

饲料铜含量对亚硝酸盐胁迫下斑节对虾血细胞的影响

冼健安, 苗玉涛, 叶超霞, 叶剑敏, 郭 慧, 张胜鹏, 王安利

(华南师范大学生命科学学院, 广东省水产健康安全养殖重点实验室,
生态与环境科学广东普通高校重点实验室, 广州 510631)

摘要: 研究了饲料铜离子含量对亚硝酸盐胁迫下斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 血细胞参数的影响。向斑节对虾投喂不同铜离子添加量 (0、10、25、40、55、110 mg/kg) 的饲料 8 周后, 进行 24 h 的 20 mg/L 亚硝酸氮胁迫, 取样测定对虾的血细胞总数 (THC)、血细胞活性氧 (ROS) 含量和血细胞凋亡率。结果显示, 经亚硝酸盐胁迫后, 25 ~ 55 mg/kg 饲料组对虾能保持较高的 THC 以及较低的血细胞 ROS 含量和凋亡率; 110 mg/kg 饲料组对虾的 THC 最低, 血细胞 ROS 含量和凋亡率均最高, 研究表明, 饲料中添加 25 ~ 55 mg/kg 的铜离子能有效降低亚硝酸盐胁迫对血细胞造成的氧化损害, 但过量添加 (110 mg/kg) 反而对血细胞造成更为严重的损害。

关键词: 亚硝酸盐; 铜; 斑节对虾; 血细胞; 氧化胁迫

中图分类号: S963.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2013)05-0071-05

亚硝酸盐是虾类养殖中最常见的胁迫因子之一, 具有较强的毒性。关于亚硝酸盐对虾类的毒性影响, 主要集中在半致死浓度、组织结构、生理生化代谢和免疫酶活性的影响等方面 (Tseng et al, 2004; Wang et al, 2004; 黄翔鸽等, 2006; 吕晓燕等, 2010; 於叶兵等, 2011)。血细胞在虾类的生理和免疫过程中均起着十分重要的作用 (Johansson et al, 2000; 冼健安等, 2012a), 其数量的下降会导致虾类免疫功能和抗病力下降, 甚至死亡 (Tseng et al, 2004); 另外, 研究还发现, 环境亚硝酸盐含量的升高会导致其在虾的血淋巴中富集 (Cheng & Chen, 2001), 因此亚硝酸盐对血细胞的影响值得关注。笔者在前期工作中, 应用流式细胞术 (Flow cytometry, FCM) 研究了亚硝酸盐对斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 血细胞的毒性影响, 结果表明, 氧化胁迫是亚硝酸盐的细胞毒性机制之一 (Xian et al, 2011)。因此, 笔者推测从营养角度提高对虾的抗氧化活性, 可能有利于提高对虾的抗亚硝酸盐能力。

铜是虾体内多种重要酶和蛋白质的组成成分, 包括起抗氧化作用的铜锌超氧化物歧化酶 (Cu, Zn-SOD) (Lee & Shiau, 2002)。多种水产动物包括虾类的研究均显示, 饲料中添加适宜含量的铜离子可显著提高机体的抗氧化活力 (郭志勋等, 2003; Lin et al, 2006; 董晓慧等, 2007; Wang et al, 2009a; 周萌等, 2010); 因此, 本研究以斑节对虾为研究对象, 探讨饲料中铜离子对亚硝酸盐胁迫下血细胞的保护作用, 旨在为解决亚硝酸盐对虾类毒害作用的问题提供更为环保健康的营养调控手段, 为铜离子在对虾饲料中的合理添加提供理论依据和参考。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

斑节对虾购自广东省珠海市某养殖场。对虾在室内循环过滤系统中驯养 1 周以适应环境, 驯养期间投喂基础饲料。DCFH-DA (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate) 购自 Sigma 公司, Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自 Invitrogen 公司, 其它试剂为国产分析纯。

1.2 饲料的制备

基础饲料的组成和营养成分见表 1。以五水硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 作为铜源, 设置 6 个不同铜添加量的饲料组: 0 (基础饲料, 对照组)、10、25、40、55、110 mg/kg, 应用电感耦合等离子体原子发射光谱法测得饲料中的实际铜离子含量分别为 6.57、15.8、30.7、45.8、61.9、115 mg/kg。各饲料原料进行粉碎, 过 60 目筛, 然后加入脂肪源和水进行混合,

收稿日期: 2013-03-25

基金项目: 国家自然科学基金 (30671628, 31100296); 中国博士后科学基金 (2012M511829); 广东省自然科学基金 (S2011020003256, S2012040008093); 广东省科技计划项目 (2011B020307010, 2012B020307004)。

通讯作者: 王安利, 1957 年生, 男, 教授, 博士生导师。E-mail: wanganl@scau.edu.cn

作者简介: 冼健安, 1983 年生, 男, 博士后, 主要从事水产动物营养免疫学和水产养殖生态及毒理学研究。E-mail: xian-ja@qq.com

用饲料机压制成颗粒饲料,60℃烘箱烘干后,置于-10℃保存备用。

表 1 基础饲料组成 %
Tab.1 Composition of the basal feed

原料	含量	营养成分	含量
鱼粉	30	粗蛋白	41.12
豆粕	4	粗脂肪	8.23
菜籽粕	18	灰分	9.15
玉米蛋白粉	20		
面粉	20		
卵磷脂	1		
鱼油	3		
维生素 C	0.1		
维生素预混料 ^a	0.5		
矿物质预混料 ^b	2		
α-纤维素	1.4		

注:a 维生素预混料来自广州飞禧特水产科技有限公司产品。b 矿物质预混料(每 kg 饲料): ZnSO₄ · 7H₂O, 0.817 g; CaCO₃, 3.28 g; NaH₂PO₄, 2.96 g; KH₂PO₄, 6.752 g; CaCl₂, 1.3328 g; Mg-SO₄ · 7H₂O, 1.6 g; KCl, 0.448 g; AlCl₃ · 6H₂O, 0.0192 g; MnSO₄ · 4H₂O, 0.229 g; FeSO₄ · 7H₂O, 1.8 g; CoCl₂, 0.0282 g; KI, 0.036 g。添加 α-纤维素至 20 g。

1.3 对虾养殖

对虾养殖在室内循环过滤系统中进行。养殖器皿为圆形塑料桶,放水约 200 L,每个饲料组设 3 个重复。对虾的平均初始体重为(2.98 ± 0.04) g,每桶随机放养 35 尾。养殖盐度为 20,温度为 22 ~ 28℃,pH 7.9 ~ 8.0,养殖期间不间断充氧,溶氧量为 6.5 ~ 6.9 mg/L。投喂量约为对虾体重的 4%,每日投饵 3 次,分别于 8: 30、11: 30 和 18: 00 进行投喂。养殖时间为 8 周。

1.4 亚硝酸盐胁迫

对经不同铜含量饲料投喂 8 周后的斑节对虾进行亚硝酸盐胁迫,养殖后的各饲料组对虾平均末重为 6.0 ~ 6.9 g,各组间对虾平均末重没有显著差异,每个饲料组设置 3 个重复,随机选取投喂 8 周后的斑节对虾,每桶放养对虾 5 尾。以 NaNO₂ 作为亚硝酸氮源,NO₂-N 胁迫浓度设为 20 mg/L。水体条件与养殖实验一致,胁迫实验期间不投饵,24 h 后取样测定。

1.5 血细胞悬液的制备与血细胞总数测定

用 2.5 mL 一次性注射器吸取 300 L 预冷的抗凝剂(葡萄糖 20.5 g/L,柠檬酸钠 8 g/L,氯化钠 4.2 g/L,pH 7.5),然后从虾的围心腔抽取等量的血淋巴,将血淋巴转移到离心管中,取 20 L 到血细胞计数板中,用光学显微镜观察计数测定血细胞总数

(Total haemocyte count, THC);余下的血淋巴用预冷抗凝剂调整细胞浓度约为 1 × 10⁶ 个/mL,制备的血细胞悬液用于流式细胞术指标的测定。

1.6 流式细胞仪

所用流式细胞仪为美国 BD 公司的 FACSCalibur,应用 CellQuest 软件(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA)进行实验数据的获取和分析。用绿色荧光通道(第一荧光通道,FL1)获取 DCF 和 FITC 的荧光数据,用橙黄色荧光通道(第二荧光通道,FL2)获取 PI 的荧光数据。每个样品均获取细胞数 10 000 个。

1.7 血细胞活性氧含量

以 DCFH-DA 为荧光标记探针测定血细胞活性氧(Reactive oxygen species, ROS)含量(洗健安等, 2012b)。分别取血细胞悬液 200 μL,加入 10 μM DCFH-DA 避光孵育 30 min,经 200 目筛网过滤后,上流式细胞仪检测。结果以 DCF 荧光强度为横坐标,细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示,分析细胞的 DCF 平均荧光强度,胞内的 ROS 含量与 DCF 平均荧光强度成正比。

1.8 血细胞凋亡率

以 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒测定血细胞凋亡率(洗健安等, 2012c)。血细胞悬液进行离心,血细胞重悬于 1x Annexin V 结合缓冲液中,使细胞浓度约为 3 × 10⁶ 个/mL,每 100 μL 血细胞悬液加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI 工作液,避光染色 15 min 后,再加入 400 μL 1x Annexin V 结合缓冲液,200 目筛网过滤后立即上流式细胞仪检测。以 Annexin V-FITC 荧光强度为横坐标,PI 荧光强度为纵坐标作双参数散点图,设十字门划分细胞类群:活细胞(Annexin V-FITC-/PI-)位于左下象限,前期凋亡细胞(Annexin V-FITC + /PI-)位于右下象限,后期凋亡细胞和死细胞(Annexin V-FITC + /PI+)位于右上象限。分析各类细胞的比例,凋亡率为前期凋亡、后期凋亡和死亡细胞所占的比例,即右下象限和右上象限细胞所占的比例。

1.9 统计分析

实验数据利用 SPSS 13.0 进行统计分析,结果显示为平均值 ± 标准差(Mean ± SD),P < 0.05 确认为差异性显著。

2 结果

2.1 血细胞总数

THC 结果见图 1。经亚硝酸盐胁迫后,

110 mg/kg铜添加组对虾的 THC 最低,为 92.3×10^5 个/mL。25 mg/kg 和 40 mg/kg 铜添加组对虾的 THC 较高,分别为 132.2×10^5 和 134.5×10^5 个/mL,显著高于 10 mg/kg 和 110 mg/kg铜添加组($P < 0.05$)。

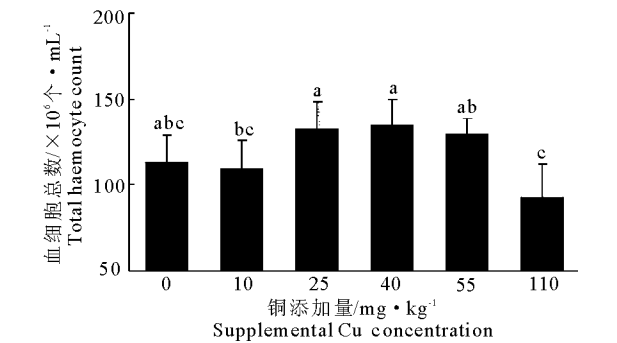


图1 投喂不同铜饲料的斑节对虾经亚硝酸氮胁迫后的血细胞总数

Fig.1 Total haemocyte count (THC) of *P. monodon* fed with different copper feed after nitrite stress

2.2 血细胞活性氧含量

血细胞活性氧含量(ROS)的测定结果见图2。经亚硝酸盐胁迫后,110 mg/kg 铜添加组对虾的血细胞 ROS 含量最高,为 188.8,显著高于其它铜添加组($P < 0.05$);0 和 10 mg/kg 铜添加组次之;25 ~ 55 mg/kg铜添加组对虾的血细胞 ROS 含量均较低,显著低于 0、10 和 110 mg/kg 铜添加组($P < 0.05$)。

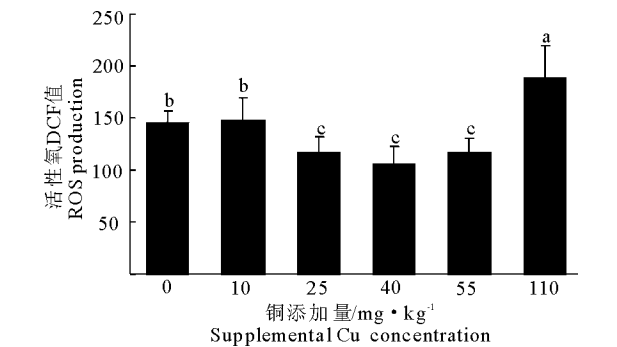


图2 投喂不同铜饲料的斑节对虾经亚硝酸氮胁迫后的血细胞活性氧含量

Fig.2 ROS content in haemocytes of *P. monodon* fed with different copper feed after nitrite stress

2.3 血细胞凋亡率

血细胞凋亡率的测定结果见图3。经亚硝酸盐胁迫后,110 mg/kg 铜添加组对虾的血细胞凋亡率最高,为 13.7%,显著高于 10 ~ 55 mg/kg 铜添加组($P < 0.05$)。0 ~ 55 mg/kg 铜添加组各组间没有显著差异($P > 0.05$),血细胞凋亡率在 8.3% ~ 10.7%。

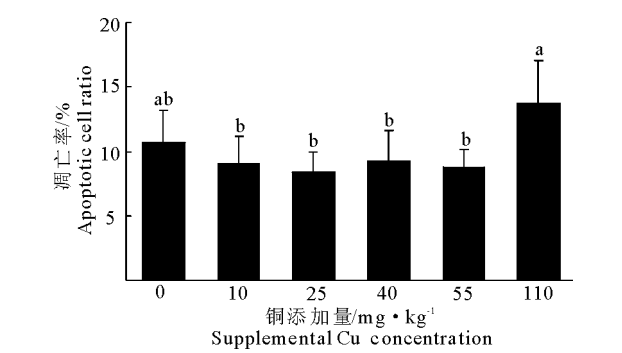


图3 投喂不同铜饲料的斑节对虾经亚硝酸氮胁迫后的血细胞凋亡率

Fig.3 Haemocyte apoptotic ratio of *P. monodon* fed with different copper feed after nitrite stress

3 讨论

3.1 环境因子胁迫对虾血细胞总数的影响

血细胞在虾类的细胞免疫和体液免疫过程中均起着十分重要的作用,包括包裹作用、吞噬、细胞毒活性以及储存和释放酚氧化酶原系统等(Johansson et al, 2000)。由于血细胞在虾类免疫功能中的重要性,血细胞总数(THC)常作为重要的细胞指标来反映虾体的健康状态(Lee & Shiau,2002; Tseng & Chen, 2004)。研究认为血细胞数量具有一定的阈值,低于该阈值对虾类可能是致命的(Lorenzon et al, 1999)。各种环境因子的胁迫均会导致虾类 THC 的下降,其中包括亚硝酸盐(Tseng & Chen, 2004; 黄翔鹄等, 2006)。笔者前期的研究显示,斑节对虾经 20 mg/L 亚硝酸盐胁迫 24 h 后,THC 由最初的 150×10^5 个/mL 下降至 112×10^5 个/mL(Xian et al, 2011)。在本研究中,经亚硝酸盐胁迫后,25 ~ 55 mg/kg 铜添加组对虾保持了较高的 THC,其中,25 mg/kg 和 40 mg/kg 铜添加组可分别达到 132.2×10^5 个/mL 和 134.5×10^5 个/mL,而 110 mg/kg铜添加组对虾的 THC 最低,仅有 92.3×10^5 个/mL;结果表明,饲料中添加 25 ~ 55 mg/kg 铜离子可使在亚硝酸盐胁迫下的对虾血细胞数量维持在较高的水平。

Lee & Shiau(2002)研究发现,不同的铜水平饲料对斑节对虾的血细胞数量产生影响,在酪蛋白为蛋白源的配合饲料中添加 10 ~ 30 mg/kg 的铜离子(实际含量为 11.87 ~ 32.67 mg/kg)可显著提高斑节对虾的 THC。笔者前期的研究工作得出了不同的结果,与不添加铜离子的对照组相比,商业基础饲料中添加铜离子对斑节对虾的 THC 没有显著影响。产生不同结果的主要原因可能是饲料蛋白源组成的

差异。因此也表明在本研究中,不同水平的铜离子对 THC 影响的差异是在胁迫过程中才产生的。

3.2 饲料铜离子水平对血细胞活性氧的胁迫作用

研究表明,亚硝酸盐会导致血细胞活性氧(ROS)含量过度上升,氧化胁迫是亚硝酸盐作用下血细胞损伤、凋亡以及数量下降的主要原因(Xian et al, 2011)。在本研究中,经亚硝酸盐胁迫后,各铜饲料组对虾的血细胞表现出了不同的 ROS 水平。25 ~ 55 mg/kg 铜添加组对虾的血细胞 ROS 含量较低,0 和 10 mg/kg 铜添加组次之,110 mg/kg 铜添加组最高。该结果与 THC 的结果较吻合,表明饲料中添加 25 ~ 55 mg/kg 铜离子可有效地抑制亚硝酸盐胁迫所诱导的 ROS,从而降低氧化胁迫程度,使血细胞维持较高的数量。亚硝酸盐胁迫下,110 mg/kg 铜添加组的 ROS 水平比其它饲料组高,表明该浓度的铜离子可能因过量而产生毒性,此 ROS 水平是亚硝酸盐和过量饲料铜离子共同胁迫作用的结果,这可能也是该铜添加组在胁迫下 THC 最低的原因。

3.3 饲料铜的添加量与抗氧化酶活力

机体内存在抗氧化系统,用以清除过多的 ROS,避免细胞受到氧化损伤。抗氧化酶在机体抗氧化防御过程中起着重要的作用,其中包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)等(Wang et al, 2009b)。通过营养调控的手段提高机体的抗氧化活力已得到了证实;其中,铜离子是铜锌超氧化物歧化酶(Cu, Zn - SOD)的组成成分。研究显示,饲料中添加适量的铜离子可显著提高凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的 SOD 活力,其中在铜添加量为 30 mg/kg 时 SOD 活力最高(郭志勋等, 2003)。因此,本研究中,25 ~ 55 mg/kg 的铜添加量可有效地抑制亚硝酸盐胁迫下的 ROS 上升,可能是通过提高 SOD 的活力来实现的。

3.4 饲料铜的添加量与血细胞凋亡率

前期的研究显示,经 20 mg/L 亚硝酸盐胁迫 24 h 后,斑节对虾的血细胞凋亡率由最初的 3.58% 上升至 10.17% (Xian et al, 2011)。本研究结果显示,经亚硝酸盐胁迫后,110 mg/kg 铜添加组对虾的血细胞凋亡率最高,达到了 13.7%,进一步表明该浓度的铜添加量对血细胞产生了毒性,该结果是亚硝酸盐和过量铜离子共同毒性作用所致;10 ~ 55 mg/kg 铜添加组均保持了较低的凋亡率,但与对照组的差异不显著。因此相比而言,THC 是虾类血细胞对亚硝酸盐胁迫更为敏感的指标。

综上所述,在基础饲料中添加 25 ~ 55 mg/kg 铜离子对亚硝酸盐胁迫下的斑节对虾血细胞起到了一定的保护作用,从而可提高对虾的亚硝酸盐耐受能力;但铜离子也是一种重金属元素,饲料中过量添加铜离子会抑制虾类的生长和体液免疫功能(Lee & Shiau, 2002; 郭志勋等, 2003; 刘伟等, 2008);本研究结果进一步表明饲料中添加过量铜离子不利于对虾血细胞的亚硝酸盐耐受能力。因此,配合饲料的组成不但影响生长、代谢和免疫水平,对虾类的抗胁迫能力也起到了重要作用。在往后的研究中应更关注营养对水产动物抗胁迫能力的影响,进一步优化饲料配方。

参考文献

- 董晓慧, 杨原志, 郑石轩, 等. 2007. 饲料中不同铜源 and 水平对凡纳滨对虾生长、免疫和组织铜含量的影响[J]. 大连水产学院学报, 22(5): 377 - 383.
- 郭志勋, 陈毕生, 徐力文, 等. 2003. 饲料铜的添加量对南美白对虾生长、血液免疫因子及组织铜的影响[J]. 中国水产科学, 10(6): 526 - 528.
- 黄翔鹤, 李长玲, 郑莲, 等. 2006. 亚硝酸盐氮对凡纳滨对虾毒性和抗病相关因子影响[J]. 水生生物学报, 30(4): 466 - 471.
- 刘伟, 文华, 吴建开, 等. 2008. 高铜饲料对凡纳滨对虾生长、肌肉和肝脏铜积累的影响[J]. 淡水渔业, 38(2): 12 - 16.
- 吕晓燕, 李嘉尧, 方燕, 等. 2010. 亚硝酸盐对红螯光壳螯虾不同组织免疫相关酶活性及超微结构的影响[J]. 水产学报, 34(12): 1812 - 1820.
- 冼健安, 王安利, 李彬, 等. 2012a. 凡纳滨对虾不同类型血细胞的活性氧水平和酯酶活性[J]. 水生态学杂志, 33(4): 132 - 137.
- 冼健安, 王安利, 苗玉涛, 等. 2012b. 镉对凡纳滨对虾离体血细胞的毒性影响[J]. 水生态学杂志, 33(1): 112 - 115.
- 冼健安, 王安利, 苗玉涛. 2012c. 流式细胞术在克氏原螯虾血细胞的分类、活性和免疫功能中的应用[J]. 淡水渔业, 42(1): 9 - 14.
- 於叶兵, 陆伟, 黄金田, 等. 2011. 亚硝酸盐和硫化物对克氏原螯虾幼虾的毒性效应研究[J]. 水生态学杂志, 32(1): 111 - 114.
- 周萌, 王安利, 曹俊明. 2010. 饲料中不同形式的铜及添加量对凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)生长性能、血清铜蓝蛋白和生长激素水平的影响[J]. 海洋与湖沼, 41(4): 577 - 582.
- Cheng S Y, Chen J C. 2001. The time-course change of nitrogenous excretion in the Kuruma shrimp *Penaeus japonicus*

- following nitrite exposure[J]. *Aquatic toxicology*, 51: 443 – 454.
- Johansson M W, Keyser P, Sritunyaluksana K, et al. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis [J]. *Aquaculture*, 191: 45 – 52.
- Lee M H, Shiao S Y. 2002. Dietary copper requirement of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 13: 259 – 270.
- Lin Y H, Shie Y Y, Shiao S Y. 2006. Dietary copper requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus* [J]. *Aquaculture*, 274: 161 – 165.
- Lorenzon S, DE Guarrini S, Smith V J, et al. 1999. Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans in vivo[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 9: 31 – 50.
- Tseng I T, Chen J C. 2004. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 17: 325 – 333.
- Wang W N, Wang A L, Zhang Y J, et al. 2004. Effects of nitrite on lethal and immune response of *Macrobrachium nipponense* [J]. *Aquaculture*, 232: 679 – 686.
- Wang W, Mai K, Zhang W, et al. 2009a. Effects of dietary copper on survival, growth and immune response of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai* Ino [J]. *Aquaculture*, 297: 122 – 127.
- Wang W N, Zhou J, Wang P, et al. 2009b. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 150: 428 – 435.
- Xian J A, Wang A L, Chen X D, et al. 2011. Cytotoxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis [J]. *Aquaculture*, 317: 240 – 244.

(责任编辑 万月华)

Effects of Feed Copper Content on Haemocyte of *Penaeus monodon* Under Nitrite Stress

XIAN Jian-an, MIAO Yu-tao, YE Chao-xia, YE Jian-min, GUO Hui, ZHANG Sheng-peng, WANG An-li

(Key Laboratory of Ecology and Environmental Science of Guangdong Higher Education Institutes, Guangdong Provincial Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, P. R. China)

Abstract: This paper studied the effects of feed copper content on haemocyte parameters of *Penaeus monodon* under nitrite stress. Feeding these *Penaeus monodon* with different dose of copper ion contents (0, 10, 25, 40, 55 and 110 mg/kg) for 8 weeks, with the stress of 20 mg/L nitrite for 24 h, it would take samples to determine its total haemocyte count (THC), haemocyte reactive oxygen species (ROS) content and haemocyte apoptotic ratio. The results showed that the feed group, which fed with copper content of 25 – 55 mg/kg, would keep higher THC, lower haemocyte ROS content and lower apoptotic ratio. The feed group, which fed with copper content of 110 mg/kg, would keep the lowest THC, the highest ROS content and the highest apoptotic ratio. These results indicated that feeding with copper content of 25 – 55 mg/kg could effectively reduce the oxidative damage for haemocytes caused by nitrite stress. However, excessive feeding with copper content of 110 mg/kg would exacerbate the damage on haemocytes.

Key words: nitrite; copper; *Penaeus monodon*; haemocyte; oxidative stress