

文章编号: 1674-5566(2019)05-0735-09

DOI:10.12024/jsou.20181002420

## 饲料胆固醇含量对凡纳滨对虾免疫相关基因表达及耐低温低溶解氧胁迫能力的影响

闫明磊<sup>1</sup>, 王鑫磊<sup>1</sup>, 黄旭雄<sup>1,2,3</sup>, 李松林<sup>1</sup>, 汪毅<sup>1</sup>, 姜德田<sup>1</sup>, 李来强<sup>1</sup>

(1. 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306; 2. 上海市水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

**摘要:** 为探究饲料中胆固醇含量对淡水养殖凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 免疫相关基因表达及耐低温低溶解氧胁迫能力的影响, 在鱼粉含量为 10% 的基础饲料中分别添加 0、1.0、2.0、3.0、4.0 g/kg 的胆固醇, 制成 5 组等氮等能饲料 (C0、C1、C2、C3 和 C4, 实测胆固醇含量依次为 0.78、1.57、2.45、3.43 和 4.18 mg/g) 投喂初始体质量为 (0.14 ± 0.03) g 的凡纳滨对虾。养殖 8 周后检测对虾耐低温和低溶解氧胁迫的能力以及急性感染副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 后免疫相关基因 (*Toll* 受体、*IMD* 和溶菌酶 mRNA) 相对表达量。结果表明: 饲料胆固醇含量显著影响弧菌急性感染后对虾鳃组织 *Toll* 受体、*IMD* 和溶菌酶 mRNA 相对表达量。在弧菌感染进程中, C2 组对虾 *Toll* 受体和溶菌酶的 mRNA 表达量表现出最大的变化幅度; 而 *IMD* mRNA 表达量最大变化幅度出现在 C1 组, 其次为 C2 组。急性感染弧菌后各组对虾 *Toll* 受体和溶菌酶 mRNA 相对表达量峰值均出现在感染后 24 h; C2、C3 和 C4 组 *IMD* mRNA 表达量峰值出现在感染后 24 h, 而 C0 和 C1 组 *IMD* mRNA 表达量峰值出现在感染后 42 h。急性程序降温胁迫下, C0 和 C4 组对虾 100% 死亡的温度为 15 °C; 而其他组对虾 100% 死亡的温度为 14 °C。急性低溶解氧胁迫下各组对虾的耗氧量和致死溶氧浓度无显著性差异。综上所述: 在淡水养殖条件下, 饲料中 2.45 mg/g 的胆固醇含量可以提高凡纳滨对虾的免疫灵敏性, 而饲料中胆固醇含量为 (1.57 ~ 3.43) mg/g 时凡纳滨对虾表现出较好的抗低温胁迫能力。

**关键词:** 凡纳滨对虾; 胆固醇; 免疫相关基因表达; 弧菌; 低温; 低溶解氧

中图分类号: S 963.1 文献标志码: A

凡纳滨对虾属于节肢动物门、甲壳纲, 是我国目前养殖范围最广的对虾品种。但近年来细菌性疾病和环境胁迫导致对虾大量死亡, 严重影响了对虾养殖产业的发展。甲壳类动物只具有先天性免疫防御系统, 而不具备获得性免疫能力<sup>[1]</sup>。在先天性免疫反应中, 机体借助细胞外的病原分子识别模式 (PAMP) 识别病原, 通过细胞膜上的多种信号传递通路, 将病原感染入侵信号传递到细胞内, 产生和释放一系列免疫效应因子完成对病原的消灭和清除<sup>[2]</sup>。因此, 免疫过程中信号传递通路的关键蛋白以及重要效应因子的转录水平可以在一定程度上反映机体免疫机能。*Toll* 受体作为一种模式识别受体, 可以识别入侵

异物的 PAMP, 并激活信号传导以诱导先天免疫反应<sup>[3]</sup>。*IMD* 基因编码具有与哺乳动物 RIP (受体相互作用蛋白) 相似的死亡结构域蛋白, 激活信号级联因子 NF- $\kappa$ B<sup>[4]</sup>。溶菌酶对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都有裂解活性, 可以激活补体系统和加强吞噬细胞的吞噬能力<sup>[5]</sup>。因此, *Toll* 受体、*IMD* 和溶菌酶 mRNA 的表达量可以作为评判机体非特异性免疫机能的指标。免疫灵敏性和平衡性 (即机体对侵入体内的异物能迅速充分清除并在异物清除后恢复到初始状态) 是评判机体免疫机能强弱的核心问题<sup>[6]</sup>。已有研究<sup>[7-9]</sup>表明, 细菌感染进程中免疫相关基因表达量的上调时刻和变化幅度可以表征机体免疫的灵敏性和

收稿日期: 2018-10-28 修回日期: 2018-12-28

基金项目: 上海市科学技术委员会项目 (14320502000); 中国-东盟海上合作基金项目 (DF)

作者简介: 闫明磊 (1992—), 男, 硕士生, 研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail: yanmlei@126.com

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

平衡性。

胆固醇是构成细胞膜的重要组成部分,可以维持细胞膜的流动性<sup>[10]</sup>;作为类固醇激素如性激素、蜕壳激素、肾上腺皮质激素和维生素D等合成的前体物质,对性腺发育、蜕壳及机体内代谢等具有重要的调节作用<sup>[11-13]</sup>。但对虾等甲壳类动物缺乏合成胆固醇的能力,必须从饲料中获取胆固醇以满足其生长发育的需求;以生长作为评判指标,凡纳滨对虾对饲料胆固醇的需求水平为0.13%~0.42%<sup>[14-17]</sup>。已有研究<sup>[18-19]</sup>表明饲料最佳生长所需的营养水平和发挥最佳免疫机能所需的营养水平并不完全一致。王鑫磊等<sup>[20]</sup>的研究表明饲料胆固醇水平影响凡纳滨对虾抗弧菌能力和抗亚硝酸态氮胁迫的能力。温度和溶解氧是水生动物赖以生存的重要影响因素。温度影响水生动物的能量代谢、蛋白质代谢、脂肪代谢和核苷酸代谢等<sup>[21]</sup>,凡纳滨对虾的适温范围为23~30℃,过高或过低的温度都会导致机体不同程度的应激反应<sup>[22]</sup>;在我国华东及华北地区,凡纳滨对虾养殖早期和晚期均容易受到寒潮影响。在高密度养殖情况下水体溶解氧也是制约对虾生产性能的重要因子。笔者在前期研究的基础上,继续探究饲料中胆固醇含量对淡水养殖的凡纳滨对虾急性感染副溶血弧菌前后免疫相关基因(*Toll*受体、*IMD*和溶菌酶)表达量及抗低温和低溶解氧胁迫能力的影响,以完善在淡水养殖条件下饲料胆固醇对凡纳滨对虾免疫及抗逆机能的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 饲料制作

根据表1饲料配方,制作5组不同胆固醇含量的等氮等能饲料。原料经破碎后过80目筛,各种原料混合均匀后加水制成面团状。用绞肉机制成粒径1.5mm的条状,90℃熟化20min后在阴凉处风干,然后破碎筛分成合适的颗粒用于对虾养殖试验。真空包装,-20℃保存备用。

### 1.2 养殖管理

实验用凡纳滨对虾虾苗购买自上海彰显渔业专业合作社。虾苗经淡化后暂养,待虾苗达到(0.14±0.03)g时,挑选750尾健康活泼、规格整齐的幼虾,随机分配到同一水池(5.0m×11.0m×1.2m)的15个网箱(1.0m×1.0m×1.2m)

表1 试验饲料配方及营养组成(%,干物质)

Tab.1 Ingredients and nutritional composition of the experimental diets (% , dry matter)

饲料成分(Ingredients)	C0	C1	C2	C3	C4
秘鲁鱼粉(Brown fish meal) <sup>a</sup>	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
肉粉(Meat meal) <sup>a</sup>	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
豆粕(Soybean meal) <sup>a</sup>	34.00	34.00	34.00	34.00	34.00
花生粕(Peanut meal) <sup>a</sup>	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
面粉(Wheat flour) <sup>a</sup>	23.70	23.70	23.70	23.70	23.70
血粉(Blood powder) <sup>a</sup>	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
磷酸二氢钙 [Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ] <sup>a</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
大豆卵磷脂 (Soybean lecithin) <sup>a</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
鱼油(Fish oil) <sup>a</sup>	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
啤酒酵母(Brewers yeast) <sup>a</sup>	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
豆油(Soybean oil) <sup>a</sup>	2.20	2.10	2.00	1.90	1.80
多矿(Mineral premix) <sup>b</sup>	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
多维(Vitamin premix) <sup>c</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
维生素C单磷酸酯 (L-Ascorbate-2-Monophosphate) <sup>d</sup>	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
氯化胆碱 (Choline chloride) <sup>a</sup>	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
酵母提取物(Yeast extract) <sup>e</sup>	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
胆固醇(Cholesterol) <sup>f</sup>	0.00	0.10	0.20	0.30	0.40
总计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels					
粗脂肪 Crude fat <sup>f</sup>	7.40	7.41	7.63	7.96	7.78
灰分 Ash <sup>f</sup>	9.81	9.89	9.66	9.73	9.78
粗蛋白 Crude protein <sup>f</sup>	41.84	41.37	40.99	41.06	40.91
胆固醇含量/(mg/g) Cholesterol content <sup>f</sup>	0.78	1.57	2.45	3.43	4.18

注:a. 购自上海农好饲料有限公司;b. 多矿预混料(kg):钴0.8g, 钙10.5g, 钾90g, 镁12g, 铜3.0g, 铁1.0g, 锌10g, 锰3.8g, 硒0.02g;c. 多维预混料(kg):维生素A 8 000 000 IU, 维生素D 2 000 000 IU, 维生素K 10g, 维生素E 50g, 维生素B1 5g, 维生素B2 15g, 维生素B6 8g, 维生素B12 0.02g, 烟酸40g, D-泛酸钙25g, 叶酸2.5g, 生物素0.08g, 肌醇100g;d. 维生素d-单磷酸酯,纯度35%;e. 购自安琪酵母股份有限公司;f. 购自高信化玻仪器有限公司,沃凯,纯度≥95%,为药检专用;g. 实测值

Notes: a. provided by Nonghao Feed Mill, Shanghai, China; b. Mineral premix containing, kg: Co 0.8 g, Ca 10.5 g, K 90 g, Mg 12 g, Cu 3.0 g, Fe 1.0 g, Zn 10 g, Mn 3.8 g, Se 0.02 g; c. Vitamin premix containing, kg: Vitamin A 8 000 000 IU, Vitamin D 2 000 000 IU, Vitamin K 10 g, Vitamin E 50 g, Vitamin B1 5 g, Vitamin B2 15 g, Vitamin B6 8 g, Vitamin B12 0.02 g, nicotinic acid 40 g, Calcium D-pantothenate 25 g, Folic acid 2.5 g, Biotin 0.08 g, Inositol 100 g; d. L-Ascorbate-2-Monophosphate purity reached 35%; e. provided by Angel Yeast co., LTD, China; f. provided by Shanghai Gaoxin chemical glass, wo kai, ≥95%, Drug quality control; g. measured values

中。实验共分 5 组,每组 3 个平行,每平行 50 尾虾。分别投喂 5 组不同胆固醇含量的实验饲料,投喂时间分别为 5:30,11:00,17:00,22:30,日投喂量占虾体质量的 5%~8%,根据摄食情况做适当调整。养殖期间,每 3 天换 1 次水,换水量约为水体的 1/4;连续充氧,保持水体溶解氧 > 6 mg/L,氨氮 < 0.2 mg/L,亚硝酸氮 < 0.01 mg/L,pH 8.0~8.5,水温(31±2)℃,表观盐度 0。8 周养殖试验结束后,各组对虾用于弧菌感染试验及低温低溶解氧胁迫试验。

### 1.3 副溶血弧菌感染试验

副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)菌株来自上海海洋大学病原库,经活化培养后,用福尔马林灭活,离心收集弧菌细胞,用生理盐水稀释成  $1.25 \times 10^6$  CFU/mL 的菌悬液,用于感染试验。

每处理组随机取蜕皮间期的对虾 45 尾,分 3 个平行,每平行 15 尾暂养于 1 个网箱(50 cm × 30 cm × 80 cm)中,所有网箱悬挂于同一水泥池(2.8 m × 4.5 m × 1.5 m)中。每尾对虾经腹部注射灭活的副溶血弧菌菌悬液 25 μL,感染期间持续曝气,水温 30~32℃。每组分别在感染 0、6、12、24、36、42 和 48 h 时随机取 3 尾虾鳃组织,迅速置于盛有预冷 RNA 保存液(北京天根公司)的 1.5 mL 离心管中,带回实验室后用于测定免疫相关基因的相对表达量。

### 1.4 急性低温胁迫试验

在低温恒温液浴循环槽(BH8104-D-D81-R10C,杭州保恒恒温技术有限公司)内设置小网箱。每处理组随机取 9 尾处于蜕皮间期、规格相近的对虾置于低温循环槽内相同规格的 3 个小网箱中,连续充气。选取 20℃ 为低温胁迫的起始温度,并以 1℃/h 的速度程序降温。以身体僵硬、针刺肌肉不动为死亡标准,依次记录对虾死亡温度和死亡时间。统计各组对虾的累计死亡率。

### 1.5 低溶解氧胁迫试验

各处理组随机取 9 尾处于蜕皮间期、规格相近的对虾,分 3 个平行。在 2 L 的锥形瓶中注入连续曝气 24 h 的 25℃ 自来水,并将 3 尾对虾和磁力搅拌子、绑定有溶氧仪探头的玻璃棒放于烧瓶中,锥形瓶用液体石蜡封口。将锥形瓶放在磁力搅拌器上以固定转速持续缓慢搅拌。试验在 25℃

的空调房中进行。以对虾侧躺不动判定对虾死亡。记录对虾开始及死亡时的溶氧和时间,并称量对虾体质量。计算耗氧量,耗氧量计算公式如下:

$$\text{耗氧量}(\text{mg/g}) = (DO_0 - DO_1) \times V/W$$

式中: $DO_0$  为初始溶解氧,mg/L; $DO_1$  为 3 尾虾死亡时的平均溶解氧,mg/L; $V$  为锥形瓶中水的体积,L; $W$  为三尾虾的总质量,g。

## 1.6 样品测定

### 1.6.1 饲料常规测定

饲料中水分采用 105℃ 烘箱干燥恒重法(GB 6435286)测定;总脂肪测定用氯仿-甲醇法;灰分用 550℃ 马福炉灼烧法(GB 6538286)测定;粗蛋白质用凯氏定氮仪(Kjeltec™ 2300,瑞典)测定(GB 6432286)。

### 1.6.2 胆固醇含量测定

胆固醇含量的测定参照王鑫磊等<sup>[20]</sup>实验方法进行。采用 Waters e2695 型液相色谱仪联合 Waters 2998 光电二极管阵列检测器,色谱柱为 Agilent TC-C18(2) 柱(5.0 μm × 4.6 mm × 250 mm)。用外标法计算胆固醇含量。

### 1.6.3 免疫相关基因相对表达量的测定

鳃组织总 RNA 用 RNA 提取试剂盒(北京天根公司)提取,用 NanoDrop2000 超微量分光光度计测定其 OD<sub>260</sub> 和 OD<sub>280</sub> 比值,1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性,-80℃ 保存备用。使用 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA,-20℃ 保存备用。

引物设计参照美国国立生物技术信息中心的凡纳滨对虾溶菌酶基因、Toll 受体基因、IMD 基因和 β-actin 基因,由上海生工生物工程股份有限公司合成(表 2)。

按照 SYBR Premix Ex Taq™ (TliRNaseHPlus) 试剂盒(TaKaRa 公司)说明,使用 RT-PCR 仪(Bio-rad 公司)进行 qRT-PCR。RT-PCR 程序为 95℃、30 s 预变性;95℃、10 s,60℃、30 s,共 39 个循环;反应后 65℃ 上升至 95℃ 测定溶解曲线检测反应特异性。每个复孔以 β-actin 为参照基因。基因表达结果采用相对表达量的形式,以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法进行计算。

表2 凡纳滨对虾溶菌酶基因、*Toll* 受体基因、*IMD* 基因与  $\beta$ -actin 内参基因引物序列

Tab.2 Primer pairs for lysozyme, *Toll* receptor, *IMD* and  $\beta$ -actin genes for *L. vannamei*

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')	GenBank 登录号 GenBank accession number
溶菌酶-F lysozyme-F	CGACCTCGATCAGTACATGG	AY170126
溶菌酶-R lysozyme-R	GTAACCTGGTGACAAGCCT	
<i>Toll</i> 受体 1-F <i>Toll</i> receptor 1-F	TGCTGCTTTCGTCAAACTTC	DQ923424
<i>Toll</i> 受体 1-R <i>Toll</i> receptor 1-R	AACCTGGCCATACACAATGA	
<i>IMD</i> -F	ATCGAGGAACGAGACAAGGT	FJ592176
<i>IMD</i> -R	CGTACTCGGTCGACATTC	
$\beta$ -actin-F	CGCGACCTCACAGACTACCT	AF300705
$\beta$ -actin-R	CTCGTAGGACTTCTCCAGCG	

## 1.7 数据分析

试验结果采用平均值  $\pm$  标准误 (Mean  $\pm$  SE) 的方式表示, 使用 SPSS 17.0 分析软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 Duncan 氏法多重比较,  $P < 0.05$  则表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 对凡纳滨对虾急性感染副溶血弧菌后免疫相关基因表达的影响

在弧菌感染前(0 h), 各组对虾鳃组织中 *Toll* 受体 mRNA 表达量无显著差异 ( $P > 0.05$ )。随着感染进程, 各组对虾鳃组织中 *Toll* 受体 mRNA 表达量总体上先升高后下降, 且均在 24 h 达到峰值, C2 组 *Toll* 受体 mRNA 表达量峰值显著高于其他组的表达量峰值 ( $P < 0.05$ )。随后各组对虾 *Toll* 受体 mRNA 表达量均逐步降低, 42 h 时 C2 组 *Toll* 受体 mRNA 表达量依然显著高于 C0 和 C1 组 ( $P < 0.05$ ), 但与 C3 和 C4 组无显著差异 (表3)。48 h 时各组间 *Toll* 受体 mRNA 表达量

无显著差异 ( $P > 0.05$ )。从感染前后对虾 *Toll* 受体 mRNA 表达量变化箱体图可知, C2 组在弧菌感染进程中表现出最大的 *Toll* 受体 mRNA 表达量变化幅度 (图1)。

在弧菌感染前(0 h), C0 组对虾鳃组织中 *IMD* mRNA 表达量显著低于其他组 ( $P < 0.05$ )。随着感染进程, 各组对虾鳃组织中 *IMD* mRNA 表达量先升高后降低。感染 6 h C0、C1 和 C2 组 *IMD* mRNA 表达量即出现显著上调, 且 C1 组表达量显著高于其他组 ( $P < 0.05$ )。感染 12 h 时 C1 组表达量依然显著高于其他组 ( $P < 0.05$ )。感染 24 h 时 C2、C3 和 C4 组 *IMD* mRNA 表达量达到峰值, 且 C1、C2 组峰值显著高于其他组 ( $P < 0.05$ )。感染 42 h 时 C0 和 C1 组 *IMD* mRNA 表达量达到峰值, 此时 C1 组显著高于其他组 ( $P < 0.05$ )。48 h 时 C2 和 C3 组 *IMD* mRNA 表达量依然显著高于 C0、C1 和 C4 组 ( $P < 0.05$ , 表3)。从感染前后对虾 *IMD* mRNA 表达量变化箱体图可知, C1 和 C2 组在弧菌感染进程中表现出最大的 *IMD* mRNA 表达量变化幅度 (图2)。

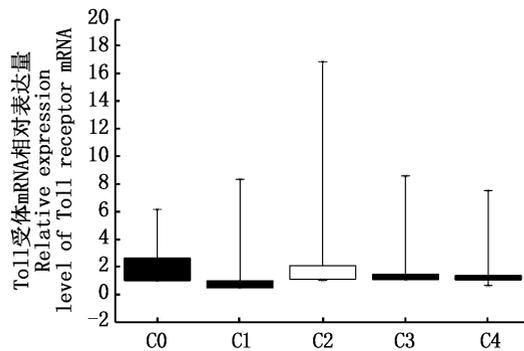
在弧菌感染前(0 h), 各组对虾鳃组织中溶菌酶 mRNA 表达量无显著差异 ( $P > 0.05$ )。随着感染进程, 各组对虾鳃组织中溶菌酶 mRNA 表达量也呈先升后降的变化。感染 6 h C1 和 C2 组溶菌酶 mRNA 表达量即出现显著上调 ( $P < 0.05$ )。感染 24 h 时各组溶菌酶 mRNA 表达量均达到峰值, 且 C3 组具有最大峰值, 显著高于 C0 和 C1 组的表达量峰值 ( $P < 0.05$ ); 随后各组溶菌酶 mRNA 表达量均逐步降低。48 h 时除 C1 组外, 其余各组溶菌酶 mRNA 表达量恢复到初始水平 (表3)。从感染前后对虾溶菌酶 mRNA 表达量变化箱体图可知, C2 组在经历弧菌感染后表现出最大的表达量变化幅度 (图3)。

表 3 饲料胆固醇含量对凡纳滨对虾急性感染副溶血弧菌后免疫相关基因表达量的影响 (Means  $\pm$  SE,  $n=3$ )Tab. 3 Effects of dietary cholesterol content on expression of immuno-related genes in white shrimp *L. vannamei* experienced acute *V. parahaemolyticus* infection for 48 h % , dry matter

组别 Treatments	时间 Time/h	C0 (0.78 mg/g diet)	C1 (1.57 mg/g diet)	C2 (2.45 mg/g diet)	C3 (3.43 mg/g diet)	C4 (4.18 mg/g diet)
Toll 受体 mRNA 相对表达量 Relative expression level of Toll receptor mRNA	0	1.14 $\pm$ 0.43 <sup>m</sup>	1.01 $\pm$ 0.06 <sup>n</sup>	1.04 $\pm$ 0.23 <sup>n</sup>	1.41 $\pm$ 0.82 <sup>n</sup>	1.40 $\pm$ 0.79 <sup>m</sup>
	6	2.65 $\pm$ 1.33 <sup>m</sup>	1.00 $\pm$ 0.03 <sup>n</sup>	1.53 $\pm$ 0.16 <sup>n</sup>	1.09 $\pm$ 0.31 <sup>mn</sup>	1.07 $\pm$ 0.25 <sup>m</sup>
	12	1.02 $\pm$ 0.14 <sup>bm</sup>	1.01 $\pm$ 0.12 <sup>bn</sup>	0.52 $\pm$ 0.01 <sup>am</sup>	0.55 $\pm$ 0.06 <sup>am</sup>	0.73 $\pm$ 0.06 <sup>abm</sup>
	24	6.17 $\pm$ 1.01 <sup>an</sup>	8.35 $\pm$ 1.17 <sup>ao</sup>	16.84 $\pm$ 1.60 <sup>bo</sup>	8.59 $\pm$ 1.31 <sup>ao</sup>	7.54 $\pm$ 2.03 <sup>an</sup>
	36	5.16 $\pm$ 1.15 <sup>bn</sup>	1.00 $\pm$ 0.05 <sup>an</sup>	1.07 $\pm$ 0.28 <sup>an</sup>	5.21 $\pm$ 1.60 <sup>bo</sup>	5.03 $\pm$ 0.23 <sup>bn</sup>
	42	1.01 $\pm$ 0.10 <sup>abm</sup>	0.50 $\pm$ 0.04 <sup>am</sup>	2.10 $\pm$ 0.37 <sup>cn</sup>	1.48 $\pm$ 0.37 <sup>bcn</sup>	1.29 $\pm$ 0.67 <sup>bcm</sup>
	48	1.00 $\pm$ 0.04 <sup>m</sup>	0.50 $\pm$ 0.02 <sup>n</sup>	1.12 $\pm$ 0.37 <sup>n</sup>	1.08 $\pm$ 0.26 <sup>mn</sup>	0.66 $\pm$ 0.42 <sup>m</sup>
IMD mRNA 相对表达量 Relative expression level of IMD mRNA	0	0.56 $\pm$ 0.12 <sup>am</sup>	1.00 $\pm$ 0.06 <sup>bm</sup>	1.14 $\pm$ 0.38 <sup>bm</sup>	1.29 $\pm$ 0.18 <sup>bmn</sup>	1.17 $\pm$ 0.16 <sup>bm</sup>
	6	2.75 $\pm$ 0.59 <sup>an</sup>	15.53 $\pm$ 0.47 <sup>cn</sup>	5.20 $\pm$ 0.37 <sup>bn</sup>	1.28 $\pm$ 0.65 <sup>amn</sup>	1.67 $\pm$ 1.11 <sup>am</sup>
	12	3.62 $\pm$ 1.84 <sup>bn</sup>	14.86 $\pm$ 1.05 <sup>cn</sup>	1.24 $\pm$ 0.17 <sup>bm</sup>	0.21 $\pm$ 0.16 <sup>am</sup>	1.42 $\pm$ 0.59 <sup>bm</sup>
	24	3.85 $\pm$ 0.36 <sup>an</sup>	16.81 $\pm$ 0.40 <sup>cn</sup>	20.59 $\pm$ 4.89 <sup>co</sup>	11.93 $\pm$ 2.18 <sup>bo</sup>	11.00 $\pm$ 2.31 <sup>bo</sup>
	36	1.24 $\pm$ 0.55 <sup>abmn</sup>	1.01 $\pm$ 0.09 <sup>bm</sup>	0.33 $\pm$ 0.20 <sup>am</sup>	0.62 $\pm$ 0.25 <sup>abm</sup>	1.80 $\pm$ 1.31 <sup>abm</sup>
	42	10.61 $\pm$ 1.23 <sup>bo</sup>	25.27 $\pm$ 5.61 <sup>co</sup>	13.21 $\pm$ 4.16 <sup>bno</sup>	5.83 $\pm$ 2.98 <sup>ano</sup>	4.49 $\pm$ 2.17 <sup>an</sup>
	48	1.03 $\pm$ 0.77 <sup>amn</sup>	5.85 $\pm$ 0.90 <sup>bm</sup>	6.46 $\pm$ 2.09 <sup>bn</sup>	1.41 $\pm$ 0.58 <sup>an</sup>	1.53 $\pm$ 0.97 <sup>am</sup>
溶菌酶 mRNA 相对表达量 Relative expression level of Lysozyme mRNA	0	0.72 $\pm$ 0.20 <sup>m</sup>	0.68 $\pm$ 0.01 <sup>m</sup>	1.06 $\pm$ 0.27 <sup>m</sup>	1.36 $\pm$ 0.77 <sup>m</sup>	1.49 $\pm$ 0.89 <sup>mn</sup>
	6	1.15 $\pm$ 0.45 <sup>amn</sup>	2.53 $\pm$ 0.25 <sup>abn</sup>	4.80 $\pm$ 1.30 <sup>bn</sup>	1.33 $\pm$ 0.72 <sup>am</sup>	1.29 $\pm$ 0.59 <sup>amn</sup>
	12	1.98 $\pm$ 0.53 <sup>an</sup>	2.81 $\pm$ 0.32 <sup>an</sup>	12.93 $\pm$ 1.65 <sup>bo</sup>	1.32 $\pm$ 0.71 <sup>am</sup>	1.39 $\pm$ 0.58 <sup>amn</sup>
	24	7.50 $\pm$ 0.01 <sup>ap</sup>	12.82 $\pm$ 1.91 <sup>bp</sup>	33.12 $\pm$ 11.24 <sup>cp</sup>	21.60 $\pm$ 8.73 <sup>bco</sup>	17.84 $\pm$ 3.72 <sup>bco</sup>
	36	0.37 $\pm$ 0.11 <sup>am</sup>	2.46 $\pm$ 0.19 <sup>bn</sup>	3.44 $\pm$ 1.04 <sup>bn</sup>	2.59 $\pm$ 1.08 <sup>abmn</sup>	1.38 $\pm$ 0.81 <sup>abmn</sup>
	42	4.16 $\pm$ 0.67 <sup>abo</sup>	3.19 $\pm$ 0.28 <sup>ao</sup>	3.75 $\pm$ 1.13 <sup>an</sup>	3.86 $\pm$ 0.20 <sup>abn</sup>	5.91 $\pm$ 0.36 <sup>bn</sup>
	48	0.83 $\pm$ 0.14 <sup>bmn</sup>	1.16 $\pm$ 0.04 <sup>bm</sup>	0.90 $\pm$ 0.14 <sup>bn</sup>	1.24 $\pm$ 0.56 <sup>bm</sup>	0.23 $\pm$ 0.13 <sup>am</sup>

注:上标不同字母 a, b, c 表示同一时间点上不同组差异显著 ( $P < 0.5$ ); 不同上标字母 m, n, o, p 表示同一组同一基因不同时间点上差异显著 ( $P < 0.5$ )

Notes: Data with different letters (a, b, c) were significantly different among the different groups at the same time point ( $P < 0.5$ ); data with different letters (m, n, o, p) were significantly different among the different time point of the same gene in the same group ( $P < 0.5$ )

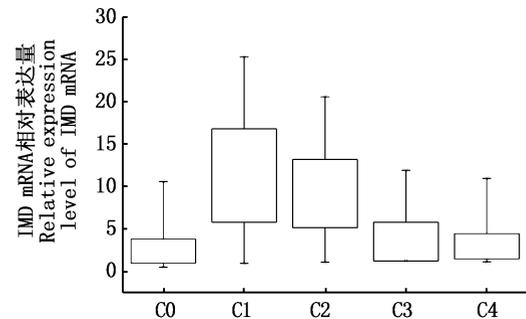


黑色箱体表示恢复到感染前水平, 空白箱体表示未恢复到感染前水平。引线上下顶点表示极值

The black box indicates that the return to pre-infection level, the white box indicates unrecovered pre-infection level. The upper and lower vertices of the lead represent extreme values

图 1 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后 48 h 内鳃组织中 Toll 受体基因相对表达量变化图

Fig. 1 Candlestick charts on changes in relative expression level of Toll receptor gene in gill of white shrimp *L. vannamei* experienced acute *V. parahaemolyticus* challenge for 48 h

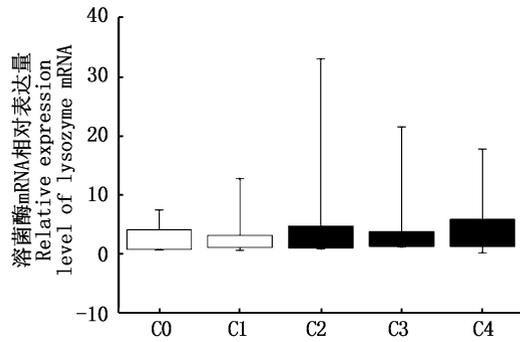


黑色箱体表示恢复到感染前水平, 空白箱体表示未恢复到感染前水平。引线上下顶点表示极值

The black box indicates that the return to pre-infection level, the white box indicates unrecovered pre-infection level. The upper and lower vertices of the lead represent extreme values

图 2 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后 48 h 内鳃组织中 IMD 基因相对表达量变化图

Fig. 2 Candlestick charts of changes in relative expression level of IMD gene in gill of white shrimp *L. vannamei* experienced acute *V. parahaemolyticus* challenge for 48 h



黑色箱体表示恢复到感染前水平,空白箱体表示未恢复到感染前水平。引线上下顶点表示极值

The black box indicates that the return to pre-infection level, the white box indicates unrecovered pre-infection level. The upper and lower vertices of the lead represent extreme values

图3 凡纳滨对虾感染副溶血弧菌后48 h内鳃组织中溶菌酶基因相对表达量变化图

Fig. 3 Candlestick charts of changes in relative expression level of lysozyme gene in gill of white shrimp *L. vannamei* experienced acute *V. parahaemolyticus* challenge for 48 h

## 2.2 对凡纳滨对虾抗低溶解氧胁迫能力的影响

由表4可知,饲料胆固醇含量对凡纳滨对虾急性溶解氧胁迫下的耗氧量和致死溶氧浓度均无显著性影响( $P > 0.05$ )。

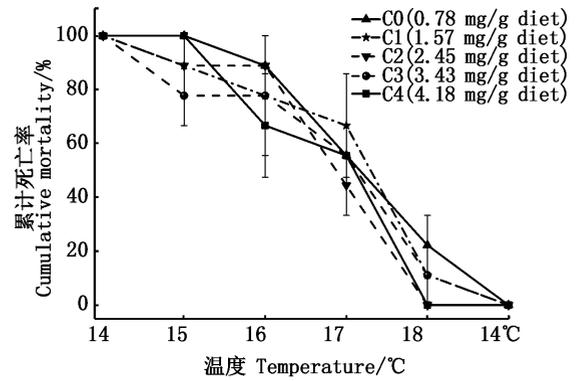
表4 饲料胆固醇含量对凡纳滨对虾耐低溶解氧胁迫能力的影响(Means  $\pm$  SE,  $n = 3$ )

Tab. 4 Effects of dietary cholesterol content on the hypoxia tolerance of white shrimp *L. vannamei* % , dry matter

组别 Treatments	耗氧量 Oxygen consumption/ (mg/g)	致死溶氧浓度 Lethal dissolved oxygen concentration/ (mg/L)
C0(0.78 mg/g diet)	0.87 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.04
C1(1.57 mg/g diet)	1.06 $\pm$ 0.11	0.16 $\pm$ 0.01
C2(2.45 mg/g diet)	0.92 $\pm$ 0.09	0.18 $\pm$ 0.02
C3(3.43 mg/g diet)	0.84 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.02
C4(4.18 mg/g diet)	0.91 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.02

## 2.3 对凡纳滨对虾抗低温胁迫能力的影响

在急性程序降温胁迫下:当温度降低到18  $^{\circ}$ C时,C0组表现出最大的死亡率,而C2和C4组无死亡对虾;当温度降低到17  $^{\circ}$ C时,C2组表现出最小的累积死亡率;当温度降低到15  $^{\circ}$ C时,C3组表现出最小的累积死亡率,而C0和C4组累计死亡率达到100%;当温度降低到14  $^{\circ}$ C时,所有实验组对虾均达到100%死亡(图4)。



黑色箱体表示恢复到感染前水平,空白箱体表示未恢复到感染前水平。引线上下顶点表示极值

The black box indicates that the return to pre-infection level, the white box indicates unrecovered pre-infection level. The upper and lower vertices of the lead represent extreme values

图4 急性程序降温下摄食不同胆固醇含量饲料的凡纳滨对虾累计死亡率曲线( $n = 3$ )

Fig. 4 The cumulative mortality curves of white shrimp *L. vannamei*, fed different cholesterol content diets, under acute process cooling stress

## 3 讨论

### 3.1 对凡纳滨对虾急性弧菌感染进程中免疫相关基因表达量的影响

营养素水平可以影响感染后对虾机体免疫相关基因表达量。罗词兴等<sup>[8]</sup>认为饲料中添加酵母提取物可以提高弧菌感染后凡纳滨对虾鳃组织中 *Toll* 受体 mRNA、*IMD* mRNA 和溶菌酶 mRNA 表达量的峰值。赵利斌等<sup>[9]</sup>研究发现饲料中花生四烯酸含量也影响弧菌感染后 *Toll* 受体 mRNA、*IMD* mRNA 和溶菌酶 mRNA 表达量的峰值。本研究发现饲料胆固醇含量显著影响弧菌急性感染后凡纳滨对虾鳃组织中 *Toll* 受体、*IMD* 和溶菌酶 mRNA 表达量。感染后 C2 组对虾 *Toll* 受体 mRNA 和溶菌酶 mRNA 表达量峰值大于其他组( $P < 0.05$ );而 *IMD* mRNA 表达量峰值在 C1 组最大,其次为 C2 组。并且, *Toll* 受体 mRNA 和溶菌酶 mRNA 表达量峰值均出现在 24 h,而 *IMD* mRNA 表达量峰值出现时间随饲料胆固醇含量的增加而提前。因此,胆固醇可以上调弧菌感染后免疫相关基因的表达量峰值,但不影响 *Toll* 受体和 *IMD* mRNA 表达量峰值的上调时间。有研究<sup>[23]</sup>表明胆固醇可以增强小鼠细胞中髓样分化因子(MyD88)和泛素连接酶(TrAF6)

的募集,而 MyD88 和 TRAF6 可以促进 *Toll* 受体和 *IMD* 信号传导,刺激免疫效应因子的产生和释放。凡纳滨对虾肝胰腺和肌肉中的胆固醇沉积水平与饲料中胆固醇含量呈正相关<sup>[20]</sup>。推测细胞膜中胆固醇增加,通过 MyD88 和 TRAF6 的募集调控 *Toll* 受体和 *IMD* mRNA 的表达,并通过信号级联反应刺激溶菌酶基因表达。然而,过高的胆固醇水平导致病菌感染后 *Toll* 受体 mRNA、*IMD* mRNA 和溶菌酶 mRNA 表达量峰值降低的机理尚不清楚。

评判机体免疫机能是否改善,不单要看某些免疫指标的水平,更要看感染进程中免疫指标的变化情况。细菌感染进程中免疫相关基因表达量的上调时刻和变化幅度可以表征机体免疫的灵敏性和平衡性<sup>[7-9]</sup>。黄旭雄等<sup>[7]</sup>研究发现饲料中添加酵母提取物可以提高人工感染溶藻弧菌后免疫相关基因的灵敏性,但不影响 *Toll* 受体 mRNA 的平衡性。赵利斌等<sup>[9]</sup>研究表明饲料中花生四烯酸水平为 0.56 mg/g(鱼油组)和 1.44 mg/g(植物油组)时,免疫相关基因表达量具有较好的免疫灵敏性。在本研究中,C2 组 *Toll* 受体和溶菌酶 mRNA 表达量变化幅度最大,而 *IMD* mRNA 表达量变化幅度最大的是 C1 组,其次为 C2 组,表明在相同剂量弧菌感染下,饲料胆固醇含量影响凡纳滨对虾免疫反应的灵敏性。

本研究中,C2 组(2.45 g/kg diet)对虾表现出最大的免疫灵敏性和较好的免疫平衡性,这与前期王鑫磊等<sup>[19]</sup>研究结果相吻合。王鑫磊等<sup>[20]</sup>发现在淡水养殖条件下,生产性饲料中 2.45 g/kg 饲料的胆固醇含量可获得最佳的抗弧菌能力。

### 3.2 对凡纳滨对虾抗低温胁迫能力的影响

温度是影响鱼虾生存的重要理化因子,水温的急剧变化会引起水生动物机体生理性变化。低温可以通过抑制机体免疫系统和干扰生理过程影响对虾的健康<sup>[24]</sup>。在急性程序降温胁迫下,C0 和 C4 组对虾 100% 死亡的温度为 15 °C,而 C1、C2 和 C3 组对虾 100% 死亡的温度为 14 °C,表明饲料中胆固醇含量过低或过高均会影响凡纳滨对虾的抗低温胁迫能力,其机理推测可能与胆固醇在细胞膜中与磷脂的相互作用有关。在动物细胞中,胆固醇对细胞膜的流动性起到了重要的调节作用,一方面胆固醇分子与磷脂分子相结合限制了磷脂分子的热运动,另一方面胆固醇

又将磷脂分子相隔开使其更易流动<sup>[25]</sup>。在较低温下细胞膜中磷脂分子运动较弱时,胆固醇可以提高细胞膜的流动性;在较高温度下细胞膜磷脂分子运动较强时,胆固醇可以降低膜的流动性,使细胞膜在很大温度范围内保持相对稳定的半流动状态<sup>[26]</sup>。一般认为机体抗低温性能与细胞膜的流动性密切相关,低温下保持细胞膜的流动性是发挥细胞正常生理功能的基础。IRVINE 等<sup>[27]</sup>研究表明饲料中添加胆固醇可以提高金鱼的耐高温和低温能力,并且耐温性能的提高与组织中胆固醇含量的增加有关。

### 3.3 对凡纳滨对虾抗急性低溶解氧胁迫能力的影响

低溶解氧环境会影响水生动物的摄食、生长、发育、繁殖等方面<sup>[28]</sup>。有关饲料胆固醇与水生动物抗低氧胁迫能力的研究未见报道。对哺乳动物红细胞氧合作用的研究发现,红细胞中血浆膜胆固醇含量与红细胞氧气的摄入和释放能呈正相关<sup>[29-30]</sup>,表明胆固醇会影响脊椎动物的耐低氧能力。然而,本研究中饲料中胆固醇含量并未影响凡纳滨对虾抗低氧胁迫能力,一方面可能是对虾具有不同的氧合作用机制,对虾通过血蓝蛋白而不是血红细胞进行氧的运输,另一方面可能与低氧胁迫试验的设置强度有关。

综上所述,在淡水养殖条件下,饲料中胆固醇含量为 2.45 mg/g 时可以提高凡纳滨对虾免疫灵敏性,而胆固醇含量在 1.57 ~ 3.43 mg/g 时凡纳滨对虾表现出较好的低温胁迫能力。

### 参考文献:

- [1] VAZQUEZ L, ALPUCHE J, MALDONADO G, et al. Review: immunity mechanisms in crustaceans[J]. *Innate Immunity*, 2009, 15(3): 179-188.
- [2] CAMPOVERDE C, MILNE D J, ESTEVEZ A, et al. Ontogeny and modulation after PAMPs stimulation of  $\beta$ -defensin, hepcidin, and piscidin antimicrobial peptides in meagre (*Argyrosomus regius*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 69: 200-210.
- [3] RAUTA P R, SAMANTA M, DASH H R, et al. Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: signaling pathways, expressions and immune responses[J]. *Immunology Letters*, 2014, 158(1/2): 14-24.
- [4] GEORGE P, NAITZA S, KAPPLER C, et al. *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis[J]. *Developmental Cell*, 2001, 1(4): 503-514.

- [5] SAURABH S, SAHOO P K. Lysozyme; an important defence molecule of fish innate immune system [J]. *Aquaculture Research*, 2008, 39(3): 223-239.
- [6] 黄旭雄, 周洪琪. 甲壳动物免疫机能的衡量指标及科学评价[J]. *海洋科学*, 2007, 31(7): 90-96.  
HUANG X X, ZHOU H Q. The parameters reflecting immune state of crustacea and its scientific evaluation [J]. *Marine Sciences*, 2007, 31(7): 90-96.
- [7] 黄旭雄, 罗词兴, 危立坤, 等. 饲料中添加酵母提取物对凡纳滨对虾免疫相关基因表达及抗菌机能的影响[J]. *水产学报*, 2014, 38(12): 2049-2058.  
HUANG X X, LUO C X, WEI L K, et al. Effects of dietary yeast extract supplementation on the immune-related gene expressions and vibrio-resistant ability in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(12): 2049-2058.
- [8] 罗词兴, 黄旭雄, 李桑, 等. 溶藻弧菌感染后凡纳滨对虾鳃组织免疫相关基因的表达[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(1): 189-196.  
LUO C X, HUANG X X, LI S, et al. Expressions of Toll receptor, IMD and lysozyme mRNA in the gills of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after acute challenge with *Vibrio alginolyticus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(1): 189-196.
- [9] 赵利斌, 王鑫磊, 黄旭雄, 等. 饲料中花生四烯酸水平对凡纳滨对虾免疫相关基因表达及抗菌能力的影响[J]. *水产学报*, 2016, 40(5): 763-775.  
ZHAO L B, WANG X L, HUANG X X, et al. Effects of dietary arachidonic acid on the immune-related gene expressions and Vibrio-resistant ability in *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(5): 763-775.
- [10] SIMONS K, IKONEN E. How cells handle cholesterol [J]. *Science*, 2000, 290(5497): 1721-1726.
- [11] D'ABRAMO L R, SHEEN S S. Nutritional requirements, feed formulation, and feeding practices for intensive culture of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Reviews in Fisheries Science*, 1994, 2(1): 1-21.
- [12] SHEEN S S. Dietary cholesterol requirement of juvenile mud crab *Scylla serrata* [J]. *Aquaculture*, 2000, 189(3/4): 277-285.
- [13] GONG H, JIANG D H, LIGHTNER D V, et al. A dietary modification approach to improve the osmoregulatory capacity of *Litopenaeus vannamei* cultured in the Arizona desert [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2004, 10(4): 227-236.
- [14] GONG H, LAWRENCE A L, JIANG D H, et al. Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei*: I. dietary cholesterol and de-oiled soy lecithin requirements and their interaction [J]. *Aquaculture*, 2000, 190(3/4): 305-324.
- [15] GONG H, LAWRENCE A L, JIANG D H, et al. Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei*: II. active components of soybean lecithin [J]. *Aquaculture*, 2000, 190(3/4): 325-342.
- [16] MORRIS T C, SAMOCHA T M, DAVIS D A, et al. Cholesterol supplements for *Litopenaeus vannamei* reared on plant based diets in the presence of natural productivity [J]. *Aquaculture*, 2011, 314(1/4): 140-144.
- [17] DUERR E O, WALSH W A. Evaluation of cholesterol additions to a soyabean meal-based diet for juvenile Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in an outdoor growth trial [J]. *Aquaculture Nutrition*, 1996, 2(2): 111-116.
- [18] GUO J P, GUO B Y, ZHANG H L, et al. Effects of nucleotides on growth performance, immune response, disease resistance and intestinal morphology in shrimp *Litopenaeus vannamei* fed with a low fish meal diet [J]. *Aquaculture International*, 2016, 24(4): 1007-1023.
- [19] XIA Z Q, WU S J. Effects of glutathione on the survival, growth performance and non-specific immunity of white shrimps (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 73: 141-144.
- [20] 王鑫磊, 李航, 黄旭雄, 等. 饲料中胆固醇含量对淡水养殖凡纳滨对虾生长性能、抗弧菌和抗亚硝态氮胁迫能力的影响[J]. *动物营养学报*, 2016, 28(8): 2639-2649.  
WANG X L, LI H, HUANG X X, et al. Effects of dietary cholesterol content on growth performance, Vibrio and Nitrite Nitrogen stress resistant abilities of *Litopenaeus vannamei* cultured in freshwater [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2016, 28(8): 2639-2649.
- [21] 许友卿, 郑一民, 丁兆坤. 冷应激对水生动物代谢的影响及调控研究进展 [J]. *中国水产科学*, 2017, 24(5): 1149-1159.  
XU Y Q, ZHENG Y M, DING Z K. Research progress on the effects, mechanisms, and control of cold stress in aquatic animals [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(5): 1149-1159.
- [22] WYBAN J, WALSH W A, GODIN D M. Temperature effects on growth, feeding rate and feed conversion of the Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) [J]. *Aquaculture*, 1995, 138(1/4): 267-279.
- [23] ITO A, HONG C, OKA K, et al. Cholesterol accumulation in CD11c<sup>+</sup> immune cells is a causal and targetable factor in autoimmune disease [J]. *Immunity*, 2016, 45(6): 1311-1326.
- [24] ZHOU M, WANG A L, XIAN J A. Variation of free amino acid and carbohydrate concentrations in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Effects of continuous cold stress [J]. *Aquaculture*, 2011, 317(1/4): 182-186.
- [25] 尉青. 胆固醇在细胞膜中的作用 [J]. *生物学通报*, 2015, 50(3): 25-27.  
WEI Q. The role of cholesterol in the cell membrane [J]. *Bulletin of Biology*, 2015, 50(3): 25-27.
- [26] 王冰. 胆固醇对生物膜流动性的影响 [J]. *广西医科大学学报*, 1997, 14(1): 34-37.

- WANG B. The effect of cholesterol on the biomembrane fluidity[J]. Journal of Guangxi Medical University, 1997, 14(1): 34-37.
- [27] IRVINE D G, NEWMAN K, HOAR W S. Effects of dietary phospholipid and cholesterol on the temperature resistance of goldfish[J]. Canadian Journal of Zoology, 1957, 35(6): 691-709.
- [28] 徐贺, 陈秀梅, 王桂芹, 等. 低氧胁迫在水产养殖中的研究进展[J]. 饲料工业, 2016, 37(2): 33-37.
- XU H, CHEN X M, WANG G Q, et al. Research progress of hypoxia on aquaculture[J]. Feed Industry, 2016, 37(2): 33-37.
- [29] STEINBACH J H, BLACKSHEAR P L JR, VARCO R L, et al. High blood cholesterol reduces in vitro blood oxygen delivery[J]. Journal of Surgical Research, 1974, 16(2): 134-139.
- [30] MENCHACA H J, MICHALEK V N, ROHDE T D, et al. Decreased blood oxygen diffusion in hypercholesterolemia [J]. Surgery, 1998, 124(4): 692-698.

## Effects of dietary cholesterol content on immune related genes and resistances to low temperature and low dissolved oxygen stress in white shrimp *Litopenaeus vannamei*

YAN Minglei<sup>1</sup>, WANG Xinlei<sup>1</sup>, HUANG Xuxiong<sup>1,2,3</sup>, LI Songlin<sup>1</sup>, WANG Yi<sup>1</sup>, JIANG Detian<sup>1</sup>, LI Laiqiang<sup>1</sup>

(1. Center for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai 201306, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** An 8 weeks feeding trial was carried out to investigate the effects of dietary cholesterol content on the immune related genes and resistances to low temperature and low dissolved oxygen stress in white shrimp *Litopenaeus vannamei* cultured in freshwater. Five isonitrogenous and isoenergetic experimental diets (C0, C1, C2, C3, C4) were prepared to feed shrimps with initial average mass of (0.14 ± 0.03) g and the measured cholesterol content of experimental diets was 0.78, 1.57, 2.45, 3.43 and 4.18 mg/g diet, respectively. The immune related genes (*Toll* receptor, *IMD*, and lysozyme) expressions before and after *Vibrio parahaemolyticus* infection, cumulative mortalities of the shrimp experienced acute low temperature and low dissolved oxygen stresses were detected. The results indicated that dietary cholesterol significantly affected the changes in expression levels of *Toll* receptor, *IMD* and lysozyme mRNAs of the shrimp experienced *Vibrio* challenge. During the 48 h after infection, the shrimp in C2 treatment displayed the largest variations in *Toll* receptor and lysozyme mRNAs expressions while the shrimp in C1 treatment displayed the largest variation in *IMD* mRNA expression, followed by shrimp in C2. All the treatments had the peaks of expressions of *Toll* receptor and lysozyme mRNAs at 24 h post infection. The shrimp in C2, C3 and C4 treatments displayed the peaks of *IMD* mRNA expression at 24 h post infection, while 42 h post infection for C0 and C1 treatments. Under the acute process cooling stress, the shrimp in C0 and C4 treatments displayed 100% mortality at 15 °C while the shrimp in C1, C2 and C3 treatments displayed 100% mortality at 14 °C. There was no significant difference in oxygen consumption and lethal dissolved oxygen concentration between the groups under acute low dissolved oxygen stress. It is therefore suggested that dietary cholesterol of 2.45 mg/g could improve the immune sensitivity of *L. vannamei* cultured in freshwater, and the shrimp fed diet containing 1.57 – 3.43 mg/g cholesterol displays better resistance to low temperature stress.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; cholesterol; immune related gene expression; vibrio; low temperature; low dissolved oxygen