文章编号:1674-7054(2016)01-0017-06

# 低氧胁迫下不同品种凡纳滨对虾 线粒体超微结构的比较

#### 

(1. 海南大学 农学院,海口 570228; 2. 海南广泰海洋育种有限公司,海南 文昌 571328;
3. 重庆市奉节永安中学,重庆奉节 404600)

摘 要:利用透射电镜技术比较研究了低氧胁迫对 2 个凡纳滨对虾品系(正大,A6410)的肌肉和鳃组织线 粒体超微结构的影响。结果表明:常氧条件下,这 2 个凡纳滨对虾品系的肌肉和鳃中线粒体结构均匀,内外 膜平滑完整,内嵴细长且分布均匀。低氧胁迫 12 h 后,正大品种肌肉线粒体膜扭曲变形,体积变大,嵴和基 质明显减少,结构不完整且伴随着肌纤维疏松,肌丝断裂溶解;而 A6410 品种肌肉线粒体轻微肿胀,外膜和内 膜局部发生变化,内嵴溶解,部分肌丝疏松断裂。正大品种鳃线粒体外膜扭曲变形,内嵴模糊且排列紊乱,髓 样变形,呈现严重空泡化; A6410 品种鳃线粒体嵴和基质部分减少,出现轻微空泡化现象。抗低氧性能较强 的 A6410 肌肉和鳃线粒体受损程度明显轻于正大。不同组织对低氧胁迫的敏感性不同,且耐低氧性能与线 粒体结构密切相关。

通常水体中溶氧含量低于 2.0 mg • L<sup>-1</sup>时,称为低氧。近年来,由于人类活动和自然环境改变的影响,水体中低氧发生的频率、强度和持续时间都在增加。生物和非生物因素(光合作用、呼吸、富营养化、 潮汐周期、天气状况、全球气候变暖、水体分层加剧、水质调控不力等)常常引起沿海、河口和养殖水体溶 氧降低。低氧严重影响沿海生态系统的稳定,使底栖群落发生改变并产生所谓的死亡区,据报道全球超 过 400 个生态系统中存在所谓的死亡区<sup>[1-2]</sup>。水体产生低氧的原因非常复杂,主要有自然因素和人为因 素,自然因素造成的低氧区对生态系统的稳定性影响相对较小,而人为因素造成的水体富营养化是低氧 区恶化与增加的主要原因<sup>[3-4]</sup>。由于人类活动产生的很多营养盐和污染物质的排入、农用化肥的流失和 养殖水体的排入等因素容易使水体产生富营养化<sup>[5]</sup>近海天然水体溶解氧经常会不足或处于大幅度波动 状态,对甲壳类动物产生重要影响<sup>[6]</sup>。低氧能对甲壳动物的行为、生长发育、呼吸、代谢、免疫 DNA 损伤 及基因表达产生影响<sup>[7-12]</sup>。线粒体是生物能量的来源,低氧能够导致线粒体结构与功能的损伤。目前, 有关对虾抗低氧性能的研究主要集中在呼吸代谢酶和氧化代谢酶等生理生化响应方面<sup>[13-15]</sup>,尚未见有 利用透射电镜手段,比较研究低氧胁迫条件下不同品种凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肌肉和鳃细胞 中线粒体超微结构的相关报道。在肌肉和鳃细胞中,线粒体是参与细胞代谢、呼吸和提供能量的主要细 胞器<sup>[16]</sup>。因此,笔者从形态学的角度,对凡纳滨对虾耐低氧陆和的选育提供科学依据。

收稿日期: 2015-10-20

基金项目:海南省自然科学基金面上项目(201641J9);海南大学中西部计划项目(ZXBJH – XK002);博士后面 上基金一等(2013M530332)

作者简介:魏琳(1990-),女 ,海南大学 2013 级硕士研究生. E-mail: 441018728@qq.com

通信作者:周海龙(1977 –),男 副教授,博士.研究方向:海洋动物逆境生物学.E-mail: zhouhl@ hainu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 试剂:环氧树脂(Eponate 12 resin ,Ted pella, INC 厂家),硬化剂(NMA),软化剂(DD-SA),加速剂(DMP-30),戊二醛,锇酸,丙酮,柠檬酸铅和醋酸双氧铀等。仪器: JEM-2100 透射电镜(日本 电子),超薄切片机(LEICA Ultracut UCT),溶氧仪(HANNA, HI 9146), PH 计(HANNA, HI 8424),盐度计 (RSH-28),氮气罐,冰箱,温箱,干燥器,青霉素小瓶,封口膜,塑料杯和注射器等。

1.2 实验材料 供试的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 品种为正大和 A6410,体长约 10.5 cm,由海南 广泰海洋育种有限公司提供。通过测定这 2 个品种 12 h 的  $LC_{50}$  (12 h 的半数致死浓度) 发现,正大的 12 h  $LC_{50}$ 显著高于 A6410 的(P < 0.05)。A6410 虽然抗性强但生长较慢,正大虽然生长快但抗逆性能差。试 验前,先将凡纳滨对虾在储物箱中驯养 5 d [盐度(31 ±0.5) 温度(26 ±1) ℃  $_{40}$ H(7.8 ±0.5)]。驯养期 间,每天更换 1/2 海水,喂 2 次。在低氧胁迫期间,不投喂饲料。

1.3 实验设计 实验设 2 个溶氧水平(1.5  $\beta$ .0 mg · L<sup>-1</sup>),每个水平重复 3 次。溶氧水平主要通过充氮 气和空气的方法来调节,每隔 30 min 利用溶氧仪对水体溶氧浓度进行监测并作相应调整。利用 pH 计和 盐度计对实验水体中的盐度和 pH 进行测定。实验进行 12 h,分别在 0 和 12 h 取所需组织(鳃和肌肉)进 行测定。

1.4 透射电镜样品处理及观察 电镜样品的处理按如下步骤进行:

1) 取材及戊二醛前固定: 取对虾肌肉和腮 剪成小块 然后放入4 ℃的2.5% 戊二醛固定液中 保存3~5 h。
 2) 锇酸后固定: 倒掉瓶中的戊二醛 ,用蒸馏水漂洗2次 ,每次10 min 然后加入1% 的锇酸固定液 4 ℃固定1 h。

3) 脱水: 倒掉锇酸固定液,用蒸馏水漂洗 2次,每次 10 min,然后将组织依次放入 50%,70% 80%, 90%,100% 丙酮,每次 10 min,重复 3次,以脱去组织中的水分。

4) 浸透: 在室温条件下 将组织放入丙酮 – 包埋剂(环氧树脂) 混合液(V<sub>丙酮</sub>: V<sub>环氧树脂</sub> = 3 : 1) 中1h,
 然后再放入丙酮 – 包埋剂混合液(V<sub>丙酮</sub>: V<sub>环氧树脂</sub> = 1 : 2) 中2~3h,最后置于纯包埋剂中3~5h。

5) 包埋: 在包埋磨具内先滴入1 滴包埋剂 ,用镊子将样品轻轻压到底 ,再加入1 滴包埋剂 ,然后放入 烤箱中进行聚合 ,使包埋剂固化 ,控温及时间依次为: 37 ℃ 3 h ,75 ℃ 10~12 h。

6) 制备超薄切片: 取出包埋样品 在 Leica 超薄切片机上切成厚 0.5~1 μm 的半薄切片 ,甲苯胺蓝染 色 15 s 在光镜下观察并精确定位 ,包埋块细修 ,然后切成 50~70 nm 的超薄切片 ,置于铜网上。

7) 电子染色:采用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重电子染色,各染色30 min,蒸馏水漂洗,烘干1h,然后用JEM-2100透射电镜观察。

2 结果与分析

2.1 2个品种凡纳滨对虾的肌细胞线粒体的超微结构观察 2个品种凡纳滨对虾的肌细胞线粒体的超微结构观察结果见图 1~4。从图 12 可知,正常组正大和 A6410 品种凡纳滨对虾肌细胞线粒体呈卵圆形 或椭圆形,内外膜平滑完整,内嵴细长分布均匀,非常清晰。从图 3 可知,低氧处理组正大对虾肌细胞线 粒体膜局部病变,出现浓缩空泡化,体积变大肿胀,嵴和基质明显减少,结构不完整并伴随着肌纤维疏松, 肌丝断裂溶解;从图 4 可知,A6410 对虾肌细胞线粒体膨胀,外膜和内膜轻微扭曲变形,内嵴溶解,部分肌 丝疏松断裂。

2.2 2个品种凡纳滨对虾的鳃细胞线粒体的超微结构观察 2个品种凡纳滨对虾的鳃细胞线粒体的超微结构观察结果见图 5~8。从图 5 6 可知,正常组正大和 A6410 品种凡纳滨对虾鳃细胞线粒体呈卵圆形 或椭圆形 整体结构均匀,外膜和内膜完整平滑,内嵴细长。从图 7 可知,低氧处理组正大对虾鳃细胞线 粒体外膜扭曲变形,内嵴模糊且排列紊乱,部分嵴消失,髓样变形,呈现空泡化;从图 8 可知,A6410 对虾鳃 细胞线粒体出现浓缩空泡化,嵴和基质明显减少。



图 1 常氧条件下正大对虾肌肉纵切片的透射电镜超 微结构图(箭头指向线粒体)×4 000

Fig.1 Longitudinal section of muscle of the shrimp strain Zhengda by transmission electron microscopy under normoxia(Arrow points at mitochondria) ×4 000



图 2 常氧条件下 A6410 对虾肌肉纵切片的透射 电镜超微结构图(箭头指向线粒体)×4 000 Fig.2 Longitudinal section of muscle of the shrimp strain A6410 by transmission electron microscopy under normoxia(Arrow points at mitochondria) ×4 000



图 3 低氧处理下正大对虾肌肉纵切片的透射电镜超 微结构图(箭头指向线粒体)×4 000 Fig.3 Longitudinal section of muscle of the shrimp strain Zhengda by transmission electron microscopy

under hypoxia(Arrow points at mitochondria)×4 000

图 4 低氧处理下 A6410 对虾肌肉纵切片的透射 电镜超微结构图(箭头指向线粒体)×4 000 Fig.4 Longitudinal section of muscle of the shrimp strain A6410 by transmission electron microscopy under hypoxia(Arrow points at mitochondria)×4 000







图 6 常氧条件下 A6410 对虾鳃横切片的透射电 镜超微结构图(箭头指向线粒体)×4 000 Fig.6 Transversal section of gill of shrimp strain A6410 by transmission electron microscopy strain normoxia(Arrow points at mitochondria)×4 000



图 7 低氧处理下正大对虾鳃横切片的透射电镜超 微结构图(箭头指向线粒体)×4 000

Fig.7 Transversal section of gill of the shrimp strain Zhengda by transmission electron microscopy under hypoxia(Arrow points at mitochondria)×4 000



图 8 低氧处理下 A6410 对虾鳃横切片的透射电 镜超微结构图(箭头指向线粒体)×4 000 Fig.8 Transversal section of gill of the shrimp strain A6410 by transmission electron microscopy under hypoxia(Arrow points at mitochondria)×4 000

### 3 讨 论

线粒体是1种半自主细胞器,处于能量传递的中心,为生物体提供能量。其内膜上附着许多参与三 羧酸循环和氧化磷酸化的酶和转运代谢中间产物的蛋白,这些酶和转运蛋白在线粒体参与低氧适应的过 程中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。低氧能导致线粒体结构与功能的损伤,因此,低氧是引起线粒体功能障碍的重要 因素之一<sup>[18]</sup>。薄海等<sup>[19]</sup>通过实验发现低氧抑制了线粒体的合成,导致线粒体含量减少。赵娟等<sup>[20]</sup>发现 低氧导致线粒体结构紊乱,肿胀变形,嵴断裂。低氧使线粒体氧化磷酸化效率降低、ATP 合成减少、自由 基生成增多、线粒体结构破坏、进而损伤细胞功能<sup>[21]</sup>。因此,研究低氧胁迫条件下线粒体超微结构的变化 对于不同品系凡纳滨对虾耐低氧性能的研究具有重要意义。

凡纳滨对虾腹屈肌属于横纹肌,每根肌纤维包含了很多平行排列的肌原纤维,纵贯肌细胞全长<sup>[22]</sup>。 因为肌原纤维上的肌丝平行于肌纤维纵轴,所以呈现特殊的横纹<sup>[23]</sup>。着色浅的部分是明带(又叫I带), 着色深的的部分是暗带(又叫A带),明带与暗带交替排列。A带中间有一着色浅的窄区称H带,H带的 正中有条深线称M线;I带中央有1条致密的粗线称为Z线,两条相邻的Z线之间的一段肌原纤维为1个 肌节<sup>[24]</sup>。肌细胞含有丰富的线粒体,成列分布于肌纤维周围或数个分散在肌纤维之间,这些线粒体体积 大而且含有大量的嵴<sup>[25]</sup>。已有研究表明,低温导致中国对虾肌纤维膨胀疏松,肌丝断裂溶解,肌细胞线粒 体变形膨胀,内嵴肿胀,外膜破裂溶解,严重的甚至解体,泡状物增大<sup>[26]</sup>。笔者发现,低氧胁迫条件下,凡 纳滨对虾肌细胞线粒体显现浓缩空泡化,外膜扭曲变形,内膜溶解。与正大比较,A6410 线粒体受损程度 较轻。凡纳滨对虾的鳃由鳃膜、微血腔和上皮细胞组成<sup>[27]</sup>,在上皮细胞内线粒体数量较多,形状呈圆形或 椭圆形。鳃丝的上皮细胞有3种类型:1)角质层下的上皮细胞层;2)含有较多的糖原颗粒和微管束的柱 状上皮细胞;3)鳃丝中隔表面的贮藏上皮细胞内含有大量的糖原颗粒和线粒体<sup>[28]</sup>。对于对虾鳃细胞超微 结构的研究多集中在病毒和杀虫剂处理方面,如刘昌彬等<sup>[29]</sup>观察经实验感染暴发性流行病病毒中国对虾 鳃组织的超微结构,发现鳃细胞线粒体减少,浓缩显空泡化。也有研究表明,经杀虫剂处理的对虾鳃细胞 内线粒体内嵴膨胀,局部瓦解乃至解体<sup>[30]</sup>。笔者发现,在低氧环境中,凡纳滨对虾鳃细胞线粒体部分内嵴 消失溶解,结构肿胀有解体的趋势,但A6410线粒体氧化损伤程度比正大的轻。

线粒体具有独特的超微结构,主要功能是进行能量的转换。动物体内超过80%的能量在线粒体中产 生,因此,也被称为细胞的能量转换器。线粒体内膜上含有大量与电子传递链、能量转换功能相关的酶和 辅酶,因此,线粒体是细胞进行呼吸作用的重要场所。线粒体受损后,会释放活性氧及细胞色素C等,引 起细胞损伤。本实验结果表明,低氧胁迫条件下,抗低氧性能较强的A6410线粒体受损程度较轻,说明低氧 耐受性不同品系的凡纳滨对虾其线粒体结构发生了变化,线粒体在应答低氧胁迫中发挥重要作用。

#### 参考文献:

- [1] Rabalais N N, Turner R E, Scavia D. Beyond science into policy: Gulf of Mexico hypoxia and the Mississippi River: Nutrient policy development for the Mississippi River watershed reflects the accumulated scientific evidence that the increase in nitrogen loading is the primary factor in the worsening of hypoxia in the northern Gulf of Mexico [J]. BioScience , 2002 , 52(2): 129 142.
- [2] Diaz R J Rosenberg R. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems [J]. Science , 2008 , 321(5891): 926 929.
- [3] 李道季 ,黄大吉. 长江口外氧的亏损 [J]. 中国科学: D 辑, 2002, 32(8): 686-694.
- [4] Chen C C , Gong G C , Shiah F K. Hypoxia in the East China Sea: One of the largest coastal low-oxygen areas in the world [J]. Marine Environmental Research , 2007 , 64(4): 399 – 408.
- [5] 袁伟, 金显仕, 戴芳群. 低氧环境对大型底栖动物的影响 [J]. 海洋环境科学, 2010, 29(3): 293-296.
- [6] 韦柳枝. 低溶解氧对中国明对虾生长的影响及其机制的实验研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学 2010.
- [7] Levin L, Ekau W, Gooday A, et al. Effects of natural and human-induced hypoxia on coastal benthos [J]. Biogeosciences Discussions, 2009(6): 3563 – 3654.
- [8] Craig J K Crowder L B. Hypoxia-induced habitat shifts and energetic consequences in Atlantic croaker and brown shrimp on the Gulf of Mexico shelf [J]. Marine Ecology Progress Series , 2005 , 294: 79 – 94.
- [9] Guadagnoli J, Tobita K, Reiber C. Assessment of the pressure-volume relationship of the single ventricle of the grass shrimp, Palaemonetes pugio [J]. Journal of Experimental Biology, 2007, 210(12): 2192 - 2198.
- [10] Guadagnoli J A, Tobita K, Reiber C L. Changes in cardiac performance during hypoxic exposure in the grass shrimp Palaemonetes pugio [J]. The Journal of Experimental Biology, 2011, 214(23): 3906-3914.
- [11] Li Y, Wei L, Cao J, et al. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation [J]. Chemosphere, 2016, 144: 234 240.
- [12] Zhou H, Li Y, Wei L, et al. Sensitivity of larvae and adult and the immunologic characteristics of *Litopenaeus vannamei* under the acute hypoxia [J/OL]. Journal of Chemistry, 2014(2014):1-6.
- [13] 戴爱敏,李利,管越强.低氧胁迫对日本沼虾能量代谢和抗氧化代谢的影响[J].科技信息,2014(10): 10-23.
- [14] 管越强, 李利, 王慧春, 等. 低氧胁迫对日本沼虾呼吸代谢和抗氧化能力的影响[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2010(3): 301-306.
- [15] 李利. 低氧胁迫对日本沼虾呼吸代谢、能量代谢和抗氧化能力的影响 [D]. 保定: 河北大学 2010.
- [16] 姜明,刘晓云,范瑞清. -18 ℃冷冻条件下中国对虾肌细胞线粒体超微结构的变化 [J]. 海洋水产研究, 1996(1): 15-19.
- [17] Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis [J]. Science, 1998, 281(5381): 1309.
- [18] 左清清,姚娜,董坤哲,等.低氧适应的线粒体调控机制研究进展[J].畜牧兽医学报,2013(7):993-999.
- [19] 薄海, 彭朋, 秦永生, 等. 低氧复合运动对大鼠骨骼肌线粒体含量的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2014(8): 1461-1466.
- [20] 赵娟,李海英,薄海,等.低氧及跑台运动对大鼠左心室肌线粒体超微结构的影响[J].中国康复医学杂志,2011 (12):1104-1107.
- [21] 黄丽英. 低氧运动对大鼠心肌线粒体结构和功能的影响 [J]. 首都体育学院学报, 2009(4): 462-465.
- [22] Elofsson R ,Hessler R. The ultrastructure of the striated muscles of *Derocheilocaris typica* (Mystacocarida, Crustacea) [J]. Arthropod Structure & Development, 2013, 42(5): 361-368.
- [23] Li T W, Zhang J, Ding M J. Histology and ultrastructure of pustule disease in abalone *Haliotis discus* hannai (Mollusca: Gastropoda) [J]. Acta Zoologica Sinica 1997, 43: 237 241.
- [24] 吴新颖,梁萌青,方伟,等.饲料中添加食盐对低盐养殖凡纳滨对虾肌肉组织形态结构的影响[J].渔业科学进展, 2009(5):40-46.
- [25] 卢建平 陈宽智 刘晓云. 中国对虾 Penaeus chinensis(o'sbeck) 肌肉系统的研究Ⅲ. 肌纤维的组织学、超微结构和组织 化学[J]. 青岛海洋大学学报, 1994(4): 539 – 551.
- [26] 林婉玲,杨贤庆,王锦旭,等.浸渍冻结对凡纳滨对虾冻藏过程中肌肉组织的影响[J].现代食品科技,2015(6): 183-189.
- [27] Bell T A , Lightner D V. A handbook of normal penaeid shrimp histology [M]. Baton Rouge L A: World Aquaculture Socie-

ty, 1988.

- [28] Belli N, Faleiros R, Firmino K, et al. Na, K-ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp Macrobrachium amazonicum (Decapoda: Palaemonidae) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2009, 152(3): 431-439.
- [29] 刘昌彬,张红卫,王金星,等. 感染暴发性流行病病毒的中国对虾形态学研究 3. 病虾鳃的显微与超微结构 [J]. 山东大学学报(理学版),2002 (5):458-462.
- [30] 汝少国,李永祺,刘晓云,等. 久效磷对中国对虾细胞超微结构的影响Ⅲ. 对鳃的毒性效应 [J]. 应用生态学报,1997 (6): 655-658.

## Comparision of the Mitochondrial Ultrastructure between Two Varieties of the Shrimp *Litopenaeus Vannamei* under Hypoxia Stress

WEI Lin<sup>1</sup>, QIU Liguo<sup>1</sup>, JIANG Xiu<sup>1</sup>, LI Yuhu<sup>1</sup>, ZHOU Daijin<sup>3</sup>, HUANG Hao<sup>2</sup>, ZHOU Hailong<sup>1</sup>

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou Hainan 570228, China; 2. Hainan Guangtai Marine Animal Breeding Co. Ltd., Wenchang, Haikou Hainan 571328, China; 3. Chongqing Fengjie Yong' an Middle School, Fengjie, Chongqing 404600, China)

Abstract: The mitochondrial ultrastructures in the tissues of muscle and gill of two varieties Zhengda and A6410 of the white-leg shrimp Litopenaeus vannamei under hypoxia were observed by transmission electron microscopy (TEM) for comparison. Observations showed that the two shrimp varieties of L. vannamei had homogeneous mitochondrial ultrastructures in the tissues of muscle and gill with smooth and intact inner and outer membranes and slender and homogeneously distributed inner cristae. However, placed under hypoxia for 12 h, the Zhengda shrimps did not show homogeneous mitochondrial ultrastructures in the muscle tissue; their mitochondrial membranes were distorted and enlarged; the number of cristae and the matrix volume were obviously decreased; the structure was not intact, with loose muscle fibers and fractured dissolved myofilaments. The mitochondria in the muscle of A6410 were slightly swelled , the outer and inner membranes had partial lesions , the inner cristae dissolved, and parts of myofilaments loosened and fractured. The outer membranes of mitochondria in the gill of the Zhengda shrimps were distorted, and the inner cristae were blurred and arranged in disorder, giving medullary deformation and serious cavitation. The mitochondrial cristae and the matrix in the gill of A6410 were partially reduced , showing slight cavitation. The high hypoxia tolerance variety A6410 showed obviously less mitochondrial damages in the tissues of muscle and gill than the variety Zhengda. It is concluded that different tissues of both the shrimp varieties displayed different levels of sensitivity to hypoxia , and that hypoxia tolerance was closely correlated with mitochondrial ultrastructure.

Keywords: Litopenaeus vannamei; hypoxia; mitochondria; ultrastructure