

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

明建华^{1,2}, 谢骏^{2*}, 徐跑^{2*}, 刘文斌³, 戈贤平²,
刘波², 何义进², 周群兰², 习丙文², 潘良坤²

(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,

农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

摘要: 选取 1 200 尾健康的团头鲂, 体重为 (133.44 ± 2.11) g, 随机分成 4 组, 其中 1 组为对照组, 投喂基础日粮(含 50.3 mg/kg 维生素 C, 以 L-抗坏血酸-2-多聚磷酸酯为 Vc 源), 另外 3 组为试验组, 投喂饲料是在基础日粮中分别添加 60 mg/kg 大黄素、700 mg/kg Vc、60 mg/kg 大黄素 + 700 mg/kg Vc。连续投喂 60 d 后, 检测团头鲂生长、肌肉成分、血液和肝脏生化指标以及两种热休克蛋白 70 s (HSP70s) mRNA 的表达水平, 并统计团头鲂感染嗜水气单胞菌后的成活率, 以综合评价大黄素、高剂量 Vc 及其配伍对团头鲂的作用效果。结果表明, 与对照组相比, 大黄素、Vc 组显著提高了鱼体增重率和特定生长率, 血清中总蛋白 (TP)、溶菌酶 (LSZ) 和碱性磷酸酶 (AKP) 的水平, 肝脏中超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性和诱导型 HSP70 mRNA 的基础表达水平, 降低了饵料系数、死亡率、血清中皮质醇 (COR)、甘油三酯 (TG) 以及肝脏丙二醛 (MDA) 的含量 ($P < 0.05$); 配伍组虽然血清中 TP、LSZ 的含量以及肝脏 HSP70 mRNA 水平显著升高, 肝脏 MDA 的含量也显著降低 ($P < 0.05$), 但均未表现出协同增效作用, 其它指标与对照组相比差异均不显著 ($P > 0.05$)。此外, 与对照组相比, 大黄素组还显著提高了团头鲂肝脏过氧化氢酶 (CAT) 的活性 ($P < 0.05$), 而 Vc 和配伍组的 CAT 活性与对照组的差异不显著 ($P > 0.05$); 其它一些指标如血清中葡萄糖 (GLU)、谷丙转氨酶 (GPT)、谷草转氨酶 (GOT)、胆固醇 (CHOL)、肝脏组成型 HSC70 mRNA 的表达水平、鱼体形体指标以及肌肉组成成分等各组间差异均不显著 ($P > 0.05$)。攻毒试验也表明, 大黄素和高剂量 Vc 组能显著提高攻毒后鱼的成活率 ($P < 0.05$), 而二者配伍后效果反而下降, 其相互作用的机理还有待于进一步研究。

关键词: 团头鲂; 大黄素; 维生素 C; 生长; HSP70s mRNA 表达

中图分类号: S 963

文献标识码: A

在水产养殖中, 鱼类经常会遇到水温剧变、养殖密度过高、水质恶化以及细菌和病毒侵袭等不良环境因子的胁迫, 这些胁迫可能会打破鱼类与环境之间的平衡与协调, 引起鱼体的应激反应^[1], 即机体对外界或内部的各种异常刺激所产

生的非特异性应答反应的总和。这是鱼类在长期进化过程中形成的一种扩大适应范围的生理反应, 但应激强度过大或持续处于应激状态, 会引起鱼体的免疫抑制, 导致机体对各类病原的敏感性升高^[2-3], 生长减缓^[4]。另外, 为了防治鱼病, 人

们在饲料中大量添加抗生素和激素,结果造成了抗药性和药物残留等诸多问题,给水产养殖业的可持续发展、水产品安全以及人类健康带来了极大的危害。因此,通过营养调控手段来改善鱼类的免疫力和抗应激能力日益受到重视,目前研究无毒副作用、无抗药性、能增强水产动物免疫力、抗应激能力和促进生长的饲料添加剂成为研究的热点。

大黄素是从中草药大黄(*Rheum officinale* Baill)根茎中提取的主要有效单体,其化学名称为1,3,8-三羟基-6-甲基蒽醌,具有抗菌消炎^[5]、抗病毒^[6]、抗氧化及清除氧自由基^[7]、降血脂^[8]、保护肝脏^[9]和免疫调节^[10]等多种功效。Xie等^[11]研究也表明,大黄蒽醌提取物(主要成分为大黄素、大黄酚和大黄酸等)能促进建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)生长,增强鱼体的免疫力和抗高密度应激能力。维生素C(Vc)又名L-抗坏血酸,是鱼类必需的营养素,而大多数鱼类缺乏合成Vc所需的L-古洛糖酸内酯氧化酶(GLO),必须从食物中获取Vc^[12-13]。Vc是一种重要的免疫增强剂^[14],鱼类摄食Vc含量较高的饲料后可提高鱼体的免疫力和抗病原菌感染力^[15-21],缓解应激所造成的负面效应^[22-23]。Vc也是一种重要的抗氧化剂,可直接或间接清除自由基,降低机体脂质过氧化物的水平,抑制其抗氧化酶活性的降低^[24]。

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs),又称热应激蛋白(heat stress proteins)是进化上高度保守,具有多种生物学功能的非特异性细胞保护蛋白^[25-26]。其按同源性及分子量大小可分为3个主要家族:HSP90(85~90 ku)、HSP70(68~73 ku)和小分子量热休克蛋白(16~47 ku)^[27],其中HSP70s是最保守和最重要的一族。HSP70s主要由2种不同的基因所编码^[28],即组成型HSC70(heat shock cognate 70)和诱导型HSP70基因。这两种HSP70s在细胞内均发挥重要作用,HSC70主要与细胞的分裂、增殖、发育等生理过程相关^[29-30],而HSP70主要参与应激保护,改善细胞的生存能力,提高对环境胁迫或伤害的耐受性^[31-32]。因此,通过日粮营养成分调控鱼体内两种热休克蛋白70的表达,对于增强机体的免疫力和抗应激能力具有重要意义。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*),隶属

于硬骨鱼纲,鲤形目,鲤科,鲴亚科,是中国主要的淡水养殖品种之一。近年来团头鲂养殖病害有逐年上升的趋势,而有关大黄素、Vc对团头鲂影响的相关研究还鲜见报道。鉴于此,本实验在团头鲂基础日粮中分别添加大黄素、高剂量Vc及其配伍成分,探讨其对团头鲂生长、生理生化指标、抗病原感染以及肝脏两种HSP70s mRNA表达的影响,以期为研制安全环保的饲料添加剂提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼种、添加剂及日粮

团头鲂由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心渔场提供。实验选择体质健壮,规格和重量基本一致的团头鲂鱼种,初始体重(133.44 ± 2.11)g,随机分为4组,分别为对照组、大黄素组、Vc组、大黄素与Vc的配伍组,每组设3个重复,共12个水泥池(规格为8.0 m × 2.0 m × 1.2 m,水深0.7 m),每池放养100尾。

大黄素由巨邦植物原料有限公司提供,有效含量40%;L-抗坏血酸-2-多聚磷酸酯(LAPP)为罗氏公司产品,用作Vc源,有效含量35%。

在基础日粮中分别添加60 mg/kg 大黄素、700 mg/kg Vc、60 mg/kg 大黄素 + 700 mg/kg Vc(均为有效含量),以基础日粮饲喂组为对照,共4个处理组,与上面的分组一致。基础日粮组成及主要营养成分见表1,其中Vc有效含量为50.3 mg/kg,能够满足团头鲂正常生长需要^[33];大黄素组添加60 mg/kg 大黄素是根据参考文献^[7-9]并结合团头鲂的生长预实验确定的;Vc组是依据高剂量Vc可有效提高鱼体的免疫力和抗病原感染力的研究报道^[15-20],结合生长预实验,在基础日粮中添加700 mg/kg Vc(共含Vc 750 mg/kg);大黄素与Vc的配伍组则为了检验二者配伍的效果。各种原料分别粉碎过60目筛,采取逐级扩大法添加微量成分,使各组分充分混匀后,用小型饲料造粒机制成直径3 mm的沉性颗粒饲料,50℃烘干后于4℃冰柜中保存备用。

1.2 饲养管理

团头鲂在中国水产科学研究院淡水渔业研究中心实验基地水泥池驯化15 d后投喂实验日粮。每天投喂两次(8:30、16:30),日投饵量为鱼体重

2% ~ 4%, 并根据摄食和生长情况作适当调整, 以每次投饲后无残饵为宜。养殖池日夜连续充气增氧, 饲养期间水温为 24 ~ 28 °C, pH 为 6.8 ~ 7.6,

溶解氧 > 5 mg/L, 氨氮 < 0.05 mg/L, 硫化氢 < 0.01 mg/L。正式养殖 60 d 后结束, 量取鱼体长、称重和采样等。

表 1 团头鲂基础日粮与营养水平
Tab. 1 Basal diet and nutrition levels of *M. amblycephala*

日粮组成 ingredients	%	营养水平 nutrition levels	
鱼粉 fish meal	4.0	干物质(%) dry matter	88.68
豆粕 soybean meal	20.0	粗蛋白(%) crude protein	30.89
花生粕 peanut meal	8.0	粗脂肪(%) crude lipid	4.58
菜籽粕 rapeseed meal	25.0	钙(%) calcium	1.15
棉粕 cotton meal	8.0	总磷(%) total phosphorous	1.24
米糠 rice bran	10.0	有效磷(%) available phosphorous	0.84
次粉 wheat middlings	17.5	蛋氨酸 + 胱氨酸(%) methionine + cystine	1.13
鱼油 fish oil	2.0	赖氨酸(%) lysine	1.58
氯化胆碱 choline chloride	0.1	总能(kJ/g) ¹ gross energy	17.68
维生素预混物 vitamin premix ²	1.0	维生素 C(mg/kg) vitamin C	50.30
矿物质预混物 mineral premix ²	1.0		
棒土 attapulgate	1.0		
磷酸二氢钙 monocalcium phosphate	2.0		
食盐 salt	0.4		
合计 total	100.0		

注:1. 营养水平中, 总能按蛋白质 23.9 kJ/g、脂肪 39.8 kJ/g、碳水化合物 17.6 kJ/g 计算^[34], 其他指标为实测值; 2. 维生素与矿物质添加剂由南京华牧动物研究所提供。

Notes: 1. Gross energy (GE, kJ/g) calculated by protein 23.9 kJ/g, crude lipid 39.8 kJ/g, carbohydrate 17.6 kJ/g^[34], and the others are measured in the nutrition levels; 2. Vitamin premix and mineral premix were provided by Nanjing Huamu Animal Institute.

1.3 攻毒试验

饲养试验结束后, 选择体重基本一致的团头鲂进行攻毒试验, 每个池取 10 尾鱼。病原菌采用浙江省淡水水产研究所提供的嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*, Ah)。按王文博等^[35]所述方法, 将两次活化后的嗜水气单胞菌用无菌生理盐水稀释, 使终浓度为 5×10^7 cells/mL。按每 100 g 鱼重腹腔注射菌液 0.5 mL, 然后分别放养于室内另一水泥池的 12 个小网箱中(规格为 2.0 m × 1.2 m × 1.0 m), 保证充足的溶氧, 观察鱼的死亡情况, 并分别于 0、6、12、24、48 h 统计成活率。

1.4 采样与处理

饲养试验结束后, 禁食 24 h, 将各池鱼称重计数, 每池随机选取 3 尾体重相近的团头鲂, 用浓度为 200 mg/L 的 MS-222 作快速深度麻醉, 经称重和量体长后用一次性医用注射器从尾静脉采血。血样在 4 °C 冰箱中静置 1 ~ 2 h 后, 以 4 °C 3 000 r/min 离心 10 min 制备血清, -20 °C 冻存备用。

鱼体采血后立即剖开腹腔, 剥离出内脏和肝胰脏并称重, 取约 0.1 g 肝脏用液氮速冻后于 -80 °C 保存用于分子生物学测定; 另取适量肝脏用于常规分析, 取部分背鳍下方侧线以上的背部肌肉用于肌肉成分分析, 均以 -20 °C 保存。

1.5 测定指标与方法

生长与形体指标 分别按下式计算增重率 (weight gain rate, WGR)、特定生长率 (specific growth rate, SGR)、饵料系数 (feed coefficient, FC)、死亡率 (mortality, M)、成活率 (survival rate, SR)、肝体比 (hepatosomatic index, HSI)、内脏比 (viscerosomatic index, VSI)、肥满度 (condition factor, CF):

$$\text{增重率 (WGR, \%)} = 100 \times (W_t - W_0) / W_0$$

$$\text{特定生长率 (SGR, \% / d)} = 100 \times (\text{Ln } W_t - \text{Ln } W_0) / t$$

$$\text{饵料系数 (FC)} = FI / (W_t - W_0)$$

$$\text{死亡率 (M, \%)} = 100 \times (N_0 - N_t) / N_0$$

$$\text{成活率 (SR, \%)} = 100 \times N_t / N_0$$

肝体比(HSI, %) = $100 \times W_h/W_b$

内脏比(VSI, %) = $100 \times W_v/W_b$

肥满度(CF, %) = $100 \times W_b/L^3$

式中, W_0 (g) 为鱼初体均重; W_t (g) 为鱼末体均重; t (d) 为饲喂天数; FI (g) 每尾鱼平均摄食饲料总量(风干样重); N_0 为初鱼尾数; N_t 末鱼尾数; W_h (g) 为每尾鱼末肝脏重; W_v (g) 为每尾鱼末内脏重; W_b (g) 为每尾鱼末体重; L (cm) 为每尾鱼末体长。

肌肉成分分析 水分采用 105 °C 恒重法(GB 6435—86)测定;粗蛋白采用凯氏定氮法(GB/T 6432—94)测定;粗脂肪采用索氏抽提法(GB/T 6433—94)测定;粗灰分采用 550 °C 灼烧法(GB/T 6438—92)测定。

血液生化指标的测定 总蛋白(TP)采用福林-酚试剂法^[36]测定;溶菌酶(LSZ)参照 Yin 等^[37]方法测定;皮质醇(COR)采用放射免疫法(RIA)测定^[38],试剂盒购自北京北方生物技术研究;葡萄糖(GLU)、甘油三酯(TG)、胆固醇(CHOL)、谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)和碱性磷酸酶(AKP)等在美国贝克曼 Cx-4 型全自动生化分析仪上测定,试剂盒均购自上海骏实生物科技有限公司。

肝脏抗氧化指标的测定 肝脏样品解冻后,用冷生理盐水冲洗干净并用滤纸吸干后称重,肝脏与匀浆介质(pH 7.4)按 1:9 (W:V)的比例冰浴匀浆,然后 4 °C 10 000 r/min 离心 20 min,取上清液用于分析。超氧化物歧化酶(SOD)活性参照 Granelli^[39]的嘌呤氧化酶法测定,过氧化氢酶(CAT)活性参照 Sinha^[40]方法测定,丙二醛(MDA)参照 Mihara 等^[41]的硫代巴比妥酸分光比色法测定。以上试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

肝脏两种热休克蛋白 70 mRNA 表达水平的测定 根据我们已经克隆到的团头鲂组成型 Ma-HSC70 和诱导型 Ma-HSP70 cDNA 全序列^[28](Ma-HSC70: EU623471, Ma-HSP70: EU884290),选择二者序列比对差异较大的部分,分别设计两对引物,即 Ma-HSC70 为 P1: CAGGTGGAATGCCCGATGGTAT, P2: GTAGCAATAGTGGCTTTGGAATGGC; Ma-HSP70 为 P3: CTTTATCAGGGAGGGATGCCAGC, P4: CCCTGCAGCATTGAGTTCATAAGGT。根据团头鲂管家基因 β -actin 序

列 (AY170122),设计引物为 P5: TCGTCCACC-GCAAATGCTTCTA, P6: CCGTCACCTTCACCGTTCCAGT。所有引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成,扩增片段长度为 123 ~ 152 bp。取团头鲂肝脏 50 ~ 100 mg,按照 RNAiso Reagent (TaKaRa 公司)说明书操作,抽提总 RNA,一般 OD_{260}/OD_{280} 为 1.8 ~ 2.0。

按照 SYBR[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit (TaKaRa 公司)使用说明,进行 RT 反应,然后采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时定量 PCR 扩增反应,以 β -actin 为内参,对得到的各样品 Ct 值进行均一化处理,以对照组 Ma-HSP70 mRNA 的水平为基准,应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[42]确定其它实验组两种热休克蛋白 70 mRNA 的相对表达量。荧光定量 PCR 反应条件为:95 °C 10 s,然后 45 个循环(95 °C 5 s, 62 °C 15 s, 72 °C 10 s, 读板记录荧光量),最后 72 °C 3 min;融解曲线的反应条件为 65 °C to 92 °C,每升高 0.2 °C 保持 0.02 s 读板记录荧光量。

1.6 数据统计与分析

实验数据用 SPSS 13.0 统计软件包中的单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 氏多重比较以及独立样本 t -检验分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。实验结果以平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)表示。

2 结果与分析

2.1 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂生长性能的影响

从表 2 可见,与对照组相比,大黄素和 Vc 组团头鲂增重率和特定生长率均显著提高($P < 0.05$),其中增重率分别提高了 9.93%、13.38%,而配伍组的增重率和特定生长率均较对照组低,但差异不显著($P > 0.05$)。大黄素和 Vc 组的饵料系数和死亡率均较对照组显著下降($P < 0.05$),其中饵料系数分别下降了 18.72%、20.43%,死亡率则分别下降了 76.91%、61.43%。在形体指标上,3 个试验组鱼体肝体比、内脏比和肥满度与对照组相比差异均不显著($P > 0.05$),但有下降趋势。由此可见,大黄素和高剂量 Vc 均可促进团头鲂的生长,降低饵料系数和死亡率,二者配伍则效果反而下降,但它们均对鱼体形体指标的影响不大。

表 2 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂生长及形体指标的影响
Tab. 2 Effects of emodin, Vc and their combination on growth and body indices of *M. amblycephala*

项目 item	对照组 control	大黄素 emodin	Vc vitamin C	大黄素 + Vc emodin + Vc
初均重(g) initial body weight	133.38 ± 1.12	133.72 ± 1.61	132.54 ± 0.92	134.10 ± 1.68
末均重(g) final body weight	229.99 ± 2.50	240.25 ± 6.52	241.41 ± 4.05	227.39 ± 5.05
增重率(%) weight gain rate	72.43 ± 1.36 ^b	79.62 ± 3.06 ^a	82.12 ± 2.20 ^a	69.52 ± 1.69 ^b
特定增长率(%/d) specific growth rate	0.91 ± 0.01 ^b	0.98 ± 0.03 ^a	1.00 ± 0.02 ^a	0.88 ± 0.02 ^b
饵料系数 feed coefficient	2.35 ± 0.05 ^a	1.91 ± 0.05 ^b	1.87 ± 0.03 ^b	2.33 ± 0.08 ^a
死亡率(%) mortality	4.33 ± 0.88 ^a	1.00 ± 0.58 ^b	1.67 ± 0.33 ^b	3.67 ± 0.33 ^a
肝体比(%) hepatosomatic index	1.62 ± 0.17	1.43 ± 0.08	1.37 ± 0.09	1.49 ± 0.10
内脏比(%) viscerosomatic index	9.68 ± 0.45	8.93 ± 0.39	9.35 ± 0.40	9.06 ± 0.23
肥满度(%) condition factor	2.34 ± 0.03	2.26 ± 0.04	2.25 ± 0.03	2.29 ± 0.03

注:同一行数据中有不同上标字母者表示差异显著($P < 0.05$)。

Notes: Values with different superscript letters in the same row are significantly different ($P < 0.05$).

2.2 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂肌肉成分的影响

由表 3 可知,与对照组相比,大黄素、Vc 及其配伍组团头鲂肌肉粗蛋白和粗脂肪的含量有升高

趋势,而水分和粗灰分的含量有下降趋势,但差异均不显著($P > 0.05$)。可见,大黄素、高剂量 Vc 及其配伍对团头鲂肌肉成分的影响不大。

表 3 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂肌肉成分的影响
Tab. 3 Effects of emodin, Vc and their combination on muscle composition of *M. amblycephala* %

组别 group	水分 moisture	粗蛋白 crude protein	粗脂肪 crude lipid	灰分 ash
对照组 control	78.37 ± 0.52	18.04 ± 0.36	1.98 ± 0.06	1.51 ± 0.06
大黄素 emodin	77.32 ± 1.03	18.87 ± 0.83	2.23 ± 0.29	1.29 ± 0.10
Vc vitamin C	77.61 ± 0.81	18.76 ± 0.86	2.22 ± 0.14	1.35 ± 0.03
大黄素 + Vc emodin + Vc	77.72 ± 0.91	18.63 ± 0.74	2.19 ± 0.21	1.31 ± 0.09

2.3 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂血液生化指标的影响

由表 4 可知,与对照组相比,大黄素、Vc 及其配伍组鱼血清总蛋白、溶菌酶的水平均显著增加($P < 0.05$),其中总蛋白含量分别增加了 16.11%、21.39%、19.17%,溶菌酶活性则分别增加了 21.14%、25.15%、29.96%。大黄素、Vc 组血清碱性磷酸酶的活性也较对照组显著提高了 20.47%、21.56% ($P < 0.05$),而配伍组与对照组的差异不显著($P > 0.05$)。大黄素、Vc 组血清皮质醇、甘油三酯含量比对照组显著下降($P < 0.05$),其中大黄素组中二者的下降较明显,分别下降了 41.29%、24.01%,但配伍组中二者与对照组的差异均不显著($P > 0.05$)。各组间血糖、胆固醇的含量差异不显著($P > 0.05$)。大黄素、Vc 及其配伍组血清谷丙转氨酶、谷草转氨酶活性均较对照组低,但差异均不显著($P > 0.05$)。由此可见,大黄素和高剂量 Vc 均能提高团头鲂血

清总蛋白、溶菌酶和碱性磷酸酶的水平,降低皮质醇和甘油三酯的含量;配伍组虽然也能提高总蛋白、溶菌酶的水平,但未起到协同增效作用。

2.4 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂肝脏抗氧化指标的影响

由表 5 可知,与对照组相比,大黄素和 Vc 组团头鲂肝脏超氧化物歧化酶(SOD)活性显著提高了 16.37%、19.90% ($P < 0.05$)。大黄素组过氧化氢酶(CAT)活性较对照组显著提高了 22.11% ($P < 0.05$),而 Vc 组 CAT 水平与对照组的差异不显著($P > 0.05$)。配伍组中 SOD 和 CAT 的活性与对照组的差异均不显著($P > 0.05$)。大黄素、Vc 及其配伍组鱼肝脏丙二醛(MDA)的含量均显著低于对照组($P < 0.05$)。由此可见,大黄素和高剂量 Vc 均能提高团头鲂肝脏 SOD 的活性,降低 MDA 的含量,而且大黄素还能提高 CAT 的水平;配伍组虽然也降低了鱼肝脏 MDA 的含量,但未起到协同增效作用。

表 4 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂血清生化指标的影响

Tab. 4 Effects of emodin, Vc and their combination on serum biochemical indices of *M. amblycephala*

项目 item	对照组 control	大黄素 emodin	Vc vitamin C	大黄素 + Vc emodin + Vc
总蛋白(g/L) TP	44.08 ± 2.48 ^b	51.18 ± 1.75 ^a	53.51 ± 2.31 ^a	52.53 ± 2.67 ^a
溶菌酶(μg/mL) LSZ	9.98 ± 0.69 ^b	12.09 ± 0.78 ^a	12.49 ± 0.33 ^a	12.97 ± 0.40 ^a
碱性磷酸酶(U/L) AKP	73.38 ± 4.22 ^b	88.40 ± 4.02 ^a	89.20 ± 6.16 ^a	83.40 ± 3.04 ^{ab}
血糖(mmol/L) GLU	3.08 ± 0.40	3.18 ± 0.35	2.96 ± 0.34	3.25 ± 0.28
甘油三酯(mmol/L) TG	3.54 ± 0.29 ^a	2.69 ± 0.20 ^b	2.75 ± 0.22 ^b	2.92 ± 0.19 ^{ab}
胆固醇(mmol/L) CHOL	5.16 ± 0.14	4.97 ± 0.26	5.00 ± 0.21	4.98 ± 0.14
谷丙转氨酶(U/L) GPT	23.43 ± 0.62	19.17 ± 0.73	19.39 ± 1.81	23.16 ± 1.13
谷草转氨酶(U/L) GOT	98.50 ± 3.40	91.60 ± 8.94	89.70 ± 2.94	93.90 ± 7.93
皮质醇(ng/mL) COR	37.37 ± 3.53 ^a	21.94 ± 1.88 ^c	29.33 ± 2.23 ^b	36.39 ± 2.46 ^{ab}

注:同一行数据中有不同上标字母者表示差异显著($P < 0.05$)。

Notes: Values with different superscript letters in the same row are significantly different ($P < 0.05$).

表 5 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂肝脏抗氧化指标的影响

Tab. 5 Effects of emodin, Vc and their combination on liver antioxidant indices of *M. amblycephala*

项目 item	对照组 control	大黄素 emodin	Vc vitamin C	大黄素 + Vc emodin + Vc
超氧化物歧化酶(U/mg prot) SOD	142.53 ± 7.10 ^b	165.86 ± 8.15 ^a	170.89 ± 6.41 ^a	160.48 ± 8.13 ^{ab}
过氧化氢酶(U/mg prot) CAT	15.06 ± 0.87 ^b	18.39 ± 0.98 ^a	16.30 ± 0.56 ^{ab}	14.25 ± 1.22 ^b
丙二醛(nmol/mg prot) MDA	3.76 ± 0.18 ^a	2.85 ± 0.34 ^b	2.68 ± 0.24 ^b	3.01 ± 0.22 ^b

注:同一行数据中有不同上标字母者表示差异显著($P < 0.05$)。

Notes: Values with different superscript letters in the same row are significantly different ($P < 0.05$).

2.5 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂感染嗜水气单胞菌后的保护作用

团头鲂人工注射感染嗜水气单胞菌后,大黄素和 Vc 组鱼的成活率在 24 h、48 h 均显著高于对照组($P < 0.05$),其中大黄素组效果较好,成活率分别比对照组提高了 1.47、4.67 倍(图 1)。配伍组鱼的成活率与对照组的差异不显著($P > 0.05$)。可见,大黄素和高剂量 Vc 均可有效提高团头鲂的抗病原感染力,而二者配伍效果反而不佳。

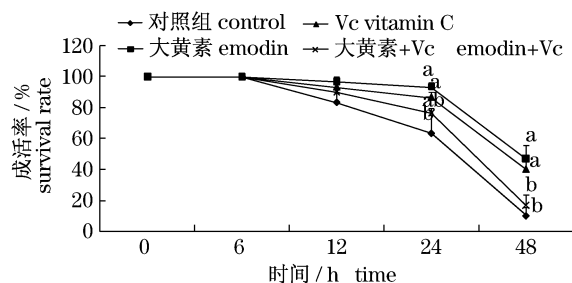


图 1 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂感染嗜水气单胞菌后成活率的影响

同一时间内,不同字母表示各组之间差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 1 Effects of emodin, Vc and their combination on survival rate of Wuchang bream challenged with *A. hydrophila*

Within the same time, different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.6 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂肝脏两种 HSP70s mRNA 表达水平的影响

组成型 Ma-HSC70 mRNA 表达水平在各组间差异不显著($P > 0.05$),而诱导型 Ma-HSP70 mRNA

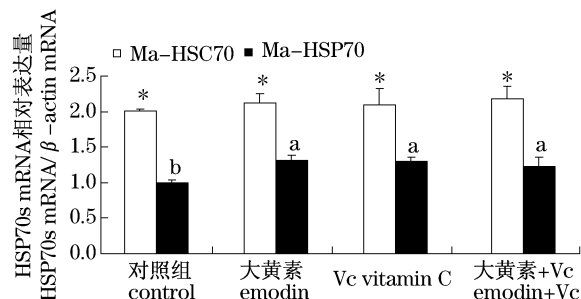


图 2 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂肝脏两种 HSP70s mRNA 表达水平的影响

不同字母表示同一基因在不同组间表达水平的 Duncan 氏多重比较差异显著($P < 0.05$); * 表示同一组内两种基因表达水平的独立样本 t -检验差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 2 Effects of emodin, Vc and their combination on two HSP70s mRNA expression levels in liver of Wuchang bream

Different letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) in different groups of the same gene expression level in Duncan's test; asterisks above the bars show significant differences ($P < 0.05$) between two genes expression levels of the same group in t -test.

在大黄素、Vc 及其配伍组中的表达水平均较对照组显著升高 ($P < 0.05$), 分别比对照组提高了 31.77%、30.36% 和 23.43% (图 2)。此外, 各組内 Ma-HSC70 mRNA 的表达水平均显著高于 Ma-HSP70 mRNA 的表达水平 ($P < 0.05$)。由此可见, 大黄素、高剂量 Vc 及其配伍对团头鲂肝脏组成型 Ma-HSC70 mRNA 表达水平无明显影响, 但可显著提高诱导型 Ma-HSP70 mRNA 的表达水平, 配伍组仍未表现出协同增效作用。

3 讨论

3.1 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂生长性能的影响

中草药具有天然、高效、毒副作用少、资源丰富等优点, 含有与动物免疫功能密切相关的生物碱、多糖、皂甙、蒽醌类、挥发油和有机酸等^[37,43], 但具体哪个成分在起作用, 还不是很清楚。本实验在团头鲂基础日粮中添加 60 mg/kg 大黄素能显著提高鱼体增重率和特定生长率, 降低饵料系数和死亡率 ($P < 0.05$), 但对鱼体肝脏比、内脏比以及肥满度等形体指标的影响不显著 ($P > 0.05$)。这与 Xie 等^[11]在饲料中添加 1.0% ~ 2.0% 大黄蒽醌提取物饲喂建鲤的相关报道是一致的, 但吉红等^[44]在鲤 (*Cyprinus carpio*) 日粮中添加 500 mg/kg 黄芩素对生长性能和饵料系数均无影响。Vc 是鱼类维持正常生理功能所必需的营养物质, Affonso 等^[21]在饲料中添加高剂量 Vc (800 mg/kg) 能显著提高石脂鲤 (*Brycon amazonicus*) 的增重率; Kumari 等^[19]用含有高剂量 Vc (1 000 ~ 2 000 mg/kg) 的饲料投喂塘虱鱼 (*Clarias batrachus*) 两周后, 鱼体的特定生长率明显增加; 但也有一些研究表明, 高剂量 Vc 对鱼体的增重率或特定生长率无显著影响^[16-18,20]。本实验在团头鲂基础日粮中添加 700 mg/kg Vc (共含 Vc 750 mg/kg) 显著提高了鱼体的增重率和特定生长率 ($P < 0.05$), 而对鱼体形体指标无影响, 这与 Wang 等^[45]在牙鲆仔鱼饲料中添加高剂量 Vc (1 500 mg/kg) 的报道一致。本实验中配伍组团头鲂的增重率、特定生长率和饵料系数均与对照组差异不显著 ($P > 0.05$), 可能与大黄素和 Vc 配伍不适当或配伍剂量过高有关, 其相互作用的机理还有待于进一步研究。

3.2 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂血液生化指标的影响

鱼类血液与机体的代谢、营养状况以及疾病等有着密切的关系, 当鱼体受到外界因子的影响而发生生理或病理变化时, 必然会在血液指标中反映出来。因此, 血液成份的变化被广泛地用来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、病理和毒理学指标^[46]。

血清总蛋白含量反应鱼体的营养和代谢状态, 也间接反映机体免疫水平的高低。刘红柏等^[47]在饲料中添加 7 种复方中草药均显著提高了施氏鲟血清总蛋白的含量; Affonso 等^[21]和李桂峰等^[48]在饲料中添加高剂量 Vc 也显著提高了鱼体血清总蛋白的含量。本实验中, 大黄素、高剂量 Vc 及其配伍都显著提高了团头鲂血清总蛋白的含量 ($P < 0.05$), 这有利于增加鱼体蛋白质的合成, 促进生长, 但配伍组未起到协同增效作用。

溶菌酶是生物体内重要的非特异性免疫因子之一, 它产生于嗜中性粒细胞和巨噬细胞, 并被分泌到血液及粘液中发挥溶菌效应^[49], 对革兰氏阳性菌有较强杀灭作用, 在补体和抗体的参与下对革兰氏阴性细菌也有杀灭作用。研究表明机体溶菌酶活性提高, 其免疫力也相应提高^[50-51]。陈孝焯等^[52]报道大黄、穿心莲、板蓝根及金银花均可提高异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 血清和体表粘液溶菌酶的活性; Xie 等^[11]研究表明, 0.5% ~ 1.0% 大黄蒽醌提取物能提高建鲤应激前血清溶菌酶活性。饲料中添加高剂量 Vc 可显著提高大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[16]头肾、点带石斑鱼 (*Epinephelus malabaricus*)^[18]和大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)^[20]血清的溶菌酶活性; 但 Kumari 等^[19]和李桂峰等^[53]报道高剂量 Vc 对鱼血清溶菌酶活性无影响。本试验中大黄素、高剂量 Vc 及其配伍均能显著提高 ($P < 0.05$) 团头鲂血清溶菌酶的活性, 但配伍组也未表现出协同增效作用。

碱性磷酸酶是生物体内的一种重要的代谢调控酶, 直接参与磷酸基团的转移和钙磷代谢, 在鱼类对营养物质的吸收与利用过程中发挥着重要作用。另外, 碱性磷酸酶能够通过改变病原体的表面结构而增强被侵袭机体对病原体的识别和吞噬能力, 有助于提高鱼的抗病力。辜玲芳等^[54]报道饲料中添加茶多酚和水飞蓟素能显著提高血清碱

性磷酸酶的活性;李桂峰等^[53]和胡斌等^[55]在饲料中添加较高剂量 Vc 也显著提高了血清碱性磷酸酶的活性。本实验中,大黄素和高剂量 Vc 均显著提高了团头鲂血清碱性磷酸酶的活性($P < 0.05$),这有助于增强机体的非特异性免疫力,但二者配伍的效果反而不佳,其原因还有待于进一步研究。

葡萄糖是许多组织的必需燃料,恒定的血糖浓度对维持鱼类正常生命活动有重要作用。本实验各组鱼的血糖水平均无显著差异($P > 0.05$),这与在饲料中添加大黄葱醌提取物^[11]或高剂量 Vc^[21]对鱼体血糖水平无影响的报道一致。周利玲等^[8]研究表明饲料中添加 80 mg/kg 大黄素能有效降低血清甘油三酯和胆固醇的水平,抑制鹌鹑(*Coturnix coturnix*)脂肪肝病变;McRae^[56]报道高剂量 Vc (500 mg/d)也能降低高血脂症患者血清甘油三酯和胆固醇的含量。本实验中,大黄素和高剂量 Vc 也均能显著降低血清甘油三酯的水平($P < 0.05$),但对胆固醇的影响不显著($P > 0.05$),二者配伍则不能明显降低血脂的水平,其原因还有待于进一步研究。

谷丙转氨酶和谷草转氨酶主要分布于肝脏和心肌等组织细胞中,在机体蛋白质代谢中起重要作用。正常情况下,血清中这些酶的活性低而且含量相对稳定,当组织发生病变或受损范围较大时,它们被释放入血液中,导致血清转氨酶活性升高。因此血清谷丙转氨酶和谷草转氨酶的活性可以用来监测鱼体的健康状况^[57-58]。本实验中,各实验组鱼体血清谷丙转氨酶和谷草转氨酶的活性无显著差异($P > 0.05$),但大黄素、高剂量 Vc 组转氨酶活性有下降的趋势,表明其对肝脏和心肌细胞有一定的保护作用。

皮质醇是鱼体在受到外界刺激后,通过下丘脑-垂体-肾间组织(HPI)轴所分泌的一种重要的应激激素,被认为是鱼类应激的灵敏信号^[59-60]。Xie 等^[11]在饲料中添 2.0% 大黄葱醌提取物能有效降低应激前建鲤血清皮质醇的含量;Mahmoud 等^[61]报道高剂量 Vc 能降低热应激肉鸡血清皮质酮的水平。本实验中,大黄素、高剂量 Vc 也能显著降低团头鲂血清皮质醇的含量($P < 0.05$),其中大黄素的效果更明显。这可能是养殖过程中不可避免地使鱼受到轻度的应激,而大黄素和高剂量 Vc 能有效缓解鱼类的应激状

态,这在鱼体生长及其它生化指标上有所体现。配伍组血清皮质醇水平与对照组差异不显著($P > 0.05$),因此该组鱼的表现也不理想。

3.3 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂肝脏抗氧化指标的影响

动物机体在新陈代谢的过程中,活性氧自由基($O_2^- \cdot$ 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 等)的产生和消除保持着一种动态平衡,过多的自由基会引起脂质过氧化反应,丙二醛(MDA)是脂质过氧化物的主要成分,具有很强的生物毒性,会破坏细胞的结构和功能^[62]。超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)等组成的抗氧化酶系统可清除过多的自由基,减少脂质的过氧化损伤^[62-63],其中 SOD 是体内以 $O_2^- \cdot$ 为惟一底物的酶类和自由基连锁反应的阻断剂,它可特异性地催化超氧化物自由基歧化为过氧化氢和氧;过氧化氢在 CAT 的作用下生成无毒性的水和氧。因此,检测动物 SOD、CAT 和 MDA 的变化能比较准确地反映机体内的抗氧化状况。

本实验中,大黄素能显著提高团头鲂肝脏 SOD 和 CAT 的活性,降低 MDA 的含量($P < 0.05$),这与中草药多糖能提高鸡抗氧化能力的报道^[64]是一致的;大黄葱醌提取物也有类似的功效,但对 CAT 活性的影响不明显^[11]。Vc 是重要的抗氧化剂,可直接或间接清除自由基,保护机体免遭过氧化物的损伤。本实验中,高剂量 Vc 显著提高了鱼体肝脏 SOD 的活性,降低 MDA 的含量($P < 0.05$),但对 CAT 活性的影响不显著($P > 0.05$),这与 Öztürk-Ürek 等^[24]和周显青等^[65]有关高剂量 Vc 对肝脏抗氧化指标的报道是基本一致的。本实验中,大黄素和高剂量 Vc 配伍后效果反而不佳,可能与二者配伍剂量过高有关,大黄素和 Vc 都有抗氧化性,二者配伍后可能在机体内形成了高浓度的抗氧化剂从而起到促氧化作用^[64],产生过多自由基会造成机体 DNA 的损伤。这与鲤鱼饲料中黄芩素添加水平过高所造成的不良影响类似^[44]。

3.4 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂感染嗜水气单胞菌后的保护作用

在本实验中,团头鲂经注射感染嗜水气单胞菌后,大黄素和高剂量 Vc 组团头鲂的成活率显著高于对照组和配伍组($P < 0.05$),这与以前的一些研究报道是一致的,如在饲料中添加大黄葱

醌提取物^[11]或高剂量 Vc^[15-16,18-20]可降低试验鱼攻毒后的死亡率,增强机体的抗病力。由于大多数鱼类特异性抗体的产生需要长期的适应并通过产生记忆而形成^[66],因此本实验中团头鲂成活率的提高,可能与大黄素、高剂量 Vc 提高了溶菌酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶等非特异性免疫酶的活性有关^[15,66]。配伍组未能有效增强鱼体的非特异性免疫力,所以成活率也不理想。

3.5 大黄素、Vc 及其配伍对团头鲂肝脏两种 HSP70s mRNA 表达水平的影响

HSP70s 是热休克蛋白家族中最保守和最重要的一族,具有分子伴侣、抗氧化、协同免疫和抗细胞凋亡等多种生物学功能,对维持细胞生存和内环境的稳定起重要作用^[25-26]。因此,通过在日粮中补充添加剂来调控机体 HSP70s mRNA 的转录或翻译水平已经成为当今研究的热点。金抗等^[67]报道大黄能增加急性肺损伤大鼠热休克蛋白 70 的表达;雷爱莹等^[68]也报道复方中草药可提高凡纳滨对虾肝脏 HSP70 基因的表达量;陈琦等^[69]和马得莹等^[70]研究发现,不同中草药可分别诱导热应激大鼠和蛋鸡肝脏 HSP70 mRNA 表达量的增加,从而增强对组织细胞的保护作用。Mahmoud 等^[61]报道,饲料中添加高剂量 Vc 会降低热应激肉鸡心肌 HSP70 的表达量,但 Khassaf 等^[71]研究发现人口服高剂量 Vc(500 mg/d)会提高其骨骼肌和淋巴细胞 HSP70 的基础表达水平,只是在淋巴细胞中升高不显著($P > 0.05$),这可能与不同物种、组织以及对 Vc 的代谢利用不同等有关。

本实验中,肝脏 Ma-HSC70 mRNA 表达水平在各组间差异不显著($P > 0.05$),这可能与组成型 HSC70 主要与细胞的分裂、增殖、发育等生理过程相关^[29-30],其在机体内的表达较稳定。肝脏 Ma-HSP70 mRNA 在 3 个试验组的表达水平均显著高于对照组($P < 0.05$),推测大黄素、高剂量 Vc 及其配伍能诱导提高 Ma-HSP70 mRNA 的基础表达水平,增加 HSP70 的合成,从而增强对机体的保护作用^[31-32],这与以上报道^[67-71]也是基本一致的,但配伍组未表现出协同增效作用。本实验中,组成型 Ma-HSC70 mRNA 水平均显著高于其诱导型 Ma-HSP70 mRNA 的水平($P < 0.05$),这与 Ming 等^[28]的报道也是一致的。

因此,在基础日粮(Vc 含量 50.3 mg/kg)中

添加大黄素 60 mg/kg 或 Vc 700 mg/kg 可促进团头鲂的生长,提高鱼体的非特异性免疫力、抗氧化能力以及 HSP70 mRNA 的基础表达水平,增强鱼体抗病原菌的感染力,对防病抗病有一定的效果。二者配伍则效果不佳,可能与二者不适合配伍或配伍剂量过高有关,其相互作用的机理还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Selye H. Stress and the general adaptation syndrome [J]. Br Med J, 1950, 1: 1383-1392.
- [2] Rotllant J, Pavlidis M, Kentouri M, et al. Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress [J]. Aquaculture, 1997, 156(3-4): 279-290.
- [3] Ndong D, Chen Y Y, Lin Y H, et al. The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2007, 22(6): 686-694.
- [4] McCormick S D, Shrimpton J M, Carey J B, et al. Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol [J]. Aquaculture, 1998, 168(1-4): 221-235.
- [5] Chang C H, Lin C C, Yang J J, et al. Anti-inflammatory effects of emodin from *Ventilago leiocarpa* [J]. Am J Chin Med, 1996, 24(2): 139-142.
- [6] Dong S S, Zhang Z G, Chen Y R, et al. Inhibition of the replication of hepatitis B virus *in vitro* by emodin [J]. Med Sci Monit, 2006, 12(9): 302-306.
- [7] Huang S S, Yeh S F, Hong C Y. Effect of anthraquinone derivatives on lipid peroxidation in rat heart mitochondria: structure activity relationship [J]. J Nat Prod, 1995, 58(9): 1365-1371.
- [8] 周利玲,舒筱灿,吴和平,等. 大黄素干预鹌鹑脂肪肝病变的效果 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(32): 57-59, F0003.
- [9] Lin C C, Chang C H, Yang J J, et al. Hepatoprotective effects of emodin from *Ventilago leiocarpa* [J]. J Ethnopharmacol, 1996, 52(2): 107-111.
- [10] 王文俊,吴咸中,姚智,等. 大黄素、丹参素对单核细胞分泌炎症细胞因子的调节 [J]. 中国免疫学杂志, 1995, 11(6): 370-372.
- [11] Xie J, Liu B, Zhou Q L, et al. Effects of

- anthraquinone extract from rhubarb *Rheum officinale* Baill on the crowding stress response and growth of common carp *Cyprinus carpio* var. *Jian* [J]. Aquaculture, 2008, 281 (1 - 4) : 5 - 11.
- [12] Wilson R P. Absence of ascorbic acid synthesis in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue catfish (*Ictalurus furcatus*) [J]. Comp Biochem Physiol B, 1973, 46 (3) : 635 - 638.
- [13] Fracalossi D M, Allen M E, Yuyama L K, *et al.* Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes [J]. Aquaculture, 2001, 192 (2 - 4) : 321 - 332.
- [14] Sakai M. Current research status of fish immunostimulants [J]. Aquaculture, 1999, 172 (1 - 2) : 63 - 92.
- [15] Navarre O, Halver J E. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C [J]. Aquaculture, 1989, 79 (1 - 4) : 207 - 221.
- [16] Waagbø R, Glette J, Raa-Nilsen E, *et al.* Dietary vitamin C immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Fish Physiol Biochem, 1993, 12 (1) : 61 - 73.
- [17] Ortuño J, Esteban M A, Meseguer J. Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunol, 1999, 9 (5) : 429 - 443.
- [18] Lin M F, Shiao S Y. Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus* [J]. Aquaculture, 2005, 244 (1 - 4) : 215 - 221.
- [19] Kumari J, Sahoo P K. High dietary vitamin C affects growth, non-specific immune responses and disease resistance in Asian catfish, *Clarias batrachus* [J]. Mol Cell Biochem, 2005, 280 (1 - 2) : 25 - 33.
- [20] Ai Q H, Mai K S, Tan B P, *et al.* Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. Aquaculture, 2006, 261 (1) : 327 - 336.
- [21] Affonso E G, Silva Eda C, Tavares-Dias M, *et al.* Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*) [J]. Comp Biochem Physiol A, 2007, 147 (2) : 383 - 388.
- [22] 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.
- [23] Sakakura Y, Koshio S, Iida Y, *et al.* Dietary vitamin C improves the quality of yellow tail (*Seriola quinqueradiata*) seedlings [J]. Aquaculture, 1998, 161 (1 - 4) : 427 - 436.
- [24] Öztürk-Ürek R, Bozkaya L A, Tarhan L. The effects of some antioxidant vitamin-and trace element-supplemented diets on activities of SOD, CAT, GSH-Px and LPO levels in chicken tissues [J]. Cell Biochem Funct, 2001, 19 (2) : 125 - 132.
- [25] Kiang J G, Tsokos G C. Heat shock protein 70 kDa: Molecular biology, biochemistry and physiology [J]. Pharmacol Ther, 1998, 80 (2) : 183 - 201.
- [26] Sørensen J G, Kristensen T N, Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins [J]. Ecol Lett, 2003, 6 (11) : 1025 - 1037.
- [27] Basu N, Todgham A E, Ackerman P A, *et al.* Heat shock protein genes and their functional significance in fish [J]. Gene, 2002, 295 (2) : 173 - 183.
- [28] Ming J H, Xie J, Xu P, *et al.* Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2010, 28 (3) : 407 - 418.
- [29] Park J H, Lee J J, Yoon S, *et al.* Genomic cloning of the Hsc71 gene in the hermaphroditic teleost *Rivulus marmoratus* and analysis of its expression in skeletal muscle: identification of a novel muscle-preferred regulatory element [J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29 (14) : 3041 - 3050.
- [30] Kregel K C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance [J]. J Appl Physiol, 2002, 92 (5) : 2177 - 2186.
- [31] Baler R, Dahl G, Voellmy R. Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1 [J]. Mol Cell Biol, 1993, 13 (4) : 2486 - 2496.
- [32] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology [J]. Annu Rev Physiol, 1999, 61 (1) : 243 - 282.
- [33] 李爱杰. 水产动物营养与饲料学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 55.
- [34] Steffens W. Principles of fish nutrition [M]. New York: Ellis Horwood Press, 1989: 256 - 258.
- [35] 王文博, 汪建国, 李爱华, 等. 拥挤胁迫后鲫鱼血液

- 皮质醇和溶菌酶水平的变化及对病原的敏感性 [J]. 中国水产科学, 2004, 11(5): 408-412.
- [36] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. *Biol Chem*, 1951, 193(1): 265-275.
- [37] Yin G J, Jeney G, Racz T, *et al.* Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *Aquaculture*, 2006, 253(1-4): 39-47.
- [38] Brock P, Eldred E W, Woiszwilllo J E, *et al.* Direct solid-phase 125I radioimmunoassay of serum cortisol [J]. *Clin Chem*, 1978, 24(9): 1595-1598.
- [39] Granelli K, Björck L, Appelgvist L A. The variation of superoxide dismutase (SOD) and xanthine oxidase (XD) activities in milk using an improved method to quantitate SOD activity [J]. *J Sci Food Agric*, 1995, 67(1): 85-91.
- [40] Sinha A K. Colorimetric assay of catalase [J]. *Anal Biochem*, 1972, 47(2): 389-394.
- [41] Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test [J]. *Anal Biochem*, 1978, 86(1): 271-278.
- [42] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [43] 程志斌, 葛长荣, 韩剑众. 中草药有效成分对动物免疫功能的影响及其应用 [J]. *动物科学与动物医学*, 2002, 19(1): 1-3.
- [44] 吉红, 曹福余, 于海森. 黄芩素对鲤鱼健康及生长的影响 [J]. *安徽农业大学学报*, 2008, 35(4): 535-539.
- [45] Wang X J, Kim K W, Bai S C. Effects of different dietary levels of L-ascorbyl-2-polyphosphate on growth and tissue vitamin C concentrations in juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel) [J]. *Aquac Res*, 2002, 33(4): 261-267.
- [46] 周玉, 郭文场, 杨振国, 等. 鱼类血液指标的研究进展 [J]. *上海水产大学学报*, 2001, 10(2): 163-165.
- [47] 刘红柏, 黄江, 马爱枝, 等. 中草药复方添加剂对施氏鲟生长及血液生化指标的影响 [J]. *水产学杂志*, 2009, 22(3): 14-18.
- [48] 李桂峰, 钱沛锋, 孙际佳, 等. 维生素 C 对胡子鲶 *Claris fuscus* 细胞活性和血清因子的影响 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2005, 44(5): 75-83.
- [49] Möck A, Peters G. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution [J]. *J Fish Biol*, 1990, 37(6): 873-885.
- [50] Haug T, Kjuul A K, Stensvåg K *et al.* Antibacterial activity in four marine crustacean decapods [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2002, 12(5): 371-385.
- [51] Rojtinakem J, Hirono I, Itami T. Gene expression in haemocytes of Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response infection with WSSV by KST approach [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2002, 13(1): 69-83.
- [52] 陈孝煊, 吴志新, 殷居易, 等. 大黄、穿心莲、板蓝根和金银花对异育银鲫免疫机能的影响 [J]. *中国水产科学*, 2003, 10(1): 36-40.
- [53] 李桂峰, 钱沛锋, 孙际佳, 等. 维生素 C 对胡子鲶血清免疫相关酶活性的影响 [J]. *大连水产学院学报*, 2004, 19(4): 301-305.
- [54] 辜玲芳, 侯永清, 丁斌鹰, 等. 几种植物提取物对异育银鲫生长性能和血液生化指标的影响 [J]. *淡水渔业*, 2008, 38(2): 23-26.
- [55] 胡斌, 李小勤, 冷向军, 等. 饲料 Vc 对草鱼生长、肌肉品质及非特异性免疫的影响 [J]. *中国水产科学*, 2008, 15(5): 794-800.
- [56] McRae M P. Vitamin C supplementation lowers serum low-density lipoprotein cholesterol and triglycerides: a meta-analysis of 13 randomized controlled trials [J]. *J Chiropr Med*, 2008, 7(2): 48-58.
- [57] Shimeno S, Shikata T, Hosokawa H, *et al.* Metabolic response to feeding rates in common carp, *Cyprinus carpio* [J]. *Aquaculture*, 1997, 151(1-4): 371-377.
- [58] Wang Y, Xiong L, Yang K J, *et al.* Effect of beta-cypermethrin on GPT and GOT activities of crucian serum [J]. *Agric Sci & Technol*, 2005, 6(1): 20-23.
- [59] Bernier N J, Peter R E. The hypothalamic-pituitary-interrenal axis and the control of food intake in teleost fish [J]. *Comp Biochem Physiol B*, 2001, 129(2-3): 639-644.
- [60] Mommsen T P, Vijayan M M, Moon T W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation [J]. *Rev Fish Biol Fisher*, 1999, 9(3): 211-268.
- [61] Mahmoud K Z, Edens F W, Eisen E J, *et al.* Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and

- plasma corticosterone response in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress[J]. *Comp Biochem Physiol B*, 2004, 137(1):35-42.
- [62] Freeman B A, Crapo J D. Biology of disease: Free radicals and tissue injury [J]. *Lab Invest*, 1982, 47(5):412-426.
- [63] Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants [J]. *Exp Physiol*, 1997, 82(2):291-295.
- [64] 徐小芳, 罗燕, 赵民, 等. 中药复方多糖对鸡抗氧化功能的影响 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42(2):706-713.
- [65] 周显青, 李胜利, 王晓辉, 等. 维生素 C 多聚磷酸酯对小鼠肝脏脂质过氧化物和抗氧化酶的影响 [J]. *动物学报*, 2004, 50(3):370-374.
- [66] Anderson D P. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carrier in fish: application to aquaculture [J]. *Annu Rev Fish Dis*, 1992, 2:281-307.
- [67] 金抗, 于东云, 由田. 大黄对急性肺损伤大鼠热休克蛋白 70 表达的影响 [J]. *中国急救医学*, 2007, 27(9):827-829.
- [68] 雷爱莹, 曾地刚. 复方中草药对凡纳滨对虾热应激蛋白 70 基因表达的影响 [J]. *广西农业科学*, 2008, 39(6):830-833.
- [69] 陈琦, 华修国, 顾晓峰, 等. 复方中草药对大鼠热应激蛋白 70 mRNA 的表达影响 [J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2006, 24(1):61-64.
- [70] 马得莹, 单安山. 几种中草药抗蛋鸡热应激作用分子机制的初步研究 [J]. *动物营养学报*, 2007, 19(3):283-288.
- [71] Khassaf M, McArdle A, Esanu C, *et al.* Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle [J]. *J Physiol*, 2003, 549(2):645-652.

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*)

MING Jian-hua^{1,2}, XIE Jun^{2*}, XU Pao^{2*}, LIU Wen-bin³, GE Xian-ping²,
LIU Bo², HE Yi-jin², ZHOU Qun-lan², XI Bing-wen², PAN Liang-kun²

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

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

3. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The study aims to evaluate the effects of dietary emodin, high-dose vitamin C (Vc) and their combination on growth, non-specific immunity and resistance to pathogens of Wuchang bream, *Megalobrama amblycephala*. 1200 healthy fish with initial body weight (133.44 ± 2.11) g were selected and randomly divided into four groups: one control and three tested. The control group was fed with basal diet (Vc content 50.3 mg/kg, with L-ascorbyl-2-polyphosphate as source). The three tested groups were fed with basal diets supplemented with 60 mg/kg emodin, 700 mg/kg Vc, and 60 mg/kg emodin + Vc 700 mg/kg, respectively. Fish were fed twice daily (8:30 and 16:30) at a feeding rate of 2%–4% body weight. After 60 days feeding, the growth performance, muscle composition, biochemical parameters of serum and liver, the mRNA levels of two heat shock protein 70s (HSP70s), and survival rates after being infected with *Aeromonas hydrophila* were investigated. The results showed that compared with the control, the weight gain and specific growth rates, the levels of total protein (TP), lysozyme (LSZ) and the alkaline phosphatase (AKP) in serum, the activity of superoxide dismutase (SOD) and basal expression level of inducible HSP70 mRNA in liver were significantly improved ($P < 0.05$), while feed coefficient, mortality, the contents of serum cortisol (COR) and triglycerides (TG), and liver malondialdehyde (MDA) were reduced ($P < 0.05$) in emodin and Vc groups. Although the serum TP, LSZ levels, and the mRNA level of liver HSP70 increased significantly ($P < 0.05$), and the liver MDA content also significantly decreased ($P < 0.05$) in combination group, the synergism didn't appear, and other indices were not significantly different ($P > 0.05$) from the control. In addition, the liver catalase (CAT) activity was also significantly improved in emodin group compared with the control ($P < 0.05$), while the CAT activities in Vc and combination groups were not significantly different from the control ($P > 0.05$). Other indices, such as serum glucose (GLU), glutamic-pyruvic transaminase (GPT), glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT), cholesterol (CHOL), the mRNA level of liver constitutive HSC70, the fish body indices, and muscle composition were not significantly different between groups ($P > 0.05$). The challenge experiment with *A. hydrophila* showed that compared with the control the survival rates in emodin and Vc groups significantly increased ($P < 0.05$) whereas the survival rate in combination group had no significant difference ($P > 0.05$). These results indicate that the basal diets supplemented with emodin 60 mg/kg or Vc 700 mg/kg could promote the growth of fish, improve the non-specific immunity, antioxidation capacity, and the basal expression level of HSP70 mRNA, and enhance disease resistance. However, the combination of emodin and high-dose Vc showed no better effect, and the mechanism of their interaction remains to be further studied.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; emodin; vitamin C; growth; HSP70s mRNA expression

Corresponding author: XIE Jun. E-mail: xiej@ffrc.cn; XU Pao. E-mail: xup@ffrc.cn