

文章编号: 1000-0615(2016)05-0763-13

DOI: 10.11964/jfc.20150609949

饲料中花生四烯酸水平对凡纳滨对虾免疫相关基因表达及抗菌能力的影响

赵利斌¹, 王鑫磊¹, 黄旭雄^{1,2,3*}, 陈春燕¹, 李航¹

(1.农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海海洋大学, 上海 201306;

2.上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306;

3.水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心, 上海 201306)

摘要: 为了评估饲料中花生四烯酸(arachidonic acid, ARA)水平对凡纳滨对虾免疫相关基因表达及抗菌能力的影响, 分别以鱼油和混合植物油为脂肪源, 设计了2个系列共9组不同ARA含量的等氮等能, 且具备相同饱和脂肪酸(SFA)、单不饱和脂肪酸(MUFA)、多不饱和脂肪酸(PUFA)和n-3/n-6比例的实验饲料, 投喂对虾6周后, 检测各组对虾在急性感染溶藻弧菌0、24、36和42 h时鳃组织中Toll受体、IMD(immune deficiency)和溶菌酶mRNA表达量, 并统计感染后96 h内对虾的死亡情况。结果表明: ①对虾摄食以鱼油为脂肪源的饲料[饲料DHA(22:6n-3)和EPA(20:5n-3)含量分别为5.85和3.83 mg/g饲料], 其鳃组织中Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA表达量均随饲料中ARA含量的升高呈现先升高后下降的变化; 0.56(B组)和0.87 mg ARA/g饲料组(C组)对虾溶菌酶mRNA表达量显著高于0.44(A组)、1.02(D组)和0.28 mg ARA/g饲料组(E组)($P<0.05$); 对虾摄食以植物混合油为脂肪源的饲料(DHA和EPA含量分别为3.28和1.87 mg/g饲料), 其鳃组织中Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA表达量随饲料中ARA含量的升高而升高; 1.44 mg ARA/g饲料组(I组)对虾Toll受体mRNA表达量显著高于0.19 mg ARA/g饲料组(F组)($P<0.05$)。②人工急性感染溶藻弧菌后, 各组对虾鳃组织中Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA的表达量随感染进程均出现显著变化。摄食以鱼油为脂肪源的饲料时, 对虾鳃组织中Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA表达量峰值均出现在0.56 mg ARA/g饲料组(B组), 且峰值分别出现在感染后24、42和24 h。摄食以混合植物油为脂肪源的饲料时, 对虾鳃组织中Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA表达量峰值均出现在1.44 mg ARA/g饲料组(I组), 且峰值分别出现在感染后24、42和36 h。③各实验组对虾急性感染溶藻弧菌后96 h累积死亡率无显著差异。本研究表明, 饲料ARA水平影响凡纳滨对虾免疫相关基因(Toll受体、IMD和溶菌酶)的表达, 且ARA调控免疫基因表达的效果受饲料EPA和DHA水平的影响。

关键词: 凡纳滨对虾; 花生四烯酸; 溶藻弧菌; Toll受体mRNA; IMD mRNA; 溶菌酶mRNA

中图分类号: S 963

文献标志码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是我国养殖范围最广且产量最大的虾类养殖品种, 据统计2011年我国凡纳滨对虾的产量为123.3万t, 占

虾类总产量的一半以上^[1]。近年来, 高密度养殖模式下各种应激和疾病的暴发严重制约了凡纳滨对虾养殖效益和产业的可持续发展^[2]。养殖过

收稿日期: 2015-06-30 修回日期: 2015-11-02

资助项目: 上海市科委项目(14320502000); 上海市教委知识服务平台项目(ZF1206)

通信作者: 黄旭雄, E-mail: xxhuang@shou.edu.cn

程中对虾应激反应和疾病的暴发与对虾自身免疫机能密切相关^[3]。研究表明饲料中脂肪酸水平会影响动物的免疫力^[4]。花生四烯酸(20:4n-6, ARA)是细胞膜的重要组成物质,在维持细胞膜的流动性及机体炎症和免疫反应中起重要作用^[5-8]。在鱼类^[9-10]、长巨牡蛎(*Crassostrea gigas*)^[11]和*Crassostrea corteziensis*^[12]中已证实,饲料ARA水平可以调节机体免疫抗菌机能。

先天免疫系统是凡纳滨对虾抵御外界病原微生物入侵的屏障,而机体产生免疫反应的首要环节在于免疫识别。因此作为引发免疫应答的上游因子,对模式识别受体的研究就显得尤为重要^[13]。Toll受体(Toll receptors)是一种跨膜病原模式识别受体,在急性炎症反应、细胞吞噬作用的调节、细胞信号传导、细胞凋亡中抗真菌和细菌等病原感染均起重要作用^[14-15]。IMD (immune deficiency)途径是对虾的另一个重要免疫识别信号传导通路。革兰氏阴性细菌和杆状阳性细菌能通过跨膜蛋白PGRP-LC激活IMD信号途径并诱导细胞产生免疫效应因子^[16]。溶菌酶是生物体内重要的非特异免疫效应因子,它通过催化水解细菌细胞壁中肽聚糖的 β -1,4糖苷键而使细菌细胞裂解,并能清除其他抗菌肽和蛋白作用后残余的细菌细胞壁,协同其他免疫因子进行防御免疫^[17]。研究表明,对虾Toll受体mRNA^[18]和IMD mRNA^[19]在鳃组织中表达量较高。大量研

究显示,饲料中添加Vc^[20]、铜^[21]、锌^[22]和酵母提取物^[2]会影响凡纳滨对虾免疫相关基因的表达。有关饲料ARA水平是否影响对虾免疫相关基因表达尚未见报道。本研究分别以鱼油和混合植物油作为脂肪源,设计了2个系列9组等能等氮且具有相同饱和脂肪酸(SFA)、单不饱和脂肪酸(MUFA)、多不饱和脂肪酸(PUFA)和n-3/n-6比例的不同ARA水平实验饲料,旨在探讨不同DHA和EPA水平下饲料中ARA水平对凡纳滨对虾在溶藻弧菌急性感染前后Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA表达量及抗菌能力的影响。

1 材料与方法

1.1 饲料的制备

按实验配方(表1,表2)制作2个系列共9组等能等氮的凡纳滨对虾饲料。将各种原料粉碎后过80目筛,采用逐级扩大法混合均匀,添加油脂后加水制成面团状,通过绞肉机挤压成直径为1 mm的面条状,在真空干燥箱内95 °C熟化15 min后,放入冷冻干燥机中-46 °C冷冻干燥。将干燥后的条状饲料用绞肉机破碎至适宜颗粒大小(1~3 mm)。真空包装,-20 °C冷冻保存。各组饲料脂肪酸含量经检测后见表3。

1.2 饲料营养组成及脂肪酸含量的测定

饲料干物质测定采用105 °C烘干恒重法,饲

表1 实验饲料混合油脂组成
Tab. 1 The compositions of the blended oil for experimental diets

处理 treatments	鱼油组 ^a based on fish oil					混合植物油组 ^b based on blended vegetable oil			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
鱼油 fish oil	2.50	2.45	2.38	2.28	1.25	0	0	0	0
紫苏油 perilla oil	0	0	0	0.03	0	0.89	0.88	0.88	0.90
棕榈油 palm oil	0	0	0	0	0.58	1.26	1.31	1.26	1.32
油菜籽油 rapeseed oil	0	0	0	0	0.27	0.35	0.26	0.26	0.13
DHA油脂 ^c DHA oil	0	0	0.02	0.04	0.40	0	0	0	0
ARA油脂 ^c ARA oil	0	0.05	0.10	0.15	0	0	0.05	0.10	0.15
总计 total	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50

注: a. 鱼油由上海农好饲料有限公司提供; b. 紫苏油、棕榈油和油菜籽油购于上海临港农工商超市; c. DHA油脂和ARA油脂购买于中国厦门市金达威维生物公司

Notes: a. Fish oil was offered by Shanghai Nonghao Feed Co., Ltd; b. The perilla oil, palm oil and rapeseed oil were bought from Lingang Nonggongshang Supermarket; c. DHA oil and ARA oil were bought from Xiamen Kingdomway Biological Company

表 2 基础饲料配方及营养组成^a(干物质)
Tab. 2 Ingredients and nutritional composition of the basal diets^a (dry matter)

项目 items	含量 content
原料 ingredients	
鱼粉/% fish meal	22
虾壳粉/% shrimp shell meal	3.5
豆粕/% soybean meal	26
花生粕/% peanut meal	11
血粉/% blood meal	3
面粉/% flour	21.59
鱿鱼膏/% squid liver	4
啤酒酵母/% beer yeast cell	3
大豆磷脂油/% soybean lecithin oil	1
氯化胆碱/% choline chloride	0.25
多维/% vitamin premix ^a	0.1
多矿/% mineral premix ^a	0.5
维生素C/% vitamin C	0.06
混合油脂/% blended oil ^b	2.5
磷酸二氢钙/% Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.5
营养组成 nutritional composition^c	
粗蛋白质/% crude protein	40.59
干物质/% dry matter	93.66
总脂肪/% total lipid	8.19
灰分/% ash	10.59
总能/(MJ/kg) gross energy ^c	19 299.28

注: a. 多维、多矿由中国广州市信豚水产科技有限公司提供, 其他原料购买于中国上海农好饲料有限公司; b. 混合油脂配方参照表 1; c. 能量参照文献[23]计算, 其余营养组成为实测值

Notes: a. vitamin premix and mineral premix were supplied by Guangzhou Xintun Aqua-Tech Co., Ltd and other ingredients were purchased from Shanghai Nonghao Feed Co., Ltd; b. the mixture oil were illustrated as in Tab. 1; c. gross energy was calculated according to the reference [23] and the others were detected

料粗蛋白质含量采用凯氏定氮法测定; 总脂肪采用氯仿甲醇法测定; 灰分采用马弗炉 550 °C 灼烧法测定。

饲料脂肪酸的测定按照 Wen 等^[24]的测定方法进行, 采用三氟化硼甲酯化法, 以 C₁₉ 烷酸(Sigma) 作为内标测定脂肪酸绝对量, 根据脂肪酸标准品(Sigma)的分析图谱和保留时间对样品脂肪酸进行定性, 按内标法计算各脂肪酸的绝对值:

$$C_x(\text{mg/g}) = C_{19} V_{19} M_x S_x / M_{19} S_{19} m$$

式中, C_x 表示某脂肪酸在饲料样品中的含量(mg/g); C_{19} 为内标物浓度(mg/mL); V_{19} 为内标物加入的体积(mL); M_{19} 为内标物甲酯分子量; S_{19} 为内标物的峰面积; M_x 为某脂肪酸甲酯的分子量; S_x 为某脂肪酸的峰面积; m 为饲料样品质量(g)。每个样品平行测定 3 次, 取平均值。

1.3 实验用虾养殖管理

选取 1800 尾规格整齐[体质量(0.77±0.27) g]活力好的幼虾, 随机分配到悬挂在同一水池(5 m × 10 m × 1.2 m)的 36 个网箱内(80 cm × 100 cm × 120 cm)。每组 4 个平行, 养殖 6 周, 日投喂量为虾体质量的 5% 左右。每天投喂 4 次, 分别在 05:30、11:30、17:30 和 23:00。每 4 天换一次水, 换水量小于总水体的 1/3, 养殖期间连续充气保持溶解氧 > 6 mg/L, 氨氮 < 0.4 mg/L, pH 为 7.8±0.5, 水温(29±2) °C。

1.4 溶藻弧菌急性感染实验

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)菌种来自上海海洋大学病原库, 在 TCBS 固体培养基上涂布培养 24 h 后, 刮取菌斑用适量生理盐水稀释成菌悬液用于人工急性感染实验。

养殖 6 周后, 从各饲料组随机取蜕皮间期的对虾 3 尾, 采集对虾鳃组织, 用于测定感染前 Toll 受体、IMD、溶菌酶 mRNA 初始表达量。然后从各饲料组随机取 40 尾蜕皮间期的对虾, 分成 4 个平行, 每平行 10 尾, 分别暂养于 36 个塑料箱(80 cm × 50 cm × 50 cm)中, 连续充气。其中 3 个平行的对虾每尾腹部注射 30 μL 1.2 × 10⁶ CFU/mL 菌液后, 用于连续观察感染后 96 h 内的死亡情况。另一平行的对虾每尾腹部注射 30 μL 1.9 × 10⁵ CFU/mL 菌液后, 在感染后 24、36 和 42 h 从各平行中随机取活虾 3 尾, 采集对虾的鳃组织。所有采集的鳃组织于液氮中速冻, 后转移至 -80 °C 冰箱中保存, 用于测定鳃组织 Toll 受体、IMD、溶菌酶 mRNA 表达量。

1.5 Toll 受体、IMD、溶菌酶 mRNA 表达量的测定

按照 Trizol 试剂(TaKaRa 公司)说明书提取对虾鳃组织总 RNA。提取的总 RNA 的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 的比值为 1.9 ~ 2.0, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性, -80 °C 保存备用。

表 3 实验饲料脂肪酸含量

Tab. 3 The contents of fatty acids in the experimental diets

mg/g

脂肪酸 fatty acids	鱼油组 based on fish oil					混合植物油组 based on blended vegetable oil			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
14:00	0.70±0.07	0.71±0.31	0.57±0.02	0.56±0.06	0.70±0.04	0.28±0.02 ^b	0.31±0.03 ^b	0.29±0.03 ^b	0.55±0.00 ^a
15:00	0.05±0.00	0.07±0.00	0.06±0.01	0.07±0.01	0.08±0.01	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.05±0.12
16:00	7.23±0.37	7.66±0.46	6.50±0.46	7.31±0.53	8.18±0.29	8.74±0.12	9.38±1.44	9.09±1.74	12.45±0.01
16:1n5	0.07±0.00	0.08±0.01	0.06±0.01	0.08±0.01	0.08±0.00	0.00±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01	nd
16:1n7	1.45±0.06	1.90±0.45	1.16±0.05	1.25±0.11	1.43±0.14	0.56±0.09 ^b	0.56±0.06 ^b	0.50±0.03 ^b	1.10±0.00 ^a
17:00	0.08±0.01	0.15±0.03	0.10±0.01	0.12±0.02	0.13±0.01	0.06±0.00	0.07±0.01	0.06±0.00	0.11±0.13
16:4n3	0.25±0.05	0.17±0.02	0.13±0.01	0.15±0.03	0.17±0.02	0.11±0.00 ^b	0.11±0.01 ^b	0.10±0.02 ^b	0.18±0.01 ^a
18:00	1.03±0.13	1.22±0.09	1.09±0.10	1.33±0.06	1.39±0.19	1.05±0.08 ^b	1.10±0.06 ^b	1.13±0.10 ^b	1.90±0.17 ^a
18:1n9	6.04±0.56	5.53±0.50	4.76±0.20	5.51±0.07	6.08±0.76	10.37±0.57 ^b	10.13±1.02 ^{bc}	8.84±0.39 ^c	13.85±0.00 ^a
18:1n7	0.77±0.07	0.77±0.09	0.66±0.04	0.71±0.07	0.78±0.06	0.44±0.04 ^b	0.48±0.04 ^b	0.45±0.03 ^b	0.71±0.03 ^a
18:2n6	10.5±0.74	9.88±1.95	6.03±0.32	8.00±0.20	7.90±0.65	9.57±0.43	9.60±1.05	9.58±0.19	9.57±0.61
18:3n3	1.18±0.45	0.74±0.12	0.63±0.02	0.79±0.05	0.26±0.38	4.77±0.27 ^b	4.42±0.15 ^b	4.42±0.30 ^b	6.45±0.00 ^a
18:4n3	0.54±0.10	0.49±0.08	0.40±0.03	0.48±0.03	0.49±0.04	0.24±0.03 ^b	0.24±0.01 ^b	0.24±0.02 ^b	0.4±0.01 ^a
20:1n9	0.63±0.08	0.55±0.10	0.48±0.10	0.57±0.03	0.61±0.07	0.14±0.15 ^b	0.25±0.17 ^{ab}	0.26±0.02 ^{ab}	0.41±0.06 ^a
20:2n6	0.09±0.01	0.07±0.02	0.06±0.01	0.07±0.00	0.08±0.00	0.04±0.01 ^b	0.04±0.00 ^b	0.04±0.01 ^b	0.62±0.01 ^a
20:4n3	0.16±0.02	0.16±0.10	0.13±0.04	0.16±0.01	0.16±0.01	0.07±0.01 ^c	0.09±0.00 ^b	0.07±0.02 ^c	0.13±0.01 ^a
22:5n3	0.46±0.09	0.35±0.04	0.31±0.02	0.39±0.05	0.39±0.04	0.20±0.05	0.23±0.02	0.19±0.06	0.24±0.09
ARA	0.44±0.07 ^a	0.56±0.03 ^z	0.87±0.07 ^y	1.02±0.04 ^x	0.28±0.03 ^v	0.19±0.01 ^d	0.38±0.03 ^c	0.48±0.10 ^b	1.44±0.00 ^a
DHA	5.72±0.52	5.9±0.80	5.81±0.11	5.77±0.03	6.07±0.10	3.02±0.29	3.73±0.41	3.12±0.64	3.23±1.21
EPA	3.96±0.28	3.81±0.50	3.75±0.68	3.71±0.22	3.91±0.32	1.83±0.16	1.92±0.16	1.95±0.37	1.79±0.47
SFA	9.39±0.52	10.21±0.72	8.56±0.42	9.75±0.63	10.48±0.24	10.16±0.2	10.88±1.51	10.6±1.82	12.07±0.52
MUFA	9.30±0.58	8.73±0.93	6.94±0.34	8.29±0.24	8.98±1.00	11.37±0.55 ^a	11.17±1.11 ^{ab}	9.80±0.44 ^b	10.72±0.43 ^{ab}
PUFA	21.89±0.44	20.08±0.62	19.17±0.83	20.36±0.37	20.28±0.41	19.94±1.04	20.68±1.14	20.09±0.84	20.74±1.01
N-3PUFA	11.98±0.38	11.28±1.43	10.50±0.72	11.32±0.17	11.29±0.56	10.14±0.64	10.65±0.44	9.99±1.26	10.73±1.45
N-6PUFA	9.91±1.74	8.80±1.94	8.67±0.12	9.04±0.17	8.99±0.65	9.80±0.43	10.03±1.08	10.10±0.30	10.01±1.23
N-3/N-6	1.21±0.05	1.28±0.03	1.21±0.01	1.25±0.80	1.26±0.05	1.04±0.04	1.06±0.06	0.99±0.01	1.07±0.04

注：表格中用x、y、z、u、v表示鱼油组各组间差异显著，用a、b、c、d表示混合植物油组各组间差异显著($P<0.05$)，nd表示未检测到

Notes: the figures super-marked with x, y, z, u, v means the significant difference among the treatments based on fish oil and the figures super-marked with a, b, c, d means the significant difference among the treatments based on blended vegetable oil ($P<0.05$), nd means not detected

按照PrimeScript[®]RT reagent Kit With gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa公司)说明书将提取的总RNA反转录为cDNA, -20 °C保存备用, 采用实时荧光定量PCR分析基因表达。参照凡纳滨对虾 Toll受体基因(GenBank: DQ923424.1)、IMD基因(GenBank: FJ592176.1)、

溶菌酶基因(GenBank: AY170126. 2)和β-actin基因(GenBank: AF300705)设计荧光定量引物(表4)。引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成。按照SYBR[®]Premix Ex Taq[™] (TliRNaseHPlus) 试剂盒(TaKaRa公司)说明书, 用Bio-rad Real-time CFX96进行荧光定量PCR。PCR程序为95 °C、

表 4 凡纳滨对虾溶菌酶基因、Toll受体基因、IMD基因与β-actin 参照基因引物序列

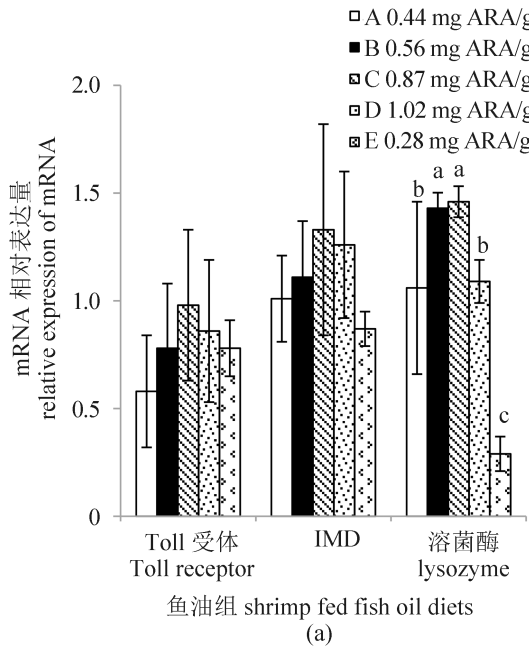
Tab. 4 Primer pairs on lysozyme, Toll receptor, IMD and β-actin genes for *L. vannamei*

引物 primer	序列 sequence
β-actin-SQF	CGCGACCTCACAGACTACCT
β-actin-SQR	CTCGTAGGACTTCTCCAGCG
Lysozyme-SQF	GTTCCGATCTGATGTCCGATG
Lysozyme-SQR	AAGCCACCCAGGCAGAATAG
Toll receptor-SQF	TGAGAGATGCCACTGCCTG
Toll receptor-SQR	CGCTTGAAGGTTTGTGAGGGAG
IMD-L134-F	ATACATCTGCCGTTGCCGA
IMD-L3-R	CCGAGATGGGTTCCCTTGTT

20 s预变性; 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 共39个循环; 反应后55.0 °C上升至95.0 °C测定熔解曲线检测反应特异性。每个复孔以β-actin为参照基因。基因表达结果采用相对表达量的形式, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[25]进行计算。

1.6 数据处理

实验结果采用平均数±标准差(mean ± SD)的



表示方法, 使用SPSS18.0 分析软件对组内不同时刻和组间同一时刻数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和Duncan氏法多重比较, P<0.05则认为差异显著。

2 结果

2.1 饲料中ARA水平对凡纳滨对虾鳃组织中免疫相关基因表达的影响

凡纳滨对虾在摄食以鱼油为脂肪源的饲料(DHA和EPA含量分别为5.85和3.83 mg/g饲料)6周后, 鳃组织中Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA表达量总体随饲料ARA水平的增加呈现先升后降的变化(图1)。摄食0.56 mg ARA/g饲料组(B组)和0.87 mg ARA/g饲料组(C组)的对虾鳃组织中溶菌酶mRNA表达量显著高于其他组(P<0.05), 而摄食0.28 mg ARA/g饲料组(E组)的对虾鳃组织中溶菌酶mRNA表达量显著低于其他组(P<0.05)。对虾在摄食以植物油为脂肪源的饲料(DHA和EPA含量分别为3.28和1.87 mg/g饲料)6周后, 对虾鳃组织中Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA表达量均随饲料ARA水平的增加呈上升趋势, 其中摄食1.44 mg ARA/g饲料组(I组)的对虾鳃组织中

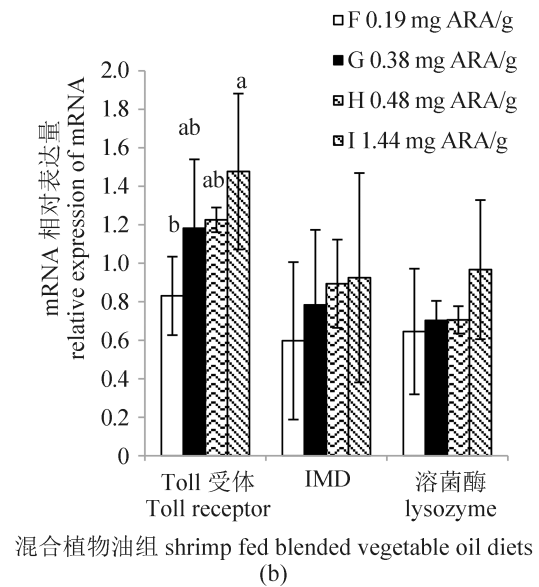


图 1 摄食不同ARA水平饲料6周后凡纳滨对虾鳃组织中Toll受体、IMD、溶菌酶mRNA相对表达量

上标不同字母表示组间差异显著(P<0.05)

Fig. 1 The mRNA expression levels of Toll receptor, IMD and lysozyme in gill of the shrimp fed diets containing different ARA levels for 6 weeks

Different superscript letters on the same gene indicate significant differences between the groups (P<0.05)

Toll受体mRNA表达量显著高于摄食0.19 mg ARA/g饲料组(F组)($P<0.05$, 图1)。

2.2 饲料中ARA水平对凡纳滨对虾急性感染溶藻弧菌后鳃组织中相关免疫基因表达的影响

以鱼油为脂肪源时,在急性感染溶藻弧菌后,各组对虾鳃组织中Toll受体mRNA的表达量随感染进程均呈现先升高后下降的变化,且在24 h达到峰值(表5);摄食0.56 mg ARA/g饲料组(B组)对虾在24和36 h时Toll受体mRNA表达量均显著高于其他组。各组对虾鳃组织中IMD mRNA表达量随感染进程呈现先下降后升高的变化,均在36 h出现最低值;感染后42 h,摄食0.56 mg ARA/g饲料组(B组)对虾鳃组织中IMD mRNA表达量显著高于其他组($P<0.05$)。各组对虾鳃组织中溶菌酶mRNA表达量随感染进程均呈现先升高后下降的变化,均在24 h时达到峰值。感染后24 h,摄食0.56 mg ARA/g饲料组(B组)对虾鳃组织中溶菌酶mRNA表达量显著高于1.02 mg ARA/g饲料组(D组)和0.28 mg ARA/g饲料组(E组)($P<0.05$, 表5)。

以混合植物油为脂肪源时,急性感染溶藻弧菌后各组对虾鳃组织中Toll受体mRNA表达量随感染进程均呈现波动变化,峰值均出现在24 h,且显著高于0 h($P<0.05$, 表6);感染24 h对虾鳃组织中Toll受体mRNA表达量随饲料ARA水平的增加而升高,摄食1.44 mg ARA/g饲料组(I组)的对虾鳃组织中Toll受体mRNA表达量在0、24、36和42 h时均显著高于0.19 mg ARA/g饲料组(F组)($P<0.05$)。摄食0.19 mg ARA/g饲料组对虾鳃组织中IMD mRNA表达量在感染42 h内无显著变化;摄食0.38 mg ARA/g (G组)、0.48 mg ARA/g (H组)和1.44 mg ARA/g饲料组(I组)的对虾鳃组织中IMD mRNA表达量随感染进程呈现先下降后升高的趋势,且其表达量峰值均出现在感染后42 h;随着饲料ARA水平的增加,弧菌感染后各组对虾IMD mRNA表达量峰值也显著增加($P<0.05$),1.44 mg ARA/g饲料组(I组)显著高于其他组($P<0.05$)。摄食0.38 mg ARA/g饲料组 (G组)、0.48 mg ARA/g饲料组 (H组)和1.44 mg ARA/g饲料组 (I组)的对虾鳃

表5 凡纳滨对虾摄食以鱼油为脂肪源的饲料后溶藻弧菌感染0、24、36和42 h时鳃组织中Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA相对表达量

Tab. 5 Toll receptor, IMD and lysozyme mRNA expression levels in gill of the shrimp fed fish oil diets at 0, 24, 36 and 42 h after *V. alginolyticus* challenge

基因 gene	时间/h time	A组(0.44 mg ARA/g) A group	B组(0.56 mg ARA/g) B group	C组(0.87 mg ARA/g) C group	D组(1.02 mg ARA/g) D group	E组(0.28 mg ARA/g) E group
Toll受体mRNA相对表达量 relative expression level of Toll receptor mRNA	0	0.58±0.26 ^b	0.78±0.30 ^b	0.98±0.35 ^b	0.86±0.33 ^a	0.78±0.13 ^b
	24	0.87±0.14 ^{by}	2.21±0.04 ^{aw}	1.39±0.13 ^{ax}	0.91±0.11 ^{by}	1.19±0.22 ^{axy}
	36	0.43±0.05 ^{byz}	0.74±0.04 ^{bw}	0.48±0.07 ^{cy}	0.60±0.01 ^{bx}	0.32±0.02 ^{cz}
	42	0.46±0.07 ^{by}	0.69±0.06 ^{bw}	0.29±0.04 ^{cz}	0.57±0.03 ^{bx}	0.61±0.05 ^{bwx}
IMD受体mRNA相对表达量 relative expression level of IMD mRNA	0	1.01±0.2 ^a	1.11±0.26 ^b	1.33±0.49 ^b	1.26±0.34 ^a	0.87±0.08 ^a
	24	0.57±0.04 ^{bw}	0.48±0.05 ^{cwx}	0.36±0.20 ^{ax}	0.50±0.13 ^{bwx}	0.61±0.10 ^{bw}
	36	0.45±0.06 ^b	0.42±0.06 ^c	0.43±0.05 ^c	0.42±0.05 ^b	0.43±0.02 ^c
	42	0.65±0.14 ^{bz}	2.02±0.04 ^{aw}	1.87±0.07 ^{ax}	1.38±0.05 ^{by}	0.45±0.03 ^{cz}
溶菌酶mRNA相对表达量 relative expression level of lysozyme mRNA	0	1.06±0.40 ^{bx}	1.43±0.72 ^{bw}	1.46±0.72 ^{abw}	1.09±0.10 ^{ax}	0.29±0.08 ^{by}
	24	1.96±0.48 ^{awx}	2.52±0.87 ^{aw}	2.01±0.23 ^{awx}	1.13±0.22 ^{axy}	0.62±0.12 ^{by}
	36	0.95±0.10 ^{bw}	0.97±0.06 ^{bcw}	0.75±0.48 ^{bx}	0.53±0.53 ^{by}	0.24±0.19 ^{bz}
	42	1.05±0.74 ^{bw}	0.93±0.23 ^{bcw}	0.87±0.12 ^{abw}	0.89±0.49 ^{abw}	0.32±0.05 ^{bx}

注: 上标不同字母a、b、c表示同一组同一基因不同时刻差异显著($P<0.05$); 上标不同字母w、x、y、z表示同一时刻不同组差异显著($P<0.05$), 下同

Notes: data in the same column with different lowercase (a, b, c) were significantly different among the different time in the same group, data in the same line with different letters (w, x, y, z) were significantly different among the different groups at the same time ($P<0.05$), the same below

表 6 凡纳滨对虾摄食以混合植物油为脂肪源饲料后溶藻弧菌感染0、24、36和42 h 鳃组织中Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA相对表达量

Tab. 6 Toll receptor, IMD and lysozyme mRNA expression levels in gill of the shrimp fed blended vegetable oil diets at 0, 24, 36 and 42 h after *V. alginolyticus* challenge

基因 gene	时间/h time	F组(0.19 mg ARA/g) F group	G组(0.38 mg ARA/g) G group	H组(0.48 mg ARA/g) H group	I组(1.44mg ARA/g) I group
Toll受体mRNA相对表达量 relative expression level of Toll receptor mRNA	0	0.83±0.20 ^{bx}	1.18±0.36 ^{bx}	1.23±0.06 ^{bw}	1.48±0.40 ^{bw}
	24	1.63±0.25 ^{ay}	2.04±0.06 ^{ax}	2.76±0.28 ^{aw}	2.92±0.09 ^{aw}
	36	0.51±0.07 ^{by}	0.92±0.08 ^{cw}	0.72±0.12 ^{cx}	0.93±0.17 ^{cw}
	42	0.71±0.03 ^{bx}	1.08±0.04 ^{bcw}	1.17±0.23 ^{bw}	1.38±0.26 ^{bw}
IMD受体mRNA相对表达量 relative expression level of IMD mRNA	0	0.60±0.41	0.78±0.39 ^{ab}	0.89±0.23 ^b	0.93±0.54 ^b
	24	0.45±0.17	0.20±0.00 ^c	0.27±0.05 ^c	0.27±0.03 ^d
	36	0.35±0.10	0.46±0.06 ^{bc}	0.41±0.05 ^c	0.53±0.08 ^c
	42	0.55±0.07 ^c	0.95±0.02 ^{ay}	1.45±0.16 ^{ax}	2.85±0.35 ^{aw}
溶菌酶mRNA相对表达量 relative expression level of lysozyme mRNA	0	0.65±0.33 ^b	0.70±0.10 ^b	0.71±0.07 ^b	0.97±0.36 ^b
	24	0.52±0.41 ^b	0.57±0.27 ^b	0.51±0.03 ^b	0.85±0.20 ^b
	36	1.43±0.26 ^{az}	1.90±0.01 ^{az}	2.03±0.12 ^{az}	2.96±0.57 ^{ay}
	42	1.61±0.33 ^{ay}	0.60±0.07 ^{bz}	0.55±0.14 ^{bz}	1.27±0.98 ^{by}

注: 上标不同字母a、b、c、d表示同一组同一基因不同时刻差异显著($P<0.05$)

Notes: data in the same column with different lowercase (a, b, c, d) were significantly different among the different time in the same group

溶菌酶mRNA表达量峰值出现在感染后36 h, 而0.19 mg ARA/g饲料组(F组)溶菌酶mRNA表达量峰值出现在感染后42 h; 溶菌酶mRNA表达量峰值同样随饲料ARA水平的增加而显著增加($P<0.05$, 表6)。

从急性感染溶藻弧菌后42 h内凡纳滨对虾鳃组织中Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA相对表达量波动图(图2)可知, 当摄食以鱼油为脂肪源的饲料时, 在相同感染剂量下摄食0.56 mg ARA/g饲料组(B组)对虾鳃组织中Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA表达量变化幅度均最大, 其次为0.87 mg ARA/g饲料组(C组)。当摄食以植物油为脂肪源的饲料时, 对虾鳃组织中Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA表达量变化幅度均随饲料ARA水平的升高而增大, 1.44 mg ARA/g饲料组(I组)具有最大的变化幅度。

2.3 饲料中ARA水平对凡纳滨对虾抗溶藻弧菌能力的影响

实验条件下摄食不同ARA饲料的凡纳滨对虾在人工急性感染溶藻弧菌48、72和96 h的累积死亡率在统计学上均无显著变化(表7)。

3 讨论

3.1 饲料ARA水平对凡纳滨对虾抗溶藻弧菌能力的影响

ARA作为磷脂结合的结构脂类, 是细胞膜的重要组成部分, 对维持细胞膜的流动性起重要作用。此外, ARA是许多具有生物活性的类二十烷酸衍生物如前列腺素E₂(PGE₂)、前列腺环素(PGI₂)、血栓烷素A₂(TXA₂)和白细胞三烯和C₄(LTC₄)的直接前体。前列腺素和白细胞三烯等类二十烷酸具有调节机体免疫力的功能^[8]。ARA可通过调节机体的皮质醇反应和Na⁺/K⁺泵来增强机体的抗应激能力^[26-27]。此外ARA能够影响细胞吞噬能力及呼吸爆发强度, 并可以通过调节谷氨酰胺转移酶活性增强水生动物机体的免疫能力^[28]。因此, ARA在机体抗应激和免疫反应中起重要调节作用。饲料ARA水平会影响机体ARA水平, 从而对机体免疫和抗应激能力产生影响。已有的研究表明, 饲料中适量ARA可以提高大西洋鲑(*Salmo Salar*)^[29]、金头鲷(*Sparus aurata*)^[30]及条纹狼鲈(*Morone saxatilis*)^[9]的抗应激能力, 也可以提高大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[31]、孔雀花鲈(*Poecilia reticulata*)^[10]和长巨牡蛎^[11]的免

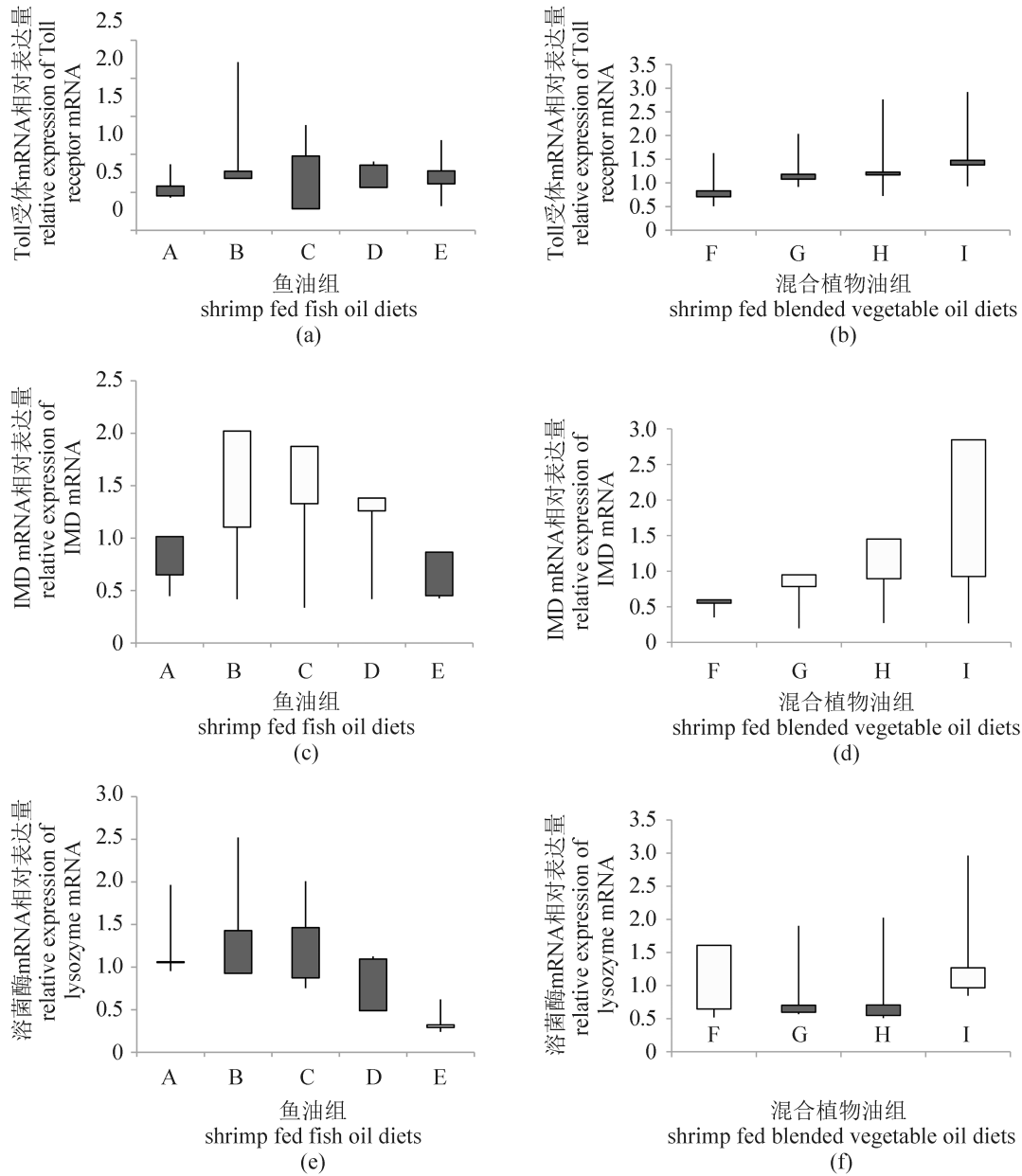


图 2 凡纳滨对虾感染溶藻弧菌后42 h内鳃组织中Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA相对表达量变化图

黑色箱体表示开始时刻的数值大于结束时刻的数值，空白箱体表示开始时刻的数值小于结束时刻的数值。箱体上引线表示变化的最大值，箱体下引线表示变化的最小值。A. 0.44 mg ARA/g; B. 0.56 mg ARA/g; C. 0.87 mg ARA/g; D. 1.02 mg ARA/g; E. 0.28 mg ARA/g; F. 0.19 mg ARA/g; G. 0.38 mg ARA/g; H. 0.48 mg ARA/g; I. 1.44 mg ARA/g

Fig. 2 Candlestick charts on changes of Toll receptor, IMD and lysozyme mRNA expression levels in gill of the shrimp in 42 h after *V. alginolyticus* challenge

The black box indicates the initial value greater than the end value. The blank box indicates the initial value smaller than the end value. The lead on the box indicates the maximum of the variation. The bead under the hex indicates the minimum of the variation

疫抗菌机能。本研究结果显示，对虾摄食不同ARA含量的饲料，在急性感染溶藻弧菌后96 h内累积死亡率并无显著变化。

3.2 饲料ARA水平对凡纳滨对虾免疫相关基因表达情况的影响

Toll受体作为凡纳滨对虾病原模式识别受

体，能够识别多种病原微生物的保守PAMPs，并通过细胞内接头蛋白将微生物入侵的信息传导给宿主免疫细胞，诱导防御反应^[18]。由IMD基因编码的含有死亡结构域的IMD蛋白，在信号通路中起到传导信号分子的作用，当IMD基因发生突变后，机体不能产生抵抗革兰氏阴性菌的抗菌

表 7 饲料中ARA水平对凡纳滨对虾人工急性感染溶藻弧菌后累积死亡率的影响

Tab. 7 Effects of dietary ARA content on cumulative mortality of *L. vannamei* after *V. alginolyticus* challenge

组别 groups		累积死亡率/% cumulative mortality		
		48 h	72 h	96 h
鱼油组 shrimp fed fish oil diets	A组(0.44 mg ARA/g) A group	12±9.58	37±11.55	58±17.56
	B组(0.56 mg ARA/g) B group	28±16.56	43±22.65	57±18.15
	C组(0.87 mg ARA/g) C group	36±20.14	52±14.81	67±19.91
	D组(1.02 mg ARA/g) D group	28±15.13	35±21.00	53±34.20
	E组(0.28 mg ARA/g) E group	25±12.30	43±29.41	55±22.73
混合植物油组 shrimp fed blended vegetable oil diets	F组(0.19mgARA/g) F group	30±16.75	51±26.85	59±27.36
	G组(0.38 mg ARA/g) G group	29±6.35	44±6.35	44±0.00
	H组(0.48 mg ARA/g) H group	38±16.09	72±20.80	76±13.27
	I组(1.44mg ARA/g) I group	49±34.27	52±28.29	57±30.51

肽^[19, 32]。因此, Toll受体和IMD蛋白是对虾免疫识别和免疫信号传导的关键蛋白。溶菌酶作为机体非特异性免疫级联反应的终端效应因子, 除了能溶解细菌细胞壁外, 溶解细胞壁时释放的肽聚糖片段还能诱导各种抗菌蛋白包括溶菌酶的合成与分泌^[33]。因此, 对虾Toll受体、IMD蛋白和溶菌酶mRNA的转录水平在一定程度上反映了对虾非特异免疫机能。已有的研究表明饲料营养素水平会影响凡纳滨对虾免疫相关基因的表达。郭腾飞等^[21]报道饲料中铜水平对凡纳滨对虾鳃组织中Toll受体mRNA表达水平有显著影响。随饲料中锌水平的升高, 对虾鳃组织中溶菌酶mRNA和Toll受体mRNA表达水平呈现先上升后下降的趋势^[22]。饲料中Vc含量的变化也会影响中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血清和鳃组织中免疫相关基因的表达^[20]。饲料中添加酵母提取物可提高凡纳滨对虾溶藻弧菌感染前Toll受体和溶菌酶mRNA的表达量及感染后Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA表达量的峰值, 并影响Toll受体和IMD mRNA表达量的变化规律^[2]。本研究中, 当以鱼油为脂肪源时, 饲料ARA水平显著影响养殖6周后凡纳滨对虾鳃组织中溶菌酶mRNA的表达水平; 当以植物油为脂肪源时, 饲料ARA水平显著影响养殖6周后凡纳滨对虾鳃组织中Toll受体mRNA的表达水平。无论是以鱼油还是植物油为脂肪源, 饲料ARA水平均显著影响感染溶藻弧菌后对虾的Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA表达量峰值。有关ARA对基因转录的调控机理, Arts等^[34]认为是通过ARA的代谢产物

——前列腺素来实现的。而Wang等^[35]则认为ARA本身可作为转录调节因子, 与cAMP一起协同作用调节基因的表达。

本实验中, 以鱼油为脂肪源时, 0.56 mg ARA/g饲料组表现出最大的Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA表达量; 而以植物油为脂肪源时, 3个免疫相关基因表达量峰值均出现在1.44 mg ARA/g饲料组。由于鱼油系列饲料与植物油系列饲料除了DHA和EPA含量有明显差异外, 其他脂肪酸特征(MUFA、SFA、n-3PUFA、n-6PUFA含量及n3/n6比值)均相近。表明饲料ARA水平对凡纳滨对虾Toll受体、IMD和溶菌酶基因表达的调控还受到饲料其他营养素的影响。比对鱼油系列A组饲料和植物油系列H组饲料的脂肪酸含量, 2组饲料ARA、MUFA、SFA、n-3PUFA、n-6PUFA含量及n3/n6比值相近, 但A组饲料较H组饲料具有明显高的DHA和EPA含量, 同时A组凡纳滨对虾在感染弧菌后的溶菌酶mRNA表达量峰值出现时间(24 h)较H组(36 h)提前, 也再次证实了饲料ARA水平对对虾免疫相关基因表达的调控还受到饲料DHA和EPA含量的影响。这种影响或许与对虾体内DHA、EPA及ARA三者之间的竞争代谢机制有关^[36-37]。有报道指出DHA、EPA和ARA能共同作用促进机体抗低氧和抗高碳酸血症的应激能力^[38-40]。

3.3 饲料ARA水平对凡纳滨对虾免疫灵敏性及平衡性的影响

从机体的免疫反应过程看, 非己物质的准确识别是启动机体免疫系统的首要步骤, 而识别

后病原入侵信号从细胞外向细胞内的传递则是细胞产生一系列免疫反应的前提。提高机体免疫力的本质不是单纯提高某个免疫指标的水平,而是提高机体免疫的灵敏性和平衡性,即机体对侵入体内的异物能够迅速产生充分的反应并在异物清除后能恢复正常状态^[41]。因此,负责免疫信号细胞内外传递的Toll受体和IMD蛋白以及负责抵抗细菌的免疫终端效应因子溶菌酶在对虾非特异免疫反应中的变化是衡量机体免疫机能状态的重要表征,Toll受体、IMD和溶菌酶基因在细菌感染进程中的表达量变化,在一定程度上可以反映对虾免疫机能的灵敏性和平衡性。饲料中添加酵母提取物提高了凡纳滨对虾免疫反应中鳃组织Toll受体、IMD mRNA表达量变化的灵敏性,但不影响Toll受体mRNA表达的平衡性^[2]。本研究中,在注射相同剂量的溶藻弧菌后,3个免疫相关基因的表达量变化幅度在摄食不同ARA水平饲料的凡纳滨对虾之间有差异。摄食鱼油0.56 mg ARA/g饲料组(B组)和摄食植物油1.44 mg ARA/g饲料组(I组)的对虾在感染溶藻弧菌后鳃组织中Toll受体、IMD和溶菌酶mRNA表达量变化幅度最大,表明摄食这2组饲料的对虾在转录水平上具有较好的免疫灵敏性。与溶藻弧菌感染前的基因表达水平相比,在急性感染42 h后,饲料中ARA水平对不同免疫相关基因表达量产生了不同的影响。各组对虾Toll受体mRNA表达量在感染42 h后基本恢复初始水平;而IMD和溶菌酶mRNA表达水平在部分组别中并没有恢复到初始水平。这可能与Toll受体、IMD和溶菌酶在抗弧菌感染中所起的作用不同有关;也与感染后监测时间及病原菌是否被清除有关。

综上所述,饲料ARA水平影响凡纳滨对虾Toll受体、IMD及溶菌酶mRNA的表达量。饲料ARA对凡纳滨对虾免疫相关基因表达的调控还受饲料中DHA和EPA水平的影响。摄食鱼油0.56 mg ARA/g饲料组(B组)和植物油1.44 mg ARA/g饲料组(I组)的凡纳滨对虾在转录水平上具有更好的免疫灵敏性。

参考文献:

- [1] 农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
The Fishery Office of Agriculture Ministry. China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2011.
- [2] 黄旭雄, 罗词兴, 危立坤, 等. 饲料中添加酵母提取物对凡纳滨对虾免疫相关基因表达及抗菌机能的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(12): 2049-2058.
Huang X X, Luo C X, Wei L K, *et al.* Effects of dietary yeast extract supplementation on the immune-related gene expressions and vibrio-resistant ability in *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(12): 2049-2058(in Chinese).
- [3] 麦康森, 艾庆辉, 徐玮, 等. 水产养殖中的环境胁迫及其预防-营养学途径[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(5): 767-774.
Mai K S, Ai Q H, Xu W, *et al.* Stress in aquaculture and its prevention with emphasis on nutritional methods[J]. Periodical of Ocean University of China, 2004, 34(5): 767-774(in Chinese).
- [4] Kiron V, Fukuda H, Takeuchi T, *et al.* Essential fatty acid nutrition and defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Physiology, 1995, 111(3): 361-367.
- [5] 陈龙, 朱祖康, 王丙云, 等. 花生四烯酸代谢物在炎症中的作用[J]. 国外畜牧科技, 2000, 27(4): 31-34.
Chen L, Zhu Z K, Wang B Y, *et al.* Effects of arachidonic acid metabolites in inflammation[J]. Animal Science Abroad, 2000, 27(4): 31-34(in Chinese).
- [6] 唐春华, 陈韬. 花生四烯酸生物活性及其对机体的免疫作用[J]. 畜禽业, 2009(6): 20-22.
Tang C H, Chen T. Arachidonic acid biological activity and its effect on the body's immunity[J]. Livestock and Poultry Industry, 2009(6): 20-22(in Chinese).
- [7] Gershwin M E, Beach R S, Hurley L S. Nutrition and Immunity[M]. Orlando: Academic Press, 1985:417.
- [8] Kinsella J E, Lokesh B. Dietary lipids, eicosanoids, and the immune system[J]. Critical Care Medicine, 1990, 18(Suppl. 2): 94-113.
- [9] Harel M, Gavasso S, Leshin J, *et al.* The effect of tissue docosaheptaenoic and arachidonic acids levels on hypersaline tolerance and leucocyte composition in striped bass (*Morone saxatilis*) larvae[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2001, 24(2): 113-123.
- [10] Khozin G I, Cohen Z, Pimenta L M, *et al.* Feeding with arachidonic acid-rich triacylglycerols from the microalga *Parietochloris incisa* improved recovery of guppies from infection with *Tetrahyena* sp[J]. Aquaculture, 2006,

- 255(1-4): 142-150.
- [11] Delaporte M, Soudant P, Moal J, *et al.* Impact of 20: 4n-6 supplementation on the fatty acid composition and hemocyte parameters of the pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. *Lipids*, 2006, 41(6): 567-576.
- [12] Hurtado M A, Reza M, Ibarra A M, *et al.* Arachidonic acid (20: 4n-6) effect on reproduction, immunology, and prostaglandin E₂ levels in *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951)[J]. *Aquaculture*, 2009, 294(3-4): 300-305.
- [13] 郑路平, 于淼, 邹向阳, 等. 革兰阴性菌结合蛋白(Toll/GNBPs)和肽聚糖识别蛋白(PGRPs)在无脊椎动物先天免疫应答中的作用[J]. *中国微生态学杂志*, 2010, 22(2): 171-174, 178.
- Zheng L P, Yu M, Zou X Y, *et al.* Function of gram-negative binding proteins and peptidoglycan-recognition proteins in invertebrate innate immune response[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2010, 22(2): 171-174, 178(in Chinese).
- [14] 张德明, 毛宝龄. Toll样受体研究进展[J]. *生命科学研究*, 2002, 6(1): 36-39.
- Zhang D M, Mao B L. Recent advances on researches of Toll-like receptors[J]. *Life Science Research*, 2002, 6(1): 36-39(in Chinese).
- [15] Hoffmann J A. The immune response of *Drosophila*[J]. *Nature*, 2003, 426(6962): 33-38.
- [16] Li F H, Xiang J H. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(4): 973-980.
- [17] Morishima I, Horiba T, Iketani M, *et al.* Parallel induction of cecropin and lysozyme in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1995, 19(5): 357-363.
- [18] Yang C J, 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(5): 564-574.
- [19] Wang P H, Gu Z H, Huang X D, *et al.* An immune deficiency homolog from the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, activates antimicrobial peptide genes[J]. *Molecular Immunology*, 2009, 46(8-9): 1897-1904.
- [20] 冯伟, 李健, 李吉涛, 等. Vc对中国对虾非特异免疫因子及TLR/NF- κ B表达量的影响[J]. *水产学报*, 2011, 35(2): 200-207.
- Feng W, Li J, Li J T, *et al.* Effects of supplemental different level Vc on survival and non-specific immunity of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(2): 200-207(in Chinese).
- [21] 郭腾飞, 黄旭雄, 苏明, 等. 饲料中铜水平对凡纳滨对虾免疫相关基因表达和抗菌能力的影响[J]. *水生生物学报*, 2012, 36(5): 809-816.
- Guo T F, Huang X X, Su M, *et al.* Effect of dietary copper level on the immunity, *Vibrio*-resistant ability, lysozyme mRNA and Toll receptor mRNA expressions in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(5): 809-816(in Chinese).
- [22] 郭腾飞, 黄旭雄, 苏明, 等. 饲料锌添加水平对凡纳滨对虾免疫抗菌机能和溶菌酶 mRNA 及 Toll 受体 mRNA 表达的影响[J]. *水产学报*, 2011, 35(7): 1081-1089.
- Guo T F, Huang X X, Su M, *et al.* Effect of zinc supplementation in diet on the immunity, *Vibrio*-resistant ability, lysozyme mRNA and Toll receptor mRNA expressions in the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(7): 1081-1089(in Chinese).
- [23] 李爱杰. 水产动物营养与饲料学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- Li A J. Nutrition and feed of aquatic animals[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996(in Chinese).
- [24] Wen W, Huang X X, Chen Q K, *et al.* Temperature effects on early development and biochemical dynamics of a marine fish, *Inimicus japonicus*[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2013, 442: 22-29.
- [25] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [26] Rezek T C, Watanabe W O, Harel M, *et al.* Effects of dietary docosahexaenoic acid (22: 6n-3) and arachidonic acid (20: 4n-6) on the growth, survival, stress resistance and fatty acid composition in black sea bass *Centropristis striata* (Linnaeus 1758) larvae[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(9): 1302-1314.
- [27] Lucu Č, Pavičić J, Ivanković D, *et al.* Changes in Na⁺/K⁺-ATPase activity, unsaturated fatty acids and

- metallothioneins in gills of the shore crab *Carcinus aestuarii* after dilute seawater acclimation[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2008, 149(4): 362-372.
- [28] Kelley D S, Daudu P A. Fat intake and immune response[J]. Progress in Food and Nutrition Science, 1993, 17(1): 41-63.
- [29] Tocher D R, Bell J G, Dick J R, *et al.* Polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation and the effects of dietary linseed and rapeseed oils[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2000, 23(1): 59-73.
- [30] Koven W, Barr Y, Lutzky S, *et al.* The effect of dietary arachidonic acid (20: 4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae[J]. Aquaculture, 2001, 193(1-2): 107-122.
- [31] Zuo R T, Ai Q H, Mai K S, *et al.* Effects of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids on growth, nonspecific immunity, expression of some immune related genes and disease resistance of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) following natural infestation of parasites (*Cryptocaryon irritans*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(2): 249-258.
- [32] Georgel P, Naitza S, Kappler C, *et al.* Drosophila immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis[J]. Developmental Cell, 2001, 1(4): 503-514.
- [33] Morishima I, Yamada K, Ueno T. Bacterial peptidoglycan as elicitor of antibacterial protein synthesis in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1992, 22(4): 363-367.
- [34] Arts M T, Kohler C C. Health and condition in fish: The influence of Lipids on membrane competency and immune response[M]//Kainz M J, Brett M T, Arts M T. Lipids in Aquatic Ecosystems. New York: Springer, 2009.
- [35] Wang X J, Stocco D M. Cyclic AMP and arachidonic acid: A tale of two pathways[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 1999, 158(1-2): 7-12.
- [36] Lands W E M. Biosynthesis of prostaglandins[J]. Annual Review of Nutrition, 1991, 11(1): 41-60.
- [37] 卢定强, 陈庶来, 陈钧. 二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的代谢和生理机能[J]. 江苏理工大学学报, 1998, 19(3): 29-36.
- Lu D Q, Chen S L, Chen J. Metabolism and physiological function of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid[J]. Journal of Jiangsu University of Science and Technology, 1998, 19(3): 29-36(in Chinese).
- [38] McKenzie D J, Piraccini G, Piccolella M, *et al.* Effects of dietary fatty acid composition on metabolic rate and responses to hypoxia in the European eel (*Anguilla anguilla*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2000, 22(4): 281-296.
- [39] McKenzie D J, Piraccini G, Steffensen J F, *et al.* Effects of diet on spontaneous locomotor activity and oxygen consumption in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*)[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1995, 14(5): 341-355.
- [40] McKenzie D J, Piraccini G, Papini N, *et al.* Oxygen consumption and ventilatory reflex responses are influenced by dietary lipids in sturgeon[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1997, 16(5): 365-379.
- [41] 黄旭雄, 周洪琪. 甲壳动物免疫机能的衡量指标及科学评价[J]. 海洋科学, 2007, 31(7): 90-96.
- Huang X X, Zhou H Q. The parameters reflecting immune state of crustacea and its scientific evaluation[J]. Marine Science, 2007, 31(7): 90-96(in Chinese).

Effects of dietary arachidonic acid on the immune-related gene expressions and *Vibrio*-resistant ability in *Litopenaeus vannamei*

ZHAO Libin¹, WANG Xinlei¹, HUANG Xuxiong^{1,2,3*}, CHEN Chunyan¹, LI Hang¹

(1. Key Laboratory of Genetic Resources for Freshwater Aquaculture and Fisheries, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai 201306, China;

3. Shanghai University Knowledge Service Platform, Shanghai Ocean University Aquatic Animal Breeding Center, Shanghai 201306, China;)

Abstract: In order to assess the effect of dietary arachidonic acid on the immune-related genes expression and *Vibrio*-resistance in white shrimp *Litopenaeus vannamei*, two series of isonitrogenous and isoenergetic experimental diets based on either fish oil or blended vegetable oil, both with the equivalents of saturated fatty acids(SFA), mono-unsaturated fatty acids (MUFA), poly-unsaturated fatty acids (PUFA), and n-3/n-6 ratios, were fed to the white shrimp respectively for six weeks. Then the mRNA expression levels of Toll receptor, IMD and lysozyme in gills of all shrimp before and after *Vibrio alginolyticus* challenge(24, 36 and 42 h), and *Vibrio*-resistance of all the shrimp were investigated. The results showed that: ① The mRNA expressions of Toll receptor, IMD and lysozyme in gills of the shrimp fed diets based on fish oil (containing 5.85 mg DHA/g diet and 3.83 EPA mg/g diet), first increased, then decreased along with the increasing dietary ARA level. Compared to the other treatments, the shrimp in treatments of 0.56 mg ARA/g diet (B group) and 0.87mg ARA/g diet (C group) displayed significant higher lysozyme mRNA expression levels($P<0.05$). The mRNA expressions of Toll receptor, IMD and lysozyme in gills of the shrimp fed diets based on vegetable oil (containing 3.28 mg DHA/g diet and 1.87 mg EPA/g diet), increased along with the dietary ARA level. The Toll receptor mRNA expression level in treatment I(1.44 mg ARA/g diet) was significantly higher than F group(0.19 mg ARA/g diet)($P<0.05$). ② The mRNA expressions of Toll receptor, IMD and lysozyme in gills of all shrimp changed significantly when the shrimp experienced *Vibrio* challenge. For the shrimp fed diets based on fish oil, the peak of mRNA expressions of Toll receptor, IMD and lysozyme appeared at 24, 42 and 24 h respectively. The maximum expressions of all the three genes appeared in B treatment(0.56 mgARA/g diet). For the shrimp fed diets based on vegetable oil, the peak of mRNA expressions of Toll receptor, IMD and lysozyme appeared at 24, 42 and 36 h respectively. For the shrimp fed diets based on vegetable oil, the maximum expressions of all the three genes appeared in I treatment (1.44 mg ARA/g diet). ③ There was no significant difference in cumulative mortality among the different ARA treatments when the shrimp were challenged with *V. alginolyticus* for 96 h. It is therefore suggested that dietary ARA level could regulate the expressions of these immune-related genes of the white shrimp, and ARA's regulation on immune related genes could be affected by dietary DHA and EPA levels.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; arachidonic acid; *Vibrio alginolyticus*; Toll receptor mRNA; IMD mRNA; lysozyme mRNA

Corresponding author: HUANG Xuxiong. E-mail: xxhuang@shou.edu.cn

Funding projects: Shanghai Science and Technology Committee Project (14320502000); Shanghai University Knowledge Service Platform Project (ZF1206)