

2 种免疫多糖对刺参组织主要免疫酶活性的影响

刘云,孔伟丽,姜国良,吴志强

(中国海洋大学 海洋生命学院,山东 青岛 266003)

摘要:研究了口服不同剂量海藻硫酸多糖、壳聚糖对刺参 (*Apostichopus japonicus*) 酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP)、溶菌酶 (LSZ)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响。在基础饲料中分别添加 0.25%、0.5%、1.0% 海藻硫酸多糖 (质量百分比); 0.5%、1.0%、2.0% 壳聚糖,以基础饲料组为对照,饲喂 7 d。于投喂后第 2 天、5 天、9 天和 15 天检测 ACP、AKP、LSZ 与 SOD 活性。结果显示,投喂后 15 d 内,各实验组 ACP、AKP 活性均随时间和剂量增加持续升高,与对照组具有显著性差异 ($P<0.05$),其中添加 1.0% 海藻硫酸多糖与 2.0% 壳聚糖效果最佳,1.0% 海藻硫酸多糖组的 ACP、AKP 酶活最高,分别是对照组的 3 倍、2.3 倍,2.0% 壳聚糖添加组的 ACP、AKP 活性分别是对照组的 3.9 倍、4.4 倍; LSZ 活性则随时间延长先升高后降低,最高时与对照组具有显著性差异 ($P<0.05$),且 LSZ 活性与免疫多糖添加量不成正比关系,0.5% 海藻硫酸多糖与 1.0% 壳聚糖组效果最佳,酶活最高分别是对照组的 1.4 倍、3.3 倍; SOD 活性均在第 2 天显著升高,短暂的升高后逐渐降低趋于对照,1.0% 海藻硫酸多糖、2.0% 壳聚糖组 SOD 酶活最高,分别是对照组的 1.7 倍、2.1 倍。研究结果表明,海藻硫酸多糖和壳聚糖可作为刺参免疫增强剂使用,建议其适宜添加量分别为 1.0% 海藻硫酸多糖、2.0% 壳聚糖。[中国水产科学,2008,15(5): 787-793]

关键词: 免疫多糖; 刺参; 酸性磷酸酶; 碱性磷酸酶; 溶菌酶; 超氧化物歧化酶

中图分类号: S963.73

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)05-0787-07

刺参 (*Apostichopus japonicus*) 具有较高的经济价值和药用价值^[1],现已成为中国水产养殖业的主要养殖品种之一。然而近几年刺参细菌性与病毒性疾病大面积发生,造成刺参养殖产业损失严重^[2-3]。刺参疾病防御已成为当务之急。

目前,抗生素及化学药品治疗给动物自身、动物产品及环境带来一系列的问题。如动物病原菌产生抗药性,引起内源性感染和二重感染;特别是长期使用会造成消化道内微生态失调和环境污染;同时药品在生物中的残留还直接影响人类健康。因此,国家对这类药物的使用已作了严格的限制^[4]。免疫多糖可提高养殖动物的免疫功能和机体防御能力,从而减少疾病发生,达到防御疾病的目的^[5],同时其具有不产生抗药性及环保的优点,可望成为抗生素的替代产品并受到科研工作者的重视。

多糖作为一种广谱的免疫增强剂,已证明对多种水产养殖动物具有免疫增强作用。曹丹等^[6]将 1.0% 壳聚糖作为添加剂投喂异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 可以极显著提高相对增殖率 ($P<0.01$)。庄承纪等^[7]证明壳聚糖能促进对

虾苗的生长,并具有抗菌防病作用。宋晓玲等^[8]报道在对虾饲料中添加肽聚糖可提高凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 抗病毒感染能力,从而达到防病治病、增加生产收益的目的。王秀华等^[9]研究表明,饲料中添加适量的肽聚糖制剂可以使南美白对虾 (*Penaeus vannamei*) 体液免疫因子总体活力达到较高水平。Takahashi 等^[10]证实日本对虾 (*Penaeus japonica*) 口服脂多糖可以显著提高细胞吞噬活性和存活率,减少病害的发生。Yuan 等^[11]用含有双壳类粪便与海藻粉的饲料饲喂刺参 (*A. japonicus*),可以改善提高刺参生长和能量分配。Santiago-Cardona 等^[12]研究表明,脂多糖可以提高海参 (*Holothuria glaberrima*) 机体免疫水平。马跃华等^[13]在海参越冬生产中进行了口服型免疫多糖的投喂实验。结果表明,饵料中添加 3% 的免疫多糖实验组的成活率、平均体质量分别比对照组提高 15%、13%。

本研究采用海藻硫酸多糖、壳聚糖 2 种免疫多糖,研究口服不同剂量对刺参组织匀浆液酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP)、溶菌酶 (LSZ) 及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响;以期探讨海

收稿日期: 2007-11-02; 修订日期: 2008-01-25.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30000129).

作者简介: 刘云 (1969-), 女, 博士, 副教授, 主要从事海洋动物免疫研究. Tel: 0532-82032913; E-mail: liuyun@ouc.edu.cn

藻硫酸多糖、壳聚糖与刺参非特异性免疫之间的关系,旨在疾病防治寻找契机,同时也为棘皮动物非特异性免疫研究积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

健康刺参购自山东青岛麦岛刺参养殖场,体长 (3.6 ± 0.32) cm,体质量 (2.5 ± 0.44) g。将刺参饲养于25 L水族箱中,水温 (15 ± 3) °C, pH (7.7 ± 0.3) ,海水盐度为 32 ± 2 ,每箱饲养50头,日投喂2次(9:00 am、16:00 pm)稚参饲料并换水30%。驯养1周后用于实验。

海藻硫酸多糖,即低分子量岩藻聚糖硫酸酯,以海带(*Laminaria japonica* Aresch)为原料制作而成,纯度90%,总糖含量65.20%,岩藻糖含量34.64%,有机 SO_4^{2-} 含量26.54%,平均分子量10 000 D,自制。

壳聚糖,即 β -1,4-聚-D-氨基葡萄糖, $(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4)_n$,以口虾蛄(*Erugosquilla woodmasoni* Kemp)壳为原料制作而成,脱乙酰度 $\geq 85\%$,水分 $\leq 10\%$,灰分 $\leq 2\%$,不溶物 $\leq 2\%$,pH值7.0~9.0,平均分子量6 000 D,自制。

1.2 实验设计

实验分7个处理组,每组设3个平行,每个平行饲养刺参50只。分别为对照组(A),投喂基础饲料;0.25%(质量百分比)海藻硫酸多糖组(B)、0.5%海藻硫酸多糖组(C)和1.0%海藻硫酸多糖组(D);0.5%壳聚糖组(E)、1.0%壳聚糖组(F)和2.0%壳聚糖组(G)。采用口服法对其投喂多糖7 d。投喂期间仍每天按时换水并测量温度、盐度、pH等各项水质指标,定时观察刺参生长及健康状况。分别于投喂后第2天、5天、9天、15天测定刺参各种免疫指标。

1.3 样品制备

每次从各组取刺参5只,测量体长、体质量后于冰浴中剪碎,按1:1加入预冷蒸馏水并匀浆,离心(12 000 r/min,4 °C,20 min)匀浆液,取上清,4 °C保存。

1.4 测定方法

1.4.1 酸性磷酸酶活性与碱性磷酸酶活性 ACP和AKP活力测定采用磷酸苯二钠法^[14]。以1 g组织蛋白在37 °C与基质作用30 min产生1 mg酚定义为1个活力单位(U)。

1.4.2 溶菌酶活性 参照Hultmark等^[15]的方法改

良后进行测定。以溶壁微球菌(*Micrococcus lysolei*cticus) (Sigma)冻干粉为底物,用磷酸钾缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.4)配成 $\text{OD}_{570} \approx 0.3$ 的菌悬液。取3.0 mL该菌悬液与150 μL 待测液于10 mL试管中混匀,测 OD_{570} ,记为 A_0 值。将试管置于37 °C振荡温浴30 min后立即置冰浴中10 min以终止反应,测 OD_{570} ,记为A值。以1 min OD_{570} 降低0.001为1个酶活力单位(UI)。LSZ活力(U/L, U/mL) = $(A_0 - A) / (30 \times 0.001) \times 1000 / 150$ 。

1.4.3 超氧化物歧化酶活性 SOD活力测定采用黄嘌呤氧化酶法^[14]。1 mg组织蛋白在1 mL反应液中抑制SOD率达50%时所对应的SOD量为1个SOD活力单位(U)。

1.4.4 蛋白含量的测定 可溶性蛋白含量采用双缩脲法^[16]测定。

1.5 数据处理与方差分析

数据用SPSS15.0软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示,当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 免疫增强剂对刺参ACP活性的影响

由图1 a可知,海藻硫酸多糖各实验组在投喂后15 d内ACP活性均随剂量增加呈现升高趋势,且随着时间的增加而增强。经统计分析,在第15天,0.25%海藻硫酸多糖组ACP活性与对照相比具有显著性差异($P < 0.05$);而0.5%海藻硫酸多糖组、1.0%海藻硫酸多糖组ACP活性在第9天、15天与对照相比均具显著差异($P < 0.05$),且第15天时与对照组差异极显著($P < 0.01$)。结果表明,1.0%海藻硫酸多糖组效果最佳,15 d时其ACP活性最高,是对照组的3倍。

由图1-b可知,壳聚糖各实验组在投喂后15 d内ACP活性均随剂量增加呈现升高趋势,且随着时间的增加而增强。经统计分析,0.5%壳聚糖组ACP活性15 d内与对照相比均无显著差异($P > 0.05$);而第9天,1.0%壳聚糖组和2.0%壳聚糖组ACP活性与对照相比均具有显著差异($P < 0.05$);且第15天,2.0%壳聚糖组与对照组差异极显著($P < 0.01$)。表明2.0%壳聚糖组效果最佳,15 d时其ACP活性最高,是对照组的3.9倍。

综上所述,海藻硫酸多糖、壳聚糖作为饲料添加剂投喂刺参7 d后的15 d内,ACP活性均随时间和剂

量的增加持续升高;其中2.0%壳聚糖组效果最佳。

2.2 免疫增强剂对刺参AKP活性的影响

由图1 c可见,海藻硫酸多糖各实验组在投喂后15 d内AKP活性均随剂量增加呈现升高趋势,且随着时间的增加而增强。经统计分析,在第15天,0.25%海藻硫酸多糖组、0.5%海藻硫酸多糖组AKP活性比对照显著升高($P<0.05$);第5天、9天、15天,1.0%海藻硫酸多糖组与对照组相比均差异极显著($P<0.01$)。图1 c表明,1.0%海藻硫酸多糖组效果最佳,第15天时其AKP活性最高,是对照组的2.3倍。

由图1 d可见,壳聚糖各实验组在投喂后15 d内AKP活性均随剂量增加呈现升高趋势,且随着时间的增加而增强。经统计分析,第9天,0.5%壳聚糖组、1.0%壳聚糖组、2.0%壳聚糖组AKP活性与对照相比均具显著性差异($P<0.05$);而第15天则均差异极显著($P<0.01$)。图1 d表明,2.0%壳聚糖组效果最佳,15 d时其AKP活性最高是对照组的4.4倍。

综上所述,海藻硫酸多糖、壳聚糖作为饲料添加剂投喂刺参后的15 d内AKP活性均升高;其中2.0%壳聚糖组效果最佳。

2.3 免疫增强剂对刺参LSZ活性的影响

由图1-e可见,海藻硫酸多糖各实验组在投喂后15 d内LSZ活性均先升高后降低;随着海藻硫酸多糖添加量的增加,LSZ活性并非也随之增加,反而有所下降。经统计分析,0.25%海藻硫酸多糖组LSZ活性在第9天与对照组相比差异极显著($P<0.01$);而1.0%海藻硫酸多糖组LSZ活性仅在第9天与对照组相比具显著性差异($P<0.05$);LSZ活性增加最多持续时间最长的是0.5%海藻硫酸多糖组,第5天、9天、15天LSZ活性均与对照组具有显著性差异($P<0.05$),其中第9天与对照组差异极显著($P<0.01$),酶活达到最高,是对照组的1.4倍。

由图1-f可见,口服0.5%壳聚糖、1.0%壳聚糖、2.0%壳聚糖后15 d内LSZ活性均先升高后下降,其中于第9天LSZ活性最高,且LSZ活性与对照组相比均具有显著性差异($P<0.05$)。随着壳聚糖添加量的增加,其效果并非持续升高,反而是有所下降。其中第9天,1.0%壳聚糖组LSZ活性最高且与对照组差异极显著($P<0.01$),是对照组的3.3倍。

综上所述,海藻硫酸多糖、壳聚糖作为饲料添加剂投喂刺参后15 d内LSZ活性呈现先升高后下降

的趋势;随着海藻硫酸多糖、壳聚糖添加量的增加,LSZ活性先升高后下降;其中效果最佳的是1.0%壳聚糖组。

2.4 免疫增强剂对刺参SOD活性的影响

由图1-g可见,海藻硫酸多糖各实验组在投喂后15 d内SOD活性均呈现短暂的升高,然后逐渐降低趋于对照。经统计分析,在第2天、5天,0.5%海藻硫酸多糖组、1.0%海藻硫酸多糖组SOD活性与对照组相比均具显著差异($P<0.05$);且1.0%海藻硫酸多糖组与对照组相比差异极显著($P<0.01$);虽然0.25%海藻硫酸多糖组SOD活性与对照组相比亦有所升高,但差异不显著($P>0.05$)。

由图1-h可见,壳聚糖各实验组在投喂后15 d内SOD活性均呈现短暂的升高,然后逐渐降低趋于对照。经统计分析,在第2天、5天、9天、15天,2.0%壳聚糖组SOD活性与对照组相比均具有显著性差异($P<0.05$);且第2天、5天,差异性极显著($P<0.01$);而0.5%壳聚糖组、1.0%壳聚糖组SOD活性与对照相比仅在第2天具显著性差异($P<0.05$),其他则差异不显著($P>0.05$)。

综上所述,海藻硫酸多糖、壳聚糖作为饲料添加剂投喂刺参后15 d内SOD活性均在第2天有显著性升高,短暂的升高后逐渐降低趋于对照;其中效果最佳的是2.0%壳聚糖组,SOD活性是对照组的2.1倍。

3 讨论

ACP是巨噬细胞溶酶体的标志酶,也是巨噬细胞内最有代表性的水解酶之一。吞噬是巨噬细胞的典型功能之一,巨噬细胞吞噬异物颗粒形成吞噬体,然后用包括ACP在内的溶解酶消化异物颗粒^[17]。本研究用ACP的活性表示吞噬细胞清除异物的能力。结果表明,口服不同剂量海藻硫酸多糖和壳聚糖后15 d内刺参匀浆液ACP活性持续升高,且部分与对照组相比具有显著差异($P<0.05$),1.0%海藻硫酸多糖与2.0%壳聚糖效果最佳,酶活最高分别是对照组的3倍、3.9倍。这与Meng等^[18]认为ACP可以被外源刺激物激活的结论相吻合。刘树青等^[19]用海藻多糖刺激中国对虾(*Penaeus chinensis*)也得到了相似的结论,即海藻多糖可显著提高ACP活性;牟海津等^[20]研究证实栉孔扇贝(*Chlamys irregularis*)经口服海藻多糖免疫增强剂后,血清中的ACP活性显著升高;此外,免疫多糖诱

导 ACP 活性的提高,亦被许多实验所证实^[6,21-23]。然而,本实验中 ACP 活性在投喂后第 15 天之后是否继续出现高活性值,尚需进一步研究。

AKP 普遍存在于动植物体内,是一种对底物专一性要求较低的磷酸单脂水解酶,是重要的解毒系统,在碱性条件下,可使磷酸单脂水解生成乙醇和磷酸,并与一些营养物质的消化吸收有关^[24]。本研究结果表明,与对照组相比,口服不同剂量海藻硫酸多糖和壳聚糖后 15 d 内,刺参匀浆液 AKP 活性持续升高,且部分具有显著性差异 ($P<0.05$),1.0% 海藻硫酸多糖与 2.0% 壳聚糖效果最佳,酶活最高,分别是对照组的 2.3 倍、4.4 倍。艾春香等^[22-23]用不同剂量 V_C 、 V_E 刺激河蟹 (*Eriocheir sinensis*) 也得到了类似的结果,即 AKP 活性显著升高;牟海津等^[20]研究报道海藻多糖免疫后的栉孔扇贝血清中 AKP 活性显著升高 ($P<0.05$);刘树青等^[19]用海藻多糖刺激中国对虾 (*Penaeus chinensis*),AKP 活性亦显著升高,本研究结果与之相同。然而,本实验中 AKP 活性在投喂完毕第 15 天之后是否继续出现高活性值,尚需进一步研究。

体内许多组织和体液中都含有溶菌酶。LSZ 是吞噬细胞杀菌的物质基础,是一种碱性蛋白,可通过水解革兰氏阳性细菌细胞壁中的乙酰氨基多糖,破坏和消除侵入体内的异物,从而担负起机体防御的功能。本研究结果表明,口服不同剂量海藻硫酸多糖和壳聚糖后 15 d 内,刺参匀浆液 LSZ 活性先升高后降低,第 9 天时最高,与对照组具有显著性差异 ($P<0.05$)。Gopalakannan 等^[25]研究证实,将壳聚糖作为饲料添加剂投喂鲤 (*Cyprinus carpio*) 90 d 后,鲤溶菌酶活性比对照组显著升高 ($P<0.05$)。沈锦玉等^[26]研究发现,口服壳聚糖免疫增强剂后第 9 天,血清溶菌酶活性显著高于对照组 ($P<0.05$),与本实验研究结果相同。这反映了免疫增强剂给药时间的重要性。在第 9 天后各实验组 LSZ 活性不再继续升高,这可能与免疫疲劳有一定关系,关于其内在机理还需要进一步的研究。然而,各实验组随着免疫多糖添加量的增加,其 LSZ 活性先升高后下降,0.5% 海藻硫酸多糖与 1.0% 壳聚糖效果最佳,最高酶活分别是对照组的 1.4、3.3 倍。王秀华等^[9]的研究结果表明,饲料中肽聚糖制剂含量过高对南美白对虾非特异免疫力的增强效果反而不佳;台湾

海洋大学的学者 Shiau 等^[27]用 3 个浓度 (2.0%、5%、10%) 壳聚糖饲喂罗非鱼,发现随着壳聚糖浓度的增加,鱼的增重降低;Kono 等^[28]研究表明,添加 10% 的壳聚糖对日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*)、黄尾笛鲷 (*Ocyurus chrysurus*) 的生长反而有着抑制作用。因此可以推测,对于不同种类的动物,免疫多糖的最适宜添加量可能会有不同,过高的添加量不仅不会促进动物的生长,反而会起到相反的效果。

SOD 是一种重要的抗氧化酶,作为活性氧清除剂参与清除体内自由基,可以加速从 O_2^- 转变成 H_2O_2 和 O_2 的反应,在防机体衰老及防生物分子损伤等方面具有极为重要的作用^[29]。有研究报道,SOD 活性与生物的免疫水平密切相关,对于增强吞噬细胞的防御能力和整个机体的免疫功能有重要的作用。本研究结果表明,刺参经海藻硫酸多糖、壳聚糖 2 种多糖免疫增强剂刺激后,其 SOD 活性显著升高;1.0% 海藻硫酸多糖组、2.0% 壳聚糖组效果最佳,最高酶活分别是对照组的 1.7 倍、2.1 倍。这与沈锦玉等^[26]用壳聚糖刺激中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 的研究结果类似;此外,刘恒等^[21]研究证明,用由海藻中提取的与微生物多糖有类似结构和性质的免疫多糖作为饵料添加剂,以口服形式对南美白对虾进行免疫,血淋巴中的 SOD 活性有一定的提高;牟海津等^[20]研究证实栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 经口服海藻多糖免疫增强剂后,血清中 SOD 活性亦显著升高。然而,本研究中 SOD 活性呈现短暂的升高然后逐渐降低趋于对照,这可能因为过量的活性氧对机体亦是一种胁迫,其内在的机理尚需进一步的研究。

此外,本实验所采用海藻硫酸多糖及壳聚糖虽然成份固定,但均为一定程度的杂多糖,各种杂质对免疫酶活性的影响有待进一步探讨。

4 结论

本研究结果表明,海藻硫酸多糖和壳聚糖作为天然免疫多糖,能对刺参体内氧化酶和水解酶系统产生积极的调理作用,使其非特异性免疫得到改善与提高,可作为免疫增强剂使用。1.0% (质量百分比) 海藻硫酸多糖组与 2.0% 壳聚糖组在各项指标中均表现较好,建议其分别为海藻硫酸多糖和壳聚糖的适宜添加量。

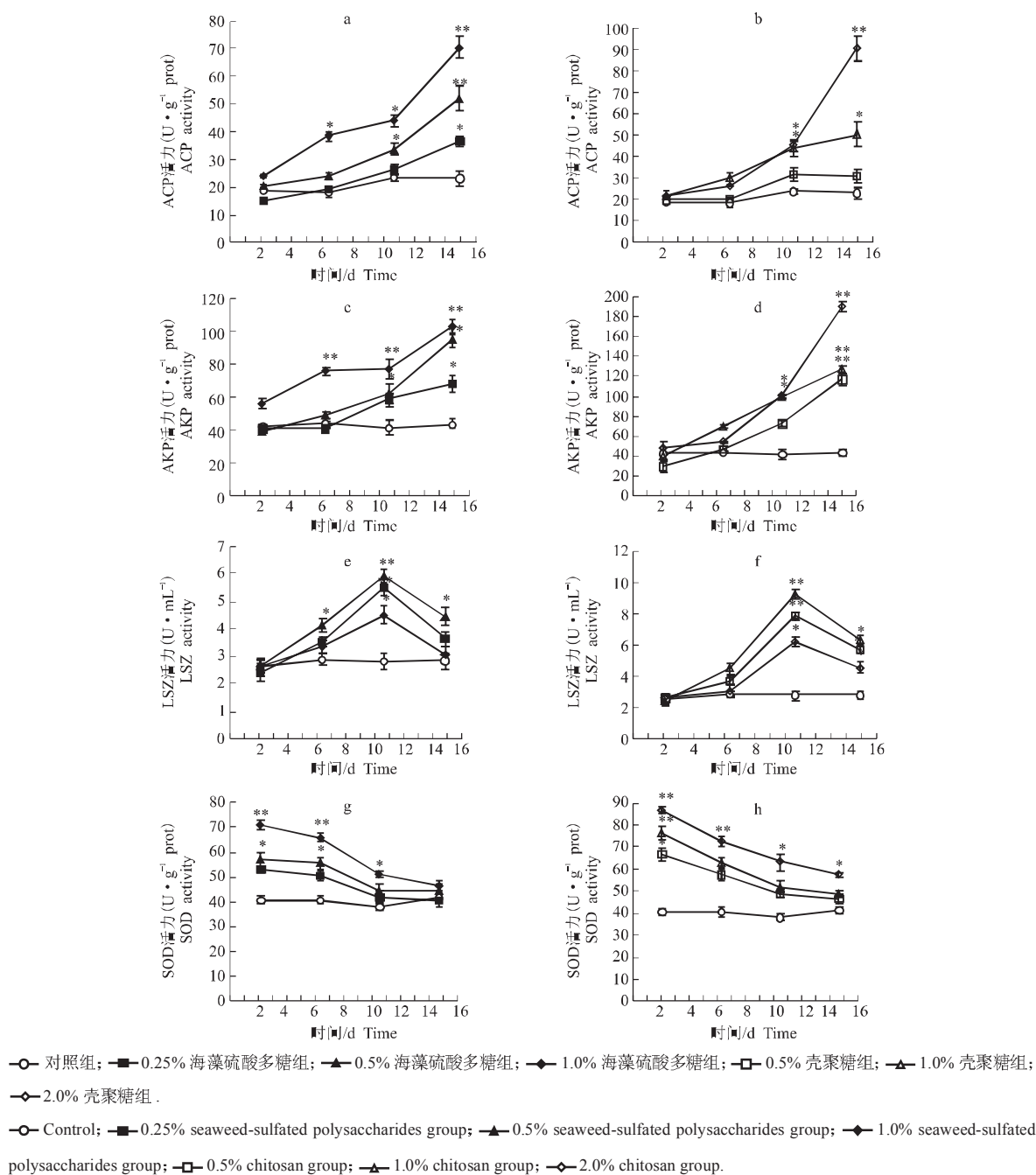


图1 海藻硫酸多糖和壳聚糖对刺参免疫酶活性的影响

注: a, c, e, g: 海藻硫酸多糖; b, d, f, h: 壳聚糖. ACP: 酸性磷酸酶; AKP: 碱性磷酸酶; LSZ: 溶菌酶; SOD: 超氧化物歧化酶. 数据表示为平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm SD$); * 与对照相比具有显著性差异 ($P < 0.05$), ** 与对照相比差异极显著 ($P < 0.01$).

Fig.1 Effects of seaweed-sulfated polysaccharides and chitosan on immunoenzyme activities of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. Note: a, c, e, g: seaweed-sulfated polysaccharides; b, d, f, h: chitosan. ACP: Acid phosphatase; AKP: alkaline phosphatase; LSZ: lysozyme; SOD: superoxide dismutase. Data are represented as means $\pm$ SD ($\bar{X} \pm SD$); * means significant difference compared with control ($P < 0.05$), ** means extremely significant difference compared with control ($P < 0.01$).

参考文献:

- [1] 樊绘曾. 海参: 海中人参—关于海参及其成分保健医疗功能的研究与开发 [J]. 中国海洋药物, 2001, (4): 37-44.
- [2] 王印庚, 方波, 张春云, 等. 养殖刺参苗期重大疾病“腐皮综合征”病原及其感染源分析 [J]. 中国水产科学, 2006, 13(4): 610-616.
- [3] 张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定 [J]. 水产学报, 2006, 30(1): 118-123.
- [4] 周德庆, 李晓川, 李兆新, 等. 无公害食品水产品中渔药残留限量 [S]// 中华人民共和国农业行业标准 NY 5070-2002. 北京: 中国标准出版社, 200: 361-369.
- [5] Masahiro S. Current research status of fish immunostimulants [J]. Aquaculture, 1999, 172: 63-92.
- [6] 曹丹, 周洪琪. 壳聚糖对异育银鲫的生长、蛋白质合成及肌肉营养成分的影响 [J]. 淡水渔业, 2004, 34(1): 6-9.
- [7] 庄承纪, 刘劲科, 杨清友, 等. 壳多糖对罗氏沼虾、斑节对虾苗生长和抗菌防病作用研究 [J]. 湛江海洋大学学报, 1998, 18(3): 29-34.
- [8] 宋晓玲, 王秀华, 陈国福, 等. 肽聚糖制剂提高凡纳对虾抗白斑综合征病毒感染力的研究 [J]. 高技术通讯, 2005, 15(1): 74-78.
- [9] 王秀华, 宋晓玲, 黄健. 肽聚糖制剂对南美白对虾体液免疫因子的影响 [J]. 中国水产科学, 2004, 11(1): 26-30.
- [10] Takahashi Y, Kondo M, Itami T, et al. Enhancement of disease resistance against penaeid acute viremia and induction of virus inactivating activity in haemolymph of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, by oral administration of Pantoea agglutinans lipopolysaccharide (LPS) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10(6): 555-558.
- [11] Yuan X, Yang H, Zhou Y. The influence of diets containing dried bivalve feces and/or powdered algae on growth and energy distribution in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) (Echinodermata: Holothuroidea) [J]. Aquaculture, 2006, 256(4): 457-467.
- [12] Santiago-Cardona PG, Berríos CA, Ramírez F, et al. Lipopolysaccharides induce intestinal serum amyloid A expression in the sea cucumber *Holothuria glaberrima* [J]. Dev Comp Immunol, 2003, 27(2): 105-110.
- [13] 马跃华, 胡守义. 免疫多糖投喂海参幼体试验 [J]. 河北渔业, 2006, 7: 22-23.
- [14] 周进, 宋晓玲, 黄健, 等. A3 α 肽聚糖对牙鲆不同组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响 [J]. 中国水产科学, 2004, 11(4): 296-301.
- [15] Hultmark D. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyatophom cecropia* [J]. Eur J Biochem, 1980, 106: 7-16.
- [16] 王镜岩, 朱圣庚, 许长法. 生物化学 [M]. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 315.
- [17] Cheng T C. The role of Lysosomes in molluscan cellular response to immunologic challenge [J]. Comp Pathobiol, 1978, 4: 59-71.
- [18] Meng Z, Shao J, Xiang L. CpG oligodeoxynucleotides activate grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) macrophages [J]. Dev Comp Immunol, 2003, 27(4): 313-321.
- [19] 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.
- [20] 牟海津, 江晓路, 刘树青, 等. 免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响 [J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(3): 463-468.
- [21] 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): 113-118.
- [22] 艾春香, 陈立侨, 高露娇, 等. Vc 对河蟹血清和组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响 [J]. 台湾海峡, 2002, 21(4): 431-438.
- [23] 艾春香, 陈立侨, 高露娇, 等. V_E 对河蟹血清和组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响 [J]. 台湾海峡, 2003, 22(1): 24-31.
- [24] Zhang R Q, Chen Q X, Zheng W Z. Inhibition kinetics of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase activity by dithiothreitol or 2-mercaptoethanol [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2000, 32(8): 865-872.
- [25] Gopalakannan A, Arul V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds [J]. Aquaculture, 2006, 255: 179-187.
- [26] 沈锦玉, 刘问, 曹铮, 等. 免疫增强剂对中华绒螯蟹免疫功能的影响 [J]. 浙江农业大学学报, 2004, 16(1): 25-29.
- [27] Shiau S Y, Yu Y P. Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in Tilapia, *Oreochromis niloticus* $\times$ *O. aureus* [J]. Aquaculture, 1999 (179): 439-446.
- [28] Kono M, Matsui T, Shimizu C. Effect of chitin, chitosan and cellulose as diet supplements on the growth of cultured fish [J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1987, 53(1): 125-129.
- [29] Fridovich I. Superoxide dismutases: An adaptation to a paramagnetic gas [J]. J Biol Chem, 1989, 264: 7 761-7 764.

Effects of two kinds of immunopolysaccharide on the activities of immunoenzymes in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*

LIU Yun, KONG Wei-li, JIANG Guo-liang, WU Zhi-qiang

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

Abstract: The effects of seaweed-sulfated polysaccharides and chitosan on the activities of acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), lysozyme (LSZ) and superoxide dismutase (SOD) of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* were studied by supplying various seaweed-sulfated polysaccharides or chitosan levels in diets. The experimental dietary levels of seaweed-sulfated polysaccharides were 0.25% (*m/m*), 0.5% and 1.0%, and those of chitosan were 0.5%, 1.0% and 2.0%, respectively. Group fed with basic feed was set as control. On the 2nd, 5th, 9th and 15th day after feeding for 7 days, the activities of ACP, AKP, LSZ and SOD in sea cucumbers were determined. The results indicated that the activities of ACP and AKP both sustainably increased and had significant differences compared with the control ($P < 0.05$). The effects of 1.0% seaweed-sulfated polysaccharides and 2.0% chitosan on the activities of ACP and AKP were the best. The highest activities of ACP were 3 and 3.9 times of that of control, and the highest AKP activities were 2.3 and 4.4 times of that of control, respectively. The activities of LSZ increased firstly after immunopolysaccharide feeding, with the tip-top significantly different compared with the control ($P < 0.05$). However, the activities of LSZ were not proportionally related to the additional dosage of immunopolysaccharide. The effects of 0.5% seaweed-sulfated polysaccharides and 1.0% chitosan on the activities of LSZ were the best. The highest LSZ activities were 1.4 and 3.3 times of control respectively. The activities of SOD were all significantly enhanced on the 2nd day after feeding in all treatment groups, and then decreased. The effects of 1.0% seaweed-sulfated polysaccharides and 2.0% chitosan on the activities of SOD were the best. The highest SOD activities were 1.7 and 2.1 times of that of control, respectively. In conclusion, seaweed-sulfated polysaccharides and chitosan can regulate the antioxidant enzymes and hydrolytic enzymes, and can improve the non-specific immunity of sea cucumber. Taking both economy and efficiency into account, it is suggested that the feasible dosage should be 1.0% (*m/m*) seaweed-sulfated polysaccharides and 2.0% (*m/m*) chitosan. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (5): 787–793]

Key words: immunopolysaccharide; *Apostichopus japonicus*; acid phosphatase; alkaline phosphatase; lysozyme; superoxide dismutase

Corresponding author: LIU Yun. Tel: 0532-82032913; E-mail: liuyun@ouc.edu.cn