

Doi: 10.11840/j.issn.1001-6392.2019.05.011

大黄鱼皮质醇无创检测技术研究

蔡晓芳, 李庆昌, 张晓林, 历俊帆, 刘贤德

(集美大学 水产学院 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘 要: 皮质醇是衡量鱼类应激状况的重要参考指标, 从血液中检测皮质醇的常规方法会对鱼造成严重伤害甚至致死。本实验室开发了一种从水中检测皮质醇的技术, 应用该技术比较了大黄鱼高温处理组 (28 °C) 和对照组 (20 °C) 血清与水样中皮质醇含量的变化, 结果显示血清与水样皮质醇的检测结果具有高度的一致性, 且相关性显著 ($P < 0.05$), 说明通过测定水样中的皮质醇来代替血清中的皮质醇是可行的。为进一步验证该方法的效果, 我们又比较了机械应激前后水样中皮质醇含量变化, 结果显示机械胁迫也导致了皮质醇含量的显著升高 ($P < 0.01$)。本技术的建立可为大黄鱼养殖过程中应激状态的无创检测提供参考。

关键词: 大黄鱼; 无创检测; 皮质醇; 高温胁迫

中图分类号: P735; Q503

文献标识码: A

文章编号: 1001-6932(2019)05-0569-05

Study on the non-invasive measuring technology of cortisol in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)

CAI Xiao-fang, LI Qing-chang, ZHANG Xiao-lin, LI Jun-fan, LIU Xian-de

(Fisheries College, Key Laboratory of Mariculture for the East China Sea, the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Cortisol is an important reference indicator to measure the stress status of fish. Conventional detection method of cortisol need sampled blood from fish, which may cause fish injury or even death. In this study, a new technology is developed which can detect cortisol concentration in water. Using this technology the cortisol content in serum and water samples under the condition of high-temperature stress (28 °C) and normal temperature (20 °C) in large yellow croaker are firstly compared. The results showed that the trend of cortisol in serum and water samples were highly consistent and correlated significantly ($P < 0.05$), which suggested the feasibility of this method to measure cortisol in water and can replace cortisol detection in serum. To further verify the effectiveness of the method, the cortisol content in water samples before and after mechanical stress are compared. The results showed that mechanical stress also led to a significant increase of cortisol content in water samples ($P < 0.01$). The technology developed in this experiment can provide reference for non-invasive monitoring of stress state during the culture of large yellow croaker.

Keywords: *Larimichthys crocea*; non-invasive measurement; cortisol; high temperature stress

鱼类的应激反应是在应对诸如温度 (张亚晨等, 2015; 李佳凯等, 2015)、盐度 (Fevolden et al, 2003; 童燕等, 2007)、拥挤 (李爱华, 1997; 王文博等, 2004)、运输 (彭士明等,

2011) 等因素的刺激时, 为了适应外界的环境变化而进行的一种适应性生理反应。硬骨鱼类在受到刺激后, 其体内下丘脑-垂体-肾间组织轴 (HPI 轴) 会迅速起作用, 这一系列的神经反射会促进肾上腺

收稿日期: 2018-06-22; 修订日期: 2018-08-30

基金项目: 福建省自然科学基金 (2019J01694); 福建省高校新世纪人才支持计划 (JA14167); 福建省大学生创新训练项目 (201810390051)。

作者简介: 蔡晓芳 (1992-), 硕士研究生, 主要从事水产动物遗传育种研究。电子邮箱: 2921611402@qq.com。

通讯作者: 刘贤德, 教授。电子邮箱: xdlu@jmu.edu.cn。

腺皮质激素(ACTH)的分泌, ACTH作用于肾间组织, 进而使头肾细胞合成并释放糖皮质激素, 引起以皮质醇为主的糖皮质激素含量增加(韦海明, 2014; Mercado et al, 2018), 因此, 常将皮质醇作为反映鱼类应激程度的一个重要参考指标(Santos et al, 2010; Ellis et al, 2012)。皮质醇是一种抑制生长的类固醇, 高浓度和较长时间的作用会对鱼体造成严重的伤害, 因此, 实时检测鱼体皮质醇浓度是非常必要的。皮质醇浓度的常规检测是通过采集血清或血浆进行, 但取血过程会对鱼体造成严重伤害甚至致其死亡, 也违反了动物福利原则。因此, 亟须开发一种对鱼体伤害程度小或无创的皮质醇检测技术。Scott等(2007)的研究发现, 鱼类血浆中的游离皮质醇可通过鳃分泌到水中, 且与血浆中皮质醇含量呈正相关。目前, 已在欧洲海鲈(*Dicentrarchus labrax*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)、丽鱼(*Amatitlania nigrofasciata*)上报道了从水中检测皮质醇的方法(Fanouraki et al, 2008; Ellis et al, 2004; Ruane et al, 2003; Wong et al, 2008; Sebire et al, 2007; Ellis et al, 2007), 但在大黄鱼上尚未见到相关报道。

大黄鱼(*Larimichthys crocea*)隶属鲈形目、石首鱼科、黄鱼属, 为传统“四大海产”之一, 是我国近海主要经济鱼类, 其出口量在海水鱼类中位列第一, 2016年大黄鱼的养殖产量达到16.55万吨(农业部渔业局, 2017)。大黄鱼对外界刺激非常敏感, 在养殖过程中大黄鱼经常遭受高温、台风、分鱼、换网等刺激(所以, 本实验采用高温和机械搅拌作为应激源), 常常导致大黄鱼生长减缓、体质变弱、疾病易发和死亡率增加(陈小明等, 2017), 因此, 开发一种方便快捷、又不伤害大黄鱼的皮质醇检测方法, 对于实时监测大黄鱼养殖过程中应激程度并及时采取应对措施具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2017年12月至2018年4月, 从厦门海鲜市场购买规格统一(体重 210 ± 10.5 g, 体长 24 ± 1 cm)、健康无伤的大黄鱼用作实验材料。大黄鱼首先在实验

室水族箱中暂养一周, 暂养期间水温为 20 ± 0.5 ℃, pH为7.5, 连续曝气, 每天投喂普通商业配合饲料, 每天投喂量为体重1.5%, 每天早晚换水两次, 换水量为总水量的75%。

1.2 实验设计与样品采集

首先以高温为应激源, 检测高温胁迫条件下和常温下血清中皮质醇浓度和水中皮质醇浓度, 并分析二者的相关性, 初步确定从水中检测皮质醇方法的有效性及其可靠性, 然后应用机械应激对上述建立的方法进行验证。

高温应激实验: 实验分为实验组(28℃)和对照组(20℃), 实验组和对照组实验分别在5个21L的独立水箱中进行, 每组实验均重复7次。实验组的5个水箱先用加热棒将温度加热到28℃, 实验时将每个水箱中各放入3条大黄鱼后, 开始计时, 在0h、0.5h、1h、1.5h、2h五个时间点分别采集各自水箱中的水样, 每次采集500mL, 采集水样后, 将实验鱼用丁香酚(0.03mL/L)麻醉3~5min, 使用无菌注射器从尾静脉采集血液, 每条鱼采集1mL血液。采集的水样与血样立即进行接下来的处理或者放入-20℃冰箱备用。

机械应激实验: 实验分为实验组(木棒搅拌10分钟)和对照组(不搅拌), 实验组和对照组实验分别在5个21L的独立水箱中进行, 每组实验均重复7次。实验组, 将每个水箱中各放入3条大黄鱼后, 采集一次水样, 记为0h, 然后用木棒搅拌10分钟, 分别在0.5h、1h、1.5h、2h四个时间点对水样都进行采集; 对照组(不搅拌), 将每个水箱中各放进3条大黄鱼后, 分别在0h、0.5h、1h、1.5h、2h五个时间点对水样都进行采集。每次采集的水样均为500mL, 采集的水样立即进行接下来的处理或者放入-20℃冰箱待测。

在以上实验过程中全程戴手套, 以防止外源污染。

1.3 样品处理

水样处理: 水样中皮质醇浓度的测定参考Brüning等(2015)的方法并略有改动, 先通过固相萃取对水样中皮质醇进行浓缩, 再采用酶联免疫法对其含量进行测定。固相萃取柱填料为SiliaSphere PCC18 polymeric, 50μm, 120Å, 酶联免疫检测采用皮质醇检测试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)。具体步骤为: ①称取2g的硅胶作填料装柱,

②用 10 mL 乙醇 (分析纯) 活化萃取柱, ③10 mL 去离子水洗涤, ④0.45 μm 微孔滤膜过滤水样后上柱, ⑤10 mL 去离子水冲洗柱子, ⑥5 mL 乙醇 (分析纯) 洗脱柱子, ⑦50 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干得到提取物, ⑧提取物用 1 mL 磷酸缓冲液溶解 (PBS, 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 8 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.47 mmol/L KH_2PO_4 ; pH7.4), ⑨皮质醇试剂盒检测。

血样处理: 血样静置 1~2 h 后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 3 000 r/min 速率离心 10 min, 收集血清, 同一水箱的 3 条鱼血清置于同一 Eppendorf 管中混匀, 放于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。血清中皮质醇的浓度直接取血清用皮质醇试剂盒进行检测。

1.4 数据分析

数据使用 Excel 2013 和 IBM SPSS 22.0 进行统计学计算和分析, 数据结果以平均值 \pm 标准误差 (mean \pm SE) 表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著, 采用 Excel 2013 软件作图。

表 1 急性高温应激下大黄鱼血清皮质醇含量的测定结果 (ng/mL)

温度	处理时间/h				
	0	0.5	1	1.5	2
20 $^{\circ}\text{C}$	11.96 \pm 1.09	25.64 \pm 0.80	21.88 \pm 0.83	28.05 \pm 0.08	17.42 \pm 2.19
28 $^{\circ}\text{C}$	14.33 \pm 1.91	45.70 \pm 5.60*	40.08 \pm 3.87**	55.56 \pm 3.85**	32.77 \pm 1.43**

注: * 表示同一列 20 $^{\circ}\text{C}$ (对照组) 与 28 $^{\circ}\text{C}$ (实验组) 之间差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

表 2 急性高温应激下大黄鱼水样皮质醇含量的测定结果 (ng/mL)

温度	处理时间/h				
	0	0.5	1	1.5	2
20 $^{\circ}\text{C}$	14.11 \pm 0.75	17.89 \pm 2.60	16.69 \pm 1.30	17.96 \pm 1.26	14.34 \pm 1.43
28 $^{\circ}\text{C}$	14.11 \pm 0.75	24.42 \pm 1.41*	22.96 \pm 1.71**	23.40 \pm 3.07**	21.23 \pm 1.09**

注: * 表示同一列 20 $^{\circ}\text{C}$ (对照组) 与 28 $^{\circ}\text{C}$ (实验组) 之间差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.2 大黄鱼血清皮质醇浓度与水中皮质醇浓度的相关分析

在高温胁迫条件下, 血清皮质醇和水样中皮质醇含量都有明显变化, 两种皮质醇含量都呈现先上升, 再下降, 再上升, 再下降的变化趋势, 其含量变化趋势高度一致, 水样皮质醇浓度变化与血清皮质醇浓度变化相比有略微滞后现象 (图 1)。水样皮质醇含量与血清皮质醇含量有显著正相关的关系, Pearson 相关系数为 0.972 ($P < 0.01$)。以上结果初步说明可以通过测水样皮质醇含量来替代血清皮质醇含量, 作为评估鱼体应激程度的应激指标。

2 结果

2.1 急性高温应激下血清和水中皮质醇含量测定结果

实验组和对照组大黄鱼血清皮质醇含量的测量结果如表 1 所示, 在 0 h 时 (即没有应激), 实验组与对照组的血清皮质醇含量没有显著差异 ($P > 0.05$), 在实验进行到 0.5 h 时, 实验组和对照组的血清皮质醇含量出现显著性差异 ($P < 0.05$), 在实验进行到 1 h、1.5 h、2 h 时, 出现极显著性差异 ($P < 0.01$)。

实验组和对照组大黄鱼水样皮质醇含量的测量结果如表 2 所示, 在 0 h 时 (即没有应激), 实验组和对照组的水样皮质醇含量没有显著差异 ($P > 0.05$), 实验组和对照组的水样皮质醇含量也在实验进行到 0.5 h 时出现显著性差异 ($P < 0.05$), 在实验进行到 1 h、1.5 h、2 h 时出现极显著性差异 ($P < 0.01$)。

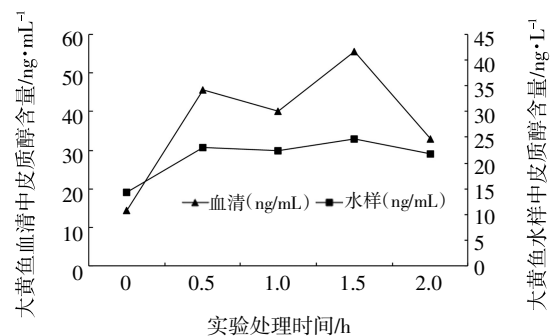


图 1 高温胁迫条件下 (28 $^{\circ}\text{C}$) 大黄鱼血清与水样皮质醇含量变化结果

2.3 机械应激前后水样皮质醇含量的变化

为进一步验证水样皮质醇含量作为评估鱼体应激程度的有效性,本实验进行了机械应激实验验证。实验组和对照组大黄鱼水样皮质醇含量的测量结果如表3所示,在0 h时(即没有应激),实验组

和对照组的水样皮质醇含量没有显著差异($P>0.05$),实验组和对照组的水样皮质醇含量也在实验进行到0.5 h时出现显著性差异($P<0.05$),1 h、1.5 h时也有显著性差异,而2 h时不再有显著性差异($P>0.05$)。

表3 机械应激下大黄鱼水样皮质醇含量的测定结果 (ng/L)

组别	时间/h				
	0	0.5	1	1.5	2
对照组	15.16±0.51	16.55±0.73	14.84±0.74	15.09±0.47	15.37±0.58
实验组	14.72±1.40	28.55±3.08*	24.28±3.09*	23.82±2.89*	21.77±1.98

注:*表示同一列对照组与实验组之间差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

血液中皮质醇浓度是衡量鱼体应激状态的一个重要参考指标,通常采用血浆(Jentof et al, 2005; 施慧雄等, 2010)或者血清(张伟等, 2014)进行测量,由于采血会对鱼体造成伤害,本实验室开发了一种从水中测定皮质醇的方法,经高温和机械应激实验检测,可以代替通过血液测定皮质醇的方法。考虑到血浆的制备相对于血清烦琐,且研究表明血浆与血清皮质醇含量相差无几(侯亚利等, 1998),故本研究均以血清皮质醇为参照指标与水中检测到皮质醇进行比较。

水温是影响鱼类营养吸收、生长代谢、免疫应答等一系列生理活动的重要因子(朱祥宇等, 2013; 杨振才等, 1995; 陈家炜等, 2017; 罗胜玉等, 2017),且温度可量化并具有很好的可控性,故本研究采用温度突变作为应激源进行本项技术的检验。在本实验室前期的研究中(李庆昌等, 2016),已证实在高温胁迫下,大黄鱼血清中皮质醇水平显著升高,本研究也得到类似的结果。同时,本研究也证明,水样皮质醇含量在高温胁迫下的变化趋势与血清中皮质醇含量变化趋势基本一致,经分析发现水样中皮质醇浓度与血清皮质醇浓度呈显著正相关($P<0.05$),这与Fanouraki(2008)的研究结果一致,说明通过检测水中皮质醇含量来衡量鱼的应激状况是可行的。

为进一步验证这一方法的效果,本实验又进行了一组机械应激实验。对照组的5个时间点的结果

有一些波动,可能有两方面原因,一方面是鱼在放入水箱后会分泌皮质醇到水体中,另一方面是皮质醇本身会降解。在本实验中,机械应激实验组与对照组水样中的皮质醇浓度在0.5 h、1 h、1.5 h差异显著($P<0.05$),而2 h时差异不显著($P>0.05$),造成这一结果的原因可能与皮质醇降解有关。此结果进一步证实了该方法的有效性和可靠性。

4 结论

本实验开发了一种大黄鱼皮质醇的无创检测技术,该方法具有零干扰、无伤害、可重复操作、简单易行等诸多优点。经大黄鱼高温胁迫及机械胁迫实验验证,具有可行性,可推广到大黄鱼养殖过程中应激状况的检测上。

参 考 文 献

- Brüning A, Hölker F, Franke S, et al, 2015. Spotlight on fish: Light pollution affects circadian rhythms of European perch but does not cause stress. *Science of the Total Environment*, 511: 516–522.
- Ellis T, James J D, Stewart C, et al, 2010. A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 65(5): 1233–1252.
- Ellis T, James J D, Sundh H, et al, 2007. Non-invasive measurement of cortisol and melatonin in tanks stocked with seawater Atlantic salmon. *Aquaculture*, 272(1–4): 698–706.
- Ellis T, Yildiz HY, LópezOlmeda J, et al, 2012. Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1): 163–188.
- Fanouraki E, Papandroulakis N, Ellis T, et al, 2008. Water Cortisol Is a Reliable Indicator of Stress in European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*. *Behaviour*, 145(10): 1267–1281.

- Fevolden S E, Roed K H, Fjalestad K, 2003. A combined salt and confinement stress enhances mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high stress responsiveness. *Aquaculture*, 216(1): 67-76.
- Jentoft S, Aastveit A H, Torjesen P A, et al, 2005. Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry & Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology*, 141(3): 353-358.
- Mcleay D J, 1975. Variations in the pituitary-interrenal axis and the abundance of circulating blood-cell types in juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during stream residence. *Canadian Journal of Zoology-revue Canadienne De Zoologie*, 53(12): 1882-1891.
- Mercado E D, Larrán A M, Pinedo J, et al, 2018. Skin mucous: A new approach to assess stress in rainbow trout. *Aquaculture*, 484.
- Pickering A. D, Pottinger T. G, Christie P, 2010. Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L. from acute handling stress: a time-course study. *Journal of Fish Biology*, 20(2): 229-244.
- Ruane N M, Komen H, 2003. Measuring cortisol in the water as an indicator of stress caused by increased loading density in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 218(1): 685-693.
- Santos G A, Schrama J W, Rep M, et al, 2010. Chronic stress impairs performance, energy metabolism and welfare indicators in European seabass (*Dicentrarchus labrax*): The combined effects of fish crowding and water quality deterioration. *Aquaculture*, 299(1): 73-80.
- Schreck C B, 1981. Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. *Stress & Fish*, 10(3): 245-258.
- Schreck C B, 1982. Stress and rearing of salmonids. *Aquaculture*, 28(1): 241-249.
- Scott A P, Ellis T, 2007. Measurement of fish steroids in water—a review. *General & Comparative Endocrinology*, 153(1-3): 3-92.
- Sebire M, Katsiadaki I, Scott A P, 2007. Non-invasive measurement of 11-ketotestosterone, cortisol and androstenedione in male three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *General & Comparative Endocrinology*, 152(1): 30.
- Wong S C, Dykstra M, Campbell J M, et al, 2008. Measuring Water-Borne Cortisol in Convict Cichlids (*Amatitlania nigrofasciata*): Is the Procedure a Stressor? *Behaviour*, 145(10): 1283-1305.
- 陈家炜, 张海滨, 2017. 压力及温度对海洋动物生理影响的研究进展. *海洋通报*, 36(6): 601-610.
- 陈小明, 李佳凯, 王志勇, 等, 2017. 基于简化基因组测序的大黄鱼耐高温性状全基因组关联分析. *水生生物学报*, 41(4): 735-740.
- 侯亚利, 田瑞环, 田军旗, 等, 1998. 放免法测定血清和血浆皮质醇浓度的对比分析. *神经药理学报*, 1998(3): 76-76.
- 李爱华, 1997. 拥挤胁迫对草鱼血浆皮质醇、血糖及肝脏中抗坏血酸含量的影响. *水生生物学报*, 21(4): 384-386.
- 李佳凯, 王志勇, 刘贤德, 等, 2015. 高温对大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 幼鱼血清生化指标的影响. *海洋通报*, 34(4): 457-462.
- 李庆昌, 陈小明, 刘贤德, 2016. 突变高温胁迫对大黄鱼血清生理指标的影响. *渔业研究*, 38(6): 437-444.
- 罗胜玉, 徐冬冬, 楼宝, 等, 2017. 低温胁迫对黄姑鱼 (*Nibea albiflora*) 抗氧化酶、Na⁺/K⁺-ATP 酶及 Hsp70 蛋白含量的影响. *海洋通报*, 36(2): 189-194.
- 农业部渔业局, 2017. 中国渔业统计年鉴 2017. 北京: 中国农业出版社.
- 彭士明, 施兆鸿, 李杰, 等, 2011. 运输胁迫对银鲟血清皮质醇、血糖、组织中糖元及乳酸含量的影响. *水产学报*, 35(6): 831-837.
- 施慧雄, 焦海峰, 尤仲杰, 等, 2010. 船舶噪声对鲈鱼和大黄鱼血浆皮质醇水平的影响. *生态学报*, 30(14): 3760-3765.
- 童燕, 陈立侨, 庄平, 等, 2007. 急性盐度胁迫对施氏鲟的皮质醇、代谢反应及渗透调节的影响. *水产学报*, 31(b09): 38-44.
- 王文博, 李爱华, 汪建国, 等, 2004. 拥挤胁迫对草鱼非特异性免疫功能的影响. *水产学报*, 28(2): 139-144.
- 韦海明, 2014. 黄芪和维生素 C 对大黄鱼抗应激的影响. 山东青岛: 中国海洋大学.
- 杨振才, 谢小军, 1995. 鲈鱼的静止代谢率及其与体重、温度和性别的关系. *水生生物学报*, 19(4): 368-373.
- 张伟, 王有基, 李伟明, 等, 2014. 运输密度和盐度对大黄鱼幼鱼皮质醇、糖元及乳酸含量的影响. *水产学报*, 38(7): 973-980.
- 张亚晨, 温海深, 李兰敏, 等, 2015. 急性温度胁迫对妊娠期许氏平鲈血清皮质醇和血液生理指标的影响. *水产学报*, 39(12): 1872-1882.
- 朱祥宇, 高勤峰, 董双林, 2013. 不同温度对草鱼 C、N、P 营养要素收支的影响. *水产学报*, 37(10): 1521-1526.

(本文编辑: 袁泽轶)