

孙学亮, 孙朦朦, 季延斌, 等. 生芪、连翘对中华绒螯蟹生长及健康指标的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 224–226.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2015.01.077

生芪、连翘对中华绒螯蟹生长及健康指标的影响

孙学亮, 孙朦朦, 季延斌, 孙金辉, 王庆奎, 陈成勋

(天津农学院水产科学系/天津市水产生态及养殖重点实验室, 天津 330384)

摘要:使用生芪、连翘与普通河蟹饲料混合制成中草药饲料, 分组饲喂, 分别在试验开始后第 2 周、第 4 周取样, 测定试验组血清中与机体非特异免疫相关的重要酶类活性指标的免疫保护率。结果表明, 在饲料中添加生芪、连翘均对河蟹体内的健康指标产生了影响, 生芪、连翘对 SOD、CAT 活力表现为促进作用, 同时 NO、MDA 含量降低, 所有单方 1.0% 浓度效果均优于 0.5% 浓度, 说明使用效果随着单方浓度的增加而增强。

关键词:中华绒螯蟹; 生芪; 连翘

中图分类号: S917.4; S963.73⁺6

文献标志码: A

文章编号: 1002–1302(2015)01–0224–03

河蟹学名中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis* H. Milne – Edward), 别称河蟹、毛蟹、湖蟹、螃蟹、大闸蟹、清水蟹等, 隶属于节肢动物门 (Arthropoda) 甲壳纲 (Crustacea) 软甲亚纲 (Malacostraca) 十足目 (Decapoda) 爬行亚目 (Reptantia) 方蟹科 (Grapsidae) 绒螯蟹属 (*Eriocheir*)^[1]。河蟹具有生长速度快、肉质细嫩、味道鲜美、经济价值高等优点, 近年来, 我国河蟹养殖业发展迅速, 河蟹养殖业已成为我国的特色产业^[2]。我国有 5 000 多种中药资源可供开发利用。中草药大多含有丰富的蛋白质、纤维素、微量元素、矿物质、未知生长因子及各类生物活性物质, 具有增进机体新陈代谢、促进蛋白质及酶的合成、增强水产动物免疫功能等作用^[3]。中草药作为混饲剂或饲料添加剂能够满足当前水产养殖业集约化、规模化生产的需要, 应用中草药防治水产动物疾病完全符合发展无公害水产产业、生产绿色水产品的病害防治准则^[4–5]。本试验使用生芪、连翘与普通河蟹饲料混合制成中草药饲料, 分组饲喂, 测定试验组血清中与机体非特异免疫相关的重要酶类活性指标的免疫保护率, 探讨中草药添加剂对于提高河蟹非特异免疫力的效果, 旨在为推广中草药免疫增强剂提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验饲料 202 型河蟹专用商品饲料 (浙江欣欣饲料股份有限公司嘉兴大桥分公司) 粗蛋白质含量 $\geq 34.0\%$, 粗脂肪含量 $\geq 3.0\%$, 钙含量 $1.0\% \sim 3.0\%$, 总磷含量 $\geq 1.0\%$, 将其粉碎后过 80 目筛, 取细粉备用。将中草药生芪、连翘 (均购于安徽新兴中药饮片有限公司) 用高速药材调料粉碎机粉碎后过 80 目筛, 取细粉备用。将 3 种中草药的细粉分别

按 0.5%、1.0% 2 个浓度梯度采用逐级混匀方法均匀混入上述已粉碎好的商品饲料中, 制型后备用。

1.1.2 试验用蟹 试验用幼蟹取自天津市宁河县七里海河蟹种业基地, 平均体质量为 (0.35 ± 0.02) g。

1.2 方法

1.2.1 试验设计及日常管理 河蟹在箱内暂养, 投喂未添加中药的饲料, 箱中放入石块提供攀爬与躲避场所。驯化 7 ~ 10 d 后, 待河蟹摄食正常后开始试验。试验按投喂饲料中含中草药种类、剂量不同分为对照组、生芪组 ($I_{0.5}$ 、 $I_{1.0}$)、连翘组 ($II_{0.5}$ 、 $II_{1.0}$), 每组设 2 个平行, 每箱 100 只河蟹。试验期间每天投喂试验饵料 2 次, 每次投喂量为河蟹体质量的 3% ~ 5%, 08:30 投喂量占每天总投喂量的 40% ~ 50%, 16:30 投喂量占每天总投喂量的 50% ~ 60%, 视河蟹吃食情况适当增减, 及时清除残留的饲料、幼蟹蜕皮物及死亡的幼蟹。每天 15:00 换 1 次曝气 1 d 的自来水, 每次换水量为箱中水量的 1/3 ~ 1/2 (视水质情况而定), 养殖过程中保持连续充气, 水温控制在 24 ~ 28 ℃。试验期内不施用任何药物, 保证试验结果不发生偏差。试验周期为 30 d, 分别在试验期内第 2 周、第 4 周进行采样, 采样时每箱随机抽取 30 只河蟹。

1.2.2 样品制备 由于幼蟹个体小, 去外壳易黏连内脏组织, 对数据产生影响, 幼蟹外壳主要成分是 $CaCO_3$, 所以将蟹体整体磨碎制作组织匀浆。将蟹用蒸馏水漂洗 2 次, 捞出并滤干, 放在 0 ℃ 含冰水的解剖盘内, 逐个沿基部剪去蟹体所有步足, 放入封口袋中并标记, 贮存于 -20 ℃ 冰箱中, 进行组织匀浆之前, 取蟹体在冷生理盐水中漂洗, 滤纸拭干, 称质量, 均匀平铺在冰浴的 5 mL 小烧杯内, 蟹体之间尽量不堆叠。用移液管量取 0.86% 冷生理盐水。先向烧杯中加入可以淹没小蟹的生理盐水量, 再用干净已消毒的眼科小剪尽快剪碎组织块, 最后用余下的生理盐水分 2 次冲洗剪刀, 以保证剪刀上无残留。将组织移入 1 mL Eppendorf 管中, 标号, 用 SCIENTZ-192 高通量组织研磨器充分匀浆, 制成 10% 组织匀浆, 取适量组织匀浆制作涂片 (直接涂片、染色均可以), 显微镜下观察细胞是否磨破, 若没有破则可延长匀浆时间或增加冻溶次数 (此步可省略)。用 5840R 高速冷冻离心机 15 000 r/min 4 ℃ 离心 30 min, 吸取上清液置于 1 mL Eppendorf 管中, 标号。将

收稿日期: 2014–02–24

基金项目: 国家星火计划 (编号: 2013GA610002); 天津市高等学校科技发展基金 (编号: 20110621); 天津市农业科技成果转化与推广项目 (编号: 201101050)。

作者简介: 孙学亮 (1984—), 男, 硕士, 从事水产养殖研究。E-mail: sunxueliang1234@aliyun.com.cn。

通信作者: 陈成勋, 从事水产养殖研究。E-mail: ccxny@163.com。

所得上清液在同样的条件下再离心 1 次,吸出上清液置于 1 mL Eppendorf 管中,根据试验需要,取适量上清液进行测定,并于 24 h 内分析完毕。

1.3 抗氧化指标的测定

试验中各组织总超氧化物歧化酶(T-SOD)含量、过氧化氢酶(CAT)含量、丙二醛(MDA)含量、NO 含量等指标均采用南京建成生物工程技术研究所提供的试剂盒测定。

1.4 数据处理

采用“平均值±标准误”表示数据,采用 SPSS 18.0 软件中的单因素方差分析数据。

2 结果与分析

2.1 生芪对河蟹体内超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

由表 1 可知,第 2 周 I_{1.0}组与 I_{0.5}组河蟹体内 SOD 活性差异不显著, I_{0.5}组河蟹体内 SOD 活性与对照组相比差异不显著, I_{1.0}组河蟹体内 SOD 活性显著高于对照组($P<0.05$)。第 4 周 3 组之间河蟹体内 SOD 活性均无显著差异, I_{1.0}组活性最大,对照组活力最小。

表 1 生芪对河蟹体内 SOD 活性的影响

处理	SOD 活性(U/mg)	
	第 2 周	第 4 周
对照组	86.49 ± 1.75b	103.19 ± 1.75a
I _{0.5} 组	94.74 ± 3.32ab	108.44 ± 3.42a
I _{1.0} 组	98.67 ± 2.77a	110.02 ± 1.52a

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。表 2 至表 8 同。

2.2 连翘对河蟹体内超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

由表 2 可知,第 2 周 II_{0.5}组河蟹体内 SOD 活性与对照组相比差异显著($P<0.05$), II_{1.0}组与对照组差异不显著, II_{0.5}组与 II_{1.0}组差异不显著。II_{1.0}组 SOD 活性最大, II_{0.5}组次之,对照组最小。第 4 周 II_{1.0}组河蟹体内 SOD 活性与对照差异不显著, II_{0.5}组与对照差异显著($P<0.05$), II_{0.5}组与 II_{1.0}组差异不显著, II_{1.0}组活性最大,对照组最小。

表 2 连翘对河蟹 SOD 活性的影响

处理	SOD 活性(U/mg)	
	第 2 周	第 4 周
对照组	86.49 ± 1.75b	103.19 ± 1.75b
II _{0.5} 组	93.42 ± 8.53a	108.11 ± 8.44a
II _{1.0} 组	99.33 ± 6.36ab	113.06 ± 6.27ab

2.3 生芪对河蟹体内过氧化氢酶(CAT)活性的影响

由表 3 可知,第 2 周 I_{0.5}组、I_{1.0}组河蟹体内 CAT 活性均显著高于对照组($P<0.05$), I_{0.5}组与 I_{1.0}组差异不显著($P>0.05$)。I_{1.0}组河蟹体内 CAT 活性最大, I_{0.5}组次之,对照组最小。第 4 周 I_{0.5}组、I_{1.0}组河蟹体内 CAT 活性均显著高于对照组($P<0.05$), I_{0.5}组与 I_{1.0}组无显著差异($P>0.05$)。I_{1.0}组河蟹体内 CAT 活性最大, I_{0.5}组次之,对照组最小。

2.4 连翘对河蟹体内过氧化氢酶(CAT)活性的影响

由表 4 可知,第 2 周 II_{0.5}组、II_{1.0}组河蟹体内 CAT 活性均显著高于对照组($P<0.05$), II_{0.5}组与 II_{1.0}组差异不显著

表 3 生芪对河蟹体内 CAT 活性的影响

处理	CAT 活性(U/mg)	
	第 2 周	第 4 周
对照组	10.11 ± 0.19b	12.45 ± 0.18b
I _{0.5} 组	10.58 ± 0.07a	12.97 ± 0.04a
I _{1.0} 组	10.62 ± 0.13a	13.04 ± 0.27a

($P>0.05$)。II_{0.5}组河蟹体内 CAT 活性最大, II_{0.5}组次之,对照组最低。第 4 周 II_{0.5}组、II_{1.0}组河蟹体内 CAT 活性均显著高于对照组($P<0.05$), II_{0.5}组与 II_{1.0}组无显著差异($P>0.05$)。II_{1.0}组河蟹体内 CAT 活性最大, II_{0.5}组次之,对照组最低。

表 4 连翘对河蟹体内 CAT 活力的影响

处理	CAT 活性(U/mg)	
	第 2 周	第 4 周
对照组	10.11 ± 0.19b	12.45 ± 0.19b
II _{0.5} 组	10.57 ± 0.06a	13.02 ± 0.09a
II _{1.0} 组	10.66 ± 0.15a	13.11 ± 0.35a

2.5 生芪对河蟹体内丙二醛(MDA)含量的影响

由表 5 可知,第 2 周 I_{0.5}组河蟹体内 MDA 含量显著低于对照组及 I_{1.0}组($P<0.05$),对照组与 I_{1.0}组之间无显著差异($P>0.05$)。第 4 周 I_{0.5}组河蟹体内 MDA 含量显著低于对照组、I_{1.0}组($P<0.05$),对照组与 I_{1.0}组无显著差异($P>0.05$)。对照组 MDA 含量最高, I_{0.5}组最低。

表 5 生芪对河蟹体内 MDA 含量的影响

处理	MDA 含量(nmol/mg)	
	第 2 周	第 4 周
对照组	2.26 ± 0.08b	1.55 ± 0.06b
I _{0.5} 组	2.02 ± 0.06a	1.35 ± 0.09a
I _{1.0} 组	2.21 ± 0.10b	1.52 ± 0.13b

2.6 连翘对河蟹体内丙二醛(MDA)含量的影响

由表 6 可知,第 2 周 II_{0.5}组河蟹体内 MDA 含量显著低于对照组、II_{1.0}组($P<0.05$),对照组与 II_{1.0}组之间无显著差异($P>0.05$)。对照组河蟹体内 MDA 含量最高, II_{0.5}组最低。第 4 周 II_{1.0}组河蟹体内 MDA 含量显著高于对照组、II_{0.5}组($P<0.05$),对照组与 II_{0.5}组无显著差异($P>0.05$)。II_{1.0}组河蟹体内 MDA 含量最高, II_{0.5}组最低。

表 6 连翘对河蟹体内 MDA 含量的影响

处理	MDA 含量(nmol/mg)	
	第 2 周	第 4 周
对照组	2.26 ± 0.08b	1.55 ± 0.06a
II _{0.5} 组	2.15 ± 0.07a	1.53 ± 0.06a
II _{1.0} 组	2.24 ± 0.11b	1.78 ± 0.10b

2.7 生芪对河蟹体内一氧化氮(NO)含量的影响

由表 7 可知,第 2 周 I_{0.5}组、I_{1.0}组河蟹体内 NO 含量均显著低于对照组($P<0.05$), I_{1.0}组河蟹体内 NO 含量虽低于 I_{0.5}组,但是二者间无显著差异($P>0.05$)。对照组河蟹体内 NO 含量最高, I_{0.5}组次之, I_{1.0}组最低。第 4 周 I_{0.5}组与

I_{1.0}组河蟹体内 NO 含量显著低于对照组($P<0.05$), I_{1.0}组河蟹体内 NO 含量虽低于 I_{0.5}组,但是二者间无显著差异($P>0.05$)。对照组 NO 含量最高, I_{0.5}组次之, I_{1.0}组最低。

表 7 生芪对河蟹体内 NO 含量的影响

处理	NO 含量(μmol/L)	
	第 2 周	第 4 周
对照组	6.97 ± 0.35b	9.70 ± 0.29b
I _{0.5} 组	3.51 ± 0.60a	4.79 ± 0.50a
I _{1.0} 组	2.62 ± 0.32a	4.33 ± 0.20a

2.8 连翘对河蟹体内一氧化氮(NO)含量的影响

由表 8 可知,第 2 周 II_{0.5}组河蟹体内 NO 含量与对照组、II_{1.0}组差异不显著($P>0.05$), II_{1.0}组 NO 含量显著低于对照组($P<0.05$),对照组 NO 含量最大, II_{0.5}组次之, II_{1.0}组最小。第 4 周 II_{1.0}组河蟹体内的 NO 含量与 II_{0.5}组差异不显著($P>0.05$), II_{0.5}组 NO 含量显著低于对照组($P<0.05$),对照组 NO 含量最大, II_{0.5}组次之, II_{1.0}组最低。

表 8 连翘对河蟹体内 NO 含量的影响

处理	NO 含量(μmol/L)	
	第 2 周	第 4 周
对照组	6.97 ± 0.35b	9.70 ± 0.29b
II _{0.5} 组	5.55 ± 0.46ab	7.83 ± 0.30a
II _{1.0} 组	4.62 ± 0.18a	7.05 ± 0.20a

3 结论与讨论

3.1 生芪、连翘对河蟹体内超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

SOD 具有抗菌、抗病毒等作用,可作为机体非特异性免疫指标来评判免疫刺激剂对机体非特异性免疫力的影响^[4-8]。过氧化氢酶是一种酶类清除剂,是以铁卟啉为辅基的结合酶。它可清除机体内的过氧化氢,使细胞免于遭受 H₂O₂ 的毒害,是生物防御体系的关键酶之一。本研究表明,生芪、连翘对中华绒螯蟹体内超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶活性(CAT)有促进作用,且与添加剂量、作用时间有关。李明等研究认为,中草药(黄芪、板蓝根、金银花、生石膏)对凡纳滨对虾血清中 SOD 活性有显著影响^[9]。李廷友等研究认为,在饲料中添加一定比例的枸杞、黄芪、茯苓等中药能大幅提高中华绒螯蟹、扣蟹体内 SOD 活性^[10]。杨柳认为,一定剂量的贯叶连翘能明显延长小鼠常压耐缺氧时间、增加 SOD 活力、CAT 活力^[11]。

3.2 生芪与连翘对河蟹体内丙二醛(MDA)含量的影响

MDA 含量能比较准确地反映机体内自由基的代谢情况及组织的氧化损伤情况,这对判断机体的健康状况以及免疫防御能力具有重要价值^[12]。本研究表明,投喂生芪 4 周后, I_{0.5}组、I_{1.0}组河蟹体内丙二醛(MDA)含量均较对照组有所降低。陈会良等在肉鸡饲料中添加中草药添加剂,发现鸡肉中 MDA 含量随之降低^[13]。陈雁南等认为,在肉鸡饲料中添加中草药添加剂能有效提高肉鸡抗氧化水平^[14]。与公衍玲等用中药提取物体外抗氧化活性研究得出的结论^[15]相同。

3.3 生芪与连翘对河蟹体内一氧化氮(NO)含量的影响

NO 起着信使分子的作用,也能在神经系统的细胞中发挥作用。免疫系统中,巨噬细胞产生的 NO 分子不仅能抗击侵入人体的细菌、病毒等微生物,而且还能够在一定程度上阻止癌细胞繁殖,阻止肿瘤细胞扩散等^[16-17]。本研究表明,投喂生芪 4 周后, I_{0.5}组、I_{1.0}组河蟹体内 NO 含量均显著低于对照组,说明生芪能降低河蟹体内 NO 含量。这与韩永禧等^[18]、杨长春等^[19]的研究结果一致。在饲料中添加生芪、连翘均对河蟹体内的健康指标产生了影响,生芪、连翘对 SOD、CAT 活力表现为促进作用。本试验中所有单方 1.0% 浓度效果均优于 0.5% 浓度,说明使用效果随着单方浓度的增加而增强。

参考文献:

[1] 王清印,李杰人,杨宁生. 中国水产生物种质资源与利用[M]. 北京:海洋出版社,2010:447.

[2] 朱清顺,苗玉霞. 河蟹规模养殖关键技术[M]. 南京:江苏科学技术出版社,2002.

[3] 王道尊,刘永发,徐寿山,等. 渔用饲料实用手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,2004:158-159.

[4] 林 林,丁美丽,孙舰军,等. 有机污染提高对虾病原菌易感性研究[J]. 海洋学报,1998,20(1):90-93.

[5] 丁美丽,林 林,李光友,等. 有机污染对中国对虾体内外环境影响的研究[J]. 海洋与湖沼,1997,28(1):7-12.

[6] 王 雷,李光友,毛远兴,等. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J]. 海洋与湖沼,1994,25(5):486-492.

[7] 王雷军,丁美丽. 氮氮对中国对虾抗病力的影响[J]. 海洋与湖沼,1999,30(3):267-272.

[8] 李光友. 中国对虾疾病与免疫机制[J]. 海洋科学,1995(4):1-3.

[9] 李 明,董晓慧. 复合中草药制剂对凡纳滨对虾生长和免疫指标的影响[J]. 淡水渔业,2008,38(6):68-72.

[10] 李廷友,谢 标,陆 波,等. 中药添加剂对中华绒螯蟹扣蟹非特异性免疫力影响的研究[J]. 淡水渔业,2005,35(增刊):174.

[11] 杨 柳. 贯叶连翘耐缺氧及抗氧化作用的实验研究[J]. 临床合理用药杂志,2010,3(22):4-5.

[12] 陈大刚,焦 燕. 中日海洋鱼类与分布的比较研究[J]. 青岛海洋大学学报,1997,27(3):39-46.

[13] 陈会良,蔡汉乔. 中草药添加剂对肉鸡抗氧化能力和红细胞免疫功能的影响[J]. 中国饲料,2006(3):17-18,25.

[14] 陈雁南,罗有文,顾莞婷,等. 中草药对肉鸡生产性能、免疫指标及抗氧化功能的影响[J]. 家畜生态学报,2008,29(4):61-64.

[15] 公衍玲,金 宏,玄光善. 7 种中药水提物体外抗氧化活性研究[J]. 医药导报,2010,29(7):863-865.

[16] Tafalla C, Figures A, Nora B. Role of nitric oxide on the replication of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1999, 72: 249-256.

[17] Kong L, Kong M M. Research development of ntric oxide and virus infection[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2003, 24(1): 23-25.

[18] 韩永禧,杨 军. 黄芪对博莱霉素肺纤维化大鼠血清 NO 水平的影响[J]. 中国社区医师:医学专业,2012(5):8-9.

[19] 杨长春,邹德勇. 黄芪与当归对血管再狭窄大鼠一氧化氮合成的影响[J]. 解放军药学报,2010,26(3):213-215.