

# 聚β-羟基丁酸酯对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)非特异性免疫力及氨氮胁迫后免疫基因表达量的影响\*

邓康裕<sup>1,2</sup> 孟宪红<sup>2①</sup> 孔杰<sup>2</sup> 张恒恒<sup>2,3</sup> 史晓丽<sup>2</sup> 曹家旺<sup>2</sup>  
罗坤<sup>2</sup> 栾生<sup>2</sup> 曹宝祥<sup>2</sup> 刘宁<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; 2. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 3. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023)

**摘要** 以凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)为研究对象,探讨饲料中添加聚β-羟基丁酸酯(Poly-β-hydroxybutyrate, PHB)对其非特异性免疫能力的影响。采用单因子浓度梯度法,在基础饲料中分别添加1.0%、2.5%和5.0%的PHB配制实验饲料,饲喂21 d后测定对虾免疫酶活性,选择最佳浓度组与空白对照组进行氨氮胁迫实验,测定对虾丙二醛(MDA)含量,同时利用RT-PCR技术测定氨氮胁迫48 h内对虾免疫基因表达水平,观察PHB对免疫基因表达量的影响。结果显示,总抗氧化能力(T-AOC)随PHB浓度升高呈现先上升后下降的趋势,血液、肝胰腺及鳃丝中T-AOC分别在2.5%、2.5%及1.0% PHB浓度时达到最高;PHB对肝胰腺中超氧化物歧化酶(SOD)活力无显著影响,血淋巴及鳃丝中SOD活力在最高浓度组(5.0% PHB)与对照组之间差异显著( $P < 0.05$ );过氧化物酶(POD)和溶菌酶(LZM)在鳃和肝胰腺中的活力于PHB浓度为1.0%和2.5%时达到最高,其中POD相对于对照组分别提高了7.63倍和0.68倍,LZM活力分别提高了0.88及0.18倍。氨氮胁迫实验结果显示,对虾经PHB饲喂后,体内免疫基因表达量高于对照组,且体内MDA含量低于对照组。综上结果说明,PHB能提高凡纳滨对虾非特异性免疫能力。

**关键词** 凡纳滨对虾;聚β-羟基丁酸酯;免疫因子;酶活力;RT-PCR

**中图分类号** S973 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)06-0071-08

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)属于无脊椎动物,其免疫反应主要是先天性免疫。Fearon(1996)发现先天性免疫对获得性免疫具有指导作用,将先天性免疫提升到了重要地位。对虾在胁迫条件下可导致机体代谢紊乱、自由基生成过多,从而造成组织损伤甚至死亡。组织中抗氧化酶系统可以清除体内过多的

氧自由基,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等是研究较多的免疫因子,其在一定程度上可以反映机体的抗氧化应激能力(管晓娟,2009;刘晓华等,2007)。同时,在胁迫条件下,机体对病菌的易感性提高(刘强等,2013;管越强,2003<sup>1)</sup>)。总抗氧

\* 国家自然科学基金面上项目(31172402)、广东省水产良种体系建设项目“南美白对虾育种关键技术研究及其产业化”(zj0001)、江苏省科技支撑计划“凡纳滨对虾繁育推关键技术集成创新与示范”子课题(BE2014414)共同资助。邓康裕, E-mail: dengkangyu@yeah.net

① 通讯作者:孟宪红,研究员, E-mail: mengxh@ysfri.ac.cn

收稿日期:2014-11-27, 收修改稿日期:2014-12-07

1) 管越强. 主要环境因子对养殖对虾抗病力及白斑综合征发生的影响. 中国科学院研究生院(海洋研究所)博士研究生学位论文, 2003

化能力(T-AOC)是衡量机体抗氧化酶系统及非酶促系统对外界应激能力的重要指标(谭树华等, 2005)。溶菌酶(LZM)是甲壳动物非特异性免疫系统的重要组成部分, 可以水解革兰氏阳性菌细胞壁中 N-乙酰葡萄糖胺与 N-乙酰胞壁酸之间的  $\beta$ -1,4-糖苷键, 破坏细胞内外的渗透压, 裂解细胞(管晓娟, 2009)。而过多的氧自由基可以造成体内脂质过氧化物(MDA)的生成, 引起细胞损伤。

凡纳滨对虾作为我国重要的经济养殖水产动物, 促进了国内水产养殖行业的发展。随着其高密度集约化养殖, 养殖过程中普遍出现水体质量下降, 病害问题也日益严重。氨氮胁迫是凡纳滨对虾养殖过程中最易出现的胁迫, Romano 等(2007)、洪美玲(2007)<sup>1)</sup>和 Bucher 等(1993)研究表明, 氨氮能破坏水产动物的鳃、肝和肾组织, 并通过渗透作用进入血淋巴, 对水产养殖动物的排泄(姜令绪等, 2004)、呼吸和生长发育等生理功能产生毒害作用(de Freitas Rebelo *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1992; Koo *et al.*, 2005)。高浓度的氨氮抑制甲壳动物体内抗氧化酶的催化作用并破坏细胞膜的稳定性, 进而影响渗透平衡(孙舰军等, 1999)。Martinez-Cordova 等(2003)研究表明, 降低饲料中蛋白含量可以降低凡纳滨对虾的氨氮排泄水平。

聚  $\beta$ -羟基丁酸酯(Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, PHB)是短链脂肪酸(Short chain fatty acid, SCFA)的聚合体, 可以在肠道内通过水解作用形成丁酸。SCFA 具有抑菌、降低动物肠道 pH 值和促进营养物质吸收利用等生理功能, 是一种具有广泛应用前景的生物活性物质和饲料添加剂(Mathew *et al.*, 1996; Antongiovanni *et al.*, 2007)。Nhan 等(2010)研究发现, 在饲料中添加 PHB 能够促进罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)的生长, 并有利于肠道益生菌的形成。另外, PHB 在一定程度上能够提高中国对虾抗白斑综合征病毒的能力(邓康裕等, 2014)。国内外研究多着重于 PHB 对生长及抑菌作用, 其对机体内部免疫力的研究鲜有报道。

本研究选用世界三大养殖对虾中的凡纳滨对虾, 利用添加 PHB 的饲料投喂凡纳滨对虾, 并使用最佳浓度组与空白对照组进行氨氮胁迫, 探讨 PHB 对凡纳滨对虾免疫能力的影响, 以期 PHB 投入生产实践提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

凡纳滨对虾取自中国水产科学研究院黄海水产研究所在青岛国家海洋科学研究中心培育的凡纳滨对虾仔虾, 平均体重为 3.18–3.53 g, 暂养期间投喂不含 PHB 的基础饲料驯化 7 d, 实验前 1 d 停止喂食。

### 1.2 饲料及制备

基础饲料配方由中国水产科学研究院黄海水产研究所食品工程与营养研究室提供。实验饲料在基础饲料配方上添加不同量的 PHB, 采用逐级放大方式混合原料, 饲料原料经过 60 目粉碎后制成颗粒, 放于密封袋内, 存放于通风干燥区域。

### 1.3 实验管理

将 360 尾凡纳滨对虾随机分为 4 组(对照组及实验组 A、B、C), 每组 3 个重复, 每个重复 30 尾, 饲养于 140 L 白桶内, 置于恒温水浴池中。对照组投喂不含 PHB 的基础饲料, 实验组依次投喂含 PHB 浓度为 1.0%、2.5%、5.0%的饲料, 每天投喂 3 次(07:00、13:30、22:00), 日投喂量为体重的 5%。养殖期间, 水温为 26℃, pH=7.2,  $\text{NH}_4^+\text{-N}<0.2 \text{ mg/L}$ , 养殖历时 21 d。每周开始时称量各组对虾体重, 进行投喂量调整, 同时记录各组实验对虾数量。

### 1.4 样品采集与处理

养殖实验结束后, 实验对虾饥饿 24 h, 每组随机取虾 3 尾, 自对虾头胸甲后插入围心腔取血淋巴液, 吸取等量抗凝剂混匀后置于离心管中, 4℃、8000 r/min 离心 10 min, 取上清液用于血淋巴非特异性免疫指标的测定。取血淋巴后, 该对虾的鳃、肝胰腺组织按照 1:9 (W/V)的比例加 PBS 后, 于超低温组织破碎仪中低温破碎, 4℃、4000 r/min 离心 10 min, 取上清液待测。

酶活力指标参照南京建成生物研究所试剂盒进行测定。测定的酶活力指标包括 T-AOC、SOD、POD、LZM 及 MDA。

### 1.5 氨氮胁迫测试

养殖实验结束后, 加分析纯  $\text{NH}_4\text{Cl}$  使水体中铵

1) 洪美玲. 水中亚硝酸盐和氨氮对中华绒螯蟹幼体的毒性效应及维生素 E 的营养调节. 华东师范大学博士研究生学位论文, 2007

2) 郭艳. Survivin、hTERT 及 STK15 在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义. 天津医科大学硕士研究生学位论文, 2009

3) 逢锦菲. “黄海 2 号”中国对虾高通量 SNP 筛选及其与抗 WSSV 性状的关联分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013

离子态的氮浓度为 15 mg/L, 于 0、3、6、12、24、48 h 心脏采血, 解剖后取肝胰腺、鳃丝, 液氮冻存。RNA 提取方法使用 Trizol 法, 具体参考郭艳(2009)<sup>1</sup>。cDNA 合成使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa)试剂盒进行。

1.6 基因相对表达量的测定

SOD、LZM、GSH-Px 引物设计参照刘群芳等(2013), 18S 序列参照逢锦菲(2013)<sup>2</sup>, CAT 引物序列根据 GenBank: AY518322.1 设计(表 1)。反应程序参照 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa)试剂盒说明书进行。所有实验设 3 个平行。结果使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法进行处理, 使用 SPSS 软件 t 检验进行显著性分析。

表 1 RT-PCR 定量引物序列  
Tab.1 The primer sequences in real-time PCR

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
18S-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18S-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT
SOD-F	TGCCACCTCTCAAGTATGATTTTC
SOD-R	TCCAACCAACTTCTTCGTAGCG
CAT-F	TCAAGTGGCGATTACCCCTC
CAT-R	TCTGCTCCACCTCAGCAAAG
GSH-Px-F	AAGATGGTTATGTTTCGGCAAAG
GSH-Px-R	GCAGACAGGTGTCCAAATGAT
LZM-F	TATTCTGCCTGGGTGGCTTAC
LZM-R	CTAGAACATAGAGCTCGAAGTGTC

1.7 数据处理

实验数据以平均值±标准差表示, 采用 SPSS 17.0 进行差异显著性分析和多重比较, 差异显著水平为 P<0.05。

2 结果

2.1 PHB 对凡纳滨对虾非特异性免疫酶活性的影响

实验发现, 不同浓度的 PHB 对对虾的非特异性免疫酶活力具有不同的影响(图 1)。PHB 对凡纳滨对虾 T-AOC 影响较一致, 在鳃、肝胰腺及血淋巴中, T-AOC 随饲料中 PHB 浓度升高呈现先上升后下降的趋势, 分别在 PHB 浓度为 2.5%、2.5%及 1.0%时达到最高, 分别为空白对照组的 4.32 倍、1.53 倍和 1.03 倍。与空白组相比, PHB 对肝胰腺 SOD 酶活力无显

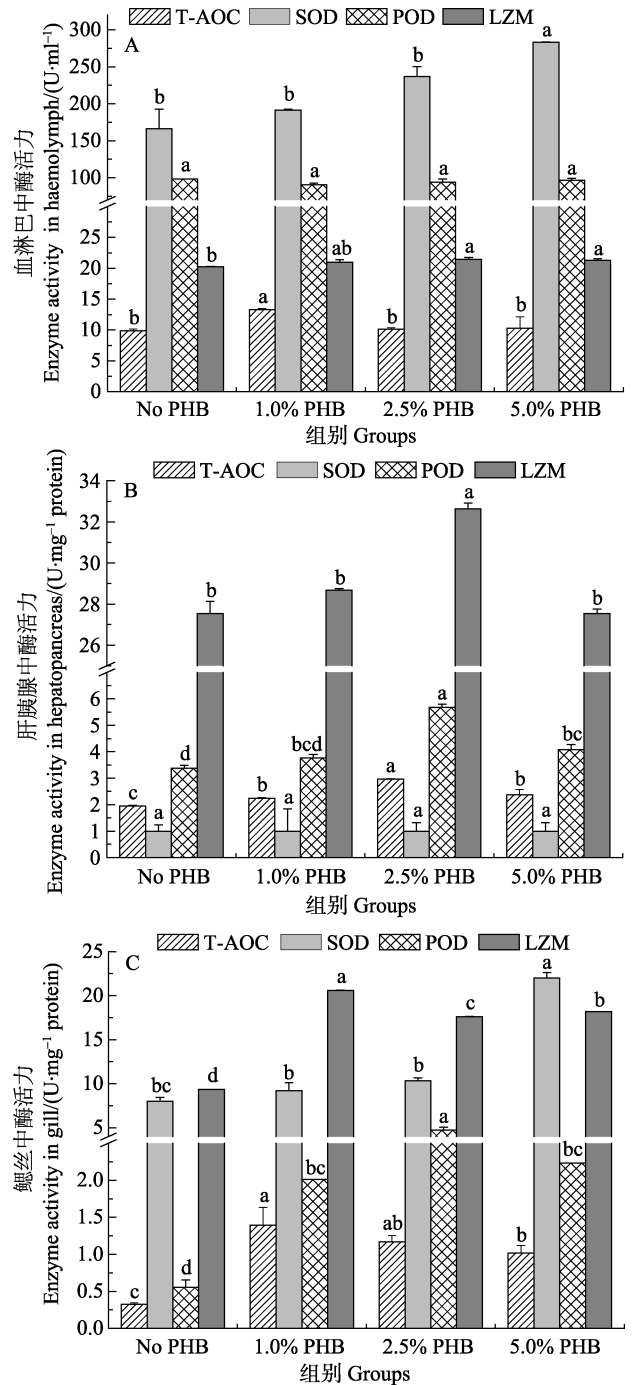


图 1 凡纳滨对虾不同组织中 T-AOC、SOD、POD、LZM 活力  
Fig.1 The activity of T-AOC, SOD, POD, and LZM in different tissues of *L. vannamei*

柱形图数据均以平均值±标准差表示, 相同酶标注不同字母表示差异显著(P<0.05)  
Each pillar represents the mean value from three determinations with the standard deviations (SD).  
Data (Mean±SD) with different letters significantly differ in the same enzyme (P<0.05)

1) 郭艳. Survivin、hTERT 及 STK15 在喉鳞状细胞癌中的表达及临床意义. 天津医科大学硕士研究生学位论文, 2009  
2) 逢锦菲. “黄海 2 号”中国对虾高通量 SNP 筛选及其与抗 WSSV 性状的关联分析. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2013

著影响( $P<0.05$ ),其余组织中 SOD 酶活力均提高,且血淋巴和鳃丝中 SOD 活力在最高浓度组(5.0% PHB)与对照组具有显著差异( $P<0.05$ )。PHB 对 POD、LZM 活力影响在鳃丝及肝胰腺中表现一致,POD 及 LZM 在鳃和肝胰腺中活力分别于 1.0% PHB 和 2.5% PHB 时达到最高,相对于对照组,POD 活性分别提高了 7.63 倍和 0.68 倍,LZM 活力则分别提高了 0.88 倍及 0.18 倍。在血淋巴中,PHB 对 POD 活力无显著影响( $P>0.05$ ),但能显著提高 LZM 活力( $P<0.05$ )。

## 2.2 PHB 对氨氮胁迫后组织中 MAD 含量的影响

氨氮胁迫后,饲喂 2.5% PHB 的对虾体内 MDA 含量要低于未投喂 PHB 的空白对照组,在血淋巴中差异显著( $P<0.05$ )。氨氮胁迫的 48 h 内,鳃中各时间点 MDA 含量变化不显著( $P>0.05$ ),血液及肝胰腺中均呈现先上升后下降的趋势,但二者变化不完全一致。血液中 MDA 含量在 6 h 达到最高,随后下降至最初水平,实验组对虾 MDA 含量下降至 24 h 达到稳定水平且低于最初水平。肝胰腺 MDA 含量在 6 h 上升到最高水平后下降,之后基本维持在同一水平,对照组与实验组在 48 h 含量为初始值的 1.21 倍和 1.18 倍。

## 2.3 PHB 对氨氮胁迫后组织中免疫基因表达量的影响

利用实时荧光定量 RT-PCR 测定 2.5% PHB 组对虾体内免疫基因在氨氮胁迫后的变化(图 2)。在氨氮胁迫后,血淋巴中 SOD 表达水平上升,在 12 h 达到最高,随后开始下降,至 48 h 其表达水平仍高于 0 h。肝胰腺及鳃中自胁迫开始 SOD 含量下降,但两部位的变化不完全一致。肝胰腺自胁迫开始 SOD 显著低于初始值( $P<0.05$ ),鳃丝中 SOD 含量在 6 h 达到最低后开始上升,至 48 h 恢复到初始水平。

抗氧化系统中的 CAT、GSH-Px 表达量在血淋巴、鳃丝、肝胰腺中 3 h 内均急速上升,CAT 分别为初始值的 3.54、3.35、3.35 倍,GSH-Px 分别为初始值的 13.01、2.60、5.78 倍。CAT 含量经过急速上升后急速下降,然后缓慢升高。3 h 后,GSH-Px 在血淋巴及肝胰腺中变化一致,缓慢下降至最低值,鳃中 GSH-Px 在 3 h 后略有下降,但基本维持在稳定水平。

LZM 在氨氮胁迫后在 3 种组织中变化完全不同。肝胰腺中 LZM 在胁迫后开始下调表达达到最低值后然后上升,鳃中呈现先缓慢上调后下调的趋势。而在血淋巴中,LZM 水平在胁迫的 6 h 内与 0 h 无显著差异( $P>0.05$ ),随后开始下调表达。

## 2.4 PHB 对氨氮胁迫后凡纳滨对虾免疫基因表达增强效应

相对于对照组,投喂 2.5% PHB 的对虾体内 SOD、CAT、GSH-Px、LZM 基因表达量均高于对照组(图 3)。在氨氮胁迫后,血淋巴中 SOD 及 CAT 比值呈现先上升后下降再上调的趋势,到 48 h,表达量是对照组的 3.81 倍和 1.56 倍( $P<0.05$ )。肝胰腺及鳃中 SOD 和 CAT 活力则呈现略微下降后上升,表达水平与 0 h 无显著差异( $P>0.05$ )。而 GSH-Px、LZM 基因表达在肝胰腺中均呈现先上升后下降的趋势,至实验结束时仍是对照组的 2.24 倍和 2.36 倍。而在血淋巴及鳃中 GSH-Px 和 LZM 比值在胁迫后略微下降后上升再下降。

## 3 讨论

PHB 首先被发现于巨大芽孢杆菌(*Bacillus pasteurii*)中,随后被分离用于研究。PHB 的疏水性避免了短链脂肪酸的过多挥发,对水质具有保护作用

表 2 氨氮胁迫下凡纳滨对虾不同组织中 MDA 含量  
Tab.2 Effects of ambient ammonia on MDA level in tissues of *L. vannamei*

时间 Time(h)	血淋巴 Haemolymph		肝胰腺 Hepatopancreas		鳃丝 Gill	
	0	2.5%	0	2.5%	0	2.5%
0	15.443±1.209 <sup>b</sup>	10.574±2.094 <sup>b/*</sup>	16.980±7.759 <sup>b</sup>	14.079±2.524 <sup>c</sup>	9.847±6.519 <sup>a</sup>	9.712±4.269 <sup>a</sup>
3	21.603±1.715 <sup>a</sup>	9.991±0.224 <sup>bc/*</sup>	26.095±12.320 <sup>b</sup>	17.921±3.887 <sup>bc</sup>	10.313±2.411 <sup>a</sup>	10.001±1.659 <sup>a</sup>
6	20.615±0.913 <sup>a</sup>	13.802±1.003 <sup>a/*</sup>	46.286±9.666 <sup>a</sup>	38.711±4.623 <sup>a</sup>	13.978±7.007 <sup>a</sup>	11.800±4.289 <sup>a</sup>
12	15.382±0.804 <sup>b</sup>	9.521±0.633 <sup>bc/*</sup>	21.573±4.828 <sup>b</sup>	20.432±2.695 <sup>b</sup>	12.007±2.846 <sup>a</sup>	11.000±1.507 <sup>a</sup>
24	12.436±1.473 <sup>c</sup>	8.214±0.868 <sup>d/*</sup>	18.097±7.063 <sup>b</sup>	15.713±3.187 <sup>c</sup>	12.034±4.869 <sup>a</sup>	10.239±4.596 <sup>a</sup>
48	14.128±0.904 <sup>bc</sup>	7.976±0.764 <sup>cd/*</sup>	20.691±4.927 <sup>b</sup>	16.606±1.704 <sup>bc</sup>	9.282±3.121 <sup>a</sup>	9.661±2.719 <sup>a</sup>

注:表中数据以平均值±标准差表示,同列中不同字母上标表示差异显著( $P<0.05$ ),\*表示同一时间点相同部位 MDA 含量与对照组相比具有显著差异( $P<0.05$ )

Note: Data (Mean±SD) within the same column with different letters significantly differ ( $P<0.05$ ), data with \* in the same tissue at the same point significantly differ compared to the control group ( $P<0.05$ )

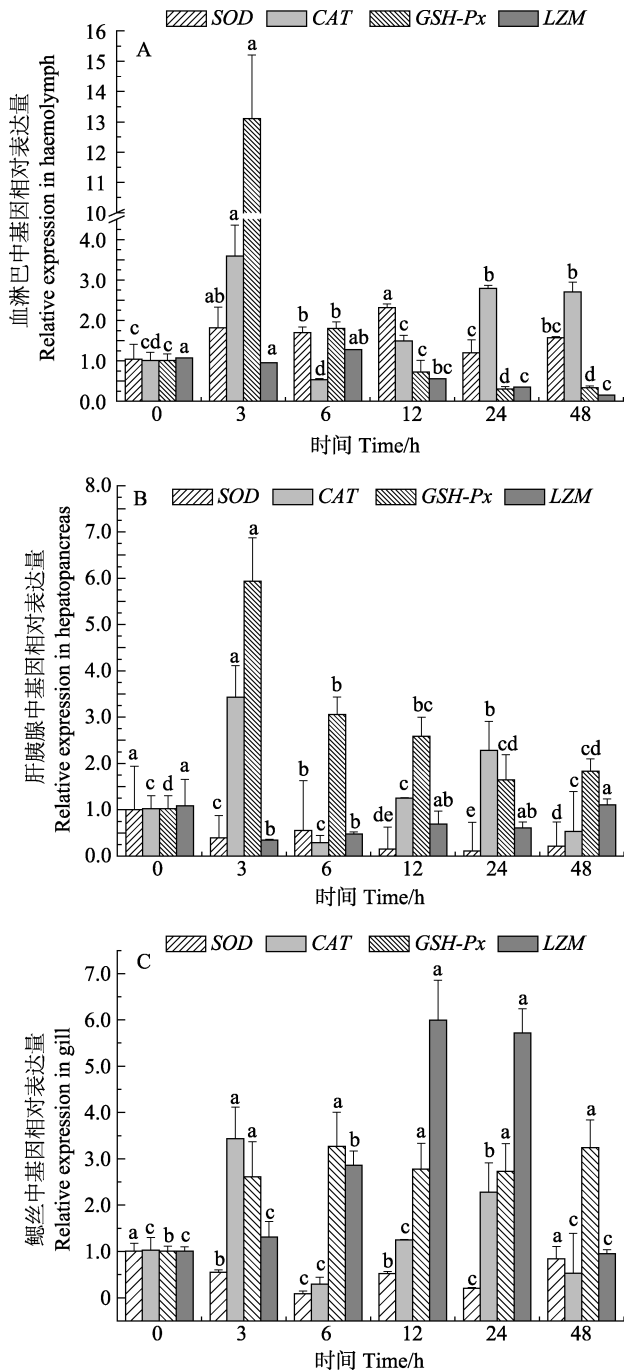


图 2 氨氮胁迫后凡纳滨对虾 *SOD*、*CAT*、*GSH-Px*、*LZM* 相对表达水平

Fig.2 The relative expression level of *SOD*, *CAT*, *GSH-Px* and *LZM* in *L. vannamei* under ammonia stress

每个柱形图数据均以平均值±标准差表示，相同基因标注不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Each pillar represents the mean value from three determinations with the standard deviations (SD).

Data (Mean±SD) for the same gene with different letters significantly differ ( $P < 0.05$ ) among treatments

用。但 PHB 颗粒在水中易结块，实验中将 PHB 与饲料混合后进行投喂，保证其饲喂水产动物的效果。

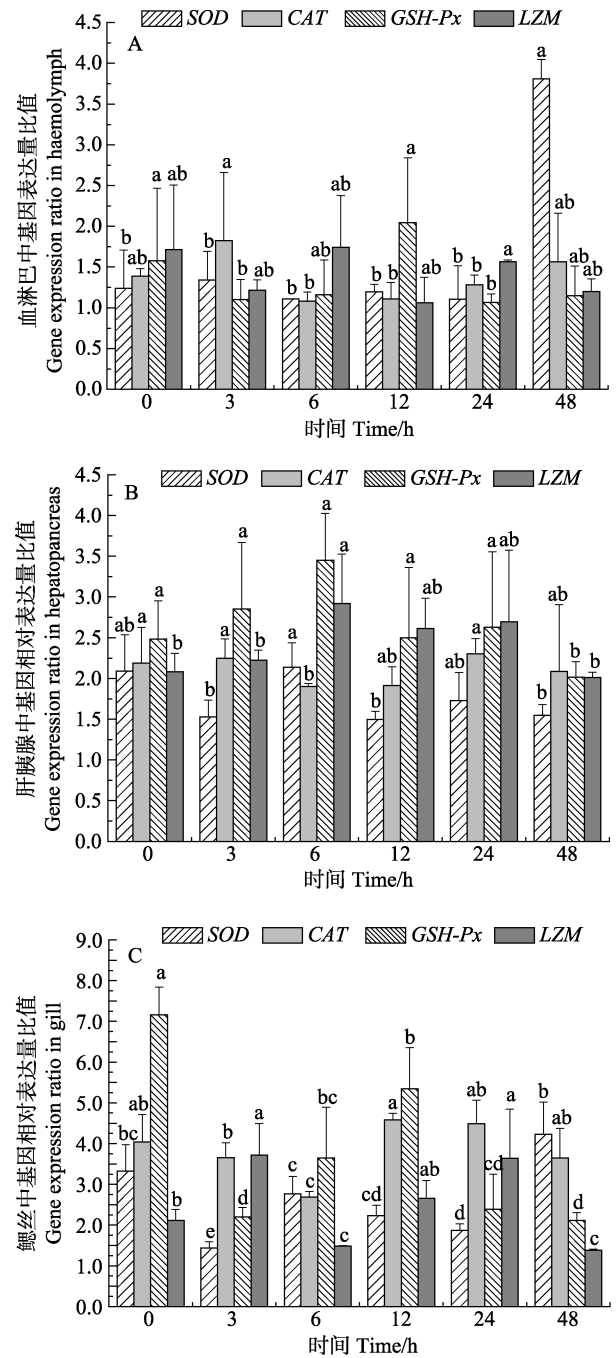


图 3 PHB 对氨氮胁迫后凡纳滨对免疫基因表达增强效应

Fig.3 The expression enhancing effects of immune gene in *L. vannamei* under ammonia stress after feeding with PHB

每个柱形图数据均以平均值±标准差表示，相同基因标注不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )

Each pillar represents the mean value from three determinations with the standard deviations (SD).

Data (Mean±SD) with different letters significantly differ ( $P < 0.05$ ) among treatments

刘树青等(1999)认为，过氧化物酶活力的提高可以提高动物机体的解毒免疫功能和防病抗病能力，研究分析了组织中非特异性免疫因子的变化，以反应

PHB 对凡纳滨对虾非特异性免疫能力及氨氮耐受力的影响。

本研究中, PHB 对 SOD 酶活性无影响, 但对虾经 PHB 投喂后体内 T-AOC 显著上升( $P<0.05$ )。这可能是由于 PHB 提高了机体某些抗氧化物质而造成总抗氧化能力上升, 例如本研究中 PHB 对 POD 酶的影响显著。对虾经 PHB 饲喂后, LZM 活力要高于对照组, 在血液中尤其显著( $P<0.05$ ), 这与一些研究相似, 杨鸢劫等(2008)研究发现, 在饲料中添加脂肪酸后能提高黄鳝血清 LZM 活性和血细胞吞噬能力。Puangkaew 等(2004)在虹鳟(*Oncorhynchus mykiss* Walbaum)饲料中添加脂肪酸后, 提高了巨噬细胞杀菌能力。PHB 提高机体免疫酶活性的原因可能与其在体内代谢产生的  $\beta$ -羟基丁酸并改变体内微生物菌群丰富度有关。丁酸对肠道黏膜有营养性作用, 进而保护肠道黏膜和机体免疫系统(徐世伟等, 2002)。Manzanilla 等(2006)研究发现, 在仔猪中添加丁酸钠盐可以增加肠道淋巴细胞数量, 提高肠道免疫功能。另外, 脂溶性、非游离态的  $\beta$ -羟基丁酸能穿过革兰氏阴性细菌( $G^-$ )的细胞膜, 在偏碱性的胞质中转变为游离态并释放  $H^+$ , 而较低的 pH 抑制酶活性, 使微生物利用能量释放质子, 进而抑制  $G^-$  的生长, 促进有益菌生长。益生菌能够通过本身或者细胞壁成分刺激宿主非特异性免疫系统, 从而提高动物免疫力(Rengpipat *et al.*, 2000; 北平等, 2003; Chang *et al.*, 2003)。王玲等(2011)研究发现, 在饲料中添加枯草芽孢杆菌可显著影响凡纳滨对虾酸性磷酸酶(ACP)和酚氧化酶(PO)活性, 但对 SOD 及 POD 影响不显著。而胡毅等(2008)在饲料中添加益生菌后发现, 凡纳滨对虾的血淋巴 LZM、T-AOC 及 PO 活性上升。本研究结果显示, PHB 能提高凡纳滨对虾的非特异性免疫力, 这与 PHB 能够提高中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的非特异性免疫能力(刘玉等, 2013)的研究结果类似。

甲壳动物在胁迫环境条件下会出现免疫力下降及对病原菌的抵抗力减弱的现象(Liu *et al.*, 2004; Le Moullac *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2002、2003; Vergheze *et al.*, 2007)。氨氮胁迫会引起机体免疫指标的变化, MDA 反映机体脂质氧化程度, 间接反映细胞损伤程度(陈新谦等, 1985)。与对照组相比, 2.5% PHB 浓度组中 MDA 含量低于对照组, 在血液中表现尤为显著( $P<0.05$ )。该结果说明, PHB 能提高机体的抗氧化能力、减少机体损伤。氨氮胁迫后, 随氨氮胁迫时间延长, MDA 含量为先上升后下降, 且不同部位变化趋势不相同, 可能与氨氮胁迫途

径有关。水体中氨氮通过扩散作用和主动运输经鳃与氧一起进入血淋巴, 鳃吸收的氨氮大部分进入血淋巴(刘晓华等, 2007), 肝胰腺是主要的解毒器官。氨氮胁迫后各组织 MDA 含量变化趋势说明, 对于该浓度的氨氮胁迫, 凡纳滨对虾肝胰腺敏感性最高, 其次为血液, 然后是鳃丝。推测肝胰腺可能是凡纳滨对虾主要的氨氮代谢中心。

PHB 作为短链脂肪酸  $\beta$ -羟基丁酸的聚合物, 能够影响基因表达。研究发现, SCFA 可以影响刺激人或动物的 G-蛋白耦合受体, 进而影响某些物质的释放(Karaki *et al.*, 2006、2008)。经过氨氮胁迫后, 各免疫基因出现波动变化, 说明氨氮胁迫对凡纳滨对虾免疫系统是一个明显刺激。对比饲喂 PHB 组与对照组之间对虾体内免疫基因表达量的差别, 发现仅血液部位 SOD 表达量与对照组无显著差别, 对虾体内免疫基因表达量均显著高于对照组( $P<0.05$ )。另外, 在氨氮胁迫后, 实验组免疫基因表达量均高于对照组, 说明投喂 PHB 后对虾免疫系统反应应激能力提高。

综上所述, 本研究中添加 PHB 可以提升凡纳滨对虾的免疫力, 并且提升机体对外界环境胁迫的抵抗力, 可以作为候选免疫增强剂用于对虾生长养殖。

## 参 考 文 献

- 王玲, 张春晓, 孙明, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌(CGMCC NO. 3755)对凡纳滨对虾生长性能和非特异性免疫力的影响. 饲料工业, 2011, 32(4): 47-52
- 邓康裕, 孔杰, 孟宪红, 等. 聚  $\beta$ -羟基丁酸酯对中国明对虾抗 WSSV 能力的影响. 水产学报, 2014, 38(8): 1167-1174
- 北平, 周岐存, 郑石轩, 等.  $\beta$ -1,3/1,6 葡聚糖制剂对凡纳滨对虾生长及免疫力的影响. 高技术通讯, 2003, 13(5): 73-77
- 刘玉, 隋丽英, 邓元告, 等. 聚  $\beta$ -羟基丁酸酯(PHB)对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)幼蟹生长和肝胰腺酶活力的影响. 海洋与湖沼, 2013, 44(5): 1333-1338
- 刘树青, 江晓路, 牟海洋, 等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 278-283
- 刘晓华, 曹俊明, 杨大伟, 等. 氨氮胁迫前后凡纳滨对虾组织中抗氧化酶和脂质过氧化产物的分布. 水利渔业, 2007, 27(6): 24-26
- 刘强, 周俊芳, 房文红, 等. 毒死蜱胁迫下 WSSV 对凡纳滨对虾的致病性. 水产学报, 2013, 37(7): 1106-1112
- 刘群芳, 曹俊明, 黄燕华, 等.  $\beta$ -葡聚糖与硒、维生素 E 联合添加对凡纳滨对虾生长、血清免疫和抗氧化指标及抗病力的影响. 中国水产科学, 2013, 20(5): 997-1006
- 孙舰军, 丁美丽. 氨氮对中国对虾抗病力的影响. 海洋与湖沼, 1999, 30(3): 267-272
- 杨鸢劫, 邴旭文, 徐增洪. 不饱和脂肪酸对黄鳝部分非特异性免疫力和代谢指标的影响. 中国水产科学, 2008, 15(4):

- 600-605
- 陈新谦, 金有豫. 新编药理学(第12版). 北京: 人民卫生出版社, 1985
- 胡毅, 谭北平, 麦康森, 等. 饲料中益生菌对凡纳滨对虾生长、肠道菌群及部分免疫指标的影响. 中国水产科学, 2008, 15(2): 245-251
- 姜令绪, 潘鲁青, 肖国强. 氨氮对凡纳滨对虾免疫指标的影响. 中国水产科学, 2004, 11(6): 537-541
- 徐世伟, 汪仕良. 肠道营养与机体免疫. 免疫学杂志, 2002, 18(S1): 233-236
- 管晓娟. 甲壳动物体液免疫相关酶及免疫因子研究概况. 生命科学仪器, 2009(7): 3-7
- 谭树华, 何典翼, 严芳, 等. 亚硝酸钠对鲫鱼肝脏丙二醛含量和总抗氧化能力的影响. 农业环境科学学报, 2005, 24(z1): 21-24
- Antongiovanni M, Buccioni A, Petacchi F, *et al.* Butyric acid glycerides in the diet of broiler chickens: effects on gut histology and carcass composition. *Ital J Anim Sci*, 2007, 6(1): 19-25
- Bucher F, Hofer R. The effects of treated domestic sewage on three organs (gills, kidney, liver) of brown trout (*Salmo trutta*). *Water Res*, 1993, 27(2): 255-261
- Chang CF, Su MS, Chen HY, *et al.* Dietary  $\beta$ -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, 15(4): 297-310
- Chen JC, Lin CY. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinity levels. *Comp Biochem Physiol C*, 1992, 102(2): 287-291
- Cheng W, Chen JC. The virulence of *Enterococcus* to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress. *Fish Shellfish Immunol*, 2002, 12(2): 97-109
- Cheng W, Chen JC, Chen S, *et al.* Effects of temperature, pH, salinity and ammonia on the phagocytic activity and clearance efficiency of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* to *Lactococcus garvieae*. *Aquaculture*, 2003, 219(1): 111-121
- de Freitas Rebelo M, Rodriguez EM, Santos EA. Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea Decapoda) following acute exposure to ammonia. *Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol*, 2000, 125(2): 157-164
- Fearon DTLR. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 1996, 272(5258): 50-53
- Jiang G, Yu R, Zhou M. Modulatory effects of ammonia-N on the immune system of *Penaeus japonicus* to virulence of white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 2004, 241(1): 61-75
- Karaki S, Mitsui R, Hayashi H, *et al.* Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. *Cell Tissue Res*, 2006, 324(3): 353-360
- Karaki S, Tazoe H, Hayashi H, *et al.* Expression of the short-chain fatty acid receptor, GPR43, in the human colon. *J Mol Hist*, 2008, 39(2): 135-142
- Koo J, Kim S, Jee J, *et al.* Effects of ammonia and nitrite on survival, growth and moulting in juvenile tiger crab, *Orithyia sinica* (Linnaeus). *Aquacult Res*, 2005, 36(1): 79-85
- Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in crustacean. *Aquaculture*, 2000, 191(1): 121-131
- Liu CH, Chen JC. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16(3): 321-334
- Manzanilla EG, Nofrarias M, Anguita M, *et al.* Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J Anim Sci*, 2006, 84(10): 2743-2751
- Martinez-Cordova LR, Campana TA, Porchas-Cornejo MA. Dietary protein level and natural food management in the culture of blue (*Litopenaeus stylirostris*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in microcosms. *Aquacult Nutr*, 2003, 9(3): 155-166
- Mathew AG, Franklin MA, Upchurch WG, *et al.* Effect of weaning on ileal short-chain fatty acid concentrations in pigs. *Nutr Res*, 1996, 16(10): 1689-1698
- Nhan DT, Wille M, De Schryver P, *et al.* The effect of poly  $\beta$ -hydroxybutyrate on larviculture of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 2010, 302(1): 76-81
- Puangkaew J, Kiron V, Somamoto T, *et al.* Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acid. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16(1): 25-39
- Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, *et al.* Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture*, 2000, 191(4): 271-288
- Romano N, Zeng CS. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. *Aquaculture*, 2007, 266(1-4): 246-254
- Vergheze B, Radhakrishnan EV, Padhi A. Effect of environmental parameters on immune response of the Indian spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758). *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 23(5): 928-936

## Effects of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate on Non-Specific Immunity and Expression of Immune Gene Under the Ammonia Stress of *Litopenaeus vannamei*

DENG Kangyu<sup>1,2</sup>, MENG Xianhong<sup>2①</sup>, KONG Jie<sup>2</sup>, ZHANG Hengheng<sup>2,3</sup>, SHI Xiaoli<sup>2</sup>,  
CAO Jiawang<sup>2</sup>, LUO Kun<sup>2</sup>, LUAN Sheng<sup>2</sup>, CAO Baoxiang<sup>2</sup>, LIU Ning<sup>2</sup>

(1. Wuxi Fisheries College of Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081; 2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 3. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023)

**Abstract** Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) is a polymer of the short-chain fatty acid  $\beta$ -hydroxybutyrate.  $\beta$ -hydroxybutyric acid facilitates food digestion, absorption, and the protein and mineral utilization. The bacteria-derived PHB can be potentially used as an alternative to the conventional antibiotics in aqua-farming. Here we explored the effects of PHB on non-specific immunity of *Litopenaeus vannamei*. The *L. vannamei* was fed with baits containing PHB at different concentrations (0, 1.0%, 2.5% and 5.0%). The enzyme activities of the total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and lysozyme (LZM) in gill, hepatopancreas and serum were analyzed and compared among groups. The group with the best performance and the control group were selected for the ammonia stress test. After the NH<sub>4</sub>Cl treatment, we measured the concentration of malonaldehyde (MDA) and the expression levels of related genes in tissues by using real-time PCR. The results suggested that PHB affected the congenital immunity in the shrimp. As the concentration of PHB increased, the T-AOC activity in the experimental groups was first elevated followed by a decline. The activities of T-AOC in the serum, the hepatopancreas and the gill reached the maximum when the concentration of PHB was 2.5%, 2.5% and 1.0% respectively. The SOD activity in the gill and serum of shrimp fed with 5.0% PHB was significantly different from that in the control group. In the gill and hepatopancreas, the activity of POD and LZM peaked when the PHB concentration was 1.0% and 2.5% respectively. Compared with the control group, the POD activities of the experiment group supplemented with 1.0% and 2.5% PHB were 7.63-fold and 0.68-fold in the gill and hepatopancreas, and LZM activities were 1.88-fold and 1.18-fold, respectively. After the ammonia stress test, the shrimp fed with PHB showed lower MDA concentration than that without PHB, and the difference was significant in the serum ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the expression levels of related genes were higher in the experimental groups compared to the control group. Our data indicated that PHB could improve non-specific immunity of shrimps.

**Key words** *Litopenaeus vannamei*; Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate; Immune factor; Enzyme activity; RT-PCR

① Corresponding author: MENG Xianhong. E-mail: mengxh@ysfri.ac.cn