

镉和低pH胁迫对中华绒螯蟹免疫应答及相关基因表达的影响

杨志刚, 赵雪健, 成永旭

Effects of cadmium and low pH stress on immune response and expression of related genes in the Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*)

YANG Zhigang, ZHAO Xuejian, CHENG Yongxu

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210303330>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

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>

饲料中胆汁酸对红鳍东方脂肪组成及抗氧化能力的影响

Effect of dietary bile acid supplementation on fatty acid composition and anti-oxidative capacity of tiger puffer *Takifugu rubripes*

上海海洋大学学报. 2020, 29(6): 829 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191002833>

饲料中植物油替代鱼油对中华绒螯蟹脂肪组成的影响

Effects of dietary replacement of fish oil by vegetable oil on fatty acid composition of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

上海海洋大学学报. 2020, 29(4): 559 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190902790>

亚硒酸钠对蛋白核小球藻生长及抗氧化酶活性的影响

Effects of sodium selenite on growth and antioxidant enzyme activity of green alga *Chlorella pyrenoidosa*

上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 838 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-279>

越冬暂养对雌性中华绒螯蟹的营养品质及风味的影响

Effects of overwintering cultivation on nutritional quality and flavor of female *Eriocheir sinensis*

上海海洋大学学报. 2021, 30(5): 800 <https://doi.org/10.12024/jsou.20191102867>

文章编号: 1674-5566(2022)02-0373-11

DOI:10.12024/jso.20210303330

镉和低 pH 胁迫对中华绒螯蟹免疫应答及相关基因表达的影响

杨志刚^{1,2,3}, 赵雪健^{1,2,3}, 成永旭^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306; 3. 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: 为了探究重金属镉和低 pH 胁迫对中华绒螯蟹抗氧化能力的影响, 实验设置了 2 个 pH(7.8、6.5)、3 个镉浓度组(0、1.45、2.90 mg/L)和 3 个处理时间(7 d、14 d、21 d), 研究镉和低 pH 胁迫对中华绒螯蟹血细胞总数(THC)、血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性、总抗氧化能力(T-AOC)、丙二醛(MDA)含量以及肝胰腺中谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、谷胱甘肽-s-转移酶(GST)、热休克蛋白 70(HSP70)和溶菌酶(LZM)基因 4 种免疫相关基因 mRNA 表达水平的影响。结果显示, 随镉浓度升高 THC 显著下降, 且在同浓度下 pH 6.5 时 THC 均低于 pH 7.8。pH 为 7.8 时, 随着镉浓度的升高中华绒螯蟹血清 SOD 活性和 T-AOC 均先升后降; 而 CAT 活性(除了第 7 天)和 MDA 含量逐渐升高。pH 为 6.5 时, 镉浓度 2.9 mg/L 胁迫 21 d 时, SOD、CAT 活性和 T-AOC 均显著低于 pH 7.8 ($P < 0.05$)。在整个实验过程中, 镉浓度 2.9 mg/L、pH 6.5 时 MDA 含量均显著高于 pH 7.8 ($P < 0.05$)。pH 为 7.8 时, GPx、GST、HSP70、LZM mRNA 表达量均随着镉浓度升高逐渐升高, 镉浓度 2.9 mg/L 胁迫 21 d 时, 各基因表达量都达到最高。在 14、21 d 时, 镉浓度 2.9 mg/L、pH 6.5 时 GPx、GST mRNA 表达量均显著降低, 并显著低于同浓度 pH 7.8 表达量 ($P < 0.05$); 而 HSP70、LZM mRNA 表达量在 21 d 时显著降低, 也显著低于同浓度 pH 7.8 表达量 ($P < 0.05$)。综上, 抗氧化酶活性以及相关基因 mRNA 表达量在低 pH 和镉应激刺激下呈上调或下调趋势以应对氧化应激, 低 pH 和镉协同处理对中华绒螯蟹的抗氧化防御的影响显著大于单一因素的作用, 高浓度镉(2.9 mg/L)处理的效果更显著。该研究结果为以后研究水体低 pH 和重金属污染对甲壳类动物影响提供了理论依据。

关键词: 中华绒螯蟹; 镉; pH; 抗氧化酶活性; 免疫基因

中图分类号: S 949 **文献标志码:** A

近年来, 由于工业和农业废水的大量排放, 重金属污染也越来越受人们的关注。重金属污染对水产养殖业、水产品的安全以及生态环境的平衡构成了威胁^[1-2]。在各种有毒金属中, 镉(Cd)是水环境中分布较广泛的重金属之一, 特别是在淡水系统中^[3-4]。在正常水体中, 镉的浓度为 10~500 ng/L, 但在中国一些工业化地区镉的浓度超过 10 $\mu\text{g/L}$ ^[5]。甲壳类动物对重金属污染特别敏感, 镉可与甲壳类等水生生物相互作用, 引起氧化应激^[6]、细胞凋亡^[7-8]和代谢紊乱^[9]等负面影响。因其毒性、持久性、生物积累和在

食物网内的生物放大作用而备受国内外学者的重视^[10]。水生动物体内镉的积累又会对动物及其人类的各种组织产生广泛的毒性影响^[11-12]。同时, 镉还能够诱导机体产生活性氧(ROS), 机体内的 ROS 一旦超出自身调节阈值时, 就会引起氧化损伤, 从而导致脂质过氧化、蛋白质变性、酶失活等危害^[13-16]。

水体 pH 是水产养殖中重要的环境因子之一, 近年来工业的高度发展带来的酸雨和水污染导致了河流和湖泊水体的酸化, 从而对水生生物产生严重危害。水体 pH 突变会对甲壳动物的存

收稿日期: 2021-03-12 修回日期: 2021-05-13

基金项目: 国家重点研究发展计划(2018YFD0900603); 现代农业产业技术体系专项资金资助(CARS-48); 上海市科学技术委员会工程技术中心能力提升项目(19DZ2284300); 黄河三角洲人才工程(DYRC20190210)

作者简介: 杨志刚(1973—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为环境胁迫或生理胁迫对中华绒螯蟹生存和生理的影响及响应机制。
E-mail: zgyang@shou.edu.cn

通信作者: 成永旭, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn

活^[17]、代谢^[18]、免疫^[19-20]和抗氧化能力^[21]等产生重要影响。当长时间处于低 pH 水体环境中时,甲壳动物机体无法维持正常的调节机能,体内代谢紊乱,个体抗病力下降,最终会影响到养殖生产的健康发展。

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 属甲壳纲 (Crustacea) 十足目 (Decapoda) 绒螯蟹属 (*Eriocheir*), 是我国重要的经济蟹类之一, 因其鲜美的口味和丰富的营养价值赢得人们的喜爱, 在水产养殖中占有极其重要的地位^[22]。中华绒螯蟹属于底栖动物, 其生活的水环境高度复杂, 经常暴露在多种污染物中。但有关镉对中华绒螯蟹的影响多为单因素, 很少考虑与其他关键环境因素的交互作用, 目前还没见到关于 pH 和镉共同对中华绒螯蟹影响的报道。通过研究不同 pH 条件下镉对中华绒螯蟹免疫的影响, 揭示了酸性环境条件下重金属的生物毒性状况。研究结果可为蟹类环境免疫学研究积累资料, 同时也为以后研究水体低 pH 和重金属污染对甲壳类动物影响提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

氯化镉 ($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$) (分析纯试剂)、浓盐酸和氢氧化钠 (优级纯), 均采购自上海国药集团试剂有限公司。在实验前氯化镉用超纯水配成 1×10^4 mg/L 的母液, NaOH 和 HCL 配成 1 mol/L 的母液备用, 使用前把母液储存在 4 °C 环境中。实验中使用的所有玻璃器皿用自来水和去离子水清洗后在 500 °C 条件下加热 4 h。

1.2 实验动物

实验用中华绒螯蟹均由上海海洋大学崇明基地提供, 体质量约 20 g。选取规格整齐、体无外伤、肢体健全的中华绒螯蟹运输到上海海洋大学实验基地, 暂养于上海海洋大学室内实验室长方形玻璃纤维池 (长 × 宽 × 高 = 3 m × 2 m × 1.0 m) 中, 同时放置 PVC 管和瓦片供中华绒螯蟹栖息和隐蔽。正式实验前所有中华绒螯蟹均暂养于曝气 3 d 以上的过滤淡水中, 实验期间对各实验水体 24 h 连续充氧, 采用自然光照 (12L:12D) 和水温 (20 ± 2) °C。实验期间水深为 15 ~ 20 cm, 24 h 增氧。每日 18:00 左右投喂商业蟹饲料 (浙江澳华), 次日上午 8:00 左右清除残饵

和粪便, 并换水 1/3 左右, 持续 2 周。每隔 4 h 采用便携式 pH 计 (Hach HQ40D) 检测水中 pH, 并用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L 从 HCl 调节 pH; 每 2 天更换 1 次 Cd^{2+} 溶液, 确保其维持在设定的实验浓度。

1.3 实验设计与样品采集

正式实验时, pH 设置为 6.5 和 7.8 (空白); Cd^{2+} 的梯度设置为 0、1.45、2.90 mg/L。实验分为 6 个组: 对照组 (pH 7.8, 0 mg/L)、(pH 7.8, 1.45 mg/L)、(pH 7.8, 2.9 mg/L)、(pH 6.5, 0 mg/L)、(pH 6.5, 1.45 mg/L)、(pH 6.5, 2.9 mg/L), 每组设 3 个平行, 每平行中放蟹 30 只。试验用水均为曝气 48 h 的自来水, 每 24 h 更换 1 次新配的染毒溶液, 每隔 4 h 采用便携式 pH 计检测水中 pH, 并用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节 pH, 确保其维持在设定的 pH。整个实验总共进行 21 d。在暴露 7、14 和 21 d 后, 分别从每个组中取出 6 只中华绒螯蟹。将中华绒螯蟹置于冰盒中麻醉 15 ~ 20 min, 用蒸馏水漂洗 2 次, 吸水纸擦干蟹体表水分。用 1.0 mL 无菌注射器从第 3 只步足基部抽取 1.0 mL 血淋巴, 一部分 (50 μL) 血淋巴与等量的抗凝剂 (由 0.8 g 的柠檬酸钠、2.05 g 的葡萄糖和 0.42 g 的氯化钠, 加 100 mL 的双蒸水配制而成, pH 为 7.4) 混合用于血淋巴细胞计数, 剩余的血淋巴放入 1.5 mL 离心管保存于 -80 °C 冰箱中, 用于后期免疫指标和免疫基因表达量的测定。用灭菌的镊子小心取出中华绒螯蟹肝胰腺组织, 迅速放入液氮中, 随后保存于 -80 °C 超低温冰箱中用于之后的指标测定。

1.4 血细胞总数的测定

将含有抗凝剂的血淋巴, 离心 (4 °C、800 g, 10 min), 弃上清, 制成 1×10^6 的细胞悬液, 用于血细胞计数。将施芳^[23]的方法稍加改进后进行血淋巴细胞计数: 将上述细胞悬液稀释 3 倍后, 在光学显微镜 (100 ×) 下观察并记录血球计数板 5 个大方格中血淋巴细胞的数量, 压线的细胞则采取左上计入, 右下弃去的原则, 每个样本做 3 次重复, 取平均值。每毫升中的血细胞总数 (total hemocyte counts, THC) 为每个方格内细胞的平均数乘以 10^4 。

1.5 血清抗氧化指标测定

用微型匀浆器 (型号: T10B, 德国 IKA 公司

生产)对解冻后的血淋巴进行匀浆,转速为 4 000 r/min 条件下匀浆 2~3 min,然后于 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 20 min,取出上清液(血清)备用。采用南京建成生物工程研究所的相关试剂盒测定血清的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)和血清总抗氧化能力(T-TOC)。

1.6 免疫基因表达量测定

将 0.2 g 肝胰腺置于含有液氮预冷的研钵中,用研杵研磨成粉末状,按照 RNA 提取试剂盒的方法提取总 RNA。把总 RNA 溶解在 200 mL 不含 RNA 酶的无菌水中,使用 Q5000 微量分光光度计测定总 RNA 的浓度(Thermo, Scientific, USA)和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。随后用 100 ng 总 RNA 作为逆转录模板,利用逆转录试剂盒合成 cDNA 第一链。根据中华绒螯蟹相关

酶基因序列利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物,序列如表 1 所示。均以中华绒螯蟹 β -actin 基因为内参基因。

1.7 数据分析

采用 SPSS 24.0 软件对试验数据进行统计分析,数据均以平均值 \pm 标准误(Mean \pm SE)表示。采用 Levene 和 Shapiro-Wilk's 法分别对数据进行方差齐性和正态分布检验,当不满足齐性方差时对百分比数据进行反正弦或平方根处理。采用双因素方差分析(ANOVA)对 pH、镉及其交互作用的影响。如果存在相互作用,则在每个固定 pH 下通过单因素方差分析镉的显著影响,然后进行 Tukey 的 HSD 试验。 t 检验用于检验 pH 在每个镉浓度下的显著影响。显著性差异水平为 $P < 0.05$ 。

表 1 特异性引物序列
Tab. 1 Specific primer sequence

目的基因 Target gene	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	NCBI 登录号 NCBI accession number
GPx	GPx-F	CTCTGGGAACAGCTTCTTGG	FJ617305.1
	GPx-R	ATCCTGTACCCTGCAACCAC	
GST	GST-F	ACGGGTTGTCATAGCTGGAG	FJ610337.1
	GST-R	CCATCAACAACCAAGTGTGC	
HSP70	HSP70-F	GGCAAGGCAGCGAAGGTCATC	KC493625.1
	HSP70-R	CGGCATTGGTGACAGACTGACC	
LZM	LZM-F	AGCGAAGGAAGTGTGAGAC	JN416111.1
	LZM-R	GTTGACATAGGGCACC	
β -actin	β -actin-F	GCATCCACGAGACCACCTACA	KY356885.1
	β -actin-R	CTCCTGCTTGCTGATCCACATC	

2 结果

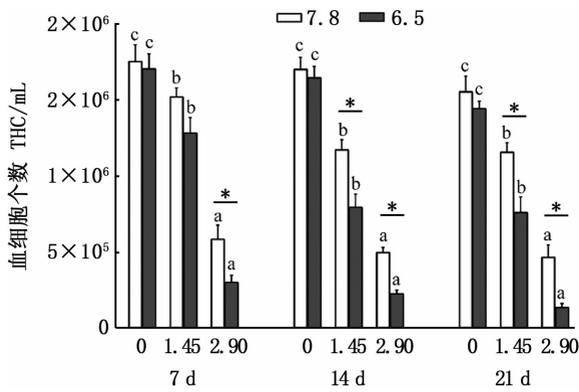
2.1 pH 和 Cd 对中华绒螯蟹血细胞总数的影响

如图 1 所示,在整个胁迫期间,随镉浓度的升高中华绒螯蟹血细胞总数均显著下降($P < 0.05$)。除第 7 天外,镉浓度为 1.45 mg/L 时, pH 6.5 时血细胞总数显著低于 pH 7.8 ($P < 0.05$);镉浓度为 2.90 mg/L 时, pH 6.5 在 3 个时间点(7、14、21 d)的血细胞总数均显著低于 pH 7.8 ($P < 0.05$)。镉和 pH 的交互作用对中华绒螯蟹血细胞总数有极显著影响,见表 2。

2.2 pH 和 Cd 对中华绒螯蟹血清抗氧化指标的影响

由图 2(a)可知;pH 为 7.8 时, SOD 活性在 7

d 时随镉浓度的升高显著升高。在 14、21 d 时,随镉浓度先升后降,其中暴露于 1.45 mg/L 浓度的镉溶液时,该酶活性达到最大。在镉浓度 2.9 mg/L 胁迫 21 d 时,中华绒螯蟹 SOD 活性显著低于对照组 ($P < 0.05$)。在 pH 6.5 胁迫 7 d 时, SOD 活性随镉浓度升高呈上升趋势;在 14、21 d 时,随镉浓度升高该酶活性显著降低。镉浓度 2.9 mg/L 胁迫 7 d, pH 6.5 时的 SOD 活性显著高于 pH 7.8 ($P < 0.05$);相反,在 14、21 d 时, pH 6.5 时 SOD 活性显著低于 pH 7.8 ($P < 0.05$)。镉和 pH 的交互作用对中华绒螯蟹体内 SOD 活性也有极显著影响,见表 2。



在各固定 pH 下不同上标所表示的平均值在各采样时间 3 种 pH 浓度之间有显著性差异 ($P < 0.05$)。在每个固定 pH 下, 两个镉水平之间的星号平均值在每个采样时间都有显著性差异 ($P < 0.05$)。The means denoted by different superscripts at each fixed pH are significantly different among three pH concentrations at each sampling time ($P < 0.05$). The means sharing the asterisk between two Cd levels at each fixed pH are significantly different at each sampling time ($P < 0.05$).

图 1 低 pH 条件下不同镉浓度对中华绒螯蟹血细胞个数 (THC) 的影响

Fig. 1 Influence of different Cd concentrations on total hemocyte counts (THC) in *Eriocheir sinensis* at low pH

如图 2(b) 所示, 在 7 d 时, pH 为 7.8 时, CAT 活性随镉浓度的升高呈先升后降趋势, 在 14、21 d 时, 随镉浓度升高 CAT 活性显著上升, 且镉浓度为 2.9 mg/L 胁迫 21 d 时活性达到最高。pH 为 6.5, 随镉浓度的升高中华绒螯蟹体内 CAT 活性均先升后降。在 pH 6.5 时, 镉浓度 2.9 mg/L 胁迫第 14 天时, CAT 活性开始显著低于 pH 7.8 ($P < 0.05$), 21 d 时, 较 pH 7.8 存在极显著差异 ($P < 0.01$)。在 14、21 d 时, 中华绒螯蟹体内 CAT

活性受镉和 pH 的交互作用的影响 (表 2)。

由表 2 可见, 除第 7 天外, 镉和 pH 的交互作用对 T-AOC 均有显著影响。在 7 d 时, T-AOC 随镉浓度增加呈先升后降趋势, 在 14、21 d 时, T-AOC 整体变化趋势与 SOD 活性相似 (图 2c)。与 pH 7.8 相比, 镉浓度 1.45 mg/L 胁迫 14、21 d 时, pH 6.5 时 T-AOC 显著低于 pH 7.8 ($P < 0.05$)。

镉浓度 2.9 mg/L 胁迫 21 d 时, pH 6.5 时 T-AOC 均显著低于 pH 7.8 ($P < 0.05$)。

由图 2d 可见, 中华绒螯蟹体内 MDA 含量随镉浓度的升高均显著增加。整个胁迫过程中, 镉浓度为 2.90 mg/L 时, pH 6.5 时 MDA 含量显著高于 pH 7.8 ($P < 0.05$)。镉浓度为 1.45 mg/L 时, pH 6.5 时 MDA 含量仅在 14 d 时显著高于 pH 7.8 ($P < 0.05$)。在 7、14 d 时, 镉和 pH 的交互作用对中华绒螯蟹体内 MDA 含量也有显著影响。见表 2。

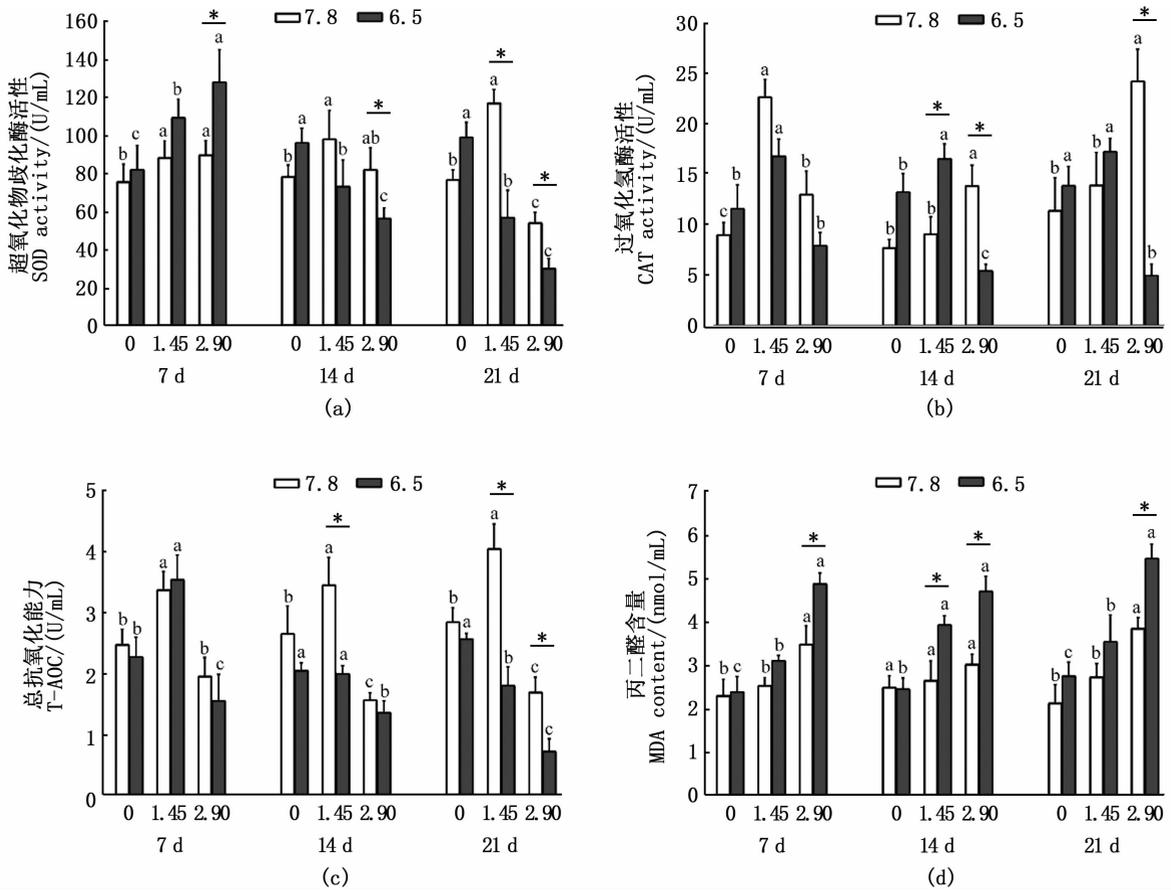
2.3 pH 和 Cd 对中华绒螯蟹肝胰腺中免疫基因表达量的影响

如图 3(a) 所示, 在 7 d 时, 各组间 GPx mRNA 表达量无显著性差异 ($P > 0.05$)。在 14、21 d 时, pH 7.8 时, GPx mRNA 表达量随镉浓度升高显著升高, 具有浓度-效应关系, 而 pH 6.5 时 GPx mRNA 表达量与 pH 7.8 相反。除第 7 d 外, 镉浓度为 2.9 mg/L, pH 7.8 时 GPx mRNA 表达量显著高于 pH 6.5 ($P < 0.05$)。镉浓度为 1.45 mg/L 胁迫 21 d, pH 7.8 时 GPx mRNA 表达量显著高于 pH 6.5 ($P < 0.05$)。镉和 pH 的交互作用在 14 d 和 21 d 时对中华绒螯蟹 GPx 相对表达量有显著影响。见表 3。

表 2 镉和 pH 对中华绒螯蟹免疫指标影响的双向方差分析

Tab. 2 Two-Way ANOVA of the effects of Cd and pH on immune indexes in *Eriocheir sinensis*

时间 Time/d	df	THC			SOD			CAT			T-AOC			MDA		
		Cd	pH	Cd * pH	Cd	pH	Cd * pH	Cd	pH	Cd * pH	Cd	pH	Cd * pH	Cd	pH	Cd * pH
		2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2
7	MS	2.88×10^{12}	2.23×10^{11}	4.22×10^{10}	2812.795	4360.633	768.948	348.382	69.588	65.461	8.884	0.187	0.252	9.128	3.128	0.785
	F	1554.350	120.206	22.735	112.428	174.295	30.735	170.815	34.120	32.096	43.596	0.919	1.237	82.029	28.106	7.058
	P	<0.001	<0.001	<0.001	0.041	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.051	<0.001	0.345	0.305	<0.001	<0.001	0.003
14	MS	2.68×10^{12}	2.90×10^{11}	4.56×10^{10}	1186.008	1075.917	1857.121	32.266	20.942	224.350	5.025	5.131	1.209	5.899	8.649	2.450
	F	2666.006	288.493	45.393	26.797	24.294	41.933	49.953	32.422	347.329	34.798	35.531	8.369	53.921	79.051	22.394
	P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.047	0.001	<0.001	<0.001	<0.001
21	MS	2.14×10^{12}	3.48×10^{11}	3.33×10^{10}	6554.315	2687.631	5114.699	26.626	181.109	493.730	6.862	8.203	3.717	13.628	11.588	0.547
	F	474.662	77.132	7.391	191.892	78.686	149.744	19.241	130.875	356.786	93.360	111.605	50.569	61.457	52.259	2.465
	P	<0.001	<0.001	0.008	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.102



在各固定 pH 下不同上标所表示的平均值在各采样时间 3 种 pH 浓度之间有显著性差异 ($P < 0.05$)。在每个固定 pH 下,两个镉水平之间的星号平均值在每个采样时间都有显著性差异 ($P < 0.05$)。

The means denoted by different superscripts at each fixed pH are significantly different among three pH concentrations at each sampling time ($P < 0.05$). The means sharing the asterisk between two Cd levels at each fixed pH are significantly different at each sampling time ($P < 0.05$).

图 2 低 pH 条件下不同镉浓度对中华绒螯蟹血清抗氧化指标的影响

Fig. 2 Influence of different Cd concentrations on serum antioxidant indexes in *Eriocheir sinensis* at low pH

表 3 镉和 pH 对中华绒螯蟹免疫相关基因 mRNA 表达量影响的双向方差分析

Tab. 3 Two-Way ANOVA of the effects of Cd and pH on expression of immune-related genes mRNA in *Eriocheir sinensis*

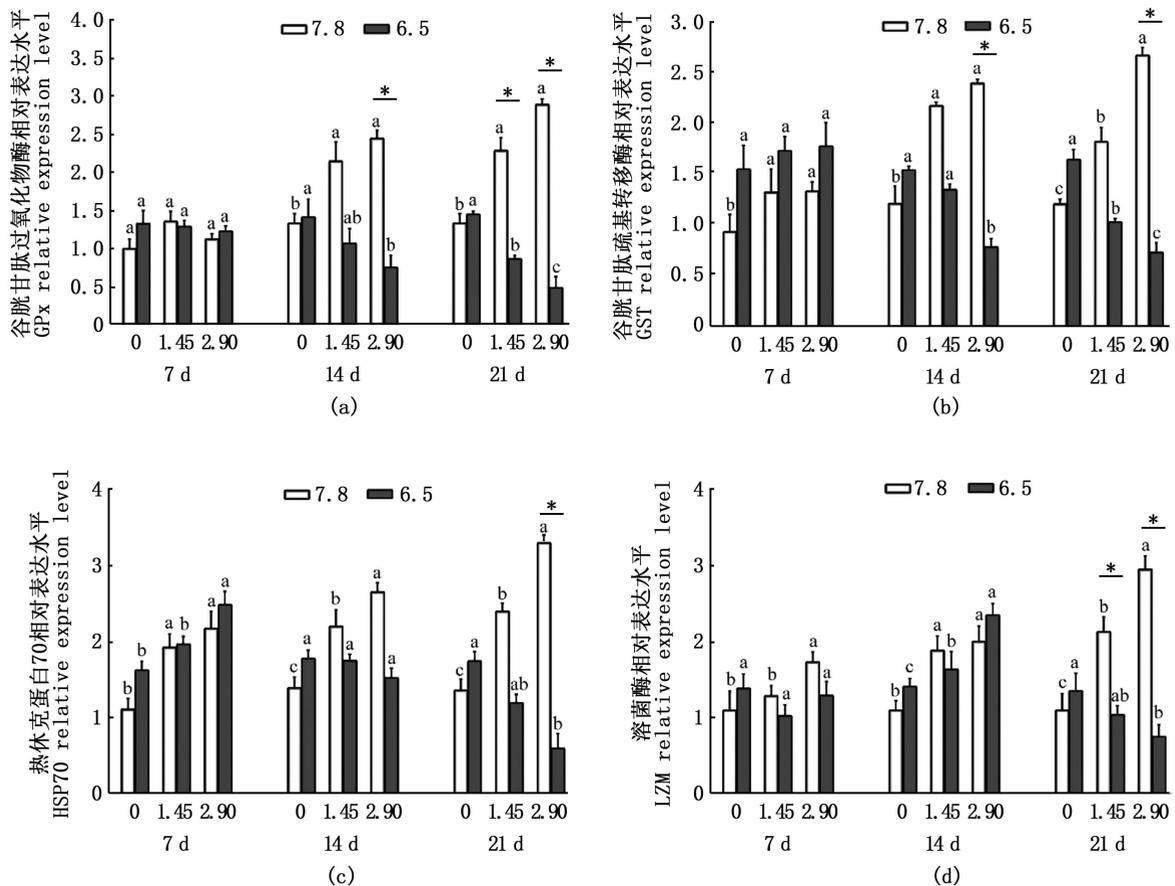
时间 Time/d	df	<i>GPx</i>			<i>GST</i>			<i>HSP70</i>			<i>LZM</i>		
		Cd 2	pH 1	Cd * pH 2	Cd 2	pH 1	Cd * pH 2	Cd 2	pH 1	Cd * pH 2	Cd 2	pH 1	Cd * pH 2
7	MS	0.049	0.069	0.059	0.182	1.077	0.019	1.397	0.380	0.084	0.206	0.087	0.216
	F	0.440	0.623	0.530	0.437	2.587	0.045	2.906	0.790	0.174	1.370	0.578	1.432
	P	0.654	0.445	0.602	0.046	0.134	0.956	0.094	0.392	0.842	0.291	0.462	0.277
14	MS	0.106	3.623	1.220	0.224	2.227	1.441	0.417	0.704	0.859	0.438	0.790	1.028
	F	0.523	17.833	6.004	1.338	13.300	8.602	0.917	1.546	1.886	1.032	1.861	2.423
	P	0.606	0.001	0.016	0.299	0.003	0.005	0.426	0.237	0.194	0.386	0.198	0.131
21	MS	0.202	6.372	2.189	3.087	2.470	0.302	0.473	8.447	4.269	0.587	4.567	2.248
	F	0.843	26.612	9.143	0.898	10.236	8.191	2.124	37.951	19.181	2.494	19.398	9.549
	P	0.454	<0.001	0.004	0.433	0.008	0.006	0.162	<0.001	<0.001	0.124	0.001	0.003

除第 7 天外,镉和 pH 的交互作用对中华绒螯蟹 *GST* mRNA 表达量有显著影响(表 3)。由图 3(b)可知,pH 为 7.8 时,*GST* mRNA 表达量随着镉浓度升高显著升高。pH 为 7.8 时,*GST* mRNA 表达量变化与 *GPx* 相同。除第 7 天外,镉浓度为 2.90 mg/L 时,pH 6.5 时 *GST* mRNA 表达量显著低于 pH 7.8 组 ($P < 0.05$)。

从图 3(c)可知: pH 7.8 时 *HSP70* mRNA 表达量随镉浓度升高显著升高,镉浓度 2.9 mg/L 胁迫 21 d 时,该基因 mRNA 表达量最高。pH 为 6.5 时,中华绒螯蟹 *HSP70* mRNA 表达量 7 d 时随镉浓度升高呈逐渐上升趋势,在 14、21 d 时随镉浓度升高呈逐渐下降趋势。镉浓度 2.90 mg/L 胁迫 21 d,pH 6.5 时 *HSP70* mRNA 表达量显著低

于 pH 7.8 组 ($P < 0.05$)。仅在 21 d 时镉和 pH 的交互作用对中华绒螯蟹 *HSP70* mRNA 表达量有显著影响。见表 3。

由图 3(d)可知:pH 为 7.8 时,随镉浓度升高 *LZM* mRNA 表达量呈逐渐升高趋势,具有浓度-效应关系;且在 2.90 mg/L、21 d,*LZM* mRNA 表达量升至最高。pH 为 6.5,在 7 d 时,各组间 *LZM* mRNA 表达量无显著性差异 ($P > 0.05$)。在 14 d 时,随着镉浓度升高中华绒螯蟹 *LZM* mRNA 表达量升高,21 d 时逐渐下降。镉浓度为 1.45、2.9 mg/L 胁迫 21 d 时,pH 6.5 时 *LZM* mRNA 表达量显著低于 pH 7.8 ($P < 0.05$)。仅在 21 d 时,镉和 pH 的交互作用对中华绒螯蟹 *LZM* mRNA 表达量有显著影响。见表 3。



在各固定 pH 下不同上标所表示的平均值在各采样时间 3 种 pH 浓度之间有显著性差异 ($P < 0.05$); 在每个固定 pH 下,两个镉水平之间的星号平均值在每个采样时间都有显著性差异 ($P < 0.05$)。

The means denoted by different superscripts at each fixed pH are significantly different among three pH concentrations at each sampling time ($P < 0.05$); The means sharing the asterisk between two Cd levels at each fixed pH are significantly different at each sampling time ($P < 0.05$).

图 3 低 pH 条件下不同镉浓度对中华绒螯蟹肝胰腺基因表达量的影响
Fig. 3 Influence of different Cd concentrations on gene expression in the hepatopancreas of *Eriocheir sinensis* at low pH

3 讨论

3.1 pH 和 Cd 对中华绒螯蟹血细胞总数的影响

甲壳动物具有一个开放的循环系统,血细胞分布在体内各类组织中。甲壳类动物血细胞在创伤修复、糖代谢、血淋巴凝固以及通过吞噬、包裹、形成细胞结以及分泌体液因子等生理功能的调节中起着重要作用^[24]。研究^[25-27]表明,甲壳动物血细胞总数与多种因素有关,环境因素的变动能够使其数量发生改变。甲壳动物血细胞总数在一定程度上直接反映了机体的免疫应答状态,同时反映了宿主的健康状况。在本研究中,中华绒螯蟹血细胞总数(THC)受镉浓度影响显著降低,且表现出浓度-效应关系;ZHOU 等^[28]在不同镉浓度下对河南华溪蟹(*Sinopotamon henanense*)免疫影响的研究中发现,镉暴露时河南华溪蟹血细胞总数随着胁迫时间延长均降低,镉浓度为 1.45 mg/L、2.90 mg/L 时血细胞总数显著下降,这与本研究结果一致。据报道,在 3~7 d 时, 3×10^{-7} 和 5×10^{-7} 镉浓度组的太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)血细胞总数与对照组相比显著增加^[29]。由以上实验结果可以看出,不同水产动物对重金属镉胁迫的响应存在差异。PIPE 等^[30]认为双壳类软体动物血细胞总数的增加,是由于细胞增殖或细胞从组织移到血淋巴引起的。在本研究中,低 pH 环境加剧了中华绒螯蟹血细胞总数的降低,高浓度镉表现得更突出。这表明了低 pH 刺激镉对中华绒螯蟹血细胞毒害作用,可能是因为镉在酸性环境更易被中华绒螯蟹摄取,增加其生物利用性,从而加剧对中华绒螯蟹血细胞毒性。

3.2 pH 和 Cd 对中华绒螯蟹血清抗氧化能力的影响

SOD 和 CAT 是生物体内抗氧化系统中非常重要的酶,对生物体防御外界不利因素引起的氧化损伤发挥重要作用^[31]。其中,SOD 又是抵抗外界损伤的第一道防线,可将生物体内 O_2^- 转化为 H_2O_2 和其他氢过氧化物^[32-33]。在真核生物中,根据其功能 SOD 被分为 Cu/Zn-SOD 和 Mn-SOD 2 种形式^[34]。本实验研究结果显示,pH 为 7.8 时,随镉浓度升高中华绒螯蟹体内 SOD 活性呈先升后降趋势。SOD 活性的升高表明镉造成了中华绒螯蟹体内活性氧自由基的产生,机体通过提

高 SOD 活性避免活性氧自由基对自身的氧化损伤。随着胁迫时间延长,镉浓度为 2.9 mg/L 时 SOD 活性受到了抑制,这可能是由于体内过多的自由基超出了 SOD 清除能力范围,从而抑制了 SOD 活性。这与河南华溪蟹(*Sinopotamon honanense*)^[35]和背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)^[36]的研究结果相似。与 pH 7.8 相比,pH 为 6.5 时,镉浓度 2.9 mg/L 对 SOD 活性的抑制作用进一步加大,这可能是由于低 pH 环境诱导高浓度镉本身对 SOD 活性的抑制作用,确切原因有待进一步研究。CAT 功能是将 H_2O_2 转化成 H_2O 和 O_2 ,减少 H_2O_2 对组织的损伤,从而保护生物体免受侵害^[37]。在本研究中,pH 为 7.8 时,中华绒螯蟹体内 CAT 活性随镉浓度的增加呈升高趋势,这是因为机体通过增加 CAT 活性来清除大量的 H_2O_2 ,从而减少 H_2O_2 对自身组织和细胞的氧化损伤。这与 ZHOU 等^[6]的研究结果一致。蔡垚^[38]和邢慧芳等^[39]在对背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)研究中发现,CAT 活性随镉浓度升高而呈现“抑制-诱导-抑制”的规律性变化,这样本实验的研究结果不同,可能是胁迫时间不同造成的,上述研究均为急性胁迫,而本实验为长期胁迫。当 pH 为 6.5,镉浓度为 2.9 mg/L 时中华绒螯蟹体内 CAT 活性受到了抑制,可能是因为氧化应激使中华绒螯蟹体内产生了大量的 H_2O_2 ,过量的 H_2O_2 可对中华绒螯蟹 CAT 的生理功能造成沉重的负担,扰乱细胞氧化还原过程的平衡,从而抑制 CAT 的活性。

细胞膜脂质过氧化过程被认为是氧化损伤的主要机制之一。MDA 是脂质过氧化发生的经典产物,反映氧化损伤的程度^[40]。因此,根据器官或细胞内 MDA 水平的变化,可以判断镉对生物体氧化应激的严重程度^[41-42]。大量研究^[43-45]表明,镉诱导的抗氧化酶活性升高加快活性氧的清除过程;反过来,活性氧自由基的过量产生会提高细胞或生物体中 MDA 的水平。本研究发现,pH 为 7.8 时,镉浓度 2.9 mg/L 胁迫 14、21 d 时,中华绒螯蟹体内 T-AOC 受到抑制;pH 为 6.5 时,镉浓度 2.9 mg/L 在胁迫的 3 个时间段均对 T-AOC 产生了显著抑制作用,这说明了此时机体抗氧化系统受损。中华绒螯蟹体内 MDA 含量波动与 T-AOC 变化规律大致相反,即 T-AOC 活性的降低伴随着 MDA 水平的升高,这与 ZHOU

等^[28]的报道一致。与 pH 7.8 相比,同镉浓度在 pH 6.5 时对中华绒螯蟹体内 MDA 含量和 T-AOC 影响较大,这表明了低 pH 环境能够刺激镉产生大量的活性氧自由基,从而加重了对中华绒螯蟹细胞的毒害作用。

3.3 pH 和 Cd 对中华绒螯蟹肝胰腺中免疫基因表达量的影响

低 pH 水体和金属暴露均可调控水生生物免疫相关基因的表达;这些基因的表达可能会在氧化应激反应中上调或下调,这取决于应激源的水平或物种^[46-48]。在本研究中,镉暴露显著影响了所研究的 4 种免疫基因 mRNA 表达,即 pH 为 7.8 时,4 种免疫基因 mRNA 表达量随镉浓度增加显著上升,表明了机体直接通过提高免疫基因 mRNA 表达量,间接增加对应免疫活性物质活性或含量来应对外源应激,使组织和细胞免受氧化损伤。在 pH 为 6.5 时,暴露高镉浓度 *GST* 和 *GPx* mRNA 表达水平在 14 d 和 21 d 均受到抑制,而 *LZM* 和 *HSP70* mRNA 表达水平在 21 d 显著下调,提示机体抗氧化和抗应激系统受损。pH 和镉两种应激源对所有基因的表达均有交互影响,表明低 pH 参与了 Cd 调控基因表达的过程。镉浓度为 500 μg 时,日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 体内 *GST* 和 *HSP70* mRNA 表达量均显著增加^[49];牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 体内 *GST* 和 *GPx* mRNA 表达水平随镉浓度增加显著上升,但低 pH 条件下两种基因表达量显著下降^[50];河南华溪蟹暴露在 1.45 mg/L 和 2.90 mg/L 镉浓度中时,*LZM* 基因表达水平始终显著高于对照组^[28],以上研究结果均与本实验相符。总之,基因表达的上调或下调是对氧化应激和活性氧自由基产生的氧化损伤,特别是遗传损伤的响应^[51]。抗氧化相关基因的响应还涉及其他调控过程,如基因的转录后调控、翻译后调控和翻译后调控,使基因表达的调控机制复杂化。

综上,低 pH 和镉单一胁迫均能引起中华绒螯蟹的氧化应激,两者共同胁迫对中华绒螯蟹的抗氧化防御的影响显著大于单一因素的作用,高镉浓度(2.9 mg/L)处理效果更显著。综上,抗氧化防御系统对氧化应激的综合反应随着应激源水平的增加而增加,抗氧化酶活性以及相关基因的 mRNA 表达在应激刺激下呈上调或下调趋势。该研究结果可为研究水体低 pH 和重金属污染对

甲壳类动物影响提供理论依据。

参考文献:

- [1] VASEEM H, BANERJEE T K. Evaluation of pollution of Ganga River water using fish as bioindicator [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2016, 188(8): 444.
- [2] JEROME F C, HASSAN A, OMONIYI-ESAN G O, et al. Metal uptake, oxidative stress and histopathological alterations in gills and hepatopancreas of *Callinectes amnicola* exposed to industrial effluent [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 139: 179-193.
- [3] CONINCK D I M D, ASSELMAN J, GLAHOLT S, et al. Genome-wide transcription profiles reveal genotype-dependent responses of biological pathways and gene-families in *Daphnia* exposed to single and mixed stressors [J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(6): 3513-3522.
- [4] MEHINTO A C, PRUCHA M S, COLLI-DULA R C, et al. Gene networks and toxicity pathways induced by acute cadmium exposure in adult largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. Aquatic Toxicology, 2014, 152: 186-194.
- [5] CHAN C Y, WANG W X. Seasonal and spatial variations of biomarker responses of rock oysters in a coastal environment influenced by large estuary input [J]. Environmental Pollution, 2018, 242: 1253-1265.
- [6] ZHOU Y Y, DAHMS H U, DONG F, et al. Immune-associated parameters and antioxidative responses to cadmium in the freshwater crab *Sinopotamon henanense* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 129: 235-241.
- [7] 雷雯雯, 徐团, 王兰. 镉诱导长江华溪蟹 (*Sinopotamon yangtsekiense*) 心肌细胞凋亡的研究 [J]. 海洋与湖泊, 2012, 43(2): 299-305.
- [8] LEI W W, XU T, WANG L. Effects of cadmium on apoptosis of cardiomyocyte in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(2): 299-305.
- [8] 李静, 闫博, 刘娜, 等. 镉诱导长江华溪蟹肝胰腺细胞凋亡研究 [J]. 环境科学学报, 2010, 30(11): 2277-2284.
- [9] LI J, YAN B, LIU N, et al. Effects of cadmium on apoptosis of hepatopancreas cell in freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense* [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2010, 30(11): 2277-2284.
- [9] XUAN R, WANG L, SUN M, et al. Effects of cadmium on carbohydrate and protein metabolisms in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2011, 154(3): 268-274.
- [10] LIU J H, CAO L, DOU S Z. Trophic transfer, biomagnification and risk assessments of four common heavy metals in the food

- web of Laizhou Bay, the Bohai Sea[J]. The Science of the Total Environment, 2019, 670: 508-522.
- [11] GARCÍA-NAVARRO J A, FRANCO L, ROMERO D. Differences in the accumulation and tissue distribution of Pb, Cd, and Cu in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to single, binary, and ternary metal mixtures[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2017, 24(7): 6599-6610.
- [12] LIU J L, XU X R, DING Z H, et al. Heavy metals in wild marine fish from South China Sea; levels, tissue and species-specific accumulation and potential risk to humans [J]. Ecotoxicology, 2015, 24(7/8): 1583-1592.
- [13] JING W X, LANG L, LIN Z G, et al. Cadmium bioaccumulation and elimination in tissues of the freshwater mussel *Anodonta woodiana*[J]. Chemosphere, 2019, 219: 321-327.
- [14] CHANDURVELAN R, MARSDEN I D, GLOVER C N, et al. Assessment of a mussel as a metal bioindicator of coastal contamination; Relationships between metal bioaccumulation and multiple biomarker responses[J]. Science of the Total Environment, 2015, 511: 663-675.
- [15] XIA L P, CHEN S C, DAHMS H U, et al. Cadmium induced oxidative damage and apoptosis in the hepatopancreas of *Meretrix meretrix* [J]. Ecotoxicology, 2016, 25(5): 959-969.
- [16] LIN Y, HUANG J J, DAHMS H U, et al. Cell damage and apoptosis in the hepatopancreas of *Eriocheir sinensis* induced by cadmium[J]. Aquatic Toxicology, 2017, 190: 190-198.
- [17] 杨富亿, 李秀军, 杨欣乔. 日本沼虾幼虾对碱度和 pH 的适应性[J]. 动物学杂志, 2005, 40(6): 74-79.
YANG F Y, LI X J, YANG X Q. Adaptability of *Macrobrachium nipponense* juvenile to water alkalinity and pH [J]. Chinese Journal of Zoology, 2005, 40(6): 74-79.
- [18] WANG W N, WANG A L, CHEN L, et al. Effects of pH on survival, phosphorus concentration, adenylate energy charge and Na⁺-K⁺ ATPase activities of *Penaeus chinensis* osbeck juveniles[J]. Aquatic Toxicology, 2002, 60(1/2): 75-83.
- [19] LI C C, CHEN J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(6): 701-709.
- [20] 陶易凡, 强俊, 王辉, 等. 低 pH 胁迫对克氏原螯虾鳃和肝胰腺酶活力及组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(6): 1279-1289.
TAO Y F, QIANG J, WANG H, et al. Acute toxicity of low-pH stress and its effect on enzyme activity and histological structure of gill and hepatopancreas in *Procambarus clarkii* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(6): 1279-1289.
- [21] WANG W N, ZHOU J, WANG P, et al. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 150(4): 428-435.
- [22] 邱仁杰, 成永旭, 吴旭干, 等. 投喂不同油脂饲料对中华绒螯蟹免疫、代谢及耐低氧性能的影响[J]. 动物学杂志, 2012, 47(1): 78-87.
QIU R J, CHENG Y X, WU X G, et al. Effect of dietary lipid sources on the immune function, metabolism and resistance to hypoxia in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Chinese Journal of Zoology, 2012, 47(1): 78-87.
- [23] 施芳. 鱼类生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1991: 5-24.
SHI F. Fish physiology [M]. Beijing: China Agricultural Machinery Press, 1991: 5-24.
- [24] CHANG C C, WU Z R, KUO C M, et al. Dopamine depresses immunity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(1): 24-33.
- [25] VICTOR B. Gill tissue pathogenicity and hemocyte behavior in the crab *Paratelphusa hydrodromus* exposed to lead chloride[J]. Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology, 1994, 29(5): 1011-1034.
- [26] CHISHOLM J R S, SMITH V J. Variation of antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*, with temperature[J]. Journal of the Marine Biological Association of the UK, 2009, 74(4): 979-982.
- [27] SMITH V J, SWINDLEHURST R J, JOHNSTON P A, et al. Disturbance of host defense capability in the common shrimp, *Crangon crangon*, by exposure to harbour dredge spoils[J]. Aquatic Toxicology, 1995, 32(1): 43-58.
- [28] ZHOU Y Y, JING W X, DAHMS H U, et al. Oxidative damage, ultrastructural alterations and gene expressions of hemocytes in the freshwater crab *Sinopotamon henanense* exposed to cadmium [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 138: 130-138.
- [29] AUFFRET M, OUBELLA R. Cytometric parameters of bivalve molluscs: effects of environmental factors [M]//STOLEN J S, FLETCHER T C. Modulators of Fish Immune Responses. New Jersey: SOS Publications, 1994: 23-32.
- [30] PIPE R K, COLES J A. Environmental contaminants influencing immunofunction in marine bivalve molluscs [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1995, 5(8): 581-595.
- [31] CZAPSKI G, GOLDSTEIN S. The uniqueness both of superoxide toxicity and of the protective role of superoxide dismutase[J]. Basic Life Sciences, 1988, 49: 43-46.
- [32] 袁牧, 王昌留, 王一斐, 等. 超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2016, 25(6): 550-558.
YUAN M, WANG C L, WANG Y F, et al. Progress in the research of superoxide dismutase [J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2016, 25(6): 550-558.
- [33] LAWNICZAK M, ROMESTAING C, ROUSSEL D, et al. Preventive antioxidant responses to extreme oxygen level

- fluctuation in a subterranean crustacean [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2013, 165(2): 299-303.
- [34] 沈敦瑜, 郭顺勤. 生物无机化学简明教程[M]. 四川: 成都科技大学出版社, 1993: 130-150.
SHEN D Y, GUO S Q. Concise bioinorganic chemistry[M]. Sichuan: University of Science and Technology of Chengdu Press, 1993: 130-150.
- [35] 侯宇华, 李娜, 李丹, 等. 镉对河南华溪蟹副性腺抗氧化酶活性及脂质、蛋白质和 DNA 的影响[J]. 水生生物学学报, 2015, 39(3): 621-626.
HOU Y H, LI N, LI D, et al. Bioaccumulation of cadmium and its effects on antioxidant enzyme activities, lipid, protein and dna in male accessory gland of the freshwater *Crabsinopotamon henanense*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(3): 621-626.
- [36] 贾嘉宝, 井维鑫, 李涌泉, 等. 慢性镉暴露对背角无齿蚌肝脏的氧化损伤效应[J]. 生物技术通讯, 2019, 30(2): 207-211.
JIA J B, JING W X, LI Y Q, et al. Oxidative damage effect of chronic cadmium exposure on the liver of the freshwater Mussel *Anodonta woodiana* [J]. *Letters in Biotechnology*, 2019, 30(2): 207-211.
- [37] 姚翠鸾, 王志勇, 相建海. 甲壳动物血细胞及其在免疫防御中的功能[J]. 动物学研究, 2006, 27(5): 549-557.
YAO C L, WANG Z Y, XIANG J H. Crustacean haemocytes and their function in immune responses [J]. *Zoological Research*, 2006, 27(5): 549-557.
- [38] 蔡垚. 重金属镉对背角无齿蚌肝脏和肌肉过氧化氢酶活性的影响[J]. 南京晓庄学院学报, 2012, 28(3): 84-86.
CAI Y. Effects of cadmium on activities of catalase in the liver and muscle of *Anodonta Woodiana Woodiana* [J]. *Journal of Nanjing Xiaozhuang College*, 2012, 28(3): 84-86.
- [39] 邢慧芳, 李涌泉, 杨慧珍, 等. 镉对背角无齿蚌外套膜和鳃抗氧化酶活性及脂质过氧化的影响[J]. 环境科学学报, 2013, 33(3): 856-860.
XING H F, LI Y Q, YANG H Z, et al. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the mantle and gill of the freshwater bivalve *A. woodiana woodiana*[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(3): 856-860.
- [40] ZHENG J L, YUAN S S, WU C W, et al. Acute exposure to waterborne cadmium induced oxidative stress and immunotoxicity in the brain, ovary and liver of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 180: 36-44.
- [41] MA D D, HOU Y H, DU L J, et al. Oxidative damages and ultrastructural changes in the sperm of freshwater crab *Sinopotamon henanense* exposed to cadmium [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, 98: 244-249.
- [42] JIN Y X, LIU Z Z, LIU F, et al. Embryonic exposure to cadmium (II) and chromium (VI) induce behavioral alterations, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2015, 48: 9-17.
- [43] JOMOVA K, VALKO M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease[J]. *Toxicology*, 2011, 283(2/3): 65-87.
- [44] NAIR A R, DEGHESELLE O, SMEETS K, et al. Cadmium-induced pathologies; where is the oxidative balance lost (or Not)? [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(3): 6116-6143.
- [45] LIU D M, YAN B, YANG J, et al. Mitochondrial pathway of apoptosis in the hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* exposed to cadmium[J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 105(3/4): 394-402.
- [46] AN K W, SHIN H S, CHOI C Y. Physiological responses and expression of metallothionein (MT) and superoxide dismutase (SOD) mRNAs in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to benzo [a] pyrene [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 149(3): 534-539.
- [47] CAO R W, LIU Y L, WANG Q, et al. The impact of ocean acidification and cadmium on the immune responses of *Pacific oyster, Crassostrea gigas* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 81: 456-462.
- [48] ZHU B, LIU L, LI D L, et al. Developmental toxicity in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos exposed to Cu, Zn and Cd[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 104: 269-277.
- [49] REN X Y, WANG X, LIU P, et al. Bioaccumulation and physiological responses in juvenile *Marsupenaeus japonicus* exposed to cadmium [J]. *Aquatic Toxicology*, 2019, 214: 105-255.
- [50] CUI W T, CAO L, LIU J H, et al. Effects of seawater acidification and cadmium on the antioxidant defense of flounder *Paralichthys olivaceus* larvae [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 718, 137-234.
- [51] REN Z H, LIU J H, HUANG W, et al. Antioxidant defenses and immune responses of flounder *Paralichthys olivaceus* larvae under methylmercury exposure [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2019, 225: 108-589.

Effects of cadmium and low pH stress on immune response and expression of related genes in the Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*)

YANG Zhigang^{1,2,3}, ZHAO Xuejian^{1,2,3}, CHENG Yongxu^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To investigate the effects of cadmium (Cd) and low pH stress on antioxidant defense ability of the Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*), two experimental groups with different pH values (7.8, 6.5), and three experimental groups with different Cd²⁺ concentrations (0 mg/L, 1.45 mg/L and 2.9 mg/L), were set and exposed for 7 d, 14 d, and 21 d, respectively. The effects of cadmium and low pH stress on total hemocyte counts (THC), serum superoxide dismutase (SOD) activity, catalase (CAT) activity, total antioxidant capacity (T-AOC), malondialdehyde (MDA) content and four immune related genes (glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), heat shock protein 70 (HSP70), lysozyme (LZM) mRNA in hepatopancreas of *Eriocheir sinensis* were studied. The results showed that THC decreased significantly with the increase of Cd concentration, and THC at pH 6.5 was lower than that at pH 7.8. When the pH value was 7.8, with the increase of cadmium concentration, the activities of SOD and T-AOC in serum increased first and then decreased, while the activities of CAT (except the 7th day) and the content of MDA increased gradually. The activities of SOD, CAT, and T-AOC were significantly lower than those of pH 7.8 ($P < 0.05$). During the whole experiment, the content of MDA at 2.9 mg/L and pH 6.5 was significantly higher than that at pH 7.8 ($P < 0.05$). When pH value was 7.8, the mRNA expression levels of GPx, GST, HSP70 and LZM increased gradually with the increase of cadmium concentration. When cadmium concentration was 2.9 mg/L for 21 days, the gene expression levels reached the highest. On the 14th and 21st day, the expression of GPx and GST mRNA at 2.9 mg/L and pH 6.5 of cadmium was significantly decreased, which was significantly lower than that at pH 7.8 of the same concentration ($P < 0.05$), while the expression of HSP70 and LZM mRNA was significantly decreased only on the 21st day, which was also significantly lower than that at pH 7.8 of the same concentration ($P < 0.05$). In general, the activity and content of antioxidant enzymes and the mRNA expression of related genes were up-regulated or down regulated in response to oxidative stress. The effect of low pH and cadmium on the antioxidant defense of *Eriocheir sinensis* was much greater than that of single factor, especially high concentration of cadmium (2.9 mg/L). The results provide a theoretical basis for the future study of the impact of water acidification and heavy metal pollution on crustaceans.

Key words: *Eriocheir sinensis*; cadmium; pH; antioxidant enzyme activity; immune gene