

研究简报

振荡胁迫后鲫血液皮质醇和溶菌酶水平的变化

王文博 汪建国 李爱华 蔡桃珍

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

CHANGES OF CORTISOL AND LYSOZYME LEVELS IN *CARASSIUS AURATUS* BLOOD AFTER HANDLING STRESS

WANG Wen Bo, WANG Jian Guo, LI Ai Hua and CAI Tao Zhen

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072)

关键词: 振荡胁迫; 皮质醇; 溶菌酶; 抗病性

Key words: Handling stress; Cortisol; Lysozyme; Resistance to disease

中图分类号: Q175 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)06-0682-03

鱼体所处的环境可能会对其产生胁迫作用, 大体可分为两类, 即慢性胁迫和急性胁迫。前者包括长期的高密度放养和水质的恶化等, 后者则主要包括在捕捞及运输过程中给鱼体带来的人为的短期惊扰, 振荡 (Handling) 便是一种较为典型的急性胁迫。国外对鱼类遭受的慢性胁迫的研究有较多报道, 如它可导致鱼体重下降, 生长减缓, 对疾病敏感性增加等^[1]。在急性胁迫方面虽也有所涉及, 但研究相对不足, 国内更是知之甚少。

已知当鱼体受到急性胁迫后, 会启动一种“战或逃” (Fight or flight) 机制, 来应付突如其来刺激并将其对机体的危害降到最小^[2]。但此过程的内在机理仍不清楚, 尚在探索中。基于鱼体应激后皮质醇水平变化的灵敏性和溶菌酶所具有的非特异性杀菌作用, 本实验选择它们作为应激鱼体的考量指标, 对其在急性胁迫后的变化及对机体的影响做了初探。

1 材料与方法

1.1 材料 鲫 (*Carassius auratus*) 购自武汉市青菱繁育场, 平均体重为 (49.83 ± 4.15) g。实验前在持续流水的水泥池 (容积为 500L) 中驯养两周, 实验期间水温控制在 (22 ± 2) °C, DO 4.0—5.5 mg/L, 隔天投喂商业配合饲料加青饲料。溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 冻干粉购自 Sigma 公司。嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) XS9F-41 为本实验室保存

菌种。

1.2 分组及处理 实验鱼被随机分为 19 个组, 每组 12 尾, 放养于同种型号的水族箱 (容积为 80L) 中。其中 1 个组作为实验前对照组, 其余 18 个组分为: 对照 6 组, 弱振 6 组, 强振 6 组, 分别用于 6 次采样。实验时, 将 1 组鱼捞入一空盆 (容积 6L) 中, 并盖以挡板, 以 120 次/min 的频率做持续地水平振荡, 强振组振荡 5min, 弱振组振荡 1min, 之后将鱼放回原位。对照鱼捞入盆中后不做振荡, 立刻放回原位。实验前对照组无任何捕捞或振荡处理, 始终保持安静状态。

1.3 血样的采集 分别在处理后 0、1、5、12、24、72、168h 采血, 实验前对照组在实验开始之前采血。所有鱼在采血前, 均要进行快速深度麻醉 (MS 222, 200mg/L)。抽血后各组鱼随即腹腔注射 *A. hydrophila* 进行感染实验。

1.4 血液皮质醇浓度 常规分离血清, 参照 Pickering^[3] 方法用放免法 (RIA) 进行测定, 试剂盒购自北京北方生物技术研究所。

1.5 血液溶菌酶浓度 按 Parry^[4] 所述分光光度计法检测。5μL 新鲜血清加入 3mL *M. lysodeikticus* 菌液中, 测定波长为 540nm。以 1min 内吸光值下降 0.001 为一个活性单位 (U)。

1.6 攻毒死亡率 将两次活化后的嗜水气单胞菌 XS9F-41 以 0.5% 的生理盐水洗脱菌苔, 用分光光度计调配成终浓度为 6×10^8 cfu/mL 的菌悬液。每尾腹腔注射 0.3mL, 观察一周, 统计死亡率。

收稿日期: 2004-04-18; 修订日期: 2004-07-15

基金项目: 中国科学院生物学及生物技术特别支持项目; 中国科学院知识创新工程项目 (KSCX2-1-04) 资助

作者简介: 王文博 (1976—), 男, 陕西省西安市人; 博士生; 主要从事鱼类免疫学研究

通讯作者: 汪建国, 研究员, wangjg@ihb.ac.cn

2 结果

2.1 血液皮质醇浓度

振荡胁迫后鲫鱼血液皮质醇浓度变化如图1所示。在振荡后几分钟内, 实验组皮质醇浓度即迅速上升, 弱振组在0.1h达到最大值(285.36±21.06)ng/mL, 而强振组继续升高, 至1.5h达峰值(473.29±16.79)ng/mL, 两者均与同期对照组呈极显著差异($P<0.005$)。之后, 两组浓度皆大幅回落, 到168h时已基本恢复正常水平, 整个曲线呈典型倒“V”型。另外, 对照组在0.1h时有升高现象, 说明即使不振荡而只是捕捞也会对鱼体产生一定的刺激。

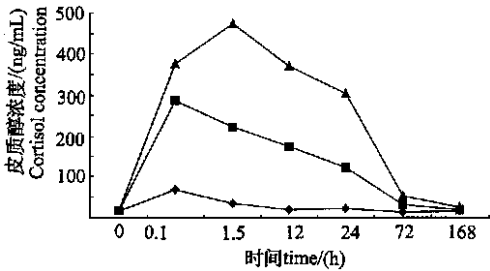


图1 振荡胁迫后鲫鱼血液皮质醇水平的变化

Fig.1 The change of cortisol level in *C. auratus* serum after handling stress
—◆—对照组; —■—弱振组; —▲—强振组

2.2 血液溶菌酶浓度

振荡胁迫后鲫鱼血液溶菌酶浓度变化如图2所示。在振荡后12h内, 实验组溶菌酶水平均有升高, 在12h至24h间隔内, 出现一个平台期, 24h之后, 皆缓慢下降, 趋向正常水平。从整体看, 弱振组变化较平缓, 而强振组相对波动较大。

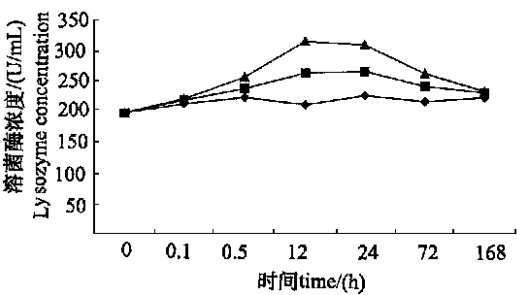


图2 振荡胁迫后鲫鱼血液溶菌酶水平的变化

Fig.2 The change of lysozyme level in *C. auratus* serum after handling stress
—◆—对照组; —■—弱振组; —▲—强振组

2.3 对病原的敏感性

振荡胁迫后, 在每个采样期用 *A. hydrophila* 对各组进行人工感染, 死亡情况见表1。振荡后12h与24h, 强振组攻毒死亡率分别为8.3%和0, 均显著低于同期对照组($P<0.05$)。其余时期实验组与对照组之间无统计学差异。

表1 振荡胁迫后鲫人工感染 *A. hydrophila* 的死亡率

Tab.1 Mortality rate of *Carassius auratus* due to *A. hydrophila* infection after handling stress

| | 实验组别 | 受试尾数(尾) | 死亡尾数(尾) | 死亡率(%) |
|------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------|------------------|
| | Groups | Number of experimental fish | Number of mortal fish | Mortality rate |
| 0h | 实验前对照组 Unrelated control | 12 | 3 | 25.0 |
| 0.1h | 对照组 Control | 12 | 4 | 33.3 |
| | 弱振组 Weak handling | 12 | 3 | 25.0 |
| | 强振组 Intense handling | 12 | 4 | 33.3 |
| 1.5h | 对照组 Control | 12 | 3 | 25.0 |
| | 弱振组 Weak handling | 12 | 4 | 33.3 |
| | 强振组 Intense handling | 12 | 3 | 25.0 |
| 12h | 对照组 Control | 12 | 4 | 33.3 |
| | 弱振组 Weak handling | 12 | 2 | 16.7 |
| | 强振组 Intense handling | 12 | 1 | 8.3 [*] |
| 24h | 对照组 Control | 12 | 3 | 25.0 |
| | 弱振组 Weak handling | 12 | 2 | 16.7 |
| | 强振组 Intense handling | 12 | 0 | 0 [*] |
| 72h | 对照组 Control | 12 | 2 | 16.7 |
| | 弱振组 Weak handling | 12 | 3 | 25.0 |
| | 强振组 Intense handling | 12 | 3 | 25.0 |
| 168h | 对照组 Control | 12 | 3 | 25.0 |
| | 弱振组 Weak handling | 12 | 4 | 33.3 |
| | 强振组 Intense handling | 12 | 3 | 25.0 |

注: * 表示与对照相比有显著差异($P<0.05$)

3 讨论

鱼体在受到外界刺激后,通过丘脑下部—垂体—肾间组织轴(Hypothalamus Pituitary Interrenal, HPI)大量分泌皮质醇,血液皮质醇水平的升高被看作是鱼类应激的灵敏信号^[5]。鲫受振荡后,血液皮质醇浓度剧增,说明鱼体产生了强烈的应激反应。然而,皮质醇水平回落也快,到 72h 已基本回复正常(图 1)。这与用鲫做的拥挤实验的结果^①截然不同。鱼体经高密度拥挤胁迫后,血液皮质醇水平几天内升至最大值,但随后并没有大幅下降,而是一直维持了较高水平。分析原因,振荡作为一种急性胁迫,只在短期内对鱼体有刺激作用,其影响随着时间的增加会逐渐消失,反映为血液皮质醇水平的下降。而拥挤是一种慢性胁迫,自始至终都对鱼体发挥胁迫作用,皮质醇水平长期升高可能是机体对刺激仍不适应的表现。图 2 中实验组血液溶菌酶水平先缓慢升高,经过一段平台期后再逐渐下降。而在拥挤实验中,到后期实验组溶菌酶水平受到极大抑制,显著低于对照组的^①。支持了急性胁迫使血液溶菌酶水平升高^[6],而慢性胁迫则使其降低^[7]的观点。在 Demers 等^[2]用虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)做的实验中,也发现振荡(Handling)可提高溶菌酶水平,尽管在数值上与本实验结果有些差别,但趋势是相同的。

将图 1 与图 2 比较,不难看出,振荡后血液皮质醇水平升得快,降得也快,中间没有过渡期,且起伏较大,而溶菌酶整个变化趋势较为迟缓,且波动较小。这可能与各自分泌或合成的机制不同有关。有学者提出血液溶菌酶水平在一定条件下亦可作为鱼体的应激信号^[8],但笔者认为,就急性胁迫而言,血液皮质醇的变化要比溶菌酶的更为灵敏,更能反映出鱼体的应激状态。另外,本实验结果没有显示血液皮质醇与溶菌酶的负相关关系,而这种关系常被报道于慢性胁迫中^[7,9],支持了 Demers 等^[2]认为的机体非特异性免疫功能在急性胁迫后得到增强,而在慢性胁迫后受到抑制的观点。

由表 1 知,在振荡后 12h 和 24h 强振组攻毒死亡率显著低于对照组的。而图 2 显示这两个时期溶菌酶正处于较高水平,两者之间是否有关联?普遍认为,溶菌酶可通过裂解细菌胞壁来使机体得到保护。但本实验中鱼体抗病性的增强可能不仅仅因溶菌酶的升高所致。实际上,机体在受到外界刺激后,短期内

会加速免疫细胞的分化与生长,释放各种效应细胞或免疫因子,其中也包括溶菌酶。就本实验而言,这些免疫细胞或免疫因子是否在振荡之后也被调动,尚需实验的佐证,在其他各时期,实验组与对照组死亡率之间均无统计学差异,表明皮质醇在短期内的升高没有对机体造成负面影响。而在慢性胁迫后,皮质醇长期的升高是会抑制机体免疫功能,甚至损伤免疫器官的^[2]。

综上所述,急性胁迫后鱼体血液皮质醇与血液溶菌酶水平的变化不同于慢性胁迫的,而这种变化是否在所谓的“战或逃”(Fight or flight)反应中发挥了积极作用,还有待深入研究。

参考文献

[1] Wang WB, Li AH. The effect of environmental stress to fish immune system: a review[J]. *J Fish. China*, 2002, **26**(4): 368—374[王文博, 李爱华. 环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概况. 水产学报, 2002, **26**(4): 368—374]

[2] Demers N E, Bayne C J. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1997, **21**: 363—373

[3] Pickering A D, Pottinger P. Seasonal and diet changes in plasma cortisol levels of the brown trout, *Salmo trutta* L [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1983, **49**: 232—239

[4] Pany R M, Chandan R C, Shahani K M. A rapid and sensitive assay of muramidase[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1965, **119**: 383—386

[5] Strange R J, Schreck C B. Anesthetic and handling stress on survival and cortisol concentration in yearling Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. *J Fish Res Bd Can*, 1978, **35**: 345—349

[6] Mock A, Peters G. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution [J]. *J Fish Biol*, 1990, **37**: 873—885

[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] Fevolden S E, Røed K H. Cortisol and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high or low tolerance to stress [J]. *J Fish Biol*, 1993, **43**: 919—930

[9] Fevolden S E, Røed K H, Fjæstad K T, et al. Poststress levels of lysozyme and cortisol in adult rainbow trout: heritabilities and genetic correlations [J]. *J Fish Biol*, 1999, **54**: 900—910

① 王文博, 汪建国, 李爱华, 蔡桃珍. 拥挤胁迫后鲫鱼血液皮质醇和溶菌酶水平的变化及对病原敏感性的研究。