

外源核苷酸对异育银鲫幼鱼非特异性免疫的影响

王 锐, 庄建桥, 朱慧玲, 黄 峰, 杨顺益

(湖北省饲料工程技术研究中心, 湖北武汉 430023)

摘要: 以异育银鲫幼鱼为试验对象, 研究不同水平外源核苷酸对其非特异性免疫的影响。试验分为4组, 在基础饲料中分别添加 0.0% (空白组)、0.02%、0.05% 和 0.10% 的外源核苷酸, 每组设3个的重复, 每个重复40尾鱼。试验鱼体初始体重为 1.03 g左右, 每天饱食投喂2次, 试验时间70 d。试验结束分别测定了添加 0.0%、0.02%、0.05% 和 0.10% 外源核苷酸的各组非特异性免疫指标, 头肾指数分别为 $0.30\% \pm 0.01\%$ 、 $0.41\% \pm 0.01\%$ 、 $0.51\% \pm 0.02\%$ 和 $0.47\% \pm 0.01\%$; 脾脏指数分别为 $0.23\% \pm 0.01\%$ 、 $0.31\% \pm 0.02\%$ 、 $0.37\% \pm 0.01\%$ 和 $0.37\% \pm 0.03\%$; 白细胞数目分别为 $(4.74 \pm 0.71) \times 10^{11}$ 个/mL、 $(6.32 \pm 0.18) \times 10^{11}$ 个/mL、 $(6.56 \pm 0.12) \times 10^{11}$ 个/mL 和 $(6.74 \pm 0.32) \times 10^{11}$ 个/mL; 吞噬百分比分别为 $76.67\% \pm 2.03\%$ 、 $85.67\% \pm 1.33\%$ 、 $83.67\% \pm 3.48\%$ 和 $79.00\% \pm 2.00\%$; 吞噬指数分别为 (2.58 ± 0.34) 、 (2.99 ± 0.11) 、 (3.93 ± 0.11) 和 (3.21 ± 0.17) ; 溶菌酶活力分别为 (0.33 ± 0.01) 、 (0.42 ± 0.01) 、 (0.39 ± 0.01) 和 (0.38 ± 0.01) 。结果表明, 在异育银鲫幼鱼日粮中添加 0.05% 外源核苷酸能够显著提高其机体的非特异性免疫功能 ($P < 0.05$)。

关键词: 核苷酸; 非特异性免疫; 异育银鲫

中图分类号: S963.73 文献标志码: A 文章编号: 1674-3075(2009)03-0096-04

核苷酸是动物体内一种重要的低分子化合物, 对动物体的胃肠道功能、机体免疫系统、机体抗氧化功能以及动物的生产性能等很多方面有着重要影响, 被认为是一种新型的饲料添加剂 (Peng Li & Delbert M, 2006)。外源核苷酸能刺激动物的特异性、非特异性免疫反应, 影响与免疫有关细胞的发生与分化。关于核苷酸对动物的免疫功能影响的报道比较多, 陈忠科等 (2001) 试验发现, RNA 及其降解物能显著提高小鼠巨噬细胞吞噬率、吞噬指数和溶血素溶血能力, 但日粮中补充核苷酸混合物是否影响异育银鲫幼鱼的非特异性免疫机能未见报道。本试验研究外源核苷酸对异育银鲫幼鱼非特异性免疫的影响, 为今后在水产养殖中推广应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 饲养条件

试验在室内循环水养殖系统的12个钢化玻璃缸中进行。每个圆柱形玻璃缸直径80 cm, 水容积250 L; 每缸注水速度为10 L/min。饲养期间, 水温变动范围是28~31℃, 氨氮浓度小于0.5 mg/L, 溶

氧大于5.0 mg/L, pH值约为6.9。

1.2 试验饲料

5种核苷酸AMP、UMP、CMP、MP、GMP购自山东凯盛生物化工有限公司, 纯度都在99%以上; 等量混匀后, 在基础日粮中分别添加0.02%、0.05%、0.10%。基础饲料配方列于表1。试验饲料用微型制粒机制粒, 破碎成3 mm的颗粒料, 备用。

1.3 试验鱼的饲养

异育银鲫由中国科学院水生生物研究所关桥渔场提供。在暂养池中驯养2周后, 随机选取体质健康、规格均匀的个体, 称重后放入实验缸中, 试验鱼初始体重为1.05 g左右, 每缸放40尾, 将4种饲料随机投喂12缸鱼, 每种饲料3个重复。试验期间, 每天9:00和15:00各饱食投喂1次。实验持续70 d, 试验鱼终末体重为3.81~5.07 g。

1.4 样品采集

试验结束时, 将鱼饥饿24 h后每缸取样5尾, 称重, 尾静脉取血, 然后在冰盘中解剖, 取出头肾和脾脏称重。将每尾鱼的血液分为2份, 其中1份血液首先在室温下静置1 h待其凝固, 置4℃冰箱保持4 h于4℃条件下以4 000 r/min离心10 min收集血清用于溶菌酶测定; 另一份用肝素抗凝, 制备抗凝血, 供测定白细胞数目和吞噬细胞吞噬活性。

1.5 头肾指数和脾脏指数的计算

头肾指数 = 个体头肾重量 / 个体重量 $\times 100\%$

脾脏指数 = 个体脾脏重量 / 个体重量 $\times 100\%$

收稿日期: 2008-01-06

基金项目: 动物营养与饲料科学湖北省重点实验室开放基金 (2006A002)。

作者简介: 王锐, 1974年生, 女, 河北吴桥人, 讲师, 主要从事水产动物营养方面的研究。E-mail: zigfeixiang@163.com。

1.6 白细胞数目计数

取 20μL 抗凝血加入盛有 38μL 白细胞稀释液的离心管中, 待红细胞全部溶解后, 吸取白细胞悬液, 在光学显微镜下用血球计数板计数白细胞总数, 每尾鱼观察计数 3 个视野, 再计算 15 尾鱼平均 1 个视野中白细胞的数目。

1.7 吞噬细胞吞噬功能的测定

参考罗琳等 (2001) 的方法。在 0.2 mL 抗凝血中加入 0.1 mL F-SA, 摇匀, 在 28℃ 的恒温水浴锅中孵育 45 min, 每隔 10 min 摇动 1 次。用吸管吸取血细胞涂片, 每个样品涂 3 张, 用甲醇固定 10 min, Giemsa 染色液染 1 h, 水洗风干后镜检并依下式计算白细胞吞噬百分比 (phagocytic percentage, PP) 和吞噬指数 (phagocytic index PI)。

吞噬百分比 (PP) = (100 个吞噬细胞中参与吞噬的细胞数 / 100) × 100%

吞噬指数 (PI) = 吞噬细胞内的细菌总数 / 参与吞噬的吞噬细胞数

1.8 溶菌酶活力的测定

依简纪常和吴灶和 (2002) 的方法进行。用 0.067 mol/L 的磷酸缓冲液 (PBS, pH 6.4) 将溶壁微球菌粉 (购于南京建成生物工程研究所) 配制成 0.2 mg/mL 的菌悬液。每个样品取 3.0 mL 菌悬液, 吸取血清 0.04 mL 加入到菌悬液中, 混匀后立刻在 540 nm 下测定 A₀ 值。然后在 28℃ 水浴中温育 30 min, 取出后置于 4℃ 冰浴中终止反应, 再测定 A 值。按公式计算溶菌酶的活性: $U = (A_0 - A) / A_0$

表 1 异育银鲫基础饲料配方及化学组成

Tab 1 Formulation and chemical composition of diets for gibel carp

饲料原料	干物质含量 /%	成分	干物质含量 /%
大豆粕	44.10	水分	9.10
次粉	24.40	粗蛋白	34.67
棉籽粕	10.00	粗脂肪	6.69
菜籽粕	8.00	灰分	8.56
鱼粉	5.00		
植物油	3.00		
膨润土	1.80		
磷酸二氢钙	1.50		
粘合剂	0.50		
胆碱	0.30		
食盐	0.20		
三氧化二铬	0.20		
预混料	1.00		

注: 饲料化学成分为实测值。

1.9 数据处理

日粮中添加外源核苷酸对鱼体非特异性免疫的

影响采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Duncan's 多重比较, 显著水平以 $P < 0.05$ 计。统计分析使用 SPSS 完成。

2 结果与分析

2.1 头肾指数和脾脏指数

由表 2 可知, 添加外源核苷酸的试验组头肾指数均显著高于空白组 ($P < 0.05$), 0.05% 组最高, 0.10% 组次之, 且 2 组又显著高于 0.02% 组 ($P < 0.05$)。脾脏指数也表现为添加外源核苷酸的试验组均显著高于空白组 ($P < 0.05$), 但 3 个试验组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。就头肾指数而言, 0.02%、0.05% 和 0.10% 组分别比空白组提高了 36.7%、70.0%、56.7%; 同样, 0.02%、0.05% 和 0.10% 组脾脏指数分别比空白组提高了 34.8%、60.9%、60.9%。因而可以看出, 日粮中添加核苷酸有助于免疫器官的发育。

2.2 吞噬指数

添加外源核苷酸的试验组白细胞数目均显著高于空白组 ($P < 0.05$)。同时, 0.02% 组的吞噬细胞百分数最高, 显著高于空白组 ($P < 0.05$), 但是 0.05% 和 0.10% 组和空白组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。在吞噬指数方面, 0.05% 组显著高于其它 3 组, 比空白组提高了 52.3%, 说明添加 0.05% 组的外源核苷酸可以增强异育银鲫幼鱼吞噬细胞的吞噬能力。

2.3 溶菌酶活性

添加外源核苷酸的试验组血清溶菌酶活性均显著高于空白组 ($P < 0.05$), 0.05% 组最高, 0.10% 组次之, 且 2 组又显著高于 0.02% 组 ($P < 0.05$), 0.02%、0.05% 和 0.10% 组分别比空白组提高了 27.3%、18.2%、15.2%。试验结果表明, 日粮中添加核苷酸明显地提高了异育银鲫幼鱼血清溶菌酶的活力, 从而增强了鱼的非特异性免疫功能以及抵抗病原微生物感染的能力。

3 讨论

核苷酸是生物体内重要的低分子化合物, 具有许多生理功能, 除作为 DNA、RNA 的前体, 也作为生理、生化过程的调节物质参与体内物质代谢。动物机体能够由内源合成各种核苷酸, 而缺乏时不表现典型的缺乏症。但近年来的许多研究表明, 当机体迅速生长或受到免疫挑战时, 一些器官和组织如肠、淋巴、骨髓细胞合成的核苷酸不能满足人与动物组

组织和细胞代谢的需要,需补充外源核苷酸以保证其组织生长和正常功能。本研究结果表明,在异育银鲫幼鱼饲料中添加核苷酸,经过 10 周的饲喂试验,

表 2 不同外源核苷酸含量对异育银鲫幼鱼非特异性免疫机能的影响

Tab 2 Effect of exogenous nucleotide level on non-specific immunity of juvenile gibel carp

项目	空白组	0.02% 组	0.05% 组	0.10% 组
头肾指数 <i>F</i> %	0.30±0.01 ^c	0.41±0.01 ^b	0.51±0.02 ^a	0.47±0.01 ^a
脾脏指数 <i>F</i> %	0.23±0.01 ^b	0.31±0.02 ^a	0.37±0.01 ^a	0.37±0.03 ^a
白细胞数目 /×10 ¹¹ 个·mL ⁻¹	4.74±0.71 ^b	6.32±0.18 ^a	6.56±0.12 ^a	6.74±0.32 ^a
吞噬百分比 <i>F</i> %	76.67±2.03 ^b	85.67±1.33 ^a	83.67±3.48 ^{ab}	79.00±2.00 ^{ab}
吞噬指数	2.58±0.34 ^b	2.99±0.11 ^b	3.93±0.11 ^a	3.21±0.17 ^b
溶菌酶活力	0.33±0.01 ^c	0.42±0.01 ^a	0.39±0.01 ^b	0.38±0.01 ^b

注: 右上角标有不同英文字母的数据之间的差异具有显著性 ($P < 0.05$)。

在鱼类血细胞中,吞噬细胞、中性粒细胞、巨噬细胞都具有吞噬异物的能力,是鱼类非特异性免疫的主要指标之一,它们的数量和吞噬能力的高低可直接反映出鱼类非特异性免疫能力的大小,因此起着至关重要的作用。核苷酸通过对巨噬细胞吞噬作用的影响,从而提高机体的非特异性免疫机能。Sakai M 等 (2001) 用核苷酸在鲤鱼中的应用发现,外源核苷酸能增强溶菌酶的活性和巨噬细胞的吞噬作用; Peng L 等 (2004) 报道,饲料中添加核苷酸的石斑鱼,其血液中的氧化因子含量较未添加核苷酸的要高。本研究结果表明,在异育银鲫幼鱼饲料中添加核苷酸,血液中白细胞数目显著高于空白组 ($P < 0.05$),细胞的吞噬能力也得到加强。

溶菌酶是鱼类血清中极为重要的非特异性免疫指标之一,溶菌酶主要针对革兰氏阳性菌发挥作用,对一些革兰氏阴性菌如伤寒杆菌、嗜水气单胞菌等也有作用,在防御病原入侵上起着重要作用。溶菌酶活力的增大,可增加溶菌酶溶解细菌的能力。因而,本研究中用核苷酸添加到饲料中饲喂异育银鲫幼鱼后,研究了血清中溶菌酶活力的变化,表明添加核苷酸的试验组血清溶菌酶活性均显著高于空白组 ($P < 0.05$)。在集约化养殖条件下,许多生理性应激都能诱导鱼类释放皮质醇,从而使其免疫功能受到抑制。一些学者研究证明,接种疫苗和感染疾病后的免疫细胞分化需要额外补充核苷酸。饲料中添加外源核苷酸后,能提高大西洋鲑、银大麻哈鱼、虹鳟和鲤的存活率、抗病力、吞噬能力、血清补体活力和溶菌酶活力 (许群和王安利, 2004)。

对于外源核苷酸影响机体免疫功能的机理还不是很清楚,可能是外源核苷酸进入体内的核苷酸池供白细胞利用,从而提高了机体的免疫力。由于白细胞在体内的代谢周期短,因而对核苷酸的需求量

试验组异育银鲫免疫器官的发育优于空白组。这与施用晖等 (2000) 的肉雏鸡试验结果一致。

大; 还可能通过促进骨髓内巨噬细胞的发育,以提高细胞和体液免疫反应能力,从而增强了免疫作用。在外源核苷酸作为饲料添加剂方面还存在着许多值得深入探讨的问题,例如动物在不同生长发育阶段对核苷酸的需求量、食物和饲料的核苷酸含量及其吸收代谢以及核苷酸添加量等。本试验结果表明,日粮中添加外源核苷酸有助于异育银鲫幼鱼非特异性免疫的提高,综合各个指标,初步认为 0.05% 的添加水平比较适宜。

参考文献:

陈忠科,王龙,章君照,等. 2001. 核糖核酸及其降解物对小鼠发育、免疫调节以及镇静催眠作用的影响 [J]. 山东大学学报 (自然科学版), 36(2): 216–221.

简纪常,吴灶和. 2002. 中草药对建鲤非特异性免疫功能的影响 [J]. 大连水产学院学报, 17(2): 114–117.

罗琳,陈孝煌,曹雪峰. 2001. 穿心莲对草鱼血液吞噬细胞吞噬活性的影响 [J]. 西南农业学报, 23(1): 33–34, 38.

施用晖,乐国伟,刘建文,等. 2000. 外源核苷酸对肉鸡生产性能的影响 [J]. 无锡轻工大学学报, 19(6): 597–600.

许群,王安利. 2004. 核苷酸对动物摄食、生长与免疫功能的影响 [J]. 动物营养学报, 16(4): 13–17.

Peng L, Lewis D H, et al. 2004. Dietary oligonucleotide from yeast RNA influences immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection [J]. Fish Shellfish Immunol, 16: 561–569.

Peng Li & Delbert M. 2006. Gatlin III. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications [J]. Aquaculture, 251: 141–152.

Sakai M, Taniguchi K, Mamoto K, et al. 2001. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp *Cyprinus carpio* L [J]. J Fish Dis, 24: 433–438.

(责任编辑 万月华)

Effect of Exogenous Nucleotide on Non-specific Immune Responses of Juvenile Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*)

WANG Rui, ZHUANG Jian-qiang, ZHU Hui-ling, HUANG Feng, YANG Shun-yi

(Hubei Feed Engineering Technology Research Center, Wuhan Hubei 430023, China)

Abstract A growth trial was conducted to investigate the effect of exogenous nucleotide on the non-specific immune responses of juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). Four diets were formulated to contain four dietary nucleotide levels (0.0%, 0.02%, 0.05% and 0.1% of dry diet respectively). Triplicate groups of 40 fishes (average weight 1.03 g) were stocked and fed to apparent satiation twice daily for 70 days. After the growth trial, the indexes of non-specific immunity were determined to evaluate the effects of the four diets containing the different exogenous nucleotide contents (0.0%, 0.02%, 0.05% and 0.1% of dry diet respectively) for gibel carp. The head kidney indexes were $0.30\% \pm 0.01\%$, $0.41\% \pm 0.01\%$, $0.51\% \pm 0.02\%$ and $0.47\% \pm 0.01\%$ respectively; The spleen indexes were $0.23\% \pm 0.01\%$, $0.31\% \pm 0.02\%$, $0.37\% \pm 0.01\%$ and $0.37\% \pm 0.03\%$ separately; The leucocyte numbers were $(4.74 \pm 0.71) \times 10^{11}$ cells/mL, $(6.32 \pm 0.18) \times 10^{11}$ cells/mL, $(6.56 \pm 0.12) \times 10^{11}$ cells/mL and $(6.74 \pm 0.32) \times 10^{11}$ cells/mL respectively; The phagocytic percentages were $76.67\% \pm 2.03\%$, $85.67\% \pm 1.33\%$, $83.67\% \pm 3.48\%$ and $79.00\% \pm 2.00\%$ separately; The phagocytic indexes were (2.58 ± 0.34) , (2.99 ± 0.11) , (3.93 ± 0.11) and (3.21 ± 0.17) respectively; The lysozyme activities were (0.33 ± 0.01) , (0.42 ± 0.01) , (0.39 ± 0.01) and (0.38 ± 0.01) separately. In conclusion, the supplementation of 0.05% exogenous nucleotides in aquaculture diets significantly enhanced non-specific immune responses of juvenile gibel carp ($P < 0.05$).

Key words Nucleotide; Non-specific immunity; Gibel carp