

急性盐度胁迫下军曹鱼稚鱼应激反应的血清学指标

徐力文¹, 苏友禄², 刘广锋¹, 郭根喜¹, 冯娟¹

(¹中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300; ²华南农业大学兽医学院, 广东广州 510642)

摘要:军曹鱼 *Rachycentron canadum* 稚鱼 [体质量 (25.6 ± 4.9)g] 从盐度 37‰ 的自然海水中直接转移至盐度为 0‰、5‰、15‰、25‰、37‰ (对照) 和 45‰ 的水体中进行盐度急性胁迫试验, 转移前及转移后 0.5、1、2、3、6 和 12 h 分别检测血清中皮质醇、血糖、乳酸和天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 等应激指标变化。结果显示, 试验期间对照组各指标在基础值附近变幅平稳; 盐度 0‰ 组在 6~12 h 内出现 100% 死亡, 且死亡前稚鱼皮质醇 (256.7 ng·mL⁻¹) 和血糖 (11.95 mmol·L⁻¹) 都显示显著高水平 ($P < 0.05$), 而乳酸和 AST 水平则较低; 其他 4 个胁迫组在最初 3 h 内皮质醇、血糖和乳酸水平都出现不同程度升高, 其中盐度 25‰ 组变幅显著高于其他组, 除盐度 5‰ 组皮质醇和乳酸水平在后期有升高趋势外, 各组 3 h 后都逐渐回落至基础值或对照组附近。血清 AST 水平前期变化较复杂, 试验后期盐度 5‰ 和 25‰ 水平显著高于其他 3 组。除在淡水中导致稚鱼死亡外, 以皮质醇水平为主要应激指标, 综合分析显示, 稚鱼对盐度胁迫反应初期强弱依次为盐度 25‰、5‰、15‰ 和 45‰, 而后期在盐度 5‰ 下的应激强度又逐渐增强。

关键词:军曹鱼; 盐度胁迫; 血清学指标; 应激反应

中图分类号: S962 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2007)02-0091-04

Serological Parameters of *Rachycentron canadum* Juveniles

Subjected to Abrupt Salinity Shock

XU Li-wen¹, SU You-lu², LIU Guang-feng¹, GUO Gen-xi¹, FENG Juan¹

(¹ South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

² College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The 12-h stress response of cobia *Rachycentron canadum*, juveniles [body mass (25.6 ± 4.9)g], acclimatized to 37‰ salinity, following abrupt transfer to salinities of 0, 5‰, 15‰, 25‰, 37‰ (control) and 45‰ were evaluated, using serum levels of cortisol, glucose, lactate and aspartate transaminase (AST) after 0.5, 1, 2, 3, 6 and 12 h post-transfer as indicators. Results indicated that all parameters of the control group fluctuated slightly around background levels throughout the trial. A mortality of 100% was observed at salinity 0 within the period range of 6-12 h, and the levels of cortisol (260.5 ng·mL⁻¹) and glucose (11.95 mmol·L⁻¹) were significantly ($P < 0.05$) higher than those of others at 6 h, but lactate and AST at salinity 0 showed lower levels at the same time. An ascending trend of levels of cortisol, glucose and lactate, to a different extent, was detected at salinities of 5‰, 15‰, 25‰ and 45‰ at 3 h, among which that of salinity 25‰ showed significantly higher. Except the levels of cortisol and lactate at salinity 5‰, which tended to increase at the end of trial, all parameter levels (except AST) at salinities of 5‰, 15‰, 25‰ and 45‰ gradually regressed to background values or about those of the control group at 3 h. The AST levels fluctuated erratically at 3 h, but were significantly higher at salinities 5‰ and 25‰ than that of others towards the end of trial. Considering cortisol level as a primary parameter, the results indicated that stress response of cobia juveniles to abrupt salinity changes after 12 h, except at salinity 0 that induced death, was the strongest at salinity 25‰ with salinity 5‰ running second, and followed by salinities 15‰ and 45‰ at the beginning of the trial, though the response to salinity 5‰ at the

收稿日期: 2006-05-15

作者简介: 徐力文 (1973—), 男, 助理研究员, 硕士; 通讯作者: 冯娟 (1973—), 女, 副研究员, 博士, E-mail: juanf@21cn.com

基金项目: 广东省科技计划项目 (2003B21502); “十五”国家科技攻关项目 (2004BA526B03)

end showed a gradual increase.

Key words: *Rachycentron canadum*; salinity shock; serological parameters; stress response

军曹鱼 *Rachycentron canadum*, 又称海鲷、海龙, 为自然分布于热带、亚热带海域中型肉食性洄游鱼类^[1]. 环境胁迫可影响鱼类一系列生理机能^[2], 其中盐度是影响海水鱼类生长的重要环境因素之一^[3], 在人工养殖条件下盐度常由于自然因素或人为因素而发生变化, 从而对养殖对象造成生理胁迫. 鱼类血液中激素含量的变化, 如皮质醇常被视为应激反应的一个敏感指标, 此外, 血糖和乳酸水平变化也与鱼类应激程度密切相关^[2]. 近年来, 也有环境盐度变化对军曹鱼稚鱼生长和成活率影响的报道^[4-7], 鉴于生产实践中军曹鱼育苗水体环境的不稳定性, 本文以急性盐度变化作为胁迫因子, 探讨 12 h 内军曹鱼稚鱼的血液应激反应指标的变化, 研究结果将有助于了解该鱼类对环境盐度变化的适应性, 对生产实践也具一定指导意义.

1 材料与方法

1.1 分组设计

试验于中国水产科学研究院南海水产研究所海南三亚试验基地进行, 军曹鱼鱼苗购自附近育苗场, 自然海水暂养 2 周后, 选取个体均匀的用于试验 [(体质量 (25.6 ± 4.9) g, 体长 (17.57 ± 0.97) cm]. 室内试验水泥池水体 $1\text{ m} \times 1\text{ m} \times 0.6\text{ m}$, 盐度为 37‰ 的砂滤自然海水添加去氯自来水或海水素调整试验组盐度为 5‰、15‰、25‰ 和 45‰ ($\pm 1\%$, WYY-II 型盐度计, 成都光学厂), 另设盐度 37‰ 的对照组及盐度为 0 的去氯自来水组, 共计 6 个盐度梯度, 每梯度 45 尾, 分 3 个平行组. 试验期间 (12 h) 连续充气, 停饵, 水温 $27.5 \sim 28.0\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 随盐度变化为 $7.6 \sim 8.4$.

1.2 取样

从自然海水暂养池中捞取试验稚鱼转移至各盐度池中, 在转移前及转移后 0.5、1、2、3、6 和 12 h 各时间点取样, 取样时迅速捞取 4~5 尾以肝素润湿的 1 mL 注射器心脏取血, 每尾鱼取血时间不超过 8~10 s, 每尾血液为 1 个样本, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置过夜后 $8\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min, 取血清于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备检. 同时记录不同盐度下 12 h 内的成活率.

1.3 血清样本分析

血清中葡萄糖 (Glu) 水平及天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 和丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 活性用全自

动生化分析仪检测 (生化免疫一体化分析系统 Modular 分析仪, Roche 公司, 德国).

血清中乳酸 (LD) 含量检测采用乳酸测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 20060113).

血清中皮质醇含量测定采用化学发光法检测 (ACS:180SE 型全自动化学发光免疫分析系统, Bayer 公司, 美国).

1.4 数据分析

所有试验数据用平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示, 统计分析应用 SPSS for Windows 10.0 软件, 在单因素方差分析基础上, 采用 Duncan's 多重比较法检验组间差异 ($P=0.05$).

2 试验结果

在盐度 0 的淡水中稚鱼 2~3 h 内开始出现死亡, 至第 6 h 死亡率超过 70.8%, 随后 2 h 内全部死亡. 其他各盐度组中试验期间稚鱼无死亡. 各检测指标含量随胁迫时间变化见表 1.

2.1 血清中皮质醇水平变化

试验期间盐度 37‰ 的对照组皮质醇水平在基础值 (时间为 0 时的含量, 下同) 附近变幅平稳, 而其他盐度组皮质醇含量在 1 h 内都达到各自的最高值. 随后, 除盐度 0 组的皮质醇维持在相对稳定的高水平直至死亡外, 其他组都呈现向基础值附近回落趋势. 至 2 h 后, 除盐度 5‰ 组在试验结束时又反弹升高至显著水平 ($P<0.05$, 下同) 外, 盐度 5‰、15‰ 和 45‰ 组与对照组皮质醇水平已无显著差异 ($P>0.05$, 下同). 而盐度 25‰ 组至试验结束时才逐渐回落至对照组水平附近.

2.2 血糖含量变化

就血糖水平而言, 盐度 15‰ 和 45‰ 在 12 h 内变幅比对照组更稳定, 与基础值相当. 但盐度 5‰ 和 25‰ 组在最初 3 h 内先出现大幅升高, 随后急剧下降至基础值附近. 胁迫 6 h 后, 除盐度 0 组外, 其他各组与对照组都无显著差异. 尽管盐度 0 组血糖水平在初期升幅不及盐度 25‰, 但其回落平稳, 在死亡前仍显著高于其他组.

2.3 血清中乳酸含量变化

对照组的乳酸水平全程保持相对稳定, 而在最初的 3 h 胁迫内, 其他各组血清乳酸水平都有一个明显峰值, 其中盐度 25‰ 在时间 0.5、1 和 2 h 点上显著

表1 急性盐度胁迫对军曹鱼稚鱼血清学部分应激指标的影响¹⁾

Tab.1 Time-course changes in several stress response serological parameters of juvenile cobia under abrupt salinity shock

指标 parameters	盐度 salinity/‰	胁迫时间 stress response time						
		0 (n=8)	0.5 h	1 h	2 h	3 h	6 h	12 h
p(血清皮质醇 serum cortisol) /(ng·mL ⁻¹)	0		211.2±15.3a	260.5±20.7a	253.5±13.7a	249.8±23.8a	256.7±20.7a	...
	5		234.7±18.6a	163.0±16.3b	112.4±15.2c	99.2±9.6c	103.7±11.2bc	145.2±26.3a
	15	70.7±5.4	196.6±17.1a	85.7±11.6c	72.4±12.6d	72.9±14.5c	73.9±10.8c	70.2±13.4b
	25		225.1±20.2a	239.7±23.1a	177.3±17.9b	146.9±16.7b	131.4±21.5b	91.2±10.5b
	37		80.0±12.9c	78.2±10.7c	88.5±8.7cd	91.5±11.6c	88.6±11.7c	78.0±6.3b
	45		144.9±14.2b	85.3±12.4c	76.5±11.3d	69.4±12.1c	72.9±8.6c	71.3±11.6b
c(血糖 serum glucose) /(mmol·L ⁻¹)	0		13.32±1.54b	18.20±1.42a	12.94±1.89b	12.83±1.21a	11.95±1.93a	...
	5		14.42±1.22b	12.80±2.10b	6.85±1.24c	6.20±1.51c	6.55±1.38b	7.14±0.97a
	15	7.66±0.47	8.01±1.22c	9.11±1.37c	8.70±1.16c	8.49±0.65bc	7.84±0.89b	7.33±1.36a
	25		18.16±0.93a	20.70±1.24a	21.08±1.92a	10.57±1.49ab	8.53±1.02b	7.85±0.91a
	37		8.67±0.74c	9.23±0.69bc	7.08±0.73c	6.93±0.42c	7.37±0.72b	7.57±0.43a
	45		8.18±0.51c	8.27±0.91c	8.33±0.86c	8.48±0.69bc	8.20±0.56b	8.02±0.39a
c(血清乳酸 serum lactate) /(mmol·L ⁻¹)	0		3.335±0.932d	4.404±0.823cd	3.319±0.672b	2.426±0.582c	2.015±0.862b	...
	5		6.267±0.896bc	6.412±0.901bc	4.344±0.568b	3.053±0.671bc	3.564±0.689a	4.93±0.924a
	15	2.960±0.328	4.702±0.626c	5.473±0.527bc	3.321±0.470b	4.442±0.678ab	4.267±0.820a	4.29±0.707ab
	25		10.290±1.481a	9.840±1.129a	7.965±0.982a	4.954±0.860a	3.687±0.693a	3.608±0.980ab
	37		3.115±0.337d	3.531±0.403d	3.651±0.343b	3.341±0.465bc	3.240±0.551a	3.196±0.281b
	45		7.115±0.882bc	5.84±1.056bc	4.244±0.887b	3.45±0.523bc	3.311±0.763a	3.321±0.492b
血清 AST serum AST /(IU·L ⁻¹)	0		75±11b	70±14b	161±25a	81±16b	49±27c	...
	5		221±26a	265±38a	56±11c	93±18b	174±22a	205±27a
	15	62.5±5.4	73±15b	51±13b	168±28a	54±16b	66±15bc	79±17c
	25		122±17b	81±10b	114±15b	168±26a	206±23a	135±16b
	37		85±12b	69±15b	39±13c	63±11b	77±10bc	67±12c
	45		90±10b	66±9b	51±14c	56±12b	88±15b	56±10c

1) Mean±SD, n=4~5;表中同一指标同列中小写字母不同者示差异显著(P<0.05,Duncan's法),盐度0组至试验结束时已全部死亡

高于其他组,但随后也逐渐回落至对照组附近.盐度0组在第1h点上的峰值明显低于其他胁迫组,且在死亡前乳酸水平持续下降,至第6h时已显著低于其他各组.而盐度5‰组水平在试验结束时又出现小幅升高,但与盐度15‰和25‰组并无显著差异.

2.4 血清中天门冬氨酸氨基转移酶(AST)含量变化
稚鱼血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)含量极低(0~6 IU·L⁻¹),大多数样本在检测限下,故数据未作统计.除对照和盐度45‰组外,其他各组血清中AST含量随时间波动都较大,如盐度5‰组在1h点上出现全组最高值,随后急剧下降,但试验结束时又逐渐上升至一个显著高水平,而盐度25‰组AST含量在试验后期也显示较高水平.尽管盐度0组在死亡前有全组最低值,但与同时间点上对照组并无显著差异.

3 讨论

在自然海域中军曹鱼成鱼分布于盐度22.5‰~44.5‰水体中^[1],但近岸或近海人工网箱养殖及陆地人工育苗环境中盐度常因人为或自然因素出现较大变化,盐度不仅涉及鱼类的渗透压调节,还关系到对饲料的吸收利用而影响鱼类的生长^[3].目前研究显示,虽然长时间低盐度环境可降低军曹鱼稚鱼生长率及增加其对病害的易感性,但低至盐度5‰的水体也不显著影响其存活率^[4,6-7].值得注意的是即使是逐渐适应,低于盐度5‰都可导致稚鱼大量死亡^[5],结合本试验结果,显示过低盐度或淡水可能已超过该鱼的渗透压调节极限.

现已明确鱼类下丘脑-垂体-肾间组织轴(HPI)在调控对环境胁迫的应激反应中占主导地位,

HPI 以皮质醇、肾上腺素等为介导影响糖原、蛋白质、脂肪代谢及离子平衡,在相关器官和系统的共同作用下维持机体生理平衡^[8]. 鱼类渗透压调节也涉及到皮质醇等多种激素的参与,如皮质醇可刺激鳃泌氯细胞的增加及 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPase}$ 活性^[9],而调节所需能量主要来自血糖代谢及其无氧代谢产物乳酸的糖质新生^[10]. 因此,本试验中选择血糖及乳酸水平作为军曹鱼对盐度应激反应的间接指标.

本试验结果显示,在盐度胁迫下稚鱼在短时间内即出现应激反应,但除淡水组及后期盐度 5‰ 组外,不同胁迫强度(盐度变化幅度)下在 3 h 后都逐渐回归至基础值或对照组附近,显示军曹鱼有较强的渗透胁迫应激能力. 从皮质醇和血糖水平观测,淡水组中稚鱼死亡前处于高度应激状态,且后期正常糖代谢(乳酸水平)途径受阻,但死亡应是由于渗透压调控中离子流和水分的失衡,急性盐度胁迫对军曹鱼的渗透压调控影响另文发表.

除盐度 0 组外,值得注意的是在胁迫 6 h 内盐度 25‰ 组从皮质醇、血糖和乳酸水平观测都处于最高水平,显示该盐度在前期对稚鱼的胁迫最大,盐度 5‰ 组次之. 但试验后期从皮质醇和乳酸水平变化看,盐度 5‰ 下稚鱼的应激反应逐渐增强,显示稚鱼启动的应激机制在盐度 5‰ 中迟于其他组,原因有待研究. 在 2 周的盐度慢性适应试验中,盐度 5‰ 下军曹鱼血清皮质醇和乳酸含量显著高于盐度 30‰ (数据另文处理),这显示低盐度可导致鱼类长时间的应激反应. 尽管在血糖水平上盐度 15‰ 组和 45‰ 组没有明显差异,可从皮质醇水平看,前者胁迫程度强于后者,但在乳酸水平上则相反,显示此 3 个应激指标在本试验中并没有严格的一致性,其中以皮质醇较为敏感. 稚鱼对盐度 15‰ 的应激反应低于盐度 25‰,可能是作为海洋广盐性鱼类军曹鱼的体内等渗点更接近于盐度 15‰ 的渗透压,相比盐度 25‰ 环境,在盐度 15‰ 中渗透压调节所需能量更低. 此外,试验中对盐度 45‰ 水体的应激程度显示军曹鱼稚鱼渗透调节可能更适应于高渗环境.

AST 和 ALT 含量在鱼类正常生理状态下都较低,当机体受到胁迫时从肝细胞释放至血液中,也常作为环境胁迫特别是毒性试验的检测指标,本试验中军曹鱼稚鱼 AST 在盐度胁迫下早期波动较大,在后期变化趋势与皮质醇相似,显示该指标有一定参考价值. ALT 含量在各组中,包括基础值都较低或在检测限下,笔者推测可能是军曹鱼本身肝细胞中 ALT 含量较低.

此外,本试验中并没有如一般推荐的在取样前对稚鱼进行麻醉,由于鱼体较小,多人协作下每尾鱼

在 8~10 s 内快速心脏取血,从对照组与基础值比较观测,显示取样过程并没有导致明显应激反应. 综合各应激反应指标,本研究显示,除在淡水中引起死亡外,军曹鱼稚鱼对盐度骤变的应激反应 12 h 内初期以盐度 25‰ 下为最强,盐度 5‰ 次之,而盐度 15‰ 与 45‰ 对稚鱼的胁迫程度相当,后期对盐度 5‰ 的应激逐渐增强,本研究结果对指导军曹鱼养殖中的环境管理具有一定实践意义,也有助于进一步探讨军曹鱼的渗透压调控机制.

致谢:南方医科大学珠江医院检验科多位同志为本试验提供了帮助,在此深表谢意!

参考文献:

- [1] BRIGGS J C. Fishes of worldwide (circumtropical) distribution[J]. Copeia, 1960, 3:171-180.
- [2] 洪磊, 张秀梅. 环境胁迫对鱼类生理机能的影响[J]. 海洋科学进展, 2004, 22(1): 114-121.
- [3] GILLES B, PATRICK P. How should salinity influence fish growth? [J]. Comp Biochem Physiol; C, 2001, 130: 411-423.
- [4] DENSON M R, STUART K R, SMITH T I J, et al. Effects of salinity on growth, survival, and selected hematological parameters on juvenile cobia, *Rachycentron canadum* [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2003, 34(4): 496-504.
- [5] ATWOOD H L, YOUNG S P, TOMASSO J R, et al. Resistance of cobia, *Rachycentron canadum*, juveniles to low salinity, low temperature, and high environmental nitrite concentrations[J]. J Appl Aquac, 2004, 15: 191-195.
- [6] RESLEY M J, WEBB K A, Jr, HOLT G J. Growth and survival of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture system[J]. Aquaculture, 2006, 253: 398-407.
- [7] FAULK C K, HOLT G J. Responses of cobia *Rachycentron canadum* larvae to abrupt or gradual changes in salinity[J]. Aquaculture, 2006, 254: 275-283.
- [8] 温海深, 高玲, 李文阁. 硬骨鱼类神经内分泌-免疫网络及其调控研究[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 31(1): 60-64.
- [9] MANCERA J. M, LAIZ-CARRION R, MARTIN DELI RiO M P. Osmoregulatory action of PRL, GH, and cortisol in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. Gen Comp Endocrinol, 2002, 129: 95-103.
- [10] SOENGAS J L, BARCIELA P, ALDEGUNDE M, et al. Gill carbohydrate metabolism of rainbow trout is modified during gradual adaptation to seawater[J]. J Fish Biol, 1995, 46: 845-856.

【责任编辑 柴 焰】