

文章编号:1000-0615(2007)06-0785-07

左旋咪唑对中华绒螯蟹非特异性免疫功能及抗病力的影响

李 义^{1,2}, 吴婷婷³, 谭夕东²

(1. 南京农业大学渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 苏州大学生命科学学院, 江苏 苏州 215123;

3. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

摘要:为测定在饲料中添加左旋咪唑(LMS)对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的免疫调节作用,以0(对照)、100、200和300 mg·kg⁻¹干饲料的剂量将LMS添加于基础饲料中制成颗粒饲料,投喂中华绒螯蟹7 d,然后投喂不含LMS的对照组饲料。在投喂含LMS的饲料之前(0周)和投喂后2、4、6、8周,采样测定中华绒螯蟹的血细胞总量(THC)、不同血细胞数量(DHC)、吞噬活性、呼吸爆发(超氧阴离子的释放)、酚氧化酶(PO)活性和溶菌酶(LSZ)活性;并在投喂含LMS的饲料后的第4周,按1.2×10⁷ cfu·kg⁻¹体重的剂量,体腔注射接种中华绒螯蟹致病性嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) CL99920菌株,记录接种10 d后中华绒螯蟹的累积死亡率。结果显示,各LMS处理组的血细胞总量(THC)、透明细胞(HC)数量、吞噬百分率、呼吸爆发、PO活性和LSZ活性均显著地高于对照组($P < 0.05$);颗粒细胞(GC)数量、血细胞吞噬指数与对照组无显著差异($P > 0.05$);LMS处理组的蟹对嗜水气单胞菌的抵抗力明显增强。研究表明,饲喂适量的LMS可增强中华绒螯蟹的免疫力和抗病力;在本试验条件下,200 mg·kg⁻¹干饲料的剂量为最适添加剂量。

关键词:中华绒螯蟹;左旋咪唑;免疫反应;抗病力;嗜水气单胞菌

中图分类号:S 963.73

文献标识码:A

Effects of levamisole on the non-specific immune response and disease resistance of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*

LI Yi^{1,2}, WU Ting-ting³, TAN Xi-dong²

(1. College of Fisheries, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. College of Life Sciences, Suzhou University, Suzhou 215123, China;

3. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: In order to determine the immunomodulatory effect of the dietary intake of levamisole in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*), the crab were fed diets containing 0 (control), 100, 200 and 300 mg levamisole kg⁻¹ dry diet for 7 days. The total haemocyte count (THC), differential haemocyte count (DHC), phagocytic activity, respiratory burst (release of superoxide anion), phenoloxidase (PO) activity and lysozyme (LSZ) activity were examined at 0, 2, 4, 6, and 8 weeks after administration of levamisole.

收稿日期:2006-11-23

资助项目:农业部跨越计划项目(2003年度);江苏省教育厅自然科学基金项目(01KJD240001);苏州市科技攻关项目(SNZ0303)

作者简介:李 义(1966-),男,四川简阳人,副教授,博士生,主要从事水产动物病害防治和甲壳动物免疫学研究。Tel:0512-65880178, E-mail:liy188168@sohu.com

通讯作者:吴婷婷, E-mail: wutt@ffrc.cn

Crab were challenged at 1.2×10^7 colony forming units (cfu) kg^{-1} crab weight with a virulent strain of *Aeromonas hydrophila* (CL99920) of *E. sinensis* at 4 weeks after administration of levamisole, and mortalities were recorded over a 10-day period. The results demonstrate that crab treated with levamisole showed significantly higher THC, the amount of hyaline cells (HC), phagocytic percentage (PP), respiratory burst (release of superoxide anion), PO activity and LSZ activity than those of the control group ($P < 0.05$). No significant differences in the amount of granular cells (GC) and phagocytic index (PI) of haemocyte among the crab fed with diets containing 0 (control) and those fed with diets at 100, 200 or 300 mg levamisole kg^{-1} dry die ($P > 0.05$). Furthermore, the levamisole treated *E. sinensis* were the more resistant. It was concluded that *E. sinensis* that were fed with diets at 100, 200 or 300 mg levamisole kg^{-1} dry diet showed increased immune ability as well as resistance to *A. hydrophila* infection. Under the experimental conditions, the optimum dose of dietary intake of levamisole should be 200 mg levamisole kg^{-1} dry diet.

Key words: *Eriocheir sinensis*; levamisole; immune response; disease resistance; *Aeromonas hydrophila*

近年来,中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 日益严重的病害问题已成为阻碍养蟹业发展的主要因素之一。在蟹病防治中,抗生素起着重要作用,但由于病原体的耐药性和药物残留等问题,其使用已受到了严格的限制。因此,研究免疫增强剂来预防蟹病就具有十分重要的意义。左旋咪唑 (Levamisole, LMS) 原本是一种驱蠕虫剂,自 Renoux^[1] 报道其具有免疫调节作用以来,现已证明它是一种有效而廉价的免疫增强剂。将 LMS 以一定的剂量混于饲料中投喂试验鱼,可增强受试鱼的非特异性免疫功能和对致病菌的抗感染能力^[2-7]。然而,国内外有关 LMS 对甲壳动物免疫功能及抗病力影响的研究报导极少^[8],对中华绒螯蟹的相关研究则至今未见报导。本文对饲料添加 LMS 对中华绒螯蟹非特异性免疫功能及对致病性嗜水气单胞菌的抗感染能力的影响进行了研究,结果可为更深入了解中华绒螯蟹的免疫防御机制及其病害防治提供理论依据和实践基础。

1 材料与方 法

1.1 材料及试验处理

180 只健康、活泼的中华绒螯蟹 (均重 20.2 g) 购于江苏省吴江市某养殖场,随机分组饲养于含 150 L 曝气自来水、大小为 100 cm \times 50 cm \times 60 cm 的 12 只 PVC 水族箱中。试验设 4 个饲料处理组,每个处理组设 3 个平行,每一平行中放蟹 15 只。每天投喂幼蟹颗粒饲料 (苏州通威饲料有限公司生产) 3 次,24 h 充气,控制水温在 25 $^{\circ}\text{C}$ 左右,每天换水 1/3。暂养 2 周后开始试验。

盐酸左旋咪唑 (LMS) 原料药由南京白敬宇

制药厂生产,批号为 20040102,含量 99.87%。将 LMS 按 0 (对照)、100、200 和 300 mg \cdot kg^{-1} 的剂量添加至预先粉碎的上述幼蟹颗粒饲料中,重新制成颗粒饲料备用。试验组投喂含 LMS 的饲料 7 d 后,改投不含 LMS 的对照组饲料。试验期管理同暂养期。

在投喂 LMS 之前 (0 周) 和投喂后第 2、4、6、8 周,从每一平行中随机取蟹 2 只,用 1 mL 一次性灭菌注射器在蟹的第三或第四步足的基关节膜处采集血淋巴。将采集到的每只蟹的血淋巴分成二份,一份加入酸性柠檬酸盐-葡萄糖 (Acid Citrate Dextrose, ACD) 抗凝剂^[9] 制成抗凝血,用于血细胞总量 (THC)、不同血细胞数量 (DHC)、吞噬活性及呼吸爆发活性 [超氧阴离子 (O_2^-) 产量] 的测定;另一份分离血清,用于酚氧化酶 (PO) 和溶菌酶 (LSZ) 活性的测定。

1.2 THC 和 DHC 的测定

采用血球计数板法在显微镜下测定 THC;取适量抗凝血,按常规方法制片,进行 DHC - 透明细胞 (HC)、小颗粒细胞 (SGC) 和颗粒细胞 (GC) 的鉴定和计数。

1.3 血细胞吞噬活性的测定

参照朱忠勇^[10] 的方法适当修改。用灭菌 PBS 洗下活化的白色念珠菌 (*Candida albicans*),煮沸灭活后制成 $1.4 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 的菌悬液。取 0.4 mL 抗凝血和 0.2 mL 菌悬液,混匀后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中温育 60 min。然后按常规方法制作血涂片,用 0.1% 结晶紫染色,随机检测计数 100 个血细胞,计算吞噬百分率 (PP) 和吞噬指数 (PI)。

吞噬百分率 (PP) = 100 个血细胞中吞噬有真

菌的细胞数/100 × 100

吞噬指数 (PI) = 100 个参与吞噬的血细胞内的真菌总数/100

1.4 血细胞呼吸爆发活性的测定

参照 Song 等^[11]的氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 还原法适当修改。以相对 O_2^- 产量即试验组 OD_{630nm} 值与对照组 OD_{630nm} 值的比值来表示每个 LMS 处理组呼吸爆发活性的增减。

1.5 血清 PO 活性的测定

参照 Ashida^[12]的方法适当修改。在 96 孔酶标板的微孔中加入 28 °C 预温的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 6.0 磷酸钾盐缓冲液 300 μL 、 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ L-dopa (Sigma) 10 μL 及待测血清 10 μL , 振荡混匀后立即用全自动酶标仪测定反应体系的初始吸光值, 然后每隔 2 min 读取一次吸光值, 共读取 10 次。酶活性以试验条件下, 每分钟 OD_{490nm} 增加 0.001 定义为 1 个酶活性单位。

1.6 血清 LSZ 活性的测定

按照 Hultmark 等^[13]方法适当修改。以溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 冻干粉 (由苏州大学医学院提供) 为底物, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 6.4 的磷酸钾盐缓冲液将底物配成一定浓度的悬液

($OD_{570nm} = 0.3$), 取 3 mL 该悬液与 50 μL 待测血清于试管中混匀, 测初始吸光值 (A_0), 然后置于 28 °C 水浴温育 45 min, 取出后立即置于冰浴中 10 min 终止反应, 测 570 nm 处吸光值 (A)。溶菌酶活性 (U_L) = $(A_0 - A) / A$ 。

1.7 免疫保护率的测定

参照 Li 等^[7]的方法, 在投喂 LMS 后的第 4 周, 在每个处理组中取蟹 9 只, 以 $1.2 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重的剂量, 体腔注射中华绒螯蟹致病性嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) CL99920 菌株 (由浙江省淡水水产研究所惠赠), 记录接种 10 d 后各组蟹的累积死亡率。免疫保护率 = (对照组死亡率 - 免疫组死亡率) / 对照组死亡率 × 100%。

1.8 统计分析

数据用统计软件 SPSS13.0 处理, 单因素方差分析差异显著 ($P < 0.05$) 时, 用 Tukey 氏检验进行均值间多重比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 LMS 对中华绒螯蟹 THC 和 DHC 的影响

LMS 对中华绒螯蟹 THC 和 DHC 的影响的结果见表 1。

表 1 左旋咪唑对中华绒螯蟹 THC 和 DHC 的影响
Tab.1 Effects of levamisole on the total haemocyte count (THC) and differential haemocyte count (DHC) of *Eriocheir sinensis*

血细胞计数 haemocyte count	采样时间(周) sampling time	处理 treatment			
		对照 control	100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	300 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
THC ($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)	0	260.6 ± 6.1 ^a	260.6 ± 6.1 ^a	260.6 ± 6.1 ^a	260.6 ± 6.1 ^a
	2	252.8 ± 12.2 ^a	301.0 ± 13.2 ^b	321.5 ± 12.0 ^b	332.7 ± 11.1 ^b
	4	266.2 ± 10.7 ^a	319.6 ± 11.9 ^b	366.0 ± 12.1 ^b	364.0 ± 13.3 ^b
	6	277.8 ± 17.4 ^a	288.3 ± 14.9 ^a	327.9 ± 25.7 ^a	310.8 ± 28.4 ^a
	8	270.3 ± 11.5 ^a	283.1 ± 7.7 ^a	291.0 ± 13.5 ^a	285.3 ± 10.5 ^a
HC ($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)	0	44.9 ± 3.2 ^a	44.9 ± 3.2 ^a	44.9 ± 3.2 ^a	44.9 ± 3.2 ^a
	2	47.7 ± 2.9 ^a	67.8 ± 4.4 ^b	80.6 ± 2.7 ^b	79.1 ± 3.6 ^b
	4	39.0 ± 6.1 ^a	77.6 ± 7.9 ^b	98.8 ± 6.3 ^b	97.8 ± 7.0 ^b
	6	45.7 ± 3.4 ^a	56.0 ± 4.6 ^{ab}	74.1 ± 5.1 ^b	67.5 ± 7.7 ^b
	8	49.8 ± 2.7 ^a	54.5 ± 3.6 ^a	59.1 ± 6.1 ^a	54.9 ± 4.5 ^a
SGC ($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)	0	171.2 ± 5.9 ^a	171.2 ± 5.9 ^a	171.2 ± 5.9 ^a	171.2 ± 5.9 ^a
	2	156.7 ± 10.2 ^a	185.6 ± 7.7 ^{ab}	198.4 ± 8.8 ^b	198.1 ± 6.9 ^b
	4	185.2 ± 9.1 ^a	192.4 ± 7.5 ^a	211.8 ± 8.9 ^a	221.1 ± 14.1 ^a
	6	177.8 ± 10.5 ^a	191.8 ± 13.5 ^a	200.9 ± 16.5 ^a	189.1 ± 19.2 ^a
	8	166.0 ± 7.8 ^a	177.6 ± 5.1 ^a	178.6 ± 10.0 ^a	172.1 ± 8.7 ^a
GC ($\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)	0	42.9 ± 3.6 ^a	42.9 ± 3.6 ^a	42.9 ± 3.6 ^a	42.9 ± 3.6 ^a
	2	47.8 ± 2.6 ^a	45.4 ± 2.7 ^a	42.5 ± 1.9 ^a	49.8 ± 5.3 ^a
	4	42.0 ± 2.3 ^a	49.6 ± 3.1 ^a	51.6 ± 3.9 ^a	45.2 ± 3.8 ^a
	6	54.3 ± 6.1 ^a	40.8 ± 4.9 ^a	53.1 ± 5.1 ^a	54.3 ± 5.6 ^a
	8	54.5 ± 6.2 ^a	50.3 ± 3.2 ^a	53.3 ± 6.5 ^a	58.4 ± 5.8 ^a

注:表中数据为 6 个重复的平均数 ± 标准误。同一行中数据后英文字母不同者表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)

Notes: Values are means and standard errors of six replicates. Data in the same row with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different treatments

由表1可见,3个试验组的THC和HC均在投喂LMS后的第2-4周(200和300 mg·kg⁻¹组的HC至第6周)显著地高于对照组;200和300 mg·kg⁻¹组的SGC在第2周显著地高于对照组;各组的GC没有显著差异。3个试验组的THC和HC都在第4周达到最高值,然后下降,至第8周时仍高于对照组,但与对照组无显著差异。

2.2 LMS对中华绒螯蟹血细胞吞噬活性的影响

3个试验组的吞噬百分率在投喂LMS后的第2-4周(200 mg·kg⁻¹组至第6周)显著地高于对照组,到第8周时仍高于对照组,但与对照组无显著差异(图1-A)。由图1-B可见,在投喂LMS后的第2-6周,3个试验组的吞噬指数均较对照组高,但无显著差异,并在第8周时恢复至正常水平。

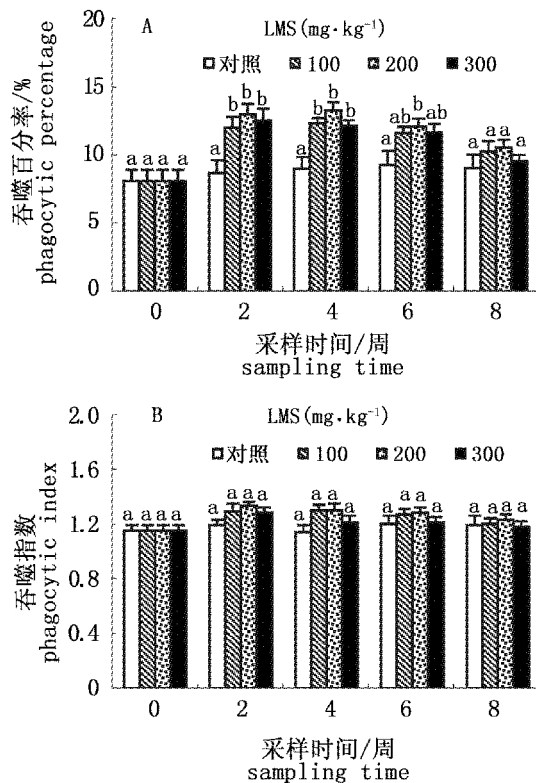


图1 LMS对中华绒螯蟹血细胞吞噬活性的影响
Fig.1 Effects of levamisole on the phagocytic activity of haemocytes of *Eriocheir sinensis*

图中数据为6个重复的平均数±标准误。在同一采样时间中,柱上字母不同者表示处理间差异显著($P < 0.05$)。下同
Values are means and standard errors of six replicates. Data at the same sampling time with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among treatments. Following is the same

2.3 LMS对中华绒螯蟹血细胞呼吸爆发的影响

在投喂LMS后的第2-6周,3个试验组的呼吸爆发活性均高于对照组,其中,100和200 mg·kg⁻¹组在第4周时显著地高于对照组,其相对超氧阴离子(O₂⁻)产量分别达到 1.74 ± 0.15 和 1.86 ± 0.19 ;同时,3个采样时间点均以200 mg·kg⁻¹组的呼吸爆发活性最高。3个试验组的呼吸爆发活性均在第4周达到最大值,然后开始下降,至第8周时恢复到正常水平(图2)。

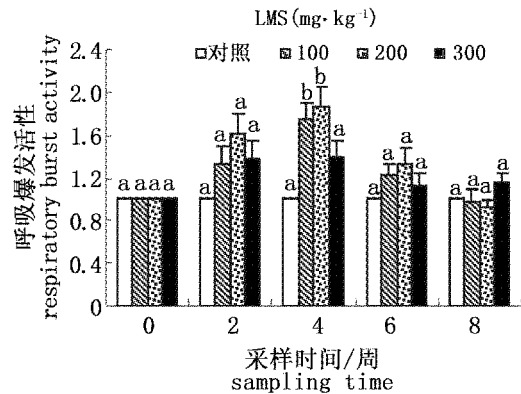


图2 LMS对中华绒螯蟹血细胞呼吸爆发活性的影响
Fig.2 Effects of levamisole on the respiratory burst of haemocytes of *Eriocheir sinensis*

2.4 LMS对中华绒螯蟹血清PO活性的影响

3个试验组的PO活性均在投喂LMS后的第2-6周(200 mg·kg⁻¹组至第8周)显著地高于对照组,并均在第4周时达到最大值(图3)。

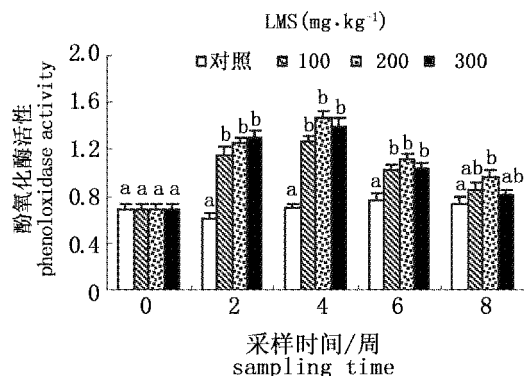


图3 左旋咪唑对中华绒螯蟹血清PO活性的影响
Fig.3 Effects of levamisole on the phenoloxidase activity of serum of *Eriocheir sinensis*

2.5 LMS对中华绒螯蟹血清LSZ活性的影响

在投喂LMS后的第2、4、6、8周,3个试验组

的 LSZ 活性均高于对照组,其中,100 mg·kg⁻¹ 组在第 2 周,200 mg·kg⁻¹ 组在第 2-6 周,显著地高于对照组(图 4)。

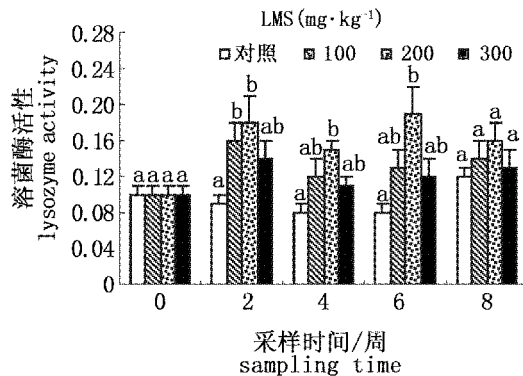


图 4 左旋咪唑对中华绒螯蟹血清 LSZ 活性的影响
Fig. 4 Effects of levamisole on the lysozyme activity of serum of *Eriocheir sinensis*

2.6 LMS 对中华绒螯蟹抗感染能力的影响

3 个 LMS 处理组的蟹的累积死亡率均较对照组低,免疫保护率分别为 37.50%、62.49% 和

25.00% (表 2)。由此说明,在饲料中添加适量的 LMS 对中华绒螯蟹对嗜水气单胞菌的抵抗力具有一定的增强作用。在本试验中,以 200 mg·kg⁻¹ 试验组的效果较好。

3 讨论

3.1 LMS 对中华绒螯蟹血细胞数量及吞噬功能的影响

甲壳动物缺乏像高等动物那样的由免疫球蛋白介导的特异性免疫机能,血细胞在非特异性免疫防御反应中起着主要作用。THC 的高低在一定程度上能体现抵抗病原体入侵能力的强弱^[14]; DHC 的变化可以较好地反映不同类型血细胞在抵抗不同病原体的防御反应中的积极作用^[15]。血细胞的吞噬作用及吞噬过程中因呼吸爆发而产生的多种活性氧在杀菌活性中起着重要作用^[11, 16]。因此,测定 THC、DHC,血细胞的吞噬百分率、吞噬指数及呼吸爆发中的 O₂⁻ 产量,能较好地评价 LMS 对中华绒螯蟹细胞免疫功能的影响。

表 2 左旋咪唑对中华绒螯蟹的免疫保护作用

Tab.2 Effect of the levamisole on the immune protection of *Eriocheir sinensis*

组别 group	被感染蟹的数量 quantity of infected crab	死亡蟹的数量 quantity of death crab	死亡率 (%) mortality rate	保护率 (%) protection rate
对照 control	9	8	88.89	0.00
100 mg·kg ⁻¹	9	5	55.56	37.50
200 mg·kg ⁻¹	9	3	33.33	62.50
300 mg·kg ⁻¹	9	6	66.67	25.00

Siwicki^[17] 的试验表明,口服 LMS 可以提高鲤鱼白细胞的数量及吞噬指数。Leaño 等^[4] 发现,按 500 和 1 000 mg·kg⁻¹ 饲料的剂量对军曹鱼投喂含 LMS 的饲料 2 周,试验鱼白细胞的吞噬活性显著高于对照组。Mulero 等^[2] 将 LMS 按 0、125、250 和 500 mg·kg⁻¹ 的剂量添加于饲料中投喂金头鲷 10 d,发现 LMS 可增强头肾白细胞对鳃弧菌的吞噬活性,在停喂含 LMS 的饲料后的第 5 周,3 个 LMS 处理组鱼的头肾白细胞的吞噬活性均显著高于对照组,到停喂 LMS 后的第 10 周,250 和 500 mg·kg⁻¹ 组的吞噬活性仍显著高于对照组。郭云贵^[18] 用含不同剂量 LMS 的饲料投喂胡子鲇 1 周,结果显示,在停喂含 LMS 的饲料后的第 2-6 周,300 mg·kg⁻¹ LMS 处理组鱼的白细胞吞噬率均显著高于对照组。Mulero 等^[2] 发现,250 和 500 mg·kg⁻¹ LMS 处理组的金头鲷白细胞

的呼吸爆发活性在停喂含 LMS 的饲料后的当天即显著增强,其中 250 mg·kg⁻¹ 组至第 5 周时仍显著高于对照组。Gopalakannan 等^[5] 对鲤鱼投喂含 250 mg·kg⁻¹ LMS 的饲料,在投喂后的第 30、60 及 90 d 检测鲤鱼嗜中性白细胞的呼吸爆发活性,结果显示试验组的活性均显著高于对照组。Kumari 等^[6] 用含 50 mg·kg⁻¹ LMS 的饲料投喂蟾胡子鲇 10 d,在停喂含 LMS 的饲料后的当天,试验组鱼的嗜中性白细胞的 O₂⁻ 产量即显著上升,到第 3 周时达到最高值。Baruah 等^[8] 用添加 0、125、250 mg·kg⁻¹ LMS 的饲料饲喂罗氏沼虾 115 d,结果发现,血细胞的 NBT 还原作用(呼吸爆发)显著增强,吞噬活性与对照组相比有所下降。本研究结果显示,按 100、200 和 300 mg·kg⁻¹ 干饲料的剂量将 LMS 添加于饲料中饲喂中华绒螯蟹 7 d,可使 THC、HC 及 SGC 显著增加,对 GC 则

没有明显的影响。试验组蟹的吞噬百分率和呼吸爆发活性显著增加,但吞噬指数和对照组相比差异不显著。从以上研究结果可以看出,在饲料中添加适量的左旋咪唑能增强包括中华绒螯蟹在内的水产动物的细胞免疫功能。

Cheng 等^[19]认为南美白对虾 O_2^- 产量的增加可能是 THC 和 HC 增加的结果,血细胞对溶藻弧菌吞噬活性的上升与呼吸爆发和 PO 活性的增加有关。本研究发现,投喂适量的 LMS 能提高中华绒螯蟹的 THC 和 HC 数量,使血细胞的吞噬、呼吸爆发及 PO 活性增加。因此,甲壳动物血细胞的吞噬活性与呼吸爆发、PO 活性,血细胞的呼吸爆发与 THC、HC 的数量,可能确实存在着某种相关关系,但具体关系如何,有待深入研究。

3.2 LMS 对中华绒螯蟹血清 PO 和 LSZ 活性的影响 酚氧化酶原(proPO)系统是甲壳动物重要的防御和识别系统,作为该系统终端酶 PO 的活性在一定程度上能反映机体免疫机能的状态。LSZ 是非特异性免疫系统的重要成分,能水解革兰氏阳性细菌细胞壁中粘肽的乙酰氨基多糖并使之裂解被释放出来,形成一个水解酶体系,破坏和消除侵入体内的异物,从而担负起机体防御的功能。因此,PO 及 LSZ 作为甲壳动物的两种主要的体液性免疫因子,其活性的变化可作为评价甲壳动物免疫机能状态的重要指标。

Baruah 等^[8]的研究表明,LMS 可显著地增强罗氏沼虾的酚氧化酶原(proPO)活性。本试验则发现,LMS 能显著地提高中华绒螯蟹血清的 PO 活性。因此,LMS 对甲壳动物的 proPO 系统可能具有活化作用。关于口服 LMS 对鱼类血清 LSZ 水平的影响已有一些研究报导。Leaño 等^[4]的试验结果显示,在饲料中添加 LMS 对军曹鱼血浆 LSZ 活性的影响不显著;Siwicki^[17]发现,用 LMS 拌料口服鲫鱼可使试验鱼血清 LSZ 水平上升;Li 等^[7]的试验表明,对胡子鲇投喂含 150 和 300 $mg \cdot kg^{-1}$ LMS 的饲料能显著地提高试验鱼血清 LSZ 水平;Gopalakannan 等^[5]也发现投喂含 250 $mg \cdot kg^{-1}$ LMS 的饲料能显著增强鲤鱼的 LSZ 活性。本试验结果表明,在饲料中添加适量的 LMS 也能显著地增强中华绒螯蟹的 LSZ 活性。

3.3 LMS 对中华绒螯蟹抗病力的影响

致病性嗜水气单胞菌能引起严重危害中华绒螯蟹的颤抖病和水肿病等多种疾病。因此,采用

蟹源致病性嗜水气单胞菌作实验性感染用菌,能较好地评价 LMS 对中华绒螯蟹抗病力的影响。

已有研究表明,口服 LMS 后,用鳗弧菌接种金头鲷^[2]、嗜水气单胞菌接种露斯塔野鲮^[3]与鲤^[5]、美人鱼发光杆菌接种军曹鱼^[4]及用鲁氏不动杆菌强毒株实验感染胡子鲇^[7],均可提高试验鱼的抗感染能力。Baruah 等^[8]以 125 和 250 $mg \cdot kg^{-1}$ 饲料的剂量对罗氏沼虾投喂 LMS 115 d 后用荧光假单胞菌强毒株接种,结果发现试验组虾死亡减缓。本试验也发现,投喂含适量 LMS 饲料的中华绒螯蟹对嗜水气单胞菌的抵抗力明显增强。由于 LMS 本身无杀菌或抑菌作用,因此我们推测 LMS 对中华绒螯蟹抗感染能力的增强作用应是得益于 LMS 对机体免疫功能的增强作用。

3.4 LMS 促进中华绒螯蟹免疫功能的适宜用量

一些研究表明,LMS 的免疫激活作用与使用剂量有关,剂量过大会导致免疫抑制^[6,7,20]。Kumari 等^[6]发现,在对蟾胡子鲇投喂含 450 $mg \cdot kg^{-1}$ LMS 的饲料 10 d 后立即测定鱼的 O_2^- 产量,结果比对照组显著下降,1 周后才恢复至正常水平。Li 等^[7]发现,以 600 $mg \cdot kg^{-1}$ 饲料的剂量口服 LMS 可使胡子鲇的免疫机能受到抑制。本试验结果表明,按 100、200 和 300 $mg \cdot kg^{-1}$ 干饲料的剂量对中华绒螯蟹投喂 LMS,均能增强蟹的免疫功能和抗病力。但是,300 $mg \cdot kg^{-1}$ 组的免疫增强效果与 200 $mg \cdot kg^{-1}$ 组相比略有下降。这似乎意味着投喂超过 300 $mg \cdot kg^{-1}$ 干饲料剂量的 LMS 会降低其对蟹免疫功能的激活作用甚至抑制蟹的免疫功能。尽管在本试验条件下,200 $mg \cdot kg^{-1}$ 干饲料的剂量是促进中华绒螯蟹免疫功能的最适添加剂量,但有关中华绒螯蟹饲料中 LMS 的适宜添加剂量仍需进一步研究。

3.5 LMS 对中华绒螯蟹免疫功能的调节机理

已有研究表明,LMS 主要通过以下三条途径进行免疫调节^[20]:(1)通过咪唑环影响环化核苷酸磷酸二酯酶,使 cAMP 的破坏增加,cGMP 的破坏减少,从而增强依赖 cGMP 的各种细胞的活性;(2)LMS 中含硫的第三环具有类似于促胸腺生成素样的作用,可诱导免疫细胞的成熟与增殖;(3)LMS 的代谢产物 2-氧-3-(2-巯基乙基)-5-苯丙硫咪唑啉(OMPI)是一个巯基化合物,可与活性细胞内的氧化产物结合,使自由基得以清除,从而起到保护细胞的作用。本试验发现,LMS 能使

蟹的 THC 增加,这有可能是 LMS 中含硫的第三环诱导蟹血细胞增殖所致。至于 LMS 对蟹血细胞吞噬功能、血清 PO 与 LSZ 活性的增强作用,则有可能是由 LMS 的咪唑环和 LMS 的代谢产物 OMPI 的作用诱导的。是否如此,有待深入研究。

参考文献:

- [1] Renoux G. The general immunopharmacology of levamisole[J]. *Drugs*, 1980, 19: 89-99.
- [2] Mulero V, Esteban M A, Muñoz J, et al. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream, *Sparus aurata* L [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1998, 8: 49-62.
- [3] Sahoo P K, Mukherjee S C. Dietary intake of levamisole improves non-specific immunity and disease resistance of healthy and aflatoxin induced immunocompromised rohu, *Labeo rohita* [J]. *J Appl Aquaculture*, 2001, 11: 15-25.
- [4] Leaño E M, Guo J J, Chang S L, et al. Levamisole enhances non-specific immune response of cobia, *Rachycentron canadum*, fingerlings [J]. *J Fish Soc Taiwan*, 2003, 30: 321-330.
- [5] Gopalakannan A, Arul V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds [J]. *Aquaculture*, 2006, 255: 179-187.
- [6] Kumari J, Sahoo P K. Dietary levamisole modulates the immune response and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus) [J]. *Aquaculture Research*, 2006, 37: 500-509.
- [7] Li G F, Guo Y G, Zhao D H, et al. Effects of levamisole on the immune response and disease resistance of *Clarias fuscus* [J]. *Aquaculture*, 2006, 253: 212-217.
- [8] Baruah N D, Prasad K P. Efficacy of levamisole as an immunostimulant in *Macrobrachium rosenbergii* (De man) [J]. *J Aquac Trop*, 2001, 16: 149-158.
- [9] 蔡武城,李碧羽,李玉民.生物化学实验技术教程[M].上海:复旦大学出版社,1983:47.
- [10] 朱忠勇.实用医学检验学[M].北京:人民军医出版社,1997,795-805.
- [11] Song Y L, Hsieh Y T. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species [J]. *Dev Comp Immunol*, 1994, 18: 201-209.
- [12] Ashida M. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Archs Biochem Biophys*, 1971, 144: 749-762.
- [13] Hultmark D, Seiner H. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* [J]. *Eur J Biochem*, 1980, 106: 7-16.
- [14] Le Moullac G, Soyeux C, Saulnier D, et al. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1998, 8: 621-629.
- [15] Hose J E, Martin G G, Tiu S, et al. Patterns of haemocyte production and release throughout the moult cycle in the penaeid shrimp *Sycionia ingentis* [J]. *Biol Bull*, 1992, 183: 185-199.
- [16] Bachère E, Miahle E, Rodriguez J. Identification of defence effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and application [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1995, 5: 597-612.
- [17] Siwicki A K. Immunomodulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Dev Comp Immunol*, 1989, 13: 87-91.
- [18] 郭云贵.左旋咪唑对胡子鲶生长和免疫机能影响的研究[D].华南农业大学硕士学位论文,2004.
- [19] Cheng W, Liu C H, Kuo C H, et al. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2005, 18: 1-12.
- [20] 张罗修.免疫药物研究与临床应用[M].上海:上海医科大学出版社,1998:15-17.