



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

葡萄籽缩合单宁及其单体的体外抗氧化与免疫作用及其
对凡纳滨对虾的饲喂效果研究

RESEARCH ON THE ANTIOXIDANT AND IMMUNE
EFFECTS OF GRAPE SEED CONDENSED TANNINS AND
THEIR MONOMERS *IN VITRO* AND THEIR FEEDING
EFFECTS ON *LITOPENAEUS VANNAMEI*

研究生：邱建强

CANDIDATE: QIU JIANQIANG

学号：2022308120058

STUDENT NO.:

学位类别：农业硕士

DEGREE TYPE: MASTER OF AGRICULTURE

导师：彭凯 研究员

SUPERVISOR: RESEARCHER PENG KAI

中国 武汉

WUHAN, CHINA

二〇二四年六月

JUNE, 2024

华中农业大学硕士学位论文

葡萄籽缩合单宁及其单体的体外抗氧化与免疫作用及其 对凡纳滨对虾的饲喂效果研究

Research on the antioxidant and immune effects of grape seed
condensed tannins and their monomers *in vitro* and their
feeding effects on *Litopenaeus vannamei*

硕士研究生：邱建强

学号：2022308120058

指导教师：彭凯 研究员

学位类型：农业硕士

领域：渔业发展

华中农业大学水产学院

中国 武汉

College of Fisheries, Huazhong Agricultural University

Wuhan, China

目 录

第一章 文献综述	1
1 缩合单宁的概述	1
1.1 来源	1
1.2 化学结构	3
2 缩合单宁及其单体的抗氧化与免疫活性	5
2.1 抗氧化活性	5
2.2 免疫活性	5
3 缩合单宁及其单体的饲用研究进展	6
3.1 缓解氧化应激	6
3.2 维护肠道健康	6
4 研究目的与意义	7
5 技术路线	8
第二章 凡纳滨对虾肠道细胞的提取与 H ₂ O ₂ 氧化应激模型构建	9
1 前言	9
2 材料与方法	9
2.1 试验材料	9
2.2 试验试剂与仪器	9
2.3 凡纳滨对虾肠道细胞的提取与培养	11
2.4 凡纳滨对虾肠道细胞 H ₂ O ₂ 氧化应激模型构建	11
2.5 数据处理与分析	12
3 结果与分析	12
3.1 凡纳滨对虾肠道细胞的提取与培养效果	12
3.2 H ₂ O ₂ 浓度及作用时间对凡纳滨对虾肠道细胞存活率的影响	16
4 讨论	17
4.1 提取与培养方法对凡纳滨对虾肠道细胞状态的影响	17
4.2 H ₂ O ₂ 浓度及作用时间对凡纳滨对虾肠道细胞存活率的影响	18
5 小结	19
第三章 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞的抗氧化与免疫作用研究	20
1 前言	20
2 材料与方法	20
2.1 试验材料	20
2.2 试验试剂与仪器	21
2.3 缩合单宁及其单体适宜作用浓度的筛选	21

2.4 试验设计	22
2.5 指标分析	22
2.6 数据处理与分析	25
3 结果与分析	25
3.1 缩合单宁及其单体的适宜作用浓度	25
3.2 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞形态指标的影响	26
3.3 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞凋亡指标的影响	28
3.4 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞抗氧化指标的影响	32
3.5 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞免疫指标的影响	39
4 讨论	41
4.1 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞形态与凋亡指标的影响	41
4.2 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞抗氧化指标的影响	41
4.3 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞免疫指标的影响	42
5 小结	43
第四章 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾生长、抗氧化与免疫力及肠道健康的影响	44
1 前言	44
2 材料与方法	44
2.1 试验饲料配制	44
2.2 试验设计与饲养管理	46
2.3 样品采集与分析	46
2.4 数据处理与分析	49
3 结果与分析	49
3.1 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾生长性能的影响	49
3.2 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾血浆代谢物的影响	50
3.3 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾血浆抗氧化与免疫指标的影响	51
3.4 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化指标的影响	52
3.5 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道抗氧化与免疫指标的影响	53
3.6 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道菌群的影响	57
3.7 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道短链脂肪酸含量的影响	61
4 讨论	62
4.1 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾生长性能的影响	62

4.2 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾血浆代谢物的影响	63
4.3 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾血浆抗氧化与免疫指标的影响	63
4.4 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化指标的影响 .	64
4.5 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道抗氧化与免疫指标的影响	65
4.6 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道菌群的影响	65
4.7 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道短链脂肪酸含量的影响	66
5 小结.....	67
第五章 全文总结	68
参考文献.....	69

摘要

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 是我国养殖产量最高的虾类品种。目前集约化养殖模式导致凡纳滨对虾受到环境、饲料、病害等方面压力增加, 容易出现氧化应激甚至死亡情况。缩合单宁是具有较强抗氧化活性的天然多酚类聚合物, 其单体组成包括儿茶素、表儿茶素、没食子儿茶素、表没食子儿茶素。研究表明, 缩合单宁可显著提高凡纳滨对虾的抗氧化能力, 但其作用机理尚不完全清楚。本研究基于凡纳滨对虾体外肠道细胞 H_2O_2 氧化应激模型及体内饲养试验, 研究葡萄籽缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾的抗氧化与免疫作用, 为开发具有重大应用价值的饲用缩合单宁资源提供理论依据。

1. 凡纳滨对虾肠道细胞 H_2O_2 氧化应激模型的构建

本试验通过构建凡纳滨对虾肠道细胞提取与培养方法, 选用浓度为 0、200、400、600、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 作用肠道细胞 2、4、6、8、10、12 h, 以细胞存活率为评价指标, 筛选 H_2O_2 适宜作用浓度与时间。结果表明: 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用凡纳滨对虾肠道细胞 10 h 为适宜氧化应激条件, 此时细胞存活率为 $(63.26 \pm 0.47)\%$ 。

2. 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞的抗氧化与免疫作用研究

基于已构建的凡纳滨对虾肠道细胞 H_2O_2 氧化应激模型, 选用浓度为 0、200、400、600、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的葡萄籽缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素作用肠道细胞 24 h, 以细胞活性为评价指标, 筛选缩合单宁及其单体的适宜作用浓度。将肠道细胞分为 6 组, 即对照组、 H_2O_2 组、缩合单宁组、儿茶素组、表儿茶素组、表没食子儿茶素组 (H_2O_2 氧化应激后分别添加缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素)。通过测定细胞形态与凋亡指标、抗氧化指标与免疫指标, 比较缩合单宁及其单体的体外抗氧化与免疫作用差异。结果表明: 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾体外肠道细胞的适宜作用浓度为 800 $\mu\text{mol/L}$ 。缩合单宁及其单体可通过抑制细胞凋亡 (降低 LDH 活性与 MPTP 开放程度以及下调促凋亡蛋白 *Bax*、*Caspase-3* 的 mRNA 相对表达量)、增强抗氧化能力 (降低 ROS 水平与上调 Nrf2 信号通路相关抗氧化酶 *HO-1*、*NQO1*、*CAT*、*SOD*、*GSH-Px* 的 mRNA 相对表达量)、降低细胞炎症反应 (下调促炎性细胞因子 *IL-1\beta*、*IL-6*、*TNF-\alpha* 的 mRNA 相对表达量), 从而有效缓解 H_2O_2 诱导的凡纳滨对虾肠道细胞氧化损伤。以 LDH 活性、ROS 水平、抗氧化酶 (*CAT*、*GSH-Px*、*NQO1*) 的 mRNA 相对表达量为评价指标, 缩合单宁、

表没食子儿茶素的抗氧化损伤作用效果要优于儿茶素、表儿茶素。以细胞凋亡基因（*Bax*、*Caspase-3*）、促炎性细胞因子（*IL-1β*、*IL-6*、*TNF-α*）的 mRNA 相对表达量为评价指标，表儿茶素的抗氧化损伤作用效果要优于缩合单宁、儿茶素、表没食子儿茶素。

3. 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾生长、抗氧化与免疫力及肠道健康的影响

选取初始体重为 0.80 ± 0.01 g 的凡纳滨对虾 800 尾，随机分为 5 组，每组设置 4 个重复，每一重复 40 尾虾，分别投喂基础饲料、缩合单宁饲料、儿茶素饲料、表儿茶素饲料、表没食子儿茶素饲料，饲养周期为 45 d。结果表明：饲料中添加 0.2% 的缩合单宁及其单体对生长性能无显著影响。表儿茶素、表没食子儿茶素分别显著升高血浆 AST、ALT 活性。表儿茶素显著升高血浆 T-AOC 与 AKP 活性，表没食子儿茶素显著升高血浆 CAT 活性而降低血浆 MDA 含量。各组肝胰腺 T-AOC 无显著差异，但缩合单宁及其单体可促进肝胰腺抗氧化相关酶 *SOD*、*GSH-Px* 的 mRNA 相对表达量。以肠道抗氧化与免疫能力指标（T-AOC 与 *Nrf2*、*CAT*、*IL-1β*、*TNF-α* 的 mRNA 相对表达量）为评价指标，表儿茶素对凡纳滨对虾作用效果最好。缩合单宁及其单体对肠道细菌菌群 alpha 多样性指数 ace、chao、shannon、simpson 无显著影响。在门水平上，变形菌门（*Proteobacteria*）、放线菌门（*Actinobacteria*）、软壁菌门（*Tenericutes*）是肠道细菌菌群的主要菌门。在属水平上，红细菌属（*Rhodobacter*）、希瓦氏菌属（*Shewanella*）、微杆菌属（*Microbacterium*）是肠道细菌菌群的主要菌属。通过对肠道细菌菌群门、属的相对丰度进行分析发现，表儿茶素组绿弯菌门（*Chloroflexi*）相对丰度显著升高。缩合单宁及其单体对肠道短链脂肪酸乙酸、丙酸、异丁酸、己酸的含量均无显著影响。饲料中添加 0.2% 的缩合单宁及其单体不影响凡纳滨对虾的生长性能、肠道通透性、细菌菌群组成与短链脂肪酸含量，表儿茶素、表没食子儿茶素可能对肝胰腺造成轻微损伤。以血浆与肠道抗氧化与免疫能力为综合评价依据，表儿茶素对凡纳滨对虾的饲喂效果最好。

关键词：缩合单宁；儿茶素类单体；凡纳滨对虾；氧化损伤；抗氧化与免疫；肠道健康

Abstract

Litopenaeus vannamei, commonly known as Pacific white shrimp, is the most extensively farmed shrimp species in China. However, the intensive farming practices have led to increased stress on *L. vannamei* in terms of environment, feed, and diseases, making them prone to oxidative stress and even mortality. Condensed tannins are natural polyphenolic polymers with strong antioxidant activity. Their monomer composition includes catechin, epicatechin, gallic acid, and epigallocatechin. According to relevant research reports, condensed tannins could significantly improve the antioxidant capacity of *L. vannamei*, but their antioxidant mechanism were not fully understood. Based on the *in vitro* intestinal cell H₂O₂ oxidative stress model and *in vivo* feeding experiments of *L. vannamei*, this study investigated the antioxidant and immune mechanism of grape seed condensed tannins and their monomers on *L. vannamei*, providing a theoretical basis for the development of feed-grade condensed tannins resources with significant application value.

1. Construction of H₂O₂ oxidative stress model in intestinal cells of *L. vannamei*

This experiment constructed a method for extracting and culturing intestinal cells from *L. vannamei*, and selected H₂O₂ with concentrations of 0, 200, 400, 600, 800, and 1000 μmol/L to treat intestinal cells for 2, 4, 6, 8, 10, and 12 h. The cell survival rate was used as the evaluation index to screen the appropriate concentration and time of H₂O₂ treatment. The results showed that 600 μmol/L H₂O₂ treatment of *L. vannamei* intestinal cells for 10 h was the appropriate oxidative stress condition, with a cell survival rate of (63.26 ± 0.47) %.

2. Study on the antioxidant and immune effects of condensed tannins and their monomers on the intestinal cells of *L. vannamei*.

This experiment was based on the established model of H₂O₂ oxidative stress in the intestinal cells of *L. vannamei*. Grape seed condensed tannins, catechin, epicatechin, and epigallocatechin with concentrations of 0, 200, 400, 600, 800, and 1000 μmol/L were selected to treat intestinal cells for 24 h. With cell viability as the evaluation index, the appropriate concentrations of condensed tannins and their monomers were screened. The

intestinal cells were divided into six groups: normal control group, H₂O₂ group, condensed tannins group, catechin group, epicatechin group, and epigallocatechin group (after H₂O₂-induced oxidative stress, groups were treated with condensed tannins, catechin, epicatechin, and epigallocatechin, respectively). By measuring cell morphology and apoptosis indicators, antioxidant indicators, and immune indicators, the differences in antioxidant and immune effects of condensed tannins and their monomers *in vitro* were compared. The results showed that the appropriate concentrations of condensed tannins and their monomers for *L. vannamei* intestinal cells *in vitro* were 800 $\mu\text{mol/L}$. Condensed tannins and their monomers could inhibit apoptosis (reduce LDH activity and MPTP opening, and downregulate the relative expression levels of pro-apoptotic proteins *Bax* and *Caspase-3* mRNA), enhance antioxidant capacity (reduce ROS levels and upregulate the relative expression of antioxidant enzymes *HO-1*, *NQO1*, *CAT*, *SOD*, and *GSH-Px* mRNA related to the *Nrf2* signaling pathway), and reduce cellular inflammatory responses (downregulate the relative expression of pro-inflammatory cytokines *IL-1 β* , *IL-6*, and *TNF- α* mRNA), thereby effectively alleviating H₂O₂-induced oxidative damage in *L. vannamei* intestinal cells. Based on the evaluation indexes of LDH activity, ROS levels, and relative expression level of antioxidant enzymes (*CAT*, *GSH-Px*, *NQO1*) mRNA, condensed tannins and epigallocatechin exhibit superior antioxidant damage protective effects compared to catechin and epicatechin. Based on the evaluation indexes of relative expression level of pro-apoptotic proteins (*Bax*, *Caspase-3*) and pro-inflammatory cytokines (*IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α*) mRNA, epicatechin demonstrates better antioxidant damage protective effects compared to condensed tannins, catechin, and epigallocatechin.

3. The effects of condensed tannins and their monomers on the growth, antioxidation and immunity, and intestinal health of *L. vannamei*.

A total of 800 *L. vannamei* with an initial weight of 0.80 ± 0.01 g were randomly divided into 5 groups. Each group had 4 replicates, with 40 shrimp per replicate. The shrimp were fed with different diets, including the basal diet, condensed tannins diet, catechin diet, epicatechin diet, and epigallocatechin diet. The feeding period was 45 d. The results showed that adding 0.2% condensed tannins and their monomers in the diet

had no significant effect on growth performance. Epicatechin and epigallocatechin significantly increased plasma AST and ALT activities respectively. Epicatechin significantly increased plasma T-AOC and AKP activities, while epigallocatechin significantly increased plasma CAT activity and decreased plasma MDA content. There were no significant differences in T-AOC levels in the hepatopancreas among all groups. However, condensed tannins and their monomers promoted the relative expression levels of antioxidant enzymes *SOD* and *GSH-Px* mRNA in the hepatopancreas. With regard to intestinal antioxidant and immune capacity indexes (T-AOC and relative expression levels of *Nrf2*, *CAT*, *IL-1 β* , *TNF- α* mRNA), epicatechin showed the best effects on *L. vannamei*. Condensed tannins and their monomers had no significant effect on the alpha diversity indexes (ace, chao, shannon, simpson) of the intestinal bacterial flora. At the phylum level, Proteobacteria, Actinobacteria, and Tenericutes were the dominant phyla in the intestinal bacterial flora. At the genus level, *Rhodobacter*, *Shewanella*, and *Microbacterium* were the dominant genera in the intestinal bacterial flora. Analysis of the relative abundance of bacterial phyla and genera in the intestinal bacterial flora revealed a significant increase in the relative abundance of Chloroflexi in the epicatechin group. Condensed tannins and their monomers had no significant effect on the contents of intestinal short-chain fatty acids (acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, caproic acid). Adding 0.2% condensed tannins and their monomers in the diet does not affect the growth performance, intestinal permeability, bacterial flora composition, and short-chain fatty acid contents in *L. vannamei*. Epicatechin and epigallocatechin might cause mild damage to the hepatopancreas. Based on the comprehensive evaluation of plasma and intestinal antioxidant and immune capacity, epicatechin showed the best feeding effects on *L. vannamei*.

Keywords: condensed tannins; catechins monomers; *Litopenaeus vannamei*; oxidative damage; antioxidant and immune; intestinal health

缩略语表

(Abbreviations)

缩略名称 Abbreviated name	英文全称 Full English name	中文全称 Full Chinese name
IBW	Initial body weight	初始体重
FBW	Final body weight	终末体重
WGR	Weight gain rate	增重率
SGR	Specific growth rate	特定生长率
FI	Feed intake	采食量
FC	Feed coefficient	饲料系数
ALB	Albumin	白蛋白
GLB	Globulin	球蛋白
TP	Total protein	总蛋白
BUN	Blood urea nitrogen	尿素氮
GLU	Glucose	葡萄糖
TC	Total cholesterol	总胆固醇
TG	Triacylglycerol	甘油三酯
HDL-C	High-density lipoprotein cholesterol	高密度脂蛋白胆固醇
LDL-C	Low-density lipoprotein cholesterol	低密度脂蛋白胆固醇
AST	Aspartate aminotransferase	谷草转氨酶
ALT	Alanine aminotransferase	谷丙转氨酶
T-AOC	Total antioxidant capacity	总抗氧化能力
CAT	Catalase	过氧化氢酶
SOD	Superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
T-SOD	Total superoxide dismutase	总超氧化物歧化酶
GSH-Px	Glutathione peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
MDA	Malondialdehyde	丙二醛
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	核因子 E2 相关因子 2
IL-1 β	Interleukin-1 β	白细胞介素-1 β
IL-6	Interleukin-6	白细胞介素-6
TNF- α	Tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子- α
LDH	Lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
MPTP	Mitochondrial permeability transition pore	线粒体通透性转换孔
Bax	B-cell lymphoma-2 associated X protein	B 淋巴细胞瘤/白血病-2 相关 X 蛋白
Caspase-3	Caspase-3	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3
HO-1	Heme oxygenase-1	血红素氧合酶-1
NQO1	NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1	醌氧化还原酶 1

续表

IgM	Immunoglobulin M	免疫球蛋白 M
C3	Complement 3	补体 3
AKP	Alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
LZM	Lysozyme	溶菌酶
DAO	Diamine oxidase	二胺氧化酶
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
D-LA	D-lactate	D-乳酸

第一章 文献综述

1 缩合单宁的概述

1.1 来源

单宁是广泛存在于植物界的一类多酚化合物，属于植物次生代谢产物。根据单宁的化学结构组成，可将单宁分为3类，即水解单宁、缩合单宁、褐藻多酚（Huang et al 2018）。其中，缩合单宁为结构复杂的聚合物，具有较强的抗氧化、抗炎、抗菌、抗寄生虫等生物活性。缩合单宁的来源广泛，存在于乔木、灌木、豆科牧草、草本植物、谷物、水果的细胞壁或者叶、花、种子的液泡之中（彭凯等 2020a; 2020b）。缩合单宁的含量受植物物种、生长期、生长部位等多种因素的影响（表 1.1）。

表 1.1 不同植物来源的缩合单宁含量

Table 1.1 Contents of condensed tannins from different plant sources

植物物种 Plant species	生长期 Growth period	生长部位 Growth area	缩合单宁含量 Contents of condensed tannins	参考文献 Reference
乔木				
人心果 <i>Manilkara zapota</i>	花期	叶	184.4 g/kg DM (可提取缩合单宁)	(冯慧玲 2014)
灌木				
胡枝子 <i>Lespedeza bicolor</i>	旺盛生长期	叶	250 g/kg DM (标准物高粱单宁相当量)	(何永生 2019)
	枯黄期	叶	150 g/kg DM (标准物高粱单宁相当量)	
豆科牧草				
紫色达利菊 <i>Dalea purpurea</i> Vent.	盛花期	全株 (冻干)	84.5 g/kg DM (总缩合单宁)	(彭凯 2017)
	盛花期	全株 (晒干)	82.2 g/kg DM (总缩合单宁)	
	盛花期	全株 (青贮)	78.9 g/kg DM (总缩合单宁)	
	营养生长期	茎	46.1 g/kg DM (可提取缩合单宁)	(黄倩倩 2016)
	营养生长期	叶	74.8 g/kg DM (可提取缩合单宁)	
	早花期	茎	30.3 g/kg DM (可提取缩合单宁)	

	早花期	叶	63.9 g/kg DM (可提取缩合单宁)	
	早花期	花	166 g/kg DM (可提取缩合单宁)	
	晚花期	茎	22.4 g/kg DM (可提取缩合单宁)	
	晚花期	叶	60.8 g/kg DM (可提取缩合单宁)	
	晚花期	花	131 g/kg DM (可提取缩合单宁)	
百脉根 <i>Lotus corniculatus</i>	成熟期	叶	5~16 g/kg DM (香草醛-盐酸法, 原花青素 定量)	(李宗英 2019)
蒙农红豆草 <i>Onobrychis viciaefolia</i> Scop.cv.Mengnong	生长期	全株	142.06 g/kg DM (总缩合单宁)	
	开花期	全株	89.21 g/kg DM (总缩合单宁)	
	成熟期	全株	48.62 g/kg DM (总缩合单宁)	
	生长期	茎	99.95 g/kg DM (总缩合单宁)	
	开花期	茎	47.27 g/kg DM (总缩合单宁)	(刘秀丽等 2018)
	成熟期	茎	6.53 g/kg DM (总缩合单宁)	
	生长期	叶	172.63 g/kg DM (总缩合单宁)	
	开花期	叶	106.88 g/kg DM (总缩合单宁)	
	成熟期	叶	90.61 g/kg DM (总缩合单宁)	
山野豌豆 <i>Vicia amoena</i>	开花期	叶	91.96 g/kg DM (香草醛-盐酸法, 儿茶素定 量)	(李林株等 2014)
尖叶胡枝子 <i>Lespedeza hedysaroides</i>	开花期	叶	43.57 g/kg DM (香草醛-盐酸法, 儿茶素定 量)	(李林株等 2014)
草本植物 珠芽蓼 <i>Polygonum viviparum</i>	枯黄期	珠芽	63.60 g/kg DM (标准物高粱单宁相当量)	
	枯黄期	地下茎	141.62 g/kg DM (标准物高粱单宁相当量)	(陈子凡 2022)

谷物				
高粱 (晋梁 5 号)			5.74 g/kg	
<i>Sorghum bicolor</i>	成熟期	小穗	(香草醛-盐酸法, 儿茶素定	
(Jinliang No.5)			量)	
		颖片/种	24.86 g/kg	
	成熟期	皮/外种	(香草醛-盐酸法, 儿茶素定	
		皮	量)	
			0 g/kg	
	成熟期	仁	(香草醛-盐酸法, 儿茶素定	(Liu et al 2009)
			量)	
			0 g/kg	
	成熟期	胚乳	(香草醛-盐酸法, 儿茶素定	
			量)	
			0 g/kg	
	成熟期	胚	(香草醛-盐酸法, 儿茶素定	
			量)	
水果				
赤霞珠葡萄			114.6 g/kg DM	
<i>Cabernet Sauvignon</i>	--	葡萄渣	(直接间苯三酚降解法,	
		(果梗)	高效液相色谱定量)	(Hixson et al 2015)
			73.7 g/kg DM	
长相思葡萄	--	葡萄渣	(直接间苯三酚降解法,	
<i>Sauvignon Blanc</i>			高效液相色谱定量)	

1.2 化学结构

缩合单宁是以黄烷-3-醇或黄烷-3,4-二醇单体通过 4-6 位、4-8 位的 C-C 键或 C-O-C 键聚合而成的多酚类物质。缩合单宁化学结构复杂, 分子量介于 1 000~20 000 Da 之间 (Huang et al 2018)。黄烷-3-醇单体根据 B 环上的 R 基团为-H (氢原子) 或-OH (羟基) 可分为儿茶素 (Catechin) 与没食子儿茶素 (Gallocatechin), 再根据 C 环 2, 3 位的 H 原子在环的同一侧又存在顺式立体异构体, 即表儿茶素 (Epicatechin) 与表没食子儿茶素 (Epigallocatechin)。缩合单宁及其单体的分子结构分别如图 1.1、图 1.2 所示。儿茶素与表儿茶素单体聚合而成物质称为原花青定, 没食子儿茶素与表没食子儿茶素单体聚合而成物质称为原翠雀定 (黄倩倩 2016)。

缩合单宁单体 (儿茶素、表儿茶素、没食子儿茶素、表没食子儿茶素) 组成与比例受到植物生长期、部位的影响, 即各单体在延伸单元与末端单元之间所占的比例存在差异 (黄倩倩 2016)。盛花期全株冻干贮藏紫色达利菊 (*Dalea purpurea* Vent.) 缩合单宁主要由延伸单元表儿茶素 (68.26%)、表没食子儿茶素 (23.50%) 组成,

而延伸单元与末端单元中没食子儿茶素含量均为 0（彭凯 2017）。黄倩倩（2016）同样报道，紫色达利菊（*Dalea purpurea* Vent.）不同生长期、部位中均未检测到没食子儿茶素含量，表儿茶素与表没食子儿茶素是紫色达利菊（*Dalea purpurea* Vent.）主要组成单体。

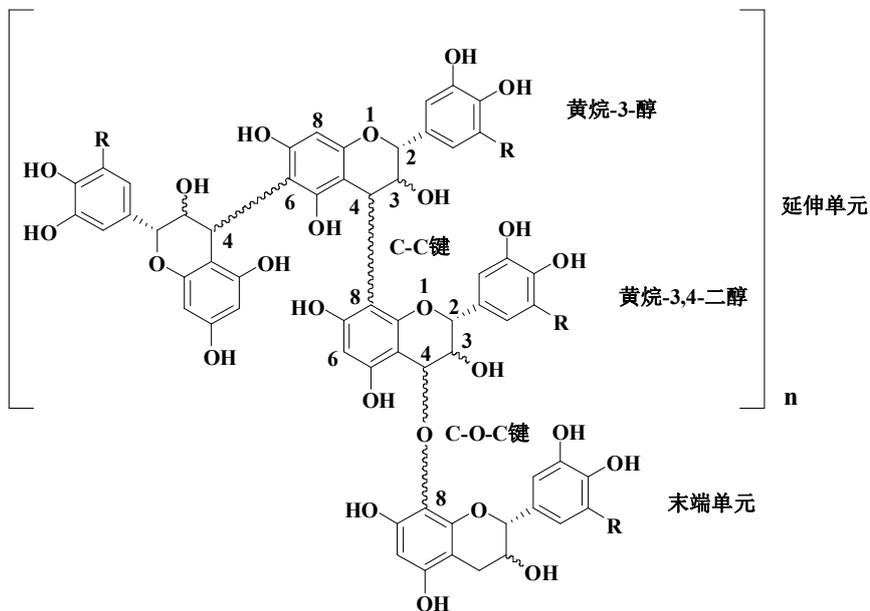


图 1.1 缩合单宁的分子结构

Fig. 1.1 Molecular structure of condensed tannins

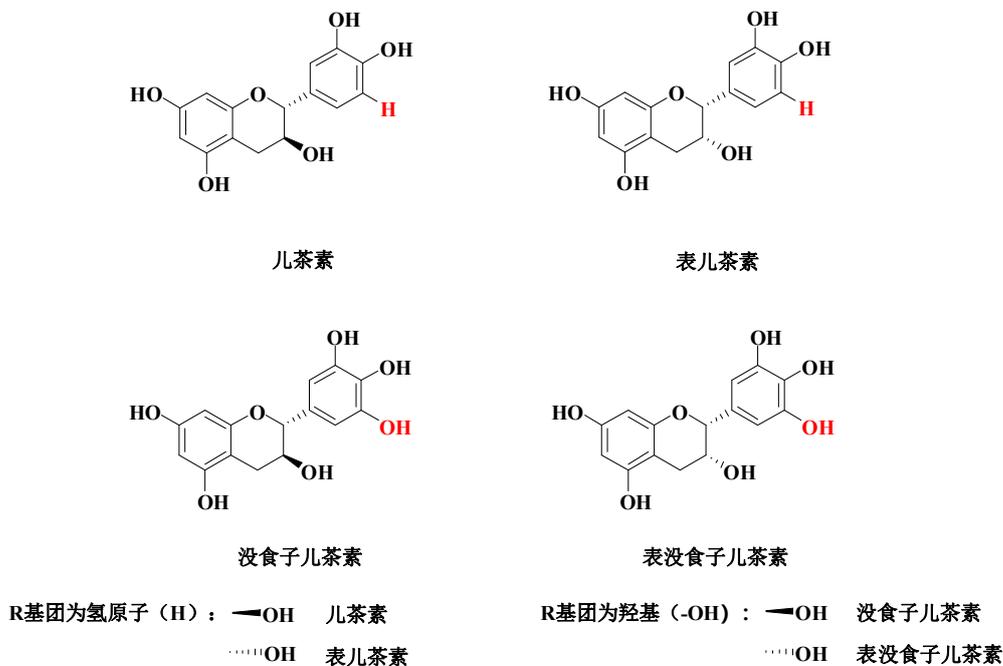


图 1.2 缩合单宁单体的分子结构

Fig. 1.2 Molecular structures of the condensed tannins monomers

2 缩合单宁及其单体的抗氧化与免疫活性

2.1 抗氧化活性

缩合单宁是天然多酚类聚合物，具有显著的抗氧化活性，归因于其多酚羟基化学结构，酚羟基可通过供氢、供电子方式减少自由基的产生（彭凯等 2021）。以 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼（DPPH）、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐（ABTS）自由基清除能力为评价指标，人心果（*Manilkara zapota*）叶缩合单宁抗氧化活性优于常用抗氧化剂维生素 C、丁基羟基茴香醚（BHA）（冯慧玲 2014）。缩合单宁可通过促进抗氧化酶活性、调控抗氧化信号通路、介导肠道微生物发生互作关系从而发挥抗氧化作用（彭凯等 2020）。缩合单宁可通过激活核因子 E2 相关因子 2（Nrf2）信号通路增强日本海鲈（*Lateolabrax japonicus*）血清总抗氧化能力（T-AOC）与过氧化氢酶（CAT）、超氧化物歧化酶（SOD）活性，同时增强肝脏 T-AOC 与 SOD、谷胱甘肽 S-转移酶（GST）活性，上调肝脏 *Nrf2* 与 *SOD* 的 mRNA 表达水平（Peng et al 2020c）。

缩合单宁单体同样表现出优异的抗氧化活性。体外试验表明，儿茶素具有显著清除羟基自由基（ $\cdot\text{OH}$ ）、超氧阴离子自由基（ $\text{O}_2^{\cdot-}$ ）、DPPH 自由基能力（赵文红等 2009）。饲料添加儿茶素可提高肉鸭（王文彪等 2014）、妊娠母猪（肖勇 2013）、草鱼（*Ctenopharyngodon idella*）（徐禛等 2020）的血清抗氧化酶活性。儿茶素（腹腔注射）可有效缓解大鼠缺氧诱导的低氧性肺动脉高压（颜俊杰等 2019）。表儿茶素可调节小鼠抗氧化反应改善脂多糖（LPS）诱导的急性肺损伤（李泽林等 2021）、激活小鼠 *Nrf2* 信号通路改善由铅诱导的脑组织损伤与功能障碍（朱可心 2022）。

2.2 免疫活性

缩合单宁及其单体具有调节机体免疫反应的生物活性。饲料中添加缩合单宁可线性降低日本海鲈（*Lateolabrax japonicus*）血清肿瘤坏死因子 α （TNF- α ）与肝脏白细胞介素-6（IL-6）的浓度（Peng et al 2020c）。攻毒试验表明，缩合单宁可下调日本海鲈（*Lateolabrax japonicus*）协同免疫蛋白热休克蛋白 70（*HSP70*）的 mRNA 表达水平，缓解水体急性铜离子（ Cu^{2+} ）应激（Peng et al 2020c）。缩合单宁可降低日本海鲈（*Lateolabrax japonicus*）血清 TNF- α 、IL-6 的浓度，调节免疫反应（Peng et al 2020a）。缩合单宁还可增强中国花鲈（*Lateolabrax maculatus*）肝脏免疫能力，表现为溶菌酶（LZM）活性与免疫球蛋白 M（IgM）含量显著升高（Peng et al 2022d）。

体外试验表明,儿茶素可通过抑制 Toll 样受体 2(TLR2)及下游核因子 κ B(NF- κ B)与丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路,有效缓解脂磷壁酸诱导的奶牛乳腺上皮细胞炎症(于井成 2023)。表儿茶素可调节小鼠炎症反应改善 LPS 诱导的急性肺损伤(李泽林等 2021)。

3 缩合单宁及其单体的饲用研究进展

3.1 缓解氧化应激

现有研究报道,缩合单宁作为饲用添加剂使用可增强机体抗氧化应激的能力,有效抵抗来自饲料、环境等各种因子引起的氧化应激。缩合单宁对镉(Cd)诱导的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生长迟缓与肝脏氧化应激具有缓解作用(Zhai et al 2018)。同样地,缩合单宁还可一定程度减轻饲料 Cd 毒性对珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)生长、体成分与肠道健康方面产生的负面影响(Jia et al 2021)。缩合单宁应用于大规格大口黑鲈饲料中可有效降低鱼体肝脂与腹脂含量,改善健康状态(彭凯等 2023)。缩合单宁可缓解日本海鲈(*Lateolabrax japonicus*)低氧胁迫(Peng et al 2020a)、高碳水化合物摄取引起氧化应激(Peng et al 2020b)、水体急性 Cu²⁺应激(Peng et al 2020c)。缩合单宁有效保护中国花鲈(*Lateolabrax maculatus*)因饲料黄曲霉毒素 B₁ 诱导的生长性能降低、血清与肝脏抗氧化与免疫系统失衡、肝脏损伤与脂质代谢紊乱、肠道损伤(Peng et al 2022b; 2022c)。缩合单宁有效保护中国花鲈(*Lateolabrax maculatus*)氧化鱼油诱导的生长性能、抗氧化能力降低以及肠道通透性增加与紧密连接结构损伤(Peng et al 2022a)。缩合单宁对中国花鲈(*Lateolabrax maculatus*)因饲料组胺诱导的生长抑制与肝肠损伤具有保护作用(Qiu et al 2024)。目前,饲用缩合单宁单体缓解动物机体氧化应激的研究还较少报道。体内与体外试验均表明,表儿茶素可预防高脂饮食诱导的胰腺 β 细胞内质网氧化应激及凋亡(Cremonini et al 2023)。表没食子儿茶素没食子酸酯(表没食子儿茶素与没食子酸的酯化化合物)对巴马香猪因热应激引起的生长性能降低以及肠道屏障功能受损具有显著改善作用(韦崇万 2023)。

3.2 维护肠道健康

缩合单宁属于植物次生代谢产物,具有显著抗菌活性,可与肠道微生物发生互作关系调控肠道微生态平衡,维护肠道健康(邱建强等 2023a)。缩合单宁对于肠道健康的影响主要体现在改善肠道组织形态、菌群结构及相关代谢物等方面。缩合

单宁可通过调节中国花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 肠道菌群结构, 降低致病菌假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的丰度, 以及通过恢复肠道完整性有效保护黄曲霉毒素 B₁ 诱导的肠道损伤与微生态紊乱 (Peng et al 2022c)。饲料中添加缩合单宁可有效缓解断奶仔猪腹泻 (唐青松等 2020)。饲料中添加缩合单宁可改善肉鸡肠道形态, 提高空肠绒毛隐比, 提高回肠绒毛高度 (唐青松等 2021)。缩合单宁不仅可保护鹅盲肠屏障完整性, 还可提高鹅盲肠有益菌属梭菌 UCG-014 (*Clostridia*_UCG-014)、产粪甾醇真细菌群 (*[Eubacterium]_coprostanoligenes_group*)、粪杆菌属 (*Faecalibacterium*) 的相对丰度, 而降低潜在致病菌属拟杆菌属 (*Bacteroides*) 的相对丰度, 促进肠道健康 (Deng et al 2023, 任继武等 2024)。缩合单宁还可增加鹅盲肠中短链脂肪酸 (乙酸、丙酸、丁酸) 的含量从而改善肠道健康 (Deng et al 2023, 任继武等 2024)。目前, 缩合单宁单体对于动物的饲喂效果研究仍然较为缺乏。儿茶素可改善高脂饲料诱导的小鼠肠道菌群紊乱, 表现为显著升高拟杆菌的相对表达量 (钟建琴等 2022)。饲料中添加表没食子儿茶素没食子酸酯可改善金华猪盲肠微生物组成, 增加潜在有益菌属粪球菌属 3 (*Coprococcus_3*)、瘤胃梭菌属 9 (*Ruminiclostridium_9*) 和多尔氏菌属 (*Dorea*) 的相对丰度 (楼芳芳等 2023)。饲料中添加表没食子儿茶素没食子酸酯还对蛋鸭热应激下的肠道形态结构具有改善作用 (郝晓娜等 2022)。

4 研究目的与意义

1. 研究目的

- (1) 比较缩合单宁及其单体的体外抗氧化与免疫作用差异;
- (2) 研究缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾的饲喂效果差异;
- (3) 解析缩合单宁及其单体的抗氧化作用机理。

2. 研究意义

后抗生素时代, 植物提取物成为“替抗”的研究热点之一。缩合单宁具有较强的抗氧化、抗炎、抗菌等生物活性。然而, 缩合单宁为聚合物, 缩合单宁及其单体 (儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素) 的抗氧化与免疫活性作用机制尚不完全清楚。本文研究了缩合单宁及其单体的体外抗氧化与免疫作用及其对凡纳滨对虾的饲喂效果差异, 旨在为开发有重大应用价值的饲用缩合单宁资源提供理论依据。

5 技术路线

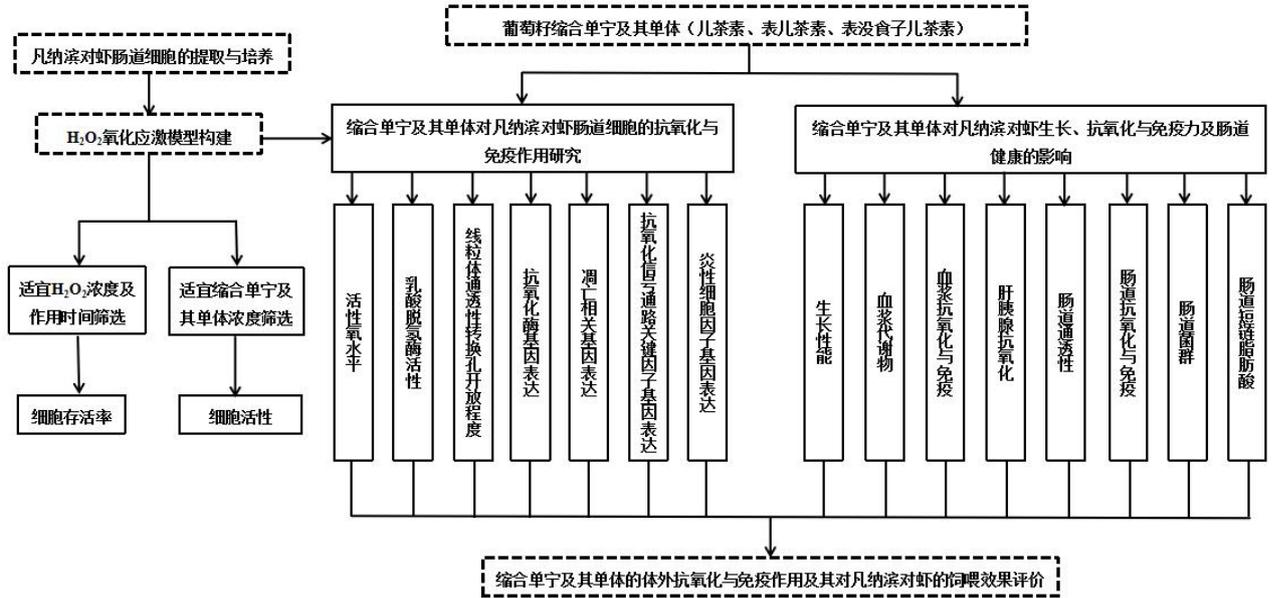


图 1.3 研究技术路线

Fig. 1.3 Research technique route

第二章 凡纳滨对虾肠道细胞的提取与 H₂O₂ 氧化应激模型构建

1 前言

水产动物肠道原代上皮细胞培养在草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、鲫 (*Carassius auratus*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis nilotica*)、中国花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 已有研究(王彦波等 2007, 宋增福等 2008, 姚仕彬等 2013, 李莎等 2024)。凡纳滨对虾肠道既是营养物质消化吸收的主要部位, 同时也是发挥抗氧化与免疫作用的重要器官。然而, 相较于鱼类肠道, 凡纳滨对虾肠道细小, 对肠道上皮细胞提取存在较大难度。本章对凡纳滨对虾肠道(中肠部分)组织进行原代细胞提取, 并探索了改善对虾肠道细胞提取效率与培养效果的适宜条件。

H₂O₂ 是体外试验常用的应激源, 归因于其强氧化性。目前, 已有较多研究基于体外 H₂O₂ 氧化应激模型, 研究植物提取活性物质(石瑶瑶 2021, 刘嘉烁等 2023, 詹经纬等 2023)对于动物机体细胞的抗氧化损伤作用效果。目前, 凡纳滨对虾肠道细胞 H₂O₂ 氧化应激模型的构建还少见报道, 本试验对凡纳滨对虾肠道细胞 H₂O₂ 氧化应激模型构建进行了初步探索, 为体外模型研究凡纳滨对虾肠道细胞抗氧化作用提供部分参考。

2 材料与amp;方法

2.1 试验材料

试验用凡纳滨对虾购于中山市广东中正水产科技有限公司, 平均体重约为 15 g/尾。

2.2 试验试剂与仪器

(1) 试验主要购置试剂见表 2.1。

表 2.1 试验主要购置试剂

Table 2.1 The main reagents purchased for this experiment

试剂与试剂盒名称 Reagent and kit name	货号与生产厂家 Article no. and manufacturer
Medium 199/EBSS 培养基	SH30253.01, Cytiva, 上海格来赛生命科技有限公司
胎牛血清	FSP500, 上海吉泰依科赛生物科技有限公司
青霉素-链霉素-庆大霉素溶液 (100×)	C0223, 上海碧云天生物技术有限公司
支原体清除剂 MRA (ZT10002)	C013, GeneCodex

续表

D-Hank's 平衡盐溶液	BL559A, Biosharp, 合肥兰杰柯科技有限公司
胶原酶 IV 型	17104-019, Gibco
胶原酶 I 型	BS163, Biosharp, 合肥兰杰柯科技有限公司
鼠尾胶原蛋白 I 型	C8062, 北京索莱宝科技有限公司
乙酸	G73562B, General-Reagent
PBS 缓冲液	G4202, 武汉塞维尔生物科技有限公司
氯化钠	C111547, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司
D-(+)-葡萄糖	G116307, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司
碱性成纤维细胞生长因子	CM-2001, 北京博奥龙免疫技术有限公司
青霉素-链霉素溶液 (100×)	C0222, 上海碧云天生物技术有限公司
胰酶细胞消化液	C0201, 上海碧云天生物技术有限公司
DMEM 培养基	C11995500BT, Gibco
30%过氧化氢	7722-84-1, 银丰化学试剂
CCK-8 细胞增殖毒性检测试剂盒	CK04, 上海东仁化学科技有限公司

(2) 试验主要配制试剂见表 2.2。配制试剂均在试验正式开展前 1 d 备好, 4 °C 冰箱保存。

表 2.2 试验主要配制试剂

Table 2.2 The main preparation reagents for this experiment

配制试剂名称 Preparation reagent name	试剂配制方法 Reagent preparation method
M199 完全培养基	15%胎牛血清、5~6 g/L 氯化钠、1~3 g/L 葡萄糖、20 ug/L 碱性成纤维细胞生长因子, 余量为 M199 基础培养基, 1×四抗液, 渗透压为 470~550 mmol/kg。
DMEM 完全培养基	10% DMEM 基础培养基, 10%胎牛血清, 1×青霉素-链霉素溶液。
四抗液	由 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素、50 ug/mL 庆大霉素、0.39 ug/mL 支原体清除剂按 1: 1: 1: 1 体积比配制而成。
胶原酶 I 型、胶原酶 IV 型 混合消化液	由 0.1 mg/mL 胶原酶 I 型、0.1 mg/mL 胶原酶 IV 型按 1: 1 体积比配制而成。
胶原蛋白溶液	24 uL 鼠尾胶原蛋白 I 型、10 mL 0.06 mol/L 乙酸配制而成 0.012 mg/mL 胶原蛋白溶液。
H ₂ O ₂ 溶液	根据 30% H ₂ O ₂ 溶液根据最高浓度计算, 配制 50 倍的母液。

(3) 试验主要使用仪器见表 2.3。

表 2.3 试验主要使用仪器

Table 2.3 The main instruments used in this experiment

仪器名称 Instrument name	型号与生产厂家 Model and manufacturer
生物安全柜	HR40-IIA2, 青岛海尔生物医疗股份有限公司
震荡培养箱	BS-1E, 常州金坛良友仪器有限公司
低速离心机	SC-3610, 安徽中科中佳科学仪器有限公司

二氧化碳培养箱	CQ-80L, 常州金坛良友仪器有限公司
倒置生物显微镜	BDS400, 重庆奥特光学仪器有限公司
酶标仪	Multiskan Mk3 型, 上海赛默飞世尔仪器有限公司

2.3 凡纳滨对虾肠道细胞的提取与培养

本试验对凡纳滨对虾肠道细胞提取与培养的适宜条件进行了探索, 比较了不同提取与培养条件对肠道细胞状态(倒置显微镜下观察)的影响, 主要包括以下不同条件处理: ①采用双抗(青霉素-链霉素溶液)、三抗(青霉素-链霉素-庆大霉素溶液)、四抗(青霉素-链霉素-庆大霉素-支原体清除剂溶液)处理; ②采用胰酶细胞消化液、胶原酶 I 型与胶原酶 IV 型混合消化液处理; ③采用 DMEM 完全培养基、M199 完全培养基处理; ④采用单次离心(1 000 r/min 离心 5 min)、二次离心(第一次 300 r/min 离心 5 min 弃沉淀, 上清液第二次 500 r/min 离心 5 min 留沉淀)处理。通过比较上述不同条件处理的肠道细胞状态, 探索出凡纳滨对虾肠道细胞提取与培养的适宜条件。

本试验凡纳滨对虾肠道细胞提取与培养的最终方法为: 选取健康对虾 15~20 尾, 将其置于已煮沸过的 2‰ 盐度水体(含四抗液)中饥饿处理 24 h。对虾采用 75% 酒精浸泡消毒 10 min 后于超净工作台解剖分离肠道, 肠道收集后采用注射器吸取 D-Hank's 平衡盐溶液(含 5×四抗液)清除肠道内容物。肠道处理完毕后, 无菌肠道加入胶原酶 I 型与胶原酶 IV 型混合消化液于细胞筛中进行研磨, 吸取滤过消化液装入离心管, 置于震荡培养箱中, 27 °C、200 r/min 条件下消化 15 min, 将消化处理得到的消化液加入 M199 完全培养基终止消化。对终止消化后的溶液进行二次离心处理, 第一次 300 r/min 离心 5 min 后弃去沉淀杂质, 吸取上清液进行第二次离心, 500 r/min 离心 5 min 后, 弃去上清液保留沉淀物。采用 M199 完全培养基重悬细胞, 利用血球计数板对细胞悬液进行细胞计数并稀释后, 将稀释成固定数量密度的细胞悬液铺于培养板(提前用胶原蛋白溶液包被)中, 置于 27 °C、6% 二氧化碳(CO₂)培养箱中培养, 48 h 之后进行扩培或换液处理, 倒置生物显微镜下观察到细胞处于对数生长期, 贴壁细胞面积达到 80% 以上, 即得到凡纳滨对虾肠道原代细胞。

2.4 凡纳滨对虾肠道细胞 H₂O₂ 氧化应激模型构建

按照本章 2.3 所述凡纳滨对虾肠道细胞提取与培养方法, 将已提取的对虾肠道细胞悬液, 接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔加入 100 uL 细胞悬液, 保持每孔细胞

数量为 2.2×10^3 个。细胞生长至 80% 融合度时，弃除原培养液并用 PBS 缓冲液清洗后，向培养板中分别加入终浓度为 0、200、400、600、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$ （每一浓度设置 6 个重复）的 H_2O_2 溶液，培养 2、4、6、8、10、12 h。到达培养时间后，弃除原培养液，换上含 10% 的 CCK-8 溶液，继续培养 1 h 后，用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度（试验设置空白孔减小误差）。计算细胞存活率，以细胞存活率为评价指标，筛选 H_2O_2 适宜作用浓度与时间。

细胞存活率计算公式：

$$\text{细胞存活率 (\%)} = (\text{试验孔 O.D}_{450 \text{ nm}} \text{ 值} / \text{对照孔 O.D}_{450 \text{ nm}} \text{ 值}) \times 100\%。$$

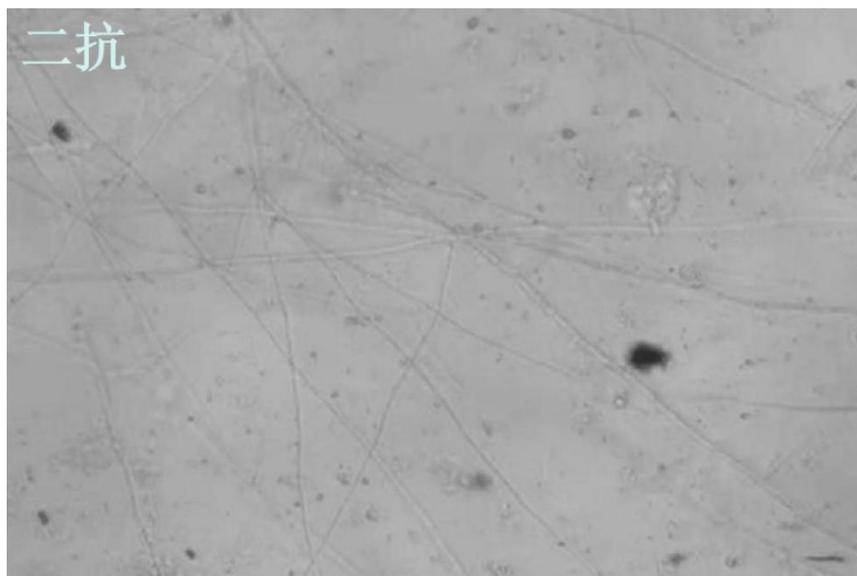
2.5 数据处理与分析

试验数据经整理后，采用 IBM SPSS Statistics 25 软件进行单因素方差分析（one-way ANOVA）。若方差满足齐性，采用 Duncan 法进行多重比较。若方差并不满足齐性，则采用 Dunnett-T3 检验法进行多重比较。试验数据以“平均值 \pm 标准误差”（Mean \pm SE）表示，设定显著性水平为 $P < 0.05$ 。采用 GraphPad Prism 8 软件对试验数据进行作图。

3 结果与分析

3.1 凡纳滨对虾肠道细胞的提取与培养效果

由图 2.1 可知，采用双抗（青霉素-链霉素溶液）、三抗（青霉素-链霉素-庆大霉素溶液）处理对虾肠道时，容易出现肠道内容物污染和微生物污染。



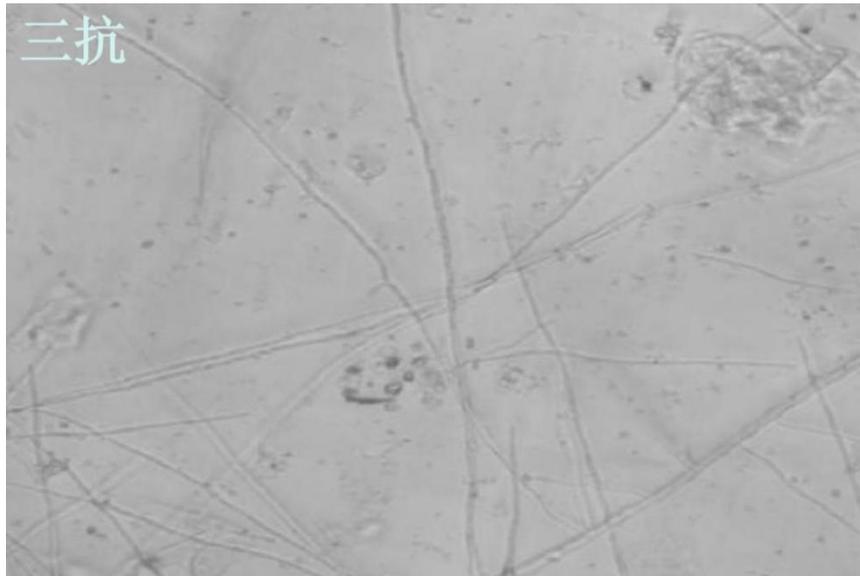


图 2.1 采用青霉素-链霉素、青霉素-链霉素-庆大霉素溶液的细胞培养效果

Fig. 2.1 Effects of penicillin-streptomycin and penicillin-streptomycin-gentamicin solution on cell culture

由图 2.2 可知，仅采用胰酶细胞消化液时，对虾肠道细胞容易受到损伤，且细胞损伤后恢复能力差。

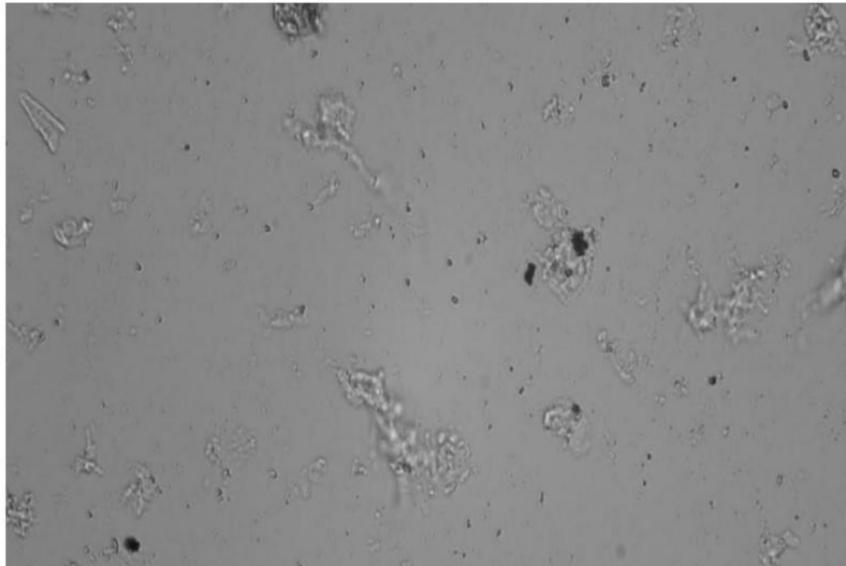


图 2.2 采用胰酶细胞消化液的细胞培养效果

Fig. 2.2 Effect of trypsin solution on cell culture

由图 2.3 可知，采用常规 DMEM 完全培养基无法满足对虾肠道细胞生长的渗透压需求，因而致使细胞破裂。



图 2.3 采用常规 DMEM 完全培养基（10% DMEM，10%胎牛血清，1×青霉素-链霉素）的细胞培养效果

Fig. 2.3 Effect of conventional DMEM complete medium (10% DMEM, 10% FBS, 1× penicillin-streptomycin) on cell culture

由图 2.4 可知，当对虾肠道细胞被收集和培养时，仅采用单次离心（1 000 r/min，5 min）容易导致细胞碎片产生和微生物污染。

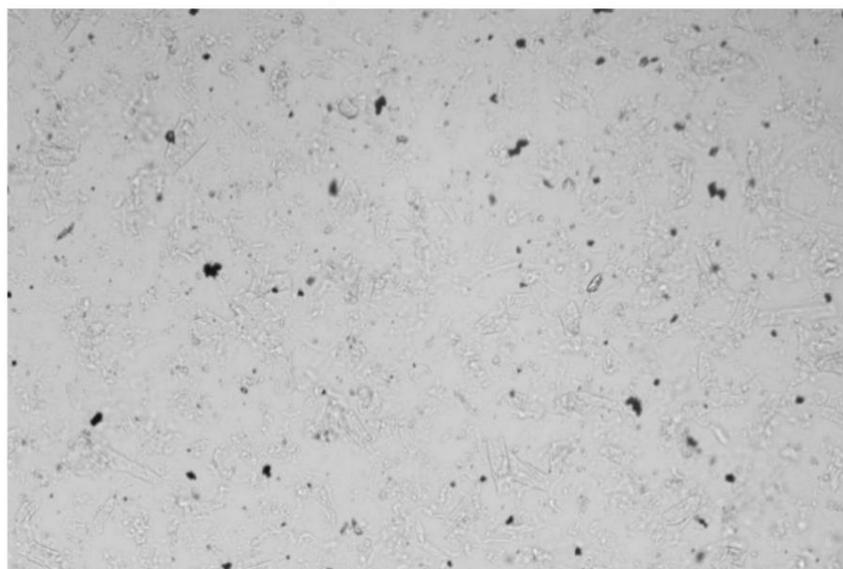


图 2.4 采用单次离心（1 000 r/min，5 min）的细胞培养效果

Fig. 2.4 Effect of single centrifugation (1 000 r/min, 5 min) on cell culture

由图 2.5 可知，本试验凡纳滨对虾肠道细胞提取与培养的最终方法可有效抑制肠道内容物与微生物污染、细胞损伤、破裂与碎片产生，同时可有效地提取到肠道细胞。细胞贴壁前，可见细胞数量较少，细胞形态尚不清晰。细胞贴壁后，可见细胞形态正常，生长状态较好。

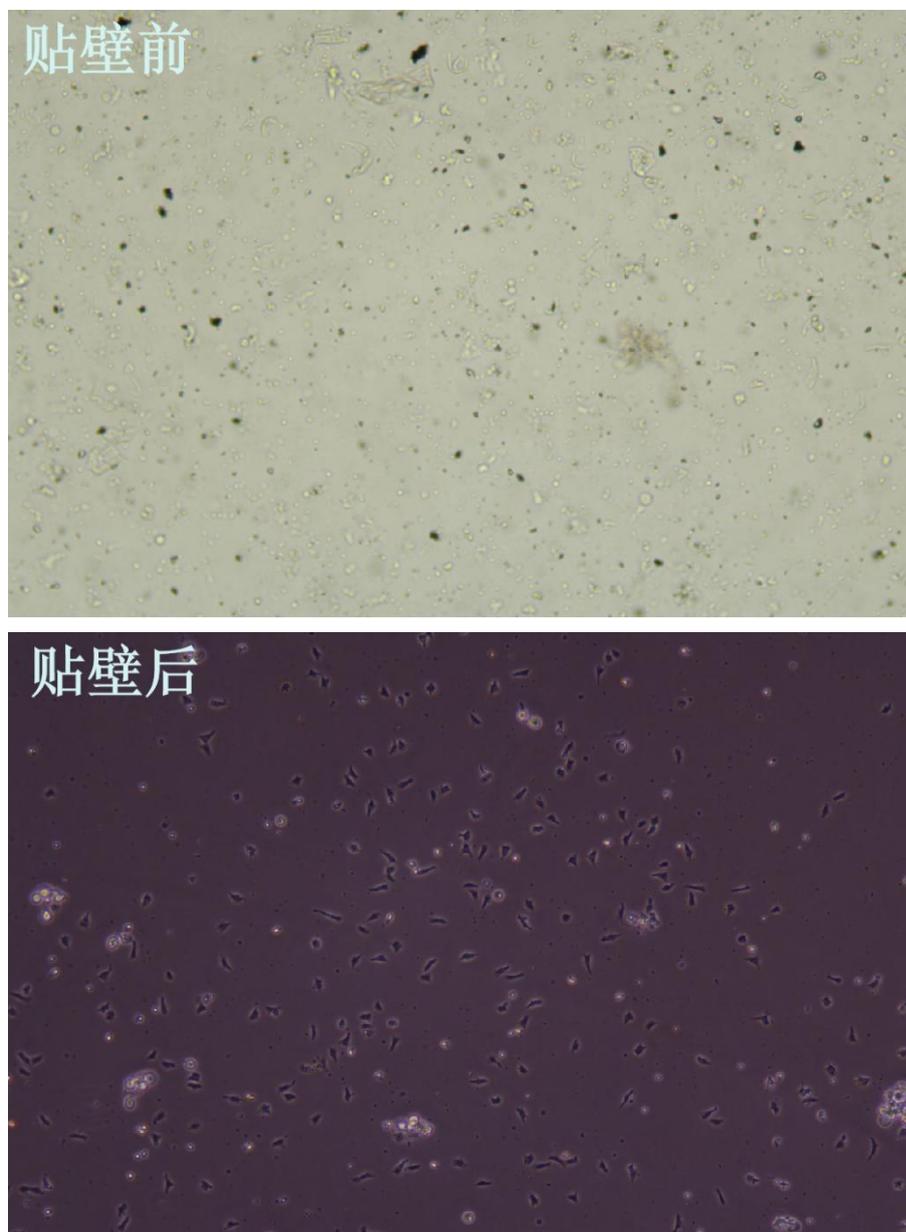


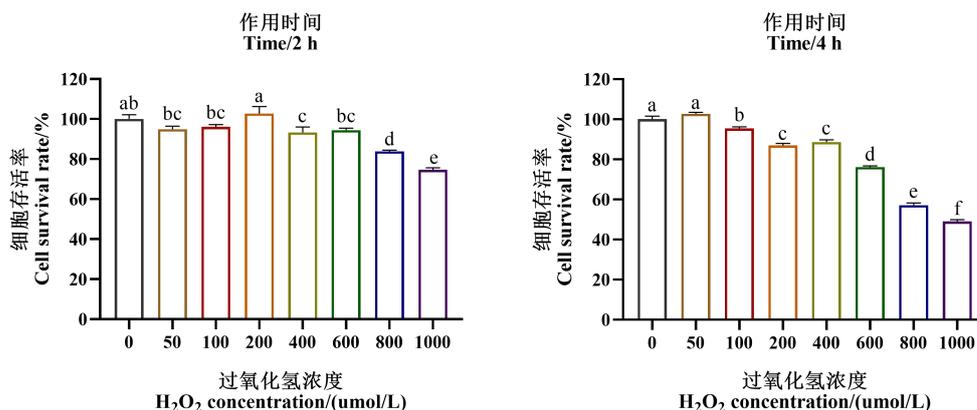
图 2.5 凡纳滨对虾肠道细胞的培养效果

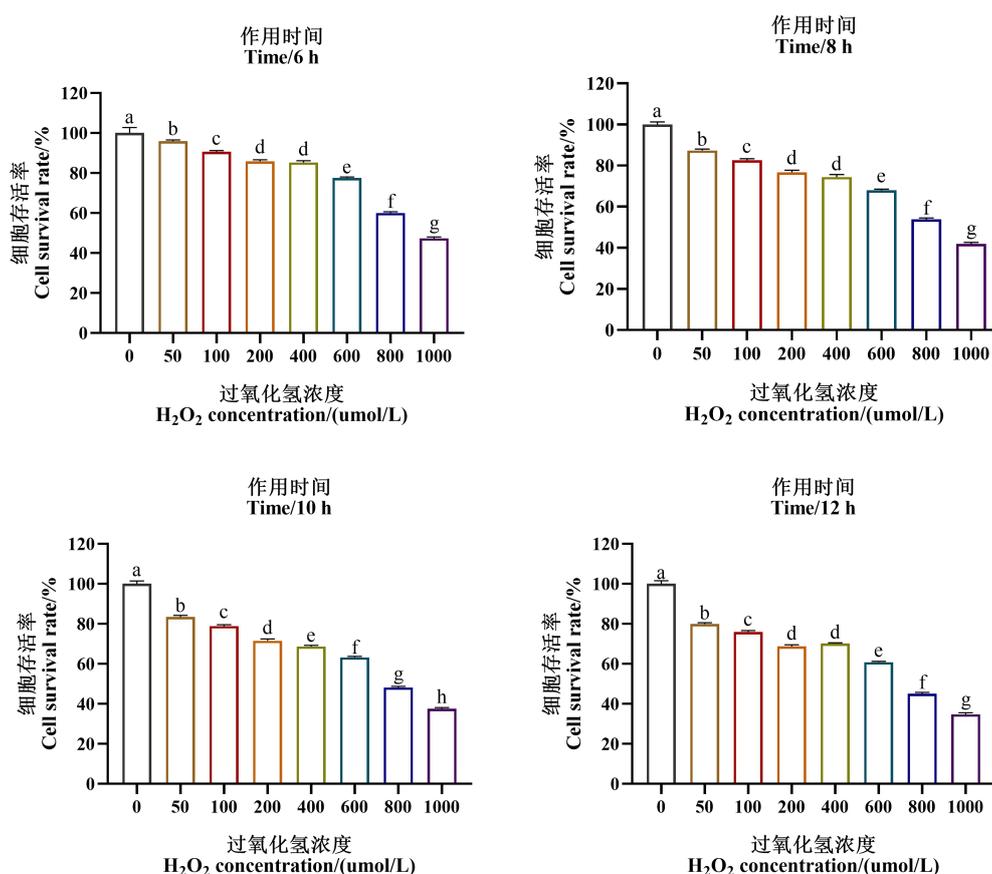
Fig. 2.5 Culture effect of intestinal cells of *Litopenaeus vannamei*

3.2 H₂O₂ 浓度及作用时间对凡纳滨对虾肠道细胞存活率的影响

由图 2.6 可知，H₂O₂ 浓度越高及作用时间越长，其对凡纳滨对虾肠道细胞存活率降低的效果越为显著。50、100、200、400 μmol/L H₂O₂ 作用肠道细胞 2~12 h 后，细胞存活率仍然在 $68.64 \pm 0.62\%$ 以上，存活率降低程度较小且缓慢，该结果表明在上述 H₂O₂ 浓度及作用时间下，H₂O₂ 对肠道细胞的氧化损伤作用较弱。然而，1 000 μmol/L H₂O₂ 仅作用肠道细胞 4 h，细胞存活率即降至 $49.09 \pm 0.85\%$ ，该结果表明上述 H₂O₂ 浓度及作用时间对肠道细胞的氧化损伤作用较强。

在构建 H₂O₂ 氧化应激模型时，对细胞适宜氧化损伤程度的选择较为关键，当细胞氧化损伤程度较低时，恢复能力较强。相反，当细胞氧化损伤程度较高时，恢复能力较差，均无法体现出添加物质对细胞氧化损伤的保护作用效果。通过查阅现有 H₂O₂ 氧化应激模型构建的相关文献，本试验初步选择细胞存活率在 55%~65% 之间作为适宜氧化损伤程度。满足上述条件的 H₂O₂ 作用浓度及时间分别为：800 μmol/L H₂O₂ 作用 4 h ($57.13 \pm 1.09\%$)，800 μmol/L H₂O₂ 作用 6 h ($60.06 \pm 0.61\%$)，600 μmol/L H₂O₂ 作用 10 h ($63.26 \pm 0.47\%$)，600 μmol/L H₂O₂ 作用 12 h ($60.84 \pm 0.40\%$)。由上述数据可知，800 μmol/L H₂O₂ 作用 4 h 及 6 h 时，细胞存活率均值分别为 57.13%、60.06%（反而呈现升高趋势），结果表现并不稳定。600 μmol/L H₂O₂ 作用 10 h 及 12 h 时，细胞存活率均可满足试验需要，考虑到后续正式试验顺利性，本试验最终选择 600 μmol/L H₂O₂ 作用 10 h 作为凡纳滨对虾肠道细胞的氧化应激条件，此时细胞存活率为 (63.26 ± 0.47) %。





注：数据柱上标不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)，数据柱上标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)。Note: Different lowercase letters of data column superscript represent significant difference ($P < 0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data column superscript represent no significant difference ($P > 0.05$).

图 2.6 H₂O₂ 浓度及作用时间对凡纳滨对虾肠道细胞存活率的影响

Fig. 2.6 Effects of H₂O₂ concentration and action time on survival rate of intestinal cells in

Litopenaeus vannamei

4 讨论

4.1 提取与培养方法对凡纳滨对虾肠道细胞状态的影响

本实验室对凡纳滨对虾肠道原代细胞提取与培养方法进行了改进，结果表明：采用四抗液（青霉素-链霉素-庆大霉素-支原体清除剂溶液）处理对虾肠道有效抑制肠道内容物及微生物污染；与四抗液相比，仅采用商业双抗、三抗液无法有效抑制微生物污染，在上述基础上补充支原体清除剂可有效抑制污染。支原体是最小、最简单的原核生物，且无细胞壁结构，所以针对细胞壁的许多常见的抗生素对支原体

无效。因此，支原体污染在细胞培养中广泛存在，通过补充支原体清除剂对于预防和去除支原体污染具有显著效果。

采用体积比为 1: (1~3) 的胶原酶 I 型、IV 型混合消化液有效提高对虾肠道组织消化效率，缩短提取时间；胶原酶的使用利于降解细胞间质胶原，将对虾肠道组织消化成单个细胞。相反，采用胰酶细胞消化液容易造成对虾肠道细胞损伤。

采用 M199 完全培养基 (15% 胎牛血清、5~6 g/L 氯化钠、1~3 g/L 葡萄糖、20 ug/L 碱性成纤维细胞生长因子，余量为 M199 基础培养基，1×四抗液，渗透压为 470~550 mmol/kg) 可有效满足对虾肠道细胞生长所需渗透压；相反，常规培养液 (10% DMEM, 10% 胎牛血清，1×青霉素-链霉素溶液) 容易使肠道细胞在低渗透压时发生破裂。

采用二次差速离心 (第一次 300 r/min, 5 min; 第二次 500 r/min, 5 min) 有效去除对虾肠道细胞碎片及抑制微生物污染；传统单次离心 (1 000 r/min, 5 min) 容易存留较多细菌和真菌污染物。

采用鼠尾胶原蛋白 I 型包被培养板可有效促进对虾肠道细胞生长。

4.2 H₂O₂ 浓度及作用时间对凡纳滨对虾肠道细胞存活率的影响

构建细胞 H₂O₂ 氧化应激模型时，存活率是客观评价细胞氧化损伤程度的指标。目前，H₂O₂ 适宜浓度及作用时间的筛选并无特定的评价指标，常用的筛选方法为初步选择适宜的细胞存活率范围，继而通过氧化损伤相关指标如细胞形态、凋亡率、活性氧 (ROS) 水平、抗氧化酶活性、线粒体损伤状况等进一步验证细胞氧化损伤程度，筛选出较佳的 H₂O₂ 浓度及作用时间作为氧化损伤条件 (张润蔚 2017, 石瑶瑶 2021, 詹经纬等 2023)。水产动物组织细胞的 H₂O₂ 氧化应激模型构建已有部分研究，如张润蔚 (2017) 在构建斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 肝细胞 H₂O₂ 氧化应激模型时，选择细胞存活率在 50%~65% 之间作为适宜氧化损伤程度，并最终筛选 800 umol/L H₂O₂ 作用 8 h 作为氧化损伤条件，此时细胞存活率为 (61.98 ± 4.18)%。构建草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 肝细胞 H₂O₂ 氧化应激模型时，选择细胞活力 (MTT 法测定，反映活细胞数) 在 50%~70% 之间作为适宜氧化损伤程度，并最终筛选 200 umol/L H₂O₂ 作用 1 h 作为氧化损伤条件，此时细胞活力为 (64.85 ± 0.38)% (石瑶瑶 2021)。本试验以细胞存活率为评价指标，初步选择细胞存活率为 55%~65% 作为适宜氧化损伤程度，结合数据重复性与后续正式试验顺利性，最终筛选出细胞存活率为 (63.26 ± 0.47)% 作为细胞适宜氧化损伤程度。

5 小结

本试验构建了凡纳滨对虾肠道细胞的提取与培养方法，有效改善了凡纳滨对虾肠道细胞提取效率与培养效果。在凡纳滨对虾肠道细胞 H_2O_2 氧化应激模型中， H_2O_2 适宜作用浓度为 $600 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ，作用时间为 10 h ，此时细胞存活率为 $(63.26 \pm 0.47)\%$ 。

第三章 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞的抗氧化与免疫作用研究

1 前言

缩合单宁与儿茶素类单体均是天然多酚类化合物，具有显著抗氧化与免疫调节生物活性。氧化应激是一系列疾病发生的核心机制，机体在不利环境因素下，倾向于氧化状态，导致氧化应激以及疾病发生。前期研究表明，缩合单宁可通过降低活性氧水平和提高抗氧化酶活性，从而对 H_2O_2 诱导的花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 肠道上皮细胞毒性具有显著保护作用 (Peng et al 2022a)。类似地，体外试验表明，儿茶素、表儿茶素均对奶牛乳腺上皮细胞炎症具有显著抑制作用 (马骁 2021, 于井成 2023)。

目前，缩合单宁及其单体的体外抗氧化与免疫作用效果对比研究还未见报道，本章基于第二章所构建凡纳滨对虾肠道细胞 H_2O_2 氧化应激模型，从细胞分子水平研究缩合单宁及其单体对于凡纳滨对虾肠道细胞抗氧化与免疫作用的效果差异。

2 材料与方法

2.1 试验材料

试验材料同第二章 2.1。葡萄籽缩合单宁的制备及其单体的来源如下所述。

葡萄籽缩合单宁的制备：参照彭凯 (2017) 的方法，将粉碎的葡萄籽溶于 70% 丙酮溶液，置于磁力搅拌器上避光搅拌 90 min，经纱布过滤，将滤液与等体积乙醚溶剂充分混合，保留下层水相溶液，然后置于旋转蒸发仪 (40 °C, 120 r/min) 蒸发浓缩，将浓缩液置于真空冷冻干燥机中冻干，冻干粉末全部溶于 80% 乙醇溶液，经滤纸过滤，将滤液加入 Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶柱中，真空抽滤，弃去滤液，用 50% 丙酮溶液洗脱凝胶柱，直至洗脱液变为无色为止，所得洗脱液经旋转蒸发仪蒸发浓缩，将浓缩液置于真空冷冻干燥机中冻干，即得到缩合单宁纯品，纯度 $\geq 98\%$ 。参照彭凯 (2017) 的方法对缩合单宁单体组成进行检测，结果表明儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素是缩合单宁的主要组成单体。

缩合单宁 3 种单体来源：儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素均购于上海源叶生物科技有限公司，货号依次为 S44760、S31326、S31356，纯度依次为 99.0%、98.9%、98.5%。

2.2 试验试剂与仪器

(1) 试验主要购置试剂见表 3.1。

表 3.1 试验主要购置试剂

Table 3.1 The main reagents purchased for this experiment

试剂与试剂盒名称 Reagent and kit name	货号与生产厂家 Article no. and manufacturer
乳酸脱氢酶 (LDH) 细胞毒性检测试剂盒	C0017, 上海碧云天生物技术有限公司
活性氧 (ROS) 检测试剂盒	S0033S, 上海碧云天生物技术有限公司
线粒体通透性转换孔 (MPTP) 检测试剂盒	C2009S, 上海碧云天生物技术有限公司
RNA 提取试剂	Trizol Reagent, 赛默飞世尔科技
Bestar™ qPCR RT kit	DBI-2220, 德国 DBI
Bestar® Sybr Green qPCR Master Mix	DBI-2043, 德国 DBI

(2) 试验主要配制试剂:

缩合单宁及其单体溶液：根据缩合单宁及其单体的相对分子质量，准确称量对应的重量，以最高浓度计算，配 50 倍的母液。配制试剂均在试验正式开展前 1 d 备好，4 °C 冰箱保存。

(3) 试验主要使用仪器见表 3.2。

表 3.2 试验主要使用仪器

Table 3.2 The main instruments used in this experiment

仪器名称 Instrument name	型号与生产厂家 Model and manufacturer
流式细胞仪	BD FACSDiva 8.0.1, 美国 BD 公司
实时荧光定量 PCR 仪	Q2000B, 杭州朗基科学仪器有限公司
低温冷冻离心机	TGL-16M, 湖南湘仪集团
超微量分光光度计	SMA4000, Merinton

2.3 缩合单宁及其单体适宜作用浓度的筛选

按照第二章 2.3 所述方法，将已提取的凡纳滨对虾肠道细胞悬液，接种于 96 孔细胞培养板中，每孔加入 100 uL 细胞悬液，保持每孔细胞数量为 2.2×10^3 个。细胞生长至 80% 融合度时，弃除原培养液并用 PBS 缓冲液清洗后，向培养板中分别加入

终浓度为 0、200、400、600、800、1 000 $\mu\text{mol/L}$ （每一浓度设置 6 个重复）的葡萄籽缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素溶液，培养 24 h。到达培养时间后测定细胞活性，细胞活性的测定方法同第二章 2.4（CCK-8 细胞增殖毒性检测试剂盒）所述。计算细胞活性，以细胞活性为评价指标，筛选缩合单宁及其单体的适宜作用浓度。

细胞活性计算公式：

$$\text{细胞活性 (\%)} = (\text{试验孔 O.D}_{450 \text{ nm}} \text{ 值} / \text{对照孔 O.D}_{450 \text{ nm}} \text{ 值}) \times 100\%。$$

2.4 试验设计

基于已构建的凡纳滨对虾肠道细胞 H_2O_2 氧化应激模型（600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 10 h）以及已筛选的缩合单宁及其单体适宜作用浓度，采用完全随机设计法将培养好的肠道细胞分为 6 组，即对照组（NC, Normal control）、过氧化氢组（HP, Hydrogen peroxide）、缩合单宁组（CT, Condensed tannins）、儿茶素组（C, Catechin）、表儿茶素组（EC, Epicatechin）、表没食子儿茶素组（EGC, Epigallocatechin）。

过氧化氢组添加 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 诱导氧化损伤 10 h 后，更换为含与缩合单宁及其单体相同等分无菌生理盐水的 M199 完全培养基继续培养 24 h。缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组添加 600 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 诱导氧化损伤 10 h 后，分别更换为含适宜作用浓度缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素的 M199 完全培养基继续培养 24 h。对照组添加含 600 $\mu\text{mol/L}$ 无菌生理盐水的 M199 完全培养基培养 10 h 后，更换为含与缩合单宁及其单体相同等分无菌生理盐水的 M199 完全培养基继续培养 24 h。到达培养时间后，测定细胞氧化损伤相关指标：细胞形态、乳酸脱氢酶（Lactate dehydrogenase, LDH）活性、活性氧（Reactive oxygen species, ROS）水平、线粒体通透性转换孔（Mitochondrial permeability transition pore, MPTP）开放程度、氧化损伤相关基因（细胞凋亡蛋白、抗氧化信号通路关键因子及下游抗氧化酶、炎性细胞因子）表达。

2.5 指标分析

2.5.1 细胞形态指标

(1) 细胞形态：采用倒置生物显微镜镜下观察各组对虾肠道细胞形态并截取图像。

(2) LDH 活性：每组设置 6 个重复以测定 LDH 活性，将提取对虾肠道细胞悬

液接种到 96 孔细胞培养板中，每孔加入 100 μL 细胞悬液，保持每孔细胞数量为 3×10^3 个。到达培养时间后，采用 LDH 细胞毒性检测试剂盒按照说明书方法，测定 490 nm 处吸光度，通过配制不同浓度 LDH 标准品绘制标准曲线，计算出样品 LDH 绝对活性。

2.5.2 细胞凋亡指标

(1) MPTP 开放程度检测：每组设置 6 个重复以测定 MPTP 开放程度，将提取对虾肠道细胞悬液接种到 6 孔细胞培养板中，每孔加入 2 mL 细胞悬液，保持每孔细胞数量密度为 1×10^6 个/mL。采用 MPTP 检测试剂盒检测 MPTP 开放程度，其基本原理为荧光探针钙黄绿素乙酰甲酯 (Calcein AM) 被动运输进入细胞后被酯酶水解成钙黄绿素 (Calcein)，整个细胞均呈现绿色荧光。氯化钴 (CoCl_2) 处理后与 Calcein 结合，而线粒体 MPTP 保持关闭状态，因此仅线粒体呈现绿色荧光。钙离子载体 (Ionomycin) 处理使得线粒体 MPTP 呈开放状态，绿色荧光减弱消失。采用流式细胞仪检测不同处理后的荧光强度，Calcein 的最大激发光波长为 494 nm，最大发射光波长为 517 nm。使用 Calcein AM 处理、Calcein AM + CoCl_2 + Ionomycin 处理分别作为阳性对照和阴性对照，通过比较不同组别 Calcein AM + CoCl_2 处理的荧光强度，反映线粒体 MPTP 开放程度。荧光强度越弱，线粒体 MPTP 开放程度越高，细胞呈凋亡或坏死状态。

(2) 细胞凋亡蛋白基因表达测定：每组设置 6 个重复以测定细胞凋亡蛋白基因表达，将提取对虾肠道细胞悬液接种到细胞培养皿中，每皿加入 4 mL 细胞悬液，保持每皿细胞数量密度为 1×10^7 个/mL。到达培养时间后，采用 Trizol Reagent 试剂提取样品总 RNA 后，紫外分光光度计检验 RNA 质量，利用 Bestar™ qPCR RT kit 将 RNA 反转录为 cDNA。实时荧光定量 PCR 仪反应条件为：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 34 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s，共 45 个循环。20 μL 反应体系包括：10 μL Bestar® Sybr Green qPCR Master Mix，0.2 μL 正向、反向引物，0.04 μL ROX 参比染料，5 μL cDNA 模板，4.56 μL 灭菌蒸馏水。表 3.3 为各细胞凋亡蛋白基因引物序列 (苏州泓讯公司合成)，选用 β -肌动蛋白作为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析基因表达水平。

表 3.3 细胞凋亡蛋白基因引物序列

Table 3.3 Primer sequences of apoptotic protein genes

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'-3')	GenBank 登录号 GenBank accession number
B 淋巴细胞瘤/白血病-2 相关 X 蛋白 <i>Bax</i>	F: AAGAACCAGATGCAGCGACT R: GAGAGAAGCAGGCAAACACC	XM_043004033.1
半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 <i>Caspase-3</i>	F: GACGCCCTTGCCGTAGTG R: CTCAGCCGTGAAGTTTATCCA	DQ988351.1
β -肌动蛋白 β -actin	F: ATCACTGCCTTGGCTCCTTC R: GCCGGATTCGTCGTATTCCT	XM_027367213.1

2.5.3 抗氧化指标

(1) ROS 水平: 每组设置 6 个重复以测定 ROS 水平, 将提取对虾肠道细胞悬液接种到 6 孔细胞培养板中, 每孔加入 2 mL 细胞悬液, 保持每孔细胞数量密度为 1×10^6 个/mL。到达培养时间后, 采用 ROS 检测试剂盒利用荧光探针 DCFH-DA 进行活性氧检测, 收集细胞后装载探针。流式细胞仪设置 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长, 通过检测平均荧光强度反映 ROS 水平。

(2) 抗氧化信号通路关键因子及下游抗氧化酶基因表达: 测定方法同本章 2.5.2, 各基因引物序列见表 3.4。

表 3.4 抗氧化信号通路关键因子及下游抗氧化酶基因引物序列

Table 3.4 Primer sequences of key factor in antioxidant signaling pathway and its downstream antioxidant enzyme genes

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'-3')	GenBank 登录号 GenBank accession number
超氧化物歧化酶 <i>SOD</i>	F: CAACCTAATTGCCGCATACGA R: GCCATGTTGGGTCCAGAAGA	AB108065.1
过氧化氢酶 <i>CAT</i>	F: TGGTTGGAGCCCAAGAGTTC R: GTCGCATCCAACCTTCTGGATAA	AY518322.1
谷胱甘肽过氧化物酶 <i>GSH-Px</i>	F: GGATGGGCAGCCGTTTAAGA R: CACCGGGTCTTCTTATCTTCT	AY973252.2
核因子 E2 相关因子 2 <i>Nrf2</i>	F: GCTTTTGCAGAACAGGAGGC R: AGGATTCTGGGTAAACGCCG	NM_182889.1
血红素氧合酶-1 <i>HO-1</i>	F: CGGCCAAATTCTGAGACGGA R: TCTCCTTTTCAACCTGGATACT	XM_027376283.1
醌氧化还原酶 1 <i>NQO1</i>	F: TTTGCAGAATCCCGAGCACT R: CTTCTGCGATCAAGCTGAAAGA	NM_001204272.2
β -肌动蛋白 β -actin	F: ATCACTGCCTTGGCTCCTTC R: GCCGGATTCGTCGTATTCCT	XM_027367213.1

2.5.4 免疫指标

炎性细胞因子基因表达：测定方法同本章 2.5.2，各基因引物序列见表 3.5。

表 3.5 炎性细胞因子基因引物序列

Table 3.5 Primer sequences of inflammatory cytokine genes

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'-3')	GenBank 登录号 GenBank accession number
白细胞介素-1 β <i>IL-1β</i>	F: ATGATGGCATGCGGGCAATA R: TCAGGGCGATGATGACGTTC	NM_212844.2
白细胞介素-6 <i>IL-6</i>	F: TGCCATCCGCTCAGAAAACA R: GGCCATCAGATGCCACTTCT	NM_001261449.1
肿瘤坏死因子- α <i>TNF-α</i>	F: TTTCACTTCCAAGGCTGCCA R: TGGCTCATAAGCACTTGTTTCCT	NM_212859.2
β -肌动蛋白 β -actin	F: ATCACTGCCTTGGCTCCTTC R: GCCGGATTTCGTTCGTATTTCCT	XM_027367213.1

2.6 数据处理与分析

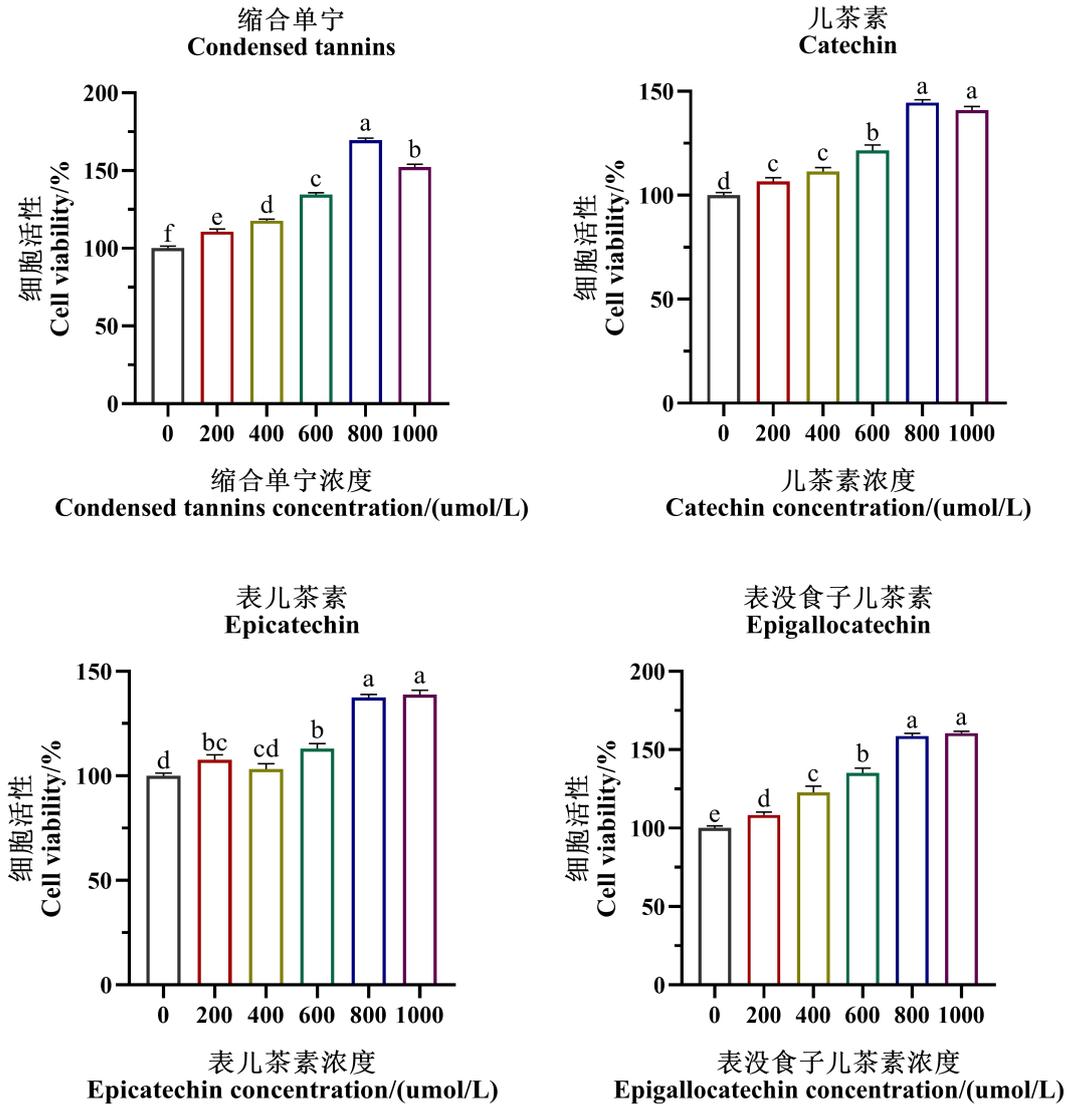
同第二章 2.5。

3 结果与分析

3.1 缩合单宁及其单体的适宜作用浓度

由图 3.1 可知，与对照组相比，仅 400 $\mu\text{mol/L}$ 作用浓度的表儿茶素组凡纳滨对虾肠道细胞活性表现升高趋势但不显著 ($P>0.05$)，200~1 000 $\mu\text{mol/L}$ 作用浓度的缩合单宁及其单体均可显著提高凡纳滨对虾肠道细胞活性 ($P<0.05$)。与 800 $\mu\text{mol/L}$ 作用浓度的缩合单宁组相比，1 000 $\mu\text{mol/L}$ 作用浓度的缩合单宁显著降低凡纳滨对虾肠道细胞活性 ($P<0.05$)。与 800 $\mu\text{mol/L}$ 作用浓度的儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组相比，1 000 $\mu\text{mol/L}$ 作用浓度的儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组凡纳滨对虾肠道细胞活性无显著差异 ($P>0.05$)。

因此，筛选出缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素的适宜作用浓度均为 800 $\mu\text{mol/L}$ 。



注：数据柱上标不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)，数据柱上标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)。Note: Different lowercase letters of data column superscript represent significant difference ($P < 0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data column superscript represent no significant difference ($P > 0.05$).

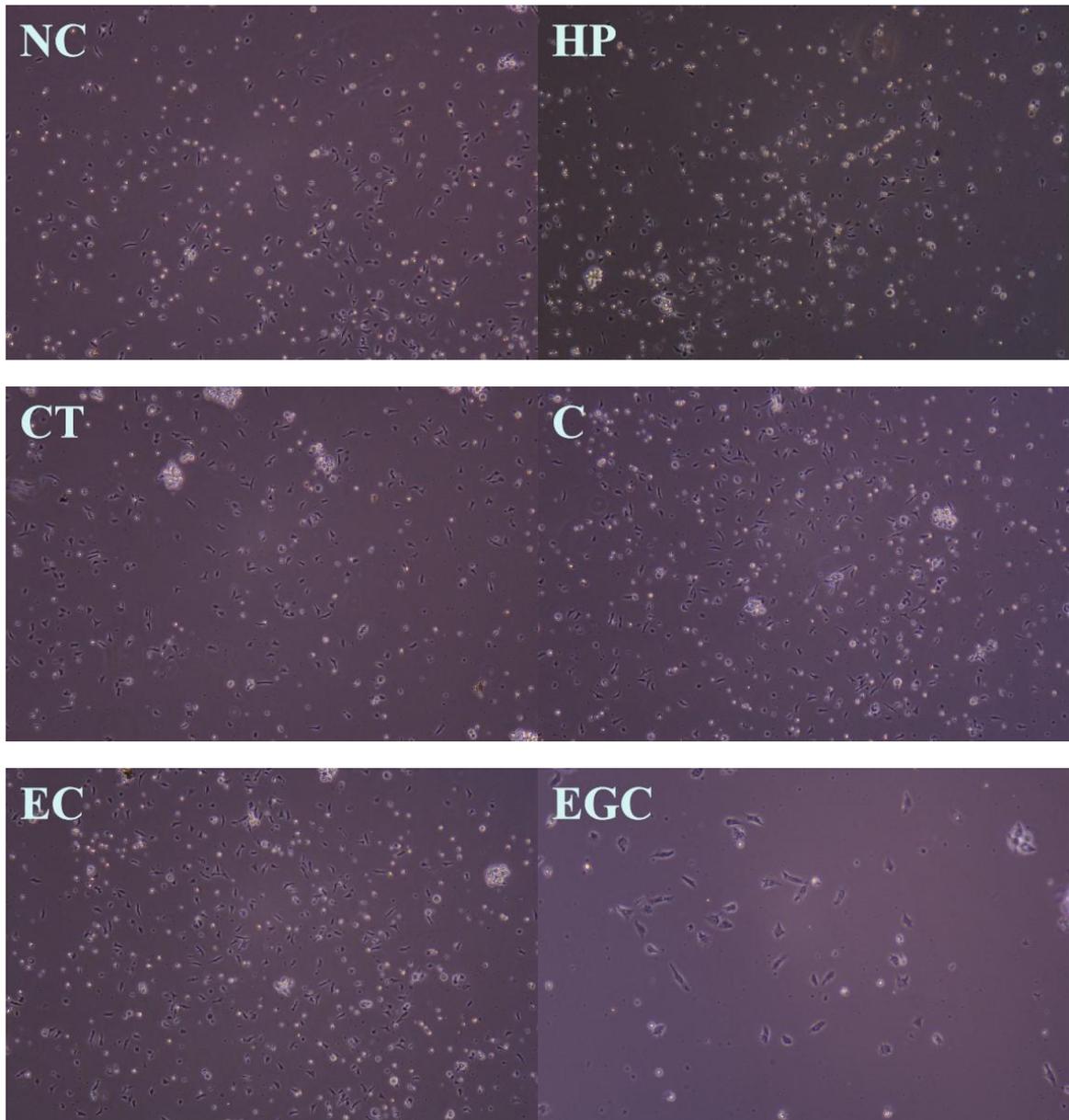
图 3.1 缩合单宁及其单体作用浓度对凡纳滨对虾肠道细胞活性的影响

Fig. 3.1 Effects of condensed tannins and their monomers concentration on intestinal cell viability of

Litopenaeus vannamei

3.2 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞形态指标的影响

由图 3.2 可知，与对照组相比，过氧化氢组凡纳滨对虾肠道细胞氧化损伤较为严重，细胞呈现漂浮状态，形态不规则，部分细胞呈圆形形态、边界模糊、皱缩。缩合单宁及其单体作用于凡纳滨对虾肠道细胞后，细胞状态都有不同程度的修复。



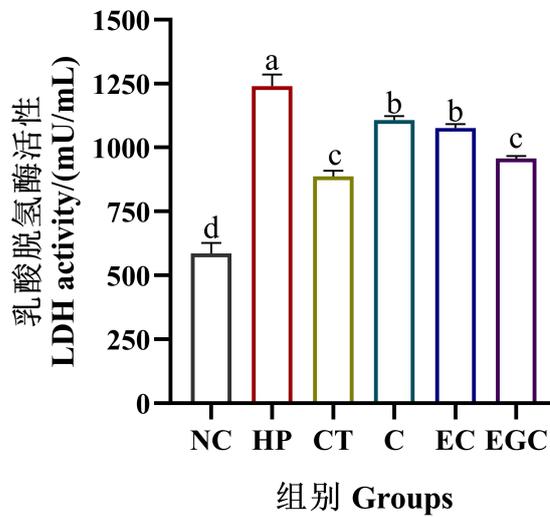
注：NC, Normal control, 对照组；HP, Hydrogen peroxide, 过氧化氢组；CT, Condensed tannins, 缩合单宁组；C, Catechin, 儿茶素组；EC, Epicatechin, 表儿茶素组；EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

图 3.2 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞形态的影响

Fig. 3.2 Effects of condensed tannins and their monomers on morphology of intestinal cells of *Litopenaeus vannamei*

由图 3.3 可知，与对照组相比，过氧化氢组 LDH 活性显著升高 ($P<0.05$)。与过氧化氢组相比，缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组 LDH 活性显著降低 ($P<0.05$)，但仍然显著高于对照组 ($P<0.05$)。缩合单宁与表没食子儿茶素组 LDH 活性显著低于儿茶素与表儿茶素组 ($P<0.05$)。儿茶素与表儿茶素组之间

LDH 活性无显著差异 ($P>0.05$)，缩合单宁与表没食子儿茶素组之间 LDH 活性无显著差异 ($P>0.05$)。



注：NC, Normal control, 对照组；HP, Hydrogen peroxide, 过氧化氢组；CT, Condensed tannins, 缩合单宁组；C, Catechin, 儿茶素组；EC, Epicatechin, 表儿茶素组；EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

数据柱上标不同小写字母代表差异显著 ($P<0.05$)，数据柱上标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P>0.05$)。

Different lowercase letters of data column superscript represent significant difference ($P<0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data column superscript represent no significant difference ($P>0.05$).

图 3.3 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞乳酸脱氢酶活性的影响

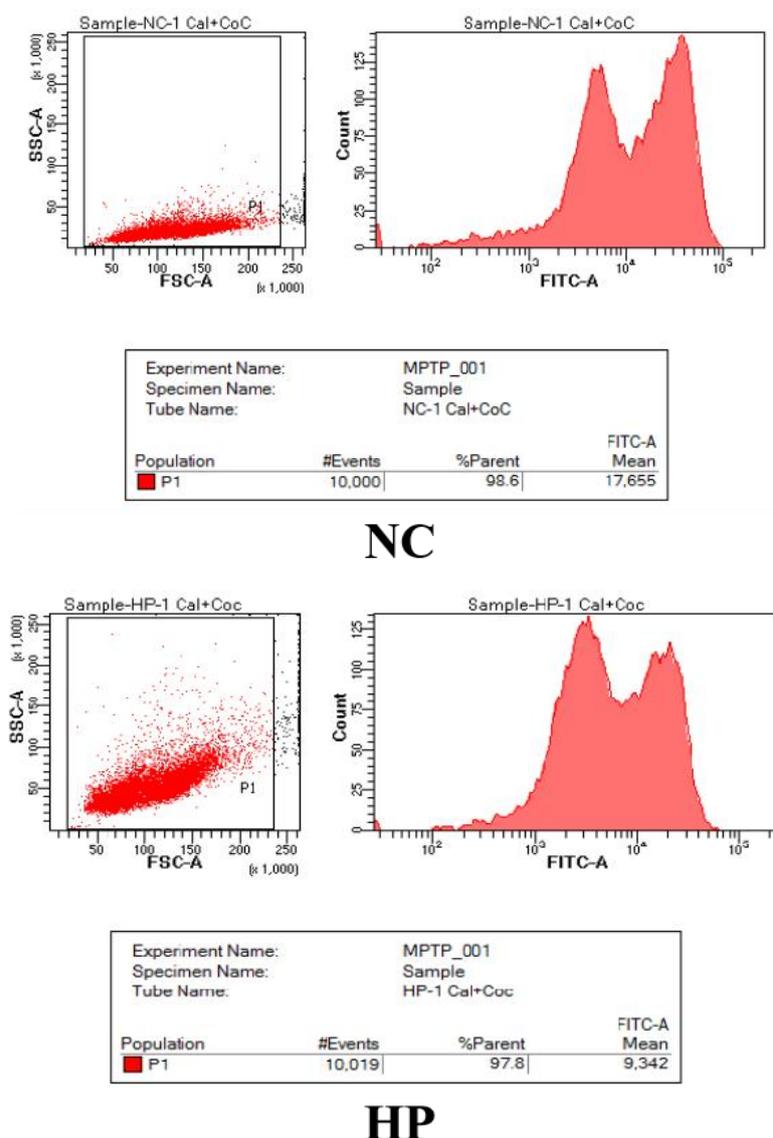
Fig. 3.3 Effects of condensed tannins and their monomers on the activity of lactate dehydrogenase of intestinal cells of *Litopenaeus vannamei*

3.3 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞凋亡指标的影响

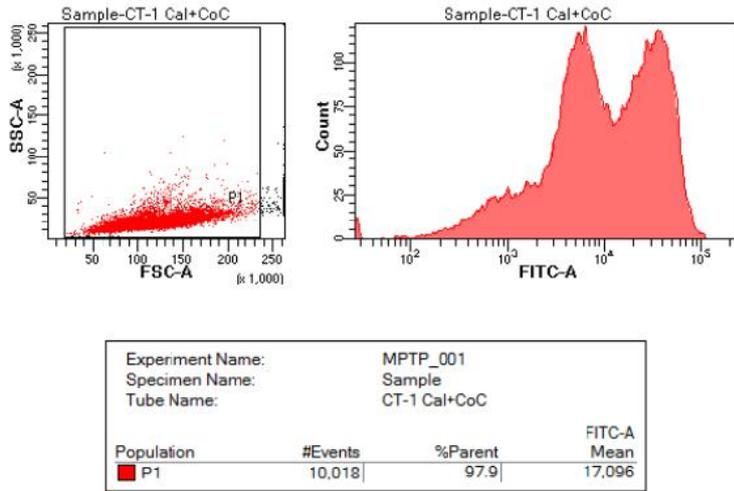
图 3.4 为流式细胞仪检测 MPTP 开放程度所呈现的 FSC-SSC 散点图、流式直方图。FSC-SSC 散点图中的散点代表单个细胞，横坐标为前向散射光区域 FSC-A (Forward scatter-area)，反映细胞体积大小。纵坐标为侧向散射光区域 SSC-A (Side scatter-area)，反映细胞颗粒度。根据细胞体积大小、颗粒度即可区分不同细胞群。流式直方图横坐标为荧光强度，纵坐标为细胞数量，通过设门分析可得细胞数目 (#Events)、门内细胞百分比 (%Parent)、平均荧光强度 (Mean)。使用 Calcein AM 处理、Calcein AM + CoCl₂ + Ionomycin 处理分别作为阳性对照和阴性对照，通过比较不同组别 Calcein AM + CoCl₂ (Cal+CoC) 处理的荧光强度，反映 MPTP 开放程度。荧光强度越弱，MPTP 开放程度越高，细胞呈凋亡或坏死状态。由于样品处

理及检测所需时间导致不同重复样品之间检测时间不一,对荧光强度测定产生影响,因此,试验仅测定单一重复比较不同组间 Cal+CoC 处理平均荧光强度变化。

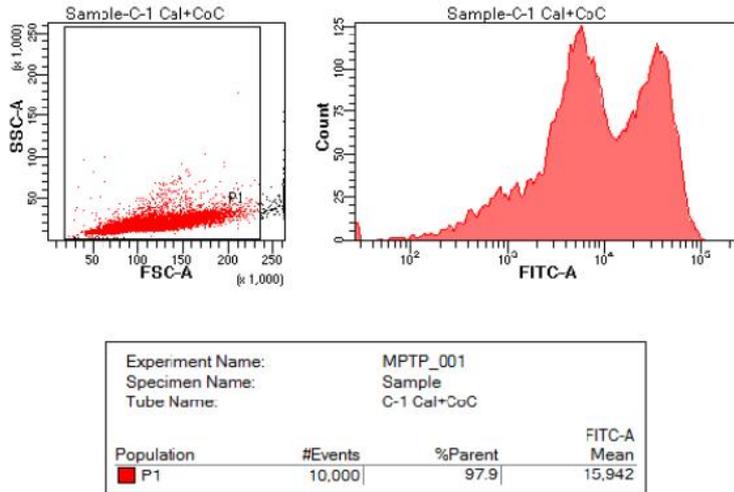
由图 3.4 可知,对照组平均荧光强度为 17 655,过氧化氢组平均荧光强度为 9 342,与对照组相比显著降低 47.09% ($P<0.05$)。缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组平均荧光强度为 17 096、15 942、16 261、15 059,相较于过氧化氢组分别显著升高 83.00%、70.65%、74.06%、61.20% ($P<0.05$),均对 H_2O_2 诱导的凡纳滨对虾肠道细胞 MPTP 开放程度升高具有显著保护作用。



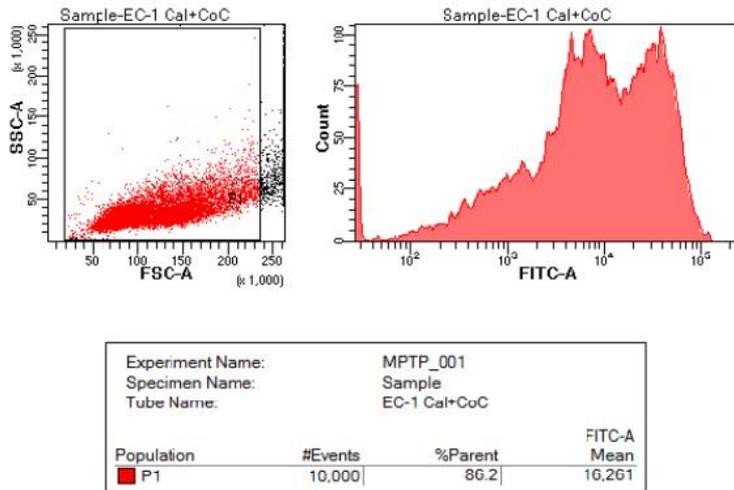
续图



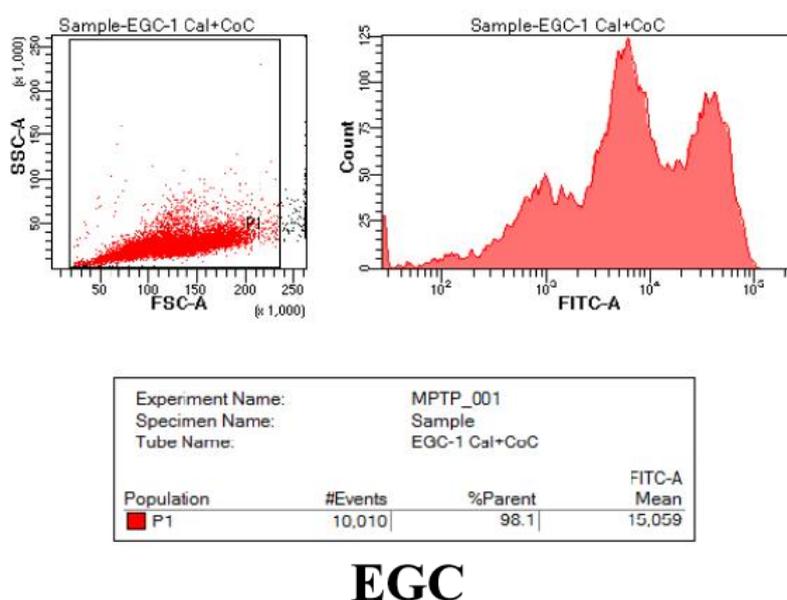
CT



C



EC



注：NC, Normal control, 对照组；HP, Hydrogen peroxide, 过氧化氢组；CT, Condensed tannins, 缩合单宁组；C, Catechin, 儿茶素组；EC, Epicatechin, 表儿茶素组；EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。
FSC: 前向散射光；SSC: 侧向散射光；P1: 细胞群；#Events: 细胞数目；%Parent: 门内细胞百分比；Mean: 平均荧光强度。

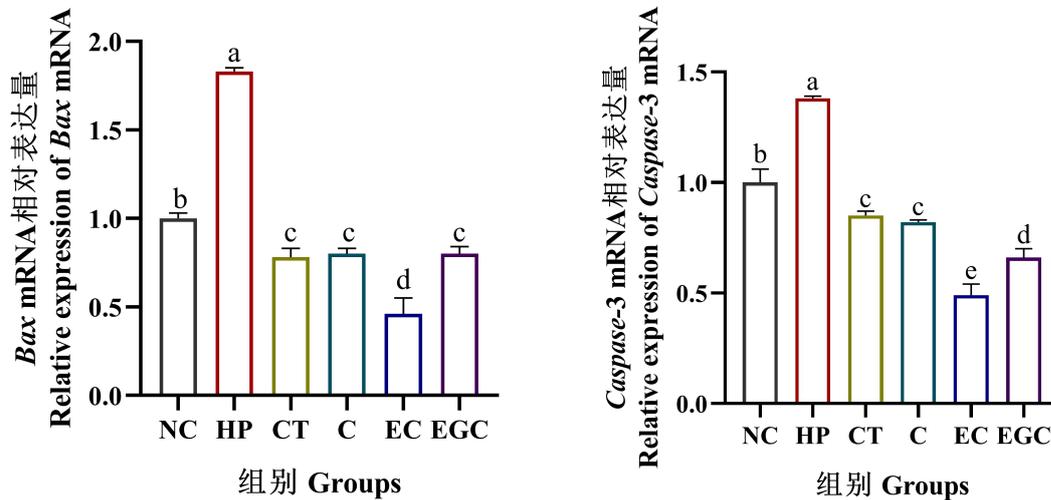
图 3.4 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞线粒体通透性转换孔开放程度的影响
(FSC-SSC 散点图、直方图)

Fig. 3.4 Effects of condensed tannins and their monomers on the opening of mitochondrial permeability transition pore in intestinal cells of *Litopenaeus vannamei* (FSC-SSC scatter diagram and histogram)

由图 3.5 可知，与对照组相比，过氧化氢组 *Bax* mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$)。与过氧化氢组相比，缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组 *Bax* mRNA 相对表达量显著降低 ($P<0.05$)，且显著低于对照组 ($P<0.05$)。表儿茶素组 *Bax* mRNA 相对表达量显著低于缩合单宁、儿茶素、表没食子儿茶素组 ($P<0.05$)。缩合单宁、儿茶素、表没食子儿茶素组之间 *Bax* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$)。

与对照组相比，过氧化氢组 *Caspase-3* mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$)。与过氧化氢组相比，缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组 *Caspase-3* mRNA 相对表达量显著降低 ($P<0.05$)，且显著低于对照组 ($P<0.05$)。表儿茶素

组 *Caspase-3* mRNA 相对表达量显著低于表没食子儿茶素组 ($P<0.05$)。表没食子儿茶素组 *Caspase-3* mRNA 相对表达量显著低于缩合单宁与儿茶素组 ($P<0.05$)。缩合单宁与儿茶素组之间 *Caspase-3* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$)。



注: NC, Normal control, 对照组; HP, Hydrogen peroxide, 过氧化氢组; CT, Condensed tannins, 缩合单宁组; C, Catechin, 儿茶素组; EC, Epicatechin, 表儿茶素组; EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

数据柱上标不同小写字母代表差异显著 ($P<0.05$), 数据柱上标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P>0.05$)。

Different lowercase letters of data column superscript represent significant difference ($P<0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data column superscript represent no significant difference ($P>0.05$).

图 3.5 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞凋亡蛋白基因相对表达量的影响

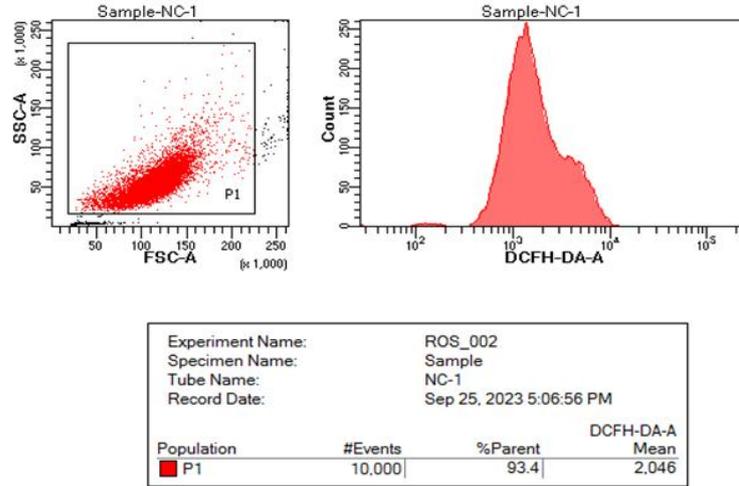
Fig. 3.5 Effects of condensed tannins and their monomers on the relative expressions of apoptosis protein genes in intestinal cells of *Litopenaeus vannamei*

3.4 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞抗氧化指标的影响

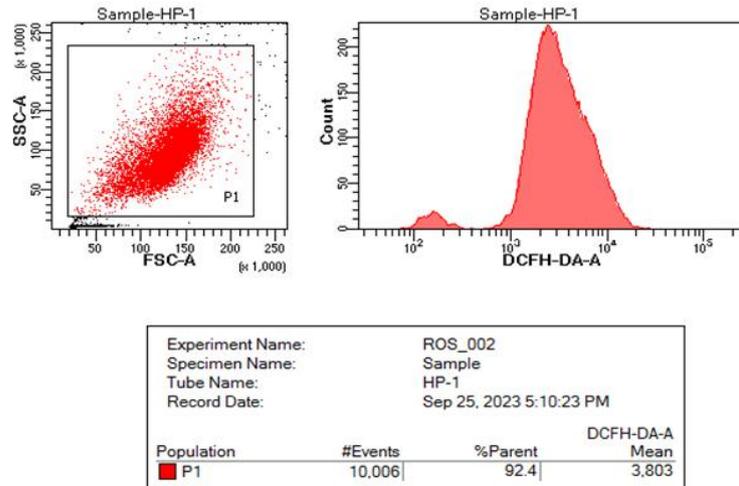
DCFH-DA 进入细胞后水解成 DCFH 留在细胞内, ROS 能把 DCFH 氧化成具荧光的 DCF, 因而通过检测 DCF 荧光强度可反映 ROS 水平, DCF 荧光强度越高, ROS 水平越高。图 3.6 为流式细胞仪检测 ROS 水平所呈现的 FSC-SSC 散点图、流式直方图。图 3.7 为流式直方图设门分析所得平均荧光强度的组间分析柱状图。

由图 3.6 可知, 各组样品根据 FSC-A 与 SSC-A 设门仅划分出单一细胞群 P1 (Population 1)。P1 门内细胞百分比在 88.90%~94.10% 范围内, 细胞数目范围为 10 000~10 046。由图 3.7 可知, 与对照组相比, 过氧化氢组 ROS 水平显著升高 ($P<0.05$)。与过氧化氢组相比, 缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组 ROS 水平显

著降低 ($P<0.05$), 但仍然显著高于对照组 ($P<0.05$)。缩合单宁组 ROS 水平显著低于表没食子儿茶素组 ($P<0.05$), 表没食子儿茶素组 ROS 水平显著低于儿茶素、表儿茶素组 ($P<0.05$)。儿茶素、表儿茶素组之间 ROS 水平无显著差异 ($P>0.05$)。

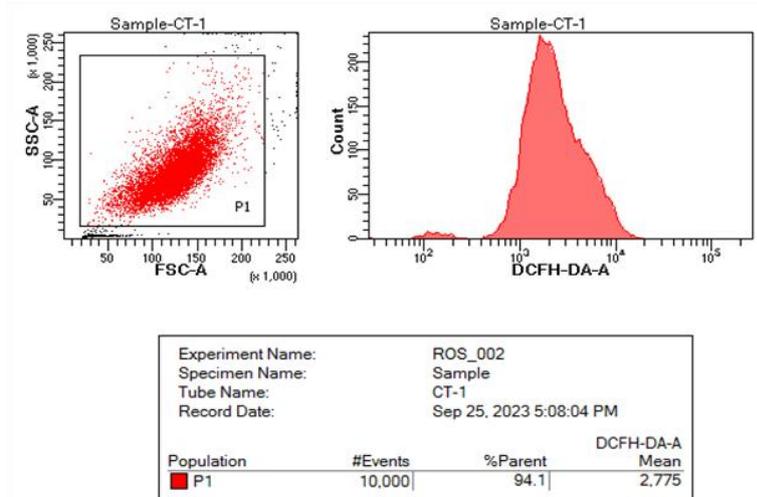


NC

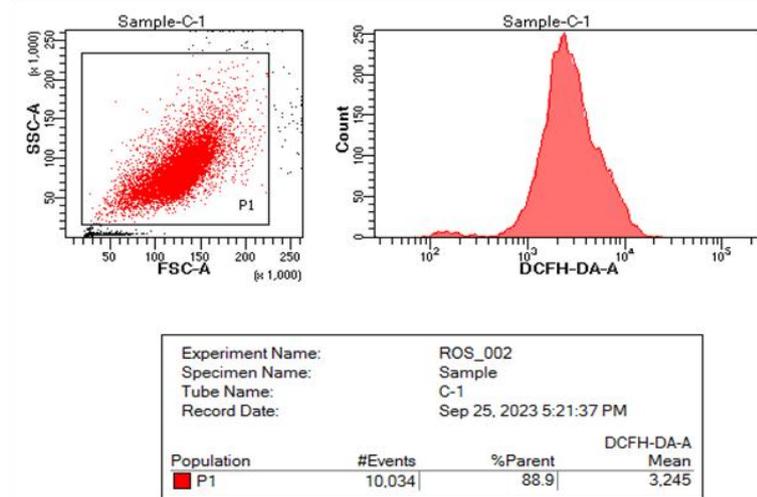


HP

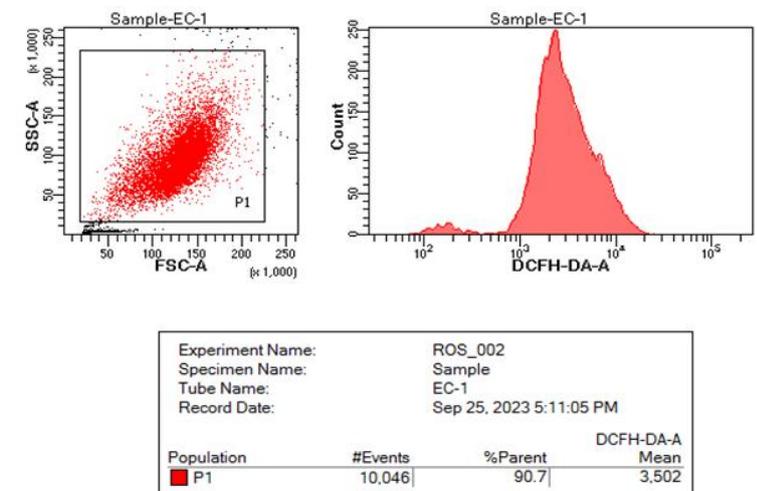
续图



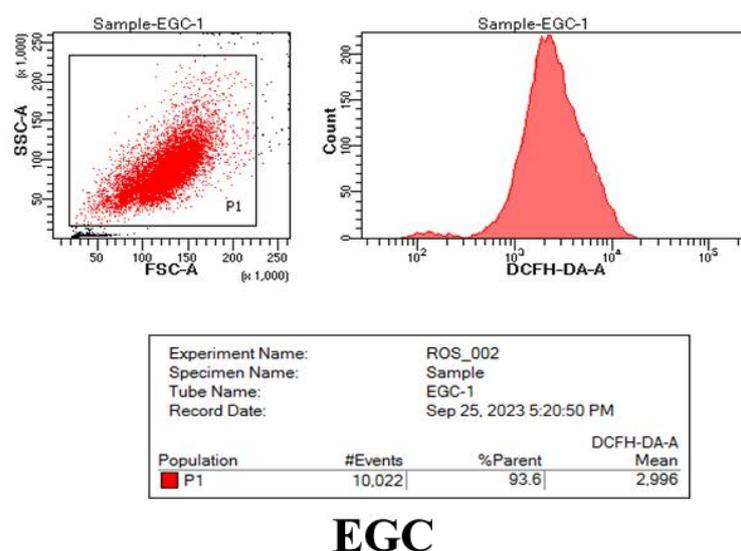
CT



C



EC

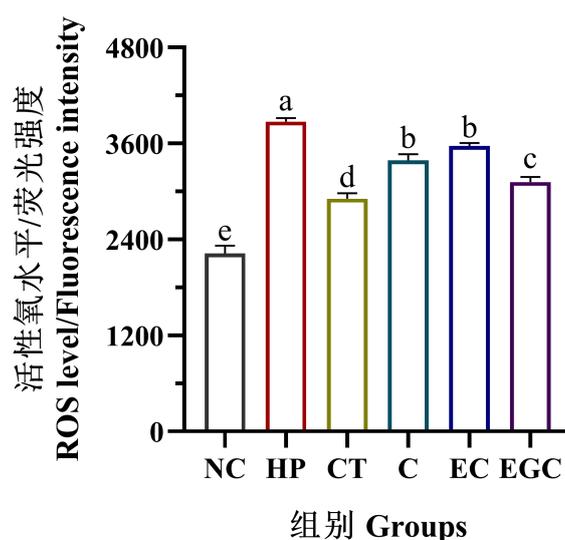


EGC

注：NC, Normal control, 对照组；HP, Hydrogen peroxide, 过氧化氢组；CT, Condensed tannins, 缩合单宁组；C, Catechin, 儿茶素组；EC, Epicatechin, 表儿茶素组；EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。
 FSC: 前向散射光；SSC: 侧向散射光；P1: 细胞群；#Events: 细胞数目；%Parent: 门内细胞百分比；Mean: 平均荧光强度。

图 3.6 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞活性氧水平的影响(FSC-SSC 散点图、直方图)

Fig. 3.6 Effects of condensed tannins and their monomers on ROS levels of intestinal cells of *Litopenaeus vannamei* (FSC-SSC scatter diagram and histogram)



注：NC, normal control, 对照组；HP, hydrogen peroxide, 过氧化氢组；CT, condensed tannins, 缩合单宁组；C, Catechin, 儿茶素组；EC, Epicatechin, 表儿茶素组；EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

数据柱上标不同小写字母代表差异显著 ($P<0.05$), 数据柱上标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P>0.05$)。

Different lowercase letters of data column superscript represent significant difference ($P<0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data column superscript represent no significant difference ($P>0.05$).

图 3.7 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞活性氧水平的影响

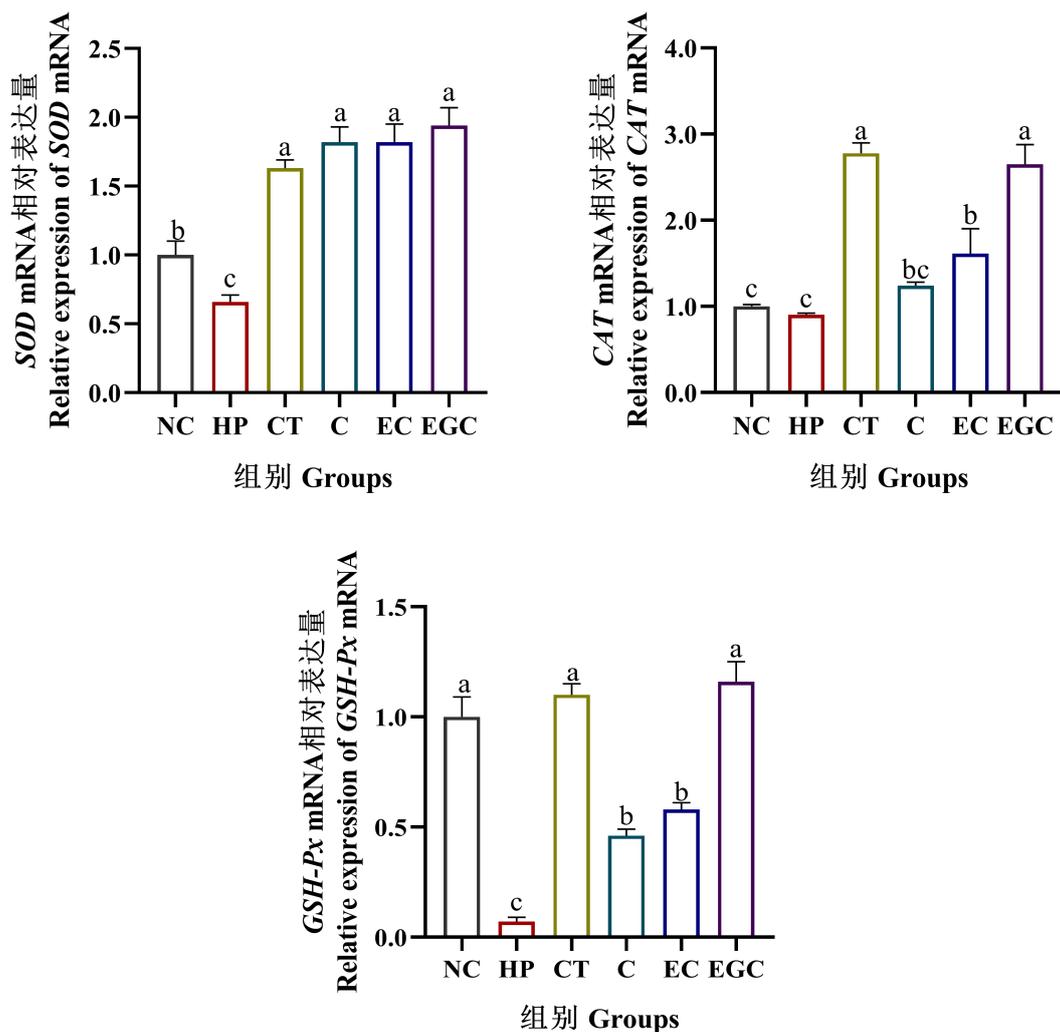
Fig. 3.7 Effects of condensed tannins and their monomers on ROS levels of intestinal cells of

Litopenaeus vannamei

由图 3.8 可知, 与对照组相比, 过氧化氢组 *SOD* mRNA 相对表达量显著降低 ($P<0.05$)。与过氧化氢组相比, 缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组 *SOD* mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$), 且显著高于对照组 ($P<0.05$)。缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组之间 *SOD* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$)。

与对照组相比, 过氧化氢组 *CAT* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$)。与过氧化氢组相比, 儿茶素组 *CAT* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$), 缩合单宁、表儿茶素、表没食子儿茶素组 *CAT* mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$)。缩合单宁、表没食子儿茶素组 *CAT* mRNA 相对表达量显著高于儿茶素、表儿茶素组 ($P<0.05$)。缩合单宁与表没食子儿茶素组之间 *CAT* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$), 儿茶素与表儿茶素组之间 *CAT* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$)。

与对照组相比, 过氧化氢组 *GSH-Px* mRNA 相对表达量显著降低 ($P<0.05$)。与过氧化氢组相比, 缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组 *GSH-Px* mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$)。缩合单宁、表没食子儿茶素组 *GSH-Px* mRNA 相对表达量显著高于儿茶素、表儿茶素组 ($P<0.05$)。对照、缩合单宁、表没食子儿茶素组之间 *GSH-Px* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$), 儿茶素与表儿茶素组之间 *GSH-Px* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$)。



注：NC, Normal control, 对照组；HP, Hydrogen peroxide, 过氧化氢组；CT, Condensed tannins, 缩合单宁组；C, Catechin, 儿茶素组；EC, Epicatechin, 表儿茶素组；EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。
数据柱上标不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 数据柱上标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)。
Different lowercase letters of data column superscript represent significant difference ($P < 0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data column superscript represent no significant difference ($P > 0.05$).

图 3.8 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞抗氧化酶基因相对表达量的影响

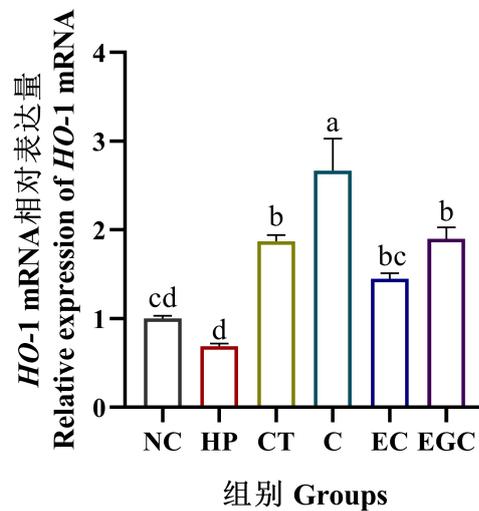
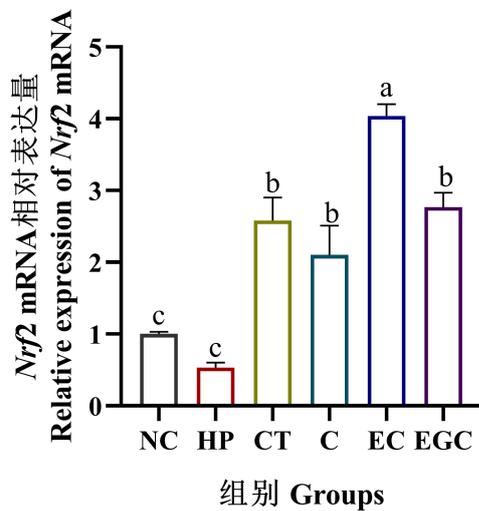
Fig. 3.8 Effects of condensed tannins and their monomers on the relative expressions of antioxidant enzyme genes in intestinal cells of *Litopenaeus vannamei*

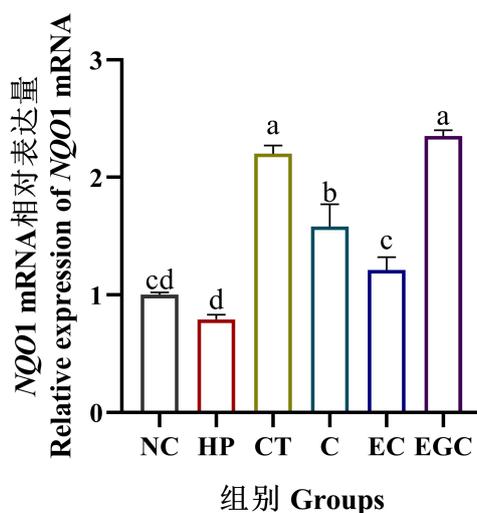
由图 3.9 可知, 与对照组相比, 过氧化氢组 *Nrf2* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$)。与过氧化氢组相比, 缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组 *Nrf2* mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.05$)。与缩合单宁、儿茶素、表没食子儿

茶素组相比，表儿茶素组 *Nrf2* mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$)。缩合单宁、儿茶素、表没食子儿茶素组之间 *Nrf2* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$)。

与对照组相比，过氧化氢组 *HO-1* mRNA 相对表达量呈降低趋势但不显著 ($P>0.05$)，表儿茶素组 *HO-1* mRNA 相对表达量呈升高趋势但不显著 ($P>0.05$)。与过氧化氢组相比，缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组 *HO-1* mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$)。与缩合单宁、表儿茶素、表没食子儿茶素组相比，儿茶素组 *HO-1* mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$)。缩合单宁、表儿茶素、表没食子儿茶素组之间 *HO-1* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$)。

与对照组相比，过氧化氢组 *NQO1* mRNA 相对表达量呈降低趋势但不显著 ($P>0.05$)，表儿茶素组 *NQO1* mRNA 相对表达量呈升高趋势但不显著 ($P>0.05$)。与过氧化氢组相比，缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组 *NQO1* mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$)。与表儿茶素组相比，儿茶素组 *NQO1* mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$)。与儿茶素组相比，缩合单宁、表没食子儿茶素组 *NQO1* mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$)。缩合单宁与表没食子儿茶素组之间 *NQO1* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$)。





注: NC, Normal control, 对照组; HP, Hydrogen peroxide, 过氧化氢组; CT, Condensed tannins, 缩合单宁组; C, Catechin, 儿茶素组; EC, Epicatechin, 表儿茶素组; EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

数据柱上标不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 数据柱上标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)。

Different lowercase letters of data column superscript represent significant difference ($P < 0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data column superscript represent no significant difference ($P > 0.05$).

图 3.9 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞抗氧化信号通路关键因子基因相对表达量的影响

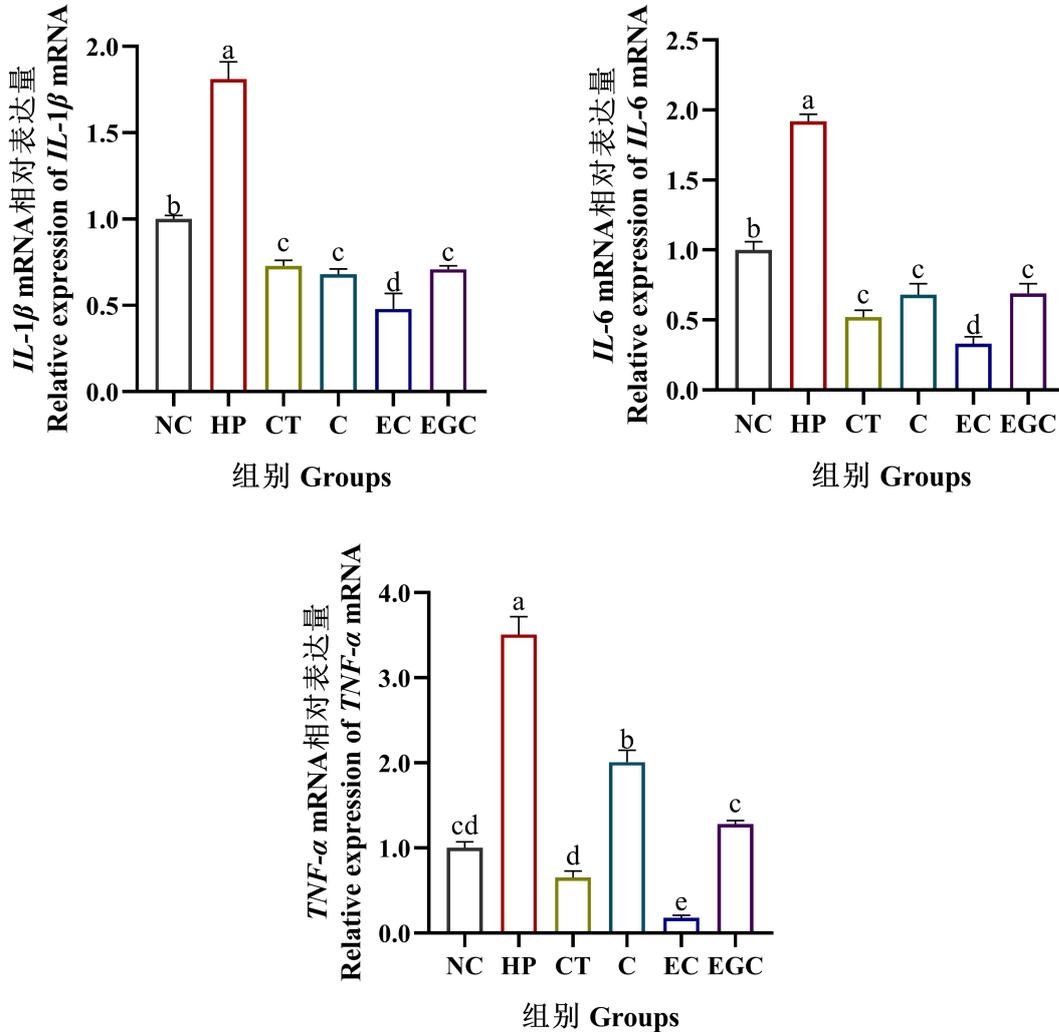
Fig. 3.9 Effects of condensed tannins and their monomers on the relative expressions of key factor genes in antioxidant signaling pathway in intestinal cells of *Litopenaeus vannamei*

3.5 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞免疫指标的影响

由图 3.10 可知, 与对照组相比, 过氧化氢组 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.05$)。与过氧化氢组相比, 缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.05$), 且显著低于对照组 ($P < 0.05$)。与缩合单宁、儿茶素、表没食子儿茶素组相比, 表儿茶素组 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.05$)。缩合单宁、儿茶素、表没食子儿茶素组之间 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ mRNA 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$)。

与对照组相比, 过氧化氢组 $TNF-\alpha$ mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.05$)。与过氧化氢组相比, 儿茶素组 $TNF-\alpha$ mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.05$), 但仍然显著高于对照组 ($P < 0.05$)。与过氧化氢组相比, 缩合单宁、表没食子儿茶素组 $TNF-\alpha$

mRNA 相对表达量显著降低 ($P<0.05$), 且与对照组相比无显著差异 ($P>0.05$), 其中缩合单宁组 *TNF- α* mRNA 相对表达量显著低于表没食子儿茶素组 ($P<0.05$)。与过氧化氢组相比, 表儿茶素组 *TNF- α* mRNA 相对表达量显著降低 ($P<0.05$), 且显著低于对照组 ($P<0.05$)。



注: NC, Normal control, 对照组; HP, Hydrogen peroxide, 过氧化氢组; CT, Condensed tannins, 缩合单宁组; C, Catechin, 儿茶素组; EC, Epicatechin, 表儿茶素组; EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

数据柱上标不同小写字母代表差异显著 ($P<0.05$), 数据柱上标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P>0.05$)。

Different lowercase letters of data column superscript represent significant difference ($P<0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data column superscript represent no significant difference ($P>0.05$).

图 3.10 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞炎症细胞因子基因相对表达量的影响

Fig. 3.10 Effects of condensed tannins and their monomers on the relative expressions of inflammatory cytokine genes in intestinal cells of *Litopenaeus vannamei*

4 讨论

4.1 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞形态与凋亡指标的影响

细胞形态观察可直观反映细胞生理状态。本试验结果表明， H_2O_2 诱导凡纳滨对虾肠道细胞后，细胞呈现漂浮状态且形态表现不规则，部分细胞呈圆形形态、边界模糊、皱缩。然而，缩合单宁及其单体对细胞形态呈现出修复作用，说明其具备减缓对虾肠道细胞氧化损伤的作用。类似研究报道，通过乳腺导管灌注脂磷壁酸（1 mg/kg）构建小鼠乳腺炎症模型，发现腹腔注射儿茶素（10~30 mg/kg）对脂磷壁酸诱导的小鼠乳腺腺泡增生与炎性细胞浸润具有缓解作用（于井成 2023）。

细胞凋亡是由于几种分解代谢酶的产生而发生的程序性细胞死亡（Zaib et al 2022）。LDH 是一种可溶性细胞质酶，在质膜损伤时释放到细胞外空间，导致坏死细胞死亡（Bhatt et al 2020）。本试验结果发现，以 LDH 绝对活性评估细胞氧化损伤，缩合单宁、表没食子儿茶素对 H_2O_2 诱导的凡纳滨对虾肠道细胞氧化损伤保护作用效果要优于儿茶素、表儿茶素。线粒体是细胞中参与细胞凋亡并控制细胞凋亡途径的主要细胞器（Zaib et al 2022）。在病理生理相关致敏因子存在情况下，线粒体基质钙（ Ca^{2+} ）离子增加会导致 MPTP 的开放，当 MPTP 持续开放时，会导致线粒体基质 Ca^{2+} 释放失调、氧化磷酸化终止、内膜展开而基质膨胀，最终外膜破裂而释放凋亡蛋白，导致细胞死亡（Rasola and Bernardi 2011）。本试验结果表明， H_2O_2 诱导凡纳滨对虾肠道细胞 MPTP 开放程度升高（荧光强度越弱，MPTP 开放程度越高，较对照组降低 47.09%），而补充缩合单宁及其单体后，均可有效降低 MPTP 开放程度（较 H_2O_2 组升高 83.00%、70.65%、74.06%、61.20%），有效缓解 H_2O_2 诱导肠道细胞损伤。

Bax 属于凋亡促进因子，当其浓度较高时会加速细胞凋亡进程（罗凤芹等 2016）。Caspase-3 属于凋亡效应子，位于级联反应的下游，可被上游引发剂激活并作用于特定底物，引起细胞形态变化，导致细胞凋亡（于丰铭和徐扬 2020）。本试验结果表明，缩合单宁及其单体均可有效抑制凡纳滨对虾细胞促凋亡蛋白 mRNA 的表达量，且抑制凋亡效果能力以表儿茶素表现较好。

4.2 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞抗氧化指标的影响

正常生理条件下，ROS 的产生与消除维持着平衡状态，当氧自由基产生增加伴随着小分子抗氧化酶减少，造成机体无法快速解除 ROS 毒性或修复自由基损伤，抗

氧化能力不足，倾向于氧化状态，导致氧化应激（Jakubczyk et al 2020）。本试验结果表明，缩合单宁及其单体均可有效降低凡纳滨对虾肠道细胞 H_2O_2 诱导后的 ROS 水平，且缩合单宁、表没食子儿茶素的保护作用效果优于儿茶素、表儿茶素。CAT、SOD、GSH-Px 是酶抗氧化系统经典指标。试验结果表明，缩合单宁与表没食子儿茶素对于增强上述抗氧化酶 mRNA 表达水平的效果较好。上述抗氧化酶以及 HO-1、NQO1 均为 Nrf2 抗氧化信号通路下游因子。缩合单宁及其单体对于动物组织细胞体外氧化应激的保护作用已有部分研究。体外试验表明，800 $\mu\text{mol/L}$ 的缩合单宁可有效保护花鲈（*Lateolabrax maculatus*）肠道细胞因 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 诱导的氧化损伤，表现为 ROS 水平降低，细胞活力、抗氧化酶（CAT、SOD、GSH-Px）活性增强，Nrf2 mRNA 相对表达量升高（Peng et al 2022a）。儿茶素可增强奶牛乳腺上皮细胞 Nrf2 以及 HO-1、NQO1 的蛋白表达，提高 CAT、SOD 活性，降低 ROS 水平，缓解脂磷壁酸诱导的细胞氧化应激（于井成 2023）。本试验结果说明，缩合单宁及其单体均可能通过激活 Nrf2 信号通路，进一步调控下游抗氧化酶 mRNA 的表达水平，增强抗氧化能力从而抵抗氧化损伤。

4.3 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞免疫指标的影响

本试验结果表明，缩合单宁及其单体可有效降低过氧化氢诱导的凡纳滨对虾肠道细胞促炎性细胞因子 *IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 的 mRNA 表达量。缩合单宁及其单体对于动物组织细胞免疫作用也有部分研究，体外试验表明，儿茶素有效抑制促炎性细胞因子 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6* 的 mRNA 表达量，缓解脂磷壁酸诱导的奶牛乳腺上皮细胞炎症（于井成 2023）。李泽林等（2021）报道，通过气管滴注 LPS 构建小鼠急性肺损伤模型，预处理于腹腔注射表儿茶素可有效调节炎症反应，降低肺组织 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6* 的含量。表儿茶素有效降低 LPS 诱导的奶牛乳腺上皮细胞 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6* 的蛋白表达升高（马骁 2021）。上述研究（马骁 2021，于井成 2023）均报道，缩合单宁单体可介导核因子 κB （NF- κB ）、丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路缓解炎症反应。本试验结果表明，表儿茶素具有较好的抗炎效果。

5 小结

(1) 本试验条件下, 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾体外肠道细胞的适宜作用浓度均为 800 $\mu\text{mol/L}$ 。

(2) 缩合单宁及其单体可通过抑制细胞凋亡(降低 LDH 活性与线粒体 MPTP 开放程度以及下调促凋亡蛋白 *Bax*、*Caspase-3* 的 mRNA 相对表达量)、增强抗氧化能力(降低 ROS 水平与上调 Nrf2 信号通路相关抗氧化酶 *HO-1*、*NQO1*、*CAT*、*SOD*、*GSH-Px* 的 mRNA 相对表达量)、降低细胞炎症反应(下调促炎性细胞因子 *IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 的 mRNA 相对表达量), 有效缓解 H_2O_2 诱导的凡纳滨对虾肠道细胞氧化损伤。

(3) 以 LDH 活性、ROS 水平、抗氧化酶(*CAT*、*GSH-Px*、*NQO1*) 的 mRNA 相对表达量为评价指标, 缩合单宁、表没食子儿茶素的抗氧化损伤作用效果要优于儿茶素、表儿茶素。以细胞促凋亡蛋白(*Bax*、*Caspase-3*)、促炎性细胞因子(*IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α*) 的 mRNA 相对表达量为评价指标, 表儿茶素的抗氧化损伤作用效果要优于缩合单宁、儿茶素、表没食子儿茶素。

第四章 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾生长、抗氧化与免疫力及肠道健康的影响

1 前言

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)，俗称南美白对虾，是我国海水养殖虾类第一大品种，占比虾类海水养殖总产量的 80.65%（中国渔业统计年鉴 2023）。作为一种重要的水产养殖生物，凡纳滨对虾在过去 30 年的繁育过程中受到了较高的选择压力，表现出较强的底栖适应能力（Zhang et al 2019）。目前，凡纳滨对虾的集约化养殖程度越来越高，普遍存在死亡率高、病害频发等问题。同时，近年国内凡纳滨对虾价格受到厄瓜多尔产区进口虾的影响较大，对国内凡纳滨对虾养殖业造成一定冲击。因此，从饲料营养学的角度对凡纳滨对虾的养殖进行提质增效，维持养殖凡纳滨对虾机体的生长与健康成为亟待解决的现实问题。

后抗生素时代，寻找抗生素替代物维持动物机体健康成为迫切需要，凡纳滨对虾的绿色健康养殖及替抗产品的开发成为行业关注的焦点之一。天然植物活性物质具有抗氧化、抑菌、消炎、调节动物免疫等多种功能，是近年来功能性饲料添加剂开发的重要方向（周雨瀚等 2020；赵玉超和蒋林树 2022）。本课题组前期研究表明，缩合单宁可显著提高凡纳滨对虾血清 SOD 和 CAT 活性，降低血清 MDA 含量，上调凡纳滨对虾肝胰腺 SOD 和 GSH-Px 表达量，激活细胞抗氧化信号通路关键调控因子 *Nrf2* 基因表达水平，说明缩合单宁可增强凡纳滨对虾机体抗氧化能力（Peng et al 2021b, 彭凯等 2022）。本试验在凡纳滨对虾基础饲料中分别添加 0.2%（添加量依据前期研究结果，血清 SOD 活性为评价指标，适宜添加量为 0.194%）的葡萄籽缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素，通过饲养试验评价缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾的饲喂效果差异。

2 材料与方法

2.1 试验饲料配制

试验饲料组成及营养水平见表 4.1，其中 NC（Normal control，对照组）为基础饲料，在基础饲料中分别添加 0.2% 的缩合单宁（Condensed tannins, CT）、儿茶素（Catechin, C）、表儿茶素（Epicatechin, EC）、表没食子儿茶素（Epigallocatechin,

EGC)，共制备 5 组试验饲料。缩合单宁来源于葡萄籽，纯度 $\geq 98\%$ 。各儿茶素类单体纯度依次为 99.0%、98.9%、98.5%，购于上海源叶生物科技有限公司。饲料原料粉碎至全部通过 60 目（250 μm ）标准筛，缩合单宁及其单体充分溶解于蒸馏水后添加到饲料中，经混合机（YHJ-50B，广州市维拉维机械设备有限公司）混合均匀后，通过双螺杆挤条机（F-75，华南理工大学科技实业总厂）制成 1.5 mm 颗粒饲料，55 $^{\circ}\text{C}$ 热风循环烘箱（CT-C I，江苏省范群干燥设备厂）烘干，自然冷却至室温，然后将饲料暂存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱（SDJ-500LDB2，深圳天翔冷柜）备用。

饲料营养成分粗蛋白质、粗脂肪、粗灰分、水分含量测定采用国标方法，依次为 GB/T 6432-2018、GB/T 6433-2006、GB/T 6438-2007、GB/T 6435-2014。饲料中缩合单宁及儿茶素类单体含量测定分别参照 Terrill 等（1992）、GB/T 8313-2018 方法，其实测值依次为 0.194%、0.186%、0.161%、0.268%。

表 4.1 试验饲料组成及营养水平（干物质基础）

项目 Items	组别 Groups ¹⁾				
	NC	CT	C	EC	EGC
原料 Ingredients					
秘鲁鱼粉 Peru fish meal	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
豆粕 Soybean meal	28.0	28.0	28.0	28.0	28.0
花生麸 Peanut bran	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
鸡肉粉 Poultry by-product meal	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
面粉 Flour	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
鱼油 Fish oil	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
大豆卵磷脂 Soybean phospholipid	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
维生素预混料 Vitamin premix ²⁾	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
矿物质预混料 Mineral premix ³⁾	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
蛋氨酸 Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
氯化胆碱 Choline chloride	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
食盐 NaCl	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
海藻酸钠 Sodium alginate	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
微晶纤维素 Microcrystalline cellulose	1.4	1.2	1.2	1.2	1.2
葡萄籽缩合单宁 Grape seed condensed tannins	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0
儿茶素 Catechin	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0
表儿茶素 Epicatechin	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0
表没食子儿茶素 Epigallocatechin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
合计 Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
实测营养水平 Actual nutrient levels					
粗蛋白质 Crude protein	45.47	45.36	44.96	45.37	46.55

续表

粗脂肪 Crude lipid	7.54	7.14	8.56	7.51	7.90
粗灰分 Ash	9.38	9.42	9.48	9.48	9.44
水分 Moisture	7.08	6.95	7.65	6.94	7.18

1) NC, Normal control, 对照组; CT, Condensed tannins, 缩合单宁组; C, Catechin, 儿茶素组; EC, Epicatechin, 表儿茶素组; EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

2) 每千克维生素预混料含: 维生素 A 4 000 000 IU, 维生素 B₁ 5 g, 维生素 B₂ 15 g, 维生素 B₆ 8 g, 维生素 B₁₂ 20 mg, 维生素 D₃ 800 000 IU, 维生素 E 30 g, 维生素 K₃ 10 g, 烟酸 40 g, 肌醇 100 g, D-泛酸钙 25 g, D-生物素 80 mg, 叶酸 2.5 g。One kilogram of vitamin premix contained: VA 4 000 000 IU, VB₁ 5 g, VB₂ 15 g, VB₆ 8 g, VB₁₂ 20 mg, VD₃ 800 000 IU, VE 30 g, VK₃ 10 g, nicotinic acid 40 g, inositol 100 g, D-calcium pantothenate 25 g, D-biotin 80 mg, folic acid 2.5 g.

3) 每千克矿物质预混料含: 铁 0.75 g, 铜 1.5 g, 锌 5 g, 镁 12 g, 钴 160 mg, 硒 3.6 mg, 碘 60 mg。One kilogram of mineral premix contained: Fe 0.75 g, Cu 1.5 g, Zn 5 g, Mg 12 g, Co 160 mg, Se 3.6 mg, I 60 mg.

注: 维生素、矿物质预混料由广州飞禧特生物科技有限公司提供。Note: Vitamin and mineral premix were provided by Guangzhou Fishtech Biotechnology Co., Ltd.

2.2 试验设计与饲养管理

本试验于广东省农业科学院动物科学研究所水产研究中心循环水养殖系统开展, 试验用凡纳滨对虾购于中山市广东中正水产科技有限公司。在正式饲养前, 将对虾置于水泥暂养池进行环境适应, 暂养期间投喂商业对虾配合饲料(湘海™, 唐人神集团)。选取初始体重为 0.80 ± 0.01 g 的凡纳滨对虾 800 尾, 随机分为 5 组, 每组设置 4 重复, 每一重复 40 尾虾, 分别置于容积为 350 L 的玻璃纤维养殖缸中。按照分组分别投喂 5 组试验饲料, 每天定时于 08:30、14:30、20:30 进行投喂, 对虾表观饱食后停止投喂。每天记录好对虾死亡情况、饲料日投喂量及水质状况, 饲养周期为 45 d。饲养期间水温 26~30 °C, 溶解氧含量 > 5 mg/L, pH 7.5~8.1, 盐度 4‰~6‰, 氨氮含量 < 0.2 mg/L, 亚硝酸盐含量 < 0.05 mg/L, 自然光照。

2.3 样品采集与分析

2.3.1 生长性能指标

饲养试验结束后, 对凡纳滨对虾禁食 24 h 后进行采样, 统计每缸对虾的数量、总重量、饲料投喂量, 用于计算终末体重(Final body weight, FBW)、增重率(Weight gain rate, WGR)、特定生长率(Specific growth rate, SGR)、采食量(Feed intake,

FI) 和饲料系数 (Feed coefficient, FC)。生长性能相关指标计算公式如下:

终末体重 (FBW, g) = 对虾终末总重 / 对虾终末尾数;

增重率 (WGR, %) = (对虾终末体重 - 对虾初始体重) / 对虾初始体重 × 100%;

特定生长率 (SGR, %/d) = (ln 对虾终末体重 - ln 对虾初始体重) / 饲养天数 × 100%;

采食量 (FI, g/shrimp) = 对虾饲料投喂量 / [(对虾初始尾数 + 对虾终末尾数) / 2];

饲料系数 (FC) = 对虾饲料投喂量 / (对虾终末体重 - 对虾初始体重)。

2.3.2 血浆代谢物及抗氧化与免疫指标

每缸随机选取 15 尾对虾, 于围心腔处采集血液, 装入含有肝素钠的 10 mL 抗凝管, 4 °C 静置 12 h 后, 5 000 r/min、4 °C 条件下离心 (Eppendorf, Centrifuge 5804 R) 15 min, 分离血浆分装于 200 uL、2 mL 离心管, 冻存于 -80 °C 冰箱, 用于后续血浆生化、抗氧化与免疫及肠道通透性指标的测定。

血浆生化指标白蛋白 (Albumin, ALB)、球蛋白 (Globulin, GLB)、总蛋白 (Total protein, TP)、尿素氮 (Blood urea nitrogen, BUN)、葡萄糖 (Glucose, GLU)、总胆固醇 (Total cholesterol, TC)、甘油三酯 (Triacylglycerol, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (High-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (Low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 含量及谷草转氨酶 (Aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶 (Alanine aminotransferase, ALT) 活性采用全自动生化分析仪 (日立 7180) 进行测定。

血浆抗氧化指标总抗氧化能力 (Total antioxidant capacity, T-AOC)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、总超氧化物歧化酶 (Total superoxide dismutase, T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量采用商业试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 按照说明书方法进行测定, 试剂盒货号依次为 A015-2-1、A007-1-1、A001-1、A005-1、A003-1。

血浆免疫指标免疫球蛋白 M (Immunoglobulin M, IgM)、补体 3 (Complement 3, C3) 含量采用酶联免疫分析试剂盒 (江苏酶标生物科技有限公司) 按照说明书方法进行测定, 产品编号依次为 MB-502918A、MB-600004A。血浆免疫指标碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, AKP)、溶菌酶 (Lysozyme, LZM) 活性采用商业试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 按照说明书方法进行测定, 试剂盒货号依次为 A059-2、A050-1-1。

血浆肠道通透性指标二胺氧化酶（Diamine oxidase, DAO）活性、脂多糖（Lipopolysaccharide, LPS）、D-乳酸（D-lactate, D-LA）含量采用酶联免疫分析试剂盒（江苏酶标生物科技有限公司）按照说明书方法进行测定，产品编号依次为 MB-600002A、MB-502909A、MB-600006A。

2.3.3 肝胰腺抗氧化指标

每缸随机选取 3 尾对虾，于超净工作台解剖分离肝胰腺，装入 5 mL 冻存管，冻存于 -80 °C 冰箱，用于后续肝胰腺抗氧化指标的测定。肝胰腺抗氧化指标 T-AOC 采用商业试剂盒（南京建成，货号 A015-2-1）按照说明书方法进行测定。肝胰腺抗氧化指标 SOD、GSH-Px 的 mRNA 相对表达量测定时，样品处理、实时荧光定量 PCR、试验数据分析方法同第三章 2.5.2、2.5.3。

2.3.4 肠道抗氧化与免疫指标

每缸随机选取 3 尾对虾，于超净工作台解剖分离肠道，装入 5 mL 冻存管，冻存于 -80 °C 冰箱，用于后续肠道抗氧化与免疫指标的测定。肠道抗氧化与免疫指标中的 T-AOC 测定方法同本章 2.3.3，而 *Nrf2*、*CAT* 以及 *IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-10*、*TNF- α* 的 mRNA 相对表达量测定方法同第三章 2.5.2、2.5.3、2.5.4。

2.3.5 肠道菌群

每缸随机选取 3 尾对虾，于超净工作台解剖分离肠道并取出内容物，装入 5 mL 冻存管，冻存于 -80 °C 冰箱，用于后续肠道菌群结构分析。采用细菌 DNA 提取试剂盒（广州美基，货号：D6361-03）提取肠道内容物微生物 DNA 后，用正向引物 341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'，反向引物 806R: 5'-GGACTACHVGGGTATCTAAT-3'，对 16S rDNA V3~V4 区进行 PCR 扩增（反应条件：94 °C 预变性 2 min，98 °C 变性 10 s、62 °C 退火 30 s、68 °C 延伸 30 s 共 30 个循环，68 °C 终延伸 5 min）。扩增子提取、纯化、定量后，构建测序文库，采用 Illumina MiSeq PE 250 平台进行高通量测序，委托广州兴誉生物科技有限公司完成。

测序得到原始数据后，经过质控、拼接、聚类获得优化序列，使用 USEARCH 软件（version 9.2.64）的 UPARSE 算法以 97% 的相似水平进行操作分类单元（Operational taxonomic units, OTUs）聚类。组间 Venn 分析在 R project 软件（version 3.4.1）中执行以识别特有与共有的 OTUs。将 OTUs 中代表性序列集合，采用 RDP Classifier（version 2.2）的 Naïve Bayesian assignment 算法与 Greengene（version gg_13_5）数据库进行物种注释（设定置信度的阈值为 0.8~1.0）。Alpha 多样性指数 a

ce、chao、shannon、simpson 的计算在 QIIME 软件 (version 1.9.1) 中执行, 而组间比较采用 Welch's t 检验和 Wilcoxon 秩和检验计算, 各组之间比较采用 Tukey's HS D 检验和 Kruskal-Wallis H 检验计算, 均在 R project 软件 (version 3.4.1) 中执行。

2.3.6 肠道短链脂肪酸含量

每缸随机选取 6 尾对虾, 于超净工作台解剖分离肠道, 装入 5 mL 冻存管, 冻存于 -80 °C 冰箱, 用于后续肠道短链脂肪酸含量分析。肠道中 (肠道组织与内容物) 乙酸 (Acetic acid)、丙酸 (Propionic acid)、异丁酸 (Isobutyric acid)、己酸 (Caproic acid) 的含量采用气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 进行测定, 委托苏州帕诺米克生物医药科技有限公司完成。

配置完各短链脂肪酸标准品后, 参考 Han 等 (2018) 方法, 取适量样本于 1.5 mL 离心管中, 加 500 μ L 水, 加入 100 mg 玻璃珠, 匀浆 1 min, 于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取 200 μ L 上清, 加 100 μ L 15 % 磷酸, 再加 375 μ g/mL 的内标 (4-甲基戊酸) 溶液 20 μ L 和乙醚 280 μ L 匀浆 1 min, 于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清上机测试。色谱条件与质谱条件参考 Zhang 等 (2018)、Hsu 等 (2019)。

2.4 数据处理与分析

同第二章 2.5。

3 结果与分析

3.1 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾生长性能的影响

由表 4.2 可知, 各组之间生长性能指标 IBW、FBW、WGR、SGR、FI、FC 均无显著差异 ($P>0.05$)。

表 4.2 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾生长性能的影响

Table 4.2 Growth performance of *Litopenaeus vannamei* fed with condensed tannins and their monomers

项目 Items	组别 Groups				
	NC	CT	C	EC	EGC
初始体重 IBW/g	0.80±0.01	0.80±0.01	0.80±0.01	0.80±0.01	0.80±0.01
终末体重 FBW/g	10.76±0.59	10.86±0.15	10.73±0.25	11.19±0.32	11.40±0.27
增重率 WGR/%	1245.00±73.70	1258.49±18.52	1242.88±32.09	1301.91±40.77	1325.15±35.12
特定生长率 SGR/(%/d)	5.90±0.12	5.93±0.03	5.90±0.06	6.00±0.07	6.04±0.06
采食量 FI/(g/shrimp)	15.79±0.32	16.92±0.67	16.67±0.62	16.88±0.42	17.66±0.75
饲料系数 FC	1.60±0.08	1.68±0.06	1.68±0.04	1.63±0.06	1.67±0.11

注：NC, Normal control, 对照组；CT, Condensed tannins, 缩合单宁组；C, Catechin, 儿茶素组；EC, Epicatechin, 表儿茶素组；EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

同行数据肩标不同小写字母代表差异显著 ($P<0.05$), 数据肩标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P>0.05$)。

In the same line, different lowercase letters of data shoulder represent significant difference ($P<0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data shoulder represent no significant difference ($P>0.05$).

3.2 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾血浆代谢物的影响

由表 4.3 可知, 与对照组相比, 表儿茶素组血浆 AST 活性显著升高 ($P<0.05$), 缩合单宁、儿茶素、表没食子儿茶素组血浆 AST 活性无显著差异 ($P>0.05$)。与对照组相比, 表没食子儿茶素组血浆 ALT 活性显著升高 ($P<0.05$), 缩合单宁、儿茶素、表儿茶素组血浆 ALT 活性无显著差异 ($P>0.05$), 缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组之间血浆 ALT 活性无显著差异 ($P>0.05$)。与对照组相比, 缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组之间血浆 AST 与 ALT 比值无显著差异 ($P>0.05$)。与表儿茶素组相比, 表没食子儿茶素组血浆 AST 与 ALT 比值显著降低 ($P<0.05$)。各组之间血浆 ALB、GLB、TP、BUN、GLU、TC、TG、HDL-C、LDL-C 含量均无显著差异 ($P>0.05$)。

表 4.3 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾血浆代谢物的影响

Table 4.3 Plasma metabolites of *Litopenaeus vannamei* fed with condensed tannins and their

monomers

项目 Items	组别 Groups				
	NC	CT	C	EC	EGC
白蛋白 ALB (g/L)	8.78±0.45	9.05±0.49	7.83±0.44	8.25±0.16	8.58±0.20
球蛋白 GLB (g/L)	84.95±4.29	91.05±2.63	83.05±3.30	81.53±3.18	82.85±4.21
总蛋白 TP (g/L)	93.73±4.61	100.10±2.27	90.88±3.72	89.78±3.21	91.43±4.36
尿素氮 BUN (mmol/L)	1.97±0.30	2.11±0.17	1.71±0.22	2.01±0.13	1.61±0.13
葡萄糖 GLU (mmol/L)	1.88±0.38	1.95±0.10	2.00±0.33	2.35±0.17	2.25±0.25
总胆固醇 TC (mmol/L)	2.62±0.23	2.56±0.30	2.34±0.26	2.43±0.25	2.27±0.28
甘油三酯 TG (mmol/L)	1.57±0.23	1.58±0.26	1.49±0.19	1.47±0.24	1.34±0.16
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C (mmol/L)	0.51±0.04	0.49±0.05	0.47±0.05	0.38±0.07	0.43±0.03
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C (mmol/L)	1.33±0.14	1.31±0.18	1.21±0.13	1.30±0.16	1.19±0.17
谷草转氨酶 AST (U/L)	293.75±20.25 ^b	329.50±36.10 ^b	324.75±28.81 ^b	422.50±33.72 ^a	293.50±21.09 ^b
谷丙转氨酶 ALT (U/L)	430.00±10.53 ^b	490.00±31.49 ^{ab}	480.25±32.19 ^{ab}	505.50±22.23 ^{ab}	530.50±10.52 ^a
谷草转氨酶/谷丙转氨酶 AST/ALT	0.68±0.04 ^{ab}	0.68±0.07 ^{ab}	0.68±0.05 ^{ab}	0.83±0.05 ^a	0.56±0.05 ^b

注: NC, Normal control, 对照组; CT, Condensed tannins, 缩合单宁组; C, Catechin, 儿茶素组; EC, Epicatechin, 表儿茶素组; EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

同行数据肩标不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 数据肩标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)。

In the same line, different lowercase letters of data shoulder represent significant difference ($P < 0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data shoulder represent no significant difference ($P > 0.05$).

3.3 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾血浆抗氧化与免疫指标的影响

由表 4.4 可知, 与对照组相比, 表儿茶素组血浆 T-AOC 显著升高 ($P < 0.05$), 缩合单宁、儿茶素、表没食子儿茶素组血浆 T-AOC 无显著差异 ($P > 0.05$)。与对照组相比, 表没食子儿茶素组血浆 CAT 活性显著升高 ($P < 0.05$) 而 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$), 缩合单宁组血浆 CAT 活性、MDA 含量无显著差异 ($P > 0.05$), 儿茶素、表儿茶素组血浆 CAT 活性呈现升高趋势而 MDA 含量呈现降低趋势但均不显著 ($P > 0.05$)。儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组之间血浆 CAT 活性、MDA 含量无显著差异 ($P > 0.05$)。与对照组相比, 表儿茶素组血浆 AKP 活性显著升高 ($P < 0.05$), 儿茶素组血浆 AKP 活性呈现升高趋势但不显著 ($P > 0.05$), 缩合单宁、表没食子儿茶素组血浆 AKP 活性无显著差异 ($P > 0.05$)。

各组之间血浆 T-SOD、GSH-Px、LZM 活性与 IgM、C3 含量均无显著差异 ($P > 0.05$)。

与对照组相比, 缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组血浆 DAO 活性与 LPS、D-LA 含量无显著差异 ($P > 0.05$)。与缩合单宁组相比, 表没食子儿茶素组血浆 D-LA 含量显著升高 ($P < 0.05$)。

表 4.4 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾血浆抗氧化与免疫及肠道通透性指标的影响

Table 4.4 Plasma antioxidant and immune and intestinal permeability indexes of *Litopenaeus*

vannamei fed with condensed tannins and their monomers

项目 Items	组别 Groups				
	NC	CT	C	EC	EGC
血浆抗氧化指标 Plasma antioxidant indexes					
总抗氧化能力 T-AOC (mM)	0.99±0.03 ^b	1.03±0.03 ^b	1.02±0.04 ^b	1.17±0.03 ^a	1.05±0.02 ^b
过氧化氢酶 CAT (U/mL)	1.51±0.38 ^b	1.61±0.16 ^b	2.44±0.28 ^{ab}	2.39±0.32 ^{ab}	2.94±0.34 ^a
总超氧化物歧化酶 T-SOD (U/mL)	33.19±0.56	30.95±2.32	33.40±2.65	31.76±1.78	36.05±1.40

谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px (Activity)	521.43±34.85	526.43±50.39	540.71±27.64	485.00±47.51	499.29±54.43
丙二醛 MDA (nmol/mL)	8.51±1.15 ^a	9.18±0.22 ^a	7.09±0.83 ^{ab}	5.75±1.64 ^{ab}	4.55±0.92 ^b
血浆免疫指标 Plasma immune indexes					
免疫球蛋白 M IgM(μg/mL)	0.14±0.01	0.10±0.02	0.11±0.01	0.12±0.01	0.12±0.01
补体 3 C3(μg/mL)	22.80±4.20	22.76±4.56	25.93±2.00	24.99±0.32	20.58±2.46
碱性磷酸酶 AKP(King unit/100 mL)	74.13±3.04 ^b	72.24±4.87 ^b	82.70±7.13 ^{ab}	93.68±9.65 ^a	73.76±3.01 ^b
溶菌酶 LZM(U/mL)	93.89±7.39	110.00±8.82	123.89±9.22	120.56±17.32	115.56±3.51
肠道通透性指标 Intestinal permeability indexes					
二胺氧化酶 DAO(U/L)	6.30±0.53	5.68±0.41	6.42±0.54	7.01±0.39	6.24±0.60
脂多糖 LPS(pg/mL)	6.62±1.01	6.10±0.76	5.98±0.64	4.95±0.29	5.47±0.58
D-乳酸 D-LA(μmol/L)	9.31±1.23 ^{ab}	7.03±1.22 ^b	12.15±2.40 ^{ab}	11.44±0.64 ^{ab}	14.55±2.35 ^a

注: NC, Normal control, 对照组; CT, Condensed tannins, 缩合单宁组; C, Catechin, 儿茶素组; EC, Epicatechin, 表儿茶素组; EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

同行数据肩标不同小写字母代表差异显著 ($P<0.05$), 数据肩标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P>0.05$)。

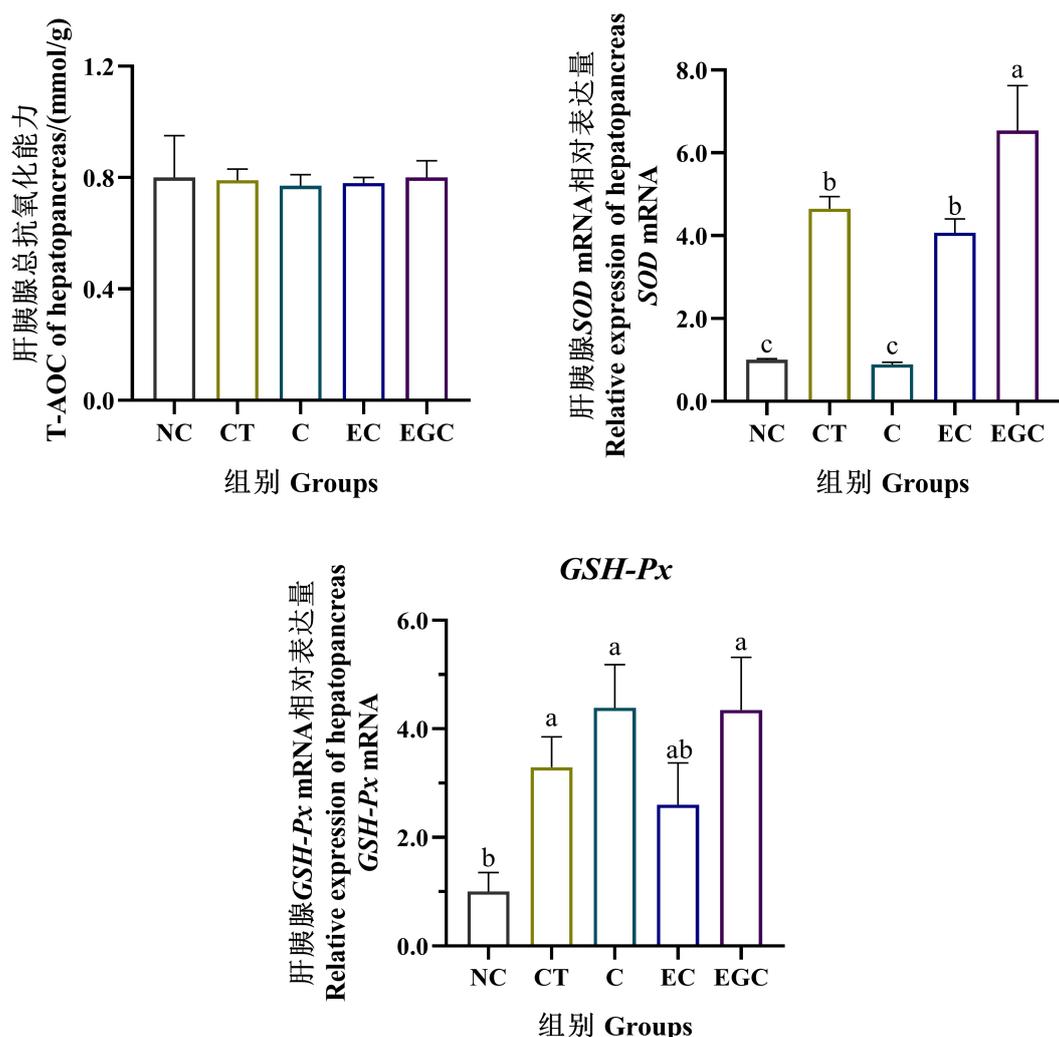
In the same line, different lowercase letters of data shoulder represent significant difference ($P<0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data shoulder represent no significant difference ($P>0.05$).

3.4 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化指标的影响

由图 4.1 可知, 各组之间肝胰腺 T-AOC 无显著差异 ($P>0.05$)。

与对照组相比, 儿茶素组肝胰腺 *SOD* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$), 缩合单宁、表儿茶素、表没食子儿茶素组肝胰腺 *SOD* mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$), 且表没食子儿茶素组肝胰腺 *SOD* mRNA 相对表达量显著高于缩合单宁、表儿茶素组 ($P<0.05$)。

与对照组相比, 表儿茶素组肝胰腺 *GSH-Px* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$), 缩合单宁、儿茶素、表没食子儿茶素组肝胰腺 *GSH-Px* mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$)。缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组之间肝胰腺 *GSH-Px* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$)。



注: NC, Normal control, 对照组; CT, Condensed tannins, 缩合单宁组; C, Catechin, 儿茶素组; EC, Epicatechin, 表儿茶素组; EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

数据柱上标不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 数据柱上标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)。Different lowercase letters of data column superscript represent significant difference ($P < 0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data column superscript represent no significant difference ($P > 0.05$).

图 4.1 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化指标的影响

Fig. 4.1 Antioxidant indexes of hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* fed with condensed tannins and their monomers

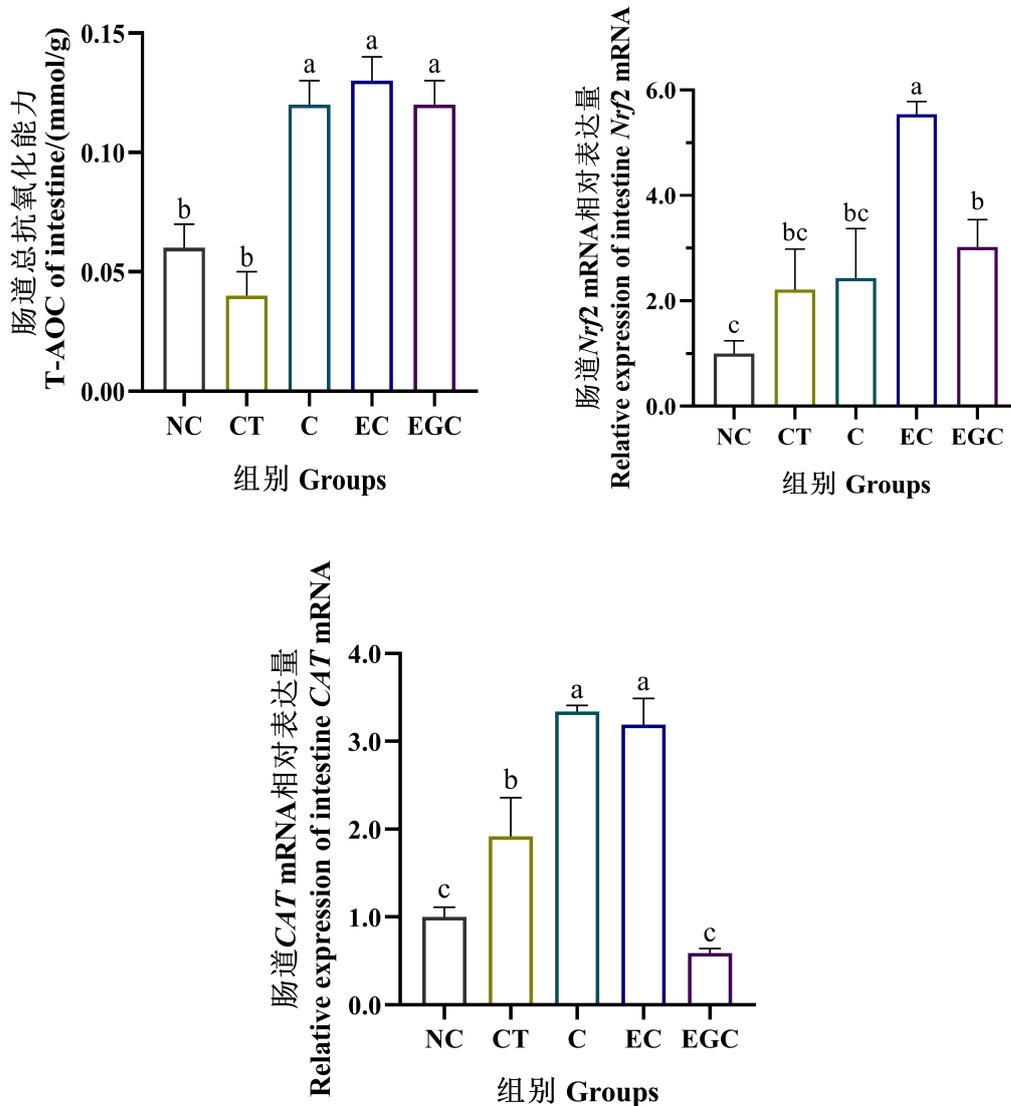
3.5 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道抗氧化与免疫指标的影响

由图 4.2 可知, 与对照组相比, 缩合单宁组肠道 T-AOC 无显著差异 ($P > 0.05$), 儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组肠道 T-AOC 显著升高 ($P < 0.05$)。

与对照组相比, 缩合单宁、儿茶素组肠道 *Nrf2* mRNA 相对表达量无显著差异

($P>0.05$)，表儿茶素、表没食子儿茶素组肠道 *Nrf2* mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$)。缩合单宁、儿茶素、表没食子儿茶素组之间肠道 *Nrf2* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$)。表儿茶素组肠道 *Nrf2* mRNA 相对表达量显著高于缩合单宁、儿茶素、表没食子儿茶素组 ($P>0.05$)。

与对照组相比，表没食子儿茶素组肠道 *CAT* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$)，缩合单宁、儿茶素、表儿茶素组肠道 *CAT* mRNA 相对表达量显著升高 ($P<0.05$)，且儿茶素、表儿茶素组肠道 *CAT* mRNA 相对表达量显著高于缩合单宁组 ($P>0.05$)。儿茶素、表儿茶素组之间肠道 *CAT* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P>0.05$)。



注: NC, Normal control, 对照组; CT, Condensed tannins, 缩合单宁组; C, Catechin, 儿茶素组; EC, Epicatechin, 表儿茶素组; EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

数据柱上标不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 数据柱上标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)。

Different lowercase letters of data column superscript represent significant difference ($P < 0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data column superscript represent no significant difference ($P > 0.05$).

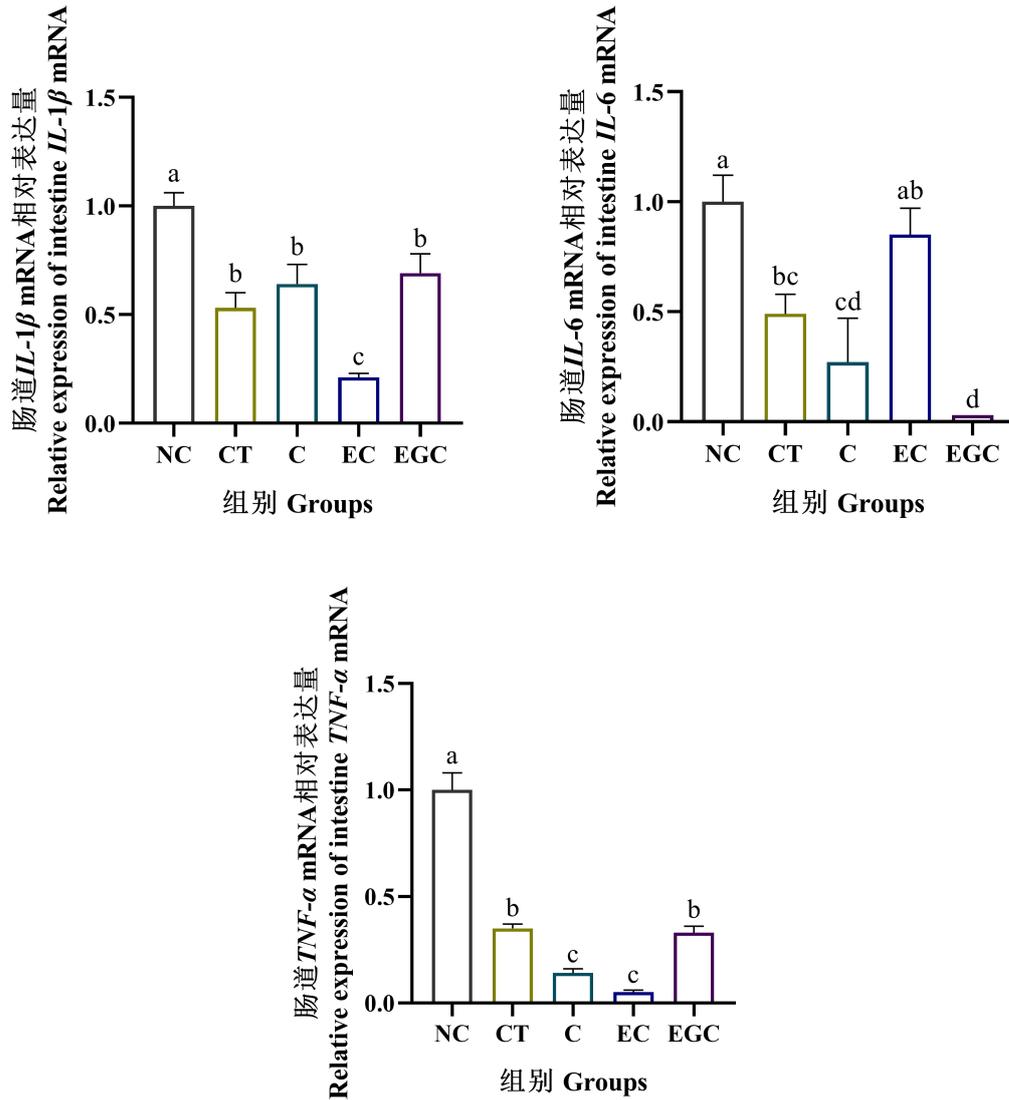
图 4.2 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道抗氧化指标的影响

Fig. 4.2 Intestinal antioxidant indexes of *Litopenaeus vannamei* fed with condensed tannins and their monomers

由图 4.3 可知, 与对照组相比, 缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组肠道 *IL-1 β* mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.05$), 且表儿茶素组肠道 *IL-1 β* mRNA 相对表达量显著低于缩合单宁、儿茶素、表没食子儿茶素组 ($P < 0.05$)。缩合单宁、儿茶素、表没食子儿茶素组之间肠道 *IL-1 β* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$)。

与对照组相比, 表儿茶素组肠道 *IL-6* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$), 缩合单宁、儿茶素、表没食子儿茶素组肠道 *IL-6* mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.05$)。与缩合单宁组相比, 儿茶素、表儿茶素组肠道 *IL-6* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$), 表没食子儿茶素组肠道 *IL-6* mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.05$)。儿茶素组肠道 *IL-6* mRNA 相对表达量显著低于表儿茶素组 ($P < 0.05$)。

与对照组相比, 缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组肠道 *TNF- α* mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.05$), 且儿茶素、表儿茶素组肠道 *TNF- α* mRNA 相对表达量显著低于缩合单宁、表没食子儿茶素组 ($P < 0.05$)。缩合单宁、表没食子儿茶素组之间肠道 *TNF- α* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$)。儿茶素、表儿茶素组之间肠道 *TNF- α* mRNA 相对表达量无显著差异 ($P > 0.05$)。



注：NC, Normal control, 对照组；CT, Condensed tannins, 缩合单宁组；C, Catechin, 儿茶素组；EC, Epicatechin, 表儿茶素组；EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

数据柱上标不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 数据柱上标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)。

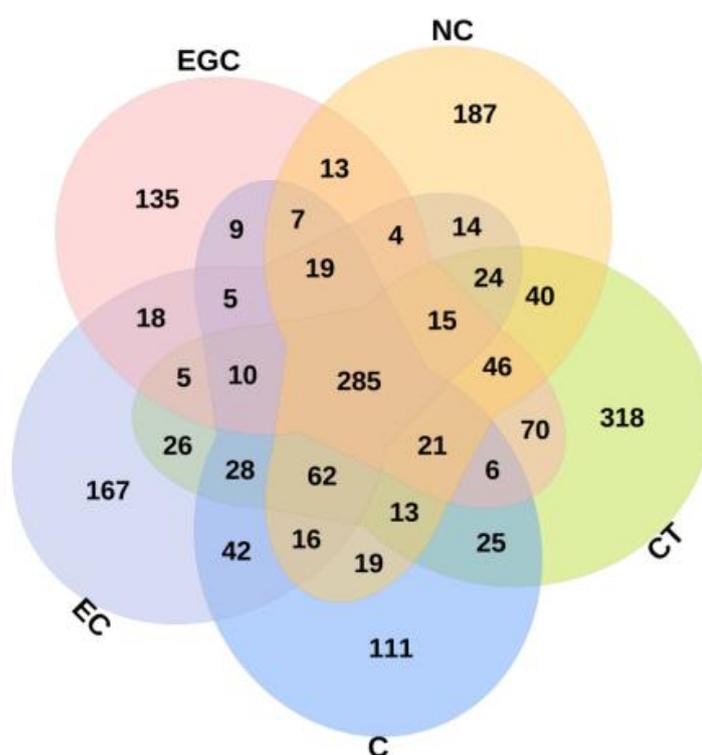
Different lowercase letters of data column superscript represent significant difference ($P < 0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data column superscript represent no significant difference ($P > 0.05$).

图 4.3 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道免疫指标的影响

Fig. 4.3 Intestinal immune indexes of *Litopenaeus vannamei* fed with condensed tannins and their monomers

3.6 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道菌群的影响

本试验 5 组样品共获得有效序列 2 135 735 条，分别为 458 244 (NC)、424 414 (CT)、445 030 (C)、414 334 (EC)、393 713 (EGC) 条，平均每组有效序列为 427 147 条。由图 4.4 Venn 图可知，5 组样品共获得 OTU 数量 1 760 个，其中共有 OTU 数量为 285 个，所占比例为 16.19%。缩合单宁组特有 OTU 数量最多，达到 318 个。

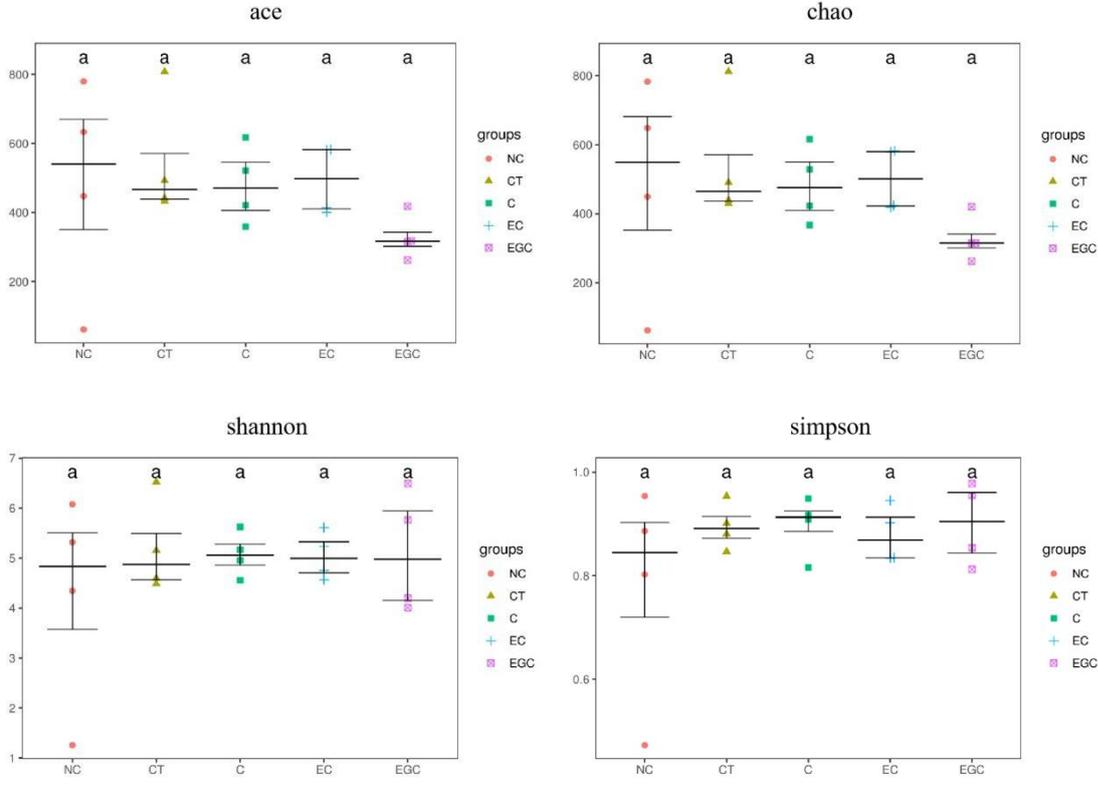


注：NC, Normal control, 对照组；CT, Condensed tannins, 缩合单宁组；C, Catechin, 儿茶素组；EC, Epicatechin, 表儿茶素组；EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

图 4.4 凡纳滨对虾肠道细菌菌群 OTU 统计 Venn 图

Fig. 4.4 Venn diagram of OTU statistics of intestinal bacterial flora of *Litopenaeus vannamei*

由图 4.5 可知，本试验条件下，饲料中添加 0.2% 的缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细菌菌群 alpha 多样性指数 ace、chao、shannon、simpson 均无显著影响 ($P>0.05$)。



注: NC, Normal control, 对照组; CT, Condensed tannins, 缩合单宁组; C, Catechin, 儿茶素组; EC, Epicatechin, 表儿茶素组; EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

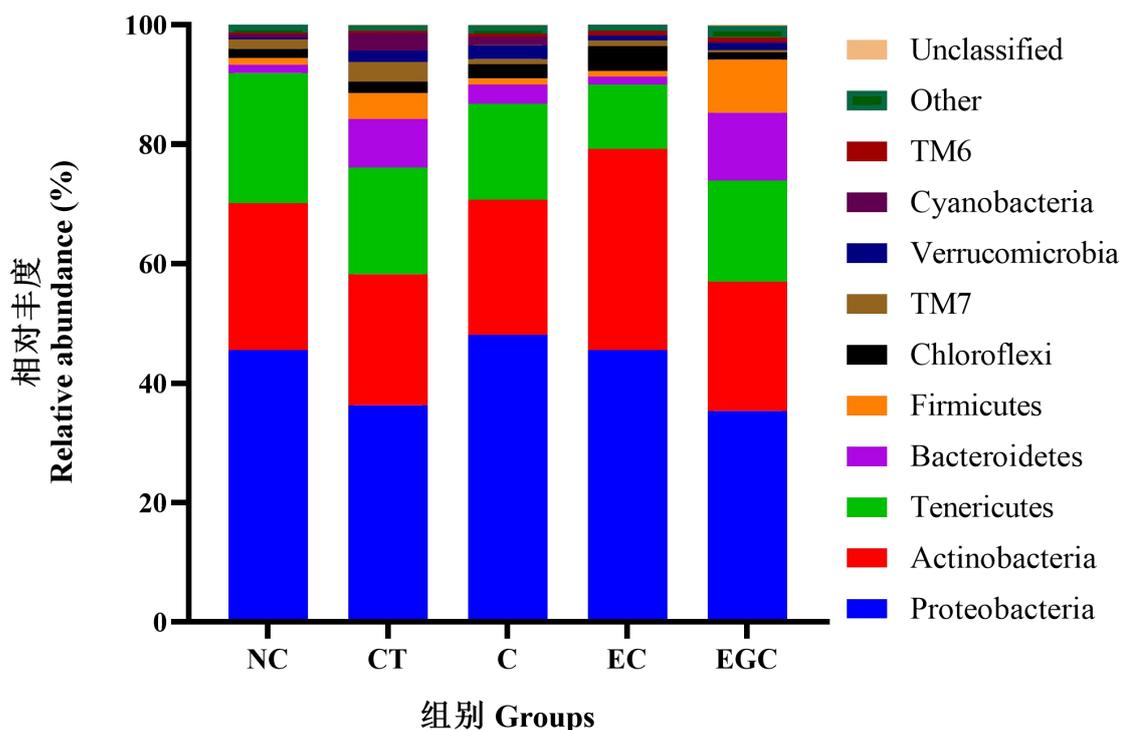
数据柱上标不同小写字母代表差异显著 ($P<0.05$), 数据柱上标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P>0.05$)。

Different lowercase letters of data column superscript represent significant difference ($P<0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data column superscript represent no significant difference ($P>0.05$).

图 4.5 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细菌菌群 alpha 多样性指数的影响

Fig. 4.5 Alpha diversity indexes of intestinal bacterial flora in *Litopenaeus vannamei* fed with condensed tannins and their monomers

图 4.6、图 4.7 分别为凡纳滨对虾肠道细菌菌群门、属分类水平下的结构组成(相对丰度排名前 10)。在门水平上,变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、软壁菌门(Tenericutes)是肠道细菌菌群的主要菌门。在属水平上,红细菌属(*Rhodobacter*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、微杆菌属(*Microbacterium*)是肠道细菌菌群的主要菌属。

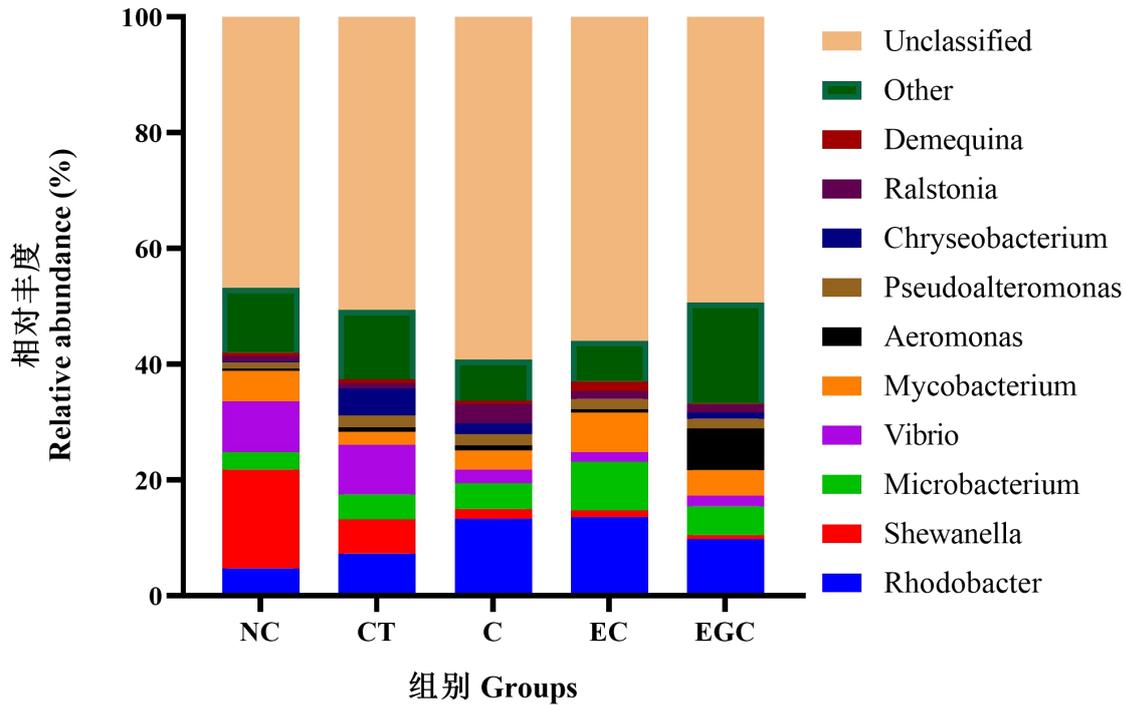


注: NC, Normal control, 对照组; CT, Condensed tannins, 缩合单宁组; C, Catechin, 儿茶素组; EC, Epicatechin, 表儿茶素组; EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

Proteobacteria: 变形菌门; Actinobacteria: 放线菌门; Tenericutes: 软壁菌门; Bacteroidetes: 拟杆菌门; Firmicutes: 厚壁菌门; Chloroflexi: 绿弯菌门; TM7: Saccharibacteria; Verrucomicrobia: 疣微菌门; Cyanobacteria: 蓝细菌门。

图 4.6 门水平下凡纳滨对虾肠道细菌菌群的组成和相对丰度

Fig. 4.6 Composition and relative abundance of intestinal bacterial flora of *Litopenaeus vannamei* at the phylum level



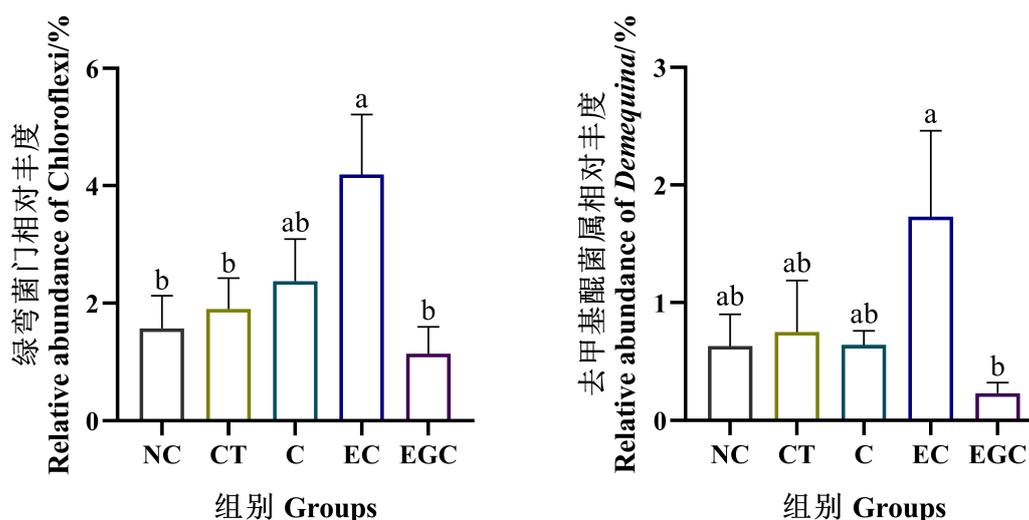
注: NC, Normal control, 对照组; CT, Condensed tannins, 缩合单宁组; C, Catechin, 儿茶素组; EC, Epicatechin, 表儿茶素组; EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

Rhodobacter: 红细菌属; *Shewanella*: 希瓦氏菌属; *Microbacterium*: 微杆菌属; *Vibrio*: 弧菌属; *Mycobacterium*: 分枝杆菌属; *Aeromonas*: 气单孢菌属; *Pseudoalteromonas*: 假交替单胞菌属; *Chryseobacterium*: 金黄杆菌属; *Ralstonia*: 罗尔斯通氏菌属; *Demequina*: 去甲基醌菌属。

图 4.7 属水平下凡纳滨对虾肠道细菌菌群的组成和相对丰度

Fig. 4.7 Composition and relative abundance of intestinal bacterial flora of *Litopenaeus vannamei* at the genus level

图 4.8 为凡纳滨对虾肠道细菌菌群（相对丰度排名前 10）中具有显著差异的门、属。与对照组相比，儿茶素组绿弯菌门（Chloroflexi）相对丰度呈升高趋势但不显著（ $P>0.05$ ），表儿茶素组绿弯菌门（Chloroflexi）相对丰度显著升高（ $P<0.05$ ）。与对照组相比，缩合单宁、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素组去甲基醌菌属（*Demequina*）相对丰度无显著差异（ $P>0.05$ ）。与表儿茶素组相比，表没食子儿茶素组去甲基醌菌属（*Demequina*）相对丰度显著降低（ $P<0.05$ ）。



注: NC, Normal control, 对照组; CT, Condensed tannins, 缩合单宁组; C, Catechin, 儿茶素组; EC, Epicatechin, 表儿茶素组; EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

同行数据肩标不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 数据肩标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)。

In the same line, different lowercase letters of data shoulder represent significant difference ($P < 0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data shoulder represent no significant difference ($P > 0.05$).

图 4.8 凡纳滨对虾肠道差异细菌菌群 (门和属水平)

Fig. 4.8 Phylum and genus with significant difference in intestinal bacterial flora of *Litopenaeus vannamei*

3.7 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道短链脂肪酸含量的影响

由表 4.5 可知, 各组之间凡纳滨对虾肠道短链脂肪酸乙酸、丙酸、异丁酸、己酸的含量均无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 4.5 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道短链脂肪酸含量的影响

Table 4.5 Intestinal short chain fatty acids contents of *Litopenaeus vannamei* fed with condensed tannins and their monomers

项目 Items	组别 Groups				
	NC	CT	C	EC	EGC
乙酸 Acetic acid/($\mu\text{g/g}$)	170.88 \pm 40.92	140.63 \pm 31.42	114.08 \pm 14.84	136.17 \pm 32.24	139.69 \pm 25.75
丙酸 Propionic acid/($\mu\text{g/g}$)	1.37 \pm 0.38	1.42 \pm 0.42	1.44 \pm 0.40	1.28 \pm 0.46	1.85 \pm 0.19
异丁酸 Isobutyric acid/($\mu\text{g/g}$)	0.50 \pm 0.13	0.64 \pm 0.21	0.37 \pm 0.07	0.35 \pm 0.10	0.65 \pm 0.22
己酸 Caproic acid/($\mu\text{g/g}$)	0.23 \pm 0.07	0.34 \pm 0.07	0.27 \pm 0.01	0.26 \pm 0.07	0.15 \pm 0.09

注: NC, Normal control, 对照组; CT, Condensed tannins, 缩合单宁组; C, Catechin, 儿茶素组; EC, Epicatechin, 表儿茶素组; EGC, Epigallocatechin, 表没食子儿茶素组。

同行数据肩标不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$), 数据肩标相同小写字母或无字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)。

In the same line, different lowercase letters of data shoulder represent significant difference ($P < 0.05$), while the same lowercase letters or no letters of data shoulder represent no significant difference ($P > 0.05$).

4 讨论

4.1 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾生长性能的影响

单宁对单胃动物生长性能的影响依赖于其对饲料适口性、营养物质消化所产生的负面影响与其通过抗菌、抗氧化、抗炎活性改善肠道生态系统健康状态所产生的正面影响之间的平衡 (Huang et al 2018)。饲料中添加低剂量的缩合单宁不影响草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*, $< 1.863\%$) (黎梅 2019)、中国花鲈 (*Lateolabrax maculatus*, $< 0.1\%$) (Peng et al 2022d; 2022e, Chen et al 2022)、日本海鲈 (*Lateolabrax japonicus*, $< 0.1\%$) (Peng et al 2020a; 2020b; 2020c, Peng et al 2021a)、大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*, $< 0.2\%$) (康鹏 2023, 彭凯等 2023) 的生长性能。相反, 适宜剂量缩合单宁可改善美洲鳗鲡 (*Anguilla rostrata*, 0.09%) (Wang et al 2022)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*, 0.02%) (Zhai et al 2014)、杂交鲟 (*Acipenser baeri* Brandt ♀ × *A. schrenckii* Brandt ♂, 0.005%) (Xu et al 2021) 的生长性能。前期试验表明, 饲料中添加 $0.05\% \sim 0.20\%$ 的缩合单宁未影响凡纳滨对虾生长性能、营养物质的表观消化率 (干物质、粗蛋白质、粗脂肪、灰分指标)、体成分产生显著影响 (Peng et al 2021b, 彭凯等 2022), 这与本试验 0.2% 剂量的缩合单宁未影响凡纳滨对虾生长的结果相一致。然而, 在 $0.1\%、0.2\%$ 添加剂量的水解单宁与缩合单宁对凡纳滨对虾的饲喂效果对比研究中, 0.2% 的缩合单宁却显著降低凡纳滨对虾生长性能, 这可能归因于较低的养殖水体盐度 ($2\% \sim 3\%$) (邱建强等 2023b)。Decamp 等 (2003) 报道, 降低盐度对凡纳滨对虾的生长、存活、能量代谢、抗逆抗病能力等均有负面影响。目前, 缩合单宁单体对于水产动物生长与健康的研究仍然较为缺乏。徐禛等 (2020) 报道, 饲料中添加 $0.01\% \sim 0.09\%$ 的儿茶素不影响草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 的生长性能。综上所述, 在本试验条件下, 相同剂量的缩合单宁及其单体均未对凡纳滨的生长造成显著影响, 这为儿茶素类单体在对虾饲料中的应用提供了理论依据。

4.2 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾血浆代谢物的影响

血浆中各项代谢物含量可反映机体相关代谢功能是否正常，是评价机体是否发生疾病的重要依据。本试验结果表明，0.20%的缩合单宁及其单体对大部分血浆代谢物并无显著影响，说明其未对凡纳滨对虾机体的蛋白质与糖脂代谢功能、肝脏合成功能造成显著的负面影响。ALT、AST 在氨基酸代谢中发挥转氨基作用，主要存在于肝脏细胞中，当肝脏损伤时释放至血液中，能够灵敏反映肝脏健康(付晶晶等 2015)。ALT、AST 分别主要分布在肝细胞的细胞质和线粒体中，因此，肝细胞轻微损伤时先释放 ALT，而严重坏死时则开始释放出 AST，肝炎症表现轻微时则 AST/ALT 比值 < 1 (易敏和付元元 2011)。表没食子儿茶素组 ALT 活性、表儿茶素组 AST 活性表现显著升高，该结果说明表儿茶素、表没食子儿茶素可能对凡纳滨对虾肝胰腺造成损伤。缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾 AST/ALT 比值无显著影响，但相较于表儿茶素组，表没食子儿茶素组 AST/ALT 比值显著下降，上述结果说明表儿茶素对于凡纳滨对虾肝胰腺造成损伤较为严重。较低剂量缩合单宁造成水产动物肝脏组织损伤也有研究报道，如 0.1%~0.2%的缩合单宁造成花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 肝细胞空泡变性并伴有炎性细胞浸润，同时血清 ALT 活性也表现显著升高 (Peng et al 2022d)。然而，Zhai 等 (2014) 报道，饲料中添加 0.04%的缩合单宁可显著降低尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 血清 ALT、AST 活性，这归因于缩合单宁对健康状况的改善作用，机体脂质代谢与免疫反应的增强可以证实这一点。目前，缩合单宁单体对水产动物血浆代谢物的影响研究较少。综上所述，本试验条件下，表儿茶素一定程度上损伤了凡纳滨对虾的肝胰腺，提示其在对虾饲料中的应用需谨慎。

4.3 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾血浆抗氧化与免疫指标的影响

本试验结果表明，饲料中添加表儿茶素显著增加了凡纳滨对虾血浆 T-AOC。T-AOC 可反应机体的抗氧化水平 (Peng et al 2022b)，该结果说明表儿茶素对凡纳滨对虾机体抗氧化作用效果较好。表没食子儿茶素 CAT 活性显著升高而 MDA 含量显著降低。CAT 在机体中发挥去除强氧化性产物 H_2O_2 的作用 (于德玲和王昌留 2016)。MDA 是脂质过氧化产物，能够反映细胞膜脂质过氧化水平 (丁小等 2021)。上述结果表明，表没食子儿茶素可增强机体 H_2O_2 去除与降低脂质过氧化水平。血浆免疫指标结果表明，表儿茶素组 AKP 活性显著升高。AKP 是非特异性免疫酶，上述结果说明表儿茶素可显著提高凡纳滨对虾机体免疫反应。类似研究报道，饲料中

添加 0.1% 的表儿茶素可增强肌肉抗氧化能力 (Mi et al 2023)。金华猪饲料中添加 0.3% 的表没食子儿茶素没食子酸酯可显著升高血清 CAT、SOD 活性并降低血清 MDA 含量 (楼芳芳等 2023)。饲料中添加 0.03% 的表没食子儿茶素没食子酸酯可增强热应激下蛋鸭的血清抗氧化与免疫能力 (张旭等 2023)。

通过测定血浆 DAO、D-LA、LPS 可较为准确评估肠道屏障功能障碍 (Zhang et al 2023)。本试验结果表明, 缩合单宁及其单体未对肠道通透性指标造成显著影响, 说明其不影响凡纳滨对虾肠道屏障完整性。缩合单宁组血浆 D-LA 表现下降趋势但不显著, 表没食子儿茶素组 D-LA 表现升高趋势但不显著。适量缩合单宁可改善肠道屏障功能, 促进肠道健康。饲料中添加 0.005%~0.015% 缩合单宁可降低鹅血清 DAO、D-LA、内毒素 (Endotoxin) 含量, 保护肠道屏障完整性 (Deng et al 2023)。Peng 等 (2021a) 报道, < 0.04% 的缩合单宁可降低海鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 血清中的 LPS 含量。缩合单宁可有效保护花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 因氧化鱼油诱导的肠道通透性增加与紧密连接结构损伤, 表现为降低血清 DAO、D-LA、内毒素含量, 升高肠道紧密连接结构蛋白 mRNA 的相对表达量 (Peng et al 2022a)。缩合单宁可通过恢复花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 肠道通透性缓解黄曲霉毒素 B₁ 诱导毒性, 表现为降低血清 DAO、LPS 含量, 升高肠道紧密连接结构蛋白 mRNA 相对表达量 (Peng et al 2022c)。较高剂量的缩合单宁会对肠道屏障完整性造成负面影响, 如 0.2% 的缩合单宁造成花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) 肠道紧密连接结构损伤, 血清 DAO 与内毒素含量也表现显著升高 (Chen et al 2022)。

目前, 缩合单宁单体对水产动物血浆抗氧化与免疫以及肠道屏障功能的影响研究较少。综上所述, 本试验条件下, 表儿茶素与表没食子儿茶素对增强凡纳滨对虾血浆抗氧化与免疫能力的作用效果较好。

4.4 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肝胰腺抗氧化指标的影响

肝胰腺抗氧化功能在凡纳滨对虾生长和抗逆过程中发挥重要作用, 如饲料、环境引起的氧化应激可能造成对虾肝胰腺细胞自噬和凋亡, 诱导肝胰腺组织氧化损伤 (Yang et al 2022)。据报道, 多酚类化合物是多数动物肝脏抗氧化细胞通路的激活剂 (熊款款等 2021)。缩合单宁是一类重要的多酚化合物, 缩合单宁提高动物肝脏抗氧化作用可能与其激活抗氧化信号通路并上调肝脏抗氧化酶的 mRNA 表达水平有关, 如本实验室前期研究表明, 饲料中添加 0.2% 的缩合单宁激活了凡纳滨对虾肝胰

腺 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1-核因子 E2 相关因子 2/抗氧化应答元件 (Keap1-Nrf2/ARE) 抗氧化信号通路, 显著上调肝胰腺 *SOD*、*GSH-Px* 细胞信号通路下游抗氧化酶的 mRNA 表达水平 (Peng et al 2021b)。本试验结果表明, 各组凡纳滨对虾肝胰腺 T-AOC 无显著差异, 但缩合单宁、表儿茶素、表没食子儿茶素组 (儿茶素组差异不显著) 显著升高肝胰腺 *SOD* 的 mRNA 表达水平。肝胰腺 *GSH-Px* 的 mRNA 表达水平均表现升高, 且缩合单宁与其单体之间的 *GSH-Px* 的 mRNA 表达水平无差异。这与上述研究结果相一致。目前, 缩合单宁单体对水产动物肝脏抗氧化的影响研究较少。综上所述, 本试验条件下, 缩合单宁及其单体可增强凡纳滨对虾肝胰腺的抗氧化能力, 且具有相似的作用效果。

4.5 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道抗氧化与免疫指标的影响

肠道是虾体内最重要的消化器官, 也是摄食饲料中营养物质消化和吸收的主要场所, 还是重要的免疫屏障。本试验结果表明, 3 种单体均显著增强肠道 T-AOC 且组间无显著差异, 同时其作用效果均优于缩合单宁, 这可能归因于相较于聚合物, 单体利于发挥其抗氧化生物活性。此外, 缩合单宁及其单体可升高肠道 *Nrf2* mRNA 的相对表达量, 以表儿茶素组较为显著。儿茶素与表儿茶素对肠道 *CAT* mRNA 相对表达量升高作用较为显著。上述结果说明缩合单宁可能通过激活 *Nrf2* 信号通路及促进下游抗氧化酶 mRNA 相对表达量, 从而提高肠道抗氧化能力。类似研究报道, 缩合单宁显著增强鹅盲肠抗氧化能力, 表现为 T-AOC 及 *CAT*、*SOD*、*GSH-Px* 活性显著升高 (Deng et al 2023)。肠道免疫指标结果表明, 缩合单宁及其单体均可降低促炎性细胞因子 *IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* mRNA 相对表达量, 维护肠道健康。目前, 缩合单宁单体对水产动物肠道抗氧化与免疫的影响研究较少。综上所述, 本试验条件下, 缩合单宁及其单体可介导 *Nrf2* 信号通路促进下游抗氧化酶 mRNA 表达水平, 降低促炎性细胞因子 mRNA 表达水平, 从而增强凡纳滨对虾机体抗氧化与免疫状态。

4.6 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道菌群的影响

目前, 缩合单宁及其单体对于凡纳滨对虾肠道菌群的影响还未见报道。本试验结果表明, 各组凡纳滨对虾肠道菌群 alpha 多样性指数 ace、chao、shannon、simpson 无显著差异, 表明缩合单宁及其单体未显著改变凡纳滨对虾肠道菌群的丰度与多样性。在门水平上, 凡纳滨对虾肠道菌群中, 变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、软壁菌门 (Tenericutes) 为主要菌门。在属水平上, 凡纳滨对虾

肠道菌群相对丰度最高的 3 个菌属依次为红细菌属 (*Rhodobacter*)、希瓦氏菌属 (*Shewanella*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)。较多研究报道, 变形菌门是凡纳滨对虾肠道菌群优势菌门, 在不同饲养环境下凡纳滨对虾肠道菌群门属组成与相对丰度存在差异 (杨硕 2017, 郭慧等 2019, 王咏梅等 2020)。通过对凡纳滨对虾门、属水平肠道菌群的相对丰度进行分析, 儿茶素组绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 相对丰度呈现上升趋势但不显著, 而表儿茶素组绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 相对丰度表现显著升高。绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 在有机物元素如碳、氮、硫的代谢循环中发挥重要作用, 具备降解碳水化合物与蛋白质的潜力 (鲜文东等 2020, 魏星 2021)。因此, 猜测表儿茶素可能通过增加绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 的相对丰度促进有机物的代谢, 其有待于进一步验证。表儿茶素组去甲基醌菌属 (*Demequina*) 相对丰度呈现上升趋势但不显著, 表没食子儿茶素组去甲基醌菌属 (*Demequina*) 相对丰度呈现下降趋势但不显著。去甲基醌菌属 (*Demequina*) 可能发挥为凡纳滨对虾肠道提供营养物质或产生有益物质从而抵抗氨与热应激 (Duan et al 2021)。然而各组之间去甲基醌菌属 (*Demequina*) 相对丰度并无显著性变化。适量缩合单宁可调节肠道菌群结构, 改善肠道健康。Peng 等 (2021a) 研究表明, 饲料中添加 0.04% 的缩合单宁显著改变了海鲈的肠道菌群结构, 缩合单宁通过增加细菌菌属梭菌属 (*Clostridium*) 和螺旋体属 (*Brevinema*) 相对丰度, 降低气单胞菌属 (*Aeromonas*) 相对丰度, 从而减少肠道内毒素的分泌, 改善海鲈肠道通透性, 提高肠道健康水平。综上所述, 本试验条件下, 饲料中添加 0.2% 的缩合单宁及其单体对于凡纳滨对虾肠道细菌菌群组成的影响较小。

4.7 缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道短链脂肪酸含量的影响

短链脂肪酸由肠道微生物产生, 具有调节免疫与抗炎的功能, 单宁可通过促进肠道产短链脂肪酸有益细菌的相对丰度, 从而促进宿主健康 (Molino et al 2022)。短链脂肪酸可促进有益细菌增殖, 使肠道环境呈弱酸性, 从而抑制部分病原菌 (Deng et al 2023)。本试验结果表明, 缩合单宁及其单体并未改变凡纳滨对虾肠道短链脂肪酸含量。Peng 等 (2020a) 报道, 0.01%~0.04% 的缩合单宁对日本海鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 肌肉与肝脏脂肪酸组成无显著影响。然而, 也有研究报道, 缩合单宁可通过增加厚壁菌门 (*Firmicutes*) 的相对丰度, 对肠道纤维起降解与发酵作用, 并产生短链脂肪酸 (Deng et al 2023)。饲料中添加缩合单宁 (0.005%~0.015%) 可增加

鹅盲肠中乙酸、丙酸和丁酸的含量从而改善肠道健康，归因于乙酸、丙酸和丁酸可发挥抗炎、调节肝胆固醇合成、增强肠道屏障功能的潜在作用（Deng et al 2023，任继武等 2024）。饲料中添加表没食子儿茶素没食子酸酯（0.025%~0.050%）可显著改善巴马香猪因热应激引起的结肠短链脂肪酸（乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸）含量降低（韦崇万 2023）。本试验各组凡纳滨对虾肠道短链脂肪酸含量无差异可能与缩合单宁及其单体的添加剂量有关。

5 小结

饲料中添加 0.2%的缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾生长性能无显著影响。表儿茶素、表没食子儿茶素可能对凡纳滨对虾肝胰腺造成轻微损伤。表儿茶素、表没食子儿茶素可显著增强血浆抗氧化与免疫能力。以肠道抗氧化与免疫能力为综合评价依据，表儿茶素的饲喂效果最好。缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道通透性、细菌菌群组成与短链脂肪酸含量无显著影响。以血浆与肠道抗氧化与免疫能力为综合评价依据，表儿茶素的饲喂效果最好。

第五章 全文总结

（1）凡纳滨对虾肠道细胞的提取与 H₂O₂ 氧化应激模型的构建

本试验采用四抗液、胶原酶 I 型、IV 型混合消化液、M199 完全培养基、二次差速离心、鼠尾胶原蛋白 I 型包被培养板处理方法提取并培养凡纳滨对虾肠道细胞，有效改善凡纳滨对虾肠道细胞提取效率与培养效果。在构建的 H₂O₂ 氧化应激模型中，H₂O₂ 适宜作用浓度为 600 $\mu\text{mol/L}$ ，作用时间为 10 h，此时细胞存活率为 $(63.26 \pm 0.47)\%$ 。

（2）缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道细胞的抗氧化与免疫作用研究

缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾体外肠道细胞的适宜作用浓度均为 800 $\mu\text{mol/L}$ 。缩合单宁及其单体可通过抑制细胞凋亡（降低 LDH 活性与线粒体 MPTP 开放程度以及下调促凋亡蛋白 *Bax*、*Caspase-3* 的 mRNA 相对表达量）、增强抗氧化能力（降低 ROS 水平与上调 Nrf2 信号通路相关抗氧化酶 *HO-1*、*NQO1*、*CAT*、*SOD*、*GSH-Px* 的 mRNA 相对表达量）、降低细胞炎症反应（下调促炎性细胞因子 *IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* 的 mRNA 相对表达量），从而有效缓解 H₂O₂ 诱导的凡纳滨对虾肠道细胞氧化损伤。以 LDH 活性、ROS 水平、抗氧化酶（*CAT*、*GSH-Px*、*NQO1*）的 mRNA 相对表达量为评价指标，缩合单宁、表没食子儿茶素的抗氧化损伤作用效果要优于儿茶素、表儿茶素。以细胞促凋亡蛋白（*Bax*、*Caspase-3*）、促炎性细胞因子（*IL-1 β* 、*IL-6*、*TNF- α* ）的 mRNA 相对表达量为评价指标，表儿茶素的抗氧化损伤作用效果要优于缩合单宁、儿茶素、表没食子儿茶素。

（3）缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾生长、抗氧化与免疫力及肠道健康的影响

饲料中添加 0.2% 的缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾生长性能无显著影响。表儿茶素、表没食子儿茶素可能对凡纳滨对虾肝胰腺造成轻微损伤。表儿茶素、表没食子儿茶素可显著增强血浆抗氧化与免疫能力。以肠道抗氧化与免疫能力为综合评价依据，表儿茶素的饲喂效果最好。缩合单宁及其单体对凡纳滨对虾肠道通透性、细菌菌群组成与短链脂肪酸含量无显著影响。以血浆与肠道抗氧化与免疫能力为综合评价依据，表儿茶素的饲喂效果最好。

参考文献

1. 陈子凡. 不同生长期珠芽蓼缩合单宁的含量与结构及其对体外瘤胃发酵的影响. [硕士学位论文]. 兰州: 兰州大学, 2022
2. 丁小, 赵云龙, 李艳娇, 乔淑芬, 许梦瑶, 苗婷婷. 急性温度胁迫对花鳅抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响. 江西水产科技, 2021, 6: 14-17
3. 冯慧玲. 人心果叶缩合单宁分离纯化及其结构与生物活性的鉴定. [硕士学位论文]. 厦门: 厦门大学, 2014
4. 付晶晶, 黄燕华, 曹俊明, 王国霞, 莫文艳, 陈晓瑛, 黄文庆. 五种植物蛋白源替代鱼粉对花鲈血清生化指标、转氨酶活性及抗氧化应激参数的影响. 湖北农业科学, 2015, 54(20): 5087-5091+5095
5. 郭慧, 朱旭枫, 陈锦霖, 李广丽, 朱春华. 水解单宁对凡纳滨对虾生长性能和肠道微生物的影响. 中国水产科学, 2019, 26(5): 883-892
6. 郝晓娜, 辛清武, 李丽, 章琳俐, 朱志明, 缪中纬, 郑嫩珠. EGCG 对热应激蛋鸭肠道结构及十二指肠 IgA 的影响. 福建畜牧兽医, 2022, 44(4): 10-12+16
7. 何永生. 胡枝子缩合单宁含量与结构的季节动态变化及其对体外瘤胃发酵的影响. [硕士学位论文]. 兰州: 兰州大学, 2019
8. 黄倩倩. 紫色达利菊缩合单宁化学结构的鉴定及其对绵羊消化性能影响的研究. [博士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2016
9. 康鹏. 菜粕替代鱼粉及缩合单宁对大口黑鲈生长生理机能的效应研究. [硕士学位论文]. 上海: 上海海洋大学, 2023
10. 黎梅. 缩合单宁对生长中期草鱼生产性能、肠道结构和免疫功能的影响及其机制. [硕士学位论文]. 成都: 四川农业大学, 2019
11. 李林株, 李成云, 张帆, 吕忠蕾. 延边地区多种野生植物缩合单宁的含量及提取条件的优化. 草业科学, 2014, 31(5): 977-981
12. 李莎, 刘紫严, 杨红玲, 蔡国鹤, 聂庆杰, 张春晓, 孙云章. 花鲈肠上皮细胞原代培养及鉴定方法的探讨研究. 2024-04-08. <https://doi.org/10.16378/j.cnki.1003-1111.23004>.
13. 李泽林, 代红丽, 沈晓静, 付晓萍, 冯励, 王雪峰, 普岳红, 范江平. 表儿茶素对急性肺损伤小鼠抗氧化应激和抗炎作用研究. 云南农业大学学报(自然科学),

- 2021, 36(5): 848-854
14. 李宗英. 百脉根种质资源缩合单宁评价及关键基因的挖掘. [硕士学位论文]. 兰州: 兰州大学, 2019
 15. 刘嘉烁, 彭灿, 汤少勋, 韩雪峰, 谭支良. 橙皮苷调控 Bcl-2/Bax-Caspase3 信号通路阻抑 H₂O₂ 诱导的奶牛乳腺上皮细胞凋亡. 南方农业学报, 2023, 54(10): 3037-3046
 16. 刘秀丽, 毕力格吐, 李树森, 韩文芳, 李锋, 裴乐, 侯勇跃, 李元恒, 刘威. 利用盐酸-正丁醇法测定蒙农红豆草缩合单宁的含量. 今日畜牧兽医, 2018, 34(3): 8-10
 17. 楼芳芳, 刘禹熙, 陈雨诗, 刘有华, 陈炜, 黄超群, 项云, 胡旭进, 杜喜忠, 章啸君, 屠平光, 王新霞. 表没食子儿茶素没食子酸酯对金华猪生产性能、肉品质、肠道菌群及抗氧化能力的影响. 中国畜牧杂志, 2023, 59(8): 345-351
 18. 罗凤芹, 张娟, 叶玲. 血必净注射液对脑挫伤大鼠脑细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响. 中国中医药科技, 2016, 23(3): 265-267+376
 19. 马骁. 表儿茶素对 LPS 诱导的奶牛乳腺炎的调控及其分子机制. [硕士学位论文]. 重庆: 西南大学, 2021
 20. 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2023 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社. 2023. 15-46
 21. 彭凯, 陈冰, 莫文艳, 吴汉, 黄文. 饲料中添加缩合单宁对凡纳滨对虾生长性能、体成分、血清生化及抗氧化指标的影响. 动物营养学报, 2022, 34(2): 1165-1174
 22. 彭凯, 黄文, 戴文因. 缩合单宁的生物活性及构效关系研究进展. 饲料工业, 2021, 42(24): 55-59
 23. 彭凯, 邱建强, 徐友良, 黄文庆, 王玉玺, 黄文. 短期饲喂缩合单宁对大规格大口黑鲈生长性能和肝脏健康的影响. 广东农业科学, 2023, 50(8): 1-9
 24. 彭凯, 王国霞, 孙育平, 陈冰, 莫文艳, 黄燕华. 植物缩合单宁抗氧化作用机制的研究进展. 饲料工业, 2020a, 41(13): 49-53
 25. 彭凯, 王玉玺, 王国霞, 黄燕华. 缩合单宁的生物功能及其在动物生产中的应用. 动物营养学报, 2020b, 32(8): 3451-3460
 26. 彭凯. 贮藏方式对饲用紫色达利菊缩合单宁的化学结构及生物活性的影响研究. [博士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2017

27. 邱建强, 黄文, 王玉玺, 彭凯. 单宁对动物肠道微生物调控的研究进展. 动物营养学报, 2023a, 35(2): 772-781
28. 邱建强, 黄文, 赵红霞, 陈冰, 鲁慧杰, 刘振兴, 彭凯. 单宁对南美白对虾生长性能、体成分、消化酶活性及抗氧化性能的影响. 中国畜牧兽医, 2023b, 50(8): 3073-3083
29. 任继武, 邓超, 乔君毅, 陈哲秀, 郝瑞荣. 基于微生物和代谢组学研究葡萄籽原花青素对鹅肠道健康的影响. 动物营养学报, 2024, 36(2): 968-980
30. 石瑶瑶. 三种天然植物水提物对 H₂O₂ 诱导的草鱼原代肝细胞损伤的保护作用. [硕士学位论文]. 苏州: 苏州大学, 2021
31. 宋增福, 吴天星, 潘晓东. 鲫肠道上皮细胞原代培养方法的研究. 淡水渔业, 2008, 38(1): 67-69+34
32. 唐青松, 肖明飞, 易宏波, 熊海涛, 黄加珍, 徐娥. 饲料添加缩合单宁对肉鸡生长性能、肉品质、免疫功能、抗氧化功能及肠道形态的影响. 动物营养学报, 2021, 33(6): 3228-3236
33. 唐青松, 徐娥, 熊海涛, 肖明飞, 李景上, 易宏波. 缩合单宁对断奶仔猪生长性能和腹泻的影响. 饲料工业, 2020, 41(21): 37-41
34. 王文彪, 和翀翼, 王爽, 于娜, 肖培芳, 王艳艳, 张鹏宇. 儿茶中儿茶素对肉鸭血清抗氧化指标影响的试验研究. 中兽医学杂志, 2014, 4: 7-9
35. 王彦波, 许梓荣. 益生菌 PSB0201 对原代培养罗非鱼肠道上皮细胞的影响. 农业生物技术学报, 2007, 15(2): 233-236
36. 王咏梅, 陈冰, 曹俊明, 黄燕华, 王国霞, 彭凯, 莫文艳, 赵红霞. 桑叶黄酮对凡纳滨对虾肠道黏膜形态和肠道菌群的影响. 动物营养学报, 2020, 32(4): 1817-1825
37. 魏星. 马里亚纳海沟深渊沉积物中绿弯菌的代谢潜力和生态功能研究. [硕士学位论文]. 上海: 上海海洋大学, 2021
38. 鲜文东, 张潇潼, 李文均. 绿弯菌的研究现状及展望. 微生物学报, 2020, 60(9): 1801-1820
39. 肖勇. 儿茶素对妊娠母猪繁殖性能、抗氧化力和免疫功能的影响研究. [硕士学位论文]. 长沙: 湖南农业大学, 2013
40. 熊款款, 谭磊, 王爱兵, 杨凌宸. Keap1-Nrf2/ARE 信号通路抗氧化机制及抗氧化

- 剂的研究进展. 动物医学进展, 2021, 42(4): 89-94
41. 徐禛, 杨航, 姜维波, 李小勤, 冷向军. 儿茶素对草鱼生长性能、血清抗氧化指标和肌肉品质的影响. 动物营养学报, 2020, 32(2): 836-846
 42. 颜俊杰, 陈方政, 陈罗薇, 王恒, 黄静雯, 金陆飞, 徐于惠, 袁琳波. (+)-儿茶素缓解大鼠低氧性肺动脉高压的作用和机制. 茶叶科学, 2019, 39(1): 55-62
 43. 杨硕. 凡纳滨对虾肠道菌群分析及其利用. [硕士学位论文]. 天津: 天津科技大学, 2017
 44. 姚仕彬, 叶元土, 蔡春芳, 姚林杰, 许凡, 刘猛, 萧培珍, 王丽宏. 草鱼肠道粘膜上皮细胞的分离与原代培养. 上海海洋大学学报, 2013, 22(1): 33-41
 45. 易敏, 付元元. 血清 TBA、AST/ALT 比值的测定在肝病诊断中的临床意义. 实用预防医学, 2011, 18(7): 1337-1338
 46. 尹雄章, 肖珊, 马郁文, 方春香, 张晓雪. 表没食子儿茶素对小鼠离体脑片及氧糖剥夺损伤 HT-22 细胞系的保护作用. 医药导报, 2019, 38(10): 1259-1263
 47. 于德玲, 王昌留. 过氧化氢酶的研究进展. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2016, 25(2): 189-194
 48. 于丰铭, 徐扬. Caspase-3 的研究进展. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(11): 2072-2078
 49. 于井成. 儿茶素对 LTA 诱导的奶牛乳腺炎的炎症反应与氧化应激反应的作用. [硕士学位论文]. 郑州: 河南农业大学, 2023
 50. 韦崇万. EGCG 对热应激巴马香猪肠道屏障功能的影响及作用机制. [硕士学位论文]. 南宁: 广西大学, 2023
 51. 詹经纬, 李欣, 关淑文, 刘明, 蒋林树. 竹叶黄酮对过氧化氢诱导的奶牛乳腺上皮细胞氧化损伤的保护作用. 动物营养学报, 2023, 35(4): 2616-2628
 52. 张润蔚. 过氧化氢诱导斜带石斑鱼肝细胞氧化损伤的转录组学研究. [硕士学位论文]. 厦门: 集美大学, 2017
 53. 张旭, 刘洋, 黄璇, 邓萍, 李闯, 蒋桂韬, 戴求仲. 表没食子儿茶素没食子酸酯对热应激蛋鸭生产性能及血清生化、抗氧化和免疫指标的影响. 动物营养学报, 2023, 35(11): 7149-7156
 54. 赵娇. 葡萄籽原花青素缓解氧化应激仔猪肝脏损伤及可能机制研究. [硕士学位论文]. 成都: 四川农业大学, 2013

55. 赵文红, 邓泽元, 范亚苇, 李静, 阮征. 儿茶素体外抗氧化作用的研究. 食品科技, 2009, 34(12): 278-282
56. 赵玉超, 蒋林树. 饲用天然植物活性功能组分制备方法研究进展. 动物营养学报, 2022, 34(4): 2054-2072
57. 钟建琴, 付相, 黄小滢, 娄金鹏, 耿毅然, 袁攀, 韩雪, 洪峰. 儿茶素对高脂饮食小鼠减肥作用及肠道菌群的影响. 中国茶叶, 2022, 44(3): 45-49+55
58. 周雨瀚, 彭凯, 王国霞, 黄燕华, 陈冰, 莫文艳, 王海瑞, 曹俊明. 植物提取物单宁的生物活性及其在水产养殖上的研究进展. 饲料研究, 2020, 43(5): 117-122
59. 朱可心. 表儿茶素对铅中毒小鼠的拮抗作用及机制研究. [硕士学位论文]. 天津: 天津科技大学, 2022
60. Bhatt BS, Gandhi DH, Vaidya FU, Pathak C, Patel TN. Cell apoptosis induced by ciprofloxacin based Cu(II) complexes: cytotoxicity, SOD mimic and antibacterial studies. *J Biomol Struct Dyn*, 2020, 39(12): 1-8
61. Chen B, Qiu JQ, Wang YX, Huang W, Zhao HX, Zhu XF, Peng K. Condensed tannins increased intestinal permeability of Chinese seabass (*Lateolabrax maculatus*) based on microbiome-metabolomics analysis. *Aquaculture*, 2022, 560: 738615
62. Cremonini E, Maëlys R, Solenne A, Devulder-Mercier C, Cellier R, Pinel P, Girard P, Krga I, Villarreal F, Mackenzie G, Oteiza P. Epicatechin prevents high-fat diet-induced endoplasmic reticulum and oxidative stress and consequent apoptosis in pancreatic β -cells: evidence *in vivo* and *in vitro*. *Free Radical Bio Med*, 2023, 208(S1): S15
63. Decamp O, Cody J, Conquest L, Delanoy G, Tacon AGJ. Effect of salinity on natural community and production of *Litopenaeus vannamei* (Boone), within experimental zero-water exchange culture systems. *Aquac Res*, 2003, 34(4): 345-355
64. Deng C, Zhai Y, Yang X, Chen ZX, Li QH, Hao RR. Effects of grape seed procyanidins on antioxidant function, barrier function, microbial community, and metabolites of cecum in geese. *Poultry Sci*, 2023, 102(9): 102878
65. Duan YF, Xiong DL, Wang Y, Li H, Dong HB, Zhang JS. Toxic effects of ammonia and thermal stress on the intestinal microbiota and transcriptomic and metabolomic responses of *Litopenaeus vannamei*. *Sci Total Environ*, 2021, 754: 141867

66. Han X, Guo JL, You YL, Yin MW, Ren CL, Zhan JC, Huang WD. A fast and accurate way to determine short chain fatty acids in mouse feces based on GC-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1099: 73-82
67. Hixson JL, Bindon KA, Smith PA. Evaluation of direct phloroglucinolysis and colorimetric depolymerization assays and their applicability for determining condensed tannins in grape marc. *J Agr Food Chem*, 2015, 63(45): 9954-9962
68. Hsu YL, Chen CC, Lin YT, Wu WK, Chang LC, Lai CH, Wu MS, Kuo CH. Evaluation and optimization of sample handling methods for quantification of short-chain fatty acids in human fecal samples by GC-MS. *J Proteome Res*, 2019, 18(5): 1948-1957
69. Huang QQ, Liu XL, Zhao GQ, Hu TM, Wang YX. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Chin J Anim Nutr*, 2018, 4(2): 137-150
70. Jakubczyk K, Dec K, Kałduńska J, Kawczuga D, Kochman J, Janda K. Reactive oxygen species-sources, functions, oxidative damage. *Pol Merkur Lekarski*, 2020, 48(284): 124-127
71. Jia ZY, Tan YT, Liu YM, Cai GH, Chen XH, Zhai SW. Grape seed proanthocyanidins alleviate the negative effects of dietary cadmium on pearl gentian grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* female × *Epinephelus lanceolatus* male). *Isr J Aquacult-Bamid*, 2021, 73: 1427267
72. Liu MX, Wang YW, Han JG, Mao PS. The content and distribution of condensed tannins in different species of the genus sorghum (*Sorghum Moench*) and their effect on seed protein electrophoresis. *J Sci Food Agr*, 2009, 89(9): 1446-1452
73. Mi JL, Liu D, Qin CB, Yan X, Pang P, Yun YH, Wang LM, Nie GX. Dietary (-)-Epicatechin supplementation regulates myofiber development, fillet quality, and antioxidant status of Yellow River carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 2023, 572: 739542
74. Molino S, Lerma-Aguilera A, Jiménez-Hernández N, Rufián Henares JÁ, Francino MP. Evaluation of the effects of a short supplementation with tannins on the gut microbiota of healthy subjects. *Front Microbiol*, 2022, 13: 848611

75. Peng K, Huang QQ, Xu ZJ, McAllister TA, Acharya S, Mueller-Harvey I, Drake C, Cao JM, Huang YH, Sun YP, Wang SX, Wang YX. Characterization of condensed tannins from purple prairie clover (*Dalea purpurea* Vent.) conserved as either freeze-dried forage, sun-cured hay or silage. *Molecules*, 2018, 23(3): 586
76. Peng K, Wang GX, Wang YX, Chen B, Sun YP, Mo WY, Li GM, Huang YH. Condensed tannins enhanced antioxidant capacity and hypoxic stress survivability but not growth performance and fatty acid profile of juvenile Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Anim Feed Sci Tech*, 2020a, 269: 114671
77. Peng K, Wang GX, Zhao HX, Wang YX, Mo WY, Wu HM, Huang YH. Effect of high level of carbohydrate and supplementation of condensed tannins on growth performance, serum metabolites, antioxidant and immune response, and hepatic glycometabolism gene expression of *Lateolabrax japonicus*. *Aquacult Rep*, 2020b, 18: 100515
78. Peng K, Zhou YH, Wang YX, Wang GX, Huang YH, Cao JM. Inclusion of condensed tannins in *Lateolabrax japonicus* diet: Effects on growth, nutrient digestibility, antioxidant and immune capacity and copper sulphate stress resistance. *Aquacult Rep*, 2020c, 18: 100525
79. Peng K, Zhao HX, Wang GX, Chen B, Mo WY, Huang YH. Effect of condensed tannins on growth performance, intestinal immune capacity and bacterial microbiomes of *Lateolabrax japonicus*. *Aquac Res*, 2021a, 52: 5321-5331
80. Peng K, Huang W, Zhao HX, Sun YP, Chen B. Dietary condensed tannins improved growth performance and antioxidant function but impaired intestinal morphology of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult Rep*, 2021b, 21: 100853
81. Peng K, Lv XH, Zhao HX, Chen B, Chen XY, Huang W. Antioxidant and intestinal recovery function of condensed tannins in *Lateolabrax maculatus* responded to *in vivo* and *in vitro* oxidative stress. *Aquaculture*, 2022a, 547: 737399
82. Peng K, Chen B, Zhao HX, Zheng CT, Wang YX, Luo CY, Huang W. Condensed tannins alleviate aflatoxin B₁-induced injury in Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*). *Aquaculture*, 2022b, 552: 738029
83. Peng K, Chen B, Wang YX, Zhao HX, Zheng CT, Chen XY, Huang W. Condensed

- tannins protect against aflatoxin B₁-induced toxicity in *Lateolabrax maculatus* by restoring intestinal integrity and regulating bacterial microbiota. *Aquaculture*, 2022c, 555: 738255
84. Peng K, Chen B, Zhao HX, Wang YX, Huang W. Condensed tannins improve glycolipid metabolism but induce liver injury of Chinese seabass (*Lateolabrax maculatus*). *Front Mar Sci*, 2022d, 9: 902633
85. Peng K, Chen B, Zhao HX, Wang YX, Zheng CT, Lu HJ, Huang MW, Zhao JC, Huang W. Reevaluation of dietary condensed tannins on growth, antioxidant and immune response and muscle quality of Chinese seabass (*Lateolabrax maculatus*). *Aquaculture*, 2022e, 558: 738413
86. Qiu JQ, Chen B, Zhao HX, Huang W, Cao JM, Wang GX, Loh JY, Peng K. The protective role of condensed tannins on growth inhibition and enterohepatic injury induced by histamine in Chinese seabass (*Lateolabrax maculatus*). *Anim Feed Sci Tech*, 2024, 310: 115921
87. Rasola A, Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*, 2011, 50(3): 222-233
88. Terrill TH, Rowan AM, Douglas GB, Barry TN. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J Sci Food Agric*, 1992, 58: 321-329
89. Wang Y, Chen XH, Wu XY, Cai GH, Zhai SW. Effects of dietary supplementation of peanut skin proanthocyanidins on growth performance and lipid metabolism of the juvenile American eel (*Anguilla rostrata*). *Animals*, 2022, 12: 2375
90. Xu GL, Xing W, Li TL, Yu HH, Wei SB, Jiang N, Ma ZH, Luo L. Dietary grape seed proanthocyanidins improved growth, immunity, antioxidant, digestive enzymes activities, and intestinal microbiota of juvenile hybrid sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt ♀ × *A. schrenckii* Brandt ♂). *Aquacult Nutr*, 2021, 27(6): 1983-1995
91. Yang SP, Luo JL, Huang YX, Yuan YH, Cai SH. Effect of sub-lethal ammonia and nitrite stress on autophagy and apoptosis in hepatopancreas of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immun*, 2022, 130: 72-78
92. Zaib S, Hayyat A, Ali N, Gul A, Naveed M, Khan I. Role of mitochondrial

- membrane potential and lactate dehydrogenase A in apoptosis. *Anticancer Agents Med Chem*, 2022, 22(11): 2048-2062
93. Zhai SW, Lu JJ, Chen XH. Effects of dietary grape seed proanthocyanidins on growth performance, some serum biochemical parameters and body composition of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Ital J Anim Sci*, 2014, 13(3): 3357
94. Zhai SW, Lu JJ, Zhao PY, Chen XH. Effect of grape seed proanthocyanidins on alleviating dietary cadmium (Cd) induced growth retardation and oxidative stress in hepatopancreas of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Isr J Aquacult-Bamid*, 2018, 70: 1513
95. Zhang RK, Chen YN, Zhang JX, Liu J. Elevated serum levels of diamine oxidase, D-lactate and lipopolysaccharides are associated with metabolic-associated fatty liver disease. *Eur J Gastroen Hepat*, 2023, 35(1): 94-101
96. Zhang SM, Wang HB, Zhu MJ. A sensitive GC/MS detection method for analyzing microbial metabolites short chain fatty acids in fecal and serum samples. *Talanta*, 2018, 196: 249-254
97. Zhang XJ, Yuan JB, Sun YM, Li SH, Gao Y, Yu Y, Liu CZ, Wang QC, Lv XJ, Zhang XX, Ma KY, Wang XB, Lin WC, Wang L, Zhu XL, Zhang CS, Zhang JQ, Jin SJ, Yu KJ, Kong J, et al. Penaeid shrimp genome provides insights into benthic adaptation and frequent molting. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 356