

文章编号:1000-0615(2012)04-0538-08

DOI:10.3724/SP.J.1231.2012.27713

## 氨氮胁迫对青鱼幼鱼鳃丝 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶、组织结构及血清部分生理生化指标的影响

胡毅<sup>1</sup>, 黄云<sup>1</sup>, 钟蕾<sup>1</sup>, 肖调义<sup>1\*</sup>, 文华<sup>2,3\*</sup>,  
郇志利<sup>1</sup>, 毛小伟<sup>1</sup>, 李金龙<sup>1</sup>

- (1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128;  
2. 中国水产科学院长江水产研究所, 淡水生态与健康养殖重点开放实验室, 湖北 武汉 430223;  
3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

**摘要:** 氨氮是诱发鱼病的主要环境因子, 以初始体质量(7.00±0.14) g 的青鱼幼鱼为研究对象, 研究氨氮胁迫对其鳃丝  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶、组织结构及血清部分生理生化指标的影响。实验设置低(对照组 0 mg/L)、中(10 mg/L)和高(20 mg/L)3 个氨氮浓度处理组, 将暂养在自然淡水(对照)中的青鱼幼鱼分别放入各实验梯度中, 进行 0、6、12、24、48 和 96 h 氨氮胁迫。结果表明: 与对照组相比, 中、高氨氮组鳃丝  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性分别在 12 h 和 6 h 降至最低, 然后升高, 48 h 达最大值, 96 h 后与对照组水平相当。鳃组织光镜观察表明, 中氨氮组鳃小片基部泌氯细胞数量 12 h 有所增加, 24 h 呼吸上皮细胞出现部分脱落, 96 h 泌氯细胞出现空泡化, 部分鳃小片充血; 而高氨氮组鳃小片基部泌氯细胞数量 6 h 呈增加趋势, 12 h 呼吸上皮细胞部分脱落, 24 h 大面积脱落, 96 h 鳃小片基部严重充血。血清皮质醇和血糖含量在胁迫 12 h 均升高至最大, 含量与氨氮浓度呈正相关, 48 h 恢复至对照组水平。氨氮胁迫下, 血清总超氧化物歧化酶(SOD)活力呈先升高后降低的趋势, 6 h 时显著高于对照组( $P<0.05$ ), 中氨氮组 12 h 后与对照组差异不显著, 而高氨氮组 96 h 时显著低于对照组( $P<0.05$ )。过氧化氢酶(CAT)活力 12 h 内均呈先降低后升高趋势, 48 h 均恢复至对照组水平。氨氮胁迫前期, 血清总抗氧化力和谷胱甘肽均呈下降趋势, 丙二醛和谷丙转氨酶活力呈升高趋势。谷胱甘肽和谷丙转氨酶活力在 96 h 恢复至对照组水平, 而丙二醛 96 h 仍显著高于对照组, 高氨氮组总抗氧化力显著低于对照组( $P<0.05$ )。由此可见, 氨氮胁迫初期, 鱼体抗氧化系统受到严重干扰。随着胁迫时间延长, 鱼体进行适应性生理调节, 但机体抗氧化能力下降, 鳃组织已受到损伤。

**关键词:** 青鱼; 氨氮胁迫;  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶; 鳃组织; 应激; 抗氧化系统

**中图分类号:** S917

**文献标志码:** A

高密度集约化养殖中, 水产养殖动物残饵和排泄物氨化作用产生大量氨态氮, 被认为是诱发鱼病的主要环境因子<sup>[1]</sup>。大多数硬骨鱼类对氨氮毒性非常敏感<sup>[2]</sup>。当水体中氨氮胁迫强度低于鱼体耐受限度时, 机体能自行调节从而适应外界环境变

化<sup>[3]</sup>。当受到氨氮连续刺激且超过机体调节阈值时, 机体抗氧化系统受到破坏, 部分抗氧化物质含量及酶活性下降, 机体清除自由基的能力降低<sup>[4]</sup>, 脂质过氧化产物增多, 从而破坏机体非特异性免疫防御系统, 导致免疫力下降<sup>[5-6]</sup>, 病原菌易感性增

收稿日期: 2011-08-30 修回日期: 2012-01-04

资助项目: 湖南省自然科学基金(11JJ3037); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系(CARS-46-462); 中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点实验室开放课题(2010FEA03018); 湖南省研究生创新课题(CX2010B285)

通讯作者: 肖调义, E-mail: Tyx1128@yahoo.com.cn; 文华, E-mail: wenhua.hb@163.com

<http://www.scxuebao.cn>

加<sup>[3]</sup>。此外, 水体中高氨氮还能使水生动物的鳃、肾和肝组织结构发生病变等<sup>[4, 6-7]</sup>, 机体呼吸系统<sup>[6]</sup>和排泄系统破坏<sup>[8]</sup>, 鱼体生长、发育受阻等<sup>[4, 9]</sup>。目前, 有关甲壳动物如中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)<sup>[5]</sup>、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)<sup>[3]</sup>等在氨氮胁迫下免疫毒性机制的研究较多, 淡水养殖鱼类研究有尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)<sup>[10]</sup>的报道。本研究通过氨氮胁迫下对青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)鳃 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶、组织结构、血清抗氧化系统和应激指标的影响, 探讨氨氮对青鱼的免疫毒性机制, 旨在为青鱼及其他淡水鱼养殖中氨氮胁迫的防控提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验鱼

实验青鱼为购自湖南水产科学研究所的同一批鱼苗, 体质量(7.00±0.14) g。实验前暂养于室外水泥池(5.0 m×1.0 m×1.5 m)中, 驯化 2 周, 日投喂商品饲料 2 次(8:30, 16:30), 日换水量占总体积 20%。暂养期间, 水温(24±1) °C, pH=7.27±0.4, 溶解氧含量 6.0 mg/L 以上, 并用次溴酸盐氧化法进行水体氨氮监测, 总氨氮(T-AN)值小于或等于 0.5 mg/L, 正式实验前停食 24 h。

### 1.2 实验设计

通过预实验, 在确定青鱼幼鱼(6.97±0.16) g 96 h 氨氮半致死浓度(24 °C, T-AN: 37.59 mg/L)的基础上, 参照龙章强<sup>[11]</sup>研究方法, 实验设置总氨氮浓度低(对照组 0 mg/L)、中(10 mg/L)和高(20 mg/L)3 个氨氮处理组, 每个处理设 3 个平行。用分析纯氯化铵试剂配制实验组总氨氮浓度。挑选体色正常、健康活泼的青鱼幼鱼随机移入 9 个水族箱(260 L)中, 每箱 30 尾。试验期间停止投饵, 并每隔 4 小时进行总氨氮浓度监测, 实测值分别为(0.22±0.06)、(10.11±0.12)和(20.17±0.45) mg/L, 以对应氨氮质量浓度的养殖用水, 采用虹吸法换水调节总氨氮浓度, 每次换水量不超过 20%, 水温(24±1) °C, pH(7.31±0.4), 且 24 h 连续微充气以保证溶解氧含量 6.0 mg/L 以上。

### 1.3 样品采集与分析

氨氮胁迫实验期间, 分别于 0、6、12、24、48 和 96 h 采集样品。每次从各水族箱中随机取出 4 尾, 放入盛有 0.15 mL/L 丁香油溶液中短暂麻醉,

用 1 mL 无菌注射器尾静脉采血, 置于无菌离心管中, 4 °C 静置 12 h, 3 500 r/min 离心 15 min, 取上层血清置于-80 °C 超低温冰箱保存备用。

谷胱甘肽(GSH)、血糖(GLU)、丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、总抗氧化力(T-AOC)、过氧化氢酶(CAT)和谷丙转氨酶(ALT)均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。皮质醇采用上海继锦化学科技有限公司的鱼用 ELISA 试剂盒测定。

鳃丝 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶参照南京建成生物工程研究所超微量 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 试剂盒测定。冰浴条件下, 取青鱼两侧第 2 鳃弓上的鳃丝, 用生理盐水润洗, 滤纸吸干水分。准确称量鳃组织质量, 按质量体积比制成 10%的组织匀浆, 4 °C 下 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液用定磷法测定 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶活性。取同批 10%组织匀浆加 0.68%的生理盐水稀释至 1%, 用考马斯亮兰法测定组织中蛋白含量。以每小时每毫克组织蛋白中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为 1 个 ATP 酶活力单位 [μmol P/(mg·h)]。

鳃组织显微观察: 取青鱼右侧第二鳃弓, 用 Bouin 氏液固定, 常规石蜡切片, H.E 染色, 显微观察并拍照(10×40)。

### 1.4 数据统计分析

实验结果以 3 个平行组数据平均值±标准差(mean±SD)表示, 用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 Duncan 氏检验法统计分析(P<0.05)。

## 2 结果

### 2.1 氨氮胁迫对鳃组织结构和 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶活力的影响

氨氮胁迫前, 鳃丝的鳃小片呼吸上皮细胞和柱状细胞排列规则, 泌氯细胞较少。胁迫 6 h, 中氨氮组鳃小片基部泌氯细胞无明显变化; 高氨氮组鳃小片基部泌氯细胞数量有所增加(图版)。胁迫 12 h, 中氨氮组鳃小片基部泌氯细胞数量略有增加; 高氨氮组泌氯细胞明显增加, 呼吸上皮细胞出现部分脱落, 柱状细胞排列不规则, 部分毛细血管破裂, 红细胞溢出。胁迫 24 h, 中氨氮组部分鳃小片呼吸上皮细胞部分脱落; 高氨氮组呼吸上皮细胞大面积脱落。胁迫 48 h, 中氨氮组鳃小片基部泌氯细胞数量增加, 呼吸上皮细胞部分脱落; 高氨氮组两鳃小片间基部出现较大空隙。胁迫 96 h, 中氨氮组泌氯

细胞部分空泡化, 鳃小片毛细血管破裂, 红细胞溢出; 高氨氮组鳃小片基部毛细血管破裂, 鳃小片呼吸上皮细胞均大面积脱落。

与对照组(0 mg/L)相比, 中、高氨氮组鳃丝  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性在 0~24 h 呈负峰值变化, 中氨氮组在 12 h 达到最小值, 但与对照组差异不显著; 高氨氮组于 6 h 达到最小值, 与对照组差异显著 ( $P<0.05$ )。两处理组 24 h 后其活力均高于对照组, 48 h 达最大值, 其中高氨氮组与对照组差异显著 ( $P<0.05$ )。96 h 后降至对照组水平(图 1)。

### 2.2 氨氮胁迫对血清皮质醇及血糖含量的影响

氨氮胁迫下, 血清皮质醇和血糖与氨氮浓度呈正相关。与对照组相比, 中、高氨氮组皮质醇和血糖在 96 h 内呈正峰值变化, 氨氮胁迫 12 h 后,

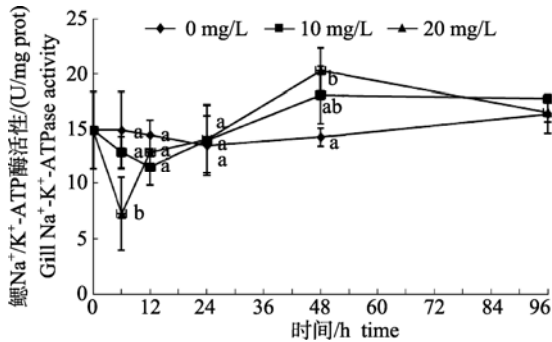


图 1 氨氮胁迫对青鱼鳃丝  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性的影响 图中不同字母表示同一时间段处理间差异显著 ( $P<0.05$ ); 反之则差异不显著 ( $P>0.05$ ); 下同。

Fig. 1 Effect of ammonia-N stress on the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in gills of *M. piceus*

Different letters mean significant difference among treatment at 0.05 levels in the same sampling time; The followings are the same.

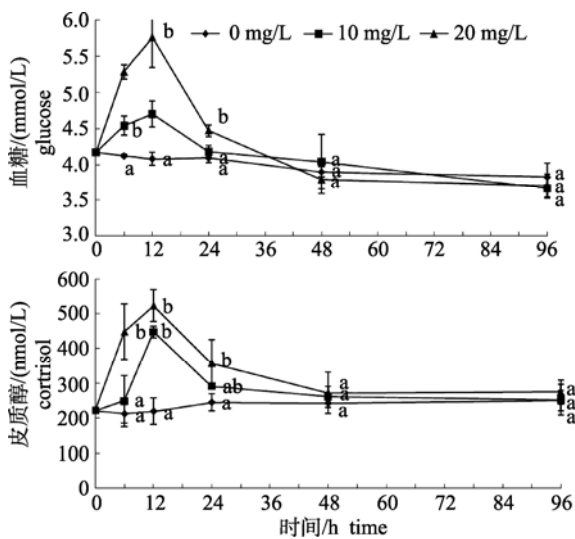


图 2 氨氮胁迫对青鱼血清血糖和皮质醇的影响  
Fig. 2 Effects of ammonia-N stress on the GLU and Cortisol in serum of *M. piceus*

皮质醇和血糖达到最大值, 其中高氨氮组与对照组差异显著 ( $P<0.05$ ), 48 h 后均恢复至对照组水平(图 2)。

### 2.3 氨氮胁迫对血清抗氧化系统的影响

与对照组相比, 血清谷胱甘肽和总抗氧化力在 96 h 内均低于对照组, 且呈先下降后升高趋势(图 3)。两氨氮组总抗氧化力在 24 h 处达到最小值,

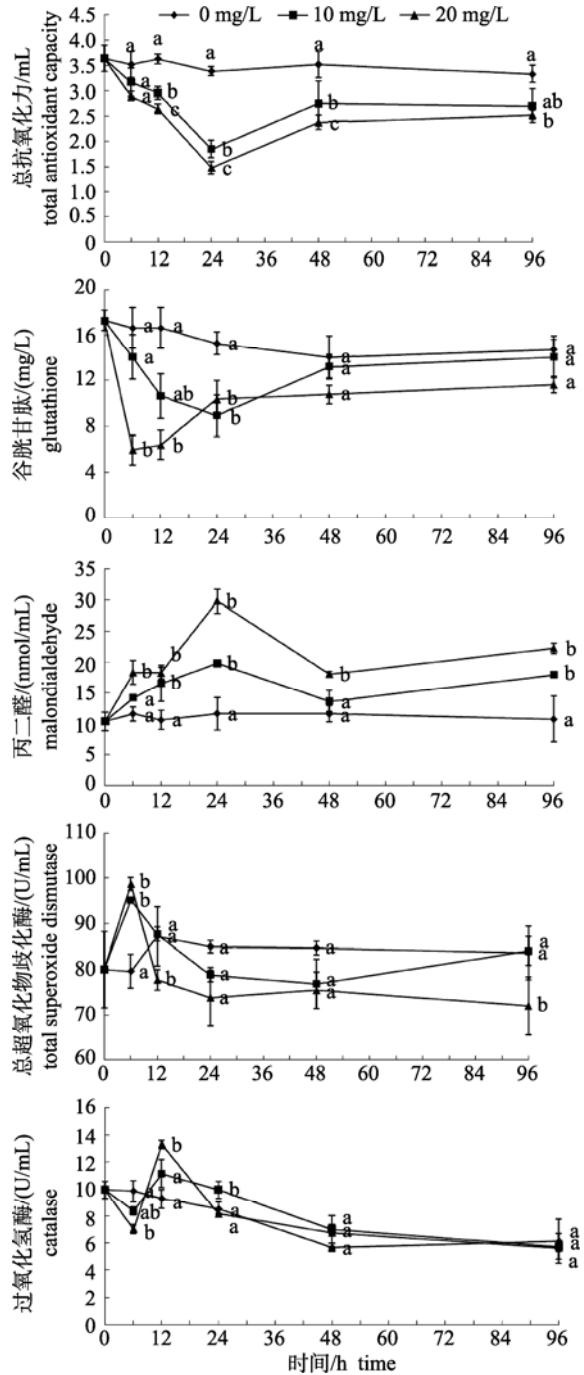


图 3 氨氮胁迫对青鱼血清抗氧化系统的影响  
Fig. 3 Effects of ammonia-N stress on the antioxidant system in serum of *M. piceus*

且均与对照组差异显著( $P < 0.05$ ), 高氨氮组 96 h 总抗氧化力仍显著低于对照组( $P < 0.05$ )。中氨氮组谷胱甘肽 24 h 下降至最小, 高氨氮组在 6 h 达最小值, 均与对照组差异显著( $P < 0.05$ ), 两处理组在 48 h 后均恢复至对照组水平。丙二醛含量胁迫 96 h 内均高于对照组, 且与氨氮浓度呈显著正相关( $P < 0.05$ ), 均呈先升高后降低趋势。两处理组均在 24 h 升至最大, 96 h 仍显著高于对照组水平( $P < 0.05$ )。两处理组总超氧化物歧化酶活力在胁迫 6 h 升高至最大值, 且与对照组差异显著( $P < 0.05$ ), 而后呈下降趋势, 中氨氮组与对照组无显著差异, 而高氨氮组总超氧化物歧化酶活力 12 h 显著低于对照组, 且 96 h 仍显著低于对照组和中氨氮组( $P < 0.05$ )。过氧化氢酶呈先降低后升高趋势, 中、高氨氮组过氧化氢酶在胁迫 6 h 达最小值, 12 h 达到最大值, 仅高氨氮组与对照组差异显著( $P < 0.05$ ), 两处理组 48 h 均恢复至对照组水平。

#### 2.4 氨氮胁迫对谷丙转氨酶活性的影响

氨氮胁迫对血清谷丙转氨酶活性产生显著影响( $P < 0.05$ )。在 0~6 h, 中、高氨氮组谷丙转氨酶活性均显著升高( $P < 0.05$ ), 且在 12 h 时达到最大峰值, 96 h 谷丙转氨酶仍维持在较高水平, 但与对照组差异不显著(图 4)。

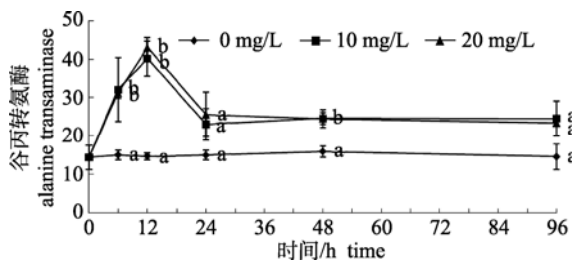


图 4 氨氮胁迫对青鱼血清谷丙转氨酶活性的影响  
Fig. 4 Effect of ammonia-N stress on the ALT activity in serum of *M. piceus*

### 3 讨论

鳃是鱼类呼吸、氨氮排泄及渗透调节的主要部位, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶是鳃组织泌氯细胞及细胞器的膜上存在的一种蛋白酶, 在鱼体渗透调节过程中起着非常重要的作用<sup>[12]</sup>。其通过耗能泵出 Na<sup>+</sup>吸收 K<sup>+</sup>, 形成细胞内外电位势, 启动二级膜蛋白运输及离子通道, 维持体内稳定的渗透压<sup>[13]</sup>。相关研究指出, 银鲈(*Bidyanus bidyanus*)和金鲈(*Macquaria ambigua*)<sup>[14]</sup>、斑鲢(*Channa punctatus*)<sup>[15]</sup>、鲫(*Car-*

*assius auratus*)<sup>[16]</sup>鳃丝 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶活力在慢性氨氮胁迫下均显著降低, 急性氨氮胁迫对鳃丝 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶活性影响的相关报道较少。而急性盐度胁迫显示, 鱼的鳃丝 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶活性呈先升高后降低趋势<sup>[17-19]</sup>。与急性盐度胁迫不同, 急性氨氮胁迫下, 青鱼鳃丝 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶 48 h 呈先下降后升高趋势, 中、高氨氮组分别在 12 和 6 h 降至最低, 48 h 升至最高, 96 h 降至对照组水平。其原因可能是, 盐度胁迫下渗透调节机能快速被有效激活, 鳃中泌氯细胞数量增加, 可较好地满足鳃组织对能量的需求, 从而能有效调节机体和环境渗透压平衡<sup>[17]</sup>, 而在氨氮胁迫初期, 环境中高浓度氨氮渗透入机体使机体氨氮排泄受阻, 机体内高浓度氨氮使得 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶蛋白结构受到影响而致酶活力降低, 然后机体渗透机制被有效激活进行主动渗透调节。而通过鳃组织电镜观察, 中氨氮组胁迫 12 h 和高氨氮组胁迫 6 h 鳃丝上泌氯细胞数量均开始增多, 说明鳃主动渗透调节机制被激活, 且胁迫浓度越高, 渗透调节机制启动越快。而后 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶下降可能与氨氮胁迫导致鳃呼吸上皮细胞脱落、鳃丝充血等有关。

下丘脑-垂体-肾间组织轴(HPI)是鱼类应激调节中枢, 能释放促肾上腺皮质激素(ACTH), 促进头肾细胞皮质醇的合成与释放<sup>[20]</sup>。而皮质醇激素通常不被储存, 直接进入血液。皮质醇还能作用于肾间组织, 使其分泌一种激素, 促进蛋白质、脂肪和碳水化合物代谢, 促进肝内糖原增生, 使血糖升高<sup>[21]</sup>。血糖作为一种直接供能物质, 在环境胁迫下鱼体为维持内环境稳定, 提高渗透调节和物质代谢的能量保障<sup>[11]</sup>。故血液皮质醇浓度和血糖常可作为衡量鱼所受应激强度的指标<sup>[22]</sup>。研究表明, 在拥挤<sup>[23]</sup>、盐度<sup>[16]</sup>和氨氮<sup>[21]</sup>等胁迫下, 鱼体主要表现为皮质醇和血糖均在短时间内急剧升高。本实验与以往研究结果相一致, 皮质醇、血糖变化趋势与氨氮存在明显时间、剂量效应。氨氮胁迫 0~12 h, 血清皮质醇和血糖浓度均显著升高至最大值, 而 48 h 恢复至对照组水平, 说明氨氮胁迫初期, 青鱼产生明显应激反应, 而 48 h 鱼体应激通过自身调节得到缓解。

生物体内存在一套完整的抗氧化防御系统, 主要由一些被氧化应激诱导的酶类如 SOD、CAT、谷胱甘肽过氧化氢酶和抗氧化物质如 GSH 等组

成。在正常生理条件下, 机体产生的自由基包括超氧阴离子、羟自由基、单线态氧与过氧化氢等, 能不断被抗氧化系统清除, 从而维持相对动态平衡<sup>[22]</sup>。当鱼体受到环境胁迫时, 机体产生大量的活性氧自由基攻击附近所有的生物分子, 对机体造成氧化胁迫, 形成脂质过氧化产物如 MDA 及新的氧自由基, 使细胞中 DNA 链断裂、酶失活, 脂质过氧化, 引起细胞凋亡等。相关研究表明, 机体受到低氨氮浓度胁迫可诱导超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性升高从而抑制氧化自由基的产生<sup>[3, 6]</sup>, 而高浓度氨氮胁迫使机体抗氧化酶活力受到抑制, 机体抗氧化能力下降。当机体抗氧化能力下降, 机体产生的大量氧自由基不能被有效清除, 使得机体脂质过氧化加剧, 脂质化产物丙二醛含量不断增加<sup>[6, 24]</sup>。在对蓝点弹涂鱼(*Boleophthalmus boddarti*)<sup>[24]</sup>和凡纳滨对虾<sup>[25]</sup>的研究表明, 氨氮胁迫可使机体出现短暂氧化应激, CAT、谷胱甘肽过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶活性和 GSH 含量下降。T-AOC 反映机体抗氧化酶系统和非酶促系统对外来刺激的代偿能力以及机体自由基代谢的状态, 是反映机体抗氧化功能的良好指标<sup>[26]</sup>。本研究中, 机体 T-AOC 变化与抗氧化防御系统中 CAT、SOD、谷胱甘肽 CAT 等抗氧化酶和抗氧化物质 GSH 的变化呈相关性。氨氮胁迫初期, 虽 T-SOD 被诱导升高, 但 CAT 和 GSH 均呈降低趋势, 导致 T-AOC 下降, 而大量过氧化氢等离子不被及时清除, 使得脂质过氧化产物 MDA 含量增加。随着氨氮胁迫 6 h 后, 虽 T-SOD 呈下降趋势, 但 CAT 活性被诱导升高, GSH 含量回升, 且胁迫 24 h 后, 应激强度有所缓解, 使得 T-AOC 开始升高, 导致 MDA 含量出现降低趋势。96 h 高氨氮组总抗氧化力仍显著低于对照组, 可能与 SOD 显著低于对照组, 而 MDA 显著高于对照组有关。

ALT 是广泛存在于动物组织细胞内参与氨基酸合成与分解代谢的重要氨基酸转移酶, 催化谷氨酸与丙氨酸之间的氨基转换, 在机体蛋白质代谢中起着重要作用。ALT 绝大部分位于细胞浆, 正常情况下, 血清中只有微量 ALT, 当机体肝损伤时, 细胞膜的通透性增加, 细胞浆内的 ALT 释放进入血液中。Jeney 等<sup>[27]</sup>研究显示, 鲤(*Cyprinus carpio*) 受到高浓度氨氮胁迫后, 血清谷丙转氨酶活力显著升高。本研究中, 10 和 20 mg/L 组均显著提高了

血清谷丙转氨酶活性, 在 12 h 达到最大值, 96 h 处仍保持较高水平。其原因可能是由于高浓度氨氮胁迫导致机体脂质过氧化产物增多, 肝细胞肿胀、坏死, 管壁细胞与基膜分离、管壁破裂等, 影响肝胰腺正常生理功能所致<sup>[28]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 王琨. 氨氮对鲤(*Cyprinus carpio* Linnaeus)幼鱼部分组织及血液指标的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007.
- [2] Handy R D, Poxton M G. Nitrogen pollution in mariculture: toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1993(3): 205–241.
- [3] 邱德全, 周鲜娇, 邱明生. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾抗病力和副溶血弧菌噬菌体防病效果研究[J]. *水生生物学报*, 2008, 32(4): 455–461.
- [4] Romano N, Zeng C S. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus* [J]. *Aquaculture*, 2007, 266: 246–254.
- [5] 黄鹤忠, 李义, 宋学宏, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)免疫功能的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2006, 37(3): 198–205.
- [6] 洪美玲. 水中亚硝酸盐和氨氮对中华绒螯蟹幼体的毒性效应及维生素 E 的营养调节[D]. 上海: 华东师范大学, 2007.
- [7] Bucher F, Hofer R. The effects of treated domestic sewage on three organs (gills, kidney, liver) of brown trout (*Salmo trutta*) [J]. *Water Research*, 1993, 27 (2): 255–261.
- [8] 姜令绪, 潘鲁青, 肖国强. 氨氮对凡纳滨对虾免疫指标的影响[J]. *中国水产科学*, 2004, 11(6): 537–541.
- [9] Foss A, Imsland A K, Roth B, et al. Effects of chronic and periodic exposure to ammonia on growth and blood physiology in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Aquaculture*, 2009, 296: 45–50.
- [10] 强俊, 徐跑, 何杰, 等. 氨氮与拥挤胁迫对吉富品系尼罗罗非鱼幼鱼生长和肝脏抗氧化指标的联合影响[J]. *水产学报*, 2011, 35(12): 1837–1848.
- [11] 龙章强. 黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)幼鱼对氨氮胁迫的生理响应及其维生素 C 的营养需求研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2008.
- [12] 徐力文, 刘广锋, 王瑞旋, 等. 急性盐度胁迫对军曹鱼稚鱼渗透压调节的影响[J]. *应用生态学报*, 2007, 18(7): 1596–1600.
- [13] Eevans D H, Piermarini P M, Choe K P. The multi-functional fish gill. Dominant site of gas exchange osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste [J]. *Physiological Reviews*, 2005, 85(1): 97–177.

- [14] Alam M, Frankel T. Gill ATPase activities of silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell), and golden perch, *Macquaria ambigua* (Richardson): Effects of environmental salt and ammonia [J]. *Aquaculture*, 2005, 251(1): 118–133.
- [15] Agrahari S, Gopal K. Inhibition of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) exposed to monocrotophos [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2008, 92(2): 57–60.
- [16] Yang W, Xiang F H, Sun H J, *et al.* Changes in the selected hematological parameters and gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity of juvenile crucian carp *Carassius auratus* during elevated ammonia exposure and the post-exposure recovery [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010, 38(4): 557–562.
- [17] 童燕, 陈立侨, 庄平, 等. 急性盐度胁迫对施氏鲟的皮质醇、代谢反应及渗透调节的影响[J]. *水产学报*, 2007, 31(1): 37–44.
- [18] 杨宇晴, 余德光, 谢骏, 等. 急性盐度胁迫对斜带石斑鱼  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶及血清应激指标的影响[J]. *热带海洋学报*, 2010, 29(4): 160–164.
- [19] 孙鹏, 彭士明, 尹飞, 等. 盐度对条石鲷幼鱼  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活力的影响[J]. *水产学报*, 2010, 34(8): 1204–1209.
- [20] Wendelaar Bonga S E. The stress response in fish [J]. *Physiological Reviews*, 1997, 77(3): 591–625.
- [21] 高明辉. VC、VE 对亚硝酸盐胁迫下异育银鲫血液指标及抗氧化能力的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [22] 麦康森, 艾庆辉, 徐玮, 等. 水产养殖中的环境胁迫及其预防 – 营养学途径[J]. *中国海洋大学学报*, 2004, 34(5): 767–774.
- [23] 于森. 拥挤胁迫对鲤生长和生理指标的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [24] Ching B, Chew S F, Wong W P, *et al.* Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (Mudskipper) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 95(3): 203–212.
- [25] 刘晓华, 曹俊明, 杨大伟, 等. 氨氮胁迫前后凡纳滨对虾组织中抗氧化酶和脂质过氧化产物的分布[J]. *水利渔业*, 2007, 27(6): 24–26.
- [26] 谭树华, 何典翼, 严芳, 等. 亚硝酸钠对鲫鱼肝脏丙二醛含量和总抗氧化能力的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24(21): 21–24.
- [27] Jeney G, Nemcsók J, Jeney Z S, *et al.* Acute effect of sublethal ammonia concentrations on common carp (*Cyprinus carpio* L.). II. Effect of ammonia on blood plasma transaminases (GOT, GPT), G1DH enzyme activity, and ATP value [J]. *Aquaculture*, 1992, 104, 1-2: 149–156.
- [28] 刘海侠, 孙海涛, 刘晓强, 等. 亚硝酸盐中毒鲤的血液和组织病理学研究[J]. *淡水渔业*, 2010, 40(3): 67–71.

## Effects of ammonia stress on the gill $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, microstructure and some serum physiological-biochemical indices of juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus*)

HU Yi<sup>1</sup>, HUANG Yun<sup>1</sup>, ZHONG Lei<sup>1</sup>, XIAO Tiao-yi<sup>1\*</sup>, WEN Hua<sup>2,3\*</sup>, HUAN Zhi-li<sup>1</sup>,  
MAO Xiao-wei<sup>1</sup>, LI Jin-long<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China;

2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

3. Freshwater Fishery Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** An important environmental concern associated with intensive fish culture is the production of ammonia, which is formed through ammonification of organic matter like unconsumed food and feces. The object of this study was to evaluate the effects of ammonia-N stress on the gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, microstructure and serum physiological-biochemical indices of juvenile black carp, *Mylopharyngodon piceus*. The black carp, whose initial average weight was  $(7.00 \pm 0.14)$  g, were transferred off the freshwater and exposed to different ammonia-N levels: 0 mg/L (low, control), 10 mg/L (middle) and 20 mg/L (high)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , each ammonia-N level was randomly triplicate and sampled at 0, 6, 12, 24, 48 and 96 h, respectively. The results indicated that the gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activities in the middle and high ammonia-N treatment groups decreased gradually at first and reached the minimum at 12 h, 6 h, respectively, then in-

creased gradually and reached the maximum at 48 h, and returned to the same level as that of control group after 96 h. Gill microstructure observation showed that chloride cell in middle ammonia group increased at 12 h; pavement cells fell off partly at 24 h; chloride cells vacuolated partly, blood capillary fractured and red blood cell overflowed at 96 h. But in high ammonia group, chloride cell increased at 6 h; pavement cells fell off partly at 12 h and largely at 24 h; After 96 h, blood capillary fractured on the base region of the lamellae and congestion, pillar cell disorganized of arrangement. Serum cortisol and glucose concentration in ammonia-N treatment group increased gradually at first 12 h, and then decreased gradually and returned to the same level as that of control group after 48 h. The activities of total superoxide dismutase (SOD) in ammonia-N treatment group increased significantly at first 6 h ( $P<0.05$ ), and SOD activity in the middle ammonia-N treatment group returned to the same level as that of control group after 12 h, but SOD activity in the high ammonia-N treatment group was still significantly higher than that of control group after 96 h ( $P<0.05$ ). Serum catalase activity decreased at first 6 h and then increased and reached the maximum at 12 h, and then decreased and recovered to the same level as that of control group after 48 h. Total antioxidant capacity (T-AOC), glutathione (GSH) and alanine transaminase (ALT) activities in ammonia-N treatment group decreased gradually at first 24 h, and malondialdehyde (MDA) concentration showed converse trends. After 96 h, GSH and ALT activities in ammonia-N treatment group returned to the same level as that of control group, however, the MDA concentration in ammonia group was significantly higher than that of control group and T-AOC activity in high ammonia group was significantly lower than that of control group. These results indicated that the ammonia stress could seriously disturb the antioxidant system at short-term ammonia-N stress, but fish showed the self-regulation ability, however, the antioxidant capacity decreased and gill structure was damaged after long-term ammonia-N stress.

**Key words:** *Mylopharyngodon piceus*; ammonia stress; gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase; gill structure; stress; antioxidant capacity

**Corresponding author:** XIAO Tiao-yi. E-mail: Tyx1128@yahoo.com.cn; WEN Hua. E-mail: wenhua.hb@163.com



图版 氨氮胁迫下青鱼幼鱼鳃组织显微结构观察

1. 表示氨氮胁迫 0 h(对照组), H.E 染色, 标尺 25 μm; 2~6. 分别表示为中氨氮浓度(10 mg/L)胁迫 6、12、24、48 和 96 h 鳃丝组织显微结构图, H.E 染色, 标尺 25 μm; 7~11. 分别表示为高氨氮浓度(20 mg/L)胁迫 6、12、24、48 和 96 h 鳃丝组织显微结构图, H.E 染色, 标尺 25 μm。

1. 鳃丝和鳃小片上呼吸上皮细胞和柱状细胞排列规则, 泌氯细胞较少; 2. 鳃丝的鳃小片呼吸上皮细胞、柱状细胞及泌氯细胞无明显变化; 3. 鳃小片基部泌氯细胞数量有所增加; 4. 鳃小片呼吸上皮细胞出现部分脱落; 5. 鳃小片基部泌氯细胞数增加, 呼吸上皮细胞部分脱落; 6. 鳃小片基部泌氯细胞数量增加, 细胞核肿大, 且部分泌氯细胞空泡化, 部分鳃小片毛细血管破裂, 红细胞溢出; 7. 鳃小片基部泌氯细胞数量有所增加; 8. 鳃小片基部泌氯细胞数量增加, 呼吸上皮细胞出现部分脱落, 柱状细胞排列不规则, 部分毛细血管破裂, 红细胞溢出; 9. 鳃小片基部呼吸上皮细胞出现大面积脱落; 10. 鳃小片基部间出现空隙, 鳃小片呼吸上皮细胞大面积脱落; 11. 鳃小片基部毛细血管破裂, 且鳃小片呼吸上皮细胞均大面积脱落, 柱状细胞排列紊乱。

CC. 泌氯细胞; PVC. 呼吸上皮细胞; PiC. 柱状细胞; B. 血窦和血细胞

**Plate Microscopical observation on the gill structure of juvenile *M. piceus* exposure different ammonia-N levels**

1. means the microscopical gill structure of juvenile black carp exposure ammonia at 0 h, H. E, bar= 25 μm; 2-6. means the microscopical gill structure of juvenile black carp exposure middle ammonia (10 mg/L) at 6, 12, 24, 48 and 96 h, H. E, bar= 25 μm; 7-11. means the microscopical gill structure of juvenile black carp exposure high ammonia (20 mg/L) at 6, 12, 24, 48 and 96 h, H. E, bar= 25 μm.

1. Showing epithelia of filament and pillar cell were rules of arrangement, less of chloride cells, H. E. 10×40; 2. no significant change of the chloride cell, epithelia of filament and pillar cell of the lamellae; 3. small increase in chloride cells on the base region of the lamellae; 4. pavement cells fall off partly; 5. small increase in chloride cells on the base region of the lamellae and pavement cells fall off partly; 6. small increase in chloride cells on the base region of the lamellae, small increase in cell nucleus and chloride cells vacuolation partly, blood capillary fractured and red blood cell overflowed; 7. small increase in chloride cells on the base region of the lamellae; 8. increase in chloride cells and pavement cells fall off partly; 9. pavement cells on the base region of the lamellae fall off largely; 10. Fissure on the base region of the lamellae and pavement cells fall off largely; 11. blood capillary fractured on the base region of the lamellae and congestion, pavement cells fall off largely, pillar cell disorganized of arrangement.

CC. chloride cells; PVC. pavement cells; PiC. pillar cell; B. blood channel and blood cell