

黑鯛種魚血容比、血紅素、血糖及乳酸之日週期變化

朱永桐 葉信利 許晉榮 丁雲源

摘要

日週期現象普遍發生於生物界的各種動物，魚類亦然。本試驗之目的即在探討 3-4 齡之雌、雄黑鯛成魚，在自然環境下之血容比、血紅素及血漿中葡萄糖和乳酸值的日週期韻律性變化。結果顯示，研究血液學及生理指標均呈現日週期性之變化，血紅素於日週期時程上有顯著變化，並於 09:00hr 達到最高值。血容比及血乳酸量在 05:00hr 達到最高點，血糖值則出現於 09:00hr。另外，在性別上血容比、血紅素、血糖及血乳酸值也呈現差異性，在各時間點上，雄魚的血紅素、血糖及血乳酸值均顯著高於雌魚($P < 0.05$)，血容比值亦有相同的趨勢，但並無統計上之顯著性($P > 0.05$)。

關鍵詞：黑鯛、日週變化、血容比、血紅素、血糖、乳酸

前言

生物在行為活動及生理普遍存在有週期性變化的特性 (rhythmicity) (Schwassmann, 1971; Rusak and Zucker, 1979)，而這些生物的行為生理週期性變化或稱為生物律動 (biological rhythms)，主要是受到某些環境因子變化的刺激所促成，如光照、溫度、鹽度、月象、潮汐…等。一般動物的行動或生理經常會隨著晝夜的交替而產生規則性的變化，而其在 24 小時期間內所產生的變化稱之為日週變化 (circadian rhythms) (Rusak and Zucker, 1979)。在魚類中呈現的日週性變化的生理現象，包括耗氧量 (oxygen consumption) (Hirata *et al.*, 200hr1)、血醣 (glycemia) (Gutierrez *et al.*, 1984; Kuhn *et al.*, 1986; Laidley and Leather, 1988; Boujard and Leatherland, 1992; Pavlidis *et al.*,

1999a,b)、及內分泌，諸如可體松 (cortisol) (Srivastava and Meier, 1972; Laidley and Leather, 1988)、甲狀腺素 (thyroid hormone) (Boujard and Leatherland, 1992; Holloway *et al.*, 1994) 及成長激素 (growth hormone) (Holloway *et al.*, 1994)...等。這些研究大多以淡水魚種，如虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) (Boujard and Leatherland, 1992; Holloway *et al.*, 1994) 鯉魚 (*Cyprinus carpio*) (Kuhn *et al.*, 1986) 為材料，在海水魚類之研究相對較少，僅少數如海鱸 (*Dicentrarchus labrax*) (Gutierrez *et al.*, 1984; Pavlidis *et al.*, 1999a) 及鯛類 (*Sparus auratus*, *Pagrus pagrus*) (Pavlidis *et al.*, 1997; Pavlidis *et al.*, 1999b) 曾進行類似的研究。

魚類各項血液學參數

(hematological parameter)目前已被廣泛應用於疾病診斷及體內生理狀態的評斷(McCarthy *et al.*, 1973; Martinez *et al.*, 1994; Huston, 1997)。由於日週期變化普遍存在於生物各種生理現象，因此在以血液學探討魚類的生理現象及調控或分析魚體健康狀況時，為避免因日週期之起伏變化所造成生理指標代表性的誤判，實有必要對各種生理指標的日週期變化進行基礎調查研究。

黑鯛(*Acanthopagrus schlegeli*)是台灣主要的海水養殖魚種之一，已建立大量生產技術，然而目前對於該魚種之生理研究大部份仍集中在生殖生理之探討(如 Chang *et al.*, 1997)，對於環境生理上的研究仍然短缺。因此本研究之目的在於探討黑鯛種魚血液學及生理參數之日週性變化及其參數之性別差異性，做為日後進行各項生理試驗及判斷健康狀況時之參考依據。

材料及方法

一、實驗動物

黑鯛種魚取自水產試驗所海水繁殖研究中心田間池。試驗魚在實驗前先置於 1.8×3.8×1.1 m 之水泥池，於自然光照下採流水式蓄養，蓄養期間鹽度範圍為 32-35 ppt、溫度範圍為 18-26 °C。試驗魚於生殖季以輕壓腹部方式，依是否可排精或鏡檢判斷性別，可排精者之雄魚並加以標幟；未能發現精液者則以 PE 管(I.D. 1.14 mm, O.D. 1.57 mm, Becton Dickinson)自泄殖腔孔抽取生殖細胞鏡檢以確定性別。蓄養期間每日上午 08:30hr 投餵成鰻粉狀飼料一餐，餵食量以達飽食為主。

蓄養 2 個月後(黑鯛繁殖季後)，乃

依先前所作之標幟，挑選試驗之雄魚(體長為 27.80±1.76 cm，體重為 423.50±74.69 g，mean±SEM)及雌魚(體長為 28.03±1.47 cm，體重為 430.33±58.65 g)各 42 尾，以 1:1 的比例分養於 6 個不同水泥池內，每池雌、雄各置 7 尾，馴養一星期後進行試驗。試驗前一天禁食，採樣分別於試驗當天的 09:00hr、13:00hr、17:00hr、21:00hr 及翌日清晨 01:00hr、05:00hr 進行，為避免每個時間點採樣時彼此干擾，將 6 個水泥池分配在 6 個不同時間點採樣，每個池內的 14 尾雌、雄魚在每次時間點均全部採樣。採樣過程為減低捕撈追逐產生之緊迫，所有魚隻先經濃度 100 ml/l 之 2-phenoxyethanol (2-PE)輕度麻醉，再迅速撈起，並以 400 ppm 之 2-PE 進行快速麻醉，麻醉後之魚以 1% heparin-ammonia salt 潤濕過之 3 ml 注射針筒於尾靜脈處抽血 1.5 ml，且為避免麻醉過程時間過長造成緊迫，在 1 分鐘內完成操作。抽出之全血以毛細管吸取一部份新鮮血液並即刻進行作血球容積比(hematocrit, Hct)分析，並採 20 µl 全血凍存於-80°C 作為日後測定血紅素(hemoglobin, Hb)之用，剩餘部份則在 4 °C 下以 4,000 rpm 離心 15 分鐘，分離血漿後凍存於-80°C 冷凍櫃供血糖及血乳酸分析用。

二、試驗分析

血紅素分析採用 diagnostic kits (Sigma 527-A)，以 cyanomethaemoglobin 方法測定。Hct 以血容比毛細管，將新鮮血液導入毛細管後直接以血容比離心機(DSC-024M, Digisystem laboratory instrument, Inc)12,000 g 離心 10 分鐘後，讀取數值。乳酸分析係參考 Lin *et al.*

(1999)之方法，以診斷試劑(Sigma 735-10)，利用乳酸的氧化反應產生過氧化氫，在過氧化酵素作用下以呈色劑進行呈色反應，利用光度比色計於波長 540 nm 測定吸光值，對照標準曲線換算乳酸濃度。血漿中葡萄糖含量的測定，以葡萄糖檢測試劑(Trinder glucose kit, Sigma 315-100)利用 glucose oxidase 法測定。

三、統計分析

各組實驗數據以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示，並以單因子變方分析(one-way ANOVA)分析是否有差異，若達 5%顯著水準($P < 0.05$)，再以特奇式公正顯著差異法(Turkey's honestly significant difference test)加以檢定平均值差異。雌、雄間之差異則以 t-test 檢定之，顯著水準同樣設為 5%。

結果

雌、雄黑鯛種魚之 Hct 日週變化，在 09:00-01:00hr 時段維持在 28.8-30.5% 範圍內，在 05:00hr 呈現上揚之趨勢，Hct 值雌雄分別為 32.4% 及 31.2%。就整體而言，並無顯著的日週期變化存在($P > 0.05$)(Fig. 1A)，01:00-09:00hr 時段雌性 Hct 較雄性為高，但統計上並無顯著差異($P > 0.05$)，其平均值介於 28.8-32.4% 之間。

雌、雄黑鯛 Hb 之日週變化如 Fig. 1B 所示。在採樣時程上顯示出雌魚及雄魚 Hb 值均有顯著日週期效應存在($P < 0.05$)，雄魚在 09:00hr 最高，為 15.8 mg/dl，明顯高於其他時間點，且下午以後至隔日清晨間之變化不大，都維持在 12.4-13.4 mg/dl 間。雌魚的 Hb 最高值同樣出現在 09:00hr (9.5 mg/dl)，然後

隨著時間進行而遞減，在 21:00hr 呈現最低(6.6 mg/dl)，且與白天時段相比較有顯著差異($P < 0.05$)，但在夜間時段 Hb 值則無顯著變化。此外雄魚在各採樣時間點上之 Hb (12.4-15.8 mg/dl) 均顯著高於雌魚(6.6-9.5 mg/dl) ($P < 0.05$)，顯示出黑鯛雌魚之 Hb 值低於雄性，且在夜間均有較低 Hb 值趨勢。

雌魚和雄魚的血糖值的日週期變化表示於 Fig. 2A。雌雄在 09:00-17:00hr 時段血醣值分別為 97.3 mg/dl 及 143.9 mg/dl，但在 17:00-05:00hr 時段則為 85.2 mg/dl 及 136.7 mg/dl。明顯地，白天之血醣量高於夜間含量，但其變化並無顯著之差異性($P > 0.05$)。顯示雌魚或雄魚的血糖值並不會受日週期影響。在各時段之性別間比較上，雄性均高於雌性，且雄性分別在 09:00hr、13:00hr、15:00hr、05:00hr 時段顯著高於雌魚($P < 0.05$)，顯示出在白晝雄魚有較高的血糖值。

在血乳酸值(Fig. 2B)，不論雌魚或雄魚在日週期上均無明顯的變化($P > 0.05$)，然而雌、雄性別間在各時間點上的血乳酸含量則有顯著差異($P < 0.05$)，雄魚在各採樣時間點上之血乳酸值 (23.0-31.9 mg/dl) 明顯高於雌魚 (5.3-12.4 mg/dl)。

討論

晝夜變化一般被認為是影響生理週期變化的一重要因子(McCormick and Naiman, 1984; Pavlidis *et al.*, 1999a,b)。本研究中，黑鯛種魚 24 小時之血紅素含量隨晝夜而有明顯變化，以上午最高，然後隨時間進行而遞降，至午夜以後其含量明顯低於上午。硬骨魚

類紅血球之相關參數如血容比、血紅素等與魚種、習性和活動能力有關。活動

量高的魚有較高的能量需求，需氧量較高，因此其血紅素含量往往較活動量低

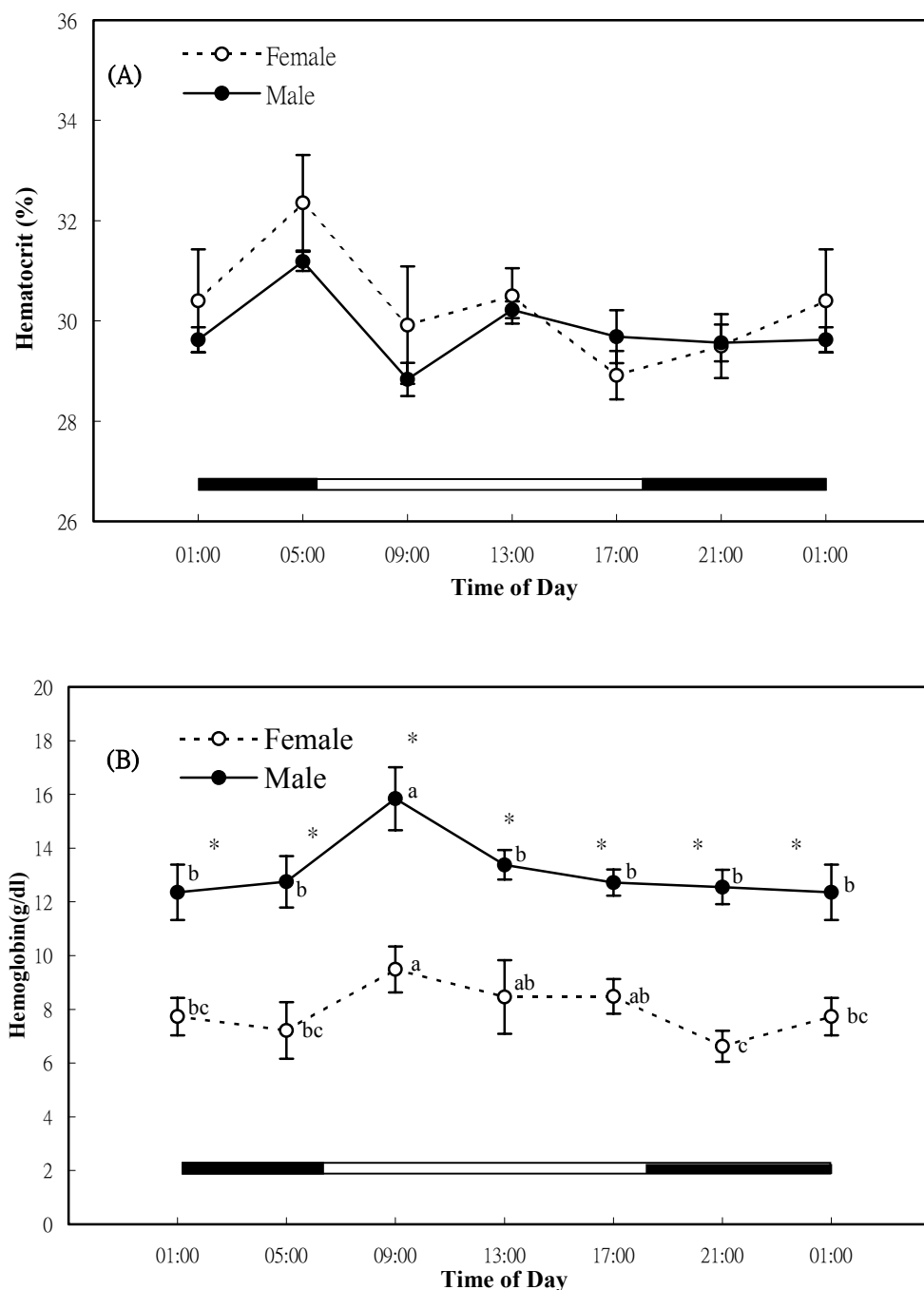


Fig. 1. Circadian rhythmic changes in the hematological parameters of black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. (A) hematocrit; (B) hemoglobin. Values represented mean \pm SEM (n = 7). Means with different letters differed significantly at 5% level over 24 hr period, and * indicates that differences between the sexes are statistically significant at 5% level.

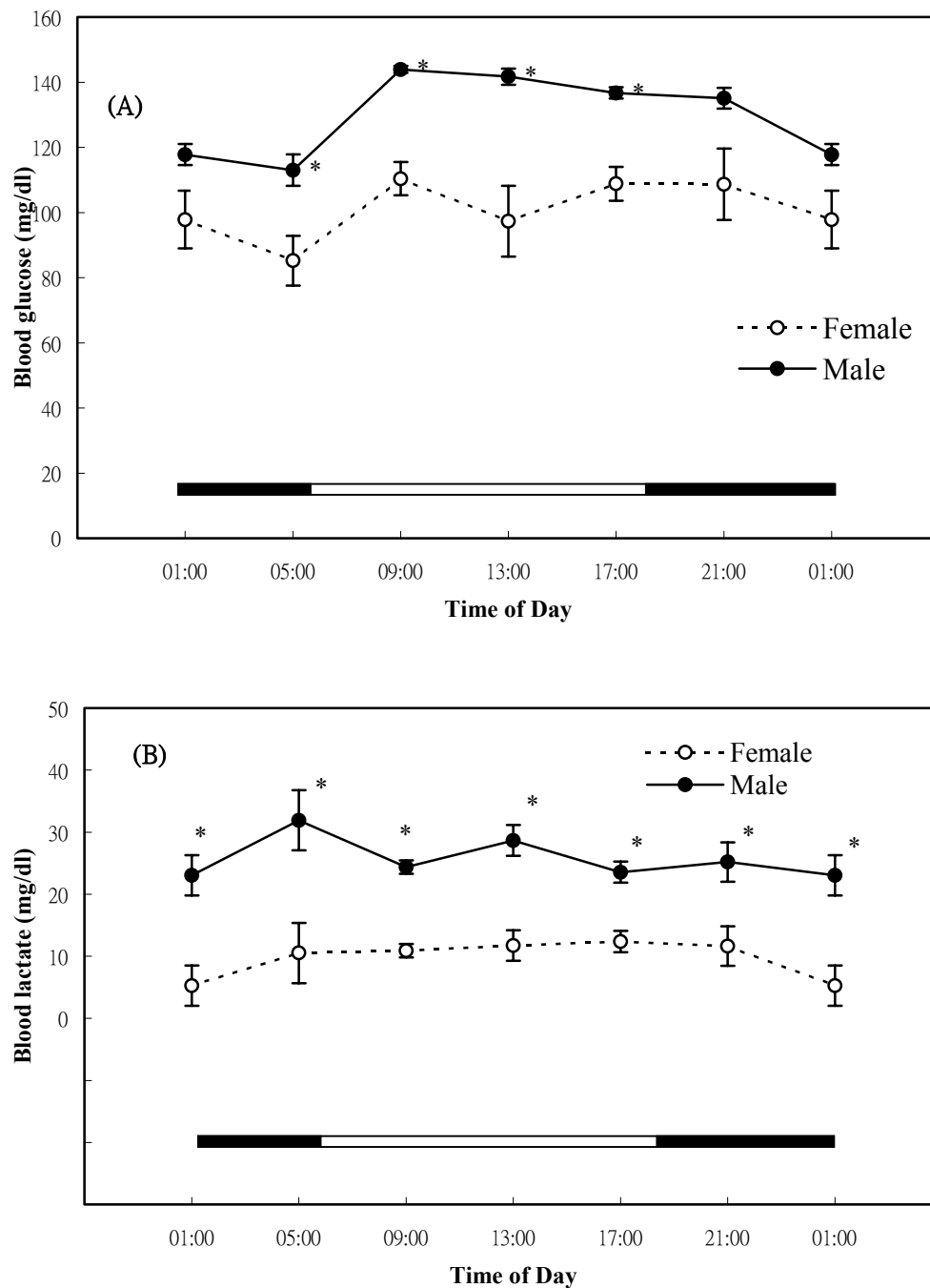


Fig. 2. Circadian rhythmic changes in physiological parameters of black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. (A) blood glucose; (B) blood lactate. Values represented mean \pm SEM (n = 7). * indicates that differences between the two sexes are statistically significant at 5% level.

者為高(Kakuno *et al.*, 1994)。Huang (1989)曾進行黑鯛攝餌週期性之研究，指出日間為野生黑鯛之低活動期，然而經人工養殖之黑鯛在日間則有較高攝食總量，屬高活動期，說明了其攝餌週期性可因人工馴化而改變。本實驗之黑鯛種魚係人工養殖，平日餵飼時間為08:30hr，因此人工養殖黑鯛已被馴化適應在白天活動及攝餌覓食，所以相對於夜晚，活動力較強的白天應會有較高血紅素值。

血糖含量之日週期變化與餵飼與否、食物種類(Gutierrez *et al.*, 1984)、餵飼規律(Pavlidis *et al.*, 1997)、光週期控制(Pavlidis *et al.*, 1999a,b)有關。Gutierrez *et al.* (1984)以牛眼鯛(*Boops boops*)魚肉及商業配合飼料投餵海鱸，投餵魚肉者其血糖呈現明顯日週期變化，但投餵配合飼料組則無此現象。此外，Biron and Benfey (1994)發現在明/暗交替切換時引起之緊迫是導至血糖上升的主因。本試驗之黑鯛平日投飼鰻魚配合飼料，並於實驗前一天開始禁食且在自然光照下進行，較不易產生緊迫現象，此可能使得本實驗中黑鯛體內之血糖及血乳酸值並未有明顯變化。

在以往的研究中，經常會發現魚類的血液學參數會存在性別差異(McCarthy *et al.*, 1975; Hille, 1982)。在血紅素方面，吳郭魚(*Tilapia zilli*)(Ezzat *et al.*, 1977)、黃鰭鯛(*Acanthopagrus latus*)(Al-Hassan *et al.*, 1993)和印度馬西亞魚(*Tor putitora*)(Kapila *et al.*, 2000)，其雄魚的血紅素值都較雌魚為高，本試驗之黑鯛種魚也有相似的結果。兩性之間血紅素值存有顯著差異，

可能是習性所致，在一般實務經驗上雄魚均顯現較為活潑，而較為活潑魚隻則有較高血紅素值(Kakuno *et al.*, 1994)。另外，黑鯛是先雄後雌魚種，一般雄魚屬較年輕者其體重較輕，而體重較輕者有較高的代謝率(Majed *et al.*, 2002)，對能量需求較高，因而血紅素值大於雌魚。

血糖及乳酸一般被認為是緊迫反應之二級反應的指標，魚體在經過外在環境刺激後，也就是處於壓迫環境下，其體內經常會呈現短暫性的高血糖(hyperglycemia)或高乳酸(hyperlacticemia)現象(Wedemeyer *et al.*, 1990; Wendelaar Bonga, 1997)，本實驗雄魚的血糖及乳酸含量大多較雌魚為高，除了表示個體代謝之狀態，就緊迫反應的觀點而言，具較高血糖及乳酸值的雄魚可能意味其對緊迫較雌魚敏感，因此容易啟動緊迫反應增加血糖及乳酸含量以作為生理調適之能量所需。Svoboda *et al.* (2001)曾探討鯉科魚類 *Tinca tinca* 在產卵前、後血液中生化因子的變化，在產卵前血中葡萄糖，蛋白質、三甘油酯和膽固醇含量，雌魚均顯著高於雄魚，然而在產卵後則大部份代謝物則呈現雄魚高於雌魚之現象，此現象更證實 Robertson *et al.* (1961)之推測，認為卵巢發育過程對能量需求較高因而此時血糖量較高。本實驗進行在繁殖季後，此時可能雌魚在繁殖季為了支付體內卵細胞的發育與成熟而消耗大量體內能量代謝物，且產卵季後已不需在支付卵巢發育之能量因而使在生殖季後雌魚呈現較低數值。

謝言

本實驗得以順利完成，承本分所張丁仁先生及梁貴龍先生之鼎力協助採樣與同仁慷慨支援相關儀器，和農委會科技計畫預算項下補助，特此誌謝。

參考文獻

- Al-Hassan, L. A. J., H. K. Ahmed and S. A. Majeed (1993) Some haematological parameters in relation to the biology of the fish *Acanthopagrus latus*. J. Environ. Sci. Health, 28A: 1599-1611.
- Biron, M. and T. J. Benfey (1994) Cortisol, glucose and hematocrit changes during acute stress, cohort sampling, and the diel cycle in diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Fish Physiol. Biochem., 13: 153-160.
- Boujard, T. and J. F. Leatherland (1992) Diel pattern of hepatosomatic index, liver glycogen and lipid content, plasma non-esterified free fatty acid, glucose, T₃, T₄, growth hormone and cortisol concentration in *Oncorhynchus mykiss* held in different photoperiod regimes and fed using demand-feeders. Fish Physiol. Biochem., 10: 111-122.
- Chang, C. F., B. Y. Lin, E. L. Lau, M. F. Lee, W. S. Yuh, Y. H. Lee, C. N. Chang, J. D. Huang, P. Tacon, F. Y. Lee, J. L. Du and L. T. Sun (1997) The endocrine mechanism of sex reversal in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*: A review. Chinese J. Physiol., 40: 197-205.
- Ezzat, A. A., M. B. Shabana and A. M. Farghally (1973) Studies on the blood characteristics of *Tilapia zilli*. I. Blood cells. J. Fish Biol., 6: 1-12.
- Gutierrez, J., M. Carrillo, S. Zanuy and J. Planas (1984) Daily rhythms of insulin and glucose levels in the plasma of sea bass *Dicentrarchus labrax* after experimental feeding. Gen. Comp. Endocrinol., 55: 393-397.
- Hille, S. (1982) A literature review of the blood chemistry of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich. J. Fish Biol., 20: 535-569.
- Hirata, H., M. Niino, Y. Ishibashi, O. Murata and H. Kumai (2001) Diurnal changes of oxygen consumption in devil stinger *Inimicus japonicus*. Suisanzoshoku, 49: 469-474.
- Holloway, A. C., P. K. Reddy, M. A. Sheridan and J. F. Leatherland (1994) Diurnal rhythms of plasma growth hormone, somatostatin, thyroid hormone, cortisol and glucose concentrations in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during progressive food deprivation. Biol. Rhythm Res., 25: 415-432. (Abstract only)
- Houston, A. H. (1997) Review: Are the classical hematological variable indicators of fish health? Trans. Am. Fish. Soc., 126: 879-894.
- Huang, B. Q. (1989) Feeding periodicity of black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. J. Fish. Soc. Taiwan, 16: 1-9.
- Kakuno, A., K. Sezaki and Y. Ikeda (1994) Comparative studies on fish blood-I. Comparative hematology among 50 fish species of perciformes. Bull. Natl. Res.

- Inst. Fish. Sci., 6: 23-40.
- Kapila, R., S. Kapila and Y. Basade (2000) Sex related haematological variations in Himalay golden mahseer, *Tor putitora*. Indian J. Fish., 47(1): 81-85. (Abstract only).
- Kuhn, E. R., S. Corneillie and F. Ollevier (1986) Circadian variations in plasma osmolality, electrolytes, glucose and cortisol in carp (*Cyprinus carpio*). Gen. Comp. Endocrinol., 61: 459-468.
- Laidley, C. W. and J. F. Leatherland (1988) Circadian studies of plasma cortisol, thyroid hormone, protein, glucose and ion concentration, liver glycogen concentration and liver and spleen weight in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Comp. Biochem. Physiol., 89A: 495-502.
- Lin, C. Y., S. H. Chen, G. H. Kou, and C. M. Kuo (1999) An enzymatic microassay for lactate concentration in blood and hemolymph. Acta Zool. Taiwan., 10: 91-101.
- Majed, S. A., R. M. G., Wells and B. H. Mcardle (2002) Season effect on lactate dehydrogenase and citrate synthesis in snapper (*Pagrus auratus*). New Zeal. J. Mar. Freshw. Res., 36: 233-239.
- Martinez, F. J., M. P. Garcia-Riera, M. Canteras, J. D. Costa and S. Zamora (1994) Blood parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Simultaneous influence of various factors. Comp. Biochem. Physiol., 107A: 95-100hr.
- McCarthy, D. H., J. P. Stevenson and M. S. Roberts (1974) Some blood parameters of the rainbow (*Salmo gairdneri*). II. The Shasta variety. J. Fish Biol., 7: 215-219.
- McCormick, S. D. and R. J. Naiman (1984) Osmoregulation in the brook trout, *Salvelinus fontinalis*-- II. Effects of size, age and photoperiod on sea water survival and ionic regulation. Comp. Biochem. Physiol., 79A: 17-28.
- Pavlidis, M., M. Berry, P. Divanach and M. Kentouri (1997) Diel pattern of haematocrit, serum metabolites, osmotic pressure, electrolytes and thyroid hormone in sea bass and sea bream. Aquacult. Int., 5: 237-247.
- Pavlidis, M., L. Greenwood, M. Paalavuo, H. Molsa and J. T. Laitinen (1999a) The effect of photoperiod on diel rhythms in serum melatonin, cortisol, glucose and electrolytes in the common *Dentex dentex*. Gen. Comp. Endocrinol., 113: 240-250.
- Pavlidis, M., M. Paspatis, M. Koistinen, T. Paavola, P. Divanach and M. Kentouri (1999b) Diel rhythms of serum metabolites and thyroid hormones in red porgy held in different photoperiod regimes. Aquacult. Int., 7: 29-44.
- Robertson, O.H., N. A. Krupp, C. B. Favour, S. Hane and S. F. Thomas (1961) Physiological changes occurring in the blood of the pacific salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) accompanying sexual maturation and spawning. Endocrinology, 68: 325-337.
- Rusak, B. and I. Zuker (1979) Neural

- regulation of circadian rhythms. *Physiol. Rev.*, 59: 449-526.
- Schwassmann, H. O. (1971) Biological rhythms. In *Fish Physiology, Vol. VI. Environmental relations and behavior* (W. S. Hoar and D. J. Randall, eds.). Academic Press, San Diego, pp 371-428.
- Srivastava, A. K. and A. H. Meier (1972) Daily variation in concentration of cortisol in plasma in intact and hypophysectomized gulf killifish. *Science*, 177: 185-187.
- Svoboda, M., J. Kouril, J. Hamackova, P. Kalab, L. Savina, Z. Svobodova and B. Vykusova (2001) Biochemical profile of blood plasma of tench (*Tinca tinca*) during pre- and postspawning period. *Acta Vet. Brno.*, 70: 259-268.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997) The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77: 591-625.

The circadian rhythm of hematocrit, hemoglobin, and plasma glucose and lactate in black porgy broodstock

Yeong-Torng Chu, Shinn-Lih Yeh, Jinn-Rong Hseu and Yun-Yuan Ting

Abstract

Circadian rhythms in the behavior and physiological processes are commonly observed in the living organisms including teleosts. The objective of this study is to investigate the circadian rhythmic changes of the hematological parameters such as hematocrit (Hct), hemoglobin (Hb), and the physiological parameters such as plasma glucose and lactate in 3 to 4 years old black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*) of both sexes under ambient conditions. The results showed that only the Hb showed significant circadian rhythm, on the other hand, Hct, glucose and lactate did not show obvious circadian rhythms. In addition, the Hb, glucose and lactate showed significantly sexual difference ($P < 0.05$). All of the values in male fish were higher than those in female ones at each time point. Hct also had a similar phenomenon but the difference between the both sexes did not reach the significant level ($P > 0.05$).

Key word: Black porgy (*Acanthopagrus schlegeli*), Circadian rhythm, Hematocrit, Hemoglobin, Glucose, Lactate