

棕点石斑鱼中草药免疫增强剂的快速筛选*

孙晓飞 郭伟良 谢珍玉 王世锋 胡文婷 李富盛 王文慧 周永灿^①

(热带生物资源可持续利用省部共建国家重点实验室培育基地 海南大学海洋学院 海口 570228)

摘要 采用离体外周血白细胞与中草药水提液共同孵育法,快速筛选棕点石斑鱼中草药免疫增强剂。39种生药量浓度为100 mg/ml的中草药水提液及添加5.0 mg/ml酵母聚糖的中草药水提液分别与棕点石斑鱼外周血白细胞孵育后,采用氮蓝四唑(NBT)还原法检测各种中草药水提液对棕点石斑鱼外周血白细胞氧呼吸爆发活性的影响,再以吞噬乳胶微球法检测具有显著增强白细胞氧呼吸爆发活性效果的中草药对棕点石斑鱼白细胞吞噬活性的影响,筛选中草药免疫增强剂,并将其拌料饲喂棕点石斑鱼,考察其对棕点石斑鱼外周血和头肾白细胞氧呼吸爆发活性的影响。结果显示,39种中草药中有10种对棕点石斑鱼离体白细胞氧呼吸爆发活性显著提高15%以上,3种酵母聚糖添加组对白细胞氧呼吸爆发活性提高70%以上;筛选出可同时提高棕点石斑鱼离体白细胞的氧呼吸爆发活性和吞噬活性的3种中草药,它们分别为鸡血藤、黄柏和墨旱莲。拌料饲喂实验结果显示,饲喂1%的鸡血藤、黄柏和墨旱莲可显著提高棕点石斑鱼体内外周血和头肾白细胞氧呼吸爆发活性。

关键词 棕点石斑鱼; 中草药; 免疫增强剂; 氧呼吸爆发活性; 吞噬活性

中图分类号 S948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2015)01-0054-07

棕点石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*)又称为褐点石斑鱼,隶属于鲈形目(Perciformes)、鲈亚目(Percoidae)、鲷科(Serranidae)、石斑鱼亚科(Epinephelinae)、石斑鱼属(*Epinephelus*),俗称老虎斑,属于暖水性岛礁鱼类。其肉质好、口感佳、营养价值高,深受消费者青睐。随着棕点石斑鱼人工繁殖技术的突破,快速促进了其养殖业的发展,养殖规模不断扩大、养殖产量日益增加(孔祥迪等, 2014; 陈超等, 2014),但随之而来的是其疾病种类越来越多,造成的损失也越来越大。病害成为目前我国棕点石斑鱼等石斑鱼养殖可持续健康发展的主要限制因素之一,在我国各主要石斑鱼养殖区,已有大量关于石斑鱼疾病及其造成危害的报道(黄志坚等, 2002; 陈晓燕等, 2003; 覃映雪等, 2004; 陈信忠等, 2004)。2008年以来,在海南陵水新村、万宁东奥和黎安、乐东莺歌海等地的网箱养殖和工厂化养殖棕点石斑鱼均陆续发生了较严重的暴发性疾病,

造成了巨大经济损失(徐先栋等, 2012; 戴小连等, 2012)。

中草药作为绿色天然药物,具有毒副作用小、多组分多靶点多功效、不易诱发病原菌耐药性、低污染等优势,在水产无公害养殖病害防治中具有广阔的应用前景(邢跃楠等, 2007; 李明等, 2007)。目前国内外已有大量关于中草药作为免疫增强剂或抗病原药物用于水产疾病防治的报道(陈孝焯等, 2003; 温周瑞等, 2004; Citarasu, 2010; Bairwa *et al.*, 2012; 李华等, 2013),但已有的报道主要借鉴人用或畜禽用中草药的使用效果,集中于少数几种中药单方或复方的研究,水产动物不论从生活环境还是自身免疫功能都与陆生动物有显著差异,有必要针对水产动物从数量庞大的中草药中筛选出更合适的中草药防治药物。为此,本研究以棕点石斑鱼为研究对象,利用离体外周血白细胞与中草药水提液共同孵育方法,通过检测不同中草药

* 国家自然科学基金(31260644)、国家海洋公益性项目(201205025)、高等学校博士点基金(20124601110006)、海南省重大科技项目(ZDZX2013009)、海南省自然科学基金(312068)和海南省产学研一体化专项资金项目(CXY20130058; CXY20130028)共同资助。共同第一作者: 孙晓飞, E-mail: sunxiaofei0532qd@163.com; 郭伟良, E-mail: guowl07@mails.jlu.edu.cn

^① 通讯作者: 周永灿, 教授, E-mail: zychnu@163.com

收稿日期: 2014-04-05, 收修改稿日期: 2014-06-23

对离体外周血白细胞氧呼吸爆发活性和吞噬活性等影响, 从 39 种中草药中筛选适合棕点石斑鱼的免疫增强剂, 为棕点石斑鱼中草药免疫增强剂的应用与开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

中草药包括墨旱莲(*Herba ecliptae prostratae*)、白术(*Rhizoma atractylodis macrocephalae*)、白鲜皮(*Cortex dictamni radialis*)、白芷(*Radix angelicae formosanae*)、姜黄(*Rhizoma curcumae longae*)、薄荷(*Herba menthae haplocalycis*)、补骨脂(*Psoraleae fructus*)、布渣叶(*Microcos paniculata* L.)、草豆蔻(*Alpinia katsumadai hayata*)、大黄(*Chinese rhubarb*)、大血藤(*Caulis sargentodoxae*)、丹参(*Radix salviae miltiorrhizae*)、当归(*Radix angelicae sinensis*)、覆盆子(*Fructus rubi*)、甘草(*Radix glycyrrhizae*)、黄柏(*Cortex phellodendri amurensis*)、鬼箭羽(*Ramulus euonymi*)、黄芪(*Radix astragali mongolici*)、荷叶(*Folium nelumbinis*)、红花(*Flos carthami*)、牛膝(*Radix achyranthis bidentatae*)、黄连(*Rhizoma coptidis*)、黄芩(*Radix scutellariae baicalensis*)、藿香(*Wrinkled gianthysop*)、鸡血藤(*Caulis spatholobi*)、降香檀(*Lignum dalbergiae odoriferae*)、绞股蓝(*Herba seu radix gnostemmatis pentaphylli*)、菊花(*Chrysanthemum*)、连翘(*Fructus forsythiae suspensae*)、良姜(*Rhizoma alpiniae officinari*)、麻黄(*Chinese ephedra*)、牛蒡子(*Great burdock fruit*)、肉桂(*Cortex cinnamomi cassiae*)、山楂(*Fructus crataegi pinnatifidae*)、土北芪(*Radix fici palmatilobae*)、土沉香(*Lignum aquilariae resinatum*)、菟丝子(*Semen cuscutae*)、五味子(*Fructus schisandrae chinensis*)、益母草(*Herba leonuri japonici*)，共 39 种，购自海口某中药店。

实验于 2013 年 4—8 月进行。棕点石斑鱼由海南定大养殖公司提供, 全长(19.0±1.0) cm, 体重(35.0±2.0) g, 从养殖场充氧运至实验室后暂养于玻璃水族箱 80 cm×50 cm×60 cm(长×宽×高)中, 外贴黑纸避光, 每个水族箱养 15 尾, 连续充氧, 每天 10:00 换水 1/3, 水温(28±2)℃, 盐度 25, 每天 08:00 按鱼体质量 1%投喂基础饲料 1 次, 暂养 14 d 后用于各项实验。

1.2 实验方法

1.2.1 中草药提取液样品制备

将各中草药于烘

箱中 60℃烘干 10 h 以上, 粉碎机粉碎, 过 40 目筛, 制成中草药粉末样品。称取 1.00 g 于 15 ml 离心管, 加去离子水 10 ml, 混匀, 室温浸泡提取 72 h, 期间不时摇动; 8500×g 离心 10 min, 取上清液, 过无菌 0.22 μm 微孔滤膜, 制成生药量浓度为 100 mg/ml 中草药提取液样品。

1.2.2 棕点石斑鱼血液样品制备

取经 14 d 暂养的棕点石斑鱼, 用丁香酚麻醉, 以含有 0.5 ml 肝素钠的 2.5 ml 无菌注射器从尾静脉取血, 转移到 15 ml 无菌离心管中, 加入等体积的细胞培养基 L-15, 制成棕点石斑鱼血液样品。

1.2.3 外周血白细胞分离混合液选择及白细胞样品制备

将无菌生理盐水和 Percoll 细胞分离液不同比例混合, 制成密度分别为 1.097、1.090、1.089、1.086、1.084、1.077、1.076、1.070、1.069 和 1.066 g/ml 的细胞分离混合液。分别取 1.5 ml 混合液于 10 ml 离心管中, 沿管壁缓慢加入 3 ml 棕点石斑鱼血液样品, 室温 800×g 离心 20 min, 取中间白细胞层于新的 10 ml 离心管中, 加入 1 ml 细胞培养液 L-15, 轻轻混匀; 取 20 μl 细胞, 加入等体积的台盼蓝染色后, 以血球计数板计数, 分别计算不同混合液分离的白细胞浓度, 每种比例的混合液平行测定 3 次, 选择最适混合液分离制备棕点石斑鱼白细胞样品。

1.2.4 提高白细胞氧呼吸爆发活性中草药筛选

参照戴小连等(2012)的方法略作修改测定氧呼吸爆发活性。取 96 孔板, 每 1 行为 1 组, 每组又分 L、N 和 Z 各 3 个亚组, 每个亚组 3 个孔, 即每行的 1—3 孔为 L 亚组、4—6 孔为 N 亚组, 7—9 孔为 Z 亚组。96 孔板的第 1 行(A 行)为空白对照组, 其余各行(B—H 行)为中草药提取液样品组。每孔加入白细胞悬液(1×10^5 CFU/ml) 100 μl; 中草药样品组的各孔再加入制备的中草药提取液 100 μl、空白对照组的各孔加入 PBS 100 μl、阳性对照组(A 行 7—9 孔)的各孔加入 5.0 mg/ml 酵母聚糖 100 μl; 此后, 所有样品组的 Z 亚组各孔再加 5.0 mg/ml 酵母聚糖 100 μl, 再用 PBS 将所有各孔补齐到 300 μl; 室温孵育 2 h 后, 每孔吸去上清液 100 μl, 用 100 μl 细胞培养液 L-15 洗涤 3 次; L 亚组各孔添加细胞培养基 L-15 50 μl, N 亚组和 Z 亚组各孔添加细胞培养液 L-15 和氮蓝四唑(NBT)各 50 μl, 再用 PBS 将所有各孔补齐到 200 μl。室温孵育 1 h 后, 每孔吸去 100 μl 上清液, 加 100 μl 甲醇固定 3 min, 再吸去 100 μl 上清液, 用 100 μl 70%甲醇洗涤 3 次。小心吸去各孔内的所有液体, 室温风干, 每孔加入 2 mol/L KOH 100 μl 和 DMSO 200 μl; 用酶标仪测定各孔

OD_{630nm} 值, 分别计算 N 组相对氧呼吸爆发活性 (Oxygen Respiratory Burst Activity of N Group, ORB_N)、Z 组相对氧呼吸爆发活性 (ORB_Z)、N 组氧呼吸爆发活性提高率 (Elevation of Oxygen Respiratory Burst Activity of N Group, $EORB_N$)、Z 组氧呼吸爆发活性提高率 ($EORB_Z$) 及 Z 与 N 组氧呼吸爆发活性差值 (ORB_{Z-N}), 计算方法如下:

$$ORB_N = OD_N - OD_L$$

$$ORB_Z = OD_Z - OD_L$$

$$EORB_N(\%) = (\text{试验组 } ORB_N - \text{空白对照组 } ORB_N) / \text{空白对照组 } ORB_N \times 100$$

$$EORB_Z(\%) = (\text{试验组 } ORB_Z - \text{空白对照组 } ORB_Z) / \text{空白对照组 } ORB_Z \times 100$$

$$EORB_{Z-N} = EORB_Z\% - EORB_N\%$$

式中, OD_L 为 L 亚组 OD_{630nm} 值, OD_N 为 N 亚组 OD_{630nm} 值, OD_Z 为 Z 亚组 OD_{630nm} 值, ORB_N 指剔除细胞培养液 L-15 作用, 外周血白细胞的氧呼吸爆发活性; ORB_Z 指剔除细胞培养液 L-15 作用后, 与酵母聚糖共同作用下白细胞氧呼吸爆发活性; $EORB_N > 0$ 表明中草药提取液具有提高白细胞氧呼吸爆发活性, $EORB_N$ 越大表明中草药提取液样品或酵母聚糖提高白细胞氧呼吸爆发活性越强; $EORB_Z > 0$ 指中草药提取液与酵母聚糖协同作用具有提高白细胞氧呼吸爆发活性。筛选 $EORB_N > 10\%$ 且中草药组与空白组 ORB_N 具有显著性差异 (t 检验 $P < 0.05$) 的中草药 (具有较强的免疫增强效果); 或 $EORB_Z > 10\%$ 、 $EORB_{Z-N} > 0$, 且中草药组与空白组 ORB_Z 具有显著性差异 (t 检验 $P < 0.05$) 的中草药 (与酵母聚糖具有较强的协同免疫增强效果), 进行后续棕点石斑鱼外周血细胞吞噬活性实验。

1.2.5 提高血白细胞吞噬活性中草药筛选 参考戴小连等 (2012) 方法检测筛选中草药对外周血白细胞吞噬活性的影响。取无菌 1.5 ml 离心管, 加入 100 μ l 白细胞悬液 (5×10^5 CFU/ml), 此后, 中草药组添加中草药浸提液 100 μ l, 空白对照组加 PBS 100 μ l, 室温孵育 1 h; 每管加入 100 μ l 0.133 g/ml 的乳胶微球, 轻轻混匀, 取 100 μ l 滴于带凹槽载玻片的凹槽内, 室温孵育 1 h, 吸去凹槽中的液体, 加戊二醛 100 μ l, 室温固定 5 min, 吸去液体, 加入 Giemsa 染色 0.5 h, 蒸馏水冲洗, 自然晾干。油镜下分别取 5 个视野观察计数, 每种中草药平行检测两次, 计算吞噬活性率 (PA) 和吞噬指数 (PI):

$$PA = \text{吞噬乳胶球的白细胞数} / \text{总白细胞数} \times 100\%$$

$$PI = \text{被吞噬的乳胶球总数} / \text{吞噬乳胶球的白细胞总数}$$

根据 PA 和 PI 测定结果, 筛选能同时提高棕点石斑鱼外周血白细胞氧呼吸爆发活性和吞噬活性的中草药。

1.2.6 中草药免疫增强剂的体内免疫效果验证 将能同时提高棕点石斑鱼离体外周血白细胞氧呼吸爆发活性和吞噬活性的中草药分别拌料投喂棕点石斑鱼, 饲料中中草药生药含量为 1% (对照组为无中草药的基础饲料), 连续投喂 28 d 后, 按 1.2.4 方法检测各组棕点石斑鱼外周血和头肾白细胞氧呼吸爆发活性差异。

1.2.7 数据处理 采用软件 Origin Pro 8.0 对数据进行统计分析, 采用 t 检验进行组间显著性分析, 显著水平为 $P < 0.05$, 极显著水平为 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 棕点石斑鱼外周血白细胞分离液的筛选

不同混合比例的生理盐水与 Percoll 细胞分离液制备的混合液对棕点石斑鱼外周血白细胞分离效果影响研究结果显示 (图 1), Percoll 细胞分离液密度为 1.084 g/ml 时, 棕点石斑鱼外周血白细胞分离效果最好, 其次为 1.077 g/ml。为此, 选择生理盐水与 Percoll 细胞分离液密度为 1.084 g/ml 用于后续各项实验的棕点石斑鱼外周血白细胞分离。

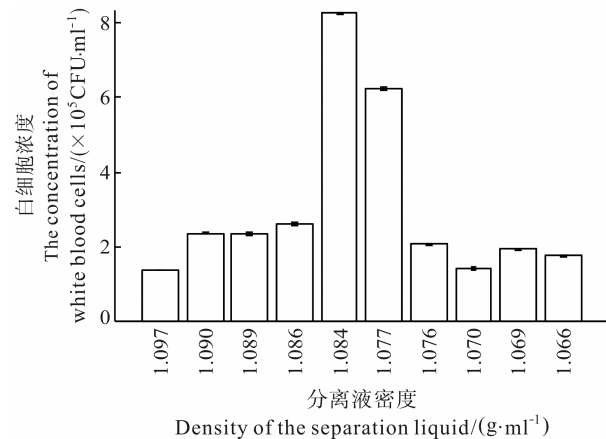


图 1 不同密度的 Percoll 细胞分离液对棕点石斑鱼外周血细胞分离的影响

Fig.1 The effects of density of Percoll gradient solution on the separation of the white blood cells of *E. fuscoguttatus*

2.2 提高棕点石斑鱼白细胞氧呼吸爆发活性中草药筛选

墨旱莲等 39 种中草药提取液对棕点石斑鱼离体外周血白细胞体外氧呼吸爆发活性影响研究结果显示 (图 2), 丹参和墨旱莲两种中草药的 ORB_N 值与对照组有极显著差异 ($P < 0.01$), 其 $EORB_N$ 分别为 91.61%

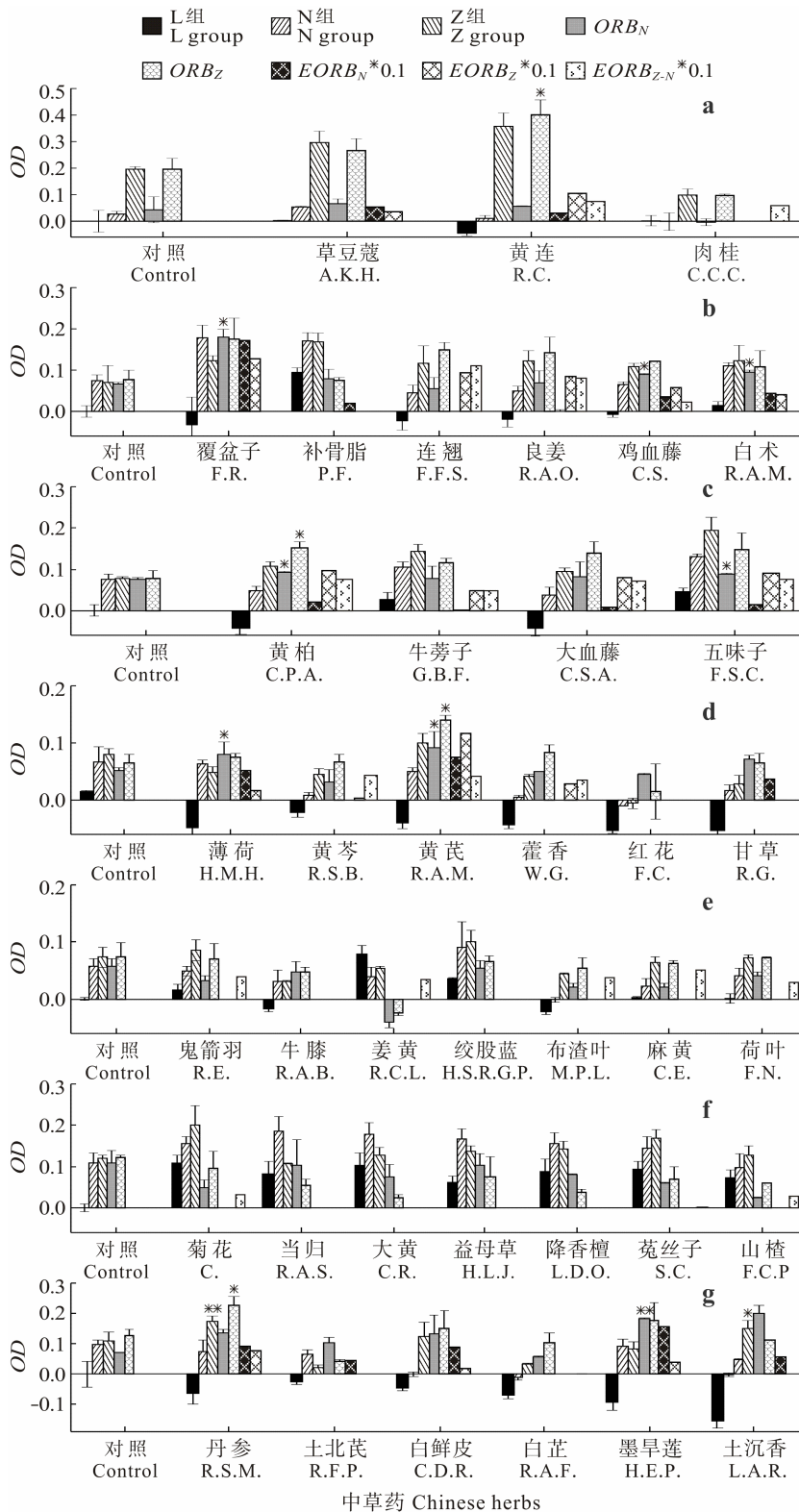


图 2 不同中草药提取液对棕点石斑鱼外周血细胞体外产氧负离子能力的影响

Fig.2 The effects of the extraction of different Chinese herbs on the activity of superoxide anion production of the white blood cells of *E. fuscoguttatus*

和 157.34%; 覆盆子、鸡血藤、白术、黄柏、五味子、薄荷、黄芪和土沉香 8 种中草药的 ORB_N 值与对照组有显著差异 ($P < 0.05$), 它们的 $EORB_N$ 分别为 171.70%、35.09%、43.40%、20.26%、15.03%、51.92%、75.00% 和 111.19%, 均大于 15%。说明以上 10 种中草药提取液能够显著提高棕点石斑鱼外周血白细胞的氧呼吸爆发活性。黄连、黄柏和黄芪 3 组中草药的 ORB_Z 与对照组有显著性差异, $EORB_Z$ 为 104.59%、79.22% 和 116.22%, 且 $EORB_{Z-N}$ 分别为 74.36%、75.84% 和 41.22%, 均大于 10%, 说明这 3 种中草药与酵母聚糖具有协同提高棕点石斑鱼外周血白细胞氧呼吸爆发活性的功能, 不过, 在这 3 种中草药中, 黄柏和黄芪单独使用也可显著提高棕点石斑鱼外周血白细胞的氧呼吸爆发活性, 而黄连单独使用对棕点石斑鱼外周血白细胞氧呼吸爆发活性影响并不显著。

图 2 中 $EORB_N$ 、 $EORB_Z$ 和 $EORB_{Z-N}$ 若为负值则自动归零。与对照组进行双边 t 检验, * 表示 $P < 0.05$, 显著差异; ** 表示 $P < 0.01$, 极显著差异。

2.3 提高棕点石斑鱼白细胞吞噬活性中草药筛选

对上述筛选的单独使用或与酵母聚糖联合使用可显著提高棕点石斑鱼外周血白细胞体外氧呼吸爆发活性的 11 种中草药, 进一步检测其对棕点石斑鱼外周血白细胞吞噬活性的影响。结果显示(图 3), 五味子对棕点石斑鱼外周血白细胞的吞噬活性的激活有抑制作用 ($P < 0.05$), 土沉香对棕点石斑鱼外周血白细胞的吞噬活性有抑制作用 ($P < 0.05$), 鸡血藤可极显著提高棕点石斑鱼外周血白细胞的 PI 值 ($P < 0.01$), 墨早莲和黄柏可显著提高棕点石斑鱼外周血白细胞的 PI 值 ($P < 0.05$)。表明鸡血藤、墨早莲和黄柏这 3 种中草药可同时显著提高棕点石斑鱼外周血白细胞的体外氧呼吸爆发活性和体外吞噬活性。

2.4 中草药对棕点石斑鱼体内免疫增强效果验证

对能同时提高棕点石斑鱼离体白细胞的体外氧呼吸爆发活性和吞噬活性的鸡血藤、墨早莲和黄柏, 分别按 1%生药添加量拌料投喂棕点石斑鱼 28 d 后, 其外周血白细胞和头肾白细胞氧呼吸爆发活性如图 4 所示。结果显示, 投喂鸡血藤、墨早莲、黄柏后, 棕点石斑鱼外周血白细胞氧呼吸爆发活性均极显著高于对照组, 而投喂墨早莲后棕点石斑鱼头肾白细胞氧呼吸爆发活性极显著高于对照组、投喂黄柏显著高于对照组。

3 讨论

3.1 细胞分离液对外周血白细胞分离效果的影响

鱼类属于低等脊椎动物, 血细胞的组成和血液指数因种类不同而差异较大, 以细胞分离液进行外周血白细胞分离时, 因鱼类种类不同分离条件也存在差异, 银大麻哈鱼、日本鳗、草鱼、真鲷、鲤等鱼类外周血白细胞分离条件研究已有报道(丰培金等, 2004), 其中, 草鱼、真鲷、鲤可将外周血白细胞有效分离出来的分离液密度分别为: 1.080-1.085、1.07、1.085 mg/ml, 而本研究对棕点石斑鱼外周血白细胞分离效果显示, 最佳的 Percoll 细胞分离液密度为 1.077-1.084 mg/ml, 与草鱼和鲤的外周血白细胞分离液密度较为相近。

3.2 中草药免疫增强剂筛选

随着水产健康和安全养殖发展的要求, 中草药等安全高效药物的研究与开发日愈迫切。盛竹梅等(2013)考察了由麻黄等 6 味中草药组成的复方制剂不同剂量投喂对鲫鱼免疫力的影响并得出该复方可有效提高鲫鱼血液白细胞吞噬活性等非特异免疫力的结论; 简纪常等(2002)用添加以黄

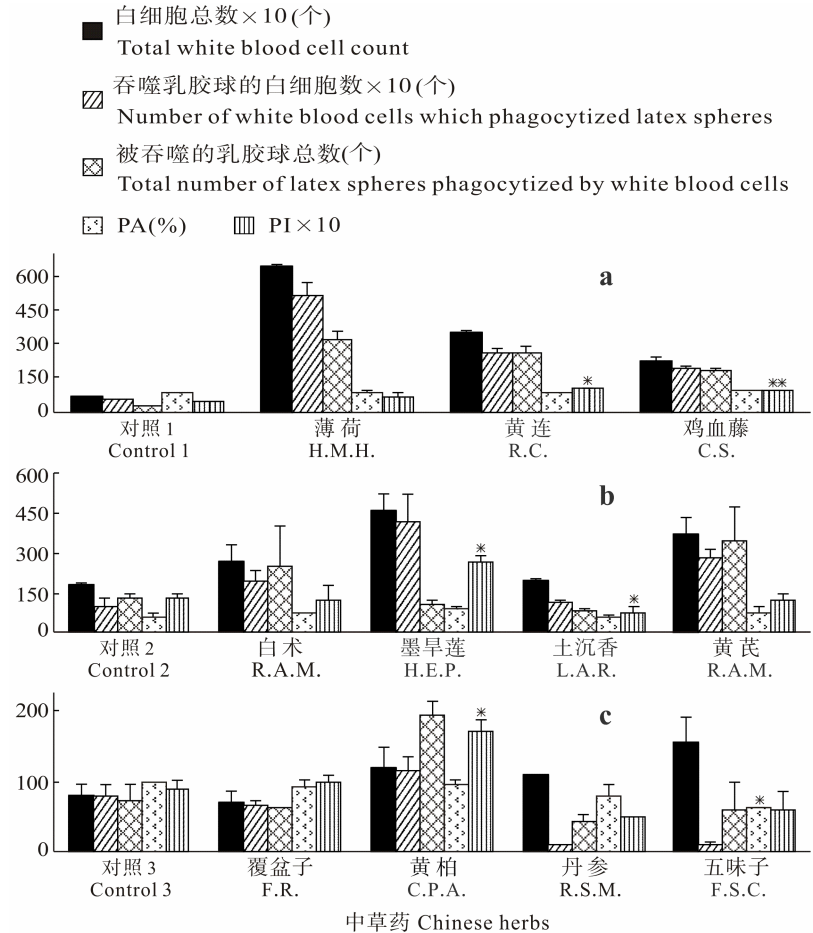


图3 不同中草药对棕点石斑鱼外周血白细胞体外吞噬活性的影响
 Fig.3 The effects of different Chinese herbs on the phagocytic activity of the white blood cells of *E. fuscoguttatus*

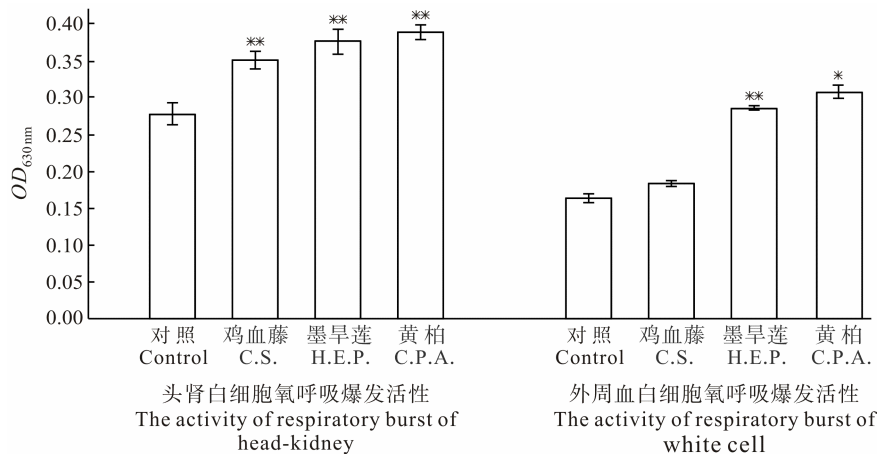


图4 饲喂不同中草药对棕点石斑鱼外周血和头肾白细胞氧呼吸爆发活性的影响
 Fig.4 The effects of different Chinese herbs on the respiratory burst activity of the white blood cells and head kidney white cells of *E. fuscoguttatus*

芪为主药的中草药的配合饲料饲喂建鲤后, 测定了建鲤非特异性免疫指标 NBT 阳性细胞和溶菌酶活力均显著提高; 张照红等(2011)研究由黄芪等 7 味中草药

组成的复方不同剂量投喂对奥尼罗非鱼血液 NBT 阳性细胞数量、血清中超氧化物歧化酶等非特异性免疫功能的影响, 结果显示投喂 1.5% 复方中草药可显著提高奥尼罗非鱼非特异性免疫力; Christyapita 等(2007)以单方中草药牛膝和早莲草分别投喂罗非鱼, 结果表明能显著提高罗非鱼的免疫力; 李超等(2011)采用拌料投喂的方法筛选增强草鱼免疫功能的复方中草药免疫增强剂, 结果表明由黄芪等 10 味中草药组成的复方的效果最佳。

本研究采用离体外周血白细胞与中草药提取液共孵育, 通过综合考察中草药对离体白细胞氧呼吸爆发活性和吞噬活性的影响, 从 39 种中草药中筛选出可以显著提高棕点石斑鱼外周血白细胞氧呼吸爆发活性的 10 种中草药。已有报道认为黄芪可提高奥尼罗非鱼血液 NBT 阳性细胞数量和血清中超氧化物歧化酶活性(张照红等, 2011)和建鲤的 NBT 阳性细胞数量和溶菌酶活力(简纪常等, 2002), 还可提高草鱼的多种非特异性免疫功能(李超等, 2011)和黄颡鱼头肾巨噬细胞的氧呼吸爆发活性(吴旋等, 2011); 筛选出鸡血藤、墨旱莲和黄柏这 3 种中草药既可同时提高棕点石斑鱼外周血白细胞的氧呼吸爆发活性和吞噬活性, 采用拌料投喂的实验方法对所筛选的 3 种中草药进行体内免疫增强效果考察, 结果显示该 3 种中草药均可极显著或显著提高棕点石斑鱼白细胞氧呼吸爆发活性和吞噬活性, 说明离体筛选结果与体内投喂实验验证结果一致, 利用该离体筛选方法进行中草药免疫增强剂筛选是可行的。而且, 已有研究表明鸡血藤水提液可提高小鼠淋巴因子活化杀伤细胞和 NK 细胞的活性(胡利平等, 1997), 其主要活性成分有黄酮类、萜类、甾醇类、萜醌类、内酯类、苷类等(符影等, 2011), 其中黄酮类化合物可促进 IL-3 的分泌及调节促红细胞(EPO)水平(邓家刚等, 2007), 促进白细胞生成(应军等, 2011), 为此, 鸡血藤对棕点石斑鱼免疫增强作用的主要成分可能是其黄酮类化合物。有研究表明墨旱莲中具有黄酮成分——木樨草素和榭皮素, 这类黄酮类成分具有增强免疫功能作用(张梅等, 1997), 可刺激小鼠脾淋巴细胞增殖转化, 提高小鼠的血清溶血素水平, 增强小鼠的单核-腹腔巨噬细胞的吞噬能力和 NK 细胞活性等(王彦武等, 2008), 可显著提高溶菌酶, 补体等非特异性免疫功能(Christyapita *et al.*, 2007)。黄柏能显著提高点带石斑鱼血液中 NBT 阳性细胞数(赵晶晶等, 2012), 其主要活性成分为生物碱类物质(侯小涛等, 2007); 采用离体筛选方法省去了投喂的过程, 并且避免了投喂过程中因不同个体摄食

量的差异而对结果产生的影响。相对于拌料投喂的筛选方法, 本研究所采用的离体筛选方法具有结果客观、筛选速度快捷、筛选成本低等优点, 非常适合大量样品的快速筛选。

参 考 文 献

- 孔祥迪, 陈超, 李炎璐, 等. 4 种常用消毒药物对棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)受精卵孵化的影响. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 122-127
- 丰培金, 卢强, 李莲瑞, 等. 鲤鱼外周血白细胞的分离和体外培养. 中国兽医学报, 2004, 24(4): 369-371
- 王彦武, 李凤文, 黄超培, 等. 墨旱莲提取物对小鼠免疫调节作用的研究. 应用预防医学, 2008, 14(6): 354-356
- 邓家刚, 梁宁, 林启云. 鸡血藤总黄酮对血虚模型小鼠造血功能的影响. 中草药, 2007, 38(7): 1055-1056
- 邢跃楠, 赵文. 中草药在水产养殖中的应用的研究进展. 中国水产, 2007(4): 64-66
- 李华, 张太娥, 李强. 复方中草药对大菱鲆非特异性免疫力的影响. 大连水产学院学报, 2013, 28(2): 115-120
- 李明, 董晓慧. 中草药在水产养殖中的研究进展. 饲料研究, 2007(2): 56-58
- 李超, 张其中, 杨莹莹, 等. 不同剂量复方中草药免疫增强剂对草鱼生长性能和免疫功能的影响. 上海海洋大学学报, 2011, 20(4): 534-540
- 吴旋, 白东清, 朱国霞, 等. 长期投喂黄芪多糖对黄颡鱼免疫细胞活性的影响. 动物营养学报, 2011, 23(5): 887-892
- 应军, 肖百全, 杨威, 等. 鸡血藤提取物对环磷酰胺致白细胞低下大鼠的影响. 中草药, 2011, 42(4): 752-755
- 张梅, 邱晓辉, 刘梅. 旱莲草中黄酮类成分的免疫调节作用. 中草药, 1997, 28(10): 615-615
- 张照红, 林旋, 张伟妮, 等. 复方中草药对奥尼罗非鱼血液非特异性免疫功能的影响. 水产科学, 2011, 30(1): 1-5
- 陈孝焯, 吴志新, 殷居易, 等. 大黄、穿心莲、板蓝根和金银花对异育银鲫免疫机能的影响. 中国水产科学, 2003, 10(1): 36-40
- 陈信忠, 苏亚玲, 龚艳清, 等. 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 5 种养殖石斑鱼的神经坏死病毒. 中国水产科学, 2004, 11(3): 202-207
- 陈晓燕, 胡超群, 陈偿, 等. 人工养殖点带石斑鱼弧菌病原菌的分离及鉴定. 海洋科学, 2003, 27(6): 68-72
- 陈超, 孔祥迪, 李炎璐, 等. 棕点石斑鱼(♀)×鞍带石斑鱼(♂)杂交子代胚胎及仔稚幼鱼发育的跟踪观察. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 135-144
- 赵晶晶, 陈成勋, 王庆奎, 等. 黄柏对点带石斑鱼生理生化指标的影响. 饲料工业, 2012, 33(6): 15-19
- 胡利平, 樊良卿, 杨锋, 等. 鸡血藤对小鼠 LAK、NK 细胞的影响. 浙江中医药大学学报, 1997, 21(6): 29-30
- 侯小涛, 戴航, 周江煜. 黄柏的药理研究进展. 时珍国医国药, 2007, 18(2): 498-500
- 徐先栋, 谢珍玉, 欧阳吉隆, 等. 褐点石斑鱼脱鳞病原菌的分离与鉴定. 海洋科学, 2012, 36(2): 67-74
- 黄志坚, 何建国. 鲑点石斑鱼细菌病原的分离鉴定和致病性.

- 中山大学学报(自然科学版), 2002, 41(5): 64-67
- 盛竹梅, 马志宏, 黄文, 等. 复方中草药对鲫鱼免疫力的影响. 四川农业大学学报, 2012, 30(4): 463-467
- 符影, 程悦, 陈建萍, 王冬梅. 鸡血藤化学成分及药理作用研究进展. 中草药, 2011, 42(6): 1229-1234
- 覃映雪, 池信才, 苏永全, 等. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原. 水产学报, 2004, 28(3): 297-302
- 温周瑞, 刘慧集, 骆敏, 等. 中草药对水产动物免疫作用研究进展. 水利渔业, 2004, 24(2): 1-3
- 简纪常, 吴灶和. 中草药对建鲤非特异性免疫功能的影响. 大连水产学院学报, 2002, 17(2): 114-119
- 戴小连, Thawonsuwan J, 李宏, 等. 中药和泰药提取物对褐点石斑鱼的免疫效果. 海南大学学报(自然科学版), 2012, 30(2): 133-140
- Bairwa MK, Jakhar JK, Satyanarayana Y, *et al.* Animal and plant originated immunostimulants used in aquaculture. J Nat Plant Resour, 2012, 2(3): 397-400
- Christybapita D, Divyagnaneswari M, Michael RD. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. Fish & Shellfish Immunol, 2007, 23(4): 840-852
- Citarasu T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. Aquacult Int, 2010, 18(3): 403-414

(编辑 冯小花)

Rapid Screening of Chinese Herbal Immunostimulants for *Epinephelus fuscoguttatus*

SUN Xiaofei, GUO Weiliang, XIE Zhenyu, WANG Shifeng, HU Wenting, LI Fusheng, WANG Wenhui, ZHOU Yongcan^①

(State Key Laboratory Breeding Base for Sustainable Exploitation of Tropical Biotic Resources, College of Marine Science, Hainan University, Haikou 570228)

Abstract *Epinephelus fuscoguttatus* is a new culturing breed with great commercial values and broad market prospects. Frequent invasion of disease restricts the development of *E. fuscoguttatus* industry. With the characteristics of pollution-free, low-toxic, and low residuals, Chinese herbs as immunostimulants may be candidates for the prevention and control the diseases among *E. fuscoguttatus*. In this study, Chinese herbal immunostimulants were screened using nitroblue tetrazolium (NBT) reduction method by incubating the isolated white blood cell with water extracts from Chinese herbs. Water extracts from 39 kinds of 100 mg/ml Chinese herbs mixed with or without 5.0 mg/ml zymosan were utilized. Phagocytizing latex beads was employed to determine the effect of water extracts on the respiratory burst activity of the white blood cells on the phagocytic activity. The screened Chinese herbal immunostimulants were mixed with the feedstuff to feed *E. fuscoguttatus*. The results showed that 10 Chinese herbs extracts significantly increased the respiratory burst of white blood cells more than 15% compared to those in the control group. Three Chinese herbs extracts mixed with zymosan significantly increased the respiratory burst of white blood cells more than 70%. The water extracts from *Caulis spatholobi*, *Cortex phellodendri amurensis* and *Herba ecliptae prostratae* simultaneously elevated the respiratory burst and the phagocytic activity of white blood cell of *E. fuscoguttatus*. The *in vivo* experiments also demonstrated that the water extracts from *Caulis spatholobi*, *Cortex phellodendri amurensis* and *Herba ecliptae prostratae* significantly elevated the respiratory burst and the phagocytic activity of white blood cell and head kidney white cells of *E. fuscoguttatus*. In this study, 3 Chinese herbal immunostimulants were screened, which significantly enhanced the immune responses in *E. fuscoguttatus*. These results provide evidence to the development and application of new, safe and effective immunostimulants of *E. fuscoguttatus*.

Key words *Epinephelus fuscoguttatus*; Immunostimulant; Chinese herb; Respiratory burst activity; Phagocytic activity

① Corresponding author: ZHOU Yongcan, E-mail: zychnu@163.com