

L-色氨酸和褪黑激素对中华绒螯蟹血清血糖水平及肝胰腺抗氧化能力的影响

徐敏杰, 张佳鑫, 黄根勇, 张 聪, 成永旭, 杨筱珍*

(上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海水产养殖工程技术研究中心,
上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 为探究L-色氨酸和褪黑激素(MT)对中华绒螯蟹血糖水平及肝胰腺抗氧化能力的影响。实验选取初始体质量为(16.58±2.20) g的雌性中华绒螯蟹, 随机分成8组(L-色氨酸和MT处理各4组), 实验周期均为30 d。(1) L-色氨酸饲料投喂实验4组: L-色氨酸所占饲料比重分别为0.36%(基础饲料即对照组)、0.47%、0.73%和1.05%(分别记为1、2、3和4组), 30 d后分别测定各组蟹的血糖水平及肝胰腺的T-AOC和SOD活性; (2) MT注射实验4组: 每组分别在第1天和15天时注射生理盐水(即对照组, C组)和不同剂量的MT 10⁻⁶ mol/只(μM组)、10⁻⁹ mol/只(nM组)和10⁻¹² mol/只(pM组)。分别于第1天和15天时, 收集血淋巴和肝胰腺, 分别测定血糖水平、T-AOC和SOD活性。于第30天时, 再次收集血淋巴以测定血糖水平。结果显示: 不同含量L-色氨酸对中华绒螯蟹血糖水平无明显影响, 其血糖含量约为(4.62±0.20) mmol/L。此外, 0.73% L-色氨酸的饲料能显著提高肝胰腺SOD活性(82.86±1.07) U/mL; 注射MT仅在第1天时对中华绒螯蟹的血糖水平有促进作用, 并呈剂量依赖性的方式升高, 其中μM组蟹血糖水平高达(7.56±0.36) mmol/L, 其值显著高于C、pM和nM组。此外注射MT在第1天时, 对肝胰腺T-AOC和SOD活性也有明显的促进作用。其中, μM组蟹肝胰腺T-AOC和SOD活性均显著高于C、pM和nM组。研究表明, 饲喂0.73% L-色氨酸的饲料能够提高中华绒螯蟹的抗氧化能力, 但对血糖水平的影响不明显; 注射10⁻⁶ mol/只MT可以在短时间内(1 d)提高中华绒螯蟹的血糖水平和抗氧化能力。

关键词: 中华绒螯蟹; L-色氨酸; 褪黑激素; 血糖水平; 抗氧化能力

中图分类号: S 966.1

文献标志码: A

色氨酸(tryptophan, Trp)属于人体必需氨基酸, 在体内不能合成, 必须从膳食中摄取^[1]。它有3种异构体分别为L型、D型及消旋体DL型。其中, L-色氨酸是国内外学者研究的主要类型^[2-3]。它参与调节多种生理功能, 如消除神经紧张、合成蛋白质、减少炎症和应激反应等^[4]。色氨酸也常作为饲料添加剂用于甲壳动物的生产养殖。其在体内含量较少, 主要通过其多元的代谢途径及代谢产物来发挥作用。褪黑激素(mela-

tonin, MT)是色氨酸的重要代谢产物, 目前多个体外注射MT实验已证实, 其参与了甲壳动物多种生理功能的调节, 如生长、应激反应和免疫水平等^[5-8]。众所周知, 血糖水平和抗氧化能力是评价动物应激反应和免疫水平的重要指标。

血糖即血液中的糖, 绝大多数情况下都是葡萄糖。它能提供机体各组织细胞活动所需的能量, 所以血糖必须保持一定的水平才能维持机体的正常生理需要^[9]。此外, 血糖调节失衡会

收稿日期: 2017-01-18 修回日期: 2017-04-07

资助项目: 国家自然科学基金(31272677, 31472287); 上海市科委项目(16DZ2281200); 上海教委知识服务平台专项(ZF1206); 上海市科技兴农推广项目[沪农科推字(2015)第1-7号]

通信作者: 杨筱珍, E-mail: xzyang@shou.edu.cn

引起糖代谢紊乱,大量代谢产物的累积可导致机体免疫功能异常。李文武等^[10]研究认为应激性高血糖会加重机体能量代谢紊乱和诱发免疫炎症的产生,破坏机体内环境稳态。近年来研究发现,氨基酸能够参与调控机体的血糖水平。如王靓等^[11]在给小鼠注射亮氨酸后发现,其餐后血糖水平显著降低。谭芳芳等^[12]研究发现饲料中添加晶体氨基酸能提高草鱼血糖含量,降低血脂趋势。但目前有关色氨酸在动物尤其是甲壳类血糖水平方面的研究还鲜见报道。众所周知,甲壳动物的血糖主要由眼柄中X-器窦腺复合体(XO-SG)合成和分泌的高血糖激素(crustacean hyperglycemic hormone, CHH)所调控^[13]。目前已证实,MT能够通过刺激CHH的释放来调节血糖水平。Sainath等^[14]在对淡水蟹(*Oziotelphusa senex senex*)注射MT后发现,不论是眼柄切除还是眼柄完整的蟹,MT都可以呈剂量依赖性的方式诱导高血糖症。Tilden等^[15]证实外源性注射MT可以提高大西洋砂招潮蟹(*Uca pugilator*)的血糖水平。

抗氧化是有效抑制自由基的氧化反应,防止过多的自由基影响机体的正常生理代谢功能,从而增强机体的免疫力。近年来,色氨酸在甲壳动物中的应用主要集中在饲料方面,并已证实其能提高甲壳动物的抗氧化能力。如裘金木等^[16]研究发现,饲料中添加适量的色氨酸可以提高凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的酚氧化酶(phenoloxidase, PO)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性。此外,MT作为调控抗氧化防御系统动态平衡的中性分子,可以越过所有的生理屏障,顺利进入细胞膜和细胞核中与氧化分子结合,从而清除自由基,降低氧化作用对生物分子的破坏。Vargas等^[17]证实MT能够抑制张口蟹(*Neohelice granulata*)脂质过氧化。除此之外,MT还能减少黏附分子和促炎细胞因子,防止组织氧化损伤,进而保护神经细胞^[18]。

本实验选用我国主要经济蟹类之一的中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)作为研究对象。从血糖水平和抗氧化能力两方面来评价色氨酸及其代谢途径中的重要激素类物质——MT对中华绒螯蟹生理功能的影响,为中华绒螯蟹的健康养殖提

供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验蟹来源与养殖管理

从上海海洋大学崇明养殖基地挑选出规格相近、四肢健全、活力较好的雌蟹(16.58±2.2)g,于室内循环水系统中暂养7d。暂养水族箱体积约为832L(长×宽×高=130cm×60cm×40cm,水深25cm),箱底部放置PVC管作为遮蔽物,日夜连续充气增氧,每天固定时间投喂基础饲料一次。在实验正式开始前,所有中华绒螯蟹禁食1d。实验期间,温度维持在19~22℃,pH为7.6~7.8,非离子氨氮<0.05mg/L,溶解氧>6.0mg/L。

1.2 L-色氨酸饲料投喂实验

以鱼粉、豆粕和棉籽粕等为主要蛋白源,鱼油和菜籽油为脂肪源配制基础饲料。参考文献^[19-21]对锯缘青蟹(*Scylla serrata*)和格鲁西东欧螯虾(*Astacus leptodactylus*)的研究,在基础饲料中添加L-色氨酸(国药集团化学试剂有限公司),使L-色氨酸含量分别为0.36%(基础饲料即对照组)、0.47%、0.73%和1.05%,分别标记为第1、2、3和4组。将中华绒螯蟹随机分成4组,每组设3个平行,每个平行10只蟹,并对其进行常规数据的测量(体质量、长、宽和高等)。各组蟹于每天18:00分别投喂不同L-色氨酸饲料,投喂量为蟹体质量的3%~5%。饲养30d后,用浸泡75%酒精的脱脂棉球擦拭体表,然后用1.0mL无菌注射器从蟹的第三步足基膜处抽取大约1.0mL的血淋巴,于-40℃保存;沿蟹壳侧面将蟹壳与躯体分离,然后直接解剖取出肝胰腺,于-40℃保存备用。

1.3 褪黑激素注射实验

从生工生物工程有限公司(上海)购得MT,溶于无水乙醇,并用0.86%蟹类生理盐水稀释(乙醇浓度<1%)。将配好的试剂于-4℃冰箱中避光保存。将中华绒螯蟹随机分成4组,每组设3个平行,每个平行30只,每只蟹于8:00分别对应注射生理盐水(C组)、 10^{-6} mol/只(μ M组)、 10^{-9} mol/只(nM组)和 10^{-12} mol/只(pM组)的褪黑激素^[14],注射剂量均为20 μ L。每次采样均为注射后的2h,血淋巴和肝胰腺样品的收集方法同第1天,从各处理组随机挑选5只蟹,用浸泡75%酒精的脱脂棉

球擦拭体表, 然后用1.0 mL无菌注射器从蟹的第三步足基膜处抽取大约1.0 mL的血淋巴, 于-40 °C保存; 取血后随即将蟹体解剖取出肝胰腺, 于-40 °C冰箱保存备用。此外, 第15天采样结束后, 各组蟹再次注射对应剂量的试剂。第30天时于10:00抽取血淋巴-40 °C冰箱保存。

1.4 样品分析

血糖水平测定 将采集的血淋巴样品于4 °C, 4000 r/min条件下离心20 min, 取上清液(血清)并用南京建成生物工程研究所的葡萄糖测定试剂盒(葡萄糖氧化酶—过氧化物酶法)测定血糖^[22]。

肝胰腺抗氧化能力测定 称取0.2 g左右的肝胰腺, 加入1 mL (m : V=1 : 5)预冷的生理盐水后用微型匀浆器匀浆30 s后, 于4 °C, 12 000 r/min, 离心20 min, 用1.0 mL无菌注射器吸取中间清液后再次离心, 最后取上层清液用于肝胰腺T-AOC和SOD活性的测定(南京建成生物工程研究所试剂盒)。

1.5 数据统计与分析

所有数据均采用平均值±标准误(mean±SE)表示。采用SPSS19.0软件对实验数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 利用Duncan氏法进行组间显著性分析, 差异显著性水平为 $P<0.05$ 。采用Origin 8.0软件绘图。

2 结果

2.1 L-色氨酸和MT对中华绒螯蟹血糖水平的影响

L-色氨酸对血糖水平的影响 4组饲料投喂中华绒螯蟹30 d后, 各组蟹血糖水平无显著差异($P>0.05$), 平均约为(4.62±0.20) mmol/L(图1)。

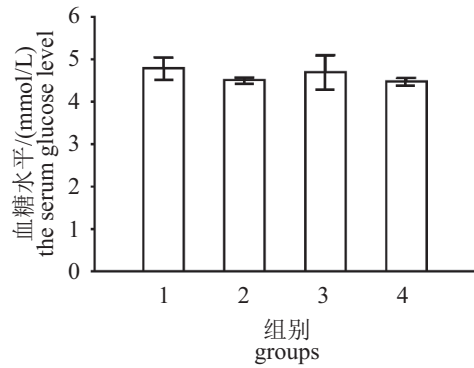


图1 不同L-色氨酸饲料投喂后中华绒螯蟹的血糖水平

Fig. 1 The serum glucose level of *E. sinensis* at the different L-tryptophan-supplemented dietary

1. 0.36%, 2. 0.47%, 3. 0.73%, 4. 1.05%

MT对血糖水平的影响 第1天, 4组蟹的血糖水平以剂量依赖性的方式升高。其中 μM 组蟹血糖水平高达(7.56±0.36) mmol/L, 其值显著高于C、pM和nM组($P<0.05$)。而在第15天和30天时, 4组蟹之间的血糖水平却无显著差异($P>0.05$), 分别约为(5.57±0.36) mmol/L和(5.36±0.31) mmol/L。此外, 4组蟹随着MT注射时间的延长, 其血糖水平略微降低, 除 μM 组外均无显著差异($P>0.05$)。 μM 组蟹在第1天时的血糖水平显著高于第30天时的血糖水平(6.07±0.48) mmol/L($P<0.05$)(表1)。

2.2 L-色氨酸和MT对中华绒螯蟹肝胰腺抗氧化能力的影响

L-色氨酸对肝胰腺T-AOC和SOD活性的影响 4组饲料投喂中华绒螯蟹后, 肝胰腺T-AOC无显著性差异($P>0.05$), 其中L-色氨酸添加量最高饲料组蟹的T-AOC最高, 达(5.48±0.32) U/mL(表2)。此外, 4组蟹肝胰腺的SOD活性随着饲料中L-色氨酸添加量的增加而呈上升趋势。实验组

表1 不同时间点各组中华绒螯蟹的血糖水平

Tab. 1 The serum glucose level of *E. sinensis* in each group at the different times

时间/d time	组别 groups			
	C	pM	nM	μM
1	5.15±0.22	5.81±0.20	6.29±0.10	7.56±0.36 ^{C/b}
15	5.09±0.29	5.27±0.11 ^{A/a}	5.56±0.69 ^{A/a}	6.37±0.34 ^{A/ab}
30	5.11±0.32	5.06±0.32 ^{A/a}	5.18±0.12 ^{A/a}	6.07±0.48 ^{A/a}

注: 同列小写字母不同表示不同时间点, 同一组的差异显著($P<0.05$); 同行大写字母不同表示同一时间, 不同组的差异显著($P<0.05$)

Notes: The different lowercase letters in the same column mean the significant difference of the same group at the different time ($P<0.05$); the different capital letters in the same row mean the significant difference of the different groups at the same time ($P<0.05$)

表 2 不同L-色氨酸饲料投喂后中华绒螯蟹肝胰腺的T-AOC和SOD活性

Tab. 2 The T-AOC and the activity of SOD in the hepatopancreas of *E. sinensis* at the different L-tryptophan-supplemented dietary

指标 parameters	组别 groups			
	1(0.36%)	2(0.47%)	3(0.73%)	4(1.05%)
T-AOC/(U/mL)	4.07±0.73	4.41±0.43	4.52±0.11	5.48±0.32
SOD/(U/mL)	56.00±1.33 ^a	70.42±2.07 ^b	82.86±1.07 ^c	78.44±0.97 ^c

注：同行肩标字母不同表示差异显著($P<0.05$)

Notes: In the same row, different letter superscripts mean the significant differences ($P<0.05$)

蟹SOD活性较对照组而言，差异显著($P<0.05$)。而当饲料中L-色氨酸添加量超过0.73%时，中华绒螯蟹肝胰腺的SOD活性并无显著变化($P>0.05$)。

MT对肝胰腺T-AOC和SOD活性的影响

第1天和15天时，C、pM、nM及 μ M组蟹肝胰腺的T-AOC均以剂量依赖性的方式升高。此外， μ M组蟹的T-AOC均显著高于C、pM和nM组($P<0.05$)。因此，当MT注射剂量达到 10^{-9} mol/只时，对中华绒螯蟹肝胰腺的T-AOC有显著提升作用。而随着MT注射时间的延长，各组蟹除 μ M组外，其肝胰腺的T-AOC均呈下降趋势(图2)。

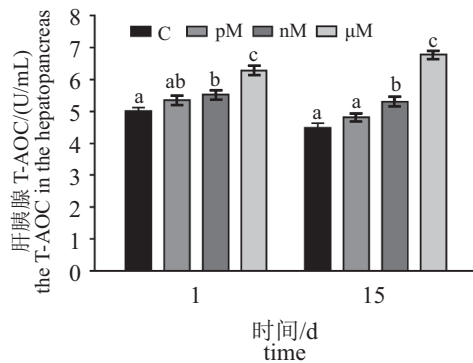


图 2 不同时间点各组中华绒螯蟹肝胰腺的T-AOC

图中标注的小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。下同

Fig. 2 The T-AOC in the hepatopancreas of *E. sinensis* in each group at the different time

The lowercase letters in the figures means the significant difference. The same below

第1天注射MT后，C、pM和nM组蟹肝胰腺的SOD活性无显著差异($P>0.05$)，而褪黑激素注射剂量最高组(μ M组)蟹肝胰腺的SOD活性达(39.07±2.78) U/mL，其值显著高于C和nM组($P<0.05$)。而在第15天时，4组蟹肝胰腺的SOD活性相比第1天均呈下降趋势，但各组间却没有显著性差异($P>0.05$) (图3)。

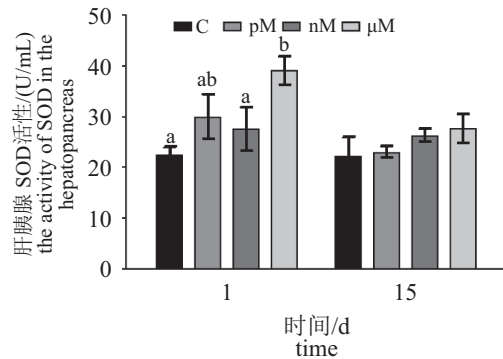


图 3 不同时间点各组中华绒螯蟹肝胰腺的SOD活性

Fig. 3 The activity of SOD in the hepatopancreas of *E. sinensis* in each group at the different time

3 讨论

3.1 L-色氨酸和MT对血糖水平的影响

氨基酸是生命活动的物质基础，是动物营养学研究的热点。色氨酸作为一种功能性氨基酸，被广泛应用于动物饲料。近年来研究发现，饲料中添加适量的色氨酸可提高水产动物的摄食、生长性能和免疫抗病力。如Tejpal等^[23]研究发现，在饲料中添加1.36%的色氨酸可促进麦瑞加拉鲮(*Cirrhinus mrigala*)的摄食。此外，研究证实，饲料中色氨酸的添加能够分别提高凡纳滨对虾的生长性能和血清中的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)活性^[24-25]。然而目前国内外就色氨酸在甲壳动物中的研究还主要集中在生长性能以及饲料中最佳添加量等方面，而对其血糖方面的研究还相对匮乏。

众所周知，甲壳动物的血糖水平主要由CHH调控。近年来，国内外学者在罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)^[26]、挪威海螯虾(*Nephrops norvegicus*)^[27]、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)^[28]、黄道蟹(*Cancer pagurus*)^[29]等甲壳动物中均证实了

CHH的存在。它作为一种多功能激素, 可以通过调控糖原合成酶、中肠淀粉酶以及磷酸化酶活性使血糖增加。MT作为一种公认的受光期调节的神经内分泌激素, 可以通过调节CHH和胰岛素来维持机体内血糖稳态。当血糖水平较高时, 胰岛素可以降低其含量, 低至一定值时, MT又能抑制胰岛 β 细胞分泌胰岛素, 并促进CHH的分泌, 以提高血糖水平。此外, Santos等^[30]研究认为CHH的浓度随昼夜节律而改变, 并分别受乳酸及葡萄糖的正负反馈调控, 这是否与MT的昼夜节律性相关还有待进一步证实。

本实验不同L-色氨酸添加量的饲料投喂中华绒螯蟹后, 其血糖水平无显著差异, 约为5 mmol/L。该值与王悦如等在研究急性高渗透胁迫对中华绒螯蟹的血糖影响时所测得的血糖值6 mmol/L相近^[31]。此外, Hoseini等^[32]研究发现, 在饲料中添加色氨酸投喂锦鲤(*Cyprinus carpio*)5 d和10 d后, 其血糖水平均无显著差异。马永萍等^[33]用不同色氨酸添加量的饲料投喂凡纳滨对虾56 d后, 其血糖水平也无显著差异。这些结果均表明, 饲料中添加色氨酸在较长的时间内(大于5 d)对血糖水平无影响。此外, 本研究发现MT对中华绒螯蟹的血糖水平仅在第1天时有明显的提升作用, 而对第15天和30天时的血糖水平无影响。这与Maciel等^[34]在给张口蟹注射MT 2 h后发现, 其血糖水平显著提高的研究结果相一致。而王悦如等^[31]也发现高盐度胁迫仅在短期内(24~48 h)对中华绒螯蟹的血糖水平有明显的调节作用。经L-色氨酸或MT处理30 d后, 本研究发现它们均未对中华绒螯蟹的血糖水平产生影响, 仅有注射MT在1 d时对中华绒螯蟹的血糖水平有促进作用。因此, 有关L-色氨酸是否在较短时间内影响血糖水平及其与MT的关系还需要进一步证实。

3.2 L-色氨酸和MT对肝胰腺抗氧化能力的影响

和其他高等动物一样, 甲壳动物在新陈代谢等活动中均会产生一定的自由基。而在受到包括物理、化学、生物和管理等方面的胁迫时, 机体产生和清除自由基的能力将会失衡。因此在长期的进化过程中, 生物体必然会产生一些物质来清除过度积累的自由基^[35-36]。T-AOC在体内被分成抗氧化酶系统和非酶促系统2个部分, 是反映机体抗氧化能力的综合性指标, 其主要作用是分解和清除机体代谢过程中

所产生的活性氧。SOD是生物体内一类重要的抗氧化酶, 它最先被自由基激活, 然后将其转化为氧气和过氧化氢。有研究表明, 色氨酸在机体抗氧化性能方面发挥着积极作用^[37-38]。魏宗友等^[39]研究证实, 与低色氨酸组相比, 中、高色氨酸组扬州鹅血清SOD活性和T-AOC显著提高。在欧斑鸠(*Streptopelia risoria*)上研究发现, 色氨酸可增强血清SOD活性^[40]。此外, 文海浪等^[41-42]在饲料中添加适量的色氨酸后提高了草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)肠道中的SOD活性和Cu-ZnSOD活性。而MT作为调控抗氧化防御系统的动态平衡分子之一, 可以调节多种抗氧化酶, 如SOD和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)等。此外, 它的降解产物AFMK、6-羟基色胺和代谢物N-乙酰基-5-甲氧基犬尿氨酸、3-羟基色胺等都是潜在的抗氧化剂。

本研究饲料中添加L-色氨酸能够显著提高中华绒螯蟹肝胰腺的SOD活性, 猜测可能是中华绒螯蟹摄食了色氨酸后, 在体内发生降解, 从而使机体的抗氧化能力提高。此外, 在研究MT对中华绒螯蟹肝胰腺抗氧化能力的影响时发现, 注射MT的第1天, 4组蟹肝胰腺的T-AOC和SOD活性均以剂量依赖性的方式升高。这表明MT在短时间内能够提高中华绒螯蟹的抗氧化能力。第15天时, 4组蟹的抗氧化能力均有所下降, 但 μM 组蟹的T-AOC仍显著高于其余3组, 而SOD活性却没有显著性差异。这与汞离子对中华绒螯蟹肝胰腺SOD活性的调控随时间的延长呈下降趋势的研究结果相似^[43]。本文推测可能是机体内活性氧自由基大量增加, 超过了蟹体的清除能力, 组织受到活性氧的攻击而受损, 影响了细胞合成SOD的能力。此外, Geihs等^[44]研究发现, MT可以提高河口蟹肌肉和鳃的抗氧化能力, 但氧化平衡只发生在一段时间内且具有剂量依赖性。

4 结论

饲喂0.73% L-色氨酸的饲料能够提高中华绒螯蟹的抗氧化能力, 但对血糖水平的影响不明显; 注射 10^{-6} mol/只MT可以在短时间内(1 d)提高中华绒螯蟹的血糖水平和抗氧化能力。

徐敏杰和张佳鑫为本文共同第一作者。

参考文献:

- [1] 李剑欣, 张绪梅, 徐琪寿. 色氨酸的生理生化作用及其应用[J]. 氨基酸和生物资源, 2005, 27(3): 58-62.
Li J X, Zhang X M, Xu Q S. Physiological and biochemical effects of tryptophan and its application[J]. Amino Acids and Biotic Resources, 2005, 27(3): 58-62(in Chinese).
- [2] Ciji A, Sahu N P, Pal A K, *et al.* Dietary L-tryptophan modulates growth and immuno-metabolic status of *Labeo rohita* juveniles exposed to nitrite[J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(8): 2013-2024.
- [3] Farhat, Khan M A. Dietary L-tryptophan requirement of fingerling stinging catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch)[J]. *Aquaculture Research*, 2014, 45(7): 1224-1235.
- [4] 胡耀辉, 王玉华, 于寒松, 等. L-色氨酸的应用及生产技术研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2008, 30(4): 586-589.
Hu Y H, Wang Y H, Yu H S, *et al.* Advance of L-tryptophan application and production technology[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2008, 30(4): 586-589(in Chinese).
- [5] Sainath S B, Swetha C H, Reddy P S. What do we (need to) know about the melatonin in crustaceans?[J]. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 2013, 319(7): 365-377.
- [6] Girish B P, Swetha C H, Reddy P S. Induction of ecdysteroidogenesis, methyl farnesoate synthesis and expression of ecdysteroid receptor and retinoid X receptor in the hepatopancreas and ovary of the giant mud crab, *Scylla serrata* by melatonin[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 217-218: 37-42.
- [7] Sainath S B, Reddy P S. Effect of selected biogenic amines on reproduction in the fresh water edible crab, *Oziotelphusa senex senex*[J]. *Aquaculture*, 2011, 313(1-4): 144-148.
- [8] Sainath S B, Reddy P S. Evidence for the involvement of selected biogenic amines (serotonin and melatonin) in the regulation of molting of the edible crab, *Oziotelphusa senex senex* Fabricius[J]. *Aquaculture*, 2010, 302(3-4): 261-264.
- [9] 李莉. 高血糖激素(CHH)在对虾渗透调节和血糖代谢中调控机制的初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011.
Li L. Study on Crustacean hyperglycemia hormone (CHH) modulates the osmoregulation and Glucose metabolism of *Litopenaeus vannamei*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011 (in Chinese).
- [10] 李文武, 欧阳艳红. 短期强化血糖控制对重症感染合并应激性高血糖患者免疫机能、炎症因子和预后的影响[J]. 免疫学杂志, 2017, 33(10): 896-899, 904.
Li W W, OuYang Y H. Immunological and prognostic effects of short-term intensive glucose control on severe infection complicated with stress hyperglycemia[J]. Immunological Journal, 2017, 33(10): 896-899, 904(in Chinese).
- [11] 王颀, 薛长勇, 张月红, 等. 不同氨基酸对小鼠血糖影响的研究[J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(11): 1158-1160, 1188.
Wang J, Xue C Y, Zhang Y H, *et al.* Effect of amino acids on blood glucose levels in mice[J]. Journal of Chinese PLA Postgraduate Medical School, 2011, 32(11): 1158-1160, 1188(in Chinese).
- [12] 谭芳芳. 在草鱼(*Ctenopharyngodon idellas*)饲料中补充微囊和晶体氨基酸的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2010.
Tan F F. The study on supplemental effects of microcapsule and crystalline amino acids in grass carp (*Ctenopharyngodon idellas*) feed[D]. Suzhou: Suzhou University, 2010.
- [13] 杨济芬, 朱冬发, 沈建明, 等. 甲壳动物高血糖激素家族生理功能研究进展[J]. 动物学杂志, 2009, 44(1): 151-158.
Yang J F, Zhu D F, Shen J M, *et al.* Physiological significance of crustacean hyperglycemic hormone family[J]. Chinese Journal of Zoology, 2009, 44(1): 151-158(in Chinese).
- [14] Sainath S B, Reddy P S. Melatonergic regulation of hemolymph sugar levels in the freshwater edible crab, *Oziotelphusa senex senex*[J]. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, 2010, 313A(4): 201-208.
- [15] Tilden A R, Rasmussen P, Awantang R M, *et al.* Melatonin cycle in the fiddler crab *Uca pugilator* and influence of melatonin on limb regeneration[J]. *Journal of Pineal Research*, 1997, 23(3): 142-147.
- [16] 裘金木, 孙育平, 曹俊明, 等. 低蛋白质饲料中添加色氨酸对凡纳滨对虾生长性能、体组成、血清免疫和抗氧化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(7):

- 2272-2281.
- Qiu J M, Sun Y P, Cao J M, *et al.* Effects of low protein diet supplemented with tryptophan on growth performance, body composition, immunity and antioxidant functions in serum of *Litopenaeus vannamei*[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27(7): 2272-2281(in Chinese).
- [17] Vargas M A, Geihs M A, Maciel F E, *et al.* The effects of UV radiation on the visual system of the crab *Neohelice granulata*: A protective role of melatonin[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2011, 154(4): 427-434.
- [18] Goc Z, Szaroma W, Kapusta E, *et al.* Protective effects of melatonin on the activity of SOD, CAT, GSH-Px and GSH content in organs of mice after administration of SNP[J]. Chinese Journal of Physiology, 2017, 60(1): 1-10.
- [19] Höglund E, Sørensen C, Bakke M J, *et al.* Attenuation of stress-induced anorexia in brown trout (*Salmo trutta*) by pre-treatment with dietary L-tryptophan[J]. British Journal of Nutrition, 2007, 97(4): 786-789.
- [20] Laranja J L Q Jr, Quintio E T, Catacutan M R, *et al.* Effects of dietary L-tryptophan on the agonistic behavior, growth and survival of juvenile mud crab *Scylla serrata*[J]. Aquaculture, 2010, 310(1-2): 84-90.
- [21] Harlioğlu M M, Harlioğlu A G, Yonar S M, *et al.* Effects of dietary l-tryptophan on the agonistic behavior, growth, and survival of freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* Eschscholtz[J]. Aquaculture International, 2014, 22(2): 733-748.
- [22] Wenzel F J. A simplified method for the determination of blood glucose[J]. American Journal of Medical Technology, 1962, 28: 117-118.
- [23] Tejpal C S, Pal A K, Sahu N P, *et al.* Dietary supplementation of l-tryptophan mitigates crowding stress and augments the growth in *Cirrhinus mrigala* fingerlings[J]. Aquaculture, 2009, 293(3-4): 272-277.
- [24] Sun Y P, Guan L Z, Xiong J H, *et al.* Effects of l-tryptophan-supplemented dietary on growth performance and 5-HT and GABA levels in juvenile *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture International, 2015, 23(1): 235-251.
- [25] 王用黎. 凡纳滨对虾幼虾对苏氨酸、亮氨酸、色氨酸和缬氨酸需要量的研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2013.
- Wang Y L. Study on the requirements of threonine, leucine, tryptophan and valine for juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2013 (in Chinese).
- [26] Ohira T, Tsutsui N, Nagasawa H, *et al.* Preparation of two recombinant crustacean hyperglycemic hormones from the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and their hyperglycemic activities[J]. Zoological Science, 2006, 23(4): 383-391.
- [27] Mettullo R, Giulianini P G, Ferrero E A, *et al.* Functional analysis of crustacean Hyperglycemic Hormone by in vivo assay with wild-type and mutant recombinant proteins[J]. Regulatory Peptides, 2004, 119(3): 189-197.
- [28] Escamilla-Chimal E G, Van Herp F, Fanjul-Moles M L. Daily variations in crustacean hyperglycaemic hormone and serotonin immunoreactivity during the development of crayfish[J]. The Journal of Experimental Biology, 2001, 204(Pt 6): 1073-1081.
- [29] Kleinholz L H. Purified hormones from the crustacean eyestalk and their physiological specificity[J]. Nature, 1975, 258(5532): 256-257.
- [30] Santos E A, Keller R. Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: A role of the Crustacean hyperglycemic hormone (CHH)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 1993, 106(2): 343-347.
- [31] 王悦如, 李二超, 陈立侨, 等. 急性高渗胁迫对中华绒螯蟹雄蟹组织中可溶性蛋白质、血蓝蛋白、血糖与肝糖原含量的影响[J]. 水生生物学报, 2012, 36(6): 1056-1062.
- Wang Y R, Li E C, Chen L Q, *et al.* Effect of acute salinity stress on soluble protein, hemocyanin, haemolymph glucose and hepatopancreas glycogen of *Eriocheir sinensis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(6): 1056-1062(in Chinese).
- [32] Hoseini S M, Hosseini S A. Effect of dietary L-tryptophan on osmotic stress tolerance in common carp, *Cyprinus carpio*, juveniles[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2010, 36(4): 1061-1067.
- [33] 马永萍. 色氨酸在二中蛋白水平饲料中对凡纳滨对虾摄食、生长和免疫的影响[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.

- Ma Y P. Effects of tryptophan in two protein levels diets on food intake, growth performance and immunity of *Litopenaeus vannamei*[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [34] Maciel F E, Ramos B P, Geihs M A, *et al.* Effects of melatonin in connection with the antioxidant defense system in the gills of the estuarine crab *Neohelice granulata*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(2): 229-236.
- [35] 姜令绪. 环境因子对甲壳动物免疫力和抗氧化酶活力的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- Jiang L X. Effects of environmental factors on the immune activity and antioxidant enzyme activity[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2004 (in Chinese).
- [36] 田文静. 饲料中添加硒和镁对中华绒螯蟹幼蟹生长、抗氧化性能的影响[D]. 上海: 华东师范大学, 2014.
- Tian W J. Effects of dietary supplementation of selenium and magnesium on growth and antioxidative capacity in juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[D]. Shanghai: East China Normal University, 2014 (in Chinese).
- [37] Koopmans S J, Guzik A C, van der Meulen J, *et al.* Effects of supplemental L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity, and behavior in weanling piglets[J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84(4): 963-971.
- [38] Guzik A C, Matthews J O, Kerr B J, *et al.* Dietary tryptophan effects on plasma and salivary cortisol and meat quality in pigs[J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84(8): 2251-2259.
- [39] 魏宗友. 色氨酸对鹅组织蛋白质代谢调控机制的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- Wei Z Y. Effect of dietary tryptophan levels on tissue protein metabolism and its manipulating mechanism in goslings[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2012 (in Chinese).
- [40] Terrón M P, Delgado J, Paredes S D, *et al.* Effect of melatonin and tryptophan on humoral immunity in young and old ringdoves (*Streptopelia risoria*)[J]. *Experimental Gerontology*, 2009, 44(10): 653-658.
- [41] 文海浪. 色氨酸对生长中期草鱼生长性能、肌肉品质和肠道健康的影响[D]. 成都: 四川农业大学, 2014.
- Wen H L. The effect of dietary tryptophan supplement on growth performance, flesh quality and intestinal health status of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [42] Wen H L, Feng L, Jiang W D, *et al.* Dietary tryptophan modulates intestinal immune response, barrier function, antioxidant status and gene expression of TOR and Nrf2 in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(1): 275-287.
- [43] 赵艳民, 王新华, 秦延文, 等. Hg²⁺对中华绒螯蟹肝胰腺抗氧化酶和脂质过氧化作用的影响[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2011, 44(5): 88-95.
- Zhao Y M, Wang X H, Qin Y W, *et al.* Effects of Hg²⁺ on hepatopancreatic antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Acta Scientiarum Naturallum Universitatis Nankaiensis*, 2011, 44(5): 88-95(in Chinese).
- [44] Geihs M A, Vargas M A, Maciel F E, *et al.* Effect of melatonin in the antioxidant defense system in the locomotor muscles of the estuarine crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Brachyura)[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 166(1): 72-82.

Effects of L-tryptophan and melatonin on the serum glucose level and antioxidant capacity in the hepatopancreas of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

XU Minjie, ZHANG Jiabin, HUANG Genyong,
ZHANG Cong, CHENG Yongxu, YANG Xiaozhen*

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture,
National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to investigate the effects of L-tryptophan and melatonin on the serum glucose level and antioxidant capacity in the hepatopancreas of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*), the female crabs with the average body weight of (16.58±2.20) g were randomly allocated into 8 groups (the processing experiments of L-tryptophan and melatonin had 4 groups respectively). Each experimental period was 30d. (1) The feeding experiment of L-tryptophan: crabs were fed with diet which added 4 levels of L-tryptophan, and the L-tryptophan percently for the diet were 0.36% (basal diet, namely control group), 0.47%, 0.73% and 1.05% (named diet 1, 2, 3 and 4, respectively). The serum glucose level and T-AOC and the capacity of SOD in the hepatopancreas were determined. (2) The injection experiment of melatonin: on the 1st and 15th days, crabs were injected with saline (control group namely C) and different doses of melatonin which were 10⁻⁶ mol/crab (μM), 10⁻⁹ mol/crab (nM) and 10⁻¹² mol/crab (pM). Then hemolymph and hepatopancreas were collected separately for the determination of the serum glucose level and T-AOC and the capacity of SOD in the hepatopancreas on the 1st and 15th days. In addition, we analyzed the serum glucose level on the 30th day. The results showed that different levels of L-tryptophan had no significant effect on serum glucose level, and its value was approximately (4.62±0.20) mmol/L. The diet which contained 0.73% L-tryptophan could significantly increase the capacity of SOD (82.86±1.07) U/mL. Injection of melatonin into crabs resulted in hyperglycemia in a dose-dependent manner on the 1st day. Among them, the serum glucose level of μM reached up to (7.56±0.36) mmol/L, which was significantly higher than other three groups. Moreover, the injection of MT played an important role in promoting the T-AOC and the capacity of SOD, but only effective on the 1st day. Compared with C, pM and nM, the T-AOC and the capacity of SOD of μM was higher than those significantly. In summary, 0.73% L-tryptophan can improve the antioxidant capacity of crabs, but the effects on the serum glucose level are not obvious. The injection of 10⁻⁶ mol/crab melatonin can improve the serum glucose level and antioxidant capacity of Chinese mitten crab for short time (1 d).

Key words: *Eriocheir sinensis*; L-tryptophan; melatonin; glucose level; antioxidant capacity

Corresponding author: YANG Xiaozhen. E-mail: xzyang@shou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31272677, 31472287); Shanghai Municipal Science and Technology Commission (16DZ2281200); Shanghai Ocean University Aquatic Animal Breeding Center (ZF1206); Key Extension Project (2015-1-7) from Shanghai Agriculture Committee