

复方中草药对中华绒螯蟹免疫因子的影响

刘丽平, 薛 晖, 周 刚

(江苏省淡水水产研究所, 江苏 南京 210017)

[摘要] 在基础饲料中添加 6 种中草药制剂煎液制成试验饲料, 同时以基础饲料为对照, 连续饲喂中华绒螯蟹 30 d 采集中华绒螯蟹血淋巴上清液测定其免疫指标活性. *T* 检验结果表明, 中草药添加饲料组蟹的噬菌活性与对照组存在显著差异 ($P < 0.05$); 溶菌酶活性、酚氧化酶活性 (PO) 与对照组则差异极显著 ($P < 0.01$); 抗菌酶活性、过氧化物酶活性 (POD) 差异不显著 ($P > 0.05$), 但均值比对照饲料组高. 说明该中草药制剂的添加能明显提高中华绒螯蟹的免疫水平. 用中华绒螯蟹致病嗜水气单胞菌 CL99920 对实验蟹进行攻毒试验, 嗜水气单胞菌的最佳攻毒剂量为 5×10^6 cfu/mL, 对照组的死亡率为 80%, 明显高于中草药免疫组的死亡率 30%, 该中草药添加剂的免疫保护率为 62.5%.

[关键词] 中华绒螯蟹, 复方中草药, 非特异性免疫, 免疫指标

[中图分类号] S941 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)01-0109-05

Effect of Chinese Herbal Medicine on Immunity Function of *Eriocheir Sinensis*

Liu Liping Xue Hui Zhou Gang

(Jiangsu Institute of Freshwater Fisheries Nanjing 210017, China)

Abstract Six indices of non-specific immunity were measured after *Eriocheir sinensis* were fed with Chinese herbal compound as additive to normal food for 30 days. There were significant differences on phagocytic activities between experimental and control group by using *T* test ($P < 0.05$). There were highly significant differences on bacteriolytic and phenoloxidase activities. But there were no significant differences on antibacterial and POD activities. These results indicated that the Chinese herbal medicine might significantly elevate the non-specific immunity of crab. The Chinese herbal medicine used in the fields could efficiently prevent the occurrence of crab disease and increase the survival rate of crab compared with the control group after the crabs were attacked with *Aeromonas tydrophila* CL99920.

Key words *Eriocheir sinensis*, Chinese herbal compound, non-specific immunity, immunity indices

近年来, 随着河蟹养殖业的迅速发展, 河蟹疾病种类也日益增多, 给养殖业造成了严重的经济损失. 寻求经济、高效且无污染的预防蟹病的方法, 成为当前迫切需要解决的问题. 我国具有丰富的中草药资源, 中(兽)医学上的研究及渔业生产实践均已证明, 中草药作为混饲剂或饲料添加剂尤其适用于当前水产养殖业的集约化、规模化生产的需要, 而且应用中草药防治鱼病完全符合发展无公害水产业、生产绿色水产品的病害防治准则^[1-5]. 利用中草药提高河蟹的免疫抵抗力, 从而增强蟹体抵御各种病害的能力和对外界环境的适应能力无疑是一种很好的方法. 为此本试验配制了由大青叶、鱼腥草、淫羊藿等 6 味中草药组成的复方中草药制剂, 并与普通河蟹饲料混合制成复方中草药饲料, 分组饲喂, 测定试验组河蟹血清中与机体非特异免疫相关的几种重要酶类活性指标及免疫保护率, 探讨中草药添加剂提高河蟹非特异免疫力的效果与影响途径, 旨在建立评价中草药使用效果的生物学指标, 以及为推广中草药免疫增强剂的应用提供理论指导.

收稿日期: 2007-05-11
基金项目: 国家十一五科技支撑计划“水产名特优品种优质高效养殖技术研究与示范”(2006BAD03B07)资助项目.
作者简介: 刘丽平(1976—), 女, 研究实习员, 硕士, 研究方向: 水产动物疾病学. E-mail: hongyingyu@sina.com

1 材料和方法

1.1 材料

实验蟹为健康的中华绒螯蟹, 体重 50~ 70 g 于 2005 年 10 月 8 日取自江苏省淡水水产研究所江浦生态养殖示范场. 在水族箱中暂养 1 周, 待摄食正常后开始实验. 实验期间日投喂饲料 2 次, 每次投喂量为蟹体重的 4%, 每日换水 1 次, 换水量约 1/3 连续充气, 水温控制在 26~ 28℃.

1.2 方法

1.2.1 饲料配制

中草药制剂: 配方由 6 味中药组成, 每味 20 g 共计 120 g(见表 1), 加水煮, 将水滤出再加水煮, 这样连加 3 次水, 将 3 次的药液合并在一起, 浓缩到所需要体积 (50 mL), 放入冰箱待用.

基础饲料: 基础饲料为苏州通威饲料公司生产的“通威”牌河蟹成蟹颗粒料.

中草药饲料: 将基础饲料 10 kg 均分成 2 份, 一份作为对照, 另一份加配制好的中草药制剂 50 mL, 加足水充分混匀, 制成颗粒饵料, 晒干备用.

1.2.2 分组

试验先分为 2 组, 每组试验蟹 40 只, 分别投喂常规饲料 (对照组) 和添加了中草药的饲料 (免疫组). 投喂 30 d 后, 每组又分为 4 小组, 分别为空白对照和 1×10^7 /mL, 5×10^6 /mL, 1×10^6 /mL 3 种不同浓度的嗜水气单胞菌攻击组.

1.2.3 蟹血淋巴上清液的采集

随机取投喂实验饲料 30 d 后的实验蟹每组各 20 只, 用一次性注射器 (2 mL) 从蟹的围心腔抽取血淋巴, 注入无菌的 1.5 mL 离心管中, 4℃ 冰箱中过夜, 次日用无菌针头划破血凝块, 2 000 r/min 离心 5 min, 取上清液用于各项指标的测定.

1.2.4 血细胞吞噬活性的测定

参照 Enright 和 Jeffers^[6] 介绍的方法进行, 每个样品做 5 张涂片, 甲醇固定, Giemsa 染色, 油镜下观察计数. 按下式计算血细胞吞噬百分比和吞噬指数.

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

吞噬指数 (PI) = 细胞内总菌数 / 被计数具吞噬作用的细胞数.

金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) 悬液的制备: 将金黄色葡萄球菌在肉汤培养基中 37℃ 振荡培养 24 h 后, 离心集菌. 用 0.15 mol/L 无菌生理盐水洗涤 3 次, 将菌液悬浮于一定量的生理盐水中, 加入终浓度为 1% 的福尔马林, 25℃ 灭活 24 h 离心集菌. 用生理盐水调整浓度为 3×10^8 cfu/mL, 置 4℃ 冰箱保存备用.

1.2.5 抗菌活力 (U_a) 和溶菌活力 (U_L) 的测定

采用改进的 Hultmark 等^[7] 方法. 在 96 孔酶标板中加入不同青虾血淋巴上清液 (10 μL/孔), 再向孔内移加 90 μL 磷酸钾缓冲液 (pH 6.4 0.1 mol/L), 读取 490 nm 处的吸光值 A_1 ; 再加入 100 μL 磷酸钾缓冲液, 读取 490 nm 处的吸光值 A_2 , 计算系统误差 K , $K = \Sigma(A_2 - A_1) / n$; 安排 96 孔板奇数列测血淋巴上清液的 U_a , 偶数列测血淋巴上清液的 U_L ; 分别将待测血淋巴上清液移入酶标板奇数列和偶数列相应的孔 (10 μL/孔), 再向样品孔内加 90 μL 磷酸钾缓冲液 (pH 6.4 0.1 mol/L), 读取 490 nm 处的吸光值 A_k ; 取出 96 孔板, 往相应列的孔内分别移加 100 μL 大肠杆菌悬液和 100 μL 溶壁微球菌悬液, 读取 490 nm 处的吸光值 A_0 , 37℃ 温育 30 min 后, 读取 490 nm 处的吸光值 A . 按下列公式计算:

$$U_a = \frac{\sqrt{(A_0 - A_k \times K) - (A - A_k \times K)}}{A - A_k \times K},$$

$$U_L = \frac{(A_0 - A_K \times K) - (A - A_K \times K)}{A - A_K \times K},$$

如果 $A_0 \leq A$, U_a , U_L 均以 0 作为结果.

1. 2. 6 酚氧化酶 (PO)活力 (A_{PO})的测定

以 L-多巴为底物,采用改进的 Ashida等^[8]方法,在 96孔酶标板中进行.把 10 μ L血淋巴上清液加入 96孔酶标板中,然后向各孔中加入 200 μ L磷酸钾缓冲液 (pH 6.4 0.1 mol/L);最后向各样品孔中加入 10 μ L的 L-多巴 (上海伯奥生物科技公司,批号 970901)液 (0.01 mol/L);在酶标仪 (550 Bio-Rad)中振荡 4次,每隔 4 min 读取 490 nm 处的吸光值.酶活力以试验条件下, A_{490} 每 min 增加 0.001 为一个酶活力单位.

1. 2. 7 过氧化物酶 (POD)相对活力 (A_{POD})的测定

采用改进的史成银等^[9]方法.在 96孔酶标板中加入血淋巴上清液 (20 μ L/孔);然后加入 180 μ L 显色缓冲液 (7.3 g 一水柠檬酸, 11.86 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 定容至 1000mL);置于酶标仪中,读取 490 nm 处的 A 值 (A_3);向样品所在孔中加 20 μ L 显色液 (4 mL 邻苯二胺, 4 μ L 30% H_2O_2 , 10 mL 显色缓冲液);置酶标仪中摇匀后,避光显色 15 min,读取 490 nm 处的 A 值 (A_4).血淋巴上清液中 POD 相对活力以 $A_{POD} = A_4 - A_3$ 表示.

1. 2. 8 免疫保护率

中华绒螯蟹饲喂中草药饲料 30 d后,用中华绒螯蟹致病嗜水气单胞菌 CL99920 分别以 1×10^7 /mL, 5×10^6 /mL, 1×10^6 /mL 的菌含量注射蟹的第三步足基部,注射量 0.1 mL/只,每组 10只,空白对照组注射无菌生理盐水,剂量同免疫组,饲养水温 26~27℃.免疫保护率 = (对照组死亡率 - 免疫组死亡率) / 对照组死亡率 $\times 100\%$.

1. 2. 9 数据处理

采用 SPSS11.0对数据进行单因素方差分析.

2 结果

2. 1 饲喂中草药饲料后中华绒螯蟹各项免疫指标的测定结果

血细胞吞噬金黄色葡萄球菌见图 1, 2, 3 免疫指标的测定结果见表 2 免疫组蟹的血细胞吞噬百分比、血细胞吞噬指数均值分别为 71.51%、81.07%,与对照组的 68.32%、76.32% 差异显著 ($P < 0.05$);免疫组的溶菌酶活性 (U_L)、酚氧化酶活性 (A_{PO}) 均值分别为 0.32 13.41,与对照组 0.15 6.13 差异极显著 ($P = 0.000$ 0.004 < 0.01);免疫组的抗菌酶活性 (U_a)、过氧化物酶活性 (A_{POD}) 活性的均值分别为 0.51 0.29,比对照组的酶活性均值 0.29 0.27 高,但差异不显著 ($P = 0.574$ 0.841 > 0.05).

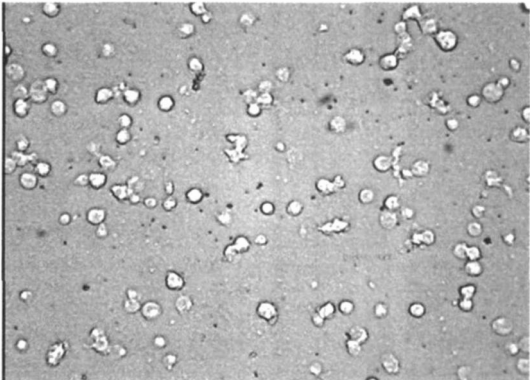


图 1 蟹血细胞 (10×40)

Fig.1 hemolymph of crab (10×40)

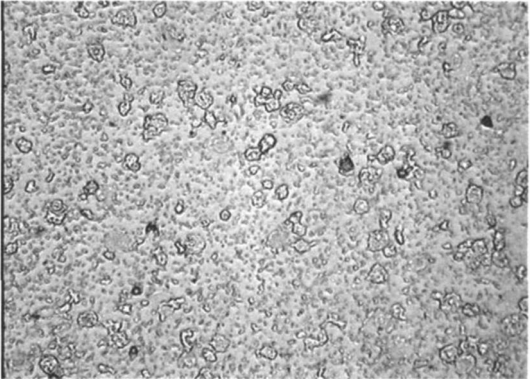


图 2 蟹血细胞吞噬金黄色葡萄球菌 (10×40)

Fig.2 The hemolymph of crab is phagocytizing *Staphylococcus aureus* (10×40)

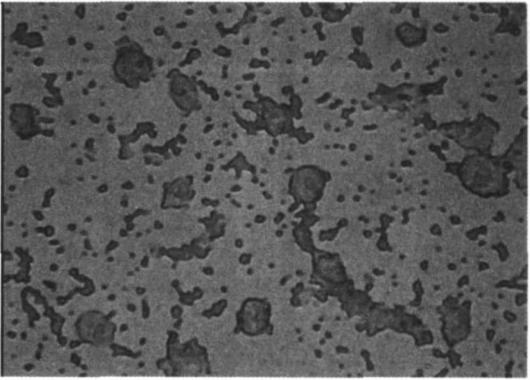


图 3 蟹血细胞吞噬金黄色葡萄球菌 (10×100)

Fig.3 The hemolymph of crab is phagocytizing *Staphylococcus aureus* (10×100)

表 2 饲喂中草药饲料后免疫指标的 *T* 检验结果

Table 2 The *T* test result after fed with Chinese herbal medicine as additive to normal food

免疫指标	对照组	免疫组	<i>P</i> 值
血细胞吞噬率 <i>%</i>	68.32±1.71	71.51±0.82	0.04 [*]
血细胞吞噬指数	76.32±0.28	81.07±1.35	0.03 [*]
溶菌酶活性 (<i>U_L</i>)	0.15±0.15	0.32±0.08	0.000 [*]
抗菌酶活性 (<i>U_a</i>)	0.49±0.18	0.51±0.12	0.574
酚氧化酶活性 (<i>A_{PO}</i>)	6.13±7.99	13.41±8.57	0.004 [*]
过氧化物酶活性 (<i>A_{POD}</i>)	0.27±0.26	0.29±0.24	0.841

注: * 差异显著, ** 差异极显著.

2.2 中草药的免疫效力试验结果

免疫效力试验结果见表 3 嗜水气单胞菌的最佳攻毒剂量为 5×10^6 cfu/mL, 对照组的死亡率为 80%, 明显高于中草药免疫组的死亡率 30%. 该中草药添加剂的免疫保护率为 62.5%.

表 3 饲喂中草药饲料后的免疫效力试验结果

Table 3 The immunity efficacy test of crab after fed with Chinese herbal medicine as additive to normal food

组别	细菌浓度 cfu/mL	试验总 数 /只	不同死亡时间 (d) 的累计死亡数					死亡率 <i>%</i>	免疫保护率 <i>%</i>
			2	4	6	8	10		
对照组	1×10^6	10	0	0	0	0	0	0	—
	5×10^6	10	1	4	5	8	8	80	—
	1×10^7	10	3	6	8	10	10	100	—
免疫组	1×10^6	10	0	0	0	0	0	0	—
	5×10^6	10	0	2	2	3	3	30	62.5
	1×10^7	10	1	3	6	10	10	100	—

3 讨论

研究发现,许多中草药可以提高机体免疫力^[10]. 本试验中选用的主药黄芪属“扶本固正”类中草药,现代免疫学认为它所含的多糖类物质能激活免疫细胞. 它丰富的营养成分保证了免疫机能的有效发挥. 其余几种分别具有清热解毒、可提高非特异性免疫细胞的吞噬作用等功用. 本试验研究表明,研制的复方制剂能明显提高河蟹的免疫功能.

甲壳动物体液中不具有免疫球蛋白,缺乏抗体介导的免疫反应,然而它们却能以不同的方式抵御病原体的侵袭并能识别异己物质,其免疫反应具有不同于脊椎动物的一些独特的性质,主要包括血细胞的吞噬、包掩以及血淋巴中的一些酶或因子的杀菌、抗菌作用等^[11],因此通常采用甲壳动物血淋巴液中一些酶的活性作为评价甲壳动物免疫水平的标准.

本试验检测了河蟹的五种免疫指标,结果表明复方中草药添加组蟹的这五项免疫指标都呈现升高的趋势,但免疫指标的显著水平有所差异,溶菌活力、酚氧化酶活性与对照组存在极显著差异 ($P < 0.01$),噬菌活性与对照饲料组存在显著差异 ($P < 0.05$),而抗菌活力、过氧化物酶活性、虽然免疫组均值比对照饲料组高,但差异不显著 ($P > 0.05$). 崔青曼等^[12]采用血细胞吞噬活性、血清抗菌活力作为免疫指标评价复方中草药添加剂对河蟹免疫功能的影响,结果试验组与对照组均差异显著,试验组免疫水平明显高于对照组. 沈锦玉等^[13]采用溶菌酶作为免疫指标评价免疫增强剂对中华绒螯蟹免疫功能的影响,结果表明注射免疫增强剂后溶菌酶活性与对照组差异不显著,口服免疫增强剂组的溶菌酶活性与对照组差异显著. 以上报道的其他酶与本研究反应结果一致,只是溶菌、抗菌酶活性与本研究有所差异,推测抗菌酶、溶菌酶可能有不同的诱导合成机制,也许与诱导源种类、剂量,诱导方式、实验动物状况等有很大关系. 王雷^[14]对中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力的特性研究亦表明,抗菌、溶菌活力产生是不同步的,即达到最高峰值时所需的时间不同. 由此可见,这些酶活性的变化可以作为评价中华绒螯蟹免疫功能及机体状态的常规指标. 这些酶的产生机理以及相互之间的密切联系尚需作进一步深入的研究.

攻毒试验结果亦表明,该中草药添加剂的免疫保护率为 62.5%. 本试验配制的中草药制剂能够增强

中华绒螯蟹抵抗疾病的能力, 但要获得最佳免疫保护效果, 还有待今后的试验中对中草药的配方进行进一步优化.

[参考文献]

- [1] 江西大学生物系, 江西省农科院水产科研所. 鱼用中草药 [M]. 南昌: 江西人民出版社, 1979.
- [2] 农业部《渔药手册》编撰委员会. 渔药手册 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1998. 292-362
- [3] 李呈敏. 中药饲料添加剂 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1993.
- [4] 马自佳. 鱼病中药防治 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998.
- [5] 王海华. 中草药防治水产动物疾病及药理学研究进展 [J]. 中兽医学杂志, 2004(4): 37-41.
- [6] Enright FM, Jeffers G W. In laboratory techniques of veterinary clinical immunology (Edited by Barta O) [J]. Springfield Illinois USA, 1984. 32(5): 58-65.
- [7] Hultmark D. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* [J]. *Eur J Biochem*, 1980, 106(1): 7-16.
- [8] Ashida M. Purification and characterization of preprophenoloxidase from hemolymph of the silkworm, *Bombyx Mori* [J]. *Arch Biochem Biophys* 1971, 144(2): 749-762.
- [9] 史成银, 宋晓玲. 对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒单克隆抗体的 ELISA 快速检测 [J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 116-118.
- [10] 徐延震. 中草药免疫初探 [J]. 山东农业大学学报, 1995, 26(1): 25.
- [11] 王雷, 李光友. 甲壳动物的体液免疫研究进展 [J]. 海洋科学, 1992, 5(3): 18-19.
- [12] 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.
- [13] 沈锦玉, 刘问, 曹铮. 免疫增强剂对中华绒螯蟹免疫功能的影响 [J]. 浙江农业学报, 2004, 16(1): 25-29.
- [14] 王雷, 李光友. 中国对虾血淋巴中的抗菌溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究 [J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(2): 179-185.

[责任编辑: 孙德泉]