

## 维生素C对急性低温胁迫下珍珠龙胆石斑鱼 HPI轴及生理生化的调控

郝甜甜<sup>1,2</sup>, 王丽丽<sup>3</sup>, 王际英<sup>1\*</sup>, 李宝山<sup>1</sup>, 马晶晶<sup>1</sup>,  
王世信<sup>1</sup>, 张燕<sup>3</sup>, 谭青<sup>3</sup>, 张利民<sup>1</sup>

(1. 山东省海洋资源与环境研究院山东省海洋生态修复重点实验室, 山东烟台 264006;

2. 山东升索渔用饲料研究中心, 山东烟台 265500;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 为初步探讨急性低温胁迫下饲料中添加维生素C (VC)对珍珠龙胆石斑幼鱼HPI(下丘脑—垂体—肾间组织)轴及相关生理生化指标的调控作用, 以初始体质量为(50.40±0.4) g的珍珠龙胆石斑鱼幼鱼为研究对象, 配制VC含量分别为0、38、76、152、304 mg/kg的5组等氮等能的实验饲料, 在养殖12周后进行急性低温(17 °C)胁迫实验。结果显示, D38组增重率显著高于D152和D304组。不同水平VC对幼鱼生长无显著作用; 不同水平VC对脑促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)、血清中促肾上腺皮质激素(ACTH)、肾上腺素(EPI)和皮质醇(cortisol)浓度均无显著性变化; D0和D38组皮质醇浓度应激后均显著高于应激前。血清T3浓度随VC水平增加呈上升趋势; T4浓度不受VC水平的影响。各组T3、T4浓度在应激前后无显著差异; 血清TSH浓度随VC水平增加呈先上升后下降的趋势; 应激后各组TSH浓度均显著高于应激前。各组间肝脏GCK和HK浓度均不受VC水平影响, 除D76组外, 其他各组应激后GCK浓度均显著低于应激前; D76组HK浓度应激前后差异显著。急性低温胁迫后, 各组肝脏PEPCK浓度均低于应激前, 其中D38和D304组应激前后差异显著。研究表明, 饲料中添加VC对急性低温胁迫下珍珠龙胆石斑鱼HPI轴相关激素酶活性可进行调控, 并对鱼体甲状腺体具有一定保护作用, 使胁迫后的鱼体达到生理稳态平衡, 增强鱼体耐受性。

**关键词:** 珍珠龙胆石斑鱼; 维生素C; 急性低温胁迫; HPI轴

**中图分类号:** S 963.73

**文献标志码:** A

维生素C是一种广泛的生理和免疫调节营养因子, 对鱼类养殖中的拥挤胁迫、酸应激胁迫等具有重要的影响<sup>[1]</sup>。硬骨鱼的下丘脑—垂体—肾间组织(hypothalamic-pituitary-interrenal, HPI)在应激调节过程中占主导地位<sup>[2-3]</sup>。鱼体受到环境因子刺激后, 下丘脑可分泌促肾上腺皮质激素释放激素(corticotrophin releasing hormone, CRH), 传递至脑下腺, 垂体前叶受到CRH调节,

将分泌促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH), 传递到肾间组织, 产生皮质类固醇释放至血液中<sup>[4]</sup>。

珍珠龙胆石斑鱼由鞍带石斑鱼(*Epinephelus lanceolatus*♂)和棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀)杂交而来, 具有生长快、抗病强、经济价值高等特点, 现已在北方成功繁殖育苗, 形成规模化养殖。但北方冬季常遭遇低温冰冻

收稿日期: 2016-02-29 修回日期: 2016-09-12

资助项目: 国家海洋生物产业水生动物营养与饲料研发创新示范平台(201601003); 山东省科技发展计划(2014GHY115006); 山东省自然科学基金青年基金(ZR2015CQ023); 山东省优秀中青年科学家奖励基金(BS2013HZ018)

通信作者: 王际英, E-mail: ytwjy@126.com

灾害, 水温骤降, 一些过度急性的变化可能会引发机体正常生理功能和行为的紊乱, 导致鱼体无法正常启动适应性应激反应, 大大降低鱼类成活率<sup>[5]</sup>, 给养殖户带来严重的经济损失。近年来, 通过营养学调控理论, 提高水生动物抗应激能力, 缓解外界环境带来的胁迫影响越来越受到关注, 这也是养殖业的可持续发展需求。李淑云等<sup>[6]</sup>研究表明, 代谢调节中最原始也最基本的方式就是酶含量和酶活性的调节。因此, 本实验拟采取急性低温胁迫作为实验应激处理方式, 主要评估维生素C在急性低温下对幼鱼HPI轴及相关激素的调控来达到缓解应激的作用, 对有效调节与缓解其他一些珍贵鱼类的低温胁迫等也具有实际意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验饲料

以鱼粉和酪蛋白为主要蛋白源, 鱼油为主要脂肪源, 配制包膜维生素C含量分别为0、38、76、152、304 mg/kg的5组等氮等能的实验饲料(粗蛋白为47.5%, 粗脂肪为9.0%, 维生素C实测值分别为0.2、39.4、78.6、161.8、315.7 mg/kg), 分别命名为D0、D38、D76、D152、D304组, D0组为对照组, 饲料配方见表1。所有饲料原料过80目筛, 按饲料配方逐级扩大混匀, 经螺旋挤压机加工成粒径分别为2和2.5 mm的硬颗粒饲料, 自然风干后放入-20 °C备用。

### 1.2 实验设计与养殖管理

养殖实验在山东省海洋资源与环境研究院东营实验基地海水循环养殖系统中进行。实验鱼用对照组饲料暂养2周, 循环水养殖, 连续充气, 自然光照周期。实验共用体质健康、规格整齐的珍珠龙胆石斑鱼幼鱼750尾[初始体质量为(50.40±0.4) g], 共5组, 每组维生素C水平设置3个平行, 每天投喂两次(08:00、17:00), 日投喂量为鱼体质量的1.5%~2%, 据摄食情况调整投喂量。养殖实验周期为12周, 养殖期间控制水温(27±1) °C, 溶解氧>6 mg/L, pH7.6~8.2, 盐度28~32, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N<0.1 mg/L, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N<0.1 mg/L。

在急性低温胁迫之前先进行预实验, 采用加冰调节温度的方式进行急性降温。预实验结果表明幼鱼在25~28 °C, 表现为正常活跃; 18~24 °C

不活跃; 13~17 °C表现为静止, 低于13 °C表现为失去平衡。因此, 本实验将胁迫温度定为17 °C。

### 1.3 样品采集与处理

**样品采集** 饲养结束后, 禁食24 h, 每桶选择体格基本一致的20尾鱼进行MS-222麻醉, 冰盘上操作, 尾静脉采血, 4 °C静置4 h以上, 4000 r/min离心取血清; 另外, 将鱼解剖, 取脑和肝脏液氮速冻后, 于-70 °C保存待测。

饲养结束后, 禁食24 h, 每桶选择体格基本一致的20尾鱼进行急性低温(17 °C)胁迫试验。胁迫期间控制水温(17±0.5) °C, 保证溶解氧充足, 2 h后取样。应激采样时, 将鱼迅速捞起并立即放入添加MS-222麻醉剂的17 °C冰水中深度麻醉, 取样操作同上。

**样品处理与测定指标和方法** 养殖实验开始和结束时分别对各桶鱼称重。

增重率(weight gain, WG)=(终末体质量-初始体质量)×100/初始体质量

分别取脑和肝脏组织, 称重, 剪碎, 加入9倍预冷PBS, 分别制成10%匀浆, 在4 °C下4000 r/min离心15 min, 取上清液分装, 4 °C保存、待测。

采用双抗体夹心法测定脑组织中的促肾上腺皮质激素释放因子(corticotropin releasing factor, CRF); 肝脏已糖激酶(hexokinase, HK)、葡萄糖激酶(glucokinase, GCK)、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)酶均采用上海酶联免疫试剂盒测定, 血清T3、T4、促甲状腺素(hormothyrin, TSH)采用双抗体夹心法测定; 血清促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、肾上腺素(epinephrine, EPI)、皮质醇(cortisol)均采用上海酶联免疫试剂盒测定。

### 1.4 数据统计

数据采用EXCEL 2007和SPSS 17.0软件进行One-Way ANOVA和Duncan氏多重比较, 以P<0.05作为差异显著的标准。数据分析前均进行方差齐性检验。数值均采用平均值±标准差(mean±SD)表示。t-检验检测急性低温胁迫前后的变化。

## 2 结果

### 2.1 维生素C水平对急性低温下珍珠龙胆石斑鱼生长作用

饲料维生素C对珍珠龙胆石斑鱼增重率见图1。

表1 饲料配方及营养成分分析

Tab. 1 Formulation and nutrient compositions of the experimental diets

原料/% ingredient	组别 groups				
	D0	D38	D76	D152	D304
鱼粉 fish meal	45	45	45	45	45
酪蛋白 casein	18	18	18	18	18
淀粉 starch	5	5	5	5	5
$\alpha$ -淀粉 $\alpha$ -starch	12	12	12	12	12
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	9.15	9.1462	9.1424	9.1348	9.1196
鱼油 fish oil	6	6	6	6	6
氯化胆碱 choline chloride	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
维生素预混料(无维生素C) vitamin mixture (without VC) <sup>a</sup>	2	2	2	2	2
复合矿物质 mineral mixture <sup>b</sup>	1	1	1	1	1
维生素C vitamin C	0	0.0038	0.0076	0.0152	0.0304
磷酸二氢钙 Ca (H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
甜菜碱 betaine	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
抗氧化剂 antioxidant	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
粘合剂 binde	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
合计	100	100	100	100	100
<b>营养组成/% nutrient composition</b>					
粗蛋白 crude protein	47.81	47.58	47.86	47.38	47.51
粗脂肪 crude lipid	9.03	9.11	9.24	9.18	9.07
粗灰分 crude ash	10.04	10.14	9.95	9.98	9.89
<b>总能量/(kJ/g) gross energy</b>	<b>20.58</b>	<b>20.58</b>	<b>20.3</b>	<b>20.6</b>	<b>20.58</b>

注: <sup>a</sup>维生素预混料(mg/kg饲料): 维生素A, 38;  $\alpha$ -生育酚, 210.0; 维生素D<sub>3</sub>, 13.2; 硫酸素, 115.0; 核黄素, 380.0; 盐酸吡哆醇, 88.0; 泛酸, 368.0; 烟酸, 1030.0; 生物素, 10.0; 叶酸, 20.0, 维生素B<sub>12</sub>, 1.3; 肌醇, 4 000.0;

<sup>b</sup>复合矿物质(mg/kg饲料): MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3568.0, 3020.5; KAl (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 8.3; CoCl<sub>2</sub>, 28.0; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 353.0; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 9.0; KI, 7.0; MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O, 63.1; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 1.5; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe·5H<sub>2</sub>O, 1533.0; NaCl, 100.0; NaF, 4.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 25 568.0; Ca-lactate, 15 968.0

Notes: <sup>a</sup>One kilogram of vitamin premix contained the following: retinol acetate 38.0, alpha-tocopherol 210.0, cholecalciferol 13.2, thiamin 115.0, riboflavin 380.0, pyridoxine HCl 88.0, pantothenic acid 368.0, niacin acid 1030.0, biotin 10.0, folic acid 20.0, vitamin B<sub>12</sub>1.3, inositol 4000.0

<sup>b</sup>One kilogram of mineral premix contained the following: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3568.0, KCl 3020.5, KAl (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 8.3, CoCl<sub>2</sub> 28.0, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 353.0, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 9.0, KI 7.0, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 63.1, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 1.5, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe·5H<sub>2</sub>O 1533.0, NaCl 100.0, NaF 4.0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 25 568.0, Ca-lactate 15 968.0

D38组WG显著高于D152、D304组( $P<0.05$ ), 与D0和D76组无显著差异( $P>0.05$ )。

## 2.2 维生素C对急性低温胁迫下珍珠龙胆石斑鱼HPI轴激素酶活性的调控作用

急性低温胁迫前, 后脑中CRF浓度为130~138 ng/L, 各组之间无显著差异( $P>0.05$ )。急性低温胁迫后, 各组CRF浓度与应激前相比, 有上升

趋势; CRF浓度在D304组达到最高值并显著高于前四组; D304组急性低温胁迫前后CRF浓度差异显著( $P<0.05$ )(图2)。

急性低温胁迫前, 血清中ACTH浓度各组无显著差异( $P>0.05$ )。急性低温胁迫后, 血清ACTH呈下降趋势, 在D304组达到最低值0.38 ng/L, 显著低于其他各组( $P<0.05$ ); 前四组之间无显著差异( $P>0.05$ )。各组血清ACTH浓度应激前后无显

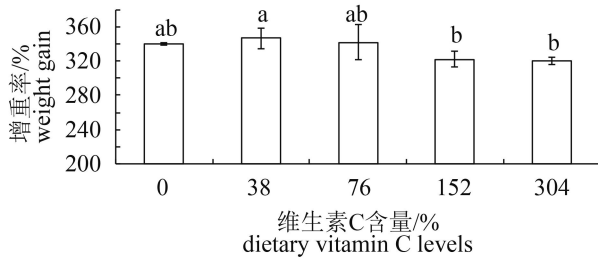


图1 饲料维生素C水平对珍珠龙胆石斑鱼生长的影响

不同大、小写字母分别表示经急性低温胁迫后各组间差异显著 (Duncan氏多重比较,  $P < 0.05$ ), 下同

Fig. 1 Effects of dietary supplementation VC on growth of juvenile hybrid grouper

The values with different capita Ls and lowercases are significantly different among different groups treated with acute low temperature stress ( $P < 0.05$ ), the same below

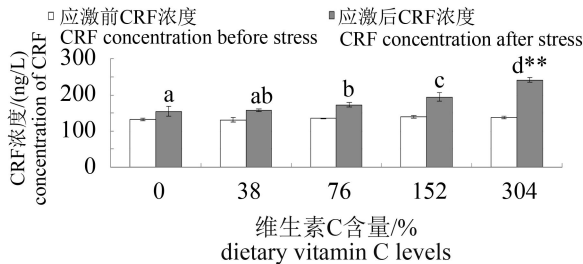


图2 饲料维生素C水平对急性低温胁迫前后珍珠龙胆石斑鱼CRF浓度的影响

\*表示急性低温胁迫前后各组数值之间的比较(配对样本t检验,  $P < 0.05$ ), 下同

Fig. 2 Effects of dietary supplementation VC on CRF content of juvenile hybrid grouper

Significant differences ( $P < 0.05$ ) between values obtained before and after stress are marked by asterisks in paired-samples *t*-tests, the same below

著差异( $P > 0.05$ )(图3)。

急性低温胁迫前, 随着饲料维生素C水平的增加, EPI浓度有降低趋势, 但各组之间无显著差异( $P > 0.05$ )(图4)。急性低温胁迫后, EPI浓度在D304组显著低于前四组( $P < 0.05$ )。D0~D152组之间无显著差异( $P > 0.05$ )。各组血清EPI浓度应激前后无显著差异( $P > 0.05$ )。

在急性低温胁迫之前, 随着饲料维生素C水平的增加, 血清皮质醇浓度呈先下降后平稳趋势, 在D304组达到最低值, 各组之间无显著性差异( $P > 0.05$ )(图5)。急性低温胁迫之后, 血清皮质醇浓度呈下降趋势, 在D304组达到最低值显

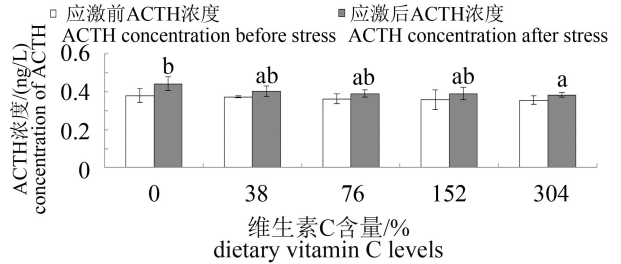


图3 饲料维生素C水平对急性低温胁迫前后珍珠龙胆石斑鱼ACTH浓度的影响

Fig. 3 Effects of dietary supplementation VC on ACTH content of juvenile hybrid grouper

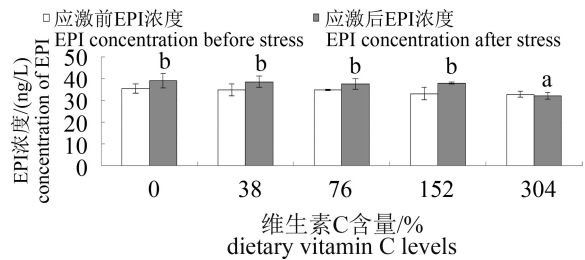


图4 饲料维生素C水平对急性低温胁迫前后珍珠龙胆石斑鱼EPI浓度的影响

Fig. 4 Effects of dietary supplementation VC on EPI content of juvenile hybrid grouper

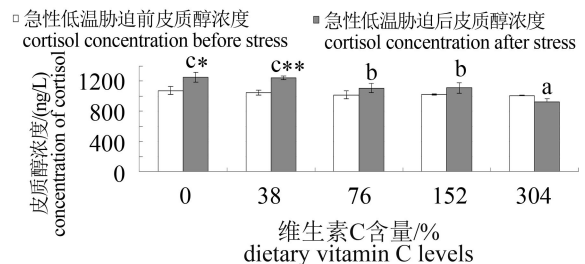


图5 饲料维生素C水平对急性低温胁迫前后珍珠龙胆石斑鱼皮质醇浓度的影响

Fig. 5 Effects of dietary supplementation VC on cortisol content of juvenile hybrid grouper

著低于前四组( $P < 0.05$ ); D76和D152组之间无显著差异( $P > 0.05$ ), 但均显著低于D0和D38组( $P < 0.05$ ); D0和D38组皮质醇浓度应激后均显著高于应激前( $P < 0.05$ )。

### 2.3 维生素C对急性低温胁迫下珍珠龙胆石斑鱼生理生化指标的调控作用

在急性低温胁迫之前, 随着饲料维生素C水平的增加, T3浓度呈上升趋势, D152和D304组

显著高于D0组( $P<0.05$ ), 前三组之间无显著差异( $P>0.05$ )(图6)。急性低温胁迫之后, 各组间T3浓度变化趋势与应激前一致, 呈上升趋势, 在D304组达到峰值, D38~D304组T3浓度显著高于D0组( $P<0.05$ )。各组血清T3浓度应激前后无显著差异( $P>0.05$ )。

各组间血清T4浓度在急性低温胁迫之前无显著差异( $P>0.05$ ); 急性低温胁迫之后, 前四组T4浓度呈平稳状态, 无显著差异( $P>0.05$ ), 但在D304组显著升高, 与前四组差异显著( $P<0.05$ )。各组血清T4浓度应激前后无显著差异( $P>0.05$ )(图7)。

饲料中添加维生素C对珍珠龙胆石斑幼鱼血清促甲状腺激素具有一定的影响。随着饲料中维生素C水平的增加, TSH浓度呈先上升后下降的趋势, 在D76组达到最高值显著高于D0、D38和D304组( $P<0.05$ ), 与D152组无显著差异( $P>0.05$ )(图8)。急性低温胁迫之后, 各组间血清TSH浓度呈上升趋势, D38~D304组显著高于D0组( $P<0.05$ ), D38~D304组之间无显著差异( $P>0.05$ )。急性低温胁迫之后, 各组TSH浓度均显著高于应激前( $P<0.05$ )。

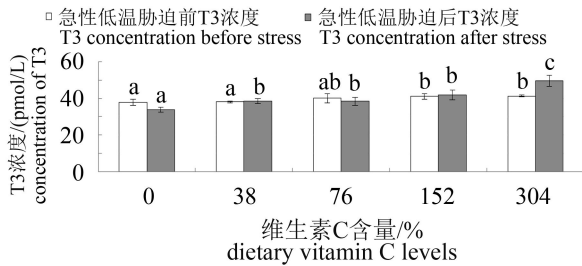


图6 饲料维生素C水平对急性低温胁迫前后珍珠龙胆石斑鱼T3浓度的影响

Fig. 6 Effects of dietary supplementation VC on T3 content of juvenile hybrid grouper

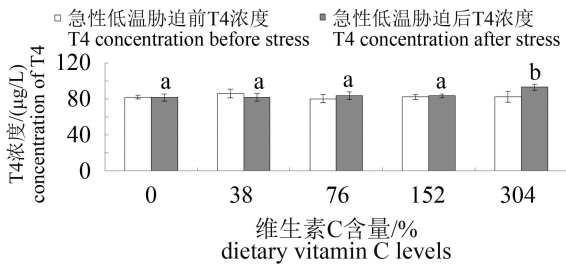


图7 饲料维生素C水平对急性低温胁迫前后珍珠龙胆石斑鱼T4浓度的影响

Fig. 7 Effects of dietary supplementation VC on T4 content of juvenile hybrid grouper

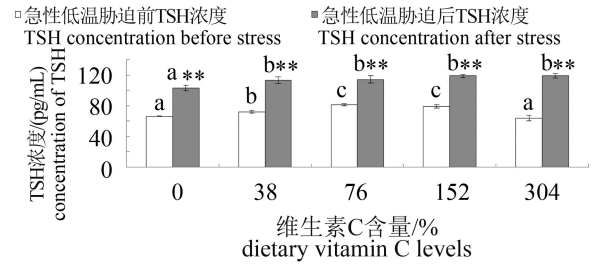


图8 饲料维生素C水平对急性低温胁迫前后珍珠龙胆石斑鱼TSH浓度的影响

Fig. 8 Effects of dietary supplementation VC on TSH content of juvenile hybrid grouper

急性低温胁迫前, 饲料中维生素C水平对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼血清GCK浓度无显著影响( $P>0.05$ )(图9)。急性低温胁迫后, 血清GCK浓度随饲料维生素C水平的升高而降低, 在D304组达到最低值显著低于其他各组( $P<0.05$ )。除D76组外, 其他各组应激后GCK浓度均显著低于应激前( $P<0.05$ )。

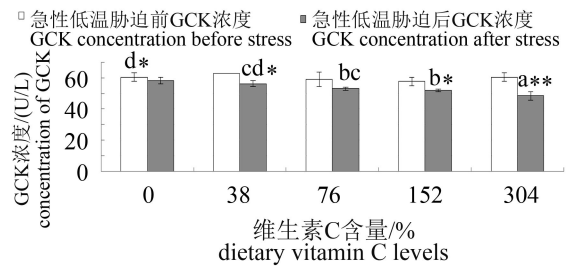


图9 饲料维生素C水平对急性低温胁迫前后珍珠龙胆石斑鱼GCK浓度的影响

Fig. 9 Effects of dietary supplementation VC on GCK content of juvenile hybrid grouper

饲料中维生素C对珍珠龙胆石斑鱼幼鱼血清HK浓度无显著影响( $P>0.05$ )。急性低温胁迫之后, 血清HK浓度呈先下降后上升趋势, 在D76组达到最低值显著低于D0、D152和D304组( $P<0.05$ ), 与D38组无显著差异( $P>0.05$ )(图10)。急性低温胁迫后, D0组HK浓度显著高于应激前( $P<0.05$ ); D38~D76应激后与应激前相比, 均低于应激前, 但D38组应激前后无显著差异( $P>0.05$ ), D76组应激前后差异显著( $P<0.05$ )。D152~D304组应激前后HK浓度无显著性差异( $P>0.05$ )。

珍珠龙胆石斑幼鱼血清PEPCK浓度随维生素C水平增加呈上升趋势, 在D304组达到最高值, 显著高于D0组( $P<0.05$ )。急性低温胁迫后,

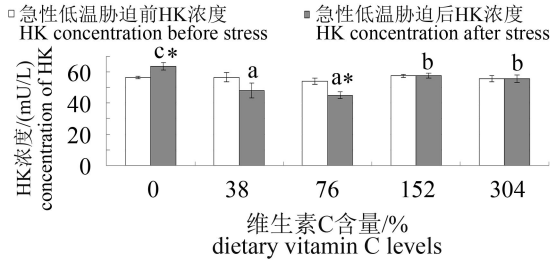


图 10 饲料维生素C水平对急性低温胁迫前后珍珠龙胆石斑鱼HK浓度的影响

Fig. 10 Effects of dietary supplementation VC on HK content of juvenile hybrid grouper

血清PEPCK浓度随饲料维生素C水平增加呈下降趋势, 在D76~D304组显著低于D0组(P<0.05), D38组与其他各组无显著性差异(P>0.05)。急性低温胁迫后, 各组PEPCK浓度均低于应激前, 其中D38和D304组应激前后差异显著(P<0.05)(图11)。

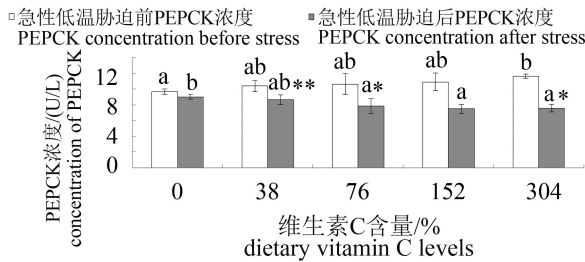


图 11 饲料维生素C水平对急性低温胁迫前后珍珠龙胆石斑鱼PEPCK浓度的影响

Fig. 11 Effects of dietary supplementation VC on PEPCK content of juvenile hybrid grouper

### 3 讨论

#### 3.1 维生素C对珍珠龙胆石斑鱼生长的影响

本实验结果表明, 饲料中添加VC对珍珠龙胆石斑幼鱼生长具有一定作用, 但过量添加VC对其生长具有抑制作用, 这一结果同周歧存等<sup>[1]</sup>对点带石斑鱼(*E. coioides*)的研究结论一致, 然而Wang等<sup>[7]</sup>在许氏平鲈(*Sebastes schlegeli*)的研究中表明, 鱼体增重率随维生素C的添加水平增加而显著升高, 这可能是与VC添加形式不同或者是由不同鱼类对VC的代谢不同造成的差异<sup>[1, 8]</sup>。

#### 3.2 维生素C对急性低温胁迫下珍珠龙胆石斑鱼HPI轴激素水平的调控

本实验中, VC对CRF、ACTH、EPI和皮质

醇浓度均无显著影响, Liu<sup>[9]</sup>和万金娟<sup>[10]</sup>也表明, 饲料中添加VC对血清皮质醇浓度无显著影响, 这表明在适宜养殖条件下, HPI轴相关激素水平在机体内环境中处于稳态平衡过程。低温胁迫2h后, 脑中CRF浓度随VC水平增加呈上升趋势, 表明VC的添加增加了机体对HPI轴CFR的上调作用; 血清ACTH和皮质醇浓度均呈下降趋势, 推测原因是下丘脑神经分泌机制较复杂, ACTH并不只受CFR的影响, VC有可能通过一些调节肽对ACTH有抑制作用, 降低了血清中皮质醇浓度<sup>[11]</sup>。这说明VC可增强幼鱼抗急性低温胁迫能力, 这与VC调节青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)<sup>[12]</sup>、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)<sup>[13]</sup>等受胁迫后的研究结果相似。EPI也可作为急性胁迫下鱼体应激灵敏指标<sup>[14]</sup>。本实验中, 低温胁迫2h后, D304组EPI浓度显著低于对照组, 原因可能是在高水平VC下可通过调节肾上腺素浓度来降低能量损耗<sup>[15]</sup>, 缓解应激胁迫。

#### 3.3 维生素C在急性低温胁迫下对珍珠龙胆石斑鱼生理生化指标的调控影响

急性低温胁迫后, 甲状腺腺体萎缩变小, 分泌机能减弱, 这主要是鱼体为了降低胁迫后机体能量损耗, 维持生理机能的一种体现<sup>[16]</sup>。本实验结果表明, 急性低温胁迫后, 随着VC水平的增加, T3和T4含量呈上升趋势, 表明能够进入组织发挥生物学功能的甲状腺激素水平相对升高, 可能原因是VC调控胁迫后鱼体生理变化, 通过对甲状腺摄碘、甲状腺过氧化酶或5-脱点酶的活性来增加甲状腺的合成, 从而增加T3和T4含量<sup>[17]</sup>, 也有可能是VC影响了甲状腺激素所调控的关键过程如能量代谢<sup>[18]</sup>。本实验结果说明, VC的添加使鱼体在受到急性低温胁迫时保护了甲状腺, 通过甲状腺激素的分泌增加机体供热, 延缓了应激胁迫。

促甲状腺激素是种糖蛋白激素, 其主要作用是促进甲状腺的生长和合成, 释放甲状腺激素<sup>[19-21]</sup>。本实验中, 随着饲料VC水平增加, TSH浓度呈先上升后下降趋势, 表明VC水平为38~152 mg/kg时, 可能对中枢释放不同调节肽, 并对垂体合成和分泌TSH具有促进作用<sup>[22]</sup>, 从而导致TSH含量增多。T3和T4浓度有上升趋势, 表明饲料中VC可通过调节TSH进而促进甲状腺的功能<sup>[23]</sup>; 但在D304组却表现出TSH浓度降低, T3和T4浓

度在D304组显著高于其他组,原因是TSH浓度受T3和T4浓度负反馈调节的抑制影响<sup>[24]</sup>。急性低温胁迫后,血清TSH浓度显著升高,VC促进了TSH的释放,保护了甲状腺功能。

己糖激酶、葡萄糖激酶对维持胁迫下的鱼体增加利用糖能量具有重要作用<sup>[25]</sup>。本实验结果表明,随着饲料VC水平升高,各组间肝脏GCK和HK浓度均无显著性差异,原因可能是糖代谢在肝脏中的合成速度与其mRNA水平相关<sup>[26]</sup>;一些研究表明,大黄鱼(*Larimichthys crocea*)<sup>[27]</sup>和欧洲鲈(*Dicentrarchus labrax*)<sup>[28]</sup>等受到胁迫之后,机体GCK、HK水平呈上升趋势。在本实验中,急性低温胁迫后,GCK浓度随VC水平升高而降低,表明VC发挥降低和缓解胁迫作用而调节糖酵解过程,减少了机体能量损失,D76组应激前后差异不显著,原因可能是在饲料中添加76 mg/kg VC可以调控机体处于一种能量节约的稳定状态,从而导致应激前后无显著性变化。HK浓度在D0~D76组显著下降,但随着VC水平进一步增加, HK浓度出现了升高的变化,出现这一现象的原因可能是在饲料VC水平高于152 mg/kg时,幼鱼机体糖酵解能力随着出现适应性增强<sup>[29]</sup>,在低温下储存了部分能量。

一些研究表明,胞浆型PEPCK浓度不只受皮质醇浓度影响<sup>[30]</sup>,也受许多激素如甲状腺素、胰高血糖素等影响<sup>[31]</sup>。本实验中,随着饲料VC水平的增加,PEPCK浓度与T3浓度变化一致,均呈上升趋势,推测原因是在本实验中PEPCK浓度变化受T3调控较大,皮质醇浓度和T4浓度在各组之间差异不显著,对PEPCK浓度的增加并无激活作用。PEPCK浓度仅在D38和D304组应激前后差异显著,可能是由于个体PEPCK mRNA合成速度或稳定性不同造成的<sup>[6]</sup>。

感谢饲料中心黄炳山、孙永智、宋志东、柳旭东、乔洪金、李培玉、夏斌等在实验饲料制备,养殖管理,样品采集及论文撰写中给予的帮助!

#### 参考文献:

- [1] 周歧存,刘永坚,麦康森,等. 维生素C对点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)生长及组织中维生素C积累量的影响[J]. 海洋与湖沼,2005,36(2): 152-158.  
Zhou Q C, Liu Y J, Mai K S, et al. Effect of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid concentrations in Juvenile grouper *Epinephelus coioides*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2005, 36(2): 152-158(in Chinese).
- [2] Wendelaar Bonga S E. The stress response in fish[J]. Physiological Reviews, 1997, 77(3): 591-625.
- [3] Flik G, Klaren P H M, Van den Burg E H, et al. CRF and stress in fish[J]. General and Comparative Endocrinology, 2006, 146(1): 36-44.
- [4] 钟燕,汝少国. 环境污染物对硬骨鱼肾间应激轴影响的研究进展[J]. 生态毒理学报,2014,9(3): 398-406.  
Zhong Y, Ru S G. Research progress in the effects of environmental pollutants on the interrenal stress axis of teleosts[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(3): 398-406(in Chinese).
- [5] Di Marco P, Priori A, Finoia M G, et al. Physiological responses of European sea bass *Dicentrarchus labrax* to different stocking densities and acute stress challenge[J]. Aquaculture, 2008, 275(1-4): 319-328.
- [6] 李淑云,刘泓宇,谭北平,等. 饲料中糖水平对不同食性海水鱼类PEPCK基因表达和酶活性的影响[J]. 水生生物学报,2015,39(1): 80-89.  
Li S Y, Liu H Y, Tan B P, et al. Effects of dietary carbohydrate levels on the gene expression and the activity of PEPCK in marine fishes with different food habits[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(1): 80-89(in Chinese).
- [7] Wang X J, Kim K W, Bai S C, Comparison of L-ascorbyl-2-monophosphate-Ca with L-ascorbyl-2-monophosphate-Na/Ca on growth and tissue ascorbic acid concentrations in Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*)[J]. Aquaculture, 2003, 225(1-4): 387-395.
- [8] 艾庆辉,麦康森,王正丽,等. 维生素C对鱼类营养生理和免疫作用的研究进展[J]. 水产学报,2005,29(6): 857-861.  
Ai Q H, Mai K S, Wang Z L, et al. Effects of vitamin C on nutritional physiology and immunity in fish: A review[J]. Journal of Fisheries of China, 2005, 29(6): 857-861(in Chinese).
- [9] 刘海燕,雷武,朱晓鸣,等. 饲料中不同维生素C含量对长吻鲢的影响[J]. 水生生物学报,2009,33(4): 682-689.  
Liu H Y, Lei W, Zhu X M, et al. Effects of different dietary vitamin C levels on Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Gunther)[J]. Acta Hydrobiologica

- Sinica, 2009, 33(4): 682-689(in Chinese).
- [10] 万金娟, 刘波, 戈贤平, 等. 日粮中不同水平维生素C对团头鲂幼鱼免疫力的影响[J]. 水生生物学报, 2014, 38(1): 10-18.
- Wan J J, Liu B, Ge X P, *et al.* Effects of dietary vitamin C on the non-specific immunity, three HSPs mRNA expression and disease resistance of juvenile Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(1): 10-18(in Chinese).
- [11] Kitabchi A E. Ascorbic acid in steroidogenesis[J]. Nature, 1967, 215(5108): 1385-1386.
- [12] 胡毅, 黄云, 文华, 等. 维生素C对青鱼幼鱼生长、免疫及抗氨氮胁迫能力的影响[J]. 水产学报, 2013, 37(4): 565-573.
- Hu Y, Huang Y, Wen H, *et al.* Effect of vitamin C on growth, immunity and anti-ammonia-nitrite stress ability in juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(4): 565-573(in Chinese).
- [13] 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[J]. 水产学报, 2010, 34(9): 1447-1459.
- 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(in Chinese).
- [14] Waring C P, Stagg R M, Poxton M G. Physiological responses to handling in the turbot[J]. Journal of Fish Biology, 1996, 48(2): 161-173.
- [15] 卢玉标, 游翠红, 王树启, 等. 浅水应激后黄斑蓝子鱼生理指标变化及牛磺酸的抗应激作用[J]. 水生生物学报, 2014, 38(1): 68-74.
- Lu Y B, You C H, Wang S Q, *et al.* Physiological changes in *Siganus canaliculatus* after shallow water stress and the anti-stress effects of taurine[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(1): 68-74(in Chinese).
- [16] 管标. 急性温度胁迫对虹鳟血液成分和关键代谢的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014: 41.
- Guan B. The effect of acute temperature stress on blood components and key metabolism mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014: 41(in Chinese).
- [17] 田华, 汝少国, 郝欣. 环境激素对鱼类内分泌轴线的干扰作用及其机制研究进展[J]. 安全与环境学报, 2009, 9(2): 10-14.
- Tian H, Ru S G, Bing X. A review on the advances in the research of disruption effects and mechanisms of environmental hormone on endocrine axes in fish[J]. Journal of Safety and Environment, 2009, 9(2): 10-14(in Chinese).
- [18] Maniyar R A, Nazeer Ahmed R, David M. Monocrotophos: Toxicity evaluation and respiratory responses of *Cyprinus carpio* (Linnaeus)[J]. Recent Research in Science and Technology, 2011, 3(1): 51-54.
- [19] Magner J A. Thyroid-stimulating hormone: Biosynthesis, cell biology, and bioactivity[J]. Endocrine Reviews, 1990, 11(2): 354-385.
- [20] Magner J A. Biosynthesis, cell biology, and bioactivity of thyroid-stimulating hormone[M]//Braverman L E, Refetoff S. Endocrine Reviews Monographs. Rockville, MD: The Endocrine Society, 1994: 3.
- [21] Hsieh Y L, Chatterjee A, Lee G, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for thyroid-stimulating hormone  $\beta$  subunit of Muscovy duck[J]. General and Comparative Endocrinology, 2000, 120(3): 336-344.
- [22] 张晓娜, 田华, 汝少国. 鱼类甲状腺轴对胚胎发育、仔鱼变态及性别分化的调控作用研究进展[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(S1): 94-101.
- Zhang X N, Tian H, Ru S G. Advances in piscine thyroidal axis and its regulatory effects on embryogenesis, metamorphosis on embryogenesis, metamorphosis and sex differentiation[J]. Periodical of Ocean University of China, 2012, 42(S1): 94-101(in Chinese).
- [23] Vassart G, Dumont J E. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth[J]. Endocrine Reviews, 1992, 13(3): 596-611.
- [24] Grossmann M, Weintraub B D, Szkudlinski M W. Novel insights into the molecular mechanisms of human thyrotropin action: Structural, physiological, and therapeutic implications for the glycoprotein hormone family[J]. Endocrine Reviews, 1997, 18(4): 476-501.
- [25] Panserat S, Capilla E, Gutierrez J, *et al.* Glucokinase is highly induced and glucose-6-phosphatase poorly repressed in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by a single meal with glucose[J]. Comparative



- Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 128(2): 275-283.
- [26] 罗毅平, 谢小军. 鱼类利用碳水化合物研究进展[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 381-390.
- Luo Y P, Xie X J. Progress of carbohydrate utilization in fish[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(2): 381-390(in Chinese).
- [27] 王猛强, 周飘苹, 黄文文, 等. 不同蛋白质水平下葡萄糖添加水平对大黄鱼生长性能、糖酵解和糖异生关键酶活性的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(8): 2431-2442.
- Wang M Q, Zhou P P, Huang W W, *et al.* Effects of glucose supplemental level at different protein levels on growth performance, hepatic glycolysis and gluconeogenic key enzyme activities of large yellow croaker (*Larimichthys crocea* Richardson)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2015, 27(8): 2431-2442(in Chinese).
- [28] Moreira I S, Peres H, Couto A, *et al.* Temperature and dietary carbohydrate level effects on performance and metabolic utilisation of diets in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles[J]. Aquaculture, 2008, 274(1): 153-160.
- [29] 聂琴, 苗惠君, 苗淑彦, 等. 不同糖源及糖水平对大菱鲆代谢酶活性的影响[J]. 水生生物学报, 2013, 37(3): 425-433.
- Nie Q, Miao H J, Miao S Y, *et al.* Effects of dietary carbohydrate sources and levels on the activities of carbohydrate metabolic enzymes in turbot[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(3): 425-433(in Chinese).
- [30] Vijayan M M, Moon T W. Acute handling stress alters hepatic glycogen metabolism in food-deprived rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1992, 49(11): 2260-2266.
- [31] Hanson R W, Reshef L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression[J]. Annual Review of Biochemistry, 1997, 66(1): 581-611.

## Effects of dietary vitamin C supplementation on hypothalamic-pituitary-interrenal axis and physiological indices of juvenile hybrid grouper *Epinephelus lanceolatus*♂×*Epinephelus fuscoguttatus*♀ under acute low temperature stress

HAO Tiantian<sup>1,2</sup>, WANG Lili<sup>3</sup>, WANG Jiying<sup>1\*</sup>, LI Baoshan<sup>1</sup>, MA Jingjing<sup>1</sup>,  
WANG Shixin<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>3</sup>, TAN Qing<sup>3</sup>, ZHANG Limin<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Ecological Restoration, Shandong Marine Resources and Environment Research Institute, Yantai 264006, China;

2. Shengsuo Fishery Feed Research Centre of Shandong Province, Yantai 265500, China;

3. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** A trial was conducted to determine the effects of dietary Vitamin C levels on hypothalamic-pituitary-interrenal axis and physiological indices of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂×*Epinephelus fuscoguttatus*♀) under acute low temperature stress. A basal diet was used as a control, and four other diets were prepared by supplementing 38, 76, 152, or 304 mg/kg vitamin C. Triplicate groups of fish (initial body weight, 50 g) were fed one of test diets at ratio of 1.5% or 2% body weight for 12 weeks at 27–28 °C. Uniform sizes of fish were selected for acute low temperature stress (17 °C) at the end of rearing management. Some biochemical indices in their serum and corticotrophin-releasing factor content of brain were examined over 2 hours. Results showed that: Weight gain of the fish fed with D38 group was significantly higher than that of D152 and D304 groups. We found no significant difference in corticotropin releasing factor content (CRF), adrenocorticotropic

hormone content (ACTH), epinephrine content (EPI) or cortisol content in juvenile hybrid grouper, among all treatment groups. After acute low temperature stress, CRF content was increased by increasing dietary vitamin C levels. While ACTH and EPI content in serum showed a reverse trend, fish fed diets with vitamin C 304 mg/kg was significantly lower than control diet. Cortisol was reduced significantly in fish fed diets 76 mg/kg to 304 mg/kg diets compared to control diet. Fish fed diets 152 mg/kg to 304 mg/kg diets T3 content were significantly higher than control diet. Whereas, after acute low temperature stress, fish fed diets 38 mg/kg to 304 mg/kg were significantly higher than control diet. There was no significant difference in T4 content in fish among different treatments. Fish fed diet 304 mg/kg diet showed significantly higher than other groups, whereas no difference was found among group D0 to D152. TSH content in D76 group exhibited obviously higher than D0, D38 or D304 groups. After acute low temperature stress, all diets containing vitamin C significantly elevated TSH content in serum. Dietary vitamin C levels had no strong effects on GCK and HK contents of liver. After acute low temperature stress, GCK content was negatively correlated with dietary vitamin C, and reached lowest value in 304 mg/kg diet, and was significantly lower than other groups. HK content reached lowest value in 76 mg/kg diet, and was significantly lower than D0, D152, D304 groups. Significantly higher PEPCCK value was found in fish fed 304 mg/kg vitamin C compared to 0 mg/kg diet. After acute low temperature stress, PEPCCK concentration was decreased significantly with increasing dietary vitamin C levels. All those data reveal new insights into the function of vitamin C that VC can modulate some biochemical indices of hypothalamic-pituitary-interrenal axis, protect and regulate the thyroid of fish, and maintain the dynamic balance of fish body under acute low temperature stress.

**Key words:** hybrid grouper; vitamin C; acute low temperature stress; hypothalamic-pituitary-interrenal axis

**Corresponding author:** WANG Jiying. E-mail: ytwjy@126.com

**Funding projects:** The National Marine Biological Industry-Demonstration Platform for Research and Development Innovation of Aquatic Nutrition and Feed (201601003); Science and Technology Development Projects of Shandong Province (2014GHY115006); The National Natural Science Foundation of Shandong Province for Young Scientists (ZR2015CQ023); Promotive Research Fund for Excellent Young and Middle-aged Scientists of Shandong Province (BS2013HZ018)