

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

郭腾飞¹, 黄旭雄^{1*}, 苏明², 王武刚¹, 怀向军²,
胡盼¹, 严佳琦¹, 吕丹¹, 黄征征¹

(1. 上海海洋大学水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海市青浦区水产技术推广站, 上海 201701)

摘要: 在基础饲料中添加不同水平蛋氨酸锌(添加水平分别为 0、50、150 mg Zn/kg)并饲喂凡纳滨对虾, 养殖 14 d 后, 取样测定对虾鳃组织中 Toll 受体 mRNA 和溶菌酶 mRNA 的表达水平以及肝胰腺、肌肉和血淋巴中超氧化物歧化酶(SOD)和溶菌酶(LSZ)活性, 并进行溶藻弧菌人工急性感染试验。结果表明, 凡纳滨对虾肝胰腺及肌肉中锌蓄积水平随饲料锌添加量的增加而显著增加($P < 0.05$), 肝胰腺中锌蓄积更明显。添加 50 mg Zn/kg 组(锌含量为 73.25 mg Zn/kg 饲料)对虾鳃组织中的 Toll 受体 mRNA 和溶菌酶 mRNA 表达量均显著高于未添加锌组和添加 150 mg Zn/kg 组($P < 0.05$)。添加 50 mg Zn/kg 组对虾肌肉、肝胰腺和血淋巴中溶菌酶活性显著高于未添加锌组($P < 0.05$)。添加 50 mg Zn/kg 组对虾肝胰腺和血淋巴中的 SOD 活性也显著高于未添加锌组, 但与添加 150 mg Zn/kg 组无显著差异。而肌肉中 SOD 活性在添加 150 mg Zn/kg 组中最高。经溶藻弧菌人工急性感染后, 添加 50 mg Zn/kg 组对虾半致死时间和全致死时间大于未添加锌组和添加 150 mg Zn/kg 组。本研究表明, 相比摄食未添加锌组饲料和添加 150 mg Zn/kg 组饲料, 凡纳滨对虾的免疫抗菌机能在摄取添加 50 mg Zn/kg(锌含量为 73.25 mg Zn/kg 饲料)饲料时得到改善。

关键词: 凡纳滨对虾; 蛋氨酸锌; Toll 受体 mRNA; 溶菌酶 mRNA; 超氧化物歧化酶; 溶菌酶
中图分类号: S 963 **文献标志码:** A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)是世界主要养殖对虾之一, 也是我国主要对虾养殖品种。2007 年全国养殖凡纳滨对虾的产量约达 50 万吨。在集约化养殖过程中, 传染性疾病(主要是弧菌病, 病毒病)的暴发是制约对虾养殖效益的主要因素。由于使用药物防病可能存在药物残留及病菌耐药性等风险, 通过营养途径改善机体的免疫机能并由此提高机体的抗病能力是营养饲料学的重要发展方向和研究热点。有关凡纳滨对虾的营养免疫研究, 已有报道主要集中在维生素^[1-4]、多糖^[5-7]、中草药^[8]等免疫添加剂^[9-10]对机体抗病能力及免疫相关指标的影

响。饲料中微量元素与对虾免疫机能的关系研究刚刚起步。锌是维持生物体生理活性的必需营养素。已知动物中有超过 300 种不同的锌依赖性酶^[11]。锌是酶的组成成分或酶的激活剂, 参与体内营养与能量代谢^[11-13], 其中锌指蛋白是生物体内调控细胞分裂、核酸代谢、DNA 和 RNA 合成的一类重要的含锌酶^[14-16]。缺锌会导致鱼和虾增长缓慢, 免疫机能下降, 死亡率升高^[17]。对虾等甲壳类不具备特异性免疫机能, 仅具备非特异性免疫机能。溶菌酶是机体重要的非特异性免疫因子, 其活性是表征机体对细菌性病原抵抗能力的重要指标^[18]。对虾类的

收稿日期:2010-12-13 修回日期:2011-05-12

资助项目:上海市科委项目(08DZ1981000);上海市重点学科建设项目(Y1101);上海高校创新团队(第二期)建设项目资助

通讯作者:黄旭雄, E-mail: xxhuang@shou.edu.cn

Toll受体(toll receptor)和果蝇Toll受体极为相似,而在进化更高级的脊椎动物中则广泛存在Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)。Toll受体是机体非特异性免疫的重要组成部分, Toll受体在免疫应答中发挥重要作用,负责将异物入侵的信号从细胞外传递到细胞内并由此介导细胞产生一系列的免疫反应^[19-21], YANG等^[22]报道了凡纳滨对虾Toll受体基因的序列,发现凡纳滨对虾Toll受体在血细胞及鳃中的表达量高,其次是血淋巴,而肠,肌肉及肝胰脏中的表达水平较低。有关饲料维生素水平对凡纳滨对虾Toll受体影响有见报道^[2],而关于饲料中锌水平对凡纳滨对虾溶菌酶mRNA和Toll受体mRNA表达的影响尚未见报道。

本文研究了饲料中不同锌添加水平对凡纳滨对虾体内锌蓄积的影响,同时检测了对虾Toll受体基因和溶菌酶基因的表达水平以及溶菌酶活性和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,并对不同水平锌饲料处理的对虾进行了弧菌人工急性感染试验,旨在探讨饲料锌水平对虾类的免疫抗病机能的影响,为虾类营养免疫学及安全水产品生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验饲料的制作及凡纳滨对虾的饲养

试验用饲料原料购自上海农好饲料有限公司。蛋氨酸锌购自上海华亭化工有限公司。根据凡纳滨对虾的营养需求,设计基础饲料配方如表1。实验饲料设3个处理,分别在基础饲料中添加0.50、150 mg Zn/kg饲料的蛋氨酸锌。将过80目筛的各实验饲料原料按配方用逐级扩大法混合均匀,加工成1.5~2.0 mm的颗粒,置于4℃冰箱中保存备用。

试验用对虾取自上海青浦练塘渔珠场的一凡纳滨对虾养殖塘。挑选规格整齐 $[(8.31 \pm 0.34) \text{ cm}]$ 、活力好的幼虾450尾,转移到9个同一水池的网箱(60 cm × 50 cm × 120 cm)中,每箱放养虾50尾。以基础饲料适应性养殖一周后,分别投喂3种试验饲料,每种饲料设3个平行。养殖期间连续充气,水温 $(32 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 。每日投喂3种试验饲料4次,日投喂率约为体重的5%。养殖期间保持水体氨氮 $\leq 0.3 \text{ mg/L}$, pH = (7.8 ± 0.5) 。

表1 试验用基础饲料配方及营养组成
Tab.1 The ingredients and proximate composition of the basal formular diet for experiment

原料名称 ingredient	配比/% ratio	原料名称 ingredient	配比/% ratio
菜籽粕 rapeseed dregs	10	酵母 yeast	5
鱼粉 fishmeal	27	磷脂油 lecithin	1
面粉 wheat flour	17.8	氯化胆碱 choline chloride	0.5
大豆粕 soybean meal	15	虾糠 shrimp bran	5
花生粕 peanut meal	11	不含锌复合矿物质 ¹ mineral mixture	0.5
甜菜碱 oxyneurine	3	复合维生素 ² vitamin mixture	1
大豆油 soybean oil	1.5	胆固醇 cholesterol)	0.2
鱼油 fish oil	1.5		
营养组成 proximate composition(% in wet weight)			
粗蛋白 crude protein	42.38 ± 0.45	水分 moisture	7.52 ± 0.67
粗脂肪 crude fat	7.40 ± 0.59	灰分 ash	9.15 ± 0.19

注:(1)复合矿物元素的配方(g/kg), Ca(H_2PO_4)₂ 23.5, NaCl 1, KH_2PO_4 10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.503, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.062, KI 0.1, Na_2SeO_3 0.1, CoCl_2 0.022; (2)复合维生素采用商品对虾多维。

Notes: (1) Mineral mixture consisted of diet(g/kg), Ca(H_2PO_4)₂ 23.5, NaCl 1, KH_2PO_4 10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.503, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.062, KI 0.1, Na_2SeO_3 0.1, CoCl_2 0.022; (2) A commercial compound vitamin premix.

1.2 样品的采集

用实验饲料养殖14 d后,每箱随机取10尾虾,分别抽取血淋巴液,去壳取其肌肉和肝胰腺-20℃保存,分别用于测定溶菌酶和SOD活性以及锌含量。同时取对虾鳃组织置于液氮速冻后,转移至-80℃保存,用于测定鳃组织中Toll受体mRNA和溶菌酶mRNA表达情况。

1.3 饲料、肌肉和肝胰腺组织中锌含量的测定

将肝胰腺、肌肉及饲料烘干至恒重后,取适量放入消化管中,加硝酸与高氯酸混合液(4:1)10 mL加热消解至溶液清亮透明,再加10~20 mL的蒸馏水继续蒸煮15 min,去除样品液中的硝酸。冷却后定容至100 mL的容量瓶中待测。以不加样品的空白消解液作空白对照,用原子吸收分光光度法测定锌含量,每个样品平行测定3次。

1.4 溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)人工急性感染试验

养殖实验14 d之后,从各箱中分别挑取处于蛻

皮间期的对虾 10 尾,每尾幼虾从尾部腹肌分别注射浓度为 7.12×10^7 CFU/mL 的溶藻弧菌菌液 30 μ L。以注射 30 μ L 无菌生理盐水组(摄食商品饲料)为阴性对照。注射后分别暂养在 12 个水族箱中,攻毒后 24 h 内连续观察并统计对虾死亡情况。

1.5 溶菌酶(LSZ)和超氧化物歧化酶(SOD)活性测定

将待测样品置于冰水浴中,加入 9 倍体积 PBS(pH 为 6.4)匀浆,匀浆液经 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液 4 $^{\circ}$ C 保存用于 LSZ 活性和 SOD 活性测定。溶菌酶活性测定参照黄旭雄等^[23]的方法进行,SOD 活性测定采用南京建成生物工程研究所的 SOD 试剂盒进行。以标准蛋白为参照,使用南京建成考马斯亮蓝试剂盒直接测定匀浆液的蛋白浓度。

1.6 Toll 受体 mRNA 和溶菌酶 mRNA 的表达检测

将 -80° C 冻存的凡纳滨对虾鳃组织用 Trizol 按试剂盒(TaKaRa)说明书提取总 RNA。所提取的 RNA 的 OD_{260nm}/OD_{280nm} 值为 1.9 ~ 2.0。参照凡纳滨对虾 Toll 受体基因(GenBank: DQ923424.1)和溶菌酶基因(GenBank: AY170126.2)设计了荧光定量引物,同时设计 β -actin 引物作为内标,所有引物均由上海生工生物技术有限公司合成(表 2)。采用荧光定量 PCR 方法检测,按照 SYBR Prmie ScriptTM RT-PCR Kit 说明书将提出的总 RNA 先反转录为 cDNA,再采用 SYBR^R Green I 嵌合荧光法进行 Real-time PCR 反应,PCR 程序为 95° C、20 s,一个循环; 95° C、3s, 60° C、30s,共 36 个循环; 95° C 溶解曲线检测反应特异性。每个复孔设置参照基因 β -actin。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法进行相对定量分析鳃中溶菌酶 mRNA 和 Toll 受体 mRNA 的相对表达量。

表 2 凡纳滨对虾溶菌酶目的基因,Toll 受体基因与 β -actin 参照基因引物序列

Tab.2 Primer pairs for lysozyme, Toll receptor 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	TGAGAGATGCCCACTGCCTG
Toll receptor-SQR	CGCTTGAAGGTTTGTGAGGGAG

1.7 数据统计

试验结果用平均数 \pm 标准差表示,使用 SPSS 17.0 分析软件对数据进行单因素方差分析,Duncan 氏法进行多重比较,检验处理间的差异显著性($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 饲料锌添加量对养殖凡纳滨对虾组织中锌蓄积的影响

蛋氨酸锌添加量为 0 时,饲料中锌的水平为 28.73 mg/kg,随着蛋氨酸锌添加量的增加,饲料中锌含量的成比例显著升高($P < 0.05$)(表 3)。饲料锌水平显著影响养殖凡纳滨对虾的肝胰腺和肌肉的锌含量($P < 0.05$)。对虾组织中的锌含量随饲料锌水平的增加而显著增加。锌在对虾肝胰腺中的蓄积量明显高于其在肌肉中的蓄积量。

表 3 不同饲料中锌含量及其饲喂后凡纳滨对虾肌肉和肝胰腺中锌含量

Tab.3 The contents of zinc in different feeds and muscle and liver of *L. vannamei* which treated with the feeds mg Zn/kg

组别 group	饲料锌含量 content of zinc in feed	肌肉锌含量 content of zinc in muscle	肝胰腺锌含量 content of zinc in hepatopancreas
0	28.73 \pm 2.42 ^a	59.56 \pm 5.53 ^a	98.14 \pm 6.50 ^a
50	73.25 \pm 2.7 ^b	68.14 \pm 4.58 ^b	121.9 \pm 5.73 ^b
150	174.48 \pm 3.2 ^c	75.50 \pm 4.15 ^c	161.15 \pm 4.22 ^c

注:同一列中不同的上标字母表示差异性显著($P < 0.05$)。

Notes: Means in the same column with a different superscript letters indicate difference at $P < 0.05$.

2.2 饲料锌添加水平对凡纳滨对虾肌肉、肝胰腺和血淋巴 SOD 和溶菌酶活性的影响

随着饲料锌添加量的增高,肌肉、肝胰腺、血淋巴中溶菌酶活性先升高后下降趋势,添加 50 mg Zn/kg 组显著高于未添加锌组($P < 0.05$),但是与添加 150 mg Zn/kg 组无显著差异(表 4)。SOD 活性也随饲料锌添加量的增加而升高。肌肉 SOD 活性在未添加锌组和添加 50 mg Zn/kg 组之间无显著差异,两者皆显著低于 150 mg Zn/kg 组($P < 0.05$)。肝胰腺和血淋巴中 SOD 活性在 50 mg Zn/kg 组和 150 mg Zn/kg 组显著高于未添加锌组($P < 0.05$),50 mg Zn/kg 组和 150 mg Zn/kg 组差异不显著($P > 0.05$)(表 4)。

表 4 不同锌添加水平饲料喂养的凡纳滨对虾肌肉、肝胰腺和血液的 SOD 和溶菌酶活性
 Tab. 4 Effects of zinc supplementation of feed on SOD, lysozyme activities in hepatopancreas, hemolymph and muscle of *L. vannamei* treated with the feeds U/mg prot

组别 group	溶菌酶比活力 lysozyme activity			SOD 比活 SOD activity		
	肌肉 muscle	肝胰腺 hepatopancreas	血淋巴 haemolymph	肌肉 muscle	肝胰腺 hepatopancreas	血淋巴 haemolymph
0	2.61 ± 0.64 ^a	4.11 ± 0.80 ^a	4.83 ± 1.26 ^a	13.56 ± 1.55 ^a	14.22 ± 1.57 ^a	13.58 ± 1.36 ^a
50	4.27 ± 1.34 ^b	5.60 ± 0.43 ^b	6.65 ± 0.84 ^b	14.14 ± 1.36 ^a	16.04 ± 1.54 ^b	15.42 ± 0.79 ^b
150	3.99 ± 0.95 ^{ab}	4.74 ± 0.63 ^{ab}	5.30 ± 0.56 ^{ab}	15.46 ± 1.37 ^b	16.47 ± 1.01 ^b	15.68 ± 0.29 ^b

注:同一列中不同的上标字母表示差异性显著($P < 0.05$)。

Notes: Means in the same column with different superscript letters indicate difference at $P < 0.05$.

2.3 饲料锌添加水平对凡纳滨对虾 Toll 受体 mRNA 和溶菌酶 mRNA 表达的影响

饲料锌添加水平对凡纳滨对虾溶菌酶 mRNA 和 Toll 受体 mRNA 表达水平有显著影响。随着饲料锌水平升高,鳃组织中溶菌酶 mRNA 和 Toll 受体 mRNA 表达水平出现先上调后下调的趋势(图 1)。添加 50 mg Zn/kg 组溶菌酶 mRNA 表达水平比未添加锌组显著提高了 171% ($P < 0.05$),添加 150 mg Zn/kg 组和未添加锌组没有显著性差异 ($P > 0.05$)。添加 50 mg Zn/kg 组和添加 150 mg Zn/kg 组 Toll 受体 mRNA 水平分别比未添加锌组显著提高了 240% 和 68% ($P < 0.05$),但添加 150 mg Zn/kg 组 Toll 受体 mRNA 水平比添加 50 mg Zn/kg 组显著降低了 172% ($P < 0.05$)。

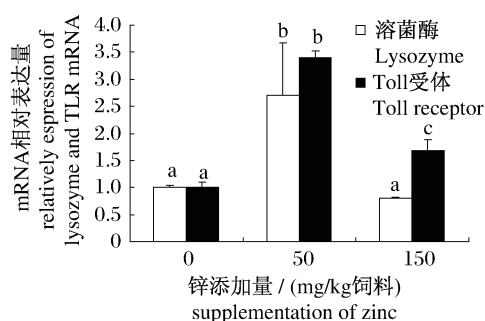


图 1 饲喂不同锌添加量的凡纳滨对虾鳃组织中溶菌酶 mRNA 和 Toll 受体 mRNA 相对表达不同上标字母表示差异性显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 1 Lysozyme mRNA and Toll receptor mRNA expression levels in gill of the shrimp fed with different zinc supplementation of feed

Values with a different superscript letter indicate difference at $P < 0.05$.

2.4 溶藻弧菌人工急性感染后全致死时间和半致死时间

在急性感染溶藻弧菌后,阴性对照组在注射

生理盐水后 24 h 内的累积死亡率为 5.7%,而其他组 24 h 内累计死亡率皆为 100%。添加 50 mg Zn/kg 组累计死亡率在第 13 小时为 36.7%,而未添加组为 66.7%,添加 150 mg Zn/kg 组为 63.7% (图 2)。添加 50 mg Zn/kg 组全致死时间和半致死时间均高于未添加锌组和添加 150 mg Zn/kg 组 (图 3)。

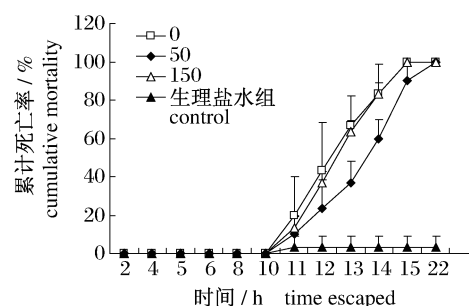


图 2 摄食不同锌添加水平饲料的凡纳滨对虾人工急性感染溶藻弧菌后的死亡曲线
 Fig. 2 Effects of zinc supplementation of feed on cumulative survival rate *L. vannamei* after being infected with *V. alginolyticus*

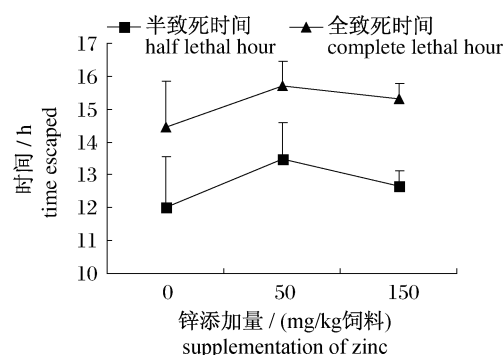


图 3 摄食不同锌添加水平饲料的凡纳滨对虾人工急性感染溶藻弧菌后的半致死时间和全致死时间
 Fig. 3 The half and complete lethal time of the shrimp fed different zinc supplementation of feed after being infected with *V. alginolyticus*

3 讨论

锌是动物的必需微量营养元素,人食物中含锌的最高允许量为 40 ~ 60 mg/kg, 畜禽的饲料中最适含量为 60 ~ 100 mg/kg, 动物饲料锌含量过高过低都会出现不良反应^[24]。对鱼类饲料中最适宜锌含量报道也很多,不同鱼类最适宜锌含量不相同^[25-26]。在对虾饲料中最适宜锌含量研究结果各不相同,杨原志等^[27]认为凡纳滨对虾饲料中蛋氨酸锌添加量为 40 ~ 60 mg/kg 时可满足需要,硫酸锌添加量在 100 mg/kg 时效果最好,过高和过低会导致生长变慢,过高会导致锌中毒,血淋巴中酚氧化酶活性降低。SHIAU 等^[28]发现斑节对虾增重率随着饲料锌添加量增加而增加,在饲料锌水平为 35 ~ 48 mg/kg 时增长率和非特异性免疫最好,饲料锌含量过高和过低时生长受阻,导致血细胞密度降低和 SOD 活性降低。DAVIS 等^[29]报道,纯日粮中锌添加量大于或等于 15 mg/kg 时,凡纳滨对虾增重最快,锌添加量大于 200 mg/kg 时才能克服饲料中植酸的不良影响。刘发义等^[30]认为,尽管添加锌对中国对虾没有明显的促生长作用,饲料中添加适量的锌仍较好,其添加量为 100 ~ 200 mg/kg 为宜。饲料锌含量过高会造成动物锌中毒和环境污染,锌缺乏会导致生长受阻。

本研究的结果表明,饲料中的锌水平显著影响养殖凡纳滨对虾肝胰腺和肌肉中锌的蓄积量。对虾组织中锌的蓄积水平随其所摄食饲料锌水平的增加而升高。SHIAU 等^[28]报道了斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 肝胰腺和全身锌含量随着所摄取饲料的锌水平升高而增加。杨原志等^[27]报道了凡纳滨对虾肌肉中锌含量随着饲料锌水平增加而呈现升高的趋势,但肝胰腺中锌含量会随着饲料锌水平增加而显著升高。WU 等^[31]将凡纳滨对虾养殖在不同锌水平水体中发现肝胰腺中锌浓度随水体锌浓度升高而显著升高,而肌肉中升高不显著。本研究的结果还表明饲料中的锌在对虾不同组织中的蓄积程度不同。肝胰腺中锌的蓄积量明显比肌肉中高。阮金山等^[32]发现锌在长毛对虾 (*Penaeus penicillatus*) 体内的蓄积分布存在组织差异性,肝胰腺蓄积量最高,鳃和肠次之,肌肉最低,外壳次低。饲料锌在对虾肌肉及肝胰腺中蓄积量的差异与肝胰腺的生理功能密切相

关。肝胰腺是对虾重要的消化器官,同时还是机体消化吸收的营养物质在体内转化和贮存的重要器官,此外还是机体有毒物质重要的分解器官。当锌摄入不足时,肝胰腺中蓄积的锌释放出来,满足机体新陈代谢需要;当摄入过量时,锌可以通过在肝胰腺中的积累而降低它的整体毒性,肝胰腺在此发挥解毒功能。

锌是机体体内多种金属酶的组成成分或激活因子,参与机体许多生理生化代谢过程。锌也是超氧化物歧化酶的重要组成部分^[33]。SOD 是机体重要的抗氧化酶,能消除体内自由基。当 SOD 活性降低时,生物体内自由基过多,势必扰乱破坏一些重要的生化过程,导致代谢紊乱,生理功能失调及免疫机能下降。李光友等^[34]研究表明,溶解氧、pH、温度、重金属等都会使水生生物体内 SOD 活性发生显著变化。俞亚东等^[35]研究表明 Zn^{2+} 影响罗氏沼虾鳃中 SOD 活性,随着水体中 Zn^{2+} 浓度的升高,鳃中 SOD 活性先升高,超过最佳浓度后开始下降。本研究发现饲料锌水平显著影响虾组织中 SOD 活性。随着饲料中锌水平提高,虾肌肉、肝胰腺和血淋巴中 SOD 酶活性也随之显著升高。摄食未添加蛋氨酸锌组饲料的对虾血淋巴和肝胰腺中 SOD 活性显著降低,暗示低锌可能抑制了超氧化物歧化酶正常表达或使其活性受阻。而摄食 50 mg Zn/kg 组和 150 mg Zn/kg 组饲料的凡纳滨对虾血液和肝胰腺中 SOD 活性差异不显著,其原因一方面可能是过量锌蓄积降低了对虾体内超氧根离子 (O_2^-) 的产生而间接降低了 SOD 活性。SHIAU 等^[28]研究发现饲料中锌水平为 35 ~ 48 mg Zn/kg 时,养殖斑节对虾体内超氧根离子 (O_2^-) 水平最高。过高或过低的饲料锌水平均会降低对虾体内超氧根离子 (O_2^-) 水平。超氧根离子 (O_2^-) 具有杀菌作用,但过多的超氧根离子在杀菌的同时也会对自身的组织产生破坏作用,因此机体必须动用包括 SOD 在内的抗氧化防御机制有效地控制和清除多余的氧自由基。另一方面也可能是过高的锌蓄积诱导锌指蛋白负调控抑制 SOD 基因的表达。

溶菌酶能破坏细菌细胞壁,是对虾免疫防御体系重要组成部分^[36]。凡纳滨对虾溶菌酶基因全长序列已见报道^[37]。对虾在感染哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)、溶藻弧菌后,其溶菌酶基因的表达会显著上调^[38-41]。本研究表明,饲料锌水平显

著影响凡纳滨对虾组织溶菌酶活力和鳃组织中溶菌酶基因 mRNA 表达量。无论是溶菌酶活性还是溶菌酶基因 mRNA 表达量,均在摄食添加 50 mg Zn/kg 组饲料的对虾中得到显著增强或上调。

无脊椎动物受微生物入侵时,机体借助 PGRP-SA 和 GGBP-1 复合物与病原微生物上病原相关的分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 结合后激活 Spatzle 蛋白,被活化的 Spatzle 蛋白与 Toll 受体结合,将异物入侵的信号从胞外传递到胞内,从而引起胞内信号级联反应,释放出类似于 NF- κ B 样蛋白的核转录因子,进入细胞核调节抗菌肽基因的表达^[19-21]。因此,对虾 Toll 受体基因的表达水平在一定程度上可以反映机体异物入侵信号能否及时传递并产生相应免疫反应。多种对虾体内的 Toll 受体基因已得到研究^[22,42-45], YANG 等^[22] 研究表明凡纳滨对虾 Toll 受体在血细胞及鳃中的表达量高,其次是血淋巴,而肠,肌肉及肝脏中的表达水平较低。凡纳滨对虾 Toll 受体不参与独立双链 RNA 病毒免疫反应,但弧菌感染之后 Toll 受体的表达能升高^[43-45],表明凡纳滨对虾 Toll 受体参与细菌感染的机体免疫反应。本研究中饲料锌水平为 73.25 mg/kg (蛋氨酸锌添加量 50 mg Zn/kg) 时, Toll 受体表达量显著高于高锌和低锌组,表明饲料中的锌水平会影响凡纳滨对虾细胞免疫反应中异物入侵信号的传递。

Toll 受体介导的免疫反应必须受到严格的调控,持续激活状态可长时间高表达免疫细胞的效应因子,导致机体产生慢性炎症、自身免疫紊乱和其他免疫相关疾病。正常生理状态下,机体存在着多种 Toll 受体的负调控机制,以维持免疫反应的平衡。抑制性锌指蛋白 (A20) 是参与 Toll 受体调控的重要蛋白,锌指蛋白 A20 过度升高或降低可以负调控 NF- κ B 样蛋白的核转录因子的过度活化,从而负调控免疫基因转录^[46-50]。本研究中,与添加 0 mg Zn/kg 组相比,添加 0 mg Zn/kg 组和 150 mg Zn/kg 组对虾溶菌酶基因和 Toll 受体基因表达相对下调,推测其机制可能与锌指蛋白 A20 相关。

用溶藻弧菌人工急性感染试验凡纳滨对虾,阴性对照组 24 h 内一直维持在 5.7%,尽管因攻毒剂量及细菌毒力等原因,各试验组在感染后 24 h 内均出现了 100% 的死亡,但死亡的进程 (50%

致死时间和 100% 致死时间) 表明摄食 50 mg Zn/kg 组饲料的凡纳滨对虾表现出相对强的抗弧菌能力,其抗菌能力与检测的溶菌酶活性,溶菌酶基因 mRNA 表达量和 Toll 受体 mRNA 表达量变化相吻合。

综上所述,饲料中锌添加水平对凡纳滨对虾的免疫抗病机能及 Toll 受体 mRNA 和溶菌酶 mRNA 表达具有显著影响,相比未添加锌组饲料和添加 150 mg Zn/kg 组饲料,凡纳滨对虾的免疫抗病机能在摄取添加 50 mg Zn/kg (饲料锌含量在 73.25 mg/kg) 饲料时得到改善, Toll 受体 mRNA 和溶菌酶 mRNA 表达量最高。

参考文献:

- [1] 艾春香,陈立侨,刘晓玲,等. 维生素 C 对中华绒螯蟹非特异性免疫的影响 [J]. 水产学报, 2008, 32 (2): 249 - 257.
- [2] 冯伟,李健,李吉涛,等. Vc 对中国对虾非特异免疫因子及 TLR/NF-B 表达量的影响 [J]. 水产学报, 2011, 35 (2): 200 - 208.
- [3] LEE M H, SHIAU S Y. Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 16: 475 - 485.
- [4] CHIEN Y H, PAN C H, BRIAN H. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin [J]. Aquaculture, 2003, 216: 177 - 191.
- [5] WANG Y C, CHANG P S, CHEN H Y. Differential time-series expression of immune-related genes of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to dietary inclusion of β -e1, 3-glucan [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24: 113 - 121.
- [6] HUANG X X, ZHOU H Q, ZHANG H. The effect of Sargassum fusiforme polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20: 750 - 757.
- [7] 汪小锋,樊廷俊,丛日山,等. 几种免疫促进剂对中国对虾血细胞数量、形态结构以及酚氧化酶产量和活性的影响 [J]. 水产学报, 2005, 29 (1): 66 - 74.
- [8] 苏永腾,刘波,周群兰,等. 大黄蕙醌提取物对罗氏沼虾抗鳃弧菌感染的研究 [J]. 水产学报, 2008, 32 (3): 455 - 464.
- [9] 赵红霞,曹俊明,周萌,等. 二甲基丙酸噻亭对凡纳

- 滨对虾幼虾生长、蜕壳和渗透调节的影响[J]. 水产学报,2006,30(3):404-410.
- [10] 陈乃松,魏涛涛,廖奕招. 蝇蛆粉和 β -葡聚糖对凡纳滨对虾生长和免疫的影响[J]. 水产学报,2007,31(6):771-778.
- [11] VALLEE B L, GALDES A. The metallobiochemistry of zinc enzymes[J]. *Advances in Enzyme Regulation*,1984,56:282-411.
- [12] HSU J M, ANTHONY W L, BUCHANAN P J. Zinc deficiency and incorporation of 14 C-labeled methionine into tissue proteins in rats[J]. *Journal of Nutrition*,1969,99:425-432.
- [13] JOSE B N, VIVIAN S, BERENICE B, *et al.* The essential role of zinc in growth [J]. *Nutrition Research*,1995,15(3):335-358.
- [14] FUJJI T. Presence of zinc in nucleoli and its possible role in mitosis[J]. *Nature*,1954,174:1108-1109.
- [15] PRASK J A, PLOCKE D J. A role for zinc in the structural integrity of the cytoplasmic ribosomes of *E. gracilis* [J]. *Plant Physiology*, 1971, 48: 150-155.
- [16] BLANCHARD R K, MOORE J B, GREEN C L, *et al.* Modulation of intestinal gene expression by dietary zinc status; effectiveness of cDNA arrays for expression profiling of a single nutrient deficiency [J]. *Journal of Nutrition*, 2003, 98 (2): 13507-13513.
- [17] SATOH S, TABATA K, IZUME K, *et al.* Watanabe T. Effect of dietary tricalcium phosphate on availability of zinc to rainbow trout [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*,1987,53:1199-1205.
- [18] 黄旭雄,周洪琪,宋理平. 急性感染对中国明对虾非特异免疫水平的影响[J]. 水生生物学报,2007,31(3):325-330.
- [19] PETROS L, NADE'GE P, HOFFMANN J A, *et al.* Activation of *Drosophila* toll during fungal infection by a blood serine protease [J]. *Science*,2002,297:114-116.
- [20] HOFFMANN J A. The immune response of *Drosophila* [J]. *Nature*,2003,426:33-38.
- [21] IMLER J L, HOFFMANN J A. Toll receptors in innate immunity [J]. *Trends in Cell Biology*,2001,11(7):304-311.
- [22] YANG L S, YIN Z X, LIAO J X, *et al.* A Toll receptor in shrimp [J]. *Molecular Immunology*, 2007,44:1999-2008
- [23] 黄旭雄,周洪琪. 不同规格中国明对虾的非特异性免疫水平[J]. 上海水产大学学报,2006(1):7-9.
- [24] 丁小波,文利新,牛同利. 微量元素锌的毒性研究 [J]. 微量元素与健康研究,2007,24(6):64-67.
- [25] 张佳明,艾庆辉,麦康森,等. 大黄鱼幼鱼对饲料中的锌需要量 [J]. 水产学报, 2008, 32 (3): 417-425.
- [26] 崔立娇,张利民,王际英,等. 饲料锌水平对星斑川鲷幼鱼生长 组织积累和抗氧化功能的影响[J]. 水产学报,2010,34(9):1420-1429.
- [27] 杨原志,董晓慧. 锌源对凡纳滨对虾生长免疫的影响[J]. 大连水产学院学报,2007(1):1-4.
- [28] SHIAU S Y, JIANG L C. Dietary zinc requirements of grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on immune responses [J]. *Aquaculture*, 2006, 254: 476-482.
- [29] DAVIS D A, LAWRENCE A L. Evaluation of the dietary zinc requirement of *Penaeus vannamei* and effects of phytic acid on zinc and phosphorus bioavailability [J]. *Journal of the World Aquaculture Society*,1993,24:40-47.
- [30] 刘发义,李荷芳. 中国对虾矿物质营养的研究 [J]. 海洋科学,1995(4):32-37.
- [31] WU J P, CHEN H C, HUANG D J. Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium and zinc in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. *Chemosphere*,2008,73:1019-1026.
- [32] 阮金山,黄美珍. 锌在长毛对虾体内的积累、分布和排出的研究 [J]. 福建水产,1992(1):23-26.
- [33] MCCALL K A, HUANG C, FIERKE C A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes [J]. *Journal of Nutrition*,2000,130:1437-1446.
- [34] 李光友. 中国对虾疾病与免疫机制 [J]. 海洋科学, 1995(4):1-3.
- [35] 俞亚东,许燕,杨洁. Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对罗氏沼虾鳃中 SOD 同工酶的影响 [J]. 上海师范大学学报,2009,38(2):189-191.
- [36] MAI W J, HU C Q. Molecular cloning, characterization, expression and antibacterial analysis of a lysozyme homologue from *Fenneropenaeus merguensis* [J]. *Molecular Biology Reports*,2009,36(6):1587-1595
- [37] SOTELO-MUNDO R R, ISLAS-OSUNA M A, DE-LA-RE-VEGA E, *et al.* cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, 15 (4): 325-331.
- [38] HIKIMA S, HIKIMA J, ROJTINNAKORN J, *et al.* Characterization and function of kuruma shrimp

- lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species[J]. *Gene*, 2003, 316: 187 – 195.
- [39] BURGE E J, MADIGAN D J, BURNETT L E, *et al.* Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22: 327 – 339.
- [40] YE X, GAO F Y, ZHENG Q M, *et al.* Cloning and characterization of the tiger shrimp lysozyme [J]. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36: 1239 – 1246.
- [41] SIMSER J A, MULENGA A, MACALUS O. Immuneresponsive lysozymes from hemocytes of the American dog tick [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 34: 1235 – 1246.
- [42] MEKATA T, KONO T, YOSHIDA T, *et al.* Identification of cDNA encoding Toll receptor, MjToll gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24: 122 – 133.
- [43] WANG H C, TSENG C W, YOU L H. RNAi knock-down of the *Litopenaeus annamei* Toll gene(LvToll) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harvey* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2010, 34: 49 – 58.
- [44] ARTA J A, CORNELISSEN F H, CIJSOUW T, *et al.* Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23: 504 – 513.
- [45] YANG C, ZHANG J, LI F, *et al.* A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24: 564 – 574.
- [46] BLANDER J M, MEDZHITOV R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors [J]. *Science*, 2004, 304: 1014 – 1018.
- [47] 孙冰, 韩代书. Toll 样受体信号通路的负调控 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36 (12): 1516 – 1522.
- [48] ONOSE A, HASHIMOTO S, HAYASHI S, *et al.* An inhibitory effect of A20 on NF- κ B activation in airway epithelium upon influenza virus infection [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2006, 541: 198 – 204.
- [49] HEYNINCK K, BEYAERT R. The cytokine-inducible zinc finger protein A20 inhibits IL-1-induced NF- κ B activation at the level of TRAF6 [J]. *FEBS Letter*, 1999, 442: 147 – 150.
- [50] KLINKENBERG M, HUFFEL S V, HEYNINCK K, *et al.* Functional redundancy of the zinc fingers of A20 for inhibition of NF- κ B activation and protein-protein interactions [J]. *FEBS Letter*, 2001, 498: 93 – 97.

Effects of zinc supplementation in diet on the immunity, *Vibrio*-resistant ability, lysozyme mRNA and Toll receptor mRNA expressions in the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

GUO Teng-fei¹, HUANG Xu-xiong^{1*}, SU Ming², WANG Wu-gang¹, HUAI Xiang-jun², HU Pan¹, YAN Jia-qi¹, LÜ Dan¹, HUANG Zheng-zheng¹

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China;

2. Fisheries Technology Extension Station of Qingpu District, Shanghai 201701, China)

Abstract: Experiments were conducted to study the effects of dietary zinc supplementation on the immune gene expression and immunity and disease-resistant ability of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The shrimp were fed with 3 zinc methionine diets (supplemented at 0, 50, 150 mg Zn/kg diet respectively) respectively for 14 days. Then the expressions of Toll Receptor mRNA and lysozyme mRNA in gill and superoxide dismutase (SOD) activity and lysozyme (LSZ) activity in hepatopancreas, muscle and haemolymph were assayed respectively. The shrimp treated with different zinc diets were also challenged with *Vibrio alginolyticus*. The results showed that the zinc levels in hepatopancreas and muscle of shrimp significantly increased ($P < 0.05$) as the dietary zinc increased. While the hepatopancreas accumulated more zinc than muscle. Compared to those of the shrimp in 0 mg Zn/kg and 150 mg Zn/kg treatments, the expressions of Toll receptor mRNA and lysozyme mRNA in gill of the shrimp in 50 mg Zn/kg treatment were significantly up-regulated. The lysozyme activities in muscle, hepatopancreas and haemolymph of the shrimp in 50 mg Zn/kg treatment were significantly higher than those in 0 mg Zn/kg treatment ($P < 0.05$). The SOD activities in hepatopancreas and haemolymph of the shrimp in 50 mg Zn/kg and 150 mg Zn/kg treatments were also higher than those in 0 mg Zn/kg treatments ($P < 0.05$). While the SOD activity in muscle of the shrimp treated with 150 mg Zn/kg was significantly higher than those treated with 0 mg Zn/kg and 50 mg Zn/kg respectively. The half lethal time and complete lethal time for the shrimp in 50 mg Zn/kg treatment were longer than those in 0 mg Zn/kg and 150 mg Zn/kg treatments after being challenged with *V. alginolyticus*. It is therefore suggested that compared to those in 0 mg Zn/kg and 150 mg Zn/kg treatments, the shrimp fed the diets added 50 mg Zn/kg (the content of zinc in diet was 73.25 mg Zn/kg) had improved immunity and *Vibrio*-resistant ability.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; zinc methionine; Toll receptor mRNA; lysozyme mRNA; SOD; lysozyme

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