

DOI: 10.12264/JFSC2020-0331

鱼源植物乳杆菌 HS-07 胞外多糖对鲤的益生作用

陈永艳, 冯军厂, 李梦, 刘莎莎, 蔡忠良, 黄梦媛, 常绪路, 张建新

河南师范大学水产学院, 河南省水产动物养殖工程技术研究中心, 水产动物疾病控制河南省工程实验室, 河南新乡 453007

摘要: 为探究植物乳杆菌 HS-07 胞外多糖(exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* HS-07, EPS-07)对鲤免疫、抗氧化及抗嗜水气单胞菌感染能力的影响。将不同浓度的 EPS-07 (250 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 和 1000 $\mu\text{g/mL}$)与鲤头肾细胞体外共培养; 并设置对照组(灌喂无菌生理盐水)和 EPS-07 处理组(灌喂 250 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 、1000 $\mu\text{g/mL}$ 的 EPS-07)进行体内实验, 1 次/d, 连续灌喂 7 d, 随后腹腔注射嗜水气单胞菌攻毒处理 24 h。体外结果显示, 鲤头肾细胞与 EPS-07 共同培养后, 其增殖能力、吞噬活性、上清液中一氧化氮(NO)的含量、促炎细胞因子[肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-1 β (interleukin, IL-1 β)、白介素-6 (IL-6)]和抗炎细胞因子[白介素-10 (IL-10)、转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β)]的表达均显著增强($P<0.05$)。体内实验结果显示, 嗜水气单胞菌感染前, EPS-07 处理组血清中 NO 的含量、促炎细胞因子和抗炎细胞因子的表达显著增强($P<0.05$); 肝胰腺中总抗氧化能力(T-AOC)和谷胱甘肽(GSH)含量, 以及超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT)的活性均显著高于对照组($P<0.05$), 但丙二醛(MDA)的含量显著低于对照组($P<0.05$); 嗜水气单胞菌感染后, EPS-07 能抑制 NO 的大量释放, 上调抗炎细胞因子的表达和下调促炎细胞因子的表达。综上所述, EPS-07 在细胞水平和个体水平均能提高鲤免疫应答能力, 增强其抗氧化和抗细菌感染能力。

关键词: 乳酸菌胞外多糖; 鲤; 免疫; 抗氧化活性; 抗感染能力

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2021)05–0591–11

近年来, 水产养殖环境不断恶化, 病害频发, 抗生素使用过程中的药物残留和耐药性病原菌不断增加等问题成为制约水产养殖业健康发展的主要因素^[1-2]。益生菌由于绿色、高效、无污染等作用, 被广泛用于水产养殖业^[3]。而鱼源乳酸菌与来自环境或哺乳动物的乳酸菌相比, 更能适应水产养殖环境, 并且存活时间长, 稳定性好, 有利于促进鱼类的生长, 提高免疫力, 抗氧化能力和抗病性能等功能^[4-6]。此外, 研究表明乳酸菌的益生作用与其次生代谢产物胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)有密切的关系^[7]。

多糖是一种天然大分子活性物质, 广泛存在

于动物、植物、微生物中^[8], 因其易得性和流变性, 被广泛应用于食品、化妆品、纺织及制药等工业中^[9]。近年来, 越来越多的证据表明, 从微生物中分离出的一些多糖具有抗氧化能力和低细胞毒性, 特别是乳酸菌胞外多糖是公认安全的生物聚合物^[10], 具有增强免疫、抗氧化和抗病能力等作用^[11-13]。Vinderola 等^[14]研究发现, 乳酸杆菌的胞外多糖能诱导小鼠肠黏膜反应, 并通过促进大肠和血清中 IL-4、IL-10 和 IL-6 等免疫相关参数的表达增强机体免疫力。Liu 等^[15]研究发现干酪乳杆菌 NTU101 和植物乳杆菌 NTU102 的胞外多糖可在体外促进鼠巨噬细胞增殖, 诱导 IL-6、TNF- α

收稿日期: 2020-09-30; **修订日期:** 2021-01-10.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31902361); 河南省重点科技攻关项目(212102110106).

作者简介: 陈永艳(1994–), 女, 硕士研究生, 专业方向为水产养殖. E-mail: 2803177636@qq.com

通信作者: 冯军厂, 讲师, 主要从事水产微生物研究, E-mail: fjc15290022@126.com; 张建新, 副教授, 主要从事水产微生物研究, E-mail: zjxlql@163.com

和 IL-1 β 等细胞因子的产生,还具有清除自由基活性,抑制亚油酸过氧化等作用。Li 等^[16]研究发现植物乳杆菌胞外多糖(EPS-3)通过提高总抗氧化能力(AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和降低丙二醛(MDA)含量来保护 PC12 细胞免受氧化损伤。Xiu 等^[17]研究发现干酪乳杆菌 WXD030 的胞外多糖(L-EPS)可以显著增强鼠 RAW264.7 细胞的增殖和吞噬活性,并诱导一氧化氮(NO)、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的产生,增强机体免疫力。但截至目前,鱼源乳酸菌胞外多糖(EPS)对鲤的免疫调节、抗氧化和抗病作用的研究报道相对较少。

鲤是我国主要的淡水养殖鱼类之一,本实验室前期从鲤肠道内容物中分离获得的乳酸菌对鲤具有促生长、提高先天免疫和保护其免受嗜水气单胞菌感染的作用^[18]。本研究通过体内和体外实验,探究植物乳杆菌 HS-07 胞外多糖(EPS-07)对鲤免疫调节、抗氧化活性及对嗜水气单胞菌感染能力的影响,为乳酸菌 EPS 在水产养殖中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*) HS-07 和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) Ah01 均由河南师范水产学院实验室提供。

1.2 乳酸菌胞外多糖 EPS-07 的制备

将植物乳杆菌 HS-07 接种于 MRS 液体培养基,置于 37 °C 静置培养 20 h,将菌液离心(5000 $\times$ g, 10 min),取上清,放入旋转蒸发仪中浓缩,乙醇沉淀,然后离心收集沉淀,冷冻干燥后得到 EPS-07 结晶。

1.3 试验动物

试验用鱼购买于郑州中牟河南省水产技术推广站水产养殖基地,在河南师范大学水产养殖基地进行试验。选择体质健康的鲤 360 尾,体重(35 $\pm$ 0.5) g,用 0.65%的生理盐水消毒 15 min,养殖池规格为 5 m $\times$ 3 m $\times$ 4 m,试验期间水温(27 $\pm$ 2) °C, pH 为 7.0 $\pm$ 0.2,溶解氧含量大于 5.0 mg/L,氨氮含量小于 0.01 mg/L。

1.4 灌喂试验

灌喂试验在地下水循环系统进行,随机分为 4 组,每组 3 个重复($n=30$)。第一组灌喂 0.1 mL 的无菌生理盐水,其余 3 组分别灌喂 0.1 mL 不同浓度的 ESP-07 (250 μ g/mL、500 μ g/mL、1000 μ g/mL),正式试验前,各试验组先以商品饲料预饲 2 周,其他基础条件相同。正式试验开始后,每天早上 8:00 定时灌喂,连续灌喂 7 d,期间早、晚饱食投喂(10:00 和 16:00),每日观察并记录各试验组鲤的生活状态。灌喂结束后,每桶随机选取 6 尾鱼,进行样品的采集。

1.5 攻毒试验

灌喂试验结束后,每个养殖桶随机选取 10 尾(对照组另外选取 10 尾攻毒作为阳性对照),阴性对照组腹腔注射 0.1 mL 灭菌的生理盐水,阳性对照组和处理组注射 0.1 mL 嗜水气单胞菌 Ah 01 ($LD_{50}=5\times 10^6$ CFU/mL)。感染 24 h 后,每桶随机选取 6 尾鱼,进行样品的采集。

1.6 样品采集

灌喂处理 7 d 和攻毒处理 24 h 后,每桶随机取 6 尾,麻醉后,从尾静脉抽取血液,4 °C 静置过夜,离心(4 °C, 3000 $\times$ g, 30 min)收集血清,-80 °C 保存备用;将抽过血的鱼迅速放到冰上解剖,取出肝胰脏,-80 °C 保存备用。

1.7 头肾单核巨噬细胞的分离与培养

另取 3 尾同一批次未经灌喂和攻毒处理的健康鲤[(35 $\pm$ 0.5) g]麻醉,体表用酒精棉球擦拭,放入超净工作台台解剖,取出头肾并分离其单核细胞/巨噬细胞,在 RPMI-1640 培养基(10%胎牛血清, GIBCO, USA; 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素, Sigma, USA)中培养,调整细胞浓度为 2×10^6 个/mL,加入 24 孔细胞培养板,添加不同浓度的 EPS-07 (0 μ g/mL、250 μ g/mL、500 μ g/mL 和 1000 μ g/mL)孵育细胞,28 °C 培养 24 h 后测定孵育液中细胞因子和一氧化氮(NO)的合成量。具体操作步骤参照本实验室先前的研究^[19]。

1.8 样品分析测定

1.8.1 头肾细胞增殖能力和吞噬活性的测定 在 96 孔细胞培养板中用不同浓度的 EPS-07 (0 μ g/mL、250 μ g/mL、500 μ g/mL 和 1000 μ g/mL)处理头肾

细胞(2×10^6 个/mL), 按照先前的研究方法采用 MTT 试剂盒(南京建成生物工程研究所)和中性红染色的方法分别测定头肾细胞的增殖能力和吞噬活性^[18]。

1.8.2 NO 含量和抗氧化指标的测定 采用硝酸还原酶法测定孵育液和血清中 NO 的含量。采用黄嘌呤氧化酶法测定肝胰腺中超氧化物歧化酶(SOD)活性, 二硫代二硝基苯甲酸法测定谷胱甘肽过氧化物酶活力(GSH-Px)和谷胱甘肽过氧化物(GSH)的含量, 紫外分光法测定过氧化氢酶(CAT)活性, Fe^{3+} -TPTZ 还原法测定总抗氧化能力(AOC)活性, 硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)的含量, 考马斯亮蓝法测定蛋白含量。试剂盒均从南京建成生物工程研究所购买。

1.8.3 血清和肝胰脏免疫相关指标的测定 用多克隆抗体^[19]测定孵育液和血清中抗炎细胞因子和促炎细胞因子的合成量。

1.9 数据的处理与分析

实验中所有的数据均采用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)的形式呈现($n=6$)。显著性分析采用 SPSS 25.0 的 One-Way ANOVA 中 Scheffe 指标, 显著性水平设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 EPS-07 对鲤头肾细胞增殖能力和吞噬活性的影响

由图 1 可知, 鲤头肾细胞与 EPS-07 共同培养 24 h 后, 与对照组相比较, 其头肾细胞的增殖能力有显著增强, 但各处理组之间无显著差异($P>0.05$, 图 1A)。此外, 处理组头肾细胞吞噬活性显著高于对照组($P<0.05$), 且随着 EPS-07 浓度的升高, 头肾细胞的吞噬活性呈上升趋势, 其中 1000 $\mu\text{g/mL}$ 处理组活性最高(图 1B)。

2.2 NO 含量的检测

由图 2 可知, EPS-07 孵育头肾细胞 24 h 后, 除低浓度(250 $\mu\text{g/mL}$)处理组外, 其他处理组中 NO 的含量均显著高于对照组, 且呈浓度依赖的趋势($P<0.05$, 图 2)。体内结果显示, EPS-07 灌喂处理后, 250 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 处理组无显著差异, 但明显高于对照组, 最高浓度处理组血清中

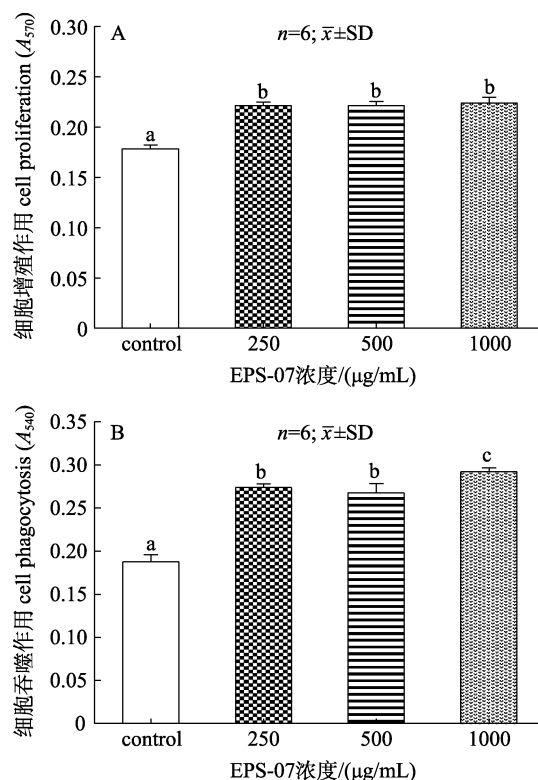


图 1 EPS-07 对鲤头肾细胞增殖能力(A)和吞噬活性(B)的影响

柱上不同字母表示组间有显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 1 Effect of EPS-07 on the proliferation and phagocytosis of head kidney cells of *Cyprinus carpio*. Different letters indicate significant difference from each other ($P<0.05$).

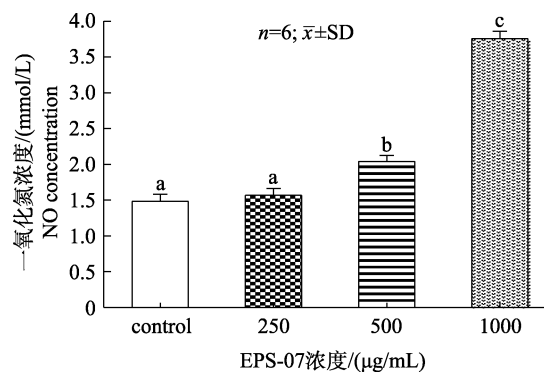


图 2 EPS-07 诱导鲤头肾细胞合成 NO 的检测

柱上不同字母标记表示组间有显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 2 Effect of EPS-07 induced nitric oxide (NO) production in head kidney cells of *Cyprinus carpio*. Different letters indicate significant difference from each other ($P<0.05$).

NO 的含量均显著高于其他组($P<0.05$, 图 3A)。嗜水气单胞菌感染后, 阳性对照组血清中 NO 的含量显著高于阴性对照组和处理组($P<0.05$), 而

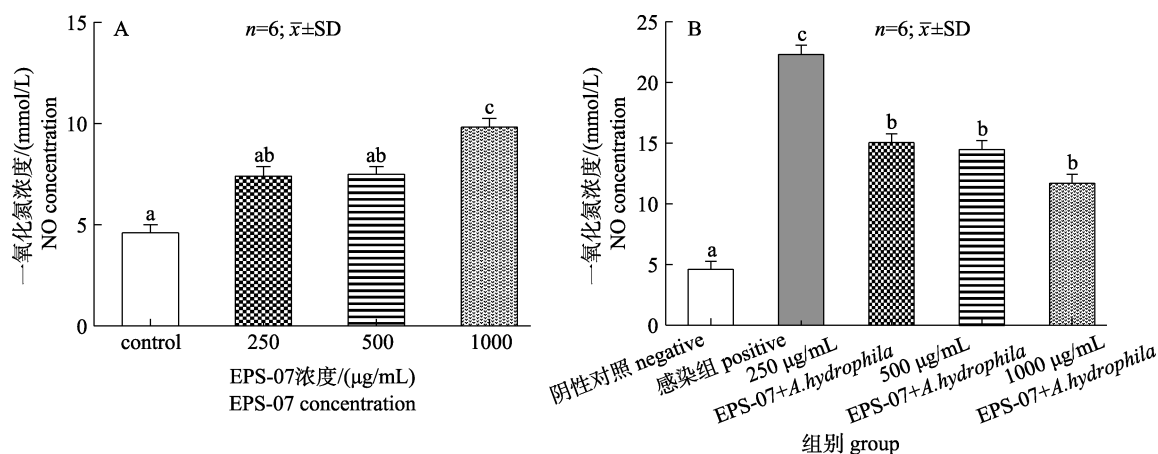


图 3 EPS-07 灌胃(A)和攻毒后(B)血清中 NO 浓度

柱上不同字母标记表示组间有显著性差异($P < 0.05$)。

Fig. 3 Effects of EPS-07 or/and *A. hydrophila* on the release of nitric oxide (NO) in the serum of common carp
Different letters indicate significant difference from each other ($P < 0.05$).

EPS-07 处理组感染后血清中 NO 的含量显著低于阳性对照组, 并呈浓度依赖型($P < 0.05$, 图 3B)。

2.3 EPS-07 对抗氧化相关指标的影响

由图 4 可知, 灌喂处理 7 d 后, 处理组 CAT 的活性与对照组相比呈现递增的趋势, 1000 µg/mL 处理组活性显著高于其他组($P < 0.05$, 图 4D)。处理组的 GSH-Px 活性显著高于对照组, 但呈现先升高后降低的趋势, 在 500 µg/mL 处理组活性达到最大(图 4C)。处理组的 T-AOC、T-SOD、GSH 水平均显著高于对照组($P < 0.05$), 但不同处理组之间无显著性差异($P > 0.05$, 图 4A, B, E)。但与对照组相比, EPS-07 处理组能显著降低 MDA 的水平, 并呈浓度依赖型($P < 0.05$, 图 4F)。

2.4 EPS-07 对头肾细胞细胞因子含量的影响

由图 5 可知, 不同浓度 EPS-07 处理组中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)和白介素-6 (IL-6) (高浓度处理组除外)、白介素-10 (IL-10)和转化生长因子- β (TGF- β)的合成量均显著高于对照组($P < 0.05$), 其中 IL-1 β 和 TGF- β 的合成呈浓度依赖型, 1000 µg/mL 处理组显著高于其他处理组($P < 0.05$)。TNF- α 和 IL-10 的合成量与对照组有显著差异($P < 0.05$), 但各处理组之间无显著差异($P > 0.05$)。相反, IL-6 的合成量呈现降低趋势, 且最高浓度与对照组无显著差异($P > 0.05$)。

2.5 EPS-07 对血清细胞因子含量的影响

由图 6 可知, 灌喂处理 7 d 后, EPS-07 能显著

增强促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达($P < 0.05$), 且呈剂量依赖型, 1000 µg/mL 处理组与其他处理组有显著差异($P < 0.05$, 图 6A)。EPS-07 还能显著提高抗炎细胞因子 IL-10 和 TGF- β 的表达水平($P < 0.05$), 但各处理组之间无明显差异($P > 0.05$, 图 6B)。

由图 7 可知, 与阴性对照组相比, 嗜水气单胞菌感染后促炎细胞因子和抗炎细胞因子的合成量显著升高($P < 0.05$)。然而, 与阳性对照组相比, EPS-07 处理组的促炎细胞因子合成量呈剂量依赖型降低($P < 0.05$, 图 7A), 尤其在高浓度(1000 µg/mL)处理组, TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的合成量与阴性对照组相比均无显著性差异($P > 0.05$)。而 EPS-07 处理组对 IL-10 的表达水平无显著影响, 但 EPS-07 处理组仍显著增加 TGF- β 的表达水平, 并呈浓度依赖型($P < 0.05$, 图 7B)。

3 讨论

3.1 头肾细胞增殖能力与吞噬活性

头肾是鱼类主要的免疫器官, 是防御细菌感染的免疫屏障, 其增殖能力与吞噬活性对评价鱼类免疫力和维持内环境稳态至关重要^[20]。王辑等^[21]研究表明植物乳杆菌 JLK0142 EPS 在一定浓度范围内能提高巨噬细胞的相对增殖率, 对正常状态的巨噬细胞无毒性。乳杆菌 EPS 能促进鼠巨噬细胞增殖和吞噬活性^[15,17]。本研究结果显示, 乳

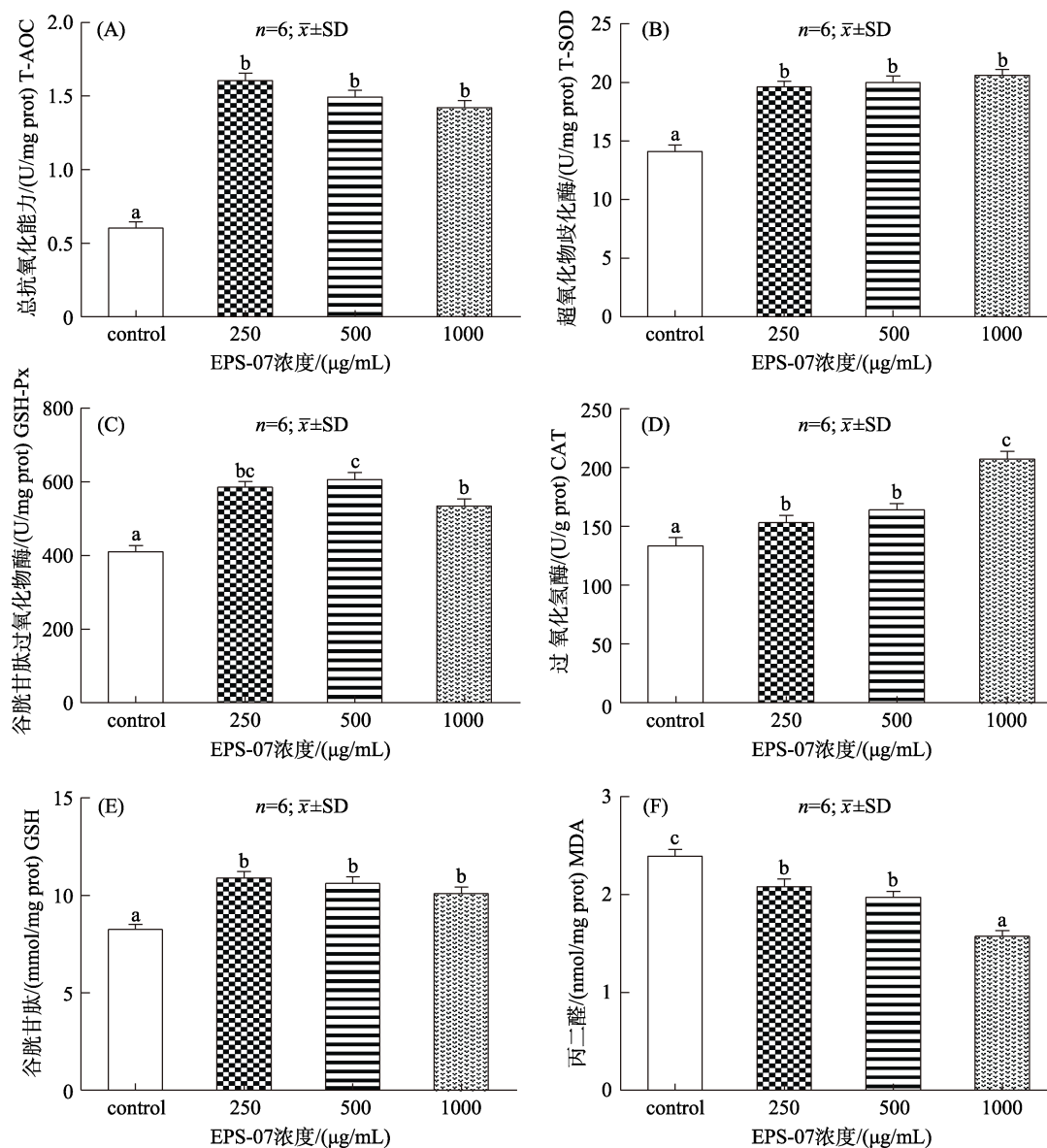


图 4 EPS-07 对鲤肝胰腺抗氧化指标的检测

柱上不同字母表示组间有显著性差异 ($P < 0.05$).Fig. 4 Effects of EPS-07 on the levels of antioxidant substances in the hepatopancreas of *Cyprinus carpio*. Different letters indicate significant difference from each other ($P < 0.05$).

酸菌 EPS-07 可显著提高对鲤头肾细胞增殖能力与吞噬活性, 说明乳酸菌 EPS 可能是诱导单核/巨噬细胞增殖能力与吞噬活性的关键因素。但目前关于 EPS 该作用的机制尚不清楚。有研究表明, EPS 可被巨噬细胞 C 型凝集素中的受体 (CLRs) 识别, 并且与该受体结合后, 通过信号转导, 诱导多种细胞反应, 包括细胞增殖、分化、免疫细胞迁移和吞噬^[22-23]。其具体作用机制, 有待进一步探索。

3.2 ESP-07 对 NO 合成的影响

NO 是一种细胞内及细胞间的信息物质, 其在机体生理、病理过程中起着重要作用。在一定范围内, NO 含量高低可用来评价疾病的发生及免疫水平的高低^[24]。研究表明, 多糖能提高 NO 的生成量, 从而发挥免疫调节活性^[25]。本研究结果显示 EPS-07 可显著提高鲤体内和体外 NO 的生成量且呈浓度依赖型, 这与灭活后的乳酸乳球菌^[26]和乳酸菌 EPS-2^[27]分别在大菱鲆 (*Scophthalmus*

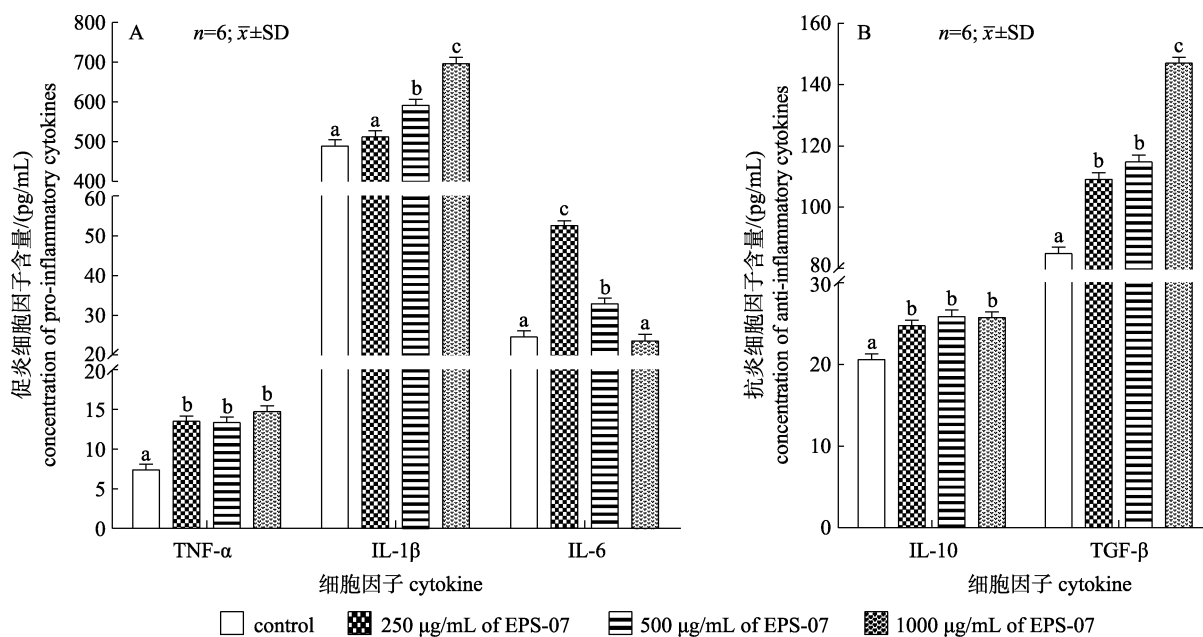


图 5 EPS-07 对鲤头肾细胞分泌细胞因子含量的影响

柱上不同字母表示组间有显著性差异 ($P < 0.05$).

Fig. 5 Effects of EPS-07 on the secretion of cytokines in the head kidney cells of *Cyprinus carpio*
Means with different letters indicate significant difference from each other ($P < 0.05$).

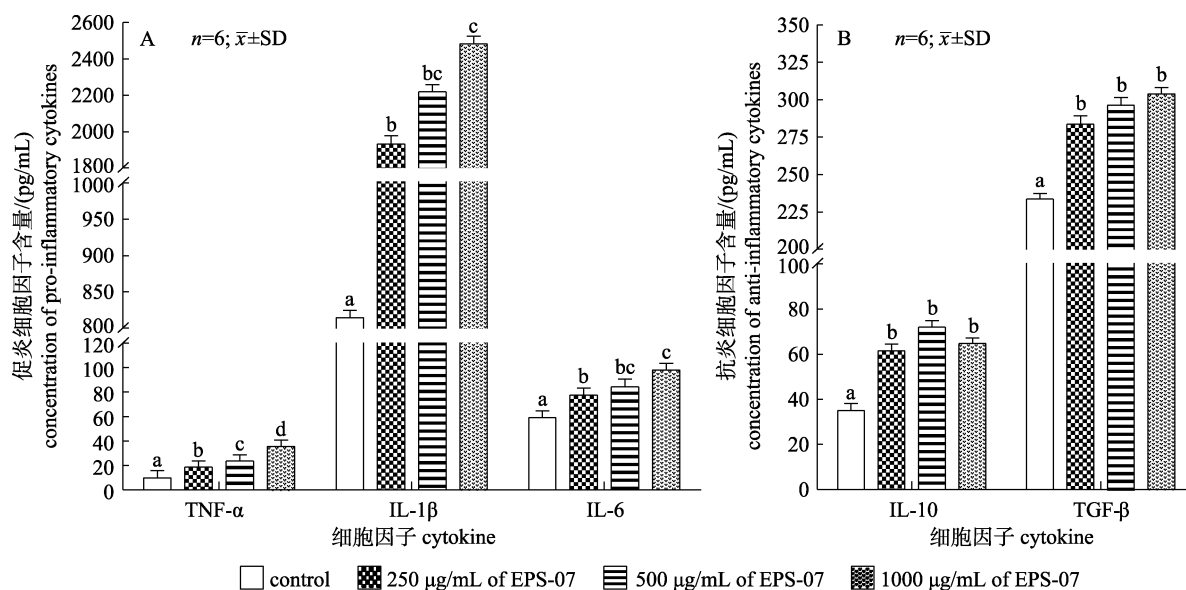


图 6 EPS-07 灌胃对鲤血清细胞因子分泌的影响

柱上不同字母表示组间有显著性差异 ($P < 0.05$).

Fig. 6 Effects of EPS-07 on the cytokines secretion in the serum of *Cyprinus carpio*
Different letters indicate significant difference from each other ($P < 0.05$).

maximus)和鲤的研究结果一致。但 NO 的过量产生会导致氧化应激和炎症反应^[28]。在高能代谢过程中, 机体容易受到过多的自由基的影响, 并且自由基的积累会加剧机体的炎症反应。嗜水气单胞菌感染后, 阳性对照组 NO 含量明显高于其他

组, 但 EPS-07 处理组能显著降低由嗜水气单胞菌引起的 NO 的大量分泌, 表明 EPS-07 可通过调节 NO 生成量来维持机体稳态, 减少嗜水气单胞菌对机体的刺激, 进而提高机体免疫力。此外, 关于 NO 生成机制的研究表明多糖可通过增加一氧化

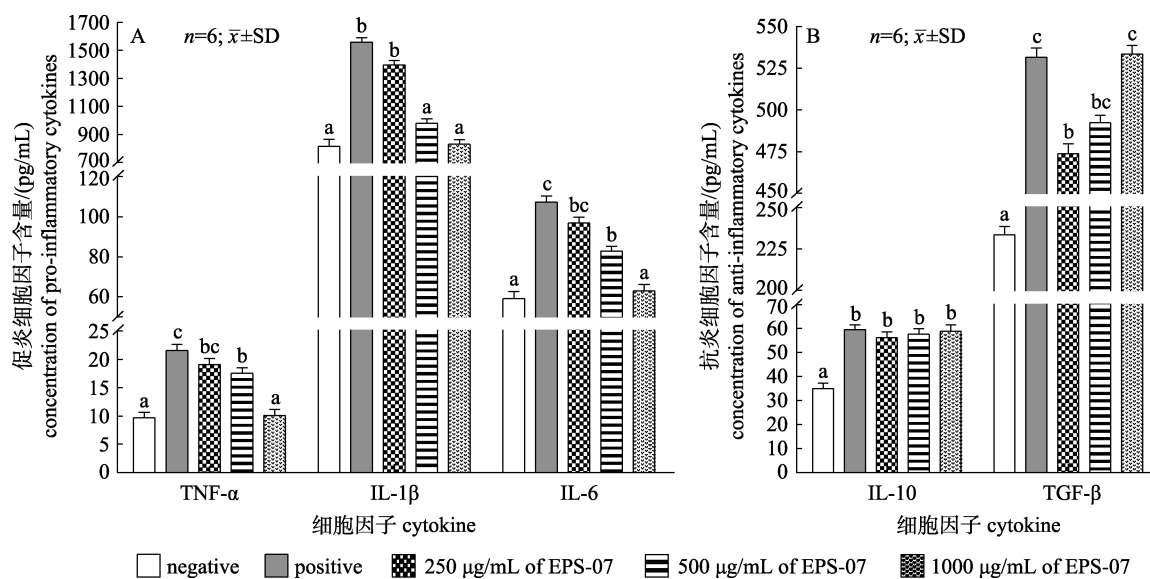


图7 ESP-07 灌喂及攻毒对鲤血清细胞因子分泌的影响

柱上不同字母标记表示组间有显著性差异($P < 0.05$).

Fig. 7 Effects of EPS-07 and *Aeromonas hydrophila* on the cytokines secretion in the serum of *Cyprinus carpio*. Different letters indicate significant difference from each other ($P < 0.05$).

氮合酶(iNOS)基因的表达,进一步通过诱导 iNOS 催化 L-精氨酸产生 NO, 来增强机体免疫力^[29-31]。本研究中的 EPS-07 多糖是否也通过该机制调控 NO 的合成需进一步研究。

3.3 ESP-07 对肝胰腺抗氧化能力的影响

肝胰腺是鱼类重要的抗氧化器官,肝胰腺的一些氧化指标可以代表机体的免疫能力^[32]。总抗氧化能力(T-AOC)可作为机体总抗氧化能力的评估指标,包括酶系统 T-SOD、CAT、GSH-Px 和非酶系统 GSH、维生素类和葡萄糖等;正常情况下, T-SOD、CAT、GSH-Px 这 3 种酶联合清除活性氧自由基,保护鱼类免受自由基伤害。其中 T-SOD 破坏了超氧自由基形成过氧化氢,随后 CAT 和 GSH-Px 将过氧化氢分解成水和氧气,并防止羟基自由基的形成;GSH 能清除体内的自由基团,对细胞有保护作用;MDA 是脂质过氧化物的主要分解产物,可导致细胞死亡^[33-34]。当鱼类受到外界刺激时,体内会产生大量的自由基,破坏细胞膜和 DNA,诱发多种氧化损伤。EPS 在抗氧化防御系统中起着重要作用,可以清除机体自由基及脂质过氧化物,保护鱼类免受氧化应激引起的细胞内损伤。在过氧化氢损伤的 Caco-2 细胞模型中,植物乳杆菌 WLPL04 EPS 显著抑制了活性氧和

MDA 含量的增加,并增强了抗氧化相关酶(T-SOD、CAT 和 GSH-Px)和基因(*T-SOD*、*GSH-Px*)的表达^[34]。本研究结果表明 ESP 处理组可通过提高肝胰腺中 T-AOC 和 GSH 的含量及 SOD、GSH-Px 和 CAT 的活性,以及降低 MDA 含量,提升机体抗氧化能力。在鱼类和哺乳动物的一些研究中也有类似的结果^[35-37]。本研究中处理组 CAT 的活性随浓度升高呈上升趋势,乳酸菌 EPS^[38]能显著提高小鼠肝脏 CAT 活性,但绿藻多糖^[39]对鲮(*Mugil cephalus*)肝胰腺中 CAT 活性无显著性影响,说明多糖对 CAT 影响并不一致,可能与多糖的来源和动物品种不同有关。ESP-07 能提高 T-AOC 和 GSH 的含量及 T-SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性,并降低 MDA 含量,可能通过促进细胞中抗氧化基因的表达来清除自由基和清除脂质过氧化物抑制脂质过氧化反应达到抗氧化作用,但具体作用机制还需要进一步研究。

3.4 EPS-07 对细胞因子的影响

炎症反应是先天免疫反应系统的关键因素,主要是由细胞因子介导的^[40]。IL-1β、IL-6 和 TNF-α 是促炎细胞因子,其上调参与炎症反应,并且表达水平通常被认为是发生炎症反应的指标。抗炎细胞因子(IL-10、TGF-β)是抗炎性细胞因子,在免

疫系统中具有多效作用,它们不仅抑制细胞因子的过度释放,在调节炎症、免疫稳态中也发挥重要的作用^[41]。体内和体外实验表明 EPS-07 可在头肾和血液中增强促炎因子(IL-6、IL-1 β 、TNF- α)和抗炎因子(IL-10、TGF- β)的表达。发酵乳杆菌产生的 EPS 通过增加小鼠血清中促炎细胞因子(IL-6、TNF- α)和抗炎细胞因子(IL-10)来促进肠道稳态^[14]。此外,乳杆菌和双歧杆菌 EPS 可增加鼠巨噬细胞中促炎和抗炎细胞因子^[42-43]。Lin 等^[44]发现水生栖热菌 EPS 可通过 Toll 样受体 2 (TLR2)介导的途径刺激鼠巨噬细胞释放促炎性细胞因子(TNF- α 、IL-6)。

多糖可通过活化巨噬细胞和淋巴细胞,刺激细胞因子的产生来激活先天免疫系统,保护鱼类免受常见细菌性病原体如嗜水气单胞菌、爱德华氏菌的侵袭^[43,45]。一旦天然免疫系统被激活,机体内环境就会维持在一个相对稳定的状态。本研究中,嗜水气单胞菌感染后,与阳性对照组相比,处理组通过下调促炎细胞因子(IL-6、IL-1 β 、TNF- α)和上调抗炎细胞因子(IL-10、TGF- β),维持机体内环境的相对稳定。这与 β -葡聚糖^[46]抑制斑马鱼诱导炎症模型中促炎性细胞因子 TNF- α 基因表达的研究结果类似。在鲫(*Carassius auratus*)^[47]、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[48]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[49]、亚洲鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[50]、大鳞鲂(*Barbus capito*)^[51]的研究中也发现多糖可增强机体抵抗细菌的感染,提高存活率。目前关于植物乳杆菌 EPS 增强鲤抵抗嗜水气单胞菌感染的报道很少,关于其抗炎的机制也尚不明确。Qin 等^[52]认为干酪乳杆菌 BL23 的胞外多糖蛋白复合物(EPSP)可能是通过 TLR1/TLR2 信号途径来增强斑马鱼对维氏气单胞菌的免疫反应,诱导斑马鱼肝脏细胞中 TLR1、TLR2、IL-10 和 TNF- α 的表达,并降低 IL-1 β 的表达。本研究中, EPS-07 也可能通过 TLRs 信号途径促进体内细胞因子的表达来抵抗嗜水气单胞菌的感染。

4 结论

综上所述, EPS-07 可以促进鲤头肾细胞增殖和吞噬活性,促进其体内细胞因子和 NO 的表达,

并增强鲤肝胰腺的抗氧化水平。此外, EPS-07 还能缓和嗜水气单胞菌感染后体内的指标变化。以上结果表明, EPS-07 可作为一种免疫刺激剂提高鲤的免疫功能。

参考文献:

- [1] Hoseinifar S H, Zou H K, Van Doan H, et al. Evaluation of some intestinal cytokines genes expression and serum innate immune parameters in common carp (*Cyprinus carpio*) fed dietary loquat (*Eriobotrya japonica*) leaf extract[J]. Aquaculture Research, 2018, 49(1): 120-127.
- [2] Li M Y, Zhu X M, Niu X T, et al. Effects of dietary *Allium mongolicum* Regel polysaccharide on growth, lipopolysaccharide-induced antioxidant responses and immune responses in *Channa argus*[J]. Molecular Biology Reports, 2019, 46(2): 2221-2230.
- [3] Dawood M A O, Koshio S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review[J]. Aquaculture, 2016, 454: 243-251.
- [4] Xia Y, Yi H X, Fan R B, et al. Effects of dietary lactic acid bacteria on the meat quality of juvenile *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(1): 74-81. [夏雨, 易华西, 范荣波, 等. 饲喂乳酸菌对凡纳滨对虾幼虾肉质的影响[J]. 中国水产科学, 2020, 27(1): 74-81.]
- [5] Nguyen T L, Chun W K, Kim A, et al. Dietary probiotic effect of *Lactococcus lactis* WFLU12 on low-molecular-weight metabolites and growth of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2059.
- [6] Sun Y, He M W, Cao Z J, et al. Effects of dietary administration of *Lactococcus lactis* HNL12 on growth, innate immune response, and disease resistance of humpback grouper (*Cromileptes altivelis*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 82: 296-303.
- [7] Conover M S, Sloan G P, Love C F, et al. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin[J]. Molecular Microbiology, 2010, 77(6): 1439-1455.
- [8] Ke C L, Qiao D L, Gan D, et al. Antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of the capsule polysaccharides from *Streptococcus equi* subsp. zooepidemicus[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 75(4): 677-682.
- [9] Dilna S V, Surya H, Aswathy R G, et al. Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4[J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 64(2): 1179-1186.
- [10] Dertli E, Toker O S, Durak M Z, et al. Development of a fermented ice-cream as influenced by *in situ* exopolysaccha-

- ride production: Rheological, molecular, microstructural and sensory characterization[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 427-440.
- [11] Durlu-Özkaya F, Aslim B, Taha Ozkaya M. Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria[J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40(3): 564-568.
- [12] Riaz Rajoka M S, Jin M L, Zhao H B, et al. Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk[J]. LWT, 2018, 89: 638-647.
- [13] Chabot S, Yu H L, De Léséleuc L, et al. Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN- γ in mouse splenocytes[J]. Le Lait, 2001, 81(6): 683-697.
- [14] Vinderola G, Perdigón G, Duarte J, et al. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranoferiens* on the gut mucosal immunity[J]. Cytokine, 2006, 36(5-6): 254-260.
- [15] Liu C F, Tseng K C, Chiang S S, et al. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(12): 2284-2291.
- [16] Li J Y, Jin M M, Meng J, et al. Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* LP6: Antioxidation and the effect on oxidative stress[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(1): 1147-1152.
- [17] Xiu L, Zhang H C, Hu Z P, et al. Immunostimulatory activity of exopolysaccharides from probiotic *Lactobacillus casei* WXD030 strain as a novel adjuvant *in vitro* and *in vivo*[J]. Food and Agricultural Immunology, 2018, 29(1): 1086-1105.
- [18] Feng J C, Chang X L, Zhang Y R, et al. Effects of *Lactococcus lactis* from *Cyprinus carpio* L. as probiotics on growth performance, innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 93: 73-81.
- [19] Feng J C, Chang X L, Zhu Z X, et al. Preparation and detection of cytokines polyclonal antibodies of *Cyprinus carpio*[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(10): 1615-1625. [冯军厂, 常绪路, 朱振祥, 等. 鲤细胞因子多克隆抗体的制备及检测[J]. 水产学报, 2018, 42(10): 1615-1625.]
- [20] Chang Z L. Recent development of the mononuclear phagocyte system: In memory of Metchnikoff and Ehrlich on the 100th Anniversary of the 1908 Nobel Prize in Physiology or Medicine[J]. Biology of the Cell, 2009, 101(12): 709-721.
- [21] Wang J, Fang X B, Wu T. Immunoregulatory effect of exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* JLK0142 on RAW_{264.7} macrophages and immunosuppressed mice[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(9): 1614-1624. [王辑, 房晓彬, 吴彤. 植物乳杆菌 JLK0142 胞外多糖对 RAW_{264.7} 巨噬细胞和免疫抑制小鼠的免疫调节作用[J]. 微生物学报, 2018, 58(9): 1614-1624.]
- [22] Abbas A K, Lichtman A H, Pober J S. Cellular and Molecular Immunology[M]. Saunders, 1991.
- [23] Kusmiati, Kukihi F E, Afati F. Exopolysaccharide (EPS) activity test of lactic acid bacteria (LAB) as immunomodulatory[J]. Indonesian Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2017, 21(3): 182-189.
- [24] Bogdan C. Nitric oxide and the immune response[J]. Nature Immunology, 2001, 2(10): 907-916.
- [25] Zheng Y G, Yan S M, Qi J Y, et al. Protective effect of chitosan oligosaccharide against oxidative damage of peripheral blood mononuclear cells in dairy cows induced by diethylenetriamine/nitric oxide via NF- κ B signalling pathway[J]. Italian Journal of Animal Science, 2020, 19(1): 602-609.
- [26] Villamil L, Tafalla C, Figueras A, et al. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2002, 9(6): 1318-1323.
- [27] Feng J C, Cai Z L, Chen Y Y, et al. Effects of an exopolysaccharide from *Lactococcus lactis* Z-2 on innate immune response, antioxidant activity, and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in *Cyprinus carpio* L[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 98: 324-333.
- [28] Lokhande P D, Kuchekar B S, Chabukswar A R, et al. Nitric oxide: Role in biological system[J]. Asian Journal of Biochemistry, 2005, 1(1): 1-17.
- [29] Lee Y S, Han O K, Park C W, et al. Pro-inflammatory cytokine gene expression and nitric oxide regulation of aqueous extracted *Astragali radix* in RAW 264.7 macrophage cells[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2005, 100(3): 289-294.
- [30] Wang J L, Meng X L, Lu R H, et al. Effects of *Rehmannia glutinosa* on growth performance, immunological parameters and disease resistance to *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Aquaculture, 2015, 435: 293-300.
- [31] Sethi G, Sodhi A. *In vitro* activation of murine peritoneal macrophages by ultraviolet B radiation: Upregulation of CD18, production of NO, proinflammatory cytokines and a signal transduction pathway[J]. Molecular Immunology, 2004, 40(18): 1315-1323.
- [32] Jin H M, Yan C, Xiao T F, et al. High fish oil diet promotes liver inflammation and activates the complement system[J].

- Molecular Medicine Reports, 2018, 17(5): 6852-6858.
- [33] Zhou Y, Cui Y H, Qu X J. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 207: 317-332.
- [34] Liu Z Q, Dong L Y, Jia K Y, et al. Sulfonation of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 exopolysaccharide amplifies its antioxidant activities *in vitro* and in a Caco-2 cell model[J]. Journal of Dairy Science, 2019, 102(7): 5922-5932.
- [35] Wang Y H, Xu X Z, Wang H C, et al. Effects of *Astragalus* polysaccharide on growth performance, immunity, antioxidant capability and disease resistance of hybrid snakehead[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(4): 1447-1456. [王煜恒, 徐孝宙, 王会聪, 等. 黄芪多糖对杂交鳢生长性能、免疫能力、抗氧化能力和抗病力的影响[J]. 动物营养学报, 2018, 30(4): 1447-1456.]
- [36] Wang Y M, Chen B, Wang G X, et al. Effects of dietary mulberry leaf flavonoids on growth performance, antioxidant indices, and anti-hypoxic stress ability of *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(10): 1184-1195. [王咏梅, 陈冰, 王国霞, 等. 饲料中添加桑叶黄酮对凡纳滨对虾生长性能、抗氧化指标及抗胁迫能力的影响[J]. 中国水产科学, 2020, 27(10): 1184-1195.]
- [37] Zahran E, Risha E, AbdelHamid F, et al. Effects of dietary *Astragalus* polysaccharides (APS) on growth performance, immunological parameters, digestive enzymes, and intestinal morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 38(1): 149-157.
- [38] Pan D D, Mei X M. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 908-914.
- [39] Akbary P, Aminikhoei Z. Effect of water-soluble polysaccharide extract from the green alga *Ulva rigida* on growth performance, antioxidant enzyme activity, and immune stimulation of grey mullet *Mugil cephalus*[J]. Journal of Applied Phycology, 2018, 30(2): 1345-1353.
- [40] Han J H, Ulevitch R J. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity[J]. Nature Immunology, 2005, 6(12): 1198-1205.
- [41] Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation[J]. Current Drug Targets Inflammation and Allergy, 2005, 4(3): 281-286.
- [42] Bleau C, Monges A, Rashidan K, et al. Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(2): 666-675.
- [43] Wu M H, Pan T M, Wu Y J, et al. Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A.1 macrophages) and antimicrobial properties[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 144(1): 104-110.
- [44] Lin M H, Yang Y L, Chen Y P, et al. A novel exopolysaccharide from the biofilm of *Thermus aquaticus* YT-1 induces the immune response through toll-like receptor 2[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(20): 17736-17745.
- [45] Ellis A E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2001, 25(8-9): 827-839.
- [46] Pérez-Ramos A, Mohedano M L, Pardo M Á, et al. B-glucan-producing *Pediococcus parvulus* 2.6: Test of probiotic and immunomodulatory properties in zebrafish models[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1684.
- [47] Wang E L, Chen X, Wang K Y, et al. Plant polysaccharides used as immunostimulants enhance innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in fish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 59: 196-202.
- [48] Gou C L, Wang J Z, Wang Y Q, et al. *Hericium caput-medusae* (Bull.: Fr.) Pers. polysaccharide enhance innate immune response, immune-related genes expression and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 72: 604-610.
- [49] Abu-Elala N M, Mohamed S H, Zaki M M, et al. Assessment of the immune-modulatory and antimicrobial effects of dietary chitosan on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) with special emphasis to its bio-remediating impacts[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 46(2): 678-685.
- [50] Ranjan R, Prasad K P, Vani T, et al. Effect of dietary chitosan on haematology, innate immunity and disease resistance of Asian seabass *Lates calcarifer* (Bloch)[J]. Aquaculture Research, 2014, 45(6): 983-993.
- [51] Wu C, Shan J F, Feng J C, et al. Effects of dietary *Radix Rehmanniae Preparata* polysaccharides on the growth performance, immune response and disease resistance of *Luciobarbus capito*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 89: 641-646.
- [52] Qin C B, Zhang Z, Wang Y B, et al. EPSP of *L. casei* BL23 protected against the infection caused by *Aeromonas veronii* via enhancement of immune response in zebrafish[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2406.

Probiotic effect of fish-derived *Lactobacillus plantarum* HS-07 exopolysaccharide in common carp (*Cyprinus carpio* L.)

CHEN Yongyan, FENG Junchang, LI Meng, LIU Shasha, CAI Zhongliang, HUANG Mengyuan, CHANG Xulu, ZHANG Jianxin

College of Fisheries, Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation; Engineering Laboratory of Henan Province for Aquatic Animal Disease Control; Henan Normal University, Xinxing 453007, China

Abstract: To explore the effects of the orally administered exopolysaccharides derived from *Lactobacillus plantarum* HS-07 (EPS-07) on the immunity, antioxidative activity, and resistance against *Aeromonas hydrophila* in *Cyprinus carpio*. In this experiment, the EPS-07 (250 µg/mL, 500 µg/mL and 1000 µg/mL) were co-cultured with the head kidney cells of *C. carpio*. The control group was fed sterile saline, and the treatment group was fed different concentrations of EPS-07 (250 µg/mL, 500 µg/mL, and 1000 µg/mL), once a day, for 7 consecutive days, then challenged with *A. hydrophila* for 24 h. *In vitro* tests showed that for EPS-07 co-cultured with the head kidney cells of *C. carpio*, the proliferation ability, phagocytic activity, NO content, and expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-6) and anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF- β) were significantly increased ($P<0.05$). *In vivo* results showed that before infection with *A. hydrophila*, the NO content and expression of pro-inflammatory cytokines and anti-inflammatory cytokines in EPS-07 serum treatment groups were significantly increased ($P<0.05$). The content of T-AOC and GSH and the activities of T-SOD, GSH-Px, and CAT in the hepatopancreas of the EPS-07 treatment group were also significantly higher than those of control group ($P<0.05$), and the content of MDA decreased in a concentration-dependent manner ($P<0.05$). After *A. hydrophila* infection, EPS-07 inhibited the release of NO, upregulated the expression of anti-inflammatory cytokines, and downregulated the expression of pro-inflammatory cytokines. In conclusion, EPS-2 has potent immunoregulatory effects at the cellular and host level, which can improve the immunomodulatory, antioxidant effects, and disease resistance against *A. hydrophila* in *C. carpio*.

Key words: *Lactobacillus* exopolysaccharide; *Cyprinus carpio*; immunity; antioxidant activity; anti-infection ability

Corresponding author: FENG Junchang, E-mail: fjc15290022@126.com; ZHANG Jianxin, E-mail: zjxlql@163.com