

山羊羔肠道淋巴集结提取物对淡水白鲢免疫力及生长的影响

梁奉军, 陈小鹏, 杨永杰, 张燕君

(山东大学 生命科学学院, 山东 济南 250100)

摘要:取出生 30 d 以内的山羊 (*Capra hircus*) 羔, 分离其肠道淋巴集结, 经匀浆、反复冻融、离心, 制备提取物。用该提取物饲喂体质量 (21.2 ± 1.1) g 的淡水白鲢 (*Colossoma brachypomum*) 以检验其对鱼类免疫力及生长的影响。实验组和对照组各设 3 个平行组, 每个平行组有 29 尾鱼, 饲于 1 个 0.3 m^3 水族箱。实验组按质量比为 2% 的比例向基础饲料中添加提取物, 对照组只投喂基础饲料。15 d 后, 实验组淡水白鲢的白细胞吞噬活性、血清抗菌活力、血清溶菌酶活性、血清溶血素、特定生长率、饵料系数均显著高于对照组 ($P < 0.05$); 血清酚氧化酶和超氧化物歧化酶活性与对照组相比没有显著提高 ($P > 0.05$)。实验表明, 山羊羔肠道淋巴集结提取物能提高淡水白鲢免疫力, 并对其生长有明显的促进作用, 其作为饲料添加剂具有良好的应用前景。[中国水产科学, 2007, 14 (2): 290–294]

关键词:淡水白鲢; 山羊羔; 肠道淋巴集结提取物; 免疫力; 生长

中图分类号: S966.12

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2007)02–0290–05

随着科技的发展, 水产养殖的集约化程度越来越高。它一方面提高了产量, 另一方面也造成养殖环境的恶化, 导致养殖生物对疾病的易感性增加, 疾病滋生, 严重影响了养殖业的发展。近 20 年来, 人们采用各种抗生素治疗鱼类的感染性疾病, 取得了一定的效果。然而, 抗生素产生的负面影响, 如细菌耐药性、药物残留等, 又成为制约水产养殖的主要症结之一。

目前在养殖业中, 免疫增强剂的应用正在日益受到重视。免疫增强剂不仅能增强特异性免疫应答, 更重要的是能作用于非特异性免疫系统, 在短时期内显著提高机体的抗病能力, 从而达到防病、抗病的目的。目前应用于水产动物的免疫增强剂主要有: 化学合成药剂、微生物衍生物、多糖、维生素及激素、细胞因子、动植物提取物等, 有些已在生产中大量应用^[1]。

张红卫等^[2]通过对不同发育时期的山羊 (*Capra hircus*) 羔肠道淋巴集结 (Peyer's patch, PP) 的形态学观察指出, 羊羔肠道淋巴集结是 B 淋巴细胞的主要来源和发育成熟场所, 出生后又兼具周围淋巴器官的功能, 可能与骨髓、胚肝共同作为体液免疫的中枢。作为鸟类法氏囊的类同器官, 羊羔 PP 提取液可能含有类似鸟类法氏囊提取液中提高机体免疫力的有效因子。Audhya 等^[3]的工作表明, 鸡 B 淋巴细胞的分

化激素—法氏囊素的有效成分是 1 个三肽: Lys-His-Gly-NH₂, 之后又证明胎牛骨髓和肝内胆管上皮细胞中也含有同样的成分^[4]。将山羊羔 PP 提取物皮下注射到仔鸡和仔兔体内, 2 周后可显著提高实验动物血清中的抗体滴度^[2]。为了试验山羊羔 PP 提取物在水产养殖动物中的作用, 本研究用 PP 提取物作为淡水白鲢 (*Colossoma brachypomum*) 的饲料添加剂, 饲喂 2 周后, 检测其对鱼体免疫力及生长的影响。结果显示 PP 提取物可提高淡水白鲢的免疫力, 并对其生长有明显的促进作用。山羊羔 PP 提取物具有作为饲料添加剂的良好前景。

1 材料与方法

1.1 山羊羔肠道淋巴集结提取物的制备

出生 30 日内的山羊羔, 雌雄不限, 购自济南郊区。将山羊羔杀死, 迅速取出小肠, 用预冷生理盐水冲洗, 低温下快速分离出全部 PP 组织, 包括呈斑状的空肠 PP (Jejunum peyer's patch) 和呈带状的回肠 PP (Ileum peyer's patch), 剥去脂肪组织。在 0.02 mol/L pH 7.4 磷酸缓冲液 (0.5 mL/g 组织) 中剪碎, 组织匀浆机中高速匀浆后冻存于 -20°C 。经反复冻融 3 次, 4°C $10\,000 \text{ g}$ 离心 20 min, 收集上清液过滤除

收稿日期: 2006–06–01; 修订日期: 2006–09–22.

基金项目: 山东省科技攻关项目 (2005GG320801); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金 (02BS040).

作者简介: 梁奉军 (1978–), 男, 硕士, 从事水生动物发育与营养研究.

通讯作者: 张燕君. E-mail: zhangyj@sdu.edu.cn

菌,即得PP提取物。测定蛋白质浓度,用磷酸缓冲液调整浓度为10 mg/mL。

1.2 实验动物的饲养和处理

淡水白鲢174尾,购于山东省淡水养殖研究所,体质量 (21.2 ± 1.1) g,分为对照组和实验组2组,每组87尾,每组又分设3个平行组,每个平行组29尾,饲于1个0.3 m³水族箱。入水族箱后投喂7 d基础饲料,即淡水白鲢专用饲料,山东省淡水养殖研究所产品,饲料成分为:鱼粉20%,酵母5%,豆粕25%,菜籽粕25%,玉米粉10%,麦麸皮33%,复合矿物质2%,复合维生素2%。观察无病后进入实验阶段。实验组在投喂的基础饲料中添加PP提取物。具体操作是将基础饲料完全浸泡于PP提取物溶液中(20 mL PP提取物溶液/100 g 饲料),自然晾干后饲喂。对照组只加基础饲料。每天投饵2次,每次投饵量为鱼体质量的2%。水温控制在28~30℃。每日换水30%。饲养15 d后,检测实验组、对照组各项免疫指标和体质量。

1.3 检测指标

1.3.1 白细胞吞噬活性 按文献[5]报道的方法进行,稍做修改。饲养15 d后,从实验组和对照组中分别随机捞取淡水白鲢10尾,以注射器从鱼心脏取血,立即滴到盛有3%柠檬酸钠溶液的凹玻片上,加1滴 6×10^{10} CFU/mL的金黄色葡萄球菌(菌种由山东大学微生物菌种室提供);混匀后将凹玻片置湿盒中,37℃震荡温育30 min。吸取1滴菌-血混合液在载玻片上推成薄片,晾干后甲醇固定30 min, Giemsa 染色,油镜下计数并计算多形核白细胞的吞噬百分率。吞噬百分率=吞噬有细菌的多形核白细胞数/多形核白细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.3.2 血清抗菌活力 以大肠杆菌 *E. coli* 为底物,采用 Hultmark 等^[6]的方法测定。将底物用0.1 mol/L、pH 6.4的磷酸缓冲液配成 $A_{570}=0.3 \sim 0.5$ 的菌悬液。随机取对照组及实验组各10尾鱼,每尾鱼取血清50 μL,加入3 mL上述菌悬液于试管中混匀,测定其在570 nm处的吸光度 A_0 ,然后置37℃水浴保温30 min,取出立即置冰浴中10 min以终止反应,测定吸光度A,抗菌活力 U_a 按下式计算: $U_a = [(A_0 - A) / A]^{1.2}$

1.3.3 血清溶菌酶活性 以溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*, Sigma) 为底物,采用 Hultmark 等^[6]的方法测定。将底物用0.1 mol/L、pH 6.4的

磷酸缓冲液配成 $A_{570}=0.3$ 的菌悬液。随机取对照组10尾鱼及实验组10尾鱼,每尾鱼取血清50 μL,加入3 mL上述菌悬液于试管中混匀,测定其在570 nm处的吸光度 A_0 ,置于37℃温育30 min后测570 nm处吸光度值A,溶菌酶活性 U_L 按下式计算:

$$U_L = (A_0 - A) / A$$

1.3.4 血清溶血素水平 3月龄雄性豚鼠 (*Cauiaporcellus*) 购自山东大学医学院动物中心。心脏取血,于4℃放置30 min,1000 g离心10 min,取上清,用生理盐水将血清稀释成10%,分装0.5 mL/管, -20℃保存备用。此即为制备好的豚鼠补体。

随机取对照组10尾鱼及实验组10尾鱼,每尾鱼取血清10 μL,用生理盐水稀释100倍,取1 mL稀释血清,与0.5 mL 5%鸡红细胞悬液、0.5 mL 10%豚鼠补体混合,37℃保温30 min,后置于4℃终止反应,1000 g离心10 min。取上清液于540 nm测吸光度A,作为判定血清溶血素的指标。

1.3.5 血清酚氧化酶活力 以左旋多巴 (L-dopa) 为底物,参照 Ashida^[7]的方法进行。随机取对照组及实验组各10尾鱼,每尾鱼取血清100 μL,加入0.1 mol/L pH 6.0的磷酸盐缓冲液3 mL和0.01 mol/L的L-dopa 100 μL,室温下混匀,每隔2 min测定其在490 nm处的吸光度A,以此实验条件下1 min吸光度A增加0.001为1个酶活力单位。

1.3.6 血清超氧化物歧化酶活力 参照邓碧玉^[8]的方法进行,所使用的联苯三酚的自氧化速率约为0.070 OD/min。随机取对照组及实验组各10尾,每尾鱼取血清10 μL。25℃下将10 μL血清加入4.5 mL浓度为50 mmol/L pH 8.3的磷酸缓冲液中,再加入50 mmol/L的联苯三酚10 μL,在325 nm波长下,每30 s测1次吸光度 A_{325} 。酶活性单位定义为:1 min抑制联苯三酚自氧化速率达50%的酶量为一个酶活单位(U)。按下面公式求出:酶的比活力(U/mL) = $(0.07 - A_{325}) / 0.07 \times 100\% / 50\% \times$ 反应液总体积 $\times$ 血清稀释倍数/血清体积。

1.3.7 生长 实验始末分别取实验组和对照组淡水白鲢各87尾测量体质量并计算其相对增长率和饵料系数:

各组鱼的相对增长率 = (末体质量 - 初体质量) / 初体质量 / 饲养天数 $\times 100\%$ 。

饲料转换系数 = 摄食饲料总质量 / (末体质量 - 初体质量)。

1.4 数据处理

各项结果均用平均值±标准误 ($\bar{X} \pm SE$) 表示。实验数据均用 SPSS 统计学软件处理, 实验组与对照组之间差异进行 t 检验, 当 $P < 0.05$ 时, 认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 PP 提取物对淡水白鲢白细胞吞噬活性、血清抗菌活性、溶菌酶活性和溶血素水平的影响

实验组与对照组相比, 多形核白细胞吞噬活性平均增加 153%, 血清的抗菌活性平均增加 104%, 溶菌酶活性增加 25%, 溶血素水平增加 1 倍, 实验组与对照组间的各项指标均存在极显著性差异 (P

< 0.01), 见表 1。表明 PP 提取物能显著提高淡水白鲢的免疫应答水平, 具较高的免疫保护力。

2.2 PP 提取物对淡水白鲢血清酚氧化酶和超氧化物歧化酶活力的影响

实验组与对照组相比, 血清酚氧化酶和超氧化物歧化酶活力无显著差异 ($P > 0.05$), 见表 2。表明 PP 提取物对二者无显著影响。

2.3 PP 提取物对淡水白鲢生长的影响

实验组和对照组存活率相似, 但相对生长率和饲料系数实验组较对照组表现好, 并存在显著差异 ($P < 0.05$), 见表 3。表明 PP 提取物能促进淡水白鲢生长。

表 1 PP 提取物对淡水白鲢白细胞吞噬活性、血清抗菌活性、溶菌酶活性和溶血素水平的影响

Tab.1 Influence of PP extract on phagocytic activities of phagocytes, serum antibacterial activities, bacteriolytic activities and serum hemolysin in *Colossoma brachypomum*

		$n = 10; \bar{X} \pm SE$			
组别 Group		白细胞吞噬率 /%	抗菌活性	溶菌酶活性	溶血素水平
		Phagocytic activity	Antibacterial activity	Bacteriolytic activity	Serum hemolysin
对照组 Control		20.67 ± 3.48	$(0.33 \pm 2.31) E-03$	$(0.12 \pm 4.62) E-03$	$(4.33 \pm 2.00) E-01$
实验组 Trial		$52.33 \pm 7.33^{**}$	$(0.68 \pm 1.53) E-02^{**}$	$(0.15 \pm 7.77) E-03^{**}$	$(8.67 \pm 3.00) E-01^{**}$

注: ** 表示与对照组有极显著差异 ($P < 0.01$)。

Note: ** indicates highly significant difference between control and trial ($P < 0.01$).

表 2 PP 提取物对淡水白鲢血清酚氧化酶和超氧化物歧化酶活力的影响

Tab.2 Influence of PP extract on serum phenoloxidase (PO) and superoxide dismutase (SOD) activities in *Colossoma brachypomum*

		$n = 10; \bar{X} \pm SE$	
组别 Group		PO 活性 / (U·mL ⁻¹)	SOD 活性 / (U·mL ⁻¹)
		PO activity	SOD activity
对照组 Control		$(0.81 \pm 1.83) E-02$	$(25.6 \pm 2.11) E-01$
实验组 Trial		$(0.83 \pm 2.12) E-02$	$(25.8 \pm 2.77) E-01$

表 3 对照组和实验组淡水白鲢相对生长率、存活率和饲料系数

Tab.3 Relative growth rates (RGR), survival rates (SR) and feed conversion rate (FCR) of *Colossoma brachypomum* in control and trials

		$n = 10; \bar{X} \pm SE$			
组别 Group		初始体质量 /g	终末体质量 /g	相对生长率 /%	存活率 /%
		IBW	FBW	RGR	SR
对照组 Control		21.2 ± 1.1	23.6 ± 1.1	0.75	100
实验组 Trial		21.2 ± 1.1	26.2 ± 1.1	1.57*	100

注: * 表示实验组与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: * indicates significant difference between trial group and control group ($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 PP 提取物对淡水白鲢免疫力的影响

在鱼类血细胞中, 中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞都具有吞噬异物的能力, 在非特异性免疫中起

着重要的作用。它们的数量和吞噬能力的高低可直接反映鱼类非特异性免疫能力的高低, 是鱼类非特异性免疫的主要指标之一^[9]。用含有 PP 提取物的饲料饲喂淡水白鲢 15 d 后, 实验组中性粒细胞吞噬活性比对照组增长了 1.53 倍。表明 PP 提取物可

在较短的时间内显著增强淡水白鲢中性粒细胞吞噬活性。给予免疫增强剂而增强吞噬细胞机能的水产动物,能更快地去除病原体,增强抗病能力^[9]。

血清抗菌活力的测定可以作为衡量免疫功能及机体状态的指标^[10]。在本研究中,实验组抗菌活力与对照组相比增长 104%,差异极显著。血清抗菌活力的提高从另一方面显示了非特异性免疫能力的增强。

溶菌酶是在自然界分布广泛的一种水解酶,在鱼类中主要存在于体表黏液、肠道黏液、血清和巨噬细胞中,它主要通过水解革兰氏阳性菌的细胞壁构成成分肽聚糖,从而起到抑菌作用^[11]。溶菌酶活性已被作为衡量机体非特异性免疫的重要指标之一。在本研究中,实验组与对照组相比血清溶菌酶活性增加了 25%,表明 PP 提取物对淡水白鲢血清溶菌酶活性有显著促进作用,进而提高了淡水白鲢的非特异性免疫功能。

血清溶血素即为 IgM。IgM 是初次免疫应答早期阶段产生的主要免疫球蛋白,是高效能的抗体,具杀菌、溶菌、溶血、促吞噬以及凝集作用,在体液免疫中发挥重要作用。在正常状态下其含量稳定,因此通过对其含量的测定,可在一定程度上反映机体的体液免疫功能状态^[11]。实验组淡水白鲢的血清溶血素水平比对照组增加了 1 倍,表明 PP 提取物也可在短期内显著提高淡水白鲢的特异性免疫能力。张红卫等^[2]将羊 PP 提取物皮下注射到仔鸡和仔兔体内,2 周后检测发现显著提高了实验动物的血清抗体滴度。PP 提取物对鱼类免疫系统的作用与其对仔鸡和仔兔的作用相似。这与 PP 作为羊羔免疫中枢,其中可能含类似法氏囊素的能刺激机体免疫系统和提高机体免疫力的因子有关^[2]。

3.2 PP 提取物对淡水白鲢生长的影响

在 15 d 的实验结束后,实验组相对生长率为 1.57%,对照组仅为 0.75%,2 个组间具有显著差异,表明 PP 提取物能显著促进鱼体生长。其促生长机理可能是通过改善鱼体免疫功能,提高了其抗病能力,也可能因为 PP 提取物有类生长因子物质从而促进生长。

3.3 PP 提取物作为免疫增强剂的使用时机

羊 PP 提取物对淡水白鲢免疫力和生长的促进

作用,显示其具有作为饲料添加剂的良好前景。但有报道认为使用免疫增强剂的时间不宜过长,免疫增强剂刺激机体免疫反应有一定的时间限度^[12]。因此用免疫增强剂应当考虑使用时机。在水产养殖中,一些疾病暴发有很强的季节性。在本实验中,添加 PP 提取物 15 d 后,显示非特异性和特异性免疫能力的多项指标有显著提高,说明 PP 提取物对免疫系统的作用具有起效快的特点。因此可以根据疾病暴发规律,有针对性地使用。

参考文献:

- [1] 黄洪敏,邵健忠,项黎新.鱼类免疫增强剂的研究现状与进展[J].2005,29(4):552-559.
- [2] 张红卫,丛英姿,于士广.山羊羔淋巴集结的研究[J].动物学报,1995,41(2):190-194.
- [3] Audhya T, Kroon D, Heavner G, et al. Tripeptide structure of bursin, a selective B-cell-differentiating hormone of the bursa of Fabricius[J]. Science, 1986, 38: 997-1 001.
- [4] Audhya T, Viamontes G, Babu U, et al. Bursin localization in mammalian bone marrow and epithelial cells of intrahepatic bile ducts[J]. Scand J Immunol, 1990, 1: 199-203.
- [5] 王军,鄢庆彬,苏永全,等.免疫添加剂对大黄鱼血液白细胞数量及吞噬功能的影响[J].海洋科学,2001,25(9):17-19.
- [6] Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, et al. 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.
- [7] Ashida M. Purification and characterization of prophenol oxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx Mori* [J]. Arch Biochem Biophys, 1971, 144(2): 749-762.
- [8] 邓碧玉,袁勤生.改良的联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): 163-165.
- [9] 唐政,马广智,徐军.鱼类免疫学研究进展[J].免疫学杂志,2002,18(3):112-116.
- [10] 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):179-185.
- [11] Hardie L J, Fletcher T C, Secombes C J. The effect of dietary vitamin C on the immune response of Atlantic salmon *Salmo salar* [J]. Aquaculture, 1991, 95: 201-214.
- [12] Soderhall K. Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition mechanism of arthropods [J]. Dev Comp Immunol, 1982, 6: 601-611.

Effects of goat lamb intestinal Peyer's patch extract on immunity and growth of *Colossoma brachypomum*

LIANG Feng-jun, CHEN Xiao-peng, YANG Yong-jie, ZHANG Yan-jun

(College of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Goat lamb intestinal Peyer's patches are both central and peripheral immune organ where B-lymphocytes originate, develop and mature. Previous study has shown that the goat lamb Peyer's patches consist of active stimulus to immune system of chicken and rabbit kids. In the present research, a study was conducted to determine effect of goat lamb intestinal Peyer's patches extract on immunity and growth of limnetic fish *Colossoma brachypomum*. Peyer's patches extract was obtained by centrifugation isolation after tissue homogenizing and repeating freezing-and-thaw of intestinal Peyer's patches from goat lamb not beyond 30 days after birth. One hundred and seventy-four *C. brachypomum* with (21.2 ± 1.1) g initial body weight were divided into test group and control group evenly. In each group 87 fish were divided again into three parallel subgroups. Every subgroup contained 29 fish which were kept in an indoor circular aquarium system (0.3 m^3) for 15 d. The diets of test group included 2% goat lamb Peyer's patches extract (total protein 20 mg/mL in PBS solution) while those of control group did not. At the end of experiment period several immune indices were tested. Results showed that adding Peyer's patches extract to the daily feed promoted immunoresponse level, including phagocytic activity of phagocytes, serum antibacterial activity, serum hemolysin level and serum bacteriolytic activity significantly ($P < 0.05$) in *C. brachypomum*. Phagocytic activity of phagocytes was 52.33% in test group and 20.67% in control group, increasing by 153%. Serum antibacterial activity was 0.68 in test and 0.33 in control, increasing by 104%. Serum bacteriolytic activity was 0.15 in test group and 0.12 in control group, increasing by 25%. Serum hemolysin value was 8.67 in test group and 4.33 in control group, increasing by 100%. However, the increases of phenoloxidase (PO) and superoxide dismutase (SOD) activities were not remarkable ($P > 0.05$). Meanwhile, relative growth rate of fish in test group increased remarkably to 1.57 compared with 0.75 in control group, and feed modulus in test group decreased to 2.55 in comparison with 5.31 in control group ($P < 0.05$). These results indicate that goat lamb Peyer's patch extract can promote immunity and growth of *C. brachypomum*, suggesting that it is likely a promising diet complement in limnetic fishery. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (2): 290–294]

Key words: *Colossoma brachypomum*; goat lamb; Peyer's patch extract; immunity; growth

Correspondence author: ZHANG Yan-jun. E-mail: zhangyj@sdu.edu.cn