N)55 mg/L，亚硝酸盐(NO_2^-)0.02 mg/L。驯化后，选择活力好且无表皮损伤的江鳕幼鱼进行急性预实验，得到NO_2^-的 96 h 半致死浓度(LC_{50})为 6.15 mg/L。基于此浓度，我们选择 50% LC_{50} 作为NO_2^-的最高暴露浓度梯度，设置 3 个NO_2^-(0.3 mg/L、0.6 mg/L 和 3 mg/L)处理组和 1 个对照组，每个处理组分别设 3 个重复，每个圆形养殖水桶(内径下 50 cm、上 60 cm，高 80 cm，实验水体 40 L)投放 18 尾江鳕幼鱼开展 96 h 暴露实验，以评估急性NO_2^-暴露对江鳕幼鱼的影响。实验期间每天测定NO_2^-浓度，确保实验条件稳定。暴露 0 h、24 h、48 h、96 h 后，每组随机选取 9 尾江鳕幼鱼，MS-222(Sigma)充分麻醉，测量体长、称量体质量后采集血液，通过离心(12000 g，4 ℃，5 min)后取上清液，−80 ℃ 保存，进行血浆参数后续分析。采血后，摘取幼鱼肝脏，−80 ℃ 保存，进行抗氧化酶活性检测和基因的相对表达分析。此外，暴露 96 h 后，另取部分江鳕幼鱼的肝脏放置于 4% 多聚甲醛(PFA)溶液中浸泡固定 24 h，后换成 75% 的酒精保存，进行组织病理学、TUNEL 组化染色分析。NO_2^-实验溶液是将亚硝酸钠溶解在 1 L 蒸馏水中制成

原液，然后用海水稀释到实验所需浓度。在整个实验过程中，使用美国 YSI 手持多参数水质检测仪每天测量 1 次水温、溶解氧、盐度和 NO_3-N 浓度；使用无锡奥克丹水质分析仪每天测定一次各处理组的 NO_2^- 和 NH_4-N 浓度，实验期间养殖条件和 NO_2^- 浓度梯度设置同上。

1.2　组织病理学分析

组织病理学分析参考文献 [11] 方法进行，将不同处理组的江鳜幼鱼肝脏切成约 0.5 cm^3 的小块，用 4% PFA 固定 12 ~ 24 h。然后将肝脏脱水，嵌入石蜡中。连续切片切至 5 μm 厚，用苏木精和伊红染色（HE 染色）。使用直立荧光显微镜观察江鳜幼鱼肝脏结构完整度、肝细胞形态等，并使用 NIS-Elements 图像系统捕获并分析图像。用 Photoshop 软件对细胞中空泡变性和肝窦扩张进行标记，以评估肝组织损伤程度。

1.3　肝脏和血液氧化应激参数的测定

从−80 ℃ 冰箱取出肝组织，迅速切碎，随机将碎块组织放入预冷的研钵中（1.5 mL 离心管），根据生工生物工程（上海）股份有限公司试剂盒的要求，加入提取液，并在冰浴上研磨成匀浆后放置在离心机中 4 ℃、12000 g 下离心 15 min，上清液即为酶液。从−80 ℃ 冰箱取出血浆样本，于冰上解冻，再依据不同指标试剂盒的检测要求，分别对血浆总抗氧化能力（T-AOC, A015-1）、过氧化氢酶活性（CAT, A007-1-1）、超氧化物歧化酶活性（SOD, A001-3-1）、谷胱甘肽（GSH, A005-1-2）和丙二醛浓度（MDA, A003-1-2）进行检测。江鳜幼鱼肝脏和血浆中的蛋白含量使用 BCA 试剂盒（A045-4-2）测定。以上商用试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.4　血液免疫指数的测定

从−80 ℃ 冰箱取出已经离心后的血浆样本，迅速置于冰上进行解冻，取 50 μL 用于检测，采用南京建成生物工程研究所酶联免疫分析（ELISA）定量试剂盒，按照试剂盒要求测定血浆中热休克蛋白（Hsp70）、白细胞介素-8（IL-8）、免疫球蛋白 M（lgM）、补体 C3 和 C4、肿瘤坏死因子 TNF-α 和 TNF-β 的含量。按照南京建成生物工程研究所商用试剂盒的要求，取样 100 uL，用于溶菌酶（LZM）和乳酸脱氢酶（LD）含量的检测。

1.5　肝脏脂质代谢和免疫相关基因的表达分析

使用 Trizol 试剂从江鳜幼鱼肝组织中提取总 RNA，再使用 DNase I（Takara）对已提取 RNA 中的基因组 DNA 进行去除。通过 Nanovue Plus 分光光度计检测提取的 RNA 浓度和纯度，选取高质量的 RNA 样本（$OD_{260/280}$ = 1.8 ~ 2.2, $OD_{260/230}$ ≥ 2.0），通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。扩增反应体系为 0.8 μL 引物，2 μL 总 RNA 模板，10 μL TB GreenTM Mix（成都福际生物技术有限公司），然后添加 7.2 μL 双蒸水至 20 μL，使用试剂盒（Invitrogen）将 RNA 反转录为单链 cDNA，保存在−20 ℃ 中后续分析待用。在 Lepgen 96 设备上进行实时荧光定量 PCR 检测江鳜幼鱼肝脏免疫和脂质代谢基因表达情况，反应条件为初始变性在 95 ℃ 下 5 min，然后在 95 ℃ 下进行 40 个循环 20 s，最后在 60 ℃ 下退火 40 s，应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析处理各组基因 mRNA 相对表达量，使用引物设计软件 Oligo 7.0 设计，引物序列列于表 1。依据溶解曲线对引物进行检验，并将 β-action 作为基因表达归一化的内参。

表 1　实时定量所用引物序列

Tab.1　Primer sequences used for real-time quantification

基因 Genes	引物序列（5′−3′） Primer sequence (5′−3′)
β-action	F:ACTGCTGCCTCCTCCTCCTC
β-action	R:GCCTCTGGACAACGGAACCTC
Hsp90	F:TGGAGGCTCTTCAGGCTGGAG
Hsp90	R:CTGCTCGTCATCATTGTGCTTGG
IL-1β	F:TCAGCGACAGCCAGAAGAAGAAC
IL-1β	R:TGTTGAGAAGAACTTTGCGGTTGTC
IL-10	F:TCCTGTCCCTGGTTCTCCTGTC
IL-10	R:TTGCCTCGTAGAAGTCTCTGATGTG
TNF-α	F:CAGGCGTCGTTCAGAGTCACC
TNF-α	R:CCGATCTCACCGCACTCATCAG
TGF-β	F:CCGCTTACATCCACCACCATCC
TGF-β	R:GCTGAGTCACCACCACACGAG
TLR-7	F:CGAGGACACACCCACGACTTC
TLR-7	R:GGAGCCGTCAACCCACAACC
PPARα	F:GCGACCGTTCAGCGACATG
PPARα	R:AGCAGATGATAGCAGCCACAAAC
PPARγ	F:ATGGCGTTGTTTCTGGTTGTCATC

续表

基因 Genes	引物序列(5′−3′) Primer sequence (5′−3′)
PPARγ	R:AGCGAATGAAGCACGGTCTCC
CYP	F:GTGAGGAGGGAGGTGGATGATG
CYP	R:CTGTGAGAGGTAGGTCAGGTTCC
FXR	F:TGCTGGCTGAGTGTCTGCTG
FXR	R:CCTGCTTGCTGTCTGTGTTGTC
ApoB	F:GACTGTTCAGGTTCTCTTGGATGC
ApoB	R:CTTGTGGTGAGCTTCTTCAGGAC
CPT	F:CCACCAGCCAGACTCCACAG
CPT	R:CCATAACCATCGTCAGCCACAG

注: Hsp90为热休克蛋白90; IL-1β为白介素1β; IL-10为白介素10; TNF-α为肿瘤坏死因子α; TGF-β为转化生长因子β; TLR-7为Toll样受体7; PPARα为过氧化物酶体增殖物激活受体α; PPARγ为过氧化物酶体增殖物激活受体γ; CYP为胆固醇羟化酶; FXR为法尼醇X受体; ApoB为载脂蛋白B; CPT为肉碱棕榈酰转移酶

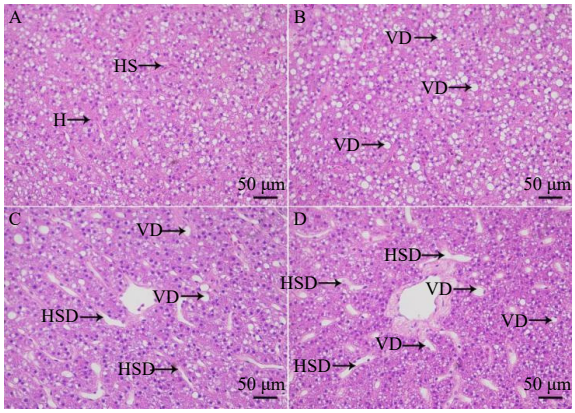
1.6 数据分析

本研究采用 SPSS v.24 软件进行统计分析。首先, 对所有收集的数据进行了 Kolmogorov-Smirnov 正态性检验和 Levene's 方差齐性检验, 以确定数据是否满足正态分布和方差齐性的前提条件。对于那些不满足正态分布或方差齐性要求的数据, 本研究采用了 Tamhane's T2 检验来进行处理。为了评估不同处理组之间的差异是否具有统计学意义, 实施了双因素方差分析(ANOVA)并应用了邓肯(Duncan)的多重比较测试。在所有情况下, 若 $p<0.05$, 则认为差异具有统计学上的显著性。

2 结果与讨论

2.1 NO_2^-暴露对江鳕幼鱼肝组织损伤的影响

HE 染色呈现出不同浓度NO_2^-暴露 96 h 后引起的江鳕幼鱼肝脏组织的损伤情况(见图 1)。在对照组, 江鳕幼鱼肝脏的组织学结构完整, 大部分肝细胞的形态正常, 未见明显的组织病理学变化(图 1A)。在不同浓度NO_2^-暴露组中, 发现了不同程度的组织病理学症状, 包括空泡变性、肝窦扩张和细胞间隙空泡; 随着暴露浓度的增加, 空泡变性和肝窦扩张加剧(图 1B ~ 图 1D), 肝组织病理学损伤也更为严重。



注: 400 倍镜检不同NO_2^-浓度暴露的江鳕幼鱼肝脏切片(标尺为 50 μm), 其中 A 为对照组; B 为 0.3 mg·L^{-1} 暴露处理组; C 为 0.6 mg·L^{-1} 暴露处理组; D 为 3 mg·L^{-1} 暴露处理组; H 为肝细胞; HS 为细胞间隙空泡; VD 为空泡变性; HSD 为肝窦扩张

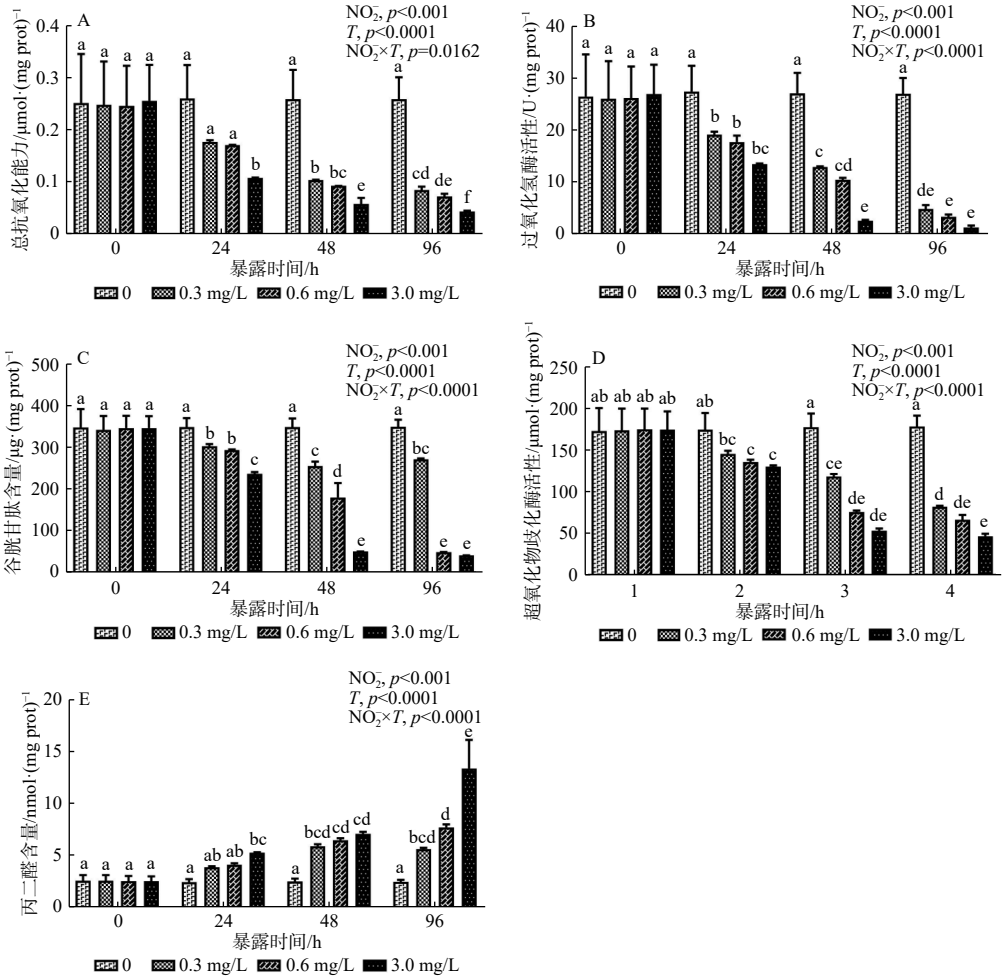
图 1 不同浓度NO_2^-暴露对星突江鳕幼鱼肝脏组织学影响

Fig. 1 Effects of NO_2^- exposure at different concentrations on liver histology of juvenile *Platichthys stellatus*

2.2 NO_2^-暴露对江鳕幼鱼肝脏和血液抗氧化能力的影响

图 2 和图 3 显示了NO_2^-暴露后, 江鳕幼鱼肝脏和血液中氧化应激生物标志物包括 T-AOC、CAT、GSH、SOD 和 MDA 等的响应情况。与对照组相比, NO_2^-处理组暴露 24 h 后, 江鳕幼鱼肝脏和血液中 T-AOC、CAT 活性、GSH 浓度及 SOD 活性逐渐下降($p<0.05$), 其中 0.6 mg/L 和 3 mg/L 处理组在NO_2^-暴露 48 h 后, T-AOC、CAT 活性、GSH 浓度及 SOD 活性显著下降($p<0.05$)。同时, NO_2^-暴露 24 h 后的所有处理组中 MDA 浓度均逐渐升高, 特别是经 0.6 mg/L 和 3 mg/L NO_2^-暴露 96 h 后, 江鳕幼鱼肝脏和血液中 MDA 浓度显著升高, 达到最大值(13.35 nmol/mg prot, $p<0.05$)。

ROS 平衡主要由酶和非酶抗氧化剂组成的氧化防御系统调节。一般来说, 抗氧化酶包括 SOD 和 CAT, 协同形成了抵御氧化损伤的第一道防线, GSH 是非酶防御系统的一员, 在中和 ROS 和直接与镉结合方面起着至关重要的作用[12]。ROS 能够攻击抗氧化防御系统, 导致抗氧化成分(SOD、CAT、GPx 和 GSH)的丢失[13]。抗氧化能力(T-AOC)的总和表征了机体的整体氧化还原状态[14]。管越强等[15]认为, ROS 抑制了



注：结果用平均值±*S.E.*表示，n=9；上标值显示组间差异显著（p < 0.05），0 mg·L^{-1} NO_2^-暴露组作为对照

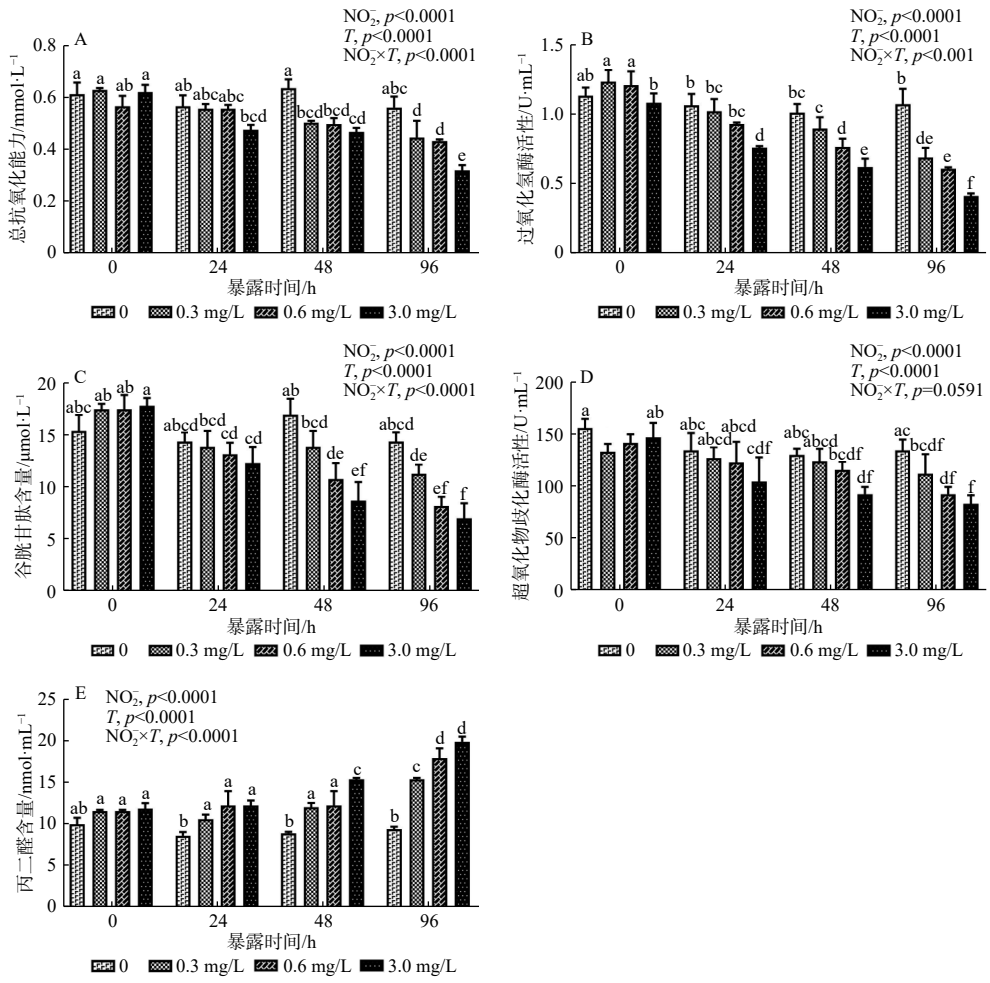
图 2　不同浓度NO_2^-暴露对星突江鲽幼鱼肝脏抗氧化能力的影响

Fig. 2　The effect of different concentrations of NO_2^- exposure on the antioxidant capacity of the liver of juvenile *Platichthys stellatus*

机体抗氧化酶活性，而在消除活性氧过程中，小分子抗氧化剂大量消耗，这是机体 T-AOC 下降的主要原因。在本研究中，随着NO_2^-暴露时间的延长和暴露浓度的升高，星突江鲽幼鱼血液和肝脏中 SOD、CAT、GSH 和 T-AOC 水平逐渐下降，SOD、CAT 和 GSH 的下降可能是 T-AOC 下降的重要原因之一，表明NO_2^-暴露可诱导鱼类的氧化损伤。当抗氧化剂不能应对氧化应激时，过量的 ROS 会攻击并氧化细胞膜上的脂质分子，产生 MDA，较高的 MDA 水平说明星突江鲽对NO_2^-产生的氧化应激反应，并耗尽了不同组织中的抗氧化剂[16]。同样，本实验结果发现，星突江鲽幼鱼经NO_2^-暴露 96 h 后，血液和肝脏中 MDA 水平显著升高，这与之前的研究结果一致。

2.3　NO_2^-暴露对江鲽幼鱼血液免疫指标的影响

对江鲽幼鱼不同暴露组血液免疫指标的测定显示，相对于对照组，0.6 mg/L 和 3 mg/L NO_2^-暴露组中 C3 浓度在暴露 24 h 后显著升高，同组的 C4 浓度在 96 h 也明显上调（图 4A 和图 4B，p< 0.05）。与对照组相比，经NO_2^-暴露 24 h 后各处理组 LZM 活性逐渐上升，但是，IgM 与对照组相比呈现下降趋势，并在 96 h 达到最低值（图 4C 和图 4D，p<0.05）。3 mg/L NO_2^-暴露组中 Hsp70 浓度在暴露 96 h 后显著增加（图 4E，p<0.05）。各暴露组中 TNF-α 与、TNF-β 与 IL-8 在暴露 24 h 后显著升高，96 h 后水平达到最高（图 4F、图 4G 和图 4H，p<0.05）。此外，LD 浓度较对照组在暴露 24 h 后显著降低（p<0.05），其中 3 mg/L 处理组



注: 结果用平均值±*S.E.*表示, n=9; 上标值显示组间差异显著(p< 0.05), 0 mg·L^{-1} NO_2^- 暴露组作为对照

图 3 不同浓度NO_2^-暴露对星突江鳐幼鱼血液抗氧化能力的影响

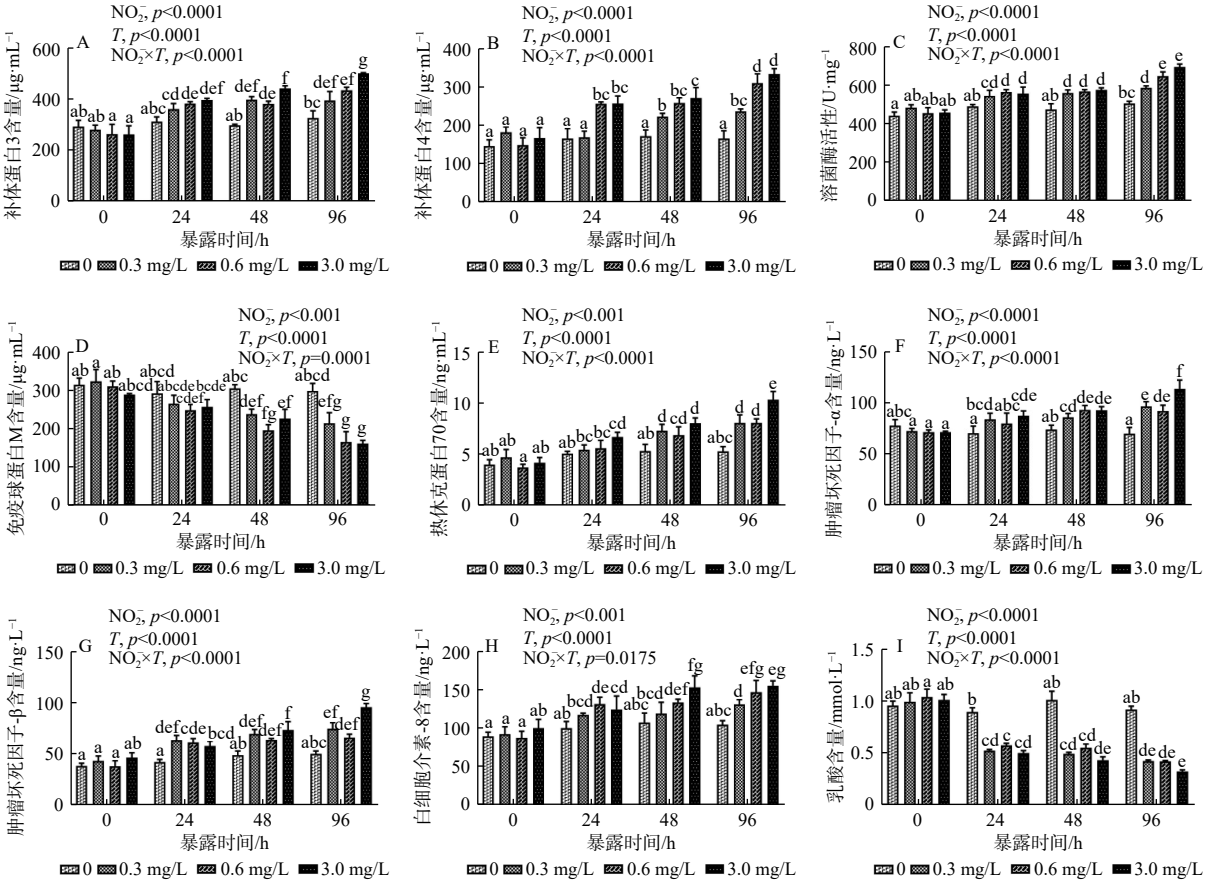
Fig. 3 The effect of different concentrations of NO_2^- exposure on the blood antioxidant capacity of juvenile *Platichthys stellatus*

中 LD 浓度在 96 h 变化最为显著(图 4I, p<0.05)。

任何不利的环境变化会导致鱼类免疫力下降, 不过, 硬骨鱼类拥有各种重要的防御分子, 如溶菌酶、补体和免疫球蛋白, 它们参与了对潜在逆境环境的防护功能[17]。学者们多次研究表明, C3 和 C4 是经典凝集素通路的关键组分, 环境污染物导致鱼类 C3 和 C4 基因或蛋白的上调[18]。学者们普遍认为, NO_2^-对鱼类具有毒性, 并扰乱多种生理功能[19]。我们的研究也发现, 暴露于 NO_2^-(0.6 mg/L 和 3 mg/L)48 h 和 96 h 的江鳐幼鱼血液中 C3 和 C4 浓度显著升高(p<0.05), 表明补体系统被化学物质暴露激活。然而, 补体的持续激活可能导致对宿主的不良反应和免疫抑制[20]。免疫球蛋白 IgM 是鱼类体液免疫系统的主要组成部分, 是评估鱼类环境毒性的灵敏性指标[21]。在鱼类, 一些研究报告发现环境污染物如硫酸铜、氨和二氧化碳, 抑制了免疫球蛋白或 mRNA 表达水平[22]。同样, 本实验的结果发现, 暴露于NO_2^-(0.6 mg/L 和 3 mg/L)48 h 和 96 h 后, 江鳐幼鱼血液中 IgM 含量显著下降(p<0.05)。

2.4 NO_2^-暴露对江鳐幼鱼肝脏免疫基因表达的影响

NO_2^-暴露在江鳐幼鱼肝脏免疫中的作用如图 5 所示, NO_2^-胁迫 96 h 后, 不同浓度的处理组间江鳐幼鱼肝脏组织的免疫应激和细胞因子相关基因发生了显著变化。与对照组相比, 处理组(0.3 ~ 0.6 mg/L)Hsp90 的转录水平在暴露 24 h 时上升后又微微下降, 但经 96 h 暴露后的所有



注：结果用平均值±*S.E.*表示，n=9；上标值显示组间差异显著（p< 0.05），0 mg·L^{-1} NO_2^- 暴露组作为对照

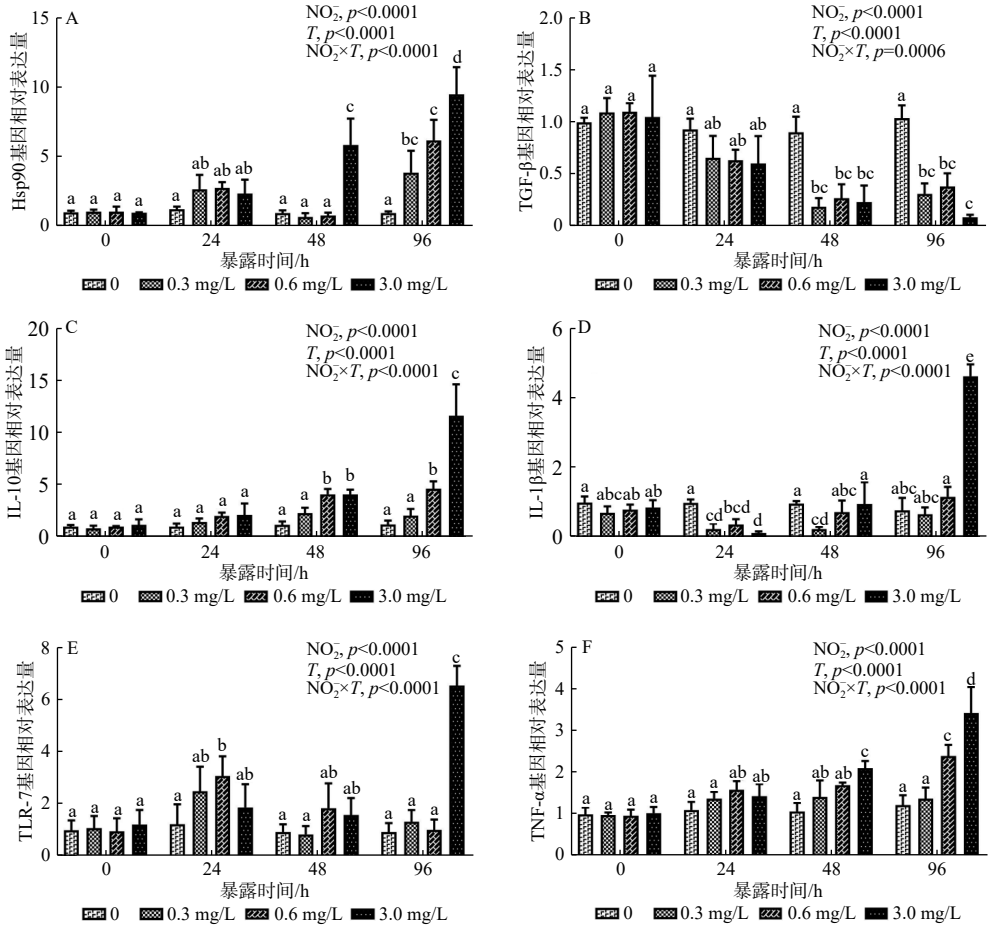
图 4　不同浓度NO_2^-暴露对星突江鲽幼鱼血液免疫指标的影响

Fig. 4　The effect of different concentrations of NO_2^- exposure on the blood immune indicators of juvenile *Platichthys stellatus*

处理组 Hsp90 的转录水平均显著升高（p<0.05，图 5A）。对于 TNF-α、IL-10、TLR-7 和 IL-1β 的表达，各处理组在NO_2^-作用下初期阶段中的表达量与对照组相比变化不明显，但 96 h 后的 3 mg/L 处理组的表达量显著高于对照组（图 5C ~ 图 5F），达到最高值。但是，在 TGF-β 表达方面，经处理后的各浓度组均随NO_2^-胁迫时间的增加呈下降趋势，在胁迫 48 h 后显著降低（图 5B）。

作为免疫反应的重要组成部分，炎症反应在清除受损组织、促进修复过程和保护宿主免受微生物入侵等方面发挥着关键作用[23]，TLR-7 是非特异性免疫中重要的模式识别受体，能够诱导 TNF-α、IL-10 和 IL-1β 细胞因子的分泌。常见的细胞因子，包括促炎性细胞因子（如 TNF-α 和 IL-1β）和抗炎性细胞因子（如 TGF-β），通过在炎症反应的激活过程中起拮抗作用，达到调控下游其他细胞因子表达的功能[24]。到目前为止，已有大量关于由环境污染物、细菌或病毒能够引起的炎症反应的报道[25]。在本研究中，3 mg/L 处理组经NO_2^-暴露 96 h 后，肝中 TLR-7 显著高表达，支持 TNF-α、IL-10 和 IL-1β 的表达显著上调。与对照组相比，3 mg/L 处理组经NO_2^-暴露 96 h 后，肝中 TNF-α、IL-10 和 IL-1β 的表达水平显著增加，而各处理组经NO_2^-暴露 48 h 后，肝中 TGF-β 的表达水平显著降低。这些结果表明，高NO_2^-暴露可诱导肝中炎症相关基因的表达，从而引起明显的炎症反应。此外，我们的研究结果可以进一步阐明星突江鲽幼鱼对NO_2^-胁迫的炎症反应的调控机制。

作为蛋白质合成的模板，mRNA 表达水平可以间接反映出相对应的蛋白合成的多寡。在涉及的几种分子中，热休克蛋白和金属硫蛋白基因



注: 结果用平均值±*S.E.*表示, n=9; 上标值显示组间差异显著(p< 0.05), 0 mg·L^{-1} NO_2^- 暴露组作为对照

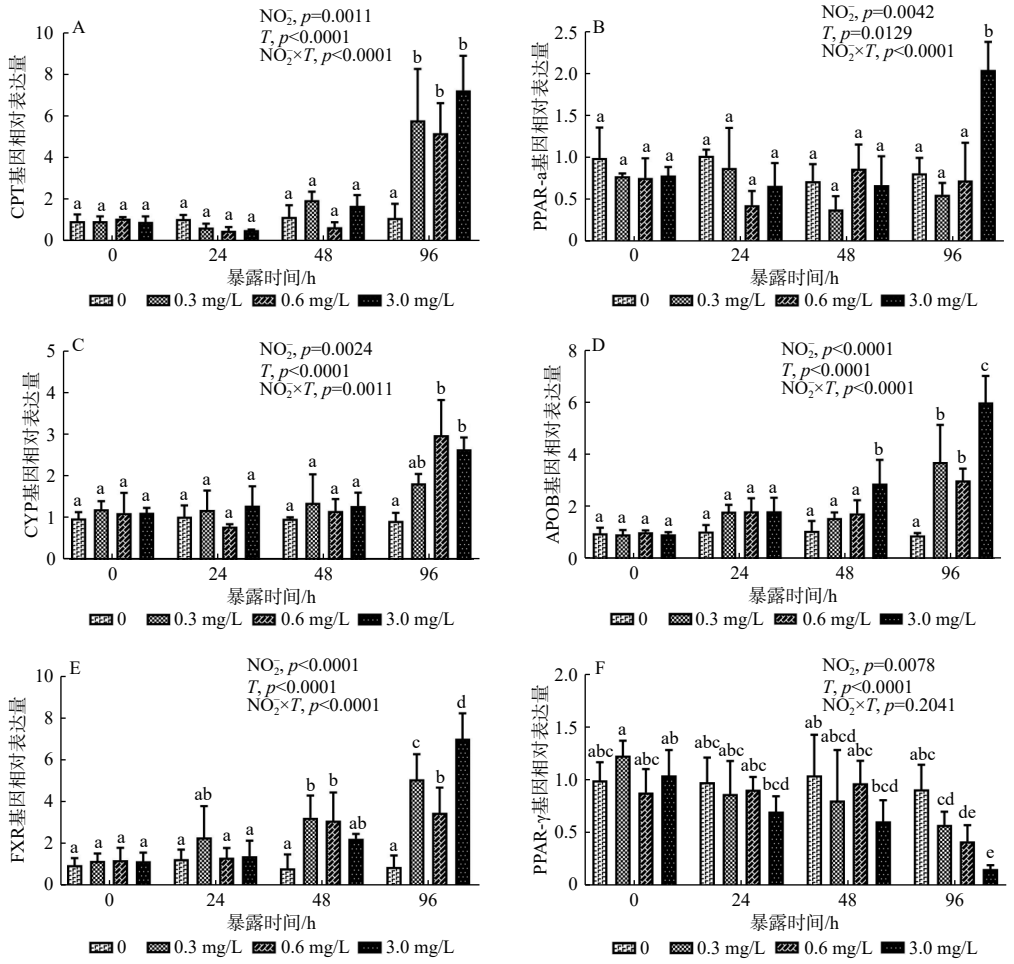
图 5 不同浓度NO_2^-暴露对星突江鳐幼鱼肝脏免疫基因表达的影响

Fig. 5 The effect of NO_2^- exposure at different concentrations on the expression of immune genes in the liver of juvenile *Platichthys stellatus*

多被用来评估各种压力对鱼类的影响[26]。热休克蛋白是分子伴侣, 在折叠新合成的蛋白质和重新折叠变性的蛋白质过程中起着关键作用[27]。在鱼类中, 两个主要的热休克蛋白家族是 Hsp70 和 Hsp90, 它们均由化学应激、热应激和拥挤等各种应激源诱导, 并参与免疫应答[22]。鱼类中 Hsp70 和 Hsp90 水平的提高可能反映了蛋白质损伤或对随后应激的耐受性的增加[28]。本研究结果显示, 随着NO_2^-浓度和暴露时间的增加, 江鳐幼鱼血液中 Hsp70 表达量和肝中 Hsp90 的基因表达量均显著增加(p<0.05), 表明 Hsp70 和 Hsp90 对亚硝酸盐急性胁迫具有灵敏的指示作用, 极大地提高了星突江鳐幼鱼对应激环境的耐受力。

2.5 NO_2^-暴露对江鳐幼鱼肝脏脂质过氧化的影响

NO_2^-暴露对江鳐幼鱼肝脏中脂肪酸合成、β 氧化和胆汁酸合成相关基因表达的影响如图 6 所示, 与 β 氧化相关的肉碱棕榈酰转移酶(CPT)和过氧化物酶体增殖物激活受体 α(PPAR-α) mRNA 的相对表达量在初期暴露后并无明显变化, 但暴露 96 h 后的表达量均显著高于对照组(p<0.05, 图 6A 和图 6B)。然而, 过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(PPAR-γ)在NO_2^-处理组后的表达水平较对照组处于下降趋势(p>0.05, 图 6F)。与对照组相比, 随着暴露时间的增加, 肝脏中载脂蛋白 B(ApoB)、胆固醇羟化酶(CYP)和法尼醇 X 受体(FXR)基因在 96 h 后表达均显著上调(图 6C、图 6D 和图 6E)。



注：结果用平均值±*S.E.*表示，n=9；上标值显示组间差异显著（p< 0.05），0 mg·L^{-1} NO_2^- 暴露组作为对照

图 6　不同浓度NO_2^-暴露对星突江鲽肝脏脂质过氧化的影响

Fig. 6　The effect of different concentrations of NO_2^- exposure on lipid peroxidation in the liver of juvenile *Platichthys stellatus*

β 氧化的关键基因 PPAR-α 显著上调；作为 PPAR-α 通路下游的关键脂肪酶，基因 *CPT* 的表达也显著增加（p<0.05）。本研究结果表明，NO_2^- 暴露增强了江鲽幼鱼体内脂肪酸的 β 氧化作用。先前的研究表明，鱼类暴露于不利环境条件下，需要调动更多的能量储备[29]。FXR 在胆固醇酯化、储存和脂肪酸合成的调节中发挥着重要作用。根据以往的研究，FXR 通过与关键的脂肪生成因子 SREBP-1 结合，参与肝脏脂肪生成的调控[30]。本研究中，NO_2^- 暴露 96 h 后，3 mg/L NO_2^- 浓度组有关脂质过氧化基因的表达显著上调（p<0.05）。这些研究结果表明，暴露于 NO_2^- 会增加肝脏中脂肪酸的合成，并在一定程度上支持了我们之前的论断，脂肪酸合成的增强可能与 PPAR-α 表达上调诱导的 β 氧化的增强有关，这是与 NO_2^- 暴露下江鲽幼鱼免疫反应增加的相关能量支出成本相吻合。在我们之前的研究中，NO_2^- 胁迫导致大菱鲆（*Scophthalmus maximus*）生长迟缓（p<0.05），说明 NO_2^- 胁迫对鱼类有很强的毒性作用[11]。因此，在鱼类生长过程中，可以通过增强肝脏的脂质代谢用来减轻 NO_2^- 的毒性，但是会影响正常的生长和发育。因而推测，抗 NO_2^- 应激是一个持续消耗能量的过程，在严重的急性胁迫压力下，鱼类不能完全补偿或恢复，导致大量的能量消耗[3]。

3　结 论

（1）本研究阐述了 NO_2^- 暴露对星突江鲽幼鱼

氧化应激、免疫反应和脂质代谢的影响。结果表明，亚硝酸盐暴露导致血液、肝脏 T-AOC、SOD、CAT、GSH 活性降低，MDA 水平上升，血液、肝脏出现了氧化应激。

（2）基于NO_2^-暴露导致血浆 C3、C4、lgM、IL-8、TNF-α 与 TNF-β 活性增加，肝脏 TNF-α、IL-10、TLR-7、IL-IB 基因表达水平上调，从而诱导细胞炎症和免疫毒性。亚硝酸盐暴露导致血液 Hsp70 水平上升和肝脏 Hsp90 转录水平上调，表明NO_2^-诱导了细胞应激反应。

（3）基于NO_2^-暴露改变了脂质代谢相关基因的表达水平，包括 CPT、PPAR-α、PPAR-γ、ApoB、FXR、CYP，暴露于NO_2^-会增加肝脏中脂肪酸的合成，说明亚硝酸盐胁迫对鱼类有很强的毒性作用。

（4）本研究结果仅揭示了在急性胁迫下NO_2^-诱导星突江鳖毒性的可能机制。为了提高我们对NO_2^-对海洋鱼类影响的理解，需要进一步研究星突江鳖长期接触NO_2^-的影响机制。

参考文献：

[1] MARTINEZ C B R, SOUZA M M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species[J]. Comparative biochemistry and physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2002, 133(1): 151-160.

[2] WUERTZ S, SCHULZE S G E, EBERHARDT U, et al. Acute and chronic nitrite toxicity in juvenile pike-perch (*Sander lucioperca*) and its compensation by chloride[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2013, 157(4): 352-360.

[3] SCHRECK C B, TORT L, FARRELL A P, et al. Biology of stress in fish[M]. Amsterdam: Academic Press, 2016: 351-590.

[4] 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.

[5] CHEN X N, XU Y L, CUI X Y, et al. Starvation affects the muscular morphology, antioxidant enzyme activity, expression of lipid metabolism-related genes, and transcriptomic profile of javelin goby (*Synechogobius hasta*)[J]. Aquaculture Nutrition, 2022, 2022: 7057571.

[6] DEANE E E, WOO N Y S. Impact of nitrite exposure on endocrine, osmoregulatory and cytoprotective functions in the marine teleost *Sparus sarba*[J]. Aquatic Toxicology, 2007, 82(2): 85-93.

[7] ALYOUSSEF A, AL-GAYYAR M M H. Thymoquinone ameliorated elevated inflammatory cytokines in testicular tissue and sex hormones imbalance induced by oral chronic toxicity with sodium nitrite[J]. Cytokine, 2016, 83: 64-74.

[8] RODRIGUES S, ANTUNES S C, NUNES B, et al. Histological alterations in gills and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to the antibiotic oxytetracycline[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2017, 53: 164-176.

[9] WANG W N, WANG A L, ZHANG Y J, et al. Effects of nitrite on lethal and immune response of *Macrobrachium nipponense*[J]. Aquaculture, 2004, 232(1/2/3/4): 679-686.

[10] 马爱军, 庄志猛, 李 晨, 等. 星突江鳖生物学特性及养殖前景 [J]. 海洋水产研究, 2006, 27(5): 91-95.

[11] CHEN J C, CHENG S Y. Hemolymph oxygen content, oxyhemocyanin, protein levels and ammonia excretion in the shrimp *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite[J]. Journal of Comparative Physiology B, 1995, 164(7): 530-535.

[12] CHEN J Q, CHEN D C, LI J X, et al. Cadmium-induced oxidative stress and immunosuppression mediated mitochondrial apoptosis via JNK-FoxO3a-PUMA pathway in common carp (*Cyprinus carpio* L.) gills[J]. Aquatic Toxicology, 2021, 233: 105775.

[13] APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 373-399.

[14] TEIMOURI M, YEGANEH S, MIANJI G R, et al. The effect of *Spirulina platensis* meal on antioxidant gene expression, total antioxidant capacity, and lipid peroxidation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2019, 45(3): 977-986.

[15] 管越强, 裴素蕊, 李泽健. 急性硫化物胁迫对日本沼虾免疫和抗氧化系统的影响 [J]. 水生态学杂志, 2011, 32(6): 89-94.

[16] ÜNER N, ORUC E Ö, CANLI M, et al. Effects of cypermethrin on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in liver and kidney of the freshwater fish, *Oreochromis niloticus* and *Cyprinus carpio* (L.)[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2001, 67(5): 657-664.

[17] TORT L, BALASCH J C, MACKENZIE S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses[J]. Inmunología, 2003, 22(3): 277-286.

[18] MA J G, LI X Y. Transcription alteration of immunologic parameters and histopathological damage in common carp (*Cyprinus carpio* L.) caused by paraquat[J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2015, 29(1): 21-28.

[19] JENSEN F B. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2003, 135(1): 9-24.

[20] YIN G W, LI W W, LIN Q, et al. Dietary administration of laminarin improves the growth performance and immune responses in *Epinephelus coioides*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 41(2): 402-406.

[21] WATTS M, MUNDAY B L, BURKE C M. Immune responses of teleost fish[J]. Australian Veterinary Journal, 2001, 79(8): 570-574.

[22] ZHANG C N, LI X F, TIAN H Y, et al. Effects of fructooligosaccharide on immune response, antioxidant capability and HSP70 and HSP90 expressions of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) under high ammonia stress[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2015, 41(1): 203-217.

[23] BOLS N C, BRUBACHER J L, GANASSIN R C, et al. Ecotoxicology and innate immunity in fish[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2001, 25(8/9): 853-873.

[24] DAN X M, ZHANG T W, LI Y W, et al. Immune responses and immune-related gene expression profile in orange-spotted grouper after immunization with *Cryptocaryon irritans* vaccine[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(3): 885-891.

[25] FALCO A, FROST P, MIEST J, et al. Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed with β-glucan supplements[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(6): 1051-1057.

[26] JUN Q, HONG Y, HUI W, et al. Physiological responses and HSP70 mRNA expression in GIFT tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* under short-term crowding[J]. Aquaculture Research, 2015, 46(2): 335-345.

[27] IWAMA G K, VIJAYAN M M, FORSYTH R B, et al. Heat shock proteins and physiological stress in fish[J]. American Zoologist, 1999, 39(6): 901-909.

[28] IWAMA G K, THOMAS P T, FORSYTH R B, et al. Heat shock protein expression in fish[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1998, 8(1): 35-56.

[29] HAMID N, JUNAID M, WANG Y, et al. Chronic exposure to PPCPs mixture at environmentally relevant concentrations (ERCs) altered carbohydrate and lipid metabolism through gut and liver toxicity in zebrafish[J]. Environmental Pollution, 2021, 273: 116494.

[30] EBERLÉ D, HEGARTY B, BOSSARD P, et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis[J]. Biochimie, 2004, 86(11): 839-848.

（本文编辑：曲丽梅）

（上接第 892 页）

[23] CHEN X X, ZHU Y X, ZHANG Y. Effects of polystyrene microplastics on the extracellular and intracellular dissolved organic matter released by *Skeletonema costatum* using a novel *in situ* method[J]. Environmental Pollution, 2024, 359: 124604.

[24] CHEN X M, ZHAO Y, MA Y Y, et al. Assessing the environmental impact of phenanthrene in different types of land use based on the binding characteristics with dissolved organic matter[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 147: 394-400.

[25] YUAN D H, GUO X J, WEN L, et al. Detection of Copper (Ⅱ) and Cadmium (Ⅱ) binding to dissolved organic matter from macrophyte decomposition by fluorescence excitation-emission matrix spectra combined with parallel factor analysis[J]. Environmental Pollution, 2015, 204: 152-160.

[26] YAMASHITA Y, JAFFÉ R. Characterizing the interactions between trace metals and dissolved organic matter using excitation-emission matrix and parallel factor analysis[J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(19): 7374-7379.

[27] MEI Y, BAI Y C, WANG L Y. Effect of pH on binding of pyrene to hydrophobic fractions of dissolved organic matter (DOM) isolated from lake water[J]. Acta Geochimica, 2016, 35(3): 288-293.

[28] BAI L L, XU H C, WANG C H, et al. Extracellular polymeric substances facilitate the biosorption of phenanthrene on cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*[J]. Chemosphere, 2016, 162: 172-180.

[29] ZHANG J, GAO X, HUANG J Y, et al. Probing the interaction between human serum albumin and 9-Hydroxyphenanthrene: a spectroscopic and molecular docking study[J]. Acs Omega, 2020, 5(27): 16833-16840.

[30] ZHU L J, ZHAO Y, CHEN Y N, et al. Characterization of atrazine binding to dissolved organic matter of soil under different types of land use[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 147: 1065-1072.

（本文编辑：曲丽梅）