

文章编号: 1000-0615(2016)09-1321-09

DOI: 10.11964/jfc.20160310303

## 饲料中添加叔丁基氢醌对大菱鲆生长、血液生化指标、非特异性免疫及肠道组织结构的影响

祁 华, 李泽邦, 李凤玉, 王裕玉, 麦康森, 徐 玮, 艾庆辉\*

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 农业部水产动物营养与饲料重点实验室, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 为研究饲料中添加不同含量叔丁基氢醌(TBHQ)对大菱鲆幼鱼生长、血液生化指标、非特异性免疫及肠道组织结构的影响, 在饲料中分别添加0、150、450和750 mg/kg的叔丁基氢醌, 配制成4种等氮等脂实验饲料, 选择初始体质量(8.31±0.04) g大菱鲆幼鱼, 随机分成4组, 每组6个重复, 每个重复30尾, 采用饱饲投喂方式, 每天投喂2次, 饲养周期为12 W。结果显示, 与对照组相比, 450和750 mg/kg TBHQ添加组大菱鲆的增重率、特定生长率均显著降低; 450 mg/kg TBHQ添加组实验鱼血清碱性磷酸酶活力显著高于150 mg/kg TBHQ添加组; 150 mg/kg TBHQ添加组实验鱼血清白蛋白和高密度脂蛋白含量显著低于对照组和450 mg/kg添加组; 450 mg/kg TBHQ添加组鱼的血清肌酐含量显著高于对照组; 150 mg/kg TBHQ添加组鱼的血清总蛋白含量显著低于对照组; 饲料中添加高剂量的TBHQ能够显著升高血清中CAT、溶菌酶活力(450和750 mg/kg)及头肾吞噬细胞呼吸爆发活力(750 mg/kg); 饲料中TBHQ添加量为750 mg/kg时, 血清SOD活力显著降低; 与对照组相比, 饲料中添加450和750 mg/kg TBHQ能够显著降低中肠肠道绒毛长度与肠道直径比, 而添加750 mg/kg TBHQ时中肠肠道微绒毛长度与肠道直径的比值显著降低。研究表明, 饲料中TBHQ的添加量为150 mg/kg时, 对大菱鲆幼鱼生长及生理生化指标无显著影响, 而饲料中添加450 mg/kg以上的TBHQ则会对大菱鲆幼鱼的生长及生理状况产生一定负面作用。

**关键词:** 大菱鲆; 叔丁基氢醌; 生长; 血液生化指标; 非特异性免疫; 肠道组织结构

**中图分类号:** S 963.7

**文献标志码:** A

饲料中添加抗氧化剂可以有效防止或减轻不饱和脂肪酸、蛋白质、类胡萝卜素、维生素A和维生素E的氧化<sup>[1-3]</sup>。此外, 饲料中适量添加乙氧基喹啉等抗氧化剂可以显著提高动物摄食率、生长率、饲料利用率和抗氧化能力<sup>[4-6]</sup>。然而, 当饲料中抗氧化剂添加水平过高时, 会对鱼类的生长及生理产生不良的影响, 如鱼类摄食含较高水平乙氧基喹啉饲料时会出现食欲降低、生长下降、抗氧化力低下等多种不良反应<sup>[7-8]</sup>。

叔丁基氢醌(TBHQ)的分子式为C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>, 化学名为特丁基对苯二酚, 是一种新型高效的

抗氧化剂。1972年美国FDA批准其作为食品抗氧化剂, 且早在20世纪80年代联合国粮农组织/世界卫生组织和美国相关的卫生部门就制定了TBHQ产品的使用限量标准。在相同类型的抗氧化剂中, TBHQ安全性最高。然而在世界范围内, 针对TBHQ能否作为食品添加剂来使用的规定也不尽相同。在欧盟和日本, TBHQ是被禁止添加的。而其他国家例如中国、美国、澳大利亚、巴西、新西兰和菲律宾等, TBHQ可以作为食品添加剂, 但其最大使用量为200 mg/kg<sup>[9-12]</sup>。

目前有关TBHQ在水产动物饲料中的研究较

收稿日期: 2016-03-09 修回日期: 2016-05-08

资助项目: 农业部饲料质量安全监管项目

通信作者: 艾庆辉, E-mail: qhai@ouc.edu.cn

少,而且结果差异较大。高蓝等<sup>[13]</sup>研究了TBHQ等几种抗氧化剂对鱼油的抗氧化效果,研究结果显示,添加0.02%的TBHQ的抗氧化效果几乎和0.1%的VE相当。对于植物性油脂,几种常用饲料抗氧化剂的效果比较为TBHQ>PG(没食子酸丙酯)>BHT(二丁基羟基甲苯)>BHA(丁基羟基茴香醚)<sup>[14]</sup>;对于动物性油脂为TBHQ>PG>BHA>BHT<sup>[15]</sup>。作为一种酚类抗氧化剂,TBHQ抗氧化效率高、而且安全性优于PG、BHA、BHT等产品,正是由于这些特性,TBHQ在食品和饲料行业获得了较为广泛的应用。此外,TBHQ具有明显的抑菌作用,在酸性条件下其抑菌能力较强<sup>[9]</sup>。我国对TBHQ作为水产动物饲料添加剂的使用还没有系统性的认识,饲料中TBHQ的检测与安全性等问题更加值得重视并解决。

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)属鲽形目(Pleuronectiformes)、鲆科(Bothidae)、菱鲆属(*Scophthalmus*),是原产于欧洲的冷水性底栖海水鱼类,其肉厚白丰,味道鲜美,目前已成为我国重要的养殖经济鱼类。目前,还没有关于饲料TBHQ水平对大菱鲆幼鱼生长、血液生化、非特异性免疫及肠道组织结构影响的研究报道。本实验旨在初步探明TBHQ在大菱鲆饲料中的安全添加限量,为大菱鲆安全健康养殖提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验设计和饲料制备

以鱼粉和豆粕为蛋白源,鱼油、豆油作为脂肪源,配制蛋白质和脂肪含量分别为50.38%和12.52%的基础饲料。TBHQ以4个水平(0、150、450和750 mg/kg)添加到基础料中,分别配制成4种等氮等能的饲料,依次记为D1(对照组)、D2、D3和D4。实验所用TBHQ购自Sigma公司,TBHQ的标示值为97%。饲料配方及营养成分分析如表1所示。

### 1.2 实验动物及饲养管理

养殖实验在中国海洋大学生命科学与技术学院教学科研基地(山东即墨)中的海水养殖实验桶中进行。实验所用大菱鲆是当年人工孵化的同一批鱼苗,由莱州泰和育苗场提供。实验正式开始前,在实验桶中暂养2周,暂养前两天每

天使用土霉素(2 g/桶)及甲醛(20 mL/桶)混合药浴2 h,暂养期间每天投喂2次对照组饲料,使之逐渐适应实验饲料、投喂规律和养殖环境。

实验开始前,所有实验幼鱼饥饿24 h,挑选出体格健壮、规格一致的大菱鲆幼鱼作为实验用鱼,并称量初始体质量[(8.31±0.04) g]。实验鱼随机分配至24个容积为300 L的养殖桶中,每桶30尾鱼。所有桶采用随机区组设计的方法进行位置的分布。实验期间,每天饱食投喂2次,定期称量记录投喂的饲料并每天记录各个实验桶的残饵数量。采用循环水系统,并连续充气,确保溶解氧大于5 mg/L,水温控制在16~25 °C,盐度约为28, pH控制在7~8。实验周期为12 W。

### 1.3 样品采集

养殖实验结束后,分别对各桶鱼称重并计数,计算存活率(SR)、饲料系数(FCR)、增重率(WGR)、特定生长率(SGR)等指标。每桶随机取3尾鱼测量体长、体质量、内脏重、肝脏重,计算肥满度(CF)、肝体比(HSI)和脏体比(VSI)。

每桶随机取8~9尾鱼,尾静脉取血,放于2 mL离心管中,抽取血液过程中要缓慢,防止血细胞因机械损伤而破裂,室温下静置1 h待其凝固,置4 °C冰箱4 h,于4 °C条件下3500 r/min离心10 min,收集血清,液氮速冻,样品转移到-80 °C冰箱中保存备用。

各处理组每桶随机取3尾鱼,每尾鱼取约1 cm左右中肠中部组织,用0.7%生理盐水冲洗后,放入波恩氏固定液中。固定的组织样品经酒精逐级脱水、透明、透蜡、包埋后,用组织切片机(Leica RM2016)切片,最后用H.E染色法染色。

### 1.4 检测方法

饲料和鱼体中的水分、粗蛋白质、粗脂肪和灰分分别采用105 °C常压干燥法、凯氏定氮法、索氏抽提法和550 °C灼烧法测定。

血液生化指标由HITACHI日立7600全自动生化分析仪检测。测定指标包括:谷氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLB)、尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)、血糖(GLU)、总胆红素(TBILI)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)。

以冻干粉(*Micrococcus lysolei*kticus, Sigma)为底物,参照Ellis<sup>[16]</sup>方法测定血清溶菌酶活力。将溶壁微球菌按0.2 mg/mL溶于0.05 mol/L的磷酸

表 1 饲料配方及营养组成(干物质)  
Tab. 1 Formulation and composition of the experimental diets (dry matter) %

项目 items	饲料 diets			
	D1	D2	D3	D4
<b>原料 ingredients</b>				
鱼粉 fish meal	46	46	46	46
豆粕 soybean meal	21	21	21	21
小麦粉 wheat flour	21.35	21.335	21.305	21.275
鱼油 fish oil	6	6	6	6
大豆卵磷脂 soybean lecithin	2	2	2	2
维生素预混物 vitamin premix <sup>a</sup>	1	1	1	1
矿物质预混物 mineral premix <sup>b</sup>	1	1	1	1
维生素C vitamin C	0.2	0.2	0.2	0.2
复合诱食剂 phagostimulant mix	1	1	1	1
氯化胆碱 choline chloride	0.25	0.25	0.25	0.25
三氧化二钇 yttrium(III)-oxide	0.1	0.1	0.1	0.1
丙酸钙 calcium propionate	0.1	0.1	0.1	0.1
叔丁基氢醌 TBHQ	0	0.015	0.045	0.075
总计 total	100	100	100	100
<b>成分分析 proximate analysis</b>				
粗蛋白质 crude protein	50.39	50.38	50.38	50.37
粗脂肪 crude lipid	12.52	12.52	12.52	12.52

注: a. 维生素预混物(mg或g/kg diet): 硫胺素 25 mg, 维生素B<sub>2</sub> 45 mg, 盐酸吡哆醇 20 mg, 维生素B<sub>12</sub> 0.1 mg, 维生素K<sub>3</sub> 10 mg, 肌醇 800 mg, 泛酸 60 mg, 烟酸 200 mg, 叶酸 20 mg, 生物素 1.20 mg, 维生素A 32 mg, 维生素D 5 mg, 维生素E 120 mg, 氯化胆碱 2000 mg, 微晶纤维素 14.67 g; b. 矿物质预混物(mg或g/kg diet): 氟化钠 2 mg, 碘化钾 0.8 mg, 氯化钴(1%)50 mg, 硫酸铜 10 mg, 硫酸铁 80 mg, 硫酸锌 50 mg, 硫酸锰 60 mg, 硫酸镁 1200 mg, 磷酸二氢钙 3000 mg, 沸石粉 15.55 g

Notes: a. vitamin premix (mg or g/kg diet): thiamin 25 mg, vitamin B<sub>2</sub> 45 mg, pyridoxine hydrochloride 20 mg, vitamin B<sub>12</sub> 0.1 mg, vitamin K<sub>3</sub> 10 mg, inositol 800 mg, pantothenic acid 60 mg, niacin acid 200 mg, folic acid 20 mg, biotin 1.20 mg, vitamin A 32 mg, vitamin D 5 mg, vitamin E 120 mg, choline chloride 2000 mg, avicel 14.67 g. b. mineral premix (mg or g/kg diet): NaF 2 mg, KI 0.8 mg, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1%) 50 mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 10 mg, FeSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 80 mg, ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 50 mg, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 60 mg, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1200 mg, Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 3000 mg, zeolite powder 15.55 g

钠盐缓冲液(pH=6.2)中混匀, 取1.9 mL该菌悬液与100 μL待测血清于试管中迅速混匀, 25 °C条件下波长设定为530 nm, 分别测定其在0.5 min时的吸光值和4.5 min时的吸光值。每分钟每毫升血清吸光值下降0.001定义为1个溶菌酶活力单位。

巨噬细胞的呼吸爆发活力用还原四氮唑蓝(NBT)的能力来衡量<sup>[17]</sup>。取100 μL已制备好的头肾细胞悬液, 加到96孔酶标板中, 分别加入100 μL 1 mg/mL NBT(Sigma)和100 μL 1 μg/mL佛波醇肉豆蔻(PMA, Sigma), 在23 °C反应60 min。然后加入甲醇终止反应, 固定巨噬细胞。再用70%的甲醇溶液冲洗2次, 自然晾干, 分别加入120 μL 2MKOH和140 μL二甲基亚砷(DMSO, Sigma)溶液, 生成

蓝色沉淀, 最后用酶标仪在630 nm下测定吸光值。SOD和CAT采用南京建成试剂盒检测。每毫升反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD量定义为一个SOD活力单位(U)。每毫升血清每分钟分解1 μmol的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的量定义为一个CAT活力单位(U)。血清SOD、CAT的单位为U/mL。

### 1.5 计算公式及统计分析

存活率(SR,%)=实验结束时鱼尾数/实验开始鱼尾数×100

增重率(WGR,%)=(鱼体终末体质量+死亡鱼体质量-鱼体初始体质量)/鱼体初始体质量×100

特定生长率(SGR,%/d)=(ln鱼体终末体质量-

$\ln$ 鱼体初始体质量)/饲喂天数 $\times 100$

饲料系数(FCR)=(总投饵量-残饵量)/(鱼体终末体质量+死亡鱼体质量-鱼体初始体质量)

摄食率(FI, g/kg MBW per day)=平均每条鱼饲料摄入量/平均代谢体质量/饲喂天数

肥满度(CF, g/cm<sup>3</sup>)=平均体质量/(平均体长)<sup>3</sup>;

肝体比(HSI,%)=100 $\times$ 肝脏重/全鱼体质量;

脏体比(VSI,%)=100 $\times$ 内脏重/全鱼体质量。

实验数据以平均数 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SE)表示,所有数据用SPSS 16.0 软件进行单因子方差分析

(One-Way ANOVY), Duncan氏多重比较检验差异的显著性,显著性水平 $P<0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 饲料中添加不同剂量TBHQ对大菱鲆生长性能的影响

与对照组相比,饲料中添加450和750 mg/kg的TBHQ对大菱鲆的增重率、特定生长率均产生显著性的抑制作用( $P<0.05$ )(表2);而添加150 mg/kg的TBHQ对大菱鲆的增重率及特定生长率没有产生显

表 2 饲料中添加不同剂量TBHQ对大菱鲆生长性能的影响

Tab. 2 Effects of dietary TBHQ level on growth performance of turbot

指标 index	饲料 diets			
	D1	D2	D3	D4
死亡率/% death rate	4.44 $\pm$ 1.11	4.44 $\pm$ 1.4	8.33 $\pm$ 2.06	6.66 $\pm$ 2.43
增重率/% WGR	390.91 $\pm$ 11.17 <sup>a</sup>	409.19 $\pm$ 14.47 <sup>a</sup>	335.05 $\pm$ 8.01 <sup>b</sup>	308.89 $\pm$ 13.3 <sup>b</sup>
特定生长率(%/d) SGR	1.86 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	1.91 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	1.68 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	1.59 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
摄食率(%/d) FI	1.44 $\pm$ 0.05	1.43 $\pm$ 0.04	1.44 $\pm$ 0.07	1.38 $\pm$ 0.09
饲料系数 FCR	0.91 $\pm$ 0.05	0.9 $\pm$ 0.01	0.96 $\pm$ 0.06	0.95 $\pm$ 0.04

注:表格中同行肩标相同小写字母或无字母表示差异不显著( $P>0.05$ ),不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同

Notes: In the same row, values with same small letter superscripts or no letter superscripts mean no significant differences ( $P>0.05$ ), different small letter superscripts mean significant differences ( $P<0.05$ ). The same below

著性的影响( $P>0.05$ );各处理组大菱鲆的死亡率、饲料系数和摄食率无显著性差异( $P>0.05$ )。

形体指标结果显示,750 mg/kg TBHQ添加组大菱鲆的脏体比显著高于对照组( $P<0.05$ ),而与其他处理组之间没有显著性差异( $P>0.05$ )。各处理组肥满度和肝体比差异不显著( $P>0.05$ )(表3)。

鱼体组分方面,与对照组相比,750 mg/kg TBHQ添加组鱼体中的水分含量升高,而脂肪含

量显著降低( $P<0.05$ );750 mg/kg TBHQ添加组鱼体中的灰分含量显著高于其他组( $P<0.05$ )。各实验组鱼体蛋白质含量差异不显著( $P>0.05$ )(表4)。

### 2.2 饲料中添加不同剂量TBHQ对大菱鲆血清生理生化指标的影响

450 mg/kg TBHQ添加组实验鱼血清碱性磷酸酶活力和球蛋白含量显著高于150 mg/kg TBHQ

表 3 饲料中添加不同剂量TBHQ对大菱鲆形体指标的影响

Tab. 3 Effects of dietary TBHQ level on physical indicators of turbot

指标 index	饲料 diets			
	D1	D2	D3	D4
肥满度 CF	1.72 $\pm$ 0.04	1.81 $\pm$ 0.06	1.78 $\pm$ 0.04	1.82 $\pm$ 0.04
肝体比 HSI	1.25 $\pm$ 0.05	1.30 $\pm$ 0.06	1.31 $\pm$ 0.06	1.26 $\pm$ 0.03
脏体比 VSI	5.63 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	5.91 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	5.80 $\pm$ 0.13 <sup>ab</sup>	6.02 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>

表 4 饲料中添加不同剂量TBHQ对大菱鲆体成分组成的影响(干物质)

Tab. 4 Effects of dietary TBHQ level on body composition of turbot (dry matter)

指标 index	饲料 diets			
	D1	D2	D3	D4
水分 moisture	78.15 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	78.66 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	78.79 $\pm$ 0.39 <sup>ab</sup>	79.18 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>
灰分 ash	19.25 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	19.74 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	19.32 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	20.32 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
脂肪 crude lipid	8.17 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	7.86 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	7.81 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	6.09 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
蛋白质 crude protein	69.33 $\pm$ 0.21	69.56 $\pm$ 0.17	69.25 $\pm$ 0.15	69.30 $\pm$ 0.32

添加组( $P<0.05$ ), 但与其他组间无显著性差异( $P>0.05$ ); 150 mg/kg TBHQ添加组实验鱼血清白蛋白和高密度脂蛋白含量显著低于对照组和450 mg/kg添加组( $P<0.05$ ), 但与750 mg/kg组无显著性差异( $P>0.05$ ); 450 mg/kg TBHQ添加组鱼的血清

肌酐含量显著高于对照组( $P<0.05$ ), 但与其他组无显著性差异( $P>0.05$ ); 150 mg/kg TBHQ添加组鱼的血清总蛋白含量显著低于对照组( $P<0.05$ ), 但与其他组无显著性差异( $P>0.05$ ); TBHQ对血清其他指标无显著性影响( $P>0.05$ )(表5)。

表 5 饲料中添加不同剂量TBHQ对大菱鲆血清生理生化指标的影响

Tab. 5 Effects of dietary TBHQ level on blood physiological and biochemical indexes of turbot

指标 index	饲料 diets			
	D1	D2	D3	D4
谷氨酸氨基转移酶/(U/L) ALT	19.17±2.43	19.00±3.53	26.50±8.44	15.67±2.82
天门冬氨酸基转移酶/(U/L) AST	43.33±7.33	44.67±9.30	68.67±27.01	35.00±9.50
谷氨酸氨基转移酶/天门冬氨酸基转移酶 ALT/AST	0.46±0.02	0.45±0.03	0.42±0.02	0.51±0.05
碱性磷酸酶/(U/L) ALP	13.17±1.01 <sup>ab</sup>	10.33±1.31 <sup>a</sup>	14.33±1.15 <sup>b</sup>	13.33±1.45 <sup>ab</sup>
总蛋白/(g/L) TP	38.22±1.57 <sup>a</sup>	32.38±1.37 <sup>b</sup>	38.62±1.52 <sup>ab</sup>	34.55±1.32 <sup>ab</sup>
白蛋白/(g/L) ALB	6.67±0.20 <sup>a</sup>	5.67±0.32 <sup>b</sup>	6.63±0.16 <sup>a</sup>	6.26±0.20 <sup>ab</sup>
球蛋白/(g/L) GLB	31.55±1.37 <sup>ab</sup>	26.81±1.99 <sup>a</sup>	30.03±0.73 <sup>b</sup>	29.53±0.91 <sup>a</sup>
白蛋白/球蛋白ALB/ GLB	0.21±0.00	0.21±0.00	0.22±0.00	0.21±0.00
尿素氮/(mmol/L) BUN	3.74±0.40	3.68±0.28	3.62±0.51	3.90±0.32
肌酐/(umol/L) CRE	32.83±0.87 <sup>a</sup>	33.50±1.84 <sup>ab</sup>	37.50±1.38 <sup>b</sup>	36.00±0.82 <sup>ab</sup>
尿素氮/肌酐 BUN/CRE	0.11±0.02	0.11±0.01	0.13±0.01	0.11±0.01
血糖/(mmol/L) GLU	1.03±0.11	0.94±0.16	1.35±0.18	1.28±0.24
总胆红素/(umol/L) TBILI	1.03±0.11	0.92±0.25	0.92±0.23	1.01±0.82
甘油三酯/(mmol/L) TG	3.86±0.71	2.55±0.46	3.25±0.28	3.01±0.11
高密度脂蛋白/(mmol/L) HDL	2.43±0.15 <sup>a</sup>	1.86±0.16 <sup>b</sup>	2.37±0.13 <sup>a</sup>	2.03±0.17 <sup>ab</sup>

### 2.3 饲料中添加不同剂量TBHQ对大菱鲆非特异性免疫反应的影响

与对照组相比, 饲料中TBHQ添加量为450和750 mg/kg时, 血清CAT和溶菌酶活力显著升高( $P<0.05$ ), 而150 mg/kg组无显著变化; 血清SOD活力在TBHQ添加量为750 mg/kg时显著降低( $P<0.05$ ); 头肾吞噬细胞呼吸爆发活力在TBHQ添加量为750 mg/kg时显著升高( $P<0.05$ ); 饲料中TBHQ添加量对GSH-Px活力影响不显著( $P>0.05$ )(表6)。

### 2.4 饲料中添加不同剂量TBHQ对大菱鲆肠道组织的影响

对中肠肠道形态计量统计分析结果显示: 与对照组相比, 饲料中添加450和750 mg/kg TBHQ能够显著降低中肠肠道绒毛长度与肠道直径比( $P<$

0.05), 而150 mg/kg组无显著变化(表7); 添加750 mg/kg TBHQ时, 中肠肠道微绒毛长度与肠道直径的比值显著低于对照组和150 mg/kg组( $P<0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 TBHQ对大菱鲆生长的影响

因抗氧化剂种类、实验动物的不同, 抗氧化剂对动物生长会有不同影响。已有研究证实, 在饲料中添加适量的抗氧化剂可以促进动物的生长, 并能提高摄食率、饲料转化率和消化率<sup>[46, 18-20]</sup>。Bohne等<sup>[21]</sup>通过对大西洋鲑(*Salmo salar*)的研究, 表明EQ对动物生长并没有明显影响, 但当饲料中添加过量的抗氧化剂时, 不仅会造成鱼体的生长水平下降, 甚至会对鱼体产生负面的影响<sup>[7, 22-23]</sup>。

表6 饲料中添加不同剂量TBHQ对大菱鲆非特异性免疫反应的影响

Tab. 6 Effects of dietary TBHQ level on nonspecific immune indexes of turbot

指标 index	饲料 diets			
	D1	D2	D3	D4
过氧化氢酶/(U/mL) CAT	13.31±4.00 <sup>a</sup>	13.49±1.30 <sup>a</sup>	16.22±0.94 <sup>b</sup>	17.55±0.81 <sup>b</sup>
超氧化物歧化酶/(U/mL) SOD	1.80±0.07 <sup>a</sup>	1.87±0.07 <sup>a</sup>	1.82±0.06 <sup>a</sup>	1.66±0.11 <sup>b</sup>
谷胱甘肽过氧化物酶/(U/mL) GSH-Px	9.43±0.43	9.35±0.32	8.80±0.78	9.57±0.51
溶菌酶/(U/mL) LZM	1.91±0.41 <sup>a</sup>	1.84±0.24 <sup>a</sup>	2.70±0.15 <sup>b</sup>	2.58±0.24 <sup>b</sup>
吞噬细胞呼吸爆发/(OD/10 <sup>5</sup> cell) phagocyte respiratory burst	0.20±0.03 <sup>a</sup>	0.22±0.02 <sup>a</sup>	0.22±0.01 <sup>a</sup>	0.28±0.03 <sup>b</sup>

表7 饲料中添加不同剂量TBHQ对大菱鲆中肠肠道形态计量的影响

Tab. 7 Effects of dietary TBHQ level on mid-intestinal morphology of turbot

指标 index	饲料 diets				%
	D1	D2	D3	D4	
肠道绒毛长度/直径 intestinal villi length/diameter	4.89±0.29 <sup>a</sup>	4.51±0.33 <sup>ab</sup>	3.67±0.31 <sup>b</sup>	3.59±0.38 <sup>b</sup>	
肌层厚度/直径 muscular layer thickness/diameter	26.25±2.33	25.45±1.36	26.93±1.28	24.78±3.17	
微绒毛长度/直径 microvillus length/diameter	0.50±0.02 <sup>a</sup>	0.51±0.03 <sup>a</sup>	0.49±0.02 <sup>ab</sup>	0.46±0.01 <sup>b</sup>	

到目前为止,有关饲料中添加TBHQ对水产动物生长性能的研究还没有报道。本实验中,各处理组大菱鲆的死亡率差异不明显。与对照组相比,饲料中TBHQ添加量为450和750 mg/kg时显著抑制了大菱鲆幼鱼生长,而饲料中TBHQ添加量为150 mg/kg时对大菱鲆的生长指标没有显著影响。饲料中TBHQ过量添加(450和750 mg/kg)对大菱鲆的生长产生了抑制作用,说明高剂量的TBHQ具有一定的毒性,会对大菱鲆产生负面的影响。与特定生长率不同,饲料中添加不同剂量的TBHQ对大菱鲆的饲料系数和摄食率均无显著影响,说明TBHQ并不是通过影响大菱鲆的摄食率和饲料转化率来影响生长水平的,TBHQ对水产动物生长性能的影响机制还有待于进一步研究。

肝体比、脏体比和肥满度等的变化,可以在一定程度上反映动物所承受的某种生理压力。在本实验的实验周期内,高剂量TBHQ组大菱鲆幼鱼的脏体比显著升高,而肝体比和肥满度无显著性变化,说明高剂量的TBHQ可能导致大菱鲆肝脏外的某种组织器官的增大,但具体是何种器官还有待于进一步研究。

### 3.2 TBHQ对大菱鲆血液生理生化及肠道生理结构的影响

当鱼类受到环境因子胁迫时,在一定程度

上会刺激并激活鱼类的免疫系统,表现为机体组织抗氧化酶活性的升高。本实验中,饲料中添加450和750 mg/kg TBHQ能够显著升高血清过氧化氢酶和溶菌酶活力,说明添加450 mg/kg以上剂量的TBHQ会对机体造成胁迫,产生过量的氧自由基,机体为清除氧自由基,抗氧化酶的活力有所升高。与对照组相比,在添加750 mg/kg TBHQ时头肾吞噬细胞呼吸爆发活力显著升高。头肾巨噬细胞是鱼体最重要的吞噬细胞,呼吸爆发活力反映的是机体抗感染能力的强弱<sup>[24]</sup>,此时活力的升高可能与鱼体因胁迫而感染所致。血清SOD活力在饲料中添加750 mg/kg TBHQ时显著降低,这可能是由于鱼体摄入的TBHQ进一步增大,对鱼体组织器官造成了损伤,机体的抗氧化能力不能被有效激活甚至被抑制。

肠道是鱼类消化吸收的主要场所,微绒毛长度和黏膜厚度增加能够扩大肠道的表面积,促进肠对营养物质的消化吸收,是肠道发育成熟的重要指标<sup>[25]</sup>。本实验中,添加750 mg/kg的TBHQ时中肠肠道绒毛和微绒毛显著缩短,肠道吸收面积下降,这会导致鱼体对饲料的消化吸收能力降低,这可能是造成该处理组中鱼体生长水平下降的一个重要原因。

### 3.3 TBHQ的安全性评价

饲料的安全性是指某种饲料在规定的处理、使用方式和用量条件下,其所含的某种有毒有害物质对动物机体不致于产生任何损害,即不引起急性、慢性中毒,亦不致对摄入该饲料的动物及其后代产生潜在危害。为了确定饲料中含有的TBHQ对动物机体是否安全无毒,必须进行各项安全性评价。目前,对于TBHQ的毒理学评价结论仍存在很大争议,而关于TBHQ对水产动物的安全性评价的影响的研究几乎为空白。代谢饲养实验表明:单胃动物和人对TBHQ均有相当强的吸收作用,并能通过胃肠道的消化代谢将其迅速排泄,TBHQ在动物体内主要以O-硫酸盐、O-葡萄糖醛酸和未分解的TBHQ的形式从尿中排出<sup>[26]</sup>。

饲料中添加抗氧化剂的主要目的是减少饲料氧化所产生的有害物质对养殖动物的影响,目前的研究结果表明,以不对养殖动物产生不良影响为原则,在饲料中适量添加抗氧化剂是一种合理的行为,因此,对抗氧化剂最适添加量的研究则成为目前研究的热点问题。本研究则以大菱鲆幼鱼为实验材料,对TBHQ进行了12周的耐受性实验。结果显示,饲料中添加过高剂量的TBHQ(450或750 mg/kg)能够对大菱鲆生长产生显著的抑制作用,而一些血清非特异性免疫反应和抗氧化酶指标随着TBHQ添加剂量的增大也有所增强,但是饲料中添加150 mg/kg的TBHQ对鱼体的生长、多数血清生理生化指标、非特异性免疫指标及肠道组织结构均无显著性的影响。

综上所述,在本实验条件下,在大菱鲆饲料中添加不高于150 mg/kg的TBHQ,不会对大菱鲆的生长及生理指标造成显著影响。本研究结果可以为TBHQ作为大菱鲆饲料添加剂使用标准的制定提供一定的理论依据,对水产饲料配方具有重要价值。

感谢中国海洋大学农业部水产动物营养与饲料重点实验室和海水养殖教育部重点实验室全体同仁的热心帮助。

#### 参考文献:

[1] Weil J T, vander Veen J, Olcott H S. Stable nitroxides as

lipid antioxidants[J]. Nature, 1968, 219(5150): 168-169.

- [2] Thorisson S, Gunstone F D, Hardy R. The antioxidant properties of ethoxyquin and of some of its oxidation products in fish oil and meal[J]. Journal of the American oil Chemists Society, 1992, 69(8): 806-809.
- [3] World Health Organization. Pesticide residues in food, Part II: Toxicological evaluations[M]//Joint meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group. Rome: WHO, 1998.
- [4] Krumsiek C L. Agrado™ for finishing cattle: effects on performance, carcass measurements & meat quality[D]. Oklahoma: Oklahoma State University, 1998.
- [5] McBride K W. Influence of dietary ethoxyquin on Performance, health status, antioxidant capacity, and ammonia emissions from manure of feedlot steers[D]. Canyon: West Texas A&M University, 2000.
- [6] Kestemont P, Vandeloise E, Mélard C, et al. Growth and nutritional status of Eurasian perch *Perca fluviatilis* fed graded levels of dietary lipids with or without added ethoxyquin[J]. Aquaculture, 2001, 203(1-2): 85-99.
- [7] Saxena T B, Zachariassen K E, Jørgensen L. Effects of ethoxyquin on the blood composition of turbot, *Scophthalmus maximus* L[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 2000, 127(1): 1-9.
- [8] Laohabanjong R, Tantikitti C, Benjakul S, et al. Lipid oxidation in Fish meal stored under different conditions on growth, feed efficiency and hepatopancreatic cells of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)[J]. Aquaculture, 2009, 286(3-4): 283-289.
- [9] Okubo T, Yokoyama Y, Kano K, et al. Cell death induced by the phenolic antioxidant *tert*-butylhydroquinone and its metabolite *tert*-butylquinone in human monocytic leukemia U937 cells[J]. Food and Chemical Toxicology, 2003, 41(5): 679-688.
- [10] Hao P P, Ni J R, Sun W L, et al. Determination of tertiary butylhydroquinone in edible vegetable oil by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2007, 105(4): 1732-1737.
- [11] Rodil R, Quintana J B, Basaglia G, et al. Determination of synthetic phenolic antioxidants and their metabolites in water samples by downscaled solid-phase extraction, silylation and gas chromatography-mass spectrometry[J].

- Journal of Chromatography A, 2010, 1217(41): 6428-6435.
- [12] Ding M Z, Zou J K. Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edible oils[J]. Food Chemistry, 2012, 131(3): 1051-1055.
- [13] 高蓝, 李浩明, 王丽, 等. 几种抗氧化剂对鳃鱼油的抗氧化作用的研究[J]. 中国食品添加剂, 1999(2): 22-25.  
Gao L, Li H M, Wang L, *et al.* Effects of several antioxidants on anchovy oil[J]. China Food Additives, 1999(2): 22-25 (in Chinese).
- [14] 王海, 王放. 新型抗氧化剂 TBHQ 对棕榈油稳定性的研究[J]. 食品工业, 1996(5): 17-19.  
Wang H, Wang F. Experiment and research of steadiness about new type antioxidant-TBHQ stabilizer for the palm oil[J]. The Food Industry, 1996(5): 17-19 (in Chinese).
- [15] 余杰, 陈美珍, 余钢哲, 等. 特丁基对苯二酚对鱼油抗氧化作用的研究[J]. 广州食品工业科技, 1994(2): 43-46.  
Yu J, Chen M J, Yu G Z, *et al.* Experiment and research of TBHQ on antioxidation ability for the fish oil[J]. Guangzhou Food Science and Technology, 1994(2): 43-46 (in Chinese).
- [16] Ellis A E. Lysozyme assays[M]//van Muiswinkel W B. Techniques in Fish Immunology. Fair Haven, NJ: SOS Publications, 1990: 101-103.
- [17] Secombes C J. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity[M]//Stolen J S, Fletcher T C, Anderson D P, *et al.* Techniques in Fish Immunology III. Fair Haven, NJ: SOS Publications, 1990: 137.
- [18] Dibner J J, Atwell C A, Kitchell M L, *et al.* Feeding of oxidized fats to broilers and swine: effects on enterocyte turnover, hepatocyte proliferation and the gut associated lymphoid tissue[J]. Animal Feed Science and Technology, 1996, 62(1): 1-13.
- [19] Han H, Hussein H S, Glimp H A, *et al.* Carbohydrate fermentation and nitrogen metabolism of a finishing beef diet by ruminal microbes in continuous cultures as affected by ethoxyquin and (or) supplementation of monensin and tylosin[J]. Journal of Animal Science, 2002, 80(4): 1117-1123.
- [20] Wang J, Ai Q H, Mai K S, *et al.* Effects of dietary ethoxyquin on growth performance and body composition of large yellow croaker *Pseudosciaenacrocea*[J]. Aquaculture, 2010, 306(1-4): 80-84.
- [21] Bohne V J B, Lundebye A K, Hamre K. Accumulation and depuration of the synthetic antioxidant ethoxyquin in the muscle of Atlantic salmon (*Salmosalar L.*) [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(5): 1834-1843.
- [22] Ohshima M, Layug D V, Yokota H O, *et al.* Effect of graded levels of ethoxyquin in alfalfa leaf extracts on carotenoid and cholesterol concentrations in chicks[J]. Animal Feed Science and Technology, 1996, 62(2-4): 141-150.
- [23] Blaszczyk A, Skolimowski J. Apoptosis and cytotoxicity caused by ethoxyquin and two of its salts[J]. Cellular & Molecular Biology Letters, 2005, 10(1): 15-21.
- [24] 刘小玲, 葛海燕, 田珍, 等. 皮质醇对黄颡鱼头肾巨噬细胞呼吸爆发活动的影响[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(6): 749-754.  
Liu X L, Ge H Y, Tian Z, *et al.* Effects of Cortisol on Respiratory Burst of Head Kidney Macrophages in *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2008, 27(6): 749-754 (in Chinese).
- [25] Uda K, Tsujikawa T, Fujiyama Y, *et al.* Rapid absorption of luminal polyamines in a rat small intestine *ex vivo* model[J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2003, 18(5): 554-559.
- [26] 黄涛, 陈喜斌, 王全利. 饲料抗氧化剂TBHQ的安全性研究[J]. 饲料研究, 2003(7): 10-12.  
Huang T, Chen X B, Wang Q L. The security research of antioxidant TBHQ in feed[J]. Feed Research, 2003(7): 10-12 (in Chinese).



## Effects of dietary tert-butylhydroquinone on growth performance, blood biochemical parameter, non-specific immunity and intestinal tissue structure of turbot (*Scophthalmus maximus*)

QI Hua, LI Zebang, LI Fengyu, WANG Yuyu, MAI Kangsen, XU Wei, AI Qinghui\*

(Key Laboratory of Aquaculture Nutrition and Feed, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** A feeding trial was conducted to evaluate the effects of dietary tert-butylhydroquinone (TBHQ) on growth performance, blood biochemical parameter, non-specific immunity and intestinal tissue structure of turbot (*Scophthalmus maximus*). Four isonitrogenous and isoenergetic diets were formulated to contain graded levels (0, 150, 450 and 750 mg/kg) of TBHQ. Fish [initial average weight (8.31±0.04) g] were randomly allocated to 24 tanks, and each tank was stocked with 30 fish. Fish were fed twice daily to apparent satiation for 12 weeks. The results indicated that fish fed the diets containing 450 and 750 mg/kg TBHQ had significantly lower weight gain ratio and specific growth rate than that of fish fed the basal diet (the control group). Fish fed the diet containing 450 mg/kg TBHQ had significantly higher activity of serum alkaline phosphatase than that of fish fed the diet containing 150 mg/kg TBHQ. Fish fed the diet containing 150 mg/kg TBHQ had significantly lower albumin and high density lipoprotein content than that of fish fed the basal diet and the diet containing 450 mg/kg TBHQ; fish fed the diet containing 450 mg/kg TBHQ had significantly higher serum creatinine content than that of fish fed the basal diet; fish fed the diet containing 150 mg/kg TBHQ had significantly lower serum total protein content than that of fish fed the basal diet. Fish fed the diets containing 450 and 750 mg/kg TBHQ had significantly higher activity of serum CAT, lysozyme activity, and fish fed the diet containing 750 mg/kg TBHQ had significantly higher respiratory burst activity of renal phagocytes. Fish fed the diet containing 750 mg/kg TBHQ had significantly lower serum SOD activity. Fish fed the diets containing 450 and 750 mg/kg TBHQ had significantly lower ratio of intestinal villus length to bowel diameter than that of fish fed the basal diet, and fish fed diet containing 750 mg/kg TBHQ had significantly lower ratio of microvillus length to bowel diameter than that of fish fed the basal diet. In conclusion, the results of the present study indicated that 150 mg/kg TBHQ in diets of juvenile turbot had no significant effects on weight gain, physiological or biochemical indexes, while fish fed diet with more TBHQ (>450mg/kg) had negative effects on the growth and physiological status.

**Key words:** *Scophthalmus maximus*; tert-butylhydroquinone; growth; blood biochemical parameter; non-specific immunity; intestinal tissue structure

**Corresponding author:** AI Qinghui. E-mail: qhai@ouc.edu.cn

**Funding projects:** Ministry of Agriculture Feed Quality and Safety Supervision Project