

中药制剂对中国对虾免疫 活性物的诱导作用*

罗日祥

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 分别于1994和1995年9—10月以胶州湾海捕中国对虾为材料,取其血淋巴测定血凝素活力、溶菌活力,并以投喂添加 V_C 、 V_{B_6} ,中药制剂1号,中药制剂2号的药饵17d、25d后的免疫活性物的活力动态变化,及注射1号、2号中药制剂3d后的活力变化等为指标,权衡上述物质激发中国对虾免疫系统的功能。实验结果表明,1号中药制剂能激发中国对虾免疫系统的功能,诱导血凝素活力,溶菌活力升高,可以提高机体非特异性体液免疫功能。2号中药制剂抑制或破坏中国对虾非特异性体液免疫系统的功能,导致血凝素活力、溶菌活力降低,直至对虾死亡。

关键词 中国对虾 血淋巴 溶菌活力 血凝素活力 中药制剂

王雷等人(1994)为了防治虾病,让对虾口服一种多糖类化合物,已成功地提高了对虾血淋巴中的抗菌物活力,罗日祥(1997)也用弧菌诱导了对虾血淋巴液的血凝素活力变化。但用中药制剂诱导对虾血淋巴的免疫活性物的活力升高,以达提高抗菌防病能力方面的工作未见报道。本文是以测定溶菌活力、血凝素活力为免疫活性物的指标,权衡上述物质能否激发中国对虾免疫系统的机能,以达抗菌防病的目的。

1 材料与方方法

1.1 试验动物

中国对虾(*Penaeus chinensis*)(下简称对虾)于1994年和1995年9—10月取自胶州湾自然海域,对虾体长为11—13cm,体重为15—22g,均为雄性。运回实验室后,放于 $100 \times 75 \times 80\text{cm}^3$ 的玻璃钢水槽内暂养,每天换水两次,连续充气。待对虾在实验室稳定7—10d再进行实验。

1.2 血球

由青岛医学院附属医院检验科血库提供的A、B、O型血球。用时以生理盐水配成2%—3%的悬浮液。

1.3 实验对虾的饵料配制

原料系虾糠(5.58%)、杂鱼粉(11.33%)、玉米粉(31.88%)、小米粉(15.94%)、黄豆

* 国家自然科学基金资助项目, 39270542号;山东省自然科学基金资助项目,93DO241号。罗日祥,男,出生于1938年7月,副研究员。

收稿日期:1996年1月9日,接受日期:1997年8月15日。

粉(15.94%)、荞麦粉(15.94%)、甲壳素(3.4%)等。将以上原料预混好,加一定量的水混匀后,分成8份,并分别向各份原料中加V_C、V_{B6}、花粉(市售),1号中药制剂(10ml),2号中药制剂(10ml),尔后加足水充分混匀,制成颗粒饵料,晒干备用。

1.4 中药制剂

表1 1号、2号中药制剂的成分与含量

Tab.1 Name and content of chinese herbal medicine No.1, No.2

| 成 分 | | 含量(g) |
|----------------------------------|-------------------------------------------|-------|
| 1号 中 药 制 剂 (No.1) | 黄芪 <i>Astragalus membranaceus</i> | 15 |
| | 猪苓 <i>Plyporus umbellata</i> | 15 |
| | 杜仲 <i>Eucommia ulmoides</i> | 15 |
| | 枸杞子 <i>Lycium chinense</i> | 15 |
| | 鱼腥草 <i>Houttuynia cordata</i> | 15 |
| | 甘草 <i>Licorice root</i> | 15 |
| 2号 中 药 制 剂 (No.2) | 陈皮 <i>Orange peel</i> | 15 |
| | 茯苓 <i>Poris cocos</i> | 15 |
| | 黄连 <i>Coptis chinensis</i> | 15 |
| | 鱼腥草 <i>Houttuynia cordata</i> | 20 |
| | 枸杞子 <i>Lycium chinense</i> | 20 |
| | 陈皮 <i>Orange peel</i> | 20 |
| | 丹皮 <i>The root bark of the tree peony</i> | 20 |

1号中药制剂配方由9味中药组成,共计135g。用水煮三次,然后三次的药液合并在一起,浓缩到所需要的体积(50ml)。2号中药制剂配方由4味中药组成,共计80g。用水煮三次,尔后三次药液合并在一起,浓缩到所需的体积(50ml),放入冰箱待用。见表1。

1.5 药品配制

磷酸钾盐缓冲液,将170ml 0.2mol/L K_{H₂PO₄}与100ml 0.2mol/L K₂HP₄混匀,调pH到6.55,冲稀1倍为0.1mol/L的磷酸钾盐缓冲液。溶壁微球

菌(*Micrococcus lysolei*)冻干粉(Sigma产品)称取100mg溶于150ml的磷酸钾盐缓冲液(pH=6.55)中,摇匀即成悬浮液。放入冰箱,用时摇匀。溶菌酶,称取2mg鸡溶菌酶(中国科学院上海生物化学研究所产品)溶于100ml磷酸钾盐缓冲液中,摇匀即为20μg/ml的鸡溶菌酶液。

1.6 实验步骤

将暂养在玻璃钢水槽的对虾,生理状态稳定后分养在实验缸(0.3m³水体)内,每次实验8个缸,每缸5条。一天换两次水,海水温度在20.6—18.4℃之间,连续充气。每天在09:00,16:00时各投饵一次,投饵量以略有剩余为准。喂养17d,25d时,从围心腔抽取血淋巴液,在4℃冰箱放置2h后,以3000r/min转速离心15min,取出上层血清放入冰箱待测。

血凝素活力用倍比稀释法,以血球进行测定,活力以滴度表示。

以溶壁微球菌为底物,按Hultmark等(1980)及Qu X-m(1982)修改的方法测定溶菌活力。取2ml配制好的微球菌悬浮液放入试管,置于水浴中,加入200μl血清混匀,测其A₀值。然后将试管移入37℃水浴中30min,取出后立刻置于水浴中10min,让其终止反应,测其A值。溶菌酶活力U_L按下公式计算:

$$U_L = \frac{A_0 - A}{A_0}$$

设两个实验组,每组对虾5尾。每尾对虾从腹部肌肉分别注射100μl的1号中药制剂、2号中药制剂。对照组注射同体积的消毒海水。养殖水温18—16.8℃。3d后取血淋巴测

定溶菌活力和血凝素活力。

2 结果

在饵料中添加 V_C 、 V_{B_6} 和花粉, 喂虾 17d、25d 时分别抽取血淋巴液测定溶菌活力和血凝素活力, 其结果见表 2。

表2 添加花粉、 V_C 、 V_{B_6} 后溶菌活力、血凝素活力的测定结果

Tab.2 Measurement of bacteriolytic and agglutinative activities after adding pollen, V_C or V_{B_6} in diets

| 物质含量(%) | | 溶菌活力(unite) | | 血凝素活力(滴度) | |
|-----------|-------|-------------|------|-----------|-----|
| | | 17d | 25d | 17d | 25d |
| 花 粉 | 1.0 | 0.12 | 0.11 | 32 | 32 |
| | 2.0 | 0.12 | 0.11 | 32 | 32 |
| | 3.0 | 0.11 | 0.12 | 32 | 32 |
| | 5.0 | 0.11 | 0.11 | 32 | 32 |
| V_C | 0.5 | 0.11 | 0.11 | 32 | 32 |
| | 1.0 | 0.12 | 0.11 | 32 | 32 |
| | 1.5 | 0.11 | 0.12 | 32 | 32 |
| | 2.0 | 0.11 | 0.11 | 32 | 32 |
| V_{B_6} | 0.010 | 0.11 | 0.11 | 32 | 32 |
| | 0.015 | 0.09 | 0.11 | 32 | 32 |
| | 0.020 | 0.10 | 0.10 | 32 | 32 |
| | 0.025 | 0.11 | 0.11 | 32 | 32 |
| 对 照 | | 0.11 | 0.11 | 32 | 32 |

对照组添加 1 号或 2 号中药制剂的饵料, 喂虾 17d、25d 抽取血淋巴液测定溶菌活力和血凝素活力的结果见表 3。喂 1 号中药制剂的, 17d、25d 时抽出的血淋巴均是粘稠状, 易凝集成块, 呈蓝颜色。喂 2 号中药制剂的, 25d 抽出的血淋巴是稀液状, 不凝集成块, 呈桔黄色。

表3 添加中药制剂后溶菌活力、血凝素活力的测定结果

Tab.3 Measurement of bacteriolytic and agglutinative activities after adding chinese herbal medicine in diets

| 测定项目 | 1号中药制剂 | | 2号中药制剂 | | 对 照 |
|-------|--------|------|--------|-----|-------|
| | 17 | 25 | 17 | 25 | |
| 血淋巴颜色 | 蓝 | 蓝 | 蓝 | 桔黄色 | 蓝 |
| 溶菌活力 | 0.167 | 0.73 | 0.135 | 0 | 0.110 |
| 血凝素活力 | 64 | 128 | 32 | 8 | 32 |

每条虾从腹部第三节肌肉注射 100 μ l 的 1 号中药制剂或 100 μ l 的 2 号中药制剂, 养殖 3d, 从围心腔抽血淋巴测定的结果见表 4。注射 1 号中药制剂抽出的血淋巴呈粘稠状, 很快就凝集成块, 为蓝色; 而注射 2 号中药制剂的呈稀液状, 不凝集成块, 颜色为桔黄色, 与病虾的完全一致。

3 讨论与结语

据一些生产花粉的厂家认为, 在对虾饵料中添加一定量的花粉, 能促进生长、提高存活率。在本实验中, 试图从非特异性体液免疫的角度找到提高存活率的依据。但实验结果

未看出花粉对免疫系统有刺激或促进作用。尽管如此,但这并不排斥对虾饵料中添加花粉的意义。也许对促进消化吸收方面有积极作用。

Guary 等(1976)的研究认为, V_C 可能由于参与几丁质的合成,而有助于虾壳硬化,从而推断在饵料中添加适量的 V_C ,可防治对虾发生黑斑病、黑死病等,提高存活率。本研究从免疫活性物的角度进行实验,添加 V_C 时,测定免疫活性物的活力,未见(表2)明显变化。这说明它对免疫功能无直接作用。但这并不否定对虾饵料中添加 V_C 的其他作用。许实荣等(1987)在饵料中添加 V_{B1} 和 V_{B6} ,使对虾肝胰腺类胰蛋白酶活性明显增加,从而提高了对虾饵料中蛋白质的吸收利用。我们向饵料中添加 V_{B6} ,从测得溶菌活力和血凝素活力的结果(表2)看,对对虾的免疫系统未起到激发作用。但这是在营养条件正常的状况下进行的实验,若在饵料完全缺乏 V_{B6} 的情况下,免疫功能可否受到抑制,血淋巴中的溶菌活力、血凝素活力是否会失控,目前还无证据,有待以后的研究证明。

用添加1号中药制剂的饵料饲喂对虾17d, 25d,抽取的血淋巴,表观与对照的一样。

表4 注射中药制剂后溶菌活力和血凝素活力测定结果

Tab.4 Measurement of bacteriolytic and agglutinative activities after injected chinese herbal medicine

| 测定项目 | 1号中药制剂 | 2号中药制剂 | 对 照 |
|-------|--------|--------|------|
| 血淋巴颜色 | 蓝 | 桔黄 | 蓝 |
| 溶菌酶活力 | 0.65 | 0 | 0.11 |
| 血凝素活力 | 64 | 4 | 32 |

呈粘稠状,易凝集成块状,蓝色。测定溶菌活力和血凝素活力的结果(表3)证明,对对虾的免疫系统有激活作用。这种作用在一定时间范围内,随着用药

饵饲喂时间的延长而加强。注射1号中药制剂所得的结果(表4)与投喂1号中药制剂饵的完全一致,且显效快。用添加2号中药制剂的饵料饲喂对虾,17d取血样测定,除溶菌活力略有提高(见表3)外,血凝素活力及外观表象均与对照相同。这种溶菌活力变化,可能是对虾机体生理反应到某一阶段的表征。25d抽取的血淋巴样品,从表观观察是稀液状,不凝集成块,呈桔黄色,与从前从病虾体内抽出的血淋巴液完全一样。测定的溶菌活力为0,血凝素活力滴度是8。从腹部肌肉注射100 μ l的2号中药制剂,3d后取血样测定时,无论是血淋巴的表观观察结果还是测定溶菌活力和血凝素活力的数据(见表4),均与投喂2号中药制剂饵料的一致。说明,2号中药制剂对对虾的免疫系统起抑制或破坏作用,该过程注射比口服来得更快。

饲喂2号中药制剂饵料的对虾,25d后不抽血淋巴液测定,再经2—3d即死亡;注射2号中药制剂的对虾第3天下午或晚上即死亡。死亡对虾外观未见黑斑,也未见鳃黑、红腿。这表明2号中药制剂进入虾体内后,可能对对虾的正常生理机能起毒害作用。

参 考 文 献

- 王雷、李光友, 1994, 海洋与湖沼, 25(5): 486—491.
 许实荣等, 1987, 海洋科学, 4: 34—37.
 罗日祥, 1997, 海洋学报, 19(4): 117—120.
 Guary, M. et al., 1976, *Men. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 25: 53—57.
 Hultmark, D. et al., 1980, *Hyalophora cecropia Eur., J. Biochem.*, 106: 7—16.
 Qu X-m et al., 1982, *J. Biochem.*, 127: 219—224.

INDUCTION OF IMMUNITY SUBSTANCE IN *PENAEUS CHINENSIS* BY CHINESE HERBAL MEDICINE

Luo Rixiang

(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071*)

Abstract The shrimp (*Penaeus chinensis*), being 11–13cm in body length and 15–20g in body weight, was collected from Jiaozhou Bay in September–October 1994 and 1995, respectively, and then cultured in laboratory tank. The shrimps were kept in the tank ($100 \times 75 \times 80 \text{ cm}^3$) for 7–10 days before the experiment and 2 / 3 of aerated seawater were changed daily, and were fed with diet supplemented with Pollen, V_C , V_{B_6} and No.1 or No.2 (Tab.1) chinese herbal medicine respectively, another group were injected with No.1 or No.2 chinese herbal medicine. The haemolymph was taken from the fed shrimps, which were cultured for 17 or 25 days, and the injected shrimps which were cultured for 3 days to test change of their nonspecific immunity, i.e. bacteriolytic activity and agglutinative activity. The results were as follows:

1. When the shrimps were fed with diet containing Pollen, V_C , V_{B_6} , their nonspecific immunity, i.e. bacteriolytic activity and agglutinative activity could not be improved (Tab.2).

2. The bacteriolytic activity in the serum was, respectively, 0.167 and 0.73 for the shrimps fed with diet containing No.1 chinese herbal medicine, measured for 17 and 25 days after feeding, it was 0.135 and 0 for the shrimps fed with diet containing No.2 chinese herbal medicine measured on the 17 and 25 days, respectively (Tab.3).

3. The agglutinative activity in the serum was, respectively, 64 and 128 for the shrimps fed with diet containing No.1 chinese herbal medicine, measured for 17 and 25 days after feeding, it was 32 and 8 for the shrimps fed with diet containing No.2 chinese herbal medicine measured on the 17 and 25 days, respectively (Tab.3).

4. The bacteriolytic activity in the serum was 0.65 and agglutinative activity titer in the serum was 64, for the shrimps, which were injected 100 μ l No.1 chinese herbal medicine 3 days latter. The bacteriolytic activity in the serum was 0, and agglutinative activity titer in the serum was 4, for the shrimps, which were injected 100 μ l No.2 chinese herbal medicine 3 days later (Tab.4).

5. The colour of haemolymph was blue for the shrimps fed with diet containing No.1 chinese herbal medicine for 17 and 25 days, it was same as the control (Tab.3).

The shrimps were injected with 100 μ l No.1 chinese herbal medicine 3 days later, the haemolymph colour was same as the control (Tab.4). The colour of haemolymph was blue for shrimps fed with diet containing No.2 chinese herbal medicine for 17 days, but the haemolymph colour was orange for the shrimps fed with diet containing No.2 chinese herbal medicine for 25 days (Tab.3). The shrimps were injected with 100 μ l No.2 chinese herbal medicine 3 days later, and the haemolymph colour was also orange (Tab.4).

The above results showed that No.1 chinese herbal medicine could improve nonspecific immunity of the shrimps, and increase their disease resistance.

Key words *Penaeus chinensis* Haemolymph Bacteriolysis activity
Agglutinative activity Chinese herbal medicine