

饲料中添加铜对凡纳滨对虾血细胞中酶活的影响

于文越¹, 杜静², 张卫群³, 李全民⁴, 陈娟⁵

(1. 辽宁水利职业学院, 沈阳 110122; 2. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁 大连 116023;
3. 新乡医学院第三附属医院检验科, 河南 新乡 453000; 4. 河南师范大学化学化工学院,
河南 新乡 453007; 5. 山东东方海洋科技股份有限公司, 山东 烟台 264000)

摘要:通过在凡纳滨对虾的饵料中添加不同浓度的铜, 研究其对血细胞中酶活的影响. 试验结果表明, 饵料中添加铜的含量对凡纳滨对虾酚氧化酶及超氧化物歧化酶都有一定影响, 当基础饵料中添加 30~45 mg·kg⁻¹ 铜时, 二者的活力最高. 当饵料铜过量时对超氧化物歧化酶活力的影响比对酚氧化酶的影响显著.

关键词:铜; 凡纳滨对虾; 血细胞; 酚氧化酶; 超氧化物歧化酶

中图分类号: S963.14; X503

文献标志码: A

凡纳滨对虾因具有营养需求低、生长快、抗病能力强、广盐性、适应能力强的特性, 从而成为当今世界上最主要的对虾养殖品种, 是世界三大经济虾类之一. 微量元素是水产动物所必需的一类营养素, 具有很多重要的生理功能. 饲料中这些微量元素的缺乏或过量, 都会引起养殖生物的相应缺乏症或中毒. 如今, 饲料中添加适量微量元素已备受重视, 并已经开展了大量的相关研究工作^[1-3]. 但尚没有学者从添加微量元素的角度来研究铜元素如何影响凡纳滨对虾虾体免疫机能.

酚氧化酶是甲壳动物的酚氧化酶原激活系统的产物, 在识别异物、释放调素促进血细胞吞噬和包囊以及产生杀灭和排除异物的凝集素和溶菌酶等免疫功能方面发挥重要的作用, 与机体的免疫功能有直接的关系^[4-5]. SOD 具有清除自由基的功能, 当 SOD 酶活力降低时, 生物体内自由基积累过多, 将导致代谢紊乱、免疫及防御水平下降, 容易引起疾病的发生^[6]. SOD 活性的高低间接反映了机体清除 O²⁻ 的能力, 并且与水生动物的免疫水平密切相关^[7], 已经被用来作为生物标记来衡量机体的免疫状况. 由于铜对于虾类来讲, 是一种非常重要的元素, 它不仅是虾类血液中血蓝蛋白的中心原子, 在虾体内的输送起着重要作用^[8]. 还是许多金属酶的重要组成成分, 在许多与铜有关的酶, 如细胞色素氧化酶、过氧化物歧化酶等生物酶中具有重要作用, 适量铜能促进生物体的生长和发育, 但一旦过量就会对生物产生毒害; Cu²⁺ 可影响虾类幼体变态, 影响酚氧化酶、超氧化物歧化酶的活性^[9]. 因此, 本文通过在凡纳滨对虾饵料中添加铜, 测定凡纳滨对虾血浆中酚氧化酶及 SOD 的变化, 分析出饲料中添加铜的剂量对凡纳滨对虾血细胞中酶活的影响规律, 从而确定铜的最佳用量范围, 为科学养殖凡纳滨对虾提供实验依据.

1 试样制备与使用仪器

1.1 试验材料

试验用虾购置后先暂养一周, 正式实验共进行 8 周. 每缸 35 尾. pH 值 7.8~8.2, 盐度 3‰~6‰, 试验期间水温变化很大, 在 20~36 ℃ 之间. 试验早期, 依据对虾体重, 按其体重的 5%~8% 投喂, 每天 7:00, 14:30, 21:00 各投喂一次. 箱中放置遮蔽物以防止对虾互相残杀, 在实验过程中, 根据对虾的采食状况, 调整投饵量, 以下一次投饵时基本无残饵为准. 每天及时清除残饵和排泄物, 8 周后取样并称重^[10].

收稿日期: 2015-02-20; 修回日期: 2015-07-20.

基金项目: 辽宁省教育科学“十一五”规划立项课题(25-9)

第 1 作者简介(通信作者): 于文越(1957-), 男, 辽宁沈阳人, 辽宁水利职业学院副教授, 主要从事农作物栽培, 水产养殖研究, E-mail: yuwenyue1957@163.com.

1.2 试验饲料

基础饲料配方表如表1所示,实验饲料是在基础饲料中添加一定量的硫酸铜.添加量分别为0,15,30,45,60 mg·kg⁻¹.最后测得实际铜含量分别为11.12,19.10,30.27,49.18,63.48 mg·kg⁻¹.制成直径1.6~1.8 mm长度0.5 cm的颗粒饲料,40℃烘箱中烘干后放在密封的塑料袋中于低温干燥处保存备用.

表1 凡纳滨对虾实验饲料配方(g·kg⁻¹)

成份	鱼粉	豆粕	菜籽粕	玉米粉	面粉	磷脂	鱼油	多维 ^a	多矿 ^b	Vc	甜菜碱	纤维素
含量	300	40	180	200	200	10	20	2	5	1	1	41

^a:维生素预混物(每千克饲料中含有的种类及克数):VA,3 000 000 IU;VB2,480 mg;VB6,360 mg;VB12,1.2 mg;VB1,20.0 mg;VK,20.0 mg;叶酸,170 mg;生物素,10 mg;VE,3 000 IU;肌醇,8 000 mg;泛酸,800 mg;烟酸,200 mg;氯化胆碱,8 000 mg;VD,40 000 IU.

^b:多矿预混物(g·100 g⁻¹):ZnSO₄·7H₂O,4.085 g;CaCO₃,16.4 g;NaH₂PO₄·H₂O,14.8 g;KH₂PO₄,33.76 g;CaCl₂,6.664 g;MgSO₄·7H₂O,8 g;KCl,2.24 g;AlCl₃·6H₂O,0.096 g;MnSO₄·H₂O,1.145 g;FeSO₄·7H₂O,9 g;CoCl₂,0.141 g;KI,0.18 g;羧甲基纤维素,3.489 g.

1.3 仪器

725型超低温冰箱(Thermo FORMA);751-GD紫外可见分光光度计(上海欣益仪器有限公司);VIS-723G可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司);22R台式冷冻离心机(德国);TGL-16G-A高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);JY92-II型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所);PB203-N型电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);MLS-3020全自动高压灭菌器(日本SANYO公司);PHS-3C型酸度计(上海虹益仪器厂);电热三用水箱(北京市医疗设备厂).

2 试验方法

2.1 分光光度计连续监测法测定酚氧化酶

取850 μl底物和50 μl血浆样品,充分混匀后立即于490 nm波长下测定光密度值(OD₄₉₀),每隔10 s读数,连续监测120 s.规定每毫升血淋巴每分钟使OD₄₉₀增加0.001为1个酶活力单位^[7].

酚氧化酶底物:用pH6.6磷酸钾缓冲液配制3.0 mg·ml⁻¹ L-dopa;0.10 mol·L⁻¹ pH 6.6的磷酸钾缓冲液:1.0 mol·L⁻¹ K₂HPO₄(38.1 ml)+1.0 mol·L⁻¹ KH₂PO₄(61.9 ml).

2.2 WST-1法测定超氧化物歧化酶

SOD活力的测定采用目前最先进的WST-1法.WST-1可以和黄嘌呤氧化酶催化产生的超氧阴离子反应产生水溶性的甲斐染料,该反应过程可以被SOD抑制.通过对WST-1产物的比色分析可计算SOD的酶活力.

检测步骤:

- 1) 将20 μl样品溶液或水加入到每个孔中.
- 2) 向各孔中加入WST工作液,稀释缓冲液和酶工作液.
- 3) 在37℃下培养20 min.
- 4) 测定450 nm处的O.D值.

SOD抑制活性(抑制率%) = $\frac{[(A \text{ blank } 1 - A \text{ blank } 3) - (A \text{ sample} - A \text{ blank } 2)]}{(A \text{ blank } 1 - A \text{ blank } 3)} \times 100$.

3 试验结果与分析

采用SPSS18统计软件处理和分析数据.方差分析和单因素AVONA比较对所得数据进行分析处理,认为在P<0.05水平上差异显著,所有的结果均以平均值±标准差来表示,采用Excel作图分析.

实验结束后,对凡纳滨对虾体重进行测定,结果发现,随着铜添加量的增加,凡纳滨对虾的SGR(特定生长率)表现出先升高后降低的趋势,铜添加量为30 mg·kg⁻¹时,SGR显著高于其他的组.饲料中添加铜对凡纳滨对虾血浆中酚氧化酶、SOD的影响见表2.

表2 不同处理组凡纳对虾血清中酚氧化酶(PO)、SOD的测定结果

铜添加量/(mg·kg ⁻¹)	酚氧化酶(U)	总 SOD	锰 SOD
0	32.81 ± 1.06a	1.097 ± 0.014a	0.849 ± 0.147a
15	42.86 ± 4.10 ^{ab}	1.769 ± 0.016 ^b	1.177 ± 0.056 ^b
30	47.64 ± 11.28 ^b	1.927 ± 0.013 ^b	1.097 ± 0.228 ^b
45	66.69 ± 4.14 ^c	1.880 ± 0.016 ^{ab}	1.091 ± 0.084 ^b
60	61.31 ± 9.64 ^c	1.353 ± 0.010 ^b	1.089 ± 0.115 ^a

注:同一栏中不同上标为差异显著($p < 0.05$).

3.1 对酚氧化酶 PO 活性的影响

图1表示饵料中不同浓度的铜对凡纳滨对虾血浆中酚氧化酶活性的影响.随着铜添加量的增加,血浆中PO活力有先升高后降低的趋势.当铜添加量为45 mg·kg⁻¹时凡纳滨对虾血浆中的酚氧化酶活性最高,不添加铜时PO活性最低,添加60 mg·kg⁻¹时的PO活性比添加45 mg·kg⁻¹时低,但仍高于其他组别.

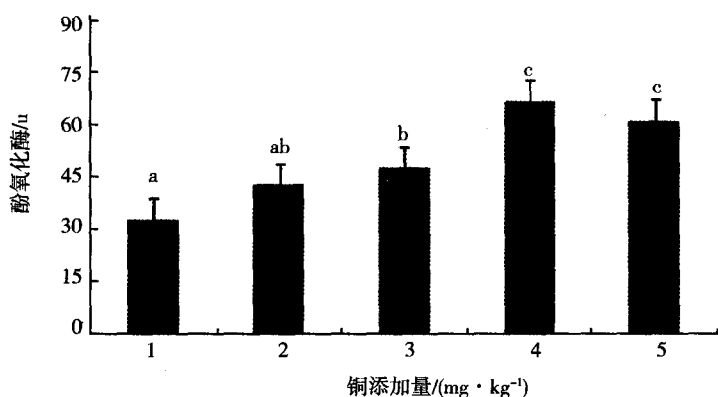


图1 饵料中不同浓度铜对凡纳滨对虾血浆中酚氧化酶的影响

3.2 对超氧化物歧化酶(SOD)的影响

饵料中不同浓度的铜对凡纳滨对虾血浆中总SOD和MnSOD活性的影响如图2所示.图A表示饵料中铜对总SOD活力的影响.总的趋势是随着铜添加量的增加总SOD活力先上升后下降.在不添加铜的实验组总SOD活力最低,在添加15、30和45 mg·kg⁻¹组,总SOD活力显著高于对照组和60 mg·kg⁻¹组,且3组之间差异不明显.60 mg·kg⁻¹组的总SOD活力与对照组相比差异不显著.

图B表示随着铜添加量的增加血浆中MnSOD活力的变化情况.而血浆中MnSOD在铜添加量为15 mg·kg⁻¹时活力最高,与其他各组有显著差异($p < 0.05$).不添加以及添加30 mg·kg⁻¹、45 mg·kg⁻¹和60 mg·kg⁻¹铜各组之间没有显著性差异,但是对照组血浆中MnSOD含量最低.

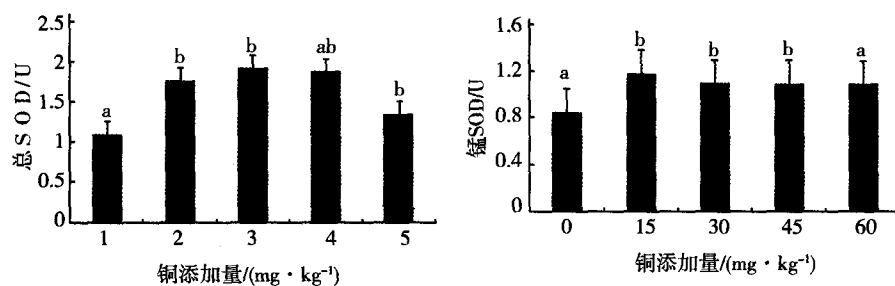


图2 饵料中不同浓度铜对凡纳滨对虾血浆中总SOD和MnSOD活性的影响

4 结 论

铜是鱼、虾等水产动物生长所必需的微量元素之一.是甲壳类动物中赖氨酰氧化酶、细胞色素C氧化酶、酪氨酸酶、铜蓝蛋白、酚氧化物酶及铜锌超氧化物歧化酶等多种酶的重要组成成分,广泛参与机体的新陈

代谢^[11]. 其中,铜蓝蛋白是甲壳类动物运输氧的载体,对甲壳类动物非常重要. 酚氧化物酶在血淋巴中以无活性的酚氧化物酶原的形式存在,在环境因子和金属离子的作用下可转变成有活性的酚氧化物酶,因此能够较敏感的反映机体的免疫状态^[12]. 有关铜添加水平对凡纳滨对虾生长的影响已有一些报道. 周双艳等研究发现添加 8~64 mg·kg⁻¹铜会造成虾的终末体重、增重率、特定生长率显著高于对照组,并未造成一般毒性效应^[9]. 董晓慧等研究得出相似结论即饲料中添加 10、30、50 mg·kg⁻¹的硫酸铜能提高凡纳滨对虾的增重率^[13].

本实验向饵料中添加不同浓度的铜对凡纳滨对虾血细胞中的酚氧化物酶及 SOD 的影响. 实验结果表明,饵料中铜的含量对凡纳滨对虾 SOD 和 PO 活力都有一定的影响,当基础饵料中添加 30~45 mg·kg⁻¹铜时,二者的活力最高,这与方允中^[14]的研究结果一致. SOD 具有清除自由基及催化过氧化物自由基为过氧化物的功能. 当 SOD 活性降低时,生物体内就会积累过多的自由基,导致代谢紊乱,正常生理功能失调,免疫和防御水平下降,从而引起疾病的发生^[15]. 铜是抗氧化酶 SOD 活性中心的重要组成成分,因此 SOD 活力被认为是虾体内铜含量的一个敏感标志^[16]. Sun 等在对中华绒螯蟹的研究中发现,在饲料中补充铜能够显著提高血清中 SOD 活力^[17]. 本试验结果与上述研究结果相似,凡纳滨对虾血细胞中 SOD 活力随着饲料中铜含量的增加呈先上升后下降的趋势,在 30~45 mg·kg⁻¹组中其活力最强,这表明饲料中适宜的铜含量有利于凡纳滨对虾血细胞中 SOD 活力的提升,进而提高虾体的抗氧化力和免疫力.

本实验中添加铜对各组血浆中的酚氧化物酶活性的影响结果表明,在添加 30 mg·kg⁻¹、45 mg·kg⁻¹和 60 mg·kg⁻¹铜时可以有效激活凡纳滨对虾的酚氧化物酶原(proPO)使之转变为有活性的酚氧化物酶 PO,使之处于比较活跃的免疫状态,维持机体的平衡和稳定. 郭志勋等^[15]对凡纳滨对虾的研究也表明,30 mg 铜可以显著增加血清中 PO 的活力. 董晓慧等^[13]的研究也发现,凡纳滨对虾的血清 PO 活力随着饲料中铜添加量的增加而上升;Sun 等^[17]对中华绒螯蟹的研究也表明,血清 PO 活力随着饲料中铜含量的升高呈先上升后下降的趋势,这表明饲料中适宜的铜含量能促进甲壳动物血细胞 PO 活力的提高,从而增强免疫力.

本试验中,当饵料铜过量时对 SOD 的活力影响比 PO 显著. 因为铜是 SOD 的组成成分,而 PO 的激活同时受到钙离子调节^[18],铜可能以间接方式对其产生影响.

参 考 文 献

- [1] 丁美丽,林林,李光友,等. 有机污染对中国对虾体内环境影响的研究[J]. 海洋与湖沼,1997,28(1):7-12.
- [2] 宋维彦,王秀敏,靳桂双. 铁铜锌对凡纳滨对虾生长和非特异免疫的影响[J]. 江苏农业科学,2011(6):376-379.
- [3] 郭建林,陈建明,潘茜,等. 日本沼虾幼虾对饲料中铜的需求量[J]. 动物营养学报,2014,26(6):1706-1714.
- [4] Soderhall K. Invertebrate immunity[J]. Developmental and comparative immunology,1999,23:263-266.
- [5] 阳会军,谭北平,方怀义. 饲料中添加蛋氨酸铜和硫酸铜对斑节对虾生长和存活的影响[J]. 饲料工业,2001,22(10):15-16.
- [6] Huang J, Yang Y, Wang A. Reconsideration of phenoloxidase activity determination in white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immunology,2010,28(1):240-244.
- [7] 牟海津,江晓路,刘树清,等. 日本对虾溶血素的活性测定及性能研究[J]. 海洋与沼,1999,30(4):362-367.
- [8] 王维娜,王安利,孙儒泳. 水环境中的铜锌铁钴离子对日本沼虾消化酶和碱性磷酸酶的影响[J]. 动物学报,2009(S1):72-77.
- [9] 简慧敏,姚庆祯,臧维玲,等. 铜,镉,敌敌畏和甲胺磷对南美白对虾的亚急性毒性作用[J]. 生态毒理学报,2007,2(2):237-242.
- [10] 刘清兰,陈香丽,郭爱莲,等. 日本沼虾血淋巴 RNA 提取方法的改进[J]. 河南师范大学学报(自然科学版),2012,40(6):134-136.
- [11] 周双艳,杨奇慧,谭北平,等. 饲料中铜源及铜添加水平对凡纳滨对虾幼虾生长性能,血清生化指标,非特异性免疫酶活性及肌肉氨基酸含量的影响[J]. 动物营养学报,2014,26(7):1888-1899.
- [12] Cheng W, Juang F, Chen J. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 16(3): 295-306.
- [13] 董晓慧,杨原志,郑石轩,等. 饲料中不同铜源和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,2007,22(5):377-383.
- [14] 方允中,郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京:科学出版社,2002.
- [15] 郭志勋,陈毕生,徐力文,等. 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,2004,10(6):526-528.

- [6] Solenthaler B, Pajarola R. Predictive-corrective incompressible SPH[J]. ACM Transactions on Graphics (TOG), 2009, 28(3): 1-6.
- [7] Ihmsen M, Cornelis J, Solenthaler B, et al. Implicit incompressible SPH[J]. Visualization and Computer Graphics, IEEE Transactions on, 2014, 20(3): 426-435.
- [8] Macklin M, Müller M, Chentanez N, et al. Unified particle physics for real-time applications[J]. ACM Transactions on Graphics (TOG), 2014, 33(4): 153.
- [9] Rustico E, Bilotta G, Herault A, et al. Advances in multi-GPU smoothed particle hydrodynamics simulations[J]. Parallel and Distributed Systems, IEEE Transactions on, 2014, 25(1): 43-52.

GPU-based Implicit Incompressible SPH Fluid Simulation

ZHANG Ying^{1a}, YU Haojie², LI Tao^{1b,3}

(1. a. The School of Continuing Education; b. The Department of Information Engineering, Henan Radio & Television University, Zhengzhou 450008, China; 2. Zhengzhou Institute of Aeronautical Industry Management, Zhengzhou 450008, China; 3. School of Computer Science and Engineering, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 611731, China)

Abstract: We present a Graphic Processing Unit (GPU) Based parallel simulation algorithm for incompressible fluids. The algorithm utilizes parallel radix sort technique to improve the efficiency of neighbor search and takes full advantage of GPU's fast on-chip shared memory. The fluid data is copied from GPU's global memory to shared memory, which reduces the latency of data access and thus improves simulation performance. The experimental result shows that the GPU-based parallel fluid simulation algorithm can largely improve the physics simulation performance. Compared to single-threaded CPU implementation, the GPU-based counterpart can achieve a 38.2 speedup.

Keywords: physically-based fluid simulation; Smoothed Particle Hydrodynamics; Graphic Processing Unit; incompressibility

(上接第 130 页)

- [16] Hari R, Burde V, Arking R. Immunological confirmation of elevated levels of CuZn superoxide dismutase protein in an artificially selected long-lived strain of *Drosophila melanogaster*[J]. Experimental gerontology, 1998, 33(3): 227-237.
- [17] Sun S, Qin J, Yu N, et al. Effect of dietary copper on the growth performance, non-specific immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Fish & shellfish immunology, 2013, 34(5): 1195-1201.
- [18] Vlerie J S, Soderhall K. Cellular immune mechanisms in the Crustacean[C]. Symposia of the Zoological Society of London, 1986: 59-79.

Dietary Copper Effects on Hemocyte Phenoloxidase and Superoxidedismutase Activities of the *Litopenaeus Vannamei*

YU Wenyue¹, DU Jing², ZHANG Weiqun³, LI Quanmin⁴, CHEN Juan⁵

(1. Liaoning Water Conservancy Vocational College, Shenyang 110122, China; 2. Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian 116023, China; 3. The 3rd Affiliated Hospital Of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China; 4. School of Chemistry and Chemical Engineering Henan Normal University, Xinxiang 453000, China; 5. Shandong Oriental Ocean Sci-tech Co., Ltd, Yantai 264000, China)

Abstract: A feeding trial was conducted to determine the dietary copper (Cu) requirement and its effect on hemocyte phenoloxidase (PO) and superoxidedismutase (SOD) activities of the *Litopenaeus vannamei*. Results showed the activities of PO and SOD were higher as shrimp fed diets supplemented with 30~45 mg Cu/kg diet than any other diet. When a little bit more Cu added to the diet, its effect on activity of SOD was much more significantly than that on activity of PO.

Keywords: copper; *Litopenaeus vannamei*; hemocyte; phenoloxidase (PO); superoxidedismutase (SOD)