

锌对鲫鱼免疫功能的影响研究

张 薇¹, 彭正羽², 李亚南³

(1. 浙江大学 城市学院, 浙江 杭州 310015; 2. 复旦大学, 上海 200433; 3. 浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310028)

摘 要:以鲫鱼为实验对象,探讨了饲料中锌质量分数对鱼类免疫功能的影响. 通过对鱼体免疫组织生物发光,抗体的凝集效价,腹腔巨噬细胞(Macrophage, M ϕ)吞噬活性等免疫指标进行研究,结果发现饲料中锌质量分数与鲫鱼的免疫机能密切相关,缺锌时鲫鱼生物发光值,抗体的凝集效价均为最低, M ϕ 吞噬活性最弱,但高锌同样也会抑制其免疫功能. 说明饲料中锌的质量分数能影响鲫鱼的免疫功能,一般需要量为 38~80 mg/kg 饲料,不宜过高.

关键词:锌; 鲫鱼; 生物发光; 凝集效价; 吞噬活性

中图分类号: Q952.5; Q959.468

文献标识码: A

文章编号: 1008-9497(2004)04-456-04

ZHANG Wei¹, PENG Zheng-yu², LI Ya-nan³ (1. Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China; 2. Fudan University, Shanghai 200433, China; 3. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310028, China)

Study on the relationship between zinc and immune function of *Carassius auratus*. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2004, 31(4): 456~459

Abstract: The relationship between the content of zinc and immune function of *Carassius auratus* was studied in three aspects; the chemiluminescent (CL) response of kidney, spleen and gill, the antibody production and the macrophage (M ϕ) phagocytosis. The result showed that it had close relationship between the content of zinc and the immune function of *Carassius auratus*. It showed that CL response, antibody production and M ϕ phagocytosis in carp were suppressed by deficiency of zinc but the higher level of zinc (160 mg/kg) also restrained these immune functions. The proper content of zinc for *Carassius auratus* is 38~80 mg/kg.

Key words: zinc; *Carassius auratus*; chemiluminescent; antibody production; phagocytosis

水产养殖越来越受病害的困扰,从 20 世纪 90 年代中期有人开始研究养殖动物抗病力与营养素的关系,以期达到提高鱼类自身免疫力的目的^[1]. 锌是鱼类生存所必需的微量元素,在生物体内,锌具有重要的生物功能,参与多种代谢过程,是许多酶的组成成分或激活剂^[2,3]. 国内外的一些研究表明,缺锌可引起鱼类的免疫缺陷,增加易感性^[4~8]. 由于水体中含锌量低,不能满足鱼类生长的需要,饲料是鱼类主要的锌源. 目前有关锌对鱼类免疫的研究多集中在虹鳟鱼,大西洋鲑鱼等常见的海水鱼类^[4,6,9],而对在我国具有较高经济价值的鲫鱼则未见报道. 本研究重点报道饲料中锌质量分数对鲫鱼免疫组织生物

发光、抗体的凝集效价、腹腔巨噬细胞吞噬活性等免疫指标的影响,对研究我国经济鱼类营养与免疫的关系,提高鱼类的品质具有积极作用.

1 材料和方法

1.1 实验鱼

鲫鱼(*Carassius auratus*)来自无污染的杭州市郊天然渔场,体重 50~100 g,体长 10~15 cm. 实验鱼在试验前置水族箱驯化二周,驯养用水为脱氯的自来水. 实验时随机选取大小一致,健康的鱼体,每组 6 尾,每个处理设 2 个重复. 喂以人工配合饲料,

收稿日期: 2003-04-02.

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(398303).

作者简介: 张 薇(1976),女,讲师,硕士,主要从事鱼类细胞生物学研究.

按鱼体重的 5% 投喂,每天 2 次,早上 8:00,晚上 17:00。

1.2 生物化学发光的测定

1.2.1 生物化学发光前待测样品的制备

取试验组活鲫鱼头肾(0.3 g)、脾(0.5 g)、鳃(0.5 g),备用。

1.2.2 生物发光测定

启动超微弱发光仪预温 30 min,先测定¹⁴C,用高压调节,使其总发光强度达到 20 000 suncount (Sc),然后测定空杯的强度。将已称好的待测样品放入样品杯中,然后加入 3 mL 0.01 mmol/L 鲁米诺(luminol),混匀后迅速测定其生物发光的变化,间隔 1 s 测定 1 次,每次测 20 s,测定结果由发光仪自动记录,连续测 2 min,记录其生物发光的动力学变化过程,发光水平以相对发光强度(Relative Light Intensity,RLI)表示。

1.3 凝集效价的测定

给分别用不同质量浓度锌的饲料喂养的鲫鱼腹腔内注射灭活的酵母菌液 0.5 mL(*Saccharomyces carlsbergensis*)(含酵母菌 10⁶ 个),4 周后取血 1 mL,4℃ 过夜,6 000 r·min⁻¹离心 20 min,收集血清。在凝集板中第一孔加入 100 μL 实验鱼血清,以后每孔用 Hank's 液倍比稀释至 2⁻¹²,每孔中再加入 100 μL 含酵母菌 10⁶ 个/mL 的菌液,充分混匀。另设 Hank's 液与菌液混合的空白对照孔,37℃ 温浴 2 h,初步观察结果,4℃ 过夜,镜检。凝集反应结果按常规分 4 种情况:部分凝集(+),1/2 凝集(++),大部分凝集(+++),全部凝集(++++)。以 1/2 凝集的免疫血清稀释度表示血清中抗体的效价。

1.4 Mφ 吞噬活性的测定

1.4.1 鲫鱼腹腔 Mφ 的制备

参照文献[10]方法进行。鲫鱼腹腔注射福氏不完全佐剂 0.5 mL,佐剂中含 10⁶ 个/mL 灭活酵母菌(*Saccharomyces Carlsbergensis*),分别用含不同质量浓度 Zn 的饲料喂养 4 周,无菌室内剪开鲫鱼的腹壁,注入 5 mL 199 培养液,再用吸管收集含腹腔液的 199 液,弃上层油脂,细胞用 199 培养液稀释至 10⁶ 个/mL。

1.4.2 Mφ 吞噬活性的测定

取腹腔液涂片,Wright's 染色,Giemsa 复染,镜检,光镜下计数 200 个 Mφ,以吞噬指数表示其吞噬活性。吞噬指数=200 个巨噬细胞中所吞噬的酵母总数/200。

1.5 实验饲料配制

实验饲料配制情况见表 1。

表 1 实验饲料组成

Table 1 The composition of diet

组成	重量/(g/100g)
酪蛋白	40
明胶	5
纤维素粉	6
马铃薯淀粉	35
棉籽油	5
混合矿物质*	5
混合维生素**	4

* 混合矿物质为不含 Zn 的混合矿物质,参见文献[11]半精制实验配方的无机盐组成,从中除去 ZnCO₃; ** 混合维生素每百克饲料中含:胆碱 500 mg, V_E 40 mg, V_K 4 mg, V_C 30 mg,肌醇 200 mg,叶酸 1 mg, V₁₄ 5 mg, V_{B2} 20 mg, V_{B6} 5 mg, V_{B12} 0.01 mg,烟酸 75 mg,泛酸钙 50 mg,对氨基苯甲酸 40 mg, V_D 30 mg, V_A 800 IU

Zn 对鲫鱼免疫功能影响的试验,以 ZnCO₃(分析纯)为锌源,每千克饲料中 Zn 添加量分别为 0(对照)、38、80、160 mg。

2 结果

2.1 生物发光的测定

饲料中每 1 kg 添加 0、38、80、160 mg 的锌时,对鲫鱼生物发光的影响结果见图 1。

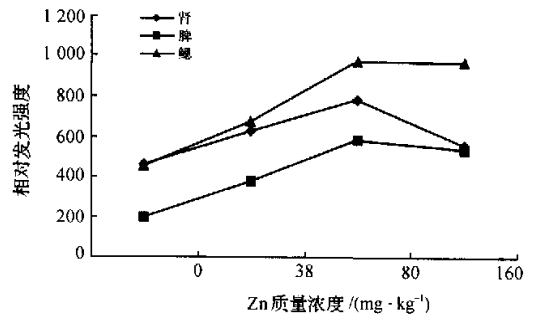


图 1 锌对鲫鱼免疫器官生物发光值的影响

Fig. 1 Influence of zinc on the chemiluminescent value of immune organ of *Carassius auratus*

结果表明,无锌喂养时,各免疫器官的发光值均为最低,当锌添加量为 38、80 mg/kg 时发光值均明显增高。若锌添加量继续增加到 160 mg/kg 时,发光值反而有所下降。

2.2 凝集效价的测定

凝集效价如表 2 所示。从表 2 可看出,饲料中无锌时血清凝集活性最低,当锌质量浓度从 0~80 mg/kg 增加时,血清凝集活性也随着上升,而锌质量浓度达 160 mg/kg 时,血清凝集活性反而下降,说明高锌对鲫鱼的抗体产生有抑制作用。

表 2 锌对鲫鱼凝集活性的影响
Table 2 Influence of zinc on the agglutinating activity of *Carassius auratus*

Zn 质量浓度/(mg · kg ⁻¹)	产生凝集的血清稀释度
0(对照)	2 ⁻³
38	2 ⁻⁵
80	2 ⁻⁶
160	2 ⁻⁵

2.3 腹腔 Mφ 吞噬活性的测定

腹腔 Mφ 吞噬活性的镜检如图 2 所示. 锌添加量对腹腔 Mφ 吞噬活性的影响见表 3.

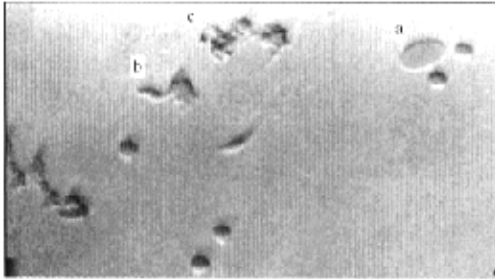


图 2 腹腔 Mφ 吞噬活性的镜检 ×400

Fig. 2 Microscope observation of macrophage phagocytosis of *Carassius auratus* × 400

a: 未贴壁的 Mφ; b: 贴壁, 未吞噬酵母的 Mφ;
c: 吞噬了酵母的 Mφ

表 3 锌对腹腔 Mφ 吞噬活性的影响

Table 3 Influence of zinc on the macrophage phagocytosis of *Carassius auratus*

Zn 质量浓度/(mg · kg ⁻¹)	吞噬指数
0(对照)	1.01 ± 0.02 ^a
38	2.20 ± 0.05 ^b
80	3.82 ± 0.01 ^c
160	2.21 ± 0.04 ^b

注 相同的上标表示无显著性差异, 不同的上标表示有显著性差异

图 2 及表 3 显示, 饲料中的锌添加量能够影响鲫鱼腹腔 Mφ 的吞噬活性. 当饲料中的锌质量浓度从 0~80 mg/kg 递增时, 鲫鱼腹腔 Mφ 的吞噬活性也随着上升, 当锌质量浓度高达 160 mg/kg 时, Mφ 的吞噬活性下降.

3 分析与讨论

头肾及脾脏是鱼类重要的免疫器官, 而鳃内含有散在的淋巴细胞生发中心, 因此其生物发光值可以作为分析实验动物免疫状态的一项指标. 生物发光的本质是活性氧自由基(O₂⁻)的形成, 当机体组织

中的免疫细胞处于活化状态, 发挥免疫功能时, 细胞会产生大量的 O₂⁻, 从而反映出不同的免疫状态^[2]. 鱼类巨噬细胞的吞噬杀伤能力也与 O₂⁻ 有关. 本研究发现在无锌喂养时, 鲫鱼巨噬细胞的吞噬能力及各免疫器官的发光值均为最低, 当锌添加量增加时, 三种组织的发光值均明显增高, 鲫鱼巨噬细胞的吞噬能力也明显增强. 这可能是由于锌是鱼体内许多酶的组成成分或激活剂, 并参与体内的多种代谢. 因此, 缺锌时会导致这些酶的活性降低以及代谢受损, 从而使 O₂⁻ 产生量减少, 发光值下降, 吞噬能力降低. 而加锌则可以促进免疫组织内酶的活性, 从而激活免疫细胞. Bjarte 也曾报道缺锌抑制鲑鱼 (*Salmo salar* L.) 头肾吞噬细胞的生物发光反应^[9]. 而锌一旦添加过量 (160 mg/kg), 则会导致免疫组织的发光值降低, 巨噬细胞的吞噬能力下降. 可能的原因是过量的锌会抑制免疫细胞内的一些酶如碱性磷酸酶等的活性, 从而使组织的免疫活性降低^[13]. 鳃的生物发光值变化不大的原因是因为其内含有的免疫细胞较少, 故反应不明显.

在一些较高级的实验动物如大鼠中发现, 锌具有刺激 B 淋巴细胞的作用, 能与 B 淋巴细胞协同作用或充当多克隆反应的促 B 淋巴细胞分裂剂, 缺锌能抑制 B 淋巴细胞的正常分裂和分化, 导致抗体量减少, 而锌质量浓度较高时抗体的凝集活性降低^[3]. 本研究首次证实, 饲料中锌的质量分数也可以影响鱼体中抗体的产量. 缺锌时, 鱼体的凝集抗体效价最低, 随着锌质量分数的增加, 凝集效价逐渐增高, 而锌质量浓度过高 (160 mg/kg) 时抗体的凝集活性又开始降低, 说明在鱼体内锌通过一种与高等脊椎动物类似的机制影响抗体产生, 即抑制免疫器官的发育, 如使脾脏重量减轻, 从而使抗体生成减少, 凝集活性降低. 因为鱼类的免疫系统比较低等, 其 T、B 淋巴细胞分离比较困难, 因此饲料中锌的质量分数影响抗体产生的具体机制还有待进一步的研究.

更多的研究表明, 不同鱼类生长时对锌的需要量不一样, 如斑点叉尾鲷饲料中须添加 30 mg/kg 的锌, 牙鲆饲料中须添加 80 mg/kg 的锌, 尼罗罗非鱼可以从天然食物和水体中摄取锌, 因而饲料中不需要添加^[12, 14]. 有关能使鲫鱼的免疫功能达到最佳状态的锌的合理添加量未见报道, 本研究通过对鲫鱼免疫组织生物发光, 抗体的凝集效价, 腹腔巨噬细胞吞噬活性等免疫指标的研究发现, 在精养体系中, 鲫鱼的免疫功能达到最佳时对锌的需要量在 80 mg/kg 左右, 在天然水体及放养状态下, 因水体及食物中含有一定的锌, 故少于 80 mg/kg 即可达到

最佳免疫状态.

参考文献(References):

- [1] KIRON V, FUKUDA H, OKAMOTO N. Protein nutrition and defense mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. **Comp Biochem Physiol**, 1995, 111(3):351-359.
- [2] 曹志华, 高贵琴. 鱼类对微量元素的需要研究现状 [J]. **淡水渔业**, 1999, 29(11):9-11.
CAO Zhi-hua, GAO Gui-qin. Status researches of trace element in fish [J]. **Fresh Water Fisheries**, 1999, 29(11):9-11.
- [3] 萨仁娜, 冯京海. 微量元素锌的营养研究 [J]. **饲料研究**, 1997, 23(3):6-8.
SA Ren-na, FENG Jing-hai. The research of zinc as nutrition [J]. **Feed Research**, 1997, 23(3):6-8.
- [4] LORENTZEN M, MAAGE A. Trace element status of juvenile Atlantic salmon *Salmo salar L.* fed a fish-meal based diet with or without supplementation of zinc, iron, manganese and copper from first feeding [J]. **Aquaculture Nutrition**, 1999, 5(3):163-171.
- [5] MASAHIO S. Current research status of fish immunostimulants [J]. **Aquaculture**, 1999, 172(1):63-92.
- [6] KIRON V. Effect of nutritional diets on activity of NK cell of rainbow trout [J]. **Research of Fish Disease**, 1993, 28(2):71-76.
- [7] 梁德海. 鱼类对矿物质的营养需要及其缺乏症 [J]. **饲料工业**, 1998, 19(10):24-25.
LIANG De-hai. The need of mineral material as nutrition and deficiency symptom [J]. **Feed Industry**, 1998, 19(10):24-25.
- [8] 梁萌青, 钱伟靖. 浅谈鱼类的营养性疾病 [J]. **饲料工业**, 1998, 19(8):33-36.
LIANG Meng-qing, QIAN Wei-jing. Primary review of nutrient deficiency disease [J]. **Feed Industry**, 1998, 19(8):33-36.
- [9] LYGREN B, WAAGB R. Nutritional impacts on the chemiluminescent response of Atlantic Salmon (*Salmo salar L.*) head kidney phagocytes, in vitro [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 1999, 9(6):445-456.
- [10] 项黎新, 孟真, 邵健忠. 草鱼巨噬细胞活化的生理生化指标研究 [J]. **浙江大学学报(理学版)**, 2002, 29(4):449-453.
XIANG Li-xin, MENG Zhen, SHAO Jian-zhong. Biological and physiological indices of the activation states of macrophage of grass carp [J]. **J of Zhejiang University (Science Edition)**, 2002, 29(4):449-453.
- [11] 李爱杰. 水产动物营养与饲料学 [M]. 北京: 农业出版社, 1996. 98-99.
LI Ai-jie. **Nutriology and Food of Aquatic Animal** [M]. Beijing: Agricultural Press, 1996. 98-99.
- [12] CADENAS E. Biological chemiluminescence [J]. **Photochem Photobiol**, 1984, 40(6):823-830.
- [13] 魏万权, 李爱杰, 李德尚. 饲料中添加锌对牙鲆生长和生化指标的影响 [J]. **青岛海洋大学学报**, 1999, 29(1):60-66.
WEI Wan-qan, LI Ai-jie, LI De-shang. Effect of dietary supplemented zinc on the growth and some Biochemical parameters of Juvenile Flounder *Paralichthys Olivaceus* [J]. **J of Ocean University of Qingdao**, 1999, 29(1):60-66.
- [14] 吴达辉, 廖朝兴. 饲料中混合无机盐含量对尼罗罗非鱼生长的影响 [J]. **淡水渔业**, 1989, 3:35-37.
WU Da-hui, LIAO Zhao-xing. Effect of mixed mineral material on the growth of Oreochromis, sp [J]. **Fresh Water Fisheries**, 1989, 3:35-37.

(责任编辑 寿彩丽)