

## 慢性氨氮暴露诱发黄颡鱼幼鱼谷氨酰胺积累、 氧化损伤及免疫抑制的研究

黎 庆, 龚诗雁, 黎 明\*

(宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 为了研究慢性氨氮胁迫对黄颡鱼幼鱼生长性能、大脑谷氨酰胺积累、肝脏抗氧化酶活性、非特异性免疫应答及抗嗜水气单胞菌感染能力的影响, 实验挑选初始体质量为  $(1.94 \pm 0.05)$  g 的健康黄颡鱼幼鱼 180 尾, 开展为期 56 d 的慢性氨氮胁迫实验。结果表明, 实验鱼的终末体质量、增重及饲料效率, 氨氮组与对照组无显著性差异, 但肝体比氨氮组显著高于对照组; 氨氮组实验鱼大脑中氨氮和谷氨酰胺含量显著高于对照组, 但谷氨酸含量各组间无显著性差异; 氨氮组实验鱼肝脏中超氧化物歧化酶、过氧化物酶及谷胱甘肽过氧化物酶活性显著低于对照组, 但硫代巴比妥酸反应物含量氨氮组显著高于对照组; 氨氮组实验鱼肝脏中溶菌酶活性、头肾巨噬细胞吞噬指数和呼吸爆发显著低于对照组; 感染嗜水气单胞菌 14 d 后, 氨氮组和对照组实验鱼累计死亡率无显著性差异。研究表明, 黄颡鱼幼鱼遭受亚致死浓度的慢性氨氮胁迫, 能够导致大脑中谷氨酰胺含量升高; 氨氮组黄颡鱼肝脏中硫代巴比妥酸反应物的过度积累表明, 应激产生的大量自由基并不能被机体自身的抗氧化酶体系完全清除; 亚致死浓度的慢性氨氮胁迫会对黄颡鱼幼鱼的免疫应答体系造成抑制。

**关键词:** 黄颡鱼; 氨氮; 生长性能; 氧化损伤; 免疫抑制

**中图分类号:** S 965

**文献标志码:** A

多年来, 我国水产品养殖总产量一直居于世界首位。然而, 随着规模化集约养殖业的发展, 养殖密度过高、投喂方式粗放、配合饲料营养不均衡, 使得养殖水体中氨氮超标成为一种常态化的环境问题<sup>[1]</sup>。氨氮在水环境中通常以离子态 ( $\text{NH}_4^+$ ) 和非离子态 ( $\text{NH}_3$ ) 形式存在, 绝大多数硬骨鱼对  $\text{NH}_3$  非常敏感。 $\text{NH}_3$  在鱼体内过度积累会抑制生长, 扰乱膜电位和离子平衡, 导致鳃组织病变, 肝脏器官衰竭及免疫抑制, 干扰中枢神经系统, 致使呼吸过速、过度兴奋、昏厥、抽搐甚至死亡<sup>[2]</sup>。早期研究认为, 鱼类氨中毒与哺乳动物肝性脑病的致病机制相同, 都是由于大脑中谷氨酰胺积累造成星状胶质细胞肿胀, 使得颅内压升高导致死亡<sup>[3]</sup>。然而, 最近有研究指出, 鱼类的颅骨构造与哺乳类相比具有较多间隙, 能够耐受较

强颅内压, 因此颅内压升高并不是导致鱼类氨中毒死亡的主要原因<sup>[4]</sup>。针对鱼类氨中毒致死原因的争论已成为研究的热点, 基于已有研究证据, 愈来愈多的学者倾向于认为, 鱼类氨中毒致死可能与星状胶质细胞肿胀诱发的氧化损伤和免疫抑制有关<sup>[5]</sup>。

已有资料表明, 哺乳类大脑星状胶质细胞肿胀, 会造成 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体和  $\text{Ca}^{2+}$  依赖一氧化氮合成酶途径过度激活, 产生大量活性氮 (RNS) 和活性氧 (ROS), 造成机体氧化损伤<sup>[6]</sup>, 典型症状包括: 神经元退化引起生理和行为异常、三羧酸循环紊乱阻断能量代谢、蛋白质氧化/脂质过氧化加速醛酮类物质积累, 最终中毒死亡<sup>[7]</sup>。相比之下, 鱼类应激氧化损伤研究相对滞后。初步研究表明, 薄氏大弹涂鱼

收稿日期: 2014-12-24 修回日期: 2015-02-09

资助项目: 浙江省自然科学基金 (LQ14C190003); 宁波大学科研基金 (XYL14006); 宁波大学人才工程专项 (ZX2013000786)

通信作者: 黎 明, E-mail: liming1@nbu.edu.cn

(*Boleophthalmus boddarti*) 浸泡于含 8 mmol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  的水体中 12 h 后,大脑和鳃组织中抗氧化酶活性受到抑制,还原型谷胱甘肽含量减少,脂质过氧化产物增多<sup>[8]</sup>。尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 经过 70 d 氨氮(10 mg/L) 刺激后,机体自身的抗氧化酶体系并不能完全清除应激产生的自由基,组织中蛋白质氧化和脂质过氧化造成的肝功能衰竭可能是导致死亡的主要原因<sup>[9]</sup>。瓦氏黄颡鱼(*Pelteobagrus vachelli*) 在 15 d 急性氨氮(5.70 mg/L) 刺激后,血红蛋白含量下降,超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性受到抑制,丙二醛迅速积累,同时,肝脏溶菌酶活性、头肾巨噬细胞吞噬指数和呼吸爆发、血清免疫球蛋白含量下降<sup>[10]</sup>。虽然学者们相继开展了诸多有益的探索,然而,鱼类氨中毒致死机制迄今尚不清楚。

黄颡鱼(*P. fulvidraco*) 是我国重要的经济养殖鱼类,为杂食偏肉食性,在我国长江和珠江流域自然水体中分布较为广泛,其肌肉中含有人体所需的多种必需氨基酸,尤其是没有肌间刺的优点,深受广大消费者的喜爱。据《2013 中国渔业统计年鉴》<sup>[11]</sup> 发布的权威数据,截至 2012 年底,全国黄颡鱼产量达到 26 万 t,年增幅超过 18%,已成为我国重要淡水养殖种类之一。本研究评估了慢性氨氮胁迫对黄颡鱼幼鱼生长性能、大脑谷氨酰胺积累、肝脏抗氧化酶活性、非特异性免疫应答及抗嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) 感染能力的影响,为鱼类氨中毒致死机制的深入研究提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 养殖管理及取样

黄颡鱼幼鱼( $1.94 \pm 0.05$ ) g 购自浙江嘉兴,养殖实验在宁波大学校内基地进行。暂养 30 d 后,挑选大小均匀、体格健壮 的鱼苗,随机分配到 6 个 300 L 塑料养殖桶中(每个处理设置 3 个重复),每桶 30 尾。参考斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*) 的氨氮安全浓度<sup>[11]</sup>,设定实验组总氨氮浓度为 5.65 ~ 5.80 mg/L(非离子氨 0.10 ~ 0.12 mg/L, pH 6.6 ~ 7.0),对照组总氨氮浓度为 0.01 mg/L(非离子氨 < 0.001 mg/L),胁迫周期为 56 d,投喂商业饲料(天邦牌 0 号黄颡鱼料)。期望氨氮浓度通过预配  $\text{NH}_4\text{Cl}$ (10 g/L) 母液每隔

7 h 进行调整,总氨氮浓度测定采用纳氏试剂法<sup>[9]</sup>,通过计算获得非离子氨浓度<sup>[12]</sup>。养殖过程中,养殖用水为除氯自来水,日换水量为总体积的 1/3,水温 27 ~ 29 °C,溶氧( $7.81 \pm 0.13$ ) mg/L,亚硝酸盐 < 0.5 mg/L,保持自然光照。

养殖结束后,禁食 24 h,分别称取每桶鱼总重并记录存活数。每桶随机挑选 5 尾实验鱼,MS-222 麻醉后解剖获得大脑,液氮保存,测定氨氮、谷氨酰胺及谷氨酸含量;称取肝脏重量,计算肝体比, -20 °C 保存,测定抗氧化酶及非特异性免疫酶活性;无菌条件下获取头肾,测定巨噬细胞吞噬指数及呼吸爆发程度。

### 1.2 氨氮、谷氨酰胺和谷氨酸含量分析

称取 0.5 g 大脑样品,液氮中研磨成粉末,加入 6% 的三氯乙酸 24 000 r/min 匀浆 3 次,每次 20 s<sup>[13]</sup>。匀浆液于 4 °C 环境中 10 000 r/min 离心 15 min。参考 Bergmeyer 等<sup>[14]</sup> 报道的方法测定氨氮含量,以新配  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为对照品。参考 Ip 等<sup>[13]</sup> 报道的方法,采用 Shimadzu LC-6A 氨基酸自动分析仪(岛津公司,日本),测定谷氨酰胺和谷氨酸含量。

### 1.3 抗氧化酶活性及脂质过氧化分析

称取 0.1 g 肝脏样品,放入预冷的磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH 7.4) 中匀浆,匀浆液于 4 °C 环境中 2 000 r/min 离心 15 min 分离上清液备测。超氧化物歧化酶活性测定参考 Beauchamp 等<sup>[15]</sup> 报道的方法;过氧化物酶活性测定参考 Aebi<sup>[16]</sup> 报道的方法;谷胱甘肽过氧化物酶活性测定参考 Flohé 等<sup>[17]</sup> 报道的方法;硫代巴比妥酸反应物测定参考 Buege 等<sup>[18]</sup> 报道的方法。所有测试分析均采用商业试剂盒(南京建成生物工程研究所),操作步骤严格按照说明书进行。

### 1.4 溶菌酶活性、吞噬指数和呼吸爆发分析

称取 0.1 g 肝脏样品,放入预冷的磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH 7.4) 中匀浆,匀浆液于 4 °C 环境中 2 000 r/min 离心 15 min,分离上清液备测。溶菌酶活性测定参考 Hultmark 等<sup>[19]</sup> 报道的方法。测试分析采用商业试剂盒(南京建成生物工程研究所),操作步骤严格按照说明书进行。

无菌条件下获取实验鱼头肾组织,置于 L-15 (Gibco) 培养基中[含 100 IU/mL 青霉素(Sigma)、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素(Sigma)、10 IU/mL 肝素(Sigma) 和 2% 的小牛血清(HyClone)],挤

压通过 100  $\mu\text{m}$  金属筛网,将细胞悬液置于 34%/51% 的 Percoll(Sigma) 溶液中,进行不连续梯度密度离心(4  $^{\circ}\text{C}$ ,600 r/min 离心 5 min),分离获得的巨噬细胞用 L-15 培养基冲洗 2 次,调整细胞浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL,成活率用 0.01% 台盼蓝测定,确保成活率 >95%。吞噬指数测定参考 Pulsford 等<sup>[20]</sup> 报道的方法;呼吸爆发测定参考 Stolen 等<sup>[21]</sup> 报道的方法。

### 1.5 细菌感染

采用营养琼脂培养基复壮冻藏的嗜水气单胞菌,30  $^{\circ}\text{C}$  光照培养 48 h。调整菌液浓度达  $1 \times 10^8$  CFU/mL 备用。胁迫实验结束后,每桶随机挑选 20 尾鱼,腹腔注射 0.1 mL 浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL ( $1 \times 10^5$  CFU/尾)的菌液。每天 2 次记录死亡情况,捞出死鱼。攻毒实验持续 14 d 至无实验鱼死亡。

### 1.6 计算方法和统计分析

存活率(survival rate,%) = 100%  $\times$  存活尾

数/初始尾数

增重(weight gain,g) = 末体质量 - 初体质量

饲料效率(feed efficiency) = (末体质量 - 初体质量)/干饲料消耗量

肝体比(hepatosomatic index,%) = 100%  $\times$  肝重/末体质量

实验数据采用 *t* 检验进行统计学处理,结果以平均值  $\pm$  标准误(mean  $\pm$  SE)表示,差异显著性设置  $P < 0.05$ 。所有分析均采用 SPSS 18.0.0 (Chicago,USA) 在 Windows 操作系统中进行。

## 2 结果

氨氮胁迫 56 d 后,实验鱼存活率高于 85.71%,处理组之间无显著性差异( $P > 0.05$ ) (表 1)。终末体质量、增重及饵料效率,氨氮组与对照组之间无显著性差异( $P > 0.05$ )。氨氮组实验鱼肝体比显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

表 1 氨氮胁迫对黄颡鱼幼鱼生长性能和存活率的影响

Tab.1 Effects of ammonia exposure on growth performance and survival of juvenile yellow catfish

处理组 treatment	终末体质量/g final weight	增重/g weight gain	饲料效率 feed efficiency	脏体比/% hepatosomatic index	存活率/% survival rate
氨氮组 ammonia	12.08 $\pm$ 2.24	11.18 $\pm$ 2.24	1.44 $\pm$ 0.63	0.55 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	85.71 $\pm$ 7.14
对照组 control	13.44 $\pm$ 3.17	12.53 $\pm$ 3.17	1.73 $\pm$ 0.33	0.18 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	94.64 $\pm$ 5.36

注:同列不同小写字母表示组间差异显著( $P < 0.05$ ),下同

Notes:the different superscripts of the same column values are significantly different( $P < 0.05$ ),the same as the following

氨氮组实验鱼大脑中氨氮和谷氨酰胺含量显著高于对照组( $P < 0.05$ ) (表 2)。然而,大脑中的谷氨酸含量在各处理组之间未检测出显著性差异( $P > 0.05$ )。

氨氮组实验鱼肝脏中超氧化物歧化酶、过氧化物酶及谷胱甘肽过氧化物酶活性显著低于对照组( $P < 0.05$ ) (表 3)。然而,肝脏中硫代巴比妥酸反应物含量,氨氮组实验鱼显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

表 2 氨氮胁迫对黄颡鱼幼鱼大脑中氨氮、谷氨酰胺及谷氨酸含量的影响

Tab.2 Effects of ammonia exposure on ammonia, glutamine and glutamate contents in the brain of juvenile yellow catfish

处理组 treatment	氨氮/ ( $\mu\text{mol/g}$ ) ammonia	谷氨酰胺/ ( $\mu\text{mol/g}$ ) glutamine	谷氨酸/ ( $\mu\text{mol/g}$ ) glutamate
氨氮组 ammonia	12.70 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>	28.47 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	8.69 $\pm$ 0.26
对照组 control	0.43 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	0.09 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	8.64 $\pm$ 0.05

表 3 氨氮胁迫对黄颡鱼幼鱼肝脏抗氧化酶活性和过氧化物含量的影响

Tab.3 Effects of ammonia exposure on antioxidant enzymes activities and peroxide contents in the liver of juvenile yellow catfish

处理组 treatment	超氧化物歧化酶/ (U/mg prot) superoxide dismutase	过氧化物酶/ (U/mg prot) catalase	谷胱甘肽过氧化物酶/ (U/mg prot) glutathione peroxidase	硫代巴比妥酸反应物/ (nmol/mg prot) thiobarbituric acid reactive substances
氨氮组 ammonia	96.57 $\pm$ 2.34 <sup>a</sup>	32.11 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>	309.63 $\pm$ 2.61 <sup>a</sup>	78.03 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>
对照组 control	106.84 $\pm$ 4.63 <sup>b</sup>	38.59 $\pm$ 1.05 <sup>b</sup>	378.74 $\pm$ 2.81 <sup>b</sup>	52.20 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>

氨氮组实验鱼肝脏中溶菌酶活性,头肾巨噬细胞吞噬指数和呼吸爆发显著低于对照组( $P < 0.05$ ) (表 4)。感染嗜水气单胞菌 14 d 后,氨氮

组和对照组实验鱼累计死亡率无显著性差异( $P > 0.05$ )。

表 4 氨氮胁迫对黄颡鱼幼鱼非特异性免疫应答和累计死亡率的影响  
Tab. 4 Effects of ammonia exposure on nonspecific immune response and cumulative mortality of juvenile yellow catfish

处理组 treatment	溶菌酶/(U/g prot) lysozyme	吞噬指数/% phagocytic index	呼吸爆发/% respiratory burst	累计死亡率/% cumulative mortality
氨氮组 ammonia	261.55 ± 1.63 <sup>a</sup>	6.15 ± 0.07 <sup>a</sup>	72.38 ± 0.29 <sup>a</sup>	70.00 ± 8.66
对照组 control	320.48 ± 4.53 <sup>b</sup>	6.78 ± 0.09 <sup>b</sup>	77.29 ± 0.43 <sup>b</sup>	68.33 ± 2.87

### 3 讨论

经过 56 d 摄食生长实验,对照组黄颡鱼存活率超过 94.64%,表明养殖系统完全适合黄颡鱼研究工作的开展。虽然氨氮组存活率(85.71%)略低于对照组,但并未发现统计学意义上的显著性差异,这与前人的研究结果一致<sup>[9]</sup>。有研究报告,氨氮胁迫会影响鱼类的饵料利用,导致生长性能下降,种类涉及花狼鱼(*Anarhichas minor*)<sup>[22]</sup>、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)<sup>[23]</sup>及大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)<sup>[24]</sup>等。然而,本研究发现,亚致死浓度(5.70 mg/L)的氨氮并没有影响黄颡鱼的增重和饵料效率,在鳙(*Hypophthalmichthys nobilis*)的研究中有过类似的报道<sup>[25]</sup>。氨氮胁迫对鱼类生长性能影响的差异,可能与实验鱼的种类、大小及胁迫程度有关。

鱼类内源性 NH<sub>3</sub> 由肝脏联合脱氨基作用产生,是氨基酸代谢的主要终产物之一,正常生理条件下,大部分(70%~90%)经鳃释放到环境中,但高浓度的氨氮环境会阻断鱼类内源性 NH<sub>3</sub> 排泄,同时,外源性 NH<sub>3</sub> 顺浓度梯度经鳃和皮肤涌入,在体内大量积累<sup>[26]</sup>。在本研究中,亚致死浓度氨氮刺激 56 d 后,黄颡鱼大脑中氨氮含量(12.70 μmol/g)为对照组的 30 倍。过量的 NH<sub>3</sub> 在鱼类大脑中,经谷氨酰胺合成酶催化,能够与谷氨酸大量合成谷氨酰胺<sup>[27]</sup>。本研究发现,氨氮组实验鱼大脑中谷氨酰胺含量(28.47 μmol/g)显著高于对照组(0.09 μmol/g)。Smart<sup>[3]</sup>提出鱼类氨中毒与哺乳动物肝性脑病的致病机制相同,由于谷氨酰胺具有的胶体渗透性,造成了脑细胞外液大量涌入,星状胶质细胞肿胀使得颅内压升高而导致死亡。但 Van 等<sup>[4]</sup>发现鲤(*Cyprinus carpio*)受到胁迫后,由于星状胶质细胞肿胀,大脑体积扩大

了 6.5%,却未发现动物死亡,他推测颅内高压并不是导致鱼类氨中毒死亡的直接原因。在本研究中,氨氮组黄颡鱼大脑中谷氨酰胺含量已远超过哺乳动物大脑谷氨酰胺的致死浓度<sup>[13]</sup>,但存活率与对照组无显著性差异,该结果较好地支持了 Van 等的观点<sup>[4]</sup>。此外,前人的研究已证实,氨氮刺激下,鱼类依赖于生理适应性调节机制:阻断外源性 NH<sub>3</sub> 流入、减少内源性 NH<sub>3</sub> 产生、抑制谷氨酰胺合成酶活性,促使鱼类大脑中谷氨酰胺含量达到“饱和”,继而缓解星状胶质细胞肿胀<sup>[28]</sup>。在本研究中,由于受到“适应性调节”的影响,氨氮与谷氨酸合成谷氨酰胺的途径受到抑制,检测发现,氨氮组黄颡鱼大脑中谷氨酸含量与对照组无显著性差异。类似的发现在其他鱼类研究中屡有报道,如金鱼(*Carassius auratus*)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)及黄鳝(*Monopterus albus*)等<sup>[5]</sup>。

愈来愈多的学者倾向于认为,鱼类氨中毒致死可能与机体氧化损伤和免疫抑制有关<sup>[5]</sup>。星状胶质细胞肿胀会造成 N-甲基-D-天冬氨酸受体和 Ca<sup>2+</sup> 依赖一氧化氮合成酶途径过度激活,产生大量活性氮和活性氧,而对于这些有害自由基的清除,鱼类主要依靠自身抗氧化酶体系,如超氧化物歧化酶、过氧化物酶及谷胱甘肽过氧化物酶等。然而,应激产生的大量自由基并不能被机体的抗氧化酶体系完全清除,自由基过度积累会破坏组织蛋白质结构、加剧细胞膜脂质过氧化程度、加速醛酮类物质积累<sup>[18]</sup>。在本研究中,氨氮胁迫造成了过氧化产物过度积累,氨氮组实验鱼肝脏中硫代巴比妥酸反应物显著高于对照组。醛酮类物质能够与蛋白和核酸等发生交联聚合,使得抗氧化酶活性逐渐丧失<sup>[18]</sup>。检测发现,氨氮组实验鱼肝脏中超氧化物歧化酶、过氧化物酶及谷胱甘肽过

氧化物酶活性显著低于对照组。此外,醛酮类物质过度积累还会导致细胞毒性和器官衰竭<sup>[29]</sup>。本研究发现,氨氮组实验鱼的肝体比显著高于对照组,这是因为醛酮类物质过度积累诱发了肝脏器官组织水肿,而相关组织学证据在罗非鱼研究中已见报道<sup>[2]</sup>。

Li等<sup>[10]</sup>报道,为期15d的急性氨氮胁迫降低了瓦氏黄颡鱼溶菌酶活性、头肾巨噬细胞吞噬指数、呼吸爆发及血液中免疫球蛋白含量。本研究也获得了相同的结果,氨氮组实验鱼肝脏中溶菌酶活性、头肾巨噬细胞吞噬指数和呼吸爆发显著低于对照组。鱼类遭受氨氮刺激后,外围淋巴组织中会产生大量免疫抑制因子,随着胁迫程度加剧,免疫抑制因子会被逐渐释放到血液中,影响淋巴细胞和巨噬细胞的含量和活性,使得免疫应答受到抑制<sup>[30]</sup>。此外,本研究发现,亚致死浓度的氨氮胁迫,并未对黄颡鱼的抗细菌感染能力造成影响,氨氮组实验鱼感染嗜水气单胞菌14d后,累计死亡率与对照组无显著性差异。然而,由于受到实验鱼种类、大小、感染菌株毒力及环境温度等影响,要彻底阐明氨氮胁迫对鱼类抗细菌感染能力的影响机制,尚需要更多的证据。

#### 4 结论

本研究结果显示,黄颡鱼幼鱼遭受亚致死浓度的慢性氨氮胁迫,能够导致大脑中谷氨酰胺含量升高;氨氮组黄颡鱼肝脏中硫代巴比妥酸反应物的过度积累表明,应激产生的大量自由基并不能被机体自身的抗氧化酶体系完全清除;亚致死浓度的慢性氨氮胁迫会对黄颡鱼幼鱼的免疫应答体系造成抑制。鱼类氨中毒致死是多因素共同作用的结果,通过深入探究环境氨氮刺激与机体氧化损伤及免疫抑制之间的内在联系,可以为弄清氨氮刺激导致黄颡鱼死亡的根本原因提供理论依据,也将使人们对鱼类适应不良环境的生理应对策略有一个全新的认识。

#### 参考文献:

- [1] Fisheries Bureau. 2013 China Fishery Statistical Yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013:31. [农业部渔业局. 2013 中国渔业统计年鉴. 北京:中国农业出版社,2013:31.]
- [2] Benli A C K, Köksal G, Özkul A. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis*

*niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology [J]. Chemosphere, 2008, 72 (9): 1355 - 1358.

- [3] Smart G R. Investigations of the toxic mechanisms of ammonia to fish-gas exchange in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to acutely lethal concentrations[J]. Journal of Fish Biology, 1978, 12 (1):93 - 104.
- [4] Van der Linden A, Verhoye M, Nilsson G E. Does anoxia induce cell swelling in carp brain? *In vivo* MRI measurements in crucian carp and common carp [J]. Journal of Neurophysiology, 2001, 85 (1): 125 - 133.
- [5] Ip Y K, Tay A S, Lee K H, et al. Strategies for surviving high concentrations of environmental ammonia in the swamp eel *Monopterus albus* [J]. Physiological and Biochemical Zoology, 2004, 77 (3):390 - 405.
- [6] Reinehr R, Görg B, Becker S, et al. Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices[J]. Glia, 2007, 55(7):758 - 771.
- [7] Rama Rao K V, Norenberg M D. Brain energy metabolism and mitochondrial dysfunction in acute and chronic hepatic encephalopathy [J]. Neurochemistry International, 2012, 60 (7): 697 - 706.
- [8] Ching B, Chew S F, Wong W P, et al. Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (mudskipper) [J]. Aquatic Toxicology, 2009, 95(3):203 - 212.
- [9] Hegazi M M, Attia Z I, Ashour O A. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure [J]. Aquatic Toxicology, 2010, 99(2):118 - 125.
- [10] Li M, Yu N, Qin J G, et al. Effects of ammonia stress, dietary linseed oil and *Edwardsiella ictaluri* challenge on juvenile darkbarbel catfish *Pelteobagrus vachelli*[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2014, 38(1):158 - 165.
- [11] Colt J, Tchobanoglous G. Chronic exposure of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, to ammonia: Effects on growth and survival [J]. Aquaculture, 1978, 15(4):353 - 372.
- [12] Johansson O, Wedborg M. The ammonia-ammonium equilibrium in seawater at temperatures between 5 and 25 °C [J]. Journal of the Chemical Society, 1980, 9(1):37 - 43.

- [13] Ip Y K, Leong M W, Sim M Y, *et al.* Chronic and acute ammonia toxicity in mudskippers, *Periophthalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti*: Brain ammonia and glutamine contents, and effects of methionine sulfoximine and MK801 [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2005, 208 (10): 1993 – 2004.
- [14] Bergmeyer H U, Bergmeyer J. *Methods of Enzymatic Analysis* [M]. New York: Academic Press, 1985.
- [15] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. *Analytical Biochemistry*, 1971, 44(1): 276 – 287.
- [16] Aebi H. Catalase *in vitro* [J]. *Methods Enzymology*, 1984, 105: 121 – 126.
- [17] Flohé L, Günzler W A. Assay of glutathione peroxidase [J]. *Methods Enzymology*, 1984, 105: 115 – 121.
- [18] Buege J A, Aust S D. Microsomal lipid peroxidation [J]. *Methods Enzymology*, 1978, 52: 302 – 310.
- [19] Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, *et al.* Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1980, 106 (1): 7 – 16.
- [20] Pulsford A L, Crampe M, Langston A, *et al.* Modulatory effects of disease, stress, copper, TBT and itamin E on the immune system of flatfish [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 1995, 5 (8): 631 – 643.
- [21] Stolen J S, Fletcher T C, Anderson D, *et al.* *Techniques in Fish Immunology* [M]. New Jersey: SOS Publications, 1990.
- [22] Foss A, Evensen T H, Vollen T, *et al.* Effects of chronic ammonia exposure on growth and food conversion efficiency in juvenile spotted wolffish [J]. *Aquaculture*, 2003, 228(1 – 4): 215 – 224.
- [23] Foss A, Imsland A K, Roth B, *et al.* Effects of chronic and periodic exposure to ammonia on growth and blood physiology in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Aquaculture*, 2009, 296(1 – 2): 45 – 50.
- [24] Paust L O, Foss A, Imsland A K. Effects of chronic and periodic exposure to ammonia on growth, food conversion efficiency and blood physiology in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) [J]. *Aquaculture*, 2011, 315(3 – 4): 400 – 406.
- [25] Sun H, Lü K, Minter E J, *et al.* Combined effects of ammonia and microcystin on survival, growth, antioxidant responses, and lipid peroxidation of bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* larvae [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 221 – 222: 213 – 219.
- [26] Wilson R W, Taylor E W. Transbranchial ammonia gradients and acid-base responses to high external ammonia concentration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) acclimated to different salinities [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1992, 166: 95 – 112.
- [27] Hernandez C, Martin M, Bodega G, *et al.* Response of carp central nervous system to hyperammonemic conditions: An immunocytochemical study of glutamine synthetase (GS), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and 70 kDa heat-shock protein (HSP70) [J]. *Aquatic Toxicology*, 1999, 45(2 – 3): 195 – 207.
- [28] Chew S F, Gan J, Ip Y K. Nitrogen metabolism and excretion in the swamp eel, *Monopterus albus*, during 6 or 40 days of aestivation in mud [J]. *Physiological and Biochemical Zoology*, 2005, 78(4): 620 – 629.
- [29] Nagasaka R, Okamoto N, Ushio H. Partial oxidative-stress perturbs membrane permeability and fluidity of fish nucleated red blood cells [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 2004, 139 (4): 259 – 266.
- [30] Mock A, Peters G. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution [J]. *Journal of Fish Biology*, 1990, 37(6): 873 – 885.

**Chronic ammonia toxicity induces glutamine accumulation,  
oxidative damage and immunosuppression of  
juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco***

LI Qing, GONG Shiyan, LI Ming\*

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** A study was carried out to test the responses of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* to ammonia stress and bacterial challenge. The catfish ( $1.94 \pm 0.05$ ) g were randomly allocated to 2 groups (control group and exposure group) in triplicate for 56 days ammonia exposure. No differences were found in fish final weight, weight gain and feed efficiency between ammonia group and control group, but hepatosomatic index of fish in ammonia group was significantly higher than that of fish in control group. Ammonia and glutamine contents in the brain of fish in ammonia group were significantly higher than those of fish in control group, but glutamate content was not significantly different compared with the control. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities were significantly lower in ammonia group than in control group, but thiobarbituric acid reactive substance content was significantly higher in ammonia group. Lysozyme activity, phagocytic index and respiratory burst of fish in ammonia group were significantly lower compared with the control group. After 14 days infection of *Aeromonas hydrophila*, cumulative mortality was not significantly different between ammonia group and control group. This study indicated that the glutamine accumulation in the brain was caused by chronic ammonia exposure; the toxic reactive oxygen species is not fully counteracted by the antioxidant enzymes; the immunosuppression is a process of gradual accumulation of immunosuppressive factors. Our findings support the multifactorial pathogenesis of ammonia toxicity in fish exposed to ammonia.

**Key words:** yellow catfish; ammonia; growth performance; oxidative damage; immunosuppression

**Corresponding author:** LI Ming. E-mail: liming1@nbu.edu.cn.