

## Vc对中国对虾非特异免疫因子及TLR/NF- $\kappa$ B表达量的影响

冯伟<sup>1,2</sup>, 李健<sup>2\*</sup>, 李吉涛<sup>2</sup>, 陈萍<sup>2</sup>, 廖梅杰<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 为了解Vc的免疫机制,以中国对虾为实验动物,对其投喂添加不同Vc含量(0%、0.5%、1%、2%)的饲料,进行存活率、iNOS、CAT、LZM酶活性及TLR、NF- $\kappa$ B表达水平的比较。结果发现:(1) 饲喂Vc的不同处理组提高了中国对虾的存活率,iNOS、CAT及LZM活性,其中1%添加组存活率达90.28%,显著高于其他组。(2) Vc可以调节TLR、NF- $\kappa$ B在血清及鳃中的表达水平。1%添加组血清、鳃中TLR的表达水平相对于各自的对照组表现出显著性差异( $P < 0.05$ )。TLR、NF- $\kappa$ B在组织中的表达趋势并不一致。1%组血清中NF- $\kappa$ B的表达水平高于对照组,其他两组的表达水平始终位于对照组之下,而2%添加组鳃中的表达水平高于其他三组,说明Vc可以调节这两个免疫基因的表达,在中国对虾的免疫应答中发挥重要作用。

**关键词:** 中国对虾; Vc; 存活率; 非特异免疫因子; TLR; NF- $\kappa$ B

**中图分类号:** Q 786; S 917

**文献标识码:** A

对虾养殖业作为我国海水养殖业的支柱产业,自1993年全国养殖对虾因感染白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)而发生大规模暴发性流行病以来,对虾养殖业受到了严重的打击。虽然抗生素和其他化学药物可用来防治虾类的急性感染,但从使用抗生素等药物的安全性、抗药性以及食品安全性等方面考虑,兼之药物不能有效地解决虾类疾病防治问题,因而,通过饲喂免疫增强剂提高对虾免疫能力是提高对虾抗病力和存活率的一个重要措施<sup>[1]</sup>。Vc在机体内参与生长、发育、繁殖等多种生理反应,通过增强细胞吞噬能力、促进抗体的产生、参与抗氧化酶系反应等方式增强对应激及病原体的抵抗能力<sup>[2-4]</sup>,是一种机体不可缺少的维生素及重要的抗氧化增强剂。Vc对抗炎反应有一定的辅助作用,李桂兰等<sup>[5]</sup>对阿司匹林维生素c酯的抗炎作用研究中发现,这种复合酯的效果较好于单独使用抗炎药物,减轻了对胃肠的刺激性。王慧敏等<sup>[6]</sup>发现大剂量的Vc可以减少真菌在大鼠体内的繁殖,减轻

炎症反应。Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)是一类与免疫相关的跨膜受体蛋白,是进化中比较保守的一个受体家族,可以在炎症组织中表达,并可以成为预防及治疗炎症时的一种潜在靶目标<sup>[7]</sup>。通过下游的信号通路激活NF- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B)使之进入细胞核诱导iNOS(inducible nitric oxide synthase)等炎症因子启动炎症反应;还可以提高吞噬细胞的吞噬活性,增强对细菌、真菌等的防御能力,在抗感染免疫方面起到重要作用。NF- $\kappa$ B是位于细胞浆中的一个重要的快反应转录因子,它可以调节的蛋白包括细胞因子、趋化因子、免疫受体、转录因子、氧化应激相关酶等,参与炎症和免疫反应以及对病毒感染的反应等<sup>[8-9]</sup>。目前,Vc对TLR及其通路因子影响的研究尚未见报道。本试验将不同浓度Vc投喂给中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*),通过测定存活率、非特异酶活力等指标寻求免疫效果较好的Vc添加浓度,并希望从分子水平讨论Vc与TLR、NF- $\kappa$ B mRNA表达量的关系。

收稿日期:2010-09-20

修回日期:2010-11-12

资助项目:国家虾产业技术体系(nycytx-46);公益性行业专项(200803012);公益性农业行业科研专项(201103034)

通讯作者:李健, Tel:0532-85830183, E-mail:lijian@ysfri.ac.cn

## 1 材料与方 法

### 1.1 饲料配制

Vc(活性成分为 35%) 购买于金得利饲料厂,按照 0.5%、1%、2% 的比例添加到基础饲料原料中(表 1),配制成三种免疫试验饲料。各原料分别粉碎过 60 目筛,准确称量后逐级充分混合,以 1% 的褐藻酸钠作为粘合剂,加适量水用小型绞肉机挤压制成颗粒饲料,晒干后于 4 °C 冰箱中保存备用。

表 1 基础饲料成分及含量

Tab. 1 Composition and content of basal feed

成分 composition	含量(%) content
花生粉 groundnut flour	25
豆粉 bean flour	10
面粉 flour	7
鱼粉 fish meal	45
鱼油 fish oil	5
NaHPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0.3
复合维生素(不含 Vc) multi-vitamin(without Vc) <sup>1</sup>	0.5
玉米粉 corn flour	5
鱼油膏 fish ointment	2

注:<sup>1</sup>复合维生素成分参照艾春香等<sup>[10]</sup>。

每 100 g 复合维生素(不含 Vc) 中含: V<sub>B1</sub> 0.15 g, V<sub>B2</sub> 0.375 g, V<sub>B3</sub> 1.0 g, V<sub>B5</sub> 1.0 g, V<sub>B6</sub> 0.4 g, V<sub>B7</sub> 0.04 g, V<sub>B11</sub> 0.1 g, V<sub>B12</sub> 0.01 g, V<sub>A</sub> 0.004 g, V<sub>D3</sub> 0.087 5 g, V<sub>E</sub> 1.125 g, V<sub>K</sub> 0.05 g, 肌醇 10.0 g, 纤维素 85.66 g。

Notes: Multi-vitamin ingredient was referred to AI *et al.* <sup>[10]</sup>.

Each 100 g multivitamin(excluding Vc) contains: V<sub>B1</sub> 0.15 g, V<sub>B2</sub> 0.375 g, V<sub>B3</sub> 1.0 g, V<sub>B5</sub> 1.0 g, V<sub>B6</sub> 0.4 g, V<sub>B7</sub> 0.04 g, V<sub>B11</sub> 0.1 g, V<sub>B12</sub> 0.01 g, V<sub>A</sub> 0.004 g, V<sub>D3</sub> 0.087 5 g, V<sub>E</sub> 1.125 g, V<sub>K</sub> 0.05 g, inositol 10.0 g, cellulose 85.66 g.

### 1.2 试验动物分组及样品处理

中国对虾取自山东青岛胶州宝荣水产科技发展有限公司,体重(13.55 ± 3.08) g,体长(10.54 ± 1.21) cm。对虾饲养于 200 L 的 PVC 桶中,养殖海水水温 26 ~ 30 °C,水溶氧 5 mg/L 以上,pH 7.8 ~ 8.4,盐度 22。

试验前按照完全随机的原则,将试验用虾分成四组,分别为对照组(0%)、低(0.5%)、中(1%)、高(2%)浓度组,每组 10 桶,每桶 20 尾,暂养一周。正式饲养试验时,各试验组分别投喂含不同浓度 Vc 的饲料,每日投喂 4 次,日投饵量约为 20 g/kg 虾。各组分别在试验的第 1、3、6、9、12、15 天取样。用纱布擦干头胸甲表面海水,然后用 75% 酒精棉球擦拭虾体,取血液和鳃组织。

酶活测定样品处理:血液抽取后 4 °C 5 000

r/min 离心 10 min,取上清至无菌离心管中,-20 °C 冰箱中保存。鳃组织经液氮研磨后取等质量样品放入离心管中,加入 10 倍的 0.1 mol/L 磷酸钾盐缓冲液,离心后取上清检测非特异免疫酶活力。

基因表达样品处理:血液抽取后放入 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中,4 °C 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 1 mL Trizol,震荡使沉淀悬浮,放入液氮中保存。鳃组织直接放入无 RNA 酶离心管,液氮保存。

### 1.3 存活率检测

试验期间每天记录各组死亡对虾数,根据以下公式计算各个取样点中国对虾的存活率。

$$S(\%) = 1 - [D_{t_1} + D_{t_3} + \dots + D_{t_{15}}] / N_{\text{总}} \times 100$$

式中: S 为存活率, D 为对虾死亡数, t 为取样时间, N<sub>总</sub> 为试验组对虾总数。

### 1.4 非特异性免疫指标检测

利用考马斯亮蓝法测定组织蛋白含量。

采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒检测诱导型一氧化氮合成酶(Inducible nitric oxide synthase, iNOS)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性。

以溶壁微球菌(Micococcus lysolei)冻干粉(南京建成生物工程研究所生产)为底物,按照 Dan Hultmark 的方法,利用 96 孔酶标板在 570 nm 处检测溶菌酶(Lysozyme, LZM)活性。

### 1.5 TLR mRNA 定量检测

Trizol 法提取血液和鳃的总 RNA,利用 Dnase 去除 RNA 中的 DNA,然后 RNA 反转录合成 cDNA。应用实时定量 PCR 技术,以 cDNA 为模板,中国对虾 18S rRNA<sup>[11]</sup> 为管家基因检测 TLR、NF- $\kappa$ B 的表达变化量,利用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法进行相对定量分析,公式如下:

$$\Delta Ct_{\text{样本}} = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}}; \Delta Ct_{\text{对照}} = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}}; \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{样本}} - \Delta Ct_{\text{对照}}; \text{目的基因的表达式} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

### 1.6 数据统计

采用 SPSS 16.0, EXCEL 分析软件进行单因子方差分析和 Duncan 氏多重检验。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度的 Vc 对中国对虾存活率的影响

根据公式计算出试验各组在各个时间点中国

对虾的存活率,由表2可知,Vc添加组之间存活率差异不明显( $P > 0.05$ );中浓度组的存活率始

终高于其他各组,在第15天显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

表2 不同浓度的Vc对中国对虾存活率的影响

Tab.2 Effects of supplemental different level Vc on survival of Chinese shrimp

	试验时间(d) time					
	1	3	6	9	12	15
对照 control	97.5 ± 5.27	91.25 ± 10.29	88.75 ± 10.94	85 ± 12.91	80 ± 15.81	71.25 ± 20.45 <sup>b</sup>
低 low	97.22 ± 5.51	95.83 ± 6.25	91.67 ± 8.84	91.67 ± 8.84	88.89 ± 7.51	86.11 ± 9.77 <sup>a</sup>
中 middle	100 ± 0.00	98.61 ± 4.17	95.83 ± 8.84	94.44 ± 11.02	93.06 ± 11.02	90.28 ± 10.42 <sup>a</sup>
高 high	96.25 ± 6.04	95 ± 6.45	93.75 ± 6.59	92.5 ± 6.45	91.25 ± 8.44	86.25 ± 9.22 <sup>a</sup>

## 2.2 不同浓度的Vc对中国对虾血清、鳃 iNOS 活性的影响

不同浓度的Vc对中国对虾血清、鳃 iNOS 活性的影响见图1和图2。Vc添加组的iNOS的活性在中国对虾血清和鳃中的活性均高于对照组。血清中除第12天iNOS活性略高于低浓度组外,对照组的iNOS活性均低于其他三组;中浓度组iNOS活性在前9天均保持较高水平,在第9天活力达到最高,并且显著高于这一时间点的其他三组( $P < 0.05$ );而在鳃中,中、高组试验的后期活性高于前期,且最高值出现在第9天。

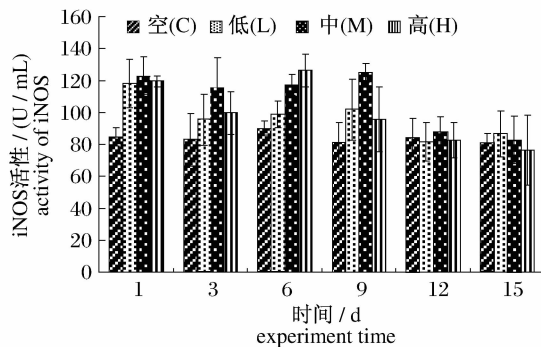


图1 不同浓度Vc对中国对虾血清iNOS活性影响  
Fig.1 Effects of Vc on iNOS in serum of Chinese shrimp

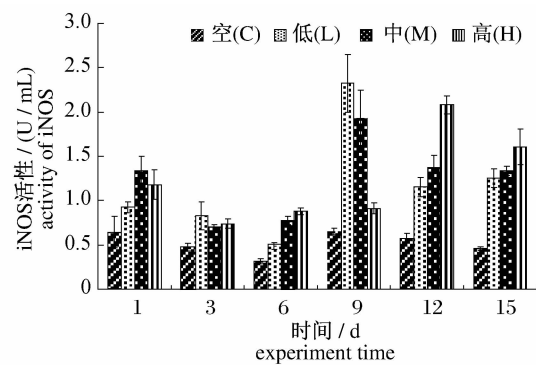


图2 不同浓度Vc对中国对虾鳃iNOS活性影响  
Fig.2 Effects of Vc on iNOS in gill of Chinese shrimp

## 2.3 不同浓度的Vc对中国对虾血清、鳃CAT活性的影响

不同浓度的Vc对中国对虾血清、鳃CAT活性的影响见图3和图4。各组血清中CAT活性呈先升高后降低的趋势,且低、中、高浓度组CAT活性始终高于对照组。中、高浓度组在同一时间点CAT活性差异不显著( $P > 0.05$ ),在第9天活性达到最高时中浓度组略高于高浓度组。鳃组织中各组CAT活性随时间变化趋势与血清相似,中浓度组在第6天达到最高值。

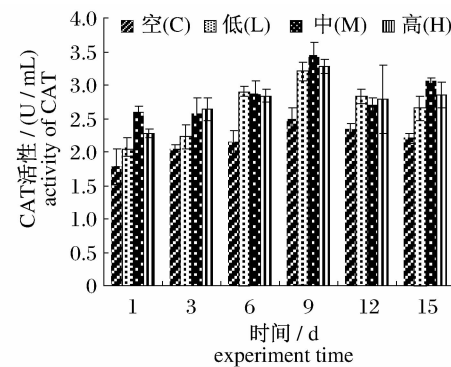


图3 不同浓度Vc对中国对虾血清CAT活性影响  
Fig.3 Effects of Vc on CAT in serum of Chinese shrimp

## 2.4 不同浓度的Vc对中国对虾血清、鳃LZM活性的影响

不同浓度的Vc对中国对虾血清、鳃LZM活性的影响见图5和图6。血清中中浓度组LZM活性在第12天达到最高,且显著高于其他组( $P < 0.05$ )。而在鳃中,中浓度组在试验的第6天LZM活性就达到了最高,显著高于其他三组( $P < 0.05$ )。6天后中、高浓度组活性都保持较高水平,但两组间差异不显著( $P > 0.05$ )。

## 2.5 不同浓度的Vc对血清、鳃TLR mRNA表达水平的影响

不同浓度的Vc对血清和鳃TLR mRNA相

对表达量的比较结果见图 7 和图 8。

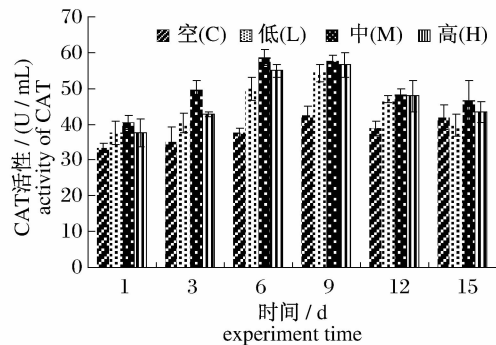


图 4 不同浓度 Vc 对中国对虾鳃 CAT 活性影响

Fig.4 Effects of Vc on CAT in gill of Chinese shrimp

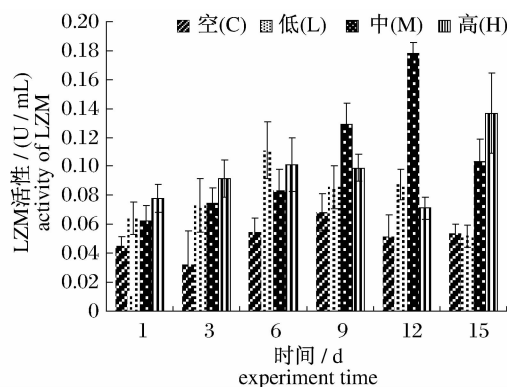


图 5 不同浓度 Vc 对中国对虾血清 LZM 活性影响

Fig.5 Effects of Vc on LZM in serum of Chinese shrimp

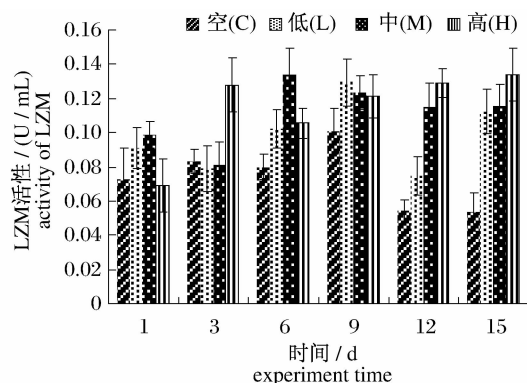


图 6 不同浓度 Vc 对中国对虾鳃 LZM 活性影响

Fig.6 Effects of Vc on LZM in gill of Chinese shrimp

在试验的前 12 天,血清对照组 TLR mRNA 相对表达量低于其他三组,第 9 天各组 TLR mRNA 相对表达量都较低。第 12 天时,对照组始终保持较低水平,但其他三个试验组的 TLR mRNA 相对表达量较对照组表现出极显著差异性 ( $P < 0.05$ ),中浓度的相对表达量最高,达 9.51。鳃组织中对对照组 TLR mRNA 相对表达量

除第 6 天高于中浓度组外,其他时间点均低于其他三个试验组,在第 12 天,高、中、低试验组的表达量显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。

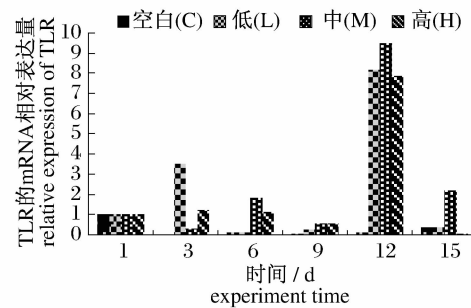


图 7 不同浓度 Vc 对中国对虾血清

TLR mRNA 表达量的影响

Fig.7 Effects of Vc on TLR mRNA in serum of Chinese shrimp

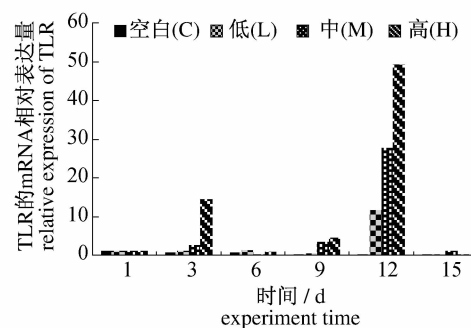


图 8 不同浓度 Vc 对中国对虾鳃

TLR mRNA 表达量的影响

Fig.8 Effects of Vc on TLR mRNA in gill of Chinese shrimp

## 2.6 不同浓度的 Vc 对血清、鳃 NF- $\kappa$ B mRNA 表达水平的影响

NF- $\kappa$ B mRNA 在血清和鳃中的表达变化见图 9 和图 10。血清中低、高浓度组 NF- $\kappa$ B mRNA 表达量在整个试验期间始终低于对照组,中等浓度组除了第 12 天低于对照组外,其他时间点表达量均高于对照组。中浓度组 NF- $\kappa$ B mRNA 相对表达量从第 6 天逐渐升高,第 9 天出现峰值而后开始降低。而在鳃组织中,低、中浓度组 NF- $\kappa$ B mRNA 相对表达量始终低于对照组,高浓度组的 NF- $\kappa$ B mRNA 相对表达量在试验开始后迅速升高,第 3 天达到最高值,显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),而后开始降低。

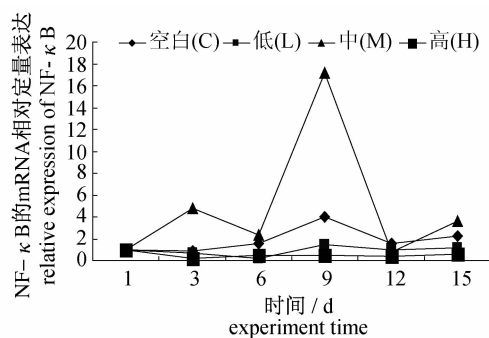


图9 不同浓度Vc对中国对虾血清NF-κB表达量的影响

Fig. 9 Effects of Vc on NF-κB in serum of Chinese shrimp

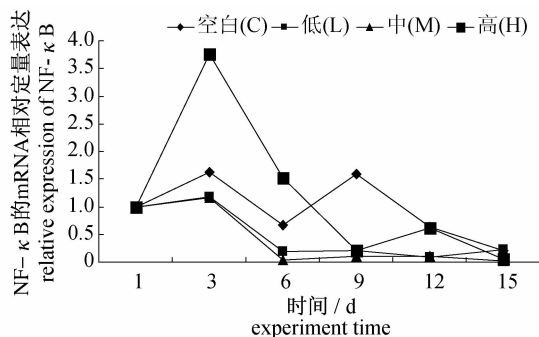


图10 不同浓度Vc对中国对虾鳃NF-κB mRNA表达量的影响

Fig. 10 Effects of Vc on NF-κB mRNA in gill of Chinese shrimp

### 3 讨论

#### 3.1 Vc对中国对虾存活率及非特异酶活性的影响

Vc是一种常见的饲料添加剂,在对虾机体内参与多种生化反应,起到营养及免疫增强的作用。由于对虾体内缺乏合成Vc的酶,因此只能通过饲料中添加获得。适量的添加Vc可以促进机体生长发育,并能提高水产动物的存活率及非特异酶活力<sup>[12-15]</sup>。秦志华等<sup>[16]</sup>建议中国对虾稚虾Vc-2-聚磷酸酯适宜添加量为3 000 mg/kg可以很好地提高免疫水平。宋理平等<sup>[3]</sup>对中国对虾幼虾的研究发现,添加0.030%、0.045 0% Vc可以显著提高CAT活性,添加0.015%后显著提高了LZM活性。NAVARRE等<sup>[17]</sup>认为虹鳟饲料中Vc添加量为最适生长量的5倍和10倍时能明显促进抗体的产生,并在10倍时产生抗体最多明显

提高了免疫水平。这与本试验的研究结果相似。本试验中Vc添加组的免疫水平高于对照组;中浓度组中国对虾的存活率最高为90.28%;中、高浓度Vc添加组在血清及鳃组织中CAT、LZM活性保持在较高水平,且中浓度组的活性最高。Vc激发的免疫反应可能受到体内维生素C库的影响<sup>[18]</sup>,过高或过低的Vc对免疫应答起到抑制作用。通过Vc的反馈抑制调节Vc库与组织中Vc的含量,进而影响免疫水平的高低。本试验发现,添加1%Vc的中浓度组可以显著提高中国对虾的存活率及非特异免疫能力。诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)在正常的生理情况下表达量很低,但接受病原或免疫刺激物刺激后活性会升高并在L-精氨酸作为底物的情况下会长时间催化产生大量的NO,通过非特异性杀伤细菌、真菌及病毒等参与抗炎反应<sup>[19-21]</sup>。本试验以Vc作为免疫刺激物发现,在血清中Vc添加组iNOS在试验前九天的活性显著高于对照组,试验后期差异不明显;鳃中Vc添加组iNOS活性始终高于对照组,说明Vc可以在一定程度上提高iNOS活性。姜国建等<sup>[22]</sup>研究发现血细胞遭受破坏后,对虾血细胞中的NOS活性会显著下降。Vc可以提高细胞数量及活性<sup>[4,23]</sup>,进而使iNOS活性增强。在接受刺激后iNOS需要经过一段时间的转录诱导才能释放出NO,使得免疫保护作用滞后<sup>[24]</sup>。Vc对血清iNOS活性的提高早于鳃组织,推测血清中NO的释放可能早于鳃,血液的免疫保护能力高于鳃。

#### 3.2 Vc与中国对虾血清、鳃TLR、NF-κB表达量变化的关系

TLRs是近10年来微生物致病机制研究的一个重要进展,是一类参与机体免疫应答反应的重要分子,在炎症及抗病毒免疫反应中发挥重要作用。TLR在对虾中的研究已经陆续开展<sup>[25-34]</sup>。外界病原微生物作为外源性配体可以引起对虾各组织中的Toll样受体的表达水平发生变化,引发免疫反应。有研究发现机体内的过氧化物可以产生TLR的内源性配体,激活TLR<sup>[35]</sup>。Vc对氧自由基的清除影响TLR内源性配体的数量,间接影响TLR的表达水平。

本试验用Vc对中国对虾进行免疫,试验前期中浓度组血清中TLR的表达量逐渐降低,到了后期又有所增高。而鳃中TLR除最后一天外,其

他时间 TLR 的表达水平均高于对照组,且中浓度处理组 TLR 的表达水平始终保持在较高水平。Vc 在提高细胞免疫及体液免疫的同时,一定程度上抵抗病原体的入侵,降低了组织中病原体与 TLR 蛋白的结合进而降低了表达水平。鳃直接与外界环境接触,可能受到外源性和内源性配体的双重影响,使得 Vc 免疫组的 TLR 表达水平始终高于对照组。此外,TLR 还可能受到其他内源性配体的影响,组织中配体的数量及活化程度的不同间接的影响着 TLR 的表达水平。因此,对虾组织之间免疫功能的差异可能造成了血清和鳃中的免疫因子活性的不同。TLR 不仅能激活 NF- $\kappa$ B,促进细胞因子的合成,还可以激活 MAPK 信号通路,对细胞的增殖、转化和死亡产生影响,将机体的免疫水平保持在适度水平<sup>[36]</sup>。NF- $\kappa$ B 作为 TLR 信号通路下游一个重要的传导因子,表达趋势与 TLR 存在一定差别。血清中,中浓度组的表达水平高于对照组,其他两组均低于对照组水平,且最高值出现在第九天,早于 TLR 的第 12 天。鳃组织中,TLR 和 NF- $\kappa$ B 均在高浓度组表达水平较高,但 NF- $\kappa$ B 的表达水平在第 6 天后下降到对照组水平以下。TLR、NF- $\kappa$ B 虽然位于同一信号通路中,但是因子的表达水平并不一定表现出正相关性,调控可能还受到其他因素的调控,如接头蛋白和配体的种类、TLRs 的负性调节等<sup>[37-39]</sup>。NF- $\kappa$ B 和 TLR 之间还可能受到某种正反馈的调节机制的调控<sup>[40]</sup>。氧自由基对 NF- $\kappa$ B 的激活也有一定影响<sup>[41]</sup>。本试验中 Vc 对自由基的清除也在一定程度上影响了 NF- $\kappa$ B 的表达水平。Vc 作为一种重要的免疫增强剂可以清除机体内氧自由基,促进抗氧化酶的活性,并参与 TLR-NF- $\kappa$ B 的调控,促进细胞因子、炎症因子的释放,对生物机体的免疫调节具有重要作用。TLR-NF- $\kappa$ B 对机体免疫因子的调控及外界因子对通路中各种因子影响的研究还有待我们做进一步深入的研究与探索。

#### 参考文献:

- [1] 刘栋辉,杨会军,刘永坚.  $\beta$ -葡聚糖和维生素 C 对斑节对虾生长和抗病力的效果[J]. 中山大学学报:自然科学版,2002,41(4):59-62.
- [2] 秦志华,李健,王芳,等. Vc-2-多聚磷酸酯对中国对虾幼体生长和存活的影响[J]. 水产科学,2007,26(1):17-21.
- [3] 宋理平,黄旭雄,周洪琪,等. Vc、B-葡聚糖和藻粉对中国对虾幼虾生长、成活率及免疫酶活性的影响[J]. 上海水产大学学报,2005,14(3):276-281.
- [4] 胡俊茹,王安利,曹俊明,等. 维生素 c 对水生动物生长、繁殖及免疫的调节作用[J]. 水产科学,2009,28(1):40-46.
- [5] 李桂兰,成源,东晓莹. 阿司匹林维生素 c 酯的抗炎作用及胃肠刺激性实验[J]. 西北药学杂志,1997,12(8):255.
- [6] 王慧敏,何慧洁,刘美琴. 大剂量维生素 c 预防白色念珠菌感染的实验研究[J]. 中华结核和呼吸杂志,2005,28(9):640-41.
- [7] 朱光勋. Toll 样受体与牙周病[J]. 国外医学口腔医学分册,2005,32(4):285-287.
- [8] 董开忠. NF- $\kappa$ B 与疾病的关系[J]. 西北民族学院学报:自然科学版,2003,24(47):68-71.
- [9] 李中海,端木德强,王敬泽. NF- $\kappa$ B 活化的信号通路及其生理意义[J]. 生物学杂志,2002,19(4):4-6.
- [10] 艾春香,陈立侨,刘晓玲,等. 维生素 E 对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 酚氧化酶、抗菌力和溶菌酶活性的影响[J]. 海洋与湖沼,2008,39(2):119-123.
- [11] 阎慧,李富花,王兵,等. 中国明对虾 *Re 1*/NF- $\kappa$ B 家族基因在弧菌刺激下的表达[J]. 海洋与湖沼,2008,39(6):628-633.
- [12] 王璇,高玉霞,常红,等. 维生素 c、E 对外氧化血管内皮细胞保护作用的研究[J]. 营养学报,2008,30(6):580-583.
- [13] 薛美兰,马爱国,张秀珍. 大剂量维生素 c 对大鼠抗氧化能力及淋巴细胞增殖功能影响的研究[J]. 营养学报,2008,30(5):525-527.
- [14] 王雷,李光友,毛远兴. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究[J]. 海洋与湖沼,1995,26(2):179-184.
- [15] 谢一荣,吴锐全,谢骏,等. 维生素 c 水平对大口黑鲈抵抗嗜水气单胞菌感染的影响[J]. 水利渔业,2007,27(5):102-104.
- [16] 秦志华,李健,王群,等. Vc-2-多聚磷酸酯对中国对虾稚虾生长、免疫及体内 Vc 含量的影响[J]. 海洋水产研究,2007,28(4):66-71.
- [17] NAVARRE O, HALVER J E. Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C[J]. Aquaculture, 1989, 79(1-4):207-221.
- [18] 石军,陈安国,张云刚. 维生素 C 对水产动物免疫促进作用的机理[J]. 中国饲料,2002(19):

- 22-23.
- [19] KRONCKE K D, FEHSEL K, KOLB-BACHOFEN V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, and where? [J]. *Biology and Chemistry*, 1997(1): 107-120.
- [20] REISS C S, KOMATSU T. Does nitric oxide play a critical role in viral infections [J]. *Virology*, 1998(72): 4547-4551.
- [21] KOLB H, KOLB-BACHOFEN V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity [J]. *Immunol Today*, 1992, 13: 157-160.
- [22] 姜国建, 于仁诚, 王云峰, 等. 中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 血细胞中一氧化氮合成酶的鉴定及其在白斑综合症病毒感染过程中的变化 [J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(4): 342-350.
- [23] 曹志华, 文华, 温小波, 等. 维生素 C 对黄鳝非特异性免疫机能的影响 [J]. *长江大学学报: 自然科学版*, 2008, 4(4): 41-44.
- [24] 吴晓峰, 钱建民, 王学浩. 诱导性一氧化氮合成酶在大鼠肝移植小移植模型早期损伤中的表达及意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(7): 281-283.
- [25] YANG C I, ZHANG J Q, LI F H, *et al.* A Toll receptor from chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24: 564-574.
- [26] YANG L S, YIN Z X, LIAO J X, *et al.* A Toll receptor in shrimp [J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44: 1999-2008.
- [27] MEKATA T, KONO T, SHIDA M, *et al.* Identification of cDNA encoding Toll receptor, MjToll gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(1): 122-133.
- [28] STAFFORDA J L, ELLESTAD K K, MAGOR K E, *et al.* A toll-like receptor (TLR) gene that is up-regulated in activated gold fish macrophages [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2003, 27: 685-698.
- [29] QIU L M, SONG L S, XU W, *et al.* Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong Scallop, *Chlamys farreri* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 22(5): 451-466.
- [30] LABREUCHE Y, O'LEARY N A, DE LA VEGA E, *et al.* Lack of evidence for *Litopenaeus vannamei* Toll receptor (IToll) involvement in activation of sequence-independent antiviral immunity in shrimp [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2009, 33: 806-810.
- [31] HAYASHI F, MEANS T K, LUSTER A D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function [J]. *Blood*, 2003, 102(7): 2660-2669.
- [32] DOYLE S E, O'CONNELL R M, MIRANDA G A, *et al.* Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38 [J]. *Exp Med*, 2004, 199(1): 81-90.
- [33] LANDER J M, MEDZHITOV R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors [J]. *Science*, 2004, 304(5673): 1014-1018.
- [34] THOMA-USZYNSKI S, STENGER S, TAKEUCHI O, *et al.* Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors [J]. *Science*, 2001, 291(5508): 1544-1547.
- [35] FRANTZ S, KELLY R A, BOURCIER T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappa B by oxidative stress in cardiac myocytes [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(7): 5197-5203.
- [36] 杨玉荣, 余锐萍, 梁宏德. Toll-NF- $\kappa$ B 信号途径及其介导的功能 [J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 29: 483-486.
- [37] 王海坤, 韩代书. Toll 样受体 (TLRs) 的信号转导与免疫调节 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(9): 820-827.
- [38] 车德才, 李水仙, 赵中夫. Toll 样受体信号传导机制研究进展 [J]. *长治医学院学报*, 2007, 21(3): 238-240.
- [39] 沈小雁, 郑捷. Toll 样受体与宿主免疫 [J]. *国外医学皮肤性病学分册*, 2003, 29(2): 106-109.
- [40] 王纪文, 曲鹏, 姜华, 等. 抑制 NF- $\kappa$ B 对 Toll 样受体 4 在 Goldblatt 鼠左室心肌中表达的影响 [J]. *高血压杂志*, 2005, 13(7): 427-431.
- [41] BLACKWELL T S, CHRISTMAN J W. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, 7(1): 3-9.

## Effects of supplemental different level Vc on survival and non-specific immunity of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)

FENG Wei<sup>1,2</sup>, LI Jian<sup>2\*</sup>, LI Ji-tao<sup>2</sup>, CHEN Ping<sup>2</sup>, LIAO Mei-jie<sup>2</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** In order to deeply understand the immune function of Vc, we fed different levels (0%, 0.5%, 1%, 2%) of Vc to study the influence on the Chinese shrimp. We detected survival rate and activity of iNOS, CAT and LZM at the different experiment times of Chinese shrimp. Using real-time fluorescent quantitative RT-PCR approach, expression TLRs and NF- $\kappa$ B genes were examined in serum and gills of the Chinese shrimp. Results showed that: (1) VC can raise the survival rate and the activity of iNOS, CAT and LZM. The 1% groups show the best immune activating effects among groups, with survival rate at 90.3%, significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that of other groups. (2) Vc has regulatory activity on mRNA expression of TLR and NF- $\kappa$ B. There are significant differences ( $P < 0.05$ ) on TLR expression in the serum and gill of 1% group compared to the control. NF- $\kappa$ B mRNA expression in serum of 1% group is higher than that in other groups, but that in 2% group has the highest levels in early six days, and then declines even lower than the control. NF- $\kappa$ B mRNA expression in gill of 2% group is higher than control. Overall, these results demonstrate that Vc can effectively improve the survival rate and the activity of three non-specific immunity enzymes of the Chinese shrimp and regulate the expression level of TLRs and NF- $\kappa$ B.

**Key words:** *Fenneropenaeus chinensis*; Vc; survival rate; non-specific immunity; TLR; NF- $\kappa$ B

**Corresponding author:** LI Jian. E-mail: lijian@ysfri.ac.cn