

崔月明,胡庭俊,秦 津,等. 马尾藻多糖脂质体纳米制剂对南美白对虾抗病力的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):323-325.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.101

马尾藻多糖脂质体纳米制剂对南美白对虾抗病力的影响

崔月明,胡庭俊,秦 津,黄 明,尹 丹,郝祝兵

(广西大学动物科学技术学院,广西南宁 530004)

摘要:研究马尾藻多糖脂质体对南美白对虾免疫功能及抗病毒活性的影响。首先,选用 72 尾 SPF 南美白对虾,分为脂质体组 and 对照组,饲喂 7 d 后,测血淋巴上清中总蛋白含量、酚氧化酶、溶菌酶、碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性;然后,选用 2 批 180 尾 SPF 南美白对虾分别观察多糖脂质体对感染白斑综合征病毒或桃拉病毒对虾的保护作用,将 180 尾对虾随机分为 6 组,设空白对照组、阳性对照组、药物阳性对照组和高、中、低 3 个脂质体剂量组,饲喂 7 d 后攻毒,攻毒后观察 7 d,记录发病数、死亡数。结果表明,在免疫试验中,脂质体组酚氧化酶、溶菌酶和碱性磷酸酶的活性极显著升高;在抗病毒保护试验中,多糖脂质体各剂量均能提高南美白对虾的存活率,高剂量组存活率最高。说明马尾藻多糖脂质体对南美白对虾具有免疫促进作用,并能提高其抗病力。

关键词:马尾藻多糖;脂质体;南美白对虾;免疫;病毒病

中图分类号:S945.4⁺9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)11-0323-03

对虾白斑综合征(WSS)和桃拉综合征(TS)是危害我国对虾养殖业最多的两大病毒病,其大面积的暴发严重危害了对虾养殖业的发展。2001—2006 年对南美白对虾养殖的主产地 10 个省份的流行病学调查研究显示,在所有检测到的病毒性疾病中白斑综合征病毒(WSSV)占 63.84%,桃拉综合征病毒(TSV)占 32.74%,成为危害最大的 2 种病毒病,并且其死亡率也呈现逐年递增的趋势^[1]。2009—2010 年在福建、海南和广东的流行病学调查中,对虾 WSSV 的阳性结果占 27.1%,它和传染性皮下及造血组织坏死病毒(IHHNV)同时呈现阳性的占 16.95%^[2]。针对这种病毒性疾病的大面积暴发,目前还没有有效的救治方法,因此对病毒病的有效防治已成为对虾养殖中的最主要问题^[3]。对虾和其他无脊椎动物一样,缺乏脊椎动物特异的抗原/抗体免疫反应机制,虽然一些病毒的重组蛋白能够诱导特异的免疫反应,但这种保护作用只是暂时的^[4],因此完全寄希望于通过疫苗免疫来控制虾病是不切实际的。目前对病毒病的防治还是以预防为主,报道称中草药类多糖、生物碱、有机酸、酮类等以及益生菌能激活对虾的免疫系统,增强抗病力,从而达到防病治病的目的^[5]。杨明用乌梅为主要材料的中药抗病毒复方饲喂南美白对虾,其中 2% 剂量的试验组促进对虾的生长最明显,酚氧化酶(PO)和过氧化物酶活性亦大大提高,表明中药复方能提高对虾的非特异性免疫力;在 WSSV 感染试验中,免疫保护率

更是达到 61.98%,效果极显著^[6]。

马尾藻多糖(SP)作为海藻中一类具有较高抗病毒活性的硫酸多糖,添加在饲料中,不仅能促进南美白对虾的生长,而且对甲壳动物的酚氧化酶系统具有激活作用,能提高南美白对虾酸性磷酸酶(ACP)、超氧化物歧化酶(SOD)及溶菌酶(LSZ)活性,并且在感染 WSSV 后,使免疫保护率从 28% 提高到 74%^[7]。脂质体是将药物包封于类脂质双分子层而制成的一种超微型球状药物载体制剂,结构类似生物膜,和靶细胞之间可通过内吞、融合、接触释放、吸附、脂质交换等方式起作用,具有减少药物治疗剂量、降低药物毒性、减轻变态反应和免疫反应、延缓释放、靶向给药等优点^[8]。多糖脂质体作为免疫增强剂在提高对虾的非特异性免疫,增强对病毒性疾病的抵抗力方面,目前国内外都未见报道。马尾藻多糖脂质体纳米制剂(SPL)是将溶解的马尾藻多糖包封于磷脂双层膜中,形成稳定的球形纳米乳剂。本试验通过在南美白对虾饲料中添加 SPL,测定对虾血淋巴液上清中总蛋白(TP)含量、酚氧化酶、溶菌酶、碱性磷酸酶(ALP)和酸性磷酸酶的活性,探讨 SPL 对南美白对虾非特异性免疫功能的调节作用;而后人工感染 WSSV 和 TSV,观察 SPL 对南美白对虾抗病力的影响,评价 SPL 作为免疫增强剂在对虾养殖中的作用,为 SPL 的进一步推广应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 药物 0.5% 马尾藻多糖脂质体纳米制剂,由广西大学动物科学技术学院制备。对照药:盐酸左旋咪唑+黄芪多糖可溶性粉,湖南湘大兽药有限公司生产,商品名为瘟毒清,生产批号为 20110680。

1.1.2 试验动物 SPF 南美白对虾的幼虾 500 尾,取自广西水产研究所南美白对虾企沙养殖基地,暂养 7 d 后量体长、称

收稿日期:2014-11-20

基金项目:广西科学研究与技术开发计划(编号:桂科攻 0992014-6)。

作者简介:崔月明(1980—),女,河南南阳人,博士研究生,讲师,研究方向多糖免疫药理学。E-mail:870180417@qq.com。

通信作者:胡庭俊,博士,教授,研究方向为中药免疫药理学。E-mail:tingjunhu@126.com。

质量,体长为(4.5±0.55) cm,体质量为(0.69±0.31) g,挑选规格基本一致的用于试验。

1.1.3 饲料 对虾饲料为豆粕、鱼粉、面粉、虾粉、鱼油、麦麸、多维多矿、大豆磷脂组成的对虾基础饲料,试验组按不同剂量将 SPL 喷涂于饲料上。

1.1.4 病毒 对虾白斑病综合征病毒、桃拉综合征病毒均由广西壮族自治区水产研究所保存,二者的 TCID₅₀均为 10⁻⁶。

1.2 试验方法

1.2.1 试验分组及处理 将 72 尾 SPF 南美白对虾分为 2 组——对照组和 SPL 组。对照组饲喂基础饲料,SPL 组饲料添加 SPL 50 mL/kg,连续饲喂 7 d。2 组分别饲养于 150 cm×80 cm×60 cm 的水族箱内,上午、下午各投料 1 次(按对虾体质量的 5% 投料),常温下喂养。

1.2.2 血淋巴液制备 用药后 8 d,用带 5 号针头的 1 mL 注射器自虾的头胸甲后插入心脏取血淋巴液 0.3 mL,置于 Eppendorf 管中,4 ℃ 冷藏,3 000 r/min 离心 10 min,取上清用于免疫指标测定。

1.2.3 免疫指标测定 用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定对虾血淋巴液上清中总蛋白含量,以及溶菌酶、碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活力;酚氧化酶活性用改进的 Ashida 方法^[9],以 L-dopa 为底物,反应时间 6 min,测定 490 nm 下的吸光度。

表 1 SPL 对南美白对虾免疫指标的影响

组别	总蛋白含量 (g/L)	酚氧化酶活性 (U/mL)	溶菌酶活性 (μg/mL)	碱性磷酸酶活性 (U/g prot)	酸性磷酸酶活性 (U/g prot)
对照组	117.52±7.76	2.75±0.42	113.85±30.69	4.83±0.4	6.12±1.89
SPL 组	114.59±11.02	5.88±0.51**	138.82±29.43**	7.78±0.35**	4.50±1.14**

注:“*”表示与对照组相比差异显著($P<0.05$),“**”表示与对照组相比差异极显著($P<0.01$)。

2.2 SPL 对人工感染 WSSV 的南美白对虾的抗感染保护作用

在对虾饲料中添加 SPL 后,高、中、低剂量组与病毒对照组相比都降低了发病率和死亡率。其中药物对照组和 SPL 中剂量组的死亡数显著减少($P<0.05$),SPL 高剂量组死亡数极显著减少($P<0.01$),相对保护率最高,达到 16.67%(表 2)。

表 2 SPL 对南美白对虾感染 WSSV 的抗感染保护作用

组别	发病数 (尾)	发病率 (%)	死亡数 (尾)	死亡率 (%)	相对保护率 (%)
空白对照组	0	0	0	0	100.00
病毒对照组	30	100.00	30	100.00	0
药物对照组	27*	90.00	27*	90.00	10.00
SPL 低剂量组	29	96.67	28	93.33	6.67
SPL 中剂量组	28	93.33	26*	86.67	13.33
SPL 高剂量组	28	93.33	25**	83.33	16.67

注:用卡方检验各组发病数及死亡数与病毒对照组的差异,“*”表示与病毒对照组相比差异显著($P<0.05$),“**”表示与病毒对照组相比差异极显著($P<0.01$)。

2.3 SPL 对人工感染 TSV 的南美白对虾的抗感染保护作用

由表 3 可见,在饲料中添加中、高剂量的 SPL 能显著提高南美白对虾对 TSV 的抵抗力,使发病数显著降低($P<0.05$)。

1.2.4 攻毒保护试验 将 360 尾 SPF 南美白对虾分成 2 大组,分别做 SPL 对 WSSV 和 TSV 的攻毒保护试验。将每大组的 180 尾 SPF 南美白对虾随机分为 6 组,每组 30 尾,分别是空白对照组、病毒阳性对照组、药物对照组以及多糖脂质体纳米制剂的高(200 mL/kg)、中(100 mL/kg)、低(50 mL/kg)剂量组,分别饲养于 150 cm×80 cm×60 cm 的水族箱内。上午、下午各投料 1 次(按对虾体质量的 5% 投料),在常温下喂养 7 d,饲喂 8 d 时按 100 倍 TCID₅₀的病毒量进行攻毒试验。攻毒后观察 7 d,记录发病数和死亡数,计算相对保护率:相对保护率=(1-试验组死亡率/病毒对照组死亡率)×100%。

1.2.5 数据处理及统计分析 采用统计学软件 SPSS 16.0 进行数据的显著性检验,免疫指标用独立性 t 检验,抗病毒保护试验用 χ^2 检验。

2 结果与分析

2.1 SPL 对南美白对虾相关免疫指标的影响

SPL 对 SPF 南美白对虾免疫指标的影响结果见表 1。添加 SPL 的试验组总蛋白含量与对照组差异不显著,而其余的相关免疫酶活性均有较大的改变,其中酸性磷酸酶活性极显著降低($P<0.01$),酚氧化酶、溶菌酶和碱性磷酸酶活性极显著升高($P<0.01$)。

SPL 组的相对保护率均高于药物对照组,其中高剂量组最高,达到 26.93%。

表 3 SPL 对南美白对虾感染 TSV 的抗感染保护作用

组别	发病数 (尾)	发病率 (%)	死亡数 (尾)	死亡率 (%)	相对保护率 (%)
空白对照组	0	0	0	0	100.00
病毒对照组	30	100.00	26	86.67	0.00
药物对照组	28	93.33	23	76.67	11.54
SPL 低剂量组	28	93.33	20	66.67	23.08
SPL 中剂量组	26*	86.67	21	70.00	19.23
SPL 高剂量组	25**	83.33	19	63.33	26.93

注同表 2。

3 讨论

对虾属于甲壳动物,其免疫防御系统由基本防御屏障(甲壳和表皮)、细胞防御屏障(血淋巴细胞免疫)和生理防御屏障(体液免疫)3 个部分组成。对虾的体液免疫包含水解和氧化等酶类、凝集素、抗菌肽、溶菌酶等体液免疫因子,它们在甲壳动物的体液免疫过程中发挥着很大的作用,使得甲壳动物能识别非己物质,抵抗病原体的侵袭。

对虾的酚氧化酶系统(proPO)作为一种非特异性识别体系是先天性体液免疫的重要组成部分之一,无论从组成、激活方式

还是免疫功能上,都非常类似于高等动物的补体系统,主要是通过酚氧化酶原激活系统、抗菌肽和凝集素等的作用达到抗病抑菌及消除异物的目的。本研究发现,在对虾饲料中添加 50 mL/kg 剂量的 SPL 可以极显著增强南美白对虾血淋巴上清中的 PO 活性,与对照组相比 PO 活性提高 2 倍以上,说明 SPL 能够有效刺激大颗粒细胞脱颗粒,从而释放出酚氧化酶原激活系统的各种组分,参与免疫识别及免疫防御反应。

溶菌酶是对虾血细胞吞噬异物后分泌的一些碱性蛋白质,主要水解细菌细胞壁的糖苷键,引起细菌细胞裂解死亡,破坏和消除侵入体中的异物。本试验结果显示,饲喂含 SPL 的饲料 7 d 后,LSZ 的活力极显著升高。与刘小玲等研究的桦褐孔菌多糖以及覃振林等研究的马齿苋对对虾非特异性免疫的效果^[10-11]一致。

磷酸酶可以催化磷酸单脂的水解反应和磷酸基团的转移反应,从而将表面带有磷酸单酯的异物破坏降解。依据它们起催化作用的最适 pH 值不同,分为碱性磷酸酶和酸性磷酸酶。在本试验中,同时测定了对虾血淋巴上清液中 ALP 与 ACP 的活性,与对照组相比均有极显著差异,说明 SPL 影响了磷酸酶的分泌和活性。其中 ALP 是极显著升高,与大多数相关的研究结果^[10,12]一致,而 ACP 的含量却是极显著降低,这可能与饲喂时间以及对虾的生长期有关。李桂英等在对虾饲料中添加肠道益生菌后发现,根据饲喂的时间不同,ACP 的活性在各个时间点有较大的差异,在第 10 天达到最高,之后就下降了^[13];王新霞用 β -葡聚糖饲喂幼虾,在第 9 天的时候活性明显升高,而在第 14 天测定时活性就下降了,甚至低于对照组^[14]。除了时间因素外,还可能与脂质体的主要组成是磷脂和胆固醇有关,因为磷脂可被磷酸酶水解,二者之间可以发生化学反应。所以,本研究测定的 ACP 含量降低的原因还需要进一步探讨。

病毒感染对虾之后,会引起对虾的免疫防御反应^[15-16]。WSSV 可感染对虾颗粒细胞,使超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和诱导性一氧化氮合成酶的活性显著降低^[17];WSSV 也能使对虾的酚氧化酶体系明显上调,对虾痊愈后其酚氧化酶活性降到正常值^[18],暗示病毒也会激活酚氧化酶体系,进而启动对虾的免疫反应。在 TSV 感染 2~3 d 后,对虾总淋巴细胞数、透明细胞数、半颗粒细胞数及颗粒细胞数都有大幅度下降,SOD、PO 活性分别下降了约 25%、68%,这表明 TSV 可能通过降低对虾血液学免疫力而实现其高致病性^[19]。Chang 等研究发现,多糖类物质(如 β -葡聚糖、脂多糖、肽聚糖等)能有效激活对虾的酚氧化酶系统,进而提高对虾自身的免疫水平,抑制体内病毒扩增,阻止未带毒个体染病,从而预防控制 WSSV 感染^[20]。本研究利用具有抗病毒活性的马尾藻硫酸多糖制成的脂质体纳米制剂作为免疫增强剂,观察对 WSSV 和 TSV 感染后对虾的保护作用发现,SPL 高剂量组可以极显著减少病死虾的数量,对 WSSV 感染后保护率达 16.67%,对 TSV 感染后保护率达 26.93%。

本试验结果显示,饲料添加 SPL 50 mL/kg,能显著提高南美白对虾的酚氧化酶、溶菌酶、碱性磷酸酶活性,对对虾的非特异性免疫具有免疫促进作用。在人工感染 WSSV 和 TSV 后,高、中、低剂量的 SPL 对南美白对虾均有一定的保护作用,效果优于对照药物瘟毒清,其中高剂量组保护效果最好。

说明脂质体作为一种新型的药物制剂,可以增强甲壳类动物的免疫活性,提高其抗病毒能力,有作为绿色免疫增强剂开发的潜力。

参考文献:

- [1] 朱泽闻,陈爱平,李文旭,等. 南美白对虾两大病毒病流行分析及趋势预测[J]. 科学养鱼,2007(4):49-50.
- [2] 林开,侯崇林,谢荣辉,等. 三种对虾病毒在浙江省凡纳滨对虾中的流行性调查研究[J]. 水产科学,2013(3):161-164.
- [3] 王蔚,章晓波. 对虾-病毒互作的分子机制研究[J]. 生命科学,2010,22(11):1102-1106.
- [4] Rout N, Kumar S, Jaganmohan S, et al. DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp[J]. Vaccine,2007,25(15):2778-2786.
- [5] 谢芝勋. 对虾病毒病研究进展[J]. 动物医学进展,2003,24(2):27-30.
- [6] 杨明. 中草药制剂在凡纳滨对虾抗病性能中的应用研究[D]. 厦门:集美大学,2012.
- [7] 何颖,陈忠伟,高建峰,等. 马尾藻多糖对南美白对虾免疫调节作用[J]. 安徽农业科学,2008,36(31):13664-13665,13680.
- [8] 姜华,高原,杨景明. 中药脂质体的研究进展[J]. 当代医学,2009(28):12-13.
- [9] Ashida M, Söderhäll K. The prophenoloxidase activating system in crayfish[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry,1984,77(1):21-26.
- [10] 刘小玲,徐向群,黄燕华,等. 桦褐孔菌多糖对凡纳滨对虾生长和血清免疫相关酶活性的影响[J]. 水产科学,2014(4):201-207.
- [11] 覃振林,韦海英,李学坚,等. 复方马齿苋影响南美白对虾非特异性免疫功能研究[J]. 水利渔业,2006(5):100-101.
- [12] 文国樑,林黑着,李卓佳,等. 饲料中添加复方中草药对凡纳滨对虾生长、消化酶和免疫相关酶活性的影响[J]. 南方水产科学,2012(2):58-63.
- [13] 李桂英,宋晓玲,孙艳,等. 几株肠道益生菌对凡纳滨对虾非特异免疫力和抗病力的影响[J]. 中国水产科学,2011,18(6):1358-1367.
- [14] 王新霞. 对虾免疫增强剂的研究与应用[D]. 青岛:中国海洋大学,2004.
- [15] 杭小英,周志明,李倩,等. 不同养殖模式对南美白对虾生长、病害发生与水质的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):191-193.
- [16] 胡振雄,刘利平. 凡纳滨对虾综合养殖的分类、存在问题及对策[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):202-204.
- [17] 宋晓玲,黄健,王秀华,等. 白斑综合征病毒感染与对虾的免疫防御反应[J]. 中国水产科学,2006,13(6):1033-1039.
- [18] Sarathi M, Basha A N, Ravi M, et al. Clearance of white spot syndrome virus (WSSV) and immunological changes in experimentally WSSV-injected *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Fish & Shellfish Immunology,2008,25(3):222-230.
- [19] 金立方,余招锋. 桃拉病毒感染对南美白对虾血液学参数的影响[J]. 农业与技术,2013(10):14-16,69.
- [20] Chang C F, Su M S, Chen H Y, et al. Dietary beta-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus [J]. Fish & Shellfish Immunology,2003,15(4):297-310.