

文章编号: 1000-0615(2008)03-0455-08

大黄蒽醌提取物对罗氏沼虾抗鳃弧菌感染的研究

苏永腾^{1,2}, 刘波¹, 周群兰¹, 何义进¹,
谢骏¹, 徐跑¹, 李国富³, 高启平³

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081;

2. 南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095; 3. 通威集团有限公司, 四川 成都 610041)

摘要: 将罗氏沼虾随机分成 5 组, 每组三个平行, 每个平行约 1000 尾(个体均重 1 g 左右), 第 1 组为对照组, 投喂基础日粮, 另外 4 组为试验组, 在基础日粮中分别添加 0.05%、0.1%、0.2%、0.4% 大黄蒽醌提取物, 饲养 6 周后对罗氏沼虾进行鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染。测定生长以及 0、12、24、48 h 血清和肝胰腺溶菌酶、丙二醛(MDA)、总抗氧化能(T-AOC)以及超氧化物歧化酶(SOD)等指标。生长试验表明, 与对照组相比, 0.1%组、0.4%组罗氏沼虾的增重率、特定生长率显著提高, 饵料系数显著降低。攻毒试验 I 表明, 各组 48 h 内罗氏沼虾血清溶菌酶活性、肝胰腺溶菌酶含量、血清 T-AOC 均呈先升高后降低趋势, 其中它们的最大值分别出现于 0.4%组的 12 h、0.2%组 24 h、0.1%组 12 h; 肝胰腺 SOD 活力呈上升趋势, 而血清 MDA 则一直下降。攻毒试验 II 表明, 大黄蒽醌提取物能有效地降低试验组罗氏沼虾的死亡率, 提高免疫保护率, 其中 0.4%组的保护效果为最佳。因此, 在饲料中添加大黄蒽醌提取物降低罗氏沼虾对病原的敏感性, 增强机体抗病力, 促进生长。

关键词: 罗氏沼虾; 大黄蒽醌提取物; 鳃弧菌; 生长; 免疫

中图分类号: S 963 **文献标识码:** A

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是一种对水产动物危害严重的细菌病原, 其流行区域广泛, 能导致各种淡、海水养殖动物发生弧菌病, 常给水产养殖业造成巨大的经济损失^[1]。鳃弧菌的致病性与许多毒力因子有关, 包括由质粒编码的铁吸收系统、细胞外溶血毒素、细菌鞭毛蛋白、胞外蛋白酶等。随着我国虾类养殖业的不断发展, 虾病发生的状况也由于水体生态环境恶化和虾的高密度人工养殖而日趋严重, 其中虾类弧菌病比较常见, 如鳃弧菌引起的黄鳃病, 由溶藻弧菌引起的红腿病等, 发病严重时往往造成对虾的大批死亡^[2]。

中草药具有天然、高效、毒副作用少、资源丰富等优点, 其含有丰富的调节水产动物免疫表达

的有效成分, 如有机酸类、生物碱、聚糖类、挥发油、蜡、甙、鞣质物质及一些未知免疫活性因子等, 这些因子主要通过影响非特异性免疫系统, 激活和诱导多种细胞因子等途径提高机体免疫力^[3-4]。但中草药添加剂对虾类免疫影响的研究则较少, 罗日祥等、陈孝煊等研究表明大黄、黄连、黄芪可提高中国对虾(*Penaeus chinensis*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)血液溶菌酶活性和白细胞吞噬作用^[5-6]。

大黄(*Rheum officinale*)蒽醌提取物主要成分为大黄素、大黄酚、大黄酸等, 其具有抑菌抗炎症、抗氧化及清除氧自由基、保护肝胰腺和提高免疫

收稿日期: 2007-04-27

资助项目: 国家“十五”攻关项目(2004BA526B0505); 中央级公益性科研院所基本科研专项资金(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 2007JBF11); 江苏省科技攻关计划(BE2007330)

作者简介: 苏永腾(1982-), 男, 广西钦州人, 硕士研究生, 从事水产动物营养与饲料学研究。E-mail: suyongteng@tom.com

通讯作者: 谢骏, Tel: 0510-85551442; E-mail: xiej@ffrc.cn

水平等作用,而饲料中添加大黄萘醌提取物对虾类免疫和抗氧化影响的研究则鲜有报道^[7-9]。鉴于此,本试验在罗氏沼虾日粮中添加了不同浓度的大黄萘醌提取物,并通过人工感染鳃弧菌手段初步探讨其对罗氏沼虾免疫的影响,以及监测机体抗氧化能力的变化和对病原菌的敏感性程度,为大黄萘醌提取物在虾病防治方面提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验罗氏沼虾、中草药及日粮

罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心渔场提供。试验选择健康、规格、重量基本一致的罗氏沼虾,初体重为 (1.07 ± 0.11) g,初体长为 (4.12 ± 0.13) cm。随机分为5组,分别为对照组、0.05%组、0.1%组、0.2%组、0.4%组,每组设3个平行试验,每个平行约1000尾,共15个水泥池(规格为 $8\text{ m} \times 2\text{ m} \times 1\text{ m}$)。

大黄萘醌提取物由南京知新医药研发有限公司提供,主要成分为大黄素、大黄酚、大黄酸。各组试验日粮为基础日粮分别添加0、0.05%、0.1%、0.2%与0.4%大黄萘醌提取物,基础日粮配方见表1。

1.2 饲养试验

罗氏沼虾在中国水产科学研究院淡水渔业研究中心实验基地温室棚水泥池驯化2周后投喂试验日粮,以虾体重的5.0%~10.0%投喂。每天投喂3次,6:00-6:30、12:00-12:30及18:00-18:30各投喂一次,长期测水温,水源为地下水,7d换水一次,每次换水1/3,每天吸污一次,日夜连续充气增氧,每周测一次水质,整个实验期间水质如下:饲养过程中溶氧 $> 5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,氨氮 $< 0.05\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,硫化氢 $< 0.1\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,pH为7.8~8.2等。饲养时间(包括驯化时间)从2006年5月17日到2006年7月12日,56d后试验结束。

1.3 攻毒试验

攻毒试验 I 饲养试验结束后随机捞取罗氏沼虾作攻毒试验 I,每个剂量组分3个平行,每个平行随机取30尾虾注射鳃弧菌。鳃弧菌购自中国科学院水生生物研究所,按刘栋辉等所述方法,将活化后的鳃弧菌用无菌生理盐水稀释,使终浓度约为 $1 \times 10^8\text{ mL}^{-1}$,并按每尾虾 $50\text{ }\mu\text{L}$ 剂量

腹肌注射菌液^[10]。后放养于同样规格($40\text{ cm} \times 40\text{ cm} \times 30\text{ cm}$)容器中,保证充足的氧气,并分别于0、12、24、48 h取血液样品和肝胰腺样品,每次采样每个平行取3尾虾。

攻毒试验 II 参照试验 I 方法,将每个剂量组分3个平行,每个平行随机取20尾虾腹肌注射 *V. anguillarum* ($1 \times 10^8\text{ mL}^{-1}$) $50\text{ }\mu\text{L}$ 并放养于同样规格($40\text{ cm} \times 40\text{ cm} \times 30\text{ cm}$)容器中,于0、12、24、48、72及96 h统计死亡率和免疫保护率。

表1 基础日粮与营养水平

Tab.1 The basic diet and nutrition levels

| 组成 ingredients | 含量(%) content |
|--|---------------|
| 鱼粉 fish meal | 24 |
| 豆粕 soybean meal | 20 |
| 花生粕 peanut meal | 16 |
| 菜籽粕 rapeseed meal | 8 |
| 膨化大豆 extruded soybean | 8 |
| 次粉 wheat middings | 17 |
| 鱼油 fish oil | 2 |
| 卵磷脂 lecithin | 1 |
| 胆固醇 cholesterol | 0.2 |
| 氯化胆碱(50%) choline chloride | 0.3 |
| 维生素添加剂 vitamin additive | 0.5 |
| 矿物质添加剂 mineral additive | 1 |
| 磷酸二氢钙 Calcium dihydrogen phosphate | 2 |
| 合计 total | 100 |
| 营养水平 nutrition levels | |
| 干物质(%) dry matter | 89.13 |
| 总能($\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$) gross energy | 17.73 |
| 粗蛋白(%) crude protein | 39.74 |
| 总磷(%) total phosphorous | 1.62 |
| 钙(%) calcium | 1.48 |
| 蛋氨酸+胱氨酸(%) methionine + cystine | 1.10 |
| 赖氨酸(%) lysine | 2.09 |
| 苏氨酸(%) Threonine | 1.34 |

注:1. 营养水平含量中总能(GE) $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$:蛋白质 $23.64\text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$,脂肪 $39.54\text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$,糖 $17.15\text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$;其他为实测值。2. 维生素与矿物质添加剂由南京华牧动物研究所提供

Notes: 1. Gross energy (GE) $\text{kJ} \cdot \text{g}^{-1}$: protein $23.64\text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$, fat $39.54\text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$, carbohydrate $17.15\text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$; And the others are measured in the nutrition levels. 2. Vitamin additive and mineral additive were provided by Nanjing Huamu Animal Institute

1.4 血液、肝胰腺的采集

在感染试验后分别于0、12、24、48 h取血液样品和肝胰腺样品,每个平行组随机取3尾虾,围心腔采血后再取肝胰腺样品,血液样品经 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置1~2 h后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\text{ 000 r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min制备血清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。肝胰腺 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置后

加入磷酸缓冲液($0.064 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 6.4)冰浴匀浆后, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清液 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 各指标的测定及计算方法

血清溶菌酶活力参照文献[11]的方法, 用 $0.067 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS(pH 6.4)将溶壁微球菌配制成 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液, 每个样品取 3 mL 菌悬液, 吸取 $40 \text{ } \mu\text{L}$ 血清加入到 3 mL 菌悬液中, 混匀后立即在 540 nm 下测定 A_0 值, 然后在 $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中温浴 30 min, 取出后置于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰浴终止反应, 再测定 A 值, 按 $U = (A_0 - A) / A$ 来计算溶菌酶的活力。肝胰腺提取液溶菌酶含量参照文献[12]的方法测定。

肝胰腺提取液超氧化物歧化酶(T-SOD)活力参照文献[13]的方法, SOD 活力定义为: 每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位(U)。肝胰腺匀浆粗提液蛋白含量采用福林酚方法测定。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA) 作为标准蛋白, 购于 AMRESCO 公司。

血清丙二醛(MDA)采用硫代巴比妥酸荧光分光光度法(TBA 法)测定; 总抗氧化能参照方展强(2005)方法测定, 总抗氧化能力定义为: 每分钟每毫升血清使反应体系的吸光度值每增加 0.01 时为一个总抗氧化能力单位^[14]。以上试剂盒均

购自南京建成生物工程研究所。

增重率(%) = (试验末虾体均重 - 试验初虾体均重) \div 试验初虾体均重 $\times 100$

特定生长率(%) = (Ln 试验末虾体均重 - Ln 试验初虾体均重) \div 试验天数 $\times 100$

饵料系数 = 所耗总饲料重 \div 虾总增重

死亡率(%) = 死亡虾数 \div 受感染虾数 $\times 100$;

免疫保护率(%) = (对照组死亡率 - 试验组死亡率) \div 对照组死亡率 $\times 100$

1.6 数据统计与分析

数据用 SPSS(Ver. 11.5)软件 Duncan 氏多重比较检验各组间的差异, $P < 0.05$ 表示有差异显著性。所有的结果均以平均值 \pm 标准误(mean \pm SE)来表示。

2 结果与分析

2.1 大黄蒽醌提取物对罗氏沼虾生长的影响

与对照组相比, 大黄蒽醌提取物可提高罗氏沼虾的增重率、特定生长率, 降低饵料系数, 其中 0.1 组%、0.4% 组增重率分别显著提高 694.09% 和 768.69%, 与对照组差异显著($P < 0.05$), 而 0.4% 组的特定生长率为 3.83, 较对照组显著提高 15.71% ($P < 0.05$)(表 2)。

表 2 大黄蒽醌提取物对罗氏沼虾生长的影响

Tab.2 Effects of anthraquinones extracted from *R. officinale* Bail on growth gains and specific growth rate of *M. rosenbergii*

| 蒽醌提取物含量(%) levels of anthraquinones extracts | 初均重(g) initial average weight | 末均重(g) final average weight | 增重率(%) weight gain rate | 特定生长率(%) specific growth rate | 饵料系数 feed conversion rate |
|--|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| 0 | 1.08 ± 0.09 | 7.01 ± 0.62^a | 540.95 ± 12.24^a | 3.31 ± 0.09^a | 1.54 ± 0.03^a |
| 0.05 | 1.07 ± 0.15 | 8.01 ± 1.03^{ab} | 648.70 ± 29.01^{ab} | 3.56 ± 0.17^{ab} | 1.28 ± 0.11^{ab} |
| 0.1 | 1.09 ± 0.08 | 8.62 ± 0.20^b | 694.09 ± 51.39^b | 3.69 ± 0.03^{ab} | 1.21 ± 0.09^b |
| 0.2 | 1.07 ± 0.11 | 7.81 ± 0.84^{ab} | 630.01 ± 19.03^{ab} | 3.50 ± 0.07^{ab} | 1.26 ± 0.12^{ab} |
| 0.4 | 1.10 ± 0.12 | 9.59 ± 0.56^b | 768.69 ± 37.36^b | 3.83 ± 0.07^b | 1.18 ± 0.17^b |

注: 表中值为平均值 \pm 标准误($n = 3$); 同一列数据中有不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

Notes: Values are means \pm SE ($n = 3$); Within the same column different letters indicate significant differences($P < 0.05$)

2.2 大黄蒽醌提取物对罗氏沼虾感染鳃弧菌后血清及肝胰腺溶菌酶的影响

感染 *V. anguillarum* 48 h 内, 0.2% 组、0.4% 组血清溶菌酶活性及肝胰腺溶菌酶含量呈先升高后降低的趋势, 而 0.1% 组血清溶菌酶活性则呈升高

趋势, 0.05% 组的肝胰腺溶菌酶含量亦持续升高(图 1)。

0.05% 组、0.1% 组、0.2% 组、0.4% 组血清溶菌酶活性分别于 24、48、12、12 h 达到最高值并比 0 h 时(感染前)显著升高($P < 0.05$), 而 0.4% 组于

12 h 比同期对照组亦显著提高 ($P < 0.05$); 0.1% 组、0.2% 组、0.4% 组肝胰腺溶菌酶含量分别于 48、24、12 h 达到最高值并比 0 h 时(感染前)显著

升高 ($P < 0.05$), 同时比同期对照组亦显著提高 ($P < 0.05$), 另外, 0.1% 组于 48 h、0.4% 组于 24 h 也比同期对照组亦显著提高 ($P < 0.05$)。

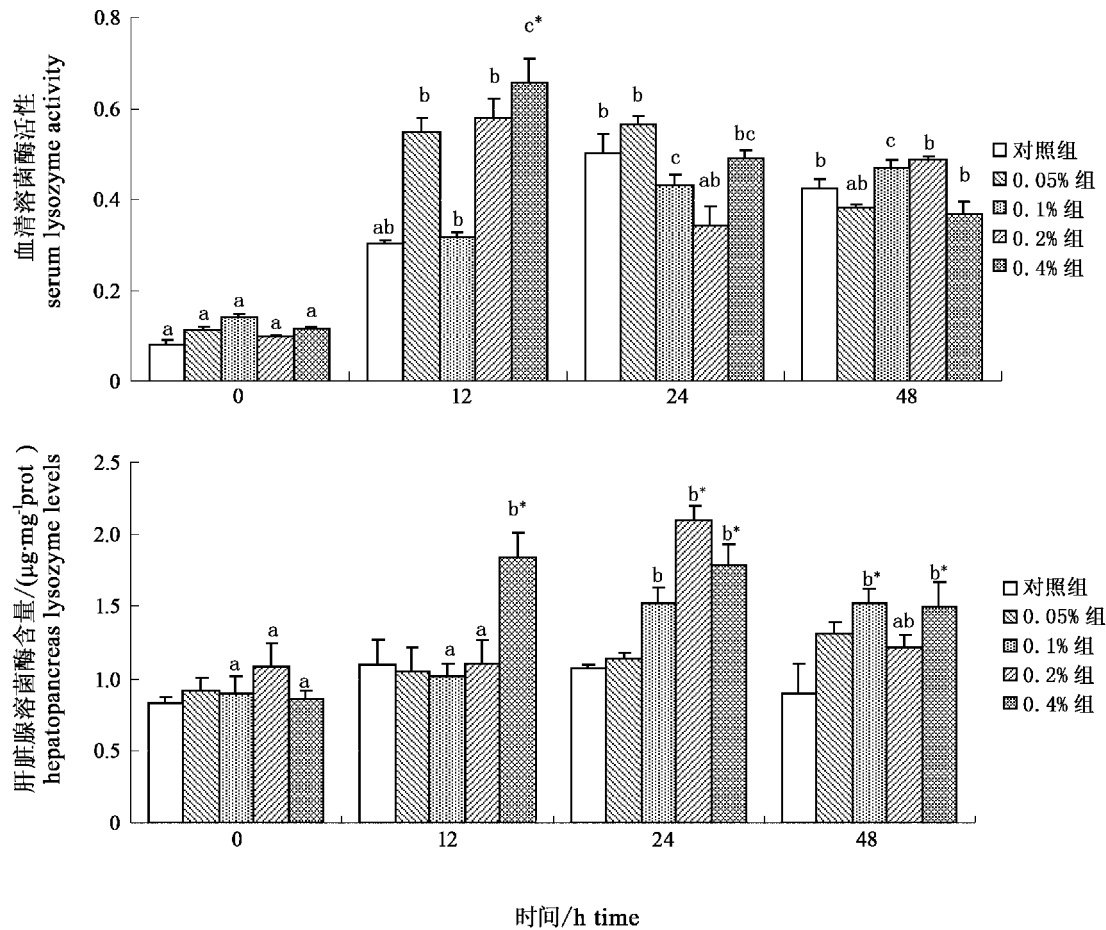


图1 大黄蒽醌提取物对罗氏沼虾感染鳃弧菌后血清溶菌酶活性及肝胰腺溶菌酶含量的影响

Fig. 1 Effects of anthraquinones extracted from *R. officinale* Bail on serum lysozyme activity and hepatopancreas lysozyme levels of *M. rosenbergii* infected with *V. anguillarum*

图中同一试验时间内试验组与对照组差异显著 ($P < 0.05$) 用 * 表示; 而同一试验组内不同试验时间的差异显著 ($P < 0.05$) 则用不同字母表示

Within the same time of the test, * indicate significant differences ($P < 0.05$) between treated groups and the control; Within the same treated group different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

2.3 大黄蒽醌提取物对罗氏沼虾感染鳃弧菌后抗氧化指标的影响

如图2所示, 感染鳃弧菌后各组罗氏沼虾血清 T-AOC 呈先升高后降低的趋势, 血清 MDA 呈下降趋势, 而肝胰腺 SOD 活力则呈上升趋势。

0.05% 组、0.1% 组、0.2% 组和 0.4% 组的血清 T-AOC 值于 12h 达到最高, 且 0.1% 组、0.2% 组相对于 0 h 时(感染前)显著升高 ($P < 0.05$); 另

外, 0.1% 组和 0.4% 组于 0 h、0.4% 组于 48 h 均比同期对照组有显著差异 ($P < 0.05$)。血清 MDA 除对照组有所升高外, 其它试验组均呈下降趋势但未显著下降; 0.05% 组于 24 h 比同期对照组降低了 28.47% ($P < 0.05$)。各组肝胰腺 SOD 在 48 h 内均呈上升趋势, 至 48 h 达到最高值且均比 0 h 时(感染前)显著升高 ($P < 0.05$); 而与同期对照组相比, 0.1% 组于 12 h 和 24 h、0.2% 组和 0.4% 组于 24 h 均显著提高 ($P < 0.05$)。

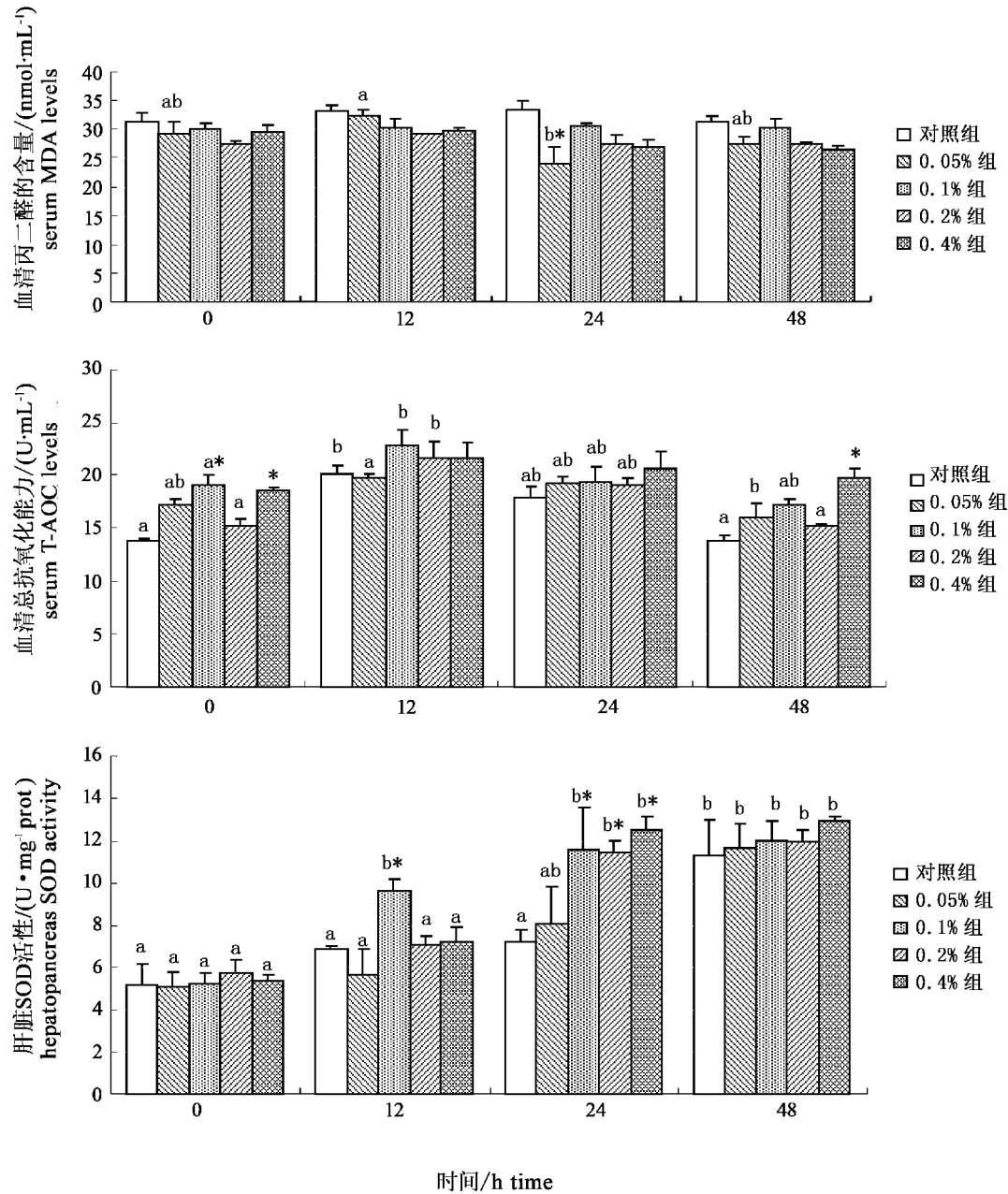


图2 大黄蒽醌提取物对罗氏沼虾感染鳃弧菌后血清丙二醛含量、血清总抗氧化能力及肝胰腺 SOD 活性的影响

Fig.2 Effects of Anthraquinones extracted from *R. officinale* Bail on serum MDA, T-AOC and hepatopancreas SOD of *M. rosenbergii* infected with *V. anguillarum*

图中同一试验时间内试验组与对照组差异显著($P < 0.05$)用*表示;而同一试验组内不同试验时间的差异显著($P < 0.05$)则用不同字母表示

Within the same time of the test, * indicate significant differences($P < 0.05$) between treated groups and the control; Within the same treated group different letters indicate significant differences($P < 0.05$)

2.4 大黄蒽醌提取物的免疫保护效果

感染鳃弧菌后 0.1% 组与 0.4% 组死亡率在

24、36、48 h 均比同期对照组显著降低($P < 0.05$), 且 0.4% 组于 72 h 亦比对照组显著降低($P <$

0.05)。对照组罗氏沼虾死亡率在48 h时就达到100%，0.05%组、0.1%组于72 h达到100%，而0.2%组和0.4%组则在96 h后才完全死亡。

0.1%组与0.4%组在24、36、48 h的免疫保护率较0.05%组和0.2%组差异显著($P < 0.05$)，随着感染时间的推延，自48 h后，大黄蒽醌提取物对罗氏沼虾的免疫保护效果呈相对下降趋势，至96 h时各组免疫保护率均为0。

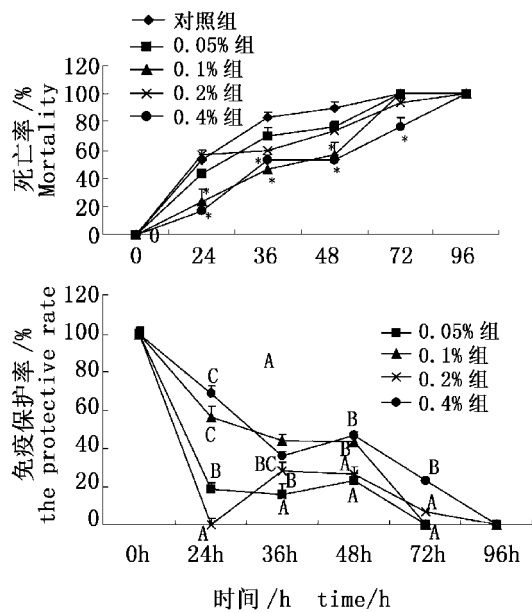


图3 大黄蒽醌提取物的免疫保护效果及其对感染鳃弧菌后罗氏沼虾死亡率的影响

Fig.3 Effects of anthraquinones extracted from *R. officinale* Bail on promoting *M. rosenbergii* to resist *V. anguillarum*

图中同一试验时间内试验组与对照组的死亡率的差异显著($P < 0.05$)用*表示;而同一试验时间的免疫保护率差异显著($P < 0.05$)则用不同大写字母表示。

Within the same time of the test, * indicate significant differences ($P < 0.05$) of mortality between treated groups and the control; different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) of protective rate

3 讨论

中草药制剂可促进水产动物摄食,提高饵料利用率和增重率,而且中草药制剂在调节虾类免疫功能,提高抗病力的同时也改善了肠道的内环境,促进有益菌的增殖,杀灭或抑制有害菌的增殖,提高机体的营养吸收功能,促进机体生长^[15-16]。在本试验中,饲料中添加大黄蒽醌提取物可提高罗氏沼虾增重率、特定生长比率并降

低饵料系数。其中,0.1%组和0.4%组的增重率及饵料系数与对照组相比差异显著($P < 0.05$);而0.4%组的特定生长率亦较对照组显著提高($P < 0.05$)。

溶菌酶是虾类血淋巴溶酶体中溶酶体酶系统的重要成分,其可以水解革兰氏阳性菌细胞壁中粘肽的乙酰氨基多糖,并使之裂解被释放出来,从而起到杀菌和消除侵入机体内异物的作用^[1,17-18]。T-AOC、MDA、SOD均是用于衡量机体内抗氧化功能的代表性指标^[14,19]。MDA是体内氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸而产生的重要产物,可以反映细胞受损伤程度以及脂质过氧化程度^[20-21]。而SOD是一种重要的氧自由基清除剂,因此SOD和MDA呈对立关系^[22-23]。

在虾类日粮中添加一些植物的提取物如中草药等可调节虾类血淋巴,影响机体内免疫和抗氧化相关酶的表达,促进各种免疫因子的生成并提高机体对病原微生物的抵抗能力等^[24-25]。研究表明,中草药提取物可显著提高虾类的溶菌活力、酚氧化酶活力,降低死亡率^[5-6]。在本次试验中,罗氏沼虾在感染 *V. anguillarum* 后,试验组血清溶菌酶活性以及肝胰腺溶菌酶含量均比同期对照组提高,如血清溶菌酶活性指标中12 h的0.4%组,肝胰腺溶菌酶含量指标中12、24、48 h的0.4%组、24 h的0.2%组及48 h的0.1%组均比同期对照组显著提高($P < 0.05$)。同样,对于抗氧化指标方面,0 h的0.1%组和0.4%组的总抗氧化能比同期对照组显著提高($P < 0.05$),12 h的0.1%组;24 h的0.1%组、0.2%组、0.4%组SOD比同期对照组显著提高($P < 0.05$),24 h的0.05%组MDA则比对照组显著降低28.47% ($P < 0.05$)。因此说明添加大黄蒽醌提取物可以提高感染 *V. anguillarum* 后48 h内罗氏沼虾的溶菌酶以及T-AOC、SOD等抗氧化指标并降低MDA,从而提高罗氏沼虾的免疫水平,降低罗氏沼虾对 *V. anguillarum* 的敏感程度,增强其抗病能力。这从感染后的死亡率及免疫保护率亦可得到印证。

虾类在感染致病微生物初始阶段时,血淋巴和组织里的各种非特异性免疫因子的活力及含量,如酚氧化还原酶、一氧化氮合成酶等在短时间内会急剧上升,促进机体抵抗病原微生物的侵袭,但随着感染时间的推延,由于病原微生物在虾类

体内的大量增殖及其对血细胞的破坏而使得这些免疫因子的活力及含量继而下降^[26-28]。在本次试验中,各组罗氏沼虾在感染 *V. anguillarum* 后 48 h 内,血清溶菌酶活性和肝胰腺溶菌酶含量也呈先升高后降低趋势,但在 48 h 时这些指标比刚感染时或 24 h 内并未显著下降,而由图 3 所示可以发现在 48 h 后大黄蒽醌提取物对罗氏沼虾的免疫保护率快速下降,死亡率则迅速上升,因此可以推测,随着 *V. anguillarum* 在罗氏沼虾体内的大量增殖及其对血淋巴等免疫系统的破坏,血清溶菌酶活性、肝胰腺溶菌酶含量等免疫指标将快速下降且对照组下降最快。同样,在 48 h 内肝胰腺 SOD 活力持续上升,血清 MDA 含量除对照组外呈下降趋势,T-AOC 则先升后降但并未显著下降,随着感染 *V. anguillarum* 时间的推延,SOD 和 T-AOC 将会迅速下降,而 MDA 则会快速上升,对照组的变化幅度则将为最大。但对于感染 *V. anguillarum* 48 h 以后溶菌酶水平以及 SOD、T-AOC、MDA 等抗氧化指标走势是否符合推测,仍需要进一步研究。

本次试验表明,0.1%组、0.4%组的增重率、特定生长比率、饵料系数、死亡率以及免疫保护率均与对照组差异显著,而 0.1%组、0.2%组、0.4%组的溶菌酶、SOD、T-AOC 等免疫抗氧化指标均比同期对照组提高,MDA 则降低,因此大黄蒽醌提取物添加为 0.1%到 0.4%比较合适。总的来说,饲料中添加大黄蒽醌提取物可有效提高了罗氏沼虾生长性能,提高机体免疫力和抗氧化能力,增强机体对 *V. anguillarum* 的抵抗能力,但最佳添加浓度仍需进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] 郑国兴,沈亚林,李 何. 中国对虾病原菌(鳃弧菌)的研究[J]. 水产学报,1990,14(1):1-7.
- [2] 王 雪,安利国,袁金铎. 鳃弧菌铁吸收系统的毒力作用研究进展[J]. 水产科学,2006,25(3):161-162.
- [3] Immanue G, Vincybai C, Sivaram V, et al. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles[J]. Aquaculture,2004,236(1-4):53-65.
- [4] Sivaram M, Babu M, Immanuel G, et al. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauwina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections[J]. Aquaculture,2004,237(1-4):9-20.
- [5] 罗日祥. 中药制剂对中国对虾免疫活性物的诱导作用[J]. 海洋与湖沼,1997,28(6):573-578.
- [6] 陈孝煊,吴志新,张厚梅. 大黄与黄连对二种淡水虾血细胞吞噬活性的影响[J]. 水生生物学报,2002,26(2):201-204.
- [7] Chang C H, Lin C C, Yang J J. Anti-inflammatory effects of emodin from *Ventilago leiocarpa* [J]. Am J Chin Med,1996,24(2):139-142.
- [8] Huang S S, Yeh S F, Hong C Y. Effect of anthraquinone derivatives on lipid peroxidation in rat heart mitochondria: structure activity relationship [J]. J Nat Prod,1995,58(9):1365-1371.
- [9] 王文俊,吴威中,姚 智,等. 大黄素、丹参素对单核细胞分泌炎症细胞因子的调节[J]. 中国免疫学杂志,1995,11(6):370-372.
- [10] 刘栋辉,阳会军. β -葡聚糖和维生素 C 对斑节对虾生长和抗病力的效果[J]. 中山大学学报(自然科学版),2002,(41)4:59-62.
- [11] Chen S C, Yoshida T, Adams A. Non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis nilotica*, to the extracellular products of *Mycobacterium* spp. and to various adjuvants [J]. Journal of Fish Diseases, 1998, 21:39-46.
- [12] 华育平,刘红柏,张 颖. 温度、疾病感染对史氏鲟血清和各组织中溶菌酶水平的影响[J]. 东北林业大学学报,2005,33(3):63-66.
- [13] 王秀华,宋晓玲,黄 健. 肽聚糖制剂对南美白对虾体液免疫因子的影响[J]. 中国水产科学,2004,11(1):26-30.
- [14] 方展强,王春风. 硒对汞致剑尾鱼鳃和肝组织总抗氧化能力变化的拮抗作用[J]. 实验动物与比较医学,2005,25(3):136-139.
- [15] 邱小琼,周洪琪,刘小刚. 中草药添加剂对异育银鲫肌肉生化成分的影响[J]. 上海水产大学学报,2003,12(1):25-28.
- [16] 王广军. 一种中草药添加剂在南美白对虾养殖中的应用试验[J]. 渔业致富指南,2004,24:52-55.
- [17] Soushi F, Izumi T T, Keiko K. Protein purification, cDNA cloning and gene expression of lysozyme from silkworm, *Samia cynthia ricini* [J]. Comp Biochem Physiol,2001,128B:709-718.
- [18] Sonomi M, Junichi H, Ikuo H. Expression of Japanese flounder c-type lysozyme cDNA in insect cells[J]. Dev Comp Immunol,2001,25:439-445.

- [19] Lewis S E M, Young I S, Boyle P M. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men[J]. *Fertil Steril*, 1996, 64:868.
- [20] Slater T F, Mickle P L. Oxygen free radicals and tissue damage[J]. *Excerpta Medica Amsterdam*, 1979, 143.
- [21] 徐德立, 赵小立, 张 铭. 低温胁迫下草鱼 ZC-7901 细胞系内丙二醛含量的变化[J]. *曲阜师范大学学报(自然科学版)*, 2003, 29(4):88-90.
- [22] Munoz M, Cedenq R. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2000, 191:89-107.
- [23] 王 雷, 李光友, 毛远兴. 口服免疫药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J]. *海洋与湖沼*, 1994, 25(5):486-488.
- [24] Achara Rattanachai, Ikuo Hirono. Peptidoglycan inducible expression of a serine proteinase homologue from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 18(1):39-48.
- [25] Lee M H, Shiau S Y. Dietary vitamin C and its derivatives affect immune responses in grass shrimp, *Penaeus monodon* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12:119-129.
- [26] 雷质文, 黄 ■, 杨 冰. 感染白斑综合症病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究[J]. *中国水产科学*, 2001, 8(4):46-51.
- [27] 姜国建, 于仁诚, 王云峰. 中国明对虾血细胞中一氧化氮合成酶的鉴定及其在白斑综合症病毒感染过程中的变化[J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(4):342-350.
- [28] Hukmark D, Steiner H, Rasmusn T, *et al.* Purification and properties of three inducible bacterial protein from hemolymph of immunized pupae of *Hyalaphora cecropia* [J]. *Eur J Biochem*, 1980. 106(1):7-16.

Influence of anthraquinones extracted from *Rheum officinale* Bail promoting *Macrobrachium rosenbergii*'s resistance to *Vibrio anguillarum*

SU Yong-teng^{1,2}, LIU Bo¹, ZHOU Qun-lan¹, HE Yi-jin¹,
XIE Jun¹, XU Pao¹, LI Guo-fu³, GAO Qi-ping³

(1. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

3. Tongwei Group Corporation Limited, Chengdu 610041, China)

Abstract: In aquaculture Chinese herbal medicines could promote specific and nonspecific immune functions of fish to control fish diseases. In mammal, Chinese herbs could promote antioxidant enzymes activity and hepatic lipid peroxide contents, alleviate free radical and reduce the lipid peroxidation injury. However the effect of anthraquinones extracted from *Rheum officinale* Bail on fish immunity has hardly been found in research reports and few reports have been found to study the immune and antioxidant effects of anthraquinones extract gave *Macrobrachium rosenbergii* certain protection against *Vibrio anguillarum*. In view of this, *Macrobrachium rosenbergii* were allotted into five groups randomly. The control group were fed with basal diet, the others were the treated groups fed with basal diet supplemented with 0.05%, 0.1%, 0.20%, 0.4% anthraquinones extracts for 8 weeks, respectively. At the end of feeding period, *M. rosenbergii* of each group were infected with *V. anguillarum*. The growth index and lysozyme, maleic dialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), total antioxidative capacity (T-AOC) were determined. The results of growth test showed that, compared with the control, 0.1% and 0.4% dose group elevated weight gain rates, specific growth rates and decreased feed conversion rates significantly. Results of Infected test I showed that, serum lysozyme activity, hepatopancreas lysozyme levels and serum T-AOC held a trend mounted up initially but down followed, the maximal value appeared at 12 h of 0.4% dose group, 24 h of 0.2% dose group and 12 h of 0.1% dose group respectively. Hepatopancreas SOD activities were a trend of increase while serum MDA contents were a trend of decrease all groups. However the treated groups were relatively higher in serum and hepatopancreas lysozymes activities, serum T-AOC levels and hepatopancreas SOD activities, and the control was the higher in serum MDA content. Results of Infected test II showed that, The artificial infection with *V. anguillarum* caused mortality in all groups, but the mortality of the control was the highest and the mortality of 0.4% dose was the lowest. The anthraquinones extracts elevated the protective rate of *M. rosenbergii* infected with *V. anguillarum*. In conclusion, the anthraquinones extracts could help to promote growth, disease resistance and depress the susceptibility of *M. rosenbergii* effectively.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; anthraquinones extracted from *Rheum officinale*; *Vibrio anguillarum*; growth; immunity protection