

池塘养殖条件下牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 甲状腺轴和生长轴关键激素的变化规律*

李晓妮^{1,2} 史宝² 柳学周^{1,2①} 徐永江²
常亚青¹ 陈圣毅² 臧坤²

(1. 大连海洋大学 大连 110623; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程
与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 通过统计学、酶联免疫学等方法研究3个池塘中养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的生长状况、血清四碘甲状腺素(T4)和三碘甲状腺原氨酸(T3)、生长激素(GH)、类胰岛素生长因子-I(IGF-I)和温度的周年变化规律。结果显示,在365 d的养殖过程中,3个池塘牙鲆体重和体长持续增长且体重日增长率和体长日增长率在温度较高的夏末秋初出现较高值。3个池塘牙鲆血清中T3、T4含量变化整体趋势一致,血清T4浓度在夏末出现最高值,T3浓度在秋初出现最高值,滞后于T4。IGF-I水平最高值出现在温度较高的夏末、秋初滞后于GH最高值夏初。牙鲆血清中T3、T4、GH和IGF-I 4种激素含量变化和生长率变化规律大体一致,呈现明显的周年变化规律。

关键词 池塘; 生长; 四碘甲状腺素; 三碘甲状腺原氨酸; 生长激素; 类胰岛素生长因子-I
中图分类号 S966 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)03-0036-06

激素在调节动物的生长和发育过程中起着重要的调节作用,其中,生长激素、胰岛素、胰岛素样生长因子、甲状腺激素能够刺激细胞分裂,使细胞数目增多,达到促进鱼类个体生长的目的(Beckman *et al.*, 2011)。甲状腺激素(Thyroid hormone, TH),包括三碘甲状腺原氨酸(T3)和四碘甲状腺素(T4),存在于所有的脊椎动物中。TH在哺乳类和两栖类动物的早期生长发育和变态过程中发挥着至关重要的作用,而在鱼类(尤其是鲆鲽类)的变态过程中,TH的调控作用更加明显(Yamano, 2005)。甲状腺滤泡富集碘离子,由过氧化物酶催化氧化成活性碘,并与甲状腺球蛋白上的酪氨酸残基作用形成四碘甲状腺素T4。T4进入血液后,大部分与血液内的运载蛋白相结合进入到其他组织中,而少量游离的T4直接进入组织内(Power *et al.*, 2000)。由于T4自身的生物活性较低,在进入肝脏等外周组织后,通过脱碘酶的外脱碘作用,形成活性较

强的T3(Hadley, 1992; Ingbar, 1985)。T3与核内受体结合,形成的复合物作为基因表达的转录因子,调控特定基因的表达,从而影响着机体生长、发育和繁殖等过程(Davis *et al.*, 2008)。

在硬骨鱼类, GH/IGF轴调节鱼类生长。鱼类脑垂体合成和分泌的生长激素(Growth hormone, GH)是一种具有广泛生理功能的生长调节素。GH刺激肝脏产生类胰岛素生长因子-I(Insulin-like growth factor-I, IGF-I), IGF-I不但可以直接刺激组织生长,同时通过影响GH促进生长的效应进而间接影响生物体生长发育(Lupu *et al.*, 2001)。IGF-I主要是介导生长激素的促生长作用。在正常发育过程中, IGF-I通过负反馈调节改变血清中GH的浓度。研究表明, IGF-I通过负反馈作用影响GH分泌(Tannenbaum, 1993)。在春季和初夏,银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*) (Sliverstein *et al.*, 1998)和金头鲷(*Sparus aurata*) (Mingarro *et al.*,

* 国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)和国家国际科技合作专项项目(2013DFA31410)共同资助。李晓妮, E-mail: li_xi_ao_ni@yeah.net

① 通讯作者: 柳学周, 研究员, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2014-07-15, 收修改稿日期: 2014-11-08

2002)血清中 GH 和 IGF-I 水平增加,表明季节对鱼类 GH/IGF 轴存在一定的影响。

在池塘养殖系统条件下进行牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)养殖实验,对池塘养殖条件下不同生长发育阶段牙鲆的生长相关参数、血清中 T4 与 T3、GH 与 IGF-I 含量变化和水温对应关系进行分析,旨在了解牙鲆在该池塘养殖条件下的生长特点,为北方地区牙鲆新的池塘养殖模式推广提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 养殖池塘特点和实验鱼饲养

在山东省日照市水利养殖场建造的池塘养殖系统进行实验。该池塘养殖系统由 6 个 0.3 hm² 的小型单体护坡池塘连体组成,养殖池分为两排,每排 3 个池塘,平均水深 2.0 m。实验选择系统中的一排 3 个养殖池塘进行(1、2、3 号池塘),每个池塘配备高效增氧机 1 台,使用水质在线检测设备测定主要水质指标。养殖用水为自然海水,控制每天的换水量在 40%–60%。整个实验期间,养殖牙鲆鱼以投喂野生杂鱼(玉筋鱼)为主,每天饲喂两次,按照养殖鱼体重的 2%–4%进行投喂,并且投喂量结合水温情况随时调整。在高温期和低温期,不投喂饵料。养殖池塘海水的理化指标控制氨氮为 0.2–0.4、pH 为 7.0–8.4、溶解氧为 5.0–6.5 mg/L、水温为 8–28℃、盐度为 27–31。夏季水温大于 29℃的高温期和冬季水温低于 4℃的严寒期,使用部分地下深井海水调节养殖池水温,保持池塘水温 5–28℃,确保牙鲆安全度夏和越冬。

1.2 样品采集

在春季,3 个池塘放养牙鲆幼鱼,其中 1 号池塘放养牙鲆体重范围为 270–350 g、投放密度为 2000 尾/亩;2 号池塘放养牙鲆体重范围为 185–225 g、投放密度为 2700 尾/亩;3 号池塘放养牙鲆体重范围为 88–117 g、投放密度为 4500 尾/亩。每 30 d 拉网 1 次,随机从每个池塘中捞取实验鱼 30 尾,测量体长和体重,并从尾静脉取血,血样在 4℃静置数小时后离心,取上层血清置–40℃冰箱保存。每天 09:00、16:00 时左右,测量池塘中海水温度,取 30 d 的水温平均值作为当月水温。

1.3 血清中四碘甲状腺素、三碘甲状腺原氨酸、生长激素、类胰岛素生长因子-I 测定

采用武汉华美生物公司的鱼类四碘甲状腺素 T4、三碘甲状腺原氨酸 T3、生长激素(GH)和类胰岛素生长因子-I(IGF-I)酶联免疫试剂盒,在酶标仪(Bio-Rad)

上进行,按照试剂盒说明书测定激素含量,IGF-I 步骤顺序:(1)、(2)、(5),其他激素步骤:(1)、(3)、(4)、(5)。

(1) 测定时,在酶标板设 3 个空白对照孔,不加任何液体;每个标准品依次各设 3 孔,每孔加入相应标准品 50 μl;其余每个检测孔直接加待测标本 50 μl。

(2) 每孔加入生物素标记物 50 μl(空白对照孔除外),充分混匀,贴上不干胶封片,置 37℃温育 1 h。

(3) 每孔加入酶结合物 50 μl(空白对照孔除外),再按同样的顺序加入抗体 50 μl,充分混匀,贴上不干胶封片,置 37℃温育 1 h。

(4) 手工洗板后,酶标板上每孔加入辣根过氧化物酶标记亲和素 50 μl(空白对照孔除外),充分混匀,贴上不干胶封片,置 37℃温育 30 min。

(5) 再次手工洗板后,每孔加显色剂 A 液 50 μl,显色剂 B 液 50 μl,振荡混匀后,37℃避光显色 15 min,每孔加终止液 50 μl。用酶标仪在 450 nm 波长依序测量各孔的光密度(OD 值)。

1.4 生长率计算

牙鲆生长速度分别用体重日增长率(*SGR*)和体长日增长率(*LGR*)表示,其计算公式为(陈松林等,1998):

$$SGR = (SW_2 - SW_1) \times 100 / SW_1 \times (t_2 - t_1)$$

$$LGR = (L_2 - L_1) \times 100 / L_1 \times (t_2 - t_1)$$

式中, SW_2 和 SW_1 分别为时间 t_1 和 t_2 (天数)时的体重, L_1 和 L_2 分别为 t_1 和 t_2 时的体长。

1.5 数据统计方法

使用 Excel 和 SPSS16.0 统计软件进行数据处理和统计分析;数据表示为平均数±标准误(Mean±SE),采用单因素方差分析(ANOVA)中的 Duncan's 多重比较进行均值显著性检验。

2 结果

2.1 体重和体长周年变化

从 6 月–翌年的 5 月,3 个池塘牙鲆幼鱼体重持续增长,3 个池塘牙鲆经过 365 d 养殖,平均体重分别达到 1341.77、1198.20、958.93 g。2–3 月,因为不投喂,牙鲆体重不增加(图 1)。3 个池塘牙鲆幼鱼体重日增长率(*SGR*)都在 9 月出现最高值(图 2)。3 个池塘牙鲆幼鱼体长持续增长,平均体长分别达到 54.22、45.33、39.40 cm(图 3)。3 个池塘牙鲆幼鱼的体长日增长率同样在 9 月出现最高值(图 4)。

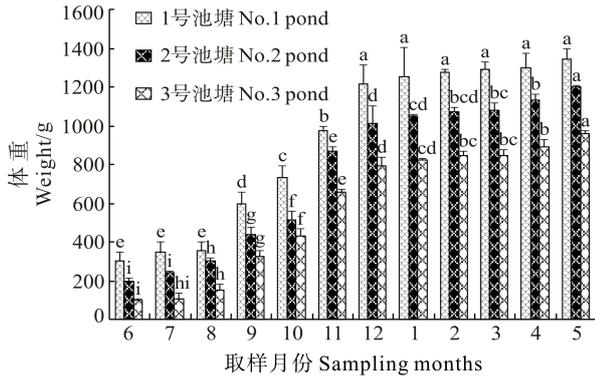


图1 牙鲆体重周年变化

Fig.1 The weight growth curve of Japanese flounder within a year

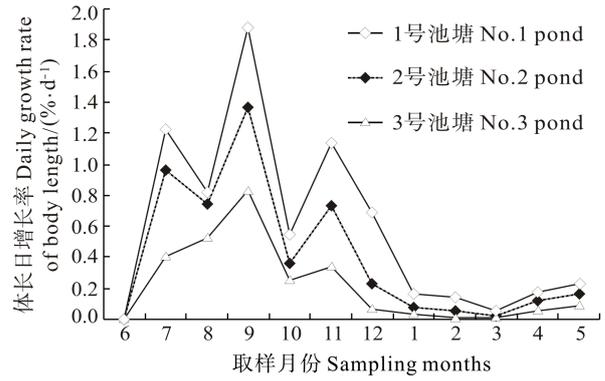


图4 牙鲆体长日增长率周年变化

Fig.4 The body length growth rate of Japanese flounder within a year

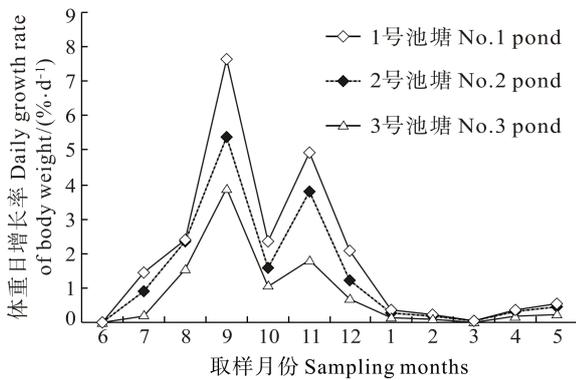


图2 牙鲆体重日增重率周年变化

Fig.2 The body weight growth rate of Japanese flounder within a year

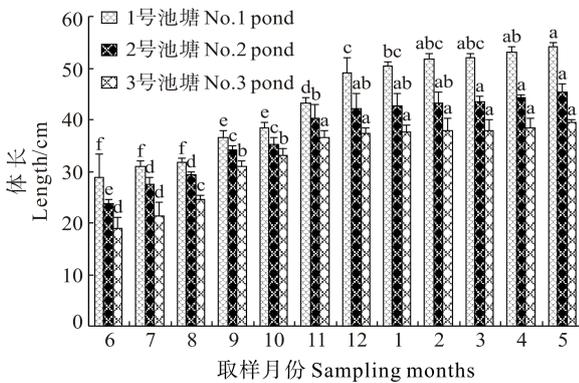


图3 牙鲆体长周年变化

Fig.3 The body length of Japanese flounder within a year

2.2 血清中激素含量随水温的周年变化

2.2.1 血清四碘甲状腺素和三碘甲状腺原氨酸水平随水温的周年变化 牙鲆血清中 T4、T3 水平随着水温变化具有明显的周年变化规律。3 个池塘牙鲆血清中 T4 含量整体变化趋势一致，在温度较高(18–28℃)的 8–11 月血清中，T4 含量呈现较高值，12 月温度骤降，血清中 T4 水平随之下降，之后的 1 月–翌年的 5

月温度较低(8–15℃)，血清中 T4 水平随之呈现较低值。同时，血清中 T4 水平最高值出现在温度最高的 8 月(图 5)。3 个池塘牙鲆血清中 T3 水平整体变化趋势一致：在温度较高(18–28℃)的 8–11 月份血清中 T3 含量也呈现较高值，12 月温度骤降血清中 T3 水平也随之下降，到翌年 3 月温度回升，血清中 T3 水平呈现较高值，但到 4、5 月则又呈现较低值。血清中 T3 水平最高值出现在 7 月。在整个养殖期间，牙鲆血清 T3 较高值与 T4 较高值交替出现(图 6)。牙鲆血清 T4/T3 比率随水温变化也呈明显的周年变化规律，3 个池塘牙鲆血清 T4/T3 整体趋势一致，分别在 6、8、11 和翌年 5 月达到较高值，整体趋势同血清中 T4 水平变化一致(图 7)。

2.2.2 血清生长激素和类胰岛素生长因子-I 水平随水温的周年变化 牙鲆血清中 GH、IGF-I 水平随着水温变化具有明显的周年变化规律。3 个池塘牙鲆血清中 GH 水平整体变化趋势一致，在温度较高(18–28℃)的 8–11 月血清中 GH 含量也呈现较高值，12 月温度骤降血清中 GH 水平也随之下降，到翌年 3 月温度回升，血清中 GH 水平上升，但到 4、5 月则

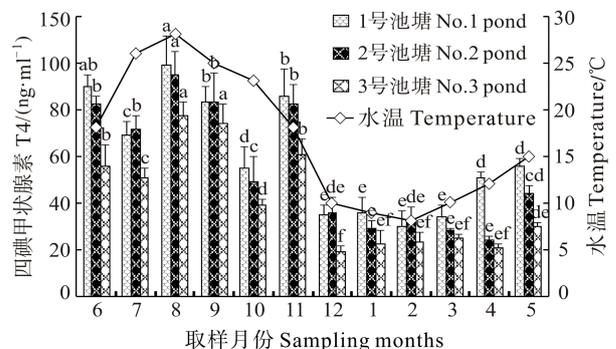


图5 牙鲆血清四碘甲状腺素水平周年变化

Fig.5 The serum L-thyroxine(T4) level of Japanese flounder within a year

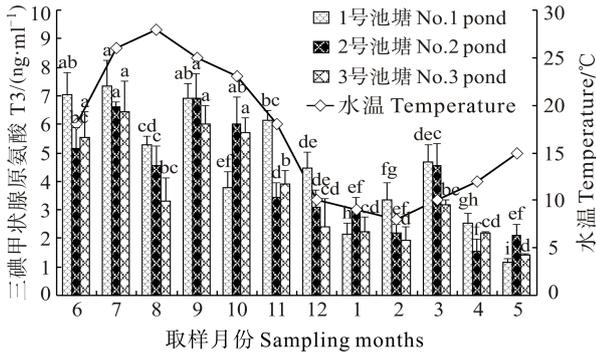


图 6 牙鲆血清三碘甲状腺原氨酸水平周年变化

Fig.6 The serum 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine(T3) levels of Japanese flounder within a year

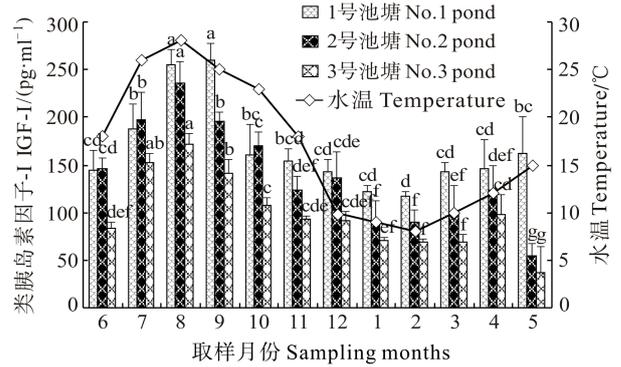


图 9 牙鲆血清类胰岛素生长因子-I 水平周年变化

Fig.9 The serum insulin-like growth factor-I levels of Japanese flounder within a year

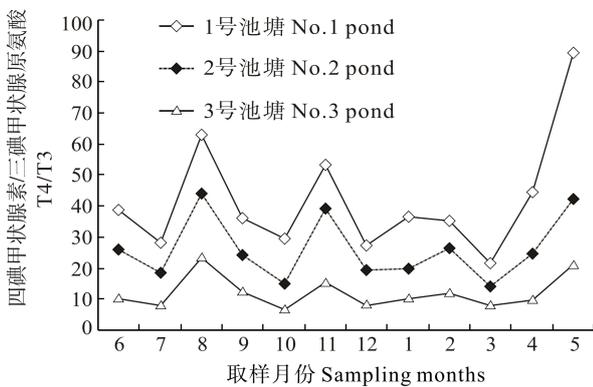


图 7 牙鲆血清 T4/T3 周年变化

Fig.7 The serum T4/T3 ratio of Japanese flounder within a year

GH 水平又下降(图 8)。3 个池塘牙鲆血清中 IGF-I 水平整体变化趋势也一致: 在温度较高(18–28℃)的 8–10 月血清中 IGF-I 含量呈现较高值, 11 月温度下降血清中 IGF-I 水平随之下降, 之后的 12 月–翌年的 2 月温度较低(8–10℃), 血清中 IGF-I 水平随之呈现较低值。到翌年 3 月份温度回升, 血清中 IGF-I 水平随之上升, 但 5 月 2、3 号池塘则又呈现较低值(图 9)。

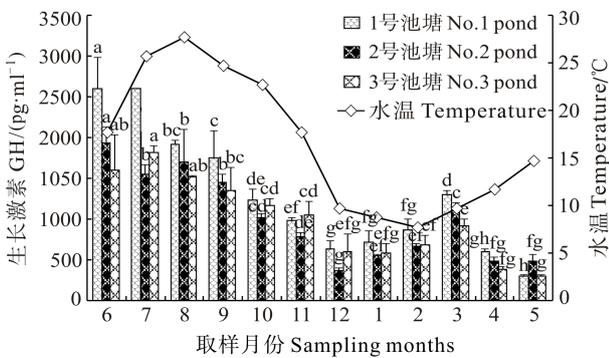


图 8 牙鲆血清生长激素水平周年变化

Fig.8 The serum growth hormone levels of Japanese flounder

3 讨论

研究表明, 在池塘养殖条件下, 牙鲆体内 T3、T4、T4/T3 水平存在明显的周年变化规律。牙鲆血清中 T4 浓度在夏季的 6、8 月出现较高值, T3 浓度的较高值出现在 7、9 月, 这反映血清中甲状腺激素浓度的变化是 T4 在先, T3 随后。有研究表明, 鱼类具有 5'-单脱碘酶, 而且鱼体血液循环中的大部分 T3 都是非甲状腺组织(肝、肾和鳃)通过 5'-单脱碘酶的作用由 T4 转化而来(Ayson *et al*, 1993)。本研究中出现血清 T3 较高值比 T4 高峰晚 30 d 的现象, 也进一步说明, 血清 T3 大部分由 T4 脱碘转化而来。6 月血清 T4、T4/T3 水平较高, 此阶段鱼苗刚放入池塘, T4 水平较高可能因为适应环境产生了应激反应, 甲状腺激素作为内分泌系统的一个重要激素, 不仅在维持机体稳态和生长发育中起了重要的作用, 而且也参与机体的应激反应(李舍予等, 2007)。牙鲆血清 T4、T4/T3 水平及池塘水温在夏季的 8 月处于最高值, 此阶段鱼已经适应环境变化, 从应激反应进入正常生长, 对生长进行调节, 进入快速生长阶段, 相应地牙鲆体长、体重的生长速率也达到最高值, 揭示了水温、体长生长率、体重生长率的快速提高和血清中 T4、T3 水平及 T4/T3 间的密切关系; 秋末 11 月水温下降, 但 T4、T4/T3 呈现较高水平, 此结果可能是适应低温环境的应激反应造成的, T4、T4/T3 较高的同时, 对应的体长、体重生长速率也较高, 此阶段可能是为适应剧烈的环境变化, T4 转化为 T3 的速率也相应的提高, 同时带动了鱼体的生长。翌年的冬季 1、2 月温度较低, 相应的血清中 T3, T4 水平和体重、体长增长率也呈现较低值, 春季 5 月温度回升, 血清 T4、T4/T3、体重、体长增长率水平相应升高, 呈现明显的周年变化规律。进一步揭示体长、体重生长率的快速提高与血清 T4、T3、T4/T3 水平密切相关。

牙鲈体内 GH 和 IGF-I 水平也存在明显的周年变化。3 个池塘牙鲈血清中 GH 水平在夏季 6–8 月及秋初的 9 月呈现较高值, IGF-I 水平在夏季 7、8 月及秋初 9 月出现较高值, 整体水平较高值都呈现在夏季和秋初两个季节, 相应的体重、体长生长速率也较高, 揭示了 GH、IGF-I 和生长存在着密切的关系。但体重、体长生长速率最高值出现的时间比 GH 高水平出现的时间稍晚, 和 IGF-I 水平及水温最高值出现的时间一致。牙鲈血清 IGF-I 水平最高值滞后于 GH 水平, 可能是牙鲈血清中 IGF-I 水平的提高对 GH 起到负反馈的作用, 进而二者协调促进牙鲈的生长。Pérez-Sánchez 等(1994)在另一种海水经济鱼类金头鲷(*Sparus aurata*)研究发现, 其血清中 GH 在 5 月达到最高值, 但是在夏季该鱼生长率最高。本研究结果与金头鲷 GH 研究结果相似。IGF-I 和水温最高值都出现在高温季节(8–9 月), 揭示了牙鲈血清 IGF-I 水平与水温存在着密切关系。研究发现, 金头鲷血清中 IGF-I 水平, 随水温升高而升高(Mingarro *et al*, 2002); 在鲑科鱼类, 也发现水温升高刺激鱼类 IGF-I 水平提高(Beckman *et al*, 1998; Pierce *et al*, 2001)。本研究进一步证实了它们的密切关系。

综上所述, 在池塘养殖条件下, 牙鲈血清中 T3、T4、GH、IGF-I 4 种激素水平存在着明显的周年变化规律。4 种激素都对牙鲈的生长起到相应的调节作用。水温的周年变化对牙鲈甲状腺轴和生长轴激素分泌影响较大, 但是具体影响机制需要进一步研究。本研究进行了 365 d 的养殖实验, 获得自然光照条件下牙鲈在池塘生长相关激素的季节变化数据, 对养殖生产实践具有较强的指导性。

参 考 文 献

- 陈松林, 陈细华, 牟松, 等. 草鱼的生长及其血清生长激素水平的季节和日变化规律的研究. 水产学报, 1998, 22(4): 23–27
- 李舍予, 李佳, 岳利民. 应激对血浆甲状腺激素水平的影响. 四川生理科学杂志, 2007, 29(4): 176–178
- Ayson FD, Lam TJ. Thyroxine injection of female rabbitfish (*Siganus guttatus*) broodstock: changes in thyroid hormone levels in plasma, eggs, and yolk-sac larvae, and its effect on larval growth and survival. *Aquaculture*, 1993, 109(1): 83–93
- Beckman BR, Larsen DA, Moriyama S. Insulin-like growth factor-I and environmental modulation of growth during smoltification of spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen Comp Endocrinol*, 1998, 109(3): 325–335
- Beckman BR. Perspectives on concordant and discordant relations between insulin-like growth factor I (IGF-I) and growth in fishes. *Gen Comp Endocrinol*, 2011, 170(2): 233–252
- Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol*, 2008, 29(2): 211–218
- Hadley ME. *Endocrinology*. London: Prentice-Hall International, 1992
- Ingbar SH. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: Saunders Company, 1985, 682–815
- Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, *et al*. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor I in mouse postnatal growth. *Dev Biol*, 2001, 229(1): 141–162
- Mingarro M, Vega-Rubín de Celis S, Astola A, *et al*. Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): The growth hormone and somatolactin paradigm. *Gen Comp Endocrinol*, 2002, 128(2): 102–112
- Pérez-Sánchez J, Marti-Palanca H, Le Bail PY. Seasonal changes in circulating growth hormone(GH), hepatic GH-binding and plasma insulin-like growth factor-I immunoreactivity in a marine fish, gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Fish Physiol Biochem*, 1994, 13(3): 199–208
- Pierce AL, Beckman BR, Shearer KD, *et al*. Effects of ration on somatotrophic hormones and growth in coho salmon. *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol*, 2001, 128(2): 255–264
- Power DM, Elias NP, Richardson ST, *et al*. Evolution of the thyroid hormone binding protein, transthyretin. *Gen Comp Endocrinol*, 2000, 199(3): 241–255
- Silverstein JT, Shearer KD, Dickhoff W, *et al*. Effects of growth and fatness on sexual development of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Parr Can J Fish Aquat Sci*, 1998, 55: 2376–2382
- Tannenbaum GS. Genesis of episodic growth hormone secretion. *J Pediatr Endocrinol*, 1993, 6(3–4): 273–282
- Yamano K. The role of thyroid hormone in fish development with reference to aquaculture. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 2005, 39(3): 161–168

(编辑 陈严)

The Key Hormone Change Pattern of Thyroid Hormone Axis and Growth Axis of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in the Ponds

LI Xiaoni^{1,2}, SHI Bao², LIU Xuezhou^{1,2}^①, XU Yongjiang², CHANG Yaqing¹,
CHEN Shengyi², ZANG Kun²

(1. Dalian Ocean University, Dalian 110623; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Enzyme-linked immuno sorbent assay was used to measure the serum L-thyroxine (T4), 3,5,3'-triiodo-L-thyronine(T3), growth hormone (GH), and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) of three ponds. The seasonal variations of body weight and body length were found in present study. Body weight and body length increased constantly as time grows, which were higher in late summer and early autumn compared with other seasons. The average weight of three aquaculture ponds were 1341.77 g, 1198.20 g and 958.93 g and the average length were 54.22 cm, 45.33 cm and 39.40 cm after cultivation for 12 months. The seasonal variations of serum T4, T3, GH and IGF-I were observed. The highest level of the serum T4 was in late summer and the peak of the serum T3 level appeared in early autumn. The highest GH level existed in early summer. The peak level of IGF-I appeared in early autumn. These results revealed the close relationship among the water temperature, body length and body weight growth rate and the serum level of T4 and T3 and T4/T3 increased rapidly, however the potential mechanism need further study.

Key words Pond; Growth; L-thyroxine(T4); 3,5,3'-triiodo-L-thyronine(T3); Growth hormone; Insulin-like growth factor-I

① Corresponding author: LIU Xuezhou, E-mail: liuxz@ysfri.ac.cn