

刘 波,王庆奎,邢克智,等. 喂食当归多糖对点带石斑鱼抗氧化酶活力及其基因表达的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(18):172-175.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.043

# 喂食当归多糖对点带石斑鱼抗氧化酶活力及其基因表达的影响

刘 波,王庆奎,邢克智,陈成勋

(天津市水产生态与养殖重点实验室/天津农学院水产学院,天津 300384)

**摘要:**为研究喂食当归多糖对点带石斑鱼抗氧化酶活力及相关基因表达的影响,将水提醇沉法提取的当归多糖按 0、2 000、4 000、6 000、8 000 mg/kg 添加到饲料中,喂食 42 d 后,测定血浆和肝胰脏中 CuZn-SOD、Mn-SOD、CAT 酶活力,以及抗氧化相关基因 CuZn-SOD、Mn-SOD、CAT 的表达量。结果表明,喂食 2 000~6 000 mg/kg 组血浆 CuZn-SOD 酶活力比对照组显著降低,6 000 mg/kg 组肝胰脏 CuZn-SOD 酶活力和基因表达量显著高于对照组,2 000、4 000 mg/kg 组比对照组显著降低;血浆 Mn-SOD 酶活力在 2 000 mg/kg 时显著降低,肝胰脏 Mn-SOD 酶活力均显著高于对照组,在 2 000 mg/kg 时达到最大值,Mn-SOD 基因表达量在 2 000、8 000 mg/kg 时明显低于对照组,在 6 000 mg/kg 时明显高于对照组;血浆 CAT 活力在 8 000 mg/kg 时显著低于对照组,在 2 000、6 000 mg/kg 时肝胰脏 CAT 活力显著高于对照组,CAT 基因表达量在 6 000 mg/kg 时显著高于对照组。由此得出,喂食当归多糖对点带石斑鱼抗氧化酶活力及其基因表达量有影响,连续喂食 6 000 mg/kg 当归多糖 42 d 能显著提高肝胰脏 CuZn-SOD、Mn-SOD、CAT 酶活力和 CuZn-SOD、Mn-SOD、CAT 基因表达量,从而提高点带石斑鱼抗氧化能力。

**关键词:**点带石斑鱼;当归多糖;抗氧化;酶活力;基因表达

**中图分类号:**S965.334 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)18-0172-04

点带石斑鱼 (*Epinephelus malabaricus*) 隶属 鲈形目 (Perciformes) 鲷科 (Serranidae), 广泛分布于中国东南沿海。点带石斑鱼对环境适应性强、肉质鲜美, 含有丰富的高不饱和脂肪酸, 是一种低脂肪、高蛋白的上等食用鱼<sup>[1]</sup>, 被中国港澳地区推为中国四大名鱼之一, 素有“海鸡肉”之称。伴随着石斑鱼集约化养殖的兴起, 石斑鱼健康水平下降, 细菌性、病毒性疾病频发<sup>[2-3]</sup>。而常用的化学消毒剂和抗生素等药物, 不仅导致病原微生物产生耐药性<sup>[4]</sup>, 而且少量药物也残留在石斑鱼体内<sup>[5]</sup>, 对人体健康有潜在的危害。

许多中草药多糖具有生物安全、可降解、环境友好等优点, 能提高水产动物免疫力和抗病力, 在水产养殖业中受到广泛关注<sup>[6]</sup>, 抗氧化系统是非特异性免疫的重要组成部分, 较强的抗氧化能力有助于机体免疫力的提高。研究发现, 中草药多糖可通过调节抗氧化酶活性和相关抗氧化基因的表达, 来提高对抗活性氧自由基的能力, 饲料中添加牛膝多糖 (*Achyranthes bidentata*) 能提高草鱼 (*Grass carp*) SOD、CAT 活力, 降低 MDA 含量<sup>[7]</sup>。对拟穴青蟹 (*Scylla Paramamosain*) 注射大黄多糖 (*Rheum palmatum* L) 后发现, 过氧化氢酶、过氧化物还原酶、酚氧化酶原等免疫基因分别在血细胞和肝胰腺中

明显上调, 推测可能与拟穴青蟹免疫增强有关<sup>[8]</sup>。

当归多糖 (*Angelica sinensis* polysaccharide, ASP) 是伞形科植物当归的主要活性成分之一<sup>[9]</sup>。研究发现, 当归多糖能通过提高血液白细胞的吞噬能力和头肾白细胞的增殖能力, 并促进点带石斑鱼的呼吸爆发活力、吞噬活力、降低迟缓爱德华菌 (*Edwardsiella tarda*) 攻毒后试验鱼的累计死亡率来提高点带石斑鱼的非特异性免疫力和抗病力<sup>[10-11]</sup>。通过激活 TLR22 及其下游相关基因 *Toll* 样接头蛋白 TRIF, 干扰素调节因子 IRF3 主要组织相容性复合体 (MHC) 与肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ )、白介素-8 (IL-8) 的方式调节石斑鱼的免疫功能<sup>[12]</sup>。改善抗氧化能力是多糖调节机体免疫力的机理之一<sup>[13]</sup>, 通过体外试验证实当归多糖能够有效清除对生物体毒性强、危害大的超氧阴离子自由基和羟基自由基, 抑制脂质过氧化<sup>[14]</sup>, 但当归多糖对鱼类抗氧化能力方面的研究较少, 本试验研究当归多糖对点带石斑鱼 CuZn-SOD、Mn-SOD、CAT 抗氧化活力以及相关基因 CuZn-SOD、Mn-SOD、CAT mRNA 的表达量的影响, 为揭示当归多糖调节点带石斑鱼抗氧化能力的机理提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验用点带石斑鱼 (89.61  $\pm$  2.08) g 由天津市海发珍品实业发展有限公司提供。当归购于天津市当地中草药市场, 产地甘肃。本试验采用水提醇沉的方法<sup>[15]</sup>提取当归多糖 (ASP)。

### 1.2 试验设计

选择健康且大小相近的点带石斑鱼 450 尾鱼随机分配到

收稿日期:2017-03-22

基金项目:国家自然科学基金面上项目 (编号:31270456); 天津市水产产业技术体系创新团队项目 (编号:201704 专题); 天津市应用基础与前沿技术研究计划重点项目 (编号:15JCZDJC33600)。

作者简介:刘 波 (1992—), 男, 天津人, 硕士研究生, 研究方向为水产动物增养殖。E-mail:274230345@qq.com。

通信作者:邢克智, 教授, 研究方向为水产养殖。E-mail:kzxing6668@126.com。

15 个玻璃钢水槽 (86 cm × 62 cm × 45.5 cm), 每个水槽 30 尾, 将 ASP 按 0、2 000、4 000、6 000、8 000 mg/kg 添加到基础饲料 (表 1) 中, 每种饲料喂食 3 槽试验鱼, 连续投喂 42 d 后采样。每组每次采样 12 尾, 取样前停食 24 h, 取样鱼用 MS-222 麻醉, 用 0.2 mL 无菌注射器尾静脉取血, 用 8% 肝素钠抗

凝, 收集血浆 (4 ℃, 4 000 r/min 离心 15 min); 将采血后的试验鱼进行解剖, 取肝胰脏, -80 ℃ 冰箱中保存。测定血浆和肝胰脏 CuZn-SOD、Mn-SOD、CAT 酶活力和 CuZn-SOD、Mn-SOD、CAT 基因表达量。

表 1 试验饵料配方及其营养成分

组号	原料配方 (g/kg)										营养成分 (%)			
	鱼粉	豆粕	虾粉	小麦粉	复合维生素	复合矿物质	鱼油	豆油	当归多糖	羧甲基纤维素	粗蛋白	粗脂肪	粗灰分	水分
1	620	120	50	120	20	20	30	10	0	10	52.91	10.58	14.47	8.66
2	620	120	50	120	20	20	30	10	2	8	53.19	10.92	13.64	8.58
3	620	120	50	120	20	20	30	10	4	6	53.62	10.46	15.11	8.2
4	620	120	50	120	20	20	30	10	6	4	54.41	10.37	14.75	8.3
5	620	120	50	120	20	20	30	10	8	2	54.81	10.76	14.21	8.53

### 1.3 试验条件和日常管理

试验水槽安置在石斑鱼室内工厂化养殖的水泥池中。试验用海水为石斑鱼循环水养殖用水, 海水经生物包处理、充纯氧, 紫外线消毒后, 以 0.3~0.8 m/s 流速流入饲养水槽, 过多的海水从出水管溢出, 不再使用。试验期间水质条件为: 水温 26.5~27.8 ℃, 盐度 23%~26%, 溶氧量 8.24~8.52 mg/L, pH 值 7.2~8.6, 铵态氮 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N) 含量 0.009~0.011 mg/L, 亚硝态氮 (NO<sub>2</sub>-N) 0.023~0.028 mg/L。每日 08:00 和 16:00 各投喂 1 次, 每次饱食投喂, 并避免产生残饵。

### 1.4 抗氧化指标

血浆及肝胰脏中的超氧化物歧化酶 (CuZn-SOD 和 Mn-SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性采用南京建成生物研究所生产的试剂盒测定。

### 1.5 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

用 Trizol 试剂 (大连宝生物工程有限公司) 提取肝胰脏中的总 RNA。用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) 合成 cDNA 第 1 条链, 反应依据产品说明书进行。经测浓度后的样本按个人要求选择反转录的用量, 10 μL 反应体系中保证总 RNA 的量在 500 ng 以下。在 200 μL 离心管中加入 2 μL 5 × PrimeScript RT Master Mix 和个人所需的 RNA 模板溶液, 最后用 ddH<sub>2</sub>O 将溶液补齐至 10 μL。反应条件: 37 ℃ 保温 15 min, 85 ℃ 保温 5 s, 然后置于 4 ℃ 下保存备用。

### 1.6 肝胰脏 CuZn-SOD、Mn-SOD、CATm RNA 表达水平测定

**1.6.1 引物设计** 根据 GeneBank 已上传的斜带石斑鱼的 CAT 序列 (AY735009.1)、Mn-SOD 序列 (AY735007.1)、CuZn-SOD 序列 (AY035854.1) 和已上传的赤点石斑鱼的 β-actin 序列 (HQ007251.1), 利用序列间的保守区域设计用于实时荧光定量 PCR 的引物 (表 2), 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

**1.6.2 实时荧光定量 PCR** 按照 SYBR Premix Dimer Eraser™ (Perfect Real Time) 试剂盒说明书操作。PCR 扩增体系为 20 μL, 包括 10 μL SYBR Premix Dimer Eraser™、0.5 μL 上游引物、0.5 μL 下游引物、2 μL cDNA 和 7 μL ddH<sub>2</sub>O。

PCR 反应程序: 95 ℃ 预变性 3 min; 95 ℃ 变性 15 s, 退火 60 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 循环 40 次。

表 2 引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度 (℃)
β-actin-F	GTGACCAACTGGGACGACA	58.3
β-actin-R	TGCTCCTCAGGGGCAACTCT	58.3
CAT-F	GGGCGTTTGGTTACTTTG	58.3
CAT-R	GAGAAGCGGACAGCAATA	58.3
Mn-SOD-F	GAGAAGGAGAGCGGAAGA	52.1
Mn-SOD-R	CTGAAGGTAGTAGCGGTG	52.1
CuZn-SOD-F	GACCTGGGAAATGTGACT	56.4
CuZn-SOD-R	GGTCATCAGCCTTCTCAT	56.4

### 1.7 数据统计

CuZn-SOD、Mn-SOD、CATm RNA 的表达以 β-actin 为内参, 参照对照组 mRNA 表达量, 应用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 计算 mRNA 的相对表达量。数据采用 SPSS 13.0 统计软件, 作单因素方差分析, 采用 Duncan's 法进行多重比较, P < 0.05 表示差异显著。数据用“平均值 ± 标准差”表示 (n = 3)。

## 2 试验结果与分析

### 2.1 提取的 RNA 质量

测定的 D<sub>260 nm</sub>/D<sub>280 nm</sub> 的比值在 1.8~2.1 之间, 可以说明提取的 RNA 纯度较高, 符合试验要求。琼脂糖凝胶电泳 5S rRNA、18S rRNA、28S rRNA 3 条条带清晰完整 (图 1)。

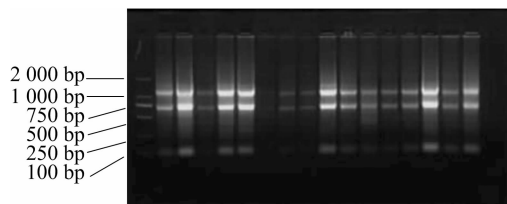


图1 点带石斑鱼肝胰脏总 RNA 电泳结果

### 2.2 CuZn-SOD 酶活力及基因

由图 2-A、图 2-B 可知, 喂食 42 d 后, 血浆 8 000 mg/kg 组与处理组差异不显著, 其他组显著低于对照组; 肝胰脏 CuZn-SOD 酶活力在 6 000 mg/kg 处理组显著高于对照组, 其他组显著低于对照组。

由图 2-C 可知, 喂食 42 d 后, 随 ASP 添加量的升高, CuZn-SOD 基因表达量先降低后升高再降低, 6 000 mg/kg

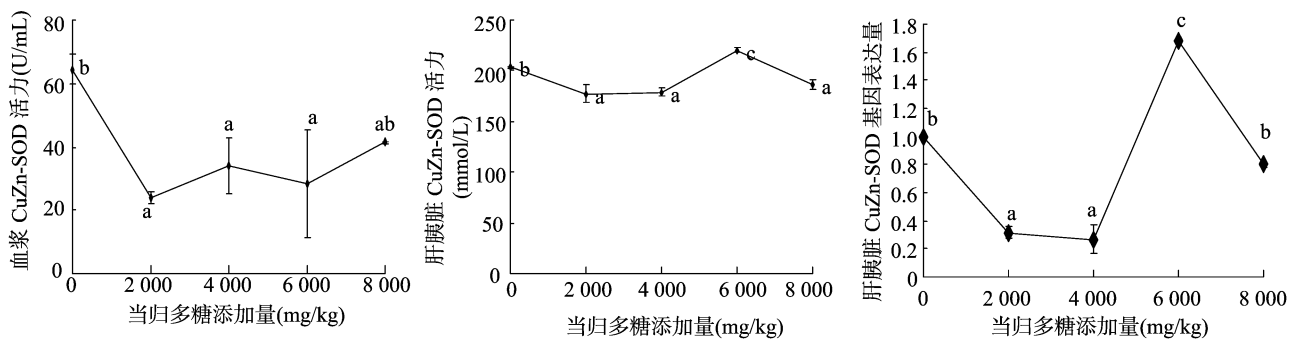


图2 当归多糖对点带石斑鱼 CuZn-SOD 酶活力以及基因的影响

明显高于对照组,2 000、4 000 mg/kg 明显低于对照组。

### 2.3 Mn-SOD 酶活力以及基因

由图 3-A、图 3-B 可知,喂食 42 d 后,随 ASP 添加量的升高,血浆处理组 Mn-SOD 酶活力先降低后升高再降低,2 000 mg/kg 组明显低于对照组,其他组与对照组无显著差

异;肝胰脏 Mn-SOD 酶活力先升高后降低再升高,各处理组均明显高于对照组,在 2 000 mg/kg 达到最大值。

由图 3-C 可知,喂食 42 d 后,Mn-SOD 基因表达量在 6 000 mg/kg 明显大于对照组及其他组,在 2 000、8 000 mg/kg 明显低于对照组。

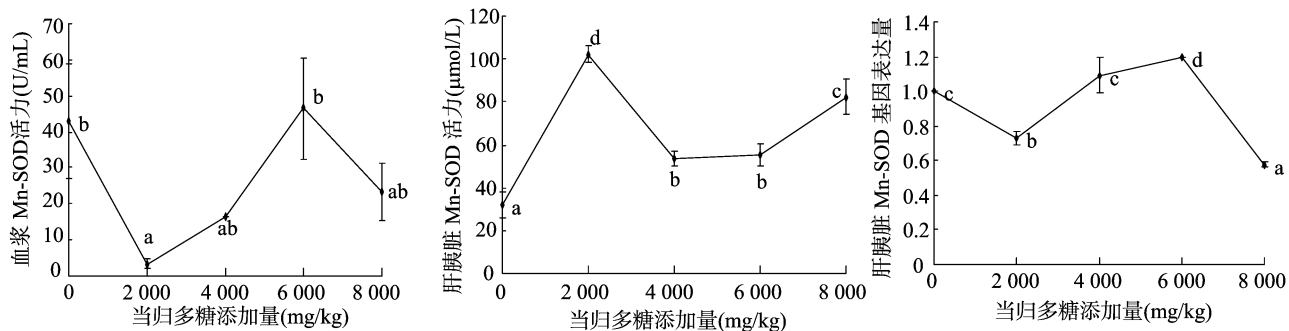


图3 当归多糖对点带石斑鱼 Mn-SOD 酶活力及基因的影响

### 2.4 CAT 抗氧化酶活力以及基因

由图 4-A、图 4-B 可知,喂食 42 d 后,血浆 CAT 酶活力在 8 000 mg/kg 明显小于对照组,其他组与对照组差异不显著;肝胰脏中各处理组随 ASP 添加量的升高 CAT 酶活力先升

高后降低,2 000、6 000 mg/kg 处理组显著高于对照组,其他组与对照组差异不显著。

由图 4-C 可知,喂食 42 d 后,6 000 mg/kg 组 CAT 基因表达量显著高于对照组,其他组与对照组差异不显著。

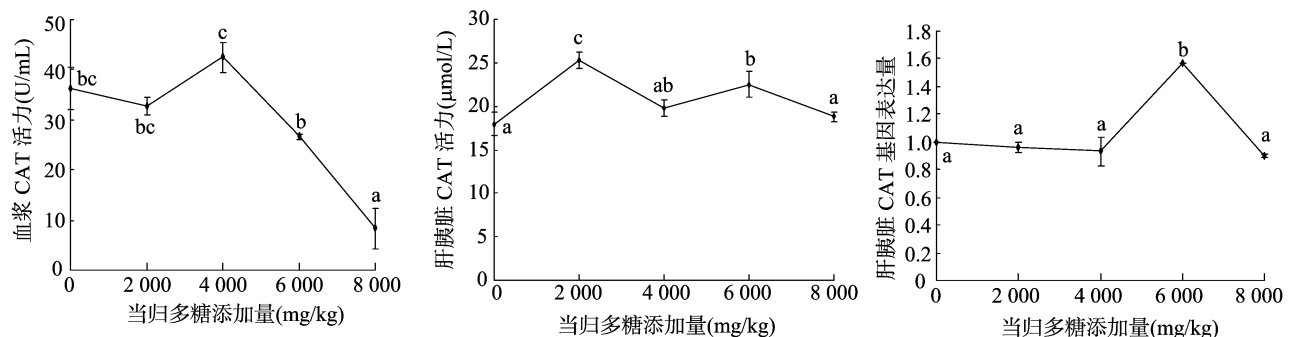


图4 当归多糖对点带石斑鱼 CAT 酶活力及基因的影响

## 3 讨论

超氧化物歧化酶 (SOD) 作为活性氧清除剂参与清除体内自由基,与水生生物的免疫水平密切相关,对于增强整个机体的免疫功能具有重要作用<sup>[16]</sup>。研究发现,汪开毓等以鲫鱼 (*Crucaia carpa*) 为研究对象,投喂无花果 (*Ficus carica*) 多糖后可显著提高其血液 SOD 活性<sup>[17]</sup>;白东清等证实,长期投喂黄芪 (*Astragalus*) 多糖可显著黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 头肾和肌肉中 SOD 酶活力<sup>[18]</sup>;李春震等对黑鲷 (*Sparus*

*inacrocephalus*) 投喂不同浓度的人参多糖饲料后发现,人参多糖能显著提高黑鲷 SOD 基因表达量<sup>[19]</sup>。本试验中,随着 ASP 添加量的升高,肝胰脏 CuZn-SOD 酶活力及其基因表达量均呈现先降低后升高再降低的趋势,肝胰脏 Mn-SOD 酶活力呈现先升高后降低再升高,Mn-SOD 基因表达量先降低后升高再降低,综合来看,添加量在 6 000 mg/kg 时肝胰脏 CuZn-SOD、Mn-SOD 酶活力和基因表达量明显高于对照组,这与高颖晖等报道的小鼠补充壳聚糖 (*chitosan*),能够增加力竭运动小鼠肝组织 SOD 酶活性和基因表达量活性的研究结果<sup>[20]</sup>

一致,基因表达量可以提高其编码蛋白的表达量,从而提高相应酶活力<sup>[21]</sup>,当归多糖可通过上调 CuZn-SOD、Mn-SOD 基因表达来提高点带石斑鱼 CuZn-SOD、Mn-SOD 酶活力,促进机体免疫机制保护机体免受损伤。研究发现,ASP 添加量在 2 000、4 000 mg/kg 时,血浆、肝胰脏 CuZn-SOD 酶活力和基因表达量均明显小于对照组,推测是当归多糖浓度过低,无法达到对基因表达所需的浓度范围,对抗氧化系统的产生干扰,从而抑制了 CuZn-SOD 基因的表达,使 CuZn-SOD mRNA 转录水平降低,进而使 CuZn-SOD 蛋白合成减少, CuZn-SOD 酶活力降低。

过氧化氢酶(CAT)是机体内不需要特殊供体而能够执行的第一道抗氧化防线任务的重要抗氧化酶。试验结果显示,喂食当归多糖 6 000 mg/kg 时能显著提高肝胰脏 CAT 酶活力和 CAT 表达量,与 SOD 结果一致,这可能与两者之间的功能有关,SOD 和 CAT 是反映有机体抗氧化能力的 2 个重要指标,前者催化超氧化物歧化为过氧化氢,后者催化过氧化氢还原成水和氧,两者酶活力具有一定的同步性<sup>[22]</sup>,活性氧产生后,CAT 活力量随 SOD 活力及其反应产物的增加而相应提高,将过氧化氢还原,从而降低组织过氧化损伤。类似地,血鸚鵡摄食牛膝(*Achyranthes bidentata*)多糖后,罗非鱼摄食黄芪多糖后,SOD 和 CAT 活力也表现出一致性<sup>[23-24]</sup>。

综上所述,当归多糖能显著影响点带石斑鱼肝胰脏 CuZn-SOD、Mn-SOD、CAT 酶活力,并且在 6 000 mg/kg 显著上调 CuZn-SOD、Mn-SOD、CAT 基因的表达量。

致谢:感谢天津农学院王晓梅教授、石洪玥实验师和天津市海发珍品实业有限公司在本试验石斑鱼养殖过程中提供的帮助,对此深表谢意!

#### 参考文献:

- [1]徐大为,邢克智,张树森,等.点带石斑鱼的肌肉营养成分分析[J].水利渔业,2008,28(3):54-56.
- [2]陈总会,肖宝华,黄志斌,等.澳洲宝石斑鱼疾病防治技术研究进展[J].水产科技情报,2007,34(3):116-118.
- [3]罗 鸣,陈傅晓,刘龙龙,等.我国石斑鱼养殖疾病的研究进展[J].水产科学,2013,32(9):549-554.
- [4]张文文.常用渔药有效含量,杀菌效果比较及抗生素耐药性初步研究[D].舟山:浙江海洋学院,2014.
- [5]胡梦红.抗生素在水产养殖中的应用,存在的问题及对策[J].水产科技情报,2006,33(5):217-221.
- [6]孙翠慈,王安利,王素芬,等.活性多糖对水产动物免疫功能的调节[J].海洋通报,2003,22(3):81-88.
- [7]王红权,唐德约,赵玉蓉,等.牛膝多糖对草鱼免疫和抗氧化功能的影响[J].水生生物学报,2013,37(2):351-357.
- [8]文 英,曹劲松,张泽蕙,等.大黄多糖对拟穴青蟹免疫相关基因表达的影响[J].中国水产科学,2015,22(3):387-392.
- [9]冯学花,梁肖蕾.当归化学成分与药理作用的研究进展[J].广州化工,2012,40(22):16-18.
- [10]Wang Q K,Chen C X,Guo Y J,et al. Dietary polysaccharide from *Angelica sinensis* enhanced cellular defence responses and disease resistance of grouper *Epinephelus malabaricus* [J]. *Aquaculture International*,2011,19(5):945-956.
- [11]王庆奎,邢克智,赵海运,等.喂食当归多糖对点带石斑鱼非特异性免疫力和抗病力的影响[J].中国海洋大学学报(自然科学版),2012,42(9):15-21.
- [12]马淑芳,王庆奎,戴 伟,等.当归多糖对点带石斑鱼 Toll 样受体 22 信号通路相关基因表达的影响[J].大连海洋大学学报,2017,32(1):33-37.
- [13]徐春燕.苜蓿多糖和黄芪多糖对肉仔鸡抗氧化性能影响的研究[D].扬州:扬州大学,2010.
- [14]李贵荣,吕昌银,杨胜圆.当归多糖清除活性氧自由基作用的研究[J].南华大学学报(理工版),2002,16(3):18-20.
- [15]张清勇,于 宏,王庆奎,等.当归多糖的提取、分离及纯化[J].河北渔业,2016(3):1-3.
- [16]牟海津,江晓路,刘树青,等.免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响[J].青岛海洋大学学报(自然科学版),1999,29(3):124-129.
- [17]汪开毓,陈 霞,黄锦炉,等.无花果多糖对鲫鱼非特异性免疫功能的影响[J].水生生物学报,2011,35(4):630-637.
- [18]白东清,吴 旋,郭永军,等.长期投喂黄芪多糖对黄颡鱼抗氧化及非特异性免疫指标的影响[J].动物营养学报,2011,23(9):1622-1630.
- [19]李春霞,胡 鲲,唐雪莲,等.人参多糖对黑鲷生长性能及抗氧化酶 mRNA 表达的影响[J].华中农业大学学报,2015,34(6):94-100.
- [20]高颖晖,周万红,曹 军,等.昆虫壳聚糖对运动训练大鼠肝脏抗氧化酶系与 SOD 基因表达的影响[J].体育科学,2011,31(5):75-78.
- [21]张庆利.中国明对虾免疫系统中抗氧化相关基因的克隆与表达分析[D].青岛:中国科学院海洋研究所,2007.
- [22]Mourete G,Diaz-Salvago E,Bell J G,et al. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil:attenuation by dietary vitamin E[J]. *Aquaculture*,2002,214(1/2/3/4):343-361.
- [23]张伟妮,林 旋,王寿昆,等.黄芪多糖对罗非鱼非特异性免疫和胃肠内分泌功能的影响[J].动物营养学报,2010,13(2):401-409.
- [24]崔 培,范耘硕,白东清,等.牛膝多糖对血鸚鵡部分非特异性免疫与脂类代谢指标的影响[J].大连海洋大学学报,2016,31(4):397-403.