

裙带菜和萱藻凝集素对刺参组织主要免疫酶活性的影响

李丹彤^{1,2*}, 谢广成^{1,2}, 李洪福^{1,2}, 邢殿楼^{1,2},
王斌^{1,2}, 刘远³, 姜峰^{1,2}, 胡昕江^{1,2}

(1. 大连海洋大学农业部海洋水产增养殖学重点开放实验室, 辽宁 大连 116023;

2. 大连海洋大学辽宁省海洋生物资源与生物修复重点实验室, 辽宁 大连 116023;

3. 大连海洋大学海洋环境与工程学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: 研究刺参基础饲料中添加不同剂量裙带菜凝集素和萱藻凝集素对刺参酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、溶菌酶(LSZ)、过氧化氢酶(CAT)活性的影响。在基础饲料中分别添加0.58%、1.16%、2.32%裙带菜凝集素(质量分数);0.32%、0.64%、1.28%萱藻凝集素,以基础饲料饲组为对照,于投喂后第4、8、13、17天检测ACP、AKP、LSZ、CAT活性。结果显示,投喂17d内,各实验组ACP活性随时间和剂量增加持续升高,ACP活性均高于对照组;LSZ活性则随时间延长持续升高,但萱藻凝集素各组活性在第17天有所下降,且LSZ活性与凝集素添加量成正比关系;裙带菜凝集素组CAT活性呈升高趋势,萱藻凝集素组呈先高后低规律变化。

关键词: 刺参;裙带菜凝集素;萱藻凝集素;免疫酶

中图分类号: S 942.1

文献标识码: A

刺参(*Apostichopus japonicus*)具有较高的经济价值和营养保健价值^[1-3],已成为中国水产养殖业主要养殖的海珍品。然而,随着养殖规模的不断扩大,细菌性与病毒性刺参疾病大面积爆发,给刺参养殖业带来严重损失^[4-6]。如果盲目使用抗生素类药物,会给动物自身、动物产品及环境带来一系列问题,如细菌耐药性,药物残留和环境污染等。因此,国家对这类药物的使用已作了严格限制^[7]。海藻凝集素具有细胞凝集、激活淋巴细胞、抑制血小板凝集和抗菌作用^[8],可以提高养殖动物的免疫功能和机体防御能力,从而减少疾病发生,达到防病治病的目的,同时具有不产生抗药性及环保的优点,有望成为抗生素的替代产品^[9]。

近年来越来越多的研究表明,凝集素作为新型绿色水产动物免疫增强剂,能够提高水产动物免疫相关酶的活性,提高机体免疫功能。用裙带

菜(*Undaria pinnatifida*)凝集素分别注射日本对虾(*Penaeus japonicus*)、鲫(*Carassius auratus*),可以明显提高日本对虾、鲫血清中凝集活性及免疫酶活性^[10-11]。条斑紫菜(*Porphyra Yezoensis Ueda*)、裙带菜(*Undaria pinnatifida*)及孔石莼(*Ulva pertusa*)凝集素可以作为一种免疫添加剂激活鲤(*Cyprinus carpio*)、鲫的免疫系统,对鲤、鲫的非特异性免疫功能具有明显的增强作用^[12-13]。关于刺参免疫增强剂的研究为数不多^[14-16],将海藻凝集素作为免疫增强剂投喂刺参,并探讨其对刺参免疫相关酶活性影响的研究鲜有报道。

本研究采用裙带菜和萱藻两种海藻凝集素,研究投喂不同剂量对刺参组织酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、溶菌酶(LSZ)、过氧化氢酶(CAT)活性的影响;旨在探讨裙带菜凝集素、萱藻凝集素与刺参非特异性免疫之间的关系,

收稿日期:2010-12-15 修回日期:2011-01-22

资助项目:辽宁省教育厅团队项目(2008T021)

通讯作者:李丹彤, Tel:0411-84762887, E-mail: lidantong@dlou.edu.cn

为刺参疾病防治寻找新路。

1 材料与方

1.1 材料

健康刺参购自大连皮口养殖场,体长(3.95 ± 0.78) cm,体重(3.30 ± 1.78) g。将刺参饲养于 30 L 水槽中,水温(14 ± 2) °C,pH(8.0 ± 0.2),海水盐度为(33 ± 0.4),每箱饲养 20 头,共 14 箱,日投喂 1 次(9:00)稚参饲料并换水 30% ~ 40%。暂养 7 d 后用于实验。

新鲜的裙带菜、萱藻从大连黑石礁市场购买,裙带菜长 1 m 左右,萱藻长 30 cm 左右。

1.2 方法

凝集素提取 裙带菜和萱藻凝集素提取参考文献[12]的方法:将购买的海藻立即用过滤海水洗净,用纱布及滤纸吸去水分,放入 -20 °C 冰箱冻干,然后置于电热鼓风干燥机中烘干(40 ~ 45 °C)。将烘干的裙带菜、萱藻用超速捣碎机研磨成粉末,放入自封袋内保存。将干粉用 0.15 mol/L NaCl 的 PBS(0.015 mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 ,pH 7.2) 缓冲液以 1:16 (W/V) 4 °C 浸泡 16 h,间歇搅拌,将混合液放入离心管中,4 °C,4 000 r/min 离心 30 min,取上清液即为粗提液。

蛋白含量的测定 参考文献[17]的方法,以 $A_{280\text{nm}}$ 表示,以牛血清白蛋白作对照。

凝集活性的测定 实验用兔血,购于大连医科大学,用生理盐水将其配制成 2% 的红细胞悬液。血凝活性测定在 96 孔 V 形血凝板上,用 40 μL 凝集素溶液与等量生理盐水倍比稀释后,加入体积分数为 2% 的红细胞悬液 40 μL ,振匀。室温放置 2 h 后用肉眼观察,无凝集现象时红细胞沉积在 V 型孔底部呈大红点状,有凝集现象时呈网状不下沉,血凝活性以能产生凝集现象的凝集素最大稀释倍数表示。

实验设计 实验分 7 个组,每组 40 头。分别为对照组投喂基础饲料;0.58% (W/W) 裙带菜凝集素组、1.16% 裙带菜凝集素组和 2.32% 裙带菜凝集素组;0.32% 萱藻凝集素组、0.64% 萱藻凝集素组和 1.28% 萱藻凝集素组。投喂期间仍每天按时换水并测量温度、盐度、pH 等各项水质指标,定时观察刺参生长及健康状况。分别于投喂后第 4、8、13 和 17 天测定刺参组织各项免疫指标。

样品制备 每次从各组取刺参 10 只,测量体长,用无菌剪刀从刺参肛门沿腹部剪开。用滤纸吸干体腔液,然后称体质量。按 1:3 的比例加入生理盐水 (W/V),用匀浆器研磨,离心(12 000 r/min,4 °C,30 min),取上清,4 °C 保存备用,每头刺参都单独测定免疫酶活性。

免疫酶活性的测定 ACP 活力测定采用磷酸苯二钠法^[18],酶活力定义为样品在 37 °C 与底物作用 60 min,产生 1 mg 酚为 1 U。

AKP 活力测定 采用磷酸苯二钠法^[18],酶活力定义为:样品在 37 °C 与底物作用 15 min,产生 1 mg 酚为 1 U。

LSZ 活性的测定 参照王雷等^[19]的方法进行,用 0.1 mol/L 的磷酸钾盐缓冲液 (pH 6.4) 配成底物(溶壁微球菌)悬液($A_{570\text{nm}} = 0.3$)。取 3 mL 该悬液于试管内置冰浴中 10 min 之后加入 50 μL 待测液,混合,570 nm 测 A_0 值,再将试液于 37 °C 水浴 30 min,之后冰浴 10 min 中止反应,测反应后的试液在 570 nm 波长处的光密度值 A 。溶菌活力计算公式: $U_L = (A_0 - A)/A_0$

CAT 的活性测定 按照桂远明法^[18]测定。CAT 活力单位定义为每分钟分解 1 μmol 的 H_2O_2 为 1 个酶活力单位(U)。

1.3 数据处理

实验数据采用 SPSS 13.0 进行 t 检验,实验结果以平均值 \pm 标准差表示,以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 凝集素的粗提

采用 40 ~ 45 °C 烘干的方法,从裙带菜及萱藻中分离出裙带菜和萱藻凝集素,裙带菜凝集素比活力是萱藻凝集素的 2.23 倍(表 1)。

表 1 凝集素的分离测定结果
Tab. 1 Results of determination for isolation of lectin

凝集素的来源 source of lectin	蛋白浓度 (mg/mL) concentration of protein	凝集活力 (U/ μg) agglutination activity	比活力 (U/mg) specific activity
裙带菜 <i>U. pinnatifida</i>	11.660 4	14.575 5	68.61
萱藻 <i>S. lomentarius</i>	6.482 9	32.414 5	30.85

2.2 海藻凝集素对刺参组织 ACP 活性的影响

投喂含裙带菜凝集素幼参饲料 17 d 内, ACP 活性均随剂量的增加呈现升高趋势, 且随时间的延长而增加。经统计分析, 0.58% 组和 2.32% 组在第 17 天活性达到最大值, 是对照组的 1.22 倍和 1.19 倍 ($P < 0.05$), 第 8、13 天, 1.16% 和 2.32% 浓度组与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$), 但是仍高于对照组 (图 1)。投喂含有萱藻凝集素的饲料后, ACP 活性均随剂量的增加呈现升高趋势, 且随时间的延长而增加。经统计分析, 0.64% 组和 1.28% 组在第 17 天活性达到最大值, 是对照组的 1.54 倍和 1.48 倍 ($P < 0.01$), 1.28% 在第 13 天与对照组有显著性差异 ($P < 0.05$), 其它各组与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 2)。

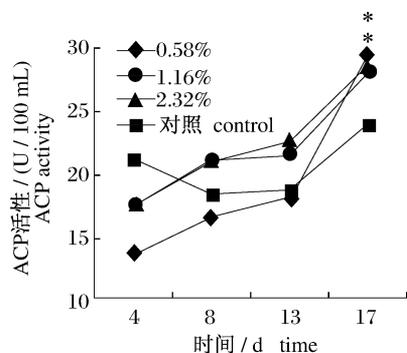


图 1 裙带菜凝集素对刺参 ACP 活性的影响

Fig. 1 Effects of *U. pinnatifida* lectin on ACP activity of *A. japonicus*

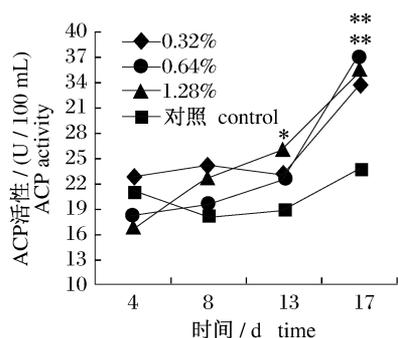


图 2 萱藻凝集素对刺参 ACP 活性的影响

Fig. 2 Effects of *S. lomentarius* lectin on ACP activity of *A. japonicus*

2.3 海藻凝集素对刺参 AKP 活性的影响

投喂含裙带菜凝集素幼参饲料后, 0.58% 组所得的碱性磷酸酶活性都是低于对照组。1.16%

组只有在第 4 天和第 17 天所得的酶活值高于对照组, 并且在第 4 天其酶活性达到最高值, 是对照组的 1.18 倍 ($P < 0.05$)。2.32% 组只有在第 13 天酶活高于对照组, 并在此天达到酶活性的最高值, 与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 3)。投喂萱藻凝集素后, 除 0.32% 第 8 天和 1.28% 的第 17 天以外, 其他各组 AKP 在任何时间都比对照组 AKP 低, 并且 AKP 无明显规律变化。0.32% 萱藻凝集素组在第 8 天, AKP 活性值是对照组的 1.26 倍 ($P < 0.01$) (图 4)。

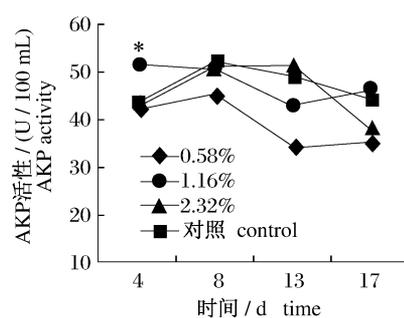


图 3 裙带菜凝集素对刺参 AKP 活性的影响

Fig. 3 Effects of *U. pinnatifida* lectin on AKP activity of *A. japonicus*

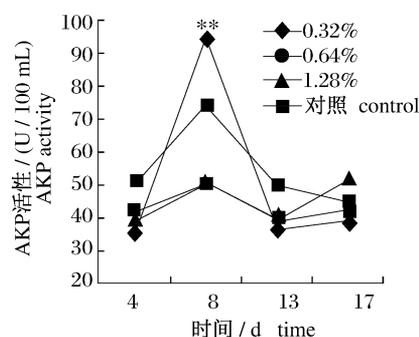


图 4 萱藻凝集素对刺参 AKP 活性的影响

Fig. 4 Effects of *S. lomentarius* lectin on AKP activity of *A. japonicus*

2.4 海藻凝集素对刺参 LSZ 活性的影响

投喂含裙带菜凝集素幼参饲料后, LSZ 活性随时间和剂量的增加, 呈现逐渐升高趋势。1.16% 组在第 8 天活性达到最大值, 是对照组的 1.28 倍 ($P < 0.05$)。3 个浓度组在 4、8、13、17 d 虽与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$), 但是仍高于对照组 (图 5)。在投喂萱藻凝集后的第 4、8、13 天后 LYS 活性均呈现升高趋势。第 17 天 4 个组的 LSZ 活性均下降, 但 1.28% 组是对照组的 1.32

倍($P < 0.05$),其它各组虽与对照组无显著性差异($P > 0.05$),但是仍高于对照组(图6)。

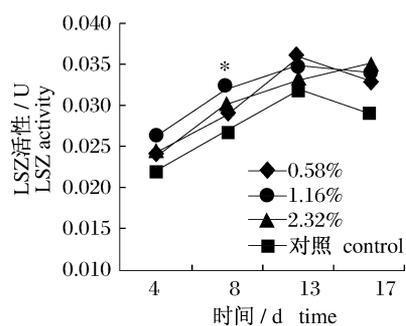


图5 裙带菜凝集素对刺参 LSZ 活性的影响

Fig. 5 Effects of *U. pinnatifida* lectin on LSZ activity of *A. japonicus*

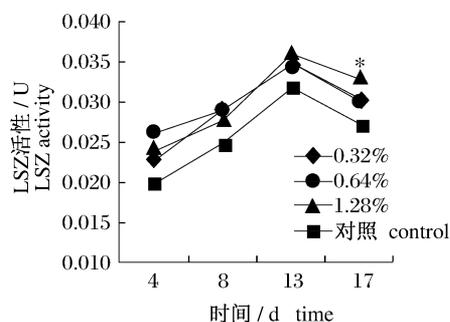


图6 萱藻凝集素对刺参 LSZ 活性的影响

Fig. 6 Effects of *S. lomentarius* lectin on LSZ activity of *A. japonicus*

2.5 海藻凝集素对刺参 CAT 活性的影响

投喂含裙带菜凝集素幼参饲料后,3个浓度组在第4天,CAT活性均小于对照组,自第8天起,CAT活性均高于对照组,2.32%组在第13天,CAT活性是对照组的1.22倍($P < 0.05$),其它各组与对照组无显著性差异($P > 0.05$),但是仍高于对照组(图7)。在17d内,投喂含有

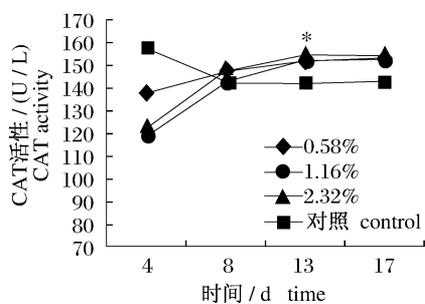


图7 裙带菜凝集素对刺参 CAT 活性的影响

Fig. 7 Effects of *U. pinnatifida* lectin on CAT activity of *A. japonicus*

0.32%、0.64%、1.28%浓度的萱藻凝集素饲料对刺参CAT活力与对照组比较均有提高。1.28%组在第13天活性最大,是对照组的1.14倍($P < 0.05$),其它各组与对照组无显著性差异($P > 0.05$),但是仍高于对照组(图8)。

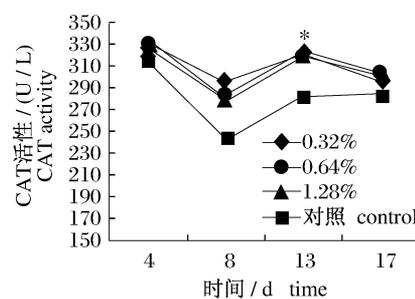


图8 萱藻凝集素对刺参 CAT 活性的影响

Fig. 8 Effects of *S. lomentarius* lectin on CAT activity of *A. japonicus*

3 讨论

3.1 刺参免疫增强剂的研究进展

目前国内外对刺参免疫增强剂的研究较少,国内的研究多集中在糖及中草药等方面。人们研究了海藻硫酸多糖、壳聚糖^[14];茯苓多糖^[15];褐藻寡糖^[16]对刺参组织、体腔液免疫酶活性的影响。黄芪多糖^[20]、甘草酸^[21]对刺参生长、免疫力的影响,中草药^[22]免疫增强剂在刺参养殖中的应用。凝集素作为一种非特异识别因子,识别自身和异己成分,包括外来入侵的病原菌,并可通过凝集、包围、调理、促进吞噬等方式将其排出体外;还具有抑制肿瘤细胞增殖,激活淋巴细胞等多种生物活性。凝集素作为免疫增强剂有很大的发展前景。

3.2 刺参的免疫防御与凝集素的关系

刺参属于无脊椎动物,缺少脊椎动物所具有的获得性免疫,因此刺参的免疫系统是非特异性的。而刺参非特异性免疫防御系统包括体壁防御和体内免疫^[20,23]。体内免疫分为细胞免疫和体液免疫,由于刺参缺少特异性免疫组织和器官,所以体腔液中的体腔细胞担负着细胞免疫和体液免疫作用^[22]。对于侵入刺参体腔液的外源异物的有效清除,同时在刺参的体壁防御和体内免疫中,ACP、AKP、LSZ和CAT都发挥着重要生理作用^[20]。

3.3 两种海藻凝集素对刺参组织主要免疫酶活性的影响

裙带菜、萱藻都属于褐藻门、褐藻纲植物,两

种海藻凝集素对刺参上述4种酶研究结果表明,裙带菜凝集素和萱藻凝集素能显著提高ACP、AKP、LSZ和CAT的活性,且最高酶活的最佳凝集素浓度和诱导时间不同。说明海藻凝集素能作为一种天然的免疫增强剂,对刺参机体具有显著的免疫诱导作用。李丹彤等^[10]用每尾2.3 mg的剂量对日本对虾(*Penaeus japonicus*)注射裙带菜凝集素,定时抽血取样,结果表明,注射裙带菜凝集素的日本对虾血清中的凝集活性、酚氧化酶活性、超氧化物歧化酶活性、碱性磷酸酶活性和溶菌酶活性在24~120 h内均高于对照组。张静等^[11]以裙带菜凝集素为免疫诱导剂,对鲫进行诱导免疫,结果显示,注射凝集素7 d和9 d时溶菌酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性均比对照组高。李丹彤等^[13]进行了孔石莼和条斑紫菜凝集素对鲫的免疫活性物诱导实验,结果表明孔石莼和条斑紫菜凝集素均能较好的增强鲫免疫功能。GOPALAKANNAN等^[23]研究证实,将壳聚糖作为饲料添加剂投喂鲤90 d后,鲤溶菌酶活性比对照组显著升高($P < 0.05$)。牟海津等^[24]研究证实栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)经口服海藻多糖免疫增强剂后,血清中SOD活性亦显著升高。江晓路等^[16]研究了褐藻寡糖对刺参体腔液和体壁免疫相关酶活性变化的影响,结果表明,褐藻寡糖能提高刺参体腔液和体壁中POD、ACP、AKP和LSZ活性,显著增强了刺参非特异性免疫水平。

本研究结果表明,裙带菜凝集素和萱藻凝集素能提高刺参体内免疫相关酶的活性,表明裙带菜凝集素和萱藻凝集素对刺参体内免疫相关酶有诱导作用,这与李丹彤等^[12]将条斑紫菜和裙带菜凝集素作为免疫增强剂对鲫进行诱导免疫所得结论相同。

本研究结果表明,裙带菜凝集素和萱藻凝集素作为天然免疫诱导剂,能对刺参体内氧化酶和水解酶系统产生积极的调理作用,使其非特异性免疫得到改善与提高。2.32% (质量百分比)裙带菜凝集素组和1.28%萱藻凝集素组在各项免疫指标中表现较好,建议其分别为裙带菜凝集素和萱藻凝集素的适宜添加剂量。

参考文献:

[1] 樊绘曾. 海参:海中人参——关于海参及其成分保健医疗功能的研究与开发[J]. 中国海洋药物, 2001(4):37-44.

[2] MOON J H, RYU H S, YANG H S, *et al.* Antimutagenic and anticancer effect of glycoprotein and chondroitin sulfates from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. The Korean Society of Food Science and Nutrition, 1998, 27 (2): 350-358.

[3] 沈鸣. 海参的化学成分和药理研究进展[J]. 中成药, 2001, 23(10):758-761.

[4] 王印庚, 荣小军, 张春运, 等. 养殖海参主要疾病与防治技术[J]. 海洋科学, 2005, 29(3):1-7.

[5] 王印庚, 方波, 张春云, 等. 养殖刺参保苗期重大疾病“腐皮综合征”病原及其感染源分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(4):610-616.

[6] 张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定[J]. 水产学报, 2006, 30(1):118-123.

[7] 中华人民共和国农业行业标准. NY 5070-2002. 无公害食品水产品中渔药残留限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002:361-369.

[8] 胡新平, 李智恩, 徐祖洪. 海藻凝集素研究进展[J]. 海洋科学, 2000, 24(8):34-37.

[9] 熊川男, 李伟, 白雪芳, 等. 凝集素作为海参免疫增强剂在人工养殖海参中的应用[J]. 饲料工业, 2005(18):30-32.

[10] 李丹彤, 张静, 陈国栋, 等. 裙带菜凝集素对日本对虾非特异性免疫因子的影响[J]. 大连水产学院学报, 2009, 24(3):274-278.

[11] 张静, 李丹彤, 范庆华, 等. 裙带菜凝集素对鲫的免疫诱导[J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(2):193-195.

[12] 李丹彤, 袁美云, 林春江, 等. 不同海藻凝集素对鲤免疫活性物的诱导[J]. 辽宁师范大学学报:自然科学版, 2006, 29(3):348-351.

[13] 李丹彤, 吕景才, 邢殿楼, 等. 孔石莼和条斑紫菜凝集素对鲫鱼免疫活性物的诱导作用[J]. 信阳师范学院:自然科学版, 2007, 20(3):309-312.

[14] 刘云, 孔伟丽, 姜国良, 等. 2种免疫多糖对刺参组织主要免疫酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2008, 15(5):787-793.

[15] 王淑娟, 李天保, 樊英, 等. 茯苓多糖对刺参体腔液中免疫因子活性的影响[J]. 饲料研究, 2010, 1:59-61.

[16] 江晓路, 杜以帅, 王鹏, 等. 褐藻寡糖对刺参体腔液和体壁免疫相关酶活性变化的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(6):1188-1192.

[17] 北京大学生物系生物化学教研室编. 生物化学实验指导[M]. 北京:人民教育出版社, 1980:94-96.

[18] 桂远明, 吴垠, 李丹彤, 等. 水产动物机能学实验

- [M]. 北京:中国农业出版社,2004:124-134.
- [19] 王雷,李光友,毛远兴,等. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J]. 海洋与湖沼, 1994,25(5):481-486.
- [20] 孙永欣. 黄芪多糖促进刺参免疫力和生长性能的研究[D]. 大连:大连理工大学,2008.
- [21] 陈效儒,张文兵,麦康森,等. 饲料中添加甘草酸对刺参生长、免疫及抗病力的影响[J]. 水生生物学报,2010,34(4):731-738.
- [22] 孟庆大,杨海燕,付本懂,等. 中草药免疫增强剂在刺参养殖中的应用研究[J]. 中兽医医药杂志, 2008,27(2):38-39.
- [23] 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.
- [24] 牟海津,江晓路,刘树青,等. 免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 青岛海洋大学学报,1999,29(3): 463-468.

Effects of two lectins from *Undaria pinnatifida* and *Scytosiphon lomentarius* on the activities of immunoenzymes in *Apostichopus japonicus*

LI Dan-tong^{1,2*}, XIE Guang-cheng^{1,2}, LI Hong-fu^{1,2}, XING Dian-lou^{1,2},
WANG Bin^{1,2}, LIU Yuan³, JIANG Feng^{1,2}, HU Xin-jiang^{1,2}

(1. Key Laboratory of Mariculture and Biotechnology Certificated by Ministry of Agriculture,
Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Laboratory of Marine Bio-resource Restoration and Habitat Reparation in Liaoning Province,
Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

3. College of Marine Environment and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract: The effects of two lectins from *Undaria pinnatifida* and *Scytosiphon lomentarius* on the activities of acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), lysozyme (LSZ) and catalase (CAT) of *A. japonicus* were studied by supplying various *Undaria pinnatifida* lectin or *S. lomentarius* lectin levels in diets. The experimental dietary levels of *U. pinnatifida* lectin were 0.58% (*m/m*), 1.16% and 2.32%, and those of *S. lomentarius* lectin were 0.32%, 0.64% and 1.28%, respectively. Group fed with basic feed was set as control. On the 4th, 8th, 13th and 17th day after feeding, the activities of ACP, AKP, LSZ and CAT in *A. japonicus* were determined. The results indicated that the activity of ACP sustainably increased and was higher than the control among 17 days. The activities of LSZ increased firstly after lectins feeding except *S. lomentarius* lectin on 17th day, which decreased on this day, and the activities of LSZ were proportionally related to the additional dosage of two kinds of lectins. The CAT activity of *U. pinnatifida* lectin groups increased as the time went on, however CAT activity, firstly increased and then decreased in *S. lomentarius* lectin groups.

Key words: *Apostichopus japonicus*; *Undaria pinnatifida* lectin; *Scytosiphon lomentarius* lectin; immunoenzymes

Corresponding author: LI Dan-tong. E-mail: lidantong@dlou.edu.cn