

维生素 C 对青鱼幼鱼生长、免疫及抗氨氮胁迫能力的影响

胡 毅¹, 黄 云¹, 文 华^{2,3*}, 郇志利¹,
钟 蕾¹, 毛小伟¹, 李金龙¹, 肖调义^{1*}

(1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128;

2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 淡水生态与健康养殖重点开放实验室, 湖北 武汉 430223;

3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

摘要:以初始体质量为(7.27±0.40)g的青鱼为研究对象,采用维生素C(V_C)含量分别为0(对照组)、16.3、33.9、69.1、137.8和277.5 mg/kg 6种等氮等能实验饲料,饲养青鱼8周后,选取0、69.1和277.5 mg/kg V_C组进行24 h氨氮胁迫(20 mg/L),研究V_C对青鱼幼鱼生长、免疫及抗氨氮胁迫能力的影响。结果显示:以特定生长率为指标,折线模型分析表明青鱼有效维生素C需要量为63.0 mg/kg。肌肉、肝脏和血清中V_C积累量与饲料中V_C含量呈正相关性,当V_C添加量达到137.8 mg/kg时,肌肉和肝脏中V_C积累量达到饱和。饲料中添加V_C对血清总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性及丙二醛(MDA)含量无显著影响,饲料中添加V_C显著提高了血清谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)和过氧化氢酶(CAT)活性($P < 0.05$);血清中谷胱甘肽(GSH)含量和鳃丝Na⁺/K⁺-ATP酶活力(NKA)随饲料中V_C添加量的增加呈升高趋势,而血清皮质醇含量(COR)呈下降趋势。氨氮胁迫有使肝脏和肌肉V_C含量、血清T-SOD、CAT、GSH-px活性、GSH含量和鳃丝NKA活性降低,血清V_C含量、COR和MDA含量增加趋势。其中,对照组T-SOD、CAT、NKA活性、GSH、MDA和COR胁迫前后差异显著($P < 0.05$),氨氮胁迫使V_C添加组青鱼肝脏V_C含量显著降低($P < 0.05$),而CAT、NKA活力、GSH、COR胁迫前后均无显著变化。69.1 mg/kg V_C组T-SOD活性胁迫前后无显著差异,但GSH-px活性和MDA含量胁迫前后差异显著($P < 0.05$),而277.5 mg/kg V_C添加组GSH-px活力和MDA含量胁迫前后差异不显著,但T-SOD活性显著降低,血清V_C含量显著升高($P < 0.05$)。研究表明,青鱼获得最好生长的饲料有效V_C添加量为63.0 mg/kg,氨氮胁迫使青鱼产生免疫应激反应,而补充V_C可有效增强机体免疫,缓解机体免疫应激,改善青鱼抗氨氮胁迫能力。

关键词:青鱼;维生素C;生长;免疫;抗氨氮胁迫

中图分类号:S 963

文献标志码:A

高密度集约化养殖中,水产养殖动物残饵和排泄物等氨化作用产生大量氨态氮,是诱发疾病的主要环境因子。大多数硬骨鱼类对氨氮毒性非常敏感^[1]。水体中过高的氨氮能干扰生物体抗氧化系统,使部分抗氧化物质含量和酶活性下

降^[2-3],机体清除自由基的能力降低,脂质过氧化产物增多,导致机体非特异性免疫防御系统遭到破坏^[4-5],外源病菌的易感性增加^[6-8],鳃、肾、肝等组织结构病变,呼吸和排泄系统受损^[5,9-11]。近年来,通过营养学调控理论,提高水产动物免疫

收稿日期:2012-09-05 修回日期:2013-01-21

资助项目:湖南省自然科学基金项目(11JJ3037);国家自然科学基金项目(31001114);国家星火计划重大专项(2011GA770007);中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点实验室开放课题(2010FEA03018);湖南省科技重大专项(2010FJ1007);湖南省研究生创新课题(CX2010B285)

通信作者:文 华,E-mail:wenhua_hb@163.com;肖调义,E-mail:Tyx1128@yahoo.com.cn

机能,缓解外界环境应激越来越受到关注。维生素C(V_C)即抗坏血酸,是动物生长和维持正常生理机能所必需的营养物质。与大多数脊椎动物不同,多数鱼类体内缺乏L-2古洛内酯氧化酶,不能自行合成 V_C ,必须从食物中获取。 V_C 又是一种重要的生理和免疫调节因子,在促进鱼类生长、提高抗病力、缓解应激和创伤愈合方面有明显作用^[12-14]。青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)是我国传统淡水养殖鱼类的四大品种之一,在人工养殖过程中面临水体环境突变(以氨氮突变为主)和疾病滋生等问题。前期研究表明,氨氮胁迫影响青鱼幼鱼鳃丝 Na^+/K^+ -ATP酶活性,抗氧化系统受到严重干扰^[15],实验在此基础上,通过饲料中 V_C 的添加,探讨 V_C 对青鱼生长、免疫和抗氨氮胁迫能力的影响,以期 V_C 营养调控青鱼抵抗外界环境应激的能力提供科学的指导。

1 材料与方法

1.1 实验动物与驯化

实验青鱼为购自湖南省水产科学研究所的同一批鱼苗。实验前暂养于室外水泥池(5.0 m × 1.0 m × 1.5 m)中驯化2周,日饱食投喂商品饲料2次,日换水量占总体积的1/3。暂养期间,水温(27 ± 2)℃,pH 7.31 ± 0.2,溶解氧含量5.0 mg/L以上,并用次溴酸盐氧化法进行水体氨氮监测,总氨氮值小于或等于0.2 mg/L,正式实验前停食24 h。

1.2 实验设计

参照商品饲料配方,配制粗蛋白36.0%和粗

脂肪6.0%的基础饲料,总能约18.0 KJ/g(表1),以 V_C 磷酸酯(V_C 有效含量35%,青岛玛斯特生物技术有限公司友情提供)作为 V_C 添加源,在基础饲料中分别添加 V_C 磷酸酯0、50、100、200、400和800 mg/kg,共配制6组实验饲料。饲料原料经粉碎后过40目筛,微量成分采取逐级扩大法混合均匀,采用双螺旋压条机挤压出1.5 mm粒径饲料颗粒,于阴凉处风干后-20℃保存备用。各处理组饲料 V_C 实测值分别为:0、16.3、33.9、69.1、137.8和277.5 mg/kg。

挑选健康活泼、规格一致的实验青鱼于室内循环水养殖系统水族箱(300 L)中投喂基础饲料驯化,1周后挑选规格均匀的青鱼[初始质量(7.27 ± 0.40)g]随机分配到18个水族箱中,每箱放养30尾,每组3个重复。日投饵量为体质量的3%~5%,分2次投喂(8:00~9:00,16:00~17:00),分别占总量的40%和60%。日换水1次,换水量占总体积1/3并清除箱内粪便。日充气12 h,溶氧不低于5.0 mg/L。实验期间平均水温(28 ± 2)℃,pH 7.31 ± 0.2,养殖水总氨氮浓度低于0.2 mg/L,自然光周期,养殖持续8周。养殖实验结束后,青鱼饥饿24 h,根据生长情况,选取0(对照组)、69.1 mg/kg和277.5 mg/kg V_C 添加组,每箱随机捞取10尾实验青鱼,参照胡毅等^[15]方法,用氯化铵调节水体总氨氮浓度至20 mg/L,进入24 h氨氮胁迫实验。期间连续充气,保证溶氧不低于5.0 mg/L。

表1 基础饲料组成及营养水平(干重)

Tab. 1 Composition of the basal diet and nutrition level

原料 ingredients	含量 contents	营养组成 proximate analysis	水平 level
鱼粉/% fish meal	20	粗蛋白/% crude protein	36.86
豆粕/% soybean meal	20	粗脂肪/% crude lipid	6.68
棉粕/% cottonseed meal	16	粗灰分/% crude ash	10.28
菜粕/% rapeseed meal	10	总能/(kJ/g) gross energy	18.1
米糠/% rice bran	7		
面粉/% wheat meal	21.94		
豆油/% soybean oil	2		
胆碱/% choline chloride	0.5		
磷酸二氢钙/% monocalcium phosphate	1.5		
预混料(不含 V_C 和 V_E) premix(V_C and V_E free)	1		
维生素E/% vitamin E	0.01		
抗氧化剂/% antioxidants	0.01		
防霉剂/% mold inhibitor	0.03		

1.3 样品采集、分析与计算

生长指标 养殖实验起始和结束时,分别对各水族箱中青鱼进行记数、称重。

特定生长率(SGR) = $[(\text{Ln}W_f - \text{Ln}W_i)/T] \times 100\%$

式中, W_f 、 W_i 和 T 分别表示平均终体质量(g)、平均初体质量(g)和饲养时间(d)。

饲料和组织维生素 C 含量 氨氮胁迫前后,分别从每水族箱随机取 3 尾实验青鱼,冰盘上解剖并分离出肝脏和轴上肌,称取一定量肝脏或肌肉,捣碎、匀浆、离心,制备上清液备用。肝脏、肌肉和血清中 V_c 含量均采用 2,4-二硝基苯肼法测定。饲料中 V_c 含量利用高效液相层析色谱(HPLC)测定。

血清指标 氨氮胁迫前后,从各实验水族箱中随机捞取 8 尾实验青鱼,放入盛有 0.15 mL/L 丁香油溶液中短暂麻醉,用 1 mL 无菌注射器尾静脉采血,置于无菌离心管中,4 °C 静置 12 h,3 500 r/min 离心 15 min,取上层血清移入离心管中放置 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

血清皮质醇含量(COR)采用上海继锦化学科技有限公司鱼 ELISA 试剂盒测定;谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)、丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)和过氧化氢酶(CAT)均采用南京建成生物研究所试剂盒测定。

鳃丝 Na^+/K^+ -ATP 酶活性 氨氮胁迫前后,冰浴条件下,取实验青鱼两侧第 2 鳃弓上的鳃丝,用生理盐水润洗,滤纸吸干水分,用于鳃丝 Na^+/K^+ -ATP 酶(NKA)活性测定。其测定参照胡毅等^[15]的方法。NKA 活性单位定义为:以每小时每毫克组织蛋白中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为 1 个 ATP 酶活力单位 [$\mu\text{mol P}/(\text{mg} \cdot \text{h})$]。

1.4 统计分析

实验结果以平均值 \pm 标准差表示,用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析,当差异显著时($P < 0.05$),则采用 Duncan 氏多重比较;用 t 检验检测氨氮胁迫前后的变化。

2 结果

2.1 维生素 C 对青鱼幼鱼生长的影响

饲料维生素 C 对青鱼幼鱼生长影响见图 1。各 V_c 添加组青鱼 SGR 均显著高于对照组($P <$

0.05),且随着饲料中 V_c 添加量的增加,青鱼幼鱼 SGR 呈升高趋势。当 V_c 添加量达到或超过 69.1 mg/kg 时,其 SGR 出现平台期,且均显著高于 0 ~ 33.9 mg/kg V_c 添加组($P < 0.05$)。

经折线回归分析表明,青鱼幼鱼达到最大生长时,饲料中 V_c 最低添加量为 63.0 mg/kg。

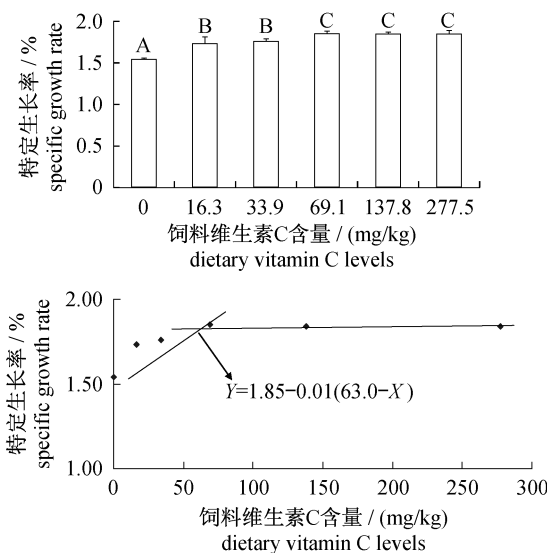


图 1 维生素 C 对青鱼幼鱼生长的影响

(平均数 \pm 标准差,重复数 = 3)

柱上不同字母表示各组间差异显著(Duncan 氏多重比较, $P < 0.05$)。

Fig. 1 Effects of dietary vitamin C levels on growth of juvenile *M. piceus* (mean \pm SD, $n = 3$)

The values with different superscript letter are significant different among different dose groups(Duncan's multiple range test, $P < 0.05$); The followings below are the same.

2.2 氨氮胁迫对青鱼幼鱼组织中维生素 C 含量的影响

肌肉、肝脏和血清中 V_c 含量均随着饲料中 V_c 含量的升高而呈显著上升趋势($P < 0.05$),当饲料中 V_c 含量达到或超过 137.8 mg/kg 时,肌肉和肝脏中 V_c 含量均达到饱和状态(图 2)。

氨氮胁迫使青鱼肌肉和肝脏中 V_c 含量有下降趋势,各实验组肌肉中 V_c 含量胁迫前后差异不显著,而 V_c 添加组肝脏 V_c 含量则显著下降($P < 0.05$),且胁迫后 V_c 添加组肝脏 V_c 含量仍显著高于对照组($P < 0.05$)。氨氮胁迫前后对照组青鱼血清 V_c 含量无显著变化,但 V_c 添加组血清 V_c 含量有升高趋势,且 277.5 mg/kg V_c 添加组血清 V_c 含量胁迫前后差异显著,胁迫后 V_c 添加组血清 V_c 含量仍显著高于对照组($P < 0.05$)。

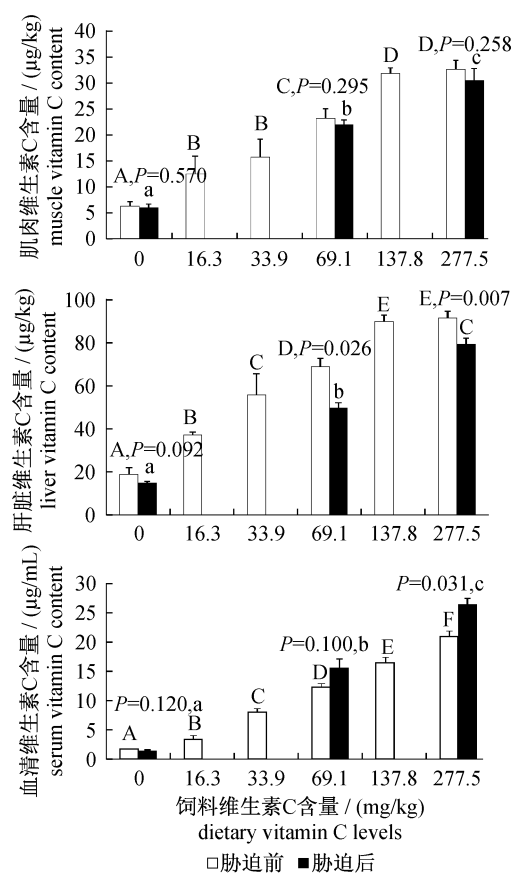


图2 维生素C对氨氮胁迫前后组织维生素C含量的影响(平均数±标准差,重复数=3)

柱上不同大、小写字母分别表示经氨氮应激前后各组间差异显著(Duncan多重比较, $P < 0.05$); P 值表示同一剂量组氨氮应激前后的比较(t 检验)。下同。

Fig. 2 Effects of the vitamin C on tissue vitamin C content of juvenile *M. piceus* before and after ammonia-nitrite stress (mean ± SD, $n = 3$)

The values with different capital and lowercase are significant different among different dose groups treated with ammonia-nitrite stressed (Duncan's multiple range test, $P < 0.05$); P values are the comparative results per dose groups between non-ammonia-nitrite stressed and ammonia-nitrite stressed (t test); The followings below are the same.

2.3 氨氮胁迫对青鱼幼鱼血清抗氧化系统的影响

饲料中 V_c 对青鱼幼鱼血清 T-SOD 活性和 MDA 含量无显著影响,但显著提高血清 GSH-px 和 CAT 活性 ($P < 0.05$),但各 V_c 添加组 GSH-px 活性无显著差异,137.8 mg/kg V_c 组有最高 CAT 活性。随着饲料 V_c 含量的升高,GSH 含量呈升高趋势,当 V_c 添加量达到或超过 137.8 mg/kg 时,GSH 含量显著高对照组 ($P < 0.05$);而 COR 随饲料 V_c 的增加呈下降趋势 ($P < 0.05$) (图3)。

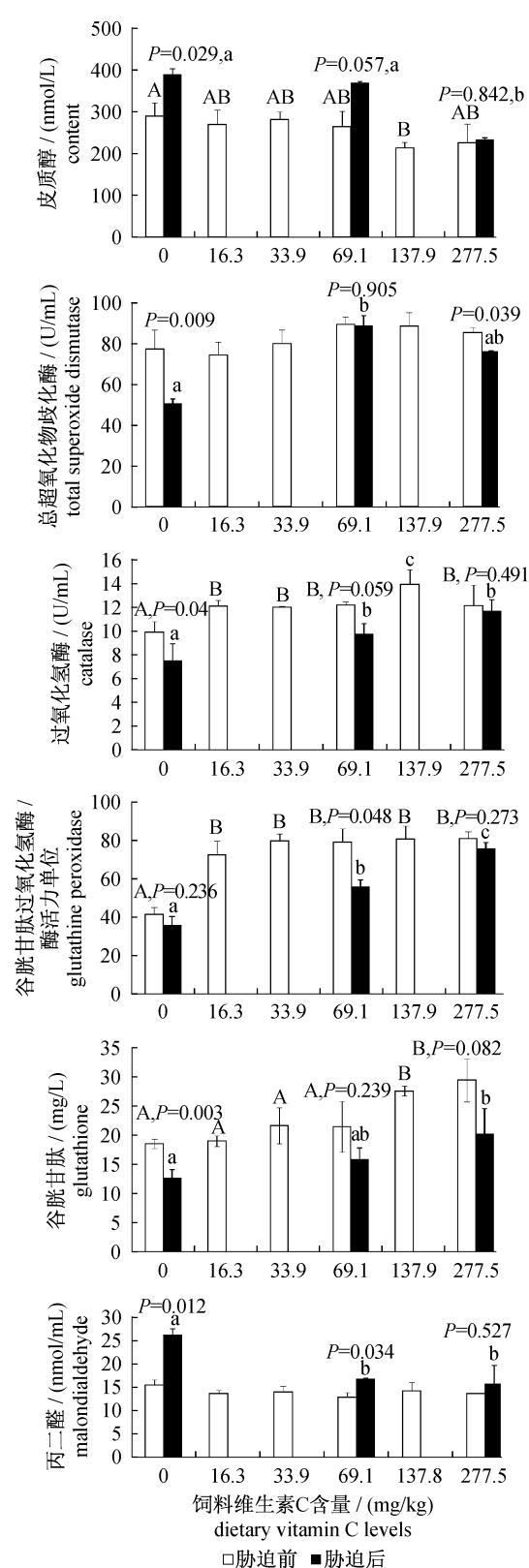


图3 维生素C对氨氮胁迫前后青鱼幼鱼血清生化指标的影响(平均数±标准差,重复数=3)

Fig. 3 Effects of the vitamin C on blood biochemical index of juvenile *M. piceus* before and after ammonia-nitrite stress (mean ± SD, $n = 3$)

氨氮胁迫有使血清 T-SOD、CAT、GSH-px 活性及 GSH 含量降低, COR 和 MDA 含量升高的趋势, 其中氨氮胁迫使对照组血清 MDA、COR 含量显著升高 ($P < 0.05$), 但饲料中添加 V_C 能有效降低胁迫后血清 MDA、COR 含量升高幅度, V_C 饲料组氨氮胁迫前后血清 COR 含量差异不显著。氨氮胁迫后, 277.5 mg/kg V_C 添加组血清 COR 显著低于对照组和 69.1 mg/kg V_C 添加组 ($P < 0.05$), 277.5 mg/kg V_C 添加组血清 MDA 含量胁迫前后差异不显著。氨氮胁迫后, V_C 饲料组血清 MDA 含量显著低于对照组 ($P < 0.05$); 氨氮胁迫显著降低了对照组血清 T-SOD、CAT 活性以及 GSH 含量 ($P < 0.05$), 而饲料中添加 V_C 能有效降低胁迫后血清 T-SOD、CAT 活性以及 GSH 含量降低的趋势, V_C 饲料组胁迫前后血清 CAT 活性、GSH 含量差异不显著, 氨氮胁迫后, V_C 添加组血清 CAT 活性显著高于对照组, 277.5 mg/kg V_C 添加组血清 GSH 含量显著高于对照组, 69.1 mg/kg V_C 添加组血清 T-SOD 活性胁迫前后差异不显著, 胁迫后, 69.1 mg/kg V_C 添加组血清 T-SOD 活性显著高于对照组。虽然氨氮胁迫前后对照组血清 GSH-px 活性差异不显著, 但胁迫后 V_C 添加组血清 GSH-px 活性仍然显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

2.4 氨氮胁迫前后鳃丝 NKA 活力变化

与对照组相比, 各 V_C 添加组鳃丝 NKA 活性均有所升高, 但仅 277.5 mg/kg V_C 添加组显著高于对照组 ($P < 0.05$)。氨氮胁迫降低了青鱼鳃丝 NKA 活性, 仅对照组胁迫前后差异显著 ($P < 0.05$)。胁迫后 277.5 mg/kg V_C 组显著高于对照组和 69.1 mg/kg V_C 组 ($P < 0.05$) (图 4)。

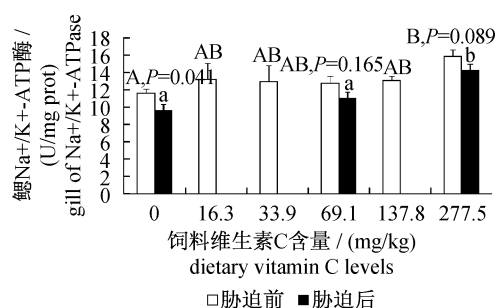


图 4 维生素 C 对氨氮胁迫前后青鱼幼鱼鳃丝 NKA 的影响 (平均数 ± 标准差, 重复数 = 3)

Fig. 4 Effects of the vitamin C on gill Na^+/K^+ -ATPase of juvenile *M. piceus* before and after ammonia-nitrite stress (mean ± SD, n = 3)

3 讨论

饲料中添加一定量的 V_C 可促进鱼类生长, 但摄食过量的 V_C 对生长无促进作用反而有抑制作用^[16-18]。实验得到相似结果, 饲料中添加 0 ~ 69.1 mg/kg V_C , 青鱼特定生长率呈升高趋势, 然而, 当 V_C 添加量超过 69.1 mg/kg 时, 其特定生长率无显著变化。通过折线模型分析得出, 青鱼获得最大特定生长率时, V_C 有效含量为 63.0 mg/kg。高于点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) (V_C 有效需求量 24.5 mg/kg)^[16]、翘嘴红鲌 (*Culter alburnus*) (V_C 有效需求量 50.1 mg/kg)^[17], 但低于鲈 (*Lateolabrax japonicus*) (V_C 有效需求量 70.0 mg/kg)^[18]、鸚鵡鱼 (*Oplegnathus fasciatus*) (V_C 有效需求量 118.0 mg/kg)^[19]。其原因可能与不同鱼类对 V_C 的代谢率不同从而导致对 V_C 需求存在差异^[20]。

组织中 V_C 积累量与食物中 V_C 含量呈正相关, 但随摄入 V_C 量的增加, 组织中 V_C 的积累量将到达饱和^[16]。实验中, 随着饲料中 V_C 含量的增加, 肌肉、肝脏和血液中 V_C 含量呈显著上升趋势, 添加量超过 137.8 mg/kg 时, 肌肉和肝脏中 V_C 积累量均达到饱和。肝脏是 V_C 的主要储存场所, 其含量远比肌肉中 V_C 含量高, 同时, 肝脏也是 V_C 的主要代谢场所。氨氮胁迫对肌肉中 V_C 含量无显著影响, 但是使各组肝脏中 V_C 含量有不同程度地降低, 且使 V_C 添加组肝脏中 V_C 含量显著下降。 V_C 作为机体重要的抗氧化物质和生理调节因子, 当鱼体受到氨氮胁迫后, 机体可能通过调节肝脏中储存的 V_C 抵抗因胁迫导致机体氧化自由基增多而产生的一系列氧化损伤, 而对照组因肝脏 V_C 积累量低, 无法有效利用来缓解应激胁迫。而氨氮胁迫使血液中 V_C 含量升高, 可能跟胁迫后机体动用肝脏中储存的 V_C 有关。然而, 在中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*)^[21] 的研究发现, 酸应激后中华鳖肝脏中 V_C 虽有所下降, 但并无显著变化, 其原因可能与应激的类型、强度和应激时间的长短等因素有关。

下丘脑—垂体—肾间组织轴是鱼类应激调节中枢, 能释放促肾上腺皮质激素, 促进头肾细胞皮质醇激素的合成与释放, 而皮质醇激素通常不被储存, 直接进入血液^[22]。当水产动物受到环境因子如拥挤、盐度、氨氮和亚硝酸盐等胁迫时, 机体

产生应激反应导致其血液中皮质醇含量升高^[15,23]。有研究指出, V_C 可有效调节机体皮质醇含量^[24], 实验也表明, 随着饲料中 V_C 含量的增加, 血清皮质醇含量呈下降趋势。V_C 还可抑制应激后皮质醇含量升高, 缓解机体应激反应^[20,25]。实验中, 氨氮胁迫能使血清皮质醇含量升高, 但饲料中添加高含量 V_C 能有效缓解氨氮胁迫后青鱼血清皮质醇含量的升高, 这说明饲料中高含量 V_C 可调节机体皮质醇含量, 增强青鱼抵抗氨氮胁迫造成机体应激反应的能力。已有研究表明, V_C 对应激调节与皮质醇的合成密切相关, 它可通过控制不饱和脂肪酸的过氧化而限制类固醇的合成, 阻止胆固醇的生成, 进而阻止皮质醇的生成^[26]。另外, 还可通过神经调节因子, 调节脑部多巴胺和去甲肾上腺素的水平, 控制鱼类行为, 增强抵抗应激反应的能力^[27]。

动物体内参与清除体内过多自由基的防御系统包括非酶系统和酶系统。非酶系统主要包括 V_C、维生素 E、GSH 及微量元素等; 酶系统主要包括超氧化物歧化酶(清除超氧阴离子)、CAT(清除过氧化氢)等。当机体受到环境胁迫, 体内产生大量自由基, 造成氧化胁迫, 影响抗氧化相关酶活性和抗氧化物质含量, 从而干扰抗氧化系统防御功能^[15]。目前, 有关环境胁迫对水产动物抗氧化能力的营养调控已有相关报道。Chien 等^[28]指出, 饲喂虾青素可提高热和渗透性应激下斑节对虾(*Penaeus monodon*) 血淋巴总抗氧化力。Liu 等^[29]研究表明, VE 可有效增强机体渗透调节和抗氧化能力, 从而有效抵抗盐度胁迫。V_C 作为一种重要的抗氧化剂, 在增强水产动物机体抗氧化能力方面已有相关报道^[30]。实验结果也显示, V_C 可有效提高血清 CAT、GSH-px 活力和 GSH 含量, 从而增强机体抗氧化能力。相关研究表明, V_C 增强水产动物抗酸^[21]、亚硝酸盐^[30]、盐度^[31]和氨氮^[32]等胁迫能力与 V_C 提高机体抗氧化能力有着密切关系。本实验结果显示, 青鱼受到氨氮胁迫后, 对照组血清 T-SOD、CAT 活性和 GSH 含量均显著降低, MDA 含量显著升高。但饲料中添加 V_C 能有效降低氨氮胁迫后血清 MDA 含量升高的幅度, 降低氨氮胁迫后血清 T-SOD、CAT 活性以及 GSH 含量降低的幅度。这说明 V_C 在缓解氨氮胁迫对青鱼抗氧化系统的影响有一定作用。V_C 可有效调节机体抗氧化酶活性和抗氧化

物质水平, 抑制环境胁迫对机体造成氧化应激, 从而降低脂质过氧化物 MDA 对机体的损害, 增强抗环境胁迫能力, 与 Wang 等^[32] 研究结果相似。

鳃是鱼类呼吸、氨氮排泄及渗透调节的主要部位, NKA 是鳃组织泌氯细胞及细胞器的膜上存在的一种蛋白酶, 在鱼体渗透调节过程中起着非常重要的作用^[33]。环境胁迫对鳃丝 NKA 活性可产生显著负面影响^[17]。目前, 有关营养途径调节鳃 NKA 活性的研究很少。Liu 等^[29]指出, VE 可有效提高南美白对虾鳃丝 NKA 活性, 缓解盐度突变对鳃丝 NKA 活性的影响。本实验研究表明, 饲料中添加 V_C 能使 NKA 活性升高, 氨氮胁迫有使青鱼鳃丝 NKA 活性降低的趋势, 但 V_C 能有效缓解氨氮胁迫对鳃丝 NKA 活性的影响。有效维持氨氮胁迫下鳃丝渗透调节功能。但 Wang 等^[13] 研究日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*) 指出, 氨氮胁迫下添加 137.8 mg/kg V_C 可抑制鳃 NKA 活性升高, 与本研究结果存在差异, 其原因可能与 V_C 添加量有关, 过量 V_C 添加可能对 NKA 活性产生抑制作用。

综上所述, V_C 可有效促进青鱼生长, 以青鱼获取最大生长的有效 V_C 需求量为 63.0 mg/kg。V_C 还能有效调节鳃丝 Na⁺/K⁺-ATP 酶活性和提高机体抗氧化能力, 降低环境应激反应, 从而有效抵抗机体抗氨氮胁迫能力。

衷心感谢刘巧林、马晓、金红春、周伟、刘敏、姚一斌、王晓娜、高巍、金柏涛和湖南省水产科学研究所何志刚等在实验和论文撰写过程中提供热心的帮助!

参考文献:

- [1] Handy R D, Poxton M G. Nitrogen pollution in mariculture: toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish [J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 1993, 3(3): 205 - 241.
- [2] Romano N, Zeng C S. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus* [J]. Aquaculture, 2007, 266 (1 - 4): 246 - 254.
- [3] Ching B, Chew S F, Wong W P, et al. Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (mudskipper)

- [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 95(3): 203 - 212.
- [4] 李文祥, 谢俊, 宋锐, 等. 水体 pH 胁迫对异育银鲫皮质醇激素和非特异性免疫的影响[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(2): 256 - 261.
- [5] 洪美玲. 水中亚硝酸盐和氨氮对中华绒螯蟹幼体的毒性效应及维生素 E 的营养调节[D]. 上海: 华东师范大学, 2007.
- [6] Liu C H, Chen J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vanamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16 (3): 321 - 334.
- [7] Jiang G J, Yu R C, Zhou M J. Modulatory effects of ammonia-N on the immune system of *Penaeus japonicus* to virulence of white spot syndrome virus [J]. *Aquaculture*, 2004, 241(1-4): 61 - 75.
- [8] 邱德全, 周鲜娇, 邱明生. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾抗病力和副溶血弧菌噬菌体防病效果研究[J]. *水生生物学报*, 2008, 32(4): 456 - 461.
- [9] Bucher F, Hofer R. The effects of treated domestic sewage on three organs (gills, kidney, liver) of brown trout (*Salmo trutta*) [J]. *Water Research*, 1993, 27(2): 255 - 261.
- [10] 姜令绪, 潘鲁青, 肖国强. 氨氮对凡纳滨对虾免疫指标的影响[J]. *中国水产科学*, 2004, 11(6): 537 - 541.
- [11] Romano N, Zeng C S. Importance of balanced Na^+/K^+ ratios for blue swimmer crabs, *Portunus pelagicus*, to cope with elevated ammonia-N and differences between *in vitro* and *in vivo* gill Na^+/K^+ -ATPase responses [J]. *Aquaculture*, 2011, 318(1-2): 154 - 161.
- [12] Chen R G, Lochmann R, Goodwin A, et al. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*) [J]. *Aquaculture*, 2004, 242(1-4): 553 - 569.
- [13] Wang A L, Wang W N, Wang Y, et al. Effect of dietary vitamin C supplementation on the oxygen consumption, ammonia-N excretion and Na^+/K^+ -ATPase of *Macrobrachium nipponense* exposed to ambient ammonia [J]. *Aquaculture*, 2003, 220(1-4): 833 - 841.
- [14] Eo J, Lee K J. Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer, *Takifugu rubripes* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(5): 611 - 616.
- [15] 胡毅, 黄云, 钟蕾, 等. 氨氮胁迫对青鱼幼鱼鳃丝 Na^+/K^+ -ATP 酶、组织结构及血清部分生理生化指标的影响[J]. *水产学报*, 2012, 36(4): 538 - 545.
- [16] 周岐存, 刘永坚, 麦康森, 等. 维生素 C 对点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 生长及组织中维生素 C 积累量的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2005, 35(2): 152 - 158.
- [17] 陈建明, 叶金云, 潘茜, 等. 饲料中添加维生素 C 对翘嘴鲌鱼种生长及组织中抗坏血酸含量的影响[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(1): 106 - 112.
- [18] 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* [J]. *Aquaculture*, 2004, 242(1-4): 489 - 500.
- [19] Wang X J, Kim K W, Bai S C C, et al. Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*) [J]. *Aquaculture*, 2003, 215(1-4): 203 - 211.
- [20] 艾庆辉, 麦康森, 王正丽, 等. 维生素 C 对鱼类营养生理和免疫作用的研究进展[J]. *水产学报*, 2005, 29(6): 854 - 861.
- [21] Zhou X Q, Xie M X, Niu C J, et al. The effects of dietary vitamin C on growth, liver vitamin C and serum cortisol in stressed and unstressed juvenile soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 2003, 135(2): 263 - 270.
- [22] Wendelaar Bonga S E. The stress response in fish [J]. *Physiological Reviews*, 1997, 77(3): 591 - 625.
- [23] 李爱华. 拥挤胁迫对草鱼血浆皮质醇、血糖及肝脏中抗坏血酸含量的影响[J]. *水生生物学报*, 1997, 21(4): 384 - 386.
- [24] 明建华, 谢俊, 徐跑, 等. 大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂生长、生理生化指标、抗病原感染以及两种 HSP70s mRNA 表达的影响[J]. *水产学报*, 2010, 35(9): 1447 - 1459.
- [25] 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 seabream, *Sparus aurata* [J]. *Aquaculture*, 1998, 161(1-4): 415 - 426.
- [26] Kitabchi A E. Ascorbic acid in steroidogenesis [J]. *Nature*, 1967, 215(5108): 1385 - 1386.
- [27] Johnston W L, MacDonald E, Hilton J W. Relationships between dietary ascorbic acid status and deficiency, weight gain and brain neurotransmitter levels in juvenile

- rainbow trout, *Salmo gairdneri* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1989, 6(6): 353 - 365.
- [28] Chien Y H, Pan C H, Hunter B. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin [J]. *Aquaculture*, 2003, 216(1-4): 177 - 191.
- [29] Liu Y, Wang W N, Wang A L, *et al.* Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes [J]. *Aquaculture*, 2007, 265(1-4): 351 - 358.
- [30] 高明辉. VC、VE 对亚硝酸盐胁迫下异育银鲫血液指标及抗氧化能力的影响 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [31] Lim L C, Dhert P, Chew W Y, *et al.* Enhancement of stress resistance of the *Guppy Poecilia reticulata* through feeding with vitamin C supplement [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2002, 33(1): 32 - 40.
- [32] Wang W N, Wang A L, Wang Y. Effect of supplemental L-ascorbyl-2-polyphosphate (APP) in enriched live food on the immune response of *Penaeus vannamei* exposed to ammonia-N [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2006, 256(1-4): 552 - 557.
- [33] 徐力文, 刘广锋, 王瑞旋, 等. 急性盐度胁迫对军曹鱼稚鱼渗透压调节的影响 [J]. *应用生态学报*, 2007, 18(7): 1596 - 1600.

Effect of vitamin C on growth, immunity and anti-ammonia-nitrite stress ability in juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus*)

HU Yi¹, HUANG Yun¹, WEN Hua^{2,3*}, HUAN Zhili¹, ZHONG Lei¹,
MAO Xiaowei¹, LI Jinlong¹, XIAO Tiaoyi^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China;

2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

3. Freshwater Fishery Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Studies were conducted to investigate the effects of dietary vitamin C (V_c) on growth, immunity and anti-ammonia-nitrite stress ability in juvenile black carp, *Mylopharyngodon piceus* (initial average weight 7.27 ± 0.40 g). Six iso-nitrogenous and iso-energetic diets were formulated to supply at dosages of 0 (control), 16.3, 33.9, 69.1, 137.8 and 277.5 mg/kg vitamin C diet, respectively. After feeding 8 weeks, according to specific growth rate, three group of 0, 69.1 and 277.5 mg/kg of black carp were subjected to an ammonia-nitrite stress (20 mg/L) for 24 h. Results indicated that the effective vitamin C content for maximum growth is about 63.0 mg/kg. The vitamin V_c levels in liver, muscle and serum were in positive correlation with V_c content in diet, and no significant differences were observed among fish fed the diets with equal to or higher than 137.8 mg/kg of vitamin V_c . No significant differences in total superoxide dismutase (T-SOD) and malondialdehyde (MDA) were observed among dietary treatments. But V_c could significantly increase the catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-px) activity ($P < 0.05$). With the V_c content increased, CAT increased at first and then decreased. Glutathione (GSH) and Na^+/K^+ -ATPase (NKA) increased when V_c concentration in diets were increased, cortisol (COR) were decreased at first and then increased. After ammonia-nitrite stress, each group of the V_c concentration in liver, T-SOD, CAT, GSH-px activity and GSH content in serum and gill NKA activity decreased, serum V_c level, COR and MDA content increased. The T-SOD, CAT and NKA activity, GSH, MDA and COR content significantly changed before and after ammonia-nitrite stress. Liver vitamin C concentration in fishes fed V_c diets significantly decreased after stress, however, there are no significant changes in CAT, NKA activity and GSH, cortisol content compared with control group. T-SOD activity in 69.1 mg/kg vitamin C diet had no significant change before and after stress, but GSH-px activity and MDA content had significantly changed. In 277.5 mg/kg vitamin C group, GSH-px activity and MDA content had no significant change except T-SOD activity and serum V_c level. All the results indicated that the effective vitamin C requirement of juvenile black carp for optimal growth might be 63.0 mg/kg diet. Fish have been stressed when put in ammonia-nitrite, and V_c concentration in diet could improve immunity and anti-ammonia-nitrite stress ability of black carp.

Key words: *Mylopharyngodon piceus*; Vitamin C; growth; anti ammonia-nitrite stress

Corresponding author: WEN Hua. E-mail: wenhua_hb@163.com;

XIAO Tiaoyi. E-mail: Tyx1128@yahoo.com.cn