

饥饿对草鱼非特异免疫水平的影响

华雪铭 朱站英 邢思华 王 军 韩加凤 于 宁 周洪琪

上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306

摘要:研究了长期饥饿对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)非特异性免疫水平的影响。实验选取平均体质量(31.86 ± 1.47) g的草鱼,随机分为2个实验组(对照组和饥饿组),每组3个平行,饥饿处理15、30、45和60 d,测定饥饿对草鱼头肾和脾中自然杀伤(NK)细胞的杀伤活性、血清和肝胰脏中溶菌酶活性、血清中碱性磷酸酶活性的影响。结果表明:受饥饿胁迫的影响,草鱼自然杀伤性细胞在脾和头肾中的杀伤活性显著低于对照组($P < 0.05$)且不随着饥饿时间的延长发生显著性变化;随着饥饿时间的延长,血清和肝胰脏中溶菌酶呈现先升高后降低的趋势,血清碱性磷酸酶在饥饿15、45、60 d时显著低于对照组;饥饿组的碱性磷酸酶活性在饥饿30 d以后,维持恒定。由此可见,长时间的饥饿胁迫降低了草鱼的免疫水平。相比较而言,自然杀伤细胞的杀伤活性在反映鱼类免疫状况时比溶菌酶和碱性磷酸酶可能更为灵敏。

关键词:草鱼;饥饿;自然杀伤细胞;溶菌酶;碱性磷酸酶

中图分类号:Q955 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2012)02-91-07

Effects of Starvation on the Non-specific Immune Parameters of Grass Carp, *Ctenopharyngodon idellus*

HUA Xue-Ming ZHU Zhan-Ying XING Si-Hua WANG Jun

HAN Jia-Feng YU Ning ZHOU Hong-Qi

Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University,
Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China

Abstract: This paper reports the effects of long-term starvation on non-specific immune parameters of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Fish with body weight (31.86 ± 1.47) g were randomly divided into two groups (the control group and the starvation group), and three parallel samples were investigated in each experimental group. Cytotoxicity of natural killer cells against K562 in the spleen and head-kidney was detected by LDH releasing assay when the fish were starved for 15, 30, 45 or 60 d, and the activities of lysozyme in the serum and hepatopancreas and alkaline phosphatase in the serum were also examined. The results indicated that under starvation stress the natural killer activity was significantly lower in starvation group than that in control group in the kidney and spleen of the Grass Carp fingerlings ($P < 0.05$), and the activity no longer prominently decreased as starvation time extended. The activity of lysozyme in the serum and hepatopancreas showed the trend of first-decrease-then-increase with the increase of the starvation time and the activity of alkaline phosphatase in the serum was significantly lower compared to the control group on 15 d, 45 d, and 60 d, which maintained at a constant level after 30 d. All these results suggest that under long-term starvation stress the non-specific immune

基金项目 中国水产科学研究院热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室课题,上海市科委地方院校能力建设项目(No. 073205111),上海高校创新团队“水产动物营养饲料与养殖环境”建设项目;

第一作者介绍 华雪铭,女,副教授;研究方向:水产动物营养免疫学;E-mail: xmhua@shou.edu.cn。

收稿日期:2011-11-08,修回日期:2012-01-04

level of Grass Carp fingerlings decreases. Natural killer cell activity is one of the critical indexes to evaluate the cellular immunity, which is more specific and sensitive than the activity of lysozyme or alkaline phosphatase.

Key words: Grass Carp, *Ctenopharyngodon idellus*; Starvation; Natural killer cell; Lysozyme; Alkaline phosphatase

随着集约化养殖模式的推广,鱼类养殖业得到了迅猛发展。草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 为我国著名的淡水鱼品种,在整个饲养过程中时常受到病害的侵扰,并因此成为制约草鱼养殖业进一步发展的瓶颈。通过增强养殖鱼类自身免疫系统的功能,提高抗病力,是突破这一难关的重要途径。在这方面研究较多的因素是蛋白质、氨基酸、脂肪酸、维生素、微量元素和碳水化合物等^[1-4] 营养素以及中草药制剂^[5-6] 等非营养性免疫增强剂,而饥饿作为一种特殊的应激状态,其对鱼类免疫力的影响机理还未有系统的报道。国内外对鱼类饥饿胁迫的研究多数集中在鱼类的生化生理^[7-11] 以及能源物质的代谢^[12-14] 方面。孙红梅等^[15]、李霞等^[16] 分别研究了短期饥饿对黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 和红鳍东方鲀 (*Fugu rubripes*) 免疫力的影响,结果表明短时间饥饿对鱼类的应激不明显。

鱼类在养殖条件下由于饲养密度过大、投喂不及时、投喂不均或投喂技术等原因,经常出现饥饿胁迫现象^[17],而且存在饥饿持续时间的不确定性。因此,为了更好地了解饥饿条件下草鱼的免疫机能变化,本实验采用对草鱼进行长时间饥饿的方式,探讨极端饥饿条件下草鱼自然杀伤(natural killer, NK)细胞的杀伤活性、溶菌酶活性和碱性磷酸酶活性的变化规律,为了解鱼类适应饥饿应激的生态对策和营养调控措施的制定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验设计 实验设置对照组和饥饿组,每组3个平行,实验为期60 d。其中对照组投喂实验饲料,饥饿组在实验期间不投喂任何饲料。

1.2 实验饲料 实验饲料根据草鱼配合饲料营养标准(SC/T 1024-2002)制备。按实验设计采用逐级扩大混合的方法将粉状原料混匀后,

用制粒机加工成直径1.5 mm的颗粒,晾干储存于-20℃备用。实验饲料配方与其营养物质含量见表1。

表1 实验饲料配方及营养组成

Table 1 Formulas and nutrient compositions of trial diets

原料名称 Ingredients	含量 (%) Content	原料名称 Ingredients	含量 (%) Content
大豆粕 Soybean meal	31.0	50%胆碱 Choline chloride	1.0
菜籽粕 Rapeseedmeal	20.0	复合矿物质 Minerals premix	0.5
小麦麸 Wheatbran	19.1	食盐 Salt	0.3
棉籽粕 Cotton seed meal	10.0	复合多维 Vitamins premix	0.2
米糠 Rice bran	5.0	基本营养成分 (风干样)	
鱼粉 Fish meal	5.0	Nutrient ingredients (air-dried samples)	
面粉 Wheat flour	5.4	粗蛋白 Crude protein	33.0
磷酸二氢钙 Monocalcium phosphate	1.5	粗脂肪 Crude lipid	5.3
大豆油 Bean oil	1.0	粗纤维 Crude fibre	7.2

复合多维、复合矿物质购于佛山市德宁生物科技有限公司。

Vitamins premix and minerals premix were obtained from Dening Bio-Tech inc.

1.3 饲养管理 在上海市临港新城果园特种水产养殖场进行饲养实验。在室内水泥池中放置6个网箱(网箱规格长×宽×高为2 m×3 m×1 m),挑选健壮、规格整齐的草鱼[体长(11.52±0.21) cm、体重(31.86±1.47) g,样本量n=36]随机分入网箱中,每组设置3个平行,每个平行36尾鱼。实验前饥饿组与对照组均用实验饲料驯养2周,待摄食正常后开始正式实验。2010年7月18日至9月18日进行养殖实验,为期60 d,每天投喂2次(08:30、16:30时),投喂量为体重的3%~5%,随鱼体质量、天气及摄食情况加以调整,并且无天然饵料补充。实验期间,自然水温24~38℃,NH₄⁺-N<0.3 mg/L,DO>5 mg/L。

1.4 样品的采集 分别在饲养实验进行至 15、30、45、60 d 时采集样本,每个组采集 20 尾鱼,用 MS-222(100 mg/L)麻醉后,用一次性注射器从尾静脉取血,4℃ 静置 6 h 后,4 000 r/min 4℃ 离心 10 min,取血清;无菌条件下取头肾、脾和肝胰脏;每 4~5 尾鱼的血清或免疫相关组织合并成一个样本;血清和肝胰脏 -20℃ 保存、待测;头肾和脾用于 NK 细胞杀伤活性的测定。

1.5 测定指标与方法

1.5.1 溶菌酶 (lysozyme, LSZ) 活性的测定 参照文献^[18]方法测定 LSZ 活性。肝上清液的制备:取肝胰脏组织,加入生理盐水,用电动玻璃匀浆机 2 000 r/min 上下研磨 2 min 成 10% 组织匀浆液,4 000 r/min 4℃ 离心 10 min,取上清液。以溶壁微球菌 (*Micrococuly sodeikticus*) 冻干粉(南京建成生物工程研究所)为底物,用 0.1 mol/L pH 6.4 的 PBS 配成一定浓度的悬液 ($A_{570} \approx 0.3$),取 3.0 ml 的该悬液与 200 μ l 肝匀浆上清液(或血清 50 μ l)于试管中混匀,立即在 570 nm 处测其透光率 ($T_{\text{样品0}}$);在 37℃ 中水浴 30 min,然后取出立刻放在冰浴中 10 min 以终止反应,再测透光率 ($T_{\text{样品}}$)。以 LSZ 标准品(100 U/ml)为参照,采用蛋白试剂盒测定匀浆液或血清中的蛋白浓度。草鱼组织中 LSZ 活性 (A_L) 的计算方法如下: A_L (U/mg prot) = $[(T_{\text{样品}} - T_{\text{样品0}}) / (T_{\text{标准}} - T_{\text{标准0}})] \times [标准管酶活力(U/ml) / 匀浆液蛋白含量(mg/ml)]$ 。

1.5.2 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 活性的测定 采用 AMP 缓冲液法^[19]在迈瑞生化分析仪 BS200 上测定。其原理是:磷酸硝基酚 + $H_2O \rightleftharpoons$ 对硝基苯酚 + 磷酸盐,AKP 催化磷酸对硝基酚水解生成对硝基酚,它的生成引起 405 nm 处吸光度上升,上升速率与样品中 AKP 的活性成正比。酶活定义:在 37℃ 下,在反应体系中 1 min 催化 1 mmol/L 底物转化所需要的酶量,单位为 U/mg prot。

1.5.3 NK 细胞杀伤活性的测定 靶细胞制备:将 K562 细胞株(人白血病细胞株,由上海瑞金医院馈赠)用含 20% 小牛血清(PAA, Austria)的 RPMI 1640(PAA, Austria)连续传代

24 h 后,以台盼兰拒染法检测细胞活性,活细胞数达 95% 以上;用 RPMI 1640 调整细胞数至所需浓度,备用。

效应细胞制备:无菌条件下取的头肾和脾称重,加入 20 倍体积的 RPMI 1640 用研钵小心研磨,将此悬浊液通过 200 目不锈钢筛网制成单细胞悬液,置于等体积(2 ml:2 ml)的分离液面上,离心(3 000 r/min, 15℃, 20 min)分离淋巴细胞。无菌取淋巴细胞层, RPMI 1640 离心(1 500 r/min, 15℃, 10 min)洗涤 2 次后,台盼兰拒染法检测细胞活性,将细胞数调整至所需浓度,待测。

NK 细胞活性测定参照陈丙莺等的乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放法^[20]测定草鱼 NK 细胞杀伤活性。按效应细胞:靶细胞 = 50:1(总体积为 100 μ l)将效应细胞和靶细胞置于 V-型酶标板中,另做 5 个对照,分别为效应细胞自然释放组、靶细胞自然释放组、靶细胞最大释放组、培养基对照组、裂解液(2% NP-40)对照组。将上述各组置于酶标板中,每组 4 个重复孔,充分混匀后置 28℃ 5% CO_2 恒温箱中培养 2 h,取出,加入 50 μ l 预冷的 RPMI 1640 培养液,离心(1 000 r/min, 5 min)。从各孔中分别吸取 100 μ l 上清液放入另一 V-型酶标板中,再加入 100 μ l LDH 底物溶液(现配现用,避光保存)混匀,室温避光放置 5 min 后加入 50 μ l 1 mol/L HCl 终止反应,将酶标板移至酶标仪上,在 490 nm 波长下读取各孔的 A 值。NK 细胞杀伤活性计算方法为:草鱼 NK 细胞杀伤活性(%) = $[(测定组 A 值 - 效应细胞自然释放组 A 值 - 靶细胞自然释放组 A 值) / (靶细胞最大释放组 A 值 - 靶细胞自然释放组 A 值)] \times 100\%$ 。式中,测定组、效应细胞自然释放组、靶细胞自然释放组各自减去培养基对照组 A 值,靶细胞最大释放组减去裂解液对照组 A 值以校准吸光值。

1.6 数据处理 实验数据以平均值 \pm 标准差表示。利用 SPSS 17.0 软件先对数据进行单因素方差分析,影响显著者再进行 Duncan 多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结 果

2.1 饥饿胁迫对草鱼死亡率的影响 在 60 d 的饥饿实验中,对照组和饥饿组的草鱼均无死亡,死亡率为 0%。

2.2 饥饿胁迫对草鱼脾和头肾中自然杀伤细胞杀伤活性的影响 受饥饿胁迫的影响,在 60 d 的饥饿实验中草鱼自然杀伤性细胞在脾中的杀伤活性显著低于对照组 ($P < 0.05$);饥饿组自然杀伤细胞的杀伤力不会随着饥饿时间的延长而显著降低,而是维持在一定的水平(表 2)。在头肾中 4 个时期的杀伤力呈现与脾相同的变化趋势,但其降低趋势小于脾(表 2)。

表 2 饥饿胁迫对草鱼脾和头肾中自然杀伤细胞杀伤活性的影响

Table 2 Effects of starvation on natural killer cell activity in the spleen and head-kidney of Grass Carp ($n = 5$)

采样天数(d) Days of sampling	组别 Group	脾(%) Spleen	头肾(%) Head-kidney
15	对照组 The control group CG	23.93 ± 0.77 ^{cd}	13.63 ± 1.63 ^c
	饥饿组 The starvation group SG	6.20 ± 0.47 ^a	10.08 ± 3.64 ^{ab}
30	对照组 The control group CG	24.15 ± 3.26 ^{cd}	13.06 ± 0.80 ^c
	饥饿组 The starvation group SG	8.65 ± 1.87 ^{ab}	8.02 ± 3.20 ^a
45	对照组 The control group CG	24.50 ± 2.98 ^{cd}	13.42 ± 2.13 ^c
	饥饿组 The starvation group SG	7.39 ± 1.80 ^{ab}	8.26 ± 2.11 ^a
60	对照组 The control group CG	22.27 ± 2.73 ^{cd}	7.59 ± 1.28 ^{ab}
	饥饿组 The starvation group SG	13.66 ± 1.67 ^c	10.46 ± 2.05 ^{ab}

表中同列中无相同字母表示差异显著,下表同。

Means not sharing the same letter in the same row indicated significant difference at $P < 0.05$. The same as follows.

2.3 饥饿胁迫对草鱼血清和肝胰脏中溶菌酶活性的影响 饥饿影响血清和肝胰脏中溶菌酶的活性。在饥饿 15 d、30 d 时血清中的溶菌酶活性升高,但差异不显著;在饥饿 45 d 时显著高于对照组,在 60 d 时降低,与对照组无显著差异。在肝胰脏中 15 d 与对照组无差异,30 d 时显著高于对照组,在 45 d 饥饿组活性显著下降(表 3)。

表 3 饥饿胁迫对草鱼血清和肝胰脏中溶菌酶活性的影响

Table 3 Effects of starvation on lysozyme activity in the serum and hepatopancreas of Grass Carp

采样天数(d) Days of sampling	组别 Group	血清($n = 4$) Serum (U/mg prot)	肝胰脏($n = 5$) Hepatopancreas (U/mg prot)
15	对照组 The control group CG	3.63 ± 1.29 ^a	14.91 ± 0.06 ^{bc}
	饥饿组 The starvation group SG	4.07 ± 1.25 ^a	15.31 ± 1.21 ^{bc}
30	对照组 The control group CG	3.43 ± 1.70 ^a	18.09 ± 3.84 ^c
	饥饿组 The starvation group SG	3.63 ± 0.92 ^a	24.82 ± 1.77 ^d
45	对照组 The control group CG	9.89 ± 0.90 ^b	34.11 ± 3.79 ^e
	饥饿组 The starvation group SG	17.19 ± 2.39 ^c	20.20 ± 0.66 ^{cd}
60	对照组 The control group CG	8.04 ± 0.45 ^b	10.59 ± 1.67 ^{ab}
	饥饿组 The starvation group SG	8.89 ± 2.41 ^b	8.31 ± 0.98 ^a

2.4 饥饿胁迫对草鱼血清中碱性磷酸酶活性的影响 长时间的饥饿影响了血清中碱性磷酸酶的活性(表 4)。与对照组相比,在饥饿 15 d、45 d、60 d 时,碱性磷酸酶的活性显著下降。饥饿组的碱性磷酸酶先降低,在饥饿 30 d 以后,随着饥饿时间的延长,碱性磷酸酶活性维持恒定。

表 4 饥饿胁迫对草鱼血清中碱性磷酸酶活性的影响
Table 4 Effects of starvation on alkaline phosphatase activity in the serum of Grass Carp ($n=4$)

采样天数(d) Days of sampling	组别 Group	血清 Serum (U/mg prot)
15	对照组 The control group CG	4.27 ± 0.15 ^{de}
	饥饿组 The starvation group SG	2.76 ± 0.25 ^a
30	对照组 The control group CG	3.64 ± 0.07 ^{bc}
	饥饿组 The starvation group SG	3.77 ± 0.34 ^{bc}
45	对照组 The control group CG	4.60 ± 0.10 ^e
	饥饿组 The starvation group SG	3.91 ± 0.11 ^{bcd}
60	对照组 The control group CG	4.02 ± 0.26 ^{cd}
	饥饿组 The starvation group SG	3.55 ± 0.46 ^b

3 讨 论

3.1 饥饿胁迫对草鱼死亡率的影响 研究发现,饥饿可以影响鱼类生长、代谢、组织结构、酶活性、血液常规指标以及鱼体的免疫功能,严重时可引起动物神经内分泌功能紊乱,诱发各种疾病,甚至导致死亡^[17]。本实验中草鱼受饥饿胁迫的影响,在 60 d 的实验中无死亡的现象表明,草鱼对饥饿有一定的耐受力 and 适应性特征。

3.2 饥饿胁迫对草鱼脾和头肾中自然杀伤细胞杀伤活性的影响 鱼类属较低等的变温脊椎动物,其特异性免疫应答能力还处于一个初期的水平,因此在防御外来病原体入侵时非特异性免疫具有重要意义^[21]。自然杀伤细胞属于淋巴谱系,被认为是第三群淋巴细胞,对 NK 细胞的研究最初集中在其杀伤肿瘤的能力上。目前 NK 细胞在宿主防御入侵病原体,特别是最早期的宿主免疫应答中有着重要作用,尤其与一些疾病的发生、发展和转归密切相关,检测 NK 细胞的活性是评价机体细胞免疫的重要指标之一。

头肾是硬骨鱼类重要的淋巴组织,具有类似哺乳动物中枢免疫器官及外周免疫器官的双重功能。与头肾相比,脾是鱼类的外周免疫器官,在体液免疫的反应中处于相对次要的地位^[22]。鱼类中存在 NK 细胞,用单克隆抗体对 NK 细胞的受体进行分析,结果表明,在肾中 25% ~ 29% 细胞具有非特异性的细胞毒性细

胞,脾中含有 42% ~ 45% 的此类细胞^[23]。结合实验中脾 NK 细胞的杀伤率变化,认为饥饿首先影响草鱼外周免疫器官中的免疫水平。

在实验中,饥饿 15 d 时,饥饿组的自然杀伤细胞的杀伤活性降低了,随后其稳定在一定的水平,说明长期饥饿影响并降低了鱼类的细胞免疫。这可能是由于在饥饿的胁迫下,鱼类由于缺少维持正常生长必需的营养素,降低了自身的代谢能力,而这些营养素也是免疫系统发挥作用的物质基础,在维持免疫系统的功能并使其充分表达免疫活性起到决定性作用;李霞等^[16]发现饥饿 40 d 后红鳍东方鲀淋巴增殖能力和吞噬力将会降低。李德发等^[24]研究也表明,当动物整体营养不良时,会引起淋巴组织萎缩、细胞免疫机能下降、体液免疫反应改变、补体 C3 下降等一系列免疫机能的改变。从头肾和脾免疫组织来看, NK 细胞在两者中呈现相同的趋势,但在脾组织中呈现较大幅度的下降。这可能是由于头肾和脾组织在鱼类免疫中所处的地位不同以及两者中所含的 NK 细胞的比例不同引起的,在长期的饥饿胁迫下,鱼类采取最有利于自身的免疫反应调节机制。

3.3 饥饿胁迫对草鱼血清和肝胰脏中溶菌酶活性的影响 溶菌酶在脊椎动物和无脊椎动物的天然免疫防御中发挥重要作用。尚云云等^[25]在研究饥饿对德国镜鲤 (*Cyprinus carpio*) 非特异性免疫系统的影响时发现,在饥饿 4 ~ 8 d 时间内,血清中的溶菌酶含量略有增加,但不显著。在饥饿 8 ~ 12 d 时间内血清中的溶菌酶含量下降,差异不显著。孙红梅等^[15]对黄颡鱼的研究发现,血清中的溶菌酶在饥饿 18 d 后显著下降,而且短期饥饿(0 ~ 6 d)对黄颡鱼免疫力无明显影响,但长期饥饿(12 ~ 30 d)使黄颡鱼免疫机能下降。刘波等^[26]研究饥饿胁迫对吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 生长及生理生化指标的影响时,发现饥饿造成吉富罗非鱼血清一氧化氮浓度与溶菌酶活性下降。本实验中饥饿组草鱼的血清溶菌酶活性与对照组比较,在 45 d 表现出升高的趋势,其前后变化不显著;肝胰脏中溶菌酶活性与对照组相比则是在

30 d 出现峰值;从饥饿组本身来说在肝胰脏和血清表现出了相同的趋势:随着饥饿时间的延长,先升高再降低。

据报道,鱼体血液中的溶菌酶水平作为应激信号所持续的时间,依胁迫的方法和强度而定^[27]。关于胁迫对溶菌酶活性的影响有两种不同的观点:一是鱼体受到急性胁迫后,常伴有血液溶菌酶水平的升高^[28-29],慢性胁迫导致溶菌酶活性降低^[28,30];二是胁迫后血液溶菌酶水平是先降后升的。也有学者表明^[31],溶菌酶活性升高是机体经历应激之后的保护机制,借此维持机体的自身平衡来克服胁迫。实验中草鱼在应对饥饿胁迫时,先采取保护机制,溶菌酶活性升高,但自身免疫系统对胁迫的承受能力有一定的限度,当其不能继续适应应激而达到临界点时,就会向着病理学的方向发展,从而降低自身的免疫力,溶菌酶活性下降。

3.4 饥饿胁迫对草鱼血清中碱性磷酸酶活性的影响 碱性磷酸酶是动物代谢过程中重要的调控酶,对动物的生存具有重要的意义^[32]。碱性磷酸酶几乎存在于高等动物的各个组织中,血清中的碱性磷酸酶主要来源于肝和骨骼^[33]。鱼类因疾病或者所处环境受到污染,其碱性磷酸酶活性必定发生变化^[34-36]。因此,可以通过监测草鱼碱性磷酸酶活性的变化,及时反映其健康状况,预测和预防疾病的发生^[37]。

尚云云等^[25]对德国镜鲤的研究发现,饥饿 12~24 d,体内磷酸酶活性从最高值显著下降。詹付凤等^[38]研究表明,随着镉浓度的升高,鲫鱼 (*Carassius auratus auratus*) 肠和鳃的 AKP、ACP 酶活性都有所降低。在实验中碱性磷酸酶的活性相比对照组呈现明显的降低趋势,说明饥饿抑制了血清中碱性磷酸酶的活性;对于饥饿组来说,其变化是先降低后稍有升高。鱼类在长期饥饿状态下或降低代谢水平以节约能量消耗,或尽可能将代谢保持在一定水平之上,以保证在重新获得食物供应或受到其他胁迫时能产生适当的应激反应^[10]。实验中 AKP 的变化与此吻合,当机体受到饥饿胁迫时,首先降低代谢反应,降低 AKP 的活性,其后机体适应了

这种胁迫,维持自身的代谢水平,磷酸酶又有所升高,并且在 60 d 时机体 AKP 活性与前一时期虽然没有显著地降低,但已有降低的趋势,说明草鱼此时或即将面临胁迫的临界点。

4 结 语

长时间的饥饿抑制了草鱼自然杀伤性细胞杀伤活性、溶菌酶活性和碱性磷酸酶活性,降低了草鱼的非特异免疫水平;饥饿过程中各个免疫指标的变化并不相同,不宜单独采用某指标来表征鱼体的免疫力。相比较而言,自然杀伤性细胞的杀伤活性在评价鱼类的免疫状况时比溶菌酶和碱性磷酸酶更为灵敏。

参 考 文 献

- [1] Kiron V, Watanabe T, Fukuda H, et al. Protein nutrition and defence mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol*, 1995, 111(3): 351-359.
- [2] Kiron V, Fukuda H, Takeuchi T, et al. Essential fatty acid nutrition and defence mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol*, 1995, 111(3): 361-367.
- [3] Sealey W M, Lim C, Klesius P H. Influence of the dietary level of iron from iron methionine and iron sulfate on immune response and resistance of Channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. *J World Aquacult Soc*, 1997, 28(2): 142-149.
- [4] Ortuño J, Esteban M A, Meseguer J. Effects of high dietary intake of vitamin C on nonspecific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol*, 1999, 9(5): 429-443.
- [5] 张照红, 林旋, 张伟妮, 等. 复方中草药对奥尼罗非鱼血液非特异性免疫功能的影响. *水产科学*, 2011, 30(1): 1-5.
- [6] 刘华忠, 刘定忠, 赵学明. 复方中草药对彭泽鲫非特异性免疫功能的影响. *淡水渔业*, 2004, 34(3): 31-32.
- [7] 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.
- [8] Sumpter J P, Le Bail P Y, Picketing A D, et al. The effect of starvation on growth and plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol*, 1991, 83(1): 94-102.
- [9] 张波, 孙耀, 唐启升. 饥饿对真鲷生长及生化组成的影响. *水产学报*, 2000, 24(3): 206-210.
- [10] 杜震宇, 刘永坚, 田丽霞, 等. 饥饿对于鲈肌肉、肝脏

- 和血清主要生化组成的影响. 动物学报, 2003, 49 (4): 458-465.
- [11] 高露姣, 陈立侨, 宋兵. 饥饿和补偿生长对史氏鲟幼鱼摄食、生长和体成分的影响. 水产学报, 2004, 28 (3): 279-285.
- [12] Mehner T, Wieser W. Energetics and metabolic correlates of starvation in juvenile perch (*Perca fluviatilis*). J Fish Bio, 1994, 45(2): 325-333.
- [13] Viana M T, D'Abramo L R, Gonzalez M A, et al. Energy and nutrient utilization of juvenile green abalone (*Haliotis fulgens*) during starvation. Aquaculture, 2007, 264 (1/4): 323-329.
- [14] Pérez-Jiménez A, Guedes M J, Morales A E, et al. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. Aquaculture, 2007, 265(1/4): 325-335.
- [15] 孙红梅, 黄权, 丛波. 饥饿对黄颡鱼血液中几种免疫相关因子的影响. 大连水产学院学报, 2006, 21(4): 307-310.
- [16] 李霞, 周宝祥, 王茂林. 饥饿对红鳍东方鲀免疫细胞功能的影响. 大连水产学院学报, 2006, 21(4): 297-301.
- [17] 隗黎丽. 饥饿对鱼类影响的研究. 饲料工业, 2009, 30 (20): 56-57.
- [18] 黄旭雄, 周洪琪. 不同规格中国明对虾的非特异性免疫水平. 上海海洋大学学报, 2006, 15(1): 7-11.
- [19] Tietz N W, Rinker A D, Shaw L M. IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 5: IFCC method for alkaline phosphatase (orthophosphoromonoester phosphohydrolase, alkaline optimum EC 3.1.3.1.). Clinica Chimica Acta, 1983, 135(3): 339-349.
- [20] 陈丙莺, 马建吟, 黄钦田, 等. 简易自然杀伤试验——LDH 释放改良法. 上海免疫学杂志, 1989, 9 (4): 218-219.
- [21] Nie P. Recent advances of nonspecific immunity in fish. J Fish China, 1997, 21(1): 69-73.
- [22] 肖克宇. 水产动物免疫与应用. 北京: 科学出版社, 2007: 155-156.
- [23] 肖克宇. 水产动物免疫与应用. 北京: 科学出版社, 2007: 159-160.
- [24] 李德发. 中国饲料大全. 北京: 中国农业出版社, 2001: 179-195.
- [25] 尚云云, 夏艳洁, 郑伟, 等. 饥饿对德国镜鲤非特异性免疫系统的影响. 吉林农业, 2010, (6): 50-51.
- [26] 刘波, 何庆国, 唐永凯, 等. 饥饿胁迫对吉富罗非鱼生长及生理生化指标的影响. 中国水产科学, 2009, 16 (2): 230-237.
- [27] Fevolden S E, Roed K H. Cortisol and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high or low tolerance to stress. J Fish Biol, 1993, 43(6): 919-930.
- [28] Möck A, Peters G. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution. J Fish Biol, 1990, 37(6): 873-885.
- [29] Demers N E, Bayne C J. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. Developmental & Comparative Immunology, 1997, 21 (4): 363-373.
- [30] 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.). Fish & Shellfish Immunology, 1995, 5(7): 519-529.
- [31] 王文博, 李爱华. 环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概况. 水产学报, 2002, 26(4): 368-374.
- [32] 张辉, 张海莲. 碱性磷酸酶在水产动物中的作用. 河北渔业, 2003, (5): 12-17.
- [33] 朱忠勇. 实用医学检验学. 北京: 人民军医出版社, 1997: 368-378.
- [34] Anan Y, Kunito T, Ikemoto T, et al. Elevated concentrations of trace elements in Caspian seals (*Phoca caspica*) found stranded during the mass mortality events in 2000. Arch Environ Contam Toxicol, 2002, 42(3): 354-362.
- [35] Covelli S, Faganeli J, Horvat M, et al. Mercury contamination of coastal sediments as the result of long-term cinnabar mining activity (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea). Applied Geochem, 2001, 16(5): 541-558.
- [36] de Mora S, Sheikholeslami M R, Wyse E, et al. An assessment of metal contamination in coastal sediments of the Caspian Sea. Marine Pollution Bulletin, 2004, 48(1/2): 61-77.
- [37] 张继平, 林建成, 谢进金, 等. 草鱼碱性磷酸酶的分离纯化与部分性质研究. 厦门大学学报: 自然科学版, 2005, 44(5): 684-687.
- [38] 詹付凤, 赵欣平. 重金属镉对鲫鱼碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性的影响. 四川动物, 2007, 26(3): 641-643.