

# 共轭亚油酸对大黄鱼免疫功能的影响

张继泽<sup>1,3</sup>, 吴天星<sup>2</sup>, 王进波<sup>3</sup>

(1. 浙江大学动物科学学院, 浙江 杭州 310029,

2 浙江大学理学院化学系, 浙江 杭州 310027

3 浙江大学宁波理工学院分子设计与营养工程市重点实验室, 浙江 宁波 315100)

摘要: 1 500 尾大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 随机分为 5 个处理, 分别饲喂冰鲜鱼 (D1 组)、添加 3% 鱼油日粮 (D2 组)、共轭亚油酸 (CLA) 水平为 1% (D3 组)、2% (D4 组)、4% (D5 组) 日粮。饲喂 10 周后, 通过测定脾脏重、脾体指数、溶菌酶、补体 C3、C4 免疫球蛋白 IgM 浓度等免疫指标, 研究不同水平 CLA 日粮对大黄鱼免疫功能的影响。结果表明, 在大黄鱼日粮中添加 CLA 可以影响其免疫器官—脾脏, 添加 CLA 组使得大黄鱼脾体指数高于未添加 CLA 的对照组。虽然日粮中添加 CLA 对于补体 C3、C4 没有显著影响, 但是对于溶菌酶和免疫球蛋白 IgM 有明显的影响。在大黄鱼日粮中添加 CLA 可以在一定程度上改善大黄鱼的免疫性能, 对于其抗细菌、抗病毒能力有一定提高。

关键词: 共轭亚油酸; 大黄鱼; 免疫性能

中图分类号: S948 文献标志码: A 文章编号: 1674-3075(2009)03-0086-05

在影响动物免疫功能的各因素中, 营养是最重要和最易调控的因子。利用营养学方法提高鱼类的免疫和抗病力, 是实现健康养殖、生产绿色水产品、保证水产养殖业可持续发展的重要途径。脂肪酸作为鱼类必需的能量和营养物质之一, 具有重要的生物学作用和生理学调控功能, 其种类和数量对鱼类免疫系统的调节作用机制也逐渐被人们所揭示, 但研究资料较少。而共轭亚油酸 (CLA) 正是这样一种具有重要生物功能的不饱和脂肪酸。目前, CLA 在鱼类上的研究相对较少, 尤其是其对大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 的免疫功能影响的研究, 未见相关报道。因此, 本试验用大黄鱼作为研究对象, 探讨饲喂 CLA 日粮对大黄鱼免疫功能的影响, 以期进一步阐明其在动物体内的作用机制, 并为 CLA 在大黄鱼生产中的应用开发提供必要的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验用 CLA

CLA 邮购自青岛澳海生物有限公司, 批号为 20070516, 物理性状为淡黄色油状液体; CLA 含量为

80%, 其中 *cis*-9, *trans*-11 和 *trans*-10, *cis*-12 的含量为 37.7% 和 39.5%。铅含量为 0.22 mg/kg, 霉菌和酵母菌总数小于 10 CFU/g, 大肠杆菌、葡萄球菌和沙门氏菌均未检出。

### 1.2 试验设计与饲养管理

采用单因素设计, 在日粮中分别用 0%、1%、2% 和 4% 的共轭亚油酸代替鱼油饲喂 1 龄大黄鱼。试验共分为 4 组, 每组设 2 个重复 (表 1)。

表 1 单因子随机区组设计试验方案

Tab 1 Experiment program designed by randomized block

| 组别 | 预饲期 (14 d)          | 正式期 (70 d)          |
|----|---------------------|---------------------|
| D1 | 冰鲜鱼                 | 冰鲜鱼                 |
| D2 | 日粮 + 3% 鱼油          | 日粮 + 3% 鱼油          |
| D3 | 日粮 + 4% 鱼油 + 1% CLA | 日粮 + 4% 鱼油 + 1% CLA |
| D4 | 日粮 + 2% 鱼油 + 2% CLA | 日粮 + 2% 鱼油 + 2% CLA |
| D5 | 日粮 + 1% 鱼油 + 4% CLA | 日粮 + 1% 鱼油 + 4% CLA |

试验在浙江省象山港凤凰礁渔场 (象山市黄避岙乡) 进行, 1 500 尾大黄鱼捕捞自该渔场同一网箱, 分别放入 10 个网箱 (3 m × 3 m × 3 m), 随机分成 5 组 (D1~D5), 每组 2 个重复。放养密度为 150 尾/箱, 每个网箱代表 1 个重复。各个网箱中大黄鱼的总体重基本相同, 以保证各网箱间不存在显著差异, 大黄鱼平均体重为 150 g。适应期后, 每天投喂 2 次 (4:30 和 16:00), 按照分组对网箱进行依次投喂, 直到大黄鱼不吃饲料为止, 投喂时间大约持续 40 min。试验为期 10 周, 期间水温 22~29℃, 盐度 38。

收稿日期: 2008-04-22  
基金项目: 浙江省科技厅海水养殖鱼类品质提升关键技术研究及示范 (编号: 2006C12098)。  
作者简介: 张继泽, 1983 年生, 男, 内蒙古呼和浩特人, 在读研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: zhangjizel226@163.com  
© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 主要试剂与仪器

1.3.1 试剂 免疫球蛋白 IgM 定量测定试剂盒购于上海科华生物工程股份有限公司; 补体 C3和 C4试剂盒均购于上海北海生物技术工程有限公司; 溶菌酶检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3.2 仪器 北京产紫外/可见光分光光度计 TU-190Q 高速冰冻离心机为德国 Hemle公司产 (Z323k)。

1.4 样品收集和保存

生长试验结束后, 对试验鱼饥饿 24 h, 然后分别从每个试验组随机捕捞 20尾 (每个重复 10尾), 记录每条鱼的重量, 然后进行血样、脾脏采集。

试验鱼通过尾椎静脉采取血样。每尾鱼的血样分别放置在 4℃静置 12h后, 4℃、3 000 g 离心 15 min 取其上清液 (即为血清), 贮存于 - 70℃备用。将脾脏完整取出, 小心剔除表面的结缔组织等附着物并称重。

1.5 测定方法

1.5.1 免疫球蛋白 IgM 测定 采用上海科华生物工程股份有限公司试剂盒之免疫比浊法进行; 主要仪器为北京产紫外/可见光分光光度计 TU-190Q。

1.5.2 补体 C3、C4测定 采用上海北海生物技术工程有限公司试剂盒; 主要仪器为北京产紫外/可见光分光光度计 TU-190Q。

1.5.3 溶菌酶测定 采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒; 主要仪器为北京产紫外/可见光分光光度计 TU-190Q。

1.5.4 脾体指数计算 脾体指数 = 脾脏重 (g) / 体

重 (g) × 100%

1.6 试验数据分析

采用 SPSS 15.0 软件对所得数据进行方差分析, 若差异显著, 则进行 Tukey多重比较法检验各组数据间的差异性, 显著性水平为  $P < 0.05$ 。数据采集用平均值 ±标准差表示 ( $n = 5$ )。

2 结果

2.1 不同 CLA 水平对大黄鱼脾脏重和脾体指数的影响

由表 2可知, 摄食不同水平 CLA 饲料 10周后, 在 5个试验组中, D1组大黄鱼脾脏重和脾体指数均为最高, D2组脾脏重和脾体指数均为最低。其中 D1组大黄鱼脾脏重极显著高于 D2组 ( $P < 0.01$ ), 显著高于其它各组 ( $P < 0.05$ ); 脾脏指数显著高于 D2组 ( $P < 0.05$ )。D4、D5组大黄鱼脾体指数也显著高于 D2组 ( $P < 0.05$ )。

2.2 不同 CLA 水平对大黄鱼溶菌酶、C3、C4和免疫球蛋白 IgM 的影响

由表 3可知, 摄食不同 CLA 水平饲料 10周后, D2组大黄鱼溶菌酶、补体 C3、C4含量均为最低, 溶菌酶含量一项, D5组大黄鱼极显著高于 D2组 ( $P < 0.01$ ), D4组显著高于 D2组 ( $P < 0.05$ ), D1、D3、D4和 D5组之间没有显著差异; 而补体 C3、C4在 D1~D5组之间都没有显著差异。IgM 为 D4组最高, D4组显著高于 D2组 ( $P < 0.05$ ), 极显著高于其它各组 ( $P < 0.01$ )。而 D1、D2、D3、D5组之间没有显著差异。

表 2 日粮 CLA 水平对大黄鱼脾脏重和脾体指数的影响

Tah 2 Effect of different CLA levels in diet on large yellow croakers' spleen weight and spleen weight/body weight

| 项目      | 组 别                          |                              |                               |                               |                              |
|---------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
|         | D1                           | D2                           | D3 (1% CLA)                   | D4 (2% CLA)                   | D5 (4% CLA)                  |
| 脾脏重 /g  | 0.1476 ± 0.0681 <sup>a</sup> | 0.0777 ± 0.0208 <sup>b</sup> | 0.1102 ± 0.0327 <sup>b</sup>  | 0.1141 ± 0.0354 <sup>ab</sup> | 0.1025 ± 0.0384 <sup>b</sup> |
| 脾体指数 /% | 0.0532 ± 0.0245 <sup>a</sup> | 0.0350 ± 0.0094 <sup>b</sup> | 0.0429 ± 0.0126 <sup>ab</sup> | 0.0513 ± 0.0159 <sup>a</sup>  | 0.0503 ± 0.0188 <sup>a</sup> |

注: 同行具有不同字母者差异显著 ( $P < 0.05$ ) 或极显著 ( $P < 0.01$ )。

表 3 日粮 CLA 水平对大黄鱼溶菌酶、C3、D4、IgM 的影响

Tah 3 Effect of different CLA levels in diet on large yellow croakers' lysozyme, C3, D4, IgM

| 项目                         | 组 别                          |                              |                              |                              |                              |
|----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                            | D1                           | D2                           | D3 (1% CLA)                  | D4 (2% CLA)                  | D5 (4% CLA)                  |
| 溶菌酶 /μg · mL <sup>-1</sup> | 32.17 ± 3.80 <sup>ab</sup>   | 25.69 ± 4.36 <sup>b</sup>    | 33.15 ± 1.59 <sup>ab</sup>   | 35.22 ± 1.29 <sup>a</sup>    | 37.00 ± 2.33 <sup>a</sup>    |
| C3 /g · L <sup>-1</sup>    | 0.0586 ± 0.0030              | 0.0547 ± 0.0069              | 0.0555 ± 0.0102              | 0.0658 ± 0.0361              | 0.0612 ± 0.0259              |
| C4 /g · L <sup>-1</sup>    | 0.0229 ± 0.0063              | 0.0203 ± 0.0041              | 0.0219 ± 0.0054              | 0.0221 ± 0.0015              | 0.0213 ± 0.0054              |
| IgM /g · L <sup>-1</sup>   | 0.5566 ± 0.0127 <sup>a</sup> | 0.5686 ± 0.0067 <sup>a</sup> | 0.5378 ± 0.0045 <sup>a</sup> | 0.6759 ± 0.0409 <sup>b</sup> | 0.5649 ± 0.0415 <sup>a</sup> |

注: 同行具有不同字母者差异显著 ( $P < 0.05$ ) 或极显著 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 CLA 水平与大黄鱼脾脏重和脾体指数的关系

免疫器官是机体免疫系统的重要组成部分,也是维持机体正常免疫力的组织学器官(杨先乐, 1989)。研究表明,营养物质可影响动物免疫器官的发育,而免疫器官的正常发育对机体免疫力有重要的影响(Fumia, 1993)。脾脏是鱼类最重要的免疫器官(李亚南等, 1995)。杨奇慧(2003)研究发现,幼建鲤摄食缺乏维生素 A 的饲料 70 d 后,脾脏的相对重量降低了 21%,免疫后的成活率降低了 88%,说明  $V_A$  缺乏可以通过引起免疫器官—脾脏生长受阻来降低幼建鲤疾病抵抗力。而关于共轭亚油酸影响免疫器官发育的报道并不一致。方志玲等(2003)每天给小鼠灌食 0.05 mL 共轭亚油酸(约占每日食量的 1%),40 d 的试验结果显示,其对脾脏指数无影响。另外, Yamasaki 等(2000)用剂量依赖的方式研究发现,SD 大鼠日粮中添加的共轭亚油酸在极低含量(0.5 g/kg)时,不增加脾脏的重量;而在添加量为 1% 时,小白鼠的脾脏重量显著高于对照组;还有研究指出,饲喂共轭亚油酸的小鼠在无免疫刺激存在的情况下,一般会出现脾脏肥大的现象(Yamasaki M et al, 2003)。本试验中,日粮中不含有 CLA 的 D2 组脾脏重量和脾体指数在各组中都是最低的,虽然 D2~D5 组之间脾脏重量没有显著差异,但是饲喂 1%、2%、4% CLA 的 D3、D4、D5 组,脾脏重量有高于 D2 组(日粮中不含有 CLA)的趋势。而 D4(CLA 2%)、D5 组(CLA 4%)的脾体指数显著高于日粮中不含 CLA 的 D2 组,同样饲喂 1%、2%、4% CLA 的 D3、D4、D5 组之间脾脏指数没有显著差异。本试验说明,在日粮中添加 CLA 可以影响大黄鱼脾脏的发育,而鱼类脾脏是参与免疫的重要器官,CLA 可能可以通过促进脾脏的发育来增强免疫力。

#### 3.2 不同 CLA 水平与大黄鱼免疫指标的关系

抗原进入机体后,机体对其的清除和破坏主要是经过呼吸作用和一些水解的酶类来完成,水解酶类如酸性磷酸酶和溶菌酶可以催化大肠杆菌和葡萄球菌的糖苷键(Melnick D A et al, 1985)。溶菌酶存在于许多鱼类的体表黏液、肠道黏液、血清和巨噬细胞中。试验证明,溶菌酶参与了血清的非特异性防御过程,它具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤等多种药理作用。溶菌酶对革兰氏阳性菌十分敏感,其溶菌机理是催化细胞壁多糖成分中  $\beta$ -1,4-N-乙酰氨基葡萄糖苷键,细菌溶解是键裂开的间接指标(Wang

X et al, 1995)。血清中溶菌酶主要由单核吞噬细胞释放,可以作为吞噬系统功能的指标。吞噬细胞是免疫系统一类重要的辅助细胞,具有递呈抗原的作用。高水平的溶菌酶含量证明 CLA 可以促进吞噬细胞的活化和对抗原的递呈作用,从而增强机体的抗菌防御机能。本试验中溶菌酶含量一项, D5 组(4% CLA)大黄鱼极显著高于 D2 组(不添加 CLA) ( $P < 0.01$ ), D4 组(2% CLA)显著高于 D2 组 ( $P < 0.05$ )。说明添加 CLA 含量为 2% 和 4% 同不添加 CLA 的对照组相比,可以显著提高大黄鱼血清中溶菌酶的浓度,这对抵抗细菌和病毒的侵害是非常有利的。

鱼类补体大约由 30 余种蛋白裂解酶、酶抑制因子和受体组成,是机体内最为复杂的限制性蛋白溶解系统(Timothy R, 1991)。在鱼类免疫系统进化中,补体的出现比免疫球蛋白还要早(Claire M H & Lambris J D, 2002)。许多研究表明,鱼类补体直接参与机体防御,其生物学活性影响机体抵抗微生物的能力,包括免疫反应细胞间的通讯联系、免疫复合物的形成和持续时间等。Nonaka 和 Koppenheffer 的研究结果表明,硬骨鱼的补体系统活化后,在病原微生物细胞膜表面形成一个贯穿膜内外的“管道”结构,引起细胞膜损伤外,导致胞内容物外漏(Claire M H & Lambris J D, 2002; Nonaka M et al, 1981)。鱼类补体的调理作用能增强体液和细胞介导的特异性免疫,补体缺失试验表明,机体的非特异性免疫力下降(Mastellos D et al, 2001; Yuanyuan XU et al, 2001)。因此,补体组分的生物功能、遗传缺陷或运转障碍等将引起鱼类的感染和自身免疫缺陷性疾病。所以,研究影响鱼类补体的生物功能是预防鱼类疾病发生的重要途径。但是在本试验中, D1~D5 组大黄鱼的补体 C3、C4 均没有显著差异,表明在大黄鱼日粮中添加 CLA 并没有显著影响补体的浓度。因此,CLA 对于补体所产生的免疫作用没有明显的影响。

硬骨鱼类免疫球蛋白的研究较为完善。目前所知,硬骨鱼类的血清中只存在 1 种免疫球蛋白,即类似于哺乳动物 IgM 的抗体分子,它由 2 条 H 链、2 条 L 链组成一单体,再通过“J”链连成四聚体。IgM 具有沉淀、凝集、补体化等多种功能,是一种高效能抗体,可破坏肿瘤细胞,在抗肿瘤免疫中起重要作用。因此,血清中抗体浓度的高低在一定程度上反映了机体对疾病的抵抗能力。CLA 能影响哺乳动物的免疫应答,诸如鼠淋巴细胞的增殖(Chew B P et al,

1997, Wong MW et al 1997)和白细胞介素 (Hayek M G, 1999), 但对抗体的产生机理还不清楚。Sugano 等 (1998)对小鼠的研究表明, 小鼠饲料中的 CLA 能提高免疫器官中免疫球蛋白的产生和血浆中 IgG 浓度。Yamasaki 等 (2000) 在小鼠的试验中观察到, CLA 不影响血浆中 IgG 的水平。在本试验中, D4 组 (2% CLA) IgM 的含量最高, 而且与其它各组相比具有显著差异, 说明共轭亚油酸 (CLA) 添加量为 2% 时, 可以明显提高大黄鱼的 IgM 水平, 对于其特异性免疫具有一定程度的促进作用。

综上所述, 在大黄鱼日粮中添加 CLA 可以影响其免疫器官—脾脏, 添加 CLA 组使得大黄鱼脾体指数高于未添加 CLA 的对照组。虽然日粮中添加 CLA 对于补体 C3、C4 没有显著影响, 但是对于溶菌酶和免疫球蛋白 IgM 有明显的影响。在大黄鱼日粮中添加 CLA, 可以在一定程度上改善大黄鱼的免疫性能, 对于其抗细菌、抗病毒能力有一定的提高。

参考文献:

方志玲, 沈继红, 刘发义, 等. 2003 共轭亚油酸对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国海洋药物, 95(5): 23–26

李亚南, 陈全震, 邵健忠, 等. 1995 鱼类免疫学研究进展 [J]. 动物学研究, 16(1): 83–94

杨奇慧. 2003 不同水平维生素 A 对幼建鲤免疫力的影响 [D]. 雅安: 四川农业大学.

杨先乐. 1989 鱼类免疫学研究进展 [J]. 水产学报, 13(3): 271–284

Chew BP, Wong TS, Shultz TD, et al 1997. Effects of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and beta-carotene in modulating lymphocyte and macrophage function [J]. Anticancer Research, 17: 1099–1106

Claire M H & Lambris J D. 2002 The complement system in teleosts [J]. Fish & Shellfish Immunology, 12: 399–420

Fumio. 1993 Yamauchi and Kunio Suetsuna [J]. J Nutrition Biochem, 4: 450–457

Hayek M G. 1999 Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrlBR mice [J]. J Nutr, 129: 32–38

Mastelbs D, Papadimitriou J C, Franchini S. 2001 A novel role of complement mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration [J]. J Immunol, 166: 2479–2486

Mehick D A, W M Nauseef, S D Markowitz. 1985. Biochemical analysis and subcellular localization of a neutrophil specific antigen, PMN-7, involved in the respiratory burst [J]. J Immunol, 134: 3346–3355

Nonaka M, Yamaguchi N, Natsuume Sakai S. 1981 The complement system of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) I. Identification of the serum lytic system homologous to mammalian complement [J]. J Immunol, 126: 1489–1494

Sugano M, A Tsujita M, Yamasaki. 1998 Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats [J]. Lipids, 33: 521–527

Timothy R. 1991 Evolution of the complement system [J]. Immunol Today, 12: 295–312

Wang X, G Ma, B Zheng. 1995. Effects of SL-probiotic preparation on the body weight and phagocytosis of white mice [J]. Wei Sheng Wu Xue Bao, 35: 455–459

Wong MW, Chew BP, Wong TS, et al 1997. Effects of dietary conjugated linoleic acid on lymphocyte function and growth of mammary tumors in mice [J]. Anticancer Res, 17: 987–993

Yamasaki M, Chujo H, Hirao A, et al 2003. Immunoglobulin and cytokine production from spleen lymphocytes is modulated in C57BL/6J mice by dietary cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid [J]. J Nutr, 133 (3): 784–788

Yamasaki M, Kishihara K, Mansho K, et al 2000. Dietary conjugated linoleic acid increases immunoglobulin productivity of Sprague–Dawley rat spleen lymphocytes [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 64(10): 2159–2164

Yuanyuan XU, Ming H M, Ippolito G C. 2001. Complement activation in factor D2 deficient mice [J]. J Immunol, 166: 14577–14582

(责任编辑 万月华)

## Effect of Dietary Conjugated Linoleic Acid on the Immunity of Large Yellow croaker(*Pseudosciaena crocea*)

ZHANG Ji-ze<sup>1,3</sup>, WU Tian-xing<sup>2</sup>, WANG Jin-bo<sup>3</sup>

( 1. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2. Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China;

3. Key Laboratory for Molecular Design and Nutrition Engineering of Ningbo  
City Ningbo Institute of Technology, Zhejiang University, Ningbo 315100, China)

**Abstract** 1 500 large yellow croakers were divided into five groups at random. The fish were fed (D1), adding 5% fish oil diet (D2), conjugated linoleic acid (CLA) level of 1% (D3), 2% (D4), 4% (D5) diet. After 10 weeks of feeding, the weight of the spleen, the spleen weight/body weight, lysozyme, C3, C4, the immunoglobulin concentration of IgM immune parameters were measured to investigate the effects of different levels of dietary conjugated linoleic acid (CLA) on the immune function of fish. The results show that CLA can affect large yellow croakers' organs-spleen and adding CLA group makes large yellow croaker spleen index higher than that of the control group. Although there has been no noticeable effect of CLA for C3 and C4, but for lysozyme and immunoglobulins IgM was significantly affected. Adding CLA in large yellow croakers' diet can improve the immune performance to a certain extent, and the anti-bacteria and anti-virus capability were also enhanced.

**Key words** Conjugated linoleic acid; *Pseudosciaena crocea*; Immunity