

免疫增强剂紫锥菊(*Echinacea purpurea*)提取物 对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)头肾内 非特异性免疫基因表达量的影响*

秦志华^{1,2} 潘柳婷² 董文宾² 单 虎²

(1. 中国海洋大学 青岛 266003; 2. 青岛农业大学 青岛 266109)

摘要 通过给大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)注射不同浓度的紫锥菊(*Echinacea purpurea*)提取物,测定其非特异性免疫指标的变化水平,研究其对大菱鲂的头肾内非特异性免疫分子基因相对表达量的影响,进而为其在大菱鲂养殖生产过程中推广应用提供科学依据。试验选取体重(250±20)g的大菱鲂作为试验动物,分别注射 10、20、40mg/mL 浓度的紫锥菊提取物,试验共进行 28d,注射试验结束后,分别从高、中、低剂量组及空白对照组选出 6 尾大菱鲂,分别取出大菱鲂的头肾并提取总 RNA。采用 ΔCt 法进行目标基因的荧光定量分析,再应用 SPSS17.0 软件对获得的实验数据进行单因素方差分析。研究结果表明,紫锥菊提取物能够不同程度地提高大菱鲂头肾内非特异性免疫分子基因相对表达量。注射紫锥菊提取物 28d 后对大菱鲂头肾中 Lysozyme 基因相对表达量的影响显著($P<0.05$),对 C3 补体基因相对表达量的影响极显著($P<0.01$),对 Transferrin 基因相对表达量的影响显著($P<0.05$),对 TGF- $\beta 1$ 基因相对表达量的影响极显著($P<0.01$),对 IL-1 α 基因相对表达量的影响极显著($P<0.01$),本试验研究表明,紫锥菊提取物能够显著提高大菱鲂头肾内非特异性免疫分子基因的相对表达量。

关键词 大菱鲂; 紫锥菊提取物; 非特异性免疫; 基因表达

中图分类号 S963.1; Q599; Q939.91

doi: 10.11693/hyh20170300081

中药免疫增强剂能增强机体免疫功能,我国的中药资源丰富,其中利用中药免疫增强剂提高免疫功能已取得显著效果。例如大黄(*Rheum palmatum* L.)、黄连(*Coptis chinensis* Franch)能引起鲤鱼(*Cyprinus carpio*)免疫器官质量增加、溶菌酶活性增高和吞噬细胞吞噬能力的增强,可显著提高鲤鱼非特异性免疫能力(蔡中华等,1998)。采用不同剂量的灰树花多糖(Polysaccharide of *Grifola frondosa*, PGF)来检测其对鲤鱼血清凝集抗体效价的影响,试验组抗体水平明显高于对照组(王高学等,2006);分别用抗体对试验鳖进行浸泡和口服免疫,结果表明试验组免疫力大幅提高(庄政,2008)。添加不同水平的黄

芪多糖(*Astragalus polysaccharides*, APS)饲喂异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*),能显著提高异育银鲫的脾脏指数($P<0.05$) (胡兵等,2008)。利用含有 90% 黄芪多糖的提取物饲喂感染嗜水气单胞菌的罗非鱼(*Oreochromis niloticus*),饲喂 0.10% 黄芪提取物比饲喂基础日粮组显著提高白细胞吞噬活性,在第四周可以显著提高吞噬细胞的呼吸爆发活性(Ardó *et al.*, 2008)。在彭泽鲫(*Carassius auratus* var. Pengze)的日粮中添加紫锥菊提取物的研究表明,紫锥菊提取物能够促进彭泽鲫的生长,并提高其抗氧化能力(唐雪莲等,2012)。

大量证据表明,渔用中药免疫增强剂可以成为

* 青岛市公共领域科技支撑计划项目资助,12-1-3-51(2)-nsh 号;国家鲆鲽类产业技术体系, GARS-50 号。秦志华,高级实验师, E-mail: qq_1126@163.com

收稿日期: 2017-03-31, 收修改稿日期: 2017-11-24

增强水产动物抗病能力的有效途径。因此, 开发一些新型的渔用免疫增强剂对促进水产养殖可持续发展具有重要意义。紫锥菊(*Echinacea purpurea*)是目前国际上普遍关注的一种免疫增强剂和免疫调节剂, 其提取物及其制剂畅销美国医药市场(黄智慧等, 2010), 紫锥菊作为一种新型的免疫增强剂, 在水产养殖中应用较少, 任永林(2008)研究了紫锥菊提取物对鲤鱼的生产性能和免疫功能的影响, 发现其能够显著提高抗病性能。唐雪莲等(2012)在彭泽鲫日粮中添加紫锥菊提取物, 促进了其生长和抗氧化能力。目前还未见紫锥菊提取物在海水养殖动物中的应用情况。

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)是近年来推广的养殖品种, 并逐渐成为我国重要的养殖品种(雷霖霖, 2000; 马爱军等, 2002)。在欧洲, 西班牙是最大的养殖国家(Cádiz, 2015), 目前中国已经成为世界上养殖第一的大国(FAO, 2011)。但仍存在一些因素制约着大菱鲆的养殖, 出苗率降低、生长速度减慢、抗逆性差等性状退化现象(雷霖霖等, 2002), 以及疾病等都造成了巨大的经济损失(雷霖霖, 2005)。免疫能力低下是大菱鲆养殖期间高死亡率的重要原因之一。头肾是硬骨鱼类重要的造血器官(Press *et al*, 1999), 同时又是重要的次级淋巴样器官(Brattgjerd *et al*, 1996), 在特异性免疫反应等方面具有特殊作用, 但有关中药提取物紫锥菊对它的作用效果尚未见报道。本试验通过研究紫锥菊提取物对大菱鲆头肾内非特异性免疫分子基因表达量的影响, 从分子水平上进一步探讨其对大菱鲆非特异性免疫功能的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验药物与试验动物 试验药物紫锥菊提取物(有效成分为 5.4%菊苣酸)由青岛市康地恩药业有限公司提供。试验用大菱鲆购于胶南通用水产有限公司。

1.1.2 试验仪器 电泳槽: 北京六一仪器厂, 型号: DYCD-31D; 核酸蛋白检测仪: 上海康华生化仪器厂, 型号: HD-93-1; 高速冷冻离心机: 德国 SIGMA, 型号: 3K18; 电泳仪: 北京市六一仪器厂, 型号: DYY-III12; 电子恒温水浴锅: 北京长风仪器仪表公司, 型号: HW.SY21-K; 荧光定量 PCR 仪: 罗氏诊断产品(上海)有限公司, 型号: Light Cycler 480。

1.2 组织材料的准备

注射试验结束后, 分别从高、中、低剂量组及空

白对照组选出 6 尾大菱鲆, 重击头部使其死亡, 放入 75%酒精中浸泡 5min, 然后在无菌环境中, 分别取出高、中、低剂量组及空白对照组的大菱鲆的头肾于液氮中保存备用。

1.3 总 RNA 的提取

按照生工生物工程股份有限公司 EZ-10Total RNA Mimi-Preps Kit 试剂盒说明书进行总 RNA 的提取, 提取的总 RNA 用 GeneQuant 核酸分析仪进行浓度的测定, 用琼脂糖凝胶电泳测 RNA 的完整性。

1.4 cDNA 第一链合成

以总 RNA 为模板, 按照 EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒说明书逆转录反应合成 cDNA, 逆转录产物置于-20℃保存备用。

1.5 琼脂糖凝胶电泳

(1) 电泳槽的处理: 电泳槽清洗后, 用无水酒精冲洗, 干燥后, 用 3%双氧水室温处理 10min, 最后用 RNase-free H₂O 彻底冲洗, 插入梳子。

(2) 配制 1%琼脂糖胶: 称取 0.25g 琼脂糖, 加入 30mL 1×TBE 电泳缓冲液中, 微波炉加热使琼脂糖溶解均匀, 待冷却到 50℃左右, 加入 1.5μL 10mg/mL 的 E.B, 混匀, 倒入电泳凝胶板中, 除去气泡。

(3) 电泳: 待凝胶凝固后, 小心取出点样梳, 在电泳槽中加入 1×TBE 电泳缓冲液, 将胶板放入电泳槽中, 使电泳缓冲液没过胶面。在待测样品中加入 1/6 体积的 6×上样缓冲液, 混匀后, 用移液枪点样, 并记录样品点样顺序, 220V 电泳 35min。

(4) 拍照: 于凝胶成像分析系统观察、拍照。

1.6 实时荧光定量 PCR

采用 SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (Code No.RR820A)进行 Real Time PCR 反应。PCR 反应体系见表 1, 试验中所需引物见表 2。

(1) 按表 1 下列组分配制 PCR 反应液(反应液配制在冰上进行)。

表 1 PCR 反应体系
Tab.1 The PCR reaction system

试剂	使用量	终浓度
SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×)	12.5μL	1.0×
PCR Forward Primer (10μmol/L)	1.0μL	0.4μmol/L
PCR Reverse Primer (10μmol/L)	1.0μL	0.4μmol/L
RT 反应液(cDNA 溶液)	2.0μL	
dH ₂ O(灭菌蒸馏水溶液)	8.5μL	
Total	25.0μL	

表 2 荧光定量 PCR 反应中所需引物序列及长度
Tab.2 The sequence and length of the primers in fluorescence quantitative PCR reaction

目的基因	上游引物	下游引物	长度
β-Actin	ATCGTGGGGCGCCCAGGCACC	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC	493bp
Transferrin	CTGTGCTGTGGCGAAGAAGG	CGATGGGCGCTGTGCTGTTAT	374bp
Lysozyme	AGCCTGGCCGACTGGGTTTG	CGCAGCGACACACAGTGAAAGTAAAG	517bp
TGF-β1	ACAAGCCGACGGGCTACCATG	CAGCAGGGCTGGGCAGAGG	173bp
IL-1h	AAAGAATCTTACCTGTCTTG	TGCTGATGTTACGCCGGAGTC	168bp
C ₃ 补体	CAACAACATATGCCACAAG	TCCGTAGACAGAGCGTAG	123bp

(2) 进行 Real Time PCR 反应

按两步法 PCR 扩增, 程序如下: 预变性 95℃ 30s, 1 个循环; PCR 反应: 95℃ 5s, 40 个循环, 60℃ 30—60s。

2 结果与分析

采用 ΔC_t 法自动进行目标基因的荧光定量分析, 再应用 SPSS17.0 软件对获得的实验数据进行单因素方差分析和 Duncan 多重比较。显著水平选为 0.05, 若 $P<0.05$, 则为差异显著, 同时用 Excel 2010 软件为作图工具。

2.1 总 RNA 提取及检测

注射 28d 后大菱鲂头肾中, 所提取的总 RNA, 使用酶标仪对 RNA 的浓度进行测定, 同时对其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的数值进行测量, 如果该值在 1.9—2.2 之间则证明所提取的 RNA 的质量比较高, 本实验采集样品所提取得 RNA 均在 2.0 左右, 属于可以继续实验的范围。同时通过电泳检测 RNA 的质量, 结果如图 1、图 2、图 3 所示。每个基因的条带都清晰可见, 后续实验结果的可靠性也得到保证。

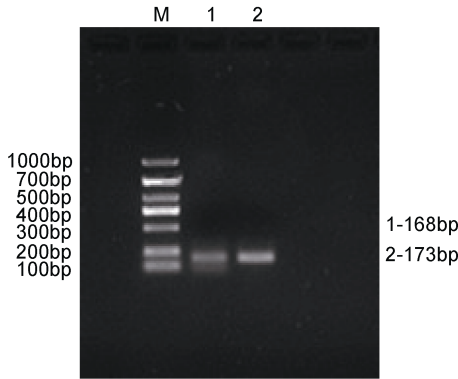


图 1 TGF-β1 基因、IL-1h 基因电泳图
Fig.1 TGF-β1 gene, IL-1h gene electrophoresis chart
注: 1 号条带: TGF-β1 基因, 2 号条带: IL-1h 基因

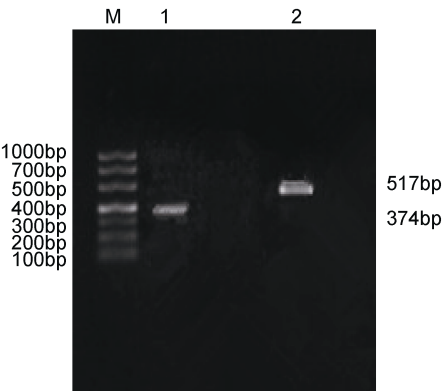


图 2 Transferrin 基因、Lysozyme 基因电泳图
Fig.2 Transferrin gene, lysozyme gene electrophoresis chart
注: 1 号条带: Transferrin 基因, 2 号条带: Lysozyme 基因

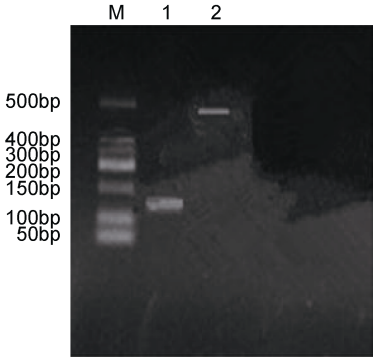


图 3 β-Actin 基因、C3 补体基因电泳图
Fig.3 β-Actin gene, C3 complement gene electrophoresis chart
注: 1 号条带: β-Actin 基因, 2 号条带: C3 补体基因

2.2 肌肉注射紫锥菊提取物对大菱鲂头肾中 Lysozyme 基因相对表达量的影响

如图 4 所示, 注射 28d 紫锥菊提取物对大菱鲂头肾中 Lysozyme 基因相对表达量的影响显著 ($P<0.05$), 高剂量组与中剂量组与其它两个剂量组差异显著 ($P<0.05$), 低剂量组与空白对照组差异不显著 ($P>0.05$)。

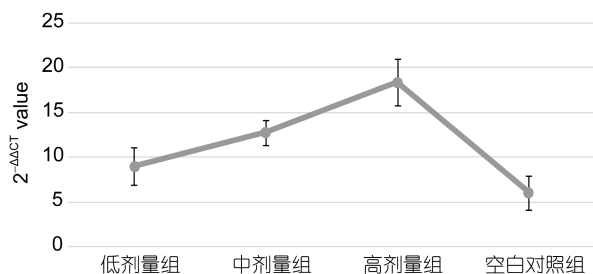


图4 注射 28d 头肾中 Lysozyme 基因相对表达量

Fig.4 The relative expression of lysozyme gene in head kidney after injection in 28d

2.3 肌肉注射紫锥菊提取物对大菱鲆头肾中 C3 补体基因相对表达量的影响

如图 5 所示, 注射 28d 紫锥菊提取物对大菱鲆头肾中 C3 补体基因相对表达量的影响极显著($P<0.01$), 高剂量组与其它 3 个剂量组差异极显著($P<0.01$), 中剂量组和低剂量组与空白对照组差异不显著($P>0.05$)。

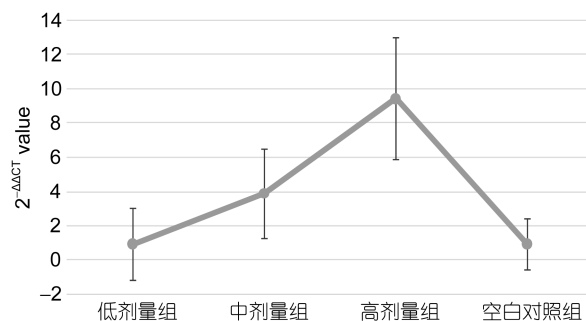


图5 注射 28d 头肾中 C3 补体基因相对表达量

Fig.5 Relative expression quantity of complement C3 gene in head kidney after injection in 28d

2.4 肌肉注射紫锥菊提取物对大菱鲆头肾中 Transferrin 基因相对表达量的影响

如图 6 所示, 注射 28d 紫锥菊提取物对大菱鲆头肾中 Transferrin 基因相对表达量的影响显著($P<0.05$), 高剂量组与中剂量组与其它两个剂量组差异显著($P<0.05$), 低剂量组与空白对照组差异不显著($P>0.05$)。

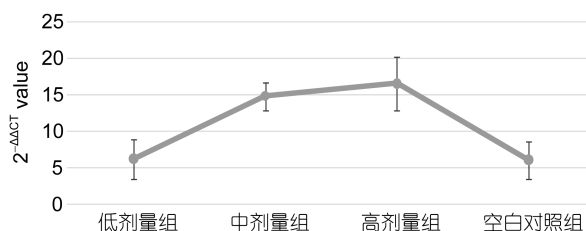


图6 注射 28d 头肾中 Transferrin 基因相对表达量

Fig.6 The relative expression of transferrin gene in head kidney after injection in 28d

2.5 肌肉注射紫锥菊提取物对大菱鲆头肾中 TGF-β1 基因相对表达量的影响

如图 7 所示, 注射 28d 紫锥菊提取物对大菱鲆头肾中 TGF-β1 基因相对表达量的影响极显著($P<0.01$), 中剂量组与其它 3 个剂量组差异极显著($P<0.01$), 高剂量组和低剂量组与空白对照组差异不显著($P>0.05$)。

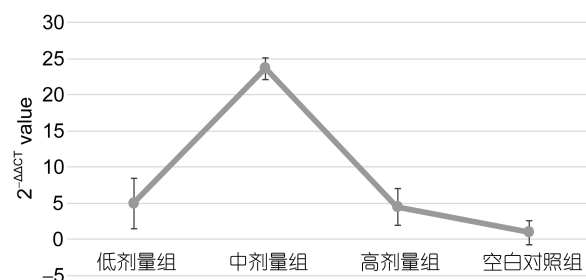


图7 注射 28d 头肾中 TGF-β1 基因相对表达量

Fig.7 The relative expression of head kidney TGF-β1 gene after injection in 28d

2.6 肌肉注射紫锥菊提取物对大菱鲆头肾中 IL-1h 基因相对表达量的影响

如图 8 所示, 注射 28d 紫锥菊提取物对大菱鲆头肾中 IL-1h 基因相对表达量的影响极显著($P<0.01$), 中剂量组与其它 3 个剂量组差异极显著($P<0.01$), 高剂量组和低剂量组与空白对照组差异不显著($P>0.05$)。

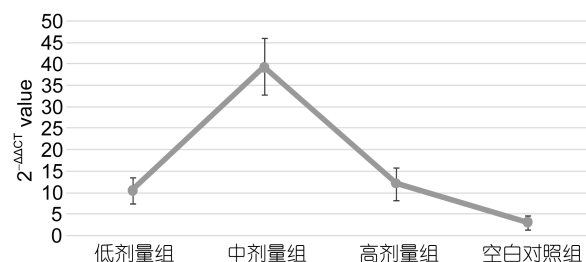


图8 注射 28d 头肾中 IL-1h 基因相对表达量

Fig.8 The relative expression of IL-1h gene in 28d injection head kidney

3 讨论

紫锥菊作为水产动物中免疫增强剂已有报道, 但多限于蛋白质水平检测, 很少从分子水平上给与阐明, 因此很多结论不够可靠。现已从贝类(Liu *et al*, 2006)、虾(Sotelo-Mundo *et al*, 2003)、海星(Bachali *et al*, 2004)等多种海洋无脊椎动物中克隆出溶菌酶基因, 这为开展水产无脊椎动物非特异性免疫力分子水平

检测提供良好平台,也为证实免疫增强剂作用效果提供理论依据。本实验采用实时荧光定量 PCR 对大菱鲂免疫基因 IgM、C3、IL-1、TGF、transferrin 和 lysozyme 在空白对照组和免疫组大菱鲂在注射紫锥菊提取物 28d 后基因的相对表达量进行了分析。实验结果显示,紫锥菊提取物对大菱鲂头肾中的相关免疫因子基因的相对表达量有不同程度的促进作用。

3.1 肌肉注射紫锥菊提取物对大菱鲂头肾中 Lysozyme 基因相对表达量的影响

前期试验已证实,紫锥菊提取物能够提高大菱鲂的溶菌酶活力,本试验则在分子水平证实,紫锥菊提取物能提高大菱鲂头肾溶菌酶 mRNA 表达量,注射 28d 后紫锥菊提取物对大菱鲂头肾中 Lysozyme 基因相对表达量的影响显著,高剂量组与中剂量组与其它两个剂量组差异显著,低剂量组与空白对照组差异不显著。说明在一定浓度内,紫锥菊提取物对大菱鲂头肾中 Lysozyme 基因相对表达量的影响随着浓度的提高而加强。研究表明,常用免疫增强剂黄芪多糖对仿刺参体腔细胞中 Lysozyme 基因相对表达量的影响显著(孙永欣等, 2009),汤菊芬等(2011)研究黄芪多糖对吉富罗非色 C 型溶菌酶基因表达量的影响也有类似现象。

3.2 肌肉注射紫锥菊提取物对大菱鲂头肾中 C3 补体基因相对表达量的影响

补体系统是免疫系统的重要组成部分,参与多重免疫反应,是生物抵抗外界感染的第一道防线。大多数补体成分都是急性期反应蛋白,在适当的免疫刺激后补体水平表现出上调趋势。已有试验表明,当鲤鱼、虹鳟、斑点叉尾鲟、牙虾及斑马鱼等硬骨鱼受细菌处理后,体内的补体成分特别是补体成分 3 和补体因子 B 的表达水平显著升高(Steel *et al.*, 1994)。

本试验中,以紫锥菊提取物处理大菱鲂成体后,注射 28d 后紫锥菊提取物对大菱鲂头肾中 C3 补体基因相对表达量的影响极显著,高剂量组与其它 3 个剂量组差异极显著,中剂量组和低剂量组与空白对照组差异不显著。由此可以得出,低浓度紫锥菊提取物对大菱鲂头肾中 C3 补体基因相对表达量的影响有限。

3.3 肌肉注射紫锥菊提取物对大菱鲂头肾中 Transferrin 基因相对表达量的影响

转铁蛋白是脊椎动物体内重要的非特异免疫因子,对细菌的繁殖起抑制作用,是机体对抗细菌感染的重要因子(Liu *et al.*, 2003);也可以促进细胞的生长和增殖等(Oppenheim, 2001)。因此,转铁蛋白的功

能可能十分广泛。

本试验将注射 28d 紫锥菊提取物的大菱鲂头肾中 Transferrin 基因相对表达量做了相关分析,结果显示连续注射紫锥菊提取物 28d 对大菱鲂头肾中 Transferrin 基因相对表达量的影响显著,高剂量组和中剂量组与其它两个剂量组差异显著,低剂量组与空白对照组差异不显著。说明低浓度的紫锥菊对 Transferrin 基因的表达影响甚微。

3.4 肌肉注射紫锥菊提取物对大菱鲂头肾中 TGF- β 1 基因相对表达量的影响

动物体内多种细胞均可分泌非活性状态 TGF- β 1,活化后的 T 细胞或 B 细胞产生的 TGF- β 1 比静止细胞明显增高,TGF- β 1 的活性很多,主要包括抑制免疫活性细胞的增值,对细胞表型的调节,抑制淋巴细胞的分化,抑制细胞因子的产生等,对机体的免疫功能起重要作用。

从对大菱鲂注射 28d 紫锥菊提取物 TGF- β 1 基因的相对表达量可以看出,对大菱鲂头肾中 IL-1h 基因相对表达量的影响极显著,其中中剂量组基因相对表达量最高,而高剂量组基因相对表达量显著降低,但是高于空白对照组。经数据分析,低剂量组和高剂量组对 IL-1h 基因相对表达量的影响并不显著。

3.5 肌肉注射紫锥菊提取物对大菱鲂头肾中 IL-1h 基因相对表达量的影响

从对大菱鲂注射 28d 紫锥菊提取物 IL-1h 的相对表达量可以看出,对大菱鲂头肾中 IL-1h 基因相对表达量的影响与对 TGF- β 1 基因的相对表达量的影响变化趋势相类似,其中中剂量组基因相对表达量最高,而高剂量组和低剂量组对 IL-1h 基因相对表达量的影响并不显著。韩雯等(2014)利用皂角苷联合灭活疫苗免疫大菱鲂后对大菱鲂 IL-1h 基因表达量也有类似增强作用,说明紫锥菊提取物对大菱鲂头肾中 IL-1h 基因表达有显著的增强作用,目前影响机理尚不明确,需要做进一步研究。

4 结论

研究不同浓度紫锥菊提取物对大菱鲂头肾内非特异性免疫分子基因相对表达量的影响,本试验通过测定 Lysozyme、IL-1h、TGF- β 1、Transferrin、C3 补体等基因相对表达量试验结果表明,紫锥菊提取物对大菱鲂头肾内非特异性免疫分子基因相对表达量有一定促进作用,重新认证紫锥菊提取物能促进大菱鲂的非特异性免疫功能。

参 考 文 献

- 马爱军, 雷霖霖, 陈四清等, 2002. 大菱鲆产卵季节对卵子的生物学及生化特征的影响. 海洋与湖沼, 33(1): 75—82
- 王高学, 白冰, 崔婧等, 2006. 灰树花多糖对鲫鱼免疫功能的影响. 水产科学, 25(1): 9—12
- 任永林, 2008. 紫锥菊提取物对鲤生产性能和免疫功能的影响. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文
- 庄政, 2008. 嗜水气单胞菌亚单位成分卵黄抗体在鳗鲡养殖中应用. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 10—11
- 汤菊芬, 吴灶和, 简纪常等, 2011. 注射黄芪多糖对吉富罗非鱼 c 型溶菌酶基因表达量的影响. 广东海洋大学学报, 31(1): 58—61
- 孙永欣, 徐永平, 汪婷婷等, 2009. 黄芪多糖对仿刺参体腔细胞中溶菌酶基因表达量的影响. 水产科学, 28(10): 572—574
- 胡兵, 刘军, 侯永清等, 2008. 黄芪多糖对异育银鲫非特异性免疫力的影响. 水利渔业, 28(3): 108—111
- 唐雪莲, 付京花, 李志华等, 2012. 紫锥菊提取物对彭泽鲫生长和抗氧化反应的影响. 饲料工业, 33(14): 20—22
- 黄智慧, 马爱军, 2010. 大菱鲆体表黏液细胞组化研究及高温胁迫对其类型和分布的影响. 水产学报, 34(5): 719—725
- 韩雯, 王秀华, 王玉娟等, 2014. 皂角苷对大菱鲆非特异免疫的增强作用. 水产学报, 38(7): 999—1008
- 雷霖霖, 2000. 海水养殖新品种介绍——大菱鲆. 中国水产, (4): 38—39
- 雷霖霖, 2005. 海水鱼类养殖理论与技术. 北京: 中国农业出版社, 321—322
- 雷霖霖, 门强, 2002. 大菱鲆人工繁殖与养殖技术讲座(II). 齐鲁渔业, 19(10): 47—48
- 蔡中华, 陈成勋, 邢克智等, 1998. 四种中药对鲤鱼非特异性免疫功能的影响. 天津农学院学报, 5(2): 31—34
- Ardó L, Yin G J, Xu P, 2008. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture, 275(1—4): 26—33
- Bachali S, Bailly X, Jollès J *et al*, 2004. The lysozyme of the starfish *Asterias rubens*. A paradigmatic type I lysozyme. European Journal of Biochemistry, 271(2): 237—242
- Brattgjerd S, Evensen Ø, 1996. A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* of the head kidney in experimentally infected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Veterinary Pathology, 33(5): 55—65
- Cádiz, 2015. Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos (APROMAR). La Acuicultura Marina de Peces en España
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2011. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA) 2010. Rome: FAO
- Liu M, Zhang S C, Liu Z H *et al*, 2006. Characterization, organization and expression of *Amphi Lys C*, an acidic c-type lysozyme gene in amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense*. Gene, 367: 110—117
- Liu Y L, Sun J H, Zhang J *et al*, 2003. Effects of transferrin on the growth and proliferation of porcine hepatocytes: a comparison with epidermal growth factor and nicotinamide. Chinese Medical Journal, 116(8): 1223—1227
- Oppenheimer S J, 2001. Iron and its relation to immunity and infectious disease. Journal of Nutrition, 131(2): 616S—635S
- Press C M, Evensen Ø, 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. Fish & Shellfish Immunology, 9(4): 309—318
- Sotelo-Mundo R R, Islas-Osuna M A, de-la-Re-Vega E *et al*, 2003. cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology, 15(4): 325—331
- Steel D M, Whitehead A S, 1994. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. Immunology Today, 15(2): 81—88

EFFECT OF *ECHINACEA PURPUREA* EXTRACT ON THE NONSPECIFIC IMMUNE GENE RELATIVE EXPRESSION QUANTITY OF *SCOPHTHALMUS MAXIMUS*QIN Zhi-Hua^{1,2}, PAN Liu-Ting², DONG Wen-Bin², SHAN Hu²

(1. Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract To determine the effect of purple coneflower *Echinacea purpurea* extract on the non-specific immune response of turbot *Scophthalmus maximus*, four groups of six turbot each in weight of (250±20)g were injected with the extract at concentrations of 0 (the control), 10 (low), 20 (intermediate), and 40 mg/mL (high) respectively. After 28d of experiment, the relative expression of specific immune gene in the head kidney and the total RNA were studied quantitatively. Results show that the relative expression of kidney nonspecific immune gene was boosted after the injection, which will provide a scientific basis for the application of the extract in turbot farming

Key words turbot *Scophthalmus maximus*; *Echinacea purpurea* extract; nonspecific immunity; gene expression