



不同碳水化合物水平对大口黑鲈鳃组织结构、 抗氧化能力和免疫能力的影响

赵柳兰, 唐小鸿, 廖磊, 梁吉, 张冬梅,
颜浩骁, 熊陈, 杨淞*
(四川农业大学动物科技学院, 四川成都 611130)

摘要: 为了探究不同碳水化合物水平对大口黑鲈鳃组织结构的完整性、抗氧化能力和免疫能力的影响, 设计3种不同碳水化合物水平的等氮等脂饲料, 即7% (L组)、12% (M组) 和17% (H组)。实验选取初始体质量为 (4.0 ± 0.2) g 的大口黑鲈360尾, 饲喂8周, 通过组织切片的观察, 抗氧化酶和免疫酶活性的测定及相关 mRNA 的表达研究, 分析碳水化合物对鳃的影响。结果发现, H组能够导致鳃小片基部细胞增生、融合, 上皮细胞脱落; H组和M组的丙二醛 (MDA) 含量显著高于L组; 鳃组织的超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (CAT) 在H组和M组显著低于L组; H组和M组抗氧化酶 (CAT、GPX、SOD1、SOD2、SOD3a 和 SOD3b) mRNA 水平也要显著低于L组; H组和M组酸性磷酸酶 (AKP), 碱性磷酸酶 (ACP) 和溶菌酶 (LZM) 也要显著低于L组; H组和M组免疫相关基因 (IL-1 β 、IL-10、IL-15、TNF- α 和 TGF-1 β) 和抗菌肽 (hepcidin-1 和 hepcidin-2) mRNA 水平显著低于L组 mRNA 水平; H组凋亡相关的基因 (caspase-3、caspase-8、caspase-9) 的 mRNA 水平显著高于L组和M组; H组的 occluding 和 claudin-7 mRNA 水平显著低于L组和M组。研究表明, 在本实验条件下, 饲喂高碳水化合物饲料会损伤大口黑鲈鳃组织结构, 降低抗氧化能力和免疫能力。

关键词: 大口黑鲈; 碳水化合物; 鳃组织结构; 抗氧化; 免疫
中图分类号: S 963.7 **文献标志码:** A

大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 隶属于鲈形目 (Perciformes) 太阳鱼科 (Centrarchidae) 鲈鱼属 (*Micropterus*), 是一种典型的肉食性鱼类。20世纪70年代引入我国, 因其味道鲜美、营养价值高、没有肌间刺等特点深受市场欢迎, 现已得到广泛养殖^[1]。随着人工配合饲料运用, 大口黑鲈养殖中烂鳃病和烂身病等成为常见的疾病, 其中烂鳃病的发病死亡率高达60%, 对养殖业造成严重的经济损失^[2]。

鳃是鱼类的多功能器官, 具有气体交换、调节渗透压、调节酸碱平衡等功能^[3]。此外, 鳃还是鱼体重要的物理屏障和免疫屏障^[4]。鳃组织结构的完整是鳃物理屏障功能的保障^[5]。鳃中富含抗菌化合物和细胞因子, 是其作为免疫屏障的前提^[6]。鳃的健康主要取决于结构完整和免疫功能^[7]。然而, 鳃极其敏感易受到营养素等因素的影响。如饲料中添加适宜水平的维生素A, 可以增加鳃组织的免疫能力, 减少烂鳃病的发生^[8]; 饲料中

收稿日期: 2021-04-01 修回日期: 2021-10-02

资助项目: 国家自然科学基金 (31802267); 四川农业大学双支计划 (035-2021993221)

第一作者: 赵柳兰, 从事水产动物免疫及营养调控方面的研究, E-mail: zhaoliulan2007@163.com

通信作者: 杨淞 (照片), 从事水产健康养殖研究, E-mail: ysys210@hotmail.com



添加过多脂肪, 会造成鳃组织结构受损, 抗氧化能力和免疫能力下降^[9]。因此, 维持饲料中营养素的平衡对鳃的结构完整和免疫功能至关重要。

淀粉作为饲料原料中最为主要的碳水化合物, 已成为水产饲料中不可缺少的成分^[10]。然而, 许多鱼类被认为葡萄糖不耐受, 尤其是肉食性鱼类, 如虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 摄入超过 20% 碳水化合物后, 出现持续性高血糖, 引起组织结构损伤和免疫抑制, 对鱼体造成负面影响^[11]。碳水化合物对鱼类的研究主要集中在对机体生长^[12]、肝脏糖脂代谢^[13]、肠道健康^[14]等方面。然而, 关于碳水化合物对鱼类鳃组织结构、抗氧化能力和免疫能力的影响仍不清楚。

目前的研究表明, 大口黑鲈饲料中碳水化合物适宜添加水平在 7%~10%^[12]; 而肉食性鱼类饲料中碳水化合物添加水平不超过 20%, 当饲料中碳水化合物水平超过 15% 时, 机体出现明显的病理特征^[14]。因此, 本实验设计 3 种不同浓度碳水化合物饲料 (L 组: 7% 淀粉, M 组: 12% 淀粉, H 组: 17% 淀粉), 探究碳水化合物对大口黑鲈鳃组织结构、抗氧化酶和免疫酶活性、相关基因表达等指标的影响, 旨在为大口黑鲈烂鳃病的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

配制 3 种碳水化合物水平的等氮 (粗蛋白质 48%) 等脂 (粗脂肪 9.5%) 饲料含量分别为 7% 淀粉 (L 组)、12% 淀粉 (M 组) 和 17% 淀粉 (H 组)。具体成分如表 1 所示。饲料原料均购于通威集团有限公司, 并以 80 目粒径研磨, 加工成 3 mm 的颗粒, 干燥后, 置于 -20 °C 冰箱中保存。

1.2 实验鱼

大口黑鲈平均体质量 (4.0 ± 0.2) g, 购于四川邛崃的一个商业养殖场。将大口黑鲈暂养在 200 L 的普通塑料循环曝气水箱中, 使用普通商业饲料喂养 (通威集团有限公司)。暂养 1 周后, 随机挑取健康活泼的大口黑鲈 360 尾分配到 9 个水箱中 (40 尾/箱)。每个组设置 3 个重复。在实验期间, 每天进行 3 次饱食投喂 (8:00、12:00 和 17:00)。投喂实验持续 8 周。在实验期间, 保持自然光周期水平, 实验所用水为曝气 24 h 的自来水, 每天换 1/4 水并吸出底部残饵粪便等杂质。每天检测并保

表 1 实验配方及近似组成 (DM, %)

Tab. 1 Formulation and proximate composition of the experimental diets (DM, %)

原料 ingredients	L	M	H
鱼粉 fish meal	52	52	52
谷朊粉 vital gluten	6.5	6.5	7.5
啤酒酵母粉 beer yeast powder	1	1	1
大豆浓缩蛋白 Soy protein concentrate	6.5	6.5	7
玉米蛋白粉 corn gluten meal	6.5	6.5	4.5
虾膏 shrimp paste	2	2	2
木薯淀粉 cassava starch	7	12	17
豆油 soybean oil	4	4	4
卵磷脂油 lecithin oil	1.5	1.5	1.5
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	9.5	4.5	0
Ca (H ₂ PO ₄) ₂	1.5	1.5	1.5
胆碱 choline	0.5	0.5	0.5
维生素预混料 ¹ vitamin premix	0.5	0.5	0.5
矿物质预混料 ² mineral premix	1	1	1
总计 total	100	100	100
营养成分 proximate composition			
粗脂肪 crude lipid	9.31	9.44	9.99
粗蛋白 crude protein	48.04	48.19	48.17
灰分 ash	10.62	10.18	10.02
水分 moisture	10.12	10.62	11.34

注: 1. 维生素预混料 (IU 或 mg/kg) 含维生素 A 16 000 IU, 维生素 D3 8 000 IU, 维生素 K3 14.72 mg/kg, 维生素 B1 17.80 mg/kg, 维生素 B2 48 mg/kg, 维生素 B6 29.52 mg/kg, 维生素 B12 0.24 mg/kg, 维生素 E 160 mg/kg, 维生素 C 800 mg/kg, 烟酰胺 79.20 mg/kg, 泛酸钙 73.60 mg/kg, 叶酸 6.40 mg/kg, 生物素 0.64 mg/kg, 肌醇 320 mg/kg, 氯化胆碱 1 500 mg/kg, L-肉碱 100 mg/kg (以砷糠粉作为载体); 2. 矿物质预混料 (mg/kg) 含有 CuSO₄ 2.00, ZnSO₄ 34.4, MnSO₄ 6.20, FeSO₄ 21.10, Ca(IO₃)₂ 1.63, Na₂SeO₃ 0.18, CoCl₂ 0.24, MgSO₄·H₂O 52.70

Notes: 1. Vitamin premix (mg/kg) contain vitamin A, 16 000IU; vitamin D3, 8 000 IU; vitamin K3, 14.72; vitamin B1, 17.80; vitamin B2, 48; vitamin B6, 29.52; vitamin B12, 0.24; vitamin E, 160; vitamin C, 800; niacinamide, 79.20; calcium-pantothenate, 73.60; folic acid, 6.40; biotin, 0.64; inositol, 320; choline chloride, 1 500; L-carnitine, 100 (using rice chaff powder as carriers); 2. mineral premix (mg/kg) contain: CuSO₄, 2.00; ZnSO₄, 34.4; MnSO₄, 6.20; FeSO₄, 21.10; Ca(IO₃)₂, 1.63; Na₂SeO₃, 0.18; CoCl₂, 0.24; MgSO₄·H₂O, 52.70

持温度 (20.0±0.5) °C, pH 为 7.5±0.2, 溶解氧大于 7.0 mg/L, 氨氮和亚硝酸盐小于 0.02 mg/L。

1.3 实验取样及处理

样品采集 实验结束后, 所有的鱼禁食 24 h 后用 MS-222 (15 mg/L) 麻醉。每个平行随机选取 15 尾鱼, 并立即解剖出鳃, 其中 3 尾固定在 Bouin 氏液中, 待分析, 剩余 12 尾放入液氮中, 随后被转移至 -80 °C 保存。

鳃组织学观察 选取每个处理 9 尾鱼 (3 个平行) 第 2 对鳃, 将固定好的鳃组织进行石蜡切片和苏木精-伊红 (H.E) 染色, 随后观察组织结构。

抗氧化酶和免疫酶活性测定 将 -80 °C

保存的鳃组织置于冰上解冻,取适量(0.2~0.3 g)鳃组织,加入9倍体积的预冷的0.8%生理盐水,用预冷研钵充分研磨后转移至1.5 mL离心管中,4 °C 2 500 r/min离心10 min,取上清液保存4 °C冰箱。鳃抗氧化酶和免疫相关酶活性使用试剂盒说明书操作,所有试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,并用分光光度计和酶标仪测定,所有样品于一周内检测完成。

抗氧化和免疫相关基因 mRNA 表达分析

使用 Animal Total RNA Isolation Kit 试剂盒(Cat.No.RE-03011, FOREGENE)提取总 RNA。测定总 RNA 浓度和纯度,并进行电泳检测。总 RNA 的 OD_{260/280} 值于 1.8~2.0 之间,电泳条带 28S *rRNA* 亮度约为 18S *rRNA* 的 2 倍且无拖尾时认定总 RNA 质量较好,将 RNA 保存于-80 °C 冰箱中。

使用 RT EasyTMII(with gDNase) 试剂盒(Cat.No. RT-01031/01032, FOREGENE)将所提取 RNA 反转录合成 cDNA。qRT-PCR(荧光定量 PCR)部分引物序列根据基因组测序得到的序列,使用 Primer premier 5.0 软件设计基因特异性引物(表 2)。根据 Real Time PCR EasyTM-SYBR Green I (Cat.No.QP-01011/01012/01013/01014, FOREGENE)检测 mRNA 表达水平。按照程序进行反应:95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s, TM 30 s, 72 °C 60 s, 40 个循环,绘制熔解曲线。所有样本进行 3 个重复,为了适应起始模板的变化,所有基因的表达量均用 L 组的 β -actin 表达量进行归一化处理。使用 $2^{-\Delta\Delta C}$ 方法分析基因的相对表达水平^[15]。

1.4 数据分析

数据以表格的形式记录在 EXCEL 文件中以建立数据库。显著性水平采用 SPSS 22.0 进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),并进行方差齐性检验,差异显著时,采用 Turkey's 进行多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 鳃的组织学分析及凋亡相关基因和紧密连接相关基因的表达

鳃由鳃弓、鳃耙和鳃丝 3 部分构成。鳃丝两侧伸出许多鳃小片。鳃小片由上皮细胞、柱细胞和血管组成,是鱼类进行气体交换的场所。鳃小片基部之间存在一定数目的泌氯细胞。不同碳水化合物饲料饲喂后,L 组鳃组织结构没有发生明

显的变化;M 组和 H 组均出现基部细胞增厚,鳃丝弯曲,上皮细胞脱落的现象;H 组还出现鳃丝融合,上皮细胞增生较多,上皮细胞排列不整齐,基部泌氯细胞膨大,鳃小片血细胞增多,充血的现象(图版 I)。

在饲养实验后,检测鳃中凋亡相关的基因(*caspase-3*、*caspase-8* 和 *caspase-9*)及上游调控基因(*bax* 和 *bcl-2*)的 mRNA 水平。结果显示,H 组 *caspase-3*、*caspase-8* 和 *caspase-9* 的 mRNA 水平显著高于 L 组和 M 组 mRNA 水平($P < 0.05$),L 组和 M 组 mRNA 水平差异不显著($P > 0.05$)。与此同时,上游调控基因 *bax* 的 mRNA 水平无显著变化($P > 0.05$),*bcl-2* 的 mRNA 水平随着淀粉浓度升高而降低,H 组 mRNA 水平只有 L 组 mRNA 水平的 44.4%($P < 0.05$)(图 1)。

2 个与紧密连接相关的基因(*occluding* 和 *claudin-7*)检测结果显示,高浓度淀粉对紧密连接相关基因的表达有抑制作用,其中 H 组 *occluding*-mRNA 水平只有 L 组 mRNA 水平的 48.2%($P < 0.05$);H 组 *claudin-7* mRNA 水平较 L 组 mRNA 水平降低了 35.4%($P < 0.05$)(图 2)。

2.2 不同碳水化合物对大口黑鲈鳃抗氧化酶活性和抗氧化相关基因的影响

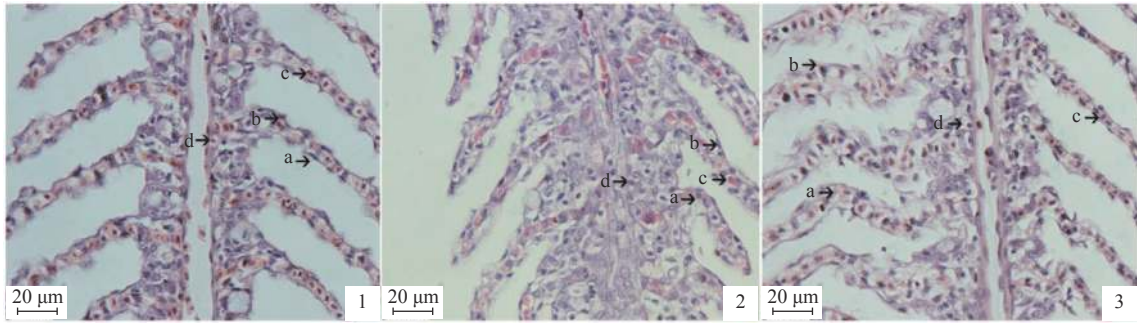
鳃的 CAT 和 SOD 活性,随着饲料中碳水化合物水平的增加而降低,其中 H 组 CAT 活性较 L 组降低了 34.8%($P < 0.05$)。SOD 活性在 3 个组之间都存在显著性差异($P < 0.05$),其中 H 组差异最大,SOD 活性仅为 L 组的 18.4%。M 组 GPX 活性分别是 L 组和 H 组的 2.1 倍和 3.0 倍($P < 0.05$)。鳃中 T-AOC 在 3 组之间存在显著性差异($P > 0.05$)。鳃的 MDA 随着碳水化合物水平的升高而上升,其中 H 组 MDA 含量最高($P < 0.05$),高达 21.0 nmol/mg,L 组的表达量仅为 H 组的 12%,M 组和 H 组之间无显著性差异($P > 0.05$)(表 3)。

PCR(聚合酶链式反应)结果显示,抗氧化相关基因 mRNA 水平随着饲料中淀粉浓度的升高逐渐降低,且高水平的淀粉组会导致鳃的抗氧化基因表达显著下降。H 组和 M 组 CAT mRNA 水平分别只有 L 组的 64.5% 和 71.1%($P < 0.05$);H 组和 M 组 GPX mRNA 水平是 L 组的 0.44 倍和 0.49 倍($P < 0.05$);H 组和 M 组 SOD1、SOD2、SOD3a 和 SOD3b mRNA 水平显著高于 L 组($P < 0.05$),H 组和 M 组之间无显著性差异($P > 0.05$)(图 3)。

表 2 引物序列用于实时 PCR 分析

Tab. 2 Primer sequences used for real-time PCR analysis

基因 gene	F/R	序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	产物长度/bp product length	退火温度/ °C TM	登录号 accession number
<i>CAT</i>	F	GTTCCCGTCCTTCATCCACT	85	60.4	MK614708.1
	R	CAGGCTCCAGAAGTCCCACA			
<i>SOD1</i>	F	CCCCACAACAAGAATCATGC	178	58.0	MK614709.1
	R	TCTCAGCCTTCTCGTGGA			
<i>SOD2</i>	F	CTGACCTACGACTATGGTGC	147	58.0	MK614710.1
	R	CGTCACATCTCCCTTCGCTA			
<i>SOD3a</i>	F	ATCCATCAGTACGGAGACCT	181	58.8	MK614711.1
	R	TTCCAATCGCAGACATCCCT			
<i>SOD3b</i>	F	CTCACAGACAATGGCACTC	101	61.0	MK614712.1
	R	CTGCTTAAACAGCGCCTGACC			
<i>GPX</i>	F	CCCTGCAATCAGTTTGACA	94	58.0	MK614713.1
	R	TTGGTTCAAAGCCATTCCT			
<i>IL-1β</i>	F	CGTGACTGACAGCAAAAAGAGG	166	59.4	XM_038733429.1
	R	GATGCCAGAGCCACAGTTC			
<i>IL-10</i>	F	CGGCACAGAAATCCCAGAGC	113	62.1	XM_038696252.1
	R	CAGCAGGCTCACAAAATAAATCATCT			
<i>IL-15</i>	F	GTATGCTGCTTCTGTGCCTGG	111	61.8	XM_038693988.1
	R	AGCGTCAGATTCTCAATGGTGT			
<i>TNF-α</i>	F	CTTCGTCTACAGCCAGGCATCG	161	63.0	XM_038723994.1
	R	TTTGGCACACCGACCTCACC			
<i>TGF-β1</i>	F	GCTCAAAGAGAGCGAGGATG	118	59.0	XM_038693206.1
	R	TCCTCTACCATTGCAATCC			
hepcidin-1	F	CATTACCGGGGTGCAA	107	58.0	EU502754.1
	R	CCTGATGTGATTTGGCATCATC			
hepcidin-2	F	TCAGTGGAAATCCTGGAAGATGC	69	58.0	EU502755.1
	R	ACAGCAAAGCGACATTTAATGC			
Caspase-3	F	GCTTCATTTCGTCTGTGTTTC	98	54.0	XM_038699323.1
	R	CGAAAAAGTGATGTGAGGTA			
Caspase-8	F	GAGACAGACAGCAGACAACCA	195	56.0	XM_038718639.1
	R	TTCCATTTAGCAAAACACATC			
Caspase-9	F	CTGGAATGCCTTCAGGAGACGGG	125	66.0	XM_038723308.1
	R	GGGAGGGGCAAGACAACAGGGTG			
<i>bax</i>	F	ACTTTGGATTACCTGCGGGA	133	61.0	XM_038704178.1
	R	TGCCAGAAATCAGGAGCAGA			
<i>bcl-2</i>	F	CGCCATCCACAGATCCT	145	59.4	XM_038711485.1
	R	CCGGAACAGTTCGTCTATCACC			
occluding	F	ACTTTGGATTACCTGCG	118	60.3	XM_038734217.1
	R	GGGAGGGGCAAGACAACAGT			
claudin7	F	CATTTCAGCAAACACATC	135	58.4	XM_038732091.1
	R	CGGCACAGAAATCCCAGAG			
<i>β-actin</i>	F	AAAGGGAAATCGTGCGTGAC	163	61.0	XM_0206513
	R	AAGGAAGGCTGGAAGAGGG			



图版 I 饲料中不同浓度碳水化合物对大口黑鲈鳃组织结构的影响

1. 饲料中含有 7% 淀粉, 2. 饲料中含有 12% 淀粉, 3. 饲料中含有 17% 淀粉; a. 鳃小片; b. 上皮细胞, c. 血细胞, d. 泌氯细胞

Plate I Effects of different concentrations of dietary carbohydrate on the gill structure of largemouth bass

1. 7% starch, 2. 12% starch, 3. 17% starch; a. gill lamella, b. epithelial cells, c. blood cells, d. chloride cell

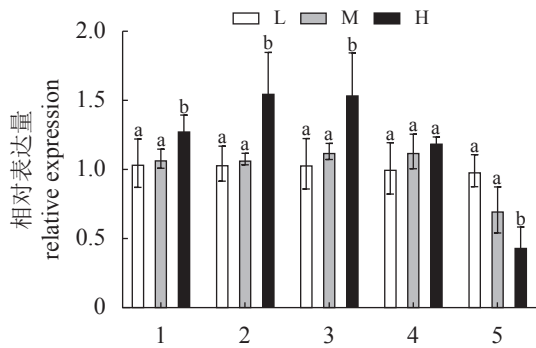


图 1 饲料中添加不同浓度碳水化合物对凋亡相关基因表达的影响

1. caspase-3, 2. caspase-8, 3. caspase-9, 4. bax, 5. bcl-2, 不同小写字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$); 下同

Fig. 1 Effects of different concentrations of carbohydrate in diets on the expression of apoptosis-related genes

1. caspase-3, 2. caspase-8, 3. caspase-9, 4. bax, 5. bcl-2, Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$); the same below

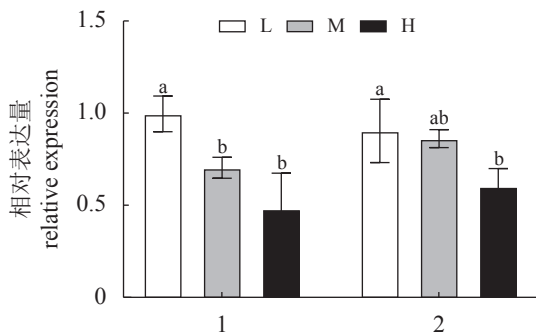


图 2 饲料中添加不同浓度碳水化合物对紧密连接相关基因表达的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of carbohydrate in diets on the expression of tight junction-related genes

1. occluding, 2. claudin-7

表 3 饲料中添加不同浓度碳水化合物对鳃抗氧化酶活性的影响

Tab. 3 Effects of different concentrations of carbohydrate in diets on antioxidant enzymes of gill

项目 items	碳水化合物水平 carbohydrate levels		
	L (7%)	M (12%)	H (17%)
CAT/(U/mg prot)	17.8±2.1 ^a	15.0±1.7 ^{ab}	11.6±2.1 ^b
SOD/(U/mg prot)	34.3±4.3 ^a	13.8±0.7 ^b	6.3±0.5 ^c
GPX/U	2634.0±649 ^a	5638.0±436.9 ^b	1836.0±519.1 ^a
T-AOC/(U/mg prot)	0.67±0.08 ^a	0.82±0.035 ^a	0.80±0.16 ^a
MDA/(nmol/mg prot)	2.6±1.6 ^a	18.6±1.2 ^b	21.0±0.6 ^b

注: 不同小写字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$); 下同
Notes: Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$); the same below

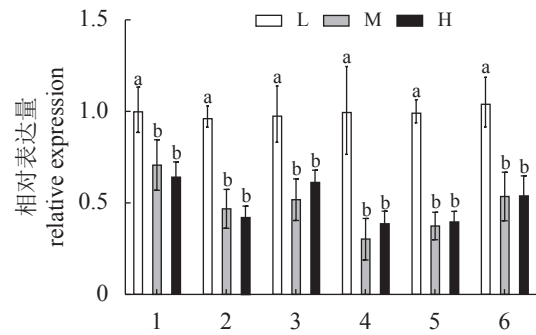


图 3 饲料中添加不同浓度碳水化合物对抗氧化相关基因表达的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of carbohydrate in diets on the expression of antioxidation-related genes

1. CAT, 2. GPX, 3. SOD1, 4. SOD2, 5. SOD3a, 6. SOD3b

2.3 不同浓度碳水化合物对大口黑鲈鳃免疫酶活性和炎症因子表达的影响

鳃的 AKP、ACP、LZM 随着淀粉水平的升高而降低。M 组和 H 组 AKP 和 ACP 活性均显著低于 L 组 ($P < 0.05$), 其中 M 组和 H 组 AKP 活性

之间无显著性差异 ($P>0.05$), 而 H 组 ACP 活性为 L 组的 57.8% ($P<0.05$), M 组是 L 组的 72.0% ($P<0.05$)。H 组 LZM 活性只有 L 组的 83.3% ($P<0.05$), H 组和 M 组无显著性差异 ($P>0.05$) (表 4)。

表 4 饲料中添加不同浓度碳水化合物对鳃免疫酶活性的影响

Tab. 4 Effects of different concentrations of carbohydrate in diets on immune enzymes

项目 items	饲料碳水化合物水平 dietary carbohydrate levels		
	L (7%)	M (12%)	H (17%)
AC/(U/g prot)	919.8±40.8 ^a	662.5±8.7 ^b	531.4±13.6 ^b
AKP/(U/g prot)	786.8±98.5 ^a	564.1±49.0 ^b	565.0±113.6 ^b
LZM/(μg/mL)	500.0±90.5 ^a	330.0±67.0 ^b	416.7±71.4 ^c

促炎因子包括 IL-1 β 、IL-15 和 TNF- α , 其表达水平随淀粉浓度的升高而降低。其中 H 组 IL-1 β 和 IL-15 mRNA 水平显著低于 L 组的, 分别为 L 组的 34.5% 和 47.0% ($P<0.05$)。抗炎因子 (IL-10 和 TGF-1 β) 和抗菌肽 Hecpudin-1 和 Hecpudin-2 的表达水平均随淀粉浓度的升高而降低。其中 H 组的 IL-10 mRNA 水平仅有 L 组 mRNA 水平的 30.0% ($P<0.05$)。H 组 Hecpudin-2 mRNA 水平是 L 组 mRNA 水平的 14.0% ($P<0.05$) (图 4)。

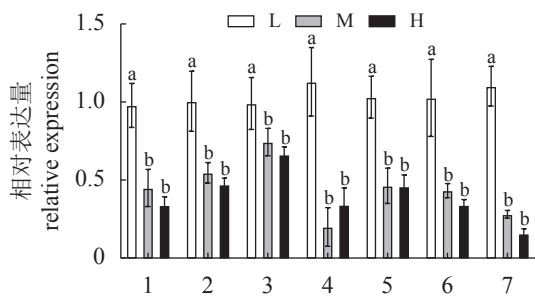


图 4 饲料中添加不同浓度碳水化合物对免疫相关基因表达的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of carbohydrate in diets on expression of immune-related genes

1. IL-1 β , 2. IL-15, 3. TNF- α , 4. IL-10, 5. TGF-1 β , 6. hepcidin-1, 7. hepcidin-2

3 讨论

3.1 高碳水化合物饲料对大口黑鲈鳃的影响

鳃是鱼类的主要呼吸器官, 同时具有调节渗透压平衡、调节酸碱平衡以及氮废物排出等功能^[16], 鳃的结构完整对于鱼体正常生理活动至关重要。鳃小片是鱼体进行气体交换的主要场所^[17],

在本研究中, H 组的鳃组织切片结果显示鳃小片基部细胞增生、鳃丝弯曲并有融合的趋势、上皮细胞脱落, 这些损伤导致鳃小片与水体接触减少, 气体交换能力下降。细胞凋亡是细胞死亡的一种形式, 对鳃组织结构的稳态和发展至关重要, 过度的凋亡会破坏上皮细胞功能^[18]。caspase-8 和 caspase-9 是凋亡启动者, caspase-3 是凋亡执行者。这些基因的上调都会导致凋亡的发生。本研究结果显示, 高碳水化合物会上调 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 的表达^[19]。Bcl-2 家族蛋白是 apaf1 介导的凋亡通路的关键调控因子^[20]。本研究中, 长期饲喂高浓度淀粉会降低 bcl-2 的表达, 对 bax 的表达无影响。这可能是因为高碳水化合物饲料饲喂降低了 apaf1 凋亡通路中 bcl-2 的表达, 使细胞色素 C 释放到细胞外, 激活 caspase-8 和 caspase-9, 诱导 caspase-3 表达, 执行细胞凋亡, 使之组织结构发生改变^[21]。同时, 紧密连接蛋白广泛存在于上皮细胞和内皮细胞之间, 其作用是保持细胞间结构的完整性, 确保其功能的正常发挥^[22]。紧密连接蛋白 occluding 和 claudin-7 的 mRNA 在 H 组的表达最低, 细胞间的通透性增加, 鳃组织紧密性降低。紧密连接蛋白表达的降低可能是高碳水化合物抑制了 mapkk6/p38mapk/mlck 信号通路。细胞凋亡和紧密连接蛋白 mRNA 表达降低是导致烂鳃病发生的原因之一^[22]。

3.2 高碳水化合物饲料对大口黑鲈鳃抗氧化能力的影响

鳃中上皮细胞是一种重要的物理屏障, 但易受 ROS 损伤^[23]。MDA 由脂质过氧化作用产生, 导致细胞膜氧化损伤, 被认为是反映氧化应激水平的生物标志物^[24]。氧化应激通过与蛋白质、核酸和氨基磷脂的亲核基团交联, 导致醛的积累和细胞毒性增加。抗氧化酶在脊椎动物细胞内氧化还原平衡和维持体内平衡的氧化应激反应中起着关键作用^[25]。在鱼体中, CAT 和 GPX 作用是消除 H₂O₂^[23, 26]。在本研究中, 长期饲喂高淀粉饲料会降低鳃组织的 CAT 和 GPX 酶及基因表达。这可能与鱼体的鳃会通过降低 CAT 和 GPX 联合作用消除 H₂O₂ 来应对高浓度淀粉。本研究结果显示, 长期饲喂高淀粉饲料会降低鳃组织中 SOD 酶活性, 同时降低 SOD1, SOD2, SOD3a, SOD3b 的表达量。SOD 的功能是将细胞内的氧自由基转化为过氧化氢^[7]。然而这些抗氧化基因又由 Nrf2 调控,

与其表达量成正相关^[27]。因此,鳃可能会通过抑制 *Nrf2* 的表达,抑制抗氧化基因的表达,从而降低抗氧化酶活性来应对高淀粉饲料应激。这与王爱明等^[28]在饲料中添加高水平脂肪对梭鱼 (*Chelon haematocheilus*) 抗氧化酶活性和相关基因表达的研究结果一致。高碳水化合物导致鳃抗氧化能力的降低,加大了氧化损伤,这也是鳃组织结构损伤的原因之一。

3.3 高碳水化合物饲料对大口黑鲈鳃免疫能力的影响

鳃健康很大程度上依赖于先天免疫和后天免疫^[29]。LZM 和 ACP 是机体内重要的抗菌分子,是反映吞噬细胞病原菌能力的重要指标。AKP 在机体内直接参与磷酸基团的转移、代谢,是维持机体健康的重要酶类^[22]。LZM、ACP 和 AKP 在先天免疫中发挥重要作用。本研究表明,长期饲喂高碳水化合物会降低鳃组织中 LZM、ACP 和 AKP 酶活性。这与珍珠龙胆石斑鱼 (*Epinephelus lanceolatus*♀×*Epinephelus fuscoguttat*♂) 中添加高碳水化合物所得的结果一致^[30]。然而在黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*) 的碳水化合物分级饲养中^[27],不同水平碳水化合物对鳃组织免疫酶活性没有影响。珍珠龙胆石斑鱼和大口黑鲈都是肉食性鱼类,而黑鲷是杂食性鱼类,这可能是食性的差异所导致的不同。

炎症反应是免疫系统应对各种挑战的关键因子^[31]。TNF- α 、IL-1 β 和 IL-15 是促炎细胞因子,主要功能是通过诱导其他炎症因子启动和加速炎症的发生^[32]; 抗炎因子包括 IL-10 和 TGF- β , 它们具有抑制炎症因子产生的功能^[32]。本研究表明,长期饲喂高碳水化合物饲料会降低促炎因子表达水平,这与小鼠饲喂高脂饲料后促炎因子变化规律相似,并且这些炎症因子表达又依赖 *NF- κ B* 通路的表达^[8], 因此,推测碳水化合物可能会通过抑制 *NF- κ B* 通路的表达来降低促炎因子的表达。长期饲喂高浓度淀粉饲料会降低抗炎因子的表达。此外,饲喂高碳水化合物饲料会降低 hepcidin-1 和 hepcidin-2 的表达水平。Hepcidin 由鳃分泌,具有抗菌和调节炎症因子作用的物质,是鱼体免疫中不可或缺的成分^[28]。本实验结果与草鱼饲料中添加过多脂肪对鳃组织抗菌肽的影响结果一致^[7]。

综上所述,在本实验条件下,高碳水化合物饲料会降低大口黑鲈鳃抗氧化能力,增加氧化损

伤,降低免疫能力,增加疾病感染机率,最终出现鳃组织损伤;中碳水化合物饲料也会对鳃健康造成威胁,但其凋亡基因和紧密连接蛋白的 mRNA 水平与低碳水化合物饲料组无显著性差异。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 黄太寿,白俊杰,李胜杰,等.我国加州鲈养殖现状和绿色发展问题探讨[J].中国水产,2017(12):44-47.
Huang T S, Bai J J, Li S J, et al. Discussion on Current Status of *Micropterus salmoides* Farming and Green Development in China[J]. China Fisheries, 2017(12): 44-47 (in Chinese).
- [2] 邓国成,白俊杰,李胜杰,等.大口黑鲈池塘养殖常见病害及其防治[J].广东农业科学,2011,38(18):102-103,137.
Deng G C, Bai J J, Li S J, et al. Common diseases and prevention in pond aquaculture of *Micropterus salmoides*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011, 38(18): 102-103,137 (in Chinese).
- [3] 董少杰,任建,马雪,等.四种消毒剂 and 一种抗生素对锦鲤幼鱼鳃功能的影响[J].水产科技情报,2014,41(6):306-310,315.
Dong S J, Ren J, Ma X, et al. Effects of four disinfectants and one antibiotic on gill function of *Cyprinus carpio*[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2014, 41(6): 306-310,315 (in Chinese).
- [4] Chen K, Zhou X Q, Jiang W D, et al. Dietary phosphorus deficiency caused alteration of gill immune and physical barrier function in the grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) after infection with *Flavobacterium columnare*[J]. Aquaculture, 2019, 506: 1-13.
- [5] Rebl A, Korytář T, Köbis J M, et al. Transcriptome profiling reveals insight into distinct immune responses to *Aeromonas salmonicida* in gill of two rainbow trout strains[J]. Marine Biotechnology, 2014, 16(3): 333-348.
- [6] Alvarez-Pellitero P. Fish immunity and parasite infections: From innate immunity to immunoprophylactic prospects[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2008, 126(3-4): 171-198.
- [7] Ni P J, Feng L, Jiang W D, et al. Impairing of gill health through decreasing immune function and structural integrity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed

- graded levels dietary lipids after challenged with *Flavobacterium columnare*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 922-933.
- [8] Pan J H, Feng L, Jiang W D, *et al.* Vitamin E deficiency depressed gill immune response and physical barrier referring to NF- κ B, TOR, Nrf2 and MLCK signalling in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) under infection of *Flavobacterium columnare*[J]. *Aquaculture*, 2018, 484: 13-27.
- [9] Li D D, Ling S C, Wu K, *et al.* Identification of five key genes involved in intrinsic apoptotic pathway from Yellow Catfish *Pelteobagrus fulvidraco* and their transcriptional responses to high fat diet (HFD)[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 921.
- [10] Kamalam B S, Medale F, Panserat S. Utilisation of dietary carbohydrates in farmed fishes: New insights on influencing factors, biological limitations and future strategies[J]. *Aquaculture*, 2017, 467: 3-27.
- [11] Marandel L, Lepais O, Arbenoits E, *et al.* Remodelling of the hepatic epigenetic landscape of glucose-intolerant rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by nutritional status and dietary carbohydrates[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 32187.
- [12] 刘浩, 杨俊江, 董晓慧, 等. 饲料碳水化合物水平对斜带石斑鱼生长性能、体成分、血浆生化指标及肠道和肝脏酶活性的影响[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(1): 357-371.
- Liu H, Yang J J, Dong X H, *et al.* Effects of dietary carbohydrate level on growth performance, body composition, plasma biochemical parameters and intestinal and liver enzyme activities of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(1): 357-371 (in Chinese).
- [13] Cai W J, Liang X F, Yuan X C, *et al.* Changes of DNA methylation pattern in metabolic pathways induced by high-carbohydrate diet contribute to hyperglycemia and fat deposition in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2020, 11: 398.
- [14] Villasante A, Ramírez C, Catalán N, *et al.* Effect of dietary carbohydrate-to-protein ratio on gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo Salar*)[J]. *Animals*, 2019, 9(3): 89.
- [15] 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.
- [16] Chasiotis H, Kolosov D, Kelly S P. Permeability properties of the teleost gill epithelium under ion-poor conditions[J]. *American Journal of Physiology:Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2012, 302(6): R727-R739.
- [17] 区又君, 刘奇奇, 温久福, 等. 急性低温胁迫对四指马鲛幼鱼肝脏、肌肉以及鳃组织结构的影响[J]. *生态科学*, 2018, 37(5): 53-59.
- Qu Y J, Liu Q Q, Wen J F, *et al.* The effects of acute low temperature stress on liver, muscle and gill tissues of juvenile *Eleutheronema tetradactylum*[J]. *Ecological Science*, 2018, 37(5): 53-59 (in Chinese).
- [18] Luzio A, Monteiro S M, Fontainhas-Fernandes A A, *et al.* Copper induced upregulation of apoptosis related genes in zebrafish (*Danio rerio*) gill[J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 128-129: 183-189.
- [19] Feng L, Luo J B, Jiang W D, *et al.* Changes in barrier health status of the gill for grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during valine deficiency: regulation of tight junction protein transcript, antioxidant status and apoptosis-related gene expression[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 239-249.
- [20] Crow M T, Mani K, Nam Y J, *et al.* The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis[J]. *Circulation Research*, 2004, 95(10): 957-970.
- [21] Ola M S, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2011, 351(1-2): 41-58.
- [22] Wang B, Feng L, Jiang W D, *et al.* Copper-induced tight junction mRNA expression changes, apoptosis and antioxidant responses via NF- κ B, TOR and Nrf2 signaling molecules in the gills of fish: Preventive role of arginine[J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 158: 125-137.
- [23] Baruah K, Norouzitallab P, Linayati L, *et al.* Reactive oxygen species generated by a heat shock protein (Hsp) inducing product contributes to Hsp70 production and Hsp70-mediated protective immunity in *Artemia franciscana* against pathogenic vibrios[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 46(2): 470-479.
- [24] Sun J L, Zhao L L, Liao L, *et al.* Interactive effect of thermal and hypoxia on largemouth bass (*Micropterus salmoides*) gill and liver: aggravation of oxidative stress,

- inhibition of immunity and promotion of cell apoptosis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 923-936.
- [25] Yang S, Yan T, Wu H, *et al.* Acute hypoxic stress: Effect on blood parameters, antioxidant enzymes, and expression of *HIF-1alpha* and *GLUT-1* genes in largemouth bass (*Micropterus salmoides*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 449-458.
- [26] Baud O, Greene A E, Li J R, *et al.* Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes[J]. *Journal of Neuroscience*, 2004, 24(7): 1531-1540.
- [27] Wang L, Sun Y X, Xu B Y, *et al.* Effects of berberine supplementation in high starch diet on growth performance, antioxidative status, immune parameters and ammonia stress response of fingerling black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*)[J]. *Aquaculture*, 2020, 527: 735473.
- [28] 张春暖, 王爱民, 刘文斌, 等. 饲料脂肪水平对梭鱼脂肪沉积、脂肪代谢酶及抗氧化酶活性的影响[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(1): 108-115.
- Zhang C N, Wang A M, Liu W B, *et al.* Effects of dietary lipid levels on fat deposition, lipid metabolize enzyme and antioxidant activities of *Chelon haematocheilus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(1): 108-115 (in Chinese).
- [29] Trichet V V. Nutrition and immunity: an update[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(3): 356-372.
- [30] 李自强. 饲料脂肪和糖类水平对珍珠龙胆石斑鱼生长、饲料利用、体组成及非特异性免疫指标的影响 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2018: 68.
- Li Z Q. Effects of dietary lipid and carbohydrate on growth performance, feed utilization, body composition and non-specific immunity of hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018: 68 (in Chinese).
- [31] Rombout J H, Yang G W, Kiron V. Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(2): 634-643.
- [32] Veenstra K A, Wangkahart E, Wang T H, *et al.* Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) adipose tissue undergoes major changes in immune gene expression following bacterial infection or stimulation with pro-inflammatory molecules[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 81: 83-94.

Effects of different carbohydrate levels on gill tissue structure, antioxidant capacity and immunity of *Micropterus salmoides*

ZHAO Liulan, TANG Xiaohong, LIAO Lei, LIANG Ji, ZHANG Dongmei,
YAN Haoxiao, XIONG Chen, YANG Song*

(College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: In order to explore the effects of different carbohydrates levels on gill tissue structure, antioxidant capacity and immunity of the gill tissue of *Micropterus salmoides*, three kinds of isonitrogen and lipid feeds with different carbohydrate levels were designed: 7% (L group), 12% (M group), 17% (H group). 360 fish were selected and fed for 8 weeks with an initial weight of (4.0±0.2) g. Through the study of tissue sections, anti-oxidation enzyme and immunoenzyme activity determination, and related mRNA expression, the effect of dietary carbohydrate on gills were analyzed, the results showed that diet in 17% carbohydrate feed can cause the proliferation and fusion of the base cells of the gill lamella, and the shedding of epithelial cells; the content of malondialdehyde (MDA) in the 17% carbohydrate feed and 12% carbohydrate feed was significantly higher than that of 7% carbohydrate feed; the superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (CAT) of gill tissue in 17% carbohydrate feed and 12% carbohydrate feed were significantly lower than 7% carbohydrate feed; Antioxidant enzymes (CAT, GPX, SOD1, SOD2, SOD3a and SOD3b) mRNA levels in 17% carbohydrate feed and 12% carbohydrate feed were also significantly lower than 7% carbohydrate feed; in 17% carbohydrate feed and 12% carbohydrate feed acid phosphatase (AKP), alkaline phosphatase (ACP) and lysozyme (LZM) were also significantly lower than the 7% carbohydrate feed; the mRNA levels of immune-related genes (IL-1 β , IL-10, IL-15, TNF- α and TGF-1 β) and antimicrobial peptides (hepcidin-1 and hepcidin-2) in the 17% carbohydrate feed and 12% carbohydrate feed were significantly lower than those in 7% carbohydrate feed; the apoptosis-related genes(caspase-3, caspase-8, caspase-9) mRNA level in 17% carbohydrate feed were significantly higher than that of the 7% carbohydrate feed and 12% carbohydrate feed; the occluding and claudin-7 mRNA levels of the 17% carbohydrate feed were significantly lower than those of the 7% carbohydrate feed and 12% carbohydrate feed. The study showed that: under the experimental conditions, 17% carbohydrate feed will damage the gill tissue structure, reduce the antioxidant capacity and immune capacity of *Micropterus salmoides*.

Key words: *Micropterus salmoides*; carbohydrate; gill tissue structure; anti-oxidation; immunity.

Corresponding author: YANG Song. E-mail: ysys210@hotmail.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31802267); Double Supported Program of Sichuan Agricultural University (035-2021993221)