

综述

鱼类营养免疫研究进展

艾庆辉 麦康森

(中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室,青岛 266003)

ADVANCE ON NUTRITIONAL IMMUNITY OF FISH

AI Qing-Hui and MAI Kang-Sen

(The key Laboratory of Mariculture (Ministry of Education), Ocean University of China, Qingdao 266003)

关键词:鱼类;营养;免疫

Key words: Fish; Nutrition; Immunity

中图分类号:S963 S942.1 文献标识码:A 文章编号:1000-3207(2007)03-0425-06

随着集约化养殖模式的推广,鱼类养殖业得到了迅猛发展。然而,由于高密度养殖、投饲频率增加以及水体污染等问题,养殖鱼类感染疾病的几率大大升高,给养殖业造成了巨大损失。因此鱼类病害已经成为制约养殖业进一步发展的瓶颈。传统的用于防治鱼病的方法主要有两种,一是化学药物治疗法;一是疫苗预防法。化学药物治疗存在抗药性和药物残留等问题,而疫苗预防法则由于其特异性和操作困难而存在一定的局限性。因此寻找新的防治鱼类病害的方法就成为人们亟待解决的重大课题。研究证明营养和免疫之间密切相关,通过营养调控来提高鱼类的免疫力,不仅可克服传统方法所存在的缺陷,有利于健康养殖,减少对环境的污染,保证食品的安全,而且这已经被证明是一种行之有效的方法。因此,研究营养和免疫之间的关系已经成为了一门新的学科,有关该方面的研究在鱼类已有了一些报道,本文将对此作一综述。

1 鱼类的免疫系统

免疫系统是鱼类执行防御功能的机构,鱼类依靠免疫系统来抵御病害生物的入侵和感染疾病后的康复^[1]。鱼类的免疫系统主要包括免疫组织器官、免疫细胞和体液免疫因子三大类。胸腺、肾脏、脾脏和黏膜淋巴组织(Mucosal Associated Lymphoid Tissue)是鱼类最主要的免疫组织器官,也是产生免疫细胞的地方。免疫细胞则是指参与免疫应答反应或与应答反应相关的细胞,包括淋巴细胞和吞噬细胞。体液因子

则主要包括特异性的抗体和非特异性的一些酶类或蛋白等^[2]。和其他高等脊椎动物一样,鱼类免疫也可分为细胞免疫和体液免疫^[3]。鱼类的细胞免疫主要涉及非特异性免疫,包括吞噬细胞的吞噬率、呼吸暴发和杀菌能力等。而体液免疫可分为非特异性体液免疫和特异性体液免疫。非特异性体液免疫主要有凝集素、溶菌酶、抗蛋白酶、C-反应蛋白、干扰素-1、转移因子以及补体,其中补体又包括替代途径补体和经典途径补体。研究表明,鱼类的替代途径补体活力水平远远高于哺乳类^[4],这说明鱼类比高等动物更依赖于替代途径补体来抵御病害的入侵。而特异性的体液免疫主要涉及特异性抗体的产生,目前已在实验鱼体中检测到免疫球蛋白分子(Ig)和Ig分泌细胞(B-细胞)^[5]。然而在多数条件下,抗体的产生毕竟不是一个短期效应,它需要长期的适应,并通过产生记忆而形成。而且对多数硬骨鱼类而言,其产生的抗体仅有IgM,因此推测鱼类的特异性免疫还处于一个初期的水平,在防御外来病原入侵时,主要还是依靠非特异性免疫来发挥作用^[1, 6, 7]。

2 研究鱼类营养免疫学的方法

用于研究鱼类营养素和免疫力之间关系的方法主要有两种,一是体外(*In Vitro*)实验法,一是体内(*In Vivo*)实验法(表1)。体外实验法是在离体条件下进行的研究。通常是以不同浓度的营养素与免疫细胞(如头肾的吞噬细胞)直接作用,以探讨营养素对吞噬细胞吞噬指数和呼吸暴发的影

收稿日期:2005-07-19;修订日期:2006-11-16

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(编号:2001BA505B06, 2004BA526B06);863高技术发展计划(2004AA603610)资助

作者简介:艾庆辉(1972—),男,江西丰城市人;博士后,副教授;主要从事鱼类营养生理和营养免疫学研究。E-mail:qinghui@163.com

通讯作者:麦康森,E-mail:kmai@ouc.edu.cn

响^[8-12]。这种方法不仅可排除其他营养素的干扰,而且能够快速、准确地发现特定营养素对免疫细胞免疫应答的影响,但是这种方法在样品制备上存在一定困难、无法测定机体的体液免疫反应,而且离体条件下的免疫应答是否能够代表体内的实际情况,尚有待进一步验证。体内实验法包括两种,一是腹腔注射法^[13];一是长期摄食生长法。实践证明,腹腔注射是一种快速而有效的方法,但是这种方法操作较为复杂,耗时耗力,而且当鱼体较小时(小于15g),一般难以实施腹腔注射^[14]。长期摄食生长法就是通过平衡饲料中的营养素,进行一定时期的摄食生长实验,经抽血采样后,测定不同处理条件下各免疫参数的变化,以研究营养素对鱼类的免疫力和抗病力的影响^[15-19]。虽然该方法的作用见效较慢,但它操作方便,能够反映实际养殖生产过程中鱼类的状况,该方法已被证明是行之有效的方法。然而,在实验的过程中应注意摄食生长的时间和免疫的关系,因为一些研究表明特定营养素对鱼类免疫力的影响具有瞬时效应,在一定时间内它能使鱼类免疫力上升,但经过一段时间后,免疫力又将恢复到原来的水平^[10, 18]。

表1 研究鱼类营养免疫学的方法

Tab. 1 Methods for studying nutritional immunity of fish

方法 Methods	优点 Advantage	缺点 Disadvantage
体外法 (In Vitro)	快速准确,可排除其他营养素的干扰	样品制备存在一定困难,无法测定体液免疫参数
体内法 (In Vivo)	快速有效	操作复杂,当鱼体较小时,难于实施
腹腔注射法 (Injection)		
摄食生长法 (Feeding)	方便有效,反映实际的情况	时间长,见效慢

3 营养素对鱼体免疫力的影响

营养素不仅是鱼类正常生长发育所必需的物质基础,而且在维持免疫系统的功能并使其免疫活性得到充分表达的过程中起到决定性的作用。影响鱼类免疫力的营养素主要包括蛋白质、氨基酸、脂肪酸、维生素、微量元素和碳水化合物等。

3.1 蛋白质和氨基酸

蛋白质是动物合成各种酶类和抗体蛋白所必需的原料,因此蛋白质和机体免疫力密切相关^[20]。已有的研究表明,饲料中不同的蛋白质水平显著影响鱼类的免疫力。当饲料中蛋白质缺乏时,实验鱼的溶菌酶活力、C-反应蛋白含量、抗体水平以及抗病菌感染力显著下降^[15, 21, 22]。而随着饲料中蛋白质水平的升高,鱼类的免疫力和抗病力均呈显著上升趋势。但是当饲料中蛋白质含量过高时,鱼类的免疫力并不能进一步提高,相反却造成了一定程度的免疫抑制^[15, 22]。这说明饲料中适宜的蛋白质含量对鱼类的免疫力具有明显的改善作用,而过高的蛋白质含量将使体内蛋白质代谢紊乱、氮排泄升高,导致水体污染,从而抑制免疫活性的发挥。有关异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)的研究表明,使实验鱼达到最佳免疫

力的蛋白质水平低于最适生长蛋白水平^[22],因此在实际的养殖过程中应权衡这两方面的因素。

鱼类的免疫力不仅和蛋白质的数量有关,而且和蛋白质的质量相关。Burrells 等^[23]以不同大豆蛋白水平替代鱼粉蛋白,结果发现在 60% 以下的替代水平,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的生长率和免疫力均未出现显著差异,而随着替代水平的升高,鱼类的非特异性免疫力和生长率均逐渐下降,而当替代水平达到 60%—70% 时,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的生长率、吞噬指数和呼吸爆发活力显著低于全鱼粉组和替代水平较低组。Krogdahl 等^[24]也发现,几种不同的大豆产品均显著影响了大西洋鲑(*Salmo salar L.*)的溶菌酶活力和抗体水平。这些研究表明饲料中不同的蛋白源能够显著影响鱼类的免疫系统,从而使其免疫应答反应出现差异。

蛋白质的营养作用,依赖于氨基酸来发挥。有关氨基酸和机体免疫力的相关性,在哺乳动物和鸟类中已有较多报道^[20, 25],而在鱼类中仅有少量报道。蔡春芳等^[22]研究表明鱼类的免疫力随着饲料中必需氨基酸指数(EAAI)和蛋白质效率下降而下降。Buentello 等^[26]探讨了精氨酸对斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)抗病力的影响,结果发现饲料中的精氨酸水平显著影响了鱼类的抗病力,在 2.0% 的精氨酸水平,实验鱼的抗病力显著高于较高(4.0%)或较低(0.0%—1.5%)精氨酸水平,这主要是由于精氨酸的抗氧化作用所致,由它代谢产生的一氧化氮(Nitric Oxide)不仅能氧化细菌的细胞膜,而且能够使细菌线粒体呼吸链上的酶失活,从而起到杀灭病原的作用。

3.2 脂肪酸

脂肪酸不仅是细胞膜的重要组成成分,而且是类花生酸的前提物质,它对维持膜的流动性,促进淋巴细胞增殖,调节细胞的免疫功能,并使其免疫活性得到正常发挥起到重要作用^[27, 28]。有关脂肪酸对鱼类免疫力的影响,已有了一些报道^[16, 28]。然而受脂肪酸的种类、剂量、比例以及实验温度的影响,当前的结果存在一定差异。Sheldon 和 Blazer^[29]对斑点叉尾鮰的研究表明,当分别以鱼油(富含 n-3 系列高度不饱和脂肪酸)、牛油(饱和脂肪酸)和大豆油(含 n-3 和 n-6 系列多不饱和脂肪酸)为脂肪源时,投喂含鱼油组饲料的实验鱼,其巨噬细胞杀菌能力显著高于其余两组。Bell 等^[30]则发现饲料中富含亚油酸的红花油能够使大西洋鲑的心脏遭到严重伤害,同时应激能力显著下降,而在使用鱼油的实验组中并未出现类似的结果。Kiron 等^[16]对虹鳟的研究也表明,饲料中添加不同的脂肪酸对实验鱼的免疫参数产生了显著影响,其中棕榈酸(Palmitic Acid)组的吞噬活力、体内抗体水平以及抗病力显著低于不饱和脂肪酸组,而亚油酸组的这些指标也显著低于亚麻酸和 n-3 系列的高度不饱和脂肪酸组。这些研究表明不同类型的脂肪酸对鱼类免疫力的影响存在一定差异,其中饱和脂肪酸明显抑制鱼类的免疫力,而多不饱和脂肪酸,尤其是 n-3 系列的高度不饱和脂肪酸对鱼类的免疫力具有重要的调节作用。脂肪酸对免疫力的影响还与所添加的剂量有关。当饲料中必需脂肪酸缺乏时,鱼类吞噬

细胞的吞噬能力、补体活性^[16, 28, 31]以及抗体水平都显著下降^[16],而当添加适宜含量的必需脂肪酸时,鱼类的生长及免疫力均得到显著提高^[16, 29, 31],但是当饲料中添加的高度不饱和脂肪酸超过需求量时,鱼类的免疫力并不能进一步提高,而是出现免疫抑制现象^[16, 32]。此外,rr3和rr6系列多不饱和脂肪酸之间的比例对免疫力也有一定影响。食物中高比例的rr6/rr3能够降低人类的免疫力,导致心血管疾病,类似的现象在大西洋鲑的研究中也有报道^[30]。这可能是由于高含量的rr6系列多不饱和脂肪酸影响了rr3系列不饱和脂肪酸的代谢,从而影响了膜的流动性,抑制鱼类免疫力。由于脂肪酸在细胞膜上的状况受温度的影响^[27],因此不同水温条件下,脂肪酸对免疫力的影响也不一致。Fractalossi和Lovell^[33]发现当水温为17℃时,摄食不同脂肪酸的实验鱼,其抗病力之间没有出现差异,但在更高水温条件下,当摄食富含rr3系列不饱和脂肪酸的饲料时,实验鱼的抗病力显著降低。这说明在高温条件下,由于rr3系列不饱和脂肪酸影响了花生四烯酸的代谢,从而使鱼类的免疫力受到明显抑制。

3.3 维生素

维生素C 维生素C是一种重要的免疫增强剂^[14]。多数研究报道了维生素C对鱼类免疫力的正效应。一些研究表明,当饲料中添加或注射较高含量的维生素C时,鱼类的淋巴细胞增殖(Lymphocyte Proliferation)、溶菌酶活力、补体活力、吞噬指数、呼吸暴发和抗感染能力均显著上升^[11, 13, 18, 34-38]。然而,另外的一些研究则表明,较高含量的维生素C并没有改善鱼类的免疫力和抗病力^[39, 40]。出现这种差异的原因主要是由于实验鱼的代谢率、实验方法以及采样时间不同所致。由于不同鱼类对维生素C的代谢率各不相同,这样维生素C的需求量存在种的差异,因而导致维生素C影响鱼类免疫力的情况不一致^[18, 37, 40]。当采用不同的研究方法时,维生素C到达靶细胞的速率和浓度都存在差异,因此导致了作用效果存在差异^[11, 13, 41]。正是由于不同实验方法显著影响维生素C对免疫力的影响^[9, 38, 41],因而在实际养殖过程中应根据实际情况而采用不同的方法。另外实验过程中采样的时间对结果也有明显影响。Ortuno等^[18]对金头鲷(*Sparus aurata*)的研究表明,当摄食高含量的维生素C时,吞噬指数、呼吸暴发活力和替代途径补体活力所出现高峰的时期各不相同。而且当摄食较高含量的维生素C时,鱼类血清中维生素C水平也升高到一较高水平,鱼体的相关免疫学参数随之升高,但在此之后,即使血清中维生素C含量再升高,鱼体的免疫学参数也不升高,而是返回到正常的水平。这说明饲料中高水平的维生素C能使鱼类的免疫力得到短暂提高,此后,机体将做出相应调节,以适应较高水平的维生素C,因此免疫力也不再明显提高。这也可能是某些研究在添加高含量的维生素C后,却不能提高免疫力的原因。因此有关维生素C对鱼类免疫力的影响随时间变化的规律值得进一步探讨。

有关维生素C提高鱼类免疫力和抗病力的机制主要有

以下几方面:(1)维生素C是重要的抗氧化剂,它存在于细胞液中,为清除细胞呼吸所产生的自由基的第一道屏障^[42, 43]。(2)维生素C可防止脂肪酸过氧化,从而保护膜的稳定性^[44]。(3)当维生素E被自由基氧化后,维生素C能够和维生素E自由基复合物发生作用,使维生素E被释放出来,重新回到细胞膜上,发挥其生理功能^[45]。(4)组胺(Histamine)是一种免疫抑制剂,它是由组氨酸经过脱羧酶转化而成,能够和H2受体结合,从而降低T细胞的调节能力、淋巴因子的释放、淋巴细胞的增殖^[46]。而维生素C可以抑制组氨酸脱羧酶的诱导,从而减少组胺的合成,提高免疫力。

维生素E 维生素E是鱼类所必需的营养素之一。已有的研究表明维生素E与鱼类的细胞免疫和体液免疫密切相关^[10, 47-49]。然而,维生素E对各个免疫指标影响情况并不一致。有关于斑点叉尾鮰、金头鲷和大西洋鲑的研究表明,饲料中添加一定量的维生素E能够显著提高实验鱼的替代途径补体活力和凝集效价等非特异性体液免疫因子^[19, 31, 41, 47, 50],而鱼体特异性的抗体水平却不受维生素E添加量的影响^[47, 48, 51],这说明维生素E是影响鱼类非特异性体液免疫的一个重要因素^[31]。同样,维生素E也能影响鱼类的细胞免疫,它能够提高吞噬细胞的吞噬能力、淋巴细胞的迁移率(Leucocyte Migration)和自然细胞的杀菌能力(Natural Cytotoxic Activity)^[10, 19, 41, 50],但多数的研究发现维生素E并不能够提高实验鱼的呼吸暴发活力和巨噬细胞激活因子(MAF)^[19, 41, 47],这可能是由于这两项指标并不是和体内膜直接相关联的细胞活动。造成上述差异的原因是由于不同实验条件下,维生素E在细胞膜上分布的位置及含量各不相同,因此各个免疫细胞通过维生素E而相互识别的能力存在差异,从而导致了免疫应答上的差异^[10]。

维生素E对鱼类免疫力的影响与下述两方面的因素密切相关。一是实验时间。Ortuno等^[19]对金头鲷的研究表明,在摄食含维生素E(100mg/kg)的食物时,当生长实验进行到第15天时,维生素E对实验鱼的吞噬、呼吸暴发和替代途径补体活力并未产生显著影响,而实验鱼的替代途径补体和吞噬活力在第30天达到最大,并一直维持到第45天。而Cuesta等^[10]的研究则表明,当饲料中添加维生素E时,金头鲷的自然细胞杀菌能力在第2—4周达到最大,而到第6周时,实验鱼的自然细胞杀菌力与未添加组之间并未出现差异。这些研究说明,在不同的实验时期,鱼类的免疫指标变化并不一致。另外一个因素是实验所采用的维生素E的剂量。一般的研究表明,随着饲料或体外培养环境中维生素E含量的升高,鱼类的免疫力也随之上升^[47, 48, 52],但有关于金头鲷的研究表明,适宜的维生素E添加量能使鱼类的免疫力达到最佳效果,而过高的添加量并不能进一步提高鱼类的免疫力^[10, 18, 19]。这在体外的实验中也得到了验证^[19]。这可能是由于过高的维生素E水平,导致了它和其他抗氧化剂比例失调,从而影响了免疫应答。

维生素E之所以能够调节鱼类的免疫力,主要因为它 是细胞膜的重要组成成分,对维持机体膜结构的稳定性具有非

常重要的作用。作为抗氧化剂,维生素 E 可清除体内的自由基,防止不饱和脂肪酸的过氧化,保护膜的完整性。由于维生素 E 在膜上发挥生理作用的结合位点独特,因此,它并不能完全由其他抗氧化剂所替代^[53, 54]。此外,维生素 E 可提高鱼类抗应激的能力,降低在应激条件下血浆中可的松(Cortisol)的浓度,提高免疫力^[49],但确切的机制还不很清楚。

3.4 微量元素

微量元素对鱼类的免疫系统具有非常重要的作用,这些微量元素主要包括铁、锌、硒和铬^[55]。影响微量元素对鱼类免疫力的作用主要有两方面的因素。一是饲料中所添加微量元素的形式。当前添加于饲料中的微量元素的形式主要有两种,一种是无机物,一种是经过有机物螯合后的微量元素复合物。Paripatananon 和 Lovell^[56]对斑点叉尾鮰的研究表明,当饲料中添加不同形式的锌时(硫酸锌和蛋氨酸锌),产生抗体的能力存在一定差异,其中添加有机锌组高于添加无机锌组,并认为添加有机锌组的抗病力比无机锌组高 3—6 倍。Lim 等^[57]同样探讨了硫酸锌和蛋氨酸锌对斑点叉尾鮰免疫力的影响结果发现添加有机锌组的实验鱼,其嗜中性粒细胞数量以及巨噬细胞的趋化反应显著高于摄食无机锌的实验组。Wang 等^[58]探讨了亚硒酸钠(NaSeO₃)、蛋氨酸硒(Se-M)和硒酵母(Se-Y)对斑点叉尾鮰的免疫力影响,结果发现无论是对非特异性免疫学指标,还是对病菌的抗感染能力,有机硒的效果都显著高于无机硒。这些研究表明,由于鱼类对经过有机物螯合后的微量元素具有较高的消化吸收率^[56, 58],因此有机微量元素能够更好地促进鱼类的免疫力。但是 Sealey 等^[17]对硫酸亚铁(FeSO₄)和蛋氨酸铁(FeM)的研究却表明,不同形式的铁并未对实验鱼的免疫力和抗病力产生影响。这种差异可能是由于不同的微量元素以及不同实验条件所致。微量元素对鱼类免疫力的影响还与其添加水平相关。当饲料中微量元素缺乏时,不仅生长率下降,免疫力和抗病力也受到抑制,因此存活率也显著下降^[17, 58]。饲料中添加适宜的微量元素可显著提高鱼类的生长率和存活率,同时促进鱼类的非特异性免疫力,提高抵抗疾病的能力。然而当饲料中的微量元素添加量过高时,其免疫力和抗病力并不能进一步提高,相反还会出现免疫抑制效应^[55, 59]。这可能是由于过高的微量元素对鱼类产生毒性的结果。通常情况下,最佳生长的微量元素水平也就是使鱼类免疫力达到最佳状态的水平,这与维生素 C 对免疫力的影响方式不一致。

不同的微量元素对鱼类免疫系统的作用机制及作用途径各不相同。铁是通过影响免疫细胞的结构以及与铁相关的酶活力来影响鱼类免疫力。当铁缺乏时,鱼类的血细胞数量、血液比容、转铁蛋白以及其他一些和免疫相关的酶活力都下降,因此鱼类的抗病力也显著下降^[60, 61]。锌是维持 T 细胞正常生理功能所必需的微量元素,在哺乳动物中,缺乏锌将导致胸腺萎缩^[62]。锌还是许多金属酶的组成成分^[27],通过这些酶类,锌可影响鱼类抗体蛋白的合成,从而影响其免疫力^[57]。铜与体内细胞色素 C 氧化酶、超氧化物歧化酶

(SOD)等抗氧化性酶类密切相关。铜对免疫力的影响在虾类中有相关报道^[59]。硒是谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)的主要成分,一般认为硒对免疫力的调节主要和 GSH 的活性相关^[58, 63],此外,它还与维生素 E 相互作用,共同参与体内的抗氧化过程,从而提高鱼类的免疫力。但最近的研究发现谷胱甘肽硫转移酶(Glutathione S Transferase)和硒蛋白磷(Seleni-umprotein P)与硒的代谢密切相关^[64],因此硒对鱼类免疫系统作用的发挥可能和这些因素有关^[65]。

3.5 碳水化合物

鱼类对碳水化合物的利用能力非常有限,饲料中碳水化合物主要是为机体提供能量。饲料中可消化碳水化合物含量过高将导致鱼体肝脏糖原的堆积,从而导致鱼体产生病变,影响鱼类的免疫力和抗病力^[66, 67]。有关饲料中碳水化合物影响鱼类免疫力的报道较少。Waagbø 等^[68]研究表明,当饲料中可消化淀粉的含量在 10%—30% 时,通过腹腔注射弧菌(*Vibrio salmonicida*),各处理组鱼体的体液免疫并没有出现显著差异。而当以气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)进行攻毒实验时,在 10% 的碳水化合物水平,其死亡率最低,这说明饲料中适宜的碳水化合物水平有助于鱼类的抗病力。

通过营养调控来改善鱼类的免疫力已成为人们关注的焦点。有关这方面的研究目前已有了一定量的报道,然而鱼类营养免疫学毕竟是一门年轻的学科,无论是研究广度还是研究深度,都存在许多未知领域。为了更深入、广泛地探讨该课题,以下几方面急需加以探讨:(1)研究更多的其他营养素对鱼类免疫力的影响;(2)各营养素之间的交互作用对鱼类免疫力的影响;(3)营养素影响鱼类免疫力的分子机制;(4)免疫力对鱼类营养需要的影响。

参考文献:

- [1] Blazer V S. Nutrition and disease resistance in fish [J]. *Ann Rev Fish Dis*, 1992, 2:309—323
- [2] Zhang Y A, Sun B J, Nie P. Immune tissue and cells in fish:a review[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(6):648—654 [张永安,孙宝剑,聂品.鱼类免疫组织和细胞的研究概况.水生生物学报,2000, 24(6):648—654]
- [3] Scapigliati G, Romano N, Buonocore F, et al. The immune system of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, reared in aquaculture [J]. *Dev Comp Immunol*, 2002, 26:151—160
- [4] Yano. The nonspecific immune system:Humoral defense [A]. In: Iwama G, Nakanishi T (Eds.), *The Fish Immune System:Organism, Pathogen and Environment* [C]. San Diego: Academic Press. 1996, 105—107
- [5] Ellis A E. Immunity to bacteria in fish [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1999, 9:291—308
- [6] Anderson D P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish:applications to aquaculture [J]. *Ann Rev Fish Dis*, 1992, 2:281—307
- [7] Nie P. Recent advances of non-specific immunity in fish [J]. *J Fish China*, 1997, 21(1):69—73 [聂品.鱼类非特异性免疫研究的新进展.水产学报,1997, 21(1):69—73]

- [8] Pulsford A L, Cramp M, Langston, et al. Modulatory effects of disease, stress, copper, TBT and vitamin E on the immune system of flatfish [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1995, **5**:631—643
- [9] Munle V, Esteban A, Meseguer J. Effects of in vitro addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) phagocytes [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1998, **66**:185—199
- [10] Cuesta A, Esteban M A, Ortuno J, et al. Vitamin E increases natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2001, **11**:293—302
- [11] Cuesta A, Esteban M A, Meseguer J. Natural cytotoxic activity in seabream (*Sparus aurata* L.) and its modulation by vitamin C [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, **13**:97—109
- [12] Sealey W M, Gatlin III D M. In vitro manipulations of vitamin C and vitamin E concentrations alter intracellular O_2^- production of hybrid striped bass (*Morone chrysops* \times *Morone saxatilis*) head kidney cells [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, **12**:131—140
- [13] Hardie L J, Marsden M J, Fletcher T C, et al. In vitro addition of vitamin C affects rainbow trout lymphocyte responses [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1993, **3**:207—219
- [14] Sakai M. Current research status of fish immunostimulants [J]. *Aquaculture*, 1999, **172**:63—92
- [15] Kiron V, Watanabe T, Fukuda H, et al. Protein nutrition and defense mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1995a, **111A**:351—359
- [16] Kiron V, Fukuda H, Takeuchi T, et al. Essential fatty acid nutrition and defense mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1995b, **111A**:361—367
- [17] Sealey W M, Lim C, Klesius P H. Influence of the dietary level of iron from methionine and iron sulfate on immune response and resistance of Channel catfish to *Edwardsiella ictaluri* [J]. *J World Aquacult Soc*, 1997, **28**(2):142—149
- [18] Ortuno J, Esteban Meseguer J. Effects of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1999, **9**:429—443
- [19] Ortuno J, Esteban M A, Meseguer J. High dietary intake of -tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2000, **10**:293—307
- [20] Wu G, Flynn N E, Flynn S P, et al. Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats [J]. *J Nutr*, 1999, **129**:1347—1354
- [21] Thomas P T, Woo P T K. Dietary modulation of humoral immune response and anaemia in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), infected with *Cryptobia samosita* Katz [J]. *J Fish Dis*, 1990, **13**:435—446
- [22] Cai C F, Wu K, Pan X F, et al. The effects of protein nutrition on growth and immunological activity of allogynogenetic silver crucian carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(6):590—595 [蔡春芳, 吴康,潘新法,等.蛋白质营养对异育银鲫生长和免疫力的影响.水生生物学报,2001,25(6):590—595]
- [23] Burrells C, Williams P D, Southgate P J, et al. Immunological, physiological and pathological responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary concentrations of soybean proteins [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1999, **72**:277—288
- [24] Krogdahl A, Bakke-Mckellep A M, Roed K H, et al. Feeding Atlantic salmon *Salmo salar* L. soybean products: effects on disease resistance (furunculosis), and lysozyme and IgM levels in the intestinal mucosa [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2000, **6**:77—84
- [25] Kidd M T, Gerard P D, Heger J, et al. Threonine and crude protein responses in broiler chicks [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2001, **94**:57—64
- [26] Buentello A J, Gatlin III D M. Effects of elevated dietary arginine on resistance of Channel catfish to exposure to *Edwardsiella ictaluri* [J]. *J Aquat Anim Hlth*, 2001, **13**:194—201
- [27] National Research Council. Nutrient Requirement of Fish [M]. Washington D. C.:National Academy of Press, 1993, 114
- [28] Montero D, Tort L, Izquierdo M S, et al. Effects of -tocopherol and n-3 HUFA deficient diets on blood cells, selected immune parameters and proximate body composition of gilthead seabream (*Sparus aurata*) [A]. In: Stolen J S, Fletcher T C, Bayne C J, et al. (Eds.), *Modulators of Immune Response. The Evolutionary Trail*, SOS Publications. Fair Haven, 1996, 251—266
- [29] Sheldon W M J, Blazer V S. Influence of dietary lipid and temperature on bactericidal activity of channel catfish macrophages [J]. *J Aquat Anim Hlth*, 1991, **3**:87—93
- [30] Bell J G, McVicar A H, Park M T, et al. High dietary linoleic acid affects the fatty acid compositions of individual phospholipids from tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar*): association with stress susceptibility and cardiac lesion [J]. *J Nutr*, 1991, **121**:1163—1172
- [31] Montero D, Tort L, Izquierdo M S, et al. Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by -tocopherol and n-3 HUFA deficiencies [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1998, **18**:399—407
- [32] Erdal J I, Evensen O, Kaupstad O K, et al. Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids [J]. *Aquaculture*, 1991, **98**:363—379
- [33] Fracalossi D M, Lovell R. Dietary lipid sources influence responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to challenge with the pathogen *Edwardsiella ictaluri* [J]. *Aquaculture*, 1994, **119**:287—298
- [34] Durve V S, Lovell R T. Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1982, **39**:948—951
- [35] Li Y, Lovell R T. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish [J]. *J Nutr*, 1985, **115**:123—131
- [36] Navarre O, Halver J. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C [J]. *Aquaculture*, 1989, **79**:207—221
- [37] Hardie L J, Fletcher T C, Seacomes C J. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Aquaculture*, 1991, **95**:201—214

- [38] Anbarasu K, Chandran M R. Effects of ascorbic acid on the immune response of the catfish, *Mystus gulio* (Hamilton), to different bacteria of *Ameromonas hydrophila* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2001, **11**:347—355
- [39] Mazik P M, Brandt T M, Tomasso J R. Effects of dietary vitamin C on growth, caudal fin development and tolerance of aquaculture-related stressors in channel catfish [J]. *The Progressive Fish Culturist*, 1987, **49**:13—16
- [40] Verlhac V, Gabaudan J. Influence of vitamin C on the immune system of salmonids [J]. *Aquaculture of Fisheries and Management*, 1994, **25**:21—36
- [41] Ortuno J, Cuesta A, Esteban M A, et al. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2001, **79**:167—180
- [42] Niki E, Yamamoto Y, Takahashi M, et al. Free radical-mediated damage of blood and its inhibition by antioxidants [J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 1988, **34**:507—512
- [43] Frei B, England L, Ames B N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1989, **86**:6377—6381
- [44] Chie L T, Hwang D F. Effects of thermal stress and vitamin C in lipid peroxidation and fatty acid composition in the liver of thornfish *Terapon jarvua* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2001, **128B**:91—97
- [45] Tappel A L. Will antioxidant nutrients slow aging process [J]. *Geriatrics*, 1968, **23**:97—105
- [46] Klein J. Immunology [M]. Oxford U. K.: Blackwell Scientific Publications, 1990
- [47] Hardie L J, Fletcher T C, Secombes C J. The effect of vitamin E on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Aquaculture*, 1990, **87**:1—13
- [48] 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]. *J Aquat Anim Health*, 1993, **5**:183—188
- [49] Montero D, Tort L, Robaina L, et al. Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2001, **11**:473—490
- [50] Blazer V S, Wolke R E. The effects of -tocopherol on the immune response and non-specific resistance factors of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) [J]. *Aquaculture*, 1984, **37**:1—9
- [51] Salte R, Asgard T, Liestøl K. Vitamin E and selenium prophylaxis against "Hitra disease" in farmed Atlantic salmon—a survival study [J]. *Aquaculture*, 1988, **75**:45—55
- [52] Clermont P, Troutaud D, Verlhac V, et al. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2001, **11**:1—13
- [53] Hung S S O, Cho C Y, Slinger S J. Effect of oxidized oil, DL- -tocopherol acetate and ethoxyquin supplementation on the vitamin E nutrition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fed practical diets [J]. *J Nutr*, 1981, **11**:648—657
- [54] Tengerdy R P, Mathias M M, Nockels C F. Vitamin E, immunity and disease resistance [A]. In: Phillips M, Baetz A (Eds.), *Diet and Resistance to Disease* [C]. New York: Plenum Press, 1981, 27—42
- [55] Landolt M L. The relationship between diet and the immune response in fish [J]. *Aquaculture*, 1989, **79**:193—206
- [56] Paripatananont T, Lovell R T. Responses of Channel catfish fed organic and inorganic sources of zinc to *Edwardsiella ictaluri* challenge [J]. *J Aquat Anim Health*, 1995, **7**:147—154
- [57] Lim C, Klesius P H, Duncan P L. Immune response and resistance of Channel catfish to *Edwardsiella ictaluri* Challenge when fed various dietary levels of zinc methionine and zinc sulfate [J]. *J Aquat Anim Health*, 1996, **8**:302—307
- [58] Wang C, Lovell T, Klesius P H. Response to *Edwardsiella ictaluri* challenge by Channel catfish fed organic and inorganic sources of selenium [J]. *J Aquat Anim Health*, 1997, **9**:172—179
- [59] Lee M H, Shiao S Y. Dietary copper requirement of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, **13**:259—270
- [60] Lim C, Klesius P H. Response of Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed iron-deficient and replete diets to *Edwardsiella ictaluri* challenge [J]. *Aquaculture*, 1997, **157**:83—93
- [61] Lim C, Klesius P H, Li M H, et al. Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge [J]. *Aquaculture*, 2000, **185**:313—327
- [62] Sherman A R. Zinc, Copper, and Iron nutriture and immunity [J]. *J Nutr*, 1992, **122**:604—609
- [63] Bell J G, Cowey C B, Adron J W, et al. Some effects of selenium deficiency on enzyme activities and indices of tissue peroxidation in Atlantic salmon parr (*Salmo salar*) [J]. *Aquaculture*, 1987, **65**:43—54
- [64] Burk R F. Recent developments in trace element metabolism and function: newer roles of selenium in nutrition [J]. *J Nutr*, 1989, **119**:1051—1054
- [65] Thorarinsson R, Landolt M L, Elliott D G, et al. Effect of dietary vitamin E and selenium on growth, survival and the prevalence of *Renibacterium salmoninarum* infection in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. *Aquaculture*, 1994, **121**:343—358
- [66] Dixon D G, Hilton J W. Effects of available dietary carbohydrate and water temperature on the chronic toxicity of waterborne copper to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1985, **42**:1007—1013
- [67] National Research Council. Nutrient Requirement of Fish [M]. Washington D. C.: National Academy of Press, 1993, 760
- [68] Waagbø R, Glette J, Sandnes K, et al. Influence of dietary carbohydrate on blood chemistry, immunity and disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L [J]. *J Fish Dis*, 1994, **17**:245—258