新琼寡糖作为免疫增强剂在鲍鱼养殖中的应用

刘春娇[1]，蔡俊鹏[1,2]

（1.华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）（2.华南理工大学生物科学与工程学院，广东广州 530002）

摘要：采用一种活性新琼寡糖作为免疫增强剂，通过在饲料中添加不同含量的新琼寡糖(分别为饲料重量的 0.1%，0.5%，1%，1.5%和 3%)，以血清溶菌酶活力、血清补体活性及白细胞总数和白细胞吞噬率为判断依据，确定新琼寡糖对于鲍鱼非特异性免疫力的影响；同时用嗜水气单胞菌（*Aeromonas hydrophila*）对各组鲍鱼进行细菌感染试验，测定鲍鱼存活率，以确定新琼寡糖对鲍鱼抗病力的影响。结果表明：投喂新琼寡糖组的鲍鱼的血清溶菌酶活力、血清补体活性及血液白细胞总数和吞噬率均明显高于对照组，且新琼寡糖的最佳投喂量为饲料重量的 0.5%~1%。细菌感染试验结果显示，在细菌感染 72 h 后，对照组鲍鱼的存活率最低，仅为 42%，而新琼寡糖投喂组鲍鱼的存活率均达到 58%以上，且最高可达到 79%。

关键词：新琼寡糖；九孔鲍；免疫增强剂；非特异性免疫

文章篇号：1673-9078(2012)11-1508-1511

Application of Neoagaro-oligosaccharides as Immunostimulants in Abalone Production

LIU Chun-jiao[1], CAI Jun-peng[1,2]

(1.College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 530002, China)

Abstract: In this study, the activity of neoagaro-oligosaccharides as a new immunostimulant was studied by adding different dosages of Neoagaro-oligosaccharides in the feed (0.1%, 0.5%, 1%, 1.5% and 3%, respectively). Then, determination of serum complement activity, lysozyme activity, phagocytic activity and the total number of leucocytes was carried out to decide the impact of neoagaro-oligosaccharides on abalone non-specific immunity. Besides, the abalone were injected peritoneally with *Aeromonas hydrophila* after fed 3 months for determine the effect of neoagaro-oligosaccharides on the disease resistance. The results showed that the serum complement activity, lysozyme activity, phagocytic activity and the total number of leucocytes of the groups of adding neoagaro-oligosaccharides in the feed were significantly higher than that of the control group. The best dosage of the Neoagaro-oligosaccharides in the feed was between 0.5% and 1%. The results of the bacterial infection test showed that the survival rate of neoagaro-oligosaccharides feeding group was significantly higher than that of the control group.

Key words: neoagaro-oligosaccharides; *Haliotis diversicolor aquatilis*; immunostimulants; non-specific immunity

鲍鱼是名贵的“八大海珍品”之一，具有极高的营养、药用、保健价值，被誉为海洋“软黄金”，深受国内外消费者的青睐。近年来，随着养殖规模的扩大、集约化程度的不断提高及养殖环境的日趋恶化，病害频发，鲍种品质严重下降，成为鲍健康养殖、持续生产的重要制约因素[1]。广谱抗生素杀死或抑制了药敏细菌而保留了耐药的致病菌，破坏或干扰了水体原有正常微生物区系的生态平衡，从而增加了水产养殖动物感染病菌的机会。此外，抗生素在水体和水产养殖动物体内的残留也会威胁到人类的健康和安全。

免疫增强剂能够借助于增强非特异性免疫提高鱼体对疾病的抵抗力。越来越多的国内外学者进行深入研究，期望寻找一些无污染、无残留、促生长、多功能的免疫增强剂。目前研究发现的免疫增强剂主要是几丁质、多糖及一些微量的营养物质如维生素 C 和维生素 E 等[2~4]。近年来，各国科学家大力从事从海洋中寻找，开发新药物的研究工作，其中对海藻、海藻多糖及低聚糖类代谢产物进行了大规模的化学分离、结构确定及生物活性物质的筛选，且已从海藻中分离得到了具有抗菌、抗肿瘤活性的多种多糖类代谢产物[5]。新琼寡糖是由红藻来源的琼胶或琼脂糖经 β-琼胶酶降解生成的以 3,6-内醚-α-L-半乳糖作为非还原性末

收稿日期：2012-06-25

基金项目：国家自然科学基金项目（40776091）

作者简介：刘春娇（1987-），女，在读硕士研究生，研究防向：食品科学

通讯作者：蔡俊鹏（1963-），男，教授，博士生导师

端，β-D-半乳糖为还原性末端的系列中性寡糖。近年来研究表明，琼寡糖具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等多种生物活性[6,7]，并且与寡糖的聚合度密切相关。然而关于新琼寡糖的活性报道相对较少。本试验将一种活性新琼寡糖按不同比例添加到鲍鱼饲料中，通过测定鲍鱼的各项非特异性免疫指标，研究新琼寡糖作为免疫增强剂在水产动物养殖中应用的可能性。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂

新琼寡糖：利用酶法降解琼脂糖制备出平均分子量为 1500Da，以 β-D-半乳糖为还原性末端和以 3,6-内醚 α-L 半乳糖为非还原性末端的活性新琼寡糖（为本实验室之前制备）。

1.1.2 试验饲料

鲍鱼人工合成饲料购于某水产科技有限公司。试验过程中，称取基础饲料总重量的 0.1%~3%的活性新琼寡糖加入饲料中，搅拌均匀后，保存备用。

1.1.3 试验菌株

溶壁微球菌（*Micrococcus lysodeikticus*）、白色葡萄球菌和嗜水气单胞菌（*Aeromonas hydrophila*）均由本实验室保存。

1.2 实验分组及试验条件

同批同龄的九孔鲍由某鲍鱼养殖厂提供，并在该场开展试验，壳长约（3.2±0.1）cm，质量约（4.59±0.5）g。试验在 6t 规格的养殖池进行，池底横向骑叠式排放四角砖，每池投放 3000 只九孔鲍。10 口养殖池作为新琼寡糖投喂组，分别编号 B、C、D、E、F，每组两个平行，另外选择 2 口养殖池作为对照组，编号 A。试验时，选取健康均匀，无伤无病的个体进行。试验组 B、C、D、E、F 分别投喂活性新琼寡糖重量百分含量依次为 0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、3%的饲料，对照组（A）投喂基础日粮，在试验第 120 d 时取样，对鲍鱼的非特异性免疫指标进行测定，投喂试验结束后，进行细菌感染试验。试验期间采用 15 d 换（全池）水一次，每天采用虹吸法进行池底的吸污，并清理出死鲍。各组均于 17:00 时投喂饲料，投饵量控制在鲍质量的 5%。

1.3 血液及血清的收集

在试验第 120 d 时从各组中随机捞取 5 只九孔鲍，用 1 mL 注射器，5 号针头插入鲍的心脏取血，由于血量太少，再用刀片将鲍的腹足从中间切开，吸取渗出的蓝色血液，4 ℃保存，一部分血液在 24 h 内检测白细胞总数及白细胞吞噬率。另外吸取其中一部分血液置于 Eppendorf 管中，于 4 ℃过夜，以 10000 r/min 离心 10 min，在无菌条件下吸出血清，进行血清溶菌酶活性及补体活性的测定。

1.4 对鲍鱼非特异性免疫指标的测定

1.4.1 溶菌酶活力的测定

以溶壁微球菌(*Micrococcus lysoleikticus*)冻干粉为底物，按 Hultmark 等[8]改进的方法进行，用 0.1 mol/L，pH=6.4 的磷酸盐缓冲液配成底物悬液（OD_{570}=0.3）。取 3.0 mL 该悬液于试管内置冰浴中，再加入 50 μL 待测血清，混合，测其在 570 nm 处的 A_0 值。然后将试液移入 37 ℃温浴中置 30 min，取出后再置于冰浴中 10 min，以终止反应，测其在 570 nm 处的 A 值。按公式计算溶菌酶的活性：$U=(A_0-A)/A$

1.4.2 血液白细胞总数及吞噬率测定

采用血球计数器计算白细胞总数（WBC）。血液经稀释后，红细胞全部被溶解，注入计数池后，在显微镜下计数。

白细胞吞噬率的测定以白色葡萄球菌为底物，参照何正义等[9]的方法进行，于油镜下观察，顺序计数 200 个细胞，分别记录吞噬和未吞噬的白细胞数。

白细胞吞噬率=（200 个中性粒细胞中吞噬细菌的细胞数/200 个中性粒细胞）×100%

1.4.3 血清中总补体活性的测定（CH_{50} 测定）

CH_{50} 测定根据补体能使溶血素致敏的绵羊红细胞发生溶血，当致敏红细胞浓度恒定时，溶血程度与补体量和活性成正比例关系。将新鲜待测血清作不同稀释处理后，与致敏红细胞反应，测定溶血程度，以 50%溶血时的最小血清量判定终点，测定补体溶血活性 CH_{50}。

1.5 细菌感染试验

投喂试验结束后，从对照组和新琼寡糖投喂组分别随机抽取 100 只九孔鲍，每只鲍于鲍腹足部注射 0.1 mL 浓度为 1×10^8 cfu/mL 嗜水气单胞菌（*Aeromonas hydrophila*）菌液。注射细菌后，按不同组别分别正常养殖。每隔 12 h 观察并记录各组死亡数目，连续观察 3 d，最终计算成活率。

2 结果与分析

2.1 对血清溶菌酶活性的影响

图 1 为饲料中添加不同百分含量的新琼寡糖对鲍鱼血清溶菌酶活性的影响。结果显示，新琼寡糖投喂组中鲍鱼的血清溶菌酶活性与对照组相比有明显的提高（$P<0.05$）。其中，当饲料中新琼寡糖的含量为 0.1%~1%范围时，随着新琼寡糖含量的增加，血清溶菌酶活性相应提高，而当新琼寡糖含量高于 1%后，

血清溶菌酶活性明显低于新琼寡糖含量为 1%时的活性（P<0.05）。

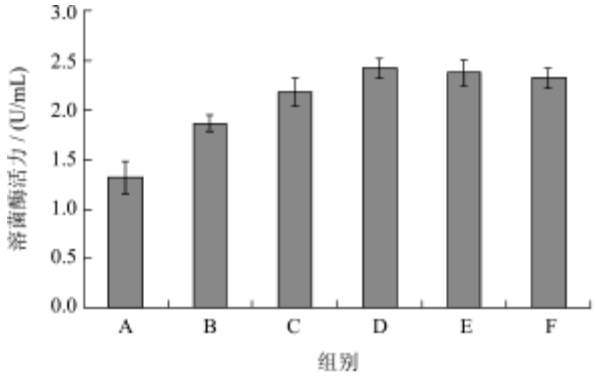


图 1 不同含量的新琼寡糖对鲍鱼血清溶菌酶活性的影响

Fig.1 Effect of content of neoagaro-oligosaccharides on lysozyme activity of abalone

2.2 对白细胞总数及白细胞吞噬率的影响

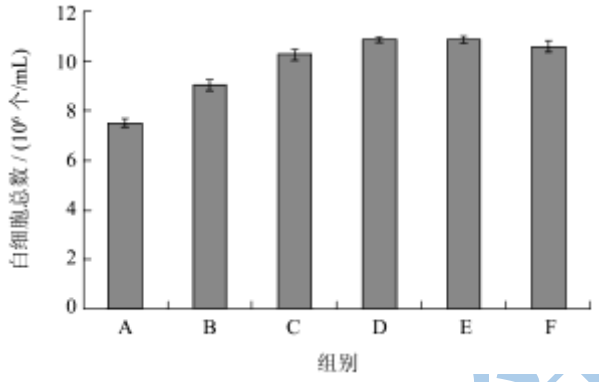


图 2 不同含量的新琼寡糖对鲍鱼血液白细胞总数的影响

Fig.2 Effect of content of Neoagaro-oligosaccharides on the total number of leucocytes of abalone

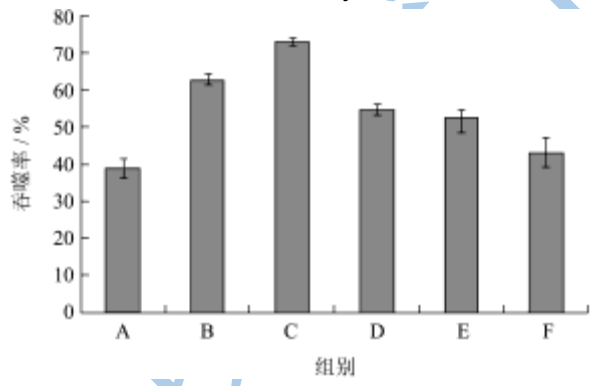


图 3 不同含量的新琼寡糖对鲍鱼白细胞吞噬活性的影响

Fig.3 Effect of content of Neoagaro-oligosaccharides on leucocytes phagocytic activity of abalone

从血液白细胞总数（图 2）和白细胞吞噬率（图 3）来看，新琼寡糖投喂组（B、C、D、E、F）与对照组相比均明显提高（P<0.05）。其中，当饲料中新琼寡糖含量为 0.1%~1%范围时，随着新琼寡糖含量的增加，血液中白细胞总数均明显升高（P<0.05），新琼寡糖含量为 1.5%时与含量为 1%时相比，白细胞总数也有升高，但差别不明显（P>0.05）。说明当饲料中新琼寡糖含量超过 1%后，继续增加新琼寡糖含量对于血液中白细胞总数的提高效果不明显。白细胞的吞噬率在饲料中新琼寡糖含量为 0.5%时达到最高，此后，随着新琼寡糖含量的增加，白细胞吞噬率反而降低。

2.3 对血清补体活性的影响

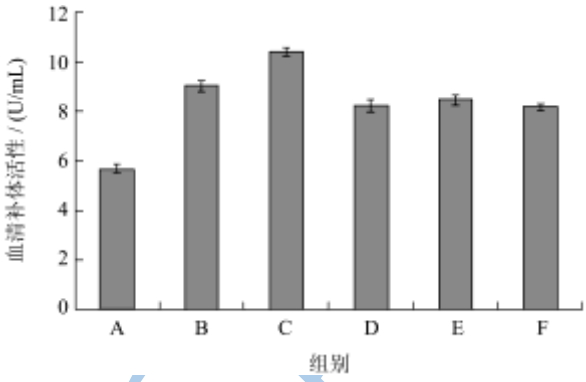


图 4 不同含量的新琼寡糖对鲍鱼血清补体活性的影响

Fig.4 Effect of content of Neoagaro-oligosaccharides on serum complement activity of abalone

图 4 为饲料中添加不同百分含量的新琼寡糖对鲍鱼血清补体活性的影响。结果表明，饲料中添加新琼寡糖后能够明显提高鲍鱼血清中的补体活性（P<0.05）。当饲料中新琼寡糖含量为 0.5%时，血清补体活性达到最高，为 10.38 U/mL。继续增加新琼寡糖含量至 1%时，血清补体活性明显降低（P<0.05），此后，再继续增加新琼寡糖含量时血清补体活性与 1%时几乎没有差别（P>0.05）。

2.4 对抵抗细菌感染能力的影响

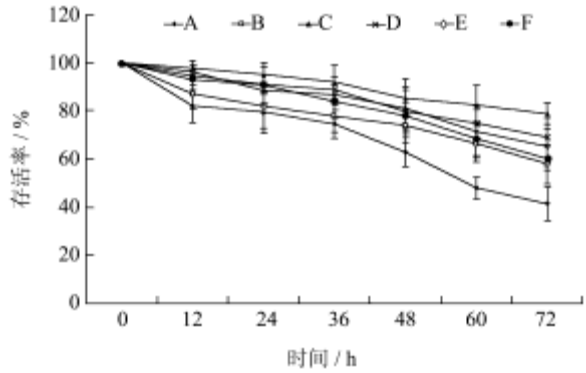


图 5 嗜水气单胞菌感染后各组中鲍鱼不同时刻的存活率

Fig.5 The survival rate of abalone after peritoneal injection by *Aeromonas hydrophila*

图 5 为用嗜水气单胞菌攻毒后各组中鲍鱼在不同时间的存活率。从图中可以看出，在感染嗜水气单胞菌 0~72 h 的时间内，对照组中的鲍鱼存活率持续降低，在 72 h 的存活率仅为 42%。相比之下，各新琼寡糖投喂组中，当新琼寡糖含量为 0.5%时，在 36 h 内鲍鱼的存活率下降不明显，在 72 h 的存活率仍然可以

达到 79%。而 D、E、F 组中鲍鱼存活率相差不明显，说明当饲料中新琼寡糖含量高于 0.5%后，鲍鱼存活率并没有相应的提高。

3 结论

3.1 鲍属软体动物门、腹足纲，为无脊椎动物，不具有获得性免疫，而是通过非特异性免疫因子，即吞噬细胞和体液因子来发挥免疫功能[10]。溶菌酶是鱼类血清中极为重要的非特异性免疫指标之一，在防御病原入侵上起着重要作用。它能水解细胞壁中的黏肽的乙酰氨基多糖并使之裂解被释放出来，从而破坏和消除侵入体内的异物，实现机体防御的功能[11]。溶菌酶作为无脊椎动物非特异性免疫系统的主要成分之一，其水平和活性直接关系到无脊椎动物的免疫功能和健康。因而，测定溶菌酶的活性，可以在一定程度上反映软体动物的非特异性免疫状态。鱼类血清中包含多种免疫因子，其中补体在抵御外来病原菌方面发挥着重要作用。补体具有溶菌和细胞溶解作用，在鱼类早期抗感染过程中发挥着重要作用。补体活化后在靶细胞膜上形成膜攻击复合物，导致靶细胞的溶解，这一功能在动物的免疫系统中起重要的防御和免疫监视作用[12]。此外，在鱼类细胞免疫中，血液中白细胞也起着重要作用，它是机体非特异性免疫的重要组成部分，其数量的多少可直接反映出鱼类非特异性免疫能力的高低[13]。白细胞的主要生理功能是保护机体、抵抗外来微生物的侵袭，其中，中性粒细胞和单核细胞都具有较强的吞噬功能。非特异性免疫系统是无脊椎动物抵御外来病原微生物入侵的第一道防线，因此，提高这类水产动物非特异性免疫防御能力在实际生产中具有广阔的发展前景。

3.2 免疫增强剂，又称免疫促进剂，是指具有促进或诱发宿主防御反应，增强生物机体抗病能力的一类物质。免疫增强剂主要作用于水产动物的非特异性免疫机制，激活机体自身的免疫机能从而达到防御效果，增强其抗病力[14]。由于其在短时期内能够产生显著的作用，而日益受到国际养殖业的重视，成为水产保护学领域研究的热点。琼胶寡糖(agaro-oligosaccharide，AOS)，即琼胶多糖经水解后形成的聚合度为 2~10 的低聚糖，又称琼胶低聚糖，是一种新型的海洋功能性低聚糖，其生物活性正在逐渐被挖掘，不仅具有功能性低聚糖的一般特性，还具有许多普通寡糖无法替代的生理功能特性，如较强的抗癌、抗氧化、抗炎、抗龋齿及抗淀粉老化等活性，是一种极具开发潜力的低聚糖[15]。琼胶寡糖包括琼寡糖和新琼寡糖两个系列。琼寡糖以 3,6-内醚-α-L-半乳糖残基为还原性末端，新琼寡糖以 β-D-半乳糖残基为还原性末端。

3.3 本文研究了饲料中添加不同含量的新琼寡糖后鲍鱼几种非特异性免疫因子的变化情况，旨在探讨新琼寡糖应用于鲍鱼养殖来增强其免疫能力的可行性。结果表明，新琼寡糖可以提高鲍鱼血清的溶菌酶活性、补体活性以及鲍鱼血液白细胞总数和白细胞吞噬率，且当新琼寡糖投喂量为饲料重量的 0.5%~1%时，免疫增强效果最明显，说明新琼寡糖的添加对增强鲍鱼的非特异性免疫能力可产生积极的作用。在细菌感染试验中，对照组鲍鱼的存活率仅为 42%，而试验组的存活率在经过 72 h 后最高仍可达到 79%，进一步表明新琼寡糖可以增强鲍鱼的免疫能力。新琼寡糖作为一种新型的海洋功能性低聚糖，其来源丰富，具有众多其他普通寡糖无可比拟的生物活性。本试验研究显示，新琼寡糖能够提高无脊椎动物的非特异性免疫能力及抗病能力，随着对其结构关系及作用机理的深入研究，可望不久的将来作为一种免疫增强剂应用于水产养殖中。

参考文献

[1] 唐保军,王慧.我国鲍养殖研究现状及展望[J].渔业现代化,2009,36(1):30-34

[2] 文华,严安生,雍文岳,等.饲料维生素 C 水平对草鱼的免疫功能和抵抗病菌感染的影响[J].饲料工业,2005,26(18):56-59

[3] 梁萌青,常青,王印庚,等.维生素 E 及脂肪源对大菱鲆非特异性免疫的影响[J].海洋水产研究,2005,26(5):15-21

[4] 宋文华,张涛,富丽静,等.大蒜素、枸杞多糖对草鱼血清非特异性免疫指标的影响[J].河北渔业,2011,6:12-19

[5] 胡晓珂,江晓路,管华诗.海藻多糖降解酶的性质和作用机理[J].微生物学报,2001,41(6):762-767

[6] 赵雪,薛长湖,徐强,等.琼胶寡糖体外清除自由基活性的研究[J].中国水产科学,2002,9(3):280-282

[7] Enoki T, Sagawa H, Tominaga T, et al. Drugs, foods or drinks with the use of algae -derived physiologically active substances [P]. 2003, U. S. Patent, 0105029 A1

[8] Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, et al .Insect immunity: Isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from Cecropia pupae *Hyalophora cecropia* [J]. European J. Biochemistry, 1982, 127(1): 207-217

[9] 何正义,李福宝,吴翠娟,等.中药制剂对猪 T 淋巴细胞转化率和白细胞吞噬率的影响[J].动物医学进展,2008,29(12):20-22

[10] 陈小红,林阿乞,蔡俊鹏.蛭弧菌对九孔鲍非特异性免疫力和抗病力的影响[J].现代食品科技,2011,27(5):502-505

[11] 汪成竹,姚鹃,吴凡,等.免疫多糖 (酵母细胞壁)对中华鳖非特异性免疫功能的影响[J].华中农业大学学报,2006,8(4):421-425

[12] Roitt. Brostoff. Male. Immunology[M].第 6 版.北京:人民卫生出版社,2002

[13] 孙建和,严亚贤,陈怀青,等.鲫鱼的细胞免疫应答研究[J].上海农学院学报,1998,16(2):89-91

[14] 周进,黄倢,宋晓玲.免疫增强剂在水产养殖中的应用[J].海洋水产研究,2003,24(4):70-79

[15] 刘美英,梅建凤,易喻,等.琼胶寡糖生物活性的研究进展[J].药物生物技术,2008,15(6):493-496

现代食品科技