

急性离水操作胁迫对四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)幼鱼组织结构和氧化应激的影响*

刘奇奇^{1,2} 温久福¹ 区又君^{1①} 李加儿¹ 周 慧^{1,2}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室 广州 510300;

2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

摘要 为探究急性离水操作胁迫对四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)幼鱼组织结构和氧化应激的影响,本研究通过组织切片和酶活性测定来观察及检测鳃和肌肉显微结构的变化、抗氧化酶活性以及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性,以探究四指马鲛应激反应规律。结果显示,急性离水操作胁迫2 h后,鳃小片、扁平上皮细胞以及线粒体丰富细胞都出现不同程度的损伤;肌肉从肌纤维变性、肌纤维束之间的间隙增宽、空泡化至肌肉组织整体失去固有形态,并且呈逐渐分解的趋势;超氧化物歧化酶(SOD)和还原型谷胱甘肽(GSH)有相同的变化趋势,胁迫后的2 h显著下降($P<0.05$),但12 h时则升至最高值。过氧化氢酶(CAT)和总抗氧化能力(T-AOC)水平在处理2 h无显著变化($P>0.05$),之后升高,直到12 h达到峰值。丙二醛(MDA)含量在胁迫后的2 h无显著差异($P>0.05$),直到6 h达到峰值。SOD和CAT活性在处理24 h后显著低于处理前,其他酶变化不显著。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性在处理2 h显著升高($P<0.05$),12 h达到峰值,24 h恢复到处理前水平。研究表明,操作胁迫会对鳃和肌肉的组织结构造成损伤,而且随时间持续,损伤呈现加重趋势;肌肉抗氧化酶系统在受到氧化压力2 h后才启动,处理后12 h肌肉受到的氧化压力最大,抗氧化酶活性最强;在受到外界刺激时,SOD和GSH之间可能存在协同作用;MDA可以作为四指马鲛氧化损伤的快速响应生物标记物。

关键词 四指马鲛;操作胁迫;抗氧化酶; $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶

中图分类号 S961.2 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)06-0048-08

四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)俗称午鱼、马友、章跳、鲤后等,隶属于鲷形目(Mugiliformes)、马鲛科(Polynemidae)、四指马鲛属(孙典荣等,2013),在我国多分布于东海、南海海域,在全球范围内主要分布于中国、日本、越南及东南亚沿海区域(张涛等,2009)。四指马鲛肉质鲜美、生长速度快、经济价值高,极具发展前景。目前,人工繁

育技术已经突破,对四指马鲛胚胎发育、盐度耐受性、消化道结构和功能细胞的发育等已有系统研究(谢木娇等,2015、2016a、2016b),大规模苗种生产技术为其作为新兴养殖品种的推广奠定了物质基础。但是,四指马鲛对应激反应十分敏感,在养殖过程中容易因手工操作受伤死亡,影响了该鱼养殖产业的健康发展。

* 广东省省级科技计划项目(2013B090300009; 2017B020204002; 2017020208001)和广东省海洋渔业科技推广专项科技攻关与研发项目(A201401A05)共同资助[This work was supported by the Provincial Scientific and Technology Planning Project of Guangdong Province (2013B090300009; 2017B020204002; 2017020208001), and Special Item about Science and Technology Research and Development in the Scientific and Technical Extension Project in Ocean and Fisheries of Guangdong Province (A201401A05)]. 刘奇奇, E-mail: 1158055407@qq.com

① 通讯作者: 区又君, 研究员, E-mail: ouyoujun@126.com

收稿日期: 2016-09-12, 收修改稿日期: 2016-10-06

应激是机体对外界或内部的各种异常刺激所产生的非特异性全身反应,是生物体在长期进化中形成的一种适应性和防御性功能。翁朝红等(2008)的研究表明,在水产养殖生产管理中,一些不可避免的操作,如运输、拉网捕捉、吸残饵排污等,会对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)造成一定的胁迫,从而导致鱼类产生应激反应。这些应激反应会对鱼类的生理生化等方面产生不利影响。孙鹏等(2014)的研究表明,长时间的应激胁迫会降低云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)的抵抗力以及生长速率。目前,有关鱼类环境胁迫的研究相对较多,主要包括盐度对龙虎斑(*Epinephelus ianceolatus*♂×*E. fuscoguttatus*♀)和鲮(*Mugil cephalus*)(王成桂等, 2014; 于娜等, 2011)、温度对舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)和银鲳(*Pampus argenteus*)(Besson *et al*, 2016; 施兆鸿等, 2016)、pH 对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)(马广智等, 2001)、鱼毒性赤潮藻对青鳉(*Oryzias latipes*)(李昌伟, 2014)¹⁾、养殖密度对北极红点鲑(*Salvelinus alpinus*)(Wallace *et al*, 1988)的胁迫等,而有关养殖过程中操作胁迫的研究主要集中在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)(Wiseman *et al*, 2007)、刀鲚(*Coilia nasus*)(王宇等, 2014; 徐钢春等, 2015; 高金伟等, 2015; Du *et al*, 2014),而对四指马鲛的研究相对较少。鱼类机体抗氧化系统在抵御由环境变化导致的氧化压力中有重要作用,包括小分子非酶物质[如谷胱甘肽、维生素 C (V_C)、维生素 E (V_E)]和抗氧化酶(如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶等)。四指马鲛受到急性应激时口裂完全张开、肌肉抽搐而死。本研究通过模拟拉网对四指马鲛进行操作胁迫,以探究四指马鲛应激反应特点,为其健康养殖技术的建立提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的四指马鲛于 2015 年 6–8 月在中国水产科学研究院南海水产研究所珠海试验基地培育所得,体长为(6.00±0.21) cm,体重为(4.00±0.15) g。实验开始前暂养 1 周,暂养期间,每天换水 1 次,每次换水量 1/2 左右,连续充气。随机挑选体色正常、健康的幼鱼 240 尾进行实验。

1.2 实验设计

采用操网捕捉的方式对四指马鲛进行急性离水

操作胁迫,每次先将四指马鲛全部聚拢在操网内拥挤胁迫 5 s,然后捞起暴露于空气中 5 s,再放入水中 3 min,重复以上操作共持续 10 个循环。

将四指马鲛分为 3 个平行组,然后胁迫结束后的 2 h、6 h、12 h 和 24 h 以及各时间点的对照组,分别取样 15 尾,采集前先用 MS-222 麻醉实验鱼 2–3 min,解剖鱼体,采集肌肉、鳃组织样品,用作组织切片观察的样品固定于 4%多聚甲醛溶液中;测量酶活的样品置于液氮中保存以备后续实验使用。

1.3 样品测定

组织切片观察,采用区又君等(2015)的研究方法:取多聚甲醛固定的肌肉和鳃,经过流水冲洗、70%–100%的乙醇脱水和二甲苯透明、石蜡包埋处理后,用 Leica 切片机进行连续切片,切片厚度为 5–6 μm,采用 HE 染色和中性树脂封片,于 Zeiss 显微镜下拍照。

肌肉抗氧化酶以及鳃 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性测定,取经液氮固定的肌肉和鳃,准确称取组织重量,按重量(g):体积(ml)=1:9 的比例加入 9 倍生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,250 r/min 离心 10 min,取上清液(10%的组织匀浆液)。按照南京建成试剂盒说明书分别测定酶活,以 BCA 法测定蛋白含量。总抗氧化能力(T-AOC)通过 520 nm 波长 37℃条件下每分钟每毫克组织蛋白使反应体系的吸光度(OD)值每增加 0.01 时,为 1 个总抗氧化能力单位来测定;过氧化氢酶(CAT)活性通过 405 nm 波长处测定过氧化氢减少量来测定,单位定义为每毫克组织蛋白每秒分解 1 μmol 的 H₂O₂ 的量为 1 个活性单位;超氧化物歧化酶(SOD)活性单位定义为:反应体系中 SOD 抑制率达到 50%时所对应的酶量为 1 个 SOD 活性单位(U);过氧化脂降解产物丙二醛(MDA)通过 TBA 法来测定,其测定原理为 MDA 分子与硫代巴比妥酸(TBA)分子在酸性条件下共热,形成粉红色复合物,该复合物在波长 532 nm 处有最大吸收峰;还原型谷胱甘肽(GSH)可与二硫代二硝基甲酸(DTNB)反应,生成一种黄色化合物,可在 405 nm 波长处进行比色定量测定 GSH 含量;鳃组织的 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性定义为:每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为 1 个 ATP 酶活性单位。

1.4 数据分析

经实验测量得到的数据都表示为平均值±标准差

1) Li CW. The detrimental mechanism of ichthyotoxic microalgae species on marine medaka (*Oryzias melastigma*). Master's Thesis of Jinan University, 2014 [李昌伟. 鱼毒性赤潮藻对海洋青鳉鱼的致害机理研究. 暨南大学硕士研究生学位论文, 2014]

(Mean±SD)。利用 Excel 2003 以及 SPSS 22.0 软件进行方差分析, Duncan 氏检验进行显著性分析和多重比较, $P<0.05$ 时, 认为数据有显著性差异。由于对照组在各时间点的数据之间无显著差异($P>0.05$), 故都归于同一组。

2 结果

2.1 急性离水操作胁迫对四指马鲛鳃和肌肉组织形态的影响

2.1.1 鳃 对照组未经胁迫, 鳃组织表现为正常的生理形态, 鳃丝整齐密集, 两侧鳃小片对称完整, 上皮细胞排列规则, 线粒体丰富细胞呈椭圆形(图 1-1)。离水胁迫后 2 h, 鳃组织轻微损伤, 部分鳃丝两侧的鳃小片出现轻微弯曲, 其中, 鳃丝血管、基底层细胞未见异常(图 1-2)。胁迫后 6 h, 鳃组织损伤明显, 鳃小片血管收缩, 血细胞减少且红细胞染色不明显, 着色力减弱, 鳃丝部分区域的鳃小片出现弯曲, 有些在中上部出现断裂。高倍镜下观察, 鳃小片基底部的黏液细胞和线粒体丰富细胞数量增多, 部分细胞出现水肿, 体积增大(图 1-3)。胁迫后 12 h, 鳃损伤更为明显, 主要表现为鳃小片严重弯曲, 其末端出现肿胀, 鳃小片出现多处断裂, 大部分上皮细胞水肿变性

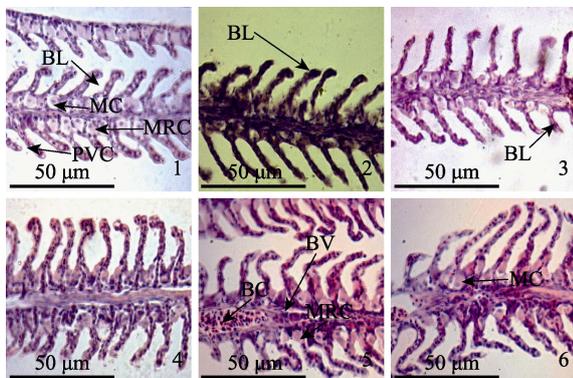


图1 急性离水操作胁迫对四指马鲛鳃组织结构的影响
Fig.1 The effects of acute off-water handling stress on microstructure of gills of *E. tetradactylum*

1: 对照组; 2: 胁迫后 2 h; 3: 胁迫后 6 h; 4: 胁迫后 12 h; 5、6: 胁迫后 24 h; MC: 黏液细胞; PVC: 扁平上皮细胞; MRC: 线粒体丰富细胞; BL: 鳃小片; BV: 血管; BC: 血细胞
1: Control group; 2: 2 h after off-water handling stress; 3: 6 h after off-water handling stress; 4: 12 h after off-water handling stress; 5 and 6: 24 h after off-water handling stress; MC: Mucous cells; PVC: Pavement cells; MRC: Mitochondrion-rich cells; BL: Gill lamella; BV: Blood vessel; BC: Blood cell

(图 1-4)。胁迫后 24 h, 鳃组织表现为不可逆的损伤, 鳃丝整体偏离正常形态, 鳃小片扭曲紊乱, 细胞变形严重, 部分细胞核发生溶解(图 1-5、图 1-6)。

2.1.2 肌肉 未经胁迫的对照组肌细胞呈现其正常形态, 其外形呈纺锤状, 肌纤维之间排列紧密, 无弯曲现象, 细胞核位于肌纤维的中央一侧(图 2-1); 在胁迫后 2 h, 肌肉组织部分区域出现肌纤维轻微变形扭曲, 纤维束间隙增宽, 肌细胞未见异常(图 2-2)。胁迫后 6 h, 肌组织损伤明显, 肌纤维变形加剧, 部分区域可见纤维束弯曲紊乱, 有些部位发现肌纤维断裂, 肌纤维间隙明显增宽, 形成空泡(图 2-3)。胁迫后 12 h, 肌组织损伤更为明显, 肌纤维排列紊乱, 扭曲变形呈锯齿状, 多处出现肌纤维断裂, 肌细胞轻微变形, 有些部位出现肌细胞核聚集现象, 部分细胞核变形, 肌纤维束间隙增宽, 空泡化严重(图 2-4、图 2-5)。胁迫后 24 h, 肌肉组织损伤程度进一步加重, 而肌纤维和肌细胞变形程度均加深, 肌肉组织整体失去固有形态, 呈逐渐分解的趋势(图 2-6)。

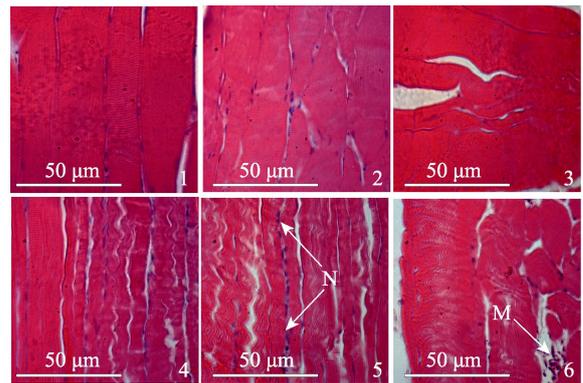


图2 急性离水操作胁迫对四指马鲛肌肉组织结构的影响
Fig.2 The effects of acute off-water handling stress on microstructure of muscles of *E. tetradactylum*

1: 对照组; 2: 胁迫后 2h; 3: 胁迫后 6h; 4、5: 胁迫后 12h; 6: 胁迫后 24h; N: 细胞核; M: 肌细胞
1: Control group; 2: 2 h after off-water handling stress; 3: 6 h after off-water handling stress; 4 and 5: 12 h after off-water handling stress; 6: 24 h after off-water handling stress; N: Nucleus; M: Muscle cells

2.2 急性离水操作胁迫对四指马鲛相关酶活性的影响

2.2.1 对肌肉 SOD 活性的影响 与对照组相比, 离水胁迫后 2 h 的 SOD 活性显著下降($P<0.05$)。随着时间的延长, SOD 活性渐渐升高, 直到胁迫后 12 h, SOD 活性达到最高值, 显著高于对照组及其他处理组($P<0.05$)。处理后 24 h, SOD 活性降到较低水平, 显著低于对照组($P<0.05$)(图 3)。

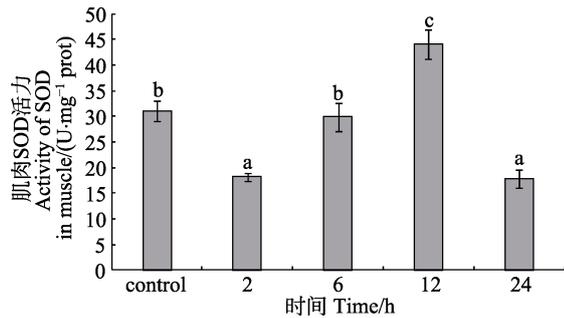


图 3 急性离水操作胁迫对四指马鲛肌肉 SOD 活性的影响
Fig.3 The effects of acute off-water handling stress on the activity of SOD in muscles of *E. tetradactylum*

不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$), 下同
Different letters indicated significant differences among groups ($P<0.05$), the same as below

2.2.2 对肌肉 CAT 活性的影响 胁迫后 2 h, CAT 活性无明显变化($P>0.05$)。随后, CAT 活性明显升高, 直到 12 h 达到最高值, 显著高于对照组及其他处理组($P<0.05$)。处理后 24 h, CAT 活性降到最低值, 显著低于对照组及其他处理组($P<0.05$)(图 4)。

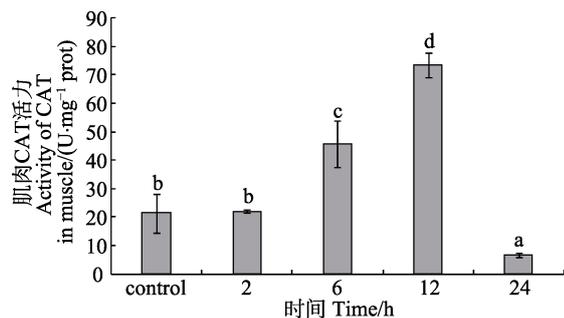


图 4 急性离水操作胁迫对四指马鲛肌肉 CAT 活性的影响
Fig.4 The effects of acute off-water handling stress on the activity of CAT in muscles of *E. tetradactylum*

2.2.3 对肌肉 MDA 含量的影响 离水胁迫 2 h, 肌肉中 MDA 含量无明显变化($P>0.05$)。处理 6 h 后, MDA 含量达到最大值, 显著高于对照组及其他处理组($P<0.05$)。随着时间延长, MDA 含量逐渐降低, 直至 24 h MDA 含量降到处理前水平(图 5)。

2.2.4 对肌肉 GSH 含量的影响 胁迫后 2 h, GSH 含量显著降低($P<0.05$)。随后其含量升高, 直到胁迫后的 12 h GSH 含量达到最高值, 显著高于对照组及其他实验组($P<0.05$)。胁迫后 24 h, GSH 含量恢复到正常水平, 与对照组无显著差异($P>0.05$)(图 6)。

2.2.5 对肌肉 T-AOC 的影响 在胁迫开始的 2 h, 肌肉 T-AOC 无显著变化($P>0.05$)。胁迫后 2-12 h, 肌肉 T-AOC 逐渐升高, 直到胁迫后 12 h 达到最大值。胁迫后 24 h, 肌肉 T-AOC 与对照组无显著差异(图 7)。

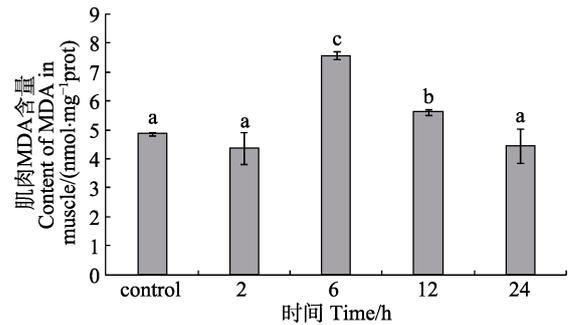


图 5 急性离水操作胁迫对四指马鲛肌肉中 MDA 含量的影响

Fig.5 The effects of acute off-water handling stress on the content of MDA in muscles of *E. tetradactylum*

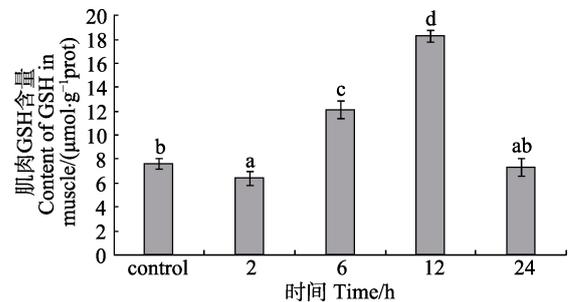


图 6 急性离水操作胁迫对四指马鲛肌肉中 GSH 含量的影响

Fig.6 The effects of acute off-water handling stress on the content of GSH in muscles of *E. tetradactylum*

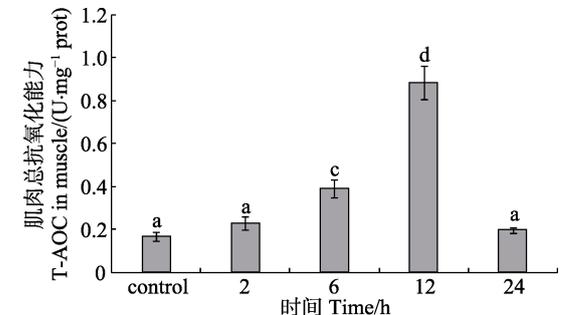


图 7 急性离水操作胁迫对四指马鲛肌肉 T-AOC 的影响

Fig.7 The effects of acute off-water handling stress on T-AOC in muscles of *E. tetradactylum*

2.2.6 对鳃 Na⁺-K⁺-ATPase 活性的影响 离水胁迫后 2 h, 鳃 Na⁺-K⁺-ATPase 活性明显升高($P<0.05$); 胁迫后 6 h, Na⁺-K⁺-ATPase 活性与胁迫后 2 h 无显著差异($P>0.05$); 胁迫后 12 h, 鳃 Na⁺-K⁺-ATPase 活性达到较高水平($P<0.05$), 24 h 后酶活水平下降, 与对照组无显著差异($P>0.05$)(图 8)。

2.3 急性离水操作胁迫后四指马鲛幼鱼的生存状态

未经胁迫的四指马鲛幼鱼表现正常, 即沿暂养池壁集体朝同一方向不停地游动; 胁迫后 2 h, 其主要

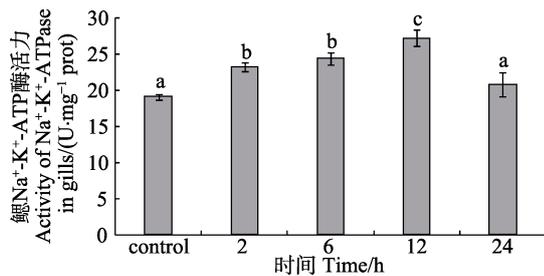


图8 急性离水操作胁迫对四指马鲛鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性的影响

Fig.8 The effects of acute off-water handling stress on the activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in gills of *E. tetradactylum*

表现为向不同的方向快速、杂乱无章地游动，并撞击池壁；胁迫后6 h，个别幼鱼死亡，其他则仍无规律地游动、撞击池壁，但游动速度明显下降；胁迫后12 h，部分幼鱼死亡，其他则游泳动作不协调，速度减慢，甚至侧游或翻身游动；胁迫后24 h，四指马鲛幼鱼出现大量死亡，剩余幼鱼大部分处于侧游或翻身游动状态。

3 讨论

3.1 操作胁迫对四指马鲛鳃和肌肉组织结构的影响

鱼类在进化过程中对内外界刺激形成了一定的适应能力，轻度刺激可促进鱼类的生长，改善鱼类体质(刘小玲, 2007)。但剧烈或长期的刺激会对鱼体产生危害，导致机体各种生理功能紊乱、甚至死亡。刘小玲(2007)的研究表明，鱼类的应激包括一系列复杂的生理变化，可分为初级、次级和第三级应激反应，其中，次级反应是由初级反应引起的组织和器官水平上的一系列功能和结构的变化。本研究表明，经过急性离水操作胁迫2 h后鳃小片、扁平上皮细胞及线粒体丰富细胞开始出现不同程度的损伤；肌肉从肌纤维变性、肌纤维束之间的间隙增宽，空泡化至肌肉组织整体失去固有形态呈逐渐分解的趋势，表明急性胁迫确实会引起四指马鲛显著的应激反应。急性离水操作胁迫后，鳃小片基底部的线粒体丰富细胞数量增多，这个结果与盐度胁迫遮目鱼(*Chanos chanos*)幼鱼实验的结果(区又君等, 2014)相类似。类比翁朝红等(2008)对大黄鱼的研究结果推测，这可能与四指马鲛为克服操作胁迫造成的应激反应，调动相关生理反应，增加额外的能量代谢有关。鱼类鳃部的黏液细胞可分泌大量黏液性物质，在鳃的表面形成一层对鳃组织具有保护作用的屏障，本研究发现，操作胁迫后6 h，黏液细胞数量增多，体积增大，也是机体抵御应激的保护机制(图1-3、图2-3)。在操作胁迫后6 h，鳃和

肌肉的组织结构开始出现损伤，表明胁迫后6 h四指马鲛的应激反应已经进入次级反应阶段，随时间持续操作胁迫对机体鳃和肌肉组织造成的损伤逐渐加剧，表明所施加的胁迫强度已经超出机体能够适应和调控的范围，对鳃和肌肉产生不可逆的损伤。本研究结果显示，在四指马鲛的养殖管理过程中要科学操作，适当添加抗应激制剂，严格控制各种胁迫因子，避免造成不良影响。

3.2 操作胁迫对四指马鲛肌肉抗氧化系统的影响

Martínez-Álvarez 等(2005)的研究表明，通常情况下，鱼体代谢产生的自由基处在动态平衡中。当受到外界环境干扰之后，平衡被打破，自由基大量积累，过量的自由基会对鱼体产生不利影响。一般情况下，鱼体率先利用第一道防线(如 V_C 、 V_E 等小分子非酶物质)清除过多的自由基；当第一道防线不足以清除过多的自由基时，鱼体则会启动第二道防线，即合成相应的抗氧化酶以减少氧化压力。本研究中，操作胁迫后2 h，肌肉 SOD、GSH 活性出现显著性下降，表明 SOD、GSH 可以作为四指马鲛受到氧化应激的灵敏指示物，这也与其功能相一致。CAT、GSH 活性也在操作胁迫后2 h下降，但变化不显著，T-AOC 稍微增加，表明此时肌肉组织主要依靠第一道防线抵御胁迫造成的氧化应激，尚未启动抗氧化酶系统来应对操作胁迫。在整个处理过程中，SOD、GSH 与 CAT 活性有相同的变化趋势，也证明了四指马鲛肌肉组织 SOD、CAT 和 GSH 之间在抗氧化应激方面具有协同作用，此结论与杨唐斌等(1994)的研究结果相似。胁迫后6 h，实验所测抗氧化酶都出现显著增加，表明机体已经启动抗氧化系统清除逐渐增多的自由基，这与孙鹏等(2014)对云纹石斑鱼进行惊扰胁迫的研究结果类似；操作胁迫后12 h，四指马鲛肌肉组织内积累的自由基达到最高峰，随后就逐渐下降，这也是操作胁迫后机体内氧化压力与抗氧化防御响应之间动态互作过程，表明抗氧化酶系统在应对氧化压力过程中发挥主要作用。

Srikanth 等(2013)的研究表明，鱼类氧化应激应在不同种类的鱼中呈现特定的时间变化趋势。在研究胁迫因子对银鲳、广东鲂(*Megalobrama terminalis*)、条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)和黄姑鱼(*Nibea albiflora*)影响的实验中发现，随处理时间延长，抗氧化酶呈现增高的变化趋势，之后体内新的平衡机制建立，抗氧化酶活性也恢复到正常水平(尹飞等, 2011; 谢明媚等, 2015; 曾艳艺等, 2014; 孙鹏等, 2010; 张晨捷等, 2015)。本研究中，相应的抗氧化酶活性先下降，可

能是机体尚未形成有效的抵抗机制,之后才逐渐升高,并在处理后24 h又下降,这与以上研究结果相似。宋林生等(2004)在温度骤升对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)肝胰腺中抗氧化酶活性的研究结果显示,温度升高后,CAT和SOD马上出现显著降低,MDA含量一直增加,认为抗氧化系统受到一定程度的影响,造成机体细胞结构和功能的丧失。本研究中,虽然抗氧化酶活性在胁迫后2 h出现下降,但从6 h又出现上升,表明其细胞结构和功能仍然正常,其下降的原因可能是四指马鲛迅速启动第一道防线,大量释放还原性物质 V_C 、 V_E 消除自由基,导致机体氧化水平迅速降低有关,但具体作用机制还需要进一步的深入研究。在处理后24 h,SOD、CAT、MDA和GSH抗氧化指标均低于处理前,而T-AOC和处理前保持一致,表明此时肌肉组织的氧化应激主要是非酶促反应。在本研究中,只观察到胁迫后24 h的变化过程,尚不能判定四指马鲛肌肉抗氧化酶系统是否受到损伤,故不能确定其抗氧化酶系统和氧化压力之间平衡机制是否仍然有效运行。基于本研究结果,初步认为四指马鲛肌肉组织应对氧化应激的策略是先依靠第一道防线,然后启动抗氧化酶系统,新平衡建立阶段仍然是非酶促反应。

3.3 操作胁迫对四指马鲛肌肉MDA含量的影响

Papadimitriou等(2002)对湖蛙(*Rana ridibunda*)的研究表明,细胞中过氧化脂降解产物MDA的含量反映了机体脂质过氧化程度,其间接反映了细胞损伤程度。本研究中,胁迫处理后2 h,MDA含量逐渐升高直到6 h达到最高值,之后MDA降低(图3),这表明,操作胁迫后6 h MDA含量逐渐积累到最大值,机体细胞已经受到损伤,这也与组织切片观察的结果相一致。然而,其他抗氧化酶在胁迫后12 h活性最高,MDA高峰出现早于其他抗氧化酶,表示如果抗氧化酶不能及时清除多余的自由基,膜脂过氧化的程度就会加重。表明鱼体通过调节体内抗氧化酶活性,可以使体内脂质过氧化程度降低。本研究结果显示,MDA可以作为四指马鲛氧化损伤的快速响应生物标记物。

3.4 操作胁迫对四指马鲛 Na^+-K^+ -ATPase活性的影响

尹飞等(2011)的研究表明, Na^+-K^+ -ATPase是组成 Na^+-K^+ 泵活性的主要部分, Na^+-K^+ -ATPase可水解ATP产生ADP和能量,同时也是一项评价环境胁迫影响的生物学指标。经过离水胁迫后,四指马鲛幼鱼鳃中 Na^+-K^+ -ATPase活性显著升高($P<0.05$),直到胁迫后12 h, Na^+-K^+ -ATPase活性达到峰值。组织学观察结果也显示,鳃小片基底部的线粒体丰富细胞数量

增多,这两方面的结果相互支持,表明四指马鲛鳃在应对氧化应激过程中耗能较大,需要 Na^+-K^+ -ATPase活性增强,提供抗氧化应激所需能量。胁迫处理后24 h, Na^+-K^+ -ATPase活性和处理前无显著差异,表明鳃结构和功能尚未受到严重破坏,由于氧化压力降低,鳃中 Na^+-K^+ 泵耗能也恢复到处理前水平。

参 考 文 献

- Besson M, Vandeputte M, van Arendonk JAM, et al. Influence of water temperature on the economic value of growth rate in fish farming: The case of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) cage farming in the Mediterranean. *Aquaculture*, 2016, 462: 47-55
- Du FK, Xu GC, Nie ZJ, et al. Transcriptome analysis gene expression in the liver of *Coilia nasus* during the stress response. *BMC Genomics*, 2014, 15: 558
- Gao JW, Du FK, Gu RB, et al. Effect of transport stress on physiological-biochemical indices and expression of HPI genes and roles of glycyrrhizin on transport response in *Coilia nasus*. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2015, 24(6): 817-825 [高金伟, 杜富宽, 顾若波, 等. 运输应激对刀鲚生理生化指标和HPI轴基因表达影响及甘草甜素的作用. *上海海洋大学学报*, 2015, 24(6): 817-825]
- Liu XL. Studies on the emergency responses of fishes. *Reservoir Fisheries*, 2007, 27(3): 1-3 [刘小玲. 鱼类应激反应的研究. *水利渔业*, 2007, 27(3): 1-3]
- Ma GZ, Tang M, Xu J. Effects of low pH on superoxide dismutase (SOD) activities of branchial and liver tissue of grass carp. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(1): 23-25 [马广智, 唐玫, 徐军. 低pH对草鱼鳃和肝组织超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响. *中国水产科学*, 2001, 8(1): 23-25]
- Martínez-Álvarez RM, Morales AE, Sanz A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2005, 15(1-2): 75-88
- Ou YJ, Lin XZ, Li JE, et al. The morphological structure of mitochondrion-rich cells in the gills of juveniles of the milkfish (*Chanos chanos*) and its changes in various salinities. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2014, 36(12): 1622-1629 [区又君, 林先智, 李加儿, 等. 遮目鱼幼鱼鳃线粒体丰富细胞的形态结构及其在不同盐度下的变化. *中国细胞生物学学报*, 2014, 36(12): 1622-1629]
- Ou YJ, Liu JH, Li JE, et al. Morphology and histology of head-kidney and spleen in *Cromileptes altivelis*. *Journal of Southern Agriculture*, 2015, 46(11): 2034-2039 [区又君, 刘江华, 李加儿, 等. 驼背鲈头肾和脾脏的形态组织学观察. *南方农业学报*, 2015, 46(11): 2034-2039]
- Papadimitriou E, Loumbourdis NS. Exposure of the frog *Rana ridibunda* to copper: Impact on two biomarkers, lipid peroxidation, and glutathione. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002, 69(6): 885-891
- Shi ZH, Xie MM, Peng SM, et al. Effects of temperature stress on activities of digestive enzymes and serum biochemical indices of *Pampus argenteus* juveniles. *Progress in Fishery Sciences*, 2016, 37(5): 30-36 [施兆鸿, 谢明媚, 彭士明, 等. 温度胁迫对银鲳(*Pampus argenteus*)幼鱼消化酶活性及血清生化指标的影响. *渔业科学进展*, 2016, 37(5):

- 30–36]
- Song LS, Ji YB, Cai ZH, *et al.* The immunochemical variation of mitten hand crab *Eriocheir sinensis* after the increment of temperature. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2004, 35(1): 74–77 [宋林生, 季延宾, 蔡中华, 等. 温度骤升对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)几种免疫化学指标的影响. 海洋与湖沼, 2004, 35(1): 74–77]
- Srikanth K, Pereira E, Duarte AC, *et al.* Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, 20(4): 2133–2149
- Sun DR, Chen Z. The retrieval of fishes in South China Sea. Beijing: Ocean Press, 2013, 380–382 [孙典荣, 陈铮. 南海鱼类检索. 北京: 海洋出版社, 2013, 380–382]
- Sun P, Yin F, Peng SM, *et al.* Effects of salinity on the activity of antioxidant enzymes in livers of juvenile *Oplegnathus fasciatus*. *Marine Fisheries*, 2010, 32(2): 154–159 [孙鹏, 尹飞, 彭士明, 等. 盐度对条石鲷幼鱼肝脏抗氧化酶活力的影响. 海洋渔业, 2010, 32(2): 154–159]
- Sun P, Yin F, Wang JJ, *et al.* Effects of handling stress activities of antioxidant enzymes in liver and $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase in gill of *Epinephelus moara*. *Marine Fisheries*, 2014, 36(3): 247–251 [孙鹏, 尹飞, 王建建, 等. 操作胁迫对云纹石斑鱼肝脏抗氧化和鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 活力的影响. 海洋渔业, 2014, 36(3): 247–251]
- Wallace JC, Kolbeinshavn AG, Reinsnes TG. The effects of stocking density on early growth in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture*, 1988, 73(1–4): 101–110
- Wang CG, Liang HF, Huang DK, *et al.* Effect of different salinity on growth and feeding of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂×*E. fuscoguttatus*♀). *Journal of Guangdong Ocean University*, 2014, 34(4): 40–44 [王成桂, 梁华芳, 黄东科, 等. 不同盐度对龙虎斑生长和摄食的影响. 广东海洋大学学报, 2014, 34(4): 40–44]
- Wang Y, Lu DQ, Li WP, *et al.* The effect of acute handling stress on the stress-related neuroendocrine factor in *Coilia nasus*. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(6): 803–812 [王宇, 卢丹琪, 李伟萍, 等. 急性操作胁迫对刀鲚应激反应相关神经内分泌因子的影响. 水产学报, 2014, 38(6): 803–812]
- Weng ZH, Wang ZY, Xie FJ, *et al.* Effect of handling stress on fingerlings of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* Richardson). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2008, 15(1): 100–105 [翁朝红, 王志勇, 谢芳靖, 等. 操作胁迫对大黄鱼幼鱼的影响. 中国水产科学, 2008, 15(1): 100–105]
- Wiseman S, Osachoff H, Bassett E, *et al.* Gene expression pattern in the liver during recovery from an acute stressor in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 2007, 2(3): 234–244
- Xie MJ, Ou YJ, Li JE, *et al.* A comparative histochemical study on mucous cells in digestive tract of *Eleutheronema tetradactylum* with juvenile, young and adult fish. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2015, 37(9): 1226–1234 [谢木娇, 区又君, 李加儿, 等. 四指马鲛稚鱼、幼鱼和成鱼消化道黏液细胞组织化学研究. 中国细胞生物学学报, 2015, 37(9): 1226–1234]
- Xie MJ, Ou YJ, Li JE, *et al.* Histology observation in digestive tract of *Eleutheronema tetradactylum* at different developmental stages. *South China Fisheries Science*, 2016a, 12(2): 51–58 [谢木娇, 区又君, 李加儿, 等. 不同发育阶段的四指马鲛消化道组织学比较研究. 南方水产科学, 2016a, 12(2): 51–58]
- Xie MJ, Ou YJ, Wen JF, *et al.* Salinity tolerance of fertilized eggs and larva *Eleutheronema tetradactylum*. *Chinese Journal of Ecology*, 2016b, 35(5): 1263–1267 [谢木娇, 区又君, 温久福, 等. 四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)受精卵和仔鱼对不同盐度的耐受性. 生态学杂志, 2016b, 35(5): 1263–1267]
- Xie MM, Peng SM, Zhang CJ, *et al.* Effects of acute temperature stress on antioxidant enzyme activities and immune indexes of juvenile *Pampus argenteus*. *Marine Fisheries*, 2015, 37(6): 541–549 [谢明娟, 彭士明, 张晨捷, 等. 急性温度胁迫对银鲳幼鱼抗氧化和免疫指标的影响. 海洋渔业, 2015, 37(6): 541–549]
- Xu GC, Du FK, Nie ZJ, *et al.* Effects of 10‰ salinity to the plasma osmotic pressure, cortisol, glucose and liver glycogen in *Coilia nasus* stressed during loading and transportation. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 66–72 [徐钢春, 杜富宽, 聂志娟, 等. 10‰盐度对长江刀鲚幼鱼装载和运输胁迫中应激指标的影响. 水生生物学报, 2015, 39(1): 66–72]
- Yang TB, Mei SY. Stress response and antioxidant enzymes. *Space Medicine & Medical Engineering*, 1994, 7(1): 75–78 [杨唐斌, 梅尚筠. 应激反应与抗氧化酶. 航天医学与医学工程, 1994, 7(1): 75–78]
- Yin F, Sun P, Peng SM, *et al.* Effects of low salinity stress on the antioxidant enzyme activities in juvenile *Pampus argenteus* liver and the APTase activities in its gill and kidney. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(4): 1059–1066 [尹飞, 孙鹏, 彭士明, 等. 低盐度胁迫对银鲳幼鱼肝脏抗氧化酶、鳃和肾脏 ATP 酶活力的影响. 应用生态学报, 2011, 22(4): 1059–1066]
- Yu N, Li JE, Ou YJ, *et al.* Effects of salinity stress and diurnal variation on digestive enzyme activity of juvenile grey mullet (*Mugil cephalus*). *South China Fisheries Science*, 2011, 7(6): 52–57 [于娜, 李加儿, 区又君, 等. 盐度胁迫和昼夜变化对鲮鱼幼鱼消化酶活力的影响. 南方水产科学, 2011, 7(6): 52–57]
- Zeng YY, Lai ZN, Yang WL, *et al.* Responses towards oxidative stress of juvenile Guangdong bream *Megalobrama terminalis* to Cu^{2+} and Cd^{2+} exposure. *Ecology and Environmental Sciences*, 2014, 23(12): 1972–1979 [曾艳艺, 赖子尼, 杨婉玲, 等. 广东鲂幼鱼对铜、镉胁迫的氧化应激响应及其指示意义. 生态环境学报, 2014, 23(12): 1972–1979]
- Zhang CJ, Zhang YL, Gao QX, *et al.* Effect of low salinity stress on antioxidant function in liver of juvenile *Nibea albiflora*. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(4): 59–64 [张晨捷, 张艳亮, 高权新, 等. 低盐胁迫对黄姑鱼幼鱼肝脏抗氧化功能的影响. 南方水产科学, 2015, 11(4): 59–64]
- Zhang T, Zhuang P, Liu J, *et al.* Species composition and biodiversity of fish community in Chongming Dongtan of Yangtze River estuary. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28(10): 2056–2062 [张涛, 庄平, 刘健, 等. 长江口崇明东滩鱼类群落组成和生物多样性. 生态学杂志, 2009, 28(10): 2056–2062]

The Effects of Acute Off-Water Handling Stress on the Tissue Structure and Oxidative Stress of Juvenile *Eleutheronema tetradactylum*

LIU Qiqi^{1,2}, WEN Jiufu¹, OU Youjun^{1①}, LI Jiaer¹, ZHOU Hui^{1,2}

(1. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract *Eleutheronema tetradactylum* is subordinate to Mugiliformes, Polynemida, *Eleutheronema* in taxonomy. As a new aquaculture species, it has gained popularity in most farmers in recent years because of the delicious meat, the fast growth, the high market value and other advantages. However, this species is prone to stress from the pulling capture and the transport due to its weak anti-stress ability. In order to understand the effects of acute off-water handling stress on the tissue structure and oxidative stress of juvenile *E. tetradactylum*, we stocked the juvenile fish in the outdoor water tank and stressed them by simulating the pulling capture. The samples were collected at 2 h, 6 h, 12 h and 24 h after the off-water handling stress, and fixed separately with poly formaldehyde and liquid nitrogen. The samples fixed with poly formaldehyde were used in tissue sectioning and we observed the changes in the micro-structure of gills and muscles. The samples fixed with liquid nitrogen were used to examine the activities of antioxidant enzymes in muscles and the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in gills. Results showed that varying degrees of damages were induced in the gill lamella, the squamous epithelium cells and mitochondrion-rich cells (MRC) in 2 h after stress. Firstly, the muscle fiber necrosis appeared and then the gap of muscle fiber became widened, followed by vacuolation and even muscle fiber loss. Superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) had the same changing pattern, which was a significant drop ($P<0.05$) in 2 h after stress, followed by the rise to the highest level 12 h later. Then they began to decline slightly lower than the control level at 24 h. Catalase (CAT) and total antioxidant capacity (T-AOC) did not change significantly ($P>0.05$) at the beginning of 2 h, but then it rose to a highest value at 12 h and subsequently recovered to the normal level at 24 h. The content of malondialdehyde (MDA) did not have a marked change ($P>0.05$), and it reached the highest value at 6 h, and then fell back to the normal value at 24 h. The activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ was elevated ($P<0.05$) at 2 h, stayed stable, and rose again until 12 h when it reached the highest value, then it went back to the normal value at 24 h. In conclusion, muscles and gills of *E. tetradactylum* will be damaged by acute off-water handling stress; besides, the damage will deteriorate as the off-water time goes over. The muscle antioxidant enzyme system will only be activated at 2 h after the handling stress. The synergy may exist between SOD and GSH when the organism was stressed by external factors. At 24 h after the stress, the activities of SOD and CAT will be in a state of equilibrium and the values will be significantly lower ($P<0.05$) than the control level, and this explains that antioxidant enzymes were affected to certain extent by off-water handling stress. In addition, MDA, the degrading product of peroxide lipid, can be used as a biological marker of rapid stress response in *E. tetradactylum*. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in gills can provide energy support during this process to improve the anti-stress ability of *E. tetradactylum*.

Key words *Eleutheronema tetradactylum*; Handling stress; Antioxidant enzymes; $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$

① Corresponding author: OU Youjun, E-mail: ouyoujun@126.com