

干露对三疣梭子蟹抗氧化和应激能力的影响

姜 娜, 王 芳*, 路允良, 董双林

(中国海洋大学水产学院,海水养殖教育部重点实验室,山东 青岛 266003)

摘要: 在实验室条件下,研究了干露时间(0.5、1.5 和 3 h)胁迫对三疣梭子蟹抗氧化能力和应激能力的影响,初步探讨了能够较灵敏地指示梭子蟹健康状况的胁迫指标。结果显示:(1)干露时间胁迫对超氧化物歧化酶(SOD)活力和丙二醛(MDA)含量均无显著影响($P > 0.05$);但干露时间显著影响肝脏总抗氧化能力(T-AOC)水平、热休克蛋白 70(HSP70)表达量和肌肉乳酸含量($P < 0.05$)。 (2)0.5 h 干露胁迫后,SOD 活力在入水恢复 4 h 时达到峰值;MDA 含量在入水恢复 2~10 h 内显著高于对照组水平($P < 0.05$);T-AOC 水平在恢复阶段基本维持在对照组水平。1.5 和 3 h 干露后,SOD 活力在入水恢复阶段一直维持在对照组水平,且各时间点与对照组差异不显著($P > 0.05$)。1.5 h 干露后 MDA 含量在入水恢复阶段呈先升高后降低趋势,各时间点与对照组差异不显著($P > 0.05$);而 3 h 干露后入水恢复 10 h 时显著增加($P < 0.05$)。1.5 h 干露后入水恢复 4 h 时,T-AOC 水平显著高于对照组($P < 0.05$);3 h 干露后入水恢复 0.5 h 时显著升高($P < 0.05$),2~10 h 内基本恢复到对照组水平。干露时间胁迫后,乳酸含量均在入水恢复 0.5 h 时达到最大值;HSP70 表达量均在入水恢复 2~4 h 内达到峰值。研究表明,相比于其他所选指标,T-AOC 水平能够较敏感地反映干露时间胁迫对机体的生理状态的影响;SOD 和 MDA 相互配合能够较灵敏地反映不同干露时长后机体在恢复阶段的免疫水平。

关键词: 三疣梭子蟹;干露时间胁迫;入水恢复;抗氧化;应激

中图分类号: Q 178.1; S 968.2

文献标志码: A

水生动物停留在空气、沙或土壤等介质的状态即干露^[1],而干露时间的长短是影响其运输方式的重要因素之一。国内外已有一些关于水生动物干露存活时间的研究报道。Omori 等^[2]认为蟹类的露空时间由鳃部的保水能力和机体对低含水量的耐受性决定,同时离水干露会导致低氧胁迫,阻碍机体代谢能力,最终引起死亡^[3]。干露会造成机体水失衡,呼吸机制受到阻碍,最终造成血液 pH 失衡而窒息死亡^[1,4]。杨凤等^[5]研究发现干露处理后的菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)稚贝需要一定时间恢复,且存在补偿生长现象。胁迫后恢复一段时间,有助于机体维持健康状态,尽快地恢复生长,并能有效地减少疾病暴发^[6]。

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*),隶属

甲壳纲(Crustacea),十足目(Decapoda),梭子蟹科(Portunidae),梭子蟹属(*Portunus*),广泛分布在中国南北沿海,是大型的海洋经济蟹类^[7],且已经成为世界上养殖规模最大的海洋经济蟹类^[8]。梭子蟹的运输方式有低温干运、活水运输等^[9],其中低温干运逐渐成为幼蟹和商品蟹的重要运输方式之一^[1,9]。梭子蟹是一种离水易死亡的海水蟹类,有研究表明,其各发育阶段的幼体死亡率均随干露时间的延长而升高^[1],而目前关于干露时间胁迫及入水恢复阶段三疣梭子蟹生理生化指标变化的相关研究未见报道。大量研究表明,超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)、丙二醛(MDA)、热休克蛋白(HSP70)和乳酸水平随胁迫强度的不同呈规律性变化,已被

收稿日期:2014-08-25 修回日期:2014-10-06

资助项目:国家“十二五”科技支撑计划(2011BAD13B03)

通信作者:王 芳,E-mail:wangfang249@ouc.edu.cn

广泛地用作研究分析机体胁迫程度的重要指标^[10-13]。本文研究了不同干露时间胁迫及入水恢复阶段三疣梭子蟹组织中 SOD、T-AOC、HSP70 的水平及 MDA 和乳酸含量的变化规律,旨在分析梭子蟹干露耐受性机理,并初步筛选出指示各阶段健康状况的灵敏指标,为离水运输和养殖监测工作提供科学参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料的来源与养殖管理

实验于 2013 年 8 月进行。三疣梭子蟹购自青岛市胶南养殖场,为健康活泼个体。梭子蟹运回实验室后,在 $(22 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 的天然海水(盐度 30, pH = 8)中暂养 14 d 左右开始实验。暂养期间连续充气,光照周期为 14L:10D,所换海水提前曝气 1 d,换水前将海水预温到暂养水温,日换水量 1/3 ~ 1/2,每天投喂菲律宾蛤仔。

选取体色正常,健康活泼,雌雄比例 1:1 的三疣梭子蟹为实验对象,平均体质量为 $(87.93 \pm 1.24)\text{g}$,实验期间不投喂,塑料筐作为干露容器。

1.2 实验设计

本实验在封闭无风的实验室内进行,室温保持在 $(22.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,室内湿度为 70% ~ 80%,每个玻璃缸(30 cm × 30 cm × 50 cm)内放一只实验蟹。实验分为干露胁迫和胁迫后入水恢复 2 个阶段。干露胁迫阶段:将 60 只实验蟹均分 3 组,干露时间分别为 0.5、1.5 和 3 h。梭子蟹从实验缸中取出后,分别放入室内的塑料筐中干露,于干露胁迫 0.5、1.5 和 3 h 3 个时间点取样,每个时间点取 4 只蟹。入水恢复阶段:将余下的梭子蟹分别放回实验缸中恢复,于入水恢复 0.5、2、4 和 10 h 4 个时间点取样,每个时间点取 4 只蟹。对照组:在暂养海水中充氧养殖的 4 只梭子蟹。恢复期间养殖条件和暂养条件保持一致。

1.3 实验方法

将梭子蟹放在冰盘上冷冻麻醉,去壳后迅速取其肝胰脏和肌肉,分别装入 1.5 mL 的离心管后迅速放入液氮,然后转入 -80°C 冰箱中保存待测。

超氧化物歧化酶、丙二醛和总抗氧化能力的测定 肝胰脏匀浆液的制备:取肝胰脏,称重,液氮研磨后加入 1:9(w/v)的预冷匀浆介质,冰浴匀浆后经 $8\ 000 \times g$, 4°C 条件下离心 10 min,取上清液测定。

SOD、MDA 和 T-AOC 均采用南京建成生物工程研究所的试剂盒进行测定,具体测定方法按试剂盒的说明进行。

SOD 活力测定采用 WST 法,酶活单位定义:在反应体系中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的酶量为一个 SOD 活力单位(U/mg prot)。

MDA 采用硫代巴比妥法^[14](TBA 法),单位为 nmol/mg prot。

T-AOC 单位定义:在 37°C 时,每分钟每毫克组织蛋白,使反应体系的吸光度(OD)值,每增加 0.01 时,为一个总抗氧化能力单位(U/mg prot)。

三疣梭子蟹肌肉组织中乳酸含量的测定 肌肉匀浆的制备:取肌肉称重后,在研钵中液氮研磨后加入 1:9(w/v)的预冷生理盐水(0.86%)冰浴匀浆, 4°C 条件下, $900 \times g$ 离心 20 min,取上清液测定。

乳酸含量采用南京建成生物工程研究所的试剂盒进行测定,具体测定方法按试剂盒的说明进行。乳酸的单位为 mmol/g prot。

热休克蛋白(HSP70) 采用南京建成生物工程研究所定量检测试剂盒(ELISA)进行测定,具体测定参照试剂盒说明书进行。

组织匀浆液中蛋白质含量的测定 参照考马氏亮蓝法^[15]测定样品的总蛋白含量,牛血清白蛋白(AMRESCO 公司)为标准蛋白。

1.4 数据分析

数据以平均值 ± 标准误(mean ± SE)表示,实验结果用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),采用 Duncan 检验进行多重比较,以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平。

2 结果

2.1 干露时间胁迫和入水恢复过程对三疣梭子蟹肝胰脏中 SOD 活力的影响

三疣梭子蟹肝胰脏中 SOD 活力随干露时间的延长先升高后降低,与对照组 $(49.21 \pm 5.91)\text{U/mg prot}$ 差异不显著($P > 0.05$)(图 1-a)。干露胁迫 1.5 h 时酶活力最高 $(58.27 \pm 3.19)\text{U/mg prot}$,但各处理组间未达到显著差异($P > 0.05$)。

三疣梭子蟹肝胰脏中 SOD 活力在 0.5 h 干露胁迫后,入水恢复 4 h 时 SOD 活力达到最大值 $(76.69 \pm 0.50)\text{U/mg prot}$,与对照组差异显著($P < 0.05$);10 h 时,SOD 活力基本恢复到对照组

水平(图 1-b)。1.5 h 干露胁迫后入水恢复阶段 SOD 活力呈波动性变化,但各时间点与对照组差异均不显著($P > 0.05$)。3 h 干露后的入水恢复阶段,SOD 活力基本呈先降低后升高的趋势,4 h 时达到最小值(39.41 ± 2.09) U/mg prot,10 时达到峰值(58.30 ± 4.53) U/mg prot,但各时间点与

对照组差异均不显著($P > 0.05$)。

2.2 干露时间胁迫和入水恢复过程对三疣梭子蟹肝胰脏中 MDA 含量的影响

干露时间胁迫对三疣梭子蟹肝胰脏 MDA 含量无显著影响($P > 0.05$)(图 2-a),且 3 个处理组间也无显著差异($P > 0.05$)。

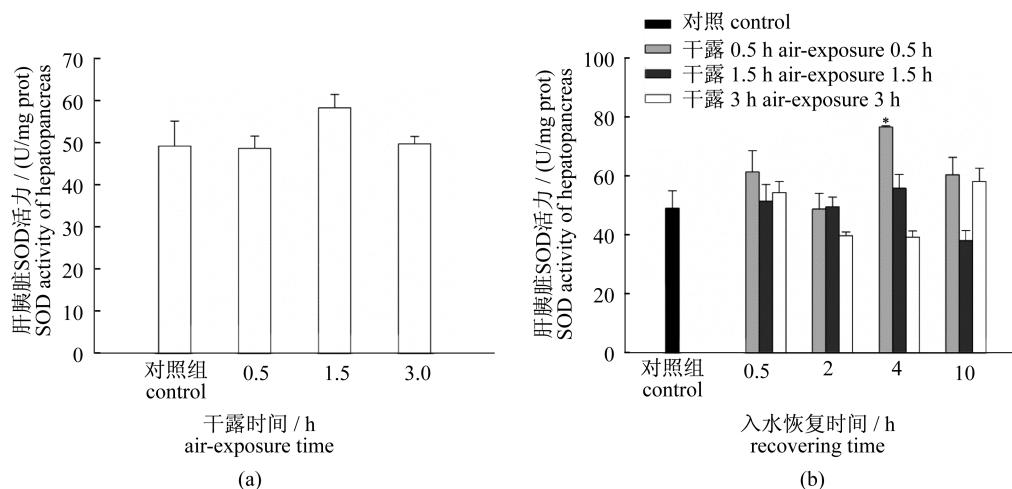


图 1 干露时间胁迫 (a) 和入水恢复过程中 (b) 三疣梭子蟹肝胰脏 SOD 活力的变化

同一干露时间组上方“*”或“**”分别表示与对照组有显著性差异($P < 0.05$)或极显著性差异。下同

Fig. 1 Variations of SOD activities in *P. trituberculatus* hepatopancreas during air-exposure stress (a) and subsequent recovery (b) at different time

Bars with asterisks at the same air-exposure time denote significant differences at $P < 0.05$ from the control without air-exposure. The same as the following

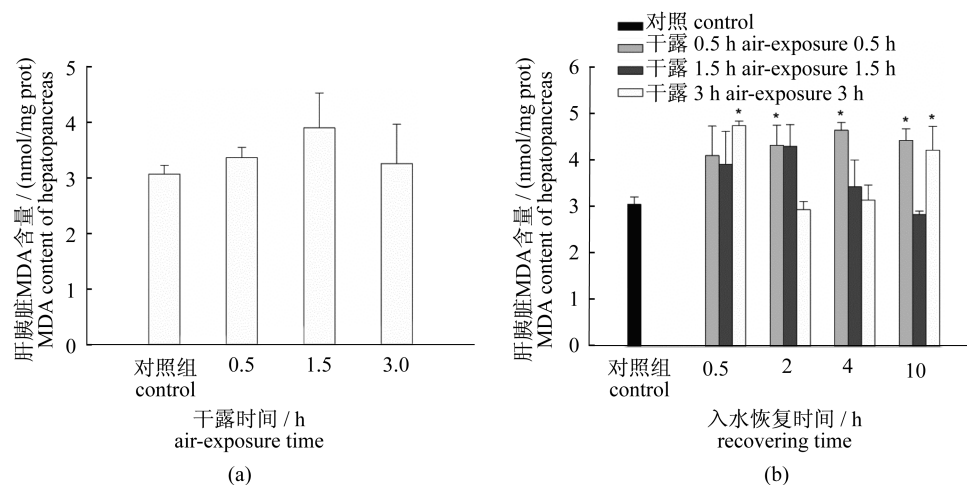


图 2 干露时间胁迫 (a) 和入水恢复过程中 (b) 三疣梭子蟹肝胰脏 MDA 含量的变化

Fig. 2 Variations of MDA contents in *P. trituberculatus* hepatopancreas during air-exposure stress (a) and subsequent recovery (b) at different time

三疣梭子蟹肝胰脏 MDA 含量在 0.5 h 干露后,入水恢复 2~10 h 内显著高于对照组(3.05 ± 0.16) nmol/mg prot ($P < 0.05$),4 h 时达到峰值(4.64 ± 0.16) nmol/mg prot(图 2-b)。1.5 h 干露

后,入水恢复阶段的 MDA 含量呈先升高后降低趋势,2 h 时达到峰值(4.3 ± 0.47) nmol/mg prot,但各时间点与对照组差异不显著($P > 0.05$)。3 h 干露胁迫后 MDA 含量随入水恢复时间的延长呈

现较大的波动变化,0.5 h 时 MDA 含量达到峰值 (4.74 ± 0.09) nmol/mg prot,2 h 时显著下降 ($P < 0.05$),2~4 h 内保持在对照组水平,10 h 时 MDA 含量又显著增加 ($P < 0.05$)。

2.3 干露时间胁迫和入水恢复过程对三疣梭子蟹肝胰脏中 T-AOC 水平的影响

干露时间胁迫导致 T-AOC 水平显著下降 ($P < 0.05$),且随干露时间的延长呈逐渐下降趋势,但各处理组间无显著差异 ($P > 0.05$) (图 3-a)。

三疣梭子蟹肝胰脏 T-AOC 水平在 0.5 h 干露后的入水恢复阶段基本维持在对照组水平 (6.29 ± 0.41) U/mg prot (图 3-b)。1.5 h 干露后 T-AOC 水平随入水恢复时间的延长基本呈先升高后降低的趋势;4 h 时达到峰值 (8.69 ± 0.82) U/mg prot,与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。3 h 干露后入水恢复 0.5 h 时 T-AOC 水平显著升高 ($P < 0.05$),随后显著下降 ($P < 0.05$),2~10 h 基本恢复到对照组水平。

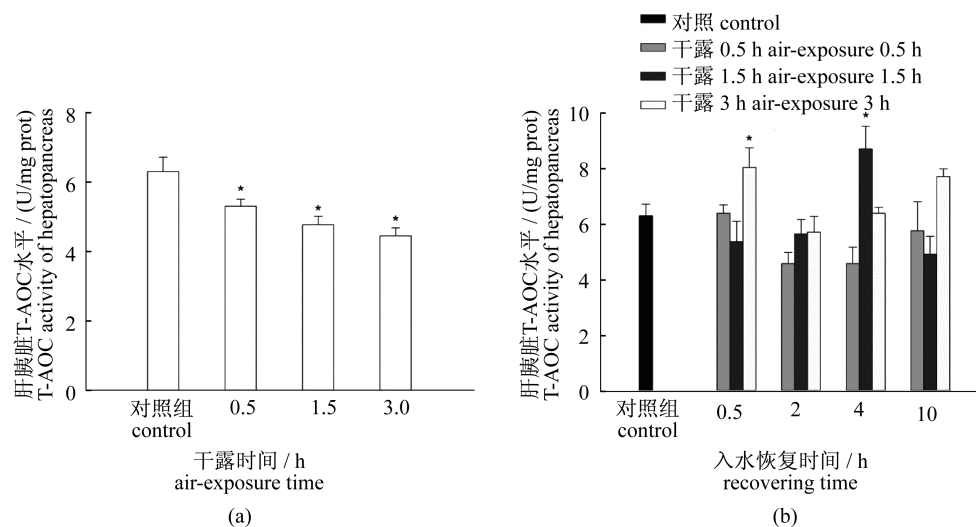


图 3 干露时间胁迫 (a) 和入水恢复过程中 (b) 三疣梭子蟹肝胰脏中 T-AOC 的变化

Fig. 3 Variations of T-AOC level in *P. trituberculatus* hepatopancreas during air-exposure stress (a) and subsequent recovery (b) at different time

2.4 干露时间胁迫和入水恢复过程对三疣梭子蟹肌肉中乳酸含量的影响

干露时间胁迫导致乳酸含量显著升高 ($P < 0.05$) (图 4-a)。1.5 h 干露结束时乳酸含量最高 (2.12 ± 0.1) mmol/g prot, 是对照组 (1.41 ± 0.07) mmol/g prot 的 1.5 倍;0.5 和 3 h 乳酸含量分别为 (1.9 ± 0.21) mmol/g prot 和 (1.87 ± 0.06) mmol/g prot, 但各处理组间乳酸含量差异不显著 ($P > 0.05$)。

干露后的入水恢复阶段,各干露处理组中乳酸含量均在 0.5 h 时达到峰值,并随入水恢复时间的延长基本呈降低的趋势 (图 4-b)。入水恢复阶段,1.5 h 干露后乳酸含量逐渐降低,但均显著高于对照组水平 ($P < 0.05$);10 h 时基本恢复到对照组水平。0.5 h 干露后乳酸含量在入水后 2 h 内基本恢复到对照组水平;3 h 干露后乳酸含量在入水恢复阶段一直处于较低水平,各时间点与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.5 干露时间胁迫和入水恢复过程对三疣梭子蟹肝胰脏中 HSP70 表达量的影响

0.5 h 干露结束时,三疣梭子蟹肝胰脏 HSP70 的表达量显著下降 ($P < 0.05$);1.5 和 3 h 干露结束时,肝胰脏 HSP70 的表达量显著高于对照组 (63.12 ± 0.34) IU/L 和 0.5 h 干露组 ($P < 0.05$) (图 5-a)。

0.5 h 干露后,HSP70 表达量随入水恢复时间的延长呈先升高后降低的趋势,4 h 时达到峰值 (92.83 ± 3.31) IU/L,其余各时间点均显著高于对照组水平 ($P < 0.05$) (图 5-b)。1.5 和 3 h 干露后入水恢复时,HSP70 表达量基本呈先降低后升高再降低的趋势;入水后 0.5 h 时,2 个处理组中 HSP70 表达量显著下降 ($P < 0.05$)。入水恢复 2 h 时,1.5 h 干露组中 HSP70 表达量达到峰值 (96.22 ± 0.27) IU/L;入水后 4 h 时,3 h 干露组中 HSP70 达到峰值 (95.63 ± 0.34) IU/L;入水后 10 h 时,0.5 和 1.5 h 干露组中 HSP70 的含量显著高于对照组水平 ($P < 0.05$),而 3 h 干露组恢复到对照组水平。

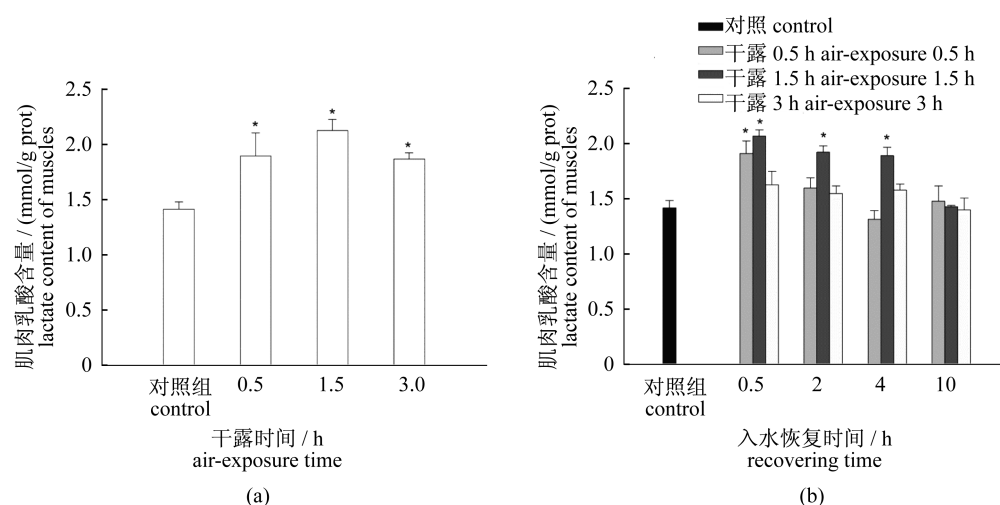


图 4 干露时间胁迫 (a) 和入水恢复过程中 (b) 三疣梭子蟹肌肉中乳酸含量的变化

Fig. 4 Variations of lactate contents in *P. trituberculatus* hepatopancreas during air-exposure stress (a) and subsequent recovery (b) at different time

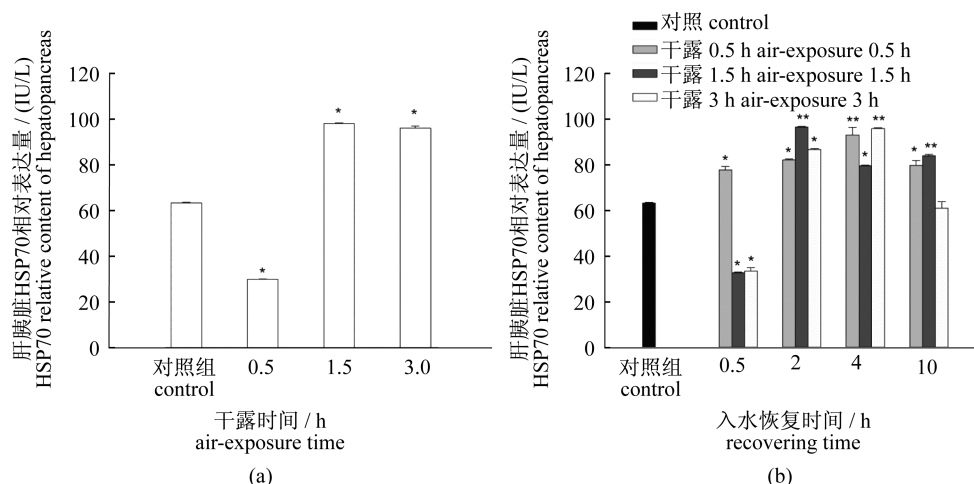


图 5 干露时间胁迫 (a) 和入水恢复过程中 (b) 三疣梭子蟹肝胰腺 HSP70 表达量的变化

Fig. 5 Variations of HSP70 expression in *P. trituberculatus* hepatopancreas during air-exposure stress (a) and subsequent recovery (b) at different time

3 讨论

3.1 干露时间胁迫和入水恢复过程对三疣梭子蟹肝胰腺抗氧化能力的影响

干露条件因低氧、pH 和盐度等胁迫因子间的联合作用,对水生生物的危害性增大,引发的机体应激反应更为复杂^[16-17]。在胁迫环境中,生物体因代谢异常产生大量的活性氧自由基(ROS),对机体产生氧化损伤。及时地清除 ROS,能够保障细胞正常发挥功能。Oliveira 等^[18]认为机体胁迫后恢复一段时间,能够清除组织器官中的代谢产物,从而缓解胁迫压力。

大量研究表明,肝胰腺是梭子蟹主要的营养代谢和解毒器官^[19],也是对外界胁迫刺激反应最早、最敏感的组织^[20-21]。SOD 是一种诱导性酶,在抗氧化防御体系中能够最先清除 ROS,维持体内自由基动态平衡。SOD 活力与 ROS 含量有着必然联系,适量的 ROS 可以激活 SOD 活性,过量的 ROS 则抑制其表达。本研究发现,干露时间胁迫对 SOD 活力无显著影响,可能是由于胁迫产生的 ROS 未达到引起 SOD 活力变化的阈值。从缺氧状态恢复到常氧状态,生物体内产生大量的 ROS,会对机体产生氧化损伤^[22]。在入水恢复阶段,SOD 活力在 3 个处理组中呈现不同的变化趋势。0.5 h

干露胁迫后引起生物体一系列复杂的生理生化反应,产生大量的 ROS,最终导致 SOD 活力在入水恢复 4 h 时达到峰值。1.5 h 干露后,SOD 活力呈波动性变化以及时清除 ROS。而 SOD 活力在干露 3 h 后一直处于较低值,可能是由于干露时间胁迫强度过大,抑制了 SOD 活力,也可能是胁迫后过多的 SOD 被用来还原超氧自由基($O_2^- \cdot$),而 $O_2^- \cdot$ 的减少负反馈导致 SOD 活力降低^[20,23],其具体原因有待进一步研究。SOD 活力在入水恢复期间呈现不同的变化规律,这可能就是生物体应激反应中的“应激适应”和“应激损伤”^[24]。

MDA 是自由基引发的脂质过氧化作用的最終分解产物^[11],其含量的高低反映了细胞膜氧化损伤的程度,也被广泛地用作细胞膜氧化损伤的评价指标之一^[25]。本研究发现,干露时间胁迫后 MDA 变化不显著,表明干露环境下细胞膜的氧化损伤较小。而 0.5 h 干露胁迫后的 2~10 h 内 MDA 含量一直处于较高水平,可能是在 0.5 h 内梭子蟹遭受剧烈胁迫,如环境变化、捕捉胁迫等,导致机体代谢异常,从而使 MDA 含量升高。Martínez-álvarez 等^[26]认为 MDA 含量的变化可能是细胞代谢发生一定程度的改变。1.5 h 干露后体内的 ROS 能够被及时有效地清除,未导致细胞氧化损伤;3 h 干露后入水恢复 10 h 时 MDA 含量升高,可能是生物膜受自由基攻击造成了氧化损伤,这与 3 h 干露后 SOD 活力降低相适应。由本实验结果可推测,0.5 和 3 h 干露胁迫后入水恢复阶段均可造成细胞膜结构损伤。

T-AOC 主要包括体内抗氧化酶体系和抗氧化物质体系,在一定程度上反映了机体所处环境因子的改变和机体非特异性免疫力的变化^[27]。而叶继丹等^[28]研究喹乙醇对鲤(*Cyprinus carpio*)毒性大小时发现,T-AOC 呈现明显的剂量效应,对毒性的敏感性最大。本研究发现,干露时间胁迫导致 T-AOC 水平显著低于对照组水平,而主要的抗氧化酶体系成员 SOD 保持在稳定水平,表明抗氧化物质体系不断地被消耗,而总体表现为 T-AOC 水平降低。在入水恢复阶段,T-AOC 水平在 3 个处理组中呈现不同的变化规律,但均在入水后 10 h 时恢复到正常水平。0.5 h 干露后 T-AOC 水平一直处于动态平衡,表明在此恢复阶段 SOD 活力升高不足以有效地清除产生的 ROS,机体需要不断消耗抗氧化剂以减少其对自身的损

害。另外,1.5 和 3 h 干露后 T-AOC 水平和 SOD 活力变化趋势大体一致。由此可以推断,在 0.5 h 干露后的入水恢复阶段,主要是由抗氧化物质体系和抗氧化酶体系共同清除 ROS;而 1.5 和 3 h 干露后则主要是通过调节抗氧化酶活力来维持机体 ROS 的平衡。

3.2 干露时间胁迫和入水恢复过程对三疣梭子蟹肌肉乳酸含量的影响

研究表明,维持三疣梭子蟹生存的溶氧水平为 2~4 mg/L^[29]。供氧不足情况下,机体会通过无氧呼吸产生乳酸供能以维持正常生命活动。在胁迫环境中,生物体对能量需求增大,而自身基础代谢水平降低,对无氧代谢供能依赖增加。本实验发现,不同干露时间处理结束时,乳酸含量均显著升高,表明无氧代谢水平增加对三疣梭子蟹适应干露胁迫环境具有重要作用。而在入水恢复阶段,0.5 h 干露后由于氧补偿效应,乳酸含量在 2 h 内基本恢复到正常水平;1.5 h 干露后的 0.5~4 h 内乳酸都维持在较高的水平,推测可能是将乳酸从体内清除需要一定的时间,显示出梭子蟹对外界环境较强的适应能力。3 h 干露后乳酸水平一直处于较低水平,由于机体需要大量能量应对长时间胁迫应激,在低氧胁迫及复氧恢复阶段会有一套代谢适应机制^[18],能将乳酸转为葡萄糖来维持酸碱平衡和葡萄糖的供应^[30]。

3.3 干露时间胁迫和入水恢复过程对三疣梭子蟹肝胰脏 HSP70 表达的影响

水生生物 HSP70 的诱导表达有着特殊的生态学意义^[31]。HSP70 是生物体内一种灵敏的应激蛋白,可提高细胞对胁迫的耐受性^[16],对生物体适应环境变化具有重要作用^[12]。本实验发现,不同干露时间胁迫对肝胰脏 HSP70 表达量产生不同的影响。0.5 h 干露结束时 HSP70 显著降低,推测可能是机体由于短时间胁迫导致代谢异常和耐受应激水平能力降低,进而使 HSP70 未得到及时表达。韩俊英等^[20]研究脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)经 pH、氯化铵刺激后,肝胰脏中 HSP70 总体表现为先降低再升高最后降低的变化规律,与本实验结果相似。1.5 和 3 h 干露结束时 HSP70 表达量显著升高,随后通过负反馈调节使 HSP70 的合成在入水恢复 0.5 h 时显著下降。在入水恢复阶段,HSP70 处于高表达水平,由此推断机体一直处于应激状态。

3.4 干露时间胁迫和入水恢复过程中指示指标选定的意义

通过选取干露时间胁迫和入水恢复过程中三疣梭子蟹免疫水平的灵敏指示指标,便于人们准确地了解胁迫时机体的健康状况,尤其是在运输后的短期恢复过程,能够采取适当的补救措施,有效地提高运输成活率。综合本实验结果,干露时间胁迫可导致所选的5种指标呈现不同的变化趋势,其中乳酸、HSP70和T-AOC水平与对照组差异显著,而SOD活力和MDA含量与对照组差异不显著。本研究发现,T-AOC的变化随干露时间的延长呈现出明显的时间效应,由此推测,T-AOC能够较敏感地反映出胁迫时机体的生理状态。而在入水恢复阶段,相比于其他所选指标,SOD活性和MDA含量的相互配合使用,可以灵敏地反映出不同干露时长后的入水恢复阶段机体的免疫水平,有利于生产中更好地了解梭子蟹的健康状况。

参考文献:

- [1] Jiang L X, Liu Q, Wang R J, *et al.* Larvae mortality of *Portunus trituberculatus* under different desiccation temperatures [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(1): 127 - 131. [姜令绪, 刘群, 王仁杰, 等. 三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 幼体不同干露温度下死亡率的研究. 海洋与湖沼, 2012, 43(1): 127 - 131.]
- [2] Omori K, Irawan B, Kikutani Y. Studies on the salinity and desiccation tolerances of *Helice tridens* and *Helice japonica* (Decapoda: Grapsidae) [J]. *Hydrobiologia*, 1998, 386(1-3): 27 - 36.
- [3] Madenjian C P, Rogers G L, Fast A W. Predicting night time dissolved oxygen loss in prawn ponds of Hawaii; part I. Evaluation of traditional methods [J]. *Aquacultural Engineering*, 1987, 6(3): 191 - 208.
- [4] Liu J Y, Yu D H, Li J B. Effects of salinity and pH on oxygen consumption and ammonia excretion rates in *Pinctada fucata* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(4): 603 - 607. [刘建业, 喻达辉, 李金碧. 盐度和 pH 对合浦珠母贝 (*Pinctada fucata*) 耗氧率和排氨率的影响. 海洋与湖沼, 2011, 42(4): 603 - 607.]
- [5] Yang F, Tan W M, Yan X W, *et al.* Effects of exposure to air, immersion in fresh-water on growth and survival of juvenile manila clam *Ruditapes philippinarum* [J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(3): 143 - 146. [杨凤, 谭文明, 闫喜武, 等. 干露及淡水浸泡对菲律宾蛤仔稚贝生长和存活的影响. 水产科学, 2012, 31(3): 143 - 146.]
- [6] Guo B, Gong C G, Shao P, *et al.* The changes of enzymes involved in metabolism and immunity of *Apostichopus japonicus* (Selenka) after short-term transportations [J]. *Aquaculture International*, 2014, 22(2): 379 - 389.
- [7] Dong Z G, Li X Y, Yan B L, *et al.* Morphological variation analysis among five populations of the swimming crab *Portunus trituberculatus* from China sea areas [J]. *Marine Science Bulletin*, 2010, 29(4): 421 - 426. [董志国, 李晓英, 阎斌伦, 等. 中国海五种三疣梭子蟹的形态差异分析. 海洋通报, 2010, 29(4): 421 - 426.]
- [8] Liao Y Y, Xiao Z P, Yuan Y Y. Temperature tolerance of larva and juvenile of *Portunus trituberculatus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(4): 534 - 543. [廖永岩, 肖展鹏, 袁耀阳. 三疣梭子蟹幼体和幼蟹的温度适应性. 水生生物学报, 2008, 32(4): 534 - 543.]
- [9] Xie J Y, Zhu A Y. The technology of live aquatic animal transportation [J]. *Fisheries Science*, 2010, 29(9): 532 - 536. [谢佳彦, 朱爱意. 几种重要水产品活体运输技术研究. 水产科学, 2010, 29(9): 532 - 536.]
- [10] Campa-Córdova A I, Hernández-Saavedra N Y, Ascencio F. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2002, 133(4): 557 - 565.
- [11] Li Y Q, Wang L, Liu N, *et al.* Effects of cadmium on enzyme activity and lipid peroxidation in freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(3): 373 - 379. [李涌泉, 王兰, 刘娜, 等. 镉对长江华溪蟹酶活性及脂质过氧化的影响. 水生生物学报, 2008, 32(3): 373 - 379.]
- [12] Hong M L, Chen L Q, Sun X J, *et al.* Effects of acute nitrite exposure on immunity indicators and HSP70 expression in Chinese mitten-hand crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2011, 17(5): 688 - 693. [洪美玲, 陈立桥, 孙新谨, 等. 亚硝酸盐急性胁迫对中华绒螯蟹幼体相关免疫指标和应激蛋白 (HSP70) 表达的影响. 应用与环境生物学报, 2011, 17(5): 688 - 693.]
- [13] Peng S M, Shi Z H, Li J, *et al.* Effect of

- transportation stress on serum cortisol, glucose, tissue glycogen and lactate of juvenile silver pomfret (*Pampus argenteus*) [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(6): 831 - 837. [彭士明, 施兆鸿, 李杰, 等. 运输胁迫对银鲳血清皮质醇、血糖、组织中糖元及乳酸含量的影响. 水产学报, 2011, 35(6): 831 - 837.]
- [14] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction [J]. Analytical Biochemistry, 1979, 95(2): 351 - 358.
- [15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1-2): 248 - 254.
- [16] Wang Q, Li J, Li J T, et al. The effect of dry exposure on HSP70 and ferritin gene expression level in *Exopalaemon carinicauda* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2013, 44(2): 409 - 414. [王琦, 李健, 李吉涛, 等. 干露胁迫对脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) HSP70 和 ferritin 基因表达的影响. 海洋与湖沼, 2013, 44(2): 409 - 414.]
- [17] Wu D H, Zheng P P, Zhang Y Y, et al. Effect of temperature stress on serum non-specific immune factors in swimming crab *Portunus trituberculatus* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2010, 25(4): 370 - 375. [吴丹华, 郑萍萍, 张玉玉, 等. 温度胁迫对三疣梭子蟹血清中非特异性免疫因子的影响. 大连海洋大学学报, 2010, 25(4): 370 - 375.]
- [18] Oliveira G, Rossi I C, da Silva R S M. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets [J]. Marine Biology, 2001, 139(2): 335 - 342.
- [19] Chen Y E, Wang G L, Jin S, et al. Enzyme Activities in *Portunus trituberculatus* with emulsification disease [J]. Fisheries Science, 2006, 25(9): 448 - 451. [陈寅儿, 王国良, 金珊, 等. 三疣梭子蟹患“乳化病”后几种保护酶活力的变化. 水产科学, 2006, 25(9): 448 - 451.]
- [20] Guan Y Q, Li L, Wang H C, et al. Effects of hypoxia on respiratory metabolism and antioxidant capability of *Macrobrachium nipponense* [J]. Journal of Hebei University: Natural Science, 2010, 30(3): 301 - 306. [管越强, 李利, 王慧春, 等. 低氧胁迫对日本沼虾呼吸代谢和抗氧化能力的影响. 河北大学学报: 自然科学版, 2010, 30(3): 301 - 306.]
- [21] Han J Y, Li J, Li J T, et al. Cloning and expression of heat shock protein 70 (HSP70) of *Exopalaemon carinicauda* [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(8): 1130 - 1138. [韩俊英, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP70 基因的克隆及其表达分析. 水产学报, 2011, 35(8): 1130 - 1138.]
- [22] Halliwell B, Gutteridge J C M. Free radicals in biology and medicine [M]. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1999.
- [23] de Oliveira U O, Araújo A S D, Belló-Klein A, et al. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 2005, 140(1): 51 - 57.
- [24] Li Y P, Gong H. The research progress of the system of antioxidant responses in insect [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 1998, 10(5): 240 - 244. [李毅平, 龚和. 昆虫体内抗氧化系统研究进展. 生命科学, 1998, 10(5): 240 - 243.]
- [25] Lepage G, Munoz G, Champagne J, et al. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography [J]. Analytical Biochemistry, 1991, 197(2): 277 - 283.
- [26] Martinez-Alvarez R M, Hidalgo M C, Domezain A, et al. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity [J]. Journal of Experimental Biology, 2002, 205(23): 3699 - 3706.
- [27] Kong X H, Wang G Z, Ai C X, et al. Comparative study on total antioxidative capability and SOD activity in different organs and tissues of mud crab *Scylla serrata* [J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2003, 22(4): 469 - 474. [孔祥会, 王桂忠, 艾春香, 等. 锯缘青蟹不同器官组织中总抗氧化能力和 SOD 活性的比较研究. 台湾海峡, 2003, 22(4): 469 - 474.]
- [28] Ye J D, Han Y W, Zhao J W, et al. Effects of dietary olaquinox on antioxidant enzymes system in hepatopancreas of *Cyprinus carpio* [J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(3): 231 - 235. [叶继丹, 韩友文, 赵吉伟, 等. 喹乙醇对鲤肝胰脏抗氧化酶系统的影响. 水产学报, 2004, 28(3): 231 - 235.]
- [29] Liu C B, Xiao M, Feng Y H, et al. Effects of water dissolved oxygen level on physiological responses in *Portunus trituberculatus* (Miers, 1876) [J]. Chinese

- Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(3): 506 – 513.
 [刘重斌, 肖敏, 冯彦红, 等. 水溶氧对三疣梭子蟹 (crab *Portunus trituberculatus*, Miers, 1876) 生理应答的影响. 动物营养学报, 2011, 23(3): 506 – 513.]
- [30] Oliveira G T, Eichler P, Rossi I C, *et al.* Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets [J]. Journal of Experimental Zoology-Part A: Comparative Experimental Biology, 2004, 301(3): 240 – 248.
- [31] Dong Y W, Dong S L, Ji T T. Research advances in the heat shock proteins in aquatic animals [J]. Periodical of Ocean University of China: Natural Science, 2008, 38(1): 39 – 44. [董云伟, 董双林, 纪婷婷. 水生动物热休克蛋白研究进展. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2008, 38(1): 39 – 44.]

Effects of air-exposure stress on antioxidant capacity and stress response of swimming crab (*Portunus trituberculatus*)

JIANG Na, WANG Fang*, LU Yunliang, DONG Shuanglin

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The purpose of this study was to evaluate the stress indicators which can reflect the physiology of swimming crabs (*Portunus trituberculatus*) sensitively during air-exposure and subsequent recovery. The effects of 0.5, 1.5 and 3 h air-exposure stress on antioxidant capacity and stress response of crabs with an average weight of (87.93 ± 1.24) g were investigated by determining hepatopancreas superoxide dismutases (SOD) activity, total antioxidant capacity (T-AOC), malondialdehyde (MDA) and heat shock protein 70 (HSP70) level and muscles lactate contents. Crabs were sampled at 0.5, 1.5 and 3 h during exposure to air, and at 0, 2, 4 and 10 h during following recovery, with crabs in seawater of $(22.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ as control. The main results showed that: (1) No significant effects of air exposure stress on SOD activity and MDA content in hepatopancreas were observed ($P > 0.05$). However, air exposure stress had a significant influence on the T-AOC level, the content of HSP70 in hepatopancreas and muscles lactate contents. (2) After 0.5 h air-exposure stress, the SOD activity reached the maximum value when crabs had recovered for 4 h. During the recovery from 2 h to 10 h after 0.5 h stress, the MDA contents were significantly higher than that of control ($P < 0.05$). No significant differences of the T-AOC level in hepatopancreas were observed during recovery after 0.5 h of air exposure ($P > 0.05$). The SOD activity was similar to control after 1.5 h and 3 h of air exposure stress, and there were no significant differences between control and time intervals ($P > 0.05$). The MDA content of crabs exposed to air for 1.5 h increased first and then decreased during recovery, with no significant differences observed between control and time intervals ($P > 0.05$). However, after 3 h of air exposure, the MDA content significantly increased at 10 h during recovery ($P < 0.05$). Besides, the T-AOC level reached the maximum value at 4 h after 1.5 h of air exposure, which was significantly higher than that of control ($P < 0.05$). For crabs exposed to air for 3 h, the T-AOC significantly increased ($P < 0.05$) at 0.5 h during recovery and then returned to the control level in 2 – 10 h ($P < 0.05$). The lactate contents of all groups reached the maximum values at 0.5 h during recovery. The HSP70 levels of different treatments reached their maximum values in 2 – 4 h during recovery. These results indicated that, compared to other stress indicators which were selected, T-AOC level could more sensitively reflect the physiology of *Portunus trituberculatus* suffering air-exposure stress. SOD activities and MDA contents could be used synergistically to indicate the physiology of crabs during recovery.

Key words: *Portunus trituberculatus*; air-exposure stress; recovery; antioxidant capacity; stress response

Corresponding author: WANG Fang. E-mail: wangfang249@ouc.edu.cn