

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20210716001

http://www.yykxjz.cn/

孙海悦, 王际英, 李宝山, 王成强, 刘财礼, 沈钰博, 孙永智, 黄炳山, 王世信. 许氏平鲈幼鱼对饲料中维生素 D<sub>3</sub> 需求量的研究. 渔业科学进展, 2023, 44(1): 103–114

SUN H Y, WANG J Y, LI B S, WANG C Q, LIU C L, SHEN Y B, SUN Y Z, HUANG B S, WANG S X. Dietary vitamin D<sub>3</sub> requirement of juvenile rockfish (*Sebastes schlegelii*). Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(1): 103–114

## 许氏平鲈幼鱼对饲料中维生素 D<sub>3</sub> 需求量的研究\*

孙海悦<sup>1,2</sup> 王际英<sup>2①</sup> 李宝山<sup>2</sup> 王成强<sup>2</sup> 刘财礼<sup>2</sup> 沈钰博<sup>2</sup>  
孙永智<sup>2</sup> 黄炳山<sup>2</sup> 王世信<sup>2</sup>

- (1. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心  
水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心 上海 201306;  
2. 山东省海洋资源与环境研究院 山东省海洋生态修复重点实验室 山东 烟台 264006)

**摘要** 本实验旨在研究维生素 D<sub>3</sub> 对许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)幼鱼生长、体组成及机体免疫能力的影响,以确定其对维生素 D<sub>3</sub> 的最适需求量。配制维生素 D<sub>3</sub> 含量分别为 707、1254、1740、2513、4519 和 8671 IU/kg 的 6 种等氮等脂饲料,饲养初始体质量为(20.95±0.05) g 的许氏平鲈幼鱼,8 周后进行哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)攻毒 48 h。研究表明,随着维生素 D<sub>3</sub> 含量的增加,许氏平鲈幼鱼增重率(WGR)和特定生长率(SGR)均先上升后下降,脏体比(VSI)和肝体比(HSI)显著下降,707 IU/kg 组显著高于其他组( $P<0.05$ ); 全鱼粗脂肪和肌肉粗脂肪随维生素 D<sub>3</sub> 含量增加呈增加的趋势,在 4519 IU/kg 组有最大值并显著高于对照组( $P<0.05$ ),脊椎骨粗灰分和钙含量显著增加;血清总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)活力和补体 3 (C<sub>3</sub>)含量均先升高后降低,均在 2513 IU/kg 组有最大值,谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)活力和丙二醛(MDA)含量均先降低后升高,总胆固醇(T-CHO)、甘油三酯(TG)和钙离子含量(Ca<sup>2+</sup>)呈增加的趋势,磷(Pi)和补体 4 (C<sub>4</sub>)含量不受维生素 D<sub>3</sub> 含量的影响( $P>0.05$ )。攻毒后,T-AOC 及 MDA、C<sub>3</sub> 和 C<sub>4</sub> 含量显著增高,肝脏和头肾 *HSP70*、*MYD88*、*IRAK4*、*TRAF6* 和 *TLR2* 基因表达显著升高( $P<0.05$ )。以 WGR 为评价指标,经折线回归分析表明,体质量为(20.95±0.05) g 的许氏平鲈幼鱼维生素 D<sub>3</sub> 的需求量为 2 223.45 IU/kg 饲料。

**关键词** 许氏平鲈; 维生素 D<sub>3</sub>; 生长; 免疫; 需求量

**中图分类号** S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2023)01-0103-12

维生素 D 包括维生素 D<sub>2</sub> 和维生素 D<sub>3</sub>, 维生素 D<sub>3</sub> 是维生素 D 最重要的表现形式,仅存在于动物体内(李向等, 2021)。与哺乳动物不同,鱼类由于长期生活在水中,对光线的吸收能力较差,因此,鱼类体内的维生素 D<sub>3</sub> 不能经由皮肤中的维生素 D<sub>3</sub> 原经紫外线照射转化而来,只能从饲料中直接获取。维生素

D<sub>3</sub> 可以维持鱼类体内矿物质的稳态、参与机体内分泌等(Lock *et al*, 2010),还可以影响免疫细胞的增殖和凋亡(Calton *et al*, 2015)。

目前,有关鱼类对维生素 D<sub>3</sub> 需求量的报道并不多,且不同鱼类对维生素 D<sub>3</sub> 的需求量差异较大。研究表明,斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、鲈鱼

\* 烟台市科技创新发展计划项目(2021XDHZ056)和山东省自然科学基金(ZR2020QC206)共同资助。

孙海悦, E-mail: 1969832776@qq.com

① 通信作者: 王际英, 研究员, E-mail: ytwjy@126.com

收稿日期: 2021-07-16, 收修改稿日期: 2021-09-03

(*Lateolabrax japonicus*) 和 黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*)对维生素 D<sub>3</sub>的需求量分别为 2250、431 和 16 600 IU/kg 饲料(张璐等, 2016; 谢诗玮等, 2019; 郭勋等, 2020)。维生素 D<sub>3</sub>缺乏时, 部分鱼类会出现佝偻病、骨骼异常、钙平衡紊乱等症状(Haga *et al.*, 2004; Taveekijakare *et al.*, 1996); 维生素 D<sub>3</sub>过量时, 部分鱼类会出现生长缓慢且中毒症状(Barnett, 1982; Andrews *et al.*, 1980)。

许氏平鲈(*Sebastes schlegelii*)又名黑头, 属鲈形目(Scorpaeniformes), 是一种冷水性近海底层肉食性鱼类, 因其肉质爽口、抗病力强、生长快速等优点, 深受人们的喜爱, 在我国北方网箱养殖规模也逐年增加(李宝山等, 2019)。目前, 对许氏平鲈幼鱼维生素的研究仅在维生素 B<sub>6</sub>(周莹等, 2020)、维生素 C (Bai *et al.*, 1996)和维生素 E (Bai *et al.*, 1998), 维生素 D 尚无研究。本研究通过添加不同含量的维生素 D<sub>3</sub>, 探究其对许氏平鲈幼鱼生长、体组成和机体免疫能力的影响, 以确定许氏平鲈幼鱼对维生素 D<sub>3</sub>的最适需求量, 为其配合饲料的开发提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验饲料

本实验以白鱼粉为主要蛋白源, 玉米油为主要脂肪源, 设计粗蛋白约为 50%、粗脂肪约为 10%的基础饲料配方。在基础饲料中分别添加 0、500、1000、2000、4000 和 8000 IU/kg 的维生素 D<sub>3</sub> (500 000 IU/g), 配制维生素 D<sub>3</sub> 含量为 707、1254、1740、2513、4519 和 8671 IU/kg 的 6 种等氮等脂饲料, 分别命名为 D1、D2、D3、D4、D5 和 D6 组, 其中, D1 为对照组。饲料配方及营养组成见表 1。

饲料制作时, 将所需原料粉碎过 80 目筛, 按配比称重后, 逐级扩大混合均匀, 将鱼油和玉米油提前混好倒入其中搅拌均匀, 再加入适量蒸馏水混合好, 用小型螺旋饲料挤压机将饲料制成粒径为 2 和 4 mm 的颗粒, 60℃烘干后, 用塑料袋密封保存备用。

### 1.2 实验用鱼及饲养管理

本研究在山东省海洋资源与环境研究院鱼房循

表 1 饲料配方及营养组成(%风干基础)

Tab.1 Formulation and nutritional composition of the experimental diets (% air-dry matter basis)

原料 Ingredients	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
白鱼粉 White fish meal	40	40	40	40	40	40
豆粕 Soybean meal	16	16	16	16	16	16
小麦面筋蛋白 Wheat gluten	20	20	20	20	20	20
酵母粉 Yeast powder	2	2	2	2	2	2
鱼油 Fish oil	2	2	2	2	2	2
玉米油 Corn oil	5	5	5	5	5	5
α-淀粉 α-Starch	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2
微晶纤维 Microcrystalline cellulose	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4	4.4
甜菜碱 Betaine	1	1	1	1	1	1
氯化胆碱 Choline chloride	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
磷酸二氢钙 Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
抗氧化剂 Antioxidant	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
维生素预混料 Vitamins premix <sup>a</sup>	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
矿物质预混料 Minerals premix <sup>a</sup>	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
维生素 D <sub>3</sub> Vitamin D <sub>3</sub> /(IU/kg)	0	500	1000	2000	4000	8000
合计 Total	100	100	100	100	100	100
营养组成(%干物质) Nutrient composition (% dry matter)						
粗蛋白 Crude protein	50.44	50.51	50.40	50.16	50.67	50.64
粗脂肪 Crude lipid	10.51	10.55	10.32	10.49	10.20	10.38
粗灰分 Crude ash	10.13	10.46	10.06	10.51	10.12	9.91
能量 Energy/(KJ/g)	20.58	20.98	20.60	20.84	20.59	20.54
维生素 D <sub>3</sub> Vitamin D <sub>3</sub> /(IU/kg)	707	1254	1740	2513	4519	8671

注: a: 维生素预混料及矿物质预混料配方参见沈钰博等(2021)。

Note: a: The formula of vitamins premix and minerals premix can be found in Shen *et al.* (2021).

环水养殖系统中进行。实验鱼购自山东荣成裕源水产有限公司。正式实验前暂养于绿色圆形养殖桶(桶高为 80 cm, 直径为 70 cm, 水深为 50 cm), 期间投喂对照组(D1)饲料, 2 周后挑选 600 尾规格均匀、体质良好的许氏平鲈幼鱼(20.95±0.05) g, 随机分配至 24 个桶, 每桶 25 尾。每种饲料随机投喂 4 桶实验鱼(其中 1 桶用于攻毒实验), 养殖时间为 8 周。每天定时定量(08:00 和 16:00)投喂 2 次, 初始投喂量按照鱼体质量的 1%进行投喂, 观察每日摄食情况, 按照需要调整次日投喂量。记录死鱼重量和数量。养殖期间水质符合以下条件: 水温为 16~18℃, 溶氧(DO)>6.0 mg/L, pH 为 7.5~8.2, 盐度为 27~28, 氨氮和亚硝酸盐氮<0.05 mg/L。

### 1.3 攻毒实验

养殖实验结束后, 攻毒实验桶挑选 20 尾体质量基本一致的许氏平鲈幼鱼, 进行攻毒实验。哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)由中科院烟台海岸带研究所提供。攻毒实验前进行预实验确定许氏平鲈的致病浓度为  $6 \times 10^3$  CFU/g 鱼体质量。许氏平鲈幼鱼感染哈维氏弧菌以后, 表现为鳞片脱落、鳍部和鳃部发红并伴有创伤溃疡。正式攻毒实验, 每尾鱼经腹腔注射  $0.9 \times 10^6$  CFU/mL 的菌液 0.2 mL。4 h 后观察许氏平鲈是否发病, 记录发病的鱼尾数。攻毒 48 h 后, 每桶随机取 3 尾病鱼, 尾静脉取血后, 无菌环境下解剖, 取肝尖和头肾放入灭菌离心管后, 再投入液氮中。血清、头肾和肝脏于 -80℃ 冰箱中保存。

### 1.4 样品采集及分析

养殖实验结束后, 禁食 24 h, 记录每个桶鱼的总体质量和数量, 每桶随机取 8 尾鱼用于体质量及体长的测量后, 进行尾静脉取血, 将鱼解剖后分离出内脏团、肝脏和肠, 分别称其质量, 然后用解剖刀将肌肉切下。将 8 尾解剖过的鱼放入恒温水浴锅中 85℃ 煮 8 min 左右, 分离脊椎骨, 然后将其浸泡于超纯水中并用牙刷洗刷去掉周围肌肉组织和毛细血管, 氯仿-甲醇溶液脱脂后于 105℃ 烘箱中烘 24 h, 保存在干燥器中备用。另取 7 尾全鱼测定鱼体常规成分。全鱼、背肌、肝脏及血清样品置于 -20℃ 条件下保存, 待测。

实验饲料及样品中水分采用 105℃ 恒重法测定(GB/T 6435-2014), 粗脂肪采用索氏抽提法测定(GB/T 6433-2006), 粗蛋白采用凯氏定氮法测定(GB/T 6432-2018), 粗灰分采用 550℃ 失重法测定(GB/T 6438-2007), 能量采用燃烧法测定(IKA, C6000, 德国)。脊椎骨中

钙含量采用国标中高锰酸钾滴定法测定。

血清总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、补体 3(C<sub>3</sub>)、补体 4(C<sub>4</sub>)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆固醇(T-CHO)、甘油三酯(TG)、钙离子(Ca<sup>2+</sup>)含量、磷(Pi)含量均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定。

使用 Trizol 法提取总 RNA, 并用 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒进行实时荧光定量 PCR 反应。根据本实验室所得的许氏平鲈转录组数据, 找到热休克蛋白(HSP70)、髓样分化因子 88 (MYD88)、肿瘤坏死因子受体活化因子 6 (TRAF6)、白细胞介素受体相关激酶 4 (IRAK4) 和 Toll 样受体 2 (TLR2) 的基因序列, NCBI Nucleotide BLAST 进行同源性比对分析, 确定同源性较高的基因序列, 利用 Primer 5.0 软件设计引物, 选用 RPL17 作为内参基因(Ma et al, 2013), 引物由上海生工生物技术有限公司合成, 引物序列如表 2 所示。并结合 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析上述基因的相对表达水平。

表 2 基因表达的引物序列  
Tab.2 Primer sequences for gene expression

引物名称 Primers	引物序列(5'~3') Sequence (5'~3')
TRAF6	Forward: TCATCTGGCTCAGTGTTCAGTTTGC Reverse: GTGTGCTCCTCTAAGTGGCTCTTTC
IRAK4	Forward: TGTGAGGAGATATGAAGGTCTTGTGTC Reverse: GACACCAGCAGCAGCCAGTAAC
MYD88	Forward: GATGGTGGTGGTGGTTTCGGATG Reverse: CTGCTTCGTCATTGGCTTGTATATCAC
TLR2	Forward: GACGCCATAGAGAAGAGTCACAGAAC Reverse: ATCTAGCTCGTACTTGCACCATTTCAC
HSP70	Forward: GGACGAGAAGACGGTGATTGAGAAG Reverse: CCTGGTACAAGCTGCTGATGATGG
RPL17	Forward: AGGCGACGCACCTACCG Reverse: CCTCTGGTTTGGGGACGA

### 1.5 指标计算

增重率(weight gain rate, WGR,%)=(鱼体终末体质量-鱼体初始体质量)/鱼体初始体质量×100

特定生长率(specific growth rate, SGR,%/d)=(ln 鱼体终末体质量-ln 鱼体初始体质量)/养殖周期×100

饲料系数(feed conversion ratio, FCR)=摄食饲料量/(鱼体终末体质量-鱼体初始体质量)

肥满度(condition factor, CF)=鱼体终末体质量/体长<sup>3</sup>×100

脏体比(viscerosomatic index, VSI,%)=内脏团重/鱼体终末体质量×100

肝体比(hepatosomatic index, HSI,%)=肝脏重/鱼体终末体质量×100

存活率(survival rate, SR,%)=终末鱼尾数/初始鱼尾数×100

## 1.6 数据统计与分析

采用统计软件 SPSS 21.0 对所有数据进行单因素方差分析。差异显著( $P<0.05$ )用 Duncan's 检验法进行多重比较分析,数据用平均值±标准差(Mean±SD)表示。使用 GraphPad 8 软件进行绘图。采用折线模型拟合数据,确定许氏平鲈幼鱼对饲料中维生素 D<sub>3</sub> 的最适需求量。

## 2 结果

### 2.1 维生素 D<sub>3</sub> 对许氏平鲈幼鱼生长和形体指标的影响

由表 3 可知,随着维生素 D<sub>3</sub> 含量的升高,许氏平鲈幼鱼 WGR 和 SGR 均先升后降, D4 组有最大值且显著高于其他组( $P<0.05$ ), FCR 先降后升, D4 组显著低于对照组( $P<0.05$ ), VSI 和 HSI 降低,实验组(D2-D6)显著低于对照组(D1) ( $P<0.05$ )。各组 CF、存活率(SR)无显著性差异( $P>0.05$ )。

以 WGR 为评价指标,经折线模型分析后得许氏平鲈幼鱼(20.95±0.05) g 对饲料中维生素 D<sub>3</sub> 的需求量为 2 223.45 IU/kg(图 1)。

表 3 维生素 D<sub>3</sub> 对许氏平鲈幼鱼生长和形体指标的影响

Tab.3 Effects of vitamin D<sub>3</sub> on growth performance and body indices of juvenile *S. schlegelii*

生长性能 Growth performances	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
初始体质量 IBW/g	20.96±0.01	20.92±0.06	20.93±0.06	20.98±0.03	20.97±0.03	20.95±0.00
终末体质量 FBW/g	33.90±0.18 <sup>a</sup>	35.62±1.15 <sup>b</sup>	35.95±0.72 <sup>b</sup>	37.49±0.55 <sup>c</sup>	35.78±0.86 <sup>b</sup>	34.73±0.91 <sup>ab</sup>
增重率 WGR/%	61.78±0.89 <sup>a</sup>	70.30±5.78 <sup>b</sup>	71.71±3.00 <sup>b</sup>	78.65±2.51 <sup>c</sup>	70.65±3.98 <sup>b</sup>	65.78±4.34 <sup>ab</sup>
特定生长率 SGR/(%/d)	0.86±0.01 <sup>a</sup>	0.95±0.06 <sup>b</sup>	0.97±0.03 <sup>b</sup>	1.04±0.03 <sup>c</sup>	0.95±0.04 <sup>b</sup>	0.90±0.05 <sup>ab</sup>
饲料系数 FCR	1.28±0.05 <sup>c</sup>	1.18±0.10 <sup>bc</sup>	1.14±0.04 <sup>ab</sup>	1.05±0.03 <sup>a</sup>	1.17±0.07 <sup>bc</sup>	1.25±0.08 <sup>bc</sup>
脏体比 VSI/%	12.22±0.95 <sup>b</sup>	11.37±0.84 <sup>a</sup>	11.68±0.84 <sup>a</sup>	11.61±0.76 <sup>a</sup>	11.24±1.08 <sup>a</sup>	11.66±1.05 <sup>a</sup>
肝体比 HSI/%	5.04±0.44 <sup>b</sup>	4.57±0.40 <sup>a</sup>	4.80±0.46 <sup>ab</sup>	4.81±0.39 <sup>ab</sup>	4.76±0.42 <sup>a</sup>	4.77±0.36 <sup>a</sup>
肥满度 CF	3.07±0.19	2.97±0.29	2.93±0.28	2.96±0.27	3.01±0.32	2.97±0.29
存活率 SR/%	100	100	100	100	100	100

注:同行数据上标相同字母或无字母表示差异不显著( $P>0.05$ ),上标不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同。

Note: The same superscript letter or no letter in the same row indicates no significant difference ( $P>0.05$ ), while different letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ). The same as below.

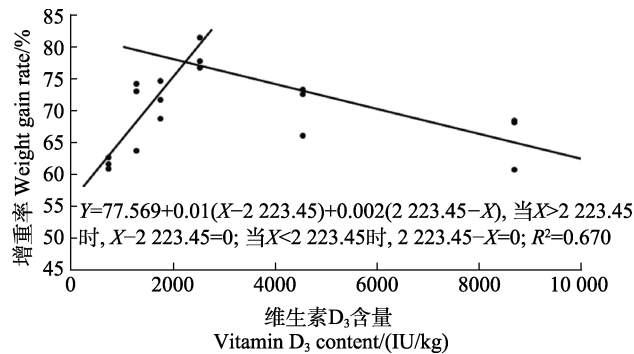


图 1 许氏平鲈幼鱼增重率与饲料中维生素 D<sub>3</sub> 含量的折线回归关系

Fig.1 The broken-line regression analysis based on weight gain rate and dietary vitamin D<sub>3</sub> of juvenile *S. schlegelii*

### 2.2 维生素 D<sub>3</sub> 对许氏平鲈幼鱼鱼体常规成分的影响

由表 4 可知,维生素 D<sub>3</sub> 含量对全鱼水分、粗蛋

白和粗灰分均无显著性影响( $P>0.05$ ),全鱼粗脂肪在 D5 组有最大值, D3、D4、D5 和 D6 组显著高于对照组和 D2 组( $P<0.05$ )。

维生素 D<sub>3</sub> 含量对许氏平鲈幼鱼肌肉水分、粗灰分无显著影响( $P>0.05$ )。肌肉粗蛋白先下降后升高, D6 组显著高于 D3 和 D4 组( $P<0.05$ )。肌肉粗脂肪在 D5 组有最大值且显著高于其他组( $P<0.05$ )。

许氏平鲈幼鱼脊椎骨粗灰分含量随着饲料中维生素 D<sub>3</sub> 含量的增加而增加, D3~D6 组显著高于对照组( $P<0.05$ )。钙含量随着维生素 D<sub>3</sub> 含量的增加而增加( $P<0.05$ )。

### 2.3 维生素 D<sub>3</sub> 对许氏平鲈幼鱼血清生化指标的影响

由表 5 可知,随着维生素 D<sub>3</sub> 含量的升高,许氏平鲈幼鱼血清中 T-AOC 和 SOD 活力均先升高后降低, D4 组有最大值; MDA 先降低后升高, D4 组显

表 4 维生素 D<sub>3</sub> 对许氏平鲈幼鱼鱼体常规成分的影响(%湿重)  
Tab.4 Effects of vitamin D<sub>3</sub> on proximate composition of juvenile *S. schlegelii* (% wet weight)

体组成 Body composition	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
全鱼 Whole body						
水分 Moisture /%	69.96±1.28	69.50±0.27	69.52±0.52	68.98±0.50	70.46±0.88	69.54±0.39
粗蛋白 Crude protein /%	16.41±0.51	16.44±0.29	16.44±0.10	16.62±0.16	16.43±0.46	16.04±0.14
粗脂肪 Crude lipid /%	7.28±0.59 <sup>a</sup>	7.63±0.29 <sup>a</sup>	8.23±0.35 <sup>b</sup>	8.14±0.29 <sup>b</sup>	8.25±0.11 <sup>b</sup>	8.13±0.40 <sup>b</sup>
粗灰分 Crude ash /%	4.59±0.25	4.64±0.14	4.65±0.16	4.63±0.21	4.65±0.18	4.61±0.03
肌肉 Muscle						
水分 Moisture /%	74.92±0.33	75.02±0.12	75.24±0.76	75.39±0.46	74.79±0.25	75.44±0.43
粗蛋白 Crude protein /%	20.82±0.25 <sup>ab</sup>	20.78±0.28 <sup>ab</sup>	20.64±0.18 <sup>a</sup>	20.60±0.28 <sup>a</sup>	20.87±0.28 <sup>ab</sup>	21.12±0.39 <sup>b</sup>
粗脂肪 Crude lipid /%	2.31±0.15 <sup>a</sup>	2.41±0.22 <sup>a</sup>	2.41±0.11 <sup>a</sup>	2.39±0.07 <sup>a</sup>	2.64±0.21 <sup>b</sup>	2.39±0.10 <sup>a</sup>
粗灰分 Crude ash /%	1.50±0.11	1.53±0.03	1.54±0.05	1.55±0.06	1.57±0.07	1.51±0.03
脊椎骨(%干物质) Vertebrae (% dry matter)						
粗灰分 Crude ash /%	47.68±0.32 <sup>a</sup>	48.83±1.29 <sup>ab</sup>	49.60±0.49 <sup>bc</sup>	50.08±0.42 <sup>bc</sup>	50.13±0.18 <sup>bc</sup>	50.82±1.56 <sup>c</sup>
钙 Calcium/%	16.57±0.17 <sup>a</sup>	17.22±0.20 <sup>b</sup>	17.81±0.15 <sup>c</sup>	18.11±0.35 <sup>cd</sup>	18.20±0.12 <sup>cd</sup>	18.48±0.20 <sup>d</sup>

表 5 维生素 D<sub>3</sub> 对许氏平鲈幼鱼血清生化指标的影响  
Tab.5 Effects of vitamin D<sub>3</sub> on serum biochemical parameters of juvenile *S. schlegelii*

血清生化指标 Serum biochemical parameters	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
总抗氧化能力 T-AOC/(mmol/mL)	0.26±0.01 <sup>a</sup>	0.30±0.01 <sup>b</sup>	0.34±0.01 <sup>c</sup>	0.39±0.01 <sup>d</sup>	0.29±0.01 <sup>b</sup>	0.27±0.01 <sup>a</sup>
超氧化物歧化酶 SOD/(U/mL)	941.50±51.20 <sup>a</sup>	1 170.38±52.72 <sup>b</sup>	1 294.70±32.20 <sup>c</sup>	1 390.49±29.55 <sup>d</sup>	1 282.27±49.39 <sup>c</sup>	1 153.56±61.58 <sup>b</sup>
丙二醛 MDA/(nmol/mL)	13.52±1.24 <sup>c</sup>	9.32±0.41 <sup>d</sup>	7.81±0.86 <sup>bc</sup>	6.35±0.34 <sup>a</sup>	7.67±0.36 <sup>b</sup>	9.04±0.60 <sup>cd</sup>
补体 C <sub>3</sub> /(μg/mL)	2 873.14±30.24 <sup>a</sup>	3 142.76±46.79 <sup>b</sup>	3 274.49±37.61 <sup>c</sup>	3 309.61±53.58 <sup>c</sup>	3 263.29±61.99 <sup>c</sup>	3 120.95±58.05 <sup>b</sup>
补体 C <sub>4</sub> /(μg/mL)	1 939.76±60.75	2 079.54±173.61	2 144.72±120.25	2 194.73±84.67	2 010.31±64.05	2 019.61±36.88
谷丙转氨酶 ALT/(U/L)	5.24±0.98 <sup>d</sup>	4.54±0.86 <sup>cd</sup>	3.59±0.61 <sup>ab</sup>	3.19±0.28 <sup>a</sup>	4.33±0.63 <sup>bc</sup>	5.16±0.10 <sup>d</sup>
谷草转氨酶 AST/(U/L)	5.47±0.19 <sup>d</sup>	4.79±0.17 <sup>c</sup>	3.67±0.20 <sup>b</sup>	2.74±0.13 <sup>a</sup>	3.52±0.12 <sup>b</sup>	4.68±0.15 <sup>c</sup>
总胆固醇 T-CHO/(mmol/L)	5.31±0.71 <sup>a</sup>	6.39±0.79 <sup>b</sup>	6.51±0.85 <sup>b</sup>	7.60±0.76 <sup>c</sup>	8.14±0.60 <sup>c</sup>	7.57±0.42 <sup>c</sup>
甘油三酯 TG/(mmol/L)	4.74±1.10 <sup>a</sup>	5.12±1.00 <sup>ab</sup>	5.47±0.76 <sup>ab</sup>	6.56±1.52 <sup>bc</sup>	7.52±1.30 <sup>c</sup>	4.04±1.54 <sup>a</sup>
钙 Ca <sup>2+</sup> /(mmol/L)	1.43±0.02 <sup>a</sup>	1.53±0.05 <sup>b</sup>	1.56±0.08 <sup>b</sup>	1.60±0.06 <sup>bc</sup>	1.66±0.09 <sup>c</sup>	1.67±0.08 <sup>c</sup>
磷 Pi/(mmol/L)	5.61±0.22	5.92±0.25	5.43±0.57	5.55±1.09	5.31±0.52	5.65±0.52

著低于对照组; C<sub>3</sub> 先上升后下降, 实验组显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); ALT 和 AST 均先下降后上升, D4 组有最小值; T-CHO 和 TG 均在 D5 组有最大值, 显著高于 D1 组 ( $P < 0.05$ )。Ca<sup>2+</sup> 含量随着维生素 D<sub>3</sub> 含量的升高而升高, 实验组显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。Pi 和 C<sub>4</sub> 含量不受维生素 D<sub>3</sub> 含量的影响 ( $P > 0.05$ )。

#### 2.4 维生素 D<sub>3</sub> 对许氏平鲈幼鱼攻毒后发病率的影响

由表 6 可知, 随着维生素 D<sub>3</sub> 含量的增加, 许氏平鲈幼鱼累积发病率逐渐降低, 对照组累积发病率达

到最高, D4 组累积发病率最低。

#### 2.5 维生素 D<sub>3</sub> 对许氏平鲈幼鱼攻毒前后血清抗氧化和免疫酶的影响

与攻毒前相比较, 攻毒后随着维生素 D<sub>3</sub> 含量的增加, 许氏平鲈幼鱼 T-AOC, MDA、C<sub>3</sub> 和 C<sub>4</sub> 含量显著增加, T-AOC 在 D4 组达到最高(图 2A); MDA 含量呈先下降后上升的趋势, D4 组有最小值(图 2B); C<sub>3</sub> 和 C<sub>4</sub> 含量先上升后下降, 均在 D4 组有最大值(图 2C、D)。

表6 维生素D<sub>3</sub>对许氏平鲈幼鱼攻毒后发病率的影响  
Tab.6 Effects of vitamin D<sub>3</sub> on incidence rate of juvenile *S. schlegelii* after challenge

项目 Item	组别 Groups					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
攻毒1天后发病数 Number of cases after 1 d challenge/ind.	10	8	5	5	7	6
攻毒2天后发病数 Number of cases after 2 d challenge/ind.	4	2	3	1	1	2
累积发病总数 Cumulative total number of cases/ind.	14	10	8	6	8	8
累积发病率 Cumulative incidence rate/%	70	50	40	30	40	40

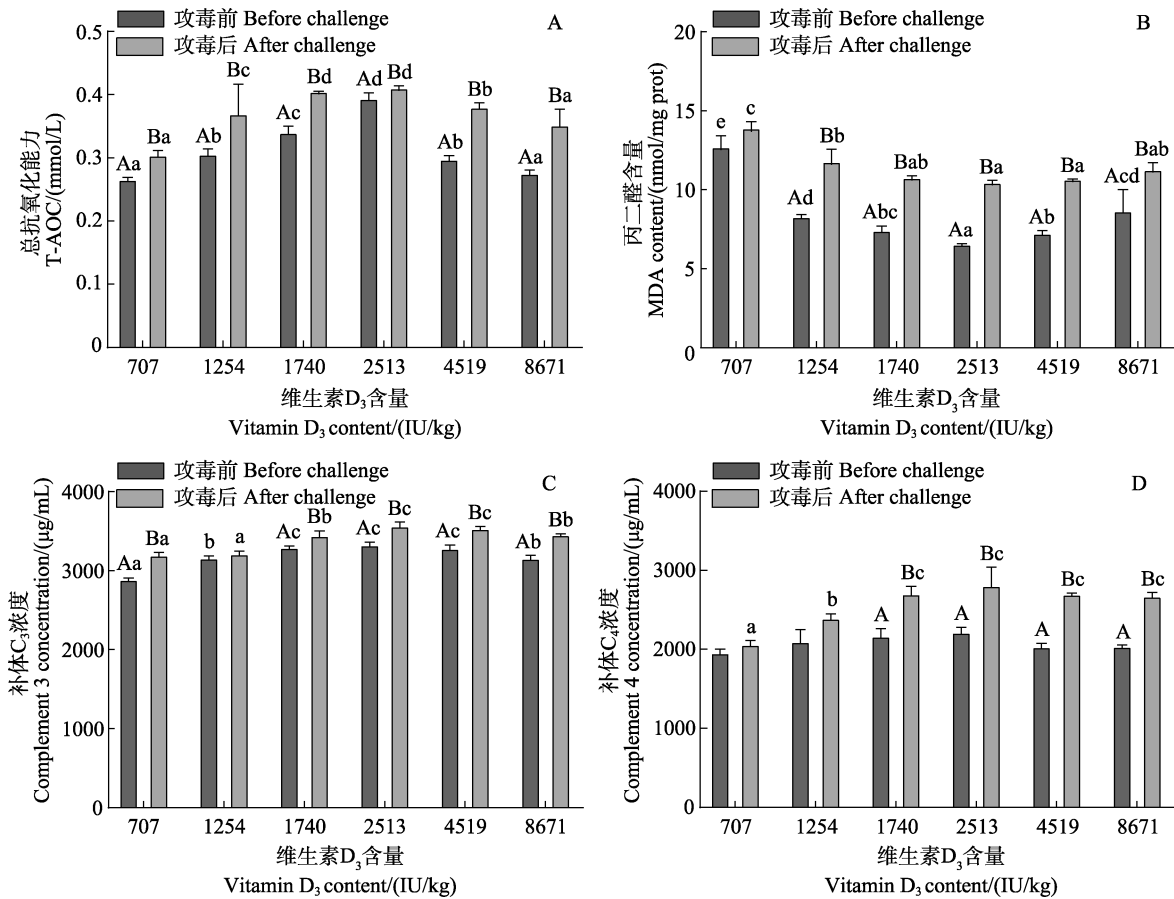


图2 维生素D<sub>3</sub>对许氏平鲈幼鱼攻毒前后血清T-AOC、MDA、补体3和补体4的影响  
Fig.2 Effects of vitamin D<sub>3</sub> on serum T-AOC, MDA, complement C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> of juvenile *S. schlegelii* before and after challenge

小写字母不同表示攻毒前后组间差异显著(P<0.05), 大写字母不同表示攻毒前后组内差异显著(P<0.05).  
Different lowercase letters indicate significant difference between groups before and after challenge (P<0.05), different uppercase letters indicate significant difference within group before and after challenge (P<0.05).

### 2.6 维生素D<sub>3</sub>对许氏平鲈幼鱼攻毒前后肝脏和头肾相关基因表达量的影响

由表7可知, 随着维生素D<sub>3</sub>含量的增加, 许氏平鲈幼鱼肝脏应激基因(HSP70)和免疫基因(MYD88、TRAF6、IRAK4和TLR2)在攻毒前后均先上升后下降; 与攻毒前相比, 攻毒后基因表达量显著高。随着维生

素D<sub>3</sub>含量的增加, 攻毒前许氏平鲈肝脏HSP70和MYD88基因表达量均在D4组有最大值并显著高于对照组(P<0.05), 攻毒后肝脏HSP70和MYD88基因表达量均在D5组达到最高; 攻毒前后肝脏IRAK4和TRAF6基因表达量均在D4组有最大值并显著高于对照组(P<0.05); 攻毒前D4和D5组TLR2基因表达量差异不显著并显著高于其他组, 攻毒后D5组TLR2

基因表达量有最大值并显著高于其他组( $P < 0.05$ )。

由表 8 可知, 随着维生素 D<sub>3</sub> 含量的增加, 许氏平鲉幼鱼头肾应激基因(*HSP70*)和免疫基因(*MYD88*、*TRAF6*、*IRAK4* 和 *TLR2*)在攻毒前后均先上升后下降; 与攻毒前相比, 攻毒后基因表达量显著高。随着维生

素 D<sub>3</sub> 含量的增加, 攻毒前后头肾 *HSP70*、*MYD88* 和 *IRAK4* 基因表达量均在 D4 组达到最高并显著高于对照组( $P < 0.05$ ); 攻毒前后头肾 *TRAF6* 基因表达量均随着维生素 D<sub>3</sub> 含量的增加而增加, 均在 D5 组达到最高; 攻毒前头肾 *TLR2* 基因表达量实验组显著高于对

表 7 维生素 D<sub>3</sub> 对许氏平鲉幼鱼攻毒前后肝脏相关基因表达量的影响

Tab.7 Effects of vitamin D<sub>3</sub> on liver related genes expression in juvenile *S. schlegelii* before and after challenge

基因 Gene	时间 Time	组别 Groups					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6
<i>HSP70</i>	攻毒前 Before challenge	1.07±0.07 <sup>aA</sup>	1.34±0.12 <sup>bA</sup>	1.62±0.16 <sup>cA</sup>	2.00±0.13 <sup>dA</sup>	1.42±0.11 <sup>bA</sup>	1.31±0.15 <sup>bA</sup>
	攻毒后 After challenge	1.53±0.41 <sup>aB</sup>	1.95±0.23 <sup>bB</sup>	2.25±0.09 <sup>cB</sup>	2.95±0.20 <sup>dB</sup>	3.85±0.19 <sup>eB</sup>	1.91±0.13 <sup>bB</sup>
<i>MYD88</i>	攻毒前 Before challenge	1.02±0.08 <sup>aA</sup>	1.26±0.11 <sup>bA</sup>	1.46±0.10 <sup>cA</sup>	1.80±0.08 <sup>cdA</sup>	1.67±0.09 <sup>dA</sup>	1.45±0.27 <sup>c</sup>
	攻毒后 After challenge	1.17±0.09 <sup>aB</sup>	1.46±0.10 <sup>bB</sup>	1.60±0.08 <sup>cB</sup>	2.02±0.07 <sup>dB</sup>	2.06±0.12 <sup>dB</sup>	1.61±0.12 <sup>c</sup>
<i>IRAK4</i>	攻毒前 Before challenge	1.09±0.12 <sup>aA</sup>	1.46±0.10 <sup>bA</sup>	1.84±0.18 <sup>cd</sup>	2.05±0.07 <sup>dA</sup>	1.86±0.27 <sup>cd</sup>	1.67±0.21 <sup>c</sup>
	攻毒后 After challenge	1.51±0.18 <sup>aB</sup>	1.85±0.14 <sup>bB</sup>	1.89±0.11 <sup>b</sup>	2.18±0.02 <sup>cB</sup>	1.92±0.06 <sup>b</sup>	1.84±0.13 <sup>b</sup>
<i>TRAF6</i>	攻毒前 Before challenge	1.12±0.20 <sup>aA</sup>	1.64±0.12 <sup>bA</sup>	1.93±0.08 <sup>cA</sup>	2.59±0.19 <sup>dA</sup>	1.67±0.17 <sup>bA</sup>	1.60±0.11 <sup>bA</sup>
	攻毒后 After challenge	2.08±0.20 <sup>aB</sup>	2.53±0.21 <sup>bB</sup>	2.78±0.11 <sup>bB</sup>	3.38±0.25 <sup>cB</sup>	2.70±0.28 <sup>bB</sup>	2.54±0.26 <sup>bB</sup>
<i>TLR2</i>	攻毒前 Before challenge	1.05±0.10 <sup>aA</sup>	1.51±0.09 <sup>bA</sup>	1.76±0.10 <sup>cA</sup>	2.07±0.17 <sup>dA</sup>	2.07±0.10 <sup>dA</sup>	1.55±0.10 <sup>bA</sup>
	攻毒后 After challenge	1.63±0.14 <sup>aB</sup>	2.18±0.04 <sup>bcB</sup>	2.07±0.13 <sup>bB</sup>	2.28±0.08 <sup>cB</sup>	3.50±0.23 <sup>dB</sup>	2.11±0.13 <sup>bB</sup>

表 8 维生素 D<sub>3</sub> 对许氏平鲉幼鱼攻毒前后头肾相关基因表达量的影响

Tab.8 Effects of vitamin D<sub>3</sub> on head kidney related genes expression in juvenile *S. schlegelii* before and after challenge

基因 Gene	时间 Time	组别 Groups					
		D1	D2	D3	D4	D5	D6
<i>HSP70</i>	攻毒前 Before challenge	1.02±0.19 <sup>aA</sup>	1.04±0.16 <sup>aA</sup>	1.16±0.12 <sup>abA</sup>	1.35±0.19 <sup>bA</sup>	1.19±0.07 <sup>abA</sup>	1.18±0.20 <sup>abA</sup>
	攻毒后 After challenge	1.60±0.15 <sup>aB</sup>	2.07±0.18 <sup>bcB</sup>	2.16±0.08 <sup>bcB</sup>	2.23±0.18 <sup>cB</sup>	2.07±0.16 <sup>bcB</sup>	2.02±0.15 <sup>bB</sup>
<i>MYD88</i>	攻毒前 Before challenge	1.01±0.17 <sup>aA</sup>	1.10±0.19 <sup>aA</sup>	1.15±0.12 <sup>aA</sup>	2.18±0.21 <sup>cA</sup>	1.50±0.09 <sup>bA</sup>	1.19±0.16 <sup>aA</sup>
	攻毒后 After challenge	1.85±0.32 <sup>aB</sup>	2.25±0.20 <sup>bB</sup>	2.36±0.17 <sup>bcB</sup>	3.86±0.25 <sup>dB</sup>	2.55±0.26 <sup>cB</sup>	2.30±0.15 <sup>bcB</sup>
<i>IRAK4</i>	攻毒前 Before challenge	1.04±0.13 <sup>aA</sup>	1.23±0.13 <sup>bA</sup>	1.31±0.11 <sup>bcA</sup>	1.44±0.14 <sup>cA</sup>	1.29±0.12 <sup>bcA</sup>	1.29±0.12 <sup>bcA</sup>
	攻毒后 After challenge	1.41±0.17 <sup>aB</sup>	1.82±0.12 <sup>bcB</sup>	1.96±0.27 <sup>bcB</sup>	2.02±0.15 <sup>cB</sup>	1.80±0.11 <sup>bB</sup>	1.76±0.07 <sup>bB</sup>
<i>TRAF6</i>	攻毒前 Before challenge	1.01±0.15 <sup>aA</sup>	2.17±0.30 <sup>bA</sup>	3.43±0.42 <sup>c</sup>	4.24±0.17 <sup>dA</sup>	4.39±0.52 <sup>dA</sup>	3.23±0.28 <sup>cA</sup>
	攻毒后 After challenge	2.77±0.46 <sup>aB</sup>	4.85±0.40 <sup>cB</sup>	3.86±0.43 <sup>b</sup>	4.51±0.10 <sup>bcB</sup>	5.38±0.93 <sup>cB</sup>	4.70±1.49 <sup>bcB</sup>
<i>TLR2</i>	攻毒前 Before challenge	1.00±0.03 <sup>aA</sup>	1.19±0.19 <sup>bA</sup>	1.48±0.17 <sup>cA</sup>	1.45±0.12 <sup>cA</sup>	1.44±0.07 <sup>cA</sup>	1.35±0.17 <sup>cA</sup>
	攻毒后 After challenge	1.82±0.15 <sup>aB</sup>	2.09±0.20 <sup>bB</sup>	2.44±0.18 <sup>cB</sup>	2.45±0.18 <sup>cB</sup>	2.41±0.13 <sup>cB</sup>	2.17±0.31 <sup>bB</sup>

照组( $P < 0.05$ ), 攻毒后在 D4 组达到最高。

### 3 讨论

#### 3.1 维生素 D<sub>3</sub> 对许氏平鲈幼鱼生长及体组成的影响

研究表明, 饲料中添加适宜的维生素 D<sub>3</sub> 可提高鲈鱼、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 的生长 (张璐等, 2016; Barnett, 1982; Andrews *et al.*, 1980), 缺乏维生素 D<sub>3</sub> 会降低杂交罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 的食欲 (Shiau *et al.*, 1993), 维生素 D<sub>3</sub> 过量时, 溪鳉 (*Salvelinus fontinalis*) 会表现出生长缓慢和中毒等现象 (Poston, 1969), 但对大西洋鲑 (*Salmo salar*) 和黄颡鱼的 WGR 和 SGR 等均无显著影响 (Horvli *et al.*, 2015; 段鸣鸣等, 2014)。本研究表明, 不同的维生素 D<sub>3</sub> 含量会显著影响许氏平鲈的 WGR、SGR 和 FCR。对照组的 WGR 和 SGR 都显著低于实验组, 说明过低的维生素 D<sub>3</sub> 含量不能满足实验鱼的生长, 当饲料中维生素 D<sub>3</sub> 含量为 2513 IU/kg 时许氏平鲈幼鱼生长最好。本实验维生素 D<sub>3</sub> 含量最高组只表现出生长缓慢并未表现出中毒现象, 表明 8671 IU/kg 的维生素 D<sub>3</sub> 不会对许氏平鲈造成毒害。适宜含量的维生素 D<sub>3</sub> 可以显著降低实验鱼的 FCR、HSI 和 VSI, 这与青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*)、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 和斜带石斑鱼的研究结果相一致 (吴成龙等, 2015; 王可宝, 2011; 谢诗玮等, 2019)。本实验中 SR 无显著差异, 与吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 的研究结果一致 (喻丽娟等, 2018)。但对杂交罗非鱼的研究表明, 饲料中添加维生素 D<sub>3</sub> 的实验组的死亡率显著低于对照组 (Shiau *et al.*, 1993), 出现不同结果的原因可能是鱼类、大小、养殖周期和养殖环境不相同导致。

多数鱼类维生素 D<sub>3</sub> 的需求量现已确定, 本研究以 WGR 为评价指标, 许氏平鲈幼鱼维生素 D<sub>3</sub> 的需求量为 2 223.45 IU/kg。这与斜带石斑鱼的需求量类似 (2250 IU/kg) (谢诗玮等, 2019)。高于吉富罗非鱼 (259.8 IU/kg) 和鲈鱼 (431.0 IU/kg) 等鱼类的需求量 (喻丽娟等, 2018; 张璐等, 2016)。低于黄颡鱼的需求量 (16 600 IU/kg, 郭勋等, 2020)。这与鱼种类、实验饲料、实验环境、实验周期等有关。

随着维生素 D<sub>3</sub> 添加量的增加, 全鱼和肌肉粗脂肪先上升后下降, 说明饲料中添加维生素 D<sub>3</sub> 影响了许氏平鲈幼鱼的脂肪代谢, 但影响脂肪代谢的机理还需进一步研究。全鱼和肌肉粗灰分无显著性差异, 但添加维生素 D<sub>3</sub> 的实验鱼的粗灰分高于对照组, 表明维生素 D<sub>3</sub> 促进了矿物质在体内的沉积。全鱼水分、

粗蛋白和肌肉水分无显著性差异, 这一结果与吉富罗非鱼的研究结果相似 (喻丽娟等, 2018), 说明水分和粗蛋白对于维生素 D<sub>3</sub> 是不敏感指标。

研究表明, 饲料中维生素 D<sub>3</sub> 含量适宜, 对骨骼矿化和钙沉积有促进作用, 低于或高于适宜含量, 都会使骨骼矿化异常 (杨玉菊, 2001)。本研究中, 随着维生素 D<sub>3</sub> 添加量的增加许氏平鲈幼鱼脊椎骨粗灰分和钙含量呈增加的趋势, 与鲈鱼幼鱼、虹鳟和皱纹盘鲍 (*Salmo gairdneri*) 的研究结果一致 (张璐等, 2016; Barnett, 1982; 周歧存等, 2004), 说明维生素 D<sub>3</sub> 对钙的代谢途径具有间接或直接的调节作用, 从而促进鱼体的生长。

#### 3.2 维生素 D<sub>3</sub> 对许氏平鲈幼鱼血清生化指标的影响

T-AOC 是反应血液抗氧化能力的重要指标。本研究中, T-AOC 随着维生素 D<sub>3</sub> 添加量的增加而增加, 在维生素 D<sub>3</sub> 含量为 2513 IU/kg 时最强, 说明 2513 IU/kg 维生素 D<sub>3</sub> 有利于提高许氏平鲈幼鱼血清中 T-AOC。SOD 呈相同的变化趋势, MDA 则呈相反的变化趋势, 这一结果说明, 饲料中添加维生素 D<sub>3</sub> 可以提高机体抗氧化能力。血清 ALT 和 AST 是反应肝脏是否健康的重要指标 (李彦等, 2008; 王宝恩, 1996), 本研究中, ALT 和 AST 随着维生素 D<sub>3</sub> 添加量的增加呈先下降后上升的趋势, 说明添加维生素 D<sub>3</sub> 对许氏平鲈幼鱼肝脏具有保护作用。血清 T-CHO 随着维生素 D<sub>3</sub> 添加量的增加先升高后下降, 与吉富罗非鱼和团头鲂的研究结果相似 (喻丽娟等, 2018; 王可宝, 2011), 表明适量的维生素 D<sub>3</sub> 促进了鱼类肝脏中脂肪的代谢, 过量的维生素 D<sub>3</sub> 可能会影响肝脏代谢脂肪的能力, 使脂肪代谢受阻, 导致进入血清的 T-CHO 减少, 但是影响机理还有待进一步研究。以上 3 组指标均表明, 饲料中添加过量的维生素 D<sub>3</sub> 会影响肝脏的生理功能。血脂与全鱼粗脂肪沉积是正相关关系, 说明维生素 D<sub>3</sub> 促进实验鱼的生长可能与促进其对脂肪的利用有关。维生素 D<sub>3</sub> 主要通过提高肠道和肾小管上皮对钙的吸收, 促使血清 Ca<sup>2+</sup> 上升 (张桐, 2011)。本研究中, 血清 Ca<sup>2+</sup> 呈增加趋势。维生素 D<sub>3</sub> 可促使补体免疫系统活性增强。本研究中, 添加维生素 D<sub>3</sub> 的实验组 C<sub>3</sub> 和 C<sub>4</sub> 含量显著高于对照组, 研究表明, 添加维生素 D<sub>3</sub> 可以增强机体的免疫能力。

#### 3.3 维生素 D<sub>3</sub> 对许氏平鲈幼鱼攻毒后保护率和血清酶活性的影响

维生素 D<sub>3</sub> 促使水产动物免疫能力增强, 本研究中, 许氏平鲈幼鱼感染哈维氏弧菌后实验组累积发病



率低于对照组, 说明维生素 D<sub>3</sub> 增强了许氏平鲈抵抗病原菌的能力。

随着维生素 D<sub>3</sub> 含量的增加, 许氏平鲈幼鱼攻毒后血清 T-AOC 和 MDA 明显增加, T-AOC 先升高后降低, MDA 呈相反的变化趋势, 说明许氏平鲈幼鱼受哈维氏弧菌侵袭后体内自由基和活性氧增多, T-AOC 增强, 脂质过氧化物增加, MDA 含量升高。T-AOC 在 D4 组活性最强, MDA 含量在 D4 组最低, 说明许氏平鲈幼鱼在感染哈维氏弧菌后饲料中维生素 D<sub>3</sub> 含量在 2513 IU/kg 时有利于提高机体的总抗氧化能力。

补体是反应机体抵抗病原菌侵袭和炎症反应的重要指标(Lambris *et al.*, 1989)。本研究中, 在哈维氏弧菌作用下, 血清 C<sub>3</sub> 和 C<sub>4</sub> 的含量显著增加, 实验组 C<sub>3</sub> 含量显著高于对照组和 D2 组, 实验组 C<sub>4</sub> 含量显著高于对照组, 出现该结果的原因可能是许氏平鲈幼鱼受哈维氏弧菌感染后血清中 C<sub>3</sub> 和 C<sub>4</sub> 含量增加用以增强机体抵抗病原菌的能力, 缺乏维生素 D<sub>3</sub> 的对照组和 D2 组抵抗病原菌的能力减弱。

### 3.4 维生素 D<sub>3</sub> 对攻毒前后应激基因与免疫基因表达量的影响

热休克蛋白又称热应激蛋白, 是生物有机体在受到刺激后, 发生热休克反应时产生的一种伴随细胞蛋白(Kiang *et al.*, 1998)。本研究中, 不同水平的维生素 D<sub>3</sub> 含量在攻毒前后均会显著影响 *HSP70* mRNA 在肝脏和头肾中的表达, 且攻毒后 *HSP70* mRNA 表达量显著高于攻毒前, 说明饲料中添加维生素 D<sub>3</sub> 有利于提高许氏平鲈的抗应激能力。Toll 样受体(TLRs)是一种病原体识别分子的受体, 参与免疫系统的信号转导过程(范泽军等, 2015)。TLRs 能够与配体结合形成二聚体, 通过上游的接头蛋白 MYD88 与其下游 IRAK4 和 TRAF6 等相结合, 最终激活核因子(NF- $\kappa$ B)进入细胞核中, 诱发炎症因子和促炎症因子的表达。本研究中, 不同水平的维生素 D<sub>3</sub> 含量在攻毒前后均会显著影响 *MYD88*、*IRAK4*、*TRAF6* 和 *TLR2* mRNA 在肝脏和头肾中的表达, 以上基因在不同组织中的表达和饲料中维生素 D<sub>3</sub> 含量有关, 这一结果说明饲料中添加适宜的维生素 D<sub>3</sub> 可以促进应激基因和免疫基因的表达, 进而增强许氏平鲈幼鱼对病原菌的抵抗能力。本研究与黄鳝(*Monopterus albus*)、金头鲷(*Sparus auratus*)和欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)等研究结果相似(黎德兵等, 2014; Cerezuela *et al.*, 2008; Rebeca *et al.*, 2009), 更进一步说明了适宜的维生素 D<sub>3</sub> 可以促进相关免疫基因在不同组织中的表达。

## 4 结论

综上所述, 维生素 D<sub>3</sub> 是许氏平鲈幼鱼维持体内矿物质稳态和生长发育的必需营养物质。适宜的维生素 D<sub>3</sub> 添加量可以提高许氏平鲈幼鱼抗氧化和免疫能力。以 WGR 为评价指标, (20.95 $\pm$ 0.05) g 的许氏平鲈幼鱼对维生素 D<sub>3</sub> 的最适需求量为 2 223.45 IU/kg 饲料。

## 参 考 文 献

- ANDREWS J W, MURAI T, PAGE J W. Effects of dietary cholecalciferol and ergocalciferol on catfish. *Aquaculture*, 1980, 19(1): 49–54
- BAI S C, LEE K J, JANG H K. Development of an experimental model for vitamin C requirement study in Korean rockfish, *Sebastes schlegelii*. *Journal of Aquaculture*, 1996, 9(2): 169–178
- BAI S C, LEE K J. Different levels of dietary DL-alpha-tocopheryl acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegelii*. *Aquaculture*, 1998, 161, 405–414
- BARNETT B J. Relative biopotency of dietary ergocalciferol and cholecalciferol and the role of and requirement for vitamin D in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Nutrition*, 1982, 112(11): 2011–2019
- CALTON E K, KEANE K N, NEWSHOLME P, *et al.* The impact of vitamin D levels on inflammatory status: A systematic review of immune cell studies. *PLoS One*, 2015, 10(11): 141–147
- CEREZUELA R, CUESTA A, MESEGUER J, *et al.* Effects of dietary vitamin D<sub>3</sub> administration on innate immune parameters of seabream (*Sparus aurata* L). *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 26(2): 243–245
- DUAN M M, WANG C F, XIE C X. Effects of vitamin D<sub>3</sub> on antioxidant capacity and immune function of juvenile *Pelteobagrus fulvidraco*. *Freshwater Fisheries*, 2014, 34(3): 80–84 [段鸣鸣, 王春芳, 谢从新. 维生素 D<sub>3</sub> 对黄颡鱼幼鱼抗氧化能力及免疫功能的影响. *淡水渔业*, 2014, 34(3): 80–84]
- FAN Z J, ZOU P F, YAO C L. Advances in fish toll-like receptors and signal transduction. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(1): 173–184 [范泽军, 邹鹏飞, 姚翠鸾. 鱼类 Toll 样受体及其信号传导的研究进展. *水生生物学报*, 2015, 39(1): 173–184]
- GUO X, CHENG K, MA C S, *et al.* Effects of dietary vitamin D<sub>3</sub> on growth and toll-like receptors TLR18, TLR19 and TLR21 in juvenile *Pelteobagrus fulvidraco*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(3): 461–469 [郭勋, 程珂, 马春松, 等. 饲料中维生素 D<sub>3</sub> 的添加水平对黄颡鱼幼鱼生长和 Toll 样受体 TLR18、TLR19 和 TLR21 的影响. *水生生物学报*, 2020, 44(3): 461–469]

- HAGA Y, TAKEUCHI T, MURAYAMA Y, *et al.* Vitamin D<sub>3</sub> compounds induce hypermelanosis on the blind side and vertebral deformity in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 2004, 70(1): 59–67
- HORVLI O, LIE O, AKSNES L. Tissue distribution of vitamin D<sub>3</sub> in Atlantic salmon *Salmo salar*: Effect of dietary level. *Aquaculture Nutrition*, 2015, 4(2): 127–131
- KIANG J G, TSOKOS G C. Heat shock protein 70 kDa, molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacology and Therapeutics*, 1998, 80(2): 183–201
- LAMBRIS J D, SERVIS C. C<sub>3</sub> synthetic peptides support growth of human CR2-positive lymphoblastoid B cells. *Journal of Immunology*, 1989, 142(7): 211–268
- LI B S, WANG J Y, WANG C Q, *et al.* Research progress and industrial development status of compound feed for *Sebastes schlegelii*. *Aquatic Research*, 2019, 6(2): 86–95 [李宝山, 王际英, 王成强, 等. 许氏平鲷配合饲料的研究进展及产业发展现状. *水产研究*, 2019, 6(2): 86–95]
- LI D B, LI C, ZHOU D G, *et al.* Effects of dietary vitamin D<sub>3</sub> level on expression of antimicrobial peptide hepcidin gene in *Monopterus albus*. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 24(8): 1520–1526 [黎德兵, 李超, 周定刚, 等. 饲料中维生素 D<sub>3</sub> 水平对黄鳝抗菌肽 hepcidin 基因表达的影响. *动物营养学报*, 2014, 24(8): 1520–1526]
- LI X, HUA X M, WEI X, *et al.* Effects of dietary vitamin D<sub>3</sub> content on growth and antioxidant capacity of largemouth bass. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2021, 30(1): 94–102 [李向, 华雪铭, 魏翔, 等. 饲料中维生素 D<sub>3</sub> 含量对大口黑鲈生长和抗氧化能力的影响. *上海海洋大学学报*, 2021, 30(1): 94–102]
- LI Y, ZHAO B, WU J. Effects of traditional Chinese medicine additives on serum biochemical indexes of broilers. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2008, 44(6): 46–47 [李彦, 赵柄, 武杰. 中药添加剂对肉杂鸡血清生化指标的影响. *中国兽医杂志*, 2008, 44(6): 46–47]
- LOCK E J, WAAGB R, BONGA S W, *et al.* The significance of vitamin D for fish: A review. *Aquaculture Nutrition*, 2010, 16(1): 100–116
- MA L M, WANG W J, LIU C H, *et al.* Selection of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Marine Genomics*, 2013, 11: 67–73
- POSTON H A. Effects of massive doses of vitamin D<sub>3</sub> on fingerling brook trout. *Fish Research Bulletin*, 1969, 32: 48–50
- REBECA C, ALBERTO C, LEE J, *et al.* Effects of dietary vitamin D<sub>3</sub> administration on innate immune parameters of seabream (*Sparus aurata* L). *Fish and Shellfish Immunology*, 2009, 26(2): 243–248
- SHEN Y B, WANG J Y, LI B S, *et al.* Study on the dietary arginine requirement of juvenile *Sebastes schlegelii*. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(3): 33–44 [沈钰博, 王际英, 李宝山, 等. 许氏平鲷幼鱼对饲料中精氨酸需求量的研究. *渔业科学进展*, 2022, 43(3): 33–44]
- SHIAU S Y, HWANG J Y. Vitamin D requirements of juvenile hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1993, 59(3): 553–558
- TAVEEKIJAKARE P, MIYAZAKI T, MATSUMOTO M, *et al.* Histopathological and haematological changes in amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus* (Jordan & McGregor), fed a vitamin-D-free diet. *Journal of Fish Diseases*, 1996, 19(4): 289–294
- WANG B E. New progress in hepatology basic and clinical. Beijing: Beijing Publishing House, 1996, 59–61 [王宝恩. 肝脏病学新进展—基础与临床. 北京: 北京出版社, 1996, 59–61]
- WANG K B. Effects of dietary vitamin D<sub>3</sub> levels on growth, non-specific immunity and anti-pathogenic of Wuchang break (*Megalobrama amblycephala*, Yih). Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2011 [王可宝. 饲料中不同水平维生素 D<sub>3</sub> 对团头鲂生产性能、非特异性免疫及抗病原菌感染的影响. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2011]
- WU C L, YE J Y. The effects of dietary vitamin D on the growth, antioxidant capacities and innate immune responses in juvenile black carp *Mylopharyngodon piceus*. Abstracts of Papers of 2015 Annual Meeting of Chinese Academy of Fisheries, Beijing: Chinese Fisheries Society, 2015, 367 [吴成龙, 叶金云. 维生素 D 对青鱼幼鱼生长、抗氧化和非特异性免疫力的影响. 2015 年中国水产学会学术年会论文摘要集, 北京: 中国水产学会, 2015, 367]
- XIE S W, TIAN L X, LIU Y J, *et al.* The demand of vitamin D<sub>3</sub> in practical feed for *Epinephelus coioides*. *Southern Fisheries Science*, 2019, 15(4): 61–67 [谢诗玮, 田丽霞, 刘永坚, 等. 斜带石斑鱼对实用饲料中维生素 D<sub>3</sub> 的需求量. *南方水产科学*, 2019, 15(4): 61–67]
- YANG Y J. The effect of vitamin D on the bone metabolism and cytokines in cows. Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2001 [杨玉菊. 维生素 D 对奶牛骨代谢调节及细胞因子的影响. 东北农业大学硕士研究生学位论文, 2001]
- YU L J, WEN H, ZHOU W H, *et al.* The effect of vitamin D addition on growth performance, body composition and serum biochemical indexes of tilapia in the middle of the cultivation period. *Journal of Animal Nutrition*, 2018, 30(3): 999–1006 [喻丽娟, 文华, 周书华, 等. 维生素 D 添加水平对养成中期吉富罗非鱼生长性能、体组成和血清生化指标的影响. *动物营养学报*, 2018, 30(3): 999–1006]
- ZHANG L, LI J, MAI K S, *et al.* Effects of dietary vitamin D content on growth performance and calcium and phosphorus metabolism of juvenile *Lateolabrax japonicus*. *Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(5): 1402–1411 [张璐, 李静, 麦康森, 等. 饲料中不同维生素 D 含量对鲈鱼幼鱼生长性能和钙磷代谢的影响. *动物营养学报*, 2016, 28(5): 1402–1411]

- ZHANG T. Effects of dietary vitamin D<sub>3</sub> on juvenile Songpu mirror carp. Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2011 [张桐. 饲料中添加不同水平维生素 D<sub>3</sub> 对松浦镜鲤幼鱼影响的研究. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2011]
- ZHOU Q C, MAI K S. Studies on the nutritional requirement of vitamin D for *Salmo gairdneri*. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(2): 155–160 [周歧存, 麦康森. 皱纹盘鲍维生素 D 营养需要的研究. 水产学报, 2004, 28(2): 155–160]
- ZHOU Y, WANG J Y, LI B S, *et al.* Study on dietary vitamin B<sub>6</sub> requirement of juvenile *Sebastes schlegelii*. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(6): 37–48 [周莹, 王际英, 李宝山, 等. 许氏平鲈幼鱼对饲料中维生素 B<sub>6</sub> 需求量的研究. 渔业科学进展, 2020, 41(6): 37–48]

(编辑 陈 辉)

## Dietary Vitamin D<sub>3</sub> Requirement of Juvenile Rockfish (*Sebastes schlegelii*)

SUN Haiyue<sup>1,2</sup>, WANG Jiyong<sup>2①</sup>, LI Baoshan<sup>2</sup>, WANG Chengqiang<sup>2</sup>, LIU Caili<sup>2</sup>, SHEN Yubo<sup>2</sup>,  
SUN Yongzhi<sup>2</sup>, HUANG Bingshan<sup>2</sup>, WANG Shixin<sup>2</sup>

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition (CREEFN) of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Collaborative Innovation for Aquatic Animal Genetics and Breeding, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shandong Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai, Shandong 264006, China)

**Abstract** Rockfish (*Sebastes schlegelii*) is a near-shore, carnivorous coldwater fish, primarily distributed in the East China Sea, Korean peninsula, Japan, and the Sea of Okhotsk. Owing to its delicious meat, strong disease resistance, rapid growth, and other characteristics, it has become one of the main cultured fish in deep water cages in northern China. A high-quality and efficient formula diet for rockfish has not been developed because of nutrient requirement deficiencies. As vitamin D<sub>3</sub> is the most important form of vitamin D and only exists in animals, cultured fish can only obtain vitamin D<sub>3</sub> from their diet. Vitamin D<sub>3</sub> can maintain the mineral homeostasis in fish, participate in the endocrine system, and affect the proliferation and apoptosis of immune cells. As such, this experiment was conducted to investigate the effects of dietary vitamin D<sub>3</sub> on growth performance, body composition, and immune function of juvenile rockfish and determine the optimum dietary vitamin D<sub>3</sub> requirement. Six kinds of isonitrogenous and isolipidemic diets with 707, 1254, 1740, 2513, 4519, and 8671 IU/kg of vitamin D<sub>3</sub> were prepared by adding 0, 500, 1000, 2000, 4000, and 8000 IU/kg of vitamin D<sub>3</sub> into the basic diet. Each diet was randomly assigned to triplicate groups of juveniles with initial bodyweights of (20.95±0.05) g for eight weeks. The fish were challenged with *Vibrio harveyi* for 48 hours after feeding. Results showed that, with the increase of vitamin D<sub>3</sub> contents, both the weight gain rate (WGR) and specific growth rate first increased and then decreased, reaching a maximum value in the 2513 IU/kg group, which was significantly higher than that in the 707 IU/kg group. The feed conversion rate first decreased and then increased and was significantly lower in the 2513 IU/kg group than other groups. Both viscerosomatic index and hepatosomatic index decreased significantly and were significantly higher in the 707 IU/kg group than in other groups. There were no significant differences in the condition factor and survival rate among all groups. The crude fat of whole fish and muscle showed an increasing trend, reaching a maximum value in the 4519 IU/kg group, which was significantly higher than 707 IU/kg group. The crude muscle protein first decreased and then increased; the 8671 IU/kg group was significantly higher than the 1740 IU/kg and 2513 IU/kg groups. The moisture, crude protein, and crude ash of whole fish, as well as

① Corresponding author: WANG Jiyong. E-mail: ytwjy@126.com

the muscle moisture and crude ash, had no significant differences in concentration among all groups. The spine crude ash showed an increasing trend; the 1740~8671 IU/kg groups had significantly higher contents than the 707 IU/kg group. The calcium contents increased with the increase of dietary vitamin D<sub>3</sub> levels. Total antioxidant capacity (T-AOC) and superoxide dismutase activities first increased and then decreased, reaching a maximum in the 2513 IU/kg group. The malondialdehyde (MDA) contents first decreased and then increased; the 2513 IU/kg group had significantly lower content than the 707 IU/kg group. Complement 3 (C<sub>3</sub>) contents first increased and then decreased; the 707 IU/kg group had significantly lower content than the other groups. Alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase first decreased and then increased, reaching minimum values in the 2513 IU/kg group. The highest cholesterol and triglyceride values were observed in the 4519 IU/kg group. The calcium (Ca<sup>2+</sup>) contents first increased with the increase of dietary vitamin D<sub>3</sub> levels, with the 707 IU/kg group showing significantly lower content than other groups. The phosphorus and complement 4 (C<sub>4</sub>) contents were not affected by dietary vitamin D<sub>3</sub>. After the challenge, T-AOC, MDA, C<sub>3</sub>, and C<sub>4</sub> were significantly elevated; T-AOC, C<sub>3</sub>, and C<sub>4</sub> in the serum had maximum values in the 2513 IU/kg group, and MDA reached its minimum value in the 2513 IU/kg group. With the increase of dietary vitamin D<sub>3</sub> content, *HSP70*, *MYD88*, *IRAK4*, *TRAF6*, and *TLR2* in the liver, and head kidney increased first and then decreased before and after the challenge. Gene expression was significantly elevated after the challenge. Taking WGR as the evaluation index, a broken line regression analysis showed that the optimum dietary vitamin D<sub>3</sub> requirement was 2 223.45 IU/kg diet for juvenile rockfish *S. schlegelii* with the body weight of (20.95±0.05) g.

**Key words** Rockfish (*Sebastes schlegelii*); Vitamin D<sub>3</sub>; Growth; Immunity; Requirement