

免疫增强剂对鲫鱼非特异性免疫功能的影响

刘 云, 孙 峰, 王 丹

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 利用主要成分为从海洋甲壳类中提取的甲壳胺作为免疫增强剂, 在饵料中添加不同的浓度(0.5%, 1%, 2%), 在 0, 10, 20, 30 d 时检测鲫鱼(*Carassius auratus*)的白细胞数量、白细胞吞噬功能的变化以及血清中酚氧化酶活力等免疫指标的变化。研究结果表明, 该免疫增强剂可以提高鲫鱼血液中白细胞数量和吞噬细胞的吞噬能力, 增强鲫鱼血清中酚氧化酶的活力, 对鲫鱼的生长无明显影响。鲫鱼的非特异性免疫功能随着免疫增强剂浓度的增加和投喂时间的延长而呈现增强的趋势。

关键词 鲫鱼(*Carassius auratus*); 免疫增强剂; 甲壳胺; 白细胞数量; 吞噬功能; 酚氧化酶活力
中图分类号 S942.1; R392.1 **文献标识码** A **文章编号** :1000-3096(2004)09-0042-04

随着鱼类养殖规模的扩大, 各种病害也频繁发生, 造成了巨大的经济损失, 这严重威胁着鱼类养殖业的发展, 因此对鱼类病害的有关防治也越来越受到重视。由于现在的养殖规模的限制, 养殖密度大, 水质恶化等现象, 也加大了鱼病防治的难度。目前有关鱼类病害的防治, 多是使用抗生素, 大量盲目使用抗生素不但防治效果差, 而且还造成药物残留、水体正常微生物种群失调、耐药性微生物的增加、养殖鱼类内脏机能损伤等一系列不良后果^[1]。采用免疫增强剂增强鱼体的免疫力与抗病力, 减少鱼病的发生, 正渐渐成为控制鱼病保证养殖效益的关键措施, 因而通过在鱼类的饵料中添加免疫增强剂成为国内外学者研究的热点^[2-8]。目前研究报道过的免疫增强剂主要有: 左旋咪唑, FK-565, MDP, β -葡聚糖, 肽聚糖, 脂多糖, 寡糖, 甲壳质, 甲壳胺, 维生素 C, 以及维生素 E 等^[9]。Sakai 报道注射甲壳质使得虹鳟的巨噬细胞活力以及对细菌感染的抵抗力都有增加, Anderson^[10-11]报道虹鳟经注射或浸泡甲壳胺后 NBT 阳性细胞, 杀伤细胞活力, 酚氧化酶活力以及免疫球蛋白含量也有增加。Esteban 对口服甲壳质作为鱼类免疫增强剂进行了报道^[12], 而口服甲壳胺作为鱼类免疫增强剂在国内外都未见报道。本实验采用甲壳胺拌饵投喂鲫鱼, 测定鲫鱼血液中白细胞数量、吞噬功能的变化及对鲫鱼血清中酚氧化酶活力的影响, 同时结合试验鲫鱼生长情况来观察免疫增强剂对鲫鱼非特异性免疫功能的影响, 为应用甲壳胺增强鱼类免疫力以防治病

害获得一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验用鱼

鲫鱼购自青岛南山水产市场, 全长 $12 \text{ cm} \pm 3 \text{ cm}$, 体质量 $17.5 \text{ g} \pm 7.5 \text{ g}$, 共 200 条。

1.1.2 养殖条件

水族箱 8 个(体积 $80 \text{ cm} \times 60 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$), 共两组。每组 4 箱, 其中对照组各 1 箱, 试验组各 3 箱, 每箱 25 条。水温 $20 \sim 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 用加热棒保持水温, 充氧泵充氧。适时吸出残饵及粪便, 日换水 1/3, 保证水质清洁、充足。

1.1.3 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的制备

在牛肉膏蛋白胨斜面培养基上培养, 用细菌生理盐水(0.85%)将金黄色葡萄球菌从斜面培养基上洗

收稿日期: 2003-06-25; 修回日期: 2003-09-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30000129); 国家重点基础研究发展规划 973 资助项目(G1999012005)

作者简介: 刘云(1969-), 副教授, 博士, 女, 黑龙江阿城人, 电话: 0532-2032913, E-mail: liuyun@ouc.edu.cn

出,制成菌悬液;将金黄色葡萄球菌悬液进行适当稀释,进行细菌计数,经计数测得金黄色葡萄球菌菌液浓度为 5×10^7 个/mL。用平板划线分离法对金黄色葡萄球菌进行分离纯化和菌种的保存。

1.1.4 饵料的制备

人工配合饲料(山东省海洋水产研究所,山东升索渔用饲料研究中心提供);免疫增强剂:甲壳胺(脱乙酰基 92.5% 粘度 8% 水份 9.3% 灰分 0.95% 不渗物 0.76%);将原饵料粉碎,按甲壳胺含量(对照组不加入,试验组 1、2、3 分别为 0.5%、1%、2%)将免疫增强剂与原饵料混匀制成试验用颗粒饵料。每天定时投喂饵料并确保试验用鱼摄食充足,投喂 30 d。

1.2 试验方法

1.2.1 鲫鱼生物学指标测定

每隔 10 d 进行 1 次生物学测定,每次取 3 个不同试验组和对照组标本各 5 条,测量体质量和全长。重复试验 1 次。

1.2.2 鲫鱼血液白细胞数量的测定

用无菌注射器从鲫鱼尾动脉取血(约 0.5 mL),用生理盐水进行适当稀释,3 000 r/min 离心 2 min,取一滴白细胞层血液于血球计数板上,用血球计数板对白细胞数量进行计数。

1.2.3 鲫鱼血液中吞噬细胞吞噬功能的测定

参照王军等的方法^[5]:(1)用无菌注射器从鲫鱼尾动脉取抗凝血 0.5 mL,加入 0.2 mL 金黄色葡萄菌液,(含菌量 5.0×10^7 个/mL);(2)置于 25℃ 培养箱中振荡培养 1 h,使其充分混匀;(3)取一滴全血—葡萄球菌混合液于洁净的载玻片上,推成薄片片,室温

待干;(4)用碱性美蓝染色 2~3 min,用水冲洗晾干;(5)置于油镜下观察,随机计数 100 个多形核白细胞中吞噬细菌的白细胞数,即为吞噬百分率(%),再数此 100 个多型核白细胞中吞噬的细菌总数,除以 100,得出每个细胞吞噬细菌平均数,即为吞噬指数。

1.2.4 鲫鱼血清中酚氧化酶活力的测定

参照 Ashida 的方法^[13]:用无菌注射器从鲫鱼尾动脉取抗凝血约 0.5 mL,5 000 r/min 离心,得上清液为鱼的血清。以 L-DOPA 为底物,将 0.1 mol/L, pH = 6.0 的磷酸钾缓冲液与 0.01 mol/L 的 L-DOPA 0.1 mL 及 0.1 mL 的待测血清于室温下混匀,每隔 2 min 测定其光密度值 $A_{490\text{nm}}$,以 $A_{490\text{nm}}$ 对反应时间作图,以试验条件下每分钟 $A_{490\text{nm}}$ 增加 0.001 为一个酶活力单位(U)。

2 结果

2.1 试验鲫鱼的生长

生物学测定结果经统计分析表明,在相似养殖管理条件下,服用甲壳胺的试验组鲫鱼在体长和体质重的增长上与对照组无明显差异,免疫增强剂含量较高的试验组 3 的生长速度稍有增加。经 t 检验:在第 30 d 时,在体长上,试验组 3 出现显著差异($P_3 = 0.03 < 0.05$),其他 2 个试验组尚未出现统计学上的差异($P_1 = 0.700 > 0.1$, $P_2 = 0.324 > 0.1$);在体质量上,试验组 3 出现统计学上的一般差异($P_3 = 0.063 < 0.1$),而其他 2 组尚未表现出统计学上的一般差异($P_1 = 0.290 > 0.1$, $P_2 = 0.188 > 0.1$),由此说明,免疫增强剂甲壳胺对鲫鱼的生长无显著影响。

表 1 试验鲫鱼体长测量结果

Tab.1 The body length of the tested crucian

时间	体长(cm)			
	对照组	试验组 1	试验组 2	试验组 3
第 1 天	10.20 ± 1.037	10.18 ± 0.968	10.20 ± 0.837	10.22 ± 0.876
第 10 天	10.38 ± 0.879	10.48 ± 0.829	10.57 ± 0.906	10.60 ± 0.894
第 20 天	10.52 ± 0.867	10.80 ± 1.095	10.98 ± 0.526	11.22 ± 1.092
第 30 天	10.64 ± 0.356	11.14 ± 0.805	11.30 ± 0.570	11.78 ± 0.570

表 2 试验鲫鱼体质量的测量结果

Tab.2 The body weight of the tested crucian

时间	体质量(g)			
	对照组	试验组 1	试验组 2	试验组 3
第 1 天	15.60 ± 0.742	15.62 ± 3.045	15.70 ± 0.570	15.74 ± 1.074
第 10 天	16.30 ± 3.718	16.70 ± 1.891	17.14 ± 2.885	17.72 ± 2.407
第 20 天	17.52 ± 0.936	18.12 ± 0.522	18.90 ± 4.464	19.50 ± 3.937
第 30 天	18.80 ± 3.033	20.50 ± 1.061	21.92 ± 3.753	22.30 ± 1.681

2.2 试验鲫鱼血液中白细胞的数量变化

虽然不同时间测得试验鲫鱼血液中各类白细胞的数量有一定的波动,但 3 个不同含量的试验组鲫鱼血液中白细胞的数量均不同程度地高于对照组鲫鱼

(表 3)。经 t 检验表明,经过 30 d 的投喂,3 个试验组鲫鱼血液中的白细胞数量明显高于对照组 ($P \leq 0.05$)。

2.3 试验鲫鱼吞噬细胞吞噬功能的测定

表 3 试验鲫鱼血液中白细胞数量

Tab.3 The number of leucocytes in the tested crucian blood

时间	白细胞数量($\times 10^7$ 个)			
	对照组	试验组 1	试验组 2	试验组 3
第 1 天	0.075 ± 0.005	0.081 ± 0.007	0.079 ± 0.002	0.084 ± 0.004
第 10 天	0.090 ± 0.011	0.250 ± 0.041	0.332 ± 0.047	0.453 ± 0.013
第 20 天	0.082 ± 0.005	0.550 ± 0.048	0.692 ± 0.042	0.810 ± 0.042
第 30 天	0.109 ± 0.007	1.072 ± 0.064	1.125 ± 0.022	1.687 ± 0.063

第 30 天时,对照组鲫鱼吞噬细胞的吞噬百分率为 27.2%,吞噬指数为 0.69;试验组吞噬细胞的吞噬百分率为 36.5%~58.4%,吞噬指数介于 0.85~1.25 之间(表 4)。 t 检验表明,添加了免疫增强剂的 3 个试验组的白细胞的吞噬百分率和吞噬指数都明显高于对照组(吞噬百分率: $P_1 < 0.05$, $P_2 < 0.05$, $P_3 < 0.05$;吞噬指数: $P_1 < 0.05$, $P_2 < 0.05$, $P_3 < 0.05$)。

表 4 试验鲫鱼吞噬细胞吞噬能力

Tab.4 The phagocytic functions of the crucian leucocytes

组别	吞噬率(%)	吞噬指数
对照组	27.2 ± 2.623	0.69 ± 0.028
试验组 1	36.5 ± 1.671	0.85 ± 0.028
试验组 2	45.3 ± 0.790	0.93 ± 0.022
试验组 3	58.4 ± 0.867	1.25 ± 0.038

2.4 试验鲫鱼酚氧化酶活力的测定

在服用了免疫增强剂后,试验组与对照组相比,酚氧化酶活力有很大的提高(表 5),经成组双样本均值分析(t 检验),3 个试验组与对照组相比其酚氧化酶活力从第 1 天开始就出现了统计学上的显著差异($P \leq 0.05$),并随着免疫增强剂剂量的增加,酚氧化

酶活力在增加。

3 讨论

当前,鱼类养殖病害频发,给养殖业带来巨大损失。而水体污染及高密度养殖都会造成鱼类自身的免疫机能低下,成为病害的暴发流行的主要原因之一。鱼类抗传染免疫中主要靠体液免疫和细胞免疫,在细胞免疫中,血液中白细胞起重要作用。它是机体非特异性免疫的重要组成部分^[14],因此,通过测定鱼类血液中白细胞数量和吞噬功能,可以反映出被测鱼类机体的免疫状态。本试验给鲫鱼服用了免疫增强剂后,通过测定特定的免疫指标,如血液中的白细胞数量,吞噬功能及血清中酚氧化酶活力等来评价免疫增强剂对试验鲫鱼免疫机能的影响。从实验结果看,服用该免疫增强剂的鲫鱼血液中白细胞数量,吞噬细胞的吞噬功能及血清中酚氧化酶的活力都得到了有效提高。而试验组鲫鱼在体长及体质量的增长上与对照组无异。这表明免疫增强剂对提高鲫鱼的免疫功能有一定的帮助,而且不会影响鲫鱼的生长。可见,在养殖鱼的饲料中添加适量的免疫增强剂对减少养殖鱼病害的发生会有一定好处,甲壳胺作为鱼类的免疫增强剂具有廉价易得,性质稳定易储存,值得在今后养殖生产中加以大力推广。

参考文献:

- [1] 潘连德,陈辉. 药物防治的临床药理学与水产药物学问题[J]. 水产科技情报, 1998, 25(4): 169-173.
- [2] Lall S P, Olivier G. Role of micronutrients in immune response and disease resistance in fish[J]. **Fish Nutrition in Practice**, 1993, 61: 101-118.
- [3] Wasgbo R, Glette J, Nilsen E R, et al. The impact of

表 5 试验鲫鱼血清中酚氧化酶活力测定结果

Tab. 5 The change of the phenol oxidase activities of the crucian

时间	酚氧化酶活力(U)			
	对照组	试验组 1	试验组 2	试验组 3
第 1 天	1.2 ± 0.08	1.5 ± 0.04	1.6 ± 0.07	1.4 ± 0.03
第 10 天	1.2 ± 0.10	1.7 ± 0.02	2.3 ± 0.17	3.3 ± 0.27
第 20 天	1.4 ± 0.12	2.4 ± 0.14	3.3 ± 0.18	5.2 ± 0.30
第 30 天	1.4 ± 0.03	3.8 ± 0.13	4.6 ± 0.23	6.7 ± 0.13

- nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmon salar* [J]. **Aquat Fish Manage**, 1994, 25: 175 – 179.
- [4] 王军, 鄢庆枇, 苏永全, 等. 免疫添加物对大黄鱼血液中白细胞数量及其吞噬功能的影响[J]. 海洋科学, 2001, 25(9): 44 – 46.
- [5] Siwicki A K, Anderson D P, Rumsey G L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non – specific immunity and protects against furunculosis[J]. **Vet Immunol Immunopathol**, 1994, 41: 125 – 139.
- [6] 鄢庆枇, 苏永全, 周化民, 等. 口服免疫添加剂对养殖大黄鱼免疫机能影响的初步研究[J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2001, 6(2): 134 – 136.
- [7] 罗庆华. 杜仲叶粉对鲤鱼免疫力的影响[J]. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 2002, 28(1): 50 – 53.
- [8] 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 – 491.
- [9] Masahiro S. Current research status of fish immunostimulants[J]. **Aquaculture**, 1999, 172: 63 – 92.
- [10] Sakai M, Kamiya H, Ishii S, *et al.* The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. **Diseases in Asian Aquaculture**, 1992, 1: 413 – 417.
- [11] Anderson D P, Siwicki A K. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in rook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion[J]. **The Progressive Fish Culturist**, 1994, 56: 258 – 261.
- [12] Esteban M A, Cuesta A, Ortuno J, *et al.* Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system[J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2001, 11: 303 – 315.
- [13] 王雷, 李光友, 毛远兴, 等. 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.
- [14] 孙建和, 严亚贤, 陈怀青, 等. 鲫鱼的细胞免疫应答研究. 上海农学院学报, 1998, 16(2): 89 – 915.

Effects of immunostimulants on the non – specific immunity of crucian (*Carassius auratus*)

LIU Yun , SUN Feng , WANG Dan

(Colleges of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Jun., 25, 2003

Key words: crucian (*Carassius auratus*); immunostimulants ; chitosan ; leucocytes ; phagocytosis ; phenol oxidase activities

Abstract : To determine the effects of chitosan on innate immune response of crucian (*Carassius auratus*), fish were fed diets containing 0 (control) , 0.5% , 1% , 2% chitosan for 10, 20 and 30 days. The growth rate, the number of leucocytes and the phagocytes functions together with the phenol oxidase activities were studied at each of the assayed time. The results showed that the number of leucocytes increased and the phagocytic activities were enhanced with the phenol oxidase activities were greatly increased, at the same time, no statistically significant impact on the growth rate was observed. These results showed the effects of immunostimulants on non – specific immunity of crucian enhanced with increased dose and time.

(本文编辑 刘珊珊)