

多酚对河蟹免疫功能的影响

马贵华 陈道印 刘六英 钟青

摘要 用一种多酚类物质——-苯基苯并吡喃作为饵料添加剂添加在河蟹饲料中,设添加量分别为每千克饲料2(A组)、4(B组)、6mg(C组)3个试验组,饲喂河蟹15d,测定其对河蟹血淋巴细胞中相关免疫因子的影响。结果表明:-苯基苯并吡喃添加剂量为4mg/kg时,可显著地提高河蟹血淋巴细胞中酚氧化酶(PO)、溶菌酶(LSZ)和超氧化物歧化酶(SOD)的酶活($P<0.05$),说明具有生物活性的-苯基苯并吡喃可刺激河蟹机体免疫功能的提高。

关键词 多酚;河蟹;免疫功能;提高活性

中图分类号 S968.25

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*),俗称河蟹,是我国特有的经济甲壳动物,由于近几年河蟹疾病爆发频繁,给养蟹业造成巨大损失。目前防治河蟹疾病的抗菌素及一些化学药物,虽对有关疾病有一定的疗效,但存在着耐药性、毒副作用大、蟹体自身免疫力下降以及药物残留对人类健康造成诸多影响等问题。因此,寻找、研制、开发能有效激活河蟹相关的免疫酶以达到提高其免疫力的免疫增强剂应该是今后防治河蟹疾病的主要研究方向。

-苯基苯并吡喃是一种从分布较为广泛的植物中提取的多酚类物质。由于具有较强的生物学活性,对动物免疫系统有一定的激活作用,且具有无毒副作用、无残留、不产生耐药性等优点,因而成为鱼类及水产甲壳类动物的免疫增强剂。但关于-苯基苯并吡喃对河蟹免疫酶活性的影响目前尚未见报道。本研究旨在揭示河蟹摄食了添加一种多酚类物质——-苯基苯并吡喃的饲料后对其免疫功能的影响,从而为免疫增强剂在河蟹养殖业上的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

河蟹购于南昌市水产市场,蟹体健康,规格为50~65g;河蟹采购后,先用5%的食盐水浸泡20min

消毒,然后饲养在(100×75×50)cm³的水族箱中。饲料为不含-苯基苯并吡喃的河蟹饲料,由广东省佛山市德宁生物技术有限公司友情提供。

1.2 试验设计

试验共设4组,试验期间3个试验组分别饲喂在基础饲料中添加不同剂量的-苯基苯并吡喃的饲料,即2(A组)、4(B组)、6mg/kg(C组),1个对照组(D组)饲喂基础饲料。每组2只箱,每箱饲养15只,用拱形瓦片作隐蔽物,水体中放入水葫芦等水生植物用以调节水质及作辅助饲料。

1.3 饲养管理

经食盐消毒后的试验蟹,分别放养在8只水族箱中,第2d投喂不含-苯基苯并吡喃的饲料,暂养5d后开始试验,每天每箱各投喂饲料2次,上午8:30、下午17:30(每次略有剩余),水温23~25℃,养殖用水为经过曝气的自来水。每天上午8:00排除残余饵料及污物,全日充气增氧,饲养15d后供试验用。

1.4 试验取样

在饲养15d后从每箱取10只蟹,用16号针头于河蟹的第三、四步足收集血淋巴1ml放入Eppendorf管中,4℃静置过夜后,将血淋巴在4℃、15000r/min条件下离心20min,小心吸取上清液,分别测血清的酚氧化酶(PO)、溶菌酶(LSZ)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性。

1.5 相关酶的酶活测定方法

1.5.1 PO酶活的测定

以L-DOPA为底物,参照Ashida(1971)的方法进行。将2.8ml的0.1mol/l、pH值为6.24的磷酸盐缓冲液与0.1ml的0.01mol/l的L-DOPA和0.1ml待测血清于室温下混匀,30℃保温5min后,在490nm下测

马贵华 江西生物科技职业学院 副教授 330200 江西省南昌市南莲路608号。

陈道印 南昌莲塘鱼病防治所。

刘六英、钟青 单位及通讯地址同第一作者。

收稿日期 2006-11-30

江西省农牧渔业科研项目基金 编号 20060302)

吸光率,每隔 2 min 读取 OD 值,测定 30 min。以试验条件下每分钟 OD_{490nm} 增加 0.001 作为一个酶活单位 (U)。为简单起见,本试验采用控制相同条件的方法,直接用酶活单位表示酶活性。

1.5.2 LSZ 酶活的测定

按 Hultmark 等的改进方法进行。将经二次活化的溶壁微球菌接种于营养琼脂培养基内,于 37 的恒温箱内培养 20 h 后用 0.1 mol/l、pH 值为 6.47 的磷酸盐缓冲液将其洗脱,收集菌体。并用 0.1 mol/l、pH 值为 6.47 的磷酸盐缓冲液配成底物悬液 ($OD_{570nm}=0.3$)。取 3 ml 该悬液于试管内置冰浴中,再加入 50 μ l 待测血清,混合,测 A_0 值。然后将试液移入 37 温浴中作用 30 min,取出后再置于冰浴 10 min 以终止反应,测其 A 值。溶菌酶 (LSZ) 酶活 U_L 按下式计算: $U_L = (A_0 - A) / A_0$ 。

1.5.3 SOD 酶活的测定

按邻苯三酚自氧化法进行,将 0.05 mol/l、pH 值为 8.2 的 Tris-HCL 缓冲液在 25 保温 20 min,取出 3.0 ml 置于试管中,加入 0.045 mol/l 适量的邻苯三酚 (7.5 μ l 左右),加血淋巴 20 μ l,迅速摇匀倒入 1 cm 比色皿,在 325 nm 波长下,每隔 30 s 测吸光值 1 次,调整邻苯三酚的加入量,使之自氧化速率控制在 0.070 A/min。计算 25 下反应 3 min 时在波长 325 nm 处的吸光度数值变化。

酶活单位定义:在 1 ml 反应液中,每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 时的酶量。

$$\text{单位体积酶活 (U/ml)} = \frac{0.070 - \text{样液速率}}{0.070} \times \frac{100\%}{50\%} \times \frac{\text{反应液总体积} \times \text{样液稀释倍数}}{\text{样液体积}}$$

1.6 数据统计

统计分析使用的软件为 Excel,各处理的数据进行单因方差分析,当差异显著 ($P < 0.05$) 时,用 Duncan's 检验法进行均值间多重比较。

2 结果

关于 - 苯基苯并吡喃对中华绒螯蟹酚氧化酶、溶菌酶和超氧化物歧化酶等相关酶酶活的影响见表 1。从表 1 中可见,PO 酶活的变化,B 组和 C 组与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$),A 组与对照组、B 组与 A 组相比差异显著 ($P < 0.05$);LSZ 酶活的变化,C 组、B 组和 A 组与对照组相比差异均极显著 ($P < 0.01$),C 组与 A 组相比差异显著 ($P < 0.05$);SOD 酶活的变化,C 组和 B 组与对照组相比差异均极显著 ($P < 0.01$),C 组

和 B 组与 A 组相比差异均显著 ($P < 0.05$),A 组与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 1 饲料中添加 - 苯基苯并吡喃对河蟹免疫相关酶的影响

组别	PO(U)	LSZ(U)	SOD(U/ml)
对照组(D组)	1.623 \pm 0.545 ^{Aa}	0.031 0 \pm 0.006 7 ^A	156.56 \pm 37.11 ^A
A组	2.101 \pm 0.350 ^B	0.040 3 \pm 0.004 9 ^{Ba}	177.56 \pm 53.41 ^B
B组	2.560 \pm 0.772 ^{Bb}	0.045 2 \pm 0.008 6 ^B	209.94 \pm 37.42 ^{Bb}
C组	2.495 \pm 0.750 ^B	0.049 7 \pm 0.008 0 ^{Bb}	234.29 \pm 32.33 ^{Bb}

注:表中同列肩标大写英文字母不同表示差异极显著 ($P < 0.01$);同列肩标小写英文字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$);相同字母或不含字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 小结与讨论

- 苯基苯并吡喃是一种从植物中提取的多酚类物质,通过激活酚氧化酶系统,将酚氧化酶原氧化成酚氧化酶,而酚氧化酶是一类氧化还原酶类,可以进一步将酚氧化成醌,并最终合成黑色素,黑色素直接参与河蟹一系列防御反应,产生、激活溶菌酶等。然而,- 苯基苯并吡喃(或其分解产物)是如何通过消化道被吸收、如何通过血细胞而激活酚氧化酶系统、如何激活超氧化物歧化酶等,还有待于进一步研究。

3.1 - 苯基苯并吡喃对酚氧化酶的影响

酚氧化酶作为一个类似补体系统在甲壳动物中的作用日益受到人们的重视,国内外学者在虾类等水生甲壳动物的酚氧化酶与免疫的关系方面作了许多研究工作,认为免疫增强剂可激活甲壳动物血细胞中的酚氧化酶原系统,从而促进其血细胞的吞噬与包掩、介导凝集和凝固功能,而产生杀菌物质。刘晓云等 (2002) 对中国对虾淋巴器的酚氧化酶的研究后认为,中国对虾淋巴小管受病毒感染后,小管细胞中的 PO 通过破坏其细胞内膜系统和直接溶解病毒,起到了破坏、杀死进入淋巴小管的病毒的作用,由此证明了 PO 在甲壳动物免疫反应中发挥着重要的作用。本试验研究表明,在饲料中添加 2 mg/kg 剂量的 - 苯基苯并吡喃就可显著地提高酚氧化酶的活性,添加 4 mg/kg 和 6 mg/kg 剂量的 - 苯基苯并吡喃则能极显著地提高酚氧化酶的活性。因此我们认为在河蟹的饲料中添加 4 mg/kg 剂量的 - 苯基苯并吡喃则可以极其明显地提高其酚氧化酶的活性而起到免疫的功效。

3.2 - 苯基苯并吡喃对溶菌酶的影响

溶菌酶是一种专门作用于微生物细胞壁的水解酶,具有抗菌、抗病毒的功效,又有一定的溶菌作用,是河蟹防御系统的重要组成成分,可以通过增强溶菌酶的酶活来提高其抗病能力。本研究表明,在饲料中

添加 2、4 和 6 mg/kg 剂量的 - 苯基苯并吡喃均能极显著地提高河蟹溶菌酶的活性,可见只要在河蟹的饲料中添加 2 或 4 mg/kg 剂量的 - 苯基苯并吡喃就能明显地提高其杀菌能力。

3.3 - 苯基苯并吡喃对超氧化物歧化酶的影响

作为活性氧自由基清除剂的超氧化物歧化酶,还具有抗菌、抗病毒等作用,其活性与河蟹等水生甲壳动物的免疫水平密切相关。因此,SOD 可作为动物机体非特异性免疫指标,来评判其机体非特异性免疫的能力。本研究表明,在河蟹的饲料中添加 4 和 6 mg/kg 剂量的 - 苯基苯并吡喃均能极显著地提高超氧化物歧化酶的活性,添加 2 mg/kg 的剂量组与对照组相比差异不显著。

因此,从本次试验所添加不同剂量的免疫增强剂对河蟹免疫相关酶的影响的研究结果显示,在饲料中添加 4 mg/kg 剂量的 - 苯基苯并吡喃饲喂河蟹可以在很大程度上提高河蟹的免疫能力。这与我们养殖生

产实践中,在河蟹饲料中添加该剂量的 - 苯基苯并吡喃添加剂饲养河蟹所达到明显降低其疫情的效果是相一致的。

参考文献

- 1 沈锦玉,尹文林,钱冬,等.中华绒螯蟹“腹水病”及“抖抖病”并发病原的研究[J].中国水产科学,2000,7(3):89-92
- 2 马贵华,钟青,曹义虎,等.中华绒螯蟹酚氧化酶的初步研究[J].江西农业学报,2006,18(1):41-44
- 3 马贵华,钟青,曹义虎,等.中华绒螯蟹免疫因子-溶菌酶的初步研究[J].淡水渔业,2006,36(1):25-27
- 4 马贵华,刘六英,钟青,等.中华绒螯蟹超氧化物歧化酶的研究[J].水利渔业,2006,26(4):24-25
- 5 刘晓云,张志峰,于利,等.中国对虾组织细胞中酚氧化酶活力的研究[J].高技术通讯,2002,8(8):89-92
- 6 王雷,李光友,毛远兴,等.口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J].海洋与湖沼,1994,25(5):486-491

(编辑:徐世良,xi-xu@163.com)

2007 年 长三角地区水产动物营养与饲料科技论坛

“长三角”地区是我国重要的水产养殖基地,也是我国重要的水产饲料生产地区,在此区域内集中了众多从事水产养殖业、水产饲料业的大院校、科研单位和生产企业。在水产养殖业和水产饲料业蓬勃发展的今天,应对原料紧缺的危机,加强区域内行业的交流合作显得尤为重要。为此特举办长三角地区水产动物营养与饲料科技论坛,诚邀各界人士与会,共谋水产动物营养研究和饲料发展大计。

1. 论坛主题

质量、安全、效益。

2. 会议日程

2007 年 3 月 22 日报到;2007 年 3 月 23-24 日开会。

3. 论坛交流

论坛将邀请国内著名专家学者就水产动物营养与饲料关键问题、热点问题作专题报告。主要内容有饲料原料质量与配方原料的选择、水产饲料加工工艺及设备、河蟹饲料质量控制技术、加州鲈饲料的研制、虾类饲料质量控制技术、水产饲料中氨基酸的使用技术、水产动物营养与免疫等。

同时,论坛将安排部分企业作技术报告。

4. 会议注册费(会务费)

每人 800 元,含会议资料费、会务费和餐费,住宿费自理。

5. 会议地址与住宿

报到地点:上海水产大学专家培训中心(上海市杨浦区军工路 334 号)。

6. 会议组织

主办单位:上海水产大学;上海市饲料工作办公室;上海市水产办公室。

协办单位:华东师范大学;苏州大学;浙江省淡水水产研究所;浙江万里学院《饲料工业》杂志社。

承办单位:上海水产大学生命科学与技术学院;上海高校水产养殖学 E-研究院;农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室。

7. 会议赞助支持

会议接受单位赞助,有意者请与冷向军教授联系,电话:13371935255, E-mail:xleng@shfu.edu.cn。

8. 会议秘书组联系方式

联系人:陈乃松 黄旭雄 杨志刚 华雪铭

地址:上海市军工路 334 号 上海水产大学生命科学与技术学院 邮编 200090

电话:021-65710025 传真:021-65710019 E-mail:zgyang@shfu.edu.cn

详情请登录中国水产网 <http://www.china-fishery.net> 和上海水产大学校园网 <http://shfu.edu.cn> 查询