

# 五种中草药复方体外激活花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)外周血白细胞活性的评价\*

李忠琴<sup>1,4</sup> 张新艳<sup>2</sup> 杨求华<sup>3,4</sup> 林茂<sup>1,4</sup> 江兴龙<sup>1,4</sup> 翟少伟<sup>1,4</sup>①

(1. 集美大学水产学院 福建厦门 361021; 2. 福建省淡水水产研究所 福建福州 350002; 3. 福建省水产研究所 福建厦门 361012; 4. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心 福建厦门 361021)

**摘要** 作为典型的降河洄游鱼类,花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)在我国主要分布于长江下游及以南水域。中草药作为抗生素等化学类渔药的绿色替代品,对养殖鱼类具有抗菌、消炎、促生长等多种功效。为研究中草药复方在花鳗鲡病害防治中的作用,扩大水产养殖业渔药研制与应用的选择,采用非连续性密度梯度离心法对花鳗鲡外周血白细胞的分离体系进行了优化,试验设置了密度分别为 1.031、1.043、1.056、1.067、1.090 g/mL 的五种分离液,分别采用染色观察法和流式细胞术检测各分离液中白细胞浓度;以浓度 1.0 mg/mL 的五种复方药液分别与  $10^5$  cell/mL 的白细胞悬液共孵育 2 h 后,分别采用 NBT 法和流式细胞术测定白细胞的呼吸暴发活性和吞噬能力,评价五种中草药复方(多糖复方 Dt,白头翁复方 Btw,板蓝根复方 Blg,大黄复方 Dh,百里酚复方 Blf)对花鳗鲡外周血白细胞的激活作用。结果显示:1.043 g/mL 和 1.056 g/mL 的分离液所分离获得白细胞浓度均接近  $10^5$  cell/mL,可在后续实验中叠加使用该两个浓度的分离液分离获得白细胞;流式细胞术检测白细胞浓度比染色观察法更为灵敏准确;5 种复方均能显著提高花鳗鲡外周血白细胞的呼吸暴发活性( $P < 0.05$ ),大小依次为 Blg>Dt>Btw>Blf>Dh;Dt 和 Blg 能显著提高白细胞吞噬率( $P < 0.05$ ),Btw、Blf、Dh 也能提高白细胞吞噬率,但差异不显著( $P > 0.05$ );5 种复方对发生吞噬白细胞比率的影响差异不显著( $P > 0.05$ )。

**关键词** 白细胞呼吸暴发活性;白细胞吞噬能力;流式细胞术;中草药复方;花鳗鲡

**中图分类号** S942; S948; S965 **doi:** 10.11693/hyhz20220300063

花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)为典型的降河洄游鱼类,隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鳗鲡目(Anguilliformes)、鳗鲡科(Anguillidae)、鳗鲡属(*Anguilla*),俗名又称花鳗、鲈鳗、雪鳗、鳍王、乌尔鳗等(Wang *et al.*, 2016),主要生活在西太平洋和印度洋的热带、亚热带的近海淡水区域(Huang *et al.*, 2016)。中国本土野生花鳗鲡受到水资源污染,过度捕捞等危害,苗种资源日渐枯竭,于 1988 年被中国列

为濒危物种,是国家二级保护野生动物(陈健荣等, 2018)。目前中国推广养殖的花鳗鲡鱼苗主要来自菲律宾等东南亚海域。相对于日本鳗鲡等传统鳗鲡品种,花鳗鲡的苗种储备丰富,价格低,养殖利润较高,有助于应对鳗鲡养殖品种单一的难题,填补鳗苗市场空缺。花鳗鲡的养殖势头良好,但由于集约化养殖的弊端和养殖技术的局限,养殖过程中容易受到环境、管理、营养、疾病等因素的影响而感染疾病(于海振,

\* 福建省科技计划农业引导性(重点)项目, 2021N01010292 号;福建省海洋渔业结构调整专项,闽财指[2021]66 号;国家重点研发计划, 2020YFD0900102 号;财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系资助, CARS-46 号;福建省海洋经济发展补助资金项目, FJHJF-L-2020-4 号;集美大学培育基金, ZP2021003 号。李忠琴, 博士, 副教授, E-mail: zhqinli@jmu.edu.cn; 同等贡献第一作者: 张新艳, 硕士, 高级工程师, E-mail: swallowz47@163.com

通信作者: 翟少伟, 博士, 教授, E-mail: zhaishaowei@jmu.edu.cn

收稿日期: 2022-03-15, 收修改稿日期: 2022-04-09

2014)。防治花鳃鲈疾病一般使用抗生素类化学药物,这类药物抑菌效果显著,但是如果使用不当,会导致生物体内抗药菌株的增加、细菌耐药性增强,而抗生素残留问题导致的水产品安全性问题也对鳃鲈出口有着严重影响,危害食用人群的健康。

中草药作为渔用合成药物、抗生素等药用添加剂的安全有效的替代品,对养殖鱼类具有免疫增强、抗炎、诱食、促消化和促生长等功效(路晶晶等, 2018; Hu *et al.*, 2019)。其配制形式可分为两种,一种是以单味中药的形式添加到饲料中,该形式对动物的作用具有偏向性,只能发挥部分功效;另一种是配伍多种具有不同功效的中草药,以复方的形式添加到饲料中,该形式能同时兼顾多种功效,比单味中药更高效、更全面。目前,中草药复方在渔业中的应用越来越常见,而评价中草药复方的药效是中草药应用推广过程中不可缺少的环节。

鱼类白细胞的呼吸暴发是指白细胞吞噬病原微生物后的一种氧依赖的杀伤机制,可以作为评价机体杀灭被吞噬进白细胞的有害物质能力的指标(程镇燕等, 2017)。血细胞中的嗜中性颗粒白细胞和巨噬细胞拥有着强大的吞噬作用,在机体非特异性免疫机制中有必不可少的作用(王晓雯等, 2017)。本实验使用非连续性密度梯度离心法优化花鳃鲈外周血白细胞的分离体系,采用染色观察法和流式细胞术检测各分离液中白细胞浓度。采用 NBT 法和流式细胞术测定白细胞的呼吸暴发活性和吞噬能力,旨在评价五种中草药复方对花鳃鲈外周血白细胞的激活作用,明确中草药复方对花鳃鲈的白细胞是否具有免疫促进作用,为中草药复方在水产养殖中的研制与应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

五种中草药复方为鳃鲈现代产业技术教育部工程研究中心自主研发,均以主成分命名,分别为多糖(Dt)复方、白头翁(Btw)复方、板蓝根(Blg)复方、大黄(Dh)复方、百里酚(Blf)复方,分别用 5%二甲基亚砷溶解成 1.0 mg/mL, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清备用。花鳃鲈(200 g±9.7 g), 购自福建省龙岩大泉鳃鲈养殖有限公司。

### 1.2 花鳃鲈外周血白细胞的分离

**1.2.1 花鳃鲈血样制备** 丁香油麻醉花鳃鲈, 用经 3 000 U/mL 肝素钠浸润的注射器从花鳃鲈尾静脉

取血 1 mL, 加入两倍体积的细胞培养基, 混匀, 4 °C 保存待用。

**1.2.2 花鳃鲈外周血白细胞的分离** 用生理盐水将 Percoll 分离液配制成 20% (1.031 g/mL)、30% (1.043 g/mL)、40% (1.056 g/mL)、50% (1.067 g/mL)、60% (1.090 g/mL) 5 个不连续密度梯度, 分别取 0.5 mL 各密度的分离液于不同的 1.5 mL 离心管中, 沿管壁小心缓慢加入上述血液样品 1 mL, 每个密度重复三管, 室温 400 g 离心 20 min。取上清, 等体积加入细胞培养基, 混匀制成白细胞悬液。

**1.2.3 白细胞计数** 取 20 μL 上述白细胞悬液于血球计数板中, 加入 20 μL 吉姆萨(Giemsa)染色液, 显微镜上计数每个密度梯度分离液中白细胞; 另取 100 μL 白细胞悬液, 使用流式细胞仪检测白细胞浓度, 综合分析并选择最适密度的分离液分离花鳃鲈外周血白细胞。

### 1.3 白细胞的呼吸暴发测定与数据分析

在 96 孔板中, 每一行为一组, 每组分为两个亚组(L, N), 每个亚组 3 个孔, 第一行(A 行)作为空白组, 其余各行(B~F 行)为实验组。96 孔板每孔加入 100 μL  $1.0 \times 10^5$  cell/mL 白细胞悬液, A 行加入 100 μL PBS 缓冲液, B~F 行分别加入 Dt、Btw、Blg、Dh 和 Blf 共 5 种 1.0 mg/mL 中草药复方, 每孔用 PBS 缓冲液补齐到 300 μL。室温孵育 2 h 后去上清 100 μL, 用细胞培养基 100 μL 清洗三次。L 亚组每孔加 50 μL 细胞培养基和 50 μL PBS 缓冲液, N 亚组每孔加入 50 μL 0.2% NBT 溶液和 50 μL 细胞培养基, 室温孵育 1 h。每孔去上清 100 μL, 加入 100 μL 甲醇固定 3 min, 去上清 100 μL, 再用 100 μL 70%甲醇清洗 3 次, 小心吸走孔内所有液体, 室温风干, 每孔加入 100 μL 2 mol/L 氢氧化钾和 200 μL 二甲基亚砷, 酶标仪测定每孔的 OD<sub>630nm</sub> 值。

分别计算每组的相对呼吸暴发活性(SPO)、实验组相较于空白组的呼吸暴发提高率 NBT%。

$$SPO = OD_N - OD_L, \quad (1)$$

$NBT\% = [(SPO_{\text{实验组}} - SPO_{\text{空白组}}) / SPO_{\text{空白组}}] \times 100\%$ , (2) 式中, OD<sub>N</sub>: 使用酶标仪检测 N 亚组在波长 630 nm 处的 OD 值; OD<sub>L</sub>: 使用酶标仪检测 L 亚组在波长 630 nm 处的 OD 值。

### 1.4 白细胞的吞噬活性测定与数据分析

流式细胞术测定白细胞的吞噬活性: 分别取 5 种 1.0 mg/mL 中草药复方药液 100 μL 于不同的离心管中, 每种药液设置 3 个重复, 作为 5 个实验组, 另取 100 μL

5%二甲基亚砜于另外 3 个离心管中, 作为空白对照。每管加入 200  $\mu\text{L}$   $1.0 \times 10^5$  cell/mL 白细胞悬液, 孵育 2 h, 每管加入 20  $\mu\text{L}$  用生理盐水 100 倍稀释的荧光微球溶液, 避光孵育 1 h, 依次使用流式细胞仪上机检测。

图 1 为以参数前向散射角(forward scatter, FSC)为  $x$  轴, 侧向散射角(side scatter, SSC)为  $y$  轴建立的散点图, 分别代表细胞的复杂程度和大小, 图 2 为 FITC 直方图(横坐标代表细胞的大小, 纵坐标代表细胞的丰富度)。分别计算白细胞吞噬率、发生吞噬白细胞率, 公式如下:

$$\text{发生吞噬白细胞率(单位: \%)} = 100 \times (N - M_1 - M_2) / (N_1 - M_1 - M_2), \quad (3)$$

$$\text{微球总数 } N_2 = P_1 + 2P_2 + 3P_3 + 4P_4 + 5P_5, \quad (4)$$

$$\text{白细胞吞噬率(单位: \%)} = 100 \times (N_2 - M_1 - 2M_2) / N_2, \quad (5)$$

式中,  $M_1$ 、 $M_2$ : 未被吞噬的荧光微球颗粒数,  $M_1$  中的每个颗粒包含 1 个荧光微球,  $M_2$  中每个颗粒包含 2 个荧光微球;  $N$ : 所有发出荧光的颗粒数;  $N_1$ : 检测得到

的颗粒总数;  $N_2$ : 荧光微球颗粒总数;  $P_1 \sim P_5$ : 分别表示发出单个、2 个、3 个、4 个和 5 个荧光强度的颗粒数, 一个荧光强度代表一个荧光微球颗粒。

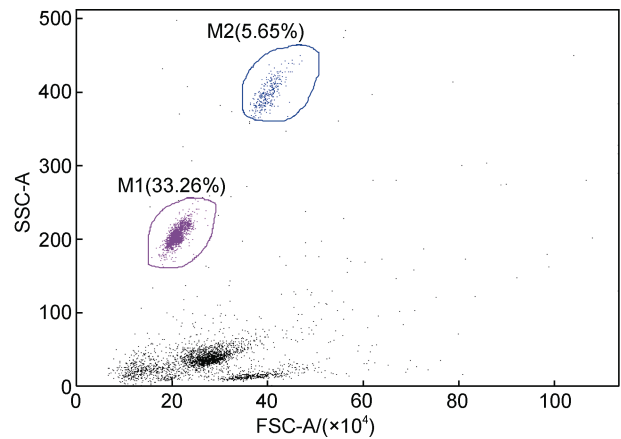


图 1 花鳗鲡白细胞吞噬反应的 SSC/FSC 二维散点图  
Fig.1 SSC/FSC two-dimensional scatter plot of phagocytosis in *A. marmorata*

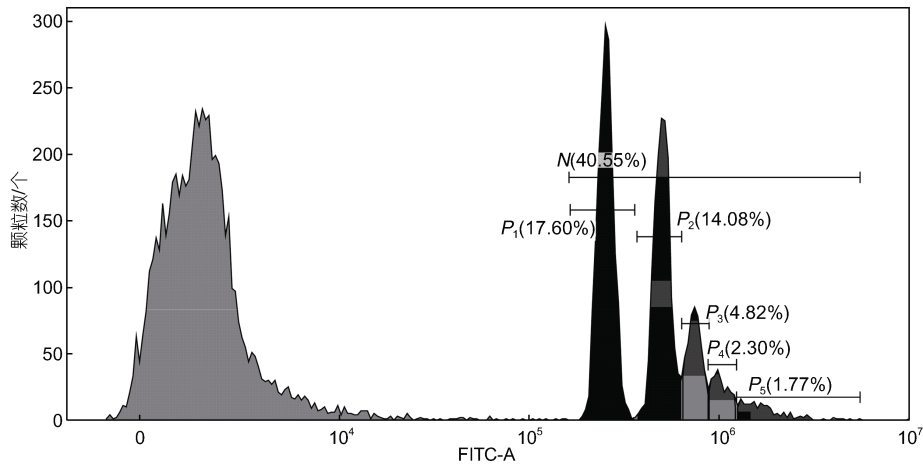


图 2 花鳗鲡白细胞吞噬反应的 FITC 直方图  
Fig.2 FITC histogram of phagocytosis in *A. marmorata*

## 1.5 统计学分析

实验数据处理采用 SPSS 25.0 统计学软件进行单因素方差分析处理, Duncan 法进行多重比较, 结果以平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 花鳗鲡外周血白细胞的分离

两种测定白细胞浓度方法的结果如图 3, 花鳗鲡外周血在 20%、30%、40%、50%、60%这 5 个密度梯度的 Percoll 分离液的作用下, 分离获得的白细胞的数量随着 Percoll 分离液的密度下降而不断减少,

即  $20\% < 30\% < 40\% < 50\% < 60\%$ , 其中, 30%和 40%的密度获得的白细胞数量都是在  $10^5$  cell/mL 左右, 而流式细胞仪要求上机颗粒浓度在  $10^5$  cell/mL 左右更具精确性, 因此, 30%和 40%的两个分离液密度更加适合本实验要求。对比两种计数方法, 可以看到, 染色法计算得出的白细胞数量普遍小于流式细胞术, 但是相差不超过 10%, 随着分离液梯度变化的规律也一致, 重复性良好, 符合实验要求。

### 2.2 五种中草药复方对花鳗鲡白细胞氧呼吸暴发活性的影响

5 种中草药复方对花鳗鲡白细胞的氧呼吸暴发活性的影响结果如图 4, NBT%为各中草药复方与空白

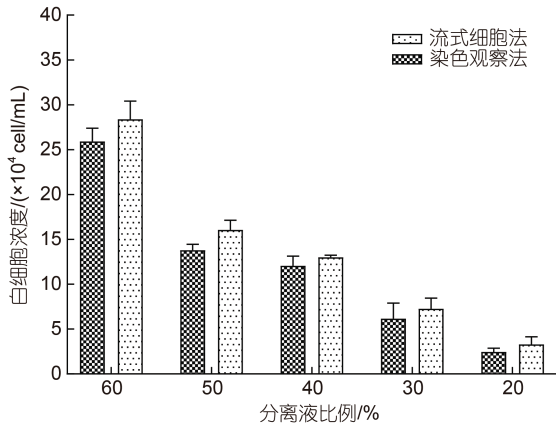


图3 各比例梯度的 Percoll 分离液分离花鳗鲡外周血白细胞的效应

Fig.3 Separation of leukocyte from *A. marmorata* peripheral blood by Percoll separation solution in different density gradients

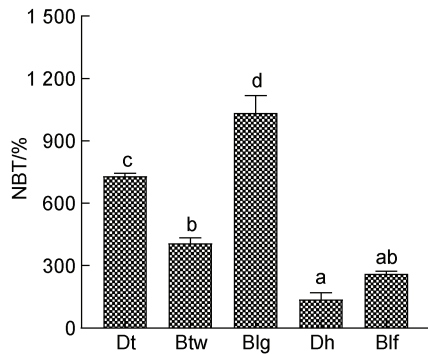


图4 五种中草药复方与花鳗鲡白细胞孵育后的呼吸暴发活性

Fig.4 Respiratory burst activity of *A. marmorata* leukocyte after incubation with five Chinese herbal compounds  
注: 不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ )

组比较的相对呼吸暴发活性提高率。5 种中草药复方皆在不同程度上提高了花鳗鲡外周血白细胞的呼吸

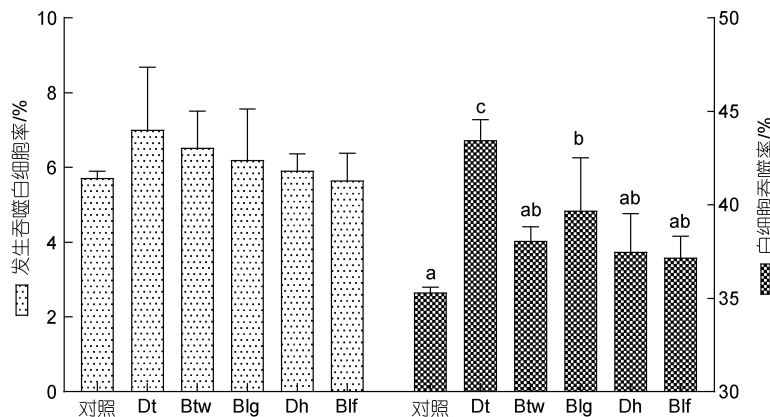


图5 五种中草药复方对花鳗鲡白细胞吞噬能力的影响

Fig.5 Effects of five Chinese herbal compounds on the phagocytosis of leukocyte from *A. marmorata*  
注: 不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ )

暴发活性, 呼吸暴发活性大小依次为 Blg>Dt>Btw>Blf>Dh, 其中 Blg 组和 Dt 组的 NBT% 分别高达 1 030.00% 和 728.57%, 约为空白组的 10 倍和 7 倍, 均极显著高于 Dh 和 Blf 组 ( $P < 0.01$ )。Btw 组的 NBT% 为 413.00%, 是空白组的 4 倍, 并显著高于 Dh 组 ( $P < 0.05$ ), 与 Blf 组差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 在该实验中, Dt 组、Btw 组和 Blg 组对花鳗鲡白细胞的呼吸暴发活性的促进效果最佳。

### 2.3 五种中草药复方对花鳗鲡白细胞吞噬能力的影响

从两个方面评价 5 种中草药复方对花鳗鲡外周血白细胞的吞噬能力, 结果如图 5 所示, 发生吞噬白细胞率代表发生吞噬活动的白细胞的百分数, 花鳗鲡白细胞经过药液的孵育后, 发生吞噬白细胞率均有提高, 大小依次为 Dt>Btw>Blg>Dh>Blf >空白, 但每组间的差异不显著 ( $P > 0.05$ )。白细胞吞噬率代表白细胞在同样微球浓度的溶液体系中吞噬微球总量的百分数, 可以看出, 5 种中草药复方均较大程度上提高了白细胞吞噬率, 由大到小依次为 Dt>Blg>Btw>Dh>Blf >空白, 其中 Dt 组的白细胞吞噬率与空白组的差异极显著 ( $P < 0.01$ ), Blg 组显著高于空白组 ( $P < 0.05$ ), Btw、Dh 和 Blf 组的白细胞吞噬率虽然高于空白组, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 Percoll 细胞分离液分离花鳗鲡外周血白细胞的 条件优化

生物种类不同, 血细胞组成和每种血细胞含量也有所不同, 因此针对不同的生物类型, 应选择适合的血细胞分离条件。国内外有许多学者对不同鱼类的白细胞分离条件进行了调整与优化, 如半滑舌鲷(郝

爽等, 2018)、鲤鱼(丰培金等, 2004)和真鲷(孙修勤, 2000)等。测定白细胞呼吸暴发活性和吞噬活性要求实验白细胞浓度在  $10^5$  cell/mL 左右, 浓度过高或过低都会影响酶标仪和流式细胞仪检测的精确性和准确性。经实验验证, 30%和 40%的密度获得的花鳗鲡外周血白细胞数量在  $10^5$  cell/mL 左右, 符合实验要求。因此在正式的白细胞分离实验中, 采取 40%和 30%分离液上下层叠加的体系。白细胞吞噬实验需要的细胞种类应为巨噬细胞和中性粒细胞等具有吞噬作用的白细胞。而该体系下得到的白细胞除了这类吞噬细胞外还存在血小板等其他不具有吞噬作用的血细胞, 使得实验获得的发生吞噬白细胞率偏低。这一点在丰培金等(2004)的研究中得到证实, 在同一离心管中叠加不同密度的细胞分离液分离鲤鱼外周血白细胞, 并鉴定了各液层分离出来的白细胞种类, 发现每种血细胞(红细胞除外)在各个液层皆有分布, 但浓度比例各异。因此, 在后续的实验, 应寻求能更准确分离具有吞噬作用白细胞的方法, 以提高实验数据的精确度。

### 3.2 白细胞浓度计数方法的比较

本研究在对 Percoll 分离液密度优化的实验中, 使用了两种方法计数白细胞浓度, 分别为染色观察法和流式细胞术。从实验结果来看, 流式细胞术比染色观察法计算得出的白细胞数量多。究其原因可能是使用血涂片在显微镜下计数, 准确性不高, 误差大, 且费时费力; 再者, 染色剂本身的局限性使得着色的白细胞种类不完全, 而流式细胞仪检测细胞的优势在于仪器的检测通道仅允许颗粒依次通过, 不但能快速而准确地定量, 还能根据颗粒的各种属性进行分选分析, 因此能捕捉到常规染色法中未能被染色剂着色的白细胞, 既有准确性又有针对性, 还省时省力, 检测更全面。

由于流式细胞术有强大的分选功能, 近些年来, 国内外许多科学家应用流式细胞术精确区分了许多类型的白细胞。Faucher 等(2007)使用流式细胞术成功区分了中性粒细胞、单核细胞和 B 淋巴细胞等白细胞类型, 但未能完全识别淋巴细胞亚群。Van De Geijn 等(2011)同样采用流式细胞术检测出浆细胞、有核红细胞、淋巴细胞亚群等, 分类更加全面。阳晶等(2015)应用流式细胞术从混合细胞群中分选活的衰老细胞。王新等(2013)发展并优化了一套操作简便、效率较高的流式细胞仪实验技术来分选转基因斑马鱼的荧光标记细胞。在今后的实验设计中, 可研究使用流式细

胞仪有效分选出具有吞噬作用的花鳗鲡白细胞, 省去体外分离白细胞的繁琐步骤, 直接在仪器上选择特定细胞群, 并分析细胞群的特定功能; 还可以研究选用微流控芯片全自动装置来检测和分选白细胞(宋振玉等, 2015)。

### 3.3 五种中草药复方对激活白细胞免疫作用的影响

本实验中用于筛选的五种中草药复方分别由多糖、白头翁、板蓝根、大黄、百里酚为主要成分, 配伍多种中药免疫活性物质制作而成。多糖主要具有抗氧化、抗病毒、提高免疫力等活性(孟祥云等, 2018), 在水产动物疾病防治研究中的用途非常广泛, 如当归多糖(谭连杰等, 2018)、海带多糖(林建斌等, 2017)、黄芪多糖(章燕铃等, 2021)分别对卵形鲳鲆、大黄鱼、黄鳝等都有免疫增强的作用。白头翁中的五环三萜皂苷类化合物是影响其药理学活性的主要成分, 具有抗菌、抗炎、促进免疫以及抗血吸虫病等作用(李春晓等, 2018); 夏与晴等(2019)研究表明白头翁针对水产养殖中常见的 5 种致病菌有良好的抑菌效果。板蓝根具有清热解毒、抗病毒和凉血利咽等功效, 彭翔等(2013)用不同浓度的板蓝根浓缩液拌料投喂施氏鲟幼鱼, 发现其抗氧化酶活性、补体 C3 和抗体 IgM 有一定的提高。大黄以清热、延缓衰老成分和消炎抑菌等功效著称于世, 李忠琴等(2012)检测大黄对 5 株从病鳗中分离出来的气单胞菌的最低抑菌浓度, 有很好的抑菌效果, 最低抑菌浓度仅为 0.75~1.50 mg/mL。百里酚来源于百里香、麝香草等植物, 该成分具有抗氧化、抑菌抗炎和防腐等功效, 百里酚目前应用于水产鱼类疾病的研究较少。在食品研究中, 裴海闰等(2011)发现百里酚对大豆油有较强的抗氧化作用, 且对金黄色葡萄球菌等四株细菌均有不同程度的抑菌效果。上述 5 种复方主要成分一般有其偏好的功效, 与具有其他作用的中药活性物质配伍后, 在一定程度上能扩大作用范围和补充更多的功效。

鱼类白细胞的呼吸暴发是指白细胞吞噬病原微生物后的一种氧依赖的杀伤机制, 生成的  $OCI^-$  具有杀菌效果, 可以杀灭被吞噬进白细胞的有害物质。NBT 能与  $O_2^-$  相互作用产生蓝色的甲腓, 甲腓在 560 nm 处有最大的峰值。血细胞中的嗜中性粒细胞和巨噬细胞拥有着强大的吞噬作用, 在机体非特异性免疫机制中有必不可少的作用。本实验研究花鳗鲡白细胞的免疫活性, 在荧光微球的胁迫下, 白细胞被药物激活产生吞噬作用, 分别以发生吞噬白细胞率和白细胞吞噬率来评价。孙晓飞(2014)检测了 39

种单味中药对棕点石斑鱼血白细胞的呼吸暴发和吞噬作用,结果显示,大部分中草药对石斑鱼白细胞免疫作用有增强效果。从本实验结果可以看出,五种复方均促进了花鳗鲡白细胞的呼吸暴发活性,其中多糖复方、白头翁复方、板蓝根复方的促进效果优于大黄复方和百里酚复方。五种中草药复方影响花鳗鲡白细胞吞噬率的差异性表现比发生吞噬白细胞率突出,其中多糖、白头翁、板蓝根复方组的白细胞吞噬率显著高于空白组,且高于大黄复方和百里酚复方。在发生吞噬白细胞率中,五种中草药复方均高于空白组,但差异并非十分明显,原因可能是白细胞悬液中含有大量不具有吞噬作用的血细胞,悬液中细胞基数增大,有吞噬作用的白细胞比率大大降低,导致实验检测的各复方之间发生吞噬白细胞率差异不显著。

#### 4 结论

中草药免疫增强剂应用于鱼类的研究已有多年的历史,本研究综合白细胞的呼吸暴发和吞噬能力的结果,分析五种中草药复方对花鳗鲡白细胞免疫活性的影响,其中多糖复方、白头翁复方、板蓝根复方的体外激活白细胞免疫活性的效应更突出,作为花鳗鲡免疫增强剂具有良好的推广应用前景,有助于扩大水产养殖业渔药研制与应用的选择。

#### 参 考 文 献

- 于海振, 2014. 花鳗鲡营养成分比较研究[D]. 厦门: 集美大学.
- 丰培金, 卢强, 李莲瑞, 等, 2004. 鲤鱼外周血白细胞的分离和体外培养[J]. 中国兽医学报, 24(4): 369-371.
- 王晓雯, 朱华, 马国庆, 2017. 高溶氧对西伯利亚鲟幼鱼非特异性免疫指标的影响[J]. 四川农业大学学报, 35(1): 93-98.
- 王新, 张素珍, 王学谦, 等, 2013. 流式细胞仪分选转基因斑马鱼胚胎荧光标记细胞的一种快速方法[J]. 中国细胞生物学学报, 36(3): 356-360.
- 孙修勤, 2000. 真鲷淋巴细胞的分离[J]. 黄渤海海洋, 18(2): 47-50.
- 孙晓飞, 2014. 棕点石斑鱼中草药免疫增强剂的筛选及其非特异性免疫增强效果研究[D]. 海口: 海南大学.
- 阳晶, 黄岚珍, 黄希仕, 等, 2015. 一种应用流式细胞术快速分选活的衰老细胞的方法[J]. 中国细胞生物学学报, 37(1): 74-78.
- 李忠琴, 关瑞章, 汪黎虹, 等, 2012. 六种中药及其复方对鳗鲡致病性气单胞菌的体外抑制作用[J]. 水生生物学报, 36(1): 85-92.
- 李春晓, 王月明, 韦东来, 等, 2018. 白头翁药理作用的研究进展[J]. 植物医生, 31(8): 26-29.
- 宋振玉, 张晓娟, 宋永欣, 2015. 全自动检测和分选全血中白细胞的微流控芯片装置研究[J]. 中国细胞生物学学报, 37(11): 1534-1540.
- 陈健荣, 刘利平, 2018. 4种常用渔药对花鳗鲡幼鱼的急性毒性[J]. 水产科学, 37(2): 233-238.
- 林建斌, 梁萍, 朱庆国, 等, 2017. 海藻多糖对大黄鱼幼鱼生长性能和免疫力的影响[J]. 中国饲料(19): 40-44.
- 孟祥云, 汪永锋, 杨丽霞, 等, 2018. 中药多糖抗氧化作用及其机制研究进展[J]. 中华中医药杂志, 33(8): 3504-3509.
- 郝爽, 罗璋, 张振国, 等, 2018. 非连续密度梯度离心法分离半滑舌鳎外周血白细胞[J]. 河北渔业(3): 1-4, 24.
- 夏与晴, 刘文珍, 傅松哲, 等, 2019. 25种中草药及其联合用药配伍对5种水产养殖常见致病菌的抑菌作用[J]. 大连海洋大学学报, 34(1): 7-14.
- 章燕铃, 孙彤, 王红权, 等, 2021. 黄芪多糖免疫功能机理及在水产养殖中的应用进展[J]. 饲料研究(15): 127-130.
- 彭翔, 夏磊, 张洪玉, 等, 2013. 板蓝根对施氏鲟幼鱼抗氧化及免疫功能的影响[J]. 大连海洋大学学报, 28(6): 573-577.
- 程镇燕, 曲木, 孙颖, 等, 2017. 精氨酸在体内和体外试验中对鲤鱼免疫力的影响[J]. 动物营养学报, 29(9): 3293-3300.
- 路晶晶, 郭冉, 齐国山, 等, 2018. 复方中草药对大菱鲆幼鱼生长性能及非特异性免疫指标的影响[J]. 大连海洋大学学报, 33(6): 722-728.
- 裴海润, 韩笑, 曹学丽, 2011. 百里香精油的成分分析及其抗氧化和抑菌活性评价[J]. 中国食品学报, 11(5): 182-188.
- 谭连杰, 林黑着, 黄忠, 等, 2018. 当归多糖对卵形鲳鲂生长性能、抗氧化能力、血清免疫和血清生化指标的影响[J]. 南方水产科学, 14(4): 72-79.
- FAUCHER J L, LACRONIQUE-GAZAILLE C, FRÉBET E, *et al*, 2007. "6 markers/5 colors" extended white blood cell differential by flow cytometry [J]. Cytometry Part A, 71A(11): 934-944.
- HU H Y, SHEN X F, LIAO B S, *et al*, 2019. Herbgonomics: a stepping stone for research into herbal medicine [J]. Science China Life Sciences, 62(7): 913-920.
- HUANG C T, CHIOU J T, KHAC H T, *et al*, 2016. Improving the management of commercial giant mottled eel *Anguilla marmorata* aquaculture in Taiwan for improved productivity: a bioeconomic analysis [J]. Fisheries Science, 82(1): 95-111.
- VAN DE GEIJN G J, VAN REES V, VAN PUL-BOM N, *et al*, 2011. Leukoflow: multiparameter extended white blood cell differentiation for routine analysis by flow cytometry [J]. Cytometry Part A, 79A(9): 694-706.
- WANG X L, WANG L, REN Q, *et al*, 2016. Two superoxide dismutases (SODs) respond to bacterial challenge identified in the marbled eel *Anguilla marmorata* [J]. Aquaculture, 451: 316-325.

## EVALUATION ON THE ACTIVITY OF FIVE CHINESE HERBAL COMPOUNDS IN ACTIVATING PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES OF *ANGUILLA MARMORATA* IN VITRO

LI Zhong-Qin<sup>1,4</sup>, ZHANG Xin-Yan<sup>2</sup>, YANG Qiu-Hua<sup>3,4</sup>, LIN Mao<sup>1,4</sup>,  
JIANG Xing-Long<sup>1,4</sup>, ZHAI Shao-Wei<sup>1,4</sup>

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Freshwater Fisheries Research Institute of Fujian, Fuzhou 350002, China; 3. Fujian Fisheries Research Institute, Xiamen 361012, China; 4. Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education, Xiamen 361021, China)

**Abstract** As a green substitute for chemical fishery drugs such as antibiotics, Chinese herbal medicines have many effects such as antibacterial, anti-inflammatory, and promoting the growth of cultured fish. To study the role of Chinese herbal compounds in the prevention and control of diseases to *Anguilla marmorata* and expand the selection of fishery medicine development and application in aquaculture, the separation system of leukocytes from peripheral blood of *A. marmorata* was optimized by discontinuous density gradient centrifugation. Five separation solutions in densities of 1.031, 1.043, 1.056, 1.067, and 1.090 g/mL were set up. The concentration of leukocytes in each separation solution was detected by staining observation and flow cytometry. After the five compound solutions in concentration of 1.0 mg/mL were incubated with  $10^5$  cell/mL leukocytes for 2 hours, the respiratory burst activity and phagocytic activity of leukocytes were analyzed by NBT method and flow cytometry, and the effects of the five Chinese herbal compounds on the activation of leukocytes in peripheral blood of *A. marmorata* were evaluated. Results show that the leukocyte concentration of  $10^5$  cell/mL was achieved from the separation solutions of 1.043 g/mL and 1.056 g/mL. Flow cytometry was more sensitive and accurate than staining method in detecting the concentration of leukocytes. The five compounds could significantly improve the respiratory burst activity of leukocytes from peripheral blood of *A. marmorata* ( $P < 0.05$ ), among them *Radix isatidis* (Banlangen, Blg) compound could maximally increase the leukocyte respiratory burst activity ( $P < 0.05$ ). These compounds could also increase the leukocyte phagocytosis rate to certain degrees, among them polysaccharide (Doutang, Dt) compound and *Radix isatidis* (Banlangen, Blg) compound could also significantly increase leukocyte phagocytic activity ( $P < 0.05$ ), but the three others among the five compounds was not significant ( $P > 0.05$ ).

**Key words** leukocyte respiratory burst activity; leukocyte phagocytic activity; flow cytometry; Chinese herbal compounds; *Anguilla marmorata*