

文章编号: 1000-0615(2019)10-2256-12

DOI: 10.11964/jfc.20190811930

肌醇对嗜水气单胞菌致生长长期草鱼头肾和脾脏氧化损伤的保护作用

胡凯^{1,2}, 李双安¹, 冯琳^{1,3,4}, 姜维丹^{1,3,4}, 吴培^{1,3,4}, 刘杨^{1,3,4},
姜俊^{1,3,4}, 邝声耀⁵, 唐凌⁵, 周小秋^{1,3,4*}

- (1. 四川农业大学, 动物营养研究所, 四川成都 611130;
2. 成都农业科技职业学院畜牧兽医分院, 四川成都 611130;
3. 鱼四川农业大学, 类营养与安全生产四川省高校重点实验室, 四川成都 611130;
4. 四川农业大学, 动物抗病营养教育部重点实验室, 四川成都 611130;
5. 四川省畜牧科学研究院动物营养研究所, 四川成都 610099)

摘要: 本实验探索了肌醇对嗜水气单胞菌致生长长期草鱼头肾和脾脏氧化损伤的保护作用。实验选取平均体质量(221.83±0.84) g的草鱼540尾, 随机分为6组, 每组3个重复, 分别饲喂含不同水平肌醇[27.0(基础饲料组, 未添加肌醇)、137.9、286.8、438.6、587.7和737.3 mg/kg]的饲料10周。随后经腹腔注射嗜水气单胞菌进行14 d攻毒实验。结果显示, 嗜水气单胞菌注射后, 与基础饲料(未添加肌醇)组相比, 饲料中适宜水平肌醇组生长长期草鱼头肾和脾脏活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)和蛋白质羰基(PC)含量显著降低, 而超氧化物歧化酶(SOD/CuZn-SOD和MnSOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx/GPx1a、GPx1b、GPx4a和GPx4b)、谷胱甘肽S-转移酶(GST/GSTP1、GSTP2、GSTO1和GSTO2)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性及mRNA水平, 谷胱甘肽(GSH)含量显著提高。此外, 饲料中适宜水平肌醇上调了嗜水气单胞菌注射后生长长期草鱼头肾和脾脏核因子E2相关因子2(Nrf2)mRNA和蛋白水平, 下调了Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)a和b mRNA水平。研究表明, 饲料中适宜水平肌醇可激活鱼类头肾和脾脏Nrf2信号途径, 提高其抗氧化能力, 增强抵抗嗜水气单胞菌致头肾和脾脏氧化损伤的能力。此外, 以嗜水气单胞菌注射后生长长期草鱼头肾和脾脏ROS含量为标识, 生长长期草鱼肌醇需要量分别为452.1和449.0 mg/kg。

关键词: 草鱼; 肌醇; 头肾; 脾脏; 抗氧化酶; 核因子E2相关因子2

中图分类号: S 963

文献标志码: A

鱼类的健康生长是为人类提供绿色、安全、优质动物蛋白的首要前提之一^[1]。一般而言, 鱼类免疫防御系统的结构完整性和功能正常是鱼类健康生长的重要保障^[2]。头肾和脾脏是鱼类免疫防疫系统的重要组成, 在鱼类免疫防疫中发挥着关键作用^[3]。然而, 当鱼类遭受病原微生物

入侵时, 会导致鱼类免疫器官的损伤^[4]。致病性嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是对养殖鱼类危害较大的致病菌^[5]。蒋自立等^[6]研究表明, 致病性嗜水气单胞菌引起草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)幼鱼的肾脏和脾脏出血与组织结构损伤。嗜水气单胞菌对鱼类组织器官结构的破坏作用

收稿日期: 2019-08-31 修回日期: 2019-09-27

资助项目: 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-45); 农业科研杰出人才及其创新团队; 四川省青年科技创新团队(2017TD0002); 国家自然科学基金(31972810)

通信作者: 周小秋, E-mail: zhouxq@sicau.edu.cn

可能部分与其导致组织器官的氧化损伤有关^[7]。明建华等^[8]研究表明,嗜水气单胞菌引起团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)肝脏丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量增加,导致肝脏脂质的氧化损伤。另一方面,鱼类头肾和脾脏等免疫器官在抵御病原微生物过程中,自身会产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)以协助病原微生物的清除^[9]。但是,过量的ROS可导致脂类、蛋白质及核酸等细胞结构的氧化损伤和功能的破坏^[10]。因此,在病原微生物入侵时,鱼类头肾和脾脏等免疫器官可能易受到氧化损伤而导致结构完整性和功能受损。

通过向饲料中添加具有抗氧化功能的营养物质增强鱼类免疫器官的抗氧化能力,保障其结构与功能正常是非常绿色和安全的营养调控技术措施^[9]。肌醇(myo-inositol, MI)是一类重要的类维生素,常应用在水生动物饲料中^[11]。研究表明,饲料中添加适宜水平的肌醇能够促进建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)幼鱼^[12]、草鱼^[13]、奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*×*Oreochromis aureus*)幼鱼^[11]、银鲫(*Carassius auratus gibelio*)幼鱼^[14]等水生动物的生长。研究表明,肌醇对建鲤幼鱼的促生长作用可能与其提高鱼类机体及肠道抗氧化能力有关。草鱼是我国重要的淡水养殖经济鱼类,同时也是致病性嗜水气单胞菌易感鱼类之一^[5,15]。然而,肌醇是否能够通过提高草鱼头肾和脾脏的抗氧化能力,防止嗜水气单胞菌引起的头肾和脾脏氧化损伤还不清楚,需要进行研究。

本实验通过考察不同肌醇水平对嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏的ROS含量、脂质过氧化、蛋白质氧化、抗氧化酶活性、抗氧化酶(含部分抗氧化酶亚型)及核因子E2相关因子2(NF-E2-related factor2, Nrf2)等抗氧化相关信号分子mRNA表达、Nrf2蛋白表达的影响,探索肌醇对嗜水气单胞菌致草鱼头肾和脾脏氧化损伤的保护作用及其作用方式,以期对草鱼健康养殖提供部分理论依据和营养调控技术措施。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

本实验与前期研究共用同一个动物实验^[13]。实验饲料的设计、配制同本实验室前期研究^[13],

即以鱼粉、酪蛋白和明胶为主要蛋白源配成基础饲料,并分别向基础饲料中添加0、150.0、300.0、450.0、600.0和750.0 mg/kg肌醇。根据Clements等^[16]的方法,测得6组实验饲料中肌醇含量分别为27.0(未添加)、137.9、286.8、438.6、587.7和737.3 mg/kg。基础饲料组成及营养水平见表1。

1.2 饲养管理

实验在四川农业大学动物营养研究所水生动物营养研究基地进行。草鱼购回经4周驯养后,参照Zhou等^[20]描述的方法进行肌醇耗竭实验,即饲喂未添加肌醇的基础饲料2周。随后,选择初始体质量为(221.83±0.84)g的健康中期草鱼540尾,随机分至18个网箱,每个网箱30尾,分别饲喂不同肌醇含量的实验饲料,进行10周的生长实验。饲养管理参照本实验室前期研究建立的管理模式进行^[17],即每天定点投喂4次,实验期间水温和pH分别维持在(27±2)°C和7.2±0.4,养殖水体溶解氧>6 mg/L。生长实验结束后,每个处理选取接近处理均重的鱼15尾,每尾鱼腹腔注射浓度 2.5×10^9 CFU/mL的嗜水气单胞菌1.0 mL,攻毒实验为期14 d,同Li等^[21]。该病原菌注射剂量和时间根据前期研究^[22]确定,能引起生长期草鱼发病但不导致其死亡^[21]。攻毒实验期间,饲料、实验条件及饲养管理同生长实验。

1.3 样品采集

攻毒实验结束后,参照本实验室前期建立的方法进行样品采集^[13]。每组随机选择12尾生长中期的草鱼,进行称重、体长测量,采血后迅速分离头肾和脾脏并称重,随后再用液氮迅速冷冻后置于超低温冰箱(-80 °C)中保存待测。

1.4 生化指标测定

ROS、MDA、蛋白质羰基(PC)和谷胱甘肽(GSH)含量,铜锌超氧化物歧化酶(CuZn-SOD)、锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)和谷胱甘肽还原酶(GR)活性的测定均参照Li等^[13]描述的方法进行。

1.5 基因表达测定

头肾和脾脏总RNA提取、RNA反转录、荧光定量PCR测定均参照Li等^[13]描述的方法进行。

表1 基础饲料配方

项目 items	含量/% content
原料 ingredients	
鱼粉 fish meal	10.97
酪蛋白 casein	20.39
明胶 gelatin	6.10
DL-蛋氨酸(99%) DL-Met	0.24
L-色氨酸(99%) L-Trp	0.06
鱼油 fish oil	2.37
大豆油 soybean oil	1.81
α -淀粉 α -starch	24.00
玉米淀粉 corn starch	22.65
纤维素 cellulose	5.00
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.36
维生素预混料 ¹ vitamin premix	1.00
矿物元素预混料 ² mineral premix	2.00
乙氧基喹啉(30%) ethoxyquin	0.05
氯化胆碱(50%) choline chloride	1.00
肌醇预混料 ³ myo-inositol premix	1.00
主要营养指标 nutrients content	
粗蛋白 ⁴ crude protein	30.73
粗脂肪 ⁴ crude lipid	5.18
n-3 ⁵	1.04
n-6 ⁵	0.96
有效磷 ⁶ available phosphorus	0.40

注: ¹维生素预混料(g/kg)包含维生素A醋酸酯(500 000 IU/g), 2.10; 维生素D₃(500 000 IU/g), 0.40; DL- α -生育酚醋酸酯(50%), 12.58; 维生素K(22.9%), 0.83; 维生素B₁₂(1%), 0.94; D生物素(2%), 0.75; 叶酸(95%), 0.42; 硝酸硫铵(98%), 0.09; 维生素C醋酸酯(95%), 4.31; 烟酸(99%), 4.04; D-泛酸钙(98%), 3.85; 核黄素(80%), 0.73; 维生素B₆(98%), 0.62; 其余部分用玉米淀粉补足至1 kg。 ²矿物元素预混料(g/kg)包含MnSO₄·H₂O(31.8% Mn), 2.659 0; MgSO₄·H₂O(15.0% Mg), 200.000 0; FeSO₄·H₂O(30.0% Fe), 12.250 0; ZnSO₄·H₂O(34.5% Zn), 8.246 0; CuSO₄·5H₂O(25.0% Cu), 0.956 0; KI(76.9% I), 0.065 0; Na₂SeO₃(44.7% Se), 0.016 8; 其余部分用玉米淀粉补足至1 kg。 ³肌醇预混料: 预混料加入相应水平的肌醇, 调整肌醇的含量使其与设计值一致。 ⁴粗蛋白和粗脂肪为实测值。 ⁵n-3和n-6参照Zeng等^[17]与NRC^[18]计算所得。 ⁶有效磷含量参照Wen等^[19]与NRC^[18]计算所得

Notes: ¹ per kilogram of vitamin premix (g/kg): retinyl acetate (500 000 IU/g), 2.10; cholecalciferol (500 000 IU/g), 0.40; D, L- α -tocopherol acetate (50%), 12.58; menadione (22.9%), 0.83; cyanocobalamin (1%), 0.94; D-biotin (2%), 0.75; folic acid (95%), 0.42; thiamine nitrate (98%), 0.09; ascorhyl acetate (95%), 4.31; niacin (99%), 4.04; calcium-D-pantothenate (98%), 3.85; riboflavin (80%), 0.73; pyridoxine hydrochloride (98%), 0.62. All ingredients were diluted with corn starch to 1 kg. ² per kilogram of mineral premix (g/kg): MnSO₄·H₂O (31.8% Mn), 2.659 0; MgSO₄·H₂O (15.0% Mg), 200.000 0; FeSO₄·H₂O (30.0% Fe), 12.250 0; ZnSO₄·H₂O (34.5% Zn), 8.246 0; CuSO₄·5H₂O (25.0% Cu), 0.956 0; KI (76.9% I), 0.065 0 g; Na₂SeO₃ (44.7% Se), 0.016 8. All ingredients were diluted with corn starch to 1 kg. ³ myo-inositol premix: premix was added to obtain graded levels of myo-inositol. ⁴ Crude protein and crude lipid contents were measured value. ⁵ n-3 and n-6 contents were referenced to Zeng, *et al*^[17], and calculated according to NRC^[18]. ⁶ Available phosphorus content was referenced to Wenet *et al*^[19], and calculated according to NRC^[18]

选择 β -actin为内参基因, 引物和扩增条件见表2。基因相对表达量采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法进行计算, 具体方法参照Livak等^[23]。

1.6 蛋白表达测定

采用Western Blot法测定头肾和脾脏细胞核Nrf2蛋白表达。抗体选择(Nrf2和Lamin B)、头肾和脾脏总蛋白提取、SDS-PAGE电泳分离、转膜、封闭、抗体孵育、发光检测与分析均同Li等^[21]描述的方法进行。Lamin B1为内参蛋白。

1.7 数据分析

实验数据用平均值 \pm 标准差表示, 采用SPSS 18.0进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 并结合Duncan氏法对数据进行多重比较, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平。参照Li等^[13]的描述, 用折线分析法确定生长中期草鱼肌醇需要量。

2 结果

2.1 肌醇对嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏氧化损伤及抗氧化能力的影响

嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏ROS、PC及脾脏MDA含量随饲料中肌醇水平的增加而显著降低($P < 0.05$), 且当饲料肌醇水平分别增加到438.6、438.6、438.6、137.9和286.8 mg/kg时, 进一步增加饲料肌醇水平, 差异不显著($P > 0.05$)(表3)。肌醇显著降低嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾MDA含量, 当饲料肌醇水平为587.7 mg/kg时, 达到最低值($P < 0.05$), 且饲料肌醇水平为286.8~737.3 mg/kg时, 各组间差异不显著($P > 0.05$)。

嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾GPx、GST和GR活性, 脾脏CuZn-SOD、MnSOD、CAT、GPx、GST和GR活性以及头肾和脾脏GSH含量随饲料中肌醇水平的增加而显著提高($P < 0.05$), 且当饲料基础水平分别增加到137.9(头肾GPx)、286.8(头肾GST)、286.8(头肾GR)、286.8(脾脏CuZn-SOD)、137.9(脾脏Mn-SOD)、438.6(脾脏CAT)、286.8(脾脏GPx)、286.6(脾脏GST)、438.6(脾脏GR)、286.8(头肾GSH)和286.8(脾脏GSH) mg/kg时, 进一步增加饲料肌醇水平, 差异不显著($P > 0.05$)。肌醇显著提高嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾CuZn-SOD、Mn-SOD和CAT活性, 当饲料肌醇水平分别为438.6、737.3

表 2 实时荧光定量引物序列

Tab. 2 Real-time PCR primer sequences

基因名称 gene name	上游引物序列 primer sequence forward (5'→3')	下游引物序列 primer sequence reverse (5'→3')	温度/°C temperature	登录号 accession no.
<i>CuZn-SOD</i>	CGCACTCAACCCCTTACA	ACTTTCCTCATTGCCTCC	61.5	GU901214
<i>Mn-SOD</i>	ACGACCCAAGTCTCCCTA	ACCCTGTGGTTCCTCCTCC	60.4	GU218534
<i>CAT</i>	GAAGTTCTACACCGATGAGG	CCAGAAATCCCAAACCAT	58.7	FJ560431
<i>GPx1a</i>	GGGCTGGTTATTCTGGGC	AGGCGATGTCATTCCTGTTC	61.5	EU828796
<i>GPx1b</i>	TTTTGTCTTGAAGTATGTCCGTC	GGGTGTTTCATAAAGGGCATT	60.3	KT757315
<i>GPx4a</i>	TACGCTGAGAGAGGTTACACAT	CTTTCCATTGGGTGTGTTCC	60.4	KU255598
<i>GPx4b</i>	CTGGAGAAATACAGGGGTACG	CTCCTGCTTCCGAACTGGT	60.3	KU255599
<i>GSTP1</i>	ACAGTTGCCCAAGTTCCAG	CCTCACAGTCGTTTTTCCCA	59.3	KM112099
<i>GSTP2</i>	TGCCTGAAGATTATGCTGG	GCTGGCTTTTATTTACCCCT	59.3	KP125490
<i>GSTO1</i>	GGTGCTCAATGCCAAGGGAA	CTCAAACGGGTCGGATGGAA	58.4	KT757314
<i>GSTO2</i>	CTGCTCCCATCAGACCCATTT	TCTCCCTTTTCTTGCCATA	61.4	KU245630
<i>GR</i>	GTGTCCAACTTCTCTGTG	ACTCTGGGGTCCAAAACG	59.4	JX854448
<i>Nrf2</i>	CTGGACGAGGAGACTGGA	ATCTGTGGTAGGTGGAAC	62.5	KF733814
<i>Keap1a</i>	TTCCACGCCCTCCTCAA	TGTACCCTCCCGCTATG	63.0	KF811013
<i>Keap1b</i>	TCTGCTGTATGCGGTGGGC	CTCCTCCATTCATCTTTCTCG	57.9	KJ729125
<i>β-actin</i>	GGCTGTGCTGTCCCTGTA	GGGCATAACCCTCGTAGAT	61.4	M25013

和438.6 mg/kg时, 达到最大值, 且饲料肌醇水平分别为286.8~737.3、286.8~737.3和137.9~737.3 mg/kg时, 各组间差异不显著($P>0.05$)(表3)。

2.2 肌醇对嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏抗氧化酶及其相关信号分子基因表达的影响

嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾*GPx1a*、*GSTP2* mRNA水平随饲料中肌醇水平的增加而显著上调($P<0.05$), 且当饲料基础水平分别增加到438.6和286.8 mg/kg时, 进一步增加饲料肌醇水平, 嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾*GPx1a*、*GSTP2* mRNA水平差异不显著($P>0.05$)(图1)。肌醇显著上调嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾*CuZn-SOD*、*Mn-SOD*、*CAT*、*GPx1b*、*GPx4a*、*GPx4b*、*GSTP1*、*GSTO1*、*GSTO2*、*GR*和*Nrf2* mRNA水平, 当饲料肌醇水平分别为438.6、737.3、737.3、587.7、737.3、737.3、587.7、587.7、587.7、587.7、737.3 mg/kg时, 达到最大值($P<0.05$), 且饲料肌醇水平分别为286.8~737.3、286.8~737.3、286.8~737.3、286.8~737.3、438.6~737.3、438.6~737.3、

286.8~737.3、286.8~737.3、286.8~737.3、286.8~737.3、286.8~737.3 mg/kg时, 各组间差异不显著($P>0.05$)。肌醇显著下调嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾*Keap1a*和*Keap1b* mRNA水平($P<0.05$), 当饲料肌醇水平分别为587.7和737.3 mg/kg时达到最低, 且饲料肌醇水平分别为286.8~737.3 mg/kg时, 各组间差异不显著($P>0.05$)。

嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼脾脏*GR*和*Nrf2* mRNA水平随饲料中肌醇水平的增加而显著上调($P<0.05$), 且当饲料肌醇水平分别增加到286.8 mg/kg时, 进一步增加饲料肌醇水平, 嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼脾脏*GR*、*Nrf2* mRNA水平差异不显著($P>0.05$)(图2)。肌醇显著上调嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼脾脏*CuZn-SOD*、*Mn-SOD*、*CAT*、*GPx1a*、*GPx1b*、*GPx4a*、*GPx4b*、*GSTP1*、*GSTP2*、*GSTO1*和*GSTO2* mRNA水平, 当饲料肌醇水平分别为438.6、587.7、587.7、737.3、737.3、737.3、587.7、587.7、737.3、438.6和587.7 mg/kg时, 达到最大值($P<0.05$), 且饲料肌醇水平分别为286.8~737.3、286.8~737.3、286.8~737.3、286.8~737.3、286.8~737.3、438.6~737.3、438.6~737.3、

表3 肌醇对嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏氧化损伤及抗氧化酶活性的影响

Tab. 3 Oxidative and antioxidant status related parameters in head kidney and spleen of on-growing *C. idella* fed diets containing graded levels of *myo*-inositol after infection with *A. hydrophila*

化合物 compound	饲料肌醇水平/(mg/kg) dietary <i>myo</i> -inositol levels					
	27.0	137.9	286.8	438.6	587.7	737.3
头肾 head kidney						
ROS(% DCF fluorescence)	100.00±5.97 ^c	95.03±7.83 ^c	85.15±7.36 ^b	73.27±3.71 ^a	72.74±5.04 ^a	73.86±6.76 ^a
MDA(nmol/mg tissue)	52.56±1.90 ^c	46.74±2.65 ^b	43.27±4.01 ^{ab}	42.75±2.74 ^a	42.56±2.44 ^a	43.52±3.84 ^{ab}
PC/(nmol/mg protein)	2.38±0.24 ^c	1.91±0.16 ^b	1.82±0.17 ^b	1.59±0.13 ^a	1.60±0.12 ^a	1.54±0.15 ^a
CuZn-SOD/(U/mg protein)	4.32±0.36 ^c	5.31±0.49 ^b	5.50±0.35 ^{bc}	6.01±0.59 ^c	5.73±0.27 ^{bc}	5.57±0.49 ^{bc}
Mn-SOD/(U/mg protein)	4.10±0.33 ^a	5.80±0.56 ^b	6.36±0.55 ^{bc}	6.52±0.58 ^c	6.27±0.49 ^{bc}	6.70±0.65 ^c
CAT/(U/mg protein)	0.64±0.05 ^a	0.70±0.06 ^{ab}	0.71±0.06 ^b	0.75±0.04 ^b	0.72±0.05 ^b	0.74±0.07 ^b
GPx/(U/mg protein)	145.25±14.44 ^a	162.96±13.77 ^b	172.76±14.94 ^b	171.50±15.92 ^b	169.75±13.60 ^b	174.56±11.40 ^b
GST/(U/mg protein)	42.15±7.24 ^a	46.55±10.44 ^a	56.75±2.91 ^b	61.26±3.86 ^b	59.04±6.35 ^b	61.08±5.34 ^b
GR/(U/mg protein)	19.47±1.39 ^a	23.22±1.99 ^b	32.33±1.92 ^c	30.63±2.83 ^c	30.73±2.18 ^c	30.48±2.25 ^c
GSH/(mg/g protein)	0.58±0.05 ^a	0.67±0.06 ^a	1.32±0.09 ^b	1.31±0.10 ^b	1.29±0.16 ^b	1.29±0.10 ^b
脾脏 spleen						
ROS(% DCF fluorescence)	100.00±4.77 ^d	79.21±3.82 ^c	65.10±5.75 ^b	34.43±3.07 ^a	33.95±3.69 ^a	37.32±3.64 ^a
MDA(nmol/mg tissue)	54.46±4.22 ^b	51.04±3.20 ^b	45.44±2.78 ^a	45.04±3.20 ^a	46.72±4.77 ^a	46.36±2.88 ^a
PC/(nmol/mg protein)	2.66±0.16 ^b	2.18±0.15 ^a	2.02±0.20 ^a	2.08±0.15 ^a	2.01±0.05 ^a	2.06±0.13 ^a
CuZn-SOD/(U/mg protein)	2.52±0.23 ^a	3.06±0.31 ^b	3.99±0.30 ^c	3.73±0.37 ^c	3.91±0.37 ^c	3.84±0.26 ^c
Mn-SOD/(U/mg protein)	3.37±0.30 ^a	3.81±0.33 ^b	3.95±0.22 ^b	3.80±0.32 ^b	3.95±0.39 ^b	4.09±0.35 ^b
CAT/(U/mg protein)	0.32±0.03 ^a	0.39±0.03 ^b	0.41±0.02 ^b	0.46±0.04 ^c	0.49±0.02 ^c	0.48±0.03 ^c
GPx/(U/mg protein)	113.30±12.16 ^a	133.74±12.11 ^b	161.20±8.63 ^c	153.05±10.64 ^c	150.05±5.04 ^c	159.52±14.70 ^c
GST/(U/mg protein)	61.38±5.80 ^a	71.65±6.32 ^b	81.97±7.56 ^c	88.91±2.49 ^c	89.40±6.70 ^c	85.83±10.23 ^c
GR/(U/mg protein)	14.23±1.37 ^a	22.77±1.76 ^b	30.72±2.37 ^c	35.90±1.78 ^d	35.34±2.69 ^d	35.46±3.45 ^d
GSH/(mg/g protein)	1.00±0.11 ^a	1.57±0.09 ^b	3.13±0.37 ^c	3.11±0.31 ^c	3.19±0.23 ^c	3.27±0.25 ^c

注: 同行肩标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 下同Notes: values with different small letter superscripts are significantly different ($P < 0.05$), the same below

286.8~737.3、286.8~737.3、286.8~737.3、286.8~737.3 mg/kg时, 各组间差异不显著($P > 0.05$)。肌醇显著下调嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼脾脏 *Keap1a* 和 *Keap1b* mRNA 水平($P < 0.05$), 当饲料肌醇水平均为737.3 mg/kg时达到最低, 且饲料肌醇水平均为286.8~737.3 mg/kg时, 各组间差异不显著($P > 0.05$)。

2.3 肌醇对嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏细胞核Nrf2蛋白表达的影响

嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾(图3)

和脾脏(图4)细胞核Nrf2蛋白水平随饲料中肌醇水平的增加而显著上调($P < 0.05$), 且当饲料肌醇水平分别增加到438.6 mg/kg时, 不再随饲料肌醇水平的进一步增加而显著提高($P > 0.05$)。

3 讨论

以往研究表明, 肌醇可提高生长期草鱼采食量和SGR, 降低嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼的肠炎和赤皮病发病率, 促进鱼类健康生长^[13]。本实验是肌醇与生长期草鱼抗病营养系列研究中围绕草鱼肠炎开展营养与免疫相关研究的一

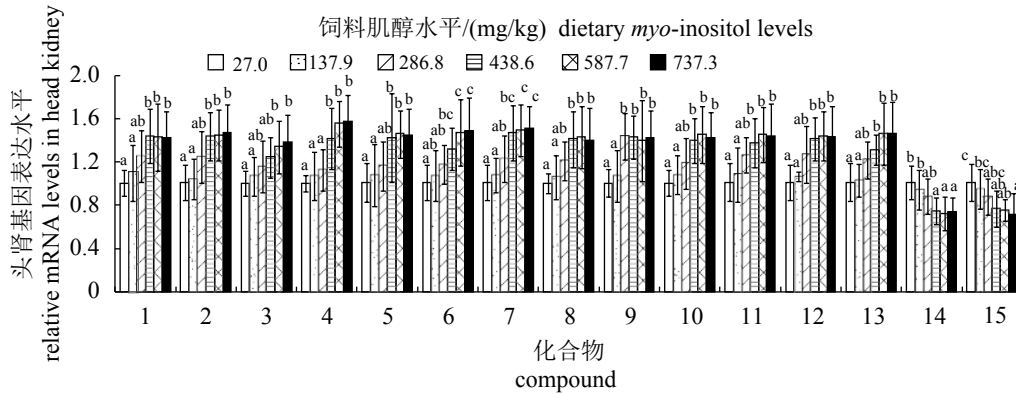


图 1 肌醇对嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾抗氧化酶及Nrf2相关信号分子基因表达的影响

1. 铜锌超氧化物歧化酶, 2. 锰超氧化物歧化酶, 3. 过氧化氢酶, 4. 谷胱甘肽过氧化物酶1a, 5. 谷胱甘肽过氧化物酶1b, 6. 谷胱甘肽过氧化物酶4a, 7. 谷胱甘肽过氧化物酶4b, 8. 谷胱甘肽硫转移酶P1, 9. 谷胱甘肽硫转移酶P2, 10. 谷胱甘肽硫转移酶O1, 11. 谷胱甘肽硫转移酶O2, 12. 谷胱甘肽还原酶, 13. 核因子E2相关因子2, 14. Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1a, 15. Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1b, 下同

Fig. 1 mRNA expression levels of antioxidant enzymes and related signaling molecules in head kidney of on-growing *C. idella* fed diets containing graded levels of myo-inositol after infection with *A. hydrophila*

1. CuZnSOD, 2. MnSOD, 3. CAT, 4. GPx1a, 5. GPx1b, 6. GPx4a, 7. GPx4b, 8. GSTP1, 9. GSTP2, 10. GSTO1, 11. GSTO2, 12. GR, 13. Nrf2, 14. Keap1a, 15. Keap1b, the same below

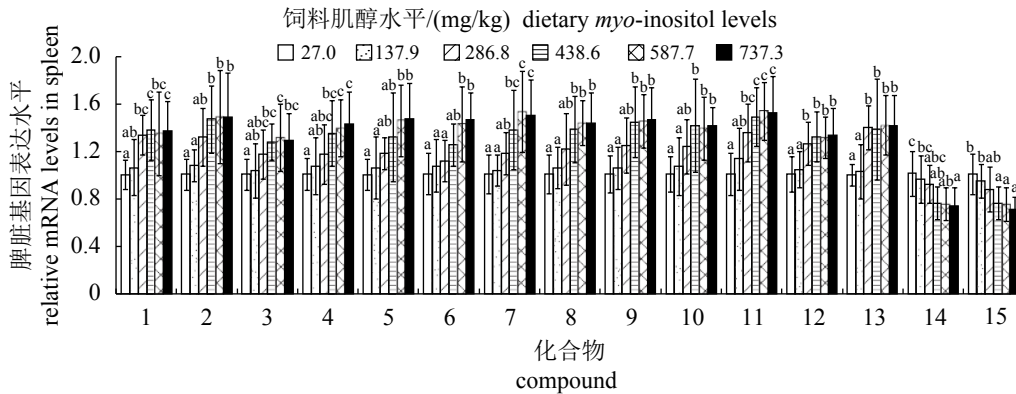


图 2 肌醇对嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼脾脏抗氧化酶及Nrf2相关信号分子基因表达的影响

Fig. 2 mRNA expression levels of antioxidant enzymes and related signaling molecules in spleen of on-growing *C. idella* fed diets containing graded levels of myo-inositol after infection with *A. hydrophila*

部分。肠道结构破坏后病原菌易入侵鱼类机体, 而头肾和脾脏是鱼类机体重要的免疫器官^[24]。因此, 本实验利用前期研究建立的肠炎模型, 考察肌醇对嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏结构完整性的影响。鱼类健康生长与鱼类免疫防御功能密切相关。头肾和脾脏是草鱼重要的免疫器官, 在鱼类免疫防疫中发挥着不可替代的作用。而头肾和脾脏的结构完整性是其免疫防御功能正常发挥的首要保障^[3]。Xu等^[25]研究表明, 维持生长期草鱼头肾和脾脏的结构完整, 能有效保证鱼类免疫防御功能正常, 增

强机体的疾病抵抗能力, 进而保护鱼类机体健康。前期研究表明, 肌醇缺乏将导致生长期草鱼肠道的氧化及结构损伤^[13]。因此, 肌醇促进生长期草鱼的健康生长可能与其能有效保护病原菌导致的头肾和脾脏氧化损伤有关, 然而相关研究未见报道。进而, 开展了肌醇对嗜水气单胞菌致生长期草鱼头肾和脾脏氧化损伤保护作用的相关研究。

3.1 肌醇降低了嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏的氧化损伤

鱼类免疫器官由于依赖ROS实现部分免疫

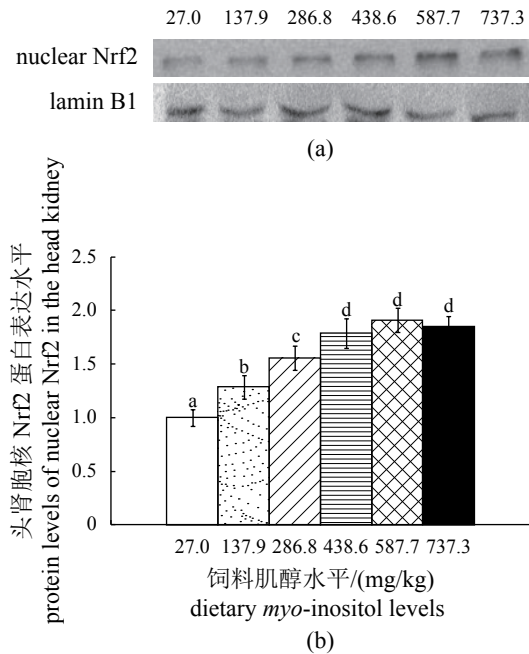


图3 肌醇对嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾细胞核Nrf2蛋白表达水平的影响

Fig. 3 Western blot analysis of nuclear Nrf2 protein levels in the head kidney of on-growing *C. idella* fed diets containing graded levels of *myo*-inositol after infection with *A. hydrophila*

功能,且含有大量多不饱和脂肪酸(PUFA),极易受到氧化损伤^[9]。过量的ROS常引起鱼类组织细胞组件,如脂肪(尤其是PUFA)、蛋白质和核酸等的氧化损伤^[13]。MDA和PC分别是鱼类组织器官脂质过氧化和蛋白质氧化损伤的重要指标。以往研究表明,嗜水气单胞菌注射后,生长期草鱼头肾和脾脏的MDA和PC含量增加,说明嗜水气单胞菌导致了草鱼头肾和脾脏脂质过氧化和蛋白质的氧化损伤^[26]。本实验结果显示,与基础日粮(未添加肌醇)组相比,适宜肌醇水平组显著降低嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏的MDA、PC及ROS含量,说明肌醇可能通过维持鱼类头肾和脾脏ROS处于适宜水平,减少了头肾和脾脏的氧化损伤,保证了免疫功能和免疫器官结构完整性的平衡。该结果与在建鲤幼鱼中的研究结果相似^[27]。

3.2 肌醇提高了嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏的抗氧化能力

饲料中适宜水平肌醇降低了嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏ROS含量,可能与

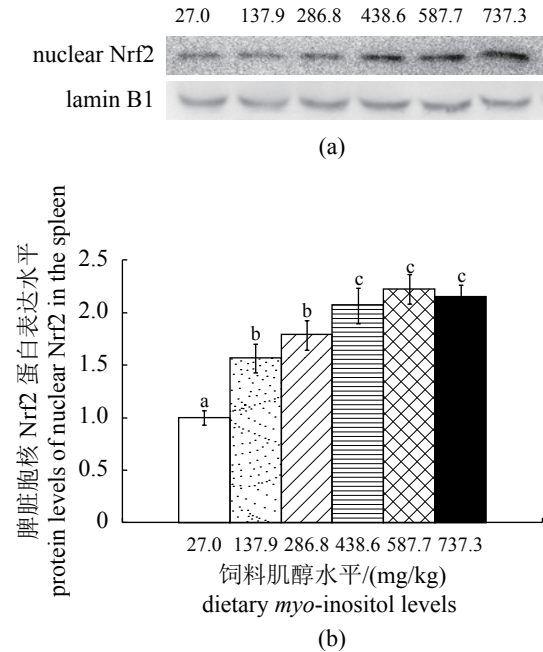


图4 肌醇对嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼脾脏细胞核Nrf2蛋白表达水平的影响

Fig. 4 Western blot analysis of nuclear Nrf2 protein levels in the spleen of on-growing *C. idella* fed diets containing graded levels of *myo*-inositol after infection with *A. hydrophila*

肌醇提高了生长期草鱼头肾和脾脏的酶性和非酶性抗氧化能力有关。SOD是鱼类清除ROS的第一道防线,CuZn-SOD位于细胞质,Mn-SOD位于线粒体中^[28-29]。本研究结果显示,与基础饲料(未添加肌醇)组相比,饲料中适宜肌醇水平组提高了嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏CuZn-SOD和Mn-SOD活性,说明肌醇增强了嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏细胞质和线粒体中清除过量ROS的能力。CAT和GPx是鱼类清除细胞内过氧化氢的抗氧化关键酶,保护细胞免受过氧化氢的毒害作用^[30-32]。本实验结果显示,与基础饲料(未添加肌醇)组相比,饲料中适宜肌醇水平组提高了嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏CAT和GPx活性,说明肌醇增强了嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏的过氧化氢清除能力。严林飞等^[32]研究表明,鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)侵染引起大黄鱼(*Larimichthys crocea*)肝脏CAT基因表达上调,与本实验结果相似。然而,Jiang等^[27]研究发现,与肌醇适宜水平组相比,饲料肌醇缺乏组嗜水气单胞菌注射后,建鲤幼鱼脾脏CAT和GPx活性显

著高于适宜水平组,与本实验在草鱼脾脏中的研究结果存在差异。导致这种差异的原因还不清楚。推测一方面可能由于品种差异;另一方面,可能由于建鲤幼鱼本身脾脏结构和功能发育尚未完善,肌醇缺乏则进一步阻碍了脾脏生长发育,导致对病原微生物的防御能力较弱,嗜水气单胞菌注射后,对肌醇缺乏组建鲤幼鱼脾脏的损伤强于肌醇添加组及生长期草鱼,引起建鲤幼鱼脾脏CAT和GPx活性的病理性提高。GSH/GSTs通路是鱼类重要的解毒、抗氧化系统^[33]。还原型GSH是动物体内重要的自由基清除剂和抗氧化剂^[34]。GSTs利用GSH实现清除体内自由基,防治脂质过氧化及解毒的双重功能^[35]。GR是机体内还原型GSH来源还原途径的关键酶,能将GSSG还原为GSH^[36]。本实验结果发现,与基础饲料(未添加肌醇)组相比,饲料中适宜肌醇水平组提高了嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏GST和GR活性及GSH含量,增强了GSH/GSTs通路的抗氧化和解毒能力。

3.3 肌醇上调了嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏抗氧化酶的基因表达

鱼类抗氧化酶活性常与其基因表达水平有关^[2]。本研究结果表明,与基础饲料(未添加肌醇)组相比,饲料中适宜水平肌醇组显著上调了嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏CuZn-SOD、Mn-SOD、CAT、GPx1b、GPx4a、GPx4b、GSTP1、GSTO1、GSTO2和GR mRNA的表达水平,说明肌醇提高嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏抗氧化酶活性可能部分得益于肌醇上调了这些抗氧化酶的mRNA表达。在GPxs家族中,鱼类的GPxs基因大多属于GPx1和GPx4家族^[37]。GPx1为胞质GPxs,在大多数动物组织中催化过氧化氢和有机过氧化物的还原。郑清梅等^[30]研究发现,GPx1 mRNA在草鱼肾脏和脾脏中均有较高的表达水平。GPx4为磷脂氢GPxs,对磷脂氢过氧化物的活性较高,是细胞膜物质的重要抗氧化酶,参与细胞膜上过氧化脂质的修复,是哺乳动物体内唯一能直接还原过氧化脂质的抗氧化酶^[33]。GPx4a和GPx4b分别是鱼类GPx4的2种亚型^[33,38]。结合本研究结果,说明肌醇可能通过上调GPx1a、GPx1b、GPx4a与GPx4b的mRNA表达,提高GPxs活性,进而保护生长期草鱼头肾和脾脏免受嗜水气单胞菌介导

的细胞质和细胞膜脂质过氧化损伤。此外,GSTs是细胞防御多种内、外源有毒化合物的重要酶类,可保护生物大分子免受活性亲电子物质的攻击^[39]。GSTP和GSTO是鱼类GSTs的2个亚家族成员^[40]。GSTO即GST Omega家族,包括GSTO1和GSTO2 2个亚型^[39,41]。GSTP即GST Pi家族,包括GSTP1和GSTP2 2个亚型^[39,41]。GSTO主要存在于细胞质中,GSTP在细胞质和线粒体中均有表达^[42]。因此,本研究结果说明,肌醇可能通过上调嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏GSTO1、GSTO2、GSTP1和GSTP2 mRNA水平,增强鱼类头肾和脾脏组织细胞中细胞质和线粒体内清除内、外源有毒化合物的能力,但其具体作用机制需要进一步研究。

3.4 肌醇激活了嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏Nrf2信号通路

抗氧化酶基因的转录受到核转录相关因子Nrf2及其相关信号分子的调控^[2]。Nrf2与抗氧化原件(ARE)相互作用,启动下游抗氧化基因转录^[43]。Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein-1, Keap1)可与Nrf2结合,抑制Nrf2的转录表达作用^[44]。Li等^[45]研究发现,鱼类Keap1有Keap1a和Keap1b 2种亚型。本实验结果显示,与基础饲料(未添加肌醇)组相比,饲料中适宜水平肌醇组显著上调了嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏抗氧化核转录因子Nrf2 mRNA的表达,同时下调了抑制Nrf2转录表达作用的Keap1a和Keap1b的mRNA表达。结果说明,一方面肌醇通过下调Nrf2抑制因子Keap1的表达,减少了Keap1与Nrf2的结合概率,解除Keap1的转录抑制作用;另一方面,肌醇同时上调了核转录相关因子Nrf2的表达,增加了细胞内Nrf2含量。对陆生动物中的研究表明,与Keap1分离后,解除Keap1抑制作用的Nrf2将迁移到细胞核中调控CuZn-SOD等抗氧化基因的表达^[44]。因此,实验进一步测定了嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏中Nrf2蛋白含量。结果显示,与基础饲料(未添加肌醇)组相比,饲料中适宜水平肌醇组显著提高了嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏细胞核内Nrf2蛋白含量,说明肌醇可能促进了Nrf2从细胞质向细胞核中的迁移。说明肌醇可能通过:①上调Nrf2 mRNA水平,下调Keap1a和Keap1b mRNA,减弱Keap1对

Nrf2的抑制作用；②促进Nrf2由细胞质向细胞核的迁移，通过两方面的作用激活Nrf2信号通路，进而上调嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏CuZn-SOD等抗氧化酶mRNA的表达。

3.5 生长期草鱼肌醇需要量

以头肾和脾脏ROS含量为标识，嗜水气单胞菌注射后，生长期草鱼肌醇需要量分别为452.1 mg/kg($y=-0.0656x+102.95$, $y_{\min}=73.29$,

$R^2=0.9892$)和449.0 mg/kg($y=-0.1522x+103.57$, $y_{\min}=35.2$, $R^2=0.9806$)(图5)。该需要量分别高于本实验室前期研究以生产性能指标增重百分比(percent weight gain, PWG)所确定的生长期草鱼需要量(276.7 mg/kg), 及以嗜水气单胞菌注射后前肠ROS含量所确定生长期草鱼肌醇的需要量(304.1 mg/kg)。

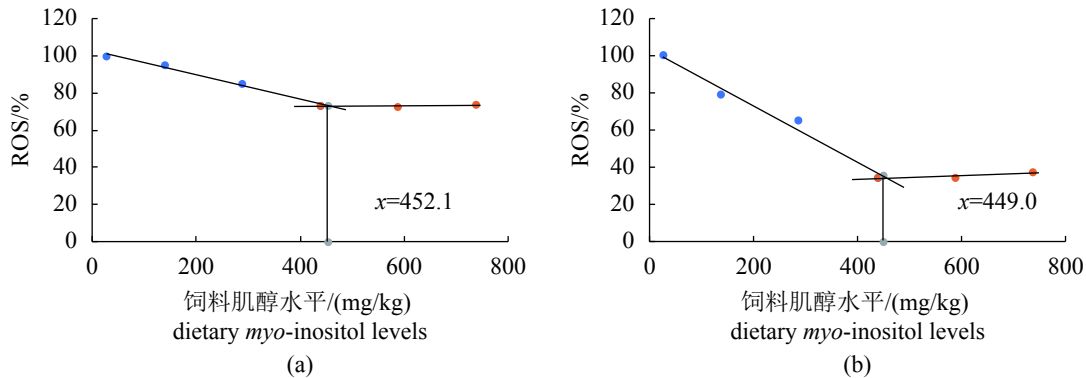


图5 肌醇与嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾(a)和脾脏(b)ROS含量的折线法分析

Fig. 5 Broken-line analysis of ROS in head kidney (a) and spleen (b) of on-growing *C. idella* fed diets containing graded levels of myo-inositol after infection with *A. hydrophila*

因此，本实验结果表明，饲料中添加适宜水平肌醇可能通过激活鱼类头肾和脾脏Nrf2信号途径，提高鱼类头肾和脾脏抗氧化酶基因表达及酶活性，同时，增加鱼类头肾和脾脏GSH含量，进而增强抵抗嗜水气单胞菌致鱼类头肾和脾脏氧化损伤的能力。此外，以嗜水气单胞菌注射后生长期草鱼头肾和脾脏ROS含量为标识，生长期草鱼肌醇需要量分别为452.1和449.0 mg/kg。

胡凯和李双安为并列第一作者

参考文献:

- [1] Wang Y, Zhou X, Jiang W, *et al.* Effects of dietary zearalenone on oxidative stress, cell apoptosis, and tight junction in the intestine of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Toxins*, 2019, 11(6): 333.
- [2] Zeng Z, Jiang W, Wu P, *et al.* Dietary aflatoxin B1 decreases growth performance and damages the structural integrity of immune organs in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Aquaculture*, 2019, 500: 1-17.
- [3] Zheng L, Jiang W, Feng L, *et al.* Selenium deficiency impaired structural integrity of the head kidney, spleen and skin in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 82: 408-420.
- [4] Løvoll M, Kilvik T, Boshra H, *et al.* Maternal transfer of complement components C3-1, C3-3, C3-4, C4, C5, C7, Bf, and Df to offspring in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Immunogenetics*, 2006, 58(2-3): 168-179.
- [5] 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.
Lu C P. Pathogenic *Aeromonas hydrophila* and the fish diseases caused by it[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1992, 16(3): 282-288(in Chinese).
- [6] 蒋自立, 李春涛. 黄颡鱼嗜水气单胞菌对草鱼幼鱼肝、肾和脾的影响[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(10): 5946-5949.
Jiang Z L, Li C T. Effect of *Aeromonas hydrophila* isolated from *Pelteobagrus fulvidraco* on liver, kidney, and spleen of juvenile grass carp[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(10): 5946-5949(in Chinese).
- [7] Baldissera M D, Souza C F, Júnior G B, *et al.* Melaleuca alternifolia essential oil enhances the non-specific

- immune system and prevents oxidative damage in *Rhamdia quelen* experimentally infected by *Aeromonas hydrophila*: effects on cholinergic and purinergic systems in liver tissue[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 61: 1-8.
- [8] 明建华, 谢骏, 徐跑, 等. 大黄素、维生素c及其配伍对团头鲂生长、生理生化指标、抗病原感染以及两种HSP70s mRNA表达的影响[J]. *水产学报*, 2010, 34(9): 1447-1459.
- Ming J H, Xie J, Xu P, *et al.* Effects of emodin, vitamin C and their combination on growth, physiological and biochemical parameters, disease resistance and two HSP70s mRNA expression of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(9): 1447-1459(in Chinese).
- [9] Kuang S Y, Xiao W W, Feng L, *et al.* Effects of graded levels of dietary methionine hydroxy analogue on immune response and antioxidant status of immune organs in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *jian*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 32(5): 629-636.
- [10] Birben E, Sahiner U M, Sackesen C, *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense[J]. *World Allergy Organization Journal*, 2012, 5(1): 9-19.
- [11] Shiau S Y, Su S L. Juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*×*Oreochromis aureus*) requires dietary myo-inositol for maximal growth[J]. *Aquaculture*, 2005, 243(1): 273-277.
- [12] Jiang W D, Feng L, Liu Y, *et al.* Growth, digestive capacity and intestinal microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *jian*) fed graded levels of dietary inositol[J]. *Aquaculture Research*, 2009, 40(8): 955-962.
- [13] Li S, Jiang W, Feng L, *et al.* Dietary myo-inositol deficiency decreased the growth performances and impaired intestinal physical barrier function partly relating to nrf2, jnk, e2f4 and mlck signaling in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 475-492.
- [14] Gong W, Lei W, Zhu X, *et al.* Dietary myo-inositol requirement for juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio*)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2015, 20(5): 514-519.
- [15] 乔芳, 李欢, 李东亮, 等. 冬夏两季五种经济鱼类组织脂肪酸含量及组成分析[J]. *水产学报*, 2018, 42(1): 80-90.
- Qiao F, Li H, Li D L, *et al.* Comparative analysis of fatty acid profiles in different tissues of five economic fish species in winter and summer[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(1): 80-90(in Chinese).
- [16] Clements R S J, Darnell B. Myo-inositol content of common foods: Development of a high-myo-inositol diet[J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1980, 33(9): 1954-1967.
- [17] Zeng Y Y, Jiang W D, Liu Y, *et al.* Optimal dietary alpha-linolenic acid/linoleic acid ratio improved digestive and absorptive capacities and target of rapamycin gene expression of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2016, 22(6): 1251-1266.
- [18] Nrc N R C. Nutrient requirements of fish and shrimp[M]. Washington, D. C.: The National Academies Press, 2011.
- [19] Wen J, Jiang W, Feng L, *et al.* The influence of graded levels of available phosphorus on growth performance, muscle antioxidant and flesh quality of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Animal Nutrition*, 2015, 1(2): 77-84.
- [20] Zhou Q, Wang L, Wang H, *et al.* Effect of dietary vitamin C on the growth performance and innate immunity of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(6): 969-975.
- [21] Li S, Jiang W, Feng L, *et al.* Dietary myo-inositol deficiency decreased intestinal immune function related to NF-κB and TOR signaling in the intestine of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 76: 333-346.
- [22] Tian L, Zhou X Q, Jiang W D, *et al.* Sodium butyrate improved intestinal immune function associated with NF-κB and p38MAPK signalling pathways in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 66: 548.
- [23] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [24] Grove S, Johansen R, Reitan L, *et al.* Immune- and enzyme histochemical characterisation of leukocyte populations within lymphoid and mucosal tissues of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(5): 693-708.
- [25] Xu H, Jiang W, Feng L, *et al.* Dietary vitamin C deficiency depresses the growth, head kidney and spleen immunity and structural integrity by regulating NF-κB, TOR, Nrf2, apoptosis and MLCK signaling in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Fish & Shell-*

- fish Immunology, 2016, 52: 111-138.
- [26] Ni P, Jiang W, Wu P, *et al.* Dietary low or excess levels of lipids reduced growth performance, and impaired immune function and structure of head kidney, spleen and skin in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) under the infection of *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 55: 28-47.
- [27] Jiang W, Hu K, Liu Y, *et al.* Dietary myo-inositol modulates immunity through antioxidant activity and the Nrf2 and E2F4/cyclin signalling factors in the head kidney and spleen following infection of juvenile fish with *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 49: 374-386.
- [28] Ferro D, Franchi N, Mangano V, *et al.* Characterization and metal-induced gene transcription of two new copper zinc superoxide dismutases in the solitary ascidian *Ciona intestinalis*[J]. Aquatic Toxicology, 2013, 140(18): 369-379.
- [29] Lyu K, Zhu X, Chen R, *et al.* Molecular cloning of manganese superoxide dismutase gene in the cladoceran *Daphnia magna*: effects of microcystin, nitrite, and cadmium on gene expression profiles[J]. Aquatic Toxicology, 2014, 148(3): 55-64.
- [30] 郑清梅, 温小波, 韩春艳, 等. 草鱼胞浆谷胱甘肽过氧化物酶cDNA全长的克隆与分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(5): 919-926.
- Zheng Q M, Wen X B, Han C Y, *et al.* Full-length cDNA cloning and analysis of glutathione peroxidase from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Genomics and Applied Biology, 2010, 29(5): 919-926(in Chinese).
- [31] 郑清梅, 韩春艳, 温茹淑, 等. 草鱼过氧化氢酶全长cDNA的克隆、序列同源分析与组织表达[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(5): 529-538.
- Zheng Q M, Han C Y, Wen R S, *et al.* Full-length cDNA cloning, sequence homology analysis and tissue expression of a catalase gene from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Genomics and Applied Biology, 2011, 30(5): 529-538(in Chinese).
- [32] 严林飞, 安昕, 包苗苗, 等. 大黄花过氧化氢酶基因的克隆及其对鳃弧菌感染的响应[J]. 水产学报, 2017, 41(5): 641-648.
- Yan L F, An X, Bao M M, *et al.* Expression of catalase in *Larimichthys crocea* after infection of *Vibrio anguillarum*[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(5): 641-648(in Chinese).
- [33] Hermes E, Ferencz Á. Identification of two phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (gp4) genes in common carp[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 2009, 150(1): 101-106.
- [34] Liang Q, Sheng Y, Jiang P, *et al.* The gender-dependent difference of liver GSH antioxidant system in mice and its influence on isoline-induced liver injury[J]. Toxicology, 2011, 280(1): 61-69.
- [35] Tierbach A, Groh K J, Schonenberger R, *et al.* Glutathione S-Transferase protein expression in different life stages of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Toxicol Sci, 2018, 162(2): 702-712.
- [36] Schmidt M M, Dringen R. Glutathione (GSH) synthesis and metabolism[J]. Advances in Neurobiology, 2012, 36: 1029-1050.
- [37] Thompson J L, See V H L, Thomas P M, *et al.* Cloning and characterization of two glutathione peroxidase cDNAs from southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2010, 156(4): 287-297.
- [38] Zhao W, Zhong X, Zhou L. Expression of PHGPx in mammalian cells and its antiviral effect against coxsackievirus group B[J]. Progress in Natural Science: Materials International, 2005, 15(7): 665-668.
- [39] Tian R, Seim I, Ren W, *et al.* Contraction of the ROS scavenging enzyme glutathione S-Transferase gene family in cetaceans[J]. G3(Bethesda), 2019, 9(7): 2303-2315.
- [40] Li L, Liang X, He S, *et al.* Transcriptional responses of mu-, pi- and omega-class glutathione S-transferase genes in the hepatopancreas of *Cipangopaludina cahayensis* exposed to microcystin-LR[J]. Chinese Science Bulletin, 2014, 59(25): 3153-3161.
- [41] Dasari S, Gonuguntla S, Ganjari M S, *et al.* Genetic polymorphism of glutathione S-transferases: relevance to neurological disorders[J]. Pathophysiology, 2018, 25(4): 285-292.
- [42] Raza H. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: Implications in oxidative stress, toxicity and disease[J]. Febs J, 2011, 278(22): 4243-4251.
- [43] Jain A K, Bloom D A, Jaiswal A K. Nuclear import and export signals in control of Nrf2[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(32): 29158-29168.

- [44] McMahon M, Thomas N K, Yamamoto M, *et al.* Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(30): 31556-31567.
- [45] Li L, Makoto K, Hiroshi K, *et al.* Molecular evolution of Keap1. Two Keap1 molecules with distinctive intervening region structures are conserved among fish[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 283(6): 3248-3255.

Protective effect of *myo*-inositol on oxidative damage of head kidney and spleen in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) induced by *Aeromonas hydrophila*

HU Kai^{1,2}, LI Shuang'an¹, FENG Lin^{1,3,4}, JIANG Weidan^{1,3,4}, WU Pei^{1,3,4}, LIU Yang^{1,3,4},
JIANG Jun^{1,3,4}, KUANG Shengyao⁵, TANG Ling⁵, ZHOU Xiaoqiu^{1,3,4*}

(1. Animal Nutrition Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Department of Animal and Veterinary Science, Chengdu Agricultural College, Chengdu 611130, China;

3. Fish Nutrition and Safety Production, University Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

4. Key Laboratory for Animal Disease-Resistance Nutrition of China, Ministry of Education, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

5. Animal Nutrition Institute, Sichuan Academy of Animal Science, Chengdu 610099, China)

Abstract: This study investigated the protective effect of *myo*-inositol on oxidative damage of head kidney and spleen in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) induced by *Aeromonas hydrophila*. A total of 540 *C. idella* [(221.83±0.84) g] were fed six diets with graded levels of *myo*-inositol [27.0(unsupplemented), 137.9, 286.8, 438.6, 587.7, 737.3 mg/kg] for 10 weeks. Subsequently, a challenge test was conducted by injection of *A. hydrophila* and the survival rates recorded for 14 days. The results indicated that compared with *myo*-inositol deficiency (basal diet, unsupplemented), optimal *myo*-inositol supplementation decreased reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), and protein carbonyl contents, and increased the activities and mRNA levels of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase and glutathione reductase, and contents of glutathione in the head kidney and spleen after injection of *A. hydrophila*. Meanwhile, compared with *myo*-inositol deficiency (basal diet, unsupplemented), optimal *myo*-inositol supplementation up-regulated NF-E2-related factor 2 (Nrf2) mRNA and protein levels, and down-regulated Kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap1) a and b mRNA levels in the head kidney and spleen after injection of *A. hydrophila*. These results suggested that optimal *myo*-inositol supplementation could protect fish head kidney and spleen structural integrity through increased antioxidative ability after injection of *A. hydrophila*. Finally, based on the antioxidant indices ROS content in the head kidney and spleen after injection of *A. hydrophila*, the *myo*-inositol requirement for juvenile *C. idella* was estimated to be 452.1 and 449.0 mg/kg diet, respectively.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; *myo*-inositol; head kidney; spleen; anti-oxidative enzyme; NF-E2-related factor 2

Corresponding author: ZHOU Xiaoqiu. E-mail: zhouxq@sicau.edu.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-45); Outstanding Talents and Innovative Team of Agricultural Scientific Research; Foundation of Sichuan Youth Science and Technology Innovation Research Team (2017TD0002); National Natural Science Foundation of China (31972810)