

甘草次酸对斑点叉尾鲷免疫应激下 血浆抗氧化酶和免疫指标的影响

蒋广震, 周嫚, 李向飞, 张定东, 刘文斌*

(南京农业大学动物科技学院, 江苏省水产动物营养重点实验室, 江苏南京 210095)

摘要: 为探讨斑点叉尾鲷免疫应激状态下血浆抗氧化酶和免疫指标的变化, 并研究甘草次酸对斑点叉尾鲷免疫应激的调控机制, 实验设计两组, 每组6个重复: 1)对照组, 饲喂基础饲料; 2)GA组, 饲喂含0.15 g/kg甘草次酸饲料, 养殖8周后, 腹腔注射大肠杆菌脂多糖(LPS), 分别在注射后0、3、6、12、24、48 h采集血液和肝脏组织, 进行红细胞、白细胞计数, 分离血浆后检测血浆皮质醇、溶菌酶、ACH50、谷草转氨酶、谷丙转氨酶、碱性磷酸酶活性, 肝脏匀浆液检测SOD、MDA和CAT抗氧化酶活性。结果显示, 在腹腔注射LPS后, 血浆溶菌酶、皮质醇、谷草转氨酶、谷丙转氨酶、ACH50、SOD均呈现先升高后下降的趋势, 白细胞计数、血浆CAT呈现先下降后升高的趋势; 饲料中添加0.15 g/kg甘草次酸显著抑制了各指标变化, 缩短了由LPS诱导产生各指标变化的恢复时间。研究表明, 腹腔注射LPS使斑点叉尾鲷产生免疫应激, 并在注射后6~12 h达到顶峰; 饲料中添加0.15 g/kg甘草次酸可以有效抑制由LPS诱导的免疫应激反应。

关键词: 斑点叉尾鲷; 甘草次酸; 脂多糖; 免疫应激; 抗氧化酶活性

中图分类号: S 963.7

文献标志码: A

抗生素因其促生长、提高免疫力、抗炎等特性而被用于水产动物饲料, 但因其在水产动物体内易残留、导致抗药性等问题而被禁用^[1]。近年来, 中草药及其提取物被认为具有替代抗生素的潜力而被广泛研究^[2]。关于中草药及其提取物在鱼虾免疫上的研究很多, 主要有提高生长、促进采食、增强抗菌力、增加抗应激能力等方面^[3]。然而已有的研究多针对某种特定的病原微生物进行, 关于中草药提取物对鱼体免疫应激的影响报道较少。本实验室前期对甘草的主要活性成分甘草次酸进行了一系列研究, 发现其在调节斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)脂肪调控、改善可食部分比例等方面有明显的效果^[4]。有研究发现, 甘草及其提取物能够增强鱼虾免疫力, 改善其生长^[5-6]。随着研究的深入, 研究甘草次酸对鱼虾免疫调节机制, 对抗生素替代物

的开发具有重要意义。

脂多糖(LPS)是从大肠杆菌细胞膜分离纯化得到的一种革兰氏阴性菌抗原, 一般认为, LPS能够引起动物体免疫应激^[7]。在水产动物上的研究发现, 鱼类对LPS的耐受性较强, 鲤(*Cyprinus carpio*)不易出现皮质醇上升等典型的应激反应, 然而, 腹腔注射LPS仍能诱导鲤^[8]、斑点叉尾鲷^[9-10]等TNF- α 表达, 产生免疫炎症反应。本实验室前期已对斑点叉尾鲷饲料脂肪节约蛋白进行研究, 确定了斑点叉尾鲷饲料中适宜的蛋白和脂肪比例^[11], 并评价了高脂饲料在斑点叉尾鲷上的应用^[12]。本实验以斑点叉尾鲷为研究对象, 研究其在腹腔注射LPS后血液中免疫、抗氧化指标的变化, 并探讨甘草次酸对其的调控作用, 为鱼类免疫应激研究提供基础数据, 并为抗生素替代物的开发提供参考。

收稿日期: 2016-04-09 修回日期: 2016-07-18

资助项目: 江苏省农业科技自主创新项目(CX(15)1013-04); 江苏省基础研究计划(自然科学基金)(BK20130687)

通信作者: 刘文斌, E-mail: wbliu@njau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验鱼、饲料和甘草次酸

实验用斑点叉尾鲷鱼苗购自江苏斑点叉尾鲷繁殖育种中心(江苏省淡水水产研究所,南京,中国)。实验鱼购回后在流水养殖系统中进行适应养殖,适应养殖期间饲料从商品饲料逐渐替代为对照组饲料。暂养15 d,选取身体健康、体质量相似的实验鱼120尾[平均体质量(159.0±5.0)g],平均分到12个水族箱中,每箱10尾。每个养殖水箱保持1.5 m³水体,流水养殖,平均每3天能够换水一次。将养殖水箱随机分成两组,每组6个重复,1)对照组:饲喂基础饲料,包含5%鱼粉,30%豆粕,13.76%菜粕,14.21%棉粕,16.14%次粉,13.78%麸皮,4.31%混合油脂(鱼油:玉米油=1:1),1.8%磷酸二氢钙和1%预混料,营养成分粗蛋白质含量30.0%,粗脂肪6.0%^[11]。2)GA组:基础饲料+150 mg/kg甘草次酸(甘草次酸购自南京泽朗医药科技有限公司)。实验饲料在实验室经粉碎、逐级混合、制粒成2.5 mm左右的沉性颗粒,颗粒饲料风干后在-20 °C冰箱中保存备用。

1.2 养殖管理和样品采集

在养殖过程每天投喂3次(7:00, 11:00, 16:30),养殖期24 h充氧,保证水体溶解氧大于6 mg/L,每天检测水质指标,养殖期间水温(28.0±3.0)°C, pH 7.2~7.8。

养殖8周后,停饲24 h,实验鱼腹腔注射LPS (2.0 mg/kg; *Escherichia coli* O127:B8; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA),分别在注射后0、3、6、12、24和48 h尾静脉采血,在注射和采血前,使用含有100 mg/L的MS-222(tricaine methanesulfonate, Sigma, USA)进行麻醉,减少采样引起的应激。每个养殖水箱每个采样时间采集1尾鱼,取肝脏,保存于冻存管备用;血液使用肝素处理过的注射器和离心管,每尾3 mL,分装成1和2 mL两管,1 mL用于血细胞计数,2 mL离心分离血浆(2000×g, 4 °C, 离心10 min),分离的血浆4 °C保存待测血浆指标。

1.3 指标测定

红、白细胞计数采用血细胞计数板进行;皮质醇测定采用放射免疫法;溶菌酶、谷草/谷

丙转氨酶,肝脏中抗氧化酶CAT、SOD、MDA采用南京建成生物技术有限公司试剂盒测定。ACH50采用未致敏的绵羊红细胞法测定。

1.4 数据统计与分析

数据经Excel 2010处理后,用SPSS 19.0软件进行重复测量方差分析(repeated measures ANOVA);当差异显著时,使用单因素方差分析(不同采样时间)和 t -检验(不同饲料处理),并用Duncan氏多重比较法进行差异显著性分析,显著水平为 $P<0.05$ 。所有数据使用Excel 2010做柱状图。

2 结果

2.1 甘草次酸对血浆皮质醇、溶菌酶和ACH50的影响

经过8周养殖后,各组均未见实验鱼死亡。腹腔注射LPS后,血浆皮质醇呈现先升高后降低的趋势,在腹腔注射LPS 6 h后,实验组和对照组血浆皮质醇含量均显著高于其他时间($P<0.05$),实验组和对照组之间差异不显著($P>0.05$),其他各时间点血浆皮质醇含量没有显著差异($P>0.05$) (图1-a)。对照组和实验组血浆溶菌酶含量随注射LPS时间延长呈现先升高后降低的趋势,但差异不显著($P>0.05$),实验组48 h后血浆溶菌酶活性恢复到注射前水平,而对照组仍处于较高水平;在注射前实验组溶菌酶活性显著高于对照组($P<0.05$) (图1-b)。与溶菌酶相似,血浆鱼总补体ACH50含量也呈现先升高后降低的趋势,注射后24 h对照组血浆ACH50水平恢复到注射前水平;注射后6 h对照组和GA组血浆ACH50水平均达到最高值($P<0.05$),且GA组ACH50含量显著高于对照组($P<0.05$);GA组ACH50水平在注射后48 h仍保持较高水平,且显著高于对照组($P<0.05$) (图1-c)。

2.2 甘草次酸对红细胞、白细胞数的影响

饲料添加甘草次酸,腹腔注射LPS对血液红细胞数量没有显著影响($P>0.05$)。血液中白细胞数量在腹腔注射LPS后呈现出先下降后升高的趋势($P<0.05$),并在注射后3、6 h达到最低值,饲料中添加甘草次酸能有效地抑制这种下降($P<0.05$)。注射48 h后,甘草次酸组较对照组白细胞数量恢复更快($P<0.05$) (图2)。

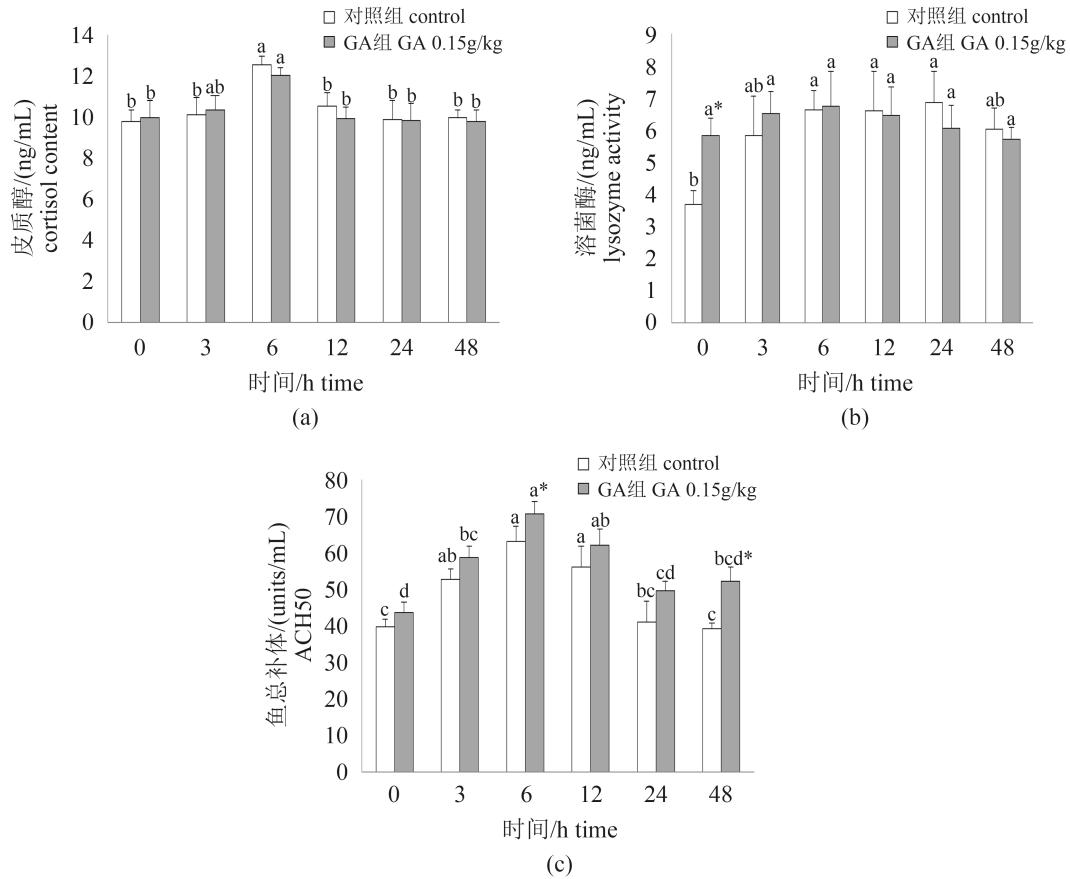


图 1 甘草次酸对斑点叉尾鲷血浆皮质醇(a)、溶菌酶(b)和鱼总补体(c)的影响

图中小写字母不同表示注射LPS后不同时间差异显著(P<0.05); 图中*表示饲喂不同饲料差异显著(P<0.05)。下同

Fig. 1 Effects of dietary GA levels on plasma cortisol (a), lysozyme (b) and ACH50 (c) of channel catfish

Data are expressed as means±SEM (n=6). Diverse low-case letters show significant differences (P < 0.05) in different dosage groups of each sampling point in Duncan's multiple range test. Significant differences (P < 0.05) between values obtained before and after infection are marked by asterisks in t-tests, the same below

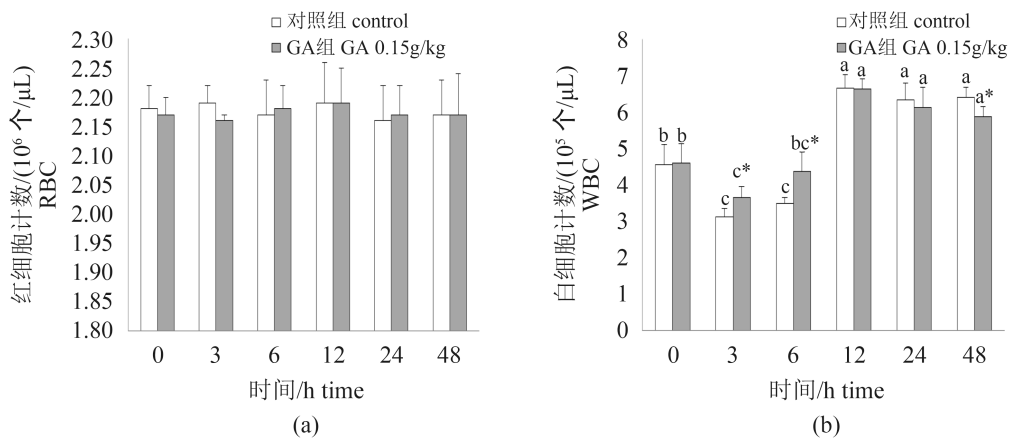


图 2 甘草次酸对斑点叉尾鲷血液红细胞计数(a)和白细胞计数(b)的影响

Fig. 2 Effects of dietary GA levels on RBC (a) and WBC (b) of channel catfish

2.3 甘草次酸对血浆谷草转氨酶、谷丙转氨酶和碱性磷酸酶的影响

在腹腔注射LPS后, 血浆谷草转氨酶和谷丙

转氨酶含量呈现先升高后下降的趋势(P<0.05), 并在3~6 h达到最高值, 在12 h以后逐渐下降, 并在24 h恢复到注射前水平(图3)。饲料中添加甘草次

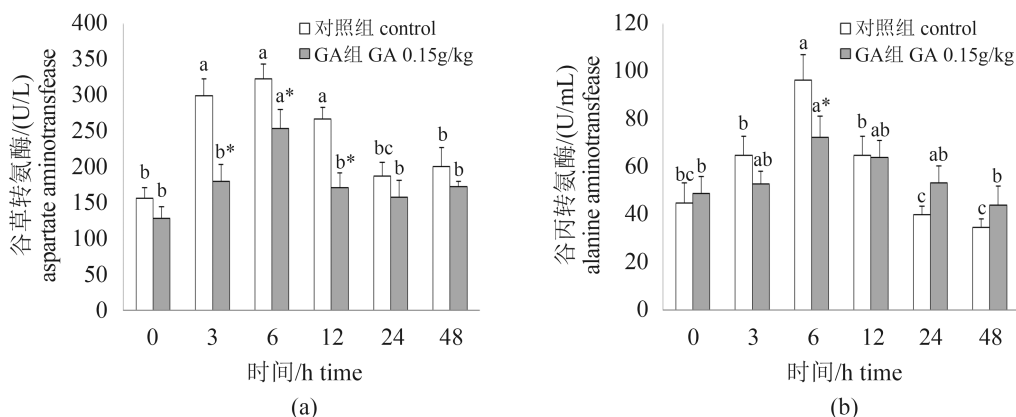


图3 甘草次酸对斑点叉尾鲷血浆谷草转氨酶(a)和谷丙转氨酶(b)的影响

Fig. 3 Effects of dietary GA levels on plasma AST (a) and ALT (b) of channel catfish

酸组血浆谷草和谷丙转氨酶在6 h达到峰值, 峰值显著低于对照组, 并在12 h时恢复到注射前水平, 甘草次酸能有效抑制由腹腔注射LPS引起的血浆谷草/谷丙含量的变化($P < 0.05$), 并使血浆谷草/谷丙含量在更短的时间内恢复到注射前水平。

2.4 甘草次酸对肝脏SOD、CAT和MDA的影响

注射LPS后, SOD活性呈现先增高后下降的趋势, 并在6 h达到峰值, 甘草次酸组SOD活性在注射前后各时间点均显著高于对照组($P < 0.05$), 对照组肝脏SOD活性在注射LPS后呈现先升高后下降的趋势($P < 0.05$)(图4-a)。注射LPS后, 肝脏CAT活性呈现先下降后升高的趋势($P < 0.05$), 甘草次酸组在注射LPS后3 h显著低于对照组($P < 0.05$)(图4-b), 24 h显著高于对照组($P < 0.05$)。饲料添加GA能够抑制LPS引起的CAT下降, 并缩短下降恢复时间。实验各组丙二醛含量在注射LPS后不同时间没有显著差异($P > 0.05$), 在注射LPS后24和48 h, 甘草次酸组丙二醛含量显著低于对照组($P < 0.05$)(图4-c)。

3 讨论

皮质醇是肾上腺皮质分泌的重要应激激素, 鱼体在环境变化(如温度、光线等)、密度改变、饲料变化、遭遇外敌等状态时血浆皮质醇分泌量大量增加^[13]。一般认为, 血浆皮质醇水平是应激发生的明显标志^[14]。因为鱼类对革兰氏阴性菌脂多糖(LPS)反应不明显或需要剂量大, 有研究表明, 腹腔注射LPS 3~8 h, 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)血浆皮质醇水平显著增加^[15], 但

也有研究认为, 注射LPS后, 血浆皮质醇水平上升不明显^[10]。本实验表明, 斑点叉尾鲷腹腔注射2.0 mg/(kg体质量)的LPS 6 h后, 血浆皮质醇含量显著增加, 并在12 h时达到正常水平。这可能揭示LPS诱导的血浆皮质醇上升时间短, 不易观察。能够引起鱼类免疫应激反应的LPS使用剂量远高于陆生动物, 但这一点还需要大量实验证实, 因为血浆皮质醇的变化可能与实验环境、采样应激水平、LPS使用剂量、实验鱼种类、实验鱼规格等多种因素有关。但总的来说, 腹腔注射2.0 mg/(kg体质量) LPS能够诱导斑点叉尾鲷血浆皮质醇水平在3~6 h显著升高, 说明在本实验条件下, LPS诱导产生了免疫应激反应, 并在3~6 h达到峰值。

血浆溶菌酶是一种广泛存在于动物体内, 非特异性的重要免疫酶, 不仅能水解病原菌黏多糖, 而且能与病毒结合, 参与鱼体内抗菌、抗炎和抗病毒过程。一般认为, 血浆溶菌酶水平代表鱼体非特异性免疫能力, 王文博等^[16]报道饲喂甘草粗提物能够显著提高鲫(*Carassius auratus*)血清中溶菌酶活性。LPS能够诱导鱼血浆溶菌酶活性上升^[17], 而血浆溶菌酶活性的上升能够有效降低LPS对鱼体的毒性^[18], 即血浆溶菌酶水平的上升可以有效抑制由LPS诱导的免疫应激反应发生。在本实验中, 甘草次酸组在LPS注射前已经使得血浆中溶菌酶活性处于较高水平, 这种水平的上升可能增强了鱼类非特异性免疫力, 在腹腔注射LPS后, 血浆溶菌酶水平维持稳定, 没有形成溶菌酶显著上升, 而对照组在注射LPS后溶菌酶呈现先升高后下降的趋势, 这种差异可能说明甘草次酸通过对调节正常情况下血浆

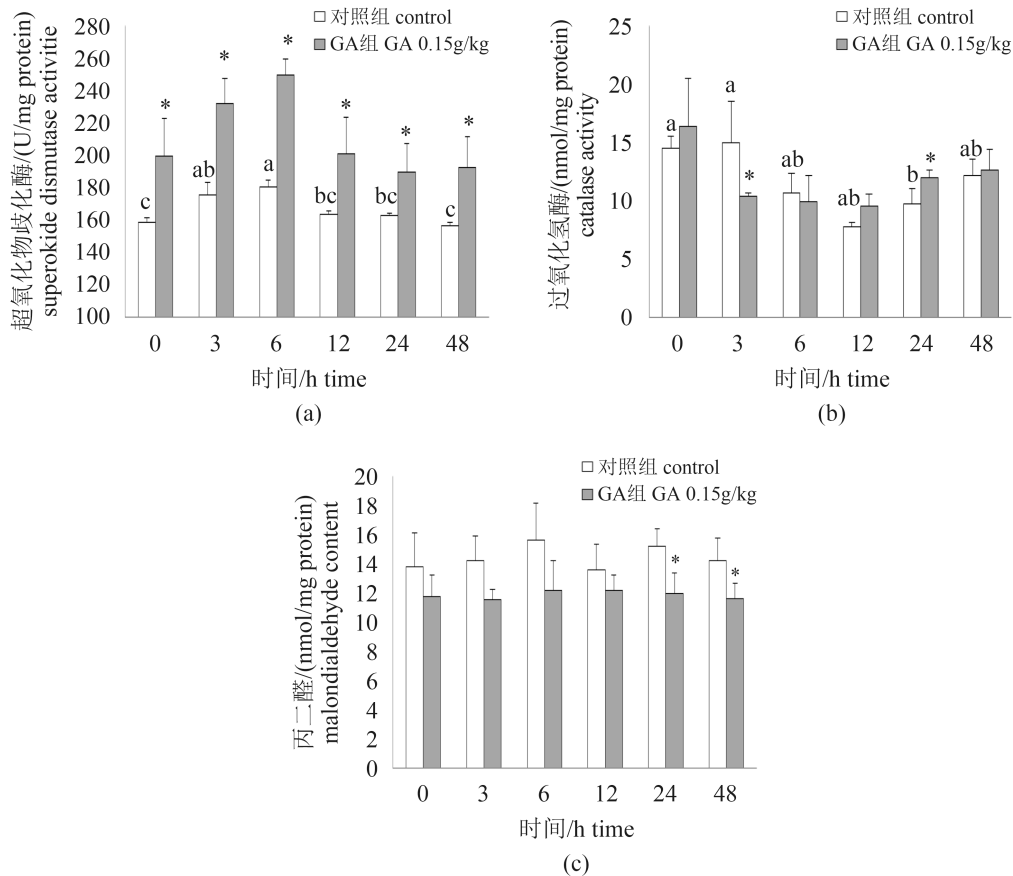


图4 甘草次酸对斑点叉尾鲷肝脏中超氧化物歧化酶(a)、过氧化氢酶(b)和丙二醛(c)的影响

Fig. 4 Effects of dietary GA levels on plasma SOD (a), CAT (b) and MDA (c) of channel catfish

溶菌酶的水平, 增强鱼类非特异性免疫, 从而抑制了由LPS诱导的免疫应激。

补体在鱼类非特异性免疫中发挥重要作用, 而鱼类特异性免疫能力差, 非特异性免疫在鱼类免疫系统中尤为重要, 而补体旁途径溶血活性(ACH50)是鱼类非特异性免疫的另一个代表指标。大量研究证实, 外源菌和免疫增强剂均能够诱导鱼体ACH50水平上升^[19]。本实验中, 腹腔注射LPS后血浆ACH50有显著的先升高后下降过程, 说明LPS能够有效诱导斑点叉尾鲷血浆补体的产生, 并在6 h达到最高峰。而甘草次酸能够略微提高血浆中ACH50水平。甘草次酸和LPS的双重作用使得6 h时甘草次酸组血浆ACH50水平显著高于对照组, 这说明甘草次酸有一定的提高鱼类补体水平的作用。

白细胞是鱼体对抗外源菌的主要工具, 血液白细胞数量代表鱼体免疫状态。本实验中, 血液白细胞水平在注射LPS 3~6 h后显著下降, 而在12~48 h显著上升, 说明鱼体为应对外源入侵进

行了免疫调控, 这与以往的研究结果相似^[20-21]。可能的原因是, LPS诱导鱼体产生免疫应激反应, 但并未有真正的病原菌侵入, 鱼体免疫调控产生的血浆白细胞大量增加并未消耗, 所以造成了后期血浆白细胞维持在较高水平。饲料中添加甘草次酸后, 血液白细胞下降和上升幅度均减弱, 并在3、6和48 h与对照组差异显著, 说明甘草次酸对血液白细胞的调节作用可能是双向的, 而这种双向调节一方面在短期内抑制了LPS诱导的白细胞下降, 另一方面也削弱了LPS诱导的免疫应激的作用时间, 促使机体在更短的时间恢复到应激前水平, 这说明甘草次酸能够显著抑制由LPS诱导的血浆白细胞变化的发生。

血浆谷草/谷丙转氨酶水平是鱼体肝脏损伤的重要表现, 因为这两种转氨酶应该存在于肝脏细胞中, 正常状态血液转氨酶水平很低, 血浆转氨酶水平升高, 提示肝脏损伤等病理情况出现。有研究显示, LPS攻毒后血浆转氨酶水平显著上升, 这暗示腹腔注射LPS可能导致肝损

伤^[22]。本实验结果很好地验证了这一点, 对照组在腹腔注射LPS后, 血浆转氨酶水平急剧下降, 这可能是腹腔注射LPS后造成的肝脏急性损伤导致的。而甘草次酸组血浆转氨酶水平均低于对照组, 其3 h时与注射前差异不显著, 说明甘草次酸能够很好地抑制由LPS诱导的肝损伤。这提示甘草次酸在LPS诱导的免疫应激过程中发挥重要的抑制作用。

肝脏中SOD、CAT和MDA是鱼体氧化还原反应中的重要中间反应酶和过氧化产物^[23]。一般认为, SOD可以有效维持鱼体氧化和抗氧化平衡, CAT能特异性地清除体内过氧化氢, MDA为脂质过氧化物反映鱼体细胞过氧化程度。贺建荣等^[24]发现甘草次酸对氧自由基有很强的清除作用, 且其清除能力与甘草次酸存在剂量依赖性。本实验室前期研究也发现, 饲料中添加甘草次酸后, 鱼体肝脏中SOD、GSH显著上升, MDA显著下降^[25]。在本实验中, 饲料中添加甘草次酸显著提高了肝脏SOD水平, 并在一定程度上降低了由LPS诱导的MDA产生, 说明甘草次酸能够提高鱼体抗氧化能力, 抑制LPS诱导的免疫应激。

综上所述, 在腹腔注射LPS的整个免疫应激发生的过程中, 血浆皮质醇、溶菌酶、ACH50、谷草/谷丙转氨酶、血液白细胞数量, 肝脏SOD、CAT均在6~12 h产生显著性变化, 说明2.0 mg/(kg 体质量)的LPS能够诱导斑点叉尾鲷产生免疫应激反应, 且在6~12 h出现免疫应激高峰, 在24~48 h基本恢复到正常水平。饲料中添加0.15 g/kg 甘草次酸可有效改善由LPS诱导的各项指标变化, 抑制LPS诱导的免疫应激的发生。

参考文献:

- [1] Cabello F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(7): 1137-1144.
- [2] Kong X F, Wu G Y, Liao Y P, *et al.* Effects of Chinese herbal ultra-fine powder as a dietary additive on growth performance, serum metabolites and intestinal health in early-weaned piglets[J]. *Livestock Science*, 2007, 108(1-3): 272-275.
- [3] Liu B, Ge X P, Xie J, *et al.* Effects of anthraquinone extract from *Rheum officinale* Bail on the physiological responses and HSP70 gene expression of *Megalobrama amblycephala* under *Aeromonas hydrophila* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(1): 1-7.
- [4] Jiang G Z, Liu W B, Li G F, *et al.* Effects of different dietary glycyrrhetic acid (GA) levels on growth, body composition and plasma biochemical index of juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*[J]. *Aquaculture*, 2012, 338-341: 167-171.
- [5] Chen C F, Chen X H, Kusuda R. Adjuvant effect of glycyrrhizine in vaccines against bacterial septicemia in mandarin fish, *Siniperca chuatsi* basilewsky[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2000, 19(3): 256-260.
- [6] Chen X R, Mai K S, Zhang W B, *et al.* Effects of dietary glycyrrhizin on growth and nonspecific immunity of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2010, 41(5): 665-674.
- [7] Sung M J, Davaatseren M, Kim W, *et al.* Vitisin A suppresses LPS-induced NO production by inhibiting ERK, p38, and NF- κ B activation in RAW 264.7 cells[J]. *International Immunopharmacology*, 2009, 9(3): 319-323.
- [8] Engelsma M Y, Stet R J M, Schipper H, *et al.* Regulation of interleukin 1 beta RNA expression in the common carp, *Cyprinus carpio* L.[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2001, 25(3): 195-203.
- [9] Zou J, Secombes C J, Long S, *et al.* Molecular identification and expression analysis of tumor necrosis factor in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2003, 27(10): 845-858.
- [10] Weber T E, Small B C, Bosworth B G. Lipopolysaccharide regulates myostatin and MyoD independently of an increase in plasma cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2005, 28(1): 64-73.
- [11] 蒋广震, 刘文斌, 王煜衡, 等. 饲料中蛋白脂肪比对斑点叉尾幼鱼生长、消化酶活性及肌肉成分的影响[J]. *水产学报*, 2010, 34(7): 1129-1135.
- [12] Jiang G Z, Liu W B, Wang Y H, *et al.* Effects of dietary protein to lipid ratio on growth, digestive enzyme activities and muscle composition of juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(7): 1129-1135 (in Chinese).
- [12] 蒋广震, 刘文斌, 梁丹妮, 等. 饲料低蛋白、高脂肪和

- 高消化能对斑点叉尾鲟1龄鱼生长及体组成的影响[J]. 水产学报, 2012, 36(1): 115-123.
- Jiang G Z, Liu W B, Liang D N, *et al.* Effects of different dietary protein, lipid and digestible energy levels on growth and body composition of juvenile channel catfish(*Ictalurus punctatus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(1): 115-123 (in Chinese).
- [13] Davis K B, Griffin B R, Gray W L. Effect of dietary cortisol on resistance of channel catfish to infection by *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus disease[J]. Aquaculture, 2003, 218(1-4): 121-130.
- [14] Peterson B C, Small B C. Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2004, 26(3): 231-240.
- [15] Holland J W, Pottinger T G, Secombes C J. Recombinant interleukin-1 β activates the hypothalamic-pituitary-interrenal axis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Journal of Endocrinology, 2002, 175(1): 261-267.
- [16] 王文博, 方平, 林小涛, 等. 甘草粗提物对鲫的免疫调节作用[J]. 水生生物学报, 2007, 31(5): 655-660.
- Wang W B, Fang F, Lin X T, *et al.* The immunoregulative effects of liquorice extract on crucian[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(5): 655-660 (in Chinese).
- [17] Haug T, Kjuul A K, Stensvåg K, *et al.* Antibacterial activity in four marine crustacean decapods[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 12(5): 371-385.
- [18] Kurasawa T, Takada K, Ohno N, *et al.* Effects of murine lysozyme on lipopolysaccharide-induced biological activities[J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 1996, 13(4): 293-301.
- [19] Funk V A, Jones S R M, Kim E, *et al.* The effect of vaccination and sea water entry on immunocompetence and susceptibility to *Kudoa thyrsites* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 17(4): 375-387.
- [20] Wideman Jr R F, Erf G F, Chapman M E. Intravenous endotoxin triggers pulmonary vasoconstriction and pulmonary hypertension in broiler chickens[J]. Poultry Science, 2001, 80(5): 647-655.
- [21] Wideman R F, Chapman M E, Wang W, *et al.* Immune modulation of the pulmonary hypertensive response to bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in broilers[J]. Poultry Science, 2004, 83(4): 624-637.
- [22] Lun L M, Zhang S C, Liang Y J. Alanine aminotransferase in amphioxus: Presence, localization and up-regulation after acute lipopolysaccharide exposure[J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 39(5): 511-515.
- [23] 韩雨哲, 姜志强, 任同军, 等. 氧化鱼油与棕榈油对花鲈肝脏抗氧化酶及组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4): 798-806.
- Han Y Z, Jiang Z Q, Ren T J, *et al.* Effects of oxidized fish oil blended with palm oil on antioxidant capacity and histology of Japanese sea bass (*Lateolabrax maculates*) juvenile[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 798-806 (in Chinese).
- [24] 贺建荣, 张琰, 程建峰, 等. 黄芪总黄酮、黄芪多糖、甘草次酸及阿魏酸清除氧自由基作用的研究[J]. 中国美容医学, 2001, 10(3): 191-193.
- He J R, Zhang Y, Cheng J F, *et al.* Study of the astragalus polyasaccharide, general flavone, ferulic acid glycyrrhetic acid clean out oxy free radical[J]. Chinese Journal of Aesthetic Medicine, 2001, 10(3): 191-193 (in Chinese).
- [25] 蔡东森, 蒋广震, 王丽娜, 等. 甘草次酸对团头鲂生长、脂肪沉积与抗氧化功能的影响[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1514-1521.
- Cai D S, Jiang G Z, Wang L N, *et al.* Effects of dietary glycyrrhetic acid levels on growth performance, lipid deposition and antioxidant capacity of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1514-1521 (in Chinese).

Effect of glycyrrhetic acid (GA) on the physiological responses and immunoreactions of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) injection lipopolysaccharide (LPS)

JIANG Guangzhen, ZHOU Man, LI Xiangfei, ZHANG Dingdong, LIU Wenbin*

(Key Laboratory of Aquatic Nutrition and Feed Science of Jiangsu Province, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Glycyrrhetic acid (GA), which is a main active principal constituent of liquorice, is extensively used as antibacterial and anti-inflammatory Chinese medicine. This study was carried out to evaluate the effects of GA on the oxidative stress of *Ictalurus punctatus* injection lipopolysaccharide (LPS). The fish were randomly divided into two groups: a control group (fed a standard diet) and a treatment group (standard diet supplemented with 0.15 mg/kg GA) and fed for 8 weeks. We then challenged the fish with LPS and recorded changes in red and white blood cell counts (RBC and WBC), plasma cortisol, lysozyme, ACH50, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and hepatic catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) for a period of 48 h. Supplementation with 0.15 g/kg GA significantly increased plasma lysozyme activity before infection, plasma ACH50 activity at 6 h after infection, WBC hepatic at 6 h after infection, CAT activity 24 h after infection, hepatic SOD activity before and after infection. In addition, the supplemented group had decreased levels of plasma AST and ALT activities 6 h after infection, hepatic CAT 3 h after infection, hepatic MDA 24 and 48 h after infection. Our results suggest that ingestion of a basal diet supplemented with 0.15 g/kg GA prevents LPS-induced immunological challenges response by regulating key enzyme activities, and challenged with LPS (2.0 mg/kg) affect physiological responses and immunoreactions of channel catfish.

Key words: *Ictalurus punctatus*; glycyrrhetic acid; lipopolysaccharide; immunological stress; antioxidant enzyme activity

Corresponding author: LIU Wenbin. E-mail: wbliu@njau.edu.cn

Funding projects: Project of Innovation of Agricultural Science and Technology of Jiangsu Province (CX(15)1013-04); Project of Natural Science Fund of Jiangsu Province (BK20130687)