

饲料中添加黄藤素对吉富罗非鱼生长性能、抗氧化能力和非特异性免疫的影响

陈培贇, 任潇潇, 毕保良

Effects of dietary palmatine on growth performance, antioxidant capacity and non-specific immunity of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

CHEN Peiyun, REN Xiaoxiao, BI Baoliang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20200703106>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

饲料中添加谷胱甘肽对吉富罗非鱼生长、组织生化指标和非特异性免疫相关酶的影响

Effects of dietary glutathione on growth performance, tissue biochemical indexes and non-specific immune related enzymes of GIFT *Oreochromis niloticus*

水产学报. 2013, 37(5): 742 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1231.2013.38161>

饲料中添加溶菌酶对吉富罗非鱼生长、免疫-抗氧化功能及血清抗菌性能的影响

EFFECTS OF DIETARY LYSOZYME SUPPLEMENTATION ON GROWTH PERFORMANCE, IMMUNE-ANTIOXIDANT CAPACITY AND SERUM ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF GIFT TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*)

水生生物学报. 2016, 40(4): 663 <https://doi.org/10.7541/2016.89>

饲料中添加水飞蓟素对吉富罗非鱼生长性能、肝脏脂肪代谢酶和抗氧化能力的影响

Effects of dietary silymarin on growth performance, enzymes of hepatic lipid metabolism and antioxidant ability in GIFT *Oreochromis niloticus*

水产学报. 2016, 40(9): 1309 <https://doi.org/10.11964/jfc.20160210292>

低聚壳聚糖对中华绒螯蟹生长性能、体成分、非特异性免疫及抗氧化能力的影响

Effects of oligo-chitosan supplementation on growth performance, body composition, non-specific immunity, and antioxidant capacity of *Eriocheir sinensis*

水产学报. 2020, 44(8): 1340 <https://doi.org/10.11964/jfc.20190411758>

饲料菜粕水平对吉富罗非鱼幼鱼生长、肝脏组织结构和部分非特异性免疫指标的影响

Effects of dietary rapeseed meal levels on growth, liver tissue structure and some nonspecific immunity indices of juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*)

水产学报. 2011, 35(5): 748 <https://doi.org/10.3724/SP.J.1231.2011.17207>

饲料中添加酵母培养物对黄颡鱼生长性能、非特异性免疫和肠道健康的影响

Effects of dietary yeast culture supplementation on growth performance, nonspecific immunity and intestinal health of *Pelteobagrus fulvidraco*

水产学报. 2019, 43(4): 1080 <https://doi.org/10.11964/jfc.20180511291>

文章编号: 1674-5566(2021)05-0812-09

DOI:10.12024/jsou.20200703106

饲料中添加黄藤素对吉富罗非鱼生长性能、抗氧化能力和非特异性免疫的影响

陈培赞, 任潇潇, 毕保良

(云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 为了研究黄藤素对吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生长性能、抗氧化能力和非特异性免疫的影响,在基础饲料中添加0、0.01%、0.02%、0.04%和0.08%的黄藤素,饲喂初始体质量为0.50 g的吉富罗非鱼幼鱼12周。结果表明:饲料中黄藤素水平对罗非鱼末重、增重率、特定生长率和饲料系数无显著影响($P > 0.05$)。随着黄藤素添加量的提高,血清中 AKP、T-AOC 活性呈上升趋势,在0.08%组达到最高;0.04%组 SOD 活性显著高于其他各组($P < 0.05$);各试验组 MDA 活性均低于对照组。各试验组肝脏 SOD、AKP 和 CAT 活性均显著高于对照组($P < 0.05$);T-AOC 活性表现出上升趋势,各试验组间无显著差异($P > 0.05$);0.08%组 GSH-Px 活性显著高于其他各组($P < 0.05$);各试验组 MDA 活性均低于对照组。添加黄藤素提高了罗非鱼血清 LZM,补体 C4 活性和肝脏 *IL-1 β* 、*TNF- α* 免疫相关基因的表达量;0.04%组巨噬细胞吞噬活性显著高于其他各组($P < 0.05$)。在本试验条件下,饲料中添加0.04%~0.08%黄藤素在维持良好生长性能的同时能有效提高罗非鱼抗氧化能力和非特异性免疫。

关键词: 黄藤素;吉富罗非鱼;生长性能;抗氧化能力;非特异性免疫

中图分类号: S 963 **文献标志码:** A

罗非鱼是我国重要的水产养殖鱼类,具有耐低氧、抗病能力强、适应能力强的特点。吉富罗非鱼(GIFT strain of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*)作为罗非鱼主要养殖品种之一,经过遗传性状改良后,具备了生长速度快、全雄率高、肉质好等优点,现已在全国范围内推广养殖^[1]。近年来,随着我国水产养殖业快速发展,养殖规模不断扩大,集约化养殖密度过大,各种病害日益增多,而长期过度使用抗生素和化学药物也引出药物残留和耐药性问题,严重影响行业发展,同时危害消费者的健康。中草药及其提取物具有安全低毒、抗菌、抗病毒、不易产生耐药性等特点^[2-3],已成为替代抗生素饲料添加剂的首选。中草药通过影响动物机体蛋白质、酶的合成,从而促进个体生长发育,并影响非特异性免疫系统,影响吞噬细胞、溶菌酶、补体、细胞因子等,从而增强机体的免疫能力。现已证明有200余种

中草药对水生动物有免疫活性^[4]。

黄藤素,又称巴马汀,是大黄藤中生物碱主要化学成分,也是大黄藤主要活性成分,具有抗炎、抗菌、提高免疫能力等作用。有研究^[5-6]表明黄藤素通过抑制肺内炎症相关 NF- κ B 信号通路,有效减轻小鼠肺内组织炎症反应。于浩飞等^[7]同样发现黄藤素具有明显的抗炎作用,能够增强小鼠非特异性免疫功能。ZHOU 等^[8]将黄藤素注射到兔膝关节,证明了黄藤素对兔关节炎软骨具有保护作用。黄藤素抑菌药理试验证实黄藤素对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌等细菌、真菌具有抑制作用,对嗜睡气单胞菌和副溶血性弧菌两种水产致病菌也表现出显著的抑制作用^[9-10]。除此之外,黄藤素也被应用于防治外科感染、肠炎、呼吸道感染、菌痢等感染性疾病^[11]。但目前尚未见黄藤素对水产动物免疫功能影响的报道。本试验在吉富罗非鱼饲料中添加不同水平的黄藤

收稿日期: 2020-07-08 修回日期: 2020-10-25

基金项目: 云南省农业联合专项(2017FG001021)

作者简介: 陈培赞(1994—),男,硕士研究生,研究方向为水产动物养殖及饲料。E-mail:1056642578@qq.com

通信作者: 毕保良, E-mail:1448151770@qq.com

素,探讨该物质对吉富罗非鱼抗氧化能力和非特异性免疫的影响,为黄藤素防治鱼病方面提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验饲料的制备

以豆粕、菜粕和鱼粉为主要蛋白源,配制粗蛋白含量为 31%,粗脂肪为 4.5% 的基础饲料。

在此基础上分别添加 0、0.01%、0.02%、0.04%、0.08% 的黄藤素,配制成 5 组不同黄藤素含量的等氮等能饲料,饲料配方及营养组成见表 1。饲料原料粉碎过 60 目筛,充分混匀后,将饲料挤压成直径为 1.2 mm 的条状,干燥后破碎,并密封保存于 -20 ℃ 条件下备用。本实验所用黄藤素购自上海源叶生物科技有限公司,含量为 90%。

表 1 试验饲料配方和营养组成 (% 风干物质基础)

Tab. 1 Formulation and proximate composition of the experimental diets (% air-dry basis)

原料 Ingredients	黄藤素添加量 The additive amount of palmatine				
	0	0.01%	0.02%	0.04%	0.08%
鱼粉 Fish meal	8.00	8.00	8.00	8.00	8.00
菜籽粕 Rapeseed meal	14.00	14.00	14.00	14.00	14.00
豆粕 Soybean meal	21.00	21.00	21.00	21.00	21.00
面粉 Flour	31.88	31.87	31.86	31.84	31.80
小麦麸 Wheat middlings	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
豆油 Soya-bean oil	1.40	1.40	1.40	1.40	1.40
大豆卵磷脂 Soya-bean lecithin	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
氯化胆碱 Choline chloride	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
食盐 NaCl	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.20	1.20	1.20	1.20	1.20
矿物质预混料 Mineral premix ^a	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
维生素 C Vitamin C	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
维生素预混料 Vitamin premix ^b	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
黄藤素 palmatine	0.00	0.01	0.02	0.04	0.08
营养组成 Proximate composition					
干物质 Dry matter / (DM, g/kg diet)	89.65	86.07	91.12	92.45	92.26
粗蛋白 Crude protein / (g/kg DM)	31.33	31.07	31.13	30.91	30.92
粗脂肪 Crude lipid / (g/kg DM)	4.22	4.58	4.59	4.59	4.22
粗灰分 Ash / (g/kg DM)	6.90	6.67	7.05	7.16	7.13
总 能 Energy / (MJ/kg)	18.85	18.03	18.82	18.935	18.86

注: ^a 矿物质预混料 (mg/kg), MgSO₄ · 7H₂O, 900 mg; KI, 5 mg; FeSO₄ · H₂O, 1 300 mg; ZnSO₄ · H₂O, 900 mg; CuSO₄ · 5H₂O, 125 mg; Na₂Se₂O₃, 0.05 mg; MnSO₄ · H₂O, 900 mg; CoCl₂ · 6H₂O, 3.75 mg; ^b 维生素预混料 (mg/kg), 维生素 A, 10 mg; 维生素 D₃, 0.15 mg; 维生素 E, 150 mg; 维生素 K, 15 mg; 盐酸硫胺, 40 mg; 核黄素, 55 mg; 盐酸吡哆醇, 40 mg; 维生素 B12, 0.1 mg; 抗坏血酸, 250 mg; 叶酸, 5 mg; 生物素, 0.5 mg; 烟酸, 150 mg; 泛酸钙, 160 mg; 肌醇, 125 mg。

Notes: ^a Mineral premix (mg/kg), MgSO₄ · 7H₂O, 900 mg; KI, 5 mg; FeSO₄ · H₂O, 1300 mg; ZnSO₄ · H₂O, 900 mg; CuSO₄ · 5H₂O, 125 mg; Na₂Se₂O₃, 0.05 mg; MnSO₄ · H₂O, 900 mg; CoCl₂ · 6H₂O, 3.75 mg; ^b Vitamin premix (mg/kg), retinyl acetate (2 800 000 IU/g), 10 mg; cholecalciferol, 0.15 mg; DL-α-tocopheryl acetate, 150 mg; menadione, 15 mg; thiamine hydrochloride, 40 mg; riboflavin, 55 mg; pyridoxine hydrochloride, 40 mg; vitamin B₁₂, 0.1 mg; ascorbic acid, 250 mg; folic acid, 5 mg; biotin 0.5 mg; niacin, 150 mg; calcium D-pantothenate, 160 mg; inositol, 125 mg.

1.2 饲养管理

养殖试验在云南农业大学动物科学技术学院水产养殖实验室中进行。试验鱼由西双版纳云博水产养殖开发有限公司提供,均为当年人工培育的同一批苗种,鱼均体质量为 0.50 g。正式试验前,试验鱼投喂对照组饲料,暂养 2 周以适应养殖环境。试验开始前禁食 24 h。选择大小

均匀、健康无病的罗非鱼幼鱼,随机分为 5 组,每组 3 个重复,每个重复 40 尾鱼,幼鱼随机分配于 15 个玻璃水族缸(1.2 m × 0.5 m × 0.6 m)中。每天投喂 3 次(7:00、12:00、18:00),至饱食。养殖用水为曝气自来水,采用内循环流水系统,水流速 5 L/min,养殖期间不间断充氧,自然光照,溶解氧质量浓度 > 5 mg/L, pH 为 7.4 ~ 7.8,氨氮质

量浓度不超过 0.5 mg/L,水温为(29 ± 1)℃。养殖周期 12 周。

1.3 样品采集

养殖试验结束禁食 24 h 后,称量每个鱼缸鱼体总质量,记录鱼体个数,计算罗非鱼生长性能。此外,每缸随机抽取 6 尾鱼,麻醉后尾静脉取血,血样在 4℃ 冰箱静置 4 h,离心分离(4 000 r/min, 10 min),取上清, -80℃ 保存备用;将采血后的罗非鱼解剖,取出肝脏,剥去脂肪后装于密封袋中, -80℃ 保存。

在超净工作台上用乙醇对采血后的罗非鱼进行充分消毒。于罗非鱼心腹腔隔膜背前方取出头肾组织,将头肾组织放入盛有 5 mL HBSS (X10)的研钵中,研磨后液体用 100 μm 尼龙网过滤,滤液盛放在无菌培养皿中。取 2 mL 滤液缓慢滴到装有 34%/51% 的 Percoll 分离液的离心管中, 4℃ 下, 4 000 r/min 离心 10 min, 吸出 34%/51% 液面交汇处的头肾巨噬细胞转移至另 1 个离心管中,用 2 mL HBSS 充分冲洗, 4 000 r/min 离心 10 min。最后加入 2 mL RPMI-1640 培养基,旋涡振荡成细胞悬液,并用培养基调整细胞浓度为 10⁷ cell/mL,用 0.1% 台盼蓝检测活细胞的数目,保证其存活率在 95% 以上。

1.4 分析测试方法

鱼体、饲料原料及饲料常规成分分析参照 AOAC 法。其中,水分测定用 105℃ 烘干恒重法;粗蛋白质含量的测定采用凯氏定氮法(JK9830, 济南精密科学仪器仪表有限公司)测定;粗脂肪的测定采用索氏提取法(以石油醚为溶剂)测定;粗灰分的测定为 550℃ 灼烧法(16 h, 箱式电阻 SX-410, 北京市永光明医疗仪器有限公司)。总能测定采用氧弹式能量计(ZDHW-6, 鹤壁市华泰仪器仪表有限公司)测定。

血清、肝脏、肠道和胃的生化指标均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒,按照使用说明进行操作。血清和肝脏中,溶菌酶(LZM)采用比浊法,过氧化氢酶(CAT)采用可见光法,谷胱甘肽过氧化氢酶(GSH-Px)及总抗氧化力(T-AOC)采用比色法,碱性磷酸酶(AKP)采用可见光比色法,补体 C4 采用免疫比浊法,超氧化物歧化酶(SOD)采用 WST-1 法,丙二醛(MDA)采用 TBA 法。

头肾巨噬细胞呼吸爆发活力测定参考

SECOMBES 等^[12]的方法,巨噬细胞呼吸爆发活力用还原四氮唑蓝(NBT)的能力来衡量。取 50 μL 已制备好的头肾巨噬细胞悬液,加到 96 孔酶标板中,然后分别加入 50 μL 1 mg/mL NBT[含 1 μg/mL 佛波醇肉豆蔻(PMA, Sigma)],在 25℃ 反应 40 min。然后加入无水甲醇终止反应并固定巨噬细胞,再用 70% 甲醇溶液冲洗 2 次,自然晾干后分别加入 60 μL 2 mol/L KOH 和 70 μL DMSO,生成蓝色沉淀,在 630 nm 下检测吸光值(以 KOH/DMSO 为空白)。巨噬细胞吞噬活力用中性红检测,取 100 μL 头肾巨噬细胞悬液加到 96 孔酶标板中,每孔加入 100 μL 0.01% 中性红溶液,反应 3 h 后用 PBS 溶液冲洗 3 次,再加入细胞裂解液 200 μL,室温静置 1 h 后,检测 547 nm 吸光度值(蒸馏水调零)。

根据 GenBank 中罗非鱼白细胞介素 1β(interleukin 1β, IL-1β)和肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor α, TNF-α)的序列,设计引物。用罗非鱼的 β-肌动蛋白(β-actin)作为内参基因,设计 β-actin 引物。所有引物经上海生工生物工程股份有限公司合成,引物序列见表 2。用 TaKaRa 公司试剂盒提取肝脏 RNA,使用紫外分光光度计检测其浓度和纯度,1.0% 琼脂糖电泳检测完整性。根据 Fermentas 公司 ReverAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书对提取 RNA 进行反转录。具体操作如下:取样本总 RNA 55 μg, Oligo(dT)18 Primer 1 μL,加 RNase Free dH₂O 至 12 μL,混匀后,65℃ 下温育 5 min 取出置于冰上冷却,然后依次加入 5 × Reaction Buffer 4 μL, Ribo lock™ RNase Inhibitor 1 μL, dNTP Mixture 2 μL, RevertAid™ M-MμLV Reverse Transcriptase 1 μL。混匀后,于 PCR 仪中:42℃, 60 min;70℃, 5 min 进行反应,反应结束后获得 cDNA 作为荧光定量 PCR 模板。荧光定量 PCR 采用 SYBR Green II 嵌合荧光法,PCR 反应体系(20 μL):包括 SYBR Premix Ex Taq™ 10 μL,上下游引物各 1 μL, cDNA 1 μL, Rnase/Dnase-free water 7 μL。荧光定量 PCR 反应程序如下:95℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 35 s, 72℃ 延伸 40 s, 40 个循环;95℃ 15 s, 65℃ 15 s, 95℃ 15 s。基因相对 mRNA 水平用 2^{-ΔΔCt}法检测。

1.5 计算与统计分析

增重率、特定生长率、饲料系数的计算公式:

$$R_{WG} = 100 \times (W_f - W_i) / W_i \quad (1)$$

$$R_{SG} = 100 \times (\ln W_f - \ln W_i) / d \quad (2)$$

$$R_{FC} = W_d / (W_f - W_i) \quad (3)$$

式中: R_{WG} 为增重率,%; R_{SG} 为特定生长率,%; R_{FC} 为饲料系数; W_f 为试验结束时鱼末体质量,g; W_i 为试验开始鱼初体质量,g; W_d 为摄食干饲料重,

g ; d 为养殖天数,d。

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行单因素方差分析 (ANOVA), 当处理组之间差异显著 ($P < 0.05$) 时, 用 Duncan 氏检验进行多重比较, 试验结果以平均值 \pm 标准误 (Means \pm SEM) 表示。

表 2 引物序列
Tab.2 Primer sequences

目标基因 Target genes	序列 Sequence
<i>IL-1β</i>	F:5'-GGACCACCTCAGTTCACCAG-3' R:5'-GTCTCAGCGATGGGTGTAGG-3'
<i>TNF-α</i>	F:5'-CGAACTCCAGTTCAGCACCT-3' R:5'-CACCTTCCCCTCATGACGAC-3'
<i>β-actin</i>	F:5'-TGATGGTGTGCCACACACAG-3' R:5'-ATGTCACGCACGATTCCT-3'

2 结果

2.1 黄藤素对吉富罗非鱼生长性能的影响

如表 3 所示,黄藤素不同添加水平对各组罗

非鱼末质量、增重率、特定生长率和饲料系数均无显著性差异 ($P > 0.05$)。随着饲料中黄藤素添加水平的提高,吉富罗非鱼体质量表现出逐渐上升的趋势。

表 3 黄藤素的不同添加水平对吉富罗非鱼生长指标的影响
Tab.3 Effects of different addition levels of palmatine on growth indexes of GIFT

项目 Items	黄藤素添加量 The additive amount of palmatine				
	对照组 0	0.01%	0.02%	0.04%	0.08%
初体质量 Initial mass/g	0.50 \pm 0.00	0.50 \pm 0.00	0.50 \pm 0.00	0.50 \pm 0.00	0.50 \pm 0.00
末体质量 Final mass/g	58.32 \pm 0.86	62.37 \pm 5.39	61.50 \pm 3.06	58.69 \pm 4.45	64.98 \pm 4.50
增重率 Weight gain rate/%	11 664.10 \pm 172.20	12 474.70 \pm 1 079.60	12 300.20 \pm 612.50	11 737.60 \pm 892.70	12 996.30 \pm 901.60
特定生长率 Specific growth rate/ (%/d)	6.26 \pm 0.02	6.34 \pm 0.11	6.32 \pm 0.07	6.26 \pm 0.10	6.39 \pm 0.10
饲料系数 Feed conversion ratio	1.46 \pm 0.13	1.48 \pm 0.14	1.52 \pm 0.12	1.49 \pm 0.07	1.43 \pm 0.12
成活率 Survival rate/%	65.00 \pm 0 ^{ab}	71.25 \pm 6.25 ^{ab}	48.33 \pm 7.12 ^b	83.75 \pm 8.75 ^a	60.00 \pm 7.50 ^{ab}

注:表中数据为平均值 \pm 标准误,同行上标不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Notes: The data in the table are average (\pm standard error), the difference of superscripts in the same row is significant ($P < 0.05$).

2.2 黄藤素对吉富罗非鱼血清抗氧化能力的影响

由表 4 可知:饲料中添加黄藤素对罗非鱼血清抗氧化能力有显著影响 ($P < 0.05$); 0.04% 组 SOD 活性显著高于其他各组 ($P < 0.05$); AKP、T-AOC 活性随黄藤素添加水平的升高逐渐增加,在

0.08% 组达到最大值; GSH-Px 和 CAT 活性未表现明显趋势,但在 0.08% 组达到最大值; MDA 含量呈先下降后上升的趋势,在 0.02% 组为最低值。

表 4 黄藤素不同添加水平对吉富罗非鱼血清抗氧化能力的影响
Tab.4 Effects of different dietary palmatine levels on antioxidant capacity in serum of GIFT

项目 Items	黄藤素添加量 The additive amount of palmatine				
	对照组 0	0.01%	0.02%	0.04%	0.08%
超氧化物歧化酶 SOD/ (U/mL)	16.61 \pm 0.19 ^c	18.97 \pm 0.14 ^b	17.97 \pm 0.63 ^{bc}	21.82 \pm 0.75 ^a	18.18 \pm 0.69 ^{bc}
碱性磷酸酶 AKP/ (U/dL)	7.01 \pm 0.55 ^c	7.87 \pm 0.28 ^{bc}	9.17 \pm 1.01 ^{ab}	10.02 \pm 0.37 ^a	10.89 \pm 0.34 ^a
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/ (U/ μ L)	409.83 \pm 10.65 ^{bc}	387.54 \pm 15.36 ^c	438.03 \pm 12.14 ^{ab}	412.45 \pm 2.85 ^{bc}	451.69 \pm 5.21 ^a
总抗氧化力 T-AOC/ (U/mL)	3.82 \pm 0.55 ^c	4.84 \pm 0.37 ^{bc}	5.91 \pm 0.25 ^{ab}	6.61 \pm 0.36 ^a	7.11 \pm 0.29 ^a
过氧化氢酶 CAT/ (U/mL)	2.53 \pm 0.11 ^{ab}	2.62 \pm 0.60 ^{ab}	2.39 \pm 0.52 ^{ab}	1.63 \pm 0.19 ^b	3.28 \pm 0.62 ^a
丙二醛 MDA/ (nmol/mL)	18.42 \pm 1.24 ^a	16.86 \pm 1.45 ^{ab}	12.52 \pm 1.02 ^c	15.28 \pm 0.56 ^b	15.85 \pm 1.93 ^b

注:表中数据为平均值 \pm 标准误,同行上标不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Notes: The data in the table are average (\pm standard error), the difference of superscripts in the same row is significant ($P < 0.05$).

2.3 黄藤素对吉富罗非鱼肝脏抗氧化能力的影响

由表5可知:饲料中添加黄藤素对罗非鱼肝脏抗氧化能力有显著影响($P < 0.05$);各试验组SOD、AKP和CAT活性显著高于对照组($P < 0.05$),SOD和CAT在0.08%组中显著最高($P <$

0.05),AKP在0.04%组显著最高($P < 0.05$);0.08组GSH-Px活性显著高于对照组及其他处理组($P < 0.05$);T-AOC随黄藤素添加水平的升高呈上升趋势,在0.04%组最高,显著高于对照组($P < 0.05$);各试验组MDA含量均低于对照组。

表5 黄藤素不同添加水平对吉富罗非鱼肝脏抗氧化能力的影响

Tab.5 Effects of different dietary palmatine levels on antioxidant capacity in liver of GIFT

项目 Items	黄藤素添加量 The additive amount of palmatine				
	对照组 0	0.01%	0.02%	0.04%	0.08%
超氧化物歧化酶 SOD/ (U/mg prot)	13.89 ± 0.86 ^c	23.58 ± 0.27 ^b	24.47 ± 0.31 ^{ab}	25.62 ± 0.48 ^a	25.78 ± 0.46 ^a
碱性磷酸酶 AKP/ (U/g prot)	43.17 ± 1.15 ^c	55.53 ± 1.93 ^b	60.74 ± 3.90 ^b	88.62 ± 1.27 ^a	84.65 ± 2.05 ^a
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/ (U/μg prot)	406.72 ± 10.66 ^b	438.87 ± 12.33 ^b	418.88 ± 7.08 ^b	441.39 ± 10.56 ^b	488.54 ± 17.98 ^a
总抗氧化力 T-AOC/ (U/mg prot)	1.50 ± 0.16 ^b	2.30 ± 0.47 ^{ab}	2.98 ± 0.12 ^a	3.07 ± 0.44 ^a	3.04 ± 0.45 ^a
过氧化氢酶 CAT/ (U/mg prot)	68.95 ± 4.99 ^c	81.43 ± 0.18 ^b	82.04 ± 1.70 ^b	87.57 ± 3.46 ^{ab}	96.20 ± 0.93 ^a
丙二醛 MDA/ (nmol/mg prot)	5.42 ± 0.71 ^a	4.86 ± 0.25 ^{ab}	3.52 ± 0.35 ^b	4.28 ± 0.32 ^{ab}	3.75 ± 0.36 ^b

注:表中数据为平均值 ± 标准误,同行上标不同者表示差异显著($P < 0.05$)。

Notes: The data in the table are average (± standard error), the difference of superscripts in the same row is significant ($P < 0.05$).

2.4 黄藤素对吉富罗非鱼非特异性免疫的影响

如表6所示:饲料中添加黄藤素能够提高吉富罗非鱼非特异性免疫能力;各试验组LZM、补体C4水平均高于对照组;黄藤素添加水平对罗非鱼头肾巨噬细胞呼吸暴发没有显著影响($P >$

0.05),但显著提高0.04%组巨噬细胞吞噬活性($P < 0.05$);各试验组*IL-1β*和*TNF-α*基因表达量均高于对照组,*IL-1β*表达量在0.04%组最高($P < 0.05$),*TNF-α*表达量在0.02%组达到最高。

表6 黄藤素不同添加水平对吉富罗非鱼非特异性免疫能力的影响

Tab.6 Effects of different dietary palmatine levels on nonspecific immune capacity and immune related genes expression of GIFT

项目 Items	黄藤素添加量 The additive amount of palmatine				
	对照组 0	0.01%	0.02%	0.04%	0.08%
血清 Serum					
溶菌酶 LZM/ (U/mL)	9.15 ± 0.10 ^b	9.7 ± 0.27 ^{ab}	11.34 ± 1.06 ^a	11.25 ± 0.31 ^a	10.81 ± 0.26 ^{ab}
补体 C4 Complement C4	0.071 ± 0.009 ^b	0.075 ± 0.004 ^b	0.080 ± 0.002 ^{ab}	0.083 ± 0.002 ^{ab}	0.096 ± 0.001 ^a
头肾巨噬细胞 Head-kidney macrophage					
吞噬活性 Rhagocytic activity	0.323 ± 0.001 ^b	0.293 ± 0.004 ^b	0.301 ± 0.001 ^b	0.408 ± 0.003 ^a	0.188 ± 0.001 ^c
呼吸暴发 Respiratory burst	2.044 ± 0.064	2.091 ± 0.034	1.951 ± 0.014	2.055 ± 0.054	1.966 ± 0.029
基因 Gene					
白细胞介素-1β <i>IL-1β</i>	1.00 ± 0.01 ^c	3.08 ± 0.08 ^b	1.54 ± 0.24 ^c	6.88 ± 0.30 ^a	1.07 ± 0.18 ^c
肿瘤坏死因子 α <i>TNF-α</i>	1.00 ± 0.02 ^c	1.30 ± 0.07 ^c	6.67 ± 0.41 ^a	5.69 ± 0.42 ^{ab}	4.50 ± 1.00 ^b

注:表中数据为平均值 ± 标准误,同行肩标不同者表示差异显著($P < 0.05$)。

Notes: The data in the table are average (± standard error), the difference of superscripts in the same row is significant ($P < 0.05$).

3 讨论

植物生物碱是植物在生态适应过程中形成的代谢产物,具有生物活性多样性,但目前大多数学者主要关注生物碱的抑制和抵抗作用^[13]。小檗碱与黄藤素均为异喹啉类生物碱,研究^[14]表

明在饲料中添加小檗碱能够显著提高团头鲂增重率和特定生长率,降低饲料系数。本实验中黄藤素未对吉富罗非鱼生长指标产生显著影响,但黄藤素添加量为0.08%时,其末质量与对照组相比升高了10%左右,且饲料系数有所降低,推测黄藤素可能在促生长方面具有一定的作用,但由

于添加剂量较小或试验时间较短不足以表现出其促生长作用。

鱼类作为变温、低等脊椎动物,与高等脊椎动物一样存在特异性免疫和非特异性免疫,但不同的是,由于免疫进化程度较低,鱼类免疫应答过程中主要依靠非特异性免疫发挥作用^[15-16]。溶菌酶、补体 C4、C4 等免疫分子在免疫调节、介导炎症反应等方面发挥了至关重要的作用^[17-19]。本试验中,随黄藤素添加量增加,LZM 活性呈现出先升高后降低的趋势,补体 C4 含量随黄藤素添加量增加而上升,0.04% 组头肾巨噬细胞吞噬活性显著高于对照组,表明适量添加黄藤素能够增强罗非鱼血清 LZM 活性,提高补体 C4 含量,提高头肾细胞的吞噬活性。曲木等^[20]在饲料中添加党参、黄芪、野菊花,发现能够提高黄颡鱼血清补体含量。朱作金等^[21]研究表明,黄藤素能提高大鼠中性粒细胞吞噬活性,提高非特异性免疫功能。虽然与本次试验对象不同,但相似的结果表明,黄藤素同样可以通过提高吉富罗非鱼巨噬细胞的吞噬活性,从而提高其非特异性免疫能力。

本试验中,0.04% 组基因 *IL-1 β* 表达量显著高于对照组,0.02% 组基因 *TNF- α* 表达量显著高于对照组,表明饲料中添加适量的黄藤素可以通过促进吉富罗非鱼炎性细胞因子的表达来提高非特异性免疫。戴小连^[22]试验结果表明饲料中添加黄芪能够显著提高石斑鱼头肾、肝脏、脾脏等器官中免疫相关基因的表达。王家敏^[23]研究表明,添加一定剂量的复方中草药能够诱导吉富罗非鱼 *Hsp70*、*TNF- α* 和 *IL-1 β* 基因在组织中表达,与本研究结果相似。

机体在正常状态下会产生一定量的自由基,并依靠自身抗氧化防御系统来维持自由基的动态平衡,当自由基生成增加或(和)清除能力降低,大量自由基在组织、器官中蓄积导致氧化损伤^[24-26],而过量自由基刺激免疫细胞将导致免疫功能下降,从而影响免疫系统功能。目前,人类疾病领域研究发现,疾病的发生多与氧化应激及免疫功能低下相关,已初步明确机体抗氧化系统与免疫系统两者互相影响,其中,核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路是联系 2 个系统的重要途径。氧自由基(ROS)和 NF- κ B 交联调控免疫系统和抗氧化系统:一方面,ROS 活化 NF- κ B,诱导 *IL-1 β* 、*TNF- α* 等细胞因子表达,影响免疫系统;另一

方面,免疫系统中 NF- κ B 和细胞因子调节 ROS 积累,影响抗氧化系统。水产动物试验^[27-28]结果表明,SOD、CAT 和 GSH-Px 活性与 *IL-1 β* 、*TNF- α* 等细胞因子表达呈正相关。

抗氧化系统主要分为抗氧化酶系统和非酶抗氧化系统 2 种类型。T-AOC 代表机体内总抗氧化系统功能状态,SOD、CAT、GSH-Px 是抗氧化系统中主要的抗氧化酶,能够衡量机体抗氧化能力。孙裔雷等^[29]对虹鳟的研究发现在饲料中添加中草药均能够提高 SOD 活性,显著降低 MDA 含量。梁拥军等^[30]通过在宝石鲈饲料中添加复方中草药,发现复方中草药可显著提高宝石鲈血清和肝脏中 SOD、LZM、CAT 活性。本试验中,各试验组血清 SOD、AKP、T-AOC 均高于对照组,各试验组肝脏 SOD、AKP、T-AOC、CAT 均显著高于对照组,并与黄藤素添加量呈一定相关性。MDA 作为自由基作用于脂质发生过氧化反应的产物,其含量的高低反映了脂质过氧化的速率和强度,间接反映机体清除自由基的能力和组织、器官损伤程度。本试验中,各处理组 MDA 含量均低于对照组。由此可知,饲料中添加适量黄藤素能够提高 T-AOC 及 SOD 和 AKP 活性,降低 MDA 含量,增强机体自由基清除能力,提高机体免疫力。

由上述试验结果可知,在试验添加范围内,添加黄藤素未对罗非鱼生长性能产生负面影响,能够增强罗非鱼巨噬细胞吞噬活性,提高炎症因子表达水平,介导炎症反应,发挥免疫系统功能,同时有效提高血清、肝脏中抗氧化酶活力,提高抗氧化能力。在本试验条件下,建议吉富罗非鱼饲料中黄藤素添加量为 0.04% ~ 0.08%。

参考文献:

- [1] 高桂平. 日粮中添加 4 种传统中药方剂对吉富罗非鱼幼鱼的相关非特异性免疫和生长指标的影响[D]. 南宁: 广西大学, 2018.
GAO G P. Effect of 4 traditional Chinese medicine formulas in diet on tilapia related non-specific immunity and growth index[D]. Nanning: Guangxi University, 2018.
- [2] 周疆, 郑凯妮, 朱斐. 中草药在水产动物免疫上的应用[J]. 浙江农林大学学报, 2019, 36(2): 406-414.
ZHOU J, ZHENG K N, ZHU F. A review on application of Chinese herbal medicine additives in immunization of aquatic animals[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2019, 36(2): 406-414.
- [3] 陈融, 金清, 程磊, 等. 中草药对嗜水气单胞菌的抑制作

- 用研究进展[J]. 水产养殖, 2019, 40(3): 11-15.
- CHEN R, JIN Q, CHENG L, et al. Research progress of inhibitory effect of Chinese herbal on *Aeromonas hydrophila* [J]. Journal of Aquaculture, 2019, 40(3): 11-15.
- [4] 阿地拉·艾皮热, 张富春, 李金耀. 中草药免疫增强功能的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(3): 423-426.
- AIPIRE A D L, ZHANG F C, LI J Y. Advances in research on immune enhancement of Chinese herbal medicine [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2016, 32(3): 423-426.
- [5] 王应霞, 杨桂梅, 胡艳文, 等. 黄藤素注射液抗脂多糖致小鼠急性肺损伤的作用[J]. 昆明医科大学学报, 2016, 37(12): 12-15.
- WANG Y X, YANG G M, HU Y W, et al. Protective effect of Fibrauretin injection against acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice[J]. Journal of Kunming Medical University, 2016, 37(12): 12-15.
- [6] 李莉, 王应霞, 杨桂梅, 等. 黄藤素对急性肺损伤小鼠肺组织 NF- κ B 蛋白表达和激活的影响[J]. 中国医药导报, 2019, 16(19): 7-10.
- LI L, WANG Y X, YANG G M, et al. Effect of Fibrauretin on the protein expression and activation of NF- κ B in lung tissues of mice with acute lung injury[J]. China Medical Herald, 2019, 16(19): 7-10.
- [7] 于浩飞, 周敏, 吕小波, 等. 合成黄藤素与天然黄藤素药效对比实验研究[J]. 昆明医科大学学报, 2012, 33(9): 31-33, 46.
- YU H F, ZHOU M, LYU X B, et al. Comparative study of the efficacy of synthesized and natural Palmatine[J]. Journal of Kunming Medical University, 2012, 33(9): 31-33, 46.
- [8] ZHOU X D, LIN X L, XIONG Y, et al. Chondroprotective effects of palmatine on osteoarthritis in vivo and in vitro: a possible mechanism of inhibiting the Wnt/ β -catenin and Hedgehog signaling pathways [J]. International Immunopharmacology, 2016, 34: 129-138.
- [9] 董建英, 赵会兰. 黄藤素片微生物限度检查方法验证研究[J]. 中国执业药师, 2012, 9(5): 36-39.
- DONG J Y, ZHAO H L. The research on the method validation of microbial limit test for Huangtengsu tablets[J]. China Licensed Pharmacist, 2012, 9(5): 36-39.
- [10] 牛国一, 王秋举, 李珊珊, 等. 厚朴酚和黄藤素对鱼类3种常见致病菌的抑制效应[J]. 云南农业大学学报, 2015, 30(3): 402-407.
- NIU G Y, WANG Q J, LI S S, et al. Antibacterial effects of Magnolol and Palmatine on three common pathogenic bacteria in fish[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2015, 30(3): 402-407.
- [11] 吕娜, 赵昱玮, 汲立伟, 等. 黄藤素的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(19): 199-202.
- LYU N, ZHAO Y W, JI L W, et al. Review of *Fibraurea recisa* [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2016, 22(19): 199-202.
- [12] SECOMBES C J, STOLEN J S, FLETCHER T C, et al. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity[J]. Techniques in Fish Immunology, 1990(1): 137-154.
- [13] 高世虎, 徐辉筠, 王华光, 等. 生物碱对动植物生长促进作用的研究进展[J]. 江苏林业科技, 2013, 40(2): 39-42.
- GAO S H, XU H Y, WANG H G, et al. Research progress of the growth promoting effect of alkaloids [J]. Journal of Jiangsu Forestry Science & Technology, 2013, 40(2): 39-42.
- [14] YU C B, ZHANG J, QIN Q, et al. Berberine improved intestinal barrier function by modulating the intestinal microbiota in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) under dietary high-fat and high-carbohydrate stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 102: 336-349.
- [15] 白姗姗, 贾智英, 石连玉. 鱼类免疫应答机制研究进展[J]. 水产学杂志, 2017, 30(4): 59-67.
- BAI S S, JIA Z Y, SHI L Y. Research progress of immune response mechanisms in fish [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2017, 30(4): 59-67.
- [16] 张媛媛, 宋理平. 鱼类免疫系统研究进展[J]. 河北渔业, 2018(2): 49-56.
- ZHANG Y Y, SONG L P. Research advances in fish immune system[J]. Hebei Fisheries, 2018(2): 49-56.
- [17] SAURABH S, SAHOO P K. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system [J]. Aquaculture Research, 2008, 39(3): 223-239.
- [18] DONG J J, WU F, YE X, et al. β -defensin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): sequence, tissue expression, and anti-bacterial activity of synthetic peptides[J]. Gene, 2015, 566(1): 23-31.
- [19] CHEN Y Y, ZHAO H, ZHANG X S, et al. Identification, expression and bioactivity of *Paramisgurnus dabryanus* β -defensin that might be involved in immune defense against bacterial infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(2): 399-406.
- [20] 曲木, 黄成, 张宝龙, 等. 复方中草药对黄颡鱼生长、肉质及血清中补体 C3、补体 C4 含量的影响[J]. 中国饲料, 2018(19): 74-79.
- QU M, HUANG C, ZHANG B L, et al. Effects of compound Chinese traditional drug on the growth performance, muscle quality and complement C3, complement C4 content in serum of *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. China Feed, 2018(19): 74-79.
- [21] 朱作金, 柯美珍, 李逢春, 等. 黄藤素对大鼠免疫功能的影响[J]. 广西医科大学学报, 1995, 12(4): 518-519.
- ZHU Z J, KE M Z, LI F C, et al. Effects of *Fibrauretinum* on the immunological functions of rats[J]. Journal of Guangxi Medical University, 1995, 12(4): 518-519.

- [22] 戴小连. 褐点石斑鱼天然免疫增强剂筛选及黄芪对其免疫功能影响研究[D]. 海口: 海南大学, 2012.
DAI X L. Selection of natural immune enhancer for *Epinephelus fuscoguttatus* and the effects of *Astragalus membranaceus* on its immune function[D]. Haikou; Hainan University, 2012.
- [23] 王家敏. 复方中草药对吉富罗非鱼免疫相关基因表达的影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2011.
WANG J M. Effects of a traditional Chinese medicine on the expression of immune related genes in GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [D]. Zhanjiang; Guangdong Ocean University, 2011.
- [24] 赵珂立. 氧化应激对动物自由基代谢、消化道损伤及抗氧化剂干预作用的研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2011.
ZHAO K L. Effects of composite antioxidants on oxidative stress and intestinal tract in animals [D]. Shanghai; Shanghai Jiao Tong University, 2011.
- [25] 刘淑兰, 翟少伟. 氧化应激对鱼类的影响及其模型的研究进展[J]. 饲料博览, 2012(2): 48-51.
LIU S L, ZHAI S W. Research progress of effects of oxidative stress on fish and oxidative stress model[J]. Feed Review, 2012(2): 48-51.
- [26] SOHAL R S, ALLEN R G. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis [J]. Experimental Gerontology, 1990, 25(6): 499-522.
- [27] SINGARAM G, HARIKRISHNAN T, CHEN F Y, et al. Modulation of immune-associated parameters and antioxidant responses in the crab (*Scylla serrata*) exposed to mercury [J]. Chemosphere, 2013, 90(3): 917-928.
- [28] XU H, SHAO X L, ZHANG Z, et al. Oxidative stress and immune related gene expression following exposure to di-n-butyl phthalate and diethyl phthalate in Zebrafish embryos [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2013, 93: 39-44.
- [29] 孙裔雷, 王荻, 刘红柏. 复方中草药对虹鳟抗氧化能力的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2015, 30(2): 170-174.
SUN Y L, WANG D, LIU H B. Effects of dietary Chinese herbal medicine compounds on antioxidant capacity in rainbow trout[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2015, 30(2): 170-174.
- [30] 梁拥军, 孙向军, 孙砚胜, 等. 复方中草药对宝石鲈抗氧化能力及免疫功能的影响[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(15): 7026-7029.
LIANG Y J, SUN X J, SUN Y S, et al. Effect of the compound Chinese herbal medicine on the antioxidant capacity and immune function of Perch[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(15): 7026-7029.

Effects of dietary palmatine on growth performance, antioxidant capacity and non-specific immunity of GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

CHEN Peiyun, REN Xiaoxiao, BI Baoliang

(College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China)

Abstract: The effects of dietary palmatine on the growth performance, antioxidant capacity and non-specific immunity of GIFT Strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) were investigated. A basal diet was supplemented with increasing palmatine to formulate five diets containing 0, 0.01%, 0.02%, 0.04% and 0.08% of palmatine. Juveniles GIFT with initial mass of 0.50 g were fed experimental diets for 12 weeks. The results showed as follows: there was no significant difference in final mass, weight gain rate, specific growth rate and feed conversion ratio among all the groups ($P > 0.05$). With the increase of palmatine, the serum activity of AKP and T-AOC showed an increasing trend, and reached the highest value in 0.08% group. The SOD activity in 0.04% group was significantly higher than that in other groups ($P < 0.05$), and the activity of MDA in palmatine groups was lower than that in the control group. The liver activities of SOD, AKP and CAT were significantly higher in palmatine group than those of the control group ($P < 0.05$). The activity of T-AOC showed an upward trend with increasing of palmatine concentration, and there was no significant difference among the palmatine groups ($P > 0.05$). The liver activity of GSH-Px was significantly higher in 0.08% palmatine group ($P < 0.05$), the activity of MDA in palmatine groups was lower than that in the control group. The increase in activities of LZM and C4 in serum and expression levels of *IL-1 β* , *TNF- α* in liver, were observed in tilapia fed the diets supplemented with palmatine. The phagocytic activity of macrophages was significantly higher in 0.04% palmatine group ($P < 0.05$). Under the present experimental conditions, the addition of 0.04% to 0.08% of palmatine can maintain good growth performance and effectively improve antioxidant capacity and non-specific immunity of GIFT.

Key words: palmatine; tilapia; growth performance; antioxidant capacity; non-specific immunity