

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200225001

http://www.yykxjz.cn/

孙敬诚, 李潇, 鲁康乐, 王玲, 宋凯, 张春晓. 饲料维生素 C 对急性降温后花鲈免疫、抗氧化及抗应激的影响. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 126–133

SUN J C, LI X, LU K L, WANG L, SONG K, ZHANG C X. Effects of dietary vitamin C on the immune, antioxidant capacity and stress tolerance of spotted seabass (*Lateolabrax maculatus*) after acute cooling. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 126–133

## 饲料维生素 C 对急性降温后花鲈免疫、 抗氧化及抗应激的影响\*

孙敬诚 李 潇 鲁康乐 王 玲 宋 凯 张春晓<sup>①</sup>

(厦门市饲料检测与安全评价重点实验室 集美大学水产学院 福建 厦门 361021)

**摘要** 为研究饲料维生素 C(Vc)对急性降温后花鲈(*Lateolabrax maculatus*)免疫、抗氧化及抗应激的影响,以含有不同水平 Vc(6.85、46.90、88.24、167.43、329.21 和 658.69 mg/kg)的饲料饲养花鲈 56 d 后,进行急性降温(从 33℃ 水体转入 27℃ 水体)处理 24 h 和 48 h。结果显示,降温 24 h 和 48 h 时,各组血清补体 3(C3)水平高于 0 h,而补体 4(C4)水平低于 0 h。饲料 Vc 在 6.85~167.43 mg/kg 时,血清免疫球蛋白 M(IgM)水平随降温时间的增加,在 24 h 和 48 h 显著高于 0 h ( $P<0.05$ );当饲料 Vc 含量高于 167.43 mg/kg 时,各时间点 IgM 差异不显著。血清溶菌酶(LZM)活性在降温 48 h 后显著低于降温前( $P<0.05$ ),而各 Vc 添加组显著高于对照组( $P<0.05$ )。肝脏丙二醛(MDA)含量在降温后显著高于降温前,但在降温后随着饲料 Vc 水平的升高而显著降低( $P<0.05$ )。肝脏总超氧化物歧化酶(T-SOD)含量随降温时间的增加,先增加后降低。在各时间点,花鲈肝脏谷胱甘肽(GSH)含量都随着饲料 Vc 水平的升高而升高。当饲料 Vc 为 6.85 mg/kg 时,肝脏血红素氧合酶(HO-1)活性在降温后显著高于降温前( $P<0.05$ );当饲料 Vc 为 88.24~167.43 mg/kg 时,肝脏 HO-1 活性在降温后显著低于降温前( $P<0.05$ )。花鲈血清热休克蛋白(HSP70)水平在降温后显著高于降温前( $P<0.05$ ),而当降温时间达到 48 h 时,各 Vc 添加组 HSP70 含量显著低于对照组。研究表明,饲料中适量的 Vc (46.90~167.43 mg/kg)能提高花鲈肝脏的抗氧化能力,减轻脂质过氧化水平,缓解花鲈急性降温引起的应激反应。

**关键词** 花鲈; 维生素 C; 急性降温; 抗应激

**中图分类号** S963 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0126-08

鱼类属变温动物,水体温度的变化会影响鱼类的各种生命活动。鱼体对温度的变化有一定的适应能力,但也有耐受限度,尤其是水温剧变时,鱼体内稳态会被破坏(常玉梅等, 2006), 消化酶活性降低(Wang *et al*, 2006), 导致摄食率降低, 进而影响鱼体的生长

(陈松波, 2004; 黄国强等, 2010; Munillá-Moran *et al*, 1996; 罗奇等, 2010)以及免疫力(强俊等, 2012), 也会造成血清生理的变化(Wakeling *et al*, 2000)。

维生素 C(Vc)是水溶性维生素,又称为抗坏血酸,是鱼类必需的营养素。Vc 作为鱼类合成羟化酶和氧

\* 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-47)资助 [This work was supported by China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-47)]. 孙敬诚, E-mail: 1397858950@qq.com

① 通讯作者: 张春晓, 教授, E-mail: cxzhang@jmu.edu.cn

收稿日期: 2020-02-25, 收修改稿日期: 2020-04-26

合酶的基质,参与鱼体胶原蛋白(Wilson *et al.*, 1973)、肉碱、类固醇的合成(Tolbert, 1979),最终促进皮肤、软骨和硬骨的生成(Darias *et al.*, 2011),在鱼类生长(Ai *et al.*, 2004)、抗氧化(Padayatty *et al.*, 2001)、机体免疫(廖畅宇等, 2012)和抗应激(Wan *et al.*, 2014)等方面具有重要作用。Vc 能降低机体皮质醇的产生,减缓动物体受到的外界应激(万金娟等, 2012)。在养殖过程中,在饲料中添加 Vc,可以提高鱼类的抗应激能力,增强鱼类对高密度、低氧胁迫的耐受性,并且显著提高养殖成活率(杨敬华等, 2004; 乔丽杰等, 2013)。

花鲈(*Lateolabrax maculatus*),别名海鲈、七星鲈,我国北起渤海、南至东海以及各大河口遍布花鲈踪迹。花鲈因其适应性广、抗病性强、肉鲜味美、营养丰富、生长快速等优质特性(胡鹏莉等, 2019),已成为养殖范围最广的海水鱼。在养殖生产中,常出现持续高温和温度突变等不可控环境变化,导致养殖花鲈生长减缓、摄食降低,甚至引发疾病,给养殖生产造成损失。管标等(2014)研究表明,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)等冷水性鱼类对高温胁迫尤为敏感,高低温急性变化会引起代谢速率的改变,影响其健康养殖。鉴于此,本研究旨在探讨饲料 Vc 对急性降温后花鲈免疫、抗氧化及抗应激的影响,以期 Vc 在抗应激营

养调控中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验饲料

以鱼粉、鸡肉粉、豆粕等作为主要蛋白源,鱼油、豆油等为主要脂肪源,配制粗蛋白水平为 43%、粗脂肪水平为 12%的实验用饲料,并以 L-抗坏血酸多聚磷酸酯(2APP)为 Vc 添加源(购买自山东天力药业有限公司维生素分公司,有效含量为 34.1%, GB/T23882-2009),配制 6 组等氮、等脂的实验饲料,其配方及营养水平见表 1。各组饲料中 Vc 含量实际测定值分别为 6.85、46.90、88.24、167.43、329.21 和 658.69 mg/kg,其中,对照组为 6.85 mg/kg。饲料于集美大学水产学院饲料加工车间制备,鱼粉、鸡肉粉、豆粕等原料均使用超微粉碎机粉碎。所有饲料原料均过 60 目筛,然后采用逐级扩大法,将各原料按配比定量混合均匀后,加入 40%左右的水搅拌。通过双螺旋杆饲料挤条机,制作粒径为 2.5 mm 的硬颗粒饲料。然后在电热鼓风干燥箱中 43℃恒温干燥 8 h,使实验饲料中的水分保持在 7%~9%,并于-20℃冰箱保存备用。

表 1 实验饲料组成及营养水平(干物质基础)

Tab.1 Formulation and proximate composition of the experimental diets (dry matter basis) (g·kg<sup>-1</sup> diet)

原料 Ingredients	维生素 C 含量 Vitamin C level					
	6.85	46.90	88.24	167.43	329.21	658.69
鱼粉 Fish meal	250	250	250	250	250	250
鸡肉粉 Poultry by-product meal	100	100	100	100	100	100
豆粕 Soybean meal	260	260	260	260	260	260
面粉 Wheat flour	267	266.87	266.74	266.48	265.96	264.92
鱼油 Fish oil	30	30	30	30	30	30
豆油 Soybean oil	20	20	20	20	20	20
卵磷脂 Lecithin	20	20	20	20	20	20
虾膏 Shrimp paste	20	20	20	20	20	20
磷酸二氢钙 Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	20	20	20	20	20	20
氯化胆碱 Choline chloride	5	5	5	5	5	5
矿物质预混料 Mineral premix <sup>1</sup>	5	5	5	5	5	5
维生素预混料 Vitamin premix <sup>2</sup>	3	3	3	3	3	3
L-抗坏血酸多聚磷酸酯 2APP	0	0.13	0.26	0.52	1.04	2.08
营养水平 Nutrient level						
粗蛋白 Crude protein	428.00	431.60	424.20	424.90	422.50	423.10
粗脂肪 Crude lipid	111.00	112.30	115.40	116.10	112.20	113.10
粗灰分 Crude ash	80.40	79.80	80.40	80.30	80.20	79.90
维生素 C Vitamin C/(mg·kg <sup>-1</sup> )	6.85	46.90	88.24	167.43	329.21	658.69

注: 1 和 2 参考 Zhang 等(2018)

Note: 1 and 2 refer to Zhang *et al.* (2018)

## 1.2 动物饲养与管理

实验所用花鲈鱼苗为当年同一批培育的鱼苗(购自福建省漳州市诏安县慧丰水产发展有限公司),养殖实验于大北农水产科技集团海康养殖基地进行。鱼苗暂养使用水泥池,并用对照组饲料驯养 10 d。将待分组鱼饥饿 24 h,随机选择体质健壮、规格一致[(2.2±0.2) g]的花鲈 720 尾,随机分为 6 组,每组 4 个生物学重复,每桶(300 L)放养 30 尾鱼,实验周期为 56 d。每天饱食投喂 2 次(08:30 和 17:30),记录每桶鱼的摄食量,并于投喂前后以虹吸管吸底排污。实验在控温的循环过滤水系统中进行,通过调试温控系统和覆盖双层塑料薄膜的方式,稳定控制缸内水温为 33℃,盐度为 25~28,溶氧≥9 mg/L。饲养 56 d 后,每个实验桶保留规格相似的花鲈 8 尾,通过换水、调试温控系统和覆盖双层塑料薄膜的方式,在 2 h 内将实验桶水温稳定控制在 27℃,进行为期 24 h 和 48 h 的急性降温实验,实验期间不再投喂饲料。

## 1.3 样品采集与分析

分别在急性降温 0、24 和 48 h,从每个实验桶各取 4 尾花鲈,以丁香酚麻醉(1:10000)后尾静脉取血,离心血清,-80℃保存,用于检测血清生化指标;取肝脏于-80℃保存,用于肝脏抗氧化酶活性的测定。

肝脏总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性(羟胺法)、丙二醛(MDA)含量(TBA 法)、谷胱甘肽(GSH)含量(微量酶标法)、血红素氧合酶 HO-1 活性、肝脏组织蛋白含量的测定所使用试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

血清溶菌酶(LZM)活性使用比浊法测定,而血清中补体 3(C3)、补体 4(C4)、免疫球蛋白 M(IgM)、热休克蛋白(HSP70)等含量均通过酶联免疫吸附法(ELISA)测定。试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

饲料中维生素 C 含量的测定采用 HPLC 法(Dabrowski *et al.*, 1989)。

## 1.4 数据统计与分析

实验数据使用 SPSS 22.0 统计软件进行单因素(one-way ANOVA)和双因素(two-way ANOVA)方差分析。若交互作用显著,则通过使用 SPSS 的语法代码进行简单效应分析(simple effect test)。所有实验数据均以平均值±标准误(Mean±SE)的形式来表示。

## 2 结果

### 2.1 Vc 对急性降温后花鲈血清免疫指标的影响

饲料 Vc 对急性降温后花鲈血清免疫能力的影响见表 2。花鲈血清 C3、C4 和 IgM 均受饲料 Vc 水平显著

表 2 饲料 Vc 对急性降温后花鲈血清免疫指标的影响

Tab.2 Effect of dietary vitamin C on serum immune index of spotted seabass after acute cooling

时间 Time/h	饲料维生素 C Vc/(mg·kg <sup>-1</sup> )	补体 3 C3/(μg·mL <sup>-1</sup> )	补体 4 C4/(μg·mL <sup>-1</sup> )	免疫球蛋白 M IgM/(mg·mL <sup>-1</sup> )	溶菌酶 LZM/(U·mL <sup>-1</sup> )
0	6.85	0.35±0.02	1.11±0.10	2.38±0.08	139.46±1.56
	46.90	0.32±0.01	1.30±0.07	2.56±0.04	149.91±3.70
	88.24	0.35±0.01	1.55±0.07	2.64±0.07	160.72±2.83
	167.43	0.39±0.01	1.67±0.04	2.86±0.02	162.52±6.72
	329.21	0.41±0.02	1.72±0.26	2.84±0.14	173.33±8.95
	658.69	0.36±0.01	1.77±0.07	2.89±0.21	189.73±1.74
24	6.85	0.58±0.02	1.02±0.04	3.49±0.29	141.98±8.22
	46.90	0.60±0.01	1.05±0.01	4.96±0.14	159.46±8.13
	88.24	0.55±0.02	0.89±0.01	3.60±0.48	154.23±6.24
	167.43	0.65±0.01	0.96±0.01	3.42±0.42	169.73±4.20
	329.21	0.77±0.01	1.04±0.05	2.63±0.09	161.98±1.78
	658.69	1.06±0.01	0.97±0.03	2.40±0.07	165.40±13.77
48	6.85	0.66±0.06	0.99±0.02	2.67±0.04	131.17±0.65
	46.90	0.73±0.05	0.88±0.04	2.35±0.03	148.83±3.28
	88.24	0.75±0.02	1.05±0.02	3.65±0.07	152.25±1.78
	167.43	0.81±0.06	1.12±0.01	4.90±0.02	155.32±11.82
	329.21	0.53±0.01	0.92±0.01	2.26±0.04	147.57±9.92
	658.69	0.51±0.01	0.82±0.03	2.71±0.13	137.66±12.64
<i>P</i> -value					
Vc		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
降温时间 Cooling time		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Vc×降温时间 Vc×cooling time		<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

影响( $P<0.05$ ), 也受降温时间显著影响( $P<0.05$ ), 且 Vc 水平和降温时间存在显著交互作用( $P<0.05$ ), 而血清 LZM 活性受饲料 Vc 水平和降温时间显著影响, 但不受二者交互作用的影响。降温 24 h 和 48 h 时, 各组 C3 水平高于 0 h, 而饲料 Vc 水平为 167.43 和 658.69 mg/kg 组的血清 C3 显著高于对照组( $P<0.05$ )。血清 C4 水平在 0 h 高于降温后 24 h 和 48 h, 且在 0 h 时, 随着饲料 Vc 水平的升高而升高。当饲料 Vc 水平在 6.85~167.43 mg/kg 时, 血清 IgM 水平在降温 24 h 和 48 h 后显著高于 0 h ( $P<0.05$ ); 当饲料 Vc 水平在 329.21~658.69 mg/kg 时, 各时间点 IgM 差异不显著。与 0 h 相比, 血清 LZM 活性在降温 24 h 后没有显著变化( $P>0.05$ ), 而在 48 h 后显著降低( $P<0.05$ ), 随着饲料 Vc 水平的增加, 血清 LZM 活性在 88.24~658.69 mg/kg 实验组显著高于对照组( $P<0.05$ )。

## 2.2 Vc 对急性降温后花鲈肝脏抗氧化能力的影响

饲料 Vc 对急性降温后花鲈肝脏抗氧化能力的影响如表 3 所示。花鲈肝脏 T-SOD、MDA 和 GSH 均受

饲料 Vc 水平显著影响( $P<0.05$ ), 也受降温时间显著影响( $P<0.05$ ), 且饲料 Vc 水平和降温时间存在显著交互作用( $P<0.05$ ), 而肝脏 HO-1 含量不受饲料 Vc 水平影响, 但受降温时间和二者交互作用的显著影响( $P<0.05$ )。肝脏 T-SOD 含量随降温时间的增加, 先增加后降低, 在降温 24 h, 当饲料 Vc 水平为 329.21 mg/kg 时最低, 而在降温 48 h, 当饲料 Vc 水平为 167.43 mg/kg 时最低。肝脏 MDA 含量在降温 24 h 和 48 h 时显著高于 0 h, 但在降温后随着饲料 Vc 水平的升高而显著降低( $P<0.05$ )。在各时间点, 花鲈肝脏 GSH 含量都随着饲料 Vc 水平的升高而升高, 而当饲料 Vc 水平在 6.85~167.43 mg/kg 时, 肝脏 GSH 含量随着降温时间的增加先升高后降低( $P<0.05$ )。在降温前, 肝脏 HO-1 含量随着饲料 Vc 水平的升高而先升高后降低, 当饲料 Vc 水平为 6.85 mg/kg 时, 肝脏 HO-1 含量在降温后显著高于降温前( $P<0.05$ ), 当饲料 Vc 水平为 88.24~167.43 mg/kg 时, 肝脏 HO-1 含量在降温后显著低于降温前( $P<0.05$ )。

表 3 饲料 Vc 对急性降温后花鲈肝脏抗氧化能力的影响

Tab.3 Effect of dietary vitamin C on antioxidant capacity of spotted seabass after acute cooling

时间 Time/h	饲料维生素 C Vc/(mg·kg <sup>-1</sup> )	总-超氧化物歧化酶	丙二醛	还原型谷胱甘肽	血红素氧合酶
		T-SOD /(U·mg <sup>-1</sup> prot)	MDA /(nmol·mg <sup>-1</sup> prot)	GSH /(μmol·g <sup>-1</sup> prot)	HO-1 /(ng·mg <sup>-1</sup> prot)
0	6.85	426.61±7.27	4.53±0.44	2.86±0.09	15.70±1.15
	46.90	428.00±14.67	5.50±0.43	3.60±0.07	23.65±2.05
	88.24	446.53±3.53	5.001±0.35	3.70±0.13	24.65±3.02
	167.43	475.44±13.41	4.68±0.26	3.82±0.14	22.87±2.68
	329.21	443.54±7.48	5.15±0.59	5.32±0.46	19.24±1.22
	658.69	438.62±12.28	4.54±0.04	5.27±0.02	18.74±0.97
24	6.85	548.30±2.70	13.45±0.19	4.43±0.11	20.64±0.69
	46.90	575.61±6.33	7.71±0.18	8.66±0.14	20.14±0.71
	88.24	550.93±13.83	8.52±0.16	4.48±0.07	18.27±0.45
	167.43	559.90±6.35	7.80±0.17	5.11±0.09	20.36±0.61
	329.21	508.95±3.21	5.66±0.16	4.65±0.13	19.10±0.56
	658.69	535.94±5.44	6.11±0.15	5.29±0.03	22.12±0.10
48	6.85	430.20±3.50	8.33±0.15	2.47±0.05	24.51±0.89
	46.90	433.99±5.34	7.16±0.10	2.48±0.05	21.18±1.16
	88.24	416.28±3.32	6.34±0.14	2.63±0.06	20.26±1.52
	167.43	410.21±3.72	6.66±0.10	2.89±0.03	19.68±1.18
	329.21	412.10±4.39	5.87±0.11	3.00±0.02	24.54±1.10
	658.69	445.77±4.30	5.22±0.11	3.99±0.06	25.39±0.42
<i>P</i> -value					
Vc		<0.05	<0.05	<0.05	>0.05
降温时间 Cooling time		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
Vc×降温时间 Vc×cooling time		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

### 2.3 Vc 对急性降温后花鲈血清抗应激能力的影响

饲料 Vc 对急性降温后花鲈血清抗应激能力的影响如图 1 所示。花鲈血清 HSP70 水平受饲料 Vc 水平显著影响( $P<0.05$ ), 也受降温时间显著影响( $P<0.05$ )。花鲈血清 HSP70 水平在降温前显著低于降温后。降温 0 h 时, 花鲈血清 HSP70 水平在 88.24~167.43 mg/kg Vc 实验组显著高于对照组( $P<0.05$ ), 且在 167.43 mg/kg 组达到最大值; 降温 24 h 时, 在 88.24 mg/kg 实验组 HSP70 水平最高, 显著高于其他各组( $P<0.05$ ), 而 46.90 和 658.69 mg/kg 实验组的 HSP70 水平显著低于对照组( $P<0.05$ ); 降温 48 h 时, 各实验组血清 HSP70 水平均显著低于对照组, 且在 167.43 mg/kg 达到最小值( $P<0.05$ )。

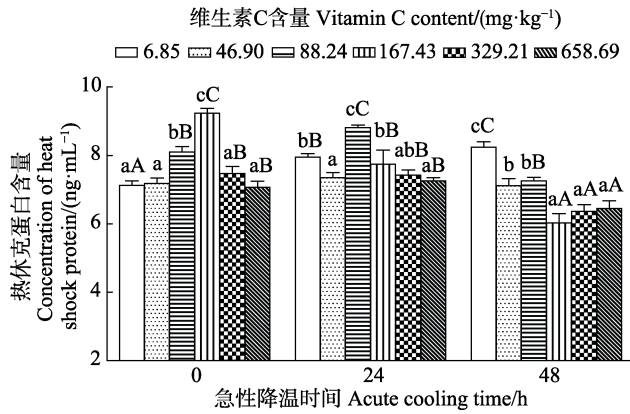


图 1 饲料 Vc 对急性降温后花鲈血清热休克蛋白含量的影响

Fig.1 Effect of dietary vitamin C on serum HSP70 concentration of spotted seabass after acute cooling

不同大写字母表示同一 Vc 水平组在不同时间差异显著( $P<0.05$ ); 不同小写字母表示不同 Vc 水平组在同一时间差异显著( $P<0.05$ )

Different capital letters above the bars indicate significant differences ( $P<0.05$ ) at different time of same Vc group.

Different lowercase letters above the bars indicate significant differences ( $P<0.05$ ) at the same time in different Vc groups

## 3 讨论

### 3.1 Vc 对急性降温后花鲈血清免疫的影响

补体系统在鱼类非特异性免疫机制中具有重要意义(Boshra *et al*, 2006), IgM 是鱼类特异性免疫最主要的效应分子(Scapigliati *et al*, 1999)。万金娟等(2012)研究表明, pH 胁迫 10 d 后, 团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)血清 C3、C4 水平均显著降低, 而饲料添加 Vc 组 C3、C4 水平均显著高于对照组。其他研究也发现, 应激源会抑制鱼类补体活性(Sunyer *et al*, 1995; Tort *et al*, 1996; Ortuno *et al*, 2001、2002)。本研

究发现, 急性降温后, 血清 C3 水平升高, C4 水平在降温后下降, LZM 活性在降温 48 h 显著降低, 但饲料 Vc 水平为 88.24~167.43 mg/kg 时活性显著提高, 说明急性降温应激降低了 C4 和 LZM 的活性, 而饲料 Vc 添加可以提高二者活性。Magnadóttir 等(1999)发现, 鱼类免疫受水温的影响, 低温会延缓免疫应答的发生。本研究中, 当饲料 Vc 水平在 329.21~658.69 mg/kg 时, 各时间点血清 IgM 差异不显著。血清 IgM 水平随降温时间的增加, 在 24 h 和 48 h 后显著高于 0 h。何杰等(2014)研究发现, 当水温由 26℃ 降到 20℃ 时, 吉富罗非鱼(genetic improvement of farmed tilapia, GIFT)、奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)与奥里亚罗非鱼(*Tilapia aureus*)的血清 IgM 水平上升。而 Klesius 等(1990)研究表明, 温度变化对斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)血清 IgM 水平无影响。上述研究结果的不同, 可能与实验环境、鱼的种类等因素有关。

### 3.2 Vc 对急性降温后花鲈肝脏抗氧化能力的影响

SOD 可以清除体内过高的超氧阴离子自由基, SOD 活性可以反映生物体受到环境氧化胁迫的程度。GSH 是重要的水溶性抗氧化剂, 在动物机体解毒代谢中具有重要作用(陈剑杰等, 2018)。而 Vc 是体内重要的抗氧化剂, 可以将氧化型谷胱甘肽(GSSG)还原为还原型谷胱甘肽(GSH)。本研究结果显示, 肝脏 MDA 含量在 0 h 低于降温后 24 h 和 48 h, 随着饲料 Vc 水平的升高而降低。说明急性温度变化对花鲈产生了氧化应激, 导致 MDA 含量升高, 激活花鲈体内抗氧化系统参与清除 ROS, 饲料中添加 Vc 能降低 MDA 含量、减少脂质过氧化反应。Wan 等(2014)研究发现, 当受到 pH 胁迫时, 团头鲂肝脏 SOD 活性显著上升。本研究也发现, 当饲料 Vc 水平在 6.85~167.43 mg/kg 时, 肝脏 T-SOD 活性和 GSH 含量在降温 24 h 后升高, 而当降温 48 h 时, 随着抗氧化系统作用和对温度的适应, 花鲈机体氧化应激水平降低, 说明花鲈对环境温度有很强的适应能力。血红素氧合酶(HO-1)是生物体内一种关键的限速酶, 除了有降解血红素的功能外, 还在许多生理和病理过程中发挥重要的调节作用, 各种应激源均可增加 HO-1 的表达(Butler *et al*, 2020)。本研究中, 对照组花鲈肝脏 HO-1 活性随着急性降温时间增加而升高, 当饲料 Vc 水平为 88.24~167.43 mg/kg 时, 肝脏 HO-1 活性随着低温应激时间的增加而显著降低, 说明肝脏 HO-1 含量是花鲈急性降温的敏感指标, 饲料中添加 Vc 可有效提高花鲈的抗急性降温应激的能力。相似研究结果已有

大量报道(Kitabchi *et al.*, 1967; Montero *et al.*, 1999; Deane *et al.*, 2005; Henrique *et al.*, 2005)。

### 3.3 饲料 Vc 对急性降温后花鲈血清 HSPs 的影响

HSP70 是细胞内的一类庞大蛋白质家族, 当动物体受到应激或者胁迫时, 它们在体内可以大量迅速表达(Hartl *et al.*, 2002)。正常情况下, HSP70 含量占细胞蛋白总量的 5%~10%, 但当机体处于应激状态时, HSP70 的表达量会增加到 15%甚至更高, 并发挥其蛋白质质量调节的功能, 维持细胞活性, 保护抗氧化酶(如 SOD 等)活性, 增强细胞抗自由基能力(Martin *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2008)。Wan 等(2014)研究表明, 当受到高 pH 胁迫时, 24 h 内, 团头鲂 HSP60、HSP70 和 HSP90 表达量会升高, 而高 Vc 组上调作用更显著, 但当胁迫达到 15 d 后, 它们的表达量下调。Deane 等(2005)将热应激 2 h 的银鲷置于常温条件下 24 h 后, 肝脏 HSP70 基因表达下调。本研究中, 不添加 Vc 组花鲈血清 HSP70 含量随急性降温时间的增加而显著升高, 说明降温导致花鲈产生应激, 而 Vc 添加组 HSP70 含量先升高后降低, 表明饲料 Vc 可增强花鲈对抗温度应激的能力, 并促进机体更快适应温度变化。

## 4 结论

急性降温胁迫实验(从 33℃ 水体转入 27℃ 水体)会在短时间内引起花鲈产生应激反应, 适量补充饲料维生素 C (46.90~167.43 mg/kg)能提高花鲈肝脏抗氧化能力, 减轻脂质过氧化水平, 提高花鲈抗应激能力。

## 参 考 文 献

- AI Q H, MAI K S, ZHANG C X, *et al.* Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Aquaculture*, 2004, 242(1/2/3/4): 489–500
- BOSHRA H, LI J, SUNYER J O. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 20: 239–362
- BUTLER M W, ARMOUR E M, MINNICK J A, *et al.* Effects of stress-induced increases of corticosterone on circulating triglyceride levels, biliverdin concentration, and heme oxygenase expression. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 2020, 240: 110608
- CHANG Y M, KUANG Y Y, CAO D C, *et al.* Effects of cooling temperature stress on hematology and serum chemistry values of *Cyprinus carpio*. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(5): 701–706 [常玉梅, 匡友谊, 曹鼎臣, 等. 低温胁迫对鲤血液学和血清生化指标的影响. *水产学报*, 2006, 30(5): 701–706]
- CHEN J J, CAO J L, LI X, *et al.* Effects of fluoride on the activities of antioxidant enzymes and MDA levels in hepatopancreas of *Cipangopaludina cahayensis*. *Journal of Ecotoxicology*, 2018, 13(1): 268–273 [陈剑杰, 曹谨玲, 李潇, 等. 氟对中华圆田螺肝脏抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响. *生态毒理学报*, 2018, 13(1): 268–273]
- CHEN S B. Study on feeding rhythm and respiratory metabolism of common carp at different temperature. Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2004 [陈松波. 不同温度条件下鲤鱼摄食节律与呼吸代谢的研究. 东北农业大学硕士研究生学位论文, 2004]
- DABROWSKI K, HINTERLEITNER S. Simultaneous analysis of ascorbic acid, dehydroascorbic acid, and ascorbic sulfate in biological material. *Analyst*, 1989, 114: 83–87
- DARIAS M J, MAZURAS D, KOUMOUNDOUROS G, *et al.* Overview of vitamin D and C requirements in fish and their influence on the skeletal system. *Aquaculture*, 2011, 315: 49–60
- DEANE E E, WOO N Y S. Cloning and characterization of the HSP70 multigene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 330(3): 776–783
- DONG Y W, DONG S L, MENG X L. Effects of thermal and osmotic stress on growth, osmoregulation and Hsp70 in sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka). *Aquaculture*, 2008, 276(1/2/3/4): 179–186
- GUAN B, WEN H S, LIU Q, *et al.* Effects of acute temperature stress on metabolic enzyme activity and gene expression related to growth in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Ocean University of China*, 2014, 29(6): 566–571 [管标, 温海深, 刘群, 等. 急性温度胁迫对虹鳟肝脏代谢酶活性及生长相关基因表达的影响. *大连海洋大学学报*, 2014, 29(6): 566–571]
- HARTL F U, HAYER-HARTL M. Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science*, 2002, 295: 1852–1858
- HE J, QIANG J, XU P, *et al.* Change in serum cortisol and immune-related indices in four strains of tilapia during low-temperature acclimation. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(2): 266–274 [何杰, 强俊, 徐跑, 等. 低温驯化下 4 种不同品系罗非鱼血清皮质醇与免疫相关指标的变化. *中国水产科学*, 2014, 21(2): 266–274]
- HENRIQUE M M F, GOMES E F, GOUILLOU-COUSTANS M F, *et al.* Influence of supplementation of practical diets with vitamin C on growth and response to hypoxic stress of sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 1998, 161: 415–426
- HU P L, WU R, LU K L, *et al.* Effects of replacing fish meal with composite protein on growth, diet digestibility, and gut health in Japanese seabass (*Lateolabrax maculatus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(6): 56–65 [胡鹏莉, 吴瑞, 鲁

- 康乐, 等. 复合蛋白替代鱼粉对花鲈生长、消化能力和肠道健康的影响. 渔业科学进展, 2019, 40(6): 56–65]
- HUANG G Q, WEI L Z, ZHANG X M, *et al.* The growth and energy allocation of the brown flounder (*Paralichthys olivaceus*) during thermal manipulation. Journal of Ocean University of China (Natural Science), 2010, 40(2): 38–46 [黄国强, 韦柳枝, 张秀梅, 等. 温度操作对褐牙鲈幼鱼的生长和能量分配的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 40(2): 38–46]
- KITABCHI A E. Ascorbic acid in steroidogenesis. Nature, 1967, 215: 1385–1386
- KLESZIUS P H. Effect of size and temperature on the quantity of immunoglobulin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1990, 24(2): 187–195
- LIAO C Y, SHAO L, WANG X X. Influence of dietary vitamin C on non-specific immunity of larval and juvenile *Symphysodon aequifasciatus*. Process in Fishery Sciences, 2012, 33(3): 54–59 [廖畅宇, 邵力, 王旭霞. 饲料中维生素 C 对七彩神仙鱼仔幼鱼非特异性免疫的影响. 渔业科学进展, 2012, 33(3): 54–59]
- LUO Q, OU Y J, AI L, *et al.* Effects of temperature and pH on the digestive enzymes activities of juvenile striped beakperch (*Oplegnathus fasciatus*). Journal of Tropical Oceans, 2010, 29(5): 154–158 [罗奇, 区又君, 艾丽, 等. 温度和 pH 对条石鲷幼鱼消化酶活力的影响. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 154–158]
- MAGNADÓTTIR B, JÓNSDÓTTIR H, HELGASON S, *et al.* Humoral immune parameters in Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.): I. The effects of environmental temperature. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 122(2): 173–183
- MARTÍN M, HERNÁNDEZ C, BODEGA G, *et al.* Heat-shock proteins expression in fish central nervous system and its possible relation with water acidosis resistance. Neuroscience Research, 1998, 31(2): 97–106
- MONTERO D, MARRERO M, IZQUIERDO M S, *et al.* Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. Aquaculture, 1999, 171: 269–278
- MUNILLÁ-MORAN R, SABORIDOREY F. Digestive enzymes in marine species. II. Amylase activities in gut from seabream (*Sparus aurata*), turbot (*Scophthalmus maximus*) and redbfish (*Sebastes mentella*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1996, 113(2): 395–402
- ORTUNO J, ESTEBAN M A, MESEGUER J. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. Fish and Shellfish Immunology, 2001, 11(2): 187–197
- ORTUNO J, ESTEBAN M A, MESEGUER J. Lack of effect of combining different stressors on innate immune responses of seabream (*Sparus aurata* L.). Veterinary Immunology and Immunopathology, 2002, 84(1/2): 17–27
- PADAYATTY S J, LEVINE M. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. Canadian Medical Association Journal, 2001, 164: 353–355
- POLJSAK B, GAZDAG Z, JENKO-BRINOVEC S, *et al.* Pro-oxidative vs antioxidant properties of ascorbic acid in Chromium (VI) -induced damage: An *in vivo* and *in vitro* approach. Journal of Applied Toxicology, 2005, 25(6): 535–548
- QIANG J, YANG H, WANG H, *et al.* The effect of acute temperatures stress on biochemical indices and expression of liver *HSP70* mRNA in gift Nile tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*). Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(5): 943–953 [强俊, 杨弘, 王辉, 等. 急性温度应激对吉富品系尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)幼鱼生化指标和肝脏 *HSP70* mRNA 表达的影响. 海洋与湖沼, 2012, 43(5): 943–953]
- QIAO L J, WANG Y R, ZHANG M. Research progress of Nrf2/HO-1 pathway in mechanism of oxidative damage and protection. Chinese Occupational Medicine, 2013, 40(1): 82–84 [乔丽杰, 王延让, 张明. Nrf2/HO-1 通路在氧化损伤保护机制中研究进展. 中国职业医学, 2013, 40(1): 82–84]
- SCAPIGLIATI G, ROMANO N, ABELLI L. Monoclonal antibodies in fish immunology: Identification, ontogeny and activity of T- and B-Lymphocytes. Aquaculture, 1999, 172(1/2): 3–28
- SUNYER J O, GOMEZ E, NAVARRO V, *et al.* Physiological responses and depression of humoral components of the immune system in gilthead seabream (*Sparus aurata*) following daily acute stress. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1995, 52: 23–39
- TOLBERT B M. Ascorbic acid metabolism and physiological function. International Journal Vitamin Nutrition Research Supplement, 1979, 19: 127–142
- TORT L, GÓMEZ E, MONTERO D, *et al.* Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immune competence: Their suitability in stress and dietary studies. Aquaculture International, 1996, 4(1): 31–41
- WAKELING J M, COLE N J, KEMP K M, *et al.* The biomechanics and evolutionary significance of thermal acclimation in the common carp (*Cyprinus carpio*). American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 2000, 279(2): 657–665
- WAN J J, GE X P, LIU B, *et al.* Effect of dietary vitamin C on non-specific immunity and mRNA expression of three heat shock proteins (Hsps) in juvenile *Megalobrama amblycephala* under pH stress. Aquaculture, 2014, 434: 325–333
- WAN J J. Effects of dietary vitamin C levels on growth and immunity of juvenile Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*). Master's Thesis of Nanjing Agricultural University [万金娟. 维生素 C 对团头鲂幼鱼生长及免疫



- 的影响. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2012]
- WANG C F, XIE S Q, ZHU X M, *et al.* Effects of age and dietary protein level on digestive enzyme activity and gene expression of *Pelteobagrus fulvhideaco* larvae. *Aquaculture*, 2006, 254(1/2/3/4): 554–562
- WILSON R P, POE W E. Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish. *Journal of Nutrition*, 1973, 103(9): 1359–1364
- YANG J H, XU Z F, YIN Z W, *et al.* Experimental study on effects of vitamin C and vitamin E on the acute nephrotoxicity of mercury. *Chinese Journal of Industrial Medicine*, 2004, 17(2): 91–93 [杨敬华, 徐兆发, 尹忠伟, 等. 维生素 C、E 对汞急性肾毒作用影响的实验研究. *中国工业医学杂志*, 2004, 17(2): 91–93]
- ZHANG C X, RAHIMNEJAD S, WANG Y R, *et al.* Substituting fish meal with soybean meal in diets for Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*): Effects on growth, digestive enzymes activity, gut histology, and expression of gut inflammatory and transporter genes. *Aquaculture*, 2018, 483: 173–182

(编辑 冯小花)

## Effects of Dietary Vitamin C on the Immune, Antioxidant Capacity, and Stress Tolerance of Spotted Seabass (*Lateolabrax maculatus*) after Acute Cooling

SUN Jingcheng, LI Xiao, LU Kangle, WANG Ling, SONG Kai, ZHANG Chunxiao<sup>①</sup>

(Xiamen Key Laboratory of Feed Testing and Safety Evaluation, Fisheries College, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China)

**Abstract** The purpose of this study was to investigate the effects of dietary vitamin C on the immunity, antioxidant capacity, and stress tolerance of juvenile *Lateolabrax maculatus* under acute cooling stress. An 8-week feeding trial was conducted with experimental diets containing 6.85, 46.90, 88.24, 167.43, 329.21, and 658.69 mg/kg vitamin C (Vc). Some fish were then exposed to acute cooling stress for 24 h and 48 h (transferred from 33°C water to 27°C water). The results showed that the serum levels of Complement 3 (C3) in each group after cooling were higher than before cooling, while the levels of serum Complement 4 (C4) showed the opposite pattern. When dietary Vc was 6.85~167.43 mg/kg, the levels of serum immunoglobulin M (IgM) at 24 h and 48 h were higher than at 0 h ( $P<0.05$ ). However, there were no differences among the treatments with higher dietary Vc supplementation (329.21~658.69 mg/kg;  $P>0.05$ ). After acute cooling for 48 h, the levels of serum lysozyme (LZM) were lower than at 0 h, but the Vc-supplemented groups were higher than the control group ( $P<0.05$ ). The concentration of hepatic malondialdehyde (MDA) were higher in all groups after cooling stress than before cooling stress, but decreased with increasing levels of dietary Vc ( $P<0.05$ ). Total superoxide dismutase (T-SOD) activity initially increased but then decreased with greater cooling time, and the glutathione (GSH) content increased with increasing dietary Vc supplementation. Heme oxygenase-1 (HO-1) activity in the 6.85 mg/kg Vc group was higher after cooling stress, but the groups supplemented with 88.24 to 167.43 mg/kg Vc had lower activities after cooling ( $P<0.05$ ). The levels of heat shock proteins (HSP70) were higher before acute cooling, and when cooled for 48 h, HSP70 levels in the Vc-supplemented groups were lower than the control group ( $P<0.05$ ). These results suggest that dietary Vc supplementation (46.90~167.43 mg/kg) may improve antioxidant capacity, reduce lipid peroxidation, and enhance the resistance to acute cooling in *L. maculatus*.

**Key words** *Lateolabrax maculatus*; Vitamin C; Acute cooling stress; Stress tolerance

① Corresponding author: ZHANG Chunxiao, E-mail: cxzhang@jmu.edu.cn