

硒对铜胁迫下大菱鲂幼鱼生长、抗氧化能力及相关基因表达的影响

郝甜甜¹, 王际英^{1*}, 马长兴^{1,2}, 周莹^{1,2}, 李宝山¹,
王成强¹, 孙永智¹, 黄炳山¹

(1. 山东省海洋资源与环境研究院, 山东省海洋生态修复重点实验室, 山东烟台 264006;
2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心,
水产动物遗传育种上海市协同创新中心, 上海 201306)

摘要: 为探讨硒对铜胁迫下大菱鲂幼鱼生长、抗氧化能力及相关基因表达的影响, 以初始体质量为(24.85±0.10) g的大菱鲂为研究对象, 通过在饲料中添加五水硫酸铜和亚硒酸钠, 配制铜、硒含量分别为(0, 0, 1 000, 0, 1 000, 2, 1 000, 4 mg/kg) 4种等氮等能的实验饲料, 命名为D1、D2、D3和D4组。养殖实验持续84 d。结果显示: ①各组间实验鱼成活率无显著差异; 增重率、特定生长率和蛋白质效率均在D2组显著低于D1、D3和D4组; 摄食率和饲料系数呈相反趋势, 在D2组显著高于其他3组。②幼鱼全鱼和肝脏粗脂肪含量呈先下降后上升趋势; 而背肌粗蛋白和粗脂肪含量在各组之间无显著性差异。全鱼、脊椎骨和肝脏中Cu含量在D2组达到最高值; Zn含量则在D4组达到最高值; 肝脏中铁含量呈下降趋势, 在D3和D4组显著低于D1和D2组。③D2组显著降低了幼鱼血清总抗氧化能力(T-AOC)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性; 丙二醛(MDA)含量则呈相反趋势, 在D2组显著高于D3和D4组; 总超氧化物歧化酶(T-SOD)和铜—锌超氧化物歧化酶(CuZn-SOD)活性均在D4组达到最低值。④血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活性均在D2组显著高于其他3组; 而血糖浓度、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)活性均在D2组达到最低值, 显著低于D1组。⑤肝脏金属硫蛋白(MT) mRNA相对表达量在D4组达到最高值, 显著高于其他3组; 谷胱甘肽转移酶(GST)和溶菌酶(LZM) mRNA相对表达量均在D2组显著低于其他3组; 热休克蛋白70(HSP70) mRNA相对表达量则在D2组显著高于其他3组。综上所述, 在本实验条件下, 饲料中添加硒(2~4 mg/kg)可缓解高铜(1 000 mg/kg)胁迫导致的鱼体生长缓慢等症状, 并可调控鱼体的抗氧化能力、生理代谢及相关基因表达量, 进而对鱼体在高铜胁迫下的内环境稳态恢复具有一定的促进作用。

关键词: 大菱鲂; 铜胁迫; 硒; 生长; 抗氧化能力; 基因表达

中图分类号: Q 786; S 965.3

文献标志码: A

铜是鱼体必需的营养元素, 但是受全球饲料原料大环境的影响, 饲料中铜含量往往超过鱼体的最适需求量, 过量的铜在鱼体高度富集会

引起鱼体生长缓慢, 机体组织氧化损伤及肝脏坏死等症状^[1], 直接导致水产养殖业的经济损失。即使鱼体没有表现出明显的中毒现象, 但仍可通过食物链蓄积于人体内脏, 造成人体各种并发症及肝硬化等^[2], 危害人体健康。近年

收稿日期: 2018-10-30 修回日期: 2018-12-27

资助项目: 烟台市科技计划(2018ZHGY066)

通信作者: 王际英, E-mail: ytwjy@126.com

来, 由于水产养殖业的集约化快速发展, 饲料中重金属超标造成的养殖经济损失及食品安全等问题日趋严重, 因此探索一种安全高效的方法来缓释铜中毒成为亟待解决的问题。

营养素在生物体内存在着复杂的相互促进或抑制作用。硒是生物体必需的营养元素, 在生长、免疫及维持机体体内平衡等方面具有重要的作用^[3]。此外, 另有研究表明, 硒可缓解畜禽因重金属导致的中毒及细胞凋亡等症状^[4-5]。目前有关硒的生物学功能在水生生物中的研究较少, 只有少数水生生物如黑带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)^[6]、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[7]、大黄鱼(*Larimichthys croceus*)^[8]、军曹鱼(*Rachycentron canadum*)^[3]等有所报道, 但也仅仅局限在硒的营养需求及抗氧化作用方面。大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)作为我国北方工厂化养殖的重要经济品种, 有关其矿物质营养生理方面的研究较少, 而关于硒对其重金属的缓释作用更未见报道。因此, 本实验以大菱鲂幼鱼作为研究对象, 通过在饲料中添加高铜对鱼体进行长期胁迫, 并在胁迫下添加不同水平的硒含量, 研究硒在铜胁迫下对大菱鲂幼鱼生长性能、抗氧化能力及相关基因表达量的影响, 探讨硒对高铜胁迫的缓释作用及作用机理, 为水产养殖业的可持续发展及水产品的质量安全控制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验设计与饲料制作

饲料配方和营养组成见表1。以鱼粉、酪蛋白和大豆浓缩蛋白为主要蛋白源, 鱼油为主要脂肪源。基础饲料预混料中含有适当含量的铜和硒(预混料由山东升索渔用饲料研究中心提供), 作为对照组。此外, 以五水硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)为铜源, 亚硒酸钠(Na_2SeO_3)为硒源, 向每千克干饲料中添加1个水平铜含量(1 000 mg)、3个水平硒含量(0、2、4 mg), 共配制成4组等氮等能的实验饲料(粗蛋白50%、粗脂肪14%), 分别命名为D1、D2、D3和D4组。经电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS, Agilent 7700, 美国)测得饲料中(以干物质计算)铜实际含量为5.30、895.23、888.55、900.10 mg/kg, 饲料中(以干物质计算)硒实际含量为0.86、0.99、3.10、6.60 mg/kg。制作饲料时, 所有饲料原料粉碎过80目筛, 按比例称

重、混匀, 加入鱼油及适量水再次混匀, 经螺旋挤压机加工成粒径3 mm的颗粒, 60 °C烘干后放置-20 °C冰箱备用。

1.2 实验用鱼和实验条件

实验用大菱鲂购自山东蓬莱宗哲养殖有限公司, 养殖实验在山东省海洋资源与环境研究院全封闭水循环系统进行。实验开始之前, 投

表 1 饲料配方和主要营养成分(干重)

Tab. 1 Formulation and proximate chemical composition of the tested diets (dry weight basis)

项目 items	比例/% percent in diet
酪蛋白 casein	20
鱼粉 fish meal	30
大豆浓缩蛋白 soy protein concentrate	15
鱼油 fish oil	8
大豆卵磷脂 soybean lecithin	1
α -淀粉 α -starch	12
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5
氯化胆碱 choline chloride	0.5
维生素预混料 vitamin premix ¹	2
矿物质预混料 mineral premix ²	1
甜菜碱 betaine	1
抗氧化物 antioxidant	0.1
羧甲基纤维素 CMC	7.9
牛磺酸 taurine	1
常规成分组成 proximate composition	
粗蛋白 crude protein	50.06
粗脂肪 crude lipid	14
粗灰分 crude ash	9.7

注: 1为维生素预混料(mg/kg预混料), 包含视黄醇, 38.0; α -生育酚, 210.0; 维生素D₃, 13.2; 硫胺素, 115.0; 核黄素, 380.0; 盐酸吡哆醇, 88.0; 泛酸, 368.0; 烟酸, 1 030.0; 生物素, 10.0 g; 叶酸, 20.0, 维生素B₁₂, 1.3; 肌醇, 4 000.0。2为矿物质预混料(mg/kg预混料), 包含硫酸锰, 3 568.0; 氯化钾, 3 020.5; 硫酸铝钾, 8.3; 氯化钴, 28.0; 硫酸锌, 353.0; 硫酸铜, 9.0; 碘化钾, 7.0; 硫酸锰, 63.1; 亚硒酸钠, 1.5; 柠檬酸铁, 1 533.0; 氯化钠, 100; 氟化钠, 4.0; 磷酸二氢钠, 25 568.0; 乳酸钙, 15 968.0

Notes: 1 is vitamin mixture(mg/kg vitamin premix), retinol acetate 38.0, alpha-tocopherol 210.0, vitamin D₃ 13.2, thiamin 115.0, riboflavin 380.0, pyridoxine HCl 88.0, pantothenic acid 368.0, niacin acid 1 030.0, biotin 10.0, folic acid 20.0, vitamin B₁₂ 1.3, inositol 4 000.0. 2 is mineral mixture(mg/kg mineral premix): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 568.0, KCl 3 020.5, $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ 8.3, CoCl_2 28.0, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 353.0, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 9.0, KI 7.0, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 63.1, Na_2SeO_3 1.5, $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 533.0, NaCl 100.0, NaF 4.0, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25 568.0, Ca-lactate 15 968.0

喂基础饲料(D1)驯化1周,使其适应养殖环境。驯化结束后,禁食24 h,挑选健康无病,规格均一的大菱鲂幼鱼[初始体质量(24.85±0.10)g]随机分配到12个圆柱形塑料养殖桶中。每个处理3个重复,每个重复40尾鱼。养殖实验持续84 d,每天投喂2次(8:30、16:30),投喂量为鱼体质量的1.5%~2%,投喂结束之后从系统自带的排水口将残饵排出,统计残饵量。整个实验期间,微流水循环水养殖,控制水温(16±1)°C, pH 7.8~8.0,盐度27~28,溶解氧>6 mg/L,氨氮<0.01 mg/L,亚硝酸盐<0.01 mg/L。

1.3 样品采集

养殖实验结束时,禁食24 h,以桶为单位称重,记录每桶实验鱼的尾数和体质量,计算成活率、增重率和饲料系数。每桶随机选择18尾幼鱼,采用丁香酚麻醉,其中3尾作为全鱼分析,12尾尾静脉采血,之后取背肌,分离肝脏。血样4 °C静置4 h, 4 000 r/min离心10 min,取血清,-70 °C待测。剩余3尾无菌取肝尖,立即放入无RNA酶管中,液氮速冻后转移至-70 °C超低温冰箱保存。

1.4 测定指标与方法

生长指标 增重率(weight gain rate, WGR, %)=($W_t - W_0$)/ $W_0 \times 100\%$;

特定生长率(specific growth rate, SGR, %/d) = ($\ln W_t - \ln W_0$)/ $t \times 100\%$;

饲料系数(feed conversion ratio, FCR)= $W_f / (W_t - W_0)$;

摄食率(feed intake, FI, %)= $W_f / [(W_0 + W_t) / 2] \times 100\%$;

蛋白质效率(protein efficiency ratio, PER)= $(W_t - W_0) / (W_f \times C_p)$;

存活率(survival rate, SR, %)= $N_f / N_i \times 100\%$ 。

式中, W_0 为实验开始时鱼体质量(g), W_t 为实验结束时鱼体质量(g), W_f 为摄食量(g), C_p 为饲料蛋白质质量分数, N_f 、 N_i 分别为实验开始和结束时实验鱼存活尾数, t 为养殖周期(d)。

实验饲料和体成分的测定 实验饲料及实验鱼组织水分、粗蛋白、粗脂肪和粗灰分含量均采用国标测定^[9-12]。能量采用燃烧法(IKA, C6000, 德国)测定。组织中Cu、Se、Fe和Zn采用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS, Agilent 7700, 美国)测定。

血清酶活性测定 血清中总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)、铜—锌超氧化物歧化酶(CuZn superoxide dismutase, CuZn-SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。

血清肝功指标丙氨酸转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天冬氨酸转移酶(aspartate transaminase, AST), 脂肪代谢指标甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TCHO)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C), 血糖指标葡萄糖(glucose, GLU)均采用生化分析仪(7020, Hitachi, 日本)测定, 试剂盒购于北京利德曼生化股份有限公司。酶活性单位参照试剂盒说明书。

采用Trizol法提取肝脏总RNA。总RNA的质量通过1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 其浓度及OD₂₆₀/OD₂₈₀值通过Nanodrop ND-2000分光光度计测定, 选择OD₂₆₀/OD₂₈₀值为1.8~2.0, 凝胶电泳条带分离以清晰、无明显拖带现象的总RNA样本为模板。

按照Prime Script[®] RT reagent Kit (TaKaRa)反转录试剂盒说明书进行操作, 用1%的琼脂糖凝胶电泳法检测合成的cDNA片段长度与目的基因是否相符, 将得到的cDNA于-70 °C保存备用。

参照基因选用β-肌动蛋白(β-actin), 目的基因为金属硫蛋白(metallothionein, MT)、谷胱甘肽转移酶(glutathione transferase, GST)、溶菌酶(lysozyme, LZM)和热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70), 5个基因均根据GenBank数据库中提供的序列设计引物(表2), 并送交上海生物工程股份有限公司合成。经标准曲线筛选后, 保证引物扩增效率在95%以上^[13]。

荧光定量PCR采用SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa公司)试剂盒进行, 反应体系20 μL, 每个反应3个重复。反应程序: 95 °C, 30 s; 95 °C, 5 s; 56 °C, 30 s; 72 °C, 1 min; 40个循环。采用2^{-ΔΔC_t}法对大菱鲂目的基因mRNA表达量进行差异分析, 计算目的基因的相对表达量^[14]。

表 2 实时荧光定量PCR使用的引物

Tab. 2 Real time qPCR primers

基因 genes	引物序列 primer sequence (5'-3')	登录号 GenBank accession number
β -肌动蛋白 <i>β-actin</i>	F: TGAACCCCAAAGCCAACAGG R: AGAGGCATACAGGGACAGCAC	EU686692.1
金属硫蛋白 <i>MT</i>	F: TGCTCCAAGAGTGGAACTG R: CGCATGTCTTCCCTTTGCAC	EF406132.1
谷胱甘肽转移酶 <i>GST</i>	F: GGGTTCGCATCGCTTTT R: GGCCTGGTCTCGTCTATGTACT	DQ848966.1
溶菌酶 <i>LZM</i>	F: CTCTCAACGTTCCCACTGGTTCTA R: GGGTTCATGAAGTGTCTGTAGAT	AJ250732.1
热休克蛋白70 <i>HSP70</i>	F: CTGTCCCTGGGTATTGAGAC R: GAACACCACGAGGAGCA	EF191027.1

1.5 数据分析

采用SPSS 17.0对所得数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)。若差异显著, 则采用Duncan氏进行多重检验, 显著水平为0.05, 统计数据以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。

2 结果

2.1 硒对铜胁迫下大菱鲂幼鱼生长性能的影响

各组之间幼鱼成活率无显著差异($P>0.05$) (表3)。饲料中添加不同水平的硒对铜胁迫下大

菱鲂幼鱼的增重率和特定生长率具有显著性影响($P<0.05$)。D3和D4组显著高于D1和D2组($P<0.05$), D3和D4组之间差异不显著($P>0.05$)。与D1组相比, D3和D4组增重率分别提高了4.86%和5.47%。与D2组相比, D3和D4组增重率分别提高了10.78%和11.43%。摄食率和饲料系数均呈先上升后下降趋势, 在D2组显著高于其他3组($P<0.05$)。蛋白质效率与饲料系数呈相反趋势, 在D2组显著低于其他3组($P<0.05$)。

2.2 硒对铜胁迫下大菱鲂幼鱼体成分的影响

本实验结果表明, 饲料中添加高铜可降低

表 3 硒对铜胁迫下大菱鲂幼鱼生长性能的影响

Tab. 3 Effects of different dietary Se on the growth performance of juvenile *S. maximus* under Cu stress

项目 items	实验饲料 experiment dietary			
	D1	D2	D3	D4
初始体质量/g initial body weight	24.85 \pm 0.02	24.87 \pm 0.02	24.84 \pm 0.03	24.85 \pm 0.01
终末体质量/g final body weight	79.15 \pm 1.11 ^b	76.31 \pm 1.02 ^a	81.76 \pm 1.21 ^c	82.09 \pm 1.66 ^c
增重率/% WGR	218.48 \pm 4.82 ^b	206.80 \pm 3.96 ^a	229.10 \pm 4.69 ^c	230.44 \pm 6.54 ^c
特定生长率/(%/d) SGR	1.38 \pm 0.02 ^b	1.33 \pm 0.01 ^a	1.42 \pm 0.02 ^c	1.42 \pm 0.02 ^c
摄食率/% FI	0.88 \pm 0.01 ^a	0.91 \pm 0.01 ^b	0.87 \pm 0.01 ^a	0.87 \pm 0.01 ^a
饲料系数 FCR	0.71 \pm 0.01 ^a	0.75 \pm 0.01 ^b	0.69 \pm 0.01 ^a	0.68 \pm 0.02 ^a
蛋白质效率 PER	2.81 \pm 0.05 ^b	2.67 \pm 0.05 ^a	2.88 \pm 0.04 ^b	2.93 \pm 0.08 ^b
存活率/% SR	98.33 \pm 2.88	97.50 \pm 2.50	97.50 \pm 3.53	99.16 \pm 1.44

注: 同行肩标相同小写字母或无字母表示差异不显著($P>0.05$), 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同
Notes: in the same row, values with same small letter superscripts or no letter superscripts mean no significant different($P>0.05$), different small letter superscripts mean significant different($P<0.05$). The same below, n=3

全鱼粗蛋白和粗脂肪含量,随着饲料中硒添加水平的升高,鱼体粗蛋白和粗脂肪含量呈上升趋势,在D4显著高于D2组($P<0.05$)。各组间全鱼水分和粗灰分含量无显著差异($P>0.05$),但饲料中添加高铜显著降低了幼鱼背肌水分含量($P<0.05$),各组间背肌粗蛋白和粗脂肪含量无显著差异($P>0.05$)。与对照组相比,D2组肝脏粗蛋白和粗脂肪含量显著低于对照组($P<0.05$),随着饲料中硒含量的增加,肝脏粗蛋白和粗脂肪含量有上升趋势,但粗蛋白含量在D3和D4组与D2组无显著差异($P>0.05$),粗脂肪含量在D3和D4组显著高于D2组($P<0.05$)。各组间肝脏水分含量无显著差异($P>0.05$)(表4)。

饲料中铜含量由5.30升高到895.23 mg/kg时,大菱鲂幼鱼全鱼铜含量由0.93上升到1.40 mg/kg,脊椎骨铜含量由1.01上升到1.47 mg/kg,肝脏铜含量由5.27上升到8.25 mg/kg,与对照组相比,分别提高了51.07%、45.54%、56.50%。各组间幼鱼背肌铜含量无显著差异($P>0.05$)(表5)。随着饲料中硒含量的增加,幼鱼全鱼、脊椎骨和肝脏中铜含量呈下降趋势,在D3和D4组显著低于D2组($P<0.05$)。在本实验中,硒对铜胁迫下大菱

鲂幼鱼全鱼、背肌和脊椎骨中的Fe和Zn含量有显著的影响($P<0.05$)。全鱼和背肌中Fe含量随饲料的变化呈上升趋势,在D4组达到最高值,显著高于其他3组($P<0.05$)。脊椎骨中Fe含量在D2组显著高于其他3组($P<0.05$);但肝脏中Fe含量在D4组达到最低值,显著低于D1和D2组($P<0.05$)。全鱼、背肌和脊椎骨中Zn含量均随饲料变化呈上升趋势,均在D4组显著高于D1组($P<0.05$)。各组间幼鱼肝脏Zn含量没有显著差异($P>0.05$)。

2.3 硒对铜胁迫下大菱鲂幼鱼血清抗氧化酶活性的影响

饲料中添加不同水平的硒对铜胁迫下大菱鲂幼鱼血清抗氧化酶活性产生了显著性影响($P<0.05$)。T-AOC、CAT和GSH-Px活性均在D2组达到最低值,显著低于其他3组($P<0.05$)(表6)。与D1和D2组相比,D3和D4组T-AOC、CAT和GSH-Px活性均显著升高($P<0.05$)。MDA含量则呈现相反趋势,在D2组达到最高值,与D1组差异不显著($P>0.05$),但显著高于D3和D4组($P<0.05$)。T-SOD和CuZn-SOD活性随饲料的变化呈下降趋势,D2、D3和D4组T-SOD活性与对照组之间差异显著($P<0.05$),但D2、D3和D4组间无显著性差

表4 硒对铜胁迫下大菱鲂幼鱼体成分的影响

Tab. 4 Effects of different dietary Se on proximate composition of the whole body and muscle of juvenile *S. maximus* under Cu stress

营养组成 nutritional composition	实验饲料 experiment dietary				%
	D1	D2	D3	D4	
全鱼 whole body					
水分 moisture	76.85±1.60	78.04±0.90	75.49±2.09	76.26±1.41	
粗蛋白 crude protein	15.16±0.33 ^{ab}	14.78±0.67 ^a	15.36±0.83 ^{ab}	16.62±1.08 ^b	
粗脂肪 crude lipid	3.22±0.15 ^c	2.16±0.20 ^a	2.64±0.43 ^{ab}	2.74±0.30 ^{bc}	
粗灰分 crude ash	3.58±0.19	3.40±0.16	3.60±0.21	3.34±0.12	
背肌 dorsal muscle					
水分 moisture	79.41±0.36 ^b	78.30±0.23 ^a	79.49±0.46 ^b	79.25±0.36 ^b	
粗蛋白 crude protein	17.76±0.53	18.37±0.15	17.86±0.36	18.29±0.12	
粗脂肪 crude lipid	0.66±0.03	0.68±0.00	0.66±0.04	0.67±0.04	
肝脏 liver					
水分 moisture	70.09±1.38	69.02±1.66	69.31±3.32	67.37±2.01	
粗蛋白 crude protein	12.29±0.21 ^b	11.11±0.52 ^a	11.75±0.22 ^{ab}	11.73±0.36 ^{ab}	
粗脂肪 crude lipid	10.32±0.14 ^b	9.56±0.25 ^a	11.01±0.27 ^{bc}	11.11±0.66 ^c	

表 5 硒对铜胁迫下大菱鲃幼鱼组织 Cu、Se、Fe、Zn 含量的影响
 Tab. 5 Effects of different dietary Se on Cu, Se, Fe, Zn content in tissues of juvenile *S. maximus* under Cu stress

项目 items	实验饲料 experiment dietary			
	D1	D2	D3	D4
全鱼 whole body				
Cu	0.93±0.06 ^a	1.40±0.09 ^c	1.15±0.02 ^b	1.07±0.04 ^b
Se	0.54±0.09 ^a	0.57±0.02 ^a	1.97±0.04 ^b	2.57±0.11 ^c
Fe	23.74±0.53 ^a	35.95±1.83 ^b	38.17±1.29 ^b	72.03±1.53 ^c
Zn	36.10±2.91 ^a	35.26±2.31 ^a	36.80±2.30 ^a	44.53±0.78 ^b
背肌 dorsal muscle				
Cu	1.13±0.03	1.17±0.00	1.21±0.07	1.21±0.04
Se	0.53±0.00 ^a	0.49±0.01 ^a	2.01±0.16 ^b	2.94±0.15 ^c
Fe	10.23±0.88 ^a	12.15±0.54 ^a	14.67±0.83 ^b	35.00±1.81 ^c
Zn	20.01±1.76 ^a	22.52±0.71 ^{ab}	21.95±0.64 ^{ab}	24.24±1.90 ^b
脊椎骨 vertebra				
Cu	1.01±0.04 ^b	1.47±0.07 ^d	1.17±0.04 ^c	0.9±0.01 ^a
Se	0.24±0.02 ^a	0.24±0.02 ^a	0.72±0.01 ^b	1.18±0.09 ^c
Fe	40.50±1.23 ^a	72.51±2.00 ^d	62.44±5.46 ^c	47.37±2.65 ^b
Zn	41.33±0.57 ^a	49.82±1.99 ^b	52.30±2.70 ^{bc}	54.65±2.15 ^c
肝脏 liver				
Cu	5.27±0.40 ^a	8.25±0.28 ^c	6.03±0.25 ^b	6.08±0.17 ^b
Se	2.92±0.25 ^a	2.20±0.38 ^a	6.36±0.22 ^b	13.12±0.64 ^c
Fe	135.08±8.10 ^c	93.56±9.25 ^b	80.53±3.62 ^a	77.16±4.72 ^a
Zn	47.74±3.56	46.39±3.48	44.16±1.42	42.63±2.87

表 6 硒对铜胁迫下大菱鲃幼鱼血清抗氧化酶活性的影响

Tab. 6 Effects of different dietary Se on serum antioxidant enzyme activity of juvenile *S. maximus* under Cu stress

项目 items	实验饲料 experiment dietary			
	D1	D2	D3	D4
T-AOC/(U/mL)	9.59±0.31 ^b	8.48±0.31 ^a	11.36±0.19 ^c	11.92±0.17 ^d
T-SOD/(U/mL)	122.99±4.29 ^b	108.41±2.50 ^a	106.24±2.26 ^a	102.89±1.38 ^a
CuZn-SOD/(U/mL)	102.80±4.08 ^c	86.18±5.46 ^b	87.66±5.92 ^b	75.62±5.77 ^a
CAT/(U/mL)	2.37±0.19 ^b	1.99±0.10 ^a	2.50±0.20 ^b	2.40±0.21 ^b
GSH-Px/(IU/mL)	99.62±5.12 ^b	83.67±1.91 ^a	114.00±4.87 ^c	125.33±3.21 ^d
MDA/(nmol/mL)	4.00±0.11 ^b	4.20±0.11 ^b	3.41±0.28 ^a	3.26±0.20 ^a

异($P>0.05$); CuZn-SOD活性在D4组达到最低值, 显著低于D1、D2和D3组($P<0.05$)。

2.4 硒对铜胁迫下大菱鲃幼鱼生理生化指标的影响

ALT和AST活性均在D2组达到最高值, 与对照组相比, ALT和AST分别显著升高了250.45%和1 187.96%, 显著高于其他3组($P<0.05$), 其他3组之间无显著差异($P>0.05$)(表7)。血糖浓度在D2组达到最低值, 显著低于对照组和D4组($P<0.05$), 与D3组差异不显著($P>0.05$)。TG呈先下降后上升趋势, 在D3组达到最低值, 与D2组无显著性差异($P>0.05$), 但显著低于D1和D4组($P<0.05$)。TC、HDL-C和LDL-C均在D2组达到最低值, 显著低于D1、D3和D4组($P<0.05$)。

2.5 硒对铜胁迫下大菱鲃幼鱼肝脏MT、GST、LZM和HSP70基因表达的影响

饲料中添加不同水平的硒对铜胁迫下大菱鲃幼鱼肝脏MT mRNA、GST mRNA、LZM mRNA和HSP70 mRNA相对表达量有显著影响($P<0.05$)(图1)。MT mRNA表达量呈显著上升趋势, D4组达到最高值, 显著高于其他3组($P<0.05$)。GST mRNA和LZM mRNA均呈先下降后上升趋势, 在D2组达到最低值, 显著低于其他3组($P<0.05$), D3和D4组显著高于D1组($P<0.05$)。HSP70 mRNA相对表达量在D2组达到最高值, 显著高于其他3组($P<0.05$), D3和D4组显著低于D1组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 硒对铜胁迫下大菱鲃幼鱼生长性能和体成分的影响

本实验中, 饲料中添加高铜使大菱鲃幼鱼生长性能下降, 与在斜带石斑鱼(*E. coioides*)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)和革胡子鲶(*Clarias gariepinus*)中的研究结果一致^[15-17]。种香玉等^[18]研究表明, 高铜胁迫可导致鱼体肠道受损, 降低营养物质的吸收, 从而减缓鱼体生长, 有可能是降低本实验中鱼体生长性能的原因之一。但随着饲料硒水平的提高, 幼鱼WGR、SGR和全鱼、肝脏中粗蛋白和粗脂肪含量呈上升趋势, 原因可能是硒在鱼体内可与铜离子相结合, 形成金属—硒—蛋白质复合物, 起到解毒排毒作用, 缓解了高铜胁迫带来的能量损耗^[19], 从而使鱼体保存更多能量用于生长和蛋白沉积。各组之间背肌粗蛋白和粗脂肪含量无显著性差异, 表明高铜胁迫能量损耗优先选择肝脏。

叶超霞等^[15]表明, 在斜带石斑鱼饲料中添加1 000 mg/kg的高铜, 可使鱼体肝脏铜含量远远超过水产品中的铜安全限量(《农产品安全质量无公害水产品安全要求》(GB18406.4-2001)^[20]和《无公害食品水产品中有毒有害物质限量》(NY5073-2001)^[21]规定的铜 ≤ 50 mg/kg), 但在本实验中, 即使饲料中铜含量达到1 000 mg/kg(实测值为

表7 硒对铜胁迫下大菱鲃幼鱼血清生理生化指标的影响

Tab. 7 Effects of different dietary Se on serum physiological index of juvenile *S. maximus* under Cu stress

项目 items	实验饲料 experiment dietary			
	D1	D2	D3	D4
肝功能 liver function				
ALT/(U/L)	3.33±0.58 ^a	11.67±1.52 ^b	2.33±0.57 ^a	2.67±0.57 ^a
AST/(U/L)	27.33±1.15 ^a	352.00±18.08 ^b	16.67±1.52 ^a	10.67±1.15 ^a
糖代谢 glucose metabolism				
GLU/(mmol/L)	2.35±0.20 ^b	1.93±0.08 ^a	1.85±0.04 ^a	2.17±0.02 ^b
脂肪代谢 lipid metabolism				
TG/(mmol/L)	3.03±0.13 ^c	2.29±0.12 ^a	2.28±0.09 ^a	2.61±0.19 ^b
TC/(mmol/L)	4.15±0.15 ^c	3.17±0.11 ^a	3.65±0.29 ^b	4.57±0.19 ^d
HDL-C/(mmol/L)	3.91±0.19 ^d	2.36±0.26 ^a	2.90±0.13 ^b	3.36±0.16 ^c
LDL-C/(mmol/L)	0.85±0.08 ^c	0.46±0.01 ^a	0.69±0.08 ^b	0.73±0.03 ^b

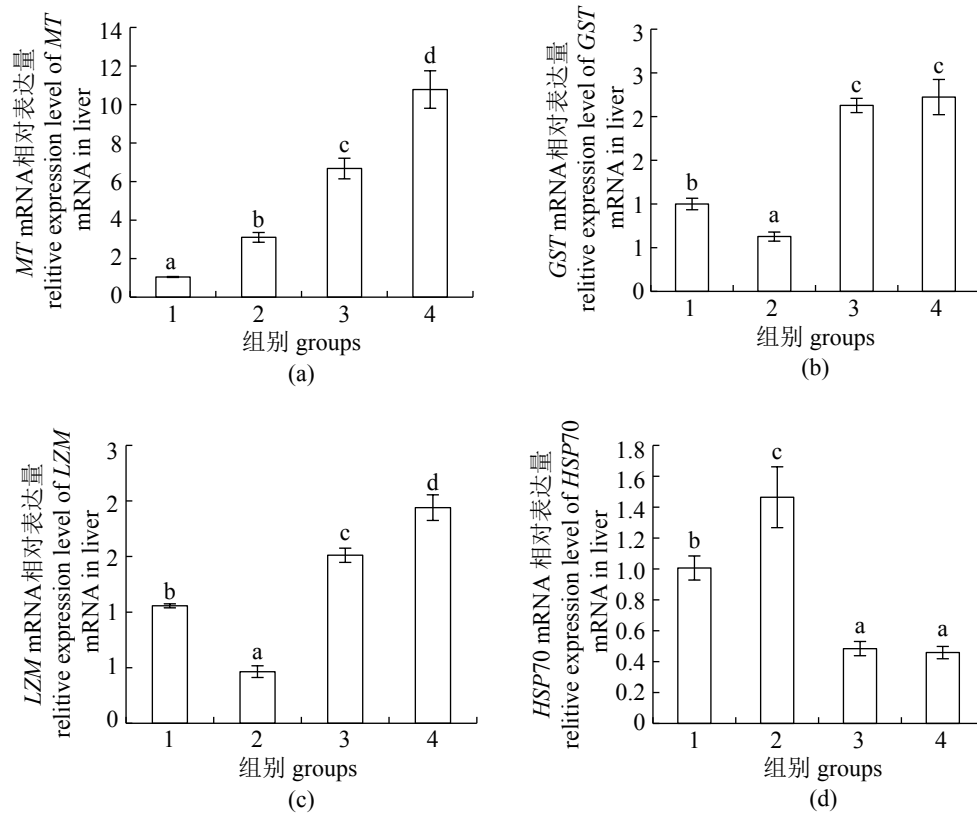


图 1 饲料中添加不同水平硒对铜胁迫下大菱鲃幼鱼肝脏中 *MT*、*GST*、*LZM* 和 *HSP70* 基因的表达影响
1. D1组, 2. D2组, 3. D3组, 4. D4组。柱上不同字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 1 Effects of different dietary Se on liver *MT*, *GST*, *LZM* and *HSP70* mRNA relative gene expression of juvenile *S. maximus* under Cu stress

1. D1 group, 2. D2 group, 3. D3 group, 4. D4 group. Values in each column with different letter superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

895.23 mg/kg), 大菱鲃幼鱼组织中的铜含量也远远低于水产品中铜安全限量的要求。但本实验中饲料铜从5.30上升到895.23 mg/kg, 肝脏铜含量提高了51.07%, 仍低于魏万权等^[22]养殖牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 31 d 的实验结果, 可能原因是与养殖周期有关, 本实验养殖周期为84 d, 鱼体可能已经建立起一种相对适应性, 通过这种适应性可以将过多的未被吸收利用的金属元素排出体外, 而不至于金属中毒^[23]。随着饲料中硒含量的增加, 可降低鱼体不同组织中的Cu含量, 与在紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 中^[24]的研究结果类似。

矿物质在生物体内相互作用, 共同维护着内环境的稳定。金属元素铁和锌在生物体内与铜的转运过程相似, 因此, 它们之间存在着相互竞争性抑制作用^[25]。本实验中, 当饲料中铜含量由5.30上升到895.23 mg/kg时, 幼鱼全鱼、背肌及脊椎骨中的铁含量均显著增加, 可能原因是铜可以参与铁的代谢, 铜作为铜蓝蛋白的主

要成分, 它能贮存一部分铁, 有利于铁的充分吸收转运和沉积^[26]。在高铜胁迫下, 随着饲料中硒含量的增加, 全鱼和背肌中铁和锌含量均呈上升趋势, 但脊椎骨和肝脏中的铁含量呈下降趋势, 肝脏中锌含量无显著差异, 造成此结果的原因可能是饲料中铜和硒含量的变化导致不同组织中质子的不同, 改变了金属离子转运蛋白的活性, 不同细胞对不同矿物质的吸收速率不同^[27], 从而导致鱼体不同组织对不同矿物质的代谢蓄积能力也不同。以上也充分表明, 矿物质在生物体内不是简单的相互促进或抑制关系, 具体机理还需进一步研究。

3.2 硒对铜胁迫下大菱鲃幼鱼血清抗氧化酶活性的影响

在本实验中, 饲料中添加高铜导致了幼鱼血清T-AOC、CAT、GSH-Px活性的降低, MDA含量的增加, 表明饲料中添加高铜导致了鱼体氧化应激。与D2组相比, D3和D4组添加不同水

平的硒显著提高了鱼体血清T-AOC、CAT、GSH-Px活性,降低了MDA活性,这表明硒可缓解高铜导致的鱼体氧化应激。其抗氧化机理:硒作为谷胱甘肽过氧化物的活性中心,可以非特异性地结合到其他蛋白质所提供的不敏感结合部位,而重金属的作用部位则可以通过GSH-Px转移到此不敏感结合部位上^[28],使组织中有足够活性的GSH-Px来发挥抗氧化作用,从而提高鱼体的抗氧化能力。本实验中,血清T-SOD和CuZn-SOD随饲料的变化呈下降趋势,原因可能是铜作为SOD的作用中心,对于维持该酶的稳定性具有作用,高铜可抑制SOD的活性^[29],随着硒含量的增加,硒和铜进行剂量修正^[30],从而降低了铜带来的氧化应激,因此SOD活性继续降低。Amaravadi等^[31]研究表明,CuZn-SOD的分子伴侣CCS1可以介导铜转运到超氧化物歧化酶上,从而参与机体的抗氧化应激反应,因此本实验结果中CuZn-SOD与T-SOD活性变化趋势一致。本实验中,在铜胁迫下,血清MDA含量随着饲料中硒水平的变化呈先上升后下降趋势,表明饲料中添加硒可降低高铜胁迫下血清脂质的过氧化水平。由此可见,饲料中添加硒有效降低了铜胁迫引起的氧化应激。

3.3 硒对铜胁迫下大菱鲂幼鱼生理生化指标的影响

谷草转氨酶和谷丙转氨酶是鱼体重要的氨基转移酶,其活性大小可反映鱼体肝脏健康状况^[32]。本实验结果表明,饲料中添加高铜显著提高了血清ALT和AST活性,表明铜过量对鱼体肝脏产生了一定损害作用,使肝细胞中的ALT和AST转移到血清中。随着饲料中硒含量的增加,血清ALT和AST活性呈现下降趋势,且与对照组无显著差异,表明硒在铜胁迫下对幼鱼肝组织具有一定的保护作用,与在鸡^[33]中的研究结果一致。血糖是鱼体主要的能量物质,在正常情况下含量较稳定,但随着应激的变化可呈规律性变化,可作为鱼体应激反应指标^[34]。本实验结果表明,饲料中添加高铜可使血糖浓度下降,表明当铜的吸收量超过一定阈值,机体消耗了大量血糖用于应激胁迫,从而使血糖浓度下降,与在褐篮子鱼(*Siganus fuscescens*)^[35]上的研究结果一致。在本实验中随着饲料硒的添加,可缓解大菱鲂幼鱼铜胁迫应激并可降低血糖水平,与

Tanko等^[36]在大鼠中的研究结果一致。在本实验中,饲料中添加高铜降低了血清TG、TC、HDL-L和LDL-L含量,其原因可能是铜与糖化蛋白反应形成更多自由基,导致甘油三酯和胆固醇功能发生障碍^[37]。随着饲料硒含量的增加,血清TG、TC、HDL-L和LDL-L含量均有上升趋势,其机理可能与硒能降低大量自由基有关^[38]。

3.4 硒对铜胁迫下大菱鲂幼鱼肝脏MT、GST、LZM和HSP70基因表达的影响

金属硫蛋白是一种普遍存在于生物体内的低分子量、富含半胱氨酸的蛋白质,结构高度保守,在维持生物体内稳态和解毒方面具有重要作用^[39]。本实验中,饲料中添加一定水平的铜可使肝脏中金属硫蛋白基因表达量升高,与在厚壳贻贝^[40](*M. coruscus*)上研究结果一致。随着饲料中硒含量的增加,大菱鲂幼鱼肝脏金属硫蛋白基因表达量持续升高,表明饲料铜和硒的添加对大菱鲂幼鱼产生了影响,可能原因是重金属与鱼体辅酶等因子结合时,MT Cu²⁺/辅酶与MT Se⁴⁺/辅酶具有正面干扰作用^[41],从而使金属硫蛋白基因表达量升高。

谷胱甘肽S-转移酶是一类多功能蛋白家族,主要参与解毒和抗氧化防御过程^[42]。在本研究中,饲料中添加高铜显著降低了谷胱甘肽S-转移酶基因表达量,表明饲料中过量铜打破了鱼体氧化系统的内稳定,使鱼体抗氧化能力下降,过量的自由基和过氧化物产物抑制了谷胱甘肽S-转移酶基因的表达。随着饲料硒含量的增加,谷胱甘肽S-转移酶基因表达量呈上升趋势,表明随着硒在体内的沉积,鱼体抗氧化能力升高,与对皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)^[43]的研究结果一致。

在本实验中,饲料中添加高铜显著降低了鱼体肝脏溶菌酶基因表达量,表明饲料中高铜的添加对鱼体的非特异性免疫系统造成了一定的损伤,随着饲料硒含量的增加,肝脏溶菌酶基因表达量显著升高,说明硒可通过调控免疫相关基因表达量来缓解高铜诱导的鱼体免疫抑制,其具体作用机理还需进一步研究。

已有研究表明,热休克蛋白70在生物体内的动态平衡中发挥重要的作用,可作为生理指标来判断鱼体的生理状态,当鱼体受重金属胁迫时,鱼体肝脏热休克蛋白70蛋白含量及基因表

达量均显著升高^[44-45], 与本实验结果一致。随着饲料中硒含量的增加, 鱼体肝脏热休克蛋白70基因表达量显著降低, 表明在重金属胁迫下, 饲料中硒的添加可以通过调节热休克蛋白70的基因表达量的平衡来保护肝组织, 与在小鼠中的研究结果一致^[46]。

4 结论

综上所述, 在本实验条件下, 饲料中添加硒可缓解高铜胁迫导致的鱼体生长缓慢等症状; 可通过增强鱼体的抗氧化酶活性, 降低丙二醛含量, 减轻鱼体抗氧化应激损伤; 可通过调节鱼体生理代谢及肝脏相关基因表达量, 促进鱼体在高铜胁迫下的内环境稳态的恢复。

参考文献:

- [1] De Romaña D L, Olivares M, Uauy R, *et al.* Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2011, 25(1): 3-13.
- [2] Gaetke L M, Chow-Johnson H S, Chow C K. Copper: toxicological relevance and mechanisms[J]. *Archives of toxicology*, 2014, 88(11): 1929-1938.
- [3] 杨原志, 聂家全, 谭北平, 等. 硒源与硒水平对军曹鱼幼鱼生长性能、肝脏和血清抗氧化指标及组织硒含量的影响[J]. *动物营养学报*, 2016, 28(12): 3894-3904. Yang Y Z, Nie J Q, Tan B P, *et al.* Effects of selenium source and selenium level on growth performance, liver and serum antioxidant indices and selenium content in tissues of juvenile cobia(*Rachycentron canadum*)[J]. *Chinese journal of animal nutrition*, 2016, 28(12): 3894-3904(in Chinese).
- [4] Xu T, Gao X J, Liu G W. The antagonistic effect of selenium on lead toxicity is related to the ion profile in chicken liver[J]. *Biological Trace Element Research*, 2016, 169(2): 365-373.
- [5] Wang M, Fu H J, Xiao Y M, *et al.* Effects of low-level organic selenium on lead-induced alterations in neural cell adhesion molecules[J]. *Brain Research*, 2013, 1530: 76-81.
- [6] Lin Y H, Shiau S Y. Dietary selenium requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*[J]. *Aquaculture*, 2005, 250(1-2): 356-363.
- [7] 谈枫, 梁萌青, 郑珂珂, 等. 鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)养殖中期对饲料硒的需求量[J]. *渔业科学进展*, 2015, 36(3): 93-100. Tan F, Liang M Q, Zheng K K, *et al.* The requirement of dietary selenium at the middle growth stage of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*)[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(3): 93-100(in Chinese).
- [8] 曹娟娟, 张文兵, 徐玮, 等. 大黄鱼幼鱼对饲料硒的需求量[J]. *水生生物学报*, 2015, 39(2): 241-249. Cao J J, Zhang W B, Xu W, *et al.* Dietary selenium requirement of juvenile large yellow croaker *Larimichthys croceus*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(2): 241-249(in Chinese).
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中水分和其他挥发性物质含量的测定: GB 6435-2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006. General administration of quality supervision, inspection and quarantine of the people's republic of china. Standardization administration. Determination of moisture and other volatile mater content in feeds: GB 6435-2006[S]. Beijing: China Standard Press, 2006(in Chinese).
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中粗蛋白测定方法: GB 6432-1994[S]. 北京: 中国标准出版社, 1994. General administration of quality supervision, inspection and quarantine of the people's republic of China. Standardization administration. Method for the determination of crude protein in feedstuffs: GB 6432-1994[S]. Beijing: China Standard Press, 1994(in Chinese).
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中粗脂肪的测定: GB 6433-2006, [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006. General administration of quality supervision, inspection and quarantine of the people's republic of China. Standardization administration. Determination of crude fat in feeds: GB 6433-2006[S]. Beijing: China Standard Press, 2006(in Chinese).
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 饲料中粗灰分的测定: GB 6438-2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007. General administration of quality supervision, inspection and quarantine of the people's republic of China. Standardization administration. Animal feeding stuffs-Determination of crude ash: GB 6438-2007[S]. Beijing: China Standard Press, 2007(in Chinese).
- [13] 王震, 徐玮, 麦康森, 等. 饲料缬氨酸水平对军曹鱼鱼体脂肪含量、血浆生化指标和肝脏脂肪代谢基因表达的影响[J]. *水生生物学报*, 2016, 40(4): 744-751.

- Wang Z, Xu W, Mai K S, *et al.* The effects of valine level on plasma biochemical indexes, lipid content and gene expression involved in lipid metabolism in cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, 40(4): 744-751(in Chinese).
- [14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method[J]. *Methods*, 2001, 25(1): 402-408.
- [15] 叶超霞, 刘永坚, 田丽霞, 等. 饲料中高水平铜对斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)生长和铜、铁、锰、锌含量的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(3): 606-610.
- Ye C X, Liu Y J, Tian L X, *et al.* Effects of elevated dietary copper levels on growth and Cu, Fe, Mn, Zn content of juvenile grouper *Epinephelus coioides*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(3): 606-610(in Chinese).
- [16] Shaw B J, Handy R D. Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 76(2): 111-121.
- [17] Hoyle I, Shaw B J, Handy R D. Dietary copper exposure in the African walking catfish, *Clarias gariepinus*: transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress[J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 83(1): 62-72.
- [18] 种香玉, 周立志, 韩冬, 等. 饲料中铜浓度对异育银鲫和斑点叉尾鲷的影响[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(4): 751-763.
- Chong X Y, Zhou L Z, Han D, *et al.* Effects of dietary copper at different concentrations on gibel carp and channel catfish[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(4): 751-763(in Chinese).
- [19] 陈春, 周启星. 金属硫蛋白作为重金属污染生物标志物的研究进展[J]. *农业环境科学学报*, 2009, 28(3): 425-432.
- Chen C, Zhou Q X. Researching advance in metallothionein and its biomarker of heavy metal contamination[J]. *Journal of Agro-environment Science*, 2009, 28(3): 425-432(in Chinese).
- [20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 农产品安全质量 无公害水产品安全要求: GB 18406.4-2001[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- General administration of quality supervision, inspection and quarantine of the people's republic of China. Safety qualification for agricultural product-Safety requirements for non-environmental pollution aquatic products: GB 18406.4-2001[S]. Beijing: China Standard Press, 2001(in Chinese).
- [21] 中华人民共和国农业部. 无公害食品水产品中有毒有害物质限量: NY 5073-2001[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- Ministry of agriculture of the people's republic of China. Limit of toxic and harmful substances in pollution-free food and aquatic products: NY 5073-2001[S]. Beijing: China Standard Press, 2001(in Chinese).
- [22] 魏万权, 李爱杰, 李德尚. 牙鲆幼鱼饲料中铜的适宜添加量研究[J]. *海洋湖沼通报*, 2001(2): 54-59.
- Wei W Q, Li A J, Li D S. Studies on optimal copper supplementation in the diet for the juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Transactions of oceanology and limnology*, 2001(2): 54-59(in Chinese).
- [23] Hardy R W, Sullivan C V, Koziol A M. Absorption, body distribution, and excretion of dietary zinc by rainbow trout (*Salmo gairdneri*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1987, 3(3): 133-143.
- [24] Trevisan R, Mello D F, Fisher A S, *et al.* Selenium in water enhances antioxidant defenses and protects against copper-induced DNA damage in the blue mussel *Mytilus edulis*[J]. *Aquatic toxicology*, 2011, 101(1): 64-71.
- [25] 钱剑, 王哲, 刘国文. 铜在动物体内代谢的研究进展[J]. *动物医学进展*, 2003, 24(2): 55-57.
- Qian J, Wang Z, Liu G W. Advance of copper metabolism in animal body[J]. *Progress in veterinary medicine*, 2003, 24(2): 55-57(in Chinese).
- [26] 吴茂江, 涂长信. 铜与人体健康[J]. *微量元素与健康研究*, 2005, 22(5): 64-65.
- Wu M J, Tu C X. Copper and human health[J]. *Studies of trace elements and health*, 2005, 22(5): 64-65(in Chinese).
- [27] Lee J, Peña M M, Nose Y, *et al.* Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(6): 4380-4387.
- [28] Jamall I S, Smith J C. Effects of cadmium on glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and lipid peroxidation in the rat heart: a possible mechanism of cadmium cardiotoxicity[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1985, 80(1): 33-42.
- [29] 胡俊茹, 王国霞, 孙育平, 等. 饲料硒含量对黄颡鱼幼鱼生长性能、抗氧化能力和脂肪代谢基因表达的影响[J]. *动物营养学报*, 2016, 28(12): 3925-3934.
- Hu J R, Wang G X, Sun Y P, *et al.* Effects of dietary selenium content on growth performance, antioxidant capacity and lipid metabolism gene expression of juvenile yellow catfish(*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Chinese journal of animal nutrition*, 2016, 28(12): 3925-3934(in Chinese).
- [30] Watanabe T, Kiron V, Satoh S. Trace minerals in fish

- nutrition[J]. *Aquaculture*, 1997, 151(1-4): 185-207.
- [31] Amaravadi R, Glerum D M, Tzagoloff A. Isolation of a cDNA encoding the human homolog of *COX17*, a yeast gene essential for mitochondrial copper recruitment[J]. *Human genetics*, 1997, 99(3): 329-333.
- [32] Pianesso D, Neto J R, Da Silva L P, *et al.* Determination of tryptophan requirements for juvenile silver catfish(*Rhamdia quelen*) and its effects on growth performance, plasma and hepatic metabolites and digestive enzymes activity[J]. *Animal feed science and technology*, 2015, 210: 172-183.
- [33] Wang H, Li S, Teng X H. The antagonistic effect of selenium on lead-induced inflammatory factors and heat shock proteins mRNA expression in chicken livers[J]. *Biological Trace Element Research*, 2016, 171(2): 437-444.
- [34] 卢玉标, 游翠红, 王树启, 等. 浅水应激后黄斑蓝子鱼生理指标变化及牛磺酸的抗应激作用[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(1): 68-74.
- Lu Y B, You C H, Wang S Q, *et al.* Physiological changes in *Siganus canaliculatus* after shallow water stress and the anti-stress effects of taurine[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(1): 68-74(in Chinese).
- [35] 宁军号, 秦宇博, 胡伦超, 等. 水温骤降和缓降胁迫对褐篮子鱼血液生理生化指标的影响[J]. *大连海洋大学学报*, 2017, 32(3): 294-301.
- Ning J H, Qin Y B, Hu L C, *et al.* Effects of abrupt and gradual decreases in water temperature on blood physiological and biochemical parameters in dusty rabbit fish *Siganus fuscescens*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2017, 32(3): 294-301(in Chinese).
- [36] Tanko Y, Jimoh A, Ahmed A, *et al.* Effects of selenium yeast on blood glucose and antioxidant biomarkers in cholesterol fed diet induced type 2 diabetes mellitus in wistar rats[J]. *Nigerian journal of physiological sciences*, 2016, 31(2): 147-152.
- [37] Askari A, Orlowski E, Thomford N R, *et al.* Superoxide dismutase(SOD) and mineral levels in copper deficient(CuD) and copper adequate(CuA) rat brains[J]. *Federation of American societies for experimental biology*, 1991, 5(5): 21-25.
- [38] Le K T, Fotedar R. Immune responses to *Vibrio anguillarum* in yellowtail kingfish, *seriola lalandi*, fed selenium supplementation[J]. *Journal of the world aquaculture society*, 2014, 45(2): 138-148.
- [39] Munari M, Sturve J, Frenzilli G, *et al.* Genotoxic effects of CdS quantum dots and Ag₂S nanoparticles in fish cell lines (RTG-2)[J]. *Mutation Research/Genetic toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2014, 775-776: 89-93.
- [40] 王昊盛, 宋鑫新, 董文强, 等. 厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)金属硫蛋白MT-10: cDNA克隆、结构分析及铜离子胁迫下的表达[J]. *海洋与湖沼*, 2017, 48(4): 864-869.
- Wang H S, Song X X, Dong W Q, *et al.* The cDNA cloning and characterization of *Mytilus coruscus* metallothionein 10 as well as its mrna expression under the Cu²⁺ stress[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2017, 48(4): 864-869(in Chinese).
- [41] Vergani L, Lanza C, Scarabelli L, *et al.* Heavy metal and growth hormone pathways in metallothionein regulation in fish RTH-149 cell line[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2009, 149(4): 572-580.
- [42] 孙盛明, 朱健, 戈贤平, 等. 团头鲂谷胱甘肽S-转移酶基因的克隆及其在氨氮胁迫中的表达分析[J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(1): 295-305.
- Sun S M, Zhu J, Ge X P, *et al.* Molecular cloning, characterization and mRNA expression of Mu-typ glutathione S-transferases from *Megalobrama amblycephala*[J]. *Asian journal of ecotoxicology*, 2016, 11(1): 295-305(in Chinese).
- [43] Wang W F, Mai K S, Zhang W B, *et al.* Dietary selenium requirement and its toxicity in juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino[J]. *Aquaculture*, 2012, 330-333: 42-46.
- [44] Jing J, Liu H C, Chen H H, *et al.* Acute effect of copper and cadmium exposure on the expression of heat shock protein 70 in the Cyprinidae fish *Tanichthys albonubes*[J]. *Chemosphere*, 2013, 91(8): 1113-1122.
- [45] Lu X J, Chen J, Huang Z A, *et al.* Influence of acute cadmium exposure on the liver proteome of a teleost fish, ayu (*Plecoglossus altivelis*)[J]. *Molecular biology reports*, 2012, 39(3): 2851-2859.
- [46] Xu Z, Wang Z, Li J J, *et al.* Protective effects of selenium on oxidative damage and oxidative stress related gene expression in rat liver under chronic poisoning of arsenic[J]. *Food and chemical toxicology*, 2013, 58: 1-7.

Effects of dietary selenium levels on growth performance, antioxidant capacity and related gene expression of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) under copper stress

HAO Tiantian¹, WANG Jiying^{1*}, MA Changxing^{1,2}, ZHOU Ying^{1,2},
LI Baoshan¹, WANG Chengqiang¹, SUN Yongzhi¹, HUANG Bingshan¹

(1. Key laboratory of Marine Ecological Restoration,

Shandong Marine Resources and Environment Research Institute, Yantai 264006, China;

2. Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition (CREEFN) of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The study was carried out to investigate the effect of dietary selenium(Se) supplementation on the growth performance, serum antioxidant enzyme activity and expression of related genes in liver of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) under copper(Cu) stress. Four experimental diets(D1,D2,D3,D4) were formulated to contain the following diets with increment levels of copper 0, 1 000, 1 000, 1 000 mg/kg and selenium 0, 0, 2, 4 mg/kg. The group D1 as the control. Each diet was randomly assigned to triplicate groups of 40 fish [initial weight, (24.85±0.1) g] per aquarium. Fish were fed twice daily(8:30 and 16:30) at ratio of 1.5% or 2% body weight for 84 days. Results showed that the different diets had no significant effect on the survival rate of turbot. The weight gain rate, specific growth rate and protein efficiency ratio of D2 group were significantly lower than other groups. Whereas, feed conversion ratio and feed intake reached the maximum in group D2. Crude lipid content of whole body and liver all showed a trend of first decreasing and then rising, and, there were no significant differences of crude lipid and crude protein contents in muscle among all groups. Cu concentration of D2 group in whole body, vertebra and liver was remarkably higher than the others. Zn concentration in whole body, vertebra and liver reached the maximum in the group D4. Hepatic Fe concentration was lower in group D4 than the others. The serum total antioxidant activity, catalase activity, glutathione peroxidase activity decreased in group D2, and increased with further increase of selenium level. While the malondialdehyde content followed the opposite trend. Total superoxide dismutase and CuZn superoxide dismutase activity both reached the minimum in group D4. Both alanine aminotransferase and aspartate transaminase activities showed their highest values in group D2, which were significantly higher than those in the other groups. Glucose, triglyceride, total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, low density lipoprotein cholesterol showed a opposite trend to alanine aminotransferase and aspartate transaminase activities with the lowest value in group D2, significantly lower than that in the control group. Metallothionein expression increased in the liver with the dietary selenium levels under Cu stress, which was significantly higher in group D4 than that in the other groups. Glutathione transferase and lysozyme expression levels decreased initially and then increased with the dietary change, which were significantly lower in group D2 than those in the control group. Heat shock protein 70(HSP70) expression level showed the highest values in group D2, which was significantly higher than those in the other groups. In conclusion, adequate dietary selenium levels could affect the growth performance, increase the total antioxidant capacities, modulate some mRNA expression of gene in liver, and then reduce the metabolic disorders caused by high copper content in juvenile *S. maximus*.

Key words: *Scophthalmus maximus*; copper stress; selenium; growth; antioxidant capacity; gene expression

Corresponding author: WANG Jiying. E-mail: ytwjy@126.com

Funding projects: Science and Technology Development Projects of Yantai City (2018ZHGY066)