

文章编号: 1000-0615(2018)06-0854-09

DOI: 10.11964/jfc.20170810931

Cu²⁺对中间球海胆生长、免疫及性腺发育的影响

李敏¹, 吴反修², 吕德亮¹, 左然涛^{1*}, 常亚青¹

(1. 大连海洋大学农业部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁大连 116023;

2. 全国水产技术推广总站, 中国水产学会, 北京 100125)

摘要: 为探讨铜离子(Cu²⁺)对中间球海胆生长和性腺发育的影响及调控机制, 在室内水槽(200 L)中进行为期60 d的浸泡实验。实验设置测试组(0.02 mg/L Cu²⁺)和对照组(自然海水), 每个处理设置3个重复, 每个水槽养殖20只海胆(13.58±0.79) g。实验中期和末期分别测定海胆增重率(WGR)、性腺指数(GI)、抗氧化酶活性和主要卵黄蛋白基因(MYP)表达量。结果显示, 30 d时, 测试组的WGR和GI与对照组差异不显著, 而60 d时测试组的WGR和GI显著低于对照组; 60 d时, 测试组海胆体腔液中过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽巯基转移酶(GST)活性均显著低于30 d时的对应值, 而丙二醛(MDA)含量较30 d时有所升高; 60 d时, 测试组抗氧化能力总体高于对照组, 其中体腔液中CAT活性显著高于对照组。2次取样中, 测试组性腺中MYP基因的表达量均显著低于对照组, 而测试组消化道中MYP基因的表达量却显著高于对照组。60 d时, 测试组海胆体腔细胞中总蛋白含量显著高于对照组, 而体腔液上清液中总蛋白含量在测试组和对照组之间差异不显著。研究表明, 铜离子能够引起氧化应激, 降低海胆的增重率和性腺指数, 这可能是通过抑制性腺MYP表达量及阻碍MYP从消化道向性腺正常转运所致。

关键词: 中间球海胆; 增重率; 性腺指数; 抗氧化酶; 主要卵黄蛋白

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

铜离子是维持动物正常生命活动的一种必需微量元素^[1]。近年来, 随着工业废水的大量排放, 海水中铜离子浓度不断增加^[2-4]。铜离子过量会影响水产动物的生长、免疫力和抗病力, 甚至造成动物大面积死亡^[5-8]。但是, 有关重金属离子影响水产动物性腺发育和繁殖性能的研究较少。唐建勋等^[9]对黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)研究发现, 用铅离子(0.10 mg/L)和铜离子(0.25 mg/L)进行联合攻毒10 d时, 各个发育阶段的卵细胞出现受损, 卵巢正常发育受阻, 在染毒20 d时, 部分卵细胞出现卵膜脱落和萎缩, 组织学损伤明显。黎东^[10]对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的研究发现, 低浓度(0.1 mg/L)的铜离子会使卵巢组织中的卵母细胞发生轻度萎缩, 而高浓度(1.0 mg/L)的铜离子会导致卵巢

组织中的细胞破裂。

但是, 有关重金属影响动物性腺发育的机制尚不完全清楚。已有研究表明, 过量的重金属铜会导致养殖动物体内积累大量活性氧自由基, 引起氧化应激, 损伤组织细胞, 从而造成动物免疫力下降和生长发育迟缓^[11-13]。王群等^[14]发现饲料中添加维生素C可以提高雄性中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)精巢和副性腺中抗氧化酶的活性, 对生殖腺和生殖细胞进行抗氧化保护。邓旭旭^[15]研究发现长时间的苯并芘胁迫会造成栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)卵巢和精巢中DNA单链断裂、蛋白质羰基化和丙二醛(MDA)含量的上升。对雄性大鼠(*Rattus norvegicus*)的研究表明, 酒精经过氧化代谢产生的自由基会损害精细胞^[16-17]。在对海胆的研究中发现, 镉污染造成的脂质过

收稿日期: 2017-08-19 修回日期: 2018-03-07

资助项目: 国家自然科学基金(41606180); 中国科协“青年人才托举工程”(YESS20150157)

通信作者: 左然涛, E-mail: rtzuo@dlou.edu.cn

氧化会阻碍海胆生殖细胞的发生,降低生殖细胞质量^[18]。性腺发育的关键是卵黄发生,而卵黄发生的关键是卵黄蛋白的合成与转运^[19]。因此,重金属可能通过影响卵黄蛋白的合成与转运来调控动物性腺发育。

中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)又称虾夷马粪海胆,因其性腺色泽好、味道鲜美,深受消费者喜爱,是价值最高的海胆经济种类之一^[20]。中间球海胆于1989年由日本引入并开展人工养殖,现已成为我国主要海胆养殖品种之一^[21]。海胆唯一的可食用部分是性腺,因此性腺品质的优劣决定了海胆的市场价值^[22]。海胆精巢和卵巢均含有丰富的主要卵黄蛋白(major yolk protein, MYP)^[23-24]。MYP是由海胆消化管道和性腺合成的,消化道合成的MYP经体腔液中营养吞噬细胞运输至卵黄小体贮存^[23, 25-26]。

因此,本实验以中间球海胆为对象,探讨水体中铜离子对中间球海胆生长、性腺发育、抗氧化酶活性、MYP表达量及其在体腔液上清液和体腔细胞中分布的影响,以期阐明重金属影响动物正常性腺发育的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验对象为同一批人工养殖的1龄中间球海胆,体质量为(13.58±0.79)g,取自大连龙王塘养殖场。实验前在水槽(1 000 L)中暂养7 d,期间每天投喂足量的新鲜海带,每3天换水、吸底1次。

实验设置对照组和测试组,对照组为自然海水(铜离子含量为0~0.32 μg/L),测试组为铜离子处理组。CuSO₄·5H₂O(分析纯)购自天津市天力化学试剂有限公司,实验前用双蒸水配置成10 g/L贮备液备用。通过向自然海水中添加CuSO₄贮备液,使得海水中铜离子浓度为0.02 mg/L。已有的相关研究^[1, 7, 27]和预实验的结果表明,铜离子浓度为0.02 mg/L浸泡时对1龄海胆的抗氧化能力影响最明显,能够使海胆处于慢性胁迫状态。根据本实验的要求,测试组只选用了慢性氧化应激时的铜离子浓度,并未设置其他铜离子浓度梯度。

实验随机选取健康无外伤的中间球海胆120只进行随机分组,每组3个平行,每个水槽养殖20只海胆。实验期间每3天全量换水1次,每天添

加适量蒸馏水以保证测试组水体中铜离子浓度恒定在0.02 mg/L,投喂足量海带以确保海胆观饱食。实验期间,水温9~12 °C,氨氮0.009~0.013 mg/L,溶解氧在6 mg/L以上,盐度28~30。

1.2 实验方法

样品制备 实验时间从2017年3月1日至2017年4月29日,共60 d。每30 d取样1次,共2次。实验分为对照组和测试组,每组3个平行,每次取样时每个平行全部海胆都称重,另外每次从每个平行随机取6只海胆,按照张伟杰等^[28]的方法测量性腺重。取性腺和消化道用液氮冷冻并放入-80 °C保存^[28]。收集海胆体腔液,离心(4 °C, 3 000 r/min)10 min,分离体腔液上清液和体腔细胞,保存于-80 °C待测^[18]。

抗氧化能力和总蛋白测定 抗氧化能力的测定采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定,测试步骤详见说明书。采用黄嘌呤氧化酶法(羟胺法)测定总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)活性;采用可见分光光度计测定过氧化氢酶(catalase, CAT)活性;采用比色法测定谷胱甘肽巯基转移酶(glutathione S-transferase, GST)活性;采用TBA显色法测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。

采用考马斯亮蓝法分别测定体腔液离心后的上清液和体腔细胞中总蛋白的含量,标准蛋白浓度为0.563 mg prot/mL。测定步骤参照南京建成生物工程研究所的试剂盒说明书进行。

MYP基因表达量的测定 RNA的提取:用RNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取对照组和测试组的消化道和性腺的总RNA。用RNase-Free DNase I除去污染的DNA,用紫外分光光度计检测其纯度和浓度,并使用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。引物的筛选:中间球海胆MYP定量PCR引物设计参照周遵春等^[29]。引物序列为F: 5'-ACCATATGGACTGACGT-3', R: 5'-GGGTTCTACCTCGGAGTTGAC-3', 预计扩增片段长度224 bp; 18S rRNA片段的引物序列为F: 5'-GTTCGAAGGCGATCAGATAC-3', R: 5'-CTGTCAATCCTCACTGTGTC-3', 预计扩增片段长度251 bp。

通过聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)对引物进行验证,反应按照TksGflex™ DNA Polymerase试剂盒(TaKaRa)的步骤在Eppen-

dorf Mastercycler gradient型PCR仪上进行。PCR反应条件：94 °C 5 min；94 °C 30 s，51 °C 30 s (18S基因和MYP基因的退火温度均为51 °C)，72 °C 30 s，共进行35个循环；72 °C延伸10 min。

用胶回收试剂盒(EasyPure® Quick Gel Extraction Kit, 北京全式金生物技术有限公司)对PCR产物进行回收，按照pEASY®-T1 Cloning Kit试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)的步骤对胶回收产物进行连接转化，用2×EasyTap PCR Super-Mix (+ dye)和M13引物对连接转化得到的菌液进行验证，送至华大基因进行测序，对测序结果进行比对，确定为18S和MYP基因。

反转录：反转录按照PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa)的步骤，在Eppendorf Mastercycler gradient型PCR仪上进行。反转录反应体系：5× PrimeScript RT Master Mix 2 μL；Total RNA 500 ng；RNase Free dH₂O补齐(总反应体系20μL)。反应条件：37 °C 15 min (反转录反应)，85 °C 5 s (反转录酶的失活反应)。

Real-time RT-PCR：采用优化好的条件以反转录产物为模板，使用ABI7500型荧光定量PCR仪。根据SYBR® Fast qPCR Mix试剂盒(TaKaRa)，对反应体系略加调整。反应体系：SYBR Fast qPCR Mix (2×)10 μL；正向引物 0.8 μL，反向引物0.8 μL；ROX Reference Dye II 0.4 μL；模板cDNA 2 μL；ddH₂O 6 μL (总反应体系 20 μL)。反应条件：采用两步法，95 °C 10 s；95 °C 5 s，51 °C 32 s，40个循环。Real-time RT-PCR计算方法：采用2^{-ΔΔC_t}法分析MYP基因相对表达量。反应的融解曲线表明，18S rRNA在 86.5 °C、MYP基因在 83.7 °C处分别形成单一的特异峰，说明没有引物二聚体及非特异性扩增产物出现，无论哪一种浓度的模板都能够得到单一的PCR扩增产物。通过3倍梯度稀释得到5个不同浓度的cDNA模板，以每个浓度cDNA为模板通过荧光定量PCR得出每对引物对每个浓度cDNA的Ct值，以Ct值为纵坐标，lg(模板拷贝数)为横坐标，根据拟合直线的斜率和E=10^(-1/Slope)-1，得出MYP的扩增效率(E)。MYP和18S的扩增效率分别为1.050和1.036，ΔCt (MYP-18S)绝对值为0.031 3，约等于0。表明目的基因和内参基因的扩增效率一致，可以通过2^{-ΔΔC_t}法进行相对定量，满足实验要求^[29]。

计算及数据处理 生长指标包括增重率和性腺指数，计算方法：

$$\text{增重率}(WGR, \%) = (W_f - W_i) / W_i \times 100$$

$$\text{性腺指数}(GI, \%) = W_x / W_f \times 100$$

W_f为每一阶段的海胆体质量，W_i为初始体质量；W_x为每一阶段海胆的性腺重量。

实验数据采用SPSS 21.0软件中的独立样本t检验比较对照组与处理组或不同取样时间之间的均值差异，当P<0.05认为差异显著。数据以平均值±标准差(mean ± SD, n=3)表示。

2 结果

2.1 生长指标和性腺发育指标

30 d时，对照组和测试组的WGR和GI均无显著差异(P>0.05)。60 d时，对照组的WGR (37.4%)显著高于测试组(21.1%)(P<0.05)；对照组的GI (13.8%)显著高于测试组(11.9%)(P<0.05)(表1)。

60 d时，对照组的WGR为37.4%，显著高于30 d时的WGR (21.1%)(P<0.05)，而此时测试组WGR仅为21.1%，略高于30 d时的对应值(20.3%)(P>0.05)。60 d时，对照组和测试组的GI分别为13.8%和11.9%，均显著高于30 d时的对应值(P<0.05)(表1)。

表1 Cu²⁺对中间球海胆增重率(WGR)及性腺指数(GI)的影响

Tab. 1 Effects of Cu²⁺ on weight gain rate (WGR) and gonadosomatic index (GI) of *S. intermedius* %

实验组别 experimental group	指标 index	
	增重率 WGR	性腺指数 GI
对照组(30 d) control group	21.1±3.0 ^A	9.0±1.3 ^A
测试组(30 d) test group	20.3±1.0	9.1±0.7 ^A
对照组(60 d) control group	37.4±4.0 ^{ab}	13.8±0.6 ^{ab}
测试组(60 d) test group	21.1±3.0 ^b	11.9±0.5 ^{bb}

注：不同小写字母表示同一次取样中测试组与对照组之间差异显著(P<0.05)，不同大写字母表示两次取样中同一处理组之间差异显著(P<0.05)，下同

Notes: the different lowercase letters indicate the significant difference between the test group and the control group in the same sampling (P<0.05). The different capital letters indicate the significant difference in the same treatment group between the two samplings (P<0.05), the same below

2.2 体腔液抗氧化能力

30 d时，对照组和测试组T-SOD、CAT和

GST的活性和MDA的含量均无显著差异($P>0.05$)。60 d时,测试组T-SOD和GST的活性低于对照组($P>0.05$),测试组CAT活性(0.16 U/mL)显著低于对照组(0.30 U/mL)($P<0.05$),而测试组MDA的含量较对照组有升高的趋势,但差异不显著($P>0.05$)(表2)。

表2 Cu²⁺对中间球海胆体腔液中抗氧化酶活性和MDA的影响

Tab. 2 Effects of Cu²⁺ on antioxidant enzyme activity and malondialdehyde in coelomic fluid of *S. intermedius*

实验组别 experimental group	抗氧化能力 antioxidant capacity			
	T-SOD/(U/mL)	CAT/(U/mL)	GST/(U/mL)	MDA/(μ mol/L)
对照组(30 d) control group	43.52 \pm 1.47	0.50 \pm 0.05 ^A	9.20 \pm 0.41 ^A	0.90 \pm 0.17
测试组(30 d) test group	44.24 \pm 1.29	0.48 \pm 0.03 ^A	10.34 \pm 0.34 ^A	1.29 \pm 0.33
对照组(60 d) control group	43.95 \pm 1.29	0.30 \pm 0.02 ^{ab}	6.90 \pm 0.34 ^B	1.14 \pm 0.13
测试组(60 d) test group	41.04 \pm 3.82	0.16 \pm 0.02 ^{bb}	5.63 \pm 0.57 ^B	1.57 \pm 0.22

2.3 MYP基因表达量

在2次取样中,测试组消化道中MYP基因的表达量均显著高于对照组($P<0.05$)。30 d时,测试组消化道中MYP基因的表达量较对照组高1.96倍;60 d时,测试组消化道中MYP基因的表达量较对照组高9.86倍(图1-a)。对照组消化道中MYP基因的表达量在2次取样前后无显著变化($P>0.05$)。而对测试组而言,60 d时消化道中MYP基因的表达量较30 d时高0.78倍($P<0.05$)(图1-b)。

在2次取样中,测试组性腺中MYP基因的表达

对照组和测试组T-SOD的活性和MDA的含量在2次取样前后无显著变化($P>0.05$)。60 d时,对照组和测试组CAT的活性分别为0.30和0.16 U/mL,均显著低于30 d的对应值($P<0.05$),对照组和测试组的GST活性分别为6.90和5.63 U/mL,均显著低于30 d时的对应值($P<0.05$)(表2)。

达量均显著低于对照组($P<0.05$)。30 d时,测试组性腺中MYP基因的表达量较对照组低93.7%。60 d时,测试组性腺中MYP基因的表达量较对照组低79.3%(图2-a)。测试组性腺中MYP基因的表达量在2次取样前后无显著变化($P>0.05$)。而60 d时对照组性腺中MYP基因的表达量较30 d低57.4%($P<0.05$)(图2-b)。

2.4 体腔液中总蛋白含量

60 d时,测试组与对照组体腔液上清液中含

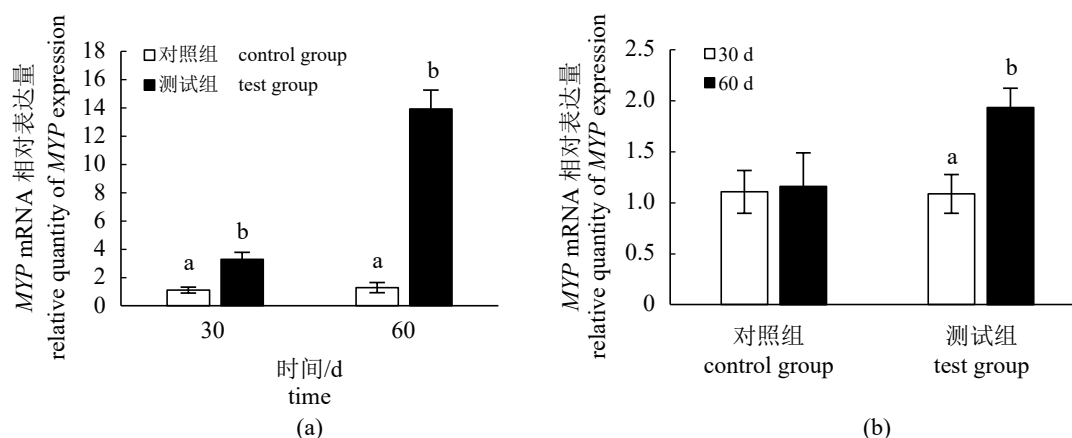


图1 Cu²⁺对中间球海胆消化道中MYP相对表达量的影响(以18S rRNA为参照)

不同字母表示测试组和对照组或者同一处理组不同取样时间彼此间差异显著($P<0.05$),下同

Fig. 1 Relative expression of MYP in the digestive tract of *S. intermedius* in response to Cu²⁺ (standardized to 18S rRNA)

The different lowercase letters indicate the significant difference in the test group and the control group during the same sampling or in the same treatment group between the two samplings ($P<0.05$), the same below

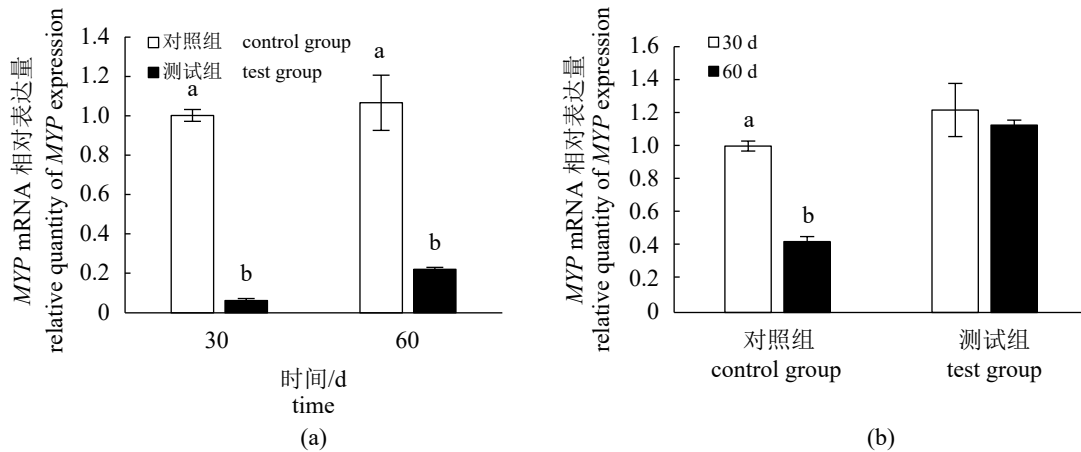


图2 Cu^{2+} 对中间球海胆性腺中MYP相对表达量的影响(以18S rRNA为参照)

Fig. 2 Relative expression of MYP in the gonads of *S. intermedius* in response to Cu^{2+} (standardized to 18S rRNA)

有的总蛋白含量一致,均为0.273 mg prot/mL。但测试组体腔细胞中总蛋白含量为0.257 mg prot/mL,显著高于对照组(0.036 mg prot/mL)($P<0.05$)(图3)。

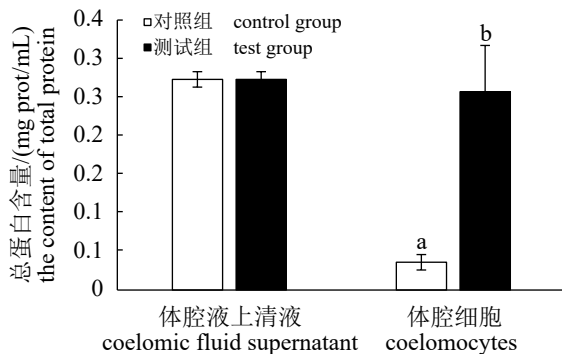


图3 Cu^{2+} 对中间球海胆体腔液中总蛋白含量的影响

Fig. 3 The total protein content in the coelomic fluid of *S. intermedius* in response to Cu^{2+}

3 讨论

氧自由基的产生与水产动物的健康状况有十分密切的联系^[30]。60 d时,测试组的增重率显著低于对照组,这可能是由于铜离子引起氧化应激导致DNA、蛋白质和脂质的氧化损伤^[20],从而影响正常生长所致。这与曹亮^[31]在褐牙鲷(*Paralichthys olivaceus*)仔鱼中的研究结果一致。

与生长结果类似,本研究发现铜离子会抑制海胆性腺发育速率。有研究表明,氧化应激会对性腺的DNA、蛋白质造成损伤,损害生殖细胞^[15-17],进而抑制性腺发育。在本研究中,与30 d相比,60 d时测试组的性腺指数明显增加,

而增重率只是略有升高。一方面,在铜离子胁迫过程中,海胆需要消耗大量能量来缓解由铜离子引起的氧化应激对机体造成的危害,从而降低了用于生长的能量,致使海胆生长延缓;另一方面,实验期间海胆正处于性腺快速发育时期,大部分能量被用于性腺发育也是导致海胆生长缓慢的一个重要原因。

SOD、CAT和GST是动物体内重要的抗氧化酶。SOD可以降低组织中超氧阴离子的含量,其活性能够反映氧自由基的代谢情况^[32-33]。CAT能清除体内浓度过高的过氧化氢,从而使细胞免受过氧化氢的毒害^[34]。GST是一种以还原性谷胱甘肽作为底物而发挥抗氧化作用的GSH依赖性抗氧化酶^[35]。MDA是脂质过氧化作用的最终产物,其含量的高低能够直接反映脂质过氧化的程度,也反映出机体被自由基损伤的程度^[36]。本实验中,60 d时,测试组和对照组海胆体腔液中CAT和GST活性均显著低于30 d,而MDA含量60 d较30 d时均有所升高。对虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)的研究表明,升温会降低抗氧化酶的活性^[37]。因此,养殖水温的升高很可能是导致第2次取样(60 d)抗氧化能力总体高于第1次(30 d)的一个原因。此外,对于测试组而言,随着时间的延长,铜离子在海胆体内累积量也随之增加,铜离子诱导产生的超氧阴离子会消耗体内大量的抗氧化酶,致使铜处理后的海胆抗氧化能力相对较差,这可能是导致2次取样,抗氧化酶活性与海胆体内过氧化水平不一致的另一个原因。

性腺发育的关键是卵黄发生^[38], 卵黄发生的关键是卵黄蛋白的合成和转运。海胆体腔液中存在大量MYP, MYP主要是由消化道和性腺合成的, 在性腺发育时, 消化道合成的MYP需要通过营养吞噬细胞转运至性腺组织, 用于性腺发育和配子发生^[23-25]。2次取样中, 测试组性腺指数和MYP基因的表达量均显著低于对照组。这说明氧化应激对性腺中MYP基因的表达有明显的抑制作用, 从而抑制了海胆性腺发育, 这与邓旭旭^[15]、Cicero等^[16]和Little等^[17]的研究结果一致。但本实验同时发现, 2次取样, 测试组消化道中MYP基因的表达量都显著高于对照组, 这与性腺中的结果不一致。以往研究表明, MYP表面富含脂类, 容易被氧化, 氧化后的MYP被吞噬后会诱导营养吞噬细胞膜发生脂质过氧化, 进而影响其正常的转运功能^[19]。由此推测, 氧化后的MYP和(或)营养吞噬细胞都不能使得消化道合成的MYP正常转运并累积于性腺组织中, 这可能是导致铜离子处理组海胆性腺指数降低的主要原因。本实验中, 测试组体腔液中体腔细胞所含有的总蛋白含量明显高于对照组, 而体腔液上清液中总蛋白含量基本相同, 这说明测试组中由消化道合成的大量MYP极有可能未被运输到性腺中, 而是积累在体腔细胞中, 这也可以证明上述猜测。本研究结果表明, 在性腺与消化道之间可能存在与MYP基因表达相关的反馈调节机制, 当性腺中MYP的表达量受到抑制, 消化道中MYP的表达量会上升。但本实验并未对体腔液中MYP的含量及氧化还原状态进行测定, 后续实验需要对此进行阐明。

4 结论

铜离子能够引起氧化应激, 而氧化应激能降低海胆的增重率和性腺发育速率, 这可能是通过降低性腺MYP基因的表达或阻碍MYP从肠道向性腺正常转运所致。

参考文献:

- [1] 李君丰, 张从尧, 王华, 等. 仿刺参幼参对Cu²⁺的蓄积及Cu²⁺慢性胁迫对其生长的影响[J]. 海洋环境科学, 2011, 30(5): 609-613.
Li J F, Zhang C R, Wang H, et al. Accumulation of Cu²⁺ in the body and the effect of chronic stress on the growth of juvenile *Apostichopus japonicus*[J]. Marine Environmental Science, 2011, 30(5): 609-613(in Chinese).
- [2] 江天久, 牛涛. 重金属Cu²⁺, Pb²⁺和Zn²⁺胁迫对近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*) SOD活性影响研究[J]. 生态环境, 2006, 15(2): 289-294.
Jiang T J, Niu T. Effects of heavy metals on superoxide dismutase (SOD) of *Crassostrea rivularis*[J]. Ecology and Environment, 2006, 15(2): 289-294(in Chinese).
- [3] Fang Z Q, Cheung R Y H, Wong M H. Heavy metals in oysters, mussels and clams collected from coastal sites along the Pearl River Delta, South China[J]. Journal of Environmental Sciences, 2003, 15(1): 9-24.
- [4] van Der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2003, 13(2): 57-149.
- [5] 王丽, 韩艳楠, 金珊, 等. 水体Cu²⁺对三疣梭子蟹主要组织ROS含量和抗氧化能力的影响[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(7): 1261-1268.
Wang L, Han Y N, Jin S, et al. Effects of aqueous copper on reactive oxygen species content and anti-oxidation capacity of major tissues in *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2015, 34(7): 1261-1268(in Chinese).
- [6] 程波, 刘鹰, 杨红生. Cu²⁺在凡纳滨对虾组织中的积累及其对蜕皮率、死亡率的影响[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(5): 2091-2095.
Cheng B, Liu Y, Yang H S. Copper accumulation in tissues and its effects on the rate of Molting and Mortality in *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2008, 27(5): 2091-2095(in Chinese).
- [7] 丁文君, 丁君, 孟凌峰. Cu(II)对海胆免疫相关酶活性的影响及其在壳中蓄积量的研究[J]. 大连海洋大学学报, 2015, 30(2): 165-169.
Ding W J, Ding J, Meng L F. Bioaccumulation and effect of Cu(II) on serum immune-related enzyme activities in sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2015, 30(2): 165-169(in Chinese).
- [8] 丛宁. 铜对金鱼毒性影响的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
Cong N. Studies on the toxicity and effect of copper used in goldfish[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2005(in Chinese).
- [9] 唐建勋, 唐奕扬, 程樟顺, 等. Pb²⁺、Cu²⁺在黄颡鱼性腺

- 中的富集及其对性腺发育的胁迫[J]. 水资源保护, 2012, 28(4): 61-63, 77.
- Tang J X, Tang Y Y, Cheng Z S, *et al.* Accumulation of heavy metals Pb^{2+} and Cu^{2+} in ovary of *Pelteobagrus fulvidraco* and effects on ovum development[J]. Water Resources Protection, 2012, 28(4): 61-63, 77(in Chinese).
- [10] 黎东. Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对罗氏沼虾生长以及卵巢发育的影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2013.
- Li D. Effects of growth and ovarian development on *Macrobrachium rosenbergii* by Cu^{2+} and Zn^{2+} [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2013(in Chinese).
- [11] 张娟, 魏克强, 赵婷. Cu^{2+} 胁迫对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)酚氧化酶原激活系统活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(5): 865-870.
- Zhang J, Wei K Q, Zhao T. Effect of Cu^{2+} stress on activity of prophenoloxidase activating system in *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2016, 35(5): 865-870(in Chinese).
- [12] De Boeck G, Meeus W, De Coen W, *et al.* Tissue-specific Cu bioaccumulation patterns and differences in sensitivity to waterborne Cu in three freshwater fish: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), common carp (*Cyprinus carpio*), and gibel carp (*Carassius auratus gibelio*)[J]. Aquatic Toxicology, 2004, 70(3): 179-188.
- [13] 亢玉静, 郎明远, 赵文. 水生生物体内抗氧化酶及其影响因素研究进展[J]. 微生物学杂志, 2013, 33(3): 75-80.
- Kang Y J, Lang M Y, Zhao W. Advance in antioxidant enzymes and its effect factors in aquatic organisms[J]. Journal of Microbiology, 2013, 33(3): 75-80(in Chinese).
- [14] 王群, 丁银娣, 赵云龙, 等. 维生素C对中华绒螯蟹雄性生殖的影响[J]. 动物学杂志, 2004, 39(2): 1-5.
- Wang Q, Ding Y D, Zhao Y L, *et al.* Influence of dietary vitamin C on reproduction of male Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Chinese Journal of Zoology, 2004, 39(2): 1-5(in Chinese).
- [15] 邓旭旭. 苯并[a]芘对栉孔扇贝生殖毒性机制的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- Deng X X. Study on mechanism for reproductive toxicity of Benzo[a]Pyrene on scallop *Chlamys farreri*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015(in Chinese).
- [16] Cicero T J, Nock B, O'Connor L, *et al.* Acute alcohol exposure markedly influences male fertility and fetal outcome in the male rat[J]. Life Sciences, 1994, 55(12): 901-910.
- [17] Little P J, Adams M L, Cicero T J. Effects of alcohol on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the developing male rat[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1992, 263(3): 1056-1061.
- [18] 王秋实, 李霞, 李丽萍. 镉对中间球海胆性腺脂质过氧化物的影响[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(4): 270-272.
- Wang Q S, Li X, Li L P. The effect of cadmium on lipid peroxidation in gonad of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2007, 22(4): 270-272(in Chinese).
- [19] Brooks J M, Wessel G M. Selective transport and packaging of the major yolk protein in the sea urchin[J]. Developmental Biology, 2003, 261(2): 353-370.
- [20] 王子臣, 常亚青. 经济类海胆增殖养殖研究进展及前景[J]. 海洋科学, 1997, 21(6): 20-22.
- Wang Z C, Chang Y Q. Reseach prospects for marine culture of economic sea urchin[J]. Marine science, 1997, 21(6): 20-22(in Chinese).
- [21] 周海森, 常亚青, 罗世滨, 等. 3种饵料模式对中间球海胆生长、性腺产量和性腺品质的影响[J]. 水产学报, 2013, 37(7): 1050-1057.
- Zhou H S, Chang Y Q, Luo S B, *et al.* Effects of three feeding models on growth, gonad yield and gonad quality of the sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(7): 1050-1057(in Chinese).
- [22] Zhao C, Sun P, Zhou H, *et al.* Heritability and phenotypic correlations of gonad sweetness in the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*[J]. Aquaculture International, 2014, 22(6): 1737-1742.
- [23] Shyu A B, Raff R A, Blumenthal T. Expression of the vitellogenin gene in female and male sea urchin[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(11): 3865-3869.
- [24] Gm B J W. Selective transport and packaging of the major yolk protein in the sea urchin[J]. Developmental Biology, 2003, 261(2): 353-70.
- [25] Unuma T, Okamoto H, Konishi K, *et al.* Cloning of cDNA encoding vitellogenin and its expression in red sea urchin, *Pseudocentrotus depressus*[J]. Zoological Science, 2001, 18(4): 559-565.
- [26] Shyu A B, Blumenthal T, Raff R A. A single gene en-

- coding vitellogenin in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*: Sequence at the 5' end[J]. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15(24): 10405-10417.
- [27] 吴益春, 吕昕, 王凡, 等. Cu在扇贝组织中的蓄积及其对酶活性的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2005, 11(5): 559-562.
Wu Y C, Lü X, Wang F, *et al.* Accumulation of copper in *Chlamys farreri* tissues and its effect on catalase activity[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2005, 11(5): 559-562(in Chinese).
- [28] 张伟杰, 常亚青, 赵冲, 等. 虾夷马粪海胆表型性状对性腺性状的影响效果分析[J]. *渔业科学进展*, 2010, 31(3): 49-55.
Zhang W J, Chang Y Q, Zhao C, *et al.* Effects of phenotypic traits on gonad traits in sea urchins *Strongylocentrotus intermedius*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(3): 49-55(in Chinese).
- [29] 周遵春, 包振民, 董颖, 等. MYP基因在中间球海胆及杂交海胆生殖腺不同发育时期的转录表达差异[J]. *遗传*, 2008, 30(11): 1453-1458.
Zhou Z C, Bao Z M, Dong Y, *et al.* MYP gene expressions at transcription level in different stages of gonad of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* and hybrids[J]. *Hereditas*, 2008, 30(11): 1453-1458(in Chinese).
- [30] Winston G W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 1991, 100(1-2): 173-176.
- [31] 曹亮. 铜、镉对褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)早期发育阶段的毒理效应研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2010.
Cao L. Toxic effects of cadmium and copper to early life stages of flounder (*Paralichthys olivaceus*)[D]. Qingdao: Graduate School of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2010(in Chinese).
- [32] 张欣. 超氧化物歧化酶(SOD)及其研究进展[J]. *内蒙古石油化工*, 2010, 36(16): 14-15.
Zhang X. Research advances on superoxide dismutase(SOD)[J]. *Inner Mongolia Petrochemical*, 2010, 36(16): 14-15(in Chinese).
- [33] Li Z H, Xie S, Wang J X, *et al.* Effect of intermittent starvation on growth and some antioxidant indexes of *Macrobrachium nipponense* (De Haan)[J]. *Aquaculture Research*, 2009, 40(5): 526-532.
- [34] David M, Munaswamy V, Halappa R, *et al.* Impact of sodium cyanide on catalase activity in the freshwater exotic carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus)[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2008, 92(1): 15-18.
- [35] 姚煜, 梁旭方, 王琳, 等. 3种不同食性淡水鱼类谷胱甘肽S-转移酶Pi、Mu、Theta型cDNA序列的克隆分析及表达[J]. *生态科学*, 2010, 29(4): 324-331.
Yao Y, Liang X F, Wang L, *et al.* Cloning, sequence analysis and expression of Pi、Mu and Them classes of glutathione S-transferases genes in three freshwater fishes[J]. *Ecological Science*, 2010, 29(4): 324-331(in Chinese).
- [36] 张喆, 马胜伟, 王贺威, 等. 十溴联苯醚(BDE-209)对菲律宾蛤仔外套膜抗氧化酶活性的影响[J]. *生态学杂志*, 2013, 32(1): 122-128.
Zhang Z, Ma S W, Wang H W, *et al.* Effects of decabromodiphenyl ether (BDE-209) on the antioxidant enzyme activities of *Lutjanus argentimaculatus* mantle membrane[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32(1): 122-128(in Chinese).
- [37] 贲月, 郝振林, 丁君, 等. 高温对虾夷扇贝体腔液免疫酶活力的影响[J]. *水产学报*, 2013, 37(6): 858-863.
Ben Y, Hao Z L, Ding J, *et al.* Effects of high temperature on the immuno-enzymetic activity in coelomic fluid of *Mizuhopecten yessoensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(6): 858-863(in Chinese).
- [38] 耿慧君, 周遵春, 董颖, 等. 海胆主要卵黄蛋白研究进展[J]. *生物技术通报*, 2009(3): 29-32.
Geng H J, Zhou Z C, Dong Y, *et al.* Research of major yolk protein of sea urchin[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2009(3): 29-32(in Chinese).

Effects of Cu²⁺ on growth, immunity and gonad development of *Strongylocentrotus intermedius*

LI Min¹, WU Fanxiu², LÜ Deliang¹, ZUO Rantao^{1*}, CHANG Yaqing¹

(1. Key Laboratory of Mariculture and Stock Enhancement in North China's Sea,
Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. The National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries, Beijing 100125, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the effects of Cu²⁺ on the weight gain rate (WGR), gonadosomatic index (GI), antioxidant enzyme activities and transcription of major yolk protein gene (*MYP*) in *Strongylocentrotus intermedius*. All experimental sea urchins were randomly divided into six tanks (200 L), and each tank was stocked with 20 individuals. Then, the test group was added CuSO₄·5H₂O to a final concentration of 0.02 mg/L Cu²⁺ with natural sea water as the control group. The experiment lasted for 60 days. Results showed that WGR and GI were significantly lower in the test group than those in the control group at 60 days. The activities of CAT and GST in the coelomic fluid of sea urchins in the test group were significantly lower at day 60 than those at day 30, and the activity of CAT was lower in the test group than that in the control group. The *MYP* transcription was significantly lower in the gonads of the test group than that in the control group, but the expression of *MYP* was significantly higher in the digestive tract of the test group than that in the control group. The total protein content was significantly higher in the coelomocytes of the test group than that in the control group. Results above showed that the WGR, GI and antioxidant enzyme activities of sea urchins could be reduced by Cu²⁺. This may be caused by inhibiting *MYP* expression in the gonad and the *MYP* transportation from the digestive tract to the gonad.

Key words: *Strongylocentrotus intermedius*; weight gain rate; gonadosomatic index; antioxidant enzyme; major yolk protein

Corresponding author: ZUO Rantao. E-mail: rtzuo@dlou.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (41606180); Young Elite Scientists Sponsorship Program By CAST (YESS20150157)