

杜仲大蒜复方添加剂对草鱼免疫力的影响

罗庆华^{1,2}, 贺建华, 刘清波, 胡超英

(1. 吉首大学城乡资源与规划学院, 湖南张家界 427000; 2. 湖南农业大学动物科技学院, 湖南长沙 410128)

摘要 [目的] 探究杜仲提取物与大蒜素复方作为饲料添加剂对鱼类免疫力的影响, 为该复方制剂作为抗病促生长的饲料添加剂在渔业生产中使用提供依据。[方法] 分别用含 0.08% 杜仲提取物、0.08% 大蒜素、0.04%、0.08%、0.12% 杜仲大蒜复方制剂的饲料添加剂的饲料饲养草鱼 50 d 后, 测定各组草鱼的生长速度及荧光假单胞菌活菌攻毒后的免疫保护力, 并测定草鱼血液中白细胞的吞噬活性及血清中的凝集抗体效价。[结果] 结果表明: 饲料中添加杜仲提取物、大蒜素和复方制剂均能明显提高草鱼的免疫应答水平, 增强抗细菌感染能力, 促进草鱼的生长; 适量添加杜仲大蒜复方制剂对于提高草鱼的免疫力较单方具有协同增效作用。[结论] 该研究为研制微量高效的鱼类用复方中草药饲料添加剂奠定了基础。

关键词 杜仲提取物; 大蒜素; 草鱼; 免疫力; 复方添加剂

中图分类号 S942.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)28-08910-02

Effects of Compound Additive of *Eucommia ulmoides* Extract and *Alium sativum* on Immunity of Grass Carp

LUO Qing-hua et al (College of Resource and Hanning Sciences, Jishou University, Zhangjiajie, Hunan 427000)

Abstract The purpose of the paper was to determine the effect of the combined additive of *Eucommia ulmoides* extract, and *Alium sativum* on the immunity of Grass carp, and provide basis for its application on fishery. 0.1% *Eucommia ulmoides* extract, 0.1% *Alium sativum* and 0.05%, 0.1%, 0.15% combination of *Eucommia ulmoides* extract and *Alium sativum* were added to Grass carp's diet and fed them for 50 days. The growth performance of grass carps and the relative percent survived after challenged with live Pathogenic Bacteria (*P. fluorescens*) were measured. The agglutinating antibody titer and phagocytic activities of leucocytes in their blood were measured. The results showed *Eucommia ulmoides* extract, *Alium sativum* and their combination could promote their immunoresponse level and growth, strengthens their resistance against bacteria. There were synergistic effects between *Eucommia ulmoides* extract and *Alium sativum* when they were combined together and added with 0.04% ~ 0.08%.

Key words *Eucommia ulmoides*; *Alium sativum*; Grass carp; Immunity; Compound additive

杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliver) 是传统名贵中药, 具补肝肾、强筋骨、抗肿瘤、消炎杀菌等诸多功效^[1]。由于资源丰富, 效用良好, 现有将其作为饲料添加剂的相关报道^[2]。笔者对于杜仲在水产养殖的应用也作了一些探索, 发现杜仲作为鲤鱼饲料添加剂也有良好的效用^[3-4]。大蒜素是大蒜 (*Alium sativum*) 提取液中主要生物活性成分的总称, 可人工合成。它是一种广谱抗菌药, 具有消炎、降压、降血脂、抑制血小板凝集、减少冠状动脉硬化、抑制体内 N-亚硝酸胺合成、防治癌症、健胃、抗病毒等多种功效^[5]。大蒜素现被广泛用于养禽、养畜、水产养殖^[6]。国内外对杜仲、大蒜在水产养殖的应用研究都局限在单方制剂。笔者在中草药的抑菌试验中发现杜仲与大蒜有协同抑菌作用^[7]。该试验研究了杜仲大蒜复方饲料添加剂对草鱼免疫力的影响, 为研制“微量、高

效”的鱼类用复方中草药饲料添加剂奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试草鱼。购自张家界市永定鱼苗场。选择体重约 35 g 的健康草鱼 540 尾, 分 6 组, 饲养于面积 2 m²、水深 0.5 m 的水池中。每组设 3 个重复, 每个重复 30 尾。

1.1.2 添加剂与日粮。杜仲提取物 (绿原酸含量 10% 以上) 由张家界市恒兴生物公司提供; 大蒜素 (大蒜油含量 10% 以上) 由晶天科技实业公司提供; 杜仲大蒜复方制剂由杜仲提取物与大蒜素 1:1 混合而成。根据产品说明与文献 [8] 的报道, 确定添加剂量。对照 1 组不添加添加剂, 对照 2、3 组分别单独添加杜仲提取物或大蒜素, 试验组添加复方制剂。各组投喂饲料的配方见表 1, 其营养指标见表 2。

表 1 试验饲料配方 %

组别	鱼粉	豆粕	菜粕	麦麸	次粉	小麦	植物油	预混料	磷酸氢钙	杜仲复方制剂	大蒜素	杜仲提取物
对照 1 组	5	15	15	20	22	18.70	2	1	1.3	0	0	0
对照 2 组	5	15	15	20	22	18.62	2	1	1.3	0	0	0.08
对照 3 组	5	15	15	20	22	18.62	2	1	1.3	0	0.08	0
试验 1 组	5	15	15	20	22	18.66	2	1	1.3	0.04	0	0
试验 2 组	5	15	15	20	22	18.62	2	1	1.3	0.08	0	0
试验 3 组	5	15	15	20	22	18.58	2	1	1.3	0.12	0	0

表 2 试验饲料的营养指标

组别	有效能 MJ/kg	CP %	Ca %	P %	赖氨酸 %
对照 1 组	10.88	25.18	0.8	0.95	1.17
对照 2 组	10.88	25.18	0.8	0.95	1.17
对照 3 组	10.88	25.18	0.8	0.95	1.17
试验 1 组	10.88	25.18	0.8	0.95	1.17
试验 2 组	10.88	25.18	0.8	0.95	1.17
试验 3 组	10.88	25.18	0.8	0.95	1.17

1.1.3 供试菌。荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) 56-12-10 菌株购自中国科学院水生生物研究所, 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 25922 菌株购自中国科学院菌种所。

1.2 方法

1.2.1 饲养管理。按表 1 配方配制配合饲料, “四定”投饵, 水温 13~20℃, 投饵率 1%~2%。

1.2.2 成活率与生长速度的测定。记录各组草鱼死亡数量, 分析原因, 统计各个处理的成活率。分组称取各组鱼的初重和饲养 50 d 后的重量, 计算各组鱼的尾均增重与相对增长率。

1.2.3 攻毒试验。饲养 50 d 后, 从试验组与对照组随机捞取

基金项目 湖南省教育厅高校科研计划项目 (02C020)。

作者简介 罗庆华 (1970-), 女, 湖南耒阳人, 副教授, 从事水生动物方面的研究。

收稿日期 2007-05-06

草鱼30尾(每个重复组10尾),用细金属丝在草鱼身体表面划痕,再用荧光假单胞菌 9×10^6 个/ml的活菌液浸泡草鱼30 min。继续饲养观察2周,记录发病症状、死亡情况,对死亡鱼体进行解剖检查、分离细菌、确认死因,计算免疫保护力(RPS)^[8]。

1.2.4 免疫。用灭菌生理盐水洗下已培养好的平板荧光假单胞菌菌苔,制取菌液,采用麦氏比浊法调整菌液含量至 9×10^8 个/ml,加5%福尔马林灭活作为免疫原(Formalin Killed P. fluorescens, FPF),加水稀释10倍后,分别将各组30尾草鱼(每个重复组10尾)浸泡1 h,7 d后重复1次。

1.2.5 凝集抗体效价的测定。距第1次浸泡后21和28 d后,分别从上述草鱼中取10尾,从腹主动脉抽取血液,待凝血后取血清。采用血凝板法测定凝集抗体效价,反应抗原为FPF^[9]。

1.2.6 白细胞吞噬活性的测定。在第28天抽取血液时,从中取1份加肝素钠抗凝,在0.5 ml抗凝血中加入金黄色葡萄球菌(9×10^8 个/ml)0.2 ml,置于培养箱(25℃)中培养1 h,后于离心机内3 000 r/min离心15 min。取沉淀底层物抹片,待风干后用甲醇固定,姬母萨氏染色,镜检。并且,计算白细胞的吞噬百分比(PP)与吞噬指数(H)^[10]。

2 结果与分析

2.1 草鱼的成活率与生长速度 由表3可知,经卡方检验,各组间成活率不存在明显差异。试验组与对照组的相对生长率从大到小为试验2组>试验1组>试验3组>对照3组>对照2组>对照1组。经统计分析,对照1组与试验1、2组间差异在0.01水平显著,与试验3组、对照2、3间差异在0.05水平显著,其他组间无差异。可见,0.08%杜仲提取物、大蒜素复方可有效促进草鱼的生长;0.04%与0.12%复方的促生长作用接近0.08%单方,说明复方在0.04%~0.08%浓度范围内更能协同促进草鱼的生长,而在0.08%~0.12%浓度范围内没有协同促生长作用。

表3 草鱼的成活率与生长速度

组别	死亡		初尾均重 g	末尾均重 g	尾均增重 g	相对生长率 %
	总数	%				
对照1组	4	87	36.7 ± 2.3	68.8 ± 3.1	32.1 ± 2.1	87.5 ± 5.1bcDEF
对照2组	3	90	37.1 ± 2.1	71.8 ± 3.5	34.7 ± 1.2	93.5 ± 3.1a
对照3组	3	90	35.9 ± 2.1	69.7 ± 4.8	33.8 ± 1.9	94.2 ± 3.7a
试验1组	4	87	35.6 ± 2.8	70.1 ± 4.1	34.5 ± 1.3	96.9 ± 4.3A
试验2组	2	93	36.4 ± 2.9	72.1 ± 3.2	35.7 ± 2.6	98.1 ± 3.5A
试验3组	4	87	34.9 ± 2.3	67.8 ± 3.7	32.9 ± 1.4	94.3 ± 4.1a

注:同列中均数后有某组代号时,表示某组与该组之间有差异;小写表示 $P > 0.05$,大写表示 $P < 0.01$ 。下表同。

2.2 攻毒后的成活率 攻毒后,各组鱼活动异常,3 d后鱼体表开始出现红色斑点,并陆续死亡。对病原菌分离培养,发现优势菌为荧光假单胞菌。由表4可知,各组成活率依次为试验2组>试验3组、对照3组>试验1组、对照2组>对照1组。经卡方检验,对照1组与其他组成活率间存在显著或极显著差异;对照2组与试验1组、对照2组成活率间存在0.05水平显著差异。这说明各组所用添加剂均可有效提高草鱼攻毒后的成活率;复方组的成活率高于同剂量的杜仲提取物单方组,接近高剂量的单方组,表明两种药物复方添加0.04%~0.08%在提高存活率方面具有协同作用。各组添加剂的免疫保护力以试验2组最高。

表4 草鱼攻毒后的成活率

组别	攻毒尾数	成活尾数	成活率 %	免疫保护力 %
对照1组	30	14	47bcdEF	-
对照2组	30	21	70ae	49
对照3组	30	22	73a	55
试验1组	30	21	70ae	49
试验2组	30	23	77Abd	64
试验3组	30	22	73A	55

2.3 凝集抗体效价 由表5可知,28 d时,各组鱼的抗体效价达较高水平,从大到小依次为试验2组>试验3组>对照2组>对照3组>试验1组>对照1组。经方差分析,对照1组与其他组抗体效价均有0.01水平显著差异;对照2、3组与试验1、3组之间不存在差异,与试验2组差异在0.05水平显著。这表明杜仲提取物、大蒜素以及不同比例复方均可提高草鱼的抗体效价;杜仲提取物与大蒜素复方提高草鱼抗体效价的作用,接近高剂量的单方,高于同剂量的单方,说明两种药物复方0.04%~0.08%对提高草鱼的抗体效价有协同作用,但过高剂量的复方抗体效价略有下降,但没有明显变化。21 d的情况与此相近。

表5 草鱼血清中抗体凝集效价

组别	天数 d	
	1	28
对照1组	1 11.2BCDEF	1 15.6BCDEF
对照2组	1 62.4Aef	1 147.2Ae
对照3组	1 65.6Aef	1 140.8Ae
试验1组	1 62.4Aef	1 134.4Ae
试验2组	1 115.2Abcd	1 179.2Abcd
试验3组	1 102.4Abcd	1 167.4A

2.4 白细胞的吞噬活性 由表6可知,对照1组的吞噬百分比与对照3组、试验1、2、3组差异在0.05水平显著,对照2组的吞噬百分比在0.05水平显著低于试验2组;对照1组的吞噬指数与其他各组差异在0.05水平显著,对照2、3组的吞噬指数与试验2组间差异在0.05水平显著。这说明杜仲提取物、大蒜素以及复方均可提高草鱼血液中白细胞的吞噬活性;杜仲提取物与大蒜素复方的吞噬活性高于同样添加剂量的单方,等同于高剂量的单方,可见两种药物复方对提高草鱼白细胞的吞噬指数有协同作用。

表6 草鱼血液中白细胞对荧光假单胞菌的吞噬活性

组别	吞噬百分比 %	吞噬指数
对照1组	57.30 ± 4.99cdEF	3.24 ± 0.31bcDEF
对照2组	61.80 ± 7.60e	3.75 ± 0.31ae
对照3组	63.30 ± 5.42A	3.94 ± 0.41ae
试验1组	62.40 ± 4.17a	4.15 ± 0.30A
试验2组	66.20 ± 3.65Ab	4.56 ± 0.29Abc
试验3组	65.40 ± 3.78Ab	4.08 ± 0.12A

3 结论与讨论

试验表明,杜仲提取物与大蒜素复方在提高草鱼抗体效价、吞噬活性及攻毒后的成活率方面均表现了一定的协同作用。从中药药理分析,大蒜“味辛,性温,暖胃行气,消肿解

(上接第8911页)

毒”,杜仲“味甘、辛,性温,补腰壮骨,安胎助阳”^[11]。两种药物性味相似,功能不同。按照中草药配伍原理,两者复方属于“相须”。但在传统验方中,未见有两者配伍的现象。按照西医药理,杜仲对细胞免疫具有双向调节作用,能激活单核巨噬细胞系统和腹腔巨噬细胞系统的吞噬活力以及体液免疫功能,其作用与所含的木脂素、环烯醚萜类、黄酮类和三萜类等化合物密切相关^[12]。大蒜素能抑制巨噬细胞产生一氧化氮,提高淋巴细胞转化率和T淋巴细胞酸性-醋酸萘酯(ANAE)阳性率,使中枢淋巴器官和外周淋巴器官增殖,增强细胞免疫功能^[13];大蒜素能增加小鼠脾脏抗体形成细胞数量,明显增强动物体液免疫功能^[14],还能明显增强小鼠腹腔M₁吞噬功能,促进小鼠T淋巴细胞转化,增强NK细胞活性的作用,从而提高机体自身免疫功能^[15]。两种药物有效成分的作用途径各不相同,而且相互间没有直接的关系。协同作用的产生可能是由于更多有效成分在多靶点与多系统的综合效应,其具体药理机制有待进一步研究。通过提取杜仲所含有的药理成分,杜仲添加剂的添加剂量从4%降低至0.1%,仍可有效改善主要养殖鱼类免疫力^[3,4,8];通过杜仲提取物与大蒜素复方,使有效改善鱼类免疫力的添加剂量降至0.04%,达到了饲料添加剂“高效、微量”的要求。提取与配伍是中草药饲料添加剂达到

“微量”的有效途径。在鱼类养殖生产中,可根据当地的资源情况,选择最经济的饲料添加剂与添加方式。

参考文献

- [1] 晏援,郭丹.杜仲叶的化学成分及药理活性研究进展[J].中成药,2003,25(6):491-492.
- [2] 姚红梅,肖克宇,钟蕾.杜仲在养殖业中的应用[J].养殖与饲养,2005,2(5):21-23.
- [3] 罗庆华,卢向阳,李文芳.杜仲叶粉对鲤鱼肌肉品质的影响[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2002,28(3):224-226.
- [4] 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):51-53.
- [5] 何荣海,马海乐.大蒜有效成分的提取研究进展[J].食品科技,2004(10):40-42.
- [6] 高红梅,王明学.大蒜素及其在水产健康养殖中的应用[J].饲料工业,2004,25(10):21.
- [7] 罗庆华,卢成英,李立君,等.10种中草药的体外抑菌试验[J].中国兽医科技,2002,32(3):38-39.
- [8] 姚红梅.杜仲提取物对彭泽鲫抗病和促生长的研究[D].长沙:湖南农业大学,2005.
- [9] 安丽英.兽医实验技术[M].北京:中国农业出版社,2000:224-226.
- [10] 陈昌福,李静,吴志新.不同方法提取两种鱼类病原菌脂多糖的化学成分分析[J].华中农业大学学报,1996,15(2):157-162.
- [11] 冯洪钱.民间兽医本草[M].北京:科学技术文献出版社,1984:388,500.
- [12] 程光丽.杜仲有效成分分析及药理学研究进展[J].中成药,2006,28(5):5-8.
- [13] 张志勉,高海青,魏瑗.大蒜素对肿瘤患者细胞免疫功能的影响[J].山东大学学报:医学版,2003,41(2):148-150.
- [14] 张晓利,张红军,唐晓云,等.大蒜素对小鼠免疫功能的影响[J].中医药学报,1998(1):57-58.
- [15] 朱金水,蒋西华,陈维雄,等.导向大蒜素抗大鼠胃癌分子免疫机制[J].肿瘤,1998,18(3):222-223.