

大黄、穿心莲、板蓝根和金银花 对异育银鲫免疫机能的影响

陈孝煊, 吴志新, 殷居易, 李 莉

(华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要:用分别含1%(质量分数)的大黄、穿心莲、板蓝根和金银花水提取物的饵料连续28 d饲喂异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*),在不同时间取样,测定其血液白细胞的吞噬活性、血清和体表粘液的溶菌酶活性。结果表明,大黄、穿心莲、板蓝根和金银花可使异育银鲫血液白细胞的吞噬活性有明显提高。投喂药饵后4 d,吞噬百分比(P_p)与对照组相比均有极显著差异($P < 0.01$);投喂药饵后4 d或7 d,吞噬指数(I_p)与对照组相比有显著($P < 0.05$)或极显著差异;在停投药饵后的10 d, P_p 、 I_p 与对照组相比仍有极显著差异。同时,投喂这4种中草药后,异育银鲫血清和体表粘液溶菌酶的活性也有明显提高,但体表粘液溶菌酶活性远远高于血清中溶菌酶活性。投喂药饵7 d后,溶菌酶的活性与对照组之间有极显著差异;但在停止投药后10 d,溶菌酶的活性与对照组之间无显著差异($P > 0.05$)。

关键词:大黄;穿心莲;板蓝根;金银花;吞噬活性;溶菌酶活性;异育银鲫

中图分类号:S942.116

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2003)01-036-05

鱼类白细胞对病原菌的吞噬和杀菌作用,是鱼类非特异性免疫的一个重要方面^[1],溶菌酶也是鱼类抵抗病原菌感染的重要因素之一^[2]。因此,许多学者都对鱼类血液白细胞的吞噬活性和溶菌酶的特性进行了研究^[3-6]。在水产养殖业中,大黄(*Rheum officinale*)、穿心莲(*Andrographis paniculata*)、板蓝根(*Isatis indigotica*)和金银花(*Lonicera japonica*)常用于防治一些鱼病^[7],但关于这4种中草药对鱼类免疫机能影响的研究报道较少^[8]。本文通过研究这4种中草药对异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)血液白细胞吞噬活性、血清及体表粘液溶菌酶活性的影响,了解这4种中草药对银鲫免疫机能的作用,从而为更好地利用这4种中草药提供依据。

1 材料与方法

1.1 药饵的配制

大黄、穿心莲、板蓝根和金银花均购自武汉市中

药材商店。称取干燥、切碎的大黄20 g,放于烧杯中加200 mL水煎煮3次,每次煎煮60 min,集中3次药液进一步浓缩至200 mL,将其喷洒于2 kg的鲫鱼全价配合饲料(基础饲料,海人公司生产)上,制成含1%大黄的药饵,烘干备用。穿心莲、板蓝根和金银花的药饵均按此法制备。

1.2 试验鱼及饲养

试验用异育银鲫来自华中农业大学水产实验站,体质健康无伤,体重95~115 g,将试验鱼消毒、暂养5 d后分成5组,分别是大黄组、穿心莲组、板蓝根组、金银花组和对照组,每组50尾。在水泥池(约4 m²)中适应性饲养7 d后开始实验。实验组连续投喂相应药饵28 d后改投喂基础饲料,再实验10 d;对照组只投喂基础饲料,日投喂量为鱼体重的2%~3%,每天下午投喂1次,未吃完残饵第2天上午及时吸出。按常规方法管理,充气饲养,保持水中溶氧5.0 mg/L以上,自然水温(21.5~26℃)。实验设2个平行。

1.3 血液白细胞吞噬活性的测定

参照文献[3]的方法,每次随机取5尾鱼,腹主动脉采血,肝素抗凝。取0.25 mL抗凝血,加入0.1 mL金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)悬液

收稿日期:2002-02-18.

基金项目:湖北省自然科学基金项目(97J061).

作者简介:陈孝煊(1963-),男,副教授,主要从事水产动物病理与免疫及水产微生物学研究. Tel:027-87282113.

E-mail: chenxx@mail.hzau.edu.cn

(1×10^8 CFU/mL), 25 °C 孵育 1 h 后制备血涂片, 晾干后甲醇固定, Giemsa 染色, 油镜观察记数。每尾鱼制血涂片 5 张。按下式计算吞噬百分比 (phagocytosis percentage, P_p) 和吞噬指数 (phagocytic index, I_p)。

$$\text{吞噬百分比} (P_p) = \frac{100 \text{ 个白细胞中参与吞噬的细菌数}}{100} \times 100\%$$

$$\text{吞噬指数} (I_p) = \frac{\text{被吞噬的细菌总数}}{\text{吞噬细菌的细胞数}}$$

1.4 溶菌酶活性的测定

每次随机取 5 尾鱼, 用解剖刀背刮取体表粘液于无菌的匀浆器中, 匀浆后 2 000 r/min 离心 10 min, 取其上清液作为供试样品。血清的制备则是从腹主动脉采血, 4 °C 过夜后离心收集。

溶菌酶活性的测定参照文献[9]中的有关方法进行, 以溶菌酶 (Amresco 产品) 为标准品, 溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*, 冻干粉, Sigma 产品) 为敏感菌株, 用 722 分光光度计于 640 nm 处测其吸光度 (A)。

2 结果

2.1 4 种中草药对异育银鲫血液白细胞吞噬活性的影响

结果见表 1。投喂大黄、穿心莲、板蓝根和金银花后, 异育银鲫血液白细胞的吞噬活性有明显提高。在 38 d 的试验期内, 对照组的吞噬百分比 (P_p) 为 14.2% ~ 16.8%, 吞噬指数 (I_p) 为 3.29 ~ 3.63; 而大黄组的 P_p 最高达 58.2% (21 d), I_p 最高达 6.42 (28 d); 穿心莲组、板蓝根组和金银花组也有类似的变化。在投喂这 4 种药物后 4 d, P_p 与对照组相比均有极显著差异 (t 检验, $P < 0.01$, 下同)。 I_p 的变化有所不同, 其中大黄组和金银花组在用药 7 d 后与对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$), 14 d 后与对照组相比有极显著差异; 穿心莲组和板蓝根组在用药 4 d 后与对照组相比有显著差异, 7 d 后与对照组相比有极显著差异。不管是 P_p 还是 I_p , 在停投药饲后的 10 d, 与对照组相比还有极显著差异。

表 1 异育银鲫血液白细胞的吞噬百分比和吞噬指数

Table 1 P_p and I_p of white blood cell of *C. auratus gibelio*

$\bar{X} \pm SD$

投药饲天数 Days of treatment	吞噬活性/% Phagocytic activity	组别 Group				
		大黄 <i>R. officinale</i>	穿心莲 <i>A. paniculata</i>	板蓝根 <i>I. indigotica</i>	金银花 <i>L. japonica</i>	对照 Control
0	P_p	15.6 ± 1.52	15.6 ± 1.52	15.6 ± 1.52	15.6 ± 1.52	15.6 ± 1.52
	I_p	3.30 ± 0.21	3.30 ± 0.21	3.30 ± 0.21	3.30 ± 0.21	3.30 ± 0.21
1	P_p	18.2 ± 1.42	17.2 ± 0.84	17.4 ± 0.89	18.8 ± 1.68	16.2 ± 0.87
	I_p	3.24 ± 0.17	3.27 ± 0.18	3.32 ± 0.12	3.45 ± 0.10	3.29 ± 0.20
4	P_p	20.9 ± 0.91	24.0 ± 1.22	23.0 ± 1.58	20.1 ± 1.68	15.2 ± 1.30
	I_p	3.88 ± 0.30	4.51 ± 0.41	4.01 ± 0.23	3.96 ± 0.18	3.52 ± 0.17
7	P_p	24.1 ± 1.41	30.4 ± 1.82	31.2 ± 1.48	21.6 ± 1.55	14.2 ± 1.46
	I_p	4.19 ± 0.31	4.48 ± 0.30	4.99 ± 0.22	3.87 ± 0.20	3.49 ± 0.13
14	P_p	48.6 ± 1.85	39.2 ± 1.58	37.6 ± 1.14	45.6 ± 1.76	15.2 ± 0.86
	I_p	4.65 ± 0.18	5.04 ± 0.20	4.70 ± 0.21	4.72 ± 0.13	3.57 ± 0.28
21	P_p	58.2 ± 2.11	39.6 ± 1.34	39.4 ± 1.52	56.8 ± 2.14	16.0 ± 1.58
	I_p	6.12 ± 0.14	5.97 ± 0.24	5.54 ± 0.25	5.90 ± 0.12	3.51 ± 0.21
28	P_p	52.3 ± 2.17	43.2 ± 1.79	40.2 ± 1.10	69.2 ± 2.39	16.8 ± 1.48
	I_p	6.42 ± 0.09	6.40 ± 0.18	5.92 ± 0.16	6.41 ± 0.13	3.61 ± 0.15
38 *	P_p	44.5 ± 2.58	39.8 ± 1.10	38.4 ± 1.45	44.5 ± 2.21	16.4 ± 1.14
	I_p	5.22 ± 0.07	6.08 ± 0.15	5.89 ± 0.11	5.52 ± 0.20	3.63 ± 0.16

* 为停药后 10 天 10 d after stopping feeding mixed diets.

2.2 4种中草药对异育银鲫血清和体表粘液溶菌酶活性的影响

结果见图1、2。投喂4种中草药后,异育银鲫血清和体表粘液溶菌酶的活性有明显提高。对照组血清溶菌酶的活性为75.8~119.7 U/mL,在38 d的实验期间无显著差异($P > 0.05$);投喂4种中草药后,溶菌酶的活性最高分别达到152.4、161.2、165.5和165.1 U/mL,而投喂4种中草药后4 d,溶菌酶的活性与投药前相比就有了显著差异($P < 0.05$),投

药后7 d,与对照组之间有极显著差异($P < 0.01$);但在停止投药后10 d,血清溶菌酶的活性与对照组之间即无显著差异($P > 0.05$)。试验期间体表粘液溶菌酶的活性变化与血清溶菌酶的活性变化规律相似,但粘液中溶菌酶的活性比血清中溶菌酶的活性高得多,大黄组最高达565.2 U/mL,穿心莲组最高达523.6 U/mL,板蓝根组最高达534.3 U/mL,金银花组最高达535.6 U/mL,对照组最高达455.2 U/mL。

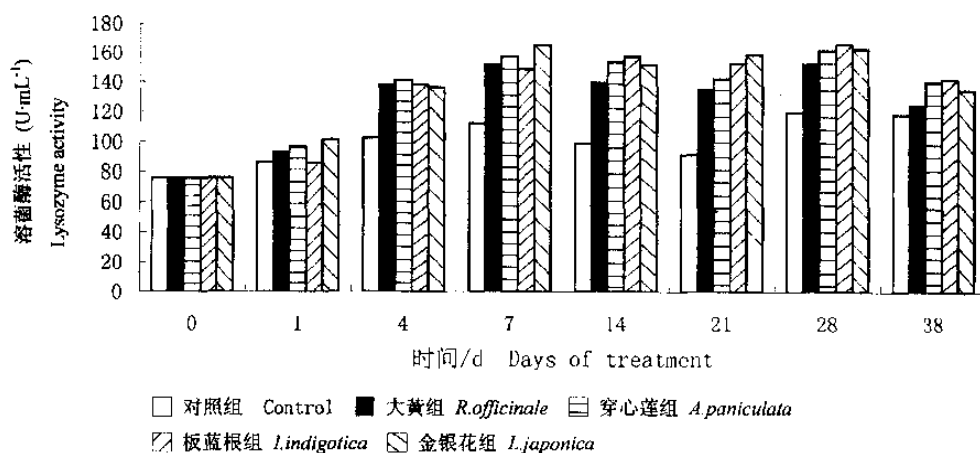


图1 异育银鲫血清溶菌酶活性

Fig 1 Lysozyme activity in serum of *C. auratus gibelio*

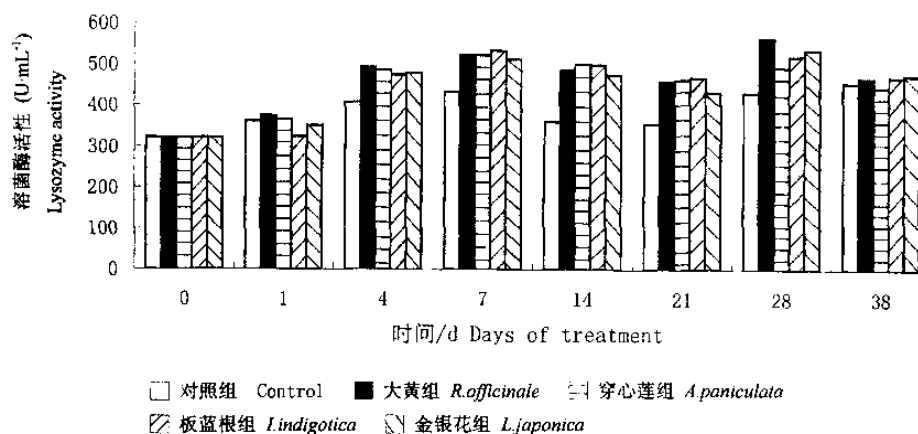


图2 异育银鲫体表粘液溶菌酶活性

Fig 2 Lysozyme activity in body surface mucus of *C. auratus gibelio*

3 讨论

一般认为,动物体内的吞噬细胞可吞噬进入体内的异物,在动物体的非特异性免疫中发挥重要作用,吞噬细胞在消化病原生物的同时,可保留有关的抗原信息并将其传递给有关的淋巴细胞,从而激发机体的体液免疫和细胞免疫。因此,吞噬细胞的吞噬活性直接与动物的免疫机能有关。有学者认为,鱼类血液白细胞的吞噬活性与抗体^[10]、鱼体的免疫状态^[11]和反应温度^[12]及饲养温度^[4]有关。本研究表明,异育银鲫的血液白细胞吞噬活性与投喂这4种中草药有密切关系,在投药4 d或7 d后, P_p 和 I_p 与对照组相比均有显著或极显著差异,而且在停投药饵后的10 d,与对照组相比仍有极显著差异,说明这4种中草药能有效地提高异育银鲫血液白细胞的吞噬活性。在投药后的1~14 d, P_p 的提高速度明显快于投药后的14~28 d; I_p 的提高速度在投药14 d或21 d后也没有开始时快,这也说明4种中草药不需长期使用。当然,具体的用药剂量和时间还有待进一步的研究。

研究结果还表明,投喂这4种中草药还可以提高异育银鲫血清和体表粘液溶菌酶的活性,在投药4 d或7 d后,溶菌酶的活性与对照组相比有显著或极显著差异。溶菌酶的活性与很多因素有关。陈昌福等^[5]认为,草鱼体表粘液中溶菌酶的活性受饲养温度的影响,在10℃下饲养时,溶菌酶的活性较低;而28℃下饲养时,溶菌酶的活性要高的多。从图1和图2可知,投药后的14~21 d,溶菌酶活性比7 d或28 d时要低,主要由于天气的变化,使水温下降,这可能是造成溶菌酶活性相对下降的原因。与血液白细胞吞噬活性变化不同的是,溶菌酶的活性在停止投药后很快下降,10 d后即与对照组之间无显著差异。

川原逸朗等^[13]在对日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)、香鱼(*Plecoglossus altivelis*)和真鲷(*Pagrus japonicus*)等鱼类的体表粘液、血清、肾脏、脾脏和肝脏等组织和器官中溶菌酶活性研究时发现,这几种鱼血清中溶菌酶活性都大幅度低于体表粘液中溶菌酶活性;陈昌福等^[6]也得出相似的结果。本研究结果也与这些学者的结果一致。

在人体医学中,大黄具泻热通肠,凉血解毒之功效,穿心莲、板蓝根和金银花也都有清热解毒的功能^[14]。邓文龙^[15]认为,穿心莲本身并不具备抗病原微生物的作用,它们对传染病的疗效很可能是对机体多方面进行调整的结果。罗琳等^[16]认为,草鱼摄入穿心莲后能降低 *Aeromonas* 在肠道中的比例,通过改变草鱼肠道细菌的组成,而成为生产中用于防治草鱼肠炎病有较好疗效的药物。这4种中草药均可有效地激活鱼体的非特异性免疫系统,从而达到防治疾病的目的。

参考文献:

- [1] 板田胜信. 鱼类免疫と免疫系[J]. 北海道水产孵化场研报, 1988, 43: 11-35.
- [2] 川原逸朗, 楠田理一. 养殖ウナギのリゾチーム活性の特性[J]. 日本水产学会誌, 1988, 54(6): 965-968.
- [3] 吴志新, 陈昌福. 日本鳗鲡对爱德华氏菌免疫应答的研究[J]. 华中农业大学学报, 1997, 16(增刊): 78-86.
- [4] 李静, 陈昌福. 低温季节草鱼离体白细胞吞噬活性的研究[J]. 水生生物学报, 1998, 22(增刊): 132-137.
- [5] 陈昌福, 纪国良. 草鱼的血清、体表和肠粘液中溶菌物质活性及其特性[J]. 华中农业大学学报, 1992, 11(3): 276-279.
- [6] 陈昌福, 罗宇良, 蔡冰, 等. 饲养水温对草鱼溶菌酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 1996, 13(3): 24-29.
- [7] 谢仲权, 赵建民. 中草药防治鱼病[M]. 北京: 中国农业出版社, 1987.
- [8] 罗琳, 陈孝焯, 蔡雪峰. 穿心莲对草鱼血液吞噬细胞吞噬活性的影响[J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(1): 33-34.
- [9] 林清华. 免疫学实验[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1999.
- [10] Sovenyi J F, Yamamoto H, Fujimoto S, et al. Lymphomyeloid cells, susceptibility to erythrematosis of carp and bacterial antigens[J]. Dev Con Immunol, 1990, 14: 185-200.
- [11] 楠田理一, 平哲史. *Edwardsiella tarda* で免疫したウナギの肾脏细胞生物学的活性的变化[J]. 鱼病研究, 1990, 25(2): 53-58.
- [12] 孟跃华, 纪国良, 刘卫红. 温度对草鱼血液吞噬细胞吞噬作用的影响[J]. 华中农业大学学报, 1990, 9(3): 302-305.
- [13] 川原逸朗, 楠田理一. 主要养殖鱼类のリゾチーム活性の特性[J]. 日本水产学会誌, 1988, 54(4): 581-584.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2000版一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [15] 邓文龙. 国内穿心莲临床药理研究概况[J]. 中草药通讯, 1978(10): 27-31.
- [16] 罗琳, 陈孝焯, 蔡雪峰. 穿心莲对草鱼肠内细菌的影响[J]. 水产学报, 2001, 25(3): 232-237.

Effects of four species of herbs on immune function of *Carassius auratus gibelio*

CHEN Xiao-xuan, WU Zhi-xin, YIN Ju-yi, LI Li

(Fisheries College, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Four species of herbs (dry)—*Rheum officinale*, *Andrographis paniculata*, *Isatis indigotica* and *Lonicera japonica*—were employed. Each species, at the weight ratio of 1% diet, was decocted three times and every time for 60 min. The three times of solution were concentrated, and mixed with the diets (mixed diets). The *Carassius auratus gibelio* were fed with the mixed diets, respectively, for 28 d and then stopped to eat normal diet. For the four groups of *R. officinale*, *A. paniculata*, *I. indigotica* and *L. japonica*, the phagocytic activities of white blood cell in *C. auratus gibelio* increased notably, and the phagocytosis percentage (P_p) was significantly higher than the control (normal diet) 4 d after the mixed diets were fed ($P < 0.01$). The phagocytic index (P_i) was significantly different compared with the control 4 d after the treatment and extremely significantly different 7 d after the treatment. Ten days after the fish stopped feeding the mixed diets, their P_p and P_i were both significantly higher than control ($P < 0.01$). Also, the lysozyme activities in the serum and the body surface mucus increased obviously that after feeding the mixed diets for 7 d, the fish all had extremely significant difference in lysozyme activity compared with control but this significant difference disappeared 10 d after the fish stopped feeding mixed diet ($P > 0.05$).

Key words: *Rheum officinale*; *Andrographis paniculata*; *Isatis indigotica*; *Lonicera japonica*; phagocytic activity; lysozyme activity; *Carassius auratus gibelio*

中国水产科学研究院首席科学家简介

沈新强,男,1951年12月出生,研究员,硕士生导师,渔业生态环境专家。现任中国水产科学研究院东海水产研究所海洋环境研究室主任,中国水产学会理事,中国湖泊学会理事,中国海洋学会理事。主要从事海洋渔业生态研究。获省部级科技进步奖3项。现主持“八六三”计划项目、社会公益性研究项目多项。1997年被国家环境保护局评为全国环境监测网络先进个人。完成论文报告20多篇,其中,已在全国学报级刊物公开发表的论文12篇。