

褐藻低聚糖对提高大菱鲆免疫机能的作用

王鹏¹, 江晓路¹, 江艳华², 曹杰铭³, 杨学宋⁴

(1. 中国海洋大学 食品科学与工程系, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 3. 沈阳市食品药品监督管理局, 辽宁 沈阳 110002; 4. 山东莱州水产研究所, 山东 莱州 261400)

摘要: 研究了在养殖过程中投喂酶解制备的褐藻低聚糖对大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 鱼苗免疫机能的影响, 对大菱鲆鱼苗血液中的酸性磷酸酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶和头肾淋巴细胞吞噬能力进行了测定。实验发现, 褐藻低聚糖能够提高大菱鲆血液中酸性磷酸酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶活力; 头肾淋巴细胞吞噬率较对照组提高 15.4%, 吞噬指数则无显著差异。结果表明在大菱鲆鱼苗的养殖过程中褐藻低聚糖可作为一种非特异免疫调节剂提高大菱鲆机体的免疫能力。

关键词: 褐藻低聚糖; 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*); 免疫调节

中图分类号: S965 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)08-0006-04

大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 属于脊椎动物 鲽形目、鲆科、菱鲆属, 是我国近年来引进的新型养殖品种。大菱鲆同其它硬骨鱼类相似, 机体抵抗外来病原体的侵害主要通过对抗原异物无针对性的非特异性免疫和对抗原异物有针对性的特异性免疫。其中非特异性免疫是个体出生时就具有的天然防御功能, 在初期具有重要的保护作用。此后随着个体重要组织和器官如头肾、脾脏等的成熟, 特异性免疫逐渐成熟、淋巴细胞分化并最终形成完整的免疫系统^[1]。许多研究表明低聚糖可作为一种免疫促进剂诱导机体免疫应答。Rina 等^[2] 利用一种五糖寡糖注入 BALB/c 小鼠体中, 发现该糖可同时诱发小鼠产生迟发性超敏反应和产生基于巨噬细胞数量的非特异性免疫应答。Kaname 等^[3] 对低聚糖的活性与构效关系的研究发现随着聚合度及低聚糖磺化程度的提高, 其抗病毒的活性也相应增加。免疫低聚糖作为一种非特异性免疫调节剂, 具有促进或诱发宿主防御反应, 增强生物体的抗病能力^[4]。

目前, 国内对于鱼类养殖, 尤其是在鱼苗期的免疫机能的变化及低聚糖对鱼类免疫机能的调节作用方面研究较少。作者研究的目的是利用专一性褐藻胶裂合酶制备的褐藻低聚糖对大菱鲆鱼苗进行长期投喂试验。在一定的养殖规模下, 对褐藻低聚糖对大菱鲆非特异体液免疫因子和细胞免疫机能的调节作用做了系统的研究, 并初步探讨了养殖过程中

鱼苗免疫机能的变化。结果表明该褐藻低聚糖对大菱鲆具有一定的免疫调节及增强作用, 为大菱鲆的健康养殖及抵御病害提供了理论依据。

1 材料与 方法

1.1 材料

1.1.1 药饵制备

该低聚糖是由底物专一性褐藻胶裂合酶将褐藻胶进行酶解, 通过工艺控制和乙醇沉淀定向制备得到, 经 GPC (gel permeation chromatography) 流动相采用 0.7% Na₂SO₄, 流速 0.5 mL/min, RI 作检测器, 测定该低聚糖的重均分子量 (M_w) 为 4 388 u 的低聚糖 (图 1)。投喂时按饵料量 1% 的低聚糖加入基础饵料中研磨、混匀, 最后制成颗粒状, 干燥备用。

1.1.2 试验用鱼及养殖环境

褐藻低聚糖对大菱鲆的免疫调节试验是在莱州大华水产有限公司养殖实验基地进行。试验用大菱鲆平均体长约 4 cm, 放苗量 200 尾/池。养殖过程中

收稿日期: 2004-02-08; 修回日期: 2004-06-04

基金项目: 山东省科技攻关项目 (003110112)

作者简介: 王鹏 (1980-), 男, 山东烟台人, 博士研究生, 研究方向: 海洋微生物资源与应用; 江晓路, 通讯作者, 电话: 0532-82032290, E-mail: foodmic@mail.ouc.edu.cn

完全使用水泥池养殖, 面积 62 m²/池。养殖水深 100 cm。实验设立一组试验池, 一组对照池。在养殖过程中每天投喂 4 次, 其中对照组投喂基础饵料, 试验组在连续投喂含有褐藻低聚糖的复合饵料。

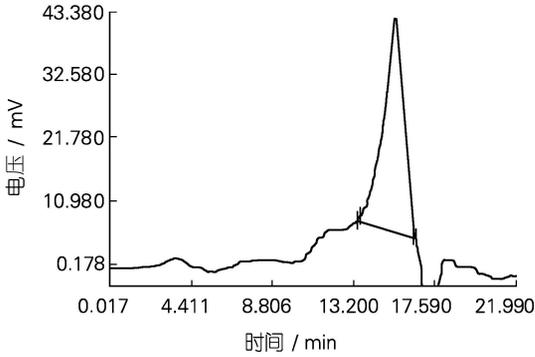


图 1 酶解褐藻低聚糖的 GPC 图谱

Fig. 1 The average molecular weight of alginate oligosaccharides determined by GPC

1.1.3 实验用菌种

白色念珠菌(*Candida albicans*)在麦氏培养基斜面上活化后用于头肾淋巴细胞吞噬实验。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

自鱼苗投喂低聚糖放养后, 每 15 d 取样 1 次。每次从各池中分别随机选取大菱鲂 10 尾。

鱼苗血液制备: 用无菌采血器从大菱鲂尾部抽取血液, 置于离心管中, -18℃冻藏保存。通过冻融法破碎细胞, 在 4℃, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液进行酸性磷酸酶、过氧化物酶及超氧化物歧化酶活力的测定。

1.2.2 酸性磷酸酶(ACP)活力的测定

ACP 活力的测定按照磷酸苯二钠法^[5]操作, ACP 活力定义为: 以每 100 μL 血清在 37℃与底物作用 15 min, 产生 1 mg 酚为 1 U。

1.2.3 过氧化物酶(POD)活力的测定

过氧化物酶(POD)活力的测定按照沃辛通(Worthington)法^[6]测定。过氧化物酶(POD)活力定义为: 在规定条件下, 于 25℃、pH 7.0, 每分钟分解 1 μmol 过氧化氢时所需的酶量为一个过氧化物酶单位。

1.2.4 超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定

SOD 活力的测定采用连苯三酚自氧化法^[7], 以每毫升反应液中, 每分钟抑制连苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量定义为一个活力单位。

1.2.5 头肾淋巴细胞吞噬作用的测定

淋巴细胞吞噬作用的测定按文献[8]进行, 用无菌生理盐水洗下经活化的白色念珠菌斜面, 煮沸灭活后制成 1.2 × 10⁷ 个/mL 的菌悬液。实验组和对照组各取 10 尾, 用无菌镊子取出大菱鲂头肾组织, 于载玻片上经 Giemsa 液染色 5 min。每尾检测 100 个淋巴细胞, 计算吞噬率和吞噬指数。

$$\text{吞噬率} = (\text{吞噬细胞数} / \text{淋巴细胞数}) \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} = \text{被吞噬细胞总数} / \text{吞噬细胞数}$$

2 结果

2.1 褐藻低聚糖对酸性磷酸酶的影响

表 1 是对大菱鲂鱼苗血液酸性磷酸酶活力的测定结果。在 3 次采样结果中试验组大菱鲂酸性磷酸酶活力均高于对照组, 其中第 30 天时, 试验组酸性磷酸酶活力较对照组结果差异显著 ($P < 0.05$)。

表 1 褐藻低聚糖对大菱鲂酸性磷酸酶活力的影响

Tab 1 Effect of alginate oligosaccharides on ACP activities of *Scophthalmus maximus*

组别	ACP 活力(U/mL)		
	15 d	30 d	45 d
试验组	26.49 ± 2.77	27.94 ± 0.23*	31.34 ± 5.02
对照组	24.55 ± 1.71	21.47 ± 1.68	18.09 ± 4.62

* 与对照相比 $P < 0.05$

2.2 褐藻低聚糖对过氧化物酶的影响

表 2 是大菱鲂鱼苗血液过氧化物酶活力的测定结果。试验结果表明, 在投喂过程中, 试验组大菱鲂过氧化物酶活力均高于对照组, 且在第 45 天的采样结果中差异显著 ($P < 0.05$)。

表 2 褐藻低聚糖对大菱鲂过氧化物酶的影响

Tab 2 Effect of alginate oligosaccharides on peroxide activities of *Scophthalmus maximus*

组别	POD 活力(U/mL)		
	15 d	30 d	45 d
试验组	4.59 ± 0.59	4.22 ± 0.16	4.45 ± 0.22*
对照组	3.91 ± 0.05	4.10 ± 0.53	3.50 ± 0.31

* 与对照相比 $P < 0.05$

2.3 褐藻低聚糖对超氧化物歧化酶的影响

表3是大菱鲆鱼苗血液超氧化物歧化酶活力的测定结果。结果表明,投喂低聚糖后,试验组的酶活力在3次的测定中均高于对照组,且在第30天结果中,试验组SOD酶活力显著高于对照组($P < 0.05$)。

表3 褐藻低聚糖对大菱鲆超氧化物歧化酶活力的影响

Tab.3 Effect of alginate oligosaccharides on superoxide dismutase activities of *Scophthalmus maximus*

组别	SOD 活力(U/mL)		
	15 d	30 d	45 d
试验组	169.5±18.4	112.4±11.5*	117.3±22.2
对照组	135.2±20.7	76.6±15.1	101.0±18.4

* 与对照相比 $P < 0.05$

2.4 褐藻低聚糖对头肾组织淋巴细胞吞噬功能的影响

表4是大菱鲆头肾淋巴细胞的吞噬作用的测定结果。其淋巴细胞的吞噬作用是在投喂褐藻低聚糖60d后测得(此时头肾已基本具有淋巴样器官的作用),实验发现,投喂低聚糖后,试验组大菱鲆淋巴细胞吞噬率较对照组提高15.4%,而试验组吞噬指数与对照组相比无明显变化。

表4 褐藻低聚糖对大菱鲆头肾淋巴细胞吞噬作用的影响

Tab.4 Effect of alginate oligosaccharides on phagocytic percent and index of lymphocyte of *Scophthalmus maximus*

组别	鱼数量 (尾)	细胞数 (个)	吞噬率 (%)	吞噬指数
试验组	10	100×10	29.14±2.10	2.37±0.29
对照组	10	100×10	25.25±2.17	2.40±0.33

3 讨论

3.1 褐藻低聚糖对大菱鲆体液免疫因子的影响

酸性磷酸酶是生物体内的一种重要的代谢调控酶,它可以在酸性条件下水解外源带有磷酸酯的异物,从而起到免疫防御的作用^[9]。超氧化物歧化酶则是机体抗氧化防御系统的重要酶之一,它主要通过催化 $O_2^{\cdot-}$ 反应生成 H_2O_2 达到清除活性氧的作用,从而使机体免受氧化伤害^[10]。而过氧化物酶催化过氧化氢与氢供给体之间的氧化反应,促进细胞内呼吸爆发,进而提高粒细胞对外源异物的吞噬能力^[11]。本次试验发现,通过对大菱鲆长期投喂褐藻低聚糖,试验组较对照组均能够不同程度地提高大菱鲆鱼苗

血液的酸性磷酸酶、过氧化物酶及超氧化物歧化酶活力。在试验中,随着养殖过程的进行,对照组酸性磷酸酶和过氧化物酶活力分别出现不同程度的降低,而试验组大菱鲆经低聚糖投喂后,相应的酶活力均高于对照组,且在3次采样结果中酸性磷酸酶活力呈上升趋势。这说明该褐藻低聚糖能够在一定程度上非特异性诱导、刺激机体提高与体液免疫相关因子的酶活力,进而起到对大菱鲆免疫防御的调节作用。在SOD酶活力的测定中,试验组和对照组均出现酶活力降低,但试验组变化幅度较小,这突出表现在第30天的结果中,因此可以推断,该褐藻低聚糖能够诱导酶活力的提高,进而抑制个体在生长过程中遇到的与免疫调节相关酶活力的突然降低。

3.2 褐藻低聚糖对大菱鲆细胞免疫因子的影响

头肾是硬骨鱼类重要的淋巴样器官,在参与免疫反应方面具有特殊作用。现有的文献表明硬骨鱼类头肾中含有B淋巴细胞、T淋巴细胞和各种粒细胞等免疫细胞^[12,13]。在遇到外源异物时,首先由吞噬细胞对其吞噬,一方面吞噬细胞体内的溶酶体酶对异物进行杀灭和消化,另一方面吞噬细胞将外来抗原物质进行加工,以激活T淋巴细胞、B淋巴细胞的增殖、分化,借此来调节免疫功能^[14,15]。同样有研究证明,其它一些生物活性多糖,如虫草多糖、脂多糖可以通过特异性激活并增强淋巴细胞的吞噬作用。本试验证明,酶解褐藻低聚糖对淋巴细胞的增强作用主要表现在,它能够提高头肾淋巴细胞的吞噬率,但对吞噬指数的影响不大,即通过该褐藻低聚糖能够非特异性诱导提高头肾免疫器官对外源异物的识别、吞噬的淋巴细胞数,但就参与吞噬的淋巴细胞而言,该褐藻低聚糖并不能明显地提高单个细胞对外源异物的吞噬能力。因此本研究结果证明该褐藻低聚糖能够从体液及细胞水平提高大菱鲆鱼苗的免疫水平,是具有开发价值的免疫增强剂。

参考文献:

- [1] Press C, Evensen ϕ . The morphology of the immune system in teleost fishes [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, 9: 309-318.
- [2] Rina S D. A novel pentasaccharide from immunostimulant oligosaccharide fraction of buffalo milk [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1 428 (2 3): 433-445.
- [3] Kaname K, Hideki N, Naoki Y, *et al.* Synthesis of sulfated oligosaccharide glycosides having high anti-HIV activity and the relationship between activity and chemical structure [J]. *Carbohydr Res*, 1999, 315(3

- 4): 234-242.
- [4] 刘岩, 江晓路. 聚甘露糖醛酸对中国对虾免疫相关酶活性的溶菌溶血活性的影响 [J]. 水产学报, 2000, 34 (6): 549-553.
- [5] 宋善俊. 临床医师手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 378-380.
- [6] 施特尔马赫. 酶的测定方法 [M]. 钱嘉渊译. 北京: 中国轻工业出版社, 1992. 276-278.
- [7] 邓碧玉. 改良的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18 (2): 163.
- [8] 朱忠勇. 实用医学检验学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1997. 177-179.
- [9] 管华诗. 海水养殖动物的免疫、细胞培养和病害研究 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1999. 23-24.
- [10] McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzyme function for erythrocyte [J]. *Biol Chem*, 1969, 224: 6 049-6 055.
- [11] Chance B, Machly A C. Assay of catalase and peroxidases [A]. Colowick S P. *Methods in Enzymology* (2) [C]. New York: Academic press, 1995. 764-775.
- [12] Bigaj J, Dulak J, Hupoule M, *et al.* Lymphoid organs of *Gasterosteus aculeatus* [J]. *Fish Biol*, 1987, 31: 371-382.
- [13] Messguer J, Lopez Ruiz A, Bajar S, *et al.* Reticuloendothelial stroma of the head kidney from the seawater teleost gilthead seabream: an ultrastructural and cytochemical study [J]. *Anatomical Record*, 1995, 241: 303-309.
- [14] Tahir A, Secombes C J. Modulation of dab macrophage respiratory burst activity [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1996, 6(2): 135-146.
- [15] Betoulle S, Duchiron C, Deschaux P, *et al.* Lindane differently modulates intracellular calcium levels in two populations of rainbow trout immune cells: Head kidney phagocytes and peripheral blood leucocytes [J]. *Toxicology*, 2000, 145(2, 3): 203-215.

Immunoregulatory effect of alginate oligosaccharides on *Scophthalmus maximus*

WANG Peng¹, JIANG Xiao-lu¹, JIANG Yan-hua², CAO Jie-ming³, YANG Xue-song⁴
 (1. Food Engineering Department, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Food and Drug Administration, Shenyang 110002, China; 4. Fishery Research Institute of Laizhou, Laizhou 261400, China)

Received: Feb., 8, 2004

Key words: alginate oligosaccharides; *Scophthalmus maximus*; immunoregulation

Abstract: To study the immunoregulatory effects of alginate oligosaccharides on the cultured *Scophthalmus maximus*, acid phosphatase (ACP), peroxide activities (POD), superoxide dismutase (SOD) of blood cells, and phagocytic capacity of lymphocyte of head kidney were determined. The results showed that the alginate oligosaccharides could improve the activities of ACP, POD and SOD of blood, and that phagocytic percent could be increased by 14.5%, but index of lymphocyte had no prominent difference. The alginate oligosaccharides could act as a potential non-specific immunoregulator in the aquaculture of *S. maximus*.

(本文编辑: 刘珊珊)