



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼的染色效果以及对其氧化应激响应

The dyeing effect of ARS on Juvenile *Spinibarbus sinensis* and
oxidative stress response to it

研究生: 霍来江

CANDIDATE: HUO LAI JIANG

导师: 危起伟 研究员

SUPERVISOR: PROF. WEIQIWEI

专业: 渔业资源

MAJOR: Fishery resources

中国 武汉

WUHAN, CHINA

二〇一五年六月

JUNE, 2015

分类号

密级

华中农业大学硕士学位论文

茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼的染色效果以及对其氧化应激响应

**The dyeing effect of ARS on Juvenile *Spinibarbus sinensis* and
oxidative stress response to it**

研 究 生：霍来江

学 号：2012308110057

指 导 教 师：危起伟 研究员

指 导 小 组：杜 浩 副研究员

吴金明 助理研究员

专业：渔业资源

研究方向：珍稀鱼类保护

获得学位名称：农学硕士

获得学位时间：2015 年 6 月

华中农业大学水产学院

二〇一五年六月

目录

摘要	i
ABSTRACT	iv
第一章 文献综述	1
1.1 中华倒刺鲃物种特性及研究进展	1
1.1.1 中华倒刺鲃简介	1
1.1.2 形态特征	2
1.1.3 生活习性	2
1.1.4 中华倒刺鲃的研究进展	3
1.2 增殖放流中的标记技术	4
1.2.1 水生生物标记技术分类	5
1.2.2 选择并开发最佳的标记技术	6
1.2.3 鱼类化学物质浸泡标记的研究进展	6
1.3 鱼类应激生物学	7
1.3.1 鱼类的应激反应	7
1.3.2 常见的鱼类应激原	8
1.3.3 应激与鱼类血液生理反应	8
1.3.4 应激与鱼类抗氧化机制	9
1.4 研究目的与意义	13
第二章 茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼的急性毒性	14
2.1 前言	14
2.2 材料与方法	15
2.2.1 实验材料	15
2.2.2 实验药品及溶液配制	15
2.2.3 实验条件	15

2.2.4 实验方法	15
2.2.5 数据统计与分析	16
2.3 结果与分析.....	16
2.3.1 中华倒刺鲃幼鱼中毒症状	16
2.3.2 茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼的急性毒性	17
2.4 讨论.....	18
2.5 结论.....	19
第三章 茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼的染色效果.....	20
3.1 前言.....	20
3.2 材料与方法.....	21
3.2.1 实验材料与条件	21
3.2.2 实验方法	21
3.2.3 样品解剖与荧光标记观察	21
3.3 染色结果.....	22
3.4 讨论.....	22
3.4.1 茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼的染色效果	22
3.4.2 适合荧光标记的浓度、时间以及鱼类阶段的选择	23
3.5 结论.....	25
第四章 茜素红 S 对幼鱼血液生化指标的影响.....	26
4.1 前言.....	26
4.2 材料与方法.....	27
4.2.1 实验用鱼	27
4.2.2 实验条件	27
4.2.3 实验方法	27
4.2.4 数据统计	28

4.3 实验结果	28
4.3.1 茜素红 S 浸泡 24 h 后幼鱼的血液生化指标	28
4.3.2 暂养 5 d 后幼鱼的血液生化指标.....	29
4.3.3 暂养 10 d 后幼鱼的血液生化指标.....	29
4.4 讨论	29
4.4.1 茜素红 S 浸泡 24 h 后对幼鱼血液蛋白质的影响	29
4.4.2 茜素红 S 浸泡 24 h 对幼鱼血液葡萄糖和总胆固醇的影响	30
4.4.3 ARS 浸泡 24 h 后对幼鱼血液转氨酶活性的影响.....	34
4.4.4 ARS 浸泡 24 h 后对幼鱼血液中肌酐和碱性磷酸酶的影响.....	35
4.5 结论	36
第五章 茜素红 S 对幼鱼不同组织抗氧化酶系统的影响	37
5.1 前言	37
5.2 材料与方法	38
5.2.1 实验用鱼.....	38
5.2.2 实验条件.....	38
5.2.3 实验方法.....	38
5.2.4 组织匀浆的制备及酶活性的测定.....	38
5.2.5 数据统计.....	39
5.3 实验结果	39
5.3.1 茜素红 S 浸泡 24 h 后脑组织抗氧化酶活性	39
5.3.2 茜素红 S 浸泡 24 h 后鳃组织抗氧化酶活性	39
5.3.3 茜素红 S 浸泡 24 h 后肝脏组织抗氧化酶活性	40
5.3.4 茜素红 S 浸泡 24 h 后不同组织丙二醛的含量	42
5.3.5 暂养后脑组织抗氧化酶活性的恢复.....	42
5.3.6 暂养后鳃组织抗氧化酶活性的恢复.....	43

5.3.7 暂养后肝脏组织抗氧化酶活性的恢复	45
5.3.8 暂养后不同组织丙二醛含量的变化	47
5.4 讨论.....	48
5.4.1 茜素红 S 浸泡 24 h 后对不同组织抗氧化酶的影响	48
5.4.2 茜素红 S 浸泡 24 h 后对不同组织脂质过氧化的影响	50
5.4.3 暂养后幼鱼不同组织抗氧化酶活性的恢复	50
5.4.4 暂养后幼鱼不同组织脂质过氧化的变化	51
5.5 结论.....	52
第六章 结论与荧光染色标记建议.....	54
附 图.....	55
参考文献.....	57
附录 I	67
附录 II	68
致 谢.....	69

摘要

中华倒刺鲃 (*Spinibarbus sinensis*) 隶属于鲤形目 (Cypriniformes)、鲤科 (Cyprinidae)、鲃亚科 (Barbinae)、倒刺鲃属 (*Spinibarbus*)，探求一种适合标记放流鱼类的方法是对其进行跟踪监测以及评估人工增殖放流效果的重要前提，目前应用于仔稚鱼标记效果最理想的是化学荧光物质标记，在国内相关研究中，大多数仅关注其浓度的选择，浸泡时间一般都规定在 24 h，并且仅关注染色效果与浓度的关系，很少关注荧光物质浸泡对标记鱼类是否造成损伤及损伤程度，荧光物质对不同发育阶段的标记鱼类毒性大小等问题。本研究以人工繁殖的中华倒刺鲃幼鱼作为实验材料，采用静态毒理试验方法研究茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼毒性，并连续监测浸泡 24 h 后，以及转入清水暂养 5 d，10 d 后其不同组织抗氧化酶系统以及血液生化指标的变化，初步评价茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼毒性强弱，说明其对放流鱼类的安全性；同时探究茜素红 S 对鱼体产生的氧化应激反应，了解其对幼鱼生理生化的影响，最终结合耳石，鳞片的荧光染色效果找出最适合中华倒刺鲃幼鱼的染色浓度。目的在于探寻对中华倒刺鲃幼鱼安全而有效的化学标记方法，为后续探求中华倒刺鲃幼鱼的人工增殖放流标记方法提供科学参考。

本研究主要的主要结果如下：

1、茜素红 S 染液对中华倒刺鲃幼鱼的 LC_{50} (24)、 LC_{50} (48)、 LC_{50} (72)、 LC_{50} (96) 以及安全浓度 (SC) 的质量浓度分别为 788.3、744.5、653.5、595.6 和 59.56 mg/L，说明 ARS 对中华倒刺鲃幼鱼的毒性为低毒性，适合其幼鱼标记放流。

2、茜素红 S 浸泡形成的标记在荧光显微镜下呈红色，并且在绿色激发光下观察效果最佳。耳石和鳞片的标记率与标记质量随着 ARS 浓度升高不断升高。除 100 mg/L 浓度组外，其他浓度组耳石标记率达到 91.7%。100 mg/L，200 mg/L 浓度组中的标记效果不理想；而 ≥ 300 mg/L 浓度组星耳石和微耳石标记质量良好 ($n \geq 2$) 的百分比分别超过 95.9%和 84.5%，标记效果理想。同时观察鳞片的染色效果发现：各个浓度组的标记效果均不理想。星耳石染色效果质量 ($n \geq 2$) 优于微耳石，耳石染色效果优于鳞片。

3、血液生化指标的研究表明：茜素红 S 浸泡 24 h 后，幼鱼血浆中 TP、GLB、CRE 随着 ARS 浓度的升高而升高，当 ARS 浓度 ≥ 300 mg/L 时，实验组与对照组存在极显著差异 ($p < 0.01$)，ALB、ALP、GLU 随着 ARS 浓度的升高表现为先升高后下降，分别在 300 mg/L、200 mg/L、300 mg/L 浓度时达到峰值；AST、ALT 随着 ARS 浓度的升高先降低后升高，均在 100 mg/L 浓度组达到最小值。

暂养 5 d 后，幼鱼血浆中 TP，ALB，GLB，T-CHO，ALP，CRE 的变化趋势基本一致，ARS 浓度 ≥ 300 mg/L 时，6 个指标随浓度升高而降低，并且 400 mg/L，500 mg/L 浓度组的数值显著低于对照组 ($p < 0.05$)；只有 500 mg/L 浓度组 GLU 显著低于对照组；ALT，AST 的变化一致，当 ARS 浓度 ≥ 300 mg/L 时，转氨酶随其浓度升高不断升高，其 400 mg/L，500 mg/L 浓度组转氨酶显著高于对照组 ($p < 0.05$)。暂养 10 d 后，除 500 mg/L 浓度组生化指标与对照组有显著差异外 ($p < 0.05$)，其它浓度组各生化指标均与对照组无显著差异。结合 3 次血液生化指标综合分析可得：ARS 浓度 ≤ 200 mg/L 时，对幼鱼比较安全；ARS 浓度 ≥ 300 mg/L 时，幼鱼虽不会出现死亡，但对鳃、肝脏、肾脏等组织器官会造成一定程度损伤，300 mg/L，400 mg/L 浓度浸泡过后组织受到的损伤在暂养 5 d 后可在自身的代偿作用下得以恢复；而 500 mg/L 浓度所造成的组织损伤经 10 d 暂养仍未恢复，所以对中华倒刺鲃幼鱼进行标记时其浓度不能超过 400 mg/L。

4、通过研究不同浓度茜素红 S 对其不同组织抗氧化酶 (SOD、CAT、GSH-Px) 活性和丙二醛 (MDA) 含量的变化，评估茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼生理生化的影响。结果表明：不同浓度茜素红 S 胁迫下，除脑组织 GSH-Px 随着茜素红 S 浓度的提升不断升高外，肝脏、鳃和脑组织抗氧化酶活性均表现为低浓度被诱导而高浓度受抑制的规律，与茜素红 S 浓度呈抛物线型剂量效应关系。肝脏，鳃，脑组织抗氧化酶活性达到最大值所对应浓度分别是 300 mg/L、300 mg/L、400 mg/L。暂养 5 d 后，随着 ARS 浓度的升高，脑组织 3 种抗氧化酶 (SOD，CAT，GSH-Px) 活性依然表现为不断升高趋势；而肝脏、鳃组织抗氧化酶活性均表现为先升高后下降，并且 400 mg/L 浓度组抗氧化酶的活性最高，500 mg/L 浓度组抗氧化酶活性最低。暂养 10 d 后，只有 500 mg/L 浓度组不同组织抗氧化酶与对照组有显著差异 ($p < 0.05$)。

浸泡 24 h 后，除鳃部 MDA 含量随着茜素红 S 浓度升高不断升高外，脑和肝脏组织 MDA 含量随着茜素红 S 浓度的升高呈现先降低后上升趋势。暂养 5 d 后，脑组织 MDA 含量随着 ARS 浓度升高先下降后升高，400 mg/L 浓度组 MDA 含量最低 ($p < 0.05$)，500 mg/L 浓度组含量最高 ($p < 0.05$)；鳃组织 MDA 含量随着 ARS 浓度升高不断升高， ≥ 300 mg/L 浓度组 MDA 含量显著高于对照组 ($p < 0.05$)；肝脏组织 MDA 含量随 ARS 浓度升高先降低后升高，500 mg/L 浓度组 MDA 含量最高，显著性高于对照组 ($p < 0.05$)。暂养 10 d 后，仅 500 mg/L 浓度组鳃，肝脏组织 MDA 含量显著高于对照组 ($p < 0.05$)。研究表明：不同组织抗氧化酶系统对茜素红 S 的胁迫具有组织特异性，ARS 浓度过高会对幼鱼不同组织会造成氧化损伤。鳃组织对茜素红 S 的胁迫敏感性最高，因此在荧光浸泡标记过程中，选择适宜茜素红 S 浓度染色时，应考虑鳃组织的敏感度，并保持水体氧气充足。

关键词：茜素红 S；中华倒刺鲃；染色效果；生化指标；抗氧化酶；丙二醛

ABSTRACT

Spinibarbus sinensis belongs to *Spinibarbus*, Barbinae, Cyprinidae, Cypriniformes. To explore a method which is suitable for the releasing fish is an important prerequisite about the effect of monitoring and evaluation of artificial enhancement. At present, immersing fish in fluorescent dyes is the most prefectest method. Now domestic studies on immersing fish with fluorescent dyes are focusing on the choice of fluorescent pigments and immersion concentrations, and immersion time is always set at 24 h. However, there is little known about the effect of marking with different immersion concentrations, different size of fish and the impact degree caused by the stress when immersing fish in fluorescent dyes. In present study, we used the juvenile *Spinibarbus sinensis* as experiment model to research the toxicity of alizarin red S to the juvenile *Spinibarbus sinensis*. Then the antioxidant enzymes and blood biochemical index were studied after immersing 24 h, transferring into freshwater 5 d, 10 d to assess the toxicity of alizarin red S to the juvenile *Spinibarbus sinensis* and to test its security. At the same time, exploring the resistance-responsive caused by alizarin red S to know the effect of the physiology and biochemistry. Then based on the dyeing effect of otolith and scales to find out the suitable marking concentration and immersion time for juvenile *Spinibarbus sinensis*. These results could provide theoretical basis and reference for marking techniques in living aquatic resources enhancement. The main results were as follows:

1. The results showed that the 24 h, 48 h, 72 h, 96 h median lethal dose and safe dose of alizarin red S for juvenile *Spinibarbus sinensis* were 788.3、744.5、653.5、595.6 and 59.56 mg/L, it showed that the toxicity of alizarin red S were low for juvenile *Spinibarbus sinensis*, and it were feasible to mark releasing activity.

2. The stained mark were red which soaked in alizarin red S, and the best results should be observed under green excitation light. The mark efficiency and quality of otoliths and scales increased with alizarin red S concentration rising. In addition to 100 mg/L concentration group, other concentrations otolith mark rate reached 91.7%. The effect of marking were not ideal in 100 mg/L, 200 mg/L concentration group; when alizarin red S concentrations were more than 300 mg/L, good quality mark ($n \geq 2$) percentage of asteriscus and lapillus were respectively over 95.9% and 84.5%, the effect of marking were ideal. Meanwhile observeing the dyeing effect of scales found: the effect

of marking were not ideal in all of concentration groups. The dyeing quality of asteriscus were better than lapillus, the dyeing quality of otolith were better than scales.

3. The research of blood biochemical parameters showed that: after alizarin red S soaking 24h, the levels of TP, GLB, CRE in plasma increased with the alizarin red S concentration riseing, when concentration of alizarin red S were more than 300 mg/L, there was extremely significant difference ($p < 0.01$) between experimental group and control group. With the alizarin red S increaseing the concentration of ALB, ALP, GLU showed increased firstly and then decreased, the peak valuer were in 300 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L espectively, the concentration of AST, ALT increased firstly and then decreased with ARS concentration increaseing, the minimum were both in the 100 mg/L concentration group.

Temporary culture 5 d later, The change trend of TP, ALB, GLB, T-CHO, ALP, CRE in juvenile plasma were basically consistent, when concentration of alizarin red S were more than 300 mg/L, the 6 indicators decreased with concentration of alizarin red S increasing, and the value in 400 mg/L, 500 mg/L experimental group were significantly lower than the control group ($p < 0.05$); only the value of GLU in 500 mg/L concentration group was significantly lower than the control group; The change trend of AST, ALT in juvenile plasma were consistent, when concentration of alizarin red S were more than 300 mg/L, the value of transaminase increased constantly with concentration of alizarin red S increasing, the value of transaminase in 400 mg/L, 500 mg/L concentration groups was significantly higher than the control group ($p < 0.05$). Temporary culture 10 days later, in addition to the biochemical index in 500mg/L concentration group were significant differences with control group ($p < 0.05$), there were no difference between other concentrations with control group. The result combined with 3 times data of blood biochemical parameters showed: when the dyeing concentration of alizarin red S were lower than 200 mg/L, it was safe for juvenile *S. sinensis*; when the dyeing concentration of alizarin red S were equal to and higher than 300 mg/L, although juvenile *S. sinensis* can not be dead, but it would cause damage to gill, liver, kidneys and other organs in a certain degree. The tissue damage which were coused in 300 mg/L, 400 mg/L concentration can be restored after temporary culture of 5 d; The tissue damage which were coused in 500 mg/L concentration can not be restored after temporary culture of 10

d, so the concentration of alizarin red S can not exceed 400 mg/L during soaking juvenile *S. sinensis*.

4. Through researching the activity of antioxidant enzymes (CAT, SOD, GSH-Px) of different tissues and change of malondialdehyde (MDA) content in different concentration of alizarin red S, it can be evaluation the effect of alizarin red S on he physiological and biochemical for juvenile *spinibarbus sinensis*. The results showed that under the stress of different concentration of alizarin red S, in addition to GSH-Px activity of brain tissue increased with concentration of alizarin red S rising, antioxidant enzyme activity of brain, liver and gill in the test groups present the same rule that low concentrations were induced and high concentration of inhibition. It present a dose effect of parabolic type relationship between antioxidant enzyme activity and concentration of alizarin red S. The concentration which liver, gill, brain reached the maximum of antioxidant enzyme activity corresponded respectively were 300 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L. After temporary culture 5 d, 3 kinds of antioxidase activity of the brain tissue still showed a rising trend with the increasing of alizarin red S concentration; but 3 kinds of antioxidase activity of liver and gill tissue were firstly increased and then decreased, antioxidant enzyme activity in 400 mg/L concentration group was the highest and antioxidant enzyme activity in 500 mg/L group was the lowest. Temporary culture 10 d later, only antioxidant enzymes of different tissues in 500 mg/L concentration group had significant difference with control group ($p < 0.05$).

After 24 h immersion, except that the MDA content of the gills were continuously rising with alizarin red S concentration increasing. the MDA content of the brain and liver tissue decreased firstly and then increased with alizarin red S concentration increasing, After temporary culture 5 d, The content of MDA in brain tissue firstly decreased and then increased with the increasing of alizarin red S concentration, The MDA content of 400 mg/L concentration was the lowest ($p < 0.05$), The MDA content of 500 mg/L concentration was the highest ($p < 0.05$); The content of MDA in gill constantly creased with increasing of alizarin red S concentration, The content of MDA in more than 300 mg/L concentration groups was significant higher than control group ($p < 0.05$); The content of MDA in liver tissue firstly decreased and then increased with increasing of alizarin red S concentration, The content of MDA in 500 mg/L concentration group was the highest, significantly higher than the control group ($p < 0.05$). Temporary culture 10 d

later, only the content of MDA in 500 mg/L concentrations group in liver and gill tissue were significantly higher than control group ($p < 0.05$). Research showed that: the antioxidant enzyme system in different tissues had tissue specificity to alizarin red S stress, Alizarin red S in too high concentrations can cause oxidative damage in different tissues of juvenile *spinibarbus sinensis*. The gill tissue were the highest sensitivity to alizarin red S stress. So we should consider the sensitivity of gill tissue in the process of fluorescence soaking and to maintain adequate oxygen. when we selected the appropriate concentration of alizarin red S to dye.

Keywords: alizarinred S; *Spinibarbus sinensis*; dyeing effect; biochemical indexes; antioxidant enzyme; MDA

第一章 文献综述

1.1 中华倒刺鲃物种特性及研究进展

1.1.1 中华倒刺鲃简介

中华倒刺鲃 (*Spinibarbus sinensis* Bleeker), 隶属于鲤形目 (Cypriniformes)、鲤科 (Cyprinidae)、鲃亚科 (Barbinae)、倒刺鲃属 (*Spinibarbus*)。俗称青波、乌鳞、青板, 是我国长江上游流域水体中一种优质淡水经济鱼类。因肉质鲜嫩, 含有丰富的不饱和脂肪酸, 口感极其鲜滑, 被称“食之鲜美者曰青波”, 同时具有祛热降火、壮阳补气的保健效果, 深得广大消费人群钟爱, 其个体壮硕, 生长速度快, 食物来源广泛, 人工生产饲料转化率高, 经实践证明: 非常适合全国各地的池塘、湖泊、水库、集约化工厂养殖(邢旭文 2004)。据资料记载, 其主要分布于我国长江上游水系及其附属湖泊(乐佩琦 2000; 陈小勇 2013), 另外汉江(杨干荣 1986)、湘江、洞庭湖(湖北省水生生物研究所鱼类研究室 1976)等长江中游的水域及湖泊中也存在一定的种群数量(如图 1.1)。

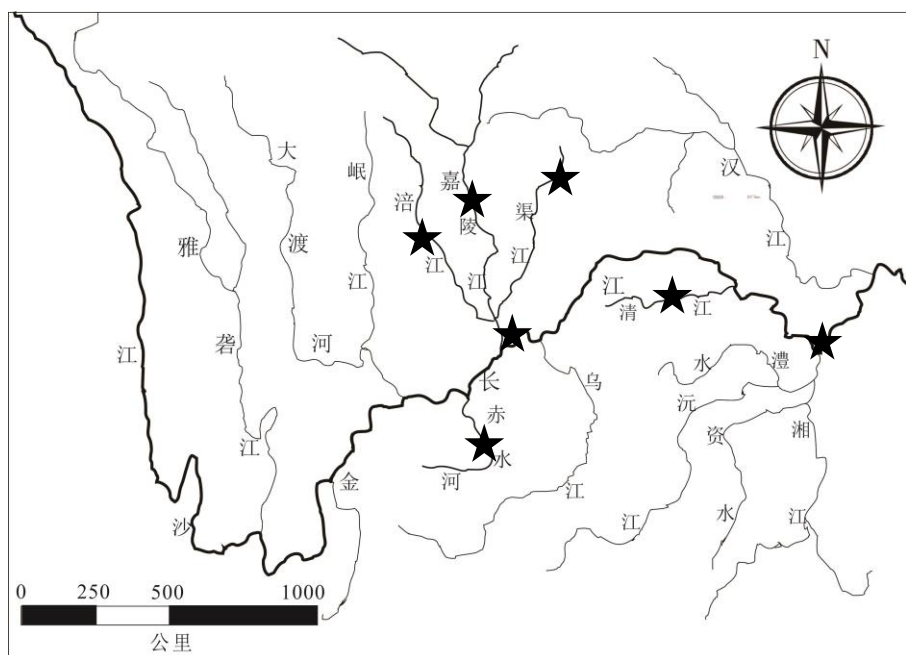


图 1.1 中华倒刺鲃分布图

Fig1.1 Ranges of *Spinibarbus sinensis*

1.1.2 形态特征

背鳍 iv-8; 臀鳍 iii-5; 胸鳍 i-15-17; 腹鳍 i-9-10。咽齿 3 行, 2·3·5-5·3·2; 第一鳃弓外鳃耙 11-12, 内侧鳃耙 17-18; 脊椎骨 34-37; 体长为体高的 2.7-3.4 倍, 为头长的 3.9-4.8 倍, 为尾柄长的 5.9-7.4 倍, 为尾柄高的 6.7-8.7 倍。头长为吻长的 3.0-3.6 倍, 为眼径的 4.1-5.2 倍, 为眼间距的 2.0-2.8 倍。

体型延长而侧面扁平, 背腹缘均为浅弧形。口亚下位, 腹部观察其形状为马蹄形。上下吻唇比较厚, 包裹于颌部外侧表面, 于口角处相连, 唇后沟中断。须 2 对, 较长, 吻须长至眼部前端, 其长度稍微小于口角须, 而口角须向后可长至眼部后端。侧线完全, 其前端稍微向下折后笔直伸至尾鳍中间。背鳍外缘微凹, 起点之前有一平卧的倒刺隐埋于皮下, 末根不分枝鳍条为强大硬刺, 后缘有细锯齿。胸鳍末端远不达腹鳍起点。腹鳍位于背鳍起点的后下方, 末端不达臀鳍起点。臀鳍外缘微凹, 其末端与尾鳍基部接近, 尾鳍分叉, 尾鳍基部有黑斑。鳃耙短小且排列稀疏。鳔 2 室, 后室长于前室 (蔡焰值等 2003; 李萍等 2009) (如图 1.2)。

1.1.3 生活习性

中华倒刺鲃为广温性鱼类, 适合其生存的温度大致为 0 °C~36 °C, 最佳摄食和生长温度 22 °C~28 °C, 当水温 <10 °C 或 >30 °C 时, 其摄食频率变小, 水温 >34 °C 时基本处于不摄食状态, 最适生长的溶氧量是 ≥ 4 mg/L, pH 值是 6.5~8.5, 有机物耗氧量 <8.5 mg/L, 总氮 ≤ 0.4 mg/L, 亚硝酸盐 ≤ 0.8 mg/L, 当水体的溶氧量是 2.5 mg/L 时, 依然可以进行正常活动, 但溶氧一旦 ≤ 1 mg/L 时开始出现缺氧浮头现象, 0.18 mg/L 时开始出现死亡 (余先明等 2008)。

中华倒刺鲃喜欢生活在水流较急并且底质有乱石或沙粒的自然河床中, 一般都是集群栖息在底质流水中, 属于底层鱼类。每年的 11-12 月份, 中华倒刺鲃游入长江干流底部岩石湾沱中进行越冬, 在此期间主要靠浮游生物以及水中有机物充饥。等到春季水位上涨后, 则游入支流生长和繁殖 (邴旭文 2004)。



图 1.2 中华倒刺鲃外部形态图

Fig.1.2 The morphology of *Spinibarbus sinensis*

1.1.4 中华倒刺鲃的研究进展

中华倒刺鲃是我国特有淡水鱼类，自熊天寿等（1988）首次报道中华倒刺鲃人工繁殖技术以来，因其具有很高的应用价值以及广阔的发展前景，我国许多研究者对其进行了大量实验研究，这些研究主要集中于其生物学基本特征、胚胎发育特点、鱼苗繁殖与培育以及遗传学等方向。

熊天寿等（1988）第一次对其亲鱼进行人工养殖实验，等到其繁殖季节后进行人工催产，实现全人工繁殖，最后并对鱼苗进行了转移喂养等工作，在此期间，对中华倒刺鲃的受精卵形态、胚胎发育的各个时期和稚鱼外部特征变化进行进一步描述和观察；唐洪玉等（1998）对其性腺进行详细的研究，把性腺发育的时期分为 6 个阶段，达到繁殖时期的雌雄亲鱼在外部特征上存在很大差异，雄鱼外表颜色呈现灰青色，出现“珠星”；而雌性外部颜色为青黄色，腹部肿胀膨圆，肛门微微红肿。潘学强等（2002）在网箱中对幼苗进行了养殖实验，进一步研究中华倒刺鲃幼鱼的营养、生态习性，实验内容包括幼鱼喂食的驯化，饲料营养，喂养方法等方面。

蔡焰值等（2003），黄洪贵（2009）分别对中华倒刺鲃基本生物学特征，胚胎和仔稚鱼生长发育以及生活习性进行了详细研究。鲁斌等（2010），张文成（2008）

对中华倒刺鲃鱼苗的培育引进以及在其规模化养殖技术推广上进行了大量的研究并取得很显著的经济收益, 研究指出: 池塘养殖宜和鲢、鳙等鱼苗进行套养, 不易与食性接近鱼类套养。罗芬等 (2009) 对其养殖中常见的疾病及其防治方法进行了相关研究。王贵英 (2007) 对其营养需求方面的研究发现: 适合幼鱼生长的配合饲料中蛋白质比例为 33.79%~35.85%, 脂肪比例为 4%~6%。

因其养殖规模的逐渐扩大, 人工繁育技术的日益完善, 为保护其种质资源的持续发展, 有必要对其进行苗种选育工作, 为此国内学者在其遗传育种方面做了大量研究。其 NYP 基因和胰蛋白酶基因已被成功克隆出来 (程树东 2006; 凌统 2006)。朱必凤等 (2006) 利用 RAPD 技术对 3 种倒刺鲃进行了分子遗传标记, 结果发现倒刺鲃和中华倒刺鲃亲缘关系比较接近。

近年来, 由于捕捞过度、栖息地破坏、水污染严重等因素影响, 中华倒刺鲃野生资源日益枯竭, 野生种群数量已经大不如前 (黄小彧等 2011)。总之, 中华倒刺鲃各方面研究还是比较薄弱, 仍需要更多的学者对其进行系统性研究。

1.2 增殖放流中的标记技术

水生生物标记技术 (marking techniques) 是研究水生生物整个生活史 (个体与种群的生长率与死亡率、种群年龄组成、栖息地变迁等) 和评估野生资源的重要方法。近些年由于标记方法和产品不断创新和完善, 标记技术随之也获得很大发展 (Delgado et al 2003)。利用优良的标记方法可以很清楚的研究生物生活史, 生态行为以及生理变化特征 (Garcia et al 2005), 对于濒危物种而言, 大规模人工放流之后, 对其进行标记回捕可以建立数据库, 进行数学模型分析, 时常监测野生种群动态变化, 评估人工放流的成效等 (Masuda et al 1998; Bell et al 2008)。

基于增殖放流的标记技术同样也适用于鱼类, 可用于研究鱼类洄游和资源动态, 根据回捕地点能推测放流鱼类游动的方向、路线、范围和速度。此外结合回捕鱼体的全长、湿重和年龄资料, 推测出放流群体在野外的生长和种群变动规律, 进而检验增殖放流的效果 (陈锦淘等 2005)。目前标记和回捕鉴定技术是评价增殖放流项目中种群增殖和种群恢复的重要组成部分 (Lorenzen et al 2010)

1.2.1 水生生物标记技术分类

鉴于标志技术所应用的对象和其本身材质不同，标志技术有不同的分类划分。根据鱼类标记技术大致分为 5 大类：1、外部标记（External mark）；2、内部标记（Internal mark）；3、化学标记（Chemical mark）；4、生物标记（Biological mark）；5、分子标记（Genetic mark）。

1.2.1.1 外部标记技术

外部标记技术是有记录以来最早被使用的标志方法(Bergman et al 1992)，目前其已广泛被应用到多种鱼类标志放流回捕项目中，目前常用的外部标记技术有：1、切除标记，例如切除鱼体的腹鳍，臀鳍等(孙忠等 2007; Dietrich et al 2006)，切除甲壳动物的足、眼柄、尾扇等(Leaño et al 2006)；2、烙印标记(Bryant et al 1990; Knight et al 1990)。

1.2.1.2 内部标记技术

内部标记主要指耳石温度标记，其原理是利用鱼类耳石日轮生长特性，人为升温时鱼体耳石生长较快会形成明带，降温时鱼体的耳石生长较慢会形成暗带。因此对受精卵孵化期较长的鱼类而言，通过人为控制其孵化环境的温度，从而达到在该种鱼类耳石上形成明暗相间的轮纹标记，这便是耳石温度标记(Volk et al 1999)。目前已经验证可以进行耳石温度标记的有大西洋鲑（*Salmo salar*）、细鳞大马哈鱼（*Oncorhynchus gorbuscha*）、湖鲱鱼（*Salvelinus namaycush*）和胭脂鱼（*Myxocyprinus asiaticus*）(Brothers et al 1985; Bergstedt et al 1990; Hagen et al 1995; Song et al 2008)。

1.2.1.3 化学标记技术

化学标记技术（Chemical mark）是利用化学物质在目标水生生物体上留下明显而且可识别的标记，所采用的化学物质有荧光染料，锇和钨（其中的很少使用具有放射性的元素）等。荧光染料是现阶段最常见的用来进行标记的化学物质，荧光物质主要包括：氧四环素（OTC）、盐酸四环素（TC）、钙黄绿素（CAL）、茜素红 S（ARS）以及茜素络合指示剂（ALC）等，这些荧光物质已被证明可以在生物体内的钙质结构上形成荧光标记或着色点标记。此外，化学标记方法的条件选择上要根据生物的生长发育阶段、生存环境以及具体生活条件而确定。

1.2.1.4 生物标记技术

生物标记技术 (Biological mark) 所需要的成本较低, 甚至不需要成本, 其是运用同种生物中不同种群间的生物学差异性来作为特征性标记的一种方法, 可细分为: 1、地理分布标记, 原理是利用生物自身地理分布的特征, 将其转移到一个没有出现过的生物的水体中, 自动形成并保存原有的地理标记, 例如海蜇 (*Rhopilema esculentum* Kishinouye) 所形成的地理标记 (王永顺等, 1994); 2、形态标记, 其实就是根据同种水生生物不同种群间的形态学区别来作为自然标记, 如体色差异, 鳞片形态差异, 身体比例差异等 (Schweigert 1990); 3、寄生虫标记, 其利用特定寄生动物都有特定宿主和分布范围的特征来作为标记; 4、痕量元素标记, 是利用某些生物种群特定生长环境中的痕量元素作为天然标记, 这些痕量元素可在鱼体组织, 骨骼和耳石上找得到。

1.2.1.5 分子标记技术

分子标记技术 (Genetic mark) 是随着分子遗传学与分子生物学技术的发展而产生, 具体是指在 DNA 分子水平上利用特殊基因组来做标记。根据利用的 DNA 分子所处位置的不同, 可将其分为线粒体控制区 DNA、分子标记与微卫星 DNA 分子标记。目前采用成功采用过分子标记技术的水生生物包括褐牙鲷 (*Paralichthys olivaceus*)、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*)、黑鲷 (*Acanthopagrus schlegeli*) 等 (Sekino 2005; Obata 2006; Gonzalez et al 2008)。

1.2.2 选择并开发最佳的标记技术

因水生生物生活环境的不同、标记的种类和技术的差异等原因, 都会影响最终的标记效果。所以选择适合的标记技术要考虑以下几方面: 1、标记对死亡率的影响; 2、标记是否会影响其生长; 3、标记能够保存的时间; 4、标记方法的成本; 5、回捕效果。鉴此, 本文根据近些年国内外的标记经验, 归纳出不同标记技术优缺点 (表 1-1), 以期能为今后我国鱼类标记技术方面提供有价值的参考。

1.2.3 鱼类化学物质浸泡标记的研究进展

荧光物质浸泡标记属于化学标记。鉴于标记部位差异, 可分外部标记与内部标记。由于鱼类的外部标记很容易掉落, 消退, 不能长时间保存, 因而极少使用。而

内部标记是通过注射、浸泡和投喂与钙组织具有亲和性的荧光物质的方式在鱼体上做标记，此标记可在鱼类的骨骼、耳石和鳍条上被发现，并且可以保存极长时间。目前较常使用的荧光物质有盐酸四环素（oxytetracycline）、钙黄素（calcein）、茜素络合指示剂（alizarin complexone）、茜素红 S（alizarin red S）。OTC 属于抗生素，作为化学荧光染料在水生生物上已使用 50 多年，尽管高剂量可形成良好的荧光标记，但高浓度会导致水生生物活力减弱，摄食停止 (Monaghan et al 1993)，影响水产品安全品质。钙黄素虽然可产生强烈荧光标记，但效果不如后两者好。当前茜素络合指示剂和茜素红 S 是化学标记中使用最频繁的两种荧光化学物质，因为通过显微镜可以很容易在鳍条，耳石以及其他骨组织中检测出荧光标记 (Baer et al 2008)，并且它们更具价格优势，适合大规模的标记。

与常规标记方法相比，化学浸泡标记优点有以下几个：1、短期内可在耳石，鳍条等钙质组织上形成标记，实现大规模标记。2、操作比较简单，可最大限度减少人为因素对标记鱼造成损伤。3、染液浓度一般 ≤ 400 mg/L，并且在 24 h 之内，浸泡过程中死亡率极低。4、从受精卵，仔稚鱼或成鱼的不同阶段都是可行的，同时标记效果非常均匀。其缺点也有以下几点：1、只能进行群体标记，不能区分具体的个体单位；2、观察荧光标记时一般需要借助荧光显微镜；3、对鱼类形成的荧光标记中，耳石染色效果最明显，需要解剖出其耳石置于荧光显微镜下观察，检测耗时长。

此外筛选有效的荧光浸泡标记条件时须考虑鱼体所受的胁迫，致死率，标记的检测等因素，但有关荧光物质对鱼类的毒理代谢方面的研究很少，并且在选择适合的染色浓度时通常只把死亡率作为一个衡量标准，往往忽略荧光物质对鱼类造成的应激反应以及是否会对组织造成损伤，这些因素可能会降低标记后鱼类的活力，会对以后的回捕率造成影响，最终影响资源评估量。

1.3 鱼类应激生物学

1.3.1 鱼类的应激反应

应激 (stress) 最早是加拿大病理生理学家 Hans Selye 于 1936 年提出的，共分为 3 个不同时期，分别是警告 (alarm)、抵抗 (resistance)、衰竭 (exhaustion)。应激是生物对其生存环境（外界）或生理状况（内部）中各种异常刺激所产生的非特异性应

答反应的总和,是生物适应性的表现,同时也是生物赖以生存和发展的进化基础(赵建华等 2011)。鱼类的应激反应(stress response)是鱼体对其所处环境中的各种理化因子的超常刺激所产生的一种非特异性生理反应。轻度的环境应激可使鱼类逐渐适应,使得鱼类的免疫机能增强,从而提高各方面的生理功能,但过度的应激不但会影响鱼类各种生理机能,还会诱发多种疾病,严重的可导致鱼类死亡(刘小玲 2007)。

1.3.2 常见的鱼类应激原

在大规模的水产养殖过程中,水产动物受到的应激因素很多,大致可分为以下几种:1、养殖环境方面(水质恶化、水温、溶氧、PH、盐度等);2、喂养管理方面(饲料营养、人为操作、养殖密度、药品使用等);3、病原微生物方面(细菌、病毒、寄生虫等)。不同程度应激会直接影响水产生物健康与生长发育,严重的会导致养殖品种免疫力下降,诱发疾病,甚至死亡。

鱼类对应激反应分为适应性和损害性,当鱼体通过自身能力可以适应应激变化时,那么鱼体的内环境就会形成一种新的平衡状态,但是当应激源超出鱼类能够承受的极限后,就会对其健康带来损害,形成损害性应激反应。所以适应性和损害性应激反应可能会顺序发生,也可能会同时发生。

1.3.3 应激与鱼类血液生理反应

鱼体中血液生化成分的改变是应激对鱼体生理机能影响的一个重要表现。幼鱼血液的生化指标和鱼体的代谢、营养情况以及疾病的发生有紧密联系,一旦机体受到外部环境影响而出现生理和病理上的变化时,都会及时在血液生化指标中表现出来(洪磊等 2004)。

关于由环境应激引起的鱼体血液生化指标变化这方面,国内外的很多学者已做了大量研究。研究发现:当鱼体处于不适宜其生存的环境时,其血糖水平在短期内会处于相对较高水平,而鱼体血脂的变化相对比较缓慢,因此血糖可作为短期的环境应激敏感指标,而血脂可作为长期的应激监测指标(Hsieh et al 2003)。而血液中的蛋白质主要负责保持血浆中胶体渗透压和 pH 值平衡,还有运输、凝血、免疫、供能等功能,可作为生理、病理和毒理学的重要指标(周玉等 2001)。

血液中不同种类酶的数量也可以反映出环境应激对鱼类的影响，主要有 ALT、AST、LDH、ALP 等。ALT 主要存在肝组织的细胞质中，当肝脏受到损伤或者死亡时，其会被释放进入血液中，使得血液中含量升高，AST 主要存在心脏组织中，在心脏组织受损后，同样会被释放进入血液中，导致其血液中的含量提高，因此血液中的转氨酶活性可用于组织受损的标识酶，同时也能反映鱼类的健康状况（何福林等 2007；Agrahari et al 2007）。

血液中无机成分含量的稳定也是内环境稳态的重要体现部分，若生存环境变动激烈，稳态便被破坏，所以血液中各离子浓度变化也可反映鱼类机体代谢和应激状况。鱼类外界环境变化可以干扰鲟鱼、金鱼、大西洋鲑、鲤鱼等内环境的稳态，引起鱼类血液中 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 和 Ca^{2+} 等离子浓度的变化（常玉梅等 2006；Handeland et al 2000）。

1.3.4 应激与鱼类抗氧化机制

氧化应激(oxidative stress)是指鱼体在遭受到各种有害刺激时，机体内部产生过多的活性氧自由基，使得脂质过氧化程度超出机体能够清除的能力范围，氧自由基与抗氧化系统失去平衡，最终导致机体受到氧化损伤。

1.3.4.1 氧自由基

氧是大多数生物完成日常代谢所必需的，但在进行有氧代谢时会产生活性氧代谢产物(reactive oxygen metabolites, ROM)，其中最重要的一类是含氧基团，并且带不配对电子的自由基，也就是氧自由基(oxygen free radicals, OFR)或者活性氧(reactive oxygenspecies, ROS)。氧自由基主要有羟自由基(hydroxyl radical, $HO\cdot$)、超氧阴离子(superoxide anion, $O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(peroxide, H_2O_2)、有机过氧化物自由基(peroxide, free radicals, $RO\cdot$ 、 $ROO\cdot$)、单线态氧(single oxygen, O_2)和氢过氧化物(hydrogen peroxide, $ROOH$)等，其中 $HO\cdot$ 的毒性最强（Gebieiki et al 2000）。

在正常的生理活动中，机体也会产生氧自由基，但它们会被抗氧化酶及时清除，使得机体中的氧自由基达到一种低水平的平衡状态，不会对机体造成影响，但在某些病理情况下，外界环境的物理或者化学因素会直接或间接诱导机体产生过多的氧

自由基,使得机体内的氧自由基不能及时被清除,机体中氧自由基失去平衡,最终对机体造成损伤,尤其是对生物大分子(DNA、蛋白质和脂类大分子)。

1.3.4.2 鱼类抗氧化防御系统

生物在长时间与大自然相互选择,相互适应的过程中,自身逐步产生一套完善的能够清理机体中过多的氧自由基从而达到自我保护与修复的系统(Cossu et al 1997),即抗氧化系统。主要分为非酶类与酶类两大类。非酶类包括维生素 E、维生素 C、谷胱甘肽以及 β -胡萝卜素等;酶类包括超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等。机体在清除氧自由基的过程中,SOD首先将氧自由基迅速歧化形成 H_2O_2 和 O_2 ,然后 H_2O_2 再经 CAT 和 GSH-Px 催化作用变为 H_2O 和 O_2 。所以 3 种酶具有清除活性氧,保护机体不受氧化损伤的功能。

超氧化物歧化酶(SOD)

其普遍存在各生物的不同组织中,SOD 的性质由蛋白质和其活性部位上结合的金属离子共同决定,故称金属酶。主要包括 Mn-SOD、Fe-SOD、CuZn-SOD 三种。三者都可以把 O_2^- 歧化为 H_2O_2 和 O_2 (O_2^- 是氧气还原成 H_2O 的第一中间产物)。若机体中的氧自由基及时的得到清除,那机体中就几乎不能产生毒性更强的 OH,这对机体的健康至关重要,同时也是 SOD 的重要性所在,其另外的功能是防止机体中脱氢酶受超氧自由基的氧化而失活。

过氧化氢酶(CAT)

CAT 的活性极高,不会因 H_2O_2 浓度而饱和。不经过其他的电子传递体就能将 H_2O_2 歧化化为 O_2 和 H_2O ,进而避免与 O_2^- 反应生成毒性更强的 OH。CAT 在细胞内以过氧化体的形式存在,细胞其中形成的 H_2O_2 通过胞膜后会和过氧化体结合从而被清除(Lledyas et al 1998)。

谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)

当机体处于病理状况下,氧自由基会诱发脂类过氧化,不仅会对生物膜造成损伤,而且会对机体的蛋白和核酸造成破坏,造成组织坏死。GSH-Px 在机体中最主要

的职能是清除脂类过氧化物，减少损伤的发生。此外，在组织中 CAT 含量很低时会代替其清除 H_2O_2 而使得细胞膜不受到损伤（Lledyas et al 1998）。

氧化应激反应是机体细胞水平上最常见的，目前国内外对哺乳动物特别是鼠类的抗氧化系统研究比较深入，但是针对环境应激因子对鱼虾等水生生物的抗氧化系统的影响方面研究虽有一定研究，但远远落后陆生动物。所以进一步深入了解水生生物抗氧化系统的作用机理以及影响其的环境因子在实际生产中有重大的指导意义。

表 1-1 增殖放流中不同标志技术的优缺点

Table 1-1 Advantages and disadvantages of different marking techniques in stock enhancement

不同标志技术		优点	缺点
Different marking techniques		Advantages	Disadvantages
外部标志和标记技术 External tag and mark	外部标志技术 External tag	1, 成本相对低廉; 2, 不需要专门检测设备; 3, 易于被发现, 有利于回捕调查; 4, 可区分不同个体和群体	1, 仅适用体型相对较大个体; 2, 会刺穿标志对象的皮肤; 3, 对标志对象的游泳行为影响较大, 进而影响其生长
	外部标记技术 External mark	1, 操作简单迅速; 2, 成本低廉甚至不需要成本; 3, 可区分不同的群体	1, 不适用于需要个体识别的项目; 2, 会对标记对象的鳞片, 皮肤或组织器官造成损伤; 3, 标记保持时间普遍较短
内部标志和标记技术 Internal tag and mark	内部标志技术 Internal tag	1, 对标志对象的影响较小; 2, 使用仪器操作, 标志简单效率高; 3, 适用范围广, 对标志对象的种类和大小的限制较少; 4, 可区分不同群体, 甚至区分不同个体	1, 标志所用设备价格昂贵; 2, 标志较小, 甚至不可见, 不利于回捕调查; 3, 标志回收时要将标志对象杀死
	内部标记技术 Internal mark	1, 成本低廉, 操作简单迅速, 可一次性标记一个群体; 2, 对标记对象不造成伤害, 标记保持时间较长	1, 标记较小, 检测要使用专业设备, 不利于回捕调查; 2, 标记时要杀死标记对象; 3, 适用对象范围较窄, 且不适用于需要个体识别
化学标记技术 Chemical mark		1, 成本低廉, 可一次性标记一个群体; 2, 对标记对象伤害和刺激较小; 3, 标记保持时间较长	1, 只可作为群体标记, 无法个体识别; 2, 标记较小不明显, 某些标记检测还必须采用专业设备, 不利于回捕调查; 3, 影响食品安全性
生物标记技术 Biological mark		1, 成本低廉, 甚至不需要成本; 2, 对标记对象无伤害	1, 适用范围较窄, 仅适用于少数种类; 2, 只可作为群体标记, 不能进行个体识别
分子标记技术 Genetic mark		1, 对标记对象无伤害; 2, 适用范围广; 3, 标记终生保留; 4, 标记检测时, 取少量鳞片或肌肉即可, 不会至标记对象死亡	1, 标记确定和检测成本较高, 不利于回捕调查; 2, 只可作为群体标记, 不能进行个体识别

1.4 研究目的与意义

中华倒刺鲃是我国长江上游重要的经济鱼类，随着其资源量的日益减少，开展人工增殖放流的活动势在必行，为更有效的评估人工增殖放流效果以及调查估算其天然资源量，通过本实验想要筛选出适合中华倒刺鲃幼鱼荧光浸泡溶液的最佳浓度，寻找最佳荧光着色部位与标记检测方法，为大规模中华倒刺鲃幼鱼人工增殖放流的标记工作提供技术支持，并为放流后的评估工作奠定基础。

因茜素红 S 对幼鱼有一定的毒性，在荧光染色过程中，鱼体会因浸染胁迫而产生氧化应激反应。通过对在不同浓度 ARS 染液浸泡 24 h 以及暂养后鱼体不同组织抗氧化酶系统中抗氧化酶的测定，了解 ARS 对中华倒刺鲃幼鱼的毒性强弱，确定幼鱼对 ARS 染液的最大耐受值，阐明 ARS 染液对中华倒刺鲃幼鱼不同组织的氧化应激响应机制，并从鱼类生理生化角度上确定适合的染色浓度，并与从外观染色效果得出的适合染色浓度做对比，相互论证最终确定最适合中华倒刺鲃幼鱼的染色浓度。

第二章 茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼的急性毒性

2.1 前言

通过可以和钙组织进行螯合并形成明显标记的荧光标记方法可在短期内标记大量放流苗种，并且操作过程简易，不伤鱼体，荧光标记能够保持很长时间，甚至终身能检测（van der Walt & Faragher 2003），目前成功运用于香鱼（*Plecoglossus altivelis*）及珊瑚鱼类的人工放流和种群生态变动方面（Tsukamoto 1988; Jones et al 1999）。

盐酸四环素是早期进行化学荧光标记的物质之一，但国内外学者在实验过程中发现其对鱼类存在很大的毒性，浓度过大会造成鱼类死亡（宋昭彬等 1999；欧阳斌等 1999）。靳建波等（2011）在研究茜素络合物对秦岭细鳞鲑耳石标记的过程中发现：茜素络合物浓度过高虽然标记效果理想，但会使鱼卵，仔稚鱼出现较高的死亡率。王正琨等（2015）在相关研究中也发现：100 mg/L 茜素络合物溶液在对唐鱼仔稚鱼进行浸泡染色时，会对其产生很强的致死毒性，死亡率达 80%；而幼鱼在 150 mg/L 的浓度浸泡时，死亡率高达 44%；在 200 mg/L 茜素络合物浓度组中，成鱼死亡率达 100%；徐采等（2012）在研究中发现，茜素络合物适合对月鳢仔鱼耳石的长期荧光标记，但较高浓度茜素络合物处理后，月鳢仔鱼浸泡后，暂养一段时间相继出现较高的死亡率，初步显示茜素络合物对月鳢仔鱼有一定的致毒效应。

大量实验证实：荧光染料是一种化学物质，高浓度的荧光浸泡对鱼类尤其是对仔稚鱼具有较强的生物毒性。浓度过高，浸染时间过长会导致实验鱼死亡率显著增加（赵亚鹏等 2013；徐采等 2012；Liu Q et al 2009），所以使用化学荧光标记时，其安全性不容忽视。因放流鱼对荧光物质的耐受性和敏感度与其种类，大小等方面有密切关系，因此不同大小，种类的放流鱼最佳浸泡条件也有差异。在探寻茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼的最佳标记浓度之前，必须先进行茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼的毒理实验，明确茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼的毒性强弱，进而才能更科学，更准确的研究茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼的染色效果。为茜素红 S 浸泡标记中华倒刺鲃幼鱼的最适宜条件的探知提供一定的数据支持，为实现中华倒刺鲃幼鱼的大规模标记放流的标记方法做一个数据参考。

2.2 材料与方法

2.2.1 实验材料

中华倒刺鲃幼鱼购于重庆合川区三江人工养殖场，运至长江水产研究所（武汉）暂养，两周后挑选体质健壮、规格均匀、反应灵敏的个体用于实验，暂养期间每日以正大幼鱼饲料早晚各投喂 1 次。在进行正式实验之前停食 24 h。随机抽取 20 尾中华倒刺鲃幼鱼测得其体长（ 12.3 ± 0.6 ）cm，体重（ 41.8 ± 3.6 ）g。

2.2.2 实验药品及溶液配制

实验所用的茜素红 S（ARS）（ $C_{14}H_7NaO_7S$ ）为分析纯（国药集团化学试剂有限公司），分子量：342.26，生产批号：F20111123。实验之前先配成 1000 mg/L 的母液，预实验及正式实验时稀释成相应的质量浓度。

2.2.3 实验条件

实验期间在长 38cm×宽 23cm×高 26cm 的透明钢化玻璃水族箱中进行，在正式实验开始时每隔 8 h 用便携式多参数水质分析仪（YSI-ADV6600）对 pH 值、温度、溶氧、氨氮、硬度等水质参数进行监测，共进行 4 次。实验用水为净水器处理后再曝气 1 d 的自来水，实验所用的饲料为正大 082 常规鱼小鱼配合饲料，所有的水族箱在实验期间充分曝气，在自然光下进行。实验期间不换水，不喂食，测得实验水体温度（ 22 ± 0.5 ）℃，pH（7.2~7.8），溶氧量 > 7.5 mg/L，硬度（ 20 ± 3 ）mg/CaCO₃/L，总氨氮 < 0.01 mg/L。

2.2.4 实验方法

为确定染液质量浓度大致范围，预实验设定 200 mg/L、400 mg/L、800 mg/L、1000 mg/L 共 4 个浓度组，每个浓度组放 12 尾中华倒刺鲃幼鱼，观察 24 h，确定无死亡效应的 ARS 最大浓度和 100%致死质量浓度。正式实验在最大耐受质量浓度和 100%致死质量浓度之间按等差数列设置 1 个空白对照组和 6 个质量浓度组，茜素红 S 的浓度分别为：0 mg/L、400 mg/L、500 mg/L、600 mg/L、700 mg/L、800 mg/L、900 mg/L，各浓度组设 3 次平行，每浓度组 12 尾中华倒刺鲃幼鱼，在实验中观察其

行为和中毒症状。经过多次刺激无反应则判断为死亡，将死亡中华倒刺鲃幼鱼捞出并记录死亡数以及死亡时间。

2.2.5 数据统计与分析

实验所得数据用平均值±标准差(Mean±SD)表示。实验数据通过 SPSS 17.0 软件处理，进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 多重比较。 $p<0.05$ 表示差异显著， $p<0.01$ 表示差异极显著。

采用 Bilss 方法计算半致死浓度，得出 24 h、48 h、72 h、96 h 的 LC_{50} 和 $\log LC_{50}$ 的 95%可信限。将死亡率转化成概率单位，染液质量浓度转换成浓度对数，求出死亡率概率单位与染液质量浓度对数的回归方程，根据常用公式：安全剂量浓度(SC) = $0.1 \times LC_{50}$ (96h)。

2.3 结果与分析

2.3.1 中华倒刺鲃幼鱼中毒症状

其在不同质量浓度 ARS 浸泡中表现出不同程度中毒症状，在大于 700 mg/L 高浓度组，中华倒刺鲃在浸泡 6~10 h 后开始出现异常情况，最早出现失去平衡，丧失游泳能力，鳃盖张合频率变快，进而出现快速游动，原地转圈或来回乱窜，鳃丝和鱼类体表分泌大量黏液，鳃丝肿大，色泽发暗，鳃丝上沾有红色絮状物，最后游动变得缓慢，鳃盖张合频率减慢，最终失去运动能力，躺卧缸底。捞出死亡个体观察发现其鳃盖和口部微张，肛门红肿；解剖死亡个体，发现其肝脏变脆、颜色变黑、胆囊肿胀、充满胆汁。在低浓度组，幼鱼在浸泡 60~72 h 后出现中毒症状，其症状如上所述。

表2-1 ARS对中华倒刺鲃幼鱼的急性毒性的死亡率

Tab. 2-1 Acute toxicity of ARS to juvenile *Spinibarbus sinensis*%

质量浓度/ (mg/ L)	浸泡时间/h Soaking time			
Concentration	24h	48h	72h	96h
400	0	0	0	8.33%
500	0	0	0	16.7%
600	0	0	8.33%	25.0%
700	8.33%	33.3%	75.0%	100%
800	50.0%	75.0%	100%	—
900	100%	—	—	—
0	0	0	0	0

注：“—”代表该处理组全部死亡

Note: “—” denotes all of juvenile were died

2.3.2 茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼的急性毒性

不同浓度 ARS 浸泡中华倒刺鲃幼鱼不同时间后，其死亡情况见表 2-1。低浓度组（400 mg/L、500 mg/L）在 0~72 h 期间未出现死亡，直至 72~96 h 才出现死亡，并且死亡率低于 20%；在中浓度组（600 mg/L、700 mg/L）中，600 mg/L 浓度组在 0~48 h 期间无死亡，在 48~72 h 期间开始出现死亡，在 72~96 h 期间的死亡率达 25%，而 700 mg/L 浓度组在浸泡开始就陆续出现死亡，96 h 后全部死亡；高浓度组（800 mg/L，900 mg/L）24 h 后死亡过半，900 mg/L 浓度组 24 h 之内全部死亡。

计算出 ARS 质量浓度对数与中华倒刺鲃幼鱼的死亡率的线性回归方程，求出 24 h，48 h，72 h，96 h 的 LC_{50} 值以及 95%置信区间。通过公式 $96h LC_{50} \times 0.1$ 计算出安全浓度（SC）为 59.56 mg/L，以上结果见表 2-2。

表2-2 茜素红S对中华倒刺鲃幼鱼死亡率的线性回归分析

Tab. 2-2 Linear regression analysis of ARS toxicity on juvenile *Spinibarbus sinensis*

浸泡时 间 Soaking time	回归方程 Regression equation	相关系 数 R^2	LC50/ (mg/L)	95%置信区间/ (mg/L) 95%confidence interval	安全质量浓 度/ (mg/L) Safe concentration
24h	$Y=21.778X-58.08$	0.978121	788.3	744.4~834.9	
48h	$Y=19.697X-51.570$	0.984064	744.5	704.8~786.5	
72h	$Y=26.548X-69.775$	0.994009	653.5	618.1~690.9	
96h	$Y=11.158X-26.032$	0.896809	595.6	548.4~646.8	59.56

注：Y：死亡率概率单位；X：浓度对数

Note: “Y” signifies probit of mortality; “X” signifies logarithm of copper ion concentration

2.4 讨论

通过研究ARS对中华倒刺鲃幼鱼的急性毒性试验，得出其在24 h、48 h、72 h、96 h的半致死浓度以及安全浓度，根据有毒物质对鱼类的毒性标准（张志杰等1991），可判断ARS对中华倒刺鲃幼鱼属于低毒性，说明ARS对中华倒刺鲃幼鱼标记方法的可行性和适用性，为以后选择合适的染色浓度进行荧光标记提供数据参考。欧阳斌等（1999）在荧光物质浸泡标记稀有鮡鲫和彭泽鲫仔、稚鱼的研究中发现：用浓度150~250 mg/L的盐酸四环素浸泡稀有鮡鲫12 h后，均出现100%死亡率，而同样浓度浸泡彭泽鲫相同时间后，成活率达100%。可见荧光物质毒性大小与鱼类种类，大小规格有关。所以本实验得出的数据结果可能只适用于中华倒刺鲃幼鱼，若鱼种类不同，规格不同，那么其对应的致死浓度，半致死浓度，适宜的浸泡浓度也应做相应调整。

2.5 结论

由毒理实验中得出茜素红S安全浓度的数值可判断其对中华倒刺鲃幼鱼的毒性属于低毒性，适合中华倒刺鲃幼鱼标记。从外部中毒症状分析可知：浸泡时茜素红S浓度过高，就会引起幼鱼强烈氧化应激反应，尤其对幼鱼鳃部会造成严重损伤；解剖后发现其肝脏，胆囊也受到严重损伤，所以浸泡浓度过高会损害幼鱼的免疫系统，降低肝脏的解毒功能，因此采用化学荧光浸泡标记鱼类时，选择适合的浸泡浓度时必须考虑到是否会对标记鱼类健康造成损伤。

第三章 茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼的染色效果

3.1 前言

鱼类标记放流是通过在从天然水体中捕获或经过人工繁育的鱼体上做好标记之后放归天然水域,根据标记鱼类数量以及回捕记录,可评估鱼类野生种群数量变化,了解其种群生长和死亡变动规律,进而结合其体长、体重、年龄等数据推断出其游动的路线,范围以及速度等(Nielsen et al 1992)。

近年来,国内外常用的标记方法包括挂牌标志法、剪鳍标记法、烙印标记法、化学物质标记法、线码标志法、生物遥测标志法等(张堂林等 2003),挂牌、剪鳍、烙印等标记法不但会对鱼体造成损伤,而且外部标记易掉落、消退,最终对种群的推算产生很大误差。而化学荧光标记方法与常规标记相比有以下几个优点:1、短期内实现放流鱼大规模标记;2、标记均匀一,损伤小,成本低;3、适用于放流鱼类从受精卵到成鱼不同的生活史;4、标记保持时间长(Yamada et al 1987; Wilson et al 1987)。常用的化学荧光染料包括:盐酸四环素、钙黄素、茜素络合物、茜素红 S。

盐酸四环素、钙黄素属于抗生素类,过多使用会对鱼体产生毒性,造成鱼类代谢减弱,活力下降,并且影响水产品安全,再加上价格不菲等问题,已很少使用,因茜素红 S 和茜素络合物可在鱼类耳石,鳞片及鳍条等骨组织上形成永久性荧光标记,效果明显,并且价格低廉,目前已成为大规模化学标记的首选(Baer et al 2008)。

化学荧光标记在渔业上有很好的应用前景。它广泛适用于放流种群确认和分离、调查洄游性鱼类的产卵场,肥育场以及鉴定鱼类的卵细胞(Grahl-Nielsen O et al 1990; Coutant 1988),可以应用在鱼类放流增殖于资源评估上(Yamada et al 1987)。当前在研究化学荧光标记浸泡鱼类时,主要关注于荧光物质浓度的选择,其浸泡时间大致都规定为 24 h。

本实验旨在寻找茜素红 S 浸泡标记中华倒刺鲃幼鱼的最佳浓度,为早期鱼苗的大规模标记方法提供技术支持,为后续中华倒刺鲃幼鱼野生资源量调查及有效评估增殖放流效果服务,以期能对珍稀鱼类的标记方法提供借鉴作用。

3.2 材料与方法

3.2.1 实验材料与条件

中华倒刺鲃幼鱼，其体长 12.3 ± 0.6 cm，体重 41.8 ± 3.6 g，购于重庆合川区三江人工养殖场，运至长江水产研究所（武汉），暂养在室内 2 m^3 的循环水槽中 14 d，暂养密度为 0.8 尾/L。暂养期间每日以正大幼鱼饲料早晚各投喂 1 次，直到饱食为止。暂养期间保持水温 $(22 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ ，pH(7.2~7.8)，溶氧量 $> 7.5 \text{ mg/L}$ ，硬度 $(20 \pm 3) \text{ mg/CaCO}_3/\text{L}$ ，总氨氮 $< 0.01 \text{ mg/L}$ 。每日换水率占养殖水体 15%。

3.2.2 实验方法

首先用蒸馏水配置 ARS 浓度为 1000 mg/L 的储备液，ARS 染色浓度设置为 0 mg/L 、 100 mg/L 、 200 mg/L 、 300 mg/L 、 400 mg/L 、 500 mg/L ，染色实验在长 $38 \text{ cm} \times$ 宽 $23 \text{ cm} \times$ 高 26 cm 的透明钢化玻璃水族箱中进行，并向其中放入 14 L 的水，染色液配置好后充分曝气，实验鱼浸泡标记前停食 24 h。每个处理组随机挑选 12 尾中华倒刺鲃幼鱼进行浸泡染色 24 h，浸泡密度约 1 尾/L，3 次平行，其中 ARS 浓度为 0 mg/L 浓度组为空白对照组。浸染结束后，用清洁水洗净中华倒刺鲃幼鱼周身染液，然后分别放置于 5 个玻璃缸中，代谢去除染液 3 h。最后，5 个处理组中华倒刺鲃幼鱼再分别置于另外 5 个带有标签并盛有新鲜过滤水的玻璃缸中暂养。

3.2.3 样品解剖与荧光标记观察

暂养 15 d 后，解剖取出经 ARS 染色标记的幼鱼耳石，每个处理随机取出 24 尾，观察发现鱼体腹部鳞片易染色，尤其是鳍条基部鳞片，同时各个浓度组中的幼鱼腹部鳍条基部随机取 10 个鳞片，以半数以上的染色强度来记录该鱼鳞片标记效果。所有样品直接处理均未磨片（Champigneulle et al 2003），解剖的样品避光保存，防止荧光衰退。

采用荧光显微镜（Olympus BX51）装配数码照相机（Olympus DP70 1200 万像素），选用 4 倍物镜观察荧光标记质量。标记质量设定为 5 级（如附图所示）：0 级，荧光显微镜观察标记不可见；1 级，荧光显微镜观察标记模糊，昏暗；2 级，荧光显微镜很容易观察到标记；3 级，荧光显微镜观察标记明亮；4 级，可见光线下标记肉

眼可见；5 级，可见光线下标记肉眼观察清晰、鲜明。通过观察每尾幼鱼的一对星耳石，微耳石、腹部鳞片来记录和评价荧光标记在不同部位的染色质量。通常两位试验人员单独记录标记质量，如果有偏差则由第三位试验人员确定。本实验中，如果标记质量 ≥ 2 ，认为标记质量良好（Taylor et al 2005）。

3.3 染色结果

解剖经不同浓度 ARS 浸染的中华倒刺鲃幼鱼耳石和腹部鳞片后，将其分别置于荧光显微镜的 3 种光源（紫外激发光，蓝色激发光和绿色激发光）下观察荧光染色效果。结果发现：在紫外光和蓝色激发光下，由 ARS 浸泡产生的浅红色荧光标记不明显，而在绿色激发光下，由 ARS 浸泡形成的猩红色荧光标记比较明显，以下内容均是在荧光显微镜的绿色激发光下观察并记录的染色结果。

在荧光显微镜下观察的荧光染色结果，如表 3-1 所示。耳石和鳞片标记率与标记质量随着 ARS 浓度的升高而不断升高。除 100 mg/L 浓度组外，其他浓度组耳石标记率达到 91.7%以上。100 mg/L 浓度组中星耳石和微耳石标记质量良好（ $n \geq 2$ ）的百分比分别为 33.3%和 25%，标记效果不理想；200 mg/L 浓度组中星耳石和微耳石标记质量良好（ $n \geq 2$ ）的百分比分别为 54.6 和 37.2，标记效果不理想；而 ≥ 300 mg/L 的各浓度组星耳石和微耳石标记质量良好（ $n \geq 2$ ）的百分比分别超过 95.9%和 84.5%，标记效果理想。同时观察鳞片染色效果发现：100 mg/L，200 mg/L 浓度组标记率 $\leq 33.3\%$ ，并且标记质量模糊（ $n \leq 1$ ），标记效果不理想；而其它浓度组标记率超过 50%，但鳞片标记质量良好（ $n \geq 2$ ）的百分比最高达 66.6%，标记效果不理想。

统计发现：星耳石染色效果质量（ $n \geq 2$ ）优于微耳石，鳞片上荧光标记质量标记效果不理想。

3.4 讨论

3.4.1 茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼的染色效果

用荧光浸泡标记水生生物时，一般在特定的激发光下才能检测到标记荧光，但赵亚鹏（2003）、何春林（2008）、欧阳斌等（1999）用荧光物质标记某些鱼类时，其耳石的荧光标记在可见光下也能被识别。本研究将中华倒刺鲃幼鱼耳石解剖后置

于可见光下并未观察到荧光标记，这与许莉佳等（2009）关于盐酸四环素对斑马鱼耳石的染色效果结果一致，因荧光标记是化学荧光物质在鱼类生长过程中与鱼体钙质组织整合所形成的，所以 Eckman（2003）认为其标记的强弱和鱼类的代谢速度有显著关系，在鱼体处于代谢旺盛的生长阶段时，其所形成的标记效果最好。本研究中中华倒刺鲃幼鱼年龄接近 1 龄，可能超出化学标记的最佳时期，因在有限的浸泡时间内，代谢强度未能达到可见光下能观察到的荧光标记程度。检测荧光标记时，发现紫外光和蓝光激发下观察到的效果很不理想，而在绿光激发下，观察到的荧光染色效果最佳，这与王正琨（2015）、赵亚鹏（2003）的研究结果一致，这可能与标记对象，标记所用的荧光染料有一定的关系。

本实验中，各浓度组星耳石的标记效果优于微耳石，这是因为星耳石薄而透明，耳石的代谢沉积率高于微耳石造成的，这与王正琨（2015）等关于茜素络合物对唐鱼耳石染色结果一致，而鳞片上的标记效果远远没有耳石标记的效果理想，并且标记率低，同时鳞片要达到与耳石相同的标记质量需要的荧光染料浓度更高。可能是因为浸泡过程中耳石的代谢沉积强度高于鳞片的沉积强度所造成的。这与刘奇等（2009）关于茜素红 S 对褐牙鲈的标记结果部分一致。

3.4.2 适合荧光标记的浓度、时间以及鱼类阶段的选择

化学荧光浸泡标记鱼体时，要综合考虑成本、浓度与时间、温度、死亡率等方面（Taylor et al 2005），在安全浓度范围内，浸泡染液浓度越高，标记效果越好。在本实验中可得到论证。Secor 等（1991）指出，标记效果的差异与鱼体代谢速率密切相关，幼鱼代谢速率大于成鱼，更易形成荧光标记。赵亚鹏等（2003）在研究茜素络合物对滇池金线鲃标记实验中证实：个体越小（代谢强度高），越容易在体内形成荧光标记。相同浓度的浸泡下，20 日龄仔鱼的标记效果优于 90 日龄的稚鱼。所以进行荧光标记时，针对不同生长阶段选择适合的标记浓度和标记时间，鱼类日龄越长，所需要的适合荧光浸泡浓度越高，时间越长。王正琨等（2015），靳建波等（2011）在相关荧光染色标记研究中可以证明此观点。所以对超出荧光标记所需要的快速生长期幼鱼进行标记时，在不影响其健康活力的前提下，可以适当延长浸泡标记时间来弥补其因代谢强度不足造成标记质量不理想的缺点。

表 3-1 不同浓度茜素红 S 浸泡中华倒刺鲃幼鱼的染色效果

Tab 3-1 dyeing effect of *Juvenile Spinibarbus sinensis* after immersion of different concentration of alizarin red S

浸泡液的 浓度	标记部 位	尾 数 (n)	标记 率 (%)	标记质量					
				0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	5 (%)
0	微耳石	24	0	100	0	0	0	0	0
	星耳石	24	0	100	0	0	0	0	0
	鳞片	24	0	100	0	0	0	0	0
100	微耳石	24	66.7	33.3	41.7	25	0	0	0
	星耳石	24	83.3	16.7	50	33.3	0	0	0
	鳞片	24	8.3	91.7	8.3	0	0	0	0
200	微耳石	24	91.7	8.3	54.1	37.6	0	0	0
	星耳石	24	100	0	45.8	54.2	0	0	0
	鳞片	24	33.3	66.7	33.3	0	0	0	0
300	微耳石	24	100	0	15.5	51.2	33.3	0	0
	星耳石	24	100	0	4.1	54.2	41.7	0	0
	鳞片	24	54.2	45.8	45.9	8.3	0	0	0
400	微耳石	24	100	0	4.1	31.9	64.0	0	0
	星耳石	24	100	0	0	29.2	70.8	0	0
	鳞片	24	62.5	37.5	4.2	16.7	33.3	8.3	0
500	微耳石	24	100	0	0	16.7	83.3	0	0
	星耳石	24	100	0	0	8.3	91.7	0	0
	鳞片	24	75	25	8.3	12.5	33.3	20.8	

注：“0”代表未观察到荧光标记

Note: “0” represents fluorescent marker was not observed.

3.5 结论

茜素红 S 在中华倒刺鲃幼鱼的钙质组织上形成的荧光标记适合在绿色激发的荧光灯下观察，产生的猩红色荧光标记，并且在浸泡 24 h 中，耳石比鳞片更易形成荧光标记，其中星耳石染色效果质量优于微耳石，鳞片要达到同样的标记质量效果需要更高的浓度。

第四章 茜素红 S 对幼鱼血液生化指标的影响

4.1 前言

环境应激可引起水产动物体内一系列复杂的生理反应，为抵抗外界环境应激，维持生理平衡，机体往往形成了一系列特定的应答机制（Weber et al 2005）。最早会在神经与内分泌系统中表现出来，是机体遭受外界环境刺激后立即显现出来的反应，进而会在组织和器官水平表现出来（心血管系统、能量代谢、水盐代谢、免疫系统、呼吸系统）（刘小玲 2007）。

通过荧光染料浸泡，在鱼类耳石，鳍条等钙质组织上形成明显标记已成为了解鱼类种群早期各种参数(种群密度、死亡、补充、生长等)，是种群估算、资源评估、洄游和分布等研究内容最常用的方法（Wilson et al 1987; Fischer et al 2010）。靳建波等(2011)在研究茜素络合物对秦岭细鳞鲑耳石的染色中发现：过高的浓度会对发眼卵、仔稚鱼产生应激反应，引起死亡。徐采等（2012）证实：过高浓度茜素络合物会引起月鳢仔鱼很高的死亡率。许多研究表明，ARS、ALC等荧光染料浓度过高，浸染时间过长会使得浸泡鱼类的死亡率显著增加（赵亚鹏等 2013; Liu Q et al 2009; Stefan et al 2012）由此可见：荧光浸泡过程中会对鱼类造成损伤，影响鱼类健康状况，进而降低放流鱼类成活率。许多学者只关注能对鱼类产生有效标记的荧光物质浓度的选择上，很少关注荧光物质是否会对鱼体造成损伤以及对鱼体造成损伤能否恢复等问题。

血液是生物体内一种必不可少的重要组成部分，鱼类的血液和机体的代谢，营养以及疾病的发生有很大的联系，当鱼体因外部环境影响而发生生理或者是病理变化时，这些都会在鱼体血液的生化指标中反映出来，因此，血液的生化指标常被应用于鱼类的健康状况，营养及对环境适应的评估上，是重要的生理、病理和毒理学指标(周玉等 2001; 黄琪淡等 1992; 陈寓儿等 2005)。

本实验通过测量浸泡24 h后，暂养5 d，10 d后中华倒刺鲃幼鱼血液生化指标来评价茜素红S对中华倒刺鲃幼鱼生理生化的影响，为筛选适合的浸泡浓度做参考。并对浸泡之后幼鱼的健康状态做一个科学评价。

4.2 材料与方法

4.2.1 实验用鱼

同上 2.2.1

4.2.2 实验条件

同上 2.2.3

4.2.3 实验方法

根据 ARS 对中华倒刺鲃幼鱼的安全剂量确定 6 个正式实验浓度组，分别是 0 mg/L（对照组）、100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L、500 mg/L，每组放入 12 尾进行实验，每组平行 3 次。在浸泡 24 h 之后，随机在各浓度组取 3 尾中华倒刺鲃幼鱼，经过 200 mg/L 的 MS-222 麻醉后，用去离子水将其体表冲洗干净并用 1.5 mL 注射器于尾部静脉处抽血，置于 5 mL 的抗凝管中（肝素钠抗凝）。将抗凝血在 4℃ 条件下快速放入 Eppendorf 5810R 离心机中，3000 r/min 离心 10 min，直至分层完全，用移液枪将上层澄清血浆转入 EP 管中，放在 4℃ 下备测，去除溶血样品，每个样品平行测 2 次。

取完血样之后，把剩余中华倒刺鲃幼鱼分别放入编号为 100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L、500 mg/L 的暂养池中暂养，并在 5 d、10 d 之后按照同样的方法进行取样测量其血液生化指标。

血液生化指标的测定：采用深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司生产的测定试剂盒，在 BS-200 全自动生化分析仪上进行测定（其中酶活单位的定义为 37℃ 条件下，每分钟转化 1 μ mol/L 底物的酶量为 1 个酶活单位，即为 1U/L）。血清生化分析指标包括：总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、球蛋白 (GLB)、血糖 (GLU)、总胆固醇 (T-CHO)、肝酐 (CRE)、谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT)、碱性磷酸酶 (ALP)。

4.2.4 数据统计

实验所得数据用平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示。实验数据通过SPSS 17.0软件处理,进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和Duncan多重比较。 $p<0.05$ 表示差异显著, $p<0.01$ 表示差异极显著。

4.3 实验结果

4.3.1 茜素红 S 浸泡 24 h 后幼鱼的血液生化指标

不同浓度ARS对中华倒刺鲃幼鱼血浆生化指标的影响结果如表4-1所示:从表4-1中可以看出:TP、GLB、CRE都随着染液浓度升高而不断升高,除100 mg/L、200 mg/L中TP, CRE含量与对照组无显著差异($p<0.01$)外,其他浓度组TP, CRE含量与对照组均有极显著差异($p<0.01$),各个浓度组GLB含量与对照组均有极显著差异($p<0.01$),同时各浓度组彼此之间也存在极显著差异($p<0.01$);ALB、ALP、GLU、T-CHO都随着浸泡染液浓度的升高呈先升高后降低的趋势,300 mg/L浓度组ALB含量达到峰值,比对照组高13.4%($p<0.05$),500 mg/L浓度组ALB含量最低,比对照组低33.4%($p<0.05$),其他浓度组与对照组无显著差异($p>0.05$);100 mg/L浓度组ALP含量达到峰值,比对照组高7.8%($p<0.01$),200 mg/L浓度组ALP也高于对照组($p<0.05$);300 mg/L浓度组ALP与对照组接近($p>0.05$),400 mg/L、500 mg/L浓度组ALP均小于对照组($p<0.01$);300 mg/L浓度组GLU含量达到峰值,比对照组高78.6%($p<0.01$),其他浓度组GLU均高于对照组($p<0.05$),除100 mg/L浓度组外,其他浓度组均与对照组有极显著差异($p<0.01$);400 mg/L浓度组T-CHO含量达到峰值,比对照组高61.7%($p<0.01$),其他浓度组T-CHO含量均高于对照组,除100 mg/L浓度组外,其他浓度组均与对照组有极显著差异($p<0.01$);ALT、AST都随着浸泡染液浓度的升高先降低后升高,100 mg/L浓度组ALT含量达到低谷,比对照组低30.8%($p<0.01$),除200 mg/L浓度组ALT含量低于对照组($p<0.05$)外,其他浓度组均高于对照组,并且400 mg/L、500 mg/L浓度组ALT含量与对照组相比有极显著差异($p<0.01$);100 mg/L浓度组AST含量达到低谷,比对照组低19.6%($p<0.01$),除200 mg/L浓度组AST含量略低于对照组外($p>0.05$),其他浓度组均高于对照组,并与对照组有极显著差异($p<0.01$)。

4.3.2 暂养 5 d 后幼鱼的血液生化指标

暂养5 d之后,各个生化指标如表4-2所示:总蛋白,白蛋白,球蛋白的变化基本一致,当ARS浓度 ≥ 300 mg/L时,3个指标随浓度的升高而降低,并且400 mg/L, 500 mg/L浓度组的数值显著低于对照组($p < 0.05$);除500 mg/L浓度组葡萄糖显著低于对照组外,其他浓度组与对照组无显著差异;总胆固醇,碱性磷酸酶,肌酐的变化趋势一致,当ARS浓度 ≥ 300 mg/L时,3个指标随着ARS浓度升高而降低,并且400 mg/L, 500 mg/L浓度组数值显著低于对照组($p < 0.05$);谷丙转氨酶,谷草转氨酶的变化一致,当ARS浓度 ≥ 300 mg/L时,转氨酶随其浓度升高而不断升高,并且400 mg/L, 500 mg/L浓度组数值显著高于对照组($p < 0.05$)。

4.3.3 暂养 10 d 后幼鱼的血液生化指标

暂养10 d后,各生化指标如表4-3所示:明显可看出除500 mg/L浓度组的总蛋白,白蛋白,球蛋白,葡萄糖,总胆固醇,碱性磷酸酶显著低于对照组($p < 0.05$),肌酐,谷丙转氨酶,谷草转氨酶显著高于对照组外($p < 0.05$),其他浓度组各个指标均与对照组无显著性差异。

4.4 讨论

4.4.1 茜素红 S 浸泡 24 h 后对幼鱼血液蛋白质的影响

血清总蛋白(TP)主要包括白蛋白(ALB)和球蛋白(GLB)。鱼体肝脏具有很强的代偿功能,只有当损伤超过肝脏的代偿能力后,肝组织合成蛋白质的功能会发生障碍,功能减弱,使得血液中总蛋白及白蛋白含量减少(郭兵等 2009)。同时血浆中总蛋白及白蛋白含量也反映机体营养和代谢状态,而球蛋白质量浓度在一定程度上对机体免疫状态有所影响(刘红柏等 2009),血清中TP含量也会因肝糖原分解而变化,故TP变化可间接反映肝组织肝糖原的储备能力(Harikrishnan et al 2003)。在本研究中,浸泡24 h后,TP、GLB随着ARS浓度升高而升高,这与何福林等(2007)研究的虹鳟TP含量随水温上升而增加的结果一致,同时在ARS浸泡过程中,中华倒刺鲃幼鱼机体处于应激状态,机体通过提高GLB含量来提高自身免疫能力来抵抗环境胁迫。而ALB随着ARS浓度先升高后下降,可能是因为ARS进入鱼体后会和血液中 Ca^{2+} 结合,影响鱼体正常渗透压,可能使机体代谢增强,代谢产物增多,运输代

谢产物压力加大, 鱼体肝脏通过合成较多的ALB来维持体内渗透压平衡, 同时也促使代谢产物排出体外, 当ARS浓度进一步增大时, 超过鱼体肝脏所能调节的水平, 阻碍肝脏白蛋白合成, 其具体生理机理还需要进一步研究, 以上3种蛋白变化趋势都说明高浓度ARS浸泡对肝脏已经造成一定损伤, 而且损伤程度以及能否恢复都需要通过暂养之后进一步研究。

ARS 浸泡 24 h 后, 转入清水池中暂养 5 d 后, 400 mg/L, 500 mg/L 浓度组中华倒刺鲃幼鱼总蛋白, 球蛋白, 白蛋白显著低于对照组, 说明高浓度 ARS 浸泡后对幼鱼肝脏造成一定损伤, 使得肝脏蛋白合成功能出现障碍, 免疫能力也受到一定影响, 这与李文平(1993)关于仔鸡喹乙醇中毒时伴有血清总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)降低是继发于肝、肾组织功能损害导致蛋白质合成障碍的研究结果一致。在暂养 10 d 后, 只有 500 mg/L 浓度组总蛋白, 球蛋白, 白蛋白显著低于对照组, 其他浓度组与对照组无显著差异, 说明经 10 d 暂养, 400 mg/L 浓度组中对肝脏造成的损伤得到一定的恢复, 而 500 mg/L 浓度组对肝脏造成的损伤难以恢复, 并且可能会影响其在物质代谢方面的功能, 降低其野外环境的生存能力, 对肝脏造成的损伤还需进一步探讨。

4.4.2 茜素红 S 浸泡 24 h 对幼鱼血液葡萄糖和总胆固醇的影响

葡萄糖 (GLU) 是鱼类进行各种代谢活动所需能量的最直接来源, 血糖含量可反映全身的糖代谢和内分泌功能, 也可侧面推断饲料营养是否适合, 肝胰脏功能是否完好, 同时也被用于指示鱼体对环境应激因子的响应指标 (赵万鹏等 2002)。

经24 hARS浸泡后, 除500 mg/L浓度组外, 随着ARS浓度升高, 血糖浓度也相应随之提高, 这和棕鲷(*Ictalurus nebulosus*), 虹鳟(*Salmo gairdneri*)暴露在铜离子溶液中血糖表现出剂量依赖性增加的结果一致 (Christensen et al 1972; Nemcsok et al 1988), 当ARS浓度超过400 mg/L之后血糖浓度出现小幅回落, 可能是因为高浓度ARS浸泡对鱼体肝脏组织造成损伤, 影响肝糖原的分解。

胆固醇 (T-CHO) 的生物学功能极其重要。血浆中70%的总胆固醇 (T-CHO) 是在肝胰脏合成并贮存, 随后被释放至血液中参与各种激素的合成, 是细胞膜必不可少的组成部分, 参与维持细胞正常生理生化功能 (万家余等 2003), 低密度脂蛋白 (LDH) 是糖分解能力的标志物之一, 并且是醣酵解的一个终点酶 (Hammeren et

表4-1 浸泡24 h后ARS对中华倒刺鲃幼鱼血清生化指标的影响

Table 4-1 Effects of ARS on serum biochemical indices of juvenile *Spinibarbus sinensis* after 24h

项目 Items ARS (mg/L)	总蛋白 TP (g/L)	白蛋白 ALB (g/L)	球蛋白 GLB (g/L)	葡萄糖 GLU (mmol/L)	总胆固醇 TCHO (U/L)	碱性磷酸酶 ALP (U/L)	肌酐 CRE (μmol/L)	谷丙转氨酶 ALT (U/L)	谷草转氨酶 AST (U/L)
0	20.00±1.00 ^{aA}	5.0±0.00 ^{bcAB}	15.00±1.00 ^{aA}	3.74±0.11 ^{aA}	6.71±0.10 ^{aA}	140.3±1.53 ^{cB}	211.3±3.51 ^{aA}	69.3±4.16 ^{cBC}	224.3±6.50 ^{bB}
100	23.3±1.53 ^{bAB}	5.0±1.00 ^{bcAB}	18.33±0.58 ^{bB}	4.06±0.08 ^{bB}	6.79±0.17 ^{aA}	151.3±5.69 ^{dC}	217±2.64 ^{abA}	48.0±1.00 ^{aA}	180.3±4.16 ^{aA}
200	22.7±2.08 ^{abA}	5.0±1.00 ^{bcAB}	17.67±1.15 ^{bB}	4.50±0.21 ^{cB}	7.74±0.10 ^{bB}	148.7±3.1 ^{dBC}	222.3±6.02 ^{aA}	59.7±5.03 ^{bAB}	213.3±10.5 ^{bB}
300	27.0±2.00 ^{cB}	5.67±0.58 ^{cB}	21.33±1.53 ^{cC}	6.95±0.21 ^{eD}	9.87±0.05 ^{cC}	141.0±2.65 ^{cB}	266.0±4.58 ^{cB}	74.3±3.21 ^{cdC}	269.3±6.11 ^{cC}
400	36.3±1.53 ^{dC}	3.67±0.57 ^{abA}	32.67±1.15 ^{dD}	6.68±0.15 ^{eD}	10.85±0.17 ^{dD}	124.3±2.08 ^{bA}	283.7±2.52 ^{dC}	80.67±4.04 ^{dC}	285.0±6.55 ^{cC}
500	39.0±1.00 ^{dC}	3.33±0.57 ^{aA}	35.67±0.58 ^{eE}	6.07±0.18 ^{dC}	9.73±0.15 ^{cC}	117.3±4.73 ^{aA}	323.0±9.54 ^{eD}	222.0±8.54 ^{eD}	507.7±14.1 ^{eD}

注：同列数据后标不同小写字母者表示差异显著 ($p<0.05$)，同列数据后标不同大写字母者表示差异极显著 ($p<0.01$)。

Note: Different lowercase letters indicates difference is significant at the 0.05 level between groups, Different uppercase letters indicates difference is significant at the 0.01 level between groups.

表4-2 暂养5 d之后ARS对中华倒刺鲃幼鱼血清生化指标的影响

Table 4-2 Effects of ARS on serum biochemical indices of juvenile *Spinibarbus sinensis* after 5 d

项目 Items ARS (mg/L)	总蛋白 TP (g/L)	白蛋白 ALB (g/L)	球蛋白 GLB (g/L)	葡萄糖 GLU (mmol/L)	总胆固醇 TCHO (U/L)	碱性磷酸酶 ALP (U/L)	肌酐 CRE (μ mol/L)	谷丙转氨酶 ALT (U/L)	谷草转氨酶 AST (U/L)
0	22.93 $\pm$ 0.27 ^c	5.37 $\pm$ 0.18 ^c	17.56 $\pm$ 0.09 ^c	4.78 $\pm$ 0.71 ^b	7.43 $\pm$ 0.85 ^c	143.7 $\pm$ 1.05 ^c	228.57 $\pm$ 4.2 ^a	73.06 $\pm$ 3.19 ^a	243.7 $\pm$ 4.95 ^a
100	23.2 $\pm$ 0.25 ^{cd}	5.38 $\pm$ 0.16 ^c	17.78 $\pm$ 0.41 ^c	4.87 $\pm$ 0.53 ^b	7.44 $\pm$ 0.18 ^c	143.3 $\pm$ 2.35 ^c	229.6 $\pm$ 5.27 ^a	73.4 $\pm$ 2.14 ^a	245.5 $\pm$ 3.64 ^a
200	23.2 $\pm$ 0.28 ^{cd}	5.40 $\pm$ 0.16 ^c	17.81 $\pm$ 0.3 ^c	4.79 $\pm$ 0.12 ^b	7.56 $\pm$ 0.35 ^c	143.9 $\pm$ 2.26 ^c	228.3 $\pm$ 4.51 ^a	74.39 $\pm$ 3.11 ^a	245.8 $\pm$ 5.41 ^a
300	23.45 $\pm$ 0.20 ^d	5.59 $\pm$ 0.89 ^c	17.86 $\pm$ 0.24 ^c	4.91 $\pm$ 0.5 ^b	7.61 $\pm$ 0.14 ^c	144.3 $\pm$ 2.29 ^c	229.8 $\pm$ 3.24 ^a	73.16 $\pm$ 2.32 ^a	249.9 $\pm$ 5.32 ^a
400	21.39 $\pm$ 0.28 ^b	4.94 $\pm$ 0.8 ^b	16.44 $\pm$ 0.29 ^b	4.74 $\pm$ 0.1 ^b	6.66 $\pm$ 0.17 ^b	128.2 $\pm$ 1.53 ^b	248.5 $\pm$ 5.56 ^b	94.42 $\pm$ 3.74 ^b	279.3 $\pm$ 4.29 ^b
500	19.69 $\pm$ 0.32 ^a	4.64 $\pm$ 0.1 ^a	15.5 $\pm$ 0.42 ^a	4.23 $\pm$ 0.09 ^a	6.08 $\pm$ 0.19 ^a	123.2 $\pm$ 1.47 ^a	314.77 $\pm$ 5.3 ^c	150.7 $\pm$ 5.32 ^c	416.7 $\pm$ 8.12 ^c

注：同列数据后标不同小写字母者表示差异显著 ($p < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters indicates difference is significant at the 0.05 level between groups.

表4-3 暂养10 d之后ARS对中华倒刺鲃幼鱼血清生化指标的影响

Table 4-3 Effects of ARS on serum biochemical indices of juvenile *Spinibarbus sinensis* after 10 d

项目 Items ARS (mg/L)	总蛋白 TP (g/L)	白蛋白 ALB (g/L)	球蛋白 GLB (g/L)	葡萄糖 GLU (mmol/L)	总胆固醇 TCHO (U/L)	碱性磷酸酶 ALP (U/L)	肌酐 CRE (μmol/L)	谷丙转氨酶 ALT (U/L)	谷草转氨酶 AST (U/L)
0	22.92 ± 0.22 ^b	5.31 ± 0.26 ^b	17.6 ± 0.21 ^b	4.67 ± 0.71 ^b	7.53 ± 0.39 ^b	146.7 ± 1.8 ^b	221.5 ± 3.8 ^a	74.1 ± 2.25 ^a	252.8 ± 2.7 ^a
100	22.91 ± 0.54 ^b	5.35 ± 0.62 ^b	17.6 ± 0.49 ^b	4.69 ± 0.12 ^b	7.64 ± 0.27 ^b	146.4 ± 2.6 ^b	220.8 ± 4.3 ^a	74.2 ± 1.33 ^a	251.9 ± 4.3 ^a
200	23.07 ± 0.37 ^b	5.38 ± 0.25 ^b	17.7 ± 0.38 ^b	4.75 ± 0.08 ^b	7.67 ± 0.45 ^b	147.1 ± 3.5 ^b	222.6 ± 2.1 ^a	74.2 ± 2.45 ^a	252.1 ± 6.6 ^a
300	23.54 ± 0.26 ^b	5.41 ± 0.51 ^b	18.1 ± 0.2 ^b	4.81 ± 0.12 ^b	7.69 ± 0.41 ^b	147.4 ± 3.3 ^b	221.6 ± 5.3 ^a	74.3 ± 3.25 ^a	253.1 ± 4.3 ^a
400	22.89 ± 0.29 ^b	5.28 ± 0.36 ^b	17.6 ± 0.31 ^b	4.75 ± 0.09 ^b	7.53 ± 0.08 ^b	147.9 ± 4.7 ^b	223.4 ± 4.4 ^a	74.7 ± 2.15 ^a	252.9 ± 3.1 ^a
500	19.67 ± 0.31 ^a	4.69 ± 0.15 ^a	14.9 ± 0.43 ^a	4.24 ± 0.11 ^a	6.71 ± 0.18 ^a	128.9 ± 2.6 ^a	285.8 ± 5.0 ^b	135.4 ± 5.6 ^b	413.7 ± 8.4 ^b

注：同列数据后标不同小写字母者表示差异显著 ($p < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters indicates difference is significant at the 0.05 level between groups.

al 1992)。李彦明等(2008)指出: LDH主要功能是将胆固醇从肝胰脏转运至周围的血管中, 尤其是到心脏周围的血管中, 容易造成其在血管壁的积累, 可能引起动脉硬化。鱼体血浆中胆固醇含量增加, 会出现动脉硬化病发症(Farrell et al 1983)。

本实验中浸泡24 h后, 除500 mg/L浓度组外, T-CHO随着ARS浓度的升高而升高, 这与姚龙章等(2011)关于 Cu^{2+} 对中华鲟幼鱼胆固醇产生显著影响的研究相一致。当ARS浓度达到500 mg/L时可能阻碍鱼体脂类代谢, 使得血浆中T-CHO含量降低, 其具体作用机理还需要进一步研究。

暂养5 d后, 400 mg/L, 500 mg/L浓度组的总胆固醇显著低于对照组, 同时500 mg/L浓度组葡萄糖显著低于对照组, 其他浓度组与对照组无显著差异。所以高浓度组葡萄糖降低的原因可能是肝脏受到损伤后, 影响肝糖原的合成与分解。总胆固醇降低的原因一个是肝脏受损后, 降低肝脏合成胆固醇的能力, 另外一个原因是糖代谢降低导致低密度脂蛋白生成减少, 不能及时从肝胰脏中携带胆固醇进入血管中使得其含量降低。而暂养10 d后, 只有500 mg/L浓度组血糖, 总胆固醇含量显著低于对照组, 400 mg/L浓度组血糖, 总胆固醇含量与对照组无差异, 可见, 高浓度ARS严重影响幼鱼的肝脏功能, 400 mg/L浓度组经暂养后可得到恢复, 而500 mg/L浓度组因受损严重, 未能完全恢复。

4.4.3 ARS 浸泡 24 h 后对幼鱼血液转氨酶活性的影响

正常生理状况下, 肝脏细胞中的转氨酶仅有很少一部分被释放进入血浆中, 所以正常情况下血浆的转氨酶含量很少, 一旦肝组织病变导致其肝细胞膜的通透性增加, 肝脏组织中的转氨酶会被大量释放进入血液中, 引起血浆中转氨酶升高。因此, 鱼体血浆中转氨酶活性升高意味着肝脏组织受到破坏, 肝负担加重(张永嘉等 1994; 尾崎久雄 1982), 血清中转氨酶是肝功能重要的血液学指标(Jyothi et al 1997)。ALT主要分布在肝细胞浆中, AST主要分布在肝细胞的线粒体中(LI Y et al 2008)。本实验研究发现: 低浓度ARS浸染24 h后, 中华倒刺鲃幼鱼血液中AST、ALT含量降低, 说明肝脏为应对低浓度刺激会增加应激蛋白类的合成, 蛋白代谢强度增大, 使得肝脏中AST、ALT含量降低, 释放到血液中比较少, 导致血液中转氨酶含量减少, 随着ARS浓度升高, 血液中转氨酶含量升高, 说明此时肝脏已受到一定程度损伤。

这与陈寅儿等（2005）报道的鲈鱼患病后血液中AST、ALT酶活上升，表明鱼体肝脏组织受损的结论一致。

暂养5 d后，400 mg/L，500 mg/L浓度组转氨酶活性显著高于对照组，而暂养10 d后400 mg/L浓度组转氨酶已恢复，与对照组无显著差异，而500 mg/L浓度组转氨酶活性显著高于对照组，尽管在高浓度ARS的胁迫下肝脏都受到一定程度损伤，但因浓度不同，组织细胞受损程度有所差异。400 mg/L浓度组肝脏可能受到轻型损伤，细胞中线粒体仍保存完整，暂养10 d后通过自身的代谢能够恢复。而500 mg/L浓度组肝细胞受损程度比较严重，肝细胞线粒体遭到严重破坏，无法通过自身代谢而恢复正常，所以暂养10 d后转氨酶活性依然显著高于对照组。

4.4.4 ARS 浸泡 24 h 后对幼鱼血液中肌酐和碱性磷酸酶的影响

血浆碱性磷酸酶（ALP）主要来自肝脏与骨骼，是以酶原的形式存在于肝细胞中，它参加机体中许多生理代谢过程（物质转运、离子分泌、软骨钙化等）（王维娜等 2001），ALP在鱼体中会直接参加磷酸基团的转移与相关代谢反应，所以其在物质代谢与免疫保护方面有重要作用（区又君等 2011），碱性磷酸酶活性降低表明急性低氧胁迫可能对机体免疫力造成不利影响。ALP常被用来指示肝功能和骨损伤（Richard et al 1987）。浸泡 24 h后，ARS染液浓度很低时，机体处于应激状态，新陈代谢强度较高，肝脏代谢旺盛，因而血液中会产生较多ALP来帮助机体应对这种生理应激状态。随着ARS浓度增大，应激强度增大，超过了机体的调节能力，ALP合成受阻，导致血液中含量下降，同时也说明处于高浓度ARS浸泡下机体肝脏受到一定程度损伤，这与章龙珍等（2010）研究的 1.6 mg/L Pb的长期胁迫可能破坏了中华鲟幼鱼的解毒调节机制，有可能会诱发肝组织损伤的研究一致。

而暂养 5 d后，400 mg/L，500 mg/L浓度组碱性磷酸酶显著低于对照组，可看出高浓度ARS浸泡对其肝脏造成了损伤，使得肝脏组织合成碱性磷酸酶的能力下降，同时会对幼鱼免疫系统造成损伤。暂养 10 d后，400 mg/L浓度组肌酐和碱性磷酸酶指标在自身的组织代偿作用下已得到恢复，而 500 mg/L浓度组幼鱼肝脏受损后并未恢复。

肌酐（CRE）是鱼体运动时肌肉组织产生的代谢产物，最后由肾脏排出体外。血浆中CRE含量一旦过高，意味其肝脏功能受损（周玉等 2002）。同时肌酐又是能够反映鱼体鳃和肾脏机能的重要生化指标，其含量升高意味鱼体鳃部与肾脏组织因损伤而发生机能紊乱（Burtis et al 1996）。尾崎久雄（1982）认为肾脏机能一旦发生障碍，血清中肌酐含量可能增大。经ARS浸泡24 h后，血浆中CRE随着ARS染液浓度升高呈现显著性升高。说明随着ARS浓度逐渐升高，幼鱼鳃部和肾脏组织负担不断加重，高浓度ARS染液可能对中华倒刺鲃幼鱼的鳃和肾脏造成一定损伤，这和巩华等（2005）研究给鲤投喂恩诺沙星和氯霉素后，其血液中非蛋白氮和CRE均高于对照组，说明药物已对肝脏和肾脏造成了损伤的结论一致。

暂养5 d后，400 mg/L，500 mg/L浓度组肌酐显著性高于对照组，其他浓度组与对照组无显著差异。说明过高浓度的ARS会对幼鱼鳃和肾脏造成损伤，加重鳃和肾脏的负担，使其功能出现紊乱。与区又君等（2014）关于低氧胁迫对卵形鲳鲷生化指标的研究结果一致。暂养10 d后，400 mg/L浓度肌酐含量与对照组无显著差异，说明其经过自身组织代偿功能，肾脏和鳃组织已得到一定限度的恢复，而500 mg/L浓度组肌酐显著高于对照组，说明500 mg/L浓度组幼鱼鳃和肾脏组织受损后无法恢复。

4.5 结论

综合毒理实验浸泡过程中幼鱼死亡率和浸泡24 h后幼鱼各生化指标的变化两方面分析可知，当ARS染液浓度 ≤ 200 mg/L时，对中华倒刺鲃幼鱼比较安全；当ARS染液浓度 ≥ 300 mg/L时，中华倒刺鲃幼鱼虽然不会出现死亡，但可能会对鳃、肝脏、肾脏等器官造成一定程度的损伤。

浸泡24 h后，由3次血液生化指标数据综合分析可得：经300 mg/L，400 mg/L浓度组浸泡过的幼鱼其受到的组织损伤在暂养5 d后可以在自身组织的代偿作用下得以恢复，而500 mg/L浓度组所造成的组织损伤经过10 d暂养仍未得到恢复，所以对中华倒刺鲃幼鱼进行茜素红S浸泡标记时的浓度不能超过400 mg/L。

第五章 茜素红 S 对幼鱼不同组织抗氧化酶系统的影响

5.1 前言

在长期进化过程中, 需氧生物在与大自然相互选择的适应中形成一系列抗氧化机制来避免代谢过程中氧自由基所对机体造成伤害。鱼类受到外源因子胁迫时, 会在机体中产生大量的氧自由基 (ROS), ROS 是生物体内最常见的自由基, 一旦生成过多会对机体造成氧化胁迫, 引起组织脂质过氧化, 监测组织中丙二醛 (MDA) 含量可间接反映组织细胞的损伤程度。而机体抗氧化酶系统可以有效防止氧自由基对机体造成损害。目前鱼体抗氧化酶系统中主要的抗氧化酶有超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GPH-Px) 等 (唐学玺等 2000; 王重刚等 2002)。

近些年, 化学荧光标记已被广泛应用于水生生物的标记放流工作中, 并在种群生长动态调查, 种群的年龄组成确定以及种群的区别与鉴定等方面取得了极显著成效 (Oliveira et al 1996; Stewart et al 1996)。采用化学荧光浸泡标记鱼类, 可以减少鱼体受到的损伤, 降低死亡率, 操作简单, 标记均匀, 保存时间长, 可短期内实现大规模标记放流的需要 (Szedlmayer et al 1995)。目前, 国内外就化学荧光标记的研究方面仅仅局限在标记效果、人工成本、放流鱼的成活率、生长指标、标记的持久性上。而荧光物质的浓度过高、浸泡时间过长都会对标记鱼类产生毒性, 从而影响其生理功能。当鱼体浸泡于化学荧光染液中时, 机体会处于应激状态, 机体产生的氧自由基会对机体造成氧化损伤 (Silva et al 1999)。而关于浸泡过程中化学荧光物质是否会对放流鱼类体造成损伤以及损伤的程度如何等相关研究知之甚少。当机体处于应激状态时, 机体的抗氧化酶系统会自发启动用以清除氧自由基以减轻机体所受到的氧化损伤。通过测定组织抗氧化酶活性就可以在一定程度上了解鱼体在浸泡过程中所受的损伤。

本实验采用不同浓度茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼进行浸泡染色, 并测量浸泡 24 h, 暂养 5 d, 10 d 后不同组织抗氧化酶的活性, 对茜素红 S 进行安全评估, 并探知茜素红 S 对其不同组织的生理影响, 以期为荧光浸泡标记法的安全程度提供参考依据。

5.2 材料与方法

5.2.1 实验用鱼

同上 2.2.1

5.2.2 实验条件

同上 2.2.3

5.2.3 实验方法

根据急性毒理实验结果,正式实验在 0 mg/L 的对照组和最大耐受质量浓度之间按等差数列设置 6 个 ARS 质量浓度组,分别为: 0 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L、500 mg/L。各浓度组设 3 个平行,每组浓度投放 12 尾中华倒刺鲃幼鱼,浸泡 24 h 后,在各浓度组中分别随机取 3 尾中华倒刺鲃幼鱼,经过 200 mg/L MS-222 麻醉后,迅速取出相应的脑、鳃、肝脏组织并放入 5 mL 塑料离心管中,置 -20℃ 冰箱保存,测定不同浓度处理组中华倒刺鲃幼鱼不同组织的 SOD、CAT、GSH-Px 活性和 MDA 含量。

取完样后,把剩余中华倒刺鲃幼鱼分别放入编号为 100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L、500 mg/L 的暂养池中暂养,并在 5 d、10 d 之后按照同样方法进行取样测量其抗氧化酶活性和丙二醛含量。

5.2.4 组织匀浆的制备及酶活性的测定

用预冷的生理盐水漂洗去血液,剪去肝脏表面附着的结缔组织,再用滤纸吸去表面水分,称取适量的样品,按质量:体积=1:10 加入 4℃ 预冷的生理盐水,在冰浴条件下,用超声波进行匀浆。匀浆液用冷冻离心机在 4000 r/min 下离心 10 min,取上清液备用。

样品上清液中蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝比色法,SOD 测定采用黄嘌呤氧化法改进的方法—羟胺法,CAT 测定采用一般分光光度法,GSH-Px 测定采用 5,5'-二硫代硝基苯甲酸(DTNB)比色法,丙二醛(MDA)测定采用 TBA 法,试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,操作按试剂盒说明进行。SOD 活性单位定义为每毫

克组织蛋白在 1 mL 反应液中, SOD 抑制率达到 50%时所对应的 SOD 量为 1 个活性单位(U); GSH-Px 活性单位定义为每毫克组织蛋白, 每分钟扣除非酶反应的作用, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 $\mu\text{mol/L}$ 为 1 个酶活性单位(U); CAT 酶活性单位定义为每毫克组织蛋白每秒分解浓度降低 1 μmol 的 H_2O_2 的量为 1 个活性单位(U)。

5.2.5 数据统计

实验所得数据用平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SD)表示。实验数据通过SPSS 17.0软件处理, 进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和Duncan多重比较。 $p<0.05$ 表示差异显著, $p<0.01$ 表示差异极显著。SOD、CAT和GSH-Px活性分别测定3次, 分析各浓度处理组与对照组的差异显著性。用Excel 2007版软件作图。

5.3 实验结果

5.3.1 茜素红 S 浸泡 24 h 后脑组织抗氧化酶活性

在不同浓度 ARS 染液浸泡 24 h 后, 脑组织 SOD 酶活性变化趋势如图 5-1 所示: 随着 ARS 浓度不断升高, SOD 酶活性先升高后下降, 当 ARS 浓度为 400 mg/L 时, SOD 酶活性达到最大值(21.74 ± 0.54), 显著高于对照组(13.03 ± 0.62) ($p<0.05$), 除 100 mg/L 浓度组中 SOD 略升高外 ($p>0.05$), 其他浓度组 SOD 显著高于对照组 ($p<0.05$), ARS 对脑组织 SOD 酶整体上表现为诱导作用。脑组织 CAT 酶活性变化趋势与 SOD 的趋势相同(如图 5-2), 400 mg/L 浓度组时达到最大(2.91 ± 0.27), 显著高于对照组(2.08 ± 0.14) ($p<0.05$), 整体表现为诱导作用。而随着 ARS 浓度不断升高, GSH-Px 酶活性变化趋势为不断升高(如图 5-3)。总之, ARS 对脑组织抗氧化酶系统整体表现为诱导作用。

5.3.2 茜素红 S 浸泡 24 h 后鳃组织抗氧化酶活性

随着 ARS 浓度升高, 鳃组织 SOD 酶活性表现为先降低后升高再降低的趋势(如图 5-1), 当 ARS 浓度为 300 mg/L 时, SOD 酶活性达到最大值(11.38 ± 0.51), 明显高于对照组(8.52 ± 0.34) ($p<0.05$), 100 mg/L, 500 mg/L 浓度组中, SOD 酶活性显著低于对照组 ($p<0.05$), 表现为抑制作用, 其他浓度组 SOD 酶活性显著高于对照组 ($p<0.05$), 表现为诱导作用。鳃组织 GSH-Px 酶活性变化趋势与 SOD 酶一致, 如图 5-3 所示: 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L 浓度组 GSH-Px 酶活性显

著或不显著高于对照组，表现为诱导作用，而 100 mg/L，500 mg/L 浓度组 GSH-Px 酶活性显著低于对照组 ($p<0.05$)，表现为抑制作用。鳃组织 CAT 酶活性随着 ARS 浓度升高表现为先升高后降低的趋势（如图 5-2）。当 ARS 浓度达 300 mg/L 时，CAT 酶活性达到最大值 (4.28 ± 0.18)，显著高于对照组 (2.43 ± 0.05) ($p<0.05$)，除 500 mg/L 浓度组 CAT 显著低于对照组 ($p<0.05$)，表现为抑制作用外，其他浓度组均显著高于对照组 ($p<0.05$)，表现为诱导作用。

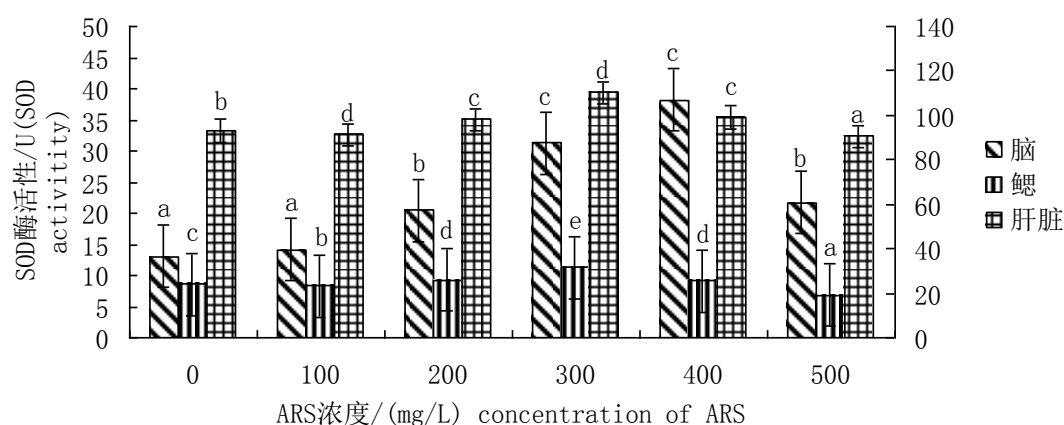


图 5-1 不同浓度 ARS 胁迫 24h 后，中华倒刺鲃幼鱼不同组织 SOD 活性的影响，不同字母表示同一组织的组间有显著性差异 ($p<0.05$)，肝脏数据见右纵坐标，下同。

Fig. 5-1 Effects of ARS stress 24h on activity of SOD of different organization in *Spinibarbus sinensis*, different letters mean significant difference with control ($P<0.05$). data of the live according to light ordinate, the same as the following

5.3.3 茜素红 S 浸泡 24 h 后肝脏组织抗氧化酶活性

随着 ARS 浓度升高，肝脏组织 SOD 酶活性表现为先降低后升高再降低的趋势（如图 5-1），当 ARS 浓度达 300 mg/L 时，SOD 酶活性达到最大值 (110.39 ± 0.89)，显著高于对照组 (93.12 ± 0.76) ($p<0.05$)，100 mg/L，500 mg/L 浓度组中，SOD 酶活性显著低于对照组 ($p<0.05$)，表现为抑制作用，其他浓度组 SOD 酶活性显著高于对照组 ($p<0.05$)，表现为诱导作用。肝脏组织 CAT 酶活性随着 ARS 浓度升高表现为先升高后降低的趋势（图 5-2）。当 ARS 浓度为 300 mg/L 时，CAT 酶活性达到最大值 (86.34 ± 0.18)，显著高于对照组 (66.95 ± 0.33) ($p<0.05$)，除 100 mg/L，500 mg/L 浓度组 CAT 显著低于对照组 ($p<0.05$)，表现为抑制作用外，其

他浓度组均显著高于对照组 ($p<0.05$)，表现为诱导作用。肝脏组织 GSH-Px 酶活性变化趋势为波动性，如图 5-3 所示。200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L 浓度组 GSH-Px 酶活性显著高于对照组 ($p<0.05$)，表现为诱导作用，而 100 mg/L, 500 mg/L 浓度组 GSH-Px 酶活性显著或者不显著的低于对照组，表现为抑制作用。

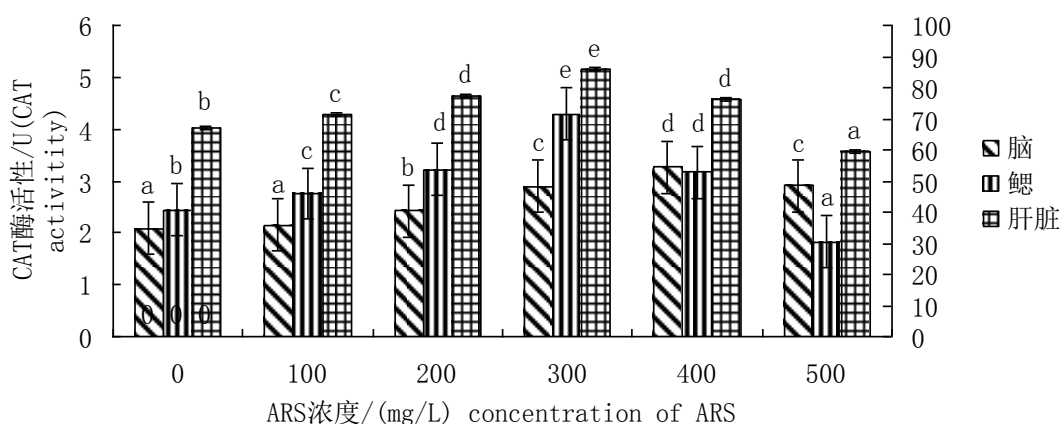


图 5-2 不同浓度 ARS 胁迫 24h 后，中华倒刺鲃幼鱼不同组织 CAT 活性的影响，不同字母表示组间有显著性差异 ($p<0.05$)。

Fig. 5-2 Effects of ARS stress 24h on activity of CAT of different organization in *Spinibarbus sinensis*, different letters mean significant difference with control ($P<0.05$).

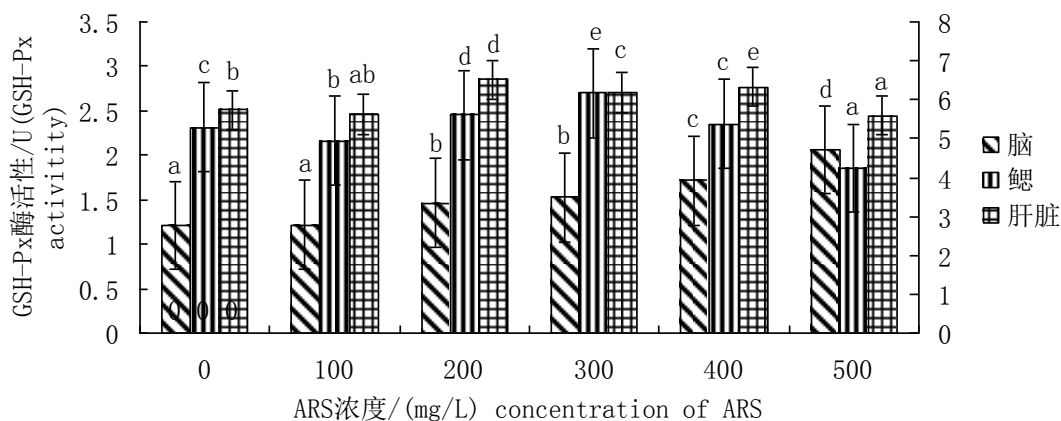


图 5-3 不同浓度 ARS 胁迫 24h 后，中华倒刺鲃幼鱼不同组织 GSH-Px 活性的影响，不同字母表示组间有显著性差异 ($p<0.05$)。

Fig. 5-3 Effects of ARS stress 24h on activity of GSH-Px of different organization in *Spinibarbus sinensis*, different letters mean significant difference with control ($P<0.05$).

5.3.4 茜素红 S 浸泡 24 h 后不同组织丙二醛的含量

不同浓度 ARS 浸泡 24 h 后, 中华倒刺鲃幼鱼不同组织 MDA 含量的变化如图 5-4 所示: 可以看出不同组织 MDA 含量差异明显, 从高到低依次为: 肝脏, 鳃, 脑。这可能与不同组织行使不同的生理机能有关。随着 ARS 浓度不断升高, 脑组织 MDA 含量变化趋势是先降低后升高, 在 300 mg/L 浓度组中达到最低值, 显著低于对照组 ($p<0.05$), 而 400 mg/L、500 mg/L 浓度组 MDA 含量显著高于对照组 ($p<0.05$)。鳃组织 MDA 含量随 ARS 浓度的升高不断升高, 除 100 mg/L 浓度组 MDA 含量略低于对照组外 ($p>0.05$), 其他浓度组 MDA 含量都显著高于对照组 ($p<0.05$)。肝脏组织中 MDA 含量随 ARS 浓度的升高先降低后升高。100 mg/L 浓度组显著低于对照组 ($p<0.05$), 200 mg/L、300 mg/L 浓度组略低于对照组 ($p>0.05$), 400 mg/L、500 mg/L 浓度组显著高于对照组 ($p<0.05$)。

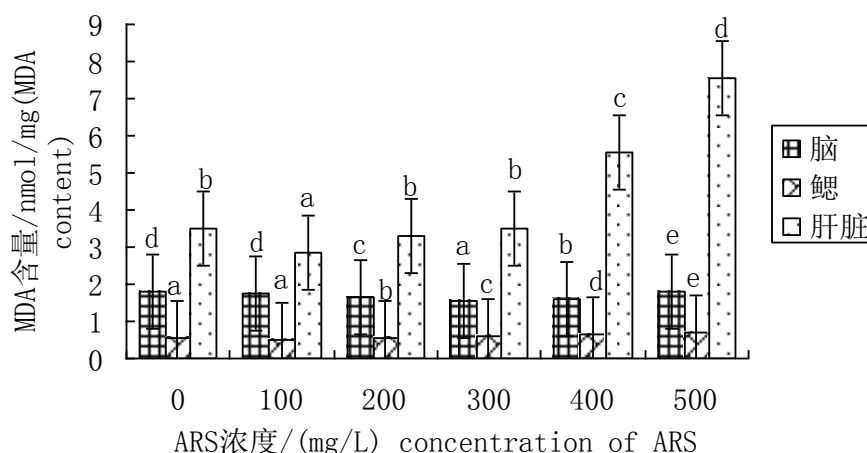


图 5-4 不同浓度 ARS 胁迫 24h 后, 中华倒刺鲃幼鱼不同组织丙二醛的含量, 不同字母表示组间有显著性差异 ($p<0.05$)。

Fig 5-4 content of ARS stress 24h on MDA of different organizations in *Spinibarbus sinensis*, different letters mean significant difference with control ($P<0.05$)

5.3.5 暂养后脑组织抗氧化酶活性的恢复

暂养 5 d 后, 如图 5-5、5-6、5-7 所示: 随着 ARS 浓度的升高, 脑组织的 SOD, CAT, GSH-Px 3 种抗氧化酶的活性依然表现为不断升高的趋势。同时各浓度组 SOD

活性均显著高于对照组 ($P<0.05$)； ≥ 300 mg/L 的浓度组中 CAT 活性显著高于对照组 ($P<0.05$)； ≥ 400 mg/L 的浓度组中 GSH-Px 活性显著高于对照组 ($P<0.05$)。

暂养 10 d 后，如图 5-8、5-9、5-10 所示：脑组织中 3 种抗氧化酶除 500 mg/L 浓度组 SOD 活性显著高于对照组外 ($P<0.05$)，其他浓度组抗氧化酶活性与对照组无显著性差别。

5.3.6 暂养后鳃组织抗氧化酶活性的恢复

如图 5-5、5-6、5-7 所示：随着 ARS 浓度的升高，鳃组织 SOD, CAT, GSH-Px3 种抗氧化酶活性表现为先升高后下降，除 100 mg/L 浓度组抗氧化酶活性与对照组无显著性差异 ($P>0.05$)，其他浓度组均与对照组有显著性差异 ($P<0.05$)，400 mg/L 浓度组抗氧化酶的活性最高 ($P<0.05$)，500 mg/L 浓度组抗氧化酶活性最低，且显著低于对照组 ($P<0.05$)。

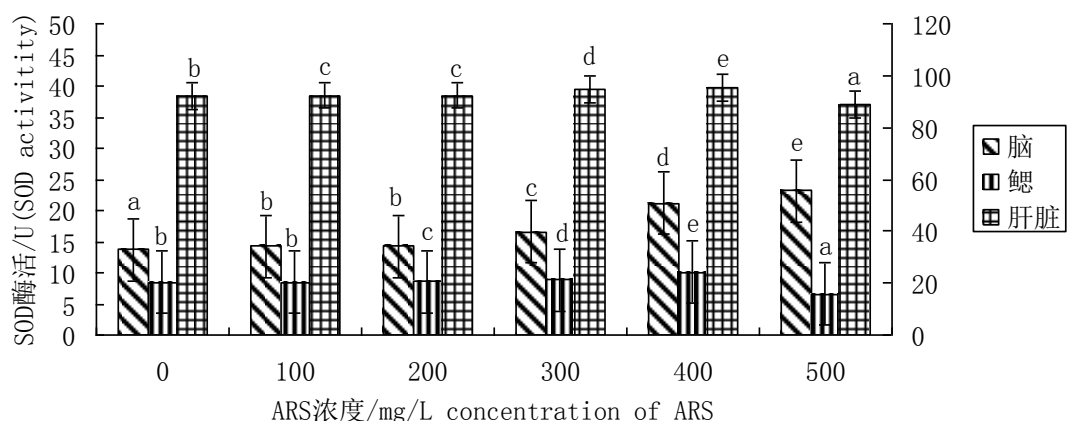


图 5-5 浸泡 24h 之后，暂养 5 d 后中华倒刺鲃幼鱼的不同组织 SOD 活性变化，不同字母表示组间有显著性差异 ($p<0.05$)，肝脏数据见右坐标。

Fig.5-5 Effects of ARS on activity of SOD of different organization in *Spinibarbus sinensis* after temporary support for 5d ,different letters mean significant difference with control ($P<0.05$).

data of the live according to light ordinate ,the same as the following

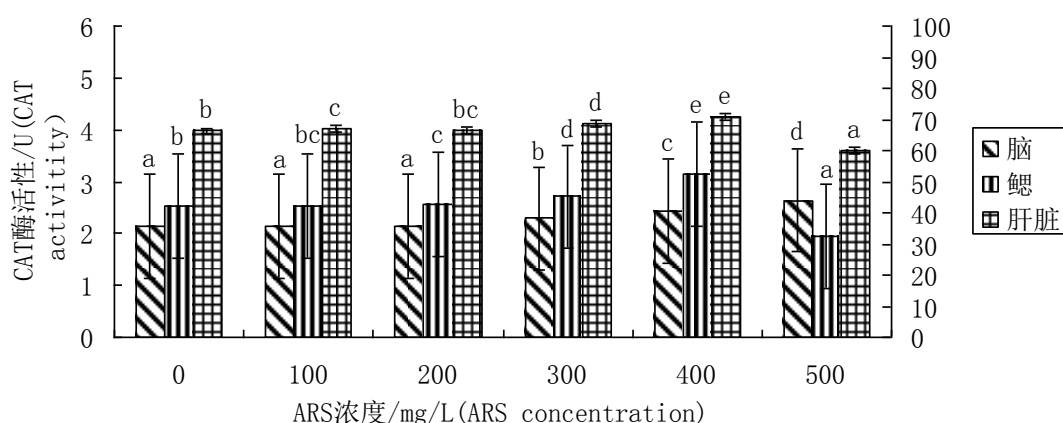


图 5-6 浸泡 24 h 后，暂养 5 d 后中华倒刺鲃幼鱼的不同组织 CAT 活性变化，不同字母表示组间有显著性差异 ($p < 0.05$)。

Fig. 5-6 Effects of ARS on activity of CAT of different organization in *Spinibarbus sinensis* after temporary support for 5d ,different letters mean significant difference with control ($P < 0.05$).
data of the live according to light ordinate ,the same as the following

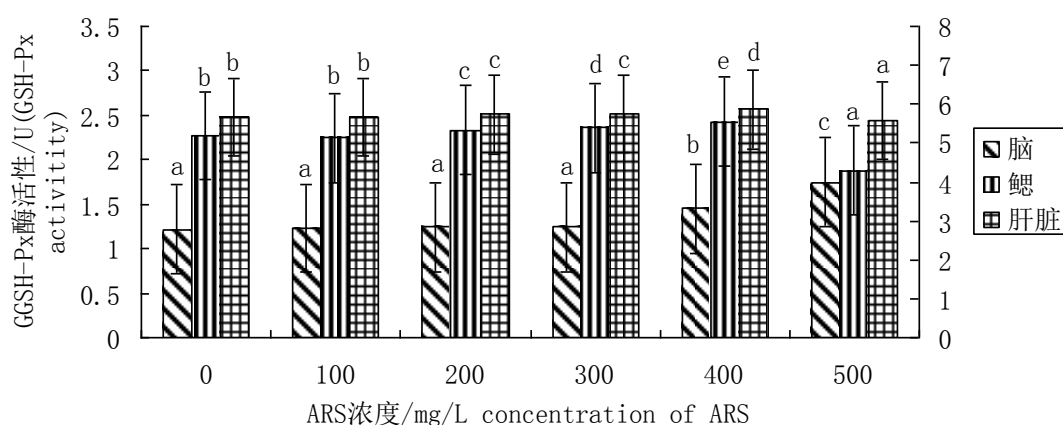


图 5-7 浸泡 24 h 后，暂养 5 d 后中华倒刺鲃幼鱼的不同组织 GSH-Px 活性变化，不同字母表示组间有显著性差异 ($p < 0.05$)。

Fig. 5-7 Effects of ARS on activity of GSH-Px of different organization in *Spinibarbus sinensis* after temporary support for 5d ,different letters mean significant difference with control ($P < 0.05$).
data of the live according to light ordinate ,the same as the following

暂养 10 d 后，如图 5-8、5-9、5-10 所示：鳃组织中 SOD，CAT 除 500 mg/L 浓度组酶活显著高于对照组外 ($p < 0.05$)，其他浓度组酶活与对照组无显著性差异 (p

>0.05)；而 400 mg/L 鳃组织 GSH-Px 酶活显著高于对照组 ($p<0.05$)，500 mg/L 鳃组织 GSH-Px 酶活显著低于对照组 ($p<0.05$)。

5.3.7 暂养后肝脏组织抗氧化酶活性的恢复

暂养 5 d 后，如图 5-5、5-6、5-7 所示：随着 ARS 浓度的升高肝脏组织的 SOD，CAT，GSH-Px 3 种抗氧化酶活性表现为先升高后下降的趋势，400 mg/L 浓度组抗氧化酶的活性最高 ($P<0.05$)，500 mg/L 浓度组抗氧化酶活性最低，且显著低于对照组 ($P<0.05$)。

暂养 10 d 后，如图 5-8、5-9、5-10 所示：肝脏组织中 3 种抗氧化酶除 500 mg/L 浓度组 SOD，CAT，GSH-Px 酶活性显著低于对照组外 ($p<0.05$)，其他浓度组抗氧化酶活性与对照组无显著性差异。

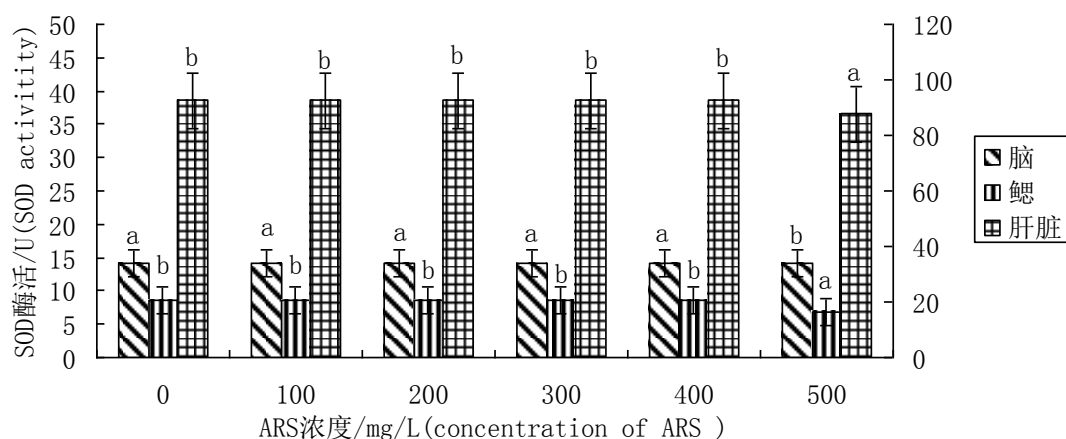


图 5-8 浸泡 24 h 之后，暂养 10 d 后中华倒刺鲃幼鱼的不同组织 SOD 活性变化，不同字母表示组间有显著性差异 ($p<0.05$)。

Fig. 5-8 Effects of ARS on activity of SOD of different organization in *Spinibarbus sinensis* after temporary support for 10d ,different letters mean significant difference with control ($P<0.05$) . data of the live according to light ordinate ,the same as the following

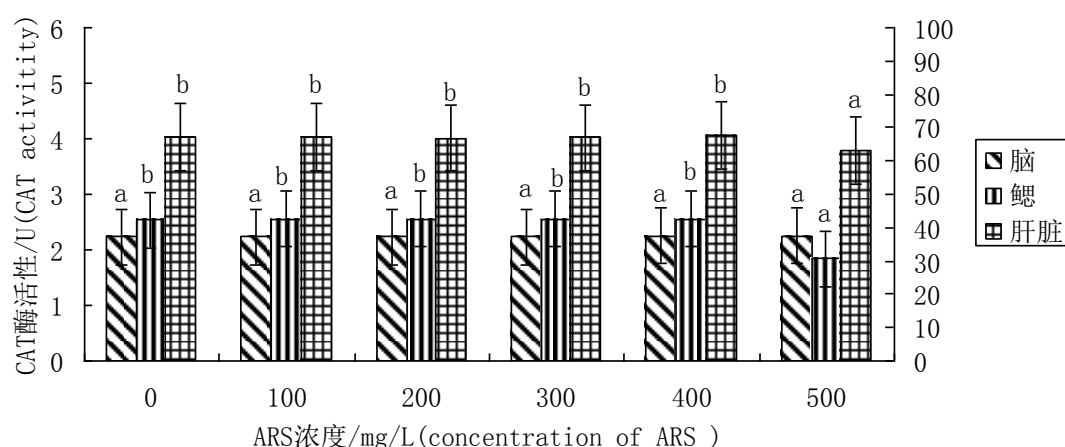


图 5-9 浸泡 24 h 之后，暂养 10 d 后中华倒刺鲃幼鱼的不同组织 CAT 活性变化，不同字母表示组间有显著性差异 ($p < 0.05$)。

Fig. 5-9 Effects of ARS on activity of CAT of different organization in *Spinibarbus sinensis* after temporary support for 10d ,different letters mean significant difference with control ($P < 0.05$) . data of the live according to light ordinate ,the same as the following

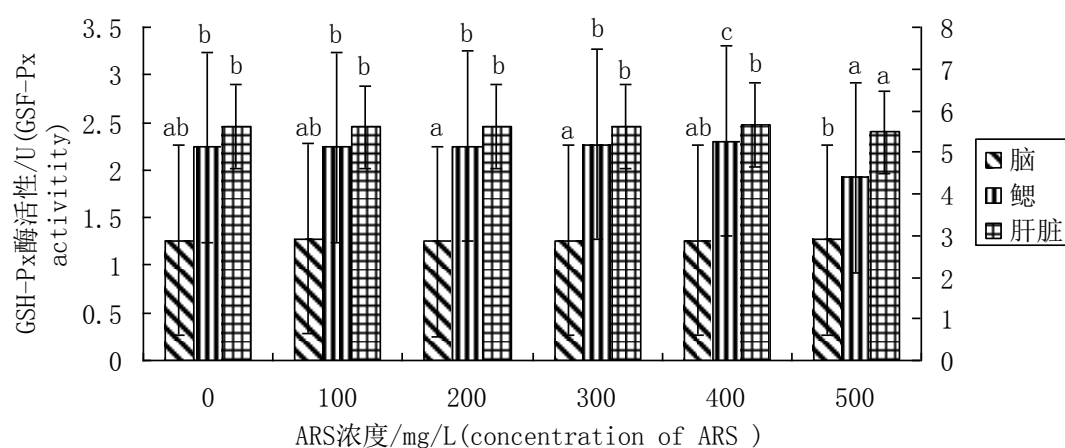


图 5-10 浸泡 24 h 之后，暂养 10 d 后中华倒刺鲃幼鱼的不同组织 GSH-Px 活性变化，不同字母表示组间有显著性差异 ($p < 0.05$)。

Fig. 5-10 Effects of ARS on activity of GSH-Px of different organization in *Spinibarbus sinensis* after temporary support for 10d ,different letters mean significant difference with control ($P < 0.05$) . data of the live according to light ordinate ,the same as the following

5.3.8 暂养后不同组织丙二醛含量的变化

暂养 5 d 后, 如图 5-11 所示: 脑组织中 MDA 含量随着 ARS 浓度的升高先下降后升高, 100 mg/L 浓度组 MDA 含量略低于对照组 ($p>0.05$), 其他浓度组中 MDA 含量与对照组有显著性差异 ($p<0.05$), 400 mg/L 浓度组 MDA 含量最低 ($p<0.05$), 500 mg/L 浓度组含量最高 ($p<0.05$); 鳃组织中 MDA 含量随着 ARS 浓度的升高不断升高, ≥ 300 mg/L 浓度组 MDA 含量显著高于对照组 ($p<0.05$); 肝脏组织 MDA 含量随 ARS 浓度的升高先降低后升高, 100 mg/L 浓度组 MDA 含量最低, 显著低于对照组 ($p<0.05$), 500 mg/L 浓度组 MDA 含量最高, 显著高于对照组 ($p<0.05$)。

暂养 10 d 后, 如图 5-12 所示: 各浓度组脑组织 MDA 含量与对照组无显著性差异 ($p>0.05$); 除 500 mg/L 浓度组鳃组织, 肝脏组织中 MDA 含量显著低于对照组外 ($p<0.05$), 其他各浓度组鳃组织, 肝脏组织中 MDA 含量与对照组无显著性差异 ($p>0.05$)。

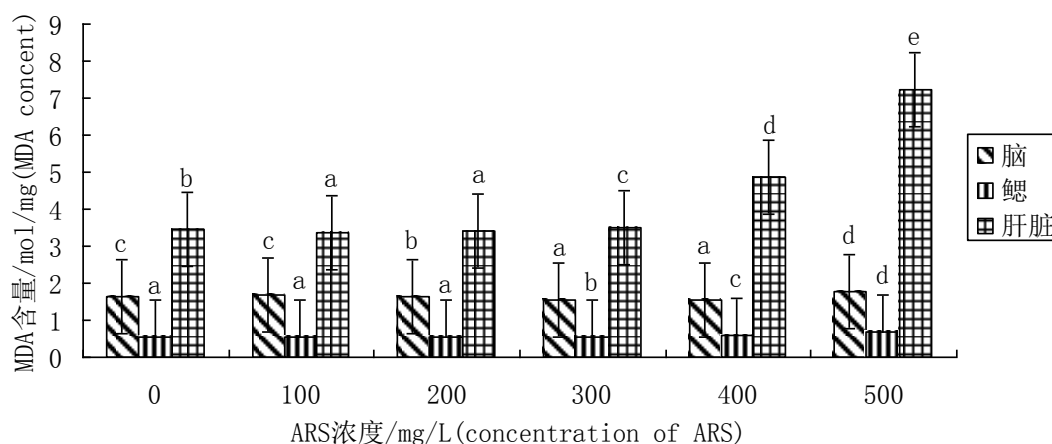


图 5-11 不同浓度 ARS 胁迫 24 h, 暂养 5 d 后, 中华倒刺鲃幼鱼不同组织丙二醛的含量, 不同字母表示组间有显著性差异 ($p<0.05$)。

Fig 5-11 Content of ARS on MDA of different organizations in *Spinibarbus sinensis* after temporary support for 5d, different letters mean significant difference with control ($P<0.05$)

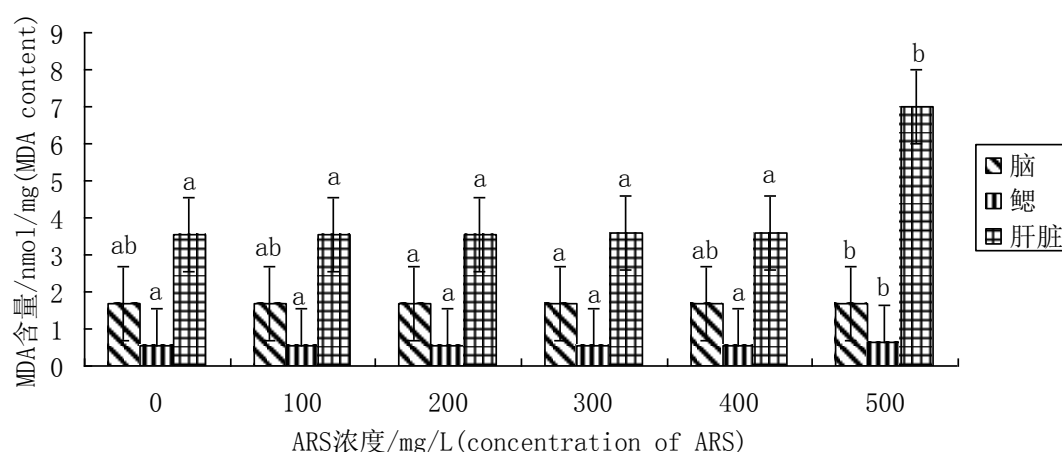


图 5-12 不同浓度 ARS 胁迫 24 h，暂养 10 d 后，中华倒刺鲃幼鱼不同组织丙二醛的含量，不同字母表示组间有显著性差异 ($p < 0.05$)。

Fig 5-11 Content of ARS on MDA of different organizations in *Spinibarbus sinensis* after temporary support for 10d, different letters mean significant difference with control ($P < 0.05$)

5.4 讨论

5.4.1 茜素红 S 浸泡 24 h 后对不同组织抗氧化酶的影响

研究表明：外源性有机物毒性机制主要是因机体中产生过多的氧自由基(ROS)，ROS 具有高度活性，会对细胞成分造成损伤。此时，机体内的抗氧化酶系统就开始发挥抗氧化功能，清除机体中多余的 ROS，减轻机体所受的损伤 (Di Giulio et al 1989)。

SOD 和 CAT 是清除机体中氧自由基最主要及最重要的蛋白酶，对防止机体组织因氧化受损及抗氧化过程中吞噬异物方面有强的防御功能。一般来说，在清除活性氧过程中，SOD 最早将 $O_2^- \cdot$ 歧化为 H_2O_2 和 H_2O ，CAT 再将 H_2O_2 催化为 H_2O 和 O_2 ，从而达到机体解毒作用 (张克烽等 2007)，本研究中，在 ARS 浸泡胁迫下，中华倒刺鲃幼鱼肝脏、鳃、脑组织 SOD、CAT 活性变化趋势基本一致，都呈现先升高再降低的变化规律，表现出毒理学中较普遍的抛物线型剂量效应关系，即低浓度 ARS 对鱼体组织抗氧化酶起诱导作用，而高浓度 ARS 对鱼体抗氧化酶起抑制作用。初步推测随着 ARS 浓度不断升高，低浓度组诱导鱼体产生较多氧自由基，激活了机体抗氧化防御系统，诱导产生了更多 SOD, CAT 等抗氧化酶来清除体内多余的氧自

由基,防止机体受到氧化损伤。当 ARS 浓度进一步升高,鱼体产生的活性氧自由基超过其自身抗氧化系统的抵御能力,因而会对机体细胞产生不可逆的损伤,破坏组织细胞结构,使得抗氧化酶活性又逐渐下降,甚至低于对照组。这与王凡等(2008)、胡蓉等(2011)分别对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)和鲫(*Carassius auratus*)抗氧化酶的研究结果一致。

在 100 mg/L 浓度组中,肝脏组织和鳃组织 SOD 显著低于对照组,可能是在 100 mg/L 浓度 ARS 胁迫下,鱼体处于氧化应激状态,机体代谢增强,产生较多活性氧,机体通过消耗一部分 SOD 来防止活性氧在体内积累,致使 SOD 含量暂时降低。当 ARS 浓度 $\leq$ 300 mg/L 时,肝脏和鳃组织 SOD 和 CAT 活性受到诱导,活性显著升高,这一变化:即有毒物质在低浓度中出现增益是其在无毒情况下的刺激反应,被称为“毒物兴奋效应”。而 500 mg/L 浓度组 SOD 和 CAT 明显受到抑制,出现“毒物抑制效应”。而不同浓度组脑组织 SOD 和 CAT 活性都显著高于对照组,只出现“毒物兴奋效应”。从不同组织抗氧化酶 CAT 和 SOD 活性的变化可看出:500 mg/L 浓度组时,幼鱼肝脏,鳃组织已受到损伤,而脑组织暂时未受到损伤。

GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要过氧化物分解酶,在消除细胞中过氧化氢方面具有与 CAT 相似的能力(Dandapat J et al 2003)。经 ARS 24 h 浸泡后,肝脏组织和鳃组织 GSH-Px 活性随着浓度提高整体呈现先升高后降低的趋势,出现“低促高抑”规律。与赵鹏等(2011)关于钙黄绿素对刺参抗氧化酶研究结果一致。而脑组织 GSH-Px 活性随着浓度提高呈现不断升高趋势,可能是脑组织对 ARS 的耐受度比较高,未超过脑组织的阈值。100 mg/L 浓度组时,肝脏组织和鳃组织 GSH-Px 活性低于对照组,可能是由于 SOD 催化氧自由基生成较多的过氧化氢消耗掉大量的 GSH-Px 致使其活性降低。而肝组织 GSH-Px 活性在 300 mg/L 浓度组中有小幅度回落,可能与肝脏抗氧化酶系统中不同氧化酶发挥作用的阶段不同相关,与肝脏中 CAT 产生一定的竞争作用导致的,其详细生理过程需要进一步的研究。

针对 SOD、CAT 和 GSH-Px 的变化呈现抛物线型剂量效应关系,谭树华(2006)等指出抛物线顶点所对应的污染浓度可作为生物对此污染物的耐受阈值,一旦超过此耐受阈值,相应酶的活性就开始下降,这也是鱼类发生中毒反应的前兆(孟范平等 2008)。本实验结果表明:脑、鳃和肝脏组织的 SOD, CAT 各自对的耐受阈值

各不相同，分别是 400 mg/L，300 mg/L，300 mg/L，而脑，鳃，肝脏组织 GSH-Px 的耐受阈值分别是： ≥ 500 mg/L，300 mg/L，400 mg/L，这可能由于不同组织执行的生理功能不同导致的结果，同时说明抗氧化酶系统的耐受阈值具有组织器官特异性。

5.4.2 茜素红 S 浸泡 24 h 后对不同组织脂质过氧化的影响

丙二醛（MDA）是一种脂质过氧化的代谢产物，其质量分数既能反映脂质过氧化强度，同时也可间接反映鱼类机体中 ROS 含量。MDA 与各抗氧化酶变化相结合，共同反映鱼体所受到的氧化胁迫（Scandalios et al,1993）。从 MDA 含量的数值上可看出不同组织含量差异很大，从大到小依次为肝脏、脑、鳃。抗氧化酶活性和 MDA 含量的组织特异性，可能与不同组织器官执行的生理功能以及代谢水平有关。本实验中，肝脏、脑、鳃组织中 MDA 含量随着 ARS 浓度升高均表现出先降低再升高的趋势，低浓度，中浓度组时，机体不同组织处于氧化应激状态，体内产生较多的氧自由基，刺激机体抗氧化酶系统产生足够多 SOD、CAT、GSH-Px 抗氧化酶来消除氧自由基，减轻脂质过氧化作用，导致机体 MDA 含量降低，但机体抗氧化酶的抗氧化能力是有限的，当 ARS 浓度超过机体所能承受的范围之后，机体会因过量氧自由基的产生，使得机体中脂质过氧化程度进一步加剧，进而组织细胞膜的结构和功能遭到不可逆的损伤，导致 MDA 含量急速上升，最终使得机体生理生化代谢发生障碍，甚至死亡。这种“低抑高促”效应与汪承润等（2005）研究结果一致。可见 MDA 数值越高，表示组织受损程度越严重，在毒理学中，一般利用最低可观察效应质量浓度（LOEC）值来反映鱼体对污染物的敏感度。本实验中肝脏、脑、鳃组织 MDA 的 LOEC 分别是 400 mg/L，500 mg/L，200 mg/L。可见鳃部对茜素红 S 浸泡的敏感性最高。

5.4.3 暂养后幼鱼不同组织抗氧化酶活性的恢复

Winstun 等（1991）认为当机体受到外源刺激后，会诱导产生过多的氧自由基，进而使得鱼体遭到氧化损伤。此时鱼体中抗氧化系统就会自发通过改变酶活性来清除 ROS，防止机体受到氧化损伤。

近年来，由于鱼类生存环境污染的加剧，以及水体中有害物质对机体生理功能的影响日益严重，因此对其毒理研究日益增多，运用 SOD、CAT 和 GSH-Px 和 MDA

等作为环境胁迫程度指标的研究在水生生物中已有广泛的研究 (Rodriguez et al,1993)。本实验中, 暂养5 d之后, 各浓度组脑组织中SOD酶活性显著高于对照组, ≥ 300 mg/L浓度组CAT含量显著高于对照组, ≥ 400 mg/L浓度组GSH-Px含量显著高于对照组, 可能是暂养5 d后, 由于ARS染液胁迫, 体内还存在大量氧自由基需要通过抗氧化酶系统来消除, 所以机体通过提高SOD酶活性来消除自由基对机体的损害, 低浓度组 (100 mg/L, 200 mg/L) 在暂养5 d后其CAT, GSH-Px酶活已恢复到对照组水平。而为消除高浓度组体内过多自由基, 机体刺激抗氧化酶系统产生更多的CAT, GSH-Px来消除氧自由基; 暂养10 d之后, 除500 mg/L浓度组SOD酶活显著高于对照组外, 从低浓度到高浓度组的3种抗氧化酶活性都与对照组无显著性差异。说明脑组织在经过10 d暂养, ARS造成的胁迫损伤通过自身的调节, 基本能恢复正常。

鳃与肝脏组织中抗氧化酶活性在暂养5 d, 10 d后的变化基本一致。暂养5 d后, 各浓度组抗氧化酶活性随ARS浓度的升高先升高后降低, 并在400 mg/L浓度时达到最高, 在500 mg/L浓度组时达到最低。并且暂养10 d后, 除500 mg/L浓度组抗氧化酶活性显著低于对照组外, 其他各浓度组抗氧化酶活性均恢复到对照组水平。表明经ARS浸泡后, 机体产生大量氧自由基, 机体抗氧化酶活性被激活, 大量产生以消除过多的自由基。低浓度组抗氧化酶经过5 d暂养部分能恢复至对照组水平, 暂养10 d后, ≤ 400 mg/L浓度组的氧化酶活性都已恢复至对照组水平, 这与许莉佳 (2009) 研究关于荧光标记斑马鱼稚鱼耳石的效果及其对抗氧化酶活力影响的研究结果一致。而500 mg/L浓度组抗氧化酶活性经10 d的暂养, 酶活性仍显著性低于对照组, 这可能是因为ARS浓度过高造成机体产生大量的氧自由基, 超过了机体自身的清除能力, 引起氧自由基在体内的大量堆积, 引起组织脂质过氧化, 对组织抗氧化酶系统造成了损伤, 降低了组织抗氧化酶合成能力以至于高浓度组抗氧化酶活性降低, 这与夏斌等 (2011) 关于胜利原油对半滑舌鲷肝脏超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性恢复的影响的结果一致。

5.4.4 暂养后幼鱼不同组织脂质过氧化的变化

MDA是鱼体脂质过氧化的代谢产物, 可以和鱼体中机体蛋白质结合, 对鱼体造成损伤, 其含量可以反映机体脂质过氧化代谢速度和程度 (孙淑红等 2009)。经过5 d暂养, 各浓度组脑组织MDA含量随着ARS浓度升高而先下降后升高, 500 mg/L浓

度组MDA含量显著高于对照组，其他浓度组MDA含量降低，是由于ARS的胁迫刺激机体抗氧化酶活性的升高，降低机体中自由基对机体造成的脂质过氧化反应，进而降低机体中MDA含量。而500 mg/L浓度组MDA升高可能是ARS浓度升高，导致机体内氧自由基过多的堆积，暂时使脑组织脂质过氧化加剧，MDA含量升高，但暂养10 d后各浓度组脑组织MDA含量均恢复正常，说明500 mg/L浓度未超过脑组织抗氧化酶的能力范围，通过自身的调节能恢复正常状态。

经过5 d暂养，鳃组织MDA含量随ARS升高不断升高，而肝脏组织MDA含量随ARS升高先降低后升高，100 mg/L，200 mg/L浓度组肝组织MDA含量低于对照组，是因为机体为清除体内的自由基，激活了机体抗氧化酶系统，抗氧化能力增强，降低了脂质过氧化程度，使得MDA暂时低于对照组， ≥ 300 mg/L浓度组鳃，肝脏组织显著高于对照组，说明过高的浓度对组织造成一定损伤，暂养10 d后，仅500 mg/L浓度组的鳃，肝脏组织MDA含量仍显著高于对照组，说明当ARS的浓度为500 mg/L时，机体产生的氧自由基超出了机体所能清除的范围，使得机体内氧自由基大量积累，加剧细胞膜的脂质过氧化，最终导致机体抗氧化酶活性降低或者酶结构遭到破坏，进一步导致抗氧化酶活性降低，导致组织过氧化加剧，使得MDA含量升高。而300 mg/L，400 mg/L浓度组虽然暂时组织受到损伤，通过自身代谢功能的调节能够恢复。但是机体承受ARS浓度浸泡的能力是有限度的，一旦浓度过高，组织就难以恢复，甚至造成代谢紊乱和死亡。

5.5 结论

1、中华倒刺鲃幼鱼不同组织对ARS浸泡的敏感性具有组织特异性。浸泡24 h后，肝脏、鳃组织的抗氧化酶都出现“先扬后抑”现象。

2、中华倒刺鲃幼鱼不同组织对ARS脂质过氧化程度的敏感性从大到小依次是鳃、肝脏，脑。

3、结合抗氧化酶活性和丙二醛含量综合比较可得：肝脏、鳃、脑组织分别在300 mg/L、300 mg/L、400 mg/L时出现中毒前兆，分别在400 mg/L，200 mg/L，500 mg/L时组织已出现脂质过氧化损伤，鳃部组织对ARS最敏感。

4、对中华倒刺鲃幼鱼进行荧光染色标记时，应结合中华倒刺鲃幼鱼鳃组织对 ARS 的耐受度及其标记效果综合考虑 ARS 浓度，且在浸泡过程中应保持溶氧充足。

5、当 ARS 浓度在 0~200 mg/L 时，对中华倒刺鲃幼鱼组织不会造成损伤，当浓度超过 200 mg/L 时，ARS 染液会在对肝脏和鳃组织造成一定损伤。而 300~400 mg/L ARS 浸泡对组织造成的损伤在暂养 10 d 后，通过其自身代谢修复能力恢复正常，500 mg/L 浓度时造成的损伤难以恢复。

第六章 结论与荧光染色标记建议

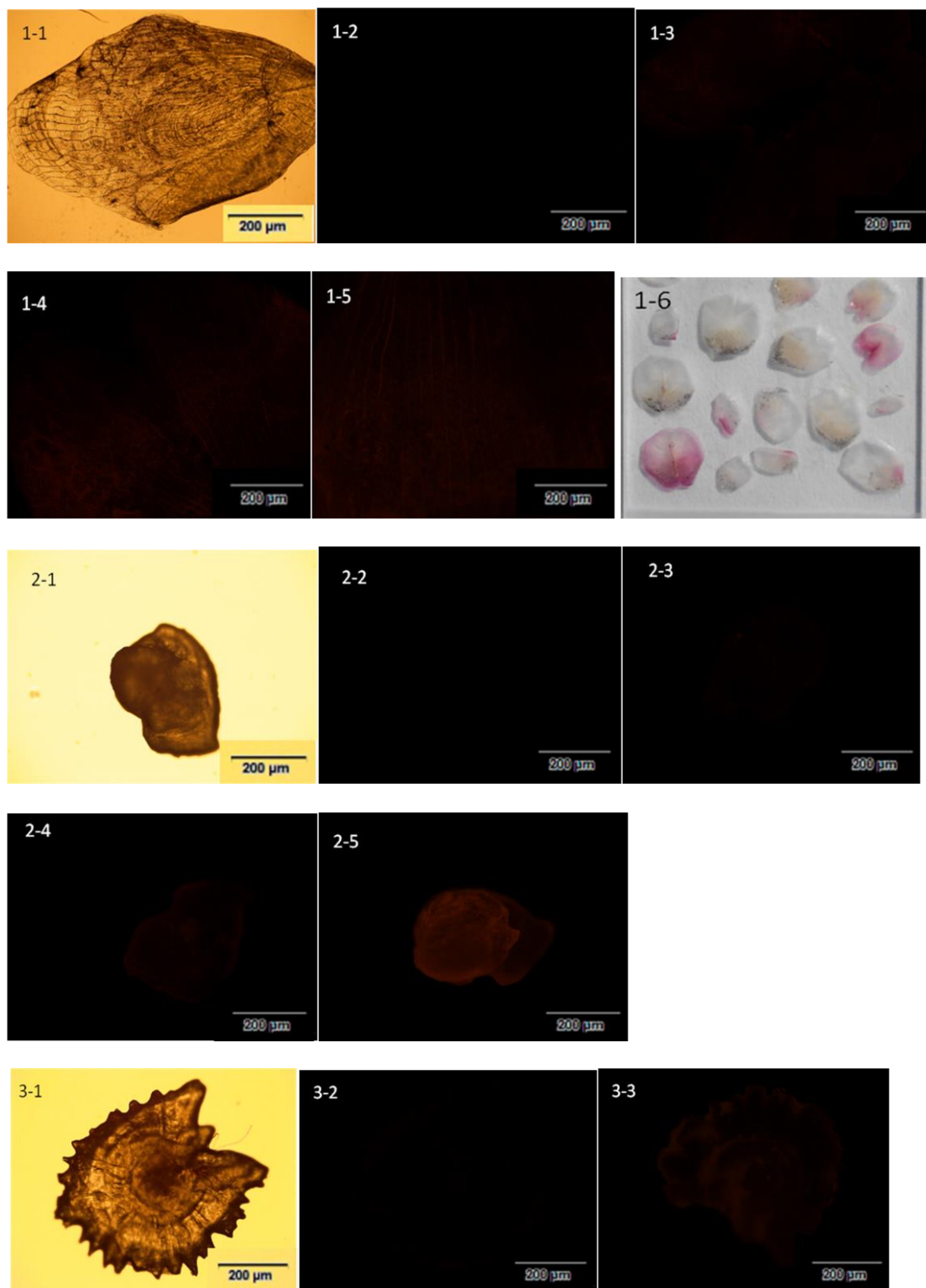
1、通过毒理试验可说明茜素红S对中华倒刺鲃幼鱼的毒性属于低毒性，适用中华倒刺鲃幼鱼的标记。

2、综合考虑本实验ARS浸泡24 h，转入清水暂养5 d，10 d后，3次幼鱼生化各指标与不同组织抗氧化酶变化两方面分析可知，当ARS染液浓度 ≤ 200 mg/L时，对中华倒刺鲃幼鱼比较安全，当ARS染液浓度 ≥ 300 mg/L时，中华倒刺鲃幼鱼虽然不会出现死亡，但可能会对鳃、肝脏、肾脏等器官造成一定程度损伤，同时300 mg/L浓度造成组织损伤经过5 d暂养可恢复，400 mg/L浓度造成的组织损伤经过10 d暂养可恢复，当ARS浓度超过400 mg/L时，对组织造成的损伤可能难以恢复。

3、同样浓度的荧光浸泡，耳石染色效果鳞片，这与标记鱼类的代谢密切相关。本研究中虽然200 mg/L浓度组耳石标记率高达91.7%。但该浓度组标记质量良好的百分比偏低，标记效果不理想，结合生理生化以及抗氧化酶变化综合考虑，建议对中华倒刺鲃幼鱼进行荧光标记时，ARS的最佳标记浓度为300 mg/L。

4、探究鱼类适合的荧光染色标记方法（浸泡浓度和时间）时，要综合考虑多种方面，比如：荧光染料种类，鱼类发育阶段，温度，溶氧等等。首先，不同荧光染料对不同鱼类以及同种鱼类的不同发育阶段的毒性是不同的，所以在寻找最佳荧光染料浓度前，有必要弄清楚染料的毒性；再者，根据标记鱼类的发育阶段来确定最佳浸泡时间，处于快速生长发育期标记鱼类，代谢旺盛，浸泡时间可适当缩短，具体视染色效果而定，处于非快速生长期的标记鱼类，代谢相对缓慢，在不损伤标记鱼组织的前提下，可根据染色效果延长标记时间，甚至超过24h；其次，标记鱼的鳃组织直接暴露于荧光染液中，对荧光染液最敏感，在浸泡过程中，要保持充足的溶氧；最后，在进行荧光标记时，可通过适当提高水体的温度，来促进鱼体自身的代谢，进而提高标记效果。

附图



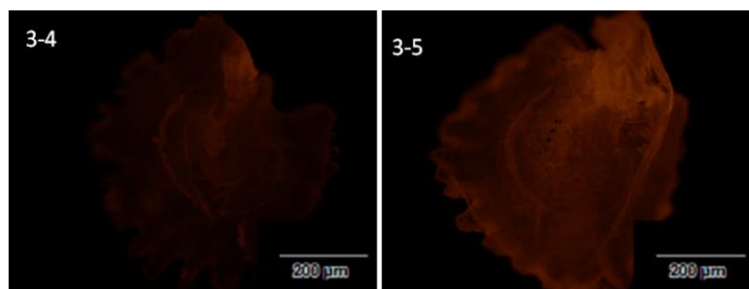


图1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6分别表示鳞片对照组, 0级, 1级, 2级, 3级, 4级的标记质量标准。

Fig 1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6 represents respectively the standard of marking quality for control group, Level 0, Level 1, Level 2, Level 3, Level 4 in scale.

图2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5分别表示微耳石对照组, 0级, 1级, 2级, 3级的标记质量标准。

Fig 2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5 represents respectively the standard of marking quality for control group, Level 0, Level 1, Level 2, Level 3 in lapillus.

图3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5分别表示微耳石对照组, 0级, 1级, 2级, 3级的标记质量标准。

Fig 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5 represents respectively the standard of marking quality for control group, Level 0, Level 1, Level 2, Level 3 in asteriscus.

参考文献

1. 邴旭文. 中华倒刺鲃生物学特性研究. 经济动物学报, 2004, 8 (4): 221-223
2. 蔡焰值, 何长仁, 蔡烨强, 蒋君. 中华倒刺鲃生物学初步研究. 淡水渔业, 2003, 33(3): 16-18
3. 常玉梅, 匡友谊, 曹鼎臣, 梁立群, 孙孝文, 雷清泉. 低温胁迫对鲤血液学和血清生化指标的影响. 2006, 30(5): 701-706
4. 陈锦淘, 戴小杰. 鱼类标志放流技术的研究现状. 水产学报, 2005, (4): 451-456
5. 陈小勇. 云南鱼类名录. 动物学研究, 2013, 34(4): 281-343
6. 陈寓儿, 金珊, 王国良. 鲈鱼溶藻弧菌病的血液生理生化指标研究. 台湾海峡, 2005, 2(1): 104-108
7. 程树东. 中华倒刺鲃神经肽 Y 的 cDNA 克隆与序列分析. [硕士学位论文]. 重庆:西南大学, 2006
8. 巩华, 李华, 于毅, 曲翊, 王恺. 恩诺沙星对鲤酯酶同工酶和血清生理生化指标的影响. 大连水产学院学报, 2005, 20(01): 29-33
9. 郭兵. 病理生理学. 成都: 四川大学出版社. 2009: 280-282
10. 何春林, 付自东, 严太明, 宋昭彬. 用荧光物质浸泡标记重口裂腹鱼仔鱼耳石. 四川动物, 2008, 27(03): 331-334
11. 何福林, 向建国, 李常健, 李治章, 陈开健. 水温对虹鳟血液学指标影响的初步研究. 水生生物学报, 2007, 31(3): 363-369
12. 洪磊, 张秀梅. 环境胁迫对鱼类生理机能的影响. 2004, 22(1): 115-121
13. 湖北省水生生物研究所鱼类研究室. 长江鱼类. 北京: 科学出版社, 1976
14. 胡蓉, 唐正义. 镉对鲫鱼肝胰脏 CAT 和 SOD 活性的影响. 西南大学学报: 自然科学版, 2011, 33(8): 94-98
15. 黄琪淡, 刘丽燕, 范丽萍. 异育银鲫溶血性腹水病的病理生理研究. 水产学报, 1992, 16(4): 316-321
16. 黄洪贵. 中华倒刺鲃胚胎与仔鱼发育的观察. 江西农业大学学报, 2009, 31(6): 1087-1092
17. 黄小贱, 章群, 马奔, 司从利. 中华倒刺鲃线粒体细胞色素 b 基因的遗传多样性分析. 广东农业科学, 2011, 24: 1-4

18. 靳建波, 危起伟, 孙庆亮, 李罗新, 甘芳. 茜素络合物浸泡标记秦岭细鳞鲑发眼卵及仔鱼耳石. 淡水渔业, 2011, 41(2): 10-17
19. 乐佩琦. 中国动物志 硬骨鱼纲 鲤形目 下卷. 2000
20. 李萍, 王宝森. 中华倒刺鲃. 生物学通报, 2009, 43(8): 17-18
21. 李文平, 袁慧, 傅童生, 陈铁桥, 易厚生, 彭涛. 喹乙醇对 AA 鸡微量元素和血液生理生化指标的影响. 湖南农学院学报, 1993, 19(2): 187-193
22. 李彦明, 赵炳芳, 武杰. 中药添加剂对肉杂鸡血清生化指标的影响. 中国兽医杂志, 2008, 44(6): 46-47
23. 刘红柏, 黄江, 马爱枝, 魏巍, 王荻, 卢彤岩. 中草药复方添加剂对施氏鲟生长及血液生化指标的影响. 水产学杂志, 2009, 22(3): 14-18
24. 刘奇. 褐牙鲈标志技术与增殖放流试验研究. [硕士学位论文]. 青岛:中国海洋大学, 2009
25. 刘小玲. 鱼类应激反应的研究. 水利渔业, 2007, 27 (3): 1-3
26. 鲁斌, 王晓斌, 高勤国, 叶显峰, 戴卫兵. 中华倒刺鲃良种引进与池塘养殖模式研究. 安徽农学通报, 2010, 16(9): 188-193
27. 罗芬, 李进寿. 中华倒刺鲃养殖中常见疾病及防治. 河北渔业, 2009, 12:36-38
28. 孟范平, 于腾. 多溴联苯醚在海洋生物中的富集及毒性效应评述. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 1-9
29. 欧阳斌, 常剑波. 荧光物质浸泡标记稀有鮡鲫和彭泽鲫仔、稚鱼. 水生生物学报, 1999, 23(04): 324-329
30. 潘学强, 吴邦亮, 樊朝久, 何明阳. 静水湖泊网箱培育中华倒刺鲃鱼种试验, 淡水渔业, 2002, (3): 10-11
31. 区又君, 罗奇, 李加儿. 卵形鲳鲹碱性磷酸酶和酸性磷酸酶的分布及其低温保存. 南方水产科学, 2011, 7(2): 49-54
32. 区又君, 范春燕, 李加儿, 于娜, 苏慧. 急性低氧胁迫对卵形鲳鲹选育群体血液生化指标的影响. 海洋学报, 2014, 3(4): 126-131
33. 宋昭彬, 曹文宣. 鳙鱼仔稚鱼耳石的标记和其日轮的确证. 水生生物学报, 1999, 6: 677-683
34. 孙淑红, 焦传珍, 刘小林, 魏振林. Cd (II) 对泥鳅抗氧化酶活性和脂质过氧化

- 的影响. 大连水产学院学报, 2009, 24(1): 52-56
35. 孙忠, 余方平, 王跃斌, 鮰鱼增殖放流标志技术的初步研究. 海洋渔业, 2007, 29(4): 344-348
36. 谭树华, 罗少安, 梁芳, 严芳, 何典翼. 亚硝酸钠对鲫鱼肝脏过氧化氢酶活性的影响. 淡水渔业, 2006, 35(5): 16-18
37. 唐洪玉, 刘建虎. 中华倒刺鲃性腺发育观察. 西南农业大学学报, 1998, 20(1): 91-93
38. 唐学玺, 张培玉. 葱对黑鲠超氧化物歧化酶活性的影响. 水产学报, 2000, 24(3): 217-222
39. 万家余, 高宏伟, 王玉平. 5 种中草药对肉仔鸡血液生化指标的影响. 畜牧与兽医, 2003, 35(11): 8-10
40. 汪承润, 闵莉, 谢影, 刘缠民. 稀土钬离子对小鼠肝脏抗氧化酶活力的影响. 卫生毒理学杂志, 2005, 18(4): 243-245
41. 王重刚, 郑微云, 余群, 郁昂, 陈荣. 苯并(a)芘和芘的混合物暴露对梭鱼肝脏抗氧化酶活性的影响. 环境科学学报, 2002, 22 (4): 529-533
42. 王凡, 赵元凤, 吕景才, 刘长发. 铜对牙鲈 CAT, SOD 和 GSH-Px 活性的影响. 华中农业大学学报, 2008, 26(6): 836-838
43. 王正鲲鹏, 赵天, 林小涛, 许忠能, 孙军, 刘明中. 茜素络合物对唐鱼耳石标记效果以及生长和存活率的影响. 生态学杂志, 2015, 34(1): 189-194
44. 王永顺, 黄鸣夏, 张庆生, 孙忠海. 蜇标志放流试验. 浙江水产学院学报, 1994, 13(3): 201-204
45. 王维娜, 王安利, 孙儒泳. 水环境中的铜锌铁钴离子对日本沼虾消化酶和碱性磷酸酶的影响. 动物学报, 2001, 1: 72-77
46. 尾崎久雄. 鱼类血液循环生理. 上海: 上海科学出版社, 1982
47. 熊天寿, 陈明忠. 中华倒刺鲃的人工繁殖和移养试验. 淡水渔业, 1988, (8): 11-14
48. 夏斌, 陈碧鹃, 李传慧, 崔毅, 马绍赛. 胜利原油对半滑舌鳎肝脏超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的影响. 渔业科学进展, 2011, 32: 54-59
49. 徐采, 陈国柱, 林小涛, 姚达章, 赵天. 月鳢仔鱼耳石的荧光标记及其日轮确证. 水生态学杂志, 2012, 33(2): 110-114

50. 许莉佳. 荧光标记斑马鱼稚鱼耳石的效果及其对抗氧化酶活力的影响. [硕士学位论文]. 重庆: 西南大学, 2012
51. 杨干荣. 湖北鱼类志. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1989
52. 余先明, 金根东. 中华倒刺鲃的生物学特征及养殖前景. 现代农业科技, 2008, (16): 250-250
53. 张成文. 中华倒刺鲃池塘养殖技术. 河北渔业, 2008, 5: 32-33
54. 赵建华, 杨德国, 陈建武, 朱永久, 李茜, 冯宪斌, 何勇凤, 吴兴兵. 鱼类应激生物学研究与应用. 生命科学, 2011, 23(4): 394-401
55. 张克烽, 张子平, 陈芸, 林鹏, 王艺. 磊动物抗氧化系统中主要抗氧化酶基因的研究进展. 动物学杂志, 2007, 42(2): 153-160
56. 章龙珍, 冯琳, 侯俊利, 庄平, 冯广朋, 黄晓荣. 铅暴露与排放对中华鲟幼鱼血液中碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶及肌酸激酶活力的影响. 生态学杂志, 2010, 29(07): 1359-1364
57. 章龙珍, 姚志峰, 庄平, 黄晓荣, 赵峰, 王好. 水体中铜对中华鲟幼鱼血液生化指标的影响. 生态学杂志. 2011, 30(11): 516-2522
58. 张堂林, 李钟杰, 舒少武. 鱼类标志技术的研究进展. 中国水产科学, 200, 10(3): 246-253
59. 张永嘉, 许其爵. 网箱养殖罗非鱼综合症的血清分析. 水利渔业, 1994(2): 8-9
60. 张志杰, 张维平. 环境污染生物监测与评价. 北京: 中国环境科学出版社, 1991
61. 赵鹏, 杨红生, 王晓宇, 林承刚, 李湘萍. 钙黄绿素标记刺参的效果及其对刺参抗氧化酶活力的影响. 水产学报, 2011, 35(3): 372-378
62. 赵万鹏, 刘永坚, 潘庆, 林鼎. 草鱼摄食后血糖和肝糖原质量分数的变化. 中山大学学报: 自然科学版, 2002, 41(5): 56-62
63. 赵亚鹏, 潘晓赋, 杨君兴, 陈小勇, 王晓爱, 李再云. 滇池金线鲃 (*Sinocyclocheilus graham*) 耳石的茜素红及茜素络合物标志. 动物学研究, 2013, 34(5): 499-503
64. 周玉, 郭文场, 杨振国, 张凯. 鱼类血液学指标研究的进展. 上海水产大学学报, 2001, 10(2): 16-165
65. 周玉, 郭文场, 杨振国, 张凯, 邹尔新. 欧洲鳗鲡“狂游病”血液生化指标研

- 究. 水生生物学报, 2002, 26(3): 314-316
66. 朱必凤, 邹佩贞, 钟良明, 刘主, 彭凌, 陈德学. 三种倒刺鲃的 RAPD 种质鉴定. 南昌大学学报(理科版), 2006, 30(6): 597-600
67. Agrahari S, Pandey KC, Gopal K. Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2007, 88: 268-272
68. Baer J, Röscher R. Mass-marking of brown trout (*Salmo trutta* L.) larvae by alizarin: method and evaluation of stocking. *Journal of Applied Ichthyology*, 2008, (1), 24: 44-49.
69. Bell JD, Leber KM, Blankenship HL, Loneragan NR. A New Era for Restocking, Stock Enhancement and Sea Ranching of Coastal Fisheries Resources. *Review in Fisheries Science*, 2008, 16(1-3): 1-9
70. Bergman PK, Haw F, Blankenship HL, Buckley RM. Perspectives on design, use, and misuse of fish tags. *Fisheries*, 1992, 17: 20-25
71. Bergstedt RA, Eshenroder RL, Bowen C, Seelye JG, Locke JC. Mass-marking of otoliths of lake trout sac fry by temperature manipulation. *American Fisheries Society Symposium*, 1990, 7: 216-223
72. Brothers EB. Otolith marking techniques for the early life history stages of lake trout. Final report to great lakes fishery commission, 1985: 34
73. Bryant MD, Dolloff CA, Porter PE, Wright BE. Freeze branding with CO₂: an effective and easy-to-use field method to mark fish. *American Fisheries Society Symposium*. 1990, 7: 30-35
74. Burtis CA, Ashwood ER, Tiet Z. Fundamentals of Clinical Chemistry. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996
75. Champigneulle A, Cachera S. Evaluation of large-scale stocking of early stages of brown trout, *Salmo trutta*, to angler catches in the French-Swiss part of the River Doubs. *Fisheries Management and Ecology*, 2003, 10: 79-85
76. Christensen GM, McKim JM, Brungs WA, Hunt EP. Changes in the blood of the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus* (Lesueur)) following short and long term exposure to copper (II). *Toxicology and applied pharmacology*, 1972, 23(3): 417-427.
77. Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC, Babut M, Exinger A, Vasseur P. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels and lipid

- peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 1997,38: 121-131.
78. Coutant CC. Microchemical analysis of fish hard parts for reconstructing habitat use: practice and promise. Oak Ridge National Lab, TN (USA), 1988.
79. Dandapat J, Chainy GBN, Rao KJ. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2003, 135(3): 221-233
80. Delgado CLN, Wada MW, Rosegrant S, et al. Fish to 2020: Supply and demand in changing global markets. International food policy research institute, Washington, DC, USA, and the World fish center, Penang, Malaysia, 2003.
81. Di Giulio RT, Washburn PC, Wenning RJ, Winston GW, Jewell CS. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1989, 8(12): 1103-1123
82. Dietrich JP, Cunjak RA. Evaluation of the impacts of Carlin tags, finclips, and panjet tattoos on juvenile Atlantic salmon. *North American Journal of Fisheries Management*. 2006, 26(1): 163-169
83. Eckmann R. Alizarin marking of whitefish, *Coregonus lavaretus* otoliths during egg incubation. *Fisheries Management and Ecology*, 2003, 10(4): 233-239
84. Farrell AP, Munt B. Cholesterol levels in the blood of Atlantic salmonids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1983, 75(2): 239-242
85. Fischer AJ, Chesney EJ, Cowan JH. Validation of first annulus formation in red snapper otoliths with the use of an alizarin complexone fluorescent marker. *Environmental Biology of Fishes*, 2010, 89: 313-317
86. Garcia SM, Grainger RJR. Gloom and doom? The future of marine capture fisheries. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2005, 360: 21-46
87. Gebieiki JM, Juan D, James C, Helen T. Peroxidation of proteins and lipids in suspensions of liposomes, in blood serum, and in mouse myeloma cells. *Acta Biochimica Polonica*, 2000, 47(4): 90-911
88. Gonzalez, EB, Nagasawa K, Umino T. Stock enhancement program for black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) in Hiroshima bay: monitoring the genetic effects.

- Aquaculture*, 2008, 276: 36-43
89. Grahl-Nielsen O, Ulvund KA. Distinguishing populations of herring by chemometry of fatty acids. *Am. Fish. Soc. Symp.* 1990, 7: 566-571
90. Hagen P, Munk K, Van Alen B White B. Thermal mark technology for in-season fisheries management: a case study. *Alaska Fishery Research Bull*, 1995, 2: 143-155.
91. Hammeren J, Powers S, Lawler J. Exercise training in duced alterations in skeletal muscle oxidative and antioix-dant enzyme activity. *International Journal of Sports Medi-cine*, 1992, 13: 412-416
92. Handeland SO, Berge A, Bjornsson BT, Stefanssona SO. Seawater adaptation by out-of-season Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts at different temperatures. *Aquaculture*, 2000, 181: 377-396
93. Harikrishnan R, Rani MN, Balasundaram C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. 2003, 221: 14-50
94. Hsieh SL, Chen YN, Kuo CM. Physiological responses, desaturase activity, and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) under cold stress. *Aquaculture*, 2003, 220: 903-918
95. Jyothi B, Narayan G. Effect of phorate on certain protein profiles of serum in freshwater fish, *Clarias batrachus*(Linn.). *Journal of Environmental Biology*, 1997, 18(2): 137-140
96. Jones GP, Milicich MJ, Emslie MJ, Lunow C. Self-recruitment in a coral reef fish population. *Nature*, 1999, 402(6763): 802-804.
97. Knight AE. Cold-branding techniques for estimating atlantic salmon parr densities. *American Fisheries Society Symposium*. 1990, 7: 36-37
98. Lea ño EM, Liao IC. Tagging of *Litopenaeus vannamei* (Boone) by uropod cutting: a comparison of two methods. *Aquaculture Research*. 2006, 37(9): 885-890

99. Li Y, Ru S. Effects of monocrotophos on GPT and GOT activities in the goldfish (*Carassius auratus*) livers and serum. *Journal of Safety and Environment*, 2008, 5: 002
100. Liu Q, Zhang XM, Zhang PD, Nwafili SA. The use of alizarin red S and alizarin complexone for immersion marking Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Research*, 2009, 98(1-3): 67-74
101. Lorenzen K, Leber KM, Blankenship HL. Responsible approach to marine stock enhancement: an update. *Rev, Fish, Sci.* 2010 18: 189-210
102. Masuda R, Tsukamoto K. Stock enhancement in Japan: review and perspective. *Bulletin of Marine Science*, 1998, 62(2): 337-358
103. Monaghan JP. Comparison of Calcein and Tetracycline as Chemical Markers in Summer Flounder. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1993(2), 122, 298-301
104. Nemcsok JG, Hughes GM. The effect of copper sulphate on some biochemical parameters of rainbow trout. *Environmental Pollution*, 1988, 49(1): 77-85
105. Nielsen LA. Methods of marking fish and shellfish. New York: *American Fisheries Society Special Publication*, 1992, 23: 37-38
106. Obata Y, Imai H, Kitakado T, Hamasaki K, Kitada S. The contribution of stocked mud crabs *Scylla paramamosain* to commercial catches in Japan, estimated using a genetic stock identification technique. *Fisheries Research*. 2006, 80: 113-121
107. Oliveira K. Field validation of annular growth rings in the American eel, *Anguilla rostrata*, using tetracycline-marked otoliths. *US National Marine Fisheries Service Fishery Bulletin*. 1996, 94(1): 186-189
108. Richard W. Tissue penetration and metabolism of Chloramphenicol. *Am J Med*, 1987, 82: 103-107
109. Scandalios JG. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*, 1993, 101(1): 7

- 110.Schweigert JF. Comparison of morphometric and meristic data against truss networks for describing pacific herring stocks. *American Fisheries Society Symposium*. 1990, 7: 47-62
- 111.Sekino M, Saitoh K, Yamada T, Hara M, Yamashita Y. Genetic tagging of released Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) based on polymorphic DNA markers. *Aquaculture*, 2005, 244: 49-61
- 112.Secor DH, White MG, Dean JM. Immersion marking of larval and juvenile hatchery-produced striped bass with oxytetracycline. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1991, 120(2): 261-266
- 113.Silva AMM, Novelli ELB, Fascineli ML, Almeida JA. Impact of an environmentally realistic intake of water contaminants and superoxide formation on tissues of rats. *Environmental Pollution*, 1999, 105(2): 243-249
- 114.Song ZB, He CL, Fu ZD, Shen DZ. Otolith thermal marking in larval Chinese sucker, *Myxocyprinus asiaticus*. *Environmental Biology of Fishes*. 2008,82: 1-7
- 115.Stefan M, Sune RS, Myron AP, Josianne GS. Sublethal effects of alizarin complexone marking on Baltic cod (*Gadus morhua*) eggs and larvae. *Aquaculture*, 2012, (324–325): 158-164
- 116.Stewart B. Growth dynamics of the radial shields of the euryalid snake star *Astrobrachion constrictum* (Echinodermata: Ophiuroidea). *Invertebrate Biology*, 1996: 321-330
- 117.Szedlmayer ST, Howe JC. An evaluation of six marking methods for age-0 red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Fishery Bulletin*, 1995, 93(1):191-195
- 118.Taylor MD, Fielder DS, Suthers IM. Batch marking of otoliths and fin spines to assess the stock enhancement of *Argyrosomus japonicus*. *Journal of Fish Biology*, 2005, 66: 1149-1162
- 119.Tsukamoto K. Otolith tagging of ayu embryo with fluorescent substances. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1988, 54(8): 1289-1295

- 120.Volk, EC, Schroder SL, Grimm JJ. Otolith thermal marking. *Fisheries Research*. 1999, 43(1): 205-219
- 121.Walt BVD, Faragher RA. Otolith marking of rainbowtrout fry by immersion in low concentrations of alizarin complexone. *N. Am. J. Fish. Manag.* 2003, 23: 141-148
- 122.Weber TE, Bosworth BG. Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth and metabolism in channel catfish. *Aquaculture*, 2005, 246: 483-492
- 123.Wilson CA, Beckman DW, Dean JM. Calcein as a fluorescent marker of otoliths of larval and juvenile fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1987, 116(4): 668-670
- 124.Winston GW, Di Giulio RT. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic toxicology*, 1991, 19(2): 137-161
- 125.Yamada SB, Mulligan TJ. Marking nonfeeding salmonid fry with dissolved strontium. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1987, 44(8): 1502-1506

附录 I

1. 霍来江, 危起伟, 吴金明, 杜浩, 辛苗苗, 张磊. 茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼急性毒性及血液生化指标影响. 淡水渔业. (接受待发表)
2. 霍来江, 危起伟, 吴金明, 杜浩, 辛苗苗, 张磊. 茜素红 S 对中华倒刺鲃幼鱼不同组织抗氧化酶活性和脂质过氧化的影响. 水生生物学报. (外审中)
3. 吴金明, 霍来江, 杜浩, 危起伟. 玛柯河的鱼类资源与栖息地特征. 淡水渔业. (接受待发表)
4. 任珑, 吴金明, 李雷, 霍来江, 杨焕超, 杜浩, 危起伟. 赤水河中华倒刺鲃的形态分化及Cytb基因序列比较研究. 淡水渔业, 2014, 6: 58-64.
5. 辛苗苗, 张书环, 汪登强, 汪珂, 张磊, 霍来江, 危起伟. 微卫星标记在多倍体中华鲟亲子鉴定中的应用. 淡水渔业. (接受待发表)

附录 II

1. 2012-2014 长江葛洲坝下游江段中华鲟自然繁殖监测（长江渔业资源管理委员会委托）横向
2. 2012-2013 甘肃秦州大鲵省级自然保护区资源调查（甘肃省秦州大鲵自然保护区管理局委托）
3. 2012-2015 长江上游珍稀特有鱼类增殖放流效果评价（中国长江三峡集团公司委托）
4. 2012-2015 长江上游珍稀特有鱼类的标志放流（农业部渔业局委托）
5. 2013 秦岭细鳞鲑栖息地适合度的研究，中国水产科学研究院淡水渔业研究中心基本科研业务费，项目编号2013JBFM19
6. 2012 中华鲟自然繁殖及早期胚胎发育河床质适合度研究 国家青年科学基金

致 谢

三年硕士研究生生涯的时光转瞬即逝，然而等快跑到终点的时候，其实才发现并没有太多的兴奋，有的只是平淡和从容。也许是这三年的时间经历许多，解决了许多读研期间的困难和挫折，使自己已褪去青春那般青涩的光环，逐渐走向成熟，三年的时间使自己对自己有了更能清楚的了解，收获满满，尽管期间有过痛苦，迷茫，失落，甚至压抑。但是还要感谢生活所给予的一切，尤其是要感谢一路走来对自己有过关心和帮助的老师，兄弟姐妹，同学以及那些形同陌路的陌生人，没有他们，自己的研究生生活不会那么的丰富多彩。真的要感谢一路上有你们的陪伴！

首先，我要感谢自己的恩师危起伟研究员，恩师在科研方面严谨的治学态度，渊博的专业知识，对具体的科学问题有自己独到的见解，善于抓住问题的关键点和核心，在自己的开题，实验实施，论文撰写等方面存在的问题，能够一针见血的指出重点，往往有种一语惊动梦中人的感觉，使自己获益匪浅。虽然平时和老师的交流次数不多，但是每次谈话总能学到很多知识，短短三年，老师让我懂得了踏踏实实做事，勤勤恳恳做事的道理，感谢这三年对自己的辛勤栽培，在此向危老师致以最崇高的敬意。

其次要感谢工作效率奇高的吴金明老师，和他一起共事，遇到问题，从没见其烦躁，总是很耐心的寻找解决办法。感觉什么难题到在吴博士面前，就是一根烟的事。感谢他在读研期间对我的实验，毕业大纲的设计行的细心指导，让我在遇到困难的时候，养成沉着冷静，积极面对的习惯。是他让我懂得了办法总比困难多的道理。从他身上使我改掉许多坏毛病，学到许多以后能在工作上用的到的宝贵技能。所以这里想十分诚恳的对吴金明博士说一句：特别感谢你对我三年来学业和生活上的关心和照顾。

同时也要特别感谢长江所八楼资环室的李志华老师，感谢他能在百忙之中能认真对我的实验方案进行详细的改进，使自己的实验思路变得清晰明了，感谢李老师在�我做实验期间能提供实验器具，以及后期对自己文章的修改和建议。在这里想声声谢谢您！

感谢杜浩副研究员、张辉副研究员、厉萍副研究员、张书环助理研究员、在科研上的指导和帮助；感谢刘志刚工程师、沈丽女士、周琼女士、在平常的生活中提供便利的条件；感谢课题组司机胡志华先生和王后建先生在自己实验需要用车时给予的便利和帮助；使自己的实验能够按时完成。

感谢陈露在软件分析时对自己的指导；感谢师弟张磊、师妹颀璇在实验中的帮助；感谢06级孙庆亮师兄；感谢08级李伟师兄；感谢09级李雷师兄和成为为师姐；感谢10级梁志强师兄；感谢11级师兄师姐王恒、叶欢、杨晓鸽、谢晓、蔺丹清、汪珂；感谢12级邵俭师兄、同门李君轶、席萌丹、辛苗苗；感谢13级师弟师妹郭威、杨焕超、颀璇、张磊、王旭歌；感谢14级师弟师妹颀江、邸军、黄君、褚志鹏。谢

谢你们在我科研、学习、生活过程中的鼓励、帮助和陪伴。感谢同一届的兄弟姐妹们在我需要帮助的时候能及时伸出援手。

感谢爸爸、妈妈和妹妹们在我求学生涯中给与我无微不至的关怀和照顾，一如既往地支持我、鼓励我。

最后特别感谢华中农业大学和中国水产科学研究院长江水产研究所对我的栽培，提供给你自己一个攻读研究生的机会。