

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00588

大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂感染嗜水气单胞菌后生理生化指标的影响

明建华^{1,2}, 谢骏², 徐跑², 刘文斌³, 周群兰², 刘波², 刁丙文²

1. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;

3. 南京农业大学 动物科技学院, 江苏 南京 210095

摘要: 为综合评价大黄素、高剂量维生素 C 及其配伍对团头鲂(*Megalobrama amblycephala* Yih)抗嗜水气单胞菌感染能力的影响, 选取 1 200 尾健康的团头鲂, 体质量为(133.44±2.11) g, 随机分成 4 组, 其中 1 组为对照组, 投喂基础日粮, 另外 3 组在基础日粮中分别添加 60 mg/kg 大黄素、700 mg/kg 维生素 C、60 mg/kg 大黄素+700 mg/kg 维生素 C(配伍组)。饲养 60 d 后, 经腹腔注射感染嗜水气单胞菌, 并在攻毒前后检测团头鲂血液和肝脏的生化指标以及肝脏 2 种热休克蛋白 70s(HSP70s)mRNA 的表达水平; 另从各池中取 10 尾鱼进行同样的攻毒试验, 统计攻毒后各时间点鱼的累积死亡率。结果表明, 攻毒后, 与对照组相比, 大黄素、维生素 C 组不同程度地提高了血清总蛋白(TP)、溶菌酶(LSZ)和碱性磷酸酶(AKP)的水平, 肝脏超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性以及 HSC70 和 HSP70 mRNA 的表达水平, 降低了血清皮质醇(COR)、血糖(GLU)、谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)、甘油三酯(TG)以及肝脏丙二醛(MDA)的水平; 配伍组中, 这些指标的变化趋势虽与上述类似, 但大多与对照组的差异不显著($P>0.05$), 且未表现出协同增效作用。此外, 各组鱼血清胆固醇(CHOL)的含量在攻毒前后的差异均不显著($P>0.05$)。统计也表明, 大黄素和维生素 C 组鱼的累积死亡率在攻毒后 24 h、48 h 均显著低于对照组($P<0.05$), 而配伍组试验鱼的累积死亡率与对照组差异均不显著($P>0.05$)。由此可见, 在基础日粮中添加大黄素 60 mg/kg 或维生素 C 700 mg/kg, 可提高鱼体的非特异性免疫力、抗氧化能力以及 2 种 HSP70s mRNA 的表达水平, 增强鱼体抗病病原菌感染的能力。二者配伍则效果不佳。

关键词: 团头鲂; 大黄素; 维生素 C; 嗜水气单胞菌; HSP70s 表达

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)03-0588-14

在水产养殖中, 鱼类经常遭到各种病原菌的侵袭, 其中嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是主要的致病菌之一, 该菌属于弧菌科气单胞菌属, 常会引起淡水鱼类出血性败血症的爆发性流行, 危害严重^[1]。目前对嗜水气单胞菌引起的疾病多采用抗生素防治, 但使用抗生素容易造成药物残留、细菌耐药性、免疫抑制和破坏微生态平衡

等诸多负面影响^[2], 不能满足无公害养殖的需要。因此, 通过营养调控手段来提高鱼体的免疫力和抗病原感染力日益受到重视, 目前开发无毒副作用、无抗药性、能增强水产动物免疫力和抗应激能力的饲料添加剂成为研究的热点。

大黄素是从中草药大黄(*Rheum officinale* Baill)根茎中提取的主要有效单体, 其化学名称为 1, 3,

收稿日期: 2010-06-25; 修订日期: 2010-07-16.

基金项目: 农业部行业专项(200803013); 现代农业产业技术体系建设专项(nycytx-49-18).

作者简介: 明建华(1973-), 男, 博士研究生, 主要从事水产动物生理与营养的研究. Tel: 15852743836, E-mail: mingjianhua686@yahoo.com.cn

通信作者: 徐跑, 研究员. E-mail: xup@ffrc.cn; 谢骏, 研究员. E-mail: xiej@ffrc.cn

8-羟基-6-甲基蒽醌, 具有抗菌消炎^[3]、抗氧化及清除氧自由基^[4]、降血脂^[5]、保护肝脏^[6]和免疫调节^[7]等多种功效。Xie等^[8]的研究也表明, 大黄蒽醌提取物(主要成分为大黄素、大黄酚和大黄酸等)能降低建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)感染嗜水气单胞菌后的死亡率。维生素C又名L-抗坏血酸, 是鱼类必需的营养素, 而大多数鱼类缺乏合成维生素C所需的L-古洛糖酸内酯氧化酶(GLO), 必须从食物中获取维生素C^[9]。维生素C是一种重要的免疫增强剂^[10], 鱼类摄食维生素C含量较高的饲料能有效提高鱼体的免疫力和抗病原菌感染力^[11-15]。维生素C也是一种重要的抗氧化剂, 可直接或间接清除自由基, 降低机体脂质过氧化物的水平, 抑制其抗氧化酶活性的降低^[16-17]。

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs), 又称热应激蛋白(heat stress proteins), 是进化上高度保守, 具有多种生物学功能的非特异性细胞保护蛋白^[18-19]。其按同源性及分子量大小可分为3个主要家族: HSP90 (85~90 kD)、HSP70 (68~73 kD) 和小分子量热休克蛋白(16~47 kD)^[20], 其中HSP70s是最保守和最重要的一族。HSP70s主要由2种不同的基因编码^[21], 即组成型HSC70基因和诱导型HSP70基因。HSC70主要与细胞的分裂、增殖、发育等生理过程相关^[22-23], 而HSP70主要参与应激保护, 改善细胞的生存能力, 提高对环境胁迫或伤害的耐受性^[24-25]。通过营养手段来调控鱼体内2种热休克蛋白70的表达, 对于增强机体的免疫力和抗病原菌感染力具有重要意义。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala* Yih)隶属硬骨鱼纲, 鲤形目, 鲤科, 鲴亚科, 是中国主要的淡水养殖品种之一。团头鲂是遭受嗜水气单胞菌危害较严重的鱼类之一, 常因患急性细菌性败血症而大量死亡, 而有关大黄素、高剂量维生素C对团头鲂抗嗜水气单胞菌感染的研究还鲜见报道。鉴于此, 本实验在团头鲂基础日粮中分别添加大黄素、高剂量维生素C及两者的配伍成分, 探讨其对团头鲂感染嗜水气单胞菌后的死亡率、血液和肝脏的生化指标以及肝脏2种HSP70s

mRNA表达的影响, 以期为大黄素和维生素C在防治鱼病和缓解应激方面的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验鱼、日粮及实验设计

团头鲂由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴渔场提供。实验鱼在渔场水泥池中驯养15 d后, 选择体质健壮, 规格基本一致的鱼, 初始体质量(133.44 ± 2.11) g, 随机分成4组, 其中1组为对照组, 投喂基础日粮(粗蛋白30.89%, 粗脂肪4.58%, 含50.3 mg/kg维生素C), 另外3组为试验组, 投喂饲料是在基础日粮中分别添加60 mg/kg 大黄素、700 mg/kg 维生素C、60 mg/kg 大黄素+700 mg/kg 维生素C。以上大黄素和维生素C均为有效含量, 其中大黄素由巨邦植物原料有限公司提供, 维生素C源为罗氏公司产品(L-抗坏血酸-2-多聚磷酸酯, LAPP)。以上每组设3个重复, 每个重复100尾鱼, 分别饲养于12个水泥池中(规格为8.0 m×2.0 m×1.2 m, 水深0.7 m)。日投饵量为鱼体质量2%~4%, 正式饲养60 d后结束。

1.2 攻毒试验

1.2.1 攻毒试验 I 团头鲂在饲养结束后, 选择规格基本一致的鱼进行攻毒试验, 每池取15尾。病原菌采用浙江省淡水水产研究所提供的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah, BSK-10)。按王文博等^[26]的方法, 将2次活化后的嗜水气单胞菌用无菌生理盐水稀释, 使终浓度为 5×10^7 /mL。按每100 g鱼腹腔注射菌液0.5 mL, 然后分别放养于室内水泥池的12个小网箱中(规格为2.0 m×1.2 m×1.0 m), 保证充足的溶氧(DO > 6 mg/L)。实验期间不投饵, 减少人为干扰, 保持安静, 防止额外应激。

1.2.2 攻毒试验 II 同攻毒试验 I 的方法, 另从每个池中取10尾鱼, 腹腔注射感染后, 分别放养于室内另一水泥池的12个小网箱中(规格为2.0 m×1.2 m×1.0 m), 保证充足的溶氧, 观察鱼的发病情况, 并分别于攻毒后0 h、6 h、12 h、24 h、48 h统计鱼的累积死亡率。累积死亡率(%) = 死亡

鱼尾数/初受感染鱼尾数 $\times 100$ 。

1.3 采样与处理

攻毒试验 I 中, 在攻毒前(0 h)和攻毒后 6 h、12 h、24 h 进行采样。每次从各小网箱中随机取 3 尾鱼, 立即投入浓度为 200 mg/L 的 MS-222 中作快速深度麻醉, 之后用一次性医用注射器从尾静脉采血。血样在 4 °C 冰箱中静置 1~2 h 后, 以 4 °C 3 000 r/min 离心 10 min 制备血清, -20 °C 冻存备用。鱼体采血后立即剖开腹腔, 剥离出肝脏, 取约 0.1 g 肝脏用液氮速冻后于 -80 °C 保存用于分子生物学测定; 另取适量肝脏于 -20 °C 保存, 用于常规分析。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 血液生化指标的测定 总蛋白(TP)采用福林-酚试剂法^[27]测定; 溶菌酶(LSZ)参照 Yin 等^[28]的方法测定; 皮质醇(COR)采用放射免疫法(RIA)测定^[29], 试剂盒购自北京北方生物技术研究所; 葡萄糖(GLU)、甘油三酯(TG)、胆固醇(CHOL)、谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)和碱性磷酸酶(AKP)等在美国贝克曼 Cx-4 型全自动生化分析仪上测定, 试剂盒均购自上海骏实生物科技有限公司。

1.4.2 肝脏抗氧化指标的测定 肝脏样品解冻后, 用冷生理盐水冲洗干净并用滤纸吸干后称重, 肝脏与匀浆介质(pH 7.4)按 1:9 (*W: V*)的比例冰浴匀浆, 然后 4 °C 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清液用于分析。超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.4.3 肝脏 2 种 HSP70s mRNA 表达水平的测定 根据已经克隆到的团头鲂组成型 Ma-HSC70 和诱导型 Ma-HSP70 cDNA 全序列^[21] (Ma-HSC70: EU623471, Ma-HSP70: EU884290), 选择两序列比对差异相对较大的部分, 分别设计 2 对引物, 即 Ma-HSC70(P1: CAGGTGGAATGCCCGATGGTAT, P2: GTAGCAATAGTGGCTTTGGAATGGC) Ma-HSP70(P3: CTTTATCAGGGAGGGATGCCAGC, P4: CCCTGCAGCATTGAGTTCATAAGGT)。根据团头鲂管家基因 β -actin 序列(AY170122), 设

计引物为 P5: TCGTCCACCGCAAATGCTTCTA, P6: CCGTCACCTTCACCGTTCCAGT。所有引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 扩增片段长度为 123~152 bp。取肝脏样品 50~100 mg, 按照 RNAiso Reagent(TaKaRa 公司)说明书操作, 抽提总 RNA, 样品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 保持在 1.8~2.0。

按照 SYBR[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit (TaKaRa 公司)使用说明, 进行 RT 反应, 然后采用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时定量 PCR 扩增反应, 以 β -actin 为内参, 对得到的各样品 C_t 值进行均一化处理, 以对照组 Ma-HSP70 mRNA 在 0 h 的水平为基准, 应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[30] 确定其他实验组 2 种热休克蛋白 70 mRNA 的相对表达量。荧光定量 PCR 反应条件为: 95 °C 10 s, 然后 45 个循环(95 °C 5 s, 62 °C 15 s, 72 °C 10 s, 读板记录荧光量), 最后 72 °C 3 min; 熔解曲线的反应条件为 65 °C 至 92 °C, 每升高 0.2 °C 保持 0.02 s 读板记录荧光量。

1.5 数据统计与分析

实验数据用 SPSS 13.0 统计软件包中的单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 氏多重比较处理, $P < 0.05$ 表示差异显著。实验结果以平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SE$)表示。

2 结果与分析

2.1 大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂感染嗜水气单胞菌后的发病情况和累积死亡率的影响

在攻毒试验 I、II 中, 团头鲂都不同程度地表现出由嗜水气单胞菌引起的典型细菌性败血症, 如鳍基部、口部、鳃裂后部有充血或出血症状, 眼球外突。部分濒死状态的鱼鳃盖凹陷, 鳃丝发白, 腹部膨大, 肛门红肿; 解剖后发现腹腔内积水, 肝肾肿大, 肠壁充血发炎。大黄素和维生素 C 组鱼比对照组和配伍组较迟出现以上症状。

在攻毒试验 II 中, 由图 1 可知各实验组团头鲂在 6 h 前均无死亡, 以后累积死亡率呈升高的变化趋势; 至 48 h, 对照组、大黄素、维生素 C 和配伍组的累积死亡率分别为 90.0%、53.3%、60.0% 和 83.3%。大黄素和维生素 C 组鱼的累积死

亡率在 24 h、48 h 均显著低于对照组($P<0.05$), 其中大黄素组效果较好, 24 h、48 h 累积死亡率分别比对照组下降了 81.82%、40.74%, 而配伍组鱼的累积死亡率与对照组的差异均不显著($P>0.05$)。

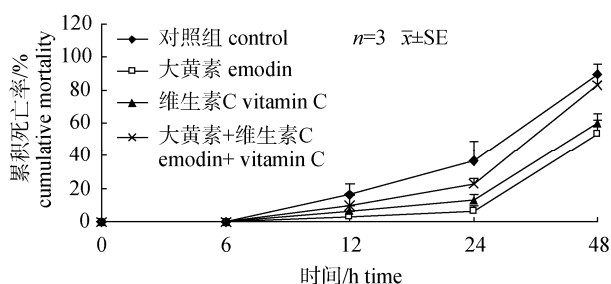


图1 大黄素、维生素C及其配伍对感染嗜水气单胞菌的团头鲂累积死亡率的影响

Fig. 1 Effects of emodin, vitamin C and their combination on cumulative mortality of *Megalobrama amblycephala* infected with *Aeromonas hydrophila*

2.2 大黄素、维生素C及其配伍对团头鲂血清总蛋白含量、溶菌酶和碱性磷酸酶活性的影响

由图2A可知, 经攻毒后, 各实验组团头鲂血清总蛋白的含量呈先升高后下降的变化趋势, 至 24 h 下降到接近攻毒前(0 h)的水平。在攻毒前, 3 个实验组总蛋白的含量均显著高于对照组($P<0.05$), 它们之间的差异则不显著($P>0.05$)。在攻毒后, 大黄素和维生素C组的总蛋白含量仍显著高于对照组($P<0.05$), 而配伍组只在 12 h、24 h 才显著高于对照组($P<0.05$)。

由图2B可知, 各实验组鱼在攻毒后血清溶菌酶的水平也呈先升高后下降的变化趋势, 至 24 h, 显著低于攻毒前的水平($P<0.05$)。在攻毒前, 3 个实验组溶菌酶的活性显著高于对照组($P<0.05$), 它们之间的差异则不显著($P>0.05$)。在攻毒后, 大黄素和维生素C组溶菌酶的活性仍显著高于对照组($P<0.05$), 而配伍组与对照组的差异则均不显著($P>0.05$)。

由图2C可知, 各组鱼在攻毒后血清碱性磷酸酶水平呈下降的变化趋势。在攻毒前, 大黄素和维生素C组碱性磷酸酶的活性显著高于对照组($P<0.05$), 而配伍组与对照组的差异不显著($P>$

0.05)。在攻毒后, 大黄素组在 6 h、维生素C组在 6 h 和 12 h 的碱性磷酸酶活性均显著高于对照组($P<0.05$), 至 24 h, 各组间差异不显著($P>0.05$)。

2.3 大黄素、维生素C及其配伍对团头鲂肝脏抗氧化指标的影响

由图3A可知, 经感染嗜水气单胞菌后, 各实验组团头鲂肝脏超氧化物歧化酶(SOD)的活性呈先升高后下降的变化趋势, 至 24 h 显著低于攻毒前(0 h)的水平($P<0.05$)。在攻毒前, 大黄素和维生素C组 SOD 的活性显著高于对照组($P<0.05$), 而配伍组与对照组的差异不显著($P>0.05$)。攻毒后, 3 个实验组 SOD 的水平均显著高于对照组($P<0.05$), 它们之间的差异则均不显著($P>0.05$)。

由图3B可知, 各组鱼经攻毒后肝脏过氧化氢酶(CAT)的活性呈下降的变化趋势。在攻毒前, 大黄素组 CAT 的活性显著高于对照组($P<0.05$), 而维生素C和配伍组 CAT 的活性与对照组的差异不显著($P>0.05$)。在攻毒后, 大黄素和维生素C组 CAT 的活性均显著高于对照组($P<0.05$), 而配伍组与对照组的差异均不显著($P>0.05$)。

在攻毒后, 各组鱼肝脏丙二醛(MDA)的含量呈升高的变化趋势(图3C)。在攻毒前后, 3 个实验组 MDA 的含量均显著低于对照组($P<0.05$), 它们之间的差异则均不显著($P>0.05$)。

2.4 大黄素、维生素C及其配伍对团头鲂血清皮质醇和葡萄糖含量的影响

由图4A可知, 各实验组团头鲂经感染嗜水气单胞菌后血清皮质醇的含量呈先升高后下降的变化趋势, 至 24 h, 各组仍显著高于攻毒前的水平($P<0.05$)。在攻毒前后, 大黄素、维生素C组皮质醇的水平均显著低于对照组($P<0.05$), 其中大黄素组皮质醇的降幅更明显。配伍组皮质醇的水平只在攻毒 6 h 才显著低于对照组($P<0.05$)。

与皮质醇的变化相似, 各实验组鱼在攻毒后血糖含量也呈先升高后下降的变化趋势(图4B)。在攻毒前, 各组鱼血糖水平的差异不显著($P>0.05$)。在攻毒后, 3 个实验组的血糖含量均显著低于对照组($P<0.05$), 它们之间的差异则均不显著($P>0.05$)。

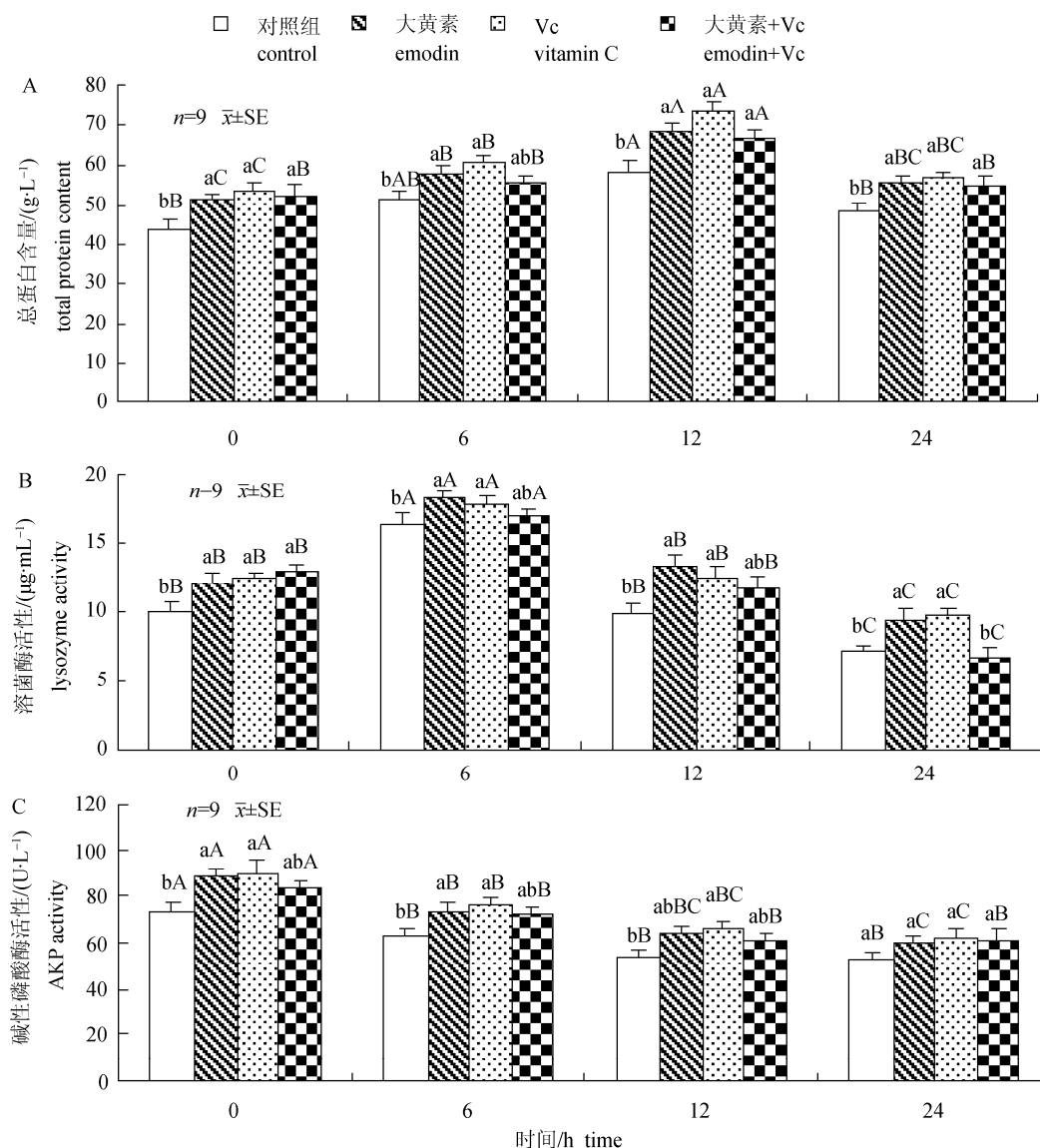


图 2 大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂感染嗜水气单胞菌后血清总蛋白(A)、溶菌酶(B)和碱性磷酸酶(C)水平的影响
不同大写字母表示同一组在不同时间点差异显著($P < 0.05$); 不同小写字母表示不同组在同一时间点差异显著($P < 0.05$).

Fig. 2 Effects of emodin, vitamin C and their combination on serum total protein (A), lysozyme (B) and alkaline phosphatase (C) levels of *Megalobrama amblycephala* infected with *Aeromonas hydrophila*

Different capital letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) among different time points in the same group in Duncan's test. Different small letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) among different groups at the same time in Duncan's test.

2.5 大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂血清谷丙转氨酶和谷草转氨酶活性的影响

由图 5A 可知, 各实验组团头鲂在感染嗜水气单胞菌后血清谷丙转氨酶(GPT)活性呈升高的变化趋势。在攻毒前, 各实验组 GPT 活性的差异不显著($P > 0.05$)。攻毒后, 大黄素、维生素 C 组 GPT 的活性均显著低于对照组($P < 0.05$); 配伍组在攻毒 6 h、12 h 后也显著低于对照组($P < 0.05$),

但至 24 h 与对照组差异不显著($P > 0.05$)。

攻毒后, 各组鱼血清谷草转氨酶(GOT)的水平呈先升高后下降的变化趋势(图 5B), 至 24 h, 各组仍显著高于攻毒前的水平($P < 0.05$)。在攻毒前, 各实验组 GOT 活性的差异不显著($P > 0.05$)。攻毒后, 大黄素、维生素 C 组 GOT 的活性均显著低于对照组($P < 0.05$), 而配伍组除 6 h 外, 其他时间也显著低于对照组的水平($P < 0.05$)。

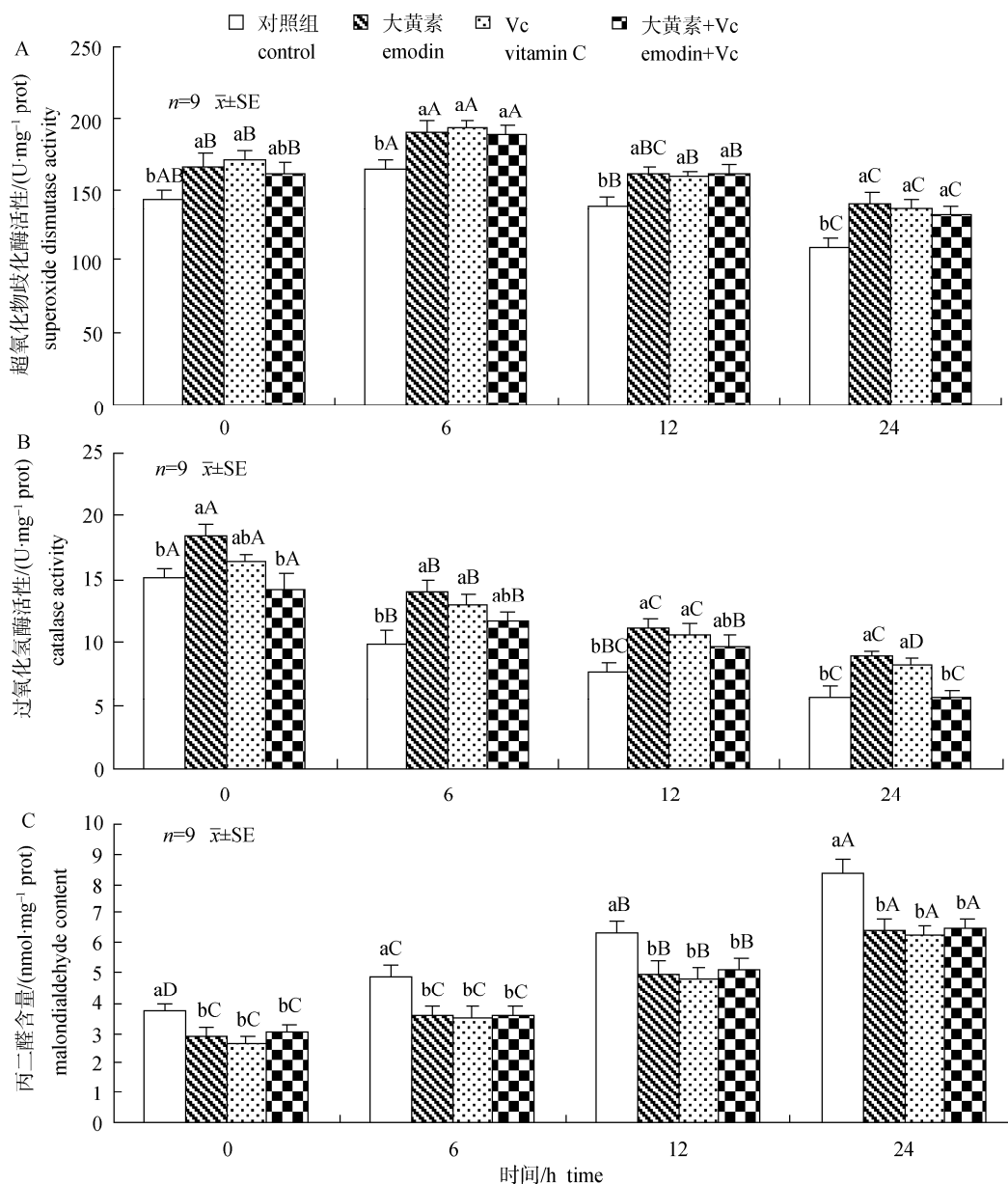


图 3 大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂感染嗜水气单胞菌后肝脏超氧化物歧化酶(A)、过氧化氢酶(B)和丙二醛(C)水平的影响

不同大写字母表示同一组在不同时间点差异显著($P < 0.05$); 不同小写字母表示不同组在同一时间点差异显著($P < 0.05$).

Fig. 3 Effects of emodin, vitamin C and their combination on liver SOD (A), CAT (B) and MDA (C) levels of *Megalobrama amblycephala* infected with *Aeromonas hydrophila*

Different capital letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) among different time points in the same group in Duncan's test. Different small letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) among different groups at the same time in Duncan's test.

2.6 大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂血清甘油三酯和胆固醇含量的影响

由图 6A 可知, 各实验组团头鲂经攻毒后血清甘油三酯的含量呈下降的变化趋势。在攻毒前, 大黄素和维生素 C 组甘油三酯的含量显著低于对

照组($P < 0.05$), 而配伍组与对照组的差异不显著($P > 0.05$)。在攻毒 6 h 后, 3 个实验组甘油三酯的含量均显著低于对照组($P < 0.05$), 而在攻毒 12 h、24 h 后各组间差异均不显著($P > 0.05$)。

由图 6B 可知, 在攻毒前后, 各实验组鱼血清

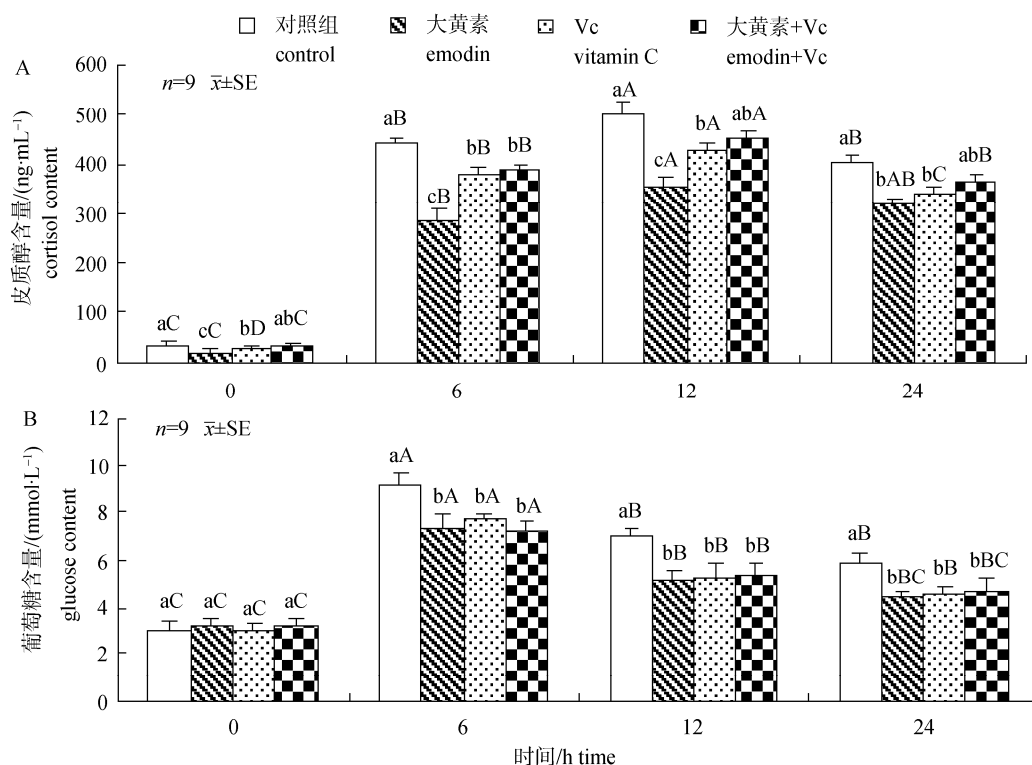


图 4 大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂感染嗜水气单胞菌后血清皮质醇和葡萄糖含量的影响

不同大写字母表示同一组在不同时间点差异显著 ($P < 0.05$); 不同小写字母表示不同组在同一时间点差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 4 Effects of emodin, vitamin C and their combination on serum cortisol (A) and glucose (B) contents of *Megalobrama amblycephala* infected with *Aeromonas hydrophila*

Different capital letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) among different time points in the same group in Duncan's test. Different small letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) among different groups at the same time in Duncan's test.

胆固醇含量的差异均不显著 ($P > 0.05$).

2.7 大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂肝脏 2 种 HSP70s mRNA 表达水平的影响

由图 7A 可知, 经攻毒后, 各实验组团头鲂肝脏 HSC70 mRNA 表达水平呈先升高后下降的变化趋势, 至 24 h 显著低于攻毒前(0 h)的水平 ($P < 0.05$). 在攻毒前, 各组鱼肝脏 HSC70 mRNA 表达量无显著差异 ($P > 0.05$). 攻毒后, 大黄素和维生素 C 组 HSC70 mRNA 的表达水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而配伍组只在 12 h 才显著高于对照组的水平 ($P < 0.05$).

由图 7B 可知, 各实验组鱼在攻毒后肝脏 HSP70 mRNA 表达水平也呈先升高后下降的变化趋势, 但至 24 h 仍显著高于攻毒前的水平 ($P < 0.05$). 在攻毒前, 3 个实验组 HSP70 mRNA 的表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 3 个实验组之间的差异则不显著 ($P > 0.05$). 攻毒后, 大黄素和维生

素 C 组 HSP70 mRNA 的表达水平仍显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而配伍组与对照组的差异均不显著 ($P > 0.05$).

3 讨论

本实验所使用的基础日粮中, 维生素 C 有效含量为 50.3 mg/kg, 能够满足团头鲂正常生长的需要^[31]; 依据高剂量维生素 C 可有效提高鱼体的免疫力和抗病原菌感染力的研究报道^[11-15], 结合团头鲂的生长预实验, 在基础日粮中添加 700 mg/kg 维生素 C (共含维生素 C 750 mg/kg)。添加 60 mg/kg 大黄素是根据参考文献^[4-6]并结合团头鲂的生长预实验确定的; 配伍组则为了检验二者配伍的效果。

3.1 大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂感染嗜水气单胞菌后的保护作用

团头鲂感染嗜水气单胞菌后不同程度地表现

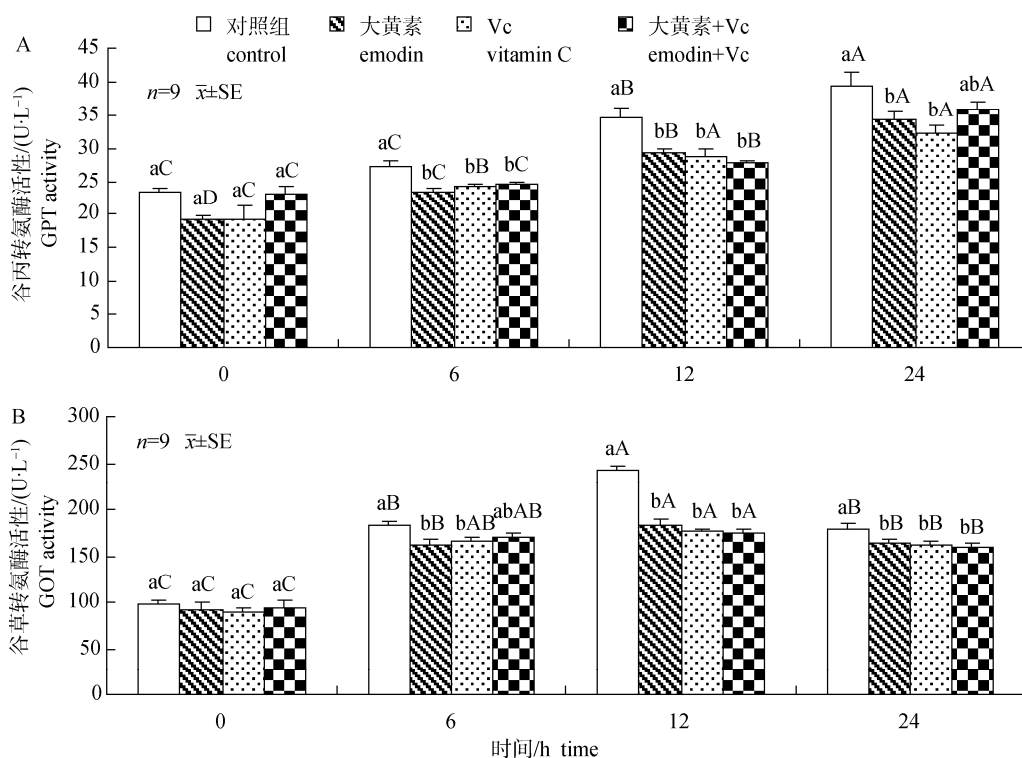


图5 大黄素、维生素C及其配伍对团头鲂感染嗜水气单胞菌后血清谷丙转氨酶(A)和谷草转氨酶(B)活性的影响

不同大写字母表示同一组在不同时间点差异显著($P < 0.05$); 不同小写字母表示不同组在同一时间点差异显著($P < 0.05$)

Fig. 5 Effects of emodin, vitamin C and their combination on serum GPT (A) and GOT (B) activities of *Megalobrama amblycephala* infected with *Aeromonas hydrophila*

Different capital letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) among different time points in the same group in Duncan's test. Different small letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) among different groups at the same time in Duncan's test.

出典型的出血症状, 这与孙峰等^[32]的报道是一致的。本研究发现, 大黄素和维生素C组比对照组和配伍组较迟出现以上病症; 攻毒试验也表明, 大黄素和维生素C组鱼的累积死亡率在 24 h、48 h, 均显著低于对照组($P < 0.05$), 这说明大黄素和高剂量维生素C可在一定程度上降低嗜水气单胞菌的危害。以前也有类似的研究报道, 如大黄蒽醌提取物可降低建鲤感染嗜水气单胞菌后的死亡率^[8], 高剂量维生素C^[11-15]同样也可降低鱼攻毒后的死亡率。大多数鱼类特异性抗体的产生需要长期的适应并通过产生免疫记忆而形成^[33], 因此本实验中团头鲂成活率在短时间内的提高, 可能与大黄素、高剂量维生素C提高了鱼体的非特异性免疫力有关^[11,33-34]。配伍组鱼的累积死亡率与对照组差异均不显著($P > 0.05$), 表明二者配伍效果反而不佳, 具体原因还有待于进一步的研究。

3.2 大黄素、维生素C及其配伍对团头鲂血清非特异性免疫指标的影响

血清总蛋白含量反映鱼体的营养和代谢状况, 也间接反映机体非特异性免疫水平的高低^[35]。溶菌酶是鱼体内重要的非特异性免疫因子之一, 它产生于嗜中性粒细胞和巨噬细胞, 并被分泌到血液及黏液中发挥溶菌效应^[36]。其主要针对革兰氏阳性菌发挥作用, 对一些革兰氏阴性菌如伤寒杆菌、嗜水气单胞菌等也有杀灭作用, 在防御病原入侵上起着重要作用^[32,34-35]。碱性磷酸酶是生物体内的一种重要的代谢调控酶, 直接参与磷酸基团的转移和钙磷代谢, 在鱼类对营养物质的吸收与利用过程中发挥着重要作用。另外, 碱性磷酸酶能够改变病原体的表面结构, 从而增强机体对病原体的识别和吞噬能力。

本实验中, 经攻毒后, 各实验组团头鲂血清

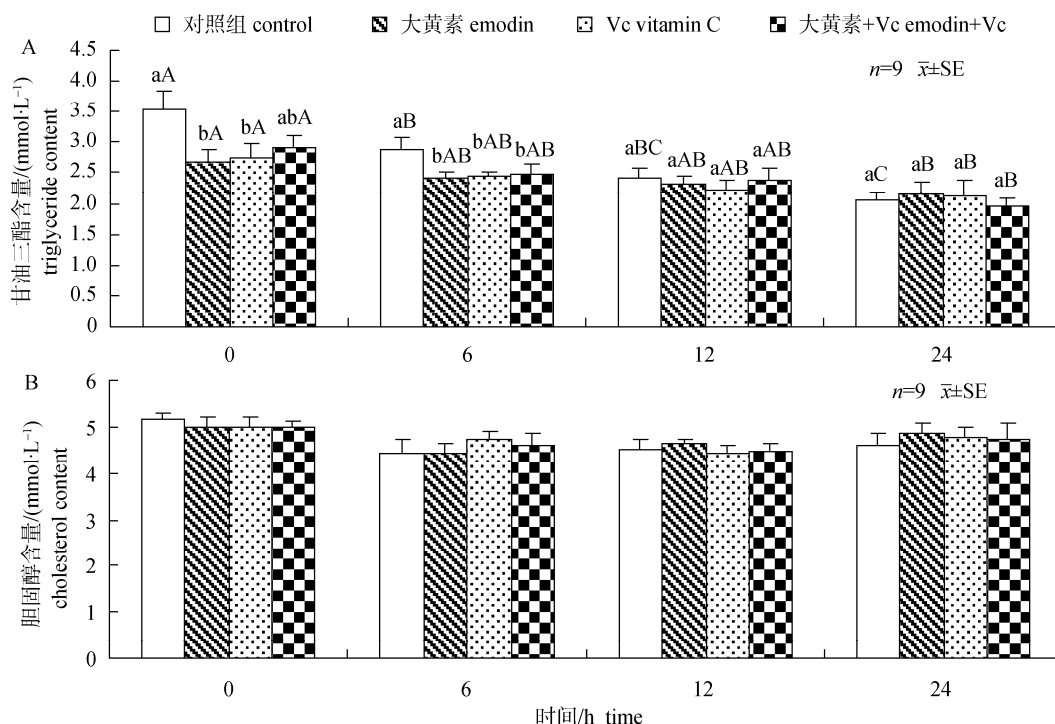


图 6 大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂感染嗜水气单胞菌后血清甘油三酯(A)和胆固醇(B)含量的影响

不同大写字母表示同一组在不同时间点差异显著($P < 0.05$); 不同小写字母表示不同组在同一时间点差异显著($P < 0.05$).

Fig. 6 Effects of emodin, vitamin C and their combination on serum triglyceride (A) and cholesterol (B) contents of *Megalobrama amblycephala* infected with *Aeromonas hydrophila*

Different capital letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) among different time points in the same group in Duncan's test. Different small letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) among different groups at the same time in Duncan's test.

总蛋白和溶菌酶的水平均先升高后下降, 而碱性磷酸酶的活性呈下降的变化趋势。陈寅儿等^[37]报道患溶藻弧菌病鲈(*Lateolabrax japonicus*)的血清总蛋白水平显著高于健康鱼, 而郭松林等^[38]发现美洲鳗鲡(*Anguilla rostrata*)经注射感染嗜水气单胞菌后, 血清总蛋白水平在 6 h 无显著变化, 在 30 h 却显著下降; 孙峰等^[32]报道鲫 (*Carassius auratus*)感染嗜水气单胞菌后, 血清溶菌酶的活力也呈先升高后下降的变化趋势。据此推测, 鱼类感染致病菌后, 引起鱼体的急性应激反应^[35], 其通过大量分泌皮质醇来促进糖的合成^[39-40]、脂肪降解^[41-42]以获得能量, 会通过增加特定蛋白(如溶菌酶、补体和 C 反应蛋白等)的水平来增强机体的免疫力^[35-36], 共同抵抗病原菌的侵袭, 从而导致血清总蛋白水平的升高。当病原菌的危害超出了鱼体的防御能力, 导致蛋白的合成水平下降, 使溶菌酶的活性也受到抑制, 血清总蛋白水平随之

降低。鱼体碱性磷酸酶活性一直呈下降趋势, 可能是嗜水气单胞菌一开始就抑制了该酶的活性, 也有鱼感染该菌后对碱性磷酸酶水平无影响的报道^[38]。

本实验中, 在攻毒前后, 大黄素、维生素 C 组鱼血清总蛋白和溶菌酶的水平均显著高于对照组($P < 0.05$); 碱性磷酸酶的活性也较对照组高, 尽管差异有时并不显著($P > 0.05$)。这些结果表明, 大黄素、高剂量维生素 C 均可提高鱼体的非特异性免疫力, 增强其抵抗致病菌感染的能力。配伍组虽然也表现出了一定的作用, 但均未起到协同增效作用, 其原因还有待于进一步的研究。

3.3 大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂肝脏抗氧化能力的影响

检测动物 SOD、CAT 和 MDA 的变化能比较准确地反映机体内的抗氧化状况^[43-44]。本实验中各组团头鲂经攻毒后肝脏 SOD 活性呈先升高后

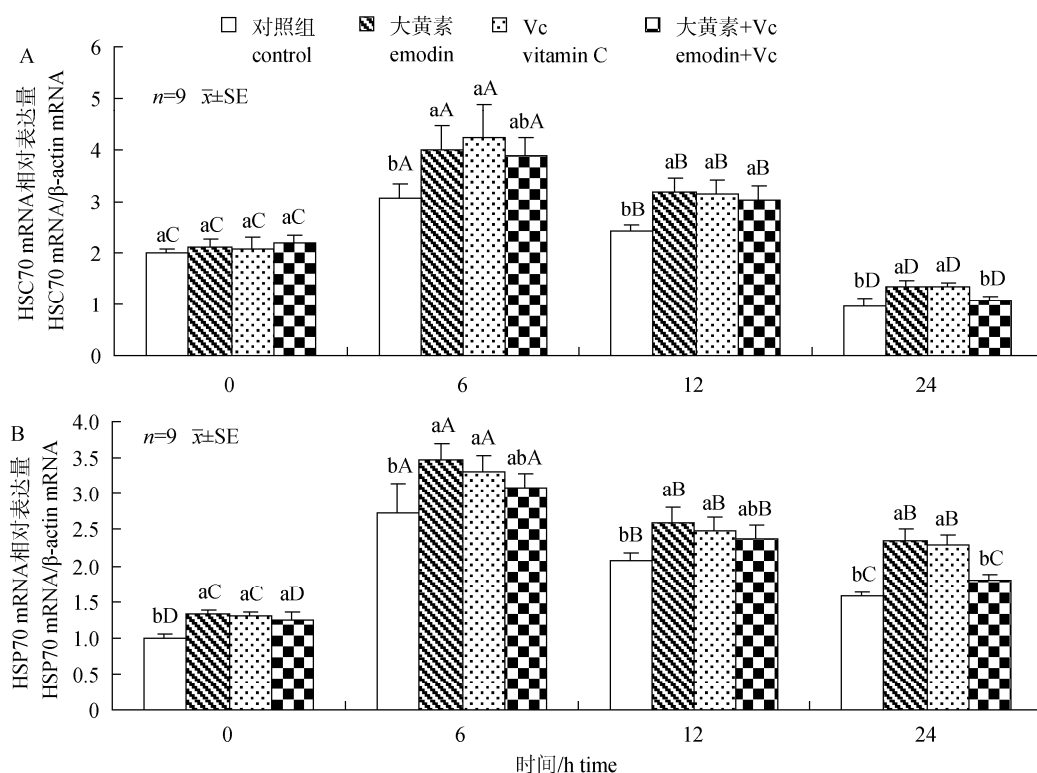


图7 大黄素、维生素C及其配伍对团头鲂感染嗜水气单胞菌后肝脏HSC70(A)和HSP70(B)mRNA相对表达水平的影响
不同大写字母表示同一组在不同时间点差异显著($P < 0.05$); 不同小写字母表示不同组在同一时间点差异显著($P < 0.05$).

Fig. 7 Effects of emodin, vitamin C and their combination on relative expression levels of liver HSC70 (A) and HSP70 (B) mRNA in *Megalobrama amblycephala* infected with *Aeromonas hydrophila*

Different capital letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) at different time points in the same group in Duncan's test. Different small letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$) among different groups at the same time in Duncan's test.

下降的变化趋势,这与背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)感染嗜水气单胞菌后肝胰腺SOD的变化趋势基本一致^[45]。SOD活性在前期的升高可能与鱼体遭到嗜水气单胞菌侵袭后,激活了该诱导酶的活性有关^[46],后期的下降则可能与鱼体因病原菌感染而导致活性氧自由基的水平超过了自身的清除阈值有关,SOD活性受到抑制。在攻毒后,各组鱼肝脏CAT活性呈下降的变化趋势,而MDA含量呈持续升高的变化趋势,表明攻毒抑制了鱼体CAT的活力。随着CAT、SOD活性的下降,机体清除自由基的能力也下降,导致鱼体一定程度的氧化损伤。

大黄素组在攻毒前后、维生素C组在攻毒后,团头鲂肝脏SOD和CAT的活性均显著高于对照组,MDA水平则均显著低于对照组($P < 0.05$)。谢一荣等^[15]报道高剂量维生素C可显著提高大口黑鲈血

清SOD的活力。这说明,大黄素和高剂量维生素C均可减缓由攻毒引起的鱼体脂质过氧化物水平的升高,并抑制抗氧化酶活性的降低。维生素C的功效可能还与其本身是抗氧化剂有关^[16-17],它不仅可直接或间接清除自由基,还可使谷胱甘肽过氧化物酶和维生素E的基团恢复活性,重新具有抗自由基作用^[47]。在配伍组中,虽然SOD的活性较对照组高,MDA含量也较对照组低,但均未表现出协同增效作用。可见大黄素与高剂量维生素C配伍的抗氧化效果并不理想。

3.4 大黄素、维生素C及其配伍对团头鲂抗应激能力的影响

血液皮质醇和葡萄糖水平被认为是鱼体应激的重要指标^[39-40]。在急性胁迫下,随着皮质醇等激素水平的上升,机体血糖水平也会升高^[40],其原因可能在于皮质醇可促进糖异生和糖原分解,用

于满足鱼体在应激过程中对能量需求的增加^[39-40]。本实验中各组团头鲂经感染嗜水气单胞菌后血清皮质醇和葡萄糖的水平均呈先升高后下降的变化趋势,至 24 h,二者仍高于攻毒前的水平。Ackerman 等^[48]报道幼虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)感染鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)后血浆皮质醇含量也呈类似的变化趋势。陈寅儿等^[37]发现患溶藻弧菌病的鲈血清中葡萄糖的水平显著高于健康鱼,但郭松林等^[38]报道美洲鳗鲡经注射感染嗜水气单胞菌后,血糖水平在 6 h 无显著变化,在 30 h 却显著下降。本实验中,大黄素和维生素 C 组团头鲂血清皮质醇的水平在攻毒前后均显著低于对照组,血糖水平在攻毒后也显著低于对照组($P < 0.05$),表明大黄素和高剂量维生素 C 能有效缓解对团头鲂的攻毒应激,增强其抗病原菌感染能力。

在应激状态下,鱼体血清 GPT 和 GOT 活性的变化反应其肝脏和心肌细胞的受损程度^[49]。本实验中各组鱼在攻毒后血清谷丙转氨酶(GPT)活性呈升高的变化趋势,而谷草转氨酶(GOT)活性呈先升高后下降的变化趋势,至 24 h 二者均显著高于对照组($P < 0.05$)。这与患溶藻弧菌病的鲈血清 GPT、GOT 活性都升高的报道是一致的^[37];美洲鳗鲡在注射感染嗜水气单胞菌 30 h,其血清 GPT、GOT 的活性也显著高于对照组^[38]。本实验中,在攻毒后,大黄素组 GPT 和 GOT 的水平均显著低于对照组($P < 0.05$),这与大黄素能降低四氯化碳性肝损伤大鼠血清 GPT 和 GOT 活性的报道类似^[6]。维生素 C 组 GPT 和 GOT 的变化与大黄素组类似。可见大黄素、高剂量维生素 C 对感染鱼肝脏和心肌细胞均有一定的保护作用。

本实验中各组团头鲂经攻毒后血清甘油三酯水平呈下降的变化趋势,而胆固醇含量则无显著变化,这可能与鱼类在应激状态下通过利用甘油三酯来满足能量的需要有关^[42]。本实验中,在攻毒 0 h 和 6 h,大黄素和维生素 C 组鱼血清甘油三酯的含量均显著低于对照组($P < 0.05$),表明二者均有利于脂肪的代谢,以满足鱼体攻毒后对能量需求的增加,从而增强机体的抗应激能力。配伍组的上述指标虽然也表现出了一定的作用,但均

未起到协同增效作用,其相互作用的机理还有待于进一步的研究。

3.5 大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂肝脏 2 种 HSP70s mRNA 表达水平的影响

本实验中各组团头鲂经攻毒后肝脏组成型 HSC70 和诱导型 HSP70 mRNA 的表达水平均呈先升高后下降的变化趋势,这与 Ming 等^[21]的相关报道是一致的。Deane 等^[50]用溶藻弧菌注射感染黄锡鲷(*Sparus sarba*),24 h、48 h 后引起肝脏 HSC70 和 HSP70 mRNA 表达量的显著增加。Cheng 等^[51]报道皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)注射感染鳗弧菌后,其肌肉和鳃中 HSP70 mRNA 表达量也呈先升高后下降的变化趋势。本实验中,攻毒 24 h 后,团头鲂肝脏 HSC70 mRNA 的表达量显著低于其攻毒前水平,而 HSP70 mRNA 的表达量则显著高于其攻毒前水平。接下来的 48 h 内感染鱼陆续死亡,推测嗜水气单胞菌的毒害可能超出了鱼体的调节能力,2 种 HSP70s 基因的表达都受到了不同程度的抑制,其中对 HSC70 基因的影响可能较大。

本实验中,经攻毒后,大黄素和维生素 C 组鱼 HSC70 mRNA 的表达水平均显著高于对照组($P < 0.05$),推测大黄素和高剂量维生素 C 可能通过增加 HSC70 的表达量来维护受感染鱼内环境的稳定和细胞生存^[22-23]。同样,大黄素和维生素 C 组鱼 HSP70 mRNA 的表达量也均显著高于对照组($P < 0.05$),表明大黄素和高剂量维生素 C 均能提高鱼体 HSP70 mRNA 的表达水平,从而增强机体抵抗病原菌的感染能力^[24-25],这与大黄素和维生素 C 组鱼的累积死亡率较低是一致的,也与文献[52-53]的结果基本吻合。配伍组 2 种 HSP70s mRNA 的表达水平虽较对照组高,但大多差异不显著($P > 0.05$),且均未表现出协同增效作用。

4 结论

在基础日粮(维生素 C 含量 50.3 mg/kg)中添加大黄素 60 mg/kg 或维生素 C 700 mg/kg 可提高团头鲂的非特异性免疫力、抗氧化能力以及 2 种 HSP70s mRNA 的表达水平,增强鱼体抗病原菌

的感染能力。二者配伍则效果不佳,其相互作用的机理还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282-288.
- [2] Ansary A, Haneef R M, Torres J L, et al. Plasmids and antibiotic resistance in *Aeromonas hydrophila* isolated in Malaysia from healthy and diseased fish [J]. J Fish Dis, 1992, 15(2): 191-196.
- [3] Chang C H, Lin C C, Yang J J, et al. Anti-inflammatory effects of emodin from *Ventilago leiocarpa* [J]. Am J Chin Med, 1996, 24(2): 139-142.
- [4] Huang S S, Yeh S F, Hong C Y. Effect of anthraquinone derivatives on lipid peroxidation in rat heart mitochondria: structure activity relationship [J]. J Nat Prod, 1995, 58(9): 1365-1371.
- [5] 周利玲, 舒筱灿, 吴和平, 等. 大黄素干预鹌鹑脂肪肝病变的效果[J]. 中国临床康复, 2006, 10(32): 57-59.
- [6] Lin C C, Chang C H, Yang J J, et al. Hepatoprotective effects of emodin from *Ventilago Leiocarpa* [J]. J Ethnopharmacol, 1996, 52(2): 107-111.
- [7] 王文俊, 吴咸中, 姚智, 等. 大黄素、丹参素对单核细胞分泌炎性细胞因子的调节[J]. 中国免疫学杂志, 1995, 11(6): 370-372.
- [8] Xie J, Liu B, Zhou Q L, et al. Effects of anthraquinone extract from rhubarb *Rheum officinale* Baill on the crowding stress response and growth of common carp *Cyprinus carpio* var. *Jian* [J]. Aquaculture, 2008, 281(1-4): 5-11.
- [9] Fracalossi D M, Allen M E, Yuyama L K, et al. Ascorbic acid biosynthesis in Amazonian fishes [J]. Aquaculture, 2001, 192(2-4): 321-332.
- [10] Sakai M. Current research status of fish immunostimulants [J]. Aquaculture, 1999, 172(1-2): 63-92.
- [11] Navarre O, Halver J E. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C [J]. Aquaculture, 1989, 79(1-4): 207-221.
- [12] Sobhana K S, Mohan C V, Shankar K M. Effect of dietary vitamin C on the disease susceptibility and inflammatory response of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) to experimental infection of *Aeromonas hydrophila* [J]. Aquaculture, 2002, 207(3-4): 225-238.
- [13] Kumari J, Sahoo P K. High dietary vitamin C affects growth, non-specific immune responses and disease resistance in Asian catfish, *Clarias batrachus* [J]. Mol Cell Biochem, 2005, 280(1-2): 25-33.
- [14] 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(1): 327-336.
- [15] 谢一荣, 吴锐全, 谢骏, 等. 维生素C水平对大口黑鲈抵抗嗜水气单胞菌感染的影响[J]. 水利渔业, 2007, 27(5): 102-104.
- [16] Öztürk-Ürek R, Bozkaya L A, Tarhan L. The effects of some antioxidant vitamin- and trace element-supplemented diets on activities of SOD, CAT, GSH-Px and LPO levels in chicken tissues [J]. Cell Biochem Funct, 2001, 19(2): 125-132.
- [17] 周显青, 李胜利, 王晓辉, 等. 维生素C多聚磷酸酯对小鼠肝脏脂质过氧化物和抗氧化酶的影响[J]. 动物学报, 2004, 50(3): 370-374.
- [18] Kiang J G, Tsokos G C. Heat shock protein 70 kDa: Molecular biology, biochemistry and physiology [J]. Pharmacol Ther, 1998, 80(2): 183-201.
- [19] Sørensen J G, Kristensen T N, Loeschcke V. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins [J]. Ecol Lett, 2003, 6(11): 1025-1037.
- [20] Basu N, Todgham A E, Ackerman P A, et al. Heat shock protein genes and their functional significance in fish [J]. Gene, 2002, 295(2): 173-183.
- [21] Ming J H, Xie J, Xu P, et al. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28(3): 407-418.
- [22] Park J H, Lee J J, Yoon S, et al. Genomic cloning of the Hsc71 gene in the hermaphroditic teleost *Rivulus marmaratus* and analysis of its expression in skeletal muscle: identification of a novel muscle-preferred regulatory element [J]. Nucl Acids Res, 2001, 29(14): 3041-3050.
- [23] Kregel K C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance [J]. J Appl Physiol, 2002, 92(5): 2177-2186.
- [24] Baler R, Dahl G, Voellmy R. Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1 [J]. Mol Cell Biol, 1993, 13(4): 2486-2496.
- [25] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and eco-

- logical physiology[J]. *Annu Rev Physiol*, 1999, 61(1): 243–282.
- [26] 王文博, 汪建国, 李爱华, 等. 拥挤胁迫后鲫鱼血液皮质醇和溶菌酶水平的变化及对病原的敏感性[J]. *中国水产科学*, 2004, 11(5): 408–412.
- [27] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. *Biol Chem*, 1951, 193(1): 265–275.
- [28] Yin G J, Jeney G, Racz T, et al. Effect of two chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *Aquaculture*, 2006, 253(1-4): 39–47.
- [29] Brock P, Eldred E W, Woiszwillo J E, et al. Direct solid-phase ^{125}I radioimmunoassay of serum cortisol [J]. *Clin Chem*, 1978, 24(9): 1595–1598.
- [30] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402–408.
- [31] 李爱杰. 水产动物营养与饲料学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 55.
- [32] 孙峰, 张煜, 李立德, 等. 感染嗜水气单胞菌对鲫鱼非特异性免疫功能的影响[J]. *中国海洋大学学报*, 2005, 35(5): 815–818.
- [33] Anderson D P. Immunostimulants, adjuvants and vaccine carrier in fish: application to aquaculture [J]. *Annu Rev Fish Dis*, 1992, 2: 281–307.
- [34] 聂品. 鱼类非特异性免疫研究的新进展[J]. *水产学报*, 1997, 21(1): 69–73.
- [35] Bayne C J, Gerwick L. The acute phase response and innate immunity of fish[J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25(8-9): 725–743.
- [36] Möck A, Peters G. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution [J]. *J Fish Biol*, 1990, 37(6): 873–885.
- [37] 陈寅儿, 金珊, 王国良. 鲈鱼溶藻弧菌病的血液生理生化指标研究[J]. *台湾海峡*, 2005, 24(1): 104–108.
- [38] 郭松林, 关瑞章, 冯建军, 等. 嗜水气单胞菌感染对美洲鳊血液和生化指标的影响[J]. *集美大学学报: 自然科学版*, 2010, 15(2): 93–97.
- [39] Mommsen T P, Vijayan M M, Moon T W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation [J]. *Rev Fish Biol Fish*, 1999, 9(3): 211–268.
- [40] Hsieh S L, Chen Y N, Kuo C M. Physiological responses, desaturase activity, and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) under cold acclimation [J]. *Aquaculture*, 2003, 220(1-4): 903–918.
- [41] Dave G, Johansson-Sjöbeck M L, Larsson Å, et al. Effects of cortisol on the fatty acid composition of the total blood plasma lipids in the European eel, *Anguilla anguilla* L. [J]. *Comp Biochem Physiol A*, 1979, 64(1): 37–40.
- [42] Vijayan M M, Leatherland J F. High stocking density affects cortisol secretion and tissue distribution in brook charr, *Salvelinus fontinalis* [J]. *J Endocrinol*, 1990, 124(2): 311–318.
- [43] Freeman B A, Crapo J D. Biology of disease: Free radicals and tissue injury [J]. *Lab Invest*, 1982, 47(5): 412–426.
- [44] Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants [J]. *Exp Physiol*, 1997, 82(2): 291–295.
- [45] 饶玉才, 胡宝庆, 文春根. 嗜水气单胞菌感染对背角无齿蚌 5 种免疫相关酶活力的影响[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(3): 406–412.
- [46] Parihar M S, Dubey A K, Javeri T, et al. Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipid content in liver of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature [J]. *J Therm Biol*, 1996, 21(5-6): 323–330.
- [47] Shankaran M, Yamamoto B K, Gudelsky G A. Ascorbic acid prevents 3,4-methylenedioxy methamphetamine (MDMA) induced hydroxyl radical formation and the behavioral and neurochemical consequences of the depletion of brain 5-HT [J]. *Synapse*, 2001, 40(1): 55–64.
- [48] Ackerman P A, Iwama G K. Physiological and cellular stress responses of juvenile rainbow trout to vibriosis [J]. *J Aquat Anim Health*, 2001, 13(2): 173–180.
- [49] Wang Y, Xiong L, Yang K J, et al. Effect of beta- cypermethrin on GPT and GOT activities of crucian serum [J]. *Agric Sci Technol*, 2005, 6(1): 20–23.
- [50] Deane E E, Li J, Woo N Y. Modulated heat shock protein expression during pathogenic *Vibrio alginolyticus* stress of sea bream [J]. *Dis Aquat Organ*, 2004, 62(3): 205–215.
- [51] Cheng P Z, Liu X, Zhang G F, et al. Cloning and expression analysis of a HSP70 gene from pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 22(1-2): 77–87.
- [52] 金抗, 于东云, 由田. 大黄对急性肺损伤大鼠热休克蛋白 70 表达的影响[J]. *中国急救医学*, 2007, 27(9): 827–829.
- [53] 徐增光, 杨进波, 杨杪, 等. 抗氧化维生素对苯并(a)芘抑制内皮细胞 HSP70 表达的干预作用[J]. *环境与职业医学*, 2004, 21(2): 111–113.

Effects of emodin, vitamin C and their combination on biochemical parameters and two HSP70s mRNA expression of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) infected with *Aeromonas hydrophila*

MING Jianhua^{1,2}, XIE Jun², XU Pao², LIU Wenbin³, ZHOU Qunlan², LIU Bo², XI Bingwen²

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: The study aims to evaluate the effects of dietary emodin, high-dose vitamin C (Vc) and their combination on the disease resistance of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) against *Aeromonas hydrophila* infection. One thousand and two hundred healthy fish with initial body weight of (133.44 ± 2.11) g were selected and randomly divided into four groups: one was the control group fed with basal diet (containing Vc 50.3 mg/kg, with the L-ascorbyl-2-polyphosphate as Vc source); the other three were the treatment groups, fed with basal diets supplemented with emodin 60 mg/kg, Vc 700 mg/kg, and the combination of emodin 60 mg/kg + Vc 700 mg/kg, respectively. After consecutive feeding for 60 days, fifteen fish taken from each tank were intraperitoneally infected with *A. hydrophila* (BSK-10), and the biochemical parameters of serum and liver, the mRNA levels of two heat shock protein 70s (HSP70s) in liver before and after infection were determined. Another ten fish taken from each tank were challenged with *A. hydrophila* using the same method as above, and the cumulative mortality of each group was counted at different time of post-infection. The results showed that before infection, compared with the control group, serum total protein (TP), lysozyme (LSZ) and alkaline phosphatase (AKP) levels, liver superoxide dismutase (SOD) activity and expression level of inducible HSP70 mRNA significantly increased in emodin and Vc groups, while serum cortisol (COR), triglyceride (TG) and liver malondialdehyde (MDA) contents decreased ($P < 0.05$) in emodin and Vc groups; the liver catalase (CAT) activity also significantly increased in emodin group ($P < 0.05$). Although the serum TP, LSZ and liver HSP70 mRNA levels significantly increased in combination group, and the liver malondialdehyde (MDA) level was also significantly reduced ($P < 0.05$), no synergism was shown.

After infection, compared with the control group, the serum TP, LSZ, AKP levels, liver SOD, CAT activities, and the expression levels of HSC70 and HSP70 mRNA increased in emodin and Vc groups in varying degrees, while the serum COR, glucose (GLU), glutamic-pyruvic transaminase (GPT), glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT), TG and liver MDA levels were reduced to some extent. In combination group, although these parameters had similar changing trend as the above ones, most of them were not significant different with the control ($P > 0.05$), and also did not show any synergism. Statistic data also showed that after infection with *A. hydrophila*, the cumulative mortalities of emodin and Vc groups were significantly lower than the control group in 24 h and 48 h ($P < 0.05$), but the difference of cumulative mortality between the combination and control groups was not significant ($P > 0.05$). Thus, the basal diet supplemented with emodin 60 mg/kg or Vc 700 mg/kg could improve non-specific immunity of fish, antioxidant capacity, and two HSP70s mRNA expression levels, and enhance disease resistance of fish against pathogenic infection. However, the combination of emodin and high-dose Vc showed no better effect, and the mechanism of their interaction needs further study.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; emodin; vitamin C; *Aeromonas hydrophila*; HSP70s mRNA expression

Corresponding author: XU Pao. E-mail: xup@ffrc.cn; XIE Jun. E-mail: xiej@ffrc.cn