

DOI: 10.3724/SP.J/1118.2011.00819

高碳水化合物日粮对异育银鲫血浆皮质醇含量和 HSP70 基因 mRNA 表达的影响

缪凌鸿¹, 戈贤平^{1,2}, 谢骏^{1,2}, 刘波^{1,2}, 潘良坤¹, 周群兰¹, 陈汝丽¹

1. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;

2. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081

摘要: 为了探讨高碳水化合物饲料是否会引起异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)的应激反应, 选用体质量为(35.60±1.11) g 的异育银鲫 168 尾, 随机分成 2 组, 一组设为对照组(NS), 投喂碳水化合物水平为 35% 的日粮; 另一组设为高碳水化合物实验组(HS), 投喂碳水化合物水平为 50% 的日粮, 每组 3 个重复。在控温的循环水系统中饲养 35 d 和 70 d 后, 测定异育银鲫血浆皮质醇激素含量及其肝、心脏、脾、肾中 HSP70 基因 mRNA 的表达量。结果显示, 高碳水化合物实验组 35 d 时血浆皮质醇激素与对照组相比较显著升高($P<0.05$), 肝和心脏 HSP70 基因 mRNA 表达较对照组明显增强($P<0.05$); 70 d 时血浆皮质醇激素含量升高, 且 70 d 时高碳水化合物组肝、心脏、脾和肾 HSP70 基因 mRNA 表达与对照组相比全部增强。各组饲养 70 d 后, 饥饿 24 h 后重新投喂的 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h, 高碳水化合物实验组(HS)皮质醇含量在 6 h、48 h 显著高于对照组($P<0.05$), 在 6 h、12 h、48 h 肝 HSP70 基因 mRNA 表达与对照组相比均增强($P<0.05$), 说明异育银鲫对 50% 碳水化合物含量的饲料的耐受性比较差, 鱼体产生了应激反应。结果说明, 当异育银鲫血清皮质醇激素含量升高时, 其肝中 HSP70 基因 mRNA 的表达量却降低, 反之亦然。本研究旨在为水生动物营养应激及营养免疫的相关研究提供新的思路, 为开辟鱼类应激的营养调节提供科学依据。

关键词: 异育银鲫; 碳水化合物; 皮质醇; HSP70 基因 mRNA 表达量

中图分类号: S96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)04-0819-09

应激是动物机体受到外界不良因素刺激后产生的一系列反应。皮质醇激素是目前从肾上腺皮质中提取出的对糖类代谢具有最强作用的肾上腺皮质激素。在应激状态下, 血液中的皮质醇含量增加以维持机体正常生理机能, 如果没有皮质醇, 机体将无法对应激做出有效反应。鱼类血液中皮质醇含量的升高被看作鱼类应激的灵敏信号^[1-3]。饲料营养成分会影响鱼体血清皮质醇激素的分泌, 初步表明饲料中不适当的营养成分会引起鱼体的代谢应激^[4]。

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一类非常保守的蛋白质分子家族, 在包括鱼类的所有有机体中都有表达^[5]。HSP70 是其中的一员, 除高温诱导外, 养殖密度、化学刺激和损伤因素(如缺氧、病毒感染、自由基等)都可以导致细胞发生热休克反应, 诱导 HSP70 的合成^[6]。它能在各种应激作用下, 快速、短暂调整应激过程中细胞的存活机能, 保护细胞抵抗损伤, 并有助于细胞恢复正常的结构和机能。因此, HSP70 目前正被广泛地用作应激的生物标记。

收稿日期: 2010-10-27; 修订日期: 2011-03-01.

基金项目: 农业部现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-46).

作者简介: 缪凌鸿(1984-), 女, 硕士, 专业方向为水产动物营养与饲料. E-mail: miaolh@ffrc.cn

通信作者: 戈贤平, 研究员. E-mail: gexp@ffrc.cn

饲料营养水平是决定鱼类生长性能的重要因素之一,各种影响因素的变化包括营养过剩和缺乏会降低鱼类的生长、免疫和对疾病抵抗力,由此推测为不合理的饲料营养可能引起鱼类应激^[7-8]。Fletcher 等提出日粮中不适宜的营养成分含量在鱼体代谢过程中会引起应激反应^[9]。目前,有关重金属、温度、拥挤、毒性等对鱼体引起的急性应激反应已经有非常多的研究,但是饲料营养水平与应激相关的报道却比较少,Pieper 等^[10]认为,鱼类摄入过量糖后会引起持续的代谢应激,而应激容易降低鱼类抗感染能力,由此可能导致免疫功能减弱,发病率增加^[8, 11]。而将日粮中高碳水化合物水平与血清皮质醇、应激蛋白 70 等多个应激指标直接联系的研究报道更为稀少,有用 0%、33% 淀粉含量日粮饲喂白鲢 10 周后,发现高淀粉含量组皮质醇含量低于无淀粉组^[12]。

异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)是中国重要的淡水养殖鱼类,本研究以异育银鲫为实验对象,探讨饲料中的高碳水化合物水平对异育银鲫血浆皮质醇激素水平和 HSP70 的表达水平的影响,为水生动物营养应激及营养免疫的相关研究提供新的思路,为开辟鱼类应激的营养调节提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 日粮配制

本实验以 α -淀粉(购自无锡金陵塔淀粉有限公司)为碳水化合物源,设计了 2 种等氮等脂的半纯合饲料配方(表 1),用微晶纤维素调节日粮配方。本实验以 α -淀粉含量 35% 的日粮(NS)为对照组日粮, α -淀粉含量为 50% 的日粮(HS)为实验组日粮。两种日粮充分混匀后制成粒径 3 mm 的沉性颗粒饲料。

1.2 实验鱼

实验用异育银鲫鱼种购于江苏省溧阳市水荡湖水产良种场,用 3% 食盐溶液消毒后移入本实验室控温流水循环系统中,用沉性颗粒饲料(通威饲料公司)驯化 15 d 后,选取体质健康、规格整齐、初始体质量为(35.60±1.11) g 的个体,随机分成 2

个组,每组 3 个平行,每个平行 28 尾鱼,于 6 个圆形蓄养槽(规格为 ϕ 820 mm×700 mm)中开展饲养实验。

表 1 实验日粮组成与营养水平
Tab.1 Composition and proximate analysis of the experimental diets

成分/% ingredients	对照组 NS	实验组 HS
鱼粉 fish meal ^a	45.0	45.0
α -淀粉 α -starch	35.0	50.0
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	15.0	0
鱼油 Fish oil	1.0	1.0
1%预混料 1% premix Feed ^b	1.0	1.0
羧甲基纤维素 carboxyl methyl cellulose	2.0	2.0
磷酸二氢钙 calcium dihydrogen phosphate	1.0	1.0
总和 total	100.0	100.0
营养水平 proximate analysis (% dry weight)	NS	HS
干物质 dry matter	91.7	90.5
粗蛋白 crude protein	30.0	30.3
粗脂肪 ether extract	5.02	5.05
可消化糖 digestible carbohydrate	36.2	50.3
总能 gross energy (kJ/g DM) ^c	17.0	18.5
钙 calcium	2.0	2.0
总磷 total phosphorous	1.5	1.5

注: a-鱼粉蛋白含量 68%. b-预混料含: CuSO₄·5H₂O 2.0 g/kg; FeSO₄·7H₂O 25 g/kg; ZnSO₄·7H₂O 22 g/kg; MnSO₄·4H₂O 7 g/kg; Na₂SeO₃ 0.04 g/kg; KI 0.026 g/kg; CoCl₂·6H₂O 0.1 g/kg; VA 900 000 IU; VB₁ 320 mg/kg; VB₂ 1090 mg/kg; VB₅ 2 000 mg/kg; VB₆ 500 mg/kg; VB₁₂ 1.6 mg/kg; VC 10 000 mg/kg; VD 200 000 IU; VE 4 500 mg/kg; VK₃ 220 mg/kg; 泛酸 1 000 mg/kg; 叶酸 165 mg/kg. c-营养水平含量中总能: 按蛋白质 23.64 kJ/g, 脂肪 39.54 kJ/g, 糖 17.15 kJ/g 计算, 其他为实测值。

Note: a-Fish Meal: protein 68%. b-Premix feed: CuSO₄·5H₂O 2.0 g/kg; FeSO₄·7H₂O 25 g/kg; ZnSO₄·7H₂O 22 g/kg; MnSO₄·4H₂O 7 g/kg; Na₂SeO₃ 0.04 g/kg; KI 0.026 g/kg; CoCl₂·6H₂O 0.1 g/kg; VA 900 000 IU; VB₁ 320 mg; VB₂ 1 090 mg/kg; VB₅ 2 000 mg/kg; VB₆ 500 mg/kg; VB₁₂ 1.6 mg/kg; VC 10 000 mg/kg; VC 10 000 mg/kg; VD 200 000 IU; VE 4 500 mg/kg; VK₃ 220 mg/kg; Pantothenate 1 000 mg/kg; Folic acid 165 mg/kg. d-Gross energy (kJ/g) were calculated using energy equivalents 23.64 kJ/g, 39.54 kJ/g, and 17.15 kJ/g for protein, lipid and digestible carbohydrate, respectively. The other is measured value.

1.3 饲养管理

每天以鱼体质量的 3%~4% 分别投喂 NS 和 HS 日粮,每天投喂 3 次,分别于 8:30、12:30 和 16:30 投喂。每次投喂后 2 h 察看异育银鲫鱼种吃食情况,将残饵吸出,并估计采食量,每两

周根据其摄食情况调整投喂量,使其饱食而无饲料剩余为宜。实验期间,每天吸污1次,并且每天冲洗滤布,日夜连续充气增氧。整个实验期间水质如下:水温(26.0 ± 1.5) $^{\circ}\text{C}$,溶氧 6 mg/L,氨氮 0.2 mg/L,亚硝酸盐 0.2 mg/L, pH 6.8~7.0。正式实验饲养10周后,鱼体称重、量体长、采集血液和肝脏等样品。

1.4 样品采集与分析

于养殖实验开始前(0 d)、正式开始后 35 d、70 d 从每个缸随机取异育银鲫 3 尾用 MS-222 麻醉后尾静脉采血,血液用柠檬酸钠抗凝剂抗凝,并迅速在 4°C 、10 000 r/min 离心 10 min 分离血浆, -70°C 冷冻保存备用,用于皮质醇含量的测定。然后于每个时间点取 50~100 mg 新鲜的肝、脾、肾和心脏在液氮中速冻后存于 -80°C 冷冻保存,用于 HSP70 基因表达的测定;70 d 养殖实验结束后对异育银鲫禁食 24 h,采用相同的方法于重新投喂前(0 h)、及重新投喂后 6 h、12 h、24 h、48 h 从每个缸随机取异育银鲫 3 尾进行尾静脉采血、取 50~100 mg 新鲜的肝,用于皮质醇含量和 HSP70 基因表达的测定。

1.5 激素测定

皮质醇参照 Picketing and Pottinger^[13]方法用放免法(RIA)进行测定,试剂盒购自北京北方生物技术有限公司,在美国贝克曼 Cx-4 型自动生化分析仪上测定。

1.6 试剂和仪器

抽提 RNA 用 RNAiso Reagent 试剂、反转录用 SYBR RT-PCR 试剂盒、荧光定量采用 SYBR[®] Prime Script TM RT-PCR Kit II (Perfect Real Time),除了荧光定量 PCR 用进口配套 PCR 管外,其他均购自 Takara(大连),其他常规化学药品均为分析纯以上。

Eppendorf Mastercycler personal PCR 仪, Mini-Opticon(Bio-RAD), MJ Opticon Monitor(Bio-RAD), 生物分光光度计(Bio-Photometer, Eppentoff), 其他常规仪器(离心机、电泳仪等)均为国产。

1.7 荧光定量 PCR 反应测定异育银鲫器官中 HSP70 基因表达量

分别称取 50~100 mg 的异育银鲫肝、脾、肾

和心脏,参照 RNAiso Reagent 说明书操作,抽提总 RNA。使用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和 OD 值,根据 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 的值判断 RNA 质量,其值在 1.8~2.0 之间表明分离所得的 RNA 质量较好、纯度较高。

为检测高碳水化合物日粮对异育银鲫肝、心脏、脾和肾中 HSP70 基因表达的影响,按照 SYBR[®] PrimeScriptTM RT-PCR Kit 使用说明,进行逆转录反应,然后采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时定量 PCR 扩增反应,以异育银鲫 β -actin 为内参,对得到的各样品 C_t 值进行均一化处理,应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法确定不同时段肝脏中 HSP70 mRNA 的相对含量。RT 反应体系为: 5 \times PrimeScriptTM Buffer (for real time) 2 μL , PrimeScriptTM RT Enzyme Mix I 0.5 μL , Oligo dT Primer (50 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , Random 6 mers (100 $\mu\text{mol/L}$) 0.25 μL , total RNA 500 ng, 加 RNase Free dH₂O 至 10 μL ; 反应条件为 37°C 15 min, 85°C 5 s, 4°C 保存。

荧光定量 PCR 反应采用 Primer 5.0 设计引物, P1、P2 是异育银鲫 β -actin (GenBank: AB039726.2) 引物, P3、P4 是异育银鲫 HSP70 基因(GenBank: AB092839.2)荧光定量 PCR 的引物,所有引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成,扩增的序列片段的大小为 100~150 bp,引物序列为:

Primer1: TTG AGC AGG AGA TGG GAA CCG

Primer2: AGA GCC TCA GGG CAA CGG AAA

Primer3: TAC ACG TCC ATC ACC AGA GCG C

Primer4: CCC TGC CGT TGA GAG AAT CCT

PCR 反应体系包含: SYBR[®] premix Ex TaqTM II (2 \times) 10.0 μL , PCR Forward Primer(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL , PCR Reverse Primer(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL , 模板(cDNA 溶液) 2.0 μL , dH₂O 6.4 μL ; 反应程序为: 95°C 2 min, 循环 44 次(95°C 5 s, 62°C 30 s, 85°C 2 s, 读板记录荧光量), 72°C 3 min, 融解曲线的反应条件为 65°C 到 90°C , 每升高 0.2°C 保持 0.02 s, 读板记录荧光量。

1.8 数据统计与分析

数据用 SPSS(Ver 16.0)软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),结果均用平均值 \pm 标准误($\bar{x} \pm \text{SE}$)表示, $n=9$ 。同一组不同时间段之间采用

LSD 法进行显著性多重比较,同一时间段不同组间采用独立 T 检验进行显著性比较。当 $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 日粮中碳水化合物水平对异育银鲫血浆皮质醇和 HSP70 基因表达的影响

2.1.1 对异育银鲫血浆皮质醇激素含量的影响 在 70 d 的饲养过程中,35%碳水化合物日粮(NS)组异育银鲫血浆皮质醇激素水平呈升高趋势,而 50%碳水化合物日粮(HS)的实验组异育银鲫血浆皮质醇激素水平先急剧升高后下降(图 1)。与 0 d 相比,2 组异育银鲫血浆皮质醇激素水平均在 35 d、70 d 显著升高($P < 0.05$);在 35 d 时,实验组异育银鲫血浆皮质醇激素水平显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

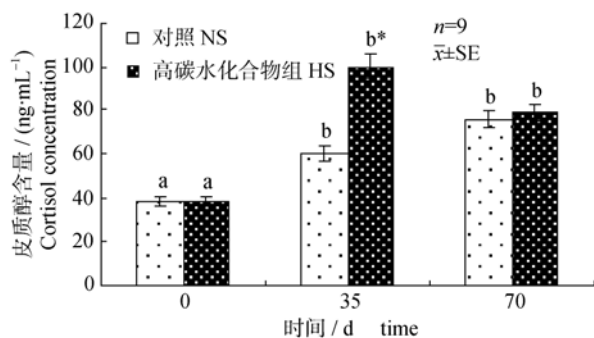


图 1 日粮中碳水化合物水平对异育银鲫血浆皮质醇激素含量的影响

注:不同小写字母表示同组不同时间段 LSD 多重比较差异显著($P < 0.05$),“*”表示同一时间段不同组之间 T 检验差异显著($P < 0.05$)。

Fig.1 Effect of different level carbohydrate diets on plasma cortisol changes of Allogynogenetic crucian Carp (*Carassius auratus gibelio*)

Note: Different lowercase letters represent significantly difference by means of LSD multiple comparison in the same group between different time periods ($P < 0.05$), * represent significantly difference by T test at the same time between different groups ($P < 0.05$).

2.1.2 日粮中碳水化合物水平对异育银鲫肝、脾、肾和心脏中 HSP70 基因 mRNA 表达的影响

在 70 d 的全程实验中,两组异育银鲫肝中 HSP70 基因 mRNA 表达量呈现先升高后略下降,但正常对照组各时间段间差异不显著($P > 0.05$),而实验组异育银鲫肝 HSP70 基因 mRNA 表达量

在 35 d、70 d 均显著高于 0 d($P < 0.05$)。实验组异育银鲫肝 HSP70 基因 mRNA 表达量在 35 d、70 d 时显著高于对照组($P < 0.05$) (图 2)。

在 70 d 的全程实验中,两组异育银鲫心脏中 HSP70 基因 mRNA 表达量均呈上升趋势,且实验组在 35 d、70 d 时均显著高于 0 d($P < 0.05$)。而在不同时间点,两组间异育银鲫心脏中 HSP70 基因 mRNA 表达量均差异不显著 ($P > 0.05$) (图 2)。

在 70 d 的全程实验中,对照组异育银鲫脾中 HSP70 基因 mRNA 表达量呈现先升高后略下降趋势,而实验组则呈持续上升趋势,并且在 70 d 时显著高于 0 d ($P < 0.05$)。在 70 d 时,实验组异育银鲫脾脏中 HSP70 基因 mRNA 表达量显著高于对照组($P < 0.05$) (图 2)。

在 70 d 的全程实验中,对照组异育银鲫肾 HSP70 基因 mRNA 表达量呈现先升高后下降趋势,而实验组则呈持续上升趋势。35 d、70 d 时的对照组异育银鲫肾 HSP70 基因 mRNA 表达量均显著高于 0 d 时($P < 0.05$),而实验组仅在 70 d 显著高于 0 d($P < 0.05$)。在 35 d 时,实验组异育银鲫肾 HSP70 基因 mRNA 表达量显著低于对照组($P < 0.05$) (图 2)。

2.2 日粮中碳水化合物含量对禁食后再投喂异育银鲫血浆皮质醇和 HSP70 基因 mRNA 表达的影响

2.2.1 对血浆皮质醇激素代谢的影响 禁食 24 h 后分别给异育银鲫投喂含 35%、50%碳水化合物的日粮,在 48 h 的代谢过程中,两组异育银鲫血浆皮质醇激素水平均表现出先降低后升高再降低的趋势,急剧升高点出现在 24 h。两组异育银鲫血浆皮质醇激素水平在投喂不同日粮后 6 h、12 h、48 h 时显著低于禁食(0 h)($P < 0.05$)。实验组异育银鲫血浆皮质醇激素水平在 6 h、48 h 时显著($P < 0.05$) 高于同时时间段的对照组,而在 12 h 则显著($P < 0.05$) 低于同时时间段的对照组(图 3)。

2.2.2 对异育银鲫肝中 HSP70 基因 mRNA 表达的影响 禁食 24 h 后分别给异育银鲫投喂含 35%、50%碳水化合物的日粮,在 48 h 的代谢过程中,对照组异育银鲫肝脏 HSP70 基因 mRNA 表达量呈现先升后降的趋势;而实验组的变化较为平缓,表现出先升高后下降再略有增加的趋势。禁食 24 h

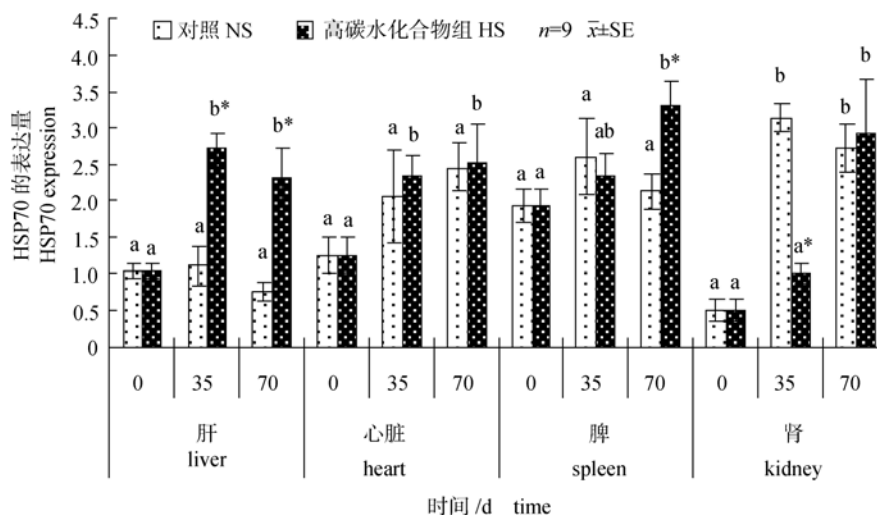


图 2 日粮中碳水化合物含量对异育银鲫肝、心脏、脾和肾 HSP70 基因 mRNA 表达的影响

不同小写字母表示同组不同时间段 LSD 多重比较差异显著 ($P < 0.05$), *表示同一时间段不同组之间 T 检验差异显著 ($P < 0.05$).

Fig.2 Effect of the same carbohydrate level diet on hsp70 in liver, heart, spleen and kidney of Allogynogenetic Crucian Carp (*Carassius auratus gibelio*) at different times

Different lowercase letters represent significant difference by means of LSD multiple comparison in the same group between different time periods ($P < 0.05$), * represent significant difference by T test at the same time between different groups ($P < 0.05$).

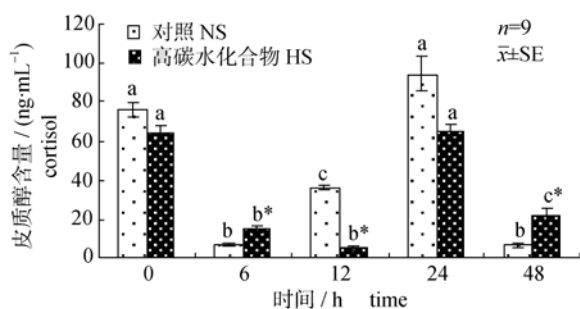


图 3 禁食 24 h 后日粮中碳水化合物含量对异育银鲫血浆皮质醇激素代谢的影响

不同小写字母表示同组不同时间段 LSD 多重比较差异显著 ($P < 0.05$), *表示同一时间段不同组之间 T 检验差异显著 ($P < 0.05$).

Fig.3 Fasted 24h and postprandial, effect of high level carbohydrate diet on plasma cortisol changes of Allogynogenetic Crucian carp (*Carassius auratus gibelio*)

Different lowercase letters represent significant difference by means of LSD multiple comparison in the same group between different time periods ($P < 0.05$), * represent significant difference by T test at the same time between different groups ($P < 0.05$).

后, 实验组异育银鲫肝脏中 HSP70 基因 mRNA 表达量在 6 h 显著高于对照组(图 4)。

3 讨论

3.1 高糖日粮投喂对异育银鲫皮质醇水平和组织 HSP70 表达的影响

皮质醇激素是当鱼类受到刺激因子的作用时,

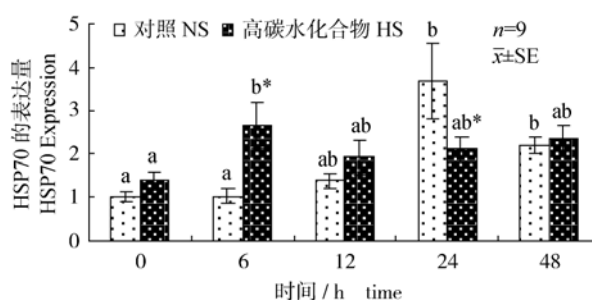


图 4 禁食 24 h 后日粮中碳水化合物含量对异育银鲫肝 HSP70 基因 mRNA 表达的影响

不同小写字母表示同组不同时间段 LSD 多重比较差异显著 ($P < 0.05$), *表示同一时间段不同组之间 T 检验差异显著 ($P < 0.05$).

Fig.4 Fasted 24h and postprandial, effect of high level carbohydrate diet on hepatic HSP70 mRNA expression of Allogynogenetic Crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) at the same time

Different lowercase letters represent significant difference by means of LSD multiple comparison in the same group between different time periods ($P < 0.05$), * represent significant difference by T test at the same time between different groups ($P < 0.05$).

其下丘脑-垂体-肾间组织轴(HPI)迅速作用, 促进了促肾上腺皮质激素(ACTH)的释放, 从而导致头肾细胞合成与释放的一类激素^[6]。

目前, 关于皮质醇激素在拉网胁迫^[14]、盐度胁迫^[15]、温度胁迫^[16]等急性应激时分泌水平的研究比较全面, 但是, 有关日粮中碳水化合物水平对皮质醇含量的影响研究较为欠缺, 对于饲料营

养素水平是否会引起鱼体产生应激,影响皮质醇激素的分泌,说法不一,但是已确认应激会引起鱼血浆中皮质醇的升高,并对鱼体免疫力产生抑制作用^[17-18]。Montero 等^[19]用不同脂肪含量的饲料、Krogdahl 等^[20]用不同蛋白质含量的饲料对大西洋鲑(*Salmo salar* L.)进行实验,发现过度的脂肪和蛋白质会对大西洋鲑的免疫产生显著的影响,并进一步对鱼体产生应激。Waagbø 等^[21]发现当日粮碳水化合物从 5%增加到 30%时,大西洋鲑血液皮质醇含量略有增加,但是在虹鳟(*Salmo gairdneri*)^[22]和鳕(*Gadus morhua*)^[23]上效果不显著。本实验室在前期翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)的研究中发现,用不同碳水化合物含量的饲料投喂翘嘴红鲌 70 d 后,从 13%碳水化合物组到 31%碳水化合物组血清中皮质醇含量都高于无碳水化合物组^[24]。本实验也再次验证这一结论,对异育银鲫投喂 35%和 50%碳水化合物水平日粮,其血浆皮质醇激素的含量均显著上升,而且高糖组的血浆皮质醇含量在 35 d 时显著高于正常组。

有关高碳水化合物饲料对鱼类代谢应激的研究,尤其是饲料中的碳水化合物含量与鱼体应激蛋白 HSP70 表达的研究很少。但在对畜禽类的相关研究中,降低动物体热应激的有效途径之一就是降低饲料中碳水化合物的含量。投喂实验日粮前(0 d),两组异育银鲫的肝、脾、肾和心脏等器官中 HSP70 表达量都比较低,这是因为通常应激蛋白在机体正常情况下表达水平极低,而当受到生理、病理或环境等刺激后,其表达水平才大量增加,从而保持细胞的自稳定,保护细胞免受变性蛋白的损害,起到对机体和细胞的保护作用。实验中 70 d 时获得的数据也同样说明这一点,投喂 50%碳水化合物水平日粮组的异育银鲫肝、心脏、脾和肾中 HSP70 的表达量都有不同程度升高,分别为正常组的 3.04、1.03、1.57 和 1.08 倍,尤其是肝中变化最为显著,说明日粮中 50%的碳水化合物含量对异育银鲫产生了一定的应激,激发了自身各器官中应激蛋白的保护功能,其中以肝反应最为迅速。这一点与某些研究结论存在分歧,

如有研究发现,大西洋鲑在受到应激时,应激蛋白的表达量依次为脑、头肾、肝和心脏,脾中表达量的变化不显著^[25]。这可能与鱼体受到的应激类型不同有关,因为 Cho^[26]、Heikkilä^[27]、Yamashita^[28]等在实验中发现热应激、重金属应激、冷应激等不同类型或者来源的应激源引起表达的应激蛋白类型及表达量不同。Airaksinen 等^[29]比较了斑马鱼(*Danio rerio*)在热胁迫(28~37℃)和冷胁迫(20~28℃)下的表达模式的差异,发现在热胁迫条件下 HSP70 呈上升表达,而冷胁迫下 HSP70 则显稳定表达。这也是由于神经内分泌系统中的交感-嗜铬组织系统和下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(HPA)复杂的作用方式呈现的差异,具体的机理还需要进一步深入研究。

3.2 高碳水化合物日粮对饥饿后再投喂的异育银鲫皮质醇水平和组织 HSP70 表达的影响

在 48 h 的代谢实验中,本研究发​​现投喂后 6 h,血浆皮质醇含量显著下降,这有可能是由于停止投喂饲料后,鱼体内碳水化合物含量减少而导致高碳水化合物对鱼体的应激效应降低,而随着鱼体对高碳水化合物的再次消化代谢,使饲料中的碳水化合物对鱼体丘脑-垂体-肾间组织轴(HPI)产生作用,逐渐促进促肾上腺皮质激素的释放,并导致皮质醇激素的合成与释放。但是,本研究发现 70 d 的饲养实验和 48 h 的代谢实验中,随着时间的延长,皮质醇含量的变化趋缓或者下降,Jonni Vielma^[30]、Schreck^[31]等也有此发现,可能是由于饲料中高碳水化合物仍然属于比较温和的长期应激,在长期的饲养过程中,鱼体逐渐适应而使皮质醇含量变化不显著,甚至下降。

大量的文献表明,虹鳟^[32]、鲑^[33]、鲤(*Cyprinus carpio* L.)^[34]等许多鱼体在受到外界刺激后,肝脏中应激蛋白 HSP70 的表达变化是最敏锐的,因此在实验设计时,选取了肝脏作为 HSP70 代谢表达的观测指标,从 0 h 到 48 h,两组异育银鲫肝中 HSP70 基因 mRNA 的表达量都表现为先高后低,Mazur 等^[35]在鳕的急性热应激实验中也发现,恢复 48 h 后 HSP70 的表达量也降低到应激前水平。高碳水化合物组鱼体肝脏应激蛋白 HSP70 的快速

升高有可能与鱼体在短时间代谢状态下,对高碳水化合物饲料的低耐受能力有关。

在代谢实验中发现,高碳水化合物组和正常碳水化合物组异育银鲫血浆皮质醇激素的代谢强度和肝脏 HSP70 基因 mRNA 表达量出现了相反的趋势,这可能在代谢调节过程中,应激激素皮质醇和 HSP70 相互作用、调节有关,Basu 等^[36]在热应激实验中也发现血液中升高的皮质醇激素会抑制虹鳟肝和鳃、罗非鱼(*Tilapia nilotica* × *T. mossambica*)鳃中 HSP70 基因 mRNA 的表达。同样,Ackerman 等^[37]也观察到皮质醇和虹鳟鳃中 HSP70 类似的相互作用。其原因可能是鱼体细胞调节和神经内分泌系统调节的相互作用的结果,这提示我们两者之间是否存在某种拮抗效应,其中详细的原因和机理仍然需要进一步研究。

4 结论

尽管经过 70 d 的饲养,各组异育银鲫没有出现死亡,但是通过研究异育银鲫分别摄食 35%和 50%碳水化合物日粮后的血浆皮质醇激素含量及其肝、心脏、脾、肾中 HSP70 基因 mRNA 表达的变化发现,异育银鲫对 50%碳水化合物含量的饲料的耐受性比较差,血浆皮质醇激素含量升高和 HSP70 基因 mRNA 表达增强,引起了鱼体的应激反应。应激反应不是独立的疾病,本实验中异育银鲫对高碳水化合物日粮的有限利用可能引起肾上腺激素的释放和下丘脑-垂体-肾间组织(HPI)轴的反应,引起皮质醇含量、HSP70 表达的增加,由此可能进一步影响鱼类健康,降低鱼体对饵料的消化和吸收,导致生长发育不良、内分泌调节紊乱、存活率降低和很多疾病的发生,从而造成生长受抑制并引起死亡的后果。但是日粮碳水化合物水平对皮质醇等应激指标的影响仍没有得到广泛的研究,并且研究结果也不相一致,其中的机制仍然需要深入研究、探索。在 48h 的代谢实验中发现,皮质醇激素的分泌和肝脏中 HSP70 基因 mRNA 的表达量呈现相反的趋势,但这其中的详细原因和机理有待于深入研究。

参考文献:

- [1] Iwama G K, Pickering A D, Sumpter J P, et al. Fish Stress and Health in Aquaculture [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1997: 25.
- [2] Wendelaar Bonga S E. The stress response in fish [J]. Physiol Rev, 1997, 77(3): 591-625.
- [3] Mommsen T P, Vijayan M M, Moon T W. Cortisol in teleost: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation [J]. Rev Fish Biol Fish, 1999, 9(3): 211-268.
- [4] Barton B A, Iwama G K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids [J]. Annu Rev Fish Dis, 1991, 1: 3-26.
- [5] Basu N, Todgham A E, Ackerman P A, et al. Heat shock protein genes and their functional significance in fish [J]. Gene, 2002, 295(2): 173-183.
- [6] Gornati R, Papis E, Rimoldi S, et al. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. Gene, 2004, 341: 111-118.
- [7] Chandra R K. Nutrition immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating suffering and improving survival [J]. Proceeding National Academic of Science, 1996, 93(25): 14304-14307.
- [8] Maule A G, Tripp R A, Kaattari S L, et al. Stress alters the immune function and disease resistance in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. J Endocrinol, 1989, 120(1): 135-142.
- [9] Fletcher T C. Fish Stress and Health in Aquaculture: Dietary effects on stress and health [M]. Cambridge, Cambridge University Press, 1997: 223-246.
- [10] Pieper A, Pfeffer E. Studies on the effect of increasing proportions of sucrose or gelatinized maize starch in diets for rainbow trout (*Salmo gairdneri*, R.) on the utilization of dietary energy and protein [J]. Aquaculture, 1980, 20(4): 333-342.
- [11] Wiik R, Andersen K, Ulgenes I, et al. Cortisol-induced increase in susceptibility of Atlantic salmon, *Salmo salar*, to *Vibrio salmonicida*, together with effects on the blood cell pattern [J]. Aquaculture, 1989, 83(3-4): 201-215.
- [12] Vielma J, Koskela J, Ruohonen K, et al. Optimal diet composition for European whitefish (*Coregonus lavaretus*): carbohydrate stress and immune parameter responses [J]. Aquaculture, 2003, 225(1-4): 3-16.

- [13] Pottinger T G, Pickering A D. The effects of 11-ketotestosterone and testosterone on the skin structure of brown trout, *Salmo trutta* L.[J]. Gen Compar Endocrinol, 1985, 59(3): 335–342.
- [14] Lappivaara J, Mikkonen J, Soimasuo M. Attenuated carbohydrate and gill Na^+ , K^+ -ATPase stress responses in whitefish caged near bleached kraft mill discharges [J]. Ecotoxic Envir Saf, 2002, 51(1): 5–11.
- [15] 童燕, 陈立侨, 庄平, 等. 急性盐度胁迫对施氏鲟的皮质醇、代谢反应及渗透调节的影响[J]. 水产学报, 2007, 31(B09): 38–43.
- [16] Tanck M W T, Booms G H R, Eding E H, et al. Cold shock: stress in common carp [J]. J Fish Biol, 2000, 57(4): 881–894.
- [17] Pickering A D. Rainbow trout husbandry: management of the stress response [J]. Aquaculture, 1992, 100(1-3): 125–139.
- [18] Balm P H M. Fish Stress and Health in Aquaculture: Immune-endocrine interactions [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1997: 195–221.
- [19] Montero D, Tort L, Izquierdo M S, et al. Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by α -tocopherol and n-3 HUFA dietary deftdendes [J]. Fish Physiol Biochem, 1998, 18(4): 399–407.
- [20] Krogdahl A, Bakke Mckellep A M, Roed K H, et al. Feeding Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) soybean products: effect on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa [J]. Aqu Nutr, 2000, 6(2): 77–84.
- [21] Waagbø, R. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a review[J]. Aquacult Fish Manage, 1994, 25(2): 175–197.
- [22] Hilton J W, Plisetskaya E M, Leatherland J F. Does oral 3,5,3'-triiodo-L-thyronine affect dietary glucose utilization and plasma insulin levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)[J]. Fish Physiol Biochem, 1987, 4(3): 113–120.
- [23] Hemre G I, Lambertsen G, Lie Ø. The effect of dietary carbohydrate on the stress response in cod (*Gadus morhua*)[J]. Aquaculture, 1991, 95(3-5): 319–328.
- [24] 王广宇. 日粮碳水化合物水平对翘嘴红鲌生长、血液指标及 GK、G6Pase、HSC70 基因表达的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2009: 37.
- [25] Susan G, Lund, Daniel Caissie, et al. The effects of environmental heat stress on heat-shock mRNA and protein expression in Miramichi Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr [J]. Can J Fish Aqu Sci, 2002, 59(9): 1553–1562.
- [26] Cho W, Cha S, Do J, et al. A novel 90-kDa stress protein induced in fish cells by fish rhabdovirus infection[J]. Biochem Biophys Res Comm, 1997, 233(2): 316–319.
- [27] Heikkilä J J, Schultz G A, Iatrou K, et al. Expression of a set of fish genes following heat or metal ion exposure[J]. J Biol Chem, 1982, 257: 12000–12005.
- [28] Yamashita M, Ojima N, Sakamoto T. Induction of proteins in response to cold acclimation of rainbow trout cells [J]. Fed Eur Biochem Soc Letters, 1996, 382(3): 261–264.
- [29] Airaksinen S, Jokilehto T, Rabergh C M, et al. Heat and cold inducible regulation of HSP70 expression in zebra fish ZF4 cells [J]. Compar Biochem Physiol (B Biochem Molec Biol), 2003, 136(2): 275–282 .
- [30] Jouni Vielmaa, Juha Koskelaa, Kari Ruohonen, et al. Optimal diet composition for European whitefish (*Coregonus lavaretus*): carbohydrate stress and immune parameter responses [J]. Aquaculture, 2003, 225(1-4): 3–16.
- [31] Schreck C B, Pickering A D. Stress and Fish: Stress and compensation in Teleostean fishes: response to social and physical factors [M]. London: Academic Press, 1981.
- [32] Aekerman P A, Iwama G K. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis [J] . J Aquat Anim Health, 2001, 13: 173–180 .
- [33] Vijayan M, Pereira C, Grau E G. Handling stress does not affect expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation enzymes in rainbow trout treated with -naphthoflavone [J]. Life Science, 1997, 61(2): 117–127 .
- [34] Das P, Gupta A, Manna S K. Heat shock protein 70 expression in different tissues of *Cirrhinus mrigala* (Ham.) following heat stress [J]. Aqu Res, 2005, 36(6): 525–529 .
- [35] Mazur C F. The heat shock protein response and physiological stress in aquatic organisms [D]. Canada: University of British Columbia, 1996.
- [36] Basu N, Nakano T, Grau E G, et al. The Effects of Cortisol on Heat Shock Protein 70 Levels in Two Fish Species[J]. Gen Compar Endocrinol, 2001, 124(1): 97–105.
- [37] Ackerman P A, Forsyth R, Mazur C F, et al. Stress hormones and the cellular stress response in *salmonids* [J]. Fish Physiol Biochem, 2000, 23(4): 327–336.

Effect of high dietary carbohydrates on plasma cortisol levels and HSP70 expression in allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*)

MIAO Linghong¹, GE Xianping^{1,2}, XIE Jun^{1,2}, LIU Bo^{1,2}, PAN Liangkun¹, ZHOU Qunlan¹, CHEN Ruli¹

1. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

2. Wuxi Fishery College, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China

Abstract: Nutrition is one of the most important factors influencing the growth of farmed fish. The effect of diet on growth, disease resistance and immune suppression is well established, including over- and underfeeding, but the effect of nutrition on stress is less well understood. When fish are stressed, their ability to resist attack is weakened, and stress is considered a primary contributing factor to impaired health in cultured fish. Dietary carbohydrates are widely included in fish feeds to improve their physical quality and to provide an inexpensive non-nitrogenous energy source. They may induce nutritional problems, however, as excessive levels of carbohydrates reduce growth rate and are often accompanied by poor feed utilization. High blood glucose levels and elevated hepatic glycogen deposition are among the most frequently described metabolic disturbances. In addition to changes in growth and intermediate metabolism, excess dietary carbohydrates have been speculated to influence the stress responses of fish. The adrenergic response and hypothalamus–pituitary–intrarenal (HPI) axis are activated by stress. The HPI response results in increased plasma cortisol, levels of which are widely used as an indicator of stress in fish. The effects of dietary carbohydrate levels on circulating cortisol have not been extensively studied and results have been inconsistent. Heat shock proteins, particularly, HSP70, rapidly up-regulates cell survival during stress, thus protecting cells from damage and restoring normal structure and function. HSP70 is also widely used as stress biomarkers. To establish if stress is induced by high dietary carbohydrates, plasma cortisol levels and HSP70 expression were measured in allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) fed different carbohydrate diets. A total of 168 carp (body weight 35.60 g±1.11 g) were divided into two groups, with three replicates. The NS group was fed a normal diet (35% carbohydrate), while the HS group was fed a high carbohydrate diet (50% carbohydrate). Fish were maintained in aquaria with an automatic temperature-controlled system of recycling water for 5–10 weeks. Plasma cortisol and HSP70 expression in the liver, heart, spleen and kidney were determined at 0, 6, 12, 24 and 48 h after fasting. In the HS group, plasma cortisol and the expression of HSP70 mRNA had increased on day 70 compare to the NS group. Furthermore, plasma cortisol and HSP70 expression in liver was increased at 48 h after a 24-h fast compare to the NS group. A 50% carbohydrate diet appears to induce stress in allogynogenetic crucian carp but the reason for fluctuating levels of plasma cortisol and HSP70 expression in liver require further study.

Key words: allogynogenetic crucian carp; carbohydrate; cortisol; HSP70 expression

Corresponding author: GE Xianping. E-mail: gexp@ffrc.cn