

doi: 10.7541/2013.52

## 维生素 E 对青鱼幼鱼生长、免疫及抗氨氮胁迫能力的影响

黄云<sup>1</sup> 胡毅<sup>1</sup> 文华<sup>2,3</sup> 钟蕾<sup>1</sup> 郇志利<sup>1</sup>  
李金龙<sup>1</sup> 毛小伟<sup>1,4</sup> 肖调义<sup>1</sup>

(1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 长沙 410128; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 淡水生态与健康养殖重点开放实验室, 武汉 430223; 3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081; 4. 益阳益华水产品有限公司, 益阳 413000)

**摘要:**以初始体质量(7.27±0.40) g 的青鱼为研究对象, 采用维生素 E(VE)有效含量分别为 14.36(对照组)、25.14、37.66、62.97、113.92 和 210.45 mg/kg 6 种等氮等能的实验饲料, 饲养青鱼幼鱼 8 周后, 根据生长情况选取对照组、62.97 和 210.45 mg/kg VE 组进行 24h 氨氮胁迫(20 mg/L), 研究 VE 对青鱼幼鱼生长、免疫及抗氨氮胁迫能力的影响。结果表明: 以特定生长率为指标, 折线模型分析表明青鱼有效维生素 E 需要量为 45.00 mg/kg。肌肉、肝脏和血清 VE 含量与饲料中 VE 含量呈明显正相关, 当饲料 VE 含量超过 113.92 mg/kg 时, 肌肉和肝脏 VE 含量均达到饱和。VE 对鳃丝 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶活性(NKA)和血清皮质醇(COR)无显著影响, 但随着饲料 VE 含量的升高, 过氧化氢酶(CAT)和总超氧化物歧化酶活性(T-SOD)呈上升趋势, 丙二醛含量(MDA)呈下降趋势。氨氮胁迫对各处理组肌肉 VE 含量和血清 CAT 活性无影响, 但肝脏 VE 含量均显著降低( $P<0.05$ ), 且 62.97 和 210.45 mg/kg VE 组血清 VE 水平有所升高。在胁迫后, 对照组血清 T-SOD、鳃丝 NKA 活性显著降低, 皮质醇含量显著增加( $P<0.05$ )。与对照组相比, 62.97 和 210.45 mg/kg VE 组 T-SOD、NKA 活性和皮质醇含量在胁迫前后无显著变化。各处理组 MDA 含量在胁迫后虽均显著升高, 但 210.45 mg/kg VE 组在胁迫后 MDA 含量仍显著低于对照组( $P<0.05$ )。以上结果说明, 青鱼幼鱼获得最大生长的有效维生素 E 需求量为 45.00 mg/kg, 且较高 VE 能有效提高青鱼机体免疫力, 缓解氨氮胁迫对青鱼机体的负面影响。

**关键词:** 维生素 E; 青鱼; 生长; 免疫; 抗氨氮胁迫

中图分类号: S965.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)03-0507-08

在密度集约化养殖中, 水产养殖动物残饵和排泄物氨化作用产生大量氨态氮, 是诱发鱼病的主要环境因子。大多数硬骨鱼类对氨氮毒性非常敏感<sup>[1,2]</sup>。水体中过高的氨氮浓度能干扰生物体抗氧化系统, 使部分抗氧化物质含量和酶活性下降<sup>[3,4]</sup>, 机体清除自由基的能力降低, 脂质过氧化产物增多, 导致机体非特异性免疫防御系统遭到破坏<sup>[5]</sup>, 外源病菌的易感性增加<sup>[6-8]</sup>; 鳃、肾、肝等组织结构病变, 呼吸和排泄系统受损<sup>[9-11]</sup>。近年来, 通过营养学调控理论, 提高水产动物免疫机能, 缓解外界环境应激

越来越受到关注。维生素 E(VE)是 Evans 在 19 世纪 20 年代发现的具有  $\alpha$ -生育酚生物活性的一类脂溶性维生素, 其第六位碳原子上羟基极易被氧化, 具有很强的还原性, 是生物体内最重要的脂溶性抗氧化剂和免疫增强剂<sup>[12]</sup>。相关研究表明, 维生素 E 参与水产动物的细胞免疫和体液免疫<sup>[13,14]</sup>, 可提高细胞介导的免疫反应、抗体滴度和吞噬细胞指数, 促进 T 淋巴细胞的有丝分裂<sup>[15]</sup>; 还可有效增强水产动物抵抗亚硝酸盐<sup>[16]</sup>、酸应激<sup>[17]</sup>和拥挤胁迫能力<sup>[18]</sup>。青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*)是我国传统淡水养殖鱼类

收稿日期: 2012-09-06; 修订日期: 2013-02-17

基金项目: 湖南省自然科学基金(11JJ3037); 国家星火计划重大专项(2011GA770007); 中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点实验室开放课题(2010FEA03018); 湖南省科技重大专项(2010FJ1007); 湖南省研究生创新课题(CX2010B285)资助

作者简介: 黄云(1986—), 男, 湖南株洲人; 硕士; 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: dahuangy@163.com

通信作者: 胡毅, E-mail: huyi740322@163.com; 肖调义, E-mail: Tyx1128@yahoo.com.cn

的四大家鱼之一,在人工养殖过程中面临水体环境突变(以氨氮突变为)和疾病滋生等问题。本研究通过饲料中 VE 的添加,探讨 VE 对青鱼生长、免疫和抗氨氮胁迫能力的影响,以期为 VE 的营养调控青鱼抵抗外界环境应激提供科学指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与驯化

实验青鱼为购自湖南水产科学研究所的同一批鱼苗。实验前暂养于室外水泥池(5.0 m×1.0 m×1.5 m)中驯化 2 周,日饱食投喂商品饲料 2 次(8:00, 16:00),日换水量占总体积 1/3。暂养期间,水温(24±3)℃,pH 7.31±0.2,溶解氧含量 5.0 mg/L 以上,并用次溴酸盐氧化法进行水体氨氮监测,总氨氮值小于或等于 0.2 mg/L,正式试验前停食 24h。

### 1.2 实验设计

参照商品饲料配方,配制粗蛋白 36.0%和粗脂肪 6.0%的基础饲料(总能约 18.0 kJ/g,表 1),以 VE 醋酸酯(干粉状,含量 50%,青岛玛斯特生物技术有限公司友情提供)作为 VE 添加源,在基础饲料中分别添加 VE 0(对照组)、12.5、25、50、100 和 200 mg/kg,

共配制 6 组实验饲料。饲料原料经粉碎后过 40 目筛,微量成分采取逐级扩大法混合均匀,采用双螺旋压条机挤压出 1.5 mm 粒径饲料颗粒,于阴凉处风干后-20℃保存备用。各处理组饲料实测值分别为:14.36、25.14、37.66、62.97、113.92 和 210.45 mg/kg。

挑选健康活泼、规格一致的实验青鱼于室内水族箱中投喂基础饲料驯化,1 周后挑选规格均匀的青鱼[初始质量(7.27±0.40)g]随机分配到 18 个水族箱中,每箱放养 30 尾,每组 3 个重复,日投饵量为体质量的 3%—5%,分 2 次投喂(8:00—9:00, 16:00—17:00),分别占总量的 40%和 60%。日换水 1 次,换水量占总体积 1/3 并清除箱内粪便。日充气 12h,溶氧不低于 5.0 mg/L。实验期间平均水温(28±2)℃,pH 7.31±0.2,养殖水总氨氮浓度低于 0.2 mg/L,自然光周期,养殖持续 8 周。养殖实验结束后,青鱼饥饿 24h,从每个水族箱中捞取青鱼置于盛有少量水的桶中,计数、称重,记录生长情况。根据生长情况,选择有代表性的 3 组,未添加 VE 组、生长最好组和高水平 VE 添加组,即对照组、62.97 和 210.45 mg/kg VE 组,每箱随机捞取 10 尾试验青鱼,进行 24h 氨氮胁迫试验,氨氮胁迫实验参照胡毅等<sup>[19]</sup>方法,为了

表 1 基础饲料组成及营养水平  
Tab. 1 Formulation and chemical composition of the basal diet

原料 Ingredients	含量 Contents (%)	营养成分 Proximate analysis	水平 Level (% DW)
鱼粉 Fish meal	20	粗蛋白 Crude protein	36.83
豆粕 Soybean meal	20	粗脂肪 Crude lipid	6.71
棉粕 Cottonseed meal	16	粗灰分 Crude ash	10.24
菜粕 Rapeseed meal	10	总能 Gross energy(kJ/g)	18.0
米糠 Rice bran	7		
面粉 Wheat meal	21.94		
豆油 Soybean oil	2		
胆碱 Choline chloride	0.5		
磷酸二氢钙 Monocalcium phosphate	1.5		
预混料(无 VC 和 VE) Premix (VC and VE free) <sup>1</sup>	1		
维生素 C Vitamin C	0.02		
抗氧化剂 Antioxidants	0.01		
防霉剂 Mold inhibitor	0.03		

注: <sup>1</sup>预混料(mg/kg 饲料): 氯化钾, 200 mg; 碘化钾(1%), 60 mg; 六水氯化钴(1%), 50 mg; 五水硫酸铜, 30 mg; 一水硫酸亚铁, 400 mg; 一水硫酸锌, 400 mg; 一水硫酸锰, 150 mg; 五水亚硒酸钠(1%), 65 mg; 一水硫酸镁, 2000 mg; 沸石粉, 3645.85 mg; 维生素 B<sub>1</sub>, 12 mg; 核黄素, 12 mg; 维生素 B<sub>6</sub>(盐酸吡哆醇), 8 mg; 维生素 B<sub>12</sub>, 0.05 mg; 维生素 K<sub>3</sub>, 8 mg; 肌醇, 100 mg; 泛酸钙(维生素 B<sub>3</sub>), 40 mg; 烟酸, 50 mg; 叶酸, 5 mg; 生物素, 0.8 mg; 维生素 A, 25 mg; 维生素 D<sub>3</sub>, 5 mg; 乙氧基喹啉, 150 mg; 小麦粉, 2584.15 mg

Note: <sup>1</sup>Premix composition (mg/kg diet): KCl, 200 mg; KI(1%), 60 mg; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1%), 50 mg; FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 400 mg; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 400 mg; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 150 mg; Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O(1%), 65 mg; MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2000 mg; zeolite power, 3645.85 mg; VB<sub>1</sub>, 12 mg; riboflavin, 12 mg; VB<sub>6</sub>, 8 mg; VB<sub>12</sub>, 0.05 mg; VK<sub>3</sub>, 8 mg; inositol, 100 mg; pantothenic acid, 40 mg; niacin acid, 50 mg; folic acid, 5 mg; biotin, 0.8 mg; VA, 25 mg; VD<sub>3</sub>, 5 mg; ethoxyquin, 150 mg; wheat meal, 2584.15 mg

减少捕捞应激对实验结果的影响, 在进行麻醉前将捞取的青鱼放于盛有 20 L 水的水箱中静置 60min, 然后滴入丁香油溶液短暂麻醉, 进行样品的采集工作。需进行氨氮胁迫实验的处理组青鱼, 在计数、称重、记录生长情况后, 随机捞取 10 尾青鱼放于盛有 10 L 水的水箱中静置 60min 后, 缓慢倒入配置好的 40 mg/L 氨氮溶液 10 L, 使水体氨氮浓度达到 20 mg/L 左右, 每个水族箱的氨氮胁迫起始时间控制间隔在 15min 左右, 以便于 24h 后样品采集时胁迫时间一致。胁迫后为避免捞取应激, 直接滴入丁香油至水族箱中进行短暂麻醉取样。期间连续充气, 保证溶氧不低于 5.0 mg/L。

### 1.3 样品采集、分析与计算

**生长指标** 实验起始和结束时, 分别对各水族箱中青鱼进行计数、称重。

特定生长率(SGR)=[(LnW<sub>f</sub>-LnW<sub>i</sub>)/T]×100%

W<sub>f</sub>、W<sub>i</sub>和 T 分别表示平均终体重(g)、平均初体重(g)和饲养时间(d)。

**饲料和组织维生素 E 含量** 在氨氮胁迫前后, 分别从每个水族箱随机取 3 尾试验青鱼, 冰盘上解剖并分离出肝脏和轴上肌, 称取一定量肝脏或肌肉, 捣碎、匀浆、离心, 制备上清液备用。肝脏、肌肉和血清中 VE 含量均参照南京建成 VE 含量测定试剂盒比色法测定。饲料中 VE 含量利用高效液相色谱(HPLC)测定。

**血清指标** 在氨氮胁迫前后, 从各试验水族箱中随机捞取 8 尾试验青鱼, 放入盛有 0.15 mL/L 丁香油溶液中短暂麻醉, 用 1 mL 无菌注射器尾静脉采血, 置于无菌离心管中, 4℃静置 12h, 3500 r/min 离心 15min, 取上层血清移入离心管中放置-80℃超低温冰箱中保存备用。

皮质醇(COR)采用上海继锦化学科技有限公司鱼 ELISA 试剂盒测定, 丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性采用南京建成生物研究所试剂盒测定。

**鳃丝 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶活力** 在氨氮胁迫前后, 冰浴条件下, 取试验青鱼两侧第 2 鳃弓上的鳃丝, 用生理盐水润洗, 滤纸吸干水分, 用于鳃丝 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶(NKA)活性测定。其测定参照胡毅等<sup>[19]</sup>的方法。NKA 活性单位定义为: 以每小时每毫克组织蛋白中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为 1 个 ATP 酶活力单位 [μmol P/(mg·h)]。

## 1.4 统计分析

实验结果以平均值±标准差表示, 用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析, 当差异显著时(P<0.05), 则采用 Duncan 进行多重比较; 用 t 检验检测氨氮胁迫前后的变化。

## 2 结果

### 2.1 维生素 E 对青鱼幼鱼生长的影响

随着饲料中 VE 含量的增加, 青鱼幼鱼 SGR 呈升高趋势, 当 VE 含量达到或超过 37.66 mg/kg 时, 其 SGR 均显著高于对照组(P<0.05), 且 37.66、62.97、113.92 和 210.45 mg/kg VE 组组间无显著差异(图 1A)。经折线模型回归分析表明, 青鱼幼鱼获得最高 SGR 时饲料中 VE 有效含量为 45.0 mg/kg (图 1B)。

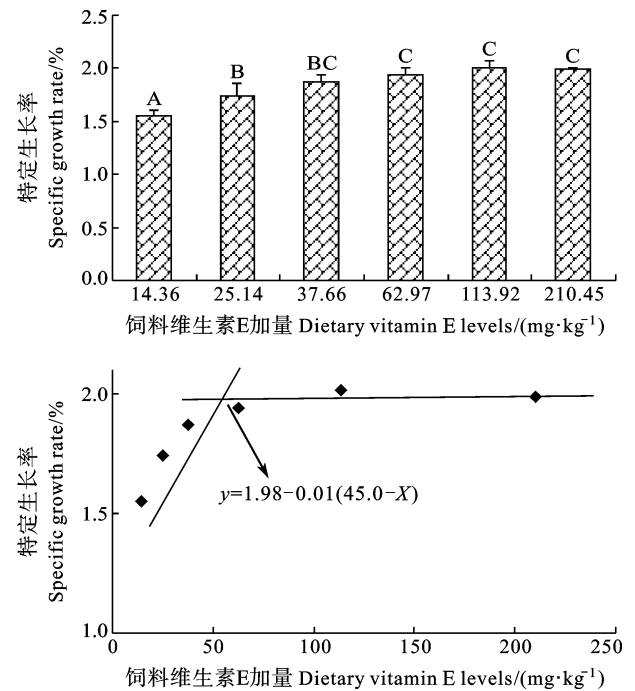


图 1 维生素 E 对青鱼幼鱼生长的影响(平均值±标准差, 重复数=3)  
Fig. 1 Effects of dietary vitamin E levels on growth of juvenile *Mylopharyngodon piceus* (mean ± SD, n=3)  
柱上不同字母表示各组间差异显著(Duncan 多重比较, P<0.05); 下同

The values with different superscripts are significantly different among different groups (Duncan's multiple range test, P<0.05). The same applies below

### 2.2 氨氮胁迫对青鱼幼鱼组织中维生素 E 含量的影响

肌肉、肝脏和血清中 VE 含量均随着饲料中 VE 含量的升高而呈显著上升趋势(P<0.05), 且当饲料中 VE 含量达到或超过 113.92 mg/kg 时, 肌肉和肝脏

中 VE 含量均达到饱和状态(图 2)。

氨氮胁迫使青鱼肌肉和肝脏中 VE 有下降趋势,各处理组肌肉中 VE 含量胁迫前后差异不显著,而肝脏中 VE 含量在氨氮胁迫前后均差异显著( $P < 0.05$ ),胁迫后,210.45 mg/kg VE 组肝脏 VE 含量仍显著高于其他组( $P < 0.05$ )。氨氮胁迫前后对照组青鱼血清 VE 含量无显著变化,但 62.97 和 210.45 mg/kg VE 组血清 VE 含量有升高趋势,仅 210.45 mg/kg VE 组血清 VE 含量胁迫前后差异显著,且胁迫后 62.97 和 210.45 mg/kg VE 组血清 VE 含量仍显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

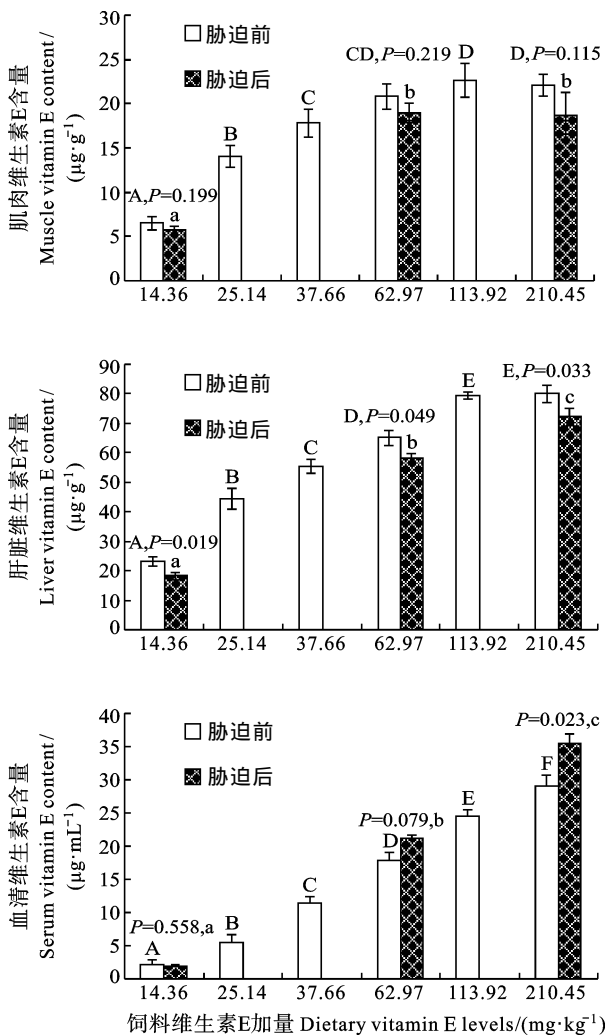


图2 维生素E对氨氮胁迫前后组织维生素E含量的影响

Fig. 2 Effects of dietary vitamin E on tissue vitamin E contents of juvenile *Mylopharyngodon piceus* before and after ammonia-nitrite stress  
P 值表示同一剂量组氨氮胁迫前后的比较( $t$  检验)

P values are the comparative results ( $t$  test) of the same dose groups before and after ammonia-nitrite stress

### 2.3 氨氮胁迫对部分血清生化指标的影响

饲料 VE 对血清 COR 无显著影响(图 3), 随着饲

料 VE 含量的升高, 血清 MDA 含量呈下降趋势且 210.45 mg/kg VE 组 MDA 含量显著低于对照组( $P < 0.05$ )。血清 T-SOD 和 CAT 活性随着饲料 VE 含量升高呈上升趋势, 当 VE 含量超过 37.66 mg/kg 时, CAT 活性显著高于对照组, 而 VE 含量达到 210.45 mg/kg 时, T-SOD 活性才显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

氨氮胁迫使血清 T-SOD 和 CAT 活性降低, COR 和 MDA 含量升高, 其中氨氮胁迫使对照组 COR 和 MDA 含量显著升高( $P < 0.05$ )。但饲料中 VE 能有效降低胁迫后血清 COR 和 MDA 升高幅度, 62.97 和 210.45 mg/kg VE 添加组氨氮胁迫前后 COR 含量差异不显著, 且胁迫后 210.45 mg/kg VE 组 COR 含量显著低于对照组( $P < 0.05$ ); 62.97 和 210.45 mg/kg VE 组氨氮胁迫前后 MDA 含量虽显著升高, 但氨氮胁迫后, 210.45 mg/kg VE 组 MDA 含量仍显著低于对照组( $P < 0.05$ )。氨氮胁迫对各处理组血清 CAT 活性无显著影响, 却显著降低了对照组 T-SOD 活性( $P < 0.05$ ), 但 62.97 和 210.45 mg/kg VE 组 T-SOD 活性氨氮胁迫前后差异不显著, 且氨氮胁迫后, T-SOD 活性仍显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

### 2.4 氨氮胁迫对鳃丝 NKA 活性的影响

饲料中 VE 对青鱼鳃丝 NKA 活性无显著影响(图 4)。在氨氮胁迫后, 对照组和 62.97 mg/kg VE 组 NKA 活性均有所下降, 而 210.45 mg/kg VE 组 NKA 活性有所上升, 仅对照组鳃丝 NKA 活性胁迫前后差异显著( $P < 0.05$ ), 且胁迫后 210.45 mg/kg VE 组均显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

饲料中 VE 含量在一定范围内可明显改善鱼类的生长性能, 缺乏或过量均会对生长产生负面效应<sup>[20-22]</sup>。本研究得到类似结果。通过折线模型分析得出, 青鱼获得最大特定生长率时 VE 有效含量为 45.0 mg/kg, 与许氏平鲈(*Sebasres schlegeli*)(VE 有效需求量 45 mg/kg)<sup>[21]</sup>的 VE 有效需求量相似。但低于大西洋鲑(*Salmo salar*)(VE 有效需求量 60 mg/kg)<sup>[23]</sup>、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)(VE 有效需求量 60.5 mg/kg)<sup>[24]</sup>、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus Rafinesque*)(VE 有效需求量 100 IU/kg)<sup>[20]</sup>、鲤(*Cyprinus carpio*)(VE 有效需求量 119 mg/kg)<sup>[22]</sup>, 高于杂交条纹鲈(*Morone saxatilis*)(VE 有效需求量 28 mg/kg)<sup>[25]</sup>。不同鱼类对 VE 的代谢率不同, 可能导致对 VE 需求

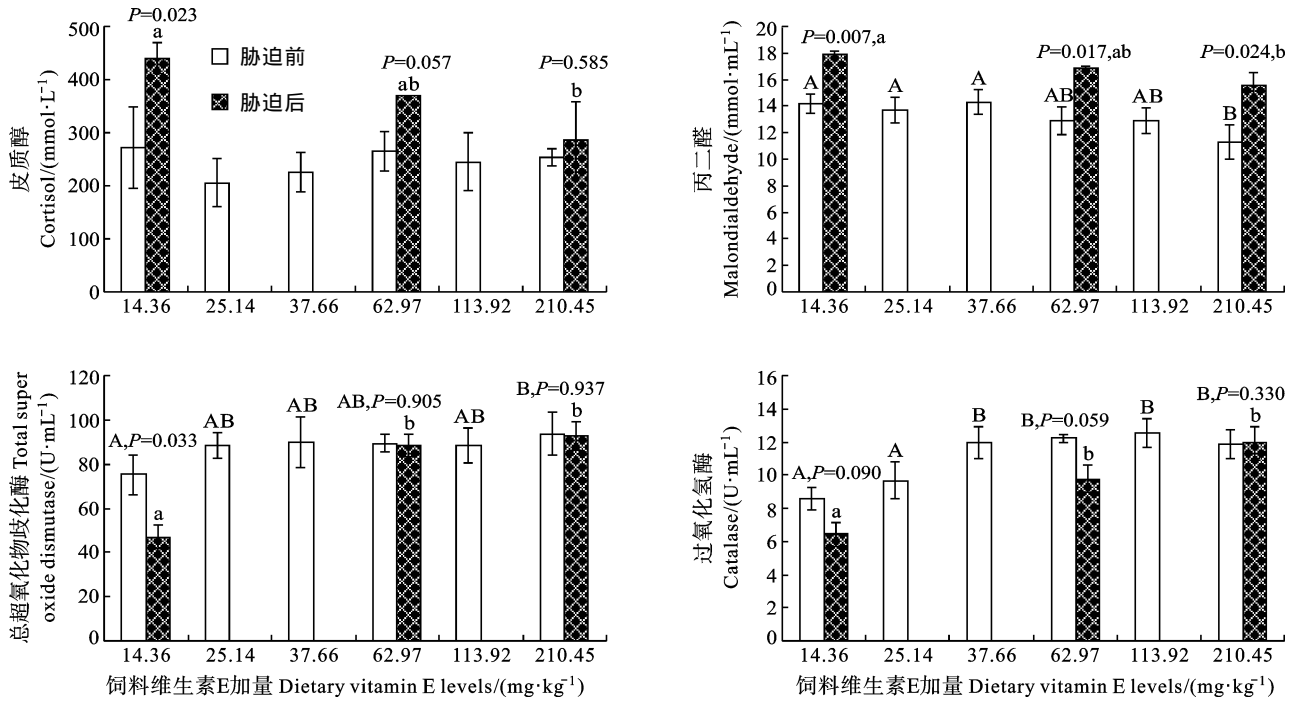
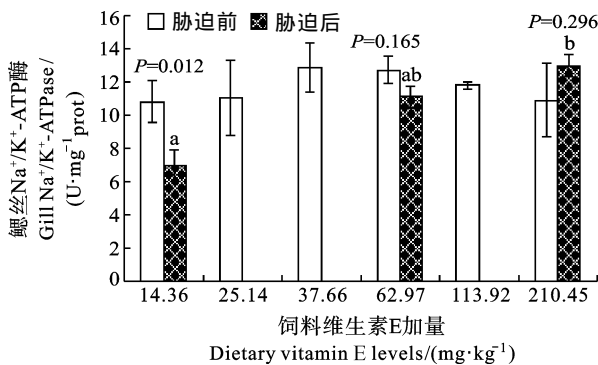


图 3 维生素 E 对氨氮胁迫前后青鱼幼鱼血清生化指标的影响

Fig. 3 Effects of dietary vitamin E on serum biochemical indexes of juvenile *Mylopharyngodon piceus* before and after ammonia-nitrite stress图 4 维生素 E 对氨氮胁迫前后青鱼幼鱼鳃丝 NKA 活性的影响  
Fig. 4 Effect of dietary vitamin E on gill NKA activities of juvenile *Mylopharyngodon piceus* before and after ammonia-nitrite stress

存在差异, 此外, 还与饲料的组成、实验鱼规格、投喂次数及水平、实验条件等多种因素有关。

组织中 VE 含量与饵料中 VE 的含量呈正相关性<sup>[24]</sup>, 但随摄入 VE 量的增加, 组织中 VE 的积累量将到达饱和<sup>[21, 24]</sup>。在本实验中也存在同样的趋势, 随着饵料中 VE 含量的升高, 肌肉、肝脏和血清中 VE 含量呈显著升高趋势, 当 VE 含量超过 113.92 mg/kg 时, 肌肉和肝脏中 VE 含量变化趋于饱和。氨氮胁迫对肌肉 VE 含量无显著影响, 但使各组肝脏中 VE 含量显著降低, 且胁迫后 62.97 和 210.45 mg/kg VE 组血清 VE 含量均有不同程度的升高。有

学者<sup>[25]</sup>认为, 肝脏内可能存在一个维生素 E 的“库”, 在调节外界环境应激上存在相关性。当鱼体受到应激后, 肝脏中储存的维生素 E 可能被释放至血液中, 缓解机体因应激所受氧化胁迫而导致抗氧化物质含量的下降。而氨氮胁迫使血液中 VE 含量升高, 可能跟胁迫后机体动用肝脏中储存的 VE 有关。然而, 中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)<sup>[17]</sup>的研究发现, 在酸应激后, 中华鳖肝脏中 VE 并无显著变化, 其原因可能与应激的类型、强度和应激时间的长短等因素有关。

动物体内参与清除体内过多自由基的防御系统包括非酶系统和酶系统。非酶系统主要包括 VE、VC、谷胱甘肽及微量元素等; 酶系统主要包括 SOD(清除超氧阴离子)、CAT(清除过氧化氢)等。VE 作为细胞内抗氧化剂, 可稳定多不饱和脂肪酸及脂肪合成与分解的中间产物不被氧化破坏, 还可影响花生四烯酸的代谢和前列腺素的功能<sup>[26]</sup>。在甲壳类动物如中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis* Milne-Edwards)<sup>[26]</sup>、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)<sup>[27]</sup>, 鱼类如大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)<sup>[28]</sup>、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)<sup>[29]</sup>等研究表明, VE 可显著提高机体抗氧化能力, 降低脂质过氧化产物 MDA 产生<sup>[29, 30]</sup>。本实验得到相似结果, 随着饵料中 VE 含量的增加, 青鱼血清 T-SOD 和 CAT 活性呈升高趋

势,血清MDA含量呈下降趋势。在中华鳖<sup>[17]</sup>和建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)<sup>[18]</sup>的研究中,VE还能有效提高机体抵抗环境应激的能力,但暂无关于VE增强水产动物抗氨氮胁迫的相关报道。本研究结果显示,氨氮胁迫虽对各处理组血清CAT活性无显著影响,但显著降低了对照组血清T-SOD活性,而饲料中VE能有效缓解氨氮胁迫对血清T-SOD活性的影响。氨氮胁迫还显著增加了各处理组青鱼血清MDA含量,但62.97和210.45 mg/kg VE组胁迫后MDA含量仍低于对照组。这表明,饲料中VE可增强机体抗氧化能力,缓解因氧化胁迫导致丙二醛的产生,从而能有效增强机体抗氨氮胁迫能力。

下丘脑-垂体-肾间组织轴是鱼类应激调节中枢,能释放促肾上腺皮质激素,促进头肾细胞皮质醇激素的合成与释放,而皮质醇激素通常不被储存,直接进入血液。因此,COR常作为衡量鱼体应激强度的指标<sup>[13]</sup>。在鱼类受到外界环境刺激后,血液中COR明显升高<sup>[19]</sup>。有研究表明,动物血液中COR与VE水平呈负相关<sup>[31]</sup>。但在本研究中,各处理组血清中皮质醇含量无显著差异,这与中华鳖<sup>[17]</sup>的研究结果相似。氨氮胁迫显著增加了对照组青鱼血清COR含量,而饲料中VE可有效缓解氨氮胁迫造成的血清COR升高,胁迫后210.45 mg/kg VE组COR显著低于对照组。这说明VE对应激后COR的升高有明显抑制作用,与VE调节中华鳖<sup>[17]</sup>、金鲷(*Sparus aurata*)<sup>[31]</sup>等受环境胁迫后COR的研究结果相似。

鳃是鱼类呼吸、氨氮排泄及渗透调节的主要部分,NKA是鳃组织泌氯细胞及细胞器的膜上存在的一种蛋白酶,在鱼体渗透调节过程中起着非常重要的作用。氨氮胁迫对青鱼鳃丝NKA活性可产生显著影响,氨氮胁迫6h后,青鱼鳃渗透调节被有效激活,鳃丝NKA活性在6—48h呈上升趋势<sup>[19]</sup>。目前,有关VE对水产动物鳃丝NKA活性的影响无相关报道,但何敏<sup>[32]</sup>指出,VE可显著提高斑点叉尾鲴肝胰脏和肠道NKA活性,此外,在人<sup>[33]</sup>和大鼠<sup>[34]</sup>的研究中发现,VE可提高应激下红细胞NKA活性。本研究显示,VE对青鱼鳃丝NKA活性虽无显著影响,但氨氮胁迫使对照组NKA显著降低,而62.97和210.45 mg/kg VE组NKA却无显著差异且210.45 mg/kg VE组胁迫后均显著高于对照组。这说明VE在调节氨氮胁迫后鳃丝NKA活性起到一定促进作用。

综上所述,VE可促进青鱼生长,其获取最大生长的有效VE需求为45.0 mg/kg。VE可提高机体血清抗氧化酶活性,抑制MDA产生,增加机体抗氧化能力,还可缓解胁迫对机体的应激强度、对抗氧化系统和渗透调节酶活性的影响,从而提高机体抗环境胁迫能力。

#### 致谢:

衷心感谢刘巧林、马晓、金红春、周伟、刘敏、姚一斌、王晓娜、高巍、金柏涛、何志刚等在实验样品采集过程中提供热心的帮助!

#### 参考文献:

- [1] Haywood G P. Ammonia toxicity in teleost fishes: a review [J]. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Science*, 1983, **1177**: 1—35
- [2] Handy R D, Poxton M G. Nitrogen pollution in mariculture: toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1993, **3**(3): 205—241
- [3] Romano N, Zeng C S. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus* [J]. *Aquaculture*, 2007, **266**(1—4): 246—254
- [4] Ching B, Chew S F, Wong W P, et al. Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (mudskipper) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, **95**(3): 203—212
- [5] Huang H Z, Li Y, Song X H, et al.  $\text{NH}_4^+$ -N stress on immune function of *Eriocheir sinensis* [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2006, **37**(3): 198—205 [黄鹤忠, 李义, 宋学宏, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 免疫功能的影响. 海洋与湖沼, 2006, **37**(3): 198—205]
- [6] Liu C H, Chen J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, **16**(3): 321—334
- [7] Jiang G J, Yu R C, Zhou M J. Modulatory effects of ammonia-N on the immune system of *Penaeus japonicus* to virulence of white spot syndrome virus [J]. *Aquaculture*, 2004, **241**(1—4): 61—75
- [8] Qiu D Q, Zhou X J, Qiu M S. Study on anti-disease ability of *Litopenaeus vannamei* and the biological control of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage under stresses of ammonia nitrogen [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(4): 456—461 [邱德全, 周鲜娇, 邱明生. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾抗病力和副溶血弧菌噬菌体防病效果研究. 水生生物学报, 2008, **32**(4): 456—461]

- [9] Bucher F, Hofer R. The effects of treated domestic sewage on three organs (gills, kidney, liver) of brown trout (*Salmo trutta*) [J]. *Water Research*, 1993, **27**(2): 255—261
- [10] Zhou X, Dong Y W, Wang F, *et al.* The effect of high ammonia concentration on gill structure alternation and expression of *sod* and *hsp90* genes in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **37**(2): 321—328 [周鑫, 董云伟, 王芳, 等. 急性氨氮胁迫对于草鱼 *sod* 和 *hsp90* 基因表达及鳃部结构的影响. 水生生物学报, 2013, **37**(2): 321—328]
- [11] Romano N, Zeng C S. Importance of balanced  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ratios for blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, to cope with elevated ammonia-N and differences between *in vitro* and *in vivo* gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase responses [J]. *Aquaculture*, 2011, **318**(1—2): 154—161
- [12] Mai K S, Ai Q H, Xu W, *et al.* Stress in Aquaculture and Its Prevention with Emphasis on Nutritional Methods [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2004, **34**(5): 767—774 [麦康森, 艾庆辉, 徐玮, 等. 水产养殖中的环境胁迫及其预防——营养学途径. 中国海洋大学学报, 2004, **34**(5): 767—774]
- [13] Wise D J, Tomasso J R, Schwedler T E, *et al.* Effect of vitamin E on the immune response of Channel catfish to *Edwardsiella ictaluri* [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1993, **5**(3): 183—188
- [14] Montero D, Tort L, Robaina L, *et al.* Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurate*) juveniles [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2001, **11**(6): 473—490
- [15] Carballo E C, Tuan P M, René J M, *et al.* Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in *Batch cultivation* [J]. *Biomolecular Engineering*, 2003, **20**(4—6): 139—147
- [16] Gao M H. Effects of supplemental vitamin C and E in diet under nitrite stress on some blood biochemical indexes and antioxidant capability of *Carassius auratus gibelio* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University Master's Degree Dissertation. 2008 [高明辉. VC、VE 对亚硝酸盐胁迫下异育银鲫血液指标及抗氧化能力的影响. 武汉: 华中农业大学硕士论文. 2008]
- [17] Zhou X Q, Xie M X, Niu C J, *et al.* Effects of the combination of vitamin C and E on growth, liver vitamin C and E, and levels of serum cortisol in stressed and non-stressed juvenile soft-shelled turtles *Pelodiscus sinensis* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2004, **50**(2): 158—164 [周显青, 谢孟峡, 牛翠娟, 等. 维生素 C 和 E 合用对应激和非应激中华鳖幼鳖生长、肝脏维生素 C 和 E 以及血清皮质醇含量的影响. 动物学报, 2004, **50**(2): 158—164]
- [18] Wang G Q, Niu X T, Lu H M, *et al.* Effect of dietary vitamin E and DHA Levels on growth and feed and differentiation of *Cyprinus carpio* var. *jian* juvenile in different stocking density [J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2010, **32**(5): 548—554 [王桂芹, 牛小天, 卢洪梅, 等. 饲料中添加 VE 和 DHA 对不同养殖密度建鲤生长、摄食和分化的影响. 吉林农业大学学报, 2010, **32**(5): 548—554]
- [19] Hu Y, Huang Y, Zhong L, *et al.* Effects of ammonia stress on the gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, microstructure and some serum physiological-biochemical indices of juvenile black carp (*Mylopharyngodon piceus*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, **36**(4): 538—545 [胡毅, 黄云, 钟蕾, 等. 氨氮胁迫对青鱼幼鱼鳃丝  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶、组织结构及血清部分生理生化指标的影响. 水产学报, 2012, **36**(4): 538—545]
- [20] He M, Wang K Y, Zhang Y. Effect of vitamin E on SS expression in gastrointestinal tract of channel catfish, *Ictalurus punctatus Rafinesque* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(1): 220—224 [何敏, 汪开毓, 张宇. 维生素 E 对斑点叉尾鮰胃肠道生长抑素表达的影响. 水生生物学报, 2010, **34**(1): 220—224]
- [21] Bai S, Lee K J. Different levels of dietary DL- $\alpha$ -tocopherol acetate affect the vitamin E status of juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* [J]. *Aquaculture*, 1998, **161**: 405—414
- [22] Watanabe T, Takeuchi T, Matsui M, *et al.* Effects of  $\alpha$ -tocopherol deficiency on carp: VII The relationship between dietary levels of linoleate and  $\alpha$ -tocopherol requirement [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1977, **43**(8): 935—946
- [23] Hamre k, Lie O. Minimum requirement of vitamin E for Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at first feeding [J]. *Aquaculture Research*, 1995, **26**(3): 175—184
- [24] Zhou L B, Zhang W, Wang A L, *et al.* Effects of dietary vitamin E supplement on growth, tissue vitamin E concentration and immune responses of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2009, **33**(1): 95—102 [周立斌, 张伟, 王安利, 等. 饲料维生素 E 添加量对花鲈生长、组织中维生素 E 积累量和免疫指标的影响. 水产学报, 2009, **33**(1): 95—102]
- [25] Kocabas A M, Gatlin III D M. Dietary vitamin E requirement of hybrid striped bass (*Morone chrysops* female  $\times$  *M. saxatilis* male) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 1999, **5**(1): 3—7
- [26] Ai C X, Chen L Q, Liu X L, *et al.* Effect of dietary vitamin E on the  $\text{Po}$ ,  $\text{U}_a$  and  $\text{U}_l$  activities of chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Ochenologia et Limnologia Sinica*, 2008, **39**(2): 119—123 [艾春香, 陈立乔, 刘晓玲, 等. 维生素 E 对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 酚氧化酶、抗菌力和溶菌酶活性的影响. 海洋与湖沼, 2008, **39**(2): 119—123]
- [27] Hu J R, Wang A L, Cao J M. Effects of dietary vitamin e and selenium on the antioxidant system of shrimp *Litopenaeus Vannamei* [J]. *Ochenologia et Limnologia Sinica*, 2010, **41**(1): 68—74 [胡俊茹, 王安利, 曹俊明. 维生素 E 和硒互作对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 抗氧化系统的调节作用. 海洋与湖沼, 2010, **41**(1): 68—74]
- [28] Wei Y T, Wang X J, Mai K S, *et al.* Effect of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation, and tissue antioxidant capacity of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* [J]. *Pe-*

- riodical of Ocean University of China*, 2011, **41**(6): 45—50 [魏玉婷, 王小洁, 麦康森, 等. 饲料中的维生素 E 对大菱鲆幼鱼生长、脂肪过氧化及抗氧化能力的影响. 中国海洋大学学报, 2011, **41**(6): 45—50]
- [29] Chen C, Xiong J, Zuo Y S, *et al.* Effects of vitamin E levels on growth performance and immune function of juvenile *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, **17**(3): 521—526 [陈骋, 熊晶, 左永松, 等. 饲料中不同维生素 E 添加量对黄颡鱼幼鱼生长性能及免疫功能的影响. 中国水产科学, 2010, **17**(3): 521—526]
- [30] Peng L I, Gatlin III D M. Dietary vitamin E requirement of the red drum *Sciaenops ocellatus* [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2009, **15**(3): 313—319
- [31] Montero D, Tort L, Robaina L, *et al.* Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2001, **11**(6): 473—490
- [32] He M. Effects of vitamin E on growth performance, meat quality and immune responses in channel catfish, (*Ictalurus punctatus Rafinesque*) [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University Doctor Degree Dissertation. 2009 [何敏. 维生素 E 对斑点叉尾鲷生长性能、免疫功能及肉质影响的机理研究. 雅安: 四川农业大学博士论文. 2009]
- [33] Wang F, Chen Y M, Dong Z S. Effect of dietary fat and vitamin E on the changes of erythrocytic membrane Na, K-ATPase and LPO in the plasma of cold-exposed human [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 1996, (1): 39—43 [王枫, 陈耀明, 董兆申. 高膳食和 VE 对冷暴露人红细胞膜 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活性及血浆脂质过氧化的影响. 营养学报, 1996, (1): 39—43]
- [34] Wang F, Dong Z S. The effect of dietary Vitamin E on content of MDA and activity of (Na, K)-ATPase in RBC membrane of cold-stress rats [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 1998, **17**(2): 696—698 [王枫, 董兆申. VE 对冷应激大鼠红细胞膜丙二醛含量和钠, 钾-ATP 酶活性的影响. 中国公共卫生学报, 1998, **17**(2): 696—698]

## EFFECTS OF VITAMIN E SUPPLEMENTATION ON GROWTH, IMMUNITY OF JUVENILE BLACK CARP (*MYLOPHARYNGODON PICEUS*) SUBJECTED TO AMMONIA-NITRITE STRESS

HUANG Yun<sup>1</sup>, HU Yi<sup>1</sup>, WEN Hua<sup>2,3</sup>, ZHONG Lei<sup>1</sup>, HUAN Zhi-Li<sup>1</sup>, LI Jin-Long<sup>1</sup>, MAO Xiao-Wei<sup>1,4</sup> and XIAO Tiao-Yi<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China; 2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China; 3. Freshwater Fishery Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 4. Yiyang Yihua Aquatic Products Co. Ltd., Yiyang 413000, China)

**Abstract:** An 8-week feeding experiment was conducted to evaluate the effects of dietary vitamin E (VE) supplementation on growth, immunity of juvenile black carp [initial average weight of (7.27±0.40) g] subjected to ammonia-nitrite stress. Six practical diets were formulated to contain 14.36 (control), 25.14, 37.66, 62.97, 113.92, and 210.45 mg vitamin E equivalent/kg diet, supplied as VE acetate. After feeding for 8 weeks, according to growth, the black carp in control, 62.97 and 210.45 mg/kg vitamin E treatment groups were selected and subjected to ammonia-nitrite stress (20 mg/L) for 24h. The results indicated that the dietary VE content for the maximum specific growth rate (SGR) was about 45.0 mg/kg. The vitamin E levels in the tissues of liver, muscle and the serum were positively correlation with diet vitamin E content, and no significant differences were observed among fish fed with the diets that had equal to or higher than 113.92 mg/kg of vitamin E. No significant difference in gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) activity were observed among these treatments. However, with increasing diet vitamin E content, activities of total superoxide dismutase (T-SOD) and catalase (CAT) increased, and malondialdehyde (MDA) content decreased. Each group of muscle vitamin E concentration and CAT activity were not affected by ammonia-nitrite stress, although liver vitamin E concentration decreased significantly and serum VE level increased in the 62.97 and 210.45 mg/kg VE treatments. After the stress, T-SOD and gill NKA activities in the control group decreased significantly and cortisol content increased significantly ( $P < 0.05$ ). In comparison, activities of T-SOD, NKA and cortisol showed no significant changes. MDA content in each group increased significantly after stress. However, for the 210.45 mg/kg VE treatment group, MDA content was significantly lower than the control group ( $P < 0.05$ ). Our results indicated that the effective VE requirement of juvenile black carp for optimal growth may be 45.0 mg/kg diet, and higher vitamin E in diet could improve non-immune response and anti ammonia-nitrite stress ability of black carp.

**Key words:** Vitamin E; *Mylopharyngodon piceus*; Growth; Immunity; The anti ammonia-nitrite capacity