

急性氨氮胁迫对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) 抗氧化系统酶活力及 GPx 基因表达的影响

任海^{1,2}, 李健^{2*}, 李吉涛², 梁忠秀^{1,2}, 梁俊平³, 葛倩倩², 刘萍²

(1.上海海洋大学水产与生命学院, 上海 200306; 2.中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 3.河南师范大学水产学院, 河南 新乡 453007)

摘要:为了研究氨氮毒性作用对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)抗氧化及脂质过氧化作用的影响,将脊尾白虾暴露于低浓度氨氮(4.79 ± 0.12)mg·L⁻¹、中浓度氨氮(9.05 ± 0.18)mg·L⁻¹、中高浓度氨氮(17.64 ± 0.25)mg·L⁻¹和高浓度氨氮(34.87 ± 0.46)mg·L⁻¹中 72 h,于胁迫后 1、3、6、12、24、48、72 h 测定血淋巴和肝胰腺中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、丙二醛(MDA)含量以及 GPx 基因相对表达量,结果显示:除低浓度氨氮组外,氨氮胁迫 6~24 h,脊尾白虾血淋巴和肝胰腺组织 SOD、CAT 活力都有不同程度的升高,胁迫 48~72 h 上述指标则均被抑制;氨氮胁迫过程中血淋巴 GPx 活力和 GPx 基因表达显著高于对照组($P<0.05$),而肝胰腺中 GPx 基因表达在 48~72 h 有所下降;血淋巴和肝胰腺中 MDA 含量随着胁迫时间的延长呈现上升的趋势,且上述指标在肝胰腺中的活力较血淋巴高。实验结果表明,氨氮胁迫 3~24 h 对脊尾白虾 SOD 和 CAT 活力具有一定的诱导作用,但胁迫 48~72 h 则抑制其活性;脂质过氧化产物 MDA 含量在整个胁迫过程中有增加的趋势;肝胰腺可能是脊尾白虾主要的氨氮代谢中心。

关键词:脊尾白虾;氨氮胁迫;超氧化物歧化酶;过氧化氢酶;谷胱甘肽过氧化物酶;丙二醛

中图分类号:X503.225 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2014)04-0647-09 doi:10.11654/jaes.2014.04.005

Effects of Acute Ammonia Stresses on Antioxidant Enzyme Activities and GPx Gene Expression in *Exopalaemon carinicauda*

REN Hai^{1,2}, LI Jian^{2*}, LI Ji-tao², LIANG Zhong-xiu^{1,2}, LIANG Jun-ping³, GE Qian-qian², LIU Ping²

(1.College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 200306, China; 2.Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3.College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: Ammonia is a common toxic substance in the aquaculture environment. However, there is little information about the effects of ammonia on antioxidant system and lipid peroxidation in ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. In this study, the prawns were exposed to different concentrations of ammonia (4.79 ± 0.12)mg·L⁻¹, (9.05 ± 0.18)mg·L⁻¹, (17.64 ± 0.25)mg·L⁻¹, and (34.87 ± 0.46)mg·L⁻¹ for up to 72 h. Activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx), malondialdehyde (MDA) content, and GPx gene expression were assessed in haemocytes and hepatopancreas at 1, 3, 6, 12, 24, 48 and 72 h after ammonia stresses. In all ammonia stresses except low concentration, activities of SOD and CAT in haemocytes and hepatopancreas increased between 6h to 24 h after ammonia stresses, but reduced at 48 h and 72 h, as compared with the control. The GPx activity and GPx gene expression in haemocytes were significantly higher in the treatments than in the control ($P<0.05$), but the expression level of GPx gene in hepatopancreas decreased under ammonia stresses. Contents of MDA in haemocytes and hepatopancreas gradually increased with increasing ammonia stresses, with higher MDA in hepatopancreas than in haemocytes. The results also showed that SOD and CAT in *E. carinicauda* were induced at 3~24 h,

收稿日期:2013-09-24

基金项目:国家高技术研究发展计划(2012AA10A409);国家虾产业技术体系专项(CARS-47);公益性行业(农业)科研专项(201103034);中国水产科学研究院基本科研业务费(2013A0701)

作者简介:任海(1982—),男,博士研究生,主要从事环境毒理学与免疫学研究。E-mail:hairen1982@163.com

*通信作者:李健 E-mail:lijian@ysfri.ac.cn

but inhibited at 48~72 h after ammonia stresses and that lipid peroxidative product MDA increased under ammonia stresses. The hepatopancreas might be a sensitive tissue to ammonia stress.

Keywords: *Exopalaemon carinicauda*; ammonia stress; superoxide dismutase(SOD); catalase(CAT); glutathione peroxidase(GPx); malonaldehyde(MDA)

氨氮是水产养殖环境中最常见的有毒物质,是甲壳动物养殖环境中重要的胁迫因子,高浓度氨氮对动物有致死作用,即使低于致死浓度的氨氮对机体生理功能也有显著影响^[1-2]。研究发现环境胁迫因子(如水体 pH、温度、盐度、氨氮等)变化诱导的生理效应可能经由氧化还原途径实现^[3-5],当机体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降低,机体清除自由基的能力下降^[6],脂质过氧化产物急剧增加,导致机体产生氧化损伤。由于甲壳动物缺乏特异性免疫,所以对其免疫功能的研究主要集中在抗氧化能力方面,众多研究表明,抗氧化酶活性以及丙二醛含量已成为评价生物体健康状况的重要指标^[7-9]。

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)是中国黄、渤海重要的底栖经济虾类^[10],近年来,随着沿海滩涂的开发,养殖面积迅速扩大,已成为池塘单养以及与鱼、蟹、贝类等混养的重要经济虾类^[11-13]。养殖过程中特别是高密度养殖条件下,氨氮已成为影响虾类正常生理代谢的重要环境因素之一。目前已经证实氨氮胁迫对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[14]、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[15]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)^[16]、日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)^[17]和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[18]等抗氧化及免疫功能均有不同程度的影响。但氨氮胁迫对脊尾白虾抗氧化系统的影响以及量效关系缺乏相应的基础数据。本实验通过分析氨氮胁迫对脊尾白虾体内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、丙二醛(MDA)含量及 GPx 基因表达的变化,从体内抗氧化酶活力、脂质过氧化产物以及基因表达水平探讨脊尾白虾对氨氮胁迫的生理应答反应,以期对脊尾白虾健康养殖提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

脊尾白虾购自山东昌邑海丰水产养殖有限责任公司,选择体质量为(3.67±0.25)g 健康、规格一致的脊尾白虾成虾,暂养于 200 L 的白色 PVC 桶内,每天投喂基础饲料 3 次,连续充气,10 d 后开始正式试验。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计

NH₄⁺-N 浓度设置参考 Chen^[19]和钟硕良等^[20]测定海水养殖池塘底层水的氨氮浓度(0~46 mg·L⁻¹和 0.01~29.3 mg·L⁻¹)以及梁俊平^[21]报道的脊尾白虾成虾 72 h 半致死质量浓度(140.28 mg·L⁻¹)确定,用浓度为 20 g·L⁻¹ 的 NH₄Cl 调整不同实验组的氨氮浓度。水样经过 0.45 μm 滤膜过滤后采用奈氏试剂法^[22]测定各梯度实际氨氮浓度,分别为对照组(0.28±0.07)mg·L⁻¹、低浓度氨氮组(4.79±0.12)mg·L⁻¹、中浓度氨氮组(9.05±0.18)mg·L⁻¹、中高浓度氨氮组(17.64±0.25)mg·L⁻¹和高浓度氨氮组(34.87±0.46)mg·L⁻¹。每组 6 个平行,其中 3 个平行用于统计死亡率,另外 3 个平行用于取样。每个平行 15 尾虾,每天上午 8:00 和下午 16:00 进行全换水,并加入相应氨氮浓度的养殖海水。实验期间水温(20.57±0.21)℃,盐度 30.18±0.29, pH8.13,溶解氧在 7.0 mg·L⁻¹ 以上,实验期间不投饵。

1.2.2 样品采集与处理

于氨氮胁迫后 1、3、6、12、24、48、72 h 分别从每个平行取样组随机挑取 2 尾虾,即每个时间点取 6 尾虾,用事先准备好的一次性注射器吸取 0.2 mL 预冷的抗凝剂,从脊尾白虾头胸甲基部抽取 0.2 mL 血淋巴,配制成 1:1 的抗凝血,4000×g(4℃)离心 10 min,取上清,置于-20℃冰箱保存,用于后续酶活检测;在原离心管中加入 1 mL Trizol(Invitrogen)于-80℃保存,用于血淋巴细胞总 RNA 提取。肝胰腺经液氮研磨成细粉后取 50 mg 加入 450 μL 生理盐水,配制成 1:10(W/V)的溶液,用于后续酶活测定,剩余研磨的组织样品取 50~100 mg 加入 1.5 mL 离心管(内含 1 mL Trizol)中,放入-80℃冰箱用于总 RNA 提取。

1.2.3 SOD、CAT、GPx 酶活力和 MDA 含量测定

按照南京建成生物工程研究所试剂盒说明书测定 SOD、CAT、GPx 活力和 MDA 含量。

1.3 GPx 基因的表达分析

1.3.1 引物设计

脊尾白虾 GPx 特异性引物参考文献[23],根据脊尾白虾 β-actin 基因 cDNA 序列,用 Primer Primer5.0 设计荧光定量 PCR 特异性扩增引物,上述引物合成

由上海生工生物工程有限公司完成,其序列见表 1。

1.3.2 RNA 提取

按照实验室建立的 RNA 提取方法^[24]提取总 RNA,核酸定量仪(Thermo Scientific)检测 RNA 含量和纯度,1.5%非变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.3.3 cDNA 第一链的合成

血细胞和肝胰腺总 RNA 经过 RNA-free 的 DNA 酶消化后,按照 M-MLV(TaKaRa)说明书进行反转录合成 cDNA 第一链,-20℃保存备用。

1.3.4 荧光定量 PCR 扩增

采用 Real-time PCR (SYBR Green)^{2- $\Delta\Delta C_t$} 相对定量法,按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa)试剂盒说明书进行 PCR 扩增。反应体积为 10 μ L,反应体系为:5.0 μ L SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (2 $\times$),3.0 μ L RNA-Free water,0.2 μ L Rox reference Dye II (50 $\times$),上、下游引物各 0.4 μ L(10 μ mol $\cdot$ L⁻¹),将上述试剂在 1.5 mL 离心管内混匀后,分装入 96 孔 PCR 板(Applied Biosystems)中,最后加入模板 cDNA 1.0 μ L。反应程序为:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s,40 个循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。每个样品 3 个重复,加样完

成后瞬时离心收集液体在管底,在 ABI 7500 Fast 荧光定量 PCR 仪中进行扩增,反应完成后采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算 GPx 基因的相对表达量。

1.4 统计分析

所得的数据以平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,用 SPSS17.0 统计软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA),经 Duncan's 检验法进行统计分析, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 氨氮胁迫对脊尾白虾成活率的影响

实验结果显示脊尾白虾成活率均在 95%以上,且各组之间无显著性差异($P>0.05$)。

2.2 氨氮胁迫对脊尾白虾抗氧化酶活力的影响

2.2.1 对脊尾白虾血淋巴和肝胰腺 SOD 活力的影响

由表 2 可知,随着氨氮浓度的增加和胁迫时间的延长,脊尾白虾血淋巴和肝胰腺 SOD 活力呈现先上升后下降的趋势。不同氨氮浓度组血淋巴和肝胰腺 SOD 活力随着胁迫时间的延长逐渐增强,在第 6 h 与对照组均具有显著性差异($P<0.05$),而在第 72 h 各氨

表 1 本研究所用的特异性引物

Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	正向引物(5'-3')Forward primer(5'-3')	反向引物(5'-3')Reverse primer(5'-3')
GPx	AAGTATGTTCCGCCAGGAAATA	TGAGCTTCTGACCCATTAACAG
β -actin	AAGGCTAACAGGGAGAAGATGA	ACCAGAGGCATACAGGGACAG

表 2 急性氨氮胁迫对脊尾白虾血淋巴和肝胰腺 SOD 活力的影响

Table 2 Activity of SOD in hemolymph and hepatopancreas of *E. carinicauda* after acute ammonia stresses

器官 Organ	浓度/mg $\cdot$ L ⁻¹ Concentration	胁迫时间(Stress time)/h						
		1	3	6	12	24	48	72
血淋巴 Hemolymph	0.28 $\pm$ 0.07	14.70 $\pm$ 0.42a/A	15.12 $\pm$ 0.16a/A	15.14 $\pm$ 0.13a/A	13.99 $\pm$ 0.25a/A	14.29 $\pm$ 0.23a/A	12.84 $\pm$ 0.36a/A	13.97 $\pm$ 0.10a/A
	4.79 $\pm$ 0.12	16.20 $\pm$ 2.05a/AB	19.03 $\pm$ 2.64b/B	27.27 $\pm$ 1.65b/C	15.92 $\pm$ 0.64b/AB	5.76 $\pm$ 0.07b/D	12.64 $\pm$ 1.57a/A	11.30 $\pm$ 1.61b/A
	9.05 $\pm$ 0.18	15.27 $\pm$ 0.54a/A	20.46 $\pm$ 0.41b/B	24.59 $\pm$ 1.70b/C	11.08 $\pm$ 0.38a/D	15.16 $\pm$ 0.39c/D	11.11 $\pm$ 0.43a/D	11.61 $\pm$ 0.30b/D
	17.64 $\pm$ 0.25	21.64 $\pm$ 0.21b/A	26.06 $\pm$ 0.86c/B	23.93 $\pm$ 1.19b/C	16.02 $\pm$ 0.26c/D	14.89 $\pm$ 0.72c/DE	14.04 $\pm$ 0.55a/E	10.72 $\pm$ 0.26c/F
	34.87 $\pm$ 0.46	26.10 $\pm$ 0.49b/A	31.40 $\pm$ 0.09d/B	33.40 $\pm$ 0.38c/C	24.58 $\pm$ 1.30d/D	28.55 $\pm$ 0.37d/E	13.13 $\pm$ 0.42a/F	8.54 $\pm$ 0.16d/G
肝胰腺 Hepatopancreas	0.28 $\pm$ 0.07	13.29 $\pm$ 0.47a/A	13.44 $\pm$ 0.73a/A	17.67 $\pm$ 0.65a/B	14.32 $\pm$ 1.12a/A	15.27 $\pm$ 1.19a/A	17.14 $\pm$ 0.14a/A	21.78 $\pm$ 0.29a/C
	4.79 $\pm$ 0.12	13.05 $\pm$ 2.81a/AB	11.28 $\pm$ 0.26a/AB	29.65 $\pm$ 0.69b/C	14.55 $\pm$ 0.49a/BD	9.39 $\pm$ 1.86b/A	17.51 $\pm$ 3.97a/DE	18.50 $\pm$ 0.88b/E
	9.05 $\pm$ 0.18	18.65 $\pm$ 2.17b/A	16.28 $\pm$ 3.49b/A	35.45 $\pm$ 1.83c/B	32.46 $\pm$ 0.46b/BC	23.93 $\pm$ 0.24c/D	29.53 $\pm$ 0.27b/C	20.96 $\pm$ 0.73c/E
	17.64 $\pm$ 0.25	13.32 $\pm$ 1.29a/A	18.50 $\pm$ 1.73b/B	27.93 $\pm$ 2.53d/C	33.38 $\pm$ 0.41b/D	27.97 $\pm$ 0.43d/C	26.91 $\pm$ 4.24b/C	20.42 $\pm$ 0.11c/B
	34.87 $\pm$ 0.46	11.17 $\pm$ 0.61a/A	5.69 $\pm$ 3.25c/B	68.05 $\pm$ 0.98e/C	54.24 $\pm$ 0.13c/D	37.31 $\pm$ 0.84e/E	34.41 $\pm$ 0.75c/F	16.41 $\pm$ 0.34d/G

注:同列内不同小写字母表示不同氨氮胁迫组同一时间点差异显著($P<0.05$);同行中不同大写字母表示同一氨氮胁迫组不同时间点差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Values with different small letters in the same column indicate significant differences between different ammonia stresses($P<0.05$); Values with different capital letters in the same line indicate significant differences between different times($P<0.05$). The same below.

氮处理组显著低于对照组($P<0.05$)。随着胁迫时间的延长,同一氨氮浓度组血淋巴 SOD 活力呈现先上升后下降的变化趋势,中高浓度氨氮组和高浓度氨氮组 SOD 活力显著升高,在 1~24 h 均显著高于对照组($P<0.05$),之后逐渐下降,至 72 h 显著低于对照组($P<0.05$)。肝胰腺低浓度氨氮组和中浓度氨氮组呈现先升高后降低再升高的变化趋势,而中高浓度氨氮组和高浓度氨氮组 3~48 h 均显著高于对照组($P<0.05$),但是 72 h SOD 活力受到显著抑制($P<0.05$)。

2.2.2 对脊尾白虾血淋巴和肝胰腺 CAT 活力的影响

如表 3 所示,氨氮胁迫后脊尾白虾血淋巴和肝胰腺组织 CAT 活性存在组织差异性,肝胰腺明显高于血淋巴,且各氨氮处理组在 72 h 时均显著低于对照组($P<0.05$)。随着胁迫时间的延长,血淋巴低浓度和中浓度氨氮组均出现先升高后降低再升高的波浪式变化,而中高浓度和高浓度组均出现先升高后下降的变化趋势,最大值分别出现在 12 h 和 6 h,均显著高于对照组($P<0.05$),之后逐渐下降。高浓度氨氮组随着氨氮胁迫时间的延长,呈现先升高后降低的变化趋势,在胁迫 6 h 时达到最大值,与对照组差异显著($P<0.05$)。不同氨氮浓度组中,肝胰腺低浓度氨氮组和中浓度氨氮组 CAT 活力最大值分别出现在 24 h 和 6 h,与对照组相比具有显著性差异($P<0.05$)。中高浓度和高浓度氨氮组 CAT 活力在 1~48 h 均显著高于对照组($P<0.05$),至 72 h CAT 活力被显著抑制($P<0.05$)。

2.2.3 对脊尾白虾血淋巴和肝胰腺 GPx 活力的影响

如表 4 所示,不同浓度氨氮组对脊尾白虾血淋巴和肝胰腺 GPx 活力的影响快速显现且维持时间较长,在胁迫 72 h 时均显著高于对照组($P<0.05$)。随着

胁迫时间的延长,血淋巴低浓度氨氮组呈现先升高后降低再升高的变化趋势,除 1 h 和 12 h 与对照组无显著性差异外($P>0.05$),其他时间点均具有显著性差异($P<0.05$)。中浓度组除 1 h 外,其他时间点均与对照组有显著性差异($P<0.05$),而中高浓度氨氮组和高浓度氨氮组在整个胁迫过程中均与对照组有显著性差异($P<0.05$)。低浓度氨氮组肝胰腺 GPx 活力出现先升高后降低再升高的变化趋势,除 1 h 和 3 h 外,其他时间点均与对照组有显著性差异($P<0.05$)。对于中浓度氨氮组、中高浓度氨氮组和高浓度氨氮组而言,除 48 h 中浓度氨氮组外,其他组均与对照组具有显著性差异($P<0.05$)。

2.2.4 对脊尾白虾血淋巴和肝胰腺 MDA 含量的影响

如表 5 所示,氨氮胁迫过程中,脊尾白虾肝胰腺中 MDA 含量明显高于血淋巴。高浓度氨氮组血淋巴在 3~72 h 与对照组均有显著性差异($P<0.05$),其他氨氮组血淋巴变化规律不明显。随着胁迫时间的延长,中浓度氨氮组和中高浓度氨氮组 MDA 含量在 72 h 与对照组差异显著($P<0.05$),除 1 h 低浓度氨氮组外,其他浓度组肝胰腺与对照组在各时间点均具有显著性差异($P<0.05$),且表现出随着氨氮浓度的增加和胁迫时间的延长,MDA 含量随之增加的变化趋势。

2.3 氨氮胁迫对脊尾白虾 GPx 基因表达的影响

由表 6 可知,各氨氮处理组血淋巴中 GPx 基因相对表达量高于肝胰腺且表现出明显的时效性,除低浓度氨氮组外,其他浓度氨氮组血淋巴 GPx 基因相对表达量均呈现出先升高后降低再升高的变化趋势,在 1~12 h 显著高于对照组($P<0.05$)。不同浓度氨氮组肝胰腺 GPx 基因相对表达量总体呈现先上升后下

表 3 急性氨氮胁迫对脊尾白虾血淋巴和肝胰腺 CAT 活力的影响

Table 3 Activity of CAT in hemolymph and hepatopancreas of *E. carinicauda* after acute ammonia stresses

器官 Organ	浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration	胁迫时间(Stress time)/h						
		1	3	6	12	24	48	72
血淋巴 Hemolymph	0.28±0.07	1.76±0.34a/A	2.33±0.57a/A	2.50±0.32a/A	2.48±0.56a/A	2.68±0.67ab/A	1.90±0.30ab/A	2.10±0.50a/A
	4.79±0.12	1.70±0.07a/A	2.94±0.15ab/B	1.90±0.04b/A	5.50±0.05b/C	1.79±0.19c/A	1.83±0.49ab/A	1.13±0.10b/D
	9.05±0.18	2.20±0.02ab/A	3.34±0.37bc/B	2.74±0.10a/C	2.34±0.25a/A	3.05±0.31b/BC	1.72±0.25ab/D	1.58±0.04c/D
	17.64±0.25	2.02±0.03ab/A	3.59±0.17c/B	2.72±0.13a/C	4.90±0.25c/D	2.03±0.34ac/A	2.26±0.16b/A	1.90±0.12ac/A
	34.87±0.46	2.45±0.52b/A	2.50±0.20a/A	4.87±0.04c/B	4.03±0.13d/B	2.77±0.07b/A	1.51±0.25a/D	0.86±0.03b/E
肝胰腺 Hepatopancreas	0.28±0.07	14.54±2.32a/A	13.54±1.53a/A	17.14±1.69a/A	14.64±2.01a/A	16.06±1.50a/A	16.60±1.68a/A	16.80±0.18a/A
	4.79±0.12	17.88±1.17a/AB	15.42±1.97ab/A	18.96±1.54a/BC	19.11±2.03ab/BC	22.82±1.56bc/D	22.02±1.51a/CD	11.59±0.29b/E
	9.05±0.18	17.77±1.40a/AB	22.73±1.56c/CD	27.03±1.26b/E	19.69±2.04ab/BC	20.20±2.56ab/D	14.89±0.64a/A	9.20±0.33c/F
	17.64±0.25	23.96±1.76b/A	27.76±2.78d/AB	23.96±1.10ab/A	23.29±2.34b/A	26.35±1.62c/AB	33.65±2.55b/C	12.02±0.99b/D
	34.87±0.46	29.46±1.94b/A	31.45±1.17d/A	32.91±1.09c/A	36.01±2.25c/AB	41.23±2.87d/B	34.70±2.77b/AB	8.39±0.64c/C

降再上升的变化趋势,高浓度氨氮组在 3 h 达到最大值,之后逐渐下降,72 h 与对照组无显著性差异($P>0.05$),而其他氨氮浓度组 1~48 h 变化规律不明显,但是在 72 h 与对照组具有显著性差异($P<0.05$)。

3 讨论

梁俊平等^[21]研究氨氮对脊尾白虾幼虾和成虾的毒性试验发现,脊尾白虾成虾的安全质量浓度为 $12.09 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,远高于中国明对虾^[25]的 $3.51 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,日本囊对虾^[26]的 $5.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,斑节对虾^[19]的 $4.26 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和凡纳滨对虾^[27]的 $4.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。上述结果说明脊尾白虾耐受氨氮浓度远高于其他虾类。氨氮作为重要的环境胁迫因子,能够导致生物体内有氧代谢异常,活性氧自由基大量积累而引起氧化损伤^[28]。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶等构成的酶系统发挥了重要的抗氧化功能,保护机体免受氧化

损伤^[29]。大量研究证明:SOD、CAT 和 GPx 相互协同清除各种氧自由基。超氧自由基的增加,可以诱导 SOD 活性的增加,催化超氧自由基的歧化反应,而生成 H_2O_2 ,进而被生物体内的 GPx、CAT 和 Prx 等一系列抗氧化酶催化生成无害的 H_2O 与 O_2 ^[30]。过多的活性氧导致机体的脂质过氧化程度加剧,脂质过氧化产物增加,MDA 作为脂质过氧化产物之一,其含量间接反映机体细胞的损伤程度^[31]。因此,本实验通过分析上述指标在体内的变化,反映脊尾白虾抗氨氮能力。

3.1 氨氮胁迫对脊尾白虾 SOD、CAT、GPx 活力及脂质过氧化产物 MDA 含量的影响

脊尾白虾不同抗氧化酶活力存在组织差异性,肝胰腺 SOD、CAT、GPx 活力和 MDA 含量明显高于血淋巴,推测可能与不同组织的功能定位有关,由于活性氧伴随着代谢过程而产生,代谢强度越大,产生的活性氧越多,而肝胰腺作为重要的代谢中心,需要更强

表 4 急性氨氮胁迫对脊尾白虾血淋巴和肝胰腺 GPx 活力的影响

Table 4 Activity of GPx in hemolymph and hepatopancreas of *E. carinicauda* after acute ammonia stresses

器官 Organ	浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration	胁迫时间(Stress time)/h						
		1	3	6	12	24	48	72
血淋巴 Hemolymph	0.28±0.07	33.05±0.59a/A	29.52±3.36a/A	27.83±1.98a/B	30.62±0.70a/A	31.23±0.12a/A	32.96±1.04a/A	29.84±2.12a/A
	4.79±0.12	32.85±0.18a/A	31.71±0.09ab/A	33.20±0.12b/A	30.97±1.01a/A	33.46±1.20a/A	37.60±0.05b/B	38.16±0.07b/B
	9.05±0.18	30.91±0.48a/A	36.82±0.04b/B	40.37±0.32c/C	32.13±0.76a/D	33.96±0.60b/E	39.84±0.27c/C	54.29±0.27c/F
	17.64±0.25	37.76±1.69b/A	37.78±1.11c/A	38.93±0.24d/A	38.73±0.03c/A	43.13±0.67c/B	61.01±1.43d/C	43.68±0.11d/B
	34.87±0.46	57.59±2.30c/AB	56.37±0.34d/A	56.80±0.90e/AB	59.75±0.33d/C	70.57±0.21d/D	39.34±0.84c/E	58.53±0.24e/BC
肝胰腺 Hepatopancreas	0.28±0.07	32.66±0.05a/A	33.23±0.33a/A	32.69±0.37a/A	31.53±0.16a/A	31.92±1.14a/A	33.72±0.58ab/A	35.44±2.66a/A
	4.79±0.12	38.25±0.80b/A	32.36±1.50a/B	41.57±0.60b/C	44.79±1.02b/D	38.74±1.82b/A	41.17±2.94a/C	51.83±0.64b/E
	9.05±0.18	40.54±2.63b/AB	44.39±0.09b/B	51.65±0.76c/C	39.01±1.08c/AB	36.74±1.17bc/A	29.50±4.59b/D	44.67±0.51c/B
	17.64±0.25	52.68±0.42c/AB	49.00±1.07c/BC	56.41±1.52d/B	40.06±1.41c/D	36.18±0.49c/D	42.84±1.22b/BD	50.39±0.68d/AB
	34.87±0.46	53.12±0.18c/A	52.95±1.32d/A	47.33±2.80e/B	90.26±0.97d/C	56.19±1.56d/D	63.44±1.57c/E	51.33±0.81cd/A

表 5 急性氨氮胁迫对脊尾白虾血淋巴和肝胰腺 MDA 含量的影响

Table 5 Contents of MDA in hemolymph and hepatopancreas of *E. carinicauda* after acute ammonia stresses

器官 Organ	浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration	胁迫时间(Stress time)/h						
		1	3	6	12	24	48	72
血淋巴 Hemolymph	0.28±0.07	0.31±0.03a/A	0.30±0.01a/A	0.39±0.08a/A	0.37±0.01a/A	0.32±0.05a/A	0.36±0.02a/A	0.24±0.06a/A
	4.79±0.12	0.28±0.01a/A	0.36±0.06ab/AB	0.34±0.07a/AB	0.45±0.10a/B	0.59±0.04a/C	0.36±0.04a/AB	0.28±0.05ab/A
	9.05±0.18	0.33±0.07ab/A	0.45±0.07bc/AB	0.42±0.07a/AB	0.50±0.11a/B	0.37±0.11a/AB	0.34±0.05a/AB	0.37±0.11bcAB
	17.64±0.25	0.41±0.07bc/A	0.40±0.02bc/A	0.47±0.12a/AB	0.61±0.19a/B	0.53±0.06a/AB	0.36±0.05a/A	0.49±0.10c/AB
	34.87±0.46	0.49±0.06c/A	0.50±0.09c/A	0.97±0.10b/BC	0.99±0.12b/C	0.87±0.08b/BCD	0.72±0.07b/D	0.83±0.02d/CD
肝胰腺 Hepatopancreas	0.28±0.07	35.39±0.72ab/A	26.96±0.15a/BC	35.59±1.94a/A	22.09±1.10a/D	23.99±1.56a/BD	27.54±4.03a/BC	15.22±0.25a/E
	4.79±0.12	32.57±0.28a/A	34.01±4.86b/A	49.48±0.28b/B	46.24±0.89b/BC	38.44±0.48b/D	54.84±2.23b/E	42.69±1.05b/C
	9.05±0.18	41.13±6.52b/A	34.38±0.48b/B	44.28±1.35c/A	61.43±2.46c/C	70.47±0.80c/D	51.044±0.79b/E	64.35±1.92c/C
	17.64±0.25	51.94±1.68c/A	60.61±0.88c/B	74.01±0.41c/B	64.48±2.25c/D	75.10±0.31c/C	68.21±0.04c/E	65.85±0.56c/D
	34.87±0.46	69.30±0.59d/A	76.68±6.67d/B	91.11±0.51d/C	84.70±2.62d/DE	88.90±4.84d/CE	105.14±0.74d/F	81.39±1.62d/BD

表6 急性氨氮胁迫对脊尾白虾血淋巴细胞和肝胰腺 GPx 基因相对表达水平的影响

Table 6 Relative GPx expression levels in haemocytes and hepatopancreas of *E. carinicauda* after acute ammonia stresses

器官 Organ	浓度/mg·L ⁻¹ Concentration	胁迫时间(Stress time)/h						
		1	3	6	12	24	48	72
血淋巴	0.28±0.07	1.00±0.06a/A	0.98±0.23a/A	1.09±0.13a/A	0.79±0.28a/A	0.86±0.24a/A	1.26±0.05a/A	1.00±0.09a/A
Hemolymph	4.79±0.12	1.31±0.15a/AB	1.31±0.07a/AB	0.98±0.11a/A	2.49±0.33b/C	3.17±0.07b/D	2.18±0.23b/C	1.61±0.68ab/B
	9.05±0.18	4.76±0.44b/A	2.54±0.51b/BCD	2.85±1.30b/CD	1.97±0.53bc/BC	2.85±0.85b/CD	1.42±0.18a/B	3.63±0.33c/AC
	17.64±0.25	5.33±1.23b/A	3.24±0.99bc/C	1.97±0.64ab/D	4.04±0.57d/AC	1.61±0.77a/D	0.90±0.04c/C	2.72±0.27d/DE
	34.87±0.46	3.03±0.66c/A	3.85±0.28c/B	1.83±0.13ab/CD	1.42±0.17c/C	1.35±0.14a/C	0.79±0.02c/E	2.07±0.05b/D
肝胰腺	0.28±0.07	1.00±0.01a/A	1.01±0.04a/A	1.08±0.01a/A	0.89±0.25a/A	0.87±0.01a/A	0.88±0.11a/A	0.88±0.05a/A
Hepatopancreas	4.79±0.12	1.01±0.03a/A	1.22±0.03ab/B	1.02±0.04a/A	0.52±0.09b/C	1.00±0.01ab/A	0.74±0.01b/D	1.05±0.06b/A
	9.05±0.18	0.96±0.01a/A	1.34±0.04b/B	1.22±0.01a/C	1.01±0.07ac/A	0.76±0.12a/D	0.72±0.03b/D	0.66±0.02c/D
	17.64±0.25	1.07±0.16a/A	0.96±0.01a/A	0.98±0.30a/A	0.96±0.02ac/A	1.49±0.03c/B	0.62±0.02c/C	0.48±0.01d/C
	34.87±0.46	0.97±0.02a/A	1.64±0.05c/B	1.52±0.03b/C	1.12±0.05c/D	1.04±0.02b/E	0.61±0.01c/F	0.87±0.03a/G

的抗氧化系统清除多余的活性氧^[32]。

SOD 是生物体内抗氧化防御性的功能酶,是活性氧自由基的天然消除剂,可以清除好氧生物生命代谢过程中产生的超氧阴离子,是维持机体细胞正常代谢的重要抗氧化酶。本实验发现,中高浓度氨氮组和高浓度氨氮组血淋巴和肝胰腺 SOD 活力呈现先上升后下降的变化趋势,在 72 h 时各氨氮处理组均显著低于对照组($P<0.05$),并且高浓度氨氮组血淋巴和肝胰腺 SOD 活力在 6~24 h 显著高于其他氨氮处理组,而在 72 h 显著低于其他氨氮处理组($P<0.05$)。有研究认为短时间内活性氧自由基的增加导致 SOD 活力增高以维持组织抗氧化水平的平衡,表现出应对外界胁迫的生理调节,短期内表现出积极的作用,但长时间氨氮胁迫使机体调节氨氮胁迫的能力越来越弱,对虾体内会出现过多的自由基而抑制 SOD 活力。低浓度氨氮组和中浓度氨氮组肝胰腺呈现先升高后降低再升高的变化趋势,这一现象与泥鳅在重金属胁迫下肝脏 SOD 活性的变化趋势相一致^[33]。刘洋等^[34]认为造成这种变化的原因可能是较低浓度的氨氮在胁迫初期对 SOD 活性有诱导作用,这种诱导作用是由活性氧自由基的增加所引起的机体代偿性增多所致。在氨氮胁迫后期有所回升,说明低浓度的氨氮胁迫并没有对肝脏产生不可逆的毒害作用。

CAT 是生物体内酶系统中重要的抗氧化酶之一,可催化 H_2O_2 降解为 H_2O 和 O_2 ,从而防止机体氧化损伤。实验结果显示肝胰腺 CAT 活力明显高于血淋巴,可能与肝胰腺是主要的解毒代谢器官有关。氨氮胁迫后血淋巴和肝胰腺 CAT 活力呈现先升高后降低的变化趋势,和 SOD 活力变化趋势相似,这可能与这两种

酶所行使的功能有关。强俊等^[35]认为一定氨氮浓度下,机体通过增加代谢来应对环境胁迫,氧自由基的产生也随之增加,SOD 与 CAT 活力的增加可视为生物体对新陈代谢的适应,减轻脂质过氧化损伤。中高浓度组和高浓度组肝胰腺 CAT 活力在 1~48 h 显著高于对照组($P<0.05$),在 72 h 显著低于对照组($P<0.05$),分析原因可能是氨氮剧烈变化诱导脊尾白虾体内活性氧增加,对虾免疫组织反馈性增强抗氧化系统酶活力以对抗外界环境变化产生多余的活性氧。这可能与低浓度条件下毒物的一种增益效应有关,Stebbing^[36]称其为“毒物兴奋效应”。随着氨氮胁迫时间的延长,血淋巴和肝胰腺 SOD 和 CAT 活力逐渐下降,在 72 h 均显著低于对照组($P<0.05$),洪美玲等^[7]认为随着氨氮胁迫时间的延长,氨氮的增益效应消失,导致机体抗氧化酶活性下降,与姜会民^[37]报道的氨氮胁迫对黄河鲤幼鱼肝胰脏、肾脏抗氧化性的影响以及强俊等^[35]报道的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结果相似。樊甄姣等^[38]研究也发现,适当的氨氮刺激可增加胞内外活性氧的含量,增加栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的 SOD 与 CAT 活力,但较高浓度氨氮可以明显抑制抗氧化酶活力。

GPx 广泛存在于动植物等有机体中,是抗氧化防御的重要组成部分,可以有效清除机体产生过多的活性氧,维持机体的内环境平衡^[39]。本实验结果显示与 CAT 活力相比,不同时间点 GPx 活性一直处于较高的水平,分析原因可能是 CAT 和 GPx 在清除自由基过程中起到协同作用,且作用底物都是 H_2O_2 ,但由于 CAT 对 H_2O_2 的亲合力较弱^[40],而 GPx 可以单独清除

脂质过氧化物和其他有机氢过氧化物的缘故^[41]。本实验结果表明,高浓度氨氮胁迫后血淋巴中 GPx 活力在短时间内上升较快且始终处于较高的水平,而在肝胰腺中的最大值出现在 12 h,推测可能是由于血淋巴中 GPx 活性对氨氮刺激短时间内较肝胰腺敏感,并通过激活抗氧化酶 GPx 清除产生的活性氧自由基^[23]。GPx 在氨氮胁迫下更多的是进入血淋巴,这样可以更有效、更直接地清除自由基,该结果与曾媛媛等^[42]对拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)的研究报道相一致。

丙二醛(MDA)作为脂质过氧化产物,可反应机体脂质过氧化程度,间接反应出机体细胞受自由基攻击的损伤程度^[14]。本实验发现不同浓度氨氮胁迫后,肝胰腺 MDA 含量明显大于血淋巴,其原因可能与肝胰腺是脊尾白虾主要的代谢组织有关,该结果与姜会民^[37]报道的氨氮胁迫对黄河鲤幼鱼肝胰脏、肾脏抗氧化性的影响结果一致。本实验还发现,MDA 在肝胰腺和高浓度氨氮胁迫的血淋巴中都有不同程度的升高,除 1 h 外,均显著高于对照组($P<0.05$)。推测可能是由于水中氨氮浓度的增加,导致脊尾白虾脂质过氧化作用增强,而作为机体脂质过氧化产物的 MDA,其含量可间接反映出机体的脂质过氧化水平以及机体细胞受自由基攻击的严重程度。由于组织中产生过多的活性氧,一方面机体通过提高自身的抗氧化酶活力来清除过多的活性氧,另一方面过多的活性氧对机体造成氧化损伤,破坏细胞电子传递链、线粒体膜电位及 ATP 能量产生,进而导致细胞的呼吸障碍,严重时引起细胞凋亡或坏死^[43-45]。这也进一步提示氨氮胁迫下丙二醛的积累可能是氨氮对脊尾白虾产生毒害作用的主要原因之一。本研究中氨氮胁迫能否导致脊尾白虾肝胰腺组织损伤以及细胞凋亡,后续实验将会进一步验证。

3.2 氨氮胁迫对脊尾白虾 GPx 基因表达的影响

GPx 是生物机体内抗氧化防御系统的重要组成部分,是生物体内重要的活性氧自由基清除剂^[46-47]。本实验结果发现,除低浓度氨氮组外,其他氨氮组胁迫初期脊尾白虾血淋巴细胞 GPx 基因相对表达量明显上调,与对照组相比具有显著性差异($P<0.05$),推测可能是机体为了降低氨氮对脊尾白虾造成的氧化损伤使 GPx 基因转录水平保持在一定水平,所以氨氮胁迫 72 h 血淋巴细胞 GPx 基因保持在较高的水平。另外,本研究结果显示脊尾白虾血淋巴细胞中 GPx 基因相对表达量明显高于肝胰腺,这与段亚飞^[23]研究的脊尾白虾 GPx 基因结果一致,但是与吴成龙^[48]研究

的皱纹盘鲍 GPx 基因以及李美玉等^[49]研究的脊尾白虾 ferritin 基因结果相反,这可能与不同基因在组织当中的功能定位有关。

4 结论

高、低浓度氨氮胁迫组均能影响脊尾白虾抗氧化酶活力及其基因表达水平,并且导致脂质过氧化产物 MDA 含量的增加,表现出一定的时间量效关系。氨氮胁迫初期能够诱导机体抗氧化酶系统酶活力变化,促使机体清除过多的活性氧自由基,短期内表现出积极的作用,但是随着胁迫时间的延长,氨氮抑制了机体的抗氧化酶活性,造成机体组织脂质过氧化加剧。氨氮胁迫下抗氧化酶系统的破坏和脂质过氧化加剧可能是氨氮对脊尾白虾产生毒害作用的重要原因。为此,在实际养殖过程中控制养殖水体中的氨氮浓度,能够有效预防对虾疾病的发生。

参考文献:

- [1] 丁美丽,林林,李光友,等. 有机污染物对中国对虾体内外环境影响的研究[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(1): 7-12.
DING Mei-li, LIN Lin, LI Guang-You, et al. Effects of organic pollution on *Penaeus chinensis* body, s intraenvironment and external environment [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1997, 28(1): 7-12.
- [2] Chen J C, Kou Y Z. Accumulation of ammonia in the haemolymph of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia[J]. *Aquaculture*, 1993, 109(2): 177-185.
- [3] Ryter S W, Kim H P, Hoetzel A, et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2007, 9(1): 49-89.
- [4] Assefa Z, Laethem A V, Garmyn M, et al. Ultraviolet radiation-induced apoptosis in keratinocytes; On the role of cytosolic factors[J]. *Biochim et Biophysica Acta: Reviews on Cancer*, 2005, 1775(2): 90-106.
- [5] Richier S, Sabourault C, Courtiade J, et al. Oxidative stress and apoptotic events during thermal stress in the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*[J]. *FEBS Journal*, 2006, 273(18): 4186-4198.
- [6] 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(1-4): 246-254.
- [7] 洪美玲,陈立侨,顾顺樟,等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 412-418.
HONG Mei-ling, CHEN Li-qiao, GU Shun-zhang, et al. Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(3): 412-418.
- [8] Bebianno M J, Company R, Serafim A, et al. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields[J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 75(4): 354-373.
- [9] 孔祥会,王桂忠,李少菁,等. 低温驯化下锯缘青蟹肝胰腺的抗氧化

- 效应及 ATPase 活性变化[J]. 中国水产科学, 2005, 12(6):708-713.
- KONG Xiang-hui, WANG Gui-zhong, LI Shao-jing, et al. Antioxidant effects and ATPase activity changes in hepatopancreas of mud crab *Scylla serrata* under low temperature acclimation[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(6):708-713.
- [10] 梁俊平, 李 健, 李吉涛, 等. 不同温度对脊尾白虾胚胎发育与幼体变态存活的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(4):1142-1152.
- LIANG Jun-ping, LI Jian, LI Ji-tao, et al. Effects of water temperature on the embryonic development, survival and development period of larvae of ridgetail white prawn (*Exopalaemon carinicauda*) reared in the laboratory[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(4):1142-1152.
- [11] 梅肖乐, 倪金佛, 陈焕根, 等. 梭鱼、缢蛏、脊尾白虾无公害综合养殖技术[J]. 水产养殖, 2005, 26(6):24-25.
- MEI Xiao-le, NI Jin-di, CHEN Huan-gen, et al. Pollution-free integrated culture technology for *Barracuda*, *Sinonovacula constricta* and *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Journal of Aquaculture*, 2005, 26(6):24-25.
- [12] 黄则平, 张沛花. 三疣梭子蟹与脊尾白虾池塘混养技术[J]. 水产养殖, 2004, 25(5):8-9.
- HUANG Ze-ping, ZHANG Pei-hua. The polyculture technology of *Portunus trituberculatus* and *Exopalaemon carinicauda* in pond[J]. *Aquaculture*, 2004, 25(5):8-9.
- [13] 唐兴本. 中国对虾、脊尾白虾、毛蚶的三季轮养技术[J]. 中国水产, 2004, 10:62-63.
- TANG Xing-ben. The three seasons of alternate culture technology on *Fenneropenaeus chinensis*, *Exopalaemon carinicauda* and *Scapharca subcrenata*[J]. *China Fisheries*, 2004, 10:62-63.
- [14] 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.
- LIU Xiao-hua, CAO Jun-ming, YANG Da-wei, et al. The distribution of antioxidant enzyme and lipid peroxidation products of tissues of *Litopenaeus vannamei* before and after ammonia stresses[J]. *Reservoir Fisheries*, 2007, 27(6):24-26.
- [15] 王 芸. pH、氨氮胁迫对中国对虾细胞凋亡和抗氧化系统影响机理的研究[D]. 上海:上海海洋大学, 2011:101-129.
- WANG Yun. Effects of pH, ammonia stress on apoptosis and antioxidant system of chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[D]. Shanghai:Shanghai Ocean University, 2011:101-129.
- [16] 李 永, 杨其彬, 苏天凤, 等. 氨氮对斑节对虾的毒性及免疫指标的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(3):358-362.
- LI Yong, YANG Qi-bin, SU Tian-feng, et al. The toxicity of ammonia-N on *Penaeus monodon* and immune parameters[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2012, 21(3):358-362.
- [17] 王国江. 氨氮和亚硝态氮胁迫对日本沼虾血淋巴的影响[D]. 保定:河北大学, 2008:36-40.
- WANG Guo-jiang. Effects of ammonia-N and nitrite-N on hemolymph of *Macrobrachium nipponense*[D]. Baoding:Hebei University, 2008:36-40.
- [18] 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.
- HUANG He-zhong, LI Yi, SONG Xue-hong, et al. NH₄⁺-N stress on immune function of *Eriocheir sinensis*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2006, 37(3):198-205.
- [19] Chen J C, Liu P C, Lin Y T. Super intensive culture of red-tailed shrimp *Penaeus penicillatus*[J]. *Journal of World Aquaculture Society*, 1988, 19:127-131.
- [20] 钟硕良, 陈月忠, 林克冰, 等. 虾池底质中 NH₄⁺-N、S²⁻ 和异养细菌含量的变化及其相关性研究[J]. 台湾海峡, 1997, 16(4):449-454.
- ZHONG Shuo-liang, CHEN Yue-zhong, LING Ke-bing, et al. Studies on variations of contents of NH₄⁺-N, S²⁻ and heterotrophic bacteria in substrate of shrimp ponds and their correlations[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 1997, 16(4):449-454.
- [21] 梁俊平, 李 健, 李吉涛, 等. 氨氮对脊尾白虾幼虾和成虾的毒性试验[J]. 水产科学, 2012, 31(9):526-529.
- LIANG Jun-ping, LI Jian, LI Ji-tao, et al. Acute toxicity of ammonia nitrogen to juvenile and adult ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(9):526-529.
- [22] 陈佳蓉. 水化学实验指导书[M]. 北京:中国农业出版社, 1996:136-139.
- CHEN Jia-rong. Hydrochemistry experimental instruction book[M]. Beijing:China Agriculture Press, 1996:136-139.
- [23] 段亚飞. 脊尾白虾血细胞 cDNA 文库构建、EST 分析及免疫等基因的克隆与表达分析[D]. 上海:上海海洋大学, 2013:56-61.
- DUAN Ya-fei. Construction of the hemocytes cDNA library EST analysis and cloning and expression analysis and cloning and expression analysis of immune-related genes in *Exopalaemon carinicauda* [D]. Shanghai:Shanghai Ocean University, 2013:56-61.
- [24] 冯 伟. 维生素 C、E 和裂壶藻对中国对虾非特异性免疫功能影响的研究[D]. 上海:上海海洋大学, 2013:33-35.
- FENG Wei. Effects of supplemental different level Vc, Ve and schizochytrium on non-specific immunity of Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[D]. Shanghai:Shanghai Ocean University, 2013:33-35.
- [25] Chen J C, Ting Y Y, Lin J N, et al. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus chinensis* juveniles[J]. *Marine Biology*, 1990, 107(3):427-431.
- [26] Lin H P, Thuett J, Trilles P, et al. Effects of ammonia on survival and osmoregulation of various development stages of the shrimp *Penaeus japonicus*[J]. *Marine Biology*, 1993, 117(4):591-598.
- [27] 胡贤德, 孙成波, 蔡鹤翔, 等. 不同盐度条件下氨氮对斑节对虾的毒性试验[J]. 广西科学, 2009, 16(2):206-209.
- HU Xian-de, SUN Cheng-bo, CAI He-xiang, et al. Toxicity of ammonia-N to *Penaeus monodon* under the different salinities[J]. *Guangxi Science*, 2009, 16(2):206-209.
- [28] Ranby B, Rabek J E. Singlet oxygen[M]. England:Wiley, 1978:331.
- [29] Cetinkaya O, Silig Y, Cetinkaya S, et al. The effects of *Rumex patientia* extract on rat liver an erythrocyte antioxidant enzyme system[J]. *Pharmacology*, 2002, 57(7):487-488.
- [30] Yildirim O, Büyükbingöl Z. Effects of supplementation with a combination of cobalt and ascorbic acid on antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in streptozocin-diabetic rat liver[J]. *Biol Trace Elem Res*,

- 2002, 90(1-3):143-154.
- [31] Lepage G, Mnuoz G, Champagne J, et al. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography[J]. *Anal Biochem*, 1991, 197(2):277-283.
- [32] 周俊, 王维娜. pH值的变化对南美白对虾组织中抗氧化酶基因表达的影响[C]. 第六届世界华人虾蟹养殖研讨会论文集摘要集, 2008:166.
- ZHOU Jun, WANG Wei-na. Effects of pH change on antioxidant enzyme gene expression of *Litopenaeus vannamei*[C]. The 6th world Chinese symposium for the crustacean aquaculture abstracts, 2008:166.
- [33] 张迎梅, 王叶菁, 虞闰六, 等. 重金属胁迫对泥鳅肝胰脏 ATPase 和 SOD 酶活性的影响[J]. 甘肃科学学报, 2008, 20(3):55-59.
- ZHANG Ying-mei, WANG Ye-jing, YU Run-liu, et al. Effects of heavy metals on ATPase and SOD activities of hepatopancreas in *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. *Journal of Gansu Sciences*, 2008, 20(3):55-59.
- [34] 刘洋, 凌去非, 于连洋, 等. 氨氮胁迫对泥鳅不同组织 SOD 和 GSH-Px 活性的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(2):1069-1072.
- LIU Yang, LING Qu-fei, YU Lian-yang, et al. Effect of Ammonia-N stress on activity of SOD and GSH-Px in different tissues of *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2011, 39(2):1069-1072.
- [35] 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.
- QIANG Jun, XU Pao, HE Jie, et al. The combined effects of external ammonia and crowding stress on growth and biochemical activities in liver of (GIFT) Nile tilapia juvenile (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(12):1837-1848.
- [36] Stebbing A R D. Hormones is the stimulation of growth by low levels of inhibitors[J]. *Sci Total Environ*, 1982, 22(1):213-234.
- [37] 姜会民. 氨氮胁迫对黄河鲤幼鱼肝胰脏、肾脏抗氧化性的影响[J]. 山东大学学报(理学版), 2012, 47(1):17-22.
- JIANG Hui-min. Effect of ammonia on antioxidant in the liver, pancreas, and kidney of Yellow River *Cyprinus carpio*[J]. *Journal of Shandong University(Natural Science)*, 2012, 47(1):17-22.
- [38] 樊甄姣, 刘志鸿, 杨爱国. 氨氮对栉孔扇贝血淋巴活性氧含量和抗氧化酶活性的影响[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(1):23-27.
- FAN Zhen-jiao, LIU Zhi-hong, YANG Ai-guo. Effect of ammonia-N on the content of ROIs and the activities of antioxidant enzyme in the haemolymph of *Chlamys farreri*[J]. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(1):23-27.
- [39] 郑青梅, 温晓波, 韩春艳, 等. 草鱼胞浆谷胱甘肽过氧化物酶 cDNA 全长的克隆与分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(5):919-926.
- ZHENG Qing-mei, WEN Xiao-bo, HAN Chun-yan, et al. Full-length cDNA cloning and analysis of glutathione peroxidase from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2010, 29(5):919-926.
- [40] Izawa S, Inoue Y, Kimura A. Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: Analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochemical Journal*, 1996, 320:61-67.
- [41] 王建梅. 弧菌和盐度胁迫下饵料中添加抗氧化物质对虾体的影响[D]. 保定:河北大学, 2003:7.
- WANG Jian-mei. Effects of dietary antioxidant on penaeus vannamei subjected to vibrio and salinity[D]. Baoding: Hebei University, 2003:7.
- [42] 曾媛媛, 蒋云霞, 艾春香. 氨氮胁迫对拟穴青蟹组织器官中 SOD 及 GPX 活性的影响[J]. 台湾海峡, 2011, 30(2):210-215.
- ZENG Yuan-yuan, JIANG Yun-xia, AI Chun-xiang. Effects of ammonia-N stress on the activities of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in different tissues and organs of *Scylla paramamosain*[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2011, 30(2):210-215.
- [43] Dandapat J, Chainy G B, Rao K J. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2003, 135(3):221-233.
- [44] Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, et al. Mitochondria oxidative stress and cell death[J]. *Apoptosis*, 2007, 12(5):913-922.
- [45] 韩俊英, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP70 的克隆及其表达分析[J]. 水产学报, 2011, 35(8):1130-1139.
- HAN Jun-ying, LI Jian, LI Ji-tao, et al. Cloning and expression of heat shock protein 70 (HSP70) of *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(8):1130-1139.
- [46] 王咏梅. 自由基与谷胱甘肽过氧化物酶[J]. 解放军药科学学报, 2005, 21(5):369-371.
- WANG Yong-mei. Free radicals and glutathione peroxidase[J]. *Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2005, 21(5):369-371.
- [47] 任洪林, 柳增善, 王克坚. 鲍免疫相关基因和蛋白的研究进展[J]. 遗传, 2009, 31(4):348-358.
- REN Hong-lin, LIU Zeng-shan, WANG Ke-jian. Progresses on immune-related genes and proteins of abalones[J]. *Heredity*, 2009, 31(4):348-358.
- [48] 吴成龙. 皱纹盘鲍抗氧化基因的克隆及其在营养调控下表达的研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2010:25.
- WU Cheng-long. Cloning and expression analysis of antioxidant genes in abalone *Haliotis discus hannai* in response to nutrition[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010:25.
- [49] 李美玉, 李健, 刘萍, 等. 脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) ferritin 基因的克隆与表达[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(2):306-312.
- LI Mei-yu, LI Jian, LIU Ping, et al. Cloning and expression analysis of ferritin gene in *Exopalaemon carinicauda*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(2):306-312.