

DOI: 10.5846/stxb201306161715

肖锋, 颀志刚, 庄建洲. 高温刺激对蟾蜍免疫活性和能量消耗的影响. 生态学报, 2015, 35(9): 3087-3092.

Xiao F, Xie Z G, Zhuang J Z. The effects of hyperthermia on immunocompetence and energy consumption in *Bufo bufo gargarizans*. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(9): 3087-3092.

高温刺激对蟾蜍免疫活性和能量消耗的影响

肖 锋, 颀志刚*, 庄建洲

浙江师范大学生态研究所, 金华 321004

摘要: 全球气候变化是导致全世界两栖动物种群衰退和灭绝的重要因素之一。为了解无尾两栖类在气候异常导致的极端高温下的生理反应特征和相关适应机制, 以雄性中华大蟾蜍 (*Bufo bufo gargarizans*) 为对象, 研究该物种在高温刺激 (环境温度由 22 °C 迅速升至 32 °C) 0、6、12、24、48 h 后的非特异性免疫活性和能量消耗的变化情况。研究结果: 与对照组 (22 °C) 比较, 高温刺激可显著抑制外周血细胞吞噬活性; 而脾脏巨噬细胞呼吸爆发在高温刺激下呈现出先增强后减弱的趋势。高温刺激导致血糖含量在第 24 和 48 h 显著低于对照组, 而对肝糖原含量无显著影响。处理组精巢 ATP 含量逐渐升高, 并于 24 和 48 h 显著高于对照组; 处理组 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性随时间呈现出先下降后上升稳定的趋势, 但与对照组相比均无显著性差异; 处理组 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 活性在不同时期与对照组相比均无显著性差异。研究结果说明, 高温刺激可显著抑制中华大蟾蜍的非特异性免疫功能, 并导致血糖的大量消耗; 当面对高温胁迫时, 雄性大蟾蜍可能会投入更多的能量来维持性腺的正常发育。

关键词: 中华大蟾蜍; 高温刺激; 免疫活性; 能量消耗

The effects of hyperthermia on immunocompetence and energy consumption in *Bufo bufo gargarizans*

XIAO Feng, XIE Zhigang*, ZHUANG Jianzhou

Institute of Ecology, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Abstract: Global climate change is a key factor which leads to either a decline or an extinction of amphibian populations worldwide. This paper investigates the effects of high environmental temperatures on non-specific immunity and energy consumption in the male toads (*Bufo bufo gargarizans*). We found that peripheral blood cell phagocytosis decreases while spleen macrophage respiratory burst activity transiently increases in high-temperature toads (32 °C) versus control toads (22 °C). Blood glucose levels decrease in high-temperature toads after 24 h and 48 h exposure versus control toads, while hepatic glycogen content remains unchanged. In addition, the ATP content in the high-temperature toad testis gradually increases and reaches significant levels after 24 h and 48 h exposure versus control toads. $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ activity show no significant changes. Our results indicate that high environmental temperatures cause a decline in immunocompetence, an increase in glucose consumption, and an accumulation of energy (ATP) within the testis in *Bufo bufo gargarizans*.

Key Words: *Bufo bufo gargarizans*; hyperthermia; immunocompetence; energy consumption

两栖类动物作为由水生向陆生过渡的典型变温动物类群, 其生存极易受到环境温度的影响。近年来的研

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30800129, 31270457)

收稿日期: 2013-06-16; 网络出版日期: 2014-05-22

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: xiezhigang@zjnu.cn

究表明,全球气候异常变化很可能是造成两栖类种群衰退和物种灭绝的重要因素^[1-4]。气候异常通常表现在极端天气的频繁出现,非季节性、短期剧烈的气温变化可能会严重干扰两栖类的免疫防御能力以及能量代谢等生理功能,从而增加死亡风险,最终影响两栖类的生存和种群稳定^[5-6]。而且,由于大多数两栖类皮肤的通透性较高,因全球气候变暖或局域热浪引起的气温升高易导致机体的脱水,因此,高温对两栖类的生存具有更大威胁。

两栖类动物尚未进化出完善的特异性免疫系统,非特异性免疫在抵抗不良环境方面通常发挥着更为重要的作用^[7]。变温动物的非特异性免疫活性具有明显的温度依赖性^[8],在适宜的温度范围内一般随温度升高而增强,但超出这个范围就会受到抑制^[9-10]。另外,高温刺激在短期内可能会诱导某些非特异性免疫活性的应激性升高,但是这种刺激作用随后会消失,且会对机体造成生理损伤^[11]。

两栖类动物的能量代谢直接受到环境温度的影响。高温能加快机体的呼吸代谢,而血糖作为基本的供能物质首先被消耗,血糖变化可反映机体在环境胁迫下的应激水平^[12]。高温可通过诱导蛙类糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase, GP)的活化来促进肝糖原分解生成葡萄糖^[13]。此外,雄性动物精子活力与环境温度密切相关,而高温可能通过干扰性腺内 ATP 含量或 ATPase 活力来影响两栖类的繁殖力^[14-16]。

中华大蟾蜍(*Bufo bufo gargarizan*)在我国南方和北方均有分布,属广温性动物。相较于其它无尾两栖类物种,中华大蟾蜍因其皮肤角质化程度较高,在高温下可更加有效地防止体内水分的蒸发,因而具有较强的高温耐受能力。因此,该物种可用来研究两栖类广布种所拥有的高温耐受与适应机制,并以此来探讨和预测两栖类在全球气候异常变化背景下可能出现的进化趋势。但是,相关研究在国内外尚不多见。本文通过研究中华大蟾蜍在高温刺激下的非特性免疫活性和能量代谢等相关指标的反应特征,来探索该物种在高温胁迫下的生理适应机制,以期在两栖类相关生态学研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 动物选择与驯化

本实验所用中华大蟾蜍(*Bufo bufo gargarizan*)于2011年10月份采集自浙江省金华市周边郊区,选取体重在70—80 g之间健康雄性个体,饲养于专用玻璃水族箱(90 cm × 40 cm × 60 cm)内,提供充足的水陆环境和遮蔽物,以黄粉虫(*Tenebrio molitor*)活体作为饵料,每日1次,控制室温(22±1)℃、光周期(12 L:12 D),两周后用于实验。

1.2 高温刺激实验

将100只健康大蟾蜍随机分为两组,分别置入两台恒温培养箱(MIR-253, SANYO, Japan)的6个玻璃槽(30 cm × 20 cm × 15 cm,土壤厚度1 cm,15—16只/槽)内,箱内起始温度为22℃。对照组培养箱温度仍保持驯化温度(22℃);处理组培养箱温度通过编程设置1 min内由22℃升至32℃,并保持48 h。于实验初,取8只个体用于非特异性免疫和能量代谢等相关生理指标的初始测定;在实验处理的第6小时、12小时、24小时、48小时进行取样,各组每次取8只个体用于相关指标分析。蟾蜍经双毁髓后断头取血,血液内加入EDTA-2Na抗凝,用于外周血细胞吞噬活性和血糖的测定。经解剖后,立即取脾脏用于脾巨噬细胞呼吸爆发活力的测定,肝脏于-80℃保存。

1.3 免疫指标的测定

1.3.1 血细胞吞噬活性的测定

血细胞吞噬活性的测定主要参考 Miliukene 等^[17]建立的方法。首先将外周血与异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate)标记的酵母细胞(*Saccharomyces cerevisiae*)混合,加入磷酸盐缓冲液(PBS, pH 值7.4),水浴(25℃)60 min,离心去上清,用冰 PBS 洗涤底物2次,再次加入 PBS 使细胞重悬,依次加入0.4%台盼蓝(trypsin blue)和0.5%Triton-100,最后利用荧光分光光度计(RF-5301PC, Shimadzu Scientific Instruments, Inc.)测定荧光强度(吸收光波长480 nm,发射光波长520 nm)。

1.3.2 脾脏巨噬细胞呼吸爆发活力的测定

将蟾蜍脾脏于 RPMI1640 培养基中充分剪碎,经细胞筛过滤得到细胞过滤液,离心去上清,加入 RPMI1640 使细胞重悬,调节浓度后加入 96 孔板,以 RPMI1640 作空白对照,置于 25 ℃ 细胞培养箱孵育 1 h,使细胞贴壁,弃去培养基,加入氮蓝四唑(nitroblue tetrazolium, NBT)继续培养 1 h,弃去 NBT,加甲醇固定,弃去甲醇,加入 KOH 和二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),经振荡后用酶标仪测定吸光度值(600 nm),详见 Couso 等^[18]的方法。

1.4 能量指标的测定

血糖、肝糖原含量以及精巢 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 活性和 ATP 含量的测定方法详见试剂盒说明书(南京建成生物工程研究所)。

1.5 数据统计与分析

采用 SPSS 17.0 进行统计分析,免疫和能量指标相关数据经 Kolmogorov-Smirnov test 后,均符合正态分布。组内差异采用 One-Way ANOVA 的 Turkey 检验,组间差异采用独立样本 T 检验(Independent-sample T-test)。实验结果以平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SE)表示, $P < 0.05$ 为差异显著,以不同英文字母表示组内差异显著,* 表示组间差异显著。

2 结果

2.1 非特异性免疫

与对照组相比,大蟾蜍受到高温刺激 6 h 之后,外周血吞噬活性明显抑制($t = 6.536$, $df = 10$, $P < 0.01$),且随着胁迫时间的延长,呈现持续下降的趋势;在 48 h,吞噬活性降为初始水平的 1/7。对照组全血吞噬活性在试验期间无明显变化($F = 0.346$, $df = 4$, $P = 0.844$)(图 1)。

对照组脾脏巨噬细胞呼吸爆发活力稳定($F = 1.725$, $df = 4$, $P = 0.175$),而处理组呼吸爆发活力随时间呈现出先升高后下降的趋势,在 6 和 12 h 呼吸爆发活力显著高于对照组($t = -18.677$, $df = 12$, $P < 0.01$; $t = -11.720$, $df = 12$, $P < 0.01$),随后又迅速下降,在 24 和 48 h 显著低于对照组($t = 2.930$, $df = 11$, $P = 0.014$; $t = 2.337$, $df = 11$, $P = 0.039$),且在 48 h 与组内初始水平差异显著($t = 2.767$, $df = 11$, $P = 0.018$)(图 2)。

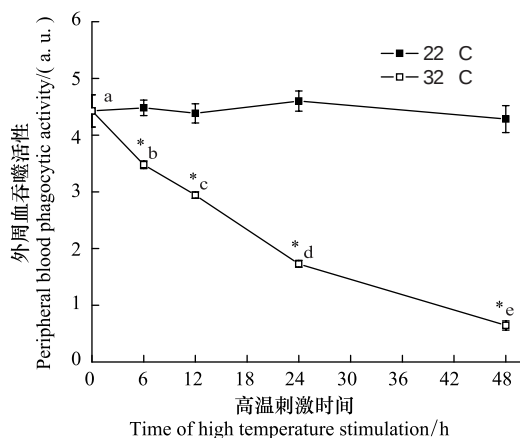


图 1 高温刺激对中华大蟾蜍外周血细胞吞噬活性的影响

Fig.1 The effect of hyperthermia on peripheral blood phagocytic activity in *Bufo bufo gargarizans*

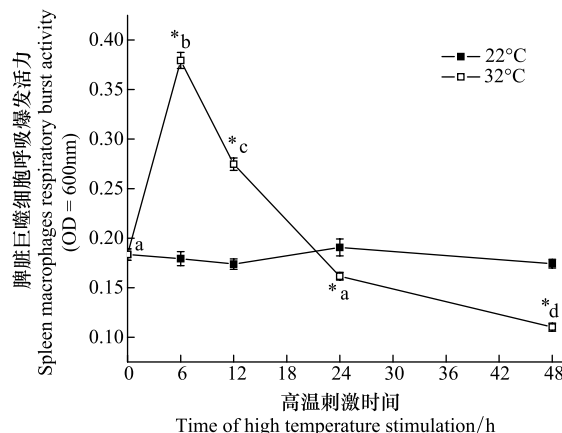


图 2 高温刺激对中华大蟾蜍脾脏巨噬细胞呼吸爆发活力的影响

Fig.2 The effect of hyperthermia on spleen macrophages respiratory burst activity in *Bufo bufo gargarizans*

2.2 能量利用

对照组血糖水平保持稳定($F = 0.122$, $df = 4$, $P = 0.973$),而处理组血糖含量随时间呈现出先升高后下降的趋势,在 12 h 内与对照组无显著差异($t = -1.823$, $df = 8$, $P = 0.106$),但在 24 和 48 h,与组内初始水平(24 h, $t =$

-4.803, $df=8$, $P<0.01$; 48 h, $t=-6.711$, $df=8$, $P<0.01$) 和对照组 (24 h, $t=3.318$, $df=8$, $P=0.011$; 48 h, $t=4.480$, $df=8$, $P<0.01$) 均有显著差异 (图 3)。

处理组与对照组在各时期的肝糖原含量均无显著性差异 (6 h, $t=-0.217$, $df=6$, $P=0.835$; 12 h, $t=0.758$, $df=6$, $P=0.477$; 24 h, $t=2.001$, $df=6$, $P=0.092$; 48 h, $t=0.552$, $df=6$, $P=0.601$), 组内也无显著差异 ($F=0.639$, $df=4$, $P=0.643$; $F=0.283$, $df=4$, $P=0.884$) (图 4)。

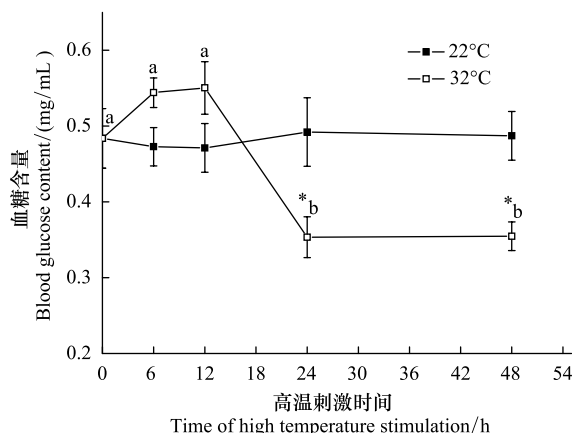


图 3 高温刺激对中华大蟾蜍血糖含量的影响

Fig.3 The effect of hyperthermia on the content of blood glucose in *Bufo bufo gargarizans*

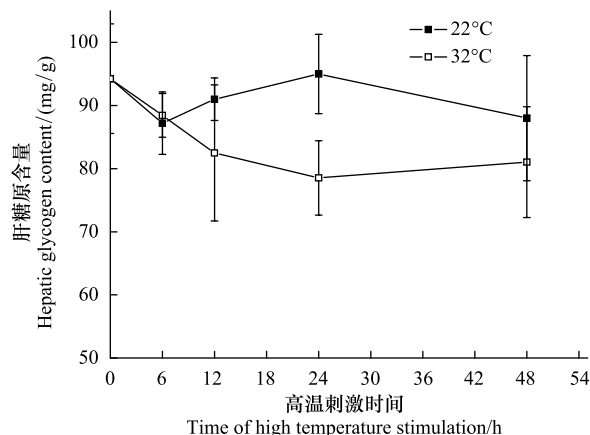


图 4 高温刺激对中华大蟾蜍肝糖原含量的影响

Fig.4 The effect of hyperthermia on hepatic glycogen in *Bufo bufo gargarizans*

2.3 精巢 ATP 含量

对照组蟾蜍精巢的 ATP 含量无显著性变化 ($F=0.572$, $df=4$, $P=0.685$); 而处理组随时间呈现出逐渐升高的趋势, 在 48 h 显著高于组内初始水平 ($t=-3.934$, $df=12$, $P<0.01$), 且在 24 和 48 h 显著高于对照组 ($t=-4.516$, $df=14$, $P<0.01$; $t=-3.151$, $df=12$, $P<0.01$) (图 5)。

2.4 精巢 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 与 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性

对照组精巢 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性在 48 h 内无显著性变化 ($F=0.339$, $df=4$, $P=0.850$); 而处理组 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性随时间呈现出先下降后上升稳定的趋势, 但与同时期的对照组相比均无显著性差异 (6 h, $t=-1.510$, $df=14$, $P=0.153$; 12 h, $t=0.337$, $df=13$, $P=0.742$; 24 h, $t=1.662$, $df=14$, $P=0.119$; 48 h, $t=0.749$, $df=14$, $P=0.466$), 组内也无显著性差异 ($F=1.824$, $df=4$, $P=0.146$) (图 6)。

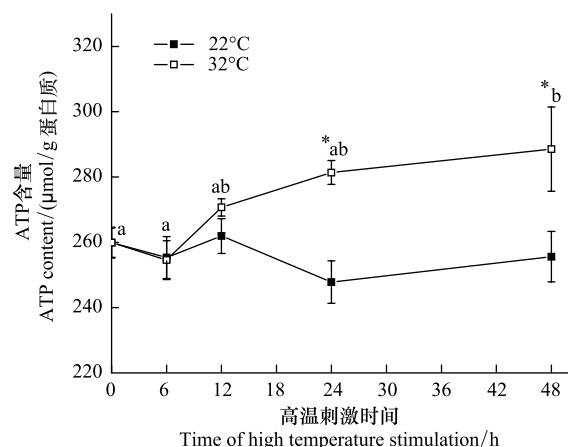


图 5 高温刺激对中华大蟾蜍精巢三磷酸腺苷 (ATP) 含量的影响

Fig.5 The effect of hyperthermia on the content of spermatic adenosine triphosphate (ATP) in *Bufo bufo gargarizans*

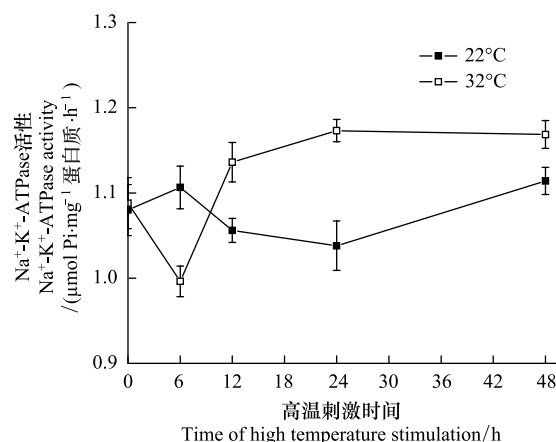


图 6 高温刺激对中华大蟾蜍精巢 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性的影响

Fig.6 The effect of hyperthermia on the activity of spermatic $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in *Bufo bufo gargarizans*

处理组与对照组精巢 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性在各同时期均无显著性差异(6 h, $t = -0.773$, $df = 14$, $P = 0.453$; 12 h, $t = 1.684$, $df = 12$, $P = 0.118$; 24 h, $t = 0.963$, $df = 14$, $P = 0.352$; 48 h, $t = 0.111$, $df = 14$, $P = 0.913$), 组内也无显著性差异($F = 2.333$, $df = 4$, $P = 0.075$; $F = 1.463$, $df = 4$, $P = 0.234$)(图 7)。

3 讨论

高温胁迫会影响细胞膜的结构及其组成成分的比例,如饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比例、磷脂与胆固醇的比例^[19],从而影响细胞膜的稳定性和流动性,最终影响吞噬细胞的正常功能^[20-21]。如高温会显著降低鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[22]、罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[23]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[24]的呼吸爆发强度。与该结果相似的是,在本研究中高温显著抑制了蟾蜍外周血的吞噬活力和脾脏巨噬细胞的呼吸爆发活力。然而,高温胁迫在短期内对吞噬细胞活性可能产生一定程度的激发作用。如将中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)从 14 °C 迅速转移至 28 °C 饲养环境,3 h 之后其全血吞噬活性达到最高值,然后逐渐降至初始水平^[9]。在本研究中,脾脏巨噬细胞呼吸爆发活力在高温处理初期(6 h 和 12 h)出现了应激性升高,这可能是因为高温胁迫导致吞噬细胞在短期内产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),但是过多的 ROS 又给自身带来了氧化损伤,最终导致吞噬活力下降。

血糖可以作为应激指标来判断机体的应激状态,因为高温胁迫会通过改变应激激素的水平和糖原磷酸化酶(GP)活力来影响糖代谢^[25]。如皮质醇(酮)能促进肝糖异生反应,提高血糖浓度以及增加肝脏组织的糖元贮备^[26]。此外,高温可能会诱导 GP 的活化,从而促进肝糖原分解生成葡萄糖,同时抑制肝糖原的合成^[13]。研究表明,无论是生活在季节性温度变化还是在不同水温环境中的斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*),温度和血糖含量的关系都呈现出负相关^[27]。而在本研究中,高温胁迫的蟾蜍血糖含量在短期内表现出先上升的趋势,但与对照组相比无显著性差异;与上述斑点叉尾鲷研究结果相似的是,血糖含量随胁迫时间的延长而显著下降。此外,蟾蜍肝糖原含量并无显著变化,说明机体没有将大量的糖原转化为血糖,而是通过消耗血糖来抵抗高温胁迫。

精巢需要机体不断供应能量来维持精子的正常生成发育,精巢 ATP 含量的下降会影响到生殖细胞的正常发育^[16]。高温胁迫会干扰质子泵 ATPase 对底物和反应离子的亲和力,以及干扰 ATPase 与生物膜上的磷脂相的耦合,从而影响生物膜的流动性^[28],最终给精巢的能量供应和精子的发育带来不利影响^[14-16]。本研究结果表明:高温胁迫可以诱导精巢 ATP 含量在 48 h 内显著上升,表明机体在高温胁迫中会投入更多的能量来维持性腺的正常生长发育;而精巢组织中 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性均无显著性变化。根据这些结果可推测:雄性中华大蟾蜍在环境温度突然升高的情况下可能会通过提高精巢 ATP 蓄积量来维持性腺的正常发育,从而提高繁殖适合度,这可能是该物种能够成为广布种的重要适应机制之一,但由于缺乏其它两栖类动物的相关报道,需要开展物种间的对比研究。

致谢:美国东卡罗莱纳大学 Ronald W Dudek 教授和英国 Chris Reading 博士(Centre for Ecology and Hydrology, Winfrith Technology Centre)帮助英文写作,实验室同仁给予帮助,特此致谢。

参考文献(References):

- [1] Rohr J R, Madison D M. Dryness increases predation risk in efts: support for an amphibian decline hypothesis. *Oecologia*, 2003, 135(4):

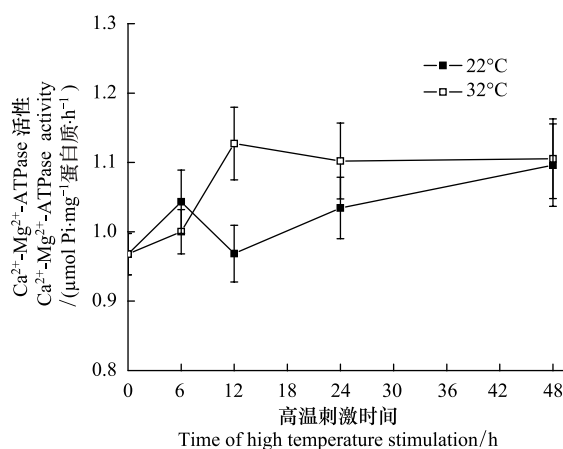


图 7 高温刺激对中华大蟾蜍精巢 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性的影响

Fig.7 The effect of hyperthermia on the activity of spermatic $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ in *Bufo bufo gargarizans*

657-664.

- [2] Stuart S N, Chanson J S, Cox N A, Young B E, Rodrigues A S L, Fischman D L, Waller R W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 2004, 306(5702): 1783-1786.
- [3] Daszak P, Scott D E, Kilpatrick A M, Faggioni C, Gibbons J W, Porter D. Amphibian population declines at Savannah River site are linked to climate, not chytridiomycosis. *Ecology*, 2005, 86(12): 3232-3237.
- [4] Pounds J A, Crump M L. Amphibian declines and climate disturbance: the case of the golden toad and the harlequin frog. *Conservation Biology*, 1994, 8(1): 72-85.
- [5] Woolbright L L. The impact of Hurricane Hugo on forest frogs in Puerto Rico. *Biotropica*, 1991, 23(4): 462-467.
- [6] Reading C J. Linking global warming to amphibian declines through its effects on female body condition and survivorship. *Oecologia*, 2007, 151(1): 125-131.
- [7] Voyles J, Rosenblum E B, Berger L. Interactions between *Batrachochytrium dendrobatidis* and its amphibian hosts: a review of pathogenesis and immunity. *Microbes and Infection*, 2011, 13(1): 25-32.
- [8] Morgon A L, Thompson K D, Auchinachie N A, Migaud, H. The effect of seasonality on normal hematological and innate immune parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* L.. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(6): 791-799.
- [9] 宋林生, 季延宾, 蔡中华, 方敏, 苏建国, 崔朝霞, 李太武. 温度骤升对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 几种免疫化学指标的影响. *海洋与湖沼*, 2004, 35(1): 74-77.
- [10] 杨先乐, 左文功. 水温与草鱼免疫应答关系的研究. *动物学报*, 1997, 43(1): 42-48.
- [11] 董晓敏, 周显青, 王迎. 温度对中华大蟾蜍和中华鳖冬眠前离体红细胞免疫功能及其大小的影响. *动物学杂志*, 2009, 44(3): 101-107.
- [12] Barton B A, Iwama G K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1991, 1: 3-26.
- [13] Storey K B, Storey J M. Freeze tolerant frogs: cryoprotectants and tissue metabolism during freeze-thaw cycles. *Canadian Journal of Zoology*, 1986, 64(1): 49-56.
- [14] 郭春雨, 管越强, 刘波兰. 温度、pH 和盐度对克氏原螯虾鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性的影响. *动物学杂志*, 2007, 42(6): 96-102.
- [15] Lagerspetz K Y H, Pivovarova N B, Senius K E O. Monovalent cation activated ouabain-insensitive ATPase in the gills of freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1992, 103(4): 903-908.
- [16] Grootegeed J A, Den Boer P J. Energy metabolism in spermatids: a review // Hamilton D W, Waites G H M, eds. *Cellular and Molecular Events in Spermiogenesis*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989: 193-215.
- [17] Miliukene V V, Biziuliavichene G L, Khaustova L P, Pilinkene A V, Biziuliavichius G A. Determination of quantitative parameters of *Escherichia coli* phagocytosis by mouse peritoneal macrophages. *Tsitologiya*, 2007, 49(10): 853-857.
- [18] Couso N, Castro R, Magarinos B, Obach A, Lamas J. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis. *Aquaculture*, 2003, 219(1): 99-109.
- [19] Wodtke E, Cossins A R. Rapid cold-induced changes of membrane order and $\Delta 9$ -desaturase activity in endoplasmic reticulum of carp liver: A time-course study of thermal acclimation. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1991, 1064(2): 343-350.
- [20] Bly J E, Clem L W. Temperature-mediated processes in teleost immunity: Homeoviscous adaptation by channel catfish peripheral blood cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1988, 91(3): 481-485.
- [21] Vallejo A N, Miller N W, Clem L W. Cellular pathway(s) of antigen processing in fish APC: effect of varying in vitro temperatures on antigen catabolism. *Developmental and Comparative Immunology*, 1992, 16(5): 367-381.
- [22] Verma A K, Pal A K, Manush S M, Das T, Dalvi R S, Chandrachoodan P P, Ravi P M, Apte S K. Persistent sub-lethal chlorine exposure augments temperature induced immunosuppression in *Cyprinus carpio* advanced fingerlings. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(5): 547-555.
- [23] Ndong D, Chen Y Y, Lin Y H, Vaseeharan B, Chen J C. The immune response of *Tilapia Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(6): 686-694.
- [24] Nikoskelainen S, Bylund G, Lilius E M. Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 2004, 28(6): 581-592.
- [25] Costanzo J P, Lee R E Jr, Lortz P H. Glucose concentration regulates freeze tolerance in the wood frog *Rana sylvatica*. *The Journal of Experimental Biology*, 1993, 181(8): 245-255.
- [26] 嵇庆, 李宗芸, 杨影, 朱静安, 汤继光. 大蟾蜍冬眠前后血清中某些激素含量变化及其与糖代谢的关系. *动物学杂志*, 1995, 30(2): 19-22.
- [27] Ottolenghi C, Puviani A C, Ricci D, Brighenti L, Morsiani E. The effect of high temperature on blood glucose level in two teleost fish (*Ictalurus melas* and *Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1995, 111(2): 229-235.
- [28] 王维娜, 牛东红, 商利新, 王军霞. 低温对日本沼虾耗氧率、排氨率和 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 比活力的影响. *应用与环境生物学报*, 2004, 10(5): 602-604.