

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.01247

β -葡聚糖对暗纹东方鲀幼鱼非特异性免疫及生长性能的影响

王永宏¹, 杨小玉², 郭正龙², 张玉晴¹, 张鸿业¹, 陈立侨¹, 周忠良¹

1. 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062;

2. 江苏中润农业发展有限公司, 江苏 南通 226634

摘要: 选取健康暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)幼鱼, 体质量约 50 g。根据设计项目分别进行取样分组, 各组设 3 个重复。分别采用注射、投喂不同剂量的 β -葡聚糖和注射相应浓度的 β -葡聚糖后于不同时间进行嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的感染试验的方法, 探讨 β -葡聚糖对暗纹东方鲀幼鱼非特异性免疫及生长性能的影响。结果显示: 腹腔注射 β -葡聚糖试验组与对照组相比, 除 C3 补体外, 试验组血清溶菌酶(LSZ)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、血清总蛋白(STP)的水平出现不同程度提高($P<0.05$); 另在腹腔注射不同剂量 β -葡聚糖之后, 进行嗜水气单胞菌的感染试验, 试验组累计存活率显著提高($P<0.05$)且注射葡聚糖 5 d 后再进行感染不能提高存活率; 投喂试验中, β -葡聚糖也可以增强暗纹东方鲀的非特异免疫功能($P<0.05$), 但对增重率、饵料系数、特定生长率没有影响; 其中, 连续投喂和间断投喂所引起的免疫增强效果没有差异。考虑到免疫抑制以及降低生产成本, 建议生产采取间断投喂的方式。

关键词: 暗纹东方鲀; β -葡聚糖; 非特异性免疫; 嗜水气单胞菌; 生长性能

中图分类号: S963

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)06-1247-010

β -葡聚糖作为一种新型、绿色的天然免疫增强剂在水产养殖中的应用上已经得到人们广泛的关注。目前已有试验证实, 葡聚糖可以通过激活鱼体内的非特异性免疫反应以及体液防御系统来增强鱼体对不同病菌的抵抗能力^[1-4], 如对南亚野鲮(*Labeo rohita*)^[5]、亚洲鲇(*Silurus asotus*)^[6]等给予不同剂量的 β -葡聚糖, 血清溶菌酶活力、白细胞吞噬活性等与非特异免疫相关的指标均有明显的上升, 同时又可以促进鱼体生长, 促进饲料转化率, 但也有一些研究显示, 如对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[7]、奥尼罗非鱼^[8](*Oreochromis aureus*)、斑点叉尾鲷^[9](*Ictalurus punctatus*)等鱼类投喂 β -葡聚糖, 非特异免疫功能没有得到增强。甚至有研究结果显示, 长时间连续投喂 β -葡聚糖导致鲤(*Cyprinus carpio*)^[10]和凡纳滨对虾(*Penaeus*

vannamei boone)^[11]的免疫功能免疫受到抑制。这说明, β -葡聚糖的免疫增强效应可能存在着种间差异, 给予方式也可能影响 β -葡聚糖的效应, 能否广泛的作为水生生物的免疫添加剂还需要大量而细致的研究。

暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)隶属于鲀科, 东方鲀属, 俗称河鲀, 为中国特有经济鱼种, 因其肉质鲜美, 营养丰富被广大食鱼爱好者所喜爱, 尤其近年来在人工养殖条件下, 暗纹东方鲀毒性大大降低, 市场前景广阔^[12]。然而, 在人工养殖条件下暗纹东方鲀对病菌的抵抗能力下降, 这已成为制约河鲀产业健康发展的难题。本研究从剂量以及给予方式两个方面探索 β -葡聚糖对暗纹东方鲀免疫增强有效性, 以期为葡聚糖作为提高暗纹东方鲀非特异性免疫的免疫增强剂提供理论依据。

收稿日期: 2013-01-24; 修订日期: 2013-03-31.

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2012BAD25B03).

作者简介: 王永宏(1987-), 硕士研究生, 研究方向: 生态毒理学. E-mail: wangyonghong2827@126.com

通信作者: 周忠良, 副教授, E-mail: zhouzl@mail.ecnu.edu.cn; 郭正龙, 工程师, E-mail: guozhenglong2008@yahoo.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用鱼由江苏省中润农业发展公司提供。 β -葡聚糖购自浙江深友生物技术有限公司,纯度为 90%。基础饲料为中润农业发展公司提供的河豚专用饲料,颗粒机购自河北邢台裕工科技开发有限公司,型号 DGP80-B。基础饲料配方以及营养成分见表 1,配置 4 种不同 β -葡聚糖添加量为(0、0.1%、0.2%、0.4%)的试验饲料。各组饲料经颗粒机加工成颗粒浮性饲料,备用。嗜水气单胞菌菌种购自上海海洋大学。

表 1 基础饲料配方及主要营养成分
Tab. 1 Composition and nutrient level of foundation diets
%, 风干基础 dry basis

原料 ingredients	含量 content	营养成分 nutrition composition	含量 content
白鱼粉 white fish meal	25.0	能量/(MJ·kg ⁻¹) energy	12.7
红鱼粉 red fish meal	20.0	粗蛋白 crude protein	38.7
面粉 wheat flour	25.0	粗脂肪 crude lipid	7.8
氯化胆碱 choline chloride	1.5		
预混料* premix*	2.0		
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.5		
豆油 soy oil	9.0		
豆粕 soybean meal	16.0		

注: “*” — 预混料为每千克日粮提供的微量元素和维生素(mg): K 28.0; Ca 282.0; Mg 9.0; Zn 3.5; Fe 24.0; Cu 1.8; I 0.25; Se 0.02; VA 8 000 IU; VC 200; VD 900 IU; VE 60; VK 5; VB₁15; 尼克酸 100; 氯化胆碱 160; 泛酸钙 40; VB₆ 20; VB₁₂ 5; 肌醇 100.
Note: “*” — The premix provides mineral and vitamin for a kilogram of diets (mg): K 28.0, Ca 282.0, Mg 9.0, Zn 3.5, Fe 24.0, Cu 1.8, I 0.25, Se 0.02, VA 8 000 IU, VC 200, VD 900 IU, VE 60, VK 5, VB₁15, nicotinic acid 100, choline chloride 160, pantothenate acid 40, VB₆ 20, VB₁₂ 5, inositol 100.

1.2 试验方法

1.2.1 β -葡聚糖对暗纹东方鲀非特异性免疫功能的影响 试验在华东师范大学生物养殖站进行。幼鱼饲养于 15 个直径 2 m, 高 1.2 m 的圆形

水族池中,水深控制在 0.8 m。每天 9:00 和 14:00 分别按体质量的 2.5%~3.5%投喂基础饲料,整个试验期间水温保持在 25~28℃, pH 6.8~7.4,溶解氧 4.5 mg/L 以上并根据水质变化情况及时换水。驯养 2 周后,开始正式试验。选取长势均匀,体质健康,体质量约 50 g 的幼鱼 600 尾,随机分为 5 组,每组设 3 个重复,每个重复 40 尾鱼。

试验采用腹腔注射法。对照组注射 0.1 mL 的鱼用生理盐水,试验组按 10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg、80 mg/kg(β -葡聚糖/鱼体质量)给予 β -葡聚糖。 β -葡聚糖用鱼用生理盐水稀释,每尾鱼的注射总量为 0.1 mL。并分别在注射 β -葡聚糖后 4 h、8 h、12 h、24 h、2 d、3 d、4 d、5 d、7 d、9 d 取样。

1.2.2 感染嗜水气单胞菌试验 嗜水气单胞菌经过 2 次复壮培养后以 4 000 r/min 离心 15 min,倒掉上清液,加入 2 mL 生理水稀释摇匀,梯度稀释后计数,进行攻毒预试验,确定合适的细菌浓度。置 4℃冰箱中备用。

选取体质健康、长势均匀的暗纹东方鲀幼鱼 420 尾,随即分为 7 组,每组 3 个重复,每个重复 20 尾鱼。对照组仅注射生理盐水;试验组分两组,一组在感染前 1 d 分别按 0 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg、80 mg/kg(β -葡聚糖/鱼体质量)给予 β -葡聚糖; β -葡聚糖用鱼用生理盐水稀释,每尾鱼的注射总剂量为 0.1 mL;另一组在感染前 5 d 按 40 mg/kg 一次性给予 β -葡聚糖。所有试验组按每 kg 体质量 5 mL 逐尾注射嗜水气单胞菌悬液(1.72×10^8 CFU/mL),记录 1、3、5、7、9 d 的累计死亡数,计算存活率。

1.2.3 β -葡聚糖给予方式对暗纹东方鲀非特异性免疫功能和生长性能的影响 选取体质量(50 ± 3.17)g 的暗纹东方鲀幼鱼 300 尾,随机分为 5 组,每组 3 个重复,每个重复 20 尾鱼。对照组为不加 β -1, 3 葡聚糖的河鲀基础饲料,添加不同含量 β -葡聚糖为试验组,其中试验组分别连续投喂添加葡聚糖含量为 0.1%、0.2%、0.4%的基础饲料,其中另设置每隔 3 d 投喂葡聚糖的试验组,56 d 之后,进行样品的收集。

1.3 血清非特异性免疫指标测定

尾椎静脉采取血样, 4℃ 静置 24 h 后, 4℃ 4 000 r/min 离心 15 min, 取其上清液(即血清)于 1.5 mL eppendorf 管中, -80℃ 保存, 冷冻备用。分别测定过氧化氢酶(CAT)、C3 补体、超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶(LSZ)和血清总蛋白的活力。超氧化物歧化酶活性测定采用黄嘌呤氧化酶法; 溶菌酶活性测定采用比浊法; 过氧化氢酶活性采用紫外分光光度法; 血清总蛋白含量测定采用双缩脲法, C3 补体含量测定采用免疫比浊法。其中超氧化物歧化酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶、血清总蛋白试剂盒购自南京建成生物试剂生物技术研究所, C3 补体试剂盒购自浙江伊利康生物试剂有限公司, 各试验步骤按照试剂盒说明书进行。

1.4 生长性能指标测定

根据下列公式计算各指标:

增重率=(终末体质量-初始均重)/初始体质量 × 100%;

特定生长率=100 × (ln 初始体质量 - ln 终末体质量)/养殖天数;

成活率=试验末鱼尾数/试验初鱼尾数 × 100%;

饵料系数=总投喂量/(终末体质量-初始体质量)。

1.5 数据统计与处理

试验结果采用“平均值 ± 标准差”表示, 采用 SPSS11.7 软件进行数据分析和统计, 先对数据作单因素方差分析(ANOVA), 若处理间差异显著, 再用 Duncan's 多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 β -葡聚糖对暗纹东方鲀非特异性免疫功能的影响

2.1.1 血清超氧化物歧化酶活性的变化 腹腔注射 β -葡聚糖 8 h 后, 各试验组血清 SOD 活性被显著诱导($P < 0.05$), 并逐日提升。注射后 2 d 达到峰值(图 1), 3 d 时 SOD 活性下降; 低浓度组(10 mg/kg)的 SOD 活性在 4 d 时已回落到与对照组相近水平, 其他各组则在注射后 5 d 时回落到对照水平, 其后直至 9 d 都与对照无差异。

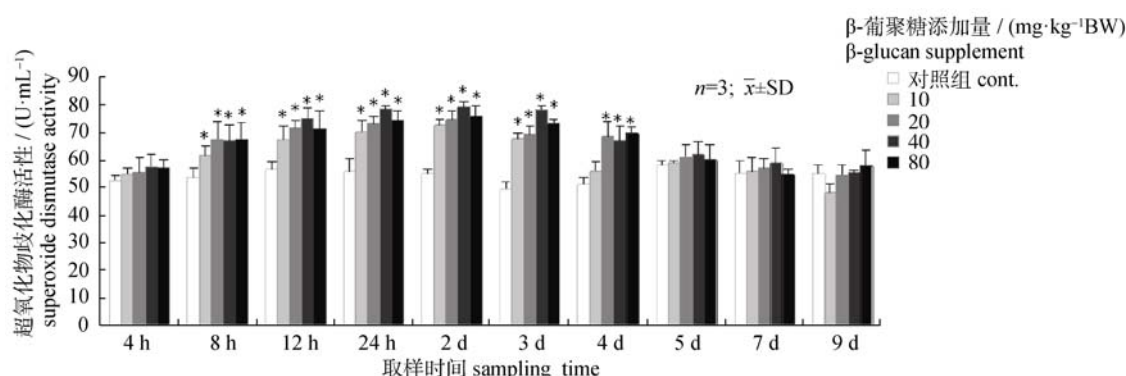


图 1 腹腔注射不同剂量 β -葡聚糖对暗纹东方鲀血清超氧化物歧化酶活性的影响

肩注“*”表示与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 1 Effects of intraperitoneal injection of different doses of β -glucan on superoxide dismutase activity in serum of *Takifugu obscurus*

Means with “*” are significantly different compared with the control group($P < 0.05$).

2.1.2 血清过氧化氢酶活性的变化 腹腔注射 β -葡聚糖 8 h 后, 各试验组血清 CAT 活性被显著诱导($P < 0.05$), 并逐日提升。注射后 24 h 到峰值(图 2), 4 d 时 CAT 活性下降; 各试验组注射后 5 d 时回落到对照水平, 其后直至 9 d 都与对照无差异($P > 0.05$)。

2.1.3 血清溶菌酶的变化 腹腔注射 β -葡聚糖 24 h 后, 各试验组血清溶菌酶活性被显著诱导($P < 0.05$), 并逐日提升。直至第 3 天, 各试验组溶菌酶活性均显著高于对照组(图 3); 低浓度组(10 mg/kg)的溶菌酶活性在 4 d 时已回落到与对照组相近水平, 其他各组则在注射后 5 d 时回落到对照

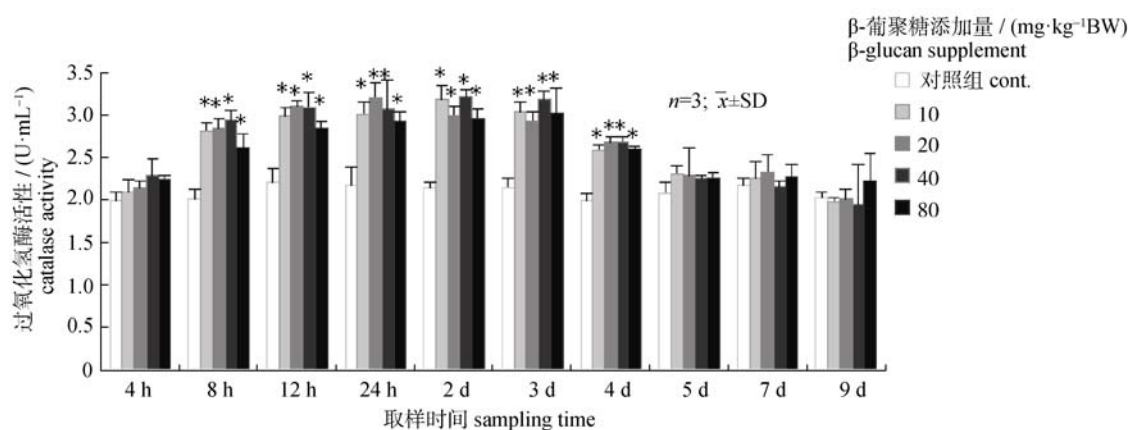


图 2 腹腔注射不同剂量β-葡聚糖对暗纹东方鲀血清过氧化氢酶活性的影响

肩注“*”表示与对照组相比差异显著($P<0.05$)。

Fig. 2 Effects of intraperitoneal injection of different doses of β -glucan on catalase activity in serum of *Takifugu obscurus*
Means with “*” are significantly different compared with the control group($P<0.05$).

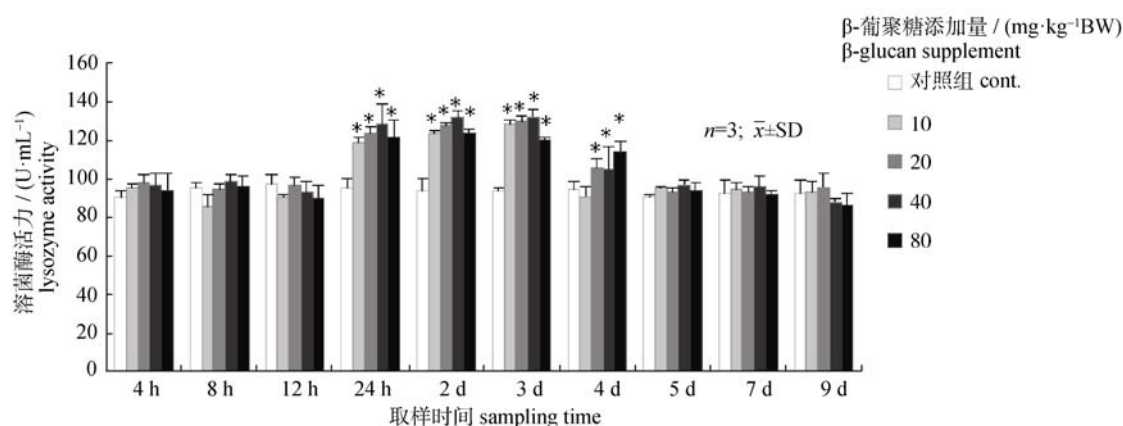


图 3 腹腔注射不同剂量β-葡聚糖对暗纹东方鲀血清溶菌酶活性的影响

肩注“*”表示与对照组相比差异显著($P<0.05$)。

Fig. 3 Effects of intraperitoneal injection of different doses of glucan on lysozyme activity in serum of *Takifugu obscurus*
Means with “*” are significantly different compared with the control group($P<0.05$).

水平, 其后直至第 9 天都与对照无差异($P>0.05$)。

2.1.4 血清总蛋白含量的变化 腹腔注射β-葡聚糖 24 h 后, 各试验组血清总蛋白含量被显著诱导($P<0.05$), 2 d 时各组血清总蛋白含量达到峰值。直至第 5 天, 各试验组溶菌酶活性均显著高于对照组(图 4); 注射后 7 d 时回落到对照水平, 其后直至第 9 天都与对照无差异。

2.1.5 血清补体 C3 含量的变化 注射β-葡聚糖后, 整个试验阶段(图 5), 血清补体 C3 的含量在试验组和对照组之间并没有出现任何差异。

2.2 β-葡聚糖对暗纹东方鲀感染嗜水气单胞菌死亡率的影响

为检测β-葡聚糖强化后暗纹东方鲀的抗病能

力, 分别对不同剂量强化组暗纹东方鲀进行了细菌攻毒试验。注射嗜水气单胞菌 1 d 后, 各试验组相继出现病状, 游动减缓, 胸鳍、臀鳍基部充血。1 d 后各试验组鱼相继出现死亡, 3 d 后, 试验组的存活率显著低于对照组($P<0.05$)(表 2), 其中, 注射β-葡聚糖的试验组存活率较不注射葡聚糖的试验组显著提高。随着攻毒时间的推移, 各试验组鱼类死亡数在增加。至 9 d 时, 未作处理的对照组试验鱼存活率为 93.3%, 各试验组存活率最高为 41.7%, 其中未注射葡聚糖的试验组仅为 16.6%, 而注射β-葡聚糖的强化组之间, 存活率虽有高低, 但差异不显著。

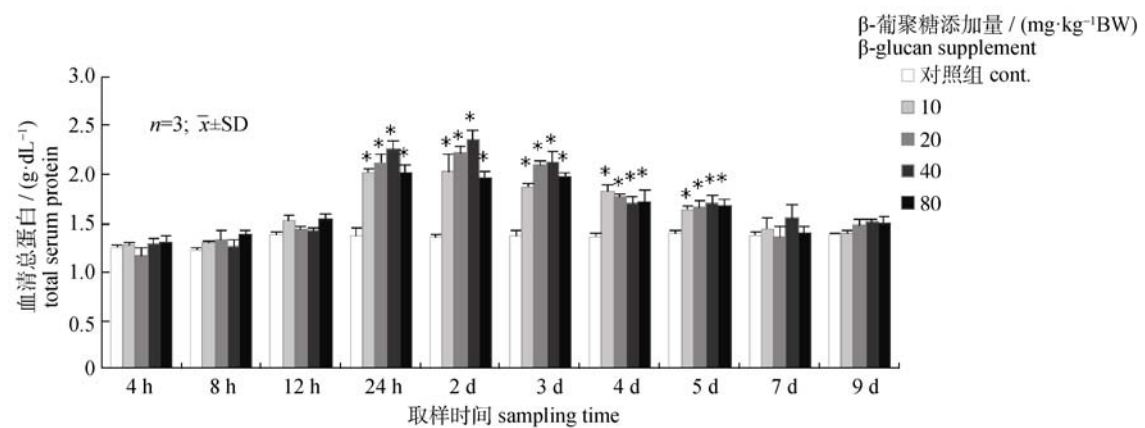


图 4 腹腔注射不同剂量β-葡聚糖对暗纹东方鲀血清总蛋白含量的影响
肩注“*”表示与对照组相比差异显著(P<0.05).

Fig. 4 Effects of intraperitoneal injection of different doses of glucan on total serum protein in serum of *Takifugu obscurus*
Means with “*” are significantly different compared with the control group(P<0.05).

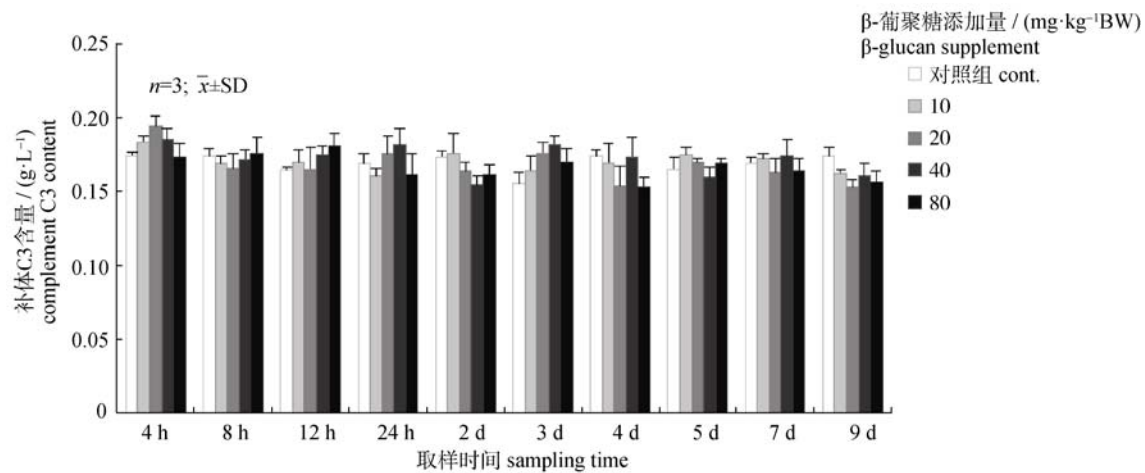


图 5 腹腔注射不同剂量β-葡聚糖对暗纹东方鲀血清补体 C₃ 含量的影响
肩注“*”表示与对照组相比差异显著(P<0.05).

Fig. 5 Effects of intraperitoneal injection of different doses of glucan on complement C₃ content in serum of *Takifugu obscurus*
Means with “*” are significantly different compared with the control group(P<0.05).

表 2 β-葡聚糖强化剂量对暗纹东方鲀幼鱼存活率的影响
Tab. 2 Effects of doses of β-glucan on the survival rate of *Takifugu obscurus*

β-葡聚糖/ (mg·kg ⁻¹ BW) β-glucan	注射嗜水气单胞菌后天数/d days after injection of <i>A. hydrophila</i>				
	1	3	5	7	9
对照组 cont.	100	100	96.6 ± 1.53	96.6 ± 1.53	93.3 ± 3.43
0	98.3 ± 1.03	73.3 ± 3.34*	48.3 ± 3.16**	35.6 ± 3.14**	16.6 ± 3.31**
10	100	90.0 ± 1.41	78.3 ± 2.65*	63.3 ± 2.45*	43.4 ± 3.32*
20	100	95.0 ± 2.61	75.0 ± 3.53*	65.0 ± 1.49*	45.0 ± 1.64*
40	96.6 ± 1.21	88.3 ± 4.51	71.6 ± 2.46*	61.6 ± 3.75*	46.6 ± 6.71*
80	98.3 ± 2.21	85.0 ± 2.34	71.6 ± 4.31*	55.0 ± 3.42*	41.7 ± 1.75*

注: “***”表示与对照组相比差异极显著(P < 0.01); “*”表示与对照组相比差异显著(P < 0.05)。对照组为生理盐水组。
Note: Means with “***” are significantly different compared with control group(P<0.01); means with “*”are significantly different compared with the control group(P<0.05). The control means the trial of normal saline.

注射阶段非特异性免疫指标的变化情况显示β-葡聚糖对暗纹东方鲀的免疫增强存在时间效应。表 3 列出了注射β-葡聚糖 5 d 后再攻毒的试验结果。从

表中可以看到,同样的强化剂量,提前 5 d 强化组在受到嗜水气单胞菌侵袭后,试验鱼的存活率与未强化的对照组接近,显著低于提前 1 d 强化组。

表 3 β-葡聚糖强化时间对暗纹东方鲀存活率的影响
Tab. 3 Effects of administration time of β-glucan on the survival rate of *Taki fugu*

%; n=3; $\bar{x}\pm SD$

β-葡聚糖/(mg·kg ⁻¹ BW) β-glucan	注射嗜水气单胞菌后天数/d days after injection of <i>A. hydrophila</i>				
	1	3	5	7	9
对照组 cont.	100	100	96.6±1.53	96.6±1.53	93.3±3.43
0	98.3±1.03	73.3±3.34*	48.3±3.16**	35.6±3.14**	16.6±3.31**
40					
(预先 1 d 强化 one day in advance)	96.6±1.21	88.3±4.51*	71.6±2.46*	61.6±3.75*	46.6±6.71*
40					
(预先 5 d 强化 5 d in advance)	100	71.0±2.61*	51.6±3.23**	40.7±1.49**	25.0±1.64**

注:“***”表示与对照组相比差异极显著($P<0.01$);“**”表示与对照组相比差异显著($P<0.05$).
Note: Means with “***” are significantly different compared with the control group ($P<0.01$); means with “**” are significantly different compared with the control group ($P<0.05$).

2.3 β-葡聚糖给予方式对暗纹东方鲀非特异性免疫功能和生长性能的影响

2.3.1 投喂方式对暗纹东方鲀生长性能的影响

表 4 显示了投喂添加β-葡聚糖的基础饲料 56 d 之后,暗纹东方鲀的各项生长指标。从表中可以看到,投喂不同含量β-葡聚糖对暗纹东方鲀的成活率、增重率、特定生长率与对照组相比均无影响($P>0.05$);此外,连续投喂和间隔 3 d 投喂,暗纹东方鲀的成活和生长性能也无差异。

2.3.2 投喂方式对暗纹东方鲀非特异性免疫指标的影响

由表 5 可知,对暗纹东方鲀进行β-葡聚糖投喂 56 d 之后,各试验组和对照组相比血清总蛋白均有显著性提高,但组间无差异。除投喂 0.1%的试验组之外,其余试验组溶菌酶活力和超氧化物歧化酶均明显高于对照组。采取间断投喂方式,也获得了和连续投喂的效果,溶菌酶活性和血清总蛋白含量、超氧化物歧化酶等活性显著高于对照组($P<0.05$)。

表 4 β-葡聚糖剂量及投喂方式对暗纹东方鲀生长性能的影响
Tab. 4 Effects of doses and administration route of β-glucan on the growth of *Takifugu obscurus*

n=3; $\bar{x}\pm SD$

β-葡聚糖添加量/% dosages	投喂方式 administration by oral	终末体质量/g final body weight	增重率/% WGR	成活率/% survival rates	特定生长率/% SGR	饲料系数 FCR
0 (cont.)	连续 continuous	71.52±3.64	43.45±1.23	97.54±1.02	0.66±0.03	3.53±0.11
0.1	连续 continuous	76.32±2.91	42.15±1.32	98.56±1.05	0.63±0.01	3.23±0.17
0.2	连续 continuous	81.21±2.41	45.34±1.28	96.43±1.08	0.59±0.04	2.89±0.10
0.4	连续 continuous	82.51±3.15	46.42±1.34	98.42±1.04	0.64±0.02	2.84±0.12
0.2	3 d 间隔 3 d interval	74.15±2.14	44.98±1.54	97.41±1.09	0.63±0.04	3.51±0.16

表 5 β-葡聚糖含量以及投喂方式对暗纹东方鲀非特异性免疫的影响
Tab. 5 Effects of doses and Administration route of β-glucan on the non-specific immunity of *Takifugu obscurus*

n=3; $\bar{x}\pm SD$

β-葡聚糖添加量/% dosages	投喂方式 administration	溶菌酶/(U·mL ⁻¹) lysozyme activity	血清总蛋白/(g·dL ⁻¹) total serum protein	SOD(U·mL ⁻¹)
0 (cont.)	连续 continuous	84.54±4.74	1.21±0.04	77.43±1.85
0.1	连续 continuous	90.43±6.84	1.67±0.06*	83.74±2.19
0.2	连续 continuous	114.64±5.83*	1.73±0.07*	98.45±3.21*
0.4	连续 continuous	109.43±8.43*	1.63±0.10*	105.45±4.32*
0.2	间隔 in 3 d interval	108.85±6.54*	1.72±0.03*	95.53±2.14*

注:肩注“*”表示与对照组相比差异显著($P<0.05$).
Note: means with “*” are significantly different compared with the control group($P<0.05$).

3 讨论

3.1 β -葡聚糖对暗纹东方鲀非特异免疫功能的影响

鱼类在抵抗外界病菌侵入时,非特异性免疫是最主要的作用机制, β -葡聚糖作为鱼类的免疫增强剂就是利用了其具有增强鱼类非特异性免疫功能的特性。作为鱼体的第一道防线,血清中存在的多肽类,如溶菌酶、C3 补体因子以及其他一些杀伤病菌的溶菌因子在阻止病菌在鱼体内的吸附和定殖起到了至关重要的作用,同时也避免了感染和病害的发生^[13]。在本试验中,通过注射方式对暗纹东方鲀施用 β -葡聚糖之后,除 C3 补体之外,血清中溶菌酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等多肽类作为非特异性免疫的标志性指标都有着相应的提升,这证明 β -葡聚糖在生产上是可以作为暗纹东方鲀的免疫增强剂。

溶菌酶作为体液免疫主要的参与者,通过破坏细胞壁中的 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰氨基葡萄糖之间的 β -1, 4 糖苷键,使细胞壁不溶性黏多糖分解成可溶性糖肽,导致细胞壁破裂内容物逸出而使细菌溶解^[14]。因此,溶菌酶在非特异性免疫中起到了关键的作用。分别对鳍短须石首鱼(*Seriola quinqueradiata*)^[15]和虹鳟^[16]进行腹腔注射之后,溶菌酶活性都得到了显著的上升,除此,在大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)^[14]中也证实了在注射 β -葡聚糖之后溶菌酶基因的表达量有了明显的提高。本试验结果显示,暗纹东方鲀腹腔注射 β -葡聚糖 24 h 后,血液中溶菌酶活力也会显著提高,且一次注射可维持 3~4 d。

有研究表明,血液活性氧是机体杀灭外来病菌的有效物质之一。葡聚糖一旦和巨噬细胞以及嗜中性粒细胞表面的特性受体结合,活性氧自由基的释放就会得到明显的提高,与之相对应,一些清除自由基的酶的活性也随之提高,血清内 SOD 和 CAT 都有着显著的上升^[15]。采用注射给予 β -葡聚糖方式,草鱼(*Cyprinus carpio*)^[16-17]以及南亚野鲮^[2]的抗氧化酶如 SOD 及 CAT 均显现出较高水平的活性。本试验中 SOD 和 CAT 在注射葡聚糖 8 h 之后,活性逐步上升,而且这种

高活性状态可维持 4 d,这和目前大多数研究结果一致。

补体系统在非特异性免疫中起着扮演者重要的角色,它通过调节吞噬作用、细胞呼吸、细胞降解等作用来杀灭外界侵入的病菌,其中,C3 补体在活化补体系统中起着关键的作用。在 Selvaraj^[21]的试验中也证实了注射 β -葡聚糖对血清中 C3 补体含量没有任何影响。在对鲑鱼的研究中,将其巨噬细胞浸入葡聚糖溶液 48 h 之后同样没有检测到 C3 补体的上升^[18]。在本试验中,C3 补体在葡聚糖的刺激下,试验组与对照组相比并没有显著的上升, β -葡聚糖不能有效的提高 C3 补体含量,这和目前对于葡聚糖促进 C3 补体含量上升的大多数研究结果一致。

3.2 β -葡聚糖对暗纹东方鲀抗感染能力的影响

为进一步验证 β -葡聚糖是否具有增强鱼体免疫能力的作用,对鱼体进行活菌感染并统计其存活率是目前常用的试验手段。Chandra^[19]采用四次间断注射 β -葡聚糖的方式,提高了野鲮对嗜水气单胞菌的抵抗力,试验组存活率与只注射生理盐水的对照组相比有明显上升。已有研究证实^[17],注射、浸浴、投喂 3 种中,注射相对于其他两种方式可以更高的提高草鱼对嗜水气单胞菌的抵抗能力,存活率相对于对照组,显著性提高。

本试验中,在感染嗜水气单胞菌前 1 d 给予 β -葡聚糖,各试验组存活率相对于对照组明显下降。给予葡聚糖可以有效的提高存活率,但注射剂量影响不大。在感染病菌前 5 d 给予则并没有有效的保护鱼体免受病菌的侵害。结合非特异免疫指标变化情况看, β -葡聚糖诱导的各项免疫指标,在注射 5 d 后都已回归到对照水平,即由 β -葡聚糖所引起的非特异性免疫增强效果已经消失,此时感染病菌其鱼体的反应与未给予葡聚糖的试验组一致。这结果同时也证明本文所采用的非特异性免疫指标是有效的。 β -葡聚糖引起的鱼体免疫增强具有一定的有效作用时间。

3.3 连续投喂和间断投喂对暗纹东方鲀非特异免疫和生长性能的影响

目前,很多研究都已证实,采用投喂方式,

可以提高鱼体的非特异免疫功能^[2, 15, 19-20, 23]。在本试验中, 采取连续投喂和间断投喂两种方式, 暗纹东方鲀各项非特异性免疫指标均得到了显著上升, 但是上升程度却低于采用注射的方式, 这可能采用投喂方式时, 大多数葡聚糖分子并没有有效的达到靶器官, 所引起的免疫激活反应不是特别激烈, 以致葡聚糖给予量过低时, 不能引起溶菌酶和 SOD 酶活性的上升^[17]。然而, β -葡聚糖对于生长性能的影响, 目前仍没有得到一致的结论, 添加 β -葡聚糖对于虹鳟^[24]和南美白对虾^[4]和促生长效果不明显; 许国煊^[25]等试验表明, 日粮中添加 β -葡聚糖对彭泽鲫(*Sparus macrocephalus*)增重率、饵料系数无任何影响。在本试验中, 采取投喂的方式对暗纹东方鲀进行 β -葡聚糖的施用, 56 d 之后, 试验组和对照组相比, 增重率、饵料系数、存活率等生长指标并没有因为 β -葡聚糖的添加以及投喂方式的不同而有所差异, 这种结果和目前其他 β -葡聚糖对生长性能的研究一致, 对于 β -葡聚糖对生长性能造成不同影响的机制尚未得到详实的阐述, 有待进一步的研究。不过, 已有研究表明^[7-9]连续投喂投喂 β -葡聚糖会对鱼体造成不可预见的危害, 会引起动物机体对病菌的免疫衰竭以及和抗原的竞争性抑制, 这会对鱼类非特异免疫系统造成不利影响。除此, 长期连续投喂 β -葡聚糖还会引起动物机体长时间处于免疫激活状态而造成营养物质重分配进而对生长性能造成影响^[26]。

因此, 考虑到生产上成本因素和潜在的免疫抑制的发生, 在生产上应尽量采用间断投喂 β -葡聚糖的方式。

4 结论

试验证明注射和投喂都可以提高暗纹东方鲀非特异性免疫功能以及抵抗病菌侵害的能力, 但对生长性能的提升没有影响; 同时试验也证明了间断和连续给予 β -葡聚糖都可以提高暗纹东方鲀的免疫性能, 为避免潜在的免疫衰竭, 建议在生产上采用间断给予 β -葡聚糖的方式。

参考文献:

- [1] Sakai M. Current research status of fish immunostimulants[J]. Aquaculture, 1999, 172: 63-92.
- [2] 乔海龙, 杨启东, 陈健. 大麦 β -葡聚糖的研究现状与展望[J]. 江苏农业科学, 2012, 19(5): 1002-1032.
- [3] Guselle N J, Markham R J F, Speare D J. Intraperitoneal administration of β -1, 3/1, 6-glucan to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*(Walbaum), protects against *Loma salmonae*[J]. J Fish Dis, 2006, 29: 375-381.
- [4] Chen Yu-Yuan, Su Sing Sim, Siau Li Chiew. Dietary administration of a Gracilaria tenuistipitata extract produces protective immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to ammonia stress[J]. Aquaculture, 2012, 370-371: 26-31.
- [5] Misra CK, Das BK. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings[J]. Aquaculture, 2006, 255: 82-94.
- [6] Kumari J, Hoo PK. Non-specific immune response of healthy and immunocompromised Asian catfish (*Clarias batrachus*) to several immunostimulants[J]. Aquaculture, 2006, 255: 133-141.
- [7] Sealey WM, Barrows FT, Hang A, et al. Evaluation of the ability of barley genotypes containing different amounts of β -glucan to alter growth and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Anim Feed Sci Technol, 2008, 141: 115-128.
- [8] Whittington R, Lim C, Klesius PH. Effect of dietary β -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 33: 111-120.
- [9] Welker TL, Lim C. Immune response and resistance to stress and *Edwardsiella ictaluri* challenge in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), fed diets containing commercial whole-cell or yeast subcomponents [J]. World Aquac Soc, 2007, 38: 24-35.
- [10] Graham Brogden, Maren von Kockritz-Blickwede, Mikołaj Adamek, β -glucan protects neutrophil extracellular traps against degradation by *Aeromonas hydrophila* in carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 33: 1060-1064.
- [11] Nan Bai, Wenbing Zhang, Kangsen Mai. Effects of discontinuous administration of β -glucan and glycyrrhizin on the growth and immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2010, 306: 218-224.
- [12] 华雪铭, 周洪琪, 张冬青, 等. 多糖和益生菌对暗纹东方鲀免疫功能的调节[J]. 水产学报, 2006, 30(4): 230-235.
- [13] Alexandar JB, Ingram GA. Noncellular non-specific defence

- mechanisms of fish[J]. Annual Rev Fish Dis, 1992(2): 249–279.
- [14] 张鹏, 江明锋. 动物源溶菌酶研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(2): 87–93.
- [15] Matsuyama H, Mangindaan REP, Yano T. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*)[J]. Aquaculture, 1992, 101: 197–203.
- [16] Lapatra SE, Lauda KA, Jones GR, et al. Resistance to IHN virus infection in rainbow trout is increased by β -glucan while subsequent production of serum neutralising activity is decreased[J]. Fish Shellfish Immunol, 1998(8): 435–446.
- [17] Steinar M. Paulsen. In vivo effects of β -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 14: 39–54.
- [18] Miest J J, Falco A, Pionnier N P M. The influence of dietary β -glucan, PAMP exposure and *Aeromonas salmonicida* on apoptosis modulation in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 33: 846–856.
- [19] Chandra Kanta Misra, Basanta Kumar Das. Effect of multiple injections of β -glucan on non-specific immune response and disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings[J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20: 305–319.
- [20] Kim Yu-sin, Ke Fei, Zhang Qi-Ya. Effect of β -glucan on activity of antioxidant enzymes and Mx gene expression in virus infected grass carp[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27: 336–340.
- [21] Alberto Falco, Patrick Frost, Joanna Miest. Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed with β -glucan supplements[J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 32: 1051–1057.
- [22] Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2005, 12: 213–225.
- [23] Secombes CJ. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity[J]. Fish Immunol Meth, 1990(1): 137–154.
- [24] Jakob Skov, Per Walter Kania, Lars Holten-Andersen. Immunomodulatory effects of dietary β -1, 3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 33: 111–120.
- [25] 许国焕, 吴月嫦, 陶家发. 两种多聚糖对彭泽鲫生长影响及免疫促进作用的初步研究[J]. 水利渔业, 2002, 22(2): 49–51.
- [26] 王忠, 吕于明, 牛桂琴. 日粮添加酵母 β -葡聚糖对哺乳仔猪生长性能和免疫功能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2006, 42(6): 19–22.

Effect of β -glucan on the non-specific immunity and growth of *Takifugu obscurus*

WANG Yonghong¹, ZHANG Hongye¹, GUO Zhenglong², ZHANG Yuqing¹, YANG Xiaoyu², CHEN Liqiao¹, ZHOU Zhongliang¹

1. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

2. Jiang Su ZhongRun Agriculture Development Co., Ltd., Nantong 226634, China

Abstract: *Takifugu obscurus* is a special economic species in China. Under the artificial aquaculture, the toxicity in this species decreases, which makes the fish consumption more widely than before. But the ability of anti-diseases decreases under aquaculture condition, which restricts the development of the aquaculture industry for this species. We used healthy juvenile specimens of *T. obscurus* at body weight about 50 g. According to the requirement of this study we designed item trials with 3 replicates for each. The fish were administered β -glucans either by injection or orally (in feed). We subsequently experimentally infected each individual with *Aeromonas hydrophila* at various times after injection with β -glucan. We observed an increase in serum lysozyme (LZM), catalase (CAT), total serum protein (TSP), and superoxide dismutase (SOD) ($P < 0.05$), but not complement 3 (C3). Intraperitoneal injection of β -glucan significantly enhanced survival. Oral administration of β -glucan enhanced non-specific immunity ($P < 0.05$), but had no effect on weight percent gain (WPG) and specific growth rate (SGR) ($P > 0.05$). There was no difference in the non-specific immune response between groups that received continuous administration and those that received a single dose. Thus, we recommend use of a single injection to prevent immunological suppression.

Key words: *Takifugu obscurus*; β -glucan; non-specific immunity; growth

Corresponding author: WANG Yonghong. E-mail: wangyonghong2827@126.com;

GUO Zhenglong. E-mail: guozhenglong2008@yahoo.cn