

α -甘露聚糖肽对鲫鱼免疫应答强度的影响研究^{*}

王高学¹, 徐 翔¹, 李素霞²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 西安恩慈制药有限公司, 陕西 西安 710075)

[摘 要] 为研究 α -甘露聚糖肽(Mannatide)对鲫鱼免疫应答强度的影响, 将 α -甘露聚糖肽按每天每千克体重1.5 mg的剂量拌饵投喂鲫鱼, 分别于7, 14, 21和28 d时检测各组鲫鱼吞噬细胞的杀菌活性、白细胞的吞噬活性、SOD酶活性和血清凝集抗体效价。结果表明, 不同投喂周期均可增强鲫鱼的免疫应答强度; 用药饵投喂7 d的试验组, 7 d后免疫应答强度很快与对照组趋于一致; 21 d和28 d投喂组的免疫应答强度差异不明显, 但均显著($P < 0.05$)高于14 d组。因此, 投喂21 d左右即可达到使非特异性免疫功能增强持续30 d以上的效果。

[关键词] α -甘露聚糖肽; 鲫鱼; 免疫应答

[中图分类号] S942.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)10-0067-04

α -甘露聚糖肽(Mannatide)是具有我国知识产权的一种从 α -溶血性链球菌(*Alpha-hemolytic streptococci*)培养液中提取的具有多种生物活性的糖蛋白, 具有抑制肿瘤^[1,2]、显著提高人体免疫功能的作用^[3,4]。本研究在确定 α -甘露聚糖肽对鲫鱼免疫应答以及最佳口服剂量(1.50 mg/kg)的基础上, 进行了最佳剂量下最佳投喂周期和非特异性免疫功能增强持续时间的测定, 以期无公害水产品的生产应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

α -甘露聚糖肽粗提物从 α -溶血性链球菌培养液中提取, 含量为1 mg/mL; 鲫鱼(*Carassius auratus*)来自黄河水产研究所, 平均体重(53.2 ± 6.4) g; 肠型点状气单胞菌(*Aeromonas punctata* f. *intestinalis*) No. 58-20-9和鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) No. E3-1-1, 均由中国科学院水生生物研究所鱼病室提供; 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 由西北农林科技大学动物科技学院水产实验室保存。

SOD检测试剂盒由南京建成生物工程研究所生产, 批号: 20040421; MEM培养基为Gibco公司产品; 噻唑兰(MTT)为Sigma公司产品; 淋巴细胞分

离液(Ficoll-Hypaque)为上海华精高科有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 供试鱼饲养 选择健康无病、体态均匀的鲫鱼125尾, 分为5组, I~IV组为试验组, V组为对照组。每组25尾, 于0.25 m³水族箱中饲养, 控制水温为(25 ± 1)℃, 每天换一定量的新水并清污。试验期间分别投喂药饵或空白饲料, 投饵率为0.5%。

4个试验组均按鱼体重添加药物于饵料中, 添加剂量为每日每千克体重1.50 mg, 投喂周期分别为: I组7 d, II组14 d, III组21 d, IV组28 d, V组为空白对照组, 全程投喂未添加药物的饵料。

1.2.2 菌悬液制备 将试验所用的3株细菌分别接种于普通肉汤中, 在25℃的培养箱中培养48 h, 用生理盐水稀释至细菌浓度为 1×10^8 /mL。并向金黄色葡萄球菌、鳃弧菌菌悬液中加入福尔马林灭活24 h。3种菌悬液均置于4℃下保存备用。

1.2.3 采血 分别在第0, 7, 14, 21, 28, 48, 58和68天, 采用腹主动脉采血法采血。每次各组随机取鱼3尾, 每尾采血样1.5 mL, 其中0.5 mL用于分离血清, 1.0 mL用于分离白细胞。

1.2.4 血清凝集抗体效价和SOD酶活性的测定 将0.5 mL上述血样置于1.5 mL离心管中, 2000 r/min离心10 min分离血清。取一部分血清, 采用血凝

^{*} [收稿日期] 2004-12-01

[基金项目] 杨凌科研基金(2000J-10)

[作者简介] 王高学(1965-), 男, 陕西富平人, 副教授, 在读博士, 硕士生导师, 主要从事水产动物病害与生物工程制药研究。E-mail: wanggaixue@126.com

板法,用灭活的金黄色葡萄球菌、鳃弧菌作为反应抗原进行测定。取另一部分血清,利用SOD检测试剂盒和紫外分光光度计测定SOD酶活性。

1.2.5 白细胞悬液制备 将1.0 mL用肝素钠抗凝的血样置于盛有0.8 mL淋巴细胞分离液的离心管中,按照余赟^[5]的方法,于2 500 r/min离心15 min分离白细胞,调整细胞浓度为 10^7 /mL后,按照司徒镇强等^[6]的方法检测白细胞活率,活细胞应不少于90%。

1.2.6 鲫鱼白细胞吞噬活性的测定 取上述制备的100 μ L白细胞悬液,参照文献[7]的方法,用肠型点状气单胞菌进行白细胞吞噬活性的测定。

1.2.7 鲫鱼吞噬细胞杀菌活性的测定 另取400

μ L白细胞悬液,参照文献[8]的方法用肠型点状气单胞菌进行杀菌活性的测定。

2 结果与分析

2.1 α -甘露聚糖肽对鲫鱼血清凝集抗体效价的影响

由表1可见,各试验组在药饵投喂期的血清凝集抗体效价均明显升高;在空白饵料投喂期的血清凝集抗体效价较药饵投喂期有平缓下降。III、IV组抗体效价的峰值均出现于14~21 d,且在随后的试验中两组间无明显差异。各组血清凝集抗体效价先后于58~68 d时与对照组趋于一致。

表1 鲫鱼投喂 α -甘露聚糖肽后不同时间的血清凝集抗体效价
Table 1 Agglutinating antibody titer in *Carassius auratus* fed with mannatide

组别 Group	采血时间/d Time of blood-test							
	0	7	14	21	28	48	58	68
I J	2 3(2~4)	24 3(16~32)	21 1(16~32)	21 1(16~64)	16 0(8~32)	8 0(4~16)	3 5(2~8)	4 0(2~8)
	M 2 3(2~4)	27 9(16~32)	21 1(16~64)	18 4(16~32)	13 9(8~32)	7 0(4~16)	5 3(4~16)	2 6(2~4)
II J	2 6(2~4)	24 3(16~64)	48 5(32~128)	37 0(16~64)	27 9(16~32)	12 1(8~16)	6 1(4~16)	3 0(2~4)
	M 3 0(2~4)	27 9(16~64)	55 7(32~64)	42 2(16~64)	32 0(16~64)	13 9(8~32)	5 3(2~8)	4 6(2~8)
III J	2 3(2~4)	21 1(16~64)	42 2(32~128)	48 5(32~128)	36 8(16~64)	16 0(8~32)	7 0(4~16)	3 0(2~8)
	M 2 6(2~4)	24 3(16~64)	64 0(32~128)	55 7(32~128)	42 2(16~64)	18 4(8~32)	6 1(4~8)	3 5(2~4)
IV J	2 3(2~4)	27 9(16~64)	55 7(32~128)	64 0(32~128)	48 5(32~64)	21 1(16~64)	8 0(4~16)	4 6(2~4)
	M 2 6(2~4)	24 3(16~32)	55 7(32~64)	55 7(32~128)	55 7(32~64)	21 1(8~32)	9 2(4~16)	3 5(2~8)
V J	2 3(2~4)	3 5(2~4)	4 0(2~8)	4 6(2~8)	4 0(2~8)	4 0(4~4)	3 5(2~4)	3 5(2~4)
	M 3 0(2~4)	4 6(4~8)	5 3(4~8)	6 1(4~8)	5 3(2~8)	4 6(2~8)	3 5(2~4)	4 0(2~8)

注:J.金黄色葡萄球菌;M.鳃弧菌;表中数据为几何平均数。
Note: J. *S. taphylococcus aureus*; M. *V. anguillarum*; geometric average value

2.2 α -甘露聚糖肽对鲫鱼SOD酶活性的影响

由表2可见,各试验组从第7天开始,其SOD酶活性与对照组出现极显著差异($P<0.01$),且随药饵投喂期的不同,I、II、III、IV组之间相比也存在差

异。各药饵投喂组鲫鱼的SOD酶活性在58 d时与对照组间仍存在显著差异($P<0.05$),于68 d时与对照组趋于一致。

表2 鲫鱼投喂 α -甘露聚糖肽后不同时间的SOD活性
Table 2 SOD activities in *Carassius auratus* fed with Mannatide

组别 Group	采血时间/d Time of blood-test							
	0	7	14	21	28	48	58	68
I	26.60 $\pm$ 0.34	82.02 $\pm$ 0.27B	76.59 $\pm$ 0.77B	71.60 $\pm$ 1.18B	68.25 $\pm$ 1.05B	41.17 $\pm$ 0.30B	35.56 $\pm$ 0.57b	32.58 $\pm$ 0.56
II	26.42 $\pm$ 0.16	81.72 $\pm$ 0.33B	92.48 $\pm$ 0.92C	79.98 $\pm$ 0.20C	68.24 $\pm$ 1.11B	41.56 $\pm$ 0.59B	35.69 $\pm$ 0.39b	32.53 $\pm$ 0.25
III	26.57 $\pm$ 0.46	81.69 $\pm$ 0.31B	91.94 $\pm$ 0.96C	82.73 $\pm$ 1.00D	70.59 $\pm$ 0.66BC	49.39 $\pm$ 0.75C	37.16 $\pm$ 0.88c	32.49 $\pm$ 0.48
IV	26.42 $\pm$ 0.14	81.62 $\pm$ 0.34B	91.21 $\pm$ 1.30C	82.80 $\pm$ 0.84D	70.79 $\pm$ 0.95C	50.50 $\pm$ 0.72C	37.24 $\pm$ 0.79c	32.64 $\pm$ 0.38
V	26.58 $\pm$ 0.17	40.64 $\pm$ 0.44A	40.74 $\pm$ 0.33A	38.87 $\pm$ 0.65A	37.91 $\pm$ 0.39A	33.51 $\pm$ 0.81A	32.38 $\pm$ 1.07a	32.39 $\pm$ 0.74

注:同列数据标不同大写字母者表示差异极显著($P<0.01$);标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。下表同。
Note: More significant difference marked by different majuscule in same tier ($P<0.01$); significant difference marked by different lowercase in same tier ($P<0.05$). Same follow.

2 3 α -甘露聚糖肽对鲫鱼白细胞吞噬活性的影响

表 3 表明, 随药饵投喂期不同, I, II, III, IV 组鲫鱼白细胞吞噬活性与对照组相比存在极显著差异 ($P < 0.01$), 且各组之间也存在差异。各组在空白饵

料投喂期的白细胞吞噬活性均较药饵投喂期有平缓下降。在药饵停喂期, 各组组间差异性逐渐缩小, 并于 68 d 时白细胞吞噬活性基本一致。

表3 鲫鱼投喂 α -甘露聚糖肽后不同时间的白细胞吞噬活性

Table 3 Phagocytic activity of leucocytes in *Carassius auratus* fed with Mannanide

组别 Group	采血时间/d Time of blood-test							
	0	7	14	21	28	48	58	68
I	0.151 ± 0.023	0.183 ± 0.035 B	0.179 ± 0.026 A	0.175 ± 0.065 A	0.164 ± 0.014 A	0.159 ± 0.048 A a	0.159 ± 0.024 a	0.161 ± 0.009
II	0.153 ± 0.034	0.183 ± 0.027 B	0.217 ± 0.056 B	0.201 ± 0.012 B	0.176 ± 0.054 B	0.175 ± 0.010 A b	0.161 ± 0.035 a	0.162 ± 0.045
III	0.150 ± 0.051	0.183 ± 0.047 B	0.218 ± 0.038 B	0.235 ± 0.011 C	0.207 ± 0.024 C	0.177 ± 0.038 A b	0.162 ± 0.011 a	0.164 ± 0.026
IV	0.150 ± 0.046	0.182 ± 0.065 B	0.220 ± 0.038 B	0.234 ± 0.036 C	0.235 ± 0.026 D	0.204 ± 0.018 B c	0.177 ± 0.048 b	0.165 ± 0.013
V	0.153 ± 0.019	0.172 ± 0.044 A	0.171 ± 0.045 A	0.165 ± 0.014 A	0.161 ± 0.037 A	0.158 ± 0.011 A a	0.160 ± 0.018 a	0.162 ± 0.010

2 4 α -甘露聚糖肽对鲫鱼吞噬细胞杀菌活性的影响

由表 4 可知, 在药饵投喂期, 随采血时间不同, 各组鲫鱼的吞噬细胞杀菌活性有极显著差异 ($P <$

0.01), 至第 58 天时, III、IV 组与对照组还保持有极显著差异 ($P < 0.01$), 但在随后的 10 d 内差异逐渐减小。

表4 鲫鱼投喂 α -甘露聚糖肽后不同时间的吞噬细胞杀菌活性

Table 4 Bactericidal activity of phagocytes in *Carassius auratus* fed with Mannanide

组别 Group	采血时间/d Time of blood-test							
	0	7	14	21	28	48	58	68
I	0.961 ± 0.063	0.874 ± 0.052 B	0.876 ± 0.044 B	0.897 ± 0.065 A	0.903 ± 0.034 A	0.956 ± 0.082 A	0.965 ± 0.071 A	0.964 ± 0.035
II	0.963 ± 0.066	0.875 ± 0.037 B	0.660 ± 0.072 C	0.691 ± 0.044 B	0.713 ± 0.074 B	0.902 ± 0.064 B	0.961 ± 0.027 A	0.963 ± 0.074
III	0.962 ± 0.043	0.872 ± 0.032 B	0.669 ± 0.050 C	0.523 ± 0.058 C	0.606 ± 0.078 C	0.889 ± 0.024 C	0.940 ± 0.065 B	0.953 ± 0.054
IV	0.963 ± 0.024	0.873 ± 0.064 B	0.663 ± 0.036 C	0.520 ± 0.022 C	0.525 ± 0.034 D	0.840 ± 0.053 D	0.940 ± 0.057 C	0.953 ± 0.048
V	0.964 ± 0.044	0.921 ± 0.023 A	0.907 ± 0.055 A	0.901 ± 0.043 A	0.911 ± 0.053 A	0.956 ± 0.047 A	0.965 ± 0.064 A	0.960 ± 0.060

3 讨 论

本试验结果表明, α -甘露聚糖肽作为微生物产生的生物活性物质, 能显著提高鲫鱼的血清凝集抗体效价、SOD 酶活性、白细胞的吞噬活性和吞噬细胞的杀菌活性, 即显著提高鱼类的体液免疫和细胞免疫功能。从本试验结果可以看出, 采用不同的给药持续时间, 鲫鱼免疫应答的强度有不同程度提高。在最佳药物投喂周期和非特异免疫功能增强持续时间的研究中发现, 鲫鱼的免疫应答水平在一定时间内与给药时间呈正相关。除 SOD 酶活性能延续较长的时间外, 第 I 组的其他检测指标在药饵投喂停止后很快与对照组趋于一致; 在停止药饵投喂后, 第 II 组的非特异性免疫应答强度维持与 III、IV 组相比, 结果并不能使人满意; 而 III、IV 组在 48~58 d 时免疫应答强度的差别不会对实际生产产生影响, 也就是说, α -甘露聚糖肽在 1.50 mg/kg 的剂量下, 连续投喂 21

d 左右, 可使鲫鱼的非特异性免疫功能增强持续 30 d 以上。

α -甘露聚糖肽能够显著提高某些畜禽以及鱼类的免疫功能, 一般认为这是由于 α -甘露聚糖肽在消化道内被消化酶分解为碱性多肽和甘露聚糖而引起的。碱性多肽具有杀伤细菌^[9], 促进巨嗜细胞吞噬和淋巴细胞、脾细胞增殖的作用, 可增强机体免疫力^[10]; 而甘露聚糖能够吸附病原菌, 为有益菌提供营养, 调节免疫机能, 并具有结合霉菌毒素和改善动物对营养物质的消化吸收等功能^[11]。

目前, 水产动物免疫增强剂主要有多糖类、蛋白质类、激素和维生素类、细菌细胞组分类、生物活性物质、中草药制剂类以及人工合成药物类等。 α -甘露聚糖肽作为微生物类生物活性物质应用于水产动物, 特别是鱼类养殖, 能提高鱼类的机体免疫力, 降低病害发生频率和强度, 尤其是降低病毒性疾病的发生与传播, 从而可减少抗菌素和农药的使用, 提高

鱼类的生产性能,降低养殖成本,为绿色水产品生产 及无公害健康养殖提供保障。

[参考文献]

- [1] 张文禄, 杨世勇, 马雅清. 多抗甲素预防和抵抗放射损伤实验观察[J]. 西安医科大学学报, 1987, 8(4): 396- 398
- [2] 朱小燕, 袁定东. 多抗甲素对小鼠S180实体瘤生长的影响及其抑瘤机制的初步分析[J]. 西安医科大学学报, 1989, 10(3): 216- 219
- [3] 王 钊, 吴荣聪, 林 琳. 多抗甲素的药理研究进展[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(4): 374- 377.
- [4] 王允生, 王晓燕. 甘露聚糖肽(多抗甲素)的药理作用与临床应用[J]. 中国药师, 2004, 7(4): 302- 304
- [5] 余 渭. 医学微生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983
- [6] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996
- [7] CHEN Chang-fu, L I Jing, Kusuda R. A preliminary study on the adjuvanticity of henbane in oral vaccination of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. J of Huazhong Agr Uni, 1996, 15(2): 157- 162
- [8] Kawai K, Kusuda R, Itami T. Mechanisms of protection in ayuorally vaccinated for vibriosis[J]. Fish Path, 1981, 15(3/4): 257- 262
- [9] 李崇婕. 增益素简介[J]. 河北畜牧兽医, 2001, 17(8): 35
- [10] 张子仪. 中国饲料科学[J]. 北京: 中国农业出版社, 2001
- [11] 郭冬生, 彭小兰, 司国利. 免疫增强剂多抗甲素的作用机理及其研究进展[J]. 兽药与饲料添加剂, 2003, 8(2): 15- 16

Effect of mannatide on immune response of *Carassius auratus*

WANG Gao-xue¹, XU Xiang¹, L I Su-xia²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Xi'an Enci Pharmaceutical Co Ltd, Xi'an, Shaanxi 710075, China)

Abstract To investigate the effect of Mannatide on immune response of *Carassius auratus*, 1.5 mg/kg dosage were fed for 7, 14, 21 and 28 days. Bactericidal activity of phagocytes, phagocytic activity of leucocytes, SOD activities and agglutinating antibody titer were checked every week. The results showed that all the feeding periods could enhance immune response; the immune response was equal with that of contrast group after feeding Mannatide for 7 days; there was no significant difference in immune response between those of 21 and 28-day groups, but they were significantly higher than that of 14-day group. It may be concluded that feeding Mannatide for 21 days can enhance immunity for more than 30 days.

Key words: Mannatide; *Carassius auratus*; immune response