

拥挤胁迫后鲫鱼血液皮质醇和溶菌酶水平的变化及对病原的敏感性

王文博, 汪建国, 李爱华, 蔡桃珍

(中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要: 分别在拥挤胁迫后第3、10、20、30天对鲫鱼(*Carassius auratus*)血液皮质醇水平和血液溶菌酶水平进行了检测, 并在每次采集血样后用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)进行人工感染以评估鱼体抵抗力。结果显示, 血液皮质醇水平在胁迫后几天内显著升高($P < 0.005$), 随后虽有所下降, 但至第30天高密度组仍保持较高水平(216.32 ± 11.91) ng/mL。实验初期, 血液溶菌酶水平小幅升高, 但经过长时间的拥挤后, 高密度组血液溶菌酶活性受到极大抑制, 显著低于同期对照组($P < 0.01$)。攻毒后的死亡率与胁迫时间成正相关, 在最后一次采样期, 高密度组死亡率高达58.3%, 而同期对照组仅为16.7%, 两者具统计学差异($P < 0.01$)。实验表明, 经过拥挤胁迫后, 鲫鱼血液皮质醇水平和溶菌酶水平均发生了变化, 短期内, 两者成正相关, 而长期胁迫则表现为负相关。另外, 拥挤胁迫也引起了鱼体抵抗力的下降。

关键词: 拥挤胁迫; 皮质醇; 溶菌酶; 抗病性

中图分类号: S943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)05-0408-05

鱼体可能面临多方面的胁迫, 如放养过程中的高密度拥挤、水质的恶化、个体间的竞争、水温的变化以及运输中的振荡等^[1-2]。其中, 拥挤胁迫较为常见, 国外对其在鱼体免疫系统的影响方面有大量研究^[3-4], 但在国内, 却少见这方面的报道。

近年来, 鱼类内分泌系统与免疫系统之间存在着双向联系的观点被提出^[5], 这对探索由胁迫介导的鱼病发生机理提供了新的思路。在所有内分泌激素中, 皮质醇是最主要的, 也是研究最多的, 而溶菌酶是鱼体非特异性免疫因子, 在抵抗病原菌入侵方面起着重要作用。鉴于此, 我们选择了这两项指标, 通过观察它们在鱼体拥挤后的动力学变化规律, 来揭示两者的内在联系, 并阐明其在胁迫诱发的鱼体对病原敏感性升高的过程中所起的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鲫鱼(*Carassius auratus*)购自武汉市青菱繁育场, 平均体重为(49.83 ± 4.15) g。实验前在持续流水的水泥池(容积为500 L)中驯养两周, 实验期间水温控制在(22 ± 2) °C, DO 4.0 ~ 5.5 mg/L, 隔天投喂商业配合饲料加青饲料。

溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)冻干粉购自Sigma公司。

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)XS91-4-1为本实验室保存菌种, 是淡水养殖鱼类细菌性败血症(Bacterial hemorrhagic septicemia)病原^[6]。

1.2 实验分组

同源同批同规格实验鱼被随机分为13个组, 其中1个组作为实验前对照组, 其余12个组做如下设计: 对照(7.5 g/L)4组, 低密度(15 g/L)4组, 高密度(80 g/L)4组, 分别用于4次采样。每组均为12尾, 放养于同样规格的水族箱(容积为80 L)中, 各组水族箱注入不同体积的水以达到不同放养密度。实验期间水流速度控制在100 L/h左右, 并减少人为干扰, 保持安静。

1.3 血样的采集

分别在实验后第3、10、20、30天采血, 实验前对照组在拥挤胁迫之前采血。采样前, 将鱼迅速捞起并立即投入质量浓度为200 mg/L的MS-222中做快速深度麻醉, 之后用1次性医用注射器于尾静脉抽血。血样静置半小时后在4 °C以3 000 r/min离心10 min, 所得血清置-20 °C冻存备用。采血后各组鱼随即进行人工感染实验。

收稿日期: 2004-04-20; 修订日期: 2004-05-03。

基金项目: 中国科学院生物学及生物技术特别支持项目(2001); 中国科学院知识创新工程项目(KSCX2-1-04)。

作者简介: 王文博(1976-), 男, 博士研究生, 主要从事鱼类细菌学及免疫学研究。E-mail: wenbowang@163.com

通讯作者: 汪建国。Tel: 027-87647720; E-mail: wangjie@ihb.ac.cn

1.4 检测项目

1.4.1 血液皮质醇浓度 参照 Pickering^[7]方法用放免法(RIA)进行测定,试剂盒购自北京北方生物技术研究所。

1.4.2 血液溶菌酶活性 按 Parry^[8]所述分光光度计法检测。5 μ L 新鲜血清加入 3 mL *M. lysodeikticus* 菌液中,测定波长为 540 nm。以 1 min 内吸光值下降 0.001 为 1 个活性单位(U)。

1.4.3 攻毒死亡率 将两次活化后的 *A. hydrophila* XS91-4-1 用生理盐水洗脱菌苔,按李爱华^[9]所述分光光度计法调配,使终浓度为 6×10^8 cells/mL。每尾腹腔注射 0.3 mL,观察 1 周,统计死亡率。

2 实验结果

2.1 血液皮质醇浓度

拥挤胁迫后鲫鱼血液皮质醇浓度变化如图 1 所示。各采样期的对照组皮质醇水平波动不大,平均值为 (15.21 ± 5.34) ng/mL,说明放养环境是安静的,满足应激实验条件。高密度组和低密度组均在胁迫后第 3 天达到最大值,分别为 (312.22 ± 17.13) ng/mL 和 (164.28 ± 13.56) ng/mL,都与同期对照组的 (21.35 ± 5.61) ng/mL 有极显著差异($P < 0.005$)。之后,实验组皮质醇水平开始回落,但高密度组至第 30 天仍维持较高水平 (216.32 ± 11.91) ng/mL。

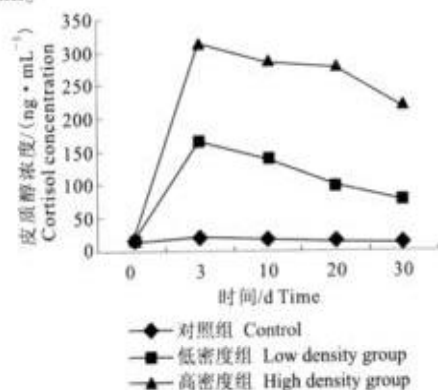


图 1 拥挤胁迫后鲫鱼血液皮质醇水平的变化

注:对照组密度:7.5 g/L;低密度组:15 g/L;高密度组:80 g/L。

Fig. 1 The change of cortisol level in *Carassius auratus* serum after crowding stress

Note: Fish density in control: 7.5 g/L; Low density group: 15 g/L; High density group: 80 g/L.

2.2 血液溶菌酶活性

拥挤胁迫后鲫鱼血液溶菌酶活性变化如图 2 所

示。在实验 3 d 内,实验组溶菌酶水平均有上升现象,高密度组自第 3 天达到峰值后即大幅下降,到第 30 天已显著低于同期对照组($P < 0.01$),低密度组也有降低,但降幅较小。

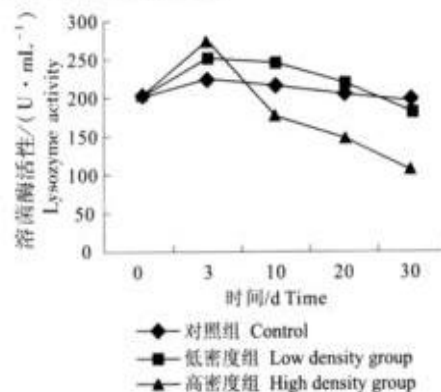


图 2 拥挤胁迫后鲫鱼血液溶菌酶活性的变化

注:对照组密度:7.5 g/L;低密度组:15 g/L;高密度组:80 g/L。

Fig. 2 Change of lysozyme activity in *Carassius auratus* serum after crowding stress

Note: Fish density in control: 7.5 g/L; Low density group: 15 g/L; High density group: 80 g/L.

2.3 对病原的敏感性

拥挤胁迫后,在每个采样期用 *A. hydrophila* 对各组进行人工感染,死亡情况见表 1。在胁迫后第 3 天,实验组死亡率均低于同期对照组,但无统计学差异。在第 10 天,低密度组死亡率显著高于同期对照组($P < 0.05$),第 30 天,高密度组死亡率高达 58.3%,而对照组仅为 16.7%,两者差异极显著($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 拥挤胁迫对鲫鱼血液皮质醇水平的影响

皮质醇(cortisol,即氢化可的松)是鱼体在受到外界刺激后,通过丘脑下部-垂体-肾间组织轴(Hypothalamus-Pituitary-Interrenal, HPI)所分泌的一种重要应激激素,血液皮质醇水平的升高被看做是鱼类应激的灵敏信号^[10]。在本实验中,拥挤后 3 d 之内,实验组皮质醇均迅速上升,且密度越高幅度越大,说明拥挤引起了鱼体的应激反应,其强度为密度依赖型。之后,两实验组皮质醇水平均有回落,但高密度组 1 月后仍维持较高水平(图 1),表明在较长时间的刺激后,低密度组鱼对胁迫已逐渐适应,而高密度组鱼仍不适应。皮质醇整个变化趋势与 Tort^[11]

表1 拥挤胁迫后鲫鱼人工感染嗜水气单胞菌的死亡率

Table 1 Mortality rate of *Carassius auratus* due to *A. hydrophila* infection after crowding stress

拥挤天数 Crowded days	实验组别 Group	受试尾数 Number of experimental fish	死亡尾数 Number of mortal fish	死亡率/% Mortality rate
0	实验前对照组 Unrelated control	12	3	25.0
3	对照组 Control	12	4	33.3
	低密度组 Low density	12	3	25.0
	高密度组 High density	12	2	16.7
10	对照组 Control	12	2	16.7
	低密度组 Low density	12	5	41.7*
	高密度组 High density	12	4	33.3
20	对照组 Control	12	3	25.0
	低密度组 Low density	12	4	33.3
	高密度组 High density	12	4	33.3
30	对照组 Control	12	2	16.7
	低密度组 Low density	12	5	41.7*
	高密度组 High density	12	7	58.3**

注: 1) 对照组密度: 7.5 g/L; 低密度组: 15 g/L; 高密度组: 80 g/L.

2) * 表示与对照相比有显著差异 ($P < 0.05$), ** 表示差异极为显著 ($P < 0.01$)

Note: 1) Fish density in control: 7.5 g/L; Low density group: 15 g/L; High density group: 80 g/L.

2) *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

和 Rotllant^[12] 分别用海鲷 (*Sparus aurata*) 和红棘鲷鱼 (*Pagrus pagrus*) 做的拥挤实验结果十分相似, 尽管在数值上差别较大。实际上, 即使是同种胁迫方法, 若实验鱼种类不同, 鱼体对胁迫的敏感性及适应能力也是不同的, 其血液皮质醇浓度是一定存在差异的。Fevolden^[13] 认为这可能是由鱼自身相关基因决定的。

3.2 拥挤胁迫对鲫鱼血液溶菌酶水平的影响

鱼类抵抗外来病原入侵的第一道防线是其广泛的非特异性的体液和细胞免疫系统^[14]。溶菌酶即是体液免疫因子之一, 它产生于嗜中性粒细胞和巨噬细胞, 并被分泌到血液及粘液中发挥溶菌效应^[15]。由图 2 可知, 实验组血液溶菌酶活性在拥挤初期呈上升趋势。普遍认为, 鱼体受到急性胁迫后, 常伴随有血液溶菌酶水平的升高^[15-16]。这是否说明短期拥挤 (如 3 d) 可以看做是急性胁迫, 而经过 30 天的高密度拥挤胁迫后, 血液溶菌酶活性受到严重抑制, 显著低于正常值, 支持了 Mock^[15] 和 Yin^[17] 等人认为的慢性胁迫会导致溶菌酶活性降低的观点。但 Røed^[18] 得出了相反的结论, 即胁迫后血液溶菌酶水平是先降后升的。这些不同的结果提示, 胁迫后鱼体溶菌酶水平变化的趋向可能受到诸多因素的影响, 如胁迫的类型、强度以及时间等^[19]。所以, 当比较溶菌酶活性时, 以上因素就必须考虑进去。

3.3 拥挤胁迫后鲫鱼血液皮质醇与溶菌酶水平的关联

鱼体胁迫后, 由 HPI 轴介导的皮质醇反应如此之灵敏, 以致血液皮质醇水平被公认为鱼体的应激信号^[10,20]。然而, 有学者认为, 胁迫后血液溶菌酶反应亦可作为鱼体的应激信号^[21-22], 但较皮质醇反应的遗传稳定性要差些^[13]。Demers^[16] 分析溶菌酶之所以能在胁迫后几分钟之内被检出, 可能是因其前体或用以指导合成的 mRNA 已经存在于血液中, 激活后合成出了有活性的溶菌酶的缘故。近年来, 鱼类内分泌与免疫系统的联系越来越受到人们的关注, 而 HPI 轴分泌的皮质醇对鱼类免疫系统的影响更成为了关注的焦点^[5,23]。皮质醇介导的溶菌酶活性升高^[16,22] 和降低^[13,17] 均有报道。结合本实验来看, 在胁迫前 3 d, 血液皮质醇与溶菌酶水平均上升, 此后高密度组皮质醇一直保持着较高水平, 而溶菌酶水平则大大降低。据此推测, 鱼体可能把短期的拥挤识别为急性胁迫, 大量分泌皮质醇来促进糖合成和脂肪降解以获得能量^[1], 并连同溶菌酶共同抵抗胁迫。而长期的拥挤是一种慢性胁迫, 引起了皮质醇浓度长时间升高和溶菌酶活性的降低。

3.4 鲫鱼血液皮质醇和溶菌酶对鱼体抵抗力的作用

溶菌酶是一种水解酶, 具有抗菌活性, 特别是对革兰氏阳性菌, 可通过破坏其细胞壁而使细菌裂解。Tomoki^[24] 报道, 鲑鱼体内的溶菌酶对 *A. hydrophila*

有杀伤作用。皮质醇对鱼体抵抗力的影响不可一概而论,应分两种情况:急性胁迫引起的皮质醇短期的升高可增强机体非特异性免疫,包括细胞免疫和体液免疫^[16],从而提高鱼体抵抗力;慢性胁迫引起的皮质醇长期的升高则会抑制机体免疫功能,导致对病原敏感性上升^[19]。在本实验中,拥挤3 d时,实验组血液皮质醇和溶菌酶水平均上升到最大值,而此时攻毒后的死亡率最低。随着胁迫时间的增加,血液皮质醇水平未有大的变化,而溶菌酶水平显著下降,同时死亡率在逐渐上升。另据报道,皮质醇还可减少组织或血液中T、B淋巴细胞的数量、抗体产生数量、抑制吞噬细胞活性以及补体活性,并可损伤脾、胸腺、头肾等免疫器官^[1]。但在本实验中,皮质醇是否对上述鱼体免疫系统也产生了一定程度的影响,尚需进一步研究。

综上所述,经过拥挤胁迫,鲫鱼血液皮质醇水平和溶菌酶水平均发生了变化,短期内,两者成正相关,而长期胁迫则表现为负相关。另外,拥挤胁迫也引起了鱼体抵抗力的下降。

参考文献:

- [1] 王文博,李爱华. 环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概况[J]. 水产学报, 2002, 26(4): 368-374.
- [2] Pickering A D, Duston J. Administration of cortisol to brown trout, *Salmo trutta* L., and its effects on the susceptibility to *Saprolegnia* infection and furunculosis[J]. J Fish Biol, 1983, 23: 163-175.
- [3] Robertson O H, Hane S, Wexler D C, et al. The effect of hydrocortisone on immature rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Gen Comp Endocrinol, 1963, 3: 422-436.
- [4] Klinger H, Delventhal H, Hilge V. Water quality and stocking density as stressors of channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf) [J]. Aquaculture, 1983, 30: 263-272.
- [5] James H, David J B. Mini Review: Modulation of the immune system by hormones[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2000, 77: 163-176.
- [6] 徐伯寅,殷战,吴玉琛,等. 淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌的研究[J]. 水生生物学报, 1993, 17: 259-266.
- [7] Pickering A D, Pottinger P. Seasonal and diet changes in plasma cortisol levels of the brown trout, *Salmo trutta* L. [J]. Gen Comp Endocrinol, 1983, 49: 232-239.
- [8] Parry R M, Chandan R C, Shahani K M. A rapid and sensitive assay of muramidase[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1965, 119: 383-386.
- [9] 李爱华. 我国鱼类病原菌耐药性、耐药质粒及几种药物抗菌作用的研究[D]. 武汉:中国科学院水生生物研究所, 1998. 108.
- [10] Strange R J, Schreck C B. Anesthetic and handling stress on survival and cortisol concentration in yearling Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. J Fish Res Bd Can, 1978, 35: 345-349.
- [11] Tort L, Sunyer J O, Gomez E, et al. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilt-head sea bream *Sparus aurata* [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1996, 51: 179-188.
- [12] Rotllant J, Pavlidis M, Kentouri M, et al. Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress [J]. Aquaculture, 1997, 156: 279-290.
- [13] Fevolden S E, Røed K H, Fjalestad K T, et al. Poststress levels of lysozyme and cortisol in adult rainbow trout: heritabilities and genetic correlations[J]. J Fish Biol, 1999, 54: 900-910.
- [14] Ellis A E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2001, 25: 827-839.
- [15] Mock A, Peters G. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution[J]. J Fish Biol, 1990, 37: 873-885.
- [16] Demers N E, Bayne C J. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout[J]. Developmental & Comparative Immunology, 1997, 21: 363-373.
- [17] Yin Z, Lam T J, Sin Y M. The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1995, 5: 519-529.
- [18] Røed K H, Larsen H J, Linder R D, et al. Genetic variation in lysozyme activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture, 1993, 109: 237-244.
- [19] Fevolden S E, Røed K H, Fjalestad K. A combined salt and confinement stress enhances mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high stress responsiveness[J]. Aquaculture, 2003, 216: 67-76.
- [20] Bonga S E W. The stress response in fish [J]. Physiol Rev, 1997, 77: 591-625.
- [21] Fevolden S E, Refstie T, Røed K H. Selection for high and low cortisol stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquaculture, 1991, 95: 53-65.
- [22] Fevolden S E, Røed K H. Cortisol and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high or low tolerance to stress[J]. J Fish Biol, 1993, 43: 919-930.
- [23] Takashi Y, Teruyuki N. Interaction between endocrine and immune systems in fish [J]. International Review of Cytology, 2002, 220: 35-92.
- [24] Tomoki Y. The nonspecific immune system: humoral defense [A]. The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment (Eds Iwama G, Nakanishi T.) [M]. USA: Academic Press, 1996, 105-157.

Changes of cortisol and lysozyme levels in *Carassius auratus* blood after crowding stress and the fish sensitivity to pathogen

WANG Wen-bo, WANG Jian-guo, LI Ai-hua, CAI Tao-zhen

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: The problem of stress in both natural fisheries and in intensive cultivation systems is a major subject of scientific investigation. It is reported that one of the fish's physiological response to different stresses is a stimulation of the hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis, with a increase in the concentration of circulating cortisol, which can be considered as both general and endocrine indicator of stress in fish. As is known, teleost fish possess a variety of specific and non-specific defence mechanisms against invading organisms. When a pathogen penetrates the physical barriers of the animal, the first defence lines it encounters are those of the non-specific immune system. Chemical defences attack the pathogen or may opsonise it for further destruction by the cellular components of the non-specific immune system. Therefore, the non-specific immune system of fish is important in resistance to disease and is worthy of more attention. Lysozyme is a well-characterized protein, having an antibacterial effect (particularly on Gram-positive bacteria) both by attacking the bacterial cell wall, thereby causing lysis, and by stimulating phagocytosis of bacteria, so lysozyme as an innate immune component plays an important role in resisting the invasion of pathogenic microbes. Crowding stress, a kind of chronic stress, is so common in aquaculture that in recent years it has received much attention. In view of the important effects of cortisol and lysozyme on fish, the two indexes were therefore chosen to test after crowding stress.

In the present study, about 160 fish were randomly allocated into 13 fiberglass tanks (12 fish per tank): one tank for control group before crowding (unrelated control group), four tanks for control groups (7.5 g/L), four tanks for low density groups (15 g/L) and four tanks for high density groups (80 g/L). Cortisol and lysozyme levels in *Carassius auratus* blood were measured at the 3rd, 10th, 20th and 30th days after crowding stress, and the mortalities due to *Aeromonas hydrophila* infection were also counted post every sampling. The results indicated that the blood cortisol level increased remarkably at third day after stress ($P < 0.005$), then decreased slightly, but still maintained a high concentration (216.32 ng/mL average) in high density group at 30th day. At third day after crowding, blood lysozyme level had a little elevation, but it was inhibited markedly by long term stress in comparison with control group ($P < 0.01$). Mortality due to *A. hydrophila* infection had a positive correlation with crowding time. At the last sampling, the average mortality of high density group was 58.3%, which was statistically higher than that of control group (16.7% only). It is suggested from the present study that, blood cortisol level and lysozyme level are a positive correlation after short term stress, whereas have a negative one post long term stress. In addition, the resistance ability to disease is also depressed by crowding stress.

Key words: crowding stress; cortisol; lysozyme; resistance to disease

Corresponding author: WANG Jian-guo. E-mail: wangjg@ihb.ac.cn