

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17013

β -葡聚糖对杀鲑气单胞菌感染后虹鳟应激过程的调节作用

纪利芹^{1,2}, 孙国祥¹, 王艺³, 杜以帅¹, 李贤¹, 刘鹰³

1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国科学院大学, 北京 100039;

3. 大连海洋大学 海洋科技与环境学院, 辽宁 大连 116023

摘要: 为研究不同浓度的 β -葡聚糖对感染杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)应激过程的调节作用, 在虹鳟饲料中添加不同浓度的 β -葡聚糖(0, 0.05%, 0.1%, 和 0.2%), 投喂 42 d 后感染杀鲑气单胞菌, 在感染后第 2, 4 和 6 天取样检测血清应激指标的变化, 第 7 天时统计虹鳟的存活率。结果表明, 添加 β -葡聚糖能显著提高感染杀鲑气单胞菌后虹鳟的存活率, 其中 0.2%剂量的保护效果最好($P<0.05$)。感染后第 4 天 β -葡聚糖组的血清总蛋白(total protein, TP)浓度显著高于对照组($P<0.05$)。0.1%和 0.2%组的血清丙二醛(malondialdehyde, MDA)活性在感染后第 2 天达到峰值, 早于 0.05%和对照组。0.1%和 0.2%组血清髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性在感染后显著上升, 而 0.05%和对照组却显著下降($P<0.05$)。 β -葡聚糖组在感染后血清乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)活性一直显著低于对照组($P<0.05$)。 β -葡聚糖组血清甘油三酯(triglycerides, TG)和总胆固醇(total cholesterol, TCH)感染后下降程度显著低于对照组($P<0.05$)。感染后第 4 天, β -葡聚糖组的血清尿素氮(urea nitrogen, BUN)浓度显著低于对照组($P<0.05$)。总胆红素(total bilirubin, T-BIL)浓度在感染后显著下降($P<0.05$), 其中 0.2%组下降幅度最小。各组肝脏和脾脏热休克蛋白 70 基因(heat shock protein 70, HSP70)表达量在感染后都显著升高($P<0.05$), 0.1%和 0.2%组表达峰值出现时间早于其他组, 且其峰值高于其他组峰值。综上所述, 本实验中, 添加 β -葡聚糖能显著提高感染杀鲑气单胞菌的虹鳟的存活率和有效减弱细菌感染引起的机体应激反应, 其中 0.2%剂量的保护效果最好且对应激过程的减弱效果最明显($P<0.05$)。

关键词: 虹鳟; β -葡聚糖; 杀鲑气单胞菌; 血清应激指标

中图分类号: S942

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)01-0178-11

近年来, 随着水产养殖业的快速发展和集约化程度的增加, 养殖生产对环境的污染日益加重, 养殖水体环境不断恶化, 大规模病害频发, 给养殖业造成严重的经济损失^[1]。抗生素在一定程度上可以有效遏制微生物的繁殖^[2], 但抗生素的大量使用, 不仅导致病原生物产生抗药性, 也会使鱼体中积累的残留抗生素通过食物链进入人体, 危害人类健康^[3]。因此, 寻找新的绿色、安全途径逐渐取代抗生素, 有效预防和控制病害频发成为世

界各国水产科技工作者的研究目标^[4]。免疫增强剂是水产养殖领域近几年新兴的研究应用, 它能提高动物的非特异性体液免疫和细胞免疫, 从而增强机体的抗病原感染力。虽然针对大量物质进行过研究, 但是只有少数种类真正适合作为水产动物免疫增强剂^[5]。

β -葡聚糖是目前研究和应用最多的免疫增强剂之一, 它能提高动物自身免疫力, 增强机体对细菌、真菌等病原的抵抗力, 减少有害应激损伤。

收稿日期: 2017-01-09; 修订日期: 2017-04-07.

基金项目: 国家自然科学基金项目(41306152, 31472312, 31402283); 第 56 批中国博士后科学基金项目(2014M560580); 山东省博士后创新基金项目(201402005); 国家科技支撑计划项目(2014BAD08B09); 江苏省重点研发计划项目(BE2015325); 青岛市海洋经济创新发展示范城市重点项目。

作者简介: 纪利芹(1989-), 女, 博士, 研究方向为鱼类营养与免疫. E-mail: goofyji@126.com

通信作者: 刘鹰, 教授. E-mail: yingliu@dlou.edu.cn

对 β -葡聚糖体内和体外的研究表明, β -葡聚糖可以显著促进南亚野鲮(*Labeo rohita*)幼鱼生长, 提高免疫力及降低被嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)感染的风险^[6], β -葡聚糖还能提高锦鲤(*Cyprinus carpio koi*)对气单胞菌(*Aeromonas veronii*)的抵抗力^[7], 以及巴丁鱼(*Pangasianodon hypophthalmus*)的免疫力^[8]。

虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)养殖已成为世界性的养殖产业, 在水产业中占据着重要地位。杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)是引起养殖虹鳟大规模病害的主要病原菌, 每年对养殖业造成严重损失^[9-10]。目前, 关于 β -葡聚糖对虹鳟抗杀鲑气单胞菌能力等的研究尚未见报道。因此, 本研究向虹鳟投喂添加 β -葡聚糖的饲料, 用杀鲑气单胞菌感染鱼体, 通过对感染阶段虹鳟死亡率、血清抗氧化指标及应激指标的检测, 探讨 β -葡聚糖在虹鳟拮抗杀鲑气单胞菌过程中的保护作用, 为研究 β -葡聚糖的保护机理提供基础数据及为其在防治虹鳟病害中的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验对象

本实验在山东东方海洋科技股份有限公司烟台开发区分公司开展。实验所用虹鳟体重为(203±18) g, 养殖池规格为 5 m×5 m×4 m, 实验开始前, 每个养殖池随机放置 1200 尾虹鳟, 养殖期间水温 11~13℃, 溶解氧饱和度 70%~74%, pH 7.6~7.9, 氨氮 0~0.2 mg/L, 亚硝酸盐 0~0.1 mg/L。

1.2 实验饲料

实验基础饲料购自北京汉业科技有限公司, β -葡聚糖购自湖北安琪酵母有限公司, 纯度为 90%。基础饲料配方见表 1, 在基础饲料中按照比例添加 β -葡聚糖(0.05%、0.1%、0.2%), 制备成 3 种实验饲料, 同时, 把不添加葡聚糖的基础饲料作为对照饲料。

1.3 养殖实验

本实验包括养殖实验和攻毒实验。养殖实验在循环水养殖系统的 12 个 100 m³ 养殖池内进行。根据 β -葡聚糖添加量(0, 0.05%, 0.1%和 0.2%)将

表 1 基础饲料配方组成表
Tab. 1 Percent inclusion of the ingredients in experimental diets used as the basal diet

组分 ingredient	含量/% percentage
鱼粉 fish meal	42.8
大豆粉 soybean meal	21.2
DL-蛋氨酸 DL-methionine	2.65
鱼油 fish oil	15.7
小麦粉 wheat flour	10.8
小麦淀粉 wheat starch	2.5
α -纤维素 α -cellulose	3.5
维生素和矿物质 vitamin and mineral	0.85

12 个养殖池随机分为 4 个组, 每组 3 个平行。实验开始前, 所有组别投喂不含 β -葡聚糖的对照饲料, 实验开始后, 向实验组投喂对应浓度的 β -葡聚糖添加饲料。每天投喂 5 次, 日投饲量为鱼体重的 2%~3%, 养殖实验持续 42 d。养殖实验开始之前和结束后, 每个养殖池随机捞取 9 尾健康鱼体进行取样, 作为投喂前和投喂后基础对照样。

1.4 攻毒实验及死亡率统计

攻毒实验是以研究 β -葡聚糖在感染杀鲑气单胞菌的虹鳟机体内发挥的应激调节作用为目的。攻毒实验在 15 个毒理实验专用系统内进行。共包含 5 个实验组: 对照不攻毒组, 对照攻毒组, 0.05 组(β -葡聚糖浓度为 0.05%), 0.1 组(β -葡聚糖浓度为 0.1%)和 0.2 组(β -葡聚糖浓度为 0.2%)。

养殖实验结束后, 从养殖车间每个养殖池内随机捞取 60 尾健康鱼体, 麻醉后通过背部肌肉注射 0.1 mL 浓度为 3×10^5 cfu/mL 杀鲑气单胞菌, 转移至毒理实验专用系统内(每个桶 60 尾鱼)。此外, 从对照组每个养殖池内随机捞取 60 尾鱼, 注射 0.1 mL 0.7%灭菌生理盐水, 同样移至 3 个圆形养殖池内作为不攻毒对照组。在感染后的第 2, 4, 6 天每个养殖池捞取感染后的活鱼 5 尾进行取样, 感染后第 7 天, 统计每个组的存活率作为虹鳟抗杀鲑气单胞菌感染的指标(采样鱼体不计算在内)。

毒理实验专用系统共计 15 个圆形养殖池(半径 1 m, 高 1.8 m, 体积 2.03 m³), 养殖水体为 5.72 m³, 水质条件与养殖池相同。每天投喂 2 次, 日投饲量根据鱼体摄食情况进行调节, 攻毒实验持续 7 d。

存活率(%)=100×存活鱼数量/(鱼体总数-采样鱼数量)

1.5 样品采集

在采样时间点捞取有感染症状的鱼体，然后立刻放入 200 mg/L 的 MS-222 溶液中快速麻醉，用 5 mL 注射器于鱼尾静脉采血 5 mL 以上，血液不加抗凝剂，在 4℃ 冰箱静置 5 h 后，用离心机 4℃、4000 r/min、离心 20 min 制备血清，血清放置于 -80℃ 冰箱长期保存。采血后解剖，取出肝脏、脾脏组织用液氮速冻后置于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.6 血清生化指标分析

血清指标采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定，具体项目如下：总蛋白(total protein, TP) (A045-3)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) (A003-1)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO) (A044)、乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH) (A20-2)、总胆红素(total bilirubin, T-BIL)(C019-1)、尿素氮(urea nitrogen, BUN) (C013-2)、总胆固醇 (total cholesterol, TCH) (A111-2)、甘油三酯 (triglycerides, TG) (A110-2)。

1.7 RNA 提取及 cDNA 制备

第一步：RNA 提取。从虹鳟的肝脏和脾脏 2 种组织中提取 RNA。RNA 提取使用上海飞捷 RNA 快速抽提试剂盒 (Fastagen, Shanghai, China)，严格按照试剂盒说明书操作。用 Nanodrop 2000 N 分光光度计(Thermo, USA)测定所提总 RNA 的质量和浓度，只有当 OD 260 nm/280 nm 在 1.9~2.1 之间，并且 OD 260 nm/230 nm>2.0 时，说明所提的总 RNA 质量较好，即可用于下一步检测。

第二步：反转录。按照 Fast Quantitative cDNA 第一链合成试剂盒(Takara, Dalian, China)说明将 RNA 反转为 cDNA。

1.8 荧光实时定量 PCR 检测独立样本 HSP70 的表达

对虹鳟各组织的 cDNA 进行 10 倍稀释之后用目标基因引物和内参基因引物进行实时荧光定量 PCR 验证，结果表明其 C_t 值都位于 15~30，因此 10 倍稀释能满足实时荧光定量的条件。以稀释后的 cDNA 为模板进行荧光实时定量 PCR，每个模板 3 个重复。定量在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, USA)中完成，根据 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(Takara, Dalian, China)的说明书进行操作。20 μ L 荧光定量反应体系包括：10 μ L SYBR Green PCR Mix，上下游引物各 0.4 μ L (表 2)，0.4 μ L ROX Reference Dy，cDNA 模版 2 μ L 和 ddH₂O 6.8 μ L。荧光定量之前，测定标准曲线和熔解曲线，检查引物的扩增效率和特异性。荧光定量 PCR 反应程序如下：95℃ 预变性 30 s，40 个循环(95℃ 变性 5 s，60℃ 退火 30 s)。根据实时荧光定量 PCR 的结果，以 β -actin 为内参基因，根据目的基因以及 β -actin 的 C_t 值，按照样品中目标基因相对内参基因的拷贝比例进行分析，采用 $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ 法计算感染组目的基因相对于对照组的表达水平，实验所需引物见表 2。

1.9 数据处理与统计

使用 SPSS 19.0 软件，对实验结果进行单因素方差分析(One-way analysis of variance, ANOVA)，数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示。当 $P < 0.05$ 时认为结果有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 口服不同浓度葡聚糖对感染杀鲑气单胞菌虹鳟存活率的影响

由图 1 可知， β -葡聚糖在投喂 42 d 后，能显著

表 2 实时荧光定量所用引物
Tab. 2 Primers designed in the RT-PCR

基因名 gene name	引物名 primer name	登录号 accession no.	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	扩增片段长度/bp amplification
β -actin	ACTINF1	NM_001124235.1	ATGGGCCAGAAAGACAGCTACGTG	140
β -actin	ACTINR1	NM_001124235.1	CTTCTCCATGTCGTCCAGTTGGT	140
HSP70	HSP70F2	AB062281.1	GACGCTGACAAATACAAAGCT	190
HSP70	HSP70R2	AB062281.1	TGTTCTCCAACCAGGAAATG	190

提高虹鳟对杀鲑气单胞菌的抵抗力。对照组在感染细菌后, 存活率为 35%, 显著低于其他感染组 ($P<0.05$)。0.05% 和 0.1% 两组的存活率没有显著差异, 但是都显著高于攻毒对照组 ($P<0.05$)。0.2% β -葡聚糖组存活率在感染组中最高, 为 67%, 且显著高于其他感染组 ($P<0.05$)。

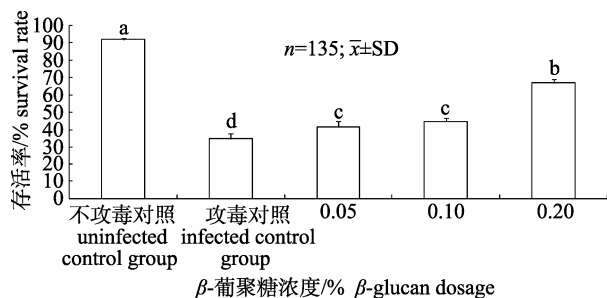


图 1 口服不同浓度葡聚糖对感染杀鲑气单胞菌后的虹鳟存活率的影响

图中标有不同字母的实验组之间有显著性差异 ($P<0.05$)。

Fig. 1 Effect of different dietary β -glucan dosages on survival of rainbow trout infected by *Aeromonas salmonicida*. Different lowercases indicate significant difference ($P<0.05$) between different groups.

2.2 口服不同浓度葡聚糖的虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后血清总蛋白含量的变化

由图 2 可知, 对照组在感染后第 2 天和第 4 天血清 TP 显著低于初始水平 ($P<0.05$), 第 6 天时回升至初始水平。3 个葡聚糖添加组在感染后第 2 天 TP 浓度降低 ($P<0.05$), 第 4 天时 TP 浓度升高, 0.1% 组和 0.2% 组都显著高于攻毒对照组 ($P<0.05$), 且 0.2% 组 TP 浓度显著高于其他组 ($P<0.05$)。第 6

天时除 0.1% 组外, 其他组血清 TP 浓度回落至初始水平, 且各组之间无显著差异 ($P>0.05$)。

2.3 口服不同浓度葡聚糖的虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后血清 MDA 活力的变化

由图 3 可知, 对照组和 0.05% 组在感染后第 2 天, 血清 MDA 活力降到最低, 分别为 8.82 U/mL 和 8.74 U/mL ($P<0.05$), 第 4 天时浓度升高至最大值为 11.47 U/mL 和 12.87 U/mL ($P<0.05$), 第 6 天时回落至初始水平 ($P>0.05$)。0.1% 和 0.2% β -葡聚糖组在感染后第 2 天血清 MDA 活力升到最大值, 分别为 12.73 U/mL 和 12.58 U/mL, 第 4 天时活力显著低于初始水平 ($P<0.05$), 第 6 天时活力与初始值无显著差异 ($P>0.05$)。

感染后第 2 天, 0.1% 和 0.2% 组 MDA 活力显著高于攻毒对照组 ($P<0.05$)。第 4 天时, 0.05% 组活力显著高于攻毒对照组, 0.1% 和 0.2% 组活力显著低于攻毒对照组 ($P<0.05$)。6 d 时各组的 MDA 活力无显著差异 ($P>0.05$)。

2.4 口服不同浓度葡聚糖的虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后血清 MPO 活力的变化

由图 4 可知, 感染后第 2 天, 对照组和 0.05% 组 MPO 活力分别降到最低点 49.21 U/L 和 55.39 U/L, 第 4 天和第 6 天虽有所回升, 但仍显著低于感染前水平 ($P<0.05$)。0.1% 组感染后第 2 天降到最低值 49.16 U/L, 第 4 天和第 6 天升高至显著高于感染前水平 ($P<0.05$)。0.2% 组感染后第 2 天, MPO 活性显著低于感染前水平 ($P<0.05$), 第 4 天

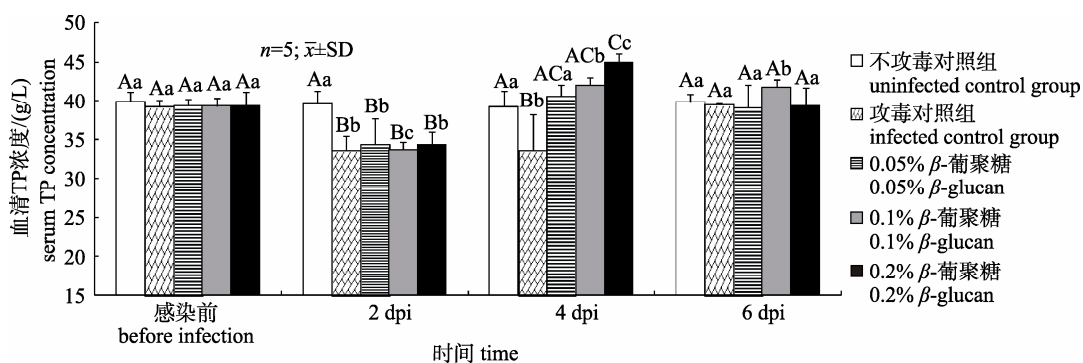


图 2 口服不同浓度葡聚糖的虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后血清总蛋白含量的变化
dpi 代表感染后天数, 小写字母代表同一实验组在不同时间点有显著性差异 ($P<0.05$)。

大写字母代表在同一时间点不同实验组有显著性差异 ($P<0.05$)。

Fig. 2 The changes on serum TP of *Aeromonas salmonicida* infected rainbow trouts which were pretreated with different dietary β -glucan dosages dpi denotes days post infection. Different lowercases indicate significant difference ($P<0.05$) at different time point of the same group. Different uppercases indicate significant difference ($P<0.05$) among different groups at the same time.

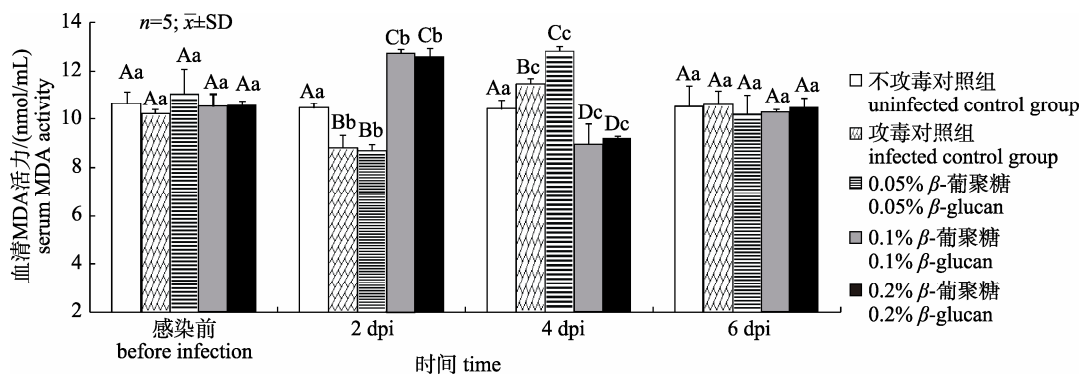


图 3 口服不同浓度葡聚糖的虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后血清 MDA 活力的变化

dpi 代表感染后天数, 小写字母代表同一实验组在不同时间点有显著性差异。

大写字母代表在同一时间点不同实验组有显著性差异 ($P<0.05$)。

Fig. 3 The changes on serum MDA of *Aeromonas salmonicida* infected rainbow trouts which were pretreated with different dietary β -glucan dosages

dpi denotes days post infection. Different lowercases indicate significant difference ($P<0.05$) at different time point of the same group. Different uppercases indicate significant difference ($P<0.05$) among different groups at the same time.

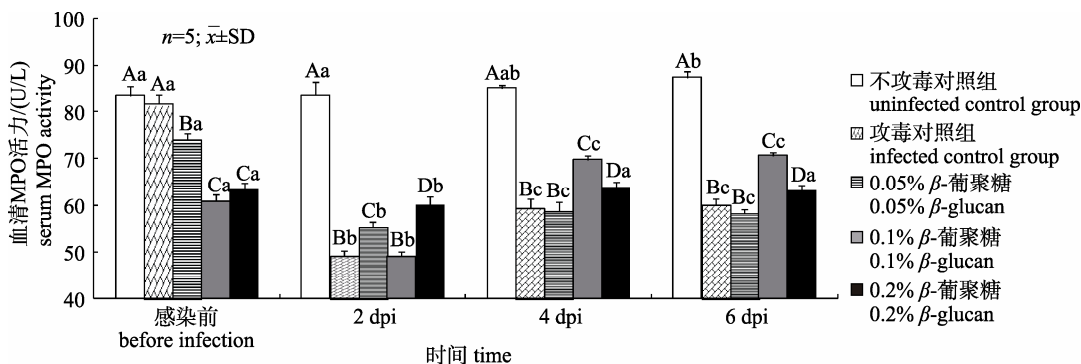


图 4 口服不同浓度葡聚糖的虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后血清 MPO 活力的变化

dpi 代表感染后天数, 小写字母代表同一实验组在不同时间点有显著性差异。

大写字母代表在同一时间点不同实验组有显著性差异 ($P<0.05$)。

Fig. 4 The changes on serum MPO of *Aeromonas salmonicida* infected rainbow trouts which were pretreated with different dietary β -glucan dosages

dpi denotes days post infection. Different lowercases indicate significant difference ($P<0.05$) at different time point of the same group. Different uppercases indicate significant difference ($P<0.05$) among different groups at the same time.

和第 6 天回升至感染前水平 ($P>0.05$)。投喂 42 d 后, β -葡聚糖添加组的 MPO 活力显著低于对照组, 且 β -葡聚糖浓度越大, MPO 活性越低 ($P<0.05$)。感染后第 2 天, 0.05% 和 0.2% 组 MPO 活力显著高于攻毒对照组和 0.1% 组, 第 4 天和 6 天 0.1% 组 MPO 活力显著高其他感染组 ($P<0.05$)。

2.5 口服不同浓度葡聚糖的虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后血清 LDH 含量的变化

由图 5 可知, 感染后, 对照组 LDH 活力一直显著高于感染前含量 ($P<0.05$)。3 个葡聚糖组血清 LDH 活力在感染后第 2 天与感染前相比无显著差异 ($P>0.05$), 第 4 天时, LDH 活力显著高于感染前

($P<0.05$), 第 6 天时又下降到感染前水平 ($P>0.05$)。感染后第 2 天, 所有 β -葡聚糖组 LDH 活性显著低于攻毒对照组 ($P<0.05$), 各葡聚糖组之间无显著差异 ($P>0.05$)。感染后第 4 天, 0.2% 葡聚糖组 LDH 活性显著低于其他实验组。感染后第 6 天, 所有 β -葡聚糖组 LDH 活性显著低于攻毒对照组 ($P<0.05$), 各葡聚糖添加组之间 LDH 活性没有显著差异 ($P>0.05$)。

2.6 口服不同浓度葡聚糖的虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后血清 TG 和 TCH 含量的变化

由图 6a 可知, 对照组在攻毒后第 2, 4 和 6 天, TG 浓度显著低于攻毒前 ($P<0.05$)。3 个葡聚糖添

加组在攻毒后第 2 天与攻毒前相比无显著差异 ($P>0.05$), 第 4 天各组 TG 浓度都显著低于攻毒前水平, 但是所有 β -葡聚糖组 TG 浓度均显著高于对照攻毒组 ($P<0.05$)。攻毒后第 6 天, 所有感染组

TG 浓度显著低于初始水平, 0.1%和 0.2%葡聚糖浓度显著高于攻毒对照组 ($P<0.05$)。

由图 6b 可知, 攻毒后第 2 天, 攻毒对照组 TCH 浓度显著低于感染前 ($P<0.05$), 其他感染组

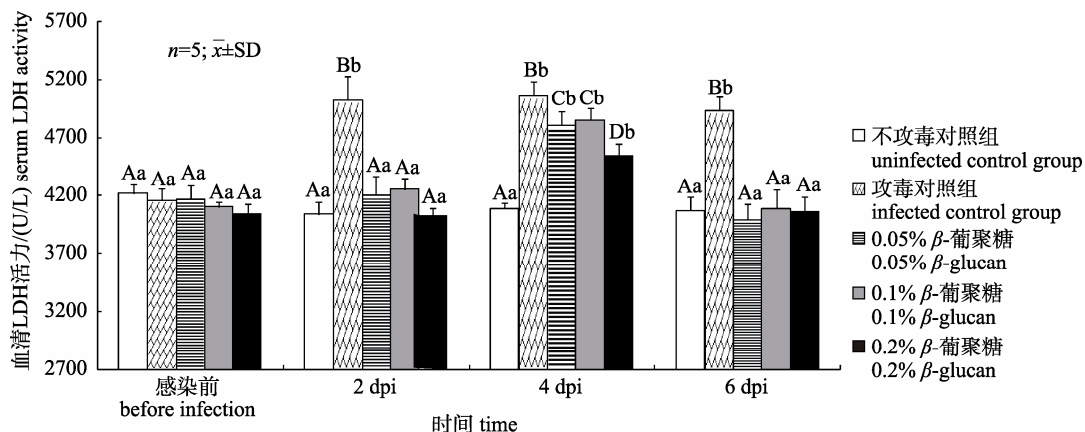


图 5 口服不同浓度葡聚糖的虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后血清 LDH 活力的变化
dpi 代表感染后天数, 小写字母代表同一实验组在不同时间点有显著性差异。

大写字母代表在同一时间点不同实验组有显著性差异 ($P<0.05$)。

Fig. 5 The changes on serum LDH of *Aeromonas salmonicida* infected rainbow trouts which were pretreated with different dietary β -glucan dosages
dpi denotes days post infection. Different lowercases indicate significant difference ($P<0.05$) at different time point of the same group. Different uppercases indicate significant difference ($P<0.05$) in different groups at the same time.

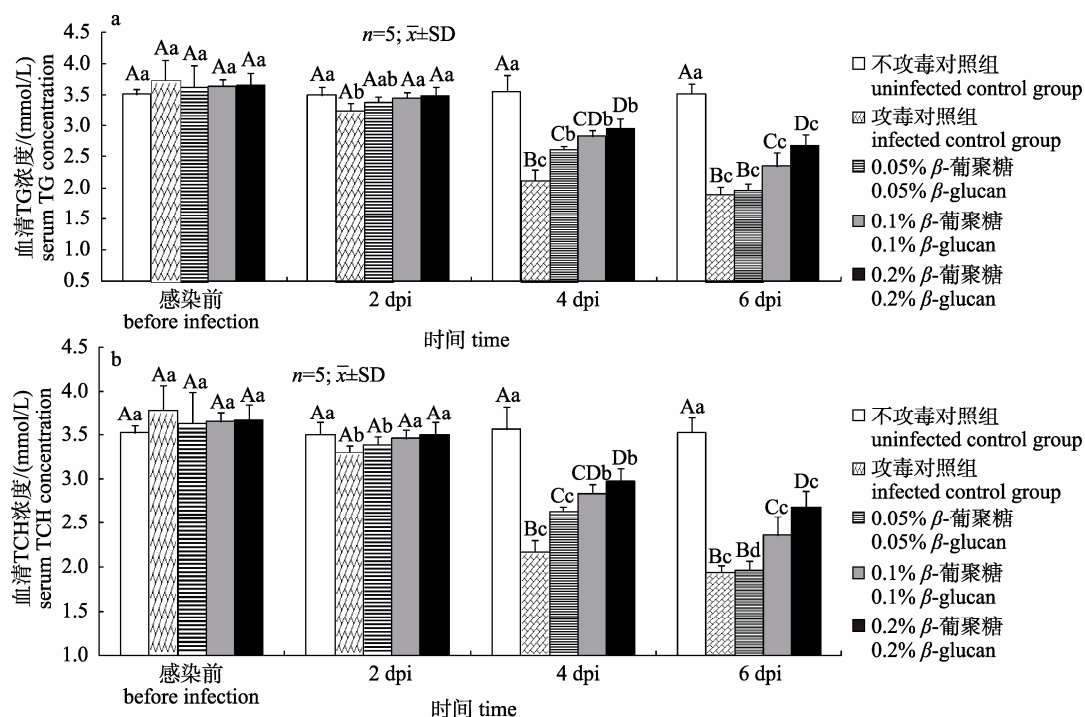


图 6 口服不同浓度葡聚糖的虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后血清 TG(a)和 TCH(b)含量的变化
dpi 代表感染后天数, 小写字母代表同一实验组在不同时间点有显著性差异。

大写字母代表在同一时间点不同实验组有显著性差异 ($P<0.05$)。

Fig. 6 The changes on serum TG (a) and TCH (b) of *Aeromonas salmonicida* infected rainbow trouts which were pretreated with different dietary β -glucan dosages
dpi denotes days post infection. Different lowercases indicate significant difference ($P<0.05$) at different time point of the same group. Different uppercases indicate significant difference ($P<0.05$) in different groups at the same time.

TCH 浓度与攻毒前水平相比均无显著差异($P>0.05$)。攻毒后第 4 天, 各感染组 TCH 浓度均显著低于感染前水平($P<0.05$), 且所有 β -葡聚糖组 TCH 浓度显著高于对照组($P<0.05$)。攻毒后第 6 天, 各组 TCH 浓度依然显著低于感染前水平, 0.1%和 0.2%葡聚糖添加组显著高于攻毒对照组, 且 0.2%组显著高于其他组($P<0.05$)。

2.7 口服不同浓度葡聚糖的虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后血清 BUN 和 T-BIL 含量的变化

由图 7a 可知, 攻毒后第 2 天, 攻毒对照组和所有葡聚糖组的血清 BUN 含量与各自感染前相比无显著差异, 各感染组之间也没有显著差异($P>0.05$)。感染后第 4 天, 各感染组 BUN 含量都显著高于感染前水平, 且所有葡聚糖组 BUN 含量显著低于攻毒对照, 0.2%葡聚糖组显著低于其他感染组($P<0.05$)。感染后第 6 天, 各感染组 BUN 含量都显著高于感染前水平, 且所有葡聚糖组 BUN 含量依然显著低于攻毒对照($P<0.05$), 3 个 β -

葡聚糖组之间没有显著差异($P>0.05$)。

由图 7b 可知, 攻毒后第 2 天, 各感染组与感染前相比 T-BIL 含量显著降低, 其中 0.2%显著高于其他感染组($P>0.05$)。感染后第 4 天, 各感染组 T-BIL 与攻毒后第 2 天相比显著升高, 且 0.2%显著高于其他感染组($P>0.05$)。感染后第 6 天, 各感染组血清 T-BIL 继续显著升高, 0.2%葡聚糖组回升至感染前水平, 其他组依然显著低于感染前水平; 各组之间, 0.2%葡聚糖组 T-BIL 含量显著高于其他感染组($P>0.05$)。

2.8 口服不同浓度葡聚糖的虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后肝脏和脾脏 HSP70 表达量的变化

由图 8a 可知, 攻毒后第 2 天, 所有感染组与未攻毒对照组相比, 表达量都显著升高, 且 0.2%葡聚糖组的 HSP70 表达量显著高于其他感染组($P<0.05$)。攻毒后第 4 天, 所有感染组 HSP70 的表达量继续显著升高, 且葡聚糖添加量越大, HSP70 表达量越高, 0.1%和 0.2%葡聚糖组表达量

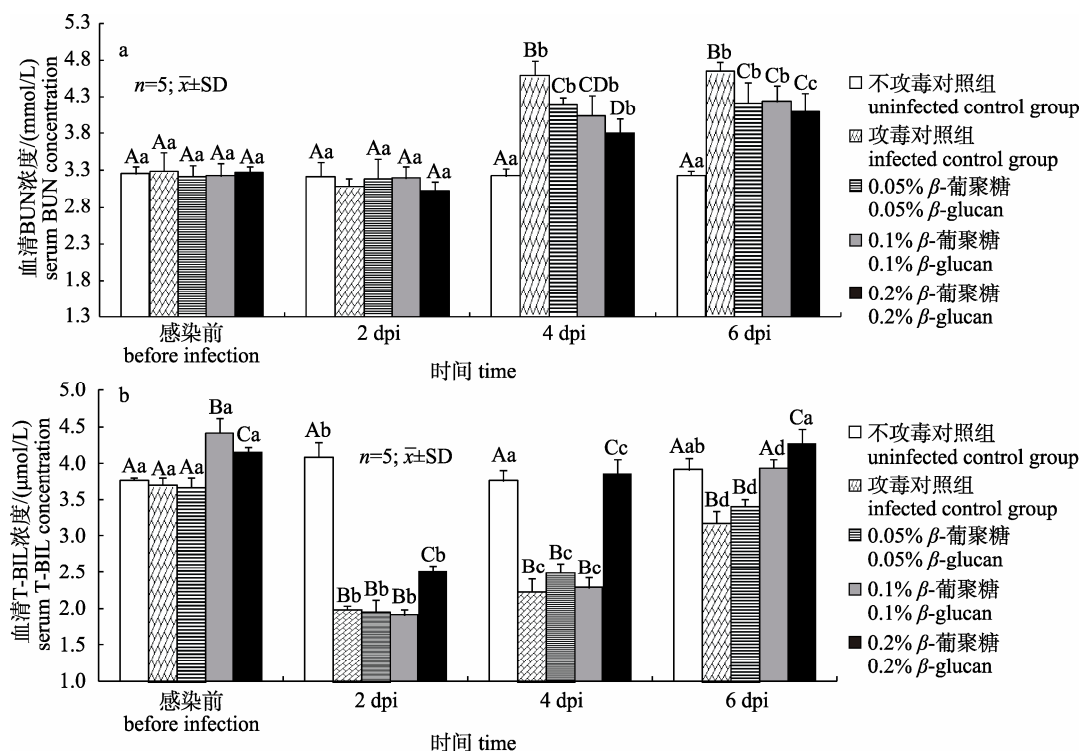


图 7 口服不同浓度葡聚糖的虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后血清 BUN(a)和 T-BIL(b)含量的变化
dpi 代表感染后天数, 小写字母代表同一实验组在不同时间点有显著性差异。

大写字母代表在同一时间点不同实验组有显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 7 The changes on serum BUN (a) and T-BIL (b) of *Aeromonas salmonicida* infected rainbow trouts which were pretreated with different dietary β -glucan dosages
dpi denotes days post infection. Different lowercases indicate significant difference ($P<0.05$) at different time point of the same group. Different uppercases indicate significant difference ($P<0.05$) in different groups at the same time.

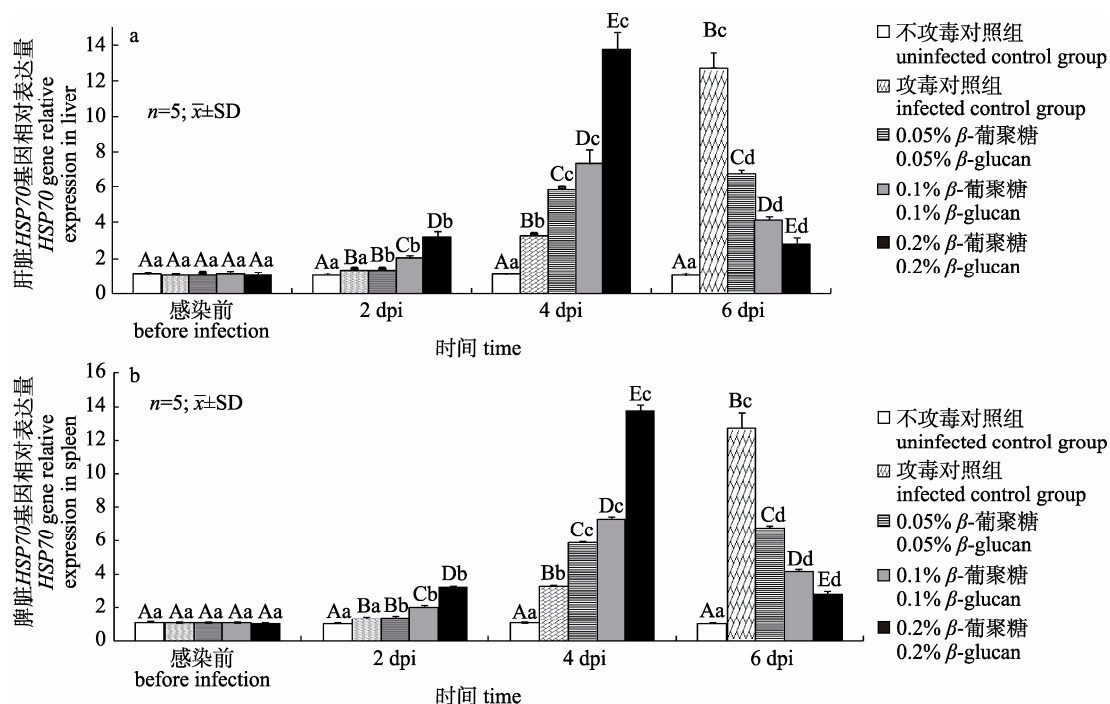


图 8 口服不同浓度葡聚糖的虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后肝脏(a)和脾脏(b)组织 *HSP70* 基因表达量的变化
dpi 代表感染后天数, 小写字母代表同一实验组在不同时间点有显著性差异 ($P < 0.05$).

大写字母代表在同一时间点不同实验组有显著性差异 ($P < 0.05$).

Fig. 8 The changes on *HSP70* expression in liver (a) and spleen (b) of *Aeromonas salmonicida* infected rainbow trouts which were pretreated with different dietary β -glucan dosages
dpi denotes days post infection. Different lowercases indicate significant difference ($P < 0.05$) at different time point of the same group. Different uppercases indicate significant difference ($P < 0.05$) in different groups at the same time.

达到最大值 ($P < 0.05$)。攻毒后第 6 天, 攻毒对照组和 0.05% 葡聚糖添加组 *HSP70* 表达量升高至最大值, 0.1% 和 0.2% 葡聚糖组表达量下降, 但仍显著高于感染前水平; 此时 β -葡聚糖添加组 *HSP70* 表达量显著低于攻毒对照组 ($P < 0.05$)。

由图 8b 可知, 攻毒后第 2 天, 所有感染组与未攻毒对照组相比, 表达量都显著升高, 且 0.2% 葡聚糖组的 *HSP70* 表达量显著高于其他感染组 ($P < 0.05$)。攻毒后第 4 天, 所有感染组 *HSP70* 的表达量继续显著升高, 且葡聚糖添加量越大, *HSP70* 表达量越高, 0.1% 和 0.2% 葡聚糖组表达量达到最大值 ($P < 0.05$)。攻毒后第 6 天, 攻毒对照组和 0.05% 葡聚糖添加组 *HSP70* 表达量升高至最大值, 0.1% 和 0.2% 葡聚糖组表达量下降, 但仍显著高于感染前水平 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 不同浓度葡聚糖对虹鳟抵抗杀鲑气单胞菌感染的影响

本实验中, 所有添加 β -葡聚糖实验组在感染

杀鲑气单胞菌后存活率均高于攻毒对照组。且 0.2% 葡聚糖组的存活率最高, 0.1% 和 0.05% 组其次, 表明在虹鳟饲料中添加 β -葡聚糖能显著增强鱼体对杀鲑气单胞菌的抵抗能力, 且高浓度 0.2% 葡聚糖组抗菌效果最好。该结果与其他学者研究发现相似, 例如 Gopalakannan 等^[11]发现在鲤 (*Cyprinus carpio*) 饲料中添加 1% 的 β -葡聚糖, 能有效提高对嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的抵抗能力。Lauridsen 等^[12]在虹鳟饲料中添加 0.2% 的 β -葡聚糖分别进行了为期 14 d 的短期投喂和 35 d 的长期投喂, 小瓜虫 (*Ichthyophthirius multifiliis*) 侵染实验表明投喂 β -葡聚糖的组别感染率更低。

3.2 不同浓度葡聚糖对感染杀鲑气单胞菌的虹鳟血清应激指标的影响

李永娟等^[13]的研究结果表明血清中的蛋白质含量变化与机体的生理密切相关, 可反映动物的健康状况。徐晓津等^[14]用哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 感染大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*), 感染后的鱼体血清总蛋白含量显著低于对照组, 这与

本研究结果一致。本实验中鱼体感染后,在第 2 天时所有感染组的血清总蛋白显著降低,徐晓津等^[14]认为感染初期鱼体血清总蛋白含量显著降低,除鱼体本身的消耗外,主要由于肝细胞受损而蛋白合成功能减退。本实验中投喂 β -葡聚糖的鱼体,在感染后第 4 天的总蛋白升高,说明投喂 β -葡聚糖能够有效缓和细菌感染引起的蛋白合成功能减退。

Farombi 等^[15]认为 MDA 是脂类物质氧化应激后的终产物,其含量可以评价机体内活性氧的水平和氧化应激的程度。Heise 等^[16]将北海绵 (*Zoarcetes viviparus*) 水环境降低到 5℃ 进行冷应激处理,结果发现其肝脏 MDA 含量显著增加。本实验中,虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后血清 MDA 含量升高。表明虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后,机体代谢加快,脂质过氧化程度增强,以应对病原菌的破坏。0.1% 和 0.2% 在感染后第 2 天血清 MDA 出现最大值,说明在机体受到感染后, β -葡聚糖能够促进脂质过氧化,以动员机体快速抵抗细菌。

韩莉莉等^[17]认为 MPO 会催化过氧化氢和氯离子产生的强氧化性物质和自由基,杀灭多种病原微生物,从而参与机体的免疫应答过程。刘腾飞等^[18]研究发现口灌吡嗪酮 1 h 后,鲫 (*Carassius auratus*) 的血液中 MPO 表达水平均明显升高并且出现峰值。本研究中,0.1% 和 0.2% β -葡聚糖组分别在攻毒后血清 MPO 含量显著升高;攻毒对照组和 0.05% 葡聚糖组在感染后一直低于初始水平。说明虹鳟在感染后,高浓度葡聚糖能刺激免疫细胞高效、大量地分泌 MPO,从而有效帮助鱼体对抗或者消灭病原菌。

徐晓津等^[14]研究发现在正常情况下 LDH 存在于许多组织细胞中,横纹肌细胞内含量最高,大黄鱼感染后 LDH 含量显著上升。本实验中攻毒对照组在感染后第 2 天血清 LDH 显著升高,徐晓津等^[14]认为感染后鱼体肌纤维即发生损伤、坏死,鱼体的肌肉组织发生代谢障碍,产生病变,这与虹鳟患病后皮肤发生溃疡症状相吻合;而 β -葡聚糖组在第 4 天才显著升高,说明 β -葡聚糖能缓和杀鲑气单胞菌引起的应激,推迟发病时间。

徐晓津等^[14]认为病鱼感染后能量指标下降,一方面与感染病鱼摄食量减少导致鱼体营养不良

有关;同时,肝脏是合成 TG 的主要场所,其含量变化是表示肝功能好坏的指标之一。本实验中感染杀鲑气单胞菌第 4 天后,所有感染后虹鳟血清 TG 和 TCH 含量都显著低于初始水平,表明虹鳟在感染后肝功能受损严重,肝细胞受损合成功能减退,造成鱼体血清 TG 含量下降。所有 β -葡聚糖组 TG 和 TCH 含量都显著高于对照组,且 0.2% 组的含量最高,说明在细菌感染过程中, β -葡聚糖在一定程度上能够减弱肝脏的应激损伤。

常玉梅等^[19]认为胆红素主要由衰老红细胞血红蛋白的辅基血红素和肝细胞中非血红蛋白的血红素辅基分解产生;由于肝细胞具有极强的摄取胆红素能力,所以血液中的胆红素经肝细胞不断地摄取、结合、转化及排泄而被及时清除。本研究中虹鳟在感染杀鲑气单胞菌后,病鱼总胆红素浓度先显著下降后又回升。原因可能是在感染初期,虽然鱼体肝脏损伤严重,后期鱼体在免疫系统的帮助下对细菌产生一定程度抵抗力,肝脏功能有所恢复;0.2% β -葡聚糖组中总胆红素浓度下降程度最小,回升最快。说明 β -葡聚糖可能参与了细菌侵染引起的肝脏应激调节。感染后第 4 天的病鱼,血清中 BUN 浓度显著升高,血 BUN 的增加表明杀鲑气单胞菌对虹鳟肾脏功能有一定影响; β -葡聚糖组的 BUN 显著低于对照组,且 0.2% 组含量最低,表明 β -葡聚糖可能能在一定程度减弱细菌对鱼体肾脏的应激损伤。

对血清应激指标综合分析可以发现,0.1% 和 0.2% β -葡聚糖组鱼体在受到细菌感染后,某些能帮助机体对抗不良环境的功能性应激指标,其活力或者浓度可以较为灵敏地上调,例如总蛋白、丙二醛、髓过氧化物酶;对于能表征组织器官受损的指示性应激指标,在 0.1% 和 0.2% β -葡聚糖组中,其变化幅度较为缓和或者出现变化的时间较晚,可以认为这两种变化方式是 β -葡聚糖增强鱼体抗应激能力的两种途径。

3.3 不同浓度葡聚糖对虹鳟肝脏和脾脏 HSP70 基因表达的影响

Ohtsuka 等^[20]认为 HSP70 家族具有许多功能,包括维持细胞内稳态,保护机体免受应激损害。同时,许多研究报道病原菌入侵机体会引起 HSP70 基因表达量的升高,例如皱纹盘鲍 (*Haliotis discus*

hannai)^[21], 黄锡鲷(*Sparus sarba*)^[22]等。

本研究中, 虹鳟感染 2 d 后, 肝脏和脾脏的 *HSP70* 表达量开始显著升高。且 0.2% 和 0.1% 葡聚糖组在感染其初期 *HSP70* 表达量始终高于对照组和 0.05% 葡聚糖组, 且表达峰值出现较早。Liu 等^[23]也研究发现感染嗜水气单胞菌后, 投喂 MOS 组的异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) *HSP70* 表达量在感染后第 2 天和第 7 天均显著高于对照组。这说明杀鲑气单胞菌感染后能够引起虹鳟 *HSP70* 表达量升高, 这是一种鱼体的保护机制。0.2% β -葡聚糖组鱼体的 *HSP70* 在感染后能在短时间内显著上调, 且上调量高于其他组, 说明高浓度葡聚糖能通过某些途径, 刺激肝脏和脾脏表达更多 *HSP70* 以应对细菌侵染。

综上所述, 杀鲑气单胞菌感染后的虹鳟肝脏和肾脏发生了一定程度的病变, 而 β -葡聚糖投喂组的指标变化较为缓和, 可以推测 β -葡聚糖可能在一定程度有效减弱对虹鳟器官产生的有害应激, 且本实验中 0.2% β -葡聚糖添加浓度保护效果最好。

参考文献:

- [1] Meena D K, Das P, Kumar S, et al. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2013, 39(3): 431-457.
- [2] Rawles S D, Kocabas A, Gatlin D M, et al. Dietary supplementation of terramycin and Romet-30 does not enhance growth of channel catfish but does influence tissue residues[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1997, 28(4): 392-401.
- [3] Alderman D J, Hastings T S. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance—potential for consumer health risks[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 1998, 33(2): 139-155.
- [4] Patterson J A, Burkholder K M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production[J]. *Poultry Science*, 2003, 82 (4): 627-631.
- [5] Sakai M. Current research status of fish immunostimulants[J]. *Aquaculture*, 1999, 172(1): 63-92.
- [6] Misra C K, Das B K, Mukherjee S C, et al. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings[J]. *Aquaculture*, 2006, 255(1): 82-94.
- [7] Lin S, Pan Y, Luo L, et al. Effects of dietary β -1, 3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*)[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 31(6): 788-794.
- [8] Sirimanapong W, Adams A, Ooi E L, et al. The effects of feeding immunostimulant β -glucan on the immune response of *Pangasianodon hypophthalmus*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 357-366.
- [9] Siwicki A K, Anderson D P, Rumsey G L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis[J]. *Veterinary Immunology and immunopathology*, 1994, 41(1-2): 125-139.
- [10] Irianto A, Austin B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(6): 333-342.
- [11] Gopalakannan A, Arul V. Enhancement of the innate immunopathg, immune system and disease-resistant activity in *Cyprinus carpio* by oral administration of β -glucan and whole cell yeast[J]. *Aquaculture Research*, 2010, 41(6): 884-892.
- [12] Lauridsen J H, Buchmann K. Effects of short- and long-term glucan feeding of rainbow trout (Salmonidae) on the susceptibility to *Ichthyophthirius multifiliis* infections[J]. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 2010, 40(1): 61-66.
- [13] Li Y J, Wang W M, Huang Y H, et al. Effects of dietary β -glucan on growth performance, serum biochemical indices and resistance against *Aeromonas hydrophila* of juvenile yellow catfish (*Pseudobagrus fulvidraco*)[J]. *Animal Nutrition*, 2015, 27(12): 3754-3762. [李永娟, 王卫民, 黄燕华, 等. 饲料中添加 β -葡聚糖对黄颡鱼幼鱼生长性能, 血清生化指标及抗嗜水气单胞菌感染能力的影响[J]. *动物营养学报*, 2015, 27(12): 3754-3762.]
- [14] Xu X J, Xu B, Wang J, et al. Studies on blood chemistry indices and histopathology of *Pseudosciaena crocea* artificially challenged with *Vibrio harveyi*[J]. *Journal of fisheries of China*, 2010, 34(4): 618-625. [徐晓津, 徐斌, 王军, 等. 大黄鱼感染哈维氏弧菌后血液生化指标的变化及组织病理学观察[J]. *水产学报*, 2010, 34(4): 618-625.]
- [15] Farombi E O, Adelowo O A, Ajimoko Y R. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River[J]. *International Journal of Environmental Research and Public health*, 2007, 4(2): 158-165.
- [16] Heise K, Puntarulo S, Nikinmaa M, et al. Oxidative stress and HIF-1 DNA binding during stressful cold exposure and recovery in the North Sea eelpout (*Zoarces viviparus*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 2006, 143(4): 494-503.
- [17] Han L L, Shen X L. Study Progress of myeloperoxidase and its gene polymorphism[J]. *Medical Recapitulate*, 2007, 13(17): 1288-1290. [韩莉莉, 沈晓丽. 髓过氧化物酶及其基因多态性的研究进展[J]. *医学综述*, 2007, 13(17): 1288-1290.]
- [18] Liu T F, Ma R R, Xiao Y Y, et al. Correlation of the relative expression of myeloperoxidase and praziquantel concentration in blood of the crucian carp, *Carassius auratus*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2016, 23(6): 1332-1338. [刘腾飞, 马荣荣, 肖艳翼, 等. 鲫血髓过氧化物酶的表达及其与血药浓度的关联性[J]. *中国水产科学*, 2016, 23(6): 1332-1338.]

- [19] Chang Y M, Cao D C, Sun X W, et al. Changes of serum biochemical indices of common carp affected by cold temperatures[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2006, 19(2): 71-75. [常玉梅, 曹鼎臣, 孙效文, 等. 低温胁迫对鲤血清生化指标的影响[J]. 水产学杂志, 2006, 19(2): 71-75.]
- [20] Ohtsuka K, Hata M. Molecular chaperone function of mammalian Hsp70 and Hsp40—a review[J]. International Journal of Hyperthermia, 2000, 16(3): 231-245.
- [21] Cheng P, Liu X, Zhang G, et al. Cloning and expression analysis of a HSP70 gene from Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2007, 22(1-2): 77-87.
- [22] Deane E E, Li J, Woo N Y. Modulated heat shock protein expression during pathogenic *Vibrio alginolyticus* stress of sea bream[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2004, 62(3): 205-215.
- [23] Liu B, Xu L, Ge X, et al. Effects of mannan oligosaccharide on the physiological responses, HSP70 gene expression and disease resistance of Allogynogenetic crucian carp (*Carrasius auratus gibelio*) under *Aeromonas hydrophila* infection[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2013, 34(6): 1395-1403.

Effect of different dietary β -glucan dosages on regulation of stress response in rainbow trout infected by *Aeromonas salmonicida*

Ji Liqin^{1,2}, SUN Guoxiang¹, WANG Yi³, DU Yishuai¹, LI Xian¹, LIU Ying³

1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;

3. School of Marine Science and Environment Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: In recent years, immunostimulants have become a new research field in aquaculture. β -glucan is one of the most important immunostimulants, which can enhance the body's resistance to infection by improving the non-specific and cellular immunity of animals. The present study evaluated the effects of different dietary β -glucan dosages (0, 0.05%, 0.1%, and 0.2%) on the anti-infection ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after 42 days of feeding. Thereafter, rainbow trout were infected with *Aeromonas salmonicida* and sampled on the 2nd, 4th, and 6th days post-infection. Survival rates as well as the regulatory processes of serum stress-related factors were analyzed. Survival rates in the β -glucan groups increased significantly compared with those in the control group after *A. salmonicida* infection, with the 0.2% group showing the best effect ($P < 0.05$). On the 4th day after infection, the serum total protein concentrations in all β -glucan groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). Serum malondialdehyde activity in the 0.1% and 0.2% groups reached a peak on the 2nd day post-infection, which was earlier than in the other infected groups. The activity of serum myeloperoxidase in the 0.1% and 0.2% groups increased significantly after infection, whereas in the 0.05% and control groups, it decreased significantly ($P < 0.05$). The activity of lactate dehydrogenase in all β -glucan groups after infection was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). Serum triglyceride and total cholesterol levels in all β -glucan groups increased more obviously than those in the control group ($P < 0.05$). On the 4th day after infection, the serum urea nitrogen concentration in all β -glucan groups was markedly lower than that in the infected control group ($P < 0.05$). Total bilirubin (T-BIL) concentration decreased significantly after infection; however, T-BIL in the 0.2% group was clearly higher than that in the other groups. After infection, *HSP70* expression in the liver and spleen in all groups increased significantly. In the 0.1% and 0.2% groups, it reached a higher peak earlier than in the control group. Overall, the liver and head kidney in rainbow trout were damaged to a certain extent after infection with *A. salmonicida*; however, β -glucan can effectively protect fish from damage caused by *A. salmonicida*, with 0.2% β -glucan showing the best effect.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*; β -glucan; *Aeromonas salmonicida*; serum stress-related indicator

Corresponding author: LIU Ying. E-mail: yingliu@dlou.edu.cn