

谢嘉华,许婉芳,袁建军. 免疫多糖对中华倒刺鲃非特异性免疫机能和疾病抵抗力的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):184-188.

免疫多糖对中华倒刺鲃非特异性免疫机能和疾病抵抗力的影响

谢嘉华,许婉芳,袁建军

(泉州师范学院化学与生命科学学院,福建泉州 362000)

摘要:在饵料中添加不同含量(0.2、4、8 g/kg)的免疫多糖,连续投喂中华倒刺鲃 4 周,分别于第 2 周末、第 4 周末检测血液白细胞总数、白细胞吞噬活性及血清、头肾和脾中溶菌酶活性,探讨口服免疫多糖对中华倒刺鲃非特异性免疫机能的影响。2 周后对添加 4 g/kg 免疫多糖的试验鱼注射副溶血性弧菌,并于感染后 0、1、2、4、8 d 取样检测血液白细胞总数、白细胞吞噬活性及血清、头肾和脾中溶菌酶活性,研究免疫多糖对中华倒刺鲃的免疫调节作用。结果表明,该免疫多糖可显著提高中华倒刺鲃血液白细胞总数、白细胞吞噬活性及血清、头肾和脾中溶菌酶活性,且在一定范围内,随着免疫多糖浓度的增加,免疫反应呈现增强的趋势;其中添加 4 g/kg 免疫多糖、投喂 2 周效果最佳,能显著增强中华倒刺鲃抵抗副溶血性弧菌感染的能力。

关键词:免疫多糖;中华倒刺鲃;非特异性免疫;抗病力

中图分类号: S942.1;S917.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0184-05

随着渔业养殖的规模化和集约化发展,制约养殖生产的问题也日益突出,如水环境污染、高密度养殖等不可避免地影

收稿日期:2012-11-18

基金项目:福建省教育厅科技计划(编号:2007F5088);福建省高校服务海西重点建设项目(编号:A102)。

作者简介:谢嘉华(1962—),女,江苏常熟人,硕士,教授,主要从事动物解剖生理方面的研究。E-mail: xjh921258@qztc.edu.cn。

通信作者:袁建军,教授,主要从事环境微生物方面的研究。E-mail: yuanjianjun2005@qztc.edu.cn。

1 号随着自繁自育世代数的增加体重在逐渐减少;4 个日本沼虾群体肥满度结果表明,太湖 1 号各世代肥满度均高于普通日本沼虾,显示了太湖 1 号品种的优良性状;就养殖产量及经济效益而言,太湖 1 号各世代的捕捞产量、产值和效益均高于普通日本沼虾,太湖 1 号 F_1 经济效益比普通日本沼虾高近 1.2 万元/hm²。由上表明太湖 1 号具有良好的生长性状,在生产实践中能够创造更多的经济价值。

李瀚声等对日本沼虾太湖和鄱阳湖人工养殖群体研究显示,在 8—11 月的 90 d 中太湖群体体长增至 44.17 mm,鄱阳湖群体体长增至 43.18 mm,太湖群体体重增至 1.78 g,鄱阳湖群体增至 1.69 g^[4]。本研究中太湖 1 号各世代成体平均体重在 3.31~3.68 g,平均体长为 5.41~5.77 cm,较之以上已研究自然日本沼虾群体均具有较明显的生长优势。

此外,太湖 1 号在自繁自育传代过程中,优良的生长性状逐步衰减, F_3 更是在与普通日本沼虾生长特征对比中优势不在,揭示在太湖 1 号养殖过程中,每 2 年最好更新 1 次亲本,从而确保生产中良好的经济效益。太湖 1 号各世代体重和体长均在养殖 70 d 左右时达到最大值,随后出现回落,此现象的发生是由于天气转冷之后太湖 1 号大个体出现不同程度的死亡造成的,推测其与太湖 1 号亲本一方为海南沼虾的种质

影响着养殖对象的健康。化学药物治疗是目前最主要的疾病防治方法,但是生产中抗生素等化学药物普遍使用或使用不当,使得抗生素的耐药菌株不断增加,动物免疫功能下降,药物在水产品中的残留也威胁到人的健康和安全。接种疫苗是水产养殖中预防疾病的有效措施,但在水产养殖实践中的应用却很受限制。

目前,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、保证养殖效益的有效措施。免疫增强剂是指单独或同时与抗原使用均能增强动物免

特性存在很大关系^[5],同时也提示养殖户在养殖 70 d 左右时要及时清塘起捕。

品种是养殖生产的物质基础,良种的选择和培育是增产增效的有效途径,优良品种对于养殖产量的提高起着十分重要的作用^[6]。从本研究生长特性对比结果来看,太湖 1 号具有良好的生长优势,可作为优良品种在本地区进行推广。

参考文献:

- [1] Hedrick P E, Booker H E, Casselman J M, et al. Stock identification: materials and methods [J]. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1981, 38: 1838-1855.
- [2] 刘瑞玉, 梁象秋, 严生良. 中国长臂虾科的研究 I: 沼虾属、瘦虾属和拟瘦虾属 [C]//中国甲壳动物学会. 甲壳动物学论文集: 第二辑. 北京: 科学出版社, 1990: 111-112.
- [3] 冯建彬, 李家乐, 程 熙. 日本沼虾种质资源挖掘和保护研究进展 [J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(3): 371-376.
- [4] 李瀚声, 冯建彬, 谢 楠, 等. 日本沼虾太湖群体和鄱阳湖群体杂交 F_1 生长性能比较研究 [J]. 淡水渔业, 2011, 41(1): 43-47.
- [5] 熊皓伟. 杂交青虾太湖 1 号生物学特性及养殖技术的研究 [D]. 无锡: 南京农业大学无锡渔业学院, 2010.
- [6] 楼允东. 鱼类育种学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.

疫反应的物质,这些物质可增强鱼类抵抗外界病原体侵袭的能力,同时也可减轻外界环境胁迫对鱼类的免疫抑制作用^[1],具有作用广泛、特性稳定、安全高效等特点,适宜作为饲料添加剂来替代抗生素对水产动物进行免疫。因此,利用免疫增强剂来提高鱼类的非特异性免疫机能,增强其对病原菌的抵抗力是一种极为有效的、具有广阔发展前景的方法。

目前国内外对免疫增强剂的研究比较活跃^[2-5]。 β -葡聚糖是常见的免疫增强剂之一,它来源于酵母菌、细菌、真菌和一些谷类的细胞壁。虽然很多文献报道 β -葡聚糖增强了鱼类的免疫性,但是由于试验时的条件不同,因而其结果也常常是不一致的^[6]。 β -葡聚糖对免疫反应的刺激作用主要是由于它能与多种跟免疫反应有关的细胞表面受体结合^[7]。本研究利用湖北安琪酵母股份有限公司以医药专用酵母生产的福邦牌免疫多糖(有效成分为 β -葡聚糖)投喂中华倒刺鲃(*Spinibarbus sinensis*)一段时间后,再经注射方式人工感染副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*),通过取样测定供试鱼血液中白细胞数量、吞噬功能及血清、头肾及脾中溶菌酶活性,评价了在饲料中添加免疫多糖对中华倒刺鲃的免疫保护作用。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验用中华倒刺鲃购自泉州昌盛渔业有限公司,活体运回暂养于 90 cm × 60 cm × 45 cm 的室内水族箱内。1 周后,选择体质健壮、无病无伤的鱼进行试验。试验分 2 次进行,第 1 次试验鱼共 80 尾,体重(77.32 ± 10.03) g,体长(16.00 ± 0.80) cm,试验共分 4 组,2 箱为 1 组,每箱 10 尾。第 1~4 组基础饲料中分别添加免疫多糖 0(对照组,CK)、2、4、8 g/kg,各组于饲养第 2 周末、第 4 周末随机取样 5 尾。第 2 次试验鱼共 100 尾,体重(25.63 ± 2.84) g,体长(11.55 ± 0.54) cm,分为 2 组,每组 5 箱,每箱 10 尾。第 1 组为对照组,投喂基础饲料,第 2 组为试验组,投喂添加免疫多糖 4 g/kg 的试验饲料,分别于饲养第 2 周末人工感染副溶血性弧菌,并于感染后 0、1、2、4、8 d 各组随机取样 5 尾。

1.2 试验饲料及饲养管理

试验用基础饲料是由鱼粉、面粉、豆粕、啤酒酵母、多维、多矿等组成的预混料,定量称取后与添加剂按比例充分混匀后制粒,凉干备用;试验用福邦牌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: β -葡聚糖(≥20%)、甘露寡糖(≥20%)、蛋白质(≤35%)。

试验过程中各水族箱内配置充气增氧设施以保证箱内的溶氧量,自然水温(16.5~20.5℃),pH 值 6.9~7.2。每天早上换水 1 次,换水量约 1/3。每天投饵 3 次,分别为 07:00、12:30、17:00,投喂量为鱼体重的 2%~2.5%。

1.3 感染试验

1.3.1 细菌的培养 副溶血性弧菌取自厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室。取副溶血性弧菌保种管 1 支,离心去甘油,加磷酸缓冲液稀释至 1 mL,振荡摇匀,吸 10 μ L 至肉汤培养基中,摇匀,置恒温摇床于 28℃ 下 200 r/min 培养 12 h,调整浓度至 10⁸ 个/mL。

1.3.2 感染试验 试验鱼饲养 2 周后,经腹腔对每尾鱼注射

0.2 mL 浓度为 10⁸ 个/mL 的副溶血性弧菌活菌液,于感染后 0、1、2、4、8 d 各组随机取样 5 尾。

1.4 样品处理

试验进行到预定时间后,用 1 mL 注射器从尾静脉取血,血样分 3 份,1 份直接测定白细胞数量;1 份以肝素钠抗凝剂制备成抗凝血供检测白细胞吞噬活性;1 份在 4℃ 下静置 4~6 h,4 000 r/min 离心 10 min,分离血清,-20℃ 冰箱保存待测溶菌酶活性。将鱼处死后迅速解剖取出头肾和脾,用锡箔纸包住放入氮液中,随后放入 -20℃ 冰箱中保存。测定前将头肾和脾分别称重,再分别加入 pH 值为 6.5 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(0.1 mg/mL),在冰水浴中将其匀浆,4℃ 下 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液置 -20℃ 冰箱中保存备测。

1.5 血液白细胞数量测定

用白细胞稀释液将血液稀释 20 倍,待红细胞完全溶解后,吸取白细胞悬液,用血球计数板在显微镜下计数。

1.6 血液白细胞吞噬活性的测定

将金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)接种在液体肉汤培养基中,37℃ 下培养 48 h,离心集菌,在菌液中加入 0.5% 甲醛溶液,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 10⁸ 个/L,即为福尔马林灭活的金黄色葡萄球菌菌体(F-SA),将其作为检测白细胞吞噬活性的吞噬菌体。

在 0.2 mL 抗凝血中加入 0.1 mL F-SA,摇匀,25℃ 恒温水浴锅中孵育 45 min,每隔 10 min 摇动 1 次。用吸管吸取白细胞涂片,每个样品涂 5 张,用甲醇固定 10 min,Giemsa 染色液染 1 h,水洗风干后,镜检,计数 100 个白细胞,记下吞噬细菌的细胞数,并依下式计算白细胞吞噬百分比(PP)和吞噬指数(PI):

吞噬百分比(PP) = (100 个白细胞中参与吞噬的细胞数/100) × 100%;

吞噬指数(PI) = 细胞内总菌数/参与吞噬的细胞数。

1.7 溶菌酶活性测定

溶菌酶活性的检测参照 Hutchinson 等的方法^[8-9]进行,主要试验步骤如下:用 pH 值为 6.0 的 0.05 mol/L Na₂HPO₄ 缓冲液将冻干的溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*, Sigma)稀释为 0.3 mg/mL,按 250 μ L/孔菌悬液加入到 96 孔细胞培养板中,然后每孔加入 10 μ L 血清(头肾上清液、脾脏上清液),重复 3 次,(15 ± 1)℃ 平衡 15 min,记录 450 nm 波长下 5 min 内酶标仪(TECAN GENios)的读数(每隔 1 min 记录 1 次)。每毫升血清(头肾上清液、脾脏上清液)每分钟内吸光度降低 0.001 定义为 1 个酶活性单位(U/mL)。

1.8 数据分析

所得数据采用 *t* 检验方法进行分析, $P < 0.05$ 时差异显著, $P < 0.01$ 时差异极显著。

2 结果与分析

2.1 免疫多糖对中华倒刺鲃生长的影响

由表 1 可见,第 2 周末取样和第 4 周末取样,随着免疫多糖投喂浓度和时间的增加,试验组中华倒刺鲃的增重率均高于对照组。第 2 周末取样时,添加免疫多糖 4 g/kg 和 8 g/kg

末体重显著高于对照组 ($P < 0.05$)。第 4 周末取样时,添加免疫多糖 2 g/kg 和 8 g/kg 末体重显著高于对照组 ($P < 0.01$)。添加免疫多糖 4 g/kg 末体重极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。

表 1 免疫多糖对中华倒刺鲃生长性能的影响

免疫多糖添加量 (g/kg)	初体重 (g)	第 2 周末取样		第 4 周末取样	
		末体重(g)	增重率(%)	末体重(g)	增重率(%)
0	77.23 ± 10.06	87.13 ± 9.62	13.02	96.93 ± 10.69	25.73
2	77.32 ± 10.22	93.50 ± 8.73	21.29	113.27 ± 10.50 *	46.93
4	77.34 ± 9.16	101.66 ± 9.70 *	31.88	118.00 ± 8.63 **	53.07
8	77.37 ± 6.33	103.19 ± 9.44 *	31.26	115.45 ± 10.87 *	49.76

注:增重率 = (末体重 - 初体重) / 初体重 × 100%; 各组数据为“平均值 ± 标准差”。“*”“**”分别表示相同取样时间试验组与对照组差异显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)。

2.2 中华倒刺鲃血液白细胞的数量

由表 2 可见,第 2 周末取样和第 4 周末取样时试验组白细胞数量显著或极显著高于对照组,且随剂量增加而增加。相同剂量免疫多糖不同取样时间测得中华倒刺鲃血液白细胞数量变化趋势不一致。第 4 周末添加免疫多糖 2、4 g/kg 白细胞数量显著高于第 2 周末,而第 4 周末添加免疫多糖 8 g/kg 白细胞数量显著低于第 2 周末。

2.3 中华倒刺鲃血液白细胞的吞噬功能

表 3 显示,第 2 周末取样时添加免疫多糖 4、8 g/kg PP 显著高于对照组,3 个试验组 PI 均显著或极显著高于对照组。第 4 周末取样时 3 个试验组 PP、PI 均显著或极显著高于对照

表 2 中华倒刺鲃血液白细胞的数量

组别 (免疫多糖添加量)	白细胞数量(×10 ² 个/mm ³)	
	第 2 周末取样	第 4 周末取样
第 1 组(0 g/kg, CK)	156.20 ± 4.61a	162.00 ± 5.65a
第 2 组(2 g/kg)	167.20 ± 9.38 * a	180.20 ± 5.21 ** b
第 3 组(4 g/kg)	169.20 ± 7.78 * a	180.80 ± 3.68 ** b
第 4 组(8 g/kg)	196.00 ± 5.80 ** b	185.40 ± 4.36 ** a

注:各组数据均为“平均值 ± 标准差”。“*”“**”表示相同取样时间试验组与对照组差异显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)。同行数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

组,高剂量组(添加免疫多糖 8 g/kg)的 PP 和 PI 略有降低。

表 3 中华倒刺鲃血液吞噬细胞的吞噬功能

组别 (免疫多糖添加量)	第 2 周末取样		第 4 周末取样	
	PP(%)	PI	PP(%)	PI
第 1 组(0 g/kg, CK)	23.40 ± 3.06a	1.29 ± 0.11a	26.60 ± 2.79a	1.46 ± 0.17a
第 2 组(2 g/kg)	26.60 ± 2.19A	1.51 ± 0.16 * a	36.80 ± 4.21 ** B	1.70 ± 0.14 * a
第 3 组(4 g/kg)	27.80 ± 1.38 * A	1.64 ± 0.10 ** a	37.80 ± 1.31 ** B	1.88 ± 0.20 ** b
第 4 组(8 g/kg)	28.40 ± 2.38 * A	1.67 ± 0.12 ** a	34.20 ± 2.99 ** B	1.70 ± 0.12 * a

注:各组数据均为“平均值 ± 标准差”。“*”表示相同取样时间试验组与对照组差异显著($P < 0.05$),“**”表示相同取样时间试验组与对照组差异极显著($P < 0.01$)。同行、同项数据后不同大、小写字母表示差异极显著($P < 0.01$)、显著($P < 0.05$)。

相同免疫多糖添加量下第 4 周取样的各试验组 PP 均极显著高于第 2 周。第 4 周取样时,添加免疫多糖 4 g/kg PI 显著高于第 2 周(表 3)。

2.4 中华倒刺鲃血清、头肾和脾脏溶菌酶活性

试验结果(表 4)显示,无论是血清或头肾或脾脏,第 2 周

末取样和第 4 周末取样测得的 3 个试验组溶菌酶活性均显著或极显著高于对照组,且这 3 种组织在 2 个取样时间的溶菌酶活性均随免疫多糖添加量的增加呈大致相同的变化趋势。添加免疫多糖 8 g/kg 的溶菌酶活性比添加免疫多糖 4 g/kg 增加不多甚至略有降低。

表 4 中华倒刺鲃不同组织溶菌酶活性

组别 (免疫多糖添加量)	血清溶菌酶活性		头肾溶菌酶活性		脾脏溶菌酶活性	
	第 2 周末取样	第 4 周末取样	第 2 周末取样	第 4 周末取样	第 2 周末取样	第 4 周末取样
第 1 组(0 g/kg, CK)	100.00 ± 15.81	101.00 ± 15.17	90.00 ± 14.72	105.00 ± 12.91	93.00 ± 15.00	95.00 ± 19.58
第 2 组(2 g/kg)	131.00 ± 13.60 *	148.00 ± 28.42 *	127.00 ± 18.23 **	130.00 ± 15.81 *	138.00 ± 28.72 *	135.00 ± 24.83 *
第 3 组(4 g/kg)	161.00 ± 16.65 **	174.00 ± 13.77 **	151.00 ± 25.88 **	166.00 ± 18.65 **	149.00 ± 15.97 **	151.00 ± 20.16 **
第 4 组(8 g/kg)	171.00 ± 17.50 **	170.00 ± 33.17 **	148.00 ± 20.15 **	165.00 ± 16.38 **	168.00 ± 22.55 **	150.00 ± 10.87 **

注:各组数据为“平均值 ± 标准差”。“*”表示相同取样时间试验组与对照组相比差异显著($P < 0.05$),“**”表示相同取样时间试验组与对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。

2.5 攻毒对白细胞总数的影响

投喂添加免疫多糖 4 g/kg 的饲料 2 周后,腹腔注射 0.2 mL 10⁸ 个/mL 副溶血性弧菌活菌液,并于感染后 0、1、2、4、8 d 取样。由图 1 可见,投喂 2 周(感染 0 d)后,试验组与

对照组白细胞总数差异极显著($P < 0.01$)。感染副溶血性弧菌后,对照组和试验组的白细胞总数均随时间增加而增加,试验组增加的幅度更大,至感染后 2 d 达到顶峰;然后白细胞总数开始降低,在感染后 8 d 降至最低,均极显著低于各自攻毒

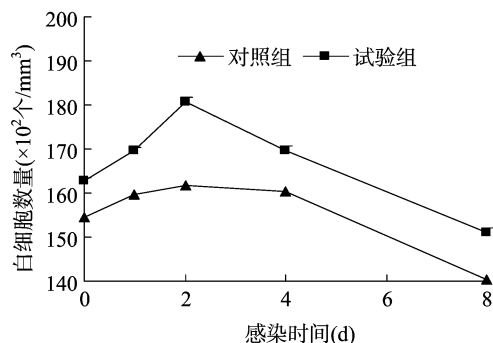


图1 注射副溶血性弧菌对中华倒刺鲃血液白细胞总数的影响

前水平 ($P < 0.01$), 但试验组白细胞总数在感染后 8 d 仍接近于对照组攻毒前水平, 也即维持在正常水平。

2.6 攻毒对白细胞吞噬百分比和吞噬指数的影响

由图 2 可见, 投喂添加免疫多糖 4 g/kg 的饲料 2 周 (感染 0 d) 后, 试验组与对照组的 PP 差异极显著 ($P < 0.01$), PI 差异显著 ($P < 0.05$)。感染副溶血性弧菌后 1、2 d, 对照组和试验组的 PP 和 PI 均无显著变化。感染后 4 d, 对照组和试验组的 PP 均极显著低于感染前各自的水平 ($P < 0.01$), PI 无明显变化, 但试验组 PP 仍接近对照组攻毒前水平。感染后 8 d, 对照组和试验组的 PP 和 PI 均极显著地低于感染前各自的水平 ($P < 0.01$), 试验组 PP 也极显著地低于对照组攻毒前水平, 即低于正常水平, 试验组 PI 则接近对照组攻毒前水平。

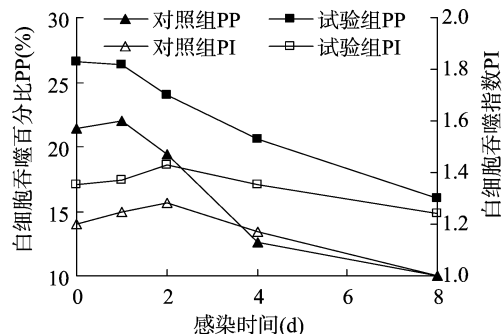


图2 注射副溶血性弧菌对中华倒刺鲃血液白细胞吞噬百分比和吞噬指数的影响

2.7 攻毒对血清、头肾和脾脏溶菌酶活性的影响

由图 3 可见, 投喂添加免疫多糖 4 g/kg 的饲料 2 周 (感染 0 d) 后, 试验组与对照组头肾溶菌酶活性差异显著 ($P < 0.05$), 血清和脾脏的溶菌酶活性差异极显著 ($P < 0.01$)。感

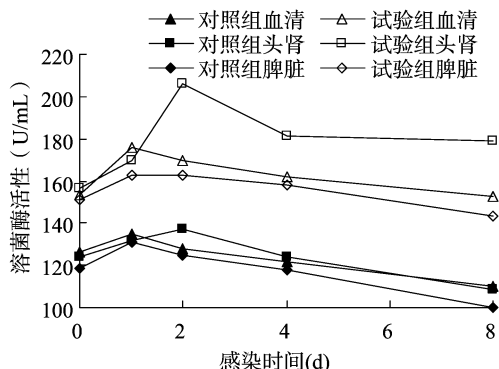


图3 注射副溶血性弧菌对中华倒刺鲃血清、头肾和脾脏溶菌酶活性的影响

染副溶血性弧菌后, 对照组头肾溶菌酶活性均无明显变化, 试验组头肾溶菌酶活性感染后 2 d 达到最高值, 与攻毒前相比差异极显著 ($P < 0.01$), 之后略有降低, 至感染后 8 d 与攻毒前相比差异不显著, 但仍极显著高于对照组攻毒前水平 ($P < 0.01$)。对照组血清和脾脏的溶菌酶活性前 4 d 无明显变化, 感染后 8 d 时明显降低, 与攻毒前相比差异显著或极显著。试验组血清和脾脏的溶菌酶活性均无明显变化, 但感染后 8 d 时的溶菌酶活性仍显著高于对照组攻毒前水平 ($P < 0.05$)。

3 讨论

非特异性免疫系统是鱼类抵御病原体、处理外来物质的第一道防线^[11]。吞噬细胞 (巨噬细胞、粒细胞和单核细胞) 是鱼类非特异性免疫反应的关键成分, 存在于免疫器官和组织、血液及淋巴液中。血液白细胞中的单核细胞和粒细胞具有较强的吞噬功能, 当病原体进入机体时, 它们聚集在感染区, 包围并吞噬病原体。单核细胞渗出血管进入组织器官, 形成巨噬细胞, 则吞噬功能大大增强。本研究通过在饲料中添加免疫多糖来投喂中华倒刺鲃, 发现其白细胞总数和吞噬功能均大大增加, 显著或极显著高于对照组。证明通过测定鱼类血液白细胞的数量及其吞噬功能可以反映鱼类机体的免疫状态。

溶菌酶也属于非特异性免疫系统^[12], 是一种存在于许多鱼类的体表黏液、肠道黏液、血清、巨噬细胞、免疫组织和其他组织中的一种水解酶^[13-15], 专门作用于细菌细胞壁, 主要针对革兰氏阳性菌发挥作用。溶菌酶的活性是决定吞噬细胞对所吞噬的致病菌能否被杀灭的物质基础之一。本研究结果显示, 在饲料中添加免疫多糖来投喂中华倒刺鲃能显著增强血清、头肾和脾脏中溶菌酶活性。这证实了 Marja 等的结果, 即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, 二者呈正相关^[16], 同时也说明测定动物溶菌酶活性在一定程度上能反映动物非特异性免疫状态。

免疫增强剂的主要功能是促进吞噬细胞的功能并增加其杀菌活性, 通过增强非特异性防御机制来抵抗传染性疾病^[17-19]。使用免疫增强剂 β -葡聚糖能增强鱼类对病原体的抵抗力和非特异性免疫反应^[20-22]; 但是免疫效应却因 β -葡聚糖的添加方式、添加剂量和添加时间的不同而不同。一般注射方式比投喂方式更快发挥作用 (小于 1 周)^[23]。采用投喂的方式, Misra 等报道 β -葡聚糖添加剂量 250 mg/kg 于投喂的第 42 天各项免疫指标达最高水平^[24], Welker 等却认为 2 周即达到效果, 时间长了反而产生免疫抑制^[25]。因为高浓度和长时间 (通常大于 4 周) 的投喂会引起吞噬细胞上葡聚糖受体出现“超负荷”, 从而降低其吞噬细菌的能力^[26]。本研究通过在饲料中添加一定量的免疫多糖来投喂中华倒刺鲃, 结果显示免疫多糖对中华倒刺鲃生长具有促进作用, 对各项免疫指标也有明显的增强作用。在第 2 周末取样, 添加免疫多糖 2、4、8 g/kg 各项免疫指标均显著或极显著地高于对照组, 且随浓度的增加而增加; 第 4 周末取样时, 虽各试验组各项免疫指标仍是显著或极显著地高于对照组, 但添加免疫多糖 8 g/kg 组的各项免疫指标已不再增加甚至显著降低。试验结果表明, 在高浓度和长时间投喂时, 吞噬细胞上的葡聚

糖受体确实存在“超负荷”现象,并由此而造成其免疫指标的降低。因此,免疫多糖的添加浓度为 4 g/kg、添加时间为 2 周对提高中华倒刺鲃的非特异性免疫功能是最经济和有效的。

在投喂添加免疫多糖 4 g/kg 的饲料 2 周后人工感染副溶血性弧菌,并于感染后的不同时间取样测定。结果表明,试验组的各项免疫指标均高于对应的对照组,且无论对照组还是试验组各项免疫指标在感染后大致呈现出先升后降的趋势,并在感染后 8 d 降至最低点。此时,对照组各指标多明显低于感染前水平,试验组各指标大多保持不变或即使低于感染前水平,但也常常是显著高于对照组感染前水平。也就是说,投喂添加了免疫多糖的饲料后,鱼类即使感染了副溶血性弧菌,其各项免疫指标仍保持接近甚至高于正常水平(对照组感染前水平),因而具有正常的免疫反应。这些结果与 Das 等的试验结果^[7,27-28]是一致的,证明了 β -葡聚糖能提高感染鱼类的存活率,同时表明免疫多糖对鱼类具有免疫保护作用,它使鱼类在感染病原菌后一定时间范围内,能保持较高的免疫活性,从而增强生存能力,为防病治病提供保障。

参考文献:

- [1] 王桂芹,周洪棋. 鱼类免疫增强剂的研究现状[J]. 吉林农业大学学报,2005,27(3):344-349.
- [2] 李桂峰,康裕财,孙际佳,等. 酵母多糖对赤眼鲈非特异性免疫功能的影响[J]. 中山大学学报:自然科学版,2003,42(4):55-58.
- [3] 王 军,鄢庆枇,苏永全,等. 免疫添加物对大黄鱼血液白细胞数量及其吞噬功能的影响[J]. 海洋科学,2001,25(9):44-46.
- [4] 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.
- [5] Kudrenko B, Snape N, Barnes A C. Linear and branched $\beta(1-3)$ D-glucans activate but do not prime teleost macrophages *in vitro* and are inactivated by dilute acid: implications for dietary immunostimulation[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(3):443-450.
- [6] Raa J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds [R/OL]. [12-11-01]. http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/V/archivos/raa.pdf.
- [7] Das B K, Debnath C, Patnaik P, et al. Effect of β -glucan on immunity and survival of early stage of *Anabas testudineus* (Bloch) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(6):678-683.
- [8] Hutchinson T H, Manning M J. Seasonal trends in serum lysozyme activity and total protein concentration in dab (*Limanda limanda* L.) sampled from Lyme Bay, U. K [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1996, 6(7):473-482.
- [9] Chen H, Mai K S, Zhang W B, et al. Effects of dietary pyridoxine on immune responses in abalone, *Haliotis discus hannai* Ino [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 19(3):241-252.
- [10] 李建武,萧 能,余瑞元,等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:北京大学出版社,1994:318-323.
- [11] Whyte S K. The innate immune response of finfish—a review of current knowledge [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(6):1127-1151.
- [12] Roed K H, Fevolden S E, Fjalestad K T. Disease resistance and immune characteristics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

- selected for lysozyme activity [J]. Aquaculture, 2002, 209(1/2/3/4):91-101.
- [13] 李 凌,吴灶和. 鱼类体液免疫研究进展[J]. 海洋科学,2001,25(11):20-22.
- [14] Balfry S K, Iwama G K. Observations on the inherent variability of measuring lysozyme activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 2004, 138(3):207-211.
- [15] 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(2):121-125.
- [16] Muona M, Soivio A. Changes in plasma lysozyme and blood leucocyte levels of hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and sea trout (*Salmo trutta* L.) during parr-smolt transformation [J]. Aquaculture, 1992, 106(1):75-87.
- [17] 杨 兵,夏先林,施晓丽,等. 熟地黄多糖对断奶仔猪抗氧化性能和免疫性能的影响[J]. 江苏农业学报,2012,28(4):787-791.
- [18] Sakai M. Current research status of fish immunostimulants [J]. Aquaculture, 1999, 172(1/2):63-92.
- [19] 徐玉凤,刘家国,王德云,等. 芪蓝抗毒饮及其组分对鸡外周血淋巴细胞增殖的影响[J]. 江苏农业学报,2011,27(2):445-447.
- [20] Rodríguez I, Chamorro R, Novoa B, et al. β -glucan administration enhances disease resistance and some innate immune responses in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2):369-373.
- [21] 张耀武,屈文俊,李文辉. $\beta(1,3)$ -葡聚糖对锦鲤非特异性免疫功能的影响[J]. 淡水渔业,2006,36(4):53-55.
- [22] 许国焕,吴月嫦,何四旺,等. 微生物多糖对罗非鱼生长及非特异免疫功能的影响[J]. 水利渔业,2004,24(1):52-53,67.
- [23] Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 19(4):293-306.
- [24] Misra C K, Das B K, Mukherjee S C, et al. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings [J]. Aquaculture, 2006, 255(1/2/3/4):82-94.
- [25] Welker T L, Lim C, Yildirim-Aksoy M, et al. Effect of short-term feeding duration of diets containing commercial whole-cell yeast or yeast subcomponents on immune function and disease resistance in channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 2012, 96(2):159-171.
- [26] Couso N, Castro R, Magarinos B, et al. Effect of oral administration of glucans on the resistance of gilthead seabream to pasteurellosis [J]. Aquaculture, 2003, 219(1/2/3/4):99-109.
- [27] 迟淑艳,周歧存,周健斌,等. β -葡聚糖对奥尼罗非鱼生长性能及抗嗜水气单胞菌感染的影响[J]. 中国水产科学,2006,13(5):767-774.
- [28] 罗 璋,姚 鹏,陈昌福,等. 酵母免疫多糖对受免疫斑点叉尾鲷免疫应答的增强作用[J]. 淡水渔业,2007,37(3):22-25.