

# 不同分子量壳聚糖对刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)生长和免疫功能的影响\*

白 阳 徐 玮<sup>①</sup> 汪东风 王艳龙

(中国海洋大学食品科学与工程学院 青岛 266003)

**摘要** 以初始体重为(6.77±0.01) g 的仿刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)为实验对象,在基础饲料中添加 1%不同分子量的壳聚糖,分子量分别为 35 kDa 和 400 kDa,进行为期 56 d 的养殖实验,研究低分子量壳聚糖(LMWC)和高分子量壳聚糖(HMWC)对仿刺参生长和免疫相关酶活性的影响。结果显示,不同分子量的壳聚糖对仿刺参的生长均有促进作用,且 LMWC 能显著促进刺参的特定生长率(SGR)( $P<0.05$ )。饲料中添加不同分子量壳聚糖,刺参体腔细胞中的总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性比对照组均显著增高( $P<0.05$ )。LMWC 可显著增强刺参体腔细胞中酸性磷酸酶(ACP)活性( $P<0.05$ ),并能提高碱性磷酸酶(AKP)和一氧化氮合酶(NOS)活性。HMWC 对刺参体腔细胞中 AKP 和 NOS 活性均有显著增强作用( $P<0.05$ )。研究表明,在刺参饲料中添加一定量的壳聚糖,对其生长和相关免疫酶活性有促进作用。

**关键词** 壳聚糖; 刺参; 生长; 免疫酶活性

**中图分类号** S963.7 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)01-0093-07

甲壳素是由 N-乙酰-2-氨基-脱氧-D-葡萄糖以  $\beta(1-4)$ 糖苷键形式链接的共聚物,它来源丰富,可从螃蟹、虾的外壳及真菌和藻类的细胞壁中获得,是生物界除纤维素外最丰富的天然多糖。甲壳素的溶解性差,不易被利用,在碱性条件下,通过 N-脱乙酰作用可得到溶解性较好的壳聚糖来提高其利用价值(Kafetzopoulos *et al*, 1993)。壳聚糖分子是由 N-乙酰-D-葡萄糖胺和 D-葡萄糖胺共聚而成的阳离子型多糖(Hejazi *et al*, 2003),化学性质稳定,具有良好的生物相容性和生物降解性,对人体安全无毒。在禽类、猪体内可以调节脂肪代谢,提高机体的营养物质转化能力和代谢水平,改善动物品质。作为水产饲料添加剂,壳聚糖对异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、罗非鱼(*Tilapia nilotica*)等有促生长和增强免疫力的作用(曹丹等, 2004; 常青等, 2006; 张艺等,

2012; 刘兴国等, 2004)。壳聚糖的化学、物理和生物学特性是由它的脱乙酰度和分子量决定的,不同分子量的壳聚糖其抗菌活性、抗氧化能力、细胞吸收能力和改变细胞膜通透性等功能也有所不同(Seyfarth *et al*, 2008; Xing *et al*, 2005; Su *et al*, 2005; 余雄伟等, 2011)。

刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)俗称海参,属棘皮动物门、海参纲,富含多种营养物质,具有较高的食用和药用价值。在中国、俄罗斯、日本和韩国都是重要的经济类养殖物种,有很大的市场需求量。然而,随着养殖量的增加,由于养殖操作的不规范,由病原菌(如灿烂弧菌、假交替单孢菌)(张春云等, 2006)引起的传染病成为海参养殖的严峻问题,导致了重大的经济损失。使用抗生素类药物和化学法杀菌将导致病菌的耐药性、环境污染和水产品中的药物残留等问题。棘皮动物缺乏特异性免疫系统,海参防御外来物质的机制只有细胞免疫和体液免疫(Eliseikina *et al*,

\* 国家自然科学基金项目(31371731)和山东省自然科学基金项目(ZR2009DM026)共同资助。白 阳, E-mail: byoung1991@126.com

<sup>①</sup> 通讯作者: 徐 玮, 教授, E-mail: weixu@ouc.edu.cn

收稿日期: 2014-11-26, 收修改稿日期: 2014-12-09

2002)。使用免疫增强剂是增强水产动物免疫力和抗病力的有效方法(安红红等, 2013), 因此, 研究合适的免疫增强剂对提高海参非特异性免疫能力意义重大。

本研究以仿刺参为实验对象, 探讨不同分子量壳聚糖对刺参生长性能和免疫力的影响, 以期对壳聚糖作为免疫增强剂的应用提供科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验饲料

低分子壳聚糖(Low molecular weight chitosan, LMWC), 分子量为 35 kDa, 由山东青岛弘海生物技术有限公司提供。

高分子壳聚糖(High molecular weight chitosan, HMWC), 分子量为 400 kDa, 由山东青岛海汇生物工程有限公司提供。

海参饲料以马尾藻粉为主料, 并添加鱼粉、小麦粉、豆粕等基础原料, 制得粗蛋白含量为 19.46%, 粗脂肪含量为 2.26%的基础饲料(表 1)。在基础饲料中分别设计添加质量分数为 1%的 LMWC 和 HMWC(赵彦翠, 2011<sup>1)</sup>; 韩丽蓉等, 2014)替代面粉, 制成实验饲料。所有原料粉碎后均过 100 目筛, 充分混合均匀, 加适量水揉成团状后, 用双螺杆制料机(F-II26 型, 华南理工大学, 广州)制成粒径均匀、长度一致的颗粒饲料, 经 40℃烘 12 h, 密封保存备用。

### 1.2 海参的饲养与管理

实验所用海参苗购于山东青岛即墨市田横镇海参育苗厂, 均为同一批次培育的参苗。挑选大小均匀、初始体重为(6.77±0.01) g 的海参, 将参苗置于室内具有循环水系统的大桶内进行暂养, 为期 14 d。养殖实验在山东青岛国家海洋科学研究中心中国海洋大学科研基地进行。暂养期间每天 09:00 定时清理粪便和残饵并换水, 并在 13:00 饱食投喂基础饲料。

暂养结束后, 挑选个体大小均匀的海参幼苗随机分组, 置于体积为 40 L 的玻璃缸中, 每缸 16 只。实验共设置 3 个处理, 每个处理 3 个重复。饲养期间每天 09:00 清理粪便和残饵, 13:00 饱食投喂 1 次, 为期 56 d。实验期间保持水温为(15±1)℃, 盐度为 30.0±1.0, pH 为 8.0±0.3。24 h 连续充氧, 保证暗室饲养。

56 d 的养殖实验结束后, 饥饿海参 24 h, 对每个玻璃缸内的海参计数、称重。从每个重复里随机取 4 只

海参, 进行解剖, 混合体腔液用于测定总蛋白含量、酸性磷酸酶(ACP)活力、一氧化氮合酶(NOS)活力、总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力和碱性磷酸酶(AKP)活力。

表 1 饲料配方及营养组成成分(按干物质计)

Tab.1 The composition and nutrient contents of the diets (Dry matter)

原料 Ingredients	含量 Content(%)		
	对照 Control	LMWC	HMWC
马尾藻粉 Sargassum powder <sup>1</sup>	65.0	65.0	65.0
鱼粉 Fish meal <sup>2</sup>	5.0	5.0	5.0
小麦粉 Wheat meal <sup>3</sup>	20.1	19.1	19.1
豆粕 Soybean meal <sup>3</sup>	3.0	3.0	3.0
啤酒酵母 Saccharomyces cerevisiae <sup>3</sup>	3.0	3.0	3.0
大豆卵磷脂 Lecithin <sup>3</sup>	1.2	1.2	1.2
维生素 C Vitamin C <sup>4</sup>	0.2	0.2	0.2
磷酸二氢钙 Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> <sup>4</sup>	1.0	1.0	1.0
复合维生素 Vitamin premix <sup>4,5</sup>	1.0	1.0	1.0
复合矿物质 Mineral premix <sup>4,6</sup>	0.5	0.5	0.5
低分子量壳聚糖 LMWC	0	1.0	0
高分子量壳聚糖 HMWC	0	0	1.0
粗蛋白 Crude protein	19.46	19.72	19.29
粗脂肪 Crude lipid	2.26	2.25	2.51

1. 马尾藻粉: 粗蛋白 12.8%, 粗脂肪 0.7%; 2. 秘鲁红鱼粉: 粗蛋白 71.6%, 粗脂肪 9.2%; 3. 豆粕、啤酒酵母、小麦粉和大豆卵磷脂购于山东六合饲料有限公司; 4. 复合维生素和复合矿物质由山东青岛玛斯特生物技术有限公司友情提供; 5. 维生素混合物(mg/kg 饲料): 盐酸硫胺素 90; 核黄素 150; 盐酸吡哆醇 210; 维生素 B<sub>12</sub> 0.03; 甲萘醌 50; 肌醇 600; 泛酸钙 150; 尼克酸 600; 叶酸 15; 生物素 1.20; 醋酸视黄醇 32; 维生素 D<sub>3</sub> 12; 维生素 E 120; 乙氧基喹啉 150; 6. 矿物质混合物(mg/kg 饲料): 碘化钾 0.8; 六水氯化钴(1%) 40; 五水硫酸铜 100; 七水硫酸亚铁 450; 一水硫酸锌 250; 一水硫酸锰 60; 七水硫酸镁 4000

1. Gulfweed powder: crude protein 12.8%, crude lipid 0.7%; 2. Fish meal: crude protein 71.6%, crude lipid 9.2%; 3. Purchased from Shandong Liuhe Group Co., Ltd., China; 4. Kindly provided by Qingdao Master Biotechnology Co., Ltd., China; 5. Vitamin premix (mg/kg diet): thiamin 90; riboflavin 150mg; pyridoxine HCl 210; vitamin B<sub>12</sub> 0.03; vitamin K<sub>3</sub> 50; inositol 600; Calcium pantothenate 150; niacin acid 600; folic acid 15; biotin 1.20; retinol acetate 32; cholecalciferol 12; α-tocopherol 120; ethoxyquin 150; 6. Mineral premix (mg/kg diet): KI 0.8; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (1%) 40; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 100; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 450; ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 250; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 60; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4000

1) 赵彦翠. 刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)多糖类免疫增强剂及微生态制剂的研究与应用. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2011, 41-48

### 1.3 样品分析及计算方法

**1.3.1 特定生长率测定** 海参特定生长率(SGR)计算公式:

$$SGR (\%/d) = (\ln \text{终末体重} - \ln \text{初始体重}) \times 100\% / \text{饲养天数}$$

**1.3.2 刺参体腔细胞破碎上清液** 首先将体腔细胞液进行超声破碎。条件为: 22 kHz, 超声时间 6 s, 间歇 6 s, 重复 25 次, 0℃。细胞破碎后于 4000×g 离心 10 min(4℃), 所得上清液即为体腔细胞破碎上清液。测定该上清液中总蛋白含量、ACP 活力、NOS 活力、T-SOD 活力和 AKP 活力。

**1.3.3 体腔细胞破碎上清液总蛋白含量的测定方法**

测定原理是考马斯亮蓝染料上的阴离子与蛋白质分子的  $\text{NH}_4^+$  结合, 生成蓝色物质, 通过测定吸光度可计算出蛋白含量。测定波长为 595 nm。

**1.3.4 体腔细胞破碎上清液 ACP 活力** 测定原理是 ACP 可分解磷酸苯二钠, 产生游离酚和磷酸。游离酚在碱性条件可与 4-氨基安替吡啉作用, 经铁氰化钾氧化生成红色醌衍生物, 可测定其吸光值。该活力选用南京建成试剂盒进行测定, 测定波长为 520 nm。体腔细胞破碎液中 1 个 ACP 活力单位定义为: 每克组织蛋白在 37℃ 与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位(U)。

**1.3.5 体腔细胞破碎上清液 NOS 活力** 原理是根据 NOS 可以催化 L-精氨酸反应生成 NO。NO 可以被氧化成  $\text{NO}_2$  和  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NO}_2$  可用 Griess 试剂[对氨基苯磺酰胺, 磷酸, N-(1-萘基)-乙二胺]进行检测。选用南京建成试剂盒进行测定, 测定波长为 530 nm。体腔细胞破碎液中 1 个 NOS 活力单位定义为: 每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol NO 为 1 个酶活力单位。

**1.3.6 体腔细胞破碎上清液 T-SOD 活力** 基本原理是: 通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^-$ ),  $\text{O}_2^-$  可氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显色剂的作用下呈现紫红色, 用可见分光光度计测其吸光值。当被测样品中含 SOD 时, 则对超氧阴离子有专一性的抑制作用, 使形成的亚硝酸盐减少, 比色时测定管的吸光值低于对照管的吸光值, 通过公式可计算出 SOD 活力。该活力选用南京建成试剂盒进行测定, 测定波长为 550 nm。体腔细胞破碎液中 1 个 T-SOD 酶活力单位定义为: 每毫克组织蛋白在 1 ml 反应液中 SOD 抑制率达到 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位(U)。

**1.3.7 体腔细胞破碎上清液 AKP 活力** 该测定原理同 1.3.4。选用南京建成试剂公司的试剂盒按照要求进行检测。体腔细胞破碎液中 1 个 AKP 活力单位

定义为: 每克组织蛋白在 37℃ 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位(U)。

**1.3.8 实验数据分析** 实验数据均以 3 个重复的平均值±标准误(Mean±SE)表示, 使用 SPSS 20.0 软件单因素方差分析法(ANOVA)进行分析, 若差异显著( $P < 0.05$ ), 采用 Tukey 检验进行多重比较。

## 2 结果

### 2.1 不同分子量壳聚糖对刺参生长的影响

各实验组海参的初始体重、终末体重和特定生长率见表 2。经过 56 d 的养殖实验, 添加 1% 的 LMWC 和 1% 的 HMWC 组均对刺参的生长有促进作用, SGR 均高于对照组, 其中, LMWC 组刺参的最终体重和 SGR 均显著高于对照组( $P < 0.05$ )。HMWC 组刺参的 SGR 比对照组略高, 但与对照组没有显著性差异( $P > 0.05$ )。

表 2 不同分子量壳聚糖对刺参生长的影响  
(平均值±标准误,  $n=3$ )

Tab.2 Effects of different molecular weight chitosan on the growth performance of *A. japonicus* Selenka  
(Mean ± SE,  $n=3$ )

饲料 Diets	初始体重 Initial body weight(g)	终末体重 Final body weight(g)	特定生长率 Specific growth rate(%/d)
对照 Control	6.771±0.018	11.222±0.353 <sup>a</sup>	0.898±0.060 <sup>a</sup>
LMWC	6.753±0.013	13.362±0.286 <sup>b</sup>	1.204±0.038 <sup>b</sup>
HMWC	6.791±0.021	12.709±0.559 <sup>ab</sup>	1.115±0.083 <sup>ab</sup>

注: 表中数据均为平均值±标准误( $n=3$ ); 每列所注上标字母不同表示组间差异显著( $P < 0.05$ )

Note: Values in this table are mean±SE,  $n=3$ ; Different letter in one column means significant difference ( $P < 0.05$ )

### 2.2 不同分子量壳聚糖对刺参免疫酶活性的影响

**2.2.1 ACP 活力** 结果显示, 在基础饲料中添加 1% 的 LMWC 可以显著提高刺参的 ACP 活力( $P < 0.05$ ), HMWC 对刺参 ACP 活力影响不大(表 3)。

**2.2.2 NOS 活力** 结果显示, 刺参体腔细胞 NOS 活力受 HMWC 影响较为显著( $P < 0.05$ ), 而受 LMWC 影响较小(表 3)。

**2.2.3 T-SOD 活力** 研究表明, 不同分子量的壳聚糖均能显著提高刺参体腔细胞 T-SOD 活性( $P < 0.05$ ), 且随着壳聚糖分子量的增大, 该酶活性有增大趋势(表 3)。

**2.2.4 AKP 活力** 结果显示, 在基础饲料中添加

表 3 不同分子量壳聚糖对刺参免疫酶活性的影响(平均值±标准误,  $n=3$ )  
 Tab.3 Effects of different molecular weight chitosan on the activities of immune-related enzymes in *A. japonicus* Selenka (Mean ± SE,  $n=3$ )

饲料 Diet	总蛋白含量 Total protein (g/L)	超氧化物歧化酶 Total superoxide dismutase (U/mg prot)	酸性磷酸酶 Acid phosphatase (U/g prot)	碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase (U/g prot)	一氧化氮合酶 Nitric oxide synthase (U/mg prot)
对照 Control	0.460±0.030	83.308±0.712 <sup>a</sup>	23.954±0.710 <sup>a</sup>	17.242±0.698 <sup>a</sup>	5.310±0.460 <sup>a</sup>
LMWC	0.479±0.031	89.450±0.490 <sup>b</sup>	29.853±0.800 <sup>b</sup>	21.051±0.391 <sup>ab</sup>	5.796±0.152 <sup>a</sup>
HMWC	0.430±0.048	104.261±1.213 <sup>c</sup>	24.363±0.980 <sup>a</sup>	25.859±1.817 <sup>b</sup>	8.347±0.328 <sup>b</sup>

注: 表中数据均为平均值±标准误( $n=3$ ); 每列所注上标字母不同表示组间差异显著( $P<0.05$ )

Note: Values in this table are mean±SE,  $n=3$ ; Different letter in one column means significant difference ( $P<0.05$ )

1%不同分子量壳聚糖, 对刺参体腔细胞 AKP 活力有不同程度的提高, 其中, HMWC 对 AKP 活力提高显著( $P<0.05$ )(表 3)。

### 3 分析与讨论

#### 3.1 饲料中添加不同分子量壳聚糖对刺参生长的影响

壳聚糖作为饲料添加剂应用在畜禽和水产动物养殖中, 可以促进生长、增强机体代谢能力。曹丹等(2004)对异育银鲫研究发现, 添加 1.0%壳聚糖组的增重率极显著高于对照组( $P<0.01$ )。Niu 等(2013)在基础饲料中分别添加了甲壳素、壳聚糖、壳寡糖和 N-乙酰-D-葡萄糖胺饲养斑节对虾(*Penaeus monodon*) 70 d, 研究表明, 壳聚糖组的增重和生物量增加均显著高于对照组和其他饲养组( $P<0.05$ )。在基础饲料中添加不同含量的壳聚糖后, 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)幼鱼的增重率(WGR)、特定生长率(SGR)显著高于对照组( $P<0.05$ ), 同样对星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)幼鱼的生长也有促进作用, 但是, 当壳聚糖添加量高于 0.50%后, WGR 和 SGR 趋于平稳, 说明壳聚糖促进机体生长的作用与其添加量有关(蒋锦坤, 2012)<sup>1)</sup>。壳聚糖对机体的影响与分子量有关, 分子量是影响壳聚糖透过 Caco-2 细胞膜的重要因素, 随分子量的增加, 其透过量和透过率均显著降低(Su *et al*, 2005)。余雄伟等(2011)比较了不同分子量壳聚糖在改变 *E.coil* 和 *S.aureus* 细胞膜通透性方面的影响, 研究表明, 改变细胞膜通透性能力大小的分子量依次是 3 kDa>300–400 kDa>700 kDa。壳聚糖具有黏膜粘附作用, 并可以暂时打开紧密的上皮

细胞, 帮助其他物质转运(Ranaldi *et al*, 2002), 因此, 不同分子量的壳聚糖其转运效果也有所不同。王红卫(2013)<sup>2)</sup>研究了不同分子量壳寡糖对鸡产蛋性能、蛋品质、血清生化指标、肠道微生物菌群的影响, 研究表明, 壳寡糖分子量为 1–3 kDa 时为蛋鸡饲料添加剂的最适宜分子量。

壳聚糖有助于机体对营养物质的消化和吸收(Gopalakannan *et al*, 2006), 可以促进机体代谢, 因此能够促进生物生长(Niu *et al*, 2013)。本研究在刺参基础饲料中分别设计添加了 1%的 LMWC(35 kDa)和 1%的 HMWC(400 kDa), 结果发现, LMWC 和 HMWC 均能够对刺参的生长起到促进作用, 其中 LMWC 作用更显著。

#### 3.2 饲料中添加不同分子量壳聚糖对刺参免疫酶活性的影响

刺参的免疫是指机体识别外来和自身抗原、对体内的外来物质进行排斥、对自身抗原形成免疫耐受性使自身免受伤害和伤口愈合等生理过程(王吉桥等, 2002)。海参缺乏特异性免疫系统, 只有体壁和体内防御机制共同组成的非特异性免疫体系。体内防御主要是体液免疫和细胞免疫(Eliseikina *et al*, 2002)。海参体腔中充满了体腔液, 体腔细胞就悬浮其中。体液免疫和细胞免疫是紧密联系的, 体腔细胞能够分泌酚氧化酶原激活系统、凝集素、溶菌酶以及 ACP、SOD 和 AKP 等免疫因子到体腔液中形成免疫防线, 同时, 细胞之间也通过信息传递, 可以迅速启动和扩大免疫应答。它们相互协同, 共同完成海参免疫防御反应(王兰等, 2009; 孙永欣等, 2007; 王淑娴等, 2012)。

1) 蒋锦坤. 壳聚糖对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)和星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)幼鱼生长及非特异性免疫的影响. 上海海洋大学硕士研究生学位论文, 2012,10–25

2) 王红卫. 不同分子量壳寡糖对蛋鸡生产性能及免疫功能的影响. 山东农业大学硕士研究生学位论文, 2013, 27–29

大量研究表明,壳聚糖作为饲料添加剂应用在养殖业中,能够增强动物的免疫能力,包括无脊椎动物的非特异性免疫能力。王兰等(2009)研究发现,添加适量 LMWC 可以提高长江华溪蟹(*Sinopotamon yangtsekiense*)LSZ、SOD、AKP 和 ACP 等酶的活性。在鲤鱼饲料中添加不同浓度的 LMWC,其中含量为 1.0%组能显著提高鲤鱼肝脏和血清中的 SOD、ACP 和 AKP 酶活力,但壳聚糖对 SOD 酶活力的增强作用具有时间效应(任国锐, 2012)<sup>1)</sup>。

关于多糖类物质对免疫的促进作用,有研究指出与其分子量有关,多糖的分子质量越大,体积就越大,就越不利于其跨越多重细胞膜进入胞内发挥生物学活性。而分子量大的壳聚糖表面带有大量的-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>等阳离子基团,这些阳离子基团是壳聚糖抑菌抗菌的结构基础,并且高分子结构使得壳聚糖对带负电荷的大分子物质具有较强的絮凝作用,也有较强的静电吸附和离子交换作用(张严伟, 2012)<sup>2)</sup>。Je 等(2004)测定了 9 种不同分子量的壳聚糖对 DPPH、-OH、超氧化物和自由基分子的清除能力,结果显示,中等分子量的壳聚糖的清除能力最强。Shin 等(1999)研究表明,分子量为 40 kDa 的壳聚糖在 0.5%浓度时可抑制 90%的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌生长,而当壳聚糖分子量增大到 180 kDa 时,0.05%浓度即可完全抑制金黄色葡萄球菌和大肠杆菌生长。本研究中海参基础饲料中添加了不同分子量的壳聚糖,发现均对刺参的生长和免疫能力有促进作用,而 HMWC 的 SOD 酶活力比 LMWC 更高,说明其清除超氧化物能力更强,与 Je 等(2004)的测定结果稍有不同,可能是体内外环境因素造成的差异。

壳聚糖可以提高机体的 SOD 活性而增强抗氧化能力(Nordberg *et al*, 2001),从而解除过氧化氢和氧化应激对机体的毒害(Cho *et al*, 2010),保护生物抵抗细菌的侵袭和保护脂质的过氧化作用。ACP 的免疫机制是在碱性条件下水解破坏表面带有磷酸基团的外来物质(Wang *et al*, 2014)。本研究表明,多糖类物质可以提高海参 ACP 酶活力,与 Zhao 等(2010)的报道结论相同,饲料中添加一定量酵母多糖提高了刺参肠道 ACP 酶的活力。AKP 可以通过提供磷酸基团来参与机体的磷代谢、蛋白质、脂质和 DNA、RNA 代谢,调节膜运输,对机体的免疫反应有重要影响(陈清西等, 1998; 绳秀珍等, 2001)。NOS 可催化 L-精氨酸转化成瓜氨酸和 NO, NO 能够刺激巨噬细胞对抗肿瘤

细胞、病原菌和分枝杆菌等多种靶细胞,因而, NOS 在特异性免疫和非特性免疫防御中都有重要作用(Buentello *et al*, 1999)。Wang 等(2014)进行的海参体腔细胞体外实验表明,小分子量(< 1 kDa)的褐藻寡糖显著提升 NOS 活力,而大分子量(2–4 kDa)的不显著,说明褐藻寡糖的分子量对 NOS 影响较大。本研究中, LMWC 对刺参的 SOD 和 ACP 活力水平均有显著提高,并且也相应增强了 AKP 活力,说明 LMWC 对刺参免疫能力有一定的促进作用。HMWC 组与对照相比, AKP 和 NOS 活力显著增强, SOD 活性显著高于其他两个处理组。

## 4 结论

本实验研究了不同分子量壳聚糖对刺参生长性能和免疫相关酶活力的影响,通过添加不同分子量壳聚糖,刺参的生长均得到了促进,且 LMWC 的促生长作用显著。高低分子量的壳聚糖表现出对海参不同的免疫增强作用, HMWC 组的 SOD、AKP 和 NOS 活性显著高于对照组( $P < 0.05$ ), LMWC 组的 SOD 和 ACP 活性显著高于对照组( $P < 0.05$ ),并且发现,随着壳聚糖分子量的增加,刺参 SOD 活性也随之增加,具体关系有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- 王兰, 王茜, 吉晋芳, 等. 低分子量壳聚糖对长江华溪蟹免疫功能的影响. 山西大学学报(自然科学版), 2009, 32(4): 627–633
- 王吉桥, 田相利. 刺参养殖生物学新进展. 北京: 海洋出版社, 2002, 350–365
- 王淑娟, 叶海斌, 于晓清, 等. 海参的免疫机制研究. 安徽农业科学, 2012, 40(25): 12553–12555
- 刘兴国, 宋理平. 壳聚糖作为罗非鱼饲料添加剂的效果研究. 渔业现代化, 2004(1): 40–41
- 安红红, 宫向红, 徐英江, 等. 海参免疫机制及免疫增强剂对其影响的研究进展. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(4): 91–95
- 孙永欣, 王吉桥, 汪婷婷, 等. 海参防御机制的研究进展. 水产科学, 2007, 26(6): 358–361
- 余雄伟, 王月慧. 不同分子量壳聚糖对细胞膜通透性的影响. 食品工业, 2011(6): 4–6
- 张艺, 徐玮, 崔丽卿, 等. 壳寡糖对大菱鲆生长和免疫功能的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(10): 71–74
- 张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分

1) 任国锐. 低分子量壳聚糖对鲤鱼生长代谢和免疫的研究. 山西大学硕士研究生学位论文, 2012, 36–41

2) 张严伟. 低聚壳聚糖对福瑞鲤生长、免疫及抗氧化功能的影响. 南京农业大学硕士研究生学位论文, 2012, 6–9

- 离与鉴定. 水产学报, 2006, 30(1): 118–123
- 陈清西, 张喆, 庄总来, 等. 锯缘青蟹碱性磷酸酶分离纯化及部分理化性质研究. 海洋与湖沼, 1998, 29(4): 362–367
- 曹丹, 周洪琪. 壳聚糖对异育银鲫的生长、蛋白质合成及肌肉营养成分的影响. 淡水渔业, 2004, 34(1): 6–9
- 常青, 梁萌青, 王家林, 等. 壳聚糖对花鲈生长和非特异性免疫力的影响. 海洋水产研究, 2006, 27(5): 17–22
- 绳秀珍, 刘晓云, 任素莲, 等. 栉孔扇贝(*Chlamys (Azumpeecten) farreri*)消化盲囊的组织学和组织化学的研究. 青岛海洋大学学报(自然科学版), 2001, 31(3): 361–367
- 韩丽蓉, 徐玮, 汪东风, 等. 壳寡糖对刺参生长、免疫反应和抗病力的影响. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2014, 44(3): 34–39
- Buentello JA, Gatlin III DM. Nitric oxide production in activated macrophages from channel catfish (*Ictalurus punctatus*): influence of dietary arginine and culture media. Aquaculture, 1999, 179(1–4): 513–521
- Su YC, Jang MK, Nah JW. Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans. J Control Release, 2005, 102(2): 383–394
- Cho SY, Lee JH, Song MJ, et al. Effects of chitoooligosaccharide lactate salt on sleep deprivation-induced fatigue in mice. Biol Pharm Bull, 2010, 33(7): 1128–1132
- Eliseikina MG, Magarlamov TY. Coelomocyte morphology in the holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae). Russ J Mar Biol, 2002, 28(3): 197–202
- 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. Aquaculture, 2006, 255(1–4): 179–187
- Hejazi R, Amiji M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. J Control Release, 2003, 89(2): 151–165
- Je JY, Park PJ, Kim SK. Free radical scavenging properties of hetero-chitoooligosaccharides using an ESR spectroscopy. Food Chem Toxicol, 2004, 42(3): 381–387
- Kafetzopoulos D, Martinou A, Bouriotis V. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(7): 2564–2568
- Niu J, Lin HZ, Jiang SG, et al. Comparison of effect of chitin, chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine on growth performance, antioxidant defenses and oxidative stress status of *Penaeus monodon*. Aquaculture, 2013, 372–375: 1–8
- Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic Biol Med, 2001, 31(11): 1287–1312
- Ranaldi G, Marigliano I, Vespignani I, et al. The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line. J Nutr Biochem, 2002, 13(3): 157–167
- Seyfarth F, Schliemann S, Elsner P, et al. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. Int J Pharm, 2008, 353(1–2): 139–148
- Shin Y, Yoo DI, Min K. Antimicrobial finishing of polypropylene non-woven fabric by treatment with chitosan oligomer. J Appl Polym Sci, 1999, 74(12): 2911–2916
- Wang XT, Wang LL, Che J, et al. In vitro non-specific immunostimulatory effect of alginate oligosaccharides with different molecular weights and compositions on sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) coelomocytes. Aquaculture, 2014, 434: 434–441
- Xing R, Liu S, Guo Z, et al. Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities in vitro. Bioorgan Med Chem, 2005, 13(5): 1573–1577
- Zhao W, Liang M, Zhang P. Effect of yeast polysaccharide on the immune function of juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka under pH stress. Aquacult Int, 2010, 18(5): 777–786

(编辑 陈辉)

## The Effect of Dietary Chitosan with Different Molecular Weights on the Growth and Immunity of *Apostichopus japonicus* Selenka

BAI Yang, XU Wei<sup>①</sup>, WANG Dongfeng, WANG Yanlong

(College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**Abstract** In this study we designed an 8-week experiment to determine the effect of dietary chitosan with low molecular weight (LMWC, 35 kDa) or high molecular weight (HMWC, 400 kDa) on the growth and immunity of the sea cucumbers (*Apostichopus japonicus* Selenka). The initial average weight of the sea cucumbers was (6.77±0.01) g. The basic diet was used as control and the experimental diets were supplemented with 1% of chitosan. The results showed that both LMWC and HMWC promoted the growth of sea cucumbers, and that the specific growth rate (SGR) of the LMWC group was significantly higher than the control group ( $P<0.05$ ). Compared to the control, the activity of the total superoxide dismutase (T-SOD) in coelomocytes was significantly increased in experimental groups ( $P<0.05$ ). LMWC enhanced the activities of acid phosphatase (ACP) ( $P<0.05$ ), alkaline phosphatase (AKP), and nitric oxide synthase (NOS). The activities of AKP and NOS in the HMWC group were also significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ). These data suggested that dietary chitosan might enhance the growth and the activities of immunity-related enzymes in sea cucumbers.

**Key words** Chitosan; Sea cucumber(*Apostichopus japonicus* Selenka); Growth; Immune enzyme activity

① Corresponding author: XU Wei, E-mail: weixu@ouc.edu.cn