



拌饲投喂钙黄绿素对中华倒刺鲃幼鱼不同组织 抗氧化酶活性和脂质过氧化的影响

汪政希¹, 吴彤飞¹, 钟雪菲¹, 王元贞¹, 陈灵涵¹,
付梅^{1*}, 姚维志¹, 张志新², 吕红健^{1*}

(1. 西南大学水产学院, 农业农村部长江上游水生生物多样性保护研究中心,

西南大学渔业资源环境研究中心, 重庆 400716;

2. 北海道大学, 北极研究中心, 北海道 001-0021)

摘要: 为探究拌饲投喂方式下, 钙黄绿素 (calcein, CAL) 对中华倒刺鲃幼鱼不同组织抗氧化水平和脂质过氧化的影响, 以及正常投喂后的恢复情况, 并进一步评价 CAL 拌饲投喂的毒性效应, 实验将含有不同剂量 CAL (0、2、8 和 32 g/kg) 的饲料连续投喂中华倒刺鲃幼鱼 16 d (即毒性积累实验), 随后使用不含 CAL 的饲料投喂暂养 32 d (即毒性消除实验)。毒性积累实验结果显示, 在 CAL 拌饲投喂剂量 ≤ 32 g/kg 的情况下, 当累积投喂时间 ≤ 8 d 时, 过量的活性氧 (ROS) 能被中华倒刺鲃幼鱼的抗氧化系统成功清除, 但更长的投喂时间 (如 16 d) 可能产生一定的毒性效应, 并导致鱼体肝胰脏和肾脏组织的氧化应激过度。毒性消除实验结果显示, 经 32 d 正常投喂后, 中华倒刺鲃幼鱼血清、肝胰脏和肾脏组织的大部分抗氧化酶指标、非酶抗氧化物、脂质过氧化产物基本恢复至安全水平。研究表明, 当拌饲投喂剂量 ≤ 32 g/kg 时, CAL 对中华倒刺鲃幼鱼的毒性作用与累积投喂时间有着密切关系, 即 CAL 的累积投喂时间应控制在 8 d 以内, 标记后的幼鱼应当至少暂养 32 d。研究结果对 CAL 在鱼类荧光标记中的安全有效使用具有重要的指导意义。

关键词: 中华倒刺鲃幼鱼; 钙黄绿素; 拌饲投喂; 脂质过氧化; 毒性效应

中图分类号: S 931

文献标志码: A

荧光标记技术是鱼类增殖放流效果评估中标记放流鱼类的重要方法之一^[1], 它可以通过浸染^[2]、加强渗透^[3]、注射^[4] (包括肌肉和腹腔注射) 和投喂^[5] (包括拌饲投喂和口灌) 的方式, 使荧光染料在目标鱼类的耳石、鳞片、鳍条、鳍棘或其他骨质结构上产生可检测的标记^[6-7]。因具有操作简便、成本较低、实用性强的优点^[8-9], 荧光标记技术目前已被广泛应用于硬骨鱼纲 (Osteichthyes) 和软骨鱼纲 (Chondrichthyes) 板鳃亚纲 (Elasmobranchii)

鱼类的标记^[10-11]。迄今为止, 常用的荧光染料有钙黄绿素 (calcein, CAL)^[12]、钙黄绿素蓝 (calcein blue, CAL-B)^[13]、茜素红 S (alizarin red S, ARS)^[14-15]、茜素络合指示剂 (alizarin complexone, ALC)^[7, 16], 以及部分四环素类药物 (tetracycline antibiotics, TCH)^[17-18]。CAL 作为一种简便、有效的小分子荧光染料, 能在多种水生动物骨质或钙质结构上形成荧光标记, 目前其已被广泛应用于鱼类和贝类的标记中^[19-20]。

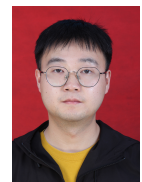
收稿日期: 2021-04-11 修回日期: 2021-05-12

资助项目: 国家自然科学基金 (31802296); 中央高校基本科研业务费专项 (XDJK2017B005)

第一作者: 汪政希 (照片), 从事渔业资源与环境保护研究, E-mail: 1159352718@qq.com

通信作者: 付梅, 从事渔业环境保护研究, E-mail: fumei@swu.edu.cn;

吕红健, 从事渔业资源评估与管理研究, E-mail: hongjianlv@swu.edu.cn



在鱼类荧光标记过程中, 荧光染料作为外源性物质进入鱼体, 势必会对目标鱼体的生理生化产生影响。一般而言, 当外源性物质(包括环境污染物)进入鱼体后, 鱼体内会产生大量活性氧($O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2), 积累过多的活性氧可致使DNA断裂、脂质过氧化、酶蛋白失活等, 进而引起机体氧化应激^[21]。生物体为了应对这种氧化应激, 体内的抗氧化系统会对活性氧自由基进行清除, 以防止氧化损伤, 其中主要的抗氧化酶包括超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)等, 以及谷胱甘肽(GSH)等氧自由基清除剂^[22-23]。此外, 丙二醛(MDA)作为脂质过氧化(LPO)的主要产物之一, 它的增加是鱼体组织中LPO增加的结果^[24]。因此, 一般通过检测鱼体组织(包括血清、肝胰脏组织、肾脏组织等)中各种抗氧化酶活性, 以及丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)含量可评估外源性物质对鱼体生理生化的影响^[25]。

近30多年来, 仅通过CAL标记效果和标记后暂养期间鱼体的生长与存活作为评价标准, 进而得出CAL荧光标记技术是一种快速、有效、经济的鱼类标记技术, 已得到了很多研究的验证^[4, 26-27]。然而, 作为全面、正确评价荧光标记技术的前提条件和必备标准, 荧光染料对标记鱼生理生化水平毒性效应和作用机理未受到足够的重视^[28], 有关标记后鱼体暂养恢复的研究也尚未见任何报道。因此, 本研究便针对这一环节, 在前期工作基础上, 开展拌饲投喂CAL对中华倒刺鲃(*Spinibarbus sinensis*)幼鱼不同组织抗氧化酶活性和脂质过氧化的影响, 以及标记后恢复的研究, 以期全面了解CAL对标记鱼体的毒性作用机理, 并为深入探讨CAL在鱼类标记实验的应用和监管提供理论和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用CAL购于天津市致远化学试剂有限公司。中华倒刺鲃幼鱼购于重庆静观养殖场, 其平均全长为(11.20±0.28)cm, 平均体质量(25.43±2.15)g。实验前, 将中华倒刺鲃实验幼鱼在1884L的圆柱形水箱(D×H: 200×60cm)中, 按光照周期为12L:12D饲养14d。所有水箱在暂养期间充分曝气, 每天对水体溶解氧(DO)、水温、pH

等理化指标进行测定, 并将实验水体DO维持在7.3~8.0mg/L, 水温维持在20.3~21.9℃, pH维持在7.3~7.9。每天换水1次, 换水量为养殖水箱体积的15%。

1.2 CAL饲料配制

先将暂养期间使用的颗粒饵料(通威集团有限公司)、CAL、干海带分别使用破壁机打成均匀的粉末备用。然后按照预先设置的CAL剂量, 将上述3种粉末按比例充分混合, 其中干海带粉末占混合后粉末总重量的2%(用作饲料黏合剂), 再添加1级水揉匀混合。最后, 使用颗粒饲料制备机(湖南衡泰机械科技有限公司)制粒, 并将制得颗粒饲料放入烘干机在35℃下烘干12h后, 装入塑封袋, 置于阴凉干燥处保存备用。

1.3 实验方法

本研究采用CAL拌饲投喂的方法, 并将饲料中CAL的含量配比为0(对照组)、2、8、32g/kg 4个梯度(参照Honeyfield等^[5, 29]方法)。实验共需4个养殖水箱(同暂养期间一致), 每个水箱投放80尾实验幼鱼, 共需320尾中华倒刺鲃幼鱼。实验共分2个部分, 即毒性积累实验和毒性消除实验。首先, 毒性积累实验持续时间为16d, 即连续16d按实验鱼体质量的2%日投饲率投喂含CAL 4个梯度的饲料, 投喂时间为每天的9:00 AM和18:00 PM(早1%, 晚1%)。毒性消除实验持续时间为32d, 仍按毒性积累实验投饲量进行投喂, 但饲料更换为无CAL饲料(即正常投喂)。整个实验过程中养殖水箱连续充气, 光照周期为12L:12D, 日换水1次, 换水量为15%。投喂1h后, 测定各水质指标, 并控制水质同暂养期间一致。

本研究取样时间设置为毒性积累实验的0h(投喂前)、1d、2d、4d、8d、16d, 以及毒性消除实验的1、4、8、16和32d。取样顺序按照投喂饲料中含CAL的量由低到高顺序进行, 每次各梯度组取中华倒刺鲃幼鱼6尾, 每次共取样24尾(4×6=24)。取样时, 将采集的中华倒刺鲃幼鱼使用100mg/L MS-222麻醉后, 再用1mL注射器从尾静脉采集血样, 将血样离心后分离血清, 并将血清样本在液氮中迅速冷冻。采血后, 对中华倒刺鲃幼鱼进行解剖, 取出肝胰脏和肾脏组织, 并使用液氮迅速冷冻。将上述血清、肝胰脏和肾脏组织样本转移并保存在-80℃冰箱中, 以备下

一步的测定分析。取样完成后按照每个梯度组剩余实验鱼尾数和重量, 重新计算下一阶段投饲量。此外, 在整个毒性实验过程中记录每组实验鱼的死亡率。

1.4 酶活性的测定

本研究使用南京建成生物工程研究所研发的试剂盒测定血清样本中碱性磷酸酶 (AKP)、谷草转氨酶 (GOT)、谷丙转氨酶 (GPT) 的活性, 肝胰脏和肾脏组织中 SOD、GST、GPx 的活性, 以及肝胰脏和肾脏组织中 MDA、GSH 的含量。

1.5 数据处理

实验所得数据均以平均值±标准误 (mean±SE) 的形式表示, 对上述数据使用 SPSS 23 (IBM, 美国) 进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 并使用 Tukey HSD 法进行多重比较。显著性水平 P 设定为 0.05, 当 $P \leq 0.05$ 时为差异显著。

2 结果

2.1 CAL 拌饲投喂对中华倒刺鲃幼鱼存活的影响

在整个 CAL 拌饲投喂以及正常投喂过程中, 4 个实验组均未出现死亡个体, 各实验组之间的死亡率无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.2 中华倒刺鲃幼鱼血清中 AKP、GPT、GOT 酶活性的变化

毒性积累实验 在 CAL 拌饲投喂第 1 天, 2、8、32 g/kg 处理组血清样本中 AKP 活性与对照组相比极显著升高 ($P < 0.01$), 且持续至毒性积累实验结束 (即拌饲投喂第 16 天)(图 1-a)。在 CAL 拌饲投喂第 1 天, 32 g/kg 处理组血清样本中 GOT 活性与对照组相比极显著升高 ($P < 0.01$), 而 2、8 g/kg 处理组在 CAL 拌饲投喂第 4 天才极显著升高 ($P < 0.01$), 且持续至毒性积累实验结束 (图 1-b)。此外, 2、8、32 g/kg 处理组血清样本中 GPT 活性极显著升高 ($P < 0.01$), 分别对应 CAL 拌饲投喂的第 2、1、4 天, 且持续至毒性积累实验结束 (图 1-c)。

毒性消除实验 正常投喂 32 d 后, 部分处理组血清样本中 AKP、GOT、GPT 活性仍极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 但上述 3 种酶活性随正常投喂时间的延长总体呈下降趋势。其中, 在正常投喂第 32 天, 2、8 g/kg 处理组血清样本中 AKP 活性与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 但 32

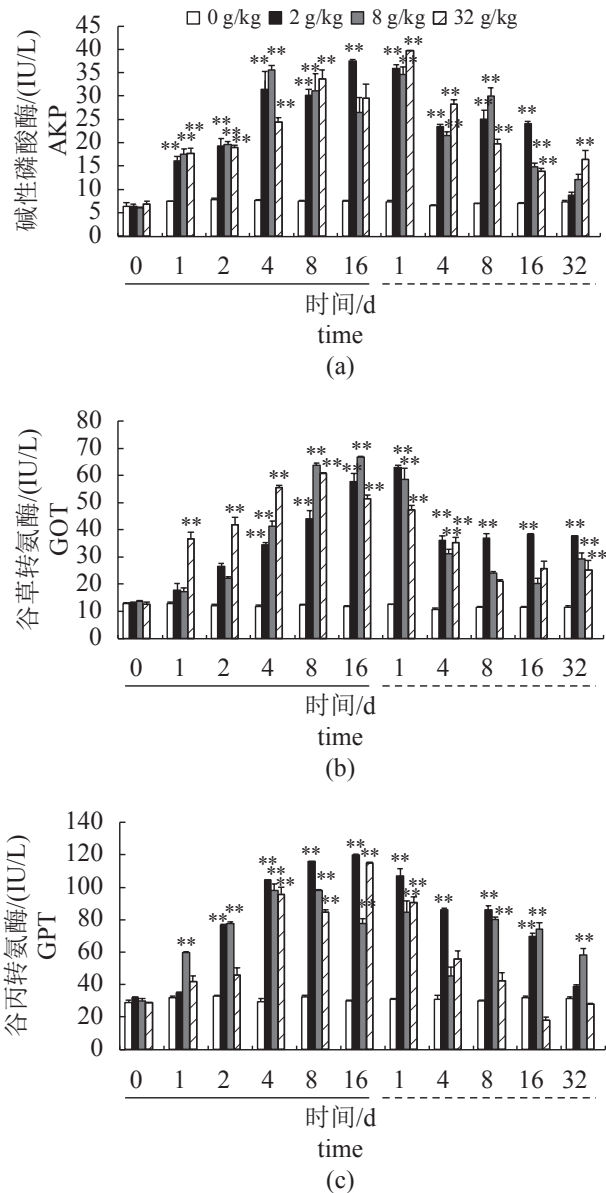


图 1 CAL 拌饲投喂和正常投喂对中华倒刺鲃幼鱼血清 AKP(a)、GOT(b) 和 GPT(c) 活性的影响

*. 差异显著 $P < 0.05$, **. 差异极显著 $P < 0.01$; “—”. 拌饲投喂时间, “- - -”. 正常投喂时间; 下同

Fig. 1 Effects of CAL mixed feeding and normal feeding on the activities of AKP (a), GOT (b) and GPT (c) in the serum of juvenile *S. sinensis*

*. significant difference $P < 0.05$, **. extremely significant difference $P < 0.01$; “—”. the mixed feeding duration, “- - -”. the normal feeding duration; the same below

g/kg 处理组仍极显著高于对照组 ($P < 0.01$)(图 1-a)。在正常投喂第 8 天, 8、32 g/kg 处理组血清样本中 GOT 活性与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 但在正常投喂第 32 天上述 2 个处理组血清样本中 GOT 活性与对照组相比又极显著升高 ($P < 0.01$),

2 g/kg 处理组血清样本中 GOT 活性始终极显著高于对照组 ($P < 0.01$) (图 1-b)。在正常投喂第 4 天, 8、32 g/kg 处理组血清样本中 GPT 活性与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 但在正常投喂第 8 天, 8 g/kg 处理组血清 GPT 活性又极显著升高 ($P < 0.01$), 并持续至实验结束, 然而, 直至正常投喂第 32 天, 2 g/kg 处理组血清样本中 GPT 活性与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 1-c)。

2.3 中华倒刺鲃幼鱼肝胰脏组织中 SOD、GPx、GST 酶活性的变化

毒性积累实验 在 CAL 拌饲投喂第 4 天, 所有处理组肝胰脏组织中 SOD 活性极显著升高 ($P < 0.01$), 且持续至毒性积累实验结束 (图 2-a)。2、8、32 g/kg 处理组肝胰脏组织中 GPx 活性显著升高, 分别对应 CAL 拌饲投喂的第 4 ($P < 0.01$)、1 ($P < 0.05$)、4 天 ($P < 0.01$), 且均持续至毒性积累实验结束 (图 2-b)。在 CAL 拌饲投喂第 1 天, 8 g/kg 处理组肝胰脏组织中 GST 活性与对照组相比极显著升高 ($P < 0.01$), 在第 2 天与对照组相比又无显著性差异 ($P > 0.05$); 在 CAL 拌饲投喂第 4 天, 所有处理组肝胰脏组织中 GST 活性与对照组相比均极显著升高 ($P < 0.01$), 并持续至毒性积累实验第 8 天; 而在第 16 天时, 所有处理组 GST 活性与对照组相比均无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 2-c)。

毒性消除实验 首先, 在正常投喂第 1 至 16 天, 所有处理组肝胰脏组织中 SOD 活性仍极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 而在第 32 天, 所有处理组 SOD 活性与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 且与毒性积累实验部分相比, 所有处理组 SOD 活性随正常投喂时间的延长总体呈下降趋势 (图 2-a)。其次, 在正常投喂第 1 至 4 天, 所有处理组肝胰脏组织中 GPx 活性极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 而在第 8 至 32 天, 所有处理组肝胰脏组织中 GPx 活性与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 且同 SOD 活性变化类似, 即 GPx 活性会随正常投喂时间的延长总体呈下降趋势 (图 2-b)。最后, 在正常投喂第 1 至 4 天, 所有处理组肝胰脏组织中 GST 活性与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 而在第 8 至 32 天, 所有处理组肝胰脏组织中 GST 活性均显著升高 ($P < 0.05$) (图 2-c)。

2.4 中华倒刺鲃幼鱼肾脏组织中 SOD、GPx、GST 酶活性的变化

毒性积累实验 在 CAL 拌饲投喂第 2 天,

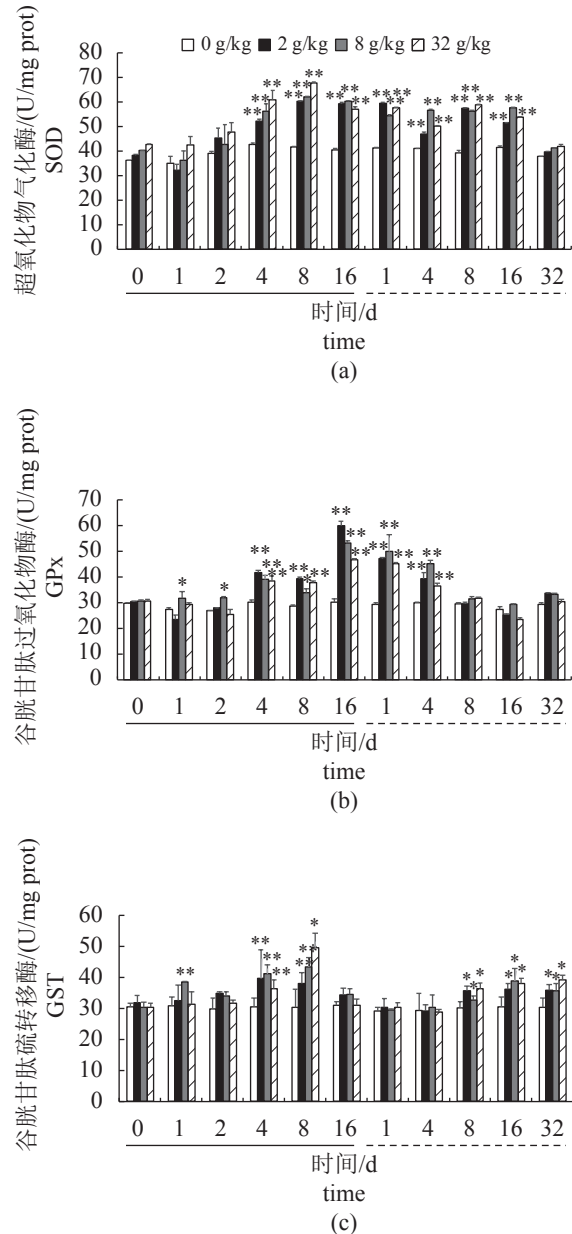


图 2 CAL 拌饲投喂和正常投喂对中华倒刺鲃幼鱼肝胰脏中 SOD(a)、GPx(b) 和 GST(c) 活性的影响

Fig. 2 The effects of CAL mixed feeding and normal feeding on the activities of SOD (a), GPx (b) and GST (c) in the hepatopancreas of juvenile *S. sinensis*

仅 8 g/kg 处理组的 SOD 活性与对照组相比显著升高 ($P < 0.05$), 而在第 4、8、16 天, 所有处理组 SOD 活性均显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 3-a)。在 CAL 拌饲投喂第 4 天, 2 g/kg 处理组 GPx 活性与对照组相比极显著升高 ($P < 0.01$), 且持续至毒性实验结束, 在第 4 和 16 天, 32 g/kg 处理组 GPx 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而在第 8 天时, 其活性显著低于对照组 ($P < 0.05$); 8 g/kg 处理组 GPx

活性仅在第 16 天时极显著高于对照组 ($P < 0.01$) (图 3-b)。在拌饲投喂第 2 天, 2 和 32 g/kg 处理组 GST 活性与对照组相比显著升高 ($P < 0.05$), 在第 8 天时, 所有处理组 GST 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$); 然而, 在第 16 天时, 所有处理组 GST 活性下降至与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 3-c)。

毒性消除实验 首先, 在正常投喂第 1 至 32 天中, 所有处理组肾脏组织中 SOD 活性均极显著高于对照组 ($P < 0.01$) (图 3-a)。其次, 在正常投喂的第 1 和 4 天, 所有处理组 GPx 活性均极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 而在第 8 天, 所有处理组 GPx 活性与对照组相比又无显著性差异 ($P > 0.05$)。此外, 2、8、32 g/kg 处理组分别在第 32、16、32 天时, 其 GPx 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 3-b)。最后, 在正常投喂第 1 至 32 天, 2 g/kg 处理组 GST 活性与对照组相比均无显著性差异 ($P > 0.05$); 8 g/kg 处理组 GST 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$) 的时间为正常投喂的第 4 至 16 天; 32 g/kg 处理组 GST 活性仅在第 1 天显著高于对照组 ($P < 0.05$); 在正常投喂的第 32 天时, 所有处理组 GST 活性与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 3-c)。

2.5 中华倒刺鲃幼鱼肝胰脏和肾脏组织中 MDA 和 GSH 含量的变化

毒性积累实验 在 CAL 拌饲投喂第 1 和 2 天, 所有处理组肝胰脏组织中 MDA 含量与对照组相比极显著降低 ($P < 0.01$), 而在第 4 天, 除 32 g/kg 处理组 MDA 含量显著低于 ($P < 0.05$) 对照组外, 2 和 8 g/kg 处理组 MDA 含量与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。在 CAL 拌饲投喂第 8 和 16 天, 所有处理组肝胰脏组织中 MDA 含量与对照组相比显著降低 ($P < 0.05$)。在 CAL 拌饲投喂第 1 至 16 天, 除 32 g/kg 处理组在第 16 天, 其 GSH 含量极显著低于对照组 ($P < 0.01$) 外, 其他所有处理组肝胰脏组织中 GSH 含量极显著高于对照组 ($P < 0.01$) (表 1)。

在 CAL 拌饲投喂第 1 至 16 天, 2 g/kg 处理组肾脏组织中 MDA 含量与对照组相比显著降低 ($P < 0.05$), 而 8 g/kg 处理组在第 2 和 16 天 MDA 含量显著低于对照组 ($P < 0.05$)。在拌饲投喂的第 2 天, 32 g/kg 处理组 MDA 含量与对照组相比极显著降低 ($P < 0.01$), 而在第 8 天, 其 MDA 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$)。在 CAL 拌饲投喂第

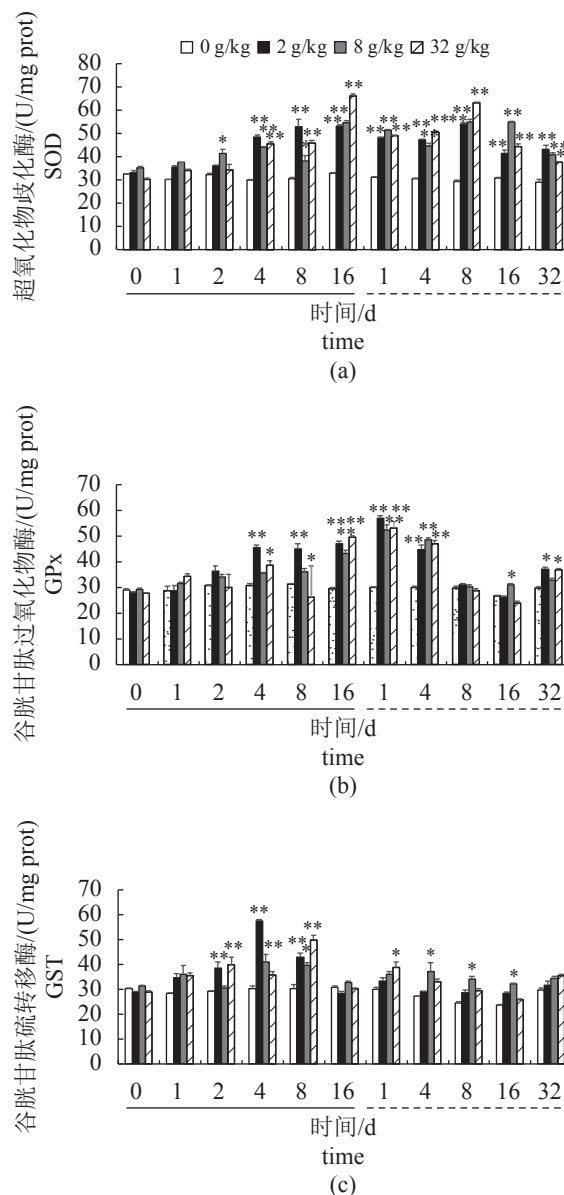


图 3 CAL 拌饲投喂和正常投喂对中华倒刺鲃幼鱼肾脏中 SOD(a)、GPx(b) 和 GST(c) 活性的影响

Fig. 3 Effects of CAL mixed feeding and normal feeding on the activities of SOD (a), GPx (b) and GST (c) in the kidney of juvenile *S. sinensis*

1 至 16 天, 所有处理组肾脏组织中 GSH 的含量与对照组相比均极显著升高 ($P < 0.01$) (表 2)。

毒性消除实验 在正常投喂的第 1、2、4 天, 所有处理组肝胰脏组织中 MDA 含量仍极显著低于 ($P < 0.01$) 对照组, 而在正常投喂第 8 和 16 天, 所有处理组肝胰脏组织中 MDA 含量与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。然而, 在正常投喂第 32 天, 所有处理组肝胰脏组织中 MDA 含量与对照组相比又显著降低 ($P < 0.05$)。在正常投

表 1 CAL 拌饲投喂 (MF) 和正常投喂 (NF) 对中华倒刺鲃幼鱼肝胰脏中 MDA 和 GSH 含量变化的影响

Tab. 1 Effects of CAL mixed feeding (MF) and normal feeding (NF) on the content of MDA and GSH in the hepatopancreas of juvenile *S. sinensis*

不同处理 different treatment	MDA/($\mu\text{mol/g prot}$)				GSH/($\mu\text{mol/g prot}$)				
	0 g/kg	2 g/kg	8 g/kg	32 g/kg	0 g/kg	2 g/kg	8 g/kg	32 g/kg	
MF	0 h	1.18±0.01	1.22±0.01	1.22±0.02	1.25±0.01	64.08±0.77	65.34±0.12	62.25±0.12	64.21±0.14
	1 d	1.07±0.09	0.60±0.13**	0.50±0.05**	0.47±0.04**	65.09±0.54	101.71±0.49**	109.93±1.20**	118.86±0.34**
	2 d	0.88±0.02	0.55±0.09**	0.53±0.05**	0.34±0.05**	62.65±0.73	88.00±3.54**	79.29±0.22**	78.76±3.61**
	4 d	0.93±0.03	0.80±0.06	0.75±0.07	0.65±0.03*	65.51±0.13	107.47±0.13**	104.13±0.10**	106.18±0.62**
	8 d	0.80±0.04	0.57±0.06*	0.35±0.06**	0.57±0.07*	63.34±0.18	98.01±0.17**	97.93±0.43**	91.95±0.38**
	16 d	0.80±0.04	0.29±0.02**	0.22±0.06**	0.26±0.02**	63.30±0.23	75.44±2.61**	66.74±1.64**	55.53±1.67**
NF	1 d	0.84±0.01	0.44±0.01**	0.75±0.01**	0.56±0.00**	61.95±0.20	66.77±1.07**	42.76±0.06**	57.18±1.94**
	4 d	0.79±0.05	0.33±0.02**	0.44±0.01**	0.29±0.01**	53.58±1.18	66.88±3.51**	74.94±3.06**	57.24±3.11
	8 d	1.03±0.04	1.19±0.03	0.91±0.01	1.20±0.13	62.98±0.40	92.32±0.22**	89.52±1.51**	104.1±0.55**
	16 d	1.14±0.08	1.01±0.05	1.17±0.10	1.07±0.02	61.32±0.20	74.27±3.21**	87.59±2.52**	72.20±0.89**
	32 d	0.84±0.03	0.41±0.03**	0.56±0.04*	0.56±0.07*	62.36±0.29	65.21±0.08	60.42±0.12	63.91±0.13

注: 数据用平均值±标准误表示, * 差异显著 $P < 0.05$, ** 差异极显著 $P < 0.01$, 下同

Notes: the values represent mean \pm SE from experiments performed in ($n = 6$), * significant difference $P < 0.05$, ** extremely significant difference $P < 0.01$, the same below

喂第 1 至 16 天, 2 g/kg 处理组肝胰脏组织中 GSH 含量仍极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 而在第 32 天时, 其 GSH 含量与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。对于 8 g/kg 处理组, 在正常投喂的第 1 天, 其 GSH 含量极显著低于对照组 ($P < 0.01$); 在正常投喂第 4 至 16 天, 其 GSH 含量极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 而在第 32 天时, 其 GSH 含量与对照组相比已无显著性差异 ($P > 0.05$)。最后, 在正常投喂第 1 天, 32 g/kg 处理组肝胰脏组织中

GSH 含量极显著低于对照组 ($P < 0.01$), 在正常投喂的第 8 和 16 天, 其 GSH 含量极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 在正常投喂的第 4 和 32 天, 其 GSH 含量与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 1)。

在正常投喂第 4 和 8 天, 2 g/kg 处理组肾脏组织中 MDA 含量显著低于对照组 ($P < 0.05$), 而在第 32 天, 其 MDA 含量却又极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 在正常投喂第 1 天, 8 g/kg 处理组肾脏组织中 MDA 含量与对照组相比显著升高 ($P <$

表 2 CAL 拌饲投喂和正常投喂对中华倒刺鲃幼鱼肾脏中 MDA 和 GSH 含量变化的影响

Tab. 2 Effects of CAL mixed feeding and normal feeding on the content of MDA and GSH in the kidney of juvenile *S. sinensis*

不同处理 different treatment	MDA/($\mu\text{mol/g prot}$)				GSH/($\mu\text{mol/g prot}$)				
	0 g/kg	2 g/kg	8 g/kg	32 g/kg	0 g/kg	2 g/kg	8 g/kg	32 g/kg	
MF	0 h	1.2±0.04	1.25±0.02	1.13±0.03	1.07±0.06	41.36±0.08	42.36±0.18	41.53±0.18	40.81±0.04
	1 d	0.79±0.03	0.45±0.02**	0.67±0.10	0.53±0.05	41.73±0.40	80.21±1.37**	82.56±1.21**	97.99±0.43**
	2 d	0.88±0.02	0.47±0.04**	0.53±0.07**	0.55±0.03**	41.91±0.20	112.88±3.03**	114.91±2.16**	86.99±3.27**
	4 d	0.78±0.03	1.23±0.03**	0.96±0.04	0.81±0.04	40.49±0.13	119.29±0.23**	94.15±0.95**	85.11±0.63**
	8 d	1±0.04	1.3±0.02*	1.23±0.02*	1.35±0.06*	42.47±0.18	106.72±0.41**	103.73±0.45**	116.92±0.26**
	16 d	0.86±0.04	0.64±0.01*	0.7±0.01*	0.76±0.05	40.59±0.23	59.57±0.34**	53.64±2.05**	58.78±1.40**
NF	1 d	0.75±0.03	0.81±0.03	1.02±0.03*	0.54±0.03*	40.34±0.09	54.16±2.62**	46.28±0.77	51.37±0.78**
	4 d	0.81±0.01	0.52±0.02*	0.84±0.05	0.51±0.07*	40.22±0.26	45.36±0.86	66.49±2.71**	48.92±0.52**
	8 d	1.21±0.05	1.02±0.02*	1.13±0.01	1.01±0.02*	40.1±0.30	74.33±1.14**	52.81±0.42**	66.68±0.94**
	16 d	1.16±0.04	1.15±0.02	0.83±0.10*	0.79±0.02*	41.01±0.12	69.55±0.08**	58.98±0.18**	70.44±0.28**
	32 d	0.89±0.01	1.21±0.10**	1.09±0.16	0.71±0.04*	41.19±0.04	46.45±0.06	43.64±0.41	45.46±0.37

0.05), 而在第 16 天, 其 MDA 含量显著低于对照组 ($P < 0.05$)。在正常投喂第 1 至 32 天, 32 g/kg 处理组 MDA 含量均显著低于对照组 ($P < 0.05$)。在正常投喂第 1、8 和 16 天, 2 g/kg 处理组肾脏组织中 GSH 含量均极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。在正常投喂第 4 至 16 天, 8 g/kg 处理组肾脏组织中 GSH 含量均极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。对于 32 g/kg 处理组, GSH 含量极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 对应正常投喂的第 1 至 16 天, 而在正常投喂第 32 天, 所有处理组肾脏组织中 GSH 含量与对照组相比又无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

3 讨论

3.1 CAL 对中华倒刺鲃幼鱼的毒性效应

一般来说, 荧光染料对标记动物的存活率有无影响是衡量标记适用性的一项重要指标^[30]。本研究结果显示, 在整个实验过程中, 包括毒性积累和毒性消除实验, 共计 48 d 里各实验组存活率均为 100%, 可见本研究所采用的 CAL 拌饲投喂剂量 (即 2~32 g/kg 剂量) 对中华倒刺鲃幼鱼并未构成致死性损伤, 这与采用 CAL 拌饲投喂标记其他鱼类^[5, 29]的研究结果保持一致。但是 Honeyfield 等^[5]认为当投喂的饲料变为半纯级或者在鱼被驯化 14 d 后, 鱼类会感知到饲料中 CAL 的存在, 从而影响其摄食; 另外投喂剂量与鱼类的不同生长阶段和生理状态均会影响到 CAL 在鱼体内含量的变化, 因此在拌饲投喂时需要考虑到这些影响因素^[29, 31]。

鱼类血清酶活性高低与相应组织器官的代谢水平和功能状态有关, 其变化在一定程度上反映组织器官功能状态的变化^[32-33]。一般而言, 血清中 GOT、GPT 是从坏死组织中释放出来的, 其可用于确定组织损伤程度, 也是肝胰脏组织损伤的重要指示酶^[34-35], 而 AKP 则在机体代谢和免疫防御中发挥着重要作用^[36]。本研究中, 随着 CAL 拌饲投喂的时间延长, 所有处理组血清样本中 AKP、GOT、GPT 活性均显著升高。上述结果表明, CAL 可能在中华倒刺鲃幼鱼的肝胰脏组织中有较高的富集潜力。在毒性消除实验部分, 随着正常投喂时间的延长, AKP、GOT、GPT 活性总体又呈现出下降趋势, 说明 CAL 通过拌饲投喂的方式进入中华倒刺鲃幼鱼体内, 对肝胰脏组织的损伤还不足以影响 AKP、GOT、GPT 的正常合成。这与霍

来江^[37]使用茜素红 S 浸泡中华倒刺鲃幼鱼, 以及潘建雄^[38]用茜素络合物浸泡鳙 (*Hypophthalmichthys nobilis*) 的结论类似, 即在受到外源物刺激时, 血清酶活性总体呈现出先升高后降低的趋势。因此, 从中华倒刺鲃幼鱼血清酶活性变化的角度出发, 我们推断在一定投喂剂量范围内, 即投喂剂量 ≤ 32 g/kg, 由 CAL 引起目标鱼体的组织损伤可控, 且经过一段时间的正常投喂, 仅依靠机体自身的代谢修复能力可恢复至接近正常水平。

鱼类的肝胰脏和肾脏组织分别作为主要的解毒和排毒器官, 其生化指标是生态毒理学和环境监测研究的重要指标^[39-40]。此外, 鱼类抗氧化系统一般有 3 道防线, SOD、GPx 为第 1 道防线, 即 SOD 能把超氧自由基转化为过氧化氢, 然后由 GPx 消除, 而过氧化氢是机体损伤的主要产物, 因此它们的作用和效果在整个抗氧化防御策略中是不可或缺的^[41]。本研究中, 肝胰脏和肾脏组织中的 SOD 和 GPx 活性都是在拌饲投喂第 2 或 4 天开始显著升高, 这是由于 CAL 导致机体产生氧化应激, 中华倒刺鲃幼鱼通过增强自身 SOD 和 GPx 活力来清除体内过多的活性氧 (ROS) 和超氧自由基。在毒性消除实验中, 中华倒刺鲃幼鱼肝胰脏组织中的 SOD 活性在第 32 天时, 基本恢复至安全水平, 而在肾脏组织中却没有, 一方面这可能是因为 CAL 对肾脏组织的损伤程度大于肝胰脏组织, 从而无法快速清除肾脏组织中的 ROS; 另一方面也可能是比起肝胰脏组织, CAL 在肾脏组织中具有更高的蓄积潜力。此外, 肝胰脏和肾脏组织中的 GPx 都是在第 8 天恢复到安全水平。上述结果表明, 以 SOD 和 GPx 为主的抗氧化酶高效协同起来以清除体内产生的氧自由基, 且这 2 种酶的诱导在时间上具有一定的同步性和异质性, 这也与许莉佳^[42]研究盐酸四环素对斑马鱼 (*Danio rerio*) 稚鱼抗氧化酶活性影响的结果相近。

GST 是生物体内最重要的代谢酶系之一, 具有清除体内氧自由基和解毒的双重功能, 可催化 GSH 与化学物质的亲电基团结合, 最终形成硫醚氨基酸排出体外, 在体内解毒功能上也起着重要作用^[43]。本研究中, 在毒性积累实验的第 1 至 8 天, 中华倒刺鲃幼鱼的肝胰脏和肾脏组织中各时间点的 GST 活性都持续上升, 这是对 CAL 胁迫的氧化应激反应。然而, 由于对现有酶的过度利用, 肝胰脏和肾脏组织中的 GST 活性又都在第 16 天下降。因此, 从肝胰脏和肾脏组织中的 GST 活性

的变化角度,可以推断当CAL拌饲投喂剂量 ≤ 32 g/kg的情况下,累计投喂时间应尽量控制在8 d以内,进而防止中华倒刺鲃幼鱼肝胰脏和肾脏组织的过度氧化应激。此外,与肝胰脏组织相比,中华倒刺鲃幼鱼肾脏组织的GST活性在CAL拌饲投喂后升高更快,也更显著,据此可以推断其对肾脏组织的损伤可能要比肝胰脏组织大。毒性消除实验初期(即正常投喂的第1和4天),肝胰脏组织中的GST活性就已经恢复至安全水平,但在后期GST活性却再次升高,我们推断可能是由于残留在鱼体肠道或体内的CAL对中华倒刺鲃幼鱼产生了一定刺激。然而,肾脏组织中的GST活性在毒性消除实验初期的较高剂量组还有升高趋势,但升高程度远不及毒性积累实验部分,这可能是由于中华倒刺鲃再次增强抗氧化防御机制来应对残留在鱼体内循环中CAL的刺激,即由于条件恢复产生新一轮的氧化应激所致。

GSH是生物体内一种重要的非酶抗氧化物,其在细胞内的含量会影响酶类抗氧化剂的活性,能够有效清除生理性或病理性的氧自由基^[44]。在此次CAL毒性积累实验,中华倒刺鲃幼鱼肝胰脏和肾脏组织中GSH含量呈现出先增加后降低的趋势,说明CAL对组织内GSH含量有明显的诱导作用,但随着CAL拌饲投喂时间延长,细胞内的GSH含量出现下降趋势,表明机体抗氧化能力下降,进而可能导致活性氧得不到及时的清除,从而对肝胰脏和肾脏组织造成氧化损伤。上述GSH含量变化结果与肝胰脏和肾脏组织中GST酶活性变化趋势相符。这一研究结果也与多数外源性毒物对鱼体肝胰脏组织中谷胱甘肽代谢的影响结果一致,如氨氮对黄河鲤(*Cyprinus carpio*)的影响研究^[45],十溴二苯乙烷对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)的影响研究^[46]。因此,依据本研究中肝胰脏和肾脏组织中GSH含量的变化趋势,我们建议CAL累计拌饲投喂时间应尽量控制在8 d以内,这样可防止中华倒刺鲃幼鱼肝胰脏和肾脏组织的氧化损伤。然而,在毒性消除实验中GSH的含量又开始逐渐增加,至毒性消除实验结束时(即第32天时),中华倒刺鲃幼鱼肝胰脏和肾脏组织中GSH含量与对照组无显著性差异($P > 0.05$),说明由CAL引起的氧化损伤,经一定时间可以恢复。据此,建议CAL拌饲投喂后的暂养时间应不小于32 d。

MDA是氧化损伤最终形成的脂质过氧化产

物,其含量可间接反映机体自由基水平,是毒性作用、保护作用的综合反映^[47]。MDA和各种抗氧化酶变化相结合,可共同反映鱼体所受到的氧化胁迫^[48]。本研究中,单从MDA的含量可以看出肾脏组织大于肝胰脏组织,这可能与不同组织所执行的生理功能以及代谢水平有关。此外,肝胰脏和肾脏组织中MDA含量总体随着积累和消除时间的延长表现出先降低后升高的趋势。引起上述实验结果的原因可能是机体不同组织处于氧化应激状态时,产生了较多的ROS,而此时抗氧化系统能够产生足够的SOD、GPx等抗氧化酶来清除ROS,从而减轻脂质过氧化作用,进而引起MDA含量的降低。然而,机体抗氧化能力是有限的,当CAL的积累时间不断增加,超过了机体自身的承受能力时,就会产生过多的ROS,导致脂质过氧化作用加剧,从而引起MDA含量升高,最终出现氧化损伤。但本研究中经过一段时间的正常投喂,毒性消除实验第8和16天所有处理组肝胰脏组织,以及第1天的2 g/kg处理组,第4和8天的8 g/kg处理组肾脏组织的MDA的含量均恢复至安全水平,这一结果说明中华倒刺鲃幼鱼可以通过自身的调节使肝胰脏和肾脏组织的MDA含量恢复正常,从而对抗氧化损伤的产生。因此,依据肝胰脏和肾脏组织中MDA含量的变化,可以推断CAL拌饲投喂后的暂养时间应不少于16 d。

3.2 用CAL标记中华倒刺鲃幼鱼的建议

研究不同标记方式下荧光染料对标记鱼类的毒性效应,将有助于这些化学品标记物安全水平的界定^[49]。Brooks等^[13]使用CAL浸泡标记青鳉(*Oryzias latipes*)幼鱼时发现标记水温为15℃的毒性明显高于标记水温为10℃的,且在同等浓度和水温下,浸泡过CAL的青鳉幼鱼的死亡率明显高于浸泡过氧四环素(OTC)的。Meyer等^[50]研究ALC对大西洋鳕(*Gadus morhua*)胚胎和幼鱼的急性和慢性毒性影响时,发现ALC浸泡会明显影响胚胎和幼鱼存活率、孵化率、首次进食时间等早期生活史参数。此外,吴金明等^[25]发现使用不同浓度的ARS浸染中华倒刺鲃幼鱼,会对不同组织的抗氧化酶活性和脂质过氧化反应产生一定影响。根据近60年的鱼类荧光标记数据,Lü等^[49]总结发现,荧光染料的毒性与鱼类种类、生活史不同阶段、荧光染料种类、浓度、剂量、处理方式(包括投喂、浸泡、注射等)、标记环境(包括水温、

pH、盐度等)有直接关系。总结上述,多数研究仅就“浸泡”这一种方式进行了荧光染料的毒性效应研究,而有关“拌饲投喂”和“注射”方式下毒性效应的研究几乎没有。

通过拌饲投喂的方式来标记目标鱼类已经被证实是可行的^[5],且不同的投喂剂量会产生不同的标记效果。Honeyfield 等^[5]发现当饲料中 CAL 的含量为 0.75 或 1.25 g/kg (按体质量的 2% 投喂)时,连续投喂 5 d 后,在鳞片上出现标记的比例:美洲红点鲑 (*Salvelinus fontinalis*) 为 100%,大西洋鲑 (*Salmo salar*) 为 93%~98%,黄金鲈 (*Perca flavescens*) 为 60%,银鲑 (*Oncorhynchus kisutch*) 为 0%,但是当饲料中 CAL 含量提高至 5.25 g/kg 时,可以在所有银鲑的鳞片上观察到标记。Honeyfield 等^[29]还发现当饲料中 CAL 的含量为 2 g/kg 时,投喂 15 d 的密西西比铲鲟 (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) 比 5 和 10 d 的标记更为明显。此外,Thomas 等^[51]发现当饲料中 CAL 的含量为 25 或 50 g/kg 时(投饲率按每日 7% 投喂),投喂 1 d 后就能在眼斑拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*) 耳石上产生明显的标记。以上研究仅从标记效果的角度评价了 CAL 拌饲投喂的可行性,但并未考虑 CAL 拌饲投喂对鱼体生理生化所产生的潜在影响。本研究发现,当 CAL 拌饲投喂剂量在 2~32 g/kg 时,与拌饲剂量相比,CAL 对中华倒刺鲃幼鱼体内抗氧化酶和脂质过氧化水平的毒性作用与累积投喂时间的关系更为密切。综合本研究中 CAL 拌饲投喂对中华倒刺鲃幼鱼血清、肝胰脏和肾脏组织的抗氧化酶和脂质过氧化水平的影响,我们推断当 CAL 拌饲投喂剂量 \leq 32 g/kg 时,累积投喂时间 \leq 8 d 时,过量的 ROS 能被中华倒刺鲃幼鱼的抗氧化系统成功清除,但更长的投喂时间如 16 d 时可能产生一定的毒性效应,并导致鱼体的氧化应激过度。另一方面,根据正常投喂后,中华倒刺鲃幼鱼血清、肝胰脏和肾脏组织抗氧化系统的恢复情况,我们推断在正常投喂 32 d 后,鱼体大部分的抗氧化酶指标、非酶抗氧化物、脂质过氧化产物基本恢复至安全水平,即中华倒刺鲃幼鱼可以依靠机体自身的代谢修复能力使各组织抗氧化酶活性和脂质过氧化反应基本恢复至 CAL 投喂前或正常水平。

本研究首次报道了 CAL 拌饲投喂对中华倒刺鲃幼鱼不同组织抗氧化酶活性和脂质过氧化的影响。研究表明,在拌饲剂量 \leq 32 g/kg 的情

况下,过长的投喂时间会显著影响中华倒刺鲃幼鱼不同组织内的抗氧化酶活性和脂质过氧化过程,但上述这些变化经一定时间的正常投喂后,是可以恢复的。综合上述,当使用 CAL 拌饲剂量 32 g/kg 之内投喂标记中华倒刺鲃幼鱼[全长为(11.20 \pm 0.28) cm,体质量为(25.43 \pm 2.15) g]时,单从 CAL 毒性效应角度出发,CAL 的累积投喂时间应控制在 8 d 以内,标记后的幼鱼应当至少正常投喂 32 d。上述研究结果对 CAL 在鱼类荧光标记中的安全有效使用具有重要的指导意义,并为进一步探讨 CAL 在鱼类标记中的应用和监管提供理论和技术支撑。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Weber D, Ridgway G J. Marking pacific salmon with tetracycline antibiotics[J]. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1967, 24(4): 849-865.
- [2] Lü H J, Fu M, Xi D, et al. Experimental evaluation of using calcein and alizarin red S for immersion marking of bighead carp *Aristichthys nobilis* (Richardson, 1845) to assess growth and identification of marks in otoliths, scales and fin rays[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2015, 31(4): 665-674.
- [3] Crook D A, O'mahony D, Gillanders B M, et al. Production of external fluorescent marks on golden perch fingerlings through osmotic induction marking with alizarin red S[J]. *North American Journal of Fisheries Management*, 2007, 27(2): 670-675.
- [4] Monaghan Jr J P. Notes: comparison of calcein and tetracycline as chemical markers in summer flounder[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1993, 122(2): 298-301.
- [5] Honeyfield D C, Ostrowski C S, Fletcher J W, et al. Dietary calcein marking of brook trout, Atlantic salmon, yellow perch, and coho salmon scales[J]. *North American Journal of Fisheries Management*, 2006, 26(2): 431-437.
- [6] Tsukamoto K. Mass-marking of ayu eggs and larvae by tetracycline-tagging of otoliths[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1985, 51(6): 903-911.
- [7] Tsukamoto K. Otolith tagging of ayu embryo with fluorescent substances[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1988, 54(8): 1289-1295.

- [8] Baer J, Rösch R. Mass-marking of brown trout (*Salmo trutta* L.) larvae by alizarin: method and evaluation of stocking[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2008, 24(1): 44-49.
- [9] Brown M L, Powell J L, Lucchesi D O. In-transit oxytetracycline marking, nonlethal mark detection, and tissue residue depletion in yellow perch[J]. *North American Journal of Fisheries Management*, 2002, 22(1): 236-242.
- [10] Liu Q, Zhang X M, Zhang P D, *et al.* The use of alizarin red S and alizarin complexone for immersion marking Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (T.) [J]. *Fisheries Research*, 2009, 98(1-3): 67-74.
- [11] Gelsleichter J, Cortés E, Manire C A, *et al.* Use of calcein as a fluorescent marker for elasmobranch vertebral cartilage[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1997, 126(5): 862-865.
- [12] Wilson C A, Beckman D W, Dean J M. Calcein as a fluorescent marker of otoliths of larval and juvenile fish[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1987, 116(4): 668-670.
- [13] Brooks R C, Heidinger R C, Kohler C C. Mass-marking otoliths of larval and juvenile walleyes by immersion in oxytetracycline, calcein, or calcein blue[J]. *North American Journal of Fisheries Management*, 1994, 14(1): 143-150.
- [14] Blom G, Nordeide J T, Svåsand T, *et al.* Application of two fluorescent chemicals, alizarin complexone and alizarin red S, to mark otoliths of Atlantic cod, *Gadus morhua* L[J]. *Aquaculture & Fisheries Management*, 1994, 25: 229-243.
- [15] Beckman D W, Schulz R G. A simple method for marking fish otoliths with alizarin compounds[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1996, 125(1): 146-149.
- [16] Partridge G J, Jenkins G I, Doupe R G, *et al.* Factors affecting mark quality of alizarin complexone-stained otoliths in juvenile black bream *Acanthopagrus butcheri* and a prescription for dosage[J]. *Journal of Fish Biology*, 2009, 75(6): 1518-1523.
- [17] Weber D D, Ridgway G J. The deposition of tetracycline drugs in bones and scales of fish and its possible use for marking[J]. *The Progressive Fish-Culturist*, 1962, 24(4): 150-155.
- [18] 段必成, 张薪, 叶勤, 等. 盐酸四环素浸泡与投喂标记鲢的效果比较及其浸泡标记对肝脏生理指标的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2020, 51(5): 1175-1181.
- Duan B C, Zhang X, Ye Q, *et al.* Effectiveness comparison of tetracycline immersing and feeding to mark silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and physiological impacts on liver[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2020, 51(5): 1175-1181 (in Chinese).
- [19] Cameron L M, Baumgartner L J, Bucher D J, *et al.* Optimising chemical marking techniques for Australian bass, *Macquaria novemaculeata*, fry and fingerlings prior to restocking[J]. *Australian Journal of Zoology*, 2011, 59(4): 242-248.
- [20] Riascos J, Guzmán N, Laudien J, *et al.* Suitability of three stains to mark shells of *Concholepas concholepas* (gastropoda) and *Mesodesma donacium* (bivalvia)[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2007, 26(1): 43-49.
- [21] 徐立红, 张甬元, 陈宜瑜. 分子生态毒理学研究进展及其在水环境保护中的意义[J]. *水生生物学报*, 1995, 19(2): 171-185.
- Xu L H, Zhang Y Y, Chen Y Y. The advances of molecular ecotoxicology and its significance in water environment protection[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1995, 19(2): 171-185 (in Chinese).
- [22] 亢玉静, 郎明远, 赵文. 水生生物体内抗氧化酶及其影响因素研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2013, 33(3): 75-80.
- Kang Y J, Lang M Y, Zhao W. Advance in antioxidant enzymes and its effect factors in aquatic organisms[J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 33(3): 75-80 (in Chinese).
- [23] Lushchak V I. Environmentally induced oxidative stress in fish[M]. Chichester: John Wiley & Sons, 2011.
- [24] Claeson K, Thorsén G, Karlberg B. Methyl malondialdehyde as an internal standard for the determination of malondialdehyde[J]. *Journal of Chromatography B:Biomedical Sciences and Applications*, 2001, 751(2): 315-323.
- [25] 吴金明, 霍来江, 杜浩, 等. 茜素红S对中华倒刺鲃幼鱼不同组织抗氧化酶活性和脂质过氧化的影响[J]. *水生生物学报*, 2016, 40(6): 1172-1177.
- Wu J M, Huo L J, Du H, *et al.* Preliminary study of the alizarin red S effect on antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation of *Spinibarbus sinensis* juveniles[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(6): 1172-1177 (in Chinese).

- [26] Bashey F. A comparison of the suitability of alizarin red S and calcein for inducing a nonlethally detectable mark in juvenile guppies[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2004, 133(6): 1516-1523.
- [27] Lü H J, Fu M, Dai S, *et al.* Experimental evaluation of calcein and alizarin red S for immersion marking of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844)[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2016, 32(1): 83-91.
- [28] Leips J, Baril C T, Rodd F H, *et al.* The suitability of calcein to mark poeciliid fish and a new method of detection[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2001, 130(3): 501-507.
- [29] Honeyfield D C, Kindschi G A, Bell T A, *et al.* Dietary calcein marking of shovelnose sturgeon and the effect of sunlight on mark retention[J]. *North American Journal of Aquaculture*, 2011, 73(2): 129-134.
- [30] 陈雷, 刘海映, 王秀丽, 等. 荧光标记红鳍东方鲀可行性研究[J]. *生物技术通报*, 2014(2): 112-115.
Chen L, Liu H Y, Wang X L, *et al.* Feasibility of fluorescent tag on *Takifugu rubripes*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014(2): 112-115 (in Chinese).
- [31] Frenkel V, Kindschi G, Zohar Y. Noninvasive, mass marking of fish by immersion in calcein: evaluation of fish size and ultrasound exposure on mark endurance[J]. *Aquaculture*, 2002, 214(1-4): 169-183.
- [32] 陈超, 施兆鸿, 薛宝贵, 等. 低温胁迫对七带石斑鱼幼鱼血清生化指标的影响[J]. *水产学报*, 2012, 36(8): 1249-1255.
Chen C, Shi Z H, Xue B G, *et al.* Influence of low-temperature stress on serum biochemical parameters in juvenile *Epinephelus septemfasciatus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(8): 1249-1255 (in Chinese).
- [33] 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).
- [34] 周越, 王伟隆, 李松林, 等. 饲料中胆碱对大口黑鲈幼鱼生长性能、体成分和血清抗氧化机能的影响[J]. *水产学报*, 2022, 46(2): 224-237.
Zhou Y, Wang W L, Li S L, *et al.* Effect of dietary choline level on growth performance, body composition and serum antioxidant activity of juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(2): 224-237 (in Chinese).
- [35] 冯健, 刘永坚, 刘栋辉, 等. 红姑鱼日粮脂肪水平和脂肪酸比例与脂肪肝病关系研究[J]. *海洋科学*, 2004, 28(6): 28-31.
Feng J, Liu Y J, Liu D H, *et al.* Relationship between dietary lipid levels and proportion of lipid acids on fatty liver disease in juvenile *Sciaenops ocellatus*[J]. *Marine Sciences*, 2004, 28(6): 28-31 (in Chinese).
- [36] 虞顺年, 魏小岚, 韦芳三, 等. 不同运动强度对黑鲟生长、血清和肝脏抗氧化指标的影响[J]. *水生生物学报*, 2018, 42(2): 255-263.
Yu S N, Wei X L, Wei F S, *et al.* Effects of different exercise intensity on growth and serum and liver antioxidant indices of *Sparus macrocephalus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, 42(2): 255-263 (in Chinese).
- [37] 霍来江. 茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼的染色效果以及对氧化应激响应[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
Huo L J. The dyeing effect of ARS on juvenile *Spinibarbus sinensis* and oxidative stress response to it[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [38] 潘建雄. 鲮对茜素络合物标记的应激响应及其标记放流效果的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
Pan J X. The stress response of alizarin complex to *Aristicluthys nobilia* markers and its tagging and releasing[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2019 (in Chinese).
- [39] 林浩然. 鱼类生理学[M]. 2版. 广州: 广东高等教育出版社, 2007.
Lin H R. *Physiology of fish*[M]. 2nd ed. Guangzhou: Guangdong Higher Education Press, 2007 (in Chinese).
- [40] Camargo M M P, Martinez C B R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream[J]. *Neotropical Ichthyology*, 2007, 5(3): 327-336.
- [41] Ighodaro O M, Akinloye O A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid[J]. *Alexandria Journal of Medicine*, 2018, 54(4): 287-293.

- [42] 许莉佳. 荧光标记斑马鱼稚鱼耳石的效果及其对抗氧化酶活力的影响 [D]. 重庆: 西南大学, 2012.
Xu L J. Marking juvenile zebrafish with fluorescent substances and its effects on antioxidases[D]. Chongqing: Southwest University, 2012 (in Chinese).
- [43] 瞿建宏, 陈家长, 胡庚东, 等. 苯酚胁迫下罗非鱼组织中过氧化氢酶与谷胱甘肽-S-转移酶的动态变化[J]. 生态环境, 2006, 15(4): 687-692.
Qu J H, Chen J Z, Hu G D, *et al.* Dynamic changes of catalase and glutathione-S-transferase in the different tissues of tilapia exposed to phenol[J]. Ecology and Environment, 2006, 15(4): 687-692 (in Chinese).
- [44] 李宜聪, 廖凯, 姬仁磊, 等. 茶多酚对大菱鲆生长、抗氧化能力及脂肪代谢相关基因表达的影响[J]. 水产学报, 2019, 43(11): 2405-2412.
Li Y C, Liao K, Ji R L, *et al.* Effects of tea polyphenols on growth, antioxidant capacity and lipid metabolism related genes expression of turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(11): 2405-2412 (in Chinese).
- [45] 袁宏利, 李利红. 氨氮对黄河鲤鱼肝组织中谷胱甘肽代谢的影响[J]. 水产养殖, 2017, 38(7): 15-17.
Yuan H L, Li L H. The effects of ammonia stress on GSH metabolism of livers in carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Journal of Aquaculture, 2017, 38(7): 15-17 (in Chinese).
- [46] 韩倩, 张丽娟, 胡国成, 等. 十溴二苯乙烷对草鱼幼鱼肝脏和肌肉组织氧化应激效应的影响[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(2): 680-686.
Han Q, Zhang L J, Hu G C, *et al.* Oxidative stress effects of decabromodiphenylethane on the liver and muscle tissues of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(2): 680-686 (in Chinese).
- [47] 赵月, 曹志会, 王冰, 等. 生化法处理后的链霉素废水出水对斑马鱼SOD活性和MDA含量的影响[J]. 江苏农业科学, 2015(8): 348-351.
Zhao Y, Cao Z H, Wang B, *et al.* Effects of streptomycin wastewater on SOD activity and MDA content in zebrafish after biochemical treatment[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2015(8): 348-351 (in Chinese).
- [48] Scandalios J G. Oxygen stress and superoxide dismutases[J]. Plant Physiology, 1993, 101(1): 7-12.
- [49] Lü H J, Fu M, Zhang Z X, *et al.* Marking fish with fluorochrome dyes[J]. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 2020, 28(1): 117-135.
- [50] Meyer S, Sørensen S R, Peck M A, *et al.* Sublethal effects of alizarin complexone marking on Baltic cod (*Gadus morhua*) eggs and larvae[J]. Aquaculture, 2012, 324-325: 158-164.
- [51] Thomas L M. Chemical marking techniques for larval and juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) otoliths using different fluorescent markers[J]. Recent Development in Fish Otolith Research, 1995, 19: 703-717.

Effects of calcein feeding on the levels of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in juvenile *Spinibarbus sinensis*

WANG Zhengxi¹, WU Tongfei¹, ZHONG Xuefei¹, WANG Yuanzhen¹, CHEN Linghan¹,
FU Mei^{1*}, YAO Weizhi¹, ZHANG Zhixin², LÜ Hongjian^{1*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, Research Central of Fishery Resources and Environment,
College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Arctic Research Center, Hokkaido University, N21W11, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 001-0021, Japan)

Abstract: In order to explore the effects of dietary calcein (CAL) for fluorescence labeling on the levels of antioxidant enzymes, and lipid peroxidation in different tissues, juvenile *Spinibarbus sinensis* were fed continuously with different CAL dosages feed (including 0, 2, 8, and 32 g/kg) for 16 days (i.e., toxicity accumulation experiment), and then with feed without CAL for 32 days (ie., toxicity elimination experiment). Moreover, the recovery after CAL feeding, as well as the toxic effects of CAL were further evaluated. The results of toxicity accumulation experiment showed that the excess reactive oxygen species (ROS) could be successfully removed by the antioxidant system of juvenile *S. sinensis*, when the CAL dosage \leq 32 g/kg and the cumulative feeding duration \leq 8 days. However, long feeding period (e.g., 16 days) might cause toxic effects, and even lead to excessive oxidative stress in hepatopancreas and kidney of experimental fish. The results of toxicity elimination experiment showed that most of the antioxidant enzyme indexes, non-enzyme antioxidants and lipid peroxidation products in serum, hepatopancreas and kidney tissues of juvenile *S. sinensis* recovered to safe levels after 32 days. The present study confirmed that the toxic effects of CAL feeding in juvenile *S. sinensis* depended on cumulative feeding duration when dosage \leq 32 g/kg. In other words, when CAL is used to mark juvenile *S. sinensis* by feeding, the CAL dosage and the feeding duration should be restricted to \leq 32 g/kg and \leq 8 days, respectively, and the marked juveniles should be reared for at least 32 days. The results are of important guiding significance for the safe and effective application of CAL in fish fluorescent labeling.

Key words: juvenile *Spinibarbus sinensis*; calcein; mixed feeding; lipid peroxidation; toxic effect

Corresponding authors: FU Mei. E-mail: fumei@swu.edu.cn;

LÜ Hongjian. E-mail: hongjianlv@swu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31802296); Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2017B005)