

壳聚糖通过甲状腺激素对草鱼免疫功能的调节

华雪铭, 闫大伟, 周洪琪

(上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 200090)

摘要:以初始体质量为 (1.04 ± 0.01) g 的草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 为对象, 在探讨内分泌激素—甲状腺激素对草鱼免疫功能影响的基础上, 研究壳聚糖对草鱼免疫功能的内分泌调控。实验分别制作含甲状腺激素饲料 (在基础饲料中分别添加 0 mg/kg、1 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg 饲料的甲状腺激素) 和含壳聚糖饲料 (在基础饲料中分别添加 0、0.25%、0.50%、0.75%、1.00% 的壳聚糖), 在循环水族箱中饲养草鱼 70 d。实验结束后测定试验鱼血清中的甲状腺激素 (T_3 和 T_4) 含量和非特异性免疫功能。结果表明, 饲料中添加甲状腺激素对草鱼血清中甲状腺激素含量和非特异性免疫功能 (头肾和脾脏溶菌酶活性、头肾 NO 含量) 有显著影响 ($P < 0.05$), 且两者变化趋势相似。故认为甲状腺激素能够调控草鱼的非特异性免疫功能。壳聚糖对草鱼血清中甲状腺激素含量和非特异性免疫功能 (吞噬活性、头肾和脾脏溶菌酶活性、头肾 NO 含量) 也有显著影响 ($P < 0.05$), 而且在各实验组有较为相似的变化趋势。综合以上结果认为, 壳聚糖可以通过内分泌途径甲状腺激素水平的变化实现对草鱼非特异性免疫功能的调控。鉴于 0.50% 壳聚糖组具有最强的非特异性免疫功能, 认为在本实验条件下, 壳聚糖在草鱼饲料中的适宜添加量为 0.50%。[中国水产科学, 2008, 15(4): 630-636]

关键词: 壳聚糖; 甲状腺激素; 免疫调控; 草鱼

中图分类号: S96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2008)04-0630-07

近年来, 免疫刺激物在水产动物健康养殖中的应用研究已越来越受到人们重视, 但是对多糖类免疫刺激物如甲壳素和壳聚糖的应用研究相对较少^[1], 且多集中在对免疫功能的调节效果上。研究表明, 壳聚糖既可以提高处于正常生理条件下鱼体的非特异性免疫功能^[2], 也可以调节处于免疫功能低下状态的暗纹东方鲀 (*Fugu obscurus*) 和异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 的免疫功能^[3-4], 但是有关壳聚糖对免疫功能调节机理的研究仍处于探索阶段。目前较公认的作用机制认为, 甲壳素、壳聚糖和壳寡糖都可以和小鼠巨噬细胞膜上的受体结合进而被吞噬^[5-7]。近 20 年来, 由于免疫学的迅速发展, 很多学者已认识到并证实神经内分泌系统与免疫系统之间存在着双向信息传递机制^[8]。鱼类的神经内分泌和免疫系统的结构较人类和哺乳动物低等, 但鱼类的神经内分泌系统与免疫系统也可以相互影响^[9]。在内分泌激素中, 甲状腺激素是由甲状腺合成和分泌的, 主要有甲状腺素又称四

碘甲腺原氨酸 (T_4) 和三碘甲腺原氨酸 (T_3) 2 种。甲状腺激素不仅可以促进代谢、促进胚胎发育和幼体生长、提高神经系统的兴奋性, 促进神经组织的正常生长和发育, 对于维持免疫系统功能也是必不可少的。对哺乳动物和鸟类的研究发现, 甲状腺激素具有免疫调节作用^[10-11]; 对水产动物而言, 用甲状腺素浸泡处理可以促进斑马鱼 (*Danio rerio*) 免疫系统的发育^[12], 口服 T_3 可以提高鲮 (*Labeo rohita*) 的免疫功能, 增强对嗜水气单胞菌的抗感染能力^[13]。因此, 了解草鱼的免疫功能与其甲状腺激素的关联以及壳聚糖能否通过甲状腺激素调节草鱼的免疫功能, 将有助于深入研究草鱼的免疫机制。鉴于壳聚糖对草鱼类免疫功能的调节作用及其通过内分泌途径调节免疫功能的研究尚未见报道, 本实验以草鱼为研究对象, 在验证甲状腺激素对草鱼免疫功能影响的基础上, 探讨壳聚糖对草鱼免疫功能的内分泌调节机制。

收稿日期: 2007-11-07; **修订日期:** 2008-03-06.

基金项目: 上海市重点学科建设项目 (Y1101); 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金 (677170701); 上海海洋大学博士启动基金 (05-25).

作者简介: 华雪铭 (1974-), 女, 副教授, 博士, 主要研究方向为水产动物营养饲料与免疫. Tel: 021-65710526; E-mail: xmhua@shfu.edu.cn

通讯作者: 周洪琪. E-mail: hqzhou@shfu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

壳聚糖由本课题组提取,实验用草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 体质量 (1.04 ± 0.01) g, 购自上海孙桥良种场,白葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 由上海第二医科大学微生物教研室馈赠。甲状腺激素片剂购自上海实业联合集团长城药业有限公司 (400 mg/片)。

1.2 实验设计及饲料制备

1.2.1 甲状腺激素对免疫功能影响的试验 采用单因子浓度梯度法,分别在基础饲料中添加 0 (对照)、1 mg/kg (饲料)、5 mg/kg (饲料)、10 mg/kg (饲料) 的甲状腺激素^[13],以基础饲料为对照组,每组 30 尾鱼;以粉料为载体按实验设计掺入甲状腺激素,用逐级扩大的方法将甲状腺激素和基础饲料混合均匀,然后加工成直径为 2.5 mm 的颗粒饲料,晒干经破碎后备用。基础饲料配方如下:豆粕 25%、菜粕 20%、次粉 24.85%、棉粕 10%、米糠 10%、鱼粉 5%、沸石粉 4%、多维 0.4%、多矿 0.6%、蛋氨酸 0.15%;营养组成分别为粗蛋白 34.8%、粗脂肪 1.22%、灰分 10.7%、水分 11.0%。

1.2.2 壳聚糖对草鱼免疫功能的调控试验 以基础饲料 (同 1.2.1) 为对照组,采用单因子浓度梯度法,分别在基础饲料中添加 0%、0.25%、0.50%、0.75% 和 1.00% 的壳聚糖^[14] (添加壳聚糖时相应减少沸石粉的比例),每组设 3 个重复,每重复 30 尾鱼。按实验设计,以粉料为载体,用逐级扩大的方法将壳聚糖和基础饲料混合均匀,然后加工成直径为 2.5 mm 的颗粒饲料,晒干经破碎后备用。

1.3 实验鱼饲养管理

挑选体质量和体长相近的草鱼暂养于上海水产大学生态楼养殖实验室循环水族箱 (70 cm × 60 cm × 50 cm) 中。实验前驯养一周,期间投喂基础饲料。2006 年 7 月 1 日至 9 月 10 日进行饲养实验,每天投喂 3 次 (8:00, 12:00, 16:00), 开始日投喂量为鱼体质量的 15%, 随着实验的进行投喂量适时调整。实验期间,水温 (25 ± 1) °C, DO > 5 mg/L, NH₃-N 水平低于 0.3 mg/L。

1.4 实验方法

1.4.1 血清和粗酶液的提取 70 d 饲养实验结束后,从每组中随机选取 20 尾鱼,用纱布擦干其尾部,分别从尾静脉处抽血,4 °C 放置 24 h, 6 000 r/min

4 °C 离心 10 min, 取血清 -70 °C 保存,待测。

从取完血的鱼中取出脾脏和头肾,分别加入 10 倍体积的 0.86% 4 °C 生理盐水,冰浴匀浆,3 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 取上清液即得粗酶液。

1.4.2 溶菌酶活性 采用南京建成生物研究所生产的试剂盒,以溶壁微球菌 (*Micrococcus lysolei*, Sigma) 冻干粉为底物,按比浊法测定脾脏和头肾的溶菌酶活性 ($\mu\text{g/g tissue}$)。

1.4.3 一氧化氮 (NO) 含量 采用南京建成生物研究所生产的试剂盒,以考马斯亮兰法测定脾脏和头肾粗酶液中的蛋白含量,按硝酸还原酶法测定脾脏和头肾的一氧化氮 (NO) 含量 ($\mu\text{mol/g prot}$)。

1.4.4 白细胞吞噬测定 每组随机取 10 尾鱼,分别从尾静脉处抽血,在经过抗凝处理的 100 μL 血液中加入 20 μL 的白色葡萄球菌悬液 ($30 \times 10^8 \text{ cells/mL}$), 混合均匀后通过水浴、推片、风干、瑞氏染色,用电子显微镜检查 100 个白细胞,计算白细胞吞噬率和白细胞吞噬指数^[15]。

1.4.5 血清中甲状腺激素含量测定 采用放射免疫分析 (PR) 法测定草鱼血清 T₃、T₄ 含量,检测试剂盒购自上海放射免疫分析技术有限公司。用质量浓度为 0.125 ng/mL、0.25 ng/mL、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、3.0 ng/mL、4.0 ng/mL、5.0 ng/mL、6.0 ng/mL、8.0 ng/mL 的 T₃ 标准液和浓度为 0.625 ng/mL、1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、3.75 ng/mL、5 ng/mL、7.5 ng/mL、10 ng/mL、15 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL 的 T₄ 标准液,分别与 ¹²⁵I-T₃、T₃ 抗体、¹²⁵I-T₄、T₄ 抗体、PR 试剂充分混合后,3 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液,测定沉淀放射性,以建立 T₃ 和 T₄ 标准曲线。待测血清按上述方法处理后,根据沉淀放射性在标准曲线上查得 T₃ 和 T₄ 含量。

1.5 数据分析

所得数据以平均值 ± 标准差表示,用 SPSS 11.0 分析软件进行单因子方差分析,差异显著者再进行 Duncan' S 多重比较,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 甲状腺激素对血清 T₃、T₄ 含量的影响

70 d 的饲养实验结果表明,饲料中甲状腺激素的添加对草鱼血清中 T₃、T₄ 含量有显著影响 (表 1)。5 mg/kg 饲料组的 T₃、T₄ 含量均为最大,显著高于对照组和 1 mg/kg 饲料组。5 mg/kg 饲料组和 10 mg/kg 饲料组的 T₃、T₄ 水平没有显著差异。

2.2 甲状腺激素对免疫功能的影响

2.2.1 甲状腺激素对外周血白细胞吞噬活性的影响

饲喂甲状腺激素对草鱼外周血白细胞的吞噬

活性无显著影响(表1)。吞噬活性虽然在各甲状腺激素组无显著差异,但随着甲状腺激素投喂量的增加,吞噬活性呈现先增大后减少的趋势。

表1 甲状腺激素对草鱼血清中 T₃、T₄ 含量和免疫功能的影响

Tab.1 Effects of thyroid hormone on the amount of triiodothyronine, thyroxine in serum and immunity capacity of grass carp $\bar{X} \pm SD; n=10$

项目 Item	甲状腺激素在饲料中的添加量/(mg·kg ⁻¹) Dietary thyroid hormone content			
	0(对照 Cont)	1	5	10
血清 T ₃ /(ng·mL ⁻¹) T ₃ content in serum	0.85±0.21 ^c	1.13±0.11 ^b	1.31±0.12 ^a	1.22±0.09 ^{ab}
血清 T ₄ /(ng·mL ⁻¹) T ₄ content in serum	2.36±0.31 ^c	2.66±0.27 ^{bc}	3.14±0.55 ^a	2.95±0.21 ^{ab}
吞噬率/% Phagocytic percentage	40.56±2.46 ^a	42.60±2.41 ^a	43.50±3.51 ^a	40.50±3.16 ^a
吞噬指数 Phagocytic index	2.14±0.10 ^a	2.18±0.07 ^a	2.18±0.10 ^a	2.09±0.10 ^a
头肾溶菌酶/(μg·g ⁻¹ tissue) Lysozyme activity of anterior kidney	60.84±8.26 ^b	63.53±3.88 ^b	77.06±9.10 ^a	57.76±3.18 ^b
脾脏溶菌酶/(μg·g ⁻¹ tissue) Lysozyme activity of spleen	37.94±6.03 ^b	44.47±3.21 ^b	55.88±9.84 ^a	43.88±6.74 ^b
头肾 NO/(μmol·g ⁻¹ prot) NO content of anterior kidney	7.75±0.61 ^b	8.79±1.12 ^{ab}	9.36±0.88 ^a	8.64±0.64 ^{ab}
脾脏 NO/(μmol·g ⁻¹ prot) NO content of spleen	2.90±0.77 ^a	2.92±0.83 ^a	3.51±0.66 ^a	2.76±0.59 ^a

注:同行不同的上标字母表示差异显著(P<0.05)。

Note: Values with different superscripts in the same row indicate significant difference at P<0.05.

2.2.2 甲状腺激素对溶菌酶活性的影响 草鱼头肾溶菌酶活性大于脾脏溶菌酶活性。饲喂甲状腺激素对草鱼头肾和脾脏中溶菌酶的活性有显著影响(表1)。头肾和脾脏溶菌酶活性以添加5 mg/kg 甲状腺激素时最大,显著高于其他组(P<0.05),1 mg/kg 组、10 mg/kg 组与对照组无显著差异。

2.2.3 甲状腺激素对 NO 含量的影响 草鱼头肾中 NO 含量大于脾脏中 NO 含量,饲喂甲状腺激素对草鱼头肾 NO 含量有显著影响(表1),总体呈现先增大后减小的趋势。其中,头肾中 NO 含量以饲喂5 mg/kg 最大,显著高于对照组(P<0.05)。饲喂甲状腺激素对脾脏中 NO 的含量没有显著影响。

2.3 壳聚糖对免疫功能的影响

2.3.1 壳聚糖对外周血白细胞吞噬活性的影响 饲料中添加壳聚糖对草鱼外周血白细胞的吞噬活性具有显著影响(表2)。0.50% 组的吞噬率最高,

达到46%,显著高于对照组、0.75% 组、1.00% 组,然而继续增加壳聚糖的添加量,白细胞吞噬率有下降的趋势。0.75% 组、0.50% 组和0.25% 组的白细胞吞噬指数显著高于对照组和1.00% 组,但上述3组之间没有显著差异。

2.3.2 壳聚糖对溶菌酶活性的影响 草鱼头肾溶菌酶活性高于脾脏,壳聚糖对草鱼头肾和脾脏溶菌酶活性有显著影响(表2)。头肾溶菌酶活性以0.50% 壳聚糖组最大,显著高于对照组、0.25% 组和1.00% 组。0.75% 组的溶菌酶活性显著高于对照组,但是与0.25%、1.00% 组没有显著差异。对照组、0.25% 组、1.00% 组之间的溶菌酶活性没有显著差异。壳聚糖组的脾脏溶菌酶均显著高于对照组,其中以0.50% 组的溶菌酶活性最大,并显著高于0.75% 组和1.00% 组,与0.25% 组没有显著差异。

表2 壳聚糖对草鱼免疫功能和血清中 T₃、T₄ 含量的影响Tab.2 Effects of chitosan on immunity capacity and amount of triiodothyronine and thyroxine in serum of grass carp
 $\bar{X} \pm SD; n=10$

项目 Item	壳聚糖在饲料中的添加含量 /% Dietary chitosan content				
	0	0.25	0.50	0.75	1.00
吞噬率 /% Phagocytic percentage	40.56 ± 2.46 ^b	43.67 ± 3.54 ^{ab}	46.00 ± 3.94 ^a	42.00 ± 1.69 ^b	40.80 ± 3.71 ^b
吞噬指数 Phagocytic index	2.14 ± 0.10 ^b	2.36 ± 0.14 ^a	2.45 ± 0.08 ^a	2.46 ± 0.09 ^a	2.21 ± 0.12 ^b
头肾溶菌酶 / (μg·g ⁻¹ tissue) Lysozyme activity of anterior kidney	60.84 ± 8.26 ^c	65.29 ± 7.65 ^{bc}	77.06 ± 4.09 ^a	71.53 ± 3.42 ^{ab}	64.37 ± 5.61 ^{bc}
脾脏溶菌酶 / (μg·g ⁻¹ tissue) Lysozyme activity of spleen	37.94 ± 6.03 ^c	50.74 ± 3.13 ^{ab}	57.65 ± 2.40 ^a	48.35 ± 5.40 ^b	48.24 ± 5.55 ^b
头肾 NO / (μmol·g ⁻¹ prot) NO content of anterior kidney	7.75 ± 0.61 ^b	9.13 ± 0.78 ^a	9.52 ± 0.68 ^a	7.79 ± 1.17 ^b	7.78 ± 1.18 ^b
脾脏 NO / (μmol·g ⁻¹ prot) NO content of spleen	2.90 ± 0.77 ^a	3.14 ± 0.60 ^a	3.53 ± 0.92 ^a	3.28 ± 0.74 ^a	3.14 ± 0.91 ^a
血清 T ₃ / (ng·mL ⁻¹) T ₃ content in serum	0.85 ± 0.21 ^d	1.01 ± 0.10 ^c	1.43 ± 0.12 ^a	1.29 ± 0.12 ^{ab}	1.19 ± 0.10 ^b
血清 T ₄ / (ng·mL ⁻¹) T ₄ content in serum	2.36 ± 0.31 ^d	4.24 ± 0.44 ^b	5.22 ± 0.50 ^a	5.00 ± 0.20 ^a	3.09 ± 0.39 ^c

注:同行不同的上标字母表示差异显著 ($P < 0.05$).

Note: Values with different superscripts in the same row indicate significant difference at $P < 0.05$.

2.3.3 壳聚糖对 NO 含量的影响 草鱼头肾的 NO 含量高于脾脏,壳聚糖对草鱼头肾中 NO 含量有显著影响(表2),但不影响脾脏的 NO 含量 ($P > 0.05$)。头肾中 NO 含量以 0.50% 组最大,显著高于对照组 ($P < 0.05$)。对照组、0.75% 组、1.00% 组之间 NO 含量没有显著性差异,但是都显著低于 0.25%、0.50% 组。

2.4 壳聚糖对血清甲状腺激素的影响

壳聚糖对草鱼血清 T₃、T₄ 水平有显著影响。壳聚糖组的 T₃、T₄ 水平显著高于对照组,随着壳聚糖添加量的增加, T₃、T₄ 水平呈现先升高后降低的趋势(表2),0.5% 组草鱼血清 T₃ 水平最高,显著高于 0.25% 组和 1.00% 组,与 0.75% 组没有显著差异;0.5% 组和 0.75% 组草鱼血清 T₄ 水平最高,显著高于 0.25% 组和 1% 组。

3 讨论

3.1 甲状腺激素对草鱼免疫功能的影响

通过投喂甲状腺激素的方式可以引起鱼体血清中甲状腺激素含量的变化。Sahoo^[13] 报道,在基础饲料中分别添加 0、1 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg 饲料的 T₃ 喂养鲮鱼 60 d,血清 T₃ 的含量要明显高于对照组,以 5 mg/kg 饲料组为最高,10 mg/kg 组的血清 T₃ 含量低于 1 mg/kg、5 mg/kg 组,本实验也得到相似的结果,其可能原因是在实验结束前血清 T₃ 含量就已经达最高生理剂量,由于反馈影响 T₃ 的分

解代谢、抑制促甲状腺激素的分泌而最终导致血清甲状腺激素水平的下降^[13];也可能是高浓度的外源甲状腺激素直接反馈调节内源甲状腺激素合成的结果。

内分泌激素和免疫系统之间的相互作用已经被人们所认知,甲状腺激素在个体发育过程中,对于维持免疫系统功能是必不可少的。研究发现,在饲料中添加 1 mg/kg、5 mg/kg、10 mg/kg 饲料 T₃ 后可以提高鲮鱼嗜中性粒细胞活性、血清总蛋白含量和球蛋白含量,其中 5 mg/kg 饲料组具有较强的对嗜水气单胞菌的抗感染能力和较高的抗体滴度^[13]。相反,平鲷 (*Sparus sarba*) 感染弧菌后血清 T₃、T₄ 含量下降,可能是为维持机体基本生命活动所需由合成代谢向分解代谢转化的结果^[16]。Lam 等^[12] 通过免疫相关基因的表达研究,得出 T₄ 可以促进 Rag-1 (作为成熟淋巴细胞的标记) 的表达、显著增加斑马鱼的胸腺体积的结论。本实验中,在饲料中添加 5 mg/kg 饲料的甲状腺激素,在提高血清 T₃、T₄ 水平的基础上,可同时提高头肾和脾脏溶菌酶活性、头肾 NO 含量和外周血白细胞吞噬活性,以上结果表明在生理剂量范围内,血清甲状腺激素含量水平上升,鱼类免疫功能增强;血清甲状腺激素水平下降,鱼类免疫功能也下降。至于甲状腺激素是如何影响免疫功能的,其可能机制是免疫细胞不仅具有多种内分泌激素的受体,还能合成多种内分泌激素并对其发生反应^[8]。目前已证实鼠血浆淋巴

细胞膜上存在甲状腺激素受体,淋巴细胞的活性受到甲状腺激素的调节^[17]。鱼类的内分泌系统与免疫系统之间是否也存在同样的作用机理,有待进一步研究。

3.2 壳聚糖对草鱼免疫功能的调控

尽管壳聚糖可以通过受体机制调节免疫功能^[5-7],并依赖 N-乙酰葡萄糖胺结构刺激巨噬细胞产生 NO^[18],由于巨噬细胞中也含有溶菌酶,因此随着巨噬细胞的活化,溶菌酶活性也增强。巨噬细胞是最重要的吞噬细胞之一,故壳聚糖在活化巨噬细胞的同时,也增强了吞噬功能。本研究发现,在草鱼摄食含壳聚糖的饲料时,伴随着鱼体非特异性免疫功能的变化,血清的甲状腺激素含量也在发生变化,而且两者的变化趋势相同;而通过投喂甲状腺激素的方法亦证实血清 T₃、T₄ 含量与草鱼非特异性免疫功能的变化趋势相似,即 T₃、T₄ 可以调节草鱼的免疫功能,故认为壳聚糖也可以通过内分泌途径甲状腺激素水平的变化实现对草鱼免疫功能的调节。

本实验中壳聚糖可以显著提高草鱼血清中甲状腺激素的含量。其可能原因是,碘是合成甲状腺的必需元素,而壳聚糖含有丰富的碘,可以作为甲状腺合成物的前体发挥作用^[19]。此外,鱼类的营养对甲状腺激素的分泌和 5'-单脱碘酶的活性有显著影响^[20-21]。蛋白质是影响甲状腺激素产生的重要因子^[22]。美洲红点鲑 (*Salvelinus fontinalis*) 摄食低蛋白饲料时血清 T₄ 水平下降,向 T₃ 的转化率降低^[23]。虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 摄食高蛋白饲料时血清中 T₃ 含量显著提高^[24]。研究证明^[4,25-26],壳聚糖可以提高蛋白酶活力,提高鱼体对蛋白质的利用率和消化吸收率。本次实验用添加壳聚糖的饲料投喂草鱼,0.50% 组草鱼血清中 T₃、T₄ 含量最大,显著高于对照组、0.25% 和 1% 组,可能就是由于壳聚糖提高了草鱼对蛋白质的利用率和消化吸收率造成的。但甲状腺激素的含量不随壳聚糖添加量的增加而增加,可能是由于壳聚糖过量添加使血液中碘的含量升高,血碘水平过高产生碘阻断效应,抑制了甲状腺分泌激素的能力^[27];壳聚糖过量添加亦可能扰乱机体正常的生理功能,降低鱼体对营养物质的吸收利用^[28],导致甲状腺激素含量的下降。

参考文献:

- [1] 黄洪敏,邵建忠,项黎新. 鱼类免疫增强剂的研究现状与进展 [J]. 水产学报,2005,29(4): 553-559.
- [2] Anderson D P, Siwicki A K. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion[J]. Progressive Fish Culturist, 1994, 56: 258-261.
- [3] 华雪铭,周洪琪,张冬青,等. 多糖和益生菌对暗纹东方鲀免疫功能的调节 [J]. 水产学报,2006,30(2): 230-235.
- [4] 陈勇. 异育银鲫饲料免疫增强剂的研究 [D]. 上海: 上海水产大学,2005: 85-90.
- [5] Shibata Y, Foster L A, Metzger W J, et al. Myrvik alveolar macrophage priming by intravenous administration of chitin parctiles, polymers of N-acetyl-D-glucosamine, in mice[J]. Infect Immuni, 1997, 65: 1 734-1 741.
- [6] Porporatto C, Bianco I D, Riera M, et al. Chitosan induces different L-arginine metabolic pathways in resting and inflammatory macrophages[J]. Biocheml Biophys Res Communic, 2003, 304: 266-272.
- [7] 侯丽娜,赵鲁杭. 壳寡糖结合并激活巨噬细胞机制的研究 [J]. 中国医科大学学报,2006,35(2): 124-127.
- [8] 胡格,穆祥,段慧琴,等. 免疫、神经和内分泌系统间的关系 [J]. 动物医学进展,2003,24(1): 5-7.
- [9] Harris J, Brid D J. Modulation of the fish immune system by hormone[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2000, 77(3-4): 163-176.
- [10] Balaze C, Leavy R, Szako M, et al. Stimulatory effect of triiodothyronine on cell-mediated immunity[J]. Eur J Clin Pharm, 1980, 17: 19-23.
- [11] Williamson R A, Davison T F, Payne L N. Effect of thyroid hormones on humoral and cell-mediated immune responses in the domestic (*Gallus domesticus*) [J]. Dev Comp Immunol, 1990, 14: 305-318.
- [12] Lam S H, Sin Y M, Gong Z, et al. Effect of thyoid hormone on the development of immune system in zebrafish[J]. General Compar Endocrinol, 2005, 142: 325-335.
- [13] Shaoo P K. Immunostimulating effect of triiodothyronine: dietary administration of triiodothyronine in rohu (*Labeo rohita*) enhances immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection[J]. J Appl Ichthyol, 2003, 19: 118-122.
- [14] 闫大伟,华雪铭,周洪琪. 壳聚糖对草鱼生长、抗病性能的影响 [J]. 饲料工业,2007,28(12): 17-18.

- [15] 华雪铭,周洪琪,余奇文,等.环磷酸胺和嗜水气单胞菌对暗纹东方鲀免疫抑制的研究[J].现代免疫学,2004,24(6):480-484.
- [16] Deane E E, Li J, Woo N Y S. Hormonal status and phagocytic activity in sea bream infected with vibriosis[J]. Comp Biochem Physiol Part B, 2001, 129: 687-693.
- [17] Segal J, Ingbar S H. Specific binding sites for triiodothyronine in the plasma membrane of rat thymocytes[J]. J Clinical Investigation, 1982, 70: 919-926.
- [18] Peluso G, Petillo O, Ranieri M, et al. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function[J]. Biomaterial, 1994, 15: 1 215-1 220.
- [19] Kobayashi S, Terashima Y, Itoh H. Chitin and chitosan—the new functional foods[J]. Feed mix, 1995, 3(4): 32-34.
- [20] Leatherland J E Reflection on the thyroidology of fishes: from molecules to humankind[J]. Guelph Ichthyol Rev, 1994, 2: 1-67.
- [21] Leatherland J F, Farbridge K J. Chronic fasting reduces the response of the thyroid to growth hormone and TSH, and alters the growth hormone-related changes in hepatic 5'-monodeiodinase activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Gen Comp Endocrinol, 1992, 87(3): 342-353.
- [22] Eales JQ, Maclatchy D L, Higgs D A, et al. The influence of dietary protein and calori content on thyroid function and hepatic tyroxine 5'-monodeiodinase activity in rainbowtrout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Can J Zool, 1992, 70: 1 526-1 535.
- [23] Higgs D A, Eales J G. Influence of diet composition on radiothyroxine kinetics in brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill) [J]. Can J Zool, 1979, 57: 396-402.
- [24] Higgs D A, Dosanjh B S, Uin L M, et al. Effects of dietary lipid and carbohydrate levels and chronic 3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine treatment on growth, appetite, food and protein utilization and body composition of immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, at low temperature[J]. Aquaculture, 1992, 105: 175-190.
- [25] 华雪铭,周洪琪,张宇峰,等.饲料中添加壳聚糖和益生菌对暗纹东方鲀幼鱼生长及部分消化酶活性的影响[J].水生生物学报, 2005: 29(3): 299-305.
- [26] Ayyaru G, Venkatesan A. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds[J]. Aquaculture, 2006, 255: 179-187.
- [27] 杨秀平,肖向红,周洪琪,等.动物生理学[M].北京:高等教育出版社,2002: 338.
- [28] Shiau S Y, Yu L P. Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*[J]. Aquaculture, 1999, 179: 439-446.

Immunoregulation of chitosan on *Ctenopharyngodon idella* by the pathway of thyroid hormone

HUA Xue-ming, YAN Da-wei, ZHOU Hong-qi

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 200090, China)

Abstract: It is well known that chitosan can enhance aquatic animal's immunity, while relatively few researches were on immunoregulation mechanism. With the development of immunology, the relationship between endocrine system and immune system was gradually known, but it's doubt there is influence of thyroid hormone on immunity capacity and that chitosan can regulate immunity capacity by the pathway of endocrine system in *Ctenopharyngodon idella*. In the present study, in order to understand the influence of thyroid hormone on immunity of grass carp *Ctenopharyngodon idella* and possible immunoregulation mechanism of chitosan by the pathway of thyroid hormone, diets containing thyroid hormone [0, 1, 5, 10 mg (thyroid hormone)/kg (feed)] or chitosan (0%, 0.25%, 0.50%, 0.75% and 1.00%) respectively were formulated to feed grass carp [initial body weight (1.04 ± 0.01)g] for 70 days in indoor recirculation aquarium. The amount of thyroid hormone in serum, the nonspecific immune function such as lysozyme activity and NO content of anterior kidney and spleen, phagocytic activity of peripheral leucocyte were determined. The results indicated that there was significant effect of dietary thyroid hormone on the amount of T_3 and T_4 in serum, the nonspecific immune function (lysozyme activity of anterior kidney and spleen and NO content of anterior kidney) ($P < 0.05$). T_3 (1.31 $\mu\text{g/mL}$) and T_4 (3.14 $\mu\text{g/mL}$) content in serum, lysozyme activity of anterior kidney and spleen (77.06 $\mu\text{g/g}$, 55.88 $\mu\text{g/g}$), the NO content (9.36 $\mu\text{mol/g prot}$) of anterior kidney of 5 mg thyroid hormone kg^{-1} feed treatment were significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$), and similar change trend between T_3 , T_4 content in serum and nonspecific immunity implied that thyroid hormone could modulate immunity of the tested fish. The results also showed that there was significant effect of chitosan on the amount of T_3 and T_4 in serum, the nonspecific immune function (lysozyme activity of anterior kidney and spleen and NO content of anterior kidney, phagocytic activity of peripheral leucocyte) ($P < 0.05$). The amount of thyroid hormone in serum and the nonspecific immune function firstly increased and then decreased with the increased dietary chitosan; the amount of T_3 , T_4 (1.43 $\mu\text{g/mL}$, 5.22 $\mu\text{g/mL}$) in serum, lysozyme activity of anterior kidney and spleen (77.06 $\mu\text{g/g}$, 57.65 $\mu\text{g/g}$), the NO content (9.52 $\mu\text{mol/g prot}$) of anterior kidney, phagocytic activity of peripheral leucocyte (46.00%) of 0.50% chitosan treatment were significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$). Summing up all the results, we can draw the conclusion that chitosan can regulate immunity of the tested fish by thyroid hormone. Since the significantly enhanced immunity was found in the 0.50% chitosan group, appropriate dosage of chitosan was 0.50% of the diets in this experiment. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (4): 630-636]

Key words: chitosan; thyroid hormone; immunoregulation; *Ctenopharyngodon idella*

Corresponding author: ZHOU Hong-qi. E-mail: hqzhou@shfu.edu.cn