

# 药性菌质对提高暗纹东方鲀免疫力的影响

霍光明, 张李阳 (南京晓庄学院, 江苏南京210017)

**摘要** [目的] 证明药性菌质对提高鱼类免疫力的作用。[方法] 以暗纹东方鲀为对象, 在中洋集团下属龙洋河鲀养殖厂进行试验, 基础饲料中分别添加不同浓度的药性菌质(0.5%、1.0%、2.0%), 并与不添加药性菌质的对照组进行比较。试验期间, 各试验组的水质基本一致, 2个月后对各组个体进行溶菌酶活力、碱性磷酸酶活力、酸性磷酸酶活力和SOD活力的测定。[结果] 药性菌质能有效地促进受试组鱼体的生长, 明显提高受试鱼的免疫力, 其效果与添加剂量和饲喂时间长短有关。以2.0%组效果最佳, 其次是1.0%组。4个组免疫能力从大到小的排序依次是: 2.0% > 1.0% > 对照 > 0.5%。[结论] 药性菌质的适宜添加量为2.0%; 药性菌质适宜作为饲料添加剂应用在名优鱼种养殖上。

**关键词** 药性菌质; 暗纹东方鲀; 免疫力

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)03-01055-02

Influence of Medicinal Fungal Substance on Enhancing the Immunity of Fugu obscurus

HUO Guang-ming et al (Nanjing Xiaozhuang College, Nanjing, Jiangsu 210017)

**Abstract** [Objective] The aim of the research was to testify the function of medicinal fungal substance on enhancing the immunity of fishes. [Method] With Fugu obscurus as experimental object, the experiment was carried out in Longyang Fugu Aquaculture Farm belonging to Zhongyang Group. The base feeds added medicinal fungal substance with different concentrations (0.5%, 1.0% and 2.0%) were compared with CK group added no medicinal fungal substance. During experimental period, the water quality in each experimental group was basically accordant and the activities of lysozyme, alkaline phosphatase, acidic phosphatase and SOD of individuals in each group were determined after 2 months. [Result] Medicinal fungal substance could promote fish growth in tested groups effectively, enhance the immunity of tested fish obviously and its effects related to additive dosage and feeding time. The effect was best in 2.0% group and secondary in 1.0% group. The immunity capabilities of 4 groups in order were 2.0% > 1.0% > 0 > 1.0% > 0.5%. [Conclusion] The suitable additive dosage of medicinal fungal substance was 2.0%, which was suitable to apply as feed additive in the aquaculture of famous fingerlings.

**Key words** Medicinal fungal substance; Fugu obscurus; Immunity

暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*) 俗称河鲀(以下称河鲀), 其肉味腴美, 营养丰富, 开发利用前景广<sup>[1]</sup>。近年来, 随着野生河鲀资源的严重衰退, 人工饲养的河鲀成为供应市场满足食用的主要产品。但在饲养过程中, 种群的生活密度远远高于自然条件, 致使养殖个体在生长阶段始终处于高度紧张的应激状态, 从而降低了对疾病的抵抗能力, 增加了对病原微生物的易感性, 导致病害频繁发生, 带来了巨大的经济损失。到目前为止, 在养殖过程中的细菌性疾病是暗纹东方鲀集约化养殖过程中危害较大的一类疾病, 其发病时间长, 治疗过程中安全隐患大。针对人工养殖的这种现状, 传统的作法是药物治疗, 治疗的后果是造成饲养个体对药物的敏感和抗药。因此, 笔者期望能开发出一种新的饲料添加剂, 通过食物传递激发机体自身的免疫防御系统, 来提高对各种病原的抵抗能力。

药用真菌在自然界种类繁多, 可供药用研发的潜力大。在我国, 药用真菌已成为一个新的药物领域, 应用到治疗肿瘤、保肝、抗病毒等多方面。近年来, 笔者利用南京晓庄学院药用菌物研究所保存的一种药用真菌在含一定量中药的全性基质上进行发酵, 得到的发酵物——药性菌质作为饲料添加剂, 已在AA肉鸡饲养上得到证实, 可明显提高AA肉鸡的免疫力<sup>[2]</sup>。并将药性菌质作为饲料添加剂延伸于水产领域, 希望在鱼的抗病、增产和优质方面发挥积极作用。该试验旨在证明药性菌质可以提高鱼类免疫力, 从而作为饲料添加剂应用在名优鱼种养殖业上。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

- 1.1.1 菌种。实验室保存的一种药用真菌——灵芝。
- 1.1.2 药性菌质。将药用真菌在含一定量可药食同源中药药渣——黄芪药渣的全性基质上双向发酵, 得到的产物。
- 1.1.3 试验用鱼。取自中洋集团下属龙洋水产有限公司河鲀养殖场, 大小相近的1冬龄暗纹东方鲀1200尾。
- 1.1.4 基础饲料。海安龙洋牌河鲀鱼饲料。

### 1.2 方法

- 1.2.1 试验地点。中洋集团下属龙洋水产有限公司河鲀养殖场。
- 1.2.2 试验分组。药性菌质作为饲料添加剂, 以投喂基础饲料为对照组(CK), 以基础饲料中分别添加0.5%、1.0%、2.0%的药性菌质为试验组, 其编号分别为1、2和3组。
- 1.2.3 试验管理。试验开始, 实行工区长负责制, 有专人管理, 每天按正常投饲量投喂河鲀饲料。饲养管理、疾病防治均按该厂正常生产规范进行。根据管理人员每天记录投饲量、鱼体健康及死亡、发病情况结果后, 分别计算出各种鱼摄食量、增重和死亡率。试验前先用基础饲料驯养7d, 已适应环境, 并确认无疾病症状后, 在试验鱼中取50尾分别测量试验鱼的体重、体长、全长, 其余则随机按250尾1组分成4组(每池250尾), 其编号分别为对照组、试验1、2和3组, 将鱼带水移入中洋集团养殖厂暗纹东方鲀养殖专用池。
- 1.2.4 取样策略。试验开始后的第15、30、45、60天, 从试验池中随机捞取8尾受试鱼进行采血, 收集血清, 肌肉、头肾、脾脏、肠道、肝脏等组织样品的受试鱼混合样品, 在-20℃冰箱中保存, 备用。

取样时停饲1次, 测试各组受试鱼50尾, 并测量体重、体长、体全长(笔者主要探讨药性菌质对暗纹东方鲀免疫力

**基金项目** 南京市科技计划“南京市重大动物疫病信息管理预警系统与疫病防治相关产品开发应用”项目(200501011)。

**作者简介** 霍光明(1980-), 男, 山东蒙阴人, 硕士, 助教, 从事免疫药理学研究。

**鸣谢** 南京师范大学华元渝教授及江苏中洋集团龙洋河鲀养殖厂秦贵祥等同志。

**收稿日期** 2007-09-11

影响,关于生长方面指标另文探讨)。

**1.2.5 酶活性的测定。**测定血清中溶菌酶、碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、超氧化物歧化酶(SOD)活性,测定按试剂盒(南京建成生物工程研究所)方法在南京晓庄学院进行。

## 2 结果与分析

**2.1 对河鲢鱼溶菌酶活性的影响(表1)** 在投喂药性菌质

后,试验组的溶菌酶活力有所升高,且以2.0%试验组溶菌酶活力最高,并在45 d时达到最大值,1.0%次之,与对照组相比差异显著。

**2.2 对河鲢鱼 AKP 活力的影响(表1)** 在投喂药性菌质后,试验组碱性磷酸酶活力有所升高,且以2.0%试验组碱性磷酸酶活力最高,并在45 d时达到最大值,1.0%次之,与对照组比较差异显著。

表1 对河鲢鱼溶菌酶与 AKP 活力的影响

Table 1 Effects of medicinal fungal substance on activity lysozyme and AKP in Takifugu fasciatus

组别 Groups	剂量 % Dosage	溶菌酶活力 U/ml Lysozyme activity				AKP 活力 U/g AKP activity			
		15 d	30 d	45 d	60 d	15 d	30 d	45 d	60 d
CK	0	289.18 ±35.28	229.94 ±30.88	290.17 ±13.79	180.56 ±28.96	7.15 ±1.66	7.96 ±2.00	34.36 ±2.86	63.92 ±7.04
1	0.5	261.78 ±30.74	200.70 ±19.46	319.98 ±16.61	281.88 ±37.43	9.27 ±1.35	47.61 ±16.24*	54.797 ±14.32*	67.99 ±6.87
2	1.0	313.46 ±10.01	288.92 ±39.11	333.04 ±48.28	290.75 ±33.18*	14.21 ±2.99	11.55 ±3.04	61.55 ±8.95**	45.62 ±8.80
3	2.0	289.18 ±35.28	344.25 ±16.38**	368.53 ±25.82*	319.20 ±21.46**	8.14 ±1.96	59.81 ±13.19*	82.31 ±15.16**	64.79 ±13.25

注:\* 为0.05水平差异显著;\*\* 为0.01水平差异显著。下表同。

Note: \*, \*\* mean significant differences at 0.05 and 0.01 level, resp. The same as followtable.

**2.3 对河鲢鱼 ACP 活力的影响(表2)** 结果与 AKP 相似, 以2.0%试验组酸性磷酸酶活力最高,在45 d时达到最大值。

表2 对河鲢鱼 ACP 与 SOD 活力的影响

Table 2 Effects of medicinal fungal substance on activity AKP and SOD in Takifugu fasciatus

组别 Groups	剂量 % Dosage	ACP 活力 μg AKP activity				SOD 活力 U/mg SOD activity			
		15 d	30 d	45 d	60 d	15 d	30 d	45 d	60 d
CK		16.13 ±4.51	28.18 ±8.91	16.08 ±2.23	42.21 ±3.11	117.29 ±22.75	221.01 ±48.23	132.19 ±20.19	145.53 ±17.98
1	0.5	23.53 ±2.96	20.76 ±5.47	31.33 ±4.83*	14.67 ±1.50*	89.01 ±20.07	202.43 ±39.62	196.20 ±63.67	138.16 ±13.93
2	1.0	12.52 ±1.98	30.69 ±16.79	35.67 ±7.46*	37.48 ±3.38	131.87 ±41.56	195.95 ±62.08	145.65 ±23.80	131.94 ±21.62
3	2.0	16.59 ±2.23	27.82 ±5.67	45.01 ±13.57*	10.73 ±2.19**	125.88 ±20.71	174.46 ±44.73	226.13 ±92.98*	72.91 ±12.03**

**2.4 对河鲢鱼 SOD 活力的影响(表3)** 投喂药性菌质后,0.5%和1%组在30 d的SOD含量达到最高峰,而2.0%试验组在45 d达到最大值,与对照相比差异显著。

## 3 分析与讨论

药用真菌具有提高免疫、抗肿瘤、延缓衰老、降血脂等多种生物功效,在医药、食品领域受到广泛关注<sup>[3]</sup>。溶菌酶是鱼体内具有杀灭外来细菌的活性酶<sup>[4]</sup>,这4种酶在鱼体免疫和抗病过程中发挥着重要的作用。

通过试验可知,添加药性菌质后,随着饲喂时间增加,各组鱼溶菌酶活力均有一定程度提高,并在45 d左右达到最高,而后有所降低,且以添加2.0%效果明显(P<0.05),说明药性菌质组均能提高暗纹东方鲢的溶菌酶活力,提高免疫水平,推测可能是药性菌质中成分激活了单核细胞的分泌功能,从而使溶菌酶大量释放。

药性菌质组 AKP 活性明显增强,可以推断其功能之一是加速物质的摄取和转运,为 ADP 磷酸化形成 ATP 提供更多所需的无机磷<sup>[6]</sup>,从而起到促生长和增强非特异性免疫功能的作用。药性菌质对肝脏中 AKP 酶活性的影响明显,各试验组酶的活性也是随着饲喂时间的增加而上升,且以2.0%添加量最好,在45 d有效期内作用最为明显,出现这种情况,与饲喂时间长短和添加药性菌质的剂量有关,这与溶菌酶组结果相似。

ACP 是吞噬溶酶体的重要组成部分,在血细胞进行吞噬和包裹反应中,会伴随有 ACP 的释放。各试验组鱼的 ACP 酶活性也是随剂量和饲喂时间的增加而上升,其中试验3组

上升的幅度比对照组明显,但是到了60 d时,这种作用已减弱。外来病原生物激活了溶酶体中以 ACP 为主体的一系列的水解酶,使这些酶活力大大提高,共同对异源物质进行降解破坏以保护机体。故药性菌质具有维持暗纹东方鲢血淋巴较高 ACP 水平的作用,应是免疫力增强的表现之一。

SOD 是一种重要的抗氧化酶,作为活性氧清除剂参与清除体内的自由基,研究发现,SOD 的水平与免疫功能密切相关。血淋巴的SOD值过高会减少超氧阴离子,降低其防御能力,SOD值过低则会减低其防止自身氧化受损害的能力<sup>[7-8]</sup>。试验组中暗纹东方鲢SOD活力有所上升,并在45 d达到最大值,此时添加2.0%药性菌质组与对照组差异明显(P<0.05),说明药性菌质作为添加剂对暗纹东方鲢SOD活力有影响,这也与其他分组试验一致。

通过以上4组数据的分析可以看出,药性菌质能有效地促进受试组鱼体的生长和明显提高受试鱼的免疫力,同时与添加剂量和饲喂时间长短有关。以2.0%组效果最佳,1.0%组效果次佳;总体上4组免疫能力的排序依次是:2.0%>1.0%>CK>0.5%;在试验过程中,由于0.5%药性菌质试验组的鱼池中含有感染性细菌,在试验中未能去除,导致暗纹东方鲢入池后鱼体在整个试验阶段一直处于患病状态,所以机体的免疫能力表现最弱,但通过饲喂添加0.5%药性菌质的饲料后,各项免疫指标由试验初始时处于最低值,到试验后期达到或超过对照组,也说明了添加药性菌质后能够激活暗纹东方鲢免疫系统,提高抵抗各种病原能力。

加入肝素或 EDTA 的发病前4 d 的血清可以用于病毒的分。用于组织解剖学检查的样本应放在10%的福尔马林溶液中并加冰块保存<sup>[9]</sup>。

**5.2 培养** LSDV 常用牛、山羊及绵羊的原代及传代细胞进行培养,并认为从绵羊体内分离得到的病原在羔羊睾丸的原代及继代细胞培养最为敏感。有报道,LSDV 可在鸡胚尿囊膜和非洲绿猴肾原代(Vero)细胞中生长<sup>[10]</sup>,但在最初病原分离时不推荐使用该法。

**5.3 镜检** 用透射电子显微镜检查是初步检查 LSDV 最直接快速的方法。将病料研磨制成悬浊液,滴1滴悬浊液在蜡板上,1 min 后,加1滴pH值7.8的Tris/EDTA buffer 20 s,然后滴加pH值7.2的1%的磷钨酸10 s。用滤纸吸干或自然干燥后镜检。该病毒呈砖块状或短管状,大小约为290 nm × 270 nm。

**5.4 血清学试验** 包括间接荧光抗体试验、病毒中和试验和 ELISA。病毒中和试验常用且有效,但由于 LSD 感染主要引起细胞免疫,因此,对于再次感染或中和抗体水平低的动物,该方法较难确诊。琼脂凝胶免疫扩散试验和免疫荧光抗体试验特异性较低,这是因为该病抗体与其他痘病毒引起的牛丘疹性口炎、伪 LSD 等之间存在交叉反应<sup>[11]</sup>。蛋白印迹分析法用于检测 LSDV 的 P32 抗原具有很好的敏感性和特异性,但由于耗费较大和操作困难使其应用上有一定的局限性<sup>[9]</sup>。将 P32 抗原在适当的载体上表达,制成单克隆抗体用于 ELISA 检测具有较高的特异性,给血清型检测带来了广阔的应用前景<sup>[12]</sup>。

**5.5 核酸鉴定方法** 血清学检验方法不能鉴定山羊痘病毒、绵羊痘病毒和皮肤疙瘩病毒,但可以通过 Hind 酶对纯化的 DNA 进行酶切而产生的基因片段进行鉴定<sup>[7,13]</sup>。

PCR 能被用于来自活体或组织培养的山羊痘病毒属属内的检测,病毒吸附蛋白和病毒融合蛋白是山羊痘病毒属的特异性蛋白。PCR 产物可被限制性核酸内切酶的酶切鉴定来证实<sup>[14]</sup>。

## 6 鉴别诊断

要与伪疙瘩皮肤病、牛疱疹性乳房炎、藓菌病、昆虫或蜱叮咬,以及牛肺疫、牛丘疹性口炎、荨麻疹、皮肤结核、盘尾丝虫病等病进行鉴别诊断。

(上接第1056页)

通过药用真菌双向发酵得到的最终产物药性菌质,质优价廉,易获得,不污染环境,且能有效提高鱼的免疫力,可以作为一种新型的水产饲料添加剂开发。

## 参考文献

- [1] 华元渝,邹宏海,顾志锋,等.无公害暗纹东方鲀养殖模式探讨[J].水产养殖,2002(6):6-8.
- [2] 张李阳,周业飞,张敦林.药用真菌发酵及其产物对AA肉鸡免疫功能及生长的影响[J].畜牧与兽医,2005,37(6):9-12.
- [3] 庄毅,池玉梅,陈慎宝,等.药用真菌新型固体发酵工程与槐芪菌质的研制[J].中国药学杂志,2004,9(3):175-178.

## 7 预防治疗与控制措施

对于无该疫病的国家,平时应做好预防措施。严格检验家畜、病尸、皮张和精液。

一旦发生疫病,应及时隔离患畜和可疑病畜,疫区严格封锁,一切用具和环境必须消毒。禁止有关的动物贸易,控制传播媒介。

目前无特异性疗法,用抗生素治疗可以避免再次感染。

药物预防:用同源弱毒苗进行免疫接种,一般皮内注射,免疫力能持续3年<sup>[15-16]</sup>。要严格按照说明书进行免疫接种,目前还没有绵羊和山羊种间传播的报道。

## 参考文献

- [1] HAINING D.Lumpy skin disease[J].Bull Epizoot Dis Afr,1957(5):421-430.
- [2] WEISS K E.Lumpy skin disease[J].Virology,1968,3:111-131.
- [3] CARN V M,KITCHING R P.An investigation of possible routes of transmission of lumpy skin disease virus (Nethling) [J].Epidemiol Infect,1995,114:219-226.
- [4] TULMAN E R,AFONSO C L,LUZ, et al[J].Genome of lumpy skin disease virus[J].Virology,2001,75:7122-7130.
- [5] KITCHING R P, SMALE C. Comparison of the external dimensions of capripoxvirus isolates[J].Res Vet Sci,1986,41:425-427.
- [6] CHHOJA C,RENNE L F,KITCHING R P.Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by Aedes aegypti (Diptera:Culicidae) [J].Epidemiol Infect,2001,126:317-321.
- [7] CARN V M,KITCHING R P.The clinical response of cattle following infection with lumpy skin disease (Nethling) virus[J].Arch Virology,1995,140:503-513.
- [8] PROZESKY L,BARNARD B J H.A study of the pathology of lumpy skin disease in cattle[J].Onderstepoort J Vet Res,1982,49:167-175.
- [9] CARN V M.An antigen trapping ELISA for the detection of capripoxvirus in tissue culture supernatant and biopsy samples [J].Virology Methods,1995,51:95-102.
- [10] DAVIES F G,KRAUSS H,LUND L J, et al .The laboratory diagnosis of lumpy skin disease[J].Res Vet Sci,1971,12:123-127.
- [11] KITCHING R P,HAMMOND J M,BLACK D N.Studies on the major precipitating antigen of capripoxvirus [J].Gen Virology,1986,70:485-489.
- [12] CARN V M,KITCHING R P,HAMMOND J M, et al .Use of a recombinant antigen in an indirect ELISA for detecting bovine antibody to capripoxvirus[J].Virology Methods,1994,49:285-29.
- [13] BLACK D N,HAMMOND J M,KITCHING R P.Genomic relationship between capripoxviruses[J].Virus Res,1986,5:277-292.
- [14] IRELAND D C,BHAPAL Y S.Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR[J].Virology Methods,1998,74:1-7.
- [15] CAPSHECK P B,COAKLEY W.Protection of cattle against lumpy skin disease. Trials with a vaccine against Nethling type infection[J].Res Vet Sci,1961,2:362-368.
- [16] CARN V M Control of capripoxvirus infections[J].Vaccine,1993,11:1275-1279.
- [4] SALTON M R J,GHUXEN J M.The structure of di and tetra saccharides released from cell walls by lysozyme and Streptomyces Fermentase and the (1-4) N-acetylhexosaminidase activity of these enzymes[J].Biochim Biophys Acta,1959,36:552-554.
- [5] 魏伟,张洪渊,石安静.育珠蚌酸性磷酸酶活力与免疫反应关系的研究[J].水生生物学报,2001,25(4):413-415.
- [6] 艾春香,陈立侨,高露姣,等.Vc对河蟹血清和组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响[J].台湾海峡,2002,21(4):431-438.
- [7] EDER K,FLADER D,HRICHE F, et al .Excess dietary vitamin E lowers the activities of antioxidative enzymes in erythrocytes of rats fed ad libitum[J].Journal of Nutrition,2002,132(11):3400-3404.
- [8] 刘红柏,卢彤岩,张春燕,等.黄芪对史氏鲟抗氧化能力及免疫力的影响[J].大连水产学院学报,2006,21(3):231-235.