

4种多糖对皱纹盘鲍血细胞活性氧和血清凝集活力的影响

张剑诚, 张峰, 王吉桥

(农业部海水增养殖生态学与生物技术重点开放实验室, 大连水产学院, 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要:水温为 $(20.0 \pm 3)^\circ\text{C}$, 盐度为 30.0 ± 1.5 下, 将灵芝多糖1、灵芝多糖2、脂多糖和酵母多糖分别配制成0、1.0、5.0、10、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度, 采用鲁米诺化学发光法(CL)和凝聚法检测其对皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)血细胞产生活性氧和血清凝集活力的影响。这些多糖均能增强鲍血细胞产生活性氧的能力和吞噬能力, 其增强效果由强至弱依次为: 灵芝多糖2 > 灵芝多糖1 > 脂多糖 > 酵母多糖; 同种多糖中, 急性组增强鲍血细胞活性氧产生和促进血清凝集活力的能力强于慢性组。本研究还比较了浸泡和注射灵芝多糖2($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和脂多糖($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)对皱纹盘鲍血细胞活性氧产生和血清凝集活力的影响。结果表明, 注射的效果优于浸泡。

关键词:皱纹盘鲍; 血细胞; 活性氧; 多糖; 血清凝集活力

中图分类号: S944.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)02-0147-07

目前作为中国对虾(*Penaeus chinensis*)和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)等无脊椎动物免疫增强剂的物质主要有海藻多糖(PV911)、北虫草多糖(CP)^[1-2]、凝集素^[3]、活性多糖IPV^[4]、成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)、脂多糖(LPS)^[5-7]、中草药制剂^[8]和弧菌悬浮液^[9]等。孙虎山等^[10-11]研究了脂多糖、硒多糖和酵母多糖对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)血清和血细胞中7种酶活力和血淋巴中2种抗氧化酶活力的影响。菌胞外糖蛋白^[12]和 β -1,3葡聚糖(glucan)等能激发血液中的免疫激活因子(cell activating factor), 促进血细胞对异物的识别和吸附, 增强血细胞的吞噬作用。但是, 这类多糖对皱纹盘鲍血细胞吞噬能力的影响, 目前尚未见报道。因此, 本实验研究了灵芝多糖1、灵芝多糖2、脂多糖和酵母多糖对鲍血细胞活性氧产生和血清凝集活力的影响, 旨在为研制鲍的免疫制剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 皱纹盘鲍 体长为 (6.0 ± 0.4) cm, 体重为 (35.0 ± 2.4) g, 共30只, 暂养于循环充气水槽(100 cm × 50 cm × 60 cm)中, 内置黑色波纹板。水温为 $(20.0 \pm 3)^\circ\text{C}$, 盐度为 30.0 ± 1.5 。每天换水1

~2次, 定时投喂海带, 清理残饵和粪便。

1.1.2 糖类的配制 灵芝多糖和脂多糖由中国科学院大连化学物理研究所提供, 酵母多糖由本实验室自制。用盐度28~32的无菌海水将灵芝多糖1(GLP1)、灵芝多糖2(GLP2)、脂多糖(LPS)、酵母多糖(YP), 按0、1.0、5.0、10、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的质量浓度配制。

1.1.3 无菌海水 砂滤盐度28~30的海水, 经0.45 μm 醋酸纤维素膜抽滤泵抽滤, 高压灭菌后置于锥形瓶内保存, 每10 d更新一次。

1.1.4 酵母悬液 取20 mg食用干酵母, 用少量鲍血清调理1~2 h(室温); 再称等量酵母不经鲍血清调理, 各用上述无菌海水10 mL配成 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的悬液, 浓度为 $10^8/\text{mL}$, 冷冻贮存备用。

1.1.5 红细胞悬液 离心管用含肝素的生理盐水润洗后放入新鲜血液(人B型、鲤、兔), 用生理盐水离心洗涤4次(4 000 r/min, 10 min), 最后分别用生理盐水配制成1%的红细胞悬液。

1.1.6 鲁米诺(Luminol)储存液 称取780 mg氢氧化钾, 618 mg硼酸和14 mg鲁米诺(5-氨基邻苯二甲酰肼)粉剂(Sigma公司产), 溶解在10 mL双重蒸馏水中, 置于棕色瓶中 4°C 冰箱内保存。使用时将鲁米诺储存液同无菌海水按浓度 $10^{-7} \text{ mol} \cdot$

收稿日期: 2003-09-30; 修订日期: 2003-11-26.

基金项目: 辽宁省科技厅农业攻关项目(2001203001).

作者简介: 张剑诚(1973-), 男, 硕士研究生, 从事水产养殖研究, 现为大连太平洋海珍品有限公司技术部部长.

通讯作者: 王吉桥. E-mail: Hothawk@yeah.net

L^{-1} 配制,即配即用。

1.2 方法

1.2.1 采血及血淋巴和血清的制备 在3~5只鲍腹足部抽取血淋巴,与盐度20的无菌海水按1:1混合,放入聚乙烯塑料管中制成混合血淋巴液备用。未稀释的血淋巴液经离心(4 000 r/min, 10 min)后,汲取上层血清备用。

1.2.2 血细胞活性氧的检测 用LS-5801型液体闪烁计数器(Beckman公司产),按单光子测定程序,室温下测定。测定管中加入混合血淋巴液200 μL ,以未受刺激的血细胞的基础发光5~10 min为记录的起始值($t=0$),再加入Luminol液100 μL 和酵母悬液100 μL ,然后记录发光值(cpm)。将不同浓度的试验糖与血淋巴液混合后立刻(急性组)或1 h后(孵育组)室温检测。

1.2.3 血清凝集活力检测 在96孔V型血凝板上用40 μL 鲍血清与等量生理盐水2倍系列稀释后加1%红细胞悬液,室温2 h后,肉眼观察。无凝集现象时红细胞沉积在V型孔底部呈大红点状,有凝集现象时呈网状部下沉。血清凝集力以形成明显凝集现象的最高血清稀释倍数表示。将不同浓度的试验糖与血清混合加入兔红细胞悬液后立即(急性组)或1 h后(孵育组)在室温下检测。

1.2.4 不同给药途径对鲍免疫能力的影响 (1)浸泡:将鲍($n>4$)单独浸泡在最佳浓度试验糖溶液的烧杯中,溶液高度超过壳高2 cm,每2 d一次,每次为2 h。对照组溶液为盐度30~32的无菌海水。共测定5次。(2)注射:用微型注射器将最佳浓度试验糖溶液注入外套膜与足肌连接部,每2 d一次,每次50 μL 。对照组注射等量无菌海水。共测定5次。

浸泡和注射后的鲍放入水槽内常规管理,在0、3、7、13、21、29 d分别采血检测血细胞活性氧和血清凝集活力。

1.3 数据处理

使用SPSS10.0统计软件进行单因素方差分析和 t -检验。

2 结果

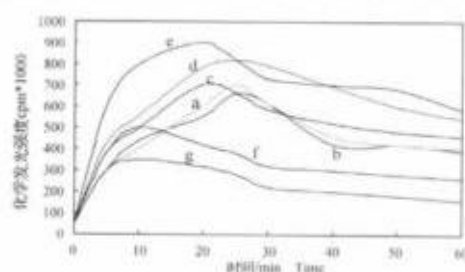
2.1 GLP1对鲍血细胞活性氧产生和血清凝集活力的影响

在急性组中,当GLP1质量浓度在0~50 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时,血细胞吞噬发光强度随GLP1质量浓度的

升高而增加,但a、b、c组间的差异不显著($P>0.05$);d和e组的发光强度显著增强,即当质量浓度为10 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 和50 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时,20 min后发光强度达高峰,且明显增强($P<0.05$);而质量浓度为100和200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时发光强度显著降低,10 min即达高峰($P<0.05$)(图1)。

在孵育组中,当GLP1质量浓度为0~5.0 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时,血细胞吞噬发光强度随GLP1质量浓度升高而增强,20 min达最大值,但无显著差异($P>0.05$);当质量浓度为10、50、100、200 $\mu g/mL$ 时发光强度较低,显著受抑制($P<0.01$),且随浓度的升高,抑制作用增强(图2)。

鲍血清对人(B型)、鲤、兔红细胞均有一定凝集活力,其中对人(B型)(128~256)血细胞的凝集活力最高,兔(32~128)次之,鲤(16~64)最低。



a: 0 $\mu g/mL$; b: 1 $\mu g/mL$; c: 5 $\mu g/mL$; d: 10 $\mu g/mL$; e: 50 $\mu g/mL$; f: 100 $\mu g/mL$; g: 200 $\mu g/mL$.

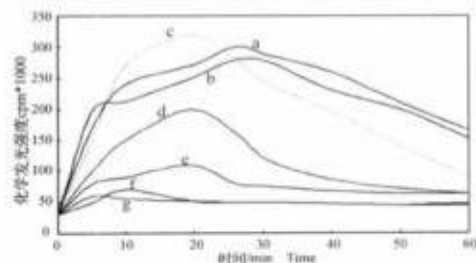
图1 GLP1急性组对皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的影响
Fig. 1 Influence of GLP1 in non-cultured group on production of reactive oxygen species in haemolymph in the abalones (GLP1-glycolipid 1)

2.2 GLP2对鲍血细胞活性氧产生和血清凝集活力的影响

急性组中, GLP2质量浓度为0~10 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时,鲍血细胞吞噬发光强度虽然随时间的延长而增加,但无明显差异($P>0.05$);当质量浓度为50 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时发光强度显著增强($P<0.05$);而质量浓度为100 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 和200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时发光强度显著受抑制($P<0.05$)(图3)。

孵育组中GLP2质量浓度为0~100 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时,鲍血细胞吞噬发光强度随浓度的升高而增强,质量浓度为50 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时最显著($P<0.05$);质量浓度为200 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时轻微抑制发光强度(图4)。质量浓度为0 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 、1.0 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 时急性组鲍

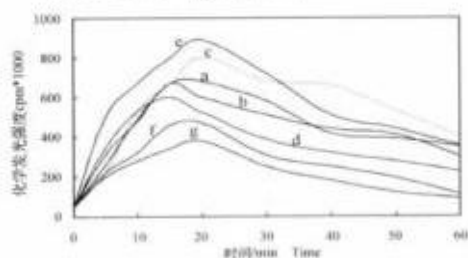
血清凝集活力与孵育组无差异;随 GLP2 浓度的升高,急性组凝集活力逐渐增强;孵育组则逐渐降低。



a: 0 µg/mL; b: 1 µg/mL; c: 5 µg/mL; d: 10 µg/mL; e: 50 µg/mL; f: 100 µg/mL; g: 200 µg/mL.

图2 GLP1 孵育组对皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的影响

Fig. 2 Influence of GLP1 in cultured groups on production of reactive oxygen in haemolymph in the abalones (GLP1 – glycolipid 1)



a: 0 µg/mL; b: 1 µg/mL; c: 5 µg/mL; d: 10 µg/mL; e: 50 µg/mL; f: 100 µg/mL; g: 200 µg/mL.

图3 GLP2 急性组对皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的影响

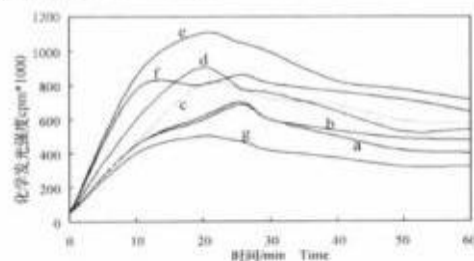
Fig. 3 Influence of GLP2 in non – cultured groups on production of reactive oxygen in haemolymph in the abalones (GLP2 – glycolipid 2)

2.3 LPS 对鲍血细胞活性氧产生和血清凝集活力的影响

急性组中 LPS 的质量浓度为 0 ~ 100 µg · mL⁻¹ 时,鲍血细胞吞噬发光强度随 LPS 质量浓度的升高而增强(图5),其中 10 µg · mL⁻¹ 时增强最显著 ($P < 0.01$); 当为 50 µg · mL⁻¹ 和 100 µg · mL⁻¹ 时发光强度有所回落,但仍高于为 0 µg · mL⁻¹ 时; 200 µg · mL⁻¹ 和 0 µg · mL⁻¹ 时,发光强度无显著差异 ($P > 0.05$)。

孵育组中 LPS 质量浓度为 0 ~ 100 µg · mL⁻¹ 时,鲍血细胞吞噬发光强度随浓度的升高而增强,10 µg · mL⁻¹ 时发光强度增强最显著 ($P < 0.01$) (图6); 50 µg · mL⁻¹ 和 100 µg · mL⁻¹ 时,发光强度有所

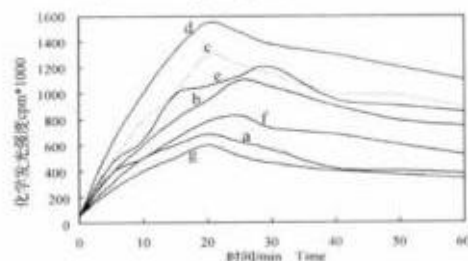
回落; 为 200 µg · mL⁻¹ 和 0 µg · mL⁻¹ 时,发光强度无显著差异 ($P > 0.05$)。



a: 0 µg/mL; b: 1 µg/mL; c: 5 µg/mL; d: 10 µg/mL; e: 50 µg/mL; f: 100 µg/mL; g: 200 µg/mL.

图4 GLP2 孵育组对皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的影响

Fig. 4 Influence of GLP2 in cultured groups on production of reactive oxygen in haemolymph in the abalones (GLP2 – glycolipid 2)



a: 0 µg/mL; b: 1 µg/mL; c: 5 µg/mL; d: 10 µg/mL; e: 50 µg/mL; f: 100 µg/mL; g: 200 µg/mL.

图5 LPS 急性组对皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的影响

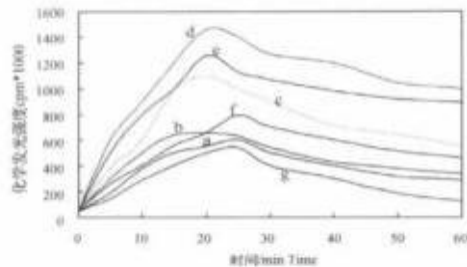
Fig. 5 Influence of LPS in non – cultured groups on production of reactive oxygen in haemolymph in the abalones (LPS – lipopolysaccharides)

当 LPS 的质量浓度为 0 µg · mL⁻¹、1.0 µg · mL⁻¹ 时,急性组和孵育组的凝集活力无显著差异,但急性组凝集活力随 LPS 质量浓度的升高而增强,200 µg · mL⁻¹ 时有所下降;孵育组凝集活力随 LPS 质量浓度的升高而降低。

2.4 YP 对皱纹盘鲍血细胞活性氧产生和血清凝集活力的影响

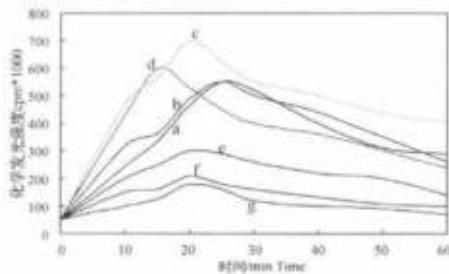
急性组中,鲍血细胞吞噬发光强度随 YP 的质量浓度由 1.0 µg · mL⁻¹ 增至 5.0 µg · mL⁻¹ 而增强(图7),其中为 5.0 µg · mL⁻¹ 时增强最显著 ($P < 0.05$), 当为 10 µg · mL⁻¹ 时发光强度有所回落; 而为 50、100、200 µg · mL⁻¹ 时,发光强度随质量浓度的升高而下降,其中为 100 µg · mL⁻¹ 和 200 µg ·

mL^{-1} 时显著抑制发光强度($P < 0.01$)。



a: $0 \mu\text{g}/\text{mL}$; b: $1 \mu\text{g}/\text{mL}$; c: $5 \mu\text{g}/\text{mL}$; d: $10 \mu\text{g}/\text{mL}$; e: $50 \mu\text{g}/\text{mL}$; f: $100 \mu\text{g}/\text{mL}$; g: $200 \mu\text{g}/\text{mL}$.

图6 LPS 孵育组对皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的影响
Fig. 6 Influence of LPS in cultured groups on production of reactive oxygen in haemolymph in the abalones (LPS - lipopolysaccharides)



a: $0 \mu\text{g}/\text{mL}$; b: $1 \mu\text{g}/\text{mL}$; c: $5 \mu\text{g}/\text{mL}$; d: $10 \mu\text{g}/\text{mL}$; e: $50 \mu\text{g}/\text{mL}$; f: $100 \mu\text{g}/\text{mL}$; g: $200 \mu\text{g}/\text{mL}$.

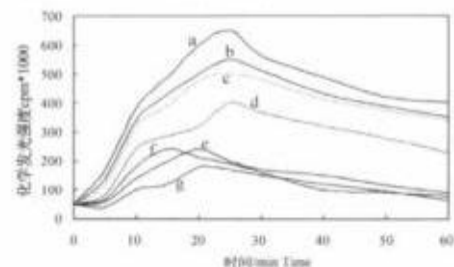
图7 YP 急性组对皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的影响
Fig. 7 Influence of YP in non - cultured groups on production of reactive oxygen in haemolymph in the abalones (YP - polysaccharidaes from yeast)

孵育组中,YP 质量浓度逐渐升高时,鲍血细胞产生活性氧的能力明显下降,其中 50 、 100 、 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时显著抑制发光强度($P < 0.01$) (图8)。急性组中鲍血清凝集活力随 YP 质量浓度的升高无明显变化,而孵育组血清凝集活力则低于急性组,且随 YP 质量浓度的升高而下降。

2.5 不同给药途径对鲍免疫能力的影响

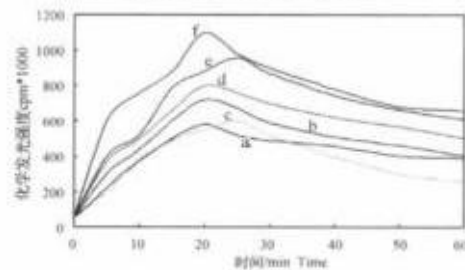
GLP2 和 LPS 增强鲍血细胞产生活性氧和提高血清凝集活力的能力显著高于其它糖。 $50 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 和 GLP2 浸泡或注射 20 min 后,鲍血细胞发光强度达最大值,之后逐渐下降(图9和图10);随着浸泡时间的延长,鲍血细胞释放活性氧的量逐渐增加,13 d、21 d 和 29 d 组的增强效果显著高于其它组($P < 0.01$);LPS 诱导鲍血细胞活性氧

释放能力较 GLP2 强(图11)。



a: $0 \mu\text{g}/\text{mL}$; b: $1 \mu\text{g}/\text{mL}$; c: $5 \mu\text{g}/\text{mL}$; d: $10 \mu\text{g}/\text{mL}$; e: $50 \mu\text{g}/\text{mL}$; f: $100 \mu\text{g}/\text{mL}$; g: $200 \mu\text{g}/\text{mL}$.

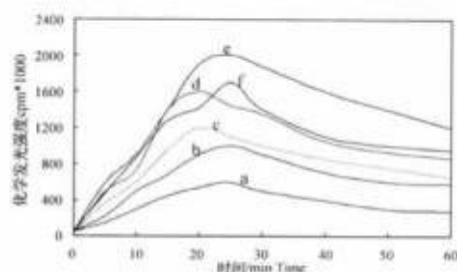
图8 YP 孵育组对皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的影响
Fig. 8 Influence of YP in cultured groups on production of reactive oxygen in haemolymph in the abalones (YP - polysaccharidaes from yeast)



a: 0 d; b: 3 d; c: 7 d; d: 13 d; e: 21 d; f: 29 d

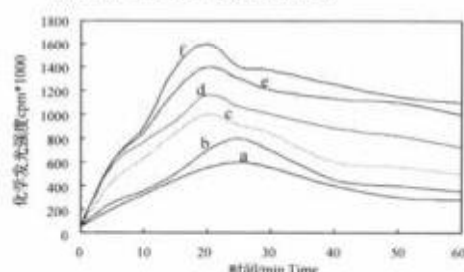
图9 GLP2 浸泡对皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的影响
Fig. 9 Influence of GLP2 in immersion groups on production of reactive oxygen in haemolymph in the abalones (GLP2 - glycidipid 2)

GLP2 注射后,13 d、21 d、29 d 组的血细胞释放活性氧的能力比其他组显著增强($P < 0.01$) (图10)。注射 LPS 13 d 后,血细胞释放活性氧的能力显著强于其他组($P < 0.01$) (图12)。在相近剂量和时间内,注射时血细胞活性氧产生量和血清凝集活力显著高于浸泡(图11和图12)。GLP2 浸泡 0、3、7 d 时,鲍血清凝集活力差异不显著,13 d 后显著升高,直至 29 d ($P < 0.01$) (表1);注射 0、3 d 时,鲍血清凝集活力差异不显著,7 d 后逐渐升高,稳定在凝集活力为 $128 \sim 512$ 的水平上,29 d 时回落到 $64 \sim 128$ 。注射对鲍血清凝集活力的增强效果高于浸泡。LPS 浸泡 0、3 d 时,鲍血清凝集活力差异不显著,7 d 后显著升高,29 d 回落到实验前的水平;注射后 3 d 鲍血清凝集活力即显著升高,21 d 达最大值。注射的效果显著优于浸泡($P < 0.05$)。



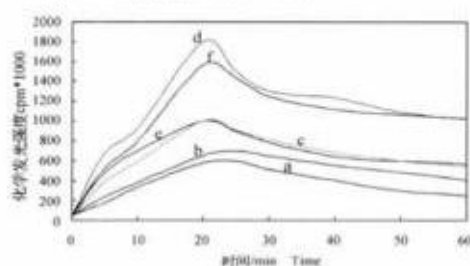
a: 0 d; b: 3 d; c: 7 d; d: 13 d; e: 21 d; f: 29 d

图10 GLP2注射对皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的影响
Fig. 10 Influence of GLP2 on production of reactive oxygen species in haemolymph from the abalones by injection (GLP2 - glycolipid 2)



a: 0 d; b: 3 d; c: 7 d; d: 13 d; e: 21 d; f: 29 d

图11 LPS浸泡对皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的影响
Fig. 11 Influence of LPS on production of reactive oxygen in haemolymph in the abalones by immersion (LPS - lipopolysaccharides)



a: 0 d; b: 3 d; c: 7 d; d: 13 d; e: 21 d; f: 29 d

图12 LPS注射对皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的影响
Fig. 12 Influence of LPS on production of reactive oxygen in haemolymph in the abalones by injection (LPS - lipopolysaccharides)

3 讨论

张峰等^[13]和本实验结果表明,皱纹盘鲍血细胞受到刺激而吞噬时伴随有呼吸爆发产生活性氧。活性氧产生的强弱直接反映了血细胞杀菌的能力。鲍

血淋巴液与 GLP1、GLP2、LPS 和 YP 等糖类的急性和孵育处理,能不同程度地诱导或抑制活性氧的产生。试验糖质量浓度过低效果不显著,过高则呈较强的抑制作用。 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ GLP2 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 浸泡或注射均可促进血细胞活性氧的产生,但注射的效果快于和强于浸泡。

表1 GLP2($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)和 LPS($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)浸泡和注射对皱纹盘鲍血清凝集活力的影响

Table 1 Influence of GLP2 ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) and LPS ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) in immersion groups and injection groups on agglutination in the abalone haemolymph

天数 Days	GLP2		LPS	
	浸泡 Immersion	注射 Injection	浸泡 Immersion	注射 Injection
0	32-128	32-128	32-128	32-128
3	32-64	32-256	32-28	32-256
7	32-256	64-256	64-128	64-128
13	64-128	128-512	64-256	128-256
21	64-128	128-512	64-128	128-512
29	64-128	64-128	32-64	128-256

许多学者曾在无脊椎动物体内发现了凝集素^[3-14]。它作为一种非特异性识别因子,能识别“异己成分”(如病毒、细菌、真菌、原虫和非生命物质),可以通过凝集、包围、调理、促进血细胞的吞噬作用等方式将其排出体外;参与止血、凝固、物质运输及创伤修复等一系列作用。

凝集素除具有识别异己,使外来病原微生物失去活力,甚至死亡,阻止其蔓延或向其他组织和器官入侵外,还能促进细胞免疫。这包含吞噬细胞与凝集素共同作用和由凝集素促进吞噬细胞活性等两方面:(1)凝集素结合在异物上为吞噬细胞识别,从而诱导对异物的吞噬(调理作用)和炎症反应及包围作用;(2)凝集素促进吞噬细胞活化,使细胞在吞噬异物的过程中释放活性氧和各种溶酶体酶,将其杀灭和降解^[15]。鉴于凝集素和凝集活力在机体免疫中的特殊作用,所以,目前许多学者将动物血细胞或血清凝集活力作为衡量机体免疫水平的一项定量指标。

李太武等^[16]观察到皱纹盘鲍的血淋巴液可与河流弧菌产生环状沉淀,即凝集反应;本研究发现鲍血清可凝集人、兔和鲤的红细胞,其中对人(B型)的凝集活力最高,这与 Margherita^[17]发现,股贻贝(*Perna perna*)的血清可以凝集多种哺乳动物的红细

胞,其中对人红细胞的凝集活力较强,而对绵羊红细胞的凝集活力较弱是一致的。杨军等^[18]发现,圆背角无齿蚌(*Anodonta woodiana pacifica*)的血细胞对经过和未经过血清处理的鸡红细胞均不能吞噬,而能吞噬大肠杆菌。

GLP1、GLP2、LPS 和 YP 对鲍血清的凝集活力表明,在相近质量浓度下,急性处理可以增强血清凝集活力,而孵育处理则有抑制作用。其原因可能是鲍血清凝集素表面的糖基结合位点与糖之间的亲和性使血清凝集素与红细胞结合的机会减少,导致血清凝集活力下降。

用 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 GLP2 和 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 LPS,浸泡或注射都可以增强鲍血清凝集活力。虽然注射的效果强于浸泡,但工作量大,对鲍的应激刺激大,在养殖生产中难以采用。而用药浴浸泡、喷淋或制成口服药饵在生产实践中易于掌握、采用和推广。

糖类(包括多糖、葡聚糖、寡糖等)、某些蛋白、酶类、多肽以及维生素等物质,作为免疫增强剂,在水产养殖动物中已广为应用。这些免疫增强剂的功能是多方面的,大致包括:在甲壳动物中,可活化血淋巴中的吞噬细胞,提高吞噬病原的能力;刺激血淋巴中抗菌、溶菌活力的产生或升高;激活酚氧化酶原系统产生识别信号及介导吞噬等。在鱼类中,可激活嗜中性粒细胞及质细胞的吞噬作用;激活淋巴细胞产生或分泌淋巴因子以协调体液免疫和细胞免疫;刺激抗体的产生和补体的生成等。本实验表明,灵芝多糖、脂多糖和酵母多糖能增强巨噬细胞的吞噬作用,加强体液免疫,提高鲍血清凝集活力,可作免疫增强剂。

参考文献:

- [1] 江晓路,刘树清,牟海津,等.真菌多糖对中国对虾血清及淋巴细胞免疫活性的影响[J].动物学研究,1999,20(1):41-45.
- [2] 江晓路,刘树清,张朝晖,等.多糖对中国对虾免疫功能的影响[J].中国水产科学,1999,6(1):66-68.
- [3] 陈皓文,孙玉真,宋庆云.外源凝集素-水产动物御敌的兵器[J].黄渤海海洋,1995,13(3):61-70.
- [4] 刘恒,李光友.免疫多糖对养殖南美白对虾作用的影响[J].海洋与湖沼,1998,20(2):113-118.
- [5] Takahashi Y, Kondo M, Itami T, et al. Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kurama shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharides (LPS) [J]. Fish Shellfish Immun, 2000, 10: 555-558.
- [6] Chang C F, Chen H Y, Su M S, et al. Immunomodulation by dietary β -1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Fish Shellfish Immun, 2000, 10: 505-514.
- [7] Sung H H, Kuo P K, Kao W Y. Effect of lipopolysaccharide on in vitro phagocytosis by hemocytes from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) [J]. Fish Path, 2000, 35(3):109-116.
- [8] 罗日祥.中药制剂对中国对虾免疫活性物的诱导作用[J].海洋与湖沼,1997,28(6):573-578.
- [9] Sung, H H, Yang Y L, Song Y L. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation [J]. J of Crust Bio, 1996, 16(2):278-284.
- [10] 孙虎山,李光友.脂多糖对栉孔扇贝血清和血细胞中7种酶活力的影响[J].海洋科学,1999,4:54-58.
- [11] 孙虎山,李光友.脂多糖和酵母多糖对栉孔扇贝血淋巴中二种抗氧化酶活力的影响[J].中国海洋药物,2000,5:20-23.
- [12] 莫照兰,李会荣,俞勇,等.细菌糖蛋白对蟹虾免疫因子的影响[J].中国水产科学,2000,7(3):28-32.
- [13] 张峰,李光友,张培军.皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的研究[J].中国水产科学,1999,6(3):37-39.
- [14] 高健,李跃华.甲壳类的体液免疫因子及其环境作用[J].水产养殖,1992,6:21-23.
- [15] 神谷久男.海产无脊椎动物淋巴液植物凝集素与机体防御[J].鱼类病害研究,1998,20(3-4):58-69.
- [16] 李太武,丁明进,相建海,等.皱纹盘鲍对河流弧菌-Ⅱ疫苗免疫的研究[J].海洋与湖沼,1997,28(1):27-31.
- [17] Margherita A B, Iguel D M, Medeiros, et al. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna* [J]. Fish & Shellfish Immun, 1999, 9: 387-404.
- [18] 杨军,邱安东,石安静.圆背角无齿蚌血细胞吞噬作用的研究[J].动物学杂志,1999,34(6):5-8.

Influence of four polysaccharides on lymphatic phagocytosis in abalone *Haliotis discus hannai* Ino

ZHANG Jian-cheng, ZHANG Feng, WANG Ji-qiao

(Key Laboratory of Marine Aquaculture Ecology and Biotechnology, Ministry of Agriculture; School of Life Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: Up to now, some polysaccharides, such as alga polysaccharide PV911, *Cordyceps militaris* polysaccharide (CP), lection, IPV, *Pantoea agglomerans*, LPS and plant extraction, have been used to enhance the immunity of shrimps and shellfish. In this experiment, glycolipid 1 (GLP1), glycolipid 2 (GLP2), lipopolysaccharides (LPS) and polysaccharides (YP, from yeast) were used to the *Haliotis discus hannai* to determine their effects on production of reactive oxygen species (ROS) in the abalone haemocyte and agglutinating activity in lymphatic phagocytosis by chemiluminescence immunoassay (luminiol). The designed concentrations of the four polysaccharides were 0, 1.0, 5.0, 10, 50, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$. The yeast solution was prepared at 10^8 cell/mL. Meanwhile, the effects on immunity in abalone were compared between two administrations—immersion and injection. In the immersion, the water temperature was $(20.0 \pm 3)^\circ\text{C}$ and salinity was 30 ± 1.5 . The body length of the sample *H. discus hannai* was (6.0 ± 0.4) cm and body weight (35.0 ± 2.4) g ($n=30$). The results show that the four polysaccharides can increase ROS production and agglutinating activity and the increasing level follows the order $\text{GLP 2} > \text{GLP 1} > \text{LPS} > \text{YP}$ from yeast. The optimal concentration of GLP 2 and LPS for ROS production and agglutinating activity in the non-cultured treatments (tested right after the mixing) was 50 $\mu\text{g/mL}$ and 10 $\mu\text{g/mL}$, respectively. For the same polysaccharide, ROS production and agglutinating activity in the non-cultured treatments were significantly higher than those in cultured treatments (tested one hour after the mixing, $P < 0.05$). The chemiluminescence immunoassay of the haemocyte and agglutinating activity in lymphatic phagocytosis in the abalones immersed and injected with GLP2 (50 $\mu\text{g/mL}$) and LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) indicated that there were significantly higher rate in ROS production and agglutinating activity in injected abalones than those in immersed ones at the water temperature of $(20.0 \pm 2)^\circ\text{C}$ and salinity of 28.0 ± 1.5 . For the sake of practices, however, the administration of immersion is safe and feasible.

Key words: *Haliotis discus hannai* Ino; haemocyte; ROS; polysaccharide; agglutinating activity

Corresponding author: WANG Ji-qiao. E-mail: Hothawk@yeah.net

* This study is supported by Agriculture Technology R & D Program of Science and Technology Department of Liaoning Province (No. 2001203001).