

急性温度应激对吉富品系尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼生化指标和肝脏 HSP70 mRNA 表达的影响*

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

(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 采用温度应激的方法, 将尼罗罗非鱼在 26℃ 下驯养 3 周后, 直接放入 16℃、21℃、26℃(对照)、31℃ 和 35℃ 水环境中, 在不同温度应激后(0—24h)对鱼体血液和肝脏生化指标及其肝脏 HSP70 mRNA 表达量变化进行了研究。结果表明, 各实验组(除对照组外)血清皮质醇水平显著上升($P < 0.05$)。16℃ 组血清葡萄糖水平在 24h 时显著高于其它各组($P < 0.05$)。血清总蛋白水平与谷丙转氨酶、谷草转氨酶、溶菌酶、碱性磷酸酶活力和肝脏 HSP70 mRNA 表达量在 0—24h 内基本呈先上升后下降的变化。24h 后, 16℃ 组血清甘油三酯含量显著上升, 而胆固醇含量显著下降($P < 0.05$)。16℃ 和 35℃ 组肝脏丙二醛含量随着应激时间的延长而上升, 超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活力均呈先上升后下降的变化。温度应激可显著改变罗非鱼的非特异性免疫力、抗氧化能力以及肝脏 HSP70 mRNA 的表达水平。在实际养殖生产中, 应密切关注温度的变化, 降低温度胁迫对鱼体免疫机能的影响。

关键词 尼罗罗非鱼, 温度, 生化指标, HSP70 mRNA

中图分类号 S962.3

2010 年全球罗非鱼产量达到 300 万 t, 中国罗非鱼的产量占全球产量的一半。罗非鱼已成为我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, 夏季温度过高以及冬季温度过低等, 对罗非鱼的可持续发展产生了严重影响。

罗非鱼能够在 6—10℃ 的低温水环境下短时间存活, 高温耐受力可达 35—42℃, 正常生长的温度范围是 20—33℃, 温度高于 37℃ 时, 罗非鱼的死亡率将上升(Fast, 1986)。通常, 罗非鱼抗病力较强。然而, 可能是因为过高或过低温度的影响, 增加了罗非鱼对病原体的易感性(Ndong *et al.*, 2007)。在许多常见的病

原体中, 温度过高可能导致链球菌病的突发, 引起罗非鱼大面积死亡(祝璟琳等, 2010); 屈挠细菌在低温或高温环境下, 可能会引发皮肤损害综合症(Paperna, 1996); 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(Chavijo *et al.*, 2002)。因此, 研究温度胁迫对鱼体免疫系统的影响具有重要意义。鱼类通过改变生理生化水平来应对环境胁迫(Ndong *et al.*, 2007)。已有报道显示, 在淡水鱼中, 温度变化会影响鲤鱼(*Cyprinus carpio*)的细胞毒性、巨噬细胞活性、呼吸与白细胞数目(Le Morvan *et al.*, 1996; 常玉梅等, 2006); 27℃ 热胁迫下, 齐口裂腹鱼(*Schizothorax*

* “十二五”国家科技支撑计划, 2012BAD26B00 号; 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 号; 江苏省普通高校研究生科研创新计划, CXLX11-0708 号; 中央公益性科研业务费专项资金, 2011jbf09 号; 广东省海洋渔业科技推广专项, A201009C02 号, A2010002-010(b)号; 广东省科技计划项目, 2010B090500032 号。强 俊, 博士研究生, E-mail: qiangjunn@163.com

通讯作者: 徐 跑, 研究员, E-mail: xup@ffrc.cn

收稿日期: 2011-12-19, 收修改稿日期: 2012-02-09

prenanti) 血糖水平上升、碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶、三酰甘油与胆固醇显著下降(崔学升等, 2010)。在海水鱼中, 长期高温胁迫会降低褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*) 的存活率, 肝脏组织中的 SOD 与 CAT 活力随胁迫温度的上升而下降(徐冬冬等, 2010)。温度变化同样也可以影响奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*) 和尼罗罗非鱼(*O. nilotica*) 血液中溶菌酶与白细胞吞噬活性以及免疫球蛋白的水平(Dominguez *et al.*, 2005)。

HSP70 (Heat Shock Protein 70) 在降低温度胁迫对鱼类影响效应方面发挥着重要作用, 通常 HSP70 可以协助新生链折叠、修复和降解变性或已损坏的蛋白(Basu *et al.*, 2003)。本研究目的是揭示不同温度应激下吉富品系尼罗罗非鱼免疫指标与肝脏 HSP70 mRNA 表达量的影响, 旨在为罗非鱼应激与免疫方面的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

实验用鱼取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴实验基地, 运回实验室后放置于水循环养殖系统中, 约 450 尾鱼用于本实验。利用自动控温仪将鱼置于 26℃ 的水环境下驯养 3 周。每天早晚各投喂 3 次(7:00、11:30 和 16:00), 饲料蛋白 30%, 脂肪 8%。实验用鱼规格为 63—77g, 平均体质量为 (70.43±9.43)g。实验期间水中溶氧高于 5mg/L, pH 为 7.6±0.2, 氨氮与亚硝酸盐低于 0.01mg/L, 实验前禁食 24h。实验期间不投饵, 尽量减少人为干扰。

1.2 实验设计

实验设置 16℃、21℃、26℃(对照)、31℃ 和 35℃, 共 5 个温度水平。每个水平下设置 3 组平行。实验在 1.2m³ 的养殖桶中进行, 每个桶加入 1m³ 曝气 3d 后的自来水, 用温控仪调节所需温度(±0.3℃)。从驯化桶中将个体相近、活力较好的罗非鱼直接放到不同温度下, 每个处理组放鱼 30 尾, 各组之间体质量无显著差异($P>0.05$)。

1.3 采样与处理

分别于 0h、2h、6h、12h 和 24h 进行采样。每个养殖桶随机选取 3 尾鱼, 用 200mg/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℃, 3500g 离心 10min 制备血清, 上清液移置 -80℃ 冰箱中保存备用, 并取 0.1g 左右的肝脏用液氮速冻后, 于 -80℃ 保存, 用于分子生物学分析; 另取适量

肝脏用于生化分析, 于 -20℃ 保存。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 血液生化指标的测定 皮质醇采用电化学发光法, 使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在罗氏全自动生化分析仪上测定, 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生产的试剂盒。

1.4.2 肝脏抗氧化指标的测定 肝脏样品解冻后, 用预冷生理盐水冲洗, 滤纸吸干水分后称重, 加入 4 倍体积(W/V) 预冷生理盐水研磨制作匀浆, 肝脏 SOD、CAT 的活性与 MDA 含量测定采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒, 按照试剂盒中的说明制备粗酶液。粗酶液置于 4℃ 保存, 在 24h 内测定完毕。

1.4.3 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: CCACGCTCTGTTCAGG ATCTTCA。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—110bp, 取罗非鱼肝脏 20mg 左右, 参照 RNeasy Mini Handbook (QIAGEN 公司) 说明书用试剂盒提取总 RNA, OD_{260}/OD_{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℃ 5min, 然后 40 个循环(95℃ 15s, 60℃ 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℃ 15s, 60℃ 15s, 95℃ 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, 以对照组 0h 时 HSP70mRNA 的表达量为基准, 应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法(Livak *et al*, 2001)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, 同一组不同时间点之间的比较采用配对样本 *T* 检验, 不同组同一时间点之间的比较采用 Duncan 多重比较。

2 结果与分析

2.1 温度应激对尼罗罗非鱼血清皮质醇和葡萄糖水平的影响

由图 1A 可以发现, 温度应激对罗非鱼血清皮质醇水平有显著影响($P < 0.05$), 各处理组(除对照组外)随应激时间的增加基本呈上升趋势。16 $^{\circ}$ C 和 35 $^{\circ}$ C 处理组 24h 时, 血清皮质醇含量分别为 1432.00ng/ml 和

595.70ng/ml, 为对照组的 21.5 倍和 8.9 倍。对照组随应激时间的增加呈先上升后下降的变化。

温度突变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 26 $^{\circ}$ C 突降到 16 $^{\circ}$ C 时, 葡萄糖水平表现出上升趋势, 开始较为缓慢, 24h 时急剧上升, 达到 9.47mmol/L; 其它各处理组(除 21 $^{\circ}$ C 外)随应激时间的增加逐渐上升。21 $^{\circ}$ C 时在应激 24h 后, 血清葡萄糖水平略微下降。

2.2 温度应激对尼罗罗非鱼血清总蛋白水平与谷丙转氨酶和谷草转氨酶活力的影响

在温度应激下, 各实验组罗非鱼血清总蛋白水平呈先上升后下降的变化趋势(图 2A), 低温组在 12h 时达到最高值, 而高温组在 6h 时达到最高值。24h 时, 21 $^{\circ}$ C 实验组与对照组无显著差异($P > 0.05$), 而 31 和 35 $^{\circ}$ C 高温组总蛋白水平显著低于对照组($P < 0.05$)。低

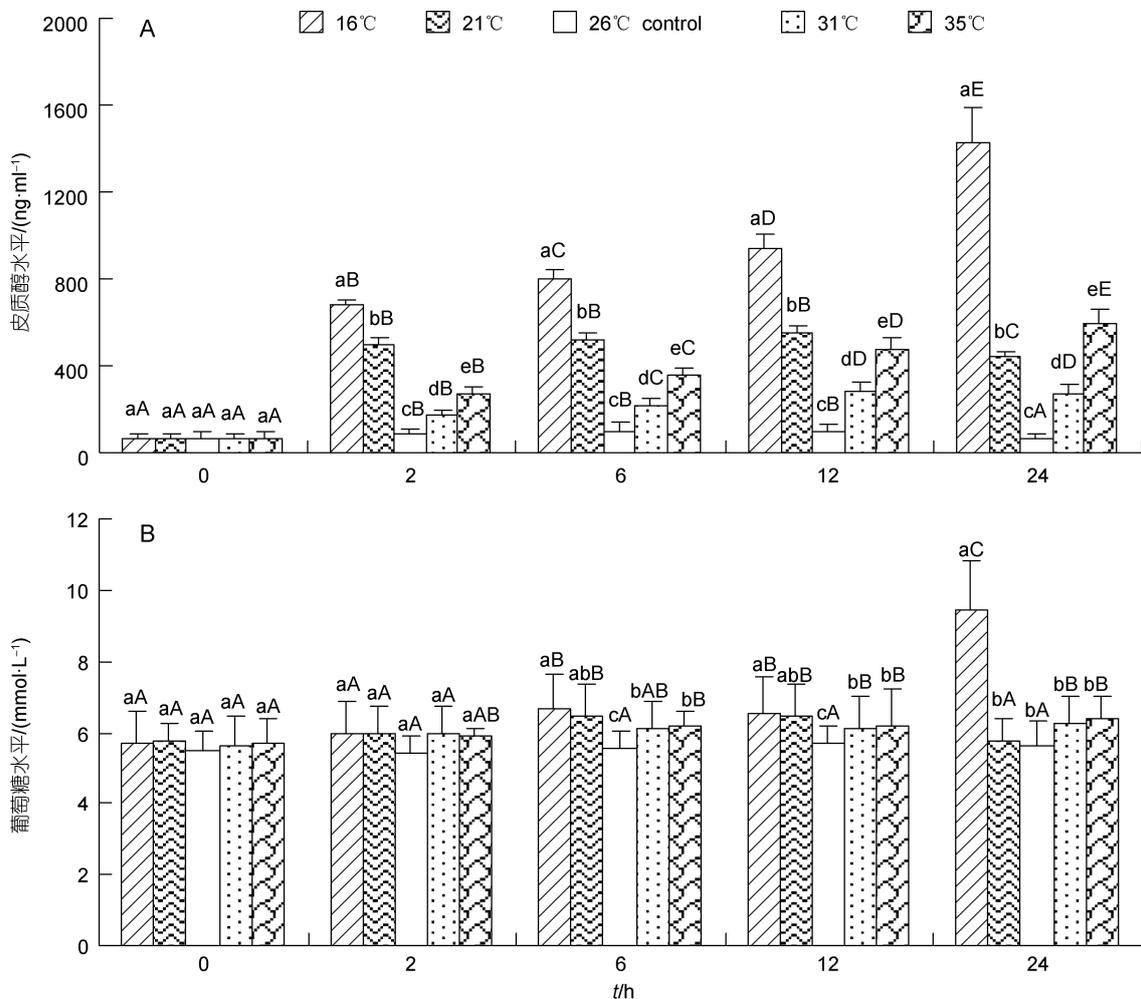


图 1 温度应激对吉富罗非鱼血清皮质醇(A)和葡萄糖(B)水平的影响

Fig.1 Effects of temperature stress on serum cortisol (A) and glucose (B) levels in GIFT tilapia

注: 不同大写字母表示同一处理组在不同时间点差异显著($P < 0.05$), 不同小写字母表示不同处理组在同一时间点差异显著($P < 0.05$), 下同

温 16°C 组在 24h 时的总蛋白水平显著高于其它各组 ($P < 0.05$)。

各组的谷丙转氨酶活力(除 16°C 组外)随应激时间的增加也呈先上升后下降的变化(图 2B), 12h 时各处理组的活力最高, 24h 时有所下降; 而 16°C 组在 24h

时无明显降低。21°C 应激组的谷丙转氨酶活力高于其它各处理组; 31°C 组在 24h 时与对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。

由图 2C 可见, 各实验组谷草转氨酶活力也呈先上升后下降的变化趋势。21°C 和 35°C 组在 12h 时活

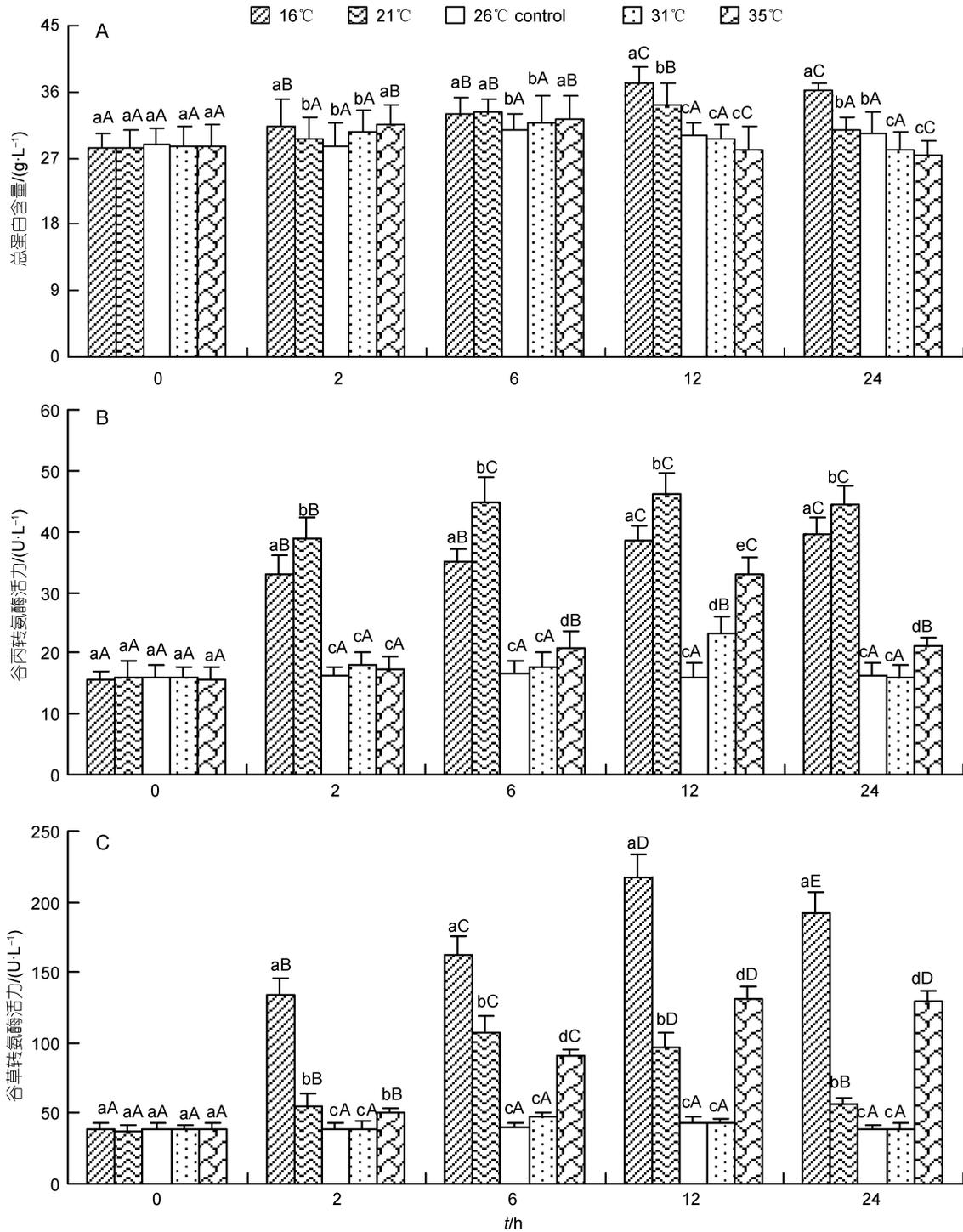


图 2 温度应激对吉富罗非鱼血清总蛋白(A)、谷丙转氨酶(B)和谷草转氨酶(C)活力的影响

Fig.2 Effects of temperature stress on serum total protein level (A), glutamic-pyruvic transaminase (B) and glutamic-oxaloacetic transaminase (C) activities in GIFT tilapia

力最高, 21℃组在 6h 时最高; 31℃实验组除 6h 时(47.00U/L)略微高于对照组(39.52 U/L)外, 其它各时间点与对照组相比无显著差异($P>0.05$)。

2.3 温度应激对尼罗罗非鱼血清溶菌酶水平和碱性磷酸酶活力的影响

温度应激对于血清溶菌酶活力有显著影响(图 3A)。低温处理组(16℃)在 2h 时溶菌酶活力(3087.18 U/L)达到最高值, 然后随着应激时间的延长而降低; 21℃和 35℃组在 6h 时血清溶菌酶活力最高, 24h 时略微下降, 但都显著高于对照组($P<0.05$)。

各组碱性磷酸酶活力呈先上升后下降的变化趋势(图 3B)。31℃组在 2h 时与对照组无显著差异($P>0.05$), 6、12 和 24h 时显著上升, 但 3 个时间点间无明显差异($P>0.05$); 16℃与 35℃应激组在 6h 时, 血清碱性磷酸酶活力最高, 然后随着应激时间的延长而显著下降($P<0.05$)。

2.4 温度应激对尼罗罗非鱼血清甘油三酯和胆固醇水平的影响

温度应激 2h 时, 除 31℃组血清甘油三酯水平与对照组相比无显著差异外($P>0.05$)(图 4A), 其余各组都高于对照组的水平($P<0.05$)。低温应激组(16℃)在 12h 时, 血清甘油三酯水平最高; 21℃与 35℃组的甘油三酯水平在 6h 时最高。而 31℃组在应激 6h 后, 血清甘油三酯水平显著低于对照组($P<0.05$)。

血清中胆固醇水平除低温应激组(16℃)外, 其它各处理组在 24h 时与对照组相比无显著差异(图 4B)。16℃组随应激时间的延长, 胆固醇水平显著下降($P<0.05$), 24h 时对照组胆固醇水平(3.87mmol/L)是 16℃应激组(1.23mmol/L)的 3.15 倍。

2.5 温度应激对尼罗罗非鱼肝脏丙二醛含量与超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活力的影响

低温处理组(16℃)与高温处理组(35℃)肝脏丙二

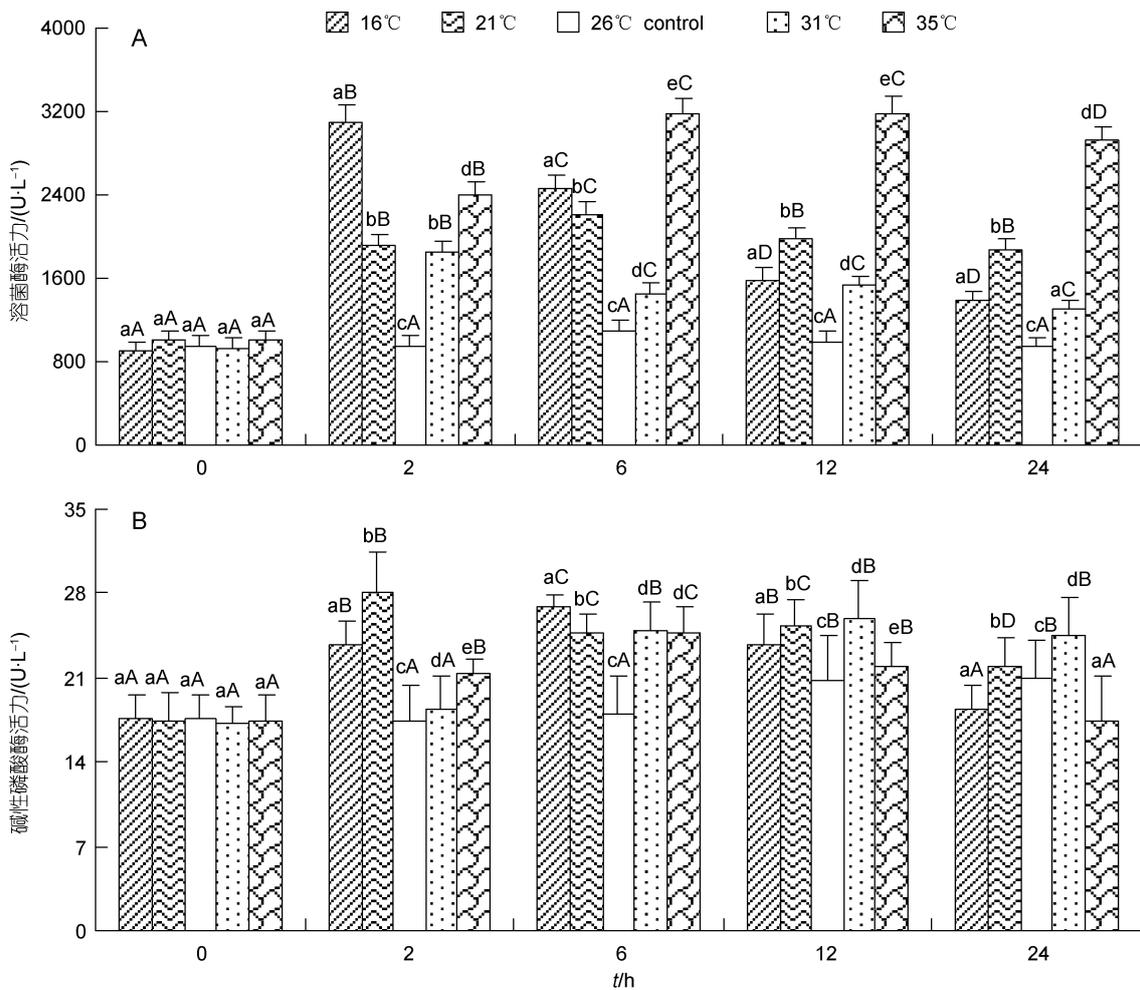


图 3 温度胁迫对吉富罗非鱼血清溶菌酶(A)和碱性磷酸酶活力(B)的影响

Fig.3 Effects of temperature stress on serum lysozyme (A) and Alkaline phosphatase (B) activity in GIFT tilapia

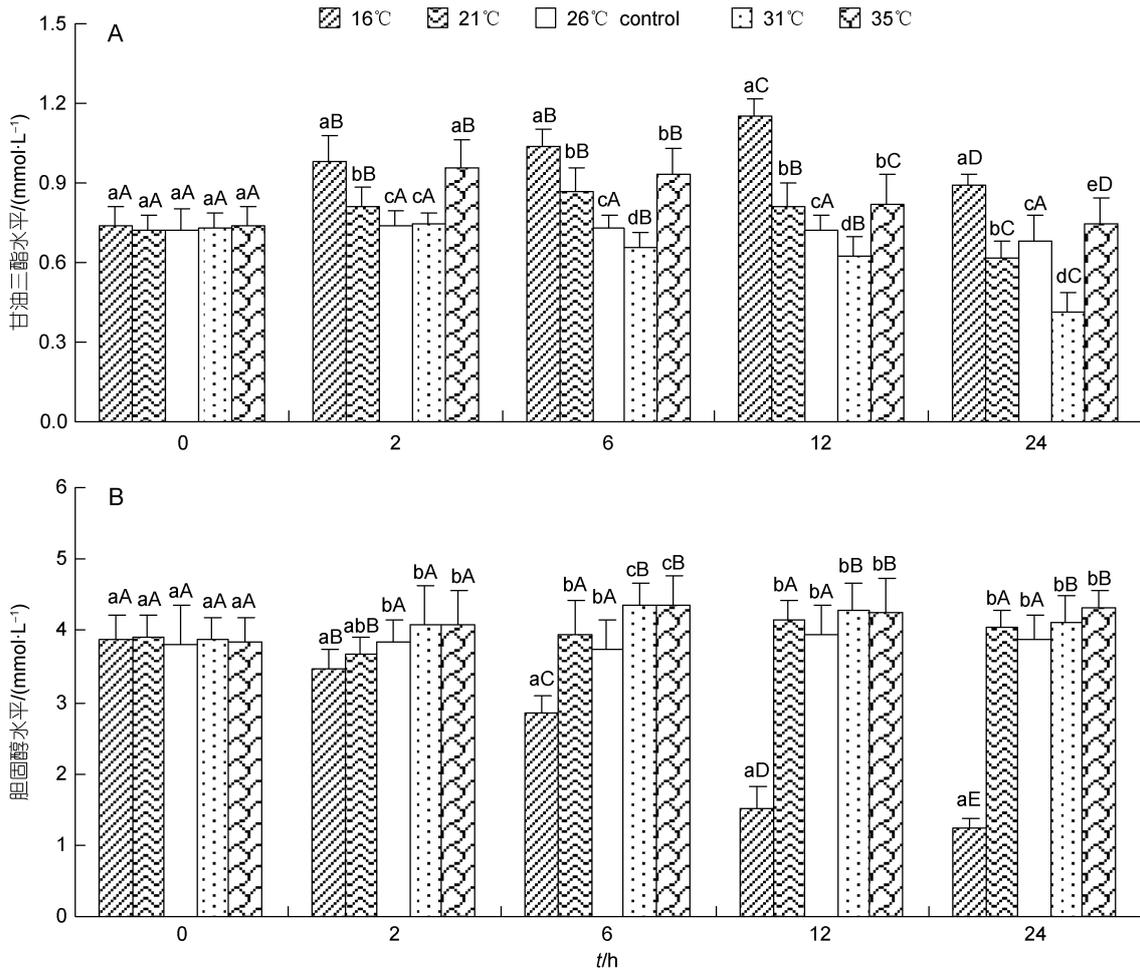


图 4 温度胁迫对吉富罗非鱼血清甘油三酯(A)和胆固醇(B)水平的影响

Fig. 4 Effects of temperature stress on serum triglyceride (A) and cholesterol (B) levels in GIFT tilapia

醛含量随着应激时间的延长而逐渐上升(图 5A)。31°C 和 21°C 组的含量呈先上升后下降的变化, 24h 时各组肝脏丙二醛含量都显著高于对照组($P < 0.05$)。

各组超氧化物歧化酶活力呈先上升后下降的变化趋势(图 5B)。21°C 与 31°C 组在 2h 时达到最高值, 24h 与对照组无显著差异($P > 0.05$); 16°C 和 35°C 应激组在 12h 时有最高值, 24h 时超氧化物歧化酶活力显著降低($P < 0.05$)。

各实验组的过氧化氢酶活力与超氧化物歧化酶变化趋势基本相同(图 5C)。24h 时, 21°C 应激组的过氧化氢酶活力 [22.22U/(mg prot)] 显著低于对照组 [28.47U/(mg prot)]。

2.6 温度应激对尼罗罗非鱼肝脏 HSP70 mRNA 表达的影响

温度应激对罗非鱼肝脏 HSP70 mRNA 的表达水平有显著影响($P < 0.05$)(图 6)。随着应激时间的延长, 16°C 和 35°C 应激组的 HSP70 mRNA 的表达量呈先上

升后下降的变化, 12h 时表达水平最高, 24h 时显著下降; 21°C 和 31°C 组在 6h 时 HSP70 mRNA 的表达最高, 12h 和 24h 时略微下降, 但 12h 与 6h 的表达量之间差异不显著($P > 0.05$)。

3 讨论

在实际水产养殖中, 鱼类经常会面对人为与环境胁迫的影响, 从而产生应激反应。应激会诱使鱼类产生生理生化上的改变。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, 并由此导致机体的各种功能与代谢改变(Mommsen *et al*, 1999)。

3.1 温度应激对尼罗罗非鱼血清皮质醇和葡萄糖水平的影响

皮质醇是一种与许多生物活性相关联的类固醇激素。鱼类面对应激胁迫时, 血浆皮质醇水平会明显

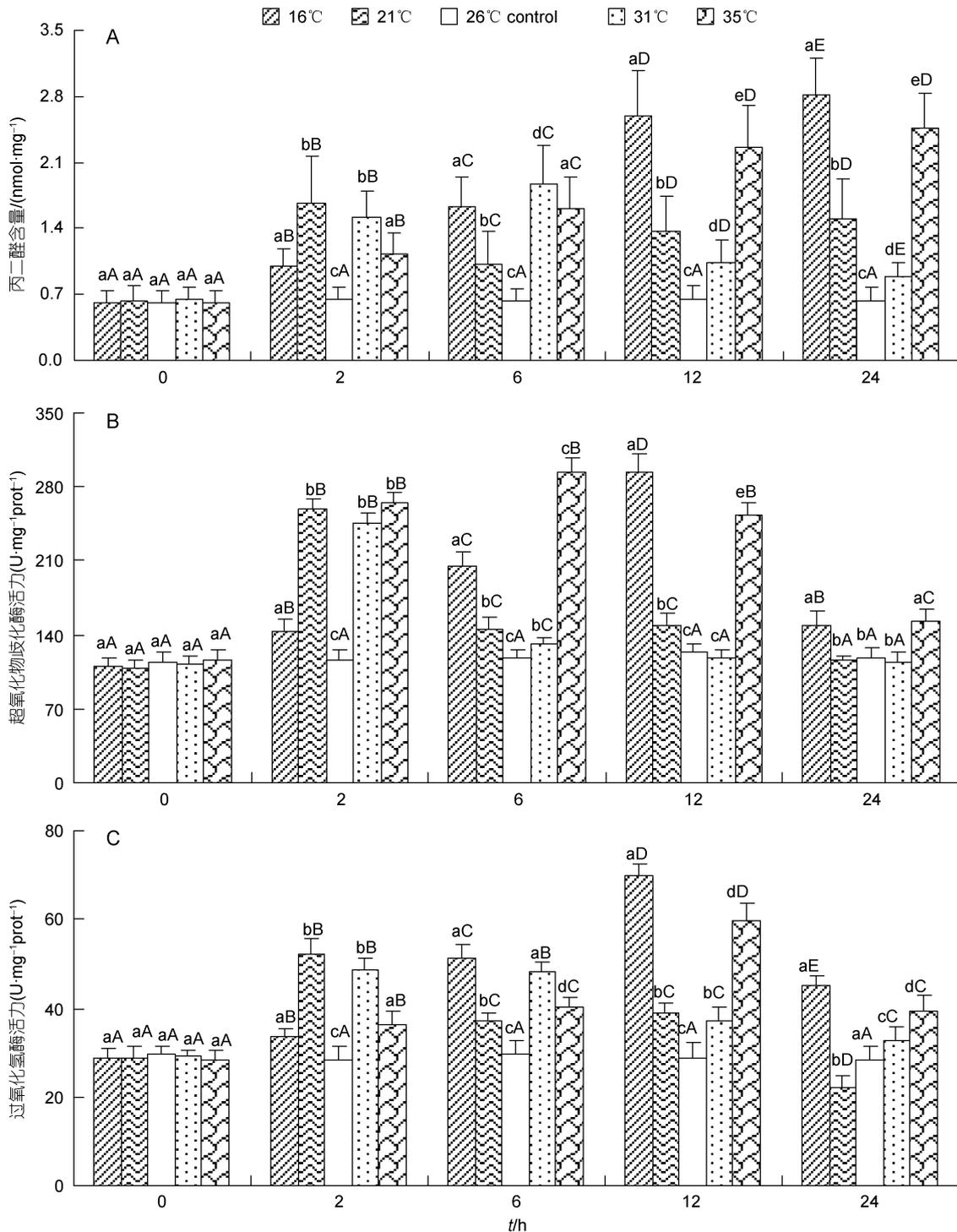


图5 温度胁迫对吉富罗非鱼肝脏丙二醛(A)、超氧化物歧化酶(B)和过氧化氢酶(C)活力的影响
 Fig.5 Effects of temperature stress on liver MDA (A), SOD (B) and CAT (C) in GIFT tilapia

提高(Mommsen *et al*, 1999)。本实验中, 在温度应激下, 各应激组血清皮质醇水平显著升高。刘波等(2011)研究发现, 将正常饲养条件下(25°C)的吉富罗非鱼进行冷应激处理(9°C), 血清皮质醇含量显著升高。在其它鱼类, 如: 大西洋鳕鱼(*Gadus morhua*)(Pérez-Casanova *et al*, 2008)、杂交条纹鲈(*Morone chrysops*×*Morone*

saxatilis)(Davis, 2004)和斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)(Davis *et al*, 1984)的研究中也得到类似结论。实验中同时发现, 16°C低温实验组的尼罗罗非鱼在胁迫24h后, 其血清皮质醇含量达到1432.00ng/ml, 远高于35°C时的595.7ng/ml。可见, 低温有助于皮质醇的增加, 这与Davis等(1984)对斑点叉尾鲷的研究结果

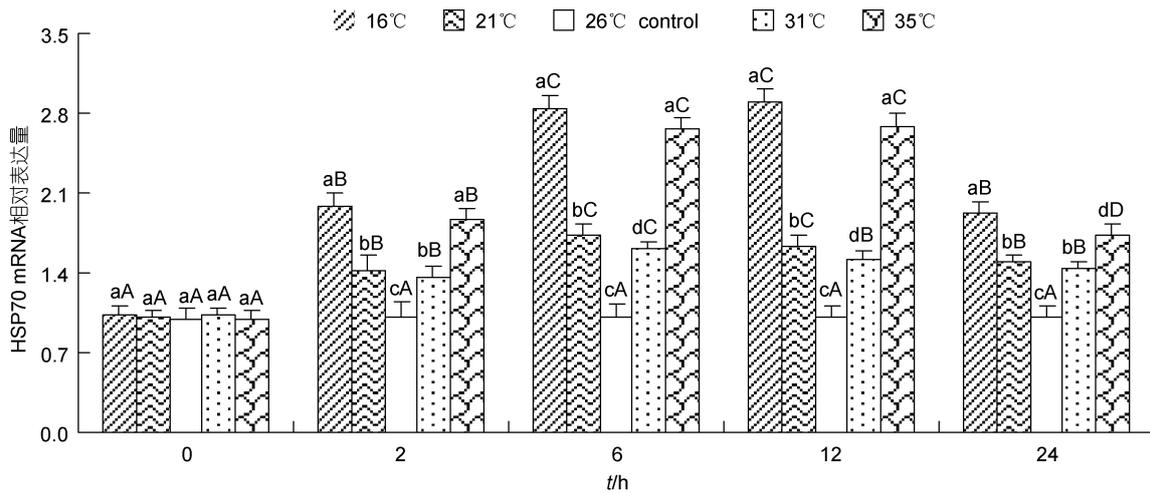


图6 温度胁迫对吉富罗非鱼肝脏 HSP70 mRNA 表达量的影响

Fig.6 Effects of temperature stress on relative expression of liver HSP70 mRNA in GIFT tilapia

相似, 低温应激时血清皮质醇含量高于高温应激时的。而对照组可能是因为饥饿的影响, 出现了略微的波动。

温度较高时, 鱼类活动较为剧烈, 肾上腺素的分泌导致血糖增加, 血糖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(Mommsen *et al.*, 1999)。机体组织以血糖作为主要能量来源。本实验中, 除低温处理组外, 高温组葡萄糖水平与对照组相比, 随着应激时间的增加而略有上升。可能是因为, 随着温度升高, 呼吸率加快, 鱼体能量代谢水平随之上升, 机体增加对糖原的利用, 葡萄糖的合成速率也会增加(Mommsen *et al.*, 1999)。皮质醇是一种重要的皮质类固醇激素, 皮质类固醇的增加可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, 导致血糖升高, 为机体应对环境应激提供能量(Pérez-Casanova *et al.*, 2008)。齐口裂腹鱼在 27°C 高温应激下, 血清血糖质量浓度比对照组高 78.29%(崔学升等, 2010)。而大西洋鳕鱼由 10°C 水环境下转移到 16°C 和 18°C 时, 血清葡萄糖水平分别增加了 1.39 倍和 1.74 倍(Pérez-Casanova *et al.*, 2008)。本实验中发现, 16°C 低温处理组葡萄糖水平在 24h 时显著上升, 鱼体为抵御冷应激的胁迫, 避免冻伤或冻死, 机体会将大量糖原分解为葡萄糖, 血糖浓度也会升高。而 21°C 的实验组随应激时间的增加, 血糖浓度呈先上升后下降的变化, 可能是因为鱼体已经适应水环境温度, 机体代谢恢复正常。

3.2 温度应激对尼罗罗非鱼血清总蛋白、谷丙转氨酶和谷草转氨酶含量的影响

血清总蛋白、谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶

(AST)的含量可以作为肝脏损伤的指示物(Casillas *et al.*, 1983)。本实验中, 环境温度的改变对于总蛋白含量有显著影响。各应激组血清总蛋白水平呈先上升后下降的变化趋势。16°C 低温组 24h 时, 血清总蛋白含量高于对照组, 可能是因为, 冷应激下, 罗非鱼肝脏受损, 机体的非特异性免疫水平提高。冀德伟等(2009)发现, 在 8.5°C 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。35°C 高温应激下, 机体合成的能量更多用于应对环境胁迫, 而用于鱼体蛋白质合成的将减少, 因而, 本实验中, 随着应激时间的延长, 血清总蛋白水平略低于对照组。

ALT 和 AST 主要分布于肝脏、心肌等组织中, 正常生理代谢条件下, 这些酶在血清中相对恒定且含量较低。但当应激引起肝脏受损时, 动物组织细胞膜通透性加大, 组织内的 ALT 和 AST 的活性下降, 而血清中酶活将上升(Casillas *et al.*, 1983)。本实验中, 低温应激组血清 AST 活力随应激时间的延长而明显升高。低温环境会对鱼体造成胁迫, 破坏鱼类血清酸碱平衡和血清离子的衡态, 影响鱼体内环境的稳定(Casillas *et al.*, 1983)。而高温组 2h 时与对照组无显著差异, 但应激 6h 以后, 开始上升, 12h 时显著高于对照组, 24h 时降低。可能与罗非鱼属亚热带鱼类, 短期内升高温度会使其心肌收缩力加强, 血液循环加速, 心肌细胞代谢加强, 从而使其更新或受损加快。24h 时, 鱼体基本上适应了较高的水温度。鲤鱼血清中 ALT 活性随应激温度的增加呈先下降后上升的变化, 而 AST 活性随温度的增加而上升(常玉梅等,

2006)。实验中同时发现, 21℃时血清 ALT 的含量高于 16℃应激条件下的, 是否是因为机体在低温环境下产生特殊的保护机制, 降低细胞膜的通透性, 阻抑细胞内 ALT 的溢出, 有待进一步研究。

3.3 温度应激对尼罗罗非鱼血清溶菌酶和碱性磷酸酶活力的影响

短期应激下血清皮质醇水平升高有利于鱼体对环境胁迫, 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(Möck *et al.*, 1990)。鱼体受到急性应激时, 肝脏受损, 血清中 LSZ 活力会显著上升。本实验中, 血清 LSZ 活力在高温(35℃)和低温(16℃)应激下显著升高。推测可能是, 罗非鱼在急性高温或低温应激下, 血清中皮质醇浓度升高, 促进血糖的合成, 脂肪降解加速, 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(Möck *et al.*, 1990)。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。Dominguez 等(2005)发现, 在不同饲养温度下(18.4—33.0℃), 罗非鱼血浆溶菌酶活力呈先上升后下降的变化, 可见温度调控了鱼体器官免疫机能的活力。

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。本实验中, 温度应激下, AKP 呈先上升后下降的变化, 可能因为, 温度应激下, 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 含量增加。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, 温度应激会抑制 AKP 活性, 机体免疫力下降。

3.4 温度应激对尼罗罗非鱼血清甘油三酯和胆固醇含量的影响

鱼类对温度的适应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温度的适应也有一定的影响(Pérez-Casanova *et al.*, 2008)。血清中甘油三酯的水平反应了机体对外源性甘油三酯吸收与利用情况。本实验中, 31℃应激组中, 随着应激时间的延长, 甘油三酯呈下降趋势, 说明升高温度有利于增加鱼体对甘油三酯的利用。然而, 高温(35℃)和低温(16℃)处理组, 可能是由于短暂刺激下, 出现能量代谢物质的应激反应, 导致甘油三酯含量增加。随着应激时间延长, 体能主要用来恢复已被破坏的衡

态, 增加了对甘油三酯的利用, 因而, 在 24h 时有所降低。血清中胆固醇除低温(16℃)应激组明显下降, 推测可能是冷应激导致罗非鱼肝和骨骼肌等组织器官脂质代谢发生改变。其余各组与对照组相比无明显差异, 可能是胁迫强度不够, 不足以引起其在短期内发生显著变化。在热应激条件下, 齐口裂腹鱼血清中甘油三酯和胆固醇质量浓度比对照组分别下降 46.06%和 35.59%, 应激对其脂质代谢产生了一定影响(崔学升等, 2010)。

3.5 温度应激对尼罗罗非鱼肝脏丙二醛含量与超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活力的影响

高温(35℃)和低温(16℃)应激组肝脏 MDA 含量随应激时间的延长而逐渐上升, 同时 SOD 与 CAT 活力在短期内也呈上升趋势。可能是因为, 机体为了适应环境应激, 通过增加 SOD 与 CAT 水平来降低过氧化氢对鱼体造成的氧化损伤(Yu, 1994)。然而, 随着应激时间的延长, 肝脏损伤加剧, 机体的新陈代谢可能会受到抑制, 氧化还原反应产生的氧自由基不断积累, 当抗氧化酶难以抵御细胞内的氧化损伤时, 机体的抗氧化酶活力将会降低。徐冬冬等(2010)研究发现, 随着环境温度(25—32℃)的升高, 褐牙鲮幼鱼肝脏抗氧化酶活力随温度的升高而降低。热应激下, 环境温度由 21℃升至 35℃时, 金鱼(*Carassius auratus*)的脑、肾脏中的 SOD 是对照组的 4 倍; 肌肉组织中的 SOD 和 CAT 活力随应激时间的延长呈先下降后上升的变化(Lushchak *et al.*, 2006)。本实验中, 31℃和 21℃组随着应激时间的增加, MDA 含量呈下降趋势, 而 CAT 和 SOD 活力在应激后期变化较为缓慢, 可能是因此温度下不足以引起罗非鱼的氧化损伤, 鱼体通过平衡调控机制来进行适应性反应, 环境应激产生的多余的 MDA, 可以利用正常代谢发生, 通过抗氧化酶来清除(Yu, 1994)。

3.6 温度应激对尼罗罗非鱼肝脏 HSP70 mRNA 表达的影响

热休克蛋白(HSPs)在鱼类中的调控作用受自身的遗传特性和环境条件共同影响。HSPs 在鱼类应对环境应激时发挥着重要作用。鱼体面对应激时可以合成一些高度保守的 HSPs (Basu *et al.*, 2003)。Kazumi 等(2002)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, 可以适应较大范围的温差变化。Airaksinen 等(1998)研究发现, 在鱼体的耐热性方面, HSPs 起着关键作用, 当 HSPs 的合成受到抑制时, 虹

鳟(*Oncorhynchus mykiss*)成纤维细胞发育过程中的耐热性能将会受到抑制。变性蛋白可逆时, HSPs 可以恢复其结构与功能; 当变性蛋白不可逆时, HSPs 可以将其移出细胞。

温度应激在鱼类生存环境中较为常见, 因而也引起许多研究者的关注。温度应激可以增加虹鳟血细胞中 HSP70 mRNA 的表达, 随着虹鳟的生长发育, 这种应激反应有所降低(Basu *et al.*, 2003)。苏岭等(2010)研究发现, 将鲫鱼(*Carassius auratus*)从 18℃ 的水温下直接放至 28℃ 时, 肝脏中的 HSP70 mRNA 表达开始上升, 4h 达到最高值, 之后逐渐下降。本实验中选取肝脏组织考察温度应激对 HSP70 mRNA 表达的影响。21℃ 和 31℃ 应激组在 6h 时, HSP70 mRNA 表达量达到最高, 分别为对照组的 1.7 倍和 1.6 倍, 之后开始下降, 但仍高于对照组。可能是因为应激强度较低, 罗非鱼可以通过提高细胞中 HSP70 mRNA 表达来适应环境应激。然而, 低温(16℃)和高温(35℃)实验组在应激处理后, HSP70 mRNA 表达水平迅速上升, 6h 时分别为对照组的 2.8 倍和 2.6 倍, 24h 时实验组的 HSP70 mRNA 表达水平急剧下降。可能是因为, HSP70 对细胞的保护作用只能在一定范围内, 如果应激超过一定强度, 或延续时间过久, 引起肝脏细胞膜结构和蛋白质组成的异常, 从而导致 HSP70 在细胞内分布的改变, HSP70 对机体的保护能力也会随之下降。

4 结语

本文研究了急性温度应激对吉富品系尼罗罗非鱼血液生化指标、肝脏抗氧化酶以及肝脏 HSP70 mRNA 表达的影响。通过本研究可以发现, 急性应激条件下可以提高皮质醇类固醇的活性, 刺激葡萄糖的生成。同时, 皮质醇在调控 HSP70 mRNA 表达上发挥着重要作用(Basu *et al.*, 2003)。血液生化指标对环境应激的敏感性较低, 在血液中保持相对平衡。本实验中所检测的血糖、血脂、血清蛋白以及酶成分属于血液中的有机成分。鱼类机体中的 HSPs 可利用水解 ATP 的能量, 维持变性蛋白的可溶状态, 使其进一步复性, 从而增强鱼类的抗逆性。温度应激下, 血清中皮质醇含量提高, 增加了葡萄糖的合成, 提高了对胆固醇和甘油三酯的利用, 产生的能量主要用于 HSPs 的合成及维持内环境的平衡。然而, 随着应激时间的延长, 低温(16℃)和高温(35℃)组皮质醇含量持续升高, 削减了机体的免疫力, 引起溶菌酶和碱性

磷酸酶活力的改变。同时, 肝脏组织受到损伤, 多余的丙二醛无法通过抗氧化酶来清除, 转氨酶由损伤肝细胞逸出进入血液, 导致机体糖、脂肪等物质代谢发生障碍。

值得注意的是, 鱼类血液学指标始终处于一种动态平衡, 由多种因素共同决定和影响。本研究仅对水环境温度的变化进行了考察, 水环境中的其它影响因素, 如: 酸碱度、氨氮、溶氧等对鱼体的应激效应还需要进一步研究。在日常养殖生产中, 需要密切关注池塘温度的变化, 减少温度应激, 增加鱼体免疫力, 提高抗病害能力。

参 考 文 献

- 刘 波, 王美鑫, 谢 骏等, 2011. 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, 31(17): 4866—4873
- 苏 岭, 李绍戎, 王 荻等, 2010. 半定量 RT-PCR 方法检测热应激对鲫鱼肝脏中 HSP70 mRNA 含量的影响. 华北农学报, 5: 100—104
- Yu B P, 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74: 139—162
- 祝璟琳, 杨 弘, 邹芝英等, 2010. 海南养殖罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)致病链球菌的分离、鉴定及其药敏实验. 海洋与湖沼, 41(4): 590—596
- 徐冬冬, 楼 宝, 詹 炜等, 2010. 高温胁迫对褐牙鲷生长及肝脏抗氧化酶活性的影响. 水产学报, 34(7): 1099—1105
- 常玉梅, 匡友谊, 曹鼎臣等, 2006. 低温胁迫对鲤血液学和血清生化指标的影响. 水产学报, 30(5): 701—706
- 崔学升, 周朝伟, 李志琼, 2010. 禁食和热应激对齐口裂腹鱼生化指标的实验. 饲料研究, 2: 63—65
- 冀德伟, 李明月, 王天柱等, 2009. 不同低温胁迫时间对大黄花鱼血清生化指标的影响. 水产科学, 28(1): 1—4
- Airaksinen S, Råbergh C M, Sistonen L, 1998. Effects of heat shock and hypoxia on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cells. *The Journal of Experimental Biology*, 201: 2543—2551
- Basu N, Kennedy C J, Iwama G K, 2003. The effects of stress on the association between hsp70 and the glucocorticoid receptor in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 134: 655—663
- Casillas E, Myers M, Ames W E, 1983. Relationship of serum chemistry values to liver and kidney histopathology in English sole (*Parophrys vetulus*) after acute exposure to carbon tetrachloride. *Aquatic Toxicology*, 3: 61—78
- Chavijo A M, Conary G, Santander J *et al.*, 2002. First report of *E. tarda* from tilapia in Venezuela. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22: 280—282
- Davis K B, 2004. Temperature affects physiological stress responses to acute confinement in sunshine bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Comparative Biochemistry and*

- Physiology Part A, 139: 433—440
- Davis K B, Suttle M A, Parker N C, 1984. Biotic and abiotic influences on corticosteroid hormone rhythms in channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 113: 414—421
- Dominguez M, Takemura A, Tsuchiya M, 2005. Effects of changes in environmental factors on the non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L.. *Aquaculture Research*, 36: 391—397
- Fast A, 1986. Pond Production Systems: Water Quality Management Practices. In: Lannan J E, Smitherman R O, Tchobanoglous G ed. *Principles and Practices of Pond Aquaculture*. Corvallis, Oregon: Oregon State University, 67—141
- Kazumi N, George K I, 2002. The 70-kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins, *Oligocottus maculosus* and *O. snyderi*: relationship of hsp70 and thermal tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133(1): 79—94
- Le Morvan C, Deschaux P, Troutaud D, 1996. Effects and mechanisms of environmental temperature on carp (*Cyprinus carpio*) anti-DNP antibody response and non-specific cytotoxic cell activity: a kinetic study. *Developmental and Comparative Immunology*, 20: 331—340
- Livak K J, Schmittgen T D, 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4): 402—408
- Lushchak V I, Bagnyukova T V, 2006. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 143: 36—41
- Möck A, Peters G, 1990. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution. *Journal of Fish Biology*, 37(6): 873—885
- Mommsen T P, Vijayan M M, Moon T W, 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9: 211—268
- Ndong D G, Chen Y Y, Lin Y H *et al*, 2007. The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. *Fish & Shellfish Immunology*, 22: 686—694
- Pérez-Casanova J C, Rise M L, Dixon B *et al*, 2008. The immune and stress responses of Atlantic cod to long-term increases in water temperature. *Fish & Shellfish Immunology*, 24: 600—609
- Paperna L, 1996. Parasites, infections and diseases of fishes in Africa, an update. CIFA technical paper 31, FAO, Rome, Italy, 220

THE EFFECT OF ACUTE TEMPERATURE STRESS ON BIOCHEMICAL INDICES AND EXPRESSION OF LIVER HSP70 mRNA IN GIFT NILE TILAPIA JUVENILES (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

QIANG Jun^{1,2}, YANG Hong^{1,2}, WANG Hui³, XU Pao^{1,2}, HE Jie²

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

Abstract Acclimated at 26°C for 3 weeks, GIFT tilapias (*Oreochromis niloticus*) were then treated at 16°C, 21°C, 26°C (control), 31°C and 35°C respectively by means of acute temperature stress, and some biochemical indices in serum and liver and expression of HSP70 mRNA were examined over 0—24 h. The results showed that serum cortisol levels for all groups except control group increased significantly over 0—24h ($P<0.05$). Glucose (GLU) level was higher significantly than that of other groups during the period of 24h when fish were transferred to low temperature (16°C) ($P<0.05$). Changes in serum total protein (TP), glutamic-pyruvic transaminase (ALT), glutamic-oxaloacetic transaminase (AST), lysozyme and Alkaline phosphatase (AKP) were increased and then decreased over 0—24h. Serum triglyceride content increased significantly and cholesterol decreased when fish were transferred to 16°C ($P<0.05$). Malondialdehyde (MDA) in liver increased significantly when fish were transferred to 16°C and 35°C over 0—24h, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were increased at first and then gradually declined. After temperature stress, expression level of HSP70 mRNA increased significantly, and reached the highest value after 6h and decreased significantly after 24h. Therefore, temperature stress could improve non-specific immunity in serum, anti-oxidative capacity in liver and expression level of HSP70 mRNA. In practice, we should pay close attention to temperature changes in aquaculture production in order to reduce stress on the fish immune function of the temperature effect.

Key words *Oreochromis niloticus*, Temperature, Biochemical indices, HSP70 mRNA