

Cu 对云龙石斑鱼幼鱼的生理生态毒性

靳智欣^{1,2}, 徐永江², 刘新富², 梁友², 周鹤庭², 崔爱君², 刘欣²

(1. 浙江海洋大学 国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术试点国家实验室深蓝渔业工程联合实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 为研究 Cu 对云龙石斑鱼(*Epinephelus moara*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂)幼鱼的生态毒性及生理生化指标的影响, 作者分析了 Cu²⁺对幼鱼的安全质量浓度(C_S)、组织损伤、酶活力、金属硫蛋白-2(MT-2)基因表达的影响。实验设置对照组以及 0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、2 mg/L 等 6 个 Cu²⁺实验组进行为期 5 d 的毒理实验。结果显示: Cu²⁺对云龙石斑鱼幼鱼的 C_S 为 0.0162 mg/L; Cu 暴露诱发实验鱼的肝脏组织血窦扩张; 鳃组织出现动脉瘤以及顶部棒状等现象; 与对照组相比, 随 Cu²⁺浓度升高, 肝脏组织总超氧化物歧化酶(SOD)活力显著下降; 谷草转氨酶(GOT)活力先上升后下降; 随 Cu 处理浓度升高, 肝脏、鳃组织 MT-2 基因表达水平均逐渐上升; 而脑组织中 MT-2 表达水平先上升后下降, 但低浓度组较对照组差异不显著。结果表明, 高浓度的 Cu 会造成云龙石斑鱼幼鱼的组织损伤、免疫酶活力降低等一系列不利影响, 结果为云龙石斑鱼养殖生产过程中利用铜制剂防控病害的适宜剂量选择提供依据。

关键词: 云龙石斑鱼(*Epinephelus moara*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂); 铜; 安全质量浓度; 生理应答; 组织损伤

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2022)08-0039-09

DOI: 10.11759/hyxx20220412002

Cu 是鱼类的必需微量元素之一, 能广泛参与到鱼类生长发育的生理生化过程中。Cu 还是杀灭刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)的有效重金属, 常用作水产养殖寄生虫病防治的有效药物。研究表明, 水体中过量的 Cu, 会通过鱼类呼吸及摄食等活动进入其体内, 造成组织损伤甚至死亡^[1-2]。硫酸铜可杀灭刺激隐核虫、淀粉卵涡鞭虫(*Amyloodinium ocellatum*)等寄生虫, 在水产养殖中通常作为渔药使用^[3-5]。在养殖生产中, 由于不注意用药环境或使用高浓度的硫酸铜治疗鱼病, 易造成硫酸铜中毒, 给水产养殖带来严重危害。因此, 适宜的使用剂量是在水产养殖过程中安全使用硫酸铜等铜制剂的关键。

云龙石斑鱼(*Epinephelus moara*♀×*Epinephelus lanceolatus*♂), 是以鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*)为父本, 以云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)为母本的具有优良杂交性状的石斑鱼新品种。鞍带石斑鱼其体型大, 但数量稀少, 在中国主要产于南海海域和海南岛海域, 具有抗病性强、生长速度快、营养价值高等优点^[6]。云纹石斑鱼在中国主要产于东海海域、南海海域等, 具有耐受低温、油脂含量高、肉质细嫩、味道鲜美等特点, 但其生长速度缓慢且对养

殖环境要求高, 一般养殖 3~5 年才能达到商品鱼规格^[7]。因此培育出的云龙石斑鱼, 具有生长快、畸形率低和耐温性广的特点^[8]。近年来, 云龙石斑鱼成为全国特别是北方石斑鱼养殖业者的养殖新宠。然而, 在幼鱼养殖过程中, 易感染刺激隐核虫等寄生虫而造成大量死亡。一般养殖生产过程中, 养殖业者多使用硫酸铜治疗刺激隐核虫, 但目前尚未有规范的使用剂量, 易造成无效果或用量过大的情况, 从而带来不必要的损失。因此, 本研究主要针对云龙石斑鱼幼鱼养殖过程中易发的刺激隐核虫病害, 研究了硫酸铜在刺激隐核虫防治过程中的安全使用浓度, 以及不同浓度 Cu²⁺条件下的组织损伤、酶活力以及毒

收稿日期: 2022-04-12; 修回日期: 2022-06-06

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0900901, 2020YFD0900605); 中国水产科学研究院级基本科研业务费专项课题 (2020TD47); 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-47)

[Foundation: National Key Research and Development Program, Nos. 2019YFD0900901, 2020YFD0900605; Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS, No. 2020TD47; China Agriculture Research System of MOF and MARA, No. CARS-47]

作者简介: 靳智欣(1998—), 女, 黑龙江鹤岗人, 硕士研究生, 主要从事鱼类生长调控机制研究, E-mail: jinzhixin98@163.com; 徐永江(1981—), 通信作者, E-mail: xuyj@ysfri.ac.cn

理相关功能基因的变化,为云龙石斑鱼养殖期间利用 Cu 防控寄生虫疾病提供科学的参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼来源于烟台海阳市黄海水产有限公司。选取体质健壮、反应灵敏的幼鱼,规格为全长(5.5±0.49) cm、体质量(2.06±0.61) g。实验开始前转移到实验用方形水槽(容积为 0.15 m³)暂养 2 d。所有暂养的实验用鱼停食 24 h 后再放入各实验组,避免消化活动对实验产生影响。实验期间不投饵,直至实验结束。

1.2 实验条件

实验用的硫酸铜(CuSO₄·5H₂O≥99.0%)试剂为分析纯。试剂在实验前配成质量浓度为 3 000 mg/L 的母液作为储备液,再用过滤海水按比例稀释,现用现配。养殖期间自然海水的水温为 23~27 °C、盐度 29±1、pH 7.8~8.2,溶氧>5 mg/L。

1.3 实验方法

参照《水生生物毒性实验方法》^[9],同时参考其他海水鱼类 Cu²⁺毒理实验,根据预实验结果,在 Cu²⁺最小 100%致死浓度和不引起死亡的最大浓度之间,设置对照组和 6 个实验组,Cu²⁺的质量浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.2、2 mg/L。每个浓度组设置 2 个平行组。每个实验组随机放入 30 尾云龙石斑鱼,在实验开始后的 1、2、3、6、12、24、48、72 和 96 h,观察记录实验鱼的行为、中毒症状和死亡情况。以多次刺激无反应视为完全死亡,将其及时从水中捞出,并计算成活率。采用概率单位法(GB 17378.7-2007),计算 24、48、96 h 半致死质量浓度(LC₅₀)和 95%置信区间。安全质量浓度(C_S)按下式计算^[10]:

$$C_S = 96 \text{ h LC}_{50} \times 0.1。$$

1.4 样品的采集与保存

毒理实验 96 h 后,不同浓度组各取 3 尾鱼中鳃、肝脏组织,以 Davidson 固定液固定,用于组织

切片的制作;各实验组分别取 6 尾鱼的肝脏组织并混合,放入液氮中保存,用于酶活力的测定;各取 3 尾鱼的脑、鳃、肝脏组织放入液氮中保存,用于基因表达分析。

1.5 光镜制样及拍照

组织样品经酒精梯度脱水,石蜡包埋(55 °C)后切片,以苏木精和伊红复染,中性树脂封片,在光学显微镜下拍照观察(NIKON ECLIPSE 80i, NIKON DS-Ri1, 日本)。

1.6 酶活力测定

利用酶标仪(Bio-rad iMark, 日本)和 WST-1 法试剂盒(A001-3, 南京建成生物工程研究所)测定肝脏超氧化物歧化酶(SOD)酶活力;紫外可见分光光度计(TU-1810, 上海)和比色法试剂盒(C010-1-1, 南京建成生物工程研究所)测定谷草转氨酶(GOT)酶活力。蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝比色法。所有操作按照试剂盒说明书严格进行。

1.7 基因定量表达分析

采用 Trizol 试剂法(AG RNAsys Pro Reagent, 湖南)提取脑、肝脏、鳃组织总 RNA。以总 RNA 为模板,使用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)合成 cDNA。

在 NCBI 数据库中查找鞍带石斑鱼 *β-actin*、金属硫蛋白-2(*MT-2*)基因的序列,设计定量 PCR 引物并进行 PCR 验证后使用,参考引物序列详见表 1。使用 Applied Biosystems ABI 7500 型定量 PCR 仪进行基因的定量扩增分析。PCR 反应体系为 20 μL,其中包含 10 μmol/L 的上、下游引物各 0.8 μL; 10 μL 的 TB Green Premix *Ex Taq*; 0.4 μL 的 ROX Reference Dye II; 2 μL 的 cDNA 模版; 6 μL 的 ddH₂O。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s 共 40 个循环。标准曲线采用 6 个稀释浓度组(每组 3 个平行,且设置空白对照)进行;制作标准曲线并根据标准曲线的相关系数 *r*² 和扩增效率 *E*。目的基因表达量采用 2^{-ΔΔCt} 法计算。

表 1 定量 PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences used for quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR)

基因	上游引物序列(5'-3')	下游引物序列(5'-3')	产物长度/(bp)	退火温度/(°C)
<i>MT-2</i>	TGGACCCTGCGATTGCTCC	GGTGGTGCAGGAGCAGTTAGT	88	60
<i>β-actin</i>	TCCTGCGGAATCCACGAGAC	AATGCCTGGGTACATGGTGGT	117	59

1.8 数据统计分析

数据以平均值±标准差(mean±SD)表示, 采用 SPSS 19.0 软件单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan 多重比较分析方法检验不同 Cu²⁺浓度组条件下酶和基因表达的差异, 设定差异显著性水平 $P=0.05$, 当 $P<0.05$ 时认为差异显著。

2 结果

2.1 Cu 暴露对云龙石斑鱼行为学的影响

本研究表明, 云龙石斑鱼在 0.4 mg/L 以上 Cu²⁺浓度组出现行为异常情况。高浓度组实验鱼在暴露 2~4 h 后开始出现行为异常, 主要表现为在水面游动, 身体失去平衡, 开始侧翻游动。6~8 h 后急速游动、到处乱窜或者水面打转, 随后身体抽搐, 沉入水底, 数分钟后, 又向上急游并旋转游动, 周而复始数次后, 直至呼吸缓慢, 乏力。12~24 h 出现大量死亡, 死亡的云龙石斑鱼鳃及体表分泌出大量黏液。低浓度组实验鱼出现中毒症状的时间较高浓度组晚, 但中毒的行为表现模式相似。

2.2 Cu²⁺对云龙石斑鱼的生态毒性

利用概率单位法计算得知, Cu²⁺对云龙石斑鱼 24、48 和 96 h 的 LC₅₀ 值分别为 0.590、0.293、0.162 mg/L, C_S 为 0.0162 mg/L。实验鱼死亡率统计详见表 2; LC₅₀ 以及 C_S 统计详见表 3。

表 2 Cu²⁺对云龙石斑鱼的生态毒性结果

Tab. 2 Acute ecotoxicity results of Cu²⁺ on *E. moara*♀ × *E. lanceolatus*♂

组编号	质量浓度/ (mg/L)	死亡率/%		
		24 h	48 h	96 h
对照	0	0.067	0.167	0.167
I	0.1	0.17	0.22	0.33
II	0.2	0.44	0.56	0.56
III	0.4	0.2	0.42	0.88
IV	0.8	0.56	0.78	0.83
V	1.2	0.39	0.56	0.72
VI	2	0.93	1.00	1.00

2.3 Cu 暴露对云龙石斑鱼的组织损伤

2.3.1 鳃的组织损伤

本研究发现, Cu 暴露造成了鳃组织的结构损

表 3 Cu²⁺对云龙石斑鱼的半致死质量浓度与安全质量浓度
Tab. 3 The safe concentration and LC₅₀ value of Cu²⁺ for *E. moara*♀ × *E. lanceolatus*♂

暴露 时间/h	半致死质量 浓度/(mg/L)	95%可信限 /(mg/L)	安全质量 浓度/(mg/L)
24	0.590	0.390~0.892	
48	0.293	0.214~0.402	0.0162
96	0.162	0.26~0.64	

伤。由图 1a 可知, 对照组鳃上皮细胞单层有序排列, 次级鳃丝结构清晰。随 Cu²⁺浓度升高, 鳃组织表面黏液增多, 鳃丝附有蓝色絮状物。低浓度处理组鳃上皮细胞水肿, 次级鳃丝黏液细胞肿胀, 出现动脉瘤并伴有上皮与毛细血管分离的现象(图 1b); 高浓度处理组次级鳃丝上皮细胞破裂脱落, 顶部棒状(图 1c)。

2.3.2 肝脏的组织损伤

Cu 暴露同样造成了肝脏组织的结构损伤。与对照组(图 1d)相比, 低浓度处理组胞浆内大量空泡; 高浓度处理组肝细胞出现大量脂褐素颗粒, 且肝细胞肿大, 并伴有部分肝细胞坏死, 血窦扩张, 肝索结构紊乱(图 1e、1f)。

2.4 Cu 暴露对云龙石斑鱼肝脏氧化酶活性的影响

本研究发现, Cu 暴露显著抑制了肝脏 SOD 酶活力(图 2a), 但肝脏 GOT 酶活力随 Cu²⁺浓度升高, 呈现先上升后下降趋势(图 2b)。统计结果显示, 0.1 mg/L 组较对照组 SOD 酶活力显著降低($P<0.05$), 0.4 mg/L 组较 0.2 mg/L 组 SOD 酶活力显著降低($P<0.05$), 1.2 mg/L 组 SOD 酶活力显著低于所有实验组($P<0.05$), 但 0.2 与 0.1 mg/L 质量浓度组、0.8 与 0.4 mg/L 质量浓度组 SOD 酶活力相比差异不显著($P>0.05$); 0.1 mg/L 组 GOT 酶活力高于对照组($P>0.05$), 但 Cu²⁺质量浓度高于 0.2 mg/L 时 GOT 酶活力受到显著抑制($P<0.05$)。

2.5 Cu 暴露对云龙石斑鱼组织 MT-2 的影响

2.5.1 对肝脏 MT-2 的影响

Cu 胁迫下肝脏组织 MT-2 mRNA 表达水平显著上升(图 3a)。0.1 mg/L 组较对照组、0.2 mg/L 组较 0.1 mg/L 组、0.8 mg/L 组较 0.4 mg/L 组 MT-2 mRNA 表达水平均显著升高($P<0.05$), 在 1.2 mg/L 组 MT-2 mRNA 表达量达峰值, 显著高于其他实验组($P<0.05$),

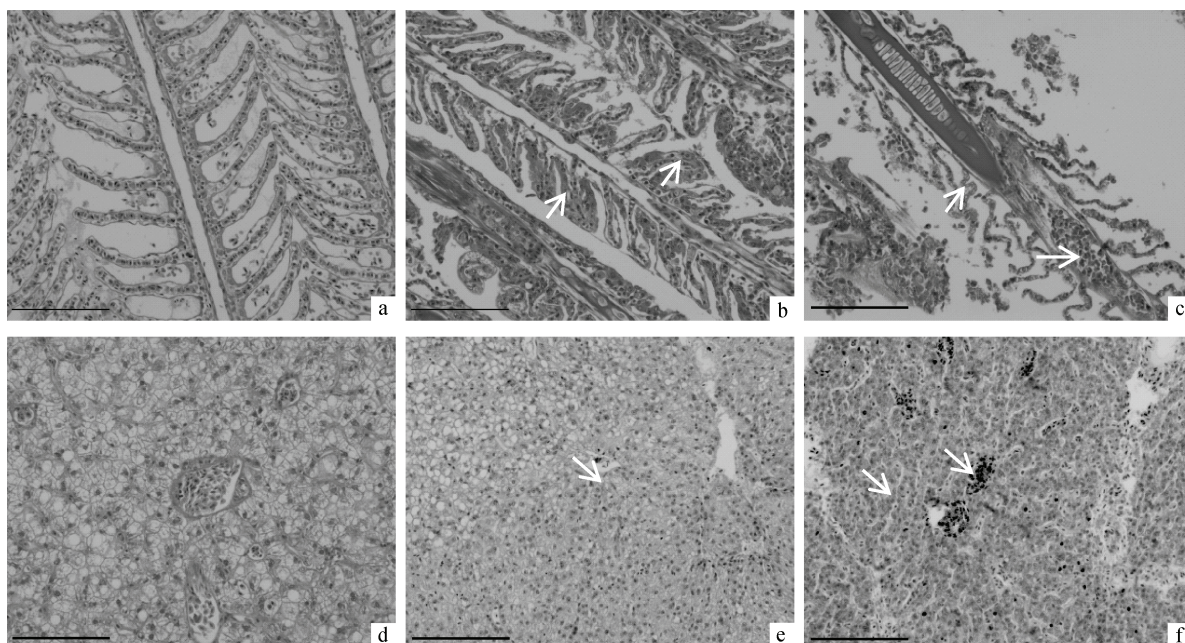


图 1 云石斑鱼经 96 h 的 Cu 暴露后鳃、肝脏的显微结构(标尺 100 μm)

Fig. 1 Effect of 96-h Cu^{2+} exposure on the gills and liver of *E. moara*♀ × *E. lanceolatus*♂ (scale: 100 μm)

a-c. 鳃, d-f. 肝脏. a, d. 对照组; b, e. 0.2 mg/L Cu^{2+} 处理; c, f. 1.2 mg/L Cu^{2+} 处理

a-c. gills, d-f. liver. a, d. control; b, e. 0.2 mg/L Cu^{2+} treatment; c, f. 1.2 mg/L Cu^{2+} treatment

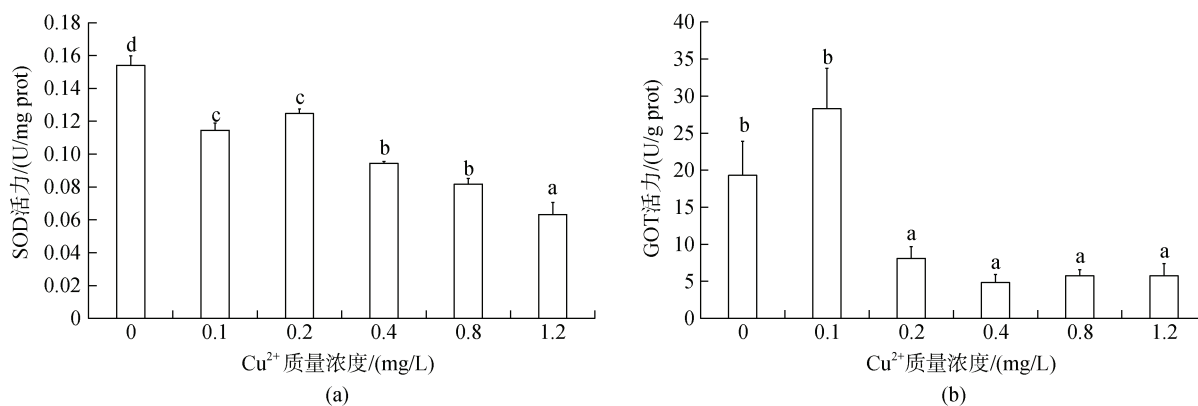


图 2 Cu^{2+} 对云石斑鱼肝脏 SOD 酶(a)和 GOT 酶(b)活力影响

Fig. 2 Effect of Cu^{2+} on the (a) superoxide dismutase (SOD) and (b) glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) enzyme activities in the liver of *E. moara*♀ × *E. lanceolatus*♂

不同小写字母表示不同处理组之间差异显著($P < 0.05$), 图 3 同

Different lowercase superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) in the different treatment, the same as Fig. 3

但 0.2 mg/L 组与 0.4 mg/L 组 *MT-2* mRNA 表达水平无显著性差异($P > 0.05$)。

2.5.2 对鳃 *MT-2* 的影响

本研究表明, Cu 胁迫下鳃组织 *MT-2* mRNA 表达水平升高, 与肝脏中表达趋势相似(图 3b)。其中 0.1~0.4 mg/L 质量浓度下 *MT-2* mRNA 表达水平与对照组无显著差异($P > 0.05$), 但在 0.8、1.2 mg/L Cu^{2+} 质量浓度下显著升高($P < 0.05$)。

2.5.3 对脑 *MT-2* 的影响

Cu 胁迫条件下, 脑组织 *MT-2* mRNA 表达水平呈现先上升再下降趋势。其中 0.1、0.2 mg/L 质量浓度下 *MT-2* mRNA 表达水平与对照组相比无显著差异($P > 0.05$), Cu^{2+} 质量浓度为 0.4 mg/L 时 *MT-2* mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$), 0.8、1.2 mg/L 浓度组 *MT-2* mRNA 表达水平显著下降, 且显著低于其他实验组($P < 0.05$) (图 3c)。

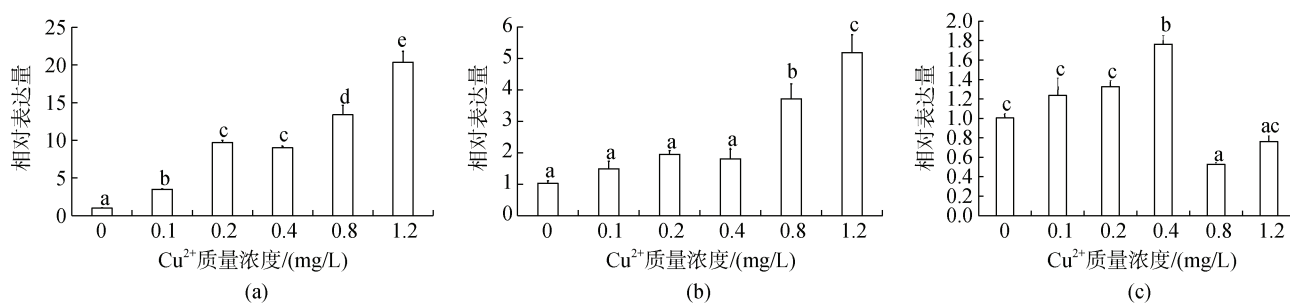


图3 Cu²⁺对云龙石斑鱼 MT-2 mRNA 表达的影响
 Fig. 3 Effect of Cu²⁺ on MT-2 mRNA expression in *E. moara*♀×*E. lanceolatus*♂
 (a). 肝脏; (b). 鳃; (c). 脑
 (a). liver; (b). gills; (c). brain

3 讨论

3.1 Cu 暴露对云龙石斑鱼的急性毒性效应

有关 Cu 对鱼类毒性效应的研究已有报道。本研究发现, Cu 暴露条件下云龙石斑鱼体表和鳃黏液增多、鳃丝附有蓝色絮状物。行为变化为翻转测游、水面上层打转、鳃盖张开频率加快, 最终窒息死亡。这与沙丁鱼(*Sardinella brasiliensis*)^[11]、莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)^[12]、刀鲚(*Coilia nasus*) 幼鱼^[13]中毒现象一致。

LC₅₀ 通常作为衡量某种药物对特定物种毒性大小的重要参数, 以 96 h LC₅₀ 作为标准^[14]。CHIDIEBERE^[15] 报道 Cu²⁺对鲶鱼(*Clarias Gariepinus*)96 h 的 LC₅₀ 为 59.36 mg/L, 而王秋实等^[16]研究发现 Cu²⁺对梭鲈(*Sander lucioperca*)幼鱼 96 h LC₅₀ 为 1.88 mg/L。本研究结果显示, Cu²⁺对云龙石斑幼鱼 96 h 的 LC₅₀ 值为 0.162 mg/L, 结果与其他鱼类不同, 这是由种的差异性造成, 表明云龙石斑鱼对 Cu²⁺较为敏感。TAVARES-DIAS^[17]也曾报道一些鱼种对 Cu 极为敏感, 而其他鱼种则有高度耐受性。孟紫强等^[18]评定 LC₅₀ 在 0.1~1.0 mg/L 为高毒, 本研究结果表明云龙石斑幼鱼 96 h LC₅₀ 在高毒范围区间, 提示在养殖生产过程中药用硫酸铜时应准确把控用量。此外, 有研究发现, 盐度^[19]、温度^[20]等理化因子的改变对重金属的毒性也可能产生影响, 本研究在实验过程中环境因子较稳定, 下一步可以通过更为精密的实验研究其他理化因子对 Cu²⁺毒性的影响。

3.2 Cu 暴露对云龙石斑鱼的组织损伤

鳃主要参与鱼类的呼吸和渗透调节过程, 是重金属首先接触的靶器官。重金属离子主要通过阻塞

鳃丝与水体的接触, 以此抑制鱼的呼吸^[21]。本研究发现, 高浓度 Cu 处理组鳃上皮细胞增生, 次级鳃丝顶部棒状, 这与 BASIRUN 等^[12]研究 Cu 对莫桑比克罗非鱼以及 AFAGHI 等^[22]研究 Cu 对鲤鱼(*Cyprinus carpio*)的结果一致。GRIFFITT 等^[23]认为 Cu 刺激斑马鱼(*Danio rerio*)鳃组织次级鳃丝基部的增生增加了气体传送的距离, 甚至很小的增生都会影响氧气穿过鳃进入到体内的效率, 本研究中 Cu 暴露导致云龙石斑鱼鳃盖张开, 呈现缺氧状态, 病理切片观察发现次级鳃丝基部出现动脉瘤, 表明 Cu 胁迫对云龙石斑鱼鳃运输气体的功能造成影响。肝脏是鱼类分解毒物的重要器官, 有研究表明, 血窦扩张是 Cu 诱导肝脏损伤的重要指示信号^[24], 并且脂褐素颗粒的大量产生是一种在致病因素影响下动物对自身肝脏的适应与修复机制^[25]。本研究结果显示, 急性 Cu 暴露 96 h 后, 肝脏显示出不同程度的损伤, 主要表现为肝细胞肿大、血窦扩张、血细胞沉积以及脂褐素颗粒产生, 这与徐永江等^[2]对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)、王海涛等^[26]对细鳞鲑幼鱼(*Brachymystax lenok*)以及 ALKOBABY 等^[27]对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)肝脏组织损伤的报道结果类似, 说明 Cu 诱导不同品种鱼类肝脏损伤的症状大体一致。

3.3 Cu 暴露对云龙石斑鱼肝脏抗氧化酶活性的影响

SOD、GOT 是脊椎动物体内抗氧化酶的重要组成部分, 先前研究表明其可作反映鱼类肝脏受损伤程度的指示指标^[28-29]。本研究中, 云龙石斑鱼 SOD 和 GOT 酶活性对 Cu 的刺激均较敏感, 但 Cu 暴露对两种酶活性的影响呈现不同趋势。低浓度 Cu 处理组较

对照组 GOT 酶活性升高,这与 RAMASWAMY 等^[30]对莫桑比克罗非鱼肝脏组织的研究结果类似。STEBBING^[31]认为,毒物在低浓度下出现这种现象,是其在无毒情况下的应激反应,他把这一现象称为“毒物兴奋效应”。但后续随着 Cu^{2+} 浓度升高, GOT 酶活力降低。作者认为低浓度 Cu 胁迫下,云龙石斑鱼肝脏 GOT 酶活力上升是用于补偿环境胁迫带来的影响,但高浓度处理组胁迫下,可能已经超出了其本身抗氧化系统的防御能力,从而造成较为严重的损伤。殷健等^[32]报道斑马鱼鳃组织在暴露于重金属 Cu 后, SOD 活性和 MDA 含量明显升高,而且 *Cu/Zn-SOD* 基因表达上调。SANCHEZ 等^[33]也报道 Cu 能够诱导三棘鱼(*Gasterosteus aculeatus*)中肝脏组织的 SOD 和 CAT 活性提高。但本研究发现,随 Cu^{2+} 浓度的升高,肝脏组织 SOD 显著降低,这与 WANG^[34]对斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)肝脏中 SOD 酶活力应答 Cu 胁迫的研究结果一致。表明云龙石斑鱼肝脏 SOD 活力对 Cu 胁迫较为敏感, SOD 系统受到 Cu 的严重胁迫抑制,提示应用 Cu 制剂处理云龙石斑鱼时应注意使用剂量,同时也提示其可作为水环境 Cu^{2+} 安全监测生理指示指标的可能性。

3.4 Cu 暴露对云龙石斑鱼组织 MT-2 的影响

MT-2 是金属硫蛋白家族成员之一,与 Zn、Cu、Fe、Cd 等二价离子可逆性结合以维持机体内金属离子平衡,对重金属解毒有重要作用^[35]。GONZALEZ 等^[36]报道 MT-2 基因在肝脏中比在脑、鳃和肌肉中表达量高。WANG 等^[34]研究表明,斜带石斑鱼肝脏是积蓄 Cu 的主要靶器官,刘瑜等^[37]报道 Cu 主要沉积在黄鳍(*Monopterus albus*)的肝脏和肠道部位,高浓度 Cu 会导致肝脏 Cu 超标,说明肝是 Cu 积累的最主要靶器官。GAO 等^[38]表明鳊鱼(*Siniperca chuatsi*) MT-2 mRNA 在所有组织都表达,且在鳃、肝脏、心脏、体肾和肠道中高表达,在脑和头肾中低表达。本研究中,随 Cu^{2+} 浓度升高, MT-2 mRNA 在肝脏、鳃组织表达水平显著升高,与 GONZALEZ^[36]描述一致。但在脑组织中 MT-2 mRNA 表达水平呈现先上升后下降的趋势,且在低浓度时上升趋势不显著,这与左鹏举^[39]对鲤鱼 MT mRNA 表达水平研究结果相似,说明高浓度 Cu 处理组脑组织 MT-2 诱导表达已与重金属饱和结合,机体产生了不可逆的毒性。CRAIG 等^[40]研究表明,斑马鱼在 Cu 暴露组(8 $\mu\text{g/L}$)中 MT-2 mRNA 表达水平比 MT-1 上调更快,表明

MT-2 基因作为 Cu^{2+} 对鱼类生理毒性的评价参数的重要性,也可作为鱼类对 Cu^{2+} 敏感应答的指示参数。

4 结论

在本实验中,硫酸铜对云龙石斑鱼幼鱼的 96 h LC_{50} 在高毒范围区间, Cu 暴露不仅造成云龙石斑鱼幼鱼的肝脏、鳃组织损伤,同时使其体内抗氧化酶活性及 MT-2 基因表达产生不同的变化。表明云龙石斑鱼对硫酸铜制剂的处理较为敏感。本研究结果显示, Cu^{2+} 对云龙石斑鱼的安全质量浓度为 0.016 2 mg/L (换算成硫酸铜质量浓度为 0.040 5 mg/L),因此在养殖过程中,建议使用 0.040 5 mg/L 及以下质量浓度的硫酸铜进行药浴或寄生虫病害防控。

参考文献:

- [1] AL-BAIRUTY G A, SHAW B J, HANDY R D, et al. Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Aquatic Toxicology, 2013, 126(1): 104-115.
- [2] 徐永江, 柳学周, 于志刚, 等. 几种重金属离子对半滑舌鳎组织损伤的研究[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 11-16.
XU Yongjiang, LIU Xuezhou, YU Zhigang, et al. Histological changes induced by Cd, Cu, Pb and Zn in *Cynoglossus semilaevis* Günther in laboratory[J]. Marine Fisheries Research, 2005, 26(6): 11-16.
- [3] 范超, 史成银. 硫酸铜对斑石鲷幼鱼的急性毒性及对眼点淀粉卵涡鞭虫的杀灭效果[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(11): 98-102.
FAN Chao, SHI Chengyin. Acute toxicity towards juvenile spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) and eradication effect on *Amyloodinium ocellatum* of copper sulfate[J]. China Animal Health Inspection, 2016, 33(11): 98-102.
- [4] 吴建绍, 李雷斌, 朱志煌, 等. 硫酸铜对双斑东方鲀刺激隐核虫病的治疗效果研究[J]. 水产科学, 2019, 38(3): 305-312.
WU Jianshao, LI Leibin, ZHU Zhihuang, et al. Therapeutic effect of copper sulfate on cryptocaryoniosis in twospot puffer *Takifugu bimaculatus*[J]. Fisheries Science, 2019, 38(3): 305-312.
- [5] 李志成, 江飏, 钟志鸿, 等. 硫酸铜治疗卵形鲳鲹淀粉卵涡鞭虫病的研究[J]. 南方水产科学, 2021, 17(3): 108-114.
LI Zhicheng, JIANG Biao, ZHONG Zhihong, et al. Treatment of amyloodiniosis in golden pompano (*Trachinotus ovatus*) by copper sulfate[J]. South China Fisheries Science, 2021, 17(3): 108-114.

- [6] 黎祖福, 陈省平, 庄余谋, 等. 鞍带石斑鱼人工繁殖与育苗培育技术研究[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(3): 78-85.
LI Zufu, CHEN Shengping, ZHUANG Yumou, et al. Studies on artificial propagation and seed breeding technology of *Epinephelus lanceol*[J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(3): 78-85.
- [7] 梁友, 雷霖霖, 倪瑜, 等. 云纹石斑鱼工厂化循环水养殖技术[J]. 渔业现代化, 2014, 41(4): 26-28.
LIANG You, LEI Jilin, NI Yu, et al. The industrial farming technology of *Epinephelus moara* in recirculation aquaculture water system[J]. Fishery Modernization, 2014, 41(4): 26-28.
- [8] 田永胜, 陈张帆, 段会敏, 等. 鞍带石斑鱼冷冻精子与云纹石斑鱼杂交家系建立及遗传效应分析[J]. 水产学报, 2017, 41(10): 1-12.
TIAN Yongsheng, CHEN Zhangfan, DUAN Huimin, et al. The family line establishment of the hybrid *Epinephelus moara* ♀ × *E. lanceolayus* ♂ by using cryopreserved sperm and the related genetic effect analysis[J]. Journal of Fisheries, 2017, 41(10): 1-12.
- [9] 吴邦灿, 费龙. 现代环境监测技术[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1999: 252-254.
WU Bangcan, FEI Long. Technology of Environmental Monitoring[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1999: 252-254.
- [10] 姜礼燾. 鱼药的安全浓度评价方法[J]. 中国渔业经济研究, 1995, 6: 27.
JIANG Lifan. Evaluation method of safe concentration of fish medicine[J]. Chinese Fisheries Economics, 1995, 6: 27.
- [11] OWATARI M S, STERZELECKI F C, SILVA C, et al. Amyloodiniosis in farmed *Sardinella brasiliensis* (Steindachner, 1879): Case report of successful therapeutic control with copper sulfate[J]. Parasitology International, 2020, 76: 102091.
- [12] BASIRUN A A, AHMAD S A, YASID N A, et al. Toxicological effects and behavioural and biochemical responses of *Oreochromis mossambicus* gills and its cholinesterase to copper: a biomarker application[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2019, 16(2): 887-898.
- [13] 聂志娟, 徐钢春, 张守领, 等. 铜对刀鲚幼鱼的急性毒性及对肝抗氧化酶活性与组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2014, 21(1): 161-168.
NIE Zhijuan, XU Gangchun, ZHANG Shouling, et al. Acute effects of copper on survival of fingerlings, antioxidant enzyme activities in liver and structure of gill and liver of *Coilia nasus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(1): 161-168.
- [14] 中国兽医协会组. 2011 年执业兽医资格考试应试指南(水生动物类)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 282-301.
Chinese Veterinary Medical Association. 2011 Practising veterinary qualification examination guide (Aquatic animals)[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011: 282-301.
- [15] CHIDIEBERE E E. Acute toxicity of copper and zinc and their lethal concentration on *Clarias Gariepinus* (Cat fish)[J]. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research, 2019, 17(5): 13160-13166.
- [16] 王秋实, 王乐, 裴月, 等. 硫酸铜对梭鲈幼鱼的急性毒性及其对车轮虫的灭杀作用[J]. 水产学杂志, 2018, 31(1): 17-20.
WANG Qiushi, WANG Le, PEI Yue, et al. Acute toxicity of copper sulfate to *Pikeperch Sander lucioperca* juveniles and extermination of parasite *Trichodina* sp.[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2018, 31(1): 17-20.
- [17] TAVARES-DIAS M. Toxic, physiological, histomorphological, growth performance and antiparasitic effects of copper sulphate in fish aquaculture[J]. Aquaculture, 2021, 535: 736350.
- [18] 孟紫强. 生态毒理学原理与方法[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 149-155.
MENG Ziqiang. Principles and methods of ecotoxicology[M]. Beijing: Science Press, 2006: 149-155.
- [19] 张晨捷, 高权新, 施兆鸿, 等. 低盐度和不同硫酸铜浓度对银鲳鳃离子调节酶和肝抗氧化功能的影响[J]. 中国水产科学, 2014, 21(4): 711-719.
ZHANG Chenjie, GAO Quanxin, SHI Zhaohong, et al. The effects of low salinity and different CuSO₄ concentrations on gill ion-regulatory enzyme activities and liver antioxidant function in silver pomfret[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(4): 711-719.
- [20] 张新铖, 朱新平, 刘毅辉, 等. 甲苯咪唑、溴氰菊酯和硫酸铜对美洲鲈的急性毒性研究[J]. 南方水产科学, 2015, 11(2): 66-71.
ZHANG Xincheng, ZHU Xinping, LIU Yihui, et al. Acute toxicity of mebendazole, deltamethrin and copper sulphate to *Alosa sapidissima*[J]. South China Fisheries Science, 2015, 11(2): 66-71.
- [21] SABULLAH M K, SULAIMAN M R, ABD SHUKOR M Y, et al. In vitro and in vivo effects of *Puntius javanicus* cholinesterase by copper[J]. Fresenius Environmental Bulletin, 2015, 24(12b): 4615-4621.
- [22] AFAGHI A, ZARE S. Effects of exposure to sub-lethal concentrations of copper on hematological and histopathological alterations in Common carp, *Cyprinus Carpio*[J]. Archives of Advances in Biosciences, 2020, 11(1): 26-33.
- [23] GRIFFITT R J, WEIL R, HYNDMAN K A, et al. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute

- lethality in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(23): 8178-8186.
- [24] SHAW B J, HANDY R D. Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions[J]. Environment International, 2011, 37(6): 1083-1097.
- [25] 赵德明, 周向梅, 杨利峰, 等. 动物组织病理学彩色图谱[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2015: 62.
ZHAO Deming, ZHOU Xiangmei, YANG Lifeng, et al. Color atlas of animal histopathology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015: 62.
- [26] 王海涛, 徐革锋, 汤施展. 铜对细鳞鲟幼鱼鳃和肝组织的急性毒性[J]. 水产学杂志, 2017, 30(2): 22-25.
WANG Haitao, XU Gefeng, TANG Shizhan. Acute toxicity of copper to gill and liver of Juvenile *Brachymystax lenok*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2017, 30(2): 22-25.
- [27] ALKOBABY A I, EL-WAHED R K A. The acute toxicity of copper to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings and its effects on gill and liver histology[J]. Journal of Aquaculture & Research Development, 2017, 8(1): 465.
- [28] GOMES T, PINHEIRO J P, CANCIO I, et al. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45(21): 9356-9362.
- [29] KIM S G, KANG J C. Effect of dietary copper exposure on accumulation, growth and hematological parameters of the juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii*[J]. Marine Environmental Research, 2004, 58(1): 65-82.
- [30] RAMASWAMY M, THANGAVEL P, PANNEER SELVAM N. Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) enzyme activities in different tissues of *Sarotherodon mossambicus* (Peters) exposed to a carbamate pesticide, carbaryl[J]. Pest Management Science, 2015, 55(12): 1217-1221.
- [31] STEBBING A. Hormesis—The stimulation of growth by low levels of inhibitors[J]. Science of the Total Environment, 1982, 22(3): 213-234.
- [32] 殷健. 重金属对斑马鱼的毒性效应及作用机制研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014: 97-99.
- YIN Jian. Studies on toxic effect and mechanism of heavy metals on zebrafish[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2014: 97-99.
- [33] SANCHEZ W, PALLUEL O, MEUNIER L, et al. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2005, 19(1): 177-183.
- [34] WANG T, LONG X H, et al. The potential toxicity of copper nanoparticles and copper sulphate on juvenile *Epinephelus coioides*[J]. Aquatic Toxicology, 2014, 152: 96-104.
- [35] SUTHERLAND D E, STILLMAN M J. The “magic numbers” of metallothionein[J]. Metallomics, 2011, 3(5): 444-463.
- [36] GONZALEZ P, BAUDRIMONT M, BOUDOU A, et al. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the Zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Biometals, 2006, 19(3): 225-235.
- [37] 刘瑜, 隗黎丽, 周秋白, 等. 饲料铜水平对黄鳝生长、组织铜蓄积和血清生化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2020, 32(4): 1800-1808.
LIU Yu, KUI Lili, ZHOU Qiubai, et al. Effects of dietary copper level on growth, tissue copper accumulation and serum biochemical indexes of rice field eel (*Monopterus albus*)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(4): 1800-1808.
- [38] GAO D, WANG G T, CHEN X T, et al. Metallothionein-2 gene from the mandarin fish *Siniperca chuatsi*: cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2009, 149(1): 18-25.
- [39] 左鹏举. 水体铜对黄河鲤鱼金属硫蛋白基因表达的影响[D]. 郑州: 河南农业大学, 2016: 30-32.
ZUO Pengju. Relative expression of metallothionein gene induced by water copper in *Cyprinus carpio*[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2016: 30-32.
- [40] CRAIG P M, GALUS M, WOOD C M, et al. Dietary iron alters waterborne copper-induced gene expression in soft water acclimated zebrafish (*Danio rerio*)[J]. American Journal of Physiology, 2009, 296(2): R362-R373.

Physiological and ecological toxicity of copper on juvenile Yunlong grouper (*Epinephelus moara*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂)

JIN Zhi-xin^{1, 2}, XU Yong-jiang², LIU Xin-fu², LIANG You², ZHOU He-ting², CUI Ai-jun², LIU Xin²

(1. National Engineering Research Center For Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Laboratory for Marine Fisheries Science and, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao) for Deep Blue Fishery Engineering, Qingdao 266071, China)

Received: Jun. 6, 2022

Key words: Yunlong grouper; copper; safe concentration; physiological stress; structure damage

Abstract: In order to investigate the effects of copper exposure on ecotoxicity as well as on physiological and biochemical indexes in Yunlong grouper (*Epinephelus moara*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂) juveniles, a safe concentration for copper (Cu²⁺) stress and the effects of Cu²⁺ on tissue structure damage, enzyme activity, and metallothionein-2 (*MT-2*) gene expression in Yunlong grouper were analyzed. In the present study, the fishes were exposed to different Cu²⁺ concentrations of 0 (control), 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, and 2 mg/L for 5 days. The results of this experiment showed that the safe concentration of copper for juvenile Yunlong grouper was 0.0162 mg/L. Exposure of the fishes to Cu²⁺ induced dilatation of sinusoids in their liver, and the arrangement of hepatocytes around the central vein of liver tissue presented different degrees of disorder. The exposure also induced clubbed tips, edema of epithelial cells, and aneurysms in gills. With an increase in Cu²⁺ concentration, the total superoxide dismutase (SOD) activity decreased in the liver, and the glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) activity showed an initial increase followed by a decreasing trend in the liver as compared with the control group. The expression level of *MT-2* mRNA increased in the liver and gills as a result of the copper exposure stress. However, in the brain, the expression level of *MT-2* mRNA increased initially and then decreased. In summary, exposure to a high concentration of copper caused a series of physiological changes such as structural damage in the gills and liver as well as immunity-related enzyme activity inhibition in the liver of Yunlong grouper. These findings would provide technical guidance for copper product selection in disease control in Yunlong grouper aquaculture.

(本文编辑: 谭雪静)