

# 水体铜胁迫条件下饲料中硫辛酸对皱纹盘鲍的保护作用\*

类延菊, 徐 玮, 张彦娇, 周慧慧, 张文兵\*\*, 麦康森

(中国海洋大学水产动物营养与饲料农业部重点实验室, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 以初始体重(3.17±0.01)g的皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)为研究对象,在其饲料中分别添加0、0.7和2.1 g/kg的 $\alpha$ -硫辛酸配制成3种半精制饲料,在水体Cu含量为0.02 mg/L的静水养殖系统中饲养60 d,探讨饲料硫辛酸在水体Cu胁迫条件下对皱纹盘鲍的保护作用。结果表明,皱纹盘鲍的特定生长率(SGR)随着饲料中硫辛酸的增加而升高,但与对照组无显著差异。0.7和2.1 g/kg硫辛酸处理组皱纹盘鲍的血清、外套膜、鳃和肝胰脏中Cu含量显著低于对照组,2.1 g/kg硫辛酸处理组的肌肉中Cu含量显著低于对照组,但是0.7 g/kg硫辛酸处理组肌肉Cu含量与对照组无显著差异。硫辛酸的各添加水平显著升高Cu胁迫下皱纹盘鲍的肝胰脏超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)的活力及还原型谷胱甘肽(GSH)的含量。0.7和2.1 g/kg硫辛酸处理组的肝胰脏丙二醛(MDA)的含量显著低于对照组。2.1 g/kg硫辛酸处理组肝胰脏蛋白羰基的含量和DNA断裂损伤显著低于对照组和0.7 g/kg处理组。由此可见,饲料中的硫辛酸可以显著升高Cu胁迫下的皱纹盘鲍肝胰脏抗氧化水平,显著降低皱纹盘鲍组织Cu的沉积量,并在一定程度上减轻了肝胰脏蛋白质、DNA损伤和脂质过氧化。

**关键词:** 皱纹盘鲍;硫辛酸;Cu;抗氧化;饲料

中图分类号: S963.7

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2015)07-039-07

DOI: 10.16441/j.cnki.hdx.20140137

硫酸铜常被用于水域的消毒和控制藻类的生长,所以重金属Cu带来的污染广泛存在于养殖水体<sup>[1]</sup>。Cu离子对水生生物的毒性主要表现在可通过Haber/Weiss反应产生大量的活性氧(ROS)<sup>[2-3]</sup>,这些过量的ROS可导致DNA的断裂、酶蛋白的失活和膜脂质的过氧化等<sup>[4]</sup>,由此增加机体的氧化胁迫,对机体诱发多种损伤<sup>[5-6]</sup>,甚至导致水生动物的死亡<sup>[7]</sup>。

$\alpha$ -硫辛酸( $\alpha$ -LA)是一种类维生素的抗氧化剂<sup>[8]</sup>。其具有特殊的双硫五元环结构,与自由基反应的能力很强。LA可以清除因Cu氧化胁迫而导致的过量的自由基,如过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、羟基自由基( $\cdot$ HO)、单线态氧(<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)等<sup>[9-10]</sup>。LA除了本身具有抗氧化的作用之外,还可以与其代谢产物二氢硫辛酸(DHLA)的联合来清除生物体内过多的活性氧,并且可以激活生物体内其他抗氧化剂的代谢循环,共同发挥抗氧化作用<sup>[11]</sup>。另外,LA和DHLA在机体内的相互转化可以还原细胞中一些抗氧化剂,如维生素C、维生素E、谷胱甘肽(GSH)和硫氧还原蛋白等。

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)为中国北方养殖的大型经济贝类。近年来,由于环境中包括重金属在内的各种胁迫因子的增加,使养殖的皱纹盘鲍不断发生各类病害,产量大幅下降<sup>[12]</sup>。本文拟研究饲料中添

加硫辛酸对水体铜胁迫条件下皱纹盘鲍的保护作用,为其在皱纹盘鲍配合饲料中的应用提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和养殖管理

皱纹盘鲍幼鲍为人工孵化同一批鲍鱼,购自青岛鳌山卫育苗场。在中国海洋大学水产馆养殖系统中暂养2周后,挑选大小一致的健康个体(平均体重为(3.17±0.01)g)随机分成3组,每组3个重复,每个重复40只鲍鱼,静水养殖60 d。实验用分析纯级的CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O购自广州化学试剂厂,用蒸馏水配制成Cu浓度为1 mg/L的母液,根据实验需要在5个350 L洁净桶中用天然海水稀释成实验所需要的Cu浓度,然后用水泵抽到各个养殖玻璃缸(100 L)中。养殖实验期间,每天换水2次,每次换水量为实验玻璃缸水量的一半。每天18:00投喂饲料,次日08:00清底,并密切观察采食及健康状况。养殖过程中水温18~21℃,盐度为22~28,pH为7.4~7.9,溶解氧大于6 mg/L。实验中的死亡鲍鱼及时取出并计数。

### 1.2 实验设计

根据前期的研究发现,在水体Cu的各浓度(0.02、0.04、0.06和0.08 mg/L)下,只有0.02 mg/L浓度下

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(30972262;31372542)资助

收稿日期: 2014-04-16; 修订日期: 2014-05-24

作者简介: 类延菊(1984-),女,博士生。E-mail: leiyanju2009@163.com

\*\* 通讯作者: E-mail: wzhang@ouc.edu.cn

的皱纹盘鲍在 28 d 内没有出现死亡,并表现出慢性中毒症状<sup>[13]</sup>。故本研究选择 0.02 mg/L 作为实验用海水中 Cu 离子浓度的标准,实测值为(0.018±0.001)mg/L。饲料中硫辛酸的添加水平为:0、0.7 和 2.1 g/kg。基础饲料配方参照文献<sup>[14]</sup>,饲料的制作和保存方法参考文献<sup>[15]</sup>。饲料配方及其营养成分见表 1。饲料常规指标,包括粗蛋白、粗脂肪和粗灰分的测定参照 AOAC (1995)。

表 1 基础饲料配方及其营养成分

Table 1 Ingredient and proximate composition of the basal diet

原料 Ingredient	含量 Contents/%
酪蛋白 Casein <sup>a</sup>	25.00
明胶 Gelatin <sup>b</sup>	6.00
糊精 Dextrin <sup>b</sup>	33.50
羧甲基纤维素 CM-cellulose <sup>b</sup>	5.00
海藻酸钠 Sodium alginate <sup>b</sup>	20.00
维生素混合物 Vitamin mix <sup>c</sup>	2.00
无机盐混合物 Mineral mix <sup>d</sup>	4.50
氯化胆碱 Choline chloride <sup>b</sup>	0.50
豆油和鲱鱼油 SO/MFO <sup>e</sup>	3.50
主要成分(干重)Proximate analysis(dry weight)/%	
粗蛋白 Crude protein	30.81
粗脂肪 Crude lipid	3.85
粗灰分 Crude ash	11.01

注:<sup>a</sup>:来自 Sigma 化工有限公司,圣路易斯,密苏里州,美国。<sup>b</sup>:来自国药集团上海化学试剂公司。<sup>c</sup>:每 1 kg 饲料中维生素混合物组成如下:盐酸硫胺素,120 mg;核黄素,100 mg;叶酸,30 mg;盐酸吡哆素,40 mg;烟酸,800 mg;泛酸钙,200 mg;肌醇,4 000 mg;生物素,12 mg;维生素 B12,0.18 mg;维生素 C,4 000 mg;维生素 E,450 mg;维生素 K3,80 mg;维生素 A,100,000 IU;维生素 D,2 000 IU。<sup>d</sup>:每 1 kg 饲料中矿物质混合物组成如下:NaCl,0.4 g;MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,6.0 g;NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O,10.0 g;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,20.0 g;Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O,8.0 g;Fe-citrate,1.0 g;ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,141.2 mg;MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O,64.8 mg;CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O,12.4 mg;CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O,0.4 mg;KIO<sub>3</sub>,1.2 mg;Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O,1.0 mg。<sup>e</sup>:豆油:鲱鱼油=1:1。

Notes: <sup>a</sup>: Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA. <sup>b</sup>: Shanghai Chemical Co., Shanghai, China. <sup>c</sup>: Vitamin mix, each 1 000 g of diet contained: thiamin HCl, 120 mg; riboflavin, 100 mg; folic acid, 30 mg; pyridoxine HCl, 40 mg; niacin, 800 mg; Ca pantothenate, 200 mg; inositol, 4 000 mg; biotin, 12 mg; ascorbic acid, 4 000 mg; B<sub>12</sub>, 0.18 mg; vitamin E, 450 mg; menadione, 80 mg; retinol acetate, 100 000 IU; cholecalciferol, 20 000 IU. <sup>d</sup>: Mineral mix, each 1 000 g of diet contained: NaCl, 0.4 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 6.0 g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10.0 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20.0 g; Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 8.0 g; Fe-citrate, 1.0 g; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 141.2 mg; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 64.8 mg; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 12.4 mg; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.4 mg; KIO<sub>3</sub>, 1.2 mg. Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1.0 mg. <sup>e</sup>: Soybean oil and menhaden fish oil (1:1).

### 1.3 取样与样品处理

养殖实验结束时,禁食皱纹盘鲍 3d,以排空其肠道内容物。然后称重计数后,进行腹足部取血,并收集肝胰脏、肌肉、鳃、外套膜和贝壳,并-80℃保存。血清用液氮速冻后放于-80℃冰箱中保存。

以特定生长率(SGR)表示皱纹盘鲍的生长情况:

$$SGR = (\ln W_t - \ln W_i) / t \times 100\%$$

式中:W<sub>t</sub>、W<sub>i</sub>分别代表终末体重和初始体重(g);t代表时间(d)。

### 1.4 组织 Cu 元素的测定

实验中所用玻璃仪器和塑料试剂瓶均用 1:3 硝酸溶液浸泡过夜,自来水冲洗后用去离子水润洗 3 次。皱纹盘鲍的贝壳、肌肉、外套膜、鳃和肝胰脏冷冻干燥 12 h 后用研钵研碎。称取 100 mg 组织或取 500 μL 血清放入硝化管中,加入 10 mL 的高氯酸,消解 1 h 至澄清溶液,转移定容 100 mL 后用电感耦合等离子体原子发射光谱仪(ICP-OES, VISTA-MPX, 瓦里安,美国)测定 Cu 的含量。

### 1.5 肝胰脏抗氧化指标的测定

解冻肝胰脏样品,加入预冷的匀浆介质(0.86%生理盐水,质量浓度=1/9),在冰浴中匀浆,然后在 4℃、1 700 g 条件下离心 10 min。取上清液,进行测定。

采用考马斯亮蓝法测定肝胰脏匀浆液中的总蛋白质含量<sup>[16]</sup>,以牛血清蛋白作为标准蛋白(南京建成生物工程,蛋白质含量为 0.563 g/L)。

超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定使用黄嘌呤氧化酶法测定<sup>[17]</sup>,一个 SOD 活力单位(U)为每毫克组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 的抑制率达到 50%时所对应的 SOD 量。

过氧化氢酶(CAT)活性的测定采用钼酸钠显色法<sup>[18]</sup>,每毫克组织蛋白每分钟催化分解 1 μmol 底物为一个酶活力单位。

谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)的活性参照 Li 等的方法<sup>[19]</sup>,一个酶活力单位为每毫克样品每分钟使反应体系中的 GSH 浓度下降 1 μmol/L(扣除非酶反应)的酶量。

谷胱甘肽硫转移酶(GST)活性参照 Habig 等的方法<sup>[20]</sup>,每毫克的组织蛋白在 37℃时反应 1 min 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μmol/L 为一个酶活力单位。

还原型谷胱甘肽(GSH)含量用比色法测定,参照 Anderson 等<sup>[21]</sup>。

硫氧还蛋白还原酶(TrxR)的测定采用 DTNB 法测定<sup>[22]</sup>,以单位时间内每毫克蛋白还原的 DTNB 的纳摩尔数为一个酶活性单位。

硫氧还蛋白过氧化物酶(TrxP)可以催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化二硫苏糖醇(DTT),通过测定 240 nm 波长处吸光度的下降速率得 TrxP 活性。每毫克蛋白每分钟催化

1 mmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>降解的酶量为一个酶活性单位。

硫氧还蛋白(Trx)的测定所用的试剂盒为上海恒远试剂公司的 Elisa 试剂盒,在 450 nm 下测其吸光度,具体的操作按照试剂盒说明书严格进行。

### 1.6 肝胰脏氧化指标的测定

丙二醛(MDA)的测定参照Şahin 等的硫代巴比妥酸法<sup>[23]</sup>。蛋白羰基的测定参照 Mecocci 等的方法<sup>[24]</sup>,摩尔吸光系数为 22 000 mol/(L·cm),羰基含量表示为 nmDNPH 每毫克蛋白质。DNA 断裂测定采用 Ching 等的方法<sup>[25]</sup>,DNA 的完整性以 *F* 值表示,公式为: $F=(X_{\text{auDNA}}-X_{\text{ssDNA}})/(X_{\text{dsDNA}}-X_{\text{ssDNA}})$ ,其中 *X* 为荧光值,auDNA 为碱解旋后的 DNA,ssDNA 为单链 DNA,dsDNA 为双链 DNA。

表 2 饲料中的硫辛酸(LA)对 Cu 胁迫下的皱纹盘鲍生长和存活的影响(平均值±标准误,*n*=3)

Table 2 Effects of dietary lipoic acid (LA) on growth and survival of abalone *Haliotis discus hannai* exposure to waterborne Cu for 60 days (mean ± S. E., *n*=3)

饲料组 Dietary LA/g·kg <sup>-1</sup>	初始体重 Initial weight/g	终末体重 Final weight/g	特定生长率 Specific growth rate/%	存活率 Survival/%
0	3.18±0.01	4.49±0.14	0.50±0.08	92.50±2.89
0.7	3.17±0.05	4.31±0.09	0.51±0.03	95.83±0.83
2.1	3.15±0.01	4.46±0.08	0.58±0.02	98.33±0.83
ANOVA				
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	0.376	0.514	0.507	0.150
<i>F</i> 值 <i>F</i> value	1.155	0.745	0.604	2.643

### 2.2 皱纹盘鲍组织中的 Cu 含量

如表 3 所示,饲料中的硫辛酸显著影响皱纹盘鲍血清、肌肉、外套膜、鳃和肝胰脏中的 Cu 含量( $P<0.05$ )。0.7 和 2.1 g/kg 处理组血清、外套膜、鳃和肝胰脏中的 Cu 含量显著低于对照组( $P<0.05$ )。2.1 g/kg

### 1.7 数据分析

采用 SPSS16.0 软件进行单因素方差分析(ANOVA),当差异显著时( $P<0.05$ ),用 Tukey 检验进行多重比较。

## 2 结果

### 2.1 皱纹盘鲍的生长和存活

如表 2 所示,饲料中添加不同水平的硫辛酸对 Cu 胁迫下皱纹盘鲍生长和存活没有显著影响( $P>0.05$ )。在 Cu 胁迫下,皱纹盘鲍的特定生长率(SGR)随着饲料中硫辛酸的增加而升高,但差异不显著( $P>0.05$ )。各处理组的皱纹盘鲍存活率在 92.50%~98.33%。

处理组肌肉中的 Cu 含量显著低于对照组( $P<0.05$ )。0.7 g/kg 处理组肌肉中的 Cu 含量低于对照组,但差异不显著( $P>0.05$ )。各处理组贝壳中的 Cu 含量差异不显著( $P>0.05$ )。

表 3 饲料中的硫辛酸(LA)对 Cu 胁迫下的皱纹盘鲍组织中 Cu 含量的影响(平均值±标准误,*n*=3)

Table 3 Effects of dietary lipoic acid (LA) on Cu accumulation in tissues of abalone *Haliotis discus hannai* exposure to waterborne Cu for 60 days (mean ± S. E., *n*=3)

饲料组 Dietary LA/ g·kg <sup>-1</sup>	血清 Serum/ μg·mL <sup>-1</sup>	贝壳 Shell/ μg·g <sup>-1</sup>	肌肉 Muscle/ μg·g <sup>-1</sup>	外套膜 Mantle/ μg·g <sup>-1</sup>	鳃 Gill/ μg·g <sup>-1</sup>	肝胰脏 Hepatopancreas/ μg·g <sup>-1</sup>
0	10.69±1.41 <sup>a</sup>	5.74±0.36	13.61±0.19 <sup>a</sup>	22.58±0.55 <sup>a</sup>	18.47±0.35 <sup>a</sup>	27.05±1.65 <sup>a</sup>
0.7	4.99±0.49 <sup>b</sup>	6.91±0.40	10.07±1.17 <sup>ab</sup>	15.13±0.78 <sup>b</sup>	14.99±1.06 <sup>b</sup>	9.17±1.76 <sup>b</sup>
2.1	4.56±1.41 <sup>b</sup>	7.08±0.41	8.19±1.40 <sup>b</sup>	15.52±0.50 <sup>b</sup>	13.28±0.54 <sup>b</sup>	13.34±0.72 <sup>b</sup>
ANOVA						
<i>P</i> 值 <i>P</i> value	0.019	0.097	0.029	0.000	0.006	0.000
<i>F</i> 值 <i>F</i> value	8.327	3.528	6.759	45.658	13.726	41.251

注:同列数据中,具有相同上标字母的平均值之间差异不显著(Tukey 检验, $P>0.05$ )。

Note: Means in the same column sharing a common superscript letter were not significantly different ( $P>0.05$ ) as determined by Tukey's test.

### 2.3 皱纹盘鲍肝胰脏中的抗氧化指标

如表4所示,饲料中的硫辛酸显著影响皱纹盘鲍肝胰脏SOD、CAT、GPx、GST活力及GSH的含量( $P < 0.05$ )。0.7 g/kg 硫辛酸处理组的SOD活力显著高于对照组( $P < 0.05$ ),2.1 g/kg 硫辛酸处理组SOD活力高于对照组,但与对照组差异不显著( $P > 0.05$ )。0.7和2.1 g/kg 硫辛酸处理组的CAT、GPx和GST活力

均显著高于对照组( $P < 0.05$ )。0.7 g/kg 硫辛酸处理组的GSH含量显著高于对照组( $P < 0.05$ ),2.1 g/kg 硫辛酸处理组GSH含量高于对照组,但与对照组差异不显著( $P > 0.05$ )。饲料中的硫辛酸对皱纹盘鲍肝胰脏的TrxR、TrxP的活性及Trx的含量无显著影响( $P > 0.05$ )。

表4 饲料中的硫辛酸(LA)对Cu胁迫下的皱纹盘鲍肝胰脏抗氧化相关指标的影响(平均值±标准误, $n=3$ )

Table 4 Effects of dietary lipoic acid (LA) on anti-oxidative parameters in hepatopancreas of abalone *Haliotis discus hannai* exposure to waterborne Cu for 60 days (mean ± S. E.,  $n=3$ )

饲料组 Dietary LA/g · kg <sup>-1</sup>	SOD	CAT	GPx	GST	GSH	Trx	TrxR	TrxP
0	7.34±0.08 <sup>b</sup>	4.40±0.12 <sup>b</sup>	12.15±0.16 <sup>c</sup>	2.21±0.04 <sup>c</sup>	4.86±0.38 <sup>b</sup>	296.20±1.12	2.50±0.02	4.62±0.13
0.7	11.81±0.88 <sup>a</sup>	6.69±0.59 <sup>a</sup>	20.38±0.44 <sup>a</sup>	2.84±0.03 <sup>a</sup>	6.50±0.27 <sup>a</sup>	294.68±0.47	2.57±0.06	4.44±0.26
2.1	9.89±0.58 <sup>ab</sup>	7.09±0.47 <sup>a</sup>	14.35±0.70 <sup>b</sup>	2.59±0.03 <sup>b</sup>	5.67±0.10 <sup>ab</sup>	294.83±1.32	2.52±0.06	4.56±0.14
ANOVA								
P值 P value	0.006	0.010	0.000	0.000	0.015	0.000	0.001	0.788
F值 F value	13.473	10.707	76.425	24.344	9.103	22.419	14.822	0.248

注:SOD,超氧化物歧化酶(U/mg Prot);CAT,过氧化氢酶(U/mg Prot);GPx,谷胱甘肽过氧化物酶(U/mg Prot);GST,谷胱甘肽硫转移酶(U/mg Prot);GSH,还原性谷胱甘肽(mg/g Prot);Trx,硫氧还蛋白(ng/L);TrxR,硫氧还蛋白还原酶(mU/L);TPx,硫氧还蛋白过氧化物酶(U/mg Prot)。同列数据中,具有相同上标字母的平均值之间差异不显著(Tukey检验, $P > 0.05$ )。

Note:SOD, total superoxide dismutase (U/mg Prot); CAT, catalase (U/mg Prot); GPX, glutathione peroxidase (U/mg Prot); GST, glutathione S-transferases (U/mg Prot); GSH, glutathione (mg/g Prot); Trx, thioredoxin(ng/L); TrxR, thioredoxin reductase (mU/L); TrxP, thioredoxin peroxidase (U/mg Prot). Means in the same column sharing a common superscript letter were not significantly different ( $P > 0.05$ ) as determined by Tukey's test.

### 2.4 皱纹盘鲍肝胰脏中的氧化指标

如表5所示,0.7和2.1 g/kg 硫辛酸处理组的肝胰脏MDA含量显著低于对照组( $P < 0.05$ )。2.1 g/kg 硫辛酸处理组蛋白羰基的含量显著低于对照组和0.7 g/kg 处理组( $P < 0.05$ ),0.7 g/kg 硫辛酸处理组的蛋白

羰基含量与对照组无显著差异( $P > 0.05$ )。2.1 g/kg 硫辛酸处理组DNA断裂显著低于对照组( $P < 0.05$ ),0.7 g/kg 硫辛酸处理组与对照组差异不显著( $P > 0.05$ )。

表5 饲料中的硫辛酸(LA)对Cu胁迫下皱纹盘鲍肝胰脏氧化指标的影响(平均值±标准误, $n=3$ )

Table 5 Effects of dietary lipoic acid (LA) on the oxidative parameters in hepatopancreas of abalone *Haliotis discus hannai* exposure to waterborne Cu for 60 days (mean ± S. E.,  $n=3$ )

饲料组 Dietary LA/g · kg <sup>-1</sup>	丙二醛 MDA	蛋白羰基 Protein carbonyl	DNA断裂 DNA strand-breaks(F value)
0	28.37±0.22 <sup>a</sup>	7.99±0.39 <sup>a</sup>	0.12±0.02 <sup>b</sup>
0.7	25.33±0.07 <sup>b</sup>	7.87±0.63 <sup>a</sup>	0.25±0.06 <sup>ab</sup>
2.1	25.86±0.51 <sup>b</sup>	5.04±0.77 <sup>b</sup>	0.37±0.05 <sup>a</sup>
ANOVA			
P值 P value	0.001	0.025	0.023
F值 F value	25.103	7.31	7.591

注:同列数据中具有相同上标字母的平均值之间差异不显著(Tukey检验, $P > 0.05$ )。

Note:Means in the same column sharing a common superscript letter were not significantly different ( $P > 0.05$ ) as determined by Tukey's test.

### 3 讨论

铜在肝脏中大量积累而导致肝细胞的坏死是 Cu 对动物体的毒性表现之一<sup>[26]</sup>。本研究发现 0.7 和 2.1 g/kg 硫辛酸处理组显著降低了皱纹盘鲍血清、肝胰脏、肌肉、外套膜和鳃中的 Cu 含量。硫辛酸(LA)具有螯合金属离子的能力,直接与 Cu 离子螯合形成亲脂性复合物,有利于 Cu 离子的排除和减轻 Cu 离子的危害<sup>[27]</sup>。另外,研究报道 GSH 的半胱氨酸部分的巯基对 Cu 离子具有较高的亲和力,形成具有较高稳定能力的硫醇盐复合物,便于排出体外<sup>[28]</sup>。本研究发现,添加 LA 处理组的肝胰脏 GSH 的含量均显著的高于对照组,由此推测 GSH 在降低组织 Cu 含量中发挥重要作用。

Cu 离子引起的氧化胁迫可以导致活性氧(ROS)的生成,从而降低机体的抗氧化能力,造成机体的氧化胁迫<sup>[29-30]</sup>。先前的研究发现,0.02 mg/L 水体 Cu 离子显著降低了皱纹盘鲍肝胰脏抗氧化酶 SOD、GPx 和 GST 的活力,并导致肝胰脏脂质过氧化水平的升高<sup>[13]</sup>。硫辛酸(LA)是一种抗氧化剂,其抗氧化性主要表现在:清除生物体内过量的 ROS,保护机体免受氧化损伤;可以再生内源性抗氧化剂;修复氧化损伤等<sup>[31-32]</sup>。

在正常生理状况下,机体的营养状态与自由基之间保持着动态平衡。但是如果该平衡受到破坏,就会导致向自由基增多一方产生倾斜,从而造成机体细胞的氧化损伤。机体中的抗氧化酶系统在维持氧自由基平衡方面起着非常重要的作用<sup>[33]</sup>。SOD、CAT、GPx、GST 和 GSH 是贝类内抗氧化酶的重要组分。SOD 可以催化超氧阴离子产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和水,抑制了超氧阴离子向·OH 的转化,是抵抗氧自由基的第一个酶<sup>[34-35]</sup>。CAT 是过氧化物酶的标志性酶,可以催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 转化成水和氧气。两者在抗氧化系统中发挥重要的作用。谷胱甘肽抗氧化系统中的 GSH 是衡量体内抗氧化能力的重要指标。GPx 和 GST 都是以 GSH 为底物的抗氧化酶,可以清除机体的有机过氧化物和过氧化氢,保护细胞免受自由基的毒害<sup>[36]</sup>。本研究发现,在 Cu 离子的胁迫下,饲料中添加 LA 显著提高皱纹盘鲍肝胰脏 SOD、CAT、GPx 和 GST 的活性,以及 GSH 的含量。这表明 LA 可以提高的皱纹盘鲍的抗氧化水平。在哺乳动物的研究中证明,外源 LA 可以再生机体 GSH<sup>[37-38]</sup>。根据刘学忠等<sup>[39]</sup>研究表明,LA 可以穿过血脑屏障,提高组织中 GPx 活性。外源补充 LA 可以明显的减少组织脂质过氧化水平,升高心肌和肝脏 GSH 含量,以及 GPx、GST 和 GR 活性,提高机体抗氧化能力<sup>[40]</sup>。

MDA 是脂质过氧化的主要产物。根据 Chelomin

和 Belcheva 研究发现<sup>[41]</sup>,随着扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)肝胰脏 Cu 积累量的升高,其 MDA 的含量显著升高。Cu 离子引起的氧化胁迫可以导致多种非酶蛋白的改变,其中蛋白羰基化被广泛用作氧化胁迫的标志性指标<sup>[42-43]</sup>。Cu 离子的胁迫还可以导致生物体 DNA 的氧化损伤<sup>[44]</sup>。本研究发现,饲料中添加 0.7 或 2.1 g/kg 的 LA 降低了水体 Cu 胁迫下皱纹盘鲍肝胰脏脂质的过氧化水平、蛋白羰基化水平和 DNA 断裂。由此可见,饲料中添加硫辛酸有效降低了 Cu 胁迫引起的氧化胁迫。推测其原因可能是:首先依赖于 LA 较强的抗氧化能力,其次 LA 和它的代谢产物 DHLA 能够螯合铁、铜、锰、铬、锌等金属,减少自由基的产生,阻断脂质过氧化,从而降低机体的氧化损伤<sup>[45-48]</sup>。

由此可见,饲料中的硫辛酸可以显著提高 Cu 胁迫下的皱纹盘鲍肝胰脏抗氧化水平,显著降低皱纹盘鲍组织 Cu 含量,在一定程度上减轻了肝胰脏蛋白质、DNA 损伤和脂质过氧化。

### 参考文献:

- [1] Sampaio F G, Bojink C D L, Oba E T, et al. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2008, 147(1): 43-51.
- [2] Bremner I. Manifestations of copper excess [J]. *Am J Clin Nutr*, 1998, 67(5): 1069-1073.
- [3] Kadiiska M B, Hanna P M, Mason R P. In Vivo ESR Spin Trapping Evidence for Hydroxyl Radical-Mediated Toxicity of Paraquat and Copper in Rats [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 1993, 123(2): 187-192.
- [4] Bagchi D, Bagchi M, Hassoun E A, et al. Cadmium induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion and hepatic lipid peroxidation in Sprague-Dawley rats [J]. *Biol Trace Elem Res*, 1996, 52(2): 143-154.
- [5] Lemairon P, Matthews A, Forlin L, et al. Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics [J]. *Arch Environ Contour Toxicol*, 1994, 26(2): 191-200.
- [6] 张迎梅,王叶菁,虞闰六,等. 重金属 Cd<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup> 和 Zn<sup>2+</sup> 对泥鳅 DNA 损伤的研究 [J]. *水生生物学报*, 2006, 30(4): 399-403.
- [7] 邓道贵,张桂凤,耿雪侠. Cu<sup>2+</sup> 对日本沼虾幼虾的急性致毒研究 [J]. *淮北煤炭师范学院学报*, 2002, 23(3): 36-38.
- [8] Reed L J. A trail of research from lipoic acid to alpha-keto acid dehydrogenase complexes [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 38329-38336.
- [9] Navariizzo F, Quartacci M F, Sgherri C. Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2002, 40(6): 463-470.
- [10] 田芳,仲伟鉴,应贤平.  $\alpha$ -硫辛酸 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞活性氧水平及 DNA 氧化损伤的影响 [J]. *环境与职业医学*, 2007, 24(2): 180-182.
- [11] Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic

- acid in the prevention of diabetes complications [J]. *Nutrition*, 2001, 17(10): 888-895.
- [12] 吴成龙. 皱纹盘鲍抗氧化基因的克隆及其在营养表达调控下的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [13] Lei Y, Zhang W, Xu W, et al. Effects of waterborne copper and cadmium on antioxidant response, lipid peroxidation and heavy metals accumulation in abalone *Haliotis discus hannai* Ino [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2015, in press.
- [14] Mai K, Zhang W, Tan B, et al. Effects of dietary zinc on the shell biomineralization in abalone *Haliotis discus hannai* Ino [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2003, 283(1): 51-62.
- [15] Zhang W, Mai K, Xu W, et al. Interaction between vitamins A and D on growth and metabolic responses of abalone *Haliotis discus hannai* Ino [J]. *J Shellfish Res*, 2007, 26(1): 51-58.
- [16] Bradford M M. A rapid method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1): 248-254.
- [17] Huang X X, Zhou H Q, Zhang H. The effect of Sargassum fusiforme polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Fish Shellfish Immun*, 2006, 20(5): 750-757.
- [18] Goth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range [J]. *Clin Chim Acta*, 1991, 196(2): 143-151.
- [19] Li L J, Zhang F, Liu X M. Oxidative stress related enzymes in response to chromium (VI) toxicity in *Oxyachinensis* (Orthoptera: Acridoidea) [J]. *J Environ Sci (China)*, 2005, 17(5): 823-826.
- [20] Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B. Glutathione S-transferases. The first step in mercapturic acid formation [J]. *Journal of Biol Chem*, 1974, 249: 7130-7139.
- [21] Anderson M E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples [J]. *Method Enzymol*, 1985, 113: 548-555.
- [22] Oblong J E, Gasdaska P Y, Sherrill K, et al. Purification of human thioredoxin reductase: properties and characterization by absorption and circular dichroism spectroscopy [J]. *Biochemistry*, 1993, 32(28): 7271-7277.
- [23] Şahin M, Sağdıç G, Elmas O, et al. Effect of chronic restraint stress and alpha-lipoic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in rat peripheral organs [J]. *Pharmacol Res*, 2007, 54(3): 247-252.
- [24] Mecocci P, Fanò G, Fulle S, et al. Age dependent increases of oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle [J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(3): 303-308.
- [25] Ching E W K, Siu W H L, Lam P K S, et al. DNA adduct formation and DNA strand breaks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to benzo [a] pyrene: dose- and time-dependent relationships [J]. *Mar Pollut Bull*, 2001, 42(7): 603-610.
- [26] Soli N E. Chronic copper poisoning in sheep. A review of the literature [J]. *Nord Vet Med*, 1980, 32(2): 75-89.
- [27] Ou P, Tritschler H J, Wollff S P. Thiocetic (lipoic acid): a therapeutic metal-chelating antioxidant? [J]. *Biochem Pharmacol*, 1995, 50(1): 123-126.
- [28] Wang W, Ballatori N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions [J]. *Pharmacol Rev*, 1998, 50(3): 335-356.
- [29] Company R, Serafim A, Bebianno M J, et al. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* [J]. *Mar Environ Res*, 2004, 58(2): 377-381.
- [30] Tamás L, Valentovicová K, Halusková L, et al. Effect of cadmium on the distribution of hydroxyl radical, superoxide and hydrogen peroxide in barley root tip [J]. *Protoplasma*, 2009, 236(1-4): 67-72.
- [31] Gerreke P H, Biewenga, Guido R, et al. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid [J]. *Gen Pharmac*, 1997, 29(3): 315-331.
- [32] Lodge J K, Trabermg, Packer L. Thiol chelation of Cu<sup>2+</sup> by dihydro-lipoic acid prevents human low density lipoprotein peroxidation [J]. *Free Rad Med*, 1998, 25(3): 287-297.
- [33] Palacea V P, Brown S B, Baron C I, et al. An evaluation of the relationships among oxidative stress, antioxidant vitamins and early mortality syndrome (EMS) of lake trout (*Salvelinus namaycush*) from Lake Ontario [J]. *Aquat Toxicol*, 1998, 43(2): 259-268.
- [34] Kappus H. Lipid peroxidation: Mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance [M]. //Sies H. *Oxidative Stress*. London: Academic Press, 1985: 273-310.
- [35] Ruas C B G, Carvalho C S, de Araujo H S S, et al. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2008, 71(1): 86-93.
- [36] Bell J G, Adron J W, Cowey C B. Effect of selenium deficiency on hydroperoxide-stimulated release of glutathione from isolated perfused liver of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Br J Nutr*, 1986, 56(2): 421-428.
- [37] Busse E, Zimmer G, Schopohl B, et al. Influence of  $\alpha$ -lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo [J]. *Arzneimittelforsch*, 1992, 42(6): 829-831.
- [38] Eason R C, Archer H E, Akhtar S, et al. Lipoic acid increases glucose uptake by skeletal muscles of obese-diabetic ob/ob mice [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2002, 4(1): 29-35.
- [39] 刘学忠, 崔旭, 卞建春, 等. 硫辛酸在大鼠全脑缺血再灌注损伤中的神经保护作用 [J]. *中国兽医学报*, 2004, 24(4): 388-390.
- [40] 李奕.  $\alpha$ -硫辛酸对耐力训练小鼠力竭运动后谷胱甘肽抗氧化系统的影响 [D]. 上海: 华东师范大学, 2006.
- [41] Chelomin V P, Belcheva N N. Alterations of microsomal lipid synthesis in gill cells of bivalve mollusk *Mizuhopecten yessoensis* in response to cadmium accumulation [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1991, 99(1): 1-5.
- [42] Shacter E, Williams J A, Lim M, et al. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification; examination by western blot immunoassay [J]. *Free Radical Bio Med*, 1994, 17(5): 429-437.
- [43] Je J H, Lee T H, Kim D H, et al. Mitochondrial ATP synthase is a target for TNBS-induced protein carbonylation in XS-106 dendritic cells [J]. *Proteomics*, 2008, 8(12): 2384-2393.
- [44] Gabbianelli R, Lupidi G, Villarini M, et al. DNA damage induced by copper on erythrocytes of gilthead sea bream *Sparus aurata*

- rata and mollusk *Scapharca naequivalvis* [J]. Arch Environ Contam Toxicol, 2003, 45(3): 350-356.
- [45] Devasagayam T P A, Subramanian M, Pradhan D S, et al. Prevention of singlet oxygen-induced DNA damage by lipoate [J]. Chem-BiolInteract, 1993, 86(1): 79-92.
- [46] Scott B C, Aruloma O I, Evans P J, et al. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation [J]. Free Radical Res, 1994, 20(2): 119-133.
- [47] Bonomi F, Cerioli A, Pagani S. Molecular aspects of the removal of the removal of ferritin-bound iron by DL-dihydrolipoate [J]. BBA-Protein Struct M, 1989, 994(2): 180-186.
- [48] Mueller L, Menzel H. Studies on the efficacy of lipoate and dihydrolipoate in the alteration of cadmium<sup>2+</sup> toxicity in isolated hepatocytes [J]. BBA-Mol Cell Res, 1990, 1052(3): 386-391.

## Protective Effect of Dietary $\alpha$ -lipoic Acid on Abalone *Haliotis discus hannai* Ino Against the Toxicity of Waterborne Copper

LEI Yan-Ju, XU Wei, ZHANG Yan-Jiao, ZHOU Hui-Hui, ZHANG Wen-Bing, MAI Kang-Sen

(The Key Laboratory of Aquaculture Nutrition and Feed, Ministry of Agriculture; The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** A feeding trial was conducted to assess the protective effect of dietary  $\alpha$ -lipoic acid (LA) on juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino against the toxicity of waterborne copper (Cu). Aabalone (initial weight  $(3.17 \pm 0.01)$ g) were fed with the diets supplemented with 0, 0.7 and 2.1 g/kg of LA each for 60 days under waterborne Cu exposure (0.02 mg/L) in a static water system. Results showed that the specific growth rate (SGR) of abalone increased with the dietary LA contents. However, no significant difference was found among diets. Compared with that of control, Cu concentration in serum, mantle, gill and hepatopancreas significantly decreased in abalone fed with 0.7 and 2.1 g/kg LA supplemented diets. The abalone fed with 2.1 g/kg LA supplemented diets had significantly lower Cu concentration in muscle than that in the control. Such decrease was not observed in abalone fed with 0.7 g/kg LA supplemented diets. Activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) and the content of glutathione (GSH) in hepatopancreas significantly increased with the dietary LA contents. Compared with that of control, the malondialdehyde (MDA) content in abalone fed with 0.7 and 2.1 g/kg LA supplemented diets significantly decreased. Protein carbonyl content and DNA strand-breaks in abalone fed with 2.1 g/kg LA supplemented diets significantly decreased. The present findings indicated that dietary LA increased the anti-oxidative capacity of abalone and decreased the Cu concentration in tissues. To some extent, dietary LA decreased protein carbonyl content, DNA strand-breaks and the level of lipid peroxidation in hepatopancreas of abalone.

**Key words:** *Haliotis discus hannai*;  $\alpha$ -lipoic acid; copper; anti-oxidation; feed

责任编辑 朱宝象