

急性缺氧对大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*) 肝脏中缺氧应答相关基因表达、蛋白含量及酶活性 的影响*

任倩妍¹ 张木子² 黎 明² 王日昕² 石 戈^{1①}

(1. 浙江海洋大学海洋科学与技术学院 舟山 316022; 2. 宁波大学海洋学院 宁波 315211)

摘要 为了评估缺氧对大弹涂鱼的影响,本研究通过模拟缺氧环境(溶解氧 $1.5 \pm 0.11 \text{ mg/L}$),探究急性缺氧(1h, 3h 和 6h)对大弹涂鱼缺氧相关基因表达、蛋白含量及酶活性的影响。结果显示,6h 缺氧过程中,对照组实验鱼肝脏中缺氧相关基因表达、蛋白含量和酶活性无显著性差异;缺氧处理组实验鱼肝脏中缺氧诱导因子(HIF)、葡萄糖转运体、脯氨酰羟化酶和 Bcl2/腺癌 E1B19KD 交互蛋白 3 基因的表达式和蛋白含量在 6h 处理时间内逐渐上调,但肿瘤抑制蛋白 p53 基因的表达式和蛋白含量在 1h 时显著最高;缺氧处理组实验鱼肝脏中乳酸脱氢酶、柠檬酸合酶和丙酮酸激酶活性逐渐下调,在 6h 时达到最低;但肝脏中葡萄糖激酶和磷酸果糖激酶活性在 3h 时显著增加,随后逐渐降低,在 6h 时达到最低;在整个缺氧过程中,缺氧处理组实验鱼肝脏中缺氧相关基因表达、蛋白含量和酶活性显著高于对照组。本研究结果表明, HIF 信号通路在缺氧应答中被激活;缺氧胁迫会抑制鱼类需氧代谢的生理过程。

关键词 大弹涂鱼; 缺氧; 基因表达; 蛋白含量; 酶活性

中图分类号 Q789; S941

doi: 10.11693/hyh20171100301

溶解氧(Dissolved Oxygen, DO)是集约化养殖系统中限制水体质量的重要因素之一,缺氧会导致养殖鱼类大量死亡。在应对缺氧胁迫时,不同鱼类表现出的生理适应性策略具有一定的差异,例如:通过调节红细胞增殖来增加氧的携带能力,抑制红细胞的凋亡,刺激血管生成并减少氧的消耗,增加对能量的需求等(Sun *et al.*, 2016),而这些与缺氧相关的生物学过程是通过缺氧诱导因子(Hypoxia inducible factor, HIF)信号通路中相关基因的表达来介导的(Zhu *et al.*, 2013),如:脯氨酰羟化酶(Prolyl-4-hydroxylase, PHD)、葡萄糖转运体(Glucose transporter, GLUT)、Bcl2/腺癌 E1B19KD 交互蛋白 3 (Bcl-2/adenocarcinoma E1B19KD interacting protein 3, BNIP3)和肿

瘤抑制蛋白 p53 (Tumour suppressor protein p53, p53)等。迄今, HIF 信号通路在鱼类缺氧研究中是一个热点领域,例如:胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*) (Chen *et al.*, 2012)、印度鲶鱼(*Clarias batrachus*) (Mohindra *et al.*, 2013)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) (Geng *et al.*, 2014)和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*) (Wang *et al.*, 2015)等。此外,鱼类缺氧应激的生理调节过程往往伴随着能量需求的变化,主要通过一些酶类活性变化表现出来,如:葡萄糖激酶(Glucokinase, GCK)、乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)、柠檬酸合酶(Citroyl synthetase, CS)、丙酮酸激酶(Pyruvate kinase, PK)和磷酸果糖激酶(Phosphofructokinase, PFK)等。

* 国家自然科学基金项目, 31472279 号, 31502176 号; 宁波市自然科学基金项目, 2016A610083 号。任倩妍, 硕士研究生, E-mail: 1107620441@qq.com

通讯作者: 石 戈, 教授, E-mail: sg2610105@126.com

收稿日期: 2017-11-30, 收修改稿日期: 2018-04-12

大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)栖息于河口咸淡水水域、潮间带滩涂上,其构建的洞穴含水量较低,水环境中经常出现缺氧和高碳酸含量(Aguilar *et al.*, 2000),由于其特殊的生理特性,使其成为研究缺氧胁迫较为合适的动物模型。此外,大弹涂鱼是商业上重要的养殖品种,在我国福建、浙江、江苏、台湾等地分布较为广泛(Jing *et al.*, 2017)。然而,目前的报道针对缺氧胁迫下大弹涂鱼生理调节机制的研究较少,导致在养殖及运输过程中,由于缺氧造成死亡的现象屡有发生,因此,弄清大弹涂鱼缺氧胁迫生理调节的分子机制显得尤为迫切。本研究拟通过评估急性缺氧条件下大弹涂鱼肝脏中缺氧应答相关基因的表达、蛋白含量(HIF, GLUT, PHD, BNIP3 和 p53)及酶活性(GCK, LDH, CS, PK 和 PFK)的变化,探究大弹涂鱼应对缺氧胁迫的生理调节机制。

1 材料与方法

1.1 实验设计

大弹涂鱼捕自浙江三门沿岸滩涂,于实验室环境中暂养 14d。随机挑选健康活泼、体表无损伤的实验鱼 180 尾(平均体重 12.58 ± 0.12 g),置于 6 个 65L 塑料桶中,每桶 30 尾。实验共设置 2 个处理组:对照组(5.67 ± 0.13 mg/L)和缺氧组(大弹涂鱼的窒息点为 1.5 ± 0.11 mg/L;曹伏君等, 2011),急性胁迫为期 6h。缺氧组通过向水中充入氮气,使得水体溶解氧在 3h 内达到缺氧水平,之后通过 YSI 水质测量仪(YSI Inc.,

Ohio, USA)监测水中溶氧情况;对照组采用气泵维持常氧条件。整个实验过程中,水温 22—24°C,保持自然光照。

1.2 取样

分别于 1h、3h、6h 取样,每次每桶随机挑选 3 尾鱼,MS-222 麻醉后解剖获得肝脏,分成 2 份,一份保存于-20°C 用于酶活分析;另一份液氮冷冻,保存于-80°C 用于基因表达和蛋白含量分析,所有实验在一个月內完成。

1.3 基因表达分析

基于大弹涂鱼 HIF、PHD、GLUT、BNIP3 和 p53 序列,以 β -肌动蛋白为内参基因(β -actin),采用 Primer 5.0 软件设计引物,引物序列见表 1,所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。采用 Takara RNAiso 试剂提取大弹涂鱼肝组织的总 RNA(大连宝生物工程有限公司,大连,中国),并采用 Trans 试剂进行反转得到用于实时荧光定量的模板(北京全式金生物技术有限公司,北京,中国)。实时荧光定量 PCR 反应体系(20 μ L): 10 μ L TransStart Tip Green qPCR SuperMix、0.4 μ L 正向引物、0.4 μ L 反向引物、0.4 μ LcDNA 模板、8.8 μ L 无菌水。热循环系统反应条件包括 95°C, 5min; 95°C, 20s, 40 个循环; 57°C, 25s; 72°C, 25s, 每个反应进行三次重复。将 cDNA 模板以 5 为单位进行 6 个梯度的稀释,用于制作目的基因和内参基因的标准曲线。目的基因的 mRNA 表达通过“delta-delta Ct”方法计算(Schmittgen *et al.*, 2008)。

表 1 本研究用到的引物序列
Tab.1 Sequence of primers used in this study

引物名称	正向引物序列(5'—3')	反向引物序列(5'—3')	片段大小(bp)
HIF	GCGACTTATGTGTGCGTGAC	TGGACAACGCTCTGCTTCTA	206
GLUT	AGCGAAGACGAAGATGAAGC	TCCATCAGCTTGGCATTGTA	116
PHD	CTACAACAGAAGCGCAGCAG	GGTCCACCGTGCTACCTAAC	100
BNIP3	TAACAATGACGCAACGTGGT	AGCCTGACGTGTTCTCTGAAG	109
p53	ATGTCACCTCCTGCGGAGAC	GATTGGTCCGTGTGTGAGTG	126
β -actin	GAGCGTGGCTACTCTTTCA	GGAGGCAGCAGTGTTCAT	200

注: HIF: 缺氧诱导因子 1; GLUT: 葡萄糖蛋白体; PHD: 脯氨酰羟化酶; BNIP3: Bcl2/腺癌 E1B19KD 交互蛋白 3; p53: 肿瘤抑制蛋白 p53

1.4 蛋白含量和酶活性分析

取 20mg 肝脏组织在 200 μ L 预冰的生理盐水中匀浆,匀浆液 3000r/min, 4°C 离心 10min, 取上清。HIF、GLUT、PHD、BNIP3 和 p53 蛋白含量的测定采用 ELISA 检测手段,以斑马鱼蛋白作为抗体。步骤简述

如下: 每个测试均设置标准检测孔、样品检测孔和空白检测孔。标准检测孔加入 50 μ L 标准品; 样本检测孔分别加入待测样本 10 μ L 及样本稀释液 40 μ L; 除空白检测孔外,向每个检测孔中加入 100 μ L 的 HRP-阻断液, 37°C 孵育 60min; 向每个检测孔中加入洗涤液,

重复洗涤五次; 向每个检测孔中加入终止液 50 μ L 终止反应; 450nm 波长处测定各孔吸光值。GCK、LDH、CS、PK 和 PFK 活性的测定采用 ELISA 试剂盒(上海源叶生物科技有限公司, 上海, 中国), 操作步骤严格按照说明书进行。

1.5 统计分析

不同缺氧处理组之间的差异采用 *t* 检验进行统计学处理; 不同取样时间之间的差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 如果 *F* 检验呈显著性, 随后采用邓肯多重比较进行差异分析, 差异显著性设置 $P < 0.05$ 。所有分析均采用 SPSS 18.0.0 (Chicago, USA) 在 Windows 操作系统中进行。

2 结果

对照处理组实验鱼肝脏中 HIF、GLUT、PHD、BNIP3 和 p53 基因 mRNA 表达式在不同时间点之间无显著性差异($P > 0.05$; 图 1); 缺氧处理组实验鱼肝脏中 HIF、PHD、BNIP3 和 GLUT 基因 mRNA 表达式, 伴随缺氧时间的延长呈显著上升趋势, 而 p53 基因 mRNA 表达式呈下降趋势($P < 0.05$), 但缺氧 3h 后无显著性差异($P > 0.05$); 整个急性缺氧期间, 缺氧处理组实验鱼肝脏中 HIF、PHD 和 GLUT 基因 mRNA 表达式显著高于对照组, 而 BNIP3 和 p53 基因 mRNA 表达式显著低于对照组($P > 0.05$)。

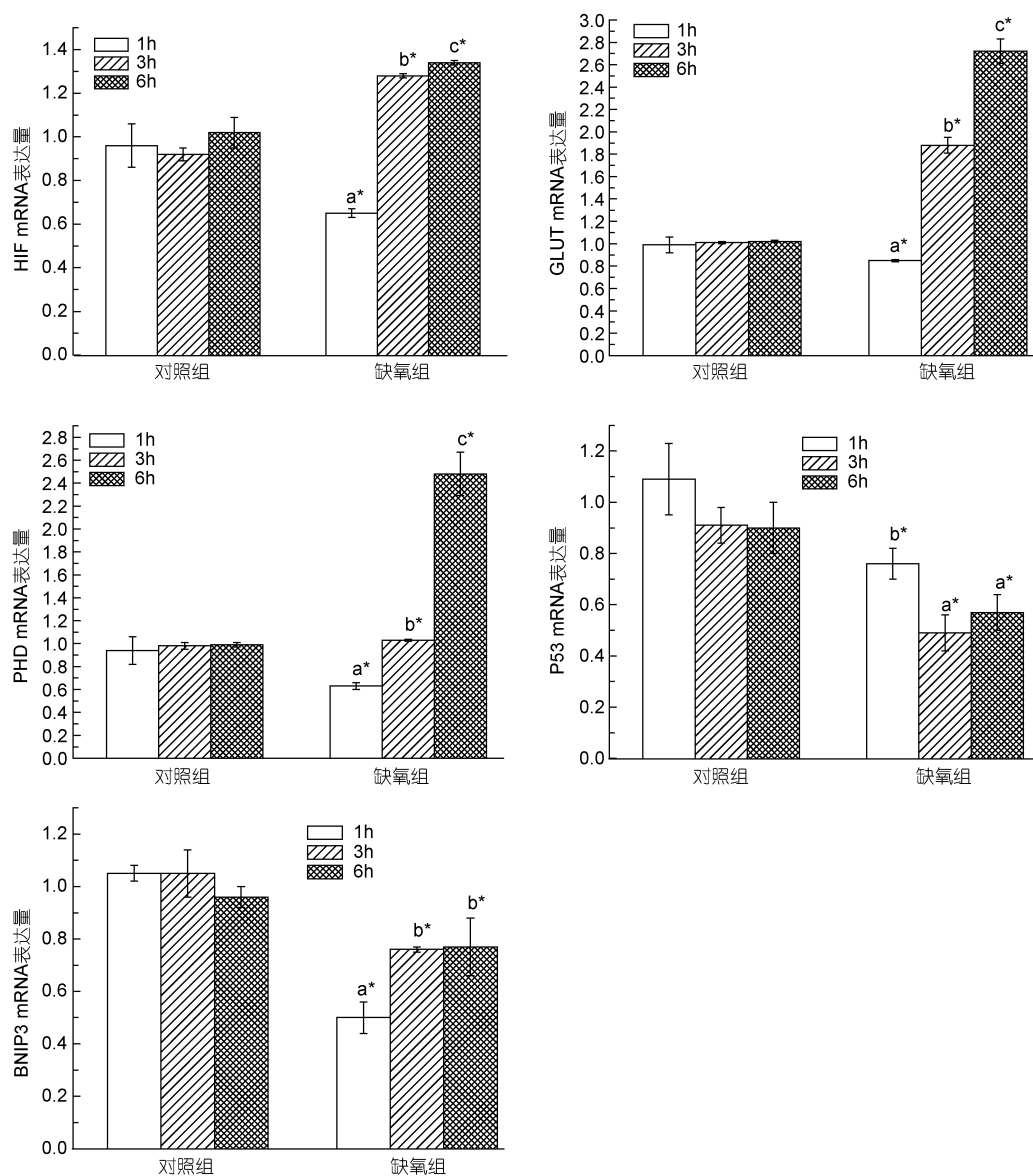


图 1 缺氧对大弹涂鱼肝脏 HIF、GLUT、PHD、BNIP3 和 p53 基因表达的影响

Fig.1 Effects of hypoxia on mRNA expression of HIF, GLUT, PHD, BNIP3 and p53 in liver of mudskipper

注: *表示缺氧差异显著, 不同字母表示差异显著($P < 0.05$), 相同字母表示无显著差异($P > 0.05$), 下同

对照组实验鱼肝脏中 HIF、GLUT、PHD、BNIP3 和 p53 蛋白含量在不同时间点之间无显著性差异 ($P>0.05$; 图 2); 缺氧处理组实验鱼肝脏中 HIF、GLUT、PHD 和 BNIP3 蛋白含量伴随缺氧时间的延长呈显著上升趋势 ($P<0.05$), 但 3h 后无显著性差异 ($P>0.05$); 相反, p53 蛋白含量伴随缺氧时间的延长呈显著下降趋势 ($P<0.05$); 整个急性缺氧期间, 缺氧处理组实验鱼肝脏中 HIF、GLUT、PHD 和 BNIP3 蛋白含量显著高于对照组, 而 p53 蛋白含量显著低于对照

组 ($P>0.05$)。

对照组实验鱼肝脏中 GCK、LDH、CS、PK 和 PFK 酶活性在不同时间点之间无显著性差异 ($P>0.05$; 表 2); 缺氧处理组实验鱼肝脏中 GCK 和 PFK 活性在 3h 时显著升高, 之后逐渐减少, 在 6h 时达到最低 ($P<0.05$); 肝脏中 LDH、CS 和 PK 酶活性伴随缺氧时间的延长呈显著下降趋势, 在 6h 时达到最低 ($P<0.05$)。整个急性缺氧期间, 缺氧处理组实验鱼肝脏中 GCK、LDH、CS、PK 和 PFK 酶活性显著高于对照组 ($P>0.05$)。

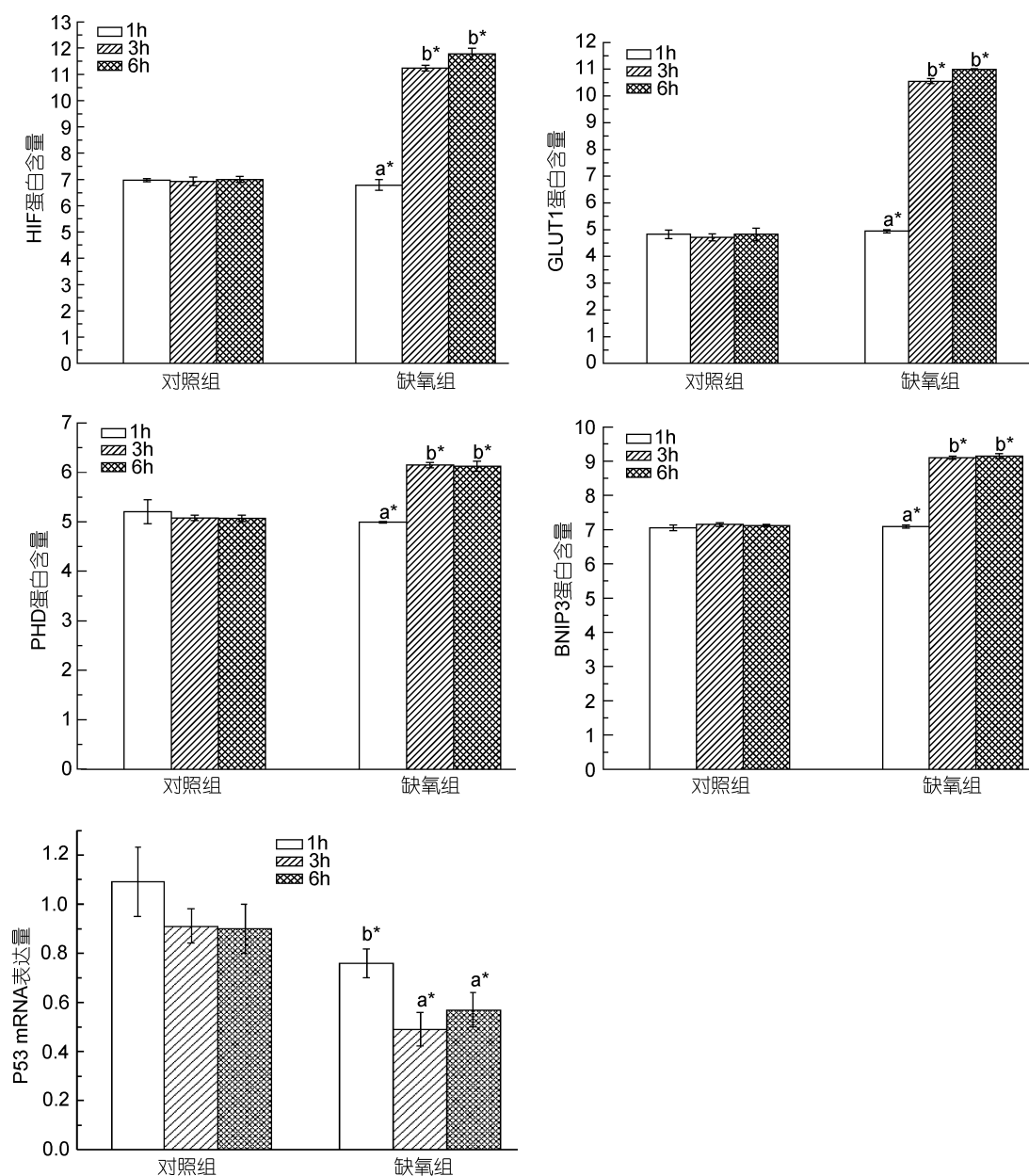


图 2 缺氧对大弹涂鱼肝脏 HIF、GLUT、PHD、BNIP3 和 p53 蛋白含量的影响

Fig.2 Effects of hypoxia on protein contents of HIF, GLUT, PHD, BNIP3 and p53 in liver of mudskipper

表 2 缺氧对大弹涂鱼肝脏 GCK、LDH、CS、PK 和 PFK 活性的影响
Tab.2 Effects of hypoxia on activities of GCK, LDH, CS, PK and PFK in liver of mudskipper

酶	组别	不同处理时间下酶的活性		
		1h	3h	6h
GCK	对照组	8.17±1.35	8.25±1.00	8.27±1.64
	缺氧组	10.23±0.69 ^{b*}	11.81±0.67 ^{c*}	6.57±0.34 ^{a*}
LDH	对照组	35.86±0.83	35.45±1.20	35.22±0.98
	缺氧组	47.26±1.15 ^{c*}	43.74±1.09 ^{b*}	36.48±0.06 ^{a*}
CS	对照组	112.19±0.77	113.02±2.75	111.82±0.57
	缺氧组	175.81±5.46 ^{c*}	160.25±4.04 ^{b*}	127.31±1.41 ^{a*}
PK	对照组	2.39±0.28	2.46±0.52	2.36±0.15
	缺氧组	3.55±0.06 ^b	3.27±0.03 ^b	2.45±0.29 ^a
PFK	对照组	74.05±1.73	75.31±3.88	75.76±3.32
	缺氧组	126.27±1.93 ^{b*}	137.06±1.54 ^{c*}	77.56±1.35 ^{a*}

注: *GCK: 葡萄糖激酶; LDH: 乳酸脱氢酶; CS: 柠檬酸合酶; PK: 丙酮酸激酶; PFK: 磷酸果糖激酶

3 讨论

本研究评估了急性缺氧对大弹涂鱼肝脏中缺氧应答相关基因表达、蛋白含量及酶活性的影响。研究发现, 缺氧处理组实验鱼肝脏中 HIF 基因的 mRNA 表达量及蛋白含量伴随缺氧时间的延长显著增加, 这个结果与 Zhang 等(2017)的报道一致, 他们发现急性缺氧胁迫会导致黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*)肝脏中 HIF 基因的 mRNA 表达量的增加。同样, Chen 等(2012)报道, 胭脂鱼暴露在缺氧环境中 24h 会上调 HIF 基因的 mRNA 表达量; Mohindra 等(2013)发现缺氧应激会引起印度鲶鱼脑、肝和头肾中 HIF 基因的转录显著增加; 类似的发现在其他鱼类中也屡见报道, 例如: 斑马鱼(*Danio rerio*) (Ton *et al*, 2003)、鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*) (Terova *et al*, 2008)、石首鱼(*Micropogonias undulates*) (Rahman *et al*, 2007)、石斑鱼(*Sebastes schlegelii*) (Mu *et al*, 2015)和眼斑星丽鱼(*Astronotus ocellatus*) (Baptista *et al*, 2016)等。结果提示, 缺氧诱导因子信号通路在缺氧应答中被激活。

缺氧诱导因子是氧稳态的主要调节器, 在常氧条件下, HIF 通过 VHL 依赖的泛素蛋白酶体通路快速被降解, 但在缺氧条件下却会导致 HIF 蛋白积累 (Ivan *et al*, 2001)。HIF 上调能够激活下游靶基因的表达, 如 GLUT (Shen *et al*, 2012)。Yang 等(2017)报道, 在缺氧状态下, 由于缺乏足够的氧气来维持正常的生理或行为功能, 鱼类为了适应低氧环境将启动一系列生理调节活动, 从而导致细胞膜上的葡萄糖转运蛋白数量增加, 而这种从有氧氧化到糖酵解途径

的代谢转变, 是增加葡萄糖摄取以促进低氧适应的一种有效策略 (Ton *et al*, 2003)。GLUT 能够在缺氧敏感的细胞中表达, 将有利于葡萄糖的转运 (Semenza, 2003)。作者在本研究中发现, 缺氧胁迫导致实验鱼肝脏中 GLUT 基因的 mRNA 表达量和蛋白含量显著增加, 该结果与前人在鲤鱼(*Cyprinus carpio*)和大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)中的发现是一致的, 他们认为鱼类暴露于急性缺氧环境中, 能够有效的增加葡萄糖摄取以维持能量的需求 (Lardon *et al*, 2013; Yang *et al*, 2017)。Wang 等(2015)研究发现, 12h 急性缺氧胁迫过程中, 团头鲂肝脏中 PHD2 和 HIF 基因的 mRNA 表达量呈先升高后降低的趋势。然而, 本研究发现, 实验鱼肝脏中 PHD 和 HIF 基因的 mRNA 表达量和蛋白含量呈现持续升高的趋势。Zhang 等(2017)提出, 在缺氧条件下, 黄颡鱼大脑和肝脏中 PHD 基因的 mRNA 表达量水平显著增加, 表明脯氨酸羟化可能在低氧适应中发挥作用。

Shimizu 等(1996)报道, 缺氧诱导的细胞凋亡是消除应激细胞的一种缺氧适应机制。在缺氧胁迫下, HIF 通过启动 Bcl-2 家族成员来激活参与厌氧代谢的基因, 包括: BNIP3 和 p53 (Semenza, 2000; Denko *et al*, 2003)。BNIP3 进入线粒体外膜, 继而加速自由基 (ROS) 的生成, 诱导细胞坏死、凋亡或自噬参与细胞死亡 (Regula *et al*, 2002)。在本研究中, BNIP3 基因的 mRNA 表达量和蛋白含量伴随缺氧时间的延长逐渐升高, 该结果与在斑点叉尾鲷急性缺氧研究中的发现是一致的 (Yuan *et al*, 2016)。先前的研究还发现, 水生动物暴露在缺氧环境中会导致 p53 基因表达量显

著上调,如:日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) (Sun *et al*, 2016)和太平洋白虾(*Litopenaeus vannamei*) (Li *et al*, 2016)。相反,在本研究中,实验鱼肝脏中 p53 基因的 mRNA 表达量和蛋白含量伴随缺氧时间的延长呈现显著下调。Liu 等(2005)提出, p53 是一种环境胁迫的通用感受器, p53 过度表达会抑制抗氧化基因的表达,导致细胞氧化应激的增加。结果提示, p53 基因表达量及蛋白含量的下调,可能是一种水生动物的缺氧保护机制,尽管在虾类的研究中已有报道 (Nuñez-Hernandez *et al*, 2018), 但机制仍不十分清楚。

生物体通过降低代谢率以应对低氧应激的生理适应能力通常有所不同(Zhang *et al*, 2016)。Butler 等(1997)提出,潜水鸟和哺乳动物可以通过增加糖酵解来弥补缺氧造成的能量损失,而鱼类则通过利用无氧代谢来应付缺氧状态下的能量需求,如:斑马鱼 (Barrionuevo *et al*, 2010)、甲鲮鱼(*Liposarcus pardalis*) (Maccormack *et al*, 2006)、金鱼(*Carassius auratus*)和黄颡鱼(Zhang *et al*, 2017)等。已有研究报道, LDH 指示无氧代谢的程度(Maes *et al*, 2016), CS 是三羧酸循环的关键酶,受到 PDK(Cai *et al*, 2010)和 GCK、PK 和 PFK 调控(Wegener *et al*, 2002), 其中 GCK、PK 和 PFK 是糖酵解限速酶。在本实验研究中, LDH 和 CS 活性伴随缺氧时间的延长而逐渐下降,尽管 GCK 和 PFK 活性在缺氧 3h 时表现出上升趋势,但此后均表现出显著降低趋势。结果表明,缺氧条件下鱼类有氧代谢能力受到了抑制(Nativ *et al*, 2014)。

4 结论

综上, HIF 信号通路在缺氧应答中被激活;大弹涂鱼缺氧应激缓释策略可能与 p53 的表达有关;缺氧抑制了大弹涂鱼需氧代谢的生理过程。

参 考 文 献

- 曹伏君, 郭良珍, 2011. 大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)窒息点及昼夜代谢规律. 海洋与湖沼, 42(6): 760—763
- Aguilar N M, Ishimatsu A, Ogawa K *et al*, 2000. Aerial ventilatory responses of the mudskipper, *Periophthalmodon schlosseri*, to altered aerial and aquatic respiratory gas concentrations. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 127(3): 285—292
- Baptista R B, Souza-Castro N, Almeida-Val V M F, 2016. Acute hypoxia up-regulates HIF-1 α and VEGF mRNA levels in Amazon hypoxia-tolerant Oscar (*Astronotus ocellatus*). Fish Physiol Biochem, 42(5): 1307—1318
- Barrionuevo W R, Fernandes M N, Rocha O, 2010. Aerobic and anaerobic metabolism for the zebrafish, *Danio rerio*, reared under normoxic and hypoxic conditions and exposed to acute hypoxia during development. Braz J Biol, 70(2): 425—434
- Butler P J, Jones D R, 1997. Physiology of diving of birds and mammals. Physiol Rev, 77(3): 837—899
- Cai M C, Huang Q Y, Liao W G *et al*, 2010. Hypoxic training increases metabolic enzyme activity and composition of α -myosin heavy chain isoform in rat ventricular myocardium. Eur J Appl Physiol, 108(1): 105—111
- Chen N, Chen L P, Zhang J *et al*, 2012. Molecular characterization and expression analysis of three hypoxia-inducible factor alpha subunits, HIF-1 α /2 α /3 α of the hypoxia-sensitive freshwater species, Chinese sucker. Gene, 498(1): 81—90
- Denko N C, Fontana L A, Hudson K M *et al*, 2003. Investigating hypoxic tumor physiology through gene expression patterns. Oncogene, 22(37): 5907—5914
- Geng X, Feng J B, Liu S K *et al*, 2014. Transcriptional regulation of hypoxia inducible factors alpha (HIF- α) and their inhibiting factor (FIH-1) of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) under hypoxia. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 169: 38—50
- Ivan M, Kondo K, Yang H F *et al*, 2001. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. Science, 292(5516): 464—468
- Jing D D, Li M, Zhang Y *et al*, 2017. Differential induction of enzymes and genes involved in oxidative stress in gill and liver tissues of mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris* exposed to lead. Turk J Fish Aquat Sci, 17(2): 437—443
- Lardon I, Eyckmans M, Vu T N *et al*, 2013. ¹H-NMR study of the metabolome of a moderately hypoxia-tolerant fish, the common carp (*Cyprinus carpio*). Metabolomics, 9(6): 1216—1227
- Li Y H, Wei L, Cao J G *et al*, 2016. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. Chemosphere, 144: 234—240
- Liu Z H, Lu H M, Shi H L *et al*, 2005. PUMA overexpression induces reactive oxygen species generation and proteasome-mediated stathmin degradation in colorectal cancer cells. Cancer Res, 65(5): 1647—1654
- Maccormack T J, Lewis J M, Almeida-Val V M F *et al*, 2006. Carbohydrate management, anaerobic metabolism, and adenosine levels in the armoured catfish, *Liposarcus pardalis* (castelnau), during hypoxia. J Exp Zool A Comp Exp Biol, 305A(4): 363—375
- Maes V, Betoulle S, Jaffal A *et al*, 2016. Juvenile roach (*Rutilus rutilus*) increase their anaerobic metabolism in response to copper exposure in laboratory conditions. Ecotoxicology, 25(5): 900—913
- Mohindra V, Tripathi R K, Singh R K *et al*, 2013. Molecular characterization and expression analysis of three hypoxia-inducible factor alpha subunits, HIF-1 α , -2 α and -3 α in hypoxia-tolerant Indian catfish, *Clarias batrachus* [Linnaeus, 1758]. Mol Biol Rep, 40(10): 5805—5815

- Mu W J, Wen H S, Li J F *et al*, 2015. HIFs genes expression and hematology indices responses to different oxygen treatments in an ovoviviparous teleost species *Sebastes schlegelii*. *Mar Environ Res*, 110: 142—151
- Nativ N I, Yarmush G, So A *et al*, 2014. Elevated sensitivity of macrosteatotic hepatocytes to hypoxia/reoxygenation stress is reversed by a novel defatting protocol. *Liver Transpl*, 20(8): 1000—1011
- Núñez-Hernández D M, Felix-Portillo M, Peregrino-Uriarte A B *et al*, 2018. Cell cycle regulation and apoptosis mediated by P53 in response to hypoxia in hepatopancreas of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere*, 190: 253—259
- Rahman M S, Thomas P, 2007. Molecular cloning, characterization and expression of two hypoxia-inducible factor alpha subunits, HIF-1 α and HIF-2 α , in a hypoxia-tolerant marine teleost, Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Gene*, 396(2): 273—282
- Regula K M, Ens K, Kirshenbaum L A, 2002. Inducible expression of BNIP3 provokes mitochondrial defects and hypoxia-mediated cell death of ventricular myocytes. *Circ Res*, 91(3): 226—231
- Schmittgen T D, Livak K J, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc*, 3(6): 1101—1108
- Semenza G L, 2000. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev*, 14(16): 1983—1991
- Semenza G L, 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 3(10): 721—732
- Shen W Q, Cheng K J, Bao Y Y *et al*, 2012. Expression of GLUT-1, HIF-1 α , PI3K and p-Akt in a case of ceruminous adenoma. *Head Neck Oncol*, 4: 18
- Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W *et al*, 1996. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res*, 56(9): 2161—2166
- Sun S M, Gu Z M, Fu H T *et al*, 2016. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of p53 from the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*, in response to hypoxia. *Fish Shellfish Immunol*, 54: 68—76
- Terova G, Rimoldi S, Corà S *et al*, 2008. Acute and chronic hypoxia affects HIF-1 α mRNA levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 279(1—4): 150—159
- Ton C, Stamatiou D, Liew C C, 2003. Gene expression profile of zebrafish exposed to hypoxia during development. *Physiol Genomics*, 13(2): 97—106
- Wang H J, Huang C X, Chen N *et al*, 2015. Molecular characterization and mRNA expression of HIF-prolyl hydroxylase-2 (*phd2*) in hypoxia-sensing pathways from *Megalobrama amblycephala*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 186: 28—35
- Wegener G, Krause U, 2002. Different modes of activating phosphofructokinase, a key regulatory enzyme of glycolysis, in working vertebrate muscle. *Biochem Soc Trans*, 30(2): 264—270
- Yang S, Yan T, Wu H *et al*, 2017. Acute hypoxic stress: effect on blood parameters, antioxidant enzymes, and expression of HIF-1 α and GLUT-1 genes in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Fish Shellfish Immunol*, 67: 449—458
- Yuan Z H, Liu S K, Yao J *et al*, 2016. Expression of Bcl-2 genes in channel catfish after bacterial infection and hypoxia stress. *Dev Comp Immunol*, 65: 79—90
- Zhang G S, Yin S W, Mao J Q *et al*, 2016. Integrated analysis of Mrna-seq and miRNA-seq in the liver of *Pelteobagrus vachelli* in response to hypoxia. *Sci Rep*, 6: 22907
- Zhang G S, Zhao C, Wang Q T *et al*, 2017. Identification of HIF-1 signaling pathway in *Pelteobagrus vachelli* using RNA-Seq: effects of acute hypoxia and reoxygenation on oxygen sensors, respiratory metabolism, and hematology indices. *J Comp Physiol B*, 187(7): 931—943
- Zhu C D, Wang Z H, Yan B, 2013. Strategies for hypoxia adaptation in fish species: a review. *J Comp Physiol B*, 183(8): 1005—1013

DIFFERENTIAL INDUCTION OF GENE EXPRESSIONS, PROTEIN CONTENTS AND ENZYME ACTIVITIES INVOLVED IN HYPOXIC RESPONSIVE IN LIVER TISSUES OF MUDSKIPPER *BOLEOPHTHALMUS PECTINIROSTRIS* EXPOSED TO ACUTE HYPOXIA

REN Qian-Yan¹, ZHANG Mu-Zi², LI Ming², WNAG Ri-Xin², SHI Ge¹

(1. School of Marine Science and Technology, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract To evaluate the effect of hypoxia on mudskipper, a study was carried out to simulated acute hypoxia (dissolved oxygen: 1.5 ± 0.11 mg/L) in the laboratory and analyzed gene expressions, protein contents and enzyme activities in mudskipper exposed to various durations of acute hypoxia (1h, 3h and 6h). No significant differences were found in gene expressions, protein contents and enzyme activities in control group. Fish exposed to acute hypoxia, liver mRNA expression and protein content of hypoxia-inducible factor 1, glucose transporters, prollyl-4-hydroxylase and Bcl-2/adenocarcinoma E1B19KD interacting protein 3 gradually increased at hour 6, on the contrary, fish exposed to hypoxia at hour 1 had the highest mRNA expression and protein content of tumour suppressor protein p53. Liver lactate dehydrogenase, citroyl synthetase and pyruvate kinase activities gradually decreased from hour 1 to hour 6, the lowest significant values were found at hour 6. However, liver glucokinase and phosphofructokinase activities abruptly increased at hour 3, and then gradually decreasing, the lowest values were found at hour 6. During the 6-hour period, gene expressions, protein contents and enzyme activities involved in hypoxic responsive of fish in the hypoxia treatment group were higher than those of fish in control group. This study indicates that the HIF signaling pathway is activated in response to hypoxia; liver enzymes are decreased, which indicated a depression in the capacity of aerobic metabolism during fish hypoxia.

Key words *Boleophthalmus pectinirostris*; hypoxic; gene expression; protein content; enzyme activity