

# 嗜水气单胞菌脂多糖及绣球菌多糖对泥鳅免疫功能及消化功能的影响

刘成荣<sup>1</sup>, 陈振平<sup>1</sup>, 张之文<sup>2</sup>

(1. 莆田学院 环境与生命科学系 福建 莆田 351100; 2. 厦门大学 海洋与环境学院 福建 厦门 361005)

**摘要:**以灭活的嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 脂多糖和绣球菌 (*Sparasis crispa*) 多糖作为免疫增强剂, 对接种免疫后的泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*) 进行抗氧化性能、免疫功能及消化功能等指标进行测定。结果表明: 嗜水气单胞菌脂多糖和绣球菌多糖不仅可以提高泥鳅的抗氧化性能和免疫功能, 而且可以增强泥鳅的消化功能, 质量浓度为 1 g/L 的灭活嗜水气单胞菌脂多糖和 9 g/L 的绣球菌多糖对泥鳅的作用效果较明显, 能较明显地提高泥鳅抗氧化性能、免疫功能及消化功能, 与注射灭活的嗜水气单胞菌脂多糖相比, 9 g/L 绣球菌多糖对泥鳅的作用时间更持久。

**关键词:**泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*); 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 脂多糖; 绣球菌 (*Sparasis crispa*) 多糖; 抗氧化性能; 免疫功能; 消化功能

中图分类号: Q959.4; Q953

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)12-0001-09

鱼类的抗氧化性能、免疫功能及消化功能与机体的新陈代谢、生理状况息息相关, 三者相结合可用于评价鱼体健康状况及其对环境的适应能力<sup>[1]</sup>。

在水产养殖生产中, 抗生素药物主要用于治疗水产动物细菌性疾病, 但是滥用抗生素能引起水产动物病原菌产生耐药性, 不仅使动物疾病的治疗越来越困难, 而且还会导致出现公共卫生安全的潜在威胁。因此探索其他更安全有效的防治方法迫在眉睫<sup>[2]</sup>。大量的研究结果表明, 利用免疫接种技术可有效预防鱼类细菌性疾病, 该方法现已成为国内外学者进行水产养殖动物疾病防治的重要途径<sup>[3,4]</sup>。嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 是水产动物的主要致病菌之一, 能引起水产动物出现多种病理症状, 嗜水气单胞菌脂多糖是位于细菌细胞壁外膜的一种由类脂和多糖链组成的物质, 具有毒性和免疫学活性<sup>[5]</sup>。给鳊鱼 (*Pleurocetes platessa*) 注射嗜水气单胞菌脂多糖可增强其巨噬细胞活性<sup>[6]</sup>; Neumann<sup>[7]</sup> 则发现给金鱼服用嗜水气单胞菌脂多糖可增强其巨噬细胞活性。陈昌福等<sup>[8]</sup> 研究证明柱状嗜纤维菌 (*Cytophaga columnaris* Garjobs), 嗜水气单胞菌、鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 3 种致病菌的粗脂多糖使异育银鲫 (*Allogenyetics silver Crucian carp*) 吞噬细胞吞噬活性明显上升, 对活菌攻毒有较强的免疫保护力; 刘勇<sup>[9]</sup> 研究表明柱状嗜纤维菌、嗜水气单胞菌和叉尾鲷爱德华菌 (*Edwardsiella ictaluri*) 3 种鱼类病原菌粗脂多糖使鱼类头肾、血液的吞噬细胞对吞噬原的吞噬活性和对病原菌的吞噬作用有明显上升; 潘金培<sup>[10]</sup> 等通过实验证明嗜水气单胞菌脂多糖

对真鲷 (*Pagrus major*) 的免疫保护率最高可达 90%, 浓度越高, 免疫保护性越高。真菌多糖是一类重要的免疫增强剂, 能提高水产动物的免疫力和抗氧化能力, 增加机体应激能力, 提高动物生产性能<sup>[11,12]</sup>, 白东清等<sup>[13]</sup> 在饲料中添加 LYCD (活酵母衍生物) 喂养丁鲷 (*Tinca tinca*), 试验组的溶菌酶活性极显著地高于对照组; Sung<sup>[14]</sup> 等发现斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 经酵母葡聚糖溶液浸泡后能增加对创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 的抵抗力; Nikl 等曾报道银大麻哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*) 注射或口服来自裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) 的葡聚糖 (VST) 后能增强对杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 的抵抗力; 绣球菌 (*Sparasis crispa*) 多糖是一类重要的食、药用菌多糖, 对人体有许多生理作用<sup>[15-21]</sup>, 但还没有在水产养殖方面得到应用。

朱越雄<sup>[22]</sup> 认为高浓度大肠杆菌感染罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 后会导致超氧化物歧化酶 (SOD) 活力和过氧化氢酶 (CAT) 活力在较大程度上偏离正常值, 并导致酶活动态变化趋势的差异。说明 SOD 和 CAT 活力的高低可以从一个侧面反映出机体的免疫状况; 王高学<sup>[23]</sup> 用添加云芝 (*Coriolus versicolor*) 多糖 400, 500 和 600 mg/kg 的药饵

收稿日期: 2008-10-10; 修回日期: 2008-10-17

基金项目: 福建省教育厅科研基金项目 (JA07165)

作者简介: 刘成荣 (1964), 男, 副教授, 福建莆田人, 从事水产动物病害防治及食、药用菌生物技术方面研究, E-mail: ptular@sina.com

饲喂鲫鱼后鲫鱼的 SOD 活力与对照组相比存在极显著性差异( $P < 0.01$ )。

消化酶活性的提高,可以促进鱼类对营养物质的消化吸收,进而促进鱼类的生长,陈勇<sup>[24]</sup>、肖明松<sup>[25]</sup>等分别进行异育银鲫消化酶活力的研究。但他们均未对泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)的抗氧化性能、免疫功能及消化功能的问题进行研究,嗜水气单胞菌脂多糖和绣球菌多糖对泥鳅抗氧化性能、免疫功能及消化功能的影响国内外未见报道,通过该项目的研究,希望为鱼类的快速养殖及其病虫害的防治提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

2,3,5-三苯基、四氮唑、L-甲硫氨酸、2-硫代巴比妥酸、柠檬酸、氢氧化钠、碘化钾、磷酸二氢钾、愈创木酚均为国产分析纯试剂;嗜水气单胞菌、绣球菌由莆田学院环境与生命科学系微生物实验室提供;泥鳅购至福建莆田市城厢市场。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 试验方 法

嗜水气单胞菌脂多糖采用 Wesphal 等<sup>[28]</sup>的热酚法提取,绣球菌胞外多糖的提取参照文献[26,27]进行。

用普通金鱼饲料驯养泥鳅,3 d 换水一次,驯养 6 d,确认无疾病症状后,开始试验,将驯养后的泥鳅分为 11 组,每组 28 尾,在泥鳅腹腔进行注射,注射生理盐水 0.1 mL 的一组为对照组,注射质量浓度分别为 0.2,0.5,1,2,5 和 10 g/L 的嗜水气单胞菌脂多糖各 0.1 mL 共 6 组,注射质量浓度分别为 3,6,9 和 15 g/L 的绣球菌多糖各 0.1 mL。

#### 1.2.2 测定方 法

在注射后的第 8 天、第 15 天、第 21 天、第 28 天、第 36 天进行相关指标的测定,每次每组测定 3 尾。测定指标有:CAT 活力、丙二醛(MDA)浓度、SOD 活力、溶菌酶活力、淀粉酶活力及蛋白酶活力。不同指标的测定部位见表 1。

表 1 各指标的测定部位

Tab. 1 The index of test

指 标	测定部位
CAT 活力	血液
MDA 浓度	肝胰脏、肌肉
SOD 活力	血液、肌肉
溶菌酶活力	血液
淀粉酶活力	胃肠道
蛋白酶活力	胃肠道

取鲜活泥鳅血液 50  $\mu$ L,移入 1 mL 生理盐水中,4 $^{\circ}$ C 静置 30 min,分离血清备用。

取 0.5~1.0 g 新鲜组织(如胃、肠、肝胰脏、腮、肌肉等),剪碎,加入 2 mL 生理盐水,充分研磨,0~4 $^{\circ}$ C 浸提 1~2 h 后,14 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,取上清,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保藏备用。

#### 1.2.2.1 CAT 活力的测定

方法为愈创木酚法<sup>[29,30]</sup>。

#### 1.2.2.2 MDA 浓度的测定

实验管(酶液 1.5 mL)和对照试管(生理盐水 1.5 mL)分别加入 1.5 mL 0.6% TBA(硫代巴比妥酸),混匀,沸水浴反应 15 min 后,迅速冷却,离心(11 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min),取上清,分别测定其在 450,532,600 nm 的光密度即  $A_{450}$ ,  $A_{532}$ ,  $A_{600}$ 。

#### 1.2.2.3 SOD 活力的测定

用直接测定法测定 SOD 活力。

表 2 测定 SOD 活力所需的药品和剂量

Tab. 2 The contents of drug measuring the SOD activities

序号	试剂名称	剂量 (mL)
1	0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8)	4.05
2	220 mmol/L 甲硫氨酸(Met)溶液(现配)	0.3
3	1.25 mmol/L 2,3,5-三苯基四氮唑溶液(现配)	0.3
4	0.033 mmol/L 核黄素溶液	0.3
5	酶液	0.05

将以上试剂依次按量加入试管中,混匀。取 2 只烧杯,1 只对照烧杯置于暗处,另 1 只对照烧杯和样品一起置于 4 000 lx 日光灯下反应 20 min(要求各管受光一致,温度高时时间缩短,温度低时适当延长)。测定反应液在 560 nm 处的光密度。以不照光的对照烧杯做参比,分别测定其他各管的光密度值。

#### 1.2.2.4 溶菌酶活性和胃蛋白酶活力的测定

参照采用《酶法分析手册》<sup>[31]</sup>略作改动和《生化技术导论》<sup>[32]</sup>的 Folin 酚试剂法。

#### 1.2.2.5 淀粉酶活力的测定

首先在试验管中加入淀粉应用液 0.5 mL,再加入胃肠道上清液 0.1 mL,而向对照试管中加入 0.1 mL 生理盐水,混匀,30 $^{\circ}$ C 水浴预热 15 min,每根试管中依次加入 1 mol/L HCl 0.3 mL、碘应用液 0.2 mL,混匀,30 $^{\circ}$ C 水浴保温 15 min 后,加入 4 mL 蒸馏水,混匀,最后以蒸馏水调零,测定在波长为 660 nm 的光密度  $A_{660}$ 。

#### 1.2.2.6 数据处理

用最小显著极差法(LSD)进行试验数据的统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 两种多糖对泥鳅血液 CAT 活力的影响

从图 1a 可看出, 在第 8 天~ 第 15 天时, 经各试验组嗜水气单胞菌脂多糖免疫后的泥鳅血液中的 CAT 活力极显著地高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 注射质量浓度为 1 g/L 的嗜水气单胞菌脂多糖的泥鳅血液的 CAT 活力显著高于注射该脂多糖的其他试验组 ( $P < 0.05$ ), 在第 15 天时免疫后的泥鳅血液的 CAT 活力达到最高, 为 0.16 U, 泥鳅血液 CAT 活力在第 15 天后就有下降的趋势; 从图 1b 可看出, 注射各质量浓度的绣球菌多糖后, 在第 8 天~ 第 21 天时泥鳅血液中的 CAT 活力极显著地高于对照组 ( $P <$

0.01), 但各试验组间的泥鳅血液 CAT 活力差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 在第 28 天时, 用质量浓度为 9 g/L 和 15 g/L 的绣球菌多糖免疫后的泥鳅其血液中的 CAT 活力极显著地高于对照组也极显著地高于绣球菌多糖的其他试验组 ( $P < 0.01$ ), 为了考虑成本, 选择质量浓度为 9 g/L 的绣球菌多糖为最适浓度, 绣球菌多糖产生的效果更加持久, 由上述可以看出, 在注射后的第 8 天~ 第 15 天时, 嗜水气单胞菌脂多糖对泥鳅血液 CAT 活力有极显著的增强作用 ( $P < 0.01$ ), 其中最适质量浓度为 1 g/L; 绣球菌多糖对泥鳅血液 CAT 酶活力也有极显著的增强作用 ( $P < 0.01$ ), 在第 21 天~ 第 28 天时, 以质量浓度为 9 g/L 的效果最好。

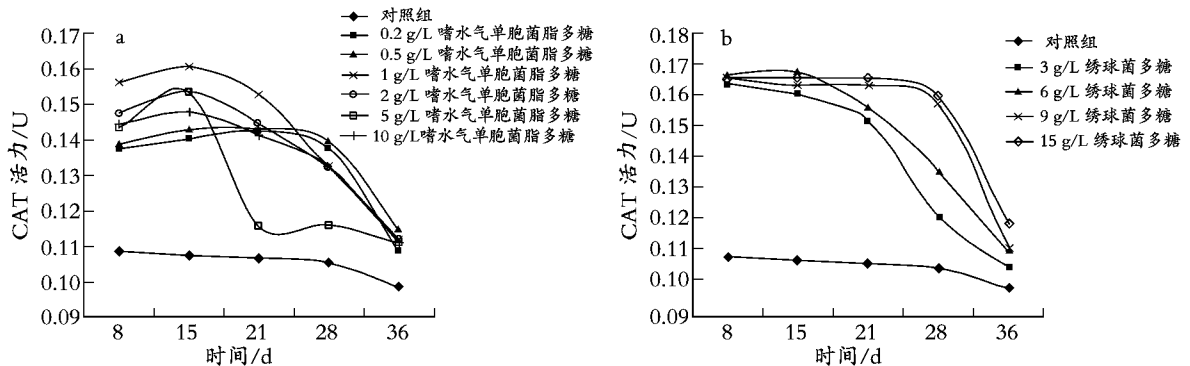


图 1 两种多糖对泥鳅血液 CAT 活力的影响

Fig. 1 Influence of 2 species of polysaccharide on the catalase (CAT) activity in the blood of loach

a. 嗜水气单胞菌脂多糖对泥鳅血液 CAT 活力的影响; b. 绣球菌多糖对泥鳅血液 CAT 活力的影响

a. Influence of *Aeromonas hydrophila* lipopolysaccharide on the CAT activity in the blood of loach; b. Influence of *Spargis crispus* polysaccharide on the CAT activity in the blood of loach

### 2.2 两种多糖对泥鳅 MDA 浓度的影响

从图 2a 可看出, 用质量浓度为 2.0, 10 g/L 的嗜水气单胞菌脂多糖注射泥鳅后, 在第 21 天时泥鳅肝胰脏 MDA 浓度高度显著地低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 其中质量浓度为 2.0 g/L 嗜水气单胞菌脂多糖免疫泥鳅后, 泥鳅肝胰脏中 MDA 浓度降到 1.4  $\mu\text{mol/L}$ , 第 21 天时 2.0, 10 g/L 嗜水气单胞菌脂多糖免疫后的泥鳅肝胰脏 MDA 浓度差异不明显 ( $P > 0.05$ , 为考虑成本, 以 2.0 g/L 的为最佳), 但分别显著低于质量浓度为 0.2 g/L 的试验组 ( $P < 0.05$ )。从图 2b 可看出, 用各质量浓度的嗜水气单胞菌脂多糖免疫泥鳅后, 在第 21 天时泥鳅肌肉 MDA 浓度都极显著地低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 用质量浓度为 0.2, 10 g/L 的嗜水气单胞菌脂多糖免疫泥鳅后, 泥鳅肌肉 MDA 浓度分别显著地低于用其他质量浓度嗜水气单胞菌脂多糖免疫的泥鳅肌肉 MDA 浓度 ( $P < 0.05$ ), 除质量浓度为 0.2, 10, 2 g/L 外, 其他试验组的嗜水气单胞菌

脂多糖免疫后的泥鳅肌肉 MDA 浓度间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。从图 2c 可看出, 质量浓度为 9 g/L 的绣球菌多糖免疫泥鳅后, 泥鳅肝胰脏 MDA 浓度极显著地低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 用质量浓度为 6 g/L 绣球菌多糖免疫泥鳅后, 泥鳅肝胰脏 MDA 浓度显著地低于对照组的泥鳅肝胰脏 MDA 浓度 ( $P < 0.05$ ), 但用质量浓度为 15 g/L 的绣球菌多糖免疫的泥鳅肝胰脏 MDA 浓度与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 用质量浓度为 9 g/L 的绣球菌多糖免疫泥鳅后, 泥鳅肝胰脏 MDA 浓度显著地低于质量浓度为 15 g/L 绣球菌多糖免疫的泥鳅肝胰脏 MDA 浓度 ( $P < 0.05$ ), 用质量浓度为 6 g/L 和 9 g/L 绣球菌多糖对泥鳅肝胰脏 MDA 差异不显著 ( $P > 0.05$ )。从图 2d 可看出, 分别用质量浓度为 9, 15 g/L 绣球菌多糖免疫泥鳅后, 泥鳅肌肉 MDA 浓度都极显著地低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 用质量浓度为 6, 3 g/L 绣球菌多糖免疫泥鳅, 泥鳅肌肉 MDA 浓度与对照组差异不显

著( $P > 0.05$ ), 用质量浓度为 9, 15 g/L 绣球菌多糖分别免疫泥鳅其肌肉 MDA 浓度均极显著地低于用质量浓度为 3, 6 g/L 绣球菌多糖分别免疫泥鳅后的泥鳅肌肉 MDA 浓度( $P < 0.01$ )。嗜水气单胞菌脂多糖和绣球菌多糖均可降低泥鳅肝胰脏及肌肉中的

MDA 浓度, 其中嗜水气单胞菌脂多糖的效果比较好。在图 2 中可以看出, 泥鳅肝胰脏中的 MDA 浓度在第 21 天有所回落, 而此时肌肉中 MDA 的浓度达到最大, 泥鳅肝胰脏中的 MDA 与其血液中的 MDA 呈现负相关关系。

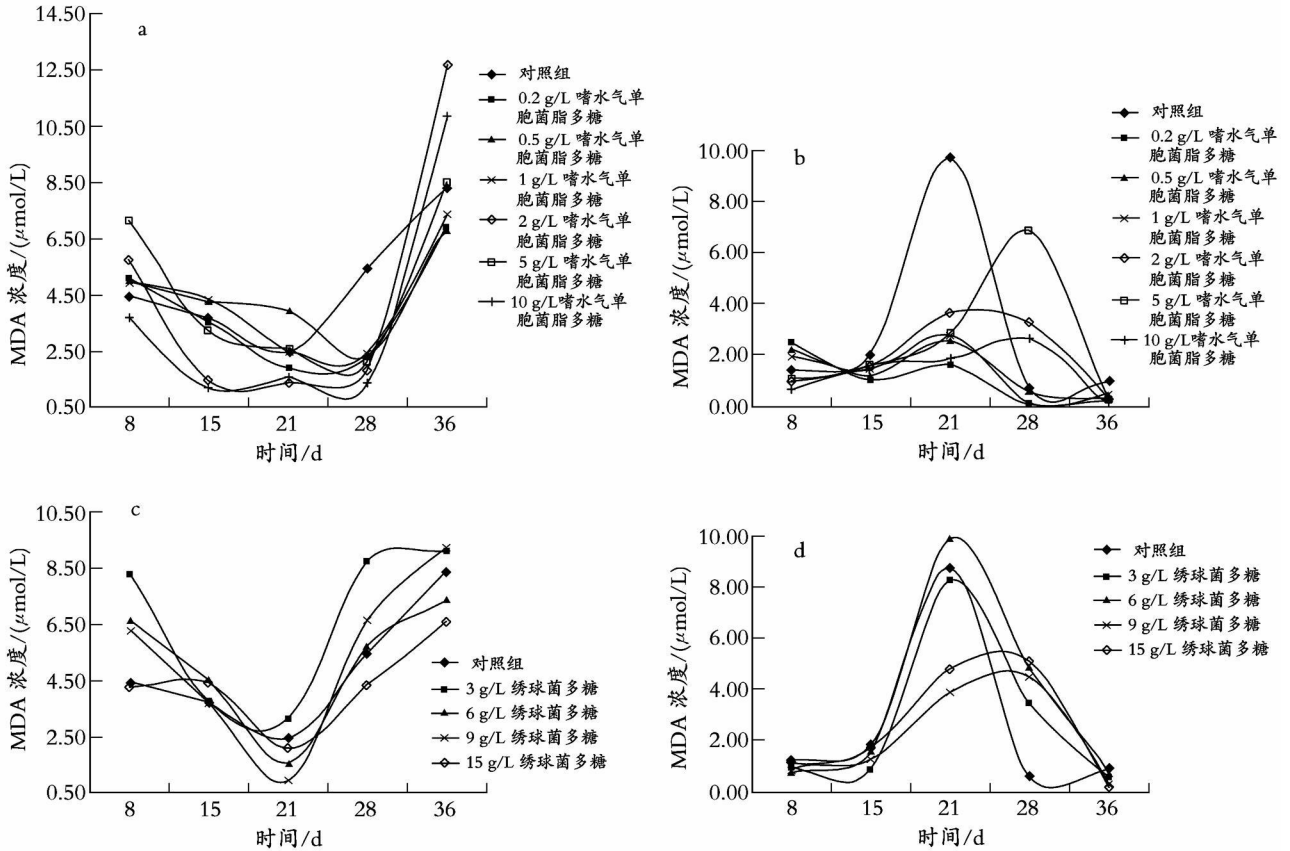


图 2 两种多糖对泥鳅 MDA 浓度的影响

Fig. 2 Influence of 2 species of polysaccharide on the content of malondialdehyde (MDA) in loach

a. 嗜水气单胞菌脂多糖对泥鳅肝胰脏 MDA 浓度的影响; b. 嗜水气单胞菌脂多糖对泥鳅肌肉 MDA 浓度的影响; c. 绣球菌多糖对泥鳅肝胰脏 MDA 浓度的影响; d. 绣球菌多糖对泥鳅肌肉 MDA 浓度的影响

a. Influence of *A. hydrophila* lipopolysaccharide on the content of MDA in the hepatopancreas of loach; b. Influence of *A. hydrophila* lipopolysaccharide on the content of MDA in the muscle of loach; c. Influence of *S. crispus* polysaccharide on the content of MDA in the hepatopancreas of loach; d. Influence of *S. crispus* polysaccharide on the content of MDA in the muscle of loach

### 2.3 两种多糖对泥鳅血液和肌肉中 SOD 活力的影响

从图 3a 可以看出, 在第 15 天时, 当嗜水气单胞菌脂多糖质量浓度小于 1 g/L 时, 免疫后的泥鳅血液 SOD 活力与对照组差异不显著( $P > 0.05$ ), 当嗜水气单胞菌脂多糖质量浓度达到 2 g/L 时, 免疫后的泥鳅血液 SOD 活力在第 15 天时达到最高(为 17 U/mg), 极显著地高于对照组( $P < 0.01$ ), 而用质量浓度为 1 g/L 的嗜水气单胞菌脂多糖免疫后的泥鳅其血液 SOD 活力影响比较持久。相对于对照组, 质量浓度为 0.2, 0.5 g/L 的嗜水气单胞菌脂多糖对泥鳅血液 SOD 活力影响不显著( $P > 0.05$ )。从图

3b 可以看出, 注射嗜水气单胞菌脂多糖后, 泥鳅肌肉的 SOD 活力是逐渐增强的, 在第 24 天~ 第 28 天时泥鳅肌肉的 SOD 活力都达到最高, 其中用质量浓度为 1 g/L 的嗜水气单胞菌脂多糖免疫后, 在第 21 天和第 28 天时泥鳅肌肉 SOD 活力均极显著地高于对照组( $P < 0.01$ ), 在第 15 天时, 除质量浓度为 0.2 g/L 的试验组外, 用质量浓度为 1, 2 g/L 的嗜水气单胞菌脂多糖免疫后的泥鳅肌肉 SOD 活力均显著地高于其他试验组( $P < 0.05$ )。从图 3c 可以看出, 绣球菌多糖对泥鳅血液 SOD 的影响, 与嗜水气单胞菌脂多糖一样, 存在一个逐渐增强然后降低的趋势, 绣球菌多糖各试验组免疫的泥鳅血液 SOD 活力均极显著

地高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 经质量浓度为 9.0 g/L 的绣球菌多糖免疫后的泥鳅血液 SOD 活力在第 15 天时显著高于其他绣球菌多糖试验组 ( $P < 0.05$ ), 其 SOD 活力达到 22 U/mg, 但绣球菌多糖其他试验组间免疫的泥鳅血液 SOD 活力差异不显著 ( $P > 0.05$ )。从图 3d 可以看出, 在试验的整个过程, 各质量浓度的绣球菌多糖免疫的泥鳅肌肉 SOD 活力均极显著地高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 在第 21 天~ 第 28 天时, 用质量浓度为 3 g/L 和 6 g/L 的绣球菌多糖免疫

后的泥鳅肌肉 SOD 活力均显著地高于用 9.0 g/L 和 15 g/L 的绣球菌多糖免疫后的各试验组 ( $P < 0.05$ ), 但在第 8 天~ 第 15 天用绣球菌多糖免疫的各试验组的泥鳅肌肉 SOD 酶活力差异不显著 ( $P > 0.05$ )。由上述可知, 在一定的时间范围内, 1 g/L 嗜水气单胞菌脂多糖能较显著地提高泥鳅肌肉 SOD 活力, 质量浓度为 9.0 g/L 的绣球菌多糖能较显著地提高泥鳅血液 SOD 活力。

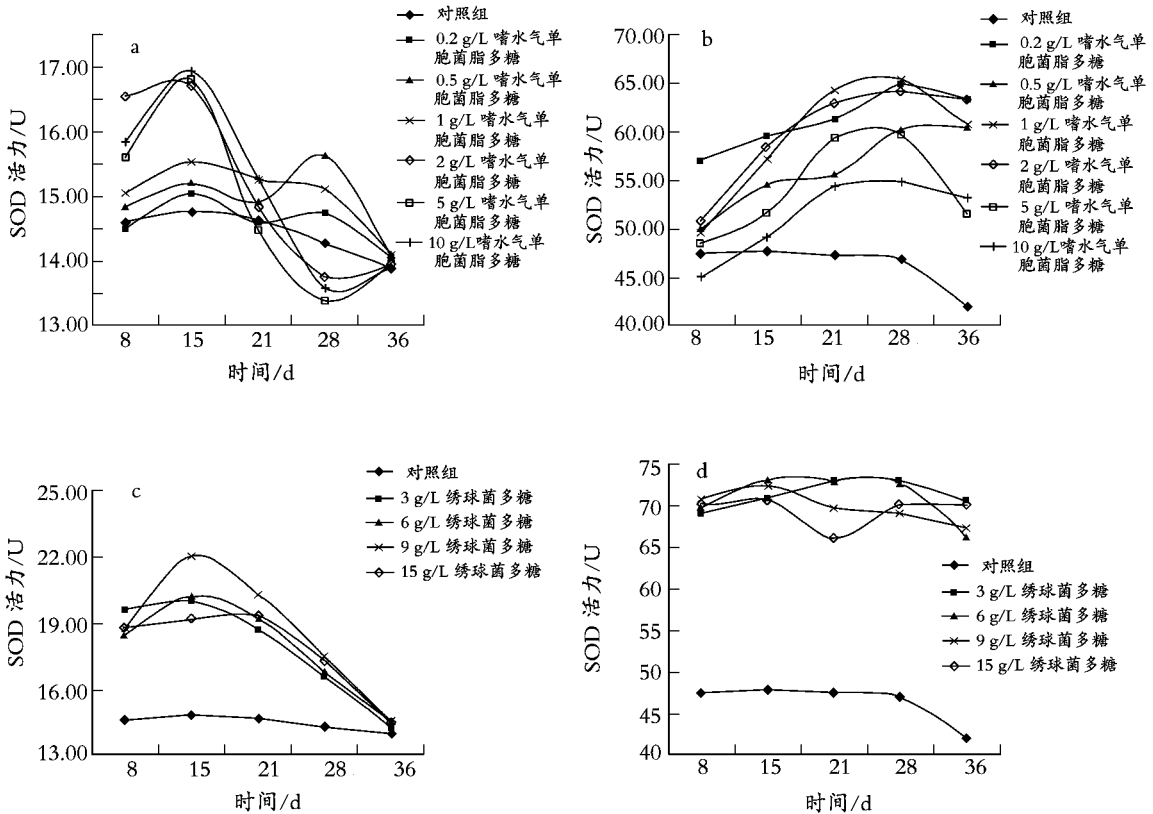


图 3 两种多糖对泥鳅血液和肌肉 SOD 活力的影响

Fig. 3 Influence of 2 species of polysaccharide on the superoxide dismutase (SOD) activity in the blood and muscle of loach

a. 嗜水气单胞菌脂多糖对泥鳅血液 SOD 活力的影响; b. 嗜水气单胞菌脂多糖对泥鳅肌肉 SOD 活力的影响; c. 绣球菌多糖对泥鳅血液 SOD 活力的影响; d. 绣球菌多糖对泥鳅肌肉 SOD 活力的影响

a. Influence of *A. hydrophila* lipopolysaccharide on the SOD activity in the blood of loach; b. Influence of *A. hydrophila* lipopolysaccharide on the SOD activity in the muscle of loach; c. Influence of *S. crispus* polysaccharide on the SOD activity in the blood of loach; d. Influence of *S. crispus* polysaccharide on the SOD activity in the muscle of loach

## 2.4 两种多糖对泥鳅血液溶菌酶活力的影响

由图 4a 可以看出, 各质量浓度嗜水气单胞菌脂多糖免疫的泥鳅血液溶菌酶活力与对照组的泥鳅血液溶菌酶活力差异不显著 ( $P > 0.05$ )。由图 4b 可以看出, 绣球菌多糖增强了溶菌酶活力, 在第 8 天~ 第 15 天时各质量浓度绣球菌多糖免疫的泥鳅血液溶菌酶活力极显著地高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 在第 21 天

时, 质量浓度为 9 g/L 绣球菌多糖免疫的泥鳅血液溶菌酶活力为 0.04 U, 显著高于其他试验组的泥鳅血液溶菌酶活力 ( $P < 0.05$ ), 到第 28 天之后各质量浓度绣球菌多糖免疫的泥鳅血液溶菌酶活力都表现出下降的趋势。由上述可看出, 质量浓度为 9 g/L 绣球菌多糖对提高泥鳅血液溶菌酶活力的效果最佳。

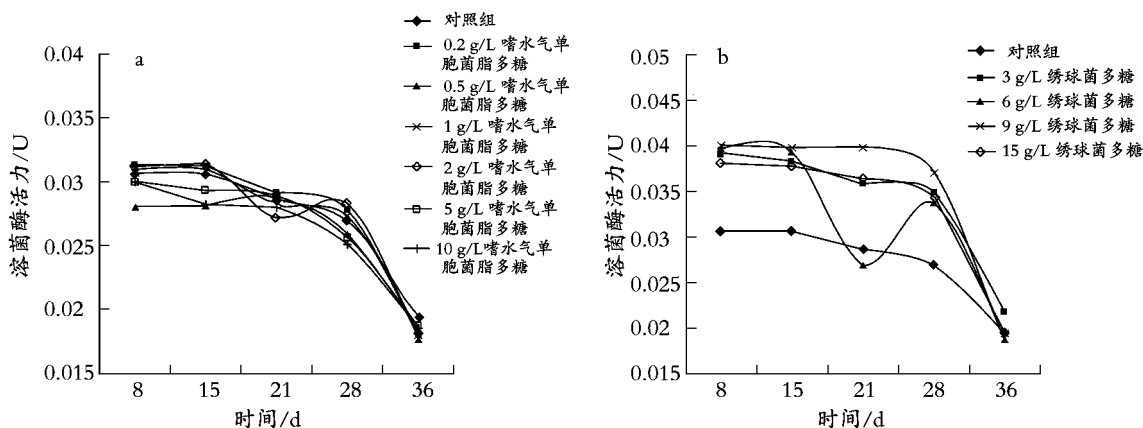


图 4 两种多糖对泥鳅血液溶菌酶活力的影响

Fig. 4 Influence of 2 species of polysaccharide on the activity of lysozyme in the blood of loach

a. 嗜水气单胞菌脂多糖对泥鳅血液溶菌酶活力的影响; b. 绣球菌多糖对泥鳅血液溶菌酶活力的影响

a. Influence of *A. hydrophila* lipopolysaccharide on the activity of lysozyme in the blood of loach; b. Influence of *S. crispus* polysaccharide on the activity of lysozyme in the blood of loach

## 2.5 两种多糖对泥鳅胃肠道淀粉酶活力的影响

由图 5a 可以看出, 各质量浓度的嗜水气单胞菌脂多糖对泥鳅胃肠道淀粉酶活力的影响不同, 其中在第 21 天~ 第 28 天时, 质量浓度为 1 g/L 的嗜水气单胞菌脂多糖免疫的泥鳅胃肠道淀粉酶活力显著地高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 第 15 天时, 该质量浓度嗜水气单胞菌脂多糖免疫的泥鳅胃肠道淀粉酶活力达到最高, 为 17 U/mg, 除质量浓度为 10, 0.2 g/L 的嗜水气单胞菌脂多糖对泥鳅胃肠道淀粉酶活力的提高有负影响外, 其他质量浓度的嗜水气单胞菌脂多糖免疫

的泥鳅胃肠道淀粉酶活力与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。从图 5b 可以看出, 除 15 g/L 绣球菌多糖对泥鳅胃肠道淀粉酶活力的提高有负面影响外, 在第 18 天~ 第 21 天时, 其他质量浓度绣球菌多糖免疫的泥鳅胃肠道淀粉酶活力极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 在第 8 天时, 注射质量浓度为 9.0 g/L 的绣球菌多糖, 泥鳅胃肠道淀粉酶活力为 18.6 U, 显著地高于对照组 ( $P < 0.05$ )。由上述可看出, 在不同时间, 质量浓度为 1 g/L 的嗜水气单胞菌脂多糖和 9.0 g/L 的绣球菌多糖可较显著提高泥鳅胃肠道淀粉酶活力。

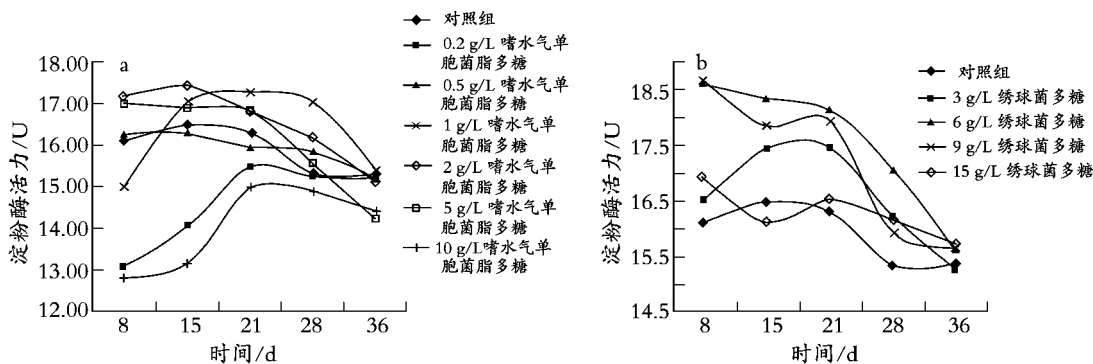


图 5 两种多糖对泥鳅胃肠道淀粉酶活力的影响

Fig. 5 Influence of 2 species of polysaccharide on the activity of amylase in the gastrointestinal tract of loach

a. 嗜水气单胞菌脂多糖对泥鳅胃肠道淀粉酶活力的影响; b. 绣球菌多糖对泥鳅胃肠道淀粉酶活力的影响

a. Influence of *A. hydrophila* lipopolysaccharide on the activity of amylase in the gastrointestinal tract of loach; b. Influence of *S. crispus* polysaccharide on the activity of amylase in the gastrointestinal tract of loach

## 2.6 两种多糖对泥鳅胃肠道蛋白酶活力的影响

从图 6a 可以看出, 在嗜水气单胞菌脂多糖试验组中, 质量浓度为 1 g/L 的嗜水气单胞菌脂多糖免疫的泥鳅胃肠道蛋白酶活力在第 15 天时达到最高,

为 0.39 U/mL, 极显著地高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 其他质量浓度的嗜水气单胞菌脂多糖免疫的泥鳅胃肠道蛋白酶活力与对照组差异不显著 ( $P > 0.05$ )。从图 6b 可以看出, 在第 15 天时, 质量浓度为 9 g/L 的

绣球菌多糖对提高泥鳅胃肠道蛋白酶活力的效果最佳,该质量浓度的绣球菌多糖免疫的泥鳅胃肠道蛋白酶活力为 0.46 U,显著高于经质量浓度为 6 g/L 的绣球菌多糖免疫的泥鳅胃肠道蛋白酶活力 ( $P <$

0.05),也极显著地高于此时对照组。由此可看出,1 g/L 的嗜水气单胞菌脂多糖和 9 g/L 的绣球菌多糖可显著提高泥鳅胃肠道蛋白酶活力。

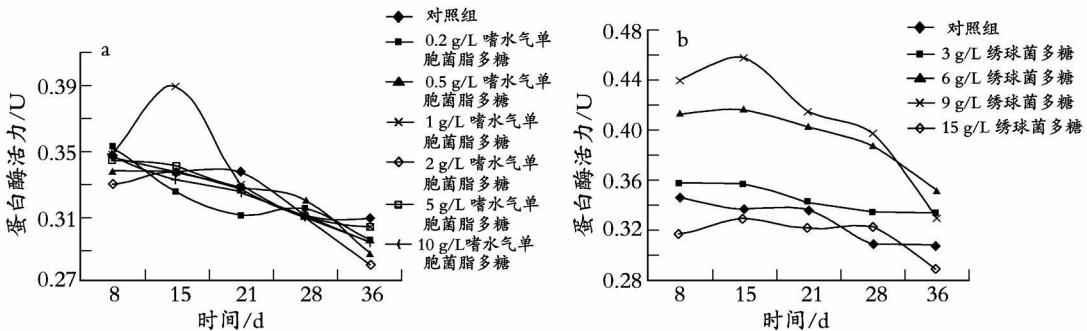


图 6 两种多糖对泥鳅胃肠道蛋白酶活力的影响

Fig. 6 Influence of 2 species of polysaccharide on the activity of protease in the gastrointestinal tract of loach

a. 嗜水气单胞菌脂多糖对泥鳅胃肠道蛋白酶活力的影响; b. 绣球菌多糖对泥鳅胃肠道蛋白酶活力的影响

a. Influence of *A. hydrophila* lipopolysaccharide on the activity of protease in the gastrointestinal tract of loach; b. Influence of *S. crispus* polysaccharide on the activity of protease in the gastrointestinal tract of loach

## 3 讨论

### 3.1 抗氧化性能

抗氧化防御系统存在于所有的需氧细胞中,是需氧生物在长期进化过程中形成的防御过氧化损害系统,生物体内许多酶促反应和非酶促反应都能产生  $H_2O_2$ ,它是有毒害作用的活性氧的前体。正常情况下,生物体内的保护酶系统如 CAT 和 SOD 等,能够及时除自由基,避免机体受损。CAT 可有效地催化  $H_2O_2$  分解成为水和分子氧,使其失去活性的作用,保护机体。酶活性较强就能减少自由基等毒害物质的积累,就能使脱脂过氧化水平稳定,MDA 浓度较低。反之,如果保护酶活性较弱,那么生物体内自由基等毒害物质的积累就增加,脱脂过氧化水平就不稳定,导致 MDA 浓度较高<sup>[33]</sup>。从本研究结果中的 CAT 活力、MDA 浓度及 SOD 活力来看,注射不同浓度灭活嗜水气单胞菌脂多糖与绣球菌多糖对泥鳅的抗氧化性能的影响有所增强,这与徐大伦等<sup>[34]</sup>、刘恒等<sup>[35]</sup>报道免疫多糖能够刺激华贵栉孔扇贝 (*Chlamys nobilis*) 肌肉和血液的酚氧化酶和超氧化物歧化酶显著提高是一致的,结果表明灭活嗜水气单胞菌脂多糖在 1 g/L 浓度时效果较其他浓度更为有效,在 9 g/L 的绣球菌多糖产生的效果最佳,在引起的抗氧化能力以及持久时间上,比其他浓度的抗氧化效果更为明显。

与嗜水气单胞菌脂多糖相比,绣球菌多糖的作

用时间更长,效果更为明显。这与 Stolen<sup>[36]</sup> 报道了斑点叉尾鲷饲喂  $\beta$ -1,3 葡聚糖 (VST) 后,其巨噬细胞超氧阴离子的产量增加,结果是一致的,说明二者可以增强泥鳅的抗氧化能力。

### 3.2 免疫功能

从对溶菌酶活力的测定结果可以发现,嗜水气单胞菌脂多糖对溶菌酶活力有一定的增强作用,但不是很明显,这与孙虎山等<sup>[37]</sup>报道的结果是一致的;由于 SOD 和 CAT 活力的高低可以从一个侧面反映出机体的免疫状况,从嗜水气单胞菌脂多糖对泥鳅的 SOD, CAT 活力的影响可知,嗜水气单胞菌脂多糖能提高泥鳅的免疫力;绣球菌多糖对泥鳅溶菌酶活力的增强作用更加明显,当其质量浓度在 9 g/L 时产生的效果最佳,并且持续时间可以延长到 25 d 左右,与 Robertsen 等<sup>[38]</sup>报道多糖类可以增强非特异性免疫也是相一致的。因此本实验研究表明,这些多糖在机体中可以增强对病原的抵抗能力,这与罗璋等<sup>[39]</sup>关于酵母免疫多糖对斑点叉尾鲷免疫增强作用的研究结果是一致的,因此在养殖过程中注射适当剂量的嗜水气单胞菌脂多糖或者绣球菌多糖作为一种免疫增强剂,可以增强机体的免疫能力。

### 3.3 消化功能

消化酶是联系动物营养状态和生长发育的中间环节,其活性的高低直接影响了动物对营养的吸收利用程度,进而影响动物的生长发育。本试验采用两种主要的消化酶即淀粉酶和蛋白酶为指标来评价

试验泥鳅的消化功能。由试验结果可以看出,用质量浓度为 1 g/L 时的灭活嗜水气单胞菌脂多糖注射到泥鳅后,泥鳅胃肠道中消化酶的活力有大幅度的增强,但是持续时间短。而注射绣球菌多糖当浓度达到 9 g/L 时,泥鳅胃肠道中的消化酶活力得到大幅度的提升。表明注射适量的多糖可以刺激泥鳅肠道内淀粉酶以及蛋白酶的活力,能够增强机体对食物的消化吸收,对泥鳅的生长具有增强作用。

从结果中可以看出,嗜水气单胞菌脂多糖和绣球菌多糖不仅可以提高泥鳅的抗氧化性能和免疫功能,而且可以增强泥鳅的消化功能,但绣球菌多糖的作用效果在持续时间上较灭活嗜水气单胞菌脂多糖的时间长,这两种多糖可以作为免疫增强剂替代一些抗生素在泥鳅的养殖中进行应用。

## 参考文献:

- [1] Sahoo P K, Mukherjee S C. Effect of dietary glucan on immune response and disease resistance of healthy and aflatoxin B<sub>1</sub> induce immunocompromised rohu (*Labeo rohita hamiltoni*) [J]. **Fish Shellfish Immunol**, 2001, 11: 683-695.
- [2] 洪惠馨, 林利民. 我国渔业问题与对策 [J]. 集美大学学报(自然科学版), 2002, 7(1): 5-8.
- [3] 吴金炉, 曾志南. 鱼类病毒病与鱼类病毒疫苗 [J]. 海洋科学, 1999, 4: 37-38.
- [4] 崔青曼, 袁春营. 免疫多糖在水产养殖中的应用 [J]. 中国饲料, 2003, 20: 24-25.
- [5] 郭闯, 王永坤. 嗜水气单胞菌研究进展 [J]. 水产科学, 2003, 22(6): 51-54.
- [6] Salati F, Hamauchi M, Kusuda R. Immune response of red sea bream to *Edwardsiella tarda* antigens [J]. **Fish Pathol**, 1987, 22: 93-98.
- [7] Neumann N F, Fagan D, Belosevic M. Macrophage factor secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leucocytes with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages [J]. **Immunol**, 1995, 19: 475-482.
- [8] 陈超然, 陈昌福. 鱼类三种致病菌的脂多糖对异育银鲫的免疫原性 [J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 483-488.
- [9] 刘勇, 汪成竹, 陈昌福. 3种鱼类致病菌脂多糖对斑点叉尾鲷的免疫原性 [J]. 长江大学学报(自然科学版), 2006, 3(4): 170-174.
- [10] 潘金培, 吴后波. 三种免疫制剂对真鲷弧菌病的免疫保护性 [J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 458-464.
- [11] 金海丽, 许梓荣. 多糖的抗病毒及免疫调节研究进展 [J]. 饲料博览, 2002, 1: 28-30.
- [12] 沈业寿, 陶文娟. 真菌的应用研究——真菌多糖 [J]. 安徽大学学报(自然科学版), 2003, 27(7): 93-97.
- [13] 白东清, 路福平, 王玉, 等. 活酵母衍生物对丁鲷抗氧化能力和部分免疫活性指标的影响 [J]. 动物学报, 2005, 51(4): 664-668.
- [14] Sung H H, Kou G H, Song Y L. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. **Fish Pathol**, 1994, 29: 11-17.
- [15] Ohno N, Miura N N, Nakajima M, et al. 1,3-β-D-glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa* [J]. **Biol Pharm Bull**, 2000, 23(7): 866-872.
- [16] Harada T, Kawaminami H, Miura N N, et al. Cell to cell contact through ICAM-1/LFA-1 and TNFα synergistically contributes to GM-CSF and subsequent cytokine synthesis in DBA/2 mice induced by 1,3-β-D-Glucan SCG [J]. **J Interferon Cytokine Res**, 2006, 26(4): 235-247.
- [17] Harada T, Miura N N, Adachi Y, et al. IFN-γ induction by SCG, 1,3-β-D-glucan from *Sparassis crispa*, in DBA/2 mice in vitro [J]. **J Interferon Cytokine Res**, 2005, 25(3): 167-173.
- [18] Harada T, Miura N N, Adachi Y, et al. Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) regulates cytokine induction by 1,3-β-D-glucan SCG in DBA/2 mice in vitro [J]. **J Interferon Cytokine Res**, 2004, 24(8): 478-489.
- [19] Hasegawa A, Yamada M, Dombo M, et al. *Sparassis crispa* as biological response modifier [J]. **Gan To Kagaku Ryoho**, 2004, 31(11): 1761-1763.
- [20] Yamamoto K, Nishikawa Y, Kimura T, et al. Antitumor activities of low molecular weight fraction derived from the cultured fruit body of *Sparassis crispa* in tumor Nippon shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi [J]. **J Jap Soc Food Sci Technol Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi**, 2007, 54(9): 419-423.
- [21] Wang Z, Binder M, Dai Y C, et al. Phylogenetic relationships of *Sparassis* inferred from nuclear and mitochondrial ribosomal DNA or RNA Polymerase sequences [J]. **Mycologia**, 2004, 96(5): 1015-1029.
- [22] 朱越雄, 贡成良. 罗氏沼虾两种抗氧化酶活性及云芝多糖的影响 [J]. 内陆水产, 2000, 7: 6-7.
- [23] 王高学, 白冰, 崔倩, 等. 灰树花多糖对鲫鱼免疫功能的影响 [J]. 水产科学, 2006, 25(1): 20-23.
- [24] 陈勇, 周洪琪. 三种多糖对异育银鲫肠道、肝脏脏蛋白酶和淀粉酶活性的影响 [J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(4): 468-471.
- [25] 肖明松, 鲍方印, 崔峰. 糖萼素对异育银鲫生长性能及其消化酶活力的影响 [J]. 淡水渔业, 2005, 35(6): 25-27.
- [26] 严慧如, 黄绍华, 余迎利. 菊糖的提取及纯化 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 1: 65-69.



- [ 27] 连宾, 郁建平. 红托竹荪多糖的提取、分离及组成研究[J]. 食品科学, 2004, 25(3): 43-45.
- [ 28] Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further application of the procedure[A]. Whistler R L, BeMiller J N, Wolfom M L. Methods in carbohydrate chemistry (V) [C]. New York: Academic press, 1965. 83-91.
- [ 29] 周玉, 郭文场, 杨振国. 鱼类血液学指标研究的进展[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(2): 163-165.
- [ 30] 徐镜波, 袁晓凡, 郎佩珍. 过氧化氢酶活性及活性抑制的紫外分光光度法测定[J]. 环境化学, 1997, 16(1): 73-76.
- [ 31] 吉尔鲍特. 酶法分析手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983. 186-193.
- [ 32] 中山大学生物系. 生化技术导论[M]. 北京: 科学出版社, 1979. 42-54.
- [ 33] 成嘉, 符贵红, 刘芳, 等. 重金属铅对鲫鱼乳酸脱氢酶和过氧化氢酶活性的影响[J]. 生命科学研究, 2006, 10(4): 372-376.
- [ 34] 徐大伦, 黄晓春, 欧昌荣, 等. 浒苔多糖对华贵节扇贝血淋巴中SOD酶和溶菌酶活性的影响[J]. 水产科学, 2006, 25(2): 72-74.
- [ 35] 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.
- [ 36] Stolen J S, Fletcher T C. Modulators of fish immune responses [M]. USA: SOS Publication, 1994.
- [ 37] 孙虎山, 李光友. 脂多糖对栉孔扇贝血清和血细胞中7种酶活性的影响[J]. 海洋科学, 1999, 4: 54-58.
- [ 38] Robertsen B, Rorstad G, Engstad R, et al. Enhancement of nonspecific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmon salar* L. by aglucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls [J]. **J Fish Dis**, 1990, 13: 391-400.
- [ 39] 罗璋, 姚鹃, 陈昌福, 等. 酵母免疫多糖对受免疫斑点叉尾鲷免疫应答的增强作用[J]. 淡水渔业, 2007, 3: 22-25.

## The effects of *Aeromonas hydrophila*- lipopolysaccharide and *Sparasis crista*- polysaccharide on the immune and digestion function of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*)

LIU Cheng-rong<sup>1</sup>, CHEN Zhen-ping<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-wen<sup>2</sup>

(1. Environment & Life Science Department, Putian University, Putian 351100, China; 2. College of Oceanography and Environment Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Received:** Oct. , 10, 2008

**Key words:** loach (*Misgurnus anguillicaudatus*); *Aeromonas hydrophila* lipopolysaccharide; *Sparasis crista* polysaccharide; anti-oxidation; immunity; digestion

**Abstract:** The lipopolysaccharides (LPS) of *Aeromonas hydrophila* and polysaccharide of *Sparasis crista* were selected as immunopotentiators to challenge the loach *Misgurnus anguillicaudatus* respectively in the present paper. The indexes of antioxidation, immunity and ingestion were tested after challenging. The results indicated that the inactivated lipopolysaccharides of *A. hydrophila* and polysaccharide of *S. crista* could improve the functions of antioxidation, immunity and ingestion. Among the different densities the effects of 1 g/L of inactivated *A. hydrophila* LPS and 9 g/L of *S. crista* polysaccharide were distinct. 1 g/L of inactivated *A. hydrophila* LPS and 9 g/L of *S. crista* polysaccharide could improve the functions of antioxidation, immunity and ingestion. As contrast, the later affects longer than the former does. The result showed that they can be applied in the aquaculture of loach as the substitution of some antibiotics.

( 本文编辑: 刘珊珊)