

文章编号:1000-0615(2008)02-0249-08

维生素 C 对中华绒螯蟹非特异性免疫的影响

艾春香, 陈立侨, 刘晓玲, 高露姣, 温小波

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要:通过在以鱼粉、豆粕、玉米粉和麦麸为主要原料配制而成的每 100g 基础饲料中分别添加 0、250、500、1 000、1 500 mg 的 V_C (以 V_C 多聚磷酸酯为 V_C 源) 配制 5 种试验饲料, 对均重为 (37.52 ± 2.19) g 的中华绒螯蟹进行为期 60 d 的饲养试验, 以酚氧化酶(PO)、抗菌力(U_a)、溶菌酶(U_L)、超氧化物歧化酶(SOD)、碱性磷酸酶(AKP)和酸性磷酸酶(ACP)等指标为判据, 研究 V_C 对中华绒螯蟹体液免疫因子的影响。结果表明, V_C 对中华绒螯蟹各组织器官中 PO、 U_a 、 U_L 、SOD、AKP 和 ACP 等活性有显著或极显著的影响 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 在适宜范围内, 随着 V_C 添加量的增加, PO、 U_a 、 U_L 、AKP 和 ACP 活性显著增强, 从而增强中华绒螯蟹的非特异性免疫力, 而 SOD 活性则显著降低 ($P < 0.05$), 表明 V_C 作为天然抗氧化剂在中华绒螯蟹体内发挥了很大的作用。综上所述, V_C 作为免疫刺激剂能有效地增强中华绒螯蟹的非特异性免疫力, 且 V_C 适宜添加量以 $500 \sim 1\ 000\ \text{mg} \cdot (100\ \text{g})^{-1}$ 饲料为宜。

关键词:中华绒螯蟹; 维生素 C; 非特异性免疫

中图分类号: Q 591.6; S 963.12 **文献标识码:** A

在集约化水产养殖条件下, 盲目的高密度养殖所带来的多种多样的应激、种质资源的破坏、养殖环境的污染等损害了养殖动物的防御系统, 进而增加了动物对病害的易感性, 其疾病问题越来越受到人们的关注。国内外一些学者已从免疫学角度对虾蟹疾病防治进行了研究, 通过应用免疫刺激剂刺激虾蟹自身的免疫系统, 增强机体自身免疫功能和对疾病的抵抗力, 从而达到防治疾病的目的, 这方面的研究工作正越来越受到人们的重视, 并在虾蟹等疾病防治中已取得了良好的效果^[1-14]。

维生素 C (vitamin C, V_C) 是维持甲壳动物正常生长、繁殖和健康等所必需的营养素。已有研究表明, V_C 是一类较好的免疫调节剂, 能增进水生动物机体的免疫功能以及对环境污染物、刺激物的耐受力 and 抗感染力^[2-3, 6, 11, 15-19]。然而迄今

为止, 有关维生素对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 免疫因子影响的研究尚未见报道。

试验通过分别对中华绒螯蟹投喂 V_C 含量不同的试验饲料 60 d 后, 检测分析其各组织、器官中与非特异性免疫相关的几种重要酶活性的变化, 探讨 V_C 与中华绒螯蟹非特异性免疫力的关系, 以期为中华绒螯蟹健康养殖提供理论支持, 同时为甲壳动物营养免疫学积累基础资料。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验用蟹取自上海市浦东孙桥名特水产养殖开发有限公司。选择附肢完整、个体均匀的健康中华绒螯蟹 [均重 (37.52 ± 2.19) g] 用于试验。

选用优质的鱼粉、豆饼、玉米粉和麦麸等为原 料, 添加不含 V_C 的复合维生素及矿物质等配制

收稿日期: 2007-02-07

资助项目: 国家自然科学基金(30271012); 高等学校博士点专项基金(2000026903); 教育部回国留学人员科研启动基金

作者简介: 艾春香(1967-), 男, 江西永丰人, 博士, 副教授, 从事水生动物营养生理研究。E-mail: chunxai@xmu.edu.cn

通讯作者: 陈立侨, E-mail: lqchenc@online.sh.cn

成基础饲料(表1)。分别在基础饲料添加不同浓度的 V_C [$\text{mg} \cdot (100\text{g})^{-1}$ 干饲料] 制成试验饲料,其中, V_{C1} 0, V_{C2} 250, V_{C3} 500, V_{C4} 1 000, V_{C5} 1 500。将各种原料分别粉碎,准确称重后逐级均匀混合,

添加 V_C 后再重新混匀,以瓊宝牌 HJ-I 水产饲料粘合剂作粘合剂,用小型绞肉机挤压制成颗粒饲料,在 $50 \sim 60 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下烘干至水分含量 10% 以下,分袋包装,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。

表1 基础饲料的基本组成

Tab.1 Composition of the basic diet

组成 component	含量 content	组成 component	含量 content
鱼粉 fish meal	40.0	复合维生素 ¹ vitamin mixture	3.0
豆饼 soybean meal	25.0	复合矿物质 ² mineral mixture	2.0
玉米粉 corn meal	11.0	氯化胆碱 choline chloride	0.5
麦麸 wheat bran	13.0	胆固醇 cholesterol	0.5
鱼油 fish oil	3.0	甘氨酸 glycine	0.5
卵磷脂 lecithin	1.0	粘合剂 binder	0.5

注:1) 每 100 g 复合维生素(不含 V_C 或不含 V_E) 中含 [per 100 g vitamin mixture (free V_C or V_E) contained]: V_{B1} 0.15 g, V_{B2} , V_{B3} 1.0 g, V_{B5} 1.0 g, V_{B6} 0.4 g, V_{B7} 0.04 g, V_{B11} 0.1 g, V_{B12} 0.01 g, V_A 0.004 g, V_{D3} 0.0875 g, V_E 1.125 g (或 V_C 2.495 g), V_K 0.05 g, 肌醇(inositol) 10.0 g, 纤维素(cellulose) 85.66 g. 2) 每 100 g 复合矿物质中含(per 100g Mineral mixture composition contained): NaH_2PO_4 10.0 g, KH_2PO_4 21.5 g, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26.5 g, CaCO_3 10.5 g, KCl 2.8 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.0 g, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.511 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ 0.143 g, KI 0.05 g, CuCl_2 0.051 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.176 g, $(\text{CH}_3\text{CHOHCOO})_2\text{Ca}$ 16.508 g, $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.061 g

1.2 试验方法

试验分组 试验共分 4 个试验组和 1 个对照组,每组 10 只蟹,分养于 $0.72 \text{ m} \times 0.50 \text{ m} \times 0.37 \text{ m}$ 的玻璃缸中,每处理设 3 个平行组。

试验于 2000 年 7-9 月间进行,在自然水温和光照,间歇充气,每天吸污换水(换水量约为 1/3),水体 pH 为 7.2~7.4,溶解氧为 6.2~6.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下饲养中华绒螯蟹 60 d。每天上午 9:00,下午 16:30 各投喂一次,投喂量约为蟹体重的 5.0%。

样品的制备 各处理组在饲养试验进行到 60 d 时取样。

从中华绒螯蟹第三对步足基部折断取血淋巴,置于 Eppendorf 管中 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜,经 $8\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下离心 10 min 后吸出血清待测;取血淋巴样品的中华绒螯蟹同时活体解剖,分别取出其肝胰腺、肌肉,迅速放入 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存待测。

组织、器官匀浆 分别迅速取中华绒螯蟹的肌肉、肝胰腺和卵巢,缓冲液(pH 7.5, $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl $0.0001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA-2Na 溶液)冲洗,用洁净的吸水纸吸去表面水分,并分别称取组织器官块 0.2 g,加入组织块重 9 倍体积的缓冲液,冰浴匀浆后经冷冻高速离

心机离心,取上清粗酶液待测。

检测指标及测定方法 酚氧化酶(phenoloxidase, PO)活性测定,以 3,4-二羟基苯丙氨酸(L-dopa, Sigma)为底物,参照 Ashida 等^[20]的方法进行。

抗菌力(antibacterial activity, U_a),采用 Boman 等^[21]及 Hultmark 等^[22]的方法。公式如下^[1]:

$$U_a = \sqrt{\frac{A_0 - A}{A}}$$

为了消除干扰,以空白的样品为对照,于 570 nm 波长处测其光密度值,以校正 A_0 , A 值。

溶菌酶(lysozyme, U_L),以溶壁微球菌(*M. lysolei*)冻干粉(购自南京建成生物工程研究所)为底物,按 Hultmark 等^[22]的方法。公式如下^[1]:

$$U_L = \frac{A_0 - A}{A}$$

校正 A_0 、 A 的方法同 U_a 测定。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),按照黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,采用南京建成生物研究所生产的试剂盒,723 光栅分光光度计(上海仪器三厂生产),具体测定方法参考试剂盒说明书进行。SOD 酶活性定义为每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个亚硝酸盐单位。

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)和酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP),按照磷酸苯二钠法测定,采用南京建成生物研究所生产的试剂盒,具体参考试剂盒说明书进行,AKP 和 ACP 活性定义为 100 mL 血清在 37 °C 与底物作用 15 min 或 60 min,产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位。

1.3 试验数据分析

试验所得数据采用 SPSS 系统进行方差分析,并进行多重比较。

2 结果

2.1 维生素 C 对中华绒螯蟹血清中 PO 活性的影响

投喂添加 V_C 饲料的中华绒螯蟹血清中 PO 活性提高,且随着 V_C 添加量的增加,血清中 PO 活性增强,C₁、C₂、C₃、C₄ 和 C₅ 组的中华绒螯蟹血清中 PO 活性分别为 11.60、15.48、30.01、33.78、35.02 活性单位。统计分析表明,除 C₂ 组外,其余试验组中华绒螯蟹血清中 PO 活性均显著和极显著高于 C₁ 组($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),但 C₃、C₄、C₅ 3 组间差异不显著($P > 0.05$)(图 1)。

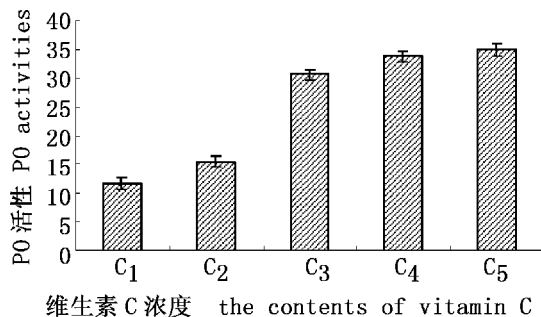


图 1 维生素 C 对中华绒螯蟹血清中 PO 活性的影响

Fig.1 Influence of dietary vitamin C on PO activities in serum of *E. sinensis*

2.2 维生素 C 对中华绒螯蟹血清、肌肉和肝胰腺中抗菌力(U_a)的影响

100 g 饲料中添加 V_C 250 ~ 1 000 mg 范围内,中华绒螯蟹相应组织、器官中的 U_a 随饲料中 V_C 含量的升高而增强,而当 V_C 添加量达 1 500 mg·(100g)⁻¹ 饲料时,各组织、器官中的(U_a)反而均下降,且以肌肉中的降幅最大。统计分析表明,血清中和肌肉中的抗菌力(U_a),C₁ 组除与 C₂ 组间差异不显著($P > 0.05$)外,与 C₃、C₄ 和 C₅ 3 组间有显著性或极显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);肝胰腺中的 U_a,C₁ 组与 C₃ 组、C₄ 组间差异极显著

($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而 C₁、C₂、C₅ 3 组间以及 C₃、C₄ 和 C₅ 3 组间差异不显著($P > 0.05$),C₂ 与 C₄ 两组间有显著差异($P < 0.05$)(图 2)。

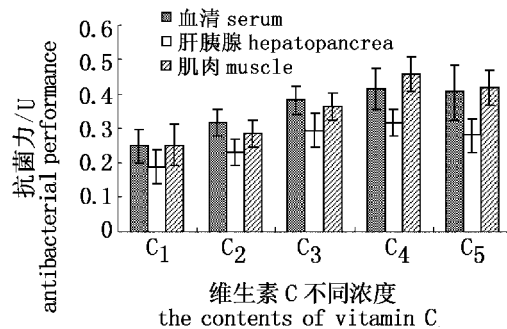


图 2 维生素 C 对中华绒螯蟹各组织中抗菌力的影响

Fig.2 Effect of dietary vitamin C on antibacterial activities in different tissues of *E. sinensis*

2.3 维生素 C 对中华绒螯蟹血清、肌肉和肝胰腺中溶菌酶活性(U_L)的影响

中华绒螯蟹各组织器官中的 U_L 大小依次为血清 > 肝胰腺 > 肌肉,100 g 饲料中添加 V_C 250 ~ 1000 mg,中华绒螯蟹相应组织、器官中 U_L 活性随饲料中 V_C 添加量的增加而增强,血清、肝胰腺和肌肉中 U_L,C₄ 比 C₁ 组分别升高了 128.68%、220.87% 和 268.18%,而当 V_C 量达到 1 500 mg·(100g)⁻¹ 饲料时,各组织器官中 U_L 活性反而下降。统计分析发现,血清中 U_L 活性,C₁ 组除与 C₂ 组差异不显著($P > 0.05$)外,与 C₃、C₄、C₅ 3 个组间有显著性差异($P < 0.05$);肝胰腺中和肌肉中 U_L,C₁ 与 C₂、C₃、C₄、C₅ 组间有极显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),C₂ 与 C₃、C₄、C₅ 组差异极显著($P < 0.01$),C₃ 与 C₄ 组间差异显著($P < 0.05$),C₄ 与 C₅ 组间差异极显著($P < 0.01$)(图 3)。

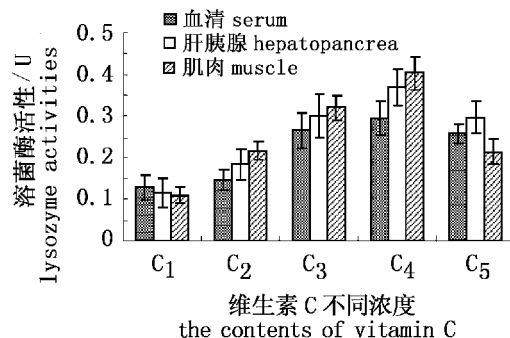


图 3 维生素 C 对中华绒螯蟹各组织中 U_L 的影响

Fig.3 Influence of dietary vitamin C on lysozyme activities in different tissues of *E. sinensis*

2.4 维生素 C 对中华绒螯蟹血清、肌肉、肝胰腺和卵巢中 SOD 活性的影响

C₁ 组中华绒螯蟹各组织、器官中 SOD 活性由高到低依次是肝胰腺、卵巢、血清和肌肉,而 C₂、C₃、C₄ 和 C₅ 组中华绒螯蟹相应组织器官中 SOD 活性发生明显的变化,随着 V_C 添加量的增加,各组织器官中 SOD 活性呈现下降趋势(图 4),但各组织、器官中 SOD 活性降幅各异,C₅ 组与 C₁ 组相比,在肝胰腺、卵巢、血清和肌肉等组织器官中,SOD 活性分别降低了 141.34%、125.94%、116.67%和 115.79%。统计结果发现,肝胰腺和血清中的 SOD 活性,C₁ 组与 C₂、C₃、C₄ 和 C₅ 组间有显著或极显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),C₂ 组与 C₃、C₄、C₅ 组间、C₃ 组与 C₄、C₅ 组间差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),C₄ 与 C₅ 组差异不显著($P > 0.05$);卵巢中 SOD 活性,C₁ 组与 C₃、C₄ 和 C₅ 组间差异极显著($P < 0.01$),但 C₁ 组与 C₂ 组、C₄ 与 C₅ 组间差异不显著($P > 0.05$),C₂ 与 C₃、C₄ 和 C₅ 组之间差异极显著($P < 0.01$),C₃ 组与 C₄、C₅ 组间差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);肌肉中 SOD 活性,C₁ 组与 C₃、C₄ 和 C₅ 组间差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),与 C₂ 组差异不显著($P > 0.05$),C₂ 组与 C₃、C₄ 和 C₄ 组、C₃ 组与 C₄、C₅ 组之间有显著差异($P < 0.05$),而 C₄ 组与 C₅ 组之间差异不显著($P > 0.05$)。

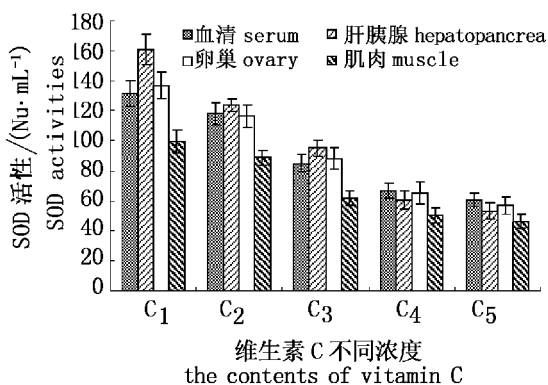


图 4 维生素 C 对中华绒螯蟹各组织中 SOD 活性的影响
Fig.4 Effect of dietary vitamin C on SOD activities in different tissues of *E. sinensis*

2.5 维生素 C 对中华绒螯蟹血清、肌肉、肝胰腺和卵巢中 AKP 活性的影响

在同一 V_C 添加量下,不同组织、器官中的 AKP 活性各异,表现为肝胰腺 > 血清 > 卵巢 > 肌

肉;且随着饲料中 V_C 添加量的升高,各组中华绒螯蟹血清、肝胰腺、卵巢和肌肉中的 AKP 活性呈升高趋势(C₅ 组除外),C₄ 组比 C₁ 组分别升高了 40.29%、95.82%、74.80%、160.05%,肝胰腺和肌肉增幅较大。统计分析表明,血清、肝胰腺和肌肉中的 AKP 活性,C₁ 组除与 C₂ 组间没有显著差异($P > 0.05$)外,与 C₃、C₄ 和 C₅ 组间均有显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),C₂ 组与 C₅ 组间差异不显著($P > 0.05$),C₄ 组和 C₅ 组间差异显著($P < 0.05$);而卵巢中的 AKP 活性,则表现为 C₁ 组与 C₂、C₃、C₄ 和 C₅ 组间有显著或极显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),C₂ 组与 C₅ 组差异不显著($P > 0.05$),但 C₄ 组与 C₅ 组间有极显著差异($P < 0.01$)(图 5)。

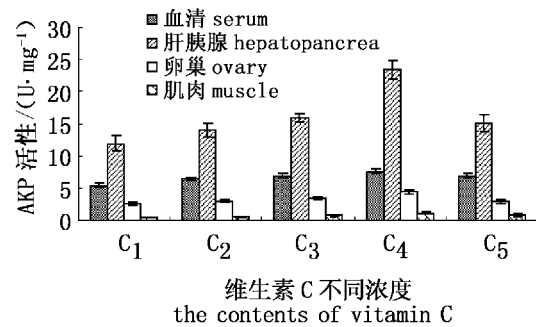


图 5 维生素 C 对中华绒螯蟹各组织中 AKP 活性的影响
Fig.5 Influence of dietary vitamin C on AKP activities in different tissues of *E. sinensis*

2.6 维生素 C 对中华绒螯蟹血清、肌肉、肝胰腺和卵巢中 ACP 活性的影响

C₁ 组中华绒螯蟹不同组织、器官中 ACP 活性各异,从大到小依次是肝胰腺 > 血清 > 肌肉 > 卵巢,而 C₂、C₃、C₄ 和 C₅ 中华绒螯蟹相应组织、器官中 ACP 活性发生明显变化,且随着 V_C 添加量的升高,卵巢、肝胰腺、肌肉和血清中 ACP 活性呈增强趋势(图 6),C₅ 组比 C₁ 组分别升高了 351.19%、127.15%、147.98%和 20.07%,以卵巢中的增幅最大,血清增幅最小。统计表明,血清和肌肉中 ACP 活性,C₁ 组与 C₄ 和 C₅ 两组间有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而与 C₂、C₃ 两组间差异不显著($P > 0.05$);肝胰腺和卵巢中 ACP 活性,C₁ 组与 C₃、C₄ 和 C₅ 3 组间差异极显著($P < 0.01$),而与 C₂ 组差异不显著性($P > 0.05$),且 C₅ 组与 C₂、C₃、C₄ 组间有极显著性差异($P < 0.01$)。

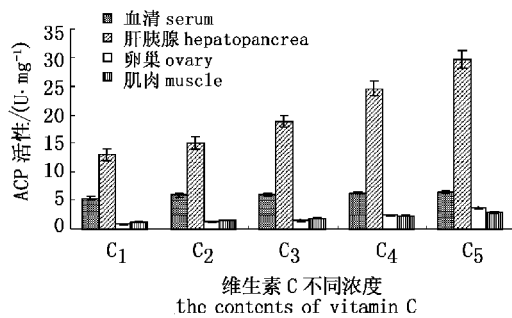


图6 维生素C对中华绒螯蟹各组织中ACP活性的影响

Fig.6 Effect of dietary vitamin C on

ACP activities in different tissues of *E. sinensis*

3 讨论

V_C能作为氢的载体,参与机体内的氧化还原反应,使体内氧化型谷胱甘肽转变为还原型谷胱甘肽,从而保护酶系统中的活性巯基(-SH),进而调节机体代谢,促进细胞间质合成,降低毛细血管的通透性,加快伤口愈合,增进水生动物机体的免疫功能,对环境污染、刺激物的耐受力和抗感染力^[23-26];V_C能清除存在于液相中的过氧自由基、超氧化物、羟自由基、过氧化氢和单线态氧,保护生物膜免遭脂质过氧化的损伤^[13,24],此外,V_C通过与V_E、Se等养分协同作用,能减轻水生动物体脂的过氧化。缺乏V_C会抑制水生动物免疫系统的功能,导致许多种类更易感染细菌性疾病^[27]。

3.1 维生素C对中华绒螯蟹血清中PO活性的影响 试验表明,适量添加V_C能显著提高中华绒螯蟹血清中PO活性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。当饲料中添加V_C 250 mg·(100g)⁻¹饲料后,中华绒螯蟹血清中PO活性显著升高,而V_C添加量达500 mg·(100g)⁻¹饲料时,血清中PO值仍然上升,只是V_C浓度越高,PO值上升幅度越小,这与Lee和Shiau^[15]研究V_C对斑节对虾(*Penaeus monodon*)血清中PO活性的结果一致,而与王伟庆等得出的饲喂添加V_C 400 mg·(100g)⁻¹饲料的饲料时,中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血清中PO活性最高,V_C高于或低于此添加量时,均不能显著增强血清中PO活性的结果不同^[3],这是否是由于蟹类和虾类不同的生理机制造成的,有待于深入研究。此外,V_C添加量达1000 mg·(100g)⁻¹饲料以上时,中华绒螯蟹血清中PO活

性上升幅度较小,这是否是由于高剂量V_C会抑制中华绒螯蟹体内某些酶活性的结果,需进一步探讨。添加V_C后能提高中华绒螯蟹血清中PO活性,应归功于V_C具有多种生理功能,一方面是作为天然生物抗氧化剂和抗应激剂,使机体处于一种良好的生理状态下,维持机体旺盛的新陈代谢,从而促进proPO的生物合成,并在V_C的刺激下,激活proPO转化为PO;另一方面是V_C本身具有烯醇式结构,有较强的还原性,而PO则具有氧化性,两者可能是通过氧化还原反应这条途径发生反应,但具体作用在哪个环节,通过哪种方式参加反应有待深入探讨。

3.2 维生素C对中华绒螯蟹血清、肌肉和肝胰腺中抗菌力、溶菌酶活性的影响

试验发现,V_C可影响中华绒螯蟹各组织、器官中抗菌力和溶菌酶活性。在适量的范围内,随着V_C含量的升高,中华绒螯蟹相应组织、器官中抗菌力、溶菌酶活性也随之增强。可见,添加V_C能在一定范围内提高中华绒螯蟹各组织、器官中的抗菌力、溶菌酶活性,增强中华绒螯蟹的非特异性免疫力,从而提高中华绒螯蟹的抗病力。添加V_C能提高中华绒螯蟹各组织、器官中的抗菌力和溶菌酶活性的可能机制是:它们作为中华绒螯蟹生长发育过程中的必需营养素,能使机体处于一种良好的生理状态,并有效地促进机体的新陈代谢,调节机体的生理生化反应,促进抗菌和溶菌蛋白的生物合成,从而提高机体的抗菌力和溶菌酶活性,增强机体的抗病力。但当V_C添加量达到1500 mg·(100g)⁻¹饲料时,中华绒螯蟹各组织、器官中抗菌力和溶菌酶活性反而下降,这可能是高剂量的V_C影响机体代谢的结果。

3.3 维生素C对中华绒螯蟹血清、肌肉、肝胰腺和卵巢中SOD活性的影响

研究表明,投喂未添加V_C饲料的中华绒螯蟹各组织、器官中SOD活性不同,以肝胰腺和卵巢较高、血清次之、肌肉相对较低。这是由于肝胰腺中脂肪含量非常高,且它是中华绒螯蟹脂类代谢最为活跃的中心,负责调节机体的新陈代谢;此外,试验用蟹的卵巢正处于快速发育的Ⅲ期,该时期积累了较多的脂肪酸,需要较强的抗氧化体系,以保证卵巢的正常发育。添加V_C后,中华绒螯蟹相应组织、器官中SOD活性显著降低($P < 0.05$),这主要是V_C自身发挥了抗氧化作用

的结果,但在不同 V_C 添加量下,各组织、器官中 SOD 活性降低百分率不同,以肝胰腺中 SOD 活性降幅最大,其次为卵巢,最小的为肌肉,这一方面表明 V_C 在中华绒螯蟹各组织、器官中的分布和积累是不均匀的;另一方面说明肝胰腺作为动物营养物质代谢的主要场所,能积累一定量的 V_C , V_C 既发挥其调节机体新陈代谢的生理功能,又发挥其较强的抗氧化保护作用,而动物体内的两大抗氧化体系的作用是协同,动物体为了保持自身自由基的产生和清除达到动态平衡, SOD 的活性就相应地降低了,且以肝胰腺中 SOD 活性降幅最大。

3.4 维生素 C 对中华绒螯蟹血清、肌肉、肝胰腺和卵巢中 AKP、ACP 活性的影响

研究发现,未添加 V_C 时,中华绒螯蟹不同组织、器官中 AKP 活性各异,其中以肝胰腺最高,血清次之,卵巢较低,而肌肉最低。AKP 可催化所有的磷酸单酯及磷酸基团的转移反应;它直接参与磷的代谢,亦与 DNA、RNA、蛋白质、脂质等代谢有关,它对钙质的吸取、磷酸钙沉积、骨骼形成、甲壳素分泌及形成都有重要的作用;虾蟹类等甲壳动物在生长过程中都要经历蜕壳过程,该酶对虾蟹类的生存、生长有特别重要的意义^[28-29]。添加 V_C 后,中华绒螯蟹相应组织、器官中 AKP 活性有显著变化,且在不同 V_C 浓度下,各组中华绒螯蟹不同组织、器官中 AKP 上升幅度,从大到小依次为肌肉 > 肝胰腺 > 卵巢 > 血清。推测是由于肝胰腺为物质代谢的中心和此时卵巢正处于快速发育期,需要较多的 AKP 参与物质代谢。添加适量的 V_C 后,刺激细胞内的 AKP 活性增强,随后释放到血清中,使血清中的 AKP 的活性也增强,促进中华绒螯蟹细胞中的物质代谢,进而促进中华绒螯蟹生长,也间接增强了其非特异性免疫能力,但当 V_C 浓度上升到 $1\ 500\ \text{mg} \cdot (100\text{g})^{-1}$ 饲料时,各组织、器官中 AKP 活性反而比 $1\ 000\ \text{mg} \cdot (100\text{g})^{-1}$ 饲料时有所下降,如肝胰腺中 AKP 活性下降了 55.75%。这是否说明添加过多的 V_C 会抑制 AKP 活性,尚需进一步研究。

添加 V_C 后,中华绒螯蟹各组织、器官中 ACP 活性提高,且在同一 V_C 浓度下,中华绒螯蟹各组织、器官中 ACP 活性为肝胰腺 > 血清 > 肌肉 > 卵巢。ACP 与机体物质代谢关系密切,在体内直接参与磷酸基团的转移和代谢^[5,30]。在不同 V_C 的

浓度下,各组中华绒螯蟹不同组织、器官中 ACP 升幅,从大到小依次是卵巢 > 肌肉 > 肝胰腺 > 血清。由表 5 可知,受 V_C 的刺激,中华绒螯蟹各组织、器官中 ACP 活性持续升高,这有利于其参与机体细胞中的物质代谢,为 ADP 磷酸化提供更多所需的无机磷酸,促进其正常生长,从而提高其的非特异性免疫能力。

PO、 U_a 、 U_L 、SOD、AKP 和 ACP 等在甲壳类血淋巴细胞和体液免疫中担负着机体防御的重要功能,添加 V_C ,中华绒螯蟹各组织、器官中 PO、 U_L 、 U_a 、AKP、ACP 活性显著提高,而 SOD 活性明显降低,说明 V_C 在中华绒螯蟹体内表现出了较强的抗氧化性,在促进中华绒螯蟹健康生长的同时,也有效地增强了中华绒螯蟹非特异性免疫能力。但有关 PO、 U_L 、 U_a 、SOD、AKP、ACP 等在中华绒螯蟹免疫防御反应中的地位、具体作用及 V_C 诱导其产生的机制仍需深入系统的研究。本试验提示, V_C 可作为防治蟹病有效的免疫刺激剂在生产实践中加以应用,并经综合分析后得出,添加 $V_C\ 500 \sim 1\ 000\ \text{mg} \cdot (100\text{g})^{-1}$ 饲料时,可有效地增强中华绒螯蟹的非特异性免疫能力。

参考文献:

- [1] 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):481-486.
- [2] 王伟庆,李爱杰. LAPP 对中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 生长、缺氧耐受力及免疫抵抗力的影响[J].海洋湖沼通报,1996,1:42-49.
- [3] 王伟庆,李爱杰.维生素 C 对中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 免疫功能的影响[C]//冯仰廉(主编).动物营养研究论文集.北京:中国农业大学出版社,1996:53-58.
- [4] 刘恒,李光友.免疫多糖对养殖南美白对虾作用的研究[J].海洋与湖沼,1998,29(2):113-118.
- [5] 刘树青,江晓路,牟海津,等.免疫多糖对中国对虾溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用[J].海洋与湖沼,1999,30(3):278-283.
- [6] 刘栋辉,阳会军,刘永坚. β -葡聚糖和维生素 C 对斑节对虾生长和抗病力的效果[J].中山大学学报(自然科学版),2002,41(4):59-62.
- [7] 沈锦玉,刘问,曹铮,等.免疫增强剂对中华绒螯蟹免疫功能的影响[J].浙江农业学报,2004,16(1):25-29.
- [8] 陈昌福,姚鹏,陈萱,等.免疫多糖对南美白对

- 虾免疫相关酶的激活作用[J].华中农业大学学报, 2004,23(5):551-554.
- [9] 徐镇,姚鹏,陈昌福,等.免疫多糖(酵母细胞壁)对中华绒螯蟹抗病力的增强效果[J].华中农业大学学报, 2005,24(4):383-386.
- [10] 杨福刚,周洪琪,黄旭雄.不同 β -葡聚糖对凡纳滨对虾稚虾生长及非特异免疫功能的影响[J].上海水产大学学报, 2005,14(3):264-269.
- [11] 宋理平,黄旭雄,周洪琪,等. V_c 、 β -葡聚糖和藻粉对中国对虾幼虾生长、成活率及免疫酶活性的影响[J].上海水产大学学报, 2005, 14(3):276-281.
- [12] Tom J, Benjamin O' C, Nick C, *et al.* Maternal Transfer of Strain-Specific Immunity in an Invertebrate [J]. *Current Biology*, 2003,13:489-492.
- [13] Smith V J, Brown J H, Hauton C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003,15 (1):71-90.
- [14] Montero-Rocha A, McIntosh D, Sánchez-Merino R, *et al.* Immunostimulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following dietary administration of Ergosan [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2006,91 (3):188-194.
- [15] Lee M H, Shiau S Y. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002,12(2):119-129.
- [16] Lee S Y, Söderhall K. Early events in crustacean innate immunity [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12 (5): 421-437.
- [17] Lee M H, Shiau S Y. Increase of dietary vitamin C improves haemocyte respiratory burst response and growth of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, fed with high dietary copper [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, 14 (4): 305-315.
- [18] Lopez N, Cuzon G, Gaxiola G, *et al.* Physiological, nutritional, and immunological role of dietary h 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles [J]. *Aquaculture*, 2003, 224(1-4): 223-243.
- [19] Daniela S M, Edemar R. A, Elizabeth M H, *et al.* Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation [J]. *Aquaculture*, 2004, 241 (1-4): 501-515.
- [20] Ashida M. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mon.* *Arch* [J]. *Biochem Biophys*, 1971,144: 749-762.
- [21] Boman H G, Nilsson Faye I, Paul K, *et al.* Insect immunity: Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia Cynthia Pupae* [J]. *Insect Immune*, 1974,10(1):136-145.
- [22] 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): 7-16.
- [23] Ortuno J, Cuesta A, Angeles E M, *et al.* Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2001, 79(3-4):167-180.
- [24] Ortuno J, Esteban M A, Meseguer J. Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, 9: 429-443.
- [25] Verlhac V, Obach A, Gabaudan J, *et al.* Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, 8:409-424.
- [26] Wahli T, Verlhac V, Gabaudan J, *et al.* Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1998, 21: 127-137.
- [27] Sakai M. Current research status of fish immunostimulants [J]. *Aquaculture*, 1999, 172: 63-92.
- [28] 孙虎山,李光友.脂多糖对栉孔扇贝血清和细胞中7种酶活性的影响[J]. *海洋科学*, 1999,4: 54-57.
- [29] 陈清四,陈素丽,石艳,等.长毛对虾碱性磷酸酶性质[J]. *厦门大学学报*, 1996,35(2): 257-261.
- [30] 牟海津,江晓路,刘树青,等.免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸、碱性磷酸酶和超氧化歧化酶活性的影响[J]. *青岛海洋大学学报*, 1999,29(3):463-468.

Effect of dietary vitamin C on the non-specific immunity of *Eriocheir sinensis*

AI Chun-xiang, CHEN Li-qiao, LIU Xiao-ling, GAO Lu-jiao, WEN Xiao-bo

(College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The studies were conducted to determine the effects of V_C on the immune factors of the Chinese mitten-handed crabs *Eriocheir sinensis* [initial mean weight of (37.52 ± 2.29) g]. The crabs were distributed into the glass tanks of 200 L capacity using a completely randomized design with five treatments respectively and each treatment was stocked with 10 crabs and was run in triplicate per treatment. The crabs *E. sinensis* were fed 60 d with a series of test diets containing graded levels of V_C [0, 250, 500, 1000, 1500 $\text{mg} \cdot (100\text{g})^{-1}$ diet respectively]. Each treatment was run in triplicate. The activities of phenoloxidase (PO), antibacterial performance (U_a), lysozyme (U_L), superoxide dismutase (SOD), alkaline phosphatase (AKP) and acid phosphatase (ACP) were measured. The results indicated that the effects of dietary VC on the activities of PO, U_a , U_L , SOD, AKP and ACP in the tissues and organs of *E. sinensis* were significant difference ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The activities of PO, U_a , U_L , AKP and ACP in the serum, muscle, hepatopancrea and ovary of *E. sinensis* were significantly enhanced with V_C supplement increasing in the range from $\text{mg} \cdot (100\text{g})^{-1}$ diet to 1000 $\text{mg} \cdot (100\text{g})^{-1}$ diet ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). However, the activities of AKP were declined at 1500 $\text{mg} \cdot (100\text{g})^{-1}$ diet V_C . The activities of SOD in the serum, muscle, hepatopancrea and ovary of *E. sinensis* were significantly lowered with V_C supplementation. V_C could promoting non-special immunity, improve animal health, enhancing general metabolism of *E. sinensis*, and optimum supplementation of V_C to increase non-specific immunity in *E. sinensis* was 500 – 1000 $\text{mg} \cdot (100\text{g})^{-1}$ diet V_C . The study also revealed the relationship of the activities of enzymes and non-special immunity of *E. sinensis*.

Key words: *Eriocheir sinensis*; vitamin C; non-special immunity