

饲料中铜离子对斑节对虾血细胞组成、活性和免疫功能的影响

冼健安, 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, 广东 广州, 510631)

摘要: 以不同铜离子添加量(0, 10, 25, 40, 55 和 110 mg/kg)的饲料喂养斑节对虾(*Penaeus monodon*)8 周, 测定对虾的血细胞总数(THC), 并应用流式细胞术测定血细胞中含颗粒细胞(小颗粒细胞和大颗粒细胞)的比例、血细胞凋亡率、活性氧(ROS)含量和酯酶活性。结果显示, 当铜添加量为 10~55 mg/kg 时, 与对照组相比, 对虾的 THC、血细胞凋亡率、ROS 含量和酯酶活性均没有显著的变化($P>0.05$); 铜添加量为 25~110 mg/kg 时, 含颗粒细胞的比例显著提高($P<0.05$); 铜添加量为 110 mg/kg 时, ROS 含量显著高于其他组($P<0.05$), 血细胞凋亡率高于 25 和 55 mg/kg 组($P<0.05$), THC 低于 55 mg/kg 组($P<0.05$), 酯酶活性低于 25mg/kg 组($P<0.05$)。这些结果表明, 适宜的饲料铜含量有利于两类颗粒细胞的生成; 铜添加过量(110 mg/kg)会诱导血细胞 ROS 的产生, 造成氧化损伤, 从而导致凋亡率上升和 THC 下降。综上所述, 在本实验日粮条件下, 针对斑节对虾的血细胞功能, 其饲料中铜适宜添加含量范围为 25~55mg/kg。

关键词: 铜; 斑节对虾(*Penaeus monodon*); 血细胞; 活性; 免疫

中图分类号: S963.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2013)12-0040-07

铜是虾体内多种重要酶和蛋白质的组成成分, 包括起免疫识别和调理作用的酚氧化酶(PO)、起抗氧化作用的铜锌超氧化物歧化酶(Cu, Zn-SOD)以及起携氧作用的血蓝蛋白^[1]。Lee 等^[1]已对斑节对虾(*Penaeus monodon*)幼虾的生长和免疫的铜需求量进行了研究, 但其使用的饲料蛋白源为酪蛋白, 缺乏应用价值。因此本研究以商业化蛋白源作为饲料原料对斑节对虾的铜需求量进行研究, 以期为生产应用提供指导。

以往的研究表明, 在饲料中添加适量的铜离子, 能够显著提高虾类的生长性能和免疫功能^[2-5]。在这些研究中, 关于铜对虾类免疫功能的影响, 均以体液免疫指标为主, 如 PO 和 SOD 活性等。虾类只有非特异性免疫, 可分为细胞免疫和体液免疫, 均主要依赖于其血细胞^[6]。因此, 准确测定血细胞功能的变化有利于全面、准确地评价虾体的免疫水平。但是, 由于研究技术的限制等原因, 目前铜离子对虾类细胞免疫影响的研究甚少, 仅 Lee 等^[1]研究了铜对血细胞总数(THC)和超氧阴离子(O_2^-)含量的影响。

流式细胞术(flow cytometry, FCM)是一种快速、准确地检测单个细胞功能的先进技术, 此技术为细胞水平的研究提供了便捷、可靠的检测平台, 近年来

已逐步应用于虾类血细胞免疫和病理学^[7-12]和环境毒理学^[13-16]的研究中, 但在虾类营养免疫学中的应用仍未开展。本研究首次应用 FCM 研究饲料铜离子对虾类血细胞组成、活性和免疫功能的影响, 为铜在虾类饲料中的添加应用提供细胞免疫学的理论依据, 并为 FCM 在水产动物营养免疫学中的推广应用奠定基础。

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私人养殖场。对虾购入后在实验室系统中驯养 1 周以适应环境, 驯养期间投喂基础饲料(表 1)。养殖桶为圆形塑料桶, 放水约 200L, 每个饲料组 3 个重复。初始平均体质

收稿日期: 2012-06-18; 修回日期: 2012-07-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671628和31302164); 广东省自然科学基金重点项目(S2011020003256和S2012040008093); 中国博士后科学基金资助项目(2012M511829); 广东省教育部产学研结合资助项目(2011B090500009); 广东省科技计划项目(2012B02030-7004); 广东省重点实验室建设项目(2009A060800019)

作者简介: 冼健安(1983-), 男, 广东鹤山人, 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@163.com; 王安利, 通信作者, 教授, 博士生导师, E-mail: wanganl@scnu.edu.cn

量为 (2.98 ± 0.04) g 的对虾随机分配到养殖桶中, 每桶放养 35 尾。

表 1 基础饲料的组成

Tab.1 Composition of the basal diet

原料	含量(%)	营养成分	含量(%)
鱼粉	30.0	粗蛋白	41.12
豆粕	4.0	粗脂肪	8.23
菜籽粕	18.0	灰分	9.15
玉米蛋白粉	20.0		
面粉	20.0		
卵磷脂	1.0		
鱼油	3.0		
维生素 C	0.1		
维生素预混料 ^a	0.5		
矿物质预混料 ^b	2.0		
α -纤维素	1.4		

维生素预混料^a: 广州飞禧水产科技有限公司产品; 矿物质预混料^b(每 kg 饲料): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.817 g; CaCO_3 , 3.28 g; NaH_2PO_4 , 2.96 g; KH_2PO_4 , 6.752 g; CaCl_2 , 1.3328 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.6 g; KCl , 0.448 g; $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0192 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.229 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.8 g; CoCl_2 , 0.0282 g; KI , 0.036 g。添加 α -纤维素至 20 g

DCFH-DA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate) 和 FDA(fluorescein diacetate)购自 Sigma 公司。Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自 Invitrogen 公司。其他试剂为国产分析纯。

1.2 饲料的制备

基础饲料的组成和营养成分见表 1。以硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)为铜源, 设置 6 个饲料组, 分别添加铜离子含量为 0(基础饲料, 对照组), 10, 25, 40, 55 和 110 mg/kg 饲料, 实际测得饲料中的铜离子含量分别为 6.57、15.8、30.7、45.8、61.9 和 115 mg/kg 饲料。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, 用饲料机制成颗粒饲料, 60℃烘箱烘干后, 置于-10℃保存备用。

1.3 对虾的养殖

对虾的养殖在室内循环过滤系统中进行。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。每日投喂量为对虾体质量的 4%, 每两周称质量调整投喂量, 每日投喂 3 次, 分别于 8:30, 11:30 和 18:00 投喂。养殖周期为 8 周。

1.4 血细胞悬液的制备和血细胞总数的测定

养殖 8 周后进行取样。用 2.5 mL 一次性注射器

吸取预冷的抗凝剂(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, 取 20 μL 到血细胞计数板上, 用光学显微镜观察计数测定 THC。余下的血淋巴用预冷的抗凝剂调整细胞浓度约为 1×10^6 个/mL, 用于 FCM 指标的检测。

1.5 流式细胞仪

实验所用流式细胞仪是美国 BD(Becton Dickinson)公司生产的 FACSCalibur, 应用 CellQuest 软件(Becton Dickinson Immuno-cytometry Systems, San Jose, CA)进行实验数据的获取和分析。DCF、FDA 和 Annexin V-FITC 通过第一荧光通道(FL1)获取荧光数据, PI 通过第二荧光通道(FL2)获取荧光数据。每个样品的细胞获取数为 10000 个。

1.6 含颗粒细胞的比例

稀释血淋巴用 200 目筛网过滤后直接上机进行血细胞分群检测。以 FSC 为横坐标、SSC 为纵坐标作散点图, 在散点图上设门划分各个细胞亚群, 分析含颗粒细胞(大颗粒细胞和小颗粒细胞)比例的变化^[10]。

1.7 细胞凋亡率的测定

以 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(Invitrogen)检测血细胞的凋亡率^[7]。实验操作按照试剂盒说明书的步骤进行。血细胞先离心重悬于 $1 \times \text{Annexin V}$ 结合缓冲液中, 调整细胞浓度约 3×10^6 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, 再加入 400 μL $1 \times \text{Annexin V}$ 结合缓冲液, 200 目筛网过滤后立即上机检测。以 Annexin V-FITC 荧光强度为横坐标, PI 荧光强度为纵坐标作散点图, 设门划分细胞类群: 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总比例。

1.8 活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量的测定

以 DCFH-DA 为标记探针检测 ROS 含量的变化^[13]。分别取血细胞悬液 200 μL , 加入 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 避光孵育 30 min, 经 200 目筛网过滤后上机检测。结果以 DCF 荧光量为横坐标, 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

荧光量。

1.9 非特异性酯酶活力的测定

以 FDA 为标记探针检测非特异性酯酶活力的变化。取血细胞悬液 200 μL , 加入 5 $\mu\text{mol/L}$ FDA 避光孵育 30 min, 用 200 目筛网过滤后上机检测。结果以 FDA 荧光量为横坐标, 细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示, 分析细胞的 FDA 平均荧光量。

1.10 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 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD), $P < 0.05$ 确认为差异性显著。

2 结果

2.1 血细胞总数

结果如图 1 所示, 55 mg/kg 添加组的 THC 最高, 为 167.22×10^5 个/mL, 显著高于 110 mg/kg 添加组 ($P < 0.05$), 110 mg/kg 添加组的 THC 最低, 为 104.33×10^5 个/mL。0~55 mg/kg 各添加组之间没有显著差异 ($P > 0.05$)。

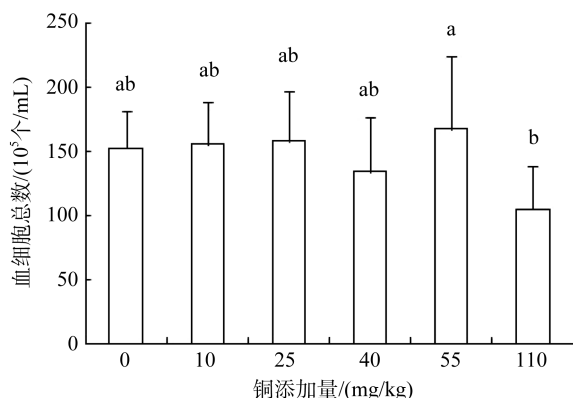


图 1 不同铜添加饲料组对虾的血细胞总数

Fig. 1 Total haemocyte count of shrimp fed with diets containing different levels of supplemental copper. Different superscripts indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$), the same as fig. 2-fig. 5.

2.2 含颗粒细胞的比例

结果如图 2 所示, 对照组对虾的含颗粒细胞(大颗粒细胞和小颗粒细胞)的比例为 79.38%, 显著低于 25~110 mg/kg 添加组 ($P < 0.05$)。55 mg/kg 添加组对虾的含颗粒细胞的比例最高, 为 89.60%, 显著高于对照组和 10 mg/kg 添加组 ($P < 0.05$)。

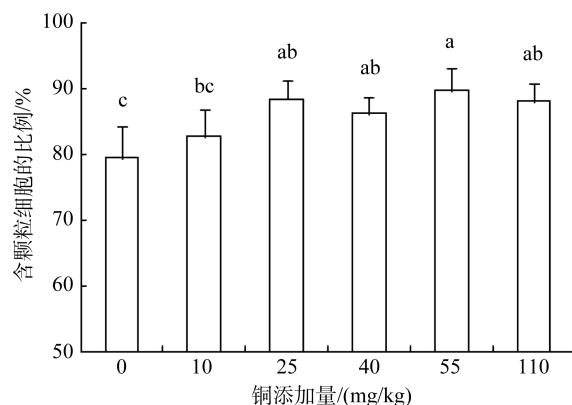


图 2 不同铜添加饲料组对虾的含颗粒细胞比例

Fig. 2 Percentage of granular-containing haemocytes of shrimp fed with diets containing different levels of supplemental copper.

2.3 血细胞凋亡率

结果如图 3 所示, 0~55 mg/kg 添加组对虾的血细胞凋亡率为 4.0%~5.1%, 110 mg/kg 添加组对虾的血细胞凋亡率最高, 为 7.54%, 显著高于 25 和 55 mg/kg 添加组 ($P < 0.05$), 与对照组的差异不显著 ($P > 0.05$)。

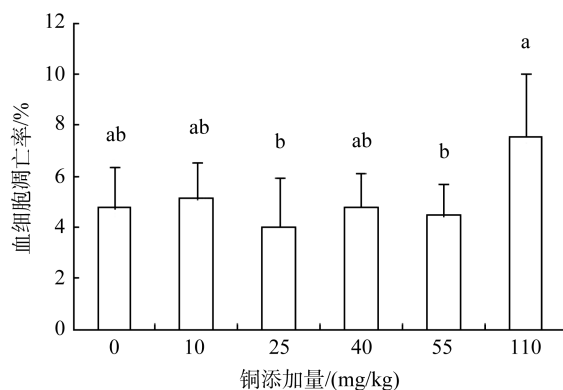


图 3 不同铜添加饲料组对虾的血细胞凋亡率

Fig. 3 Apoptotic haemocyte ratio of shrimp fed with diets containing different levels of supplemental copper.

2.4 ROS 含量

结果如图 4 所示, 110 mg/kg 添加组对虾血细胞的非诱导性 ROS 含量最高, 为 276.4, 显著高于其他浓度组 ($P < 0.05$), 是对照组的 1.37 倍, 是 ROS 含量最低组 (10 mg/kg 添加组) 的 1.77 倍。0~55 mg/kg 各添加组之间没有显著差异 ($P > 0.05$)。

2.5 非特异性酯酶活性

结果如图 5 所示, 110 mg/kg 添加组对虾的酯酶活性最低, 显著低于 25 mg/kg 添加组 ($P < 0.05$), 与对照

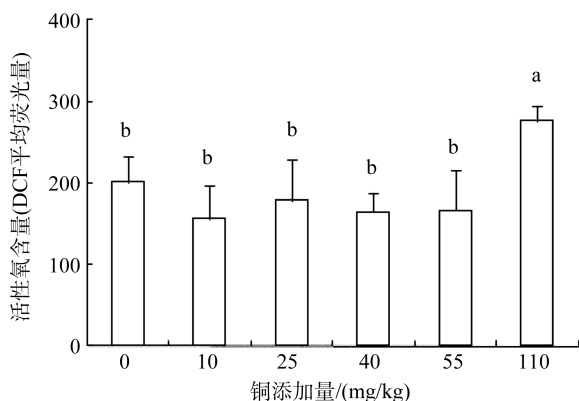


图4 不同铜添加饲料组对虾血细胞的活性氧含量

Fig. 4 ROS production in haemocytes of shrimp fed with diets containing different levels of supplemental copper

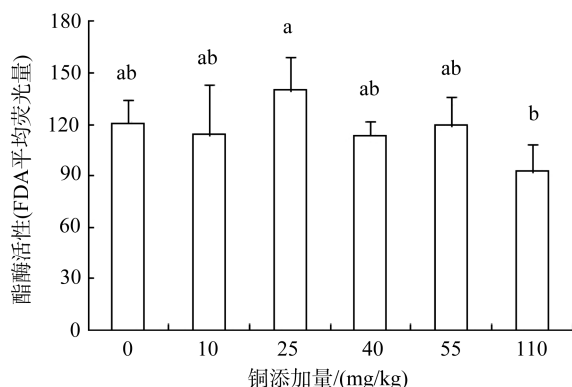


图5 不同铜添加饲料组对虾血细胞的酯酶活性

Fig. 5 Esterase activity in haemocytes of shrimp fed with diets containing different levels of supplemental copper

组和其他添加组之间没有显著差异($P>0.05$)。25 mg/kg 添加组酯酶活性最高, 0~55 mg/kg 各添加组之间没有显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 饲料铜离子对血细胞数量和组成的影响

THC 是反映虾体免疫水平的重要指标, 各种内在和外在因素均会影响虾类血细胞的数量, 如饲料蛋白质水平^[17]、亚硝酸盐胁迫^[14]、重金属胁迫^[18]、病原体感染^[19-20]等。研究表明当 THC 下降到低于一定的阈值时, 便会导致虾的死亡^[18-19]。因此, 一定数量的血细胞是维持虾体正常生理和免疫过程所必需的。Lee 等^[1]的研究结果显示饲料中铜含量为 11.87~32.67 mg/kg 能显著提高斑节对虾的 THC。但在本研究中, 与对照组相比, 各铜添加组对虾的

THC 未见显著变化。推测产生不同结果的原因可能主要有两点: (1) 两研究所用对虾的虾龄不同; (2) 两研究中的饲料蛋白源差异较大。Lee 等^[1]的研究以酪蛋白为唯一的饲料蛋白源, 蛋白质成分单一, 基础铜含量较低(不添加组为 0.92 mg/kg), 其铜缺乏所带来的对 THC 的负面影响可能较为显著; 而本研究中则选用鱼粉、豆粕等商业用蛋白源, 基础铜含量较高(6.57 mg/kg)。

虽然各铜添加组与对照组对虾的 THC 差异不显著, 但仍可发现 110 mg/kg 添加组对虾的 THC 最低, 且显著低于 THC 最高的 55 mg/kg 添加组, 此结果表明饲料中过量的铜离子可能对血细胞的数量造成一定的威胁。Lee 等^[1]的研究也发现饲料中过量的铜离子(实际含量 152.8 mg/kg)会导致血细胞数量的下降。

根据血细胞的大小和内含颗粒的情况, 虾类的血细胞可分为 3 类: 透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞^[9, 21]。3 类血细胞的功能有一定的分工, 其中两类颗粒细胞胞质中均含有颗粒, 是酚氧化酶原系统储存的位置^[22]。研究发现, 各种内在和外在因素都会影响虾类血细胞的组成比例, 如蜕皮^[23]、温度^[24]和盐度^[25]胁迫、浸泡和注射免疫刺激剂^[10, 26]等, 各类细胞的组成比例可能在一定程度上反映了机体的免疫状态。两类颗粒细胞均大于透明细胞, 且含有颗粒, 性质和功能较为相似^[10], 在本研究中作者将两类颗粒细胞定义为含颗粒细胞, 分析饲料铜离子含量对其比例的影响。结果显示当铜添加量 ≥ 25 mg/kg 时, 含颗粒细胞的比例显著提高。此结果表明一定含量的饲料铜离子可诱导颗粒细胞的产生, 这可能与含颗粒细胞的功能有关, 其胞质中的颗粒是酚氧化酶原系统合成和储存的位置, 而酚氧化酶是一种铜蛋白, 其合成必须有铜离子的参与, 铜的缺乏可能会阻碍颗粒的形成, 从而阻碍颗粒细胞的生成。过量添加的铜离子(110 mg/kg)对含颗粒细胞的比例没有造成负面的影响, 但结合 THC 的结果, 其含颗粒细胞的绝对数量仍相对较少。这些结果也显示, 含颗粒细胞的比例可作为衡量饲料中铜离子适宜含量的指标。从本研究的结果来看, 在本实验日粮条件下, 饲料铜离子的适宜添加范围应为 25~55 mg/kg。

3.2 饲料铜离子对血细胞活性的影响

以往的研究显示, 在正常生理状态下, 虾体血细胞中存在一定比例的凋亡细胞, 这可能是血细胞新陈代谢的正常表现^[7]。研究也发现, 当虾受到环境胁迫

或病原体感染时,血细胞的凋亡率会显著上升^[14, 27]。这些研究表明血细胞凋亡状况是反映虾体免疫水平的敏感指标。本研究首次研究饲料不同铜离子水平对血细胞凋亡的影响,结果显示各铜添加组与对照组之间没有显著差异,但可发现 110 mg/kg 的铜添加过量组的凋亡率提高,显著高于 25 和 55 mg/kg 添加组。此结果与 THC 的结果较吻合,表明过量的铜离子可能对血细胞产生一定的毒性作用,诱导血细胞凋亡,从而造成 THC 下降。

3.3 饲料铜离子对血细胞免疫功能的影响

酯酶是溶酶体酶的一种,参与降解被血细胞吞噬的病原体、异物和坏死细胞等,广泛存在于各类细胞的细胞质中^[28]。FDA 能自由通过完整的细胞膜,在胞内被酯酶酶切而产生荧光性、膜不透性的产物,这种荧光物质能存留于细胞膜完好的细胞内,但在细胞膜不完整的死细胞中很快散失,通过检测 FDA 荧光强度便可反映细胞的酯酶活性和细胞膜完整性。本研究结果显示,各铜添加组与对照组之间的酯酶活性没有显著差异,仅 110 mg/kg 添加组显著低于 25 mg/kg 添加组,与 THC 和血细胞凋亡率的结果较一致,因此铜过量组酯酶活性的下降可能是凋亡细胞数量的增加所导致的。

ROS 是一类具有强氧化性的物质,包括 O_2^- 、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基 $[·OH]$ 和单线态氧($·O_2$)等,在免疫杀菌过程中起着十分重要的作用^[29]。Lee 等^[1]研究了铜对斑节对虾血细胞 O_2^- 含量的影响,各铜添加组与对照组之间没有显著差异,但铜过量组(实际含量 152.8 mg/kg)低于 11.87~32.67 mg/kg 组,该作者认为此结果表明 11.87~32.67 mg/kg 铜离子在一定程度上提高了虾体的免疫功能。但 O_2^- 只是 ROS 的其中一种,仅测定其含量不能全面地反映机体的 ROS 抗菌水平。因此,作者建立了应用 FCM 测定虾类血细胞总 ROS 含量的方法^[13]。另一方面,ROS 会被各种环境胁迫所诱导,从而对机体自身造成氧化伤害^[16]。因此,有学者认为,ROS 的少量提高才是免疫水平提高的表现,ROS 的过量提高则是受到胁迫的表现^[30-31]。但是,如何界定其含量是否过高,目前仍没有定论。因此,目前仅以 ROS 含量的变化较难反映机体的真实状态,应结合其他指标综合探讨。本研究结果显示,110mg/kg 添加组对虾的血细胞 ROS 含量显著提高,表明过量的铜离子诱导了血细胞 ROS 的产生。在该铜浓度下,细胞活性和 THC 均最低,表明此提高的 ROS 含量可能超过了血细胞的

承受能力,对细胞产生一定的氧化损伤,诱导细胞的凋亡。

3.4 流式细胞术的应用

由于技术限制等原因,以往虾类营养免疫学研究均以体液免疫研究为主^[3-4, 17, 32-33],本研究充分展示了 FCM 在虾类细胞免疫研究中的适用性和优越性,其推广应用将填补虾类营养免疫学在细胞免疫方面的空白,并可更全面、综合地反映机体的免疫水平以及进行营养免疫学评价。

参考文献:

- [1] Lee M H, Shiao S Y. Dietary copper requirement of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses[J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 13: 259-270.
- [2] 刘发义, 梁德海, 孙凤, 等. 饲料中的铜对中国对虾的影响[J]. 海洋与湖沼, 1990, 21(5): 404-410.
- [3] 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, 2003, 10(6): 526-528.
- [4] 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.
- [5] 周萌, 王安利, 曹俊明. 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, 2010, 41(4): 577-582.
- [6] Johansson M W, Keyser P, Sritunyalucksana K, et al. Crustacean haemocytes and haematopoiesis[J]. Aquaculture, 2000, 191: 45-52.
- [7] 冼健安, 王安利, 苗玉涛. 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, 2012, 42(1): 9-14.
- [8] 冼健安, 王安利. 流式细胞术与显微观察对罗氏沼虾血细胞的比较研究[J]. 水生态学杂志, 2009, 2(5): 90-94.
- [9] 孙敬锋, 冼健安, 张铁军, 等. 流式细胞术比较研究三种对虾血细胞的分群[J]. 淡水渔业, 2008, 38(3): 18-22.
- [10] 冼健安, 王安利, 苗玉涛, 等. 流式细胞术检测脂多糖对罗氏沼虾血细胞活性和免疫功能的影响[J]. 海洋学报, 2011, 33(1): 170-177.
- [11] Xian J A, Wang A L, Tian J X, et al. Morphologic,

- physiological and immunological changes of haemocytes from *Litopenaeus vannamei* treated by lipopolysaccharide[J]. *Aquaculture*, 2009, 298: 139-145.
- [12] Yip E C R, Wong J T Y. Fluorescence activated cell-sorting of haemocytes in Penaeid prawns[J]. *Aquaculture*, 2002, 204: 25-31.
- [13] 冼健安, 苟妮娜, 陈晓丹, 等. 流式细胞术检测虾类血细胞活性氧含量方法的建立[J]. *海洋科学*, 2012, 36(2): 29-33.
- [14] Xian J A, Wang A L, Chen X D, et al. Cytotoxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis[J]. *Aquaculture*, 2011, 317: 240-244.
- [15] 冼健安, 王安利, 苗玉涛, 等. 镉对凡纳滨对虾离体血细胞的毒性影响[J]. *水生态学杂志*, 2012, 33(1): 112-115.
- [16] Chang M, Wang W N, Wang A L, et al. Effects of cadmium on respiratory burst, intracellular Ca^{2+} and DNA damage in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2009, 149: 581-586.
- [17] 夏苏东, 李勇, 王文琪, 等. 蛋白质营养对高密度养殖凡纳滨对虾生长与免疫力的影响[J]. *海洋科学*, 2009, 33(5): 51-58.
- [18] Lorenzon S, Francese M, Smith V J, et al. Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2001, 11: 459-472.
- [19] Lorenzon S, DE Guarrini S, Smith V J, et al. Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans *in vivo*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1999, 9: 31-50.
- [20] Li C C, Yeh S T, Chen J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25: 853-860.
- [21] 李光友, 王青. 中国对虾血细胞及其免疫研究[J]. *海洋与湖沼*, 1995, 26(6): 591-597.
- [22] 孟凡伦, 张玉臻, 孔健, 等. 甲壳动物中的酚氧化酶原激活系统研究评价[J]. *海洋与湖沼*, 1999, 30(1): 110-116.
- [23] Liu C H, Yeh S T, Cheng S Y, et al. The immune response of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio infection* in relation with the moult cycle[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16: 151-161.
- [24] Wang F I, Chen J C. The immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* under temperature stress[J]. *Aquaculture*, 2006, 258: 34-41.
- [25] Wang F I, Chen J C. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 20: 671-681.
- [26] Su B K, Chen J C. Effect of saponin immersion on enhancement of the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 24: 74-81.
- [27] Sahul Hameed A S, Sarathi M, Sudhakaran R, et al. Quantitative assessment of apoptotic hemocytes in white spot syndrome virus (WSSV)-infected penaeid shrimp, *Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*, by flow cytometric analysis[J]. *Aquaculture*, 2006, 256: 111-120.
- [28] Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Renault T. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16: 501-512.
- [29] 孙敬锋, 吴信忠. 贝类血细胞及其免疫功能研究进展[J]. *水生生物学报*, 2006, 30(5): 601-607.
- [30] Yeh S T, Liu C H, Chen J C. Effect of copper sulfate on the immune response and susceptibility to *Vibrio alginolyticus* in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 17: 437-446.
- [31] Tseng I T, Chen J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 17: 325-333.
- [32] 朱春华, 李广丽, 吴天力, 等. L-精氨酸对凡纳滨对虾体液免疫因子的影响[J]. *海洋科学*, 2009, 33(2): 55-59.
- [33] 王兴强, 马甦, 曹梅, 等. 二溴海因和碳水化合物水平对凡纳滨对虾生长和免疫的影响[J]. *海洋科学*, 2010, 34(4): 25-31.

Effects of dietary copper on subpopulation composition, viability and immune functions of haemocytes in black tiger-shrimp (*Penaeus monodon*)

XIAN Jian-an, WANG An-li

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

Received: Jun., 18, 2012

Key words: copper; *Penaeus monodon*; haemocytes; viability; immunity

Abstract: The black tigershrimps (*Penaeus monodon*) were fed with diets supplemented copper at different concentrations (0, 10, 25, 40, 55 and 110 mg/kg) for 8-week, and the total haemocyte count (THC), percentage of cells contained granular, apoptotic cell ratio, reactive oxygen species (ROS) production and esterase activity were analyzed. The results showed that THC, apoptotic cell ratio, ROS production and esterase activity were not affected by 10~55 mg/kg supplemental Cu, compared to the control group. Percentage of cells contained granular was significantly increased when the shrimps were fed with diets containing 10~55 mg/kg supplemental Cu. In shrimps fed with diets containing 110 mg/kg supplemental Cu, the ROS production in haemocytes was significantly increased, and the apoptotic cell ratio was higher than that of the shrimps fed with diets supplemented with 25 and 55 mg/kg Cu, while THC was lower than that of the shrimps fed with diets supplemented with 55 mg/kg Cu, and the esterase activity was lower than that of the shrimps fed with diets supplemented with 25 mg/kg Cu. These results indicate that adequate dietary Cu concentration could increase the number of cells contained granular. Excess supplemental Cu (110 mg/kg) will induce the production of ROS in haemocytes, and then induce apoptosis and THC decrease by oxidative damage. In conclusion, the adequate supplemental Cu concentration in diet for haemocyte functions in *P. monodon* is 25~55 mg/kg.

(本文编辑: 谭雪静)