

# 维生素 E 和裂壶藻对中国对虾生长及 TLR/NF- $\kappa$ B 表达水平的影响

李美玉<sup>1,2</sup> 李健<sup>1\*</sup> 陈萍<sup>1</sup> 王琦<sup>3</sup>

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 200306;  
3. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003)

**摘要:** 以中国对虾为实验动物, 在基础饲料中添加不同含量的  $V_E$  和裂壶藻, 配制成 3 种试验饲料, 即 B 组(1% 裂壶藻)、C 组(400 mg/kg  $V_E$ )、D 组(400 mg/kg  $V_E$  + 1% 裂壶藻), 以基础饲料为 A 组(对照饲料), 进行为期 1 个月的饲养。应用实时定量 PCR 方法研究了不同浓度的  $V_E$  对中国对虾血液、肌肉及肝胰腺中 TLR、NF- $\kappa$ B 基因表达的影响。结果表明: 1) 饲料中添加裂壶藻和  $V_E$  与对照组相比显著提高中国对虾体长、体质量、特定生长率和成活率, 并且 2 种都添加的 D 组效果更显著 ( $P < 0.05$ )。2) 饲料中添加裂壶藻和  $V_E$  比对照组显著降低血液、肝胰腺和肌肉中 TLR、NF- $\kappa$ B 基因的表达水平, 且  $V_E$  和裂壶藻联合对免疫基因的调控能力更加显著 ( $P < 0.05$ )。这些结果表明饲料中添加 400 mg/kg  $V_E$  + 1% 裂壶藻能显著促进中国对虾生长, 提高存活率及对 TLR、NF- $\kappa$ B 两种免疫功能基因的调控能力。[中国渔业质量与标准 2012 2(2): 37-44]

**关键词:** 维生素 E; 裂壶藻; 中国对虾; TLR; NF- $\kappa$ B

**中图分类号:** S96      **文献标志码:** A      **文章编号:** 2095-1833(2012)02-0037-08

中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 是主要分布于我国黄渤海以及朝鲜半岛西海岸的一种洄游性虾类, 营养和经济价值高, 是我国对虾养殖的主要种类之一。由病害流行及抗生素滥用带来的产量降低、经济效益低下和生态环境破坏的问题给中国对虾养殖业的健康发展带来了巨大的困难。有研究发现, 在饲料中添加免疫增强剂可明显增强对虾自身免疫力, 提高对虾的生长率及存活率<sup>[1-2]</sup>。因此, 从提高对虾自身免疫力着手来预防对虾病害的爆发和流行, 是一条可行的措施。

NF- $\kappa$ B 是一类存在于多种组织的多种细胞中的具有多向转录调节作用的核蛋白因子。它位于 TLR 信号通路下游, 在机体免疫应答、炎症反应中充当重要的角色<sup>[3]</sup>。 $V_E$  作为一种免疫增强剂, 能防止自由基对细胞和生物膜的破坏, 保护不饱和脂肪酸免受过氧化作用<sup>[4-5]</sup>, 甚至能提高虾类对盐度急性突变引起的抗氧化能力<sup>[6]</sup>。此外,  $V_E$  可以影响核转录因子 (NF- $\kappa$ B) 活性<sup>[7-8]</sup>, 进而影响许多基因的转录调控, 引起机体免疫水平发生变化。裂壶藻 (*Schizochytrium* sp.)

是一种富含  $n-3$  不饱和脂肪酸的海洋真菌, DHA 含量高达 20%, 并且自身含有多种维生素、必需氨基酸等, 是优质的饲料营养添加剂。在大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 仔鱼的研究中发现通过用裂壶藻强化卤虫无节幼体可明显提高仔鱼存活率<sup>[9]</sup>。在中国对虾养殖中,  $V_E$  免疫调节作用的研究还只是停留在酶活水平, 而对其分子水平的探讨并不多。而对裂壶藻的研究尚未开始, 与  $V_E$  的协同作用研究尚未见报道。

本研究通过用添加  $V_E$  及裂壶藻的饲料喂养中国对虾, 研究  $V_E$  及裂壶藻对中国对虾生长和 Toll 样受体 (TLR) 及 NF- $\kappa$ B 两种免疫功能基因的表达影响。旨在探讨  $V_E$  协同裂壶藻对中国对虾免疫功能的调节机理及确定  $V_E$  和裂壶藻的最佳添加量。

## 1 材料与方法

### 1.1 饲料配制

$V_E$  购于 Solarbio 公司(北京-中国), 裂壶藻(脂肪含量 53%, DNA 占脂肪的 46%) 购于青岛森森实

收稿日期: 2011-10-25; 接收日期: 2012-03-01

资助项目: 国家虾产业技术体系 (CARS-47); 公益性农业行业科研专项 (201103034); 科技部农业科技成果转化资金项目 (2010GB23260589)

作者简介: 李美玉 (1987-), 女, 硕士, 研究方向为水产动物分子与免疫学。E-mail: momo6860@sina.com

通信作者: 李健, 研究员, 主要从事水产动物健康养殖研究。E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

业有限公司。在基础饲料<sup>[2]</sup>(见表1)中添加不同浓度的 $V_E$ 和裂壶藻配制成4种免疫试验饲料(见表2)。各原料分别粉碎过60目筛,准确称量后逐级充分混合,以1%的褐藻酸钠作为粘合剂,加适量水,用小型绞肉机挤压制成颗粒饲料,晒干后于4℃冰箱中保存备用。

表1 基础饲料成分及含量  
Tab.1 Composition and content of basal feed

成分 Composition	含量/% Content
花生粉	25
豆粉	10
面粉	7
鱼粉	45
鱼油	5
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	0.2
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	0.3
复合维生素(不含 $V_E$ )	0.5
玉米粉	5
鱼油膏	2

注:复合维生素成分参照何敏等<sup>[10]</sup>。复合维生素(IU· $kg^{-1}$ ): $V_A$  4400, $V_{D3}$  2200, $V_K$  44, $V_{B1}$  11, $V_{B2}$  13.2, $V_{B6}$  11, $V_{B12}$  0.01,生物素0.5,泛酸35.2,烟酸88,叶酸22,氯化胆碱275, $V_C$  40。

表2 试验分组及 $V_E$ 、裂壶藻添加量  
Tab.2 Test groups and quantity of additives

试验组 Test group	$V_E$ 含量/( $mg \cdot kg^{-1}$ ) $V_E$ content	裂壶藻含量/% <i>Schizochytrium</i>
A	0	0
B	0	1
C	400	0
D	400	1

## 1.2 实验动物

实验用中国对虾“黄海1号”平均体质量( $2.821 \pm 0.630$ )g、平均体长( $5.183 \pm 0.289$ )cm,购自青岛胶州宝荣水产有限公司。选取健康的中国对虾随机放入200L PVC桶中暂养10d,使其适应实验室养殖环境,期间每天换水1次,投喂空白饲料,保证连续充氧。水温( $22 \pm 1$ )℃,盐度( $25 \pm 1$ )。

## 1.3 方法

### 1.3.1 试验分组及取样

根据投喂饲料的不同,随机将中国对虾分组(分组见表2),即:空白对照组(A组)、裂壶藻组(B组)、 $V_E$ 组(C组)、 $V_E$ 裂壶藻混合组(D组),每组90尾虾,每次取6尾进行试验,每组设3个平行组。每日投喂相应饲料4次,日投饵量约为20g/kg。各组在投喂后的1、5、10、15、20、25、30d取样。用纱布擦干头胸甲表面海水,然后用75%酒精棉球擦拭虾体,取血液、肌肉和肝胰腺组织样品,每个时间点随机取对虾8尾。

### 1.3.2 生长指标检测

试验开始及结束时测量对虾的体质量、体长。根据以下公式计算生长率:

相对增长率(%) = [(试验末体长 - 试验初体长) / 试验初体长] × 100;

相对增重率(%) = [(试验末体质量 - 试验初体质量) / 试验初体质量] × 100;

特定生长率SGR(%/d) = (ln 试验末体质量 - ln 试验初体质量) / 时间 × 100。

### 1.3.3 TLR、NF- $\kappa$ B 基因组织表达分析

Trizol法提取样品的总RNA,反转录合成第一链cDNA。应用实时荧光定量PCR技术,以cDNA为模板,中国对虾18S rRNA为管家基因检测TLR、NF- $\kappa$ B的表达变化量。引物序列见表3。荧光定量PCR反应体系20 $\mu$ L:分别加入SYBR Premix Ex Taq™ II(2×)10 $\mu$ L,PCR正反引物(10 $\mu$ mol/L)各0.8 $\mu$ L,cDNA模板2.0 $\mu$ L,灭菌水6.4 $\mu$ L。TLR基因反应条件:95℃ 15s、60℃ 20s、72℃ 20s,40个循环;72℃ 10min。NF- $\kappa$ B基因反应条件:95℃ 15s;95℃ 5s、56℃ 30s、72℃ 40s,40个循环。每个反应做3个平行对照,以纠正系统误差。另外,将此实验重复3次,进行统计学分析。

### 1.3.4 数据统计

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对数据进行处理。

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

## 2 结果

### 2.1 $V_E$ 和裂壶藻对中国对虾生长指标的影响

2.1.1  $V_E$ 和裂壶藻对中国对虾体长及成活率的影响  
由表4可以看出:添加 $V_E$ 和裂壶藻的试验组对

表 3 引物编号及序列  
Tab. 3 The number and sequence of primers

正向引物 Forward primer	序列(5' - 3') Sequence(5' - 3')	反向引物 Reverse primer	序列(5' - 3') Sequence(5' - 3')
Toll - F	GCTTTGATCAGCTATTCTCACAAAGGA	FeToll - R	CCTGTGAGTGAGCCGCCTTGAA
NF - $\kappa$ B - F	CCTGTGAAGACATTAGGAGGAGTA	NF - $\kappa$ B - R	CCAGTTGTGGCATTCTTTAGG
18s - F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA	18s - R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

中国对虾体长的增长显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。D 组添加  $V_E$  及裂壶藻后体长的增长最快, 增长率显著高于只添加等量  $V_E$  的 C 组和只添加等量裂壶藻的 B 组 ( $P < 0.05$ )。根据公式计算出试验各组在 30 d 后

中国对虾的存活率, 由表 7 可知: D 组的存活率显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ )。D 组存活率最高达到 94.52%。裂壶藻与  $V_E$  联合使用, 提高了中国对虾的存活率。

表 4  $V_E$  和裂壶藻对中国对虾体长及成活率的影响  
Tab. 4 Effects of  $V_E$  and *Schizochytrium* on body length and survival of Chinese shrimp  $n = 3; \bar{x} \pm SD$

组别 Group	体长/cm Body length			30 d 相对增长率/%	30 d 成活率/%
	1 d	15 d	30 d	30 d relative growth rate	30 d survival rate
A	5.280 $\pm$ 0.319	6.125 $\pm$ 0.328 <sup>a</sup>	7.225 $\pm$ 0.623 <sup>a</sup>	36.84 $\pm$ 7.22 <sup>a</sup>	73.37 $\pm$ 7.97 <sup>a</sup>
B	5.160 $\pm$ 0.279	5.963 $\pm$ 0.456 <sup>a</sup>	7.153 $\pm$ 0.561 <sup>a</sup>	38.62 $\pm$ 4.45 <sup>a</sup>	76.19 $\pm$ 6.53 <sup>a</sup>
C	5.100 $\pm$ 0.232	6.571 $\pm$ 0.475 <sup>b</sup>	7.974 $\pm$ 0.110 <sup>b</sup>	56.35 $\pm$ 3.63 <sup>c</sup>	81.91 $\pm$ 5.57 <sup>a</sup>
D	5.180 $\pm$ 0.289	6.911 $\pm$ 0.255 <sup>c</sup>	8.484 $\pm$ 0.206 <sup>c</sup>	63.78 $\pm$ 5.81 <sup>d</sup>	94.52 $\pm$ 8.34 <sup>c</sup>

注: 同一列中不具相同字母标记的值表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

2.1.2 不同浓度  $V_E$  对中国对虾体质量及特定生长率的影响

由表 5 可知, 添加  $V_E$  和裂壶藻的试验组对中国对虾体质量的增长显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。D 组添加  $V_E$  及裂壶藻后对虾体质量的增加最快, 增重率显著高于其他组 ( $P < 0.05$ ), 达到 99.79%, 显著高于

只添加等量  $V_E$  的 C 组和只添加等量裂壶藻的 B 组 ( $P < 0.05$ )。

特定生长率反映了中国对虾体质量的日平均增重量。由表 6 可知, 试验期间的前 15 天和后 15 天, 添加  $V_E$  和裂壶藻的 D 组 SGR 增长最快, 并显著高于其他试验组 ( $P < 0.05$ )。

表 5  $V_E$  和裂壶藻对中国对虾体质量及特定生长率的影响  
Tab. 5 Effects of level  $V_E$  and *Schizochytrium* on weight and SGR of Chinese shrimp  $n = 3; \bar{x} \pm SD$

组别 Group	体质量/g			相对增重率/% Relative weight gain	特定生长率/(% $\cdot$ d <sup>-1</sup> )	特定生长率/(% $\cdot$ d <sup>-1</sup> )
	1 d	Body weight 15d	30 d		SGR 0 - 15 d	SGR 15 - 30 d
A	2.78 $\pm$ 0.61	3.43 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	4.55 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	64.73 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	0.0408 $\pm$ 0.0010 <sup>a</sup>	0.0743 $\pm$ 0.0082 <sup>a</sup>
B	2.80 $\pm$ 0.49	3.46 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	4.71 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	67.07 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	0.0423 $\pm$ 0.0011 <sup>a</sup>	0.0839 $\pm$ 0.0054 <sup>c</sup>
C	2.81 $\pm$ 0.60	3.54 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>	5.11 $\pm$ 0.48 <sup>c</sup>	81.25 $\pm$ 11 <sup>b</sup>	0.048 $\pm$ 0.011 <sup>b</sup>	0.105 $\pm$ 0.043 <sup>d</sup>
D	2.82 $\pm$ 0.63	3.63 $\pm$ 0.54 <sup>c</sup>	5.64 $\pm$ 0.45 <sup>d</sup>	99.79 $\pm$ 8 <sup>c</sup>	0.0538 $\pm$ 0.0250 <sup>c</sup>	0.1339 $\pm$ 0.0640 <sup>c</sup>

注: 同一列中不具相同字母标记的值表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 不同浓度 $V_E$ 及裂壶藻对中国对虾各组织 TLR 表达水平的影响

1) 不同浓度  $V_E$  及裂壶藻对中国对虾血淋巴 TLR 表达水平的影响

$V_E$  及裂壶藻对中国对虾血淋巴 TLR mRNA 表达量的影响如图 1 所示: D 组 TLR mRNA 表达水平始终低于对照组水平。其他各组在前 5 天 TLR mRNA 表达水平高于对照组水平,而后开始下降,在试验末期 B 组表达水平上升至对照组水平以上。

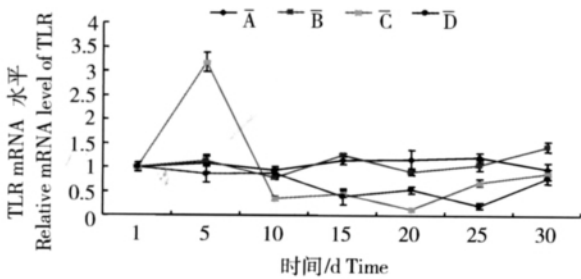


图 1 不同浓度  $V_E$  及裂壶藻对中国对虾血淋巴 TLR mRNA 表达量的影响

Fig.1 Effects of  $V_E$  and *Schizochytrium* on TLR mRNA in serum of Chinese shrimp

2) 不同浓度  $V_E$  及裂壶藻对中国对虾肝胰腺 TLR 表达水平的影响

$V_E$  及裂壶藻对中国对虾肝胰腺 TLR mRNA 表达量的影响如图 2 所示: 试验各组 TLR 表达水平趋势大致相同。B 组在 5 d 后 TLR mRNA 表达水平降低至对照组水平以下。其他各组始终低于对照组水平, D 组下调幅度最大。

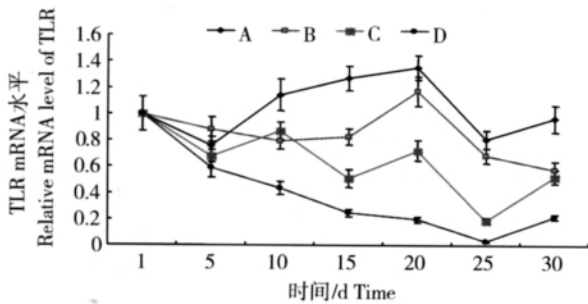


图 2  $V_E$  及裂壶藻对中国对虾肝胰腺 TLR mRNA 表达量的影响

Fig.2 Effects of  $V_E$  and *Schizochytrium* on TLR mRNA in hepatopancreas of Chinese shrimp

3) 不同浓度  $V_E$  及裂壶藻对中国对虾肌肉 TLR 表达水平的影响

$V_E$  及裂壶藻对中国对虾肌肉 TLR mRNA 表达量的影响如图 3 所示:  $V_E$  对肌肉 TLR 的表达具有下调的作用。表现为 B 组 TLR 表达水平在试验前 5 天高于 A 组,而后下降。C、D 组的表达水平始终低于对照组 A 组。

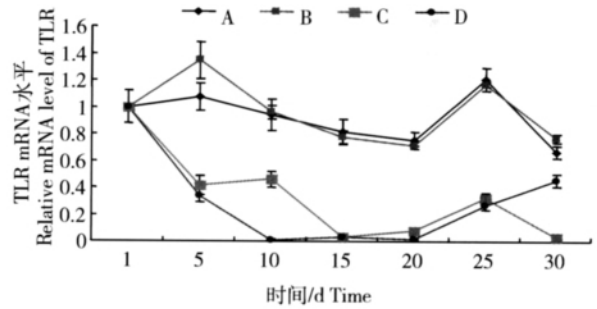


图 3  $V_E$  及裂壶藻对中国对虾肌肉 TLR mRNA 表达量的影响

Fig.3 Effects of  $V_E$  and *Schizochytrium* on TLR mRNA in muscle of Chinese shrimp

### 2.3 不同浓度 $V_E$ 及裂壶藻对中国对虾各组织 NF- $\kappa$ B 表达水平的影响

1) 不同浓度  $V_E$  及裂壶藻对中国对虾血液 NF- $\kappa$ B 表达水平的影响

$V_E$  及裂壶藻对中国对虾血淋巴 NF- $\kappa$ B mRNA 表达量的影响如图 4 所示: 试验前期  $V_E$  添加组 NF- $\kappa$ B 表达水平低于空白对照组 A 组,随着时间的变化,在试验后期 B 组 NF- $\kappa$ B 水平上调至 A 组水平以上。C、D 试验组血清 NF- $\kappa$ B 表达水平始终低于对照组 A 组。B 组在试验第 5 天达到了最高值,为对照组的 3.12 倍。

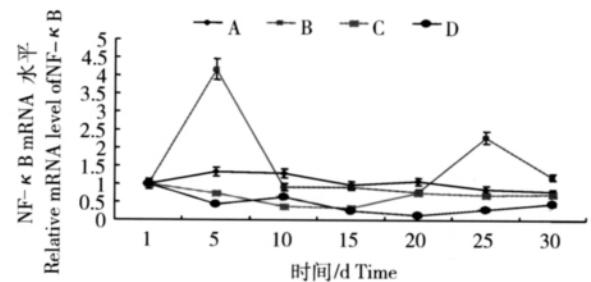


图 4  $V_E$  及裂壶藻对中国对虾血淋巴 NF- $\kappa$ B mRNA 表达量的影响

Fig.4 Effects of  $V_E$  and *Schizochytrium* on NF- $\kappa$ B mRNA in serum of Chinese shrimp

2) 不同浓度  $V_E$  及裂壶藻对中国对虾肝胰腺 NF- $\kappa$ B 表达水平的影响

$V_E$  及裂壶藻对中国对虾肝胰腺 NF- $\kappa$ B mRNA 表达量的影响如图 5 所示: 试验各组随时间变化 NF- $\kappa$ B 表达水平变化趋势大致相同。添加  $V_E$  及裂壶藻的 F 组可以下调肝胰腺 NF- $\kappa$ B 表达量。B 组和 C 组在试验前 20 天低于 A 组 NF- $\kappa$ B 表达水平, B 组在 20 d 后 NF- $\kappa$ B 表达量快速升高, 为 A 组的 3.4 倍, C 组在 20 d 后表达量略高于 A 组。

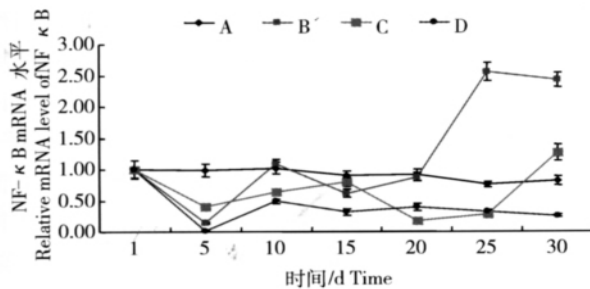


图 5  $V_E$  及裂壶藻对中国对虾肝胰腺 NF- $\kappa$ B mRNA 表达量的影响

Fig. 5 Effects of  $V_E$  and *Schizochytrium* on NF- $\kappa$ B mRNA in hepatopancreas of Chinese shrimp

3) 不同浓度  $V_E$  及裂壶藻对中国对虾肌肉 NF- $\kappa$ B 表达水平的影响

$V_E$  及裂壶藻对中国对虾肝胰腺 NF- $\kappa$ B mRNA 表达量的影响如图 6 所示: 对照组 A 在第 10 天 NF- $\kappa$ B 表达量升高, 随后的 20 d 表达量逐渐降低到正常水平。只添加裂壶藻的 B 组在试验开始后 NF- $\kappa$ B 表达量始终下调, 并显著低于对照组。只添加  $V_E$  的 C 组表达量呈现先升高后降低的趋势, 在 15 d 达到最高, 随后迅速降低并显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。添加  $V_E$  和裂壶藻的 D 组与对照组变化趋势大致相同, 仅在第 10 天高于 A 组, 其他时间点肌肉 NF- $\kappa$ B 表达量均显著低于 A 组 ( $P < 0.05$ )。

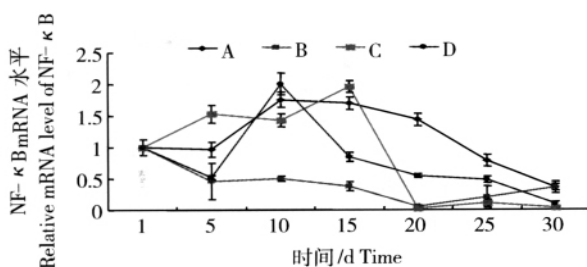


图 6  $V_E$  及裂壶藻对中国对虾肌肉 NF- $\kappa$ B mRNA 表达量的影响

Fig. 6 Effects of  $V_E$  and *Schizochytrium* on NF- $\kappa$ B mRNA in muscle of Chinese shrimp

### 3 结论

#### 3.1 添加 $V_E$ 和裂壶藻对中国对虾生长及存活率的影响

$V_E$  是生物体生长所不可缺少的营养素, 它能调节体内碳水化合物和肌酸的代谢, 提高糖和蛋白质的利用效率, 最终提高机体的生长速度和饲料效率。王桂芹等<sup>[11]</sup>对鲤的研究发现 DHA 对鲤 (*Cyprinus carpio*) 的生长具有正面效应,  $V_E$  对鲤的生长的影响不明显的。Wassel<sup>[12]</sup>研究表明, 饲料中添加  $V_E$  可促进鲮 (*Mugil cephalus*) 幼苗的生长, Huang 等<sup>[13]</sup>报道, 饲料中  $V_E$  添加量达到 80 IU/kg 时, 能显著促进尼罗罗非鱼 (*Tilapia nilotica*) 幼鱼的生长。裂壶藻含有丰富的中国对虾不能合成的 22 碳 6 烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 等不饱和脂肪酸, 如裂壶藻 OUC88 型 DHA 含量为 37.05%, 是生产 DHA 的重要来源。研究表明, 将裂壶藻用于大菱鲆仔鱼提高了仔鱼的成活率, 降低了白化的发生, 提高了卤虫无节幼体的 DHA 含量<sup>[9]</sup>。王桂芹等<sup>[11]</sup>在  $V_E$  和 DHA 对鲤的抗病能力具有明显的协同保护作用。在高等脊椎动物和鱼类也已经证明  $V_E$  和脂肪酸存在一定的交互作用<sup>[14-15]</sup>。

本试验表明, 添加  $V_E$  和裂壶藻的试验组中国对虾体长、体质量、特定增长率及存活率均显著高于对照组, 说明添加  $V_E$  和裂壶藻可以促进中国对虾生长, 并提高存活率, 与王桂琴等<sup>[11]</sup>和 Huang 等<sup>[13]</sup>研究结果相同。但是添加  $V_E$  及裂壶藻的 D 组体长、增重、特定增长率及成活率显著高于只添加等量  $V_E$  的 C 组和只添加等量裂壶藻的 B 组 ( $P < 0.05$ )。其原因可能是裂壶藻含有丰富的 DHA, 添加到饲料中后增强了饲料中的不饱和脂肪酸含量, 促进了对虾体长的增长,  $V_E$  对不饱和脂肪的保护作用和对机体的免疫功能的发挥, 促进了对虾的生长。说明裂壶藻的添加增强了饲料的不饱和脂肪酸含量, 与  $V_E$  的联合使用, 比单添加其中任何一种效果更好。由本实验结果可知, 每千克饲料添加 400 mg  $V_E$  和 1% 裂壶藻时, 中国对虾生长最快、存活率最高。

#### 3.2 添加 $V_E$ 和裂壶藻对中国对虾免疫相关功能基因表达的影响

##### 3.2.1 添加 $V_E$ 和裂壶藻对中国对虾 TLR 表达水平的影响

Toll 样受体是一天然模板识别受体家族, 在机体

天然免疫对病原体的识别方面发挥着非常重要的作用。TLR 配体种类很多,其中体内的一些过氧化物产物可以作为 TLR 的内源性配体激活 TLR 信号通路反应,产生免疫应答<sup>[16]</sup>。V<sub>E</sub> 作为一种脂溶性抗氧化剂,通过清除自由基保护不饱和脂肪酸免受过氧化作用<sup>[17]</sup>,提高机体的免疫力,是增强生物氧化稳定性比较理想的维生素。V<sub>E</sub> 可以提高血液中各种细胞的数量<sup>[18-19]</sup>,清除血液中的氧自由基。Jumroensri Puangkaew 等<sup>[20]</sup>的实验结果显示,维生素 E 对虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 血浆、肝、肾脏中的 SOD、CAT、GPX 活力都有显著影响。而周立斌等<sup>[21]</sup>也发现饲料中添加适量的 V<sub>E</sub> 可显著提高美国红鱼 (*Sciaenops ocellatus*) 抗氧化酶超氧化物歧化酶活性。Buckley 等<sup>[22]</sup>人研究发现, V<sub>E</sub> 和不饱和脂肪酸的含量共同影响脂质氧化程度。

在本实验中,用添加 V<sub>E</sub> 和裂壶藻的饲料饲喂中国对虾后,检测组织中 TLR 的表达水平,发现血液、胰腺和肌肉中的 TLR 表达水平出现下调,并且组织差异性不显著。其原因可能是 V<sub>E</sub> 通过提高中国对虾抗氧化酶的活性,使体内一些过氧化物对虾体的伤害降低,导致体内的过氧化物不能激活 TLR 信号通路反应,从而引起 TLR 表达水平的降低。实验中还发现同时添加 V<sub>E</sub> 和裂壶藻的 D 组各组织 TLR 表达水平下调明显 ( $P < 0.05$ ),并且比只添加 V<sub>E</sub> 或裂壶藻的 C 组和 B 组更加稳定。其原因可能为裂壶藻作为一种富含 DHA 的物质添加到饲料中,目的是提高饲料中不饱和脂肪酸含量,增强饲料的营养。V<sub>E</sub> 对不饱和脂肪酸的保护作用,可以防止裂壶藻中的 DHA 氧化。V<sub>E</sub> 通过对细胞膜磷脂层中脂肪酸不饱和键的抗氧化作用,减少裂壶藻中 DHA 发生氧化反应,两者的协调作用使其抗氧化作用更加稳定,进而减少体内 TLR 的一些内源性配体的种类和数量,减低了 TLR 在组织中的表达水平。本实验结果表明同时添加 V<sub>E</sub> 和裂壶藻可明显下调 TLR 表达水平,提高机体抗氧化能力,从而增强中国对虾免疫力。

### 3.2.2 添加 V<sub>E</sub> 和裂壶藻对中国对虾 NF- $\kappa$ B 表达水平的影响

NF- $\kappa$ B 是一类具有多向转录调节作用的核蛋白因子,在感染、炎症反应、氧化应激、细胞增生等过程中发挥作用<sup>[23-24]</sup>。多种细胞外刺激信号如细胞因子 IL-1、活性氧自由基等可以激活 NF- $\kappa$ B<sup>[11, 25-26]</sup>。许多学者研究发现可以通过维生素 E 降低 NF- $\kappa$ B 活性,发挥免疫功能<sup>[27-28]</sup>。鞠善德等<sup>[29]</sup>研究发现

V<sub>E</sub> 干预组的 NF- $\kappa$ B 在耳蜗毛细胞中的表达水平低于未干预组并推测 NF- $\kappa$ B 与细胞死亡作用存在一定的关系。

本实验研究发现,只含裂壶藻的 B 组在胰腺和血液中 NF- $\kappa$ B 表达水平出现上调,而在肌肉中出现下调,含 V<sub>E</sub> 的 C 组和 D 组在各组织中 NF- $\kappa$ B 表达水平出现下调,同时添加 V<sub>E</sub> 和裂壶藻的 D 组下调明显 ( $P < 0.05$ )。NF- $\kappa$ B 表达水平具有明显的组织差异性。说明饲料中添加一定量的 V<sub>E</sub> 可以降低机体内 TLR、NF- $\kappa$ B 基因的表达水平,并且当同时添加裂壶藻时,表达水平下调的更显著。这可能是由于饲料中的不饱和脂肪酸含量的增加, V<sub>E</sub> 阻止了不饱和脂肪酸的氧化,增加了中国对虾的营养水平,使得机体内免疫能力增强,对抗刺激及应激的能力增强,减少了体内有害代谢物的产生,而单独添加其中一种的效果没有共同使用效果显著。试验中所出现的组织差异性可能是由于组织的功能差异导致 NF- $\kappa$ B 表达水平的不同。由试验结果可知, V<sub>E</sub> 和裂壶藻联合使用对免疫基因的调控能力更加显著。

本实验对 V<sub>E</sub> 和裂壶藻协同作用对中国对虾的生长和免疫功能基因表达水平的影响做了初步研究,确定了最佳生长和表达调控的 V<sub>E</sub> 及裂壶藻的添加量。而对其联合作用对中国对虾的免疫机理的研究还不完善,在机体内的调节机制还不明了,因此今后可在分子水平、蛋白水平等多种层面开展更多的免疫相关基因研究,加深对中国对虾免疫系统和药物免疫途径的了解。

### 参考文献:

- [1] 吴桂玲,梁萌青,常青,等. 维生素 A、E 对凡纳滨对虾受精卵、孵化率及幼体存活率的影响[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(4): 59-62.
- [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- $\kappa$ B 表达量的影响[J]. 水产学报, 2011, 35(2): 200-207.
- [3] 王纪文,曲鹏,姜华,等. 抑制 NF- $\kappa$ B 对 Toll 样受体 4 在 Goldblatt 鼠左室心肌中表达的影响[J]. 高血压杂志, 2005, 13(7): 427-431.
- [4] He H, Lawrence A L. Vitamin E requirement of *Penaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 1993, 118(3): 245-255.
- [5] Dandapat J, Chainy G B N, Janardhana - Rao K. Dietary Vitamin - E modulates antioxidant defense system in Slant freshwaterprawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2000, 127( part

- C): 101 - 111.
- [6] 王传蓉,王加启,周振峰,等. 维生素E的免疫研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2008,35(8):24-28.
- [7] Carlson D, Maass D L, White D J. Antioxidant vitamin therapy alters sepsis - related apoptotic myocardial activity and inflammatory responses [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(6): 79 - 89.
- [8] Calfee - Meson K G, Spear B T, Glauert H P. Vitamin E inhibits hepatic NF -  $\kappa$ B activation in rats administered the hepatic tumor promoter, Phenobarbital [J]. Nutr, 2002, 132(10): 3178 - 3185.
- [9] 陈家鑫. 裂壶藻及其制品在水产苗种培育中的应用[J]. 科学养鱼,2002(6):53.
- [10] 何敏,汪开毓,张宇. 维生素E对斑点叉尾鮰胃肠道生长抑素表达的影响[J]. 水生生物学报,2010,34(1):220-224.
- [11] 王桂芹,牛小天,闫先春,等. 饲料中添加维生素E和二十二碳六烯酸对鲤鱼生长和抗病力的影响[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2010,28(2):124-128.
- [12] Wassef E A, Masry E L, Mikhail F R. Growth enhancement and muscle structure of striped mullet, *Mugil Cephalus L.* fingerlings by feeding algal meal - based diets [J]. Aquaculture Res, 2001, 32 ( supplement ): 315 - 322.
- [13] Huang C H, Lin, Zhang S P, et al. Effects of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation, and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus*, *O. aureus*, fed oxidized oil [J]. Aquaculture, 2004, 237: 381 - 389.
- [14] Leibovitz B, Hu M L, Tappel A. Lipid peroxidation in rat tissue slices: effect of dietary vitamin E, corn oil - lard and menhaden oil [J]. Lipids, 1990, 25 ( 3 ): 125 - 129.
- [15] Hu M L, Frankel E N, Leibovitz B E, et al. Effects of dietary lipids and vitamin E on in vitro lipid peroxidation in rat liver and kidney homogenates [J]. J Nutr, 1989, 119(11): 1574 - 1582.
- [16] James L, Stafforda, Kristofor K, et al. A toll - like receptor ( TLR) gene that is up - regulated in activated goldfish macrophages [J]. Dev Comp Immunol, 2003, 27 ( 8 ): 685 - 698.
- [17] Evstigneeva R P, Volkov I M, Chudinova V V. Vitamin E as a universal antioxidant and stabilizer of biological membranes [J]. Membr Cell Bid, 1998, 12(2): 151 - 172.
- [18] Ortun J, Esteban M A, Meseguer J. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilt-head seabream ( *Sparus aurata L.* ) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 14(2): 145 - 156.
- [19] 张琼. 维生素E对幼建鲤生产性能和免疫功能的影响[M]. 雅安:四川农业大学,2004:28-32.
- [20] Puangkaew J, Kiron V, Satoh S, et al. Antioxidant defense of rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* ) in relation to dietary n - 3 highly unsaturated fatty acids and vitamin E contents [J]. Comp Biochem Physiol, 2005, 140(2): 187 - 196.
- [21] 周立斌,王安利,张伟,等. 饲料维生素E含量对美国红鱼生长和非特异性免疫的影响[J]. 渔业科学进展,2009,30(1):48-53.
- [22] Buckley D J, Morrissey P A, Gray J I. Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat [J]. J Anim Sci, 1995, 73(10): 3122 - 3130.
- [23] Digicaylioglu M, Lipton S A. Erythropoietin - mediated neuroprotection involves cross - talk between Jak2 and NF -  $\kappa$ B signaling cascades [J]. Nature, 2001, 412: 641 - 647.
- [24] Ng C S, Novick A C, Tannenbaum C S, et al. Mechanisms of immune evasion by renal cell carcinoma: tumor - induced T - lymphocyte apoptosis and NF -  $\kappa$ B suppression [J]. Urology, 2002, 59(1): 9 - 14.
- [25] Sunil K M, Valsala H, Bharat B A. Bcl - xl suppressor TNF - mediated apoptosis and activation of nuclear factor -  $\kappa$ B, activation protein - 1, and c - Jun N - terminal kinase [J]. J Inter CK Res, 2000, 20(8): 725 - 735.
- [26] 席恺,董明敏,叶放蕾,等. 核因子 -  $\kappa$ B在豚鼠缺血 - 再灌注耳蜗的表达[J]. 第四军医大学学报,2004,25(17):1592-1594.
- [27] Carlson D, Maass D L, White D J. Antioxidant vitamin therapy alters sepsis - related apoptotic myocardial activity and inflammatory responses [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(6): 79 - 89.
- [28] Calfee - Meson K G, Spear B T, Glauert H P. Vitamin E inhibits hepatic NF -  $\kappa$ B activation in rats administered the hepatic tumor promoter, Phenobarbital [J]. J Nutr, 2002, 132(10): 3178 - 3185.
- [29] 鞠善德,王苹,杜宝东. 噪声所致耳蜗毛细胞表达NF -  $\kappa$ B中维生素E的调节[J]. 中国实用医药,2009,4(4):7-9.

## Effects of $V_E$ and *Schizochytrium* on growth and TLR / NF- $\kappa$ B expression level of *Fenneropenaeus chinensis*

LI Meiyu<sup>1,2</sup>, LI Jian<sup>2\*</sup>, CHEN Ping<sup>2</sup>, WANG Qi<sup>3</sup>

(1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Ocean University of China, Qingdao 266071, China.)

**Abstract:** In this study, *Fenneropenaeus chinensis* was taken as the experimental animal. Selected as the control group, group A was fed with basic feed stuff for one month. Different concentrations of  $V_E$  and *Schizochytrium* were added into basic feedstuff and made into three trials feed, namely group B (1% *Schizochytrium*), group C (400 mg/kg  $V_E$ ) and group D (400 mg/kg  $V_E$  + 1% *Schizochytrium*). The Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-PCR) was used to examine the expression of TLRs and NF- $\kappa$ B genes in serum, muscle and hepatopancreas of *F. chinensis* when fed with different concentrations of  $V_E$ . The results showed that: (1) Compared with the control group, feedstuff with adding  $V_E$  and *Schizochytrium* can significantly improve the length, weight, specific growth rate and the survival rate of *F. chinensis*. In addition, the effect was more pronounced in group D, in which  $V_E$  and *Schizochytrium* were both added ( $P < 0.05$ ). (2) Compared with the control group, the expression of TLRs and NF- $\kappa$ B genes in serum, muscle and hepatopancreas of *F. chinensis* with feeding feed which contain  $V_E$  and *Schizochytrium* could be significantly reduced. In addition, Combination of  $V_E$  and *Schizochytrium* could more effectively improve the regulation of immune genes. These results showed that feed stuff which were added with 400 mg/kg  $V_E$  + 1% *Schizochytrium* could significantly improve the growth rate and the survival rate of *F. chinensis* and improve the regulation of immune genes TLRs and NF- $\kappa$ B. [Chinese Fishery Quality and Standards, 2012, 2(2): 37-44]

**Key words:**  $V_E$ ; *Schizochytrium*; *Fenneropenaeus chinensis*; TLR; NF- $\kappa$ B

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