

高碳水化合物水平日粮对异育银鲫生长、 生理、免疫和肝脏超微结构的影响

缪凌鸿¹, 刘波^{1,2}, 戈贤平^{1*}, 谢骏¹, 周传鹏²,
潘良坤¹, 陈汝丽¹, 周群兰¹

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,农业部淡水鱼类遗传育种和
养殖生物学重点开放实验室,江苏无锡 214081;
2. 南京农业大学无锡渔业学院,江苏无锡 214081)

摘要: 为了探讨异育银鲫对日粮中高碳水化合物的利用,选用168尾异育银鲫,分成2组,一组为正常对照组,投喂35%碳水化合物(35% CHO)水平日粮;另一组为高糖试验组,投喂50%碳水化合物(50% CHO)水平日粮每组设3个重复。在控温的循环水系统中饲养10周后,测定鱼体生长指标、肌肉成分、肝糖元、血液生化指标和免疫指标。结果表明,高糖组(50% CHO)显著($P < 0.05$)降低了特定生长率、增重率,但是对饵料系数、肝体比、脏体比、鱼体肌肉成分等没有显著($P > 0.05$)影响;两组异育银鲫血浆总蛋白、甘油三酯、总胆固醇、血糖和肝糖原含量都没有显著差异($P > 0.05$);高糖组(50% CHO)肝脏丙二醛含量显著升高($P < 0.05$)、天门冬氨酸转氨酶显著降低($P < 0.05$),而肝脏超氧化物歧化酶、总抗氧化能力、丙氨酸转氨酶和碱性磷酸酶都没有显著变化($P > 0.05$)。试验还对两组异育银鲫肝细胞进行超微结构观察,发现高糖饲料引起了异育银鲫肝细胞中糖原和脂肪的沉积,并对细胞和细胞器的结构产生一定损伤。从本试验结果来看,异育银鲫可以耐受50%饲料糖含量,但是长期摄食50%碳水化合物日粮对其生长不利,并会引起一定程度肝脏功能和结构的损伤。

关键词: 异育银鲫; 生长; 血液指标; 免疫; 透射电镜

中图分类号: S 917

文献标识码: A

通常认为,鱼类对碳水化合物的消化和代谢能力比较差,尤其是肉食性鱼类。研究发现,在摄食了高糖饲料后,会引起鱼体生长速度下降,饲料利用率低下、肝糖原蓄积太多及代谢紊乱^[1],并会出现长时间的高血糖现象^[2-3]。

而饲料营养水平是决定鱼类抗病能力的重要因素之一,各种影响因素的变化包括营养过剩和缺乏都会引起鱼类应激,影响鱼类的免疫反应和对疾病抵抗力^[4-5]。因此需要配制适当的日粮以提高水产动物的健康和抗病能力。目前,已有研究表明摄入过量糖引起鱼体代谢应激,降低鱼体免疫能力^[6-8]。研究发现由于糖原的过度沉积,

高糖会引起虹鳟鱼体细胞损伤,并通过其影响鱼体对矿物质的代谢而降低其肝脏解毒能力^[9]。但是除了通常认为的高碳水化合物会对血糖有一定刺激外,PAGE等^[10]在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)上并没有发现长期摄食高碳水化合物对非特异性免疫的影响。对于高碳水化合物日粮是否会影响鱼体的生长和抗病能力,相关的文献报道还是比较缺乏,而其中的机理更需要进一步探讨。

作为杂食性鱼类,异育银鲫的日粮碳水化合物水平一般比较高,其对日粮糖需求量为30%~40%^[11-12]。也有研究表明,日粮中低于40%凝

收稿日期:2010-10-25

修回日期:2010-12-09

资助项目:现代农业产业技术体系建设专项资金资助(nycytx-49)

通讯作者:戈贤平,E-mail:gexp@ffrc.cn

胶淀粉可以加快异育银鲫的生长^[13]。因此,本试验以 α -淀粉为糖源,设置了35%、50%两个日粮碳水化合物添加水平,分别作为正常组和高糖组,探讨高碳水化合物日粮对异育银鲫生长、生理和免疫的影响。

1 材料与方

1.1 试验日粮

以 α -淀粉为糖源,设计了两种等氮等脂的饲料配方(表1),用微晶纤维素调节日粮配方。

表1 试验日粮组成
Tab.1 Composition and proximate analysis of the experimental diets

	饲料 diets	
	对照组 NS	高糖试验组 HS
成分(%) ingredients		
鱼粉 fish meal ^a	45.0	45.0
α -淀粉 α -starch ^b	35.0	50.0
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	15.0	0
鱼油 Fish oil	1.0	1.0
1% 预混料 1% premix feed ^c	1.0	1.0
羧甲基纤维素 carboxyl methyl cellulose	2.0	2.0
磷酸二氢钙 calcium dihydrogen phosphate	1.0	1.0
总和 total	100.0	100.0
组分分析(% dry weight) proximate analysis		
干物质 dry matter	NS	HS
粗蛋白 crude protein	91.7	90.5
粗脂肪 crude fat	30.0	30.3
可消化糖 digestible carbohydrate	5.02	5.05
总能(kJ/g DM) gross energy ^d	36.2	50.3
钙 calcium	17.0	18.5
总磷 total phosphorus	2.0	2.0
	1.5	1.5

注:a. 鱼粉中粗蛋白含量68%; b. α -淀粉购自无锡金陵塔淀粉有限公司; c. 每千克预混料含: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 25 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7 g; Na_2SeO_3 0.04 g; KI 0.026 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g; VA 900 000 IU; VD 200 000 IU; VE 4 500 mg; VK_3 220 mg; VB_1 320 mg; VB_2 1 090 mg; VB_5 2 000 mg; VB_6 500 mg; VB_{12} 1.6 mg; VC 10 000 mg; 泛酸 1 000 mg; 叶酸 165 mg; d. 营养水平含量中总能(kJ/g): 按蛋白质 23.64 kJ/g, 脂肪 39.54 kJ/g, 糖 17.15 kJ/g 计算; 其他为实测值。

Notes: a. fish meal; protein 68%; b. α -starch; bought from Jing Lingta Co., Ltd. China; c. Premix feed (per kg diet): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 25 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7 g; Na_2SeO_3 0.04 g; KI 0.026 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g; VA 900 000 IU; VD 200 000 IU; VE 4 500 mg; VK_3 220 mg; VB_1 320 mg; VB_2 1 090 mg; VB_5 2 000 mg; VB_6 500 mg; VB_{12} 1.6 mg; VC 10 000 mg; Pantothenate 1 000 mg; Folic acid 165 mg; d. Gross energy (kJ/g) were calculated using energy equivalents 23.64 kJ/g, 39.54 kJ/g, and 17.15 kJ/g for protein, lipid and digestible carbohydrate, respectively. The other is measured value.

以添加35% α -淀粉组为正常对照组(NS), 添加50% α -淀粉组为高糖试验组(HS)。所有试验饲料充分混匀后用SLP-45型膨化制粒机(中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所生产)制成粒径3 mm的颗粒饲料。

1.2 试验鱼

试验用异育银鲫鱼种购于江苏省溧阳市长荡湖水产良种场, 用3%食盐溶液消毒后移入本实验室控温流水循环系统中, 用沉性颗粒饲料(通威饲料公司)驯化15 d后, 选取体质健康、规格整齐一致[初均重(35.60 \pm 1.11) g]的个体, 随机分成2个组, 每组3个平行, 每个平行28尾鱼, 饲养于6个圆形蓄养槽(规格为 ϕ 820 mm \times 700 mm), 进行正式试验。

1.3 饲养管理

每天以鱼体重的3%~4%投喂自制试验沉性颗粒饲料, 每天投喂3次, 分别于8:30、12:30和16:30各投一次。每次投喂后2 h观察吃食情况, 将残饵吸出, 并估计采食量, 每两周根据其摄食情况调整投喂量, 使其饱食而无饲料剩余。试验期间, 每天吸污一次, 并且每天冲洗滤布, 日夜连续充气增氧。整个试验期间水质如下: 平均水温(26.0 \pm 1.5) $^{\circ}\text{C}$, 溶氧 \geq 6 mg/L, 氨氮 \leq 0.2 mg/L, 亚硝酸盐 \leq 0.2 mg/L, pH为6.8~7.0。试验饲养10周后, 鱼体称重、量体长、采集血液和肝脏等样品。

1.4 样品采集与分析

试验结束后分别从每个缸随机取异育银鲫3尾用MS-222麻醉后尾静脉采血, 血液用柠檬酸钠抗凝剂抗凝, 并迅速在4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min离心5 min分离血浆, -70 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存备用, 用于血液指标的测定。随后测量每尾鱼体长、体重、肝脏重和性腺重, 并采集鱼体背部去鳞肌肉和体内肝胰脏, 同样-70 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存备用, 用于鱼体肌肉常规营养成分和肝脏指标的测定。所有肝胰脏样品解冻后加10倍的4 $^{\circ}\text{C}$ 缓冲液^[14]冰浴匀浆, 制成10%匀浆液, 4 000 r/min离心10 min, 上清液保存于-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 备测肝胰脏抗氧化指标。

血浆总蛋白、甘油三酯、胆固醇以及血糖等测定试剂盒购买自上海骏实生物科技有限公司, 在美国贝克曼Cx-4型自动生化分析仪上测定, 分别采用双缩脲法、GPO-PAP酶法、CHOD-PAP酶法和葡萄糖氧化酶法^[15]。肝糖元测定试剂盒购

于南京建成生物工程有限公司。饲料碳水化合物含量的测定参照王芬^[16]的方法。水分、粗蛋白、粗脂肪和灰分的含量分别用恒温干燥法(105℃)、凯氏定氮法、索氏抽提法和灼烧法(550℃)进行测定^[16]。

溶菌酶参考文献^[17]的方法测定,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。碱性磷酸酶(AKP)、丙氨酸转氨酶(ALT)和天门冬氨酸转氨酶(AST)采用骏实生物技术有限公司试剂盒在美国贝克曼 Cx-4 型自动生化分析仪上测定。肝脏上清液蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定。肝脏上清液超歧化物酶活性(SOD)、丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)采用嘌呤氧化酶法、过氧化氢酶和氧化还原法比色法测定^[17],以上试剂盒均购自南京建成生物工程有限公司。

肝脏透射电镜取样及处理、操作方法采用常规方法,具体步骤参考文献^[18]的方法。

1.5 数据统计与分析

数据用 SPSS (Ver 16.0) 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),结果均用平均值±标准误($\bar{X} \pm SE$)表示, $n=9$ 。同一时间段不同组间采用独立 t 检验进行显著性比较,*表示同一时间段不同组之间独立 t 检验差异显著($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同碳水化合物日粮对异育银鲫生长和饲料利用的影响

由表 2 可知,投喂不同碳水化合物日粮 70 d 后,与正常(35% CHO)组相比,高糖(50% CHO)组特定生长率(SGR)、增重率(WGR)和蛋白质效率(PER)显著降低($P < 0.05$),而两组的摄食率(FR)、饵料系数(FCR)没有显著变化($P > 0.05$)。

2.2 不同碳水化合物含量日粮对异育银鲫肌肉成分及脏体比、肝体比、肥满度的影响

由表 3 可知,投喂不同碳水化合物日粮 70 d 后,正常(35% CHO)组和高糖(50% CHO)组异育银鲫肌肉中的干物质(DM)、粗蛋白(CP)、粗脂肪(EE)和灰分(ash)均无显著影响($P > 0.05$),并且其脏体比(viscerosomatic index)、肝体比(hepatosomatic index)和肥满度(fullness coefficient)也没有产生显著变化($P > 0.05$)。

表 2 投喂不同日粮对异育银鲫生长和饲料利用的影响

Tab. 2 Effects of different experimental diets on growth and feed utilization

	NS	HS
特定生长率 ^a specific growth rate	1.16 ± 0.04	1.00 ± 0.01 *
增重率 ^b weight gain rate	1.25 ± 0.06	1.02 ± 0.02 *
饵料系数 ^c feed conversion rate	1.11 ± 0.01	1.14 ± 0.02
摄食率 ^d feeding rate	1.06 ± 0.03	1.03 ± 0.02
蛋白质效率 ^e protein efficiency rate	1.97 ± 0.28	1.64 ± 0.09 *

注:*表示 T 检验不同处理组间差异显著($P < 0.05$); a. 特定生长率(%) = $100 \times [(\ln \text{末体重} - \ln \text{初体重})/\text{天数}]$; b. 增重率(%) = $100 \times (\text{平均末体重} - \text{平均初体重})/\text{平均初体重}$; c. 饵料系数 = 饲料摄入量/增重; d. 饲料系数(% weight/day) = $(100 \times \text{摄入饲料干重})/[\text{天数} \times (\text{末体重} + \text{初体重})/2]$; e. 蛋白质效率(%) = $100 \times \text{湿增重}/\text{粗蛋白摄入量}$ 。

Notes: * means significant differences ($P < 0.05$) between different treatment groups by T -test; a. specific growth rate (SGR, %) = $100 \times [(\ln \text{terminal BW} - \ln \text{initial BW})/\text{test days}]$; b. weight gain rate (WGR, %) = $100 \times (\text{average terminal BW} - \text{average initial BW})/\text{average initial BW}$; c. feed conversion rate (FCR) = feed intake/weight gain; d. feeding rate (FR, % weight/day) = $(100 \times \text{dry feed intake})/[\text{days} \times (\text{terminal BW} + \text{initial BW})/2]$; e. protein efficiency ratio (PER, %) = $100 \times (\text{wet weight gain})/(\text{crude protein intake})$.

表 3 投喂不同日粮对异育银鲫肌肉成分及内脏的影响

Tab. 3 Effects of different experimental diets on muscle ingredients and viscero

	NS	HS
干物质(%) DM	25.23 ± 0.27	25.34 ± 0.36
粗蛋白(%) DM CP	76.80 ± 0.71	76.06 ± 1.03
粗脂肪(%) DM EE	11.49 ± 0.75	11.91 ± 0.67
灰分(%) DM Ash	9.25 ± 1.00	7.34 ± 0.43
脏体比 viscero-somatic index ^a	10.44 ± 0.97	11.95 ± 0.33
肝体比 hepato-somatic index ^b	3.68 ± 0.49	3.52 ± 0.53
丰满度 fullness coefficient ^c	2.78 ± 0.03	2.76 ± 0.02

注:*表示 T 检验不同处理组间差异显著($P < 0.05$); a. 脏体比(%) = $100 \times \text{内脏末重}/\text{末体重}$; b. 肝体比(%) = $100 \times \text{末肝脏重}/\text{末体重}$; c. 丰满度(%) = $\text{末体重}/\text{末体长}^3$ 。

Notes: * means significant differences ($P < 0.05$) between different treatment groups by T -test; a. viscera-somatic indices (%) = $100 \times \text{terminal gut weight}/\text{terminal BW}$; b. hepatic-somatic indices (%) = $100 \times \text{terminal liver weight}/\text{terminal B}$; c. fullness coefficient (%) = $\text{terminal BW}/\text{terminal body length}^3$.

2.3 不同碳水化合物含量日粮对异育银鲫血液生化指标和肝糖原的影响

由表 4 可知,投喂不同碳水化合物日粮 70 d 后,高糖组和正常组在血浆总蛋白(TP)、总胆固醇(TG)、甘油三酯(CHOL)、血糖(GLU)和肝糖原(hepatic glucose)上都没有出现显著的变化

($P > 0.05$)。

表4 投喂不同日粮对异育银鲫血液生化指标和肝糖原的影响

Tab.4 Effects of different experimental diets on plasma biochemical indicator and hepatic glucose means \pm SE, $n = 9$

	NS	HS
总蛋白(g/L) TP	22.56 \pm 0.71	20.16 \pm 0.89
总胆固醇(mmol/L) TG	1.41 \pm 0.13	1.93 \pm 0.24
甘油三酯(mmol/L) CHOL	3.99 \pm 0.32	4.63 \pm 0.46
血糖(mmol/L) GLU	34.21 \pm 1.32	33.99 \pm 1.92
肝糖原(mg/g) hepatic glucose	68.34 \pm 3.42	70.86 \pm 2.73

注: * 表示 T 检验不同处理组间差异显著($P < 0.05$)。

Notes: * means significant differences($P < 0.05$) between different treatment groups by T -test.

2.4 不同碳水化合物含量日粮对异育银鲫免疫的影响

由表5可知,投喂不同碳水化合物日粮70 d后,肝脏免疫指标中,高糖组异育银鲫肝脏中丙二醛(MDA)含量显著升高($P < 0.05$),而肝脏超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)和血浆丙氨酸转氨酶(ALT)含量都没有显著变化($P > 0.05$)。血液免疫指标中,血浆天门冬氨酸转氨酶(AST)含量显著降低($P < 0.05$),而血浆碱性磷酸酶(AKP)、血浆溶菌酶(lysozyme)含量都没有显著差异($P > 0.05$)。

表5 投喂不同日粮对异育银鲫免疫的影响

Tab.5 Effects of different experimental diets on immunity

	NS	HS
肝脏免疫指标 hepatic immune parameters		
超氧化物歧化酶(U/mg pro) SOD	114.63 \pm 8.86	123.50 \pm 7.08
总抗氧化能力(U/mg pro) T-AOC	1.52 \pm 0.36	1.45 \pm 0.37
丙二醛(nmol/g pro) MDA	758.26 \pm 14.54	854.15 \pm 21.29*
丙氨酸转氨酶(U/mg pro) ALT	43.69 \pm 2.39	38.80 \pm 2.63
血浆免疫指标 plasma immune parameters		
碱性磷酸酶(U/L) AKP	76.71 \pm 3.80	73.44 \pm 2.38
溶菌酶(μ g/mL) lysozyme	61.59 \pm 2.87	54.59 \pm 4.324
天门冬氨酸转氨酶(U/L) AST	120.43 \pm 10.32	95.75 \pm 4.07*

注: * 表示 T 检验不同处理组间差异显著($P < 0.05$)。

Notes: * means significant differences($P < 0.05$) between different treatment groups by T -test.

2.5 不同碳水化合物含量日粮对异育银鲫肝脏超微结构的影响

正常组肝脏细胞核圆形,核中紧贴内膜为电

子密度较高的异染色质。细胞质匀质,偶尔可见溶酶体,内质网和线粒体清晰可见。内质网以糙面内质网为主,层次整齐地排列在细胞核以及线粒体周围。线粒体数量较多,结构清晰,基质丰富,嵴短管状,纵切可见长条形;横切可见圆形切面,基质电子密度均匀。罕见糖原颗粒和脂滴(图版-1,2)。

电镜下,高糖组肝脏细胞核形状扭曲,呈不规则几何形状,异染色质显著增多。细胞内粗面内质网数量明显减少,而滑面内质网大量出现,杂乱的排列在线粒体及细胞核周围,大部分排列在靠近细胞膜一边,围绕在线粒体周围。线粒体形状扭曲,其间电子密度低,双膜结构损伤或破坏,拥挤在一起,排列不规则,嵴末端呈现泡状扩大。电镜下,细胞内容酶体大量增多,形状多样,特别可见大的溶酶体。细胞核与细胞质中糖原颗粒明显增多,呈斑块化分布不同的细胞器官。细胞质中,大小脂滴丰富,呈着色均匀的浅灰色球形,部分甚至挤压细胞核(图版-3~6)。

3 讨论

3.1 高碳水化合物日粮对异育银鲫生长的影响

在鱼类日粮中经常以一定量的可消化糖来代替一定量的蛋白质,从而起到节约蛋白质的作用。一般表明鱼类可以利用一定量的糖,但是糖水平过高可能抑制对鱼体的生长^[19]。DENG等^[20]发现杂食性鱼类相对于肉食性鱼类可耐受较高含量的饲料淀粉并表现出很高程度的蛋白质节约效应。银锯眶鲷(*Bidyanus bidyanus*)饲料中30%的淀粉具有良好的蛋白质节约效应,但含量达到45%时生长显著下降^[21]。FURUICHI等^[22]报道,鲤(*Cyprinus carpio*)分别摄食含有10%、20%和30%糊精的饲料时,生长没有显著性差异,摄食含为40%糊精组生长下降。本试验也发现饲料中碳水化合物水平为35%时,异育银鲫的特定生长率、增重率和对蛋白质的利用效率显著高于50%组($P < 0.05$)。蔡春芳等^[23]认为这些与投喂频率和糖源有关,每天投喂2次时,高糖组增重率显著低于低糖组,但是将投喂频率从每天2次增加到每天6次时,增重率无显著差异。TUNG等^[24]也支持这种推测,当投饲频率从每天2次增加到每天6次时,罗非鱼对糖的利用率得到显著改善,尤其是改善了对葡萄糖的利用。对于本试验中

35% 和 50% 的日粮碳水化合物水平,增加投喂频率或者采用其他糖源物质是否可以进一步有效改善异育银鲫的生长性能和饲料利用,仍然需要深入研究。

有研究指出,摄食一定碳水化合物含量的饲料会影响鱼体内脏器官的相对质量^[25]。但是谭肖英等^[26]发现 15%、19% 和 23% 碳水化合物组间大口黑鲈肥满度、脏体比和脂体比没有显著变化,只有肝体比较试验前升高。本试验中高糖组与正常组鱼体的脏体比、肝体比和丰满度均没有显著差别($P > 0.05$),提示我们高糖摄入很可能没有影响异育银鲫的肝脏解毒功能,但是在鱼体肌肉成分上与王芬^[16]获得的结果一致。赵永志等^[27]也发现,用 20%、40% 水平的糊精饲喂青鱼后,肌肉成分同样没有差异。还有一些研究发现饲料中过量使用糖类并不影响鱼类的生长和对饲料的利用^[28-29],这些不同的试验结果提示我们,由于鱼类食性的差异,其对糖类的耐受量和代谢能力也不同,但是即使食性相同的鱼类之间也存在差异。

3.2 高碳水化合物含量日粮对异育银鲫血液生化指标的影响

肝脏是机体的重要代谢器官,当摄食不同碳水化合物水平饲料时,鱼体肝脏中营养物质含量会有所改变。血浆总蛋白、甘油三酯和总胆固醇代表了机体生理和肝脏代谢功能。当肝脏发生病变时,肝细胞合成蛋白质的功能减退,血浆中蛋白质即会发生质和量的变化,从而导致血清总蛋白和白蛋白减少。在鳕鱼和其它鱼类中已经发现,胁迫和疾病等因素均可以导致血浆总蛋白含量下降^[30-31]。PANSERAT 等^[32]在虹鳟中发现投喂高糖饲料后鱼体血浆甘油三酯呈现先增加后降低趋势。阎红卫等^[33]报道在哺乳动物中肝细胞受到损害时,血清胆固醇水平降低。而本试验中,两组异育银鲫血浆总蛋白、甘油三酯和总胆固醇的含量均没有显著差异($P > 0.05$)。

合成肝糖原是血糖的代谢途径之一,鱼类摄入高糖饲料后肝糖原含量通常增高以储存糖分^[34],有助于调控摄食碳水化合物饲料后过高的血糖,但肝糖原含量过高会损害鱼类肝脏的正常功能^[35-36],导致解毒能力下降^[37-39]。而在本试验中,50% 高糖并没有引起异育银鲫肝脏糖原的过多积累,这与异育银鲫脏体比的结论是相一致

的;两组异育银鲫的血糖同样没有出现显著差异($P > 0.05$),王芬^[16]也在试验中发现 32%、36% 和 40% 饲料淀粉对异育银鲫血糖没有影响。本研究发现,日粮中 50% 的碳水化合物对杂食性的异育银鲫的生理、代谢等方面没有影响。这可能与各研究中采用的碳水化合物源和鱼的食性、种类差异有关。因为杂食性鱼类较肉食性鱼类对糖的耐受能力更强,能够利用饲料中更多的糖;另外许多研究也发现,鱼类对淀粉、糊精这类大分子碳水化合物的利用能力明显低于葡萄糖,这是可以理解的,因饲料中分子结构复杂的淀粉或糊精消化吸收慢,血糖始终维持在相对较低的水平,从而高血糖引起的应激就减弱或不出现。

3.3 高碳水化合物含量日粮对异育银鲫免疫的影响

由于鱼类的胰岛素分泌不足,糖代谢酶活性较低,鱼类被认为是先天性的“糖尿病体质”。因此,过多的摄入碳水化合物可能会导致鱼类出现病理状态,从而有可能抑制免疫功能。因此,高碳水化合物可能会影响鱼类对疾病的易感性^[8]。饲料糖对于鱼体免疫的影响的报道比较少,有限的研究结果也不太一致,其影响机理仍不甚清楚。但是已有研究证明高碳水化合物饲料抑制了南方鲷^[40]、虹鳟^[41]、石斑鱼^[42]、高印度大鲷^[43]、欧洲白鲑^[35]等的免疫能力。而 WAAGBØ 等^[44]报道饲料糖含量对大西洋鲑的特异性、非特异性免疫力都没有显著影响,虹鳟的免疫系统也未受饲料糖含量的显著影响^[45]。

鱼体抗氧化能力的强弱与健康程度存在着密切的关系,抗氧化能力降低时常导致各种疾病的产生。本试验中高糖组异育银鲫肝脏丙二醛显著升高($P < 0.05$),说明 50% 饲料糖对鱼体肝脏抗氧化能力有一定的影响,但是异育银鲫 SOD、T-AOC 没有显著变化,这与赵永志在青鱼的试验中获得的结果一致^[27]。碱性磷酸酶是动物代谢过程中重要的调控酶,也是动物体内重要的解毒体系,对动物的生存具有重要的意义。据报道,高糖饲料可能引发鱼类肝糖过度蓄积,肝功能下降,但是否会引起 AKP 活性的变化尚不得知。从本试验结果来看,高糖组(50% CHO)的血清碱性磷酸酶含量低于正常组(35% CHO),但差异不显著。与蔡春芳等^[46]对青鱼和异育银鲫的研究结果一致,这可能是肝脏中丙二醛等毒性产物的量

超过了其所能清除的限度,引起鱼体的应激反应。在评价鱼类非特异性免疫力时,溶菌酶是经常被选用的指标,因为它在天然防御体系中具有比较重要的作用。水产动物体内的溶菌酶是一种重要的非特异性防御因子,也可以体现病原菌及其他环境因素对鱼体健康的影响。VIELMA 等^[35]研究了糖对白鲑 (*Coregonus lavaretus*) 免疫参数的影响,结果表明,摄食高糖饲料的白鲑比摄食低糖饲料组的溶菌酶活性低了 25%。WAAGBØ 等^[44]也发现,当饲料中糖水平从 5% 升到 30%,大西洋鲑血清中的皮质醇浓度呈上升趋势,溶血指数则呈下降趋势,但是大西洋鲑的抗病力却不受影响。本试验也得到了类似的结果,摄食 50% 碳水化合物水平日粮的异育银鲫血浆溶菌酶活性比 35% CHO 组的降低了 16.34%,但是差异不显著。

3.4 高碳水化合物含量日粮对异育银鲫肝脏超微结构的影响

鱼肝脏细胞的粗面内质网以片层状结构围绕核层层排列,膜上附着许多核糖体,核糖体是蛋白质合成的场所。鱼类的粗面内质网发达,广泛分布于胞质内,尤其是核周;而滑面内质网数量较少,分布于狄氏腔和胆小管附近,它似乎与细胞解毒作用、胆盐的形成和胆小管壁的葡糖苷酸连接有关^[47]。正常情况下,在鱼肝脏细胞中,线粒体呈圆形或椭圆形;嵴短管状,稀疏而排列不规则。肝细胞受到损失的个体,其内嵴结构往往被破坏,膜间腔明显,电子染色极浅,嵴间腔电子染色稍深,含颗粒物质。从电镜结果看,与正常组相比,摄食高糖日粮的异育银鲫肝脏中细胞核、线粒体等细胞器形状扭曲、排列杂乱,线粒体内嵴膨胀,局部瓦解乃至解体,这可能会导致蛋白质合成过程受阻。大量核糖体从粗面内质网脱落,滑面内质网增多;并且出现大量溶酶体,其大小不一,多数呈浓密小圆球状。而溶酶体的主要功能是进行细胞内消化、对细胞内无用大分子或者衰老的细胞器进行自体吞噬和将病原体杀死、降解的防御作用等。与哺乳动物不同,鱼类肝细胞中溶酶体较少^[48],有研究在鲢鱼饥饿试验中,正常投喂的鲢鱼肝细胞中,溶酶体数量亦比较少见,表明高糖组饲料确实对异育银鲫肝脏细胞引起了一定程度的损伤和刺激,这与本试验中免疫指标获得的结论相一致。

与正常组相比,摄食高糖日粮的异育银鲫肝脏细胞内容物中,糖原颗粒和脂滴大量出现。GONZALEZ 等^[49]认为,肝细胞糖原的积累是其分解途径发生了病变的结果,而这可能是由于长时间摄食高糖日粮所致,王广宇^[50]在翘嘴红鲌的糖代谢试验中也同样发现,高糖引起了肝脏细胞脂滴和糖原颗粒的大量出现,表明异育银鲫肝脏无法及时对糖分解代谢,并将部分过量的糖原转化为脂肪,作为能源物质贮存。

4 小结

虽然异育银鲫可以耐受 50% 饲料糖,但是生长试验表明,日粮中 50% 碳水化合物已经降低了异育银鲫增重率、特定生长率和蛋白质的利用效率。通过对血液和肝脏生理、免疫指标的测定,虽然两组异育银鲫的血浆生化指标、肝糖原、血糖和溶菌酶等免疫指标没有显著差异,但是提高了高糖组肝脏丙二醛含量,肝脏细胞的超微结构观察也体现出了高糖对异育银鲫肝脏细胞的影响和损伤,说明异育银鲫长期摄食 50% 碳水化合物日粮对其生长不利,并会对其肝脏细胞代谢、免疫功能产生一定影响。

研究指出,罗非鱼的饲料糖含量较低时(10%)葡萄糖对蛋白质的节约作用比糊精和淀粉强,含量较高(40%)时糊精、淀粉对蛋白质的节约作用比葡萄糖明显^[51]。田丽霞等^[52]通过同位素试验发现,葡萄糖在草鱼体内的代谢远远快于淀粉,也就是说相较于葡萄糖,淀粉不容易引起鱼类的高糖应激。但是对于 50% 的日粮淀粉含量是否已经引起了异育银鲫的高糖应激,这仍需要进一步研究和更深入的探讨。

参考文献:

- [1] HEMRE G I. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes [J]. *Aquacult Nutr*, 2002, 8(3): 175-194.
- [2] COWEY C B, WALTON M J. Intermediary metabolism[M]//HALVER J E. Ed. *Fish nutrition*. 2nd ed. London: Academic Press, 1989: 259-329.
- [3] MOON T W. Glucose tolerance in teleost fish: fact or fiction[J]. *Comp Biochem Physiol*, 2001, 129(2-3): 243-244.
- [4] 李红霞, 刘文斌, 李向飞, 等. 饲料中添加氯化胆碱、甜菜碱和溶血卵磷脂对异育银鲫生长、脂肪代谢和血液指标的影响[J]. *水产学报*, 2010, 34(2):

- 292 - 299.
- [5] MAULE A G, TRIPP R A, KAATTARI S L, *et al.* Stress alters the immune function and disease resistance in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. J Endocrinol, 1989, 120 (1): 135 - 142.
- [6] 陈勇, 华雪铭, 周洪琪, 等. 壳聚糖和益生菌对异育银鲫非特异免疫功能及血清甲状腺激素、皮质醇水平的影响 [J]. 水产学报, 2010, 34 (5): 711 - 718.
- [7] FLETCHER T C. Dietary effects on stress and health [M] // IWAMA G K, PICKERING A D, SUMPTER J P, *et al.* . Ed. London/New York: Academic Press, 1981: 147 - 169.
- [8] BARTON B A, IWAMA G K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids [J]. Annu Rev Fish Dis, 1991, 1: 3 - 26.
- [9] STONE D A J. Dietary carbohydrate utilization by fish [J]. Reviews in Fisheries Science, 2003, 11 (4): 337 - 369.
- [10] PAGEG I, HAYWORTH K M, WADE R R, *et al.* Non-specific immunity parameters and the formation of advanced glycosylation end-products (AGE) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed high levels of dietary carbohydrates [J]. Aquac Res, 1999, 30 (4): 287 - 297.
- [11] SATOH S. Common carp, *Cyprinus carpio* [M] // WILSON R P. Ed. Handbook of Nutrient Requirements of Finfish CRC Press, Raton, FL, 1991: 55 - 67.
- [12] 麦康森. 无公害渔用饲料配制技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [13] 蔡春芳, 王永玲, 陈立侨, 等. 饲料糖种类和水平对青鱼、鲫生长和体成分的影响 [J]. 中国水产科学, 2006, 13 (3): 452 - 459.
- [14] 蔡春芳. 青鱼 (*Mylopharyngodon piceus* Richardson) 和鲫 (*Carassius auratus*) 对饲料糖的利用及其代谢机制的研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2004.
- [15] XIE J, LIU B, ZHOU Q L, *et al.* Effects of anthraquinone extract from rhubarb *Rheum officinale* Bail on the crowding stress response and growth of common carp *Cyprinus carpio* var. *Jian* [J]. Aquaculture, 2008, 281 (1 - 4): 5 - 11.
- [16] 王芬. 饲料中饲料中高淀粉含量对异育银鲫生长、代谢及鱼体成分的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [17] 苏永腾, 刘波, 周群兰, 等. 大黄蒽醌提取物对罗氏沼虾抗鳃弧菌感染的研究 [J]. 水产学报, 2008, 32 (3): 455 - 463.
- [18] 刘晓晖. 温度和铜对鲤鱼肝脏细胞超微结构的影响 [D]. 河北: 华北师范大学, 2006.
- [19] ENES P, PANSEERAT S, KAUSHIK S, *et al.* Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2006, 143 (1): 89 - 96.
- [20] DENG D F, REFSTIE S, HEMRE G I, *et al.* A new technique of feeding, repeated sampling of blood and continuous collection of urine in white sturgeon [J]. Fish Physiol Biochem, 2000, 22 (3): 191 - 197.
- [21] STONE D J, ALLAN G L, ANDERSON A J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). III. The protein-sparing effect of wheat starch-based carbohydrates [J]. Aquac Res, 2003b, 34 (2): 123 - 134.
- [22] FURUICHI M, YONE Y. Effects of dietary dextrin levels on growth and fed efficiency, the chemical composition of liver and dorsal muscle, and absorption of dietary protein and dextrin in fishes [J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1980, 46 (2): 225 - 229.
- [23] 蔡春芳, 陈立侨, 叶元土, 等. 增加投喂频率改善彭泽鲫对饲料糖的利用 [J]. 华东师范大学学报: 自然科学版, 2009 (2): 88 - 104.
- [24] TUNG P H, SHIAU S Y. Effects of meal frequency on growth performance of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. Aureus*, fed different carbohydrate diets [J]. Aquaculture, 1991, 92: 343 - 350.
- [25] RAWELS S D, GATTLIN III D M. Carbohydrate utilization in striped bass (*Morone saxatilis*) and sunshine bass (*M. chrysops* ♀ × *M. saxatilis* ♂) [J]. Aquaculture, 1998, 161 (1 - 4): 201 - 212.
- [26] 谭肖英, 刘永坚, 田丽霞, 等. 饲料中碳水化合物水平对大口黑鲈 *Micropterus salmoides* 生长、鱼体营养成分组成的影响 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2005, 6 (44): 258 - 263.
- [27] 赵永志. 青鱼对饲料糖的利用 [D]. 苏州: 苏州大学, 2009.
- [28] MOHAPATRA M, SAHU N, CHAUDHARI A. Utilization of gelatinized carbohydrate in diets of *Labeo rohita* fry [J]. Agua Nutr, 2003, 9 (3): 189 - 196.
- [29] LEE S M, LEE J H. Effect of dietary glucose, dextrin and starch on growth and body composition of juvenile starry flounder *Platichthys stellatus* [J].

- Fish Sci, 2004, 70(1): 53 - 58.
- [30] MELINGEN G O, STEFANSSON S O, BERG A, *et al.* Changes in serum protein and IgM concentration during molting and early post-smolt period in vaccinated and unvaccinated Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1995, 5(3): 211 - 221.
- [31] MAGNADÓTTIR B, CRISPIN M, ROYLE L, *et al.* The carbohydrate moiety of serum IgM from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 12(3): 209 - 227.
- [32] PANSEERAT S, PERRIN A, KAUSHIK S. High dietary lipids induce liver glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Journal of Nutrition, 2002, 132(2): 137 - 141.
- [33] 阎红卫, 张欣, 党双锁. 血清总胆固醇在肝病中的应用[J]. 胃肠病学, 2006, 2: 1 - 3.
- [34] ENCARNACIÓN C, FRANCOISE M, ISABEL N, *et al.* Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in rainbow trout [J]. Regulatory Peptides, 2003, 110(2): 123 - 132.
- [35] VIELMA J, KOSKELA J, RUOHONE K, *et al.* Optimal diet composition for European whitefish (*Coregonus lavaretus*): carbohydrate stress and immune parameter response [J]. Aquaculture, 2003, 225(1-4): 3 - 16.
- [36] DENG D F, REFSTIE S, HUNG S S O. Glycemic and glycosuric responses in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) after oral administration of simple and complex carbohydrates [J]. Aquaculture, 2001, 199(1-2): 107 - 117.
- [37] HERNRE G L, SANDNES K, LIE Ø, *et al.* Carbohydrate nutrition in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., growth and feed utilization [J]. Aquaculture Research, 1995, 26(3): 149 - 154.
- [38] 田丽霞. 草鱼的糖代谢研究[D]. 广州: 中山大学, 2003.
- [39] 付世建, 谢小军, 袁伦. 强饲料碳水化合物水平对南方贴幼鱼摄食后肝指数的影响[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2005, 30(3): 548 - 551.
- [40] 李强. 碳水化合物水平对肉食性鱼类南方鲇免疫的影响[D]. 重庆: 西南农业大学, 2007.
- [41] BÆVERFJORD G. Digestible and indigestible carbohydrates in rainbow trout diets [D]. Norwegian College of Veterinary Medicine, 1992.
- [42] LIN M F, SHIAU S Y. Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus* [J]. Aquaculture, 2005, 244(1-4): 215 - 221.
- [43] KUMAR S, SAHU N P, PAL A K, *et al.* Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *L. rohita* juveniles [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 19(4): 331 - 344.
- [44] WAAGBØ R, GLETTE J, SANDNES K, *et al.* Influence of dietary carbohydrate on blood chemistry, immunity and disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. [J]. Fish Dis, 1994, 17(3): 245 - 258.
- [45] PAGE G I, HAYWORTH K M, WADE R R, *et al.* Non-specific immunity parameters and the formation of advanced glycosylation end-products (AGE) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fed high levels of dietary carbohydrates [J]. Aquac Res, 1999, 30(4): 287 - 297.
- [46] 蔡春芳, 王道尊. 异育银鲫口服葡萄糖耐量试验 [J]. 上海水产大学学报, 1998, 7(增刊): 63 - 66.
- [47] BONATES A B, FERRI S. Fine structure of a freshwater teleost (*Pimelodus maculatus*) hepatocytes revealed by ultrathin sections [J]. Anat Anz, 1980; 148(2): 132 - 144.
- [48] BYCZKOWSKA-SMYK W. Observation of the ultrastructure of the hepatic cells of the burbot (*Lota lota* L.) [J]. Zool Poloniae, 1968, 18: 287 - 298.
- [49] GONZALEZ S, CRESPO S, BRUSLE J. Histocytological study of the liver of the cabrilla sea bass, *Serranus cabrilla* (Teleostei, Serranidae), an available model for marine fish experimental studies [J]. J Fish Biol, 1993, 43(3): 363 - 373.
- [50] 王广宇. 日粮碳水化合物水平对翘嘴红鲌生长、血液指标及 GK、G6Pase、HSC70 基因表达的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [51] ANDERSON J, JACKSON A J, MATTY A J, *et al.* Effects of dietary carbohydrate and fiber on the tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linn) [J]. Aquaculture, 1984, 37(4): 303 - 314.
- [52] 田丽霞, 刘永坚, 刘栋辉, 等. 草鱼对葡萄糖和淀粉作为能源的利用研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2001, 40(2): 104 - 106.

Effect of high carbohydrate levels in the dietary on growth performance, immunity and transmission electron microscopy (TEM) on hepatic cell of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*)

MIAO Ling-hong¹, LIU Bo^{1,2}, GE Xian-ping^{1*}, XIE Jun¹, ZHOU Chuan-peng²,
PAN Liang-kun¹, CHEN Ru-li¹, ZHOU Qun-lan¹

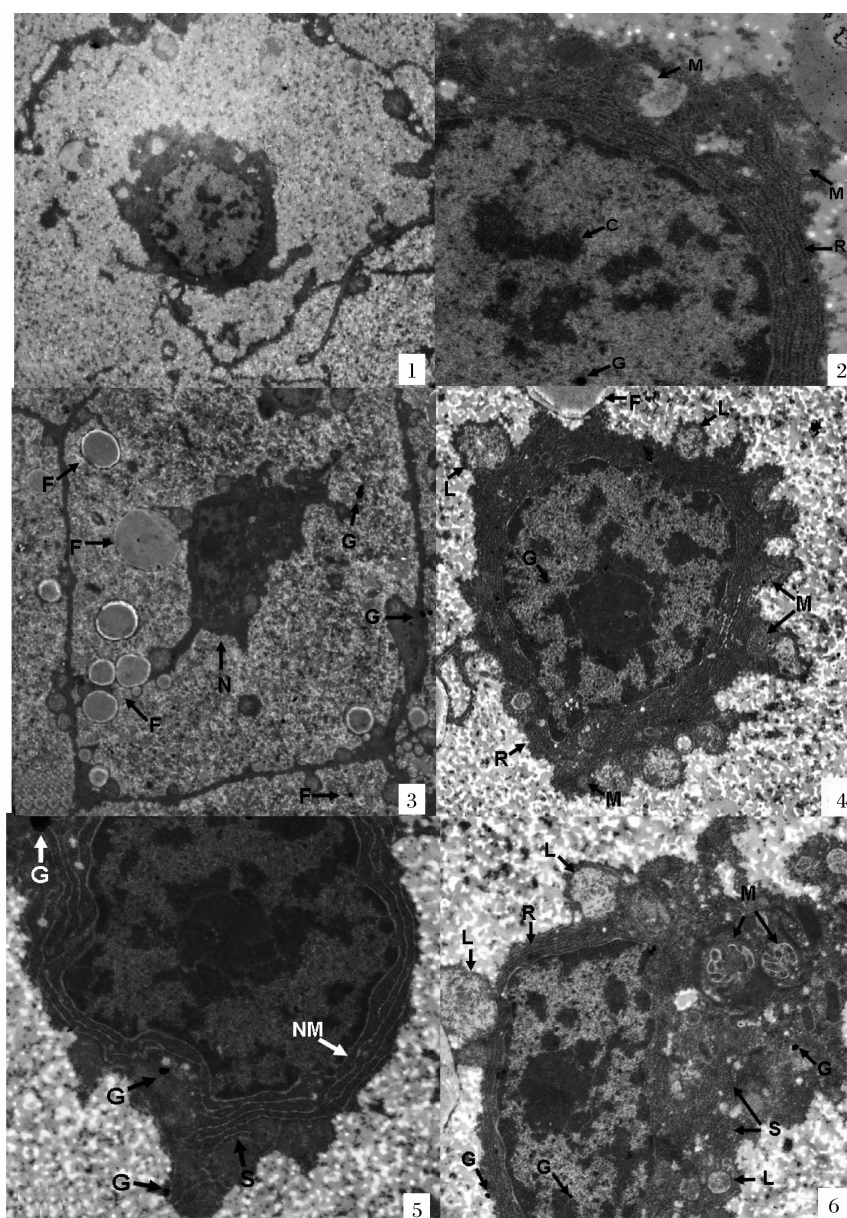
(1. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. Wuxi Fishery College, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China)

Abstract: In order to study the capability of utilizing carbohydrate in the diet and the effects of different carbohydrate diets on allogynogenetic crucian carp, artificial purified feed with normal (including 35% carbohydrate) and high (including 50% carbohydrate) level carbohydrate were applied. 168 individuals of allogynogenetic crucian carp [(35.60 ± 1.11) g] were divided into the two carbohydrate level groups, and each group has three replicates which were cultured in aquarium with automatic temperature control culturing system with recycling water for 10 weeks. After that, indicators of fish growth, plasma biochemical indices and immune indicators were measured. The results showed the specific growth rate, weight gain rate were significantly lower than normal carbohydrate group (35% CHO), but no significant difference on feeding rate, feed conversion rates, muscle composition, hepatosomatic indices, gonad indices and fullness coefficient. The total plasma protein, plasma triglycerides, total cholesterol, blood glucose and hepatic glycogen did not significantly change ($P > 0.05$). The hepatic MDA content of 50% CHO group was significantly ($P < 0.05$) higher, while the AST was significantly ($P < 0.05$) lower. The hepatic SOD, T-AOC, ALT, and AKP had no significant ($P > 0.05$) differences between 35% CHO group and 50% CHO group. The hepatic ultrastructure in allogynogenetic crucian carp have been investigated using transmission electron microscopy. The result shows high carbohydrate dietary induced sedimentation of glucose and fat in hepatic cell, and structure damages are observed as well. Overall, 50% carbohydrate dietary has impacts on growth, hepatic immunity function and induces structure damages, although allogynogenetic crucian carp has greater tolerance for it.

Key words: allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*); fish growth; blood indicators; immunity; transmission electron microscopy

Corresponding author: GE Xian-ping. E-mail: gexp@ffrc.cn



图版

1. 摄食正常日粮组异育银鲫肝脏细胞 ($\times 1\ 000$) ; 2. 摄食正常日粮组异育银鲫肝脏细胞核(示 M、C、R、G, $\times 4\ 000$) ; 3. 摄食高糖日粮组的异育银鲫肝细胞(示 F、N、G, $\times 700$) ; 4. 摄食高糖日粮组的异育银鲫肝细胞核(示 L、G、R、M、F, $\times 2\ 000$) ; 5. 摄食高糖日粮组的异育银鲫肝细胞核(示 G、NM, $\times 3\ 000$) ; 6. 摄食高糖组日粮的异育银鲫肝细胞核(示 L、R、M、G、S、L, $\times 2\ 500$)。
C. 异染色质; M. 线粒体; N. 细胞核; NM. 核膜; R. 粗面内质网; S. 滑面内质网; L. 溶酶体; G. 糖原; F. 脂滴。

Plate

1. hepatic cell ultrastructure fed with NS dietary ($\times 1\ 000$) ; 2. hepatic cell nucleus ultrastructure fed with NS dietary (show M, C, R, G, $\times 4\ 000$) ; 3. hepatic cell ultrastructure fed with HS dietary (show F, N, G, $\times 700$) ; 4. hepatic cell nucleus ultrastructure fed with HS dietary (show L, G, R, M, F, $\times 2\ 000$) ; 5. hepatic cell nucleus ultrastructure fed with HS dietary (show G, NM, $\times 3\ 000$) ; 6. hepatic cell nucleus ultrastructure fed with HS dietary (show L, R, M, G, S, L, $\times 2\ 500$) .
C. chromatin; M. mitochondria; N. nucleus; NM. nuclear membrane; R. rough endoplasmic reticulum; S. smooth endoplasmic reticulum; L. lysosome; G. glycogen; F. fat.