

黄芪多糖对杂交鮠的非特异性免疫作用

王永杰¹ 甘小顺² 张起仿² 张汉勤²

1.安徽省农业科学院水产研究所,合肥 230000;

2.安徽省皖江水产技术研究院有限责任公司,安徽安庆 246003

摘要 在饲料中添加定量的黄芪多糖,探讨黄芪多糖对杂交鮠的免疫调节作用。用添加不同含量黄芪多糖的饲料,连续投喂杂交鮠 30 d,测定试验鱼的增重、血清凝集抗体效价、溶菌酶的活性、谷丙转氨酶的活性、血清总蛋白含量和白细胞吞噬活性。进行攻毒嗜水气单胞菌活菌的复感染试验,测定相对免疫保护率。结果显示添加黄芪多糖的饲料投喂杂交鮠生长速度较对照组稍快;试验组鱼体的溶菌酶活性和白细胞吞噬活性,比对照组鱼体均有所提高;谷丙转氨酶活性的检测结果表明试验组鱼体的肝功能有所改善;对嗜水气单胞菌的抵抗能力,与空白对照组相比有所增强。说明黄芪多糖对杂交鮠免疫机能具有调节作用。

关键词 黄芪多糖;杂交鮠;非特异性;免疫增强剂;免疫应答

黄芪多糖(astragalus polysacharin, APS)资源丰富、价格低廉、长期服用在动物体内无残留、不产生耐药性,近年来成为畜牧和水产动物非特异性免疫调节研究的热点之一^[1-3]。水产养殖致病菌的抗药性,是水产养殖中急需解决的问题,实践中依靠于抗生素类药物防控鱼类细菌性疾病的效果越来越差,还导致药物残留和养殖环境不断恶化,使鱼产品质量下降,严重影响了水产养殖业的健康发展。因此,寻求绿色、环保、高效的添加剂,以及如何增强养殖鱼类自身非特异免疫系统的功能,减少病害发生,成为水产养殖动物疾病防控研究者关注的课题^[4-5]。近年来,在非特异性免疫增强剂预防水产动物传染性疾病研究方面,科研人员已经做了许多工作,研制出了一些免疫增强剂,并在水产养殖业中发挥了重要作用^[6-9]。

杂交鮠是近年来安徽省推广的新品种,深受广

大消费者的厚爱,但养殖中出现的病害问题,成了制约该品种推广的瓶颈^[10]。本研究通过在日粮中添加不同水平的黄芪多糖投喂杂交鮠,通过测定供试鱼的增重、血清中凝集抗体效价、溶菌酶活性、谷丙转氨酶活性、血清总蛋白含量、白细胞吞噬活性以及嗜水气单胞菌活菌攻毒后的相对免疫保护率等免疫指标,探讨黄芪多糖对杂交鮠自身非特异免疫机能的刺激作用,为其在水产养殖中得到广泛应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验设计

本研究中供试鱼来自于安徽省皖江水产技术研究院有限责任公司养殖基地,选取 1 龄健康杂交鮠 270 尾,平均体重为(76±4.6) g,无外伤,体质健壮。在长 2.0 m,宽 2.0 m,高 2.0 m 的网箱中开展以

收稿日期:2017-03-12

基金项目:安徽省攻关项目“杂交鮠种质创制与苗种培育关键技术集成示范”(1604a0702003)和安徽省农业科学院科技创新团队“水产动物重大病害防控关键技术研究”项目(14C0504)

王永杰,男,1966 年生,研究员,研究方向:水产动物病害防控。



[11] 张俊娟.具有黏附性乳杆菌的筛选与特性研究[D].保定:河北农业大学,2011.

[12] 廖延雄.兽医微生物试验诊断手册[M].北京:中国农业出版社,1991.

[13] 刘宏宇,汪立平,艾连中,等.乳酸菌的抗氧化活性和耐酸耐胆盐性能的研究[J].食品工业科技,2014,35(2):92-96.

[14] 谯仕彦,侯成立,曾祥芳.乳酸菌对猪肠道屏障功能的调节作用及其机制[J].动物营养学报,2014,26(10):3059-3070.

[15] 易力,倪学勤,汪洋,等.乳酸菌制剂对鸡免疫应用效果的研究[J].养禽与禽病防治,2007(5):2-3.

[16] 张以芳,向文彬,刘旭川,等.用筛选的乳酸菌复合活菌制剂饲喂雏鸡试验[J].畜牧与兽医,2000,32(3):31-33.

下各项试验, 首先将供试鱼驯养 15 d 适应试验环境, 并确认无疾病症状。

黄芪多糖由本地生物技术有限公司提供, 采用逐级混匀的方法将原料混合, 用绞肉机制成直径为 1 mm 的硬颗粒沉性饲料, 自然风干, 4 ℃ 保存备用。将试验分为 6 个组, 每组 45 尾供试杂交鲂鱼种。试验组编号分别为 I、II、III、IV、V、VI 组, 第 VI 组对照组在饲料中不添加任何黄芪多糖。饲料中黄芪多糖含量水平分别达到 50.0 mg/kg (I 组)、100.0 mg/kg (II 组)、150.0 mg/kg (III 组)、200.0 mg/kg (IV 组)、250.0 mg/kg (V 组) 的剂量, 分别投喂不同试验组鱼。在试验开展前, 各试验组鱼称总体重, 并记录其平均初始体重。按正常方法进行饲养, 每天投喂相当于鱼总体重 2.0% 的人工配合饲料, 早、晚各投喂 1 次, 连续投喂 30 d, 再次称量总体重。

1.2 样品制备

1) 菌株培养。嗜水气单胞菌为本研究室分离保存, 首先解冻划线培养, 然后取优势单菌落接种于 LB 液体培养基中, 28 ℃ 条件下, 培养 48 h 后, 离心收集菌体, 用已灭菌生理盐水将菌体浓度调至 3.0×10^8 cfu/mL, 作为攻毒试验菌液使用。从其中取一半的菌液加入 0.5% 的福尔马林, 25 ℃ 条件下灭活 24 h, 离心收集, 用灭菌生理盐水清洗 3 次, 再将其浓度调整至 3.0×10^8 cfu/mL, 制成经福尔马林灭活的嗜水气单胞菌。

2) 血清制备。将等量的佛氏完全佐剂与上述经福尔马林灭活的嗜水气单胞菌混匀, 皮下多点注射昆明大白鼠, 每只鼠注射 0.2 mL, 共接种 8 只大白鼠。14 d 后以相同的方法对大白鼠加强免疫 1 次, 加强免疫后第 14 天再对每只受免疫的大白鼠以相同方式注射 1 次。经半个月后, 开始对受免疫的大白鼠断尾采血, 制备血清, 置 -20 ℃ 冰箱保存备用。

3) 试验鱼种采血。养殖试验结束后, 从试验组和对照组每个网箱中随机分别捞取 15 尾供试鱼, 用 75% 乙醇棉球擦拭体表后, 切断腹主动脉, 使用 5 mL 一次性无菌注射器从试验鱼尾静脉中取血, 每组鱼所取的血液分为 2 份, 其中 1 份血液在室温下静置 1 h 待其凝固, 再置于 4 ℃ 的冰箱保持 4 h, 4 ℃ 条件下, 4 000 r/min 转速, 离心 10 min, 收集上层血清, 保存于 4 ℃ 冰箱中备用; 另一份血液用肝素抗凝, 制备成抗凝血, 供后面试验检测白细胞的吞噬活性。

1.3 免疫指标测定

1) 凝集抗体效价的测定。试验鱼抗体效价按照常规的血凝板法进行测定, 在不同稀释的小试管中进行, 观察凝集结果并记录, 反应抗原为经福尔马林灭活的嗜水气单胞菌。

2) 溶菌酶活性的测定。采用比浊法, 溶菌酶含量按文献[11]的方法, 将溶壁微球菌用 0.067 mol/L 的磷酸缓冲液 (PBS, pH 6.4) 调至 0.2 mg/mL 的菌悬液。取 3.0 mL 菌悬液, 吸取血清 40 μL 加入到菌悬液中, 在 96 孔板中混匀后, 立刻使用 570 nm 的波长在酶标仪上测定 A_0 值。然后在 28 ℃ 水浴中温育 30 min 后, 置于 4 ℃ 冰浴中终止反应, 在 570 nm 波长下测定反应后的光密度值 A , 按公式 $(A_0 - A) / A_0$ 计算溶菌酶的活性。

3) 白细胞吞噬活性的测定。将金黄色葡萄球菌 37 ℃ 条件下培养 48 h, 离心收集, 在菌液中加入浓度为 0.5% 的福尔马林, 37 ℃ 条件下, 灭活 24 h, 用已灭菌的生理盐水清洗 3 次, 并将其浓度调整至 3.0×10^8 cfu/mL, 用作检测白细胞吞噬活性的吞噬菌体。取 100 μL 抗凝血, 加入 100 μL 金黄色葡萄球菌液, 摇匀, 在 28 ℃ 条件下孵育 30 min, 孵育期间每隔 10 min 摇晃 1 次。用甲醇固定 10 min, Giemsa 染色 1 h, 水洗晾干后镜检。吞噬细胞活力以吞噬指数 (phagocytic index, PI) 和吞噬百分比 (phagocytic percentage, PP) 表示: 吞噬指数 = (吞噬细胞内的细菌总数 / 参与吞噬的吞噬细胞数) × 100%; 吞噬百分比 = (100 个吞噬细胞中参与吞噬的细胞数 / 100) × 100%。

4) 血清中总蛋白含量和谷丙转氨酶活性的测定。分别采用血清总蛋白试剂盒和谷丙转氨酶试剂盒测定。

1.4 攻毒试验

试验前将健康的黄金鲫暂养 1 周, 随机取 5 尾鱼进行解剖, 并取肝脏和脾脏等组织涂板, 确认无类似细菌感染后, 再继续开展下列试验。对每尾供试鱼胸鳍基部注射 0.2 mL 的嗜水气单胞菌活菌液, 在 (26 ± 1) ℃ 养殖水温下正常饲养 14 d。每天早晚 2 次定期观察并记录发病和死亡情况, 对濒临死亡的鱼进行剖检, 病原菌再分离和鉴定。以鼠抗嗜水气单胞菌血清与分离所得致病菌进行玻片凝集试验, 判断是否由嗜水气单胞菌感染致死, 并统计各组鱼体的死亡率。依下式计算相对免疫保护率

(relative percent survival, RPS): 免疫保护率 = (1 - 试验组死亡率 / 对照组死亡率) × 100%; 死亡率 = [(试验初鱼体尾数 - 试验末鱼体尾数) / 试验初鱼体尾数] × 100%。

1.5 数据处理

试验结果数据,采用 SPSS 17.0 软件包中的单因素方差方法进行分析处理,所有数据采用平均值 ± 标准误进行表示,以 $P < 0.05$ 作为差异显著性标准。

2 结果

1) 黄芪多糖的促生长作用。对照组和 5 个试验组杂交鮠的体重增重测定结果如表 1 所示,投喂黄芪多糖的试验组体重增重显著高于空白对照组 ($P < 0.05$),而且随着饲料中黄芪多糖添加量的增加,各试验组体重增重有增加趋势,当添加量达到 150.0 mg/kg 时,增重大小趋缓。

表 1 试验组和对照组杂交鮠的增重

组别	开始时体重/g	结束时体重/g	增重/g
I	76.8	106.1	29.3
II	77.1	107.2	30.1
III	77.8	108.5	30.7
IV	75.7	108.4	32.7
V	75.5	108.3	32.8
VI	77.6	101.8	24.2

注:体重测量为 30 尾供试鱼的平均值。

2) 凝集抗体效价、溶菌酶活性和白细胞吞噬活性的变化。对照组和试验组杂交鮠的血清凝集抗体效价、溶菌酶活性和白细胞吞噬活性的测定结果见表 2,试验组杂交鮠的凝集抗体效价与空白对照组以及药物对照组之间均没有出现显著差异,各试验组之间也未出现显著差异。但试验组鱼体溶菌酶活性显著高于空白对照组 ($P < 0.05$),试验组鱼体血液中白细胞的吞噬率(PP)和吞噬指数(PI)均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)。说明特异性免疫指标没有变化,非特异性免疫指数增加,溶菌酶活性提高。

3) 血清总蛋白和谷丙转氨酶(SGPT)活性的变化。供试杂交鮠的血清中总蛋白含量和谷丙转氨酶(SGPT)活性测定结果见表 3。试验组鱼体的血清中总蛋白含量并未随着黄芪多糖添加量的增加而提高,但供试鱼血清中谷丙转氨酶活性显著提升。

4) 人工感染试验。对照组及试验组鱼经嗜水气单胞菌活菌攻毒后,各组鱼的死亡情况如表 4 所示。投喂黄芪多糖的杂交鮠,均获得了一定程度的

相对免疫保护率,试验组鱼体死亡率要显著低于未添加黄芪多糖的空白对照组 ($P < 0.05$)。

表 2 试验组和对照组杂交鮠血清中凝集抗体效价、溶菌酶活性和白细胞吞噬活性

组别	凝集抗体	溶菌酶活性	吞噬活性	
			PP	PI
I	<6	0.042±0.006	47.3±6.24	4.2±1.32
II	4	0.043±0.006	48.2±5.76	4.3±1.34
III	<5	0.043±0.007	49.3±5.51	4.5±1.35
IV	<6	0.044±0.008	49.5±5.72	4.6±1.44
V	4	0.045±0.009	51.7±5.15	4.6±1.52
VI	<5	0.035±0.004	41.2±3.64	3.5±1.32

注:凝集抗体效价为 15 尾鱼体的几何平均数。

表 3 试验组杂交鮠血清总蛋白和谷丙转氨酶活性

组别	血清总蛋白含量	谷丙转氨酶活性
I	26.34±1.47	14.78±1.39
II	26.46±1.35	15.27±1.78
III	25.85±1.58	15.61±1.64
IV	26.27±1.46	15.94±1.49
V	26.76±1.52	16.35±1.48
VI	25.25±1.49	12.22±1.52

表 4 活菌攻毒后杂交鮠的死亡率和相对免疫保护率

组别	攻毒鱼尾数/		死亡率/%	相对免疫保护率/%
	尾	死亡鱼尾数/尾		
I	30	21	70.0	25.0
II	30	18	60.0	35.7
III	30	15	50.0	46.4
IV	30	17	56.7	39.3
V	30	16	53.3	42.8
VI	30	28	93.3	-

3 讨论

多糖不仅具有促生长作用,而且还影响机体的免疫机能,研究发现通过调节免疫器官、免疫细胞、免疫因子以及某些信使物质等来发挥免疫调节作用,对非特异性免疫有调节作用。关于此类研究涉及的内容较为广泛,相关研究结果可为水产动物中的应用及相关产品开发提供试验数据。近年来,许国焕等^[12-13]在对彭泽鲫的非特异免疫研究中发现,在饲料中添加 2.0 g/kg 的多聚糖类物质,彭泽鲫的生长率和成活率与对照组相比有提高。本研究中投喂黄芪多糖的试验组的杂交鮠的增重明显高于空白对照组的增重,而且当黄芪多糖的添加量达到 250.0 mg/kg(V 组)时,鱼体的平均增重达到最大。笔者认为这可能是因为是在饲料中添加适量的黄芪

多糖,对供试鱼的非特异性免疫系统有一定的刺激作用,有利于预防各种传染性疾病的发生,同时具有一定的促生长作用。

溶菌酶是动物机体许多组织重要的非特异性免疫因子^[14-15],具有机体防御的功能。在动物非特异性免疫研究中,衡量动物机体非特异性免疫力的一个重要的量化指标是血清溶菌酶活力。巨噬细胞对水产动物产生免疫促进作用的机理是水产动物机体内巨噬细胞的表面存在一个多糖的特殊受体^[16]。当多糖与巨噬细胞结合后,激活巨噬细胞的活性,可促进巨噬细胞的吞噬作用或通过补体途径激活机体体液免疫反应^[17-18]。有研究发现,注射酵母多糖能增强斑点叉尾鲷的抵抗力,能够增强虹鳟、大西洋鲑和大菱鲆体内溶菌酶活性,且作用功效较为规律^[19-20]。但对黄芪多糖作用效果未见报道,在本研究中发现试验组鱼体溶菌酶活性和白细胞的吞噬活性较对照组鱼体有所提高,试验组鱼体血液中白细胞的吞噬率(PP)和吞噬指数(PI)均显著高于空白对照组,说明投喂含有黄芪多糖饲料的杂交鲈的非特异性免疫增强。这在嗜水气单胞菌活菌攻毒试验结果中也获得了验证。但血清凝集抗体效价的测定结果表明,投喂黄芪多糖对杂交鲈血清中的凝集抗体效价没有任何影响,这可能是嗜水气单胞菌的刺激在杂交鲈体内没有产生相应的特异性抗体的缘故。供试鱼血清中谷丙转氨酶(SGPT)的活性测定结果显示定量投喂黄芪多糖,在一定程度上降低了杂交鲈血清中 SGPT 的活性,证明了黄芪多糖在杂交鲈改善肝脏功能方面拥有良好效果。

参 考 文 献

- 赵智华,左福元.中草药添加剂的研究进展[J].饲料研究,2006,7(1):49-52.
- 张小梅.黄芪多糖的免疫调节作用及抗肿瘤作用研究进展[J].大连大学学报,2003,6(24):101-104.
- 葛斌,许爱霞,杨社华.黄芪多糖抗衰老作用机制的研究[J].中国医院药学杂志,2004,24(10):610-612.
- 李廷友,谢标,陆波,等.中药添加剂对中华绒螯蟹扣蟹非特异性免疫力影响的研究[J].淡水渔业,2005,35(1):3-6.
- PACHER P,BECKMAN J S,LIAUDET L.Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease [J].Physiological Reviews,2007,87(1):315-424.
- 张伟妮,林旋,王寿昆,等.黄芪多糖对罗非鱼非特异性免疫和胃肠内分泌功能的影响[J].动物营养学报,2010,22(2):401-409.
- 富丽静,宋文华,于翔,等.五种植物免疫增强剂对草鱼非特异性免疫力的影响[J].水产学杂志,2010,32(4):14-17.
- SAKAI M.Current research status of fish immunostimulants[J].Aquaculture,1999,17(2):63-92.
- 吉水守,木村乔久,阪井稔.サケ科鱼类の肠内細菌丛に関する研究-I. 飼育魚の肠内細菌数と細菌丛 [J]. 日本水产学会志,1976,42(1):91-99.
- 王永杰,甘小顺,张汉勤,等.杂交鲈 F1 苗种繁殖与饲养效益对比[J].养殖与饲料,2016(10):15-18.
- 许国焕,吴月嫦,陶家发.两种多聚糖对彭泽鲫生长影响及免疫促进作用的初步研究[J].水利渔业,2002,22(4):49-51.
- 陈昌福,罗宇良,蔡冰,等.饲养水温对草鱼溶菌酶活性的影响[J].中国水产科学,1996,3(3):24-30.
- ENGSTAD R E,ROBERTSEN B,FRIVOLD E.Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood [J].Fish Shell Immunol,1992(2):287-297.
- 国家药典委员会.中华人民共和国药典一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:303.
- JORGENSEN J B,SHARP G J E,SECOMBES C J,et al.Effect of yeast-cell-wall on the bactericidal activity of rainbow trout macrophages[J].Fish Shellfish Immunol,1993(3):51-58.
- PU X Y,MA X L,LIU L,et al.Structural characterization and antioxidant activity in vitro of polysaccharides from angelica and astragalus[J].Carbohydrate Polymers,2016,137(10):154-164.
- JIN M L,ZHAO K,HUANG Q S,et al.Structural features and biological activities of the polysaccharides from *Astragalus membranaceus*[J].Int J Biol macromol,2014,64(5):257-266.
- DUNCAN P L,KLESZIUS P H. Dietary immunostimulants enhances nonspecific immune responses in channel catfish but no resistance to *Edwardsiella ictaluri*[J].J Aquat Anim Health,1996(8):241-248.
- 颜爱,李波,李润成,等.香菇多糖和黄芪多糖对免疫抑制小鼠免疫功能调节的研究 [J]. 中国免疫学杂志,2012,28(11):999-1005.
- TIERNEY K L,JULIA R H,GREGORY E D.Sexual activity modulates shifts in TH 1 /TH 2 cytokine profile across the menstrual cycle:an observational study [J].Fertil Steril,2015,104(6):1513-1521.