

## 不同温度短期暴露对雄性斑马鱼焦虑及恐惧行为的影响\*

陶 鸿, 李英文, 刘智皓

(重庆师范大学 生命科学学院 水生生态健康与环境安全研究中心, 重庆 401331)

**摘要:**为探究不同温度短期暴露对雄性斑马鱼(*Danio rerio*)焦虑及恐惧行为的影响,将实验用雄性斑马鱼分为空白组、对照组、低温组和高温组,驯养水温分别为27、27.20和34℃,连续处理7 d后对各组实验鱼进行新缸潜游试验;在焦虑行为测试结束后对对照组、低温组和高温组的实验鱼施以警戒素刺激,并对实验鱼的恐惧行为进行测试。焦虑行为测试结果显示:与对照组实验鱼相比,低温组实验鱼首次上浮时间、底层停留时间及冻结时间均有明显增加,而高温组实验鱼首次上浮时间和冻结时间均明显减少。恐惧行为测试结果显示:与空白组实验鱼相比,内源警戒素能明显增加其他3组实验鱼首次上浮时间、底层停留时间及冻结时间;与对照组实验鱼相比,低温组实验鱼首次上浮时间、底层停留时间及冻结时间有明显增加而高温组实验鱼首次上浮时间和底层停留时间有明显减少。研究结果提示低温暴露和高温暴露分别明显增强和减弱了雄性斑马鱼的焦虑反应和恐惧反应。

**关键词:**斑马鱼;温度;焦虑行为;恐惧行为

**中图分类号:**Q492.5

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-6693(2024)05-0029-06

对动物尤其是外温动物而言,温度是至关重要的非生物因子之一。大量研究表明,温度在外温动物的生命活动中扮演着极为重要的角色<sup>[1]</sup>。鱼类是典型的外温动物,它们的体温通常会随水温的变化而改变,而它们的各项生命活动过程也受到水温的影响<sup>[2]</sup>。从全球历史温度变化规律上看,全球温度存在着循环往复的波动<sup>[3]</sup>。有研究显示,近些年来由全球变暖引起的极端高温和由北极冰盖融化引起的寒潮将会引起全球性温度大幅度变化<sup>[4]</sup>。全球性的温度改变势必对鱼类等外温动物正常生命活动造成影响。过去的研究发现,温度会影响鱼类胚胎孵化<sup>[5]</sup>、生长发育<sup>[6]</sup>及生物节律<sup>[7]</sup>,例如水温仅发生2℃的改变就能干扰斑马鱼(*Danio rerio*)的生物节律<sup>[8]</sup>。

应激反应是指受到相关生态因子刺激或其他生物影响后,动物产生的一系列非特异性防御反应<sup>[9]</sup>,最常见的应激反应为焦虑反应和恐惧反应。鱼类的焦虑反应一般为对内部冲突或未知威胁的普遍反应,而恐惧反应一般是由外界施加压力后自发的防御行为或回避行为<sup>[10]</sup>。焦虑及恐惧反应能帮助动物躲避天敌,对动物的生存具有重要的生态学意义。适度的焦虑恐惧能使动物保持警觉性和对环境变化的敏感性,有利于它们躲避外界伤害;过度或过低的焦虑恐惧均不利于动物个体生存及种族延续,因为前者会影响动物摄食、繁殖等正常生理活动而后者则会降低动物警觉性<sup>[11]</sup>。最近的研究发现光照<sup>[12]</sup>、光周期<sup>[13]</sup>、氨氮<sup>[14]</sup>、溶氧<sup>[15]</sup>等多种生态因子均会影响斑马鱼的应激行为,但温度是否会影响斑马鱼的焦虑行为及恐惧行为尚有待研究。

斑马鱼是一种原产于亚洲南部的淡水热带鱼类,具有易饲养、繁殖快等特点,并对温度变化有较强的抵抗力<sup>[16]</sup>;同时,因斑马鱼与人类(*Homo sapien*)在基因组方面高度相似,故该鱼种成为了研究动物生殖、发育和行为的模式动物之一,在基础医学、生态学等研究领域得到广泛应用<sup>[17]</sup>。本研究考察了不同温度短期暴露对雄性斑马鱼焦虑及恐惧行为的影响,以为鱼类生理生态及行为学研究积累新的参考资料。

\* 收稿日期:2023-09-10 修回日期:2023-12-18 网络出版时间:2024-07-08T15:39

资助项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 31901183);重庆市自然科学基金项目(No. cstc2020jcyj-msxmX0805);重庆市基础科学与前沿技术研究专项基金项目(No. cstc2016jcyjA1032);重庆市教育委员会科学技术研究计划项目(No. KJ1600308)

第一作者简介:陶鸿,女,研究方向为鱼类生理学,E-mail:1198696663@qq.com;通信作者:刘智皓,男,副教授,博士,E-mail:minenut@163.com

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/50.1165.N.20240705.1752.002

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验鱼的来源及驯化

实验用体型相似且健康活泼的成年雄性斑马鱼共 180 尾购于国家斑马鱼资源中心。在正式实验前,所有实验鱼先于恒温系统中在水体的温度、溶解氧质量浓度和 pH 分别为 $(28\pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、 $6.0\sim 7.3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $7.1\sim 7.8$  的条件下驯化 14 d,每隔 2 d 换水 1 次且每次换水量为 180 L。驯化期间的光周期设置为 14 h 光照:10 h 黑暗,每日 9:00、15:00 和 21:00 定时投喂山东升索饲料科技有限公司生产的商业饲料,每日投喂饲料总量为实验鱼体质量的 2%。

### 1.2 实验仪器

本研究使用的主要实验仪器为日本索尼公司生产的 DSC-RX100 M4 型索尼相机、温州德福智能科技有限公司生产的 RE-W5005 型电子温度计、上海恒勤仪器设备公司生产的 SG9-B 型溶解氧分析器和湖南湘仪实验室仪器开发有限公司生产的 TG16-W 型常温离心机。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 不同温度短期暴露实验

为避免外界环境及人为活动的影响,整个实验过程皆在由遮光帘搭建的简易暗室中进行。在暗室中放置 12 个长 $\times$ 宽 $\times$ 高均为  $50\text{ cm}\times 40\text{ cm}\times 30\text{ cm}$  且装有脱氯自来水的亚克力材质鱼缸以及 4 个光照强度均为  $1\ 000\text{ lx}$  的 LED 灯,光照周期与驯化期间时相同。实验共设置 4 个处理组即空白组、对照组、低温组和高温组,其中水温分别为  $27^\circ\text{C}$ 、 $27^\circ\text{C}$ 、 $20^\circ\text{C}$  和  $34^\circ\text{C}$ 。每个组设置 3 个平行缸,除空白组每个缸中放置 7 尾实验鱼以外,其余各组每个缸中放置 14 尾实验鱼。每个缸的 4 个侧面和底部外壁均贴上白纸,以避免外界环境对实验鱼的干扰。通过加热棒对各组水体进行控温,控制水温波动不超过  $1^\circ\text{C}$ ,其他条件与驯化期间保持一致,整个不同温度短期暴露实验时间为 7 d。

#### 1.3.2 焦虑行为测试

上述实验结束后,通过新缸潜游实验,测试对照组、低温组及高温组实验鱼的焦虑行为,各组样本量均为 21 尾。将长 $\times$ 宽 $\times$ 高为  $26\text{ cm}\times 18\text{ cm}\times 20\text{ cm}$  的测试鱼缸中水体深度设为  $10\text{ cm}$ ,并控制其中水温为与对应处理组水温相同,用记号笔在鱼缸拍摄面绘制 1 条水平分隔线,将水体分为上下 2 层,每层水深均为  $5\text{ cm}$ (图 1a)。摄像机固定于测试缸正前方  $50\text{ cm}$  处。

在进行焦虑行为测试时,小心地将 1 尾实验鱼放入测试鱼缸中后立即进行拍摄,拍摄时长为  $10\text{ min}$ 。为保证实验的可靠性,严格控制拍摄过程中缸内水温变化不超过  $1^\circ\text{C}$ 。每次拍摄完 1 组实验鱼行为后,彻底清洗所有鱼缸,并更换饲养水体,然后再准备下一组拍摄。视频拍摄结束后即对斑马鱼焦虑行为进行行为学分析。斑马鱼在进入新环境后会因焦虑而下潜至下层水体,在焦虑缓解后又会逐渐探索新环境。基于以上特性,本研究参照文献[18]设计以下行为学指标:1) 首次上浮时间,即实验鱼首次从下层水体跨越分隔线移动至上层水体的时间点;2) 底部停留时间,即实验鱼在下层水体活动的总时间;3) 冻结时间,即实验鱼除眼、鳃活动外身体在水体中大于  $1\text{ s}$  的完全静止时间<sup>[18]</sup>。

#### 1.3.3 恐惧行为测试

在测试缸内背侧距水面  $5\text{ cm}$  高处,粘贴有一段  $10\text{ cm}$  的透明胶管(图 1b),用于注射内源警戒素(alarm substance)溶液。经研究证实:当硬骨鱼类受到攻击且表皮受损时,表皮棒状细胞会分泌化学预警信息即警戒素,从而引起同类的恐惧反应及报警行为<sup>[19]</sup>。实验室条件下通常采用同种或近源鱼类皮肤匀浆法制备内源警戒素溶液<sup>[20]</sup>。本研究在实验当天制备所需内源警戒素溶液,具体操作为:取正常条件下饲养的斑马鱼数尾,用 MS-222 麻醉液( $w_{\text{MS-222}}=0.1\%$ )麻醉斑马鱼,并用镊子小心取下完整表皮,再将表皮研磨混匀并溶解到双蒸水中,制成内源警戒素溶液( $\rho_{\text{表皮}}=1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。

在行为测试时,通过移液枪/透明胶管向空白组测试缸中加入  $1\text{ mL}$  双蒸水,向其他组均加入  $1\text{ mL}$  上述内源警戒素溶液,然后立刻开始拍摄,拍摄及清洗测试缸的要求与焦虑行为测试时相同。视频拍摄结束后对斑马鱼恐惧行为的行为学分析指标也与焦虑行为测试中的指标一致。

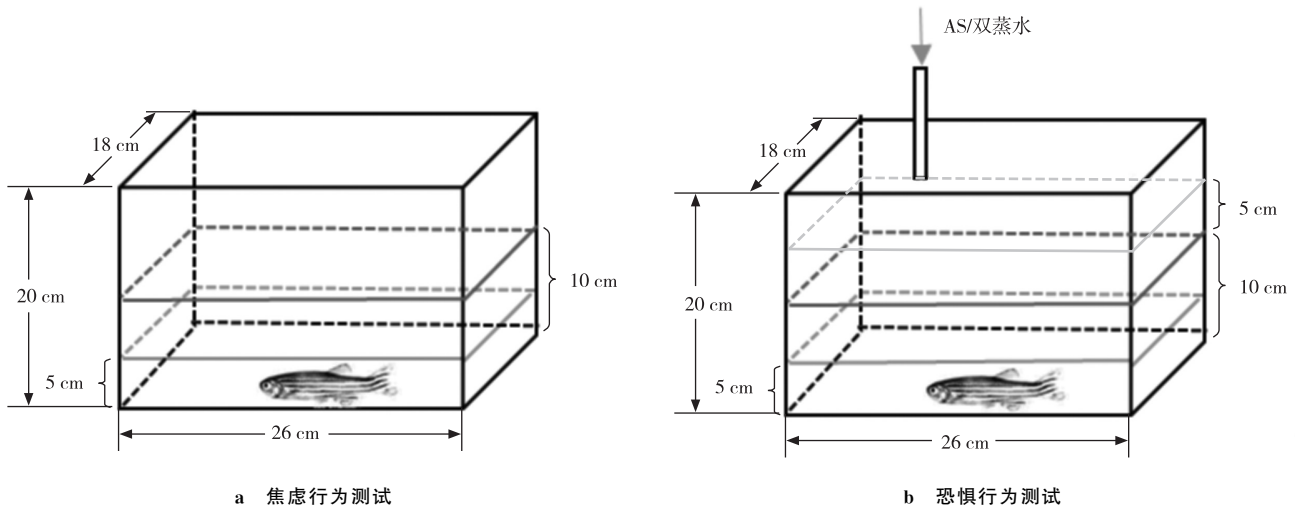


图 1 斑马鱼焦虑及恐惧行为测试实验示意图

Fig. 1 Experimental diagram of anxiety and fear behavior test of zebrafish

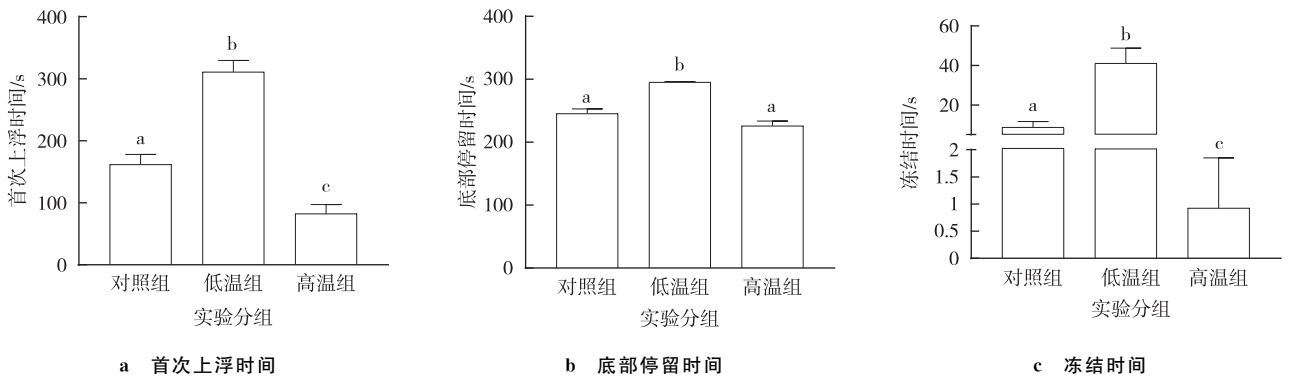
### 1.4 数据分析

实验数据经过常规计算及统计处理,均以“平均值±标准误”表示。用 SPSS 17.0 软件对实验结果进行单因素方差分析,并对各处理组间的数据进行 Tukey 比较。当  $p < 0.05$  时,上述统计分析结果具有统计学意义。最后,使用 Prism 8.0 软件绘制相关柱形图。

## 2 结果

### 2.1 对焦虑行为的影响

图 2 显示:与对照组实验鱼相比,低温组实验鱼首次上浮时间、底部停留时间及冻结时间均有统计学意义上的增加( $p < 0.05$ ),而高温组实验鱼首次上浮时间、冻结时间则均有统计学意义上的减少( $p < 0.05$ )。



注:不同小写字母表示不同实验组(样本量均为 21 尾)的数据差异具有统计学意义( $p < 0.05$ ),下同。

图 2 不同温度短期暴露对雄性斑马鱼焦虑行为的影响

Fig. 2 Effect of short-term exposure at different temperatures on anxiety behavior of zebrafish

### 2.2 对恐惧行为的影响

由图 3 可知:与不加入内源警戒素的空白组实验鱼相比,内源警戒素明显能增加其他 3 组实验鱼首次上浮时间、底部停留时间及冻结时间,且有关差异均具有统计学意义( $p < 0.05$ )。同时,与对照组实验鱼相比,低温组实验鱼首次上浮时间、底部停留时间及冻结时间均有统计学上的增加( $p < 0.05$ ),而高温组实验鱼首次上浮时间及底部停留时间则均有统计学意义上的减少( $p < 0.05$ )。

## 3 讨论与结论

应激反应对鱼类的生存和繁衍具有重要意义。鱼类的焦虑反应和恐惧反应在行为上通常表现为冻结行为

频繁发生、探索行为明显减少、首次进入上层水体时间增加等<sup>[21]</sup>。由此可见,首次上浮时间、底层停留时间及冻结时间的增加均表明鱼类的焦虑反应及恐惧反应加剧,反之则表明鱼类的焦虑及恐惧得到了缓解<sup>[22]</sup>。

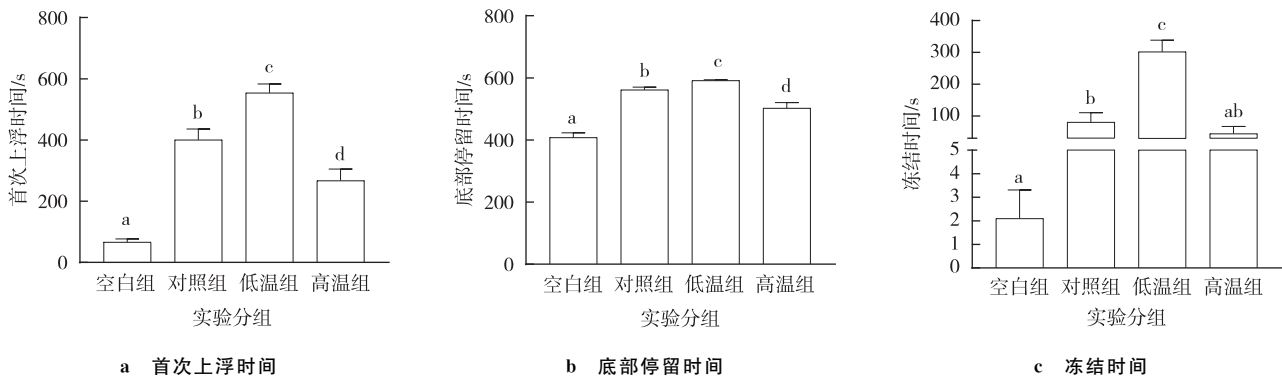


图 3 不同温度短期暴露对雄性斑马鱼恐惧行为的影响

Fig. 3 Effect of short-term exposure at different temperatures on fear behavior of zebrafish

本研究结果显示:与空白组实验鱼相比,对照组实验鱼首次上浮时间、底层停留时间及冻结时间均明显增加,表明内源警戒素能够引起实验鱼恐惧反应;与对照组实验鱼相比,低温组实验鱼首次上浮时间、底层停留时间及冻结时间均明显增加,表明低温短期暴露加剧了实验鱼的焦虑反应和恐惧反应。焦虑反应作为一种应激反应,在动物保持警惕,适应环境中具有重大意义<sup>[23]</sup>;恐惧反应能帮助动物面临现存或潜在的胁迫时调动机体各项代谢活动,以便迅速逃避回避危险<sup>[24]</sup>。本研究中,雄性斑马鱼在低温短期暴露下显得更为谨慎,它的探索能力大幅度减弱,焦虑反应和恐惧反应都明显加剧。其他研究也发现,低温同样会加剧人类的焦虑反应<sup>[25]</sup>,这一结果与本研究结果极为相似。然而,增强的焦虑或恐惧反应一方面虽能增加斑马鱼面对捕食者时的生存概率,但另一方面会干扰斑马鱼正常摄食和繁殖活动,这又可能进而导致斑马鱼生存率降低,并改变斑马鱼种群数量和种群结构。显然,焦虑反应及恐惧反应的增强对于动物而言是非常不利的。有趣的是,在本研究中,高温对雄性斑马鱼的焦虑反应及恐惧反应均呈抑制效应(或趋势),表明高温能缓解雄性斑马鱼的这 2 种反应,使斑马鱼更勇敢。Angiulli 等人<sup>[26]</sup>的研究也发现:持续 21 d 的 34 °C 高温暴露也能降低斑马鱼的焦虑情绪,让斑马鱼更加勇敢。因此,高温短期暴露能缓解雄性斑马鱼的应激反应,从而可能促进它的繁殖、摄食等活动。但另一方面,焦虑反应及恐惧反应的减弱也降低了斑马鱼对生境中天敌的警惕性,使之更易被捕食者的发现,增加了被捕食者捕食的风险。

综上所述,低温短期暴露明显增强斑雄性马鱼的焦虑反应及恐惧反应;而高温短期暴露则明显减弱斑马鱼雄性的焦虑及恐惧反应。上述应激反应的增强或减弱均会严重干扰雄性斑马鱼的正常生命活动和生理过程,给它的正常的生长发育和生存带来不利影响,也对该鱼种种族的延续带来风险。

#### 参考文献:

- [1] BEITINGER T L, BENNETT W A, McCAULEY R W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 2000, 58(3): 237-275.
- [2] 张先炳, 胡亚萍, 杨威, 等. 水温对淡水温水性鱼类生命活动的影响[J]. *水生态学杂志*, 2021, 42(4): 117-122.  
ZHANG X B, HU Y P, YANG W, et al. Effect of water temperature on the life activities of temperate freshwater fish[J]. *Journal of Hydroecology*, 2021, 42(4): 117-122.
- [3] KERR R A. What happened to global warming? scientists say just wait a bit[J]. *Science*, 2009, 326(5949): 28-29.
- [4] 李文豪. 温度驯化对斑马鱼发育影响的表观遗传学研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.  
LI W H. Epigenetic studies on the influence of thermal acclimation on zebrafish development[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.
- [5] 邵鑫斌, 张立宁, 马建忠, 等. 温度对绿鳍马面鲈胚胎发育和孵化率的影响[J]. *浙江农业科学*, 2021, 62(4): 790-791.  
SHAO X B, ZHANG L N, MA J Z, et al. The effect of temperature on embryonic development and hatching rate of *Thamnaconus septentrionalis*[J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2021, 62(4): 790-791.

- [6] 王亚利. 四川华鳊早期发育及温度影响研究[D]. 重庆:西南大学,2021.  
WANG Y L. The early development and temperature effect on *Sinibrama taeniatus*[D]. Chongqing: Southwest University, 2021.
- [7] 陈珍珍, 卢虹, 王跃骅, 等. 光周期对中华通草蛉自然越冬成虫及实验种群幼虫耐寒能力的影响[J]. 昆虫学报, 2014, 57(1): 52-60.  
CHEN Z Z, LU H, WANG Y Y, et al. Effects of two different photoperiods on cold hardiness of naturally overwintering adults and laboratory-bred larvae of *Chrysoperla sinica* (Neuroptera: Chrysopidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2014, 57(1): 52-60.
- [8] LAHIRI K, VALLONE D, GONDI S B, et al. Temperature regulates transcription in the zebrafish circadian clock[J]. PLoS Biology, 2005, 3(11): e351.
- [9] WENDELAAR B S E. The stress response in fish[J]. Physiological Reviews, 1997, 77(3): 591-625.
- [10] STEIMER T. The biology of fear-and anxiety-related behaviors[J]. Dialogues in Clinical Neuroscience, 2022, 4(3): 231-249.
- [11] CAMPOS F A, FEDIGAN L M. Spatial ecology of perceived predation risk and vigilance behavior in white-faced capuchins[J]. Behavioral Ecology, 2014(3): 477-486.
- [12] 武军旭. 水质预警中无损伤性物理刺激对斑马鱼应激行为的影响[D]. 西安:西安工业大学, 2023.  
WU J X. Effect of non-invasive physical stimulation on stress behavior of zebrafish in early warning of water quality[D]. Xi'an: Xi'an Technological University, 2023.
- [13] 刘智皓, 李庆玲, 李柯毅, 等. 不同光周期急性暴露对斑马鱼雄性攻击、焦虑和恐惧行为的干扰效应[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2020, 37(6): 33-38.  
LIU Z H, LI Q L, LI K R, et al. Acute photoperiod disturbances disrupted the aggressive, anxiety, and fear behaviors of male zebrafish[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2020, 37(6): 33-38.
- [14] 葛海龙. 胭脂鱼幼鱼对氨氮胁迫的应答及机制研究[D]. 重庆:西南大学, 2023.  
GE H L. Study on the response and mechanism of ammonia nitrogen stress in juvenile Chinese sucker[D]. Chongqing: Southwest University, 2023.
- [15] 徐世宏. 大西洋鲑在不同养殖密度和溶氧条件下生长和生理的响应[D]. 武汉:华中农业大学, 2023.  
XU S H. The growth and physiological response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) under the conditions of different rearing densities and dissolved oxygen[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023.
- [16] 夏继刚, 黄艳, 付世建, 等. 斑马鱼热耐受性对温度驯化的响应及其性别差异[J]. 生态学杂志, 2019, 38(8): 2477-2481.  
XIA J G, HUANG Y, FU S J, et al. Gender differences in thermal tolerance of zebrafish in response to temperature acclimation [J]. Chinese Journal of Ecology, 2019, 38(8): 2477-2481.
- [17] 赵丹. 急、慢性缺氧对斑马鱼幼鱼神经系统损伤机制的初步研究[D]. 广州:南方医科大学, 2014.  
ZHAO D. Pilot study of mechanism of nervous system damage of zebrafish larvae caused by acute/chronic hypoxia[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2014.
- [18] CACHAT J M, CANAVELLO P R, ELKHAYAT S I, et al. Video-aided analysis of zebrafish locomotion and anxiety-related behavioral responses[M]//KALUEFF A, CACHAT J. Zebrafish Neurobehavioral Protocols, Neuromethods, vol 51. Clifton: Humana Press, 2010: 1-14.
- [19] FRISCH K. Über einen Schreckstoff der Fischhaut und seine biologische Bedeutung[J]. Zeitschrift für vergleichende Physiologie, 1942, 29: 46-145.
- [20] SPEEDIE N, GERLAI R. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Behavioural Brain Research, 2008, 188(1): 168-177.
- [21] SZESKA C, RICHER J, WENDT J, et al. Attentive immobility in the face of inevitable distal threat-startle potentiation and fear bradycardia as an index of emotion and attention[J]. Psychophysiology, 2021, 58(6): e13812.
- [22] EGAN R J, BERGNER C L, HART P C, et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish[J]. Behavioural Brain Research, 2009, 205(1): 38-44.
- [23] BARLOW D H. Unraveling the mysteries of anxiety and its disorders from the perspective of emotion theory[J]. The American Psychologist, 2000, 55(11): 1247-1263.
- [24] PERROT-MINNOT M-J, BANCHETRY L, CÉZILLY F, et al. Anxiety-like behaviour increases safety from fish predation in an amphipod crustacea[J]. Royal Society Open Science, 2017, 4(12): 171558.
- [25] 周雨萌. 西安市大气污染和温度短期变化与焦虑、抑郁门诊就诊的相关性: 一项基于医院的研究[D]. 重庆:陆军军医大学, 2022.  
ZHOU Y M. The relationship between short-term changes of air pollution and temperature and outpatient visits of anxiety and

depression in Xi'an: a hospital-based study[D]. Chongqing: Army Medical University, 2022.

- [26] ANGIULLI E, PAGLIARA V, CIONI C, et al. Increase in environmental temperature affects exploratory behaviour, anxiety and social preference in *Danio rerio*[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 5385.

## Animal Sciences

### Effects of Short-Term Exposure at Different Temperatures on Anxiety and Fear Behavior of Male Zebrafish

TAO Hong, LI Yingwen, LIU Zhihao

(Laboratory of Water Ecological Health and Environmental Safety, School of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

**Abstract:** To investigate the effects of short-term exposure of different temperatures on anxiety and fear behavior of male zebrafish (*Danio rerio*), adult zebrafish males were categorized into blank group, control group, low-temperature (L-T) group and high-temperature (H-T) group, with acclimation water temperatures of 27, 27, 20, and 34 °C, respectively. After continuous treatment for 7 days, novel tank diving test was conducted in each group. After anxiety behavior test, male fish in Control group was stimulated with alarm substances and fear responses were tested. The results of the anxiety behavior test showed that compared to Control group, the onset time to the higher half, duration in the lower half and total duration of freezing of male zebrafish in L-T group were significantly increased. While the onset time to the higher half and total duration of freezing of zebrafish males in H-T group were significantly reduced. In the fear behavior test results, alarm substances can significantly increase the onset time to the higher half, duration in the lower half and total duration of freezing of zebrafish in the control group. Compared with the control group, L-T group significantly increased the onset time to the higher half, duration in the lower half and total duration of freezing of zebrafish males, while H-T group significantly reduced the onset time to the higher half and duration in the lower half of zebrafish males. Results suggests that low-temperature exposure and high-temperature exposure significantly enhanced and decreased the anxiety and fear responses in male zebrafish, respectively.

**Keywords:** zebrafish; temperatures; anxious behavior; fear behavior

(责任编辑 方 兴)