

doi: 10.7541/2015.33

饲喂蚕豆对草鱼抗氧化能力及免疫机能的影响

吴康^{1,2,3} 黄晓声⁴ 金洁南^{1,2} 李男⁴ 张学振^{1,2}

(1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 武汉 430070;
3. 湖北省农业科学院经济作物研究所, 武汉 430064; 4. 中山市水产技术推广中心站, 中山 528403)

摘要: 投喂蚕豆 100d 左右, 草鱼肌肉的弹性和咀嚼性增强, 肌肉品质显著改善, 此种模式养殖的草鱼俗称“脆肉鲩”。实验比较了投喂蚕豆与商用配合饲料的草鱼, 在养殖过程中(30d、60d、100d)机体抗氧化能力及免疫机能的异同, 以了解脆肉鲩肌肉品质改变过程中鱼体的生物学变化。实验结果表明, 投喂蚕豆显著影响了草鱼血清总抗氧化能力(T-AOC)、血清丙二醛(MDA)含量及肝胰脏超氧化物歧化酶(SOD)活力, 但对肝胰脏 T-AOC、MDA 含量、谷胱甘肽(GSH)含量及血清 SOD 活力无显著影响。实验 30d 和 60d 时, 投喂蚕豆的草鱼机体抗氧化能力强于投喂配合饲料的草鱼, 但实验 100d 时两种养殖模式的草鱼机体抗氧化能力无显著差异。投喂蚕豆对草鱼免疫机能有一定的影响, 实验 100d 时, 投喂蚕豆的草鱼血液红细胞数量(RBC)及白细胞数量(WBC)显著高于投喂配合饲料的草鱼。投喂蚕豆的草鱼血清 TP、ALB、GLB 含量在实验 30d 时显著低于投喂配合饲料的草鱼, 在实验 60d 时与投喂配合饲料的草鱼无显著差异, 在实验 100d 时又显著低于投喂配合饲料的草鱼。投喂蚕豆显著影响了草鱼脾指数及脾脏中免疫相关基因的表达, 实验末期, 在投喂蚕豆的草鱼脾脏中 *IL-1 β* 、*MHC*、*IFN-1*、*TNF- α* 的表达量显著高于投喂配合饲料的草鱼。以上结果表明, 投喂蚕豆初期鱼体抗氧化能力增强, 随着投喂时间的增加, 鱼体抗氧化能力降低至与投喂配合饲料相当的水平; 投喂蚕豆使草鱼产生了免疫应答。

关键词: 草鱼; 蚕豆; 脆肉鲩; 抗氧化; 免疫

中图分类号: S917 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2015)02-0250-09

使用蚕豆(*Vicia faba*)喂养草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*), 可提高草鱼的肌肉品质, 这种独特的养殖方式最早出现在 20 世纪 70 年代的广东省中山市。人们使用浸泡 24h 的去壳蚕豆连续投喂草鱼 100d 左右, 养成的草鱼的肌肉较使用商用配合饲料养出的草鱼的肌肉具有更高的硬度和咀嚼性^[1-6], 这种使用蚕豆喂养出的草鱼俗称“脆肉鲩”, 其因肌肉久煮不烂、耐咀嚼而深受人们喜爱。投喂蚕豆不仅可以改变草鱼的肌肉品质, 鲫(*Carassius auratus*)^[1, 7]、罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[8]、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)^[9] 在投喂蚕豆后, 肌肉品质也会发生变化。

近年来, “蚕豆改变草鱼肌肉品质”的这一现象

吸引了诸多学者的注意力, 但大多数研究集中在探讨脆肉鲩肌肉质构特性及肌肉营养成分方面, 关于脆肉鲩在养殖过程中的生理生化变化鲜有报道。已有研究表明, 鱼体的营养状况与免疫状况密切相关^[10, 11], 营养物质不仅促进鱼体生长, 同时也刺激鱼体的免疫系统^[12]。此外, 抗营养因子也对动物的健康具有不良影响^[13]。蚕豆的营养成分并不能较好满足草鱼的营养需求, 且蚕豆中含有大量抗营养因子, 长期投喂蚕豆, 容易导致草鱼营养不良, 其免疫机能也可能受到影响。此外, 生产实践表明, 脆肉鲩肌肉变化是一个时间依赖性的过程, 在养殖后期肌肉的变化更为明显。基于此, 本研究主要探讨饲喂蚕豆及养殖时间对草鱼抗氧化能力及免疫机能的影响,

收稿日期: 2014-04-14; 修订日期: 2014-08-19

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-46-15A); 中山市水产技术推广中心站项目资助

作者简介: 吴康(1988—), 男, 陕西安康人; 硕士; 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: wuk@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 张学振, E-mail: xuezhen@mail.hzau.edu.cn

以期为进一步探索脆肉鲩肌肉品质改变的原因提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验鱼及管理

实验在广东省中山市大涌镇一养殖场(北纬 22°26'48"; 东经 113°15'22")的一个池塘中进行, 该池塘平均水深 1.5 m, 池塘中设置 6 个围隔, 每围隔面积约 100 m²。300 尾规格均匀的草鱼被随机均分到 6 个围隔中, 在进行两周的驯养过程中, 每天用等量的商用配合饲料两次饱食投喂(9:00 和 18:00)。在驯养期后, 将 6 个围隔分为两个处理组, 每处理组 3 个重复。其中一个处理组投喂商用配合饲料(Formula feed, FF, 中山市新泰饲料厂, 903 鱼料), 另一处理组投喂用池塘水浸泡过 24h 的去壳蚕豆(Faba bean, FB), 每天两次饱食投喂(9:00 和 18:00)。实验从 2012 年 7 月中旬开始至 2012 年 11 月上旬结束。蚕豆和商用配合饲料常规成分见表 1。

1.2 取样

在驯养期结束后的第 30、第 60 和第 100 天分别从每个围隔中取 6 尾鱼, 经 MS-222 麻醉后称重(各时间点鱼体重如表 2 所示)。臀鳍后方尾动脉或尾静脉取血(抗凝血和非抗凝血各一份), 抗凝血立即进行红、白细胞计数, 计数操作按照南京建成生物工程研究所的试剂盒说明书进行(仅对养殖 100d 时的血液红、白细胞进行了计数, 且每围隔仅挑选了 1 尾鱼的抗凝血进行计数); 非抗凝血以 3500 r/min 离心 15min 后, 取上层血清。之后将实验鱼解剖, 分离肝胰脏及脾脏, 并称重以计算脾指数

(脾指数为脾重占体重的百分比)。用于测定酶活力的肝胰脏组织置于液氮中; 用于 Real-time PCR 的脾脏组织浸于 sample protector (TaKaRa)中, 之后置于液氮中。所有样品经液氮速冻后, 用干冰转运至实验室后置于-80℃保存。

1.3 抗氧化相关指标的测定

同一取样点同一围隔 6 尾鱼的血清样品等量混匀后, 按照南京建成生物工程研究所的试剂盒说明书测定血清总抗氧化能力(Total antioxidative capacity, T-AOC)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活力及丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量。同一取样点同一围隔 6 尾鱼的肝胰脏样品等量混合后, 按照南京建成生物工程研究所的试剂盒说明书测定肝胰脏 T-AOC、SOD 活力、MDA 及谷胱甘肽(Glutathione, GSH)含量。

1.4 血清 TP、ALB、GLB 的含量测定

同一取样点同一围隔的 6 尾鱼的血清等量混匀后, 使用西门子 ADVIA 2400 全自动生化分析仪测定血清总蛋白(Total protein, TP)、白蛋白(Albumin, ALB)及球蛋白(Globulin, GLB)含量。

1.5 总 RNA 的提取及反转录

同一取样点同一围隔的 6 尾鱼的脾脏样品等量混合后, 依照 RNAiso Plus (TaKaRa)说明书提取脾脏总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳确定 RNA 完整性。通过 OD₂₆₀ 对 RNA 定量后, 取 1 μg RNA 使用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa)进行基因组 DNA 去除反应及反转录, 所得的 cDNA -20℃保存备用。

1.6 荧光定量 PCR

使用 Primer premier 5.0 设计各基因的特异性跨

表 1 蚕豆与配合饲料的常规成分(平均值±标准差, n=3)
Tab. 1 Proximate composition of formula feed and faba bean (Mean±SD, n=3)

成分 Composition	配合饲料 Commercial formula feed	蚕豆 Faba bean	浸泡 24h 的蚕豆(相对于浸泡之前的蚕豆重) Faba bean soaked for 24h
粗蛋白 Crude Protein content (%)	30.21±0.20	27.74±0.72	25.57±1.75
粗脂肪 Crude Lipid content (%)	6.33±0.28	1.26±0.13	1.40±0.08
灰分 Ash content (%)	8.1±0.32	2.78±0.21	2.86±0.13

表 2 各取样点实验用鱼的体重(kg, 平均值±标准误, n=3)
Tab. 2 Body weight of fish at every sampling point (kg, Mean±SE, n=3)

饲料组 Diet	养殖时间 Rearing time (d)			
	0	30	60	100
配合饲料组 FF	1.85±0.04	2.13±0.08	2.37±0.02	3.15±0.12
蚕豆组 FB	1.86±0.02	2.00±0.03	2.11±0.06	2.45±0.09

内含子引物(引物序列见表 3), 扩增的 PCR 产物经测序无误后进行 Real-time PCR。Real-time PCR 在 Rotor-Gene Q(QIAGEN)上进行, 扩增体系使用 SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa)推荐的体系进行。

PCR 反应程序使用 95℃预变性 5min, 95℃ 5s、退火 30s、72℃ 30s、40 个循环, 之后进行溶解曲线分析。每份样品做 3 个复孔。结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行。

表 3 Real-time PCR 中所用引物
Tab. 3 Primers used in Real-time PCR

引物名 Primer	引物序列 Sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	NCBI 登录号 Accession number
<i>β-actin</i> -F	GATGATGAAATTGCCGCACTG	57	M25013.1
<i>β-actin</i> -R	ACCGACCATGACGCCCTGATGT		
<i>IL-1β</i> -F	GAGAGACGGAAACAGCGAT		
<i>IL-1β</i> -R	TTCAGTGACCTCCTTCAAGAC	57	JX014320.1
<i>MHC IIβ</i> -F	TTGTGGGGTTTACAGAGTTTGG		
<i>MHC IIβ</i> -R	TTGATTGGTTGAGGGTAGAAG		
<i>TNFα</i> -F	CATCCATTTAACAGGTGCATAC	57	JQ670915.1
<i>TNFα</i> -R	GCAGCAGATGTGGAAGAG		
<i>IFN 1</i> -F	CTGAAGGAAATGGGTGGAAT		
<i>IFN 1</i> -R	TTATGTGATGGCTGGTATCGG	57	DQ357216.1

1.7 数据分析

对 100d 两处理组的红、白细胞数据分别进行 *t* 检验。其他数据以养殖时间和饲料类型作为固定因素采用 SPSS 17.0 进行双因素方差分析, 并结合 Duncan 氏法进行多重比较。

2 结果

2.1 在饲喂蚕豆过程中草鱼肝胰脏抗氧化能力的变化

由表 4 可知, 养殖时间显著影响草鱼肝胰脏 T-AOC、SOD 活力、MDA 及 GSH 的含量($P<0.05$)。具体表现在: 100d 时肝胰脏的 T-AOC、SOD 活力、MDA 及 GSH 的含量均显著低于 60d 时的($P<0.05$); 60d 时, 肝胰脏的 T-AOC 及 MDA 含量均显著高于 30d 时的($P<0.05$), 而肝胰脏的 SOD 活力与 30d 时差异不显著($P>0.05$), 肝胰脏 GSH 含量显著低于 30d 时的($P<0.05$); 100d 时肝胰脏的 T-AOC、SOD 活力及 GSH 的含量均显著低于 30d 时的($P<0.05$)。不同饲料对草鱼肝胰脏 T-AOC、MDA 及 GSH 的含量没有显著影响($P>0.05$), 但对肝胰脏 SOD 活力有显著影响($P<0.05$), 投喂 FB 的草鱼其肝胰脏 SOD 活力显著高于投喂 FF 的草鱼($P<0.05$)。

饲养时间和饲料对草鱼肝胰脏 SOD 活力及 GSH 含量表现出交互作用($P<0.05$)。表现在: 100d 时, 投喂 FB 的草鱼的肝胰脏 SOD 活力显著低于投喂 FF 的草鱼($P<0.05$); 60d 时, 投喂 FB 的草鱼肝胰

脏 GSH 含量显著高于投喂 FF 的草鱼($P<0.05$); 30d 时, 投喂 FB 的草鱼肝胰脏 GSH 含量显著低于投喂 FF 的草鱼($P<0.05$); 投喂 FB 的草鱼肝胰脏 GSH 含量在 60d 时与 30d 时差异不显著($P>0.05$)。

2.2 在饲喂蚕豆过程中草鱼血清抗氧化能力的变化

由表 5 可知, 养殖时间显著影响草鱼血清 T-AOC、MDA 含量及 SOD 活力($P<0.05$)。100d 时血清 T-AOC 显著低于 60d 及 30d 时的($P<0.05$), 60d 时血清 T-AOC 显著低于 30d 时的($P<0.05$); 100d 时血清 MDA 含量与 60d 时无显著差异($P>0.05$), 均显著低于 30d 时的($P<0.05$); 100d 时血清 SOD 活力与 30d 时无显著差异($P>0.05$), 均显著高于 60d 时的($P<0.05$)。不同饲料对草鱼血清 SOD 活力没有显著影响($P>0.05$), 但对血清 T-AOC 及 MDA 含量有显著影响($P<0.05$)。投喂 FB 的草鱼血清 T-AOC 显著高于投喂 FF 的草鱼($P<0.05$), 而血清 MDA 含量显著低于投喂 FF 的草鱼($P<0.05$)。

饲养时间和饲料对草鱼血清 T-AOC 及 SOD 活力表现出交互作用($P<0.05$)。100d 时, 投喂 FB 的草鱼与投喂 FF 的草鱼血清 T-AOC 无显著差异($P>0.05$); 100d 时, 投喂 FB 的草鱼血清 SOD 活力显著高于投喂 FF 的草鱼($P<0.05$); 60d 时, 投喂 FB 的草鱼血清 SOD 活力显著低于投喂 FF 的草鱼($P<0.05$); 投喂 FF 的草鱼 60d 时的血清 T-AOC 与 30d 及 100d 时的血清 T-AOC 均无显著差异($P>0.05$);

表 4 饲喂蚕豆对草鱼肝胰脏抗氧化能力的影响(平均值±标准误, $n=3$)
Tab. 4 Effect of feeding faba bean on antioxidant ability in liver of grass carp (Mean±SE, $n=3$)

时间 Rearing time	饲料 Diet	T-AOC (U/mg prot.)	MDA (nmol/mg prot.)	SOD (U/mg prot.)	GSH (mg/g prot.)
30d	配合饲料 FF	0.32±0.03 ^a	14.03±1.35	142.20±6.34 ^c	6.62±0.12 ^d
	蚕豆 FB	0.34±0.02 ^a	16.74±1.65	198.07±4.51 ^d	5.18±0.38 ^c
60 d	配合饲料 FF	0.37±0.01 ^a	24.17±4.72	151.09±6.44 ^c	2.90±0.17 ^b
	蚕豆 FB	0.58±0.11 ^b	33.53±5.18	203.59±7.31 ^d	4.83±0.40 ^c
100d	配合饲料 FF	0.23±0.02 ^a	10.98±0.94	105.56±4.41 ^b	2.07±0.13 ^a
	蚕豆 FB	0.20±0.05 ^a	8.64±1.25	83.08±2.72 ^a	1.99±0.05 ^a
主效应 Main effect					
30d		0.33±0.02 ^b	15.39±1.13 ^a	170.13±12.97 ^b	5.90±0.37 ^c
60d		0.47±0.07 ^c	28.85±3.77 ^b	177.34±12.23 ^b	3.86±0.47 ^b
100d		0.22±0.02 ^a	9.81±0.87 ^a	94.32±4.88 ^a	2.03±0.06 ^a
	配合饲料 FF	0.31±0.02	16.39±2.46	130.21±7.37 ^a	3.86±0.70
	蚕豆 FB	0.37±0.06	19.64±4.00	153.73±19.33 ^b	4.00±0.53
P 值 P value					
时间		0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
饲料		0.136	0.218	< 0.001	0.508
时间×饲料		0.081	0.201	< 0.001	< 0.001

注: 在相同的一组数据中若标有不同的字母, 则代表差异显著($P<0.05$); 下同
Note: Means with different superscripts are significantly different ($P<0.05$); the same applies bellow

表 5 饲喂蚕豆对草鱼血清抗氧化能力的影响(平均值±标准误, $n=3$)
Tab. 5 Effect of feeding faba bean on antioxidant ability in serum of grass carp (Mean±SE, $n=3$)

时间 Rearing time	饲料 Diet	T-AOC (U/mL)	MDA (nmol/mL)	SOD (U/mL)
30d	配合饲料 FF	6.07±0.29 ^{bc}	8.55±0.15	40.43±7.24 ^{bc}
	蚕豆 FB	8.19±0.14 ^d	8.01±0.33	45.84±2.73 ^c
60d	配合饲料 FF	5.24±0.26 ^{ab}	7.01±0.31	34.06±4.33 ^{bc}
	蚕豆 FB	6.63±0.46 ^c	6.50±0.84	12.22±1.60 ^a
100d	配合饲料 FF	5.03±0.34 ^a	8.36±0.73	28.61±2.79 ^b
	蚕豆 FB	5.02±0.34 ^a	5.98±0.20	44.39±2.64 ^c
主效应 Main effect				
30d		7.13±0.43 ^c	8.28±0.20 ^b	43.13±3.66 ^b
60d		5.93±0.36 ^b	6.75±0.43 ^a	23.14±5.30 ^a
100d		5.02±0.22 ^a	7.17±0.57 ^a	36.50±3.93 ^b
	配合饲料 FF	5.45±0.21 ^a	7.97±0.31 ^b	34.36±3.08
	蚕豆 FB	6.61±0.43 ^b	6.83±0.38 ^a	34.15±5.61
P 值 P value				
时间		< 0.001	0.019	0.001
饲料		< 0.001	0.012	0.949
时间×饲料		0.012	0.130	0.001

投喂 FF 的草鱼血清 SOD 活力在 30d、60d 及 100d 时差异不显著($P>0.05$)。

2.3 饲喂蚕豆过程中草鱼血清 TP、ALB、GLB 含量的变化

由表 6 可知, 养殖时间对草鱼血清 TP、ALB 及

GLB 含量无显著影响($P>0.05$), 而不同饲料显著影响草鱼血清 TP、ALB 及 GLB 含量($P<0.05$)。投喂 FB 的草鱼血清 TP、ALB 及 GLB 含量显著低于投喂 FF 的草鱼($P<0.05$)。

饲养时间和饲料对草鱼血清 TP、ALB 及 GLB

含量表现出交互作用($P<0.05$)。60d 时, 投喂 FB 的草鱼血清 TP、ALB 及 GLB 含量与投喂 FF 的草鱼无显著差异($P>0.05$); 30d 时, 投喂 FB 的草鱼血清 GLB 含量与投喂 FF 的草鱼无显著差异($P>0.05$); 投

喂 FB 的草鱼在 60d 时的血清 TP 及 GLB 含量显著高于 30d 时及 100d 时的($P<0.05$); 投喂 FF 的草鱼在 60d 时的血清 ALB 含量显著高于 30d 时及 100d 时的($P<0.05$)。

表 6 两处理组草鱼血清总蛋白、球蛋白和白蛋白含量(平均值±标准误, $n=3$)
Tab. 6 TP, GLB and ALB in serum of grass carp (Mean±SE, $n=3$)

时间 Rearing time	饲料 Diet	总蛋白 TP (g/L)	白蛋白 ALB (g/L)	球蛋白 GLB (g/L)
30d	配合饲料 FF	35.16±1.42 ^b	12.40±0.56 ^b	22.76±0.88 ^{bc}
	蚕豆 FB	29.92±1.36 ^a	10.44±0.31 ^a	19.48±1.10 ^{ab}
60d	配合饲料 FF	33.47±1.91 ^{ab}	10.80±0.65 ^a	22.67±1.27 ^{bc}
	蚕豆 FB	35.70±1.65 ^b	11.47±0.48 ^{ab}	24.23±1.17 ^c
100d	配合饲料 FF	37.83±0.81 ^b	12.87±0.35 ^b	24.97±0.48 ^c
	蚕豆 FB	28.83±1.13 ^a	10.47±0.38 ^a	18.37±0.78 ^a
主效应 Main effect				
30d		32.54±1.27	11.42±0.44	21.12±0.86
60d		34.58±1.23	11.13±0.39	23.45±0.85
100d		33.33±2.11	11.67±0.58	21.67±1.53
	配合饲料 FF	35.43±0.93 ^b	12.09±0.39 ^b	23.34±0.59 ^b
	蚕豆 FB	31.20±1.15 ^a	10.73±0.24 ^a	20.47±0.94 ^a
P 值 P value				
时间		0.394	0.614	0.102
饲料		0.005	0.008	0.006
时间×饲料		0.010	0.019	0.009

2.4 饲喂蚕豆对草鱼血液红细胞及白细胞数量的影响

在养殖 100d 后, 两处理组草鱼的血液红细胞及白细胞的数量见表 7。结果显示, 100d 时投喂 FB 的草鱼血液的红细胞数量及白细胞数量均显著高于投喂 FF 的草鱼($P<0.05$)。

2.5 饲喂蚕豆过程中草鱼脾指数的变化

由图 1 可知, 养殖时间对草鱼脾指数无显著影响($P>0.05$); 不同饲料对草鱼脾指数有显著影响($P<0.05$), 投喂 FB 的草鱼的脾指数显著低于投喂 FF 的草鱼 $P<0.05$); 养殖时间和饲料对草鱼脾指数没有交互作用($P>0.05$)。

表 7 养殖 100d 时两处理组草鱼血液红细胞数量及白细胞数量
(平均值±标准误, $n=3$)
Tab. 7 RBC and WBC of grass carp after rearing for 100 days
(Mean±SE, $n=3$)

项目 Variable	配合饲料组 FF	蚕豆组 FB
红细胞数量 RBC ($\times 10^{12}/L$)	2.62±0.02 ^a	3.07±0.04 ^b
白细胞数量 WBC ($\times 10^{10}/L$)	7.68±0.17 ^a	8.64±0.03 ^b

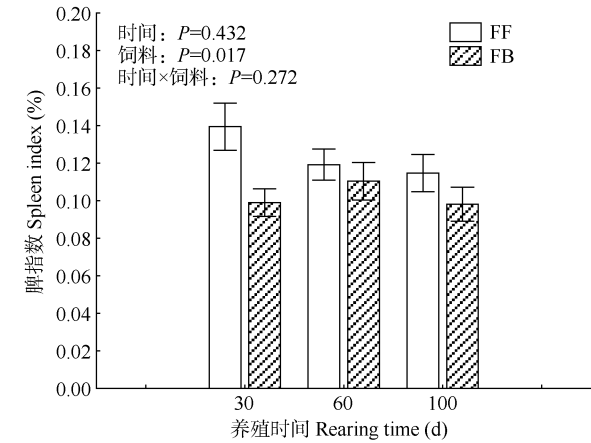


图 1 饲喂蚕豆对草鱼脾指数的影响(平均值±标准误, $n=3$)
Fig. 1 Effect of feeding faba bean on spleen index of grass carp
(Mean±SE, $n=3$)

2.6 饲喂蚕豆过程中草鱼脾脏中免疫相关基因表达的变化

脾脏中免疫相关基因白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complex, MHC)、型干扰素(Interferon-

1, *IFN-1*)、肿瘤坏死因子- α (*Tumor necrosis factors*, *TNF- α*)的表达情况如图 2 所示。由图 2 可知, 饲料、养殖时间均显著影响草鱼脾脏 *IL-1 β* 、*MHC*、*IFN-1*、*TNF- α* 基因的表达($P<0.05$)。投喂 FB 的草鱼脾脏 *IL-1 β* 、*IFN-1*、*TNF- α* 的表达量均显著高于投喂 FF 的草鱼($P<0.05$), 而 *MHC* 的表达量显著低于投喂 FF 的草鱼($P<0.05$)。100d 时, 脾脏 *IL-1 β* 、*MHC*、*IFN-1*、*TNF- α* 基因的表达量均显著高于 30d 时的和 60d 时的($P<0.05$)。

饲养时间和饲料对草鱼脾脏 *IL-1 β* 、*MHC*、*IFN-1*、*TNF- α* 基因的表达有交互作用($P<0.05$)。30d 及 60d 时, *TNF- α* 在投喂 FB 的草鱼脾脏中的表达量与投喂 FF 的草鱼脾脏中的表达量差异不显著($P>0.05$); 100d 时, *MHC* 在投喂 FB 的草鱼脾脏中的表达量显著高于投喂 FF 的草鱼($P<0.05$); 30d 时, *IFN-1* 在投喂 FB 的草鱼脾脏中的表达量显著低于投喂 FF 的草鱼($P<0.05$)。

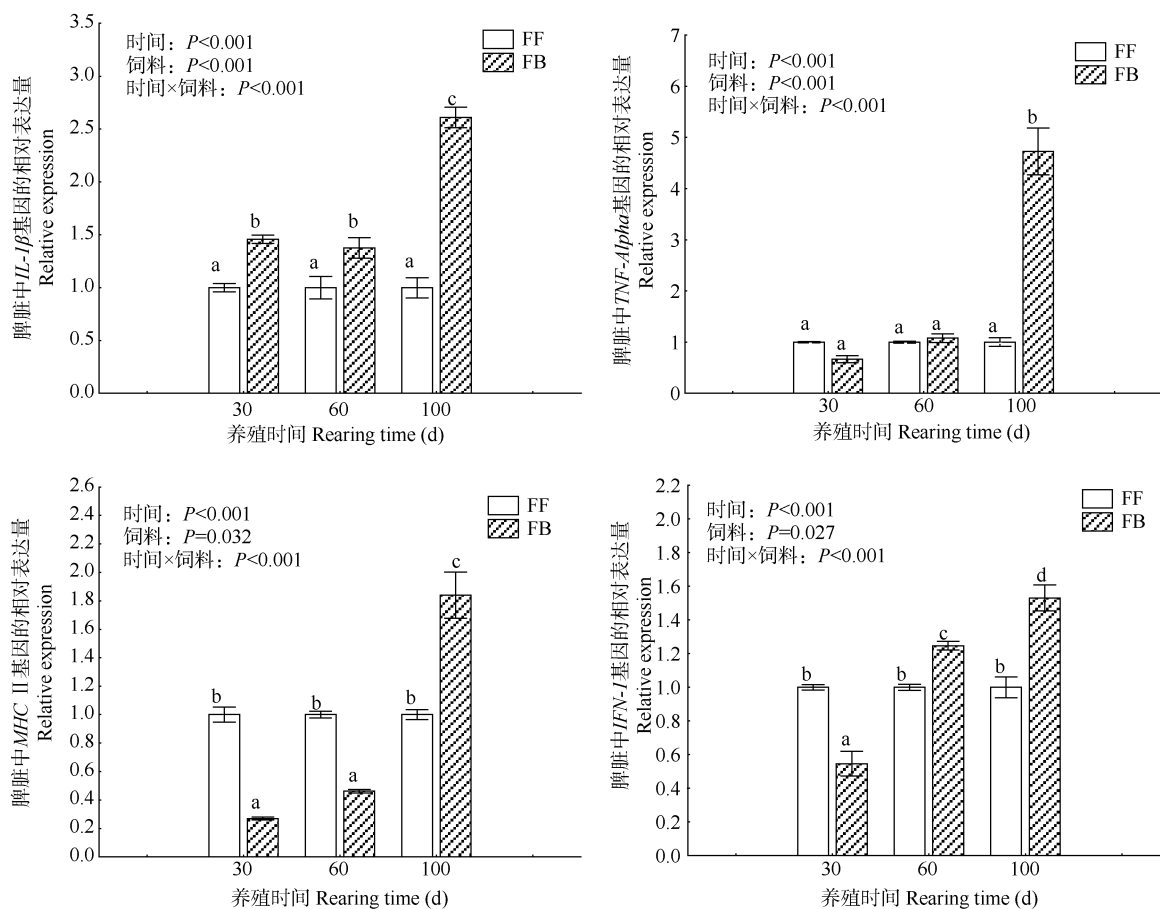


图 2 饲喂蚕豆对草鱼脾脏免疫相关基因表达的影响(平均值 $\pm$ 标准误, $n=3$)

Fig. 2 Transcriptional levels of *IL-1 β* , *TNF- α* , *MHC*、*IFN-1* in spleen of grass carp (Mean $\pm$ SE, $n=3$)

柱上不同字母表示差异显著($P<0.05$)

Bars with different superscripts are significantly different ($P<0.05$); the same applies below

3 讨论

相比于大豆, 同为蝶形花亚科的蚕豆, 在水产动物饲料领域研究较少。在畜禽研究领域, 仅在 20 世纪 80 年代有少数学者研究过饲料中添加蚕豆对鸡、猪生长性能的影响。相关结果表明饲料中蚕豆添加量高于 20% 时, 就会对猪的生长性能产生不利影响; 在母鸡饲料中, 蚕豆的添加量上限为 25%。

然而脆肉鲩这种养殖模式是以蚕豆作为唯一饲料, 长期饲喂蚕豆可能会造成草鱼营养缺乏, 且已有研究表明其生长性能较低^[1], 因而推测脆肉鲩在养成后, 其机体生化指标可能与投喂配合饲料的草鱼有所区别。故本实验从饲喂蚕豆对草鱼抗氧化能力及免疫机能两方面入手, 探讨脆肉鲩肌肉发生变化过程中, 鱼体抗氧化能力及免疫机能的变化, 以为研究脆肉鲩肌肉变化的原因提供参考。

3.1 饲喂蚕豆对草鱼抗氧化能力的影响

蚕豆除了含有单宁、多酚等抗营养因子, 还含有胰蛋白酶抑制因子及血球凝集素等不良因子。有研究表明, 胰蛋白酶抑制因子能够使小鼠体内的自由基增加, 导致氧化应激的产生^[14]; 而血球凝集素具有刺激淋巴细胞转化及分裂的作用。在本实验中, 不同饲料显著影响了草鱼血清 T-AOC 及血清 MDA 含量, 投喂蚕豆的草鱼血清 T-AOC 显著高于投喂配合饲料的草鱼, 而血清 MDA 含量显著低于投喂配合饲料的草鱼。随着养殖时间的推移, 初期投喂蚕豆的草鱼血清 T-AOC 高于投喂配合饲料的草鱼, 血清 MDA 含量及 SOD 活力差异不显著; 后期两处理组草鱼血清 T-AOC 无显著差异, 而投喂蚕豆的草鱼其血清 SOD 活力高于投喂配合饲料的草鱼, 其血清 MDA 含量低于投喂配合饲料的草鱼。这些结果表明, 与投喂配合饲料相比, 投喂蚕豆可提高草鱼血清的抗氧化能力, 降低机体脂质过氧化。而随着养殖时间的推移, 血清总抗氧化能力会降低至与投喂配合饲料的草鱼相当的水平。

对肝胰脏抗氧化能力而言, 不同饲料对草鱼肝胰脏 T-AOC、GSH 及 MDA 含量无显著影响, 但对肝胰脏 SOD 活力有影响。60d 时投喂蚕豆的草鱼肝胰脏 T-AOC、SOD 活力及 GSH 含量均显著高于投喂配合饲料的草鱼, 至 100d 时两处理组肝胰脏 T-AOC 及 GSH 含量差异不显著。这表明投喂蚕豆初期肝胰脏抗氧化能力高于投喂配合饲料的草鱼, 后期与投喂配合饲料的草鱼相当。这可能是因为, 投喂蚕豆初期机体有应激反应, 而随着时间的推移, 机体逐渐适应了投喂蚕豆的养殖模式。

3.2 饲喂蚕豆对草鱼免疫机能的影响

在抵御病原生物侵袭过程中, 鱼类的非特异性免疫发挥着重要作用。白细胞在鱼类非特异性免疫中扮演着重要作用。在本研究中, 100d 时, 饲喂蚕豆的草鱼血液白细胞数量高于饲喂配合饲料的草鱼, 这与唐湘北^[15]的研究结果一致, 表明投喂蚕豆 100d 对草鱼机体的免疫系统有一定的刺激。这可能是由于蚕豆营养成分并不完全符合草鱼的营养需求, 长期以蚕豆作为单一饲料, 对草鱼的免疫机能造成了影响。

脾脏是鱼类的主要免疫器官, 在鱼类的免疫保护方面具有重要意义, 脾指数可以反映免疫器官的生长发育状态^[16]。在本实验中, 饲料对草鱼脾指数有显著影响, 而养殖时间不影响草鱼脾指数, 且

60d 及 100d 时饲喂蚕豆的草鱼与饲喂配合饲料的草鱼的脾指数差异不显著。这表明虽然蚕豆的营养成分不均衡, 但尚未对脾脏造成损伤。

总蛋白(TP)由白蛋白(ALB)和球蛋白(GLB)组成, 其浓度是鱼体健康状况的基本指标^[17]。较高的血清球蛋白含量对应着较强的免疫力^[18], 较高的血清白蛋白标志着较快的生长速度。在本研究中, 饲喂蚕豆的草鱼其血清 TP、ALB、GLB 含量均显著低于饲喂配合饲料的草鱼, 血清 ALB 含量较低可能是脆肉鲩生长较普通草鱼慢的一个原因, 而血清 GLB 含量较低提示饲喂蚕豆的草鱼免疫力较饲喂配合饲料的草鱼弱。从养殖时间上来看, 30d 时饲喂蚕豆的草鱼其血清 TP 及 ALB 均显著低于饲喂配合饲料的草鱼, 60d 时两处理组血清 TP、ALB、GLB 无显著差异, 100d 时饲喂蚕豆的草鱼其血清 TP、ALB 及 GLB 又都显著低于饲喂配合饲料的草鱼。这可能是由于养殖初期草鱼摄食蚕豆造成营养缺乏, 而中期机体代谢系统发挥作用以代偿营养缺乏, 但养殖末期鱼体无法再补偿蚕豆的营养缺乏, 从而造成 100d 时血清 TP、ALB 及 GLB 含量低于饲喂配合饲料的草鱼。

主要组织相容性复合体(MHC)的主要功能是呈递抗原, 使其为 T 细胞所识别, 激活体液免疫和细胞免疫。鱼类 MHC 主要分为 MHC I 和 MHC II 两类, 通常 MHC I 应答细胞内的病毒感染, 而 MHC II 应答细菌的体液反应^[19]。干扰素(IFN)除了具有抑制病毒复制的生物学活性, 还具有促进巨噬细胞吞噬杀菌、调节淋巴细胞转化等功能^[20]。IL-1 β 及 TNF- α 是由单核吞噬细胞分泌的, 是引起炎症反应、抵抗细菌感染的主要介质。投喂蚕豆的草鱼其脾脏中 IL-1 β 、TNF- α 、IFN-1 β 的表达量显著高于投喂配合饲料的草鱼, 且随着实验的进行, 投喂蚕豆的草鱼脾脏中 IL-1 β 、TNF- α 、MHC II、IFN-1 β 的表达量不断升高。这可能是由于蚕豆营养成分不均衡, 或因蚕豆含有血清凝集素等因子, 从而刺激脾脏免疫相关基因高表达。

综上所述, 投喂蚕豆初期鱼体抗氧化能力强于投喂配合饲料的草鱼, 而随着养殖时间的推移, 鱼体抗氧化能力逐渐恢复至与投喂配合饲料的草鱼相当的水平。相比于投喂配合饲料, 饲喂蚕豆会使草鱼血液中红、白细胞数目增多, 会造成草鱼血清球蛋白含量降低, 但会促使脾脏中免疫相关基因的表达

量升高。然而, 脆肉鲩肌肉品质的改变是否与鱼体免疫机能发生变化有关, 则需要进一步的研究探明。

参考文献:

- [1] Li B S. A study of crisping flesh quality of grass carp and crucian carp by broad bean [D]. Thesis for Master of Science. Shanghai Ocean University, Shanghai. 2007 [李宝山. 蚕豆脆化草鱼、鲫鱼肉质的研究. 硕士学位论文, 上海水产大学, 上海. 2007]
- [2] Zhu Z W, Li B S, Ruan Z, *et al.* Differences in the physicochemical characteristics between the muscles of *Ctenopharyngodon idellus* C. et V and *Ctenopharyngodon idellus* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007, **24**(2): 109—112 [朱志伟, 李汴生, 阮征, 等. 脆肉鲩鱼肉与普通鲩鱼肉理化特性比较研究. 现代食品科技, 2007, **24**(2): 109—112]
- [3] Lin W L, Guan R, Zeng Q X, *et al.* Factors affecting textural characteristics of dorsal muscle of crisp grass carp [J]. *Journal of South China University of Technology* (Natural Science Edition), 2009, **37**(4): 134—137 [林婉玲, 关榕, 曾庆孝, 等. 影响脆肉鲩鱼背肌质构特性的因素. 华南理工大学学报(自然科学版), 2009, **37**(4): 134—137]
- [4] Guan L, Zhu R J, Li X Q, *et al.* Muscle characteristics comparison between grass carp and crisped grass carp [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2011, **20**(5): 748—753 [关磊, 朱瑞俊, 李小勤, 等. 普通草鱼与脆化草鱼的肌肉特性比较. 上海海洋大学学报, 2011, **20**(5): 748—753]
- [5] Li Z M, Leng X J, Li X Q, *et al.* Analysis of growth performance, flesh quality and blood biochemical parameters of crisp grass carp [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2012, **40**(3): 186—189 [李志铭, 冷向军, 李小勤, 等. 脆化草鱼生长性能, 肌肉品质, 血清生化指标和消化酶活性分析. 江苏农业科学, 2012, **40**(3): 186—189]
- [6] Lin W, Zeng Q, Zhu Z, *et al.* Relation between protein characteristics and TPA texture characteristics of crisp grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* C. et V) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Journal of Texture Studies*, 2012, **43**(1): 1—11
- [7] Tan Q K, Zhou H K, Li H S, *et al.* Morphological and physiological analysis of crisped silver prussian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, **26**(24): 391—396 [谭乾开, 周鸿凯, 黎华寿, 等. 脆化异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio* Bloch) 生态、生理学研究. 中国农学通报, 2010, **26**(24): 391—396]
- [8] Lun F. A study of crisping fresh quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and hybrid tilapia (*Oreochromis aureus* × *Oreochromis niloticus*) by broadbean [D]. Thesis for Master of Science. Shanghai Ocean University, Shanghai. 2006 [伦峰. 蚕豆脆化草鱼、罗非鱼肉质的研究. 硕士学位论文, 上海水产大学, 上海. 2006]
- [9] Zhu Y Q, Li D Y, Zhao S M, *et al.* Effect of feeding broad bean on growth and flesh quality of channel catfish [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2012, **31**(6): 771—777 [朱耀强, 李道友, 赵思明, 等. 饲喂蚕豆对斑点叉尾鲴生长性能和肌肉品质的影响. 华中农业大学学报, 2013, **31**(6): 771—777]
- [10] Jin Y, Tian L, Zeng S, *et al.* Dietary lipid requirement on non-specific immune responses in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, **34**(5): 1202—1208
- [11] Kiron V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2012, **173**(1): 111—133
- [12] Oliva Teles A. Nutrition and health of aquaculture fish [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2012, **35**(2): 83—108
- [13] Wang J Q, Bao P Y, Li W K. Antinutritional factors in plant feedstuff used in fish formulated feeds [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2004, **19**(3): 208—217 [王吉桥, 包鹏云, 李文宽. 鱼饲料中植物原料抗营养因子的研究. 大连水产学院学报, 2004, **19**(3): 208—217]
- [14] Han L L. The separation and purification of soybean trypsin inhibitor and the effect of STI on the oxygen free radical levels in mice pancreas [D]. Thesis for Master of Science. Jilin Agricultural University, Changchun. 2012 [韩玲玲. 大豆胰蛋白酶抑制因子的分离纯化及对小鼠胰腺氧自由基水平的影响. 硕士学位论文, 吉林农业大学, 长春. 2012]
- [15] Tang X B, Xiao T Y, Peng Z N. Analysis of blood routine and serum free amino acids of crisp grass carp [J]. *Inland Aquatic Product*, 2004, **29**(5): 36—37 [唐湘北, 肖调义, 彭正宁. 脆肉鲩血常规及血清游离氨基酸分析. 内陆水产, 2004, **29**(5): 36—37]
- [16] Jia R, Du J L, Cao L P, *et al.* Protective effects of Astragalus radix extract on acute liver injury in *Cyprinus carpio* [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, **29**(3): 606—612 [贾睿, 杜金梁, 曹丽萍, 等. 黄芪提取物对鲤急性肝组织损伤的保护作用. 江苏农业学报, 2013, **29**(3): 606—612]
- [17] Misra S, Sahu N, Pal A, *et al.* Pre-and post-challenge immuno-haematological changes in *Labeo rohita* juveniles fed gelatinised or non-gelatinised carbohydrate with n-3 PUFA [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, **21**(4): 346—356
- [18] Li X, Liu W, Lu K, *et al.* Dietary carbohydrate/lipid ratios affect stress, oxidative status and non-specific immune responses of fingerling blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, **33**(2): 316—323
- [19] Cardwell T, Sheffer R, Hedrick P. MHC variation and tissue transplantation in fish [J]. *Journal of Heredity*, 2001, **92**(4): 305—308
- [20] Shao J Z, Xiang L X. In vitro induction and tissue and cell

origin of interferon in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2001, 47(6):

677—683 [邵健忠, 项黎新. 草鱼干扰素的体外诱生及其组织细胞的来源. 动物学报, 2001, 47(6): 677—683]

EFFECTS OF FEEDING WITH FABA BEAN (*VICIA FABA*) ON THE ANTIOXIDANT CAPABILITY AND IMMUNE FUNCTIONS OF GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLU*)

WU Kang^{1, 2, 3}, HUANG Xiao-Sheng⁴, JIN Jie-Nan^{1, 2}, LI Nan⁴ and ZHANG Xue-Zhen^{1, 2}

(1. Fisherise College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China; 3. Institute of Industrial Crops, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China; 4. Fisheries Technical Extension Center of Zhongshan City, Zhongshan 528403, China)

Abstract: Crisp grass carp is a common name for *Ctenopharyngodon idellus* that is fed with faba bean (*Vicia faba*) for 100 days and thus has improved flesh quality, flexibility and mastication properties compared to grass carp fed with regular formula. To better understand the changes in the physiology of crisp grass carp, we explored and compared the antioxidative status and immune functions of crisp grass carp (grass carp fed with faba bean, FB) and common grass carp (grass carp fed with formula feed, FF). Both the FB and FF groups were reared for 30 days, 60 days and 100 days before sampling. The results showed that FB markedly affected the SOD activity in the liver, and T-AOC and MDA in the serum. However, it had little impact on T-AOC and MDA in the liver, GSH in the liver, and the SOD activity in the serum. Fish fed with FB possessed higher antioxidative capability than those fed with FF when tested on the 30th and the 60th day; however on the 100th day the antioxidative capabilities of the two groups were similar. On the 100th day WBC and RBC of the FB group were significantly higher than those of the FF group. On the 30th and the 100th day levels of TP, ALB and GLB in the serum were significantly decreased by feeding with FB compared to the FF group. In the contrast, there was no difference in the serum TP, ALB and GLB between the two groups on the 60th day. The spleen index and the transcription of some immunity-related genes in the spleen could also be altered by diet. On the 100th day, the transcription of *IL-1 β* , *MHC*, *IFN-1* and *TNF- α* in the spleen of the FB group was significantly higher than that of the FF group. These results indicated that antioxidative capability of grass carp could be initially enhanced by feeding with faba bean, followed by a decrease to the level of grass carp fed with formula feed. The immune functions of grass carp could also be changed by feeding with faba bean.

Key words: *Ctenopharyngodon idellu*; *Vicia faba*; Crisp grass carp; Antioxidant capability; Immune function