

水体 Cu^{2+} 对三疣梭子蟹主要组织 ROS 含量和抗氧化能力的影响

王 丽, 韩艳楠, 金 珊*, 赵青松, 陈寅儿, 王春琳

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘 要:为探究水体 Cu^{2+} 对三疣梭子蟹主要组织氧自由基水平和抗氧化能力的影响, 采用生态学单因子梯度试验方法, 研究了不同浓度水体 Cu^{2+} (0.04、0.4、2、4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 胁迫下三疣梭子蟹鳃、肝胰腺、肌肉组织中的活性氧(ROS)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性和总抗氧化能力(T-AOC)的变化。结果表明:与对照组相比, 低浓度水体 Cu^{2+} (0.04、0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 对三疣梭子蟹鳃、肝胰腺和肌肉组织 ROS 含量没有显著影响, 而高浓度水体 Cu^{2+} (2、4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 会导致鳃、肝胰腺和肌肉组织 ROS 含量显著升高, 且升高的幅度与 Cu^{2+} 浓度成正比。低浓度水体 Cu^{2+} (0.04、0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 对三疣梭子蟹鳃、肝胰腺和肌肉组织的 SOD 活性和 T-AOC 均具有诱导作用, 随实验时间的延长, SOD 活性和 T-AOC 呈峰值变化; 而高浓度水体 Cu^{2+} (2、4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 短时间内对梭子蟹的鳃、肝胰腺、肌肉组织的 SOD 活性及鳃 T-AOC 具有诱导作用, 但对肝胰腺和肌肉 T-AOC 却有明显的抑制作用, 在实验时间内两种组织 T-AOC 始终低于对照组, 并呈逐渐下降趋势。由此说明低于 0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水体 Cu^{2+} 在三疣梭子蟹抗氧化解毒能力的可控范围, 但高于 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水体 Cu^{2+} 会对三疣梭子蟹主要组织细胞造成损伤, 使之抗氧化解毒能力下降。抗氧化酶和非酶抗氧化物在三疣梭子蟹抵御 Cu^{2+} 胁迫中共同发挥作用, 三种组织 SOD 和 T-AOC 表现出明显的时间和剂量效应。

关键词:三疣梭子蟹; Cu^{2+} ; 活性氧; 超氧化物歧化酶; 总抗氧化能力

中图分类号:X503.225 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2015)07-1261-08 doi:10.11654/jaes.2015.07.006

Effects of Aqueous Copper on Reactive Oxygen Species Content and Anti-oxidation Capacity of Major Tissues in *Portunus trituberculatus*

WANG Li, HAN Yan-nan, JIN Shan*, Zhao Qing-song, CHEN Yin-er, WANG Chun-lin

(School of Marine, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: High levels of copper in water can affect aquacultural production. Here an experiment was designed to examine the responses of reactive oxygen species(ROS), superoxide dismutase(SOD) and total anti-oxidation capacity(T-AOC) in gill, hepatopancreas and muscle of *Portunus trituberculatus* exposed to different concentrations of Cu^{2+} (0, 0.04, 0.4, 2 and 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) using single factor gradient method of ecology. The ROS level increased with elevated concentrations of Cu^{2+} (2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), but was no significant differences ($P>0.05$) between 0.04 and 0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Compared with control, SOD and T-AOC activities in gill, hepatopancreas and muscle were induced by low concentrations of Cu^{2+} (0.04 and 0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), and displayed an inverted V-shape over the experimental period. Furthermore, the activities of SOD and T-AOC in gill, hepatopancreas and muscle showed obvious relationships between concentration-time effects and time-effect. Under high concentrations of Cu^{2+} (2 and 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), the activity of SOD in gill, hepatopancreas and muscle and the activity of T-AOC in gill were induced during the initial 24 h, but activity of T-AOC in hepatopancreas and muscle were inhibited at the beginning and decreased markedly over time. The present results suggest that exposure to low (<0.04 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and short-term exposure to high Cu^{2+} concentrations (>2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) would not cause significant oxidative damages, but enhance the antioxidant defense system. Under extended exposure to high Cu^{2+} , however, oxidative damage was obviously increased, decreasing the antioxidation capacity. Antioxidant enzyme and non-enzymatic antioxidants could jointly play a role in the defense system.

Keywords: *Portunus trituberculatus*; Cu^{2+} ; ROS; SOD; T-AOC

收稿日期:2015-01-27

基金项目:浙江省教育厅项目(Y201224126);宁波市科技创新团队(2011B81003);宁波大学学科项目(XKL11093)

作者简介:王 丽(1992—),女,安徽马鞍山人,硕士研究生,从事水产动物病害与防控研究。E-mail:1255150404@qq.com

*通信作者:金 珊 E-mail:jinshan@nbu.edu.cn

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是我国海水养殖的主要品种,其肉味鲜美,营养丰富,颇受消费者的喜爱,也是重要的出口创汇品种,养殖前景十分广阔。随着养殖集约化程度的提高,投喂频率增加、消毒剂和药物的滥用以及不适当的管理方法使得养殖环境日益恶化,时常爆发不明原因大规模死亡现象,严重阻碍了梭子蟹养殖的健康和可持续发展。

据资料显示,许多病害的发生并不是由某种具体的病原体造成的,异常的温度、盐度、溶氧或环境中的毒性污染物才是引起水产动物批量死亡的主要原因^[1]。近年来,由于各种工业废水和固体废弃物渗出液大量地排入水体以及在水产养殖中经常使用硫酸铜进行清塘灭藻和病害防治,所以养殖水体中 Cu^{2+} 含量越来越高,已成为我国水产养殖的主要污染物。水域中过量的 Cu^{2+} 不仅可以诱导养殖动物体内积累大量活性氧自由基,造成组织细胞损伤和生长发育障碍,而且使养殖动物免疫力大大下降^[2-5]。目前国内外已有许多关于 Cu^{2+} 对水产养殖动物生态毒理学方面的研究报道^[4,6-7],但大多针对鱼类和虾类,研究的内容也主要集中在 Cu^{2+} 的急性毒性及对鱼类生长发育的影响^[4,8]。关于水体 Cu^{2+} 对蟹类毒性和生理功能影响方面的研究资料很少^[9-12],而有关梭子蟹的仅见陈寅儿等关于 Cu^{2+} 在三疣梭子蟹体内的毒性效应和积累的研究报道^[13]。本文通过测定不同浓度水体 Cu^{2+} 胁迫下三疣梭子蟹鳃、肝胰腺和肌肉等主要组织活性氧(ROS)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性和总抗氧化能力(T-AOC)的变化,探讨水体 Cu^{2+} 对三疣梭子蟹主要组织氧自由基水平和抗氧化能力的影响规律,以期在水体 Cu^{2+} 污染的早期检测及生态风险评估提供理论基础,也为三疣梭子蟹养殖环境的人工调控和健康安全养殖模式的建立提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验用蟹

三疣梭子蟹购于浙江宁波水产市场,蟹体健康活力强、附肢完整,雄性,蟹龄 $\text{C}_{10}\text{--}\text{C}_{12}$,体重 $(132.19 \pm 14.63)\text{g}$,置于 $60\text{ cm} \times 50\text{ cm} \times 40\text{ cm}$ 的塑料水槽中暂养 1 d 后进行实验。实验所用海水用海水水晶配制($\text{Cu}^{2+} \leq 0.001\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),水温 $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$,盐度 22 ± 1 ,pH 7~8,实验期间不投饵,用充气泵不间断充气。每日及时吸去排泄物,换水 50%。

1.2 主要药品和试剂

活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧

化能力(T-AOC)和考马斯亮蓝蛋白等测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;硫酸铜($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)为分析纯,用蒸馏水配成 $10\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 储备液,实验时根据需要用人工海水稀释到所需浓度;海水水晶由上海保嘉生化技术有限公司金坛分公司生产。

1.3 主要仪器设备

微量移液器、漩涡混匀器、恒温水浴锅、分析天平、可见分光光度计(722S,上海精密科学有限公司)、冷冻离心机(Eppendorf 5430R, Germany)。

1.4 Cu^{2+} 梯度设置

根据渔业水质标准 GB 11607—1989($\text{Cu}^{2+} \leq 0.01\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、急性毒性试验、预试验及宁波地区梭子蟹养殖池塘水域 Cu^{2+} 含量。本实验设置 4 个 Cu^{2+} 处理组和一个对照组,处理组 Cu^{2+} 浓度分别为 0.04、0.4、2、4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,各处理组浓度均大于渔业水质标准要求,每个处理组设置两个平行组,另外设置一个 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照组,每组 50 只蟹。

1.5 样品采集和处理

在 Cu^{2+} 胁迫后 0、6、12、24、48、72、96 h 时分别从每组中取 6 只蟹,用吸水纸吸干蟹体表水分,置于冰盘内,用消毒过的剪刀剪开背壳,快速取出全部鳃、肝胰腺和头胸部肌肉,再用 4°C 90% 的灭菌生理盐水洗净、吸水纸吸干后置于洁净样品袋中于 -40°C 冷冻保存。实验时将各样品于 4°C 冰箱中解冻,用分析天平准确称取 0.4 g 各组织分别移入无菌离心管中,加入 9 倍体积的预冷生理盐水冰浴匀浆 1 min ($12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),然后于 4°C $6000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清酶液分装备用^[14]。

1.6 ROS 含量、总 SOD 活性及 T-AOC 的测定

组织 ROS 含量、总 SOD 活性、T-AOC 及组织匀浆粗提取液蛋白的测定均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒,具体测定方法按说明书进行。

ROS 含量定义为:在 37°C 下每毫克组织蛋白每秒钟使反应体系中双氧水浓度降低 $1\text{ }\mu\text{mol}$ 为一个抗活性氧单位($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)。SOD 活性定义为:在 37°C 下每毫克组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达到 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)。总抗氧化能力(T-AOC)单位定义为:在 37°C 时,每分钟每毫克组织蛋白使反应体系的吸光度值(OD)增加 0.01 时,为一个总抗氧化能力单位($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)。

1.7 数据处理

所有结果均以两个平行组数据的平均值 $\pm$ 标准偏差(Mean $\pm$ SD)表示,采用单因素方差分析(One-way

ANOVA)和 Duncan 检验法进行数据差异性检验。统计学分析均采用 SPSS 13.0 软件完成。

2 结果与分析

2.1 水体 Cu^{2+} 对三疣梭子蟹鳃 ROS 含量的影响

不同浓度 Cu^{2+} 胁迫后三疣梭子蟹鳃 ROS 含量的变化见图 1,各实验组鳃 ROS 变化的趋势均不相同。与对照组相比,0.04 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组鳃 ROS 含量略有升高,但无显著差异;0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组呈下降-恢复的变化趋势,各实验时间点也未呈显著变化;2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组在实验 12 h 内呈下降趋势,实验进行 24 h 后逐渐升高,48 h 后显著高于对照组 ($P<0.01$),96 h 时鳃 ROS 含量为 $(347.63\pm23.26)\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$,是对照组的 7.1 倍;4.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组随着实验时间的延长呈逐渐升高趋势,实验 12 h 时已显著高于对照组,实验 96 h 时为 $(402.59\pm14.21)\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$,是对照组的 8.2 倍。

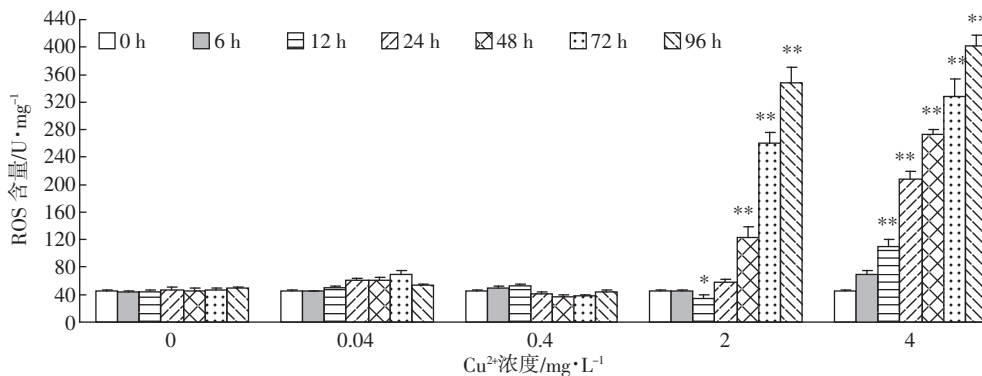
2.2 水体 Cu^{2+} 对三疣梭子蟹肝胰腺 ROS 含量的影响

不同浓度 Cu^{2+} 胁迫后三疣梭子蟹肝胰腺 ROS 含

量的变化见图 2,各实验组肝胰腺 ROS 含量变化趋势与鳃相同。0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组肝胰腺 ROS 含量在实验 48 h 时分别为 $(76.39\pm9.08)\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 和 $(60.49\pm11.75)\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$,与对照组相比下降了约 35%和 48% ($P<0.01$),其后 0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组逐渐恢复到正常水平,而 2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 72 h 后已显著高于对照组,至实验 96 h 时为 $(246.51\pm23.49)\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$,是对照组的 2.2 倍;4.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组随着实验时间的延长呈逐渐升高趋势,实验 12 h 时已显著高于对照组,实验 96 h 时为 $(422.49\pm49.90)\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$,是对照组的 3.8 倍。

2.3 水体 Cu^{2+} 对三疣梭子蟹肌肉 ROS 含量的影响

不同浓度 Cu^{2+} 胁迫后三疣梭子蟹肌肉 ROS 含量的变化见图 3,各实验组肌肉 ROS 含量变化趋势基本与鳃和肝胰腺相同。0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组肝胰腺 ROS 含量分别在实验 48 h 和 24 h 时降到最低,为 $(60.84\pm9.62)\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 和 $(59.19\pm20.43)\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$,与对照组相比下降了 31%和 33% ($P<0.01$),其后逐渐上升,2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组在实验 48 h 后已显著高于对照组,



* 表示实验组和对照组存在显著差异 ($P<0.05$); ** 表示实验组和对照组存在极显著差异 ($P<0.01$)。下同
*Indicates significant difference between experiment and control group ($P<0.05$); ** Indicates extremely significant difference between experiment and control group ($P<0.01$). The same below

图 1 Cu^{2+} 胁迫下三疣梭子蟹鳃 ROS 含量的变化

Figure 1 Changes of ROS content in gill of *Portunus trituberculatus* under Cu^{2+} stresses

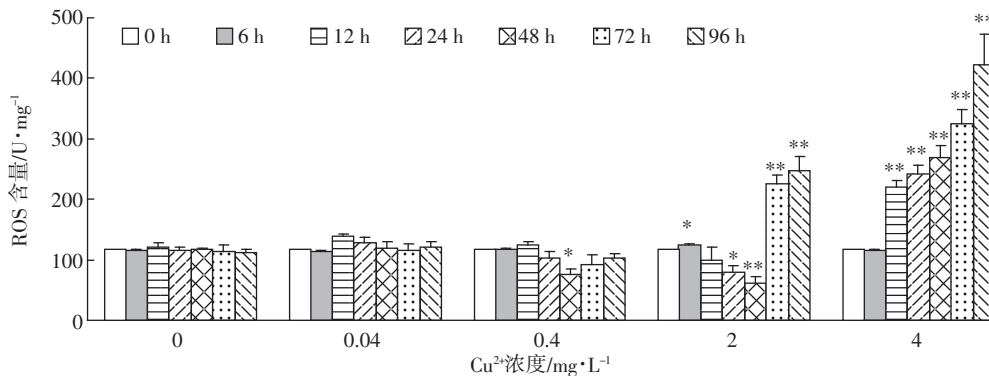


图 2 Cu^{2+} 胁迫下三疣梭子蟹肝胰腺 ROS 含量的变化

Figure 2 Changes of ROS content in hepatopancreas of *Portunus trituberculatus* under Cu^{2+} stresses

至实验 96 h 时为 $(301.27 \pm 21.78) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 是对照组的 3.4 倍; $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组随着实验时间的延长呈逐渐升高趋势, 实验 12 h 时已显著高于对照组, 实验 96 h 时为 $(379.79 \pm 26.14) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 是对照组的 4.3 倍。

2.4 水体 Cu^{2+} 对三疣梭子蟹鳃 SOD 活性的影响

不同浓度 Cu^{2+} 胁迫后三疣梭子蟹鳃 SOD 活性的变化见图 4。各实验组鳃 SOD 活性均呈现先升后降的变化趋势, Cu^{2+} 浓度越高鳃 SOD 活性达峰时间越早。低浓度 Cu^{2+} (0.04 、 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对鳃 SOD 活性总体呈诱导作用, 在实验期间鳃 SOD 活性均高于对照组, 峰值出现在实验 72 h, 分别为 $(480.65 \pm 17.35) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $(446.04 \pm 40.55) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 较对照组分别提高了 79% 和 67% ($P < 0.01$); 高浓度 Cu^{2+} (2.0 、 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 鳃 SOD 活性峰值分别出现在实验 24 h 和 12 h, 为 $(377.82 \pm 37.29) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $(418.74 \pm 47.18) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 较对照组提高了 42% 和 56% ($P < 0.01$), 之后鳃 SOD 活性开始下降, 实验 48 h 后两组的鳃 SOD 活性都显著低于对照组, 呈抑制趋势。

2.5 水体 Cu^{2+} 对三疣梭子蟹肝胰腺 SOD 活性的影响

不同浓度 Cu^{2+} 胁迫后三疣梭子蟹肝胰腺 SOD 活

性的变化见图 5。各实验组肝胰腺 SOD 活性变化趋势与鳃基本相同, 但各组的 SOD 活性达峰时间更早, 且 Cu^{2+} 浓度越低诱导作用越强。 0.04 、 0.4 、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 三组对肝胰腺 SOD 活性总体呈诱导作用, 在实验时间内肝胰腺 SOD 活性均高于对照组, 峰值出现在实验 48 h 和 24 h, 分别为 (260.44 ± 27.25) 、 $(282.69 \pm 17.21) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $(205.55 \pm 11.34) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 较对照组分别提高了 238%、267% 和 174% ($P < 0.01$); $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组肝胰腺 SOD 活性呈先诱导后抑制的变化趋势, 峰值出现在实验 6 h 时, 为 $(139.15 \pm 15.43) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 较对照组提高了 82% ($P < 0.01$), 之后肝胰腺 SOD 活性开始下降, 实验 72 h 后低于对照组。

2.6 水体 Cu^{2+} 对三疣梭子蟹肌肉 SOD 活性的影响

不同浓度 Cu^{2+} 胁迫后三疣梭子蟹肌肉 SOD 活性的变化见图 6, 各实验组肌肉 SOD 活性变化趋势不同。与对照组相比, $0.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组肌肉 SOD 活性在整个实验时间内基本没有明显变化, $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组肌肉 SOD 活性随着实验时间的延长逐渐增强, 实验 96 h 时达到峰值 $(200.26 \pm 20.45) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$; $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组肌肉 SOD 活性呈先升后降的变化, 峰值出现在实验 24 h

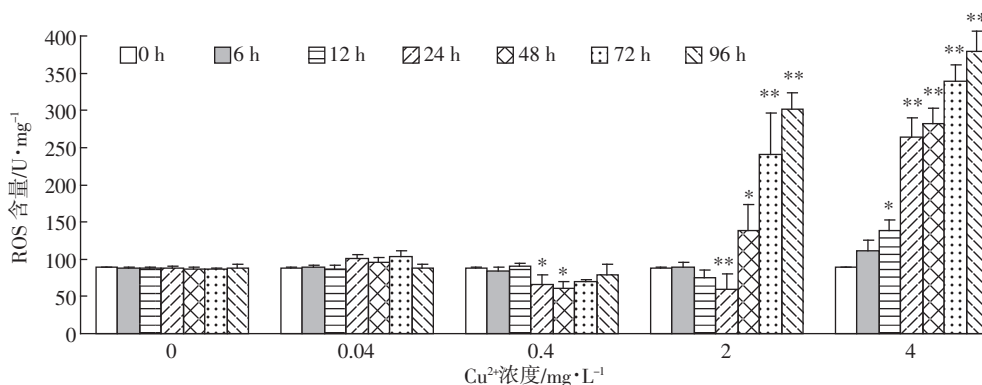


图3 Cu^{2+} 胁迫下三疣梭子蟹肌肉 ROS 含量的变化

Figure 3 Changes of ROS content in muscle of *Portunus trituberculatus* under Cu^{2+} stresses

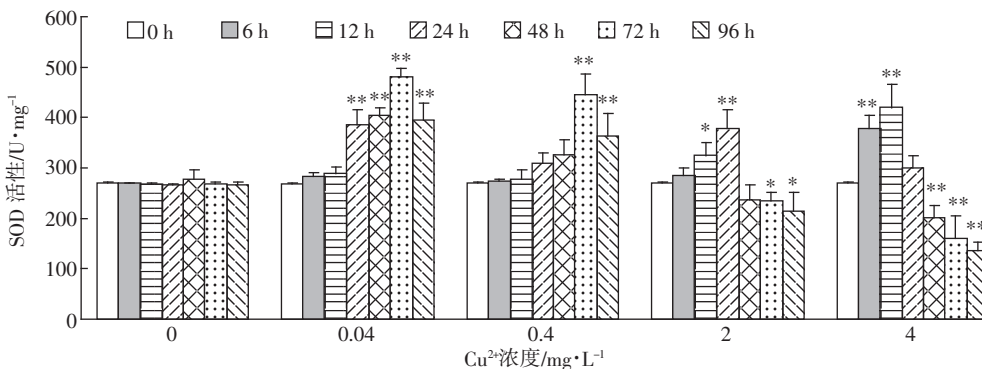


图4 Cu^{2+} 胁迫下三疣梭子蟹鳃 SOD 活性的变化

Figure 4 Changes of SOD activity in gill of *Portunus trituberculatus* under Cu^{2+} stresses

时,为 $(183.36 \pm 13.58) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($P < 0.01$),实验 78 h 后基本恢复正常水平;而 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组肌肉 SOD 活性呈先诱导后抑制的变化趋势,峰值出现在实验 12 h 时,为 $(99.85 \pm 6.18) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($P < 0.01$),实验 48 h 后显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

2.7 Cu^{2+} 胁迫对三疣梭子蟹鳃 T-AOC 的影响

不同浓度 Cu^{2+} 胁迫后三疣梭子蟹鳃 T-AOC 的变化见图 7。与对照组相比, $0.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组鳃 T-AOC 呈诱导趋势,随着实验时间的延长逐渐升高;其他三组鳃 T-AOC 均呈先升高后降低的变化趋势, $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组在实验 24 h 时达到峰值,分别为 $(26.69 \pm 6.12) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $(18.71 \pm 2.74) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$,是对照组的 3.5 倍和 2.5 倍,且鳃 T-AOC 在整个实验时间内均明显高于对照组;而 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组在实验 12 h 时达到峰值 $(17.78 \pm 1.15) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$,是对照组的 2.5 倍,其后逐渐下降,实验 96 h 时已恢复至对照组水平。

2.8 Cu^{2+} 胁迫对三疣梭子蟹肝胰腺 T-AOC 的影响

不同浓度 Cu^{2+} 胁迫后三疣梭子蟹肝胰腺 T-AOC 的变化见图 8。与对照组相比, $0.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组肝胰腺 T-AOC 呈先升后降的变化趋势,都在实

验 6 h 时达到最大值,分别为 $(151.35 \pm 23.28) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $(95.61 \pm 10.68) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$,是对照组的 2.3 倍和 1.4 倍。 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组肝胰腺 T-AOC 随实验时间的延长呈逐渐降低的变化趋势,T-AOC 水平被显著抑制,且与实验时间呈负相关。

2.9 Cu^{2+} 胁迫对三疣梭子蟹肌肉 T-AOC 的影响

不同浓度 Cu^{2+} 胁迫后三疣梭子蟹肌肉 T-AOC 的变化见图 9。 Cu^{2+} $0.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 T-AOC 随实验时间的延长呈先升后降的变化趋势,并均在 6 h 时达到峰值,分别为 $(23.41 \pm 3.39) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 和 $(26.97 \pm 5.01) \text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($P < 0.01$)。 Cu^{2+} $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 T-AOC 随实验时间延长呈抑制趋势,与实验时间呈负相关。

3 讨论

ROS 是需氧生物在代谢过程中产生的比氧活泼的含氧活性物质,主要有超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)和羟基自由基($\text{OH}^{\cdot-}$)等,它们不仅在机体细胞、组织和器官的发生、生长过程中发挥着重要的作用,而且还参与凝血酶原和胶原蛋白的合成、核

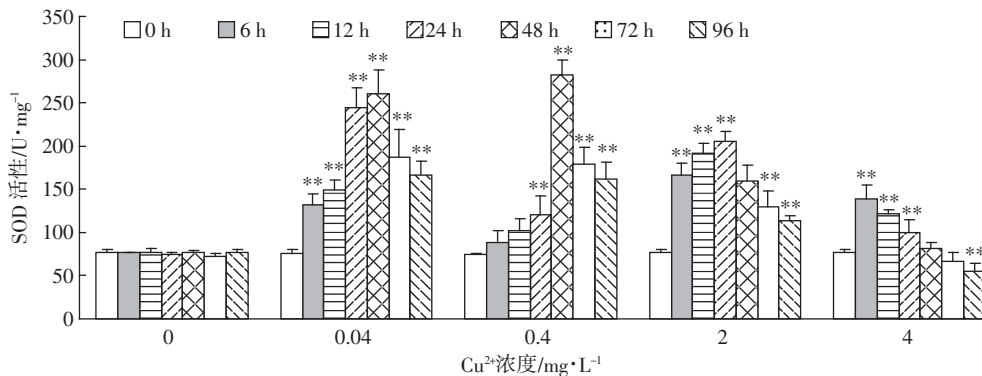


图 5 Cu^{2+} 胁迫下三疣梭子蟹肝胰腺 SOD 活性的变化

Figure 5 Changes of SOD activity in hepatopancreas of *Portunus trituberculatus* under Cu^{2+} stresses

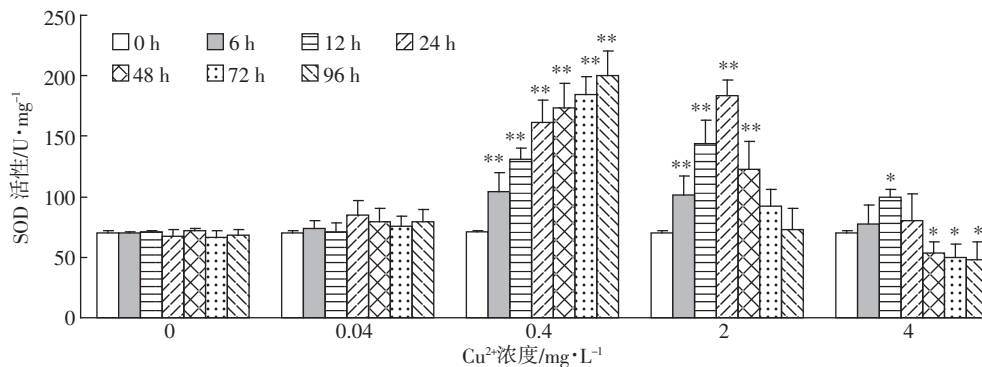


图 6 Cu^{2+} 胁迫下三疣梭子蟹肌肉 SOD 活性的变化

Figure 6 Changes of SOD activity in muscle of *Portunus trituberculatus* under Cu^{2+} stresses

苷酸的还原、体内药物和毒物的解毒过程及杀菌等作用^[15]。当生物体受到环境中某些污染物胁迫时,机体受刺激会产生大量活性氧自由基,但过量的 ROS 就会引起机体组织细胞氧化应激反应造成生物大分子物质损伤,甚至引起疾病和死亡,而机体为保持活性氧自由基平衡,就必须通过抗氧化防御体系及时清除过量的活性氧自由基^[4,15-16]。本实验结果表明,正常情况下三疣梭子蟹鳃、肝胰腺和肌肉组织中的活性氧含量相对稳定,且为肝胰腺>肌肉>鳃。作者认为这与各组织的生理功能密切相关,肝胰腺是物质代谢的中心,肌肉产生力并导致运动,它们在执行生理功能时都会产生 ROS,另外由于蟹循环系统为开放式,肝胰腺和肌肉中会有血淋巴细胞,也会产生 ROS;而鳃是外源性器官,主要功能是呼吸,正常情况下其 ROS 含量远低于肝胰腺和肌肉。本实验结果还显示,在 0.04、0.4 mg·L⁻¹ 水体 Cu²⁺作用下,三疣梭子蟹鳃、肝胰腺和肌肉组织 ROS 含量相比对照组没有显著变化,在 2、4 mg·L⁻¹ 水体 Cu²⁺作用下,会导致梭子蟹鳃、肝胰腺和肌肉组织 ROS 含量显著升高,且升高的幅度与 Cu²⁺ 浓度成正比。这说明低于 0.4 mg·L⁻¹ 的水体 Cu²⁺在三

疣梭子蟹抗氧化解毒能力的可控范围,对三疣梭子蟹组织细胞不会造成明显损伤;但高于 2 mg·L⁻¹ 的水体 Cu²⁺已对梭子蟹主要组织细胞造成损伤,三疣梭子蟹抗氧化解毒能力下降。

SOD 是目前发现的唯一以超氧阴离子自由基 (O₂⁻) 为底物的酶^[5],也是活性氧清除反应过程中第一个发挥作用的抗氧化酶,它在生物抗氧化酶类中处于核心地位,可催化 O₂⁻ 转化为 H₂O₂ 和 O₂,从而清除 O₂⁻^[17]。本实验结果显示,正常情况下梭子蟹三种组织的 SOD 活性为鳃>肝胰腺>肌肉,与 Dandapat 等^[18]研究的罗氏沼虾和潘鲁青等^[19]研究的中华绒螯蟹结果一致。作者推测由于鳃主要用于呼吸作用,有氧呼吸的氧化磷酸化过程主要产生超氧阴离子自由基 (O₂⁻),会诱导 SOD 的大量产生;而肝胰腺和肌肉在执行正常生理功能时会产生多种 ROS,不同 ROS 诱导的抗氧化酶不一定相同,如它们可通过诱导 SOD、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSP-Px)、谷胱甘肽转硫酶(GST)等多种抗氧化酶来清除不同的 ROS,因此其中产生的 SOD 含量可能低于鳃。另外,从实验结果还可看 Cu²⁺ 0.04、0.4 mg·L⁻¹ 实验组对

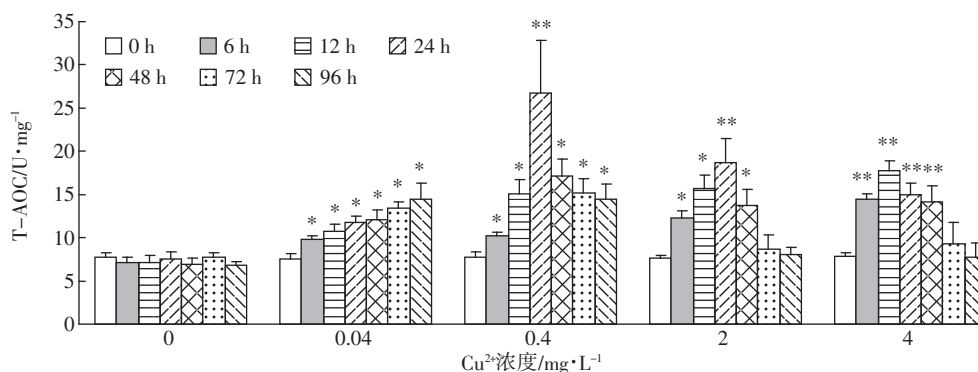


图7 Cu²⁺胁迫下三疣梭子蟹鳃 T-AOC 的变化

Figure 7 Changes of T-AOC content in giu of *Portunus trituberculatus* under Cu²⁺ stresses

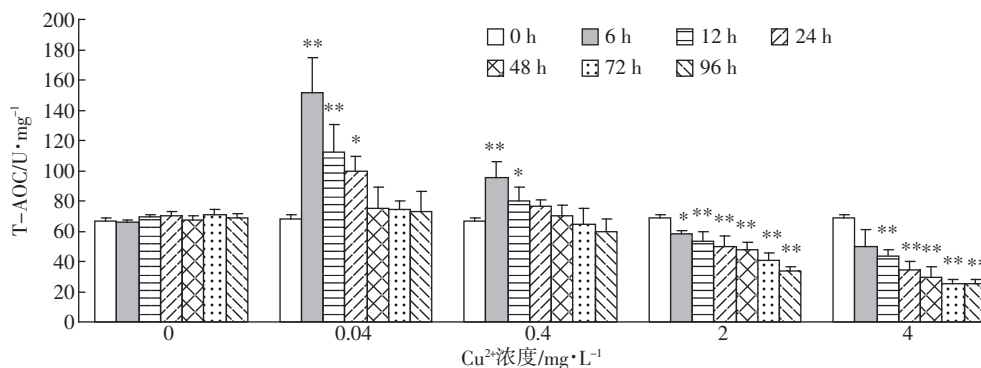
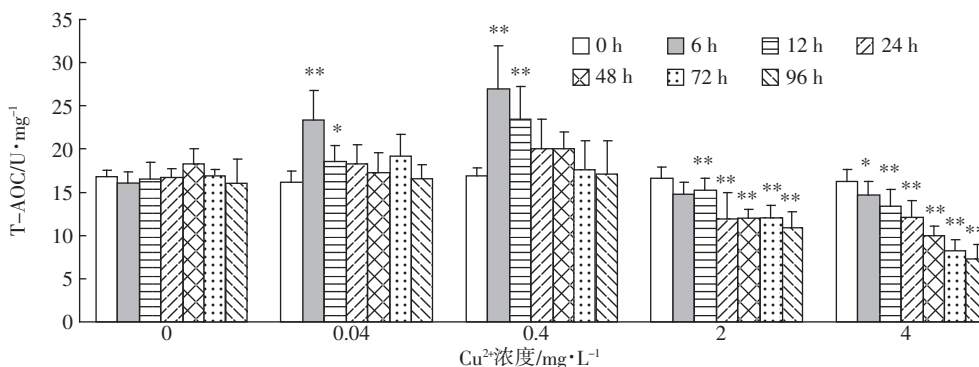


图8 Cu²⁺胁迫下三疣梭子蟹肝胰腺 T-AOC 的变化

Figure 8 Changes of T-AOC content in hepatopancreas of *Portunus trituberculatus* under Cu²⁺ stresses

图 9 Cu^{2+} 胁迫下三疣梭子蟹肌肉 T-AOC 的变化Figure 9 Changes of T-AOC content in muscle of *Portunus trituberculatus* under Cu^{2+} stresses

鳃、肝胰腺、肌肉 SOD 活性总体呈诱导趋势,而 Cu^{2+} 2、4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 实验组仅在实验 24 h 内对三种组织 SOD 活性具有一定的诱导作用,且诱导作用与浓度成反比;4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 实验组在实验 48 h 后 SOD 活性呈现明显被抑制现象,与吴众望^[20]和姜令绪^[21]的实验结果一致。

T-AOC 包括抗氧化酶系统和非酶促抗氧化系统两个部分,它主要通过消除活性氧自由基避免引发脂质过氧化、分解过氧化物阻断过氧化链、除去起催化作用的金属离子等途径起抗氧化作用,是水生动物抗氧化应激的生物标志性指标^[22]。正常情况下,由于机体不同组织执行不同生理功能,它们的总抗氧化能力(T-AOC)存在差异。孔祥会等^[14]研究表明锯缘青蟹中 T-AOC 表现为肝胰腺>肌肉>鳃,谭树华等^[23]研究也显示克氏原螯虾中肝胰腺的 T-AOC 高于鳃。本实验的结果也证实,水体 Cu^{2+} 为 0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时梭子蟹 T-AOC 表现为肝胰腺>肌肉>鳃。这与它们的生理功能是一致的,因为肝胰腺是三疣梭子蟹生理代谢活动的中心,它需要丰富的抗氧化酶和抗氧化物的种类和数量来清除物质代谢和能量代谢过程中产生的大量氧化产物,维持机体内环境的稳定,所以 T-AOC 最高;肌肉运动需要 ATPase 产生大量能量,产能过程中伴随着糖酵解和氧化磷酸化,会产生活性氧自由基和其他氧化产物,也需要多种抗氧化酶和抗氧化物质来清除,因此 T-AOC 次之;而鳃以产生超氧阴离子自由基为主,其他代谢物少,抗氧化物质主要是 SOD,所以鳃 T-AOC 最小。另外,本实验结果也显示, Cu^{2+} 0.04、0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 实验组对三疣梭子蟹三种组织 T-AOC 均具有一定的诱导作用, Cu^{2+} 2、4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 实验组仅对鳃 T-AOC 有促进作用,而对肝胰腺和肌肉 T-AOC 却具明显的抑制作用,在实验时间内呈下降趋势。可见 Cu^{2+} 对

肝胰腺和肌肉 T-AOC 的影响大于鳃,与谭树华等^[23]和李艳东^[24]研究 Cd^{2+} 对克氏原螯虾和中华绒螯蟹组织 T-AOC 影响的结果类似。

本实验结果也说明三疣梭子蟹组织 SOD 活性和 T-AOC 均具有明显的“毒物兴奋效应”^[25], Cu^{2+} 低浓度刺激或高浓度短暂的刺激均能诱导梭子蟹组织 SOD 和 T-AOC 活性增加,但高浓度长时间的 Cu^{2+} 胁迫会使机体产生大量的活性氧自由基和丙二醛等有毒有害物质,而过量的自由基数量和其他有毒有害物质超过了机体抗氧化体系的还原能力,结果导致机体组织细胞损伤,使酶的合成受影响,SOD 和 T-AOC 活性下降。

4 结论

低浓度水体 Cu^{2+} 对三疣梭子蟹不会造成明显损伤,但高浓度水体 Cu^{2+} 对三疣梭子蟹会造成一定损伤。 Cu^{2+} 低浓度刺激或高浓度短暂的刺激对三疣梭子蟹抗氧化能力具有一定诱导作用,但高浓度长时间的 Cu^{2+} 胁迫使三疣梭子蟹抗氧化体系受损,从而导致机体组织细胞损伤。因此,合理的水体 Cu^{2+} 调控是三疣梭子蟹健康养殖的关键。

参考文献:

- [1] 唐启升. 水产学学科发展现状及发展方向研究报告[M]. 北京:海洋出版社, 2013:70-83.
TANG Qi-sheng. Research of development and tendency on aquaculture [M]. Beijing: Ocean Press, 2013:70-83.
- [2] De Boeck G, Meeus W, De Coen W, et al. Tissue-specific Cu bioaccumulation patterns and differences in sensitivity to waterborne Cu in three freshwater fish: Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*) and gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 70(3): 179-188.
- [3] 王文博, 李爱华. 环境胁迫对鱼类免疫系统影响的研究概述[J]. 水产学报, 2002, 26(4): 368-374.

- WANG Wen-bo, LI Ai-hua. A review: Effect of environmental stress on immunity of aquaculture animals[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, 26(4): 368-374.
- [4] 马莉芳, 蒋晨, 高春生. 水体铜对水生动物毒性的研究进展[J]. 江西农业学报, 2013, 25(8): 73-76.
- MA Li-fang, JIANG Chen, GAO Chun-sheng. Research progress of copper exposure on aquaculture[J]. *Acta Agriculture Jiangxi*, 2013, 25(8): 73-76.
- [5] 亢玉静, 郎明远, 赵文. 水生生物体内抗氧化酶及其影响因素研究进展[J]. 微生物学杂志, 2013, 33(3): 75-80.
- KANG Yu-jing, LANG Ming-yuan, ZHAO Wen. Research progress of influence and antioxidant enzyme in aquaculture[J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 33(3): 75-80.
- [6] Liu X J, Luo Z, Xiong B X, et al. Effect of waterborne copper exposure on growth, hepatic enzymatic activities and histology in *Synechogobius hasta*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, 73(6): 1286-1291.
- [7] 魏克强, 庞胜喜, 赵辉, 等. Cu^{2+} 对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)肝胰腺的蛋白质氧化损伤效应[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(7): 1310-1315.
- WEI Ke-qiang, PANG Sheng-xi, ZHAO Hui, et al. Effects of Cu^{2+} on oxidative protein damage of *Procambarus clarkii* hepatopancreas[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(7): 1310-1315.
- [8] 丛宁. 铜对金鱼毒性影响的研究[D]. 南京农业大学, 2005.
- CONG Ning. The study of copper exposure on Goldfish[D]. Nanjing Agriculture University, 2005.
- [9] 杨志彪. 水体 Cu^{2+} 对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)毒性作用机制的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2005.
- YANG Zhi-biao. The study of water-copper exposure on toxicity mechanism in *Eriocheir sinensis*[D]. Shanghai: East China Normal University, 2005.
- [10] 王春琳, 丁爱侠. 硫酸铜蓄积对日本鳕体内保护酶系统的影响[J]. 大连水产学院学报, 2005, 20(4): 278-282.
- WANG Chun-lin, DING Ai-xia. The effect of copper sulfate on protective enzyme system in *Charybdis japonica*[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2005, 20(4): 278-282.
- [11] 张红霞, 潘鲁青, 刘静. 重金属离子对日本鳕血淋巴抗氧化酶(SOD, CAT, GPx)活力的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(增刊): 49-53.
- ZHANG Hong-xia, PAN Lu-qing, LIU Jing. The effects of heavy metal ion on antioxidant enzyme(SOD, CAT, GPx) activity in *Charybdis japonica*[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2006, 36(suppl): 49-53.
- [12] 李涌泉, 王兰, 王茜, 等. 铜联合作用对长江华溪蟹四种组织中酶活性的影响[J]. 动物学报, 2005, 51(增刊): 180-184.
- LI Yong-quan, WANG Lan, WANG Qian, et al. The effects of copper on four main tissues activity in *Sinopotamon yangtsekiense*[J]. *Journal of Animal*, 2005, 51(suppl): 180-184.
- [13] 陈寅儿, 金珊, 徐赞. Cu^{2+} 在三疣梭子蟹体内的毒性效应和积累[J]. 科技通报, 2011, 27(4): 554-556.
- CHEN Yin-er, JIN Shan, XU Yun. The toxicity effect and accumulation of Cu^{2+} in *Portunus trituberculatus*[J]. *Bulletin of Science and Technology*, 2011, 27(4): 554-556.
- [14] 孔祥会, 王桂忠, 艾桂香, 等. 锯缘青蟹不同器官组织中总抗氧化能力和SOD活性的比较研究[J]. 台湾海峡, 2003, 22(4): 469-474.
- KONG Xiang-hui, WANG Gui-zhong, AI Gui-xiang, et al. The comparative research of T-AOC and SOD in different tissues of mud crab[J]. *Taiwan Strait*, 2003, 22(4): 469-474.
- [15] 洪美玲, 陈立侨. 水产动物养殖胁迫评价及预防[M]. 北京: 中国林业出版社, 2012: 48-54.
- HONG Mei-ling, CHEN Li-qiao. The evaluation and prevention of aquatic animal breeding[M]. Beijing: China Forestry Publishing, 2012: 48-54.
- [16] 崔剑, 李兆陇, 洪啸吟. 自由基生物抗氧化与疾病[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2000, 40(6): 9-12.
- CUI Jian, LI Zhao-long, HONG Xiao-yin. Free radical oxidation and disease[J]. *Journal of Tsinghua University(Nature Science)*, 2000, 40(6): 9-12.
- [17] 魏俊发, 俞贤达, 金道森. 锰超氧化物歧化酶及其化学模拟研究[J]. 化学进展, 1997, 9: 14-21.
- WEI Jun-fa, YU Xian-da, JIN Dao-sen. The research of manganese SOD and the chemical simulation[J]. *Progress in Chemistry*, 1997, 9: 14-21.
- [18] Dandapat J, Chainy G B, Rao K J, et al. Dietary vitamin E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2000, 127C(1): 101-115.
- [19] 潘鲁青, 任加云, 吴众望. 重金属离子对中华绒螯蟹肝胰腺和鳃丝SOD, CAT活力的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(2): 189-194.
- PAN Lu-qing, REN Jia-yun, WU Zhong-wang. The effects of heavy metal ions on SOD and CAT activity in *Eriocheir sinensis* liver and gill[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2004, 34(2): 189-194.
- [20] 吴众望. 重金属离子对凡纳滨对虾毒性效应的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- WU Zhong-wang. The toxic effect of heavy metal ions in *Penaeus vannamei*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004.
- [21] 姜令绪. 环境因子对甲壳动物免疫力和抗氧化酶活力的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- JIANG Ling-xu. The effect of environmental factors on immunity and antioxidant enzyme activity in crustacean[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004.
- [22] 刘松岩. 环境胁迫对中华鲟体内自由基水平和抗氧化酶活力的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- LIU Song-yan. The effect of environmental stress on free radical level and antioxidant enzyme activity in *Acipenser sinensis*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006.
- [23] 谭树华, 邓先余, 蒋文明, 等. 高浓度铬对克氏原螯虾抗氧化酶系统的影响[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(4): 1356-1360.
- TAN Shu-hua, DENG Xian-yu, JIANG Wen-ming, et al. The effect of high concentration of Cr on antioxidant system in *Procambarus clarkii*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(4): 1356-1360.
- [24] 李艳东. 水体镉对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)亲体毒性作用研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2007.
- LI Yan-dong. The toxicity research of water-cadmium in *Eriocheir sinensis* parent[D]. Shanghai: East China Normal University, 2007.
- [25] Stebbing A R D. Hormones is the stimulation of growth by low levels of inhibitions[J]. *Science of the Total Environment*, 1982, 22(1): 213-234.