

纳米硒对镉胁迫下吉富罗非鱼 非特异性免疫和抗氧化功能的影响

秦粉菊^{1,3}, 金 璘¹, 顾华杰¹, 钱 伟¹, 陈家长^{2*}

(1.苏州科技学院化学与生物工程学院, 江苏 苏州 215009; 2.中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 内陆渔业生态环境和资源
重点开放实验室, 江苏 无锡 214081; 3.苏州大学放射医学与公共卫生学院, 江苏 苏州 215123)

摘 要:通过在基础饵料中添加不同水平的纳米硒(Nanometer Selenium, NSe),探讨其对镉暴露下吉富罗非鱼(*genetic improvement of farmed tilapia, GIFT*)非特异性免疫和抗氧化功能的保护作用。将吉富罗非鱼随机分为5个处理组,即对照组(Control)、镉胁迫组(Cd stressed, CdS)和纳米硒低、中、高剂量组(NSe L、M、H)。在NSe L、M和H 3组基础饵料中分别添加0.125、0.250、0.500 mgSe·kg⁻¹的纳米硒,连续30 d,Control和CdS组投喂基础饵料。第15 d,CdS组和NSe 3组用0.5 mg·L⁻¹ Cd²⁺的镉溶液进行为期16 d的镉处理。结果表明:与Control组比较,0.5 mg·L⁻¹ Cd²⁺的暴露降低了吉富罗非鱼血清中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)和溶菌酶(LYS)活力以及白细胞的吞噬活性(PA)和总抗氧化能力(T-AOC)水平,增加了丙二醛(MDA)含量;与CdS组比较,NSe增强了吉富罗非鱼血清GSH-Px、ACP、AKP和LYS活力,提高了白细胞PA和T-AOC水平,降低了MDA含量。研究结果显示:饵料中添加纳米硒可在一定程度上改善镉胁迫所造成的吉富罗非鱼非特异性免疫功能和抗氧化能力的下降,对镉暴露起到一定保护作用。

关键词:纳米硒;镉;罗非鱼;非特异性免疫;抗氧化

中图分类号:X503.225 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)06-1044-07

Effect of Nanometer Selenium on Nonspecific Immunity and Antioxidase of *GIFT* Stressed by Cadmium

QIN Fen-ju^{1,3}, JIN Jin¹, GU Hua-jie¹, QIAN Wei¹, CHEN Jia-zhang^{2*}

(1.Department of Chemistry and Bioengineering, Suzhou Science and Technology University, Suzhou 215009, China; 2.Key Open Laboratory of Ecological Environment and Resources of Inland Fisheries, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 3.School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: The objective of this experiment was to assess the protective impacts of nanometer selenium(NSe) on antioxidant and nonspecific immunity in *genetic improvement of farmed tilapia(GIFT)* stressed by cadmium. *GIFT* were randomly divided into five groups: control, CdS(Cd stressed)and NSe low, middle, high dose groups(NSe L, M, H). Basal fish food of NSe L, M and H three groups were added NSe by 0.125 mgSe·kg⁻¹, 0.250 mgSe·kg⁻¹, 0.500 mgSe·kg⁻¹ respectively every day for 30 days, Control and CdS were given basal fish food. At the fifteenth day, CdS and NSe groups were exposure in cadmium solution(0.5 mg·L⁻¹ Cd²⁺) for sixteen days. The results showed that 0.5 mg·L⁻¹ Cd²⁺ cadmium solution weakened GSH-Px, ACP, AKP, LYS and Phagocytic activities of *GIFT* tilapia, increased MDA content, compared with control group. Compared with CdS group, NSe carried an contribution to enhanced GSH-Px, ACP, AKP, LYS and Phagocytic activities of *GIFT* tilapia, reduced MDA content. This present experiment indicates that NSe supplementation could effectively ameliorate deterioration of nonspecific immunity and antioxidant function in *GIFT* tilapia stressed by cadmium to a certain extent, strengthen protection against cadmium exposure.

Keywords: nanometer selenium; cadmium; tilapia; nonspecific immunity; antioxidant

收稿日期:2010-12-16

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-49);国家自然科学基金青年项目(81008257)

作者简介:秦粉菊(1976—),女,陕西富平人,讲师,在读博士,从事动物生理毒理学研究。E-mail:qinfenju@126.com

* 通讯作者:陈家长

在当今社会面临的最为紧迫的水重金属污染方面,镉(Cd)污染尤为突出。其主要来源于电池、电镀、冶金、印染、油漆等行业生产中大量排放的工业废水^[1]。Cd是多靶效应毒物,在1971年的国际环境会议上被公认为当前环境污染最危险的物质之一,次年FAO(Food and Agriculture Organization)与WHO(World Health Organization)将其列为第3位优先研究的食品污染物^[2]。Cd在环境中具有存留时间长、不易消除、可在生物体内富集等特点,如甲壳类的富集系数为 1.5×10^2 ,藻类为 4×10^2 ,鱼类为 5×10^3 。机体免疫系统对重金属镉非常敏感,同时,镉会降低机体免疫能力并引起机体的氧化损伤导致细胞死亡^[3-4]。

机体必需的微量元素硒(Selenium, Se)具有抗病毒、抗氧化及调节免疫等广泛的生物学活性^[5],但传统硒源使用的最佳浓度和致毒浓度之间的安全限度非常狭窄^[6],限制了硒的应用。纳米硒是纳米级的单质硒,小鼠急性毒性和慢性毒性实验表明,纳米硒毒性远低于亚硒酸钠(纳米硒 $LD_{50}=112.98 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ BW}$,亚硒酸钠 $LD_{50}=15.72 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ BW}$)^[7]。因此纳米硒较传统硒源具有高效低毒的特点。硒是重金属镉良好的拮抗剂,能在多方面有效消除镉对机体的损害,减少镉在机体内的蓄积,对机体镉中毒具有较好的预防和保护作用^[8],并已在临床应用中得到证实。但以纳米硒为材料,将鱼类作为试验对象研究硒对抗镉水质污染的报道较为少见。本文以吉富罗非鱼(*genetic improvement of farmed tilapia, GIFT*)为试验对象,研究微量元素纳米硒对水质镉污染环境罗非鱼非特异性免疫和抗氧化指标的影响,探讨纳米硒对镉胁迫下罗非鱼的保护作用,为鱼类对抗镉污染提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

氯化镉($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, 分析纯, AR.), 纳米硒(上海四通纳米技术港有限公司), 瑞氏染液、溶菌酶(LYS)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、总抗氧化能力(T-AOC)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(南京建成生物工程研究所), 鱼饲料(养鱼场所赠的江升牌标准日粮)。

723PC 可见分光光度计(岛津仪器苏州有限公司); TGL-16G 型飞鸽高速台式冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); HH-4 型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司); 双目生物显微镜(上海莱卡仪器有限公司); 解剖器具一套; 玻璃匀浆器; 水族箱; 充氧泵;

加热泵。

1.2 试验饵料

试验鱼饵料分为3批配制: 将纳米硒分别按照 $0.125 \text{ mgSe} \cdot \text{kg}^{-1}$ (NSe L组)、 $0.250 \text{ mgSe} \cdot \text{kg}^{-1}$ (NSe M组)、 $0.500 \text{ mgSe} \cdot \text{kg}^{-1}$ (NSe H组)加入基础日粮(升江牌罗非鱼基础日粮)。采用逐级扩大混合的方法加入纳米硒, 称重混匀, 加水, 用小型绞肉机制成直径2.5 mm左右的颗粒饲料, 晾干后密封使之与空气隔绝, 置 -20°C 冰箱保存备用。

1.3 试验用鱼

将中国水产科学研究院淡水渔业研究中心鱼类试验场提供的吉富罗非鱼驯养1周后, 选择120尾(76 ± 9) g活泼、无病、体表无损伤的试验鱼, 随机分为5个处理组(24尾/组), 即对照组(Control), 镉胁迫组(CdS), 纳米硒低、中、高剂量组(NSe L、M、H)。NSe L、NSe M和NSe H组分别投喂添加 0.125 、 0.250 、 $0.500 \text{ mgSe} \cdot \text{kg}^{-1}$ 纳米硒的试验饵料, 连续30 d, Control和CdS组投喂基础饵料。在第15 d, 对CdS、NSe L、NSe M和NSe H组用 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ (参照GB 11607—1989《渔业水质标准》中所规定的 Cd^{2+} 浓度不超过 $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 胁迫浓度设为标准浓度的100倍)溶液进行为期16 d的胁迫处理, 试验期间每天换水50%, 并补足 Cd^{2+} 至原有的质量浓度。试验期间定量投喂, 每日09:30和16:30分2次投喂, 日投喂量(以饲料干物质计算)为体重的2%。每天观察鱼的健康状况, 每周称重1次, 并根据体重调整投喂量。试验用水为曝气3 d的自来水, 水温 $25 \sim 28^\circ\text{C}$, 用充氧泵不间断地充氧, 以保证养殖水体中的溶氧水平。

1.4 金黄色葡萄球菌液的制备^[9]

将金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)接种于普通肉汤琼脂斜面培养24 h, 0.5% 甲醛灭活24 h, 无菌生理盐水洗涤3次, 最后以无菌生理盐水比浊法(625 nm处, 生理盐水调零, $A=0.08 \sim 0.1$)配成 1.0×10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 菌悬液(实测 $A=0.097$), 保存于 4°C 冰箱中作为检测白细胞吞噬活性的吞噬菌体(吞噬原)。

1.5 测定指标及方法

1.5.1 体表粘液溶菌酶活力测定

在第31 d, 每处理组取16尾鱼, 用灭菌生理盐水冲洗鱼体1~2次, 吸去多余水分, 再用洁净玻片从鳃盖后缘开始轻刮体表粘液, 在尾部收集刮下的粘液于灭菌离心管中。粘液在 4°C 冰箱中放置2~4 h, 或 4°C 低速离心, 去除管底重力水, 称重并记录数据^[10]。将粘液用生理盐水稀释10倍, 冰浴匀浆后, 4°C 下离心

($10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 20 min), 取上清液采用比浊法测定 LYS 活力。

1.5.2 血清相关酶活力测定

采用尾静脉采血方法, 血液分为 2 份, 1 份用经肝素钠处理的离心管收集, 制备抗凝血, 供测定白细胞吞噬活性用。另 1 份以常法收集后, 制备血清, 供测定 ACP、AKP、T-AOC、GSH-Px 活力和 MDA 含量。其中, 磷酸苯二钠法测 ACP 和 AKP 活力, 比浊法测定 LYS 活力, 二硫代二硝基苯甲酸法测定 GSH-Px 活性, Fe^{3+} 还原法测定 T-AOC, 硫代巴比妥酸比色法测定 MDA 含量。具体测定方法按照说明书进行。

1.5.3 白细胞吞噬活性的测定

取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 抗凝血, 加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 的金黄色葡萄球菌液, 摇匀, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min, 水浴期间每隔 10 min 摇动 1 次; 用吸管吸取混合液涂片 (每个血样涂 5 片), 用甲醇固定 10 min, 蒸馏水冲洗后, Wright 氏染色 15 min, 水洗风干后镜检。镜下计数 100 个白细胞, 以吞噬指数和吞噬百分比表示白细胞的吞噬活性^[1]。吞噬百分比 (Phagocytic percentage, PP) = 100 个白细胞中参与吞噬的细胞数 / 100 个白细胞 $\times 100\%$, 吞噬指数 (Phagocytic index, PI) = 100 个中性粒细胞吞噬细菌总数 / 100 个中性粒细胞。

1.6 统计分析

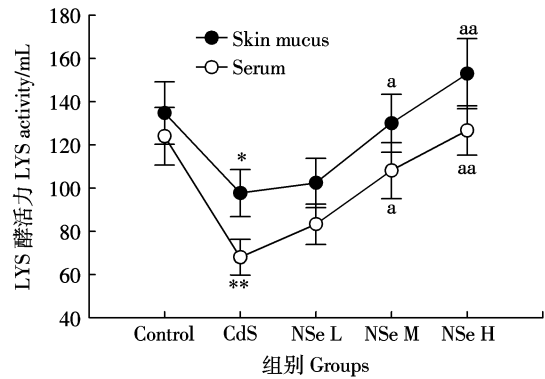
用 SPSS16 软件进行统计学分析, 各组间差异均采用独立样本 t 检验进行分析。数据全部表示为平均值 $\pm$ 标准误 (Mean $\pm$ SE), $n=16$, $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 纳米硒对镉胁迫下罗非鱼非特异性免疫功能的影响

2.1.1 对镉胁迫下罗非鱼血清和体表黏液中溶菌酶活力的影响

如图 1 所示, 当以 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Cd}^{2+}$ 溶液胁迫作用 16 d 后, 吉富罗非鱼体表黏液和血清中的 LYS 活力降低, 与 Control 组比较, 其体表黏液中的 LYS 活力显著降低 ($t_{30}=2.172$, $P<0.05$), 血清 LYS 活力极显著降低 ($t_{30}=2.843$, $P<0.01$)。当饵料中添加不同剂量的纳米硒后, 对镉胁迫引起的吉富罗非鱼 LYS 活力降低具有一定的保护作用, 并呈现一定的剂量-效应关系, 其中以 NSe M 和 H 组的保护作用显著。与镉胁迫组 (Cd) 相比, NSe M 组差异显著 (体表黏液: $t_{30}=2.099$, $P<0.05$; 血清: $t_{30}=2.436$, $P<0.05$), NSe H 组差异极显著 (体表



CdS 与 Control 组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; NSe 组与 CdS 组比较: $a\ P<0.05$, $aa\ P<0.01$ 。下同。

CdS signs in figures signify comparison to the Control: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; NSe compared with CdS: $a\ P<0.05$, $aa\ P<0.01$. The same below.

图 1 纳米硒对镉胁迫吉富罗非鱼体液中溶菌酶活力的影响

Figure 1 Effects of Nano-Se on the activity of LYS in body fluid of GIFT tilapia stressed by cadmium

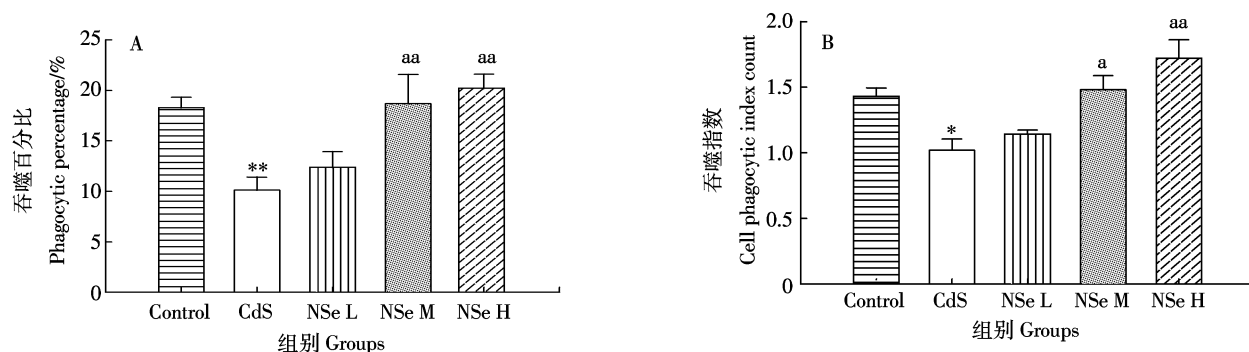
黏液: $t_{30}=3.072$, $P<0.01$; 血清: $t_{30}=2.941$, $P<0.01$)。由此表明, 镉胁迫降低了吉富罗非鱼体表黏液和血清中的溶菌酶活力, 而饵料中添加一定剂量的纳米硒可以改善镉胁迫所造成的吉富罗非鱼溶菌酶活力的下降。

2.1.2 对镉胁迫下罗非鱼白细胞吞噬活性的影响

如图 2 所示, 与 Control 比较, 当 CdS 以 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Cd}^{2+}$ 溶液胁迫作用 16 d 后, 吉富罗非鱼白细胞吞噬活性显著降低 (PP: $t_{30}=3.126$, $P<0.01$; PI: $t_{30}=2.473$, $P<0.05$)。当饵料中添加不同剂量的纳米硒后, 对镉胁迫引起的吉富罗非鱼白细胞吞噬活性的降低具有一定的保护作用, 并呈现一定的剂量-效应关系, 其中以 NSe M 和 H 组的保护作用显著。与镉 CdS 相比, NSe M 组差异显著 (PP: $t_{30}=3.147$, $P<0.01$; PI: $t_{30}=2.508$, $P<0.05$), NSe H 组差异极显著 (PP: $t_{30}=4.245$, $P<0.01$; PI: $t_{30}=3.082$, $P<0.01$)。

2.1.3 对镉胁迫下罗非鱼血清中磷酸酶活力的影响

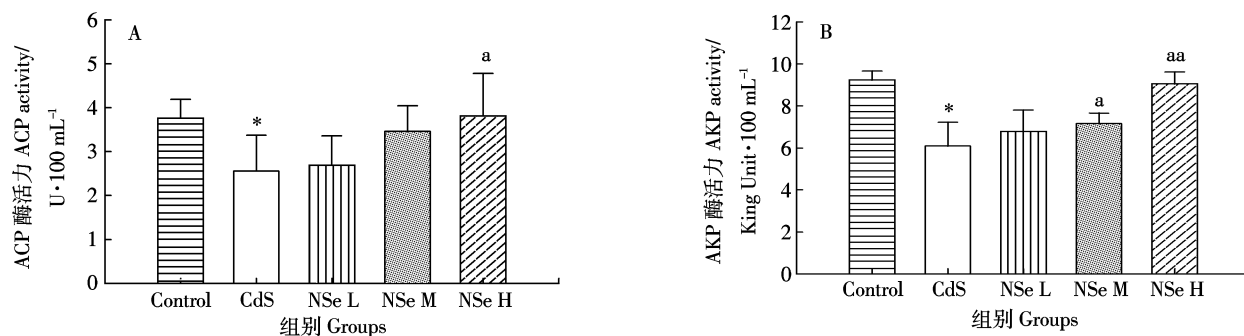
如图 3 所示, 当 CdS 以 $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Cd}^{2+}$ 溶液胁迫作用 16 d 后, 吉富罗非鱼血清中的磷酸酶活力下降, 与 Control 组比较, 其血清中的 ACP 和 AKP 活力显著降低 (ACP: $t_{30}=2.582$, $P<0.05$; AKP: $t_{30}=2.695$, $P<0.05$)。当饵料中添加不同剂量的纳米硒后, 对镉胁迫引起的吉富罗非鱼磷酸酶活力的降低具有一定的保护作用, 并呈现一定的剂量-效应关系, 其中 NSe M 组保护 AKP 的作用显著, NSe H 组保护 ACP 和 AKP 的作用均显著。与 CdS 比较, NSe M 组明显增强了 AKP 活力 ($t_{30}=2.436$, $P<0.05$), 而 ACP 和 AKP 活力在 NSe H 组均显著增强 (ACP: $t_{30}=2.507$, $P<0.05$; AKP: $t_{30}=2.796$, $P<0.01$)。



A: 吉富罗非鱼白细胞吞噬百分比; B: 吉富罗非鱼白细胞吞噬指数。

A: Phagocytic percentage of leucocyte of *GIFT* tilapia; B: Phagocytic index of leucocyte of *GIFT* tilapia

图2 纳米硒对镉胁迫吉富罗非鱼白细胞吞噬活性的影响

Figure 2 Effects of Nano-Se on phagocytes of leucocyte of *GIFT* tilapia stressed by cadmium

A: 吉富罗非鱼血清酸性磷酸酶活力; B: 吉富罗非鱼血清碱性磷酸酶活力

A: The activity of ACP in serum of *GIFT* tilapia; B: The activity of AKP in serum of *GIFT* tilapia

图3 纳米硒对镉胁迫吉富罗非鱼血清中磷酸酶活力的影响

Figure 3 Effects of Nano-Se on the activity of phosphatase in serum of *GIFT* tilapia stressed by cadmium

2.2 纳米硒对镉胁迫下罗非鱼抗氧化功能的影响

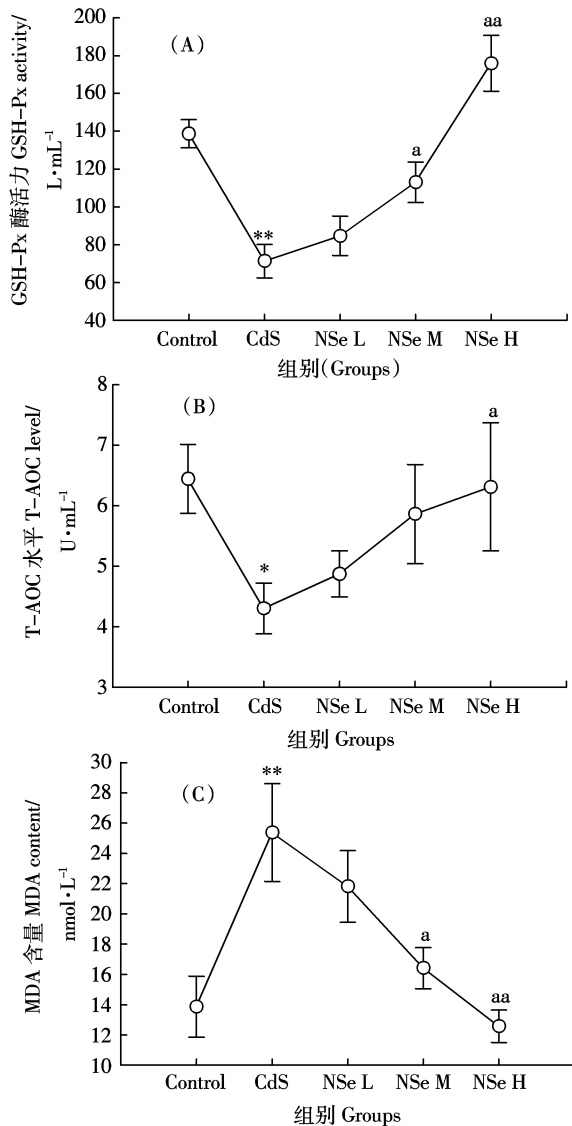
如图4所示,当CdS以 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 溶液胁迫作用16 d后,吉富罗非鱼血清抗氧化功能下降,与Control组比较,其血清中的GSH-Px活力极明显减弱($t_{30}=3.361, P<0.01$),T-AOC水平显著降低($t_{30}=2.573, P<0.05$),MDA含量极显著增加($t_{30}=3.658, P<0.01$)。当饵料中添加不同剂量的纳米硒后,对镉胁迫引起的吉富罗非鱼血清抗氧化功能的降低具有一定的保护作用,并呈现一定的剂量-效应关系,其中NSe H组保护血清T-AOC作用显著,NSe M和H组保护GSH-Px并降低MDA含量的作用均显著。与CdS比较,NSe M组明显增强了GSH-Px活力($t_{30}=2.592, P<0.05$),降低了MDA含量($t_{30}=2.613, P<0.05$);NSe H组使血清T-AOC水平($t_{30}=2.685, P<0.05$)明显升高,GSH-Px活力的增强($t_{30}=3.712, P<0.01$)和MDA含量($t_{30}=3.483, P<0.01$)的降低极其显著。

3 讨论

水环境中的重金属镉(Cd),在低水平暴露情况

下就能危害生物机体^[12]。它主要是通过水及食物的途径进入生物机体,积累在水生动物的肝肾并难以降解^[13-15]。其中淡水鱼类对镉的生物浓集倍数很高。镉的免疫毒性已被国内外学者的研究所确认^[16-17],但迄今还有一些机制没有得到确认。目前认为,氧化应激是镉毒性作用的一条重要途径^[18-19]。大量研究表明:镉会在多种细胞增加应激产生超氧化物(ROS)提高细胞脂质过氧化物和谷胱甘肽水平^[20-21],揭示镉诱导的免疫毒性与氧化应激相关。罗非鱼是人们普遍食用的一种热带淡水鱼类且对镉暴露特别敏感^[22-23],因此本研究以罗非鱼为实验动物,将其暴露于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 的镉溶液作为研究水环境镉污染对水生动物胁迫的模型。

非特异性免疫功能在低等脊椎动物鱼类的防御体系中具有重要地位^[24]。本研究中吉富罗非鱼暴露于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 溶液16 d后,非特异性免疫指标血清和体表黏液中LYS活力明显下降($P<0.05$)。LYS是鱼类非特异性免疫系统的重要组成部分^[25],是吞噬细胞杀菌的物质基础,能破坏和消除侵入体内的细菌等病



A: 吉富罗非鱼血清谷胱甘肽过氧化物酶活力; B: 吉富罗非鱼血清总抗氧化能力水平; C: 吉富罗非鱼血清丙二醛含量

A: The activities of GSH-Px in serum of *GIFT* tilapia; B: The level of T-AOC in serum of *GIFT* tilapia; C: The content of MDA in serum of *GIFT* tilapia

图4 纳米硒对镉胁迫吉富罗非鱼抗氧化功能的影响

Figure 4 Effects of Nano-Se on the function of anti-oxidant in serum of *GIFT* tilapia stressed by cadmium

原体,并能分泌到细胞外,如血液和体表黏液中,担负起机体防御的功能^[26]。Møynner K 等研究发现,鱼病暴发后幸存的鱼类血清中 LYS 的活力显著高于对照组的鱼类(未感染鱼病)LYS 活力^[27]。而本试验结果中镉胁迫造成了吉富罗非鱼血清和体表黏液中 LYS 活力的下降亦表明吉富罗非鱼非特异性免疫能力下降。吞噬细胞完成对外来异物的吞噬后,会产生溶酶体酶来裂解和消化被吞噬的物质。ACP 是溶酶体的标志酶,本研究中吉富罗非鱼在 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 溶液暴露

16 d 后,血清中 ACP 活力降低 ($P < 0.05$),与 Sarosiek B 等的研究结果一致^[28]。AKP 能直接参与有机磷的代谢,亦与 DNA、蛋白质及脂类的代谢有关。AKP 水平提高,可以加速机体相应组织的物质代谢,为 ADP 磷酸化形成 ATP 提供所需的无机磷,积累更多能量,从而促进生长,间接增强其非特异性免疫能力^[29],而本研究中,吉富罗非鱼在 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 溶液暴露 16 d 后,血清中 AKP 活力降低 ($P < 0.05$)。吞噬细胞在鱼类抗感染免疫中发挥核心作用,本研究中吉富罗非鱼在 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 溶液暴露 16 d 后,白细胞吞噬活性显著降低 ($P < 0.05$)。

机体在镉胁迫下产生活性氧 ($\text{O}_2 \cdot^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 和 H_2O_2)^[23],并损伤机体细胞,如:脂质过氧化就是活性氧自由基攻击生物膜中多聚不饱和脂肪酸(PUFA)而引起的一系列氧化过程,进而对生物体造成一种氧化胁迫状态。当氧化胁迫超出了生物体抗氧化防御系统的保护能力的时候,就会对生物体造成毒害^[30]。丙二醛(MDA)是自由基引发的脂质过氧化作用的最终分解产物,MDA 含量的多少可以间接反映活性氧自由基含量的多少以及组织细胞脂质过氧化的强度或速率^[31]。机体内酶促防御体系的抗氧化酶如 GSH-Px、CAT 和 SOD 等都可清除活性氧自由基并在机体的保护性防御反应中起重要作用。T-AOC 是衡量机体总抗氧化能力的指标,它的高低代表机体体液、细胞、组织酶系统和非酶系统抗氧化能力的综合水平。Casalino E 等研究发现镉降低 SOD 和 CAT 的活性,并抑制其基因表达^[32-33]。在本研究中,吉富罗非鱼暴露于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 16 d 后,血清中 GSH-Px 活力和 T-AOC 水平明显降低 (GSH-Px: $P < 0.01$; T-AOC: $P < 0.05$),MDA 含量极显著增加 ($P < 0.01$)。说明镉胁迫 ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 溶液) 16 d 使吉富罗非鱼的抗氧化功能降低。

硒是一种能影响机体内在免疫并能增强免疫功能的微量元素^[34-35],其免疫功能主要来自硒代半胱氨酸。硒代半胱氨酸是最具抗氧化作用的硒蛋白——GSH-Px 的氧化还原中心,可催化过氧化物分解,对体内自由基和过氧化脂质的清除起着重要作用,减少自由基的潜在性损伤,保护蛋白质和 DNA 及生物膜的完整性^[36-37],其表达及活性均受硒营养水平调节^[38-39]。纳米硒是以蛋白质为核、红色元素硒为膜并以蛋白质为分散剂的红色元素硒的纳米粒子,粒径在 80 nm 以内,是单质硒。这种纳米硒对热稳定,不转化形成灰或黑色元素硒。添加在本实验饵料中的纳米级微量元素硒,分布均匀、比表面积大、表面活性中心多,可通过

主动转运机制和被动扩散两种方式在肠淋巴组织处吸收以提高硒的生物利用度。

本研究发现,与镉胁迫组比较,纳米硒可以提高吉富罗非鱼血清 GSH-Px 活力和 T-AOC 水平,降低 MDA 含量,并呈现一定的剂量-效应关系,改善了镉胁迫所造成的吉富罗非鱼抗氧化功能的降低,减少了机体的氧化损伤,其中以 NSe M 和 H 组效果显著,这与 Ognjanovic' B I 等的研究结果一致^[40]。研究同时发现,纳米硒提高了镉胁迫下吉富罗非鱼体表黏液和血清中的 LYS 活力、白细胞的吞噬活性并增强血清磷酸酶活力,改善了镉胁迫所造成的吉富罗非鱼非特异性免疫能力的下降。纳米硒改善了镉胁迫所造成的吉富罗非鱼抗氧化功能的降低,亦增强了抗氧化酶的活力,使其清除体内自由基的能力提高,保护了免疫器官和细胞生物膜的完整性,从而改善吉富罗非鱼的非特异性免疫能力。吞噬细胞在非特异性免疫功能中发挥着重要作用,其吞噬功能必须有 Ca^{2+} 的存在,无 Ca^{2+} 时吞噬作用就会受阻^[41]。重金属镉会抑制机体对钙的吸收并增加排泄作用^[42]。微量元素硒能够保持吞噬细胞内 Ca^{2+} 的稳定并抑制膜上 Ca^{2+} -ATP 酶活性,减少 Ca^{2+} 外流^[43],从而保护吉富罗非鱼的吞噬功能来对抗镉的胁迫作用,进而增强其非特异性免疫功能。而对于纳米硒在鱼体内拮抗镉的具体作用机制还有待进一步研究。

4 结论

(1) 镉胁迫对吉富罗非鱼非特异性免疫指标 ACP、AKP、LYS 和白细胞的吞噬活性均有影响。暴露于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 溶液 16 d 后,吉富罗非鱼血清中 ACP 和 AKP、体表黏液和血清中 LYS 活力下降,白细胞的吞噬活性减弱。表明镉胁迫使吉富罗非鱼非特异性免疫功能下降。

(2) 镉胁迫对吉富罗非鱼抗氧化指标 GSH-Px、T-AOC、MDA 均有影响。暴露于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 溶液 16 d 后,吉富罗非鱼血清中 GSH-Px 活力下降,T-AOC 能力水平下降,MDA 含量增加。表明镉胁迫使吉富罗非鱼的抗氧化功能减弱。

(3) 纳米硒可以影响镉胁迫所引起的吉富罗非鱼非特异性免疫功能的下降。与镉胁迫组比较,纳米硒使吉富罗非鱼血清中磷酸酶、体表黏液和血清中 LYS 的活力提高,白细胞的吞噬活性增强,并呈现一定的剂量-效应关系。表明纳米硒能够在一定程度上改善镉胁迫所造成的吉富罗非鱼非特异性免疫功能

的下降。

(4) 纳米硒对镉胁迫所引起的吉富罗非鱼抗氧化能力的减弱有显著影响。与镉胁迫组比较,纳米硒使吉富罗非鱼血清中 GSH-Px 活力上升,T-AOC 能力水平提高,MDA 含量下降,并呈现一定的剂量-效应关系。表明纳米硒能够在一定程度上改善镉胁迫所造成的吉富罗非鱼抗氧化功能的减弱。

参考文献:

- [1] 林顺利,黄亦真,尤胜炮,等. 平阳县近岸海域养殖水产品重金属与农药监测[J]. 宁波大学学报(理工版), 2010, 23(2): 84-90.
LIN Shun-li, HUANG Yi-zhen, YOU Sheng-pao, et al. Safety monitoring and analysis on the heavy metal and pesticide in aquatic products from Pingyang coastal waters[J]. *Journal of Ningbo University (Natural Science and Engineering Edition)*, 2010, 23(2): 84-90.
- [2] Sjöbeck M L, Haux C, Larsson Å, et al. Biochemical and hematological studies on perch, *Perca fluviatilis*, from the cadmium-contaminated river Emån[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1984, 8(3): 303-312.
- [3] Ohsawa M. Heavy metal-induced immunotoxicity and its mechanisms[J]. *Yakugaku Zasshi Ma*, 2009, 129(3): 305-319.
- [4] Nzengue Y, Steiman R, Guiraud P. Characterization of the cell death induced by cadmium in HaCaT and C6 cell lines[J]. *Free Radical Research*, 2008, 42(2): 142-153.
- [5] Shi H, Sui Y, Wang X, et al. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*[J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2005, 140(1): 115-21.
- [6] 黄开勋,徐辉碧. 硒的化学、生物化学及其在生命科学中的应用[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 1994: 53.
HUANG Kai-xun, XU Hui-bi. Selenium chemistry, biochemistry and its application in life science[M]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology Press, 1994: 53.
- [7] Zhang J, Wang X, Xu T. Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: Comparison with se-methylselenocysteine in mice[J]. *Toxicol Sci*, 2007, 101: 22-31.
- [8] 汪再娟,金 锋,唐红芳,等. 镉污染区居民的体镉负荷与硒元素水平相关性研究[J]. 广东微量元素科学, 1999, 6(6): 20-23.
WANG Zai-juan, JIN Feng, TANG Hong-fang, et al. Study on the correlation between Cd and Se in residents from exposed area of Cd[J]. *Guangdong Trace Elements Science*, 1999, 6(6): 20-23.
- [9] 马爱敏,闫茂仓,常维山,等. 柴胡对美国红鱼免疫机能的影响[J]. 海洋通报, 2009, 28(4): 35-42.
MA Ai-min, YAN Mao-cang, CHANG Wei-shan, et al. Effects of *Bupleurum chinense* on the immune function of *Sciaenops ocellatus*[J]. *Marine Science Bulletin*, 2009, 28(4): 35-42.
- [10] 周 进,宋晓玲,黄 健,等. A3 α 肽聚糖对牙鲆不同组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2004, 11(4): 296-301.
ZHOU Jin, SONG Xiao-ling, HUANG Jie, et al. Effect of A3 α peptidoglycan (PG) on SOD, ACP, and AKP activities in different tissues of

- Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(4):296–301.
- [11] 刘青, 赵恒寿. 鱼类常用免疫指标及其检测技术[J]. *渔业现代化*, 2007, 34(3):28–30.
- LIU Qing, ZHAO Heng-shou. Fish common immune indexes and testing technology[J]. *Fishery Modernization*, 2007, 34(3):28–30.
- [12] Cope W G, Wiene J G, Steingraeber M T. Test system for exposing fish to resuspended contaminated sediment[J]. *Environmental Pollution*, 1996, 91(2):177–182.
- [13] Novelli E B, Vieira E P, Rodrigues N L, et al. Risk assessment of cadmium toxicity on hepatic and renal tissues of rats[J]. *Environmental Research*, 1998, 79(2):102–105.
- [14] Klaassen C D, Liu Jie. Role of metallothionein in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity[J]. *Drug Metab Rev*, 1997, 29(1–2):79–102.
- [15] Novelli E B, Lopes A M, Rodrigues A S, et al. Superoxide radical and nephrotoxic effect of cadmium exposure[J]. *International Journal of Environmental Health Research*, 1999, 9(2):109–116.
- [16] Bols N C, Brubacher J L, Ganassin R C, et al. Ecotoxicology and innate immunity in fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2001, 25(8–9):853–873.
- [17] Bertin G, Averbek D. Cadmium: Cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review)[J]. *Biochimie*, 2006, 88(11):1549–1559.
- [18] Ognjanović B I, Marković S D, Đorđević NZ, et al. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E[J]. *Reproductive Toxicology*, 2010, 29(2):191–197.
- [19] Kim J, Sharma R P. Cadmium-induced apoptosis in murine macrophages is antagonized by antioxidants and caspase inhibitors[J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2006, 69(12):1181–1201.
- [20] Pathak N, Khandelwal S. Oxidative stress and apoptotic changes in murine splenocytes exposed to cadmium[J]. *Toxicology*, 2006, 220(1):26–36.
- [21] Oh SH, Lim S C. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 212:212–223.
- [22] Kaliba A R, Ngugi C C, Mackambo J, et al. Economic profitability of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) production in Kenya[J]. *Aquaculture Research*, 2007, 38(11):1129–1136.
- [23] Almida J A, Diniz Y S, Marques S F G, et al. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination[J]. *Environment International*, 2002, 27(8):673–679.
- [24] Ellis A E. Immunity to bacteria in fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, 9(4):291–308.
- [25] Swain P, Dash S, Sahoo P K, et al. Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(1–2):38–43.
- [26] Verlhac V, Gabaudan J, Obach A, et al. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquaculture*, 1996, 143(2):123–133.
- [27] Møyner K, Røed K H, Sevatdal S, et al. Changes in non-specific immune parameters in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., induced by *Aeromonas salmonicida* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1993, 3(4):253–265.
- [28] Sarosiek B, Pietrusiewicz M, Radziwoniuk J, et al. The effect of copper, zinc, mercury and cadmium on some sperm enzyme activities in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *The Society for Biology of Reproduction*, 2009, 9(3):295–302.
- [29] Li J, Sun X, Zheng F, et al. Histochemical localization and characterization of AKP, ACP, NSE, and POD from cultured *Apostichopus japonicus* [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009, 27(3):550–554.
- [30] Ritola O, Lyytikäinen T, Pyllkö P, et al. Glutathione-dependent defence system and monooxygenase enzyme activities in Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.) exposed to ozone[J]. *Aquaculture*, 2000, 185(3–4):219–233.
- [31] Guven Y, Unur M, Bektas K, et al. Salivary malondialdehyde levels in patients with oral leukoplakia[J]. *Turk J Med Sci*, 2005, 35:329–332.
- [32] Casalino E, Calzaretto G, Sblano C, et al. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium[J]. *Toxicology*, 2002, 179(1–2):37–50.
- [33] Jo P G, Choi Y K, Choi C Y. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure[J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2008, 147(4):460–469.
- [34] Arthur J R, McKenzie R C, Beckett G J. Selenium in the immune system[J]. *The Journal of Nutritional*, 2003, 133:1457–1459.
- [35] Bhaskaram P. Micronutrient malnutrition, infection, and immunity: An overview[J]. *Nutr Rev*, 2002, 60(5):S40–S45.
- [36] Saito Y, Yoshida Y, Akazawa T, et al. Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(41):39428–39434.
- [37] Thomson C D. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: A review[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2004, 8:391–402.
- [38] Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 27(9–10):951–965.
- [39] Zhong Lw, Holmgren A. Essential role of selenium in the catalytic activities of mammalian thioredoxin reductase revealed by characterization of recombinant enzymes with selenocysteine mutations[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(24):18121–18128.
- [40] Ognjanović B I, Marković S D, Pavlovic S Z, et al. Effect of chronic cadmium exposure on antioxidant defense system in some tissues of rats: Protective effect of selenium[J]. *Physio Res*, 2008, 57:403–411.
- [41] Leiro J, Siso M I G, Ortega M, et al. A factorial experimental design for investigation of the effects of temperature, incubation time, and pathogen-to-phagocyte ratio on in vitro phagocytosis by turbot adherent cells[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1995, 112C(2):215–220.
- [42] Verboost P M, Flik G, Lock R A C, et al. Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport[J]. *Journal of Membrane Biology*, 1988, 102(2):97–104.
- [43] 温和瑞, 陈荣三. 亚硒酸钠与细胞的作用[J]. 微量元素与健康研究, 1998, 15(2):6–7.
- WEN He-rui, CHEN Rong-san. Effects of sodium selenite on cell[J]. *Studies of Trace Elements and Health*, 1998, 15(2):6–7.