

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2012.04.007

## 密度胁迫对凡纳滨对虾稚虾免疫指标及生长的影响

张华军<sup>1,2</sup>, 李卓佳<sup>1</sup>, 张家松<sup>1</sup>, 张晓阳<sup>1</sup>, 曹煜成<sup>1</sup>, 文国樑<sup>1</sup>, 程开敏<sup>2</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东省渔业生态环境重点实验室, 广东 广州 510300; 2. 广东粤海饲料集团有限公司, 广东 湛江 524017)

**摘要:** 将体长为(3.59 ± 0.26) cm 的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)按 1 800 尾·m<sup>-3</sup>、1 500 尾·m<sup>-3</sup>和 1 200 尾·m<sup>-3</sup>的密度分别饲养在注水 0.3 m<sup>3</sup> 的圆形玻璃纤维桶(容量为 0.5 m<sup>3</sup>)中 30 d, 检测了基本水质因子、对虾肝胰腺和肌肉组织中的酚氧化酶(PO)活力、超氧化物歧化酶(SOD)活力、抗菌活力(Ua)、碱性磷酸酶(AKP)活力、体质量增长和成活率, 研究了不同放养密度对凡纳滨对虾稚虾免疫指标及生长的影响。统计分析发现, 试验过程中水体理化因子均在适宜范围, 各处理间水质因子的差异不显著; 对虾的 PO 活力、Ua 和 AKP 活力均随着密度的增加而降低, SOD 活力则反之; 对虾的体质量增长、体质量特定增长率和成活率随着密度的增加而降低, 成活率差异显著( $P < 0.05$ )。结果表明, 凡纳滨对虾(体长 < 4.8 cm 或体质量 < 1.2 g)在密度为 1 200 ~ 1 800 尾·m<sup>-3</sup>时, 密度胁迫可明显影响其免疫指标和生长。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 密度胁迫; 免疫指标; 生长

中图分类号: S 945.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2012)04-0043-06

## Effects of stocking density on immune parameters and growth of juvenile *Litopenaeus vannamei*

ZHANG Huajun<sup>1,2</sup>, LI Zhuojia<sup>1</sup>, ZHANG Jiasong<sup>1</sup>, ZHANG Xiaoyang<sup>1</sup>,  
CAO Yucheng<sup>1</sup>, WEN Guoliang<sup>1</sup>, CHENG Kaimin<sup>2</sup>

(1. Key Lab. of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture; Key Lab. of Fishery Ecology and Environment, Guangdong Province; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. Guangdong Yuehai Feed Group Co., Ltd, Zhanjiang 524017, China)

**Abstract:** In order to investigate the effects of different stocking density on the immune parameters and growth of juvenile *Litopenaeus vannamei*, we cultured the shrimps [body length (3.59 ± 0.26) cm] in 0.3 m<sup>3</sup> fiberglass tanks (water volume 0.5 m<sup>3</sup>) at 1 800 ind·m<sup>-3</sup>, 1 500 ind·m<sup>-3</sup> and 1 200 ind·m<sup>-3</sup>, respectively, for 30 d to determine the phenoloxidase (PO) activity, superoxide dismutase (SOD) activity, antibacterial activity (Ua), alkaline phosphatase (AKP) activity in hepatopancreas and muscle, as well as weight gain, survival and basic water quality factors. It is showed that the physical and chemical factors vary within suitable range with no significant difference. The PO activity, Ua and AKP activity in the muscle of shrimp reduce while SOD activity increases with the increase of stocking density. The weight gain, special weight growth rate (SGR<sub>w</sub>) and survival reduce with the increasing stocking density with significant difference in survival ( $P < 0.05$ ). The results indicate that stocking density may obviously affect the growth and immune parameters of juvenile *L. vannamei* (body length < 4.8 cm or body weight < 1.2 g) when stocking density is within 1 200 ~

收稿日期: 2012-03-07; 修回日期: 2012-05-01

资助项目: 现代农业(虾)产业技术体系建设专项资金(CARS-47); 国家公益性行业(农业)科研专项(201103034); 广东省鱼病防治专项(2130108); 广东省科技计划项目(2010B02039001); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院南海水产研究所)资助项目(2010YD05); 广东省海洋渔业科技推广专项(201001B02)

作者简介: 张华军(1984-), 男, 硕士研究生, 从事生态免疫调控研究。E-mail: zhj565784@163.com

通讯作者: 李卓佳, E-mail: zhuojiali609@163.com

1 800 ind·m<sup>-3</sup>.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; stocking density; immune parameters; growth

近年来,随着凡纳滨对虾养殖规模的扩大,多造养殖技术在华南对虾养殖区得到广泛推广。为了提高养殖虾苗的成活率和加强多造养殖的时间合理衔接,众多养殖户进行虾苗中间标粗培育(中间标粗培育或称中间暂养,是指将个体较小的虾苗放入水体面积不大的水域中,经过一段时间高密度的饲养培育使虾苗长到一定规格,再移入养成池继续饲养的一种过渡生产措施)。随着标粗虾苗密度的增加,其发病几率及死亡率必然升高,因此,研究不同标粗密度条件下凡纳滨对虾的免疫指标及生长,对虾苗标粗密度的合理选择有重要意义。目前,环境理化因子<sup>[1-5]</sup>对对虾免疫指标影响的研究较多,有关密度对对虾生长影响<sup>[6-11]</sup>及密度对较大规格(体长>5 cm)凡纳滨对虾非特异性免疫因子影响<sup>[12]</sup>也已有报道,然而未见有凡纳滨对虾稚虾密度与其免疫指标关系的研究。此试验借助流水养殖措施维持水质因子良好,探索密度胁迫对凡纳滨对虾稚虾免疫指标及生长的影响,为虾苗标粗密度的合理选择提供基础数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

凡纳滨对虾购于海南省三亚某种苗场,运回中国水产科学研究院南海水产研究所三亚安游试验基地,培育至3~4 cm时运抵陵水实验站。

### 1.2 试验设计

试验于0.5 m<sup>3</sup>圆形玻璃纤维桶中(注水0.3 m<sup>3</sup>)进行。选择大小均匀、健康的对虾[体长为(3.59±0.26)cm,体质量为(0.56±0.11)g],设置1 800尾·m<sup>-3</sup>(D1)、1 500尾·m<sup>-3</sup>(D2)、1 200尾·m<sup>-3</sup>(D3)3个养殖密度,每个处理3个平行。试验时间从2010年6月17日至2010年7月16日,共30 d,试验开始与结束时取凡纳滨对虾样品。

### 1.3 日常管理

试验中投喂恒兴饲料公司生产的对虾1#饲料,每天投喂2次(7:00和19:00),日投饵量为对虾湿质量的5%左右,根据对虾的摄食情况适当调整。连续充气增氧,流水养殖,日换水量在200%左右。

### 1.4 指标测定

试验开始与结束时每桶取5尾对虾。分别取肌肉与肝胰腺组织0.1 g,然后将每组样品混合一起置于研磨器中,加入0.5 mL的PBS缓冲液(pH 7.4)低温匀浆,4℃、6 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,取上清液,放入-80℃超低温冰箱内保存待测。

酚氧化酶(PO)活力的测试以L-DOPA(Sigma)为底物,参照ASHIDA<sup>[13]</sup>和王雷等<sup>[14]</sup>的方法进行;超氧化物歧化酶(SOD)活力采用邓碧玉等<sup>[15]</sup>改良的连苯三酚自氧化法测试;抗菌活力(Ua)以大肠杆菌菌悬液为底物,参照HUHMARK等<sup>[16]</sup>改进的方法测试;碱性磷酸酶(AKP)活力采用磷酸苯二钠法<sup>[17]</sup>测试;蛋白浓度采用BRADFORD<sup>[18]</sup>的考马斯亮蓝法测试,以牛血清蛋白做标准。

试验过程中每天采用PHB-3型便携式pH计测定pH;YSI-550便携式溶氧仪测定溶解氧(DO)和水温;WYY-II便携式折射盐度计测量盐度(S)。每5 d取水样按照国家相关标准<sup>[19]</sup>用次溴酸盐氧化法测定氨氮(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N),用萘乙二胺光度法测定亚硝酸盐氮(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)。

试验结束时每桶取15尾对虾进行体质量增长和体质量特定增长率的测定。体质量增长的计算公式为 $W(g) = y_2 - y_1$ ,体质量特定增长率的计算公式为 $SGR(\%/d) = 100 \times (\ln y_2 - \ln y_1) / t$ ,式中 $y_2$ 和 $y_1$ 表示试验开始和结束时对虾的体质量, $t$ 为试验持续的天数。然后排水收虾,记录成活数目,计算成活率。

### 1.5 数据处理采用

用SPSS 13.0软件进行单因素方差分析,用Excel 2003软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 水质因子的变化

整个试验过程中水体理化因子均在适宜范围。水温随天气变化在28.16~30.86℃之间波动,盐度约为35,pH为7.83~8.30,溶解氧(DO)的质量浓度为4.13~4.93 mg·L<sup>-1</sup>, $\rho$ (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)和 $\rho$ (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)也一直处在安全阈值以下,且各处理间差异不显著(图1)。

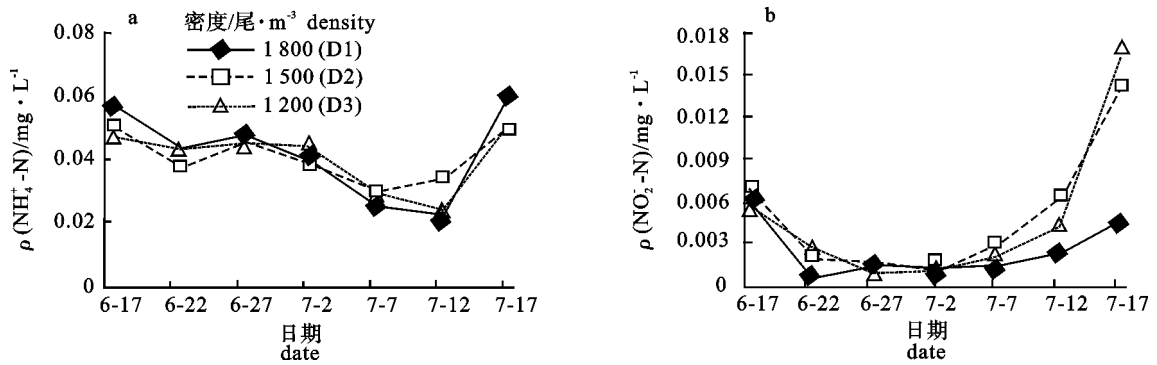


图 1 试验过程中氨氮(a)和亚硝酸盐氮(b)的变化

Fig. 1 Variation in ammonia (a) and nitrite (b) content during experiment

2.2 密度胁迫对不同组织免疫指标的影响

2.2.1 PO 活力 试验结束时对虾肝胰腺 PO 活力均低于试验开始时，D3 肝胰腺 PO 活力显著高于 D2 和 D1 ( $P < 0.01$ )，D2 高于 D1，但差异不显著。试验对虾肌肉 PO 活力未检出(图 2)。

2.2.2 SOD 活力 试验结束时对虾 SOD 活力基本高于试验开始时(除 D2 肝胰腺外)，D1 和 D3 肝胰腺和肌肉 SOD 活力均显著高于 D2 ( $P < 0.01$ )，而 D3 高于 D1，但差异不显著(图 3)。

2.2.3 Ua 试验结束时对虾肝胰腺和肌肉 Ua 均比试验开始时低。试验结束时 D3 对虾肝胰腺 Ua 显著高于 D2 和 D1 ( $P < 0.01$ )，D2 高于 D1 但差异不显著；而各肌肉 Ua 高低相近，D1 低于 D2，D3 略低于 D2 但高于 D1，差异均不显著(图 4)。

2.2.4 AKP 活力 试验结束时肝胰腺 AKP 活力比试验开始时低。试验结束时 D1 对虾肝胰腺 AKP 活力显著高于 D2 和 D3 ( $P < 0.01$ )，D3 高于 D2，但差异不显著；D3 肌肉 AKP 活力高于 D2，D2 高

于 D1，差异均极显著 ( $P < 0.01$ ) (图 5)。

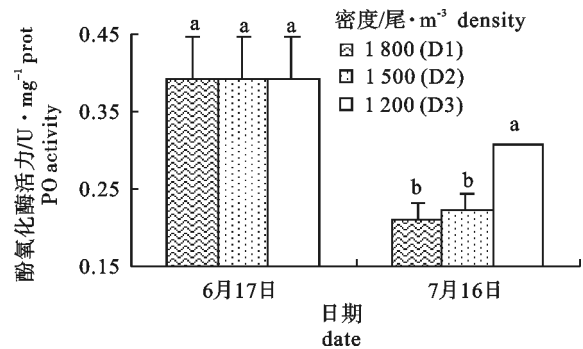


图 2 凡纳滨对虾肝胰腺酚氧化酶活力 同一次采样组间标有不同字母者表示差异显著

( $P < 0.01$ )，标有相同字母者表示差异不显著，后图同此 Fig. 2 PO activity in hepatopancreas of *L. vannamei* Values with different letters on the same sampling day indicate significant difference ( $P < 0.01$ ), while those with the same letters indicate no significant difference.

The same case in the following figures.

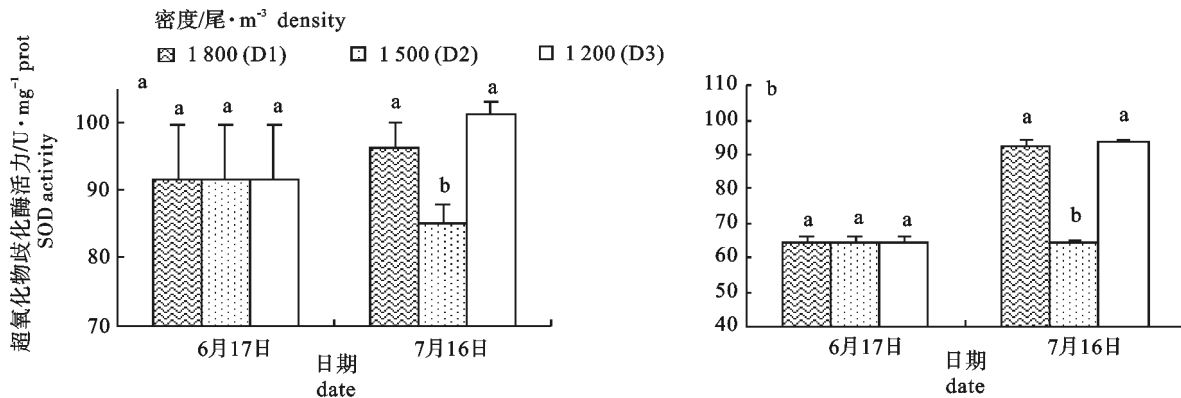


图 3 凡纳滨对虾肝胰腺(a)和肌肉(b)的超氧化物歧化酶活力

Fig. 3 SOD activity in hepatopancreas (a) and muscle (b) of *L. vannamei*

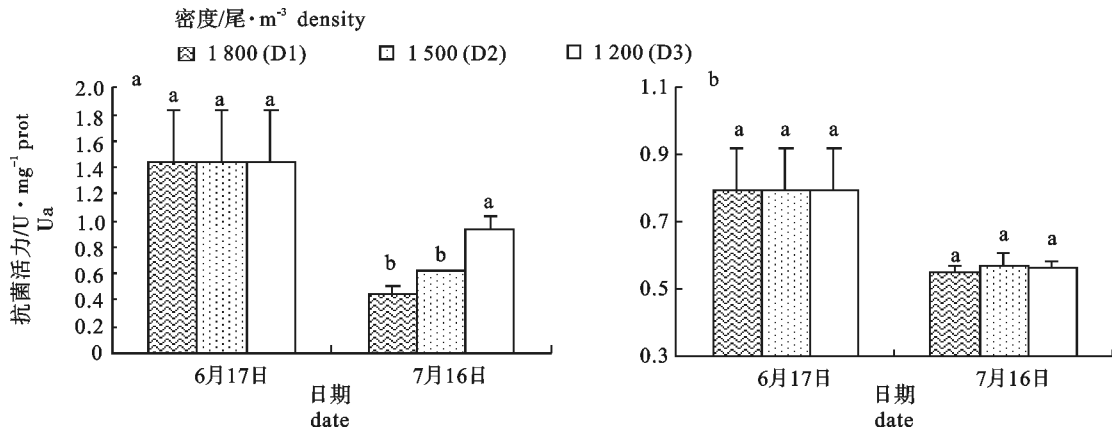


图4 凡纳滨对虾肝胰腺(a)和肌肉(b)的抗菌活力

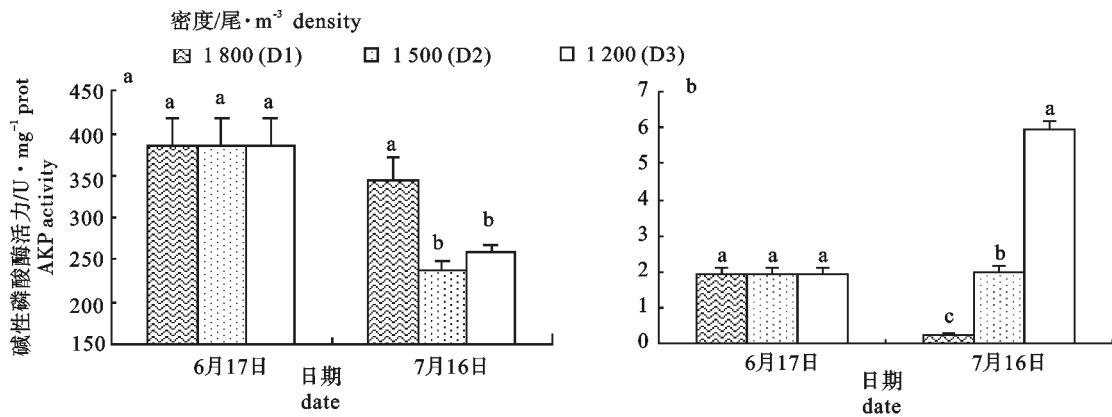
Fig. 4 Ua in hepatopancreas (a) and muscle (b) of *L. vannamei*

图5 凡纳滨对虾肝胰腺(a)和肌肉(b)的碱性磷酸酶活力

Fig. 5 AKP activity in hepatopancreas (a) and muscle (b) of *L. vannamei*表1 密度胁迫对凡纳滨对虾生长的影响( $\bar{X} \pm SD$ )Tab. 1 Effects of stocking density on growth of *L. vannamei*

处理/尾·m <sup>-3</sup> treatment	成活率/% survival	体质量增长/g weight gain	体质量特定增长率/% special weight growth rate
1 800 (D1)	64.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.26 ± 0.07 <sup>a</sup>
1 500 (D2)	77.6 ± 0.9 <sup>b</sup>	0.55 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.27 ± 0.11 <sup>a</sup>
1 200 (D3)	85.4 ± 2.2 <sup>c</sup>	0.67 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.60 ± 0.31 <sup>a</sup>

注: 同一列中不同字母表示处理间差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Values with different superscripts in the same row indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

### 2.3 密度胁迫对生长的影响

凡纳滨对虾的成活率、体质量增长和体质量特定增长率均随着密度的降低而增加, 各处理的成活率差异显著( $P < 0.05$ ), 体质量增长和体质量特定增长率差异未达到显著水平(表1)。试验结束时对虾实际密度分别为(1 163 ± 5)尾·m<sup>-3</sup>(D1)、(1 163 ± 14)尾·m<sup>-3</sup>(D2)和(1 025 ± 26)尾·m<sup>-3</sup>(D3), 对

虾的体长和体质量分别为(4.53 ± 0.39) cm 和(1.15 ± 0.29) g。

### 3 讨论

对虾类甲壳动物主要以非特异性免疫为主, 在许多环境胁迫条件下, PO、SOD、Ua、AKP 和酸性磷酸酶(ACP)在免疫抗病力方面起着重要作用,

其活力常用作对虾健康评价的指标。

PO 是酚氧化酶原激活系统识别异物和免疫反应的起点, 其活力高低影响着对虾免疫系统对进入体内的异物反应速度和强度, 以及激活后续反应如凝集、吞噬、黑化等作用的效率<sup>[20]</sup>, 在对虾体液免疫中占极其重要的地位。外来物质入侵被血细胞包裹后, 机体会产生一系列高活性氧物质来杀死清除异物, 但同时会对正常细胞产生危害; SOD 是一种超氧负离子或羟自由基诱导酶, 能清除体内多余的高活性氧物质, 使其形成和消除处于一种动态平衡, 进而免除对生物体的伤害<sup>[21]</sup>; Ua 为血细胞产生的抗菌肽和抗菌蛋白所特有, 在体液免疫中起着防御病原微生物入侵的作用; AKP 是溶酶体酶的重要组成部分, 直接参与磷酸化代谢和转移, 因此磷酸酶在对虾免疫方面具有重要作用。此试验结束时测试的免疫指标中, 总体上是 PO 活力、Ua 和 AKP 活力随着密度的增加而降低, 而 SOD 活力随着密度的增加而升高。结果表明, 密度胁迫对凡纳滨对虾稚虾不同免疫指标的影响效果不同, 这与李玉全等<sup>[12]</sup>的研究结果相一致。笔者推测, 当对虾受到密度胁迫时其免疫相关酶 PO、AKP 和 SOD 等的表达降低, 而杀死清除异物的超氧负离子或羟自由基升高, 因此, SOD 表达随之升高以清除体内过多的高活性氧物质, 免除对虾体的伤害。此研究发现试验结束时 PO 活力、Ua 和 AKP 活力大体低于试验开始, 而 SOD 反之。此时由于对虾生长, 其相对密度均有所增加, 进一步证实随着密度增加对虾 PO 活力、Ua 和 AKP 活力降低, SOD 活力升高。此研究还发现, 对虾的体质量增长、体质量特定增长率和成活率随着密度的增加而降低。其中 D3 的 SOD 活力高于 D2, 并超出 D1, 可能是试验结束时 D1 和 D2 密度降低幅度较大致使胁迫有较大程度缓解, 以及由于 D3 对虾生长密度相对增加较大导致胁迫加剧的外在表现。D1 肝胰腺 AKP 活力高于 D2, 且超过 D3, 原因可能是试验结束时 D1 密度降低幅度较大而导致密度胁迫有较大程度缓解的直观表现。

高密度养殖条件下, 养殖系统中残饵和排泄物分解产生  $\text{NH}_4^+$ -N 等有毒物质, 另一方面生物呼吸和有机物氧化分解消耗水体中的 DO, 降低 DO 含量, 影响对虾的生长、成活<sup>[6]</sup>和免疫抗病力。然而此试验各处理间 DO、 $\text{NH}_4^+$ -N 和  $\text{NO}_2^-$ -N 等水质因子均在适宜范围内, 没有显著差异, 表明密度胁迫

是影响对虾免疫指标和生长的主要因素。关于密度胁迫引起凡纳滨对虾稚虾免疫指标及生长的差异, 推测可能是由于对虾相对活动空间较小、种内竞争激烈所致, 相关机制还有待进一步研究。

综上所述, 凡纳滨对虾稚虾(体长 < 4.8 cm, 体质量 < 1.2 g)养殖密度为 1 200 ~ 1 800 尾·m<sup>-3</sup>时密度胁迫明显影响免疫指标及生长。随着密度增加, 对虾 PO 活力、Ua 和 AKP 活力等免疫指标及体质量增长、体质量特定增长率和成活率降低, SOD 活力升高。因此, 凡纳滨对虾标粗培育时应选择适当的养殖密度以提高免疫抗病力, 降低密度胁迫对对虾生长和成活率的影响。

#### 参考文献:

- [1] CHENG W, WANG L U, CHEN J C. Effect of water temperature on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* to *Vibrio alginolyticus* [J]. *Aquaculture*, 2005, 250(3/4): 592 - 601.
- [2] CHENG W, CHEN J C. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2000, 10(4): 387 - 391.
- [3] 叶建生, 王兴强, 马牲, 等. 盐度突变对凡纳滨对虾非特异性免疫因子的影响 [J]. *海洋水产研究*, 2008, 29(1): 38 - 43. YE Jiansheng, WANG Xingqiang, MA Shen, et al. The effect of abrupt change in salinity on the nonspecific immune factors of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Mar Fish Res*, 2008, 29(1): 38 - 43. (in Chinese)
- [4] 李强, 李华, 姜传俊, 等. 温度对凡纳滨对虾血淋巴免疫指标的影响 [J]. *大连水产学院学报*, 2008, 23(2): 132 - 135. LI Qiang, LI Hua, JIANG Chuanjun, et al. Comparison of immune parameters in the haemolymph of white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* at different temperatures [J]. *J Dalian Fish Univ*, 2008, 23(2): 132 - 135. (in Chinese)
- [5] 潘鲁青, 姜令绪. 盐度、pH 突变对 2 种养殖对虾免疫力的影响 [J]. *青岛海洋大学学报*, 2002, 36(2): 903 - 910. PAN Luqing, JIANG Lingxu. The effect of sudden changes in salinity and pH on the immune activity of two species of shrimps [J]. *J Ocean Univ Qingdao*, 2002, 36(2): 903 - 910. (in Chinese)
- [6] RAY W M, CHIEN Y H. Effects of stocking density and aged sediment on tiger prawn, *Penaeus monodon*, nursery system [J]. *Aquaculture*, 1992, 104(3/4): 231 - 248.
- [7] MARTIN J L M, VERAN Y, GUELORGET O, et al. Shrimp rearing: stocking density, growth, impact on sediment, waste output and their relationships studied through the nitrogen budget in rearing ponds [J]. *Aquaculture*, 1998, 164(1/2/3/4): 135 - 149.
- [8] COMAN G J, CROCOS P J, PRESTON N P, et al. The effects of density on the growth and survival of different families of juvenile *Penaeus japonicus* Bate [J]. *Aquaculture*, 2004, 229(1/2/3/4):

- 215 - 223.
- [9] LANARI D, BALLESTRAZZI R, TIBALDI E. Effects of fertilization and stocking rate on the performance of *Penaeus japonicus* (Bate) in pond culture [J]. *Aquaculture*, 1989, 83(3/4): 269 - 279.
- [10] WYBAN J A, LEE C S, SATO V T, et al. Effect of stocking density on shrimp growth rates in manure-fertilized ponds [J]. *Aquaculture*, 1987, 61(1): 23 - 32.
- [11] 李玉全, 李健, 王清印, 等. 溶解氧含量和养殖密度对中国对虾生长的影响 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12(6): 751 - 756.
- LI Yuquan, LI Jian, WANG Qingyin, et al. Effects of dissolved oxygen concentration and stocking density on growth performance in *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *J Fish Sci China*, 2005, 12(6): 751 - 756. (in Chinese)
- [12] 李玉全, 李健, 王清印, 等. 密度胁迫对凡纳滨对虾生长及非特异性免疫因子的影响 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(9): 2091 - 2096.
- LI Yuquan, LI Jian, WANG Qingyin, et al. Effects of intensity-stress on the growth and non-specific immunity factors of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(9): 2091 - 2096. (in Chinese)
- [13] ASHIDA M. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1971, 144(2): 749 - 762.
- [14] 王雷, 李光友, 毛远兴, 等. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究 [J]. *海洋与湖沼*, 1994, 25(5): 486 - 492.
- WANG Lei, LI Guangyou, MAO Yuanxing, et al. Effect of oral immuno drugs for prevention and control of diseases of cultured *Penaeus Chinensis* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1994, 25(5): 486 - 492. (in Chinese)
- [15] 邓碧玉, 袁勤生, 李文杰. 改良的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1991, 18(2): 163.
- DENG Biyu, YUAN Qinsheng, LI Wenjie. The method of improved pyrogalllic acid autoxidation determination of superoxide dismutase (SOD) [J]. *Prog Biochem Biophys*, 1991, 18(2): 163. (in Chinese)
- [16] HULTMARK D, STEINER H, RASMUSON T, et al. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* [J]. *Eur J Biochem*, 1980, 106(1): 7 - 16.
- [17] 宋善俊. 临床医师手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 185 - 187.
- SONG Shanjun. Clinicians manual [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1991: 185 - 187. (in Chinese)
- [18] BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248 - 254.
- [19] 国家质量监督检验检疫总局. GB 17378.4-2007. 海洋监测规范: 海水分析 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- The State General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. GB 17378.4-2007. The specification for marine monitoring: seawater analysis [S]. Beijing: Chinese Standard Press, 2008. (in Chinese)
- [20] SODERHALL K. Invertebrate immunity [J]. *Dev Comp Immunol*, 1999, 23(4/5): 263 - 266.
- [21] 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 162 - 212.
- FANG Yunzhong, ZHENG Rongliang. Theory and application of free radical biology [M]. Beijing: Science Press, 2002: 162 - 212. (in Chinese)