

## 肌醇对氨氮应激下团头鲂幼鱼免疫的影响

崔红红<sup>1,2</sup>, 刘波<sup>1,2</sup>, 戈贤平<sup>1,2\*</sup>, 廖英杰<sup>1,2</sup>, 谢骏<sup>1,2</sup>,  
任鸣春<sup>2</sup>, 周群兰<sup>2</sup>, 缪凌鸿<sup>2</sup>, 陈汝丽<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

**摘要:** 为了研究氨氮应激下肌醇对团头鲂幼鱼免疫的影响, 实验选择初均重为(3.40 ± 0.07) g的健康团头鲂幼鱼450尾, 随机分为6组, 每组3个重复, 分别投喂含肌醇0、101.2、202.3、404.8、809.1和1616.4 mg/kg的精制饲料, 实验期为90 d。结果表明: 与对照组相比, 氨氮应激前, 404.8 mg/kg肌醇添加组显著提高了团头鲂幼鱼淋巴细胞百分比、补体3、补体4和血液呼吸爆发活性( $P < 0.05$ ); 氨氮应激12 h, 404.8和809.1 mg/kg肌醇添加组的血液白细胞、红细胞、淋巴细胞百分比、血红蛋白和血清补体3、补体4水平显著升高( $P < 0.05$ ), 皮质醇水平显著降低( $P < 0.05$ ), 202.3和404.8 mg/kg肌醇添加组的血细胞呼吸爆发活性显著提高( $P < 0.05$ ); 氨氮应激72 h, 404.8 mg/kg肌醇添加组的血液白细胞、红细胞、淋巴细胞百分比、血红蛋白、血清补体3和血细胞呼吸爆发活性显著升高( $P < 0.05$ ), 皮质醇水平显著下降( $P < 0.05$ ), 809.1 mg/kg肌醇添加组的血清补体4水平显著升高( $P < 0.05$ )。研究表明, 饲料中添加适量的肌醇(404.8 mg/kg)即可增强团头鲂幼鱼的免疫力, 对团头鲂幼鱼抗氨氮应激起到了一定的保护作用。

**关键词:** 团头鲂幼鱼; 氨氮应激; 肌醇; 免疫

**中图分类号:** S 965

**文献标志码:** A

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)俗称鳊鱼或草鳊等, 草食性鱼类, 隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes), 鲤形目(Cypriniformes), 鲤科(Cyprinidae), 鳊亚科(Abramidae), 其味鲜美、生长速度快、抗病性高<sup>[1-3]</sup>, 是中国淡水混养系统中主要的养殖种类<sup>[4]</sup>。团头鲂具有很高的经济价值, 2011年, 团头鲂在中国的总产量远远超过60万t, 是我国重要的大宗淡水鱼类之一<sup>[5]</sup>。

近年来, 随着团头鲂养殖业的迅猛发展, 以及养殖规模的不断扩大, 高密度养殖使得其残饵、排泄物等有机物发酵, 产生大量的氨氮、硫化氢以及亚硝酸盐等物质, 其中氨氮能够对水生动物的许多器官造成损伤, 降低其免疫力, 甚至导致死亡<sup>[6-7]</sup>。据报道, 水体中的氨氮可引起草鱼鱼种

红细胞渗透脆性增高, 进而改变胞浆的酸碱度、渗透压, 使红细胞膜上过氧化脂质含量增加, 膜流动性下降<sup>[8]</sup>。姜令绪等<sup>[9]</sup>认为, 在氨氮浓度突变后, 对虾在短时间内因应激反应导致机体能量需求增加, 而能量供给减少和体内氨氮累积增加所产生的毒性效应, 使其免疫力明显下降, 对病原的易感性提高, 从而容易爆发疾病。Liu等<sup>[10]</sup>的研究发现, 随着氨氮水平升高(0.01 ~ 21.60 mg/L), 168 h后凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的血细胞酚氧化酶活力、吞噬活性和清除率降低, 抗病力下降。氨氮已成为集约化水产养殖中影响鱼类的主要限制因子之一<sup>[11]</sup>。

肌醇(Myoinositol)即环己六醇, 是饱和的环状多元醇, 属于维生素B族类的物质<sup>[12]</sup>, 具有与

收稿日期: 2013-09-27 修回日期: 2013-11-28

资助项目: 公益性行业(农业)科研专项(201003020); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2013A08XK02)

通信作者: 戈贤平, E-mail: gexp@ffrc.cn

维生素 B 和维生素 H 相类似的作用。肌醇广泛存在于植物和动物中,并以磷脂酰肌醇的形式作为细胞膜的一部分<sup>[13]</sup>。肌醇对鱼类具有非常重要的作用,研究表明,饲料中添加适量的肌醇,有助于鱼体内淀粉的消化<sup>[14]</sup>,促进细胞的新陈代谢<sup>[15]</sup>,提高其特异性免疫和非特异性免疫功能<sup>[16-17]</sup>。

目前,肌醇对团头鲂幼鱼抗氨氮应激方面的研究还未见有报道,鉴于此,本实验通过测定血液中白细胞、淋巴细胞百分比、红细胞、血红蛋白,以及血清中补体 3、补体 4 等相关的免疫指标,来探讨氨氮应激下,肌醇对团头鲂幼鱼免疫的影响,以为团头鲂的健康养殖提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验团头鲂及饲料

团头鲂幼鱼由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心苗种基地提供。实验鱼放入可控温循环

流水圆形蓄养槽(规格为  $\varphi 820 \text{ mm} \times 700 \text{ mm}$ )内,采用循环流水控温系统进行养殖。实验选择健康、重量、规格基本一致的团头鲂幼鱼,初始体质量为  $(3.40 \pm 0.07) \text{ g}$  的团头鲂幼鱼随机分为 6 组,每组 3 个重复,每个重复 25 尾鱼。

实验以酪蛋白和明胶为蛋白源,糊精和淀粉为糖源,豆油为脂肪源配制了 6 组等氮等能饲料,肌醇(98%,吉林海资生物工程技术有限公司)的添加水平分别为:0、101.2、202.3、404.8、809.1、1 616.4 mg/kg 饲料(江南大学食品学院维生素检测中心的高效液相色谱仪 Waters600 HPLC 测定饲料中肌醇实际含量)。基础饲料组成和主要营养成分见表 1。饲料原料经过粉碎过 60 目孔径分筛,按表 1 配比混合均匀,微量营养原料采用逐级扩大法混合。加 20% 的水揉匀,用 SLP-45 型颗粒机(中国水产科学研究院渔业机械仪器研究所)制成粒径 2.0 mm 的沉性颗粒饲料,50 °C 烘干后于 4 °C 冰箱中保存备用。

表 1 团头鲂幼鱼基础日粮与营养水平  
Tab. 1 Basal diet and nutrition levels of juvenile *M. amblycephala* %

原料 ingredients	含量 content	营养成分 chemical composition	含量 content
酪蛋白(不含肌醇) casein( inositol free)	27.5	粗蛋白 CP	32.12
明胶 gelatin	6.5	粗脂肪 EE	6.68
磷酸二氢钙 calcium dihydrogen phosphate	2.75	总能/(kJ/g) <sup>3</sup> GE	16.74
豆油 soybean oil	6	无氮浸出物 <sup>4</sup> NFE	37.91
大豆磷脂 soy lecithin	1	赖氨酸 lysine	2.26
氯化胆碱(50%) choline chloride(50%)	0.15	蛋氨酸 methionine	0.79
维生素预混料(不含肌醇) <sup>1</sup> vitamin premix( inositol free)	0.5		
矿物质预混料 <sup>2</sup> mineral premix	0.5		
糊精 dextrin	10		
$\alpha$ -淀粉 $\alpha$ -starch	25		
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	9.05		
羧甲基纤维素 carboxyl-methy cellulose	11		
乙氧基喹啉 ethoxyquin	0.05		

注:1. 维生素预混料(每千克预混料):维生素 A,900 000 IU;维生素 D,250 000 IU;维生素 E,4 500 mg;维生素 C,5 000 mg;维生素 K<sub>3</sub>, 220 mg;维生素 B<sub>1</sub>,320 mg;维生素 B<sub>2</sub>,1 090 mg;维生素 B<sub>6</sub>,5 000 mg;维生素 B<sub>12</sub>,116 mg;生物素,50 mg;泛酸盐,1 000 mg;叶酸,165 mg;胆碱,60 000 mg;烟酸,2 500 mg;2. 矿物质预混料(每千克):CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O,2.5 g;FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O,28 g;ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O,22 g;MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O,9 g;Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>,0.045 g;KI,0.026 g;CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O,0.1 g;3. 总能(kJ/g) = 23.64 粗蛋白 + 39.54 粗脂肪 + 17.15 无氮浸出物;4. 无氮浸出物(%) = 100% - (粗蛋白 + 粗脂肪 + 粗纤维 + 粗灰分)%

Notes:1. Vitamin premix(mg per kg premix):Vitamin A,900 000 IU;Vitamin D,250 000 IU;Vitamin E,4 500 mg;Vitamin C,5 000 mg;Vitamin K<sub>3</sub>,220 mg;Vitamin B<sub>1</sub>,320 mg;Vitamin B<sub>2</sub>,1 090 mg;Vitamin B<sub>6</sub>,5 000 mg;Vitamin B<sub>12</sub>,116 mg;biotin,50 mg;Pantothenate,1 000 mg;Folic acid,165 mg;Choline,60 000 mg;Niacin acid,2 500 mg;2. Mineral premix(per kg premix):CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O,2.5 g;FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O,28 g;ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O,22 g;MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O,9 g;Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>,0.045 g;KI,0.026 g;CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O,0.1 g;3. GE(kJ/g) = 23.64 CP + 39.54 EE + 17.15NFE;4. nitrogen free extract(NFE,% ) = 100% - (CP + EE + crude fiber + crude ash)%

### 1.2 饲养管理

实验开始前,先用不含肌醇的基础饲料驯养

4 周后进行正式实验。实验期间,每天投喂 4 次(8:00 ~ 8:30,11:00 ~ 11:30,14:00 ~ 14:30,17:

00~17:30),达饱食水平,日投饵量为鱼体质量的3%~4%,并根据摄食和生长情况作适当调整。养殖期间水温27.5℃左右,pH为7.6~7.8,溶解氧和氨氮分别大于5 mg/L和小于0.01 mg/L。减少人为干扰,保持安静,防止额外的应激。

### 1.3 氨氮应激实验

进行预实验,将NH<sub>4</sub>Cl(分析纯)配置成N浓度为10 g/L的母液,按比例稀释成实验所需浓度5、10、15、20、25、30、35和40 mg/L,每缸10尾鱼,分别于6、12、24、48、72和96 h观察团头鲂幼鱼的死亡率,参照梁俊平等<sup>[18]</sup>的方法,得出实验使用浓度为10 mg/L。

正式实验将N浓度为10 g/L的母液按比例稀释成氨氮浓度10 mg/L,应激72 h。实验过程中,每隔4 h按照《水和废水监测分析方法》(第四版)<sup>[19]</sup>采用纳氏试剂法测定氨氮的浓度,及时调整养殖水体中的氨氮浓度,并进行适当的pH调节。实验期间不投饵,减少人为干扰,保持安静,防止额外应激。

### 1.4 样品采集及处理

分别在氨氮应激前,应激12 h,应激72 h随机采样,每次每缸随机取3尾鱼,每组共9尾鱼。将鱼迅速捞起并立即投入浓度为150 mg/L的MS-222中做快速深度麻醉,用一次性医用注射器(用肝素钠润湿)从尾静脉采血,每尾鱼的血液分成3份,一份置于抗凝管中制备全血,用于血细胞测定;一份血液于4℃条件下,10 000 r/min离心5 min制备血清,-20℃冻存备用;另一份吸取100 μL抗凝新鲜血于1.5 mL的离心管,用于血细胞呼吸爆发的测定。

### 1.5 指标的测定方法

**血液常规参数的测定** 白细胞(WBC)、淋巴细胞百分比(Lym)、红细胞(RBC)和血红蛋白含量(HGB)等在迈瑞BC-5300VEt全自动五分类动物血液细胞分析仪上测定,试剂购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司。

**血清免疫指标的测定** 补体3(C3)、补体4(C4)采用免疫比浊法,试剂盒购自浙江伊利康生物技术有限公司。皮质醇(cortisol)利用化学发光免疫竞争法,在MAGLUMI 1000全自动化学发光免疫分析仪上检测,试剂盒均购自深圳新产业生物医学工程有限公司。

**血细胞呼吸爆发的测定** 参考 Song 等<sup>[20]</sup>

的方法略有改动。在取得的100 μL抗凝新鲜血液中加入100 μL 0.2% NBT(nitroblue tetrazolium, sigma),37℃下孵育30 min,取15 μL反应液,加入300 μL N,N-二甲基甲酰胺(DMF),充分混匀,在2 000 r/min,4℃条件下离心5 min,取200 μL上清液于540 nm下读取吸光值,以200 μL DMF为空白对照,呼吸爆发活性表示为OD<sub>540nm</sub>。

**饲料中肌醇含量的测定** 饲料中肌醇含量的测定采用高效液相色谱法,即采用江南大学食品学院维生素检测中心的高效液相色谱仪Waters600 HPLC。

### 1.6 数据处理

数据用SPSS(Ver. 11.5)软件Duncan多重比较检验各组间的差异, $P < 0.05$ 表示差异显著。所有的结果均以平均值±标准误( $\bar{X} \pm SE$ )表示。

## 2 结果

### 2.1 氨氮应激下,肌醇对团头鲂幼鱼血液常规参数的影响

氨氮应激前,各实验组血液白细胞数量无显著性差异( $P > 0.05$ );氨氮应激后,白细胞数量呈现先升高后降低的变化趋势,与对照组相比,氨氮应激12 h,404.8、809.1和1 616.4 mg/kg肌醇添加组显著升高了血液白细胞数量( $P < 0.05$ ),其中,404.8 mg/kg肌醇添加组的血液白细胞数量显著高于101.2 mg/kg肌醇添加组;氨氮应激72 h时,202.3和404.8 mg/kg肌醇添加组的白细胞数量显著升高( $P < 0.05$ ),其中404.8 mg/kg肌醇添加组的白细胞数量显著高于其它各肌醇添加组( $P < 0.05$ )(图1-a)。

与对照组相比,氨氮应激前,404.8 mg/kg肌醇添加组的淋巴细胞百分比显著升高( $P < 0.05$ );氨氮应激12 h,202.3、404.8和809.1 mg/kg肌醇添加组的淋巴细胞百分比显著增大( $P < 0.05$ ),其中,404.8和809.1 mg/kg肌醇添加组的淋巴细胞百分显著高于101.2 mg/kg肌醇添加组( $P < 0.05$ );氨氮应激72 h,202.3和404.8 mg/kg肌醇添加组的淋巴细胞百分比显著升高( $P < 0.05$ )(图1-b)。

氨氮应激后,各肌醇添加组的血液红细胞数量呈先升高后降低的趋势,与对照组相比,氨氮应激12 h,各肌醇添加组的红细胞数量显著升高( $P < 0.05$ ),其中202.3、404.8、809.1和1 616.4

mg/kg肌醇添加组的红细胞数量显著高于101.2 mg/kg肌醇添加组( $P < 0.05$ );氨氮应激72 h时,404.8 mg/kg肌醇添加组的红细胞数量显著升高( $P < 0.05$ );氨氮应激前,各实验组的红细胞数量无显著性差异( $P > 0.05$ )(图1-c)。

氨氮应激12 h,202.3、404.8、809.1和

1 616.4 mg/kg肌醇添加组血红蛋白含量显著高于101.2 mg/kg肌醇添加组和对照组( $P < 0.05$ );氨氮应激72 h,404.8 mg/kg肌醇添加组血红蛋白含量显著大于其它各实验组及对照组( $P < 0.05$ );氨氮应激前,血红蛋白含量无显著性变化( $P > 0.05$ )(图1-d)。

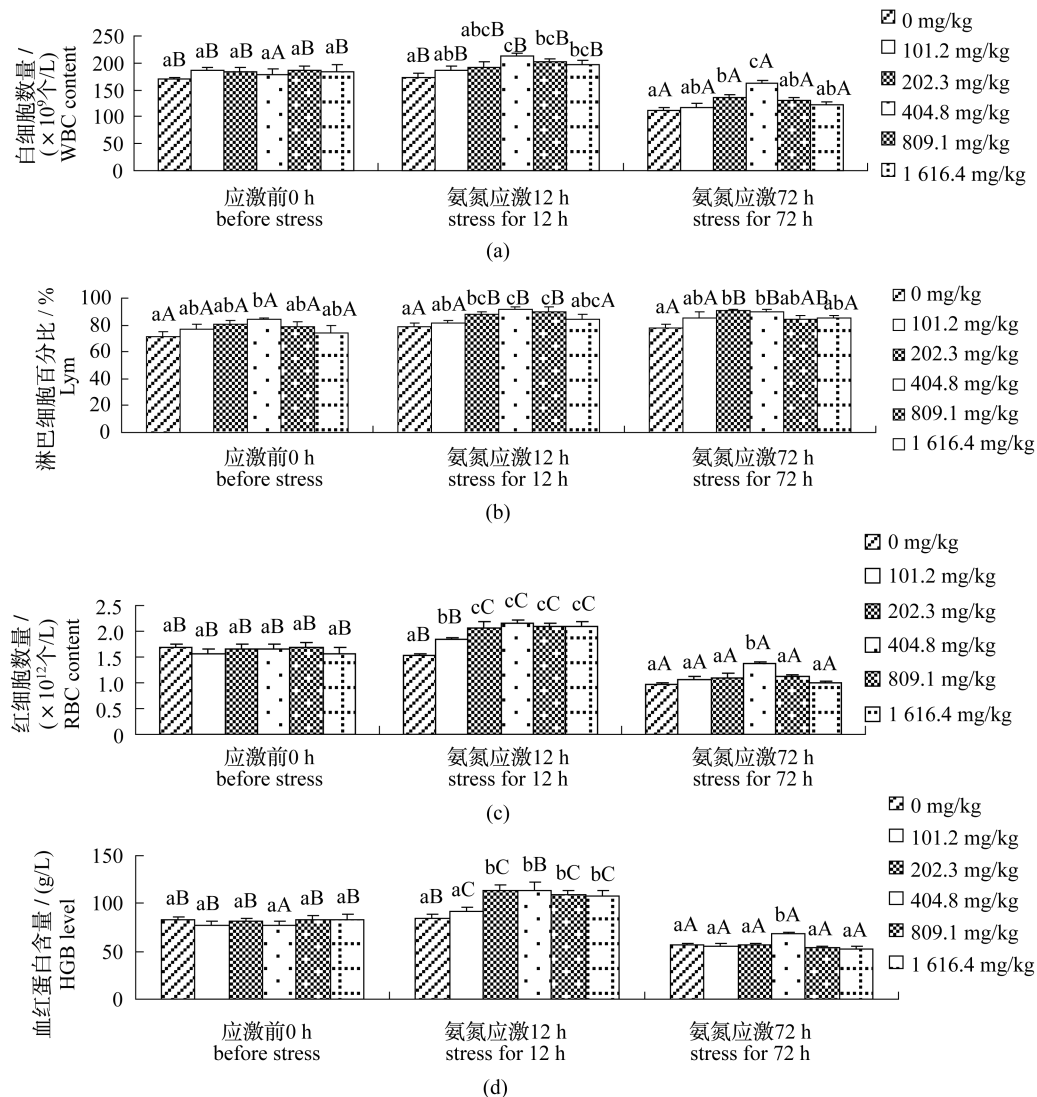


图1 日粮中不同水平的肌醇对团头鲂幼鱼在氨氮应激下白细胞 WBC (a)、淋巴细胞百分比 Lym (b)、红细胞 RBC (c) 和血红蛋白含量 HGB (d) 水平的影响  
Fig.1 Effect of various inositol levels on blood WBC (a), Lym (b), RBC (c) and HGB (d) levels of juvenile *M. amblycephala* under ammonia stress

## 2.2 氨氮应激下,肌醇对团头鲂幼鱼血清补体3、补体4和皮质醇水平的影响

氨氮应激前和氨氮应激72 h,202.3、404.8和809.1 mg/kg肌醇添加组的补体3水平显著高于对照组( $P < 0.05$ );氨氮应激12 h,202.3、404.8和809.1 mg/kg肌醇添加组的补体3水平

显著高于101.2 mg/kg肌醇添加组和对照组( $P < 0.05$ ),其中,404.8 mg/kg肌醇添加组的补体3水平显著高于809.1和1 616.4 mg/kg肌醇添加组( $P < 0.05$ )(图2-a)。

氨氮应激前和氨氮应激12 h,404.8和809.1 mg/kg肌醇添加组的补体4水平显著高于对照组

( $P < 0.05$ ),其中,809.1 mg/kg 肌醇添加组的补体 4 水平显著高于 101.2 和 202.3 mg/kg 肌醇添加组( $P < 0.05$ );氨氮应激 72 h,809.1 mg/kg 肌醇添加组的补体 4 水平显著高于 101.2 mg/kg 肌醇添加组和对照组( $P < 0.05$ )(图 2-b)。

与对照组相比,氨氮应激 12 h,404.8 和 809.1 mg/kg 肌醇添加组的血清皮质醇水平显著降低( $P < 0.05$ );氨氮应激 72 h,404.8 mg/kg 血清皮质醇显著下降( $P < 0.05$ ),氨氮应激前,血清皮质醇水平无显著性差异( $P > 0.05$ )(图 2-c)。

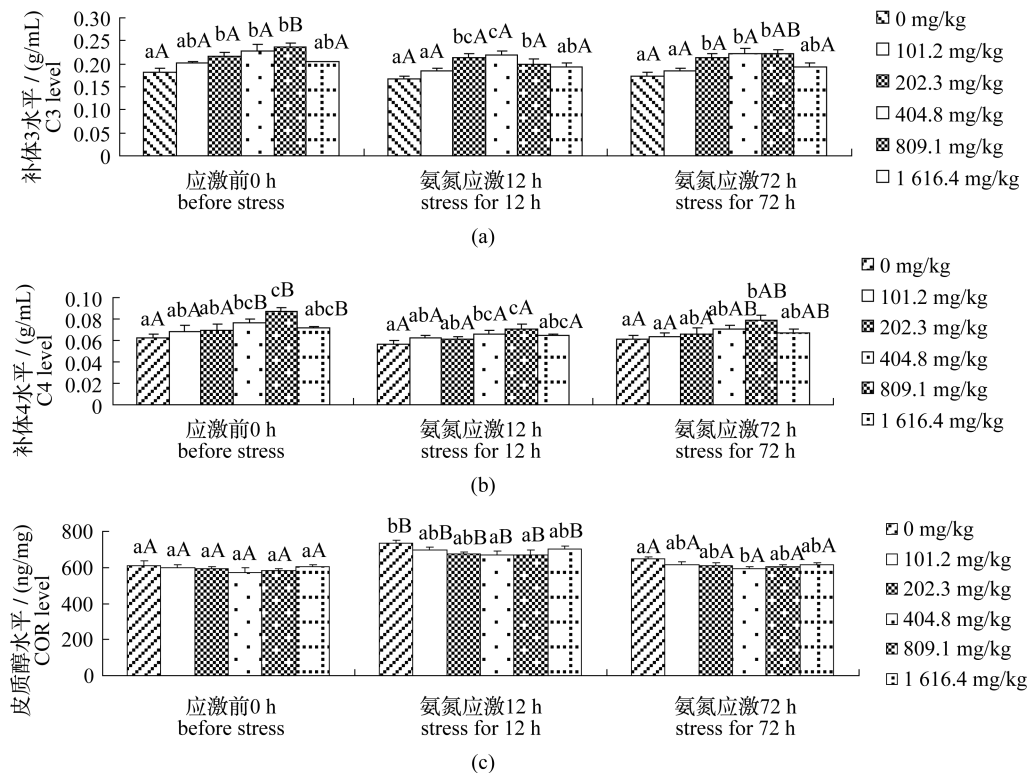


图 2 日粮中不同水平的肌醇对团头鲂幼鱼在氨氮应激下血清补体 3 C3(a)、补体 4 C4(b)和皮质醇 COR(c)水平的影响

Fig. 2 Effect of various inositol levels on serum C3 (a), C4 (b) and cortisol COR (c) levels of juvenile *M. amblycephala* under ammonia stress

### 2.3 氨氮应激下,肌醇对团头鲂幼鱼血液呼吸爆发的影响

团头鲂幼鱼的血细胞呼吸爆发活性呈现先升高后降低的变化趋势。氨氮应激前,404.8 mg/kg 肌醇添加组的呼吸爆发活性显著高于 1616.4 mg/kg 肌醇添加组和对照组( $P < 0.05$ );氨氮应激 12 h,202.3 和 404.8 mg/kg 肌醇添加组的血

细胞呼吸爆发活性与 1616.4 mg/kg 肌醇添加组和对照组相比,显著增大( $P < 0.05$ );氨氮应激 72 h,与对照组相比,肌醇添加组的呼吸爆发活性显著升高( $P < 0.05$ ),其中,202.3 和 404.8 mg/kg 肌醇添加组的血细胞呼吸爆发活性显著高于其它各肌醇添加组( $P < 0.05$ )(图 3)。

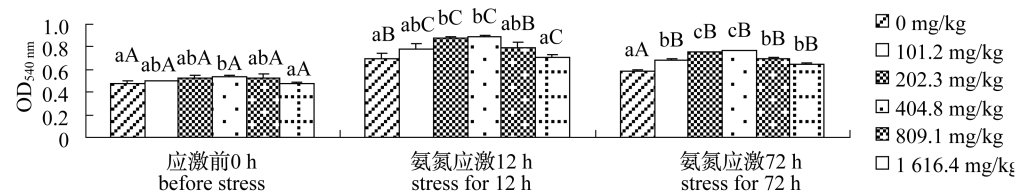


图 3 日粮中不同水平的肌醇对团头鲂幼鱼在氨氮应激下血液呼吸爆发的影响

Fig. 3 Effect of various inositol levels on blood respiratory burst of juvenile *M. amblycephala* under ammonia stress

### 3 讨论

#### 3.1 肌醇对氨氮应激前后团头鲂幼鱼血液常规参数的影响

血液是鱼体内一种极其重要的组织,鱼类血液与机体代谢、营养状况及疾病等有着非常密切的关系。当鱼体受到外界因子的影响而发生生理或病理变化时,必定会通过血液指标反映出来。通过检查血液学指标,可以初步了解鱼类的健康状况及其生活的水环境质量;因而,血液指标的变化被广泛地用于评价鱼类的健康状况、营养状况以及对环境的适应状况,是重要的生理、病理以及毒理学指标<sup>[21-23]</sup>。

白细胞是鱼类主要的免疫细胞,具有吞噬异物、产生抗体和抗御病原体入侵的作用,是机体防御系统的一个重要组成部分,其数量或功能的改变会引起机体免疫功能的变化<sup>[24]</sup>。白细胞的数目受很多因素的影响,如温度上升、运动等,尤其是机体发生炎症反应时,会呈现出白细胞数量增多的现象<sup>[25-26]</sup>。本实验中,与对照组相比,氨氮应激前,团头鲂幼鱼血液中的白细胞数量随饲料中肌醇含量的添加无显著性变化;氨氮应激 12 h, 404.8、809.1 和 1 616.4 mg/kg 肌醇添加组的白细胞的数量显著升高;氨氮应激 72 h, 202.3 和 404.8 mg/kg 肌醇添加组的白细胞数量显著升高。表明鱼体受到氨氮应激时,团头鲂幼鱼体内的白细胞增多,肌醇能够提高鱼类体内的白细胞的数目,以起到增强鱼体免疫能力的目的。

鱼类虽属于低等的脊椎动物,但同样存在相当于哺乳动物的 T、B 细胞的两种淋巴细胞<sup>[27-29]</sup>来参与体内的特异性免疫反应。淋巴细胞作为主要的免疫细胞,在免疫应答中能够介导细胞免疫且调节免疫应答;在体液免疫中能够产生特异性的免疫因子和免疫球蛋白。因此,淋巴细胞在免疫反应中起核心作用<sup>[30]</sup>。本实验中各阶段的团头鲂幼鱼的血液淋巴细胞百分比随着饲料中肌醇添加水平的增加呈先升高后降低的趋势,氨氮应激前,404.8 mg/kg 肌醇添加组的淋巴细胞百分比显著高于对照组,说明饲料中添加适量的肌醇可能诱导淋巴细胞的增殖和分化,增强机体的免疫力;而当机体受到氨氮应激后,202.3 和 404.8 mg/kg 肌醇添加组的淋巴细胞百分比与对照组相比,显著升高,说明团头鲂幼鱼在受到氨氮应激

后,淋巴细胞在肌醇的作用下,可能被活化、增殖以及分化,发生免疫应答,说明肌醇对团头鲂幼鱼抗氨氮应激可能起到了正向的调节作用。

血红蛋白是运载氧气的物质,红细胞的数量不仅与氧气的交换和运输能力有关<sup>[16]</sup>,还与免疫密切相关<sup>[24]</sup>。血红蛋白含量和红细胞数量也是反映鱼体是否贫血的重要指标<sup>[31]</sup>。本实验中,与对照组相比,氨氮应激前,红细胞和血红蛋白含量均无显著性变化,这与 Peres 等<sup>[13]</sup>在尼罗罗非鱼中的研究结果相似;氨氮应激 12 h, 202.3、404.8、809.1 和 1 616.4 mg/kg 肌醇添加组的红细胞的含量均显著升高;氨氮应激 72 h, 404.8 mg/kg 肌醇添加组的红细胞和血红蛋白含量显著增大。表明肌醇对团头鲂幼鱼抗氨氮应激具有一定的作用。

#### 3.2 肌醇对氨氮应激前后团头鲂幼鱼血清补体 3、补体 4 和皮质醇水平的影响

补体系统广泛的参与机体免疫调节及抵抗微生物防御反应,通过吞噬细胞的协助作用溶解外来细胞和外来生物体,致使它们毁灭<sup>[32]</sup>,在抵抗炎症反应方面起着重要的作用<sup>[33]</sup>。C3 和 C4 是补体系统中的主要成分,是体内一组具有酶原活性的球蛋白。其存在于体液中,能够通过免疫复合物、调理吞噬细胞等机制对机体发挥免疫调节等功能,其水平是衡量体液免疫的重要指标<sup>[32,34]</sup>。冯琳等<sup>[17]</sup>的研究结果表明肌醇添加组能够显著提高血清中补体 C3、C4 的含量,这与本实验氨氮应激前 404.8 和 809.1 mg/kg 肌醇添加组的血清补体 C3、C4 的含量显著大与对照组的结果相似,原因可能是肌醇刺激了分泌补体细胞的分泌活性,增强了其分泌功能。有研究表明,应激能够降低补体的活性和含量<sup>[33]</sup>,本实验中,202.3、404.8 和 809.1 mg/kg 肌醇添加组的补体 C3 含量显著高于对照组,809.1 mg/kg 肌醇添加组的补体 C4 含量较对照组显著升高,且氨氮应激后血清补体 C3、C4 的含量与应激前相比,略有降低,表明氨氮应激可能导致补体 C3、C4 的含量下降,而肌醇对这种下降具有缓和作用,说明肌醇有抗氨氮应激的作用。

皮质醇是与许多生物活性相关联的类固醇激素,通常不能够被贮存,而是直接进入血液,因此,血清皮质醇水平可作为鱼类应激的灵敏信号<sup>[35]</sup>。本实验中,团头鲂幼鱼在氨氮应激前后,血清皮质醇水平呈先升高后降低的趋势,应激 12 h 和 72 h, 404.8 mg/kg 肌醇添加组的血清皮质醇水平

显著低于对照组,可能是因为团头鲂幼鱼在受到氨氮应激后,其下丘脑—垂体—肾间组织轴(HPI)迅速作用,促进肾上腺皮质激素(ACTH)释放,从而加快头肾细胞皮质醇激素的合成与释放。

### 3.3 肌醇对氨氮应激前后团头鲂幼鱼血液呼吸爆发的影响

鱼体内存在各种具有吞噬功能的细胞,如吞噬细胞、中性粒细胞和巨噬细胞,它们能够利用活性氧来杀伤分子,通过将侵入机体的病原菌吞噬后,其膜内结合的NAD(P)H氧化酶可以将分子氧转化为超氧阴离子( $O_2^-$ ),这个过程称之为呼吸爆发<sup>[36]</sup>,这是一种古老的自然免疫反应。这种活性氧对于侵入机体的外来异物有很大的杀伤力,它可以独立地与其它溶酶体酶类系统地发挥作用<sup>[37]</sup>。有研究表明,活性氧产生的强弱直接反映了血细胞杀菌机能的强弱<sup>[38-39]</sup>,呼吸爆发活性的高低是衡量吞噬细胞杀菌能力的一个直观指标。本实验中,404.8 mg/kg肌醇添加组的呼吸爆发活性与对照组相比显著升高,说明肌醇可能刺激发生呼吸爆发的血细胞的数目及速度都有所增加,因此表现出540 nm下的吸光度值最大;氨氮应激后的血细胞呼吸爆发活性较氨氮应激前显著升高,并且随着饲料中肌醇添加量的增加呈现先升高后降低的趋势,一般来说,血细胞是通过吞噬作用来清除进入到血淋巴中的外来异物,当入侵的病原体的数量太多以至于无法被单个血细胞吞噬时,就会以多个血细胞形成结节来完成<sup>[40]</sup>。本实验中,饲料中添加的肌醇以及水体环境中的氨氮都相当于外来的异物,并且在氨氮浓度一致的情况下,饲料中肌醇的增加就相当于外来异物数量的增加,当肌醇增加到一定程度时,血细胞就会以形成结节的方式来清除体内的异物。这时,血细胞的呼吸爆发就会被抑制,这样可以避免呼吸爆发过度产生大量活性氧,从而对生物体本身造成伤害。

上述结果表明,团头鲂受到氨氮应激时,日粮中添加适量的肌醇,可有效地提高团头鲂幼鱼血液红细胞、白细胞数量、淋巴细胞百分比和血红蛋白含量、血清补体3和补体4水平以及血细胞的呼吸爆发活性,起到抗氨氮应激的作用,从而对机体产生一定的保护。

因此,建议在团头鲂饲料生产中添加404.8 mg/kg肌醇即可满足基本需求。

### 参考文献:

- [1] Li S F, Cai W Q, Zhou B Y. Variation in morphology and biochemical genetic markers among populations of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Aquaculture*, 1993, 111 (1-4): 117-127.
- [2] Ke H W. Chinese blunt snout bream breeding [J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 1986, 5:1-5. [柯鸿文. 中国团头鲂的养殖. 水产科技情报, 1986, 5:1-5.]
- [3] Zhou Z, Ren Z, Zeng H, et al. Apparent digestibility of various feedstuffs for bluntnose black bream *Megalobrama amblycephala* Yih [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2008, 14(2):153-165.
- [4] Ke H W. An excellent fresh-water food fish, *Megalobrama amblycephala*, and its propagating and culturing [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1975, 5(3):293-314. [柯鸿文. 一种优良淡水鱼——团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)的繁殖和饲养. 水生生物学报, 1975, 5(3):293-314.]
- [5] The People's Republic of China Ministry of Agriculture, Fisheries Bureau. China fisheries statistical yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2012:28. [农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴. 北京:中国农业出版社, 2012:28.]
- [6] Benli A C K, Köksal G, Özkul A. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology [J]. *Chemosphere*, 2008, 72(9):1355-1358.
- [7] Frances J, Nowak B F, Allan G L. Effects of ammonia on juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*) [J]. *Aquaculture*, 2000, 183(1-2):95-103.
- [8] Wang J Y, Li H, Gong H, et al. Influence and lipid peroxidation of ammonia nitrogen, nitrite nitrogen sub acute toxicity to carp erythrocyte membrane fluidity [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, 28(B12):135-140. [王金叶, 李华, 巩华, 等. 氨氮、亚硝态氮亚急性毒性对鲤红细胞膜流动性和过氧化脂质的影响. 水产学报, 2004, 28(B12):135-140.]
- [9] Jiang L X, Pan L Q, Xiao G Q. Effects of ammonia-N on immune parameters of white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(6):537-541. [姜令绪, 潘鲁青, 肖国强. 氨氮对凡纳对虾免疫指标的影响. 中国水产科学, 2004, 11(6):537-541.]

- [10] Liu C H, Chen J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 16 (3): 321 - 334.
- [11] Colt J. Water quality requirements for reuse systems [J]. *Aquacultural Engineering*, 2006, 34 (3): 143 - 156.
- [12] Shiao S Y, Su S L. Dietary inositol requirement for juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon* [J]. *Aquaculture*, 2004, 241 (1-4): 1 - 8.
- [13] Peres H, Lim C, Klesius P H. Growth, chemical composition and resistance to *Streptococcus iniae* challenge of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed graded levels of dietary inositol [J]. *Aquaculture*, 2004, 235 (1-4): 423 - 432.
- [14] Yone Y, Furuichi M, Shitanda K. Vitamin requirements of the red sea bream: 1. Relationship between inositol requirements and glucose levels in diet [J]. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 1971, 37: 149 - 155.
- [15] Zhang Y Q, Li Z W, Zhang B T, et al. Characteristic of inositol and its application in aquaculture [J]. *Feed Industry*, 2008, 14 (28): 28 - 30. [张艳秋, 李志伟, 张宝彤, 等. 肌醇的性质及其在水产养殖中的应用. 饲料工业, 2008, 14 (28): 28 - 30.]
- [16] Jiang W D, Feng L, Liu Y, et al. Effects of graded levels of dietary myo-inositol on non-specific immune and specific immune parameters in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) [J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41 (10): 1413 - 1420.
- [17] Feng L, Li J, Zhou X Q, et al. Effects of Inositol Deficiency on Digestive and Immune Function of Juvenile Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) [J]. *Acta Zoonutrientia Sinica*, 2009, 21 (6): 878 - 883. [冯琳, 李江, 周小秋, 等. 肌醇缺乏对幼建鲤消化功能和免疫功能的影响. 动物营养学报, 2009, 21 (6): 878 - 883.]
- [18] Liang J P, Li J, Li J T, et al. Acute Toxicity of ammonia nitrogen to juvenile and adult ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda* [J]. *Fisheries Science*, 2012, 31 (9): 526 - 529. [梁俊平, 李健, 李吉涛, 等. 氨氮对脊尾白虾幼虾和成虾的毒性试验. 水产科学, 2012, 9 (31): 526 - 529.]
- [19] State Environmental Protection Administration. Monitoring and analysis method of water and waste water [M] (4<sup>th</sup> ed). Beijing: China Environmental Science Press, 2002. [国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.]
- [20] Song Y L, Hsieh Y T. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: Analysis of reactive oxygen species [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1994, 18 (3): 201 - 209.
- [21] Ming J H, Xie J, Xu P, et al. Effects of emodin, vitamin C and their combination on growth, physiological and biochemical parameters, disease resistance and two HSP70s mRNA expression of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34 (9): 1447 - 1459. [明建华, 谢骏, 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. 水产学报, 2010, 34 (9): 1447 - 1459.]
- [22] Zhou Y, Guo W C, Yang Z G, et al. Advances in the study of haematological indices of fish [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2001, 10 (2): 163 - 165. [周玉, 郭文场, 杨振国, 等. 鱼类血液学指标研究的进展. 上海水产大学学报, 2001, 10 (2): 163 - 165.]
- [23] He F L, Xiang J G, Li C J, et al. Preliminary study on the effect of water temperature on hematology indices of rainbow trout [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 12 (3): 363 - 369. [何福林, 向建国, 李常健, 等. 水温对虹鳟血液学指标影响的初步研究. 水生生物学报, 2007, 31 (3): 363 - 369.]
- [24] Tao J F, Liu L T, Niu H J, et al. Effect of *Pycnonotus sinensis* on some immune indices in *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Feed Research*, 2007 (3): 52 - 54. [陶健芳, 刘来亭, 牛慧军, 等. 白头翁对草鱼免疫功能指标的影响. 饲料研究, 2007 (3): 52 - 54.]
- [25] Su S P, Li Y L. The influence of *Pseudomonas* sp on blood indices of *Siniperca chuatsi* [J]. *Journal of Biology*, 2007, 24 (3): 36 - 38. [苏时萍, 李延璐. 假单胞菌对鳊鱼血液的影响. 生物学杂志, 2007, 24 (3): 36 - 38.]
- [26] Yang X P. *Animal Physiology* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2005. [杨秀萍. 动物生理学. 北京: 高等教育出版社, 2005.]
- [27] Secombes C J, van Groningen J J, Egberts E. Separation of lymphocyte subpopulations in carp *Cyprinus carpio* L. by monoclonal antibodies: immunohistochemical studies [J]. *Immunology*, 1983, 48 (1): 165 - 175.



- [28] Xia C, Kusuda R. Studies on the heterogeneity of lymphocyte population in eel, *Anguilla japonica* [J]. *Suisan zoshoku*, 1993, 41(1): 119 - 123.
- [29] Scapiqliati G, Romano N, Abelli L, et al. Immunopurification of T-cells from sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2000, 10(4): 329 - 341.
- [30] Zhang Y A, Sun B J, Nie P. Immune tissues and cells of fish: a review [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(6): 648 - 654. [张永安, 孙宝剑, 聂品. 鱼类免疫组织和细胞的研究概况. *水生生物学报*, 2000, 24(6): 648 - 655.]
- [31] Duan P C, Zhang L M, Wang J Y, et al. The preliminary study on the effects of new protein sources replacing dietary fishmeal on growth performance, body composition and hematology of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(5): 797 - 804. [段培昌, 张利民, 王际英, 等. 新型蛋白源替代鱼粉对星斑川鲮幼鱼生长、体成分和血液学指标的影响. *水产学报*, 2009, 33(5): 797 - 804.]
- [32] Holland M C H, Lambris J D. The complement system in teleosts [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(5): 399 - 420.
- [33] Zhou X Q, Niu C J, Sun R Y. Effects of radix astragali and acid-stress on contents of serum complement c3 and c4 in juvenile soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*) [J]. *Zoological Research*, 2002, 23(2): 177 - 180. [周显青, 牛翠娟, 孙儒泳. 黄芪和酸应激对中华鳖幼鳖血清补体 C3 和 C4 含量的影响. *动物学研究*, 2002, 23(2): 177 - 180.]
- [34] Ellis A E. Immunity to bacteria in fish [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, 9(4): 291 - 308.
- [35] Hsieh S L, Chen Y N, Kuo C M. Physiological responses, desaturase activity, and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) under cold acclimation [J]. *Aquaculture*, 2003, 220(1 - 4): 903 - 918.
- [36] Babior B M, Kipnes R S, Curnutte J T. Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1973, 52(3): 741 - 744.
- [37] Grant J J, Loake G J. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance [J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(1): 21 - 29.
- [38] Welch W D, Graham C W, Zaccari J, et al. Analysis and comparison of the luminol-dependent chemiluminescence responses of alveolar macrophages and neutrophils [J]. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, 1980, 28(3): 275 - 283.
- [39] Horan T D, English D, Mcpherson T A. Association of neutrophil chemiluminescence with microbicidal activity [J]. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1982, 22(2): 259 - 269.
- [40] Gillespie J P, Bailey A M, Cobb B, et al. Fungi as elicitors of insect immune responses [J]. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2000, 44(2): 49 - 68.

## Effects of dietary inositol on immune function of juvenile Wuchang bream under ammonia stress

CUI Honghong<sup>1,2</sup>, LIU Bo<sup>1,2</sup>, GE Xianping<sup>1,2\*</sup>, LIAO Yingjie<sup>1,2</sup>, XIE Jun<sup>1,2</sup>,  
REN Mingchun<sup>2</sup>, ZHOU Qunlan<sup>2</sup>, MIAO Linghong<sup>2</sup>, CHEN Ruli<sup>2</sup>

(1. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** This study was designed to determine the effects of dietary inositol on immune function of juvenile Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) under ammonia stress. In trial, four hundred and fifty juvenile Wuchang bream with initial body weight of  $(3.40 \pm 0.07)$  g were randomly allocated to 6 groups (with 3 replicates) fed with purified diet containing inositol 0, 101.2, 202.3, 404.8, 809.1 and 1 616.4 mg/kg for 90 days. The results showed that, before ammonia stress, compared to the control group, Lym, C3, C4 and respiratory burst activity of fish fed diet 404.8 mg/kg inositol were significantly higher ( $P < 0.05$ ). Under ammonia stress for 12 hours, the WBC, RBC, Lym, HGB, C3 and C4 were significantly higher in the groups supplemented with 404.8 and 809.1 mg/kg inositol ( $P < 0.05$ ); respiratory burst activity was significantly higher than that of control ( $P < 0.05$ ); cortisol level was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Under ammonia stress for 72 hours, the WBC, RBC, Lym, HGB, C3 and respiratory burst activity fed diet 404.8 mg/kg inositol were significantly higher ( $P < 0.05$ ); cortisol level was significantly decreased ( $P < 0.05$ ); C4 levels was significantly enhanced in the group supplemented with 809.1 mg/kg inositol ( $P < 0.05$ ). So, it is suggested that ingestion of a basal diet supplemented with inositol (404.8 mg/kg) can enhance immune function and resistance against ammonia stress of juvenile Wuchang bream.

**Key words:** juvenile Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*); ammonia stress; inositol; immune

**Corresponding author:** GE Xianping. E-mail: gexp@ffrc.cn