

果寡糖对草鱼非特异性免疫功能的影响

卢明森 陈孝煊 吴志新** 易春龙 李雪竹

华中农业大学水产学院, 武汉 430070

摘要 在基础饲料中添加不同剂量的果寡糖(每 kg 饵料含量分别为 0、0.5、2 和 4 g),连续投喂,分别于试验前 1 d、试验第 7 天、第 14 天、第 21 天、第 28 天、第 42 天、第 56 天检测草鱼血液白细胞吞噬活性、血清溶菌酶活性和补体 C₃、C₄ 的含量。结果表明,试验组草鱼的各免疫指标均有不同程度的提高,且果寡糖添加剂量为 2 g/kg 时各试验指标与对照组差异显著,同时优于其它两试验组,而且其攻毒死亡率最低。因此,从提高免疫力和经济角度考虑,建议果寡糖添加剂量为 2 g/kg 为宜。

关键词 果寡糖; 草鱼; 吞噬活性; 溶菌酶; 补体

中图分类号 Q 959.46⁺⁸ **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)02-0213-04

在水产养殖生产中,应用抗生素等化学方法治疗养殖鱼类细菌性疾病是常用的手段,但是由此可引发致病菌抗药性的产生、破坏环境生态及造成抗生素污染等一系列问题^[1-2]。因此,增强养殖鱼类自身免疫系统的功能,提高抗病力,已成为当前国内外研究者探讨水产养殖动物疾病防治方法的重要途径^[3]。果寡糖(fructooligosaccharide, FOS),是指在蔗糖(GF)分子上以 -1,2 糖苷键结合数个 D-果糖所形成的寡糖的总称。近年已有较多研究报道果寡糖可以改善动物肠道微生态^[4]、增强蛋白质代谢^[5]、促进矿物质吸收^[6]。有关草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的免疫学研究已有较多^[7-8],笔者以草鱼为试验对象,通过检测草鱼的血液白细胞吞噬活性、血清溶菌酶活力和补体 C₃、C₄ 的含量,探讨饲料中添加果寡糖对草鱼非特异性免疫机能的影响,为今后在水产养殖中推广应用果寡糖提供依据。

材料与方 法

供试鱼分组及其饲养管理

试验草鱼取自武汉市野芷湖渔场,平均体重 100 g、活泼无外伤,将试验鱼饲养于华中农业大学水产养殖基地,待其适应环境并确认无疾病症状后,开始正式试验。试验鱼随机分为 4 组(编号分别为 A₀组、A₁组、A₂组、A₃组),每组设 3 个重复。A₀组

为对照组,投喂基础饲料;A₁组、A₂组、A₃组为试验组,分别投喂果寡糖添加量为 0.5、2、4 g/kg 的饲料。在整个试验期间,保持微流水,水源为曝气 24 h 以上的自来水,水温为(24 ± 2) °C, pH 6.8 ~ 7.4。每日投饲料 2 次(08:30 - 09:00, 16:00 - 16:30),投喂量为鱼体重的 3% ~ 5%。

饲料配方

基础饲料配方为鱼粉(12%)、豆粕(25%)、菜粕(30%)、面粉(27%)、豆油(2.2%)、磷酸二氢钙(2%)、羧甲基纤维素(1%)、食盐(0.2%)、氯化胆碱(0.2%)、复合维生素(0.1%)和复合矿物盐(0.3%)。其中的复合维生素为(每千克含)VA 650.0 万 IU, VD₃ 450.0 万 IU, VC 120.0 g, VE 25.0 g, VK₃ 5.0 g, VB₁ 12.5 g, VB₂ 12.5 g, VB₆ 15.0 g, VB₁₂ 25 mg, 烟酸 50 g, 泛酸 40 g, 肌醇 75 g, 叶酸 2.5 g, 生物素 80 mg。复合矿物盐为(质量分数): NaCl (1%)、MgSO₄ · 7H₂O (15%)、NaH₂PO₄ · 2H₂O (25%)、AlCl₃ · 6H₂O (0.06%)、KH₂PO₄ (32%)、Ca (H₂PO₄)₂ · H₂O (20%)、C₆H₅FeO₇ · 10H₂O (2.5%)、CaC₆H₁₀O₆ · 5H₂O (3.5%)、ZnSO₄ · 7H₂O (0.353%)、MnSO₄ · 4H₂O (0.162%)、CuSO₄ · 5H₂O (0.031%)、CoCl₂ · 6H₂O (0.001%)、KIO₃ · 6H₂O (0.003%)、纤维素(0.39%)。饲料各营养成分含量为:粗蛋白 33.28%、粗脂肪 6.89%、水

收稿日期:2009-06-23; 修回日期:2009-11-16

* 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD37B02、2006BAK02A22)和湖北省科技攻关计划项目(2007AA203A01、2006AA203A02)资助

** 通讯作者。E-mail: wuzhixin@mail.hzau.edu.cn

卢明森,女,1987年生,本科生。研究方向:鱼类营养与免疫学。E-mail: lumingmiao@126.com

分 10.59%、灰分 7.52%。果寡糖来自广州微生物研究所,该产品主要活性成份为果寡三糖、果寡四糖、果寡五糖(总含量 90%)。

采 血

于开始投喂果寡糖前 1 d(第 0 天)和开始投喂果寡糖后的第 7、14、21、28、42 和 56 天,分别从各平行组取 5 尾供试鱼,尾静脉取血,将每尾鱼的血液分成 2 份,其中 1 份以 1% 肝素抗凝,制备抗凝血,供检测血液白细胞吞噬活性;将另 1 份血液首先在 4℃ 冰箱放置 4 h,于 4℃ 条件下以 3 500 r/min 离心 10 min,收集上层血清,在 4℃ 冰箱中保存备用。

吞噬原 - 的制备

将金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 接种在 FWA 培养基中,37℃ 培养 24 h 后离心集菌。在菌悬液中加入终浓度为 0.5% 的福尔马林,37℃ 灭活 24 h,并用无菌生理盐水离心洗涤 2 次,并将其浓度调整至 1.0×10^8 个/mL,经过平皿法证实其完全灭活后,置 4℃ 冰箱中保存备用。

白细胞吞噬活性的测定

在 200 μ L 抗凝血中加入 50 μ L F-SA,轻轻摇匀,在 28℃ 的恒温水浴锅中孵育 1 h,每隔 10 min 摇动 1 次。用吸管吸取血细胞涂片,每个样品涂 5 张,自然晾干后用甲醇固定 3 min, Wright-Giemsa 染色液染 6 min,迅速用蒸馏水冲洗后风干,油镜观察,并依下式计算白细胞吞噬百分比 (phagocytic percentage, PP) 和吞噬指数 (phagocytic index, PI)。

吞噬百分比 (%) = (100 个吞噬细胞中参与吞噬的细胞数 / 100) \times 100

吞噬指数 = 吞噬细胞内总菌数 / 参与吞噬的吞噬细胞数

血清溶菌酶活性的测定

以溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 冻干

粉 (Sigma 公司产品) 为底物,按下列步骤进行:用 1/15 mol/L pH = 6.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 配底物悬液 ($D_{570\text{nm}} = 0.3 \sim 0.5$)。取 3 mL 悬液于试管内,加入 50 μ L 待测血清混匀,测其在 570 nm 处的吸光值 D_0 。然后将试管移入 37℃ 水浴中温育 30 min,取出后立即置于冰浴中 10 min 以终止反应,测其 570 nm 处的吸光值 D 。按公式计算溶菌酶的活性: $U = (D_0 - D) / D_0$ 。

补体 和 含量的测定

采用补体 C_3 和 C_4 试剂盒 (上海玉兰生物技术有限公司) 测定,方法参照试剂盒上的说明进行。

攻 毒

投喂试验饲料 56 d 后,各组草鱼按每千克体重 1.0×10^8 个的注射量,经胸鳍基部注射病原性嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*),饲养观察 14 d。对攻毒死亡的鱼体进行解剖并分离致病菌,判断是否由致病菌感染致死,统计各组的死亡率。

数据统计与分析

试验数据通过 STATISTICA 6.0 软件进行处理,包括对数据进行单因素方差分析和邓肯检验。

结果与分析

不同添加量果寡糖对草鱼血液白细胞吞噬活性的影响

投喂果寡糖后,草鱼白细胞吞噬百分比 (PP) 呈现明显的剂量和时间关系, A_1 (0.5 g/kg) 组在试验的第 42 天后,PP 值显著高于对照组; A_2 (2.0 g/kg) 组、 A_3 (4.0 g/kg) 组的 PP 分别在第 7 天与第 21 天开始显著高于对照组,且 A_2 组与其它试验组的差异明显。白细胞吞噬指数 (PI) 也有类似的变化,但 A_1 和 A_3 组在第 42 天或第 56 天时与对照组的差异不显著,详见图 1 和图 2。

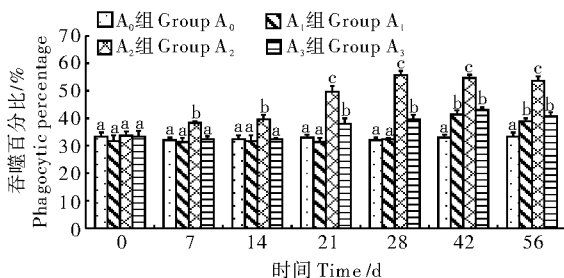


图 1 投喂果寡糖后草鱼白细胞吞噬百分比的变化

Fig. 1 Variations of the phagocytic percentage of leukocytes of *C. idellus* after feeding fructooligosaccharides

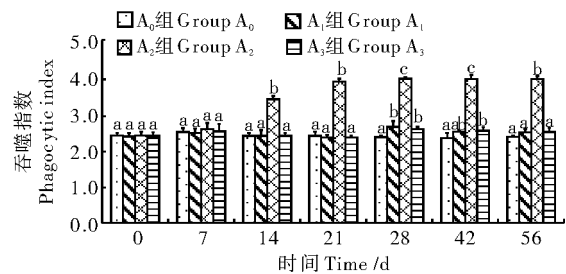


图 2 投喂果寡糖后草鱼白细胞吞噬指数的变化

Fig. 2 Variations of the phagocytic index of leukocytes of *C. idellus* after feeding fructooligosaccharides

不同添加量果寡糖对草鱼血清溶菌酶活性的影响

投喂果寡糖后, A₁组、A₃组草鱼血清溶菌酶活性从第 14 天开始均显著高于对照组(A₀组在第 21 天除外); A₂组从第 7 天开始就显著高于对照组, 同时也显著高于其它试验组。详见图 3。

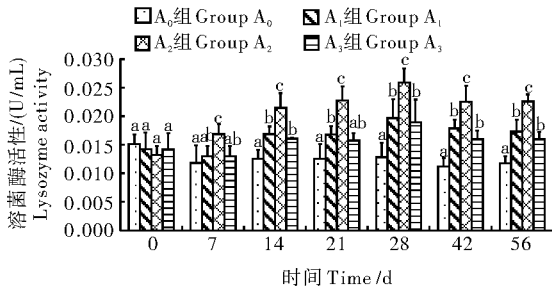


图 3 投喂果寡糖后草鱼血清溶菌酶活性的变化

Fig. 3 Influence of the lysozyme activity in serum of *C. idellus* after feeding fructooligosaccharides

不同添加量果寡糖对草鱼血清补体 C₃ 含量的影响

投喂果寡糖对草鱼血清补体 C₃ 含量的影响结果见图 4。A₁组在整个试验期间与对照组差异不显著, A₃组除在第 21 天与对照组差异显著外, 其余各时间差异均不显著, A₂组在第 7~56 天与对照组间均有显著差异。草鱼血清补体 C₄ 的含量变化与 C₃

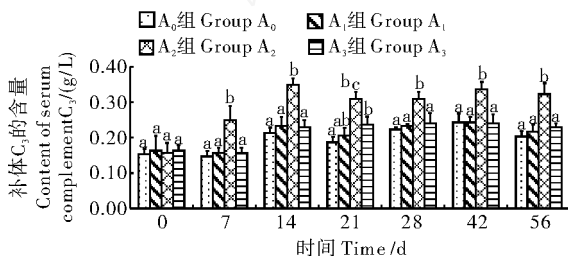


图 4 投喂果寡糖后草鱼血清补体 C₃ 含量的变化

Fig. 4 Influence of the content of serum complement C₃ in serum of *C. idellus* after feeding fructooligosaccharides

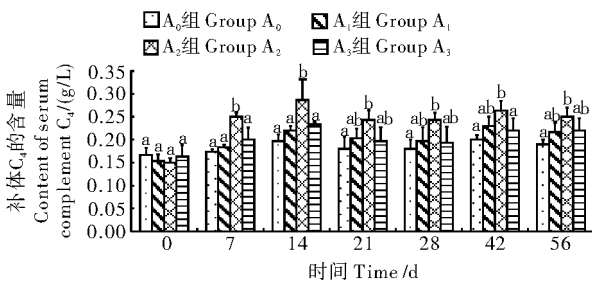


图 5 投喂果寡糖后草鱼血清补体 C₄ 含量的变化

Fig. 5 Influence of the content of serum complement C₄ in serum of *C. idellus* after feeding fructooligosaccharides

含量的变化相似, A₂组从第 7 天开始显著高于对照组, 其它各组间均无显著差异, 详见图 5。

攻毒后的死亡率

试验鱼经嗜水气单胞菌活菌攻毒 14 d 后, 投喂基础饲料的对照组(A₀)和投喂果寡糖剂量 0.5 g/kg 饲料的试验组(A₁)草鱼死亡率最高, 累计达到 46.7%, 其次是投喂果寡糖剂量 4 g/kg 饲料的试验组(A₃), 为 40.0%。投喂果寡糖剂量 2 g/kg 饲料的试验组(A₂)死亡率最低, 为 33.3%。

讨论

果寡糖为 -1,2-糖苷键连接而形成的低聚糖, 由于动物消化道内缺乏相应的降解酶类, 被动物采食后, 以未完全降解的形式进入消化道后段, 并选择性地被双歧杆菌等利用, 形成能被动物吸收利用的生物蛋白及一些挥发性的短链脂肪酸(SCFA)和乳酸, 降低肠道 pH, 阻止病原菌及腐败菌在肠内的定植, 减少疫病的发生^[9]。除了作为免疫佐剂直接参与机体细胞免疫和体液免疫调节, 果寡糖也可促进肠道双歧杆菌的增殖^[10], 而双歧杆菌具有良好的免疫活性, 可以激活机体吞噬细胞的吞噬能力, 并促进与抗氧化有关的 Ca、Zn、Se 等矿物微量元素的吸收, 加强非特异性免疫。有研究表明, 牛蒡寡糖能有效地提高大菱鲂白细胞的吞噬活性^[11]; 甘露寡糖能够提高大西洋鲑嗜中性粒细胞的吞噬活性^[12], 提高鲑鱼苗抗鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)的能力^[13], 提高奥尼罗非鱼的非特异性免疫功能^[14]。

本试验结果表明, 果寡糖添加量为 2 g/kg 时, 试验第 14 天开始草鱼白细胞吞噬活性显著高于对照组, 其血清溶菌酶活性, 血清补体 C₃、C₄ 含量, 第 7 天开始显著高于对照组, 草鱼抗病原性嗜水气单胞菌感染的能力增强。当添加剂量为 0.5 g/kg 时, 供试鱼白细胞吞噬活性和补体 C₃、C₄ 含量均无显著提高, 攻毒效果和对照组相同。果寡糖的添加要采用适宜的剂量, 添加量不足, 起不到使用效果。当添加剂量为 4 g/kg 时, 其活性并没有高于剂量为 2 g/kg 的试验组, 而是和 A₁组差异不显著。有研究表明, 免疫刺激剂的用量与免疫刺激作用不存在正相关^[15]。原因可能是过量的果寡糖, 使消化道后部寄生的微生物发酵过度^[16], 限制了肠道部分有益菌的增殖, 进而影响到机体的免疫机能。本试验结果提示果寡糖在草鱼饲料中的添加量以 2 g/kg 为宜。

参 考 文 献

- [1] HSU C H, HWANG S C, LIU J K. Succession of bacterial drug resistance as an indicator of antibiotic application in aquaculture[J]. J Fish Soc Taiwan, 1992, 19(1): 55-64.
- [2] LI J, YIE J, FOO R W T, et al. Antibiotic resistance and plasmid profiles of *Vibrio* isolates from cultured silver sea bream, *Sparus sarba*[J]. Mar Pollut Bull, 1999, 39: 245-249.
- [3] SAKAI M. Current research status of fish immunostimulants[J]. Aqua culture, 1999, 172(1/2): 63-92.
- [4] HOWARD M D, KERLEY M S, SUNVOLD G D, et al. Source of dietary fiber fed to dogs affects nitrogen and energy metabolism and intestinal microflora populations[J]. Nutri Res, 2000, 20(10): 1473-1484.
- [5] YOUNES H, GARLEB K A, BEHR S R, et al. Dietary fiber stimulates the extra-renal route of nitrogen excretion in partially nephrectomized rats[J]. J Nutri Biochem, 1998, 9(11): 613-620.
- [6] LOPEZ H W, COUDRAY C, LEVRAT-VERNY M A, et al. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats[J]. J Nutri Biochem, 2000, 11(10): 500-508.
- [7] 刘太亮, 蒋明, 文华, 等. 吡啶羧酸铬对草鱼生长和糖耐量的影响[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(2): 198-201.
- [8] 祝东梅, 吴志新, 冯雪, 等. 草鱼受精卵菌群的研究[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(1): 91-95.
- [9] PERDIGON G, ALVAREZ S, MACIAS M N, et al. The oral administration of lactic acid bacteria increase the mucosal intestinal immunity in response to enteropathogens[J]. J Food Prot, 1990, 53(5): 404-410.
- [10] ROBERFROID M B, VAN-LOO J A E, GIBSON G R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products[J]. J Nutri, 1998, 128(1): 11-19.
- [11] 郝林华, 孙丕喜, 石红旗, 等. 牛蒡寡糖对大菱鲆生长和免疫机能的影响[J]. 海洋科学进展, 2007, 25(2): 208-214.
- [12] YOSHIDA T, KRUGER R, INGLIS V. Augmentation of non-specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants[J]. J Fish Dis, 1995, 18(2): 195-198.
- [13] NEWMAN K. Mannan-oligosaccharides: natural polymers with significant impact on the gastrointestinal microflora and immune system[C]//LYONS T P, JACQUES K A. Biotechnology in feed industry: proceedings of Alltech's tenth annual symposium. Nottingham: Nottingham University Press, 1994: 167-174.
- [14] 刘爱君, 冷向军, 李小勤, 等. 甘露寡糖对奥尼罗非鱼 (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) 生长、肠道结构和非特异性免疫的影响[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2009, 35(3): 329-336.
- [15] 周映华, 张石蕊. 甘露寡糖对肉鸡生产性能和肠道微生物以及免疫机能的影响[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2003, 29(3): 250-254.
- [16] 占秀安, 胡彩虹, 许梓荣. 果寡糖对肉鸡生长、肠道菌群和肠形态的影响[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(2): 196-198.

Effect of Fructooligosaccharides on Non-Specific Immunity of *Ctenopharyngodon idellus*

LU Ming-miao CHEN Xiao-xuan WU Zhi-xin YI Chun-long LI Xue-zhu
College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract In order to study the effect of fructooligosaccharides on non-specific immunity of *Ctenopharyngodon idellus*, the fish were fed with diets containing fructooligosaccharides 0, 0.5, 2 and 4 g/kg respectively for 56 days. Phagocytic activity of leukocytes, lysozyme activity and the content of complement C₃ and C₄ in serum were studied on 0, 7th, 14th, 21st, 28th, 42nd and 56th day. The results showed that the immune indexes of experiment groups were markedly enhanced, especially in the group of 2 g/kg fructooligosaccharides in diet ($P < 0.05$). The group with 2 g/kg addition in diet had lower mortality than the other groups. We suggested that 2 g/kg addition was suitable from the aspects of immunity and economy.

Key words fructooligosaccharides; *Ctenopharyngodon idellus*; phagocytic activity; lysozyme; serum complement

(责任编辑: 边书京)