

拥挤胁迫对史氏鲟稚鱼血浆溶菌酶活性和补体水平的影响

聂芬¹ 石小涛¹ 李大鹏¹ 庄平²

(1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070;

2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

THE EFFECT OF CROWDING STRESS ON PLASMA LYSOZYME ACTIVITY AND
COMPLEMENT LEVES OF JUVENILES AMUR STURGEON, *ACIPENSER SCHRENCKII*NIE Fen¹, SHI Xiao-Tao¹, LI Da-Peng¹ and ZHUANG Ping²

(1. College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;

2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090)

关键词: 拥挤胁迫; 史氏鲟; 非特异性免疫功能; 溶菌酶; 补体

Key words: Crowding stress; *Acipenser schrenckii*; Non-specific immune function; Lysozyme; Complement

中图分类号: Q459 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)04-0581-04

鱼类主要依赖先天性免疫反应或称非特异性免疫反应来保护自己, 其非特异性免疫反应似乎比某些高等脊椎动物更有潜力, 因此探讨非特异性免疫反应是必要的^[1]。在鱼类的养殖过程中, 会发生各种的应激反应, 急性胁迫结果是打乱代谢平衡, 使用于生长的能量转移到适应外界环境的生理转变中, 慢性胁迫更是会使能量耗竭^[1]。鱼类处于慢性胁迫时常表现出免疫抑制^[2-8], 尽管其机理尚未完全揭示, 但应激过后表现出的生长率降低、死亡是常见的现象。拥挤胁迫作为一种常见的应激因子在国外已有较多报道, 但拥挤胁迫对鱼类非特异性免疫反应影响的研究尚少。特别是高密度养殖作为通常的增加产量的手段正影响着我国水产养殖业的发展, 其较长时间的高密度养殖是否可以认为是一种慢性胁迫影响鱼类的免疫系统尚需探讨。

史氏鲟 (*Acipenser schrenckii* Brandt) 隶属于鲟形目、鲟科、鲟属, 主要分布于黑龙江流域, 其已快速成为中国主要的淡水养殖鱼类之一。庄平^[9]的结果指出高密度养殖对史氏鲟的生长有抑制作用, 但未报道其对免疫机能的影响。本实验就拥挤胁迫对史氏鲟非特异性免疫机能的影响展开了研究,

为史氏鲟人工养殖提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验用史氏鲟由中国水产科学院东海水产研究所提供, 为同一亲本经人工繁殖而得到的子代。实验前在华中农业大学水产学院的室外水泥养殖池中进行暂养。实验鱼体质健康, 初始体重 43.90 ± 1.75 g, 初始体长 23.64 ± 0.20 cm。实验在室内进行, 实验容器为灰色内壁圆底玻璃缸, 内半径为 40 cm, 水深 40 cm, 缸上盖有聚苯乙烯薄片以避免人为干扰。采用曝气自来水流水系统。实验期间, 各实验组的水温为 18 ± 1 °C, 氨氮水平为 0.02 ± 0.01 mg/L, pH 为 7.6 ± 0.1 , 溶氧水平为 6.8 ± 0.7 mg/L。养殖饲料为本实验室配制的鲟鱼人工养殖饲料, 饲料中粗蛋白含量为 43.31%, 粗脂肪为 9.11%, 粗灰分为 13.24%。各种饲料原料使用前将其粉碎至 60 目, 制成粒径 2—2.5 mm 的硬颗粒作为实验饵料。

1.2 研究方法

1.2.1 实验设计 实验设计高(High density)、中(Middle den-

收稿日期: 2005-10-27; 修订日期: 2006-12-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2004AA603110); 国家十五科技攻关计划项目(2004BA526B0114); 农业部海洋与河口渔业重点开放实验室开放课题(开-03-06); 华中农业大学科技创新基金(52204-03072)资助

作者简介: 聂芬(1982—), 女, 汉, 湖北人; 硕士研究生; 研究方向为动物生理生化。E-mail: niefennf@reah.net

通讯作者: 李大鹏, 男, 副教授; 主要从事鱼类生态生理学方面研究。E-mail: fishldp@163.com; 庄平, 男, 研究员; 主要从事鱼类生物学方面研究。E-mail: pzhuang@online.sh.cn

sity)、低(Low density)3个养殖密度处理组,分别放养6、13、25尾史氏鲟,每个处理8个重复,初始实验密度分别为0.525、1.139、2.189kg/m²。2.0% BW/d投喂人工饲料,每天于8:00、15:00、20:00分别投喂3次。实验开始时取鱼12尾,然后每15天取样一次,每次每个处理取样2个缸,每个缸取4尾鱼即每个处理8尾鱼测量体重、体长,抽血,分离血浆测定溶菌酶活性和补体C3、C4含量,实验结束各处理组取鱼6尾解剖取脾,实验周期为60天。

1.2.2 实验方法 采样前,先将鱼置于200mg/L的MS-222中麻醉,尾动脉采血,用肝素抗凝(50—70IU/mL)。3000r/min离心10min,取血浆。

血浆溶菌酶活性的测定参照Parry^[10]和王文博^[8]。

脾脏脏器系数测定:脾脏重量与体重之比即为脾脏脏器系数(Spleen weight index)。先称量实验鱼体重,再行深度麻醉(MS-222),尾静脉血,摘取脾脏,用生理盐水稍加冲洗,吸干表面水分,立即在电子秤上称重。

血浆C3和C4含量的测定采用上海明华体外诊断试剂有限公司生产的试剂盒,用全自动生化分析仪(ACTO II)测定补体C3和C4的含量。

1.2.3 数据统计与分析 实验数据通过STATISTICA(6.0)统计软件(StatSoft, Inc.)进行处理分析,利用方差分析(One-Way ANOVA)进行显著性检验,用最小显著极差法(LSD)进行多重比较, $p < 0.05$ 为显著性水平, $p < 0.01$ 为极显著水平。

2 结果与分析

2.1 拥挤胁迫对史氏鲟稚鱼血浆溶菌酶活性的影响

拥挤胁迫对史氏鲟稚鱼血浆溶菌酶活性的影响结果见图1,拥挤胁迫在第15天($p < 0.05$)和30天($p < 0.01$)时对史氏鲟稚鱼血浆溶菌酶活性有显著影响。各实验组在实验期间,溶菌酶活性表现为由低密度到高密度依次降低;15天时低密度组溶菌酶活性显著高于高密度组($p < 0.01$),30天时低密度组显著高于中、高密度组,中密度组显著高于高密度组,45天和60天时各密度组溶菌酶活性之间没有显著差异。实验开始后15天,低、中密度组溶菌酶活性显著高于实验前的对照组,

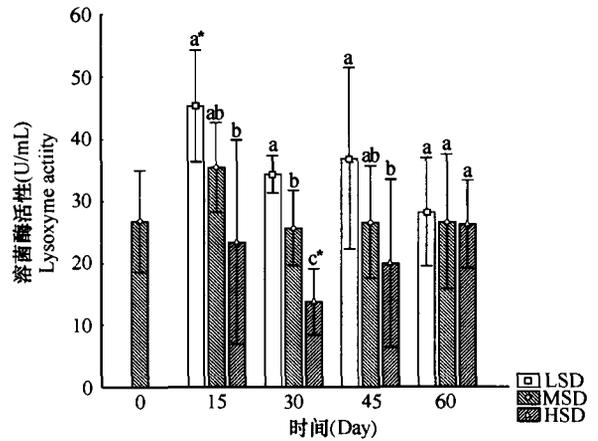


图1 拥挤胁迫对史氏鲟稚鱼血浆溶菌酶活性的影响(均值±标准差)

Fig.1 Effect of crowding stress on lysozyme activity in plasma of juvenile Amur sturgeon (mean ± SD)

相同时间的相同字母表示组间无显著差异(T检验, $p < 0.05$)。*和**分别表示与初始值比较有显著($p < 0.05$)或极显著($p < 0.01$)差异。下同。

Values with different small superscript letters within at the same time indicate significantly different ($p < 0.05$) by T-test. * and ** mean values significantly different ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) from value at 0d.

The same as below

第30天、45天时低、中密度组溶菌酶活性显著高于实验前的对照组,第60天时,各实验组溶菌酶活性基本回复到实验前水平。

2.2 拥挤胁迫对史氏鲟稚鱼血浆补体C3、C4含量的影响

拥挤胁迫对史氏鲟稚鱼血浆补体C3、C4含量的影响的测定结果见表1,拥挤胁迫在第15天($p < 0.05$)和30天($p < 0.05$)时对史氏鲟稚鱼血浆补体C3含量有显著影响,在第15天($p < 0.05$)和30天($p < 0.01$)时对史氏鲟稚鱼血浆补体C4含量有显著影响。各实验组在第15天、30天时,血浆补体C3、C4含量表现为由低密度到高密度依次降低,血浆补体C3、C4含量的变化规律基本一致;15天、30天时低密度组显著高于中、

表1 不同养殖密度下史氏鲟稚鱼的C3和C4含量(均值±标准差)

Tab.1 Plasma concentrations of C3 and C4 of juvenile Amur sturgeon stocked at three rearing densities(mean ± SD)

项目 Items	实验组别 Group	胁迫时间 Crowded time				
		0天(N=12)	15d(N=8)	30天(N=8)	45d(N=8)	60天(N=8)
C3 含量(g/L) Concentration of C3	低密度组 Low density	0.70 ± 0.21	1.80 ± 0.59 ^{a*}	1.23 ± 0.46 ^{a*}	0.58 ± 0.15 ^a	0.92 ± 0.31 ^a
	中密度组 Middle density	0.70 ± 0.21	1.09 ± 0.23 ^{b**}	0.63 ± 0.02 ^b	0.53 ± 0.18 ^a	0.73 ± 0.14 ^a
	高密度组 High density	0.70 ± 0.21	0.96 ± 0.17 ^{c*}	0.54 ± 0.14 ^c	0.67 ± 0.34 ^a	0.81 ± 0.09 ^a
C4 含量(g/L) Concentration of C4	低密度组 Low density	0.18 ± 0.08	0.58 ± 0.22 ^{a**}	0.48 ± 0.09 ^{a**}	0.21 ± 0.05 ^a	0.29 ± 0.07 ^a
	中密度组 Middle density	0.18 ± 0.08	0.35 ± 0.08 ^{b**}	0.17 ± 0.01 ^b	0.17 ± 0.05 ^a	0.23 ± 0.06 ^a
	高密度组 High density	0.18 ± 0.08	0.32 ± 0.05 ^{c*}	0.15 ± 0.05 ^c	0.23 ± 0.12 ^a	0.27 ± 0.03 ^{a*}

1)相同时间的不同字母表示组间有显著差异(T检验, $p < 0.05$)。*和**分别表示与初始值比较有显著($p < 0.05$)或极显著($p < 0.01$)差异。2)N为受试尾数

1) Values with different small superscript letters within at the same time indicate significantly different ($p < 0.05$) by T-test. * and ** mean values significantly different ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) from value at 0d. 2) N = Number of experimental fish

高密度组,中密度组显著高于高密度组($p < 0.01$),45天和60天时各密度组溶菌酶活性之间没有显著差异。实验开始后15天,低、中密度组补体水平显著高于实验前的对照组,第30天、45天时低、中密度组补体水平显著高于实验前的对照组,第60天时,除了高密度组C4显著高于($p < 0.05$)实验前的对照组,其余各实验组补体水平基本回复到实验前水平。

2.3 拥挤胁迫对史氏鲟稚鱼脾脏的脏器系数的影响

胁迫60天后,低、中、高密度组的脾脏脏器系数平均值分别为0.40%,0.36%和0.41%,三者之间没有显著差异(图2)。

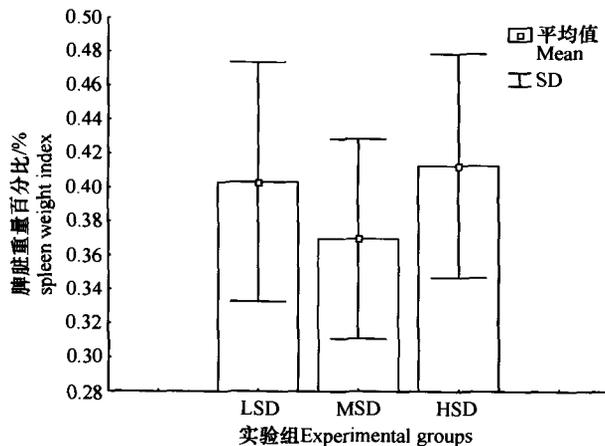


图2 拥挤胁迫对史氏鲟稚鱼脾脏的脏器系数的影响

Fig.2 Effect of crowding stress on juvenile Amur sturgeon spleen weight index

3 讨论

鱼类已具备免疫的基本特征,血清中包含多种免疫因子,其中溶菌酶和补体在抵御外来病原菌方面发挥着重要作用。Fevolden^[11]等认为溶菌酶活性亦可作为鱼类应激的信号,其水平升高所持续的时间依胁迫的方法和强度而定。王文博^[8]报道在草鱼的实验中拥挤程度越大,溶菌酶活性越易受到影响,草鱼高密度组的倒“U”型趋势表明在胁迫初期,草鱼受到较强应激,溶菌酶水平因此升高,而后鱼体产生了一定的耐受性,溶菌酶水平趋于降低。从图1可以看出其呈现随放养密度的增加而减小的趋势,且低密度组第15天溶菌酶活性显著高于实验初,高密度组未呈倒“U”型趋势,与王文博^[8]的结果有所不同。Rped^[12]实验得出胁迫后血液溶菌酶水平是先降后升的结果,Mock^[13]和Yin^[7]等人认为慢性胁迫会导致溶菌酶活性降低,Rotllant^[14]则报道第16天时高密度赤鲷(*Sparus aurata* Linnaeus)的溶菌酶活性显著高于对照组,Montero^[15]报道经过9周的拥挤,金头鲷(*Pagrus pagrus* Linnaeus)溶菌酶活性上升了。这些不同的结果表明,胁迫后鱼体溶菌酶水平变化的趋向可能受到诸多因素的影响,如胁迫的强度以及持续时间等^[16]。

补体是抵抗微生物感染的重要成分,具有独特的理化性质,激活后具有细胞溶解、细胞黏附、调理、免疫调节、介导炎

症反应、中和毒素、免疫复合物溶解和清除等重要的生物学效应,而C3和C4则是补体系统的主要成分,鱼类的C3往往比哺乳动物具较多的活性形式^[1]。本实验中C3和C4随密度时间变化表现出相似性,本实验结果从表1可以看出C3和C4呈现随养殖密度的增加而减小的趋势。王文博^[9]指出高强度的拥挤胁迫对草鱼的血清杀菌活性造成了极大抑制,并推测胁迫可能也引起了补体活性或浓度的下降,或者是补体中某些蛋白组分的失活,从而阻断了补体的激活途径。本实验结果证实了拥挤胁迫引起了补体浓度的下降,与Rotllant^[14]等指出拥挤胁迫引起了补体活性或浓度的下降的结果一致。Montero^[15]报道经过长时间的拥挤,金头鲷补体活性降低了。Yin^[7]报道拥挤胁迫导致了溶菌酶和补体活性的下降,并提出处于慢性胁迫中的鲤鱼(*Cyprinus carpio* L.)可能以一种较低的免疫水平来生存。

硬骨鱼类脾脏具有免疫功能^[12]。王文博^[8]报道60天后拥挤胁迫对高、中密度组草鱼的脾脏造成了严重损伤,李爱华^[17]得到相似结果。Schreck^[18]也支持拥挤胁迫会造成鱼类脾脏受损。本实验并未得到拥挤胁迫显著影响脾体系数的结果。

王文博^[8]报道当草鱼养殖密度达到指出密度时,机体免疫机能会受到抑制,密度越大,时间越长,抑制程度就越深,也更易于引发鱼病。本实验结果表明经过60天的实验,史氏鲟最终并未表现出低、中、高密度免疫机能存在显著差异,分析其原因为本实验史氏鲟与草鱼存在种属差异,或史氏鲟通过生理调节最终适应拥挤的环境。综上所述,本实验结果反映出了在一定的密度范围内,拥挤胁迫对史氏鲟稚鱼免疫机能产生了一定的负面影响,但其对史氏鲟稚鱼的免疫机能的不良影响只是暂时的。

参考文献:

- [1] Tort L, Balasch J C, MacKenzie S. Fish health challenge after stress. Indicators of immunocompetence [J]. *Contributions to Science*, 2004, 2 (4): 443—454
- [2] Bly J E, Quiniou S M, Clem L W. Environmental effects on fish immune mechanisms [J]. *Developments in Biological Standardization*, 1997, 90: 33—43
- [3] Clearwater S J, Pankhurst N W. The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroids and vitellogenic oocytes in the marine teleost, red gurnard [J]. *Journal of Fish Biology*, 1997, 50: 429—441
- [4] Maule A G, Tripp R A, Kaatari S L, Schreck C B. Stress alters the immune function and disease resistance in Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* [J]. *Journal of Endocrinology*, 1989, 120: 135—142
- [5] Pickering A D, Pottinger T G. Stress and disease resistance in salmonid fish: Effects of elevated plasma cortisol [J]. *Fish Physiology Biochemistry*, 1989, 7(1—4): 253—258
- [6] Tort L, Sunyer J O, Gómez E, et al. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata* [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1996b, 51: 179—188

- [7] Yin Z, Lam T J, Sin Y M. The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp (*Cyprinus carpio* L) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1995, 5: 519—529
- [8] Wang W B, Li A H, Wang J G, et al. The effect of crowding stress on non-specific immune functions of *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(2): 139—144 [王文博, 李爱华, 汪建国, 等. 拥挤胁迫对草鱼非特异性免疫功能的影响. 水产学报, 2004, 28(2): 139—144]
- [9] Zhuang P, Li D P, Wang M X, et al. Effect of stocking density on growth of juvenile *Acipenser schrenckii* [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2002, 13(6): 735—738 [庄平, 李大鹏, 王明学, 等. 养殖密度对史氏鲟稚鱼生长的影响. 应用生态学报, 2002, 13(6): 735—738]
- [10] Parry R M, Chandan R C, Shabani K M. A rapid and sensitive assay of muramidase [J]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1965, 119: 383—386
- [11] Fevolden S E, Roed K H. Cortisol and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high or low tolerance to stress [J]. *Journal of Fish Biology*, 1993, 43: 919—930
- [12] Røed K H, Larsen H J, Linder R D, et al. Genetic variation in lysozyme activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 1993, 109: 237—244
- [13] Mock A, Peters G. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution [J]. *Journal of Fish Biology*, 1990, 37: 873—885
- [14] Rotllant J, Pavlidis M, Kentouri M, et al. Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress [J]. *Aquaculture*, 1997, 156: 279—290
- [15] Montero D, Marrero M, Izquierdo M S, et al. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding [J]. *Aquaculture*, 1999, 171: 269—278
- [16] Fevolden S E, Roed K H, Fjalestad K. A combined salt and confinement stress enhances mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high stress responsiveness [J]. *Aquaculture*, 2003, 216: 67—76
- [17] Li A H. Effects of crowding stress on plasma cortisol, glucose and liver ascorbic acid in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 1997, 21(4): 384—387 [李爱华. 拥挤胁迫对草鱼皮质醇、血糖及肝脏中抗坏血酸含量的影响. 水生生物学报, 1997, 21(4): 384—387]
- [18] Schreck C B. Immunomodulation: endogenous factors [A]. In: Iwama G, Nakanishi T (Eds.), *The fish immune system, organism, pathogen and environment* [M]. London: Academic Press. 1996, 311—337