

黄芪等复方中药对锯缘青蟹免疫力的影响

谢丽玲 成 凯 朱炎坤 赵水灵 梁剑勇

(汕头大学理学院生物系, 515063)

摘 要 将黄芪、黄芩、杜仲和甘草按照 4 : 3 : 2 : 1 的质量比制成一定浓度的复方药液并注射锯缘青蟹, 分析血淋巴中的酚氧化酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶等相关的非特异免疫因子活力。结果表明, 青蟹血清酚氧化酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶的活力和血清抗菌活力比对照组显著提高 ($P < 0.05$), 除超氧化物歧化酶外, 各种免疫酶活力在注射后先缓慢上升, 2d 达到最高值, 然后缓慢下降, 至第 4 天基本回复到正常水平。用副溶血弧菌攻毒 7d 后, 注射复方中药提取液的锯缘青蟹, 其免疫保护率达到 53.33%。

关键词 锯缘青蟹 中药 免疫增强剂

中图分类号 S963 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)06-0093-06

Effects of Chinese herbal formula on the immune response of mud crab *Scylla serrata*

XIE Li-ling CHENG Kai ZHU Yan-kun ZHAO Shui-ling LIANG Jian-yong

(Department of Biology, College of Sciences, Shantou University, 515063)

ABSTRACT Experiments were carried out to explore the function of Chinese herbal medicine as immunostimulants in *Scylla serrata*. The formula included *Astragalus membranaceus*, *Baicalensis Georgi*, *Eucommia ulmoides Oliver*, and *GLycyrrhiza uralensis Fisch* in the proportion of 4 : 3 : 2 : 1. The control group was injected with saline, while the experimental groups were injected with liquid formulated Chinese herbal formula medicine. The activity of enzymes in hemolymph firstly increased until the peak appeared 2-day after injection (except SOD), then decreased back to normal level 4-day after injection. The survival rate of treatment groups was improved to 53.33% when *S. serrata* was subjected to *Vibrio parahaemolyticus*. It is suggested that this herbal formula may be used as a herbal feed additive and serve as an effective immunostimulant in cultured aquatic animals.

KEY WORDS *Scylla serrata* Chinese herbal medicine Immunostimulants

锯缘青蟹 *Scylla serrata* 俗称青蟹, 分类上属甲壳纲 Crustacea、十足目 Decapoda、短尾亚目 Brachyura、梭子蟹科 Portunidae, 是我国东南沿海的主要经济蟹类之一。但随着集约化养殖业的发展, 青蟹易遭受细菌、病毒和寄生虫病害的感染(徐海圣等 2009; 毛芝娟等 2001; Holme *et al.* 2009), 严重制约了我国养殖业的

发展。为此,国内外学者对青蟹病害的防治进行积极的探索(艾春香等 2005;潘清清 2008;Pavasovic *et al.* 2004),然而迄今为止,尚无有效的防治策略。近年来中草药免疫增强剂越来越多地受到了人们的重视,并且在水产养殖业上的应用也越来越广。

中草药作为天然药物,具有低残留、低副作用、环境友好等优点,并且其中有些抑菌杀菌效果明显,在现代预防、控制细菌性感染疾病和解决微生物耐药性问题中发挥了积极作用。关于中草药作为水产动物饲料添加剂的报道不少,但以单方或者精制多糖作为研究对象居多(崔青曼等 2001;杨福刚等 2005;陈星 2007;付媛媛等 2011),根据与中药饲料添加剂相关的文献报道(周洪波等 2002;童国忠等 2007),本研究筛选出黄芪、黄芩、杜仲、甘草 4 种中药,按照一定配比制成粗提药液,以注射法研究复方中药对锯缘青蟹免疫力的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验中 草药

黄芪、黄芩、杜仲、甘草购自广东汕头市龙安药店,经鉴定后用搅碎机磨碎后过筛,室温干燥保存。

1.2 实验 菌种

副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* 由汕头大学海洋生物研究所惠赠,金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 由汕头大学医学院惠赠。将菌种接种于 LB 普通培养基和营养肉汤培养基中,置于摇床中培养 24 h 活化即可用。

1.3 实验 动物

锯缘青蟹于 2010 年 9~10 月购自广东汕头市牛田洋青蟹养殖基地,体重 100 ± 20 g。随机挑取 30 只青蟹,选用自制海水(盐度为 15),暂养于 $56 \text{ cm} \times 45 \text{ cm} \times 27 \text{ cm}$ 塑料箱中,每天更换海水 1 次,水温 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, pH 7.4 ± 0.2 , 24 h 充气。在箱底放置拱形瓦片供青蟹栖息。每天晚间投喂各组红肉篮蛤,投喂量根据第 2 天的剩余量来决定。

1.4 实验 方法

1.4.1 中 药 水 提 液 的 制 备

用电子天平分别准确称取黄芪、黄芩、杜仲、甘草粉末 20.0、15.0、10.0、5.0g 分装于 4 个干净的烧瓶中,分别按照不同的提取条件提取其水提液。黄芪和黄芩水提液提取条件为:料液比为 1:10,提取温度为 100°C ,提取时间为 1h,提取次数为 3 次;甘草和杜仲水提液提取条件:料液比为 1:15,提取温度为 80°C ,提取时间为 1.5h,提取次数为两次。每次提取结束后,分别将上清液收集,经两次纱布过滤,3 500r/min 离心 10min,最后取上清液,在水浴锅中浓缩并分别定容至 20、15、10、5ml,然后混匀,即为 50ml 的复方药液,置于 4°C 冰箱备用。

1.4.2 中 药 水 提 液 注 射 浓 度 的 确 定

参照潘清清(2008)的方法进行。分别设置 4×10^{-2} 、 4×10^{-3} 、 4×10^{-4} g/ml 3 个浓度梯度,根据注射中草药水提液后青蟹的成活率,确定合适的注射浓度。

1.4.3 中 药 水 提 液 注 射 浓 度 的 确 定

中草药水提液的注射采用一次性给药方式进行(田允波等 2008)。取 0.2ml 1.4.2 中筛选的合适浓度的中草药水提液分别注射实验组,对照组注射相同剂量的生理盐水。在注射后 0.5、1、2、3、4d 分别抽取血淋巴进行血清的制备。

1.4.4 血 清 的 制 备

采用 1ml 一次性灭菌注射器在青蟹的第 3 或 4 步足的基关节膜处采集血淋巴液。 4°C 冰箱过夜,600g 离

心 20min, 取上清液即为血清, 置于 -20°C 备用。

1.4.5 血清免疫酶活力的测定

酚氧化酶(Phenoloxidase, PO)的测定参照 Ashida(1971)的方法进行, 溶菌酶(Lysozyme, LZM)、碱性磷酸酶(Alkalinephosphatase, AKP)、酸性磷酸酶(Acidphosphatase, ACP)、过氧化物酶(Peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)的测定均按照南京建成生物工程研究所生产的相关试剂盒进行测定。

1.4.6 血清抗菌活力的测定

采用 Hultmark 等(1980)的方法并加以改进。取 24 h 金黄色葡萄球菌培养液, 0.5% 福尔马林溶液 37°C 水浴灭活 24 h, 灭活菌体 $6\ 000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min, 0.1mol/L pH 6.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次, 制备 OD 为 0.4 的菌悬液, 取 3ml 该悬液冰浴 10min, 添加 $50\mu\text{l}$ 待测血清, 混匀后于 570nm 下测其吸光度 A_0 , 然后 37°C 水浴 30min, 冰浴终止反应, 测吸光度 A 。最后按照公式计算抗菌活力: 抗菌活力 = $\sqrt{(A_0 - A)/A}$ 。

1.4.7 攻毒试验

取副溶血弧菌过夜培养物, $6\ 000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min 收集菌体, 0.9% 生理盐水洗涤菌体两次, 血球计数板计数后, 制备浓度为 $1 \times 10^8\text{CFU}/\text{ml}$ 的菌悬液。同时, 随机挑取 $100 \pm 20\text{g}$ 的锯缘青蟹 40 只, 分为对照组和实验组两组, 每组 10 只, 设两个平行, 其中对照组注射生理盐水, 实验组注射 0.2ml 浓度为 $4 \times 10^{-4}\text{g}/\text{ml}$ 的中药水提液。2d 后取 0.2ml 副溶血弧菌悬液在青蟹的第 3 或 4 步足的基关节膜处注射。攻毒期间各组不进行投喂食物和更换海水, 在接下来的 7d 内观察各组的死亡情况。免疫保护率按如下公式计算:

$$\text{免疫保护率} = (\text{对照组死亡率} - \text{免疫组死亡率}) / \text{对照组死亡率} \times 100\%$$

1.5 数据统计分析

利用 SPSS 13.0 软件, 实验数据采用平均值士标准差的格式表示, 对实验数据进行单因素方差(ANOVA)分析。显著水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 注射用中草药提取液浓度的确定

选取浓度为 4×10^{-2} 、 4×10^{-3} 、 $4 \times 10^{-4}\text{g}/\text{ml}$ 的复方药液注射青蟹, 分析锯缘青蟹注射后 7d 内的成活率。结果如表 1 所示。浓度为 $4 \times 10^{-4}\text{g}/\text{ml}$ 的复方药液对青蟹成活率几乎没影响, 说明该浓度的中草药提取液适合于青蟹的注射。

表 1 中草药注射浓度对锯缘青蟹成活率的影响

Table 1 Effect of different concentrations of liquid Chinese herbal medicine on the survival rate of *S. serrata*

注射浓度 Injection concentration(g/ml)	注射剂量 Injection volume(ml)	成活率 Survival rate(%)
4×10^{-2}	0.20	20
4×10^{-3}	0.20	40
4×10^{-4}	0.20	100

2.2 中草药对锯缘青蟹血清免疫酶活力的影响

2.2.1 中草药对锯缘青蟹酚氧化酶活力的影响

如表 2 所示, 实验组酚氧化酶活力在注射后 4d 内与对照组相比均存在显著性差异($P < 0.05$), 其中注射后 2d, 实验组酚氧化酶活性达到最高值, 为 $4.70 \pm 0.141\text{U}/100\text{ml}$ 。

表2 注射中草药对锯缘青蟹酚氧化酶活力的影响

Table 2 Effect of liquid Chinese herbal medicine on the enzyme activity of phenoloxidase

组别 Group	不同时间的酶活力 Enzyme activity at different time(U/100ml)				
	0.5d	1d	2d	3d	4d
对照组 Control	2.80±0.300	2.90±0.200	2.70±0.300	2.60±0.200	2.40±0.300
实验组 Treatment	3.28±0.264*	3.80±0.282*	4.70±0.141*	3.55±0.707*	3.00±0.141*

注: *代表差异显著($P<0.05$),下表同

Note: * represents significant difference($P<0.05$). Same in the following tables

2.2.2 中草药对锯缘青蟹溶菌酶活力的影响

如表3所示,与对照组相比,实验组溶菌酶活力明显上升,其中注射2d后,实验组溶菌酶活性达到最高值,为 11.50 ± 0.863 U/ml。

表3 注射中草药对锯缘青蟹溶菌酶活力的影响

Table 3 Effect of liquid Chinese herbal medicine on the enzyme activity of lysozyme

组别 Group	不同时间的酶活力 Enzyme activity at different time(U/ml)				
	0.5d	1d	2d	3d	4d
对照组 Control	6.897±0.213	7.390±0.403	7.007±0.131	6.906±0.094	6.723±0.367
实验组 Treatment	7.405±0.191*	7.940±0.382	11.50±0.863*	8.095±0.163*	7.880±0.410*

2.2.3 中草药对锯缘青蟹碱性磷酸酶活力的影响

如表4所示,与对照组相比,实验组碱性磷酸酶活力明显上升,其中注射2d后,碱性磷酸酶活性达到最高值,为 26.800 ± 0.396 金氏单位/100ml。

表4 注射中草药对锯缘青蟹碱性磷酸酶活力的影响

Table 4 Effect of liquid Chinese herbal medicine on the enzyme activity of alkalinephosphatase

组别 Group	不同时间的酶活力 Enzyme activity at different time(金氏单位/100ml)				
	0.5d	1d	2d	3d	4d
对照组 Control	9.533±0.846	10.033±0.703	9.243±0.987	8.910±0.507	9.540±0.220
实验组 Treatment	9.520±0.057	18.455±0.304*	26.800±0.396*	15.605±1.82*	11.450±0.948*

2.2.4 中草药对锯缘青蟹酸性磷酸酶活力的影响

如表5所示,与对照组相比,实验组的酸性磷酸酶活力明显上升,其中注射2d后,酸性磷酸酶活性达到最高值,为 1.15 ± 0.183 U/100ml。

表5 注射中草药对锯缘青蟹酸性磷酸酶活力的影响

Table 5 Effect of liquid Chinese herbal medicine on the enzyme activity of acidphosphatase

组别 Group	不同时间的酶活力 Enzyme activity at different time(U/100ml)				
	0.5d	1d	2d	3d	4d
对照组 Control	0.674±0.0350	0.631±0.006	0.673±0.096	0.695±0.0510	0.701±0.0120
实验组 Treatment	0.709±0.0190	0.957±0.114*	1.15±0.183*	0.826±0.701*	0.842±0.0290

2.2.5 中草药对锯缘青蟹过氧化物酶活力的影响

如表 6 所示,与对照组相比,实验组的过氧化物酶活力明显上升,其中注射 2d 后,过氧化物酶活力达到最高值,为 107.42 ± 2.77 U/ml。

表 6 注射中草药对锯缘青蟹过氧化物酶活力的影响

Table 6 Effect of liquid Chinese herbal medicine on the enzyme activity of peroxidase

组别 Group	不同时间的酶活力 Enzyme activity at different time(U/ml)				
	0.5d	1d	2d	3d	4d
对照组 Control	49.377 ± 0.758	45.203 ± 3.630	53.793 ± 3.450	49.580 ± 4.150	45.667 ± 5.720
实验组 Treatment	49.750 ± 3.680	$58.030 \pm 0.269^*$	$107.420 \pm 2.770^*$	$57.822 \pm 2.130^*$	$49.450 \pm 1.100^*$

2.2.6 中草药对锯缘青蟹超氧化物歧化酶活力的影响

如表 7 所示,与对照组相比,实验组的超氧化物歧化酶活力上升不显著,其中注射 2d 后,超氧化物歧化酶活力达到最高值,为 957.330 ± 14.4 U/ml。

表 7 注射中草药对锯缘青蟹超氧化物歧化酶活力的影响

Table 7 Effect of liquid Chinese herbal medicine on the enzyme activity of superoxide dismutase

组别 Group	不同时间的酶活力 Enzyme activity at different time(U/ml)				
	0.5d	1d	2d	3d	4d
对照组 Control	695.440 ± 16.9	812.673 ± 16.5	860.623 ± 68.1	845.554 ± 61.0	871.777 ± 45.3
实验组 Treatment	755.300 ± 47.7	839.425 ± 8.41	957.330 ± 14.4	$929.965 \pm 7.91^*$	881.750 ± 23.6

2.3 中草药对锯缘青蟹血清抗菌活力的影响

如表 8 所示,与对照组相比,实验组的血清抗菌活力明显上升,其中注射 2d 后,血清抗菌活力达到最高值,为 0.36 ± 0.00700 U/ml。

表 8 注射中草药对锯缘青蟹血清抗菌活力的影响

Table 8 Effect of liquid Chinese herbal medicine on the enzyme activity of Ua

组别 Group	不同时间的酶活力 Enzyme activity at different time(U/ml)				
	0.5d	1d	2d	3d	4d
对照组 Control	0.11 ± 0.020	0.16 ± 0.020	0.15 ± 0.030	0.13 ± 0.100	0.11 ± 0.020
实验组 Treatment	$0.18 \pm 0.014^*$	$0.25 \pm 0.007^*$	$0.36 \pm 0.007^{**}$	$0.22 \pm 0.035^{**}$	0.15 ± 0.007

2.4 攻毒试验

如表 9 所示,对照组和实验组在注射副溶血弧菌 7d 后青蟹死亡率分别为 100%、46.67%,实验组的免疫保护率约为 53.33%。

表 9 注射副溶血弧菌 7d 后锯缘青蟹的存活状况

Table 9 The survival rate of *S. serrata* 7 days after injection *in vivo*

	攻毒前	攻毒后	死亡率	免疫保护率
	Prior challenge (Ind.)	Post challenge (Ind.)	Mortality (%)	Survival rate (%)
对照组 Control	20	2	100	—
实验组 Treatment	20	8	46.67	53.33

3 讨论

锯缘青蟹的养殖中因感染副溶血弧菌、嗜水气单胞菌等致病菌易造成大规模死亡,据吴清洋等(2010)报道条件致病菌(副溶血弧菌及嗜水气单胞菌)的大量滋生等是汕头牛田洋地区锯缘青蟹9~11月暴发病害的重要原因。本研究针对锯缘青蟹细菌性疾病,在已有的中草药对水产动物常见致病菌的体外抑菌试验(成凯等2011;梁立国等2011)的研究基础上,进行了中草药的筛选与配伍应用,通过分析受试动物血淋巴中的免疫相关酶的活性,结合攻毒实验,证实了中草药在提高锯缘青蟹对细菌病抵抗力方面的作用。

本研究旨在评价黄芪、黄芩、杜仲、甘草的复方中药对锯缘青蟹的免疫增强作用,为进一步开发中草药作为锯缘青蟹免疫增强剂和配合饲料奠定理论基础。目前关于锯缘青蟹免疫增强剂的报道,多以单方或者从中草药的精制提炼物如多糖、生物碱、苷类等有效活性物质为主,本研究采用中草药传统煎煮提取工艺,既避免了繁琐的分离纯化工序,又能最大程度地保留中草药中的有效成分,以发挥中草药的多靶位效应。由于实验用锯缘青蟹购自养殖基地,一直投喂红肉蓝蛤,对人工制作的饲料不进食,故本研究采用注射法来替代饲料投喂法,参照潘清清(2008)的方法对锯缘青蟹进行注射和免疫指标的测定。

研究表明,锯缘青蟹属于低等的甲壳纲动物,只具有非特异性免疫系统。因而许多研究将血细胞吞噬能力作为衡量非特异性免疫功能的指标之一(潘清清2008;滕玉清等2011)。在中草药效果评价中,也常选用非特异性免疫酶活力作为评价指标(付媛媛等2011)。本研究根据锯缘青蟹非特异性免疫酶活力指标和感染副溶血弧菌后的攻毒试验结果初步判断:该复方中药能够提高锯缘青蟹的非特异性免疫酶活性和感染致病菌后的成活率,具有免疫增强剂活性。关于该复方药液的毒理学指标、中药有效成分的鉴定以及锯缘青蟹免疫力提高的机制需做进一步研究。

参 考 文 献

- 毛芝娟,卓华龙,杨季芳,吴雄飞. 2001. 锯缘青蟹细菌性传染病的病原菌研究. 台湾海峡, 20(2): 187~192
- 艾春香,林琼武,王桂忠,李少菁. 2005. 锯缘青蟹的营养需求及其健康养殖. 福建农业学报, 20(4): 222~227
- 田允波,周家容. 2008. 天然植物饲料添加剂. 广州:中山大学出版社, 16~20
- 付媛媛,李健,陈萍,刘磊. 2011. 黄芩苷增强中国对虾组织免疫和解毒代谢能力. 渔业科学进展, 32(4): 102~110
- 成凯,谢丽玲,赵水灵,梁剑勇,刘向云. 2011. 黄芩对7种水产动物病原菌的体外抑菌活性研究. 水产科学, 30(7): 415~417
- 杨福刚,周洪琪,黄旭雄. 2005. 不同 β -葡聚糖对凡纳滨对虾稚虾生长及非特异性免疫功能的影响. 上海水产大学学报, 14(3): 263~269
- 吴清洋,李远友,夏小安,张亮,王树启,徐树德,林尤顺. 2010. 汕头牛田洋沿海围垦区锯缘青蟹病害爆发的环境因素. 生态学报, 30(8): 2043~2048
- 陈星. 2007. 两种植物多糖的提取及对中华绒螯蟹免疫功能影响的研究. 见:苏州大学硕士学位论文, 21~46
- 周洪波,操继跃. 2002. 中草药免疫促进剂的药效学研究进展. 中国兽药杂志, 36(6): 42~44
- 徐海圣,舒妙安,邵庆均,王美珍. 2000. 锯缘青蟹常见病害及其防治技术. 水产科学, 19(5): 24~26
- 崔青曼,张耀红,袁春营. 2001. 中草药、多糖复方添加剂提高河蟹机体免疫力的研究. 水利渔业, 21(4): 40~41
- 梁利国,阎斌伦,张晓君,秦国民,杨家新. 2010. 常用中草药对4种病原弧菌体外抗菌效果的研究. 渔业科学进展, 31(2): 114~119
- 滕玉清,梁萌青,王正丽,刘宁,王新星,常青,郑珂珂. 2011. 饲料中水解鱼蛋白对中国对虾非特异免疫的影响. 渔业科学进展, 32(5): 84~89
- 潘清清. 2008. 锯缘青蟹免疫增强剂的筛选及在病害防控中的应用. 见:华中农业大学硕士学位论文, 40~46
- Ashida, M. 1971. Purification and characterization of pre-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. Archives Biochem. Biophys. 144(2): 749~762
- Hultmark, D., and Steiner, H. *et al.* 1980. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. Eur. J. Biochem. 106(1): 7~16
- Holme, M. H., Zeng, C., and Southgate, P. C. 2009. A review of recent progress toward development of a formulated microbound diet for mud crab, *Scylla serrata*, larvae and their nutritional requirements. Aquaculture, 286(3-4): 164~175
- Pavasovic, M., Richardson, N. A., and Anderson, A. J. 2004. Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profiles in the mud crab, *Scylla serrata*. Aquaculture, 242(1-4): 641~654