

文章编号:1000-0615(2002)04-0351-06

## 用生长和非特异性免疫力评定 异育银鲫维生素 C 需要量

宋学宏, 蔡春芳, 潘新法, 赵林川

(苏州大学生命科学学院, 江苏 苏州 215006)

**摘要:** 用维生素 C(Vc)含量为 0~1200 mg·kg<sup>-1</sup>的精制饲料,连续投喂异育银鲫 8 周后,测定异育银鲫生长速度和非特异性免疫指标。结果表明,在饲料 Vc 含量达 150mg·kg<sup>-1</sup>时日增重率最大,进一步提高饲料 Vc 含量,日增重率没有显著变化;饲料 Vc 含量为 75 mg·kg<sup>-1</sup>时头肾指数显著提高,而脾指数不受饲料 Vc 含量的影响;头肾细胞吞噬活性和 A 花环率均在 Vc 含量为 300 mg·kg<sup>-1</sup>时达最高水平;而血清溶菌酶活性和总补体活性分别在饲料 Vc 为 300 mg·kg<sup>-1</sup>和 600 mg·kg<sup>-1</sup>时达最高值。上述结果表明饲料 Vc 可显著提高异育银鲫免疫力。鉴于 Vc 的免疫促进作用,建议在疾病多发季节饲料 Vc 添加量提高到 300mg·kg<sup>-1</sup>。

**关键词:** 异育银鲫; 维生素 C; 生长; 非特异性免疫

**中图分类号:** S963.731      **文献标识码:** A

## Determining the vitamin C requirement of allogynogenetic silver crucian carp with growth and non-specific immunity

SONG Xue-hong, CAI Chun-fang, PAN Xing-fa, ZHAO Lin-chuan

(College of Life Sciences, Suzhou University, Suzhou 215006, China)

**Abstract:** Allogynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* ♀ × *Cyprinus carpio* ♂) were fed with purified diets containing 0 to 1200 mg·kg<sup>-1</sup> of vitamin C (Vc) in the form of ascorbate polyphosphate for 8 weeks. The aim of this experiment was to determine the Vc requirement of allogynogenetic silver crucian carp with growth and non-specific immunity. The results showed that the highest growth rate was reached at dietary Vc level of 150 mg·kg<sup>-1</sup>, while increasing dietary Vc level from 150mg·kg<sup>-1</sup> to 1200 mg·kg<sup>-1</sup> gave no significant change in growth rate; The dietary Vc level of 75 mg·kg<sup>-1</sup> markedly enhanced head kidney index, however, no difference was seen in spleen index when the dietary Vc level increased; phagocytic rate and A rosette of head kidney cell increased significantly when dietary Vc level was at 300mg·kg<sup>-1</sup>, but even more Vc amount led to no improvement in immune function of head kidney cells; The total activities of sera complement and lysozyme reached the highest values at the dietary Vc level of 600 mg·kg<sup>-1</sup> and 300 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively. These data indicated that increasing dietary Vc level resulted in significant increase of non-specific immunity. For the immunomodulatory effect of Vc, it is suggested that Vc content up to 300 mg·kg<sup>-1</sup> be added to the diet of allogynogenetic silver crucian carp in the disease-prevalent seasons.

收稿日期:2001-10-16

资助项目:苏州大学青年教师基金(Q3114810);苏州市农业科技发展基金(SNZ-0117)

作者简介:宋学宏(1963-),女,江苏南通人,讲师,主要从事水产动物营养与疾病防治的教学和研究工作。Tel:0512-65226775

**Key words:** allogynogenetic silver crucian carp; vitamin C; growth; non-specific immunity

嗜水气单胞菌等水生病原菌能引起多种水产动物溶血性出血病,异育银鲫则是对此类细菌最敏感鱼类之一<sup>[1]</sup>。维生素C(又称L-抗坏血酸)是生物体内有关酶的激活剂,能促进铁的吸收,可以防止鱼类贫血症及出血症,并具有缓解应激反应、抵抗多种传染病侵袭的作用<sup>[2]</sup>。在饲料中添加Vc以提高鱼体整体抗病力已为越来越多的研究工作者及生产者所重视。鱼类对Vc的需要量一般以肝脏中Vc含量、生长曲线、缺乏症等作评定标准来确定<sup>[3]</sup>。事实上,能使鱼类快速生长的饲料未必使鱼类获得最佳抗病力<sup>[4]</sup>。生产上Vc的添加量是否能使鱼类免疫力达到最佳,目前还未见报道。本文在分析异育银鲫生长曲线的同时,测定了头肾指数、脾指数、头肾细胞吞噬活性、头肾细胞自身红细胞花环、血清总补体活性及溶菌酶活性等免疫学指标,旨在弄清饲料中Vc含量与异育银鲫非特异性免疫功能的关系,为生产上更客观、合理地添加Vc提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验用精制饲料

根据 Lovell 的配方<sup>[3]</sup>自配精制饲料,其各种组分(分析纯)购于上海生化试剂公司。Vc-多聚磷酸酯(Vc含量为9.4%)由北京营养源研究所提供。制成Vc含量分别为0、37.5、75、150、300、600、1200 mg·kg<sup>-1</sup>的7组异育银鲫适口饲料,风干,4℃保存备用。

### 1.2 异育银鲫的来源与处理

实验用异育银鲫鱼种由本校水产养殖实习基地提供,体重为41~43g,在50 cm×60 cm×100 cm的水族箱中用普通鱼用颗粒饲料于25℃驯养2周。实验时随机将鱼分配到21个水族箱中,每箱15尾。将7组饲料(每组3个重复)随机地分配给每箱鱼,日投喂量为体重的3%,连续喂养8周,实验期间,每天吸污并换水三分之一左右,溶氧保持在5 mg·L<sup>-1</sup>以上,水温为25℃,每隔2周调整其投饲率。

### 1.3 酵母菌、微壁溶球菌等实验菌

由本校微生物实验室保存,生长于普通培养基中,待用。

### 1.4 日增重率、头肾指数、脾指数的测定

饲养8周后将鱼称重,计算日增重率,并取鱼的头肾、脾脏,用滤纸吸干后精密电子天平称重,计算头肾指数和脾指数。计算公式为

$$\text{日增重率}(\%) = 100 \times (\text{喂养后的鱼体重} - \text{喂养前的鱼体重}) / \text{喂养天数};$$

$$\text{头肾指数(或脾指数)} = \text{头肾重量(或脾重量)}(\text{mg}) / \text{体重}(\text{g})。$$

### 1.5 头肾细胞自身红细胞花环(A花环)试验

参照卢全章<sup>[5]</sup>的方法,并稍作修改。取0.2mL头肾细胞(约 $2 \times 10^7$ 个·mL<sup>-1</sup>),加0.1mL异育银鲫的血清,混匀,4℃预温30min,再加0.2mL浓度为2%异育银鲫红细胞, $1000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5min,4℃孵育10h后重悬涂片,用0.25%戊二醛固定,Wright-Giemsa染液染色并观察,以粘附3个以上红细胞的头肾细胞为A花环阳性细胞。

### 1.6 头肾细胞吞噬试验

用0.67%生理盐水(含Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>)洗涤去糖脱脂酵母菌液,并稀释成 $2 \times 10^8$ 个·mL<sup>-1</sup>的菌悬液。

参照卢全章和聂品等<sup>[6]</sup>的方法制备头肾细胞(约  $4 \times 10^7$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ),取 0.1mL 头肾细胞加 0.1mL 酵母悬液,混匀后,制成湿片,0.25% 戊二醛固定,甲基紫( $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )染色并镜检,统计 200 个头肾细胞中吞噬酵母的细胞数。按下式求出吞噬百分率。

$$\text{吞噬百分率}(\%) = 100 \times (\text{噬酵母的头肾细胞数}/200)$$

### 1.7 血清总补体活性的测定

参照巴德年<sup>[7]</sup>的方法,稍加改进。待测的血清取自尾静脉,反应温度为  $25^\circ\text{C}$ ,反应时间为 60min,吸收波长为 542nm。

### 1.8 溶菌酶活性的测定

测定参照刘岩等<sup>[8]</sup>的方法进行。测定波长为 570nm,溶菌酶活性( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) =  $(A_0 - A) / A$ ,其中,  $A_0$  为保温前的光吸收值,  $A$  为保温后的光吸收值。

### 1.9 数据处理

所有数据经方差分析后,进行邓肯氏新复极差检验。

## 2 结果

### 2.1 生长和非特异性免疫力指标的统计分析

本研究在对与异育银鲫生长和非特异性免疫力有关的指标测定的基础上,进行了数据的统计分析,结果见表 1。

表 1 不同水平饲料 Vc 处理对异育银鲫生长及非特异免疫指标的影响

Tab.1 Effects of different levels of dietary vitamin C on the growth and non-specific immunity of allogynogentic silver crucian carp

处理组别 treat	1	2	3	4	5	6	7
VC 含量( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) Vc content	0	37.5	75	150	300	600	1200
日增重率(%) daily growth rate of weight	0.80c	0.83b	0.91ab	0.97A	0.95ab	0.99A	0.96A
头肾指数( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) head kidney index	1.78b	1.84b	2.03A	2.01A	2.06A	2.02A	1.98a
脾指数( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ) spleen index	2.60a	2.51a	2.50a	2.58a	2.52a	2.60a	2.61a
头肾细胞 A 花环比例(%) A rosette of head kidney cell	4.86c	5.31c	6.36b	8.25A	8.50A	6.09b	6.26b
头肾细胞吞噬率(%) phagocytic rate of head kidney cell	9.32c	8.92c	14.13b	14.50b	21.45a	20.55a	19.91a
血清溶菌酶活性( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) activity of serum lysozyme	0.070c	0.065c	0.071bc	0.089abc	0.101A	0.095AB	0.096AB
总补体活性( $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) total activity of serum complement	61.85c	62.31c	67.06b	70.11ab	72.96ab	77.50A	77.81A

注:同行不同小写字母的数字间有显著差异( $P < 0.05$ ),不同大写字母的数字间有极显著差异( $P < 0.01$ )。

Notes: Figures with different small letters in the same line are significantly different ( $P < 0.05$ ), and these with different capital letters are very significantly different ( $P < 0.01$ ).

### 2.2 Vc 对日增重率及免疫器官的作用

饲料中 Vc 添加量明显影响日增重率和头肾指数,添加量低于  $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,日增重率随 Vc 含量增加而增加,但当饲料 Vc 含量达  $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  以上时,日增重率不再继续明显上升,并在  $1200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时略有下降。因此,饲料 Vc 含量为  $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时可使异育银鲫获得比较理想的生长速度,同时比较

经济(图1)。Vc从0增加到 $37.5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 对头肾指数无显著影响,但当进一步增加到 $75\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,头肾指数显著上升,并不再继续随Vc增加而增加(图2)。而脾指数则不受饲料Vc含量的影响(表1)。

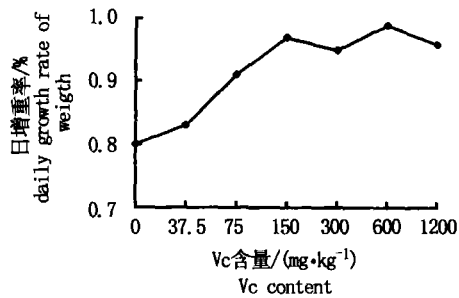


图1 饲料Vc对日增重率的影响

Fig.1 Effect of dietary Vc level on daily growth rate of weight

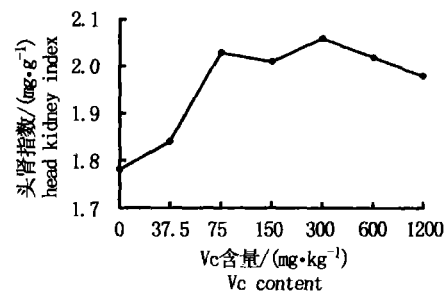


图2 饲料Vc对头肾指数的影响

Fig.2 Effect of dietary Vc level on head and kidney index

### 2.3 Vc对头肾细胞A花环比例的影响

将异育银鲫头肾细胞与自身红细胞共孵育10h后,发现头肾细胞具有吞噬自身红细胞的细胞,而在不加Vc的对照组,头肾细胞A花环检出率较低,为4.86%,极显著地低于第4组及第5组( $P < 0.01$ )。然而当Vc含量达 $600\sim 1200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,A花环检出率又明显下降,但仍显著高于对照组(图3)。

### 2.4 头肾细胞吞噬活性

将异育银鲫头肾细胞与酵母菌共孵育一定时间后,均显示较强的吞噬作用,由图4可见,头肾细胞吞噬能力随着饲料中Vc含量的增加而增加,当Vc含量达到 $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,头肾细胞吞噬率最高,Vc含量进一步增加到 $600\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $1200\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,头肾细胞吞噬率没有显著变化。

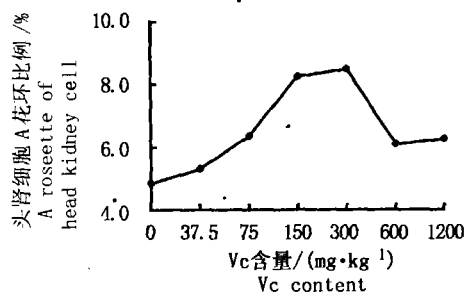


图3 饲料Vc对头肾细胞A花环率的影响

Fig.3 Effect of dietary Vc level on A rosette of head kidney cell

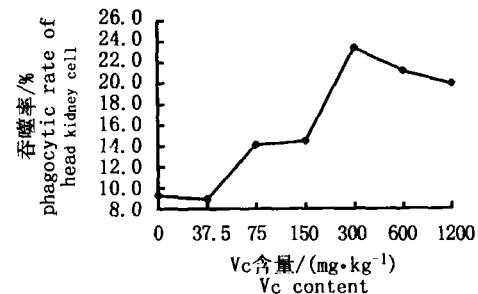


图4 饲料Vc对头肾细胞吞噬率的影响

Fig.4 Effect of dietary Vc level on phagocytic rate of head kidney cell

### 2.5 血清总补体活性和溶菌酶

不同剂量Vc的饲料饲养8周后,供试异育银鲫的血清中的总补体活性、溶菌酶活性测定结果如图5、图6所示。新复极差检验结果表明第1组(零对照组)的异育银鲫的总补体活性显著地低于第4、5、6、7组等高剂量组( $P < 0.01$ );并且总补体活性随着Vc含量的增加而明显提高,当Vc含量达 $600\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时补体活性最高,以后不再随Vc含量的增加而明显提高。溶菌酶活性测定结果与此相似,也是随饲料Vc含量增加而提高,当Vc含量增加到 $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,溶菌酶活性最高,而随Vc含量进一步提高,活性不再显著变化。

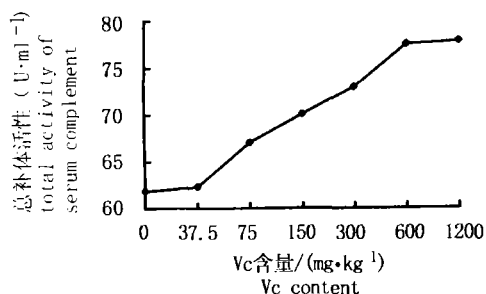


图5 饲料 Vc 对血清总补体活性的影响

Fig.5 Effect of dietary Vc level on total activity of serum complement

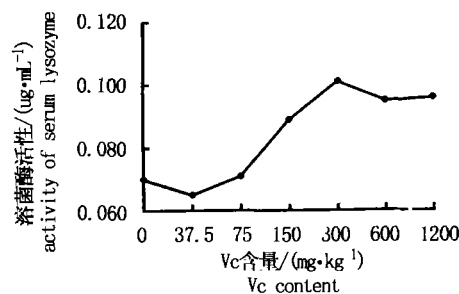


图6 饲料 Vc 对血清溶菌酶的影响

Fig.6 Effect of dietary Vc level on activity of serum lysozyme

### 3 讨论

#### 3.1 Vc 与非特异性免疫力的关系

Vc 既是一种具广泛生理功能的营养素,又是一种具有免疫作用的免疫调节因子,有明显的抗感染作用。但许多鱼类自身不能合成 Vc。Li 和 Lovell<sup>[9]</sup>、Hardie 等<sup>[10]</sup>、秦启伟等<sup>[11]</sup>用高剂量 Vc 分别投喂美洲沙鲶、大麻哈鱼和青石斑鱼,均发现鱼体血清中补体活性明显提高。Vc 是原胶原蛋白中脯氨酸、赖氨酸羟基化生成羟脯氨酸、羟赖氨酸的一个辅助因子,而补体的经典激活途径 C<sub>1</sub> 复合体中的 C<sub>1q</sub> 在化学结构上有大量的羟脯氨酸和羟赖氨酸残基<sup>[12,12]</sup>,因而适量的 Vc 可激活补体活性。

本研究中异育银鲫血清的溶菌酶活性也随 Vc 含量增加而增加,与秦启伟等<sup>[11]</sup>对青石斑鱼的研究结果有较大差异,这可能与基础饲料中是否含有 Vc 有关,他们所用基础饲料为含有一定 Vc 的冰杂鱼,所以测得的对照组血清溶菌活性也很高,从而表现为添加 Vc 的各实验组与对照组无显著差异。Vc 提高异育银鲫溶菌酶活性,说明 Vc 对鱼血清补体的替代型杀菌途径也有影响。鱼类的免疫器官与组织主要是头肾、脾脏、胸腺以及消化道淋巴组织及血液淋巴等,头肾及脾脏与体液免疫有关,头肾是 B 淋巴细胞的发生源<sup>[13]</sup>,本研究中异育银鲫头肾指数、头肾细胞吞噬酵母的能力及 A 花环形成比例都随着饲料中 Vc 含量增加而增大,这从另一方面证明 Vc 能增强头肾的免疫功能。

由此可见,Vc 是一种较好的免疫激活剂和免疫调节剂。但综合本研究结果发现,饲料 Vc 含量并非越高越好,只有当其适量时,才能增强其免疫功能,提高鱼体的整体抗病力。

#### 3.2 饲料 Vc 适宜添加量及其评定标准

研究鱼类对 Vc 的需要量,评定标准不同,得值也不同。Fournier 等<sup>[14]</sup>用 Vc 含量分别为 0、5、10、20、40、80、160、320mg·kg<sup>-1</sup>的饲料喂养舌齿鲈幼鱼 15 周,研究依赖于饲料 Vc 含量的皮肤反应、个体中羟脯氨酸的浓度和肝脏中抗坏血酸浓度与饲料 Vc 之间的关系。研究表明,饲料 Vc 分别为 5mg·kg<sup>-1</sup> 和 30mg·kg<sup>-1</sup>时,皮肤及全鱼中羟脯氨酸含量最高,而使肝脏 Vc 含量达最高水平的饲料 Vc 为 121mg·kg<sup>-1</sup>。因此认为肝脏 Vc 饱和度是评价舌齿鲈对 Vc 需要量最严格的反应标准。也有人研究鱼类 Vc 需要量时以生长速度、相关酶活性及是否出现缺乏症作为评判标准,用这些判据所得结果比用肝脏饱和度标准低一些<sup>[3]</sup>。近年来关于 Vc 免疫功能的研究报导较多,Bagni 等<sup>[15]</sup>发现,饲料 Vc 可显著提高鲑鱼补体溶血活性及溶菌酶活性;Li 和 Lovell<sup>[9]</sup>报导,饲喂不含 Vc 饲料的大西洋鲑,对爱德华氏菌抗原的抗体反应、补体溶血活性、外周血吞噬细胞的吞噬作用等均有不良影响,饲料 Vc 含量在 30~300 mg·kg<sup>-1</sup>时,大西洋鲑的免疫力没有显著差异,而在 Vc 含量达 3 000mg·kg<sup>-1</sup>时,抗体形成和补体活性均有显著提高。本实验综合前人成果,试图从免疫学角度探讨异育银鲫饲料 Vc 适宜添加量,结果表明,饲料 Vc 缺乏或不足可导致非特异性免疫功能下降,从头肾细胞 A 花环比例和吞噬率、总补体活性

及溶菌酶活性等判据来看,异育银鲫免疫力在一定范围内随 Vc 增加而提升:在饲料 Vc 为  $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时头肾细胞 A 花环率显著高于对照组,饲料 Vc 为  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时头肾细胞吞噬率、血清溶菌酶活性等显著高于对照组,血清总补体活性则在饲料 Vc 为  $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时达最高水平。因此,综合各免疫力指标可以认为,饲料 Vc 为  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时可使异育银鲫获得较强的抗病力。

从实验结果可见,饲料 Vc 为  $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,异育银鲫可获得最大生长速度,高于美国国家研究委员会(NRC)推荐的温水性鱼类饲料 Vc 添加量  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,这可能因为生活于水体的鱼类可从其它途径获得部分 Vc,因此饲料中添加  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  可基本满足其正常生长的需要,而本实验是在可控条件下进行的,异育银鲫没有其它 Vc 来源,因而研究结果高于 NRC 推荐量。综上所述,异育银鲫维持最大生长速度的饲料 Vc 需要量为  $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,获得较强抗病力的饲料 Vc 需要量为  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。因此,我们认为,为减少病害带来的损失,在疾病多发季节应适当提高饲料 Vc 含量,建议在原有基础上再增加  $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  左右。

### 参考文献:

- [1] Lu C P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it [J]. Journal of Fisheries of China, 1992, 16: 282 - 287. [陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, 16: 282 - 287.]
- [2] Sandel L J, Daniel J C. Effect of ascorbic acid on collagen in RNA levels in short term chondrocyte cultures [J]. Connect Tissue Res, 1988, 17: 11 - 22.
- [3] Li A J. Nutrition and feeding in aquacultural animals [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996. 52 - 53. [李爱杰. 水产动物营养与饲料学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996. 52 - 53.]
- [4] Yang S W. Nutrition and disease resistance of fish [J]. Fish Farming World, 1983, (9): 23 - 26. [杨顺维. 营养与鱼类之抗病力[J]. 养鱼世界, 1983, (9): 23 - 26.]
- [5] Lu Q Z. Preliminary studies on the auto-rose of red blood cells to thymocytes of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [A]. Transactions of researches on fish diseases [C], Beijing: Oceanographic Press, 1993. 26 - 29. [卢全章. 草鱼胸腺细胞自身红细胞花环的初步研究[A]. 鱼病学研究论文集[C], 北京: 海洋出版社, 1993. 26 - 29.]
- [6] Lu Q Z, Nie P. Anti-infection immunity to *Aeromonas punctata* in thymocytes and head kidney cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [A]. Transactions of researches on fish diseases [C], Beijing: Oceanographic Press, 1993. 37 - 45. [卢全章, 聂品. 草鱼胸腺和头肾细胞在抗 *Aeromonas punctata* 感染中的免疫作用[A]. 鱼病学研究论文集[C], 北京: 海洋出版社, 1993. 37 - 45.]
- [7] Ba D N. Technology and application of contemporary immunology [M]. Beijing: Joint Press of Beijing Medical University and China Xiehe Medical University, 1998. 300 - 301. [巴德年. 当代免疫学技术与应用[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998. 300 - 301.]
- [8] Liu Y, Jiang X L, Lu Q, et al. Effects of mannuronate polysaccharide on enzymes of *Penaeus chinensis* related with immune and hemolysis [J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(6): 549 - 553. [刘岩, 江晓路, 吕青, 等. 聚甘露糖酸对中国对虾免疫相关酶活性和溶菌溶血活性的影响[J]. 水产学报, 2000, 24(6): 549 - 553.]
- [9] Li Y, Lovell R T. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immuneresponses in channel catfish [J]. J Nutr, 1985, 115(1): 123 - 131.
- [10] Hardie L J, Fletcher T C, Secombes C J. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon *Salmo salar* L. [J]. Aquac, 1991, 95(2): 201 - 214.
- [11] Qin Q W, Wu Z H, Zhou Y C, et al. Non-specific immunomodulatory effects of dietary vitamin C on grouper *Epinephelus awoara* [J]. Tropic Oceanology, 2000, 19(1): 58 - 63. [秦启伟, 吴灶和, 周永灿, 等. 饲料 Vc 对青石斑鱼的非特异性免疫调节作用[J]. 热带海洋, 2000, 19(1): 58 - 63.]
- [12] Zheng W F. Medical immunology [M]. Beijing: People's Health Press, 1989. 63 - 69. [郑武飞. 医学免疫学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 63 - 69.]
- [13] Li Y N, Chen Q Z, Shao J Z, et al. Advances in research of fish immunology [J]. Zoological Research, 1995, 16(1): 83 - 94. [李亚南, 陈全震, 邵健忠, 等. 鱼类免疫学研究进展[J]. 动物学研究, 1995, 16(1): 83 - 94.]
- [14] Fournier V, Gouillou-Coustans M F, Kaushik S J. Hepatic ascorbic acid saturation is the most stringent response criterion for determining the vitamin C requirement of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. J Nutr, 2000, 130(3): 617 - 620.
- [15] Bagni M, Archetti L, Amadori M, et al. Effect of long-term oral administration of an immunostimulant diet on innate immunity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2000, 47(10): 745 - 751.