



刺激隐核虫感染对大黄鱼生理生化指标及免疫指标的影响

胡水木¹, 刘悦¹, 李奕晨¹, 田国鹏¹, 郭心怡¹,
林嘉琪¹, 白玉麟¹, 徐鹏^{1,2}, 周涛^{1,2*}

(1. 厦门大学海洋与地球学院, 海水养殖生物育种全国重点实验室, 福建 厦门 361102;

2. 厦门大学海洋与地球学院, 福建省海洋经济生物遗传育种重点实验室, 福建 厦门 361102)

摘要: 刺激隐核虫感染能够导致海水鱼类感染“白点病”, 而大黄鱼是受“白点病”影响最严重的海水养殖鱼类。为了探究刺激隐核虫感染对大黄鱼生理生化指标及免疫指标的影响, 本研究利用刺激隐核虫人工感染大黄鱼, 分别在感染后 0、12、24、48 和 72 h 采集血液、肝脏、脾脏、肠道、鳃、头肾和皮肤组织, 并检测血清皮质酮、皮质醇以及肝脏谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量等指标的变化。同时使用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验检测肝脏、脾脏、肠道、鳃、头肾和皮肤组织中 *TNF- α* 、*IL-8* 和 *IL-1 β* 基因的表达量。结果显示, 在大黄鱼感染刺激隐核虫后的 0~72 h 内, 实验组大黄鱼表现出刺激隐核虫病的发病症状; 血清皮质醇和皮质酮含量显著增加; 肝脏 GSH-Px 活性极显著降低; 肝脏 SOD 活性极显著增加; 肝脏 MDA 含量在 0~12 h 内急剧增加并达到峰值, 随后含量缓慢降低; 各组织中的 *TNF- α* 、*IL-8* 和 *IL-1 β* 的表达量均有不同程度的上调, 在鳃、头肾、肝脏和皮肤中上调最为显著。研究表明, 刺激隐核虫感染后有明显变化的皮质类激素含量和氧化应激指标能够反映大黄鱼的感染程度, 有助于进一步辅助抗刺激隐核虫表型测量的优化。本研究可为深入理解刺激隐核虫感染后大黄鱼生理生化及免疫指标的动态变化提供基础, 为后续的机制解析和品种选育工作提供参考。

关键词: 大黄鱼; 刺激隐核虫; 生理生化指标; 免疫指标; 抗虫性状评价

中图分类号: S 941.5

文献标志码: A

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 隶属于辐鳍鱼纲 (Actinopterygii) 鲈形目 (Perciformes) 石首鱼科 (Sciaenidae) 黄鱼属 (*Larimichthys*)^[1]。大黄鱼作为近岸暖水性鱼类, 分布在我国黄海、东海以及南海^[2]。2022 年我国的大黄鱼海水养殖产量达 257 683 t, 位居全国海水养殖鱼类产量之首^[3]。庞大的消费市场推动大黄鱼养殖产业迅猛发展, 20 世纪 90 年代以来, 我国大黄鱼人工育苗技术飞速提高, 在各项技术细节上取得了巨大突破, 现已发展成

为一个成熟的产业, 目前我国的大黄鱼苗种数量、养殖规模和成鱼产量均居世界首位^[4-5]。然而, 部分养殖区域的生态环境恶化、网箱分布过密和养殖密度过大等问题导致大黄鱼病害频发, 造成巨大的经济损失, 急需行之有效的解决方法^[6-8]。

我国大黄鱼人工养殖阶段中的常见病害可以根据病原生物种类不同分为病毒性疾病、细菌性疾病和寄生虫性疾病三大类^[9]。其中, 刺激隐核虫病是一种多发于每年 5—10 月的寄生虫性疾病,

收稿日期: 2023-06-07 修回日期: 2023-09-26

资助项目: 国家自然科学基金 (U21A20264); 国家重点研发计划 (2022YFD2401002); 福建省种业创新与产业化工程项目 (2021FJSCZY01); 厦门大学大学生创新创业训练计划项目 (S202210384455)

第一作者: 胡水木 (照片), 从事鱼类遗传与育种研究, E-mail: hushuimu@stu.xmu.edu.cn

通信作者: 周涛, 从事鱼类遗传与育种研究, E-mail: zt@xmu.edu.cn



其病原为前口纲 (Prostomatea) 前管目 (Proreodonia) 隐核虫科 (Cryptocaryonidae) 隐核虫属 (*Cryptocaryon*) 的刺激隐核虫 (*C. irritans*)^[10]。刺激隐核虫分布范围广, 繁殖速率快, 可以感染绝大多数的海水硬骨鱼, 在红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)^[11]、欧洲鲈 (*Dicentrarchus labrax*)^[12] 和褐菖鲉 (*Sebastes marmoratus*)^[13] 等鱼类中也有过刺激隐核虫寄生染病的报道。大黄鱼是刺激隐核虫病暴发频率最高、受影响最严重的海水养殖鱼类, 病鱼常出现黏液分泌增多、食欲下降、难以维持平衡、应激反应减弱及呼吸困难的症状^[14]。刺激隐核虫的主要寄生部位为鱼的鳃和皮肤, 鱼的皮肤被感染后, 病鱼频繁摩擦池壁和网衣, 并在寄生部位出现难以修复的物理损伤; 鳃部感染后的病鱼易因继发性细菌感染和缺氧而大量死亡^[15]。

刺激隐核虫病给水产养殖业带来巨大危害, 尚未找到经济的方法有效遏制网箱养殖模式下该病的暴发^[10, 16]。Zhao 等^[17] 将基因组选择育种技术成功应用到大黄鱼抗病育种实践中, 培育了大黄鱼抗刺激隐核虫品系。对大黄鱼抗刺激隐核虫的表型性状进行精准评价, 是抗虫新品种培育的重要基础工作。本研究旨在从生理生化指标及免疫因子角度评估刺激隐核虫的感染强度, 完善抗虫性状评价体系。目前国内外有关大黄鱼感染刺激隐核虫后的生理生化和免疫指标研究较少, 相关文献报道主要聚焦在病害防控预警、抗病机制^[18]、转录调控^[19] 等方面。实际上, 皮质醇、皮质酮、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 等皮质类激素含量和氧化应激指标在鱼体感染寄生虫后可能会出现波动。例如有研究者发现, 感染刺激隐核虫的褐菖鲉血液中的皮质醇、血糖含量存在不同程度的升高, 肝脏 MDA 含量呈先降后升的变化趋势, SOD 和过氧化氢酶活性均出现不同程度的升高^[13]。此外, 一些免疫分子指标也可能参与鱼体针对寄生虫感染的响应。有研究表明, 口服牛血清白蛋白免疫刺激复合物可以改善大黄鱼对溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 的免疫反应和抵抗力, 实验组血清中 IFN- α 、TNF- α 和 ALP 活性在投喂 30 d 后显著升高, 且实验鱼的累积死亡率明显低于对照^[20]。白细胞介素 (IL) 则是一类具有重要免疫生物学功能的细胞因子。在鱼类中已发现了若干种白细胞介素, 如 IL-2、IL-1 和 IL-8 等。IL-8 参与鱼类炎症反应的发生, 并且与招募中性粒细胞及诱导伤

口愈合有关, 在鱼类发生感染及炎症反应时可以作为一种免疫指标反映鱼类感染状况^[21]。在有关大黄鱼防御溶藻弧菌感染的实验中, IL-1 β 在调节鱼类免疫应答中起着关键作用^[20]。而刺激隐核虫感染对大黄鱼免疫指标的影响尚未见报道。

本研究检测了大黄鱼感染刺激隐核虫后 0~72 h 内的皮质类激素含量, 评价了大黄鱼的氧化应激状态, 并探究了 3 种抗炎细胞因子的表达模式, 基于此对大黄鱼的刺激隐核虫感染强度进行综合测评。通过皮质类激素、氧化应激状态和促炎细胞因子等生理与免疫指标的检测结果反映感染程度, 从而进一步优化抗虫表型测量的准确性。

1 材料与方法

1.1 实验材料与样本来源

实验用大黄鱼购买于福建省宁德市蕉城区 (宁德市富发水产有限公司)。随机选取 300 尾体重 (75.67 \pm 11.06) g、体长 (17.13 \pm 1.25) cm 的健康大黄鱼, 并在水泥池中暂养 15 d, 暂养期间盐度、水温、pH 和溶氧量含量分别为 30 \pm 1、(25 \pm 1) $^{\circ}$ C、8.0 \pm 0.3 和 (7.0 \pm 0.9) mg/L。暂养期间每天观察水泥池的底部, 检查是否有包囊附着, 确保实验开始前实验鱼没有感染刺激隐核虫。每天 8:00 及 17:00 饱食投喂 (健马牌大黄鱼配合饲料, 每次投喂量约为体重 2%), 在实验开始前 1 周停止喂食。随后, 将实验鱼随机平均分配为 4 组 (3 个感染组、1 个对照组), 并分别转移到 4 个注入无菌海水的水箱 (1 000 L) 中。

在上述水箱中开展大黄鱼刺激隐核虫攻毒实验。参照 Dan 等^[22] 报道的刺激隐核虫传代方法和课题组已经建立的大黄鱼刺激隐核虫攻毒技术体系, 在包囊孵化高峰期人工感染大黄鱼。感染组攻毒浓度为 17 000 个/尾的幼虫, 对照组未攻毒, 用于排除环境因素造成的大黄鱼死亡。在实验开始即 0 h 时取 6 尾大黄鱼的血液、肝脏、脾脏、肠道、鳃、头肾和皮肤组织, 此后分别在感染后 12、24、48 和 72 h 四个时间点采集上述组织。在实验全程观察实验组与对照组大黄鱼的状态, 所取样本均置于 1.5 mL 冻存管中, 立即放入液氮中暂存, 随后转移至 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱中保存, 以便后续提取 RNA 与指标测定。本研究得到了厦门大学海洋与地球学院动物管理和使用委员会批准, 所有方法均按照批准的指南进行。

1.2 血清皮质酮、皮质醇含量的测定

参考 Barton 等^[23]的方法, 对大黄鱼所采血样静置 1 h 后在 4 °C 条件下以 3 000 r/min 速率离心 10 min, 收集血清放于 -80 °C 冰箱保存待测。使用皮质酮酶免检测试剂盒 (Corticosterone EIA Kit, Cayman, 美国) 测定血清皮质酮含量, 采用皮质醇快速酶免检测试剂盒 (Cortisol Express EIA Kit, Cayman, 美国) 测定血清皮质醇含量, 皮质酮和皮质醇含量单位为 ng/L。

1.3 肝脏组织 SOD、GSH-Px 和 MDA 的测定

对所取大黄鱼肝脏组织样本进行 SOD、MDA 和 GSH-Px 含量或活性的测定。采用 SOD 活性检测试剂盒 (Solarbio, 中国)、MDA 含量检测试剂盒 (Solarbio, 中国) 和 GSH-Px 活性检测试剂盒 (Givei, 中国) 进行含量或活性检测, SOD、GSH-Px 的活性, 以及 MDA 含量计算参照已有文献^[24], 具体测定方法参照说明书进行。

1.4 运用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测大黄鱼体内促炎细胞因子的转录模式

对采集的肝脏、脾脏、肠道、鳃、头肾和皮肤组织样品用 TRIzol™ Reagent 试剂 (Invitrogen, 中国) 提取总 RNA, 用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (TaKaRa, 中国) 反转录合成 cDNA。使用 Primer premier 5.0 软件设计大黄鱼 *TNF-α*、*IL-8* 和 *IL-1β* 基因的特异性引物 (表 1), 随后采用 TB Green Premix Ex Taq II (TaKaRa, 中国) 配置 PCR 反应体系 (表 2), 6 种组织的 qRT-PCR 反应在 ROCHE LightCycler 480 II 荧光定量 PCR 仪中进行。使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[25] 计算各基因的相对表达量, 并以柱状图的形式呈现每个基因相对表达量的平均值。

表 1 本研究所用到的引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 primer names	序列 sequence
<i>IL-1β</i> -F	ATGCTGTGATGCTGCAGGGA
<i>IL-1β</i> -R	TTGTGCCCTTGATGCCAGCA
<i>IL-8</i> -F	CAGTGAAGGGATGAGCCTGA
<i>IL-8</i> -R	CGATGGGTTTGCTCTCTGTC
<i>TNF-α</i> -F	GGTGTTATCCAGCCCTCGCT
<i>TNF-α</i> -R	AGTCCTGTAGCAGCCGTTCC

表 2 荧光定量 PCR 反应体系

Tab. 2 Quantitative real-time PCR reaction system

试剂 reagents	使用量/ μ L volume of use
TB Green Premix Ex Taq II (2 \times)	5.0
PCR forward primer (10 μ mol/L)	0.2
PCR reverse primer (10 μ mol/L)	0.2
cDNA	0.5
RNase free dH ₂ O	4.1
总计 total	10.0

1.5 大黄鱼抗刺激隐核虫生理生化及免疫指标时间表达谱绘制

采用多因素析因实验设计方法, 实验数据经 Excel 软件处理后, 以上述促炎细胞因子、酶活性及皮质类激素作为指标进行分析, 通过多指标综合评估大黄鱼感染刺激性隐核虫后的患病程度, 用 R 等统计学软件对数据进行分析及绘图, 以明确大黄鱼感染刺激隐核虫后生理生化指标以及免疫指标与感染时间的关系, 进一步优化抗虫表型测量的准确性。

2 结果

2.1 刺激隐核虫感染后大黄鱼发病症状观察

在为期 3 d 的感染时间内, 实验组大黄鱼逐渐表现出了刺激隐核虫病的发病症状, 即随着感染时间增加, 鱼体活力降低、游动缓慢、食欲减退甚至停止进食、体表、鱼鳃和鱼鳍处可见白点 (刺激隐核虫胞囊) 等, 而对照组大黄鱼并未出现类似症状, 这表明刺激隐核虫已经成功感染实验组大黄鱼, 可以检测鱼体的相关指标。

2.2 刺激隐核虫感染对大黄鱼血清皮质酮和皮质醇浓度的影响

在大黄鱼感染刺激隐核虫后的 72 h 内, 与对照组 (0 h) 相比, 血清皮质醇和皮质酮含量均随感染时间的增加而显著增加 ($P < 0.05$), 皮质醇总体含量稍高于皮质酮总体含量 (图 1)。

2.3 刺激隐核虫感染对大黄鱼肝脏 GSH-Px 活性、SOD 活性和 MDA 含量的影响

与对照组 (0 h) 相比, 随着感染时间的增加, 大黄鱼肝脏 GSH-Px 活性呈现出持续降低的趋势, 且极其显著 ($P < 0.001$) (图 2)。肝脏 SOD 的活性除在 48 h 出现一定的下降外, 总体呈现上升趋势,

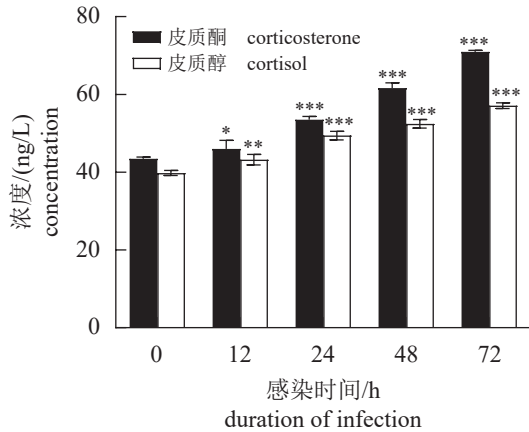


图 1 刺激隐核虫感染对大黄鱼血清皮质酮和皮质醇浓度的影响

*. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$, ***. $P < 0.001$, 均为组间比较。

Fig. 1 Effects of *C. irritans* infection on serum corticosterone and cortisol concentrations in *L. crocea*

*. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$, ***. $P < 0.001$, all between-group comparisons.

各时间点的 SOD 活性与对照组 (0 h) 相比均有极其显著升高 ($P < 0.001$) (图 3)。与对照组 (0 h) 相比, 感染后各时间点的肝脏 MDA 含量均显著升高 ($P < 0.05$), 总体上看, 肝脏 MDA 含量在 12 h 内急剧增加, 达到峰值后持续降低 (图 4)。

2.4 刺激隐核虫感染对大黄鱼 *TNF- α* 、*IL-1 β* 和 *IL-8* 基因表达量的影响

在大黄鱼感染刺激隐核虫后的 72 h 内, 总体上看, *TNF- α* 基因的表达水平最高, *IL-1 β* 基因次之, *IL-8* 基因最低。与其他组织相比, 鳃中的

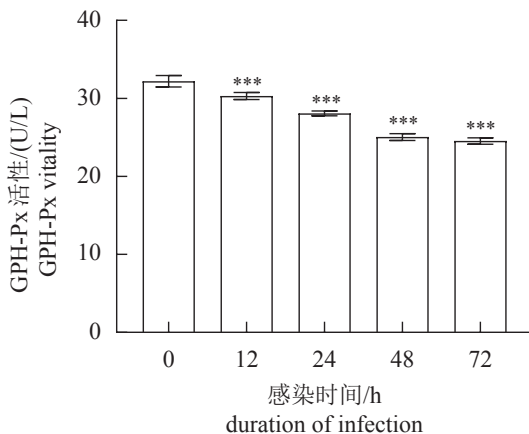


图 2 刺激隐核虫感染对大黄鱼肝脏 GSH-Px 活性的影响

*. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$, ***. $P < 0.001$, 下同。

Fig. 2 Effects of *C. irritans* infection on GSH-Px viability in the liver of *L. crocea*

*. $P < 0.05$, **. $P < 0.01$, ***. $P < 0.001$, the same below.

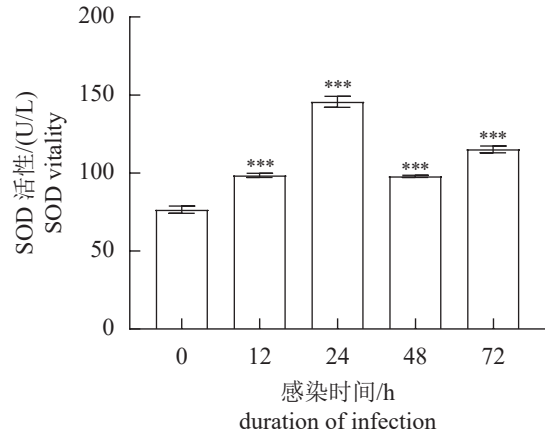


图 3 刺激隐核虫感染对大黄鱼肝脏 SOD 活性的影响

Fig. 3 Effects of *C. irritans* infection on SOD viability in the liver of *L. crocea*

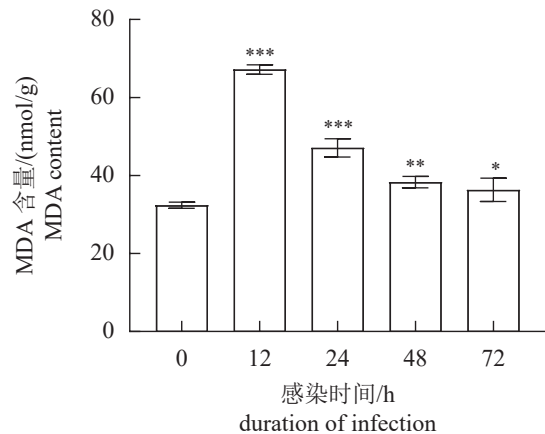


图 4 刺激隐核虫感染对大黄鱼肝脏 MDA 含量的影响

Fig. 4 Effects of *C. irritans* infection on MDA content in the liver of *L. crocea*

TNF- α 在感染后 48 h 显著高表达 (图 5)。多个组织中的 *IL-8* 和 *IL-1 β* 的表达模式较为相似, 表达量随感染时间的增加而上调, 且这种上调主要集中在感染后 24 h 内, 如鳃、肝脏、头肾和皮肤等组织 (图 6, 图 7)。

3 讨论

大黄鱼是中国最重要的海洋经济鱼类之一。养殖大黄鱼刺激隐核虫病频发, 给产业造成了巨大的经济损失^[18]。在本研究中, 对大黄鱼感染刺激隐核虫后 0、12、24、48 和 72 h 的多种组织进行了皮质类激素含量检测和氧化应激状态评价, 并探究了 3 种抗炎细胞因子的转录模式, 以评价大黄鱼感染刺激隐核虫后的动态调节模式。

在相同的养殖条件下, 更高的感染浓度意味

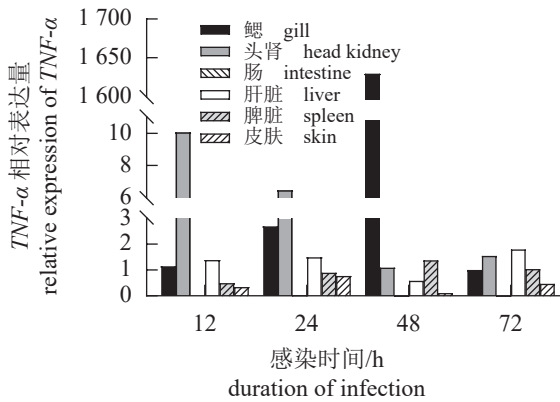


图5 刺激隐核虫感染对大黄鱼 *TNF-α* 基因表达量的影响

Fig. 5 Effects of *C. irritans* infection on the expression of *TNF-α* in *L. crocea*

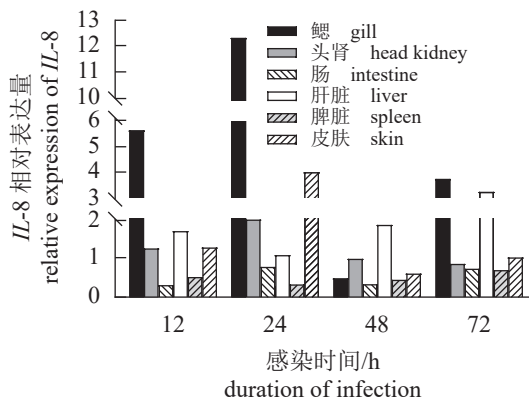


图6 刺激隐核虫感染对大黄鱼 *IL-8* 基因表达量的影响

Fig. 6 Effects of *C. irritans* infection on the expression of *IL-8* in *L. crocea*

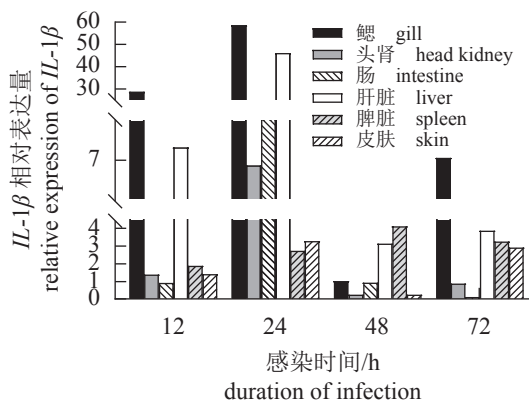


图7 刺激隐核虫感染对大黄鱼 *IL-1β* 基因表达量的影响

Fig. 7 Effects of *C. irritans* infection on the expression of *IL-1β* in *L. crocea*

着更多的病原数量。许多研究表明, 感染浓度对鱼体的生理生化指标和免疫指标的变化有一定影响。在刺激隐核虫感染对褐菖鲈的胁迫研究中,

随着感染浓度从 2 500 只/尾逐步升高至 10 000 只/尾, 鱼体的血清皮质醇含量、SOD 活性和 MDA 含量总体上均不断升高, 表明鱼体的免疫反应不断增强^[13]。另一项有关大黄鱼感染刺激隐核虫后黏膜免疫反应的研究结果表明, 随着感染浓度从 12 000 个/尾逐步升高至 36 000 个/尾, 鱼的相对感染强度不断上升, 而 SOD 活性和 MDA 含量则先升高后下降^[26]。鱼体的调节能力是有一定限度的, 感染浓度过高会超过鱼体免疫反应可调节范围, 造成免疫失衡。本研究选取了 17 000 个/尾的感染浓度进行刺激隐核虫攻毒, 可以在各项生理及免疫指标达到较高的水平时研究其随感染时间的变化, 能够更好地反映大黄鱼的感染情况。

多种证据表明, 包括皮质酮和皮质醇在内的糖皮质激素对鱼类免疫功能的影响是多方面的, 主要包括抗炎作用、免疫抑制作用等药理学作用。糖皮质激素可以通过结合炎症基因的转录因子来抑制炎症基因的表达, 同时 *TNF-α*、*IL-1* 等细胞因子也会抑制糖皮质激素的抗炎作用^[27]。这种抑制可以是细胞组织层面的, 也可以是分子水平的。血液中皮质类激素浓度升高可能会造成鱼类免疫组织损伤并抑制体液免疫因子的形成, 从而影响鱼类特异性细胞免疫和体液免疫应答^[28-32]。在本实验中, 大黄鱼感染刺激隐核虫后皮质醇、皮质酮含量随感染时间增加而升高, 在感染后 0~24 h, 大黄鱼血清皮质酮和血清皮质醇浓度较低, 刚刚开始升高, 此时 *IL-8* 和 *IL-1β* 基因在各组织中的表达量较快增加, 体现了这些细胞因子对体液免疫的应答。而 48 h 后, 大黄鱼血清皮质酮、皮质醇浓度逐渐升高至较高水平, *IL-8* 和 *IL-1β* 基因在各组织中的表达量总体上先下降再缓慢增加, 表明炎症基因的表达被抑制, 使得大黄鱼抗病能力降低, 体现了糖皮质激素和细胞因子作用的相互制约。这也证明糖皮质激素与应激相关, 对刺激隐核虫感染敏感, 因此大黄鱼体内皮质醇和皮质酮含量的变化可以作为反映大黄鱼刺激隐核虫感染程度的显著性表型。

外源微生物刺激可诱发机体细胞产生过量的 H_2O_2 和其他类型的活性氧 (ROS), 在细胞内, ROS 积累过多会导致 DNA 断裂、酶蛋白失活和脂质过氧化等损伤, 甚至造成死亡^[33]。SOD 与 GSH-Px 在机体抗氧化系统中发挥着重要作用, 作为一种重要的活性氧自由基清除酶蛋白, SOD 在机体细胞损伤后的氧化过程和吞噬作用中发挥着

很强的防御功能^[13], 其活性水平是衡量生物对外界氧化胁迫反应程度的生理生化指标。GSH-Px 也是生物体内一种重要的抗氧化酶, 它可以消除由活性氧和羟基自由基生成的脂质过氧化物和过氧化氢, 使生物机体免受自由基造成的损伤^[33]。在 ROS、氧自由基、羟基自由基等被清除后, 细胞膜的结构和功能完整性便得到了保护。而 MDA 是反映机体脂质过氧化程度的指标, 其含量的异常增加可能表明生物体内的氧化-抗氧化防御系统失衡^[34]。当机体内脂质过氧化增强, 氧自由基生成过量时, 体内的 SOD 等抗氧化酶就会增加, 从而清除多余的氧自由基, 使机体内氧化与抗氧化处于动态平衡状态^[35]。在本研究中, 随感染时间增加, 肝脏组织中的 GSH-Px 活性呈现出缓慢降低的趋势, 体现出大黄鱼在受到刺激隐核虫感染后肝脏的抗氧化能力受损, 使得自由基大量积累。自由基作用于脂质发生过氧化反应, 最终产生 MDA, 引起核酸和蛋白质等分子交联聚合, 这可能是肝脏 MDA 在感染后 12 h 内升高的原因。同时, 肝脏 SOD 活性总体呈上升状态, 有助于清除多余的氧自由基并降低肝脏损伤, 使得 12 h 后大黄鱼的肝脏 MDA 含量开始下降, 也体现了生物对于氧化胁迫效应具有一定的适应性。此外, 肝脏 SOD 活性在 48 h 出现了小幅下降, 这可能是由于感染初期 SOD 对氧自由基的响应存在一定的滞后性并受到免疫系统的综合调控, 这也与前人的研究结果一致^[13, 32]。由此可知, GSH-Px、SOD 和 MDA 在清除鱼体内由刺激隐核虫感染而产生的活性氧过程中起到综合作用, 其含量和活性的动态变化可以显著体现大黄鱼的感染程度。

细胞因子在鱼类的免疫系统及疾病调节中起重要作用^[36]。其中, *TNF- α* 、*IL-8* 和 *IL-1 β* 在调节鱼类免疫应答中起着关键作用, 可以反映鱼类感染状况^[21, 37-38]。总体上, 在大黄鱼感染刺激隐核虫 72 h 内, *TNF- α* 、*IL-8*、*IL-1 β* 基因的表达量在各组织中均有不同幅度的上调, 这表明免疫反应已经出现。在感染前期, 促炎细胞因子的表达量随感染时间延长而上升, 可能体现了大黄鱼体内免疫反应强度的增加。此外, 这些因子在鳃、头肾、肝脏和皮肤中的表达最为明显。已有研究显示, 这些部位在鱼类寄生虫感染中起着重要的免疫功能, 例如在大黄鱼溶藻弧菌感染引起的免疫反应中, 肝脏、皮肤和头肾是主要的参与器官^[20]; 在三代虫感染后, 金鱼 (*Carassius auratus auratus*)

肝脏、脾脏、肾脏组织中促炎细胞因子的表达量显著上调^[39]等。这表明鳃、头肾、肝脏和皮肤在刺激隐核虫引起的免疫反应中发挥主要作用, 是重要的参与器官。众所周知, 表型由基因座控制, 但基因座及相关遗传背景和环境因素的影响会使得二者的关系更为复杂^[40-41]。这些基因表达量随感染后时间的动态变化不仅证明了相关免疫因子在大黄鱼的抗虫免疫中发挥了作用, 更有助于优化抗虫表型性状测量体系的准确性, 从而辅助后续的机制解析和品种选育工作。

综上所述, 以上生理生化指标及免疫指标在刺激隐核虫感染后有明显变化, 可以在一定程度上体现大黄鱼的感染程度。这些研究有助于理解各指标间的相互作用和动态变化, 更精细的实验设计、更多规格的大黄鱼、更大范围的刺激隐核虫感染浓度、更长的感染时间、更多种类的生理生化指标及免疫指标等内容可以加入到后续研究中, 从而进一步辅助大黄鱼抗刺激隐核虫表型测量的优化。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 陈永俊, 林龙山, 李渊, 等. 台湾海峡鱼类物种多样性研究回顾 [J]. 水生生物学报, 2016, 40(1): 157-64.
Chen Y J, Lin L S, Li Y, et al. Research review of fish species diversity in Taiwan Strait [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(1): 157-164 (in Chinese).
- [2] 张其永, 洪万树, 杨圣云, 等. 大黄鱼地理种群划分的探讨 [J]. 现代渔业信息, 2011, 26(2): 3-8.
Zhang Q Y, Hong W S, Yang S Y, et al. Discussion on the division of geographic populations for the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. Modern Fisheries Information, 2011, 26(2): 3-8 (in Chinese).
- [3] 农业部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2023 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2023.
Fisheries and Fisheries Administration of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023 (in Chinese).
- [4] Hu F Z, Zhong H T, Wu C, et al. Development of fisheries in China [J]. *Reproduction and Breeding*, 2021, 1(1):
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 64-79.
- [5] Zeng J J, Long F, Wang J Y, *et al.* GWAS reveals heritable individual variations in the inherent swimming performance of juvenile large yellow croaker[J]. *Aquaculture*, 2022, 559: 738419.
- [6] Chen X H, Lin K B, Wang X W. Outbreaks of an iridovirus disease in maricultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), in China[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2003, 26(10): 615-619.
- [7] Liu J G, Diamond J. China's environment in a globalizing world[J]. *Nature*, 2005, 435(7046): 1179-1186.
- [8] Mohamad N, Amal M N A, Yasin I S M, *et al.* Vibriosis in cultured marine fishes: a review[J]. *Aquaculture*, 2019, 512: 734289.
- [9] Zhao J, Zhou T, Bai H Q, *et al.* Genome-wide association analysis reveals the genetic architecture of parasite (*Cryptocaryon irritans*) resistance in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Marine Biotechnology*, 2021, 23(2): 242-254.
- [10] Li Y W, Jiang B, Mo Z Q, *et al.* *Cryptocaryon irritans* (Brown, 1951) is a serious threat to aquaculture of marine fish[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2022, 14(1): 218-236.
- [11] Liu P F, Xia Y Q, Hua X T, *et al.* Quantitative proteomic analysis in serum of *Takifugu rubripes* infected with *Cryptocaryon irritans*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 104: 213-221.
- [12] Cheng J X, Xia Y Q, Liu Y F, *et al.* Transcriptome analysis in *Takifugu rubripes* and *Dicentrarchus labrax* gills during *Cryptocaryon irritans* infection[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2021, 44(3): 249-262.
- [13] 尹飞, 龚颀杨, 施兆鸿, 等. 刺激隐核虫感染对褐菖鲉的胁迫及鱼体的免疫应答 [J]. *水生生物学报*, 2014, 38(4): 681-688.
- Yin F, Gong Q Y, Shi Z H, *et al.* Stress and immune responses of the marbled rockfish *Sebastes marmoratus* infected with *Cryptocaryon irritans*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(4): 681-688 (in Chinese).
- [14] 李言伟, 江飏, 但学明, 等. 鱼类抗刺激隐核虫感染的黏膜免疫研究进展 [J]. *水产学报*, 2019, 43(1): 156-67.
- Li Y W, Jiang B, Dan X M, *et al.* Advances in the research on mucosal immune response of fish against *Cryptocaryon irritans* infection[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 156-167 (in Chinese).
- [15] 刘振勇, 林小金, 谢友佺, 等. 大黄鱼刺激隐核虫病继发细菌感染致死原因的研究 [J]. *福建水产*, 2012, 34(1): 11-15.
- Liu Z Y, Lin X J, Xie Y Q, *et al.* Research on death caused by secondary bacterial infection of *Cryptocaryon irritans* on *Larimichthys crocea*[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2012, 34(1): 11-15 (in Chinese).
- [16] 刘振勇, 谢友佺, 林小金, 等. 福建宁德海水鱼类刺激隐核虫病流行病学研究 [J]. *福建水产*, 2014, 36(5): 351-358.
- Liu Z Y, Xie Y Q, Lin X J, *et al.* Research on the Cryptocaryoniosis of marine fishes from the perspective of epidemiology in Ningde of Fujian[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2014, 36(5): 351-358 (in Chinese).
- [17] Zhao J, Bai H Q, Ke Q Z, *et al.* Genomic selection for parasitic ciliate *Cryptocaryon irritans* resistance in large yellow croaker[J]. *Aquaculture*, 2021, 531: 735786.
- [18] Bai Y L, Wang M, Zhao J, *et al.* Comparative transcriptome analysis reveals immunoregulation mechanism of lncRNA-mRNA in gill and skin of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in response to *Cryptocaryon irritans* infection[J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 206.
- [19] Bai Y L, Liu Y, Qu A, *et al.* Dual RNA-seq reveals a host-pathogen interaction transcriptional regulation pattern between *Cryptocaryon irritans* and large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Aquaculture*, 2023, 565: 739104.
- [20] Chen X X, Chi H S, Xu B F, *et al.* Oral bovine serum albumin immune-stimulating complexes improve the immune responses and resistance of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*, Richardson, 1846) against *Vibrio alginolyticus*[J]. *Aquaculture Research*, 2019, 50(10): 2802-2809.
- [21] Li C, Yao C L. Molecular and expression characterizations of interleukin-8 gene in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(3): 799-809.
- [22] Dan X M, Li A X, Lin X T, *et al.* A standardized method to propagate *Cryptocaryon irritans* on a susceptible host pompano *Trachinotus ovatus*[J]. *Aquaculture*, 2006, 258(1-4): 127-133.
- [23] Barton B A, Peter R E, Paulencu C R. Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest, and subjected to handling, confinement, transport, and stocking[J]. *Canadian Journal of Fisheries and*

- Aquatic Sciences*, 1980, 37(5): 805-811.
- [24] Abdel-Tawwab M, Hamed H S. Effect of bisphenol A toxicity on growth performance, biochemical variables, and oxidative stress biomarkers of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2018, 34(5): 1117-1125.
- [25] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [26] Yin F, Gong H, Ke Q Z, *et al.* Stress, antioxidant defence and mucosal immune responses of the large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* challenged with *Cryptocaryon irritans*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(1): 344-351.
- [27] Ferlazzo V, D'Agostino P, Milano S, *et al.* Anti-inflammatory effects of annexin-1: stimulation of IL-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis[J]. *International Immunopharmacology*, 2003, 3(10-11): 1363-1369.
- [28] Chilmonczyk S. Rainbow trout lymphoid organs: cellular effects of corticosteroids and anti-thymocyte serum[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1982, 6(2): 271-80.
- [29] Yada T, Tort L. 10-stress and disease resistance: immune system and immunoendocrine interactions[J]. *Fish physiology*, 2016, 35: 365-403.
- [30] Sunyer J O, Gómez E, Tort L, *et al.* Physiological responses and depression of humoral components of the immune system in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) following daily acute stress[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1995, 52(11): 2339-2346.
- [31] Morvan C L, Deschaux P, Troutaud D. Effects and mechanisms of environmental temperature on carp (*Cyprinus carpio*) anti-DNP antibody response and non-specific cytotoxic cell activity: a kinetic study[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1996, 20(5): 331-340.
- [32] 蔡小辉, 刘旭佳, 彭银辉, 等. 人工感染 3 种弧菌对鲢鱼血清酶活力的影响 [J]. *南方农业学报*, 2014, 45(1): 137-42.
- Cai X H, Liu X J, Peng Y H, *et al.* Serum enzyme activity of *Mugil cephalus* Linnaeus artificially infected by *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. harveyi*[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2014, 45(1): 137-142 (in Chinese).
- [33] 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.
- [34] 陈海刚, 马胜伟, 林钦, 等. 氯化三丁基锡对黑鲷鳃和肝组织 SOD、MDA 和 GPx 的影响 [J]. *南方水产*, 2009, 5(2): 23-27.
- Chen H G, Ma S W, Lin Q, *et al.* Effects of tributyltin chloride (TBTCI) on SOD activities, MDA contents and GPx activities in gill and liver of the black porgy (*Sparus macrocephalus*)[J]. *South China Fisheries Science*, 2009, 5(2): 23-27 (in Chinese).
- [35] 王薪华. 肉苁蓉苯乙醇苷对 MPTP 致 PD 模型小鼠 MDA、SOD 和 GSH-Px 水平的影响 [J]. *临床医学研究与实践*, 2023, 8(6): 9-12.
- Wang X H. Effects of phenylethanoid glycosides on MDA、SOD and GSH-Px levels in MPTP-induced PD model mice[J]. *Clinical Research and Practice*, 2023, 8(6): 9-12 (in Chinese).
- [36] Savan R, Sakai M. Genomics of fish cytokines[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D:Genomics and Proteomics*, 2006, 1(1): 89-101.
- [37] Xie F J, Zhang Z P, Lin P, *et al.* Cloning and infection response of tumour-necrosis factor alpha in large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* (Richardson)[J]. *Journal of Fish Biology*, 2008, 73(5): 1149-1160.
- [38] Wu J, Shi Y H, Zhang X H, *et al.* Molecular characterization of an *IL-1 β* gene from the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and its effect on fish defense against *Vibrio alginolyticus* infection[J]. *Zoological Research*, 2015, 36(1): 133-141.
- [39] Tu X, Qi X Z, Huang A G, *et al.* Cytokine gene expression profiles in goldfish (*Carassius auratus*) during *Gyrodactylus kobayashii* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 116-124.
- [40] You X X, Shan X X, Shi Q. Research advances in the genomics and applications for molecular breeding of aquaculture animals[J]. *Aquaculture*, 2020, 526: 735357.
- [41] Oti M, Brunner H G. The modular nature of genetic diseases[J]. *Clinical Genetics*, 2007, 71(1): 1-11.

Effects of *Cryptocaryon irritans* infection on physiological and biochemical indexes and immune indexes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

HU Shuimu¹, LIU Yue¹, LI Yichen¹, TIAN Guopeng¹, GUO Xinyi¹,
LIN Jiaqi¹, BAI Yulin¹, XU Peng^{1,2}, ZHOU Tao^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Mariculture Breeding, College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China;

2. Fujian Province Key Laboratory of Marine Biological Genetic Breeding,
College of Ocean and Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: The large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) is the marine culture fish most affected by white spot disease, with the highest frequency of *C. irritans* outbreaks in China. After years of efforts from scholars at home and abroad, many research progresses have been made in *C. irritans* propagation, pathogen pathology and vaccine research and development, but there are fewer studies on the physiological, biochemical and immune indexes of *L. crocea* infected with *C. irritans*. In order to understand the changes in various physiological and immune indicators of *L. crocea* after *C. irritans* infection, in this study, we selected 300 experimental fish for artificial *C. irritans* infection experiments at the peak of hatching of *C. irritans* cyst. The experimental fish were randomly assigned to three experimental groups and one control group. Blood, liver, spleen, intestines, gills, head kidney, and skin tissues were collected at 0, 12, 24, 48, and 72 h after infection to monitor changes in serum cortisol and corticosterone levels, liver glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) level. Transcription patterns of *TNF- α* , *IL-8* and *IL-1 β* in liver, spleen, intestine, gill, head kidney, and skin tissues were detected by quantitative real-time PCR experiments. During the 3 days after infection, the serum cortisol and corticosterone level increased significantly and gradually from 0 h to 72 h after *C. irritans* infection ($P < 0.05$); the GSH-Px activity in the liver showed a highly significant decreasing trend ($P < 0.001$); the SOD activity in the liver showed an overall upward trend except for a decrease at 48 h ($P < 0.001$); the MDA level in the liver increased sharply within 12 h, and began to decrease after reaching the peak ($P < 0.05$); the expression of *TNF- α* , *IL-8* and *IL-1 β* in various tissues were upregulated to varied degrees, with those in the gills, head kidney, liver, and skin being the most obvious, which indicated these organs may play important roles in the immune response against *C. irritans*. These results suggested that corticosteroid content and oxidative stress indexes significantly changed after *C. irritans* infection can reflect the degree of infection in *L. crocea*, facilitating the optimization of anti-parasite trait assessment. This study contributes to understanding the dynamic physiological, biochemical, and immune changes after *C. irritans* infection in *L. crocea*, offering insights for subsequent mechanistic analyses and breeding efforts.

Key words: *Larimichthys crocea*; *Cryptocaryon irritans*; physiological and biochemical indexes; immune indexes; evaluation of insect resistance traits

Corresponding author: ZHOU Tao. E-mail: zt@xmu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (U21A20264); National Key Research and Development Program (2022YFD2401002); Seed Industry Innovation and Industrialization Project of Fujian Province (2021FJSCZY01); XMU Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Programs (S202210384455)