

一种复方中草药制剂对黄颡鱼 非特异性免疫机能和抗病力的增强作用

盛竹梅¹ 黄文¹ 张英杰² 杨华莲¹ 马立鸣¹ 徐晓玲¹ 夏露¹

1. 北京市水产技术推广站, 北京 100021; 2. 华中农业大学食品科技学院, 武汉 430070

摘要 根据供试黄颡鱼的鱼体质量添加中草药制剂剂量(0~1 000 mg/kg)的不同, 试验设6个组(对照、I、II、III、IV、V), 连续投喂30 d后, 测定黄颡鱼血液中白细胞的吞噬活性、血清中溶菌酶和补体活性; 另采用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)注射的方法进行人工攻毒, 进行抗病力检测。结果表明, 各供试组黄颡鱼血液中白细胞的吞噬活性均显著高于对照组。第I组黄颡鱼血清中溶菌酶的活性与对照组之间没有显著性差异, 而试验II、III、IV组和V组黄颡鱼血清中溶菌酶的活性均显著高于对照组。第II、III、IV和第V组黄颡鱼血清中补体活性与对照组之间存在显著差异, 而第I组与对照组之间无显著性差异。活菌攻毒的方式证明投喂复方中草药制剂能增强黄颡鱼对人工感染*A. hydrophila*活菌的抵抗力。从增强非特异性免疫机能与抗病力的效果考量, 这种复方中草药制剂在黄颡鱼饵料中添加量以400~800 mg/kg为宜。

关键词 黄颡鱼; 复方中草药制剂; 抗病力; 嗜水气单胞菌; 吞噬活性

中图分类号 S 942.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)02-0243-04

多种抗生素类药物被允许在我国水产养殖中用于控制由致病菌引起的疾病^[1]。由于不规范使用渔药等导致的药物残留和水产品安全问题的出现及它们对我国养殖水产品造成的不利影响, 陈昌福^[2]作出了较为详细的阐述。

中草药在水产养殖动物病害的防治过程中, 具有多种药用效果^[3-7]。Punitha等^[8]发现在石斑鱼幼苗饲料中添加绊根草、萆拔等中药不但可以提高鱼苗的体质质量, 还可以提高其对哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的非特异性免疫作用^[8]。本试验利用自制的一种复方中草药制剂定量投喂黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco* R.)后, 在测定供试鱼的几种非特异性免疫指标变化的基础上, 采用活菌攻毒的方法检测了供试黄颡鱼的抗病力, 现将结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 供试黄颡鱼和饲养条件

黄颡鱼购自武汉市野芷湖水产养殖场, 饲养试验在华中农业大学水产实验基地进行。在每个盛有

0.8 m³曝气自来水的圆形水族缸中饲养体质质量为(34.0±3.6) g的60尾黄颡鱼, 控制水温在24~28℃之间, 光照为人工光照和自然光照。每天09:00和18:00各投喂1次武汉通威饲料有限公司生产的黄颡鱼饲料。驯养7 d待试验鱼适应室内养殖环境后, 开始正式试验。

1.2 复方中草药制剂

复方中草药制剂自制, 其中主要成分包括麻黄、苦参、黄芩、五倍子等, 选用天津市泰斯特仪器有限公司FW177型中草药粉碎机, 24 000 r/min粉碎至0.12 mm大小, 各组分依质量进行等量混合。

1.3 试验设计

以6个条件相同的水族缸作为饲养试验鱼的容器, 每个水族缸中饲养的60尾黄颡鱼作为1组(不区分雌雄性别)。各组饵料中复方中草药制剂的添加量按照黄颡鱼体质量计算, 分别为0(对照组)、200(试验I组)、400(试验II组)、600(试验III组)、800(试验IV组)和1 000 mg/kg(试验V组)。制作的饵料存放在阴凉处, 每天喂食前4 h配制饵料。连续投喂30 d。

收稿日期: 2011-06-28

基金项目: 北京市财政局项目(PXM2009-036237-073415)、北京市农委项目(PXM20030110)

盛竹梅, 高级工程师。研究方向: 水产病害防控。E-mail: zhumeisheng@gmail.com

通讯作者: 夏露, 助理工程师。研究方向: 水产病害防控。E-mail: xialu1982@gmail.com

1.4 采 血

在预定连续投喂 30 d 结束后的第 2 天,从每个试验和对照池中随机捞取 10 尾黄颡鱼通过断尾法采血,具体方法参见文献[9]。

1.5 吞噬原的制备及血细胞吞噬活性的测定

依照文献[9]的方法进行,计算白细胞吞噬百分比(phagocytic percentage, PP)和吞噬指数(phagocytic index, PI)。

1.6 鼠抗 F-AH 血清的制备

将等量佛氏完全佐剂(Difco)与福尔马林灭活的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) BS-1 菌株^[10](F-AH)混匀,参照罗璋等^[11]的方法,多点皮下注射昆明鼠,每只注射 0.2 mL,共接种 10 只昆明鼠。14 d 后将等量的 F-AH 菌苗与佛氏不完全佐剂(Difco)混匀,以相同的方法对昆明鼠加强免疫。于加强免疫后第 10 天,对每只受免昆明鼠经皮下多点注射 0.2 mL F-AH 菌苗,于 14 d 后,对受免昆明鼠断尾采血,制备血清,置-20℃冰箱保存备用^[11]。

1.7 血清溶菌酶活性、补体 C3 和 C4 活性的测定

血清溶菌酶活性测定参照文献[9, 12]的方法进行。补体 C3、C4 活性的测定依照文献[9]的方法进行。

1.8 抗病力检测

将从患病黄颡鱼上分离的 *A. hydrophila* BS-1 菌株接种在 BHI(Difco)培养基中,28℃条件下培养 36 h 后,离心法集菌并以除菌生理盐水调节菌液浓度至 2.3×10^7 cfu/mL 备用。从各试验和对照组中分别随机捞取 30 尾黄颡鱼,经胸鳍基部每尾注射 0.2 mL 的 *A. hydrophila* 活菌液后,继续饲养观察 21 d。对死亡的黄颡鱼进行解剖并分离致病菌,以鼠抗 *A. hydrophila* 菌株血清与分离所得致病菌进行玻片凝集试验,判断是否由 *A. hydrophila* 感染致死。统计各组的死亡率,并计算相对保护率(relative percent survival, RPS)。

相对保护率 = $[1 - (\text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率})] \times 100\%$

2 结果与分析

2.1 复方中草药制剂对黄颡鱼体质量的影响

对试验和对照黄颡鱼鱼体质量的称量结果如表 1 所示。试验期间黄颡鱼的质量,除试验组第 I 组外,其他试验组黄颡鱼的鱼体质量增加量均显著高于对照组(t 测验, $P < 0.05$)。此外,经过肉眼观察,

对照与试验组黄颡鱼的体形、内脏形态与颜色均未出现明显差别。表明口服本研究中采用的各种剂量的复方中草药制剂,对黄颡鱼的生长和机体各组织器官的正常生理机能没有明显不良影响。

表 1 对照和试验黄颡鱼的鱼体质量¹⁾

组别 Groups	开始时鱼体质量/g Initial body weight	结束时鱼体质量/g Final body weight	质量增加/g Gain
I	34.5±3.6	41.2±3.8	6.7±1.2
II	34.2±3.3	42.4±3.6	8.2±1.3*
III	35.1±3.8	44.2±3.7	9.1±1.1*
IV	34.6±4.1	43.9±4.2	9.3±1.2*
V	34.8±3.8	44.3±3.8	9.5±1.3*
对照 Control	34.4±3.5	40.3±3.9	5.9±1.6

1)表中数据为 10 尾供试黄颡鱼的平均值; * 表示试验组与对照组之间差异显著,下表同。Mean value of 10 experimental yellow catfish; * indicates significant differences ($P < 0.05$) between treated groups and the control, the same as below.

2.2 白细胞吞噬活性的变化

供试黄颡鱼血液中白细胞的 PP 和 PI 测定结果如表 2 所示。黄颡鱼在投喂复方中草药制剂后血液中白细胞的 PP 和 PI 均高于对照组,而 PP 和 PI 最高的是复方中草药制剂投喂量为 800 mg/kg 的第 IV 组。统计分析结果表明,试验组黄颡鱼血液中白细胞的 PP 和 PI 均显著高于对照组(t 测验, $P < 0.05$),而各试验组之间没有显著性差别($P > 0.05$)。

表 2 黄颡鱼血液中白细胞的吞噬活性

组别 Groups	吞噬活性 Phagocytic activity	
	PP/%	PI
I	49.5±4.3*	4.11±0.39*
II	51.2±5.2*	4.08±0.42*
III	52.3±5.4*	4.32±0.54*
IV	52.8±4.6*	4.44±0.47*
V	50.6±4.5*	4.36±0.37*
对照 Control	42.3±5.2	3.03±0.69

2.3 溶菌酶和补体活性的变化

供试黄颡鱼血清中溶菌酶与补体活性的测定结果如表 3 所示。投喂复方中草药制剂的试验组黄颡鱼血清中的溶菌酶活性均高于对照组,溶菌酶活性最高的是第 VI 组(投喂量为 800 mg/kg),其次是第 V 组(投喂量为 1 000 mg/kg)。统计分析结果表明,第 III、VI 和 V 组黄颡鱼血清中溶菌酶活性与对照组之间存在显著性差异(t 测验, $P < 0.05$);而第 I 组和第 II 组与对照组之间没有显著性差异($P > 0.05$)。

表3 黄颡鱼血清中溶菌酶和补体 C3、C4 的活性

Table 3 Lysozyme and complement activity in the serum of yellow catfish

组别 Groups	溶菌酶 Lysozyme	补体活性 Complement activity	
		C3	C4
I	0.232±0.042	0.282±0.043	0.293±0.063
II	0.238±0.053	0.323±0.054*	0.334±0.059*
III	0.343±0.048*	0.342±0.058*	0.353±0.056*
IV	0.388±0.051*	0.375±0.055*	0.369±0.063*
V	0.374±0.062*	0.382±0.064*	0.372±0.056*
对照 Control	0.214±0.046	0.269±0.058	0.289±0.055

供试黄颡鱼血清中补体 C3 和 C4 的活性测定结果表明,投喂复方中草药制剂的黄颡鱼血清中补体 C3 和 C4 活性均高于对照组,补体 C3 和 C4 活性最高的是投喂量为 1 000 mg/kg 的第 V 组,其次是投喂量为 800 mg/kg 的第 IV 组。统计分析结果显示,第 II、III、IV 和第 V 组黄颡鱼血清中补体活性与对照组之间存在显著差异($P < 0.05$),而第 I 组与对照组之间无显著性差异($P > 0.05$)。

2.4 人工接种致病菌后黄颡鱼的存活率

对照和试验组黄颡鱼经活菌人工感染后,各组的死亡情况如表 4 所示。投喂复方中草药制剂的黄颡鱼均获得了比较高的 RPS,而在饵料中添加复方中草药制剂 600 mg/kg 以上的第 III、IV 和 V 组黄颡鱼死亡率明显低于添加量为 200 和 400 mg/kg 的第 I 和第 II 组。

表4 活菌攻毒后黄颡鱼的死亡率和相对保护率

Table 4 Mortality and relative percent survival of yellow catfish, after challenged with live *Aeromonas hydrophila*

组别 Groups	攻毒鱼尾数 Number of fish challenged	死亡鱼尾数 Number of dead fish	死亡率/% Mortality	相对保护率/% Relative percent survival
I	30	13	43.3	50.1
II	30	11	36.7	57.8
III	30	8	26.7	69.2
IV	30	7	23.3	73.1
V	30	7	23.3	73.1
对照 Control	30	26	86.7	

3 讨论

动物的非特异性免疫功能包括体液免疫和细胞免疫两部分。在水产动物的细胞免疫中,血液中的白细胞又发挥着至关重要的作用^[13]。鱼类的嗜中性粒细胞和单核细胞具有很强的吞噬能力,这种能力对于特异性免疫功能相对比较低的动物而言,具有重要的意义^[12]。白细胞的吞噬能力是动物非特异性免疫的重要组成功能。因此,通过测定血液中白细胞的吞噬能力,可以反映机体的非特异性细

胞免疫状态^[14]。有研究结果证明在大西洋鲑(*Salmo salar* L.)的巨噬细胞上存在免疫多糖受体,因此可以通过免疫多糖的刺激而增强其细胞的吞噬活性^[12]。此次研究证明,在黄颡鱼的饵料中添加复方中草药制剂,能有效增强白细胞的吞噬活性,证明复方中草药制剂对黄颡鱼的免疫系统具有刺激作用。然而,关于这种中草药制剂究竟是作用于黄颡鱼的何种免疫细胞而启动细胞免疫过程的,尚有待于更深入的研究。

溶菌酶活性的高低是决定吞噬细胞对所吞噬的致病菌能否杀灭的物质基础之一^[6]。因此,测定动物的溶菌酶活性,在一定程度上能反映动物非特异性体液免疫的状态。鱼类血清中的溶菌酶活性可因机体接触抗原性物质或受到环境因子的刺激而上升^[15]。本研究证明复方中草药制剂能提高在黄颡鱼血清中溶菌酶的活性,而且在 400~1 000 mg/kg 的添加量范围内,随着复方中草药制剂添加量的提高,供试黄颡鱼血清中溶菌酶的活性也逐渐提高。由于本研究中采用的最高添加量为 1 000 mg/kg,所以,更高用量的复方中草药制剂对黄颡鱼的免疫机能是否也有抑制作用,值得进一步研究。

动物体内补体主要是由肝细胞和巨噬细胞合成的,而血清中补体主要是来自肝细胞^[10]。本研究结果表明投喂复方中草药制剂可以增强黄颡鱼血清中补体 C3 和 C4 的活性,试验组黄颡鱼血清中补体 C3 和 C4 的活性均高于对照组。

用 *A. hydrophila* 活菌对黄颡鱼人工感染试验结果表明,口服给予复方中草药制剂能提高黄颡鱼对 *A. hydrophila* 活菌感染的 RPS,并且其 RPS 的变化趋势与黄颡鱼血液中白细胞的吞噬活性、血清中溶菌酶、补体活性上升趋势一致,这种结果表明检测黄颡鱼血液中白细胞的吞噬活性、血清中溶菌酶、补体活性等指标,可以反映黄颡鱼机体抗病力的状况。综上所述,投喂适量的复方中草药制剂对黄颡鱼的非特异性免疫功能有明显的促进作用,并且对黄颡鱼的生长、机体形态和颜色均没有不良影响,说明在饵料中添加适量的中草药制剂能增强黄颡鱼抗病力、达到预防传染性疾病发生的效果。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国农业部公告第 1435 号[EB]. 北京:中华人民共和国农业部,2010.

- [2] 陈昌福. 抗菌渔药的使用问题与水产品质量安全[J]. 饲料工业, 2009, 30(4): 1-5.
- [3] 彭金菊, 马骅, 罗伟英, 等. 32种中药及其复方对嗜水气单胞菌体外抑菌效果[J]. 中兽医医药杂志, 2009, 28(6): 5-7.
- [4] 刘宏伟, 关瑞章, 黄文树. 不同加工处理中草药对鳢鲡主要致病细菌抑制作用的比较[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2009, 14(3): 229-233.
- [5] 王广军, 谢骏, 胡隐昌, 等. 中草药添加剂对日本鳢鲡生长和非特异性免疫效应的研究[J]. 水利渔业, 2008, 38(6): 38-41.
- [6] 胡先勤, 侯永清. 中草药提取物对鲫鱼生长及体成分的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2005(5): 40-41.
- [7] 王吉桥, 孙永新, 张剑诚. 金银花等复方草药对牙鲆生长、消化和免疫能力的影响[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 90-96.
- [8] PUNITHA S M J, BABU M M. Immunostimulating influence of herbal biomedicines on nonspecific immunity in grouper *Epinephelus tauvina* juvenile against *Vibrio harveyi* infection [J]. Aquaculture International, 2008, 16: 511-523.
- [9] 刘宗英, 姚鹃, 陈昌福, 等. 高活性干酵母对中华鳖非特异性免疫功能和抗病力的影响[J]. 养殖与饲料, 2005(6): 9-12.
- [10] 田甜, 胡火庚, 陈昌福. 团头鲂细菌性败血症病原菌分离鉴定及致病力研究[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(3): 341-345.
- [11] 罗璋, 姚鹃, 陈昌福, 等. 酵母免疫多糖对受免疫斑点叉尾鱼回免疫应答的增强作用[J]. 淡水渔业, 2007, 37(3): 22-25.
- [12] SAMUEL M, LAM T J, SIN Y M. Effect of laminaran [β -1, 3-D-glucan] on the protective immunity of blue gourami, *Trichogaster trichopterus* against *Aeromonas salmonicida* [J]. Fish & Shellfish Immunol, 1996, 6(4): 443-454.
- [13] SAKAI M. Current research status of fish immunostimulants [J]. Aquaculture, 1999, 172: 63-92.
- [14] 大野尚仁. β グルカンの生体防御系修飾作用[J]. 日本细菌学杂志, 2000, 55(3): 527-537.
- [15] 史春路. 壳聚糖对黄颡鱼非特异性免疫机能和生长的影响[D]. 武汉: 华中农业大学水产学院, 2008.

Effect of complex Chinese herbs on non-specific immune function and disease resistance in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* R.) by oral administration

SHENG Zhu-mei¹ HUANG Wen¹ ZHANG Ying-jie²
YANG Hua-lian¹ MA Li-ming¹ XU Xiao-ling¹ XIA Lu¹

1. Beijing Aquatic Product Technology Promotion Department, Beijing 100021, China;

2. Department of Food Science and Technology,

Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The effects of the dietary complex Chinese herbs on non-specific immune function and disease resistance in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* R.) were studied. The yellow catfish were divided into 6 groups and were fed with feed supplemented with different ratios of complex Chinese herbs, 0 mg/kg (control group), 200 mg/kg (group I), 400 mg/kg (group II), 600 mg/kg (group III), 800 mg/kg (group IV) and 1 000 mg/kg (group V), respectively. Thirty days later, the yellow catfish were bled, and the leucocytes phagocytic activity, serum lysozyme activity, complement activity and disease resistance were monitored. The results showed that the phagocytic activity of the leucocytes were significantly higher than the control group (t -test, $P < 0.05$). The lysozyme activity of the serum in group III, IV and V were significantly higher than the control group (t -test, $P < 0.05$), but there were no significant differences between group I, II and the control group (t -test, $P > 0.05$). The complement activity of the serum in group II, III, IV and V were significantly higher than the control group (t -test, $P < 0.05$), while there were no significant differences between group I and control group (t -test, $P > 0.05$). The results showed that the best supplementation ratio of the complex Chinese herbs for the yellow catfish was about 400-800 mg/kg.

Key words yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco* R.); complex chinese herbs; disease resistance; *Aeromonas hydrophila*; phagocytic activity