

文章编号:1000-0615(2004)02-0139-06

## 拥挤胁迫对草鱼非特异性免疫功能的影响

王文博, 李爱华, 汪建国, 蔡桃珍, 吴玉深

(中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

**摘要:** 在实验室条件下利用放养密度和放养时间构建组间差异, 模拟养殖过程中草鱼所面临的拥挤胁迫。胁迫第 7、14、30、60d 后采样测量免疫指标。结果表明, 高密度组 ( $80\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的血清溶菌酶活性在胁迫后开始升高, 并于 14d 时达峰值, 以后逐渐下降, 呈倒“U”型趋势。血清杀菌活性随放养密度的剧增而锐减 ( $P < 0.005$ )。白细胞比容在各组间未显示明显差异。而在 30d 和 60d 所测的高密度组草鱼的头肾巨噬细胞吞噬百分率和吞噬指数结果显示, 高密度组低于对照组 ( $P < 0.05$ )。60d 后用嗜水气单胞菌进行攻毒实验, 高密度组死亡率高达 75.0%, 中密度组也达到了 63.6%, 而对照组只有 25.0%。同期所测的脾脏脏系数显示无论高密度组还是中密度组均显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 且经解剖和正常鱼对比, 发现其脾脏已明显萎缩。各实验组血清皮质醇浓度均在胁迫初期达到最大值, 随后降低, 至实验后期基本恢复到正常水平。

**关键词:** 拥挤胁迫; 草鱼; 非特异性免疫功能; 免疫器官

中图分类号: S917 文献标识码: A

## The effect of crowding stress on non-specific immune functions of *Ctenopharyngodon idellus*

WANG Wen-bo, LI Ai-hua, WANG Jian-guo, CAI Tao-zhen, WU Yu-shen

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology,  
Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** Under laboratory conditions, the effect of crowding stress on the non-specific immune system and the resistance to fish pathogenic bacterial infection of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) was investigated. We made an inter-group difference by feeding grass carp (*C. idellus*) in different densities and time to simulate the crowding stress encountered by aquaculture fish. After stress of 7, 14, 30, 60 days, fish were sampled to examine their immune indexes. The results indicated that the lysozyme activity in serum of high density group (HG) increased after stress and reached a maximum on 14th day, then decreased over time. Plasma bactericidal activity reduced sharply when density increased. Leucocrit value did not show a significant difference among all groups, but phagocytic activity of macrophages from head kidney after crowding stress of 30 and 60 days showed a difference between HG and control group (CG) ( $P < 0.05$ ). After 60 days stress, fish in each group were challenged with *Aeromonas hydrophila* by intraperitoneal injection. Mortality rate of HG was 75.0%, middle density group (MG) 63.6% and control group only 25.0%. At the same sampling time, spleen weight indexes

收稿日期: 2003-03-17

资助项目: 中科院生物学及生物技术特别支持费(2001)和中国科学院水生生物研究所知识创新工程领域前沿项目(KSCX2-1-04)

作者简介: 王文博(1976-), 男, 陕西西安人, 硕士, 主要从事鱼类细菌学及免疫学研究

通讯作者: 李爱华(1963-), 男, 江西南昌人, 副研究员, 主要从事鱼类病害学及免疫学研究。Tel: 027-87647721, E-mail: liaihua@ihb.

ac.cn

of both HG and MG were much lower than CG ( $P < 0.01$ ). Additionally, cortisol concentration in serum of all experimental groups came to their maximum values at the beginning of the stress, then dropped and recovered to normal level at the end of experiment.

**Key words:** crowding stress; *Ctenopharyngodon idellus*; non-specific immune functions; immune organs

养殖鱼类中普遍存在着因放养密度过高而造成的拥挤胁迫(crowding stress),由此引发鱼体的应激反应<sup>[1]</sup>。这虽是一种保护性反应,但鱼体若持续的处于应激状态,机体的免疫防御功能会受到抑制,导致鱼体对各类病原敏感性升高<sup>[2]</sup>。所以,对以拥挤为代表的环境胁迫的研究正受到人们的普遍关注。国外在拥挤胁迫对鱼类的免疫组织与器官、免疫细胞、体液免疫因子等三个层面的影响均有较为全面的研究<sup>[3,4]</sup>,但在国内,却少见这方面的报道。鉴于非特异性免疫系统在维持机体健康方面的重要性,实验就其所受拥挤胁迫的影响展开了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)由中科院水生生物研究所关桥养殖场提供,平均体重 $53.05 \pm 5.03\text{g}$ 。实验前在持续流水的水泥池(容积为500L)中以 $2.3\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的密度驯养两周,实验期间水温控制在 $22 \pm 2$ ,DO $4.0 \sim 5.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,隔天投喂商业配合饲料加青饲料。

溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)冻干粉购自Sigma公司。

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)XS91-4-1和河弧菌(*Vibrio fluvialis*)91-24-3为本实验室保存菌种,作为淡水养殖鱼类细菌性败血症(bacterial hemorrhagic septicemia)病原<sup>[5]</sup>。

### 1.2 实验分组

密度组的构建参考Mazur等<sup>[6]</sup>及李爱华<sup>[7]</sup>。同源同批实验鱼被随机分为4组,即常规密度对照组( $2.3\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),低密度组( $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),中密度组( $35\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),高密度组( $80\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。每组9~12尾,实验鱼均放养于同样规格的水族箱(容积为80L)中,注入不同体积的水,并保持流水放养,水流速度约为 $120\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ 。试验期间周围环境力求保持最大限度安静。除密度外,其余饲养条件均保持一致。

### 1.3 血样和组织样品的采集

实验后的第7、14、30、60d采血及取头肾,并在实验后60d取脾脏。采样前,将鱼迅速捞起并立即投入浓度为 $200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的MS-222中做快速深度麻醉。这样可避免因人为刺激而引起的血液皮质醇浓度的升高<sup>[6]</sup>。

### 1.4 血液学和免疫学指标的检测

血清溶菌酶活性 按Parry等<sup>[8]</sup>所述方法进行。50 $\mu\text{L}$ 新鲜血清加入3mL菌液中,测定波长为540nm。以1min内吸光值下降0.001为1个活性单位(U)。

血清杀菌活性 参照Ainsworth等<sup>[9]</sup>,略作修改。0.5%盐水制备*V. fluvialis*菌悬液,用分光光度计按李爱华<sup>[10]</sup>方法将浓度调整为 $10^6\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。50 $\mu\text{L}$ 血清加入到等量菌悬液中,22 $^{\circ}\text{C}$ 孵育5h之后,将混合液倍比稀释,不同稀释度各取10 $\mu\text{L}$ 加于TSB上,28 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,计算平皿菌落数(colony forming units, CFUs)。用50 $\mu\text{L}$ 盐水代替50 $\mu\text{L}$ 血清加入等量菌悬液作为阳性对照。结果用杀菌百分率(killing percent)表示:

杀菌百分率(%) = (1 - 实验组CFUs/阳性对照CFUs)  $\times 100$

头肾巨噬细胞的吞噬活性 头肾巨噬细胞悬液按Secombes<sup>[11]</sup>方法制备。菌悬液按Thompson等<sup>[12]</sup>方法制备,所不同的是菌株为本实验室保藏的*A. hydrophila* XS91-4-1,而非*A. salmonicida* MT004。操作方法按Rafiq等<sup>[13]</sup>所述。显微镜下观察计数200个巨噬细胞中吞噬*A. hydrophila*的细胞数及所吞噬的细菌总数,按下式求出吞噬百分率(phagocytic percent)及吞噬指数(phagocytic index):

吞噬百分率(%) = (吞噬细菌的巨噬细胞数/200)  $\times 100$

吞噬指数 = 200个巨噬细胞所吞噬的细菌总数/200

白细胞比容 将采集的血液样本装于肝素化的医用白细胞压积管中,22 $^{\circ}\text{C}$  2000r  $\cdot \text{min}^{-1}$ 离心30min,小心将压积管取出,用游标卡尺测量白细

胞压积的高度占全长的百分比,即为白细胞比容(leucocrit)。

**脾脏脏系数** 脾脏重量与体重之比即为脾脏脏系数(spleen weight index)。先称量实验鱼体重,再行深度麻醉(MS-222),断尾放血,摘取脾脏,用生理盐水稍加冲洗,吸水纸吸干表面水分,立即在电子秤上称重。

**血液皮质醇浓度** 常规分离血清,参照 Pickering 等<sup>[14]</sup>方法用放免法(RIA)进行测定。试剂盒由北京北方生物技术研究所生产,批号为(93)卫药准字 R-14。

**攻毒实验** 将两次活化后的嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* XS91-4-1 用 0.5% 生理盐水洗脱菌苔,按李爱华<sup>[10]</sup>所述用分光光度计精确调配,使终浓度为  $2.3 \times 10^6$  CFUs  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>。每尾腹腔注射 0.3 mL,观察 1 周,统计死亡率。

## 2 结果

### 2.1 血清溶菌酶活性的变化

拥挤胁迫对草鱼非特异性免疫功能的影响结果见图 1。各实验组在胁迫 1~2 周后,溶菌酶活性均有增高现象,至 1 个月后,出现回落。但各组达到峰值的时间不同,高密度组的峰值出现在胁迫 14d 后,方差分析结果显示其与对照组有显著差异( $P < 0.01$ )。在相同胁迫时间内,基本呈现溶菌酶活性随放养密度的增加而增强的趋势。

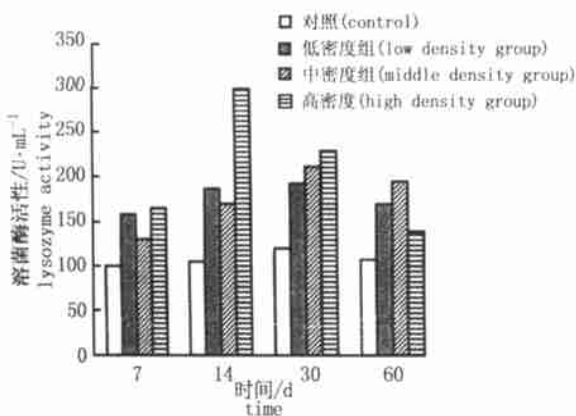


图 1 拥挤胁迫对草鱼血清溶菌酶活性的影响

Fig. 1 Effect of crowding stress on lysozyme activity in *C. idellus* serum

### 2.2 血清杀菌活性的变化

如图 2 所示,高密度组从刚开始胁迫 1 周后

杀菌能力即开始骤减,在随后的几次采样时间内并未有太大波动。经 t 检验,其杀菌能力与其它各组的在 4 个采样时期均显示了极为显著的差异( $P < 0.005$ )。

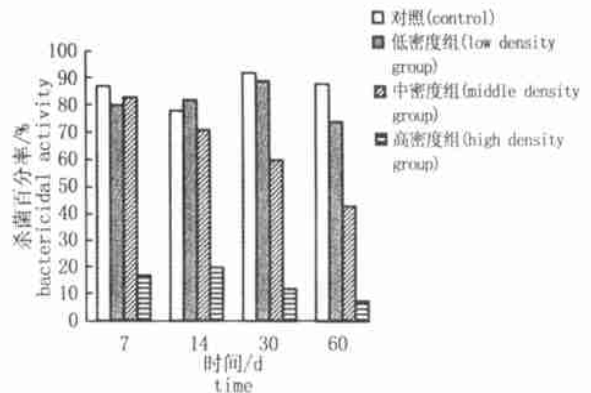


图 2 拥挤胁迫对草鱼血清杀菌活性的影响

Fig. 2 Effect of crowding stress on bactericidal activity in *Ctenopharyngodon idellus* serum

### 2.3 白细胞比容的变化

对照组 4 次采样测量结果在  $(2.9 \pm 0.4) \% \sim (3.1 \pm 0.2) \%$  内,而高密度组在  $(3.5 \pm 0.3) \% \sim (4.6 \pm 0.5) \%$  范围内(表 1)。可见拥挤胁迫在一定程度上促进了鱼体白细胞的增生,但并不显著( $P > 0.05$ )。

表 1 拥挤胁迫对草鱼白细胞比容的影响

Tab. 1 Effect of crowding stress on leucocrit value of *Ctenopharyngodon idellus*

实验组别 group	白细胞比容 % (WBC)			
	7d	14d	30d	60d
对照组 control	$3.1 \pm 0.2$	$3.0 \pm 0.3$	$3.0 \pm 0.2$	$2.9 \pm 0.4$
低密度组 low density	$2.9 \pm 0.4$	$2.8 \pm 0.5$	$3.1 \pm 0.3$	$3.2 \pm 0.1$
中密度组 middle density	$3.3 \pm 0.2$	$3.3 \pm 0.1$	$3.5 \pm 0.5$	$3.5 \pm 0.2$
高密度组 high density	$3.5 \pm 0.3$	$3.7 \pm 0.4$	$4.1 \pm 0.3$	$4.6 \pm 0.5$

### 2.4 头肾巨噬细胞吞噬活性的变化

胁迫 30d 和 60d 后各组吞噬百分率、吞噬指数结果见表 2。经长时间高密度放养的草鱼的这两项指标均显著低于同期对照组的,且随拥挤时间的增长呈下降趋势。另外,从表中还可以看出,吞噬百分率与吞噬指数成正相关。

表2 拥挤胁迫对草鱼头肾巨噬细胞吞噬活性的影响

Tab.2 Effect of crowding stress on phagocytic activity of macrophages in *C. idellus* head kidney

实验组别 group	吞噬百分率(%) phagocytic percent		吞噬指数 phagocytic index	
	30d	60d	30d	60d
	对照组 control	51.3 ±7.5	48.4 ±5.8	3.5 ±0.8
低密度组 low density	39.5 ±11.1	43.6 ±8.7	2.8 ±0.2	3.4 ±0.4
中密度组 middle density	42.2 ±9.4	38.1 ±10.2	3.2 ±0.5	2.8 ±0.3 *
高密度组 high density	31.6 ±6.1	29.7 ±8.8	2.4 ±0.4	2.0 ±0.2 *

注: \* 表示与同期对照相比有显著差异( $P < 0.05$ )

Notes: \* means  $P < 0.05$

2.5 脾脏的脏器系数

胁迫60d后,高密度组与中密度组的脾脏重量百分比平均值分别为0.044%和0.052%,两值均显著低于对照组的0.120%( $t$ -检验,  $P < 0.005$ ) (图3)。经解剖发现,高密度组草鱼的脾脏与正常鱼的相比有明显萎缩症状。说明拥挤胁迫已对脾脏这个鱼类重要免疫器官造成了极大损伤。

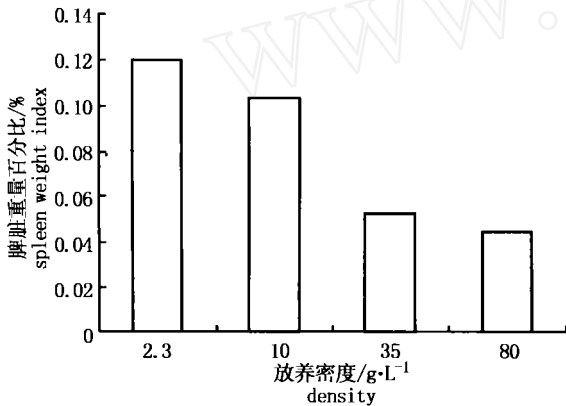


图3 拥挤胁迫对草鱼脾脏的脏器系数的影响

Fig.3 Effect of crowding stress on *Ctenopharyngodon idellus* spleen weight index

2.6 血清皮质醇浓度的变化

血清皮质醇浓度变化趋势如图4所示。对照组血清皮质醇浓度4次平均值为(10.07 ±3.21) ng mL<sup>-1</sup>,说明基本避免了因人为因素造成的皮质醇水平的升高。在胁迫7d后,各实验组即达各自的最大值,高、中两个密度组较为接近,分别为(184.92 ±18.47) ng mL<sup>-1</sup>和(173.43 ±14.91) ng mL<sup>-1</sup>,两值与对照组的(11.53 ±4.63) ng mL<sup>-1</sup>均显示了极为显著的差异( $P < 0.005$ )。之后,各组

均呈回落趋势,至60d,基本恢复到正常水平。

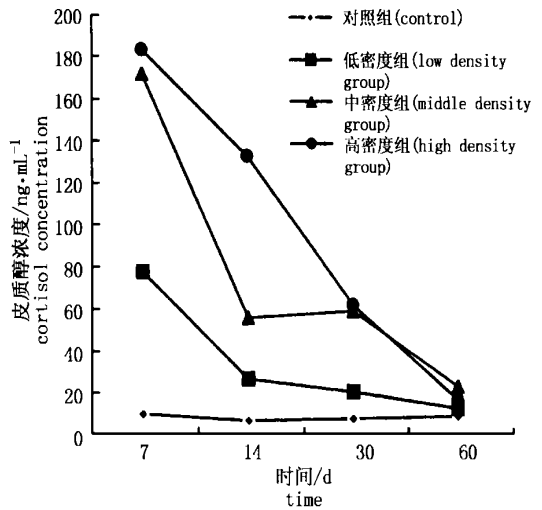


图4 拥挤胁迫对草鱼血清皮质醇浓度的影响

Fig.4 Effect of crowding stress on cortisol concentration in *Ctenopharyngodon idellus* serum

2.7 嗜水气单胞菌感染后对抵抗力的影响

胁迫60d后各组用嗜水气单胞菌进行腹腔注射,1周后累计死亡率,结果见表3。中密度组与对照组有显著差异( $P < 0.05$ ),而高密度组与对照组差异极为显著( $P < 0.01$ )。对高密度组与对照组死鱼的血液进行细菌培养后,发现前者检出的菌落数明显多于后者,这和前面血清杀菌活性的结果相吻合。

表3 拥挤胁迫对草鱼死亡率的影响

Tab.3 Effect of crowding stress on mortality rate of *Aeromonas hydrophila*

实验组别 group	受试尾数(ind.) no. of experimental	死亡尾数(ind.) no. of mortal	死亡率(%) mortality rate
对照组 control	12	3	25.0
低密度组 low density	9	3	33.3
中密度组 middle density	11	7	63.6 *
高密度组 high density	12	9	75.0 **

注: \* 表示与对照相比有显著差异( $P < 0.05$ ), \*\* 表示差异极为显著( $P < 0.01$ )

Notes: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

3 讨论

溶菌酶是一种水解酶,存在于鱼类粘液、血清和巨噬细胞中,它能杀死病原微生物,使鱼类获得保护<sup>[15]</sup>。从图1可以看出,3个实验组的溶菌

酶测定结果随时间波动的幅度是不一样的。高密度组最大,中密度组次之,低密度组则基本保持平稳。说明拥挤程度越大,溶菌酶活性越易受到影响,支持了 Fevolden 等<sup>[16]</sup>认为溶菌酶活性亦可作为鱼类应激的信号,其水平升高所持续的时间依胁迫的方法和强度而定的说法。高密度组的倒“U”型趋势表明,在胁迫初期,草鱼受到较强应激,因此溶菌酶水平升高,而后鱼体产生了一定的耐受性,溶菌酶水平趋于降低。组织或组织液中的溶菌酶含量存在着种属差异,虹鳟 (*Salmo gairdneri*) 体内溶菌酶的最高含量是褐鳟 (*Salmo trutta*) 和大西洋鲑 (*Salmo salar*) 的 15 倍<sup>[17]</sup>,所以当用溶菌酶作为评估应激程度的指标时,应当是针对同种鱼的,而不应一概而论。

血清中包含多种免疫因子,其中溶菌酶和补体在抵御外来病原菌方面发挥着重要作用。实验结果表明,高强度的拥挤胁迫对草鱼的血清杀菌活性造成了极大抑制。若仅仅是溶菌酶活性在胁迫后受抑制是不足以引起高密度组杀菌能力如此大幅度的衰减的,根据 Rotllant 等<sup>[4]</sup>有关补体方面的实验结果,推测在本实验中,胁迫可能也引起了补体活性或浓度的下降,或者是补体中某些蛋白组份的失活,从而阻断了补体的激活途径,使其不能发挥杀菌作用。其机理有待进一步探讨。杀菌活性的下降为病原微生物入侵机体并大量增殖提供了可乘之机,可能是导致鱼病暴发的直接原因之一。实验后期高密度组鱼体色显著发黑,已经出现了发病的征兆。

从血液白细胞压积的实验结果看,鱼体在受到外界胁迫后,加速了免疫细胞的分化与生长。这可以看作是机体在受到外界刺激后,激活了自身免疫防御体系而采取的一种保护措施。但吞噬实验结果显示,高密度组草鱼头肾巨噬细胞的吞噬活性低于同期对照组。我们知道,头肾是鱼体血液中白细胞的发源地之一<sup>[18]</sup>,结合上面提到的两项实验结果,是否说明鱼体在受到外界刺激后的短期内,加速了头肾产生免疫细胞的功能,使其数量有所增加,但活性却因长期胁迫而受到了抑制。巨噬细胞中含有大量的溶菌酶,而后者能溶解嗜水气单胞菌的细胞壁致其死亡<sup>[19]</sup>,实验后期溶菌酶活性的下降可能是导致巨噬细胞吞噬活性降低的重要因素之一。

脾脏不但是鱼类的造血器官,而且是重要的免疫器官<sup>[18]</sup>。实验结果显示 60d 后拥挤胁迫对高、中密度组草鱼的脾脏造成了严重损伤。这和李爱华<sup>[7]</sup>的结果是一致的。攻毒感染实验常被用来评估鱼体的综合体质,本实验结果反映出了拥挤对草鱼健康状况所产生的负面影响。Schreck<sup>[20]</sup>、Wise 等<sup>[21]</sup>也得出了相同的结论。

环境胁迫与鱼体内分泌系统有着广泛联系,而鱼的丘脑下部-垂体-肾间组织轴(HPI轴)则在这种联系中占主导地位。鱼体受胁迫后发生一系列级联反应,最后由肾间组织产生皮质醇并释放到血液中去<sup>[22]</sup>。血液皮质醇水平可以被看作鱼类应激的一个灵敏信号<sup>[23,24]</sup>。在本实验中,就高密度组而言,当第 1 次采样测得的血清皮质醇浓度即达最高值时,同期测得的血清溶菌酶活性、血清杀菌活性、白细胞比容均处于 4 次测量中的较低,甚至最低水平。而当皮质醇浓度开始下降时,除血清杀菌活性外的其余两项均有升高趋势。这虽然和 Tort 等<sup>[3]</sup>、Rotllant 等<sup>[4]</sup>的实验结果极为相似,但笔者认为它并不足以证明这些免疫指标的变化是由皮质醇浓度来调控的,只能说它们之间存在着某种关联。另外,在实验后期高密度组草鱼的脾脏已严重受损,可同期检测的皮质醇浓度却已基本恢复到正常水平,脾脏的萎缩似乎并非由皮质醇直接引起。上述现象说明若把血浆中皮质醇激素水平作为鱼体应激反应强度的信号,也只能是在急性应激范围内,而不能推广到慢性应激范围内。为了更深入了解皮质醇在免疫调控中的介导作用,在本实验基础上,我们已采取了新的方案,对其展开了进一步的研究。

需要指出的是,低密度组除在 30d 后的吞噬百分率和 7d 后的血液皮质醇浓度上与同期对照组有显著差异外 ( $P < 0.05$ ),其余指标结果均接近于对照的,说明养殖鱼类在此密度 ( $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,合每公顷 150t) 下长期流水放养是安全的,不会对其健康造成损害。而当密度达到  $35\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  或高于此密度时,机体免疫机能会受到抑制,密度越大,时间越长,抑制程度就越深,也更易于引发鱼病。综上所述,中度和高强度的拥挤对草鱼非特异性免疫功能具有抑制效应,脾脏也因此发生了器质性病变。

## 参考文献:

- [ 1 ] Wang W B , Li A H . The effect of environmental stress to fish immune system : a review [ J ] . J Fish China , 2002 , 26 ( 4 ) : 368 - 374 . [ 王文博, 李爱华. 环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概况 [ J ] . 水产学报, 2002, 26 ( 4 ) : 368 - 374 . ]
- [ 2 ] Robertson O H , Hane S , Wexler D C , et al . The effect of hydrocortisone on immature rainbow trout ( *Salmo gairdneri* ) [ J ] . Gen Comp Endocrinol , 1963 , 3 : 422 - 436 .
- [ 3 ] Tort L , Sunyer J O , Gomez E , et al . Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata* [ J ] . Veterinary Immunology and Immunopathology , 1996 , 51 : 179 - 188 .
- [ 4 ] Rotllant J , Pavlidis M , Kentouri M , et al . Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress [ J ] . Aquac , 1997 , 156 : 279 - 290 .
- [ 5 ] Xu B H , Yin Z , Wu Y S , et al . Studies on the pathogen of acute epidemic septicaemia of freshwater fish [ J ] . Acta Hydrobiol Sin , 1993 , 17 : 259 - 266 . [ 徐伯亥, 殷战, 吴玉深, 等. 淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌的研究 [ J ] . 水生生物学报, 1993 , 17 : 259 - 266 . ]
- [ 6 ] Mazur C F , Iwama G K . Handling and crowding stress reduces number of plaque-forming cells in Atlantic salmon [ J ] . J Aquat Anim Health , 1993 , 5 : 98 - 101 .
- [ 7 ] Li A H . Effects of crowding stress on plasma cortisol , glucose and liver ascorbic acid in grass carp ( *Ctenopharyngodon idellus* ) [ J ] . Acta Hydrobiol Sin , 1997 , 21 ( 4 ) : 384 - 387 . [ 李爱华. 拥挤胁迫对草鱼皮质醇、血糖及肝脏中抗坏血酸含量的影响 [ J ] . 水生生物学报, 1997 , 21 ( 4 ) : 384 - 387 . ]
- [ 8 ] Parry R M , Chandan R C , Shahani K M . A rapid and sensitive assay of muramidase [ J ] . Proc Soc Exp Biol Med , 1965 , 119 : 383 - 386 .
- [ 9 ] Ainsworth A J , Rice C D , Xue L . Immune responses of channel catfish , *Ictalurus punctatus* ( Rafinesque ) , after oral or intraperitoneal vaccination with particulate or soluble *Edwardsiella ictaluri* antigen [ J ] . J Fish Dis , 1995 , 18 : 397 - 409 .
- [ 10 ] Li A H . Studies on drug resistance , resistance plasmid of fish bacterial pathogens and antibacterial activity of some drugs [ D ] . Wuhan , China : Institute of Hydrobiology , Chinese Academy of Sciences , 1998 . 108 . [ 李爱华. 我国鱼类病原菌耐药性、耐药质粒及几种药物抗菌作用的研究 [ D ] . 中国武汉: 中国科学院水生生物研究所学位论文, 1998 . 108 ]
- [ 11 ] Secombes C J . Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity [ A ] . Techniques in fish immunology ( eds by Stolen J S , Fletcher T C , Anderson D P , et al . ) [ M ] . USA : SOS Publications , 1990 . 137 - 154 .
- [ 12 ] Thompson K D , Tatner M F , Henderson R J . Effects of dietary ( n-3 ) and ( n-6 ) polyunsaturated fatty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon , *Salmo salar* L [ J ] . Aqua Nutr , 1996 , 2 : 21 - 31 .
- [ 13 ] Rafiq M , Sarder I , Kim D , et al . Immune responses of Nile tilapia ( *Oreochromis niloticus* L . ) clones I . Non-specific responses [ J ] . Dev Comp Immunol , 2001 , 25 : 37 - 46 .
- [ 14 ] Pickering A D , Pottinger P . Seasonal and diet changes in plasma cortisol levels of the brown trout , *Salmo trutta* L [ J ] . Gen Comp Endocrinol , 1983 , 49 : 232 - 239 .
- [ 15 ] Yang X L . Advance on fish immunology research [ J ] . J Fish China , 1989 , 13 ( 3 ) : 271 - 280 . [ 杨先乐. 鱼类免疫学研究的进展 [ J ] . 水产学报, 1989 , 13 ( 3 ) : 271 - 280 . ]
- [ 16 ] Fevolden S E , Roed K H . Cortisol and immune characteristics in rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* ) selected for high or low tolerance to stress [ J ] . J Fish Biol , 1993 , 43 : 919 - 930 .
- [ 17 ] Lie O , Evensen O , Sorensen A , et al . Study on lysozyme activity in some fish species [ J ] . Diseases of Aquatic Organisms , 1989 , 6 : 1 - 5 .
- [ 18 ] Zhang Y A , Sun B J , Nie P . Immune tissues and cells of fish : a review [ J ] . Acta Hydrobiol Sin , 2000 , 24 ( 6 ) : 648 - 653 . [ 张永安, 孙宝剑, 聂品. 鱼类免疫组织和细胞的研究概况 [ J ] . 水生生物学报, 2000 , 24 ( 6 ) : 648 - 653 ]
- [ 19 ] Grinde B . Lysozyme from rainbow trout , *Salmo gairdneri* Richardson , as an antibacterial agent against fish pathogens [ J ] . J Fish Diseases , 1989 , 12 : 95 - 104 .
- [ 20 ] Schreck C B . Immunomodulation : endogenous factors [ A ] . The fish immune system , organism , pathogen and environment . ( eds by Iwama G , Nakanishi T ) [ M ] . London : Academic Press , 1996 . 311 - 337 .
- [ 21 ] Wise D J , Schwedler T E , Otis D L . Effects of stress on susceptibility of naive channel catfish in immersion challenge with *Edwardsiella ictaluri* [ J ] . J Aquat Anim Health , 1993 , 5 : 92 - 97 .
- [ 22 ] Ader R , Felten D L , Cohen N . Psychoneuroimmunology ( 2nd ) [ M ] . New York : Academic Press , Inc , 1991 . 12 - 18 .
- [ 23 ] Strange R J , Schreck C B . Anesthetic and handling stress on survival and cortisol concentration in yearling chinook salmon ( *Oncorhynchus tshawytscha* ) [ J ] . J Fish Res Bd Can , 1978 , 35 : 345 - 349 .
- [ 24 ] Strange R J , Schreck C B , Ewing R D . Cortisol concentrations in confined juvenile chinook salmon ( *Oncorhynchus tshawytscha* ) [ J ] . Trans Am Fish Soc , 1978 , 107 : 812 - 819 .