

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20150116001

王文龙, 崔欣, 安立龙, 等. 日粮中铜胁迫对吉富罗非鱼幼鱼抗氧化、脂质过氧化及肝脏组织结构的影响[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(2): 266-275

Wang W L, Cui X, An L L, et al. Effects of dietary copper stress on antioxidation, lipid peroxidation and tissue structure of liver in juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(2): 266-275 (in Chinese)

日粮中铜胁迫对吉富罗非鱼幼鱼抗氧化、脂质过氧化及肝脏组织结构的影响

王文龙¹, 崔欣¹, 安立龙^{1,*}, 效梅^{2,#}, 高涵³, 李成成¹, 邢星⁴, 李延伟¹, 许英梅¹

1. 广东海洋大学 动物科学系, 湛江 524088

2. 广东海洋大学 动物医学系, 湛江 524088

3. 中国药科大学 药物制剂系, 南京 211198

4. 中华人民共和国钦州保税港区出入境检验检疫局, 钦州 535008

收稿日期: 2015-1-16 录用日期: 2015-3-17

摘要: 吉富罗非鱼是我国南方沿海地区水产养殖中的主要经济鱼类之一, 但近年来, 随着我国城镇化和工业化进程的推进, 罗非鱼养殖面临着前所未有的铜富集的挑战。为探究日粮中铜胁迫对吉富罗非鱼幼鱼抗氧化系统和肝脏组织结构的影响, 将 1 080 条罗非鱼幼鱼暴露于 6 个浓度梯度(0.3、30、300、1 000、3 000 mg·kg⁻¹)的高铜日粮中, 通过 60 d 的暴露试验, 实时测定罗非鱼血清与肝脏抗氧化能力, 监测肝脏病理变化。结果表明, 在本试验条件下, 罗非鱼幼鱼血清和肝脏中 MDA 的含量随日粮中铜含量的增加和胁迫时间的延长显著升高, 而 SOD、GSH-PX 和 CuZn-SOD 的活性表现出先升高后降低的趋势; 各组间肝脏表现出不同程度的病变, 主要是浊肿变性和脂肪变性, 且第Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ组肝脏病变严重。综上, 日粮中铜胁迫对吉富罗非鱼幼鱼的抗氧化机能具有较明显的抑制作用, 长时间的暴露能严重损伤其肝脏的组织结构, 因此, 建议吉富罗非鱼幼鱼日粮中铜的实际含量应控制在 42.36 mg·kg⁻¹ 以下。

关键词: 日粮中铜胁迫; 吉富罗非鱼幼鱼; 肝脏病变; 抗氧化; 脂质过氧化; 浊肿变性

文章编号: 1673-5897(2015)2-266-10 **中图分类号:** X171.5 **文献标识码:** A

Effects of Dietary Copper Stress on Antioxidation, Lipid Peroxidation and Tissue Structure of Liver in Juvenile GIFT Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Wang Wenlong¹, Cui Xin¹, An Lilong^{1,*}, Xiao Mei^{2,#}, Gao Han³, Li Chengcheng¹, Xing Xing⁴, Li Yanwei¹, Xu Yingmei¹

1. Department of Animal Science, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

2. Department of Animal Medicine, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

3. Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

4. The People's Republic of China Qinzhou Free Trade Port Area Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qinzhou 535008, China

Received 16 January 2015 **accepted** 17 March 2015

Abstract: GIFT tilapia is an important economic species in aquaculture production in coastal regions in south

基金项目: 广东省科技计划项目(2010B090400376); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201310566005)

作者简介: 王文龙(1989-), 男, 硕士, 研究方向为动物营养与环境、生态毒理学, E-mail: wangwenlong2012@yeah.net;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: anlilong@126.com;

共同通讯作者(Co-corresponding author), E-mail: xiao0812@126.com

of China, where is now facing an increasing challenge from Cu contamination with accelerated urbanization and industrialization. In order to evaluate the effects of dietary Cu stress on antioxidant activity and liver structure of juvenile GIFT tilapia, a total of 1 080 fishes were fed with 6 different concentrations of Cu in diets (0, 3, 30, 300, 1 000, 3 000 mg·kg⁻¹) for 60 days. Antioxidation of serum and liver was measured, and the pathological changes of liver were observed. The results showed that the concentration of MDA in serum and liver increased significantly with exposure time and the increase of Cu accumulation in diets. Activities of SOD, CuZn-SOD and GSH-PX showed a down trend after a rise. Meanwhile, cloudy swelling and fatty degeneration in cells of liver was observed, especially pathological changes of liver aggravated when Cu concentration was increased to group III, IV and V. It could be concluded that dietary Cu stress depressed the antioxidant activity and damaged the liver of tilapia. Therefore, we suggest that Cu concentration in diets for juvenile tilapia should not be more than 42.36 mg·kg⁻¹.

Keywords: dietary copper stress; GIFT tilapia; pathological changes in liver; antioxidation; lipid peroxidation; cloudy swelling degeneration

现代工业社会、社会经济和人类各种生产活动都会引起重金属的输入,对生态环境造成严重的危害^[1-3],特别是近几十年来随着我国工业化进程的不断升级,日益加剧的重金属污染及其引发的生态和食品安全问题成为我国学者关注的焦点^[1,4]。铜(copper, Cu)是主要的重金属之一,也是有机生命正常生理生化反应必须的微量元素之一^[5],但过量的Cu则会导致毒性效应,对生物体机体造成损伤^[2,6],Cu在水生生物体内的富集已经成为无法规避的安全隐患。

早在20世纪90年代,西方学者就已经预见到了水源性和食源性Cu暴露对水生生物的毒害作用^[6-7],引发了人们的广泛关注。而我国针对Cu的生态毒性研究起步较晚,随着90年代中后期我国地域环境中Cu的输入量逐渐攀高,Cu等重金属引发的生态风险和食品安全问题才慢慢进入我国学者的视野,过量的Cu对水生动物肝脏造成巨大伤害,进而影响动物机体的抗氧化体系的正常运转,引发动物机体代谢、免疫等诸多方面功能紊乱^[2,4,6]。目前关于日粮中高Cu胁迫对畜禽的毒性作用的报道比较多,但日粮中Cu暴露对鱼类的毒性研究较少,未见探讨日粮中Cu暴露影响罗非鱼抗氧化功能、脂质过氧化和肝脏组织结构的报道,少数的相关研究仅限于对Cu最适添加量的探索,汪华^[8]的研究表明,吉富罗非鱼的日粮Cu需要量为8 mg·kg⁻¹左右,但为保证鱼对Cu的需要量,鱼日粮中Cu的实际含量往往大于其实际需要量,且在不同饲养环境和饲养条件下鱼的需要量和耐受度也不尽相同^[9-11]。

本课题组立足于现今重金属污染愈发严重,两

广、福建等地区水生生物Cu等重金属富集加剧的大背景下开展了一系列关于罗非鱼Cu耐受以及Cu暴露条件下罗非鱼机体抗氧化响应机制的工作,前期研究表明,Cu在各组织中积累量的顺序依次为:肝脏>脾脏>肠道>鳃>肌肉,与对照组相比,肝脏、脾脏、肠道中Cu的含量随着时间和日粮中Cu浓度的升高而逐渐升高^[4],肝脏是Cu最大的储存器官,也是鱼体内最重要的解毒器官,其病理变化可以直观地反映出Cu痕量长时间蓄积或大量短时摄入对鱼体造成损伤,与此同时,血清生化指标也能敏感地反映动物机体的生理状态,基于此,本文以饲喂Cu暴露日粮的吉富罗非鱼幼鱼为模型,研究日粮中Cu暴露对罗非鱼幼鱼抗氧化、脂质过氧化和肝脏组织结构的影响,探究日粮Cu暴露对吉富罗非鱼幼鱼机体抗氧化系统及功能脏器的损伤机制,为罗非鱼养殖中日粮Cu的需要量和使用限量研究提供依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试验动物与材料

试验鱼由广东省吴川国联罗非鱼良种场提供,试验前用药浴消毒(投入0.02%的高锰酸钾溶液浸泡5 min,将有不良反应的病鱼去除),用对照组日粮驯养15 d,使其适应试验环境及试验日粮,选择健康无病、活跃灵敏的个体作为试验用鱼;试验中Cu以CuSO₄·5H₂O(分析纯,上海易蒙斯化工科技有限公司)形式添加。

1.2 试验日粮

以鱼粉、豆粕、玉米粉、面粉、磷酸二氢钙、豆油、胆碱、食盐、预混料配制基础日粮,经粉碎后过60目

表 1 试验基础日粮及营养水平(饲喂基础)

Table 1 Ingredients and nutrient level of basal diet (fed-basis)

成分 Ingredients	含量/% Content/%	营养水平 Nutrient level	含量/% Content %
秘鲁鱼粉	25.00	粗蛋白质	34.46
Peru fish meal		Crude protein	
豆粕 Soybean meal	30.00	粗脂肪 Crude fat	5.35
玉米 Corn	15.00	粗灰分 Ash	9.11
面粉 Flour	26.00	水分 Moisture	9.20
磷酸二氢钙	1.00		
Ca(H ₂ PO ₄) ₂			
豆油 Soybean oil	1.50		
胆碱 Choline	0.30		
食盐 Salt	0.20		
预混料 Premix [*]	1.00		

注: * 每千克预混料含 VA 350 000 IU、VD₃100 000 IU、VE 4 000 mg、VK₃ 250 mg、VB₁ 400 mg、VB₂ 1 500 mg、VB₆ 600 mg、VB₁₂ 2.5 mg、D-泛酸钙 2 000 mg、烟酰胺 2 500 mg、叶酸 250 mg、D-生物素 5 mg、肌醇 7 000 mg、VC 6 300 mg、锌 2 250 mg、锰 1 200 mg、铁 6 500 mg、钴 120 mg、碘 120 mg、硒 25 mg。

Note: * Each kilogram of premix provided: VA 350 000 IU, VD₃100 000 IU, VE 4 000 mg, VK₃ 250 mg, VB₁ 400 mg, VB₂ 1 500 mg, VB₆ 600 mg, VB₁₂ 2.5 mg, calcium D-pantothenate 2 000 mg, nicotinamide 2 500 mg, folic acid 250 mg, biotin 5 mg, Inositol 7 000 mg, VC 6 300 mg, Zn 2 250 mg, Mn 1 200 mg, Fe 6 500 mg, Co 120 mg, I 120 mg, Se 25 mg.

筛后混匀,微量原料采用逐级扩大法混合,混合均匀后 - 20 ℃密封保存,备用,试验基础日粮及营养组成见表 1。试验中设计 Cu 的添加梯度为: 0 mg·kg⁻¹、3 mg·kg⁻¹、30 mg·kg⁻¹、300 mg·kg⁻¹、1 000 mg·kg⁻¹、3 000 mg·kg⁻¹ 6 个水平,用电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS,美国安捷伦科技有限公司)测得各组日粮中 Cu 的实际含量如表 2 所示。

1.3 试验分组与饲养管理

选取健康无病的罗非鱼 1 080 尾(平均体重为 (9.20 ± 0.18) g),将其分为 6 组(见表 2),每组 3 个重复,每个重复 60 尾,饲养在规格为 500 L 的玻璃鱼缸中。空气压缩机增氧,每 3 天监测一次水质:水温为 (31.50 ± 1.50) ℃,溶解氧不小于 5 mg·L⁻¹,氨氮含量不超过 0.02 mg·L⁻¹,水体 pH 为 7.8 ~ 8.3;每 3 天换水 1/2 缸,每天上午 9 点和下午 6 点投放 2 次相应组别的日粮,日投料量为鱼体重的 3% (每 10 天测一次鱼的平均体重,及时调整日投料量),30 min 后将剩余饵料吸出,烘干称重,每天观察记录罗非鱼摄食和死亡情况。

表 2 试验分组

Table 2 Design of experiment

组别 Groups	日粮 Diets	Cu 实际含量 /(mg·kg ⁻¹) Measured values of Cu /(mg·kg ⁻¹)
对照组 Control	基础日粮 Basal diet	8.23
I 组 Group I	基础日粮 + 3 mg·kg ⁻¹ Cu Basal diet + 3 mg·kg ⁻¹ Cu	10.98
II 组 Group II	基础日粮 + 30 mg·kg ⁻¹ Cu Basal diet + 30 mg·kg ⁻¹ Cu	42.36
III 组 Group III	基础日粮 + 300 mg·kg ⁻¹ Cu Basal diet + 300 mg·kg ⁻¹ Cu	334.47
IV 组 Group IV	基础日粮 + 1 000 mg·kg ⁻¹ Cu Basal diet + 1 000 mg·kg ⁻¹ Cu	1 057.29
V 组 Group V	基础日粮 + 3 000 mg·kg ⁻¹ Cu Basal diet + 3 000 mg·kg ⁻¹ Cu	3 086.76

1.4 样品采集与指标测定

分别于试验第 20 天、40 天、60 天采样,采样前饥饿 24 h,每个重复取 12 条鱼,其中 4 尾进行尾静脉采血,室温静置待其凝固后 3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取制得的血清于 - 20 ℃保存,待测;余下的 8 尾鱼则采用捣毁脑髓法处死,其中 6 尾取肝脏用 4 ℃预冷的生理盐水漂洗并滤干,切 1.0 g 左右肝脏组织块制成 10% 组织匀浆,冷冻离心机 (3K30,德国 SIGMA 公司)2 500 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液于 - 20 ℃保存,待测。脂质过氧化与抗氧化指标的测定均严格按照南京建成生物工程研究所相应试剂盒的使用说明进行。

取其余 2 尾的新鲜肝脏、脾脏用 4 ℃预冷的生理盐水漂洗并滤干,切成大小约为 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 的小组织块放于配好的波音氏(Bouin's)固定液中固定(波音氏液的体积约为组织块的 15 ~ 20 倍),固定 24 h;再经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片(5 μm)、展片、烘干、水洗、染色,最后用中性树胶封片,贴上标签并编号,备用,Nikon-E200 显微镜下观察并拍照(Olympus DP70 显微成像系统,奥林巴斯中国有限公司)。

1.5 数据处理

采用 SPSS 20.0 软件对试验数据进行单因素方差分析,采用 Duncan's 法多重比较差异的显著性,差异显著定义为 $P < 0.05$,数据表示为“Mean ± SD”。

2 结果 (Results)

2.1 日粮 Cu 胁迫对罗非鱼幼鱼抗氧化、脂质过氧化的影响

2.1.1 日粮 Cu 胁迫对罗非鱼幼鱼 MDA 含量的影响

由表 3 可见血清中 MDA 的含量略低于肝脏中 MDA 的含量。在第 20、40、60 天时,对照组 ~ II 组血清中 MDA 的含量无显著差异,III ~ V 组血清中 MDA 的含量随着 Cu 的升高而逐渐升高,第 60 天时第 V 组血清 MDA 的含量达到最高(7.08 ± 0.04) nmol·mL⁻¹。

随着日粮 Cu 胁迫时间的延长,对照组 ~ III 组血清中 MDA 的含量无显著差异($P > 0.05$)。第 IV 组血清中 MDA 的含量随时间的延长显著升高,而第 V 组在第 40 天时比在第 20 天时显著升高($P < 0.05$),到 60 d 时无显著变化($P > 0.05$)。说明日粮中高剂量的 Cu 可引起脂质过氧化,使血清中 MDA 含量升高。

肝脏中 MDA 含量的变化与血清中 MDA 的变化规律相似。肝脏中 MDA 含量在第 20 天时对照组 ~ III 组间无显著差异($P > 0.05$);第 IV 组和第 V 组显著高于其他组。第 40 天时,第 I 组中 MDA 的含量最少,为(5.35 ± 0.02) nmol·mg⁻¹ prot,但之后随着日粮中 Cu 浓度的升高,肝脏中 MDA 的含量也随着升高;而与对照组相比,第 IV、V 组肝脏中 MDA 的含量显著升高($P < 0.05$)。第 60 天时,肝脏中 MDA 的含量随日粮中 Cu 浓度的升高而升高,第 V 组肝

脏中 MDA 的含量此时达到最高,为(8.69 ± 0.05) nmol·mg⁻¹ prot。对照组 ~ 第 IV 组肝脏中 MDA 的含量随时间的延长无显著变化($P > 0.05$),而第 V 组肝脏中 MDA 的含量随时间的延长显著增加($P < 0.05$),其原因可能是日粮中高 Cu 引起脂质过氧化,使肝脏中 MDA 含量升高。

2.1.2 日粮 Cu 胁迫对罗非鱼幼鱼 SOD 活性的影响

如表 4 所示,血清中 SOD 的活性与肝脏差异不显著。在 20 d 时,对照组 ~ 第 II 组血清中 SOD 的活性无显著差异($P > 0.05$),之后随着 Cu 的升高 SOD 的活性也逐渐增强。40 d 时,第 III 组 SOD 的活性最高,第 V 组次之,最低为第 I 组。60 d 时,随着日粮中 Cu 浓度的升高,SOD 的活性呈现先升高再降低的趋势,最高是第 II 组,达到了(115.71 ± 7.25) U·mL⁻¹。对照组和第 I 组血清中 SOD 的活性随着日粮 Cu 胁迫时间的延长无显著变化,第 II 组随着时间的延长而升高,第 III 组呈先升高后降低的趋势,第 IV、V 组均呈下降的趋势,且 SOD 活性在第 60 天时显著低于第 20 天时的活性($P < 0.05$)。

肝脏中 SOD 的活性在 20 d 时,随着日粮中 Cu 浓度的升高也逐渐升高。40 d 时,第 III 组 SOD 的活性最高,达到(126.15 ± 19.27) U·mg⁻¹ prot。第 60 天时,第 I 组 SOD 的活性最高,为(120.26 ± 14.03) U·mg⁻¹ prot,在这 2 个时期,SOD 的活性均随 Cu 浓度的升高呈现抛物线型变化。

表 3 日粮 Cu 胁迫条件下罗非鱼幼鱼的 MDA 含量
Table 3 Concentration of MDA in juvenile GIFT tilapia under dietary Cu stress

指标 Index	组别 Groups	20 d	40 d	60 d
血清/(nmol·mL ⁻¹) Serum/(nmol·mL ⁻¹)	对照组 Control	2.52 ± 0.12 ^a	2.69 ± 0.15 ^a	2.82 ± 0.13 ^a
	I 组 Group I	2.96 ± 0.06 ^a	3.20 ± 0.05 ^a	2.73 ± 0.08 ^a
	II 组 Group II	3.01 ± 0.05 ^a	2.78 ± 0.07 ^a	3.21 ± 0.01 ^a
	III 组 Group III	2.68 ± 0.03 ^a	3.19 ± 0.04 ^a	4.62 ± 0.02 ^b
	IV 组 Group IV	3.62 ± 0.24 ^{bA}	4.95 ± 0.11 ^{bB}	6.71 ± 0.01 ^{cC}
	V 组 Group V	4.23 ± 0.17 ^{cA}	6.89 ± 0.05 ^{cB}	7.08 ± 0.04 ^{cB}
肝脏/(nmol·mg ⁻¹ prot) Liver/(nmol·mg ⁻¹ prot)	对照组 Control	5.24 ± 0.02 ^a	5.46 ± 0.04 ^a	5.82 ± 0.13 ^a
	I 组 Group I	6.02 ± 0.04 ^a	5.35 ± 0.02 ^a	5.34 ± 0.14 ^a
	II 组 Group II	5.42 ± 0.10 ^a	6.45 ± 0.07 ^{ab}	6.01 ± 0.09 ^a
	III 组 Group III	5.84 ± 0.13 ^{ab}	5.74 ± 0.06 ^{ab}	5.74 ± 0.16 ^a
	IV 组 Group IV	6.76 ± 0.05 ^b	7.25 ± 0.14 ^b	7.82 ± 0.04 ^b
	V 组 Group V	6.89 ± 0.12 ^{bA}	8.65 ± 0.06 ^{cB}	8.69 ± 0.05 ^{cB}

注:同行或同列肩标中大写或小写字母完全不同,表示显著差异($P < 0.05$),未标字母或字母有相同者表示差异不显著($P > 0.05$)。下表同。
Note: In the same row or column, values with totally different uppercase or lowercase superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), while with the same letter or no letter mean no significant difference ($P > 0.05$). The same as below.

表 4 日粮 Cu 胁迫条件下罗非鱼幼鱼的 SOD 活性

Table 4 Activity of SOD in juvenile GIFT tilapia under dietary Cu stress

指标 Index	组别 Groups	20 d	40 d	60 d
血清/(U·mL ⁻¹) Serum/(U·mL ⁻¹)	对照组 Control	103.45 ± 8.21 ^a	106.12 ± 18.59 ^a	107.59 ± 9.47 ^a
	I 组 Group I	105.24 ± 5.17 ^a	104.26 ± 10.46 ^a	107.20 ± 9.14 ^a
	II 组 Group II	104.56 ± 2.48 ^{aA}	106.45 ± 5.24 ^{aA}	115.71 ± 7.25 ^{bB}
	III 组 Group III	110.47 ± 6.42 ^{abA}	120.27 ± 11.43 ^{bB}	109.56 ± 12.04 ^{abA}
	IV 组 Group IV	124.29 ± 10.25 ^{bA}	112.02 ± 12.50 ^{abB}	102.56 ± 8.16 ^{cC}
肝脏/(U·mg ⁻¹ prot) Liver/(U·mg ⁻¹ prot)	V 组 Group V	134.50 ± 9.48 ^{cA}	119.23 ± 11.41 ^{bB}	102.27 ± 10.82 ^{cC}
	对照组 Control	114.04 ± 9.47 ^a	112.08 ± 12.57 ^a	113.14 ± 6.72 ^a
	I 组 Group I	116.42 ± 6.28 ^a	118.24 ± 8.21 ^{ab}	120.26 ± 14.03 ^b
	II 组 Group II	118.17 ± 9.12 ^a	122.75 ± 14.53 ^b	112.61 ± 8.04 ^a
	III 组 Group III	115.25 ± 12.09 ^{aA}	126.15 ± 19.27 ^{bB}	111.08 ± 4.20 ^{aA}
	IV 组 Group IV	122.91 ± 5.27 ^{bA}	112.07 ± 5.49 ^{aB}	109.26 ± 16.25 ^{aB}
	V 组 Group V	128.68 ± 9.15 ^{bA}	109.46 ± 10.42 ^{aB}	107.37 ± 10.64 ^{aB}

表 5 日粮 Cu 胁迫条件下罗非鱼幼鱼的 CuZn-SOD 活性

Table 5 Activity of CuZn-SOD in juvenile GIFT tilapia under dietary Cu stress

指标 Index	组别 Groups	20 d	40 d	60 d
血清/(U·mL ⁻¹) Serum/(U·mL ⁻¹)	对照组 Control	86.24 ± 10.28	84.27 ± 7.86 ^a	88.92 ± 10.64 ^a
	I 组 Group I	82.16 ± 12.4	79.51 ± 11.24 ^b	83.51 ± 13.11 ^a
	II 组 Group II	83.29 ± 6.50	85.43 ± 14.57 ^a	86.73 ± 8.65 ^a
	III 组 Group III	88.92 ± 7.43	85.84 ± 6.08 ^a	85.62 ± 11.26 ^a
	IV 组 Group IV	81.05 ± 11.02	78.92 ± 7.80 ^b	75.24 ± 9.61 ^b
肝脏/(U·mg ⁻¹ prot) Liver/(U·mg ⁻¹ prot)	V 组 Group V	84.51 ± 6.53 ^A	77.59 ± 8.59 ^{bB}	76.43 ± 12.72 ^{bB}
	对照组 Control	66.84 ± 4.15	68.54 ± 10.58 ^a	65.24 ± 5.94 ^a
	I 组 Group I	65.15 ± 9.57	67.62 ± 9.50 ^a	68.04 ± 2.35 ^a
	II 组 Group II	67.92 ± 10.37	70.95 ± 14.61 ^a	71.68 ± 8.32 ^a
	III 组 Group III	69.24 ± 8.17 ^A	65.86 ± 6.67 ^{abA}	63.81 ± 5.02 ^{abB}
	IV 组 Group IV	63.85 ± 9.20 ^A	64.28 ± 9.58 ^{abA}	59.67 ± 14.37 ^{bB}
	V 组 Group V	62.27 ± 8.15 ^A	58.95 ± 11.49 ^{bB}	57.92 ± 6.25 ^{bB}

随着日粮 Cu 胁迫时间的延长,对照组肝脏中 SOD 的活性无显著变化($P > 0.05$),第 I 组呈上升趋势,但无显著差异,第 II、III 组为先升高再降低的趋势,而第 IV、V 组呈下降趋势,且差异显著($P < 0.05$),说明日粮中高剂量的 Cu 可能会抑制血清和肝脏中 SOD 的活性。

2.1.3 日粮 Cu 胁迫对罗非鱼幼鱼 CuZn-SOD 活性的影响

由表 5 可知,在第 20 天时,各组间血清中 CuZn-SOD 的活性无显著差异($P > 0.05$),第 IV 组最低,为(81.05 ± 11.02) U·mL⁻¹,最高的第 III 组为(88.92 ± 7.43) U·mL⁻¹;第 40 天时,对照组和 II、III 组间无

显著差异($P > 0.05$),I 组和 IV、V 组间无显著差异($P > 0.05$);第 60 天时,随日粮中 Cu 浓度的升高总体呈现出降低的趋势,且与对照组相比,IV、V 组显著降低($P < 0.05$)。

随着日粮 Cu 胁迫时间的延长,第 V 组血清中 CuZn-SOD 的活性显著降低($P < 0.05$),在第 20 天时为(84.51 ± 6.53) U·mL⁻¹,第 60 天时则降至(76.43 ± 12.72) U·mL⁻¹,其他各组随日粮 Cu 胁迫时间的延长无显著变化($P > 0.05$)。

肝脏中 CuZn-SOD 的活性略低于血清。在第 20 天时,各组间无显著差异;第 40 天和 60 天时,肝脏 CuZn-SOD 的活性都随着日粮中 Cu 浓度的升高

而呈现出先升高后降低的趋势,第Ⅱ组在第 60 天时最高,为 $(71.68 \pm 8.32) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$,显著高于对照组($P < 0.05$)。

随着日粮 Cu 胁迫时间的延长,对照组和Ⅰ、Ⅱ组肝脏中 CuZn-SOD 的活性无显著变化($P > 0.05$);第Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ组均随时间的延长逐渐降低,第Ⅴ组在 60 d 时最低,为 $(57.92 \pm 6.25) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$;表明日粮中过高浓度的 Cu 可能会抑制罗非鱼血清和肝脏中 CuZn-SOD 的活性。

2.1.4 日粮 Cu 胁迫对罗非鱼幼鱼 GSH 水平和 GSH-PX 活性的影响

由表 6 可知,肝脏中 GSH 的含量在 20 d 时随日粮中 Cu 浓度的升高逐渐升高,最高的第Ⅴ组达到了 $(7.23 \pm 0.15) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ prot}$,显著高于对照组($P < 0.05$);在 40 d 时,各组间无显著差异($P > 0.05$);在 60 d 时,随日粮中 Cu 含量的升高 GSH 含量逐渐下降。

随着日粮 Cu 胁迫时间的延长,对照组~第Ⅲ组无显著变化,第Ⅳ组 GSH 含量缓慢下降,但差异不显著,第Ⅴ组随着时间的延长显著下降($P < 0.05$),第 60 天时降至最低的 $(5.20 \pm 0.24) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ prot}$,这也表明日粮中过高剂量的 Cu 可能会降低肝脏中 GSH 的含量。

表 6 日粮 Cu 胁迫条件下罗非鱼幼鱼肝脏中的 GSH 水平 ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$)

Table 6 Concentration of GSH in liver of juvenile GIFT tilapia under dietary Cu stress ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$)

组别 Groups	20 d	40 d	60 d
对照组 Control	5.62 ± 0.24^a	5.89 ± 0.07	6.09 ± 0.30
Ⅰ组 Group I	6.02 ± 0.19^a	6.21 ± 0.21	6.41 ± 0.14
Ⅱ组 Group II	5.69 ± 0.34^a	6.08 ± 0.09	6.12 ± 0.32
Ⅲ组 Group III	5.84 ± 0.31^a	5.90 ± 0.21	5.82 ± 0.15
Ⅳ组 Group IV	6.41 ± 0.09^{ab}	6.05 ± 0.15	5.64 ± 0.68
Ⅴ组 Group V	7.23 ± 0.15^{bA}	6.81 ± 0.24^B	5.20 ± 0.24^C

表 7 日粮 Cu 胁迫条件下罗非鱼幼鱼肝脏中的 GSH-PX 活性 ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ prot}$)

Table 7 Activity of GSH-PX in liver of juvenile GIFT tilapia under dietary Cu stress ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ prot}$)

组别 Groups	20 d	40 d	60 d
对照组 Control	23.21 ± 0.56^a	24.18 ± 0.43^a	26.54 ± 2.04^{ab}
Ⅰ组 Group I	25.37 ± 0.82^a	26.84 ± 1.70^{ab}	25.85 ± 1.53^{ab}
Ⅱ组 Group II	26.51 ± 1.57^{ab}	23.57 ± 1.24^a	27.24 ± 0.86^b
Ⅲ组 Group III	22.37 ± 0.92^{aA}	26.34 ± 2.03^{abB}	28.10 ± 1.62^{bB}
Ⅳ组 Group IV	28.64 ± 2.04^{bA}	30.52 ± 2.57^{bA}	23.02 ± 0.24^{aB}
Ⅴ组 Group V	27.75 ± 1.38^{bA}	29.24 ± 0.26^{bA}	22.31 ± 2.47^{aB}

如表 7 所示,在 20 d 时,第Ⅳ组和第Ⅴ组 GSH-PX 的活性分别为 $(28.64 \pm 2.04) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$ 和 $(27.75 \pm 1.38) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ prot}$,显著高于对照组($P < 0.05$)。到第 60 天时,随日粮中 Cu 含量的升高,各组间呈现先升高后降低的变化趋势,与对照组相比,第Ⅳ、Ⅴ组 GSH-PX 的活性显著降低($P < 0.05$)。

对照组和Ⅰ、Ⅱ组中 GSH-PX 的活性随着日粮 Cu 胁迫时间的延长无显著变化,第Ⅱ组在 40 d 时含量最低;第Ⅲ组 GSH-PX 的活性随着时间的延长逐渐升高,而第Ⅳ、Ⅴ组随时间的延长逐渐降低,表明日粮中过高剂量的 Cu 也可能会抑制 GSH-PX 的活性。

2.2 日粮 Cu 胁迫对罗非鱼幼鱼肝脏组织结构的影响

2.2.1 肝脏病理解剖的观察

第 20 天时,解剖发现对照组与第Ⅰ~Ⅳ组肝脏颜色正常,表面湿润光滑,质地柔软,富有弹性;第Ⅴ组肝脏颜色略发黄,质地柔软,弹性略差。第 40 天时,对照组与第Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组肝脏依旧正常,而第Ⅳ组肝脏颜色发黄,弹性变差;第Ⅴ组肝脏颜色呈淡黄色,质地脆软,部分出现颗粒变性。第 60 天时,对照组与第Ⅰ、Ⅱ组肝脏表现正常,第Ⅲ组肝脏颜色略发黄。第Ⅳ组肝脏颜色为土黄色,质地脆软,出现颗粒变性。第Ⅴ组肝脏颜色呈土黄色,质地脆软易碎,有明显的颗粒变性,部分可见出血斑点。

2.2.2 肝脏组织切片的观察

第 20 天时,对照组和第Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ组肝脏细胞结构正常,肝细胞呈圆形或多角形,细胞膜完整清晰,细胞核圆形,染色比较深,细胞质染色较浅(图 1-A1),肝小叶周边细胞呈放射状排列整齐,肝索结构明显(图 1-A2);第Ⅳ组肝脏细胞中有较小的分散的空泡,细胞界限不清晰(图 1-B1);第Ⅴ组肝细胞中圆形空泡较多,肝细胞拥挤肿大,核固缩现象明显,细胞界限模糊,出现轻度的脂肪变性(图 1-B2)。

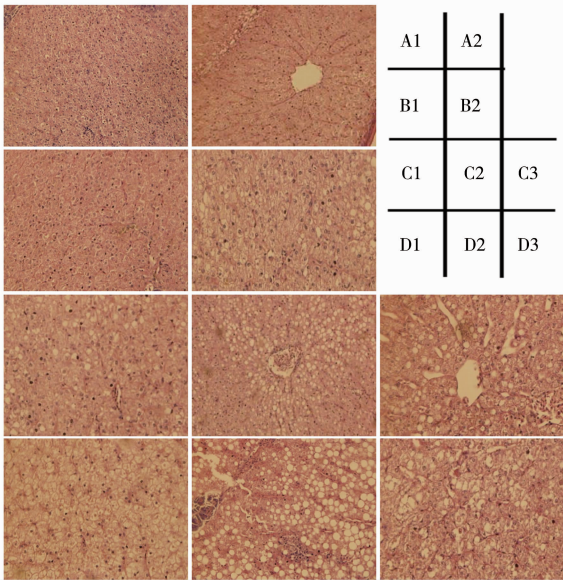


图 1 日粮 Cu 胁迫条件下罗非鱼幼
鱼肝脏组织病理变化图

注:H.E, ×400;其中,A1、A2 为第 20 天时肝脏正常结构图,
B1、B2 分别为第 20 天时Ⅳ组和Ⅴ组的肝脏结构图,
C1、C2、C3 分别为第 40 天时Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ组的肝脏结构图,
D1、D2、D3 分别为第 60 天时Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ组的肝脏结构图。

Fig. 1 The pathological changes of livers of juvenile
GIFT tilapia under dietary Cu stress

Note: H.E, ×400; A1 & A2, the normal structure of livers in
20th day; B1, B2, the histological structure of livers in group
Ⅳ and Ⅴ in 20th day; C1, C2, C3, the histological structure
of livers in group Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ in 40th day; D1, D2, D3, the
histological structure of livers in group Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ in 60th day.

第 40 天时,对照组和第Ⅰ、Ⅱ组肝脏细胞结构正常;第Ⅲ组肝脏细胞出现分散的空泡,细胞界限模糊,有轻微的核固缩现象(图 1-C1);第Ⅳ组肝脏出现轻度的脂肪变性,细胞空泡变大,肝索紊乱,细胞浆内出现细颗粒物质(图 1-C2);第Ⅴ组肝脏脂肪变性加重,空泡明显变大,出现局灶性坏死(图 1-C3)。

第 60 天时,对照组和第Ⅰ组肝脏细胞结构正常;第Ⅱ组肝脏细胞出现分散的空泡,细胞界限开始模糊;第Ⅲ组肝脏细胞中分散空泡变大,细胞界限更加模糊,核固缩现象明显,出现轻度脂肪变性(图 1-D1);第Ⅳ组肝脏出现大面积的脂肪变性,细胞结构破坏,呈紊乱的一片红色(图 1-D2);第Ⅴ组肝脏遭到严重破坏,局灶性坏死现象加剧,坏死处肝细胞崩解(图 1-D3)。

3 讨论 (Discussion)

脂质过氧化(lipid peroxidation, LPO)是反应脂

质过氧化作用强弱的重要指标之一^[12]。刘向阳等^[13]在日粮中分别添加 Cu 0.54 mg·kg⁻¹(缺 Cu)和 6.05 mg·kg⁻¹(正常 Cu),发现缺 Cu 组肝脏中 MDA 比正常组提高了 18%,血浆中 MDA 也相应升高 9%,且肝脏中 MDA 的含量显著高于血浆中的含量。在本实验中,肝脏中 MDA 的含量略高于血清中 MDA 的含量,对照组与前 3 组血清中 MDA 的含量随时间的延长无显著变化,说明日粮中添加低于 300 mg·kg⁻¹Cu 时,没有造成明显的脂质过氧化;而当日粮中 Cu 含量升高为 1 057.29 mg·kg⁻¹时,血清中 MDA 的含量渐渐升高;当添加量达到 3 000 mg·kg⁻¹后,血清中 MDA 的含量随胁迫时间的延长明显升高,表明在本试验条件下,日粮中 Cu 含量为 1 057.29 mg·kg⁻¹时,可引起罗非鱼血清中的脂质过氧化,同样在肝脏中也可得到类似的结论。

生物体内参与清除过氧化因子的物质主要包括:SOD、CuZn-SOD、GSH 和 GSH-PX 等。在本研究中低浓度组血清中 SOD 的活性无显著差异,而高浓度组与对照组相比在前期显著升高,之后又逐渐降低。肝脏中 SOD 的活性在日粮中 Cu 含量为 1 057.29 mg·kg⁻¹和 3 086.76 mg·kg⁻¹时也表现出先升高后降低的趋势,且随着日粮中 Cu 浓度的升高,肝脏中 SOD 的活性呈下降趋势。Knox 等^[14]研究表明,肝脏中 SOD 的活性随着日粮中 Cu 含量的升高而降低,这与本研究的结果一致。鲁双庆等^[15]在研究 Cu 对黄鳝肝脏保护酶 SOD、CAT、GSH-PX 活性的影响时发现,随着时间的推移,SOD 活性表现出先抑制,之后升高又降低的变化趋势,本试验前期没有发现有抑制现象,这可能与 Cu 的浓度或胁迫时间的长短有关。肝脏是动物体内重要的解毒器官,有较强的主动调节能力,当 Cu 浓度升高时,罗非鱼肝脏会产生适应性的诱导反应,此时 SOD 活性增强,清除自由基使机体免受伤害,但当 Cu 浓度继续升高,或时间继续延长,超过肝脏的耐受极限,肝脏就会表现出中毒反应,最后导致 SOD 活性下降^[16]。CuZn-SOD 是所有生物体的一种重要的自由基清除剂,保护机体免受超氧阴离子的损害^[17]。乔永刚^[18]分别以硫酸铜和蛋氨酸铜为 Cu 源,在军曹鱼基础日粮中添加 0、4、8、16、32、64 mg·kg⁻¹Cu,发现对军曹鱼肝脏中 CuZn-SOD 的活性无显著影响。本试验中,对照组与前 3 组血清中 CuZn-SOD 的活性没有显著差异,这与乔永刚^[18]的研究相一致;但当 Cu 含量超过 1 000 mg·kg⁻¹时,随着日粮中 Cu 胁迫时

间的延长,CuZn-SOD的活性下降,而且随着日粮中Cu浓度的升高CuZn-SOD的活性也随之下降。肝脏中CuZn-SOD的活性也随着日粮中Cu的增加而下降,且日粮中Cu的添加量超过 $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,随着时间的推移,CuZn-SOD的活性就开始下降,这也表明肝脏中CuZn-SOD的活性比血清中CuZn-SOD的活性更敏感,而且高Cu抑制了CuZn-SOD的活性。这可能是由于随着Cu含量的升高,自由基反应的速度加快,没有被及时清除的氧自由基就会破坏细胞结构,加速细胞衰老,损害细胞,因此,CuZn-SOD的活性降低可能与细胞解毒能力的过饱和有关。还原型谷胱甘肽(GSH)在分解过氧化物时起重要作用,也是生物体内含量丰富的抗氧化剂。刘慧等^[19]在研究Cu对鲫鱼肝脏谷胱甘肽的影响时发现,在不同浓度的Cu诱导下,GSH含量升高,且认为肝脏GSH含量的升高是机体对Cu浓度升高的适应性反应。而在本试验前期,随着日粮中Cu含量的升高肝脏中GSH的含量也随之升高,这和刘慧等的研究结果一致。但在中后期第Ⅳ组和第Ⅴ组肝脏中GSH的含量开始下降,尤其是第Ⅴ组与对照组相比显著下降,而其他组没有显著变化,表明低浓度的Cu并没有对GSH产生诱导作用。而高浓度组GSH的含量随着暴露时间的延长而降低,可能是罗非鱼在高浓度Cu的胁迫下产生的大量活性氧直接与GSH结合,消耗了GSH;或是高浓度的Cu使得以GSH为底物的酶GSH-PX活性受到抑制,导致的GSH含量下降^[20]。GSH-PX是生物体内广泛存在的一种酶,它能催化 H_2O_2 分解,从而保护细胞免受损害^[21]。本实验中,在第20天时,随着日粮中Cu含量的升高,肝脏中GSH-PX的活性也随之升高,这与Shao等^[22]的研究结果一致。而刘慧等^[23]报道也表明较高浓度的Cu对彭泽鲫鱼肝脏中GSH-PX的活性均有不同程度的抑制作用;王凡等^[24]也发现,随着Cu浓度的升高,栉孔扇贝内脏团中GSH-PX的活性表现出先抑制后诱导又抑制的规律。在本研究中,高浓度组随着时间的延长,肝脏中GSH-PX的活性也随之降低,而且在60 d时,随着日粮中Cu的升高,各组也表现出降低的趋势,这与刘慧等^[23]、王凡等^[24]的研究结果一致,机制可能是因为Cu含量升高,罗非鱼肝脏中对谷胱甘过氧化物酶代谢外源化合物的能力已达到饱和,或者可能是过氧化氢酶(消耗 H_2O_2 比GSH-PX快)活性显著提高,抑制了GSH-PX的活性。日粮中高Cu胁迫可促使膜脂质过氧

化产物MDA含量增加,破坏细胞膜结构,对机体造成一定的损伤,同时,罗非鱼肝脏和血清中SOD活性与肝脏中GSH的含量、GSH-PX活性也发生相应变化。SOD和GSH-PX作为内源活性氧清除剂,在高Cu的胁迫下能清除体内过量的氧自由基,使动物在一定程度上减缓逆境的胁迫^[21,25]。但随着Cu含量的继续升高或胁迫时间的继续延长,抗氧化酶的活性就会受到抑制,从而损伤细胞膜,降低生物的适应性^[25]。

肝脏是Cu对鱼类损害的主要靶器官,同时也是脂肪代谢的重要器官,通常最容易也最常见的变性就是脂肪变性。一般情况下,肝细胞胞浆内没有脂肪滴,但如果胞浆内脂肪增多,出现一些不正常的脂肪滴或超过细胞所含脂肪滴的正常范围,则会发生肝细胞脂肪变性^[26]。在本实验中,第Ⅴ组罗非鱼肝脏在第20天时就出现了轻微的脂肪变性,之后脂肪变性逐渐加重。第Ⅲ组和第Ⅳ组分别在第60天和第40天时也出现了轻微的脂肪变性。在本实验中,第Ⅳ、Ⅴ组在第20天时就出现细胞界限不清晰的现象,而第Ⅲ组在第40天时也出现了细胞界限模糊,有轻微核固缩的现象,其机制可能是由于Cu对细胞产生了毒性作用,抑制了细胞内酶的活性,使体内产生大量自由基,引发细胞膜的脂质过氧化作用,造成细胞的完整性受到破坏,细胞结构和功能受到影响。黄启福^[27]认为,如果有比较强烈的有害刺激或者细胞内环境严重紊乱时,会导致部分生物体细胞或局部组织急剧死亡(局灶性坏死),甚至整个肢体或器官坏死(全局性坏死)。在本实验中,第Ⅴ组在40天时出现散在的局灶性坏死,而到第60天时,局灶性坏死现象加重,原因可能是Cu中毒时,大量的Cu首先聚集在肝细胞核、线粒体和肝浆液中,在肝细胞溶酶体内贮存,当溶酶体被破坏后,Cu和水解酶被释放出来,损伤细胞结构,引起肝功能异常;如果肝脏从血液中吸收的Cu超过其贮存的限度,则可能抑制多种酶的活性,从而导致肝细胞变性、坏死^[28]。

综上,本实验以吉富罗非鱼为研究对象,分别在日粮中添加0、3、30、300、1 000、3 000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cu,研究了对其抗氧化功能、脂质过氧化和肝脏组织结构的影响,得出以下主要结论:(1)日粮Cu胁迫条件下,膜脂质过氧化产物MDA含量增加,罗非鱼幼鱼血清和肝脏中MDA的含量随日粮中Cu含量的升高和胁迫时间的延长显著升高,而SOD、GSH-PX和

CuZn-SOD 的活性表现出先升高后降低的趋势,(2)随着暴露时间的推移和日粮中 Cu 含量的升高,各组间肝脏表现出不同程度的病变,主要是浊肿变性和脂肪变性,试验中第Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ组均能观测到较为严重的肝脏病变;(3)在本试验条件下,吉富罗非鱼幼鱼日粮中 Cu 的实际含量不得高于 $42.36 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

致谢:感谢广东海洋大学动物科学系 412 实验室全体同仁,以及广东恒兴集团湛江恒兴水产科技有限公司、广东吴川国联罗非鱼良种场对本试验的支持。

通讯作者简介:安立龙(1967-),男,博士,教授,主要研究方向为动物营养与环境。

效梅(1965-),女,教授,主要从事动物组织与胚胎工程的科研和教学工作。

参考文献(References):

- [1] Lapointe D, Pierron F, Couture P. Individual and combined effects of heat stress and aqueous or dietary copper exposure in fathead minnows (*Pimephales promelas*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 104(1-2): 80-85
- [2] Luoma S N, Rainbow P S. *Metal Contamination in Aquatic Environments: Science and Lateral Management* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2008: 1-38
- [3] 张亚南, 贺青, 陈金民, 等. 珠江口及其邻近海域重金属的河口过程和沉积物污染风险评价[J]. *海洋学报(中文版)*, 2013, 35(2): 178-186
Zhang Y N, He Q, Chen J M, et al. Heavy metal's process in water and pollution risk assessment in surface sediments of the Zhujiang River Eatuary [J]. *Acta Oceanologica Sinica* (in Chinese), 2013, 35(2): 178-186 (in Chinese)
- [4] 王文龙, 崔欣, 李成成, 等. 饲料中铜暴露对吉富罗非鱼幼鱼红细胞微核和组织中铜蓄积的影响[J]. *生态毒理学报*, 2014, 9(4): 757-764
Wang W L, Cui X, Li C C, et al. Effects of dietary copper exposure on micronucleus of erythrocyte and accumulation in different tissues of juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, 9(4): 757-764 (in Chinese)
- [5] Shaw B J, Handy R D. Dietary copper exposure and recovery in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 76(2): 111-121
- [6] Handy R D. Dietary exposure to toxic metals in fish [M]// Taylor E W. Ed. *Toxicology of Aquatic Pollution*. Cambridge: Cambridge University Press, 1996: 29-60
- [7] Van Vuren J H J, Vandermerwe M, Du Preez H H. The effects of copper on the blood chemistry of *Clarias gariepinus* (Clariidae) [J]. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 1994, 29(2): 187-199
- [8] 汪华. 吉富罗非鱼对饲料铁、铜需要量的研究[D]. 武汉: 武汉工业学院, 2012: 15-27
Wang H. Study on nutrition requirements of iron and copper in genetically improved farmed tilapia [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2012: 15-27 (in Chinese)
- [9] 于丹. 饲料 Cu、Fe 对罗非鱼幼鱼生长、生理机能及器官微量元素含量的影响[D]. 南宁: 广西大学, 2010: 4-30
Yu D. Effect of dietary Cu and Fe supplement on growth performance, physiological function and the trace element concentration of the different organs in *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* [D]. Nanning: Guangxi University, 2010: 4-30 (in Chinese)
- [10] Jacquet C, Thermes V, Luze A, et al. Effects of microcystin-LR on development of medaka fish embryos (*Oryzias latipes*) [J]. *Toxicon*, 2004, 43(2): 141-147
- [11] 王振, 金小伟, 王子健. 铜对水生生物的毒性: 类群特异性敏感度分析[J]. *生态毒理学报*, 2014, 9(4): 640-646
Wang Z, Jin X W, Wang Z J. Taxon-specific sensitivity differences of copper to aquatic organisms [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, 9(4): 640-646 (in Chinese)
- [12] 贾秀英, 董爱华. Cd、Cr(VI)及复合污染对鲫鱼组织脂质过氧化物的影响[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2003, 29(3): 325-328
Jia X Y, Dong A H. Effects of Cd, Cr(VI) single and combined pollution on lipid peroxidation in *Cruciar carp* [J]. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 2003, 29(3): 325-328 (in Chinese)
- [13] 刘向阳, 计成, 丁丽敏, 等. 日粮硒、铜水平对大鼠体内有关的抗氧化酶活性及脂质过氧化产物的影响[J]. *中国农业大学学报*, 1998, 3(3): 107-112
Liu X Y, Ji C, Ding L M, et al. The effects of dietary selenium and copper on rat's activity of some antioxidant enzymes and lipid peroxidation products [J]. *Journal of China Agriculture University*, 1998, 3(3): 107-112 (in Chinese)
- [14] Knox D, Cowey C D, Adron J W. Effects of dietary copper and copper: Zinc ratio on rainbow trout, *Salmo gairdneri* [J]. *Aquaculture*, 1982, 27(2): 111-119
- [15] 鲁双庆, 刘少军, 刘红玉, 等. Cu^{2+} 对黄鳝肝脏保护酶 SOD、CAT、GSH-PX 活性的影响[J]. *中国水产科学*,

- 2002, 9(2): 138 – 141
- Lu S Q, Liu S J, Liu H Y, et al. Effects of Cu^{2+} on activities of protecting enzymes SOD, CAT and GSH – PX in liver tissue of *Monopterus albus* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(2): 138 – 141 (in Chinese)
- [16] 戴伟, 杜华华, 付玲琳, 等. 不同水平铅对罗非鱼生长性能及组织中铅残留的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2009, 35(3): 345 – 349
- Dai W, Du H H, Fu L L, et al. Effects of dietary Pb at different levels on growth performance and Pb residues in tissues of tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2009, 35(3): 345 – 349 (in Chinese)
- [17] 张博润, 谭华荣. 超氧化物歧化酶的研究进展和应用前景[J]. 微生物学通报, 1992, 19(6): 352 – 357
- Zhang B R, Tan H R. Research progress and application prospects of superoxide dismutase [J]. Microbiology China, 1992, 19(6): 352 – 357 (in Chinese)
- [18] 乔永刚. 军曹鱼微量元素锌铁铜营养生理的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007: 70 – 79
- Qiao Y G. Study on nutrition physiology of zinc, iron and copper in cobia (*Rachycentron canadum*) [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007: 70 – 79 (in Chinese)
- [19] 刘慧, 王晓蓉, 张景飞, 等. 铜及其配合物对鲫鱼肝脏谷胱甘肽的影响[J]. 南京大学学报: 自然科学版, 2004, 40(3): 356 – 361
- Liu H, Wang X R, Zhang J F, et al. Effects of copper and its complex compound (Cu – EDTA) on the Glutathione system of liver in goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Journal of Nanjing University: Natural Science, 40(3): 356 – 361 (in Chinese)
- [20] 陈亮, 郭红岩, 沈红, 等. 低浓度铅暴露对鲫鱼肝脏抗氧化系统的影响[J]. 环境化学, 2002, 21(5): 485 – 489
- Chen L, Guo H Y, Shen H, et al. Effect of trace lead on the antioxidant system of fish liver [J]. Environmental Chemistry, 2002, 21(5): 485 – 489 (in Chinese)
- [21] Kanak E G, Dogan Z, Eroglu A, et al. Effects of fish size on the response of antioxidant systems of *Oreochromis niloticus* following metal exposures [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2014, 40(4): 1083 – 1091
- [22] Shao X, Liu W, Xu W, et al. Effects of dietary copper sources and levels on performance, copper status, plasma antioxidant activities and relative copper bioavailability in *Carassius auratus* gibelio [J]. Aquaculture, 2010, 308(1 – 2): 60 – 65
- [23] 刘慧, 王晓蓉, 张景飞, 等. 铜及其 EDTA 配合物对彭泽鲫鱼肝脏抗氧化系统的影响[J]. 环境化学, 2004, 23(3): 263 – 267
- Liu H, Wang X R, Zhang J F, et al. Effects of copper and its EDA complex (Cu – EDTA) on the antioxidant system of *Carassius auratus* liver [J]. Environmental Chemistry, 2004, 23(3): 263 – 267 (in Chinese)
- [24] 王凡, 赵元凤, 吕景才, 等. 铜污染对扇贝内脏团抗氧化酶活性的影响[J]. 水产科学, 2008, 27(12): 622 – 624
- Wang F, Zhao Y F, Lu J C, et al. Effect of Cu^{2+} on the antioxidant enzymes of scallop *Chlamys farres* viscera [J]. Fisheries Science, 2008, 27(12): 622 – 624 (in Chinese)
- [25] Selvi M, Çavaş T, Çağlan Karasu Benli A, et al. Sublethal toxicity of esbiothrin relationship with total antioxidant status and in vivo genotoxicity assessment in fish (*Cyprinus carpio* L., 1758) using the micronucleus test and comet assay [J]. Environmental Toxicology, 2013, 28(11): 644 – 651
- [26] 郭慕依, 叶诸榕. 病理学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 2001: 7 – 11
- [27] 黄启福. 病理学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 35 – 36
- [28] Azizishirazi A, Dew W A, Bougas B, et al. Dietary sodium protects fish against copper – induced olfactory impairment [J]. Aquatic Toxicology, 2015, 161C(4): 1 – 9
- ◆