

家蝇抗菌肽对凡纳滨对虾生长性能及免疫相关指标的影响

陈冰, 曹俊明, 陈平洁, 赵红霞, 蓝汉冰, 朱选

(广东省农业科学院 畜牧研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 通过 8 周的生长实验研究了饲料中添加家蝇幼虫抗菌肽提取物对初始体质量为 (0.86 ± 0.01) g 的凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的生长性能、体成分及免疫相关指标的影响。家蝇抗菌肽提取物添加量分别为 0、1 000 mg/kg、2 000 mg/kg、3 000 mg/kg、4 000 mg/kg、5 000 mg/kg, 每组饲料设 4 个重复, 每个重复饲养 40 尾虾。结果显示, 在一定添加水平范围内, 家蝇抗菌肽能显著提高凡纳滨对虾成活率、增重率、特定生长率、饲料效率 ($P < 0.05$), 当抗菌肽提取物添加量为 2 000 ~ 3 000 mg/kg 时, 以上 4 个指标均达最高, 且显著高于对照组 ($P < 0.05$)。以增重率为评价指标, 凡纳滨对虾饲料中家蝇抗菌肽提取物的最适添加量为 2 900 mg/kg。当抗菌肽提取物添加量为 2 000 ~ 3 000 mg/kg 时能显著提高虾体的粗蛋白和灰分含量, 虾体粗脂肪不受添加抗菌肽水平的显著影响。添加 2 000 ~ 5 000 mg/kg 抗菌肽提取物组与对照组相比能显著提高对虾血细胞数量; 添加 3 000 mg/kg 抗菌肽提取物时对虾血细胞吞噬率最高。当抗菌肽提取物添加量为 2 000 ~ 3 000 mg/kg 时, 对虾血清中酚氧化酶 PO、过氧化物酶 POD、碱性磷酸酶 AKP、溶菌酶 LZM 的活性和总抗氧化能力 T-AOC 均维持在一个较高的水平, 且显著高于对照组; 超氧化物歧化酶 SOD 的活性在各组组间差异不显著 ($P > 0.05$)。肝胰腺中 AKP、SOD、T-AOC 活性各组间差异均不显著 ($P < 0.05$); LZM 活性以 3 000 mg/kg 组最高, 显著高于其他组。结果表明, 饲料中添加适量的家蝇抗菌肽对凡纳滨对虾有一定的促生长作用, 并能提高对虾的免疫相关指标。[中国水产科学, 2010, 17 (2): 258-266]

关键词: 抗菌肽; 凡纳滨对虾; 生长性能; 免疫

中图分类号: S97

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)02-0258-09

抗菌肽是生物体内的内源性抗生素, 是生物体先天性免疫体系的重要组成部分^[1]。昆虫抗菌肽或抗菌蛋白是昆虫在诱导或非诱导情况下产生的具有体液免疫功能的小分子物质, 参与机体对入侵病原微生物的免疫反应。该类物质分子量较小, 具有对热稳定、水溶性好、广谱抗菌等特点^[2], 而且抗菌机理与抗生素完全不同, 不易产生耐药性^[3], 其已成为转基因抗病动植物的基因来源和新型抗菌、抗癌药物研究开发的目标。家蝇从幼虫到成虫都生活在杂菌横生的污浊环境中, 体内存在着独特的免疫防御机制, 具有很高的理论研究价值和潜在的应用价值。中国对家蝇抗菌物质的研究进展缓慢, 本世纪初国内学

者柏鸣等^[4]、陈留存等^[5]、安春菊等^[6]、宫霞等^[7]对家蝇抗菌肽进行了分离纯化和生物学研究, 也有学者试图将家蝇抗菌肽应用于畜禽饲料^[8-14], 并均有成功报道。上述研究结果预示, 抗菌肽作为一种安全、无残留、环保的饲料添加剂, 将有广阔的应用前景。

目前, 抗菌肽用于水产养殖生产的研究较少, 仅发现姜兰等^[15]以制备重组昆虫抗菌肽抑制水产养殖常见病原菌的报道。为了了解家蝇抗菌肽对对虾生长和相关的一些生理生化指标的影响, 本研究以凡纳滨对虾为对象, 在饲料中分别添加不同剂量的家蝇抗菌肽提取物, 观察其对凡纳滨对虾生长性能、对虾血细胞数、吞噬率和免疫相关酶活性的影响, 并确定饲

收稿日期: 2009-04-28; 修订日期: 2009-07-28.

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(060285383); 广州市知识产权局项目(穗知[2008]50号).

作者简介: 陈冰(1982-), 女, 硕士, 专业方向为水产动物营养与饲料科学. E-mail: chenbing114@163.com

通讯作者: 曹俊明, 研究员, 博士. Tel: 020-87596219; E-mail: junmcao@163.com

料中家蝇抗菌肽提取物的最适添加量,为抗菌肽在凡纳滨对虾饲料中的合理应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 家蝇抗菌肽的提取及制备

家蝇抗菌肽的提取参照屈军梅等^[8]的方法,家蝇蝇蛆干制品由天津贾立明蚯蚓养殖有限公司提供,取蝇蛆干 45 g,粉碎,以乙酸铵缓冲液(0.05 mol/L,pH 5.5)按体积比 1:10 浸泡 4~5 h,冰浴中匀浆,沸水浴处理 10 min,收集上清液,置于-20℃冰箱中保存。

1.2 实验饲料

按表 1 的各种原料和配方配制基础饲料,并作为对照饲料,在基础饲料中分别添加 1 000 mg/kg、2 000 mg/kg、3 000 mg/kg、4 000 mg/kg、5 000 mg/kg 的家蝇幼虫抗菌肽提取物(剂量的添加以蝇蛆干粉状的质量来计算,折算成提取后相应体积的上清液添加到饲料中)制备 5 种试验饲料。各种饲料原料全部粉碎过 60 目筛,按表 1 饲料配方称重,均匀混合,挤压制粒成直径为 1.0 mm 的颗粒,于-20℃的冰箱中保存,备用。

表 1 实验饲料配方和营养成分分析
Tab. 1 Formulation and nutrient composition of experimental diets % , DW

原料组成 Ingredients	含量 Content	原料组成 Ingredients	含量 Content
鱼粉 Fish meal	27.00	鱼油 Fish oil	1.00
豆粕 Soybean meal	23.00	大豆磷脂 Soybean lecithin	2.00
花生粕 Peanut meal	10.00	维生素预混料 Vitamin premix ¹	0.10
乌贼粉 Cuttlefish meal	5.00	矿物质预混料 Mineral premix ²	0.50
虾壳粉 Shrimp shell meal	4.00	胆碱 Choline chloride	1.00
酵母 Yeast powder	3.00	黏合剂 Adhesive	2.00
高筋面粉 Wheat flour	20.00	维生素 C Vitamin C	0.10
沸石粉 Zeolites	1.30	水分 Moisture	6.13
营养成分 Nutrient composition		灰分 Ash	11.04
粗蛋白 Crude protein	38.11		
粗脂肪 Ether extract	7.57		

注: 1) 维生素预混料配方(g/kg 预混料): V_A,16; V_{D3},1; V_E,40; V_{K3},3.86; V_{B1},6.15; V_{B2},7.5; V_{B6},10.1; 泛酸钙,15.3; 叶酸,2.1; 生物素,10; 烟酸,30.15; V_{B12},1; 肌醇,31.25; V_C,171.42; 纤维素,654.17。2) 矿物质预混料配方(g/kg 预混料): KCl,229.08; NaCl,118.68; MgSO₄·7H₂O,292.16; FeSO₄·7H₂O,9.9; ZnSO₄·7H₂O,7.34; MnSO₄·H₂O,10.32; KI,0.015 6; CoCl₂·6H₂O,0.106 4; NaSO₃,0.013 2; CuSO₄·5H₂O,1.68; 沸石粉,331。
Note: 1) Vitamin premix contained (in per kg premix): V_A 16, V_{D3} 1, V_E 40, V_{K3} 3.86, V_{B1} 6.15, V_{B2} 7.5, V_{B6} 10.1, calcium pantothenate 15.3, PTGA 2.1, V_H 10, VPP 30.15, V_{B12} 1, inositol 31.25, V_C 171.42; cellulose 654.17。2) Mineral premix contained (in per kg premix): KCl 229.08, NaCl 118.68, MgSO₄·7H₂O 292.16, FeSO₄·7H₂O 9.9, ZnSO₄·7H₂O 7.34, MnSO₄·H₂O 10.32, KI 0.0156, CoCl₂·6H₂O 0.1064, NaSO₃ 0.0132, CuSO₄·5H₂O 1.68, Zeolites 331.

1.3 实验虾及饲养管理

实验凡纳滨对虾由广州虾苗场提供,取体质量(0.86±0.01)g 的健康活泼的凡纳滨对虾 960 尾随机分为 6 组,每组 4 个重复,每个重复 40 尾,驯养 1 周。在实验期间,每天喂料 3 次,喂料时间分别为 8:30、14:30 和 20:30,日投喂率为凡纳滨对虾体质量的 7%~21%(根据虾的摄食情况来调节投喂率)。实验持续采用循环过滤水系统,保持充氧。24 只容积为 250 L 的圆桶型水族箱,水深约 0.6 m,pH 值保持在 7.8~8.0 之间,水温为 26.0~29.5℃,

盐度为 5.2 左右,NH₄⁺ 水平低于 0.005 mg/L,溶解氧高于 6.0 mg/L。生长实验的饲养周期为 8 周。

1.4 样品采集

饲养结束时,对虾空腹 24 h,称终末体质量,统计死亡率。每个重复随机取 5 尾虾,备测虾体灰分、粗脂肪、粗蛋白。随机从每个重复取 10 尾虾,采集虾血和剥离肝胰腺并制备血清和肝胰腺匀浆液。另外每个重复再随机取 4 尾虾,进行血细胞计数实验。再从每个重复中随机取 6 尾虾进行血细胞吞噬率测定。

1.5 样品分析

1.5.1 常规营养成分分析 饲料的水分、灰分、粗蛋白、粗脂肪及虾体的灰分、粗脂肪、粗蛋白均按国标方法进行测定^[16]。

1.5.2 生长指标计算 增重率(Weight gain rate, WGR, %)=(终末体质量-初始体质量)×100/初始体质量。成活率(Survival rate, SR, %)=实验结束时虾尾数×100/实验开始时放虾尾数。特定生长率(Specific growth rate, SGR, %/d)=(ln 终末平均体质量-ln 初始平均体质量)/饲养天数×100。饲料效率(Feed efficiency, FE, %)=总体质量增加量/总饲料投喂量×100。

1.5.3 生理生化指标分析 参照冯守明^[17]的方法略做改动,用1 mL消毒的注射器抽取180 μL抗凝剂^[18-19],然后从对虾心脏中抽取血淋巴至200 μL(稀释倍数为10倍),立即将注射器中的混合物注到血球计数板上,按照动物白细胞的计数方法^[20]计数血细胞总数。血细胞吞噬率的测定方法采用TTC(氯化三苯四氮唑蓝)还原法^[21],采用体内实验,将TTC(氯化三苯四氮唑蓝)用Hank's液配成0.01%的溶液,每尾虾注射20 μL,40 min取心脏血,常规涂片后甲醇固定,用Wright's液染色5 min,以每100个血细胞中吞噬TTC细胞数为吞噬百分率。以L-多巴为底物,采用改进的Ashida等^[22]方法测定血清酚氧化酶PO活力,酶活力以试验条件下,OD₄₉₀每分钟增加0.001为1个酶活力单位。采用改进的史成银等^[23]方法测定血清过氧化物酶POD相对活力,血清中POD相对活力以 $A_{\text{POD}}=A_2-A_1$ 表示。血清和肝胰腺中碱性磷

酸酶AKP的测定参照宋善俊^[24]的磷酸苯二钠法,以每100 mL样品在37℃水浴中与底物作用15 min,产生酚1.0 mg作为1个酶活性单位(1U)。血清和肝胰腺中超氧化物歧化酶SOD的测定采用改进的邻苯三酚自氧化法^[25],把在1 mL反应液中,每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达50%时的酶量定义为1个酶活性单位。匀浆上清液总蛋白、血清和肝胰腺中溶菌酶LZM、血清和肝胰腺中总抗氧化能力T-AOC的活性测定,均参照南京建成生物工程研究所试剂盒说明书。

1.6 数据统计分析

实验结果采用平均值±标准误差($\bar{x} \pm \text{SE}$)表示,采用SPSS13.0统计软件进行统计分析。经方差分析之后有显著差异再做Duncan's多重比较进行组间显著性差异的两两比较,显著水平 P 为0.05。

2 结果与分析

2.1 生长性能

2.1.1 凡纳滨对虾的成活率、增重率、特定生长率、饲料效率 不同的抗菌肽添加水平显著影响凡纳滨对虾的终末体质量、成活率、增重率、特定生长率和饲料效率(表2)。所有添加抗菌肽组凡纳滨对虾的终末体质量均显著高于对照组($P < 0.05$),最高值出现在3 000 mg/kg组;成活率以2 000 mg/kg组最高,显著高于对照组和5 000 mg/kg组;增重率和特定生长率以3 000 mg/kg组最高,且显著高于对照组;饲料效率以2 000 mg/kg组最高,且显著高于对照组、1 000 mg/kg、4 000 mg/kg和5 000 mg/kg组,2 000 mg/kg和3 000 mg/kg组组间差异不显著($P > 0.05$)。

表2 家蝇抗菌肽不同添加量组凡纳滨对虾的成活率、增重率、特定生长率及饲料效率

Tab. 2 Survival rate, growth and feed efficiency in shrimp groups with different addition level of ovntibacterial peptides

$n=40; \bar{x} \pm \text{SE}$

添加量/(mg·kg ⁻¹) Supplementation	初始体质量/g Initial weight	终末体质量/g Final weight	成活率/% SR	增重率/% WGR	特定生长率/(%·d ⁻¹) SGR	饲料效率/% FE
0	0.82±0.02	4.14±0.08 ^a	72.50±4.17 ^a	419.12±16.41 ^a	2.94±0.06 ^a	41.80±3.00 ^a
1000	0.87±0.02	4.79±0.19 ^b	77.50±3.94 ^{ab}	451.31±17.46 ^{ab}	3.05±0.06 ^{ab}	48.56±2.64 ^b
2000	0.84±0.03	5.08±0.27 ^b	87.50±2.85 ^b	492.20±17.72 ^b	3.17±0.05 ^b	58.84±1.41 ^c
3000	0.88±0.02	5.25±0.07 ^b	82.50±1.60 ^{ab}	494.11±10.96 ^b	3.18±0.03 ^b	56.33±1.46 ^c
4000	0.87±0.01	4.88±0.12 ^b	78.33±5.00 ^{ab}	461.74±24.79 ^{ab}	3.08±0.08 ^{ab}	48.63±2.10 ^b
5000	0.86±0.02	4.77±0.20 ^b	74.17±5.34 ^a	455.38±28.21 ^{ab}	3.05±0.09 ^{ab}	44.70±1.58 ^{ab}

注:同一行数据右上角英文字母有相同的表示差异不显著($P > 0.05$)。

Note: Values with the same superscript letters indicate no significant difference ($P > 0.05$).

以增重率为指标,得到增重率和添加量之间的一元二次回归方程为: $y=-867.48x^2+495.03x+418.07$, $R^2=0.88$ (图 1)。经计算,饲料中家蝇抗菌肽提取物的最适添加量为 2 900 mg/kg。

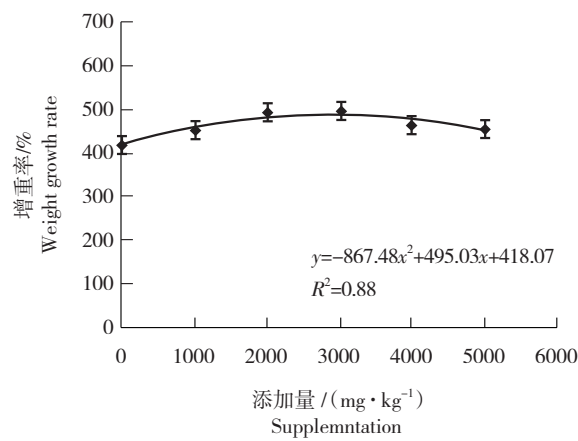


图 1 饲料中添加家蝇抗菌肽提取物对凡纳滨对虾增重率的影响
Fig. 1 Effects of dietary antibacterial peptides levels on WGR of shrimps

2.1.2 凡纳滨对虾的体成分 6 组凡纳滨对虾的全虾体成分列于表 3。其中体蛋白以 3 000 mg/kg 组最高,显著高于对照组、1 000 mg/kg 和 5 000 mg/kg 组($P<0.05$); 3 000 mg/kg 组与 2 000 mg/kg 组和 4 000 mg/kg 组组间差异不显著($P>0.05$); 体脂肪各组组间差异不显著; 体灰分以 2 000 mg/kg 组最高,显著高于 5 000 mg/kg 组,与其他组组间差异不显著。

表 3 全虾体成分分析
Tab. 3 Body composition of *Litopenaeus vannamei* feeding test diets % , DW; n=5; $\bar{x} \pm SE$

添加量 / (mg · kg ⁻¹) Supplementation	粗蛋白 Crude protein	粗脂肪 Crude fat	灰分 Ash
0	69.99 ± 0.81 ^a	5.92 ± 0.13	14.22 ± 0.24 ^{ab}
1000	72.23 ± 0.97 ^{bc}	5.95 ± 0.07	14.05 ± 0.21 ^{ab}
2000	73.88 ± 0.32 ^{cd}	6.10 ± 0.12	14.61 ± 0.25 ^b
3000	74.27 ± 0.15 ^d	6.11 ± 0.10	14.27 ± 0.45 ^{ab}
4000	73.16 ± 0.48 ^{bcd}	6.12 ± 0.08	13.79 ± 0.17 ^{ab}
5000	71.70 ± 0.68 ^{ab}	6.13 ± 0.13	13.57 ± 0.07 ^a

注: 同一行数据右上角英文字母有相同的表示差异不显著($P>0.05$)。
Note: Values with the same superscript letters indicate no significant difference ($P>0.05$).

2.2 生理生化指标

2.2.1 血细胞计数与吞噬率 由表 4 可见,在本实验的添加范围内,随饲料中家蝇抗菌肽提取物添加量的增加,凡纳滨对虾血细胞数量呈现升高的趋势,且 2 000 mg/kg、3 000 mg/kg、4 000 mg/kg 组和 5 000 mg/kg 组显著高于对照组和 1 000 mg/kg 组($P<0.05$)。血细胞吞噬率以 3 000 mg/kg 组最高,显著高于对照组、1 000 mg/kg 和 5 000 mg/kg 组($P<0.05$)。

2.2.2 血清 PO、POD、AKP、LZM、SOD 和 T-AOC 活性 由表 5 可见,添加不同水平的抗菌肽显著影响血清中 PO、POD、AKP、LZM 的活性及 T-AOC。生长实验结束后,血清中 PO 活性以 4 000 mg/kg 组最高,且显著高于对照组、1 000 mg/kg 和 5 000 mg/kg 组($P<0.05$); 2 000 mg/kg、3 000 mg/kg 和 4 000 mg/kg 组组间差异不显著($P>0.05$); POD 活性以 3 000 mg/kg 组最高,且显著高于其他组; AKP 活性以 2 000 mg/kg

表 4 实验凡纳滨对虾血细胞计数及吞噬率
Tab. 4 Number of haemocytes and phagocytic rate of *Litopenaeus vannamei* feeding test diets $n=5$; $\bar{x} \pm SE$

添加量 / (mg · kg ⁻¹) Supplementation	血细胞数 / (× 10 ⁶ · mL ⁻¹) Number of haemocytes	吞噬率 / % Phagocytic rate
0	7.54 ± 1.02 ^a	15.50 ± 1.04 ^a
1000	12.15 ± 2.79 ^a	19.50 ± 0.65 ^a
2000	22.08 ± 1.17 ^b	34.00 ± 1.08 ^c
3000	23.08 ± 0.78 ^b	36.00 ± 2.65 ^c
4000	24.03 ± 3.22 ^b	32.00 ± 1.08 ^{bc}
5000	26.53 ± 2.39 ^b	28.25 ± 0.47 ^b

注：同一行数据右上角英文字母有相同的表示差异不显著 ($P>0.05$)。
Note: Values with the same superscript letters indicate no significant difference ($P>0.05$).

表 5 抗菌肽对凡纳滨对虾血清中 PO、POD、AKP、LZM、SOD 酶和 T-AOC 活性的影响
Tab. 5 Activities of PO, POD, AKP, LZM, SOD and T-AOC in serum of *Litopenaeus vannamei* feeding test diets
 $n=10$; $\bar{x} \pm SE$; U/mL

添加量 / (mg · kg ⁻¹) Supplementation	PO	POD	AKP	LZM	SOD	T-AOC
0	2.82 ± 0.30 ^a	0.47 ± 0.05 ^a	4.48 ± 0.36 ^a	474.61 ± 60.64 ^{ab}	688.97 ± 25.64	9.86 ± 0.78 ^a
1000	3.25 ± 0.20 ^{ab}	0.59 ± 0.04 ^b	6.33 ± 0.87 ^b	443.21 ± 134.42 ^{ab}	686.85 ± 30.07	8.14 ± 0.87 ^a
2000	4.49 ± 0.49 ^{bc}	0.61 ± 0.11 ^{bc}	8.94 ± 0.37 ^c	659.94 ± 51.71 ^{bc}	663.35 ± 54.21	15.54 ± 0.77 ^c
3000	4.57 ± 0.59 ^{bc}	0.67 ± 0.12 ^c	7.25 ± 0.17 ^b	742.88 ± 53.88 ^c	640.18 ± 61.58	17.02 ± 1.15 ^c
4000	5.53 ± 0.51 ^c	0.47 ± 0.01 ^a	6.45 ± 0.13 ^b	635.18 ± 37.78 ^{abc}	632.90 ± 23.03	12.46 ± 0.84 ^b
5000	3.00 ± 0.34 ^a	0.49 ± 0.05 ^a	5.87 ± 0.13 ^b	386.42 ± 102.25 ^a	590.00 ± 18.31	9.00 ± 0.55 ^a

注：同一行数据右上角英文字母有相同的表示差异不显著 ($P>0.05$)。
Note: Values with the same superscript letters indicate no significant difference ($P>0.05$).

组最高,且显著高于其他组; LZM 活性以 3 000 mg/kg 组最高,且显著高于对照组、1 000 mg/kg 和 5 000 mg/kg 组,但 2 000 mg/kg、3 000 mg/kg 和 4 000 mg/kg 组组间差异不显著; SOD 活性各组组间差异不显著; 总抗氧化能力 T-AOC 以 3 000 mg/kg 组最高,显著高于对照组、1 000 mg/kg、4 000 mg/kg 和 5 000 mg/kg 组。

2.2.3 肝胰腺 AKP、LZM、SOD 和 T-AOC 活性 从表 6 可以看出,生长实验结束后,凡纳滨对虾肝胰腺中 AKP、SOD、T-AOC 活性各组的组间差异不显著 ($P>0.05$); LZM 活性以 3 000 mg/kg 组最高,显著高于其他组 ($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 饲料中添加抗菌肽对凡纳滨对虾生长性能的影响 屈军梅等^[26]将家蝇抗菌肽提取物纯化后,检测

出家蝇抗菌肽对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均有抗菌活性,并测得以本方法分离的家蝇抗菌肽相对分子质量为 678.3 ~ 1 017.2。从生长实验结果来看,在饲料中添加家蝇抗菌肽,无论是终末体质量、增重率、成活率、特定生长率,还是饲料效率方面均优于对照组。以增重率为判定依据,得到最适的添加量为 2 900 mg/kg。添加量继续增加,实验虾的增重率呈下降趋势。这表明饲料中添加适量的家蝇抗菌肽提取物可显著促进凡纳滨对虾的生长和提高饲料的利用率。这与对其他一些动物在饲料中添加抗菌肽的研究结果相似^[9-14]。陈晓生等^[9]在肉鸭日粮中添加液体的蚕抗菌肽 AD-酵母制剂发现,血清代谢激素的活动显著增强, IGF-1 浓度升高,营养物质合成加强; 甲状腺素 T₃ 升高,脂肪、T₄ 降低; 尿素氮浓度显著降低,体内氮排出减少。陈晓生等^[10]发现抗

表 6 抗菌肽对凡纳滨对虾肝胰腺中 AKP、LZM、SOD、T-AOC 活性的影响
Tab. 6 Activities of AKP, LZM, SOD and T-AOC in hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* feeding test diets
n=10; $\bar{x} \pm \text{SE}$; U/mL prot

添加量 / (mg · kg ⁻¹) Supplementation	AKP	LZM	SOD	T-AOC
0	2.24 ± 0.07	51.00 ± 0.11 ^b	1.05 ± 0.07	0.71 ± 0.08
1000	2.24 ± 0.11	62.30 ± 0.12 ^c	1.17 ± 0.03	0.78 ± 0.02
2000	2.14 ± 0.16	72.70 ± 0.19 ^d	1.11 ± 0.11	0.72 ± 0.04
3000	2.11 ± 0.13	83.80 ± 0.23 ^e	1.16 ± 0.07	0.70 ± 0.04
4000	2.12 ± 0.15	48.90 ± 0.33 ^b	1.00 ± 0.07	0.77 ± 0.05
5000	1.85 ± 0.20	23.70 ± 0.20 ^a	1.15 ± 0.07	0.84 ± 0.02

注：同一行数据右上角英文字母有相同的表示差异不显著($P>0.05$)。
Note: Values with the same superscript letters indicate no significant difference ($P>0.05$).

菌肽能使肉鸭的产肉率提高,腹脂率、内脏器官比重降低。温刘发等^[12]研究发现使用抗菌肽制剂对断奶仔猪的增重无不良影响。但抗菌肽制剂使用的剂量要适当,过高的剂量会影响仔猪的消化吸收,从而影响了仔猪的生长。何丹林等^[27]得出抗菌肽可促进小鸡生长和减少排泄氮含量,对粤黄鸡具有促生长、保健和治疗疾病的功能。黄永彤等^[11]在肉鸡上应用也得到显著效果。抗菌肽提高对虾生长性能的作用机制,是否与畜禽有相似点,是否是因抗菌肽抑制了动物肠道的有害菌而起到了促生长的作用,高剂量抗菌肽对肠道自身菌群是否会产生抑制等,仍有待于进一步探讨。

对全虾体成分分析发现,家蝇抗菌肽添加 2 000 mg/kg 和 3 000 mg/kg 时,虾体灰分、粗蛋白的含量较高,说明在饲料中添加适量的家蝇抗菌肽提取物可提高对虾体灰分、体蛋白的含量,也说明抗菌肽可能对虾体矿物质、蛋白质合成分解代谢方面有一定的影响。陈晓生等^[13-14]研究发现,与不加抗菌肽制剂组相比,每吨日粮抗菌肽制剂添加达 2 L 和 3 L 时,胰岛素样生长因子 IGF-1 均较高且达到显著水平。说明抗菌肽制剂能促进体内营养物质的合成和贮存;当添加量分别达到 2 L 和 3 L 时,则尿素氮浓度显著降低,说明添加抗菌肽制剂可能是在蛋白质合成未变的情况下减少机体蛋白质的分解代谢,从而有可能为肉鸭生长速度的提高提供依据。

3.2 饲料中添加抗菌肽对凡纳滨对虾生理生化相关指标的影响

血细胞能够吞噬侵入体内的细菌、真菌^[28]、洋红颗粒^[29]、松脂^[30]等,还能对某些真菌、寄生虫等起包掩作用,同时血细胞在伤口修复过程中也起着十分重要的作用^[31]。本实验中,凡纳滨对虾血淋巴细胞数量的变化说明家蝇抗菌肽添加水平的不同可能影响血细胞的数量及其参与细胞免疫的效果,当家蝇抗菌肽提取物添加量增加到 2 000 mg/kg 或更多时,对对虾血细胞数量的影响更大。血细胞的吞噬功能是对虾机体最重要的非特异性的细胞免疫功能。家蝇抗菌肽提取物添加量在 2 000 ~ 4 000 mg/kg 时,血细胞吞噬率显著处于较高水平,表明适量添加家蝇抗菌肽可显著提高凡纳滨对虾血细胞的吞噬能力。

酚氧化酶系统(proPO)在对虾的防御系统中起着重要的异物识别和防御功能。本实验发现,饲料中家蝇抗菌肽提取物添加量为 2 000 ~ 4 000 mg/kg 时可以显著增强凡纳滨对虾血淋巴中的 PO 活性,与对照组相比 PO 活性提高 1.6 倍以上,当家蝇抗菌肽提取物添加量继续增高时,血清中 PO 的活性反而降低到与对照组相同的水平。王雷等^[32]、刘恒等^[33]、江晓路等^[34]对对虾的酚氧化酶活性的存在及其激活机制进行过报道,他们认为酚氧化酶以酶原形式存在血细胞中,当微生物入侵后刺激血细胞,使该酶释放到血淋巴并激活表现活性,它与血细胞的吞噬、

包裹以及血淋巴的抗菌活性和对外源物质的识别有关。但 PO 活性与对虾免疫功能是否呈正相关,适量的家蝇抗菌肽提取物是否可通过 proPO 发挥其免疫增强作用,这还有待于进一步研究。

过氧化物酶(POD)在清除自由基(O_2^-),防止生物分子损伤方面有十分重要的作用,因此 POD 的大小可以用来推断对虾的生理状态,甚至可用其辅助检测或诊断对虾病害的生理指标^[35]。本实验结果表明,饲料中添加 1 000 ~ 3 000 mg/kg 的家蝇抗菌肽提取物后凡纳滨对虾血淋巴中 POD 活性较对照组提高了约 1.33 倍。本实验中适量添加家蝇抗菌肽提取物可提高对虾血淋巴 POD 的活性,降低自由基对机体的损害,过高的添加量并不能发挥免疫增强的作用。但对于 POD 活性与免疫系统的相关性还不十分清楚,尚需深入的研究。

碱性磷酸酶(AKP)具有促进水解和转磷酸的作用,并与一些营养物质的消化吸收有关。磷酸酶对于需要磷酸化以及去磷酸的各种代谢过程都非常重要^[36-37]。饲料中添加 2 000 mg/kg 的家蝇抗菌肽提取物后凡纳滨对虾血淋巴中 AKP 活性显著高于其他组,与对照组相比提高了将近 2 倍,效果极为显著,且抗菌肽添加组均比对照组高,说明添加抗菌肽可以在一定程度上提高 AKP 的活性。

溶菌酶(LZM)是非特异性免疫系统的主要成分,在甲壳动物的免疫中起重要的作用^[38-39]。王静^[40]研究发现,肉鸡日粮添加抗菌肽能提高血清中溶菌酶含量,总体效果好于抗生素。本实验中家蝇抗菌肽提取物的添加量为 3 000 mg/kg 时,对虾血清中 LZM 的活性最高,比对照组提高了 1.6 倍左右。

实验中添加不同剂量的家蝇抗菌肽提取物对血清中 SOD 的活性没有显著的影响,说明抗菌肽可能主要不是通过提高对虾血淋巴 SOD 活性这一途径增强免疫作用的,关于抗菌肽对凡纳滨对虾血清中 SOD 活性调节的作用机制,还有待于进一步研究。

机体防御体系的抗氧化能力的强弱与健康程度存在着密切联系,实验结果表现为家蝇抗菌肽提取物的添加量为 3 000 mg/kg 时,对虾血清中 T-AOC 水平最高,与对照组相比显著提高了 1.7 倍。

本实验结果显示,饲料中添加抗菌肽提取物对肝胰腺中 AKP、SOD、T-AOC 活性没有显著的影响,但是对溶菌酶活性的影响较明显,当添加量为 3 000 mg/kg 时,溶菌酶的活性比对照组提高了 1.6 倍以上。结果表明,在抗菌肽的作用下,凡纳滨对虾肝胰腺中溶菌酶这个免疫指标表现较为敏感,添加适量的家蝇抗菌肽提取物可能通过提高溶菌酶的活性这一途径来增强免疫作用。

参考文献:

- [1] Destoumieux D, Munoz M, Bulet P, et al. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda) [J]. CMLS Cell Mol Life Sci, 2000, 57: 1260-1271.
- [2] 翟朝阳. 昆虫抗菌肽物质研究进展 [J]. 昆虫学报, 1996, 39(1): 99-104.
- [3] Gazit E, Lee WJ. Mode of action of the antimicrobial cecropin B2: a spectrofluorometric study [J]. Biochem, 1994, 33(35): 10 681-10 692.
- [4] 柏鸣, 周立. 家蝇抗菌蛋白的分离纯化及部分性质 [J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(6): 568-571.
- [5] 陈留存, 王金星. 家蝇抗菌肽的分离纯化及性质研究 [J]. 山东大学学报, 2001, 36(3): 351-357.
- [6] 安春菊, 石明, 郝友进, 等. 家蝇幼虫抗菌相关蛋白/多肽的诱导及抗菌活性分析 [J]. 昆虫学报, 2003, 46(5): 545-548.
- [7] 宫霞, 施用晖, 乐国伟. 家蝇幼虫抗菌肽 MDL-1 的分离纯化及其对大肠杆菌超微结构的影响 [J]. 昆虫学报, 2004, 47(1): 8-13.
- [8] 屈军梅, 陈平洁, 李文平, 等. 家蝇抗菌肽提取及对鸡大肠杆菌病药效试验 [J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(3): 56-59.
- [9] 陈晓生, 刘为民, 温刘发, 等. 抗菌肽替代抗生素对肉鸭生产性能及血清代谢激素水平的影响 [J]. 中国家禽, 2005, 27(5): 7-9.
- [10] 陈晓生, 张辉华, 田允波, 等. 抗菌肽作饲料添加剂对肉鸭生长性能的影响 [J]. 绿色养殖, 2005, 3: 64-65.
- [11] 黄永彤, 黄自然. 抗菌肽与抗生素饲喂肉鸡的效果比较 [J]. 广东饲料, 2004, 13(2): 24-25.
- [12] 温刘发, 张常明. 抗菌肽制剂代替抗生素在断奶仔猪饲料中的应用效果 [J]. 中国饲料, 2001, 18: 13-14.
- [13] 陈晓生, 刘为民, 周庆国, 等. 饲料中添加抗菌肽对肉鸭血清代谢激素及生理生化指标的影响 [J]. 兽药与饲料添加剂, 2005, 10(2): 4-6.
- [14] 陈晓生, 温刘发, 黄国庆, 等. 饲料中添加抗菌肽对肉鸭增重及

- 血清尿素氮、总蛋白水平的影响[J]. 中国饲料, 2005, 10: 21–23.
- [15] 姜兰, 黄自然. 重组抗菌肽的制备及其对水产养殖中常见病原菌的抑菌效果[J]. 中国水产科学, 2002, 9 (2): 152–156.
- [16] 崔淑文, 陈必芳. 饲料标准资料汇编[M]. 北京: 中国标准出版社, 1991: 254–280.
- [17] 冯守明, 杨先乐, 李军, 等. 凡纳滨对虾白斑综合征血液病理研究[J]. 水产学报, 2006, 30 (1): 108–112.
- [18] Vargas-Albores F, Guzman Maria-Antonia, Ochoa Jose-Luis. An anticoagulant solution for haemolymph collection and propheonoxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1993, 106A (1): 299–303.
- [19] 蒋琼, 王雷, 罗日祥. 中国对虾血淋巴抗凝剂的筛选[J]. 水产学报, 2001, 25 (4): 259–362.
- [20] 江青艳, 高萍. 动物生理学实验指导[M]. 广州: 华南农业大学出版社, 2004: 4–5.
- [21] 全国中等卫生学校适用教材《微生物学及检验技术》编写组. 微生物技术及检验技术[M]. 广东: 广东人民出版社, 1981: 110–111.
- [22] Ashida M. Purification and characterization of propheonoxidase from hemolymph of the silkworm Bombyx mori [J]. Arch Biochem Biophys, 1971, 144: 749–762.
- [23] 史成银, 黄捷, 宋晓玲, 等. 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.
- [24] 宋善俊. 临床医师手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 1985–2000.
- [25] 张宏, 谭竹钧. 四种邻苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性方法的比较[J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 2002, 33 (6): 677–681.
- [26] 屈军梅, 黄庭汝, 屈孝初, 等. 家蝇抗菌肽的分离纯化及生物学活性[J]. 中国兽医报, 2007, 27 (3): 387–39.
- [27] 何丹林, 温刘发, 邓春柳, 等. 蚕抗菌肽 AD- 酵母制剂对粤黄鸡肠道消化酶和饲料品质的影响[J]. 中国家禽, 2004, 26 (7): 9–10.
- [28] Smith V J, Ratcliffe N A. Cellular defense reactions of the shore crab, *Carci nus maenas*; in vivo hemocytic and histopathological responses to injected bacteria [J]. J Inverteb Pathol, 1980, 35: 65–74.
- [29] Fontaine C T, Lightner D V. Observation on the phagocytosis and elimination of carmine particles injected into the abdominal musculature of the white shrimp, *Penaeus setiferus* [J]. J Invertebr Pathol, 1974, 24: 141–148.
- [30] Fontaine C T, Bruss R G, Sanderson I A, et al. Histopathological response to turpentine in white shrimp, *Penaeus setiferus* [J]. J Invertebr Pathol, 1975, 25: 321–330.
- [31] 徐海圣, 徐步进. 甲壳动物细胞及体液免疫机理的研究进展[J]. 大连水产学院学报, 2001, 16 (1): 49–56.
- [32] 王雷, 李光友, 毛远兴. 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): 179–184.
- [33] 刘恒, 李光友. 免疫多糖对养殖南美白对虾作用的研究[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29 (2): 113–117.
- [34] 江晓路, 刘树青, 张朝晖, 等. 多糖对中国对虾免疫功能的影响[J]. 中国水产科学, 1999, 6 (1): 66–68.
- [35] 杨文鸽, 薛长湖, 徐大伦, 等. β -1,3-葡聚糖及其羧甲基衍生物对海湾扇贝免疫功能的影响[J]. 水产学报, 2006, 30 (2): 236–240.
- [36] 陈清西, 陈素丽. 长毛对虾碱性磷酸酶性质[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1996, 35 (2): 257–261.
- [37] 陈素丽, 陈清西. 长毛对虾酸性磷酸酶的纯化与性质[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1997, 36 (1): 121–125.
- [38] 刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30 (3): 278–283.
- [39] 丁美丽, 林林, 李光友. 有机污染对中国对虾内外环境影响的研究[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28 (1): 7–12.
- [40] 王静. 抗菌肽对肉鸡生产性能和免疫功能的影响研究[D]. 青岛: 山东农业大学, 2007: 49.

Effects of antibacterial peptides of *Musca domestica* on growth performance and immune-related indicators in *Litopenaeus vannamei*

CHEN Bing, CAO Junming, CHEN Pingjie, ZHAO Hongxia, LAN Hanbing, ZHU Xuan

(Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: An 8-week growth experiment was conducted to investigate the dietary effects of different levels of antibacterial peptides extractives from *Musca domestica* (0, 1 000 mg/kg, 2 000 mg/kg, 3 000 mg/kg, 4 000 mg/kg, 5 000 mg/kg respectively) on growth performance and immune-related indicators of *Litopenaeus vannamei* with initial body weight (0.86 ± 0.01) g. Each diet was fed to four replicates of 40 shrimps. The results showed that antibacterial peptides extractives of *Musca domestica* could enhance survival rate, weight gain rate, specific growth rate and feed efficiency of *Litopenaeus vannamei* significantly ($P < 0.05$). When antibacterial peptides extractives were at 2 000–3 000 mg/kg, the shrimps had the maximal survival rate, weight gain rate, specific growth rate and feed efficiency, which were significantly higher than those in control. By using the model based on WGR, an optimum dietary antibacterial peptides extractives level of 2 900 mg/kg was calculated. The shrimps fed on the diets with antibacterial peptides extractives at 2 000–3 000 mg/kg had significantly higher body crude protein content and body ash contents. The body crude lipid content was not significantly affected by the supplemental levels of antibacterial peptides extractives. The number of haemocytes in shrimp fed on the diets with antibacterial peptides extractives at 2 000–5 000 mg/kg was significantly higher than that of control. The highest phagocytic rate was obtained in the shrimps fed on the diet with antibacterial peptides extractives at 3 000 mg/kg. When antibacterial peptides extractives were at 2 000–3 000 mg/kg, the shrimps had a higher level in activities of PO, POD, AKP, LZM and T-AOC in serum. The activities of SOD in serum were not significantly different among all the groups ($P > 0.05$). There were no significant difference among all the groups in the activities of AKP, SOD and T-AOC in hepatopancreas. The highest activities of LZM in hepatopancreas were obtained in shrimp fed on the diet with antibacterial peptides at 3 000 mg/kg, significantly higher than the others. The results suggested that the dietary supplementation of certain level of antibacterial peptides extractives could improve the growth performance and immune-related indicators in *Litopenaeus vannamei*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (2): 258–266]

Key words: antibacterial peptides; *Litopenaeus vannamei*; growth performance; immunity

Corresponding author: CAO Junming. E-mail: junmcao@163.com