

维生素 E 和硒互作对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)抗氧化系统的调节作用*

胡俊茹^{1,2} 王安利¹ 曹俊明²

(1. 华南师范大学生命科学学院 广东省水产健康安全养殖重点实验室 广东省高等学校生态与环境科学重点实验室 广州 510631; 2. 广东省农业科学院畜牧研究所 广州 510640)

提要 采用二因素三水平设计试验,用添加不同水平配比的 VE 和 Se(mg/kg)的饵料 G₀(0, 0)、G₁(200, 0.2)、G₂(200, 0.4)、G₃(200, 0.8)、G₄(400, 0.2)、G₅(400, 0.4)、G₆(400, 0.8)、G₇(800, 0.2)、G₈(800, 0.4)、G₉(800, 0.8)投喂凡纳滨对虾,研究 VE 和 Se 对体长 3cm 左右凡纳滨对虾体液抗氧化系统的影响,试验进行 4 周。结果表明,第 2 周时,VE、VE 和 Se 对 O²⁻、酚氧化酶(PO)、血清总抗氧化能力(T-AOC)有显著影响(P<0.05);Se 对 PO、血清和肝胰腺中 T-AOC 以及肝胰腺中 GPx 有显著影响(P<0.05)。第 4 周时,VE 和 Se 协同作用对 4 种抗氧化指标都有显著影响(P<0.05)。第 2、4 周时,抗氧化酶活力比第 0 周显著升高。对 O²⁻的研究发现,在第 2 和第 4 周时,G₈组血细胞 O²⁻最多。第 2 周时,血清 PO 在 G₅、G₉组活力最高(P<0.05),两组间差异不显著(P>0.05);血清和肝胰腺中 T-AOC 在 G₂、G₃组最高(P<0.05);对虾肝胰腺中 GPx 酶活力在 G₃和 G₅组达到最高(P<0.05),两组间差异不显著(P>0.05)。第 4 周时,G₇组 PO 和 GPx 活力最高,G₉组 T-AOC 活力达到最高(P<0.05)。研究结果提示:添加适量的 VE 和 Se 能显著提高对虾抗氧化能力,VE 和 Se 对抗氧化系统具有随时间变化的动态调节作用,VE 和 Se 之间存在交互作用。当在基础饵料中分别添加 VE 和 Se 在 400mg/kg、0.4mg/kg 时,凡纳滨对虾机体抗氧化能力整体达到平衡,能有效抵制氧自由基的损伤。

关键词 凡纳滨对虾, 硒, 维生素 E, 抗氧化酶

中图分类号 S963.7

机体对脂质过氧化作用的损伤有两类防御体系:一类是非酶促反应,包括含巯基化合物、辅酶 Q、维生素(VA、VC 和 VE)、醇类和酚羟基化合物等;另一类是酶促防御体系,包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等。它们可以有效清除 O²⁻、H₂O₂、ROOH 等活性氧并终止自由基链式反应(Levander, 1983)。VE 可固定在细胞膜上,并与结合在膜上的能产生氧自由基的酶紧密相邻,很快地捕集和清除自由基,防止膜上形成脂质过氧化(Wagner *et al*, 1996)。而 Se 是体内含硒酶的

重要组成成分,它的营养状态与体内含硒酶的活性和合成密切相关(Mihailovic *et al*, 1992)。关于 VE 和 Se 单独添加对水生动物抗氧化作用的研究已有不少报道如在凡纳滨对虾(Lee *et al*, 2004; Haiqi *et al*, 1993; Wang *et al*, 2006)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*) (Kiron *et al*, 2004)、石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*) (Lin *et al*, 2005, 2007)、美洲河鲶(*Edwardsiella ictaluri*) (David *et al*, 1993; Felton *et al*, 1996)、欧洲鲫鱼(*Carassius auratus gibelio*) (Wang *et al*, 2007)等。VE 和 Se 共同添加在畜禽的研究较多,而在水生动物上

* 广东省自然科学基金重点项目, 021098 号、5005909 号; 广东省科技计划项目, 2002C20304 号、2007B020708013 号; 广州市科技攻关项目, 2002Z2-E0102 号; 广东省教育部产学研结合专项资金项目, 2006D90204005 号; 国家自然科学基金资助项目, 30671628 号; 国家科技支撑计划课题, 2007BAD29B04 号、2007BAD29B06 号。胡俊茹, 硕士, E-mail: hujunru1025@163.com

通讯作者: 王安利, 教授, 博导, E-mail: wanganl@scnu.edu.cn

收稿日期: 2008-12-17, 收修改稿日期: 2009-03-12

仅见于皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino) (万敏等, 2004)。同时, VE 和 Se 对抗氧化系统随时间的调节作用未见报道。从而, 本试验开展了 VE 和 Se 互作在凡纳滨对虾上抗氧化作用的初步研究, 为阐明 VE 和 Se 互作的机理以及免疫营养素在对虾养殖中的合理搭配提供基础研究。

1 材料与方法

1.1 饵料配制

试验饵料是在基础饵料基础上添加一定 VE(VE 醋酸酯)和 Se(亚硒酸钠为硒源)(以 mg/kg 计): G₀(0, 0); G₁(200, 0.2); G₂(200, 0.4); G₃(200, 0.8); G₄(400, 0.2); G₅(400, 0.4); G₆(400, 0.8); G₇(800, 0.2); G₈(800, 0.4); G₉(800, 0.8), 饵料制成直径为 1.6—1.8mm、长度为 0.5cm 的颗粒, 在 40 ℃ 烘箱中烘干后, 放在密封的塑料袋中, 于低温干燥处保存备用。基础饵料配方见表 1。

表 1 基础饵料的组成(g/kg)
Tab.1 The composition of the basal diet (g/kg)

组成成分	含量(g)	组成成分	含量(g)
鱼粉	412	复合矿物质	2
面粉	227	Ca(H ₂ PO ₄) ₂	20
豆粉	250	维生素 C	2
玉米粉	52	磷脂	10
豆油	5	胆碱	6
鱼油	10	羧甲基纤维素	2
复合维生素 (不含 VE)	2		

注: 复合维生素: VA 4000000IU; VD 2000000IU; VB₁ 5g/kg; VK 10g/kg; VB₂ 15g/kg; 烟酸 40g/kg; 泛酸钙 25g/kg; 叶酸 2.5g/kg; 生物素 800mg/kg; 肌醇 15g/kg; VB₁₂ 20mg/kg; VB₆ 8g/kg。复合矿物质: 锰适量; 钾 90mg/kg; 铜 3mg/kg; 镁 12mg/kg; 铁 1g/kg; 钴 16mg/kg; 锌 10g/kg; 碘 60mg/kg

1.2 试验分组及管理

试验用凡纳滨对虾购于广东肇庆某养殖场。试验前暂养 1 周, 养殖于具有循环盐水的玻璃水族箱(70×45×30cm)中, 每箱放养 25 尾, 每个梯度设三个重复, 养殖水体盐度为 8—10, 由海水晶配制。箱中放置遮蔽物以防止对虾互相残杀, 每天早晚各投饵 1 次, 投饵量根据对虾的摄食情况进行调整, 饵料以不剩余为准, 每天及时清除残饵和排泄物。饲养期为 4 周, 在取样前 24h 停止投饵。在 0 周时, 从各处理组 3 个重复共随机抽取 10 只虾, 第 2、4 周时从每个处理组的 2 个重复中各随机抽取 10 只虾, 然后从第 3 个重复中补足前 2 组所取的尾数, 使前 2 组保持 25 尾/箱。

用 250μl 的灭菌玻璃注射器自对虾头胸甲后部插入凡纳滨对虾围心腔取血, 置于 2ml Eppendorf 管中于 4 ℃ 冰箱中过夜, 然后于 4 ℃ 低速离心 10min (3000r/min)取血清放入 -80 ℃ 超低温冰箱, 备用。在冰浴条件下, 用小剪刀和镊子取出对虾肌肉和肝胰腺 0.5g 加入 5ml 生理盐水, 进行超声波冰浴匀浆, 匀浆液冷冻离心(0 ℃, 10000r/min, 30min)后, 取上清液保存在 -80 ℃ 冰箱中待测。

1.3 超氧阴离子(O²⁻, Reactive oxygen intermediates)的测定

2ml 离心管中加入 200μl MHBSS、30μl Alsever 氏抗凝剂和 20μl 虾血, 在 25 ℃ 下培养 30min, 加入 50μl 0.3% NBT 37 ℃ 室温培养 2h, 再加入 300μl 纯甲醇, 离心(6500r/min, 10min)取上清液。将沉淀用 70% 的甲醇洗 2 次, 在干燥器内干燥后, 加 700μl 的 2mol/L KOH 和 800μl 的二甲基亚砷溶解后, 在波长 620nm 处测定 OD 值。

1.4 酚氧化酶(PO, Phenoloxidase)活力测定

0.01mol/L 的二甲砷酸钠缓冲溶液(Na-CAC buffer, pH 7.0)50μl 置于 96 孔酶标板中, 加 20μl 血清, 100μl 多巴(L-dopa), 在 490nm 下用酶标仪测定吸光度, 每 2min 读数一次。酶活力单位定义为每 min 每 mg 蛋白 OD₄₉₀ 增加 0.001。

1.5 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH, glutathione peroxidase)活力测定

DTNB 直接法, 即测定底物谷胱甘肽(GSH)被氧化的程度来表示酶活。

1.6 总抗氧化能力(T-AOC, total anti-oxidant activity)活力测定

采用试剂盒的方法, 总抗氧化能力试剂盒购于南京建成生物有限公司, 严格按照试剂盒的方法操作。

1.7 统计分析

采用 SPSS11.5 统计软件两因素方差分析和 LSD 法多重比较对所得数据进行分析处理, P<0.05 差异显著, 所有的结果均以平均值±标准差来表示。

2 结果

2.1 血细胞 O²⁻含量的变化

O²⁻含量的变化见表 2。饲料中不同浓度的 VE 以及 VE 和 Se 对 O²⁻有显著的影响(P<0.05), Se 对 O²⁻无显著的影响(P>0.05), 但 VE 和 Se 有交互作用。第 2 和第 4 周时 G₈ 组血细胞中 O²⁻生成量最多(P<0.05), 第 4 周时产生的 O²⁻与第 2 周相比有所降低。

表2 VE和Se对凡纳滨对虾血细胞中超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)(OD)的影响

Tab.2 Effects of vitamin E and selenium on reactive oxygen intermediates ($O_2^{\cdot-}$)(OD) in hemocytes (mean±SD, $n=3$)

处理组	时间		
	第0周	第2周	第4周
G ₀	0.19±0.02 ^a	0.27±0.04 ^c	0.19±0.03 ^b
G ₁	0.19±0.02 ^a	0.30±0.02 ^{bc}	0.25±0.05 ^{ab}
G ₂	0.19±0.02 ^a	0.28±0.03 ^c	0.19±0.01 ^b
G ₃	0.19±0.02 ^a	0.39±0.03 ^{ab}	0.20±0.01 ^{ab}
G ₄	0.19±0.02 ^a	0.39±0.02 ^{ab}	0.20±0.01 ^{ab}
G ₅	0.19±0.02 ^a	0.38±0.02 ^{ab}	0.26±0.04 ^{ab}
G ₆	0.19±0.02 ^a	0.39±0.05 ^{ab}	0.21±0.01 ^{ab}
G ₇	0.19±0.02 ^a	0.38±0.01 ^{ab}	0.26±0.03 ^{ab}
G ₈	0.19±0.02 ^a	0.41±0.07 ^a	0.28±0.02 ^a
G ₉	0.19±0.02 ^a	0.32±0.05 ^{abc}	0.27±0.05 ^{ab}
Ve		$P=0.001$	$P=0.001$
Se		$P=0.960$	$P=0.426$
Ve×Se		$P=0.008$	$P=0.006$

2.2 PO活力变化

PO活力的变化见表3。第2周时饲料中不同浓度的VE、Se以及VE和Se对PO有显著的影响($P<0.05$),但第4周时Se的影响作用不显著($P>0.05$)。第2周时,G₉组PO活力达到最高,其次是G₅组,但差异不显著($P>0.05$)。第4周时,G₇组PO活力最高($P<0.05$),其次是G₆、G₈组但与G₇组无显著性差异($P>0.05$),各组PO与第2周相比也有降低的趋势。

表3 VE和Se对凡纳滨对虾血清中PO(U/ml)的影响

Tab.3 Effects of vitamin E and selenium on PO (U/ml) activity in serum (mean±SD, $n=3$)

处理组	时间		
	第0周	第2周	第4周
G ₀	2.44±0.38 ^a	2.45±0.01 ^f	2.55±0.09 ^e
G ₁	2.44±0.38 ^a	3.19±0.11 ^f	4.78±0.23 ^{cd}
G ₂	2.44±0.38 ^a	3.28±0.04 ^f	5.15±1.62 ^c
G ₃	2.44±0.38 ^a	4.68±0.11 ^e	3.42±0.05 ^{de}
G ₄	2.44±0.38 ^a	7.83±0.05 ^b	2.86±0.05 ^e
G ₅	2.44±0.38 ^a	9.39±0.62 ^a	3.05±0.01 ^e
G ₆	2.44±0.38 ^a	5.62±0.01 ^d	9.59±0.21 ^{ab}
G ₇	2.44±0.38 ^a	7.48±0.03 ^{bc}	9.97±0.17 ^a
G ₈	2.44±0.38 ^a	6.79±0.19 ^c	8.36±0.11 ^b
G ₉	2.44±0.38 ^a	9.78±0.23 ^a	4.94±0.17 ^{cd}
Ve		$P=0.001$	$P=0.001$
Se		$P=0.001$	$P=0.288$
Ve×Se		$P=0.001$	$P=0.001$

2.3 血清T-AOC活力的变化

血清T-AOC活力的变化见表4。饲料中不同浓度的VE、Se以及VE和Se对血清T-AOC有显著的影响($P<0.05$)。第2周时G₂组T-AOC活力最高,其次是G₄、G₈组,但组间差异不显著($P>0.05$)。第4周G₉组T-AOC活力最高($P<0.05$),其次是G₅、G₃组。

2.4 肝胰腺GPx活力的变化

肝胰腺GPx活力的变化见表5。饲料中不同浓度的VE、Se以及VE和Se对凡纳滨对虾肝胰腺GPx有显著影响($P<0.05$)。第2周时,G₃组GPx活力最高($P<0.05$),其次是G₅、G₂组,但3组间差异不显著($P>0.05$)。第4周时,G₇组GPx活力最高($P<0.05$),其次是G₄组,但与G₇组差异显著($P<0.05$)。

2.5 肝胰腺T-AOC活力的变化

肝胰腺T-AOC活力的变化见表6。第2周时,饲料中不同浓度的VE、Se以及VE和Se对凡纳滨对虾T-AOC活力有显著影响($P<0.05$),但第4周时,VE对T-AOC影响不显著($P>0.05$)。第2周时,G₃组T-AOC活力最高($P<0.05$),第4周时G₉组最高($P<0.05$),其次是G₅组,但两组间差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

关于VE和Se对生物机体抗氧化能力的研究可见诸多报道,但研究结果却不尽一致。在畜禽动物上的研究表明,VE和Se能够协同提高肉鸡抗氧化能力

表4 VE和Se对凡纳滨对虾血清总抗氧化能力(T-AOC)(IU/ml)的影响

Tab.4 Effects of vitamin E and selenium on total anti-oxidant activity (T-AOC) (IU/ml) in serum (mean±SD, $n=3$)

处理组	时间		
	第0周	第2周	第4周
G ₀	13.56±0.68 ^a	17.62±0.42 ^b	17.44±0.43 ^d
G ₁	13.56±0.68 ^a	20.85±0.98 ^{ab}	20.63±0.27 ^{cd}
G ₂	13.56±0.68 ^a	28.54±2.22 ^a	22.09±1.55 ^{bc}
G ₃	13.56±0.68 ^a	20.98±1.34 ^{ab}	24.34±0.26 ^{ab}
G ₄	13.56±0.68 ^a	24.50±5.97 ^{ab}	20.67±0.45 ^d
G ₅	13.56±0.68 ^a	22.35±0.64 ^{ab}	24.68±0.59 ^{ab}
G ₆	13.56±0.68 ^a	21.93±0.64 ^{ab}	17.53±1.25 ^d
G ₇	13.56±0.68 ^a	19.17±0.52 ^b	20.06±0.81 ^{cd}
G ₈	13.56±0.68 ^a	23.7±2.73 ^{ab}	22.44±1.03 ^{bc}
G ₉	13.56±0.68 ^a	19.75±1.33 ^{ab}	27.66±0.97 ^a
Ve		$P=0.001$	$P=0.001$
Se		$P=0.021$	$P=0.001$
Ve×Se		$P=0.044$	$P=0.001$

表 5 VE 和 Se 对凡纳滨对虾肝胰腺中谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)(U/mg 蛋白)的影响

Tab.5 Effects of vitamin E and selenium on glutathione peroxidase (GPx) (U/mg prot.) in hepatopancreas (mean ± SD, n = 3)

处理组	时间		
	第 0 周	第 2 周	第 4 周
G ₀	1.06±0.02 ^a	1.10±0.03 ^c	1.95±0.01 ^c
G ₁	1.06±0.02 ^a	1.12±0.01 ^c	2.13±0.05 ^{bc}
G ₂	1.06±0.02 ^a	2.88±0.11 ^a	1.90±0.09 ^c
G ₃	1.06±0.02 ^a	3.04±0.06 ^a	2.00±0.11 ^c
G ₄	1.06±0.02 ^a	2.54±0.68 ^{ab}	2.35±0.04 ^b
G ₅	1.06±0.02 ^a	2.94±0.05 ^a	2.12±0.03 ^{bc}
G ₆	1.06±0.02 ^a	1.80±0.25 ^{bc}	1.35±0.02 ^d
G ₇	1.06±0.02 ^a	2.55±0.07 ^{ab}	2.92±0.05 ^a
G ₈	1.06±0.02 ^a	2.67±0.09 ^{ab}	1.83±0.05 ^c
G ₉	1.06±0.02 ^a	1.49±0.02 ^c	0.91±0.08 ^e
Ve		P=0.001	P=0.001
Se		P=0.001	P=0.001
Ve × Se		P=0.001	P=0.001

表 6 VE 和 Se 对凡纳滨对虾肝胰腺中总抗氧化能力(T-AOC)(IU/ml)的影响

Tab.6 Effects of vitamin E and selenium on total anti-oxidant activity (T-AOC) (IU/ml) in hepatopancreas (mean ± SD, n = 3)

处理组	时间		
	第 0 周	第 2 周	第 4 周
G ₀	14.78±1.07 ^a	19.37±0.63 ^c	9.41±0.17 ^d
G ₁	14.78±1.07 ^a	20.74±0.54 ^{bc}	11.44±0.82 ^{cd}
G ₂	14.78±1.07 ^a	23.36±1.64 ^b	16.47±0.78 ^{ab}
G ₃	14.78±1.07 ^a	28.33±0.72 ^a	12.54±1.01 ^c
G ₄	14.78±1.07 ^a	19.67±0.32 ^c	12.32±0.94 ^{cd}
G ₅	14.78±1.07 ^a	20.72±0.55 ^{bc}	17.61±1.08 ^a
G ₆	14.78±1.07 ^a	22.51±0.79 ^{bc}	15.36±0.68 ^{ab}
G ₇	14.78±1.07 ^a	19.28±0.39 ^c	10.71±0.62 ^{cd}
G ₈	14.78±1.07 ^a	17.55±0.79 ^c	14.22±1.25 ^{bc}
G ₉	14.78±1.07 ^a	22.50±1.72 ^{bc}	18.04±1.91 ^a
Ve		P=0.001	P=0.173
Se		P=0.001	P=0.001
Ve × Se		P=0.001	P=0.001

(石娇等, 2006), 对肉鸡自由基代谢存在互作作用(徐建雄等, 2007), 但也有发现, VE 能有效影响鸡肌肉中抗氧化酶活力, 而 Se 不能(Avanzo *et al.*, 2001)。VE 和 Se 对皱纹盘鲍血清中 CAT、GPx 和 GR 的活力有显著作用, Se 对 CAT、SOD、GPX、GR、GST 有显著影响, 但 VE 仅对 GPX 和 GR 的活力有显著影响(万敏等, 2004)。可见由于抗氧化系统中各种抗氧化酶作

用的机制或者物种的差异, VE 和 Se 之间的协同作用也呈现不一致性。关于 VE 和 Se 的协同作用效果在本研究中呈现了时间上的动态变化。

3.1 VE 和 Se 对血细胞 O²⁻ 的影响

在需氧生物利用氧气代谢过程中, 会产生一类含有氧的比氧气性质还活泼的物质——活性氧(reactive oxygen species, ROS), 它包括过氧化氢(H₂O₂)、超氧阴离子(O²⁻)、羟自由基(·OH)等(刘春英等, 2007)。活性氧为活化的吞噬细胞功能之一与黏附、趋化、吞噬、脱颗粒等功能共同保证吞噬细胞发挥其正常的防御作用(严仪绍, 1989), 适量的活性氧能够杀死侵入机体的有害微生物, 对机体起到防御保护作用。Sharp 等(1993)研究发现, 呼吸爆发产生的活性氧能够作为吞噬细胞杀死气单胞菌(*A. salmonicida*)的机制, 皱纹盘鲍血细胞经刺激诱导吞噬活动中有明显的呼吸爆发现象和很强的 O²⁻ 产生, 皱纹盘鲍血细胞在吞噬防御反应中能够通过产生活性氧对外源病原进行杀灭(张峰等, 2006)。试验中发现 VE 和 Se 对 O²⁻ 有交互作用, 这与在肉鸡上的研究结果具有一致性(徐建雄等, 2007), 但单独的 Se 对 O²⁻ 却无显著影响, 这与 Wang 等(2006)在体长 2cm 的凡纳滨对虾研究得出的 Se 不能降低由氨氮应激引起的自由基损伤的结论具有一致性。因此推测, 在刺激活性氧产生方面, Se 可能是 VE 的辅助因子, 从而加强了 VE 的免疫刺激作用。试验发现, 在第 2 周产生的 O²⁻ 比第 4 周多, 这可能是短时间内由于外源物质短时的刺激呼吸爆发增强, 释放了相对较多的 O²⁻, 但在添加量未产生细胞毒负效应时, 随着饲喂时间延长, 机体受激发产生 O²⁻ 的作用机制会趋于缓和。

3.2 VE 和 Se 对 PO 的影响

甲壳动物中的酚氧化酶系统(proPO 系统)是一种与脊椎动物补体系统类似的酶级联系统, 该系统中的因子以非活化状态存在于血细胞的颗粒中(Ashida *et al.*, 1984)。酚氧化酶原系统(proPO 系统)经活化产生的酚氧化酶(PO)广泛存在于无脊椎动物体内, 是非特异性免疫系统的主要成员之一。许多研究都已证实中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血淋巴、血清和凡纳滨对虾血清中都存在 PO(王雷等, 1995)。幼虾(幼体)体内的 PO 活性, 对虾血清 PO 活性, 血浆上清液 PO 性和血细胞内 PO 活性常常被用作对对虾健康状况的评估指标(陈国福等, 2007)。本试验中同样检测到了凡纳滨对虾血清中 PO 的活性, 并且发现 VE、Se 以及 VE 和 Se 在第 2 周时对 PO 有显著的影响, 但第

4周时 Se 作用不显著。第2周 G₅酶活性达到最高,第四周 G₆和 G₇酶活性达到最高,说明在短时间内添加中剂量的 VE 和 Se 足以使 PO 活性激发到较高水平,但若饲喂时间延长,对虾饵料中需要配合高剂量的 VE 或 Se 来维持高水平的 PO 活性。在整个饲喂过程中 VE 对 PO 一直有影响,但低 Se 持续的时间相对较短,对此种现象,酚氧化酶可能作为一种铜结合态酶,铜原子是否结合在 PO 上以及铜离子的价态对 PO 活力有着深远的影响,适量地增加 VE 是否会通过影响体内铜的吸收或铜离子的价态来影响 PO 活性,还有待进一步研究。

3.3 VE 和 Se 对 T-AOC 的影响

总抗氧化能力(total antioxidative capacity, T-AOC)是近年研究发现的用于衡量机体抗氧化系统功能状况的综合性指标。T-AOC 的大小可代表和反映机体抗氧化酶系统和非酶促系统对外来刺激的代偿能力以及机体自由基代谢的状态。朱选等(2007)发现,在低浓度氨氮应激下,添加中草药饲料的凡纳滨对虾血清 T-AOC 升高。第2周时,VE、Se 以及 VE 和 Se 对血清和肝胰腺 T-AOC 有显著的作用,但第4周时 VE 对肝胰腺 T-AOC 影响不显著。随时间的延长维持高水平 T-AOC 所需的 VE 和 Se 的量无明显变化,第4周时 G₉组酶活力也达到了最高,至于随时间的延长高 VE 和 Se 组是否会对细胞产生毒性或中剂量的 VE 和 Se 能否满足抗氧化需求还需进一步验证。在本试验中,从提高 T-AOC 活性来讲,Se 是一种有效的因子,它可能从多种酶来整体调控 T-AOC 的强弱,这与方展强等(2005)关于 Se 在一定程度上拮抗汞对剑尾鱼机体 T-AOC 的降低具有一致性。

3.4 VE 和 Se 对 GPx 的影响

GPx 是生物体内重要的抗氧化酶之一,它可以消除机体内的过氧化氢及脂质过氧化物,阻断活性氧自由基对机体的进一步损伤,是生物体内重要的活性氧自由基清除剂,它以硒代半胱氨酸(SeC)的形式发挥作用,以谷胱甘肽(GSH)为还原剂分解体内的脂质过氧化物,因而可防止细胞膜和其它生物组织免受过氧化损伤。研究发现,动物机体在一定范围内的硒含量与谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)的活性成正相关(刘永萍等,2003;王亭亭等,2005;Fu *et al.*,2007)。第2周时,VE、Se 以及 VE 和 Se 对 GPx 作用显著,这与 Shinde 等(2008)在雄性水牛上的研究结果具有一致性;第4周 G₇组效果最好,当 Se 的添加量超过一定范围或随着养殖周期的加长,VE 对 GPx 的保护作用可能

更大,这与刘丽华等(1999)对仓鼠的研究结果有一致性,对仓鼠 VE 和 Se 都有明显的抗氧化作用,VE 的作用却更加明显,但 Burk 等(2008)却发现,缺 Se 而不是 VE 导致细胞溶质的过氧化反应,并且两种营养素无交互作用,基于对虾抗氧化系统有别与畜禽,对以上研究结果的异同,今后还需要从对虾营养和免疫调控机理等方面入手进行更深入和全面的研究探讨。

4 结论

由于 VE 和 Se 对抗氧化系统的保护机制不同,导致 VE、Se 以及 VE 和 Se 在不同时间阶段对凡纳滨对虾体内各种抗氧化酶的作用效果不同,但从整体而言在一定剂量范围内 VE、Se 以及 VE 和 Se 的抗氧化作用显著。在养殖周期相对短时间(1个月)内,体长 3cm 左右的虾饲料中 VE 和 Se 的添加量分别以 400mg/kg、0.4mg/kg 最佳。

参 考 文 献

- 万 敏, 麦康森, 马洪明等, 2004. 硒和维生素 E 对皱纹盘鲍血清抗氧化酶活力的影响. 水生生物学报, 28(5): 496—502
- 王 雷, 李光友, 毛远兴, 1995. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其研究方法. 海洋与湖沼, 26(2): 179—185
- 王亭亭, 蔡完其, 2005. 饲料中添加花粉和酵母硒对中华鳖幼鳖生长和非特异性免疫功能的影响. 上海水产大学学报, 14(2): 97—103
- 方展强, 王春风, 2005. 硒对汞致剑尾鱼鳃和肝组织总抗氧化能力变化的拮抗作用. 试验动物与比较医学, 25(3): 136—139
- 石 娇, 于维军, 王洪海等, 2006. 硒和维生素 E 协同添加对肉鸡机体抗氧化能力的影响. 黑龙江畜牧兽医, 12: 42—43
- 朱 选, 曹俊明, 赵红霞等, 2007. 饲料中添加虾安 对南美白对虾生长性能和抗非离子氨应激的影响. 水产养殖, 28(6): 28—30
- 刘永萍, 边建超, 2003. 硒全血组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力与硒含量的关系. 中国地方病防治杂志, 18(3): 134—136
- 刘丽华, 呼文亮, 曹守义, 1999. 硒和维生素 E 对需谷胱甘肽抗氧化酶的保护作用. 广东微量元素科学, 6(4): 8—11
- 刘春英, 张 勇, 高 玲等, 2007. 活性氧的信号转导功能. 食品与药品, 9(2): 72—73
- 严仪绍, 1989. 吞噬细胞产生氧自由基的机制及意义. 生理科学, 9(4): 10—13
- 张 峰, 刘洪伟, 宋志东, 2006. 几种重金属对刺参体腔细胞超氧阴离子(O²⁻)产生的影响. 农业环境科学学报, 25: 100—103

- 陈国福, 宋晓玲, 黄 捷等, 2007. A3 α -肽聚糖对凡纳滨对虾磷酸酶及细胞内酚氧化酶活性的影响. 海洋水产研究, 28(1): 59—64
- 徐建雄, 王 晶, 王 恬, 2007. 维生素 E 和硒水平对肉鸡不同自由基代谢的影响. 应用生态学报, 18(8): 1789—1793
- Avanzo J L, Mendonca J, Pugine C X *et al*, 2001. Effect of vitamin E and selenium on resistance to oxidative stress in chicken superficial pectoralis muscle. Comp Biochem Physiol, 129: 163—173
- Ashida M, Skterh O K, 1984. The pmphenoloxidase activating system in Crayfish. Comp Biochem Physiol, 77(1): 21—26
- Burk R F, Hill K E, Nakayama A *et al*, 2008. Selenium deficiency activates mouse liver Nrf2-ARE but vitamin E deficiency does not. Free Radical Biology and Medicine, 44(8): 1617—1623
- David J W, Tomasso J R, Thomas E S, 1993. Effect of Vitamin E on the immune Response of Channel Catfish to *Edwardsiella ictaluri*. Journal of Aquatic Animal Health, 5: 183—188
- Felton S P, Landolt M L, Grace R P, 1996. Effects of selenium dietary enhancement on hatchery-reared coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), when compared with wild coho. Aquaculture Research, 27(2): 135—142
- Fu J H, Zhang W B, Mai K S *et al*, 2007. Effects of vitamin E on antioxidant enzyme activities and fatty acid compositions in juvenile abalone *Haliotis discus hannai* Ino. Shellfish Research, 26(3): 809—814
- Haiqi H, Addison L L, 1993. Vitamin E requirement of *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 118: 245—255
- Kiron V, Puangkaew J, Ishizaka K *et al*, 2004. Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. Aquaculture, 234(1—4): 361—379
- Levander O A, 1983. Considerations in the design of selenium bioavailability studies. Fed Proc, 42: 1721—1725
- Lee M, Shiao S, 2004. Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses. Fish & Shellfish Immunology, 16(4): 475—485
- Lin Y H, Shiao S Y, 2005. Dietary vitamin E requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus*, at low lipid levels and their effects on immune Response. Aquaculture, 248: 235—244
- Lin Y H, Shiao S Y, 2007. The effects of dietary selenium on the oxidative stress of grouper, *Epinephelus malabaricus*, fed high copper. Aquaculture, 267(1—4): 38—43
- Mihailovic M, Matic G, Lindberg P *et al*, 1992. Accidental selenium poisoning of growing pigs. Biol Trace Elem Res, 33: 63—69
- Shinde P L, Dass R S, Garg A K *et al*, 2008. Effect of vitamin E and selenium supplementation on antioxidant status of male buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. Animal and Feed Sciences, 17(3): 318—327
- Sharp G J E, Secombes C J, 1993. The role of reactive oxygen species in killing of bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. Fish Shellfish Immunol, 3: 119—129
- Wagner B A, Buettner G R, Burns C P, 1996. Vitamin E slows the rate of free radical-mediated lipid peroxidation in cells. Arch Biochem Biophys, 334: 261—267
- Wang Y B, Han J Z, Li W F *et al*, 2007. Effect of different selenium source on growth performances, glutathione peroxidase activities, muscle composition and selenium concentration of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). Animal Feed Science and Technology, 134(3—4): 243—251
- Wang W N, Wang A L, 2006. Effect of dietary higher level of selenium and nitrite concentration on the cellular defense response of *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 256: 558—563

EFFECTS OF DIETARY VITAMIN E AND SELENIUM ON THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF SHRIMP *LITOPENAEUS VANNAMEI*

HU Jun-Ru^{1,2}, WANG An-Li¹, CAO Jun-Ming²

(1. Key Laboratory of Ecology and Environmental Science in Guangdong Higher Education, College of Life Science, Guangdong Provincial Key Laboratory for Healthy and Safe Aquaculture, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou, 510631; 2. Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, 510640)

Abstract *Litopenaeus vannamei* (PL 3cm) samples were divided randomly into 10 groups in triplication, each contained 30 individuals. A matrix of three-level by two-factor was designed. The shrimp were fed with vitamin E and selenium for each group, respectively as: G₀ (0, 0), G₁ (200, 0.2), G₂ (200, 0.4), G₃ (200, 0.8), G₄ (400, 0.2), G₅ (400, 0.4), G₆ (400, 0.8), G₇ (800, 0.2), G₈ (800, 0.4), and G₉ (800, 0.8mg/kg). The experiment lasted for four weeks during which the effects of different levels of vitamin E and selenium on O²⁻ in haemocytes, Phenoloxidase (PO) activity and total-antioxidative activity (T-AOC) in serum and hepatopancreas, and glutathione peroxidase (GPx) activity in hepatopancreas, were studied. The antioxidant activity was checked at 0, 2, and 4 weeks. The result shows that vitamin E and selenium could enhance the antioxidant ability dynamically. The optimal point of adding scheme was at 400mg/kg vitamin E and 0.4mg/kg selenium into the basal diets, at which the overall antioxidant system of the shrimp would reach the balance for fighting against the damage by oxygen radical.

Key words *Litopenaeus vannamei*, Selenium, Vitamin E, Antioxidant enzyme