

# 慢性氨氮胁迫对鲮鱼(*Mugil cephalus*)幼鱼 组织细胞免疫指标的影响研究\*

蒋 玫<sup>1</sup>, 李 磊<sup>1</sup>, 沈新强<sup>1</sup>, 吴庆元<sup>2</sup>, 牛俊翔<sup>2</sup>

(1. 农业部海洋与河口渔业重点开放实验室 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090;  
2. 上海海洋大学 上海 200336)

**提要** 以鲮鱼(*Mugil cephalus*)幼鱼为研究对象, 研究低浓度氨氮长时间胁迫对组织细胞免疫指标和遗传物质代谢的影响。实验分 0.35、0.7、1.5 和 3mg/L 氨氮处理组, 分别于 0、5、10、15、20d 取样并进行相关指标测定。结果显示: 肝脏和鳃丝的丙二醛(MDA)含量表现出先上升后下降的趋势, MDA 活性与氨氮浓度呈一定的正相关。氨氮对 MDA 的影响具有不同组织和不同时序的选择性。不同浓度氨氮胁迫下, 鳃丝和肝脏  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  活性均呈现先升高后降低, 并随着时间的增加逐渐趋于稳定。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  活性与氨氮浓度呈一定的负相关性, 尤其是 3mg/L 处理组与对照组差异性显著 ( $P<0.05$ )。在氨氮浓度 0.7mg/L 和 1.5mg/L 时, 肌肉中 RNA/DNA 均表现出不同程度的增加, 各浓度组与对照组差异不显著; 而高浓度(3mg/L)比值基本无变化。肝脏和鳃丝的  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的 mRNA 表达量, 在氨氮胁迫第 5d 时检测到达最高, 随后表达量缓慢回落, 实验 20d 除 3mg/L 处理组表达量仍高于对照组水平外, 其他处理组均降至对照组水平。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的表达水平变化趋势与  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  活性基本一致。结果表明, 在一定浓度的氨氮长时间胁迫作用下, 抗氧化免疫系统和肌肉中的核酸代谢受到了一定的影响。

**关键词** 氨氮; 鲮鱼幼鱼; 丙二醛(MDA);  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ ; RNA/DNA 比值; mRNA 表达量  
**中图分类号** X171.5 **doi:** 10.11693/hyhz20130300010

水中氨氮包括离子氨和非离子氨, 总氨氮即是这两种形态氨的总和。在总氨氮中, 离子氨对鱼类毒性较小, 而低浓度的非离子态氨则会对鱼类造成较强的毒性作用(郝小凤等, 2012)。非离子氨会降低鱼类等水生生物的能量代谢活动, 损害其鳃、肝、肾、脾和甲状腺组织, 使其出现呼吸困难, 分泌物增多, 甚至衰竭死亡等一系列生理毒性反应(谭树华等, 2005; Benli *et al.*, 2008; 尹飞等, 2011a)。

丙二醛(MDA)是脂质过氧化作用的最终分解产物, 其含量可间接反映机体的活性氧自由基和脂质的过氧化水平, 从而间接反映出细胞受损伤的程度, 近年来已开始应用于水生生态毒理学的研究(谭树华等, 2005; 廖静等, 2011)。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶普遍存在于水生动物体内, 参与能量代谢、物质运送、氧化磷酸化的重要生化过程, 同时它与膜上磷脂的结合状态, 将影

响膜的流动性, 从而还会影响膜的其它功能, 为多种毒物攻击的靶器官(赵小晶等, 2011)。鱼体肌肉核酸水平作为衡量水环境的指标, 能在一定条件下预测污染与否及水环境是否有利于鱼类的生长, 因此 RNA/DNA 比值在水产动物的生产和研究中是一种非常重要的研究指标(Bulow, 1970; 刘存歧等, 2010)。

鲮鱼(*Mugil cephalus*)广泛分布于我国沿海, 具有生长快、病害少、食性广、广盐性、肉味鲜美等特点, 是我国咸淡水养殖的重要经济鱼类之一。国内有关鲮鱼的研究目前主要集中于繁殖生物学、生理、及养殖技术方面(方永强等, 2002; 殷帅文等, 2007; 于娜, 2011; 于娜等, 2012)。许多学者就氨氮对鱼类的影响进行了大量报道, 但大多都集中于急性毒性的效应研究(韩力强等, 2005; 杜浩等, 2007; 曲克明等, 2007; 王甜等, 2010), 而对于慢性影响实验则开展的较少。

\* 国家重点基础研究发展计划(973 项目), G2010CB429005 号。蒋玫, 研究员, E-mail: jiangrose73@163.com

收稿日期: 2013-03-30, 收修改稿日期: 2013-05-30

本文通过开展氨氮对鲢鱼幼鱼的慢性胁迫实验, 分析氨氮胁迫下鲢鱼幼鱼肌肉组织中(RNA/DNA)遗传代谢的变化情况, 了解肝脏组织和鳃丝组织中 MDA 含量和 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶基因表达水平的响应关系, 探索鱼类生物在长时间低浓度的氨氮胁迫下致毒机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

试验生物选自江苏启东黄海滩涂养殖育苗场外海域的天然鲢鱼幼鱼。挑选其中健康活泼、规格一致的个体作为试验鱼, 质量为 $(0.3693\pm 0.1070)\text{mg}$ , 体长为 $(3.35\pm 0.27)\text{cm}$ 。

实验用水来源于育苗场附近的近岸天然海水, 经过沉淀沙滤后备用, 盐度为 $20\pm 2$ , 温度为 $20\text{—}23^\circ\text{C}$ , pH 为 $7\text{—}8$ 。经过消毒后, 氨氮质量浓度在 $0.35\text{mg/L}$ 。

试验容器为容量 20L 的塑料整理箱, 在水箱中充氧保证饱和和溶解氧在 60% 以上。

### 1.2 实验设计

采用室内半静水方法进行慢性染毒实验。将 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 试剂(优级纯)配制成母液, 将实验浓度按 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 母液等对数间距设计设定 4 个对应氨氮浓度梯度组(0.75、1.5、3.0mg/L)和 1 个对照组(0.35mg/L)过滤消毒海水, 每组 3 个平行, 每组各放鲢鱼幼鱼 70 尾。为保证实验浓度的稳定, 减少鲢鱼幼体自身氨排泄影响, 每天换水一次, 测定氨氮质量浓度。实验时间持续 20d。试验开始后每天观察, 并记录生理活动反应情况。分别于实验开始的 0、5、10、15 和 20d 随机抽取鲢鱼幼鱼, 分别采集鳃丝、肝脏和肌肉组织, 进行相关数据的测定分析。

RNA/DNA 比值测定: 取部分肌肉组织, 加入酒精制成石蜡切片, 进行切片再脱蜡, 吖啶橙工作液染色 15min, 磷酸缓冲液(PBS)漂洗, 水溶性封片剂封片, 倒置于共聚焦显微镜(LSM 5 EXCITER, 德国)观察细胞层面, 选择波长为 488nm 的氩原子作为激发光进行光束扫描, 细胞核或 DNA 病毒包涵体呈绿色荧光。而核仁和细胞质内 RNA 或 RNA 病毒包涵体呈橘红色荧光。经激光共聚焦扫描系统进行测定分析 RNA/DNA 的荧光像素积分值的比值。

MDA 和 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 的测定: 将肝脏和鳃丝组织取出, 在经 $-20^\circ\text{C}$ 预冷的研钵中加入少许石英砂和 3.0mL 的 Tris-蔗糖缓冲液, 研碎后转入离心管, 10000r/min 离心

15min, 上清液即为粗酶液, 采用南京建成生物工程研究所的专用试剂盒进行测定分析。

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶的 mRNA 表达分析: 采用 qRT-PCR 法提取鲢鱼苗肝脏和鳃丝组织的 Total RNA。RNA 质量和含量检测用分光光度计分析。取 $5\mu\text{g}$  Total RNA 用 Dnase I 消化纯化基因组 DNA, 电泳检测消化纯化基因组 DNA 前后的 RNA 的质量。 $1\mu\text{g}$  消化纯化后的 RNA 采用 RNA PCR kit(AMV) Ver. 3.0(TaKaRa)进行第一链 cDNA 合成。引物采用 Primer 5.0 软件, 按照 Real-time PCR 要求设计 3 个内参照基因和 BmGSTd1 基因的引物对。采用 SYBR Prime Script TM RT-PCR 试剂盒进行测定, 具体实验步骤按照说明书进行, 反应体系为 $20\mu\text{L}$ 。反应程序为:  $95^\circ\text{C}$  变性 1min; 随后的 40 个循环包括  $95^\circ\text{C}$  5s、 $55^\circ\text{C}$  10s、 $72^\circ\text{C}$  10s。反应过程由测定仪软件自动设定, 每个样品重复 3 次。RT-PCR 的结果数据用仪器自带的 Sequence detection software version 1.3.1 软件处理, 图表采用 SPSS16.0 软件制作。

### 1.3 数据分析

试验结果使用 EXCEL 2007 数据处理, 用 SPSS16.0 软件进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  表明差异显著。

## 2 结果分析

### 2.1 氨氮对肌肉组织细胞 RNA/DNA 的影响

氨氮胁迫下, 除最高浓度组外, 其他各处理组鲢鱼幼鱼肌肉组织的 RNA/DNA 比值随着实验时间的持续均呈现一定的变化(图 1)。对照组 RNA/DNA 的比值随时间持续, 表现出缓慢增加的趋势, 但各实验时间段差异不显著( $P > 0.05$ )。最高处理组(3.0mg/L) RNA/DNA 的比值基本无变化, 始终维持在实验最初 0d 水平。其他 2 个处理组的 RNA/DNA 比值较实验 0d 缓慢增加, 但时间效应不明显, 5d 至 20d 数值基本

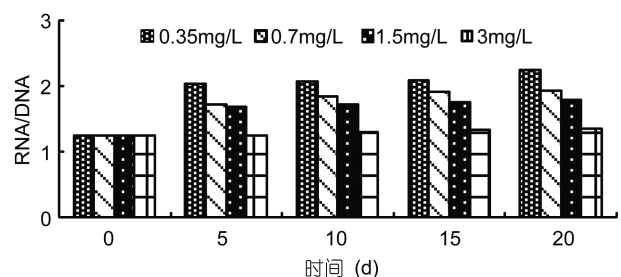


图 1 氨氮对鲢鱼肌肉组织细胞 RNA/DNA 的影响  
Fig.1 Effect of muscle RNA/DNA ratio of juvenile *Mugil cephalus* exposed to ammonia

维持在一个水平( $P>0.05$ )。各处理组的 RNA/DNA 比值与对照组之间无显著性差异( $P>0.05$ )。

## 2.2 氨氮对肝脏和鳃组织的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 活性和 MDA 含量影响

两个高浓度氨氮处理组对肝脏组织的  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  的活力影响较为显著( $P<0.05$ ), 而低浓度处理组(0.70mg/L)和对照组无明显变化(图 2)。两个高浓度处理组活力受到不同程度抑制, 5d 后呈较明显地下降趋势, 5d 后活力变化趋缓, 下降幅度明显减少, 尤其是低浓度处理组(0.70mg/L)和次高浓度组(1.50mg/L)基本降至同一水平。高浓度处理组(3.0mg/L)的  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  的活力与对照组呈显著性差异( $P<0.05$ ), 而两个低浓度处理组与对照组相比基本无显著性差异。各处理组  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  的活力变化基本与氨氮浓度呈显著负相关( $R=-0.65$ )。

氨氮胁迫对鳃组织的  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  的活力影响, 各处理组均小于对照组。除最高浓度处理组(3.0mg/L)与对照组差异性较为显著外( $P<0.05$ ), 其他各处理组和对照组无显著性差异(图 3)。实验开始第 5d, 两个

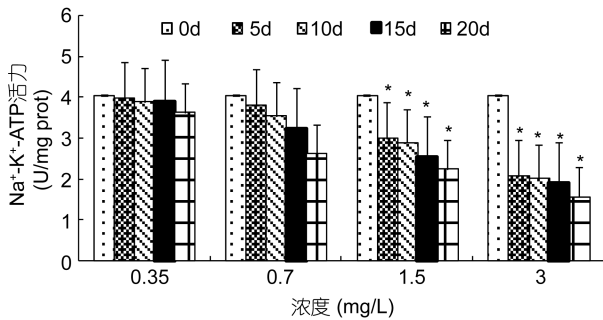


图 2 氨氮对肝脏组织  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的活力影响

Fig.2 Effect of the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  activity of juvenile *Mugil cephalus* liver exposed to ammonia

\*表示与对照组(0.35mg/L)相比差异显著( $P<0.05$ )

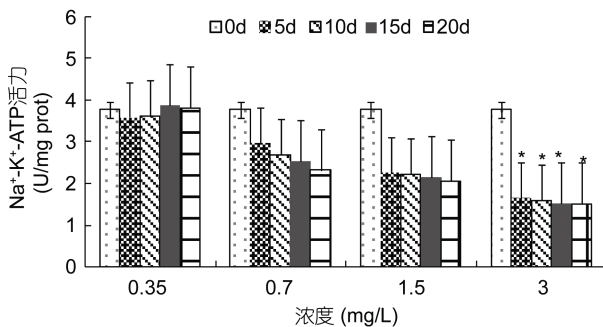


图 3 氨氮对鳃组织  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的活力影响

Fig.3 Effect of the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  activity of juvenile *Mugil cephalus* gill exposed to ammonia

\*表示与对照组(0.35mg/L)相比差异显著( $P<0.05$ )

低浓度组处理组  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  的活力均出现小幅下降, 活性受到轻度抑制。高浓度处理组  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  的活力则受到显著抑制, 下降幅度十分明显, 但 10d 后活力下降幅度逐步缩小, 基本趋于稳定。5d 至 15d 活力与对照组差异性显著( $P<0.05$ )。各处理组间  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  的活力与氨氮浓度呈较低的负相关性( $R=-0.39$ )。

## 2.3 氨氮对肝脏和鳃组织的 MDA 含量影响

肝脏组织 MDA 含量变化如图 4 所示。对照组(0.35mg/L)MDA 含量变化相对平稳, 实验前后无显著性差别( $P>0.05$ )。各浓度处理组 MDA 含量整体上呈现先逐渐上升而后小幅下降的趋势, 实验 15d 时, 各处理组的 MDA 含量达到峰值, 其中 1.5mg/L 的处理组 MDA 含量与对照组在实验进行第 10d 后呈显著性差异( $P<0.05$ )。最高浓度处理组(3mg/L)MDA 含量在整个实验第 5d 快速增加, 各时间段与对照组均表现出显著差异性( $P<0.01$ )。而最低浓度(0.7mg/L)MDA 含量则与对照组无显著性差异。各处理组 MDA 含量与氨氮浓度呈现较低的正相关性( $R=0.33$ )。

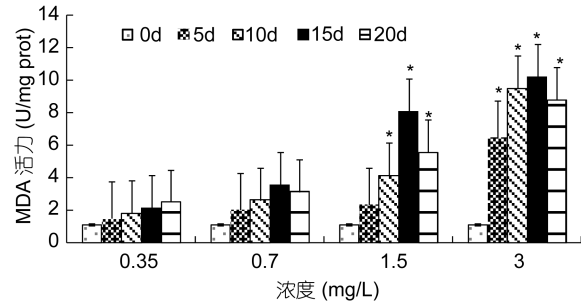


图 4 氨氮对肝脏组织 MDA 的含量影响

Fig.4 Effect of ammonia on content of MDA in juvenile *Mugil cephalus* liver

\*表示与对照组(0.35mg/L)相比差异显著( $P<0.05$ )

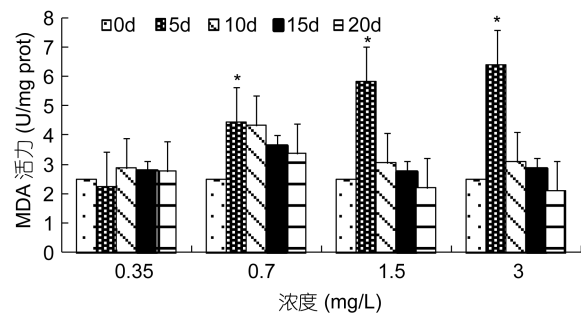


图 5 氨氮对鳃组织 MDA 的含量影响

Fig.5 Effect of ammonia on content of MDA in juvenile *Mugil cephalus* gill

\*表示与对照组(0.35mg/L)相比差异显著( $P<0.05$ )

鳃组织 MDA 含量变化如图 5 所示。对照组 (0.35mg/L)MDA 含量基本无太大波动变化, 实验前后无显著性差异( $P>0.05$ )。三个处理组 MDA 含量整体上呈现先上升后下降的趋势, 第 5d 达到峰值后逐步下降趋稳, 20d 后各处理组的 MDA 含量基本恢复到对照组水平。各处理组的 MDA 含量在 5d 时显著受到激活, 上升趋势明显, 与对照组呈显著性差异( $P>0.05$ )。5d 至 20d 后 MDA 活力逐步降低, 与对照组均无显著性差异。5d 前各处理组的 MDA 含量与氨氮浓度呈现较低的正相关( $R=0.42$ ), 5d 至 20d 的 MDA 含量则与氨氮浓度呈较低的负相关( $R=-0.33$ )。

#### 2.4 氨氮对肝脏组织和鳃丝组织的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶基因表达量的影响

氨氮胁迫对肝脏组织  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的 mRNA 表达影响见图 6 所示。各处理组  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的 mRNA 表达量在实验开始至 5d 前呈明显上升趋势, 尤其是 3mg/L 处理组与对照组差异显著( $P<0.05$ )。5d 后各处理组 mRNA 表达量均呈逐步下降趋势, 其中 1.5mg/L 和 0.7mg/L 处理组到 15d 逐步稳定至对照组水平, 3mg/L 处理组的 mRNA 表达水平仍处于高位, 明显高于对照组( $P<0.05$ )。而对照组 mRNA 表达水平在实验期间始终保持稳定, 无明显变化( $P>0.05$ )。实验时间从第 5d 开始至第 15d,  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的 mRNA 表达量随着氨氮胁迫浓度的增加而升高。实验时间持续到第 20d, 除最高浓度组外(3mg/L), 各浓度组的表达量基本维持同一水平, 其差异不显著。

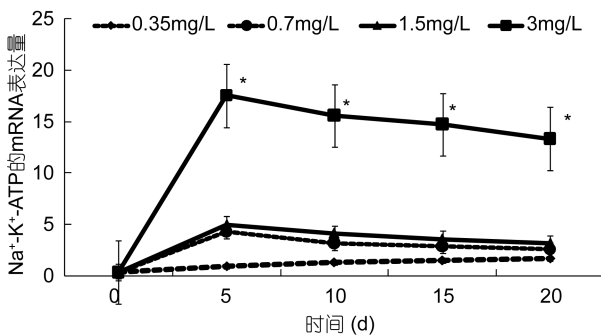


图 6 氨氮对鲮鱼肝脏组织中  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的 mRNA 表达量的影响

Fig.6 Effect of the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ ase relative expression level of juvenile *Mugil cephalus* liver exposed to ammonia  
\*表示与对照组(0.35mg/L)相比差异显著( $P<0.05$ )

氨氮胁迫下, 各处理组鳃丝组织  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的 mRNA 表达量呈现先升高, 后下降并逐步趋稳的变化趋势(图 7)。高浓度处理组  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的

mRNA 表达量, 在实验第 5d, 呈明显升高趋势, 而后至 20d 后逐步下降, 与对照组相比, 差异性显著( $P<0.05$ )。而 0.7mg/L 和 1.5mg/L 处理组  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的 mRNA 表达量与对照组差异均不显著( $P>0.05$ )。实验时间持续第 5d 开始至第 15d, 各处理组  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的 mRNA 表达水平与氨氮浓度无相关性( $R=0.27$ )。实验持续到第 20d, 除 3.0mg/L 浓度组外, 其余各浓度组表达量均处于同一水平。

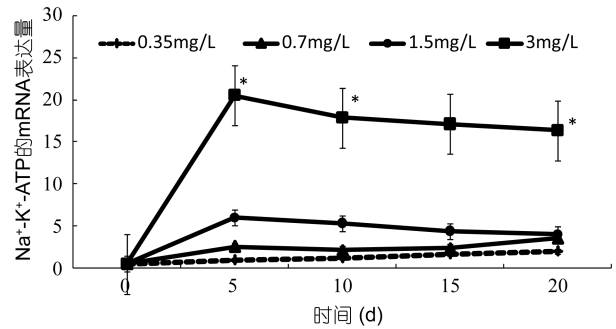


图 7 氨氮对鲮鱼鳃丝组织中  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的 mRNA 表达量的影响

Fig.7 Effect of ammonia on the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ ase relative expression level of juvenile *Mugil cephalus* gill  
\*表示与对照组(0.35mg/L)相比差异显著( $P<0.05$ )

### 3 讨论

#### 3.1 氨氮对鲮鱼幼鱼肌肉组织 RNA/DNA 的影响

鱼体肌肉中核糖核酸(RNA)与脱氧核糖核酸(DNA)的比值(RNA/DNA)在一定程度上反映了鱼类生长发育的优劣, RNA/DNA 值通常作为鱼类种群长期生长状况的评价指标(Steinhart *et al*, 1992; Weber *et al*, 2003)。本实验结果表明, 随着氨氮胁迫时间的延续, 对照组和两个较低浓度组(0.75mg/L 和 1.5mg/L)肌肉的 RNA/DNA 比值呈较明显地上升趋势, 且对照组的比值上升幅度较大, 而两个低浓度组 RNA/DNA 比值与对照组相比无显著性变化( $P>0.05$ )。与蒋玫等(2011)报道的低浓度氨氮(0.99mg/L)作用下对脊尾白虾肌肉组织中 RNA/DNA 比值增长影响较小, 结果相一致。表明受试生物在一定浓度氨氮胁迫下, 其肌肉组织对外界环境的耐受性较强。而氨氮长期胁迫则会降低鱼类生长率和摄食率(Singh *et al*, 2002; Lemarie *et al*, 2004), 进而导致生长发育缓慢。本研究发现高浓度组(3.0mg/L)RNA/DNA 比值几乎没有增长变化, 说明在一定浓度的氨氮长时间胁迫作用下, 鲮鱼肌肉中的核酸代谢受到了一定的影响, 蛋白质合成和修补更新组织的能力进一步下降。

### 3.2 氨氮对鳙鱼幼鱼鳃丝组织和肝脏组织 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性的影响

水环境中非离子氨增加时, 会抑制生物自身氨的排泄量, 使血液和组织中氨的浓度升高, 降低血液载氧能力, 此外因非离子氨( $\text{NH}_3$ )不带电荷, 具有较高脂溶性, 很容易透过细胞膜, 直接导致生物中毒(胡毅等, 2012)。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶是细胞膜的主要成分, 以膜上其他蛋白、磷脂等成分为作用靶点的毒物也会间接地影响  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的活性(李文英等, 2007)。大多数硬骨鱼类对氨氮毒性非常敏感, 由于受到胁迫强度、胁迫时间等各种因素的作用, 鱼类在氨氮胁迫过程中, 其自身抗氧化免疫系统必将受到不同程度的影响。

从实验结果可知, 氨氮长时间胁迫下肝脏组织中的  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  活性均出现下降趋势, 尤其是 3mg/L 处理组降幅最为明显, 与对照组差异性显著( $P<0.05$ ), 这一结果与以往的研究基本一致(Agrahari *et al.*, 2008)。各处理组  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  的活性基本随着实验时间的增加, 呈现先下降后逐渐趋缓稳定的变化趋势。这主要是因为当环境中高浓度氨氮渗透入肝脏后, 肝脏氨氮排泄受阻, 肝脏内  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶蛋白结构受到影响而导致酶活力降低, 随着时间延续, 肝脏渗透机制又被有效激活进行主动渗透调节。本实验同时显示出  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶活力与氨氮浓度呈负相关, 表明氨氮对肝脏  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶活性的抑制作用具有时间和浓度依赖性(赵小晶等, 2011)。

鳃是鱼类呼吸、氨氮排泄及渗透调节的主要部位,  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶是鳃组织泌氨细胞及细胞器的膜上存在的一种蛋白酶, 在鱼体渗透调节过程中起着非常重要的作用(潘鲁青等, 2006; 徐力文等, 2007)。本实验中, 氨氮胁迫第 5d 后各处理组的  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶活力均出现下降, 尤其是高浓度(3mg/L)处理组与对照组相比下降十分明显。随着实验时间的增加, 各处理组  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶活力下降幅度趋缓, 接近稳定。而两个高浓度处理组的酶活力变化趋缓情况出现的时间(10d)均早于低浓度处理组出现的时间(15d)。笔者认为, 在较高浓度氨氮胁迫下, 对鳃丝细胞的伤害加重, 特别是对膜磷脂产生过氧化, 不仅改变了生物膜功能和结构的完整性, 而且抑制了膜上的  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的活性。由于环境毒物对  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶活性的抑制作用具有时序性(尹飞等, 2011b), 长时间氨氮胁迫作用下, 可能导致鳃主动渗透调节机制被有效激活, 且胁迫浓度越高, 渗透调节机制启动越快。

### 3.3 氨氮对鳙鱼幼鱼鳃丝组织和肝脏组织 MDA 含量的影响

MDA 是自由基攻击膜不饱和脂肪酸的产物, 可与蛋白质的游离氨基作用, 引起蛋白质分子内和分子间交联, 导致细胞损伤。正常生理状态下, 体内的 MDA 含量极低, 其含量高低可以反映机体细胞受到自由基攻击的程度(Papadimitriou *et al.*, 2002)。本实验研究发现, 各氨氮处理组肝脏组织的 MDA 含量均高于对照组, 3.0mg/L 和 1.5mg/L 处理组的 MDA 在实验的第 15d 受到最大程度的诱导, MDA 含量与对照组差异显著( $P<0.05$ ), 尤其是 3.0mg/L 处理组 MDA 含量比对照组高出近 5 倍。鳃丝 MDA 在实验第 5d 受到最大程度的诱导, 且各浓度组均与对照组差异显著( $P<0.05$ )。鳃丝和肝脏 MDA 含量在实验第 20d 均出现不同程度的下降。这主要是由于高浓度氨氮胁迫使抗氧化酶活力受到抑制, 此时肝脏内产生的大量氧自由基不能被有效清除, 使得机体脂质过氧化加剧, 从而导致脂质化产物丙二醛含量不断增加。长时间胁迫下, 一定范围内氨氮对鳙鱼幼鱼组织的氧化损伤是可逆的, 肝脏和鳃丝可能对氨氮带来的可逆性氧化损伤已经适应(王奇等, 2010), 最终导致两种组织的 MDA 含量随时间延长而逐渐下降。本实验结果显示, 实验进行到第 5d, 各处理组中鳃丝 MDA 的增量幅度明显高于肝脏; 鳃丝 MDA 含量出现下降的时间段也明显早于肝脏组织近 10d, 表明氨氮对 MDA 的影响具有组织器官的特异性和时序性。

### 3.4 氨氮对鳙鱼幼鱼鳃丝组织和肝脏组织 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶的基因表达水平影响

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的主要功能是参与细胞内外  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  跨膜转运, 使细胞内外的离子浓度处于相对稳定的生理平衡状态。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶是鱼类渗透压调节组织中离子交换的关键性酶(Hirose *et al.*, 2003; 林仕梅等, 2007)。由于在许多基础和特定细胞功能上的重要性,  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶必须适应动物细胞改变和生理刺激(Therien *et al.*, 2000)。鱼类在环境胁迫初期, 某些器官组织的功能活动会随着外界环境变化发生相应改变, 使得机体在胁迫中能保持平衡状态。实验开始 5d, 鳙鱼幼鱼鳃丝和肝脏组织  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  的基因表达量快速升高, 同时  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶活力也有所增加, 以此保证鱼体内氧的供应和基础代谢正常, 以维持鳃的正常呼吸、肝脏的正常解毒能力和机体渗透压处于稳定的生理水平。硬骨鱼鳃内  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  基因表达对渗透压调节起关键性作用的  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶活

性密切相关(Deane *et al*, 2005)。实验较好地显示出鳃丝和肝脏  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  的基因表达水平的变化趋势与酶的活力变动趋势基本一致。实验进行到 5d 后, 鳃丝和肝脏  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的基因表达水平有所降低, 并逐渐趋于一个平缓稳定期。实验第 20d 除了 3mg/L 氨氮处理组  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的基因表达量仍显著高于对照组外( $P<0.05$ ), 其他各浓度组表达量基本维持在与对照组表达量同一水平。有研究表明, 随着环境胁迫时间的延长, 部分鱼类能够通过自身调节最终适应环境的变化, 在变化后的环境中再次达到新陈代谢的平衡, 保持机体内环境的稳态(Ishioka, 1982)。当水体中氨氮胁迫强度低于鱼体耐受限度时, 机体能自行调节从而适应外界环境变化(邱德全等, 2008)。鲢鱼幼鱼或许正是通过采取自我调节组织细胞的渗透能力这一被动方式, 来适应低浓度氨氮胁迫因子长时间的作用。

致谢 本次实验得到了江苏启东金海岸水产研究所朱善央老师的大力支持, 特此表示感谢。

### 参 考 文 献

- 王 奇, 范灿鹏, 陈锷慈等, 2010. 三种磺胺类药物对罗非鱼肝脏组织中谷胱甘肽转移酶(GST)和丙二醛(MDA)的影响. 生态环境学报, 19(5): 1014—1019
- 王 甜, 杜劲松, 高攀等, 2010. 氨氮对白斑狗鱼幼鱼的急性毒性研究. 水产学杂志, 23(3): 37—39
- 于 娜, 2011. 盐度对鲢鱼消化生理和渗透调节生理的影响. 上海: 上海海洋大学硕士论文, 25—37
- 于 娜, 李加儿, 区又君等, 2012. 不同盐度下鲢鱼幼鱼鳃和肾组织结构变化. 生态科学, 31(4): 424—428
- 尹 飞, 孙 鹏, 彭士明等, 2011a. 亚硝态氮和氨态氮急性胁迫下曼氏无针乌贼幼体血液的生化指标. 生态毒理学, 6(3): 289—295
- 尹 飞, 孙 鹏, 彭士明等, 2011b. 低盐度胁迫对银鲳幼鱼肝脏抗氧化酶、鳃和肾脏 ATP 酶活力的影响. 应用生态学报, 22(4): 1059—1066
- 方永强, 翁幼竹, 胡晓霞等, 2002. 鲢鱼胃肠道内分泌细胞免疫组织化学的定位. 水产学报, 26(6): 481—485
- 李文英, 刘 荣, 蒋 园等, 2007. DBP 对斑马鱼肝脏和鳃 SOD 及 ATPase 酶活性的影响. 水利渔业, 27(4): 15—18
- 曲克明, 徐 勇, 马绍赛等, 2007. 不同溶解氧条件下亚硝酸盐和非离子氨对大菱鲆的急性毒性效应. 海洋水产研究, 28(4): 83—88
- 刘存歧, 王军静, 王军霞等, 2010. 饥饿时间对日本沼虾能源物质利用和能量收支的影响. 河北大学学报(自然科学版), 30(6): 706—710
- 杜 浩, 危起伟, 刘鉴毅等, 2007. 苯酚、 $\text{Cu}^{2+}$ 、亚硝酸盐和总氨氮对中华鲟稚鱼的急性毒性. 大连水产学院学报, 22(2): 118—122
- 邱德全, 周鲜娇, 邱明生, 2008. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾抗病力和副溶血弧菌噬菌体防病效果研究. 水生生物学报, 32(4): 455—461
- 林仕梅, 麦康森, 谭北平, 2007. 菜粕、棉粕替代豆粕对奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)生长、体组成和免疫力的影响. 海洋与湖沼, 38(2): 168—173
- 赵小晶, 孔华庭, 颜进等, 2011. 纳米  $\text{TiO}_2$ 、 $\text{ZnO}$ 、 $\text{SiO}_2$  对剑尾鱼肝组织中  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶活性的影响. 生物学杂志, 28(5): 9—13
- 徐力文, 刘广锋, 王瑞旋等, 2007. 急性盐度胁迫对军曹鱼稚鱼渗透压调节的影响. 应用生态学报, 18(7): 1596—1600
- 郝小凤, 刘 洋, 凌去非, 2012. 氨氮对泥鳅的急性毒性及其对肝、鳃组织超微结构的影响. 水生态学杂志, 33(5): 101—107
- 胡 毅, 黄 云, 钟 蕾等, 2012. 氨氮胁迫对青鱼幼鱼鳃丝  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶、组织结构及血清部分生理生化指标的影响. 水产学报, 36(4): 538—545
- 殷帅文, 林学群, 陈洁辉, 2007. 饥饿以及再充分投喂对鲢鱼血液生化指标的影响. 水产养殖, 28(1): 7—9
- 韩力强, 康现江, 李双石等, 2005. 氨氮对斑马鱼 2 种代谢酶类的影响. 河北大学学报(自然科学版), 25(2): 179—184
- 蒋 玫, 沈新强, 李 磊等, 2011. 氨氮对脊尾白虾幼体存活生长及体内 RNA/DNA 比值的影响. 动物学杂志, 46(4): 102—108
- 潘鲁青, 唐贤明, 刘泓宇等, 2006. 盐度对褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)幼鱼血浆渗透压和鳃丝  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  活力的影响. 海洋与湖沼, 37(1): 1—6
- 廖 静, 谷 浩, 牟 文等, 2011. 硫氰酸钠对斑马鱼毒性的评价. 生态毒理学, 6(1): 43—47
- 谭树华, 何典翼, 严 芳等, 2005. 亚硝酸盐对鲫鱼肝脏丙二醛含量和总抗氧化能力的影响. 农业环境科学学报, 24(S1): 21—24
- Agrahari S, Krishna G, 2008. Inhibition of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) exposed to monocrotophos. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2(92): 57—60
- Benli A C K, KoKsal G, Ozkul A, 2008. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia(*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. Chemosphere, 72(9): 1355—1358
- Bulow F J, 1970. RNA/DNA ratio as indicator of recent growth rate of a fish. Journal Fish Resource Bulletin Canada, 12(27): 2343—2349
- Deane EE, Woo N Y S, 2005. Cloning and characterization of sea bream  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$   $\alpha$  and  $\beta$  subunit genes: In vitro effects of hormones on transcriptional and translational expression. Biochemical and Biophysical Research Communications, 331(4): 1229—1238
- Hirose S, Kaneko T, Naito N *et al*, 2003. Molecular biology of major components of chloride cells. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 136(4): 593—620

- Ishioka H, 1982. Live fish transportation. Series of Fisheries Book 39. KoseshaKosekaku, Tokyo: 52—69
- Lemarie G, Dosdata A, Coves D *et al*, 2004. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, 229(1): 479—491
- Papadimitriou E, Loumbourdis N S, 2002. Exposure of the frog *Rana ridibunda* to copper: Impact on two biomarkers, lipid peroxidation and glutathione. *Bulletin Environment Contaminant Toxicology*, 69(6): 885—891
- Singh A K, Jiang Y. 2002. Immunotoxicity of acute acephate exposure in control or 1L-1-challenged Rats: Correlation between the immune cell composition and corticosteroid concentration in blood. *Applied Toxicology*, 22: 279—291
- Steinhart M, Eckmann R, 1992. Evaluating the nutritional condition of individual whitefish (*Coregonus* spp.) larvae by the RNA/DNA ratio. *Journal of Fish Biology*, 40(5): 791—799
- Therien A G, Blostein R, 2000. Mechanisms of sodium Pump regulation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279(3): 541—566
- Weber L P, Higgins P S, Carlson R I *et al*, 2003. Development and validation of methods for measuring multiple biochemical indicators of condition in juvenile fishes. *Journal of Fish Biology*, 63(3): 637—658

## EFFECT OF AMMONIA STRESS ON IMMUNITY INDICATORS OF JUVENILE *MUGIL CEPHALUS*

JIANG Mei<sup>1</sup>, LI Lei<sup>1</sup>, SHEN Xin-Qiang<sup>1</sup>, WU Qing-Yuan<sup>2</sup>, NIU Jun-Xiang<sup>2</sup>

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

2. Shanghai Ocean University, Shanghai 200336, China)

**Abstract** To evaluate the effects of ammonia on immunity and metabolism of juvenile *Mugil cephalus*, their tissues were exposed to different ammonia levels: 0.35 (natural seawater or control), 0.7, 1.5, and 3.0 mg/L for 20 days and sampled randomly on Days 0, 5, 10, 15, and 20. The results indicate that as the exposure time lasted, malondialdehyde (MDA) content in liver and gill decreased after an initial increase. Ammonia concentration was positively correlated to the MDA content significantly. The relationship of ammonia stress and MDA content in liver and gill is somewhat tissue and sequence specific. The activity of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP in liver and gill decreased after an initial increase with exposure time lasted; and ammonia concentration showed significant negative correlation to Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP activity. The ratio of RNA/DNA in muscle slightly increased but lower than the control except at 3.0 mg/L ( $P>0.05$ ) treatment group. The mRNA expression of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase increased till Day 5, then resumed to the level same as control after Day 20 except for 3.0 mg/L group staying at higher level than the control's. The variation trends of mRNA expression of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase were largely the same to the activity of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP. The results indicate that ammonia-nitrogen stress in a certain concentration for a long time could disturb the antioxidant immune system and nucleic acid metabolism in muscle of juvenile *Mugil cephalus*.

**Key words** ammonia exposure; juvenile *Mugil cephalus*; malondialdehyde(MDA); Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP; ratio of RNA/DNA; mRNA expression