

免疫增强剂对河鲫鱼白细胞吞噬和溶菌酶活性的影响

刘勇^{1,2}, 贾永红^{*} (1. 华中农业大学水产学院, 湖北武汉 430070; 2. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江宁波 315100)

摘要 在饵料中添加不同含量的免疫增强剂(0.2%、0.5%、0.8%)连续投喂21 d。分别在投喂后0、1、4、7、14、21 d检测河鲫鱼血液白细胞的吞噬活性、血清和体表粘液的溶菌酶活性。结果表明,该免疫增强剂可使河鲫鱼血液中白细胞吞噬活性、血清和体表粘液的溶菌酶活性都有明显提高。在停止投喂后7 d,血清溶菌酶的活性逐渐降低,与对照组无显著差异($P > 0.05$);但白细胞吞噬活性依然显著高于对照组($P < 0.05$)。

关键词 免疫增强剂; 吞噬活性; 溶菌酶活性; 河鲫鱼

中图分类号 Q955 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)01-00111-03

Effects of Immunostimulants as a Feed Additive on Lysozyme Activity and Phagocytic Activity of *Carassius auratus*
LIU Yong et al (Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

Abstract To determine the effects of immunostimulants on innate immune response of *Carassius auratus*, fish were fed diets containing 0 (control), 0.2%, 0.5%, 0.8% immunostimulants for 1, 4, 7, 14 and 21 days. The results showed that the phagocytic activities were greatly increased and the lysozyme activities were obviously enhanced. This significant difference of the lysozyme activities disappeared 7 d after the fish stopped feeding mixed diet ($P > 0.05$), while the phagocytic activities were obviously holding ($P < 0.05$).

Key words Immunostimulants; Phagocytic activity; Lysozyme activity; *Carassius auratus*

随着渔业养殖的规模化和集约化发展,各种鱼病的暴发了影响渔业养殖的重要制约因素,对鱼病防治与控制问题也就显得日益重要。利用免疫增强剂来提高鱼类的非特异性免疫机能和增强其对病原菌的抵抗力是一种极为有效和具有广阔发展前景的方法^[1]。鱼类白细胞对病原菌的吞噬和杀菌作用,是鱼类非特异性免疫的一个重要方面^[2],溶菌酶也是鱼类抵抗病原菌感染的重要因素^[3]。因此,许多学者都对鱼类血液白细胞的吞噬活性和溶菌酶的特性进行了研究^[4-7]。采用免疫增强剂增强鱼体的免疫力与抵抗力,减少鱼病的发生,正逐渐成为控制鱼病、保证养殖效益的关键措施,因而在鱼类饵料中添加免疫增强剂成为国内外学者研究的热点^[8-14]。目前国内外鱼用免疫增强剂的研究比较活跃^[15-16],部分多糖类物质已经被证明能够刺激动物免疫系统及增强非特异性免疫活性^[17-20]。但关于口服多糖免疫增强剂对河鲫鱼非特异性免疫的研究报道很少。

该研究利用湖北安琪酵母股份有限公司生产的福邦免疫多糖水产专用高效免疫增强剂定量投喂河鲫鱼后,测定供试鱼血清中溶菌酶活性和血液中白细胞的吞噬活性,初步探讨了该免疫增强剂对河鲫鱼非特异性免疫机能的影响,为将这种免疫增强剂用于防御水产养殖动物的传染性疾病预防提供理论依据和实践基础。

1 材料与试验方法

1.1 材料

1.1.1 免疫增强剂。试验用福邦免疫多糖水产专用高效免疫增强剂来自湖北安琪酵母股份有限公司,其主要成分及含量:葡聚糖 20%,甘露寡糖 20%,蛋白质 35%。

1.1.2 试验鱼及饲养饲料。试验用河鲫鱼(*Carassius auratus*)来自浙江省象山港某养殖场。基础饲料由鱼粉、豆粕、麦麸、次粉、花生粕、菜籽粕、磷酸二氢钙、多微、多矿等组成。

1.2 方法

1.2.1 试验设计。选择体质健壮、无病无伤的河鲫鱼120尾,体重123~148 g/尾。将试验鱼用高锰酸钾消毒后分成I、II、III、IV组,即1个对照组和3个试验组,每组30尾。饲养于水泥池(5.0 m×4.0 m×1.2 m)中,按常规方法管理,充气饲养,保持水中溶氧5.0 mg/L以上,自然水温(19±2)。饲养10 d后,待供试鱼适应环境,并确认无疾病症状后开始试验。I、II、III、IV组分别投喂基础饲料、基础饲料加0.2%的免疫增强剂、基础饲料加0.5%的免疫增强剂、基础饲料加0.8%的免疫增强剂,所有饲料均制成颗粒料投喂。

1.2.2 金黄色葡萄球菌的制备。将金黄色葡萄球菌接种在液体肉汤培养基中(上海生物制品厂出品),37℃下培养48 h,离心集菌。在菌液中加入浓度为0.5%的福尔马林,37℃条件下灭活24 h,用灭菌生理盐水清洗3次,并将其浓度调整至 1.0×10^8 个细胞/ml,即为福尔马林灭活的*S. aureus*菌体(FSA),用作检测白细胞吞噬活性的吞噬菌体。

1.2.3 溶壁微球菌的制备。活化溶壁微球菌在37℃培养18 h,用浓度为0.1 ml/L, pH=6.5的磷酸缓冲液配成一定浓度的悬液,稀释,直至该悬液在570 nm波长下的吸光值为0.3左右;将配好的菌悬液放在4℃冰箱保存,备用。

1.2.4 采血^[4]。每次随机取10尾供试鱼,断尾取血。将每尾鱼的血液分为2份,其中1份以肝素抗凝,制备抗凝血,供检测白细胞吞噬活性;将另1份血液首先在室温下静置1 h待其凝固,置4℃冰箱保持4 h后,于4℃条件下以4 000 r/min离心10 min,收集上层血清,保存在4℃冰箱中备用。

1.2.5 溶菌酶活性的测定^[21]。每次随机取10尾鱼,用解剖刀背刮取体表粘液于无菌的匀浆器中,匀浆后2 000 r/min离心10 min,取其上清液作为供试样品。

1.2.6 白细胞吞噬活性的测定^[22]。在0.2 ml抗凝血中加入0.1 ml用灭菌生理盐水调整为 1×10^8 个细胞/ml的*S. aureus*悬液,摇匀后置28℃的恒温水浴锅中孵育1 h,涂片,每个血样涂5张片,自然晾干,甲醇固定,Gensa染色2 h,水洗风干后置油镜下观察计数,并按下式计算吞噬百分比(Phagocytic percentage, PP)和吞噬指数(Phagocytic index, PI)。

基金项目 宁波市博士基金(2005A610026);浙江省教育厅项目(20050-223);浙江万里学院校课题。

作者简介 刘勇(1980-),男,湖北随州人,硕士研究生,研究方向:水产动物病理与免疫。* 通讯作者。

收稿日期 2006-09-30

PP = (100 个白细胞中参与吞噬的细胞数 / 100) × 100;

PI = 被吞噬的细菌数 / 吞噬细菌的细胞数

2 结果与分析

2.1 免疫增强剂添加剂量对河鲫鱼血液白细胞吞噬活性的影响 表1 表明, 添加免疫增强剂对河鲫鱼白细胞吞噬活力均有显著影响 ($p < 0.01$)。投喂0.2%、0.5%、0.8%的免疫多糖增强剂后, 河鲫鱼血液白细胞的吞噬活性有明显提高。在28 d 的试验期内, 对照组的 PP 为13.6%~16.8%, PI 为3.15~3.65; 而0.8%组的 PP 最高达39.8% (21 d), PI 最高达5.89 (28 d), 其他两组也有类似变化。在投喂饲料后4 d, PP 与对照组相比均在0.01 水平上有显著差异。PI 的变化有所不同, 其中0.2%、0.5%、0.8%组在投喂饲料后1 d, 与对照组相比均无显著差异 ($P > 0.05$); 在投喂饲料4 d 后, 0.2%组与对照组间在0.05 水平上有显著差异, 0.5%、0.8%组则与对照组在0.01 水平上有显著差异。不管是 PP 还是 PI, 在停止投喂饲料后的7 d, 试验组与对照组相比还在0.01 水平上存在极显著差异。

表1 河鲫鱼血液白细胞的吞噬百分比和吞噬指数

投喂天 数 d	吞噬 活性	对照组 0	免疫增强剂 0.2%	免疫增强剂 0.5%	免疫增强剂 0.8%
0	PP	13.6 ± 1.42	13.6 ± 1.43	13.6 ± 1.42	13.6 ± 1.42
	PI	3.15 ± 0.19	3.15 ± 0.17	3.15 ± 0.17	3.15 ± 0.17
1	PP	16.2 ± 0.85	18.2 ± 1.42	17.2 ± 0.84	17.4 ± 0.88
	PI	3.29 ± 0.20	3.24 ± 0.17	3.27 ± 0.18	3.32 ± 0.12
4	PP	15.2 ± 1.30	20.9 ± 0.91	24.0 ± 1.23	25.0 ± 1.58
	PI	3.35 ± 0.17	3.89 ± 0.30	4.51 ± 0.41	4.34 ± 0.23
7	PP	14.2 ± 1.44	24.1 ± 1.41	30.4 ± 1.81	31.2 ± 1.47
	PI	3.49 ± 0.13	4.19 ± 0.31	4.48 ± 0.30	4.99 ± 0.22
14	PP	15.2 ± 0.86	38.3 ± 1.75	37.2 ± 1.56	38.6 ± 1.14
	PI	3.57 ± 0.28	4.65 ± 0.18	5.04 ± 0.20	4.70 ± 0.21
21	PP	16.8 ± 1.56	38.2 ± 2.11	38.4 ± 1.34	39.8 ± 1.52
	PI	3.61 ± 0.21	6.12 ± 0.14	5.97 ± 0.24	5.54 ± 0.25
28*	PP	16.4 ± 1.14	39.5 ± 2.58	38.1 ± 1.10	38.4 ± 1.43
	PI	3.65 ± 0.16	5.22 ± 0.07	6.08 ± 0.15	5.89 ± 0.11

注: * 为停药后7 d 数据。

2.2 免疫增强剂添加剂量对河鲫鱼血清和体表粘液溶菌酶活性的影响 图1、2 表明, 饲料中添加免疫增强剂对河鲫鱼血清和体表粘液溶菌酶活性均有显著影响 ($P < 0.01$)。与对照组相比, 投喂0.2%、0.5%、0.8%免疫多糖增强剂的试验组河鲫鱼血清和体表粘液溶菌酶活性均有明显提高。对照组血清溶菌酶的活性为0.12~0.139, 在28 d 的试验期间无显著差异 ($P > 0.05$); 投喂21 d 后, 0.2%、0.5%、0.8%试验组溶菌酶的活性最高分别达到0.179、0.185、0.191, 与投喂前相比均在0.01 水平上存在显著差异; 在投喂后1 d, 各试验组溶菌酶活性就和投喂前及对照组在0.05 水平上有了显著差异, 在投喂4 d 后, 试验组与对照组间在0.01 水平上有显著差异; 在停止投喂后7 d, 血清溶菌酶活性与对照组间即无显著差异 ($P > 0.05$)。试验期间体表粘液溶菌酶活性变化与血清溶菌酶的活性变化规律相似, 但粘液中溶菌酶的活性比血清中溶菌酶的活性高很多, 对照组最高为0.32, 而0.2%、0.5%、0.8%试验组分别达到0.53、0.56、0.61。

3 讨论

目前研究报道过的免疫增强剂主要有: 左旋咪唑、FK

565、MDP、- 葡聚糖、肽聚糖, 脂多糖、寡糖、甲壳质、甲壳胺、VC 以及 VE 等^[23]。动物体内的吞噬细胞可以吞噬进入体内的异物, 吞噬细胞在消化病原生物的同时可保留有关抗原信息并且将其传递给相关的淋巴细胞, 从而激发机体的体液免疫和细胞免疫。因此, 吞噬细胞的吞噬活性直接与动物的免疫机能有关。Marja 等研究表明, 在一定程度上, 血浆中溶菌酶活性变化与循环系统中白细胞数目变化相一致, 白细胞数目多, 溶菌酶活性就增加, 两者正相关^[24]。陈昌福等研究表明, 在饲料中添加适量的免疫多糖(酵母细胞壁)能够增强异育银鲫非特异性免疫功能, 试验组异育银鲫白细胞吞噬活性均显著高于对照组^[25]。该试验添加免疫多糖作为免疫增强剂, 使鱼体白细胞吞噬活性显著提高, 在投喂饲料4 d 后, 试验组 PP 与对照组相比均在0.01 水平上有显著差异; 投喂饲料后4 d, 0.2%组 PI 与对照组在0.05 水平上有显著差异, 0.5%、0.8%组 PI 则与对照组在0.01 水平上有显著差异。不管是 PP 还是 PI, 在停止投喂饲料后7 d, 试验组与对照组相比 PI 还有显著差异。这说明在饲料中添加福邦免疫多糖水产专用高效免疫增强剂可以有效提高鱼体的吞噬活性, 加快免疫器官发育, 直接强化鱼体自身的免疫系统。

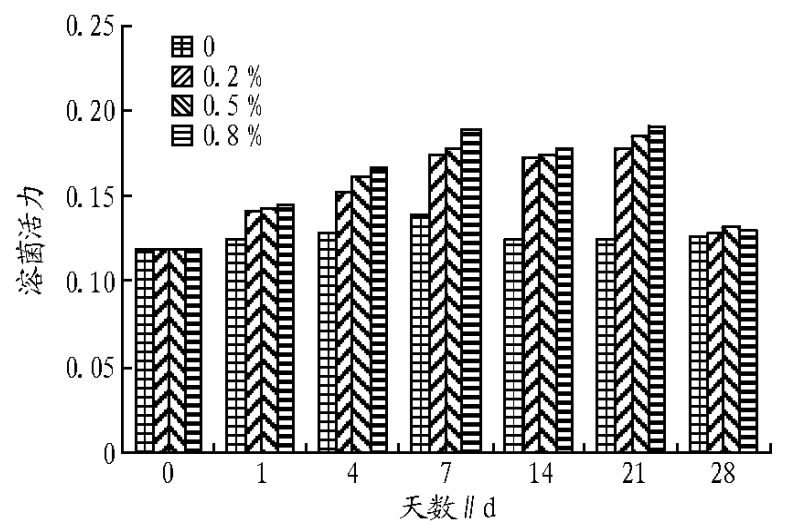


图1 河鲫鱼血清溶菌酶活性变化

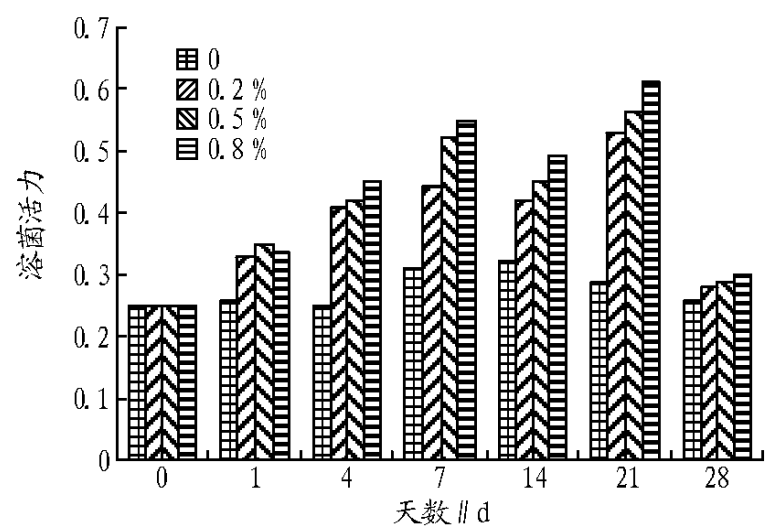


图2 河鲫鱼体表粘液溶菌酶活性变化

研究结果还表明, 添加免疫增强剂可以提高河鲫鱼血清和体表粘液溶菌酶的活性, 在投喂1 d 后, 各试验组溶菌酶活性和投喂前及对照组就在0.05 水平上有显著差异; 在投喂4 d 后, 各试验组与对照组间在0.01 水平上有显著差异。溶菌酶的活性与很多因素有关。陈昌福等认为, 草鱼体表粘液中溶菌酶活性受饲养温度的影响, 在10℃ 下饲养时, 溶菌酶的活性较低; 而28℃ 下饲养时, 溶菌酶的活性要高的多。该试验表明, 溶菌酶活性在投喂后14 d 比7 d 和21 d 时要低, 这可能是由于天气变化, 使水温下降, 造成溶菌酶活性相对下降。陈孝焯等^[26]也得出相似的结论。

川原逸郎等在对日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)、香鱼(*Plecoglossus*)和真鲷(*Pagullajaponica*)等鱼类的体表粘液、血清、肾脏、脾脏和肝脏等组织和器官中溶菌酶活性研究时发现,这几种鱼血清中溶菌酶活性都大幅度低于体表粘液中溶菌酶活性^[27];陈昌福等^[6]、陈孝煊等^[26]也得出相似的结果。该研究结论与这些学者的研究结果一致。

免疫增强剂可以通过注射、浸泡和饲料添加3种途径给予动物,然而给予途径影响其在动物上的应用效果。刘云等以鲫鱼为研究对象,向饲料中添加甲壳胺作为免疫增强剂,试验表明,该免疫增强剂可以提高鲫鱼血液中白细胞吞噬能力,增强血清中酚氧化酶活性^[28]。王树芹等以异育银鲫为研究对象,在饲料中添加壳聚糖作为动物免疫增强剂,试验表明,添加0.5%或1.0%壳聚糖能够有效地提高异育银鲫的溶菌酶活性($P < 0.01$)和白细胞的吞噬作用($P < 0.01$)^[29]。该试验将福邦免疫多糖作为饲料添加剂饲喂河鲫鱼能够激活供试鱼的吞噬活性、增加溶菌酶活性等,从而提高鱼类非特异性免疫功能,达到预防和治疗鱼病的目的。

参考文献

- [1] 李桂峰,康裕财,孙际佳,等.酵母多糖对赤眼鲟非特异性免疫机能的影响[J].中山大学学报,2003,42(4):56-57.
- [2] 板田胜信.鱼类免疫と免疫系[J].北海道水产孵化场研报,1988,43:11-35.
- [3] 川原逸郎,楠田理一.养殖ウナキのらゾチ4△活性的特性[J].日本水产学会志,1988,54(6):965-968.
- [4] 吴志新,陈昌福.日本鳗鲡对爱德华氏菌免疫应答的研究[J].华中农业大学学报,1997,16(增刊):78-86.
- [5] 李静,陈昌福.低温季节草鱼离体白细胞吞噬活性的研究[J].水生生物学报,1988,22(增刊):132-137.
- [6] 陈昌福,纪国良.草鱼的血清、体表和肠粘液中溶菌物质活性及其特性[J].华中农业大学学报,1992,11(3):276-279.
- [7] 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):24-29.
- [8] LALL S P, OLIVER G. Role of micronutrients in immune response and disease resistance in fish[J]. HSH Nutrition in Practice, 1993, 61:101-118.
- [9] WASCBO R, GETTE J, NILSEN E R, et al. The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmon salar*[J]. Aquat Fish Manage, 1994, 25:175-179.
- [10] 王军, 鄢庆彬, 苏永全, 等. 免疫添加剂对大黄鱼血液中白细胞数量及其吞噬功能的影响[J]. 海洋科学, 2001, 25(9):44-46.
- [11] S WICK A K, ANDERSON D P, RUMSEY G L. Delay intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protects against furunculosis[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1994, 41:125-139.
- [12] 鄢庆彬, 苏永全, 周化民, 等. 口服免疫添加剂对养殖大黄鱼免疫机能影响的初步研究[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2001, 6(2):134-136.
- [13] 罗庆华, 杜仲叶粉对鲤鱼免疫力的影响[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2002, 28(1):50-53.
- [14] 王雷, 李光友, 毛远兴, 等. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J]. 海洋与湖沼, 1994, 25(5):486-491.
- [15] FLETCHER T C. Non-specific defense mechanisms of fish[J]. Developmental and Cooperative Immunology Suppl, 1982, 10(2):123-132.
- [16] 吴志新, 陈强, 陈昌福. 左旋咪唑对异育银鲫免疫促进作用的初步研究[J]. 华中农业大学学报, 1998, 17(4):378-381.
- [17] 陈昌福, 陈萱, 陈超然, 等. -葡聚糖的特性及其对动物免疫功能的调节[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(1):95-100.
- [18] KAWAKAM H, SHINOHARA N, SAKAI M. The non-specific immunostimulation and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail[J]. Fish path, 1998, 33(3):283-292.
- [19] SAMEL M, LAMT J, SIN Y M. Effect of laminaran [(1,3)-D-glucan] on the protective immunity of blue gourami, *Tichogaster trichopterus* against *Aeromonas salmonicida*[J]. Fish & Shellfish Immunol, 1996, 6(4):443-454.
- [20] SAKAI M. Current research status of fish immunostimulants[J]. Aquaculture, 1999, 172:63-92.
- [21] HULMARK D. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hydophora cecropia*[J]. Eur J Biochem, 1980, 106:7-16.
- [22] 陈昌福, 邹华君, 史维舟, 等. *Aeromonas punctata* 菌体 LPS 的化学成分分析及其对草鱼的免疫原性 C// 中国科学院水生生物研究所鱼病学研究室编. 鱼病学研究论文集. 北京: 海洋出版社, 1995.
- [23] MSAHROS. Current research status of fish immunostimulants[J]. Aquaculture, 1999, 172:63-92.
- [24] MARJA M, ANTI S. Changes in plasma lysozyme and blood leucocyte levels of hatchery-reared Atlantic Salmon and sea trout during parent-smolt transformation[J]. Aquaculture, 1992, 106:75-87.
- [25] 陈昌福, 吴凡, 熊传喜, 等. 免疫多糖 酵母细胞壁 对受免异育银鲫免疫应答的调节作用[J]. 淡水渔业, 2004, 6(4):55-57.
- [26] 陈孝煊, 吴志新, 殷居易, 等. 大黄、穿心莲、板蓝根和金银花对异育银鲫免疫机能的影响[J]. 中国水产科学, 2003, 10(1):36-40.
- [27] 川原逸郎, 楠田理一. 养殖ウナキのらゾチ4△活性的特性[J]. 日本水产学会, 1988, 54(4):581-584.
- [28] 刘云, 孙峰, 王丹. 免疫增强剂对鲫鱼非特异性免疫功能的影响[J]. 海洋科学, 2004, 28(9):42-45.
- [29] 王树芹, 周洪琪. 壳聚糖对异育银鲫溶菌酶和白细胞吞噬活性的影响[J]. 上海水产大学学报, 2004, 13(6):121-125.