

饲料中不同维生素 C 含量对长吻鲢的影响

刘海燕^{1,2} 雷 武¹ 朱晓鸣¹ 杨云霞¹ 韩 冬¹ 薛 敏² 解绶启¹

(1. 中国科学院水生生物研究所,淡水生态与生物技术国家重点实验室,武汉 430072; 2. 中国农业科学院饲料研究所,北京 100081)

摘要:用维生素 C 含量为 38、364 和 630 mg/kg 的三种饲料饲喂初体重为 (23.19 ± 0.58) g 的长吻鲢 8 个月,实验结果表明,38mg/kg V_C 饲料组饲喂的长吻鲢表现出了典型的 V_C 缺乏症状:体色发黑,脊椎侧弯,鳍边由开始的萎缩直到腐烂、贫血、特定生长率显著降低 ($p < 0.05$)。并且 38mg/kg V_C 饲料组长吻鲢的生理指标也受到影响:血清溶菌酶活性显著下降 ($p < 0.05$),肝脏的 SOD 活性及 MDA 含量均显著升高 ($p < 0.05$),血清皮质醇没有显著差异 ($p > 0.05$),但各处理组长吻鲢肝脏中均未检测到诱导型 HSP70 的存在。因此,相对于皮质醇和 HSP70,血清溶菌酶、肝脏 SOD 活性、肝脏 MDA 含量以及血液理化指标 (红细胞数及血红蛋白)更能反映出 V_C 缺乏下长吻鲢的生理状态。

关键词:维生素 C;维生素 C 缺乏症;长吻鲢

中图分类号: S963 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207 (2009) 04-0682-08

维生素 C (V_C, 又名抗坏血酸 AA) 是鱼类所必需的一种微量营养物质,其具有很强的还原性,作为机体的强抗氧化剂参与抗氧化作用^[1,2],同时参与体内胶原蛋白及皮质类固醇的合成^[3,4],因此在鱼体内的多项生理功能中发挥着重要作用。大多数鱼类体内缺乏 L-古洛内酯氧化酶而不能在体内合成 V_C,必须依赖于外源饲料中 V_C 的提供^[5,6]。但在实际鱼类的养殖过程中,由于 V_C 的不稳定性,生产中的加工与贮存很容易造成饲料中 V_C 的破坏^[7],使饲料中的 V_C 含量达不到鱼类的需求量从而使鱼出现 AA 缺乏症。已知典型的鱼类 V_C 缺乏症在很多鱼类中已有报道^[8]。V_C 缺乏可引起鱼类生长减缓,骨骼及软骨组织畸形,毛细血管脆性增大、伤口愈合减慢,死亡率提高,鳍腐烂、眼球突出、贫血、皮肤及内脏出血,不同鱼类具体的表现症状又不完全相同^[8-14]。V_C 缺乏还可引起机体免疫反应及抗氧化反应的改变^[15-19]。长吻鲢 (*Leiocassis longirostris* Günther) 是我国的一种名贵经济鱼类,但有关维生素 C 缺乏对长吻鲢的影响还未见报道。

鱼类在环境胁迫作用下会产生一定的应激反应,表现在一些应激指标,如皮质醇及热休克蛋白

HSP 的变化上^[20,21],饲料中的营养不平衡与缺乏是鱼类养殖过程中经常遇到的营养胁迫,营养胁迫下鱼类的机体反应是否也会在这些应激指标上有一定的反映,目前为止还没有相关研究探讨 V_C 缺乏下鱼类的应激激素及细胞水平应激指标的变化,是否能在营养缺乏症出现以前找到预警指标也是本文的一个重要目的。

本文旨在探讨实用饲料中添加不同浓度的维生素 C 对长吻鲢的生长和生理状态的影响以及阐明长吻鲢维生素 C 缺乏症的表现。

1 材料与方法

1.1 实验设计与实验饲料 实验为三个维生素 C 处理水平,分别为 38、364 和 630 mg/kg。三种实验饲料的配方与化学组成见表 1。饲料中不同的维生素 C 水平是通过在饲料中添加不同剂量的维生素 C-2 聚磷酸酯 (北京桑普公司, 35% 活性),各饲料中的维生素 C-2 聚磷酸酯的测定值分别为 108.5、1040 和 1800 mg/kg,各饲料维生素 C 的计算值分别为 38、364 和 630 mg/kg,实验饲料制成硬颗粒并贮存在 -4℃ 冰柜中备用。

1.2 实验鱼及养殖管理 实验用长吻鲢来自湖北

收稿日期: 2008-02-25; 修订日期: 2009-01-14

基金项目: 湖北省水产重大专项 (2006AA203A01); 十一五国家科技支撑计划 (2006BAD03B01); 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金 (2009FB09) 资助

作者简介: 刘海燕 (1971—), 女, 汉族, 河北石家庄人; 博士; 主要从事水产动物营养与饲料研究。E-mail: hy_liu99@163.com

通讯作者: 解绶启, E-mail: sqxie@ihb.ac.cn

省石首市长吻鲢良种场的当年幼鱼 (3 ± 0.11) g,实验开始前暂养在循环水养殖系统的 2000L 的圆形大缸 ($\phi 150\text{cm} \times 120\text{cm}$) 中 8 周,每天饱食投喂高龙长吻鲢全价配合饲料 (蛋白含量为 42.4%,总能为 17.98 kJ/g)。实验开始前两周改投实验饲料 1 (Diet 1,表 1)。

表 1 实验饲料配方及化学组成成分 (干物质基础)
Tab.1 Formulation and chemical composition of the experimental diet (dry weight basis).

原料 Ingredient	含量 Content (%)		
	Diet 1	Diet 2	Diet 3
白鱼粉 White fish meal(USA)	60.99	60.99	60.99
鱼油 Fish oil	6.00	6.00	6.00
α 淀粉 α -starch	8.00	8.00	8.00
玉米淀粉 Com starch	14.00	14.00	14.00
矿物盐预混物 Mineral premix ¹	5.00	5.00	5.00
维生素预混物 Vitamin premix ²	0.50	0.50	0.50
氯化胆碱 Choline chloride	0.11	0.11	0.11
纤维素 Cellulose	4.40	4.31	4.21
三氧化二铬 Cr ₂ O ₃	1.00	1.00	1.00
维生素 C-2 聚磷酸酯	100	1000	2000
Ascorbyl 2-monophosphate (mg/kg) ³			
成分 Chemical composition			
粗蛋白质 Crude protein (%)	46.11	46.22	46.47
粗脂肪 Crude lipid (%)	12.96	13.18	13.32
灰分 Ash (%)	11.56	11.57	11.85
维生素 C-2 聚磷酸酯	108.5	1040	1800
Ascorbyl 2-monophosphate (mg/kg)			
总能 Gross energy (kJ/g)	20.33	20.44	20.43

注: ¹矿物盐预混物 Mineral mixture (per kg feed): NaCl, 500.0mg; MgSO₄ · H₂O, 4575.0mg; NaH₂PO₄ · 2H₂O, 12500.0mg; KH₂PO₄, 16000.0mg; CaH₂PO₄ · H₂O, 6850.0mg; C₆H₁₀CaO₆ · 5H₂O, 1750.0mg; FeSO₄, 1250.0mg; ZnSO₄ · H₂O, 111.0mg; MnSO₄ · H₂O, 61.4mg; CuSO₄ · 5H₂O, 15.5mg; CoSO₄, 0.5mg; KI, 1.5mg; starch, 6385mg; ²维生素预混物 Vitamin mixture (per kg feed): vitamin A, 5500 I.U.; vitamin D₃, 1000 I.U.; vitamin E, 50 I.U.; vitamin K, 10 I.U.; niacin, 100mg; riboflavin, 20mg; pyridoxine, 20mg; thiamin, 20mg; D-calcium pantothenate, 50mg; biotin, 0.1mg; foliacin, 5mg; vitamin B₁₂, 20mg; inositol, 100mg; ³维生素 C-2 聚磷酸酯 Ascorbyl 2-monophosphate (mg/kg): 只有 35% 维生素 C 活性, only 35% vitamin C activity

实验开始前暂养鱼停喂 24h,实验开始时随机选取大小相等的鱼 (23.19 ± 0.58) g,分别称重,计量,然后转移到实验小缸中。每个处理 3 个重复。各组之间初体重没有显著性差异 ($p > 0.05$)。实验养殖系统采用流水养殖系统,实验缸为 150L 的圆形玻璃纤维缸 ($\phi 70\text{cm} \times 50\text{cm}$),为避免长吻鲢的相互残杀行为,减少其他干扰对鱼产生额外的刺激,缸内用网间隔为 6 个小隔^[22],每隔内一尾鱼,每缸 6 尾鱼。实验期间每天饱食投喂 2 次。实验期为 2005.8.27—2006.4.27 共八个月,自然水温 (图 1),光周期为 12L 12D (8:00—20:00)。每周定期检测水质,实验期间水质条件如下: pH 值 7.5—8.0,非离子态氨氮 U A-N 0.004mg/L,溶氧保持在 6.0mg/L 以上。

1.3 样品采集 实验结束时,长吻鲢饥饿 24h,取样时用 MS-222 (220mg/L, Sigma-Aldrich Co. St. Louis. Mo. USA)深度麻醉长吻鲢,逐条测定体长、体重。6 尾鱼取血、解剖,用肝素钠润过的注射器从尾静脉采血进行红细胞计数与血红蛋白的测定,用没有肝素钠润过的注射器采血用以制备血清。冰盘上解剖取肝脏、脾脏并称重。将所取血样用 4 离心机 5000 r/min 离心 15min 制得血清。血清和肝脏放置 -25℃ 冰箱冷冻保存留待分析。

1.4 样品分析方法 血清溶菌酶活性的测定方法参照改良后的 Hulmark 方法^[23]用溶壁微球菌 *Micrococcus lysodeikticus* 进行测定。肝脏超氧化物歧化酶 SOD 活性根据 Oyanagi^[24]采用亚硝酸盐形成法测定,在 550 nm 处测 OD 值,蛋白总量依 Bradford^[25]方法用小牛血清白蛋白作为标准蛋白测得结果表示为 U/mg prot, 肝脏脂质过氧化物以丙二醛 (MDA) 的含量来表示,MDA 的测定依据 Mihara 和 Uchiyama^[26]的方法用硫代巴比妥酸在 532nm 处进行比色测定,结果表示为 nmol/mg prot, 饲料中维生素 C-2-聚磷酸酯的含量用液相色谱方法进行测定。红细胞计数 (RBC) 是把全血稀释 200 倍后用 Neubauer 计数板进行计数; 血红蛋白的测定 (HB) 采用氰化高铁血红蛋白试剂在 540nm 下进行比色测定,结果表示为 g/L。血清皮质醇用北京北方生物技术研究所的皮质醇试剂盒采用放射免疫的方法^[27]进行测定; 热休克蛋白 HSP70 的测定方法参照沈骅^[28]的方法,采用一抗 (Spa-763, Rabbit Anti-Hsp 70, Stressgen Bioreagents Corp.) 和二抗 (Rabbit Anti, Vector) 通过 Western Blotting 进行检测。

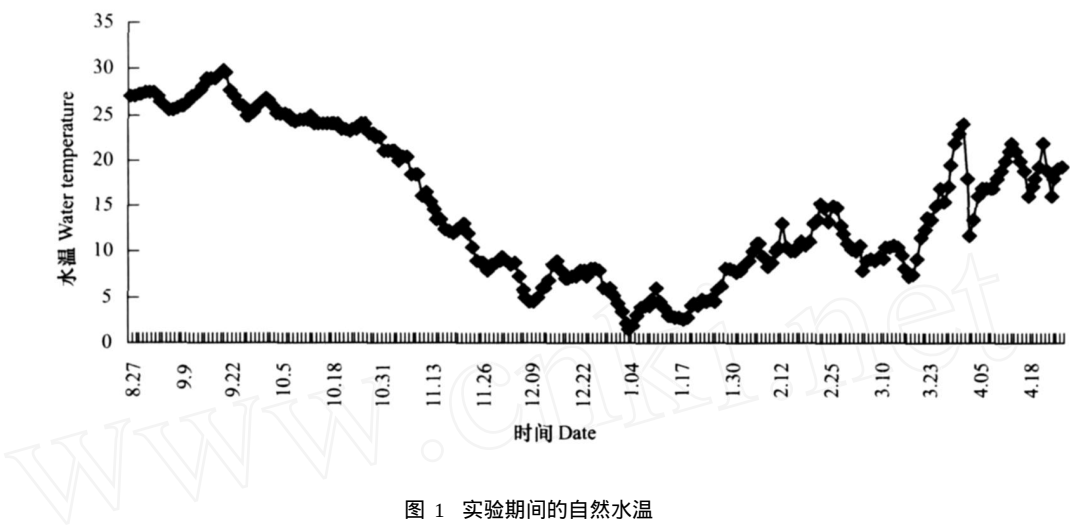


图 1 实验期间的自然水温
Fig.1 Water temperature () during experimental period

1.5 统计分析方法 所有实验结果均采用 Statistica 6.0统计软件进行一元方差分析 (One-way ANOVA), 差异显著性为 $p<0.05$ 。若结果差异显著再进行邓肯多重比较 (Duncan's multiple range tests)。

2 结 果

2.1 表观特征

38mg/kgV_C 组的长吻鲩体色变黑, 脊椎侧弯, 鳍边由开始的萎缩直到腐烂 (图 2), 另外两组 V_C 含量下没有发现异常情况。

表 2 饲料中维生素 C 对长吻鲩生长、肥满度、肝体比和脾体比的影响

Tab.2 Effects of dietary vitamin C on SGR, condition factor, hepatosomatic index and spleen-somatic index in Chinese longsnout catfish. (mean ±S. E.) *

	Diet 1	Diet 2	Diet 3
初体重 BW (g)	22.94 ±0.99	23.31 ±0.97	23.27 ±1.10
末体重 FBW (g)	55.29 ±3.33 ^a	110.10 ±6.02 ^b	114.36 ±7.15 ^b
SGR (% /d) ¹	0.36 ±0.04 ^a	0.64 ±0.02 ^b	0.66 ±0.03 ^b
肝体比 HSI ²	1.26 ±0.08 ^a	1.62 ±0.08 ^b	1.44 ±0.11 ^{ab}
脾体比 SSI ³	0.17 ±0.04	0.16 ±0.02	0.15 ±0.01
肥满度 CF ⁴	1.47 ±0.09 ^a	1.25 ±0.02 ^b	1.23 ±0.01 ^b

注: * 同一行中平均数的不同上标表示显著差异 (one-way ANOVA; $p<0.05$) * Means with different letters in a row showed significant differences (one-way ANOVA; $p<0.05$); ¹特定生长率 SGR (Specific growth rate) % /d = 100% × [ln (FBW) - ln (BW)] /t; 其中 BW (Initial body weight) 为初均重, FBW (Final body weight) 为末均重, t (Time) 为实验天数; ²肝体比 HSI (Hepatosomatic index) % = 肝脏重 (Liver weight) / 体重 (Whole body weight) × 100%; ³脾体比 SSI (Spleen-somatic index) % = 脾脏重 (Spleen weight) / 体重 (Whole body weight) × 100%; ⁴肥满度 CF (Condition factor) = (体重 Live weight, g) / (体叉长³ Fork length³, cm) × 100

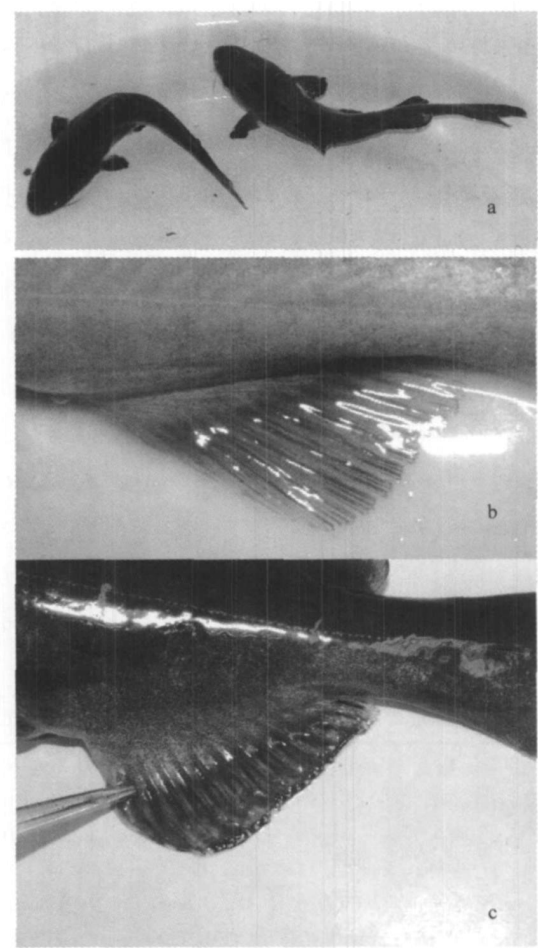


图 2 维生素 C 缺乏对长吻鲩体色、脊椎和鳍边的影响
Fig.2 Effects of Vitamin C deficiency on skin color, spine and fin in Chinese longsnout catfish
a: 38mg/kg V_C 组长吻鲩体色变黑, 脊柱弯曲; b: 正常组;
c: 38mg/kgV_C 组长吻鲩鳍边由萎缩到腐烂
a and c were in 38mg/kg Vitamin C group, b was in Vitamin C normal groups

2.2 生长、肥满度、肝体比和脾体比

38mg/kg V_C 组的长吻鲢的末体重及特定生长率显著低于其他两组,其肝体比也显著低于 364mgAA/kg组 ($p < 0.05$),其他各组间无显著差异(表 2)。38mg/kg V_C 组长吻鲢的肥满度显著高于其他两组。脾体比在各组之间没有显著性差异 ($p > 0.05$)。

2.3 红细胞计数及血红蛋白

由图 3可知,38mg/kg V_C 组长吻鲢血液中的红细胞数量显著低于其他两组,且血红蛋白的含量也显著低于 630mg/kg V_C 组 ($p < 0.05$)。其他各组间

无显著差异 ($p > 0.05$)。

2.4 血清溶菌酶、皮质醇、肝脏 SOD 活性、肝脏 MDA及肝脏热休克蛋白 HSP70

由图 4可知,38mg/kg V_C 组长吻鲢肝脏的 SOD 活性及 MDA 含量显著高于其他两组,溶菌酶活性显著低于 364mg/kg V_C 组 ($p < 0.05$),其他各组间无显著差异。38mg/kg V_C 组长吻鲢的血清皮质醇高于其他两组,但没有显著性差异 ($p > 0.05$)。在肝脏中,用 Western-blotting 的方法没有检测到诱导型 HSP70 的产生。

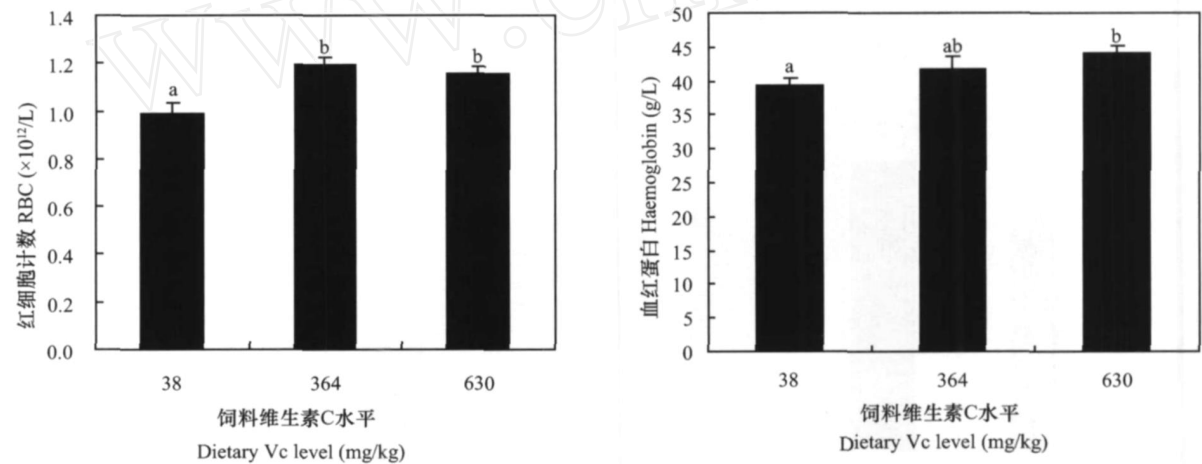


图 3 饲料中维生素 C 对长吻鲢红细胞计数及血红蛋白的影响,不同的字母代表各饲料组间的差异 ($p < 0.05$)

Fig. 3 Effects of dietary Vitamin C on red blood cell count and haemoglobin in Chinese longsnout catfish, different letters showed significant differences between groups (one-way ANOVA; $p < 0.05$)

3 讨论

尽管 NRC^[29]中确定幼鱼的维生素 C 的最需要量为 25—50mg AA/kg,但在本研究中经 8 个月的生长实验,饲料中维生素 C 含量为 38mg AA/kg 时长吻鲢生长显著降低,其体表特征及血液指标均出现了典型的维生素 C 缺乏症,很显然饲料中 38mg AA/kg 的维生素 C 含量并不能满足长吻鲢的最大生长需求。

3.1 V_C 缺乏的症状

V_C 缺乏可引起鱼类生长减缓,骨骼及软骨组织畸形,毛细血管脆性增大、伤口愈合减慢,死亡率提高,鳍腐烂、眼球突出、贫血、皮肤及内脏出血^[8,9]。但不同的鱼类具体的 V_C 缺乏症状并不完全相同,如经 20 周的实验,非洲胡子鲶鱼 *Clarias gariepinus* 并没有出现脊柱弯曲现象,却出现组织病变:鳃丝肥大、水肿、毛细血管扩张,肾小球萎缩、肾小囊坏死、肾小管扩张^[9]。斑点叉尾鲴缺乏 V_C 时,体色发黑,

体侧中部的竖条纹褪色,生长缓慢,饵料系数增高,体内外可见出血,鳍腐烂^[10];罗非鱼则出现惊厥、突眼、皮肤出血、尾鳍腐蚀、伤口愈合慢^[11,12]。墨西哥丽体鱼鱼苗生长减慢,体色变黑,鳃盖变短,眼、头、鳍出血、皮肤和鳍腐烂、鳞片脱落、腹部肿胀、脊柱侧凸^[13]。幼建鲤表现出体色变黑、尾柄和鳍发黑、鳍基部出血、鳍条糜烂、脊柱侧凸、尾部明显弯曲等症状^[14]。本实验 V_C 缺乏下长吻鲢出现生长迟缓、体色发黑、脊椎弯曲、鳍腐蚀、贫血、短粗症等,但并没有出现眼球突出、皮肤及内脏出血的症状。

3.2 V_C 对骨骼及血细胞的影响

V_C 的功能之一是促进胶原蛋白的形成。胶原蛋白的形成包括将脯氨酸羟化形成一个稳定的细胞外基质,将赖氨酸羟化和糖基化以及纤维网的形成等。而维生素 C 的作用在于活化脯氨酸羟化酶和赖氨酸羟化酶,促进脯氨酸和赖氨酸向羟脯氨酸和羟赖氨酸的转化^[3],保护参加羟化作用的酶类不受铁离子和巯基氧化,进而促进组织细胞间质中胶原

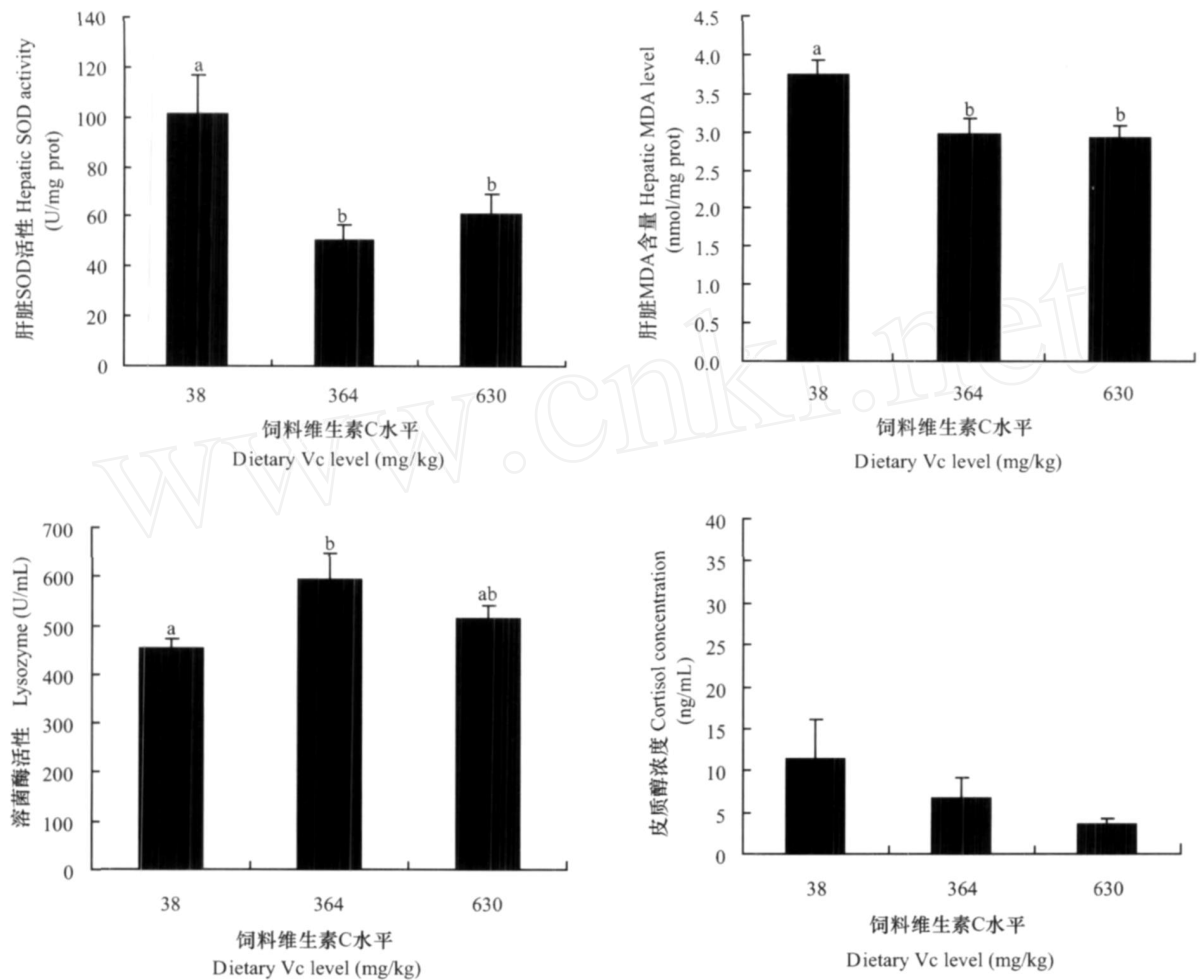


图 4 饲料中维生素 C 对长吻鲢血清溶菌酶、皮质醇、肝脏 SOD 活性及肝脏 MDA 的影响, 不同的字母代表各饲料组间的差异 ($p < 0.05$)
Fig. 4 Effects of dietary Vitamin C on serum lysozyme, cortisol, hepatic SOD and hepatic MDA in Chinese longsnout catfish, different letters showed significant differences between groups (one-way ANOVA; $p < 0.05$)

的形成。 V_C 缺乏下鱼鳍的腐烂和脊柱的弯曲可能与此有关^[10, 30]。Wimberger 研究报道 V_C 缺乏可影响鱼类骨骼的发育及体型^[31]。因此, 本实验中 V_C 缺乏下长吻鲢肥满度的提高可能与此有关, 由于 V_C 缺乏可能导致长吻鲢骨骼发育受阻, 使其体型发生改变。

贫血是 V_C 缺乏的典型症状之一^[9], 本实验中长吻鲢也表现出此特征, 红细胞数及血红蛋白都显著降低。其原因可能来源于两个方面, 一是由于 V_C 缺乏下鱼类摄食量的降低导致其摄入的铁含量减少; 二是 V_C 缺乏影响了铁的代谢, V_C 缺乏可使血红蛋白三价铁转变为亚铁干扰铁在血浆中运输及细胞的吸收^[32], Hilton, et al. 报道 V_C 可提高虹鳟肠道中 Fe 的吸收效率, V_C 缺乏时可影响网状内皮组织内铁的释放, 进而影响到血细胞的合成^[33]。

3.3 V_C 的抗氧化作用

V_C 的化学本质是一种含 6 个碳原子的酸性多

羟基化合物, 同时具有强有机酸性和强还原性, 因此经常作为机体的强抗氧化剂参与抗氧化作用^[1, 2]。 V_C 缺乏下鱼体体色变黑与其抗氧化性有关, 在动物体内, 酪氨酸在酪氨酸酶的作用下, 氧化后可以生成多巴醌, 而多巴醌能自发形成黑色素, 当饲料中 V_C 缺乏时加速了体内酪氨酸氧化反应的进行, 使黑色素形成增多, 表现出体色变黑^[14]。此外, 从 V_C 与 SOD 的研究中也可以发现 V_C 的抗氧化作用, 高强等报道饲料中高 V_C 的情况下中华鲟肝脏的 SOD 活性显著降低^[19]。本研究中, 虽然 V_C 缺乏组长吻鲢肝脏 SOD 活性很高但肝脏中的 MDA 仍然处于一个很高的水平, 说明其体内的脂质过氧化程度已经达到不能被机体的抗氧化系统所清除的阶段, 机体发生了氧化损伤。这与鲢鱼 *Terapon jarbua* 的实验结果相似, 经 8 周实验摄食缺乏维生素 C 饲料的鲢鱼无论是在低温或是高温下, 其肝脏中的脂质过氧化

物 (MDA) 均显著高于摄食含 V_C 的其他饲料组^[15]。

3.4 V_C 对免疫力的影响

V_C 对免疫力有一定的影响^[34], 一般认为 V_C 能提高溶菌酶的活性, 缺乏 V_C 的情况下溶菌酶的活性降低。这在点带石斑鱼 *Epinephelus malabaricus*、花鲈 *Lateolabrax japonicus*、大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* 及中华鲟 *Acipenser sinensis* 的研究中已得到证实^[16—19]。宋学宏等的研究也表明, 异育银鲫血清中溶菌酶的活性也是随着 V_C 含量的增加呈正相关关系^[35]。但也有不同的结果, 李桂峰等的研究表明维生素 C 对胡子鲶 *Claris batrachus* 对溶菌酶活性的提高并不显著^[36]。艾春香等研究发现, 河蟹体内的 SOD 酶活性却随着 V_C 剂量的增加而降低^[37]。出现这种差异的原因主要是由于实验鱼的代谢率、实验方法以及取样时间不同所致。不同鱼类对维生素 C 代谢率不同, 从而导致维生素 C 需要量的差异, 使维生素 C 对鱼类免疫力作用的形式也不一样^[38]。当实验方法、取样时间不同时, 维生素 C 到达靶细胞的速率、浓度以及免疫应答出现高峰的时间都不同, 因此观测到的作用效果也将受到影响^[34, 39]。

皮质醇及热休克蛋白 HSP 是鱼类在环境胁迫下的应激指标^[20, 21], 在本实验中, 尽管 V_C 缺乏的长吻鲢血清皮质醇含量比其他组较高, 但可能由于所测定数值的变异太大并没有检验出差异显著性, 而诱导型 HSP70 既没有在正常组也并没有在缺乏 V_C 组的长吻鲢肝脏中有所表达, 这说明皮质醇和 HSP70 作为 V_C 缺乏的应激指标还有待进一步探讨。

4 结 论

本实验结果表明, 用维生素 C 含量为 38mg/kg 的饲料经 8 个月饲喂的长吻鲢表现出了典型的 V_C 缺乏症状: 体色发黑, 脊椎侧弯, 鳍边由开始的萎缩直到腐烂; 生长降低; 贫血; 免疫力降低; 肝脏出现脂质过氧化现象。皮质醇和 HSP70 作为 V_C 缺乏下营养胁迫的可靠指标还有待实验探讨, 而血清溶菌酶、肝脏 SOD 活性和肝脏 MDA 含量, 以及血液理化指标 (血红细胞数及血红蛋白) 更能代表 V_C 缺乏下的生理状态, 这些指标是否能成为 V_C 缺乏症出现之前的早期胁迫状态的预警指标还需要进一步的实验验证。

参考文献:

[1] Rinne T, Mutschler E, Wimmer-Greinecker G *et al* Vitamins

- C and E protect isolated cardiomyocytes against oxidative damage [J]. *International Journal of Cardiology*, 2000, 75: 275—281
- [2] Yu B P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species [J]. *Physiological Reviews*, 1994, 74: 139—162
- [3] Zhou S W. *Animal Biochemistry* (Edition 3) [M]. Beijing: Press of China Agriculture, 1999, 298—299, 337—341 [周顺伍. 动物生物化学 (第三版). 北京: 中国农业出版社, 1999, 298—299, 337—341]
- [4] Kibatchi A E. Ascorbic acid in steroidogenesis [J]. *Nature*, 1967, 215: 1385—1386
- [5] Chatterjee L B. Evolution and biosynthesis of ascorbic acid [J]. *Science*, 1973, 182: 1271—1272
- [6] Wilson R P, Poe W E. Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish [J]. *Journal of Nutrition*, 1973, 103: 1359—1364
- [7] Shiau S Y, Hsu T S. Stability of ascorbic acid in shrimp feed during analysis [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi (Currently Fisheries Sci)*, 1993, 59: 1535—1537
- [8] Liu Y, Shen S L, Zhou X Q. Research development of Vitamin C deficiency of aquatic animals [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2004, 22(3): 283—286 [刘杨, 申顺立, 周小秋. 水生动物维生素 C 缺乏症研究进展. 四川农业大学学报, 2004, 22(3): 283—286]
- [9] Adham K G, Hashem H O, Abu-shabana M B, *et al* Vitamin C deficiency in the catfish *Clarias gariepinus* [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2000, 6: 129—139
- [10] Lin C and Lovell R T. Phylogeny of vitamin C deficiency syndrome in channel catfish [J]. *Journal of Nutrition*, 1978, 108: 1137—1141
- [11] Soliman A K, Jauncey K, Roberts R T. The effect of varying forms of dietary ascorbic acid on the nutrition of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Aquaculture*, 1986, 52(1): 1—10
- [12] Soliman A K, Jauncey K, Roberts R T. Water-soluble vitamin requirements of tilapia: ascorbic acid (vitamin c) requirement of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) [J]. *Aquaculture and Fisheries Management*, 1994, 25(3): 269—278
- [13] Chavez-de-Martinez Martinez-MCC-de. Vitamin C requirement of the Mexican native cichlid *Cichlasoma urophthalmus* (Günther) [J]. *Aquaculture*, 1990, 86(4): 409—416
- [14] Liu Y, Zhou X Q. Study on vitamin C deficiency of juvenile Jian carp [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2004, 22(2): 187—191 [刘杨, 周小秋. 幼建鲤维生素 C 缺乏症研究. 四川农业大学学报, 2004, 22(2): 187—191]
- [15] Chien L T, Hwang D F. Effects of thermal stress and vitamin C on lipid peroxidation and fatty acid composition in the liver of thomfish *Tetraodon lineatus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 2001, 128: 91—97
- [16] Lin M F, Shiau S Y. Dietary L-ascorbic acid affects growth, non-specific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus* [J]. *Aquaculture*, 2005, 244: 215—221
- [17] Ai Q H, Mai K S, Zhang C X, *et al* Effects of dietary vitamin C

- on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* [J]. *Aquaculture*, 2004, **242**: 489—500
- [18] Ai Q H, Mai K S, Tan B P, *et al* Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. *Aquaculture*, 2006, **261**: 327—336
- [19] Gao Q, Wen H, Li Y W, *et al* Study on Vitamin C Nutritional Requirement of Juvenile Chinese Sturgeons (*Acipenser sinensis*) [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2006, **18** (2): 99—104 [高强, 文华, 李英文, 等. 中华鲟幼鲟维生素 C 营养需要的研究. 动物营养学报, 2006, **18** (2): 99—104]
- [20] Mommsen T P, Vijayan M M, Moon T W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation [J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1999, **9**: 211—268
- [21] Iwana G K, Afonso L O B, Todgham A A, *et al* Are hsp's suitable for indicating stressed states in fish [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2004, **207**: 15—19
- [22] Han D, Xie S, Lei W, *et al* Effect of ration on the growth and energy budget of Chinese longsnout catfish, *Leiocassis longirostris* Günther [J]. *Aquaculture Research*, 2004, **35**: 866—873
- [23] Hutchins C G, Rawles S D and Gatlin D M. Effects of dietary carbohydrate kind and level on growth, body composition and glycemic response of juvenile sunshine bass (*Morone chrysops* ♀ × ♂ *M. saxatilis*) [J]. *Aquaculture*, 1998, **161**: 187—199
- [24] Ôyanagi Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase [J]. *Analytical Chemistry*, 1984, **142** (1): 290—296
- [25] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248—254
- [26] Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursors in tissues by thiobarbituric acid test [J]. *Analytical Biochemistry*, 1978, **86**: 271—278
- [27] Brock P, Eldred E W, Woiszillo J E, *et al* Direct solid-phase ¹²⁵I radioimmunoassay of serum cortisol [J]. *Clinical Chemistry*, 1978, **24**: 1595—1598
- [28] Shen H, Wang X R, Zhang J F, *et al* Effects of copper (Cu²⁺) and Cu-EDTA complex on the induction of HSP70 in the fish brain [J]. *Environmental Science*, 2004, **25** (3): 94—97 [沈骅, 王晓蓉, 张景飞, 等. Cu²⁺ 和 Cu-EDTA 对鲫鱼脑组织应激蛋白 HSP70 诱导的影响. 环境科学, 2004, **25** (3): 94—97]
- [29] NRC (National Research Council). Nutrient Requirements of Fish [M]. Washington, DC: National Academy Press 1993
- [30] Mustin W G, Lovell R T. NaL-ascorbyl-2-monophosphate as a source of vitamin C for channel catfish [J]. *Aquaculture*, 1992, **105**: 95—100
- [31] Winberger P H. Effects of vitamin C deficiency on body shape and skull osteology in *Geophagus brasiliensis*: Implications for interpretations of morphological plasticity [J]. *Copeia*, 1993, **2**: 343—351
- [32] Lipschitz D A, Bothwell T H, Seftel H C, *et al* The role of ascorbic acid in the metabolism of storage iron [J]. *British Journal of Haematology*, 1971, **20**: 155—165
- [33] Hilton J W, Cho C Y, Slinger S J. Effect of graded levels of supplemental ascorbic acid in practical diets fed to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1978, **35**: 431—436
- [34] Ai Q H, Mai K S. Advance on nutritional immunity of fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31** (3): 425—430 [艾庆辉, 麦康森. 鱼类营养免疫研究进展. 水生生物学报, 2007, **31** (3): 425—430]
- [35] Song X H, Cai C F, Pan X F. Determining the Vitamin C requirement of allogynogenetic silver crucian carp with growth and non-specific immunity [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2002, **6** (8): 351—356 [宋学宏, 蔡春芳, 潘新法. 用生长和非特异性免疫力评定异育银鲫维生素 C 需要量. 水产学报, 2002, **6** (8): 351—356]
- [36] Li G F, Qian G F, Sun J J, *et al* Effects of Vitamin C enzymes activities related to immunity in *Claris batrachus* serum [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2004, **19** (4): 301—305 [李桂峰, 钱沛锋, 孙际佳, 等. 维生素 C 对胡子鲶血清免疫相关酶活性的影响. 大连水产学院学报, 2004, **19** (4): 301—305]
- [37] Ai C X, Chen L Q, Gao L J. Effects of Vitamin C on SOD, ALP and ACP activities of Chinese mitten-handed crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2002, **21** (4): 431—438 [艾春香, 陈立桥, 高露姣. V_C 对河蟹血清和组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响. 台湾海峡, 2002, **21** (4): 431—438]
- [38] 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 [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. 水产学报, 2005, **29** (6): 857—861]
- [39] Ortuno J, Esteban A, Meseguer J. Effects of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 1999, **9**: 429—443

EFFECTS OF DIFFERENT DIETARY VITAMIN C LEVELS ON CHINESE LONGSNOUT CATFISH (*LEIOCASSIS LONGIROSTRIS* GÜNTHER)

LIU Hai-Yan^{1,2}, LEI Wu¹, ZHU Xiao-Ming¹, YANG Yun-Xia¹, HAN Dong¹, XUE Min² and XIE Shou-Qi¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Feed Research Institute, the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Vitamin C is an essential micro-nutrient for most fish and plays an important role in immunity and physiology. The deficiency of dietary vitamin C can result in the damage on fish. The study on the deficiency symptom and the sensitive indicator of vitamin C could provide useful information for fish feed industry. This experiment was conducted to investigate the effects of dietary Vitamin C levels on growth performance, immune and physiological responses in Chinese longsnout catfish (*Leiocassis longirostris* Günther), which is an high value aquaculture fish in China. Three practical diets containing 38, 364 and 630mg/kg vitamin C were fed to Chinese longsnout catfish (23.19 ± 0.58 g) for 8 months. Vitamin C was used in the form of L-ascorbyl-2-polyphosphate. The results indicated that the Chinese longsnout catfish in 38mg/kg vitamin C groups showed typical vitamin C deficiency symptom: skin color turning darker, spinal deformities and scoliosis, erosion of fins, anaemia. SGR and the serum lysozyme activities decreased significantly ($p < 0.05$), the hepatic SOD activities and MDA contents increased significantly ($p < 0.05$). There was no significant difference in serum cortisol concentrations ($p > 0.05$). The inductive HSP70 in liver was not detected by western-blotting in all groups. In conclusion, serum cortisol and hepatic HSP70 were not the sensitive indicators for vitamin C deficiency symptom, but the serum lysozyme, hepatic SOD activity, hepatic MDA content and the haematological index (red blood cell number and hemoglobin content) were the more reliable makers to indicate the physiological status in Chinese longsnout catfish.

Key words: Vitamin C; Vitamin C deficiency symptom; Chinese longsnout catfish