

β -胡萝卜素对中华绒螯蟹卵巢发育及免疫学指标的影响

袁春营, 崔青曼

(天津科技大学 海洋科学与工程学院, 天津 300457)

摘要:通过投喂添加 β 胡萝卜素质量比分别为 50, 100 mg/kg 的实验饲料, 饲养中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 60 d, 探讨了对中华绒螯蟹卵巢发育及免疫学指标的影响。结果表明, β 胡萝卜素能够明显增加中华绒螯蟹的质量, 提高养殖成活率; 极显著提高中华绒螯蟹血细胞吞噬百分率 ($P < 0.01$); 显著或极显著降低血清超氧化物歧化酶活力 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 极显著增加卵巢中总类胡萝卜素的含量 ($P < 0.01$); 显著增加肝胰腺中总类胡萝卜素的含量 ($P < 0.05$); 较明显增加中华绒螯蟹卵巢指数和卵母细胞直径, 但对于肝胰腺指数、卵巢和肝胰腺蛋白质影响较小。

关键词: β -胡萝卜素; 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*); 卵巢发育; 血细胞吞噬百分率; 超氧化物歧化酶

中图分类号: S965

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2007)06-0025-04

甲壳动物胚胎和开口前仔体发育都属于卵黄营养, 其胚胎仔体发育、生长所需能量和营养完全依赖卵黄, 因此卵的质量往往决定亲体的孵化率及子代的质量和成活率。所以供应充足的营养和能量对亲体性腺正常发育、适时产卵、卵巢及卵的质量和营养状况至关重要。卵黄主要由蛋白质、脂类、类胡萝卜素、碳水化合物、游离脂肪酸、核苷酸和核酸组成。已有资料报道了蛋白质、脂类、维生素 E、维生素 C 等对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 卵巢发育的作用^[1-3]。而类胡萝卜素是广泛存在于自然界中的各种动植物及微生物体中的一类由异戊二烯残基组成的共轭双键长链类萜化合物, 同其他动物一样, 水产动物体内不能合成类胡萝卜素, 其所需类胡萝卜素只能从食物中得到, β 胡萝卜素是自然界中存在的 600 多种类胡萝卜素中最为重要的具有维生素 A 活性的一种, 具有广泛的生理功能^[4]。为此作者研究了 β 胡萝卜素对中华绒螯蟹卵巢发育及免疫学指标的影响, 以期为进一步研究中华绒螯蟹亲体的生殖营养提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

实验用蟹购自唐海养蟹场, 选择附肢完整、个体较均匀的健康中华绒螯蟹用于实验, 生物学参数见表 1。

1.1.2 饲料配制

选用优质鱼粉、豆饼、玉米粉、麦麸等为原料, 添加复合维生素和矿物质等配成基础饲料, 以基础饲料为对照, 分别在基础饲料中添加不同量 β 胡萝卜素 (化学纯), 制成颗粒饲料。基础饲料主要营养成分如下: 粗蛋白 37.68%, 粗脂肪 6.54%, 粗纤维 3.65%, 无氮浸出物 33.42%, 粗灰分 7.31%。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组和饲养管理

实验分两个实验组 ($\beta 1, \beta 2$) 和一个对照组, 实验组分别添加 β 胡萝卜素 50, 100 mg/kg。每组 15 只中华绒螯蟹, 分别饲养于 $3 \text{ m} \times 3.5 \text{ m} \times 1 \text{ m}$ 的水泥池中, 池水深度 40~50 cm, 各处理组设 2 个平行样。每天上午 9:00 和下午 16:00 各饲喂一次, 投喂量为中华绒螯蟹体质量的 3%, 实验期间养殖水体 pH 为 7.2~7.4, 溶解氧质量浓度为 6.2~6.8 mg/L, 实验结束后分别称质量并计算平均体质量增长率: 平均体质量增长率 = [(结束平均体质量 - 起始平均体质量) / 起始平均体质量] \times 100, 同时统计成活率。

收稿日期: 2005-04-21; 修回日期: 2005-07-27

基金项目: 河北省教委资助项目 (2004319)

作者简介: 袁春营 (1965-), 男, 河北徐水人, 副教授, 电话: 13920740886, E-mail: cqm2006@yahoo.com.cn

1.2.2 样品制备

各组统一在实验后 60 d 取样, 血淋巴用于免疫学指标测定, 组织用于其它指标测定。

1.2.2.1 血淋巴采集

将中华绒螯蟹第二对关节处折断取血淋巴, 部分制成抗凝血, 部分置于 Eppendorf 管中 4℃ 过夜, 经冷冻高速离心机离心后吸出血清待测。

1.2.2.2 组织摘除

无菌操作解剖取出卵巢及肝胰腺, 分别称质量, 计算如下生物学指标:

卵巢指数计算: (卵巢质量/体质量) × 100

肝胰腺指数计算: (肝胰腺质量/体质量) × 100

1.2.3 指标测定

本研究测定的指标有卵母细胞直径、卵巢和肝胰腺中的蛋白质、卵巢和肝胰腺中的总类胡萝卜素含量、血细胞吞噬百分率和超氧化物歧化酶。

1.2.3.1 卵母细胞直径测量

剪下一小块卵巢置于波恩氏液中固定 24 h, 系列酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片、苏木精伊红染色, Olympus 显微镜观察^[5], 测量卵母细胞直径, 细胞直径以(细胞短径+ 细胞长径)/2 计算, 每个切片测定 30 个卵母细胞。

1.2.3.2 蛋白质质量比测定

准确称取一定量的肝胰腺组织或卵巢组织, 定量加入 0.5 mol/L NaCl+5 mmol/L EDTA 溶液, 匀浆后 4℃ 下 4 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 分装后置于 -20℃ 低温保存。考马斯亮蓝法测蛋白质质量比, 蛋白质质量比用每克组织中含有的蛋白质质量(mg)来表示。

1.2.3.3 类胡萝卜素质量比测定

称取 1.0 g 左右肝胰腺或卵巢(已烘干), 加入石油醚浸提 3 h, 取出, 定容, 以水为对照测定其 OD₄₅₀ (OD₄₅₀ 为波长 450 nm 下的光密度值, 记为 S₁), 取试管一只, 加入胡萝卜素应用液(精确称取 β 胡萝卜素 25 mg, 用石油醚溶解并稀释到 50 mL, 再稀释到 10

mg/L) 2.5 mL, 以水为对照测定 OD₄₅₀ (记为 S₂)。按照下列公式进行计算:

类胡萝卜素总质量比(mg/g) = (S₁ × 10 × 稀释倍数) / (S₂ × W × 1 000), 其中 W 为样品干质量。

1.2.3.4 血细胞吞噬百分率

采用 TTC 还原法。将 TTC (氯化三苯四氮唑蓝) 用 Hank's 液配成 0.01% 的溶液, 取 TTC 0.5 mL 与抗凝血 0.5 mL 混匀后共同孵育(28℃, 1 h), 常规涂片后甲醇固定, 用 Wright's 染色 5 min, 观察吞噬结果。以每 100 个血细胞中吞噬 TTC 细胞数为吞噬百分率。

1.2.3.5 超氧化物歧化酶(SOD)活性

用南京建成生物研究所生产的试剂盒测定 SOD, 具体测定方法参照说明书。SOD 酶活性定义为每立方厘米反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个亚硝酸盐单位(U/mL)。

1.2.4 数据统计与处理

采用 SPSS 统计软件处理数据, 结果以 $\bar{x} \pm SE$ 表示。

2 实验结果

2.1 β 胡萝卜素对中华绒螯蟹平均质量增长率、成活率的影响

实验结束后逐个称质量, 并统计成活率, 结果见表 1。从表 1 可看出, 饲料中添加 β 胡萝卜素能够明显促进中华绒螯蟹体质量增加, 提高成活率。

2.2 β 胡萝卜素对中华绒螯蟹卵巢指数、肝胰腺指数、卵母细胞直径、卵巢蛋白及肝胰腺蛋白的影响

结果见表 2。从表 2 可看出 β 胡萝卜素添加组的中华绒螯蟹卵巢指数、卵母细胞直径均有增加, 但与对照组相比, 未达显著水平, 肝胰腺指数、卵巢及肝胰腺蛋白质等指标变化不明显。

表 1 不同实验组中华绒螯蟹平均体质量增长率、成活率的比较

Tab. 1 The comparison of weighth gain and survival rate of *E. sinensis* in different experimental groups

组别	起始体质量(g)	结束体质量(g)	平均体质量增长率(%)	成活率(%)
对照组	46.37 ± 6.90	63.96 ± 9.68	37.93	93.3
β1	46.68 ± 6.93	66.70 ± 10.09	42.89	100
β2	45.34 ± 6.54	67.05 ± 9.71	47.88	100

表 2 不同实验组中华绒螯蟹卵巢指数、肝胰腺指数、卵母细胞直径、卵巢及肝胰腺蛋白质的比较

Tab. 2 The comparison of ovarian index, hepatopancrea index, oocyte diameter, ovarian and hepatopancrea protein of *E. sinensis* in different experimental groups

组别	卵巢指数 (%)	肝胰腺指数 (%)	卵母细胞直径 (μm)	卵巢蛋白质质量比 (mg/g)	肝胰腺蛋白质质量比 (mg/g)
对照组	7.83±2.92	5.44±0.85	290.18±21.89	317.16±33.92	109.54±17.23
β1	8.02±0.96	5.46±0.71	297.08±17.18	318.95±39.70	108.91±19.42
β2	8.03±1.18	5.38±0.51	298.33±21.84	321.77±38.71	111.20±17.04

2.3 β-胡萝卜素对中华绒螯蟹卵巢及肝胰腺中的总类胡萝卜素质量比、血细胞吞噬百分率、超氧化物歧化酶的影响
β-胡萝卜素对中华绒螯蟹组织总类胡萝卜素质量比及血淋巴免疫学指标的影响见表 3。从表 3 可

看出 β-胡萝卜素极显著增加卵巢中总类胡萝卜素质量比 ($P < 0.01$), 显著增加肝胰腺中总类胡萝卜素质量比 ($P < 0.05$), 极显著提高中华绒螯蟹血细胞吞噬百分率 ($P < 0.01$), 显著提高超氧化物歧化酶活力 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 3 不同实验组中华绒螯蟹卵巢及肝胰腺中的总类胡萝卜素质量比、血细胞吞噬百分率、超氧化物歧化酶的比较

Tab. 3 The comparison of total carotenoids in ovary and hepatopancrea, phagocytic percentage of blood cells, activities of SOD of *E. sinensis* in different experimental groups

组别	卵巢中类胡萝卜素质量比 (mg/g)	肝胰腺中类胡萝卜素质量比 (mg/g)	血细胞吞噬百分率 (%)	超氧化物歧化酶活力 (U)
对照组	2.75±0.39	1.34±0.38	28.09±2.82	119.02±10.85
β1	3.16±0.32**	1.65±0.37*	31.60±2.36**	107.85±12.49*
β2	3.31±0.32**	1.68±0.37*	32.56±2.38**	103.19±13.01**

注: 与对照组相比, * 表示显著性差异 ($P < 0.05$), ** 表示极显著性差异 ($P < 0.01$)

3 讨论

β-胡萝卜素作为维生素 A 源转化成维生素 A 满足动物对维生素 A 的需要, 避免了过多维生素 A 的摄入而导致的胚胎畸形^[6], 此外还具有许多独特的营养生理功能, 改善水产动物的体色和肉质, 是动物体内一种重要的生理性抗氧化剂, 能有效地扑灭多种活性氧成分和自由基, 保护机体免受氧化损害, 从而提高动物非特异免疫机能, 还可提高水产动物体质量增长率及繁殖力。

SOD 是重要的抗氧化酶之一, 具有催化超氧化物阴离子自由基 O_2^- 的歧化反应, 清除自由基, 阻止自由基引起连锁反应, 对机体起保护作用。因此 SOD 可作为机体非特异性免疫指标, 常用来评判免疫刺激剂对机体非特异性免疫力的影响。本实验添加 β-胡萝卜素后, SOD 活性显著或极显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 这主要是 β-胡萝卜素自身发挥了抗氧化作用, 使自由基在发挥作用前被清除, 从而导致诱导性酶——SOD 活性降低; 此外中华绒螯蟹血

细胞吞噬百分率极显著升高 ($P < 0.01$), 很显然 β-胡萝卜素充分发挥了提高机体免疫力的作用, 可能是导致养殖中华绒螯蟹成活率由 93.3% 提高到一个重要原因。同样 Amar 等^[7] 在虹鳟饵料中添加 β-胡萝卜素养殖 12 周后, 明显提高了鱼类特异和非特异免疫机能。

向泉等^[8] 研究认为, 在花玛丽鱼的生长过程中, 类胡萝卜素能促使其性腺发育, 在雌鱼的卵巢中沉积, 促进卵黄成熟, 加深卵黄颜色; 饲料中添加质量分数为 0.1% 的虾红素网养虹鳟, 发现实验组的鱼成熟后所产卵的受精率、发眼率及出苗率均明显高于对照组^[9]; 津岛己幸等研究后指出 β-胡萝卜素投喂量与盘鲍中肠腺和肌肉组织中的胡萝卜素含量成正比。β-胡萝卜素提高动物繁殖性机能的机制可能为: β-胡萝卜素作为动物体内的一种生理性抗氧化剂, 能够抑制脂质过氧化, 从而保护了卵巢和卵细胞免受氧化损害, 有助于卵巢细胞生成类固醇, 此外 β-胡萝卜素能刺激孕酮的产生, 与雌激素、黄体素的合成有关^[10]。本研究表明 β-胡萝卜素的添加显著增加卵巢和肝胰腺中

总类胡萝卜素的含量,较明显增加中华绒螯蟹的卵巢指数、卵母细胞直径,但对于肝胰腺指数、卵巢和肝胰腺蛋白质等指标作用不明显。

研究证实中华绒螯蟹饲料中添加 β 胡萝卜素,可明显提高中华绒螯蟹的体质量增长和成活率,显著增强机体的非特异免疫机能,显著促进类胡萝卜素在卵巢和肝胰腺中的沉积,较好地促进了中华绒螯蟹的卵巢发育。

参考文献:

- [1] 艾春香,陈立侨,周忠良. 维生素 C、E 对中华绒螯蟹生殖性能的影响[J]. 水产学报, 2003, 27(1): 62-68.
- [2] 江洪波. 中华绒螯蟹蛋白质营养生理研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2003. 55-66.
- [3] Wen X B, Chen L Q, Zhou Z L, *et al.* Reproduction response of Chinese mitten handed crab (*Eriocheir sinensis*) fed different sources of dietary lipid[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2001, 131A: 675-681.
- [4] 向泉,周兴华,唐龙碧. 类胡萝卜素在水产动物养殖上的应用[J]. 粮食与饲料工业, 2002, 3: 27-29.
- [5] 芮菊生,杜懋琴,陈海明,等. 组织切片技术[M]. 北京: 人民教育出版社, 1980. 98-107.
- [6] Peterka M. Different embryo toxic effect of vitamin A and beta-carotene detected in the chick embryo[J]. *Acta Chir Plast* 1997, 39(4): 1-129.
- [7] 向泉,何利君,曾学润,等. 类胡萝卜素对花玛丽鱼体色影响的最适量研究[J]. 四川畜牧兽医学院学报, 2000, 14(2): 6-10.
- [8] 朱秉仁,张艳萍. 刘家峡水库网箱养殖虹鳟商品鱼着色试验[J]. 水利渔业, 1998, 18(6): 45-46.
- [9] Amar E C, Kiron V, 佐藤秀一,等. ニジマスの免疫反応に対する β -胡萝卜素カロテニの添加効果[J]. *Fish Sci*, 2000, 66(6): 1068-1075.
- [10] 李永义,陈代文. β 胡萝卜素的营养[J]. 中国饲料, 2001, 1: 26-28.

The effect of β carotene on ovary development and immunological parameters of *Eriocheir sinensis*

YU AN Chur-ying, CUI Qing-man

(College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Received: Apr. , 21, 2005

Key words: β -carotene; *Eriocheir sinensis*; ovary development; phagocytic percentage of blood cells; Superoxide dismutase

Abstract: The study was conducted to determine the effects of β -carotene on ovary and immunological parameters of *Eriocheir sinensis* after a 60 day feeding trial. The experimental dietary levels of β -carotene were 50, 100 mg/kg. The result showed that β -carotene could increase weight of *E. sinensis* obviously. raise the survival rate, improve significantly the phagocytic percentage of blood cells of *E. sinensis* ($P < 0.01$), decline significantly superoxide dismutase (SOD) activities in serum ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), increase significantly total carotenoids in ovary ($P < 0.01$), increase significantly total carotenoids in hepatopancrea ($P < 0.05$), increase ovary index and oocyte diameter more obviously. But it had less influence on hepatopancrea index, ovary and hepatopancrea protein.

(本文编辑: 刘珊珊)