

盐酸四环素浸泡与投喂标记鲢的效果比较 及其浸泡标记对肝脏生理指标的影响*

段必成¹ 张 薪¹ 叶 勤³ 何 春¹
邓华堂² 陈轍聿¹ 李 云^{1①}

(1. 西南大学水产学院 重庆三峡生态渔业产业技术研究院 重庆 400715; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所
农业农村部长江中上游渔业资源环境科学观测实验站 武汉 430233; 3. 西南大学化学化工学院 重庆 400715)

摘要 本研究以淡水天然水体主要放流鱼类鲢鱼种为实验材料, 采用盐酸四环素(TCH)浸泡和药饵投喂两种方式对鲢进行荧光标记, 比较这两种 TCH 处理方法对鲢微耳石的标记效果; 测定 150、250 和 350mg/L 的浓度条件下浸泡 24h 鲢血液转氨酶以及肝脏氧化损伤和抗氧化指标的变化。结果显示, TCH 浸泡处理比投喂处理对耳石的标记效果更好, 在 150—350mg/L 浓度范围内, 浓度越高标记效果越好; TCH 浸泡处理 24h 会引起鲢血清的谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)活性在处理 1d 后显著升高, 2d 后降低到对照水平。肝脏氧化损伤指标丙二醛(MDA)水平, 抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性均呈现先快速极显著升高, 然后下降直至恢复正常水平。表明 TCH 浸泡对鲢肝脏造成了短暂的功能异常和氧化应激胁迫, 但在 2—5d 后即可恢复正常, TCH 浸泡方法是鲢标记放流有效、安全、可靠的方法。本研究结果可为鲢的增殖放流、跟踪监测和效果评估工作提供技术支撑, 为其他鱼类的标记放流提供参考。

关键词 鲢; 荧光标记; 微耳石; 盐酸四环素; 肝脏; 氧化损伤

中图分类号 S931.9 **doi:** 10.11693/hyhz20191200244

人工增殖放流是水生生物资源养护的重要措施, 对放流效果的评价及渔业资源的管理和评估工作需要放流鱼类进行标记, 目前较多使用的挂牌、剪鳍等标记方法存在保留时间短、成本高、操作损伤、标记量小等问题(王茂元等, 2015)。荧光染料标记方法减少了操作损伤, 适用于大规模标记放流。荧光物质标记方法的原理主要是通过用与钙具有亲和性的荧光化合物如盐酸四环素、钙黄绿素、茜素红等使其沉积于鱼类的钙化组织——耳石上以形成在荧光显微镜下可识别的化学标记(Nielsen, 1992)。盐酸四环素(Tetracycline Hydrochloride, TCH)作为荧光标记染料已经使用了近 50 年(Weber *et al.*, 1962), 对太平洋鲑

鱼(*Oncorhynchus* spp.)、美洲西鲱(*Alosa sapidissima*)、白鲢(*Coregonus* sp.)、许氏平鲱(*Sebastes schlegelii*)、斑马鱼(*Danio rerio*)等鱼类耳石的标记效果明显, 荧光标记可维持约 5—24 个月, 最长可保持 3 年半(Weber *et al.*, 1967; Lorson *et al.*, 1987; Yamada *et al.*, 1987; Nagieć *et al.*, 1988; Lü *et al.*, 2014a; 郭鹤等, 2019)。在标记放流过程中, 被标记鱼体所受的胁迫、损伤是影响成活率的关键, 荧光标记是否对标记鱼类机体产生胁迫、损伤及鱼类生理响应等方面需要加强研究。

鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)是我国主要养殖鱼类, 也是内陆河流、湖泊、水库主要增殖放流和渔

* 农业部长江中上游渔业资源环境科学观测实验站开放课题, FRESES201905 号; 重庆市农业农村委员会生态渔产业技术体系岗位专家项目, 40810017 号; 重庆市农业农村委员会增殖放流效果评价项目, JQCG2019-19 号。段必成, 硕士研究生, E-mail: bichengduan@email.swu.edu.cn

通信作者: 李 云, 博士生导师, 教授, E-mail: aquatics@swu.edu.cn

收稿日期: 2019-12-01, 收修改稿日期: 2020-03-07

业捕捞种类(李思发等, 1990; 谢平, 2003; 张永正等, 2018), 人工增殖放流已经成为补充和恢复其天然资源的重要途径(陈文静, 2013; 张永正等, 2018), 对其增殖放流效果的评估对有效了解其资源状况尤为重要。然而, 关于鲢的标记方法及效果报道较少(李小芳等, 2012; 王茂元等, 2015)。为建立一种有效的 TCH 荧光标记鲢耳石的方法, 了解 TCH 标记对鲢肝脏的应激胁迫影响, 本研究首先用显微镜检的方法对 TCH 浸泡与药饵投喂两种荧光标记耳石的方法进行效果比较, 之后用其中一种效果较好的标记方法处理实验鱼, 运用生理生化方法对标记后鲢的肝脏转氨酶和氧化应激指标进行检测, 了解 TCH 标记对鲢肝脏功能的影响情况, 研究结果可为 TCH 标记鲢的可行性及安全性提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

鲢鱼种购于重庆市北碚区歇马鱼场。体长为 17.5—20.0cm, 体重为 80.0—100.0g, 该规格为三峡库区鲢增殖放流常用规格大小。实验鱼缸规格为 220L(养殖水体 100L), 调节室温在 24—28°C, 曝气 2d 的自来水, pH 为 7.5 左右, 光周期为 10h:14h。购回后在恒温室内暂养 7d, 期间按时按量投喂花白鲢粉料, 早晚各一次。之后挑选体质健康鱼种作为实验对象, 在进行正式实验前停食 24h, 为防止饵料对实验的影响, 24h 浸泡实验期间不投喂。

1.2 药饵投喂荧光标记方法及样品处理

先将 TCH(上海生工生物工程公司, 分析纯粉剂)按比例称取与花白鲢粉料混合, 将明胶溶液倒入饲料中搅拌混匀, 再铺开晾干制成粉状药饵饲料。根据预试验, 设置 1 个对照组和 3 个实验组, 实验组 TCH 含量依次为 4%、8%、12%, 各组均设 3 个平行重复组, 每组随机分 20 尾鱼, 投喂养殖密度为 2 尾/10L, 投喂周期为 3d, 每天投喂 2 次。投喂结束后进行常规饲养, 每天定时投喂两次, 换水一次, 每次换水三分之一。

在药饵投喂处理后于第 10、22d 进行取样, 每次均在每个重复组随机选取 3 尾鱼, 每个投喂组共取 9 尾鱼, 根据本实验室前期研究发现 TCH 标记微耳石效果更好(郭鹤等, 2019), 解剖取出不同 TCH 含量下的鲢微耳石(lapillus), 清洗后用配有数码照相机(Leica DFC 495)的倒置荧光显微镜(Leica DMIL LED)5 倍物镜下观察荧光标记并拍照, 标记质量判断参照欧阳斌等(1999)的方法。

1.3 荧光浸泡标记方法及样品处理

先将 TCH(上海生工生物工程公司, 分析纯粉剂)溶于蒸馏水中, 配制成 2g/L 的母液, 然后用母液加曝气的自来水稀释配制成不同浓度的浸泡液。根据预实验, 设置 1 个对照组和 3 个实验组, 实验组 TCH 浓度依次为 150、250、350mg/L, 所有组均设 3 个平行重复组, 每组随机分 20 尾鱼, 浸泡密度为 2 尾/10L, 浸泡时间为 24h。浸泡结束后将鱼转移至正常水体中饲养, 每天定时投喂两次, 换水一次, 每次换水三分之一。浸泡处理后第 1、2、5、10、22d, 每次均在每个平行重复组随机选取 3 尾鱼, 每个浓度组共取 9 尾鱼, 用浓度为 0.2g/L 的 MS-222 快速麻醉, 尾静脉采血, 然后在冰盘上剥离出肝脏用液氮速冻并称重, -80°C 保存待测。抽取的血样在 4°C 静置 2—4h 后, 用冷冻离心机(4°C)以 3000r/min 离心 10min, 吸取上清液待测。同时在浸泡处理后于第 10、22d 分别解剖取出不同浓度下的鲢微耳石(lapillus), 显微镜检方法同 1.2。

1.4 浸泡荧光标记生化指标测定

将离心所得血清分别取 500 μ L 装于 5mL 离心管中, 用试剂盒测定血清生化指标谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)的活性(四川省新成生物科技有限公司)。取出冻存的肝脏, 按照质量体积比 1:9 加入生理盐水, 置于冰上充分匀浆后, 用冷冻离心机(4°C)以 3000r/min 离心 10min, 取上清液, 用试剂盒测定肝脏超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)、总蛋白(TP)含量(南京建成生物工程公司)。

1.5 数据分析

实验数据用 SPSS18.0 进行统计分析, 采用单因素方差分析法(One-Way ANOVA)进行分析, 最小极差法(LSD)比较组间差异, Microcal Origin6.0 作图处理, 实验结果用平均值 $\pm$ 标准偏差(Mean $\pm$ SD)表示, $P<0.05$ 时表示有显著性差异, $P<0.01$ 时表示有极显著性差异。

2 结果

2.1 TCH 药饵投喂荧光标记效果

TCH 药饵投喂处理 3d, 4%、8%、12%含量的鲢鱼种在投喂过程中及投喂后 22d, 均无死亡个体, 摄食及活动能力与对照组无明显区别。在蓝色激发光 I_3 下观察投喂结束后第 10、22d 的鲢微耳石, 标记率为 100%。但是同一观测时间点, 随着药饵 TCH 含量升

高, 微耳石上的荧光强度变化不规律, 标记效果不稳定(图 1)。

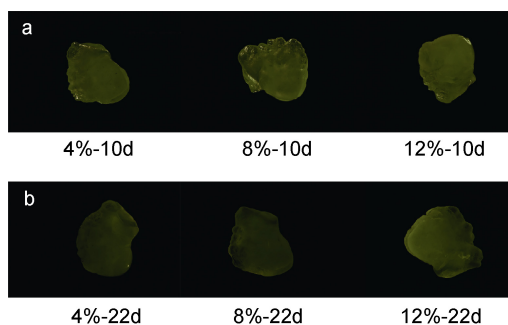


图 1 不同含量 TCH 药饵投喂 3d 微耳石(lapillus)荧光照片(放大 5 倍)

Fig.1 The fluorescent photographs of lapillus with different dosed TCH diets feeding for 3d (5 times)

注: a. 投喂后第 10d; b. 投喂后第 22d

2.2 TCH 浸泡荧光标记效果

TCH 溶液浸泡处理 24h, 150、250、350mg/L 浓度中的鲢鱼种在浸泡过程中及浸泡后 22d, 均无死亡个体, 摄食及活动能力与对照组无明显区别。在蓝色激发光 I_3 下观察浸泡结束后第 10d、22d 的鲢微耳石, 标记率 100%。同一时间下, TCH 浸泡液浓度越高, 微耳石上的荧光标记强度越高, 标记效果越好, 350mg/L 组标记效果最明显(图 2)。

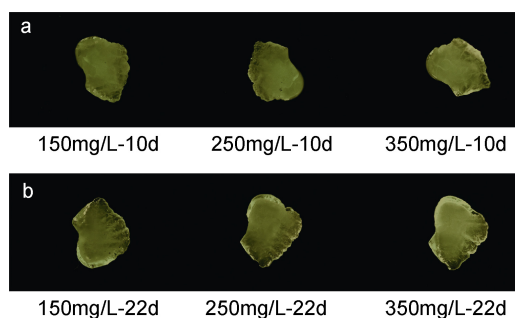


图 2 不同浓度 TCH 浸泡 24h 微耳石(lapillus)荧光照片(放大 5 倍)

Fig.2 The fluorescent photograph of lapillus with different-concentration TCH immersion for 24h (5 times)

注: a. 浸泡后第 10d; b. 浸泡后第 22d

2.3 TCH 浸泡标记鲢血清转氨酶活性变化

2.3.1 血清 ALT 酶活性的变化 TCH 浸泡处理后的第 1d, 各浓度组 ALT 活性与对照组[(23.43±3.69)U/L]相比分别极显著升高至(32.15±1.96)、(32.71±5.92)和(41.75±4.50)U/L ($P<0.01$)。第 2d 150mg/L 浓度组 ALT 活性下降至对照组水平[(23.39±2.74)U/L], 250mg/L

和 350mg/L 浓度组 ALT 活性仍有极显著升高, 第 5d 之后虽有波动, 但均与对照组无显著差异, 直至处理后第 22d(图 3)。

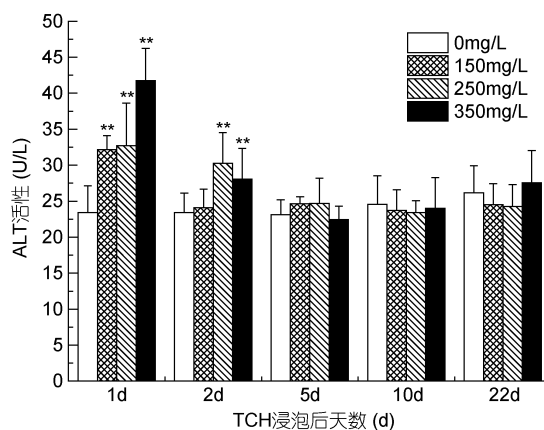


图 3 TCH 24h 浸泡处理对鲢血清谷丙转氨酶(ALT)活性的影响($n=9$)

Fig.3 Effect of TCH 24h immersion on serum alanine aminotransferase (ALT) activity in silver carp ($n=9$)

注: 与对照组比较, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$

2.3.2 血清 AST 活性的变化 TCH 浸泡处理后第 1d, 250mg/L 和 350mg/L 浓度组 AST 活性与对照组[(83.00±5.11)U/L]相比极显著升高至(97.98±3.59)U/L 和(115.08±3.72)U/L ($P<0.01$), 150mg/L 浓度组出现略微降低, 但差异不显著, AST 与 ALT 同为反映肝功能状况的指标, 其变化趋势与 ALT 基本一致。处理后第 2d 除 250mg/L 浓度组外, 其他组 AST 活性出现下降, 在第 5d 降至与对照组水平[(85.88±6.09)U/L]无显著差异(图 4)。

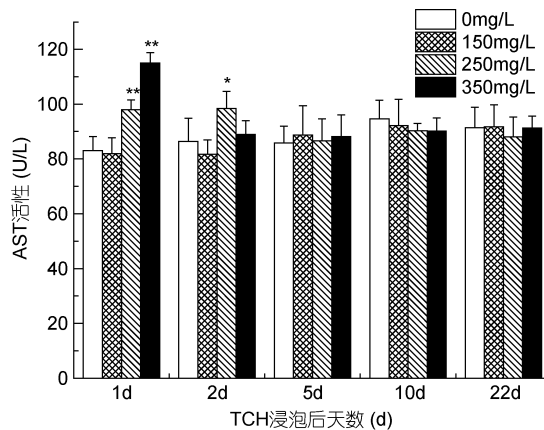


图 4 TCH 24h 浸泡处理对鲢血清谷草转氨酶(AST)活性的影响($n=9$)

Fig.4 Effect of TCH 24h immersion on serum aspartate aminotransferase (AST) activity in silver carp ($n=9$)

注: 与对照组比较, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$

2.4 肝脏 MDA 含量和抗氧化酶活性变化

2.4.1 肝脏 MDA 含量的变化 TCH 浸泡后第 1d, 各浓度组与对照组氧化损伤指标 MDA 含量 $[(276.78 \pm 29.23) \text{ nmol/mg prot}]$ 相比分别极显著升高至 (438.11 ± 61.15) 、 (472.25 ± 27.98) 和 $(548.51 \pm 18.97) \text{ nmol/mg prot}$ ($P < 0.01$), 但在第 2d MDA 含量即开始出现大幅度下降, 均极显著低于 $(279.27 \pm 18.79) \text{ nmol/mg prot}$ 的对照组含量 ($P < 0.01$), 从第 2d 到第 10d, 期间除 10d 时 150mg/L 浓度组 MDA 最先恢复到与对照组 $(209.44 \pm 26.74) \text{ nmol/mg prot}$ 无显著差异外, 到第 22d 各浓度组均恢复到与对照组 $[(240.33 \pm 13.82) \text{ nmol/mg prot}]$ 无显著差异 (图 5)。

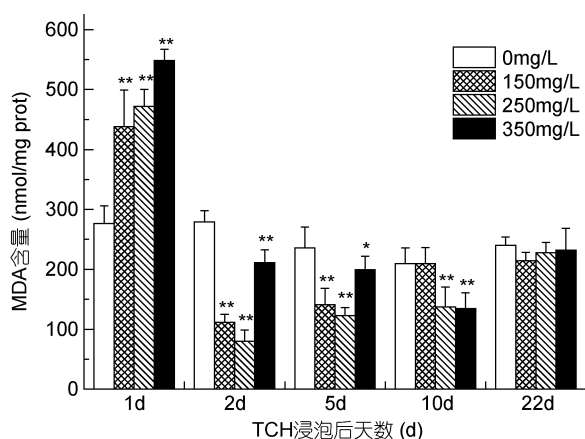


图 5 TCH 24h 浸泡处理对鲢肝脏丙二醛(MDA)含量的影响($n=9$)

Fig.5 Effect of TCH 24h immersion on liver malondialdehyde (MDA) content in silver carp ($n=9$)

注: 与对照组比较, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$

2.4.2 肝脏 SOD 活性的变化 TCH 浸泡处理后第 1d, 150mg/L 浓度组 SOD 活性与对照组 $[(403.26 \pm 25.76) \text{ U/mg prot}]$ 相比, 显著升高至 $(561.86 \pm 39.71) \text{ U/mg prot}$ ($P < 0.05$), 250 和 350mg/L 浓度组 SOD 活性极显著升高至 (574.25 ± 63.36) 和 $(583.96 \pm 64.17) \text{ U/mg prot}$ ($P < 0.01$), 标记后第 2d 除 150mg/L 组外, 其余两组 SOD 活性与对照组 $[(395.62 \pm 52.93) \text{ U/mg prot}]$ 无显著差异, 从第 5—22d 各组均恢复至与对照组无显著差异的水平 (图 6)。

2.4.3 肝脏 CAT 活性的变化 TCH 浸泡后第 1d, 150mg/L 浓度组 CAT 活性与对照组 $[(20.48 \pm 2.88) \text{ U/mg prot}]$ 相比, 显著升高至 $(26.52 \pm 0.93) \text{ U/mg prot}$ ($P < 0.05$), 250mg/L 浓度组 CAT 活性与对照组相比极显著升高至 $(39.18 \pm 4.03) \text{ U/mg prot}$ ($P < 0.01$), 350mg/L 浓度组略有升高, 但不显著, CAT 是与 SOD 相关联的

抗氧化酶, 本实验中其活性变化趋势与 SOD 基本一致; 在第 2d CAT 活性下降至与对照组水平 $[(23.60 \pm 2.82) \text{ U/mg prot}]$ 无显著差异, 其中 350mg/L 浓度组例外, CAT 活性在第 2d 下降到 $(13.66 \pm 2.74) \text{ U/mg prot}$, 极显著低于对照组 ($P < 0.01$), 到第 5d 至 22d 各浓度组均与对照组水平 $[(24.95 \pm 3.86) \text{ U/mg prot}]$ 无显著差异 (图 7)。

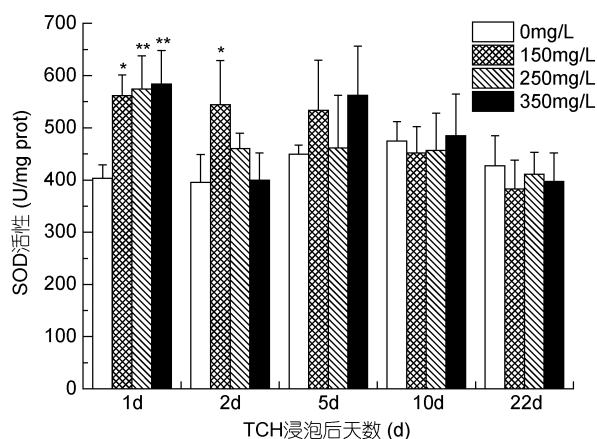


图 6 TCH 24h 浸泡处理对鲢肝脏超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响($n=9$)

Fig.6 Effect of TCH 24h immersion on liver superoxide dismutase (SOD) activity in silver carp ($n=9$)

注: 与对照组比较, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$

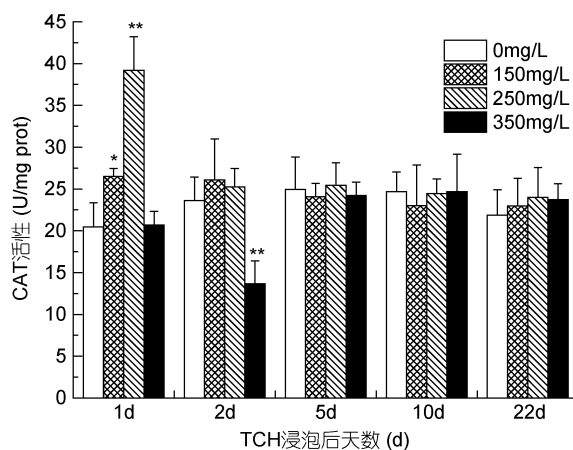


图 7 TCH 24h 浸泡处理对鲢肝脏过氧化氢酶(CAT)活性的影响($n=9$)

Fig.7 Effect of TCH 24h immersion on liver catalase (CAT) activity in silver carp ($n=9$)

注: 与对照组比较, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$

3 讨论

3.1 TCH 荧光标记鲢耳石的效果

荧光标记能够较好地用于短时间、大规模标记鱼类 (耿倩等, 2016), TCH 作为荧光物质已经在鱼类的

标记放流中使用了近 50 年, 标记效果稳定可靠 (Weber *et al.*, 1962)。对 TCH 标记的鱼类耳石目前多采用紫外激发光和蓝色激发光进行观察(何春林等, 2008; 郭鹤等, 2019), 根据本实验室前期斑马鱼的荧光浸泡标记研究结果(郭鹤等, 2019), 本研究采用蓝色激发光 I_3 进行鲢鱼种微耳石的荧光标记效果鉴定, 结果在 TCH 各浓度组浸泡的鲢微耳石上均检测到黄绿色荧光及标记轮, 并且随着浸泡浓度增加, 耳石上的荧光强度也越明显, 其中 350mg/L 浓度的 TCH 溶液浸泡标记效果最明显。

药饵投喂的各含量组鲢微耳石虽然可以被 TCH 标记, 但标记在荧光显微镜下观察到的效果不稳定, 标记效果在不同个体之间差异较大, 原因有几个方面。一方面, 鲢虽然是滤食性鱼, 但是食道对食物团的吞咽是主动的, 饲料中添加 TCH 可能导致适口性下降, 导致摄食减少; 另一方面, 不同个体间在摄食量和肠道吸收上会有差异, 这些因素综合叠加导致标记的均一性较差, 很难在同批次标记鲢的耳石上形成稳定的荧光标记。比较两种不同标记方式, 浸泡方式操作方便, 被标记鱼是被动吸收, 结果均一, 因此, 本研究结果表明, 浸泡方式比药饵投喂更适合对鲢鱼种进行荧光标记。

在使用荧光物质标记放流鱼类时, 要综合考虑荧光染料的成本、浸泡浓度、标记效果、对标记鱼类的安全性及标记可保持时间等多方面因素(Taylor *et al.*, 2005)。有研究表明四环素类荧光标记最长可保持 3 年半(Lorson *et al.*, 1987; Yamada *et al.*, 1987), 由此推断 TCH 标记鲢也可长时间保持沉积在骨质的耳石中。此外, TCH 与茜素络合物、钙黄绿素和茜素红 S 等其他荧光染料相比, 短时间可代谢的抗生素, 不会长时间残留在鱼体(徐维海等, 2004), 食用是安全的。此外, 作为抗生素还可以预防或治疗放流操作过程所致的损伤感染, 减少标记放流所造成的死亡。综合分析, 对应激反应强, 操作易受损伤的鲢, TCH 荧光浸泡标记是一种较优选择。

3.2 TCH 浸泡标记对鲢肝功能的可逆性影响

TCH 作为荧光染料浸泡标记鲢鱼种, 有较好的标记效果, 但是作为一种抗生素通过鳃、皮肤和消化道吸收难免会对标记鱼体造成一定的生理影响。血清转氨酶 AST 和 ALT 是广泛存在于动物组织细胞线粒体内的重要氨基转移酶, 在机体蛋白质代谢中起着重要的作用, 其变化能反映肝脏的损伤程度(De La Torre *et al.*, 1999, 2000)。本研究为了解 TCH 对鲢肝功

能的影响, 检测了血清两种转氨酶 AST 和 ALT 活性, 结果显示在 TCH 浸泡后 1d, 150、250、350mg/L 三个浓度组鲢的血清转氨酶均出现急性升高, 表明 TCH 浸泡对鲢造成急性肝功能损伤。但是 AST 和 ALT 的活性在浸泡后 2—5d 即很快就恢复正常。文献报道, 茜素红 S 浸泡中华倒刺鲃引起的转氨酶活性升高需要 10d 后方可恢复正常水平(霍来江, 2015), 此外, 四环素类药物在吉富罗非鱼体内的消除半衰期为 24h 左右(徐维海等, 2004), 本研究表明 TCH 浸泡可能会造成鲢鱼种肝功能短期急性损伤, 但这种损伤是可逆的, 随着 TCH 从鱼体代谢清除, 鱼体在短时间内可自行恢复, 不会造成永久损伤。

3.3 TCH 浸泡标记对鲢肝脏的氧化损伤和抗氧化酶的保护作用

化学药物浸泡对水生生物的影响是显著的, 用于防治病害在水产养殖上广泛应用的抗生素类药物, 其施用会引起鱼体的氧化应激, 使机体内产生大量活性氧自由基(ROS)(Bomzon *et al.*, 2001; 李兆新等, 2017), 当机体内 ROS 的含量快速增加超过机体的清除能力时, 就会对机体造成应激损伤, 引起细胞脂质过氧化、酶失活、DNA 损伤等反应, 使组织细胞代谢失调, 机体随之发生进行性的生理和病理改变(Livingstone *et al.*, 1990; Palace *et al.*, 1998)。MDA 是细胞脂质氧化的代谢产物, 它反映了机体受氧化损伤的程度(Benli *et al.*, 2008)。本研究结果显示不同浓度的 TCH 浸泡后 1d 就导致了肝脏 MDA 呈浓度依赖的极显著升高, 表明鲢肝脏受到氧化损伤, 与此同时, 也检测到肝脏两种抗氧化酶 SOD 和 CAT 的活性也在同一时间呈浓度依赖的极显著升高, 这是由于 SOD 和 CAT 是动物体内主要的抗氧化酶, 它们通过协同作用保持细胞和机体的正常生理活动, 当 TCH 浸泡对肝脏造成氧化损伤时, 鲢肝细胞会大量合成 SOD 和 CAT 等抗氧化酶清除细胞内氧化应激产生的多余 ROS。只有 350mg/L 浓度组的 CAT 活性出现下降, 推测可能是由于 CAT 酶对过高浓度 TCH 敏感而受到抑制所致。据文献报道, 茜素红 S 浸泡中华倒刺鲃, 钙黄绿素浸泡标记刺参, TCH 浸泡斑马鱼也得到了类似的结果(赵鹏等, 2011; 霍来江, 2015; 郭鹤等, 2019)。此外, 研究发现使用钙黄绿素和茜素络合物联合标记中华倒刺鲃, TCH 浸泡标记许氏平鲈, 钙黄绿素和茜素红 S 浸泡标记许氏平鲈都可获得良好的标记效果并且不会明显影响其生存和生长, 这与本研究的结果也是一致的(Lü *et al.*, 2014a, b, 2017)。鲢

在处理 2—5d 后抗氧化酶活性逐渐恢复到正常水平, 同样是 TCH 处理的斑马鱼则需要 9d 才恢复正常水平。本研究结果显示, 肝脏 MDA 在急性升高后的第 2d 就极显著下降低于对照组, 直至第 10—22d 逐渐恢复正常水平, 表明了鲢抗氧化系统有效而快速地清除肝细胞脂质氧化的代谢产物这一过程。结果表明 TCH 浸泡造成了鲢肝脏急性氧化应激, 但鱼体通过自身抗氧化系统的调节可以有效避免应激导致的永久损伤。因此不会影响鲢的野外存活, 这种标记对鲢是安全的。

4 结论

综上, 采用 TCH 浸泡标记鲢微耳石的方法比药饵投喂荧光标记的效果更好, 更方便操作。350mg/L 的 TCH 溶液可以作为鲢鱼种浸泡标记的参考浓度; 150—350mg/L 的 TCH 溶液浸泡会导致鲢的肝功能短暂异常, 表现为血清转氨酶急性升高和氧化应激指标上升, 但这种肝脏应激损伤可在短时间恢复正常, 表明 TCH 浸泡方法是鲢标记放流的有效、安全、可靠的方法。本研究结果可为鲢的增殖放流、跟踪监测和效果评估工作提供技术支撑, 为其他鱼类的标记放流提供参考。

参 考 文 献

- 王茂元, 黄洪贵, 赖铭勇等, 2015. 鲢鱼增殖放流标志技术研究. 江苏农业科学, 43(9): 261—263
- 李小芳, 程晓凤, 王 生等, 2012. 鲢微卫星标记的荧光多重 PCR 体系建立及其应用. 农业生物技术学报, 20(7): 822—830
- 李兆新, 董 晓, 孙晓杰等, 2017. 渔业养殖环境中抗生素残留检测与控制技术研究进展. 食品安全质量检测学报, 8(7): 2678—2686
- 李思发, 陆伟民, 周碧云等, 1990. 长江、珠江、黑龙江鲢、鳙、草鱼渔业资源状况. 淡水渔业, (6): 15—20
- 何春林, 付自东, 严太明等, 2008. 用荧光物质浸泡标记重口裂腹鱼仔鱼耳石. 四川动物, 27(3): 331—334
- 张永正, 郑善坚, 张婉萍, 2018. 钱塘江鱼类资源人工增殖放流效果评价. 浙江师范大学学报(自然科学版), 41(1): 97—101
- 陈文静, 张燕萍, 段辛斌等, 2013. 基于线粒体控制区全序列的鄱阳湖水系鲢增殖放流群体与野生群体的遗传多样性分析. 中国农学通报, 29(35): 89—95
- 欧阳斌, 常剑波, 1999. 荧光物质浸泡标记稀有鮡鲫和彭泽鲫仔、稚鱼. 水生生物学报, 23(4): 324—349
- 赵 鹏, 杨红生, 王晓宇等, 2011. 钙黄绿素标记刺参的效果及其对刺参抗氧化酶活力的影响. 水产学报, 35(3): 372—378
- 耿 倩, 张淑荣, 段 妍等, 2016. 荧光标记技术在增殖放流中的应用现状. 水产科学, 35(3): 308—312
- 徐维海, 林黎明, 朱兆斌等, 2004. 四环素类抗菌药物在吉富罗非鱼体内的代谢动力学研究. 水产科学, 23(3): 1—3
- 郭 鹤, 徐莉佳, 叶 勤等, 2019. 盐酸四环素标记斑马鱼耳石效果及对抗氧化力的影响. 淡水渔业, 49(2): 33—38
- 谢 平, 2003. 鲢、鳙与藻类水华控制. 北京: 科学出版社, 13—16
- 霍来江, 2015. 茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼的染色效果以及对其氧化应激响应. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 26—53
- Benli A Ç K B, Köksal G, Özkul A *et al*, 2008. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): effects on gill, liver and kidney histology. Chemosphere, 72(9): 1355—1358
- Bomzon A, Ljubuncic P, 2001. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell function in liver disease. Pharmacology & Therapeutics, 89(3): 295—308
- De La Torre F R, Salibián A, Ferrari L, 1999. Enzyme activities as biomarkers of freshwater pollution: responses of fish branchial (Na⁺K)-ATPase and liver transaminases. Environmental Toxicology, 14(3): 313—319
- De La Torre F R, Salibián A, Ferrari L, 2000. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. Environmental Pollution, 109(2): 277—282
- Livingstone D R, Martinez P G, Michel X *et al*, 1990. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. Functional Ecology, 4(3): 415—424
- Lorson R D, Mudrak V A, 1987. Use of tetracycline to mark otoliths of American shad fry. North American Journal of Fisheries Management, 7(3): 453—455
- Lü H J, Chapelsky A, Zhang Z X *et al*, 2017. Can calcein and alizarin complexone be used for double immersion marking of juvenile qingbo *Spinibarbus sinensis*?. Fisheries Science, 83(5): 767—776
- Lü H J, Zhang X M, Fu M *et al*, 2014a. Use of tetracycline hydrochloride and alizarin complexone for immersion marking black rockfish *Sebastes schlegelii*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 32(4): 810—820
- Lü H J, Zhang X M, Xi D *et al*, 2014b. Use of calcein and alizarin red S for immersion marking of black rockfish *Sebastes schlegelii* juveniles. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 32(1): 88—98
- Nagić M, Dąbrowski K, Nagieogoéa C *et al*, 1988. Mass-marking of coregonid larvae and fry by tetracycline tagging of otoliths. Aquaculture Research, 19(2): 171—178
- Nielsen L A, 1992. Methods of Marking Fish and Shellfish. New York: American Fisheries Society, 23
- Palace V P, Brown S B, Baron C L *et al*, 1998. An evaluation of the relationships among oxidative stress, antioxidant vitamins and early mortality syndrome (EMS) of lake trout (*Salvelinus namaycush*) from Lake Ontario. Aquatic Toxicology, 43(2—3): 195—208
- Taylor M D, Fielder D S, Suthers I M, 2005. Batch marking of otoliths and fin spines to assess the stock enhancement of *Argyrosomus japonicus*. Journal of Fish Biology, 66(4): 1149—1162
- Weber D D, Ridgway G J, 1962. The deposition of tetracycline

drugs in bones and scales of fish and its possible use for marking. *The Progressive Fish-Culturist*, 24(4): 150—155

Weber D, Ridgway G J, 1967. Marking pacific salmon with tetracycline antibiotics. *Journal of the Fisheries Research*

Board of Canada, 24(4): 849—865

Yamada S B, Mulligan T J, 1987. Marking nonfeeding salmonid fry with dissolved strontium. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(8): 1502—1506

EFFECTIVENESS COMPARISON OF TETRACYCLINE IMMERSING AND FEEDING TO MARK SILVER CARP (*HYPOPHthalmichthys molitrix*) AND PHYSIOLOGICAL IMPACTS ON LIVER

DUAN Bi-Cheng¹, ZHANG Xin¹, YE Qin³, HE Chun¹,
DENG Hua-Tang², CHEN Zhe-Yu¹, LI Yun¹

(1. College of Fisheries, Institute of Three Gorges Ecological Fisheries of Chongqing, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Fishery Resources and Environmental Science Experimental Station of The Upper-Middle Reaches of Yangtze River Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangtze River Fisheries Research institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) were treated with tetracycline hydrochloride (TCH) by immersing and feeding for fluorescence labeling. The labeling effects of TCH treatments by immersing and feeding on lapillus of the silver carp were compared. Variations of the blood transaminase, liver oxidative damage, and antioxidant index of the silver carp were measured after 24h immersing at concentrations of 150, 250, and 350mg/L. Results show that the effect of TCH immersing was better than that of feeding. In the concentration range of 150—350mg/L, the higher the concentration, the better the labeling effect. The activities of aspartate transaminase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in the serum increased significantly after one day of TCH treatment, and decreased to the level of the control after two days. In addition, the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) in liver oxidative damage index increased rapidly and significantly at first, then decreased to normal level. Results show that the TCH immersing resulted in temporary dysfunction and oxidative stress in the liver, but the situation could return to normal after 2—5 days. Overall, the TCH immersing method was an effective, safe, and reliable method for labeling silver carp. The results of this study provides technical support for the stock enhancement and releasing, monitoring and evaluation of silver carp, and reference for other fish marker releasing.

Key words silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*); fluorescent labeling; lapillus; tetracycline hydrochloride; liver; oxidative damage