

皂角苷对大菱鲆血细胞的溶血作用

王玉娟, 王秀华*, 韩雯, 王锐, 黄捷

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 通过显微观察初步测定了不同浓度皂角苷(2.5、5、12.5、25、50、125 mg/L)融解大菱鲆红细胞的时间及其对白细胞的裂解作用;比较了4℃与20℃条件下,不同浓度皂角苷(2.5、5、12.5、25、50 mg/L)在体外对大菱鲆血细胞的溶血活性;用不同浓度的皂角苷溶液浸浴大菱鲆,得出皂角苷对大菱鲆的半致死浓度;同时分析了不同浓度皂角苷(0、5、25、45 mg/L)浸泡大菱鲆后血液中乳酸脱氢酶(LDH)活力变化。结果显示,显微观察实验中红细胞溶血时间与皂角苷浓度呈对数负相关($R^2 = 0.9825$),皂角苷对大菱鲆白细胞也具有细胞裂解作用;50 mg/L的皂角苷在20℃条件下5 min即可导致血细胞100%溶血,而4℃时处理相同时间仅为42.2%;皂角苷对大菱鲆的24 h半致死浓度(24h LC_{50})为64.85 mg/L。本研究的结果从细胞水平上初步评价了皂角苷的溶血毒性,为其安全使用提供了理论支持。

关键词: 大菱鲆;皂角苷;溶血;乳酸脱氢酶

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

应用抗生素治疗水产养殖动物细菌病可产生很多副作用^[1-3],中草药种类多,功能各异,在杀菌消炎、预防寄生虫病、调节机体免疫力等方面具有显著效果^[4-6],因而已成为鱼用药物研究的重要领域。目前有关中草药在水产养殖中应用的研究多侧重于功能及疗效,对其毒副作用的研究鲜有报道。但作为药物,在应用于临床之前,需要对其进行多种生物安全性评价,方能正确地应用。

皂角苷(saponin)又称皂甙或皂素,是多种植物中含有的一种以多环式化合物为配基的配糖体的总称。皂角苷在植物中广泛分布,也是中药材的主要活性成分组成之一^[7-8]。研究发现皂角苷具有抗菌、消炎、降血压、降低血浆胆固醇等生物功能^[9-10],可增强巨噬细胞吞噬活力,刺激脾细胞增殖,诱导CD4⁺和CD8⁺T细胞应答,提高细胞与体液免疫水平^[11-12]。在水产养殖中,皂角苷能提高对虾非特异免疫力^[13],刺激鱼类生长^[14];同时皂角苷具有免疫佐剂的功能^[15]。因而显示出其在水产养殖领域具有潜在应用价值。但是,

皂角苷对脊椎动物的红细胞具有溶血活性,高浓度皂角苷接触到鱼体时,可导致鱼类死亡^[16]。因此,开展皂角苷对鱼类的毒性机理研究,确定其安全使用范围,对其在水产养殖中的进一步开发应用尤为必要。

实验以大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)为受试动物,研究了皂角苷对大菱鲆红细胞的溶血作用,结合毒力分析,从个体及细胞水平上对皂角苷的使用安全进行了探讨,以期在皂角苷在鱼类养殖中的应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大菱鲆体长(7.0±0.2)及(30±0.3)cm两种规格,购自烟台某大菱鲆苗种公司,在实验室暂养1周,养殖用水为地下海水,pH 7.5、盐度28,养殖水温为19℃,期间正常投喂,连续充气。皂角苷(纯度大于99.8%)购自美国Alfa Aesar公司,该产品提取自皂皮树(*Quillaja saponaria*)。

收稿日期:2013-01-04 修回日期:2013-03-26

资助项目:国家自然科学基金项目(31172440)

通信作者:王秀华,E-mail:wangxh@ysfri.ac.cn

乳酸脱氢酶(LDH)测试盒购于南京建成生物技术公司。

1.2 血细胞的制备

用无菌注射器于体长 30 cm 的大菱鲂尾静脉采集血液,溶于等体积的阿氏液($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.80 g, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 0.055 g, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 2.05 g, NaCl 0.42 g, 蒸馏水 100 mL, pH 6.1, 115 °C 灭菌 30 min, 4 °C 保存)中,于 4 °C 以 300 g 离心 10 min,弃上清液,沉淀用无菌生理盐水(0.9% NaCl)重复清洗 3 次。最后用生理盐水溶液配成 0.5% (v/v) 血细胞悬浮液,24 h 内使用^[17]。

1.3 皂角苷对大菱鲂红细胞体外溶血观察

配制浓度分别为 5、10、25、50、100 和 250 mg/L 的皂角苷溶液,在不同的载玻片上分别滴加各浓度皂角苷溶液 20 μL ,再滴加等体积的大菱鲂红细胞悬浮液,快速混匀后,显微镜下观察记录各皂角苷浓度中红细胞的溶解时间,对照组用生理盐水代替皂角苷溶液。每个浓度皂角苷下观察视野中细胞数在 30 个以上,重复 3 次。完全溶血时间定义:在一个视野下,从滴加红细胞悬液混匀后开始,至所有细胞融解完全为止的时间(s)。

1.4 室温及低温条件下不同浓度皂角苷对大菱鲂血细胞体外溶血率

用生理盐水分别配制浓度为 5、10、25、50 和 100 mg/L 的皂角苷溶液,各 30 份(0.5 mL/份)分别置于 1 mL 离心管中,从中取各浓度溶液 15 份置于 4 °C 冰箱预冷,剩余各浓度置于室温(20 °C)条件下备用。取浓度为 0.5% (v/v) 的大菱鲂红细胞悬液 2 份,分别调整其温度到 4 °C 与室温,向各皂角苷溶液中分别加入相同温度的血细胞悬液 0.5 mL 混匀,在相应的温度下分别孵育 0、5、10、15、25 和 40 min(其中 0 min 组与零溶血对照组的处理方法相同),于 4 °C 以 700 \times g 离心 10 min,各组取 200 μL 上清液于平底的 96 孔酶标板中,每个浓度组设 3 个平行,在 540 nm 下测定不同组的吸光值。

实验中用 0.25% (v/v) 红细胞悬浮液离心上清液作为零溶血对照项,以含 1% TritonX-100 的红细胞(0.25%)悬浮液离心上清液作为 100% 溶血对照,用含各浓度皂角苷的生理盐水作为空白对照组。

溶血率以 3 次重复的平均值计算,其公式:

$$H\% = [(A_s - A_0) / (A_{100} - A_0)] \times 100$$

式中, A_s = 样品组吸光值 - 空白组吸光值; A_0 = 零溶血对照组吸光值 - 空白组吸光值; A_{100} = 100% 溶血对照组吸光值 - 空白组吸光值。

1.5 皂角苷对大菱鲂白细胞体外融细胞作用定性观察

用 1 mL 的无菌注射器预装含 1.0% 肝素钠的生理盐水 0.1 mL,再抽取等体积的大菱鲂血液,混匀后垂直静置于 4 °C 冰箱中过夜,让红细胞与白细胞分层,之后将下层的红细胞弃掉,收集中层的白细胞备用。将白细胞置于载玻片上采用相差显微镜观察;之后加等体积浓度为 25 mg/L 的皂角苷生理盐水溶液快速混匀,每隔 15 秒拍照一次,观察白细胞裂解情况,对照组则加等体积生理盐水。

1.6 皂角苷对大菱鲂毒性分析

采用 24 h 半致死浓度测定方法。在预实验结果的基础上,确定了皂角苷的实验浓度范围为 44 ~ 139 mg/L。在 6 个整理箱(0.4 m \times 0.6 m \times 0.45 m)中,加入养殖用海水 20 L,采用等对数差值的方法溶解皂角苷至终浓度分别为 44、57、70、88、110 和 139 mg/L,每个整理箱各投放 7 cm 体长的大菱鲂 15 尾,连续充气。实验养殖期间不换水,连续观察 24 h,记录 24 h 内的各组鱼的死亡数。

应用 SPSS 16.0 求出 24 h 半致死浓度(LC_{50})^[18],安全浓度(S)按公式 $S = 24\text{h LC}_{50} \times 0.1$ 计算^[19]。

1.7 皂角苷溶液浸浴对大菱鲂血液中乳酸脱氢酶(LDH)活力影响

分别在 4 组 20 L 养殖用海水中配制浓度为 0、5、25 和 45 mg/L 的皂角苷溶液,各组投放体长约 7 cm 的大菱鲂各 20 尾,保持连续充气。分别于浸泡处理后的第 0.5、4 和 8 h 时段,每组随机取鱼 5 尾进行尾静脉取血,等体积混合,将采集的血液于 4 °C 冰箱过夜,之后 2 000 \times g 离心 5 min,取上清液用于 LDH 活性检测。

为了跟踪大菱鲂浸泡皂角苷后血清中 LDH 随时间变化趋势,在含 25 mg/L 皂角苷的 20 L 海水中暂养 20 尾体长约 7 cm 的大菱鲂,测定浸泡后 0、1、2 和 6 h 的 LDH 活性,以不含皂角苷的海水暂养的大菱鲂为对照,分析 LDH 活力随时间变化趋势。

LDH 活性的测定:LDH 活性测定按照试剂

盒说明书进行操作。每个样品设 3 个平行,取平均值,根据对照组 OD 值和皂角苷处理组的 OD 值,按照以下方法计算酶活性。

$$\text{LDH 活性} = \frac{\text{OD}_U - \text{OD}_C}{\text{OD}_S - \text{OD}_b} \times C_S \times N \times 1000$$

式中, OD_U 为测定孔吸光度值; OD_b 为空白孔吸光度值(蒸馏水); OD_S 为标准孔吸光度值; OD_C 为对照孔吸光度值(样品不加辅酶); C_S 为标准浓度(0.2 mmol/L); N 为样品测试前稀释倍数。

1.8 数据处理

实验数据采用平均值(M)±标准差(SD)表示,使用 SPSS 16.0 分析软件对数据进行单因素方差分析(ANOVA)及拟合优度检验,应用 Excel (2007)软件作图。

2 结果

2.1 皂角苷致大菱鲃血细胞融解过程的显微观察

在光学显微镜下,观察大菱鲃红细胞在不同浓度皂角苷溶液中的融解过程(图 1)。发现与皂角苷混合的红细胞,其细胞膜结构逐渐模糊,细胞内物质外流消失,最后只留下尚未溶解完的印迹。将皂角苷浓度与红细胞融解时间进行非线性拟合(图 2)。根据统计结果可知,红细胞的完全溶血时间与皂角苷的浓度呈对数负相关,对数回归方程为 $y = -3.673\text{Ln}x + 18.278$, $R^2 = 0.9825$,应用 SPSS 软件进行拟合优度检验, $P < 0.01$,拟合度好。

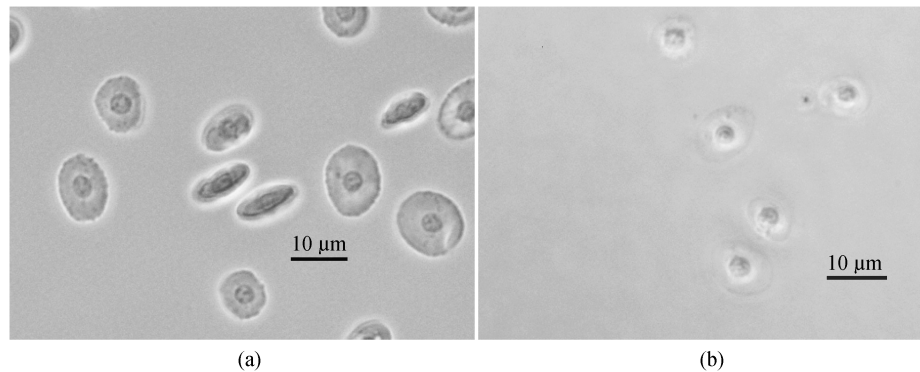


图 1 大菱鲃红细胞在 25 mg/L 皂角苷溶液中的 IPWK 溶解过程

(a) 对照组完好的红细胞; (b) 实验组正在溶解的红细胞。

Fig. 1 Microscopic hemolysis of red blood cells from *S. maximus* in the concentration of 25 mg/L saponin

(a) control, the whole red blood cells; (b) the hemolyzing red blood cells.

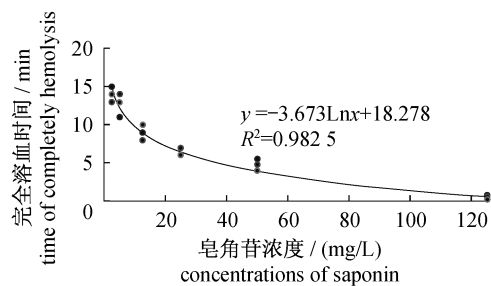


图 2 皂角苷浓度与溶血时间关系的回归曲线

Fig. 2 The graph of relationship between concentrations of saponin and hemolysis time

2.2 室温及低温条件下不同浓度皂角苷对大菱鲃血细胞体外溶血

不同浓度皂角苷直接与大菱鲃血细胞在室温条件下孵育时,可以见到皂角苷浓度低于 12.5 mg/L 时,在整个 40 min 孵育时间内溶血率均较

低。浓度为 50 mg/L 时,在 5 min 内容血率由 0 迅速升到 100%,达到完全溶血。皂角苷浓度为 25 mg/L 时,其溶血率变化介于高浓度组与低浓度组之间,从溶血开始到 40 min 时,溶血率由 1% 逐渐升高到 59.9% (图 3)。

在 4 °C 条件下不同浓度皂角苷与大菱鲃血细胞体外孵育时,皂角苷浓度为 50 mg/L 时 15 min 后达到 64.2%,之后基本不再升高,至 40 min 时达到 65.3%;皂角苷浓度在 12.5 mg/L 以下时,在整个孵育时间内溶血率不高于 2.3%;皂角苷浓度为 25 mg/L 时,25 min 内与其他 3 个低浓度组没有显著差异($P > 0.5$),之后到 40 min 时升高到 14.45%,高于其他 3 个低浓度组($P < 0.01$) (图 4)。两种温度下的溶血率表明,低温会降低皂角苷对血细胞的溶血活性。

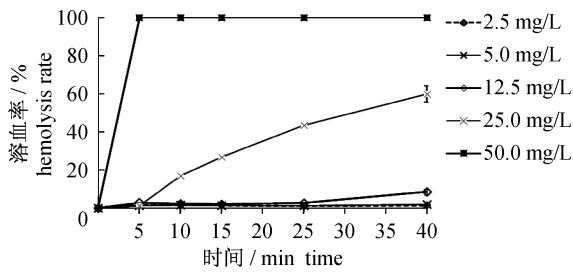


图3 20 °C条件下大菱鲂红细胞在不同浓度皂角苷溶液中的溶血率

Fig. 3 Hemolysis of blood cell of *S. maximus* in different concentrations of saponin at 20 °C

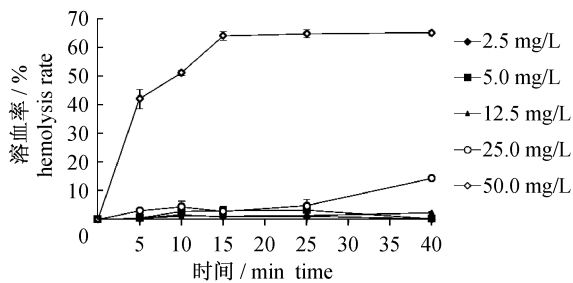


图4 4 °C条件下大菱鲂红细胞在不同浓度皂角苷溶液中的溶血率

Fig. 4 Hemolysis of blood cell of *S. maximus* in different concentrations of saponin at 4 °C

2.3 皂角苷对大菱鲂白细胞体外融细胞作用定性观察

显微观察发现,皂角苷对大菱鲂白细胞也具有融解作用(图版)。对照组的大菱鲂白细胞,细胞膜结构完整,细胞内颗粒物清晰可见;加入皂角苷 15 s 时的大菱鲂白细胞已经融解,多数细胞膜结构模糊,细胞内含物失去完整结构;加入皂角苷 30 s 时多数白细胞膜接近融解,细胞内物质失去细胞膜包裹后逐渐外流消失;加入皂角苷 45 s 时所有的白细胞均已失去原有的形态结构,细胞形态消失,个别细胞尚存有部分未融解完的印迹。

2.4 皂角苷 24 h 浸浴对大菱鲂的半致死浓度

皂角苷浸泡大菱鲂后各实验组大菱鲂均表现出一定的药物刺激反应,随着浓度增高,刺激反应加大,受试鱼在水中狂躁蹿动,呼吸困难,鱼体分泌大量粘液于浸泡液中,水面出现大量泡沫。从大菱鲂在皂角苷溶液中连续浸泡 24 h 后的死亡率(表 1),可知皂角苷浓度高于 88 mg/L 时,实验鱼 100% 死亡,浓度低于 44 mg/L 时,实验鱼没有死亡。根据表 1 结果计算得,浸泡 24 h 皂角苷对大菱鲂的半致死浓度为 64.85 mg/L,安全浓度为 6.49 mg/L。

表 1 大菱鲂在不同浓度皂角苷中浸浴 24 h 后的死亡率
Tab. 1 Mortality of *S. maximus* immersed in different concentrations of saponin

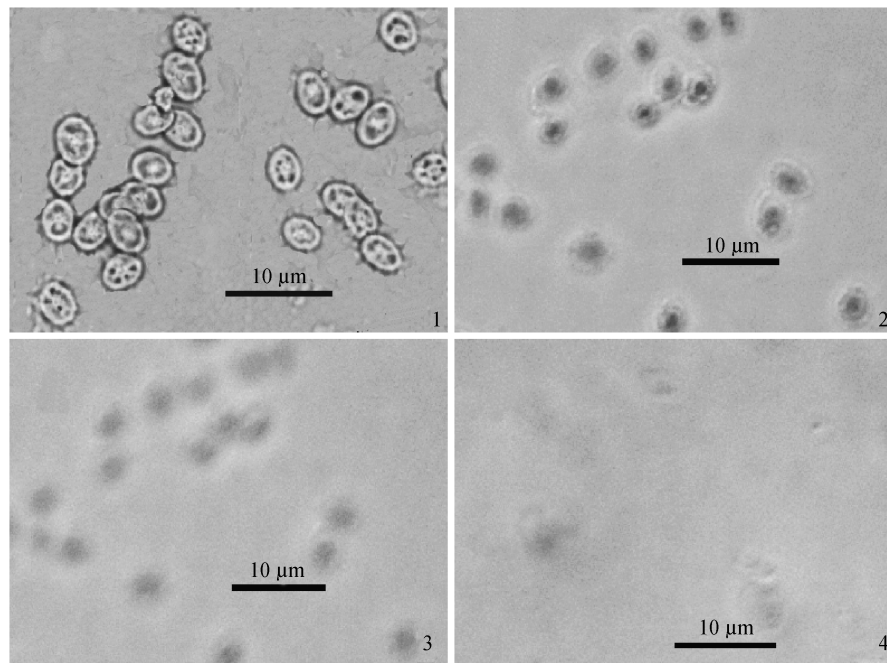
| 皂角苷浓度/(mg/L) saponin concentration | 实验鱼/尾 fish number | 累积死亡数/尾 death number | 死亡率/% mortality |
|--|----------------------|-------------------------|--------------------|
| 139 | 15 | 15 | 100 |
| 110 | 15 | 15 | 100 |
| 88 | 15 | 15 | 100 |
| 70 | 15 | 10 | 66.7 |
| 57 | 15 | 3 | 20 |
| 44 | 15 | 0 | 0 |
| 对照 control | 15 | 0 | 0 |

2.5 不同浓度皂角苷浸泡大菱鲂后血液中 LDH 活性

分别用浓度为 0、5、25 和 45 mg/L 皂角苷浸泡大菱鲂后,测定其血清中 LDH 活性(图 5)。结果显示,大菱鲂在浸泡 0.5 h 时,皂角苷浓度为 45 mg/L 的大菱鲂血清中 LDH 活性最高达 183.1 U/L,次高 LDH 活力(117.4 U/L)出现在浓度为 5 mg/L 的组,中浓度皂角苷组(25 mg/L)与空白组的 LDH 分别为 78.3 和 87.8 U/L;统计分析显示,皂角苷浓度为 5 与 45 mg/L 的两组 LDH 显著高于空白对照组与中浓度组($P < 0.05$),中浓度组与对照组差异不显著($P > 0.05$)。大菱鲂在浸泡 4 h 时,皂角苷浓度为 25 mg/L 的大菱鲂血清中 LDH 活性最高达 115.7 U/L,浓度组为 5、45 mg/L 及空白组 LDH 活力分别为 75.0、59.0 和 65.1 U/L;统计分析表明,除 25 mg/L 浓度组显著高于对照组外($P < 0.05$),其他各组间差异不显著($P > 0.05$)。在浸泡到 8 h 时,5、25 和 45 mg/L 3 个皂角苷浓度组对应的大菱鲂血清 LDH 活性分别为 144.2、107.1 和 136.6 U/L,3 组间差异不显著($P > 0.05$),但均显著高于对照组的 50.8 U/L($P < 0.05$)。

2.6 大菱鲂浸泡于浓度 25 mg/L 的皂角苷溶液后血液中 LDH 随时间变化趋势

大菱鲂浸泡于浓度 25 mg/L 的皂角苷溶液后,血清中 LDH 随时间变化趋势(图 6)。由图 6 可见,在浸泡的 8 h 内血清 LDH 处于动态变化状态,变化范围为 70.8 ~ 187.7 U/L,最低及最高时间分别出现在浸泡后的 1 及 6 h,自浸泡 1 h 后 LDH 活力开始提高,到 6 h 时达到最高,6 ~ 8 h 间出现降低趋势;对照组在实验期间 LDH 活力也处于动态变化中,自浸泡 0.5 ~ 1 h 时,血清 LDH 活



图版 浓度 25 mg/L 的皂角苷对大菱鲆白细胞的溶解显微照片

1. 没有加皂角苷溶液时的白细胞; 2. 加入皂角苷 15 s 时白细胞的溶血照片; 3. 加入皂角苷 30 s 时白细胞的溶血照片; 4. 加入皂角苷 45 s 时白细胞的溶血照片。

Plate Microscopic photographs of the lytic white blood cells from turbot treated with 25 mg/L saponin

1. untreated white blood cells; 2. white blood cells treated for 15 s; 3. white blood cells treated for 30 s; 4. white blood cells treated for 45 s.

力有下降趋势, 1~4 h 时变化不大, 维持在 41.5~65.1 U/L 之间, 之后缓慢上升, 到 6 h 时达到最高, 6~8 h 间出现降低趋势。对照组与实验组在 4~8 h 血清中 LDH 的变化趋势相似。统计分析显示浸泡 1~8 h 内, 对照组的大菱鲆血清 LDH 活力均低于实验组 ($P < 0.05$)。

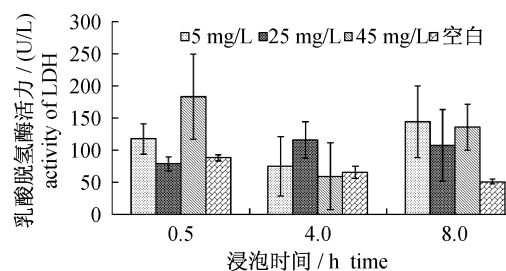


图 5 用不同浓度皂角苷浸泡大菱鲆后不同时间段血清中乳酸脱氢酶活性

Fig. 5 LDH activity in the serum of *S. maximus* after bathing in different concentrations of saponin in different time

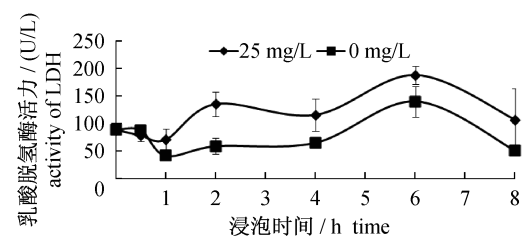


图 6 大菱鲆在浓度 25 mg/L 皂角苷中浸泡后血清中乳酸脱氢酶活性随时间变化趋势

Fig. 6 Variation trend of LDH activity in the serum of *S. maximus* after bathing in saponin at the concentration of 25 mg/L

3 讨论

目前,对皂角苷生物学活性的研究已有较多的报道^[8-10,13-15],由于皂角苷具有良好的佐剂功效,已被开发成高效的佐剂产品用于多种动物及人类疫苗免疫^[12],王秀华等^[15]研究发现皂角苷对鱼类浸泡疫苗也同样具有良好的佐剂活性,可显著提高浸泡疫苗的免疫保护率,表明皂角苷具有广阔的开

发应用前景。皂角苷的佐剂活性与其分子结构特别是亲水亲油平衡值及侧糖链长度有关^[9],由于皂角苷结构中存在亲脂基团,当皂角苷与红细胞接触后,可将红细胞膜的磷脂双分子层结构破坏,导致细胞质(含血红蛋白)流失,引发溶血^[20],进而对生物体的生理机能带来危害。本文的研究结果表明,过高浓度的皂角苷浸泡大菱鲆后可导致其死亡(表1),且浸泡后大菱鲆血清乳酸脱氢酶出现升高(图6),表明鱼体内组织中的细胞出现破裂^[21]。采用体外的血细胞溶血分析,也表明皂角苷不仅导致大菱鲆红细胞溶血,对白细胞也同样具有裂解活性,且对大菱鲆红细胞的溶血率与皂角苷浓度、环境温度及溶血时间关系密切。

皂角苷由皂苷元和糖、糖醛酸或其他有机酸组成,皂角苷分为两类,一类为甾体皂苷,另一类为三萜皂苷,三萜皂苷具有佐剂活性^[9],皂角苷的溶血活性由其配糖体的结构决定^[22]。不同植物来源的皂角苷溶血活性存在差异,用从澳大利亚古苏格兰树(*Harpullia austro-caledonica*)皮中分离出的三萜皂苷对羊红细胞进行溶血分析,发现当皂角苷浓度为5 mg/L时,就可达到100%溶血^[23],而用竹节香附皂角苷(*Anemone raddeana* saponins, ARS),当浓度为500 mg/L时,其溶血率仅为16.5%^[24]。实验中所用皂角苷分离来自南美洲皂皮树(*Quillaja saponaria*)的树皮,属于三萜皂苷类,具有佐剂活性,但也存在一定的溶血特性,因此用于疫苗佐剂时,其溶血危害仍需引起关注。

乳酸脱氢酶是机体能量代谢中参与糖酵解的一种重要酶,广泛存在于机体各组织细胞内。当血液中的红细胞膜出现破损时,会直接导致血清中LDH活性升高,因此LDH活性的提高可用于反映血细胞溶血的程度^[21]。实验发现大菱鲆浸泡在不同实验浓度的皂角苷溶液中后,实验组血清LDH活性在0.5 h时即出现明显的变化,随着取样时间的差异,实验组与对照组酶活性的高低出现变化(图6),各组的差异表明溶液中的皂角苷被鱼体吸收后,体内血细胞处于不稳定的溶血状态。关于LDH在组织中的功能,最新研究发现乳酸脱氢酶在动物体内具有刺激免疫球蛋白产生并诱导相关细胞因子表达的功能^[25],皂角苷提高鱼类浸泡疫苗免疫保护效果是否与其导致血清中LDH释放有关有待后续研究^[15]。

通过显微观察发现,皂角苷不仅融解大菱鲆

红细胞,对白细胞也同样具有裂解活性。类似的研究也发现,用从皂皮树中提取的皂角苷对罗非鱼的脑垂体细胞具有融解活性,并导致细胞中的黄体激素(luteinizing hormone)释放,而清除皂角苷后,被融解的脑垂体细胞膜可以修复^[26]。由于白细胞在鱼类免疫中具有重要作用,因此开展皂角苷对白细胞融解的相关研究,将有助于揭示皂角苷的佐剂作用机制。研究中也发现,在显微镜下观察红细胞溶血时常温下浓度为2.5~12.5 mg/L的皂角苷,完全溶血时间为15~10 min,而在皂角苷对大菱鲆红细胞的体外溶血分析中,测得浓度为12.5%的皂角苷40 min的溶血率仅为8.5%,对该结果差异的原因初步分析认为可能与分析方法有关,具体有待进一步验证。

中草药由于具有环保、无残留、副作用小的特性,近年来在水产养殖中的应用日益受到重视,相关的研究报道也较多^[27-29],但中草药的生物安全性评价方面尚为空白。皂角苷作为中草药中的一员,其生物学功能已有较多的研究报道,在水产养殖中也具有较大的开发前景,但也存在着其特殊的细胞毒性,能导致鱼类血细胞融解。实验结果提示,在水产养殖中应用中草药,进行其安全性评价,明确其潜在的副作用是非常重要的一个环节。

参考文献:

- [1] Poulliquen H, Delépée R, Larhantec-Verdier M, et al. Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water, freshwater and seawater under abiotic conditions[J]. *Aquaculture*, 2007, 262(1): 23-28.
- [2] Wu T S, Yang J J, Yu F Y, et al. Evaluation of nephrotoxic effects of mycotoxins, citrinin and patulin, on zebrafish(*Danio rerio*) embryos[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(12): 4398-4404.
- [3] Tafalla C, Novoa B, Alvarez J M, et al. In vivo and in vitro effect of oxytetracycline treatment on the immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) [J]. *Journal of Fish Disease*, 2002, 22(4): 271-276.
- [4] Yim N H, Jung Y P, Cho W K, et al. Screening of aqueous extracts of medicinal herbs for antimicrobial activity against oral bacteria[J]. *Integrative Medicine Research*, 2013, 2(1): 18-24.
- [5] Youn H J, Lakritz J, Kim D Y, et al. Anti-Protozoal

- efficacy of medicinal herb extracts against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* [J]. *Veterinary Parasitology*, 2003, 116(1): 7 - 14.
- [6] Yin G, Ardó L, Thompson K D, *et al.* Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(1): 140 - 145.
- [7] 王忠全. 三七总皂甙提取工艺研究进展 [J]. *中医药导报*, 2009, 15(9): 69 - 71.
- [8] 商义, 张才全. 人参皂甙 Rg1 对体外人胃癌细胞增殖的抑制作用及机制 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(3): 269 - 274.
- [9] Song X M, Hu S H. Adjuvant activities of saponins from traditional Chinese medicinal herbs [J]. *Vaccine*, 2009, 27(36): 4883 - 4890.
- [10] Sparg S G, Light M E, van Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 94 (2/3): 219 - 243.
- [11] Zhang X F, Cui Y, Huang J J, *et al.* Immunostimulating properties of diosgenyl saponins isolated from *Paris polyphylla* [J]. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 2007, 17(9): 2408 - 2413.
- [12] 王斌, 徐苗. ISCOMATRIX™ 佐剂: 细胞和体液免疫应答的有效诱导剂 [J]. *国外医学(预防、诊断、治疗用生物制品分册)*, 2005, 28(5): 204 - 207.
- [13] Su B K, Chen J C. Effect of saponin immersion on enhancement of the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(1): 74 - 81.
- [14] Francis G, Makkar H P S, Becker K. Quillaja saponins—a natural growth promoter for fish [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2005, 121(1): 147 - 157.
- [15] 王秀华, 黄健, 赵伟伟, 等. 鱼类浸泡疫苗特异免疫增强剂及其应用和使用方法: 中国, 200910255825. 7 [P]. 2012.
- [16] 朱全芬, 夏春华, 樊兴土, 等. 茶皂素的鱼毒活性及其应用的研究—V. 茶皂素的溶血性与鱼毒作用 [J]. *茶叶科学*, 1993, 13(1): 69 - 78.
- [17] 侯少贞, 龙彦纲, 黄晓其, 等. 葛根素注射液浓度对红细胞溶血率的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(3): 655 - 656.
- [18] 贾春生. 利用 SPSS 软件计算杀虫剂的 LC₅₀ [J]. *昆虫知识*, 2006, 43(3): 414 - 417.
- [19] 周永欣, 章宗涉. 水生生物毒性试验方法 [M]. 北京: 农业出版社, 1989: 192 - 231.
- [20] Baumann E, Stoya G, Völkner A, *et al.* Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure [J]. *Acta Histochem*, 2000, 102(1): 21 - 35.
- [21] Muller A, Jacobsen H, Healy E, *et al.* Hazard classification of chemicals inducing haemolytic anaemia; An EU regulatory perspective [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 2006, 45(3): 229 - 241.
- [22] Haruna M, Tanaka M, Sugimoto T, *et al.* Alteration of Na⁺ permeability in human erythrocytes as studied by ²³Na-NMR and inhibition of the kidney Na⁺, K⁺-ATPase activities with saponins; interaction of Gleditsia saponins with human erythrocyte membranes [J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 1995, 5(8): 827 - 830.
- [23] Voutquenne L, Guinot P, Froissard C, *et al.* Haemolytic acylated triterpenoid saponins from *Harpullia austro-caledonica* [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(7): 825 - 835.
- [24] Sun Y X, Li M Q, Liu J C. Haemolytic activities and adjuvant effect of *Anemone raddeana* saponins (ARS) on the immune responses to ovalbumin in mice [J]. *International Immunopharmacology*, 2008, 8(8): 1095 - 1102.
- [25] Miho D, Kosuke N, Takeaki O, *et al.* Immunomodulatory effects of lactate dehydrogenase *in vitro* and *in vivo* [J]. *Journal of Functional Foods*, 2012, 4(4): 972 - 978.
- [26] Levavi-Sivan B, Hedvat R, Kaniyas T, *et al.* Exposure of tilapia pituitary cells to saponins: Insight into their mechanism of action [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2005, 140(1): 79 - 86.
- [27] 王印庚, 刘志伟, 林春媛, 等. 养殖大菱鲆隐核虫病及其治疗 [J]. *水产学报*, 2011, 35(7): 1105 - 1112.
- [28] Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo M S. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(2): 354 - 361.
- [29] Yogeewaran A, Velmurugan S, Punitha S M J, *et al.* Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by inactivated vaccine with herbal immunostimulants [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(6): 1058 - 1067.

Hemolysis of turbot (*Scophthalmus maximus*) blood cell with *Quillaja saponaria* saponin

WANG Yujuan, WANG Xiuhua*, HAN Wen, WANG Rui, HUANG Jie

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The correlation between hemolysis time and concentration of saponin (2.5, 5, 12.5, 25, 50 and 125 mg/L) was analyzed via microscope observation. *In vitro* hemolysis rate of turbot blood cells in different concentrations of saponin (2.5, 5, 12.5, 25 and 50 mg/L) at 20 and 4 °C, for different time duration were tested respectively. To investigate the toxicity of saponin extracted from *Quillaja saponaria* to turbot (*Scophthalmus maximus*), median lethal concentration (LC₅₀) was calculated by immersing the turbot in sea water with different concentrations of saponin. In addition, the lactic dehydrogenase (LDH) activities in serum of turbot after bathing in saponin seawater solution (0, 5, 25 and 45 mg/L) were analyzed. The results indicated that the correlation between hemolysis time of erythrocytes and saponin concentration showed a logarithmic negative correlation ($R^2 = 0.98$), and that saponin could also induce hemolysis to leukocytes of turbot. Saponin in concentration of 50 mg/L could result in 100% hemolysis at 20 °C for 5 min, in contrast, only 42.2% hemolysis was observed at 4 °C. The 24 h LC₅₀ of saponin for *S. maximus* was 64.85 mg/L. In this report, from cell level, the evaluation of the toxicity of saponin to blood cells for hemolysis was made, which will theoretically support its safe application in aquaculture.

Key words: *Scophthalmus maximus*; saponin; hemolysis; lactic dehydrogenase

Corresponding author: WANG Xiuhua. E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn