

低盐胁迫下三疣梭子蟹 γ -氨基丁酸及其A型受体相关蛋白对渗透压调节的影响

张伟佳^{1,2}, 卢少坤¹, 李荣华^{1,2*}, 王春琳^{1,2}, 母昌考^{1,2}, 宋微微^{1,2}

(1.宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315823; 2.浙江海洋高效健康养殖协同创新中心, 浙江 宁波 315823)

摘要: 为探究低盐胁迫下 γ -氨基丁酸(GABA)及其A型受体相关蛋白(GABARAP)在三疣梭子蟹渗透压调节过程中起到的作用, 实验检测了低盐度10条件下, 三疣梭子蟹在0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 h的血清渗透压、血清氯离子(Cl⁻)浓度等指标, 同时对鳃组织的GABA量以及GABARAP基因表达量变化进行测定。结果显示, 血清渗透压和血清Cl⁻浓度在12 h内显著下降($P < 0.05$), 12 h后趋于稳定; 相对0 h, 血清Cl⁻浓度降低17.93%, 血清渗透压降低24.46%, 与外界海水渗透压的差值维持在 $(183.21 \pm 9.51) \text{mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。GABA量及GABARAP基因表达量波动上升, 12 h后基本维持稳定。研究结果表明, 三疣梭子蟹对低盐度条件的适应性调节在12 h内进行, 之后基本维持稳定, GABA量以及GABARAP基因表达量在此过程中呈现显著的正相关关系, 对血清Cl⁻浓度的调节起到了重要作用, 使得12 h后血清渗透压与外界海水渗透压维持在 $(183.21 \pm 9.51) \text{mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$, 保证各项生理活动的正常进行。

关键词: 三疣梭子蟹; 低盐胁迫; γ -氨基丁酸; γ -氨基丁酸A型受体相关蛋白

中图分类号: Q592.1; S968.25 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-5132 (2019) 03-0009-06

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是我国重要的海洋经济蟹类, 具有较高的经济价值, 也是我国沿海地区的重要养殖种类, 在黄渤海的产量最大^[1]。三疣梭子蟹具有生长快、适宜食用、养殖利润高等特点^[2]。在三疣梭子蟹养殖过程中, 恶劣的天气状况如暴雨或是大量换水等都会造成养殖水体盐度的突变, 造成大量发病甚至死亡。

盐度是影响甲壳动物生理代谢的重要环境因子^[3], 如渗透调节、免疫防御、呼吸代谢等生理功能都直接影响着甲壳动物的生长发育。水生甲壳动物随着生存环境盐度的改变, 在神经分泌系统调控下, 渗透调节器官的结构、血清渗透压和离子转运等都会发生一系列变化, 以适应外界环境中盐度的改变, 维持机体正常的生理代谢活动。水生甲壳动物渗透压调节的主要器官是鳃, 三疣梭子蟹的鳃分为前鳃和后鳃, 前鳃的主要作用为呼吸,

后鳃的主要作用为离子转运、渗透压调节(前鳃及后鳃各3对)。氯离子(Cl⁻)作为海水及三疣梭子蟹血清中的主要阴离子, 在三疣梭子蟹的渗透压调节中具有重要作用。关于水生甲壳动物鳃的功能研究已经被证明, Cl⁻转运和渗透压调节的场所主要定位于后鳃^[4]。

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric Acid, GABA)是一种非蛋白氨基酸, 是中枢神经系统中重要的抑制性神经递质, 它通过与其他受体结合从而调节机体的生理功能^[5]。有研究表明GABA与生物对盐度胁迫的抗性相关^[6]。GABA可以协助GABA受体打开氯离子通道, 对氯离子进行主动运输, 对生物渗透压的调节具有重要作用^[7]。GABA受体分为3种亚型: GABA_A、GABA_B、GABA_C, 不同亚型的生理特性及分布有所差异。GABA_A是三者中最为重要的一种, 由GABA受体识别点、苯二氮卓(BDZ)识

收稿日期: 2018-09-13.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(41476124); 浙江省自然科学基金(LY17C190005); 宁波市科技计划(2017C110007, 2016C10037)。

第一作者: 张伟佳(1994-), 男, 浙江平湖, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产动物遗传育种。E-mail: 398137718@qq.com

*通信作者: 李荣华(1983-), 女, 湖北宜昌, 博士/副教授, 主要研究方向: 水产动物遗传育种。E-mail: lironghua@nbu.edu.cn

别点和 Cl^- 门控通道 3 部分组成的大分子蛋白复合体, 属配体门控离子通道(LGIC_S)超家族, 研究表明 GABA_A 在个体生长发育、离子转运、渗透压调节、食物吸收等方面具有重要调节作用^[8]。

GABA_A 受体功能受到 GABA_A 受体相关蛋白(GABA_A Receptor Associated Protein, GABARAP)调节, GABARAP 能将 GABA_A 受体转移到质膜上, 从而提高 GABA_A 受体活性和氯离子转运效率^[9-10]。

目前国内外关于盐度胁迫下三疣梭子蟹免疫、存活和生长方面已经有较多研究报道, 但关于盐度胁迫下 GABA 及其受体对三疣梭子蟹渗透压调节作用的研究甚少。本文检测了低盐 10 胁迫下 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 h 共 8 个时间点的血清渗透压、血清 Cl^- 浓度, 同时测定了对应时间点三疣梭子蟹鳃组织的 GABA 量和 GABARAP 基因表达量的变化, 以探究 GABA 及其 A 型受体相关蛋白对三疣梭子蟹血清渗透压调节的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用三疣梭子蟹体重为(12.5±1.8)g, 来自浙江的宏野水产有限公司。实验前, 于自然海水盐度下(盐度为 30)暂养 7 d。暂养期间连续充气, 每天定时投喂新鲜小鱼, 换水清污。

1.2 实验方法

1.2.1 盐度条件设置

实验设置海水盐度为 10, 每个组均设 3 个平行。盐度为 10 的低盐海水用自然海水(盐度为 30)加入曝气自来水调配, 用 YSI 盐度仪校准。实验于水桶中进行, 温度 18~20℃。每组 90 只蟹, 实验期间饲养管理与暂养期间相同。

1.2.2 样品采集与保存

取 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48 h 三疣梭子蟹样品。从每组中随机抽取 5 只三疣梭子蟹, 抽取心脏处血淋巴 1 mL 于 1.5 mL 离心管内, 加等量抗凝剂。将血淋巴样品混匀, 在 4℃下 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 用移液器吸取上清液于新的 1.5 mL 离心管中, 标记编号后, 置于 -80℃冰箱中保存, 用于测定血清渗透压和血清 Cl^- 浓度; 解剖取后 2 对鳃, 分成 2 份, 1 份放进 50 mL 离心管, 加入 RNA 保护液(CoWin Biotech, 中国); 另 1 份放进 1.5 mL 离心管

用于 GABA 量测定。所有样品用液氮冷冻, 放入 -80℃冰箱保存。每个采样时间点取自然盐度海水和低盐胁迫实验用海水各 1 mL, 于 1.5 mL 离心管中, 各取 3 个样本, 标记编号后置于液氮保存。

1.2.3 渗透压和 Cl^- 含量测定

采用 Fiske Micro-Osmometer 210 冰点渗透压计(ADVANCED, 美国)测定血清及环境海水渗透压。氯离子检测试剂盒(南京建成, 中国)测定血清中的 Cl^- , 操作按试剂盒说明书进行。

1.2.4 GABA 量测定

采用毛细管电泳检测蟹鳃中 GABA 量。首先用 IKA T10(IKA, 德国)对鳃进行称重和匀浆, 然后进行 FMOC-CL 衍生, 缓冲液经 0.45 μm 孔的膜过滤器过滤后, 经超声脱气 1 min。电泳缓冲液由 60 mmol·L⁻¹ 硼酸盐, 60 mmol·L⁻¹ SDS, 20 mmol·L⁻¹ β-CD, 3%(v/v)异丙醇组成, NaOH 调节 pH 至 9.5。所有分离操作均在装有 UV 检测器的 Beckman 毛细管电泳仪上进行。毛细管使用 65 cm×75 μm 的未涂层熔融石英毛细管(永年光纤, 中国)。

1.2.5 GABARAP 基因表达量测定

TRIzol® Reagent(Invitrogen, 美国)分离每个样品的总 RNA。SuperRT Reverse Transcriptase (Co Win Biotech, 中国)合成 cDNA 模板, -20℃保存用于实时定量 PCR。根据产品说明书, 应用 Ultra-SYBR 预混体系经 Master cyclerep Realplex PCR 仪(Eppendorf, 德国)实时定量技术分析相关基因表达情况。实验选择 *RPL-18* 作为管家基因, GABARAP 序列来源于实验室三疣梭子蟹转录组数据库, 采用 Primer 5.0 设计引物(表 1)。

表 1 实验中用到的引物序列

项目	Primer sequence(5'-3')
<i>RPL-18</i>	GCACTGTCACCGATGACCTC
	CCTTGCACCAGCAGAGTGTT
GABARAP	CGGCTACTATGGGGTCCCTCTA
	CCAATCCGTCACCTACCCACT

qPCR 程序设置为 95℃ 10 min, 随后 40 个循环, 94℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s。在每个 PCR 反应结束时, 进行扩增产物的解离分析, 用比较阈值法分析靶基因的表达水平。

1.2.6 统计分析

实验数据用平均值±标准方差表示(mean±SD)。

采用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 Duncan 检验, 对不同测定指标进行差异比较, 数据统计的显著性水平设定为 $P<0.05$ 。

2 实验结果

2.1 血清渗透压和血清 Cl 浓度测定

低盐胁迫下, 8 个时间点三疣梭子蟹血清 Cl 浓度、血清渗透压测定结果见表 2。实验期间, 外界海水渗透压保持在 $(367.00\pm9.51)\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。在 0~12 h 内, 三疣梭子蟹血清渗透压和血清 Cl 浓度显著下降($P<0.05$), 12 h 后, 血清 Cl 浓度降至 $165.62\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右, 相对 0 h, 下降 17.93%; 12 h 血清渗透压下降至 $559.50\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ 左右, 相对 0 h, 下降 24.46%。12 h 后, 血清 Cl 浓度和血清渗透压趋于稳定, 血清渗透压与外界海水渗透压差值维持在 $(183.21\pm9.51)\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

表 2 血清 Cl 浓度和血清渗透压

时间/h	血清 Cl 浓度/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	血清渗透压/ ($\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$)
0	201.81 ± 11.74^a	740.67 ± 2.08^a
3	201.58 ± 10.90^a	660.67 ± 2.52^b
6	191.18 ± 5.52^{ab}	630.33 ± 12.22^c
9	177.72 ± 9.51^{bc}	602.67 ± 16.50^d
12	165.62 ± 14.39^c	559.50 ± 10.61^e
24	168.00 ± 4.19^c	557.00 ± 10.82^e
36	175.50 ± 6.63^{bc}	544.33 ± 5.13^e
48	171.23 ± 6.72^c	540.00 ± 10.50^e

注: 表中数据为平均值 $\pm$ 标准差, $n=3$, 同列数据上标完全不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 下表同。

2.2 GABA 量和 GABARAP 基因表达量

低盐胁迫下, 8 个时间点三疣梭子蟹鳃中的 GABA 量和 GABARAP 基因表达量检测结果见表 3。可以看出, GABA 量在 0~3 h 没有发生变化, 3 h 后开始显著升高($P<0.05$), 在 12~24 h 有所下降, 但差异不显著; 而 GABARAP 基因表达量从 0 h 开始显著升高, 同样在 12~24 h 稍有下降, 但差异不显著。GABA 量和 GABARAP 基因表达量在 12 h 达到峰值, 之后总体趋于稳定。

2.3 低盐胁迫下三疣梭子蟹生理指标的变化及其相关性分析

三疣梭子蟹 GABA 量、GABARAP 基因表达量、血清 Cl 浓度和血清渗透压在各检测时间点的

表 3 GABA 量和 GABARAP 基因表达量

时间/h	GABA 量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	GABARAP 基因表达量
0	9.65 ± 2.98^a	1.03 ± 0.29^a
3	9.68 ± 1.97^a	2.74 ± 0.68^{bc}
6	15.97 ± 2.63^{ab}	2.84 ± 0.34^{bc}
9	15.01 ± 4.51^{ab}	2.49 ± 0.18^b
12	28.67 ± 6.34^c	4.91 ± 0.68^{cd}
24	22.64 ± 4.72^{bc}	3.26 ± 0.51^{bc}
36	26.43 ± 4.95^c	4.91 ± 0.68^d
48	25.92 ± 3.21^c	4.48 ± 0.61^d

变化如图 1 所示(图中同折线上标不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$)。在低盐度 10 胁迫条件下, 血清 Cl 浓度和血清渗透压均呈现降低趋势, 在 12 h 达到相对稳定, 相关性分析结果显示: 血清 Cl 浓度和血清渗透压的相关系数为 0.909, 呈显著正相关($P<0.05$)。而 GABA 量和 GABARAP 基因表达量均呈现波动上升趋势, 并在 12 h 达到相对稳定。相关性分析显示, GABA 量和 GABARAP 基因表达量的相关系数为 0.916, 呈显著正相关($P<0.05$)。

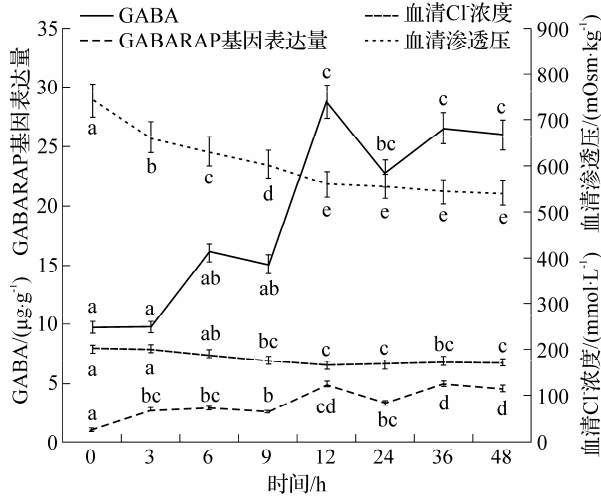


图 1 低盐胁迫下三疣梭子蟹血清 Cl 浓度、血清渗透压、GABA 量及 GABARAP 基因表达量的变化

3 讨论

3.1 低盐胁迫下三疣梭子蟹血清 Cl 浓度和血清渗透压的变化

甲壳动物对盐度的适应能力主要体现在对渗透压和离子浓度的调节能力上, 渗透压调节主要通过调节血液中无机离子和自由氨基酸含量实现, 而其中又主要通过调节无机离子含量实现^[11-12]。

已有很多学者对脊尾白虾^[13]、凡纳滨对虾^[14]等甲壳类动物进行了盐度胁迫实验,通过盐度胁迫下部分生化指标发生的变化来探究盐度胁迫对甲壳类动物的影响。研究表明,渗透压调节主要由鳃 Na^+/K^+ -ATPase起作用^[15],细胞外液的渗透压主要来源于 Na^+ 和 Cl^- ,细胞内液的渗透压主要来源于 K^+ 和 Cl^- ,所以 Na^+/K^+ 的调节总是伴随着 Cl^- 转运。 Na^+ 、 Cl^- 是形成渗透压的2种主要离子,所占比例高达76%~90%^[16]。因此,血清 Cl^- 浓度的变化与血清渗透压的变化密切相关。

本实验中,由于受到低盐度10胁迫,三疣梭子蟹体内 Cl^- 浓度高于外部介质, Cl^- 顺着浓度差大量外流,使得体内血清渗透压降低。三疣梭子蟹的血清 Cl^- 浓度和血清渗透压在0~12h持续下降,呈显著正相关,但在12h后基本趋于稳定。由此可以判断,三疣梭子蟹在盐度为10的海水中,渗透压调节时间为12h左右。文献[17-18]的研究表明,三疣梭子蟹在盐度5~50等不同盐度胁迫下,渗透压在12~24h之间达到稳定,说明三疣梭子蟹渗透压的调节时间会随着盐度梯度的改变而变化,但基本在12~24h完成。

甲壳动物对外界渗透压的适应性调节具有不同的类型。卢俊等^[19]研究发现,中华绒螯蟹在低盐胁迫时,血清中离子浓度和渗透压都显著高于养殖水体,且水体盐度越高,血清渗透压与环境渗透压差异越小,其渗透压调节类型属于高渗调节型。而Chen等^[16]发现青蟹在盐度胁迫下,血清渗透压始终低于环境渗透压,是一种低渗调节型蟹类。本实验中,三疣梭子蟹血清渗透压始终高于低盐度(盐度为10)海水的渗透压,未出现等渗现象,属于渗透压调节型中的高渗调节型^[17]。

3.2 GABARAP对 Cl^- 转运的影响

细胞质膜对某一特定离子的高度透性依赖于特异性通道的存在,细胞质膜上存有大量与离子转运有关的结构,如离子通道和相关酶等^[20]。研究证明, GABA_A 受体是由镶嵌于细胞质膜双层脂层中的5个亚基(来自8个亚基族)组成的五边形异质多肽类寡聚体,其中心部位形成一个直径为0.5nm的 GABA 门控 Cl^- 通道,选择性地通过带负电荷的 Cl^- ^[21]。 GABA_A 受体的配体通过改变复杂的 GABA_A 受体构象,来调节 Cl^- 通道中的 Cl^- 流量,增强或减

弱 GABA 作用于受体的效能。 GABA 激活质膜上的 GABA_A 受体,使 Cl^- 门控通道开启,导致 Cl^- 内流^[22]。

受到盐度为10的低盐海水胁迫,三疣梭子蟹体内 Cl^- 顺着浓度差外流,从而使得体内渗透压降低,但随着GABARAP表达量的增加,提高了 GABA_A 受体的活性和氯离子的转运效率^[9],使得海水中 Cl^- 也通过 GABA_A 受体上的 Cl^- 门控通道内流,血清 Cl^- 浓度以及体内渗透压没有持续降低,该调节过程在12h左右达到稳定状态,此时,三疣梭子蟹体内血清 Cl^- 浓度下降17.93%,血清渗透压下降24.46%。

3.3 GABA对血清渗透压调节的影响

当外界盐度发生变化时,甲壳类动物先通过离子浓度(主要为 Na^+ 、 Cl^-)调节渗透压,在极端条件下,会通过自由氨基酸调节渗透压。三疣梭子蟹血淋巴和肌肉中含量较高的自由氨基酸主要为牛磺酸(Tau)、精氨酸(Arg)、甘氨酸(Gly)、脯氨酸(Pro)和丙氨酸(Ala)。发挥主要渗透压调节作用的自由氨基酸为脯氨酸(Pro)、丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly)、天冬氨酸(Asp)、谷氨酸(Glu),研究表明这些自由氨基酸对渗透压的调节具有较为重要作用^[23]。

GABA 是非蛋白氨基酸,属于自由氨基酸的一种,可以促进细胞膜上 GABA_A 受体生成,通过对 Cl^- 转运的调节从而间接调控渗透压变化^[24]。本实验结果表明, GABA 量在12h内显著升高(相对0h增加了197.10%), GABA 量的升高可能在一定程度上促进了 GABA_A 受体数量的增加,同时也协助 GABA_A 受体打开氯离子通道对 Cl^- 进行主动运输^[7],提高了转运效率。

从本实验结果可以看出,三疣梭子蟹血清 Cl^- 浓度和血清渗透压的变化伴随着 GABA 量和GABARAP基因表达量的变化,在0~12h血清 Cl^- 浓度和血清渗透压逐渐降低的过程中, GABA 量以及GABARAP基因表达量逐渐上升,12h后 GABA 量与GABARAP基因表达量趋于稳定,同时血清 Cl^- 浓度及血清渗透压也趋于稳定,体现了较强的协同作用。

4 结论

研究表明,三疣梭子蟹在盐度为10的低盐海水胁迫下,调节血清渗透压以适应低盐环境

时间为12 h,且体内始终处于高渗状态,血清渗透压与外界海水渗透压差值维持在 (183.21 ± 9.51) mOsm $\cdot$ kg $^{-1}$ 。三疣梭子蟹在降低血清渗透压以适应低盐环境的过程中,Cl $^{-}$ 顺着浓度差外流,而鳃中GABA量及GABARAP表达量的增加,提高了GABA $_A$ 受体活性和氯离子的转运效率,促进Cl $^{-}$ 通过Cl $^{-}$ 门控通道内流,及时维持血清Cl $^{-}$ 浓度,从而稳定血清渗透压。说明鳃中GABA及GABARAP与三疣梭子蟹血清渗透压调节密切相关。本实验揭示了低盐10‰胁迫下三疣梭子蟹体内Cl $^{-}$ 浓度和血清渗透压的变化规律,以及GABA及GABARAP在血清渗透压调节过程中的重要作用,为进一步探究GABA及其相关通路在三疣梭子蟹渗透压调节中的作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] 周双林,姜乃澄,卢建平,等.甲壳动物渗透压调节的研究进展I.鳃的结构与功能及其影响因子[J].海洋学研究,2001,19(1):45-52.
- [2] 王冲,姜令绪,王仁杰,等.盐度骤变和渐变对三疣梭子蟹幼蟹发育和摄食的影响[J].水产科学,2010,29(9):510-514.
- [3] 孙颖民,宋志乐,严瑞深,等.三疣梭子蟹生长的初步研究[J].生态学报,1984,4(1):59-66.
- [4] 江山,许强华.盐度胁迫对三疣梭子蟹鳃Na $^{+}$ /K $^{+}$ -ATPase酶活的影响[J].水产学报,2011,35(10):1475-1480.
- [5] 堀江典子,菅美奈子,金武祚.GABA(γ -氨基丁酸)的功能性[J].中国食品添加剂,2010(6):169-173.
- [6] AL-Quraan N A, Sartawe F A, Qaryouti M M. Characterization of γ -aminobutyric acid metabolism and oxidative damage in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings under salt and osmotic stress[J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170(11):1003-1009.
- [7] Ducić I, Caruncho H J, Zhu W J, et al. gamma-Aminobutyric acid gating of Cl $^{-}$ channels in recombinant GABA $_A$ receptors[J]. Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics, 1995, 272(1):438-445.
- [8] 袁莲芳,陈果,贾宏阁,等.GABA $_A$ 受体研究现状[J].现代临床医学,2014,40(2):89-92.
- [9] Leil T A, Chen Z W, Chang C S, et al. GABA $_A$ receptor-associated protein traffics GABA $_A$ receptors to the plasma membrane in neurons[J]. The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 2004, 24(50):11429-11438.
- [10] Chen Z W, Olsen R W. GABA $_A$ receptor associated proteins: A key factor regulating GABA $_A$ receptor function[J]. Journal of Neurochemistry, 2007, 100:279-294.
- [11] Lima A G, Mcnamara J C, Terra W R. Regulation of hemolymph osmolytes and gill Na $^{+}$ /K $^{+}$ -ATPase activities during acclimation to saline media in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae)[J]. Journal of Experimental Marine Biology & Ecology, 1997, 215(1):81-91.
- [12] Via J D. The effect of salinity on free amino acids in the prawn *Palaemon elegans* (Rathke)[J]. Archiv Fur Hydrobiologie, 1989, 115(1):125-135.
- [13] Ren H, Li J, Li J, et al. Cloning of catalase and expression patterns of catalase and selenium-dependent glutathione peroxidase from *Exopalaemon carinicauda* in response to low salinity stress[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2015, 34(8):52-61.
- [14] 孙武卫.低盐胁迫下凡纳滨对虾消减cDNA文库构建及谷氨酰胺合成酶cDNA克隆和表达[D].湛江:广东海洋大学,2012.
- [15] Morris S. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans [J]. Journal of Experimental Biology, 2001, 204(5):979-989.
- [16] Chen J C, Chia P G. Osmotic and ionic concentrations of *Scylla serrata* subjected to different salinity levels[J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part A Physiology, 1997, 117(2):239-244.
- [17] 马金武,吕建建,刘萍,等.急性盐度胁迫对三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)“黄选1号”血清渗透压及离子含量的影响[J].渔业科学进展,2016,37(1):58-62.
- [18] 王林,潘鲁青.三疣梭子蟹在低盐胁迫下渗透生理适应性的研究[J].海洋湖沼通报,2016(3):106-112.
- [19] 卢俊,庄平,冯广朋,等.中华绒螯蟹亲蟹渗透压调节和抗氧化系统对盐度的响应[J].海洋渔业,2011,33(1):39-45.
- [20] 马金武,吕建建,刘萍,等.盐度胁迫对三疣梭子蟹“黄选1号”血清部分生化指标的影响[J].水产学报,2017,41(4):506-511.
- [21] 王秀坤, Nielsen M. GABA $_A$ 受体药理学研究进展[J].国际药学研究杂志,2001,28(1):29-34.
- [22] 梁臣,陈忠. γ -氨基丁酸及其受体功能的研究与应用现状[J].动物医学进展,2015,36(4):108-112.
- [23] 付萍,吕建建,刘萍,等.盐度胁迫对三疣梭子蟹肌肉和血淋巴中游离氨基酸含量的影响[J].水产学报,2017,

- 41(3):374-381.
- [24] Eshaq R S, Stahl L D, Smith S S, et al. GABA acts as a ligand chaperone in the early secretory pathway to promote cell surface expression of GABA_A receptors[J]. Brain Research, 2010, 1346(8):1-13.

Effects of gamma-aminobutyric acid and GABA_A receptor associated protein on osmotic regulation in *Portunus trituberculatus* under low salinity stress

ZHANG Wei-jia^{1,2}, LU Shao-kun¹, LI Rong-hua^{1,2*}, WANG Chun-lin^{1,2}, MU Chang-kao^{1,2}, SONG Wei-wei^{1,2}

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315823, China; 2. Collaborative Innovation Center for Zhejiang Marine High-efficiency and Healthy Aquaculture, Ningbo 315823, China)

Abstract: In order to investigate the effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) and GABA_A receptor associated protein (GABARAP) on osmotic regulation in *Portunus trituberculatus* under low salinity stress, the osmotic pressure and concentration of chloride ion (Cl⁻) in the serum of *P. trituberculatus* at 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36 and 48 h were measured under salinity 10, the changes of GABA content and GABARAP gene expression in gill tissue were also determined at each time point. The results showed that osmotic pressure and concentration of chloride ion (Cl⁻) in the serum decreased significantly within 12 hours ($P<0.05$), and stabilized after 12 hours, the concentration of Cl⁻ decreased 17.93% and the osmotic pressure of the serum decreased 24.46% compared to time 0 h, the difference between the serum osmotic pressure and the seawater was $(183.21\pm9.51)\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ after 12 h. The content of GABA and the gene expression of GABARAP increased at the beginning and became stable after 12 h. These results indicated that the regulation of *P. trituberculatus* to low salinity conditions should be completed within 12 h. GABA content and GABARAP gene expression showed a significant positive correlation during this process. The results suggest that they played an important role in the regulation of Cl⁻ to maintain the difference between the serum osmotic pressure and the seawater at $(183.21\pm9.51)\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$, which is of great importance for *P. trituberculatus* to ensure the normal physiological activities.

Key words: *Portunus trituberculatus*; low salinity stress; gamma-aminobutyric acid (GABA); GABA_A receptor associated protein (GABARAP)

(责任编辑 章践立)