

文章编号: 1000-0615(2017)08-1192-11

DOI: 10.11964/jfc.20160310305

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

林艳¹, 缪凌鸿^{1,2}, 盘文静¹, 戈贤平^{1,2*}, 任鸣春²,
刘波^{1,2}, 梁化亮¹, 赵振新¹

(1. 南京农业大学渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 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)

摘要: 为了探讨亚硝酸盐氮胁迫对鳙[初均重:(180.05±0.092) g]血液生化指标和组织热休克蛋白70基因表达水平的影响, 实验选用170尾鳙, 暴露于48.634 mg/L亚硝酸盐氮96 h后, 进行96 h恢复实验。并在胁迫0、6、12、24、48、72和96 h以及恢复12、24、48、72和96 h时采集样品。结果显示, 胁迫6 h后, 血清皮质醇含量和谷丙转氨酶活性显著升高; 胁迫12 h后, 血清中葡萄糖含量显著升高; 胁迫24 h后, 血清总胆固醇含量开始显著降低; 胁迫48 h后, 血清总蛋白和甘油三酯含量开始显著降低, 三碘甲状腺原氨酸含量和谷草转氨酶活性则显著升高; 胁迫72 h后, 血清低密度脂蛋白和高密度脂蛋白含量开始显著降低。恢复96 h后, 鱼体血清生理指标大多都已恢复至胁迫前水平, 而组织热休克蛋白70 mRNA表达水平的差异显示, 头肾抗亚硝酸盐氮响应最快, 其次为鳃和肠道, 而脾脏热休克蛋白70 mRNA表达水平在恢复12 h时显著升高; 恢复96 h后, 除鳃组织外, 肾脏、肠道和脾脏的热休克蛋白70 mRNA表达量均恢复至胁迫前水平。研究表明, 亚硝酸盐氮对鳙的蛋白质代谢、脂质代谢和糖代谢均产生影响, 并且诱导部分组织热休克蛋白70 mRNA的表达, 而鳙对水体中高浓度的亚硝酸盐氮应激6 h即可产生快速应答, 并启动防损伤自我保护机制, 促进新陈代谢水平, 保护机体免受应激损伤。

关键词: 鳙; 亚硝酸盐氮; 胁迫; 血液生化指标; 应激激素; HSP70

中图分类号: 965.1

文献标志码: A

亚硝酸盐是生态系统中氮循环的重要中间产物, 也是水产养殖过程中常见的污染物。水环境中高浓度的亚硝酸盐对水生动物的健康存在严重威胁, 并能在鱼类血液中大量蓄积, 导致鱼类离子调控、呼吸、心血管、内分泌等多种生理进程紊乱, 甚至引起鱼类缺氧而窒息死亡及鱼类疾病的暴发^[1-4]。Siikavuopio等^[5]研究发现, 大西洋鳕(*Gadus morhua*)的生长速率随着水环境中亚硝酸盐浓度升高而逐渐降低。此外, 亚硝酸盐暴露会显著降低鱼类血红蛋白含量和

血细胞比容^[6], 抑制碱性磷酸酶活性^[7]。将平鲷(*Sparus sarba*)^[8]暴露在不同NO₂⁻浓度(0、25和50mg/L)7 d后, 发现随NO₂⁻浓度上升, 其肝脏指数增加、血清甲状腺素含量下降, 并且胁迫可提高鳃丝中Na⁺-K⁺ ATPase活性。无备平鲷(*Sebastes inermis*)^[9]暴露在700 mg/L NO₂⁻浓度96 h后, 肝脏、肾脏、皮肤和鳃丝发生非正常组织学变化, Das^[10]也发现亚硝酸盐胁迫会导致鱼体头肾组织损伤。

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)主要分

收稿日期: 2016-03-10 修回日期: 2016-10-10

资助项目: 现代农业产业技术体系大宗淡水鱼专项(CARS-46); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2015GBFM25)

通信作者: 戈贤平, E-mail: gexp@ffrc.cn

为4个家族, 分别为HSP90家族、HSP70家族、HSP60家族及小分子量smHSP家族, 在细胞内具有抗氧化的生物活性, 可使机体内源性抗氧化剂的合成与释放增加, 对抗高热、低氧、缺血、紫外线、重金属离子、DNA损伤、环境毒物等引起的损伤^[11-12]。其中, HSP70是一类最保守的热休克蛋白家族, 在几乎所有生物的应激细胞中都能够被高度诱导, 保护机体和细胞的功能^[11]。关于各种应激因素影响HSP70表达的研究已经有很多, 如重金属应激诱导黑鲟(*S. macrocephalus*)成纤维细胞HSP70表达^[13]; 金头鲷(*S. aurata*)幼鱼和虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)受饥饿胁迫后HSP70表达升高^[14]; 低温应激吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus* GIFT)可以使肝HSP70 mRNA水平显著升高^[15]。此外, 本实验中定量的是HSP70家族中的HSP70, 又称HSP72, 属于诱导型HSP70, 本实验室在温度与免疫增强剂诱导和抑制HSP70 mRNA基因表达水平方面具有一定研究积累^[16-18]。

鳊(*Aristichthys nobilis*), 隶属于鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、鲢亚科(Hypophthalmichthyinae)、鳊属(*Aristichthys*), 是我国大宗淡水鱼主要养殖品种, 具有生长快、抗病力强、肉质鲜美、营养丰富等优点, 主养或配养均适宜, 以食浮游生物为主, 是淡水生态食物链的重要环节^[19]。目前, 国内外对鳊的研究主要集中在生长繁殖^[20-22]、生态调控^[23]和对藻类的消化吸收^[24]等方面。本实验研究了亚硝酸盐氮胁迫对鳊血液生化指标、皮质醇等应激激素以及组织HSP70 mRNA基因表达水平的影响, 为养殖环境胁迫对鳊健康养殖的影响及其生理响应提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象

实验用鳊选自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心南泉养殖基地, 暂养于控温非循环流水养殖系统(圆形蓄养桶规格 ϕ 1 m \times 1 m)。选取体质健康, 规格整齐的鳊170尾[初均重(180.05 \pm 0.092) g], 进行预实验和正式实验。

1.2 养殖管理

每个养殖桶内水体积为350 L, 本实验采用

NaNO₂逐级溶解法, 调节水中亚硝酸盐浓度。预实验和正式实验均每隔12 h调节水中亚硝酸盐氮浓度1次, 按照N-1-萘基乙二胺光度法测定水体中亚硝酸盐氮浓度。实验期间, 日夜连续充气增氧, 水体温度(23.0 \pm 1.0) °C, 溶解氧 \geq 5 mg/L, 氨氮 \leq 0.2 mg/L, pH为7.2~7.8。光照周期为自然光周期。

1.3 实验方法

预实验 选取实验鳊50尾, 分为5组(水体亚硝酸盐浓度分别为1000.000、1500.000、1783.811、2121.320和2522.689 mg/L), 每组10条, 分别记录胁迫后24、48、72和96 h时的死亡率, 并且绘制亚硝酸盐浓度和亚硝酸盐氮浓度拟合曲线, 曲线公式:

$$y = 0.1706x + 10.966, R^2 = 0.99$$

式中, y 为水体中亚硝酸盐氮浓度(mg/L), x 为水体中亚硝酸钠浓度(mg/L), 通过拟合曲线, 求得亚硝酸盐氮96 h LC₅₀为121.585 mg/L。

正式实验 选取实验鳊120尾, 随机分为4组, 每组30尾。以40% 96 h LC₅₀ (48.634 mg/L)为水体亚硝酸盐氮浓度胁迫鳊。实验期间每天换水1/4, 及时调节水中亚硝酸盐氮至初始浓度。恢复实验时, 将实验鱼换至曝气24 h的自来水中。

1.4 样品采集

在胁迫实验的0、6、12、24、48、72、96 h以及恢复实验的R12、R24、R48、R72、R96 h (“R”表示恢复实验)采集样品。每桶随机选取2尾鳊用MS-222麻醉, 然后进行尾部静脉采血, 并迅速在4 °C、7400 r/min离心5 min分离血清, 用于血液生理生化指标的测定; 随后采集鱼体鳃、头肾、肠道和脾脏, -80 °C保存, 用于HSP70 mRNA基因表达水平的测定。

1.5 指标测定

血清总蛋白(total protein, TP)、白蛋白(albumin, ALB)、总胆固醇(total cholesterol, CHOL)、甘油三酯(triglycerides, TG)、葡萄糖(glucose, GLU)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein cholesterol, HDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein cholesterol, LDL)含量与谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, ALT)和谷草转氨酶(glutamic oxalacetic transaminase, AST)活性测

定试剂盒均购自上海骏实生物科技有限公司, 用迈瑞BS-400全自动生化分析仪测定。皮质醇(cortisol, COR)和三碘甲状腺原氨酸(3'-triiodothyronine, T3)测定采用全自动化学发光免疫分析仪(MAGLUMI 1000)进行测定, 试剂盒购自深圳新产业生物医学工程股份有限公司。

鳃、头肾、肠道和脾脏HSP70 mRNA表达水平采用荧光定量法(qRT-PCR)^[17], 仪器选择ABI 7500 Real-time PCR System, 鳃HSP70引物设计参照基因1(GenBank accession no. AF210640.1)、2(GenBank accession no. JN544930.1)、3(GenBank accession no. EU884290.2)、4(GenBank accession no. EU816595.1)保守序列设计, 选用 β -actin(GenBank accession no. AY170122.2)为内参基因, 利用NCBI设计RT-PCR特异性引物, 引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成(表1), 应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法确定各组织不同胁迫时间HSP70 mRNA的相对表达量。

1.6 数据统计与分析

数据用SPSS 20.0统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和Duncan氏多重比较, 结果以平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)表示, $P < 0.05$ 表示差异显著。

表1 HSP70和 β -actin基因RT-PCR引物序列

Tab. 1 Primers for RT-PCR analysis of HSP70 and β -actin

| 基因 gene | 引物 primer | 引物序列(5'-3') primer sequence |
|----------------|----------------|--------------------------------|
| HSP70 | forward primer | 5'-GGCCTGGACAAAGGCAAATC-3' |
| | reverse primer | 5'-CAGATGAGTGTCTCCAGCGG-3' |
| β -actin | forward primer | 5'-TCGTCCACCGCCAAATGCTTCTA-3' |
| | reverse primer | 5'-CCGTCACCTTCACCGTTCCAGT-3' |

2 结果

2.1 亚硝酸盐氮胁迫对鳃血液生化指标的影响

随着胁迫实验和恢复实验的进行, 鳃血清中TP、CHOL、TG、LDL、HDL和ALB含量均表现为持续下降趋势(表2)。胁迫24 h后, 血清CHOL含量开始表现为显著降低($P < 0.05$); 胁迫48 h后, 血清TP和TG含量开始表现为显著降低($P < 0.05$); 胁迫72 h后, 血清LDL和HDL含量开始显著下降($P < 0.05$); 胁迫96 h后血清TP、CHOL、TG、LDL、HDL含量仍显著低于胁迫前水平($P < 0.05$); 而血清ALB含量在R12 h时开始显著降低($P < 0.05$)。鳃血清中TG和ALB含量在恢复实验后均恢复至胁迫前水平($P > 0.05$)。

随着胁迫时间的延长, 鳃血清中ALT活性

表2 亚硝酸盐氮胁迫对鳃血清TP、CHOL、TG、LDL、HDL和ALB含量的影响

Tab. 2 Effects of nitrite nitrogen stress on serum TP, CHOL, TG, LDL, HDL and ALB of *A. nobilis*

$n=8$

| 胁迫时间/h stress time | 总蛋白/(g/L) TP | 总胆固醇/ (mmol/L) CHOL | 甘油三酯/ (mmol/L) TG | 低密度脂蛋白/ (mmol/L) LDL | 高密度脂蛋白/ (mmol/L) HDL | 白蛋白/(g/L) ALB |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 0 | 25.78 \pm 2.11 ^b | 3.48 \pm 0.14 ^c | 0.14 \pm 0.01 ^d | 1.38 \pm 0.11 ^d | 1.44 \pm 0.07 ^d | 9.33 \pm 0.74 ^d |
| 6 | 23.15 \pm 0.25 ^{ab} | 3.08 \pm 0.08 ^{dc} | 0.13 \pm 0.01 ^{cd} | 1.24 \pm 0.06 ^{bcd} | 1.37 \pm 0.04 ^{cd} | 9.15 \pm 0.32 ^{cd} |
| 12 | 23.09 \pm 0.80 ^{ab} | 3.12 \pm 0.14 ^{dc} | 0.14 \pm 0.01 ^{cd} | 1.26 \pm 0.05 ^{cd} | 1.39 \pm 0.07 ^{cd} | 9.64 \pm 0.42 ^d |
| 24 | 22.77 \pm 0.42 ^{ab} | 2.84 \pm 0.25 ^{cd} | 0.13 \pm 0.02 ^{bcd} | 1.20 \pm 0.10 ^{abcd} | 1.32 \pm 0.07 ^{bcd} | 9.30 \pm 0.08 ^{cd} |
| 48 | 22.63 \pm 0.42 ^a | 2.87 \pm 0.10 ^{cd} | 0.10 \pm 0.01 ^{abc} | 1.21 \pm 0.19 ^{abcd} | 1.30 \pm 0.02 ^{bcd} | 9.57 \pm 0.25 ^d |
| 72 | 21.39 \pm 1.07 ^a | 2.48 \pm 0.07 ^{abc} | 0.09 \pm 0.01 ^{ab} | 0.95 \pm 0.12 ^{abc} | 1.23 \pm 0.11 ^{abc} | 8.17 \pm 0.62 ^{bcd} |
| 96 | 22.18 \pm 0.11 ^a | 2.47 \pm 0.09 ^{abc} | 0.09 \pm 0.01 ^a | 0.91 \pm 0.08 ^{ab} | 1.23 \pm 0.01 ^{abc} | 8.32 \pm 0.55 ^{bcd} |
| R12 | 21.02 \pm 0.31 ^a | 2.15 \pm 0.10 ^a | 0.09 \pm 0.01 ^a | 0.86 \pm 0.19 ^a | 1.11 \pm 0.08 ^{ab} | 6.32 \pm 0.75 ^a |
| R24 | 20.42 \pm 1.27 ^a | 2.33 \pm 0.11 ^{ab} | 0.09 \pm 0.01 ^{ab} | 0.89 \pm 0.05 ^{ab} | 1.13 \pm 0.10 ^{ab} | 6.80 \pm 0.60 ^{ab} |
| R48 | 21.60 \pm 0.39 ^a | 2.70 \pm 0.08 ^{bcd} | 0.10 \pm 0.01 ^{ab} | 0.92 \pm 0.06 ^{abc} | 1.06 \pm 0.01 ^a | 7.78 \pm 0.20 ^{abc} |
| R72 | 20.47 \pm 1.24 ^a | 2.71 \pm 0.13 ^{bcd} | 0.12 \pm 0.01 ^{abcd} | 0.91 \pm 0.01 ^{abc} | 1.08 \pm 0.07 ^a | 7.13 \pm 0.04 ^{ab} |
| R96 | 22.32 \pm 1.04 ^a | 2.83 \pm 0.23 ^{cd} | 0.14 \pm 0.004 ^d | 0.970 \pm 0.08 ^{abc} | 1.08 \pm 0.06 ^a | 8.15 \pm 0.48 ^{bcd} |

注: 同一列数据右上角有不同字母代表Duncan氏多重比较下差异显著($P < 0.05$)

Notes: values in the same column sharing different superscript letter mean significant difference determined by Duncan's test ($P < 0.05$)

在胁迫实验的6 h显著升高($P<0.05$), 在R72 h恢复至胁迫前水平($P>0.05$)(图1-a); AST活性在胁迫

实验的48 h显著升高($P<0.05$), 于R12 h恢复至胁迫前水平($P>0.05$)(图1-b)。

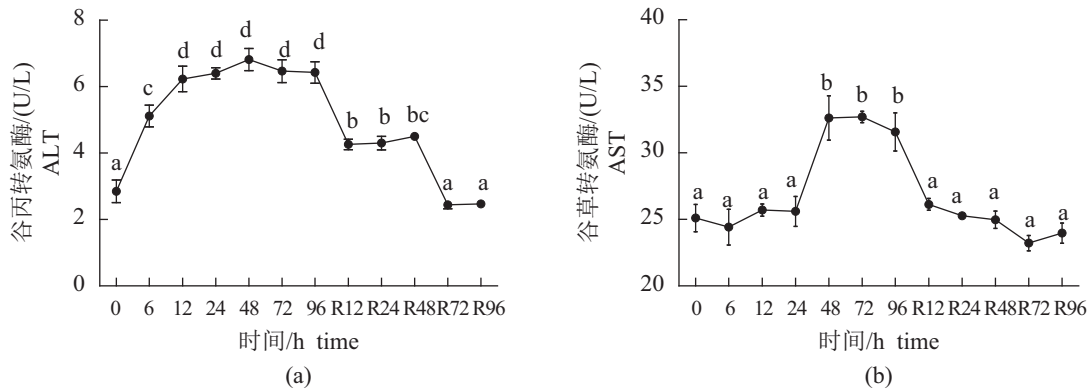


图 1 亚硝酸盐氮胁迫对鳙血清中ALT (a)和AST (b)活性的影响

字母不同代表差异显著($P<0.05$), 下同

Fig. 1 Effects of nitrite nitrogen stress on the serum ALT (a) and AST (b) activity of *A. nobilis*

The different superscript letters mean significant difference ($P<0.05$), the same below

2.2 亚硝酸盐氮胁迫对鳙血清生理应激应答指标的影响

随着胁迫时间的延长, 血清中COR(图2-a)、GLU(图2-b)和T3(图2-c)含量表现为先升高后下降的趋势。胁迫6 h后, 血清COR含量显著升高($P<0.05$), GLU含量于胁迫12 h时显著升高($P<0.05$), T3含量在胁迫48 h显著升高($P<0.05$)。COR、GLU和T3分别在恢复实验的12、48 h和胁迫实验的96 h恢复至胁迫前水平($P>0.05$)(图2)。

2.3 亚硝酸盐氮胁迫对鳙组织HSP70 mRNA基因表达水平的影响

在胁迫实验过程中, 胁迫24 h时头肾(图3-b)HSP70 mRNA表达量显著升高($P<0.05$); 胁迫96 h时肠(图3-c)HSP70 mRNA表达量达到最大值并显著升高($P<0.05$)。脾脏(图3-d)HSP70的表达量在R12和R24 h时显著升高($P<0.05$); 鳃(图3-a)中HSP70呈现逐渐降低趋势, 并在胁迫6 h即开始显著降低($P<0.05$), 恢复96 h后仍未恢复到胁迫前水平($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 亚硝酸盐氮胁迫对鳙血液生化指标的影响

有研究发现随着亚硝酸盐(0.5、1.0、4.0和16.0 mg/L)暴露时间的延长, 草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)血清CHOL、TG、HDL-C和LDL-C含

量逐渐下降, 暴露96 h后, 均显著低于对照组^[25], 这与本研究结果相一致, 随着胁迫时间的延长, 鳙血清中CHOL、TG、HDL-C和LDL-C含量显著降低, 而本实验中CHOL、LDL和HDL在恢复96 h后依然没有恢复至胁迫前水平, 说明亚硝酸盐氮胁迫对鳙的脂质代谢与转运功能产生影响。4.0~10.8 mg/L亚硝酸盐胁迫会导致印鲢(*Cirrhinus mrigala*)血清TP含量显著下降^[26]; 亚硝酸盐(1、2、4、8和10.4 mg/L)胁迫也可显著降低印度鲤(*Catla catla*)血清TP含量^[27]; 草鱼暴露于0.5、1.0、4.0和16.0 mg/L的亚硝酸盐96 h后, TP和ALB含量显著降低^[25]。同样的, 本实验中鳙血清TP和ALB含量随胁迫时间的延长显著降低, 而TP在恢复96 h后依然没有恢复到胁迫前水平。血清中TP及ALB的增加表明机体先天免疫的增强^[28-29], 说明亚硝酸盐氮胁迫对鳙蛋白质代谢具有显著影响, 并且降低鳙非特异性免疫, 可能在处于应激水平时, 蛋白质被大量消耗以获取能量, 提高机体的应激能力。

正常情况下, 血清中ALT和AST活性低且相对稳定, 但当肝脏受到损伤后, 肝脏中氨基转移酶的合成增加并释放到循环系统中, 导致血清中转氨酶活性升高, 因此, 血清中ALT和AST活性可以作为评价鱼类肝损伤程度的指标^[30]。异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)暴露于1.28 mg/L亚硝酸盐氮中, 能够引起肝损伤, 导致血清中ALT和AST活性上升^[31]。印度鲤(*Catla catla*)、南

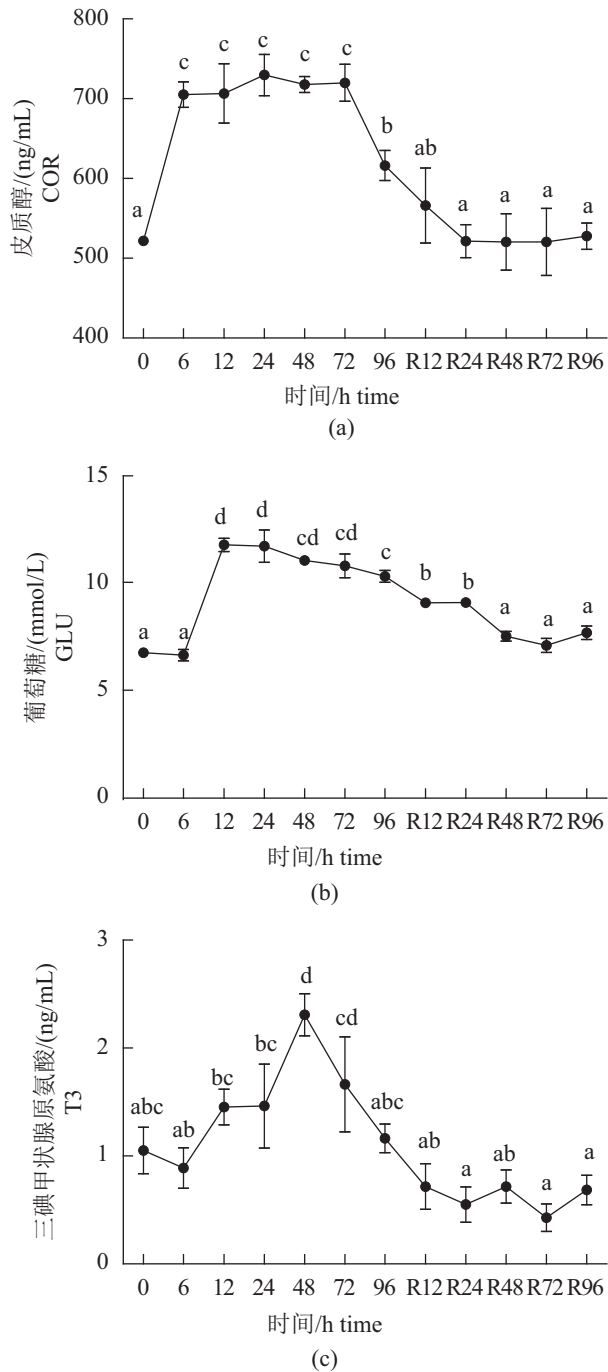


图2 亚硝酸盐氮胁迫对鲮血清COR (a)、GLU (b)和T3 (c)含量的影响

Fig. 2 Effects of nitrite nitrogen stress on the serum COR (a), GLU (b) and T3 (c) of *A. nobilis*

亚野鲮 (*Labeo rohita*) 和印鲮受不同亚硝酸盐浓度 (1、2、4、8 和 10.4 mg/L) 胁迫 96 h 后, 结果显示胁迫浓度越高血清中 AST 和 ALT 活性越高^[32]。本实验同样发现随着水体亚硝酸盐氮胁迫时间的延长, 血清中 AST 和 ALT 活性均显著升高, 说明亚硝酸盐氮胁迫能够对鲮肝脏造成损伤。实验

同时发现, ALT 和 AST 活性分别在胁迫 6、48 h 时显著升高, 恢复 72、12 h 时回落到胁迫前水平, 说明鲮血清中 ALT 活性对于水体中的亚硝酸盐氮胁迫更为敏感, 可能是因为肝内 ALT 主要存在于细胞质中, 而肝内 AST 主要存在于线粒体中, 当肝细胞受损时, ALT 逸出胞外, 仅仅 1% 的肝细胞坏死, 血清 ALT 水平便可以升高 1 倍, 而当肝组织受损严重涉及到亚细胞结构时, 线粒体内的 AST 才大量释放入血, 使血清中 AST 浓度升高^[33]。

3.2 亚硝酸盐氮胁迫对鲮生理应激响应的影响

COR 作为糖皮质激素, 是鱼体在受到外界刺激后, 通过下丘脑—垂体—肾间组织轴 (hypothalamus-pituitary-interrenal, HPI) 所分泌的一种重要应激激素, 适度 and 短时增高能够帮助机体对抗环境压力^[34-35]。本实验中, 亚硝酸盐氮对鲮胁迫使其血清 COR 含量由胁迫 6 至 72 h 均显著高于胁迫前水平, 胁迫 96 h 后开始回落, 恢复 12 h 已恢复至胁迫前水平。同样的经过运输刺激的虹鳟^[36]和热应激状态下的西伯利亚鲟 (*Acipenser baeri*)^[37] 血清中 COR 含量均迅速升高。因为在急性胁迫下 COR 通常会迅速升高, 以增强鱼体的非特异性免疫, 调控营养和生理代谢, 因此血液 COR 水平的升高被看做是鱼类应激反应的灵敏信号^[38-39]。说明亚硝酸盐氮胁迫能够使鲮迅速作出应激反应, 提高应激能力、非特异性免疫等对抗环境压力。同时实验还发现, 随着胁迫时间和恢复时间的延长, GLU 的变化趋势与 COR 的变化趋势相一致, 其含量在胁迫 12 h 时开始显著升高, 恢复 48 h 后恢复至胁迫前水平, Ciji 等^[40]对南亚野鲮的研究也得出相似结论。正常情况下, 虽然鱼类血糖含量受其摄食状态、健康状态、活动性以及栖息环境等许多因素的影响, 但在神经系统和内分泌系统的调节下, 鱼类血糖总量处于动态平衡^[41]。造成 GLU 发生变化的原因可能是亚硝酸盐氮胁迫能够通过激活 HPI 使机体分泌更多的 COR, 以提高 GLU 水平用来满足能量代谢的需求^[40], 因为在面对环境刺激和压力时, 动物组织会提供更多的能量来应对这种压力^[42]。Milligan^[43]对虹鳟的研究也表明, COR 可以增强肝脏内与糖元合成有关的酶的活性, 大大加强糖元异生, 使血糖升高; Bernier 等^[44]对异育银鲫的研究表

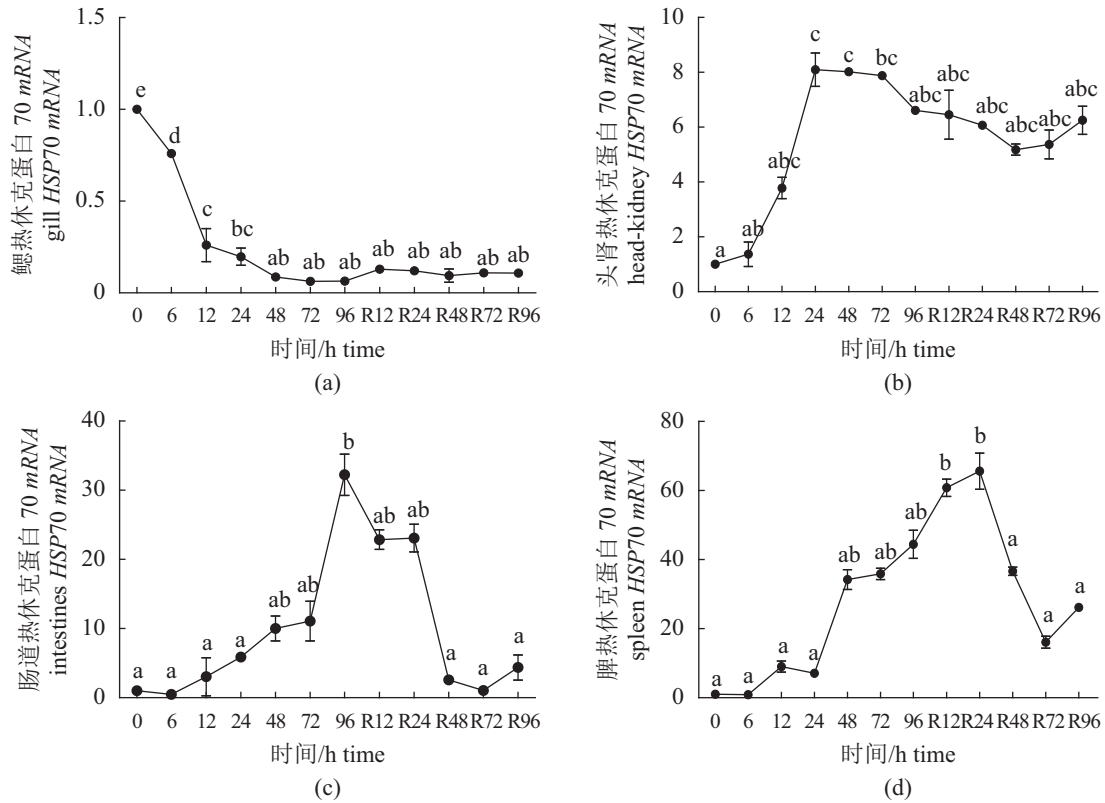


图3 亚硝酸盐氮胁迫对鳙鳃(a)、头肾(b)、肠道(c)和脾脏(d)组织中HSP70 mRNA基因表达水平的影响
 Fig. 3 Effects of nitrite nitrogen stress on the HSP70 mRNA gene expression levels of *A. nobilis* in gill (a), head-kidney (b), intestines (c) and spleen (d)

明, COR可以抑制细胞内核酸的合成, 减少RNA聚合酶使蛋白质合成减少, 并能促进肝外组织, 尤其是肌肉组织的蛋白质分解, 使血中氨基酸浓度增加, 加速糖的异生, 均与本实验结论一致。

下丘脑—垂体—甲状腺轴在神经内分泌系统调节中也占有重要地位^[45], 下丘脑产生的促甲状腺激素释放激素可促进促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)的分泌, 甲状腺受到TSH作用, 分泌出甲状腺素和三碘甲腺原氨酸(T3), 释放到血液中作用于靶细胞, 调节机体糖、蛋白、脂及水盐代谢^[46]。Deane等^[8]发现, 平鲷在25.0和50.0 mg/L亚硝酸盐中暴露7 d后, 血清中T3含量不变。本实验所得结论不同, 鳙血清中T3含量在胁迫12 h时开始显著升高, 直到胁迫96 h后降低到胁迫前水平。说明亚硝酸盐氮对鳙神经内分泌调节中的下丘脑—垂体—甲状腺轴产生影响, 血清T3含量受胁迫显著升高, 会影响到其调节的机体糖、蛋白、脂和水盐代谢, 但是具体调节机制还有待研究。

3.3 亚硝酸盐氮胁迫对鳙组织HSP70 mRNA表达水平的影响

实验中鳙头肾、肠道和脾脏中HSP70基因的表达水平分别在胁迫的48、96和R12 h时开始显著升高, Deane等^[8]对平鲷的研究也得出类似结论。这一结论提示, 鳙受到亚硝酸盐氮胁迫后, HSP70 mRNA被高度地诱导表达用于保护机体免受损伤, 这与许多环境应激因素可引起机体HSP70 mRNA表达上调的结果相一致, 例如工业污水(含有漂白剂或十二烷基硫酸钠)胁迫实验组大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*) 30 d, 其体内HSP70的表达量显著高于对照组^[47]; 污染的海水可提高海胆(*Paracentrorus lividus*)体腔细胞HSP70的表达上调^[48]; 杀虫剂复禄芬会提高尼罗罗非鱼体内HSP70的表达^[49]。在胁迫48 h时鳙头肾HSP70 mRNA含量最先应答性显著升高, 其次为肠道和脾脏, 且头肾和肠道HSP70 mRNA表达量均在恢复实验开始时恢复至胁迫前水平, 说明鳙不同组织HSP70对于亚硝酸盐氮胁迫的敏感程度不同, 头肾要先于肠道和脾脏对亚硝酸盐氮

胁迫做出反应,这与草鱼HSP70组织分布特征相似^[50],Zhang等^[50]对草鱼的研究也发现HSP70在所有组织中均有表达,但是在肾、头肾和外周淋巴细胞中表达量相对较高。此外,脾脏HSP70 mRNA含量在恢复实验的12 h才开始显著升高,可能是因为脾脏对于亚硝酸盐氮胁迫的应激反应相对滞后。

实验中,鳙鳃中HSP70基因表达水平呈现逐渐下降趋势,并在胁迫6 h开始显著降低,恢复实验并未使其表达水平恢复,而洪美玲^[51]对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的研究却发现,亚硝酸盐胁迫(10、20、30和40 mg/L)能够使其幼体鳃组织中HSP70表达量升高,并且各浓度组所诱导的HSP70的最大表达量与水中亚硝酸盐的浓度呈正相关;平鲷在25和50 mg/L的水体亚硝酸盐中暴露7 d,鳃中HSP70的表达水平也显著上调^[8]。实验结果的差异,可能与不同物种对亚硝酸盐氮胁迫的耐受程度有关,对于本实验而言,水体中浓度为48.643 mg/L的亚硝酸盐氮可能已经超出了鳙鳃组织的抗应激修复能力,对鳃中HSP70相关的转录酶产生抑制作用,或者高浓度的亚硝酸盐氮产生较高渗透压,使鳃组织细胞生理功能下降,最终导致鳃中HSP70表达水平不升反降,但是具体作用机制还需进一步研究。

4 结论

本研究发现,将鳙在浓度为48.634 mg/L的亚硝酸盐氮水体中暴露6 h后即产生生理响应,首先主要表现为鱼体血清中应激激素皮质醇含量快速升高,通过HPI轴调控血糖,使其含量应答性升高,以此应对亚硝酸盐氮胁迫;随后机体中蛋白代谢和脂质代谢受显著影响,同时肾脏HSP70表达上调对抗亚硝酸盐氮胁迫引起的机体损伤;而脂质转运功能与肠道和脾脏HSP70表达受亚硝酸盐氮胁迫的影响相对迟缓。因此,鳙对水体中高浓度的亚硝酸盐氮应激可产生快速应答反应,以提高防损伤自我保护机制,促进新陈代谢水平,保护机体免受应激损伤,为研究实际生产中鱼类与环境因子应激的响应关系提供理论基础。

参考文献:

[1] 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.

- [2] Kroupova H, Machova J, Svobodova Z. Nitrite influence on fish: a review[J]. Veterinární Medicína-Czech, 2005, 50(11): 461-471.
- [3] Aggergaard S, Jensen F B. Cardiovascular changes and physiological response during nitrite exposure in rainbow trout[J]. Journal of Fish Biology, 2001, 59(1): 13-27.
- [4] Lewis J W M, Morris D P. Toxicity of nitrite to fish: a review[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 1986, 115(2): 183-195.
- [5] Siikavuopio S I, Sæther B S. Effects of chronic nitrite exposure on growth in juvenile Atlantic cod, *Gadus morhua*[J]. Aquaculture, 2006, 255(1-4): 351-356.
- [6] Yildiz H Y, Köksal G, Borazan G, et al. Nitrite-induced methemoglobinemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2006, 22(5): 427-426.
- [7] Ajani F, Emikpe B O, Adeyemo O K. Histopathological and enzyme changes in *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) exposed to nitrite at different water temperatures[J]. Nature and Science, 2011, 9(5): 119-124.
- [8] 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.
- [9] Park I S, Lee J, Hur J W, et al. Acute toxicity and sublethal effects of nitrite on selected hematological parameters and tissues in dark-banded rockfish, *Sebastes inermis*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2007, 38(2): 188-199.
- [10] Das P C. Assessment of stress factors in intensive aquaculture[D]. Bhubaneswar: Orissa University of Agriculture and Technology, 2002.
- [11] 曲凌云. 三种养殖扇贝热休克蛋白HSP70在逆境因子下的表达和相关基因的克隆[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2004.
Qu L Y. Expression under adversity and cloning analysis of a heat shock protein70 (HSP70) in three species of cultured scallop[D]. Qingdao: Graduate school of Chinese academy of sciences (The Institute of Oceanology), 2004 (in Chinese).
- [12] Bond U, Schlesinger M J. Heat-shock proteins and

- development[J]. *Advances in Genetics*, 1987, 24: 1-29.
- [13] Deane E E, Woo N Y S. Impact of heavy metals and organochlorines on *hsp70* and *hsc70* gene expression in black sea bream fibroblasts[J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 79(1): 9-15.
- [14] Cara J B, Aluru N, Moyano F J, *et al.* Food-deprivation induces HSP70 and HSP90 protein expression in larval gilthead sea bream and rainbow trout[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part-B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 142(4): 426-431.
- [15] 刘波, 王美垚, 谢骏, 等. 低温应激对吉富罗非鱼血清生化指标及肝脏HSP70基因表达的影响[J]. *生态学报*, 2011, 31(17): 4866-4873.
- Liu B, Wang M Y, Xie J, *et al.* Effects of acute cold stress on serum biochemical and immune parameters and liver HSP70 gene expression in GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(17): 4866-4873(in Chinese).
- [16] Ming J H, Xie J, Xu P, *et al.* Effects of emodin and vitamin C on growth performance, biochemical parameters and two HSP70s mRNA expression of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) under high temperature stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(5): 651-661.
- [17] 崔素丽, 刘波, 徐跑, 等. 两种温度下大黄素对团头鲂生长、血液指标及肝脏HSP70 mRNA表达的影响[J]. *水生生物学报*, 2013, 37(5): 919-928.
- Cui S L, Liu B, Xu P, *et al.* Effects of emodin on growth, haematological parameters and HSP70 mRNA expression of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) at two temperatures[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(5): 919-928(in Chinese).
- [18] Cui Y T, Liu B, Xie J, *et al.* Effect of heat stress and recovery on viability, oxidative damage, and heat shock protein expression in hepatic cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40(3): 721-729.
- [19] 刘乐和, 吴国犀, 曹维孝, 等. 葛洲坝水利枢纽兴建后对青、草、鲢、鳊繁殖生态效应的研究[J]. *水生生物学报*, 1986, 10(4): 353-364.
- Liu L H, Wu G X, Cao W X, *et al.* Studies on the ecological effect on spawning of the black carp the grass carp, the silver carp and the bighead carp in the Chang Jiang river after the constructions of the Ge Zhouba hydroelectric project[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1986, 10(4): 353-364(in Chinese).
- [20] Santiago C B, Reyes O S. Optimum dietary protein level for growth of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fry in a static water system[J]. *Aquaculture*, 1991, 93(2): 155-165.
- [21] Afzal M, Rab A, Akhtar N, *et al.* Effect of organic and inorganic fertilizers on the growth performance of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) in polyculture system[J]. *International Journal of Agriculture & Biology*, 2007, 9(6): 931-933.
- [22] Santiago B C B, Gonzal A C. Effect of prepared diet and vitamins A, E and C supplementation on the reproductive performance of cage-reared bighead carp *Aristichthys nobilis*(Richardson)[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2000, 16(1): 8-13.
- [23] Chen J, Xie P, Zhang D W, *et al.* In situ studies on the distribution patterns and dynamics of microcystins in a biomanipulation fish-bighead carp (*Aristichthys nobilis*)[J]. *Environmental Pollution*, 2007, 147(1): 150-157.
- [24] Xie P. Gut contents of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) and the processing and digestion of algal cells in the alimentary canal[J]. *Aquaculture*, 2001, 195(1-2): 149-161.
- [25] 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.
- 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 (in Chinese).
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] Nya E J, Austin B. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J]. Journal of Fish Diseases, 2009, 32(11): 963-970.
- [30] 周玉, 郭文场, 杨振国, 等. 欧洲鳗鲡“狂游病”血液生化指标研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(3): 314-316.
Zhou Y, Guo W C, Yang Z G, *et al.* Studies on the blood biochemical indice of “mad swim disease” eel. *Anguilla anguilla* L.[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2002, 26(3): 314-316(in Chinese).
- [31] 高明辉. VC、VE 对亚硝酸盐胁迫下异育银鲫血液指标及抗氧化能力的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
Gao M H. Effect of VC、VE on blood parameters and antioxidant capability of *Carassius auratus gibelio* under nitrite stress[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008 (in Chinese).
- [32] 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.
- [33] 杨楠. 血清ALB/ChE比值和AST/ALT比值联合检测对肝硬化Child-Pugh分级的临床意义研究[D]. 延安: 延安大学, 2014.
Yang N. Studies on clinical significance of combined determination of serum AST/ALT, ALB/ChE ratios with Child-Pugh classification in hepatic cirrhosis[D]. Yan'an: Yan'an University, 2014 (in Chinese).
- [34] Strange R J, Schreck C B. Anesthetic and handling stress on survival and cortisol concentration in yearling Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)[J]. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1978, 35(3): 345-349.
- [35] 肖克宇. 水产动物免疫与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 182-186.
Xiao K Y. Immunization and Application of Aquatic Animals [M]. Beijing: Science Press, 2007: 182-186 (in Chinese).
- [36] Pickering A D, Pottinger T G, Sumpter J P, *et al.* Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. General and Comparative Endocrinology, 1991, 83(1): 86-93.
- [37] 田照辉, 徐邵刚, 王巍, 等. 急性热应激对西伯利亚鲟HSP70 mRNA表达、血清皮质醇和非特异性免疫的影响[J]. 水生生物学报, 2013, 37(2): 344-350.
Tian Z H, Xu S G, Wang W, *et al.* Effects of acute thermal stress on HSP70 mRNA, physiology and nonspecific immunity in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(2): 344-350(in Chinese).
- [38] 王文博, 汪建国, 李爱华, 等. 振荡胁迫后鲫血液皮质醇和溶菌酶水平的变化[J]. 水生生物学报, 2004, 28(6): 682-684.
Wang W B, Wang J G, Li A H, *et al.* Changes of cortisol and lysozyme levels in *Carassius auratus* blood after handling stress[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2004, 28(6): 682-684(in Chinese).
- [39] 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(4): 363-373.
- [40] 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.
- [41] Imsland A K, Foss A, Gunnarsson S, *et al.* The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Aquaculture, 2001, 198(3-4): 353-367.
- [42] Mcewen B S, Wingfield J C. The concept of allostasis in biology and biomedicine[J]. Hormones and Behavior, 2003, 43(1): 2-15.
- [43] Milligan C L. A regulatory role for cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum[J]. Journal of Experimental Biology, 2003, 206(18): 3167-3173.
- [44] Bernier N J, Bedard N, Peter R E. Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression in goldfish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2004, 135(2): 230-240.
- [45] Kühn E R, Geris K L, Van D G S, *et al.* Inhibition and activation of the thyroidal axis by the adrenal axis in

- vertebrates[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 1998, 120(1): 169-174.
- [46] 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1991: 420-460.
- Shen T, Wang J Y. *Biochemistry*[M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 1991: 420-460 (in Chinese).
- [47] Vijayan M M, Pereira C, Kruzynski G, *et al.* Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in two salmonids[J]. *Aquatic Toxicology*, 1998, 40(2-3): 101-108.
- [48] Matranga V, Toia G, Bonaventura R, *et al.* Cellular and biochemical responses to environmental and experimentally induced stress in sea urchin coelomocytes[J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2000, 5(2): 113-120.
- [49] Hassanein H M A, Banhawly M A, Soliman F M, *et al.* Induction of HSP 70 by the herbicide oxyfluorfen (Goal) in the Egyptian Nile fish, *Oreochromis niloticus*[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999, 37(1): 78-84.
- [50] Zhang A Y, Zhou X F, Wang X Y, *et al.* Characterization of two heat shock proteins (Hsp70/Hsc70) from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): evidence for their differential gene expression, protein synthesis and secretion in LPS-challenged peripheral blood lymphocytes[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 159(2): 109-114.
- [51] 洪美玲. 水中亚硝酸盐和氨氮对中华绒螯蟹幼体的毒性效应及维生素E的营养调节[D]. 上海: 华东师范大学, 2007.
- Hong M L. Toxicity of ambient nitrite and ammonia on *Eriocheir sinensis* juveniles and nutritional modulation of dietary VE[D]. Shanghai: East China Normal University, 2007 (in Chinese).

Effects of nitrite nitrogen stress on blood biochemical indicators and *HSP70* mRNA expression level of *Aristichthys nobilis*

LIN Yan¹, MIAO Linghong^{1,2}, PAN Wenjing¹, GE Xianping^{1,2*}, REN Mingchun²,
LIU Bo^{1,2}, LIANG Hualiang¹, ZHAO Zhenxin¹

(1. Fishery College, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China;

2. 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)

Abstract: In order to study the effects of nitrite nitrogen stress on blood biochemical indicators and *HSP70* mRNA expression level of *Aristichthys nobilis* [initial average weight (180.05±0.092) g], 170 individuals of *A. nobilis* were exposed to water body with nitrite nitrogen concentration of 48.634 mg/L for 96 hours, and then a 96-hour recovery experiment was carried out. Blood and tissues of gill, head kidney, intestines and spleen were sampled at 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 h after stress, and at 12, 24, 48, 72, 96 h after recovery. For the stress and recovery experiment process, the results showed serum cortisol and ALT activity significantly increased first, after being stressed for 6 h. Thereafter, serum GLU presented significant increase at 12 h. Whereafter, serum CHOL, TP and TG decreased significantly and T3, AST increased significantly, while serum LDL and HDL decreased significantly at 72 h. For the recovery experiment, *A. nobilis* were recovered from nitrite nitrogen stress after 96 h. The *HSP70* mRNA expression of different tissues showed that head kidney presented the fastest response to nitrite nitrogen stress, then gill, intestine and spleen. For recovering 96 h, *HSP70* mRNA expression of head kidney, intestine and spleen returned to normal. The result suggested that nitrite nitrogen affected the protein metabolism, lipid metabolism and glycometabolism of *A. nobilis*, and also influenced the *HSP70* mRNA expression of different tissues. *A. nobilis* showed rapid response to stress of high concentrations of water nitrite nitrogen after 6 h, so as to regulate physiological metabolism, and improve protection from stress injury and damage.

Key words: *Aristichthys nobilis*; nitrite nitrogen; stress; blood biochemical indicators; stress hormone; *HSP70*

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

Funding projects: China Agriculture Research System Special Project of National Conventional Freshwater Fishery Industry (CARS-46); National Nonprofit Institute Research Grant of Freshwater Fisheries Research Center of CAFS (2015GBFM25)