



## 维生素 E 对虎龙杂交斑生长、抗氧化及免疫功能的影响

翟浩云, 张璐, 蔡亲晓, 周智愚, 殷浩然, 耿丽娜, 吴小易\*

(海南大学, 南海海洋国家资源与利用国家重点实验室,  
海南省热带水生生物技术重点实验室, 海南海口 570228)

**摘要:** 为研究虎龙杂交斑对维生素 E( $V_E$ ) 的最适需求量, 评估  $V_E$  对虎龙杂交斑生长性能、抗氧化和免疫功能的影响, 实验设计了 6 组  $V_E$  含量分别为 4.1、26.3、40.7、57.1、116.8、209.6 mg/kg 的等能 (340 kcal/100 g 干物质)、等蛋白 (占饲料干重的 51.5%)、等脂 (占饲料干重的 9%) 的实验饲料, 每组 3 个平行。实验鱼初始均重为 (14.22±0.01) g, 养殖实验期间每日饱食投喂 2 次 (8:00 和 16:30), 周期为 8 周。生长实验结束后每组随机挑选 7 尾实验鱼进行 72 h 铜胁迫实验。实验结果显示, 摄食 57.1 mg/kg  $V_E$  饲料实验鱼增重率 (WG) 显著高于摄食 4.1 mg/kg  $V_E$  饲料实验鱼, 各实验组肥满度 (CF)、肝体比 (HSI) 和肠系膜脂肪比 (IPF) 无显著差异。全鱼和肌肉水分、粗蛋白和粗脂肪含量在各  $V_E$  处理组之间也无显著差异。摄食 209.6 mg/kg  $V_E$  饲料实验鱼肝脏  $V_E$  含量高于摄食 4.1 mg/kg  $V_E$  饲料实验鱼。肝脏总抗氧化能力 (T-AOC)、血清溶菌酶 (LZM) 活性和免疫球蛋白 (IgM) 活性均先升后降, 4.1 mg/kg  $V_E$  组以上指标均低于 57.1 mg/kg  $V_E$  组。铜胁迫 72 h 后, 40.7、57.1 和 116.8 mg/kg  $V_E$  组存活率均显著高于 4.1 mg/kg  $V_E$  组。40.7 mg/kg  $V_E$  组头肾核因子 E2 相关因子 2 基因 (*nrf2*) 的相对表达量高于 4.1、26.3 和 116.8 mg/kg  $V_E$  组。以 WG 和 T-AOC 为评价指标, 基于二次折线模型确定虎龙杂交斑饲料中  $V_E$  的最适需求量分别为 62.92 mg/kg 饲料和 86.25 mg/kg 饲料。实验结果表明, 饲料中添加适量的  $V_E$  可提高虎龙杂交斑生长性能、抗氧化和免疫能力。

**关键词:** 虎龙杂交斑; 维生素 E; 生长; 抗氧化; 免疫

中图分类号: S 963.73<sup>+1</sup>

文献标志码: A

维生素 E( $V_E$ ) 被称为动物体内最重要的脂溶性抗氧化剂, 是维持鱼类血液质量、免疫力、毛细血管通透性、心肌健康、红细胞膜免疫和保护白细胞功能不可缺少的营养物质<sup>[1-2]</sup>。目前已确定了多种养殖鱼类对  $V_E$  的需求量 (30~200 mg/kg 饲料)<sup>[3]</sup>。饲料中缺乏  $V_E$  会导致动物白肌纤维萎缩、坏死和毛细血管渗透性增加、肌肉退化、心脏和肌肉等组织水肿、贫血、红细胞生成障碍、褪色和肝脏蜡样沉着等症状<sup>[3]</sup>。虹鳟 (*Oncorhynchus*

*mykiss*) 摄食低水平的  $V_E$  饲料后, 肌肉中微粒体比鳃、心脏或肝脏中更容易产生过氧化反应, 说明饲料  $V_E$  的含量对微粒体过氧化程度有影响<sup>[4]</sup>。Lin 等<sup>[5]</sup>对玛拉巴石斑鱼 (*Epinephelus malabaricus*) 研究发现, 摄食高  $V_E$  水平饲料可以提高鱼血细胞数量、白细胞呼吸爆发活力、血浆溶酶体和补体活性。Gatlin 等<sup>[6]</sup>的研究表明, 饲料  $V_E$  水平升高能够抑制饲料脂肪氧化。有研究发现,  $V_E$  也可降低草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 和白姑鱼 (*Argyro-*

收稿日期: 2021-09-23 修回日期: 2021-12-07

资助项目: 国家自然科学基金 (31760760); 海南省重点研发计划 (ZDYF2018055)

第一作者: 翟浩云 (照片), 从事水产动物营养与饲料研究, E-mail: 245580839@qq.com

通信作者: 吴小易, 从事水产动物营养与饲料研究, E-mail: wjrk@163.com



*somus regius*) 体内的脂质过氧化<sup>[7-8]</sup>。然而, 饲料中添加过量的  $V_E$  也会引起鱼类生长性能下降等副作用, 这可能是由于体内自由基失衡和  $V_E$  摄入过多起到促进氧化作用导致的<sup>[9-10]</sup>。Wang 等<sup>[11]</sup> 的研究表明, 当饲料中  $V_E$  超过 300 mg/kg 时,  $V_E$  在体内不再作为抗氧化剂, 反而起到促氧化剂的作用。综上所述, 饲料中添加适量的  $V_E$  可以促进鱼类健康生长。

虎龙杂交斑 (*E. fuscoguttatus*♀ × *E. lanceolatus*♂) 是棕点石斑鱼母本和鞍带石斑鱼父本杂交产生的子一代石斑鱼。该鱼种具有生长快速和适应性强的特点, 在全球水产养殖业中具有巨大的发展潜力<sup>[12]</sup>。目前, 对虎龙杂交斑  $V_E$  需求量的研究未见报道, 因此, 本实验通过设计不同  $V_E$  水平的饲料投喂虎龙杂交斑, 研究  $V_E$  对虎龙杂交斑生长性能、免疫及抗氧化功能的影响, 从而确定虎龙杂交斑饲料中最适的  $V_E$  需求量, 以期补充完善虎龙杂交斑营养需求数据库。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验设计及饲料配方

本实验饲料配方参考已有研究中的虎龙杂交斑基本营养信息<sup>[13-15]</sup>, 以鱼粉、鸡肉粉和大豆分离蛋白为主要蛋白源, 以鱼油为主要脂肪源设计了 6 组等能 (340 kcal/100 g) 等蛋白 (占干物质 51%) 等脂肪 (占干物质 9%) 饲料, 分别添加 0、35、70、105、250、500 mg/kg  $V_E$  粉末 (50%), 通过高效液相色谱法 (HPLC)<sup>[16]</sup> (沃特世 2690 系统, 美国) 测得饲料  $V_E$  含量分别为 4.1、26.3、40.7、57.1、116.8、209.6 mg/kg。饲料配方及主要成分见表 1。将所有原料用搅拌机混合均匀后放入压条机 (F-75 型双螺旋杆挤条机, 中国) 压条, 制成直径 3 mm 的条状饲料后, 放入制粒机 (G-500 型造粒机, 中国) 制粒。所有饲料在 25 °C 阴干后过筛, 置于 -20 °C 保存。

表 1 实验饲料配方及成分分析 (干重)

Tab. 1 Formulations and analyzed composition of experimental diets (dry-matter basis)

	饲料维生素E水平/(mg/kg) analyzed $V_E$ levels					
	4.1	26.3	40.7	57.1	116.8	209.3
<b>原料 ingredients</b>						
鱼粉/% fishmeal (anchovy)	20	20	20	20	20	20
鸡肉粉/% poultry by-product meal	20	20	20	20	20	20
大豆分离蛋白/% soybean protein isolate	23	23	23	23	23	23
蛋氨酸/% L-methionine	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62
维生素E粉/% (50%, mg/kg) vitamin E	0	35	70	105	250	500
玉米淀粉/% corn starch	13.08	13.08	13.08	13.08	13.08	13.08
鱼油/% (salmon) Chile fish oil (Salmon)	5.03	5.03	5.03	5.03	5.03	5.03
复合维生素/% ( $V_E$ free) <sup>1</sup> vitamin mixture	1	1	1	1	1	1
复合矿物质/% <sup>1</sup> mineral mixture	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
甲基纤维素纳/% carboxymethyl cellulose	2	2	2	2	2	2
纤维素/% cellulose	14.77	14.77	14.77	14.76	14.76	14.75
合计 total	100	100	100	100	100	100
<b>成分分析(干重) analyzed composition (dry matter)</b>						
干重/% dry matter	92.3	92.5	92.7	92.4	92.2	93.0
粗蛋白/% crude protein	51.5	51.8	51.3	51.0	51.9	51.8
粗脂肪/% crude lipid	9.2	9.2	9.0	8.8	9.2	9.3
维生素E/(mg/kg) vitamin E	4.1	26.3	40.7	57.1	116.8	209.3

注: 1. 复合维生素和复合矿物质见参考文献<sup>[5]</sup>。

Note: 1. Fore vitamin and mineral mixture, see reference<sup>[5]</sup>.

### 1.2 生长实验

本实验所用虎龙杂交斑购买于海南省临高县的一个商业孵化场。生长实验前用商业饲料对实验鱼驯化养殖 13 d。实验鱼适应养殖环境后随机放于 18 个网箱 (长 130 cm×宽 80 cm×高 50 cm) 组

成的流水养殖系统中, 初始重量为 (14.22±0.01) g, 每组饲料 3 个重复, 每个重复 12 尾鱼。实验鱼每日饱食投喂 2 次 (08: 00 和 16: 30), 并记录摄食量, 实验周期为 8 周。实验期间, 每周清理 1 次养殖池, 测得水中溶解氧含量为 5.8~6.8 mg/L, 氨氮含量为 0~0.2 mg/L, 水温保持在 29~31 °C。海

水盐度为 33.1。

### 1.3 铜胁迫实验

生长实验结束后, 每组各取 7 尾实验鱼进行 72 h 铜胁迫实验, 以五水硫酸铜为铜源, 铜离子浓度为 3.5 mg/L, 实验期间密切观察鱼的活动状态, 及时记录死亡情况并清理死鱼。

### 1.4 样品采集

生长实验开始前, 从暂养鱼中取 10 尾与实验鱼规格相同的鱼作为初始鱼样本并于 -20 °C 储存, 供后续分析相关指标。生长实验期间每周进行一次称重并记录实验鱼生长情况。生长实验结束后, 将实验鱼饥饿 24 h, 统计每个网箱实验鱼存活尾数、总重以及投喂的饲料总重, 计算存活率、增重率和饲料系数。取样前用 MS-222 将鱼麻醉, 每个实验组中随机取 2 尾鱼于 -20 °C 保存, 用于全鱼组成分析, 另取 3 尾鱼分别记录其体重和体长, 用肝素钠浸润的 1 mL 针管尾静脉取血, 在 4 °C, 3 000 r/min 下离心 15 min, 吸取上清液血清, -80 °C 保存备用。后采集肌肉、腹腔脂肪、肝脏、肠道称重并记录, 用于计算肝体比 (HSI)、肠系膜脂肪体比 (IPF)、肥满度 (CF) 等指标, 解剖时取头肾、肝脏和肌肉等样品用于组分分析和分子生物学分析, 所有样品采集并称重记录后置于液氮罐中暂存, 后置于 -80 °C 储存。铜胁迫实验后, 统计各组实验鱼存活情况, 计算存活率, 每组各取 3 尾鱼, 采集头肾用于分子生物学分析。本研究获得了海南大学动物伦理委员会批准 (批准文号: HNUAUCC-2021-00032), 实验过程中操作人员严格遵守海南大学动物伦理规范, 并按照海南大学动物伦理委员会制定的规章制度执行。

### 1.5 生长指标计算

增重率 (WG, %) = (末均重 - 初始均重) / 初始均重 × 100%

饲料转化率 (FCR) = 摄食量 (g) / 增重 (g)

肝体比 (HSI, %) = 肝脏重 (g) / 鱼重 (g) × 100%

肠系膜脂肪体比 (IPF, %) = 肠系膜脂肪重 (g) / 体重 (g) × 100%

肥满度 (CF, %) = 体重 (g) / [体长 (cm)]<sup>3</sup> × 100%

### 1.6 样品测定与分析

用杜马斯燃烧法快速定氮仪 (Elementar, 德国) 测定全鱼和肌肉的粗蛋白含量, 用全自动脂肪仪 (ANKOMx715 自动脂肪仪, 美国) 测定全鱼和

肌肉的粗脂肪含量。肌肉样品在烘箱中 125 °C 烘干 3 h, 全鱼样品在烘箱中 125 °C 烘干 24 h, 按照减重法计算水分含量。

用 Elisa 试剂盒测定血清溶菌酶和血清免疫球蛋白 (CUSABIO, 武汉华美生物工程有限公司), 肝脏和肌肉 V<sub>E</sub> 含量 (AMEKO, 上海联硕生物科技有限公司) 与总抗氧化能力 (SAB, 美国)。

### 1.7 总 RNA 的提取与反转录

从 -80 °C 冰箱中取出肝脏和头肾样品, 使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国) 提取总 RNA。提取完成后用 1.0% 变性琼脂糖凝胶进行质量测定, 看是否有杂条带产生, 确认无污染后用仪器 Nano-Drop<sup>®</sup>ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 进行浓度测定。通过 Prime Script<sup>™</sup> RT reagen Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 日本) 进行反转录建立 cDNA 文库。具体方法参照 He 等<sup>[17]</sup>。

### 1.8 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析

在定量热循环仪 RT-PCR (QuantStudio 6 Flex, Applied Biosystem, 新加坡) 中进行 qRT-PCR 分析。实验反应总体系和程序参考 He 等<sup>[17]</sup>。根据已发表的相关鱼类目的基因序列, 采用 Primer premier 5.0 软件设计 *tor*、*s6k1*、*nrf2* 和 *keap1* 的 PCR 引物对 (表 2)。在每次 PCR 反应结束时, 对扩增产物进行熔解曲线分析, 以确认这些反应中存在单一 PCR 产物。将 cDNA 样品用 5 种不同稀释倍数 (3 个重复) 制作标准曲线, 并根据公式分析扩增效率:  $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ 。采用 Livak 描述的  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法计算目的基因的表达水平<sup>[18-19]</sup>。

表 2 实时荧光定量基因表达引物序列

Tab. 2 Primers used for qRT-PCR

基因 genes	基因序列编号 GenBank accession no.	引物序列 (5'-3') primer sequences (5'-3')
<i>tor</i>	JN850959.1	F: TCTCCCTGTCCAGAGGCAATAA R: CAGTCAGCGGGTAGATCAAAGC
<i>s6k1</i>	XM_020085100.1	F: TCCTTCTCCGTCTGTAACGA R: CATGAACACCTGCTTACCAT
<i>keap1</i>	XM_018665037.1	F: TCCACAAACCCACCAAAGTAA R: TCCACCAACAGCGTAGAAAAG
<i>nrf2</i>	KU892416.1	F: TATGGAGATGGGTCTTTGGTG R: GCTTCTTTCTGCGTCTGTTG
<i>β-actin</i>	AY510710.2	F: CTCTGGGCAACGGAACCTCT R: GTGCGTGACATCAAGGAGAAGC

### 1.9 数据统计分析

由于单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 难以对营养素需求量实验中得到的定量数据进行准

确地统计分析<sup>[3]</sup>, 因此, 本研究采用折线模型<sup>[19-20]</sup>来模拟和分析各项实验指标, 以增重率 (WG) 和总抗氧化能力 (T-AOC) 为评价指标分别计算实验鱼饲料中维生素 E 的最适需求量。

## 2 结果

### 2.1 生长性能、形态学和饲料利用

养殖 8 周后, 不同  $V_E$  水平饲料对实验鱼增重率有显著影响, 摄食 57.1 mg/kg  $V_E$  饲料的实验

组增重率显著高于摄食 4.1 mg/kg  $V_E$  饲料的实验组 ( $P<0.05$ )(表 3)。各组实验鱼的 HSI、IPF、CF 和 FCR 均无显著差异 ( $P>0.05$ )。以 WG 为评价指标, 经二次折线模型分析得出在本实验条件下虎龙杂交斑饲料中最适  $V_E$  水平为 62.92 mg/kg(图 1)。

### 2.2 全鱼和肌肉组成分析

不同  $V_E$  水平饲料对虎龙杂交斑全鱼、肌肉的水分、粗蛋白和粗脂肪含量均无显著影响 ( $P>0.05$ )(表 4)。

表 3 饲料维生素 E 水平对虎龙杂交斑生长性能和饲料利用的影响

饲料维生素E水平/(mg/kg) dietary vitamin E level	WG/%	CF/%	HSI/%	IPF/%	FCR	存活率/% survival rate
4.1	328.27 <sup>b</sup>	3.32	2.24	1.91	1.00	100
26.3	329.49 <sup>ab</sup>	3.30	1.90	1.97	1.03	100
40.7	349.59 <sup>ab</sup>	3.32	2.10	2.12	1.04	100
57.1	373.40 <sup>a</sup>	3.32	2.21	1.83	1.02	100
116.8	332.69 <sup>ab</sup>	3.21	1.77	2.02	1.02	100
209.6	350.94 <sup>ab</sup>	3.60	2.30	1.83	0.96	100
PSE	5.06	0.06	0.07	0.05	0.01	0
Regression ( $n=3$ )						
QBL						
Adj. $R^2$	0.204	Ns	Ns	0.06	Ns	
P-value	0.180	Ns	Ns	0.76	Ns	

注: 1. 同一列上标字母不同表示差异显著( $P<0.05$ ), 下同; PSE. 集合标准误( $n=3$ ); QBL. 二次折线模型。

Notes: 1. Different superscript letters in the same row indicate significant differences( $P<0.05$ ), the same below; PSE. pooled standard error of treatment means ( $n=3$ ); QBL. Quadratic Broken Line Model.

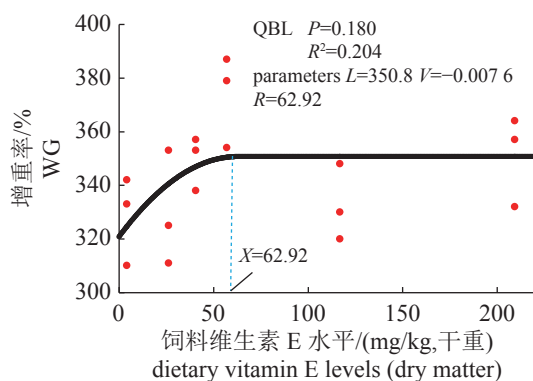


图 1 饲料维生素 E 水平与虎龙杂交斑增重率的关系  
Fig. 1 Relationship of WG of hybrid grouper juveniles with different dietary  $V_E$  levels

### 2.3 肝脏总抗氧化能力 (T-AOC) 和组织 $V_E$ 含量

肝脏 T-AOC 和  $V_E$  含量均受饲料  $V_E$  水平影响 ( $P<0.05$ ), 摄食 57.1 mg/kg  $V_E$  饲料实验组鱼 T-

AOC 高于摄食 4.1 mg/kg  $V_E$  饲料。摄食 4.1 mg/kg  $V_E$  饲料实验鱼肝脏  $V_E$  含量低于摄食 209.6 mg/kg  $V_E$  饲料实验鱼。各组实验鱼肌肉  $V_E$  含量之间无显著差异。以 T-AOC 为评价指标, 经二次折线模型分析得出在本实验条件下虎龙杂交斑饲料中最适  $V_E$  水平为 86.25 mg/kg(图 2)。

### 2.4 血清免疫指标

各组实验鱼血清免疫指标结果表明, 摄食 57.1 mg/kg  $V_E$  饲料实验鱼血清溶菌酶 (LZM) 浓度高于摄食 4.1 mg/kg  $V_E$  饲料实验鱼, 其血清免疫球蛋白 (IgM) 浓度也高于摄食 4.1 和 209.3 mg/kg  $V_E$  饲料, LZM 和 IgM 浓度都呈先升高后降低的趋势 ( $P<0.05$ )(表 5)。

### 2.5 铜胁迫存活率

在铜胁迫 72 h 后, 各实验组鱼存活率结果显示, 摄食 4.1 mg/kg  $V_E$  饲料实验鱼存活率低于摄食

表 4 饲料维生素 E 水平对虎龙杂交斑全鱼和肌肉组成的影响 (湿重)

Tab. 4 Effects of dietary  $V_E$  levels on whole-body and white muscle compositions of hybrid grouper juveniles (fresh weight base) %

饲料维生素E水平/(mg/kg) dietary vitamin E level	肌肉组成 white muscle composition			全鱼组成 whole-body composition		
	水分	粗蛋白	粗脂肪	水分	粗蛋白	粗脂肪
4.1	75.90	20.93	2.12	70.55	18.13	6.37
26.3	75.46	21.17	2.04	70.22	18.03	6.76
40.7	75.81	21.15	1.98	70.82	17.96	6.33
57.1	75.97	20.58	1.89	70.85	18.22	6.15
116.8	76.19	20.37	1.98	70.66	17.95	6.87
209.6	76.31	20.39	2.05	70.97	18.07	6.48
PSE	0.52	0.11	0.04	0.17	0.07	0.12
Regression ( $n=3$ )						
QBL						
Adj. $R^2$	0.001	0.028	0.132	0.007	0.012	0.002
P-value	0.884	0.502	0.347	0.751	0.669	0.852

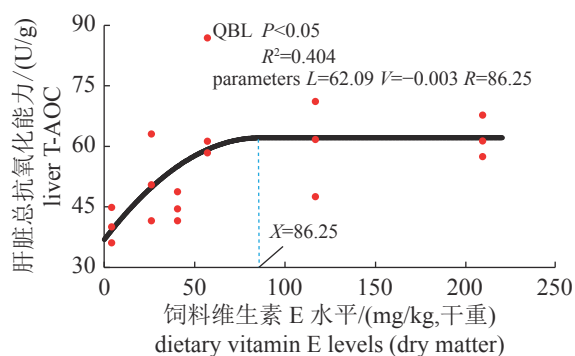


图 2 饲料维生素 E 水平对虎龙杂交斑肝脏总抗氧化能力的影响

Fig. 2 Effects of dietary  $V_E$  levels on T-AOC of liver of hybrid grouper juveniles

40.7、57.1、和 116.8 mg/kg  $V_E$  饲料实验鱼 ( $P<0.05$ ) (图 3)。

## 2.6 肝脏 *tor*、*s6k1* 基因和头肾 *nrf2*、*keap1* 基因表达

在铜胁迫后, 摄食 40.7 mg/kg  $V_E$  饲料实验鱼头肾 *nrf2* 基因相对表达量高于摄食 4.1、26.3 和 116.8 mg/kg  $V_E$  饲料实验鱼 (表 6)。经二次折线模型分析, 饲料  $V_E$  水平对肝脏 *s6k1* 基因和头肾 *keap1* 基因相对表达量有显著影响 ( $P<0.05$ ) (图 4)。

## 3 讨论

### 3.1 饲料维生素 E 含量对虎龙杂交斑生长性能和饲料利用的影响

$V_E$  是鱼类生长发育和维持自身健康的必需营

养素, 鱼类自身不能合成  $V_E$ , 必须从外界摄取。 $V_E$  可以保护细胞免受活性氧和其他自由活性集团的损害, 从而避免了膜磷脂中不饱和脂肪酸和关键蛋白质被氧化<sup>[3]</sup>。饲料中  $V_E$  的缺乏和过量均会导致生长缓慢, 这可能是由于鱼体内累积过多的脂质过氧化物造成的。因为脂质过氧化特别是多不饱和脂肪酸的氧化会导致动物机体损伤严重。摄入过多的  $V_E$  还会影响其他脂溶性维生素的吸收<sup>[21-24]</sup>。在本实验中, 当饲料中添加 57.1 mg/kg  $V_E$  时, 实验鱼生长速率显著高于摄食 4.1 mg/kg  $V_E$  饲料的实验鱼, 这表明饲料中添加适量的  $V_E$  可以提高虎龙杂交斑的生长性能; 但随着  $V_E$  水平的持续升高, 虎龙杂交斑的 WG 较适宜添加水平有所下降。

本研究中, 饲料  $V_E$  水平对饲料转化率 (FCR) 无显著影响, 这与前人在白姑鱼<sup>[7]</sup> 和日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)<sup>[25]</sup> 中报道的实验结果相同。但也有研究发现, 饲料  $V_E$  水平会显著影响饲料效率<sup>[26]</sup>, 但这种影响仅发生在一定的  $V_E$  添加量范围内, 不是严格意义上的剂量依赖性改变<sup>[27]</sup>。即饲料  $V_E$  水平对饲料效率的影响也会因不同品种而产生变化。WG 是水生动物营养研究中最常用的评价指标<sup>[3]</sup>, 可以直接体现饲料对鱼类生长性能的影响。经二次折线模型分析, 本实验条件下虎龙杂交斑幼鱼饲料中最适  $V_E$  水平为 62.92 mg/kg, 这与在玛拉巴石斑鱼<sup>[5]</sup> 研究中的到的结果 (61~68 mg/kg) 相似。为减少用单一评价指标的局限性, 考虑到  $V_E$  在体内最主要的抗氧化作用, 我们选择

表 5 饲料维生素 E 水平对虎龙杂交斑幼鱼血清溶菌酶 (LZM), 免疫球蛋白 (IgM), 肝脏总抗氧化能力 (T-AOC) 和肝脏肌肉维生素 E 含量的影响

Tab. 5 Effects of dietary  $V_E$  levels on serum LZM, IgM, T-AOC of liver and liver vitamin E concentration of hybrid grouper juveniles

饲料维生素E水平/(mg/kg) dietary vitamin E level	LZM (ng/mL)	IgM ( $\mu$ g/mL)	T-AOC (U/g)	维生素E含量/(nmol/g) vitamin E concentration	
				肝脏 liver	肌肉 muscle
4.1	1036.52 <sup>b</sup>	127.01 <sup>b</sup>	40.22 <sup>b</sup>	269.01 <sup>b</sup>	185.89
26.3	1142.97 <sup>ab</sup>	134.34 <sup>ab</sup>	51.60 <sup>ab</sup>	297.951 <sup>ab</sup>	187.78
40.7	1131.22 <sup>ab</sup>	130.66 <sup>ab</sup>	44.83 <sup>ab</sup>	297.96 <sup>ab</sup>	187.57
57.1	1946.71 <sup>a</sup>	172.97 <sup>a</sup>	68.76 <sup>a</sup>	297.57 <sup>ab</sup>	187.76
116.8	1230.89 <sup>ab</sup>	133.12 <sup>ab</sup>	60.02 <sup>ab</sup>	296.40 <sup>ab</sup>	188.37
209.6	1355.16 <sup>ab</sup>	109.99 <sup>b</sup>	62.08 <sup>ab</sup>	309.35 <sup>a</sup>	190.82
PSE	96.05	5.63	3.09	4.00	1.37
Regression ( $n=3$ )					
QBL					
Adj. $R^2$	0.03	0.174	0.404	0.377	Ns
P-value	0.059	0.240	0.002	0.006	Ns

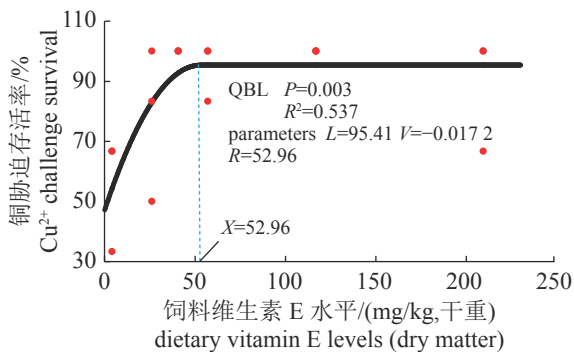


图 3 饲料维生素 E 水平对虎龙杂交斑铜胁迫 72 h 存活率的影响

Fig. 3 Effects of dietary  $V_E$  levels on  $Cu^{2+}$  challenge survival of hybrid grouper for 72 h

了总抗氧化能力 (T-AOC) 作为第二种评价指标来确定虎龙杂交斑饲料  $V_E$  的最适水平。

### 3.2 饲料维生素 E 含量对虎龙杂交斑体组成的影响

$V_E$  作为动物体内重要的脂溶性抗氧化物质, 可以改善肉质, 增加风味, 减缓脂肪酸分解<sup>[28]</sup>。在施氏鲟 (*Acipenser schrenckii*)<sup>[29]</sup> 和眼斑拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*)<sup>[30]</sup> 中, 缺乏  $V_E$  会导致肌肉营养不良和蛋白质含量下降。本实验中也得到了同样的结果, 即随饲料中  $V_E$  水平增加, 肌肉粗蛋白含量呈现先上升后下降的趋势, 表明饲料  $V_E$  水平会影响虎龙杂交斑肌肉蛋白沉积。有研究认为,  $V_E$  不足导致的肌肉蛋白沉积的下降主要是由于其

蛋白质分解增强, 且这一变化和胰岛素降低及皮质醇升高紧密相关<sup>[31]</sup>。胰岛素能刺激靶细胞的葡萄糖氧化以及糖原、ATP 脂肪、蛋白质的合成, 并同时抑制蛋白质的分解<sup>[32]</sup>。

本实验发现,  $V_E$  缺乏会使虎龙杂交斑肝脏 *s6k1* 基因表达显著降低, 这可能也是由于  $V_E$  缺乏引起的胰岛素降低, 进而造成 *s6k1* 基因未被诱导表达, 最终影响蛋白质的合成。但是作为蛋白质合成途径中的另一个关键因子 *tor*, 其在虎龙杂交斑肝脏中的表达并未受到饲料  $V_E$  水平的影响, 一般来说, *s6k1* 作为受 mTOR 调控的下游基因, *s6k1* 的表达受 *tor* 的调控, *tor* 的表达会上调 *s6k1* 的表达<sup>[33-34]</sup>, 而本实验中未得到该结果。肌肉脂肪随着饲料  $V_E$  水平增加呈先升后降, 116.8 mg/kg  $V_E$  饲料组肌肉脂肪含量最少, 类似的结果同样出现在施氏鲟<sup>[29]</sup> 和花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)<sup>[35]</sup> 的研究中, 脂肪含量的上升可能会在一定程度上增加脂质过氧化程度, 从而导致鱼肉在保存过程中出现滴水损失增加和酸败<sup>[28]</sup>。上述结果证明, 饲料中添加适量的  $V_E$  可以增加肌肉蛋白含量, 减少脂肪含量, 能在一定程度上提高鱼肉品质。

### 3.3 饲料维生素 E 含量对虎龙杂交斑肝脏、肌肉维生素 E 含量的影响

组织中维生素 E 含量是评价维生素 E 需求量的重要指标。有实验表明饲料中添加 110 mg/kg  $V_E$  可以使大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 幼鱼、

表 6 饲料维生素 E 水平对虎龙杂交斑幼鱼肝脏 *s6k1*、*tor* 和头肾 *keap1*、*nrf2* 基因相对表达量的影响

**Tab. 6 Effects of dietary vitamin E levels on relative expression of hepatic *s6k1*, *tor* and head kidney *keap1*, *nrf2* of hybrid grouper juveniles**

饲料维生素E水平/(mg/kg) dietary vitamin E level	铜离子胁迫前 before Cu <sup>2+</sup> challenge				铜离子胁迫后 after Cu <sup>2+</sup> challenge	
	<i>tor</i>	<i>s6k1</i>	<i>nrf2</i>	<i>keap1</i>	<i>nrf2</i>	<i>keap1</i>
4.1	0.98	1.01	0.97	1.05	1.08 <sup>a</sup>	0.99
26.3	1.24	1.10	1.19	1.76	1.13 <sup>a</sup>	1.22
40.7	1.22	1.43	1.07	1.52	2.11 <sup>b</sup>	1.63
57.1	1.08	1.50	1.01	1.81	1.57 <sup>ab</sup>	1.63
116.8	1.26	1.53	1.19	1.97	1.02 <sup>a</sup>	1.16
209.6	1.02	1.60	1.23	1.52	1.31 <sup>ab</sup>	0.87
PSE	0.07	0.07	0.07	0.10	0.11	0.14
Regression (n = 3)						
QBL						
Adj.R <sup>2</sup>	Ns	0.561	Ns	0.385	0.150	Ns
P-value	Ns	0.002	Ns	0.006	0.297	Ns

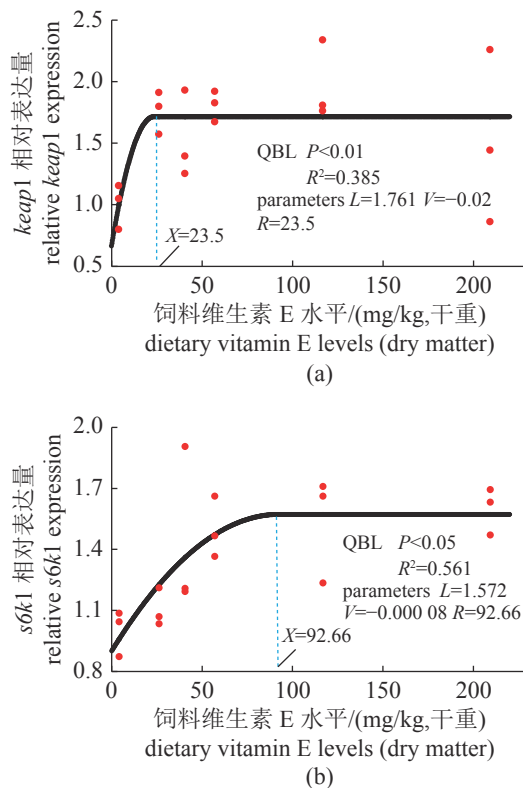


图 4 饲料维生素 E 水平对虎龙杂交斑头肾 *keap1*(a) 和肝脏 *s6k1*(b) 基因相对表达量的影响

Fig. 4 Effects of dietary V<sub>E</sub> levels on relative expression of head kidney *keap1* (a) and liver *s6k1* (b) of hybrid grouper

庸鲈 (*Hippoglossus hippoglossus*) 和金头鲷 (*Sparus aurata*) 肝脏 V<sub>E</sub> 含量显著增加<sup>[36]</sup>, 周立斌等<sup>[35]</sup>对

花鲈的研究同样发现肝组织内 V<sub>E</sub> 蓄积量是随着饲料中 V<sub>E</sub> 添加水平的升高而增加。本研究也得到类似的研究结果, 即 209.3 mg/kg V<sub>E</sub> 组虎龙杂交斑肝脏 V<sub>E</sub> 含量显著高于 4.1 mg/kg V<sub>E</sub> 组, 且肌肉 V<sub>E</sub> 含量随饲料 V<sub>E</sub> 水平增加而升高, 这与在玛拉巴石斑鱼中报道的相似<sup>[11]</sup>。

本研究中, 肌肉 V<sub>E</sub> 含量少于肝脏, 这可能是由于肝脏是 V<sub>E</sub> 的主要代谢器官<sup>[37]</sup>, 且肝脏脂肪含量比肌肉高, 也可能是增加脂溶性 V<sub>E</sub> 沉积的原因。在吉富罗非鱼 (*Oreochromis niloticus* GIFT)<sup>[38]</sup>、大菱鲆<sup>[39]</sup> 和胭脂鱼 (*Myxocyprinus asitius*)<sup>[40]</sup> 的研究中也有相似的结论。饲料 V<sub>E</sub> 水平升高会使虎龙杂交斑肌肉 V<sub>E</sub> 含量持续上升。V<sub>E</sub> 在肌肉中的累积不仅能提高鱼肉品质, 还可以缓解鲜肉失色、脂质氧化和异味形成<sup>[28]</sup>, 摄食适宜水平 V<sub>E</sub> 饲料可有效延长水产动物肌肉的货架寿命<sup>[41]</sup>。

### 3.4 饲料维生素 E 含量对抗氧化和免疫指标的影响

V<sub>E</sub> 是水产饲料中一种常用的强效抗氧化剂, 根据饲料脂肪水平的不同, V<sub>E</sub> 的最适添加量也会发生变化。当饲料中 V<sub>E</sub> 水平为 61~115 mg/kg 时, 可优化生长性能并最大限度地减少氧化应激<sup>[5,42]</sup>。T-AOC 的水平可以体现动物机体的总抗氧化能力, 包括抗氧化酶系统和非酶促系统<sup>[43]</sup>。本实验中, 57.1 mg/kg V<sub>E</sub> 饲料组肝脏 T-AOC 显著高于 4.1 mg/kg V<sub>E</sub> 饲料组。但随着饲料 V<sub>E</sub> 水平增加, 肝脏 T-AOC 呈下降趋势, 与在胭脂鱼中观察到的现

象一致<sup>[40]</sup>。这可能是由于摄入过多的  $V_E$  导致其在体内不再起到抗氧化作用, 反而会促进氧化<sup>[10, 23]</sup>, 或是由于过多的  $V_E$  抑制了抗氧化酶的活性, 从而导致肝脏 T-AOC 下降<sup>[40]</sup>, 但其机制尚不完全明确。

头肾作为鱼类重要的免疫及抗氧化器官, 在遭受氧化损伤时, 其正常功能会受到影响, 有报道指出, 可通过增加抗氧化酶的活性来减弱这种氧化损伤<sup>[44]</sup>, Nrf2-Keap1 信号通路已被证明是抗氧化应激最重要的内源性信号通路, 可调控多种抗氧化酶基因的表达<sup>[45]</sup>。本实验结果显示, 饲料  $V_E$  水平对 *keap1* 基因的表达有显著影响, 即当饲料  $V_E$  含量超过 23.05 mg/kg 时, *keap1* 基因表达较之前有显著提升, 这与在多鳞鱖 (*Sillago sihama*)<sup>[46]</sup> 中结果相似。*keap1* 是 Keap1-Nrf2 信号通路的主调节器, 可根据细胞内的氧化还原状态打开或者关闭 Keap1-Nrf2 通路<sup>[47]</sup>。正常生理条件下, KEAP1 与 NRF2 在胞浆内结合, 主导 NRF2 的降解, 使之维持在正常水平, 抑制下游基因表达。当细胞受到刺激后, NRF2 脱离 KEAP1 进入细胞核, 启动下游基因表达, 提高抗应激及抗氧化能力。在铜胁迫 72 h 后, 摄食 40.7 mg/kg  $V_E$  饲料实验鱼头肾 *nrf2* 基因相对表达量显著高于摄食 4.1、26.3 和 209.3 mg/kg  $V_E$  饲料实验鱼, *keap1* 基因的表达量也呈现先升高后降低的趋势。铜胁迫后建鲤 (*Cyprinus carpio* var. Jian) 脑细胞核中 NRF2 增加, 会诱导下游抗氧化元件 (CuZn-SOD 等) 的表达<sup>[48]</sup>, 与本实验结果一致。说明在铜胁迫下, 饲料中添加适量的  $V_E$  可上调 *nrf2* 基因表达, 增加细胞的抗氧化应激能力。*keap1* 的表达会增加 NRF2 的降解, 避免了由于 NRF2 持续积累导致的细胞凋亡和自由基损伤<sup>[49]</sup>。有研究证明氧化压力增加会导致欧洲鳗鲡细胞 *nrf2* 和 *keap1* 转录上调, 在相同促氧化剂的作用下会造成相似的表达趋势<sup>[50]</sup>。上述结果表明, 饲料中  $V_E$  缺乏或过量都会抑制抗氧化基因的表达, 当饲料中添加适量的  $V_E$  可以有效提高虎龙杂交斑杂交的机体抗氧化能力。

免疫球蛋白 (IgM) 在先天免疫和适应性免疫中起着识别和清除潜在病原体的重要作用。本实验显示饲料  $V_E$  含量在 57.1 mg/kg 时虎龙杂交斑血清 IgM 浓度显著高于 4.1 mg/kg  $V_E$  饲料组和 209.3 mg/kg  $V_E$  饲料组。有研究表明, 饲料中添加适量  $V_E$  增加了草鱼<sup>[51]</sup> 鳃中的 IgM 活性和多鳞鱖<sup>[47]</sup> 肝脏 IgM 活性, 然而在黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvid-raco*)<sup>[52]</sup> 中并未观察到相同情况。溶菌酶 (LZM) 是

鱼类重要的非特异性免疫酶<sup>[53]</sup>, 饲料中添加适量的  $V_E$  会增加军曹鱼 (*Rachycentron canadum*)<sup>[54]</sup>、玛拉巴石斑鱼<sup>[5]</sup> 和黄颡鱼<sup>[52]</sup> 的 LZM 活性。在本实验中, 57.1 mg/kg  $V_E$  饲料组虎龙杂交斑血清 LZM 的浓度高于 4.1 mg/kg  $V_E$  饲料组, 这说明当饲料中添加适量的  $V_E$  时可增强虎龙杂交斑的非特异性免疫能力。 $V_E$  可以促进免疫, 这在本次铜胁迫实验中也得到了进一步验证。铜胁迫后, 4.1 mg/kg  $V_E$  饲料组存活率显著低于 40.7、57.1 和 116.8 mg/kg  $V_E$  饲料组。尽管  $V_E$  对非特异性免疫的作用机制尚不清楚, 但据报道,  $V_E$  可能与白细胞介素 (IL)-2 一样影响基因表达<sup>[55]</sup>, 调节包括核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号传导在内的信号传递<sup>[56]</sup>, 并可能通过细胞免疫反应间接影响体液免疫<sup>[57]</sup>。

## 4 结论

综上所述, 在本实验条件下, 以 WG 和 T-AOC 为评价指标得出虎龙杂交斑饲料  $V_E$  最适水平分别为 62.92 mg/kg 饲料和 86.25 mg/kg 饲料, 饲料中添加适量的  $V_E$  可提高虎龙杂交斑生长性能、抗氧化和免疫能力。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

## 参考文献 (References):

- [1] Sahoo P K, Mukherjee S C. Influence of high dietary  $\alpha$ -tocopherol intakes on specific immune response, nonspecific resistance factors and disease resistance of healthy and aflatoxin B<sub>1</sub>-induced immunocompromised indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2002, 8(3): 159-167.
- [2] Halver J E. The vitamins[M]//Halver J E, Hardy R W. Fish nutrition. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2003: 61-141.
- [3] National Research Council. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp[M]. Washington: National Academies Press, 2011.
- [4] Cowey C B, Degener E, Tacon A G J, et al. The effect of vitamin e and oxidized fish oil on the nutrition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) grown at natural, varying water temperatures[J]. *British Journal of Nutrition*, 1984, 51(3): 443-451.
- [5] Lin Y H, Shiau S Y. Dietary vitamin E requirement of



- grouper, *Epinephelus malabaricus*, at two lipid levels, and their effects on immune responses[J]. *Aquaculture*, 2005, 248(1-4): 235-244.
- [6] Gatlin III D M, Bai S C, Erickson M C. Effects of dietary vitamin e and synthetic antioxidants on composition and storage quality of channel catfish, *Ictalurus punctatus*[J]. *Aquaculture*, 1992, 106(3-4): 323-332.
- [7] Li J, Liang X F, Tan Q S, *et al.* Effects of vitamin E on growth performance and antioxidant status in juvenile grass carp *Ctenopharyngodon idellus*[J]. *Aquaculture*, 2014, 430: 21-27.
- [8] Lozano A R, Borges P, Robaina L, *et al.* Effect of different dietary vitamin E levels on growth, fish composition, fillet quality and liver histology of meagre (*Argyrosomus regius*)[J]. *Aquaculture*, 2017, 468: 175-183.
- [9] Zhang C X, Huang F, Li J, *et al.* Interactive effects of dietary magnesium and vitamin E on growth performance, body composition, blood parameters and antioxidant status in Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) fed oxidized oil[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2016, 22(3): 708-722.
- [10] Welker T L, Congleton J L. Effect of dietary  $\alpha$ -tocopherol + ascorbic acid, selenium, and iron on oxidative stress in sub-yearling Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum)[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2009, 93(1): 15-25.
- [11] Wang L G, Li E C, Qin J G, *et al.* Effect of oxidized fish oil and  $\alpha$ -tocopherol on growth, antioxidation status, serum immune enzyme activity and resistance to *Aeromonas hydrophila* challenge of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2015, 21(4): 414-424.
- [12] Yao W, Wu X Y, Gao Y J, *et al.* Effects of replacing fishmeal protein by hemoglobin powder protein on growth performance, food intake, feeding-related gene expression and gut histology of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*  $\times$  *Epinephelus lanceolatus*) juveniles[J]. *Aquaculture*, 2018, 488: 235-243.
- [13] Jiang S T, Wu X Y, Li W F, *et al.* Effects of dietary protein and lipid levels on growth, feed utilization, body and plasma biochemical compositions of hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*  $\times$  *Epinephelus fuscoguttatus*) juveniles[J]. *Aquaculture*, 2015, 446: 148-155.
- [14] Jiang S T, Wu X Y, Luo Y, *et al.* Optimal dietary protein level and protein to energy ratio for hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*  $\times$  *Epinephelus lanceolatus*) juveniles[J]. *Aquaculture*, 2016, 465: 28-36.
- [15] Wu M J, Lu S D, Wu X Y, *et al.* Effects of dietary amino acid patterns on growth, feed utilization and hepatic IGF-I, TOR gene expression levels of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*  $\times$  *Epinephelus lanceolatus*) juveniles[J]. *Aquaculture*, 2017, 468: 508-514.
- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 17812—2008 饲料中维生素 E 的测定 高效液相色谱法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration. GB/T 17812-2008 Determination of vitamin E in feeds-high-performance liquid chromatography[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008 (in Chinese).
- [17] He L Q, Yang H S, Hou Y Q, *et al.* Effects of dietary l-lysine intake on the intestinal mucosa and expression of CAT genes in weaned piglets[J]. *Amino Acids*, 2013, 45(2): 383-391.
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [19] Robbins K R, Saxton A M, Southern L L. Estimation of nutrient requirements using broken-line regression analysis[J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84(S13): E155-E165.
- [20] Robbins K R, Norton H W, Baker D H. Estimation of nutrient requirements from growth data[J]. *The Journal of Nutrition*, 1979, 109(10): 1710-1714.
- [21] Thorarinnsson R, Landolt M L, Elliott D G, *et al.* Effect of dietary vitamin E and selenium on growth, survival and the prevalence of *Renibacterium salmoninarum* infection in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)[J]. *Aquaculture*, 1994, 121(4): 343-358.
- [22] Paveena T, Teruo M, Taveekijakarn P, *et al.* Study on vitamin E deficiency in amago salmon[J]. *The Bulletin of the Faculty of Bioresources, Mie University*, 1996(16): 17-24.
- [23] Tokuda M, Takeuchi M. Effects of excess doses of  $\alpha$ -tocopherol on the lipids and function of rainbow trout liver[J]. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*

- logy, 1995, 41(1): 25-32.
- [24] Tokuda M, Takeuchi M. Effects of excess doses of  $\alpha$ -tocopherol on lipid in serum and muscle of rainbow trout[J]. *Fisheries Science*, 1999, 65(3): 496-497.
- [25] Shahkar E, Hamidoghli A, Yun H, *et al.* effects of dietary vitamin E on hematology, tissue  $\alpha$ -tocopherol concentration and non-specific immune responses of Japanese eel, *Anguilla japonica*[J]. *Aquaculture*, 2018, 484: 51-57.
- [26] Hamre K, Lie Ø. Minimum requirement of vitamin e for Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at first feeding[J]. *Aquaculture Research*, 1995, 26(3): 175-184.
- [27] Peng L I, Gatlin III D M. Dietary vitamin E requirement of the red drum *Sciaenops ocellatus*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2009, 15(3): 313-319.
- [28] 侯永清, 李绍钰. 饲料中添加维生素E对畜禽肉质的影响[J]. *饲料博览*, 2001(9): 30-32.  
Hou Y Q, Li S Y. Effects of vitamin E on meat quality of livestock and poultry[J]. *Feed Review*, 2001(9): 30-32 (in Chinese).
- [29] 文华, 严安生, 高强, 等. 饲料维生素E水平对施氏鲟幼鱼生长及组织维生素E含量的影响[J]. *吉林农业大学学报*, 2008, 30(5): 743-749.  
Wen H, Yan A S, Gao Q, *et al.* Effects of dietary vitamin e on growth performance and tissue vitamin E level of juvenile *Acipenser schrenckii*[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2008, 30(5): 743-749 (in Chinese).
- [30] 周立斌, 王安利, 张伟, 等. 饲料维生素E含量对美国红鱼生长和非特异性免疫的影响[J]. *渔业科学进展*, 2009, 30(1): 47-53.  
Zhou L B, Wang A L, Zhang W, *et al.* Effects of dietary vitamin E levels on growth and nonspecific immunity of red drum *Sciaenops ocellatus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, 30(1): 47-53 (in Chinese).
- [31] 张琼. 维生素 E 对幼建鲤生产性能和免疫功能的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2004.  
Zhang Q. Effects of vitamin E levels on immune function of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian)[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2004 (in Chinese).
- [32] 尹娜, 邵庆均. 饲料维生素C、维生素E在水产动物免疫作用中的研究进展[J]. *中国饲料*, 2011(16): 41-44.  
Yin N, Shao Q J. Research progress of vitamin C and E on the immune function in aquatic animals[J]. *China Feed*, 2011(16): 41-44 (in Chinese).
- [33] Li X J, Mu W, Wu X Y, *et al.* The optimum methionine requirement in diets of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀ × *Epinephelus lanceolatus*♂): effects on survival, growth performance, gut micromorphology and immunity[J]. *Aquaculture*, 2020, 520: 735014.
- [34] Zhou Z Y, Wu X Y, Li X J, *et al.* The optimum dietary isoleucine requirement of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2020, 26(4): 1295-1310.
- [35] 周立斌, 张伟, 王安利, 等. 饲料维生素E添加量对花鲈生长、组织中维生素E积累量和免疫指标的影响[J]. *水产学报*, 2009, 33(1): 95-102.  
Zhou L B, Zhang W, Wang A L, *et al.* Effects of dietary vitamin E supplement on growth, tissue vitamin E concentration and immune responses of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, 33(1): 95-102 (in Chinese).
- [36] Tocher D R, Mourente G, Van Der Eecken A, *et al.* Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L. ), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L. ) and sea bream (*Sparus aurata* L. ) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2002, 8(3): 195-207.
- [37] Hamre K. Metabolism, interactions, requirements and functions of vitamin E in fish[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2011, 17(1): 98-115.
- [38] 邵辉. 吉富罗非鱼对维生素 E 和胆碱需要量的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.  
Shao H. The dietary vitamin E and choline requirement of GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*)[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [39] 魏玉婷, 王小洁, 麦康森, 等. 饲料中的维生素E对大菱鲆幼鱼生长、脂肪过氧化及抗氧化能力的影响[J]. *中国海洋大学学报*, 2011, 41(6): 45-50.  
Wei Y T, Wang X J, Mai K S, *et al.* Effect of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation, and tissue antioxidant capacity of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2011, 41(6): 45-50 (in Chinese).
- [40] 张志强, 蒋明, 文华, 等. 胭脂鱼幼鱼对饲料中维生素E需要量的研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2017, 45(2): 23-30,36.  
Zhang Z Q, Jiang M, Wen H, *et al.* Research progress of vitamin E requirement in diets of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂): effects on survival, growth performance, gut micromorphology and immunity[J]. *Aquaculture*, 2020, 520: 735014.

- Zhang Z Q, Jiang M, Wen H, *et al.* Dietary vitamin E requirement of juvenile Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*)[J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2017, 45(2): 23-30,36 (in Chinese).
- [41] 李可胜, 王芙蓉, 谢中国, 等. 维生素E在水产动物中的应用及研究进展[J]. *中国饲料*, 2016(24): 26-29,34.  
Li K S, Wang F R, Xie Z G, *et al.* Application and research progress of vitamin E in aquatic animals[J]. *China Feed*, 2016(24): 26-29,34 (in Chinese).
- [42] Lin Y H, Shiau S Y. Mutual sparing of dietary requirements for alpha-tocopherol and selenium in grouper, *Epinephelus malabaricus*[J]. *Aquaculture*, 2009, 294(3-4): 242-245.
- [43] Burton G W, Traber M G. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability[J]. *Annual Review of Nutrition*, 1990, 10: 357-382.
- [44] Kobayashi A, Kang M I, Watai Y, *et al.* Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26(1): 221-229.
- [45] Jaiswal A K. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, 36(10): 1199-1207.
- [46] Huang Q C, Zhang S, Du T, *et al.* Effects of dietary vitamin e on growth, immunity and oxidation resistance related to the Nrf2/Keap1 signalling pathway in juvenile *Sillago sihama*[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2020, 262: 114403.
- [47] Stępkowski T M, Kruszewski M K. Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, 50(9): 1186-1195.
- [48] Jiang W D, Liu Y, Hu K, *et al.* Copper exposure induces oxidative injury, disturbs the antioxidant system and changes the Nrf2/ARE (CuZnSOD) signaling in the fish brain: protective effects of myo-inositol[J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 155: 301-313.
- [49] Regoli F, Giuliani M E. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms[J]. *Marine Environmental Research*, 2014, 93: 106-117.
- [50] Giuliani M E, Regoli F. Identification of the Nrf2-Keap1 pathway in the European eel *Anguilla anguilla*: role for a transcriptional regulation of antioxidant genes in aquatic organisms[J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 150: 117-123.
- [51] Pan M L, Gao S, Zhou Z W, *et al.* A reverse genetics system for enterovirus D68 using human RNA polymerase I[J]. *Virus Genes*, 2018, 54(4): 484-492.
- [52] Lu Y, Liang X P, Jin M, *et al.* Effects of dietary vitamin E on the growth performance, antioxidant status and innate immune response in juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Aquaculture*, 2016, 464: 609-617.
- [53] 王艳妮, 刘哲, 康玉军, 等. 热应激对虹鳟部分非特异性免疫指标的影响[J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(5): 634-642.  
Wang Y N, Liu Z, Kang Y J, *et al.* Effects of heat stress on some non-specific immunity parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23(5): 634-642 (in Chinese).
- [54] Zhou Q C, Wang L G, Wang H L, *et al.* Dietary vitamin E could improve growth performance, lipid peroxidation and non-specific immune responses for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2013, 19(3): 421-429.
- [55] Meydani S N, Han S N, Wu D Y. Vitamin E and immune response in the aged: molecular mechanisms and clinical implications[J]. *Immunological Reviews*, 2005, 205(1): 269-284.
- [56] Pan J H, Feng L, Jiang W D, *et al.* Vitamin E deficiency depressed fish growth, disease resistance, and the immunity and structural integrity of immune organs in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): referring to NF- $\kappa$ B, TOR and Nrf2 signaling[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 60: 219-236.
- [57] Puangkaew J, Kiron V, Somamoto T, *et al.* Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 16(1): 25-39.

## Effects of dietary vitamin E on growth, anti-oxidation and immunity of hybrid grouper juveniles (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂)

ZHAI Haoyun, ZHANG Lu, CAI Qinxiao, ZHOU Zhiyu,  
YIN Haoran, GENG Lina, WU Xiaoyi\*

(State Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea, Hainan Provincial Key Laboratory for  
Tropical Hydrobiology and Biotechnology, Haikou 570228, China)

**Abstract:** An eight-week feeding trial was carried out to evaluate the influence of vitamin E ( $V_E$ ) on the growth performance, antioxidation and immunity of hybrid grouper juveniles (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂). Six isoenergetic (340 kcal/100 g dry matter), isoproteinic (51.5% of dry matter) and isolipidic (9% of the dry matter) diets were formulated to contain graded levels of  $V_E$  (4.1, 26.3, 40.7, 57.1, 116.8, 209.6 mg/kg, dry matter basis). Triplicate groups of twelve fish [initial average weight of (14.22±0.01)g] were stocked into floating cages and offered their prescribed diet twice daily (8:00 and 16:30) to apparent satiation. After the growth experiment, the remained experimental fish from each group were used for a 72 h copper challenge. Results showed that fish fed 57.1 mg/kg  $V_E$  exhibited higher weight gain percentage (WG) than fish fed 4.1 mg/kg  $V_E$ . Whereas, condition factor (CF), hepatosomatic index (HSI) intraperitoneal fat (IPF) values remained non-significant among all dietary groups. Whole-body and muscular compositions (moisture, protein and lipid) did not show significant differences among all dietary groups. Fish fed 209.6 mg/kg  $V_E$  had higher hepatic  $V_E$  concentration than fish fed 4.1 mg/kg  $V_E$ . The total-antioxidant capacity (T-AOC) of liver, serum lysozyme (LZM) and immunoglobulin (IgM) concentrations were increased with the increasing  $V_E$  levels, reaching a peak value at the 57.1 mg/kg level, and thereafter, it started to decrease as dietary  $V_E$  level further increased. After the challenge, the survival rate of the experimental fish fed with 40.7, 57.1 or 116.8 mg/kg  $V_E$  diet was higher than that of the experimental fish fed with 4.1 mg/kg  $V_E$ . The relative expression of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) in head kidney of fish fed 4.1 mg/kg  $V_E$  was lower than that of fish fed 40.7, 57.1 or 116.8 mg/kg  $V_E$ . Generally, the analysis of a quadratic broken line model based on WG and T-AOC indicated that the optimal dietary  $V_E$  requirement of hybrid grouper juvenile was found to be 62.92 mg/kg and 86.25 mg/kg dry matter, respectively.

**Key words:** hybrid grouper; vitamin E; growth; anti-oxidation; immunity

**Corresponding author:** WU Xiaoyi. E-mail: wjurk@163.com

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31760760); Hainan Key Research and Development Projects (ZDYF2018055)