

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.20076

尼罗罗非鱼幼鱼对亚硝酸盐氮长期胁迫的生理功能响应

肖炜¹, 陈炳霖^{1,2}, 祝璟琳¹, 李大宇¹, 邹芝英¹, 喻杰¹, 杨弘^{1,2}

1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村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: 为了解亚硝酸盐氮长期胁迫下尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生理功能变化, 实验设置不同浓度亚硝酸盐氮(空白对照、0.03 mmol/L、0.06 mmol/L、0.12 mmol/L、0.23 mmol/L), 研究亚硝酸盐氮 21 d 胁迫对尼罗罗非鱼幼鱼血液和肝脏组织的生理生化、代谢功能和非特异性免疫的影响。结果表明, 随着亚硝酸盐氮的浓度的提高, 尼罗罗非鱼幼鱼血液中白细胞数呈现略微上升的趋势, 而红细胞数和血红蛋白浓度均呈现显著下降的趋势($P<0.05$); 幼鱼血清中, 葡萄糖、谷丙转氨酶、谷草转氨酶和 K^+ 随着亚硝酸盐氮的增加浓度显著提高($P<0.05$), 与此同时甘油三酯、总胆固醇、总蛋白、 Na^+ 和 Cl^- 浓度、超氧化物歧化酶、碱性磷酸酶、溶菌酶和免疫球蛋白浓度以及亚硝酸盐氮浓度表现出负相关的下降趋势($P<0.05$); 肝脏组织中非特异性免疫因子 *HSP70*、*IL-1 β* 、*IL6* 和 *TNF- α* 随着亚硝酸盐氮的浓度增加表达量显著上升($P<0.05$), 而 *LYS* 因子表达量则与之相反。研究表明, 0.06~0.23 mmol/L 亚硝酸盐氮长期胁迫下可导致罗非鱼幼鱼血液生理、代谢和免疫产生功能障碍, 并影响肝组织的非特异性免疫基因表达。本研究结果有助于进一步了解亚硝酸根离子在罗非鱼体内的毒性机制, 为建立罗非鱼养殖水质亚硝酸盐氮因子的安全阈值提供参考。

关键词: 尼罗罗非鱼; 亚硝酸盐氮; 生理生化; 代谢功能; 非特异免疫

中图分类号: S964

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)11-1305-11

罗非鱼具有生长快、食性杂、抗逆性强等优点, 是联合国粮农组织推荐的养殖鱼类之一。目前罗非鱼养殖已遍布 142 个国家和地区, 2017 年全球罗非鱼养殖产量达 453 万 t^[1]。中国罗非鱼养殖经过 30 多年来的快速发展, 目前养殖年产量和出口量均稳居世界第一, 带动不少养殖户脱贫、致富。然而, 在中国罗非鱼养殖发展过程中, 养殖业主常常忽视养殖管理和水质调控, 导致养殖残饵和鱼类排泄物聚集, 引起水体亚硝酸盐等有毒物质浓度升高, 引起罗非鱼的非正常死亡, 给产业发展带来隐患^[2]。在亚硝酸盐对鱼类毒理研究方面, Das 等^[3]研究发现养殖水体中亚硝酸盐能显

著破坏印度鲮(*Cirrhinus mrigala*)体内红细胞和白细胞, 影响其正常代谢和非特异免疫; Jia 等^[4]发现高浓度亚硝酸盐胁迫会导致大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)肝组织受到损伤, 体内血红蛋白和 Na^+ 浓度下降, 超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等抗氧化酶活性失常; 叶俊^[5]研究发现养殖水体中亚硝酸盐浓度的升高会对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的非特异性免疫性能产生影响, 导致草鱼抗病力的下降和对病原的易感性提高。因此, 了解养殖水体中亚硝酸盐浓度变化对罗非健康状态变化的影响, 特别是亚硝酸盐胁迫下罗非鱼的生理响应和免疫水平的变化至关重要。Wang 等^[6]

收稿日期: 2020-03-24; 修订日期: 2020-06-11.

基金项目: 现代农业产业技术体系特色淡水鱼专项(CARS-49); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2019JBFZ07); 中国水产科学研究院罗非鱼和鲤鱼遗传育种创新团队专项(2020TD37)

作者简介: 肖炜(1982-), 男, 副研究员, 专业方向为水产育种与养殖. E-mail: xiaow@ffrc.cn

通信作者: 杨弘, 研究员, 专业方向为水产育种与养殖. E-mail: yangh@ffrc.cn

发现水体中高浓度的亚硝酸盐会导致尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)体内高铁血红蛋白浓度升高,造成罗非鱼输氧功能失常。然而,这些研究主要集中在 24~96 h 内的高浓度亚硝酸盐胁迫下的鱼类的应激反应、组织受损程度及存活率等相关领域,而低浓度亚硝酸盐长期胁迫下罗非鱼的生理功能、代谢和免疫学指标研究尚未讨论。鉴于此,本研究以尼罗罗非鱼幼鱼为对象,通过设置不同浓度亚硝酸盐氮胁迫处理,研究亚硝酸盐氮胁迫对尼罗罗非鱼幼鱼血液代谢和非特异免疫学等生化指标的影响,来探讨尼罗罗非鱼对亚硝酸盐胁迫的生理响应,为探讨罗非鱼健康养殖下水体亚硝酸盐氮安全阈值的建立提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

尼罗罗非鱼幼鱼取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心罗非鱼遗传育种基地,选择个体健康、规格一致的尼罗罗非鱼幼鱼 150 尾,初始体重(25.0 ± 0.5) g,随机分为 5 个组,每组 3 个平行,每个平行放养实验鱼 10 尾,将幼鱼置于 100 L 的循环水养殖桶中驯化 14 d,期间投喂蛋白含量为 28% 的颗粒饲料(百洋水产),日投喂两次(8:00、17:30),以 30 min 内吃完为准,多余饲料及时捞出。

1.2 实验方法

通过预实验获得尼罗罗非鱼幼鱼对亚硝酸盐氮胁迫下 96 h 安全浓度为 0.23 mmol/L,在 5 组养殖罗非鱼水体中分别亚硝酸盐氮浓度分别设置为 0 mmol/L(空白对照)、0.03 mmol/L、0.06 mmol/L、0.12 mmol/L、0.23 mmol/L,亚硝酸盐氮质量浓度通过 10 g/L NaNO₂ 溶液进行调节,进行 21 d 的亚硝酸盐胁迫实验,实验期间关闭循环水泵和桶间循环管道,通过加热棒将水温维持在 27~28 °C 之间,pH 维持在 7.6~7.8 之间,溶解氧维持在 4~5 mg/L。实验期间每日适量投喂饵料,投饵后及时清除残饵和粪便并置换养殖用水 1/5,而后检测水体亚硝酸盐氮浓度并及时调节至初始设置浓度。

1.3 样品采集及处理

养殖 21 d 后,禁食 12 h,每桶随机取 5 尾鱼,每组共 15 尾鱼,将鱼迅速捞起并立即投入质量浓

度为 50 mg/L 的 MS-222 中进行麻醉,每个实验样本从尾静脉采血 0.5 mL,将血液样本分成 2 份,1 份置于抗凝管用于血细胞和血红蛋白含量测定;1 份血液于 4 °C 条件下,3500 r/min 离心 5 min 制备血清,用于血清电解质和生化指标测定。

1.4 血液常规生化指标和免疫指数的测定

白细胞(WBC)、红细胞(RBC)和血红蛋白含量(HGB)等指数采用迈瑞 BC-5300VET 全自动血细胞分析仪进行测定,试剂购自深圳迈瑞生物医疗股份有限公司; 血清中钾(K⁺)、钠(Na⁺)、氯(Cl⁻)、葡萄糖(Glu)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、总蛋白(TP)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)和超氧化物歧化酶(SOD)等指标采用贝克曼 DXC-800 全自动生化分析仪进行分析测定,试剂购自 Roche 制药有限公司; 溶菌酶(LYS)指数和免疫球蛋白(IgM)浓度采用 ELISA 试剂盒测定,ELISA 试剂购自南京建成生物工程有限公司。

1.5 肝脏免疫基因 mRNA 的表达分析

养殖 21 d 后,禁食 12 h,每桶随机捞取幼鱼 3 尾,每组共 9 尾,将鱼迅速投入质量浓度为 50 mg/L 的 MS-222 中麻醉,解剖鱼体并采集肝脏组织 0.1~0.2 g,采用 TRIzol 试剂(Invitrogen, 美国)提取尼罗罗非鱼幼鱼肝脏组织总 RNA,通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳与紫外分光光度计 NanoDrop-Lite (Thermo Scientific, 美国)分别测定纯度和浓度。取 1 μg RNA 使用 PrimeScriptTM 逆转录试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA,保存于 -20 °C。以肌动蛋白 β -actin 为参照基因,设计选取细胞白介素 IL-1 β 、IL-6,肿瘤坏死因子 TNF- α 、热休克蛋白 HSP70 和溶菌酶 LYS 基因作为肝脏免疫候选基因,使用生物软件 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物,引物序列信息见表 1,将引物序列委托生工生物有限公司(上海)进行合成。

以罗非鱼肝脏组织 cDNA 为模板,在 ABI 7900HT PCR 仪上进行荧光定量 PCR。反应体系为 20 μ L: SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo, 中国)10 μ L, 目标基因上下游引物各 1.6 μ L, cDNA 模板 1 μ L, RNase free water 5.8 μ L, 单样品重复 3 次。反应程序为: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C

变性 15 s, 59~61 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。实验结束后进行熔解曲线分析, 验证每个反

应的特异性。荧光定量 PCR 的相对表达数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法 ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{ 目的基因}} - \Delta C_{t\text{ 参照基因}}$) 进行分析^[4]。

表 1 候选基因的引物序列及其退火温度
Tab. 1 Primer sequences of candidate genes

基因 gene	引物序列(5'-3') sequences	退火温度/°C annealing temperature	产物大小/bp product length	GenBank 号 GenBank ID
<i>IL-1β</i>	F: CAAGGATGACGACAAGCCAACC R: AGCGGACAGACATGAGAGTGC	59	149	XM_019365842
<i>IL-6</i>	F: TTGAAGACGGAAGTGTGGCA R: TGGTGCTCAAACGCTTTCTC	60	136	XM_019350387
<i>TNF-α</i>	F: GGAAGCAGCTCCACTCTGATGA R: CACAGCGTGTCTCCTTCGTTCA	61	129	NM_001279533
<i>HSP70</i>	F: CATCGCCTACGGTCTGGACAA R: TGCCGTCTTCATGGTCAGGAT	59	107	XM_003442456
<i>LYS</i>	F: AAGGGAAGCAGCAGCAGTTGTG R: CGTCCATGCCGTTAGCCTTGAG	60	151	XM_019361339
<i>β-actin</i>	F: CCACACAGTGCCCATCTACGA R: CCACGCTCTGTCAGGATCTCA	59	110	XM_003443127

1.6 数据分析

所有实验数据均用 SPSS 22.0 软件进行单因子方差分析(one-way ANOVA), 多重比较用 LSD 进行差异显著性检验, 数据用平均值±标准差表示, 使用 GraphPad Prism 7 绘图, $P<0.05$ 代表差异显著(不同字母表示)。

2 结果与分析

2.1 亚硝酸盐氮胁迫对罗非鱼幼鱼血液生化指标和电解质的影响

从图 1 可见, 亚硝酸盐氮胁迫 21 d 后, 各实

验组尼罗罗非鱼幼鱼血液 WBC 数量水平随着亚硝酸盐氮的浓度提高呈现略微上升的趋势, 但各处理组与对照组之间无显著性差异($P>0.05$); 亚硝酸盐氮胁迫处理对罗非鱼的血液 RBC 和 HGB 浓度有显著影响, 其中 0.03~0.23 mmol/L 处理组的 RBC 数量和 HGB 浓度显著低于对照组($P<0.05$), 各处理组间 RBC 和 HGB 浓度随着亚硝酸盐氮浓度的增加总体呈现下降趋势, 0.23 mmol/L 处理组下两项指标显著低于 0~0.06 mmol/L 处理组($P<0.05$), 显示亚硝酸盐氮胁迫可导致罗非鱼血液中的 RBC 和 HGB 浓度降低。

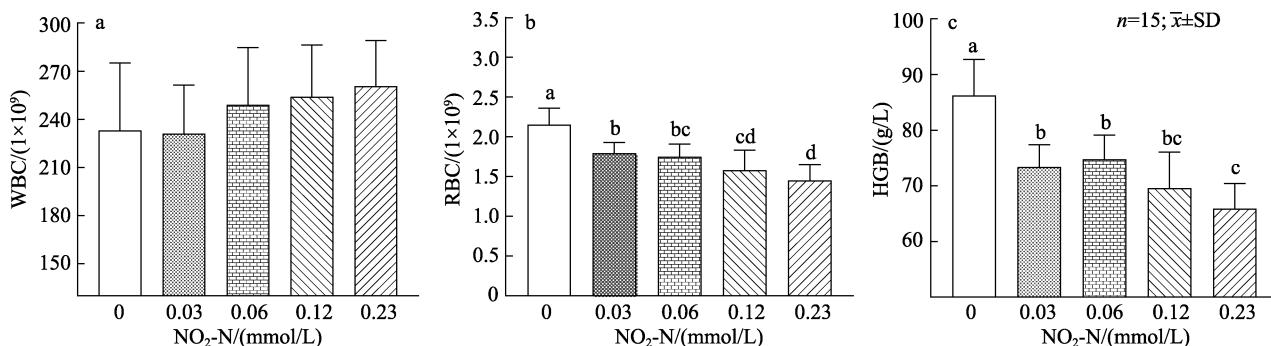


图 1 亚硝酸盐氮胁迫对尼罗罗非鱼幼鱼血液常规指数的影响
a: 白细胞(WBC)浓度; b: 红细胞(RBC)浓度; c: 血红蛋白含量(HGB)浓度.
不同处理中不同字母表明差异显著($P<0.05$).

Fig. 1 Effect of nitrite nitrogen stress on plasma indices of juvenile *Oreochromis niloticus*
a: white blood cell (WBC) concentration; b: red blood cell (RBC) concentration; c: hemoglobin (HGB) concentration.
The treatments with different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

在亚硝酸盐氮胁迫 21 d 后, 各实验组幼鱼血清中 Glu 浓度与亚硝酸盐氮浓度呈现正相关(图 2), 随着亚硝酸盐氮的提高血清中葡萄糖(Glu)浓度逐渐增加, 且 0.23 mmol/L 处理组罗非鱼血清 Glu 浓度显著高于 0~0.12 mmol/L 处理组($P<0.05$), 比对照组高 32.1%; 与此同时, TC、TG 和 TP 三者浓度与亚硝酸盐氮处理浓度表现出负相关, 随着亚硝酸盐氮的处理浓度增加而总体呈现下降趋势, 且 0.12 mmol/L、0.23 mmol/L 处理组罗非鱼血清

TC 浓度显著低于对照组($P<0.05$), 0.23 mmol/L 处理组 TP 浓度显著低于对照组($P<0.05$)。

由图 2 可见, 幼鱼血清中 ALT 和 AST 随着亚硝酸盐氮浓度的增加发生显著变化, 0.06~0.23 mmol/L 处理组血清 ALT 活性显著高于对照组($P<0.05$), 其中 0.23 mmol/L 处理组血清 ALT 指数比对照组高 46.0%; 0.03~0.23 mmol/L 处理组血清 AST 活性显著高于对照组($P<0.05$), 其中 0.23 mmol/L 处理组血清 AST 指数比对照组高 51.8%。

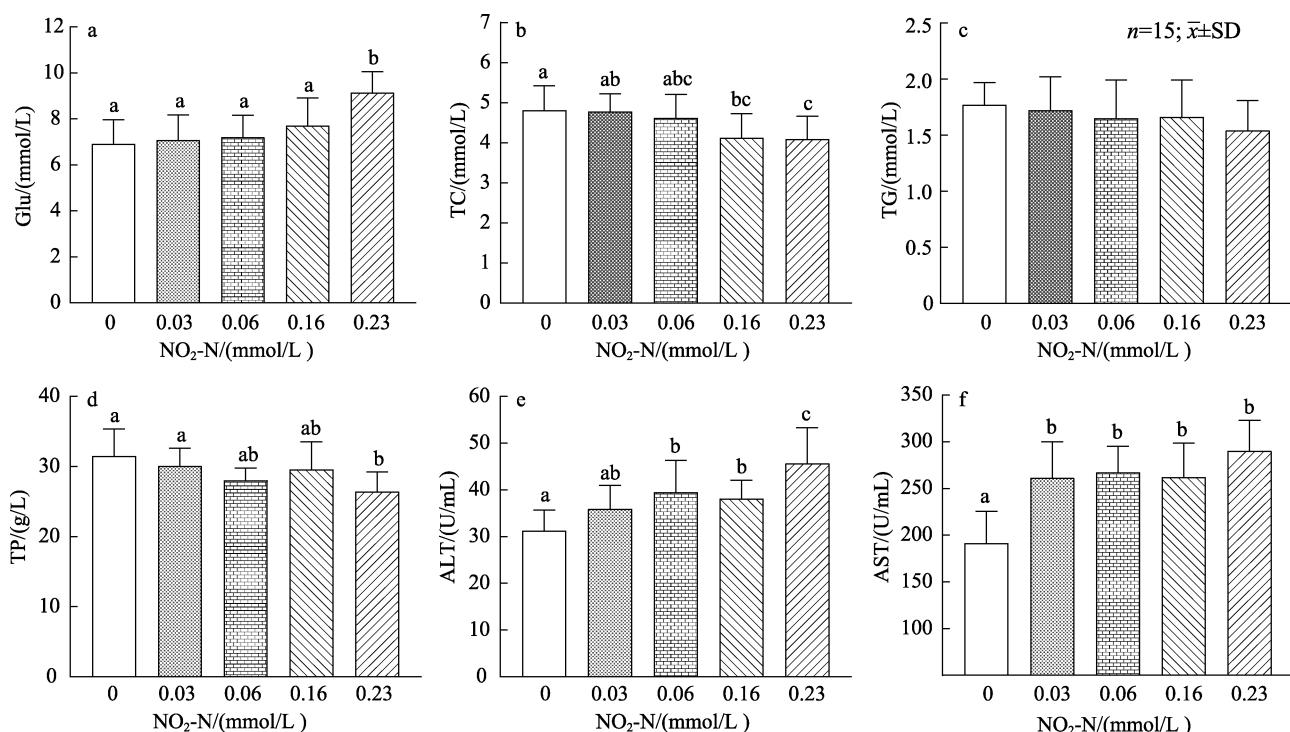


图 2 亚硝酸盐氮胁迫对尼罗罗非鱼幼鱼血清代谢指数的影响

a: 葡萄糖(Glu)浓度; b: 总胆固醇(TC)浓度; c: 甘油三酯(TG)浓度; d: 总蛋白(TP)浓度; e: 谷丙转氨酶(ALT)活性; f: 谷草转氨酶(AST)活性。不同处理中不同字母表明差异显著($P<0.05$)。

Fig. 2 Effect of nitrite nitrogen stress on serum metabolic indices of juvenile *Oreochromis niloticus*
a: glucose (Glu) concentration; b: total cholesterol (TC) concentration; c: triglyceride (TG) concentration;
d: total protein (TP) concentration; e: alanine aminotransferase (ALT) activity; f: aspartate aminotransferase
(AST) activity. The treatments with different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

亚硝酸盐氮胁迫 21 d 后, 各处理组间罗非鱼幼鱼血清中 Na^+ 、 K^+ 和 Cl^- 浓度均发生显著变化(图 3), 其中 K^+ 浓度与亚硝酸盐氮浓度呈现正相关, K^+ 浓度随着处理浓度的增加而显著提高, 且 0.06~0.23 mmol/L 处理组的罗非鱼血清 K^+ 浓度显著高于对照组($P<0.05$), 0.23 mmol/L 处理组比对照组

高 76.0%; 与 K^+ 浓度变化相反, Na^+ 和 Cl^- 浓度均随着亚硝酸盐氮处理浓度的增加而下降, 且 0.23 mmol/L 处理组罗非鱼血清 Na^+ 浓度显著低于对照组($P<0.05$), 比对照组显著下降 5.0%, 0.06~0.23 mmol/L 处理组的血清的 Cl^- 浓度显著低于对照组($P<0.05$), 且 0.23 mmol/L 处理组 Cl^- 浓度比对照组低 7.1%。

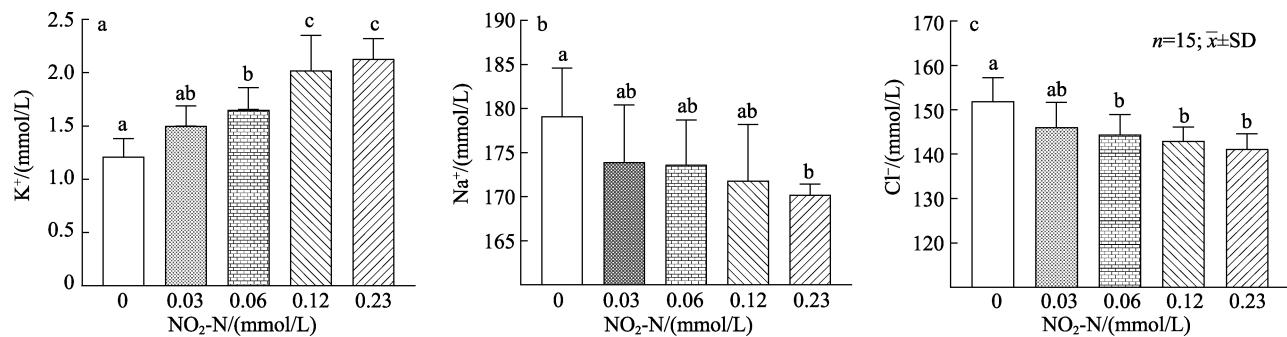
图 3 亚硝酸盐氮胁迫对尼罗罗非鱼幼鱼血清电解质(Na^+ 、 K^+ 、 Cl^-)浓度的影响a: 钾离子(K^+)浓度; b: 钠离子(Na^+)浓度; c: 氯离子(Cl^-)浓度.不同处理中不同字母表明差异显著($P<0.05$).

Fig. 3 Effect of nitrite nitrogen stress on serum electrolyte (Na^+ , K^+ , Cl^-) concentrations of juvenile *Oreochromis niloticus*
a: potassium (K^+) concentration; b: sodium (Na^+) concentration; c: chlorine (Cl^-) concentration.

The treatments with different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

2.2 亚硝酸盐氮胁迫对罗非鱼幼鱼血清代谢和免疫指标的影响

在非特异性免疫反应方面, 血清 ALP、SOD、LYS 指数和 IgM 浓度均随着亚硝酸盐氮胁迫浓度

的增加呈现逐步下降的趋势(图 4), 其中 0.23 mmol/L 处理组血清 ALP 和 LYS 指数显著低于对照组($P<0.05$), 分别比对照组低 13.4% 和 30.4%; 在 SOD 指数和 IgM 浓度方面, 0.06~0.23 mmol/L 处理组两

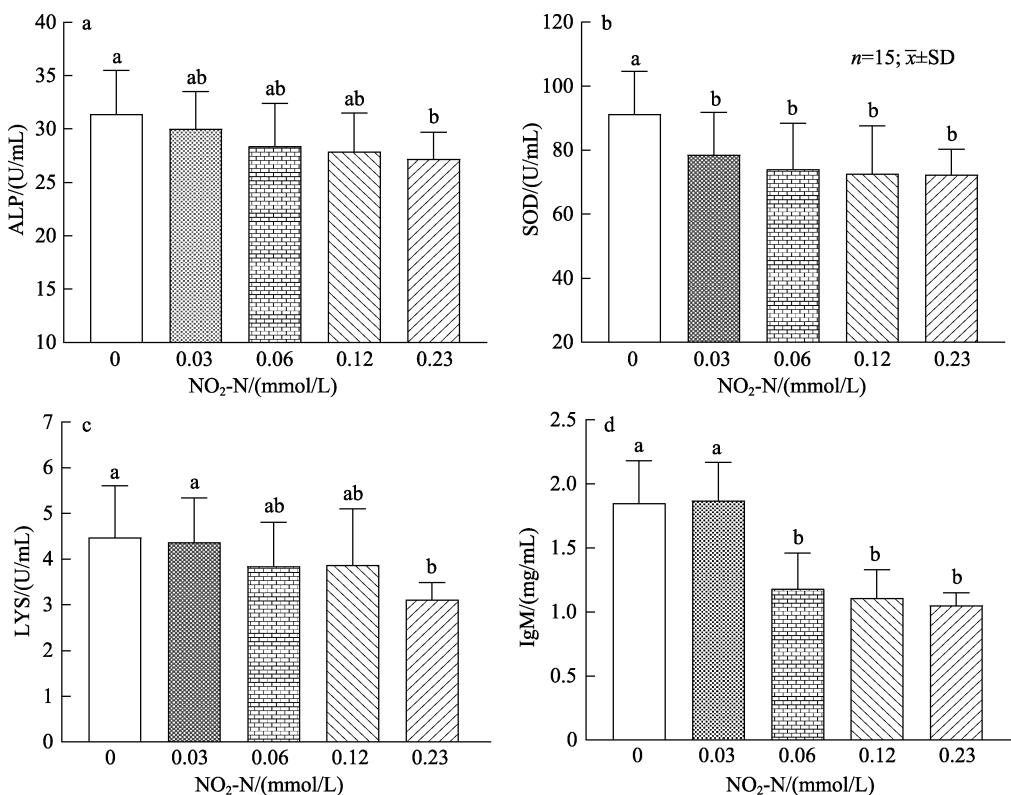


图 4 亚硝酸盐氮胁迫对尼罗罗非鱼幼鱼血清非特异性免疫的影响

a: 碱性磷酸酶(ALP)活性; b: 超氧化物歧化酶(SOD)活性; c: 溶菌酶(LYS)活性; d: 免疫球蛋白(IgM)浓度.

不同处理中不同字母表明差异显著($P<0.05$).

Fig. 4 Effect of nitrite nitrogen stress on serum non-specific immune response of juvenile *Oreochromis niloticus*

a: alkaline phosphatase (ALP) activity; b: superoxide dismutase (SOD) activity;

c: lysozyme (LYS) activity; d: immunoglobulin M (IgM) concentration.

The treatments with different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

者指标显著低于对照组($P<0.05$)，其中 0.23 mmol/L 处理组分别比对照组低 20.7% 和 43.2%，结果显示以上非特异性免疫酶指数和免疫球蛋白浓度在长期的亚硝酸盐氮胁迫下受到显著的抑制。

2.3 亚硝酸盐氮胁迫对罗非鱼幼鱼肝脏组织免疫和应激相关基因的表达的影响

由图 5 可见，亚硝酸盐氮胁迫 21 d 后，不同亚硝酸盐氮浓度的处理组间尼罗罗非鱼幼鱼肝脏组织的免疫应激和细胞因子相关基因发生显著变化。随着亚硝酸盐氮浓度的增加，尼罗罗非鱼肝脏组织中 *HSP70*、*IL-1β*、*IL-6* 和 *TNF-α* 均随之逐步上升，其中 0.03~0.23 mmol/L 处理组的 *HSP70* 相对表达量显著高于对照组($P<0.05$)，且 0.23 mmol/L 处理组 *HSP70* 相对表达量比对照组高 805%；在

IL-1β、*IL-6* 方面，0.06~0.23 mmol/L 处理组的相对表达量显著高于对照组($P<0.05$)，其中 0.12 mmol/L 处理组两者的表达水平略微高于 0.23 mmol/L 处理组，但无显著差异($P>0.05$)，0.12 mmol/L 处理组肝脏组织 *IL-1β*、*IL-6* 表达水平分别比对照组高 365% 和 144%；在 *TNF-α* 方面，0.03~0.12 mmol/L 处理组的表达水平与对照组无显著差异($P>0.05$)，但 0.23 mmol/L 处理组显著高于 0~0.12 mmol/L 处理组($P<0.05$)，比对照组高 103%。

此外，*LYS* 表达方面与亚硝酸盐氮胁迫浓度呈负相关，随着亚硝酸盐氮浓度的增加，*LYS* 相对表达量显著下降，0.12~0.23 mmol/L 处理组的表达水平显著低于对照组($P<0.05$)，且 0.23 mmol/L 处理组 *LYS* 表达相比对照组下降 41.3%。

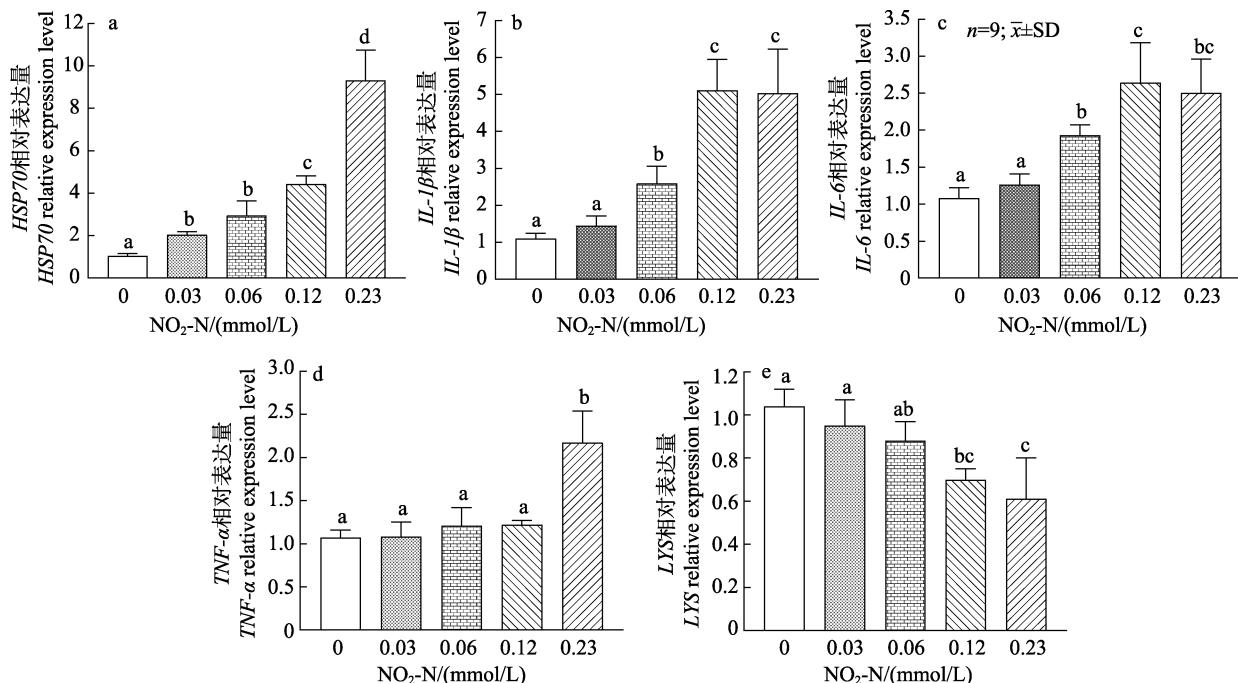


图 5 亚硝酸盐氮胁迫对罗非鱼肝脏组织的 *HSP70*、*IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α* 和 *LYS* 基因表达水平

a: 热休克蛋白 *HSP70* 基因表达量；b: 细胞白介素 *IL-1β* 基因表达量；c: 细胞白介素 *IL-6* 基因表达量；d: 肿瘤坏死因子 *TNF-α* 基因表达量；e: 溶菌酶 *LYS* 基因表达量。不同处理中不同字母表明差异显著($P<0.05$)。

Fig. 5 Effect of nitrite nitrogen stress on *HSP70*, *IL-1β*, *IL-6*, *TNF-α* and *LYS* gene expression levels in gill of juvenile *Oreochromis niloticus*

a: heat shock protein 70 (*HSP70*) gene expression; b: cytokines *IL-1β* gene expression; c: cytokines *IL-6* gene expression; d: tumor necrosis factor α (*TNF-α*) gene expression; e: lysozyme (*LYS*) gene expression.

The treatments with different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 亚硝酸盐氮胁迫对罗非鱼幼鱼血液生化代谢指标的影响

WBC 能参与机体的非特异性免疫，通过将病

菌包围、吞噬的方式抵抗病毒入侵，其数量能够反映生物体的生理和病理状态^[7]。研究发现，鱼类的应激^[8]、运动^[9]、非特异性免疫^[10]均会引起 WBC 数量的变化。此外，Almeida 等^[11]发现 Glu 的浓度变化与机体的应激显著相关，机体为对应激做出

适应而增加了肝糖原的分解从而提高了 Glu 的浓度。在本研究中, WBC 数量和 Glu 浓度随亚硝酸盐氮胁迫浓度的增加而出现轻度上调, 推测 WBC 和 Glu 浓度上升主要与罗非鱼受硝酸盐氮胁迫产生的轻度应激有关, 且应激水平与胁迫浓度成正相关。研究发现, 硝酸盐氮胁迫下, RBC 会出现收缩现象^[12], 且会诱导血红蛋白分子辅基血红素中的亚铁被氧化成三价铁, 将血红蛋白转变为高铁血红蛋白^[13], 导致生物体的缺氧。这与本研究中 RBC 和 HGB 随亚硝酸盐氮胁迫浓度上升而显著下调的结果相一致, 由此研究结果可推测, 亚硝酸盐氮胁迫的浓度与红细胞溶解速度和血红蛋白分子亚铁氧化速度成正相关, 相关推测有待进一步深入研究。

在本研究中, 随着亚硝酸盐氮胁迫浓度的上升, 罗非鱼幼鱼血清内 TC、TG 和 TP 的含量逐渐降低, 这与草鱼^[5]、印度鲮^[3]、印度鲤(*Catla catla*)^[14]和鳙(*Aristichthys nobilis*)^[15]的研究结果类似。作为血脂的主要组成成分, TC 和 TG 的降低表明亚硝酸盐氮胁迫对罗非鱼的脂质代谢产生影响。在亚硝酸盐氮胁迫下, 研究发现草鱼血清 TC 和 TG 含量显著下降, 胁迫浓度越大, 下降程度越显著^[5], 但本研究中, TG 的浓度虽有下降, 但各实验组(0.03~0.23 mmol/L)与对照组间均无显著差异, 表明低浓度亚硝酸盐氮胁迫对脂质代谢的影响程度较低, 说明脂类代谢受亚硝酸盐氮胁迫影响的程度与其的浓度成正相关。TP 数量与机体的代谢和免疫相关, Jha 等^[16]发现 TP 数量的上升会提高机体的先天免疫能力。在本研究中, 0.23 mmol/L 的亚硝酸盐氮胁迫会导致 TP 数量显著下降, 0.23 mmol/L 以下浓度虽会引起 TP 数量下降, 但并不显著。因此可推测在 0.23 mmol/L 及以上浓度的亚硝酸盐氮胁迫即会对罗非鱼幼鱼的免疫能力造成负面影响。

ALT 和 AST 通常作为鱼类肝损伤的评价指标^[17]。研究发现亚硝酸盐胁迫会对鱼类肝脏造成损伤, 在不同亚硝酸盐浓度(1 mg/L、2 mg/L、4 mg/L、8 mg/L 和 10.4 mg/L)的长期胁迫下, 印度鲮^[3]、印度鲤^[14]和南亚野鲮^[18]血清 ALT 和 AST 指数均出现上调, 且胁迫浓度越高, 上调程度越显著, 肝

损伤程度越高。在本研究中, 引起 ALT 和 AST 指数出现显著上调的亚硝酸盐氮胁迫的浓度起点分别为 0.06 mmol/L 和 0.03 mmol/L, 表明 0.06 mmol/L 以上处理组会对鱼类肝脏组织造成损伤, 造成转氨酶活性的非正常上升。

3.2 亚硝酸盐氮胁迫对罗非鱼幼鱼血液免疫指标及电解质的影响

水生生物有多个重要的防御分子, 如 ALP、LYS、补体和 IgM 等, 它们广泛地参与到机体的代谢和免疫过程^[19], 其中 ALP 和 LYS 作为机体免疫标志酶, 均能反映出机体的免疫力和对不良环境的抵抗力^[20~21]。本研究发现, 随着亚硝酸盐氮胁迫浓度的上升, ALP 和 LYS 活性逐渐下降, 研究结果与陈家长等^[22]关于亚硝酸盐氮急性胁迫对吉富罗非鱼幼鱼(120 g)血液 ALP 和 LYS 指数影响的结果一致。此外, 本研究发现, 随着亚硝酸盐氮胁迫浓度的上升, ALP 和 LYS 活性下降趋势较为缓慢, 当胁迫浓度提升至 0.23 mmol/L 时 ALP 和 LYS 才出现显著降低, 表明 0.12~0.23 mmol/L 亚硝酸盐氮胁迫浓度之间可能存在引起 ALP 和 LYS 活性显著性变化的阈值。IgM 是鱼类中的主要免疫球蛋白^[23], 研究发现多种环境污染物, 如五氯酚、重金属、氨等均可以抑制 IgM 及其 mRNA 的表达, 从而对硬骨鱼的免疫系统造成破坏^[24~25]。在本研究中, 浓度为 0.03 mmol/L 的亚硝酸盐氮胁迫并未对罗非鱼幼鱼 IgM 浓度产生影响; 但当胁迫浓度提升至 0.06 mmol/L 时, IgM 浓度显著降低, 且随胁迫浓度的提升, 0.06~0.23 mmol/L 处理间并无显著差异, 由此推测, 0.06 mmol/L 亚硝酸盐氮胁迫会显著影响尼罗罗非鱼幼鱼 IgM 的合成, 但超过这一胁迫浓度后 IgM 的合成情况并不会随胁迫浓度的上升而显著下降, 类似结果也出现在大菱鲆幼鱼对亚硝酸盐胁迫的应激反应中^[26], 具体生理机制有待进一步研究。

SOD 是机体中重要的抗氧化酶, 可对机体氧自由基进行防护性清除, 一定程度上可作为生物体的免疫指标^[27]。研究发现, 在 12 h 的短期胁迫下, 随着亚硝酸盐氮胁迫浓度的提高, 鲤的 SOD 活性呈现先增大后降低的趋势^[28]。短期高浓度胁迫会造成 SOD 的合成瞬间受到抑制^[5]。本研究结

果表明, 亚硝酸盐氮长期胁迫下罗非鱼血清 SOD 的活性随胁迫浓度的上升逐渐下调, 结合已有的研究成果, 推测 SOD 仅在短期低浓度胁迫下会提高机体对应激的抵抗能力, 长期胁迫下, 不论胁迫浓度的高低, 均会使 SOD 的活性受到抑制。从结果发现, 0.06 mmol/L 的亚硝酸盐氮长期胁迫对 SOD 的活性造成显著影响, 但随胁迫浓度增加, SOD 活性并无显著变化, 在浓度为 0.06~0.23 mmol/L 的亚硝酸盐氮长期胁迫下, 罗非鱼幼鱼 SOD 活性较为稳定, 由此推测, 低浓度 (0.06~0.23 mmol/L) 亚硝酸盐氮长期胁迫对罗非鱼幼鱼 SOD 活性的影响程度有限, 不会使 SOD 活性持续降低。

多项研究表明, 亚硝酸盐氮胁迫会影响鱼类的离子调控^[29~30]。 NO_2^- 会影响渗透平衡, 其与 Cl^- 存在吸收路径的竞争并引起 Cl^- 向低渗透环境流出^[31], K^+ 的渗透方向也会受到干扰, 并从红细胞和骨骼肌中流出^[32], 与 Na^+ 形成渗透压竞争从而引起 Na^+ 的降低。此外, Jensen 等^[30]认为 K^+ 和 Na^+ 的浓度变化与 Na^+/K^+ -ATPase 酶有关, 亚硝酸盐氮胁迫会导致 Na^+/K^+ -ATPase 酶的活力受抑制, 降低了机体对 K^+ 和 Na^+ 的渗透调控能力, 并导致了 K^+ 和 Na^+ 的浓度出现显著改变。本实验中, 亚硝酸盐氮胁迫引起了 K^+ 的显著上调和 Na^+ 、 Cl^- 的显著下调, 与以上结果相一致, 由此推测, 亚硝酸盐氮的长期胁迫对鱼类离子调控的影响与短期胁迫相似, 此外, 罗非鱼在 0.06 mmol/L 亚硝酸盐氮长期胁迫下, 血清 K^+ 和 Cl^- 浓度出现显著降低, 但随着胁迫浓度的上升, 血清 K^+ 和 Cl^- 浓度均保持稳定, 表明低浓度 (0.06~0.23 mmol/L) 亚硝酸盐氮长期胁迫对罗非鱼幼鱼 K^+ 和 Cl^- 浓度影响程度有限; 而血清 Na^+ 浓度在 0.23 mmol/L 亚硝酸盐氮长期胁迫下出现显著降低, 结合上述离子渗透平衡机制, 推测 0.23 mmol/L 亚硝酸盐氮长期胁迫下罗非鱼幼鱼 K^+ 与 Na^+ 的渗透压竞争达到较大水平, 促使 Na^+ 的显著降低。

3.3 亚硝酸盐氮胁迫对罗非鱼幼鱼肝组织免疫和应激相关基因 mRNA 表达的影响

基因表达的分析将有助于从分子水平上理解机体对各种环境应激的反应及调节模式^[33~34], 并

提供了一个可靠的分子生物标志物来评估生物体的应激或免疫状态^[35]。本研究中, LYS 表达水平随亚硝酸盐氮胁迫浓度的提高呈现缓慢下调, 这一趋势与 LYS 因子活性变化相一致。但与对照组相比, 在 0.12 mmol/L 亚硝酸盐氮胁迫下 LYS 表达水平出现了显著下调, 而 LYS 酶活出现显著下调的亚硝酸盐氮长期胁迫浓度为 0.23 mmol/L, 推测这方面的差异一方面可能是因为肝组织和血液两者之间溶菌酶表达有所差异; 另一方面可能是因为溶菌酶是一个大类, 包括 g、c 和 i 型等^[36], 而本研究主要是研究肝组织 c 型溶菌酶单个基因的表达水平变化, 故存在一定的差异。

热休克蛋白(HSP)是一种伴侣蛋白, 在新蛋白折叠和变性蛋白重折叠方面起到重要作用, 其家族成员 HSP70 已被广泛用于评估各种胁迫对鱼类的影响, HSP70 表达水平的升高可能反映了蛋白质损伤或对环境压力的耐受力的增加^[37~38]。研究发现, 随着亚硝酸盐氮胁迫浓度的提升, HSP70 在肝组织中的表达水平显著提高, 这一结果与黄锡鲷(*Sparus sarba*)^[39]和团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[40]的研究结果类似。此外, 0.03 mmol/L 的亚硝酸盐氮浓度胁迫下即可使罗非鱼 HSP70 表达水平显著提高, 表明 HSP70 对亚硝酸盐氮长期胁迫具有灵敏的指示作用, 极大地提高了罗非鱼幼鱼对应激环境的耐受力。

作为重要的免疫反应成分, 炎症在清除受损组织、促进修复过程和保护宿主免受微生物入侵方面发挥着关键作用^[41], *IL-1β*、*IL-6* 和 *TNF-α* 是 3 种重要的促炎性细胞因子, 能够诱导抗体产生, 诱导 T 细胞增殖和分化, 并调节其他细胞因子的表达^[34,42], 促炎性细胞因子基因的表达水平可被环境毒素、细菌或病毒所诱导或抑制^[43]。本研究中, *IL-1β* 和 *IL-6* 的表达水平随亚硝酸盐氮胁迫浓度的上升而逐渐上调, 且均在胁迫浓度为 0.06 mmol/L 时出现显著上升, 表明 0.06 mmol/L 浓度处理已超出罗非鱼幼鱼肝组织 *IL-1β* 和 *IL-6* 发生显著变化的安全阈值。此外, 随亚硝酸盐氮胁迫浓度的上升, *TNF-α* 表达水平虽在整体上与 *IL-1β* 和 *IL-6* 存在相似趋势, 但在胁迫浓度低于 0.23 mmol/L 的各组间(0~0.12 mmol/L) *TNF-α* 表达水平并无显

著差异, 幼鱼肝组织 *TNF-α* 发生显著变化的安全阈值要高于 *IL-1β* 和 *IL-6* 因子, 由此推测这可能是因为该基因对硝酸盐氮胁迫的敏感度要低于两者。

4 小结

本研究探究了亚硝酸盐氮长期胁迫对罗非鱼幼鱼血液常规指数、代谢和免疫生化指标、肝脏非特异性免疫基因表达的影响。结果表明, 胁迫 21d 后, 罗非鱼血液中 Glu、ALT、AST 和 K⁺浓度等指标随着亚硝酸盐氮胁迫水平的增加而出现显著上调, 而 TG、TC、TP、SOD、ALP、LYS、IgM、Na⁺和 Cl⁻浓度与亚硝酸盐氮浓度呈负相关。肝脏组织中 *HSP70*、*IL-1β*、*IL6* 和 *TNF-α* 表达水平随着亚硝酸盐氮的浓度增加呈现显著上调趋势, 而 LYS 则与之相反。综合分析认为, 0.06~0.23 mmol/L 的亚硝酸盐长期胁迫下可导致罗非鱼幼鱼血液生理、代谢和免疫产生功能障碍, 并影响肝组织的非特异性免疫基因表达, 结果有助于进一步了解亚硝酸盐氮在罗非鱼体内的毒性机制, 为罗非鱼的养殖水质因子调控提供参考。

参考文献:

- [1] FAO. Fishery and Aquaculture Statistics 2017[M]. Rome: Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2019: 30.
- [2] Mao L, Xiao W, Yang H. Improvement of aquaculture water quality monitoring system by information fusion[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2015, 28(2): 55-58. [毛力, 肖炜, 杨弘. 用信息融合技术改进水产养殖水质监控系统[J]. 水产学杂志, 2015, 28(2): 55-58.]
- [3] Das P C, Ayyappan S, Jena J K, et al. Nitrite toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham.): Acute toxicity and sub-lethal effect on selected haematological parameters[J]. Aquaculture, 2004, 235(1-4): 633-644.
- [4] Jia R, Han C, Lei J L, et al. Effects of nitrite exposure on haematological parameters, oxidative stress and apoptosis in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Aquatic Toxicology, 2015, 169: 1-9.
- [5] Ye J. The acute effect of nitrite on blood physiological and biochemical parameters and non-specific immunity in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013: 34-42. [叶俊. 亚硝酸盐急性胁迫对草鱼血液生理生化指标和非特异性免疫性能的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013: 34-42.]
- [6] Wang Y B, Zhang W J, Li W F, et al. Acute toxicity of nitrite on tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different external chloride concentrations[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2006, 32(1): 49-54.
- [7] Ciji A, Sahu N P, Pal A K, et al. Alterations in serum electrolytes, antioxidative enzymes and haematological parameters of *Labeo rohita* on short-term exposure to sublethal dose of nitrite[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2012, 38(5): 1355-1365.
- [8] Santhakumar M, Balaji M, Ramudu K. Effect of sublethal concentrations of monocrotaphos on erythropoietic activity and certain hematological parameters of fish *Anabas testudineus* (Bloch)[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1999, 63(3): 379-384.
- [9] Yu L J. The effects of exercise training on growth, antioxidative ability and immune function in juvenile *Spinibarbus sinensis*[D]. Chongqing: Southwest University, 2014: 18-27. [于丽娟. 运动训练对中华倒刺鲃幼鱼生长、抗氧化及免疫机能的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2014: 18-27.]
- [10] Das P C, Ayyappan S, Jena J K, et al. Nitrite toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham.): Acute toxicity and sub-lethal effect on selected haematological parameters[J]. Aquaculture, 2004, 235(1-4): 633-644.
- [11] Almeida J A, Novelli E L B, dal Pai Silva M, et al. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Environmental Pollution, 2001, 114(2): 169-175.
- [12] Knudsen P K, Jensen F B. Recovery from nitrite-induced methaemoglobinemia and potassium balance disturbances in carp[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1997, 16(1): 1-10.
- [13] Jensen F B. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2003, 135(1): 9-24.
- [14] Das P C, Ayyappan S, Jena J K, et al. Effect of sub-lethal nitrite on selected haematological parameters in fingerling *Catla catla* (Hamilton)[J]. Aquaculture Research, 2004, 35(9): 874-880.
- [15] Lin Y, Miao L H, Pan W J, et al. Effects of nitrite nitrogen stress on blood biochemical indicators and HSP70 mRNA expression level of *Aristichthys nobilis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(8): 1192-1202. [林艳, 缪凌鸿, 盘文静, 等. 亚硝酸盐氮胁迫对鳙血液生化指标以及组织 HSP70 mRNA 表达水平的影响[J]. 水产学报, 2017, 41(8): 1192-1202.]
- [16] Jha A K, Pal A K, Sahu N P, et al. Haemato-immunological

- responses to dietary yeast RNA, ω-3 fatty acid and β-carotene in *Catla catla* juveniles[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(5): 917-927.
- [17] Xiao W, Li D Y, Zhu J L, et al. Dietary valine requirement of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Aquaculture Nutrition, 2018, 24(1): 315-323.
- [18] Das P C, Ayyappan S, Das B K, et al. Nitrite toxicity in Indian major carps: Sublethal effect on selected enzymes in fingerlings of *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhinus mrigala*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2004, 138(1): 3-10.
- [19] Tort L, Balasch J C, Mackenzie S. Fish immune system: A crossroads between innate and adaptive responses[J]. Inmunología, 2003, 22(3): 277-286.
- [20] Song S S, Ma H L, Feng J, et al. Tissue distribution and response to infection of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* of *Tf*, *TNFα* and *C-Lys* in *Trachinotus ovatus*[J]. South China Fisheries Science, 2017, 13(2): 77-84. [宋沙沙, 马红玲, 冯娟, 等. 卵形鲳鲹 *Tf*、*TNFα* 和 *C-Lys* 的组织分布及对美人鱼发光杆菌感染的响应[J]. 南方水产科学, 2017, 13(2): 77-84.]
- [21] Liu B, Leng X J, Li X Q, et al. Effect of Chinese medicine herb on growth, hemolymph non-specific immunity and muscle composition of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2014, 23(4): 528-534. [刘波, 冷向军, 李小勤, 等. 中草药对凡纳滨对虾生长、血淋巴非特异性免疫和肌肉成分的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2014, 23(4): 528-534.]
- [22] Chen J Z, Zang X L, Meng S L, et al. Effect of nitrite nitrogen stress on the activities of nonspecific immune enzymes in serum of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*)[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2012, 21(5): 897-901. [陈家长, 贲学磊, 孟顺龙, 等. 亚硝酸盐氮胁迫对罗非鱼 (GIFT *Oreochromis niloticus*) 血清非特异性免疫酶活性的影响[J]. 生态环境学报, 2012, 21(5): 897-901.]
- [23] Tellez-Bañuelos M C, Santerre A, Casas-Solis J, et al. Endosulfan increases seric interleukin-2 like (IL-2L) factor and immunoglobulin M (IgM) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(2): 401-405.
- [24] Chen X, Yin D, Hu S, et al. Immunotoxicity of pentachlorophenol on macrophage immunity and IgM secretion of the crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2004, 73(1): 153-160.
- [25] Martins K, Applegate B, Hagedorn B, et al. Di(2-ethylhexyl) phthalate inhibits B cell proliferation and reduces the abundance of IgM-secreting cells in cultured immune tissues of the rainbow trout[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 44(1): 332-341.
- [26] Jia R, Liu B L, Han C, et al. The physiological performance and immune response of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) to nitrite exposure[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2016, 181-182: 40-46.
- [27] Wang W N, Wang A L, Zhang Y J, et al. Effects of nitrite on lethal and immune response of *Macrobrachium nipponense*[J]. Aquaculture, 2004, 232(1-4): 679-686.
- [28] Han Y, Zhang H, Wang K. Activity of SOD and GSH-Px in the blood of fingerling *Cyprinus carpio* under different nitrite concentration[J]. Freshwater Fisheries, 2007, 37(1): 66-68. [韩英, 张辉, 王琨. 亚硝态氮对鲤鱼种血液 SOD 及 GSH-Px 的影响[J]. 淡水渔业, 2007, 37(1): 66-68.]
- [29] Lefevre S, Jensen F B, Huang D T T, et al. Effects of nitrite exposure on functional haemoglobin levels, bimodal respiration, and swimming performance in the facultative air-breathing fish *Pangasianodon hypophthalmus*[J]. Aquatic Toxicology, 2011, 104(1-2): 86-93.
- [30] Jensen F B, Andersen N A, Heisler N. Effects of nitrite exposure on blood respiratory properties, acid-base and electrolyte regulation in the carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Journal of Comparative Physiology B, 1987, 157(5): 533-541.
- [31] Williams E M, Eddy F B. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity[J]. Journal of Comparative Physiology B, 1986, 156(6): 867-872.
- [32] Stormer J, Jensen F B, Rankin J C. Uptake of nitrite, nitrate, and bromide in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Effects on ionic balance[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1996, 53(9): 1943-1950.
- [33] Gagné F, Smyth S A, André C, et al. Stress-related gene expression changes in rainbow trout hepatocytes exposed to various municipal wastewater treatment influents and effluents[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2013, 20(3): 1706-1718.
- [34] Dan X M, Zhang T W, Li Y W, et al. Immune responses and immune-related gene expression profile in orange-spotted grouper after immunization with *Cryptocaryon irritans* vaccine[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(3): 885-891.
- [35] Kim J H, Dahms H U, Han K N. Biomonitoring of the river pufferfish, *Takifugu obscurus* in aquaculture at different rearing densities using stress-related genes[J]. Aquaculture Research, 2013, 44(12): 1835-1846.
- [36] Yan Q Q, Tao Y, Li W, et al. Recombinant expression of common carp (*Cyprinus carpio*) c-type lysozyme in *pichia pastoris* and its antibacterial activity[J]. Journal of Agricultural and Applied Biology, 2013, 10(1): 1-6.

- tural Biotechnology, 2019, 27(11): 1912-1922. [颜倩倩, 陶妍, 李雯, 等. 鲤鱼 c 型溶菌酶在毕赤酵母中的重组表达及其抑菌活性[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(11): 1912-1922.]
- [37] Iwama G K, Vijayan M M, Forsyth R B, et al. Heat shock proteins and physiological stress in fish[J]. American Zoologist, 1999, 39(6): 901-909.
- [38] Qiang J, Yang H, Wang H, et al. Physiological responses and HSP70 mRNA expression in GIFT tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* under short-term crowding[J]. Aquaculture Research, 2015, 46(2): 335-345.
- [39] Deane E E, Woo N Y S. Impact of nitrite exposure on endocrine, osmoregulatory and cytoprotective functions in the marine teleost *Sparus sarba*[J]. Aquatic Toxicology, 2007, 82(2): 85-93.
- [40] Sun S M, Zhu J, Ge X P, et al. Cloning and expression analysis of a heat shock protein 90 β isoform gene from the gills of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) subjected to nitrite stress[J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(2): 3036-3051.
- [41] Bols N C, Brubacher J L, Ganassin R C, et al. Ecotoxicology and innate immunity in fish[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2001, 25(8-9): 853-873.
- [42] Eulenfeld R, Dittrich A, Khouri C, et al. Interleukin-6 signalling: More than Jak and STATs[J]. European Journal of Cell Biology, 2012, 91(6-7): 486-495.
- [43] Meloni M, Candusso S, Galeotti M, et al. Preliminary study on expression of antimicrobial peptides in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) following in vivo infection with *Vibrio anguillarum*. A time course experiment[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 43(1): 82-90.

Physiological performance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposure to long term of nitrite nitrogen stress

XIAO Wei¹, CHEN Binglin^{1,2}, ZHU Jinglin¹, LI Dayu¹, ZOU Zhiyin¹, YU Jie¹, YANG Hong^{1,2}

1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;
2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China

Abstract: To study the physiological performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under long term nitrite exposure stress, five different treatments of nitrite concentration groups (control, 0.03, 0.06, 0.12, and 0.23 mmol/L) were set to assess the effects of the physiological, biochemical, metabolic function, and non-specific immune response in blood and liver tissue of juvenile tilapia under 21 days of nitrite exposure treatments. The results showed that the white blood cell count in the blood increased slightly with the increasing nitrite nitrogen concentrations, whereas the red blood cell count and hemoglobin concentration decreased significantly ($P<0.05$). Serum glucose concentration, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase activities, and K^+ concentration in juvenile tilapia increased significantly with increasing nitrite nitrogen concentrations ($P<0.05$), whereas triglycerides, total cholesterol, total protein, Na^+ , and Cl^- concentration, and superoxide dismutase, alkaline phosphatase, and lysozyme activities, and immunoglobulin concentrations showed an inverse trend with increased nitrite nitrogen ($P<0.05$). The hepatic expression of non-specific immune factors *HSP70*, *IL-1 β* , *IL6*, and *TNF α* mRNA levels was significantly improved by increased nitrite nitrogen concentrations ($P<0.05$), whereas *LYS* mRNA expression decreased. The results suggested that long-term exposure of low nitrite nitrogen concentrations (0.06–0.23 mmol/L) could lead to dysfunction of blood physiology, metabolism, and immune response in tilapia, and furthermore the hepatic non-specific immune gene expression could be affected. Data from this study will be useful to further understand nitrite ion toxicity mechanisms in the tilapia, and thereby help to establish a safe range of nitrite nitrogen in tilapia aquaculture.

Key words: *Oreochromis niloticus*; nitrite nitrogen; physiological performance; metabolism; non-specific immune response

Corresponding author: YANG hong. Email: yangh@ffrc.cn