

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170101001

http://www.yykxjz.cn/

王贞杰, 叶保民, 常青, 陈四清, 刘长琳, 胡建成, 王志军. 维生素 C 对圆斑星鲈早期发育的影响. 渔业科学进展, 2018, 39(2): 96-103
Wang ZJ, Ye BM, Chang Q, Chen SQ, Liu CL, Hu JC, Wang ZJ. Effects of vitamin C on early development of spotted halibut (*Verasper variegatus*). Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(2): 96-103

维生素 C 对圆斑星鲈早期发育的影响*

王贞杰^{1,2} 叶保民³ 常 青¹ 陈四清^{1①} 刘长琳¹ 胡建成¹ 王志军⁴

- (1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071;
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 辽宁省海洋与渔业厅 沈阳 110000;
4. 山东科合海洋高技术有限公司 威海 264500)

摘要 本研究旨在探究维生素 C(V_C)对圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)早期发育中孵化率、出膜率和成活率的影响,对其消化酶和脂蛋白脂酶(Lipoprotein lipase, LPL)及肝脂酶(Hepatic Lipase, HL)的影响。实验用圆斑星鲈为人工受精卵,分为 5 组,孵化水体 V_C 浓度分别为 0、20、25、30 和 35 mg/L,分别在成熟卵、受精卵、原肠中期、晶体出现期、内源营养期(2 日龄)、混合营养期(6 日龄)及外源营养期(9 日龄)取样。记录圆斑星鲈的出膜时间、出膜率和成活率,测定对照组和生长指标优越组的消化酶活性和 2 种酯酶的活性。结果显示,25 mg/L 的 V_C 能显著提高圆斑星鲈的出膜率和成活率,并缩短出膜时间($P<0.05$)。V_C 能促进圆斑星鲈早期发育过程中蛋白质的沉积。外源营养期后,胃蛋白酶活性显著提高($P<0.05$),淀粉酶活性在混合营养期显著提高($P<0.05$),脂肪酶和胰蛋白酶活性在内源营养期就显著提高($P<0.05$)。25 mg/L V_C 溶液浸泡使圆斑星鲈胚胎发育过程中的 LPL 和 HL 比活力显著升高($P<0.05$)。合子中的 LPL 和 HL 基因可能在原肠期开始表达,合成脂质水解酶分解脂质,为胚胎发育供能。研究表明,圆斑星鲈成熟卵受精后脂肪酶和胰蛋白酶酶优先发挥作用,分解卵黄中的碳水化合物为胚胎发育迅速提供能量。25 mg/L 的 V_C 能显著提高消化酶活性,并促进蛋白质的沉积,有利于孵化成活的 V_C 浓度可以显著促进圆斑星鲈早期发育的脂质代谢。

关键词 圆斑星鲈; 早期发育; 维生素 C; 消化酶; 脂酶

中图分类号 S965 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)02-0096-08

维生素 C(Vitamin C)俗称抗坏血酸,是动物生长、生产及维持正常的生理机能所必需的微量营养素,具有广泛的生理和免疫调节作用,对动物快速生长起促进作用(颀志刚等, 2003)。目前,针对鱼类生长补充维生素的方法有 2 种,对于胚胎期和卵黄囊期的仔稚鱼补充维生素等营养物质的途径为水体浸泡(季延滨等, 2007); 对于已经开口摄食的鱼类,可以在饲料中

添加 Vc。目前,关于 Vc 对鱼类的生长和生理影响的研究报道均在成鱼(谢全森等, 2008),而研究在孵化水体添加 Vc 对胚胎和卵黄囊仔鱼的影响的报道较少。已有研究表明,适宜的 Vc 为受精卵提供营养补偿,对鱼类的早期发育有促进作用,可以显著提高受精卵孵化率和仔稚鱼的成活率(李俊霞, 2007)。季延斌等(2007)研究表明,刚出膜的六须鲶(*Silurus glanis*)仔鱼

* 山东省自主创新成果转化专项(2013ZHZX2A0803)和鳌山科技创新计划(2015ASKJ02-03)共同资助[This work was supported by Shandong Special Independent Innovation Achievements (2013ZHZX2A0803), and Aoshan Science and Technology Innovation Plan (2015ASKJ02-03)]. 王贞杰, E-mail: 1218370725@qq.com

① 通讯作者: 陈四清, 研究员, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-01-01, 收修改稿日期: 2017-02-28

浸泡在添加 40 mg/L 的 Vc 孵化水体中, 可以使仔鱼开口摄食的时间提前 8 h, 其成活率也由自然孵化条件下的 5%~20% 提高至 70%; 薛凌展(2008)研究也表明, 水体中添加 0.09 g/L 的 Vc 可使栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的孵化率显著提高。可见, 胚胎及仔鱼可以吸收孵化水体中的 Vc, Vc 可为鱼类胚胎生长发育提供营养需求, 促进早期发育。熊铎龙等(2014)研究表明, 30 mg/L 的 Vc 可显著提高晋安银鲫(*Carassius auratus*)的孵化率、成活率及卵黄囊仔稚鱼的生长速度。

圆斑星鲈(*Verasper variegatus*)主要分布在我国黄渤海, 韩国和日本的北部沿海。圆斑星鲈肉质细嫩、味道鲜美, 耐低温, 具有较强抗病力, 生长速度快, 是重要的经济养殖鱼种。由于人工饲养下的圆斑星鲈排卵周期不稳定, 受精率比其他鱼种较低, 对于提高孵化阶段的孵化率和卵黄囊期的成活率有待提高。本研究将 Vc 添加到圆斑星鲈的孵化水体中, 旨在探究 Vc 对圆斑星鲈早期发育的影响, 为提高该鱼的孵化率、成活率和营养消化能力提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验于 2016 年 5 月在山东科合海洋高技术有限公司进行。选用全长为 30~50 cm、体重为 1.2~3.0 kg 的 4 龄圆斑星鲈亲鱼。挑选可挤出乳白色精液的雄性亲鱼, 用吸管取其精液, 用 0.9% 生理盐水稀释; 挑选腹部膨大、肛门突出的雌性亲鱼, 挤出成熟卵。挤出的卵立即滴入数滴稀释精液, 轻轻搅拌, 使精卵均匀混合, 2~3 min 后洗净, 将受精卵置于 2 L 烧杯中孵化。孵化水温为 $(11.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 出膜后水温升高至 $(14.5 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。每 8 h 全部换同一温度的新水。实验 Vc 质量浓度为 0、20、25、30 和 35 mg/L, 每组分别设 3 个重复。水体中受精卵的平均密度为 1000 粒/L, 开口后投喂轮虫。受精卵发育过程使用显微镜 4 倍下进行连续观察, 并记录发育的时间和时期。实验的取样点标准为 50% 的仔鱼发育至某个时期。实验仔鱼的内源营养期为 1~5 日龄仔鱼, 混合营养期为 5~8 日龄仔鱼, 外源营养期为 9 日龄仔鱼。因此, 在成熟卵、受精卵、原肠中期、晶体出现期、内源营养期(2 日龄)、混合营养期(6 日龄)及外源营养期(9 日龄) 7 个时期分别取样。将样品置于 1.5 ml 的 Eppendorf 管中, 于 -80°C 冰箱保存。

1.2 样品制备

选取最优仔稚鱼出膜时间、出膜率和成活率的

Vc 浓度 25 mg/L 组和对照组的样品进行指标测定。取不同胚胎时期的样品加入 10 倍体积(*W/V*)预冷双蒸水, 冰浴匀浆, 4000 r/min、 4°C 离心 20 min 后取上清液, 置于 4°C 冰箱中保存备用, 24 h 内测定完毕。

1.3 酶活测定

酶液蛋白浓度采用考马斯亮蓝法测定。脂蛋白脂酶(LPL)、肝脂酶(HL)、胃蛋白酶、胰蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶活性均采用南京建成生物技术有限公司试剂盒测定。总脂酶活性(GE)=脂蛋白脂酶活性+肝脂酶活性。

1.4 体重和全长的测定方法

用电子天平称量体重, 每次称量 100 尾, 取平均值。显微镜下通过目微尺测定全长, 每次测量 50 尾, 取平均值。体重和全长均测定 3 次。

1.5 数据分析

实验结果以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示, 用 SPSS 17.0 软件进行单因子方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异显著, 采用 Duncan 氏多重比较检验。

2 结果

2.1 Vc 对圆斑星鲈出膜时间、孵化率和仔鱼成活率的影响

随着孵化水体中 Vc 浓度的增加, 圆斑星鲈仔鱼的出膜时间缩短, 孵化率和成活率得到提高(表 1)。Vc 浓度在 30 mg/L 时, 仔鱼出膜时间最短, 比对照组缩短了 5.5 h; Vc 浓度在 20 mg/L 时, 孵化率显著高于其他各组($P < 0.05$); Vc 浓度在 25~30 mg/L 时, 成活率显著高于其他各组($P < 0.05$); 当 Vc 浓度大于 30 mg/L 时, 高浓度 Vc 对圆斑星鲈胚胎及仔鱼孵化率和成活率表现出抑制。

2.2 Vc 对圆斑星鲈仔稚鱼全长和体重的影响

Vc 对圆斑星鲈仔稚鱼全长的影响显著(表 2)。同一发育时期, 随 Vc 浓度增加仔稚鱼全长增加, Vc 浓度高于 30 mg/L 时, 全长增长速度表现出抑制。Vc 浓度在 25 mg/L 时, 仔稚鱼各时期全长最长, 并显著高于对照组($P < 0.05$)。随着 Vc 浓度增加, 不同发育时期的全长增长幅度比对照组显著增大($P < 0.05$), 外源营养期的仔稚鱼在 25 mg/L 时, 全长增长幅度最大。Vc 浓度高于 30 mg/L 时, 增长幅度与对照组无显著

表1 V_C对圆斑星鲈出膜时间、孵化率和成活率的影响Tab.1 The effect of vitamin C on the hatching time, hatching ratio and survival rate of *V. variegatus* larvae (n=3)

项目 Items	Vc 浓度 Vc concentration (mg/L)				
	0	20	25	30	35
出膜时间 Hatching time (h)	163.66±1.52 ^a	159.00±1.00 ^c	153.00±1.00 ^b	152.43±0.57 ^b	162.00±1.73 ^a
孵化率 Hatching rate (%)	34.03±2.43 ^a	46.63±1.04 ^b	44.36±0.81 ^{bc}	43.93±1.43 ^c	29.80±0.55 ^d
成活率 Survival rate (%)	71.30±1.05 ^a	70.93±0.55 ^a	81.95±1.22 ^b	81.96±2.15 ^b	67.83±1.26 ^c

注：同行上标不同字母表示差异显著($P<0.05$)，相同字母表示差异不显著($P>0.05$)；下同

Note: Values within the same line with different letters are significantly different ($P<0.05$), while the same letters indicate no significant difference ($P>0.05$); the same in the following

差异($P>0.05$)。由表3可知，随着Vc浓度的增加，体重呈上升趋势。当Vc浓度高于30 mg/L时，体重增加受到抑制。对于外源营养期的仔稚鱼，体重在Vc浓度25 mg/L时最大并显著高于对照组($P<0.05$)。

2.3 Vc对圆斑星鲈早期发育过程中总蛋白的影响

浸泡水体Vc浓度为30 mg/L时(表4)，在圆斑星鲈仔稚鱼早期发育过程中，对照组的总蛋白含量呈下降趋势，成熟卵总蛋白量为(0.775±0.012) mg/ml，发育到外源营养期时，总蛋白含量下降至(0.131±0.011) mg/ml。Vc组总蛋白含量也呈下降趋势，但下降幅度显著低于对照组。发育到外源营养期时，总蛋白含量下降至(0.225±0.005) mg/ml，显著高于对照组($P<0.05$)。

2.4 Vc对圆斑星鲈早期发育过程中消化酶的影响

浸泡水体Vc浓度在30 mg/L时圆斑星鲈早期发育过程中消化酶活性的变化见表5。从表5可以看出胃蛋白酶活性在外源营养期出现，Vc组显著高于对

照组($P<0.05$)。淀粉酶活性在混合营养期出现，并呈显著上升趋势，混合营养期和外源营养期间差异显著($P<0.05$)。在混合营养期和外源营养期，Vc组均显著高于对照组($P<0.05$) (表6)，Vc可显著提高淀粉酶活性。在发育的各个时期，脂肪酶活性均呈显著上升趋势，Vc组脂肪酶活性均显著高于对照组($P<0.05$)。胰蛋白酶在内源营养期有较高活性，混合营养期活性下降，外源营养期有所升高。在混合营养期，胰蛋白酶活性Vc组和对照组差异不显著($P>0.05$)；在混合营养期和外源营养期，Vc组均显著高于对照组($P<0.05$)。

2.5 Vc对圆斑星鲈早期发育过程中2种酯酶的影响

圆斑星鲈发育的各个时期，LPL活性Vc组均高于对照组。成熟卵、受精卵和混合营养期2组差异不显著($P>0.05$)，原肠中期、晶体期和外源营养期Vc组显著高于对照组($P<0.05$)。圆斑星鲈胚胎发育和卵黄囊仔稚鱼HL活性均呈上升趋势，且Vc组显著高于对照组($P<0.05$) (表6)。

表2 Vc对圆斑星鲈仔稚鱼全长的影响

Tab.2 The effects of vitamin C on the full-length of *Verasper variegatus* larvae (n=3, mm)

时期 Stages	Vc 浓度 Vc concentration (mg/L)				
	0	20	25	30	35
内源营养期 Endogenous nutrition stage	4.91±0.06 ^a	4.98±0.02 ^b	5.14±0.03 ^c	5.13±0.02 ^c	4.92±0.03 ^{ab}
混合营养期 Mixed nutrition stage	6.15±0.03 ^a	6.21±0.03 ^b	6.31±0.02 ^c	6.29±0.02 ^c	6.13±0.04 ^a
外源营养期 Exogenous nutrition stage	6.25±0.02 ^a	6.33±0.02 ^b	6.46±0.04 ^c	6.45±0.02 ^c	6.26±0.02 ^a

表3 Vc对圆斑星鲈仔稚鱼体重的影响

Tab.3 The effects of vitamin C on the body weight of *V. variegatus* larvae (n=3, mg)

时期 Stages	Vc 浓度 Vc Concentration (mg/L)				
	0	20	25	30	35
内源营养期 Endogenous nutrition stage	1.66±0.02 ^a	1.74±0.02 ^a	1.98±0.08 ^b	2.07±0.02 ^b	1.68±0.01 ^a
混合营养期 Mixed nutrition stage	2.62±0.01 ^a	2.78±0.02 ^b	2.95±0.01 ^c	2.95±0.02 ^c	2.60±0.03 ^a
外源营养期 Exogenous nutrition stage	3.36±0.04 ^a	3.42±0.02 ^b	3.66±0.04 ^c	3.64±0.02 ^c	3.31±0.02 ^a

表 4 圆斑星鲷早期发育过程中总蛋白含量变化

Tab.4 The total protein content of *V. variegatus* during early development (mg/ml)

时期 Stages	对照组 Control	Vc 组 Vc group
成熟卵 Mature eggs	0.775±0.012	0.786±0.012
受精卵 Fertilized eggs	0.743±0.058	0.705±0.004
原肠中期 Mid-gastrula stage	0.659±0.004	0.688±0.001
晶体出现期 Crystal appearing stage	0.492±0.004	0.581±0.006
混合营养期 Mixed nutrition stage	0.193±0.004	0.311±0.003
外源营养期 Exogenous nutrition stage	0.130±0.011	0.225±0.005

表 5 圆斑星鲷早期发育过程中消化酶活性变化

Tab.5 The digestive enzyme activities of *V. variegatus* during early development (U/mg prot)

项目 Items	胃蛋白酶 Pepsin	淀粉酶 Amylase	脂肪酶 Lipase	胰蛋白酶 Trypsin
内源营养期 对照组 Control	—	—	0.201±0.147 ^{Aa}	1.564±0.045 ^{Aa}
Endogenous nutrition stage Vc 组 Vc group	—	—	0.299±0.086 ^{Ab}	1.953±0.020 ^{Ab}
混合营养期 对照组 Control	—	1.041±0.014 ^{Aa}	0.605±0.044 ^{Ba}	0.603±0.083 ^{Ba}
Mixed nutrition stage Vc 组 Vc group	—	1.392±0.020 ^{Ab}	0.691±0.032 ^{Bb}	0.711±0.075 ^{Ba}
外源营养期 对照组 Control	0.463±0.034 ^a	1.374±0.033 ^{Ba}	0.684±0.011 ^{Ca}	0.671±0.058 ^{Ca}
Exogenous nutrition stage Vc 组 Vc group	0.623±0.001 ^b	1.468±0.006 ^{Bb}	0.770±0.041 ^{Cb}	1.003±0.111 ^{Cb}

注: 同组、同列数据肩标不同大写字母表示差异显著($P<0.05$), 相同或无大写字母表示差异不显著($P>0.05$); 同一发育时期、同列数据肩标不同小写字母表示组间同一发育时期有显著差异($P<0.05$), 相同小写字母表示无显著差异($P>0.05$), 下同

Note: Values in the same row with different capital letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), and with the same or no capital letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$); Values in the same column with different small letter superscripts in the same row mean significant difference between groups of same period ($P>0.05$), the same small letter superscripts mean no significant difference between groups of same period ($P>0.05$), the same in the following

表 6 圆斑星鲷早期发育过程中脂蛋白脂酶(LPL)和肝脂酶(HL)活性变化

Tab.6 The specific activity and total activity of lipoprotein lipase and hepatic lipase of *V. variegatus* during early development (U/mg prot)

项目 Items	脂蛋白脂酶 Lipoprotein lipase	肝脂酶 Hepatic lipase
成熟卵 Mature eggs	对照组 Control	0.283±0.003 ^{Aa}
	Vc 组 Vc group	0.294±0.014 ^{Aa}
受精卵 Fertilized eggs	对照组 Control	0.306±0.002 ^{Aa}
	Vc 组 Vc group	0.314±0.004 ^{Aa}
原肠中期 Mid-gastrula stage	对照组 Control	0.403±0.024 ^{Ba}
	Vc 组 Vc group	0.513±0.016 ^{Bb}
晶体出现期 Crystal appear stage	对照组 Control	0.441±0.013 ^{Ca}
	Vc 组 Vc group	0.673±0.036 ^{Cb}
混合营养期 Mixed nutrition stage	对照组 Control	0.283±0.003 ^{Aa}
	Vc 组 Vc group	0.294±0.014 ^{Aa}
外源营养期 Exogenous nutrition stage	对照组 Control	0.507±0.025 ^{Da}
	Vc 组 Vc group	0.674±0.012 ^{Db}

3 讨论

3.1 Vc 对圆斑星鲷早期胚胎发育的影响

本研究显示, 不同浓度 Vc 均可以缩短圆斑星鲷

的出膜时间。在 Vc 浓度为 25~30 mg/L 时, 出膜时间比对照组提前 10 h, 表明 Vc 浸泡对圆斑星鲷的胚胎发育有促进作用。Vc 是鱼类的必需营养元素, 为机体细胞提供营养, 有研究报道, 一定量的 Vc 不仅可

以保护卵子避免氧化损伤,还能对早期发育中的卵内物质和能量代谢起到调控作用,进而促进胚胎发育(Terova *et al.*, 2008)。另外,不同浓度Vc也可对圆斑星鲈的孵化率和仔鱼的成活率造成不同的影响,在V_C为25 mg/L时,孵化率、出膜率和成活率最高,孵化率和成活率比对照组分别高29.4%和14.8%,仔鱼的全长和体重增量最显著,熊铎龙等(2014)研究发现,30 mg/L的Vc可显著提高晋安银鲫的孵化率、成活率及卵黄囊仔稚鱼的生长速度,与本实验结果相吻合。不同的物种对同一营养物质的利用率和机制也不同。V_C对圆斑星鲈早期发育的影响至今还未见报道,本研究为V_C在圆斑星鲈孵化上的运用提供了理论依据。Vc除了作为营养物质为机体提供营养,还是鱼体内的抗氧化剂,具有清除有害自由基的作用,使胚胎免受氧化损伤,保护卵膜(Brown *et al.*, 2001; Menezes *et al.*, 2006)。体外实验表明,Vc具有提高机体免疫力的作用(李桂峰等, 2005)。水体中的Vc进入机体,提高胚胎及仔鱼的免疫力,减少病害的发生,从而提高圆斑星鲈仔鱼的出膜率和成活率。

当Vc浓度高于30 mg/L时,圆斑星鲈仔鱼的出膜时间、孵化率和成活率均受到抑制,原因可能是Vc水溶液呈酸性,当Vc浓度过高时,水体的pH降低,不适宜胚胎的正常发育。因此,低于30 mg/L的Vc浸泡可促进圆斑星鲈的早期发育。

Vc组仔鱼的全长和体重显著高于对照组,其原因一方面是Vc作为营养物质促进了其生长发育,另一方面Vc起抗氧化作用,使机体损伤率降低,发育过程中的正常代谢得到保障。

3.2 Vc对圆斑星鲈早期发育过程中总蛋白的影响

在圆斑星鲈胚胎期和卵黄囊期,卵黄物质分解代谢,为胚胎提供能量,同时,也为机体组织、器官的形成提供原料。在圆斑星鲈胚胎及早期发育过程中,总蛋白含量整体呈下降趋势。受精后至原肠中期下降的幅度较小,因为受精卵发育至原肠中期胚胎主要进行细胞分裂和迁移,不需要消耗大量能量。从晶体期至出膜期,细胞大量增殖分化,胚胎组织逐渐形成,出膜时脱落的卵膜带走部分蛋白质(Selman *et al.*, 2000),因此,晶体期至出膜期总蛋白含量下降幅度增大。出膜后仔鱼体内尚未摄入食物,会大量分解蛋白质以维持正常生命活动,所以总蛋白含量持续下降。混合营养期,仔鱼虽然开口摄食,但摄食量很少,总蛋白含量仍下降。

本研究用25 mg/L的Vc浸泡圆斑星鲈胚胎及卵黄囊仔鱼表明,总蛋白含量呈下降趋势且下降幅度显

著小于对照组,表明Vc对机体发育起到积极的促进作用。王文辉等(2006)在饲料中添加Vc饲喂黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*),发现Vc可提高黄颡鱼血浆总蛋白含量。本研究对圆斑星鲈胚胎及卵黄囊仔鱼进行Vc浸泡,在混合营养期和外源营养期,25 mg/L的Vc使圆斑星鲈仔鱼蛋白含量分别高于对照组61.14%和68.14%,说明对于开口摄食的仔鱼Vc能促进其摄食,加速蛋白质的沉积,但机体具体的工作机制还有待进一步研究。

3.3 Vc对圆斑星鲈早期发育过程中消化酶的影响

仔稚鱼消化酶活性变化有两个重要时期,一是未开口向开口摄食的转变,二是开口后混合营养期向外源营养期的转变(Cousin *et al.*, 1987)。在圆斑星鲈胚胎发育过程中,在内源营养期和混合营养期均没有检测到胃蛋白酶活性,在外源营养期开始检测到微弱胃蛋白酶活性。初孵仔鱼中胰蛋白酶活性最高,混合营养期降低。鱼类在孵化6 d后胃区才稍膨大发育(王思锋等, 2006),胃蛋白酶属于酸性蛋白酶,在仔鱼发育期形成较晚,而碱性蛋白酶如胰蛋白酶在仔鱼发育早期阶段就具有较高的活性。因此,在仔鱼发育早期,胰蛋白酶可以补偿酸性蛋白酶缺乏的影响,这一结论已在无胃鱼类和金头鲷(*Sparus aurata*) (Moyano *et al.*, 1996)中验证。在开口摄食前,圆斑星鲈碱性蛋白酶如胰蛋白酶的活性较高,这与对半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)仔鱼的结果一致(常青等, 2005)。在仔鱼的胃腺未形成时,对摄入食物的消化吸收主要依赖胰蛋白酶类,因此,在仔鱼早期发育过程中,胰蛋白酶对营养物质的消化吸收起到重要作用(Suzuki *et al.*, 2002)。在混合营养期出现淀粉酶活性并在外源营养期升高,表明圆斑星鲈的仔鱼在由混合性营养向外源性营养转变时,已具备消化多糖类食物的能力。在胚胎发育过程中,卵黄中的营养物质被分解用于维持代谢和提供能量,首先分解代谢的是蛋白质,其次是脂质(Gunasekerar *et al.*, 1999)。在圆斑星鲈初孵仔鱼中,检测到脂肪酶活性呈上升状态,说明从内源营养期仔鱼生长发育加快,需要分解大量脂质维持生命活动。初孵仔鱼开口摄食前机体处于饥饿状态,此时,脂质被大量分解提供能量以维持其基础代谢。对于混合营养期和外源营养期的卵黄囊仔鱼,脂肪酶活性仍呈上升趋势,说明仔鱼出膜后发育代谢所需能源主要由脂质提供,这与在单斑重牙鲷(*Diplodus sargus kotschy*) (Cejasa *et al.*, 2004)仔鱼发育过程一致。

胚胎发育是生命过程中最脆弱的环节,发育质量好坏决定个体能否存活。生理代谢旺盛的胚胎期易产

生大量氧化自由基, 造成胚胎氧化损伤。Vc 可有效清除自由基使胚胎免受氧化损伤, 尤其是保护卵膜完整, 提高卵的质量(Bromage *et al.*, 1992)。在鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)和鲷鱼(*Pagrosomus major*)的成熟卵中 Vc 积累较多后, 能有效促进鱼的早期发育(Terova *et al.*, 1998)。当 Vc 在受精卵中积累到一定量时, 就可以对卵内物质与能量代谢起调控作用。六须鲶鱼(*Silurus glanis*)卵黄囊仔鱼进行水体添加 Vc 浸泡, Vc 可有效促进卵黄物质被机体分解吸收, 使仔鱼开口时间提前(季延滨等, 2007), 说明 Vc 在六须鲶鱼胚胎发育期进入卵黄囊仔鱼机体, 诱导激活参与代谢卵黄物质的消化酶加速分解卵黄物质, 同时, 对鱼类其他调节酶的合成与分泌起调节作用使机体达到新的代谢模式, 从而适应变化的营养环境(王文辉等, 2006)。本研究采用 25 mg/L 的 Vc 对圆斑星鲈卵黄囊仔鱼进行浸泡, 结果显示, 同一发育时期的蛋白酶、脂肪酶及淀粉酶活性相比对照组均显著提高, 说明在卵黄囊仔鱼期 Vc 能有效提高消化酶活性促进卵黄物质的分解, 从而为圆斑星鲈早期发育提供能源。

3.4 圆斑星鲈早期发育过程中 LPL 和 HL 活性变化特点

脂质不仅是鱼类的能量来源, 也是必需的营养物质。对于仔稚鱼, 脂肪的代谢直接关系到其能否存活(Keembiyehetty *et al.*, 1998)。LPL 和 HL(合称总脂酶)均是参与脂质降解的关键酶, LPL 是甘油三酯水解的限速酶, HL 是血液循环内源性甘油三酯代谢的关键酶。姚俊杰(2006)对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的研究表明, 胚胎发育过程中原肠期机体调控机制由母型调控转变为合子型调控, 同时, 这一时期自身的 mRNA 也开始合成。本研究显示, 在圆斑星鲈的成熟卵可以检测到脂酶活力, 说明脂酶合成源于母体, 成熟卵中的脂酶为最初胚胎发育提供了营养物质保障。在胚胎发育过程中, LPL 活性呈上升趋势, 在原肠期其活性显著提高, 说明原肠期合子基因开始表达合成水解酶。这与内源营养期器官形成分化、仔鱼破膜孵出、细胞增殖组织构建大量耗能有关(Selman *et al.*, 2000)。这一现象与淡水鱼类相一致(Cejas *et al.*, 2004)。在混合营养期, LPL 活性下降。原因可能与混合营养期的仔鱼摄食及消化器官发育均不完善, 摄食和消化能力较弱有关(姚俊杰等, 2013; 蒋左玉等, 2015), 此时, LPL 缺乏底物, 饥饿状态的仔鱼使 LPL mRNA 下调, 导致 LPL 活力降低。这与朱俊华等(2014)对瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)的研究相一致。外源营养期后, 摄食及消化能力加强, 说明食物

可诱导 LPL mRNA 表达, 使 LPL 活性升高。

HL 活性在圆斑星鲈早期发育中呈上升趋势, 在外源营养期活性最高。可能与外源营养期仔鱼的器官及血液循环系统趋于完善, 外界摄入的食物为 HL 提供底物有关(梁正其等, 2013)。其具体作用机制还需进一步研究。

本研究使用 25 mg/L 的 Vc 浸泡圆斑星鲈胚胎, 测得胚胎的 LPL 和 HL 比活力变化趋势与对照组一致, 但其活性均显著高于对照组。结果表明, 适宜水平的 Vc 浸泡可以促进鱼体内脂质的代谢。可能原因有两个: 一是 Vc 在脂质代谢中起到了抗氧化作用, 使 V_E 和 β -胡萝卜素水平较高, 从而使脂肪的氧化链被阻断, 避免脂肪酸过氧化细胞膜受损, 使机体免疫功能提高(Chien *et al.*, 2001)。同时, 机体中高水平的 Vc 可提供自由电子使谷胱甘肽由氧化型转变为还原型, 使酶系统的活性巯基得到保护, 从而超氧化物歧化酶活性提高(Luo *et al.*, 2003), 使脂质膜避免过氧化。二是 Vc 与圆斑星鲈卵黄囊仔鱼体内肉碱合成有关, 间接加速了脂质代谢(颀志刚等, 2003), 进而诱导 LPL 和 HL 的合成分泌, 保证仔鱼对脂质的分解利用顺利进行。表明适宜水平的 Vc 可促进脂质代谢。

4 结论

低于 30 mg/L 的 Vc 浸泡可促进圆斑星鲈的早期发育, 25 mg/L 的 Vc 浸泡下, 圆斑星鲈的孵化率、出膜率和成活率最高, 仔鱼的全长和体重增加最显著。25 mg/L 的 Vc 能显著提高圆斑星鲈仔鱼胃蛋白酶、胰蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性, 并可以促进蛋白质在鱼体内的沉积。适宜水平的 Vc 对圆斑星鲈早期机体内脂质的维持和代谢平衡具有重要作用。

参 考 文 献

- Bromage N, Jones J, Randall C, *et al.* Broodstock management, fecundity egg quality and timing of egg production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 1992, 100(1-3): 141-166
- Brown M, Lavens P. Critical review of the concentration, interactions with other nutrients, and transfer of ascorbic acid in algae, crustaceans and fish. BocaRaton: CRC Press, 2001: 167-189
- Cejas JR, Almansa E, Jérez S, *et al.* Changes in lipid class and fatty acid composition during development in white seabream (*Diplodus sargus*) eggs and larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 139(2): 209-216
- Chang Q, Zhang XM, Chen SQ, *et al.* Variations in digestive

- enzymes activities in tongue fish *Cynoglossus semilaevis* larvae and juveniles. *Advance in Marine Science*, 2005, 23(4): 472–476 [常青, 张秀梅, 陈四清, 等. 半滑舌鳎仔稚鱼消化酶活性的变化. *海洋科学进展*, 2005, 23(4): 472–476]
- Chien LT, Hwang DF. Effects of thermal stress and vitamin C on lipid peroxidation and fatty acid composition in the liver of thornfish *Teraponjarbua*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2001, 128(1): 91–97
- Cousin JCB, Baudin-Laurencin F, Gabaudan J. Ontogeny of enzymatic activities in fed and fasting turbot *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Fish Biology*, 1987, 30(1): 15–33
- Gunasekerar M, Desilva S, Ingram BA. Early ontogeny-related changes of the fatty acid composition in the Percichthyid fishes trout cod, *Maccullochella macquariensis* and *Murraycod*, *M. peelipeelii*. *Aquatic Living Resources*, 1999, 12(3): 219–227
- Ji YB, Chen CX, Wang X, *et al.* The application of vitamins in improving the seedling survival rate of *Silurus glanis* Linnaeus. *China Fisheries*, 2007, 384(11): 60–61 [季延滨, 陈成勋, 王祥, 等. 维生素在提高六须鲶育苗成活率中的应用. *中国水产*, 2007, 384(11): 60–61]
- Jiang ZY, Yao JJ, Xiong HL, *et al.* The effects of glucose and vitamin C on the gene expression of lipoprotein lipase and hepatic lipase during the development of the yolk-sac larva of *Carassius auratus gibelio*. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(6): 43–48 [蒋左玉, 姚俊杰, 熊铎龙, 等. 普安银鲫(*Carassius auratus gibelio*)卵黄囊期脂蛋白脂酶和肝脂酶基因的表达及葡萄糖、维生素 C 对其的影响. *渔业科学进展*, 2015, 36(6): 43–48]
- Jie ZG, Niu CJ. The study of important and application of vitamin C in fish nutrition and feed. *Feed China*, 2003, 13(2): 29–32 [颀志刚, 牛翠娟. 维生素 C 在鱼类营养与饲料研究中的重要作用及应用. *饲料广角*, 2003, 13(2): 29–32]
- Keembiyehetty CN, Wilson RP. Effect of water temperature on growth and nutrient utilization of sunshine bass (*Morone chrysops*♀×*Morone saxatilis*♂) fed diets containing different energy/protein ratios. *Aquaculture*, 1998, 166(1): 151–162
- Li GF, Qian PF, Sun JJ, *et al.* Effect of vitamin C on cellular activities and serum factors of *Claris fuscus*. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2005, 44(5): 75–83 [李桂峰, 钱沛锋, 孙际佳, 等. 维生素 C 对胡子鲶细胞活性和血清因子的影响. *中山大学学报(自然科学版)*, 2005, 44(5): 75–83]
- Li JX. Effect of glucose, sucrose and NaCl to embryo development of zebrafish. Jinan: Shandong Normal University, 2007 [李俊霞. 葡萄糖、蔗糖、氯化钠对斑马鱼胚胎发育的影响. 济南: 山东师范大学, 2007]
- Liang ZQ, Yao JJ, Xiong HL, *et al.* Growth and development of larvae and juveniles in Puan silver crucian carp *Carassius auratus* Linnaeus. *Fisheries Science*, 2013, 32(7): 380–384 [梁正其, 姚俊杰, 熊铎龙, 等. 普安银鲫仔稚鱼的发育及生长研究. *水产科学*, 2013, 32(7): 380–384]
- Luo X, Liu Z, Sun Y, *et al.* Lipophilic enhance of vitamin C protective activity against free-radical-induced damage *in vivo*. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2003, 19(4): 428–431
- Menezes GC, Travares Dias M, Ono EA, *et al.* The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of Pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comparative Biochemistry & Physiology, Part A: Physiology*, 2006, 145(2): 274–279
- Moyano FJ, Diaz M, Alarcon FJ, *et al.* Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1996, 15(2): 121–130
- Selman C, McLaren JS, Himanka MJ, *et al.* Effect of long term cold exposure on antioxidant enzyme activities in a small mammal. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 28(8): 1279–1285
- Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, *et al.* A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nature Genetics*, 2002, 31(6): 141–149
- Terova G, Saroglia M, Papp ZG, *et al.* Ascorbate dynamics in embryos and larvae of seabass and seabream, originating from brood stocks fed supplements of ascorbic acid. *Aquaculture Internet*, 1998, 6(5): 357–367
- Terova G, Saroglia M, Papp ZG, *et al.* Dynamics of collagen indicating amino acids, in embryos and larvae of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*), originated from brood stocks fed with different vitamin C content in the diet. *Comparative Biochemistry & Physiology, Part A: Physiology*, 1998, 121(2): 111–118
- Wang SF, Zhang ZF, Zhang QQ, *et al.* Morphological and histological studies on development of digestive system in *Verasper variegatus* Temminck et Schlegel larvae prior to metamorphosis. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(1): 1–7 [王思锋, 张志峰, 张全启, 等. 圆斑星鲽仔鱼变态前消化系统发生的形态学和组织学研究. *中国水产科学*, 2006, 13(1): 1–7]
- Wang WH, Wang JQ, Cheng X, *et al.* Effects of dietary vitamin C levels and sources on growth and immunity of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*(Richardson). *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(6): 951–958 [王文辉, 王吉桥, 程鑫, 等. 不同剂型维生素 C 对黄颡鱼生长和几种免疫指标的影响. *中国水产科学*, 2006, 13(6): 951–958]
- Xie QS, Li JW, Yang ZC. Japanese flounder fish vitamins and trace elements in the nutritional needs of progress. *Modern Agricultural Sciences*, 2008, 15(12): 5–7 [谢全森, 李俊伟, 杨振才. 鲆鲽鱼类维生素及微量元素营养需求研究进展. *现代农业科学*, 2008, 15(12): 5–7]
- Xiong HL, Yao JJ, An M, *et al.* Effects of glucose and vitamin C on early development of Puan silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *South China Fisheries Science*, 2014, 10(6): 88–92 [熊铎龙, 姚俊杰, 安苗, 等. 葡萄糖、维生素 C 对

- 普安银鲫早期发育的影响. 南方水产科学, 2014, 10(6): 88–92]
- Xue LZ. Effect of the change of environmental factors and nutritious factors on embryo and early larvae of tetraploid *Chlamys ferrerii*. Master's Thesis of Fujian Normal University, 2008 [薛凌展. 环境和营养因子对四倍体栉孔扇贝胚胎及早期幼虫的影响. 福建师范大学硕士研究生学位论文, 2008]
- Yao JJ, Liang ZQ, Feng YN, *et al.* Histological studies on post-embryonic development for digestive system of *Carassius auratus*. Guizhou Agricultural Sciences, 2013, 41(11): 152–155 [姚俊杰, 梁正其, 冯亚楠, 等. 普安银鲫消化系统胚胎发育的组织学观察. 贵州农业科学, 2013, 41(11): 152–155]
- Yao JJ. Correlation between embryonic nutrition and morphogenesis of *Macrobrachium rosenbergii*. Doctoral Dissertation of East China Normal University, 2006 [姚俊杰. 罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)胚胎营养与形态发生相关性的研究. 华东师范大学博士研究生学位论文, 2006]
- Zhu JH, Yao JJ, Feng YN, *et al.* Activities of two lipases and effects of *m*-cresol on them during early development of *Cyprinus carpio* var. color. Freshwater Fisheries, 2014, 44(1): 32–35 [朱俊华, 姚俊杰, 冯亚楠, 等. 瓯江彩鲤早期发育中两种脂酶活性及间甲酚对其活性的影响. 淡水渔业, 2014, 44(1): 32–35]

(编辑 冯小花)

Effects of Vitamin C on Early Development of Spotted Halibut (*Verasper variegatus*)

WANG Zhenjie^{1,2}, YE Baomin³, CHANG Qing¹, CHEN Siqing^{1①},
LIU Changlin¹, HU Jiancheng¹, WANG Zhijun⁴

(1. Key Laboratory for Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306; 3. Administration of Ocean and Fisheries of Liaoning Province, Shenyang 110000; 4. Kehe Ocean High Technologies Company of Shandong, Weihai 264500)

Abstract This study investigated effects of exogenous Vitamin C (V_C) on the membrane time, hatching ratio, survival rate, growth characteristics, digestive enzyme activities and Lipases enzyme activities of spotted halibut (*Verasper variegatus*) during early development using mature eggs by the method of artificial fertilization. The eggs were divided into five groups with five different V_C concentration of 0, 20, 25, 30, and 35 mg/L, respectively. Samples were collected at mature eggs, fertilized eggs, mid-gastrula, crystal appear, mixed nutrition and exogenous nutrition stages. The results showed that 25 mg/L V_C significantly improved the hatching ratio, survival rate and growth characteristics and shorten the membrane time, and that V_C contributed to the deposition of protein in spotted halibut during early development, and significantly enhanced the activity of pepsin after exogenous nutrition stage ($P < 0.05$). After mixed nutrition stage, V_C significantly increased the activity of amylase ($P < 0.05$). After endogenous nutrition stage, V_C significantly induced the activity of lipase and trypsin ($P < 0.05$). V_C at 25 mg/L increased the activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase enzyme during embryo development ($P < 0.05$). The findings indicated that lipoprotein lipase and hepatic lipase genes in zygotes may play functions at gastrula stage when lipid hydrolytic enzymes express to release energy for embryonic development. The results demonstrate that lipase and trypsin priority digest carbohydrates in yolk of mature eggs from spotted halibut to provide energy for embryonic development right after fertilization. The study revealed that appropriate level of V_C could improve lipid metabolism during embryo development of spotted halibut.

Key words *Verasper variegatus*; Early development; Vitamin C; Digestive enzyme; Lipase

① Corresponding author: CHEN Siqing, E-mail: chensq@ysfri.ac.cn