

文章编号: 1004-7271(2007)01-0016-06

饥饿对日本沼虾生长和部分免疫功能的影响

李志华¹, 谢松², 王军霞², 陈大庆¹

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北荆州 434000,

2. 河北大学生命科学学院, 河北保定 071002)

摘要:在 25.0 ± 1 °C 范围条件下, 对日本沼虾进行了不同时间的饥饿处理后再投饵的恢复生长实验。对照组连续饱食投喂 18 d, 处理组分别饥饿 2、4、8 d, 再分别饱食投喂 16、14、10 d。实验结果如下: 在恢复生长期, 处理组的特殊生长率、摄食率、食物转化率明显高于对照组, 超氧阴离子是随着饥饿时间的延长而增加, 而超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的酶活力则是随着饥饿实验先稍微增加, 后又下降。在恢复投饵后, 超氧阴离子、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶又恢复至对照组水平。实验结果表明, 日本沼虾继饥饿后再恢复喂食出现完全或部分补偿生长效应不仅由于增加食欲, 提高摄食水平, 同时改善了食物转化率。因此, 补偿生长是这两种生理因素共同作用的结果。

关键词: 日本沼虾; 饥饿; 补偿生长; 免疫功能

中图分类号: Q 959.223; S 917 文献标识码: A

The effects of starvation on growth and some immune function in the shrimp *Macrobrachium nipponense*

LI Zhi-hua¹, XIE Song², WANG Jun-xia², CHEN Da-qing¹

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China;

2. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: In the condition of 25.0 ± 1 °C, the recovery growth experiment in the shrimp *Macrobrachium nipponense* following different periods of starvation was carried out. The experiment lasted for 18 days for each test group. Group C, S2, S4 and S8 were deprived of food for 0 (control), 2, 4 and 8 days, respectively. Then each group was fed during its rest experimental time. The indexes of specific growth rate, feeding rate and food conversion efficiency in terms of wet weight in each previously starved group were higher than those in group C. During the time of starvation, the quantity of ROS was rising too. While the activity of superoxide dismutase and catalase increased a little and then decreased significantly. At the end of the recovery growth, the indexes of the immune system of the shrimp in each group were similar with control group. The results indicated that there was completely-or-partially-compensatory effect in the recovery growth in the *Macrobrachium nipponense* following starvation, and that the compensatory effect mainly resulted from significant increase of the feeding level and food conversion efficiency in the recovery growth. So, the

收稿日期: 2005-12-23

基金项目: 国家自然科学基金重大和面上项目 (30490234, 30371105); 世界自然基金项目 (0523) 和河北省教育厅资助项目 (No. 2002273)

作者简介: 李志华 (1979-), 男, 河北辛集人, 研究实习员, 研究方向为水生生物资源保护。E-mail: lizhuhua426@yahoo.com.cn

通讯作者: 陈大庆, chdq@yfi.ac.cn

compensatory growth in the shrimp *Macrobrachium nipponense* is the result of the two physiological factors working together.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; starvation; compensatory growth; immune function

动物继饥饿或营养不足一段时间后恢复喂食,在恢复生长阶段中出现的高于正常生长速度的快速生长现象称之为补偿生长(Compensatory growth)^[1,2]。有关补偿生长研究多集中在畜禽类及其他一些哺乳类上^[3,4],水产动物补偿生长的研究起步较晚,且以鱼类为主的研究较多。在虾蟹类, Bostworth 和 Wolters^[5]报道过克氏原螯虾(*Procambaru sclarkii*)的补偿生长现象;董双林等对中国对虾(*Penaeus chinensis*)继饥饿后的补偿生长效应做了报道^[6]。日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)又名“青虾”,是我国淡水渔业资源重要组成部分。本文以日本沼虾为材料进行试验,以期得到其补偿生长特点,了解饥饿对日本沼虾部分免疫指标的影响,以阐明饥饿对日本沼虾机体所发生的应激反应,为今后深入研究补偿生长的机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验用虾的来源与驯养

实验所用的日本沼虾购自河北省白洋淀,为健康活泼个体。实验开始前,先将虾暂养于玻璃水族箱(50 cm × 50 cm × 25 cm,实际水量 40 L)内进行驯养一周,每箱放养 20 尾。驯养期间每日过量投喂人工饵料 2 次(8:00 和 16:00 时),每次投喂前用吸管取出残饵和粪便。水族箱为循环水系统,并配以充气泵连续充气增氧。水温控制在 25.0 ± 1 °C。

1.2 实验方法

驯化结束后选取个体相近(体长 3.5 ~ 4.1 cm,体重 0.52 ~ 0.64 g)的虾 480 尾,随机分为 4 组,分别饥饿处理 0(对照)、2、4、8 d。每个饥饿组设 6 个重复组,每个重复组 20 尾虾。对照组 C 持续饱食投喂 18 d;处理组 S2、S4 和 S8 分别先饥饿 2、4 和 8 d 后再恢复饱足喂食 16、14 和 10 d。各处理组在饥饿阶段用带孔(直径为 0.5 cm)的半透明塑料板将水族箱分隔成 20 室,每室放入 1 尾虾以防止个体间互相残食,饥饿结束时拆除塑料隔板。

1.2.1 样品采集与生长指标的测定

分别测定饥饿处理开始前、结束后和恢复生长结束时每尾虾的体重。投喂阶段各实验组每天过量投喂 2 次,每次投喂后至下一次投喂前收集残饵,残饵经烘干后称重。每日的耗饵量由投饵量与残饵量之差求得。在实验过程中,每两天取样一次,每个实验组取虾 12 尾,取出后将虾立即用液氮迅速冷冻后,放零下 83 度冰柜储存备用。

1.2.2 部分免疫指标的测定

虾血中超氧阴离子测定^[7] 用卡介苗注射器先从虾的心脏中直接吸取虾血 20 μL,再吸取 20 μL 抗凝剂(0.25% 半胱氨酸),一起注入 1.5 mL 离心管中,加入 200 μL MHBSS 培养基,半小时后,除去上清液,再加入 200 μL MHBSS 培养基和 100 μL 的 0.3% NBT,培养 2 h。再加入 200 μL 甲醇,在冷冻离心机中 5 000 r/min 离心 15 min,去上清液,用 70% 甲醇冲洗两次沉淀。在低温烘箱烘至完全干燥,分别加入 600 μL 2 mol/L 的 KOH 和 700 μL DMSO(二甲基亚砷)将沉淀完全溶解,在 620 nm 下进行比色测定。

SOD 的测定方法^[8,9] 取样:取虾的肌肉 0.2 g,加入 2 mL PH 值为 6.5 的磷酸缓冲液,用超声波匀浆机匀浆,再用冷冻离心机离心,转数为 10 000 r/min。取上清液测定酶活。调 A0 值:在一系列 20 mL 试管中加入 9 mL Tris - HCl 缓冲液,再加入 40 μL 邻苯三酚溶液,3 min 后加入 40 μL 抗坏血酸溶液,立刻摇匀,在 420 nm 下进行比色测定,测的值若大于 0.182,加 2 mol/L 的 HCl,若测的值小于 0.178,则加 1 mol/L 的 Tris 调缓冲液。直至邻苯三酚在这种缓冲液中的自氧化率为 0.178 - 0.182。测酶活:在一

系列 20 mL 试管中加入 9 mL 已经调好 Tris - HCl 的缓冲液,再加入 400 μL 粗酶液,再加入 40 μL 邻苯三酚,3 min 后加入 40 μL 抗坏血酸终止邻苯三酚氧化,1 min 内用 3 cm 比色杯在 420 nm 下测定得出 OD 值。

酶活计算:

$$\text{SOD 的活力单位} = (A_0 - A_s) \times N \times 18 / A_0 \times V \times P$$

N-样品的稀释倍数; V-加样体积(mL); P-所加样品体积中的蛋白含量

过氧化氢酶(CAT)测定^[10] 实验前在肌肉中加入 10 倍体积的磷酸钠缓冲液(PH = 7.0)进行超声冰浴匀浆匀浆液,然后用冷冻离心机离心 15 min,取上清液做酶活分析。反应液为:10 mmol/L H_2O_2 , 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH = 7.0)。测定酶促反应(20 $^{\circ}\text{C}$)过程中 240 nm 处吸光值降低,消光系数 $\varepsilon = 0.04 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。用 1 min 内 1mg 蛋白质分解底物 H_2O_2 (μmol)表示酶活力。

1.3 计算与数据分析

实验期间虾的生长率(Specific growth rate, SGR)、摄食率(Feeding rate, FR)和食物转化率(Food conversion efficiency, FCE)的计算公式:

$$\text{SGR}(\%/d) = 100 \times (\ln W_2 - \ln W_1) / t$$

$$\text{FR}(\%/d) = 100 \times C / [t \times (W_1 + W_2) / 2]$$

$$\text{FCE}(\%) = 100 \times (W_2 - W_1) / C$$

其中 W_1 和 W_2 分别为 t_1 和 t_2 时实验虾的湿重(g), C 为摄食饵料的湿重(g), t 为实验时间(d)。

2 结果

2.1 日本沼虾饥饿后的补偿生长

从表 1 中可以看出随着饥饿时间的延长虾的体重下降比较明显,饥饿 2、4 和 8 d 的体重损失率分别为 2.90%、9.36% 和 13.08%。但恢复投饵后,随着恢复生长实验结束,虾的体重又有不同程度的增加,其中对照组体重增加最多,增重率为 9.57%,饥饿 2、4 d 的虾体重增加率分别为 9.35% 和 8.92%,基本达到了对照组的体重增加量,经方差分析,这两组与对照组差异不显著($P > 0.05$),可以认为是完全补偿生长,而饥饿 8 d 的虾恢复生长后体重虽然也有增加,但增加率仅为 4.83%,经方差分析,与对照组差异显著($P < 0.05$),故认为其出现了部分补偿生长效应。从表 2 可以看出,饥饿处理各组恢复生长后其生长率、摄食率和食物转化率都高于对照组。

表 1 日本沼虾在饥饿过程中及恢复生长后的体重变化

Tab.1 The change of weight in *Macrobrachium nipponense* during starvation and after recovery growth

饥饿处理时间 (d)	饥饿处理前体重 (g)	饥饿处理后体重 (g)	饥饿处理后体重 损失率(%)	恢复生长后体重 (g)	恢复生长后体重 增加率(%)
0	0.585 8 \pm 0.039 1	0.585 8 \pm 0.039 1 ^a	0	0.641 8 \pm 0.020 9 ^a	9.57
2	0.578 7 \pm 0.028 9	0.561 9 \pm 0.015 8 ^b	2.90	0.632 8 \pm 0.018 7 ^a	9.35
4	0.599 6 \pm 0.032 7	0.543 5 \pm 0.028 3 ^c	9.36	0.653 1 \pm 0.024 9 ^a	8.92
8	0.596 3 \pm 0.039 4	0.518 3 \pm 0.017 0 ^d	13.08	0.625 1 \pm 0.035 1 ^b	4.83

注:同一列标有不同字母的表示组间差异显著($P < 0.05$)

表 2 日本沼虾在恢复生长过程中的生长率(SGR)、摄食率(FR)和食物转化率(FCE)

Tab.2 The specific growth rate, feeding rate and food conversion efficiency in *Macrobrachium nipponense* during recovery growth

饥饿处理时间 (d)	SGR(%)		FR(%)		FCE(%)	
	平均值	S. E.	平均值	S. E.	平均值	S. E.
0	0.526 7 ^a	0.009 8	18.141 1 ^a	1.153 6	6.018 9 ^a	0.043 1
2	0.538 1 ^b	0.006 1	19.806 3 ^b	0.975 3	6.318 7 ^b	0.065 2
4	0.542 5 ^b	0.008 3	20.814 2 ^b	1.546 1	6.351 0 ^c	0.038 1
8	0.550 9 ^c	0.002 1	22.082 5 ^c	1.336 4	6.361 2 ^c	0.025 8

注:同一列标有不同字母的表示组间差异显著($P < 0.05$)

2.2 部分免疫指标的变化

2.2.1 超氧阴离子的变化

如图 1 所示,随着饥饿时间延长超氧阴离子含量逐渐升高,饥饿 8 d 的处理组由 0.517 7 升至 0.691 7。其中从第 6 d 到第 10 d 期间,各组差异十分明显($P < 0.01$),但随着恢复投饵后,超氧阴离子的值逐渐降低,最终达到对照组水平,与对照组无明显差异($P > 0.05$)。

2.2.2 超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的变化

在本实验中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的变化趋势相同,在饥饿初期 2 d 内,其活性均先升高,而后随着饥饿时间延长,这两种酶的活性急剧下降,尤其是饥饿 8 d 的处理组下降比较明显。其中实验中期各组差异十分明显($P < 0.01$),待饥饿处理结束开始恢复投饵后其活性才缓慢升高,最终达到对照组水平($P > 0.05$)。(图 2-3)

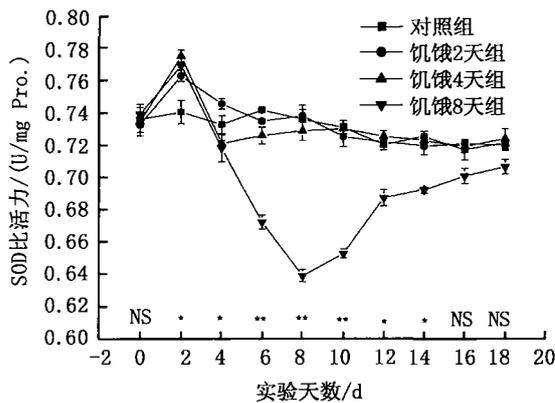


图 2 日本沼虾在饥饿过程中及恢复生长后的超氧化物歧化酶(SOD)活性变化

Fig. 2 The change of SOD activity in *Macrobrachium nipponense* during starvation and after recovery growth
NS, ; $P > 0.05$; * ; $P < 0.05$; * * ; $P < 0.01$

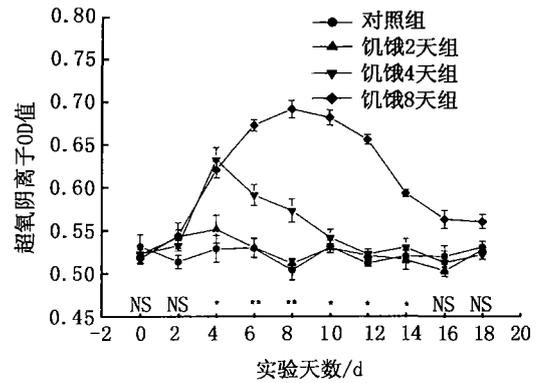


图 1 日本沼虾在饥饿过程中及恢复生长后的超氧阴离子值变化

Fig. 1 The change of ROIs in *Macrobrachium nipponense* during starvation and after recovery growth
NS; $P > 0.05$; * ; $P < 0.05$; * * ; $P < 0.01$

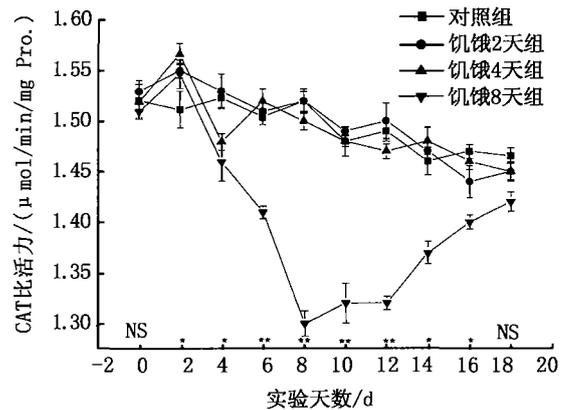


图 3 日本沼虾在饥饿过程中及恢复生长后的过氧化氢酶(CAT)活性变化

Fig. 3 The change of CAT activity in *Macrobrachium nipponense* during starvation and after recovery growth
NS; $P > 0.05$; * ; $P < 0.05$; * * ; $P < 0.01$

3 讨论

3.1 补偿生长及其机制

有关水产动物补偿生长的研究主要集中在鱼类。从补偿量的角度可将其分为 4 类:1) 超补偿生长、完全补偿生长、部分补偿生长、不能补偿生长。有关甲壳动物补偿生长方面的资料甚少,其中 Paul 等研究表明,受试的两种蟹(*Chionoecetes baird* 和 *Cancer magister*) 分别饥饿 30、60 和 90 d 后在恢复生长阶段均没有补偿生长能力^[11]; Bostworth 和 Wolters^[5] 则揭示了克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*) 继饥饿 15 和 30 d 后恢复生长时均具有补偿生长效应,而且饥饿 30 d 的个体在恢复喂食时生长速度快于饥饿 15 d 的个体。本实验中,恢复生长后各饥饿处理组的湿重摄食率及湿重生长率高于对照组。从实验期间各组体重变化看,处理组 S2、S4 的终末湿重赶上了对照组,表明该处理组出现完全补偿生长效应;对于处

理组 S8 而言,其终末湿重仍显著低于对照组,故认为该组可能具部分补偿生长效应。

现在对于水产动物补偿生长的生理机制还不清楚,但主要有以下 3 种观点:①饥饿或限食使动物的代谢水平降低,当恢复正常进食时,较低的代谢水平能持续一段时间,这种代谢支出的降低使动物在恢复生长阶段摄入同样的净能用于生长的比例增大,从而提高了食物转化率^[3,12,13];②饥饿或限食后恢复正常喂食时,动物体内将立刻进行高速的合成作用,代谢水平迅速升高,不可能通过降低代谢水平来明显改善食物转化率。补偿生长是动物在恢复生长阶段的一段时间内通过增加摄食实现的^[4,14~17];③动物在恢复喂食阶段不仅增加食欲,提高摄食水平,同时改善了食物转化率。因此,补偿生长是这两种生理因素共同作用的结果^[18,19]。

本实验结果表明,饥饿处理各组恢复生长后其湿重摄食率和湿重食物转化率都高于对照组。这说明日本沼虾继饥饿后的恢复生长中出现的补偿生长效应主要是通过提高摄食水平同时提高食物转化率来实现的。

3.2 饥饿对日本沼虾部分免疫指标的影响

超氧阴离子是生物体内通过单电子还原产生化学性质活泼的物质。当处于不利于生存的环境时,甲壳动物体内会释放一些毒性物质来自我保护,这些毒性物质中有一类是超氧阴离子(ROIs)。这些 ROIs 具有强有力的杀菌作用^[20,21],但过多的超氧阴离子会对机体造成伤害。因此超氧阴离子的高低反映出虾机体免疫机能的好坏。超氧化物歧化酶是重要的抗氧化酶之一,在清除自由基,预防生物分子损伤方面有十分重要的作用,有研究发现,超氧化物歧化酶活性与生物的免疫水平密切相关^[22,23]。健康的生物体,其内环境中的自由基的产生与消除处于动态平衡。当 SOD 酶活性降低时,生物体内会出现自由基量过多,势必扰乱,破坏一些体内重要的生化过程,导致代谢混乱,正常生理功能失调,体内免疫水平下降,潜在的病原被激活,许多疾病也逐渐产生和形成。过氧化氢酶也是一种重要的抗氧化酶,与机体的免疫水平有密切关系。除了起到清除超氧阴离子自由基的作用外对于增强细胞的吞噬能力和整个机体的免疫功能起重要作用,当机体处于健康状态中,此酶活力处于一种相对稳定的动态平衡中^[24]。总之,CAT 活力的高低可以从一个侧面反映出机体免疫状况的好坏。

本实验中,由于饥饿使虾处于营养不足状态,外界环境不适合生存,有害物质对于虾体的威胁加强,故其体内的超氧阴离子含量增加,加强自我保护。超氧化物歧化酶和过氧化氢酶均表现出先升高后降低的趋势,表明,日本沼虾在饥饿初期,由于处于营养不充足,故其机体内免疫机能加强来适应环境,加强自我保护。但随着饥饿时间延长,其体内的营养状况严重不足,故这两种酶活力在饥饿 4 d 后很快下降。但随着恢复生长,虾的营养状况得到改善,其超氧阴离子的含量降低,超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性也随着营养状况的恢复缓慢上升,并逐渐达到对照组水平,表明虾体内的免疫系统已经恢复正常水平。至于饥饿对于日本沼虾免疫系统的微观细胞结构有何影响,还不清楚,有待进一步研究。

本实验结果表明,日本沼虾在饥饿后能表现出补偿生长效应,其中饥饿 2、4 处理组能表现出完全补偿生长,而饥饿 8 d 的处理组表现出的是部分补偿生长。日本沼虾在恢复喂食阶段不仅增加食欲,提高摄食水平,同时改善了食物转化率。因此,补偿生长是这两种生理因素共同作用的结果。本实验中,在饥饿过程中,其体内的超氧阴离子含量增加,超氧化物歧化酶和过氧化氢酶均表现出先升高后降低的趋势,但随着恢复生长,虾的营养状况得到改善,其超氧阴离子的含量降低,超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性也随着营养状况的恢复缓慢上升,并逐渐达到对照组水平。这就表明饥饿对日本沼虾的免疫指标有一定影响,但在恢复生长后,其免疫功能又可逐渐恢复至正常水平。

参考文献:

- [1] Wilson P N, Obsourn D F. Compensatory growth after under nutrition in mammals and birds[J]. Biol Rev, 1960, (35):324-363.
- [2] Jobing M, Meloy O H, Santos J D, et al. The compensatory growth response of the Atlantic cod: effects of nutritional history[J]. Aquaculture International, 1994, (2):75-90.
- [3] Plavnik I, Hurwitz S. The performance of broiler chicks during and following a severe food restriction at an early age[J]. Poultry Sci, 1985, (64):348-355.

- [4] Hayward R S, Noltie D B, Wang N. Use of compensatory growth to double hybrid sunfish growth rates[J]. Trans Amer Fish Soc, 1997, (126): 316 - 322.
- [5] Bostworth B G, Wolters W R. Compensatory growth in juvenile red swamp crawfish, *Procambarus clarkii* [C]//Eighth International Symposium on Astacology. Batonrouge, La USA, Louisiana State Univ, Printing Office, 1995: 648 - 656.
- [6] 吴立新,董双林,田相利. 中国对虾继饥饿后的补偿生长研究[J]. 生态学报, 21(3): 452 - 457.
- [7] Munoz M, Cedeno R, Rodriguez J. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2000, (191): 89 - 107.
- [8] Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. Eur J Biochem, 1974, (47): 469 - 474.
- [9] 静天玉,赵晓瑜. 一种改进的临苯三酚法测定超氧化物歧化酶活性的方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, (1): 13 - 15.
- [10] Beers R F, Sizer I W. Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase[J]. J Biol Chem, 1952, (195): 133 - 140.
- [11] Paul J M, Paul A J, Kimker A. Compensatory feeding capacity of 2 brachyurancrabs, tanner and dungeness, after starvation periods like those encounte red in pots[J]. Alaska Fish Res Bull, 1994, (1): 184 - 187.
- [12] Dobson S H, Holmes R M. Compensatory growth in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson[J]. J Fish Biol, 1984, (25): 649 - 656.
- [13] Gaylord T G, Gatlin D M. Dietary protein and energy modifications to maximize compensatory growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Aquaculture, 2001, (194): 337 - 348.
- [14] Weatherley A H, Gill H S. The Biology of Fish Growth[M]. London: Academic Press, 1987.
- [15] Hayward R S, Wang N, Noltie D B. Group holding impedes compensatory growth of hybrid sunfish[J]. Aquaculture, 2000, (183): 299 - 305.
- [16] Wang Y, Cui Y, Yang Y, et al. Compensatory growth in hybrid tilapia, *Oreochromis mossambicus*_O. niloticus, reared in seawater[J]. Aquaculture, 2000, (189): 101 - 108.
- [17] Xie S, Zhu X, Cui Y, et al. Compensatory growth in the gibel carp following feed deprivation: temporal patterns in growth, nutrient deposition, feed intake and body composition[J]. J Fish Biol, 2001, (58), 999 - 1009.
- [18] Russell N R, Wootton R T. Appetite and growth compensation European minnows (*Phoxinus phoxinus*) following short periods of food restriction[J]. Environ Biol Fish, 1992, (34): 277 - 285.
- [19] Skilbrei O T. Compensatory sea growth of male Atlantic *salmo*(*Salmos alar* L.), which previously mature as parr[J]. J Fish Biol, 1990, (37): 425 - 438.
- [20] 崔 剑,李兆陇,洪啸吟. 自由基生物抗氧化与疾病[J]. 清华大学学报, 2000, 40(6): 9 - 12.
- [21] 李毅平,龚 和. 昆虫体内抗氧化体系研究进展[J]. 生命科学, 1998, 10(5): 240 - 245.
- [22] Horowitz N H, shen S. Neurospora tyrosinae[J]. J Boil Chem, 1952, (197): 573 - 520.
- [23] Chung M H. Free Radic[J]. Biol Med, 1972, 12(6): 523.
- [24] 朱越雄,魏育红,贡成良. 罗氏沼虾两种抗氧化酶活性及云芝多糖的影响[J]. 内陆水产, 2000, (7): 6 - 7.