



饲料中添加水飞蓟素对低盐度下凡纳滨对虾生长、免疫、肝胰腺组织结构及肠道菌群的影响

李会峰^{1,2,3}, 李二超^{1*}, 徐畅¹, 周利¹, 陈立侨^{2*}

(1. 海南大学海洋学院, 海南省水产种业工程研究中心,
海南省热带水生生物技术重点实验室, 海南海口 570228;
2. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200241;
3. 张家港市水产技术指导站, 江苏 张家港 215600)

摘要: 为探究低盐度下水飞蓟素作为凡纳滨对虾饲料添加剂的作用效果, 实验配制了水飞蓟素添加量分别为 0 (对照组)、0.1、0.2 和 0.4 g/kg 的 4 种实验饲料, 在低盐度 (盐度为 3) 下养殖虾苗 [(0.080 ± 0.002) g] 8 周后, 分析了水飞蓟素对对虾生长、免疫、肝胰腺组织结构及肠道菌群的影响。结果显示: ①低盐度下, 水飞蓟素能显著提高对虾的增重率, 降低饲料系数, 但对存活率、肥满度和体成分无显著影响。②水飞蓟素能提高对虾消化酶的活性, 0.4 g/kg 组对虾的肝胰腺淀粉酶活性显著高于对照组, 0.2 和 0.4 g/kg 水飞蓟素组能显著提高对虾肠道的消化酶活性。③水飞蓟素能降低低盐度下凡纳滨对虾的氧化损伤, 提高对虾的抗氧化能力。0.4 g/kg 组对虾肝胰腺总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 活性、过氧化氢酶 (CAT) 活性和还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量显著升高, 而肠道抗氧化能力没有明显变化。0.2 g/kg 组对虾的肠道酸性磷酸酶 (ACP) 和碱性磷酸酶 (AKP) 活性显著高于对照组, 溶菌酶和酚氧化酶活性无明显变化。④低盐度下, 饲料中添加水飞蓟素改善了对虾肝胰腺的组织结构。随着水飞蓟素含量的增加, 对虾肝胰腺结构更为完整, 肝小体排列紧密, 肝小管横切面呈规则的多角星形, 且含有大量的分泌细胞 (B 细胞) 和胚细胞 (E 细胞)。⑤对虾摄食添加 0.4 g/kg 水飞蓟素的饲料后, 肠道中拟杆菌门和纤维菌门相对丰度显著下降。研究表明, 水飞蓟素作为饲料添加剂可以有效缓解凡纳滨对虾的低盐应激, 提高对虾生长性能和抗氧化性能, 改善肝胰腺组织结构, 并且会对肠道菌群组成产生影响。

关键词: 凡纳滨对虾; 水飞蓟素; 低盐度; 生长; 免疫; 肝胰腺组织结构; 肠道菌群
中图分类号: S 963.73 **文献标志码:** A

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是全球最重要的经济养殖虾类之一, 具有广盐性 (0.5~50) 的特点^[1], 已在全球海水、咸水和淡水等水域广泛养殖。沿海养殖资源的局限性和环境污染的

加剧促进了凡纳滨对虾的低盐度养殖在多个国家的发展^[2], 然而低盐度对凡纳滨对虾的生长存活、能量代谢和抗逆抗病能力的负面影响已被广泛证实, 如存活率下降^[3]、生长缓慢^[4]、免疫

收稿日期: 2020-06-08 修回日期: 2020-07-19

资助项目: 广东省重点领域研发计划 (2020B0202010001); 海南省自然科学基金 (318MS008); 海南省重点研发计划 (ZDYF2019068); 国家重点研发计划 (2018YFD0900400); 海南大学科研启动基金 [KYQD(ZR)1736]

第一作者: 李会峰 (照片), 从事水产动物营养与饲料学研究, E-mail: 1292917752@qq.com

通信作者: 李二超, E-mail: ecll@bio.ecnu.edu.cn; 陈立侨, E-mail: lqchen@bio.ecnu.edu.cn



受损^[5]和肠道菌群^[6]改变等, 这些变化大大增加了低盐度养殖中对虾的易感性和病害暴发的可能性。因此, 亟需找到提高凡纳滨对虾抗应激的有效手段, 以保障低盐度下对虾的健康养殖。

饲料不但能为动物机体提供能量和营养素, 还可以通过添加或补充活性物质来调控机体生理状态, 达到改善机体性能的目的。采用营养学方法是消除环境因子对动物机体负面效应的有效手段^[7-8]。在水产业的健康养殖中, 功能性饲料的开发是近年来行业的热点, 拥有广阔的市场前景^[9]。研究表明, 低盐度养殖条件下, 饲料中添加 β -葡聚糖^[10]、菊粉^[11]、红景天提取物^[12]和绿原酸^[13]等能有效改善凡纳滨对虾的生长性能, 缓解对虾的低盐应激, 具有成为凡纳滨对虾抗应激的饲料添加剂的潜力。水飞蓟素提取自菊科植物水飞蓟 (*Silybum marianum*) 的果实, 主要成分是水飞蓟宾及其异物等黄酮类物质^[14], 具有抗脂质过氧化、清除自由基、维持细胞膜稳定和促进肝细胞再生的作用^[15], 在保肝护肝、免疫调节和疾病治疗等方面有着多种药理作用^[16]。在鱼类中的研究表明, 水飞蓟素能提高草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、吉富罗非鱼 (*GIFT Oreochromis niloticus*)、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 和大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 的生长性能^[17-20], 能提高吉富罗非鱼和大菱鲂的抗氧化能力^[18-20], 提高虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 肝脏组织蛋白质的合成能力^[21], 抑制草鱼肝脏脂肪的蓄积^[17]。在甲壳动物中, 水飞蓟素能提高中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 幼蟹的增重率, 同时能提高幼蟹肝胰腺的抗氧化能力, 并能在一定程度上缓解氧化鱼油对幼蟹造成的损伤^[22]。但是有关水飞蓟素缓解凡纳滨对虾低盐应激的相关研究尚未见报道。

因此, 本实验研究了低盐度下不同水飞蓟素添加水平的饲料对凡纳滨对虾生长、免疫指标、肝胰腺组织结构、肠道菌群等方面的影响, 探讨了水飞蓟素缓解凡纳滨对虾低盐应激的效能, 为对虾抗胁迫功能饲料的开发提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

根据低盐度下凡纳滨对虾的营养需求研

究^[23-25], 以豆粕、鱼粉为蛋白源, 鱼油、大豆油和卵磷脂为主要脂肪源, 小麦淀粉为糖源配制了4种实验饲料: 水飞蓟素添加量分别为0、0.1、0.2和0.4 g/kg。饲料原料经粉碎机粉碎后过80目筛, 准确称量后逐级混匀, 然后分别加入油脂和水混合均匀, 用制粒机压成2 mm粒径的颗粒饵料, 风干至水分低于10%, 置于-20 °C冰箱中保存备用。饲料成分见表1。

1.2 饲养管理

凡纳滨对虾幼虾取自海南儋州蓝色海洋生物科技有限公司, 养殖实验在该公司养殖棚内进行。海水从儋州近海岸处抽取, 经过滤和消毒后使用, 盐度为32, 调节盐度所用淡水为当地地下井水, 养殖用水由海水和淡水混和而成。在正式实验前, 将幼虾暂养2周, 每天用淡水调低盐度, 直至养殖水体盐度为3。待调至目标盐度后, 随机挑选活力强的幼虾 (0.080 ± 0.002) g 开始正式实验。实验每个处理设4个平行, 每个饲养水缸 (110 cm×80 cm×40 cm) 随机放入幼虾50尾。每日投喂3次, 投喂时间分别为7:00、12:00和20:00, 采用饱食投喂并根据对虾摄食情况加以调整, 记录饲料用量。每日换水1/2, 补充调好盐度且充分曝气的养殖用水。每天用温度计测定水温, 不定期用溶解氧仪和氨氮测试盒测定水质。整个养殖期间, 水温为24.5~30.0 °C, 溶解氧不低于6.5 mg/L, 总氨氮小于0.03 mg/L, pH 7.5~8.0, 养殖周期为8周。

1.3 样品采集和分析

养殖实验结束后, 将凡纳滨对虾禁食24 h。将所有对虾捞出, 使用低温水麻醉 (水温较养殖缸温度低3~5 °C), 吸干体表水分, 称量并统计各缸存活数量。每缸随机取12尾虾, 测定其体长、体质量和肝胰腺质量, 用于生长指标的分析。各缸预留6尾处于蜕皮间期的整虾, 冻存于-20 °C冰箱, 用于水分、粗蛋白、粗脂肪和粗灰分的测定。取肝胰腺固定在4%多聚甲醛中, 用于制备H.E染色切片。每缸随机挑取5尾虾, 用75%酒精擦拭虾体进行消毒, 再用无菌生理盐水冲洗2~3次, 在无菌操作条件下取出肠道, 将5尾虾的肠道混合样本冻于液氮中。其余对虾于冰上迅速取出肝胰腺和肠道组织, 置于-80 °C冰箱保存备用。

表 1 实验饲料配方和营养成分分析

Tab. 1 Compositions of experimental diets

项目 items	水飞蓟素不同含量组/(g/kg) different groups of silymarin content			
	0	0.1	0.2	0.4
原料/(g/kg) ingredients				
鱼粉 fish meal	370	370	370	370
豆粕 soybean meal	280	280	280	280
小麦淀粉 wheat starch	200	200	200	200
鱼油 fish oil	22.8	22.8	22.8	22.8
大豆油 soybean oil	25	25	25	25
卵磷脂 lecithin	10	10	10	10
胆固醇 cholesterol	5	5	5	5
维生素预混物 vitamin premix ^a	20	20	20	20
矿物质预混物 mineral premix ^b	5	5	5	5
维生素C vitamin C	1	1	1	1
羧甲基纤维素钠 sodium carboxymethyl cellulose	30	30	30	30
纤维素 cellulose	11.2	11.1	11.0	10.8
碳酸钙 calcium carbonate	20	20	20	20
水飞蓟素 silymarin	0	0.1	0.2	0.4
组成分析/(g/kg) proximate analysis				
水分 moisture	93.5	90.7	90.1	92.3
粗蛋白 crude protein	341	342	347	344
粗脂肪 crude lipid	87.1	88.9	88.5	87.5
粗灰分 crude ash	110.9	114.3	109.7	113.6

注: a. 维生素预混物(g/kg预混物)包括维生素B₁ 0.5, 维生素B₂ 3.0, 维生素B₆ 1.0, DL-泛酸钙 5.0, 烟酸 5.0, 生物素 0.05, 叶酸 0.18, 维生素B₁₂ 0.002, 氯化胆碱 100.0, 肌醇 5.0, 维生素K 2.0, 维生素A醋酸酯(20 000 IU/g) 5.0, 维生素D₃(400 000 IU/g) 0.002, DL- α -生育酚乙酸酯(250 IU/g) 8.0, 纤维素 865.266; b. 矿物质预混物(g/100 g预混物)包括六水氯化钴 0.004, 五水硫酸铜 0.250, 硫酸亚铁 4.0, 七水硫酸镁 28.398, 一水硫酸锰 0.650, 碘化钾 0.067, 亚硒酸钠 0.010, 七水硫酸锌 13.193, 磷酸二氢钠 15, 纤维素 38.428

Notes: a. vitamin premix, diluted in cellulose, provided the following vitamins(g/kg premix) are thiamin HCl 0.5, riboflavin 3.0, pyridoxine HCl 1.0, DL Ca-pantothenate 5.0, nicotinic acid 5.0, biotin 0.05, folic acid 0.18, vitamin B₁₂ 0.002, choline chloride 100.0, inositol 5.0, menadione 2.0, vitamin A acetate (20 000 IU/g) 5.0, vitamin D₃ (400 000 IU/g) 0.002, DL- α -tocopheryl acetate (250 IU/g) 8.0, α -cellulose 865.266; b. trace mineral premix provided the following minerals (g/100 g premix) are CoCl₂·6H₂O 0.004, CuSO₄·5H₂O 0.250, FeSO₄ 4.0, MgSO₄·7H₂O 28.398, MnSO₄·H₂O 0.650, KI 0.067, Na₂SeO₃ 0.010, ZnSO₄·7H₂O 13.193, NaH₂PO₄ 15, filler 38.428

全虾及饲料组成分析 全虾及饲料组成分析参考 AOAC(2000) 的标准方法, 水分测定采用 105 °C 烘干至恒重 (24 h), 粗灰分测定采用 550 °C 马弗炉灼烧法 (PCD-E3000, Serials, Peaks, Japan), 粗蛋白和粗脂肪测定分别采用凯氏定氮法 (KjeltecTM8200, FOSS, Sweden) 和索氏抽提法 (FOSS, SoxtecTM2055, 瑞士)。

石蜡切片的制备与观察 肝胰腺在 4% 多聚甲醛中固定超过 24 h 后, 脱水, 二甲苯清

洁, 石蜡包埋, 苏木精-伊红 (H.E) 染色, 切成 5 μ m 薄片。使用 BX51 (OLYMPUS, 日本) 对染色切片进行分析。

消化酶、免疫相关酶活性测定 消化酶活性测定使用特定的商业检测试剂盒进行。蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶均采用酶联免疫吸附法检测, 试剂盒购自上海翼飞生物科技有限公司。丙二醛 (MDA)(TBA 法)、总超氧化物歧化酶 (T-SOD)(羟胺法)、过氧化氢酶 (CAT)(可见光法)、

谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)(比色法)、还原型谷胱甘肽 (GSH)(微板法)、酸性磷酸酶 (ACP)(微板法)、碱性磷酸酶 (AKP)(微板法)、酚氧化酶 (POX)(ELISA 检测法)、溶菌酶 (LZM)(比浊法) 测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。具体实验操作按试剂盒说明书进行。

1.4 计算方法

生长指标计算公式:

增重率 (weight gain rate, WGR, %) = $(W_t - W_0) / W_0 \times 100\%$

存活率 (survival rate, SR, %) = $N_t / N_0 \times 100\%$

饲料系数 (feed conversion ratio, FCR) = $W_f / (W_t - W_0)$

肥满度 (condition factor, CF, g/cm^3) = $W/L^3 \times 100$

肝体比 (hepatosomatic index, HSI, %) = $W_h / W \times 100\%$

式中, W_0 为对虾的初始体质量 (g), W_t 为对虾的终末体质量 (g), N_0 为对虾的初始数量 (尾), N_t 为对虾的终末数量 (尾), W_f 为摄入饲料量 (g), W_h 为肝胰腺的质量 (g), L 为对虾体长 (cm), W 为对虾体质量 (g)。

1.5 肠道菌群分析

实验虾肠道样品中微生物总 DNA 用 E.Z.N.A. soil DNA 试剂盒 (OMEGA, USA) 提取, 并用 NanoDrop ND-2000 分光光度计 (Thermo, USA) 测定所提 DNA 纯度和浓度。使用正向引物 338F (5'ACTCCTACGGGAGGCAGCA3') 和反向引物 806R(5'GGACTACHVGGGTWTCTAAT3') 扩增细菌 16S RNA 基因的 V3~V4 高可变区。PCR 反应体系为 25 μ L, 反应参数: 98 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 26 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。纯化后的 PCR 产物, 送上海美吉生物医药科技有限公司, 通过 Illumina MiSeq PE300 平台进行双末端测序。

从测序公司获得原始数据, 使用 QIIME 程序 (版本号 1.9.1, <http://qiime.org/install/index.html>) 对序列质量进行控制, 用 UPARSE(版本号 7.0.1090, <http://www.drive5.com/uparse/>) 将相似性高于 97% 的序列聚类成同一个分类操作单元 (operational taxonomic units, OTUs), 用 Usearch(版本号 7.0, <http://www.drive5.com/usearch/>) 对数据进行处理, 统计 OTU。采用 RDP classifier 贝叶斯

算法对 97% 相似性水平的 OUT 代表序列进行分类学分析, 根据样品 OUT 与 Silva 数据库 (<https://www.arb-silva.de/>) 的相似性对比结果进行物种注释。根据分类学统计结果分析肠道微生物的群落组成和结构, 用 Mothur 软件进行 Alpha 多样性分析, 计算 Chao1、Shannon、Ace 和 Simpson 指数, 使用 GraphPad Prism 5 软件绘制群落组成图。使用 R 语言 mixOmics 包中的 plsda 进行样本分组分析和作图。所有操作通过美吉生物云平台完成。

1.6 数据分析

本实验所有的数据分析使用 SPSS Statistics 23 (IBM, Armonk, NY, USA) 软件, 用平均值 \pm 标准误 (mean \pm SE) 表示。对照组、0.1、0.2 和 0.4 g/kg 组之间的差异分析使用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 影响显著时再进行 Duncan 氏多重比较, 莱文方差 (Levene) 等同性检验后使用独立样本 t 检验分析对照组和 0.4 g/kg 组之间的差异, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 生长性能

水飞蓟素添加组增重率均显著高于对照组, 饲料系数显著低于对照组 ($P < 0.05$)。各处理组存活率和肥满度无显著差异 ($P > 0.05$)。0.1 g/kg 组对虾的肝体比显著高于 0.4 g/kg 水飞蓟素添加组 ($P < 0.05$), 但与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

2.2 全虾体成分

各组全虾的水分、粗蛋白、粗灰分、粗脂肪均无显著性差异 (表 3) ($P > 0.05$), 但随着饲料中水飞蓟素添加量的升高, 各组全虾水分呈下降趋势。0.2 和 0.4 g/kg 组粗蛋白、粗脂肪和粗灰分数值均高于对照组。

2.3 消化酶活性

低盐度养殖环境下, 饲料中添加水飞蓟素对肝胰腺和肠道的消化酶活性产生了显著影响 (图 1)。在肝胰腺中, 水飞蓟素添加量为 0.4 g/kg 时, 对虾有最大的淀粉酶和脂肪酶活性并且淀粉酶活性显著高于对照组 ($P < 0.05$)。在肠道中,

表 2 饲料中添加水飞蓟素对低盐度下凡纳滨对虾生长的影响

Tab. 2 Growth performance of *L. vannamei* fed with silymarin at low salinity

项目 items	水飞蓟素不同含量组/(g/kg) different groups of silymarin content			
	0	0.1	0.2	0.4
增重率/% WGR	3 728.59 ± 106.96 ^b	4 207.94 ± 120.82 ^a	4 309.68 ± 57.83 ^a	4 202.58 ± 67.30 ^a
存活率/% SR	99.50 ± 0.50	98.00 ± 1.41	96.50 ± 1.26	97.00 ± 1.29
饲料系数 FCR	1.35 ± 0.02 ^a	1.24 ± 0.03 ^b	1.26 ± 0.01 ^b	1.26 ± 0.01 ^b
肥满度/(g/cm ³) CF	0.68 ± 0.00	0.70 ± 0.01	0.69 ± 0.00	0.70 ± 0.01
肝体比/% HSI	5.57 ± 0.08 ^{ab}	5.66 ± 0.20 ^a	5.43 ± 0.08 ^{ab}	5.26 ± 0.05 ^b

注: 表中同一行数据中不同字母上标表示差异显著($P < 0.05$), 下同

Notes: different superscripts of the same row values are significantly different ($P < 0.05$), the same below ($n=4$)

表 3 饲料中添加水飞蓟素对低盐度下凡纳滨对虾体成分的影响(比湿质量)

Tab. 3 Body composition of *L. vannamei* fed with silymarin at low salinity(wet mass basis)

项目 items	水飞蓟素不同含量组/(g/kg) different groups of silymarin content			
	0	0.1	0.2	0.4
水分/% moisture	77.82 ± 0.10	77.67 ± 0.38	77.63 ± 0.44	77.63 ± 0.20
粗蛋白/% crude protein	15.35 ± 0.07	15.33 ± 0.30	15.39 ± 0.34	15.47 ± 0.17
粗脂肪/% crude lipid	3.55 ± 0.08	3.76 ± 0.11	3.69 ± 0.13	3.69 ± 0.11
粗灰分/% crude ash	2.69 ± 0.12	2.68 ± 0.02	2.84 ± 0.06	2.77 ± 0.03

消化酶的活性均随着水飞蓟素添加量的增加而升高, 0.2~0.4 g/kg 水飞蓟素能显著提高蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性 ($P < 0.05$)。

2.4 免疫指标

随着水飞蓟素添加量的增加, 肝胰腺和肠道中 MDA 的含量呈下降趋势, 但各组间无显著差异 ($P > 0.05$) (图 2-a)。添加 0.4 g/kg 的水飞蓟素, 肝胰腺组织中的 T-SOD 和 CAT 的活性显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 2-b, c), 且 GSH 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 2-e)。但水飞蓟素对肠道中 T-SOD、CAT 和 GPx 的活性无显著影响。在肠道中, 水飞蓟素添加量为 0.2 g/kg 时, ACP 和 AKP 的活性显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 2-g, h)。水飞蓟素的添加未对溶菌酶和酚氧化酶活性产生影响, 而且肝胰腺和肠道中的酚氧化酶含量呈下降趋势 (图 2-i)。

2.5 肝胰腺组织结构

饲料中添加水飞蓟素对低盐度养殖的凡纳滨对虾肝胰腺组织有明显影响 (图版)。与对照组 (图版-1) 相比, 添加水飞蓟素的处理组 (图版-2~

4) 肝胰腺显微结构中, 肝小体排列紧密, 且基底膜结构完整, 管腔成规则的星形 (五角或四角)。而对照组肝小体萎缩, 排列疏松, 管腔变形扭曲不规则, 甚至丧失星形管腔结构。肝小体中, 水飞蓟素添加组的对虾含有大量 B 细胞和 E 细胞, 而对照组 B 细胞虽有膨大, 但数量较少。

2.6 低盐度下饲料中添加水飞蓟素对凡纳滨对虾肠道菌群的影响

对照组和 0.4 g/kg 组样本肠道 16S rDNA 测序分析共获得 521 693 条序列, 每个样本测序量超过 50 000 条, 平均长度约为 440 bp。比较对照组和 0.4 g/kg 组对虾肠道微生物的多样性指数, 发现没有显著差异 ($P > 0.05$), 0.4 g/kg 组的 Chao1 指数、ACE 指数、Simpson 指数较对照组略有下降, 而 Shannon 指数略有上升 (图 3-a)。

PLS-DA 分析发现, 对照组样本和水飞蓟素添加组样本可以明显区分并聚成 2 个类群, 2 组间未有交叉, 且相距较远。2 组样本位点值 COMP1 差异极显著 ($P < 0.01$), 说明对照组和 0.4 g/kg 组对虾肠道菌群具有显著差异, 表明水飞蓟素能在一定程度上影响肠道菌群组成。此外,

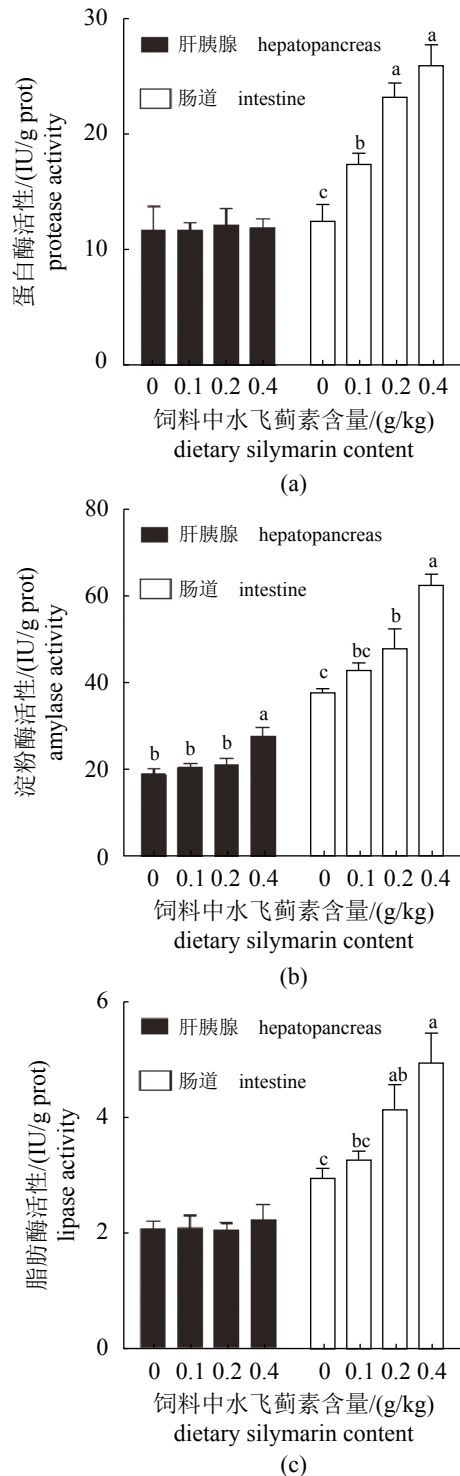


图1 饲料中添加水飞蓟素对低盐度下凡纳滨对虾蛋白酶(a)、淀粉酶(b)和脂肪酶(c)活性的影响
图中不同字母上标表示在同种组织内差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Fig. 1 Specific activity of protease (a), amylase (b) and lipase (c) in hepatopancreas and intestines of *L. vannamei* fed with silymarin at low salinity

Different letters mean significant difference within same tissue ($P < 0.05$), the same below

通过 PLS-DA 分析中的样本点分布的离散情况也可以看出, 对照组样本个体肠道菌群组成接近, 而水飞蓟素添加组不同个体的肠道菌群组成差异较大(图 3-b, c)。

在门分类水平上, 对照组和 0.4 g/kg 组各样品的细菌群落组成类似, 2 个处理组的肠道优势菌群较为一致, 其中变形菌门 (Proteobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes) 在各样本中变化较大, 核心菌群相对丰度最高的是变形菌门, 其后依次是拟杆菌门、放线菌门 (Actinobacteria) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia), 这 4 类优势菌群占肠道菌群的比例超过 98%, 排名前 7 的细菌丰度之和占肠道菌群的比例超过 99%(图 4)。

比较 0.4 g/kg 组和对对照组凡纳滨对虾的肠道细菌在门水平和属水平的差异, 发现饲料中添加水飞蓟素后, 凡纳滨对虾肠道中的拟杆菌门和纤维菌门 (Gracilibacteria) 相对丰度显著下降 ($P < 0.05$)(图 5-a)。对照组中, 厚壁菌门 (Firmicutes) 比拟杆菌门相对丰度比例为 3.81×10^{-4} (图 5-b, R_1), 0.4 g/kg 组中该比例为 3.66×10^{-3} (图 5-b, R_2), 比值扩大了 9.6 倍。在属水平, 共有 14 种存在显著差异, 但大多没有明确分类地位, 其中已分类命名的海边杆菌属 (*Actibacter*) 和矿生菌属 (*Fodinicola*) 的丰度显著下降, 志贺氏杆菌属 (*Shinella*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 和迪茨氏菌属 (*Dietzia*) 的丰度显著升高 (图 5-c)。但通过分析对照组和 0.4 g/kg 组肠道菌群 KEGG pathway (level 3) 丰度组成, 发现代谢通路并无显著差异, 可见水飞蓟素对肠道细菌的代谢功能没有影响。

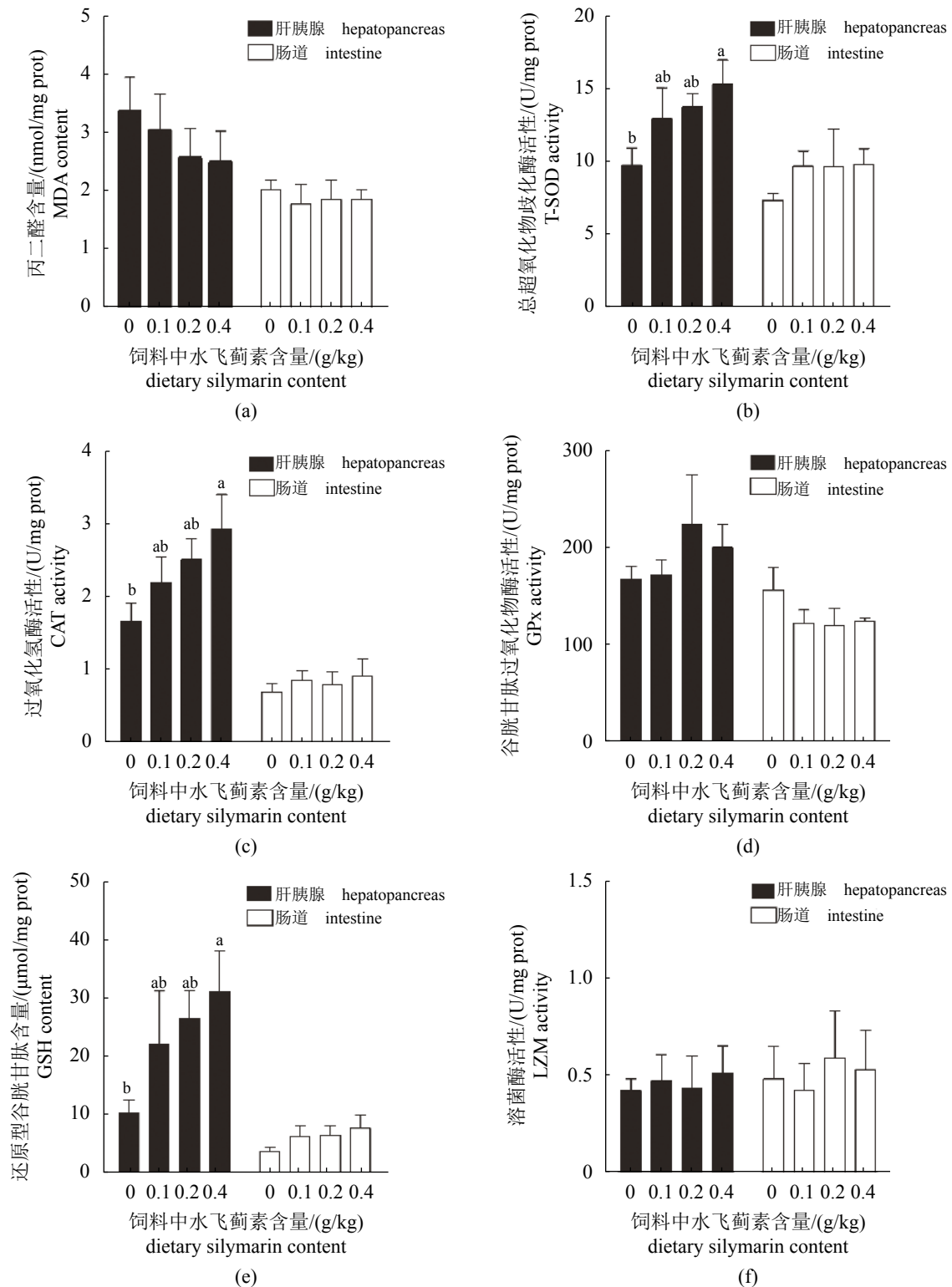
3 讨论

3.1 低盐度下水飞蓟素对凡纳滨对虾生长性能的影响

研究表明, 低盐度会对凡纳滨对虾的生长和存活造成不良影响^[3, 26-27]。凡纳滨对虾体液等渗点约为 718 mOsm/kg^[28], 对应的盐度约为 25。盐度的偏好选择实验表明, 凡纳滨对虾更偏爱 17~35 的盐度, 同时趋避极低盐度^[29]。虽然凡纳滨对虾能适应 3 的低盐度, 但低盐度的环境使其处于一种胁迫之下, 机体需要消耗额外的能量用于渗透压调节以应对低渗环境, 维持机体离子平衡, 从而导致对虾的生长性能下降。本研究中, 在低盐度养殖条件下, 饲料中添加 0.1~

0.4 g/kg 水飞蓟素能显著提高凡纳滨对虾的增重率，降低饲料系数，而生长性能的改善和饲料利用能力的增强可能与消化酶活性的提高有关。有研究表明，消化酶活性的提高能够促进机体对

饲料的消化吸收，从而提高动物的生长性能^[30-31]。在本研究中，水飞蓟素对消化酶活性也有提高作用。消化酶的活性可反映机体对饲料的消化利用程度，消化酶活性越高，意味着机体对饲



(图2 Fig. 2)

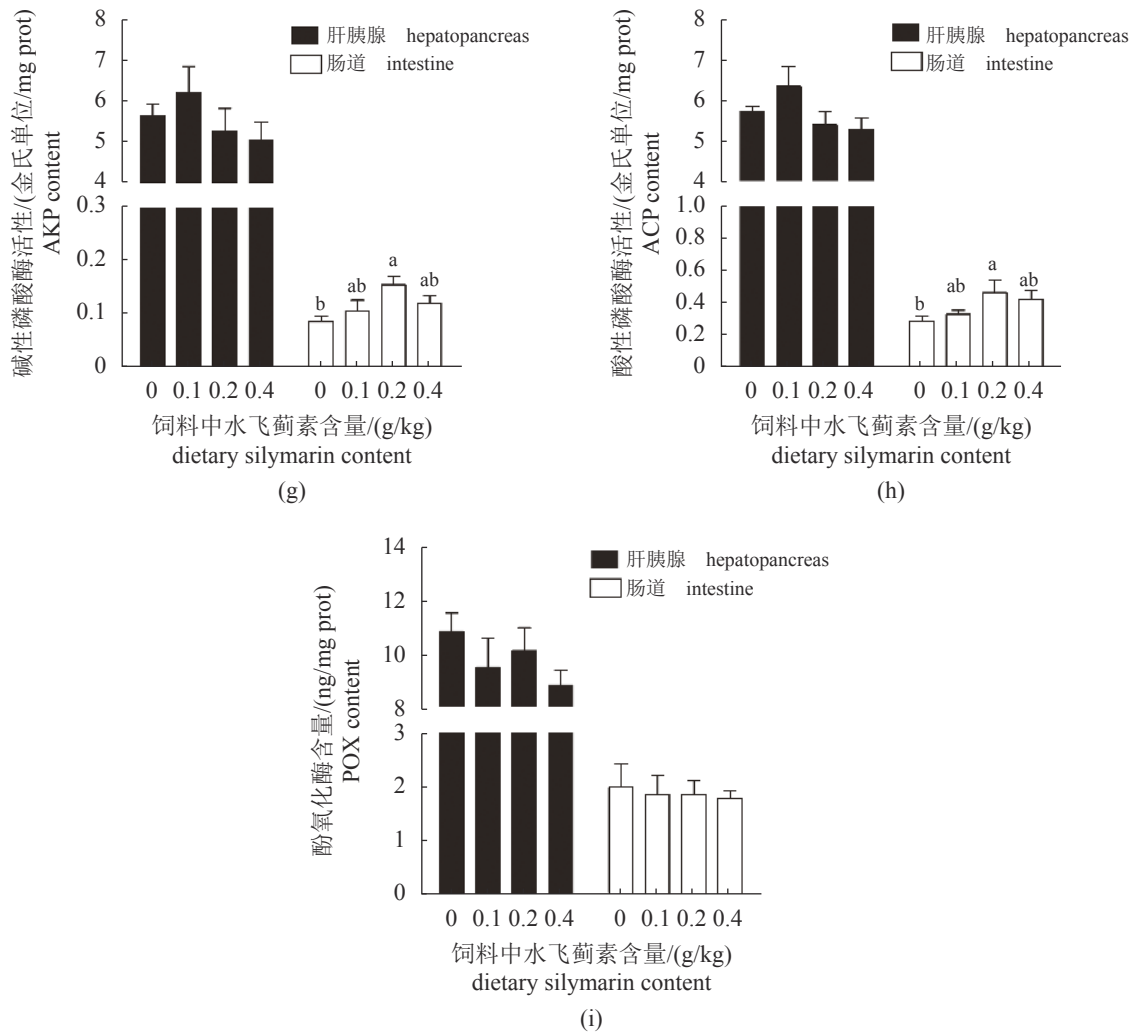


图 2 饲料中添加水飞蓟素对低盐度下凡纳滨对虾免疫指标的影响

Fig. 2 Effects of silymarin on immune indexes of *L. vannamei* fed with silymarin at low salinity

料的利用越充分。同样有研究表明,水飞蓟素具有一定的促进生长、提高饲料效率的作用,如虹鳟、团头鲂、草鱼、吉富罗非鱼^[17-19, 21]。同时,水飞蓟素添加量的提高能有效降低肝体比,增大对虾可食部分。这可能与水飞蓟素改善对虾肝胰腺物质能量代谢的作用有关。在吉富罗非鱼中的研究也有类似的结果,添加水飞蓟素后,罗非鱼的肝体比和脏体比显著下降^[18]。已有的研究普遍认为低盐度会降低凡纳滨对虾的存活率,本研究中各处理组存活率无显著差异,对照组高达 99.5%,这可能与实验饲料配方的优化、养殖密度较小有关。

3.2 低盐度下水飞蓟素对凡纳滨对虾免疫指标的影响

非特异性免疫是甲壳动物免疫系统应对病

菌的主要抵抗方式^[32],非特异性免疫酶活性的变化是衡量凡纳滨对虾免疫功能状态的重要指标,主要包括抗氧化酶系和非抗氧化酶系。

虽然凡纳滨对虾能适应广泛的环境盐度,但是低盐度仍会造成凡纳滨对虾的氧化压力增大、新陈代谢紊乱和免疫力低下^[33-34]等不良反应。面对环境胁迫,水产动物会通过一系列的抗氧化防御体系来清除氧化应激产生的自由基,从而维持组织结构的正常和代谢功能的稳定^[35-36]。MDA 是脂质过氧化的代谢产物,其含量可以反映机体内脂质过氧化的程度,被广泛用作细胞损伤的评价指标^[37]。CAT 和 SOD 是相互关联的抗氧化酶,其活性的大小能够反映生物体内代谢状态和外界环境胁迫的变化^[38]。机体代谢中产生的活性氧会对细胞造成损伤, $\cdot\text{O}_2^-$ 经 SOD 催化

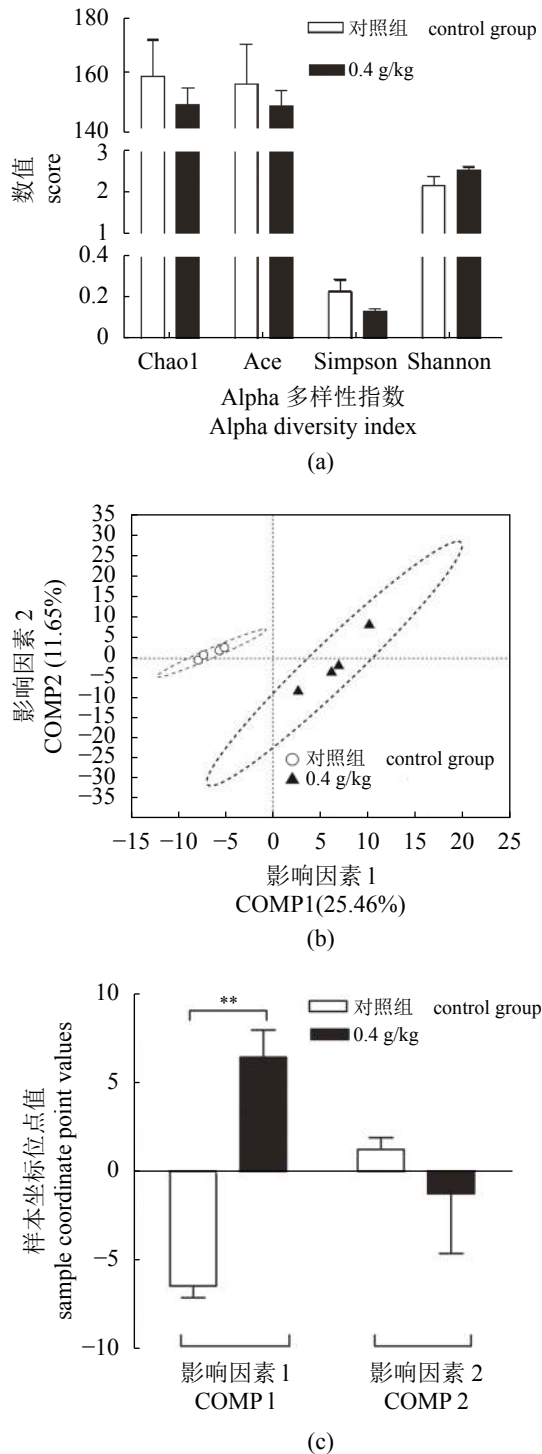


图3 肠道微生物多样性(a)和样本分组(b、c)分析
**. 差异极显著 ($P < 0.01$), 下同

Fig. 3 Intestinal microbial diversity (a) and sample grouping (b, c) analysis

** indicates significantly different at level of $P < 0.01$, the same below

生成过氧化氢, 过氧化氢再经 CAT 转换成无害的水和氧气, 从而保护细胞, 避免机体损伤。

GPx 是机体广泛存在的催化过氧化氢分解的酶, 可特异性催化还原型谷胱甘肽对过氧化氢的还原反应。GSH 可直接消除活性氧自由基, 同时可作为 GPx 的底物清除细胞内过氧化氢及脂过氧化物。在应对低盐度环境时, 凡纳滨对虾的抗氧化防御系统发挥着重要作用。本研究发现, 在低盐度胁迫下, 饲料中添加水飞蓟素可有效改善凡纳滨对虾的肝胰腺抗氧化功能, 缓解凡纳滨对虾的氧化应激。随着水飞蓟素添加量的增多, 对虾肝胰腺中 MDA 含量逐渐降低, SOD 和 CAT 活性明显升高, GSH 含量显著增加, GPx 活性也有一定的升高, 凡纳滨对虾的抗氧化能力得到显著增强, 组织氧化损伤降低。水飞蓟素在其他水产动物上也表现出相近的作用效果。大西洋鲑 (*Salmo salar*) 头肾细胞 (SHK-1) 离体实验发现, 水飞蓟素能够有效保护细胞阻断氧化应激 (高葡萄糖和水杨酸)^[39]; 而水飞蓟素对四氯化碳致鲫 (*Carassius auratus*) 肝细胞损伤的保护作用也与其抗氧化作用有关^[40]; 在大菱鲆的营养实验中, 水飞蓟素能有效促进 SOD、GPx 和过氧化物酶 6 (peroxiredoxin 6, Prdx6) mRNA 的表达, 提高抗氧化酶系活性, 从而改善大菱鲆生长性能和生理机能, 缓解低蛋白饲料的影响^[20]。可见, 水飞蓟素通过提高肝脏抗氧化能力, 进而改善机体生长和生理状态, 缓解机体应激和环境胁迫。

AKP 与 ACP 直接参与磷酸的转移和代谢, 是生物体内重要的代谢调控酶。AKP 在对虾的钙质吸收、骨骼形成和甲壳素的形成及分泌过程中具有重要作用, 研究证实 AKP 活性与虾蜕皮直接相关, 罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 通过提高 AKP 活性以提高钙的沉积和吸收速率^[41]。ACP 是溶酶体的标志酶, 其活性可以代表溶酶体吞噬和包裹反应的强度。本实验中, 饲料中添加 0.2 g/kg 水飞蓟素可以明显提高肠道 AKP 和 ACP 活性。而低盐度下, 对虾需要加强钙质吸收, 显然肠道 AKP 活性的增强有利于凡纳滨对虾的蜕壳。AKP 和 ACP 在凡纳滨对虾中的分布具有组织特异性, 尤其是在肝胰腺中的活性最强^[42]。但肝胰腺中的 AKP 和 ACP 活性并未在水飞蓟素的作用下有明显变化。在异育银鲫 (*C. auratus gibelio*) 中的研究表明, 水飞蓟素能显著提高血清碱性磷酸酶的含量^[43]。水飞蓟素的主要成分是黄酮类物质, 其成分复杂, 可能导

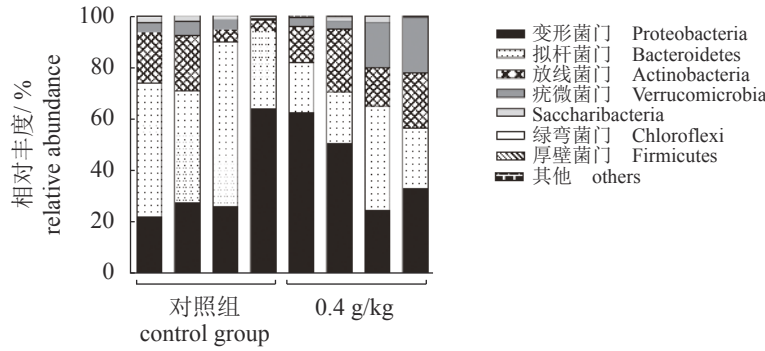


图 4 各处理组凡纳滨对虾肠道细菌在门水平上的群落组成 (丰度值排名前 7)

Fig. 4 Top 7 phyla of microbial community in *L. vannamei* intestine of each treatment group

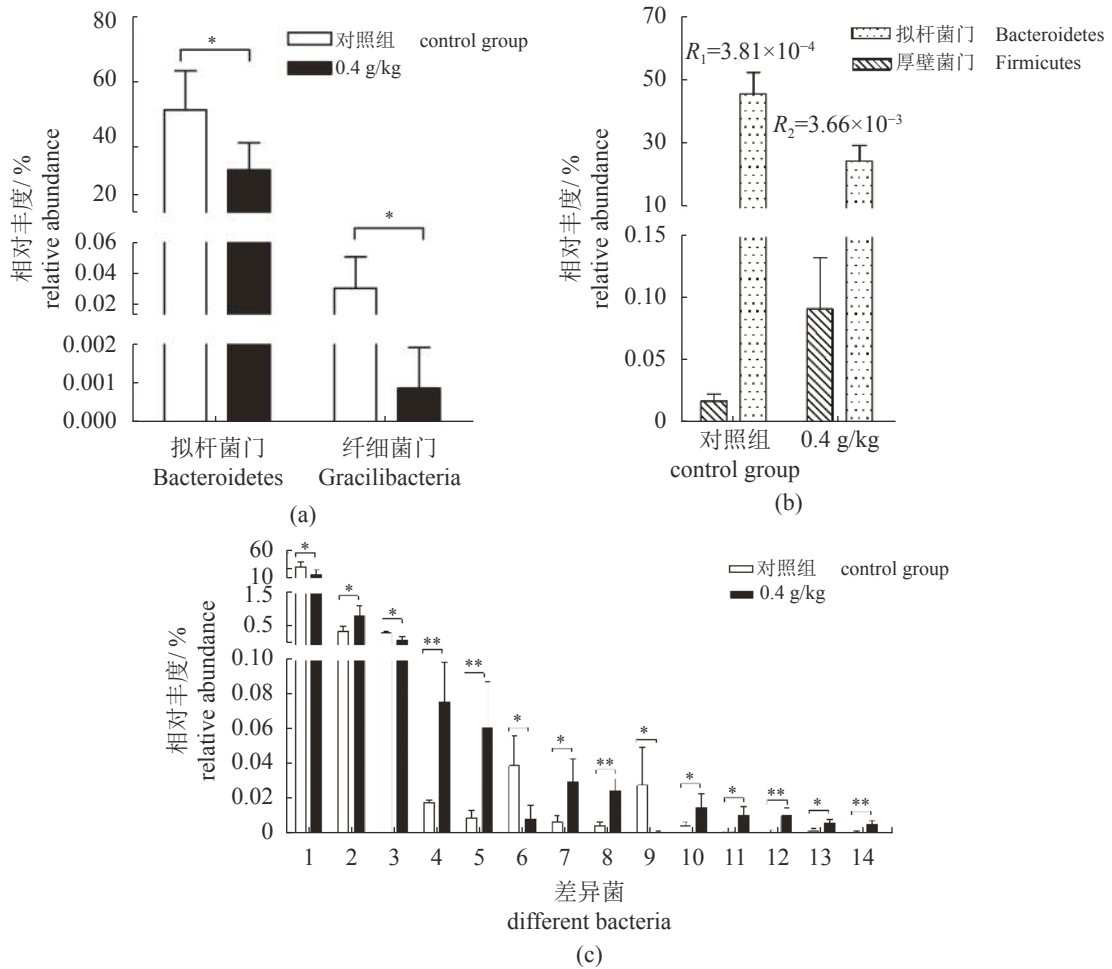


图 5 凡纳滨对虾肠道微生物在门水平 (a, b) 和属水平 (c) 上差异菌群分析

R 为厚壁菌门相对丰度/拟杆菌门相对丰度; 1. 海边杆菌属; 2. *Iamia*; 3. *g_norank_o_JG30-KF-CM45*; 4. 志贺氏杆菌属; 5. *norank_o_Gaiellales*; 6. 矿生菌属; 7. 不动杆菌属; 8. 未分类_根瘤菌目; 9. *norank_p_Gracilibacteria*; 10. *norank_f_MNG7*; 11. 迪茨氏菌属; 12. 未分类_生丝微菌科; 13. 未分类_赤杆菌科; 14. *norank_f_Sva0996_marine_group*; * 差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 5 Intestinal differential flora analysis at phylum level (a, b) and at genus level (c)

R is the ratio of relative abundance between Firmicutes and Bacteroidetes; 1. *Actibacter*; 2. *Iamia*; 3. *g_norank_o_JG30-KF-CM45*; 4. *Shinella*; 5. *norank_o_Gaiellales*; 6. *Fodinicola*; 7. *Acinetobacter*; 8. unclassified_o_Rhizobiales; 9. *norank_p_Gracilibacteria*; 10. *norank_f_MNG7*; 11. *Dietzia*; 12. unclassified_f_Hyphomicrobiaceae; 13. unclassified_f_Erythrobacteraceae; 14. *norank_f_Sva0996_marine_group*; * indicates different at level of $P < 0.05$

致水飞蓟素在不同动物上的作用效果不尽相同。本实验中,水飞蓟素对对虾的溶菌酶和酚氧化酶活性均无明显影响,仅 0.2 g/kg 水飞蓟素能显著提高对虾肠道 AKP 和 ACP 活性,这可能与水飞蓟素在不同组织中的最佳作用浓度和时间不同有关。

3.3 低盐度下水飞蓟素对凡纳滨对虾肝胰腺组织结构的影响

在无脊椎动物中,肝胰腺具有特殊的生理功能。肝胰腺是凡纳滨对虾最大的消化器官,为复管状腺结构,由多级分支的小管组成。肝胰腺由若干个肝小体组成,肝小体是对虾行使消化吸收功能的基本结构单位,主要由基膜、细胞层和肝小管组成。细胞层包括 B 细胞、R 细胞、E 细胞和 F 细胞^[44-45]。

本研究以低盐度作为胁迫因子,以添加水飞蓟素的饲料投喂凡纳滨对虾,结果显示,水飞蓟素能有效改善其肝胰腺和肠道组织形态,并且这些变化与消化酶、抗氧化指标的变化相一致。对照组和各处理组对虾均未出现肝胰腺坏死症状,但添加组较对照组肝小体排列紧密,且基底膜结构完整,管腔形状规则;而对照组肝小体有一定程度的萎缩,管腔形状扭曲不规则,这与生化指标中对照组肝胰腺 MDA 含量更高相一致。添加水飞蓟素后,肝胰腺 MDA 含量下降,抗氧化酶活性升高,肝胰腺中还原型谷胱甘肽含量显著升高,表明水飞蓟素能提高机体抗氧化能力,修复肝脏损伤,维护肝胰腺组织结构和生理功能正常。添加水飞蓟素后,肝小体 B 细胞数量明显增多,而 B 细胞的主要功能是分泌消化酶及消化。组织形态的变化印证了消化酶活性的变化^[46]。添加水飞蓟素后,消化酶活性显著提高,生长性能得到改善。E 细胞是一种未分化的胚性细胞,可分化为其他类型的肝胰腺细胞^[44-45]。在本研究中,水飞蓟素添加组肝小体 E 细胞数量增多可能与水飞蓟素能调控细胞周期,提高肝脏再生能力的作用有关。对大鼠 (*Rattus norvegicus*) 的研究表明,水飞蓟素能够对肝切除手术 (PHx) 后的细胞周期进行调控,增加 G1、S、G2、M 期蛋白质和 mRNA 的含量及加强生长因子的表达以促进肝脏再生^[47]。在对虹鳟的研究中发现,水飞蓟素能提高肝脏合成蛋白质的能力^[21]。说明水飞蓟素可能通过清除氧

化损伤、调节细胞周期和促进物质合成等途径来修复低盐度下对虾受损的肝胰腺组织。

3.4 低盐度下水飞蓟素对凡纳滨对虾肠道菌群的影响

肠道微生物的结构和组成影响着宿主的免疫应答、营养吸收和能量平衡^[48-49]。同时,肠道微生物群落结构与功能紧密关联,可用指示微生物评估宿主健康状况^[50]。饮食和宿主系统发育是影响肠道菌群组成的重要因素,通过对比不同盐度下肠道菌群的结构,发现盐度的变化能够显著影响凡纳滨对虾肠道微生物的组成,进而影响肠道菌群功能^[6]。关于水飞蓟素对肠道菌群的影响研究较少,但相关的报道表明水飞蓟素能够影响肠道微环境,且更多的结果指向水飞蓟素会降低肠道微生物的多样性^[51-52]。在本研究中,对比对照组和 0.4 g/kg 水飞蓟素添加组,发现水飞蓟素会使凡纳滨对虾肠道微生物的多样性和丰度下降,水飞蓟素对小鼠肠道菌群也表现出类似的作用效果^[52]。

添加组和对照组对虾肠道微生物菌群中,相对丰度最高的前 4 种分别为变形菌门、拟杆菌门、放线菌门和疣微菌门,这与以往对凡纳滨对虾肠道菌群的研究结果相似^[11, 50]。PLS-DA 分析结果显示,对照组和添加组的肠道样本菌群有显著差异。对比不同分类学水平菌群相对丰度值,发现添加组拟杆菌门、纤维菌门相对丰度都显著低于对照组。拟杆菌门可将复杂的碳水化合物降解成短链脂肪酸,为动物提供能量^[53]。添加水飞蓟素后,对虾肠道拟杆菌门细菌丰度显著下降,且主要是黄杆菌科 (*Flavobacteriaceae*),厚壁菌门与拟杆菌门的比例提高了 9.6 倍,该比例的提高可能更易促进宿主吸收并储存能量,从而促进对虾生长^[54]。因目前关于水飞蓟素与细菌作用的影响研究极少,缺乏参考资料,水飞蓟素降低拟杆菌门相对丰度的作用和可能机理需要进一步探究。*Gracilibacteria* 是菌纲未定的分类群,相关研究极少,在此不做讨论。属水平有显著差异的菌群都比较少见,且肠道菌群代谢功能预测分析表明,饲喂水飞蓟素后,凡纳滨对虾肠道菌群代谢功能没有发生显著变化。

4 结论

低盐度下,饲料中添加适量水飞蓟素能有效提高凡纳滨对虾的生长性能,增强机体的抗

氧化能力, 改善肝胰腺组织结构, 并会影响肠道菌群组成结构, 但并不会改变肠道菌群的代谢功能。

参考文献 (References):

- [1] Pante M J R. Influence of environmental stress on the heritability of molting frequency and growth rate of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*[D]. Houston: University of Houston-Clear Lake, 1990.
- [2] Li E C, Wang X D, Chen K, *et al.* Physiological change and nutritional requirement of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2017, 9(1): 57-75.
- [3] Li E C, Chen L Q, Zeng C, *et al.* Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities[J]. *Aquaculture*, 2007, 265(1-4): 385-390.
- [4] Decamp O, Cody J, Conquest L, *et al.* Effect of salinity on natural community and production of *Litopenaeus vannamei* (Boone), within experimental zero-water exchange culture systems[J]. *Aquaculture Research*, 2003, 34(4): 345-355.
- [5] Xu C, Li E C, Liu Y, *et al.* Comparative proteome analysis of the hepatopancreas from the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* under long-term low salinity stress[J]. *Journal of Proteomics*, 2017, 162: 1-10.
- [6] Zhang M L, Sun Y H, Liu Y K, *et al.* Response of gut microbiota to salinity change in two euryhaline aquatic animals with reverse salinity preference[J]. *Aquaculture*, 2016, 454: 72-80.
- [7] 乔洪金, 胡冬雪, 胡文靖, 等. 饲料中添加鼠尾藻粉对大菱鲆幼鱼生长、体成分、抗氧化和非特异免疫参数的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2019, 28(1): 109-116.
Qiao H J, Hu D X, Hu W J, *et al.* Effects of dietary *Sargassum thunbergii* powder on growth performance, body composition, antioxidation and non-specific immune parameters of juvenile turbot[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(1): 109-116(in Chinese).
- [8] Sokolova I M, Frederich M, Bagwe R, *et al.* Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates[J]. *Marine environmental Research*, 2012, 79: 1-15.
- [9] 艾春香. 功能性水产配合饲料的研发与应用[J]. 饲料工业, 2017, 38(14): 1-9.
Ai C X. The development and application of functional aquatic feed[J]. *Feed Industry*, 2017, 38(14): 1-9(in Chinese).
- [10] Li H F, Xu C, Zhou L, *et al.* Beneficial effects of dietary β -glucan on growth and health status of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 91: 315-324.
- [11] Zhou L, Li H F, Qin J G, *et al.* Dietary prebiotic inulin benefits on growth performance, antioxidant capacity, immune response and intestinal microbiota in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at low salinity[J]. *Aquaculture*, 2020, 518: 734847.
- [12] 王芸, 李正, 段亚飞, 等. 红景天提取物对凡纳滨对虾抗氧化系统及抗低盐度胁迫的影响[J]. 南方水产科学, 2018, 14(1): 9-19.
Wang Y, Li Z, Duan Y F, *et al.* Effect of dietary *Rhodiola rosea* extract on antioxidant system and anti-low salinity stress of *Litopenaeus vannamei*[J]. *South China Fisheries Science*, 2018, 14(1): 9-19(in Chinese).
- [13] 王芸, 李健, 李正, 等. 绿原酸诱导凡纳滨对虾抗氧化功能及抵御低盐度胁迫的响应[J]. 中国水产科学, 2014, 21(2): 340-350.
Wang Y, Li J, Li Z, *et al.* Antioxidant activity and resistance to low-salinity stress in *Litopenaeus vannamei* induced by chlorogenic acid[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(2): 340-350(in Chinese).
- [14] Pferschy-Wenzig E M, Atanasov A G, Malainer C, *et al.* Identification of isosilybin a from milk thistle seeds as an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma[J]. *Journal of Natural Products*, 2014, 77(4): 842-847.
- [15] Bijak M. Silybin, a major bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) —Chemistry, bioavailability, and metabolism[J]. *Molecules*, 2017, 22(11): 1942.
- [16] Vahabzadeh M, Amiri N, Karimi G. Effects of silymarin on metabolic syndrome: a review[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2018, 98(13): 4816-4823.
- [17] Xiao P Z, Ji H, Ye Y T, *et al.* Dietary silymarin supplementation promotes growth performance and improves lipid metabolism and health status in grass carp (*Cteno-*

- pharyngodon idellus*) fed diets with elevated lipid levels[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2017, 43(1): 245-263.
- [18] 苟庚午, 蒋明, 文华, 等. 饲料中添加水飞蓟素对吉富罗非鱼生长性能、肝脏脂肪代谢酶和抗氧化能力的影响[J]. 水产学报, 2016, 40(9): 1309-1320.
Gou G W, Jiang M, Wen H, *et al.* Effects of dietary silymarin on growth performance, enzymes of hepatic lipid metabolism and antioxidant ability in GIFT *Oreochromis niloticus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(9): 1309-1320(in Chinese).
- [19] 王永庆. 水飞蓟素对团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 氧化油脂肝损伤的保护作用 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
Wang Y Q. Protection of silymarin to liver injury of *Megalobrama amblycephala* induced by oxidized oil[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012 (in Chinese).
- [20] Wang J Y, Zhou H H, Wang X, *et al.* Effects of silymarin on growth performance, antioxidant capacity and immune response in turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2019, 50(6): 1168-1181.
- [21] Banaee M, Sureda A, Mirvaghefi A R, *et al.* Effects of long-term silymarin oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2011, 37(4): 885-896.
- [22] 刘爽. 水飞蓟素对中华绒螯蟹幼蟹生长和脂肪利用的影响 [D]. 上海: 华东师范大学, 2018.
Liu S. Effects of silymarin on growth performance and lipid utilization of juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[D]. Shanghai: East China Normal University, 2018 (in Chinese).
- [23] Wang X D, Li E C, Wang S F, *et al.* Protein - sparing effect of carbohydrate in the diet of white shrimp *Litopenaeus vannamei* at low salinity[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2015, 21(6): 904-912.
- [24] Wang X D, Li E C, Xu C, *et al.* Growth, body composition, ammonia tolerance and hepatopancreas histology of white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed diets containing different carbohydrate sources at low salinity[J]. *Aquaculture Research*, 2016, 47(6): 1932-1943.
- [25] Wang X D, Li E C, Qin J G, *et al.* Growth, body composition, and ammonia tolerance of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* fed diets containing different carbohydrate levels at low salinity[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2014, 33(2): 511-517.
- [26] 王兴强, 曹梅, 马甦, 等. 盐度对凡纳滨对虾存活、生长和能量收支的影响[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(1): 8-13.
Wang X Q, Cao M, Ma S, *et al.* Effects of salinity on survival, growth and energy budget of juvenile *Litopenaeus vannamei*[J]. *Marine Fisheries Research*, 2006, 27(1): 8-13(in Chinese).
- [27] Zhang P D, Zhang X M, Li J, *et al.* Effect of salinity on survival, growth, oxygen consumption and ammonia - N excretion of juvenile whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture Research*, 2009, 40(12): 1419-1427.
- [28] Castille Jr F L, Lawrence A L. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Physiology*, 1981, 68(1): 75-80.
- [29] Doerr J C, Liu H, Minello T J. Salinity selection by juvenile brown shrimp (*Farfantepenaeus aztecus*) and white shrimp (*Litopenaeus setiferus*) in a gradient tank[J]. *Estuaries and Coasts*, 2016, 39(3): 829-838.
- [30] van Hai N. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review[J]. *Aquaculture*, 2015, 446: 88-96.
- [31] 丁自勉, 石凤敏. 中国中草药饲料添加剂的现状与展望[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(3): 446-454.
Ding Z M, Shi F M. Current status and prospect of Chinese herbal feed additives in China[J]. *World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine*, 2013, 15(3): 446-454(in Chinese).
- [32] Lee S Y, Söderhäll K. Early events in crustacean innate immunity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(5): 421-437.
- [33] 季延滨, 于雯雯, 孙金辉, 等. 盐度骤降对南美白对虾仔虾抗氧化机能的影响[J]. 天津农学院学报, 2008, 15(4): 19-23.
Ji Y B, Yu W W, Sun J H, *et al.* Effects of sudden drop

- in salinity on activities of antioxidant enzymes of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Tianjin Agricultural College*, 2008, 15(4): 19-23(in Chinese).
- [34] 郑佩华, 钱坤, 张秀霞, 等. 不同养殖盐度对凡纳滨对虾血细胞的影响[J]. *饲料工业*, 2017, 38(20): 14-19.
Zheng P H, Qian K, Zhang X X, *et al.* Effect of salinities on haemocyte of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Feed Industry*, 2017, 38(20): 14-19(in Chinese).
- [35] 崔燕燕, 张南南, 马倩倩, 等. 四种植物蛋白对中华绒螯蟹幼蟹生长性能、氨基酸沉积率和抗氧化酶活性的影响[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(1): 146-154.
Cui Y Y, Zhang N N, Ma Q Q, *et al.* Effects of four commonly used plant protein sources on growth performance, amino acids retention and antioxidant enzyme activities in juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(1): 146-154(in Chinese).
- [36] 李宜聪, 廖凯, 姬仁磊, 等. 茶多酚对大菱鲆生长、抗氧化能力及脂肪代谢相关基因表达的影响[J]. *水产学报*, 2019, 43(11): 2405-2412.
Li Y C, Liao K, Ji R L, *et al.* Effects of tea polyphenols on growth, antioxidant capacity and lipid metabolism related genes expression of turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(11): 2405-2412(in Chinese).
- [37] Lepage G, Munoz G, Champagne J, *et al.* Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography [J]. *Analytical Biochemistry*, 1991, 197(2): 277-283.
- [38] Holmblad T, Söderhäll K. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity[J]. *Aquaculture*, 1999, 172(1-2): 111-123.
- [39] Sanchez R, Olivares P, Carmona E, *et al.* Fish Nutrition Additives in SHK-1 Cells: protective effects of silymarin[J]. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2016, 7(2): 55-62.
- [40] 贾睿, 曹丽萍, 杜金梁, 等. 水飞蓟素对四氯化碳致鲤肝(细胞)损伤的保护和抗氧化作用[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(3): 551-560.
Jia R, Cao L P, Du J L, *et al.* *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective and antioxidant effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in crucian carp *Carassius auratus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(3): 551-560(in Chinese).
- [41] Latif M A, Brown J H, Wickins J F. Effects of environmental alkalinity on calcium-stimulated dephosphorylating enzyme activity in the gills of postmoult and intermoult giant freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* (de Man)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Physiology*, 1994, 107(4): 597-601.
- [42] 宋芹芹, 李玉虎, 周海龙. 凡纳滨对虾应答低氧-复氧胁迫免疫相关酶活力的时空变化[J]. *热带生物学报*, 2015, 6(4): 353-358.
Song Q Q, Li Y H, Zhou H L. Spatial and temporal changes of immune-related enzymes activities in *Litopenaeus vannamei* under hypoxia-reoxygenation stress[J]. *Journal of Tropical Biology*, 2015, 6(4): 353-358(in Chinese).
- [43] 辜玲芳, 侯永清, 丁斌鹰, 等. 几种植物提取物对异育银鲫生长性能和血液生化指标的影响[J]. *淡水渔业*, 2008, 38(2): 23-26.
Gu L F, Hou Y Q, Ding B Y, *et al.* Effects of several plant extracts on growth performance and blood biochemical indices in *Carassius auratus gibelio*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2008, 38(2): 23-26(in Chinese).
- [44] 姜永华, 颜素芬, 陈政强. 南美白对虾消化系统的组织学和组织化学研究[J]. *海洋科学*, 2003, 27(4): 58-62.
Jiang Y H, Yan S F, Chen Z Q. Histological and histochemical study of the digestive system of *Penaeus vannamei* Boone[J]. *Marine Sciences*, 2003, 27(4): 58-62(in Chinese).
- [45] 王小刚. 虾蟹肝胰腺组织学研究进展[J]. *广西水产科技*, 2015(1): 9-15.
Wang X G. Progress in histological study of shrimps and crabs hepatopancreatic[J]. *Fisheries Science & Technology of Guangxi*, 2015(1): 9-15(in Chinese).
- [46] 李二超, 陈立侨, 曾嵘, 等. 不同盐度下饵料蛋白质含量对凡纳滨对虾生长、体成份和肝胰腺组织结构的影响[J]. *水产学报*, 2008, 32(3): 425-433.
Li E C, Chen L Q, Zeng C, *et al.* Effects of dietary protein levels on growth, survival, body composition and hepatopancreas histological structure of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different ambient salinities[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(3): 425-433(in Chinese).

- [47] Wu J P, Tsai C C, Yeh Y L, *et al.* Silymarin accelerates liver regeneration after partial hepatectomy[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 2015: 603529.
- [48] Ahern P P, Maloy K J. Understanding immune-microbiota interactions in the intestine[J]. *Immunology*, 2020, 159(1): 4-14.
- [49] Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota—masters of host development and physiology[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(4): 227-238.
- [50] 郁维娜, 戴文芳, 陶震, 等. 健康与患病凡纳滨对虾肠道菌群结构及功能差异研究[J]. *水产学报*, 2018, 42(3): 399-409.
Yu W N, Dai W F, Tao Z, *et al.* Characterizing the compositional and functional structures of intestinal microflora between healthy and diseased *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(3): 399-409(in Chinese).
- [51] Lu Y M, Xie J J, Peng C G, *et al.* Enhancing clinical efficacy through the gut microbiota: a new field of traditional Chinese medicine[J]. *Engineering*, 2019, 5(1): 40-49.
- [52] Shen L, Liu L, Li X Y, *et al.* Regulation of gut microbiota in Alzheimer's disease mice by silibinin and silymarin and their pharmacological implications[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(17): 7141-7149.
- [53] Becker A A M J, Hesta M, Hollants J, *et al.* Phylogenetic analysis of faecal microbiota from captive cheetahs reveals underrepresentation of Bacteroidetes and Bifidobacteriaceae[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 43.
- [54] Turnbaugh P J, Ley R E, Mahowald M A, *et al.* An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. *Nature*, 2007, 444(7122): 1027-1031.

Effects of silymarin on growth, activities of immune-related enzymes, hepatopancreas histology and intestinal microbiota of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) at low salinity

LI Huifeng^{1,2,3}, LI Erchao^{1*}, XU Chang¹, ZHOU Li¹, CHEN Liqiao^{2*}

(1. Key Laboratory of Tropical Hydrobiology and Biotechnology of Hainan Province, Hainan Aquaculture Breeding Engineering Research Center, College of Marine Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China;

3. Spread Station of Aquaculture Technology of Zhangjiagang, Zhangjiagang 215600, China)

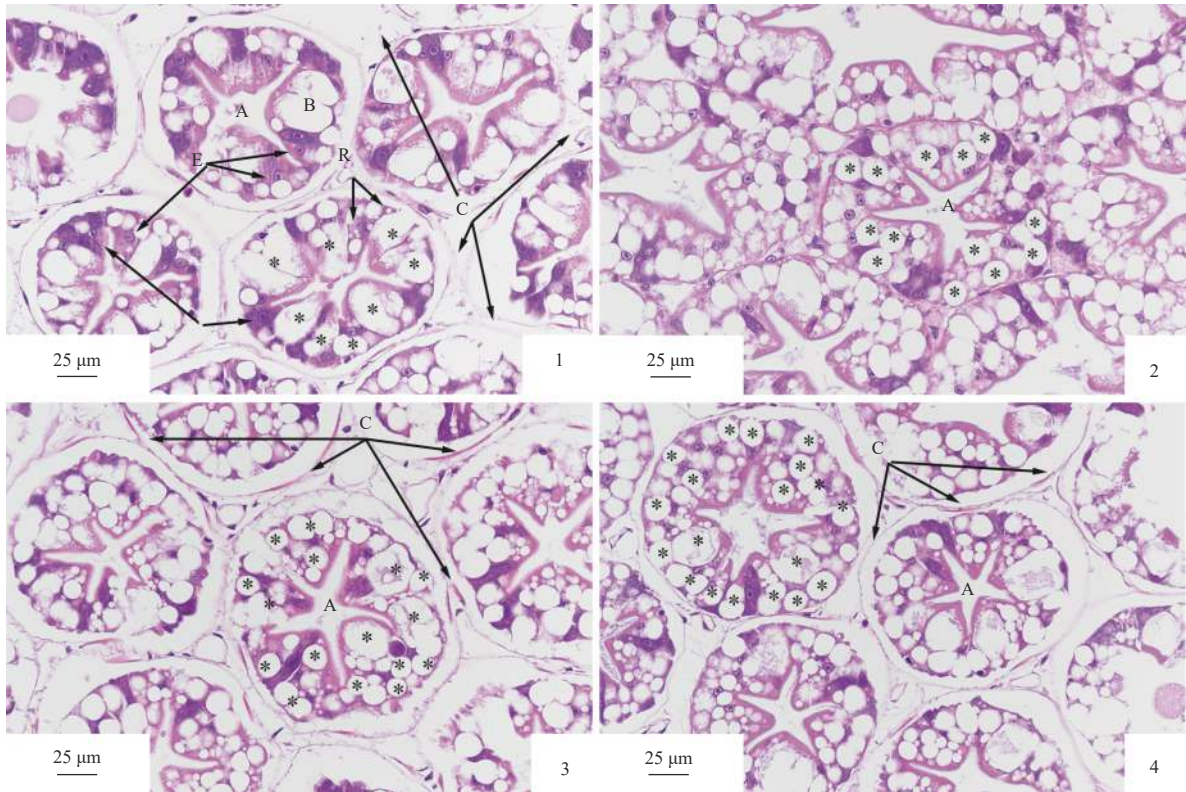
Abstract: In order to explore the effect of silymarin on relieving low salinity induced stress in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, four experimental diets with silymarin supplementation of 0 (control group), 0.1, 0.2 and 0.4 g/kg were prepared. The effects of silymarin on shrimp growth, immune-related enzymes, microstructure of hepatopancreas and intestinal microbiota were analyzed after juvenile *L. vannamei* (0.080 ± 0.002) g were cultured at low salinity of 3 for 8 weeks. The results showed that: ① Silymarin significantly increased the weight gain rate and decreased the feed coefficient of shrimp at low salinity, but had no significant effects on survival rate, fatness and body composition. ② Silymarin increased the activities of digestive enzymes of shrimp. The activity of amylase in hepatopancreas of 0.4 g/kg group was significantly higher than that of the control group. Dietary 0.2 and 0.4 g/kg silymarin significantly increased the activities of digestive enzymes in intestinal tract of shrimp. ③ Silymarin alleviated the oxidative damage of shrimp caused by low salinity and improved the antioxidant capacity of shrimp. In 0.4 g/kg group, the activities of total superoxide dismutase (T-SOD), catalase (CAT) and reduced glutathione (GSH) in hepatopancreas were significantly increased, but there was no significant change in intestinal antioxidant capacity. The activities of intestinal acid phosphatase (ACP) and alkaline phosphatase (AKP) in 0.2 g/kg group were significantly higher than those in the control group, but the activities of lysozyme and phenoloxidase had no significant change. ④ With the increase of dietary silymarin content, the structure of hepatopancreas of shrimp became more complete, the arrangement of hepatic corpuscles was compact, the crosssection of hepatic tubules displayed the shape of regular polygonal star, and contained a large number of secretory cells (B cells) and embryonic cells (E cells). ⑤ The relative abundance of Bacteroides and Gracilibacteria decreased significantly in *L. vannamei* fed 0.4 g/kg silymarin. The results suggest that silymarin as a feed additive can effectively alleviate the stress caused by low salinity, improve the growth and antioxidant performance in *L. vannamei*, and have positive effects on the hepatopancreas health and the composition of intestinal microbiota.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; silymarin; low salinity; growth; immunity; hepatopancreas histology; intestinal microbiota

Corresponding authors: LI Erchao. E-mail: ecli@bio.ecnu.edu.cn;

CHEN Liqiao. E-mail: lqchen@bio.ecnu.edu.cn

Funding projects: Key Research and Development Project of Guangdong Province(2020B0202010001); Hainan Provincial Natural Science Foundation (318MS008); Key Research and Development Project of Hainan Province (ZDYF2019068); National Key R & D Program of China(2018YFD0900400); Initial Fund from Hainan University for R & D [KYQD(ZR)1736]



图版 低盐度下凡纳滨对虾摄食不同添加量水飞蓟素后肝胰腺 H.E 染色切片

1~4 分别表示低盐度下对虾饲喂 0(对照组)、0.1、0.2 和 0.4 g/kg 水飞蓟素后肝胰腺组织形态变化。A 表示星形管腔, C 表示基底膜, B、R、E、F 分别代表 B 细胞(分泌细胞)、R 细胞(吸收细胞)、E 细胞(胚细胞)、F 细胞(纤维细胞), *表示 B 细胞数量明显增加。400×

Plate Transverse hepatopancreas section of *L. vannamei* fed with silymarin at low salinity

Histological examination of 1-4 respectively shows the morphological changes of hepatopancreas after feeding 0 (control group), 0.1, 0.2 and 0.4 g/kg silymarin to shrimp with low salinity. A. star shape of the lumen, C. basal membrane, B. secretory cells, R absorption cells, E. embryonic cells, F. fibrocytes, * indicates a significant increase in B cells. The multiple is 400 ×