

# 患诺卡氏菌病的大黄鱼几种主要组织的酶活力变化分析

安树伟 袁思平 王国良\*

(应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波大学生命科学与生物工程学院, 315211)

**摘 要** 以酶学分析方法,测定患诺卡氏菌病的大黄鱼几种主要组织的酶活力变化。结果表明,与对照组相比,患病大黄鱼淀粉酶活力在心、脾中无明显变化,在肾、肝和鳃中均有极显著下降( $P < 0.01$ );溶菌酶活力在心、肾、肝、鳃中极显著升高( $P < 0.01$ ),而在脾脏中极显著下降( $P < 0.01$ );碱性磷酸酶活力在心、脾、肝、鳃中明显升高,在肾脏中极显著下降( $P < 0.01$ );酸性磷酸酶活力在心、脾中较高,肾、肝中偏低,鳃中无明显变化;谷草转氨酶和谷丙转氨酶活力在肾脏中均极显著升高,肝脏中均极显著降低( $P < 0.01$ ),而在心、脾、鳃组织中均无明显变化( $P > 0.05$ );丙二醛在肾脏和肝脏中含量均有升高,在心、脾、鳃中无明显变化;超氧化物歧化酶活力在肝和鳃中极显著下降( $P < 0.01$ ),在心、脾、肾中无明显变化;过氧化氢酶活力在心和肾中显著降低,在脾脏中极显著升高( $P < 0.01$ ),而在肝脏和鳃中无明显变化。由此可见,大黄鱼对诺卡氏菌感染有明显的应激反应,且病原菌对病鱼器官有不同程度的损伤。

**关键词** 大黄鱼 诺卡氏菌病 酶活力

**中图分类号** S 941.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)02-0043-06

## The analysis of enzymatic activities in several major tissues of *Pseudosciaena croceas* infected with nocardiosis

AN Shu-wei YUAN Si-ping WANG Guo-liang\*

(Key Laboratory of Applied Technology of Marine Biology, Ministry of Education, College of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, 315211)

**ABSTRACT** In order to reveal the effect of nocardiosis on *Pseudosciaena croceas* physiological conditions, the process of physiological and biochemical pathology was explored in this article. With the method of enzymology analysis, the change of enzyme activity in several main lesion tissues of *P. croceas* infected with *Nocardia* was tested. The results indicated that, in contrast with the control group, the amylase activities had no significant change in heart and spleen, while decreased apparently in kidney, liver and gill ( $P < 0.01$ ). Lysozyme activities in heart, liver, kidney and gill increased significantly ( $P < 0.01$ ), whereas declined significantly in spleen ( $P < 0.01$ ). Alkaline phosphatase activities in heart, spleen, liver and gill increased sig-

农业部公益性行业科研专项(200903029)、教育部长江学者与创新团队项目(IRT0734)和浙江省自然科学基金项目(Y304078)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: wangguoliang@nbu.edu.cn, Tel: (0574) 87600122

收稿日期: 2011-04-10; 接受日期: 2011-06-03

作者简介: 安树伟(1987-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物病害研究。E-mail: anshuwei6688@126.com

nificantly, while became lower in kidney ( $P < 0.01$ ). Acidic phosphatase activities were higher in heart, spleen, and lower in kidney and liver, while no significant change in gill was found. Both glutamic-oxalacetic transaminase and glutamic-pyruvic transaminase increased significantly in kidney and decreased apparently in liver ( $P < 0.01$ ), while none of them showed significant change in heart, spleen and gill ( $P > 0.05$ ). Malondialdehyde both in kidney and liver decreased and had no significant changes in heart, spleen and gill. Superoxide dismutase activities reduced significantly in liver and gill ( $P < 0.01$ ), while no significant changes in heart, spleen. The catalase activities reduced significantly in heart and kidney, and increased in spleen ( $P < 0.01$ ), while no significant changes in liver or gill. Therefore, *P. croceas* had obvious stress response to *Nocardia* infection and showed different levels of damage to the organs of sicken fishes.

**KEY WORDS** *Pseudosciaena crocea* Nocardiosis Enzyme activity

大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* 是我国东南沿海海水养殖的重要种类之一, 近些年浙江省大黄鱼养殖发展较快, 在宁波象山港、台州大陈岛、温州和舟山等海域, 网箱养殖大黄鱼已成为该地区的主要产业之一。但随着养殖业的持续发展, 各种病害频繁发生, 严重制约了大黄鱼养殖产业的健康发展。自 2003 年我国发现大黄鱼诺卡氏菌病以来 (Wang *et al.* 2005), 已给养殖业造成了很大的经济损失, 现作为养殖大黄鱼的主要病害而引起重视。

国内外学者已对由诺卡氏菌引起的水产养殖动物诺卡氏菌病做了较多研究 (Friedman *et al.* 1998; Isik *et al.* 1999; Chen *et al.* 2000; 王国良等 2006; Wang *et al.* 2007; 王瑞旋等 2010), 也有关于防治措施的报道 (王家沛 2010; 李思源等 2010), 但关于水产动物诺卡氏菌病的生理病理学的研究很少。鱼类组织相关酶活力的变化能反映机体正常生理代谢功能损伤程度和免疫能力的活动状态, 目前较多研究见于环境因子胁迫对水产动物体内酶活力的影响 (王晓杰等 2005; 赵峰等 2008; 王茂林等 2010)。本研究以自然发生的大黄鱼诺卡氏菌病与正常大黄鱼为材料, 比较研究心、脾、肾、肝、鳃 5 种组织中几种保护酶活力的指标变化, 进行生理生化病理分析, 以期对诺卡氏菌病的预防和防治提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验用鱼

病鱼于 2009 年 10 月采自浙江台州大陈岛海水网箱养殖鱼排, 体长 20~30 cm, 体重 300~500 g。正常鱼采自同一地区非发病时期的大黄鱼养殖网箱, 规格与病鱼相同, 经检查确认无病后作为对照。病鱼和正常鱼各取 6 尾。

### 1.2 病鱼鉴定

将患病大黄鱼与正常大黄鱼进行体表及内部解剖病理比较观察, 取病灶组织作涂片染色检查病原菌形态特征, 同时采用本实验室建立的鳊鱼诺卡氏菌 *Nocardia seriolae* LAMP 检测方法进行快速检测 (王国良等 2011)。

### 1.3 样品处理

解剖患病大黄鱼和正常大黄鱼, 分别取心、脾、肾、肝、鳃 5 种组织, 用双蒸水将样品漂洗干净, 吸水纸吸干水分。各称取鲜重 0.4 g, 冰浴研磨, 置于 3.6 ml 的双蒸水中抽提, 4 °C 下 3 000 r/min 离心 15 min。移取上清液, 分装至无菌离心管, 保存于 4 °C 冰箱中备用。

## 1.4 酶活力指标测定

选择淀粉酶(Amylase)、溶菌酶(Lysozyme)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase)、酸性磷酸酶(Acidic phosphatase)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase)、过氧化氢酶(Catalase)、谷草转氨酶(Glutamic-oxalacetic transaminase)、谷丙转氨酶(Glutamic-pyruvic transaminase)8种生化酶和丙二醛(Malondialdehyde),采用南京建成生物工程研究所的酶活力测定试剂盒测定。活力测定以及活力单位定义参照李贵生等(2001)和艾春香等(2002)的方法进行。每项指标采用6份组织样品,每个样品进行3次平行测试。

## 1.5 数据处理

数据用SPSS 13.0软件统计,采用 $t$ 检验,结果用平均值±标准差表示。

## 2 结果

### 2.1 大黄鱼诺卡氏菌病的病症特点

大黄鱼诺卡氏菌病的病原是鲷鱼诺卡氏菌(Wang *et al.* 2005)。主要病症表现为反应迟钝、食欲下降、上浮水面、鳍条充血,部分病鱼体表出现溃疡,腹部膨大。解剖观察,在肾、脾、肝等内脏组织中出现乳白色或淡黄色结节,直径1~5 mm。取结节内物质涂片,镜检发现大量短或细长杆状或分枝状革兰氏阳性菌体。经LAMP检测证实为鲷鱼诺卡氏菌。

### 2.2 4种水解酶活力的变化

患病后大黄鱼的4种水解酶活力变化见表1。结果表明,淀粉酶在心、脾中无明显变化,在肾、肝和鳃中均极显著降低( $P<0.01$ );各检测组织溶菌酶活力都有显著变化,在心、肾、肝、鳃中均高于对照组,而在脾脏中极显著降低( $P<0.01$ );碱性磷酸酶活力在各组织中均有显著变化,在心、脾、肝、鳃中明显升高,而在肾脏中极显著降低( $P<0.01$ );此外,患病鱼心、脾中酸性磷酸酶活力较对照组高,而肾、肝中酸性磷酸酶活力较对照组偏低,在鳃中无显著变化( $P>0.05$ )。

表 1 5种组织中4种水解酶活力

Table 1 The activities of four hydrolysis enzymes in five tissues

检测酶 Enzymes	检测组织 Tissues				
	心脏 Heart	脾脏 Spleen	肾脏 Kidney	肝脏 Liver	鳃 Gill
正常鱼 AMS 活力(u/dl) Amylase in healthy fish	64.52±8.38	312.90±40.68	322.67±41.95	4 225.81±549.35	64.52±8.39
患病鱼 AMS 活力(u/dl) Amylase in infected fish	72.84±9.47	258.06±33.55	16.13±2.09**	2 290.32±297.74**	16.13±2.09**
正常鱼 LZM 活力(U/ml) Lysozyme in healthy fish	646.71±81.07	4 958.08±644.55	1 940.12±252.22	2 479.04±322.27	970.06±126.11
患病鱼 LZM 活力(U/ml) Lysozyme in infected fish	2 694.61±350.30**	2 425.15±315.27**	4 041.92±525.45**	3 826.35±497.43**	1 724.55±224.19**
正常鱼 AKP 活力(U/g prot) Alkaline phosphatase in healthy fish	26.48±3.44	54.59±7.09	235.38±30.59	79.48±10.33	36.47±4.74
患病鱼 AKP 活力(U/g prot) Alkaline phosphatase in infected fish	56.50±7.34**	103.12±13.41**	103.28±13.43**	105.97±13.77*	47.86±6.22*
正常鱼 ACP 活力(U/g prot) Acidic phosphatase in healthy fish	71.73±9.33	195.10±25.36	271.38±35.28	1 109.93±144.29	11.57±1.50
患病鱼 ACP 活力(U/g prot) Acidic phosphatase in infected fish	170.37±22.14**	528.83±68.75**	170.76±22.19**	362.50±47.13**	11.58±1.1.51

注: \* 差异显著( $P<0.05$ ), \*\* 差异极显著( $P<0.01$ ), 下表同; AMS、LZM、AKP、ACP 分别为淀粉酶、溶菌酶、碱性磷酸酶和酸性磷酸酶

### 2.3 两种转氨酶活力的变化

患病后大黄鱼的两种转氨酶活力的变化见表2。结果表明,病鱼谷草转氨酶和谷丙转氨酶的酶活力在肾和肝中均有明显变化,肾组织中两种酶的活力均有极显著的升高,而在肝脏中两种酶都有极显著的降低( $P < 0.01$ )。在心、脾、鳃组织中两种转氨酶活力都无明显的变化( $P > 0.05$ )。

表2 5种组织中两种胞内酶活力  
Table 2 The activities of two enzymes within cell in five tissues

检测酶 Enzymes	检测组织 Tissues				
	心脏 Heart	脾脏 Spleen	肾脏 Kidney	肝脏 Liver	鳃 Gill
正常鱼 GOT 活力(U/mg prot) Glutamic-oxalacetic transaminase in healthy fish	482.07±62.67	64.94±8.44	136.76±17.78	683.33±88.84	109.82±14.27
患病鱼 GOT 活力(U/mg prot) Glutamic-oxalacetic transaminase in infected fish	464.03±60.32	76.75±9.97	203.38±26.44**	429.77±55.87**	96.51±12.54
正常鱼 GPT 活力(U/mg prot) Glutamic-oxalacetic transaminase in healthy fish	20.62±2.68	14.71±1.91	3.51±0.46	206.29±26.82	39.94±5.19
患病鱼 GPT 活力(U/mg prot) Glutamic-oxalacetic transaminase in infected fish	23.20±3.02	12.36±1.61	38.57±5.01**	85.95±11.17**	43.18±5.61

注:GOT 为谷草转氨酶,GPT 为谷丙转氨酶

### 2.4 两种抗氧化酶活力及丙二醛的变化

患病后大黄鱼两种抗氧化酶活力及丙二醛的变化见表3。结果表明,病鱼在肾脏和肝脏中丙二醛的含量均有显著的升高( $P < 0.05$ ),在心、脾、鳃中无明显变化( $P > 0.05$ );超氧化物歧化酶活力在病鱼的肝和鳃中极显著下降( $P < 0.01$ ),而在心、脾、肾中无明显变化( $P > 0.05$ )。此外,病鱼在心和肾中过氧化氢酶活力显著降低,在脾脏中极显著升高( $P < 0.01$ ),而在肝脏和鳃中则无明显变化( $P > 0.05$ )。

表3 5种组织中两种抗氧化酶活力及丙二醛的测定  
Table 3 The activities of two kinds of antioxidant enzymes and MDA in five tissues

检测酶 Enzymes	检测组织 Tissues				
	心脏 Heart	脾脏 Spleen	肾脏 Kidney	肝脏 Liver	鳃 Gill
正常鱼 MDA 活力(nmol/mg prot) Malondialdehyde in healthy fish	114.35±14.86	112.03±14.56	156.45±20.34	80.44±10.45	47.78±6.21
患病鱼 MDA 活力(nmol/mg prot) Malondialdehyde in infected fish	120.03±14.56	129.44±16.83	194.22±25.25*	190.64±24.78**	56.32±7.32
正常鱼 SOD 活力(U/mg prot) Superoxide dismutase in healthy fish	41.52±5.39	127.63±16.59	229.58±29.84	680.12±88.41	73.48±9.55
患病鱼 SOD 活力(U/mg prot) Superoxide dismutase in infected fish	47.79±6.21	82.85±10.77	150.39±19.55	101.31±13.17**	12.47±1.62**
正常鱼 CAT 活力(U/mg prot) Catalase in healthy fish	58.21±7.56	23.46±3.05	46.88±6.09	107.92±14.03	45.69±5.94
患病鱼 CAT 活力(U/mg prot) Catalase in infected fish	43.08±5.60*	50.13±6.52**	33.57±4.36**	100.94±13.12	41.48±5.39

注:MDA、SOD、CAT 分别为丙二醛、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶

### 3 讨论

研究结果显示,与正常大黄鱼比较,患诺卡氏菌病大黄鱼在测定的9项指标中均存在不同程度的变化,表明大黄鱼对诺卡氏菌侵染有明显的应激反应,且病原菌对病鱼器官有着不同程度的损伤。以肾、肝、脾脏组织中的变化最为明显,而心脏、鳃组织中的变化不太明显,表明患病大黄鱼最主要的病变器官是肾脏、肝脏和脾脏,解剖病症也显示诺卡氏菌感染形成的结节病灶以这3个组织为主(Wang *et al.* 2005)。它们是鱼体进行物质代谢、消化吸收、排泄和免疫等的主要功能器官,组织器官的损伤致使相关酶活力发生显著变化。

鱼类肝胰脏是淀粉酶中心生成器官,其分泌机能的强弱直接影响鱼类对食物的消化能力(陈春娜 2008)。患病大黄鱼肝脏淀粉酶活力极显著低于正常鱼( $P < 0.01$ ),不仅影响其消化能力,还引起摄食功能下降。组织中溶菌酶含量会因动物体发生炎症、感染、组织损伤而改变,它在一定程度上能反映机体的免疫活动状态(刘树青等 1999)。病鱼心、肾、肝、鳃中溶菌酶活力均高于正常鱼,显示鱼体在应激状态下免疫作用增强,有利于清除病原菌;正常鱼脾脏中溶菌酶含量最高,病鱼却显著下降。由于脾脏是重要的造血及免疫器官,可能诺卡氏菌侵入脾脏致使组织严重损伤,造成溶菌酶分泌障碍影响正常功能。酸性磷酸酶(ACP)是巨噬细胞溶酶体的标志酶,碱性磷酸酶(AKP)也是溶酶体酶的组成部分,在免疫反应中发挥重要作用。患病鱼这两种酶在脾脏、心脏中显著升高,在肾脏、肝脏中呈现下降,表明脾脏富含大量具有吞噬功能的细胞,能增强免疫抗病能力(马 骞等 2010)。

谷草转氨酶(GOT)和谷丙转氨酶(GPT)是主要存在于细胞线粒体中的氨基转移酶,是在蛋白质代谢过程中起到重要作用的细胞内酶,其活力大小反映了氨基酸代谢的强度(冯 健等 2004)。肝和肾脏是与蛋白质代谢最密切的器官,病鱼肝脏中两种转氨酶都降低,说明其受损严重,蛋白质代谢障碍,血液中不完全代谢产物增多,从而肾脏的吸收功能相对增强,表现在肾脏两种转氨酶的升高。

鱼体重要的抗氧化酶包括超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT),可清除氧自由基,减少自由基对机体自身的伤害,常被作为机体非特异性免疫指标应用。丙二醛(MDA)是机体受氧自由基攻击后产生的脂质过氧化物,其含量测定常与SOD和CAT的测定相互配合使用(叶继丹等 2004)。本研究表明,病鱼肾、肝中MDA含量有显著的升高,其他组织抗氧化酶活性也有不同程度的变化,反映患病后大黄鱼体内抗氧化作用受抑制,使自由基未能被有效清除,导致自由基的“产生—清除”动态平衡受到破坏,正常的免疫防御功能受到限制。

经过对患诺卡氏菌病的大黄鱼几种主要组织的酶活力变化分析,表明了诺卡氏菌侵染鱼体后不仅造成组织器官的病变损伤,而且明显影响主要组织重要酶类的生理功能,引起鱼体代谢障碍及免疫活动状态的变化。目前对鱼类诺卡氏菌病的研究较少,有较多问题尚不明了。因此,需进一步开展组织病理学研究,探明诺卡氏菌的致病机理;分析病原菌的来源和致病途径;加强免疫预防和药物控制研究;从生态学角度探索健康的养殖模式。

### 参 考 文 献

- 马 骞,洪婧妮,蒋秋芬,苏永全,王 军. 2010. 哈维氏弧菌对条纹斑竹鲨4种酶活性的影响. 台湾海峡, 29(2):196~204
- 王瑞旋,刘广锋,王江勇,冯 娟,郭志勋,徐力文. 2010. 养殖卵形鲳鲹诺卡氏菌病的研究. 海洋湖沼通报, 1:52~58
- 王家沛. 2010. 乌鳢诺卡氏菌病的诊治. 现代农业科技, 13:387,390
- 王茂林,张秀梅,黄国强,张沛东,李君丰. 2010. 不同钙、镁浓度对褐牙鲈幼鱼生长及SOD和CAT酶活力的影响. 渔业科学进展, 31(3):29~36
- 王晓杰,张秀梅,李文涛. 2005. 盐度胁迫对许氏平鲈血液免疫酶活力的影响. 海洋水产研究, 26(6):17~21
- 王国良,袁思平,金 珊. 2006. 大黄鱼结节病病原菌—诺卡氏菌的鉴定及其系统发育分析. 中国水产科学, 13(3):410~414
- 王国良,刘 璐,徐益军. 2011. 鱼类致病鲑鱼诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)的LAMP检测技术建立与应用. 海洋与湖沼, 42(1):27~31
- 叶继丹,韩友文,赵吉伟,卢彬岩,刘红柏,杨雨辉. 2004. 喹乙醇对鲤肝胰脏抗氧化酶系统的影响. 水产学报, 28(3):231~235
- 冯 健,刘永坚,田丽霞,王 勇,高 玲. 2004. 草鱼实验性镉中毒对肝胰脏、肾脏和骨骼的影响. 水产学报, 28(2):195~200
- 艾春香,陈立侨,高露姣,温小波,江洪波. 2002.  $V_C$ 对河蟹血清和组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响. 台湾海峡, 21(4):431~438
- 刘树青,江晓路. 1999. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用. 海洋与湖沼, 30(3):278~283

- 李思源,王国良,徐益军. 2010. 养殖鱼类诺卡氏菌病的危害及防治. 科学养鱼, 5:52
- 李贵生,何建国,余南,翁少萍,江静波. 2001. 斑节对虾杆状病毒感染对脂肪代谢的影响. 暨南大学学报, 22(1):84~88
- 陈春娜. 2008. 鱼类淀粉酶的研究进展. 中国饲料, 5:33~35
- 赵峰,庄平,章龙珍,黄晓荣,张涛,冯广朋. 2008. 施氏鲟不同组织抗氧化酶对水体盐度升高的响应. 海洋水产研究, 29(5):65~69
- Chen, S. C., Lee, J. L., Lai, C. W., Gu, Y. C., Wang, C. T., Chang, H. Y., and Tsai, K. H. 2000. Nocardiosis in sea bass, *Lateolabrax japonicus*, in Taiwan. J. Fish Dis. 23(5):299~307
- Friedman, C. S., Beaman, B. L., Chun, J., Goodfellow, M., Gee, A., and Hedrick, R. P. 1998. *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. Int. J. Syst. Bacteriol. 48(1):237~246
- Isik, K., Chun, J., Hah, Y. C., and Goodfellow, M. 1999. *Nocardia salmonicida* nom. rev., a fish pathogen. Int. J. Syst. Bacteriol. 49(2):833~837
- Wang, G. L., Yuan, S. P., and Jin, S. 2005. Nocardiosis in large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson). J. Fish. Dis. 28(6):339~345
- Wang, G. L., Xu, Y. J., Jin, S., Zhu, J. L., and Yuan, S. P. 2007. Nocardiosis in snakehead, *Ophiocephalus argus* Cantor. Aquaculture, 271(1-4): 54~60

## 《渔业科学进展》编辑部网上投稿启事

为充分利用网络资源,提高编辑办公和期刊出版效率,《渔业科学进展》编辑部已从2010年1月开始采用期刊网络化办公系统。该系统使投稿、审稿和编辑工作都在同一个网络平台上完成,可大大节省通讯时间,并规范编辑工作流程。同时,网络投稿将以更加友好的界面服务于广大作者,方便作者与编审之间的沟通,为您提供易查、易用、更加方便快捷的服务。

敬请作者访问黄海水产研究所网站(<http://www.ysfri.ac.cn>)右下角的“《渔业科学进展》期刊网上投稿系统”。投稿程序请参看《渔业科学进展》网络化稿件处理系统作者使用指南。

如有疑问,请致电 0532-85833580 陈严老师或 0532-85800117 王建坤老师咨询。也可发邮件到《渔业科学进展》编辑部咨询, E-mail: [chenyan@ysfri.ac.cn](mailto:chenyan@ysfri.ac.cn)。

《渔业科学进展》编辑部

2012年4月20日