

维生素 C 对普安银鲫早期发育中氧化损伤及总抗氧化能力的影响

姚俊杰 熊铧龙 蒋左玉 安苗 朱忠胜

贵州大学动物科学学院水产科学系 贵阳 550025

摘要: 本实验旨在探究普安银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 早期发育过程中氧化损伤程度和总抗氧化能力的变化, 及添加维生素C (Vc) 后对它们的影响。采用生化方法测定了普安银鲫早期发育过程中丙二醛 (MDA) 含量、蛋白质羰基 (PCA) 含量、乳酸脱氢酶 (LDH) 的活性和总抗氧化能力 (T-AOC)。

(1) 30 mg/L的Vc溶液中仔鱼孵化率和成活率最高, 分别高出对照组 (Vc浓度为0 mg/L) 16.2%和17.8%; (2) 普安银鲫早期发育过程中丙二醛、蛋白质羰基含量及乳酸脱氢酶活性均呈“升高-降低”的趋势, 均在原肠中期达到最高, 总抗氧化能力逐渐增加; (3) 30 mg/L的Vc组中丙二醛、蛋白质羰基含量及乳酸脱氢酶的活性显著低于对照组 ($P < 0.05$), 总抗氧化能力显著高于对照组 ($P < 0.05$)。结果表明, (1) 普安银鲫胚胎期受到的氧化损伤比胚后严重; (2) 适宜浓度的维生素C能提高胚胎及仔鱼的抗氧化能力, 有效降低胚胎及仔鱼受到的氧化损伤, 提高其孵化率及存活率。

关键词: 维生素 C; 普安银鲫; 早期发育; 氧化损伤; 总抗氧化能力

中图分类号: S917.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2015) 04-581-10

Effect of Vitamin C on Oxidative Damage and Total Antioxidant Capacity in Early Development of *Carassius auratus gibelio*

YAO Jun-Jie XIONG Hua-Long JIANG Zuo-Yu AN Miao ZHU Zhong-Sheng

Department of Fisheries Science, College of Animal Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: The experiment was conducted to study the contents of malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PCA), the activity of lactic dehydrogenase (LDH) and the total antioxidant capacity (T-AOC) as well as the effects of glucose and vitamin C on them indexes during early development of *Carassius auratus gibelio*. In order to improve the hatching rate and survival rate of larva, the research takes *C. a. gibelio* as studying objects, and different concentrations of glucose solution and vitamin C solution were added to hatching water, respectively, until the yolk sac disappeared completely. The concentrations of glucose were 5 g/L, 10 g/L, 15 g/L, and 20 g/L, and the concentrations of vitamin C were 20 mg/L, 25 mg/L, 30 mg/L and 35 mg/L, respectively. The incubation time, hatching rate and survival rate of larvae were recorded during the

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31160527);

第一作者介绍 姚俊杰, 男, 教授; 研究方向: 水生动物繁殖与发育生物学; E-mail: junjieyao@163.com.

收稿日期: 2014-09-11, 修回日期: 2015-04-12 DOI: 10.13859/j.cjz.201504010

process of experiment, and the contents of malondialdehyde and protein carbonyl, the activity of lactic dehydrogenase and the total antioxidant capacity during early development of *C. a. gibelio* were analyzed by enzymological method and data were analyzed by T-test and one way ANOVA. The results showed that: (1) The hatching rate and survival rate of larva in vitamin C group were higher than those of control group, the hatching rate and survival rate were highest when the concentration of vitamin C was 30 mg/L, and they 16.2% and 17.8% higher than those of control group, respectively (Table 1). (2) The contents of malondialdehyde and protein carbonyl, the activity of lactic dehydrogenase showed a “up-down” trend, and these three indexes reached the highest in mig-gastrocoel stage, while the total antioxidant capacity increased during early development of *C. a. gibelio*. (3) In the group of vitamin C (30 mg/L), the contents of malondialdehyde and protein carbonyl and the activity of lactic dehydrogenase were significantly lower than those of control group, while the total antioxidant capacity was significantly higher than that of control group ($P < 0.05$) (Fig. 2 - 4). The research showed that: 1) The oxidative damages more seriously in embryonic stage than postembryonic stage in *C. a. gibelio*; 2) Appropriate vitamin C solution (30 mg/L) improves the antioxidant capacity of embryos and larvae, effectively reduces the oxidative damage, and improves the hatching rate and survival rate of larvae.

Key words: Vitamin C; *Carassius auratus gibelio*; Early development; Oxidative damage; Total antioxidant capacity

胚胎期是鱼类生活史的重要阶段, 也是最脆弱的时期, 其质量的好坏决定着个体存活活力。胚胎期生理代谢活动很活跃, 是细胞增殖和组织构建等生命活动进行的关键时期, 在代谢过程中会产生大量自由基, 如果不及时清除, 会引起脂质和蛋白质等的氧化损伤, 如果损伤程度较重, 将会导致胚胎发育停止。而维生素C (vitamin C, Vc) 作为一种水溶性抗氧化剂, 具有多种生物功能和较强的抗氧化作用, 可清除氧自由基、保护细胞免受氧化损伤。维生素C在促进鱼类生长、创伤愈合、缓解应激、提高抗病力和提高抗氧化能力方面有明显作用 (Wang et al. 2003, Chen et al. 2004, Eo et al. 2008, 高明辉 2008, 刘扬等 2012)。鱼类受精卵中积累一定量的Vc, 既可以保护卵不被氧化损伤, 也能调控早期发育过程中卵内物质和能量代谢 (Terova et al. 1998), 降低脂质过氧化和蛋白质等的氧化损伤, 维持细胞结构完整性和功能正常 (Liu et al. 2011)。

普安银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 属鲤科鲤亚科鲫鱼属, 是长期封闭在贵州高原特定

环境里自然形成的一个行天然雌核发育的鲫鱼类型或种群, 为贵州特有的鱼类种质资源, 具有肉质细嫩、营养丰富、生活力强、生长快、杂食性、群体产量高、育种简便等特点, 宜在池塘、稻田、山塘和水库中养殖 (胡世然等 2012)。由于多方面因素的影响, 其资源已锐减, 仅在普安县青山镇等几个很小的水域有发现。为了保护普安银鲫, 相关学者已开展了一些研究 (梁正其等 2012, 牟洪民等 2012, 梁正其等 2013, 姚俊杰等 2013, 蒋左玉等 2014), 但在自然条件下, 普安银鲫胚胎孵化率和仔鱼存活率低仍是制约其发展的瓶颈。本文探究了普安银鲫早期发育过程中氧化损伤情况和总抗氧化能力的变化, 以及Vc对氧化损伤及总抗氧化能力的影响, 旨在了解普安银鲫早期发育过程中氧化损伤程度和抗氧化能力变化规律, 为该鱼在人工繁育过程中有效提高孵化率及仔鱼存活率提供科学依据, 进而为普安银鲫的资源保护和开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验在贵州省普安银鲫原种场进行, 以普安银鲫为母本, 兴国红鲤 (*Cyprinus carpio*) 为父本。经过人工催产、干法授精后将受精卵放在 90 cm × 50 cm × 55 cm 的水箱内孵化, 实验设置维生素 C 浓度为 0 mg/L (对照组)、20 mg/L、25 mg/L、30 mg/L 和 35 mg/L 进行胚胎孵化实验, 每组设 3 个平行。每个实验组的孵化水体中卵的平均密度为 1 000 粒/L, 孵化用水和维生素 C 的量均先称量好, 使用时将 Vc 溶解到孵化水体并混匀, 然后放入卵进行孵化, 水温控制于 24℃, 每 8 h 全部更换一次同温度同浓度 Vc 的新水, 添加 Vc 的孵化水每次更换时现配。

用显微镜对实验材料进行连续观察, 定期取样, 取样标准为 50% 发育至该时期为取样点。参照梁正其等 (2012), 取样时期为成熟卵、受精卵、原肠中期、心跳期、出膜前期、内源营养期 (24 h)、混合营养期 (72 h) 和外源营养期 (120 h), 然后用滤纸吸干, 置于离心管中, 贮存于 - 80℃ 冰箱中待用。

1.2 酶液制备

取不同时期的样品, 加入样品质量 10 倍体积的预冷重蒸水, 在玻璃匀浆器中冰浴匀浆, 9 000 ~ 10 000 r/min 冷冻离心 30 min, 上层为油层, 下层为沉淀, 小心取中间层, 3 000 r/min 再次离心后取上清液进行消化酶活力的测定。酶液置于冰箱 4℃ 保存备用, 在 24 h 内分析完毕。

1.3 指标测定

酶液蛋白浓度采用考马斯亮蓝法测定。总抗氧化能力 (total antioxidative capacity, T-AOC)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和蛋白质羰基 (protein carbonyl, PCA) 均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行测定, 具体方法参照试剂盒说明书。

1.4 数据分析

采用 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行统计分析, 数据用平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) ($n = 3$) 表示, 同一实验组不同发育时期之间采用单因素方差分析, 用 LSD 多重比较分析实验结果的差异显著性, 同一时期不同处理组之间采用 t 检验, 取 $P < 0.05$ 为差异显著水平。

2 结果

2.1 维生素 C 对普安银鲫孵化率和仔鱼成活率的影响

维生素 C 对普安银鲫孵化率和仔鱼成活率的影响见表 1, 维生素 C 的浓度低于 30 mg/L 时, 随着维生素 C 浓度的增加, 孵化率和成活率逐渐升高; 浓度超过 30 mg/L, 高浓度的维生素 C 溶液对普安银鲫胚胎及仔鱼表现出抑制作用。在 30 mg/L 的维生素 C 溶液中仔鱼孵化率和成活率最高, 分别高出对照组 16.2% 和 17.8%, 均表现为显著差异 ($F_{(4, 2)} = 0.91$, $P = 0.000$)。

表 1 维生素 C 对普安银鲫孵化率和成活率的影响 ($n = 3$)

Table 1 Effects of vitamin C on the hatching ratio and survival rate of *Carassius auratus gibelio*

	对照组 Control	维生素 C Vitamin C (mg/L)			
		20	25	30	35
孵化率 Hatching rate (%)	69.2 ± 1.1 ^a	75.1 ± 2.4 ^b	81.7 ± 2.1 ^d	85.9 ± 2.3 ^e	78.3 ± 1.8 ^c
成活率 Survival rate (%)	72.0 ± 1.4 ^a	76.4 ± 1.7 ^b	80.5 ± 1.6 ^c	89.8 ± 1.5 ^e	82.7 ± 1.6 ^d

同一行数据上标不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Different letters in the row mean significant difference ($P < 0.05$).

2.2 普安银鲫早期发育过程中丙二醛 (MDA) 含量变化

普安银鲫早期发育过程中丙二醛含量的变化见图1。在对照组中,丙二醛的含量呈“升高-降低-升高-降低”的变化,受精卵发育至原肠中期时,丙二醛的含量达到最高;随着发育的继续,丙二醛的含量开始降低,直至出膜后再升高,随着普安银鲫仔鱼发育时间的延长丙二醛含量逐渐降低。在30 mg/L维生素C组中,丙二醛的含量呈“升高-降低”的变化,从受精卵显著上升至原肠中期的(0.355 ± 0.015) U/mg ($F_{(7,2)} = 30.01, P = 0.000$),且丙二醛的含量在原肠中期达到最高,之后逐渐降低,直至外营养期。30 mg/L维生素C组丙二醛的含量从原肠中期发育至混合营养期均显著低于对照组

(原肠中期: $F_{(1,2)} = 0.165, P = 0.027$;心跳期: $F_{(1,2)} = 2.252, P = 0.046$;出膜前期: $F_{(1,2)} = 0.115, P = 0.038$;内源营养期: $F_{(1,2)} = 0.966, P = 0.005$;混合营养期: $F_{(1,2)} = 0.167, P = 0.032$)。

2.3 普安银鲫早期发育过程中蛋白质羰基 (PCA) 的含量变化

普安银鲫早期发育过程中蛋白质羰基含量的变化见图2,在整个早期发育过程中,对照组和30 mg/L维生素C组中蛋白质羰基的含量均呈“升高-降低”的变化。对照组和30 mg/L维生素C组中蛋白质羰基的含量均在原肠中期最高,二者差异不显著($F_{(1,2)} = 0.142, P = 0.058$)。30 mg/L维生素C组蛋白质羰基的含量从心跳期到混合营养期均显著低于对照组(心跳期:

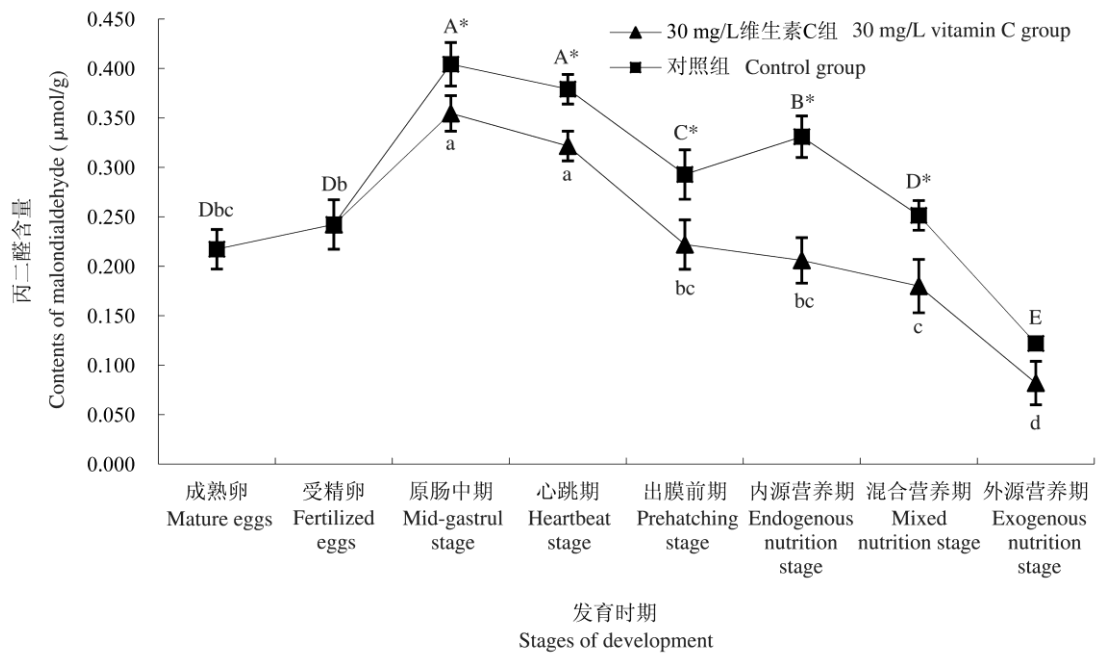


图1 普安银鲫早期发育中丙二醛 (MDA) 的含量变化

Fig. 1 Malondialdehyde content during embryonic development of *Carassius auratus gibelio*

不同大写字母表示对照组不同发育时期间有显著差异 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示30 mg/L维生素C组中不同发育时期间有显著差异 ($P < 0.05$), 同一发育时期标有*表示对照组与30 mg/L维生素C组间有显著差异 ($P < 0.05$)。

Different capital letter superscripts mean significant difference in the control group ($P < 0.05$). Different small letter superscripts mean significant difference in the group of 30 mg/L vitamin C ($P < 0.05$), the * mean significant difference in the same stages between the control group and 30 mg/L vitamin C group ($P < 0.05$).

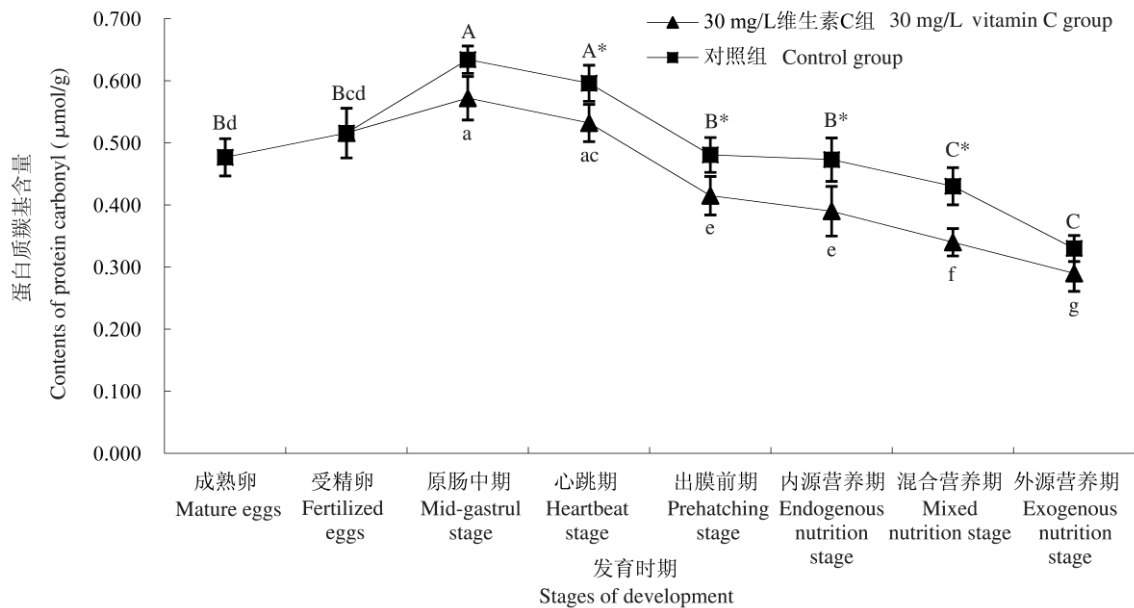


图2 普安银鲫早期发育过程中蛋白质羰基 (PCA) 的含量变化

Fig. 2 Protein carbonyl content during embryonic development of *Carassius auratus gibelio*

不同大写字母表示对照组不同发育时期间有显著差异 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示30 mg/L维生素C组中不同发育时期间有显著差异 ($P < 0.05$), 同一发育时期标有*表示对照组与30 mg/L维生素C组间有显著差异 ($P < 0.05$)。

Different capital letter superscripts mean significant difference in the control group ($P < 0.05$). Different small letter superscripts mean significant difference in the group of 30 mg/L vitamin C ($P < 0.05$), the * mean significant difference in the same stages between the control group and 30 mg/L vitamin C group ($P < 0.05$).

$F_{(1,2)} = 2.240$, $P = 0.022$; 出膜前期: $F_{(1,2)} = 0.225$, $P = 0.043$; 内源营养期: $F_{(1,2)} = 0.223$, $P = 0.010$; 混合营养期: $F_{(1,2)} = 0.116$, $P = 0.005$ 。

2.4 普安银鲫早期发育过程中乳酸脱氢酶 (LDH) 活性变化

普安银鲫早期发育过程中乳酸脱氢酶的活性变化见图3, 乳酸脱氢酶的活性在成熟卵中最低, 经异源受精后乳酸脱氢酶的活性显著上升。在整个早期发育过程中, 对照组中乳酸脱氢酶的活性呈“升高-降低-升高-降低”的变化, 由受精卵发育至原肠中期时, 乳酸脱氢酶的活性显著上升 ($F_{(7,2)} = 26.295$, $P = 0.000$), 并在原肠中期达到最高, 之后降低至出膜前期; 出膜后又开始升高至混合营养期, 之后开始显著降低 ($F_{(7,2)} = 26.295$, $P = 0.004$)。而30 mg/L 维生素C组乳酸脱氢酶的活性从受精卵显著上

升 ($F_{(7,2)} = 14.288$, $P = 0.000$), 至原肠中期后便降低至外源营养期, 从原肠中期开始30 mg/L维生素C组中乳酸脱氢酶的活性显著低于对照组 (原肠中期: $F_{(1,2)} = 0.254$, $P = 0.035$; 心跳期: $F_{(1,2)} = 0.617$, $P = 0.013$; 出膜前期: $F_{(1,2)} = 0.185$, $P = 0.029$; 内源营养期: $F_{(1,2)} = 0.089$, $P = 0.034$; 混合营养期: $F_{(1,2)} = 0.059$, $P = 0.012$; 外源营养期: $F_{(1,2)} = 0.111$, $P = 0.003$)。

2.5 普安银鲫早期发育过程中总抗氧化能力 (T-AOC) 的变化

普安银鲫早期发育过程中总抗氧化能力 (T-AOC) 的变化见图4。在整个发育过程中, 对照组和30 mg/L 维生素C组的总抗氧化能力随着发育的进行均逐渐增强, 总抗氧化能力在成熟卵中最低, 经异源受精后显著上升 ($F_{(7,2)} = 306.951$, $P = 0.000$); 对照组中, 由受精卵发

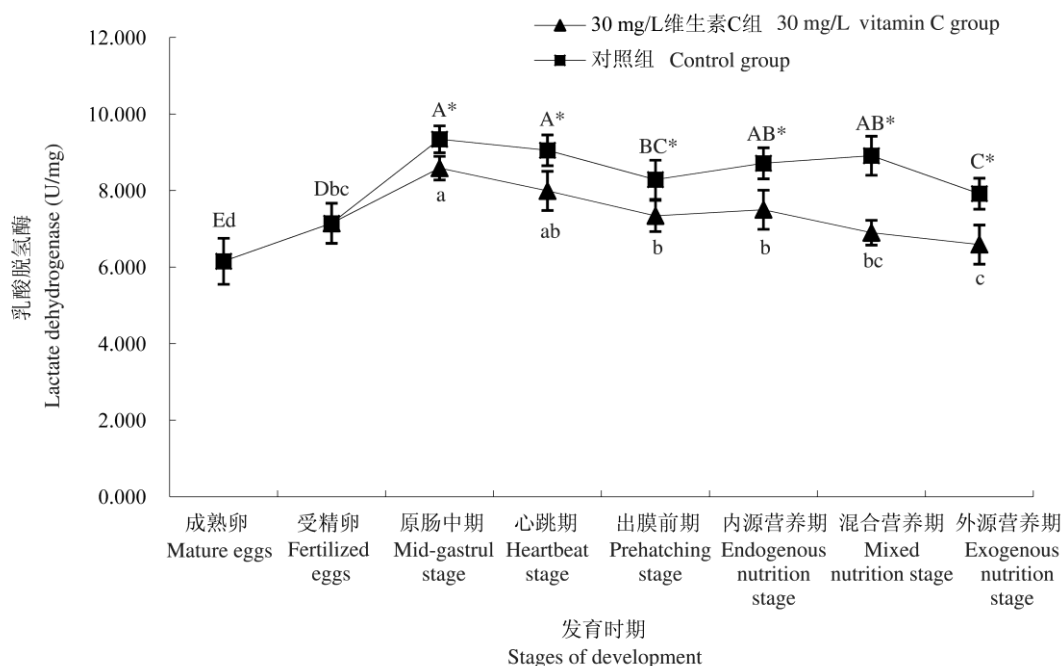


图3 普安银鲫早期发育过程中乳酸脱氢酶 (LDH) 活性变化

Fig. 3 Lactate dehydrogenase activity during embryonic development of *Carassius auratus gibelio*

不同大写字母表示对照组不同发育时期间有显著差异 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示30 mg/L维生素C组中不同发育时期间有显著差异 ($P < 0.05$), 同一发育时期标有*表示对照组与30 mg/L维生素C组间有显著差异 ($P < 0.05$)。

Different capital letter superscripts mean significant difference in the control group ($P < 0.05$). Different small letter superscripts mean significant difference in the group of 30 mg/L vitamin C ($P < 0.05$), the * mean significant difference in the same stages between the control group and 30 mg/L vitamin C group ($P < 0.05$).

育至心跳期时, 总抗氧化能力的变化不显著 ($F_{(7,2)} = 306.951, P = 0.053; F_{(7,2)} = 306.951, P = 0.085$)。30 mg/L 维生素 C 组总抗氧化能力从受精卵发育至外源营养期均一直显著增加 ($F_{(7,2)} = 572.141, P = 0.000$)。从原肠中期开始 30 mg/L 维生素 C 组中总抗氧化能力均显著高于对照组 (原肠中期: $F_{(1,2)} = 0.009, P = 0.006$; 心跳期: $F_{(1,2)} = 0.006, P = 0.002$; 出膜前期: $F_{(1,2)} = 0.303, P = 0.001$; 内源营养期: $F_{(1,2)} = 0.196, P = 0.000$; 混合营养期: $F_{(1,2)} = 0.002, P = 0.001$; 外源营养期: $F_{(1,2)} = 0.005, P = 0.007$)。

3 讨论

3.1 普安银鲫早期发育中氧化损伤及总抗氧化能力的变化特点

在一些损伤因素作用下细胞内氧化代谢物增加或细胞中抗氧化保护作用不足时, 自由基会增多并对细胞产生毒性, 这种氧化和抗氧化的不平衡状态称为氧化应激 (Aw 2003)。发生氧化应激时, 自由基会攻击生物大分子, 如脂质和蛋白质等, 造成细胞氧化损伤。丙二醛 (MDA)、蛋白质羰基 (PCA) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 是评价细胞氧化应激的常用指标 (Kohen et al. 2002)。丙二醛和蛋白质羰基含量的高低可分别反映出脂质和蛋白质过氧化程度, LDH活性的增加常常是细胞不可逆损伤或坏死的标志 (冯琳 2006)。总抗氧化能力 (T-AOC) 是用于衡量机体抗氧化系统功能状况的综合性指标, 是机体包括抗氧化酶系统和非酶促系统功能整体状况的综合性衡量指标,

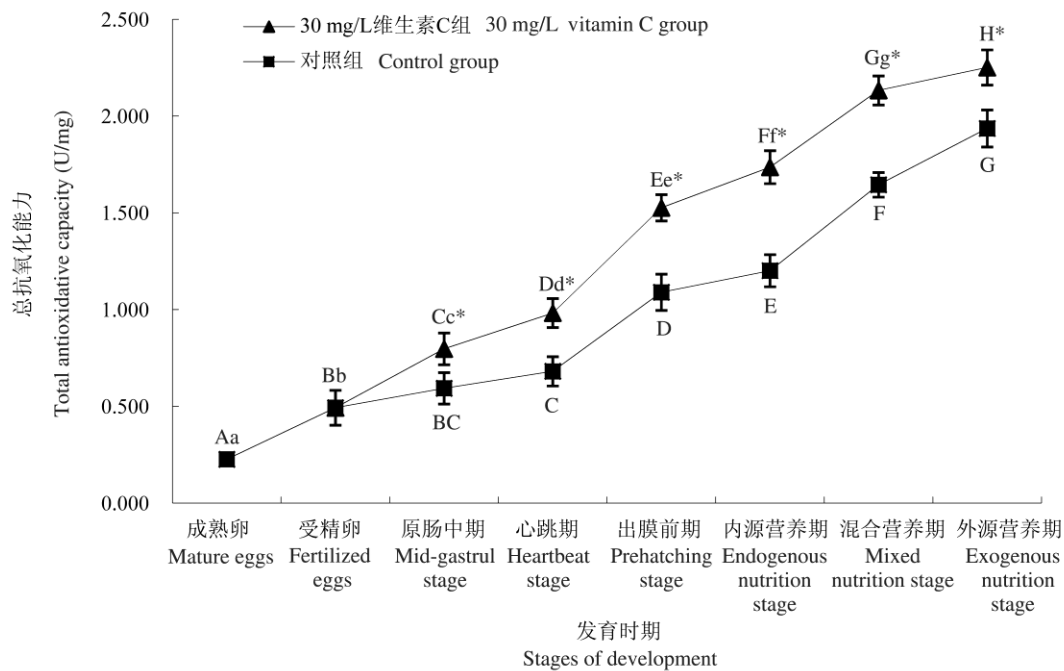


图4 普安银鲫早期发育过程中总抗氧化能力 (T-AOC) 的变化

Fig. 4 Total antioxidative capacity during embryonic development of *Carassius auratus gibelio*

不同大写字母表示对照组不同发育时期间有显著差异 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示30 mg/L维生素C组中不同发育时期间有显著差异 ($P < 0.05$), 同一发育时期标有*表示对照组与30 mg/L维生素C组间有显著差异 ($P < 0.05$)。

Different capital letter superscripts mean significant difference in the control group ($P < 0.05$). Different small letter superscripts mean significant difference in the group of 30 mg/L vitamin C ($P < 0.05$), the * mean significant difference in the same stages between the control group and 30 mg/L vitamin C group ($P < 0.05$).

机体抗氧化能力的强弱与健康程度密切相关。

大量研究表明, 随着鱼类早期发育的不断进行, 其耗氧率逐渐增加, 其代谢强度也在不断增加, 代谢过程中产生的自由基会逐渐增多, 如不及时清除将会对胚胎产生损伤, 进而影响到胚胎的发育(唐国盘等 2004, 庄平等 2008, 翁敏婵等 2010)。本研究中, 在原肠中期之前, 乳酸脱氢酶的活性显著增加, 说明成熟卵受精后, 在不断的分裂过程中, 受精卵受到的损伤在不断增加。有研究表明, 普安银鲫受精卵中含有较高的不饱和脂肪酸(牟洪民等 2012), 受精卵在卵裂过程中由于外界环境的压迫导致细胞产生大量的自由基, 此时的抗氧化能力较弱, 不饱和脂肪酸极易受氧自由基攻击, 引起脂质过氧化 (Oruc et al. 2007), 从而引起丙二

醛的含量增加。脂质过氧化作用不仅把活性氧转化成活性化学剂, 且还通过链式或链式支链反应, 放大活性氧作用, 进而引起蛋白质氧化, 使得蛋白质羰基的含量增加。随着胚胎发育过程中脂质和蛋白质不断发生过氧化, 丙二醛和蛋白质羰基含量的增加, 间接的反映出普安银鲫的胚胎在不断受到损伤。而胚胎为了维持机体自身的健康, 机体中的抗氧化防御体系将发挥作用, 随着普安银鲫胚胎的不断发育, 总抗氧化能力在不断增强, 使得胚胎中的丙二醛和蛋白质羰基含量不断减少, 乳酸脱氢酶的活性逐渐降低, 说明随着普安银鲫胚胎的发育其受到的损伤逐渐降低。普安银鲫出膜后, 丙二醛的含量和乳酸脱氢酶的活性显著升高, 蛋白质羰基含量不断减少, 可能的原因是刚出膜的仔

鱼没有卵膜的保护,环境因子对仔鱼产生了胁迫作用,从而导致自由基增加,引起脂质过氧化反应及丙二醛增多;其次可能与卵黄囊仔鱼的主要营养物质由脂质供给有关(蒋左玉等 2014)。研究发现大菱鲂(*Psetta maxima*)(Peters et al. 1996)胚胎期体内丙二醛含量较孵化后3天仔鱼体内的丙二醛含量高3.8倍,对尖吻鲈(*Lates calcarifer*)(Kalaimani et al. 2008)的研究也发现,胚胎期丙二醛的含量也显著高于孵化后3至25天仔鱼体内的丙二醛含量。本实验结果也表明,外源营养期的仔鱼丙二醛、蛋白质羰基含量及乳酸脱氢酶活性均显著低于胚胎期,而总抗氧化能力显著高于胚胎期,很可能随着鱼体的不断生长和发育,体内的抗氧化防御系统逐渐发育成熟完善有关(Aceto et al. 1994, Peters et al. 1996, Arun et al. 1998, Kalaimani et al. 2008)。而对鲟鱼(*Acipenser naccarii*)(Diaz et al. 2010)和金鱼(*Carassius auratus*)(孔祥会等 2011)的研究却发现,其早期发育过程中丙二醛含量逐渐增加。

3.2 Vc对普安银鲫早期发育中氧化损伤的保护作用

Vc作为一种重要的水溶性抗氧化剂,能够抑制过量自由基的形成,从而减少氧化损伤。将维生素C加入水体中可净化和消除水相中的氧自由基及各种氧化产物,同时进入鱼体内的维生素C会在体内累积,形成一个抗坏血酸池(Li et al. 1985),在动物生长和代谢中发挥作用。研究认为,在鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)和鲷鱼(*Sparus aurata*)(Terova et al. 1998)卵中积累较多的维生素C后既可以保护卵子不被氧化损伤,也能调控早期发育过程中卵内物质和能量的代谢,有效促进鲈鱼和鲷鱼的早期发育。但是大多数鱼类自身不能合成维生素C,且对维生素C的缺乏都很敏感,必须从外界获取。目前,鱼类获取维生素C的方法有两种,一是向饲料中添加,这种方法应用最为广泛;二是将维生素C添加到水体中进行浸泡。因此,对尚未开口摄食的胚胎和仔鱼,浸泡是获取维

生素C最有效的途径。

已有的研究表明,维生素C可提高建鲤(*Cyprinus carpio* var. Jian)的抗氧化能力,降低脂质过氧化和蛋白质氧化损伤,维持细胞结构完整性和功能正常(Liu et al. 2011)。本实验结果表明,在30 mg/L的维生素C溶液浸泡下,普安银鲫早期发育中丙二醛和蛋白质羰基的含量显著低于对照组,且出膜后仔鱼中的丙二醛和蛋白质羰基的含量及乳酸脱氢酶的活性均显著降低,说明维生素C使脂质和蛋白质的过氧化程度降低。其可能原因有三个:一是维生素C作为抗氧化剂,清除了普安银鲫胚胎发育中过多的自由基,避免了过多的自由基对胚胎的损伤(刘扬等 2012);二是增强了胚胎的抗氧化能力和抵抗不良环境胁迫的能力,靠胚胎自身清除了过多的自由基(聂月美 2006, 谢一荣等 2007, 刘扬等 2012);维生素C可直接参与水产动物新陈代谢的氧化还原反应,并且能和维生素E(vitamin E)、硒(selenium)等养分协调作用,增强水产动物的抗氧化能力(邓红玉 1998),正是如此,添加适宜浓度的Vc在孵化水体中能明显地增强普安银鲫早期发育的抗氧化能力和抵抗不良环境胁迫的能力,促进了普安银鲫的胚胎发育,提高了普安银鲫的孵化率及仔鱼成活率。

3.3 普安银鲫早期发育的危险期及应对措施

普安银鲫胚胎发育至原肠中期时,丙二醛和蛋白质羰基含量及乳酸脱氢酶的活性均达到最高,说明在原肠中期时胚胎的损伤程度最大。哺乳动物可以通过胎盘和乳汁将母源性抗体传递给子代,而鱼类则主要通过卵子传递免疫力(Swain et al. 2009)。研究发现,大马哈鱼(*Oncorhynchus keta*)(Yousif et al. 1994)卵子中的溶菌酶来自母体,它有助于防止细菌从母体向子代的垂直传递。卵生动物早期发育中抗氧化防御体系有两种来源,一是母体中带来,另一种是自身的合子基因表达合成(姚俊杰等 2006)。在普安银鲫胚胎发育的早期,可能随着发育的不断进行,部分母源性抗氧化成分在

逐渐被消耗, 在发育至原肠期时自身的抗氧化成分还未发挥明显的作用, 使得普安银鲫胚胎发育的早期抗氧化能力较弱, 从而导致原肠中期丙二醛和蛋白质羰基的含量及乳酸脱氢酶的活性均最高。哺乳动物的整个胚胎发育过程均在母体内进行, 受到母体的严密保护, 具有较高的存活率。而鱼类的整个胚胎发育过程均在母体外, 且受外界环境的影响很大, 因而存活率较低; 鱼类的胚胎在不同的发育时期对外界环境的反应也不一样。从本结果可以看出, 在普安银鲫胚胎发育的早期, 其总抗氧化能力较低, 且受到的损伤最严重, 原肠中期是普安银鲫胚胎发育中的一个危险期, 如果胚胎过了此期便能够正常发育下去。

为了使普安银鲫胚胎能安全地渡过危险期, 获得较高的存活率, 在普安银鲫人工繁殖中, 特别是在胚胎的孵化过程中必须采取一定的应对措施, 一是减少环境因子对胚胎的应激影响, 在孵化中要保持环境的相对稳定, 使胚胎处于安静状态, 不能有太大的波动, 在要进行人工繁殖时, 注意未来几天的天气情况, 防止环境的突变; 二是在孵化水体中添加抗氧化剂维生素C, 维生素C可以提高胚胎的抗氧化能力, 从而降低胚胎的氧化损伤, 还可增强机体的营养及抵抗不良环境胁迫的能力。

参 考 文 献

- Aceto A, Amicarelli F, Sacchetta P, et al. 1994. Developmental aspects of detoxifying enzymes in fish (*Salmo iridaceus*). Free Radical Research, 21(5): 285–294.
- Arun S, Subramanian P. 1998. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 121(3): 273–277.
- Aw T Y. 2003. Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation. News in Physiological Sciences, 18(5): 201–204.
- Chen R G, Lochmann R, Goodwin A, et al. 2004. Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). Aquaculture, 242(1/4): 553–569.
- D áz M E, Fum é M, Trenzado C E, et al. 2010. Antioxidant defences in the first life phases of the sturgeon *Acipenser naccarii*. Aquaculture, 307(1/2): 123–129.
- Eo J, Lee K J. 2008. Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. Fish & Shellfish Immunology, 25(5): 611–616.
- Kalaimani N, Chakravarthy N, Shanmugham R, et al. 2008. Anti-oxidant status in embryonic, post-hatch and larval stages of Asian seabass (*Lates calcarifer*). Fish Physiology and Biochemistry, 34(2): 151–158.
- Kohen R, Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicologic Pathology, 30(6): 620–650.
- Li Y, Lovell R T. 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. The Journal of Nutrition, 115(1): 123–131.
- Liu Y, Chi L, Feng L, et al. 2011. Effects of graded levels of dietary vitamin C on the growth, digestive capacity and intestinal microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Aquaculture Research, 42(4): 534–548.
- Oru ç E Ö, Usta D. 2007. Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 23(1): 48–55.
- Peters L D, Livingstone D R. 1996. Antioxidant enzyme activities in embryologic and early larval stages of turbot. Journal of Fish Biology, 49(5): 986–997.
- Swain P, Nayak S K. 2009. Role of maternally derived immunity in fish. Fish & Shellfish Immunology, 27(2): 89–99.
- Terova G, Saroglia M, Papp Z G, et al. 1998. Dynamics of collagen indicating amino acids, in embryos and larvae of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*), originated from broodstocks fed with different vitamin C content in the diet. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 121(2): 111–118.
- Wang A L, Wang W N, Wang Y, et al. 2003. Effect of dietary vitamin C supplementation on the oxygen consumption,

- ammonia-N excretion and Na^+/K^+ — ATPase of *Macrobrachium nipponense* exposed to ambient ammonia. *Aquaculture*, 220(1/4): 833–841.
- Yousif A N, Albright L J, Evelyn, T P T. 1994. *In vitro* evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 19(1): 15–19.
- 邓红玉. 1998. 水产动物的维生素C营养. *粮食与饲料工业*, (6): 26–28.
- 冯琳. 2006. 大豆凝集素对鲤鱼肠道上皮细胞增殖分化及其功能的影响. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文.
- 高明辉. 2008. VC、VE对亚硝酸盐胁迫下异育银鲫血液指标及抗氧化能力的影响. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 28–54.
- 胡世然, 安苗, 方世贞, 等. 2012. 普安银鲫异精雌核发育子代稻田养殖试验. *科学养鱼*, (2): 51–53.
- 蒋左玉, 姚俊杰, 熊锋龙. 2014. 普安银鲫早期发育过程中消化酶活性变化及外源维生素C对其的影响. *动物营养学报*, 26(5): 1246–1253.
- 孔祥会, 王书平, 江红霞, 等. 2011. 金鱼胚胎发育过程中免疫相关酶活性及丙二醛含量的变化. *中国水产科学*, 18(6): 1293–129.
- 梁正其, 马珊, 姚俊杰, 等. 2012. 普安银鲫胚胎发育的初步研究. *水产科学*, 31(6): 316–320.
- 梁正其, 姚俊杰, 熊锋龙, 等. 2013. 普安银鲫仔稚鱼的发育及生长研究. *水产科学*, 32(7): 380–384.
- 刘扬, 池磊, 冯琳, 等. 2012. 维生素C对建鲤肠上皮细胞氧化损伤保护作用的研究. *动物营养学报*, 24(8): 1503–1511.
- 牟洪民, 马珊, 姚俊杰, 等. 2012. 普安银鲫胚胎发育早期的总脂与脂肪酸变化. *西南农业学报*, 25(5): 1925–1928.
- 聂月美. 2006. 饲料维生素C对中华鳖免疫、抗应激和体组成的影响. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 49–52.
- 唐国盘, 刘鉴毅, 危起伟, 等. 2004. 中华鲟胚胎的耗氧率. *动物学杂志*, 39(5): 30–34.
- 翁敏婵, 郭莎园, 胡先成. 2010. 河川沙塘鳢早期发育过程中耗氧率及 $\text{NH}_3\text{-N}$ 排泄率的变化. *重庆师范大学学报: 自然科学版*, 27(5): 14–18.
- 谢一荣, 吴锐全, 谢骏, 等. 2007. 维生素C水平对大口黑鲈抵抗嗜水气单胞菌感染的影响. *水利渔业*, 27(5): 102–104.
- 姚俊杰, 梁正其, 冯亚楠, 等. 2013. 普安银鲫消化系统胚后发育的组织学观察. *贵州农业科学*, 41(11): 152–155.
- 姚俊杰, 赵云龙. 2006. 罗氏沼虾胚胎发育期主要消化酶和同工酶特性. *水产科学*, 25(12): 595–600.
- 庄平, 赵优, 章龙珍, 等. 2008. 纹缟虾虎鱼胚胎耗氧率及 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 对其影响的研究. *海洋渔业*, 30(1): 43–48.