

doi: 10.7541/2013.40

饲料蛋白水平对低温应激下吉富罗非鱼血清生化指标 和 *HSP70* mRNA 表达的影响

强 俊^{1,2} 杨 弘^{1,2} 王 辉³ 徐 跑^{1,2} 何 杰¹

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 无锡 214081;

2. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214081; 3. 广东海洋大学水产学院, 湛江 524025)

摘要: 在水温 27℃ 条件下, 分别对吉富罗非鱼(27.64±2.79) g 投喂 3 组不同蛋白水平的饲料, 养殖周期 56d。饲养结束后, 进行 14℃ 低温应激实验, 研究低温应激后 0—24h 内, 鱼体血清生化指标与肝脏 *HSP70* mRNA 表达量的变化。结果表明, 短期投喂 50%蛋白水平的饲料可以提高罗非鱼血清中葡萄糖、总蛋白、甘油三酯与胆固醇水平以及血清谷丙转氨酶与谷草转氨酶活力。在低温应激后, 50%蛋白组血清葡萄糖、总蛋白、甘油三酯与胆固醇水平呈下降趋势, 而血清皮质醇水平与谷草转氨酶活力表现为先上升后下降变化。25%和 38%蛋白组血清葡萄糖水平与谷丙转氨酶活力在应激期间呈上升趋势, 而谷草转氨酶与碱性磷酸酶活力和总蛋白与胆固醇水平呈先上升后下降变化。各实验组溶菌酶活力与肝脏 *HSP70* mRNA 的表达量呈先上升后下降的变化。由此可知, 短期投喂高蛋白饲料可以提高罗非鱼血液中蛋白、血糖与脂肪含量, 增强鱼体抗应激能力, 同时, 高蛋白水平的饲料也会引起肝脏产生分解压力以及增加饲料成本。在生产中, 需要根据实际需要合理确定饲料的蛋白含量。

关键词: 吉富罗非鱼; 饲料蛋白; 低温应激; 血清; *HSP70*

中图分类号: S962.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)03-0434-10

在集约化养殖中, 鱼类经常会应对各种胁迫。胁迫可引发鱼体在短期内机体平衡调节^[1], 从而导致生理上的变化。这些生理响应可以通过肾上腺素调节机制达到增加能量利用、释放儿茶酚胺以及提高促肾上腺皮质激素和血浆皮质醇水平^[2]。应激时间延长可能导致急性应激转为慢性胁迫, 使机体的不平衡增多^[3]。

在应激期内, 鱼类具有较差的抗逆性, 对病原体的易感性较高。如在低温环境下, 屈挠细菌可引发鱼类皮肤损害综合征^[4]; 而车轮虫病与淋巴囊炎病毒可能在低温下引发鱼类的白点病^[5]。2010 年全球罗非鱼产量达到 300 万吨, 中国罗非鱼产量占全球产量的一半。罗非鱼已成为中国南方地区主要养

殖的淡水品种之一。然而, 随着全球气候日益恶化与反常, 夏天温度过高以及冬天温度过低等, 这对罗非鱼的可持续发展产生了严重影响。低温应激可引发罗非鱼肝脏损伤^[6]、机体免疫功能下降, 同时, 增加海豚链球菌的致病性^[3]。

鱼类的最优生长状态依赖于饲料的营养状况, 以及鱼类的生理状态、年龄、繁殖性能以及一些环境因子(如: 温度、盐度等)^[7]。鱼类在应激时的生理变化往往与营养状况紧密相关。Atwood, *et al.*^[8]研究发现, 在饲料中添加椰油后, 尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的低温应激能力明显高于添加鲱鱼油的实验组。Abdel-Tawwab & Mousa^[9]研究发现, 饲料中较高的蛋白水平可明显提高尼罗罗非鱼在拥

收稿日期: 2012-03-15; 修订日期: 2012-12-16

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAD26B00); 现代农业产业技术体系建设专项资金“罗非鱼产业技术体系”(CARS-49); 江苏省普通高校研究生科研创新计划(CXLX11-0708); 中央公益性科研业务费专项资金(2011jbf09); 广东省海洋渔业科技推广专项(A201009C02、A2010002-010(b)); 广东省科技计划项目(2010B090500032)资助

作者简介: 强俊(1984—), 男, 安徽合肥人; 博士研究生; 研究方向鱼类遗传繁殖和健康养殖。E-mail: qiangjun@163.com

通信作者: 徐跑, 研究员, 博士生导师; E-mail: xup@ffrc.cn

挤胁迫下的应激能力。Kiron, *et al.* [10] 研究发现, 最优蛋白水平下虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 抗病毒感染能力明显高于低蛋白或高蛋白时的。罗非鱼属亚热带鱼类, 能够在 6—10℃ 的低温水环境下短时间存活, 低温耐受性较差 [11]。因而, 研究饲料蛋白水平与低温胁迫的关系具有重要意义, 有助于预测鱼类生理需求方面可能的变化, 以及饲料蛋白水平是否可以改变鱼体的抗应激能力, 降低胁迫对鱼体的影响。本研究选取在 3 种蛋白水平下 (25%、38% 和 50%) 饲养的罗非鱼, 采用急性低温应激, 分析应激后罗非鱼的生理生化响应, 旨在为吉富罗非鱼的高效健康养殖提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

尼罗罗非鱼幼鱼来自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴基地自繁的第 16 代“吉富”品系, 选择无病无伤, 活力强的个体作为实验用鱼。实验前在室内水泥池 (水温 27℃±0.3℃, pH 7.4±0.2) 中暂养 10d, 水体循环使用, 连续充气, 自然光周期。每天 7:00、11:00 和 16:00 各投喂沉水性饲料 1 次 (粗蛋白质为 38.0%、脂肪 8.0%), 投喂量为体重的 10%—12%。

1.2 实验方法

设置 3 组不同饲料蛋白水平, 分别为 25%、38% 和 50%, 每组设 3 个平行, 饲料成分 (表 1)。实验在封闭式水循环养殖系统中进行, 实验用鱼平均体重为 27.64 (±2.79) g, 体长为 9.43 (±0.46) cm, 每个养殖桶放置 30 尾鱼。实验共使用 9 个 450 L 的养殖桶, 每个蛋白水平设置 3 组平行。每日投喂 3 次 (7:00、12:00 和 17:00), 日投喂量为鱼体总重量的 5%—10%。每隔 10 天测定鱼的生长情况, 调节投喂量, 养殖周期为 8 周, 养殖条件: 水温 27 (±0.3)℃, pH 7.5±0.2, 溶氧在 5.0 mg/L 以上, 氨氮和亚硝酸盐分别不高于 0.01 mg/L, 自然光周期, 每天换水 1/3。

饲养结束后, 禁食 24h, 选择规格基本一致的鱼进行低温应激实验。从水温为 27℃ 的桶中选取 20 尾转入水温为 14℃ (水温低于 14℃ 时, 吉富罗非鱼停止摄食并开始出现死亡现象) 的相应 9 个 450 L 养殖桶中, 进行 24h 急性低温应激, 用自动控温系统控温于 14℃, 保证溶氧充足, 实验期间不投饵, 尽量减少人为干扰。

表 1 饲料组分与组成
Tab. 1 Ingredients and composition of experimental diets

原料 Ingredient	蛋白水平 Dietary protein level (%)		
	25.0	38.0	50.0
鱼粉 Fish meal	5.00	5.00	5.00
酪蛋白 Casein	4.00	16.20	27.50
明胶 Gelatin	1.00	4.05	6.88
玉米淀粉 Corn starch	36.80	21.55	7.42
鱼油+豆油 (1:1) Fish oil + soybean oil	7.00	7.00	7.00
豆粕 Soybean meal	12.00	12.00	12.00
棉粕 cottonseed meal	15.00	15.00	15.00
菜粕 Rapeseed meal	15.00	15.00	15.00
复合维生素 Vitamin premix	1.00	1.00	1.00
复合矿物盐 Mineral premix	1.00	1.00	1.00
氯化胆碱 Choline chloride	0.50	0.50	0.50
维 C 磷酸酯钠 (95%) Vitamin C phosphate ester	0.20	0.20	0.20
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1.50	1.50	1.50
组成成分			
Proximate composition (%)			
干物质 Dry matter	91.57	91.74	92.05
蛋白 Crude protein	25.16	38.04	49.92
脂肪 Crude lipid	7.87	7.93	7.99
灰分 Ash	6.23	6.64	6.92
总能量 Gross energy	12.90	13.12	13.31

注: 复合维生素与复合矿物盐由广州市诚一水产科技有限公司提供

Note: Vitamin premix and mineral premix were provided by Guangzhou Chengyi Aquatic Science & Technology Co., Ltd.

1.3 采样与制备

分别于 0、6、12 和 24h 进行采样。每个养殖桶随机选取 3 尾鱼, 用 200 mg/L 的 MS-222 作快速深度麻醉, 尾静脉采血, 血样于 4℃ 冰箱中静置 2h, 在 4℃, 3500 r/min 离心 10min 制备血清, 上清液移置 -80℃ 冰箱中保存备用, 并取约 0.1 g 的肝脏组织用液氮速冻后, 于 -80℃ 保存备用。

1.4 测定指标与方法

血清生化指标的测定 皮质醇采用罗氏电化学发光免疫分析仪 E170 测定, 试剂盒购自北京北方生物技术研究所; 总蛋白、白蛋白、球蛋白、葡萄糖、甘油三脂、胆固醇、谷丙转氨酶、谷草转氨酶和碱性磷酸酶用罗氏全自动生化分析仪测定, 试剂盒均购自上海骏实生物科技有限公司; 溶菌酶活力的测定采用南京建成生物科技有限公司的试剂盒。

肝脏 *HSP70* mRNA 表达的测定 根据

Genbank 中罗非鱼 HSP70 序列(FJ207463.1), 设计 HSP70 引物, F1: CATCGCCTACGGTCTGGACAA, R1: TGCCGTCTTCAATGGTCAGGAT。用罗非鱼的管家基因 β -actin (EU887951.1)作为内参, 设计 β -actin 引物, F1: CCACACAGTGCCCATCTACGA, R1: CCACGCTCTGTCAGGATCTTCA。所有引物由上海基康生物技术有限公司合成, 扩增的片段为 100—110 bp, 取罗非鱼肝脏 20 mg 左右, 参照 RNeasy Mini Handbook (QIAGEN 公司)说明书用试剂盒提取总 RNA, A_{260}/A_{280} 为 1.90 左右。

根据 PrimeScript RT reagent Kit Perfect Real Time(大连 TaKaRa 公司)进行 RT 反应, 然后采用 ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System 的 SYBR Green 渗入法进行实时定量 PCR 扩增反应, 以 β -actin 为内参。PCR 反应体系(50 μ L)包括: 高压灭菌去离子水 19 μ L、SYBR Green PCR Master Mix(2 $\times$)25 μ L、正向及反向引物(10 μ mol/L)各 2 μ L、cDNA 工作液 4 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5min, 然后 40 个循环(95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 60s, 读板记录荧光量), 反应结束后制备溶解曲线, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 15s, 95 $^{\circ}$ C 15s。每个反应设 3 复孔。所有检测样品均包含 1 个无模板的阴性对照以排除假阳性结果。

1.5 数据处理

在 HSP70 与 β -actin 的定量 PCR 扩增效率基本一致的前提下, 计算 HSP70 mRNA 表达量。以罗非鱼 β -actin 为内参, 对得到的各样品 C_t 值进行均一化处理, 以 25%蛋白水平组 0h 时的 HSP70 mRNA 表达量为基准, 应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[12]确定不同时间点各处

理组 mRNA 的相对表达量。数据结果用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示, 实验数据用 SPSS15.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 低温应激对饲喂不同蛋白水平的吉富罗非鱼血清皮质醇和葡萄糖水平的影响

饲喂不同蛋白水平的吉富罗非鱼在低温应激试验期间, 未发现死鱼。由图 1A 可以发现, 低温应激对罗非鱼血清皮质醇水平有明显影响。应激 6h 时, 各蛋白水平组呈上升趋势。应激 24h 时, 各实验组血清皮质醇水平分别为 557.4、709.5 和 453.7 ng/mL, 均显著低于应激 6h 的水平, 但仍显著高于应激前的水平($P<0.05$)。38%蛋白组的皮质醇水平在应激 24h 后高于其他实验组($P<0.05$)。

低温应激对罗非鱼的血清葡萄糖水平产生了一定的影响(图 1B)。当温度从 27 $^{\circ}$ C 突降到 14 $^{\circ}$ C 时, 25%和 38%蛋白组的葡萄糖水平在应激 6h 时表现出上升趋势, 开始较为缓慢, 24h 时急剧上升, 分别达到 6.05 和 4.99 mmol/L($P<0.05$); 50%蛋白组的葡萄糖水平呈先下降后上升的变化趋势, 应激 24h 时, 葡萄糖水平与应激前相比无显著差异($P>0.05$)。

2.2 低温应激对饲喂不同蛋白水平的吉富罗非鱼血清总蛋白、白蛋白和球蛋白水平的影响

在低温应激下, 25%蛋白组的血清总蛋白水平在应激 24h 内呈上升趋势; 38%和 50%蛋白组的总蛋白水平呈先上升后下降的变化趋势(图 2A)。24h 时, 各实验组的血清总蛋白水平与应激前相比无显著差

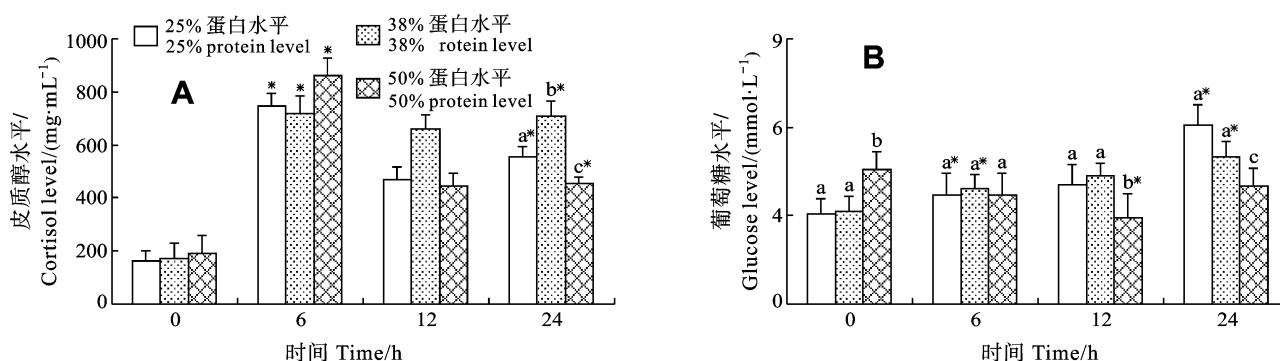


图 1 不同蛋白水平对吉富罗非鱼幼鱼在低温应激下血清皮质醇(A)和葡萄糖(B)水平的影响

Fig. 1 Effects of different dietary protein levels on serum cortisol (A) and glucose (B) levels of GIFT tilapia under low temperature stress. 实验数据为 9 尾鱼的平均值, 用平均值 $\pm$ 标准差表示; 用“*”表示应激前后各组数值之间的显著性差异($P<0.05$), 方差分析采用配对样本 t 检验; 同一时间点不同蛋白水平间的显著性差异($P<0.05$)用小写字母表示, 采用 Duncan 多重比较进行分析, 下同

Data are expressed as the mean of nine fish $\pm$ SD. Significant differences ($P<0.05$) between values obtained before and after stress are marked by asterisks in paired-samples t -tests. Diverse little letters show significant differences ($P<0.05$) in different protein groups of each sampling point in Duncan's multiple range test. The same as below

异($P>0.05$)。

血清白蛋白的变化趋势与总蛋白相似(图 2B)。38%和 50%蛋白组的血清白蛋白水平在应激 6h 时达到峰值, 随后呈逐渐下降趋势。24h 时, 各实验组的血清白蛋白水平与应激前相比无显著差异($P>0.05$)。

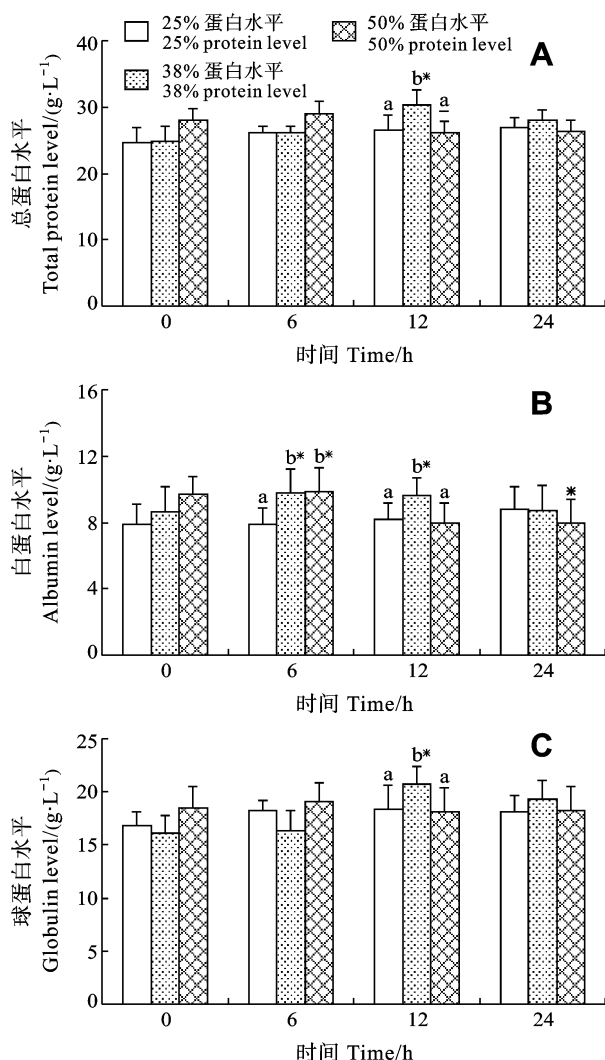


图 2 不同蛋白水平对吉富罗非鱼幼鱼在低温应激下血清总蛋白(A)、白蛋白(B)和球蛋白(C)水平的影响

Fig. 2 Effects of different dietary protein levels on serum total protein (A), albumin(B) and globulin(C) levels of GIFT tilapia under low temperature stress

随着应激时间的延长, 各实验组球蛋白水平均呈先上升后下降的变化趋势(图 2C)。应激 24h 时, 除 38%蛋白组的血清球蛋白水平显著高于应激前外($P<0.05$), 其他各实验组与应激前相比无显著差异($P>0.05$)。

38%和 50%蛋白组的血清白蛋白/球蛋白比值随着应激时间的延长呈下降趋势(表 2), 应激 24h 时,

显著低于应激前的水平($P<0.05$); 25%蛋白组的比值与应激前相比无显著差异($P>0.05$)。

表 2 不同蛋白水平对吉富罗非鱼幼鱼在低温应激下血清白蛋白/球蛋白比值的影响

Tab. 2 The variation of albumin/globulin ratio of GIFT tilapia under low temperature stress during 24h

应激时间 Stress time (h)	不同蛋白水平 Dietary protein level (%)		
	25	38	50
0	0.47 ^a ±0.03	0.54 ^b ±0.02	0.53 ^b ±0.06
6	0.43 ^a ±0.03	0.48 ^b ±0.02	0.52 ^c ±0.02
12	0.45±0.02	0.46 [*] ±0.04	0.44 [*] ±0.02
24	0.49 ^a ±0.03	0.45 ^b ±0.03	0.45 ^b ±0.03

2.3 低温应激对饲喂不同蛋白水平的吉富罗非鱼血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶和碱性磷酸酶活力的影响

应激前, 不同蛋白水平下各实验组血清谷丙转氨酶活力有显著差异(图 3A), 50%蛋白组血清谷丙转氨酶活力为 8.0 U/L 显著高于 25%蛋白组的 4.67 U/L。各实验组血清谷丙转氨酶活力在应激 24h 内呈逐渐上升趋势, 25%蛋白组血清谷丙转氨酶活力在应激 24h 时显著高于 38%和 50%蛋白组($P<0.05$)。

应激前, 50%蛋白组的血清谷草转氨酶活力显著高于 25%和 38%蛋白组(图 3B)。低温应激后, 各实验组的谷草转氨酶活力开始显著上升。24h 时, 25%和 50%蛋白组血清谷草转氨酶活力低于 12h 时的活力, 而 38%蛋白组的谷草转氨酶活力与 12h 时相比无显著差异($P>0.05$)。

各实验组碱性磷酸酶活力的变化趋势与谷草转氨酶活力的基本相同(图 3C)。应激 24h 时, 38%蛋白组血清碱性磷酸酶活力显著高于应激前的水平($P<0.05$), 而 25%和 50%蛋白组碱性磷酸酶活力与应激前相比无显著差异($P>0.05$)。

2.4 低温应激对饲喂不同蛋白水平的吉富罗非鱼血清甘油三酯和胆固醇水平的影响

在应激前, 随着饲料蛋白水平上升, 血清甘油三酯水平显著提高($P<0.05$)(图 4A)。在低温应激后, 各实验组基本呈先下降会上升的变化趋势。应激 6h 时, 各实验组血清甘油三酯水平显著下降($P<0.05$); 应激 24h 时, 50%蛋白组血清甘油三酯水平与应激前相比无显著差异($P>0.05$)。

在应激前, 50%蛋白组的血清胆固醇水平显著高于 25%和 38%蛋白组(图 4B)。在应激后, 25%和 38%蛋白组血清胆固醇水平呈先上升后下降的变化

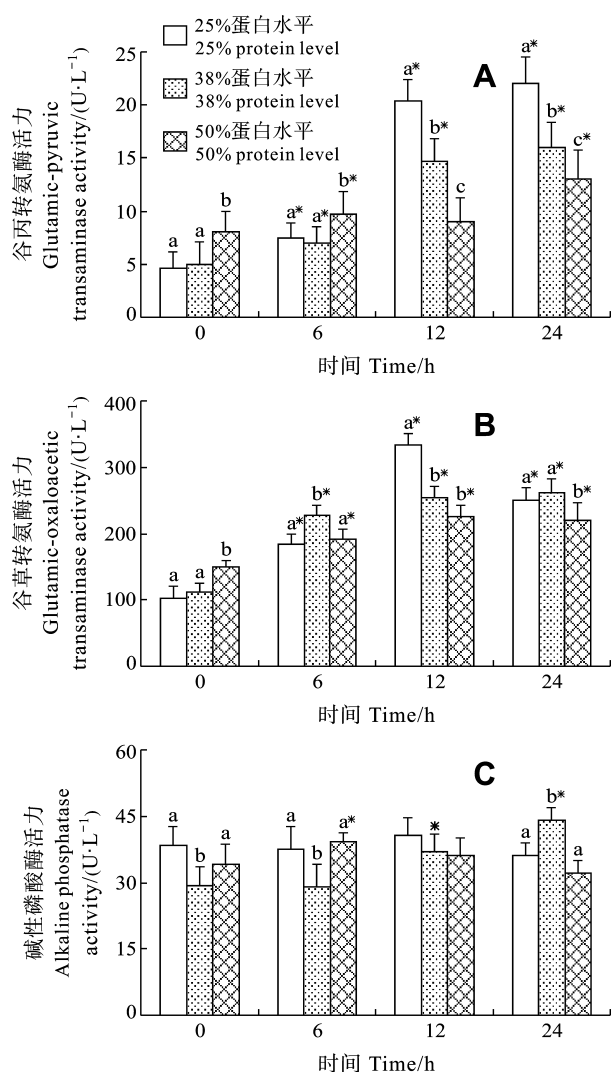


图 3 不同蛋白水平对吉富罗非鱼幼鱼在低温应激下血清谷丙转氨酶(A)、谷草转氨酶(B)和碱性磷酸酶(C)活力的影响

Fig. 3 Effects of different dietary protein levels on serum glutamic-pyruvic transaminase (A), glutamic-oxaloacetic transaminase (B) and Alkaline phosphatase (C) activities and of GIFT tilapia under low temperature stress

趋势, 24h 时, 两实验组与应激前相比无显著差异 ($P>0.05$); 50%蛋白组血清胆固醇水平随应激时间的延长呈下降趋势。

2.5 低温应激对饲喂不同蛋白水平的吉富罗非鱼血清溶菌酶活力的影响

低温应激对于血清溶菌酶活力有显著影响(图 5A)。各实验组血清溶菌酶活力在应激前无显著差异 ($P>0.05$)。低温应激后, 溶菌酶活力显著升高; 12h 和 24h 时, 各实验组溶菌酶活力低于 6h 时的, 但均显著高于应激前水平 ($P<0.05$)。

2.6 低温应激对饲喂不同蛋白水平的吉富罗非鱼肝脏 HSP70 mRNA 表达的影响

低温应激对罗非鱼肝脏 HSP70 mRNA 的表达

水平有显著影响 ($P<0.05$)。随着应激时间的延长, 各实验组呈先上升后下降的变化趋势(图 5B)。应激 12h 时, 38%和 50%蛋白组肝脏 HSP70 mRNA 的相对表达量显著高于 25%蛋白组 ($P<0.05$); 24h 时, 各蛋白组均呈下降趋势。

3 讨论

水温是鱼类工厂化养殖中的重要影响因素之一。在实际生产中, 可能因为季节的变化或其他人为因素的影响, 鱼类经常会面对低温所产生的胁迫。低温环境会降低鱼类的摄食率, 导致鱼体生长速度下降, 同时也会诱使鱼类产生生理生化上的改变, 增加病害发生的几率^[3, 13]。应激反应是机体对外界刺激的一种非特异性防御反应, 主要是交感神经兴奋和垂体-肾上腺皮质分泌增多引起的一系列神经内分泌反应^[1]。

3.1 低温应激对饲喂不同蛋白水平的吉富罗非鱼血清皮质醇和葡萄糖水平的影响

急性或慢性应激可以显著影响鱼类的血清生化参数。皮质醇是一种与许多生物活性相关联的类固醇激素。通常, 在低温应激下鱼类血清皮质醇水平开始呈上升趋势, 随着时间的延长而逐渐下降, 显示了鱼体对新环境的适应^[14]。血清皮质醇水平被广泛用作应激状况下的观察指标^[15]。在本实验中, 低温应激 6h 后, 各应激组血清皮质醇水平显著升高, 这与 Sun, et al.^[16]和刘波等^[6]的研究结果相似。Su, et al.^[16]研究发现, 在 14℃低温应激下, 尼罗罗非鱼血清皮质醇水平显著升高; 刘波等^[6]也研究发现, 将正常饲养条件下(25℃)的吉富罗非鱼进行冷应激处理(9℃), 血清皮质醇水平显著升高。在其他鱼类, 如大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)^[17]、杂交条纹鲈(*Morone chrysops*×*Morone saxatilis*)^[18]和鲟鱼(*Acipenser medirostris*)^[19]的研究中也得到类似结论。在应激 24h 时, 各实验组血清皮质醇水平呈下降趋势, 但仍显著高于应激前。可能是因为, 在低温应激 24h 后, 吉富罗非鱼的耐受性有所增强, 然而仍未适应环境温度。50%蛋白组血清皮质醇水平在应激 24h 后低于 25%和 38%蛋白组, 短期投喂较高蛋白水平的饲料可能有助于缓解罗非鱼在低温应激下的胁迫响应。

血清葡萄糖主要来自食物中消化吸收后的葡萄糖及肝糖原的分解和异生作用^[20]。在投喂不同蛋白

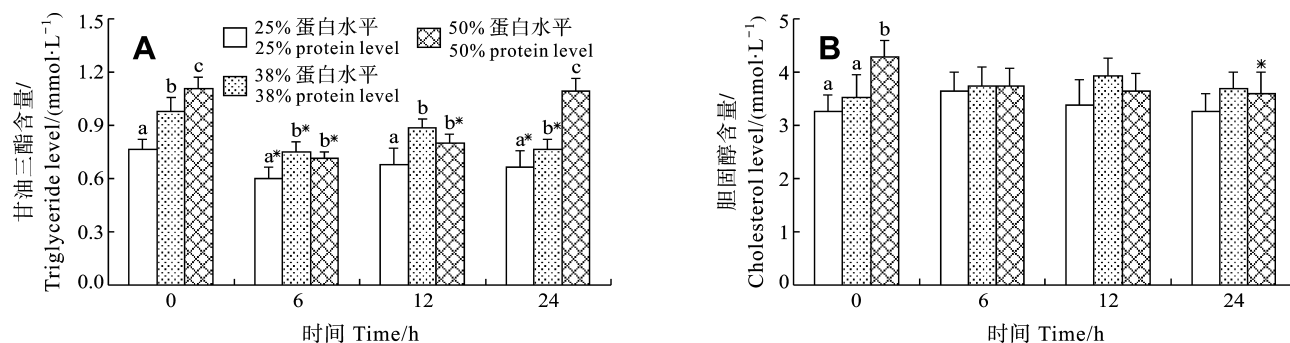
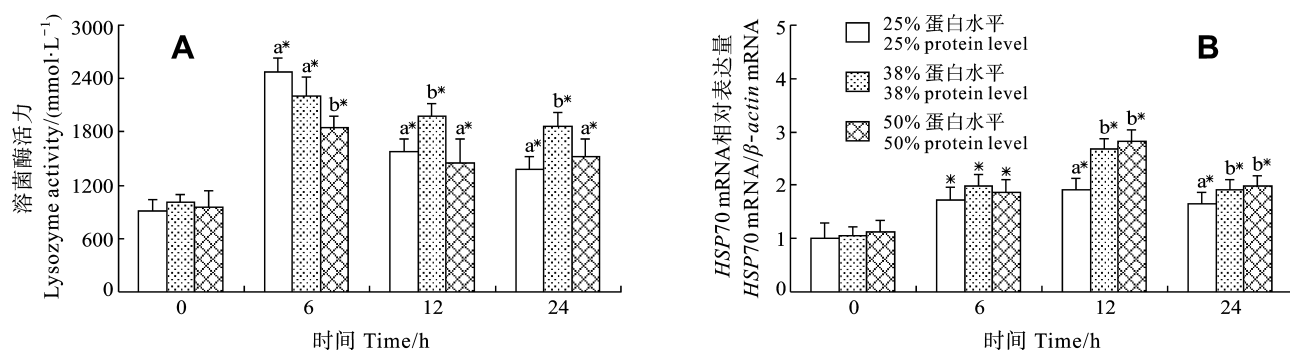


图4 不同蛋白水平对吉富罗非鱼幼鱼在低温应激下血清甘油三酯(A)与胆固醇(B)水平的影响

Fig. 4 Effects of different dietary protein level on serum triglyceride (A) and cholesterol (B) levels of GIFT tilapia under low temperature stress

图5 不同蛋白水平对吉富罗非鱼幼鱼在低温应激下血清溶菌酶活力(A)和肝脏 *HSP70* mRNA (B)表达的影响Fig. 5 Effects of different dietary protein levels on serum lysozyme activity (A) and relative expression of liver *HSP70* mRNA (B) of GIFT tilapia under low temperature stress

的饲料后, 罗非鱼血清葡萄糖水平随饲料蛋白水平的减少而下降, 这与 Abdel-Tawwab, *et al.* [21] 对罗非鱼的研究结果相似。面对应激时, 机体组织利用血糖作为主要能量来源, 肾上腺素的分泌导致血糖增加。在本实验中, 低温应激后, 25%和 38%蛋白组的血清葡萄糖水平显著上升。在应激条件下可以刺激某些葡萄糖转运基因的表达, 增加葡萄糖在细胞间的转运 [22]。同时, 血清中皮质醇水平的变化也能对葡萄糖代谢产生影响。Vijayan & Moon [23] 研究发现, 皮质醇是一种重要的皮质类固醇激素, 皮质类固醇的增加使机体各组织对葡萄糖的利用率降低, 肝脏糖异生作用加强, 结果导致血糖升高, 为机体应对环境提供能量。Sun, *et al.* [16] 也研究发现, 在低温应激下可以显著提高尼罗罗非鱼血清皮质醇与葡萄糖水平。本实验同时发现, 50%蛋白组的血清葡萄糖水平呈先下降后上升的变化趋势。短期投喂高蛋白的饲料会提高罗非鱼血清中葡萄糖的水平。应激前期, 可以利用葡萄糖分解来提供能量, 随着应激时间的延长, 机体通过增加组织中糖原的分解或肝脏中糖原代谢的关键酶葡萄糖激酶活性从而提高血清葡萄糖

糖水平 [24]。

3.2 低温应激对饲喂不同蛋白水平的吉富罗非鱼血清总蛋白、白蛋白和球蛋白水平的影响

血清总蛋白、白蛋白与球蛋白水平的变化可以作为鱼体应对外界应激的重要指标 [25]。血清总蛋白反映鱼体的营养和代谢状况, 白蛋白在鱼体内起到营养细胞和维持血液渗透压的作用, 而球蛋白与机体的免疫功能相关。在本实验中, 50%蛋白组中血清总蛋白水平在应激前高于 25%和 38%蛋白组。饲料中粗蛋白水平的提高, 可以增加消化蛋白的含量或饲料中过量的蛋白被消化道吸收后, 在血液中沉积 [26]。在低温应激后, 38%和 50%蛋白组血清总蛋白水平均呈先上升后下降的变化趋势。可能因为低温应激使罗非鱼肝脏受损, 短期内提高了机体的非特异性免疫水平, 随着应激时间延长, 机体合成的能量更多用于应对环境胁迫, 用于鱼体蛋白质合成则减少, 因而, 引起血清总蛋白水平降低。25%蛋白组血清总蛋白水平在应激后 24h 内始终是上升趋势。投喂低蛋白水平的饲料可能会引起鱼体营养不良, 造成免疫功能下降 [27]。蔡春芳等 [27] 研究发现, 投喂

20%蛋白组的异育银鲫(*Carassius auratus*)其机体免疫力高于 10%蛋白组。因而,在应激时,鱼体需要不断地分解组织中储存的能量来满足生理需要。

血清白蛋白水平和白蛋白/球蛋白比值可以衡量机体正常的蛋白质维持程度^[28]。本实验发现,38%和 50%蛋白组血清白蛋白与球蛋白水平随着应激时间延长呈先上升后下降的变化趋势。这可能与短期应激可以提高罗非鱼的能量代谢与免疫功能有关。25%蛋白组血清白蛋白与球蛋白水平基本处于上升趋势,鱼体可能需要分解更多的能源物质来提供能量。Adham, *et al.*^[28]也认为,血清总蛋白、白蛋白等浓度的变化可作为鱼类环境响应的指标。不同鱼类血清蛋白的变化有较大差异, Collazos, *et al.*^[29]发现丁鲷(*Tincatinca*)血清白蛋白和球蛋白在冬季低温时显著下降; Sala-Rabanal, *et al.*^[27]发现低温应激下可引起海鲤(*Cyprinus qionghaiensis*)白蛋白等血浆蛋白质水平显著下降;冀德伟等^[30]发现在 8.5℃低温下,大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)血清总蛋白随应激时间的增加呈先下降后上升的变化趋势。在本研究中 38%和 50%蛋白组血清白蛋白/球蛋白比值显著低于应激前。这可能与低温应激提高了两实验组血清球蛋白水平有关。

3.3 低温应激对饲喂不同蛋白水平的吉富罗非鱼血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶和碱性磷酸酶活力的影响

血清谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活力可以作为肝脏损伤的指示物。在本实验中,低温应激前,50%蛋白组血清 ALT 和 AST 活力高于 38%和 25%蛋白组,投喂高蛋白可能会增加了肝脏的压力。在低温应激后,各实验组血清 ALT 和 AST 活力基本呈上升趋势,这与刘波等^[6]的研究结果相似。在应激 24h 时,各实验组 ALT 活力显著高于应激前。ALT 作为肝脏中连接糖、脂质和蛋白质代谢的重要酶,应激可能对肝脏组织造成了一定损伤,导致血清 ALT 活力短期内升高^[31]。25%蛋白组血清 ALT 活力显著高于 38%和 50%蛋白组。这可能与短期投喂高蛋白饲料可以提高其免疫功能有关。AST 属于细胞内酶,在正常情况下主要存在于肝细胞的可溶性部分,在血清中水平较低。在应激条件下可以提高肝细胞的产酶活性或增加细胞膜通透性与细胞坏死,AST 大量进入血液,使血清中酶活性提高^[32]。本实验表明,50%蛋白组血清 AST 活力在应激 24h 后显著低

于 38%和 25%蛋白组。短期投喂较高蛋白水平的饲料可能有助于提高鱼体在低温环境下的自我保护能力,降低细胞膜的通透性,阻抑细胞内 ALT 的溢出。

碱性磷酸酶(AKP)属于代谢调控酶,与磷酸基团转移和钙磷代谢有关^[33]。在本实验中,在应激 24h 内,25%和 50%蛋白组血清 AKP 活力呈先上升后下降的变化。在低温应激下,罗非鱼可以增加糖类和脂质代谢,AKP 与肠内脂质转移有关,短期应激可以促进血清中 AKP 活力增加。然而,随着应激时间的延长,血清中高浓度的皮质醇会促使脂肪降解,抑制 AKP 活性,降低机体免疫力。38%蛋白组血清 AKP 活力在应激期间始终处于上升趋势,应激 24h 时显著高于 25%和 50%蛋白组。当饲料蛋白水平过量或低于适宜范围时,可能会对鱼体产生分解或应激压力,增加肝脏与肾脏的负担,降低鱼体的免疫应激能力。

3.4 低温应激对饲喂不同蛋白水平的吉富罗非鱼血清甘油三酯和胆固醇水平的影响

鱼类对应激的适应能力是由遗传因素决定的。同时,饲料的来源与利用、个体的发育阶段等对其应激反应也有一定的影响^[14]。血液中甘油三酯和胆固醇水平的变化与鱼类对于胁迫后的抗应激能力有关。甘油三酯和胆固醇主要来源于肠道对于脂类的吸收以及肝脏脂肪的代谢^[34]。在本实验中,低温应激 24h 内,各实验组血清甘油三酯水平基本呈先下降后上升的变化。可能是由于短暂刺激下,鱼类为了保持机体的生理生化平衡,通过分解血清甘油三酯而提供能量。应激 24h 后,50%蛋白组血清甘油三酯水平与应激前相比无显著差异;而 25%和 38%蛋白组血清甘油三酯水平显著低于应激前。短期投喂高蛋白的饲料可以提高罗非鱼血清甘油三酯水平,同时也可以增加组织的摄取与转化。当血清甘油三酯水平降低时,促使了储存组织中的能源物质分解或转化。50%蛋白组血清胆固醇水平显著下降,可能是因为鱼体增加了脂肪代谢,提供更多能量用于满足抗应激的需要。

3.5 低温应激对饲喂不同蛋白水平的吉富罗非鱼血清溶菌酶活力的影响

在短期应激下血清皮质醇水平升高有利于鱼体应对环境胁迫,但持续升高则会抑制机体的免疫功能。溶菌酶(LSZ)是水生动物血淋巴细胞酶系统中的重要组成部分,反映了机体非特异性免疫水平的变

化^[35]。鱼体受到急性应激时, 肝脏受损, 血清中 LSZ 活力会显著上升。饲喂不同蛋白水平的饲料对罗非鱼血清 LSZ 活力无显著影响。在低温应激 6h 时, 罗非鱼血清 LSZ 活力显著升高。推测罗非鱼在急性低温应激下, 血清中皮质醇浓度升高, 促进血糖的合成, 加快脂肪降解, 从而促使鱼体在急性应激下获得更多的能量用于增加血清中一些特定免疫蛋白如 LSZ 或补体 C₃、C₄ 等的含量, 从而提高机体的免疫力^[36]。然而, 随着应激时间的延长, LSZ 活力开始降低, 机体免疫力下降, 进而引起一些相关免疫指标发生改变。本实验发现, 应激 24h 后, 25%蛋白组血清 LSZ 活力显著下降, 这可能与营养状态不良, 机体的免疫应激能力较差有关。

3.6 低温应激对饲喂不同蛋白水平的吉富罗非鱼肝脏 HSP70 mRNA 表达的影响

生理及细胞胁迫响应代表机体维持体内平衡的两个重要防御机制。生理响应包括下丘脑-垂体-肾间组织(Hypothalamic-pituitary-interrenal, HPI)轴所分泌的一种重要的应激激素皮质醇^[37]。而细胞响应主要是胁迫过程中蛋白质与基因表达的变化, 如分子伴侣 HSP70 与 HSP90, HSPs 可以与糖皮质激素受体相互作用, 调控受体的正确折叠、激活活性与细胞转运等^[38]。在应激条件下可以激活这两种响应, Kazumi & George^[39]研究发现, 当潮间带杜父鱼(*Oligocottus maculosus*)体内 HSP70 含量较高时, 机体具有更强的抗应激能力, 适应较大范围的温差变化。Takle, et al.^[40]也发现, 低温应激可以提高大西洋鲑(*Salmo salar*)体内 HSP70 含量。本实验发现, 在低温应激 6h 后, 罗非鱼血清皮质醇水平与肝脏 HSP70 mRNA 的表达量显著上升。HSP70 mRNA 的表达量在 12h 时达到峰值, 同时, 38%和 50%蛋白组肝脏 HSP70 mRNA 的表达量显著高于 25%蛋白组。可见投喂较高的饲料蛋白水平有助于提高鱼体对于环境应激的耐受性。在 24h 时, 各实验组的 HSP70 mRNA 表达水平急剧下降。可能 HSP70 只在一定范围内对细胞起保护作用, 如果应激持续时间太长, 就会引起肝脏细胞膜结构和蛋白质组成的异常, 从而改变 HSP70 在细胞内分布, HSP70 对机体的保护能力也会随之下降。

蛋白质在饲料中所占比例较大, 同时也是饲料中非常重要的营养成分之一。本研究结果表明, 投喂高蛋白饲料可以提高吉富罗非鱼血清葡萄糖、总

蛋白、甘油三酯和胆固醇水平, 这些能源物质在低温应激时为鱼体提供能量需求, 在一定程度上提高罗非鱼的抗应激能力。同时, 投喂高蛋白饲料可能增加肝脏分解蛋白质的负担, 并提高饲料成本。因此, 冬季温度较低或长途运输中温度降幅较大时, 在投喂饲料中应提早增加饲料蛋白水平, 以便提高罗非鱼的抗应激能力。

参考文献:

- [1] Xu S W, Li T, Wu J Y, et al. Cloning and expression of white cloud mountain minnow (*Tanichthys albonubes*) Caspase-3 and Caspase-9 cDNAs [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(1): 138—144 [徐胜威, 李恬, 吴金英, 等. 唐鱼 Caspase-3 和 Caspase-9 cDNA 全长克隆及胁迫表达分析. 水生生物学报, 2011, 35(1): 138—144]
- [2] Li W X, Xie J, Song R, et al. Effects of pH stress on cortisol and non-specific immunity of *Carassius auratus gibelio* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(2): 256—261 [李文祥, 谢骏, 宋锐, 等. 水体 pH 胁迫对异育银鲫皮质醇激素和非特异性免疫的影响. 水生生物学报, 2011, 35(2): 256—261]
- [3] Di Marco P, Priori A, Finoa M G, et al. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge [J]. *Aquaculture*, 2008, 275(1/4): 319—328
- [4] Paperna L. Parasites, Infections and Diseases of Fishes in Africa [M]. CIFA Technical Paper 31, FAO, Rome, Italy. 1996, 220
- [5] Chavijo A M, Conary G, Santander J, et al. First report of *E. tarda* from tilapia in Venezuela [J]. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 2002, 22(4): 280—282
- [6] Liu B, Wang M Y, Xie J, et al. Effects of acute cold stress on serum biochemical and immune parameters and liver HSP70 gene expression in GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(17): 4866—4873 [刘波, 王美玉, 谢骏, 等. 低温应激对吉富罗非鱼血清生化指标及肝脏 HSP70 基因表达的影响. 生态学报, 2011, 31(17): 4866—4873]
- [7] Prymaczok N C, Chaulet A, Medesani D A, et al. Survival, growth, and physiological responses of advanced juvenile freshwater crayfish (*Cherax quadricarinatus*), reared at low temperature and high salinities [J]. *Aquaculture*, 2012, 334(7): 176—181
- [8] Atwood H L, Tomasso J R, Webb K, et al. Low-temperature tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, effects of environmental and dietary factors [J]. *Aquaculture Research*, 2003, 34(3): 241—251
- [9] Abdel-Tawwab & Mousa. Effect of crowding stress on some physiological functions of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), fed different dietary protein levels [J]. *International*

- Journal of Zoological Research*, 2005, **1**(1): 41—47
- [10] Kiron V, Watanabe T, Fukuda H, *et al.* Protein nutrition and defense mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, part A, 1995, **111** (3): 351—359
- [11] Fast A. Pond Production Systems: Water Quality Management Practices [M]. In: Lannan J E, Smitherman R O, Tchobanoglous G (Eds.), Principles and practices of pond aquaculture. Corvallis, Oregon: Oregon State University. 1986, 67—141
- [12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402—408
- [13] Qiang J, Ren H T, Xu P, *et al.* Synergistic effects of water temperature and salinity on the growth and liver antioxidant enzyme activities of juvenile GIFT *Oreochromis niloticus* [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, **23**(1): 255—263 [强俊, 任洪涛, 徐跑, 等. 温度与盐度对吉富品系尼罗罗非鱼幼鱼生长和肝脏抗氧化酶活力的协同影响. 应用生态学报, 2012, **23**(1): 255—263]
- [14] Tort L, Sunyer J O, Gómez E, *et al.* Crowding stress induced changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata* [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1996, **51**(1/2): 179—188
- [15] Barton B A, Iwama G K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids [J]. *Annual Review of Fish Diseases*, 1991, **1**: 3—26
- [16] Sun L T, Chen G R, Chang C F. The physiological responses of tilapia exposed to low temperatures [J]. *Journal of Thermal Biology*, 1992, **17**(3): 149—15
- [17] King W V, Buckley L J, Berlinsky D L. Effect of acclimation temperature on the acute stress response in juvenile Atlantic cod, *Gadus morhua* L., and haddock, *Melanogrammus aeglefinus* L [J]. *Aquaculture Research*, 2006, **37**(16), 1685—1693
- [18] Davis K B. Temperature affects physiological stress responses to acute confinement in sunshine bass (*Morone chrysops*×*Morone saxatilis*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2004, **139**(4A): 433—440
- [19] Lankford S E, Adams T E, Cech J J Jr. Time of day and water temperature modify the physiological stress response in green sturgeon, *Acipenser medirostris* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2003, **135**(2A): 291—302
- [20] Mommsen T P, Vijayan M M, Moon T W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1999, **9**(3): 211—268
- [21] Abdel-Tawwab M, Ahmad M H, Khatib Y A E, *et al.* Effect of dietary protein level, initial body weight, and their interaction on the growth, feed utilization, and physiological alterations of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) [J]. *Aquaculture*, 2010, **298**(3/4): 267—274
- [22] Caipang C M A, Brinchmann M F, Kiron V. Short-term overcrowding of Atlantic cod, *Gadus morhua*: Effects on serum-mediated antibacterial activity and transcription of glucose transport and antioxidant defense related genes [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2008, **151**(4A): 560—565
- [23] Vijayan M M, Moon T W. Acute handling stress alters hepatic glycogen metabolism in food-deprived rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1992, **49**(11): 2260—2266
- [24] Trenzado C E, Morales A E, De La Higuera M. Physiological effects of crowding in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness [J]. *Aquaculture*, 2006, **258**(1/4): 583—593
- [25] Adham K, Khairalla A, Abu-Shabana M. Environmental stress in lake maryut and physiological response of Tilapia zilli Gerv [J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology*, 1997, **32**(9/10): 2585—2598
- [26] Melo J F B, Lundstedt L M, Metón I, *et al.* Effects of dietary levels of protein on nitrogenous metabolism of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2006, **145**(2A): 181—187
- [27] Cai C F, Wu K, Pan X F, *et al.* the effects of protein nutrition on growth and immunoloical activity of allogynogenetic silver crucian carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(6): 590—596 [蔡春芳, 吴康, 潘新法, 等. 蛋白质营养对异育银鲫生长和免疫力的影响. 水生生物学报, 2001, **25**(6): 590—596]
- [28] Adham K, Khairalla A, Abu-Shabana M. Environmental stress in lake maryut and physiological response of Tilapia zilli Gerv [J]. *Journal of Environmental Science and Health*, 1997, **32**(9/10A): 2585—2598
- [29] Collazos M E, Barriga C, De-Sande F, *et al.* Seasonal variations and influence of gender on several haematological parameters in the cyprinid fish *Tinca tinca* [M]. Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura. Cervino A, Landin A, De-Coo, Guerra A, Torte M (Eds.), Pontevedra, Spain. 1993, 173—178
- [30] Ji D W, Li M Y, Wang T Z, *et al.* Effects of low temperature stress periods on serum biochemical indexes in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* [J]. *Fisheries Science*, 2009, **28**(1): 1—4 [冀德伟, 李明月, 王天柱, 等. 不同低温胁迫时间对大黄鱼血清生化指标的影响. 水产科学, 2009, **28**(1): 1—4]
- [31] Zhang L, Fan Q X, Zhao Z G, *et al.* The effects of chronic crowding stress on growth and blood biochemical indexes in common carp *Cyprinus carpio* [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2007, **22**(6): 465—469 [张磊, 樊启学, 赵志刚, 等. 慢性拥挤胁迫对鲤生长及血液生化指标的影响. 大连海洋大学学报, 2007, **22**(6): 465—469]

- [32] Richard J, Strance C B, Schreck B. Corticoid stress response to handling and temperature in salmonids [J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1977, **106**(3): 213—218
- [33] Ming J H, Xie J, Xu P, *et al.* Effects of emodin, vitamin c and their combination on crowding stress resistance of wuchang bream (*Megalobrama amblycephala yih*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(3): 400—413 [明建华, 谢骏, 徐跑, 等. 大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂抗拥挤胁迫的影响. 水生生物学报, 2011, **35**(3): 400—413]
- [34] Lermen C L, Lappe R, Crestani M, *et al.* Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen* [J]. *Aquaculture*, 2004, **239**(1/4): 497—507
- [35] Ellis A E. Immunity to bacteria in fish [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, **9**(4): 291—308
- [36] Möck 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**(6): 873—885
- [37] Salas-Leiton E, Anguis V, Martín-Antonio B, *et al.* Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, **28**(2), 296—302
- [38] Grad I, Picard D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2007, **275**(1/2): 2—12
- [39] Kazumi N, George K I. The 70-kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins, *Oligocottus maculosus* and *O. snyderi*: relationship of hsp70 and thermal tolerance [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2002, **133**(1): 79—94
- [40] Takle H, Baeverfjord G, Lunde M, *et al.* The effect of heat and cold exposure on HSP70 expression and development of deformities during embryogenesis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Aquaculture*, 2005, **249**(1/4): 515—524

EFFECTS OF DIFFERENT DIETARY PROTEIN LEVELS ON SERUM BIOCHEMICAL INDICES AND EXPRESSION OF LIVER *HSP70* mRNA IN GIFT TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) UNDER LOW TEMPERATURE STRESS

QIANG Jun^{1, 2}, YANG Hong^{1, 2}, WANG Hui³, XU Pao^{1, 2} and HE Jie¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 3. Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: Three Groups of GIFT tilapias (*Oreochromis niloticus*) were fed with protein levels at 25%, 38% and 50%, respectively at 27°C in 56 days. The initial body weights were (27.64±2.79) g. Uniform sizes of fish were selected for low temperature stress test at the end of rearing management. Tilapias in the experiment group were subjected to 14°C, and some biochemical indices in their serum and the expression of *HSP70* mRNA in liver were examined over 0—24h. The results showed that, before low temperature stress, the 50% protein level group had highest serum glucose (GLU), total protein (TP), triglyceride and cholesterol level; Serum glutamic-pyruvic transaminase (ALT) and glutamic-oxaloacetic transaminase (AST) activities was also increased. After low temperature stress, in the 50% protein level group, serum glucose (GLU), total protein (TP), triglyceride and cholesterol level decreased within 24h, while glutamic-pyruvic transaminase (ALT) and glutamic-oxaloacetic transaminase (AST) activities increased at first and then gradually declined. In 25% and 38% protein groups, serum glucose (GLU) level and glutamic-pyruvic transaminase (ALT) activity increased within 24h, whereas serum ALT, alkaline phosphatase (AKP), TP and cholesterol level increased at first and then decreased. Serum lysozyme activity and expression level of *HSP70* mRNA in liver of all groups also increased at first and then gradually declined. In conclusion, diet supplemented with high protein level could improve serum protein, blood sugar and lipid level and enhance resistance to low temperature, but could cause liver damage due to decomposition pressure; and could increase feed cost. Therefore, in production, the proportion of protein in the feed should be arranged according to the practical need of tilapia.

Key words: GIFT tilapia; Dietary protein; Low temperature stress; Serum; *HSP70*