

投喂不同油脂饲料对中华绒螯蟹免疫、代谢及耐低氧性能的影响

邱仁杰 成永旭* 吴旭干 杨筱珍 王春 杨志刚 佟蕊 赵亚婷

上海海洋大学水产与生命学院 农业部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 210306

摘要:为研究饲料中添加鱼油和豆油对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 成蟹生长、免疫、代谢和耐低氧性能的影响,配制了添加不同比例鱼油和豆油的3种蟹用饲料,添加3%鱼油饲料组、3%豆油饲料组、3%鱼油和豆油混合组(1:1,质量比),将其分别投喂中华绒螯蟹115 d后测量蟹体重、壳长和壳宽的变化,再将其放入溶解氧(dissolved oxygen, DO)为(9.06 ± 0.06) mg/L和(2.57 ± 0.44) mg/L的水体中,测定其免疫、代谢指标及耐低氧性能的变化。结果发现:投喂添加3种不同油脂饲料的中华绒螯蟹各组间体重无显著性差异;低氧胁迫对中华绒螯蟹代谢指标影响较大;添加鱼油和豆油混合油饲料组中华绒螯蟹血细胞密度、血蓝蛋白含量及超氧化物歧化酶、酸性和碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶的活性都为最高,说明鱼油与豆油混合添加对中华绒螯蟹免疫和抗氧化能力有促进作用,并增加其耐低氧能力。

关键词:中华绒螯蟹;脂肪酸;免疫;低氧

中图分类号:Q955 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2012)01-78-10

Effect of Dietary Lipid Sources on the Immune Function, Metabolism and Resistance to Hypoxia in Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*)

QIU Ren-Jie CHENG Yong-Xu* WU Xu-Gan YANG Xiao-Zhen WAN Chun
YANG Zhi-Gang TONG Rui ZHAO Ya-Ting

Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Fisheries and Life Institute,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The objective of this study is to measure the effect of supplement of fish oil, soybean oil and fish and soybean mixture oil (1:1) in diets on the growth, immune function, metabolism and resistance to hypoxia in Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*). The three diets for adult crabs with 3% fish oil, 3% soybean oil and 3% mixture oil were prepared. These diets were used for feeding crabs for 115 days. Crab weights, lengths and widths were measured. And then the crabs were placed into normal DO level (9.06 ± 0.06 mg/L) and hypoxia water (2.57 ± 0.44 mg/L), and their immune and metabolic indices were measured. We found that the hypoxia stress evidently influenced the metabolism of crab. The weights of crab were not significantly affected by the variation of oil lipid in diets; the hemocyte count, hemocyanin content, the activities of SOD, ALP, ACP and

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30871927),上海科技兴农推广项目(沪农科推字 2009D2-1),国家农业转化基金项目(No. 2009GB2C300156);

* 通讯作者, E-mail: yxcheng@shou.edu.cn;

第一作者介绍 邱仁杰,男,博士研究生;研究方向:水产动物营养与免疫;E-mail: qiurenjie1981@163.com。

收稿日期:2011-07-15,修回日期:2011-11-11

LDH of the crab were the highest in the mixture oil group (1:1), so the supplement of fish and soybean oil (1:1) in diets evidently improved the crabs' immune and antioxidant ability, comparing to other two groups, and the crabs in mix oil group had a better ability of resistance to hypoxia.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Fatty acid; Immune; Hypoxia

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 又名河蟹, 是我国重要的经济水产养殖种类之一, 从 20 世纪 80 年代以来, 河蟹养殖业发展迅速, 到 2005 年全国河蟹养殖产量超过 570 000 t^[1]。池塘养殖是我国现阶段河蟹养殖的主要模式, 但一般养蟹塘深为 0.8 ~ 1.0 m, 养殖水质不稳定, 而且投喂饵料品种杂、数量大, 残饵及排泄物在水中分解发酵, 消耗大量氧气, 致使水体溶氧急剧降低^[2], 加之夏季气温高, 病原体 and 细菌滋生, 河蟹极易染病死亡^[3]。关于低氧对蟹类生理和免疫的影响国内外学者已做了大量研究, 多数报道表明低氧对蟹类的生理代谢和免疫性能具有负面影响, 试验发现智利毛脚蟹 (*Lithodes santolla*)、罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 和中华绒螯蟹受低氧胁迫后血细胞密度及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性下降, 而血蓝蛋白、总蛋白、乳酸等含量显著上升^[3-7]。

众所周知, 脂类在虾蟹类饲料中不仅是重要的能量提供者, 而且是必需脂肪酸 (essential fatty acids, EFA)、甾醇类、磷脂和脂溶性维生素的重要来源。一些高不饱和脂肪酸, 如二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA, C₂₀:5n-3)、二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA, C₂₂:6n-3) 和花生四烯酸 (arachidonic acid, ARA, C₂₀:4n-6) 等, 由于动物体内自身合成能力有限, 必须借助于外界食物的供给, 所以它们对生物体的生理代谢非常重要^[8-9]。大豆油富含亚麻酸和亚油酸, 鱼油富含高不饱和脂肪酸 (highly unsaturated fatty acids, HUFA), 两者都在水产动物饲料中大量应用。但是, 鱼油产量有限, 现在很难满足水产养殖饲料业越来越大的需求。大量对淡水鱼的研究表明, 日粮中植物油可以部分替代鱼油^[10-11]。海洋鱼类和虾蟹类中的研究发现, 凡纳滨对虾

(*Litopenaeus vannamei*) 投喂不同含量的鲱鱼油、大豆油和大豆磷脂油的饲料对其体重无显著影响, 但是投喂大豆磷脂油组凡纳滨对虾血淋巴中甘油三酯、胆固醇和磷脂的含量显著高于只添加大豆油和鱼油组^[12]。对大麻哈鱼 (*Oncorhynchus keta*) 的研究发现, 改变其饲料中鱼油和油菜籽油的比, 对正常溶氧下的基础耗氧量和低氧过程中的代谢反应都无显著影响^[13]。

在无脊椎动物中, 关于 EFA 营养对动物抗外界压力胁迫的研究已经有大量报道, 对凡纳滨对虾投喂高或低含量的 HUFA 饲料, 其体内乳酸、葡萄糖含量及 Na⁺/K⁺-ATP 酶活性差异显著; 对南美兰对虾 (*Penaeus stylirostris*) 投喂富含 n-3HUFA 的饲料能增强其抗盐度胁迫和免疫能力, 表现为血细胞呼吸爆发和血淋巴凝集力增强; 对牡蛎 (*Crassostrea corteziensis*) 投喂含适量浓度 ARA 的饲料, 其血淋巴中甘油三酯和超氧化物阴离子出现上升^[14-17]。在这些研究中以总血细胞密度、超氧化物离子、血蓝蛋白、葡萄糖、乳酸、总蛋白、甘油三酯等作为衡量其对外界胁迫的生理和免疫反应指标。由于在中华绒螯蟹成蟹中关于不同油脂饲料对其生理影响及耐低氧性能的研究至今尚未见报道, 所以本实验设计使用添加豆油、鱼油以及鱼油和豆油混合油 (1:1) 的 3 种饲料投喂中华绒螯蟹, 然后放入低氧与正常溶氧条件下 90 h 后测定血淋巴中生理和免疫指标, 以评估其对中华绒螯蟹免疫、生理及耐低氧能力的影响。

1 材料与方 法

1.1 中华绒螯蟹与日粮 实验用蟹取自上海崇明岛水产技术推广站特色水产养殖基地, 从 8 个养殖塘随机取中华绒螯蟹成蟹共 30 只, 添加鱼油组、添加豆油组、添加鱼油和豆油混合油

组(1:1)各 10 只,各组内雌雄比例为 1:1。平均体重 (42.32 ± 9.37) g、壳长 (4.17 ± 0.29) cm、壳宽为 (4.60 ± 0.34) cm,带回实验室后,放入自动水循环养蟹系统内。

在中华绒螯蟹基础配合饲料中分别添加总量为 3% 不同比例鱼油、豆油,进行养殖实验,实验共分 3 组,分别为全鱼油组、全豆油组、鱼油与豆油的质量比为 1:1 的添加组。3 组饲料原料及配方见表 1。基础饲料配方由上海海洋大学营养与繁殖实验室提供,饲料原料均由江

苏南通巴大饲料公司提供并委托江苏南通巴大饲料有限公司加工,添加油脂方式为人工后喷涂。

饲料水分、粗蛋白(凯氏定氮法)和灰分的测定依照 AOAC 的方法步骤进行^[18]。总脂的提取依照 Folch 等方法利用氯仿-甲醇(2:1, V/V)进行提取^[19]。总脂甲酯化后,根据 Coutteau 等^[20]的方法利用高效气相色谱分析仪对脂肪酸成分进行测定。测量结果见表 1 和 2。

表 1 中华绒螯蟹基础日粮及营养水平

Table 1 Formulated diets with different lipid sources in feeding experiment of adult crabs

	鱼油添加组 Fish oil group	豆油添加组 Soy oil group	鱼油和豆油混合添加组 Fish oil + Soy oil (1:1)	
原料(g) Ingredient	豆粕 Soy dregs	216.8	216.8	
	菜粕 Rapeseed dregs	120	120	
	棉粕 Cotton dregs	60	60	
	鱼粉 Fish meal	200	200	
	啤酒酵母粉 Beer yeast powder	30	30	
	面粉 Flour	120	120	
	乌贼粉 Squid meal	100	100	
	虾壳粉 Shrimp shell powder	20	20	
	虾蟹多维 Vitamin mixture	4	4	
	磷酸二氢钙 CaH_2PO_4	20	20	
	沸石粉 Zeolite powder	40	40	
	胆碱 Sinkaline	2	2	
	磷脂油 Lecithin oil	15	15	
	鳕鱼油 Codfish oil	30	0	
	大豆油 Soy oil	0	30	
	鳕鱼大豆混合油(1:1) Mixture of codfish and soy oil	0	0	30
	饲料生化指标 Biochemical indices of diets	粗蛋白 Crude protein (%)	38.90 ± 0.01	38.72 ± 0.27
灰分 Ash content (%)		13.93 ± 0.93	13.72 ± 0.75	
水分 Moisture content (%)		11.56 ± 0.01	9.47 ± 0.05	
总脂 Total lipid (g/kg)		6.43 ± 0.01	7.09 ± 0.20	

饲料原料均由江苏南通巴大饲料公司提供。

The feeding sources were all provided by Bada feed company at Nantong in Jiangsu Province.

1.2 饲养实验 河蟹养殖装置为自动水循环系统,养殖箱长 × 宽 × 高 = 50 cm × 30 cm × 20 cm,单隔间养殖,以防止河蟹自相残杀。养殖条件保持在温度为 20.50 ~ 20.90℃,溶解氧(dissolved oxygen, DO)为 8.98 ~ 9.15 mg/L, pH 为 8.03 ~ 8.34,氨氮为 0.1 ~ 0.2 mg/L,亚硝酸盐小于 0.005 mg/L,光照条件为 12L:12D。每天早晚投喂各组饲料 2 次,在每天清

晨将前一天的剩余饲料及残渣捞出,防止其污染水质,喂养时间为 115 d,实验结束后各组蟹均剩余 9 只,分别称量其体重、壳长和壳宽。

1.3 低氧实验 饲养实验结束后,将各组蟹放入养殖系统中暂养 1 周,然后,再分别放入正常溶氧(9.06 ± 0.06) mg/L 和低氧(2.57 ± 0.44) mg/L 条件下 90 h,每只蟹为一个重复,分别取血淋巴进行免疫和生理指标的测定。实验所需

的低溶氧水体通过自行设计的室内水循环养殖系统获得,此系统是根据 Goodman 等和 Brown-Peterson 等描述的系统改装而来^[21-22],它由 3 个连接在一起的水槽组成,分别是蓄水槽、实验槽和过滤槽,低氧期间所有的水槽都密封,并在过滤槽上开通气孔。各个槽之间用软管相连,蓄水槽流入实验槽的水流速度为 60 L/h,蓄水

槽的容积为 192 L,实验槽为 480 L。在实验期间每个隔间仅放置一只蟹以防止其相互残杀。将氮气通入蓄水槽后,在其中达到一定水平后均匀地流入实验槽中,随着氮气不断通入实验槽中就能维持实验所需的低氧浓度。在低氧期间,每间隔 1 h 用 YSI-pro20 溶氧仪测定实验槽中的溶氧浓度,对低氧水平进行监控。

表 2 投喂中华绒螯蟹的 3 种饲料中所含脂肪酸的比例 (%)

Table 2 The profile of fatty acids in three diets feeding the crabs

脂肪酸 Fatty acid	鱼油添加组 Fish oil diet	豆油添加组 Soy oil diet	鱼油和豆油混合组 Fish and soy mixture oil diet(1:1)
C14	2.59 ± 0.23	1.86 ± 0.53	2.05 ± 0.07
C15:0	0.56 ± 0.01	0.22 ± 0.03	0.39 ± 0.00
C16:0	20.88 ± 0.05	15.93 ± 0.41	18.45 ± 0.10
C16:1n7	3.58 ± 0.01	2.23 ± 0.41	2.70 ± 0.04
C16:3n4	0.75 ± 0.09	0.24 ± 0.02	0.51 ± 0.04
C18:0	6.08 ± 0.30	4.19 ± 0.88	5.39 ± 0.01
C18:1n9	15.46 ± 0.22	18.32 ± 2.09	17.18 ± 0.10
C18:1n7	3.65 ± 0.04	2.95 ± 0.27	3.37 ± 0.05
C18:2n6	20.14 ± 0.66	38.21 ± 0.28	28.81 ± 0.32
C18:3n3	2.86 ± 0.25	4.97 ± 0.87	3.74 ± 0.11
C18:3n4	0.48 ± 0.05	0.45 ± 0.17	0.45 ± 0.03
C18:4n3	0.29 ± 0.15	0.22 ± 0.16	0.43 ± 0.13
C20:1n9	0.82 ± 0.03	0.47 ± 0.27	0.77 ± 0.14
C20:4n6	1.04 ± 0.01	0.49 ± 0.43	0.78 ± 0.06
C20:4n3	0.23 ± 0.17	0.21 ± 0.04	0.25 ± 0.06
C20:5n3	5.02 ± 0.55	3.58 ± 0.74	4.07 ± 0.13
C22:0	0.34 ± 0.01	0.26 ± 0.11	0.33 ± 0.05
C22:5n3	1.14 ± 0.06	0.47 ± 0.02	0.85 ± 0.05
C24:0	0.26 ± 0.01	0.16 ± 0.06	0.21 ± 0.06
C22:6n3	12.20 ± 0.47	3.81 ± 0.21	8.62 ± 0.20

1.4 血淋巴的采集与指标的测定

1.4.1 血细胞测定 每只蟹在正常溶氧和低氧 90 h 后,用 1 ml 注射器取血淋巴样。具体方法为从蟹的第 3 对腹肢上抽取 0.9 ml 的血淋巴后与注射器内原有的 0.1 ml 的抗凝剂(30 mmol/L 柠檬酸钠,0.34 mol/L 氯化钠,10 mmol/L EDTA,pH = 7.55)充分混合。将一滴血淋巴和抗凝剂的混合液滴到血细胞计数板上利用倒置相差显微镜测定总血细胞密度及透明血细胞密度。

1.4.2 血淋巴总蛋白和血蓝蛋白的测定 从正常溶氧和低氧 90 h 后的蟹吸取 0.1 ml 血淋巴,放入离心管中待其凝固,然后匀浆,放入离

心机中 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液放入 -80℃ 冰箱中保存,以备后续实验使用。血蓝蛋白含量的测定,需要将离心后的血淋巴按照 1:99 的体积比与 Tris-Ca 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl + 10 mmol/L CaCl₂,pH = 8.0)混合。利用 UV-2600 分光光度计,以 Tris-Ca 缓冲液为空白对照,测 280 nm 和 334 nm 下的吸光度,以测定血淋巴中总蛋白和血蓝蛋白的浓度。分别利用 280 nm 和 334 nm 下测定的吸光度对应的消光系数 13.5 和 2.3 计算总蛋白和血蓝蛋白浓度^[23]。

1.4.3 其他生理指标 从每个饲料组的蟹中抽取血淋巴,先将其放入 4℃ 冰箱中过夜,然后

迅速取出 6 000 r/min 离心 30 min, 上清液取出进行各种酶和生理指标的测定。SOD 按照黄嘌呤氧化酶法进行测定, 采用南京建成生物研究所生成的试剂盒。具体测定方法参照试剂盒说明书进行。酸性磷酸酶 (acid phosphatase, ACP) 活性和碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性按照磷酸苯二钠法测定, 采用南京建成生物研究所生产的试剂盒, 具体参考试剂盒说明书进行。乳酸浓度利用南京建成生物研究所试剂盒, 根据化学比色法测定。乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活性及尿酸和葡萄糖浓度, 利用多通道数显医用自动生化分析仪 (上海迈瑞生物仪器公司) 进行测定, 所需盒装试剂由迈瑞试剂公司提供。每个参数的校准利用双点线性法。

1.5 数据处理 利用 SPSS 12.0 软件对实验数据进行统计分析, 所有数据均采用平均值 \pm

标准差 (Mean \pm SD) 表示, 采用 Levene's 法进行方差齐性检验, 当不满足齐性方差时, 对各数据进行反正弦转换, 但数据仍用原始值表示。采用 one-way ANOVA 分别分析投喂前和投喂后各饲料组蟹体重的差异。采用双尾 *t*-检验 (independent samples *t*-test) 分析正常溶氧和低氧后对个体各个指标的影响。3 种饲料组之间采用 one-way ANOVA 分别分析低氧和正常溶氧下各个指标之间的差异。并采用 two-way ANOVA 比较溶氧浓度和不同饲料对个体各个指标的影响, 取 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 生长指标 经过 115 d 的投喂, 3 种饲料组成蟹的体重、壳长和壳宽都发生了增加, 但是各饲料组之间无显著性差异 (表 3)。在 3 个饲料组中添加豆油组的蟹体重、壳长和壳宽都为最高。

表 3 中华绒螯蟹投喂含 3 种不同油脂饲料 115 d 后体重、壳长和壳宽的变化
Table 3 The growth of the crabs during feeding with different dietary lipid sources

		饲料组 Diet group		
		鱼油组 Fish oil diet	豆油组 Soy oil diet	鱼豆油混合组 (1:1) Fish and soy mixture oil diet
投喂前 Before feeding	体重 Weight (g)	37.42 \pm 8.43	45.10 \pm 9.75	42.71 \pm 9.47
	壳长 Length (cm)	4.00 \pm 0.28	4.26 \pm 0.29	4.20 \pm 0.28
	壳宽 Width (cm)	4.40 \pm 0.40	4.67 \pm 0.31	4.65 \pm 0.34
投喂后 After feeding	体重 Weight (g)	69.92 \pm 15.54	76.25 \pm 26.38	57.53 \pm 8.97
	壳长 Length (cm)	4.78 \pm 0.27	4.94 \pm 0.48	4.70 \pm 0.21
	壳宽 Width (cm)	5.34 \pm 0.33	5.44 \pm 0.58	5.07 \pm 0.25

2.2 免疫和抗氧化指标 各饲料中总血细胞密度和透明血细胞密度在低氧和正常溶氧下无显著性差异 (表 4)。two-way ANOVA 分析发现水体溶氧浓度对透明血细胞密度影响明显。对河蟹投喂 3 种饲料后, 正常溶氧下总血细胞和透明血细胞密度各组之间差异不显著, 鱼豆油混合组数值最高。低氧 90 h 后测定发现, 鱼豆油混合组数值最高且显著高于鱼油组。

血蓝蛋白含量在低氧下上升, 但与正常溶氧下比较差异不显著。鱼豆油混合饲料组对血蓝蛋白含量的影响显著, 此组血蓝蛋白正常溶氧下含量为 (54.42 \pm 5.60) mg/ml, 低氧后含量为 (56.96 \pm 4.54) mg/ml, 都高于鱼油和豆

油组。

SOD 活性受溶解氧和添加油脂的影响与血蓝蛋白的变化相似, 但是正常溶氧下 3 组饲料间数值无显著性差异, 其中鱼豆油混合组最高, 为 (387.25 \pm 52.15) U/ml。低氧 90 h 后鱼豆油混合组为 (417.00 \pm 27.30) U/ml, 显著高于鱼油组 (表 4)。

添加鱼油组和鱼豆油混合组 ALP 在正常溶氧下分别为 (995.00 \pm 69.28) U/L 和 (1 020.83 \pm 36.66) U/L, 在低氧 90 h 后分别为 (1 181.25 \pm 28.69) U/L 和 (1 121.67 \pm 42.52) U/L, 低氧使其活性显著上升, 而豆油组无显著性变化。two-way ANOVA 分析可知溶氧对 ALP

表 4 投喂添加鱼油、豆油及鱼油与豆油混合油(1:1)饲料的中华绒螯蟹正常溶氧和低氧 90 h 血液中生理代谢和免疫指标的变化

Table 4 Effects of diets with different lipid sources on immunological and physiological indices in Chinese mitten crabs at normal DO level and exposed to hypoxia for 90 h

测量指标 Indices	饲料组 Diet	正常溶氧 Normal dissolved oxygen (DO)	低氧 Hypoxia	P 值 P-value	ANOVA (P 值 P-value)		
					溶氧 DO	饲料 Diet	溶氧×饲料 DO×Diet
总血细胞密度 Total hematocyte counts (THC) × 10 ⁶ (个/ml)	Y	7.20 ± 8.80 ^a	9.85 ± 6.39 ^a	0.613			
	D	7.64 ± 5.81 ^a	14.14 ± 4.45 ^{ab}	0.136	0.057	0.058	0.456
	YD	13.47 ± 15.14 ^a	29.13 ± 17.15 ^b	0.283			
透明血细胞密度 Hyaline hematocyte counts × 10 ⁶ (个/ml)	Y	2.40 ± 3.07 ^a	2.67 ± 1.13 ^a	0.936			
	D	2.18 ± 2.28 ^a	5.11 ± 2.52 ^{ab}	0.121	0.023	0.026	0.191
	YD	4.07 ± 4.17 ^a	10.33 ± 5.19 ^b	0.149			
血淋巴总蛋白 Haemolymph protein (mg/ml)	Y	58.57 ± 27.34 ^{ab}	38.75 ± 25.62 ^a	0.342			
	D	38.75 ± 21.34 ^a	35.00 ± 13.23 ^a	0.736	0.259	0.020	0.833
	YD	72.50 ± 13.32 ^b	65.00 ± 5.00 ^a	0.390			
血蓝蛋白 Hemocyanin (Hc) (mg/ml)	Y	31.41 ± 12.99 ^a	34.35 ± 14.82 ^a	0.731			
	D	25.90 ± 16.18 ^a	31.45 ± 16.91 ^a	0.636	0.470	0.000	0.967
	YD	54.42 ± 5.60 ^b	56.96 ± 4.54 ^b	0.522			
超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase (SOD) (U/ml)	Y	355.54 ± 37.69 ^a	367.51 ± 20.37 ^a	0.572			
	D	386.86 ± 41.83 ^a	400.23 ± 3.38 ^{ab}	0.608	0.228	0.069	0.869
	YD	387.25 ± 52.15 ^a	417.00 ± 27.30 ^b	0.395			
碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase (ALP) (U/L)	Y	995.00 ± 69.28 ^a	1 181.25 ± 28.69 ^a	0.000			
	D	1 005.63 ± 83.73 ^a	1 095.00 ± 5.00 ^b	0.119	0.000	0.330	0.227
	YD	1 020.83 ± 36.66 ^a	1 121.67 ± 42.52 ^b	0.008			
酸性磷酸酶 Acid phosphatase (ACP) (U/L)	Y	4.36 ± 0.76 ^a	3.45 ± 0.35 ^a	0.052			
	D	6.21 ± 1.60 ^b	3.17 ± 0.45 ^a	0.014	0.000	0.000	0.071
	YD	8.14 ± 0.64 ^c	6.18 ± 0.52 ^b	0.003			
尿酸 Uric acid (mmol/L)	Y	1.28 ± 0.25 ^a	1.12 ± 0.18 ^a	0.269			
	D	1.47 ± 0.48 ^a	1.21 ± 0.24 ^a	0.916	0.263	0.471	0.605
	YD	1.33 ± 0.19 ^a	1.36 ± 0.15 ^a	0.812			
葡萄糖 Glucose (mmol/L)	Y	29.88 ± 0.58 ^a	29.75 ± 0.50 ^a	0.723			
	D	29.86 ± 0.38 ^a	30.17 ± 0.29 ^a	0.245	0.586	0.562	0.537
	YD	29.92 ± 0.20 ^a	30.00 ± 0.01 ^a	0.516			
乳酸脱氢酶 Lactate dehydrogenase (LDH) (U/L)	Y	294.95 ± 87.59 ^a	282.83 ± 112.48 ^a	0.869			
	D	575.76 ± 109.73 ^b	249.16 ± 128.30 ^a	0.005	0.013	0.000	0.200
	YD	901.01 ± 316.08 ^c	659.93 ± 11.66 ^b	0.248			

Y 表示添加鱼油组饲料; D 表示添加豆油组饲料; YD 表示添加鱼油和豆油混合组饲料; $P < 0.05$ 表示差异性显著。各指标每一竖列内的不同上标字母表示在不同溶氧水平下 3 组饲料间有显著性差异。

Y represents diet supplement with fish oil; D represents diet supplement with soy oil; YD represents diet supplement with fish and soy mixture oil (1:1); $P < 0.05$ represents the significant difference. For every index different letters in the vertical column represent the significant difference among three diets at two DO levels.

活性影响显著(表 4)。对于 ACP 来说,无论正常溶氧和低氧下,鱼豆油混合组的值均为最高,并且显著高于鱼油和豆油组,其值分别为(8.14 ± 0.64)U/L 和(6.18 ± 0.52)U/L。且低氧下 3 种饲料组的 ACP 的值均低于正常溶氧

下的。另外,由 two-way ANOVA 分析可知溶氧水平和不同日粮对 ACP 活性均有显著影响。

2.3 生理代谢指标 血淋巴中总蛋白含量受溶氧水平的变化影响不显著,但是低氧 90 h 后 3 种饲料组总蛋白的含量都发生了降低,其含

量鱼油组由正常溶氧的(58.57 ± 27.34) mg/ml 降至(38.75 ± 25.62) mg/ml, 豆油组由正常溶氧的(38.75 ± 21.34) mg/ml 降至(35.00 ± 13.23) mg/ml, 鱼豆油混合组由正常溶氧的(72.50 ± 13.32) mg/ml 降至(65.00 ± 5.00) mg/ml(表4)。在正常溶氧下鱼豆油混合组的值为最高,显著高于豆油组;低氧下各组之间无显著差异,但是鱼豆油组的均值仍为最高。乳酸含量在正常溶氧和低氧90 h后3个饲料组之间都无显著差异,而对于鱼油、豆油、鱼豆油混合饲料组来说,乳酸含量正常溶氧与低氧后比较也都无显著性差异(表4)。葡萄糖含量的变化与乳酸非常相似, two-way ANOVA 分析发现其受溶氧和饲料中油脂的影响不显著(表4)。豆油组 LDH 活性在低氧胁迫90 h后与正常溶氧相比显著性降低,由(575.76 ± 109.73) U/L 降至(249.16 ± 128.30) U/L, 鱼油组和鱼豆油混合组的降低不显著。在两种溶氧水平下,鱼豆油混合组的 LDH 活性都为最高,分别为(901.01 ± 316.08) U/L和(659.93 ± 11.66) U/L,且都显著高于鱼油和豆油组。

3 讨论

3.1 3种油脂饲料对中华绒螯蟹生长的影响

实验对中华绒螯蟹投喂添加3种油脂饲料115 d后,其体重、壳长和壳宽在3个饲料组间无显著性差异。实验测得各组饲料的n-3脂肪酸含量不同,豆油组最低,由此分析饲料中较低含量的n-3多不饱和脂肪酸也能满足中华绒螯蟹生长的需求,不会对成蟹的体重、壳长和壳宽造成影响。这与凡纳滨对虾和鱼类中的研究结果相似^[12,24]。另外,对于用植物油替代鱼油,在其他一些研究也得到了符合人们预期的结果。Richard等^[25]用植物混合油替代鱼油投喂虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*),对其生长未产生影响;刘玮等用占饲料干重6%的豆油、鱼肝油、花生油、菜油、猪油以及上述所有油脂的混合油投喂团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)稚鱼,发现混合油组的相对增重率、饲料系数和蛋白质效率最

好^[26];Ng等也发现在饲料中添加大豆油、玉米油、棕榈油以及鳕鱼油喂养丝尾鳢(*Mystus nemurus*),会使其产生相同的生长速度^[27]。这些实验都表明用植物油替代鱼油对动物的生长没有显著影响,与本实验的结果相吻合。

3.2 3种油脂饲料对中华绒螯蟹免疫、生理及耐低氧性能的影响

甲壳动物缺乏高等动物具备的由免疫球蛋白介导的特异性免疫,因此血细胞在甲壳动物的非特异性防御反应中起着主要作用^[28]。中华绒螯蟹防御反应同其他甲壳动物一样,是由循环血细胞以及存在于细胞或从细胞释放到血浆中的多种因子的活性而产生,中华绒螯蟹的血细胞既是细胞免疫的担当者,又是体液免疫因子的提供者,所以,血细胞总数常常可作为甲壳动物健康状况的评定指标^[28]。本研究结果显示,低氧和正常溶解氧下相比,中华绒螯蟹血淋巴总血细胞密度和透明血细胞密度在低氧后均值比正常溶氧下上升,但没有显著性差异,而 two-way ANOVA 分析显示,溶氧水平对透明血细胞有显著影响($F = 0.023$),说明低氧90 h使中华绒螯蟹血细胞密度有一定程度的升高。但此结果与其他学者的研究结果有所不同,中华绒螯蟹幼蟹经低氧24 h后,其血细胞密度有显著降低^[3];智利毛脚蟹在不同溶氧水平下10 d后,低氧下的血细胞密度显著低于中等和高溶解氧水平下的^[6]。结果差异的原因可能与低氧时间及物种不同有关,因为智利毛脚蟹为海水种,其对低氧环境较中华绒螯蟹更为敏感。

3种饲料中,鱼豆油混合组的总血细胞密度和透明血细胞密度都为最高,在正常溶氧下虽然3者没有显著性差异,但是在低氧后,鱼豆油混合组显著高于其他两组,说明鱼油与豆油以1:1混合添加在饲料中比单独添加鱼油或豆油对成蟹的免疫性能更加有益。对鱼类的研究也得到类似的结果^[29]。

SOD为生物体内一种重要抗氧化酶,能清除体内多余自由基,防止其对生物的损伤。近年来的研究表明,SOD酶活性与生物的免疫水平密切相关,其活性变化可以作为机体非特异

性免疫指标^[30]。本实验中,SOD 酶活性在低氧 90 h 后与正常溶氧下相比较没有显著差异。在低氧胁迫下,鱼油豆油混合组的 SOD 活性最高。扇贝 (*Chlamys farreri*) 在水体溶氧为 2.5 mg/L 和 8.5 mg/L 下分别胁迫 12 h、24 h、7 d、14 d 和 21 d,低氧组在 12 h 时 SOD 酶活性值达到整个过程的最高值,后呈下降趋势,在 24 h 与正常溶氧组无显著差异,在 7 d 后则显著低于正常溶氧组^[31]。本实验中低氧后 SOD 活性与正常溶氧下相比无显著差异,但在低氧后 SOD 活性为先上升后下降的变化趋势,然后一段时间保持与起始水平相同的活性。相同的现象在中华绒螯蟹幼蟹中也存在^[3]。因此,低氧时间的长短对动物 SOD 酶活性具有重要影响。鱼豆油混合组的 SOD 活性最高,在虹鳟^[24]、牡蛎和日本鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*)^[17,32] 中也是如此,说明鱼油与豆油在饲料中的混合添加对生物低氧后的抗氧化性有明显的增强作用。鱼油组的 SOD 活性显著低于豆油和混合组,这与鱼油组含 ARA 较少有关。

甲壳动物的血蓝蛋白约占血淋巴总蛋白的 90% 以上,在体内具有运输氧、免疫等多种生理功能^[33-34]。挪威螯虾 (*Nephrops norvegicus*) 处于低溶氧下体内血蓝蛋白浓度有升高趋势^[35];草虾 (*Palaemonetes pugio*) 放于低溶氧下血蓝蛋白基因合成表达水平升高^[36]。而智利毛脚蟹的血蓝蛋白和总蛋白浓度在实验 10 d 后低氧组比高溶氧组显著降低^[6]。与以上挪威螯虾和草虾中的研究结果相反,本实验中低氧对血蓝蛋白和总蛋白影响不大,总蛋白有降低,血蓝蛋白有增加,但不显著。中华绒螯蟹幼蟹低氧 24 h 后,其血蓝蛋白含量呈先降低后升高的趋势,最后保持初始浓度不变^[3],这与本文的结果类似。研究结果的不同可能也与物种不同有关。另外,在添加 3 种油脂饲料组中,混合油组的血蓝蛋白含量为最高,显著高于鱼油和豆油组,说明豆油和鱼油 1:1 的比例搭配,比单纯鱼油或者豆油能更好地促进血蓝蛋白的生成和合成,对其运输氧气和免疫力有更好的促进作用。

ALP 和 ACP 受低氧胁迫后的变化趋势不

一。ALP 在低氧后鱼油组和豆油混合组都有了显著升高,而豆油组无显著变化,3 组之间也无显著差异。ACP 在低氧后都发生了降低,且豆油和鱼豆油混合组两者显著低于正常溶氧组,但是 3 种饲料组中最高值仍为鱼豆油混合组。有实验发现扇贝在低氧过程中 ALP 呈现先上升后降低的趋势^[31],动物在受到外界胁迫后短时间内会有应激反应,本文 ALP 活性的上升应为低氧胁迫后的应激变化,这与扇贝中的研究相似。另外,扇贝实验还发现 7 d 内 ACP 活性在低氧与正常溶氧下没有显著差异,7 d 后显著降低,本文中 ACP 活性低氧 90 h 后豆油和鱼豆油混合组都发生了显著降低,这可能与物种差异有关。3 种油脂饲料相较,添加鱼豆油混合组 ALP 和 ACP 活性都为最高,这与徐奇友等^[24]的研究相似,表明适量鱼油、豆油的同时添加对水产动物的免疫有促进作用。

葡萄糖为甲壳动物血淋巴中糖的主要组成形式,也是细胞水平有氧代谢的能量物质。Taylor 等发现一些对虾种类能在无氧呼吸前靠运输葡萄糖感知水体低氧^[37]。Zou 等认为这种反应是为适应无氧呼吸而准备^[7]。根据其他一些学者的研究,葡萄糖浓度的改变与压力的调节、渗透压、低氧和运动活性有关^[38]。岩虾 (*Palaemon elegans*)、锯齿长臂虾 (*Palaemon serratus*) 和中华绒螯蟹在低氧胁迫后体内葡萄糖含量都上升^[37-38]。本文中低氧后葡萄糖浓度虽数值上略高但与正常溶氧下无显著差异,但上述实验的低氧时间都较短。Mercier 等发现在凡纳滨对虾中,改变其饲料中 HUFA 的含量对其血淋巴中的葡萄糖含量没有显著影响^[14],这也与本实验的结果相似。尿酸为水生动物体内代谢的终产物,本实验其浓度与葡萄糖变化趋势一致。有实验发现低氧胁迫后尿酸含量会有稍微升高,且尿酸的变化与体内血蓝蛋白结合氧的能力有关^[39]。本实验中尿酸含量低氧与正常溶氧下无显著差异,表明此低氧浓度对中华绒螯蟹成蟹影响不显著。

本实验低氧后豆油组 LDH 活性与正常溶氧下相比出现显著下降,而其他组无显著变化,

可知豆油组成蟹 LDH 活性受低氧胁迫影响最大。LDH 存在于动物体的各组织中,能催化乳酸脱氢生成丙酮酸,在生理代谢中起重要作用。低氧下动物体内乳酸含量会增加^[7],LDH 在降低细胞内乳酸含量上发挥重要作用,添加豆油组成蟹 LDH 活性的降低必将影响其耐低氧胁迫的能力。脂肪酸在动物体内的作用机理现在还未完全清楚,但其在动物细胞中至少有 3 种作用,作为能量的来源,作为细胞膜的组成成分,还有 C₂₀HUFA (ARA, EPA) 是细胞调节所需的类二十碳烷酸的前体。饲料中 HUFA 含量的差异会引起动物组织中各种 HUFA 比例的变化,进而影响组织类二十碳烷酸的产生。类二十碳烷酸在细胞代谢中发挥各种各样的作用^[40],因此,类二十碳烷酸产物的不同就能影响到细胞的代谢活性。本文饲料中脂肪酸组成分析知添加豆油组 ARA、DHA 和 EPA 等必需脂肪酸含量最少。正常溶氧下 LDH 活性在 3 种饲料组之间差异显著,可见中华绒螯蟹饲料中添加不同油脂显著改变其体内脂肪酸的组成和含量,进而影响蟹体内代谢酶的活性。

参 考 文 献

- [1] Cheng Y X, Wu X G, Yang X Z, et al. Current trends in hatchery techniques and stock enhancement for Chinese mitten crab, *Eriocheir japonica sinensis*. Rev Fish Sci, 2008, 16(1/3): 377 - 386.
- [2] Jin Z W, Zheng Z M, Wu S J, et al. Preliminary study on improvement of pond water quality by bottom aeration. South China Fisheries Science, 2010, 6(6): 20 - 25.
- [3] Qiu R J, Cheng Y X, Huang X X, et al. Effect of hypoxia on immunological, physiological response, and hepatopancreatic metabolism of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Aquaculture International, 2010, 19(2): 283 - 299.
- [4] Cheng W, Liu C H, Kuo C M. Effects of dissolved oxygen on hemolymph parameters of freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquaculture, 2003, 220(1/4): 843 - 856.
- [5] Mangum C P. Adaptation of the oxygen transport system to hypoxia in the blue crab, *Callinectes sapidus*. Amer Zool, 1997, 37(6): 604 - 611.
- [6] Paschke K, Cumillaf J P, Loyola S, et al. Effect of dissolved oxygen level on respiratory metabolism, nutritional physiology, and immune condition of southern king crab *Lithodes santolla* (Molina, 1782) (Decapoda, Lithodidae). Mar Biol, 2010, 157(1): 7 - 18.
- [7] Zou E M, Du N S, Lai W. The Effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentrations in the blood of the Chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). Comp Biochem and Physiol: A, 1996, 114(2): 105 - 109.
- [8] Chang G L, Wu X G, Cheng Y X, et al. Effect of lipid nutrition on hepatosomatic index and biochemical composition of juvenile *Eriocheir sinensis*. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2008, 39(3): 276 - 283.
- [9] Wu X G, Cheng Y X, Sui L Y, et al. Effect of dietary supplementation of phospholipids and highly unsaturated fatty acids on reproductive performance and offspring quality of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards), female broodstock. Aquaculture, 2007, 273(4): 602 - 613.
- [10] Liu K K M, Barrows F T, Hardy R W, et al. Body composition, growth performance, and product quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing poultry fat, soybean/corn lecithin, or menhaden oil. Aquaculture, 2004, 238(1/4): 309 - 328.
- [11] Montero D, Robaina L, Caballero M J, et al. Growth, feed utilization and flesh quality of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets containing vegetable oils: a time-course study on the effect of a re-feeding period with a 100% fish oil diet. Aquaculture, 2005, 248(1/4): 121 - 134.
- [12] Hu Y, Tan B P, Mai K S, et al. Effects of dietary menhaden oil, soybean oil and soybean lecithin oil at different ratios on growth, body composition and blood chemistry of juvenile *Litopenaeus vannamei*. Aquacult Int, 2011, 19(3): 459 - 473.
- [13] Regan M D, Kuchel L J, Huang S S Y, et al. The effect of dietary fish oil and poultry fat replacement with canola oil on swimming performance and metabolic response to hypoxia in stream type spring Chinook salmon parr. Aquaculture, 2010, 308(3/4): 183 - 189.
- [14] Mercier L, Racotta I S, Yepiz-plascencia G, et al. Effect of diets containing different levels of highly unsaturated fatty acids on physiological and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to handling stress. Aquaculture Research, 2009, 40(16): 1849 - 1863.
- [15] Hurtado M A, Racotta I S, Civera R, et al. Effect of

- hypo- and hypersaline conditions on osmolality and Na^+/K^+ -ATPase activity in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed low- and high-HUFA diets. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A*, 2007, 147(3): 703–710.
- [16] Chim L, Lemaire P, Delaporte M, et al. Could a diet enriched with n-3 highly unsaturated fatty acids be considered a promising way to enhance the immune defences and the resistance of *Penaeid* prawns to environmental stress? *Aquaculture Research*, 2001, 32(2): 91–94.
- [17] Hurtado M A, Reza M, Ibarra A M, et al. Arachidonic acid (20:4n-6) effect on reproduction, immunology, and prostaglandin E_2 levels in *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). *Aquaculture*, 2009, 294(3/4): 300–305.
- [18] Williams S, ed. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 14th ed. Arlington VA: AOAC, 1984: 114.
- [19] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Biol Chem*, 1957, 226(1): 497–509.
- [20] Coutteau P, Sorgeloos P. Intercalibration Exercise on the Qualitative and Quantitative Analysis of Fatty Acids in *Artemia* and Marine Samples Used in Mariculture. ICES Cooperative Research Reports 211, 1995: 30.
- [21] Goodman L R, Campbell J G. Lethal levels of hypoxia for gulf coast estuarine animals. *Mar Biol*, 2007, 152(1): 37–42.
- [22] Brown-Peterson N J, Manning C S, Patel V, et al. Effects of cyclic hypoxia on gene expression and reproduction in a grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Biol Bull*, 2008, 214(1): 6–16.
- [23] Johnson B A, Bonaventura C, Bonaventura J. Allosteric modulation of *Callinectes sapidus* hemocyanin by binding of L-Lactate. *Biochemistry*, 1984, 23(5): 872–878.
- [24] 徐奇友, 许红, 李婵, 等. 用豆油代替鱼油对虹鳟生长、非特异性免疫和组织酶活性的影响. *大连水产学院学报*, 2009, 24(2): 104–108.
- [25] Richard N, Kaushik S, Hroquet L, et al. Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effect on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br Nutr*, 2006, 96(2): 299–309.
- [26] 刘玮, 戴年华, 任本根, 等. 不同脂肪源饲料对团头鲂稚鱼生长的影响. *水产学报*, 1997, 21(增刊1): 44–48.
- [27] Ng W K, Tee M C, Boey P L. Evaluation of crude palm oil and refined palm olein as dietary lipids in pelleted feeds for a tropical bagrid catfish *Mystus nemurus* (Cuvier & Valenciennes). *Aquacult Res*, 2000, 31(4): 337–347.
- [28] 陈国福, 黄捷, 宋晓玲. 对虾免疫机能研究概况. *水产学报*, 2004, 28(2): 209–215.
- [29] Montero D, Grasso V, Izquierdo M S, et al. Total substitution of fish oil by vegetable oils in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) diets: Effects on hepatic Mx expression and some immune parameters. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 24(2): 147–155.
- [30] 赵红霞, 张艳秋, 黄磊, 等. 虾类的免疫系统与免疫防治. *中国兽医杂志*, 2003, 39(1): 42–44.
- [31] Chen J H, Mai K S, Ma H M, et al. Effects of dissolved oxygen on survival and immune responses of scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston). *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 22(3): 272–281.
- [32] Xu H G, Ai Q H, Mai K S, et al. Effects of dietary arachidonic acid on growth performance, survival, immune response and tissue fatty acid composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture*, 2010, 307(1/2): 75–82.
- [33] 潘鲁青, 金彩霞. 甲壳动物血蓝蛋白研究进展. *水产学报*, 2008, 32(3): 484–491.
- [34] 章跃陵, 卓奕明, 朱永飞, 等. 南美白对虾人工感染细菌后肝胰脏中主要变化蛋白的研究. *水产科学*, 2005, 24(6): 19–23.
- [35] Baden S P, Pihl L, Rosenberg R. Effects of oxygen depletion on the ecology, blood physiology and fishery of the Norway lobster *Nephrops norvegicus*. *Mar Ecol Prog Ser*, 1990, 67: 141–155.
- [36] Brouwer M, Brown-Peterson N J, Laikin P, et al. Molecular and whole animal responses of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, exposed to chronic hypoxia. *Exp Mar Bio Ecol*, 2007, 341(1): 16–31.
- [37] Taylor A C, Spicer J I. Metabolic responses of the prawns *Palaemon elegans* and *P. serratus* (Crustacea: Decapoda) to acute hypoxia and anoxia. *Mar Biol*, 1987, 95(4): 521–530.
- [38] Taylor H H, Paterson B D, Wong R J, et al. Physiology and live transport of lobsters; report from a workshop. *Mar Freshw Res*, 1997, 48(8): 817–822.
- [39] Lallier F, Truchot J P. Hemolymph oxygen transport during environmental hypoxia in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Respiration Physiology*, 1989, 77(3): 323–336.
- [40] Rowley A F, Knight J, Lloyd-Evans P, et al. Eicosanoids and their role in immune modulation in fish—a brief overview. *Fish Shellfish Immunol*, 1995, 5(8): 549–567.