

# 饲料维生素 C 对美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)组织 NO 含量、NOS 活力和 nNOS 基因表达的影响\*

周立斌<sup>1,3</sup> 白茹<sup>2</sup> 马细兰<sup>1</sup> 王树齐<sup>3</sup> 张海发<sup>4</sup>

(1. 惠州学院生命科学系 生物技术研究所 惠州 516007; 2. 华南师范大学生命科学学院 广州 510631;  
3. 汕头大学 广东省海洋生物技术重点实验室 汕头 515063; 4. 广东省海洋渔业试验中心 惠州 516081)

**提要** 本试验旨在研究饲料维生素 C 对美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)组织中的 NO 含量、NOS 活力和 NOS 基因表达的影响。采用单因子试验设计, 将 360 尾平均体重为(147.28±7.69)g 的美国红鱼随机分为 6 个处理, 每个处理设 3 个重复, 每个重复 20 尾, 分别饲喂 6 种不同维生素 C 水平(0、49.3、98.9、197.5、396.4 和 1989.8mg/kg)的等氮等能饲料, 进行为期 8 周的生长试验。结果表明: 头肾、肝、肠、胸腺 NO 含量随着饲料维生素 C 含量增加有显著增加; 脾中各组 NO 含量无显著性差异; 脑中 NO 含量 C<sub>0</sub> 组与其它各组相比有显著性差异。头肾、肝、胸腺 NOS 活力随着饲料维生素 C 含量增加有显著增加; 脾和肠中各组 NOS 活力无显著性差异; 脑中 NOS 活力 C<sub>396.4</sub> 组与其它各组相比有显著性差异。脑中各组 nNOS 基因 mRNA 的表达含量无显著性差异; 在饲料维生素 C 含量达到 1989.8mg/kg 时, 其它各组织内的 nNOS 基因 mRNA 的表达量最高。综上所述, 饲料中添加适当维生素 C 对美国红鱼组织中的 NO 含量、NOS 活力和 nNOS 基因 mRNA 的表达有显著影响。

**关键词** 美国红鱼; 维生素 C; 一氧化氮; 免疫

**中图分类号** S917; Q50 **doi:** 10.11693/hyhz20140700193

一氧化氮(nitric oxide, 简称 NO)是一种气体信号分子, 许多研究表明, NO 对鱼类的非特异性免疫有着重要的作用, 通过格兰氏阳性菌(*Renibacterium salmoninarum*)处理虹鳟后, 发现血清中一氧化氮含量升高, 并且鱼体血清中一氧化氮含量随细菌毒性增强而增高(Campos-Perez *et al*, 2000)。用一种热灭活乳酸菌的(*Lactococcus lactis*)能显著诱导巨噬细胞产生 NO (Villamil *et al*, 2002)。水产动物体内的 NO 在病毒免疫方面也有一定的作用, 病毒性出血性败血症病毒(VHSV)能导致大菱鲆体内的 NO 含量增加(Tafalla *et al*, 1999)。NO 的生成通过一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, 简称 NOS)进行, 通过催化 L-精氨酸, 在体内合成 NO, 从而在鱼体的免疫中起到作用。一氧化氮合酶(NOS)参与鱼类的多种生理活动

并与免疫和神经传递有关, 有研究表明病毒性出血性败血症病毒促使虹鳟体内的诱导型一氧化氮合酶含量增加的上调(Tafalla *et al*, 2005)。

美国红鱼(*Sciaenops ocellatus* Linnaeus), 属鲈形目 Perciformes、石首鱼科 Sciaenidae、拟石首鱼属 *Sciaenops*, 是一种重要的养殖鱼类。有关美国红鱼生长和免疫的研究有一些报道(周立斌等, 2009, 2013), 主要是研究维生素和矿物质对美国红鱼生长和免疫的影响, 但有关美国红鱼的一氧化氮免疫调控的研究相对较少(Zhou *et al*, 2009; 周立斌等, 2012)。本实验研究在配合饲料中添加不同剂量的维生素 C 对美国红鱼组织中的 NO 含量、NOS 活力以及 nNOS 基因 mRNA 的表达的影响, 探讨维生素 C 与美国红鱼组织中 NO、NOS 以及 nNOS 基因的免疫关系, 对美国红

\*广东省高等学校高层次人才项目, 粤财字[2013]246 号; 广东省海洋生物技术重点实验室开发基金资助项目, GPKLMB 201202 号; 国家自然科学基金项目, 31201978 号; 惠州市科技计划项目, 2011B040010003 号; 惠州学院自然科学研究重点项目, 2012ZD07 号。周立斌, 教授, E-mail: zlb2003@163.com

收稿日期: 2013-11-07, 收修改稿日期: 2014-03-19

鱼饲料饲料配方设计和鱼病防治提供基础资料和实践依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验鱼与试验设计

试验于广东省海洋渔业试验中心进行, 试验鱼和试验设计参考周立斌等(2013)方法, 美国红鱼分 6 组, 各组维生素 C 实际含量为 0、49.3、98.9、198.7、398.6、1987.4 mg/kg, 分别用  $C_0$ 、 $C_{49.3}$ 、 $C_{98.9}$ 、 $C_{197.5}$ 、 $C_{396.4}$  和  $C_{1989.8}$  来表示。

### 1.2 饲养管理

饲养管理参考周立斌等(2013)方法。试验共进行 8 周, 将美国红鱼解剖后取出出头肾、脾脏、肝脏、肠、脑、胸腺组织, 存放于 $-80^{\circ}\text{C}$  低温冰箱备用。

### 1.3 试剂

总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent 试剂盒购自 Invitrogen 公司。ReVerTra Ace-a-<sup>TM</sup> Kit、Real-time PCR Master Mix 试剂盒购自 TOYOBO 公司 Ex-Taq Polymerase Kit 购自 TaKaRa 公司。引物委托上海英俊生物工程公司合成。100bp DNA Ladder 为天为时代公司产品; 其余均为国产分析纯试剂。

### 1.4 美国红鱼组织 nNOS 基因表达分析

选取头肾、脾脏、肝脏、肠、脑、胸腺组织进行检测。用 Trizol 提取各组织的总 RNA, 通过 Dnase I 处理后。采用 ReVerTra Ace-a-<sup>TM</sup> Kit 进行反转录。根据已测序的美国红鱼 nNOS 基因 cDNA 序列和 18S 基因序列, 应用 Prime Primer 5.0 引物设计软件在美国红鱼 nNOS 基因 3'端设计适用于 Real-time PCR 的引物(表 1)。引物委托上海英俊生物工程公司合成。

Real-time PCR 反应体系采用 20  $\mu\text{L}$  体系: 10  $\mu\text{L}$  SYBR Green Realtime PCR Master Mix, 1  $\mu\text{L}$  RT 产物, 0.4  $\mu\text{L}$  特异性产物。PCR 反应程序为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 60s; 随后  $95^{\circ}\text{C}$  变性 15s,  $57^{\circ}\text{C}$  退火 15s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 30s, 进行 40 个循环。

通过 ABI PRISM 7900 Sequence Detection System

表 1 Real-time PCR 检测美国红鱼体内 nNOS 基因所用引物

Tab.1 Nucleotide sequences of the primers used for Real-time PCR

| 引物     | 序列                         |
|--------|----------------------------|
| nNOS F | GGCTGTCCTGGAGACTGGGTGT     |
| nNOS R | GGCGGTAGTTGAGCATTCTTGGT    |
| 18S F  | CCTGAGAAACGGCTACCACATCC    |
| 18S R  | AGCAACTTTAGTATACGCTATTGGAG |

(Applied Biosystems)测定, 达到荧光阈值( $C_T$ )的 18S 反应循环数。通过质粒浓度和所对应  $C_T$  值建立  $\beta$ -action、nNOS 基因的标准曲线。然后通过各样本达到  $C_T$  值所需的循环数, 和相应的内参基因达到  $C_T$  值所对应的循环数做比对, 从而得出样本的相对浓度, 结果采用相对浓度表示, 即表示为目的基因浓度/内参基因浓度( $\text{nNOS}/\beta\text{-action} \times 100$ )。

### 1.5 NO 和 NOS 测定

NO 测定采用硝酸还原酶法, NOS 测定采用化学比色法, 试剂均购于南京建成生物工程研究所。各项指标的测定均在 722 紫外光栅分光光度计上进行。

### 1.6 数据处理统计

实验所得数据均以平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SE), 采用 SPSS11.0 软件统计包中的单因素方差分析和 Duncan's 法检验, 当  $P<0.05$  时认为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 饲料维生素 C 对美国红鱼组织 NO 含量的影响

经过 8 周饲养试验, 各试验组美国红鱼各组织 NO 含量见表 2。从表 2 可以看出, 头肾、肝、肠、胸腺 NO 含量随着饲料维生素 C 含量增加有显著增加, 饲料中维生素 C 最高含量的  $C_{1989.8}$  组头肾、肝、肠和胸腺中 NO 含量与其它试验组 NO 含量相比有显著增加, 达到最高水平; 脾中各组 NO 含量无显著性差异; 脑中 NO 含量对照组  $C_0$  组与其它各组相比有显著性差异, 其它各组之间脑中 NO 含量无显著性差异。

表 2 不同水平饲料维生素 C 处理对美国红鱼组织 NO( $\mu\text{mol/g prot}$ )的影响

Tab.2 Effect of dietary vitamin C in different level on NO in tissues of red drum

| 处理           | 头肾                | 脾               | 肝                 | 肠                 | 脑                 | 胸腺                |
|--------------|-------------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| $C_0$        | $0.58 \pm 0.10^a$ | $0.25 \pm 0.03$ | $0.28 \pm 0.03^a$ | $0.19 \pm 0.03^a$ | $0.35 \pm 0.06^a$ | $0.75 \pm 0.10^a$ |
| $C_{49.3}$   | $0.69 \pm 0.12^b$ | $0.27 \pm 0.04$ | $0.42 \pm 0.06^b$ | $0.25 \pm 0.04^b$ | $0.50 \pm 0.07^b$ | $1.36 \pm 0.31^b$ |
| $C_{98.9}$   | $0.75 \pm 0.18^b$ | $0.29 \pm 0.07$ | $0.48 \pm 0.06^b$ | $0.35 \pm 0.06^c$ | $0.52 \pm 0.09^b$ | $1.50 \pm 0.35^b$ |
| $C_{197.5}$  | $0.95 \pm 0.21^c$ | $0.28 \pm 0.06$ | $0.52 \pm 0.08^b$ | $0.38 \pm 0.06^c$ | $0.58 \pm 0.08^b$ | $1.98 \pm 0.40^c$ |
| $C_{396.4}$  | $1.35 \pm 0.31^d$ | $0.30 \pm 0.05$ | $0.55 \pm 0.09^b$ | $0.48 \pm 0.09^d$ | $0.57 \pm 0.08^b$ | $2.56 \pm 0.41^d$ |
| $C_{1989.8}$ | $2.58 \pm 0.54^e$ | $0.31 \pm 0.06$ | $0.87 \pm 0.12^c$ | $0.78 \pm 0.14^e$ | $0.56 \pm 0.14^b$ | $2.92 \pm 0.44^e$ |

表中同列数据后小写英文字母不同者表示差异显著。表 3、表 4 同

**2.2 饲料维生素 C 对美国红鱼组织 NOS 活力的影响**  
经过 8 周饲养试验, 各试验组美国红鱼各组织 NOS 活力见表 3。从表 3 可以看出, 头肾、肝、胸腺 NOS 活力随着饲料维生素 C 含量增加有显著增加, 饲料中维生素 C 最高含量的  $C_{1989.8}$  组头肾、肝和胸腺中 NO 含量与其它试验组 NO 含量相比有显著增加, 达到最高水平; 脾和肠中各组 NOS 活力无显著性差异; 脑中 NOS 活力  $C_{396.4}$  组与其它各组相比有显著性差异, 其它各组脑中 NOS 活力没有显著性的差异。

表 3 不同水平饲料维生素 C 处理对美国红鱼 NOS 活力(U/mg prot)的影响  
Tab.3 Effect of dietary vitamin C in different level on NOS activity in tissues of red drum

| 处理           | 头肾                   | 脾               | 肝                    | 肠               | 脑                 | 胸腺                |
|--------------|----------------------|-----------------|----------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| $C_0$        | $1.19 \pm 0.13^a$    | $0.21 \pm 0.06$ | $0.36 \pm 0.04^a$    | $0.42 \pm 0.07$ | $0.68 \pm 0.09^a$ | $0.91 \pm 0.16^a$ |
| $C_{49.3}$   | $1.66 \pm 0.22^b$    | $0.23 \pm 0.05$ | $0.55 \pm 0.05^b$    | $0.45 \pm 0.06$ | $0.72 \pm 0.08^a$ | $1.51 \pm 0.28^b$ |
| $C_{98.9}$   | $1.83 \pm 0.26^b$    | $0.19 \pm 0.04$ | $0.62 \pm 0.07^b$    | $0.51 \pm 0.07$ | $0.70 \pm 0.07^a$ | $1.68 \pm 0.31^b$ |
| $C_{197.5}$  | $2.05 \pm 0.29^{bc}$ | $0.22 \pm 0.06$ | $0.79 \pm 0.09^{bc}$ | $0.46 \pm 0.07$ | $0.73 \pm 0.09^a$ | $2.14 \pm 0.39^c$ |
| $C_{396.4}$  | $2.35 \pm 0.33^c$    | $0.25 \pm 0.06$ | $0.46 \pm 0.05^b$    | $0.49 \pm 0.06$ | $1.12 \pm 0.18^b$ | $2.78 \pm 0.51^d$ |
| $C_{1989.8}$ | $3.21 \pm 0.62^d$    | $0.26 \pm 0.06$ | $1.95 \pm 0.23^d$    | $0.52 \pm 0.08$ | $0.69 \pm 0.09^a$ | $3.23 \pm 0.53^c$ |

表 4 不同水平饲料维生素 C 处理对美国红鱼组织 nNOS 基因 mRNA 表达( $1 \times 10^{-8}$  nNOS/18S)的影响  
Tab.4 Effect of dietary vitamin C in different level on nNOS mRNA expression in tissues of red drum

| 处理           | 头肾                  | 脾                 | 肝                   | 肠                | 脑               | 胸腺                   |
|--------------|---------------------|-------------------|---------------------|------------------|-----------------|----------------------|
| $C_0$        | $230.0 \pm 40.5^b$  | $3.8 \pm 0.4^d$   | $0.2 \pm 0.04^a$    | $0.9 \pm 0.2^b$  | $2.2 \pm 0.4^a$ | $170.0 \pm 40.0^a$   |
| $C_{49.3}$   | $230.5 \pm 50.8^b$  | $0.75 \pm 0.15^c$ | $0.4 \pm 0.05^b$    | $8.5 \pm 1.9^c$  | $2.5 \pm 5.0^b$ | $240.0 \pm 50.5^b$   |
| $C_{98.9}$   | $350.5 \pm 60.0^c$  | $8.0 \pm 1.6^c$   | $1.3 \pm 0.2^c$     | $0.2 \pm 0.05^a$ | $2.2 \pm 0.4^a$ | $250.0 \pm 60.5^b$   |
| $C_{197.5}$  | $110.5 \pm 30.0^a$  | $0.08 \pm 0.02^a$ | $2.0 \pm 0.4^d$     | $0.3 \pm 0.07^a$ | $2.3 \pm 0.5^a$ | $410.0 \pm 80.0^c$   |
| $C_{396.4}$  | $170.5 \pm 40.5^b$  | $0.40 \pm 0.10^b$ | $0.3 \pm 0.06^{ab}$ | $11.0 \pm 2.6^d$ | $2.3 \pm 0.5^a$ | $240.0 \pm 60.5^b$   |
| $C_{1989.8}$ | $500.5 \pm 100.0^c$ | $10.0 \pm 2.0^c$  | $19.5 \pm 4.2^e$    | $15.0 \pm 3.2^e$ | $2.4 \pm 0.6^a$ | $2460.0 \pm 410.0^d$ |

### 3 讨论

大量的实验证据表明, NO 参与心血管系统、神经系统、免疫系统、生殖系统、消化系统和肿瘤等多种生理活动的调节(Moncada *et al*, 1991)。有关哺乳动物的研究中, NO 在舒张血管的反应中具有重要作用, 可以维持正常血管的张力。NOS 在中枢神经系统(CNS)中分布非常广泛, 通过免疫组化技术, 已在大鼠小脑、上下丘、海马齿状回、垂体后叶、下丘脑视上核、室旁核等处发现有强阳性免疫反应产物(Saxena *et al*, 2001)。NO 在 CNS 的信号传递中起神经递质的作用。NO 在免疫系统中有重要的功能, 包括抗菌, 抗肿瘤, 抗炎症, 促进细胞因子、趋化因子、生长因子增殖, 促进 T 细胞活化等各方面的功能(Kolb *et al*, 1998; Kroncke *et al*, 1998; Weinberg, 1998)。

神经元型 NOS (neuronal NOS, nNOS) 为细胞内

### 2.3 饲料维生素 C 对美国红鱼组织 nNOS 基因 mRNA 表达的影响

经过 8 周饲养试验, 各试验组美国红鱼各组织 nNOS 基因 mRNA 表达的结果见表 4。从表 4 可以看出, 脑中各组 nNOS 基因 mRNA 的表达含量无显著性差异; 头肾、脾、肝、肠和胸腺的各组 nNOS 基因 mRNA 的表达含量有显著性差异, 变化趋势不明显, 在饲料维生素 C 含量达到最高水平 1989.8mg/kg 时, 各组织内的 nNOS 基因 mRNA 的表达量最高。

钙离子依赖型, 在正常生理状态下即可表达, 产生少量 NO 发挥生理效应。nNOS 在哺乳动物中的许多组织中都有分布, 而在鱼类中, 虹鳟鱼仔鱼头肾中的 nNOS 细胞数量较多, 随着鱼体长大, nNOS 细胞出现在一些神经细胞和神经纤维中(Campos-Perez *et al*, 2000), 虹鳟成鱼肾和胃肠道中 NOS 细胞数目也较多(Jones *et al*, 2007)。而 NOS 合酶的基因在海胆、果蝇、蚊、鱼、鸡、鼠、牛和人都进行了研究。人类 nNOS 基因是三个亚型基因中最大的, 长度大于 24kb, 含 29 个外显子(Chartrain *et al*, 1994)。目前在多种鱼中已有 NOS 基因研究的报道, 包括虹鳟、金鱼、大西洋鲑和沟鲶等(Bell *et al*, 1997; Laing *et al*, 1999; Ebbesson *et al*, 2005)。

维生素 C 是鱼类生长和生理活动必需的营养物质, 有研究表明它在鱼类的免疫中有着重要的作用。维生素 C 在体内参与氧化还原反应, 作为脯氨酸羟化

酶的辅酶直接影响胶原蛋白的合成。鲑鱼饲料中缺乏维生素 C 会导致生长变慢, 脊柱变形, 出血, 鳍坏死等严重症状(Lim *et al*, 1978)。维生素 C 还具有防止低价铁的氧化, 促进肠道对铁的吸收, 增强水生动物的抗病力等生理功能(赵文, 1995)。研究表明, 配合饵料中添加维生素 C 可以增强中国对虾的抗低氧能力, 同时降低中国对虾的发病率(王安利等, 1996)。金头鲷(*Sparus aurata* L.)头肾巨噬细胞与含维生素 C 的培养液孵育能提高其细胞杀伤活性, 体内实验也表明, 饲料中添加维生素 C 能提高其血清溶菌酶活力(Cuesta *et al*, 2008)。本研究中, 饲料中最高含量的维生素 C 的组头肾、肝、肠和胸腺中 NO 含量与其它试验组 NO 含量相比有显著增加, 表明随着饲料中维生素 C 水平增加, 头肾、肝、肠和胸腺中 NO 含量也随着增加; 脾中各组 NO 含量无显著性差异, 表明饲料中维生素 C 含量对脾组织中 NO 含量影响不大; 另外各试验组脑中 NO 含量与对照组相比有显著增加, 表明饲料中添加维生素 C 能显著影响美国红鱼脑中 NO 含量。Montero 等(1999)的研究也表明, 金头鲷(*Sparus aurata* L.)摄食维生素 C 含量为 250mg/kg 的饲料时, 耐密集和抗病力较强; 而摄食含 500—300mg 维生素 C 的饲料时, 头肾白细胞的吞噬活性、呼吸暴发活力较强(Mulero *et al*, 1998; Ortuno *et al*, 2001); 维生素 C 对美国红鱼组织中 NOS 活力的影响的结果类似于组织中 NO 含量的变化。本研究中, 头肾、肝、胸腺 NOS 活力随着饲料维生素 C 含量增加有显著增加, 与组织中 NO 含量的变化相类似; 脑中 NOS 活力  $C_{396.4}$  组与其它各组相比有显著性差异, 表明饲料中适当的维生素 C 可以提高脑中 NOS 活力, 维生素 C 含量过高可能影响脑中 NOS 活力。另外本研究中, 脾和肠中各组 NOS 活力无显著性差异, 表明维生素 C 对美国红鱼脾和肠组织中 NOS 活力影响不大。

对于 NOS 基因表达与免疫的研究, 大多集中在诱导型 NOS(iNOS)基因的诱导表达, 有关 nNOS 基因诱导表达研究在鱼类开展的还很少, 通过本次实验, 可以推测美国红鱼体内的 nNOS 的表达像 iNOS 一样, 也是可以被诱导表达的。与 iNOS 表达诱导不同的是, nNOS 基因在正常的生理状态下少量的表达, 产生少量的 NO 维持机体的生理活动。在本研究中, 高剂量的维生素 C 对美国红鱼 nNOS 基因 mRNA 的表达起到明显的促进作用, 除在脾脏外, 其它组织内的 nNOS 基因 mRNA 的表达均随着维生素 C 的浓度的增长有所增高, 并且维生素 C 含量在 1987.4mg/kg 时

对多数组织 nNOS 基因表达的促进作用最为显著, 这与包膜维生素 C 对胡子鲶血清 SOD 活力的结果类似(李桂峰等, 2004), 随着饲喂时间的增长和维生素 C 水平的增加, 其 SOD 活力就越高, 以血清 SOD 为非特异性免疫指标, 大口黑鲈饲料中维生素 C 最适添加量为 2000 mg/kg。还有报道, 当维生素 C 浓度为 3g/kg 添加饲料投喂金头鲷(*Sparus aurata* L.), 发现其体内头肾巨噬细胞吞噬能力和呼吸链暴发活性增强(Ortuno *et al*, 2001), 通过本次研究可以推测维生素 C 不仅可以增强机体溶菌酶、SOD 以及巨噬细胞吞噬能力, 还能够诱导体内 nNOS 的表达, 从而进一步增强机体免疫能力。更重要的是, 通过实验发现维生素 C 对胸腺和头肾内 nNOS 基因 mRNA 基因表达促进作用明显高于其它组织内 nNOS 基因的表达, 这又进一步证明维生素 C 可以在机体免疫方面起到重要的作用。综上所述, 饲料中添加适当维生素 C 对美国红鱼组织中的 NO 含量、NOS 活力和 nNOSmRNA 基因表达有显著影响, 表明饲料中适当的维生素 C 对美国红鱼的免疫有促进作用。

## 参 考 文 献

- 王安利, 母学全, 凌利英, 1996. 中国对虾配合饵料中维生素 C 添加量的研究. 海洋与湖沼, 27(4): 368—372
- 李桂峰, 钱沛锋, 孙际佳, 2004. 维生素 C 对胡子鲶血清免疫相关酶活性的影响. 大连水产学院学报 19: 301—305
- 周立斌, 马细兰, 王安利等, 2009. 饲料中铁对美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)生长和免疫的影响. 海洋与湖沼, 40(5): 663—66
- 周立斌, 王树齐, 张海发, 2013. 饲料维生素 C 对美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)生长、免疫的影响. 海洋与湖沼, 44(4): 1108—1114
- 周立斌, 吴小明, 毛露甜等, 2012. 饲料维生素 A 对美国红鱼组织 NO 的影响. 广东农业科学, 9: 119—121
- 赵 文, 1995. 维生素 C 与水产养殖. 饲料博览, 5: 35—37
- Bell T D, Pereda A E, Faber D S, 1997. Nitric oxide synthase distribution in the goldfish Mauthner cell. Neurosci Lett, 226: 187—190
- Campos-Perez J J, Ward M, Grabowski P S *et al*, 2000. The gills are an important site of iNOS expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after challenge with the gram-positive pathogen *Renibacterium salmoninarum*. Immunology, 99(1): 153—161
- Cuesta A, Meseguer J, Esteban M A *et al*, 2008. The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream. Mol Immunol, 45: 2333—2342
- Ebbesson L O, Tipsmark C K, Holmqvist B *et al*, 2005. Nitric oxide synthase in the gill of Atlantic salmon: colocalization with and inhibition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. J Exp Biol, 208:

1011—1017

- Jones M A, Powell M D, Becker J A *et al*, 2007. Effect of an acute necrotic bacterial gill infection and feed deprivation on the metabolic rate of Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ*, 78: 29—36
- Kolb H, Kolb-Bachofen V, 1998. Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator? *Immunol Today*, 19: 556—561
- Kroncke K D, Fehsel K, Kolb-Bachofen V, 1998. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol*, 113: 147—156
- Laing K J, Hardie L J, Aartsen W *et al*, 1999. Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Comp Immunol*, 23: 71—85
- Lim C, Lovell R T, 1978. Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J Nutr*, 108: 1137—1146
- Moncada S, Palmer R M, Higgs E A, 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43: 109—142
- Montero D, Marrero M, Izquierdo M S, 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) juveniles subjected to crowding stress. *Aquaculture*, 168: 269—278
- Mulero V, Esteban M A, Meseguer J, 1998. Effects of *in vitro* addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) phagocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 185—199
- Ortuno J, Cuesta A, Esteban M A, 2001. Effects of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 79: 167—180
- Saxena S K, Mathur A, Srivastava R C, 2001. Induction of nitric oxide synthase during Japanese encephalitis virus infection: evidence of protective role. *Arch Biochem Biophys*, 391: 1—7
- Tafalla C, Coll J, Secombes C J, 2005. Expression of genes related to the early immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) infection. *Dev Comp Immunol*, 29(7): 615—626
- Tafalla C, Figueras A, Novoa B, 1999. Role of nitric oxide on the replication of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus. *Vet Immunol Immunopathol*, 72(3): 249—256
- Villamil L, Tafalla C, Figueras A *et al*, 2002. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Clin Diagn Lab Immunology*, 9(6): 1318—1323
- Wadt K A, Larsen C M, Anderser H U, 1998. Ciliary neurotrophic factor Potentates the beta-cell inhibitory effectors of IL-1 beta in rat Pancreatic islets associated with increased nitric oxide synthesis and increased expression of inducible nitric oxide synthase. *DIABETES*, 47(10): 1602—1608
- Weinberg J B, 1998. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review. *Mol Med*, 4: 557—591
- Zhou L B, Bai R, Tian J X *et al*, 2009. Bioinformatic comparisons and tissue expression of the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene from the red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 27(4): 577—584

## EFFECTS OF DIETARY VITAMIN C ON NITRIC OXIDE, NITRIC OXIDE SYNTHASE ACTIVITY AND NITRIC OXIDE SYNTHASE GENE EXPRESSION IN TISSUE OF RED DRUM *SCIAENOPS OCELLATUS*

ZHOU Li-Bin<sup>1,3</sup>, BAI-Ru<sup>2</sup>, MA Xi-Lan<sup>1</sup>, WANG Shu-Qi<sup>3</sup>, ZHANG Hai-Fa<sup>4</sup>

(1. Department of Life Science, Institute of Biotechnology, Huizhou University, Huizhou 516007, China; 2. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, Shantou University, Shantou 515063, China; 4. Guangdong Marine Fishery Development Center, Huizhou 516081, China)

**Abstract** We conducted an experiment to study the effects of dietary vitamin C on nitric oxide, NOS activity and nNOS mRNA expression in tissues of red drum *Sciaenops ocellatus*. Six iso-nitrogenous and iso-energetic diets were formulated to contain graded level of vitamin C (0, 49.3, 98.9, 198.7, 398.6, and 1987.4 mg/kg diet, respectively) and fed to 18 floating net cages (1.5×1.0×1.0 m) each containing 20 fish (initial weight: 147g) twice daily (07:30, 16:30) for 8 weeks. Results indicate that after 8-week feeding trial, the levels of nitric oxide (NO) content and nitric oxide synthase (NOS) activity in head, kidney, liver, and thymus were boosted with increasing dietary vitamin C from 0 to 1987.4 mg/kg ( $P<0.05$ ), but in spleen and intestines, no significant difference was found among dietary treatments. The NOS activity reached a peak value in brain fed at 398.6 mg/kg of dietary vitamin C. No significant difference in nNOS mRNA expression in brain was found among dietary treatments; the level of nNOS mRNA expression was found maximal in all tissues except for brain when fed 1987.4 mg/kg of dietary vitamin C. Therefore, adding dietary vitamin A in feed a proper amount could increase remarkably the NO content, NOS activity, and nNOS mRNA expression of red drum.

**Key words** red drum *Sciaenops ocellatus*; vitamin C; nitric oxide; immunity