

文章编号: 1004 - 7271(2005)02 - 0097 - 06

饲料中添加花粉和酵母硒对中华鳖幼鳖 生长和非特异性免疫功能的影响

王亭亭, 蔡完其

(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要:在基础饲料中分别添加 0.5×10^{-6} 酵母硒、0.1% 花粉、 0.5×10^{-6} 酵母硒 + 0.1% 花粉的混合物, 投喂中华鳖幼鳖 90 d 后。测定幼鳖的生长和血清中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)活性、T 淋巴细胞转化率、自然杀伤细胞(NK)活性。同对照组相比, 0.5×10^{-6} 酵母硒 + 0.1% 花粉组能显著促进中华鳖的生长($P < 0.05$), 0.5×10^{-6} 酵母硒组与 0.1% 花粉组的日增重率均高于对照组, 但差异不显著($P > 0.05$)。各组间成活率无差异($P > 0.05$)。 0.5×10^{-6} 酵母硒组 NK 细胞活性以及血清中 SOD 酶和 GSH-PX 酶的活力分别比对照组高了 156.06%、44.7%、47.5% ($P < 0.05$)。0.1% 花粉组、 0.5×10^{-6} 酵母硒 + 0.1% 花粉组血清中 GSH-PX 酶的活力分别比对照组高了 39.9%、32.9% ($P < 0.05$), 但两组的 SOD 酶活力与对照组相比均无显著性差异($P > 0.05$)。 0.5×10^{-6} 酵母硒组以及 0.1% 花粉组的 T 淋巴细胞转化率均比对照组高, 但差异均不显著($P > 0.05$)。0.1% 花粉组的 NK 细胞活性也比对照组高, 但差异不显著($P > 0.05$)。 0.5×10^{-6} 酵母硒 + 0.1% 花粉组能显著增强中华鳖 T 淋巴细胞转化率及 NK 细胞活性($P < 0.05$)。

关键词:中华鳖; 酵母硒; 花粉; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; T 淋巴细胞转化率; 自然杀伤细胞活性; 非特异性免疫

中图分类号: S 963.73 文献标识码: A

Effects of dietary pollen and selenoyeast on growth, non-specific immunity of *Trionyx sinensis*

WANG Ting-ting, CAI Wan-qi

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certificated
by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: *Trionyx sinensis* were fed with basal formulated diet supplemented with 0.5×10^{-6} selenoyeast, 0.1% pollen and complex of 0.5×10^{-6} selenoyeast + 0.1% pollen, respectively for 90 days. There were three replicates in each of the four treatments. Growth, T lymphocytes proliferation, activities of GSH-PX, SOD and NK cells were measured. Compared with the control group, daily weight gain of complex of 0.5×10^{-6} selenoyeast + 0.1% pollen group was significantly higher than that of control group ($P < 0.05$). The daily weight gain of 0.5×10^{-6} selenoyeast group and 0.1% pollen group was higher than that of control group, but the difference was not significant ($P > 0.05$). There was no significant difference on survival rate among four groups ($P > 0.05$). Activities of SOD,

收稿日期: 2004-09-13

基金项目: 上海市水产办“中华鳖良种筛选和培育”(科 04 - 06)

作者简介: 王亭亭(1979 -), 男, 山东青岛人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物医学。

通讯作者: 蔡完其(1939 -), 女, 浙江鄞县人, 教授, 博士生导师。主要从事水产动物抗逆性和育种研究。Tel: 021 - 65710333, E-mail:

lsf 038@mail.online.sh.cn

GSH-PX and NK cells of 0.5×10^{-6} selenoyeast group were 44.7%, 47.5% and 156.06% higher than those of control group respectively ($P < 0.05$). Activities of GSH-PX of 0.1% pollen group and complex of 0.5×10^{-6} selenoyeast + 0.1% pollen group were 39.9%, 32.9% higher than that of control group ($P < 0.05$). There was no significant difference on activities of SOD among control group, 0.1% pollen group and complex of 0.5×10^{-6} selenoyeast + 0.1% pollen group ($P > 0.05$). T lymphocytes proliferation of both 0.5×10^{-6} selenoyeast group and 0.1% pollen group was higher than that of control group, but the difference was not significant ($P > 0.05$). Activities of NK cells of 0.1% pollen group was higher than that of control group, but the difference was not significant ($P > 0.05$). In general, complex of 0.5×10^{-6} selenoyeast + 0.1% pollen group can significantly improve the T lymphocytes proliferation and activities of NK cells in soft-shelled turtle ($P < 0.05$).

Key words: *Trionyx sinensis*; selenoyeast; pollen; SOD; GSH-PX; T lymphocytes proliferation; activity of NK; non-specific immunity

饲料中添加多糖和中草药能提高中华鳖血细胞吞噬率、血清 SOD、溶菌酶活力^[1],提示在饲料中添加合适的免疫增强剂可以增强中华鳖的非特异性免疫功能。花粉是植物的雄性生殖细胞,含有植物生长所需的全部营养物质及多种生理活性成分,能增强多种哺乳动物的免疫功能,还能促进水产动物生长^[2],但花粉对水产动物免疫功能的影响还未见报道,硒是动物体必需的营养元素之一,能促进鱼虾生长^[3,4],增强鱼类免疫水平。研究花粉和硒在饲料中的适宜添加量,对水产动物生长、疾病的防治有重要的意义。本文在本课题组前期工作(花粉、酵母硒单一因子研究)基础上,进一步研究花粉+硒对中华鳖生长、非特异性免疫功能的影响,以期花粉和酵母硒作为中华鳖饲料添加剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验中华鳖幼鳖取自崇明东泰养鳖业有限公司,选择体重为 62.3 ± 7.5 g 的健康鳖放入室外 25 m^2 的水泥池,每池放 200 只,正式试验前先用基础饲料驯养一周,试验从 2003 年 6 月 22 日始至 2003 年 10 月 10 日结束,共饲养 90 d。酵母硒来自北京奥特奇生物制品有限公司,啤酒脱水酵母,硒含量为 $1000 \mu\text{g/g}$,花粉来自浙江大飞龙动物保健品有限公司。基础饲料采用森泰牌幼鳖料,具体成分见表 1。

表 1 基础饲料成分
Tab.1 Main composition of basal diet

组 分	水份	粗蛋白	粗脂肪	粗纤维	粗灰分	食盐	钙	总磷
含量	≤ 10.0	≥ 45.0	≥ 3.0	≤ 2.0	≤ 17.0	≤ 2.0	≤ 4.6	≥ 1.5

1.2 方法

1.2.1 试验设计

在基础饲料中分别添加 0.1% 花粉、 0.5×10^{-6} 酵母硒、 0.5×10^{-6} 酵母硒 + 0.1% 花粉的混合物(以下简称花粉组、酵母硒组、混合组),以基础饲料为对照,采用完全随机区组设计,试验组和对照组各 3 个重复。

1.2.2 饲养管理

采用逐级扩大的方法按试验设计将花粉和酵母硒加入到基础饲料中,并混匀成试验饲料,投喂前按 1:1 的重量比向试验饲料中加水,人工揉成饼状。投喂时将饼状饲料固定于饲料台上,日投饲量为鳖体重的 2%~4%,每日投喂两次,并根据摄食与天气情况适当调节,投喂 1 h 后收集残饵。饲养期间每两周用生石灰消毒一次。水中 DO 大于 1.4 mg/L , NH_3 小于 2.1 mg/L , pH 8.5~9.1,水温 $17 \sim 36 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

1.2.3 生长测定

放养时及饲养 90 d 后每池随机抽样 30 只鳖逐只称重; 池中其余鳖称总重量计算平均重量、日增重率及成活率。

1.2.4 血清制备

从试验组和对照组中各随机抽取 30 只鳖, 断头取血, 室温放置 1 h, 3 000 r/min 离心 15 min, 取血清, -20℃ 保存备用。

1.2.5 超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活力测定

采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定。具体操作步骤参照试剂盒说明书, 每组测 15 个样品。

$$\text{SOD 活力 (NU/mL)} = \frac{\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}}{\text{对照管吸光度}} \div 50\% \times \text{稀释倍数}$$

血清中 GSH-PX 活力计算

定义: 规定每 0.1 mL 血清在 28℃ 反应 5 min, 扣除非酶促反应作用, 使反应体系中 GSH-PX 深度降低 1 μmol/L 为一个酶活力单位。

$$\text{GSH-PX 活力} = \frac{\text{非酶管 OD 值} - \text{酶管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \text{标准管浓度 (20 } \mu\text{mol/L)} \times \text{稀释倍数}$$

1.2.6 T 淋巴细胞转化率和自然杀伤细胞(NK)活性测定

在无菌室内, 将鳖断头杀死后取脾脏用 Hank 氏液洗 2 次, 用平底小试管在 0.22 μm 筛绢网上压磨脾脏, 使之分离成单个细胞; 将细胞吸入试管中加入 10 mL Hank 氏液, 2 000 r/min 水平离心 20 min, 取中间灰白色层加入 10 mL Hank 氏液, 1 000 r/min 水平离心 10 min, 底部沉淀细胞即为效应细胞, 加入完全 RPMI-1640 培养液, 用完全 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度为 2×10^9 ind/L, 备用。

T 淋巴细胞转化率(LTR)以及自然杀伤细胞(NK)活性的测定均采用³H 胸腺嘧啶核苷掺入法(³H-TdR 法)其中自然杀伤细胞活性测定以 K-562 为靶细胞, 每组测 5 个样品。

$$\text{转化率} = \frac{\text{试验孔放射强度均值} - \text{对照孔放射强度均值}}{\text{对照孔放射强度均值}}$$

$$\text{NK 细胞活性}(\%) = \frac{\text{对照孔放射强度均值} - \text{试验孔放射强度均值}}{\text{对照孔放射强度均值}} \times 100$$

1.2.7 数据处理

采用统计软件 SPSS 12.0 处理, 差异显著性采用 ANOVA、LSD 检验。

2 结果

2.1 生长差异

饲养至 90 d 时, 各组中华鳖日增重率依次为: 对照组 < 花粉组 < 酵母硒组 < 酵母硒 + 花粉组, 其中酵母硒 + 花粉组显著高于对照组 ($P < 0.05$)。成活率在各组间并无显著性差异(表 2)。

表 2 试验 90 d 中华鳖日增重率及成活率

Tab.2 Weight gain, survival rate of *Trionyx sinensis* during the 90th testing day

	初重(g)	末重(g)	日增重率(g/d)	成活率(%)
对照	62.60 ± 0.95	148.97 ± 2.24	0.959 ^a	73.67 ^a
酵母硒	61.00 ± 2.60	151.53 ± 3.33	1.006 ^{ab}	74.00 ^a
花粉	62.57 ± 2.14	149.43 ± 3.17	0.964 ^{ab}	73.67 ^a
酵母硒 + 花粉	63.03 ± 0.57	157.70 ± 4.91	1.052 ^b	73.50 ^a

注: 表中小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

2.2 血清中超氧化物歧化酶活力

4组的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力依次为:混合组 \cong 对照组 $<$ 花粉组 $<$ 酵母硒组,酵母硒组SOD活力显著高于其它3组($P < 0.05$),比对照组高了44.7%。对照组、花粉组和混合组之间无显著性差异($P > 0.05$),如表3。

2.3 血清中谷胱甘肽过氧化物酶活力

四组的谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)活力依次为:对照组 $<$ 混合组 $<$ 花粉组 $<$ 酵母硒组,三个试验组的GSH-PX活力分别比对照组高了32.9%、39.9%、47.5%,差异显著($P < 0.05$),但三个试验组之间无显著性差异($P > 0.05$),如表3。

2.4 T淋巴细胞转化率

酵母硒+花粉组的T淋巴细胞转化率比对照组高了64.09%,但单一的酵母硒组或花粉组同对照组之间无显著性差异($P > 0.05$),如表3。

2.5 NK细胞活性

酵母硒组和酵母硒+花粉组的NK细胞活性分别比对照组高了156.06%、219.68%,差异显著($P < 0.05$),花粉组比对照组高,但两者之间无显著性差异($P > 0.05$),如表3。

表3 试验90d中华鳖血清中SOD、GSH-PX酶活力以及NK细胞活性、T淋巴细胞转化率

Tab.3 T lymphocytes proliferation and activities of SOD, GSH-PX and NK cells in four groups

Trionyx sinensis during the 90th testing day

	血清 GSH-PX (U/0.1mL)	血清 SOD(NU/mL)	T淋巴细胞 转化率(%)	NK细胞 活性(%)
对照组	243.57 \pm 15.67 ^a	250.69 \pm 13.28 ^a	7.49 \pm 1.18 ^a	10.06 \pm 1.53 ^a
酵母硒组	359.36 \pm 15.33 ^b	362.84 \pm 10.42 ^b	8.50 \pm 1.21 ^a	25.76 \pm 4.25 ^b
花粉组	340.87 \pm 21.97 ^b	269.32 \pm 8.57 ^a	8.41 \pm 2.27 ^a	14.05 \pm 1.04 ^a
酵母硒+花粉组	323.65 \pm 32.88 ^b	250.39 \pm 15.57 ^a	12.29 \pm 0.87 ^b	32.16 \pm 1.19 ^b

注:表中小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 花粉和酵母硒对中华鳖生长的影响

花粉中含有多种营养物质及酶类,不仅能补充动物生长所需的营养,还能提高动物对饵料的消化与分解能力,从而起到促生长作用。本试验表明饲料中添加0.1%的花粉对中华鳖有促生长作用,但与对照组相比差异不显著($P > 0.05$),花粉的添加量过低是可能的原因之一,王迎春等^[5]的研究表明,玉米花粉添加量为5 g/kg以上时对麦穗鱼幼鱼(135 mg/ind)有促生长作用,而本试验中华鳖(62.3g \pm 7.5 g/ind)添加量只有1 g/kg。如果提高花粉的添加量结果会怎样有待进一步研究。

硒是动物体必需的微量元素,鱼类缺硒会抑制生长^[4,6],但是过量的硒也会产生毒害作用^[4],饲料中添加合适量的硒会促进养殖对象的生长,降低饲料系数,提高成活率,但添加的最适剂量因养殖对象的种类、大小而异^[3,4,7]。本试验在饲料中添加 0.5×10^{-6} 的酵母硒发现对中华鳖有促生长作用,但效果不显著($P > 0.05$)。

但是酵母硒和花粉的混合物却能显著促进中华鳖的生长,说明两者对中华鳖的生长具有一定的协同效应。

3.2 酵母硒和花粉对中华鳖血清GSH-PX活力的影响

硒是GSH-PX酶的重要组成部分,GSH-PX酶能保护生物膜和生物大分子结构免受氧化损伤,而且能有效地清除自由基,还具有抑制细菌的作用。有研究发现硒的缺乏会损伤动物体内的细胞膜和细胞

膜器,导致鲑科鱼类血清和肝脏中 GSH-PX 水平显著下降、肌肉营养不良、贫血、死亡^[6,8],所以日粮补硒对很多动物具有很重要的意义。本试验发现酵母硒组的 GSH-PX 酶活性比对照组提高了 47.5% ($P < 0.05$),这与富硒酵母对鲤的结果相似^[9],而 GSH-PX 酶在机体免疫过程中发挥极其重要的作用,表明酵母硒能增强多种水生动物机体的抗氧化能力和免疫水平^[3]。

花粉能增强正常动物的非特异性和特异性免疫功能^[10],而且对营养不良、免疫功能低下动物显示良好的作用,这是花粉中所含的丰富营养成分综合作用的结果,一方面可作为动物营养素的来源,另一方面还可补充维持免疫组织和免疫活性细胞的必要成分,其中的多糖成分使机体参与细胞免疫的细胞数量增多,还能增强巨噬细胞的吞噬功能;其中的黄酮类物质具有抗肿瘤的作用;而且花粉有抑制脂质过氧化作用,减少脂质过氧化物(LPO)的产生,而 LPO 本身对免疫功能有直接的抑制作用。总之,但花粉对水产动物免疫功能的影响鲜有报道,本试验的结果表明饲料中添加花粉投喂中华鳖,使花粉组血清 GSH-PX 酶活力比对照高了 39.9% ($P < 0.05$),提示与别的哺乳动物一致,花粉也能提高水产动物的免疫水平。

3.3 酵母硒和花粉对中华鳖血清 SOD 活力的影响

SOD 是一种重要的抗氧化酶,可清除体内自由基,保持细胞免受损害,使细胞能正常合成各种酶类,对增强吞噬细胞活性和整个机体的免疫功能具有重要的作用^[11],当 SOD 的活性降低时,生物体内自由基会过多,导致生理功能失调,免疫水平下降,容易产生疾病^[12]。故 SOD 可作为机体非特异性免疫指标来评价免疫增强剂对机体非特异性免疫力的影响。本试验的结果表明,酵母硒组的 SOD 酶活力比对照组提高了 44.7% ($P < 0.05$),这与富硒酵母对鲤的结果相似^[10],说明酵母硒能增强中华鳖的免疫水平^[6]。

值得注意的是,本试验发现,在酵母硒 + 花粉混合组,无论是 GSH-PX 酶活力还是 SOD 酶活力均低于酵母硒组或花粉组,但差异均不显著 ($P > 0.05$)。当酵母硒与花粉一起使用,对中华鳖的酶活力有无协同作用有待于进一步深入研究。

3.4 酵母硒和花粉对中华鳖 T 淋巴细胞转化率和 NK 活性的影响

硒能增强动物机体细胞免疫功能,增强 T 淋巴细胞和 NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用^[13],但硒本身没有丝裂原作用,不能引起 T 淋巴细胞转化,只能增强 T 淋巴细胞或脾细胞对丝裂原刺激的转化能力,同时增强 T 淋巴细胞的细胞毒作用。本试验表明,酵母硒组和花粉组中华鳖 T 淋巴细胞转化率和 NK 细胞活性比对照组高,其中酵母硒能显著提高中华鳖 NK 细胞活性 ($P < 0.05$),添加酵母硒和花粉的混合物也能显著提高中华鳖 T 淋巴细胞转化率和 NK 细胞活性 ($P < 0.05$)。NK 细胞对靶细胞具有非特异性的杀伤作用、还具有抗病毒和免疫调节作用、分泌 IFN- γ 增加巨噬细胞的杀菌活性。花粉中含有丰富的 VC、VE 以及多种微量元素,酵母硒和花粉的混合物能显著提高 T 淋巴细胞转化率和 NK 活性,可能与硒和花粉中含有的多种物质协同效用有关,硒本身具有直接的抗氧化作用,含硒 GSH-PX 分解形成的过氧化物,阻止过氧化物生成能引发膜脂质过氧化的羟基自由基和单线态氧,而花粉中的 VE 阻止膜脂质过氧化链式反应,降低不饱和脂肪酸的过氧化物的生成,它们可以协同保护机体组织器官免受氧化损伤,维持其正常的生理功能。

对于硒是如何增强 T 淋巴细胞转化能力和 NK 活性的机理存在不同的观点,杜立芹^[14]发现硒对脾细胞 IL-2 的生成并无影响,却发现补硒与 IL-2 受体的表达量呈正相关,而 IL-2 和其受体的相互作用作为第二信号能引起 IL-2 受体阳性细胞合成及繁殖 DNA,由此推测硒对 T 细胞介导的细胞免疫的影响,可能是通过诱导和扩大其受体作用的第二信号来实现的。而张叔人等^[15]发现,硒能增加机体 T 淋巴细胞产生 IL-2 的能力,而 IL-2 能明显增强 T 淋巴细胞、NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用以及 T 淋巴细胞对丝裂原的增殖反应,由此推测硒增强 T 淋巴细胞、NK 细胞对肿瘤细胞的杀伤作用以及 T 淋巴细胞对丝裂原的增殖反应,是通过增加 T 淋巴细胞产生 IL-2 能力而实现的,至于硒究竟是通过哪一种机理来影响 T 淋巴细胞转化和 NK 活性? 还有待进一步深入研究。

总之,饲料中添加酵母硒+花粉投喂中华鳖能促进生长,提高鳖 T 淋巴细胞转化率和 NK 细胞活性,增强鳖的非特异性免疫功能。

致谢:在试验过程中冷向军老师、刘至治博士、季高华硕士提供了许多建议和帮助,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] 季高华,刘至治,冷向军.饲料中添加 β -葡聚糖、低聚果糖对中华鳖幼鳖生长和血清 SOD、溶菌酶活力的影响[J].上海水产大学学报,2004,13(1):36-40.
- [2] 黄锦莲,张贵后.花粉活性物对对虾生长发育影响的研究[J].浙江水产学院学报,1993,12(3):200-203.
- [3] 华雪铭,周洪琪,邱小琼,等.饲料中添加芽孢杆菌和硒酵母对异育银鲫的生长及抗病力的影响[J].水产学报,2001,25(5):448-453.
- [4] 王安利,王荣端,王维娜,等.饲料中硒含量对中国对虾生长及其体内含量的影响[J].水产学报,1994,18(3):245-248.
- [5] 王迎春,张晓华,张继平.玉米花粉作麦穗鱼饵料添加剂的研究[J].齐鲁渔业,1996,13(5):32-35.
- [6] Poston H A, Combs G F, Leibovitz L. VE and selenium interreaction in the Atlantic salmon: gross, histological, and biochemical deficiency signs [J]. Nutr, 1976,20:427-434.
- [7] 魏文志,杨志强,罗方妮,等.饲料中添加有机硒对异育银鲫生长的影响[J].淡水渔业,2001,31(3):45-46.
- [8] Bell J G, Pirie B J S, Adon J W, et al. Some effects of selenium deficiency on glutathione peroxidases activity and tissue pathology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)[J]. Nutr, 1986,55:305-311.
- [9] Javanovic A, Grubor-Lajsic G, Djukic G, et al. The effect of selenium, on antioxidative system in erythrocytes and liver of the carp (*Cyprinus carpio*)[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 1997,37(5):443-448.
- [10] 田维毅,马春玲,白惠卿,等.天花粉及其组分对小鼠 NK 细胞杀伤活性的影响[J].贵州医药,2001,25(11):982-984.
- [11] 艾春香,陈立侨,高露姣,等. VC 对河蟹血清和组织中超氧化物歧化酶及磷酸酶活性的影响[J].台湾海峡,2002,21(4):431-438.
- [12] 丁美丽,林林,李光友,等.有机污染对中国对虾内外环境影响的研究[J].海洋与湖沼,1997,28:17-21.
- [13] 张叔人,张友会.硒增强细胞免疫的研究[J].中国免疫学杂志,1986,2:257.
- [14] 杜立芹.硒与免疫[J].国外医学卫生学分册,1999,26(2):91-94.
- [15] 张叔人,张友会,常立水.硒促进淋巴细胞产生 IL-2,但并不影响其对 IL-2 的反应性[J].中国医学科学院学报,1988,10(4):245.