

DOI: 10.12264/JFSC2023-0040

植物甾醇对克氏原螯虾生长消化、肠肝形态及抗氧化和免疫水平的影响

杨志刚¹, 王笑^{1,2}, 任胜杰^{2,3,4}, 刘永健², 顾晓龙², 王爱民²

1. 上海海洋大学, 农业农村部淡水种质资源重点实验室, 上海 201306;
2. 盐城工学院海洋与生物工程学院, 江苏 盐城 224000;
3. 江苏省水产动物营养重点实验室, 江苏 苏州 215000;
4. 浙江省淡水水产研究所, 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 浙江湖州 313001

摘要: 本研究旨在探究饲料中添加植物甾醇对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)生长、消化、抗氧化、免疫及肠肝形态的影响。制备 5 组等氮等脂饲料, 分别为在基础饲料中添加 0% (CON)、0.10% (P1)、0.19% (P2)、0.38% (P3) 和 0.76% (P4) 的植物甾醇, 对体均重为(9.37±0.02) g 的克氏原螯虾进行 6 周的养殖实验。结果显示, P1 和 P2 组的增重率、特定生长率显著高于 CON 组($P<0.05$), 且 P2 组实验虾的生长性能最佳。P3 组实验虾肠道蛋白酶活性显著高于 CON 组, 脂肪酶活性显著低于 CON 组($P<0.05$)。P1 组肝胰腺中酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性最高, P2 组血淋巴中酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性最高, 但与 CON 差异均不显著($P>0.05$)。随着植物甾醇添加水平提高, 肝胰腺和血淋巴总超氧化物歧化酶活性与过氧化氢酶活性呈上升趋势, 丙二醛含量呈下降趋势。相较 CON 组, P1 组肠道结构更加健康完整, 植物甾醇水平达到 0.19% 及以上时, 克氏原螯虾的肝胰腺与肠道组织形态出现受损状态。随着植物甾醇水平提高, 肝胰腺的 *NF- κ B* 相对表达水平升高。P1 组 *Hsp70* 相对表达水平显著高于其他组($P<0.05$)。研究表明, 本实验条件下添加 0.10%~0.19% 植物甾醇可以促进克氏原螯虾的生长消化, 改善肠肝组织形态, 提高克氏原螯虾抗氧化和免疫能力。

关键词: 植物甾醇; 克氏原螯虾; 生长性能; 免疫; 抗氧化; 组织形态

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)05-0655-13

植物甾醇是一类天然存在的甾醇, 具有环戊烷全氢菲结构, 与胆固醇(5-胆甾烯-3 β -醇)结构相似。以游离态、酯化态及糖苷的形式广泛存在于各种植物油、坚果和种子中, 常见的植物甾醇有谷甾醇、豆甾醇、菜油甾醇等^[1-2]。植物甾醇具有多种优异的生理功能, 医学研究中发现植物甾醇能够降低血清中低密度脂蛋白胆固醇而不影响其

他脂蛋白水平^[3-5]。此外, 植物甾醇能够降低心血管疾病的发生, 具有抗癌^[6]、消炎^[7]、调节免疫^[8]和抑菌^[9]等生理功效, 是一类安全的食品添加剂, 国际上也已允许其在动物饲料中添加使用^[10-11], 目前在畜禽上已有应用报道。许栋等^[12]研究发现饲料中添加 100、200 mg/kg 植物甾醇能够显著提高“杜洛克猪×长白猪×大白猪”三元杂交猪(*Sus*

收稿日期: 2023-03-01; 修订日期: 2023-03-28.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32273154); 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20210943); 上海市自然科学基金项目(22ZR1427300); 江苏省水产动物营养重点实验室开放课题项目(KJS2228); 盐城工学院高层次人才科研启动项目(xjr2021022); 上海市研究生教育学会研究课题项目(ShsgeG202215).

作者简介: 杨志刚(1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向为水产动物饲料与营养代谢. E-mail: zgyang@shou.edu.cn

通信作者: 任胜杰, 讲师, 研究方向为水产动物饲料与营养代谢, E-mail: 601897646@qq.com; 王爱民, 教授, 研究方向为水产动物饲料与营养代谢, E-mail: bluesawam@ycit.edu.cn

scrofa)的生长性能,增强免疫性能和血液抗氧化性能,促进背长肌和肝脏 *Wnt1* 基因表达。谢颖等^[13]研究发现每天摄入 200 mg 的植物甾醇可有效提高中国荷斯坦牛(*Bos taurus*)产奶量,提高血液超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性,减少氧化产物。Ding 等^[14]研究发现,饲料添加 40、80 mg/kg 植物甾醇可以改善白羽肉鸡(*Gallus domesticus*)的生长性能、血清脂质水平、促炎细胞因子水平和肠道形态。以上研究表明植物甾醇在改善动物的生长性能及生理代谢方面能够起到积极的促进作用。然而相比于畜禽,植物甾醇在水产动物中的研究工作非常匮乏。李志华等^[15]研究发现,饲料中添加 20 mg/kg 植物甾醇可以促进吉富罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)生长,降低血清脂质含量,同时明显改善罗非鱼肝胰脏抗氧化能力。潘忠超等^[16]研究发现在罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)饲料中添加 40 mg/kg 的植物甾醇能够显著提高其生长性能,增加肌肉谷氨酸和甘氨酸含量。令狐克川等^[17]在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)饲料中添加 50 mg/kg 混合植物甾醇能够显著提高生长性能,降低血淋巴总胆固醇含量,增加可食内脏和肌肉比例,增强可食内脏抗氧化能力。

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)属节肢动物门(Arthropoda),甲壳纲(Crustacea),十足目(Decapoda),螯虾科(Astacidae),原螯虾属(*Procambarus*)。2021年,克氏原螯虾总产量为 263.36 万 t,同比增长 10.02%,是我国养殖产量最高的甲壳类经济动物^[18]。随着市场需求的增加,其养殖规模仍在不断扩大,与此同时,受动物性蛋白原料紧缺影响,克氏原螯虾饲料配方中的植物性蛋白源的比例亦逐渐增加,在不额外添加胆固醇的高植物性蛋白源饲料中缺乏甲壳动物必需的胆固醇,进而会对克氏原螯虾生长生理造成负面影响,植物甾醇作为甾醇类添加剂能够改善因饲料缺乏胆固醇而产生的不利影响,然而针对克氏原螯虾饲料中添加植物甾醇的研究尚未见报道。本研究通过在克氏原螯虾饲料中添加不同水平的植物甾醇,研究植物甾醇对克氏原螯虾生长消化、抗氧化和免疫的影响,为克氏原螯虾饲料的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物与养殖管理

克氏原螯虾购自江苏进峰农业科技有限公司(中国,盐城)。将大小一致、螯足完好的 300 只均重为(9.37±0.02) g 的克氏原螯虾随机分到 15 个水泥池中(长×宽×高: 2 m×1.5 m×1 m),共 5 组,每组 3 个重复,每个重复投放 20 尾虾。实验虾暂养 1 周以适应养殖环境和实验饲料。暂养期间按照初始重量的 1%投喂对照组饲料,每天观察实验虾的摄食及存活情况,及时将应激致死的实验虾捞出并称重记录,补充大小规格一致的实验虾。暂养结束后饱食投喂实验饲料,分别在 7:00 和 18:00 按照每天饲喂总量的 40%和 60%各投喂 1 次,实验时间共计 6 周(2022 年 7 月 12 日至 8 月 24 日)。养殖期间出现死虾及时捞出并称重记录,每 3 d 更换 1/3 的水体,保持水体 pH 在 7.0~8.5、溶氧>5 mg/L、氨氮<1 mg/L、亚硝酸盐<0.02 mg/L。

1.2 实验饲料

植物甾醇(甾醇含量为 95%,其中 β -谷甾醇占 50%,豆甾醇占 36%,菜油甾醇占 7%,菜籽甾醇占 2%)购自南京诺奇生物有限公司。实验饲料以鱼粉、豆粕、菜粕和棉粕为蛋白源,以豆油和植物甾醇为脂肪源,糖源为面粉和米糠,共制备 5 组等氮等脂(粗蛋白: 32%;粗脂肪: 6%)饲料,植物甾醇添加量依次为 0%、0.10%、0.19%、0.38%和 0.76%,分别命名为 CON、P1、P2、P3 和 P4 (饲料配方见表 1)。制备过程中先将原料粉碎后过 80 目筛网,准确称重后按逐级扩大法充分混匀,加入油料与 15%的蒸馏水用混料机(元芳 HJ25 型搅拌机,元芳食品机械制造有限公司,广州)充分混匀至无结块后用制粒机(泰锐达 230 型颗粒饲料机,河南泰锐达机械制造有限公司,河南)制成粒径为 2 mm 的沉水性颗粒饲料。自然阴凉风干后用自封袋密封包装保存在-20℃冰箱待用。

实验饲料基本成分采用以下方法检测:凯氏定氮法(GB/T 5009.5—2016)测定饲料粗蛋白质含量;索氏抽提法(GB/T 5009.6—2016)测定饲料粗脂肪含量;恒温干燥失重法(GB/T 5009.3—2016)测定饲料水分;马弗炉灼烧法(GB/T 5009.4—

2016)测定饲料灰分。

表 1 实验饲料配方和营养成分
Tab. 1 Composition and proximate analysis
of the experimental diets

饲料成分 diet composition	组别 group				
	CON	P1	P2	P3	P4
饲料配方 diet formulation					
鱼粉 fish meal	8	8	8	8	8
豆粕 soybean meal	26.3	26.3	26.3	26.3	26.3
菜粕 rapeseed meal	14	14	14	14	14
棉粕 cottonseed meal	8	8	8	8	8
豆油 soybean oil	3.76	3.66	3.57	3.38	3.00
面粉 wheat flour	27	27	27	27	27
米糠 rice bran	6	6	6	6	6
赖氨酸 Lys	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
蛋氨酸 Met	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
精氨酸 Arg	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
维他命预混料 vitamin premix ^a	1	1	1	1	1
矿物质预混料 mineral premix ^b	1	1	1	1	1
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	2	2	2	2	2
植物甾醇 phytosterols ^c	0	0.10	0.19	0.38	0.76
微晶纤维素 microcrystalline cellulose	2.54	2.54	2.54	2.54	2.54
营养成分 chemical composition					
粗蛋白 crud protein	32.06	32.02	32.12	32.01	32.06
粗脂肪 crud lipid	6.25	6.33	6.34	6.32	6.45
水分 moisture	13.62	13.41	13.64	13.63	13.52
灰分 ash	7.27	7.09	7.02	7.05	7.06
植物甾醇 phytosterols	0.03	0.13	0.21	0.40	0.79

注: a. 维生素预混料为每千克饲料提供以下成分(mg/kg diet): 维生素 A 醋酸酯, 12500 IU; 维生素 D₃, 2800 IU; 维生素 K, 5.5; 维生素 B₁, 3.5; 维生素 B₂, 21; 维生素 B₁₂, 0.4; 生育酚乙酸酯, 65; 泛酸钙, 48; 肌醇, 870; 烟酸, 200; 生物素, 1.8; 叶酸, 3.4。
b. 矿物质预混料为每千克饲料提供以下成分(mg/kg diet): 硫酸铁, 80; 硫酸铜, 10; 硫酸锰, 45; 碘化钾, 60; 硫酸镁, 1200; 硫酸锌, 50; 氯化钴, 50; 亚硒酸钠, 20。
c. 植物甾醇(甾醇含量为 95%, 其中 β-谷甾醇含量占 50%, 豆甾醇含量占 36%, 菜油甾醇含量占 7%, 菜籽甾醇含量占 2%)由南京诺奇生物有限公司提供。
Note: a. Vitamin premix supplied the diet with the following ingredients (mg/kg diet): retinyl acetate, 12500 IU; vitamin D₃, 2800 IU; vitamin K, 5.5; vitamin B₁, 3.5; vitamin B₂, 21; vitamin B₁₂, 0.4; DL-α-tocopherol acetate, 65; calcium pantothenate, 48; inositol, 870; nicotinic acid, 200; biotin, 1.8; folic acid, 3.4。
b. Mineral premix supplied the diet with (mg/kg diet) the following ingredients: FeSO₄·H₂O, 80; CuSO₄·5H₂O, 10; MnSO₄·H₂O, 45; KI, 60; MgSO₄·7H₂O, 1200; ZnSO₄·H₂O, 50; CoCl₂·6H₂O, 50; Na₂SeO₃, 20。
c. Phytosterols (sterol content was 95%, of which β-sitosterol content accounted for 50%, stigmasterol content accounted for 36%, rapeseed sterol content accounted for 7%, rapeseed sterol content accounted for 2%) were provided by Nanjing Nuoqi Biological Technology Company Limited.

1.3 样品采集

6 周养殖结束后, 禁食 24 h, 快速捕捞实验虾, 冰浴麻醉 5 min, 分别对每池实验虾计数并称总重。每池随机取 3 只克氏原螯虾, 分别量取体重、体长, 用 2.0 mL 无菌注射器从围心腔收集血淋巴, 4 ℃静置 2 h, 离心 20 min (4 ℃, 8000 r/min), 取上清, 保存在-80 ℃冰箱, 用于后续分析。解剖抽取血淋巴后的实验虾, 取肝胰腺、肌肉称重并记录, 将肝胰腺、肌肉分装后-20 ℃保存, 用于检测组织酶活性。再随机取 3 只克氏原螯虾的肝胰腺和中肠组织, 用 4%多聚甲醛浸泡, 4 ℃保存, 用于制作切片, 进行组织 HE 染色观察。最后取 3 只克氏原螯虾用经过 RNA 酶灭活处理的解剖器械取出肝胰腺, 在盛放预冷 PBS (NaCl 8.0 g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g, KH₂PO₄ 0.2 g, KCl 0.2 g 加蒸馏水定容至 1 L)的一次性玻璃皿中清洗后放入无酶离心管中, 液氮速冻, 保存在-80 ℃冰箱用于基因表达检测。

1.4 指标检测

1.4.1 生长性能与形体指数测定 根据采样时记录的克氏原螯虾体重、体长、肝胰腺重、腹部肌肉重, 以及养殖实验开始到结束的记录, 包括幼虾初始体重、饲料消耗量、实际养殖天数等, 计算存活率、增重率、特定生长率、饲料系数、肥满度、腹部含肉率和肝胰腺指数。以增重率、特定生长率和饲料系数作为生长性能评判指征, 以肥满度、腹部含肉率和肝胰腺指数作为形体指数指征。其公式如下:

存活率 (survival, %)=100×N_t/N₀

增重率 (WG, %)=100×[(W_t-W₀)/W_t]

特定生长率 (SGR, g/d)=100×(ln W_t-ln W₀)/t

饲料系数 (FCR)=W_f/(W_tN_t-W₀N₀+W_d)

肥满度 (CF, %)=100×W_t/L_t

腹部含肉率 (FC, %)=100×W_m/W_t

肝胰腺指数 (HSI, %)=100×W_h/W_t

式中, *t* 为养殖天数(d); N_t 为存活尾数; N₀ 为初始投放尾数; W_t 为终末体重(g); W₀ 为初始体重(g); W_f 为饲料消耗量(g); W_d 为养殖期死亡虾总重(g); L_t 为终末体长(cm); W_m 为虾腹部肌肉重(g); W_h 为肝胰腺重(g)。

1.4.2 血淋巴生化与组织酶活性检测 选用南京建成生物工程研究所试剂盒测定克氏原螯虾血淋巴生化。克氏原螯虾血淋巴总胆固醇(T-CHO, No. A111-1-1)使用单试剂 GPO-PAP 法, 甘油三酯(TG, No. A110-1-1)使用单试剂 GPO-PAP 法, 高密度脂蛋白(HDL, No. A112-1-1)使用双试剂直接法, 低密度脂蛋白(LDL, No. A113-1-1)使用双试剂直接法测定, 谷丙转氨酶(ALT, No. C009-3-1)和谷草转氨酶(AST, No. C010-3-1)使用紫外比色法, 根据试剂盒说明使用全自动化学分析仪(Hitachi 7170, DAICHI, 日本)测定以上指标。此外, 选用南京建成生物工程研究所试剂盒测定克氏原螯虾肠道消化酶、肝胰腺抗氧化指标和免疫酶活。克氏原螯虾的肠道蛋白酶(PES, No.A080-2-2)使用紫外比色法, 淀粉酶(α -AMS, No. C016-1-1)使用淀粉-碘比色法, 脂肪酶(LPS, No. A054-1-1)使用比色法, 肝胰腺总超氧化物歧化酶(T-SOD, No. A001-1-2)使用羟胺法, 过氧化氢酶(CAT, No. A007-1-1)使用钼酸铵法, 丙二醛(MDA, No. A003-1-2)使用 TBA 法, 碱性磷酸酶(AKP, No. A059-1-1)和酸性磷酸酶(ACP, No. A060-1-1)使用分光光度法, 根据试剂盒说明使用酶标仪(iMark; BIO-RID, 美国)和可见分光光度计(2100; UNIC, 中国)测定以上指标。

1.4.3 组织形态观察 每池随机取 3 尾虾, 采集肝胰腺和中肠, 进行组织形态病理学观察。分离的肝胰腺和中肠先在 0.65%生理盐水中漂洗, 快速洗去血污、粪便等杂质后分别转入 4%多聚甲醛溶液固定后制成石蜡切片并进行 HE 组织染色, 评估肝胰腺、肠道组织形态变化。

1.4.4 肝胰腺基因表达检测 用灭菌剪刀剪取约 50 mg 肝胰腺组织样本, 加入 1000 μ L 组织裂解液(TRIzol), 使用 Ultrapure RNA Kit (DNase I, 康为世纪, 货号 CW0597S)进行总 RNA 提取。使用

Transgen 反转录试剂盒进行反转录操作(货号: AE-311)。20 μ L 反转录体系各组分如下: 10 μ L 2 $\times$ RT Buffer, 1 μ L RT/RI, 1 μ L gDNA Remove, 1 μ L Random Primer (10 μ mol/L), 1~3 μ L (约 900 ng) RNA (稀释后), RNase free dH₂O 加到 20 μ L。将各组分混匀后置于 42 $^{\circ}$ C 水浴锅中孵育 1 h, 得到第一链 cDNA, 将逆转录后的 cDNA 用 H₂O 5 倍稀释后, 进行后续 QPCR 反应。实验采用 SYBR Green I 法实时荧光定量 PCR (相对定量)进行 mRNA 表达量分析, 定量 PCR 试剂盒为: TransStart Green qPCR SuperMix (货号: AQ131-01), 检测仪器为 LightCycler96 (Roche, Swiss)。反应体系 20 μ L, 其中 10 μ L 的 2 $\times$ Top Green EX-Taq Mix, 各 0.5 μ L 上下游引物(10 μ mol/L), 2 μ L 的 Template cDNA, 7 μ L 的 RNase Free dH₂O。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 30 s; 接着 94 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 35 s, 循环 42 次。通过熔解曲线和电泳确定 PCR 产物的特异性。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对表达量计算。本研究过程中所使用的 *NF- κ B*、*Hsp70* 基因引物序列见表 2。

1.5 数据分析

采用 SPSS 26.0 软件进行统计计算, 经单因素方差(one-way ANOVA)分析后, 存在显著差异, 则进行 Duncan's 多重比较各组间的显著性差异, 统计显著性水平设为 0.05。数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm$ SD)表示。使用 GraphPad 6.0.1 绘制柱状图。

2 结果与分析

2.1 植物甾醇对克氏原螯虾生长的影响

各组间存活率、肥满度、腹部含肉率、肝胰腺指数均无显著性差异($P>0.05$)。P2 组实验虾生长性能最佳, 且 P1 和 P2 组的增重率、特定生长率显著高于 CON、P3、P4 组($P<0.05$)。实验组的饲料系数低于 CON 组, 但差异不显著($P>0.05$, 表 3), P2 组饲料系数最低。

表 2 克氏原螯虾肝胰腺基因相对表达引物序列表
Tab. 2 QPCR primers for hepatopancreas gene of *Procambarus clarkii*

基因 gene	上游引物(5'-3') forward (5'-3')	下游引物(5'-3') revised (5'-3')	基因登录编号 accession number
<i>NF-κB</i>	TAGTGC GTGATGATGGGTCTT	GCTGATTATGGAGGCAGAAAA	KF662471.1
<i>Hsp70</i>	GGTGT TGGTGGGAGGGTCTA	GGCTCGCTCTCCCTCATACAC	MG910466.1
β -actin	GCACCATCCACCATGAAGATTA	GGTAGAAAGGGAAGCCAAGATG	KR135165.1

表 3 饲料植物甾醇添加水平对克氏原螯虾生长性能的影响
Tab. 3 Effect of phytosterol levels on growth performance of *Procambarus clarkii*

n=3; $\bar{x} \pm SD$

指标 index	组别 group					P-value
	CON	P1	P2	P3	P4	
初均重/g IBW	9.36±0.03	9.33±0.01	9.34±0.01	9.42±0.07	9.40±0.02	0.309
末均重/g FBW	26.23±0.70 ^b	30.19±0.18 ^a	30.30±0.78 ^a	25.92±0.87 ^b	26.67±0.90 ^b	0.003
增重率/% WG	180.19±8.26 ^b	223.48±1.97 ^a	224.56±8.52 ^a	175.00±10.05 ^b	183.77±9.78 ^b	0.003
存活率/% survival	70.00±2.88	70.00±5.00	71.67±3.33	78.33±1.67	76.67±3.33	0.331
特定生长率/(%/d) SGR	2.10±0.06 ^b	2.39±0.01 ^a	2.40±0.05 ^a	2.06±0.07 ^b	2.13±0.07 ^b	0.003
饲料系数 FCR	1.70±0.24	1.28±0.15	1.21±0.10	1.38±0.12	1.36±0.14	0.304
肥满度 CF	6.77±0.04	8.09±0.40	8.36±0.36	7.68±0.20	8.13±0.40	0.097
腹部含肉率/% FC	7.40±0.40	7.63±0.96	7.19±0.29	7.48±0.16	7.60±0.40	0.988
肝胰腺指数/% HSI	4.62±0.17	5.22±0.34	4.34±0.81	4.31±0.36	6.14±0.29	0.181

注: 同行不同小写字母表示数据间差异显著($P<0.05$).
Notes: Values in the same row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

2.2 植物甾醇对克氏原螯虾血淋巴生化指标的影响

各组实验虾血淋巴中甘油三酯(TG)、总胆固醇(T-CHO)、高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白(LDL)浓度无显著差异($P>0.05$)。P1 组谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性显著低于其他组($P<0.05$)。P4 组谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性最高(表 4)。

2.3 植物甾醇对克氏原螯虾肠道消化酶活性的影响

在肠道中胰蛋白酶和淀粉酶活性随着植物甾醇水平的提高呈现先上升后下降的趋势, 脂肪酶活性的趋势与胰蛋白酶和淀粉酶相反。P3 组肠道胰蛋白酶、淀粉酶活性最高, 胰蛋白酶活性显著

高于 CON 和 P1 组($P<0.05$), 但 P3 组淀粉酶活性与 CON 组无显著差异($P>0.05$)。P3 组脂肪酶活性最低, 显著低于 CON、P1 和 P4 组($P<0.05$, 图 1)。

2.4 植物甾醇对克氏原螯虾免疫和抗氧化能力的影响

在肝胰腺中, P1 组 ACP 活性最高, 显著高于 P2 组($P<0.05$), 其余各组间无显著差异($P>0.05$); CON 和 P1 组 AKP 活性显著高于 P2 和 P4 组($P<0.05$), 且 P1 组最高。在血淋巴中, P1 和 P2 组 ACP 活性最高, 各组间 ACP 活性无显著差异($P>0.05$); P1 和 P2 组 AKP 活性高于 CON 组, 但不显著($P>0.05$), P1 和 P2 组 AKP 活性显著高于 P4 组($P<0.05$, 图 2)。

在肝胰腺中, P3 和 P4 的 T-SOD 和 CAT 活性显著高于 CON 组($P<0.05$), 且 P3 的 T-SOD 和 CAT

表 4 饲料植物甾醇添加水平对克氏原螯虾血淋巴生化的影响
Tab. 4 Effect of phytosterol levels on hemolymph biochemistry of *Procambarus clarkii*

n=3; $\bar{x} \pm SD$

指标 index	组别 group					P
	CON	P1	P2	P3	P4	
甘油三酯/(mmol/L) TG	0.11±0.01	0.09±0.01	0.11±0.01	0.12±0.01	0.11±0.01	0.253
总胆固醇/(mmol/L) T-CHO	0.15±0.01	0.13±0.01	0.15±0.00	0.14±0.00	0.14±0.01	0.495
高密度脂蛋白/(mmol/L) HDL	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	*
低密度脂蛋白/(mmol/L) LDL	0.07±0.01	0.06±0.01	0.07±0.00	0.06±0.00	0.07±0.01	0.388
谷丙转氨酶/(U/L) ALT	33.67±2.34 ^b	14.07±0.59 ^d	25.90±2.26 ^c	47.00±3.06 ^a	47.93±2.58 ^a	0.000
谷草转氨酶/(U/L) AST	109.23±3.73 ^{ab}	60.13±2.97 ^c	115.80±2.25 ^{ab}	121.13±4.50 ^{ab}	191.37±4.95 ^a	0.000

注: *表示实验中未能检测出高密度脂蛋白 HDL; 同行不同小写字母表示数据间差异显著($P<0.05$).
Notes: * indicates high density lipoprotein (HDL) was not detected in the experiment. Values in the same row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

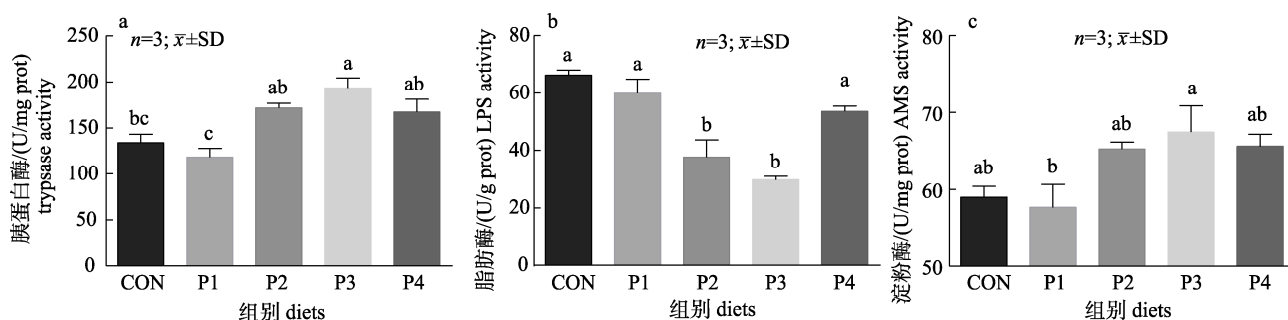


图 1 饲料植物甾醇添加水平对克氏原螯虾肠道消化酶活性的影响

柱形图上方不同字母表示组间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 1 Effects of phytosterols levels on intestinal digestive enzyme activities of *Procambarus clarkii*
Different letters on the column indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

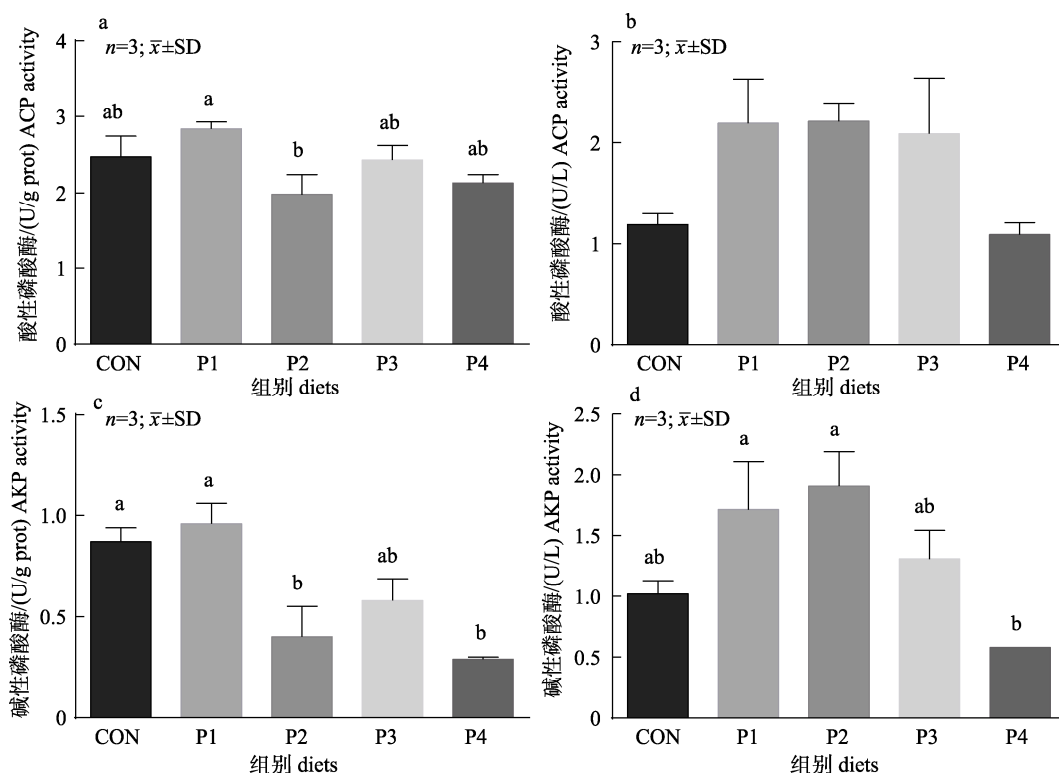


图 2 饲料植物甾醇水平对克氏原螯虾肝胰腺(a, c)和血淋巴(b, d)免疫酶活性的影响

柱形图上方不同字母表示组间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 2 Effects of phytosterols levels on immune enzyme activities in hepatopancreas (a, c) and hemolymph (b, d) of *Procambarus clarkii*
Different letters on the column indicate significant differences between groups ($P < 0.05$).

活性最高。P3 和 P4 组 MDA 含量显著低于 CON、P1 和 P2 组($P < 0.05$), 且 P3 的 MDA 含量最低。在血淋巴中, P4 组 T-SOD 活性最高, 显著高于其他组($P < 0.05$), P3 组 CAT 活性最高, 显著高于 CON 组($P < 0.05$), 但与其他组无显著差异($P > 0.05$), P4 组的血淋巴 MDA 含量最低, 显著低于 P1 和 P3 组($P < 0.05$, 图 3)。

2.5 植物甾醇对克氏原螯虾组织形态结构的影响

P1 组肠道形态结构清晰完整, 由内到外分别为上皮层、结缔组织层、肌肉层、外膜, 相较 CON 组, P1 组的肠道结缔组织空泡化得到改善(图 4a, 图 4b); P2 组肠道出现结缔组织萎缩, 上皮组织与结缔组织分离(图 4c); P3 组皱褶数量减少, 上皮柱状细胞皱缩, 细胞核脱落(图 4d); P4 组上皮组

织损伤, 肠道绒毛脱落, 组织间存在大量空隙(图 4e)。

如图 5 所示, CON 组和 P1 组肝小管结构完整, 不同细胞区分明显, 细胞间连接紧密, 但 CON 组

肝小管星状结构消失, P1 组的肝小管管腔有明显的星状结构(图 5a, 图 5b); P2 组的 B 细胞变大, 空泡的数量增多, 不同细胞间的差异不明显(图 5c);

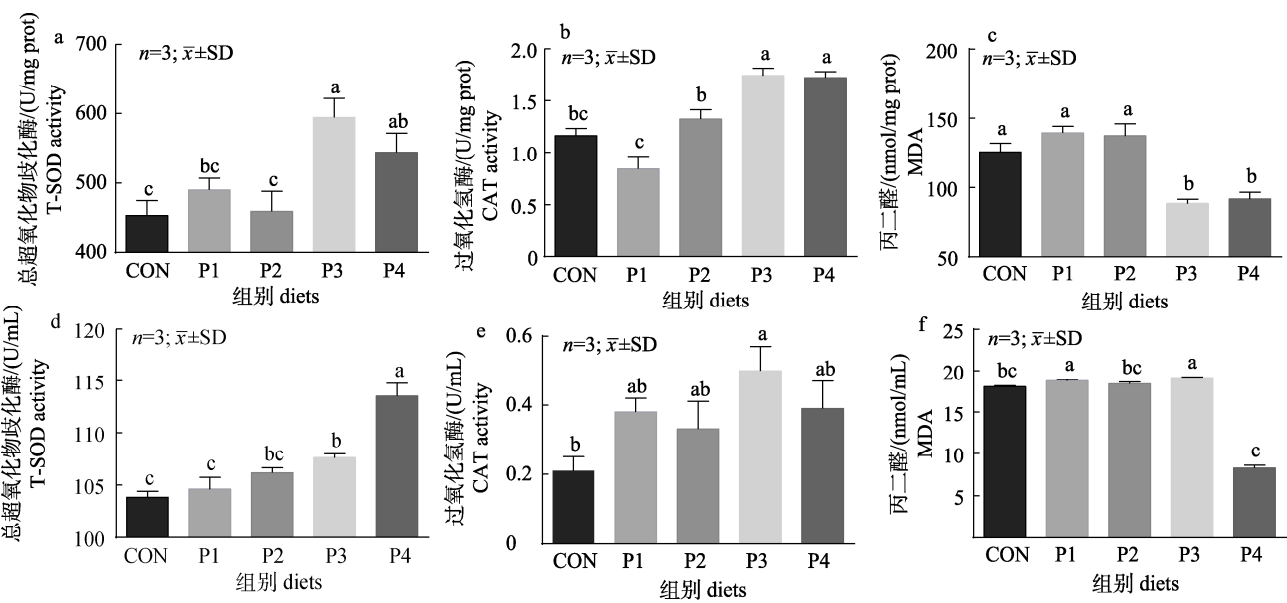


图 3 饲料植物甾醇水平对克氏原螯虾肝胰腺(a, b, c)和血淋巴(d, e, f)抗氧化能力的影响

柱形图上方不同字母表示差异显著($P < 0.05$).

Fig. 3 Effects of phytosterols levels on antioxidant capacity in hepatopancreas (a, c, e) and hemolymph (b, d, f) of *Procambarus clarkia*

Different letters on the column indicate significant differences ($P < 0.05$).

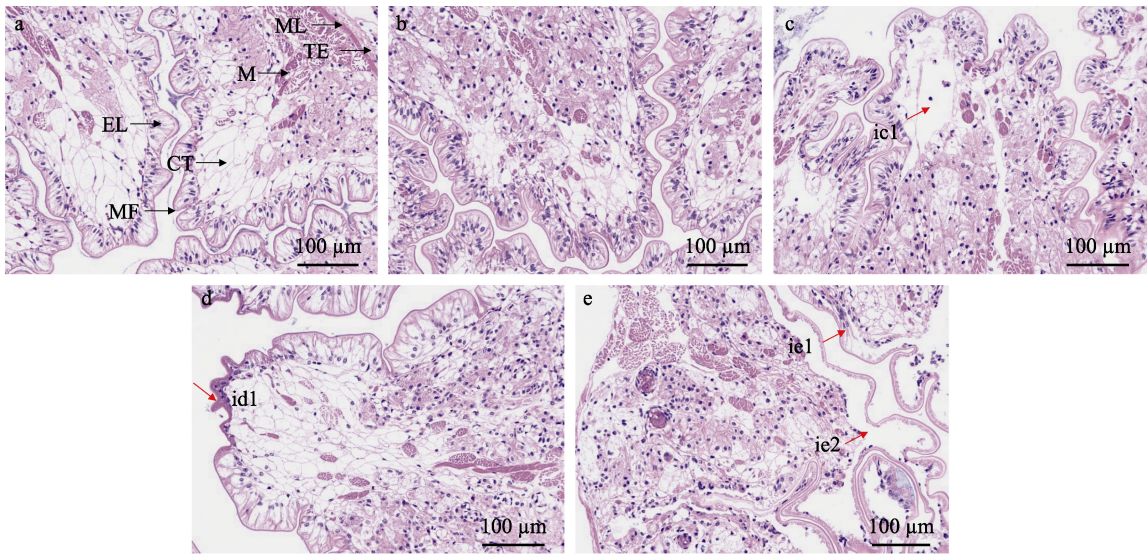


图 4 饲料植物甾醇水平对克氏原螯虾肠道组织形态的影响

a-e 分别代表 CON、P1、P2、P3 和 P4 处理组。EL: 上皮层; CT: 结缔组织; ML: 肌层; TE: 外膜; M: 肌束; MF: 皱褶; ic1: 结缔组织萎缩; id1: 上皮层皱缩; ie1: 上皮层损伤; ie2: 上皮层与结缔组织间空隙。

Fig. 4 Effects of phytosterols levels on intestinal morphology of *Procambarus clarkia*

a-e represent CON, P1, P2, P3, and P4 treatment groups, respectively. EL: epithelial layer; CT: connective tissue; ML: muscle layer; TE: tunica externa; M: muscle; MF: muscle folds; ic1: connective tissue atrophy; id1: epithelial layer shrinkage; ie1: epithelial layer injury; ie2: the gap between epithelial layer and connective tissue.

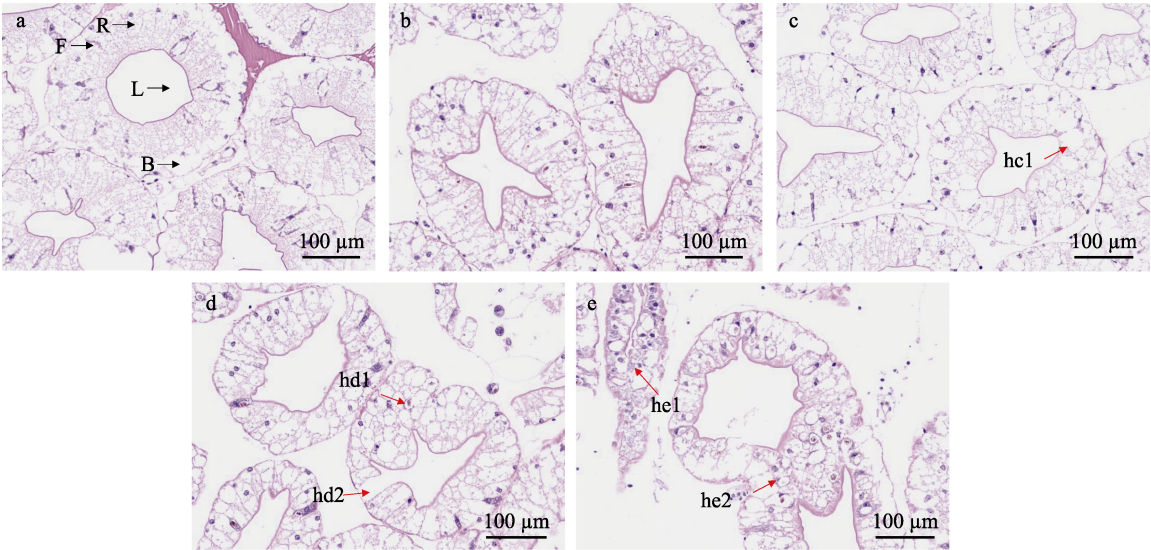


图 5 饲料植物甾醇水平对克氏原螯虾肝胰腺组织形态的影响

a-e 分别代表 CON、P1、P2、P3 和 P4 处理组。L: 管腔; B: 分泌细胞; R: 吸收细胞; F: 纤维细胞; hc1: 变大的 B 细胞液泡; hd1: 肝小管畸形; hd2: 肝小管结构破损; he1: 肝小管畸形; he2: 肝小管粘连。

Fig. 5 Effects of phytosterols levels on hepatopancreas morphology of *Procambarus clarkia*

a-e represent CON, P1, P2, P3, and P4 treatment groups, respectively. L: Lumen; B: blazenzenllen cell; R: restzellen cell; E: embryonalzellen cell; F: fibrillenzellen cell; hc1: enlarged B cell vacuoles; hd1: hepatic tubular malformation; hd2: hepatic tubular structure damage; he1: hepatic tubular malformation; he2: hepatic tubule adhesion.

P3 组的肝胰腺肝小管结构破损, 肝小管出现畸形, 各种细胞内部液泡体积增大, 数量增多(图 5d); P4 组肝小管畸形, 肝小管间出现粘连, 细胞空泡化严重(图 5e)。

2.6 植物甾醇对克氏原螯虾基因相对表达的影响

由图 6 可知, 随植物甾醇的添加量增多, 克氏原螯虾肝胰腺的 *NF-κB* 基因相对表达水平升高, 且除 P1 组外其他组显著高于 CON ($P<0.05$)。同 CON 组相比, P2 组的 *Hsp70* 基因相对表达水平无显著差异($P>0.05$), 其他组显著高于 CON 组

($P<0.05$), P1 组的 *Hsp70* 基因相对表达水平显著高于其他组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 植物甾醇对克氏原螯虾生长和消化的影响

本研究中在克氏原螯虾饲料中添加 0.10%和 0.19%的植物甾醇其生长性能出现显著提升, 这一结果与 Guo 等^[19]在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)中的研究结果相一致。这可能和部分甲壳动物能够将所摄入外源植物甾醇在体内转化为

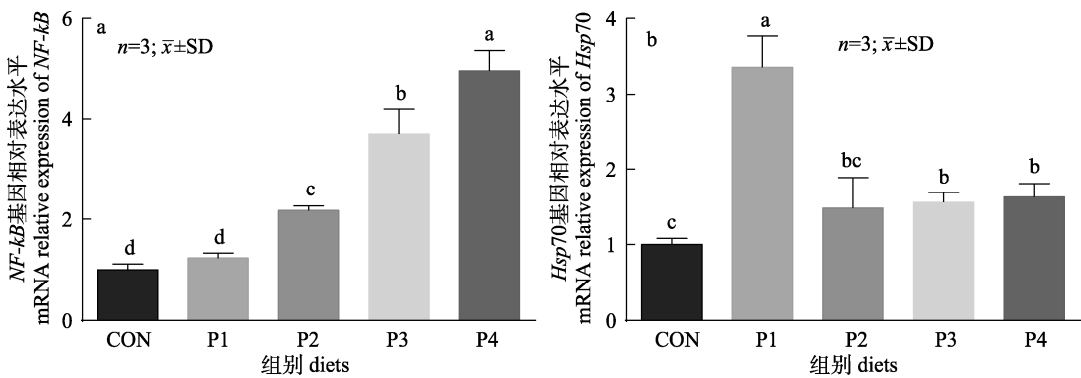


图 6 饲料植物甾醇水平对克氏原螯虾肝胰腺基因表达的影响

柱形图上方不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 6 Effects of Phytosterols levels on hepatopancreas gene expression of *Procambarus clarkii*

Different letters on the column indicate significant differences ($P<0.05$).

胆固醇有关, 如子午原螯虾(*Proasellus meridianus*)无胆固醇摄入时仍能在体内检测出胆固醇^[20]。此外研究发现, 同为节肢动物的家蝇(*Musca domestica* L.)能够将植物甾醇支链 C24 位脱烷基化形成胆固醇^[21]。本课题组前期研究结果也证实, 在本研究对照组饲料组分中添加适宜比例的胆固醇可以提升克氏原螯虾生长性能^[22]。这一结果也在凡纳滨对虾中得到验证, 在饲料中分别添加相同水平的胆固醇和植物甾醇, 其生长性能和饲料系数较对照组显著改善^[23]。另外本研究发现高水平植物甾醇添加组生长性能与对照组无显著差异, 可能是克氏原螯虾无法将过量的植物甾醇转化为胆固醇, 故而将过量植物甾醇排出体外^[24], 同时过量胆固醇也会抑制克氏原螯虾的生长^[22]。

消化酶能够将摄入的营养物质分解成动物机体可吸收利用的小分子, 其活性水平在一定程度上反映了动物消化和利用饲料的能力^[25]。在罗非鱼中的研究表明, 植物甾醇显著提高了罗非鱼肠道蛋白酶和淀粉酶活性^[15]。而在罗氏沼虾、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)中植物甾醇对蛋白酶和淀粉酶活性无显著影响^[16,26]。这些结果说明植物甾醇对消化酶的影响可能存在物种特异性。在本实验中, 克氏原螯虾肝胰腺蛋白酶与淀粉酶随植物甾醇添加比例的增加呈现先上升后下降的趋势, 脂肪酶变化趋势则相反, 3种酶活性均在 P3 组达到峰值。这可能是由于饲料中豆油的减少, 用于肠道脂肪酶作用的底物水平减少所引起的脂肪酶活性降低^[27-28]。此外, 在肠道 HE 形态学观察中发现, P3 与 P4 组相较其他组肠道出现明显损伤, 褶皱数量减少, 这也影响肠道对营养物质的消化吸收能力, 致使克氏原螯虾生长性能下降。

3.2 植物甾醇对克氏原螯虾组织形态结构的影响

研究表明热应激能够引起克氏原螯虾的肝胰腺和肠道组织的损伤^[29], 本实验中, 由于养殖实验过程中出现持续高温天气的缘故, 实验虾的肝胰腺和肠道组织出现不同程度的损伤。而 P1 组相较于 CON 组其肠道结缔组织液泡数量和体积降低, 肝小管结构和细胞均有显著改善^[30], 这说明摄食适量植物甾醇饲料能够缓解克氏原螯虾在长时间高温环境下的应激损伤, 增强克氏原螯虾的

抗高温应激能力。研究发现, 植物甾醇能够降低应激下动物体的肝脏与肠道损伤^[1], 如在大西洋鲑(*Salmo salar*)饲料中添加植物甾醇对肠道组织形态有明显改善效果^[31], 添加 45 mg/kg 的植物甾醇可显著改善大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)肝脏、肠道健康状况^[32]。这可能是因为饲料中添加植物甾醇能够显著促进闭合蛋白(occludin)的 mRNA 表达水平, 调节肠上皮稳态和上皮细胞的屏障功能, 并降低回肠黏膜 TNF- α 、IL-8 含量^[33]。在本研究条件下, 当饲料中植物甾醇水平达到 0.19%及以上时, 克氏原螯虾的肝肠组织表现出受损状态, 随着植物甾醇水平的增高, 克氏原螯虾的肠道上皮层逐渐萎缩, 结缔组织空泡逐渐增多, 这说明饲料中过量植物甾醇对高温引起的克氏原螯虾的肝肠损伤缓解作用降低。这可能是因为高温引起肠道和肝胰腺中促炎因子增多^[34], 进而导致克氏原螯虾肠道和肝胰腺出现炎症反应。TNF- α 和是炎症反应中最关键的炎症因子之一, 适量植物甾醇能够显著降低 TNF- α 基因表达, 但添加过量植物甾醇则无法显著降低 TNF- α 等促炎因子基因表达水平^[35], 同时本实验中, 0.19%及以上水平植物甾醇下调 *Hsp70* 基因相对表达水平的结果也表明, 过量植物甾醇导致克氏原螯虾抗高温能力减弱。

3.3 植物甾醇对克氏原螯虾血淋巴生化、免疫与抗氧化水平的影响

克氏原螯虾的健康受多种因素影响, 包括养殖环境、饲料营养、种质等^[36-37]。血淋巴生化指标是监测动物体健康的主要指标^[14,38], 本实验中, 摄食不同水平植物甾醇饲料对克氏原螯虾血淋巴内 TG、T-CHO、HDL 和 LDL 的浓度无显著影响。类似的, Shin 等^[39]发现添加 0.1%和 0.2%植物甾醇对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)中 T-CHO 浓度无显著影响。但这与在中华绒螯蟹中添加植物甾醇能够降低血淋巴 T-CHO 的结果不同^[17], 这可能是因为克氏原螯虾的基础饲料中鱼粉的添加水平远低于中华绒螯蟹造成, 而众所周知鱼粉是虾蟹饲料中胆固醇的主要来源。ALT 和 AST 是机体重要的转氨酶, 其大部分存在于肝细胞中, 当肝胰腺组织细胞肿胀、坏死时会导致大量的 ALT 与 AST

释放到血淋巴中,因此常用血淋巴中 ALT 与 AST 的含量反映肝胰腺的健康状态^[40-41]。本实验中与 CON 相比, P1 组血淋巴中 ALT 与 AST 浓度显著降低,这一结果也与 P1 组肝胰腺组织形态的结果相吻合,此结果进一步表明饲料中添加适宜的植物甾醇能改善克氏原螯虾肝胰腺损伤。

克氏原螯虾缺少获得性免疫系统,只能通过非特异性免疫反应抵御病害。磷酸酶是巨噬细胞中溶酶体的标志性酶,在免疫应答中发挥重要作用,其中包括 AKP 和 ACP^[42-43]。本实验中随着饲料中植物甾醇比例的增加,克氏原螯虾血淋巴和肝胰腺中 AKP 和 ACP 活力呈先上升后下降的趋势,这些结果表明适量添加植物甾醇有益于克氏原螯虾免疫水平的提高,但过量添加植物甾醇对克氏原螯虾的免疫力产生不良影响,添加水平以不超过 0.19%为宜。研究表明,饲料中添加脂质^[40]、蛋白酶^[41]、中草药多糖^[44]等可以提高 AKP 和 ACP 的活性,但过量添加会出现 AKP 和 ACP 活性降低的情况,这些结果与本研究中添加植物甾醇的影响相似。

NF- κ B 与细胞的炎症反应、免疫应答相关,可以抑制细胞的凋亡^[43]。研究表明, NF- κ B 基因上调表明克氏原螯虾免疫力增强^[44-45]。本研究中,随着饲料中植物甾醇水平的提高,实验虾肝胰腺的 NF- κ B 相对表达水平逐渐上升,除 P1 组外各组表达水平显著高于 CON 组。HSP70 是 HSP 家族蛋白中含量最高的热应激蛋白,具有高度的物种保守性,其功能主要是参与细胞凋亡和协同免疫^[29]。Hsp70 基因表达升高是克氏原螯虾响应水温升高的一种应激保护机制^[46]。本实验中,除 P2 组外各组 Hsp70 基因表达水平显著高于 CON 组,且 P1 组 Hsp70 表达水平达到最高,显著高于其他组。克氏原螯虾肝胰腺酶活和基因表达说明饲料中添加植物甾醇能够增强克氏原螯虾的免疫力,综合分析显示,添加 0.10%的植物甾醇克氏原螯虾表现出最佳的免疫力水平。

SOD 和 CAT 能够清除动物机体在代谢过程中产生的过量自由基,减少细胞的氧化损伤^[47]。MDA 是脂质氧化的产物,其在组织中浓度越高表明组织受损越严重^[22]。研究表明,植物甾醇能

够提高养殖动物抗氧化能力^[2]。本实验中, P3、P4 组肝胰腺 MDA 浓度显著低于 CON 组, P4 组血淋巴 MDA 浓度显著低于 CON 组。肝胰腺与血淋巴内 T-SOD 与 CAT 酶活性随着饲料中植物甾醇水平的提高而上升,相较于 CON 组, P3 和 P4 组 T-SOD 和 CAT 酶活性显著上升。这与在饲料中添加植物甾醇后中华绒螯蟹和罗氏沼虾肝胰腺组织 SOD 和 CAT 活性显著上升的结果相一致^[16-17]。本实验进一步证明,植物甾醇能够提高克氏原螯虾肝胰腺抗氧化能力,当饲料中植物甾醇添加水平到 0.38%时抗氧化能力最高。

4 结论

本研究条件下,饲料中添加 0.10%~0.19%植物甾醇能显著增强克氏原螯虾生长性能,提升克氏原螯虾抗氧化和免疫水平并改善克氏原螯虾肝胰腺与肠道损伤。

参考文献:

- [1] Peng J, Chen L P, Bei Y J, et al. Physiological functions and application in animal production of phytosterols[J]. Feed Research, 2021, 44(5): 152-154. [彭建, 陈刘浦, 贝亦江, 等. 植物甾醇的生理功能及在动物生产中的应用[J]. 饲料研究, 2021, 44(5): 152-154.]
- [2] Bot A. Phytosterols[M]//Encyclopedia of Food Chemistry. Amsterdam: Elsevier, 2019: 225-228.
- [3] Brufau G, Canela M A, Rafecas M. Phytosterols: Physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties[J]. Nutrition Research, 2008, 28(4): 217-225.
- [4] Mensink R P, Ebbing S, Lindhout M, et al. Effects of plant stanol esters supplied in low-fat yoghurt on serum lipids and lipoproteins, non-cholesterol sterols and fat soluble antioxidant concentrations[J]. Atherosclerosis, 2002, 160(1): 205-213.
- [5] Ling W H, Jones P J H. Dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects[J]. Life Sciences, 1995, 57(3): 195-206.
- [6] Rajavel T, Mohankumar R, Archunan G, et al. Beta sitosterol and daucosterol (phytosterols identified in *Grewia tiliaefolia*) perturbs cell cycle and induces apoptotic cell death in A549 cells[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 3418.
- [7] Hu Q L, Zhuo Z, Fang S L, et al. Phytosterols improve immunity and exert anti-inflammatory activity in weaned piglets[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture,

- 2017, 97(12): 4103-4109.
- [8] Spann N J, Glass C K. Sterols and oxysterols in immune cell function[J]. *Nature Immunology*, 2013, 14(9): 893-900.
- [9] Rudkowska I. Plant sterols and stanols for healthy ageing[J]. *Maturitas*, 2010, 66(2): 158-162.
- [10] Berger A, Jones P J H, Abumweis S S. Plant sterols: Factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2004, 3: 5.
- [11] Zhang L H, Xu X D, Shao B, et al. Toxicological safety assessment of phytosterol[J]. *China Oils and Fats*, 2010, 35(5): 19-22. [张莉华, 许新德, 邵斌, 等. 植物甾醇毒理学安全性评价[J]. *中国油脂*, 2010, 35(5): 19-22.]
- [12] Xu D, Li J J, Lin L X, et al. Effects of phytosterol on performance, immune indexes and *Wnt1* gene expression in different tissues of pigs[J]. *Feed Research*, 2021, 44(17): 14-17. [许栋, 李景军, 林丽秀, 等. 植物甾醇对猪生产性能、免疫指标及不同组织 *Wnt1* 基因表达的影响[J]. *饲料研究*, 2021, 44(17): 14-17.]
- [13] Xie Y, Jin Z H, Zhu J, et al. Effects of phytosterols on production performance, blood cholesterol and antioxidant capacity of dairy cows[J]. *China Dairy Cattle*, 2020(2): 12-18. [谢颖, 金志红, 朱靖, 等. 植物甾醇对奶牛生产性能、血液胆固醇和抗氧化能力的影响[J]. *中国奶牛*, 2020(2): 12-18.]
- [14] Ding X Q, Yuan C C, Huang Y B, et al. Effects of phytosterol supplementation on growth performance, serum lipid, proinflammatory cytokines, intestinal morphology, and meat quality of white feather broilers[J]. *Poultry Science*, 2021, 100(7): 101096.
- [15] Li Z H, Huang Z Y, Pan Z C, et al. Effects of phytosterol on growth performance, serum lipid metabolism indicators and hepatopancreas antioxidant indicators of tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2019, 31(12): 5866-5872. [李志华, 黄志毅, 潘忠超, 等. 植物甾醇对罗非鱼生长性能、血清脂质代谢指标和肝胰脏抗氧化指标的影响[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(12): 5866-5872.]
- [16] Pan Z C, Li Z H, Sun F G, et al. Effects of phytosterols on growth performance, digestive enzymes, muscle quality and amino acid composition of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Jiangxi Fishery Science and Technology*, 2019(6): 3-7. [潘忠超, 李志华, 孙凤刚, 等. 植物甾醇对罗氏沼虾生长性能、消化酶、肌肉品质及氨基酸组成的影响[J]. *江西水产科技*, 2019(6): 3-7.]
- [17] Linghu K C, Zhang R Q, Zhang G, et al. Effects of phytosterols on growth performance, serum biochemical parameters, body composition, and antioxidant capacity of Chinese mitten crab[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2019, 47(18): 204-208. [令狐克川, 张瑞强, 张干, 等. 植物甾醇对中华绒螯蟹生长性能、血清生化指标、体成分和抗氧化能力的影响[J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(18): 204-208.]
- [18] Fishery Administration of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Centre, China Society of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022. [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. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022.]
- [19] Guo J P, Hussain A S, Tacon A G J, et al. Cholesterol requirement and phytosterols efficiency in semi-purified diets of juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2020, 26(4): 1231-1243.
- [20] Mondy N, Grossi V, Cathalan E, et al. Sterols and steroids in a freshwater crustacean (*Proasellus meridianus*): Hormonal response to nutritional input[J]. *Invertebrate Biology*, 2014, 133(1): 99-107.
- [21] Feldlaufer M F, Svoboda J A. Sterol utilization and ecdysteroid content in the house fly, *Musca domestica* (L.)(J). *Insect Biochemistry*, 1991, 21(1): 53-56.
- [22] Tian H Y, Yang C C, Yu Y B, et al. Dietary cholesterol level affects growth, molting performance and ecdysteroid signal transduction in *Procambarus clarkii*[J]. *Aquaculture*, 2020, 523: 735198.
- [23] Zhang W, Yang Q H, Tan B P, et al. Study of the requirements of dietary cholesterol at two different growth stages of Pacific white shrimps, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Aquaculture International*, 2019, 27(6): 1583-1597.
- [24] Hutchins R F N, Kaplanis J N. Sterol sulfates in an insect[J]. *Steroids*, 1969, 13(5): 605-614.
- [25] Yao W X, Li X Q, Kabir Chowdhury M A, et al. Dietary protease, carbohydrase and micro-encapsulated organic acid salts individually or in combination improved growth, feed utilization and intestinal histology of Pacific white shrimp[J]. *Aquaculture*, 2019, 503: 88-95.
- [26] 侯晓莹, 鲁菲, 王恬, 等. 植物甾醇对异育银鲫生长及血脂含量的影响研究[C]//第六次全国饲料营养学术研讨会论文集. 杨凌, 2010: 277.
- [27] Li S B, Yang Z G, Tian H Y, et al. Effects of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth performance, intestinal digestion, lipid and carbohydrate metabolism of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2022, 24: 101117.
- [28] He Y D, Hua X M, Zhao C Y, et al. Fat requirement and optimal dietary fat to carbohydrate ratio for red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(5): 1017-1024. [何亚丁, 华雪铭, 赵朝阳, 等. 克氏原螯虾的脂肪需求量及饲料中脂肪与糖类适宜比例的研究[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(5): 1017-1024.]

- [29] Guo K, Ruan G L, Fan W H, et al. Immune response to acute heat stress in the intestine of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 100: 146-151.
- [30] Wu Y N. The establishment and evaluation of liver injury model of *Procambarus clarkii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020. [吴峪楠. 克氏原螯虾肝胰腺损伤模型的构建与评估[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.]
- [31] Liland N S, Espe M, Rosenlund G, et al. High levels of dietary phytosterols affect lipid metabolism and increase liver and plasma TAG in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*)[J]. The British Journal of Nutrition, 2013, 110(11): 1958-1967.
- [32] Wang Y, Dong K Y, Wu J J, et al. Effects of dietary phytosterol on growth performance, health status and muscle texture of juvenile *Micropterus salmoides*[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(12): 8007-8021. [王艺, 董凯玥, 吴建军, 等. 饲料中添加植物甾醇对大口黑鲈幼鱼生长性能、健康状况和肌肉质构的影响[J]. 动物营养学报, 2022, 34(12): 8007-8021.]
- [33] Zhuo R W, Chen G, Yang K L, et al. Effects of dietary phytosterol esters on growth performance, nutrient apparent digestibilities, serum biochemical indices, ileal digestive enzyme activities and intestinal immune indices of weaned piglets[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2022, 34(7): 4237-4248. [卓锐文, 陈罡, 杨凯丽, 等. 饲料中添加酯化植物甾醇对断奶仔猪生长性能、养分表观消化率、血清生化指标、回肠消化酶活性及肠道免疫指标的影响[J]. 动物营养学报, 2022, 34(7): 4237-4248.]
- [34] Lan R X, Wei L L, Chang Q Q, et al. Effects of dietary chitosan oligosaccharides on oxidative stress and inflammation response in liver and spleen of yellow-feather broilers exposed to high ambient temperature[J]. Italian Journal of Animal Science, 2020, 19(1): 1508-1517.
- [35] Zhang F. Study on the biological-activity and structure-activity relationship of phytosterols[D]. Nanchang: Nanchang University, 2018. [张帆. 植物甾醇的生物活性与构效关系初探[D]. 南昌: 南昌大学, 2018.]
- [36] Salama W M, Lotfy M M, Mona M M. Depuration effect on the total hemocytes count and heavy metals concentration in freshwater crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. The Egyptian Journal of Aquatic Research, 2022, 48(3): 257-263.
- [37] Soares M C, Banha F, Cardoso S C, et al. Hemolymph glycemia as an environmental stress biomarker in the invasive red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. Physiological and Biochemical Zoology: PBZ, 2022, 95(3): 265-277.
- [38] Zhao Y R, Chen Y P, Cheng Y F, et al. Effects of dietary phytosterols on growth performance, antioxidant status, and meat quality in Partridge Shank chickens[J]. Poultry Science, 2019, 98(9): 3715-3721.
- [39] Shin J, Lee C, Kim Y J, et al. Dietary supplementation of phytosterol for olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2020, 53(2): 191-202.
- [40] Peng D, Chen X R, Wen H, et al. Effects of dietary lipid levels on growth performance, muscle composition, reproductive performance and hemolymph biochemical indices of *Procambarus clarkii* broodstock[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(10): 2175-2185. [彭迪, 陈效儒, 文华, 等. 饲料脂肪水平对克氏原螯虾亲虾生长性能、肌肉成分、繁殖性能以及血淋巴生化指标的影响[J]. 水产学报, 2019, 43(10): 2175-2185.]
- [41] Yang W X, Chen X R, Wen H, et al. Effects of dietary protease supplementation in high-plant-protein diets on the growth, immunity and digestion of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(6): 1053-1062. [杨文秀, 陈效儒, 文华, 等. 高植物蛋白饲料中添加蛋白酶对克氏原螯虾生长、免疫力及消化力的影响[J]. 水产学报, 2022, 46(6): 1053-1062.]
- [42] Zhu L, Kong Y M, Chang X L, et al. Effects of two fish-derived probiotics on growth performance, innate immune response, intestinal health, and disease resistance of *Procambarus clarkii*[J]. Aquaculture, 2023, 562: 738765.
- [43] Yang M X, Guo X R, Chen T, et al. Effect of dietary replacement of fish meal by poultry by-product meal on the growth performance, immunity, and intestinal health of juvenile red swamp crayfish, *Procambarus clarkia*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 131: 381-390.
- [44] Liu F, Shao G Y, Tian Q Q, et al. Enhanced growth performance, immune responses, immune-related gene expression and disease resistance of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) fed dietary glycyrrhizic acid[J]. Aquaculture, 2021, 533: 736202.
- [45] Qian X Y, Zhu F. Hesperetin protects crayfish *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 93: 116-123.
- [46] He N J, Ruan G L, Liu Y L, et al. Effects of sustained high-temperature stress on growth performance, digestive enzyme activities and immune indexes of crayfish, *Procambarus clarkii*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2022, 46(3): 395-402. [何乃娟, 阮国良, 刘玉林, 等. 持续高温胁迫对克氏原螯虾生长、消化酶活性与免疫指标的影响[J]. 水生生物学报, 2022, 46(3): 395-402.]
- [47] Ren X, Peng G H, Zhang H Y, et al. Sex differences in the disease resistance of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. Aquaculture, 2022, 548: 737712.

Effects of phytosterols on growth performance and digestion, immune and antioxidant responses, and digestive organ morphology in *Procambarus clarkia*

YANG Zhigang¹, WANG Xiao^{1,2}, REN Shengjie^{2,3,4}, LIU Yongjian², GU Xiaolong², WANG Aimin²

1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. College of Marine and Bioengineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224000, China;
3. Key Laboratory of Aquatic Animal Nutrition of Jiangsu Province, Suzhou 215000, China;
4. Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province; Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China

Abstract: This study aimed to investigate the effects of dietary phytosterols on growth performance, digestion, antioxidant and immune responses, and hepatopancreas and intestinal morphology in *Procambarus clarkii*. Five diets were prepared by adding 0%, 0.10%, 0.19%, 0.38%, and 0.76% phytosterols to the basal diet, which were named CON, P1, P2, P3, and P4, respectively. The crayfish were cultured for six weeks, and their average body weight was (9.37±0.02) g. The results showed that the weight gain rate and specific growth rate in P1 and P2 were significantly higher than those in CON ($P<0.05$), and the growth performance in P2 was the best. The protease activity in the gut in P3 was significantly higher than that in CON, while the lipase activity was significantly lower ($P<0.05$). The acid phosphatase and alkaline phosphatase activities in P1 were the highest in the hepatopancreas, and the acid phosphatase and alkaline phosphatase activities in P2 were the highest in the hemolymph; however, there were no significant differences compared to those in CON ($P>0.05$). As the phytosterol level increased, the total superoxide dismutase and catalase activity in the hepatopancreas and hemolymph increased, and the malondialdehyde content decreased. Compared with CON, the intestinal structure in P1 was improved. However, when the phytosterol level exceeded 0.10%, hepatopancreas and intestinal damage increased with the increase in the dietary phytosterol level. The expression of *NF- κ B* in the hepatopancreas increased as the phytosterol level increased. The expression of *Hsp70* in P1 was significantly higher than that in other groups ($P<0.05$). In conclusion, 0.10%–0.19% dietary phytosterol could promote the growth and digestion of *P. clarkii*, improve the morphology of the intestinal and liver tissues, and enhance the antioxidant and immune responses of *P. clarkii*.

Key words: phytosterols; *Procambarus clarkii*; growth performance; immune; antioxidation; organizational morphology

Corresponding author: REN Shengjie, E-mail: 601897646@qq.com; WANG Aimin, E-mail: blueseawam@ycit.edu.cn