

吴卫星,申亮,张秀文,等.复方中草药提取物对鲤鱼非特异性免疫及生长性能的影响[J].江苏农业科学,2014,42(8):236-238.

复方中草药提取物对鲤鱼非特异性免疫及生长性能的影响

吴卫星,申亮,张秀文,齐遵利

(河北农业大学海洋学院,河北秦皇岛 066003)

摘要:将黄芪多糖、人参茎叶总皂苷、绿原酸、生物碱和黄酮等 5 种中草药提取物按照一定的比例制成复方添加剂。将其以 0 (对照组)、0.1% (B1)、0.2% (B2)、0.3% (B3) 的比例加入到基础饲料中制成颗粒膨化饲料投喂鲤鱼,研究复方中草药提取物对鲤鱼非特异性免疫及生长性能的影响。结果表明,鲤鱼血清中的过氧化氢酶、溶菌酶和超氧化物歧化酶的活性均强于对照组,但是 B2 组的鲤鱼又显著强于其他 3 组;饲养后 42 d, B1 组和 B2 组鲤鱼体质量均高于对照组。

关键词:复方中草药;鲤鱼;非特异性免疫;生长性能

中图分类号: S942.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0236-03

近 20 年来,人们逐渐发现抗生素和激素这些添加剂的应用对水产养殖业发展起一定的促进作用,但同时也带来了不可避免的负面效应。抗生素的大量使用和滥用破坏了动物体内微生态的平衡,导致耐药菌株的产生,使动物免疫力下降^[1]。因此,世界上许多国家先后作出限用或禁用抗生素作饲料添加剂的决定,特别是欧盟已法定从 2000 年开始所有成员国全面禁止使用抗生素作饲料添加剂。2006 年,因滥用抗生素引起的“多宝鱼事件”给我国大菱鲆主要养殖区(山东、河北)造成了巨大的经济损失,严重影响了大菱鲆养殖业的健康快速发展。激素类的大量使用使动物体内的非特异性免疫能力下降^[2],所以天然的中草药添加剂引起了国内外的重视。

中草药饲料添加剂是以自然界中动物、植物等为原料加工而成的饲料添加剂,具有高效、低毒、低残留等优点^[3]。但是,传统的中草药添加剂往往是将中草药粉碎后直接添加到饲料中进行投喂的,存在药效慢、添加量大、适口性差、成本高等缺点。为了保证中草药添加剂的效果,本试验采用高浓度中草药和纯中草药提取物进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验用鱼 试验鱼为天津市换新水产良种场培育的健康鲤鱼,规格约 150 g/尾。鲤鱼采购后,先用 5% 食盐水浸泡 20 min 消毒,然后放入暂养池内驯化 2 周。暂养期间,投喂饲料为基础饲料,以鲤鱼出现有规律摄食为驯化指标。

1.1.2 试验药品 试验药品成分为黄芪多糖、人参茎叶总皂

苷、绿原酸、生物碱和黄酮,均购自河北征宇制药有限公司。

1.2 方法

1.2.1 试验设计与管理 将各试验药品根据中草药药理及相互配伍原则配制,分别以 0 (对照)、0.1% (B1)、0.2% (B2)、0.3% (B3) 的比例加入到基础饲料中,每组 3 个平行,每个平行放置 25 尾试验鱼,分别随机放入 12 个网箱内。每天 08:00、12:00 和 16:00 定时投喂,每天的投喂量约为体质量的 3%,隔天 09:00 清池换水 1/4,全天充氧,水温控制在 25 ℃ 左右。

1.2.2 生长指标的测定 喂养 42 d 后,每组捞取 25 尾鱼称重,计算各组鱼的相对增重率和成活率。每天检查草鱼的发病或死亡情况,做好记录,最后统计各组的成活率。饲料系数 (CF) = 饲料消耗量/增加的质量;相对增重率 = (末尾平均体质量 - 初尾平均体质量)/初尾平均体质量 × 100%;成活率 = 试验末鱼总数/试验初鱼总数 × 100%。

1.2.3 生化指标的测定

1.2.3.1 血清的采集及制备 分别在试验后 14、28、42 d 时,从每个试验处理组随机取 2 尾鱼,用盛有肝素钠的一次性注射器采血 2 mL,立即轻轻摇匀,使血液抗凝,置于 4 ℃ 冰箱内保存。

1.2.3.2 超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定 采用南京建成生物工程研究中心生产的 SOD 试剂盒测定。原理:SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法测定,通过黄嘌呤及其氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基,后者氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂的作用下呈紫红色,用可见分光光度计测定其吸光度;当样品中含有 SOD 时,则因对超氧阴离子自由基专一性的抑制作用使形成的亚硝酸盐减少,比色时测定管的吸光度低于对照管。定义:1 mL 反应液中 SOD 抑制率达到 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个活性单位(U)。

1.2.3.3 溶菌酶(LSZ)活性的测定 采用南京建成生物工程研究中心生产的溶菌酶试剂盒测定。原理:在一定浓度的混浊菌液中,由于溶菌酶能水解细菌细胞壁上肽聚糖而使细菌裂解浓度降低,透光度增强,因此根据透光度变化来推测溶

收稿日期:2014-01-07

作者简介:吴卫星(1987—),男,浙江杭州人,硕士,从事水产动物营养与饲料方面研究工作。E-mail:wwxing311@163.com。

通信作者:齐遵利,硕士,教授,硕士生导师,从事水产动物营养与饲料和水产动物遗传及育种研究。Tel:(0335)3150025;E-mail:qz2421@163.com。

菌酶的活性。定义:在温度为 37 ℃、波长为 530 nm 下,1 min 内引起吸光度下降 0.001 为 1 个活性单位。

1.2.3.4 过氧化氢酶(CAT)活性的测定 采用南京建成生物工程研究中心生产的过氧化氢酶试剂盒测定。原理:CAT 分解 H₂O₂ 的反应可通过钼酸铵而迅速中止,剩余的 H₂O₂ 与钼酸铵作用产生一种淡黄色的络合物,通过测定其生成量可计算出 CAT 的活性。定义:1 mL 血清或血浆 1 s 分解 1 μmol 的 H₂O₂ 的量为 1 个活力单位(U)。

1.2.3.5 酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)活性的测定 采用南京建成生物工程研究中心生产的酸性磷酸酶和碱性磷酸酶试剂盒测定。原理:酸性磷酸酶或者碱性磷酸酶在分解产生磷酸苯二钠的同时产生游离酚和磷酸,酚在碱性溶液中与 4-氨基安替吡啉作用经铁氰化钾氧化生成红色醌衍生物,根据红色深浅可以测定 ACP、AKP 的活性。ACP 活性单位的定义:100 mL 血清在 37 ℃与基质作用 30 min 时产生 1 mg 酚为 1 个金式单位。AKP 活性单位的定义:100 mL 血清在 37 ℃与基质作用 15 min 时产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位。

1.2.3.6 谷草转氨酶(GOT)活性的测定 采用南京建成生

物工程研究中心生产的 GOT 试剂盒测定。GOT 能使 α-酮戊二酸和天门冬氨酸转移置换氨基和丙酮,生成谷氨酸和草酰乙酸。草酰乙酸在反应过程中自行脱羧成丙酮酸。丙酮酸与 2,4-二硝基苯胍作用产生 2,4-二硝基苯腙,在碱性环境中显棕色,比色后可得出其活性。定义:1 mL 血清,反应液总容量 3 mL,340 nm 波长,1 cm 光径,25 ℃,1 min 内所生成的丙酮酸,将 NaOH 氧化成 Na⁺而引起吸光度每下降 0.001 为 1 个卡门氏单位。

1.3 数据处理
用 SPSS 19.0 进行数据处理,采用一般线性模型进行比较以及单因素方差分析,显著水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 复方中草药添加剂对鲤鱼生长性能的影响

由表 1 可知,6 周后添加复方中草药的饲料能使鲤鱼的生长性能有所增强。但是,B1 组的增重效果与 B3 组差异不显著;B2 组的增重率显著高于其他 3 组($P < 0.05$),但其饲料系数显著低于其他 3 组($P < 0.05$)。

表 1 复方中草药添加剂对鲤鱼生长性能和成活率的影响

组别	初始平均体质量 (g/尾)	终平均体质量 (g/尾)	增重率 (%)	饲料系数	成活率 (%)
对照组	151.74 ± 9.26	205.83 ± 8.89a	36.10 ± 10.48a	2.22 ± 0.12a	100
B1	157.99 ± 6.96	217.68 ± 9.01a	38.11 ± 10.40a	2.11 ± 0.31a	100
B2	155.11 ± 10.91	248.86 ± 10.86b	61.23 ± 14.66b	1.62 ± 0.24b	100
B3	157.64 ± 9.91	221.75 ± 9.95b	39.20 ± 8.43a	2.05 ± 0.16a	100

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。表 2、表 3 同。

2.2 复方中草药添加剂对鲤鱼非特异性免疫性能的影响

2.2.1 SOD 由表 2 可知,用药后 14 d,鲤鱼用药组各项指标均显著高于对照组($P < 0.05$),B1 组显著高于其他 3 组($P < 0.05$)。药后 28 d,B1 组、B2 组显著高于对照组和 B3

组($P < 0.05$),但是 B1 组和 B2 组之间差异不显著。药后 42 d,用药组各项指标显著高于对照组($P < 0.05$),且 B2 组极显著高于其他 3 组。

表 2 复方中草药添加剂对鲤鱼 SOD、LSZ、CAT 活性的影响

组别	SOD 活性(U/mL)			LSZ 活性(U/mL)		
	14 d	28 d	42 d	14 d	28 d	42 d
对照组	92.83 ± 2.73b	125.34 ± 5.01c	138.07 ± 2.66c	50.15 ± 7.29c	64.20 ± 4.57c	85.39 ± 4.20c
B1	154.74 ± 3.68a	181.07 ± 1.52a	221.02 ± 3.45b	118.24 ± 15.36a	129.57 ± 9.12b	263.34 ± 11.28b
B2	123.49 ± 3.26c	179.41 ± 4.21a	266.49 ± 5.07a	106.16 ± 5.65ab	186.12 ± 6.10a	318.16 ± 12.20a
B3	102.99 ± 2.55d	165.72 ± 2.80b	205.01 ± 4.57b	99.93 ± 9.11b	145.86 ± 5.73b	263.42 ± 14.33b

组别	CAT 活性(U/mL)		
	14 d	28 d	42 d
对照组	2.14 ± 0.13a	2.26 ± 0.06b	2.61 ± 0.10c
B1	2.09 ± 0.14a	3.70 ± 0.57a	4.52 ± 0.31b
B2	2.15 ± 0.32a	3.88 ± 0.51a	5.34 ± 0.40a
B3	2.16 ± 0.12a	3.84 ± 0.55a	4.65 ± 0.0.27b

2.2.2 LSZ 由表 2 可知,用药组各项指标均显著强于对照组($P < 0.05$)。药后 14 d,B1 组显著强于其他 2 个用药组($P < 0.05$)。药后 28、42 d,B2 组鲤鱼中 LSZ 活性均显著强于其他 2 个用药组($P < 0.05$)。药后 42 d,B1 组和 B3 组差异不显著;B2 组最强,为 318.16 U/mL。

2.2.3 CAT 由表 2 可知,药后 14 d,各组中的 CAT 活性变化均不显著;药后 28 d,用药组均显著强于对照组($P < 0.05$),但

是 B2 组和 B3 组差异不明显;药后 42 d 时,B2 组 CAT 活性达到 5.34 U/mL,且均显著强于其他 3 组($P < 0.05$)。

2.2.4 ACP 和 AKP 由表 3 可知,对照组和 B3 组鲤鱼的 ACP 活性随着时间的推移有所增强,但是 B3 组在药后 28、42 d 增强的差异不显著。B1 组、B2 组随着时间推移先增强再减弱,但是减弱的差异不显著。药后 14 d,各组 ACP 活性差异均不显著;药后 28 d,B1 组和 B2 组的 ACP 活性显著强于对照组

和 B3 组;药后 42 d,对照组的 ACP 活性最强,但是各组差异不显著(除 B3 组与对照组、B1 组)。AKP 活性变化趋势和

ACP 活性相似,但是在药后 42 d 时 B1 组最强,与 B2 组差异不显著,但是与对照组和 B3 组差异显著($P<0.05$)。

表 3 复方中草药添加剂对鲤鱼 ACP 和 AKP 活性的影响

组别	ACP 的活性(金氏单位/100 mL)			AKP 的活性(金氏单位/100 mL)		
	14 d	28 d	42 d	14 d	28 d	42 d
对照组	7.47 ± 0.66a	8.01 ± 0.11b	8.80 ± 0.98c	4.83 ± 0.46a	6.47 ± 0.40b	6.68 ± 0.41c
B1	7.46 ± 0.17a	8.80 ± 0.44c	8.67 ± 0.76c	3.84 ± 0.26c	6.80 ± 1.19b	7.77 ± 0.39a
B2	7.33 ± 0.37a	8.66 ± 0.90c	8.35 ± 0.69bc	4.38 ± 1.58b	7.13 ± 0.16a	7.34 ± 0.42a
B3	7.45 ± 0.51a	8.10 ± 0.60b	8.18 ± 0.26b	4.59 ± 0.22ab	7.12 ± 0.26c	6.67 ± 0.47c

注:ACP、AKP 活性等指标的所有数据后的不同字母均表示差异显著($P<0.05$)。

2.2.5 鲤鱼 GOT 活性变化趋势 由表 4 看出,所有组的 GOT 活性随着时间的延长先减弱再增强。药后 14 d,B3 组的 GOT 活性显著强于其他 3 组($P<0.05$);药后 28 d,B2 组显著强于其他 3 组($P<0.05$);药后 42 d,各组差异不显著。

表 4 复方中草药添加剂对鲤鱼 GOT 的影响

组别	GOT 的活性(卡门氏单位)		
	14 d	28 d	42 d
对照组	57.59 ± 2.45a	51.39 ± 4.34a	56.71 ± 1.05a
B1	59.58 ± 4.55a	52.45 ± 2.31a	58.36 ± 1.98a
B2	59.19 ± 3.53a	56.25 ± 7.85b	58.79 ± 8.50a
B3	62.61 ± 6.56b	52.58 ± 2.55a	53.72 ± 6.67a

3 结论与讨论

3.1 复方中草药添加剂对鲤鱼生长性能的影响

本试验是按照医学配伍的原则将黄芪多糖、人参茎叶总皂苷、绿原酸、生物碱和黄酮等 5 种中草药提取物按照一定比例配制的。结果表明,复方中草药添加剂能够提高试验组鲤鱼增重率,降低饲料系数,其中 B2 组效果较明显,这一结果和许多学者的试验结果一致。例如,齐遵利等发现,在饲料中添加黄芪、黄芩、大黄、大蒜能促进草鱼的生长,降低饲料系数^[4];阮国良等发现,五加皮、黄芪、茯苓及这 3 种中药的混合物均对黄鳝的增重有显著的促进作用,且五加皮对黄鳝的增重最明显^[5];童圣英等发现,山奈(沙姜、山辣)中含有大量的有机酸,对皱纹盘鲍具有明显的诱食作用^[6];曾虹等在鲤鱼饵料中添加 11 mg/kg 大蒜素,结果发现其可显著提高鲤鱼成活率 2.6%、增重率 14.3%,同时还能提高饲料转化率 11%^[7]。

3.2 复方中草药添加剂对鲤鱼非特异性免疫的影响

本试验发现,在基础饲料中添加不同剂量的复方中草药提取物能提高草鱼的免疫力和抗病力,表现为血清中 CAT、LSZ、SOD 活性均显著高于对照组。各组的辅助免疫指标 ACP、AKP、GOT 活性差异不大,说明试验采样的动物基本生理指标差异不大,没有在得病时被随机取样。蔡中华等用中药大黄、黄连、花粉、无花果 4 种中草药喂养鲤鱼,结果发现,鱼体免疫器官质量增加,溶菌物质的溶菌活性及吞噬能力增强,鱼体特异性免疫能力显著提高^[8]。崔青曼等用海藻多糖、大黄、黄芪、连翘等喂养河蟹,通过检测河蟹的血细胞吞噬活性、血清凝集效价及血清杀菌活性等免疫学指标后证实,该添加剂可显著提高河蟹机体的免疫功能^[9]。Sun 等研究了黄

芪多糖对仿刺参免疫的影响,结果发现,黄芪多糖能促进仿刺参体腔细胞的吞噬能力^[10]。Ying 等确认了黄芪和灵芝能提高鲤鱼白细胞吞噬活性和血清溶菌活性^[11]。李超等将黄芪、大蒜、菊花、山楂和板蓝根 5 味中草药等比的水提取物分别按质量分数 1%、2%、4%、8% 的比例添加到基础饲料中饲喂草鱼,结果显示,各组草鱼的 LSZ、SOD 活性均极显著增强了^[12]。

综合复方中草药添加剂对鲤鱼生长性能和非特异性免疫指标的综合比较得出,B2 组鲤鱼生长和非特异免疫性能均显著强于其他 3 组。因此,在基础饲料中添加 0.2% 复方中草药添加剂效果最佳。

参考文献:

[1] 邱楚武. 抗菌素的合理选用[J]. 中国饲料,1998(4):42-44.
[2] 赵振山,高贵琴. 鱼类必需脂肪酸营养研究进展[J]. 饲料研究,1996(12):12-15.
[3] 谢仲权,牛树琦. 天然植物饲料添加剂生产技术与质量标准[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2004:23-28.
[4] 齐遵利,张秀文,孙步太,等. 复方中草药饲料添加剂对草鱼生长性能和免疫保护力的影响[J]. 科学养鱼,2009(12):64-66.
[5] 阮国良,杨代勤,王金龙. 几种中草药饲料添加剂对黄鳝免疫功能和生活性能的影响[J]. 饲料工业,2005,26(24):34-36.
[6] 童圣英,赵艳,李宏,等. 几种常用中草药对皱纹盘鲍摄食行为的影响[J]. 大连水产学院学报,1998,12(4):73-76.
[7] 曾虹,任泽林,郭庆. 大蒜素在罗非鱼饲料中的应用[J]. 中国饲料,1996(21):29-30.
[8] 蔡中华,陈成勋,邢克智,等. 四种中药对鲤鱼非特异性免疫功能的影响[J]. 天津农学院学报,1998,5(2):31-34.
[9] 崔青曼,张耀红,袁春营. 中草药、多糖复方添加剂提高河蟹机体免疫力的研究[J]. 水利渔业,2001,21(4):40-41.
[10] Sun Y X, Jin L J, Wang T T, et al. Polysaccharides from *Astragalus membranaceus* promote phagocytosis and superoxide anion (O₂⁻) production by coelomocytes from sea cucumber *Apostichopus japonicus* in vitro[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2008, 147(3):293-298.
[11] Ying J, Aardo L, Thompson K D, et al. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immuneresponse of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2009, 26(1):140-145.
[12] 李超,张其中,杨莹莹,等. 不同剂量复方中草药免疫增强剂对草鱼生长性能和免疫功能的影响[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(4):534-540.