

文章编号: 1674-5566(2013)04-0571-06

黄芪多糖对克氏原螯虾生长和非特异性免疫指标的影响

洪徐鹏¹, 夏思瑶¹, 唐嘉蓁², 张庆华¹, 薛 晖³, 唐建清³

(1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306; 2. 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009; 3. 江苏省淡水水产研究所, 江苏 南京 210017)

摘要: 研究了饲料中不同添加浓度的黄芪多糖(0%、0.2%、0.4%、0.8%)对克氏原螯虾生长和非特异性免疫指标的影响。结果表明,在0 d、2 d、4 d、6 d、8 d、12 d、16 d、20 d,不同浓度组的克氏原螯虾增重率(R_{wc})及特定生长率(R_{sc})的变化规律符合修正的高斯模型($R^2 = 0.9999$);当黄芪多糖的添加浓度为0.40%~0.75%时,实验虾的增重率、特定生长率达到最大值,分别为 $37.13\% \pm 7.75\%$ 和 $1.57\% \pm 0.28\%$;不同添加浓度的黄芪多糖对克氏原螯虾蜕壳数 N_M 的影响符合对数模型($R^2 = 0.9976$),实验组与对照组的蜕壳数有显著差异($P < 0.05$),体重增长有极显著差异($P < 0.01$)。非特异性免疫指标检测发现,超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)随黄芪多糖浓度变化差异不显著($P > 0.05$);黄芪多糖浓度对溶菌酶(LSZ)的影响极显著($P < 0.01$)。本实验表明,黄芪多糖对克氏原螯虾的生长和非特异性免疫具有明显的促进作用,建议黄芪多糖在饲料中的最适添加浓度为0.40%~0.80%。

研究亮点: 虾蟹类免疫系统较鱼类而言相对低等,且以非特异性免疫为主,本实验以克氏原螯虾为研究对象,考察比较不同浓度的黄芪多糖对克氏原螯虾生长和非特异性免疫酶活的影响;实验结果为黄芪多糖在虾类的饵料开发与病害预防提供了理论依据。

关键词: 黄芪多糖; 克氏原螯虾; 生长; 超氧化物歧化酶; 酸性磷酸酶; 溶菌酶

中图分类号: S 963.73

文献标志码: A

黄芪多糖(Astragalus Polysaccharides, APS)是黄芪的主要活性成分之一,是一种免疫多糖,可作为免疫促进剂或调节剂,具有抗疾病、抗疲劳等作用^[1-2];通过引起机体免疫系统的非特异性应答,如巨噬细胞的激活以及对补体系统的调节作用来影响机体的免疫应答,并且可以刺激胃蛋白酶、肠蛋白酶、肝胰脏蛋白酶等的分泌^[3-6]。研究表明黄芪多糖对齐口裂腹鱼的生长和免疫力有较好的促进作用,在添加浓度0.04%~0.074%时对齐口裂腹鱼生长和免疫效果最佳^[7]。饲料中添加适量的黄芪对异育银鲫的血清溶菌酶、SOD等活性具有显著的促进作用^[8]。同时,免疫多糖对南美白对虾的免疫相关酶有激活作用^[9-10];目前有研究表明克氏原螯虾经注射免疫多糖后,肝胰腺中的酸性磷酸酶(ACP)和碱

性磷酸酶(ALP)活性明显增加^[11]。

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)俗称小龙虾,属节肢动物门、甲壳纲,是目前全世界最广的淡水螯虾养殖种类,在我国长江中下游地区有广泛养殖,其肉质鲜美、营养丰富深受消费者青睐。近年来,克氏原螯虾养殖中暴发流行的白斑综合征等病害,给养殖业带来巨大损失^[12],目前尚无有效的治疗药物,主要是通过预防的方法进行控制。

黄芪多糖能有效地提高动物的免疫力,对克氏原螯虾的病害预防具有很好的应用前景,且有关黄芪多糖在克氏原螯虾养殖中的应用研究尚未见报道。本实验旨在探索黄芪多糖对于克氏原螯虾生长性能和非特异性免疫因子的影响,以为克氏原螯虾的饵料开发及疫病综合防控提

收稿日期: 2012-11-02 修回日期: 2013-02-14

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201003070); 国家级大学生创新训练计划项目(B-5106-12-0002)

作者简介: 洪徐鹏(1993—),男,硕士研究生,研究方向为水产动物病害。E-mail: xphong1017@163.com

通信作者: 薛 晖, E-mail: jsxuehui@163.com

供有益参考。

1 材料与方法

1.1 材料

克氏原螯虾取自江苏省淡水水产研究所,平均体重(10.25 ± 1.7)g,平均头胸甲长(28.5 ± 3.7)mm,选取体质健壮、反应灵敏的个体进行实验,实验前驯养7 d。

实验用黄芪多糖(批号:20120701,购自大连容海生物科技有限公司),含70%的有效成份。以江苏省淡水水产研究所提供的河蟹用饲料为基础饲料(不含免疫多糖),分别添加0%、0.2%、0.4%、0.8%的黄芪多糖,配成实验饲料,自然风干。在干燥条件下密封保存备用。

1.2 实验条件

实验在80 cm × 58 cm × 60 cm的聚乙烯塑料箱中进行,设置掩蔽物(PVC管、石棉瓦),养殖用水为充分曝气3 d的自来水,每天采用便携式多参数水质分析仪(YSI-ADV6600)监测水质,pH值7.4 ~ 7.9,总硬度(100 ~ 250)mg/L(以CaCO₃计),实验温度为(25 ± 2)℃,溶解氧(7.05 ~ 8.67)mg/L,在实验室内自然光照。

1.3 实验设计

实验分为空白对照组(S1)与添加处理组(S2、S3、S4),每组设置3个平行。每组投放20只克氏原螯虾(共计用虾240只)。S1、S2、S3、S4组分别投喂含黄芪多糖质量分数为0%、0.2%、0.4%、0.8%的实验饲料。每天两次定点投喂实验饲料0.5 g/只。次日,用虹吸管将未利用饲料吸出。实验期间,每天更换水量1/3。在0、2、4、6、8、12、16、20 d分别对各实验组的克氏原螯虾随机抽取5只进行活体体重称量,活体抽取血淋巴进行免疫指标测定,将取样后的克氏原螯虾再放回原箱进行饲养。实验期间每天观察各实验组中克氏原螯虾的个体蜕壳数等情况。

1.4 生长指标测定

在0、2、4、6、8、12、16、20 d计算增重率(R_{WC})、特定生长率(R_{SG})与蜕壳数(N_M):

$$R_{WC} = 100 \times (W_t - W_0) / W_0 \quad (1)$$

$$R_{SG} = 100 \times (\ln W_t - \ln W_0) / t \quad (2)$$

$$N_M = \sum n_t \quad (3)$$

式中: W_0 为实验开始时克氏原螯虾体重(g); W_t 为 t 天时克氏原螯虾体重(g); t 为养殖实验天数

(d); n_t 为 t 天时各试验组蜕壳数。

1.5 免疫指标测定

在0、2、4、6、8、12、16、20 d各实验组中随机抽取5只实验虾,采用1 mL无菌注射器于腹节第二节背部抽取血淋巴150 μL,将血淋巴置于加入150 μL抗凝血剂(4.8 g/L柠檬酸,13.2 g/L柠檬酸钠,14.7 g/L葡萄糖)的离心管中,置于冰箱中(-80℃)保存,用于测定溶菌酶(LSZ)、酸性磷酸酶(ACP)及超氧化物歧化酶(SOD)活力。

使用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)及溶菌酶(LSZ)活性,按说明书进行操作。SOD以每毫升反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD量为一个SOD活力单位(U/mL)。ACP以100 mL血清在37℃时与基质作用30 min产生1 mg酚为1个活力单位(U/100mL)。LSZ在血清中单位为μg/mL。

1.6 数据分析

实验数据均以(平均值 ± 标准误)表示,通过统计软件SPSS 16.0对数据进行重复测量方差分析,采用SigmaPlot 12.0软件对数据进行方差分析(ANOVA)与作图。

2 结果

2.1 黄芪多糖对克氏原螯虾生长性能的影响

不同添加浓度的黄芪多糖对克氏原螯虾的体重均起促进作用且影响极显著($P < 0.01$)。16 d时,黄芪多糖浓度为0.2%的添加组显著高于其他实验组($P < 0.05$);20 d时,0.2%、0.4%、0.8%添加组差异不显著,但显著高于对照组($P < 0.01$,图1)。

增重率受黄芪多糖浓度影响差异不显著($P > 0.05$)。20 d时,0%、0.2%、0.4%、0.8%添加组的增重率分别为 $13.72\% \pm 6.69\%$ 、 $31.62\% \pm 11.58\%$ 、 $37.13\% \pm 7.75\%$ 、 $36.47\% \pm 29.07\%$ (图2)。特定生长率变化与增重率变化类似(图3)。通过修正的高斯模型($R^2 = 0.9999$)得出当黄芪多糖添加浓度为0.40%~0.75%时, R_{WC} 与 R_{SG} 均取得最大值。

蜕壳数 N_M 与黄芪多糖添加浓度关系符合对数模型($R^2 = 0.9976$)。不同添加浓度的黄芪多糖对克氏原螯虾蜕壳数的影响差异显著($P < 0.05$),高浓度的黄芪多糖对蜕壳有抑制作用(图

4)。

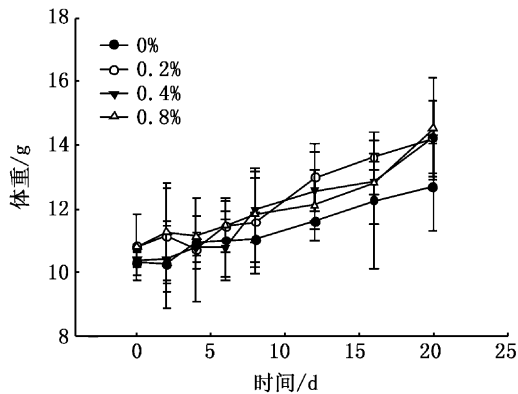


图1 不同黄芪多糖浓度组的克氏原螯虾体重随时间变化

Fig. 1 The weight change over time with the *P. clarkii* in different APS concentration groups

表1 时间和 APS 浓度对克氏原螯虾生长指标的交互影响结果

Tab. 1 Results of two-way ANOVA about the interaction between time and APS concentration on parameters of growth in *P. clarkii*

项目	变量	df	F	P
体重	时间	7	22.350	<0.01
	APS 浓度	3	2.627	0.059
	时间 × APS 浓度	21	0.448	0.977
增长率	时间	7	8.994	<0.01
	APS 浓度	3	0.748	0.528
	时间 × APS 浓度	21	0.353	0.995
特定增长率	时间	7	0.416	0.888
	APS 浓度	3	0.133	0.940
	时间 × APS 浓度	21	0.172	1.000

注: df 表示自由度; $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著;下同。

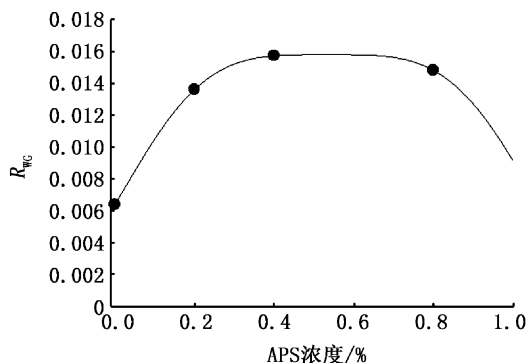


图2 黄芪多糖浓度对增重率 R_{wg} 的影响

Fig. 2 The effect of APS concentration to the R_{wg}

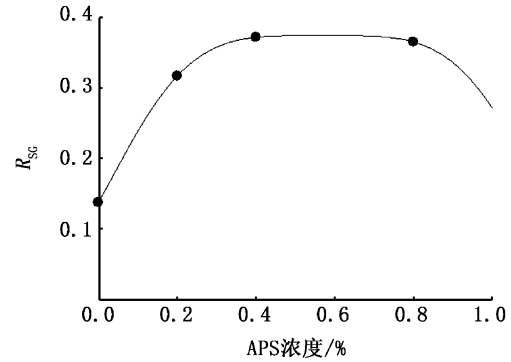


图3 黄芪多糖浓度对特定增长率 R_{sg} 的影响

Fig. 3 The effect of the APS concentration to the R_{sg}

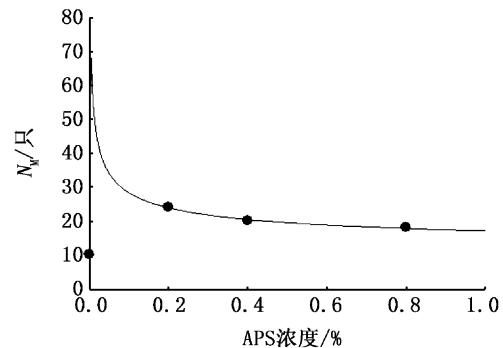


图4 黄芪多糖浓度与蜕壳数 N_m 的关系

Fig. 4 The effect of APS concentration to the N_m

2.2 黄芪多糖对克氏原螯虾非特异性免疫指标的影响

在不同添加浓度的黄芪多糖组中,酸性磷酸酶(ACP)均呈现先上升达到峰值再下降后上升的趋势。4 d 时各组 ACP 均达到峰值;16 d 时,0.4% 的实验组 ACP 显著高于 0.2%、0.8% 组与对照组 ($P < 0.05$);20 d 时,0.2%、0.4%、0.8% 组 ACP 高于对照组,0.4%、0.8% 组与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)。

超氧化物歧化酶(SOD)变化趋势与 ACP 类似。2 d 时,0.8% 组与对照组有极显著差异 ($P < 0.01$);4 d 时,0.2%、0.4% 组与对照组差异极显著 ($P < 0.01$);8 d 时,0.2% 组与对照组差异显著 ($P < 0.05$);16 d 时,0.2%、0.4%、0.8% 组与对照组差异显著 ($P < 0.05$);20 d 时,黄芪多糖添加浓度为 0.2% 组与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。

不同时间及不同添加浓度的黄芪多糖对溶菌酶(LSZ)的影响极显著($P < 0.01$)。各组变化趋势一致;8 d时,0.2%、0.4%、0.8%的实验组与对照组差异极显著($P < 0.01$),0.4%、0.8%实验组明显高于对照组;8 d到12 d时,LSZ随时间增加而下降;12 d后,LSZ随时间增加而上升,在18 d时达到峰值;18 d时,0.4%实验组与对照组差异显著($P < 0.05$)。

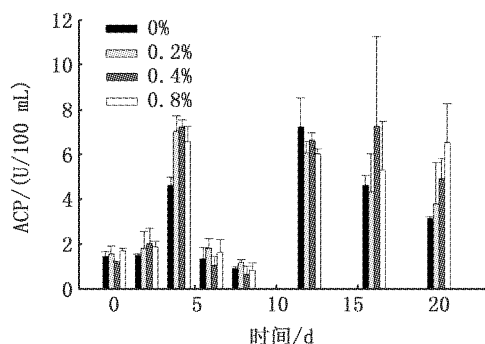


图5 黄芪多糖对酸性磷酸酶(ACP)的影响
Fig. 5 The effect of APS to ACP

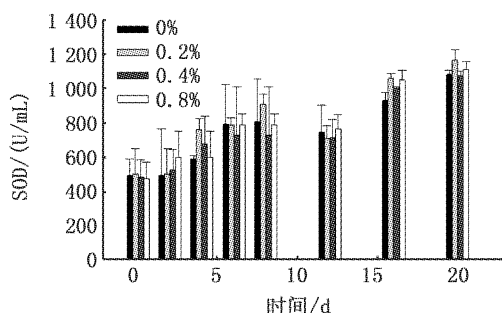


图6 黄芪多糖对超氧化物歧化酶(SOD)的影响
Fig. 6 The effect of APS to SOD

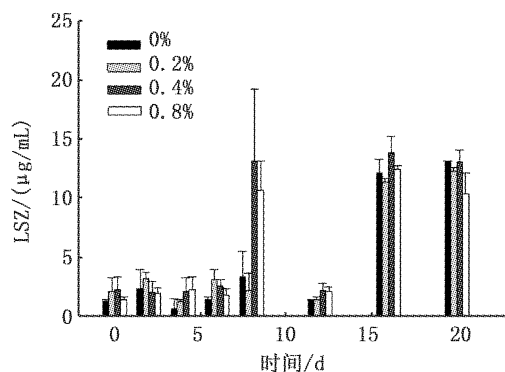


图7 黄芪多糖对溶菌酶(LSZ)的影响
Fig. 7 The effect of APS to LSZ

3 讨论

黄芪多糖可促进细胞中的核酸、蛋白质及多肽的合成。能够促进胃液分泌和养分消化,调节代谢过程,促进对虾生长^[13]。黄芪中的活性物质可以促进克氏原螯虾体内蛋白质的转化,从而提高克氏原螯虾的蜕壳率和存活率^[14]。FREEMAN等认为甲壳类动物的生长与蜕壳步调一致^[15]。黄芪多糖可以促进克氏原螯虾机体蜕皮激素的分泌与机体蛋白质的合成,从而提高蜕壳数。免疫多糖促进了虾体内消化酶的分泌并提高其活性^[3],加速了食物的消化吸收与利用,在一定浓度范围内能够有效促进克氏原螯虾蛋白质的合成,促进克氏原螯虾生长。当黄芪多糖浓度为0.2%时对克氏原螯虾体重增加效果明显;根据RWG与RSG达到最大值时黄芪多糖添加浓度范围是0.40%~0.75%。

表2 时间和APS浓度对克氏原螯虾免疫指标的交互影响结果

Tab. 2 Results of two-way ANOVA about the interaction between time and APS concentration on parameters of immunity in *P. clarkii*

项目	变量	df	F	P
酸性磷酸酶	时间	7	49.478	<0.01
	APS浓度	3	2.165	0.102
	时间×APS浓度	21	1.446	0.137
超氧化物歧化酶	时间	7	62.995	<0.01
	APS浓度	3	0.940	0.428
	时间×APS浓度	21	0.573	0.920
溶菌酶	时间	7	109.632	<0.01
	APS浓度	3	7.763	<0.01
	时间×APS浓度	21	4.892	<0.01

当病原入侵时,甲壳动物通过体液免疫因子等识别病原,将信息传递到特定细胞内促使免疫因子合成,利用免疫因子或协助免疫细胞清除病原等异物发挥免疫功能^[16]。ACP能催化磷酸单酯水解,已有研究表明,在甲壳动物血细胞进行吞噬和包围化的免疫反应中,会伴随有ACP的释放^[17]。超氧化物歧化酶(SOD)是机体快速有效清除活性氧的重要抗氧化酶,可以保持细胞正常结构免受伤害,其活性与生物的免疫水平密切相关^[18-19]。复合中草药对凡纳滨对虾血清中超氧化物歧化酶、碱性磷酸酶、酚氧化物酶和溶菌酶有显著影响,随着复合中草药水平的增加,酶活

力出现先显著增加后下降的趋势^[10]。同时,饲料中添加黄芪多糖对异育银鲫的非特异性免疫力具有明显的促进作用^[8]。童春等发现在饲料中添加 0.6% 壳聚糖后,淡水白鲢的 ACP、LSZ、SOD 均达到最高^[20]。本实验中,ACP、SOD 随时间变化差异极显著,时间及黄芪多糖浓度对 LSZ 影响极显著($P < 0.01$),说明 LSZ 可以作为衡量克氏原螯虾非特异性免疫的重要因子。LSZ、SOD、酚氧化酶与多种生理代谢和免疫反应有关,酶活力的大小在一定程度上可体现红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*)幼虾抗病力的强弱。肝胰腺细胞内粗面内质网发达,游离的核糖体和酶原颗粒具有蛋白合成、贮存作用,免疫多糖的作用使肝小管上皮细胞内粗面内质网核糖体增多,促进了消化酶的合成以及分泌等功能,在增强肝胰腺生理功能的同时,在一定程度上提高了幼虾的抗病能力^[21-22]。在本实验中:ACP、SOD、LSZ 的变化与黄芪多糖刺激了肝胰腺细胞内粗面内质网和核糖体促进相关酶的合成有关。本实验中,0.2% 组的 SOD 高于其他组,且差异显著($P < 0.05$)。20 d 时,0.4%、0.8% 组的 ACP 与对照组有极显著差异($P < 0.01$)。LSZ 随时间、黄芪多糖不同添加浓度的变化均有极其显著差异($P < 0.01$);16 d 时,0.4% 组与对照组有显著差异($P < 0.05$);因此为提高克氏原螯虾非特异性免疫水平,黄芪多糖添加的最佳浓度范围为 0.4% ~ 0.8%。

在本实验中 ACP 与 LSZ 随时间变化出现较大幅度的波动,由于 ACP、SOD、LSZ 受水质中氨氮、亚硝酸盐等的影响会发生显著变化^[23],SOD 的增加与克氏原螯虾蜕壳有关,SOD 可以消除体内的自由基,故在蜕壳期有显著变化。ACP 与 LSZ 的减少可能与蜕壳期的蜕皮激素分泌旺盛而抑制了其他激素的分泌有关。

综上所述,在本实验的条件下,建议克氏原螯虾饲料中黄芪多糖添加浓度为 0.40% ~ 0.80% 时,可以获得较好的生长性能和免疫力。

承蒙江苏省淡水水产研究所丁正峰同志在实验中给予的悉心指导,谨表谢忱!

参考文献:

- [1] 高慧,韩森,叶凤兰,等.黄芪多糖的免疫学研究进展[J].饲料研究,2007(6):35-36.
- [2] 金英子,张红英.复方黄芪水提取物对小鼠的耐缺氧和抗疲劳作用[J].延边医学院学报,2007,30(2):107-108.
- [3] 谭崇桂,冷向军,李小勤,等.多糖、寡糖、蛋白酶对凡纳滨对虾生长、消化酶活性及血清非特异性免疫的影响[J].上海海洋大学学报,2013,22(1):93-99.
- [4] TZIANABOS A O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function[J]. Clinical Microbiology Reviews,2000,13:523-533.
- [5] CHIHARA G. Recent progress in immunopharmacology and therapeutic effects of polysaccharides [J]. Development of Biology Stand,1992,77:191-197.
- [6] BEUTLER B. Innate immunity:an overview [J]. Molecular Immunology, 2004,40:845-859.
- [7] 向泉,陈建,周兴华,等.黄芪多糖对齐口裂腹鱼生长、体组成和免疫指标的影响[J].水生生物学报,2011,35(2):292-296.
- [8] 胡兵,刘军,侯永清,等.黄芪多糖对异育银鲫非特异性免疫力的影响[J].水利渔业,2008,28(3):108-111.
- [9] 陈昌福,姚娟,陈萱,等.免疫多糖对南美白对虾免疫相关酶的激活作用[J].华中农业大学学报,2004,23(5):551-554.
- [10] 仲伟静,王安利.对虾免疫多糖的研究进展[J].水产科学,2009,28(8):482-484.
- [11] 许第新,姚娟,陈昌福.注射免疫多糖(酵母细胞壁)对克氏原螯虾几种免疫相关酶活性的影响[J].淡水渔业,2004,34(5):56-58.
- [12] 丁正峰,薛晖,夏爱军,等.白斑综合征病毒在养殖克氏原螯虾中感染流行研究[J].南京农业大学学报,2008,31(4):129-133.
- [13] 李明,董晓慧.复合中草药制剂对凡纳滨对虾生长和免疫指标的影响[J].淡水渔业,2008,38(6):68-72.
- [14] 唐宁,何晓瑾,何晓冬,等.复方中草药对克氏原螯虾生长和脱壳的影响[J].淡水渔业,2010,40(1):70-72.
- [15] FREEMAN J A. Molt increment, molt cycle duration, and tissue growth in *Palaemonetes pugio* Holthuis larvae [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology,1990,143(1/2):47-61.
- [16] 杨玉姣,王国良,金珊,等.环境胁迫对对虾免疫系统的影响研究[J].水产科学,2006,25(12):652-655.
- [17] 赵红霞,张艳秋,黄磊,等.虾类的免疫系统与免疫防治[J].中国兽医杂志,2003,39(1):41-44.
- [18] 肖克宇.水产动物免疫与应用[M].北京:科学出版社,2007:102-138.
- [19] 郭伟荣,刘利平,张宗峰,等.感染鳃弧菌对花鲈非特异性免疫功能的影响[J].上海海洋大学学报,2011,20(1):89-95.
- [20] 童春,曹振杰,杨玲,壳聚糖对淡水白鲢生长和非特异性免疫功能的影响[J].上海海洋大学学报,2010,19(2):219-225.
- [21] 左迪,王丹丽,孙婷,等.白斑综合征病毒对红螯光壳螯虾幼肝胰腺免疫酶活性及其超微结构的影响[J].水产学

- 报,2012,36(3):451-458.
- [22] VOGT G, STORCH V, QUINITO E T, et al. Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diets in *Penaeus monodon* (Decapoda) [J]. *Aquaculture*, 1985, 48(1): 1 - 12.
- [23] 彭自然, 臧维玲, 高杨, 等. 氨和亚硝酸盐对凡纳滨对虾幼虾的毒性影响 [J]. *上海水产大学学报*, 2004, 13(3): 274 - 278.

Effect of Astragalus Polysaccharide on the growth and non-specific immune parameters of *Procambarus clarkii*

HONG Xu-peng¹, XIA Si-yao¹, TANG Jia-jin², ZHANG Qing-hua¹, XUE Hui³, TANG Jian-qing³

(1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China; 3. Freshwater Fisheries Research institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017, Jiangsu, China)

Abstract: This experiment researched the effects of Astragalus Polysaccharide (APS) on the growth and non-specific immune parameters of *Procambarus clarkii*, with different additive concentrations (0%, 0.2%, 0.4% and 0.8%). Results showed that, 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 d, weight gain ratio (R_{WG}) and specific growth ratio (R_{SG}) of the crayfish fitted the modified Gauss model well ($R^2 = 0.9999$). At the concentration of 0.40% - 0.75%, R_{WG} and R_{SG} reached the maximum values of $37.13\% \pm 7.75\%$ and $1.57\% \pm 0.28\%$ respectively. Curve of crayfish molt count (N_M) was consistent with the log normal model ($R^2 = 0.9976$), with significantly different between experimental and control groups ($P < 0.05$), and weight gain was also significantly different ($P < 0.01$). Non-specific immune parameters of superoxide dismutase (SOD) and acid phosphatase (ACP) changed with APS isn't significantly ($P > 0.05$), but APS influenced the lysozyme (LSZ) significantly ($P < 0.01$). It was indicated that APS could effectively promote the growth and non-specific immunity of crayfish. In addition, the suitable additive concentration was 0.40% - 0.80%.

Key words: Astragalus Polysaccharides; *Procambarus clarkii*; growth; SOD; ACP; LSZ