

美洲鲈应激后皮质醇激素和血液生化指标的变化*

杜浩^{①②} 危起伟^{①②*} 甘芳^{①②} 刘鉴毅^① 陈细华^① 杨德国^①

(^①农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室,中国水产科学研究院长江水产研究所 荆州 434000;

^②中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 无锡 214081)

摘要:比较了美洲鲈(*Alosa sapidissima*) 1龄幼鱼因环境改变和运输引起的血清皮质醇激素浓度和血液生化指标变化。结果表明,美洲鲈转入较小容器中后血清皮质醇含量迅速增加到对照组(2.05 ± 1.48) ng/ml, $n = 10$ 的10倍左右。运输2 h后美洲鲈血清皮质醇激素含量(41.97 ± 17.92) ng/ml, $n = 9$ 比运输前显著上升20倍左右。2 h运输后总蛋白、白蛋白、谷丙转氨酶、碱性磷酸酶、 Ca^{2+} 比对照组极显著增加($P < 0.01$),白球比和乙酸胆碱酯酶、血糖、 K^+ 显著增加($P < 0.05$),谷草转氨酶和乳酸脱氢酶无显著变化($P > 0.05$), Cl^- 显著低于对照组($P < 0.01$)。血液指标明显变化表明美洲鲈运输应激后,心脏和肝脏等组织一定程度受损,可能导致了较高的死亡率。

关键词:美洲鲈 皮质醇 血液生化指标 应激

中图分类号 S917.4, Q494 文献标识码:A 文章编号 0250-3263(2006)03-80-05

Changes in Serum Cortisol and Blood Biochemical Parameters after Stress in American Shad

DU Hao^{①②} WEI Qi-Wei^{①②} GAN Fang^{①②} LIU Jian-Yi^① CHEN Xi-Hua^① YANG De-Guo^①

(^①Key Lab of Freshwater Fish Germplasm Resources and Biotechnology, Ministry of Agriculture,

Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Jingzhou 434000;

^②Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fisheries Science, Wuxi 214081, China)

Abstract: Changes in cortisol and blood biochemical parameters in 1 year old *Alosa sapidissima* to stress provoked by environment changes and 2 h transport were investigated. The results showed that serum cortisol increased 10 times than the control [(2.05 ± 1.48) ng/ml, $n = 10$] after the fish were transferred into smaller containers. Serum cortisol in fish after 2 h transport [(41.97 ± 17.92) ng/ml, $n = 9$] was 20 times higher than the control. Serum total protein, albumin, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase and Ca^{2+} in fish after 2 h transport were significantly higher than the control ($P < 0.01$). Albumin to globulin ration, serum acetylcholine esterase, glucose, and K^+ were significantly higher than the control ($P < 0.05$). Serum Cl^- was significantly lower than the control ($P < 0.01$). Serum lactate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in fish after 2 h transport were not significantly different from the control ($P > 0.05$). The changes in blood biochemical parameters indicate that the heart or liver of the American shad has been harmed to a certain extent, which may be the reason of high mortality after long-distance transport.

基金项目 农业部“948”引进先进农业科学技术项目(No.993121);

* 通讯作者;

第一作者介绍 杜浩,男,硕士,主要从事鱼类生态学研究;E-mail: duhao@yfi.ac.cn.

收稿日期 2005-09-23, 修回日期 2006-02-28

Key words : *Alosa sapidissima* ; Cortisol ; Blood biochemical parameter ; Stress

美洲鲈(*Alosa sapidissima*)隶属于鲱形总目、鲱形目、鲱科、西鲱属。它同中国鲈鱼(*Tenualosa reevesii*)和印度云鲈(*T. ilisha*)等都是名贵的鲈亚科鱼类,具有重要的经济价值。中国鲈鱼目前已经濒临灭绝,仅在珠江发现少量幼鱼^[1]。国内从 2000 年开始引进美洲鲈鱼受精卵进行孵卵驯养试验,到 2003 年取得一定的成功,但是伴随着美洲鲈的生长发育,美洲鲈的仔、幼鱼都表现出对光、声、人工操作等明显的应激反应,严重制约了美洲鲈苗种培育成活率的提高。同中国鲈鱼一样,美洲鲈显示了鲱科鱼类苗种长途运输难的问题^[2],这已经成为美洲鲈规模化养殖和产业化的技术瓶颈。血浆或血清中的皮质醇激素含量随应激强度呈现规律性变化,从而被广泛用来衡量应激水平的重要指标^[3,4]。血液理化指标也能很好地反映机体生理状态,并用于鱼体病理的诊断^[5,6]。因此,文章对美洲鲈应激反应后血液皮质醇激素指标和血液生化指标的变化进行了研究,探讨了养殖生产和运输中刺激因子导致的高死亡率的原因,为养殖生产提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 试验鱼 试验用鱼是长江水产研究所 2003 年 7 月首次规模化驯养成功的美洲鲈。选择体长为(24.4 ± 1.8) cm、体重为(246.5 ± 27) g 的 1+ 龄健康无病害的鱼,共 34 尾。试验鱼在实验前 24 h 停止喂食。

1.2 实验设计 对照组 将美洲鲈从养殖池中捞取迅速放入 200 mg/L MS-222 中,在 30 s 内深度麻醉(以便不影响血清皮质醇含量的测定^[7]),采集血样用于基础血液指标测定,重复测定 10 尾鱼的基础指标。

环境应激刺激 :从养殖池中用塑料袋网捕捞后,转入聚乙烯白桶,每个白桶中转入美洲鲈 5 尾,共 3 个桶。分别用于测试在白桶中 0.5 h、1 h、4 h 后的美洲鲈血清皮质醇和血糖含量。评价美洲鲈幼鱼对活动空间等环境改变后的应

激情况。

运输应激刺激 :用自制塑料袋网捞取美洲鲈 3 尾放入盛水 15 L 的塑料袋中,充入纯氧、打包,用皮卡车运输 2 h,运输 3 包,共 9 尾鱼。

1.3 血液样品的制备 用 5 ml 注射器 8 号针从尾静脉采集试验鱼的血液,全血不加抗凝剂于 4℃ 下放置 2 h,待血液明显分层后以 2 000 r/min 离心 30 min 后分离,收集血清,放于 -18℃ 低温冰箱中暂存,用于血液生化指标和血清皮质醇激素含量的测定。

1.4 血清皮质醇含量测定 采用放射免疫分析法^[8],在国营二六二厂生产 XH-6020 型 γ 放射免疫计数器中检测。试剂盒是通过代理邮购美国 DIASORIN 公司生产的¹²⁵I 放射免疫试剂盒。

1.5 血液生化指标的测定 所有生化指标在奥林帕斯(OLYMPUS)Au600 全自动生化分析仪上完成^[9]。血液生化指标测定方法见周玉等^[10]。每批血样皮质醇含量指标测定在 4 h 内完成,血液生化指标在 24 h 内完成。

1.6 数据分析 实验数据由 SPSS 11.5 程序包进行生物学统计,用 *t*-检验应激后各指标显著性变化。 $P < 0.05$,差异显著; $P < 0.01$,差异极显著。

2 结 果

2.1 环境应激后美洲鲈血清皮质醇和血糖含量的变化 将美洲鲈从养殖池转移到白桶中后,有的鱼能够绕着桶壁游动,有的鱼则时常有冲撞桶壁的行为,随着冲撞桶壁行为的持续,有的鱼会出现背部变红的现象,进而导致其头部出血。通过血清皮质醇含量的测定表明,放入桶中 0.5 h 后,血清皮质醇迅速升高,是对照组的 10 倍左右。随后由于对水体一定的适应后,1 h 后皮质醇含量有所下降。然而,由于长时间的应激积累,4 h 后的血清皮质醇含量又升高,由初始值(2.05 ± 1.48) ng/ml 迅速上升到(25.75 ± 11.80) ng/ml,平均为初始值的 12 倍左右(图 1)。

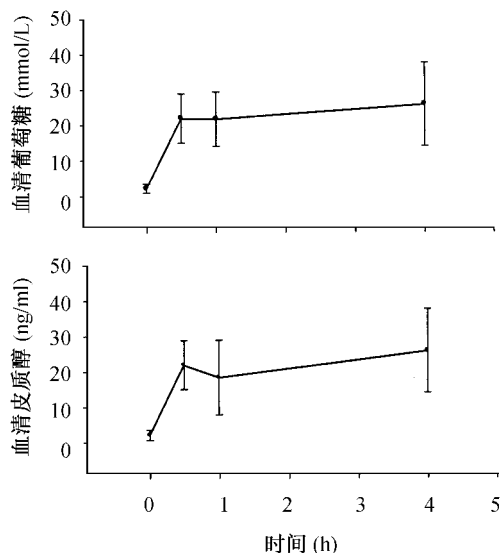


图 1 美洲鲈在桶中血清皮质醇及血糖随时间的变化($\bar{X} \pm SD$, $n = 5$)

血糖含量的变化呈现出与皮质醇一致的趋势。

2.2 运输应激后美洲鲈血清皮质醇和血液生化指标的变化 皮卡车运输过程中时速平均在 60~70 km/h 左右。运输后水温由 18.6℃ 上升到 19.4℃。2 h 运输后有的鱼头部、鳍基部出现了充血现象。鱼在运输的过程中,鱼在氧气袋中水波的动荡下显得烦躁不安,游动激烈,用头不停地冲撞袋壁。经 2 h 运输后,鱼血清皮质醇含量明显高于运输前的水平($P < 0.05$)。运输鱼在 2 h 运输应激刺激下,血清皮质醇含量由初始的(2.05 ± 1.48)ng/ml 迅速上升到 (41.97 ± 17.92)ng/ml,平均为运输前的 20 倍左右(表 1)。

对 2 h 运输应激后的美洲鲈血清蛋白和酶活性的测定表明,运输组与对照组(运输前)存

表 1 美洲鲈运输前和运输后血清皮质醇和生化指标的变化($\bar{X} \pm SD$)

项目	对照组($n = 10$)	运输组($n = 9$)
皮质醇 (ng/ml)	2.05 ± 1.48	$41.97 \pm 17.9^*$
总蛋白 (g/L)	41.17 ± 6.55	$62.02 \pm 3.91^{**}$
白蛋白 (g/L)	17.23 ± 2.20	$23.63 \pm 0.87^{**}$
球蛋白 (g/L)	23.93 ± 4.35	$38.38 \pm 3.05^{**}$
白球比	0.72 ± 0.04	$0.60 \pm 0.03^*$
谷草转氨酶 (IU/L)	865.00 ± 373.12	$1\ 271.50 \pm 215.92$
谷丙转氨酶 (IU/L)	88.67 ± 37.54	$202.00 \pm 32.14^{**}$
碱性磷酸酶 (IU/L)	27.33 ± 2.31	$41.00 \pm 7.21^{**}$
乳酸脱氢酶 (IU/L)	$1\ 794.33 \pm 545.89$	2283.33 ± 607.87
乙酰胆碱酯酶 (IU/L)	$5\ 478.00 \pm 1\ 899.16$	$9\ 528.00 \pm 1\ 042.40^*$
血糖 (mmol/L)	5.56 ± 0.46	$9.24 \pm 2.23^*$
甘油三酯 (mmol/L)	4.61 ± 1.00	5.80 ± 1.15
总胆固醇 (mmol/L)	5.58 ± 1.66	6.62 ± 0.21
Na^+ (mmol/L)	169.67 ± 1.53	172.67 ± 1.53
K^+ (mmol/L)	1.20 ± 0.29	$2.39 \pm 0.14^*$
Cl^- (mmol/L)	133.00 ± 2.65	$128.00 \pm 1.00^*$
Ca^{2+} (mmol/L)	4.41 ± 0.09	$5.60 \pm 0.21^{**}$

* $P < 0.05$), ** $P < 0.01$ 。

在较大的差异。运输后总蛋白、白蛋白、谷丙转氨酶、碱性磷酸酶比对照组极显著增加($P < 0.01$),白球比和乙酰胆碱酯酶显著增加($P < 0.05$)。谷草转氨酶和乳酸脱氢酶不显著增加($P > 0.05$)。

运输后血糖、 K^+ 显著高于对照组($P < 0.05$)。 Ca^{2+} 极显著高于对照组, Cl^- 显著低于

对照组($P < 0.01$)。 Na^+ 和甘油三酯及总胆固醇的含量与对照组没有明显的差异($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 美洲鲈的应激 由对动物产生有害的应激因子引起的非特异性、生理性紧张状态的现

象称为应激(stress)。当鱼类受到刺激因子的作用后,其下丘脑-垂体-肾间组织轴(HPI)会迅速作用,促进促肾上腺皮质激素(ACTH)的释放,从而导致头肾细胞皮质醇激素的合成与释放^[4]。而皮质醇激素并不被储存起来而是释放到血液循环系统中,因此血液中皮质醇浓度可以作为衡量鱼应激强度的指标。

实验显示美洲鲈对外界环境改变具有明显的应激反应。将美洲鲈从养殖池转到白桶中后,环境的改变(容积改变、背景改变等)使美洲鲈产生了明显的应激刺激,0.5 h后皮质醇激素快速升高到原来的10倍左右,且到4 h后皮质醇仍没有降低。表明了4 h内美洲鲈并不能适应这种新的环境,仍然处于较高的应激状态。可见美洲鲈对环境改变的适应能力很差。

实验表明,美洲鲈的基础皮质醇水平要比美洲鲈雌(15.8 ± 3.12) ng/ml,雄(29.6 ± 5.45) ng/ml^[8]、大鳞大马哈鱼[(38.27 ± 12.57) ng/ml]^[11]低很多。而当美洲鲈转入较小容器中后与容器壁发生冲撞行为,在这种刺激下,0.5 h后血清皮质醇迅速升高到原来的10倍左右,并且4 h后皮质醇又有所增加。运输情况下,美洲鲈不仅处于陌生的环境,更重要的是由车体的颠簸造成水波的震荡以及鱼体间、容器与鱼体间的撞击对美洲鲈的刺激更加强烈。2 h运输应激后血清皮质醇浓度迅速升高到原来的20倍左右。美洲鲈初始较低的皮质醇激素水平与环境改变或运输等刺激后,导致的皮质醇激素的快速增高很可能导致了美洲鲈不可逆转的生理变化,从而导致美洲鲈养殖和运输中的高死亡率。运输试验中还发现了一个现象,就是长时间运输后,美洲鲈血液常常导致自身溶血,这与鱼类应激性出血病有何联系也很值得研究。

3.2 美洲鲈应激后生理机能的改变 由于血液生化指标的变化是以机体组织细胞机能改变和新陈代谢变化为基础的,血液生化指标是反映动物运输应激时体内物质代谢和某些组织器官机能状态变化的一个重要特征^[12]。谷丙转氨酶(ALT)主要存在于肝脏组织,是肝脏损伤

的重要指示酶,运输后美洲鲈血清ALT的升高表明肝代谢极度活跃。运输后ALT显著增高表明运输应激对美洲鲈肝脏造成了一定损伤^[13]。损伤的原因可能是皮质醇作用的结果。在鱼类,皮质醇是调节代谢系统的重要激素,有研究表明皮质醇激素参与肝脏代谢的调节^[7]。谷草转氨酶(AST)含量最多的组织是心肌,运输应激使谷草转氨酶显著升高,可能是由于运输刺激中心肌收缩力加强,血液循环加速,心肌细胞代谢加强,使其更新或受损加快所致。乙酰胆碱酯酶(CHE)含量的变化同样预示心肌受损,从而影响对O₂的吸收和CO₂的排放,造成机体缺氧,这可能是导致美洲鲈运输容易死亡的原因之一。

葡萄糖是许多组织的必需燃料,因而恒定的血糖浓度对维持鱼类正常生命活动有重要的作用。运输后血糖有明显的增高,这与大西洋鲑运输后的血糖变化相同^[7,14]。这可能与运输应激后皮质醇激素增高有关。皮质类固醇可使机体各组织对葡萄糖的利用率降低,同时使肝脏的糖元异生作用增强,结果使血糖升高。另外,美洲鲈处于应激时,肾上腺髓质释放肾上腺素的量也增加,可促使糖元分解成葡萄糖进入血液,引起血糖升高。

综上所述,美洲鲈在运输等强应激刺激因子作用下,皮质醇激素含量迅速升高,从而引起对机体新陈代谢和生理机能的改变。运输应激的刺激可能导致美洲鲈心脏、肝脏等组织的损伤,造成机体不可逆转的生理变化,从而加速了鱼体的死亡,使得美洲鲈的运输难以实现。

参 考 文 献

- [1] 刘绍平,陈大庆,段辛斌等.中国鲈鱼资源现状与保护对策.水生生物学报,2002,26(6):679~684.
- [2] 王汉平,陈大庆,钟鸣远等.鲈鱼幼鱼的捕捞、暂养与运输.淡水渔业,1992,12(4):17~19.
- [3] 洪磊,张秀梅.环境胁迫对鱼类生理机能的影响.海洋科学进展,2004,22(1):114~121.
- [4] Wendelaar Bonga S E. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 1997, 77: 591~625.
- [5] 庞启华,黄文芳,谢凤.丰产鲫细菌性败血症的血液病

- 理变化.应用与环境生物学报 2004, **10**(3):315~317.
- [6] Barcellos L J G, Kreutz L C, Rodrigues L B, *et al.* Haematological and biochemical characteristics of male jundia (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard Pimelodidae): changes after acute stress. *Aquaculture Research*, 2003, **34**(15): 1465~1469.
- [7] Sandodden R, Finstad B, Iversen M. Transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): anaesthesia and recovery. *Aquaculture Research*, 2001, **32**(2): 87~90.
- [8] Barcellos L J G, Woehl V M, Wassermann G F, *et al.* Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. *Aquaculture Research*, 2001, **32**(2): 121~123.
- [9] 钱云霞,陈惠群,孙江飞.饥饿对养殖鲈鱼血液生理生化指标的影响.中国水产科学 2002, **9**(2):133~137.
- [10] 周玉,郭文场,杨振国等.欧洲鳗鲡血液某些生物化学指标的测定.动物学杂志 2002, **37**(1):50~52.
- [11] Cho G K, Heath D D. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 2000, **31**(6):537~546.
- [12] 董淑丽,王占彬,雷雪芹等.热应激对动物血液生化指标的影响.家畜生态 2004, **25**(2):54~56.
- [13] 周玉,郭文场,杨振国等.欧洲鳗鲡“狂游病”血液生化指标研究.水生生物学报 2002, **26**(3):314~316.
- [14] Barcellos L J G, Nicolaiewsky S, Souza S M G, *et al.* Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*(L.), previously exposed to chronic stress. *Aquaculture Research*, 1999, **30**(30):437~444.