

食盐对草鱼血清超氧化物歧化酶和溶菌酶活性的影响

孔祥会, 郭春丽, 郭彦玲, 刘占才

(河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要:草鱼养殖过程中经常使用食盐药浴,以便在高渗环境下杀死病原体。研究食盐药浴后草鱼代谢酶变化,有助于了解食盐药浴对草鱼机体生理免疫的影响。将草鱼(*Ctenpharyngodon idella*)分别暴露于食盐浓度为0、2%、3%、4%水体中浸浴10 min,然后置入水簇箱中饲养,分别在药浴后12 h、24 h、36 h取样,测定其血清中超氧化物歧化酶(SOD)和溶菌酶(LSZ)活性变化。结果显示,与对照组相比,血清SOD活性在12 h时,2%组中显著上升($P < 0.05$),3%、4%组显著下降($P < 0.05$);24 h取样时,2%、3%组中无显著差异($P > 0.05$),4%组显著下降($P < 0.05$);36 h取样时,各组间均无显著差异($P > 0.05$);血清LSZ活性各组间均无显著差异($P > 0.05$)。食盐能引起草鱼SOD活性变化,而对溶菌酶活性影响不大;表明食盐对草鱼不同代谢酶有不同的反应模式,抗氧化酶SOD对食盐应激有敏感的生理应答。

关键词:食盐;超氧化物歧化酶;溶菌酶;草鱼

中图分类号:S948 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2008)01-0080-04

水体盐度是影响鱼类生长的重要环境因子之一,其变化对水生动物代谢、生长、生存、渗透压调节及免疫系统均有较大影响(Britoa R et al, 2000)。实际生产中,食盐药浴常被用来对鱼种进行杀菌消毒。浸泡法导入疫苗时,有时也把鱼种置于高浓度食盐水中,通过渗透压改变促使疫苗更多地进入鱼体而获得免疫,并且发现利用高渗法对鱼体导入疫苗是一种较好的方法(李友华, 1989)。食盐对虾类(Wang L U & Chen J C, 2005)、牙鲆(魏然等, 2003)、许氏平鲉(王晓杰等, 2005)等水生动物的非特异性免疫功能具有一定影响,但对淡水鱼类的影响报道较少。因此,进一步认清食盐对淡水鱼类代谢酶和免疫生理的影响具有十分重要的意义。

超氧化物歧化酶(SOD, EC 1.15.1.1)是超氧阴离子自由基(O_2^-)的清除剂,是机体防御氧化应激的关键酶之一。在生理状态下,SOD可以通过歧化作用分解超氧阴离子自由基(O_2^-)在活性氧自由基产生和清除的生理平衡中起着非常重要的作用(徐立红等, 1995)。溶菌酶(LSZ, EC 3.2.1.17)是吞噬细胞杀菌的物质基础,体内许多组织和体液中都含有溶菌酶,它是一种碱性蛋白,能水解革兰氏阳

性细菌的细胞壁中粘肽的乙酰氨基多糖,并使之裂解被释放出来形成一个水解酶体系,破坏和消除侵入体内的异物,从而担负起机体防御的功能(李凌和吴灶和, 2001)。

草鱼(*Ctenpharyngodon idella*)是淡水渔业中重要的经济养殖鱼类。本研究以草鱼种为研究对象,使草鱼暴露食盐浓度为0、2%、3%、4%水体,然后置于正常的养殖水体中饲养。分别于不同时间取样,通过研究食盐对草鱼血清SOD和LSZ活性的影响,探究高浓度食盐对草鱼免疫生理的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用草鱼种购自河南省新乡市郊区鱼场,为同批繁殖、同池培育、体色正常的健康鱼种。体重(55.7 ± 5.3) g,体长(15.2 ± 3.5) cm。草鱼运回后,放养在体积200 L(100 cm × 50 cm × 40 cm)的塑料水簇箱内养殖,水体积为100 L。驯养1周后开始实验。实验期间养殖用水为充氧曝气的自来水。每天换水2/3,定时投饵。

1.2 方法与步骤

依据草鱼食盐药浴的常用浓度3%,不同处理组的食盐浓度设为0、2%、3%和4%(1个对照组和3个实验组)。草鱼随机分为4组,每组30尾。分别置于4个不同浓度的水体中10 min,然后取出置于正常水体中,分别于12 h、24 h、36 h时随机取10尾鱼进行取血。每组设1个平行。应激解除后的饲养与驯化期间相同。

收稿日期:2007-08-16

基金项目:河南省重点科技攻关计划(072102130027);河南省科技攻关计划(0624030022);河南省高等学校青年骨干教师资助计划(2006);河南省动物学重点学科(04006)。

作者简介:孔祥会,1968年生,男,河南虞城人,博士,教授,主要从事环境效应和水生动物健康、环境适应及分子进化研究。E-mail: xhkong@henannu.edu.cn

1.3 血清的制备

在每尾鱼鳃部取血约 1 mL,分别存放于 1.5 mL 的离心管中,室温静置 2h,4℃ 时 5 000 r/min(1 930 × g)离心 10 min,分别吸取上清,分装 2 份,置于 -20℃ 冰箱保存备用。2 周内测完。

1.4 测定方法

1.4.1 SOD 活性的测定 参考邹国林等(1986)改进的邻苯三酚自氧化法。SOD 活力单位定义:反应液每分钟、每毫升血清 SOD 抑制率达 50% 时为 1 个酶活单位(U/mL)。

1.4.2 LSZ 活性的测定 按王雷等(1994)的方法,将活化的溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)接种于液体培养基内,37℃ 进行摇床培养 48 h 后取出,经 4 000 r/min (1 230 × g)离心 5 min 收集菌体,并用 0.1 mol/L (pH 6.4)的磷酸缓冲液稀释至 $A_{570} = 0.3$,配成底物悬液置于 4℃ 冰箱中供用。测定时将 3 mL 菌悬液与 0.1 mL 血清混合后,迅速测其 570 nm 处的吸光值 A_1 ,然后 28℃ 水浴 30 min 取出,冰浴终止反应 10 min,再测其 570 nm 处的吸光值 A_2 。在此条件下,血清 LSZ 活性(U/mL) = $[(A_1 - A_2)/A_2]/0.1$ 。

1.5 数据分析

实验数据以平均值 ± 标准差 (Means ± SD) 表示。采用 Excel2003 统计软件进行 One - way ANOVA 分析和独立性 *t* 检验。显著水平设为 $P = 0.05$ 。

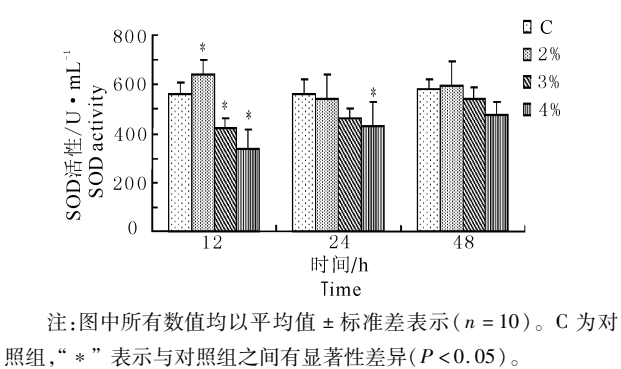
2 结果

2.1 食盐处理后血清 SOD 活性的变化

不同浓度食盐处理后 12 h、24 h、36 h, SOD 活性呈现出不同变化(图 1)。12 h 时,2% 浓度组 SOD 活性达 638.18 U/mL,显著高于对照($P < 0.05$),上升了 14%,表明 2% 处理下 SOD 活性较短时间内即可被诱导;3% 和 4% 组 SOD 活性分别是 422.00 U/mL、366.36 U/mL,显著下降($P < 0.05$),较对照分别下降了 25% 和 37%,说明在这 2 个浓度处理 12 h 后 SOD 活性受到显著抑制;食盐处理后 24 h 时,2% 和 3% 组中无显著差异($P > 0.05$);4% 组 SOD 活性是 430.91 U/mL,显著低于对照组($P < 0.05$),较对照组降低了 22%,表明此浓度下 24 h 时 SOD 活性仍受到抑制,但较同浓度 12 h 上升了 28%,显示 SOD 活性已有明显的恢复;食盐处理后 36h 时,处理组与对照组之间无显著差异($P > 0.05$),说明草鱼血清中 SOD 活性变化已恢复至正常水平。

2.2 食盐处理后血清 LSZ 活性的变化

与对照组比较,不同浓度食盐处理后 12 h、24 h、36 h,LSZ 活性没有呈现出显著性变化(图 2),说明食盐处理对血清中溶菌性酶活性影响不明显。



注:图中所有数值均以平均值 ± 标准差表示($n = 10$)。C 为对照组,“*”表示与对照组之间有显著性差异($P < 0.05$)。

图 1 不同浓度食盐暴露处理后草鱼血清 SOD 活性变化

Note: All values in figure is presented by Means ± SD ($n = 10$). C represents control group, Compared with the control, “*” represents significant difference ($P < 0.05$).

Fig. 1 Changes of SOD activities in serum of grass carp under different salt concentrations

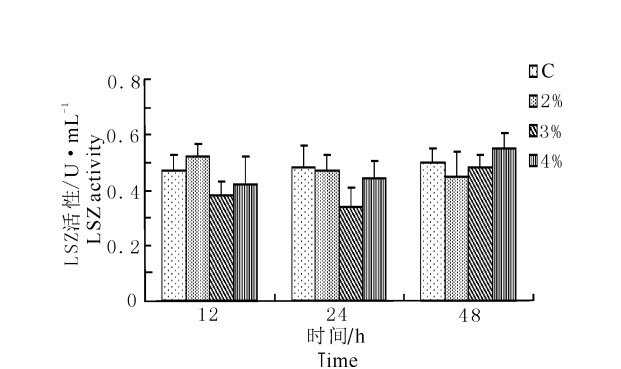


图 2 不同浓度食盐暴露处理后草鱼血清 LSZ 活性的变化

Fig. 2 Changes of LSZ activities in serum of grass carp under different salt concentrations

3 讨论

3.1 食盐对超氧化物歧化酶的影响

SOD 是清除动物体内活性氧自由基的关键酶类之一。正常生理条件下,自由基的产生和清除处于动态平衡状态。然而,机体受到外界环境影响时,这种平衡就会被打破,会引起抗氧化系统的变化(方允中和郑荣梁,2002)。SOD 同时也是一类对环境变化较为敏感的指标(徐立红等,1995),因此可以用 SOD 活性变化来评价生物体的环境应激程度。目前,国内用镉、氯氰菊酯、低 pH 处理对草鱼鳃、肝组织中 SOD 活性研究已有报道(曹剑辉等,2004;谢文平和马广智,2003;马广智等,2001),均表明环境变化对鱼体 SOD 活性有一定影响。

本研究中的草鱼血清 SOD 活性,在 2% 食盐处

理时,12 h 升高,这是由于鱼体受低浓度食盐应激而代谢强度增加,产生过量的氧自由基,诱导鱼体 SOD 活性增高,以清除过量的氧自由基。但当食盐浓度为 3% 和 4% 时,鱼体也会因应激反应而产生大量的超氧阴离子自由基,诱导 SOD 活性增加,但高浓度食盐应激可破坏代谢酶的生理功能,使 SOD 活性受到抑制或失活,从而使 SOD 活性降低。24 h 时,仅 4% 组 SOD 活性受到抑制,其它组均恢复至正常水平;36h 时 SOD 活性各处理组均恢复至正常水平。说明食盐应激对草鱼影响较小,草鱼依靠自身生理平衡调节能力,在较短的时间内使生理代谢酶恢复至正常水平。

3.2 食盐对溶菌酶活性的影响

鱼类是较低等的脊椎动物,特异性免疫机制很不完善。体内只存在 1 种抗体 IgM,且抗体形成期较长,抗体滴度增加也较为缓慢。因此,非特异性免疫作为机体的第一道防线,在鱼类维持机体健康、防止病害中具有更为重要的作用(Narnaware Y K et al,1994)。溶菌酶作为动物极为重要的一类非特异性免疫因子,在机体免疫过程中不仅能水解细菌细胞壁,导致细菌溶解死亡;还可诱导调节其它免疫因子的合成与分泌(Bergljót Magnadóttir,2006)。水产动物血清中 LSZ 活性的高低是衡量机体免疫状态的指标之一,又是衡量养殖环境污染程度的重要指标。Fevolden 等(1993)认为 LSZ 活性可作为鱼类应激的信号,其活性变化依胁迫的方法和强度而定。本研究中,LSZ 的活性在各处理组之间均未出现显著变化,说明食盐短时间应激对草鱼的非特异性免疫无显著影响,同时又说明食盐药浴对草鱼免疫机能影响不大,可以作为一种杀菌消毒、防治鱼病的有效环保方法。

通过食盐对草鱼 SOD 和 LSZ 活性的影响研究,说明食盐浸浴短时间处理对草鱼的影响可在较短时间(36h)内恢复至正常水平。渔业生产中,食盐浸浴消毒和高渗食盐浸浴导入疫苗时,采用 3% ~ 4% 食盐浓度,浸浴 10 min,对鱼体生理代谢酶的影响可很快恢复至正常水平。但仅用 SOD 和 LSZ 来评价食盐对鱼类生理代谢和免疫的影响,显然不够全面,还有待于选用更多的生理代谢和免疫系统指标进行更全面、更深入的研究。

参考文献:

- 曹剑辉,马广智,方展强. 2004. 镉对草鱼鳃和肝组织超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 水利渔业,24(1):9-11.
- 方允中,郑荣梁. 2002. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京:科学出版社,122-161.
- 李友华. 1989. 鱼类病毒病的预防研究概述[J]. 鱼病简讯,(1):46-49.
- 李凌,吴灶和. 2001. 鱼类体液免疫研究进展[J]. 海洋科学,25(11):20-22.
- 马广智,唐玫,徐军. 2001. 低 pH 对草鱼鳃和肝组织超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响[J]. 中国水产科学,8(1):23-25.
- 魏然,张士瑾,王长法,等. 2003. 盐度对牙鲆非特异性免疫功能的影响[J]. 海洋科学进展,21(2):209-213.
- 王晓杰,张秀梅,李文涛. 2005. 盐度胁迫对许氏平鲉血液免疫酶活力的影响[J]. 海洋水产研究,26(6):17-21.
- 王雷,李光友,毛远兴,等. 1994. 口服免疫性药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J]. 海洋与湖沼,25(5):486-491.
- 徐立红,张甬元,陈宜瑜. 1995. 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,9(2):171-185.
- 谢文平,马广智. 2003. 氯氰菊酯对草鱼鳃和肝组织超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响[J]. 水产科学,22(6):5-7.
- 邹国林,桂兴芬,钊晓凌,等. 1986. 一种 SOD 的测活方法 - 邻苯三酚自氧化法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展,13(4):71-73.
- Britoa R, Chimal M E, Rosas C. 2000. Effect of salinity in survival, growth and osmotic capacity of early juveniles of *Farfantepenaeus brasiliensis* (Decapoda: Penaeidae) [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 244: 253-263.
- Fevolden S E & Roed K H. 1993. Cortisol and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high or low tolerance to stress[J]. Fish Biol, 43:919-930.
- Narnaware Y K, Baker H N, Tomlinson M G. 1994. The effect of various stress, corticosteroids and adrenergic agents on phagocytosis in the ranbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Fish Physiol Biochem, 13:31-34.
- Bergljót Magnadóttir. 2006. Innate immunity of fish (overview) [J]. Fish Shellfish Immun, 20(2):137-151.
- Wang L U & Chen J C. 2005. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels[J]. Fish Shellfish Immun, 18:269-278.

Effects of Sodium Chloride on Activities of Superoxide Dismutase and Lysozyme in Serum of Grass Carp (*Ctenpharyngodon idella*)

KONG Xiang-hui, GUO Chun-li, GUO Yan-ling, LIU Zhan-cai

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Grass carp(*Ctenpharyngodon idella*) is sensitive to environmental changes. As the highly concentration sodium chloride is used to kill pathogens under hyper – osmotic condition, stresses will be produced on physiological metabolism in grass carp. Superoxide dismutase and Lysozyme play an important role in regulating physiological metabolism. To study activity changes of superoxide dismutase and lysozyme in serum can help understand the effects of sodium chloride on physiological metabolism of grass carp. In this study, grass carps were randomly grouped into 4 groups (3 experimental groups and one control group, each group with 30 fish). Experimental fishes exposed to different salt concentrations(2% 、3% 、4%) for 10 min were replaced under the normal condition respectively. At Hour 12、24 and 36 respectively, serum of each fish was sampled to analyze. Compared with the control, at Hour 12, SOD activity increased significantly at 2% of sodium chloride, while decreased significantly at 3% and 4%. At Hour 24, SOD activity did not show significant change at 2% and 3% , while decreased significantly at 4%. At Hour 36, the activity of SOD presented no obvious changes at all experimental concentration. For Lysozyme activity, no significant change was shown at different times at various experimental concentrations. In summary, different metabolism enzymes in serum of grass carp show different physiological reactions to sodium chloride stress, and SOD indicates the sensitive physiological response.

Key words: sodium chloride; superoxide dismutase; lysozyme; grass carp (*Ctenpharyngodon idella*)