

黄芪多糖对罗非鱼肠绒毛形态结构及 肠道免疫细胞的影响

黄玉章¹ 林旋^{1*} 王全溪¹ 谢建强¹ 陈佳铭² 赵堇² 林树根¹

(1. 福建农林大学动物科学学院, 福州 350002; 2. 上海朝翔生物技术有限公司, 上海 201611)

摘要: 本试验旨在探讨黄芪多糖对罗非鱼肠绒毛形态及肠道黏液细胞和上皮内淋巴细胞的分布和数量的影响。选用平均体重为 47 g 的罗非鱼共 150 尾, 随机分为 5 组, 每组 3 个重复, 每个重复 10 尾鱼。对照组饲喂基础日粮, 试验组分别饲喂在基础日粮中添加 500、1 000、1 500、2 000 mg/kg 黄芪多糖的试验日粮。试验 40 d 后, 从各组中随机抽取 5 尾罗非鱼进行解剖, 取出肠管, 固定、包埋并做成切片, 并应用组织化学染色方法对各组肠管切片进行染色, 观察肠绒毛形态结构、黏液细胞及上皮内淋巴细胞的分布和数量。结果表明: 各组肠绒毛的结构都较为完整; 各试验组肠绒毛长度、隐窝深度和肌层厚度以及肠道黏液细胞和上皮内淋巴细胞的数量与对照组相比均有所提高, 其中除前肠肌层厚度和前肠上皮内淋巴细胞数量外, 1 000 和 1 500 mg/kg 组均较对照组有显著或极显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。由此得出, 日粮中添加黄芪多糖可提高罗非鱼肠绒毛长度、隐窝深度和肌层厚度, 增加肠道黏液细胞和上皮内淋巴细胞的数目, 且以 1 000 和 1 500 mg/kg 两个添加量效果较好。

关键词: 罗非鱼; 黄芪多糖; 肠绒毛; 黏液细胞; 上皮内淋巴细胞

中图分类号: S963.73

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2010)01-0108-09

黄芪为豆科植物膜荚黄芪和内蒙古黄芪的干燥根, 其味甘、性温, 有补气升阳、固表止汗、托毒排脓、利水消肿和生肌等功效, 为补气之要药。现代医学发现其药理作用广泛, 能增强机体免疫功能、增强细胞代谢、调节 DNA 复制及 RNA 和蛋白质的合成, 并具有固肾降压、保肝抗炎等功能^[1]。黄芪多糖 (astragalus polysaccharides, APS) 是黄芪的主要活性成分之一, 其具有调节免疫、抗病毒、抗肿瘤、抗衰老、抗氧化、抗辐射和抗应激作用, 在临床上已经用于治疗肝炎、肿瘤等疾病^[2-3]。目前, 黄芪多糖作为免疫增强剂和抗病毒药物在畜牧业及水产养殖上已开始应用。

许多研究发现, 黄芪多糖能促进单核巨噬细胞的功能, 增强巨噬细胞的吞噬作用, 提高自然杀伤细胞 (NK) 的活性。单核巨噬细胞系统能非特异性地吞噬侵入畜禽体内的病原体和有害异物, 能将抗原提呈给 T、B 淋巴细胞从而参与机体的特异性免疫应答^[4]。苗明三等^[5] 和单俊杰等^[6] 研究表明, 黄芪多糖能增加小鼠腹腔巨噬细胞数量, 显著促进小鼠

腹腔巨噬细胞吞噬功能。

本试验以罗非鱼为研究对象, 在罗非鱼基础饲料中分别添加不同剂量的黄芪多糖作为试验组, 以不添加黄芪多糖为对照组, 饲喂罗非鱼一段时间后解剖取材, 应用组织化学染色方法观察各组罗非鱼肠道黏膜结构和肠道内相关免疫细胞的数量变化, 探讨黄芪多糖对罗非鱼肠道免疫功能的影响。

1 材料与方 法

1.1 试验设计与日粮

本试验所用的罗非鱼鱼种由福建省淡水水产研究所提供。选用体长 9 cm 左右、平均体重为 47 g 的健康罗非鱼 150 尾随机分为 5 组, 每组设 3 个重复, 每个重复 10 尾。试验组饲料分别在基础饲料中添加 500、1 000、1 500、2 000 mg/kg 的黄芪多糖, 以不添加黄芪多糖的基础日粮作为对照组 (0 mg/kg)。黄芪多糖由上海朝翔生物技术有限公司提供。基础日粮组成及营养水平见表 1。

收稿日期: 2009-02-01

基金项目: 农业公益性行业科研专项经费项目子项目 (20080313)

作者简介: 黄玉章 (1984-), 男, 福建漳州人, 硕士研究生, 研究方向为动物组织学。E-mail: huangyuzhang2002@163.com

* 通讯作者: 林旋, 讲师, E-mail: linkaixuan79@hotmail.com

1.2 饲养管理

试验前罗非鱼先集中驯养 2 周,试验开始时,鱼体称重分组,注意将鱼的体重调整至各组间差异不显著($P>0.05$),分别饲养在 150 L 水族箱里。试验前用金益优碘液消毒自来水 1 次,各组水质均为脱氯自来水,昼夜 24 h 用增氧机充气。采用饱食的方式,每天 08:00 和 16:00 分别饲喂和换水 1 次,每次换水量约为 50%,每天的饲料投喂量为罗非鱼总体重的 2%~4%,3 d 调整 1 次。试验期间水温保持在 27~29 °C。

表 1 基础日粮组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of basal diet (air-dry basis, %)	
项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
菜籽粕 Rapeseed meal	30.50
米糠 Rice bran	25.70
次粉 Wheat middings	18.00
红鱼粉 Red-fish meal	10.00
大豆粕 Soybean meal	13.00
磷酸二氢钙 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1.00
氯化胆碱 Choline chloride	0.30
矿物质 Mineral ¹⁾	1.00
多维 Multi-vitamin ²⁾	0.50
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels ³⁾	
粗蛋白质 CP	31.20
粗脂肪 EE	6.40
粗纤维 CF	11.30
糖类 Sugar	26.56
粗灰分 Ash	13.78
赖氨酸 Lys	3.36
蛋氨酸 Met	1.63

¹⁾ 每千克日粮中含有 Per kg of diet contains: Ca 20 g; Mg 0.5 g; Fe 0.04 g; Zn 0.067 g; Mn 0.033 g; Cu 4 mg; Co 0.67 mg; I 0.6 mg; Se 0.13 mg。

²⁾ 每千克日粮中含有 Per kg of diet contains: VB₁ 12 mg; VB₂ 16 mg; VB₆ 12 mg; 泛酸钙 calcium pantothenate 32 mg; 烟酸 nicotinic acid 72 mg; 生物素 biotin 0.1 mg; 叶酸 folic acid 2 mg; VB₁₂ 0.01 mg; VC 200 mg; 肌醇 inositol 100 mg; 胆碱 choline 800 mg; VA 2 000 IU; VD₃ 1 000 IU; VE 80 mg; VK 6 mg。

³⁾ 营养水平为实测值。Nutrient levels were measured values.

1.3 检测指标及方法

1.3.1 取材与固定

试验进行至 40 d 时,对各组罗非鱼饥饿 24 h 后,从每组中随机抽取 5 尾鱼,按常规方法解剖,迅速取出罗非鱼的前肠、中肠和后肠,各肠段长度约

1 cm,浸入 pH 7.2~7.4 的磷酸盐缓冲液洗掉内容物。Carnoy's 固定液固定 12~24 h,包埋并制作横断面切片。常规苏木精-伊红(HE)染色和阿利新兰-高碘酸雪夫氏(AB-PAS)染色。

1.3.2 肠绒毛的形态观察和测量

光镜下观察并应用图象分析系统(IM50),具体测量肠绒毛长度、隐窝深度和肌层厚度。每个肠管取 5 张染色结果较好的切片进行拍照,每张切片随机选取 5 根最长肠绒毛进行测量。

1.3.3 肠道免疫细胞的观察与计数

光镜下观察各组罗非鱼肠道内黏液细胞和上皮内淋巴细胞的分布与数量。

1.3.3.1 黏液细胞的计数 每个部位选择 5 张着色较好的 AB-PAS 染色切片,每张切片均在 40×10 倍的光镜下进行拍照观察并计数,每张切片随机抽取 5 根最长肠绒毛统计其中黏液细胞数量后取平均值。

1.3.3.2 上皮内淋巴细胞的计数 每个部位选择 5 张着色较好的 HE 染色切片,每张切片均在 40×10 倍的光镜下进行拍照观察并计数,取每根肠管横切面,选 5 根最长且排列整齐的肠绒毛,至少计算位于肠绒毛根部以上的上皮内淋巴细胞核,所有单核的非上皮细胞被认为是上皮内淋巴细胞,统计每 100 个肠绒毛上皮柱状细胞间上皮内淋巴细胞的数目。

1.4 数据处理

应用 SPSS 11.0 统计软件的单因素方差分析进行生物学统计,各组间的差异显著性采用两组间独立样本双尾 *T* 检验分析,结果用平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 黄芪多糖对罗非鱼肠绒毛长度、隐窝深度、肌层厚度的影响

2.1.1 罗非鱼肠绒毛长度的变化

由表 2 可知,各试验组前肠、中肠和后肠的肠绒毛长度均比对照组长,且随添加量的增加呈现先增加后降低的趋势。其中,前肠肠绒毛长度:1 000 和 1 500 mg/kg 组比对照组分别增加了 36.62% 和 60.87%,差异极显著($P<0.01$),2 000 mg/kg 组比对照组增加了 16.69%,差异显著($P<0.05$);中肠肠绒毛长度:1 000 mg/kg 组比对照组增加了 25.96%,差异显著($P<0.05$),1 500 mg/kg 组比对照组增加了 59.58%,差异极显著($P<0.01$);后肠肠绒毛长度:1 000 和 1 500 mg/kg 组相对于对照组增加了 38.48% 和 63.56%,差异极显著($P<0.01$)。其余各组各肠段肠绒毛长度均与对照组差异不显著($P>0.05$)。此外,在同一组中,罗非鱼肠

绒毛长度从前肠、中肠到后肠逐步降低,前肠肠绒毛长度最长,中肠次之,后肠最短。

2.1.2 罗非鱼肠绒毛隐窝深度的变化

由表2可知,各试验组前肠、中肠和后肠的隐窝深度均比对照组深,且随添加量的增加呈现先增加后降低的趋势。其中,前肠和中肠隐窝深度:与对照组相比,1 500 mg/kg组极显著增加($P < 0.01$);1 000 mg/kg组显著增加($P < 0.05$);后肠隐窝深度:1 000和1 500 mg/kg组分别比对照组增加了23.35%和32.01%,差异显著($P < 0.05$)。其余各组各肠段肠绒毛隐窝深度均与对照组差异不显著($P > 0.05$)。此外,在同一组中,罗非鱼肠绒毛隐窝深度变化与绒毛长度一样由前肠、中肠到后肠逐步降低。

2.1.3 罗非鱼肠绒毛肌层厚度的变化

由表2可知,各试验组前肠、中肠和后肠的肌层厚度比对照组均有所增加,且随添加量的增加呈现先增加后降低的趋势。其中,前肠肌层厚度:各试验组与对照组相比均差异不显著($P > 0.05$);中肠肌层厚度:1 500 mg/kg组比对照组增加了36.43%,差异极显著($P < 0.01$);1 000 mg/kg组比对照组增加了26.22%,差异显著($P < 0.05$);后肠肌层厚度:1 000和1 500 mg/kg组分别比对照组增加了37.81%和45.36%,差异极显著($P < 0.01$)。其余各组各肠段肠绒毛肌层厚度均与对照组差异不显著($P > 0.05$)。另外,在同一组中,罗非鱼肠绒毛肌层厚度中肠最大,后肠次之,前肠最小。

表2 罗非鱼肠绒毛组织形态变化
Table 2 Morphological changes of villus intestinal of tilapia (μm)

项目 Items	指标 Indices	黄芪多糖水平 APS levels (mg/kg)				
		0	500	1 000	1 500	2 000
前肠 Foregut	绒毛长度 Villus length	458.83 ± 31.77 ^{Aa}	513.22 ± 38.03 ^{Aa}	626.86 ± 69.42 ^B	738.13 ± 87.16 ^B	535.43 ± 47.78 ^{Ab}
	隐窝深度 Crypt depth	211.39 ± 25.87 ^{Aa}	227.58 ± 23.71 ^{Aa}	264.80 ± 31.89 ^{Ab}	302.66 ± 29.80 ^B	243.49 ± 28.28 ^{Aa}
	肌层厚度 Muscular thickness	67.25 ± 6.57 ^a	69.71 ± 9.83 ^a	72.92 ± 8.90 ^a	75.05 ± 10.51 ^a	71.33 ± 9.42 ^a
中肠 Midgut	绒毛长度 Villus length	370.52 ± 39.28 ^{Aa}	385.46 ± 42.16 ^{Aa}	466.71 ± 52.96 ^{Ab}	591.29 ± 68.23 ^B	417.20 ± 47.92 ^{Aa}
	隐窝深度 Crypt depth	196.54 ± 22.95 ^A	199.87 ± 23.55 ^A	228.76 ± 26.84 ^A	284.90 ± 32.46 ^B	212.08 ± 20.91 ^A
	肌层厚度 Muscular thickness	124.86 ± 14.39 ^{Aa}	132.23 ± 13.45 ^{Aa}	157.60 ± 17.88 ^{Ab}	170.35 ± 20.93 ^B	141.08 ± 16.19 ^{Aa}
后肠 Hind gut	绒毛长度 Villus length	253.79 ± 28.26 ^A	280.35 ± 34.07 ^A	351.45 ± 31.04 ^B	415.09 ± 37.73 ^B	271.98 ± 30.89 ^A
	隐窝深度 Crypt depth	153.28 ± 19.76 ^a	165.86 ± 18.33 ^a	189.07 ± 22.56 ^b	202.34 ± 28.17 ^b	165.60 ± 17.99 ^a
	肌层厚度 Muscular thickness	83.79 ± 11.85 ^A	92.43 ± 12.78 ^A	115.47 ± 12.23 ^B	121.80 ± 15.89 ^B	88.93 ± 10.57 ^A

同行肩标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), with different capital letter superscripts mean significant difference ($P < 0.01$), with same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$). The same as below.

2.1.4 罗非鱼肠道黏膜的形态结构显微观察

肠黏膜层结构特点是有环形皱襞、肠绒毛和小肠腺,肠黏膜是肠道屏障的重要组成部分,它包括黏膜上皮、上皮之间的连接结构、上皮的基膜、细胞表面的细

胞衣。在显微镜下观察,各组罗非鱼肠黏膜形态结构都较为完整,层次分明,肠黏膜上皮细胞的轮廓清晰,染色鲜明,排列规则,2 000 mg/kg组肠绒毛顶端有稍微脱落的现象,但不严重。(见图版1~5)

2.2 黄芪多糖对罗非鱼肠道内黏液细胞分布及数量的影响

2.2.1 罗非鱼肠道内黏液细胞的分布情况

罗非鱼肠道组织经 AB-PAS 染色后,显微镜下观察黏液细胞呈红色、蓝色、紫红色和蓝紫色。肠道各段上皮均有黏液细胞分布,黏液细胞主要有囊状、梨状和杯状 3 种形态。罗非鱼黏液细胞以成熟期的杯状细胞为主,少量为囊状细胞和梨状细胞。杯状细胞散在分布于柱状细胞之间,呈高脚杯状,其顶部胞质为大量糖原颗粒拥塞而膨隆,底部纤细,有小而深染的不规则核与少量嗜碱性胞质。杯状细胞排列紧密,靠近绒毛顶端的杯状细胞呈散在分布,不同的肠段杯状细胞的数量有所不同。(见图版 6~10)

2.2.2 罗非鱼肠道内黏液细胞的数量变化

由表 3 可以看出,各试验组罗非鱼肠道内黏液细胞数量均比对照组有所增加,且随添加量的增加呈现先增加后降低的趋势。其中,前肠和中肠内黏液细胞数量:与对照组相比,1 000 和 1 500 mg/kg 组显著增加 ($P < 0.05$),500 和 2 000 mg/kg 组无显著变化 ($P > 0.05$);后肠内黏液细胞数量:1 000 和 1 500 mg/kg 组比对照组分别增加了 30.82% 和 47.17%,差异极显著 ($P < 0.01$),2 000 mg/kg 组比对照组增加了 23.90%,差异显著 ($P < 0.05$),500 mg/kg 组比对照组只增加了 5.66%,差异不显著 ($P > 0.05$)。此外,在同一组的不同肠段中,罗非鱼肠道内黏液细胞的数量顺序为中肠 > 后肠 > 前肠。

表 3 罗非鱼肠道内黏液细胞数量变化

Table 3 Quantity changes of mucous cells in intestinal of tilapia

(个)

项目 Items	黄芪多糖水平 APS levels (mg/kg)				
	0	500	1 000	1 500	2 000
前肠 Foregut	24.40 ± 2.41 ^a	26.20 ± 1.48 ^a	30.60 ± 4.13 ^b	31.80 ± 4.86 ^b	25.80 ± 1.92 ^a
中肠 Midgut	51.20 ± 3.57 ^a	53.40 ± 4.65 ^a	60.40 ± 6.31 ^b	62.20 ± 5.96 ^b	55.60 ± 3.79 ^a
后肠 Hindgut	31.80 ± 4.39 ^{Aa}	33.60 ± 2.96 ^{Aa}	41.60 ± 2.55 ^B	41.60 ± 2.55 ^B	39.40 ± 2.72 ^{Ab}

2.3 黄芪多糖对罗非鱼肠道上皮内淋巴细胞分布及数量的影响

2.3.1 罗非鱼肠道上皮内淋巴细胞的分布情况

罗非鱼肠道组织经 HE 染色后,显微镜下观察上皮内淋巴细胞为散在分布于肠绒毛上皮细胞内一群特殊淋巴细胞,多数位于上皮细胞基膜附近,少量见于上皮游离面。胞核大而圆,深染,胞浆少,固有层亦有淋巴细胞分布。不同的肠段和不同的试验组,数量有差异,但形态差异不明显。(见图版 1~5)

2.3.2 罗非鱼肠道上皮内淋巴细胞的数量变化

由表 4 可以看出,各试验组罗非鱼肠道上皮内淋巴细胞数量均多于对照组,且随添加量的增加呈现先增加后降低的趋势。其中,前肠上皮内淋巴细

胞数量:各试验组虽比对照组有所增加但差异均不显著 ($P > 0.05$);中肠上皮内淋巴细胞数量:1 000 和 1 500 mg/kg 组比对照组分别增加了 10.55% 和 13.17%,差异极显著 ($P < 0.01$),2 000 mg/kg 组比对照组增加了 8.72%,差异显著 ($P < 0.05$),500 mg/kg 组比对照组只增加了 3.67%,差异不显著 ($P > 0.05$);后肠上皮内淋巴细胞数量:1 000 mg/kg 组比对照组增加了 5.52%,差异显著 ($P < 0.05$),1 500 mg/kg 组比对照组增加了 10.67%,差异极显著 ($P < 0.01$),其余组与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。此外,同一组不同肠段上皮内淋巴细胞数量中肠最多,后肠次之,前肠最少。

表 4 罗非鱼肠道上皮内淋巴细胞数量变化

Table 4 Quantity changes of lymphocyte in intestinal epithelial of tilapia

(个)

项目 Items	黄芪多糖水平 APS levels (mg/kg)				
	0	500	1 000	1 500	2 000
前肠 Foregut	233.60 ± 7.67 ^a	235.00 ± 8.79 ^a	241.20 ± 8.38 ^a	239.80 ± 7.99 ^a	237.20 ± 8.16 ^a
中肠 Midgut	305.20 ± 10.78 ^{Aa}	337.40 ± 7.69 ^B	345.40 ± 8.91 ^B	331.80 ± 6.10 ^{Ab}	316.40 ± 10.24 ^{Aa}
后肠 Hindgut	264.40 ± 6.98 ^{Aa}	268.60 ± 9.34 ^{Aa}	279.00 ± 9.87 ^{Ab}	292.60 ± 6.65 ^B	270.20 ± 8.29 ^{Aa}

3 讨论

肠道是机体消化、吸收营养物质的重要场所,而肠绒毛作为小肠的重要组成部分,不但在吸收营养物质上至关重要,而且其强有力的、有规律的摆动也有助于排斥有害菌群的定植,同时,绒毛形态的变化也直接影响绒毛的表面积,进而影响机体吸收营养物质的能力^[7]。Caspary 等^[8]报道指出肠绒毛长度增加后会使小肠接触营养物质的面积增大,从而增强小肠对营养物质的吸收,所以肠绒毛的形态直接和机体的生长发育有关。隐窝深度反映了隐窝细胞的增殖率和成熟度。隐窝细胞从底部向绒毛上部迁移,在迁移过程中,细胞逐渐分化,形成具有吸收能力的柱状细胞,肠绒毛高度与细胞数量呈显著相关。绒毛短时,成熟的绒毛细胞减少,对养分的吸收能力低。而隐窝深度反映了细胞生成率,不断有细胞从隐窝基部向绒毛端部迁移、分化,形成具有吸收能力的绒毛细胞,以补充绒毛上皮的正常脱落。如果此过程减慢,则基部的细胞生成率降低,使隐窝变浅。而绒毛长度/隐窝深度比值(V/C 值)综合反映小肠的功能状况,比值下降,表示黏膜受损,消化吸收功能降低,动物生长发育受阻^[9-10]。本试验研究结果表明,添加不同水平黄芪多糖的试验组肠绒毛长度、隐窝深度和肌层厚度相比于对照组都有一定程度的增加,其中以添加量为 1 000 和 1 500 mg/kg 的 2 个试验组增加效果较好,从而得出在饲料中添加黄芪多糖可以在一定程度上增加小肠绒毛的表面积,从而有助于罗非鱼机体对营养物质的吸收。

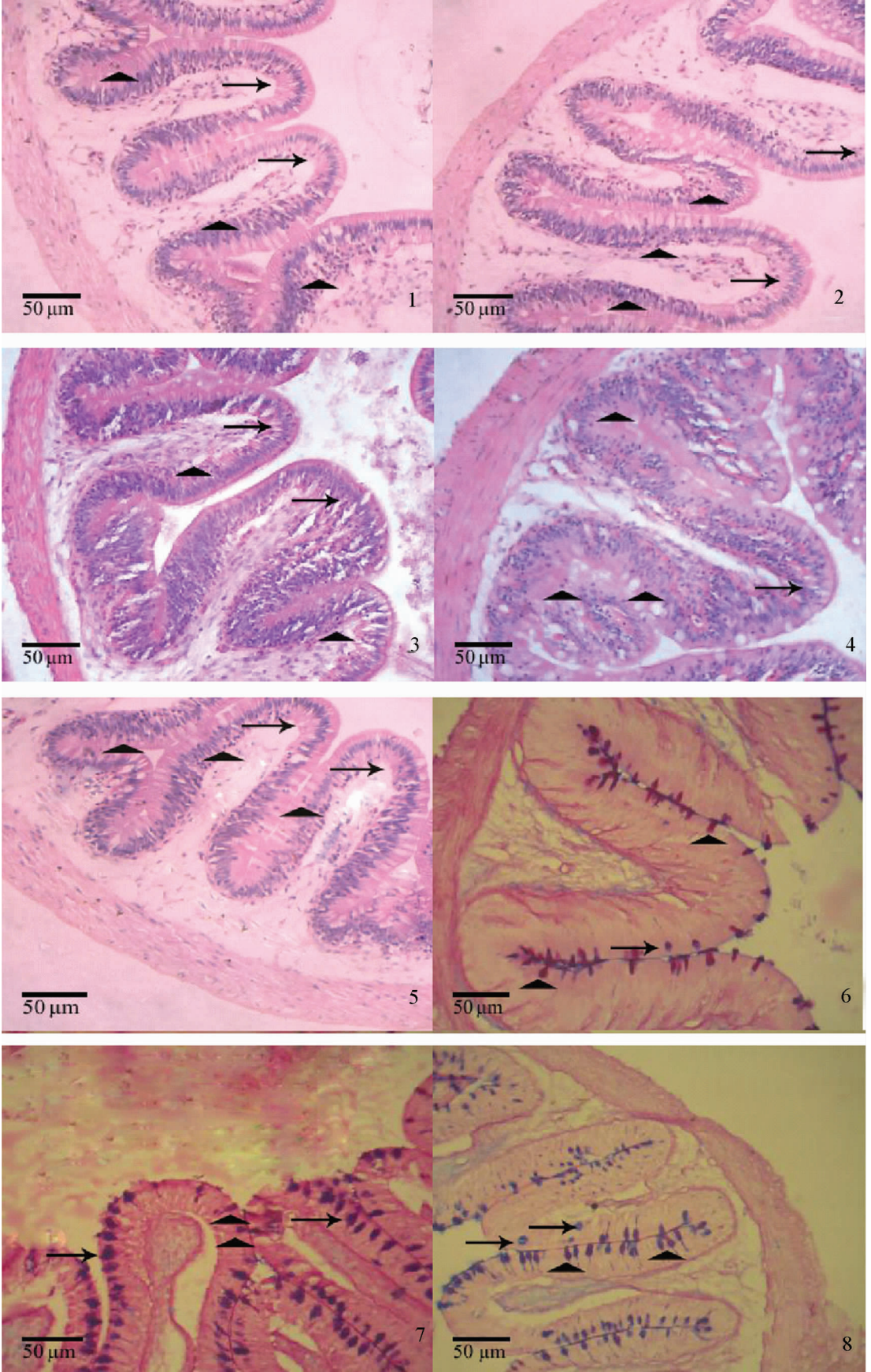
对鱼类黏液细胞的研究国内外已有大量的报道^[11],鱼类黏液细胞广泛分布于鱼类体表、鳃和消化道等部位,分泌的黏液中含有多种有机物质,如粘多糖、糖蛋白、免疫球蛋白及各种水解性酶类,对鱼类的许多生理功能有重要影响。黏液细胞所分泌的黏液中具有抵抗病原微生物入侵的非特异性的免疫化学反应物质,这些物质包括溶菌酶、转移因子、C-反应蛋白、几丁质、I 型干扰素及补体类物质等。它们有的可以杀灭细菌(如溶菌酶),有的可抑制病毒的复制(如干扰素),有的可作为调理素增加吞噬量(如 C-反应蛋白)。此外,黏液中还具有同血液相似的血清学反应,免疫电泳分析也证明了黏液中含有免疫球蛋白,并且这种免疫球蛋白同血清免疫球蛋白具有一定的相似性。黏液细胞分泌的黏液物质中具有多种化学成分,因而黏液物质也具有不同的功能。杯状细胞是一种典型的黏液细胞,主要分布于消化道和呼吸道等器官内的上皮中,杯状细胞

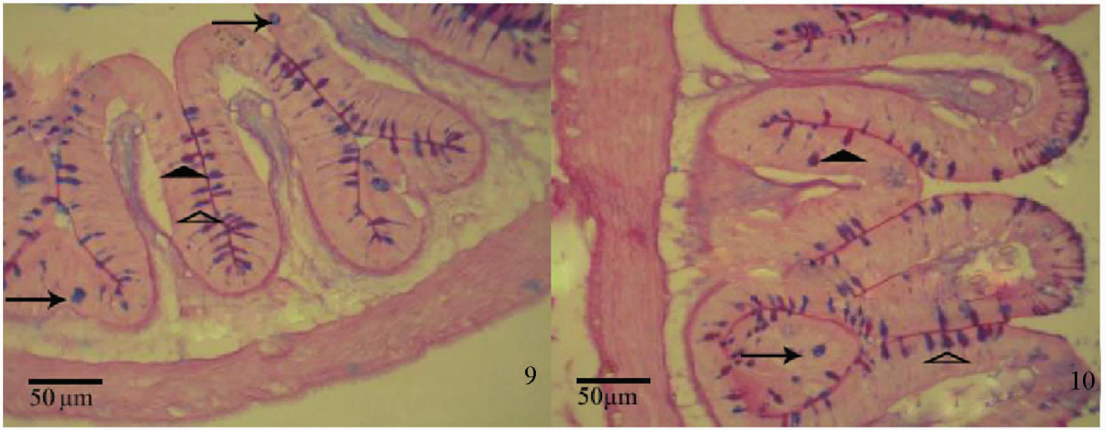
作为肠道黏膜免疫相关细胞的重要组成部分,构成肠道黏膜免疫系统的第一道防御屏障,在抗感染、调节上皮细胞的完整性和外来抗原的免疫应答方面起重要作用,其数量的变化可以在一定程度上反映消化道的局部免疫状况^[12]。本试验结果表明,黄芪添加量为 1 000 和 1 500 mg/kg 的 2 个试验组中肠黏液细胞数量比对照组分别增加了 17.97% 和 21.48%,差异显著($P < 0.05$);黄芪添加量为 1 000 和 1 500 mg/kg 的 2 个试验组后肠黏液细胞数量比对照组分别增加了 30.82% 和 47.17%,差异极显著($P < 0.01$)。表明在饲料添加适量黄芪多糖在一定的程度能够促进肠道黏液细胞的增殖。

作为一种特殊的淋巴细胞群体,肠上皮内淋巴细胞长期与肠道菌群、病原体等接触,在黏膜抗感染免疫、调节上皮细胞的完整性和调节外来抗原的免疫应答方面起重要作用^[13]。肠道相关淋巴组织分为组织性淋巴样组织及散在于整个肠壁中的淋巴细胞。上皮内淋巴细胞是黏膜免疫系统中最先接触抗原的免疫活性细胞,在肠道黏膜中起重要的免疫屏障作用^[14]。肠上皮内淋巴细胞作为肠道相关淋巴组织中的一个特殊组分,是机体免疫系统与外来抗原以及微生物最先接触的免疫细胞,同时也是最先发生免疫反应的细胞。因此小肠上皮内淋巴细胞的数量可以反映小肠局部黏膜免疫屏障的完整及免疫防御功能的完善程度^[15]。另据研究表明,黄芪多糖可提高雏鸡 T 淋巴细胞的转化率,加速细胞免疫功能的发育与完善^[16],促进浆细胞增生和抗体合成^[17]。本试验结果表明,添加不同水平黄芪多糖的各试验组肠绒毛长度、隐窝深度和肌层厚度相比于对照组都有一定程度的增加,而且肠道黏液细胞和上皮内淋巴细胞的数量比对照组也有明显的增多,其中以添加量为 1 000 和 1 500 mg/kg 的 2 个试验组效果最好。这表明饲料中添加黄芪多糖可以提高罗非鱼机体的特异性免疫功能。此外本试验还发现各组罗非鱼不同肠段黏液细胞和上皮内淋巴细胞的数量分布也明显不同,这和王子旭^[18]对肉鸡肠黏膜结构的研究结果相似。这可能与肠道不同部位所接触病原微生物及食物抗原的种类和数量不同有关。

4 结论

日粮中添加黄芪多糖可提高罗非鱼肠绒毛长度、隐窝深度和肌层厚度,增加肠道黏液细胞和上皮内淋巴细胞的数量,且以 1 000 和 1 500 mg/kg 添加量效果较好。





图版
Plate

1. 对照组中肠绒毛如箭头所示,肠上皮内淋巴细胞如三角形所示,倍数 40×10 ;2. 500 mg/kg组中肠绒毛如箭头所示,肠上皮内淋巴细胞如三角形所示,倍数 40×10 ;3. 1 000 mg/kg组中肠绒毛如箭头所示,肠上皮内淋巴细胞如三角形所示,倍数 40×10 ;4. 1 500 mg/kg组中肠绒毛如箭头所示,肠上皮内淋巴细胞如三角形所示,倍数 40×10 ;5. 2 000 mg/kg组中肠绒毛如箭头所示,肠上皮内淋巴细胞如三角形所示,倍数 40×10 ;6. 对照组后肠黏液细胞,箭头所示为酸性黏多糖呈蓝色,三角形所示为中性黏多糖呈红色,倍数 40×10 ;7. 500 mg/kg组后肠黏液细胞,箭头所示为酸性黏多糖呈蓝色,三角形所示为中性黏多糖呈红色,倍数 40×10 ;8. 1 000 mg/kg组后肠黏液细胞,箭头所示为酸性黏多糖呈蓝色,三角形所示为中性酸性黏多糖混合物呈蓝紫色,倍数 40×10 ;9. 1 500 mg/kg组后肠黏液细胞,箭头所示为酸性黏多糖呈蓝色;实心三角形所示为中性黏多糖呈红色,空心三角形所示为中性酸性黏多糖混合物呈蓝紫色,倍数 40×10 ;10. 2 000 mg/kg组后肠黏液细胞,箭头所示为酸性黏多糖呈蓝色;实心三角形所示为中性黏多糖呈红色;空心三角形所示为中性酸性黏多糖混合物呈蓝紫色,倍数 40×10 。

1. control group midgut intestinal villus as the arrow show, intestinal intraepithelial lymphocytes as the triangle show, multiple 40×10 ; 2. 500 mg/kg group midgut intestinal villus as the arrow show, intestinal intraepithelial lymphocytes as the triangle show, multiple 40×10 ; 3. 1 000 mg/kg group midgut intestinal villus as the arrow show, intestinal intraepithelial lymphocytes as the triangle show, multiple 40×10 ; 4. 1 500 mg/kg group midgut intestinal villus as the arrow show, intestinal intraepithelial lymphocytes as the triangle show, multiple 40×10 ; 5. 2 000 mg/kg group midgut intestinal villus as the arrow show, intestinal intraepithelial lymphocytes as the triangle show, multiple 40×10 ; 6. control group hindgut mucous cells, the arrow show acid mucopolysaccharide is blue, the triangle show neutral mucopolysaccharide is red, multiple 40×10 ; 7. 500 mg/kg group hindgut mucous cells, the arrow show acid mucopolysaccharide is blue, the triangle show neutral mucopolysaccharide is red; multiple 40×10 ; 8. 1 000 mg/kg group hindgut mucous cells, the arrow show acid mucopolysaccharide is blue, the triangle show mixture of neutral and acid mucopolysaccharide is blue-violet, multiple 40×10 ; 9. 1 500 mg/kg group hindgut mucous cells, the arrow show acid mucopolysaccharide is blue, the solid triangle show neutral mucopolysaccharide is red, the hollow triangle show mixture of neutral and acid mucopolysaccharide is blue-violet, multiple 40×10 ; 10. 2 000 mg/kg group hindgut mucous cells, the arrow show acid mucopolysaccharide is blue, the solid triangle show neutral mucopolysaccharide is red, the hollow triangle show mixture of neutral and acid mucopolysaccharide is blue-violet, multiple 40×10 .

参考文献:

- [1] 胡庭俊, 梁纪兰, 程富胜. 黄芪对小鼠脾淋巴细胞蛋白激酶 C 活性的影响[J]. 中兽医医药杂志, 2003, 2: 11-12.
- [2] 程志斌, 葛长荣, 韩剑众. 中草药有效成分对动物免疫功能的影响及其应用[J]. 河北畜牧兽医, 2000, 18(10): 16-17.
- [3] 陈光, 戚文臣, 刘显清. 黄芪多糖对动物肿瘤细胞凋亡影响的研究[J]. 中医药学报, 2002, 30(4): 55-56.
- [4] 储岳峰, 颜新敏, 胡元亮. 几种中药成分的免疫增强活性及其作用效果[J]. 中国兽医科技, 2005, 35(1): 67-70.
- [5] 苗明三, 方晓艳, 孙艳缸. 当归补血汤多糖及其单味药多糖对正常小鼠免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2003, 19(4): 7.
- [6] 单俊杰, 王易, 翁颖琦. 黄芪毛状根与黄芪多糖化学组成和免疫活性的比较[J]. 中草药, 2002, 33(12): 1 096-1 099.
- [7] 马仲华. 家畜解剖及组织胚胎学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [8] Caspary W F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 1992, 55: 299-308.
- [9] 王子旭, 余锐萍, 陈越, 等. 日粮锌硒水平对肉鸡小肠黏膜结构的影响[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(7): 18-21.
- [10] 韩正康. 家畜营养生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1991: 16-17.
- [11] 杨桂文, 安利国. 鱼类黏液细胞研究进展[J]. 水产学报, 1999, 23(4): 403-408.
- [12] 史玉兰, 段相林. 杯状细胞的研究进展[J]. 解剖科学进展, 2001, 7(4): 358-341.
- [13] 赵太平, 徐玉东, 魏岚, 等. 大鼠小肠、大肠上皮及固有层淋巴细胞的分布差异[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2004, 38(1): 42-44.
- [14] 李霄凌, 李公启, 徐玉东. 免疫大鼠肠道上皮内淋巴细胞的实验研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2005, 26(3): 241-242.
- [15] 王继凤, 陈耀星, 王子旭. 丁酸钠对断奶仔猪小肠黏膜形态结构的影响[J]. 中国兽医科技, 2005, 35(4): 298-301.
- [16] Kong X, Hu Y, Rui R, et al. Effects of Chinese herbal medicinal ingredients on peripheral lymphocyte proliferation and serum antibody titer after vaccination in chicken[J]. International Immunopharmacology, 2004, 4(7): 975-982.
- [17] Guo F C, Kwakkel R P, Williams B A, et al. Effects of mushroom and herb polysaccharides on cellular and humoral immune response of Eimeria tenella-infected chickens[J]. Poultry Science, 2004, 83(7): 1 124-1 132.
- [18] 王子旭. 锌硒互作对肉鸡肠黏膜形态结构及黏膜免疫相关细胞影响的研究[D]. 硕士学位论文. 北京: 中国农业大学, 2003.

Effects of Astragalus Polysaccharide on Structure of Intestinal Villus and Intestinal Immunocyte of Tilapia

HUANG Yuzhang¹ LIN Xuan^{1*} WANG Quanxi¹ XIE Jianqiang¹
CHEN Jiaming² ZHAO Jin² LIN Shugen¹

(1. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fujian 350002, China;

2. Shanghai Zhaoxiang Biotechnology Co. Ltd., Shanghai 201611, China)

Abstract: This experiment was conducted to discuss the effects of astragalus polysaccharide on the structure of intestinal villus and distribution and quantity of intestinal mucous cells and intraepithelial lymphocytes of tilapia. One hundred and fifty tilapia with average body weight of 47 g were randomly divided into 5 groups with 3 replicates each and 10 fish in each replicate. Five groups were fed basal diet supplemented with 0, 500, 1 000, 1 500 and 2 000 mg/kg astragalus polysaccharide, respectively. After 40 days, 5 tilapia in per group were randomly selected, anatomized, taken out intestine, fixed, embedded and sliced. Then the structure of intestinal villus and the distribution and quantity of mucous cells and intraepithelial lymphocytes were observed by histochemical staining method. Results were as follows: the structure of intestinal villus in all groups were rather integrally. The length of intestinal villus, depth of crypt, thickness of muscular and quantity of intestinal mucous cells and intraepithelial lymphocytes in four experimental groups were larger than those in control group, and that in 1 000 and 1 500 mg/kg groups had significantly improved except thickness of muscular and quantity of intraepithelial lymphocytes in foregut ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In conclusion, supplementing astragalus polysaccharide to the diet could improve the length of intestinal villus, depth of crypt, thickness of muscular and quantity of intestinal mucous cells and intraepithelial lymphocytes of tilapia, and the appropriate addition levels were 1 000 and 1 500 mg/kg. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2010, 22(1):108-116]

Key words: Tilapia; Astragalus polysaccharide; Intestinal villus; Mucous cells; Intraepithelial lymphocytes