

文章编号:1000-0615(2008)03-0411-06

饲料中添加肽聚糖对大黄鱼生长和非特异性免疫力的影响

张春晓^{1,2}, 麦康森¹, 艾庆辉¹, 段清源¹, 张璐¹, 李会涛¹, 万军利¹

(1. 中国海洋大学教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 集美大学水产学院, 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要:以初始体重(30.8±1.33) g 的大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)为研究对象,探讨饲料中添加肽聚糖对其生长和非特异性免疫力的影响。分别向每千克基础饲料中添加 0(对照组)、100、500 mg 肽聚糖,配制出 3 种等氮等能的实验饲料,进行为期 8 周的摄食生长实验。实验在海水浮式网箱(1.5 m×1.5 m×2.0 m)中进行,每个处理设 3 个重复,每个重复放养 40 尾。实验采取饱食投喂方式,每天投喂 2 次(05:00 和 17:30),实验期间海水水温为 27.5~30.5 °C,盐度为 29~33,溶解氧含量在 7 mg·L⁻¹以上。饲喂实验结束后测定实验鱼的生长及相关的免疫学指标,同时每网箱取 10 尾实验鱼转入室内 300 L 水族箱内进行攻毒实验。实验结果表明,饲料中添加肽聚糖显著影响大黄鱼的成活和生长。当饲料中添加 100 和 500 mg·kg⁻¹肽聚糖时,成活率(分别为 95.8%和 95.0%)显著高于对照组(88.3%)。当饲料中添加 100 和 500 mg·kg⁻¹肽聚糖时特定生长率(分别 1.44%·d⁻¹和 1.41%·d⁻¹)显著高于对照组(1.12%·d⁻¹)(*P*<0.05)。饲料中添加肽聚糖实验组大黄鱼血液白细胞吞噬活力和血清溶菌酶活力显著高于对照组(*P*<0.05),且添加肽聚糖的两实验组之间差异不显著;而血清替代补体途径活力则随着饲料中肽聚糖添加水平的增加而显著提高(*P*<0.05)。哈维氏弧菌攻毒实验结果表明,饲料中添加肽聚糖实验组的累积死亡率(分别为 25.0%和 25.7%)显著低于对照组(64.3%)(*P*<0.05)。因此,饲料中添加适宜含量的肽聚糖可显著提高大黄鱼生长率和非特异性免疫力,肽聚糖可以作为一种安全高效的口服免疫增强剂应用于大黄鱼的养殖生产。

关键词:大黄鱼;肽聚糖;特定生长率;非特异性免疫力;累积死亡率

中图分类号:S 963

文献标识码:A

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)属于鲈形目(Perciformes),石首鱼科(Sciaenidae),黄鱼属(*Larimichthys*),是我国重要的经济养殖鱼类之一。目前,大黄鱼的网箱养殖业已在我国的东南沿海得到了大规模的发展。然而,随着大黄鱼高密度、集约化养殖的迅速发展,各种疾病也随之频繁发生。当前,网箱养殖过程中防治鱼病主要使用抗生素和杀虫剂等化学药物。这些药物的使用导致了耐药菌株增加、环境污染、药物残留等一系列重大环境问题^[1-2]。因此,寻找新的防治鱼类病害

的方法就成为水产养殖业亟待解决的重要问题。免疫增强剂是通过增强养殖动物自身免疫力来预防疾病^[3],已被证明是一种高效、环保的预防疾病的新方式^[2,4],符合当今绿色环保的时代主题。因此,在水产养殖中应用免疫增强剂来预防疾病将有广阔的发展前景^[3]。

肽聚糖(peptidoglycan)来源于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的细胞壁中,是由氨基糖骨架和肽链组成的一种复合糖化物,是免疫增强剂中的重要成员^[5]。细胞壁二肽(MDP)是细菌肽聚糖的

收稿日期:2007-05-17

资助项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA505B06,2004BA526B06);国家“八六三”高技术研究发展计划(2004AA603610)

作者简介:张春晓(1979-),男,山东荣成人,讲师,博士,主要从事鱼类营养生理研究。E-mail:cxzhang@jmu.edu.cn

通讯作者:麦康森,E-mail:kmai@ouc.edu.cn

一个保守亚单位^[6],也是肽聚糖的活性部分,它存在于所有真细菌中^[7-8]。肽聚糖作为细菌细胞壁的保守结构,可以刺激动物体提高非特异性免疫力^[8]。体外实验也表明,肽聚糖是巨噬细胞和多克隆 B 细胞的一种强有力的激活剂,并且分枝杆菌的肽聚糖和细胞壁二肽(MDP)及其类似物,在体内或体外均表现出刺激 B、T 淋巴细胞,增强体液免疫和细胞免疫,激活单核细胞及多核白细胞的吞噬活性,活化补体等功能^[9]。本实验以大黄鱼为研究对象旨在探讨饲料中添加不同水平的肽聚糖对大黄鱼生长和非特异性免疫力的影响,以期为大黄鱼免疫增强剂的开发和利用提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验饲料设计

以鱼粉(50%)和豆粕(9%)为主要蛋白源,鱼油(3.0%)及豆油(2.5%)为脂肪源,小麦粉(25.6%)为糖源,搭配酵母粉(3.0%),无机盐混和物(2.0%),维生素混和物(2.0%),卵磷脂(2.5%),诱食剂(0.3%)和防霉剂(0.1%)配制出基础饲料。分别在每千克基础饲料中添加 0 mg、100 mg、500 mg 肽聚糖配制出 3 种等氮等能的实验饲料。在饲料制作过程中,各原料按配比定量后混合均匀,然后加入适量的水揉匀,经双螺杆挤条机(华南理工大学研制的 F-III(26)型)加工成 2.5 mm × 8.0 mm 的颗粒状饲料,并在 40 °C 烘干至饲料水分含量为 10% 左右。实验饲料中使用的肽聚糖(A3 α 肽聚糖,由嗜热双歧杆菌 *Bifidobacterium thermophilum* 中提取)由中国水产科学研究院黄海水产研究所提供。

1.2 实验过程

实验鱼来源与驯化 实验于浙江省宁波市象山县西沪港进行。正式实验前,大黄鱼放于海水网箱(3.0 m × 3.0 m × 3.0 m)中暂养,并以实验对照组饲料饱食投喂,使之逐渐适应实验饲料。暂养 2 周后,对实验鱼饥饿 24 h,然后称重,并挑选出体格健壮、规格一致[(30.8 ± 1.33) g]的大黄鱼进行分组实验。实验浮式海水网箱规格为 1.5 m × 1.5 m × 2.0 m,放养密度为 40 尾/箱,每种饲料随机投喂 3 组实验鱼。每天投喂 2 次(05:00 和 17:30),达饱足。投喂期 8 周。实验期间海水水温为 27.5 ~ 30.5 °C,盐度为 29 ~ 33,溶解氧

含量在 7 mg · L⁻¹ 以上。样品收集 8 周生长实验结束后,对实验鱼饥饿 24 h,以丁香油(1:10000)麻醉,然后计数,称重。分别从每网箱随机抽取 5 尾麻醉的实验鱼,以无菌注射器自尾静脉取血。每尾实验鱼所得血液均分为两份,加肝素抗凝的血液用于白细胞吞噬活力的分析,不抗凝的血液放入 4 °C 冰箱中,待其凝血后 4 °C 离心分离血清,用于血清溶菌酶活力和替代补体途径活力的测定。

攻毒实验 养殖实验结束后,分别从每网箱随机抽取 10 尾大黄鱼放于室内水族箱(58 cm × 66 cm × 78 cm)中进行攻毒实验。对每尾实验鱼腹腔注射 0.3 mL(浓度为 5.6 × 10⁷ cell · mL⁻¹)哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)进行感染,并记录攻毒后 10 d 的死亡率。攻毒所用哈维氏弧菌菌种由宁波市水产研究所提供,将菌株于 28 °C 扩大培养后,以灭菌生理盐水洗脱,计数,然后稀释到实验所需浓度。

1.3 样品分析测定方法

吞噬指数测定 参照 Martello 等^[10]和 Barracco 等^[11]方法进行测定。肝素钠抗凝的血液加入等体积的 HBSS 缓冲液(pH 7.2)稀释,并于 4 °C 下静置 1 h。向离心管中加入 3 mL 细胞分离液(51% Percoll),取 1 mL 上层稀释血(稀释血的上层为富含白细胞的血浆层),轻轻滴加于 Percoll 液面,离心 30 min(4 °C、500 × g)。然后吸取 Percoll 液面上白细胞层,以 HBSS 离心洗涤 2 次,所得白细胞再以 HBSS 稀释至 2 × 10⁷ cell · mL⁻¹。取 50 μ L 白细胞悬液滴片,放入湿盒,于 25 °C 下静置 20 min,滴加 50 μ L 浓度约为 108 cell · mL⁻¹ 的酵母细胞悬液(浓度约为白细胞浓度的 10 倍),置于 25 °C 湿盒中孵育。45 min 后取出玻片用灭菌生理盐水冲洗后自然风干,用甲醇固定 5 min,待甲醇全部挥发后用 Gimsa 染液染色 15 ~ 20 min,再用灭菌生理盐水反复冲洗,风干后置于光镜下观察,记录吞噬指数。

吞噬指数(phagocytic index, PI) = 吞噬细胞内酵母细胞总数/参与吞噬的细胞数

溶菌酶活力测定 以溶壁微球菌(*Micrococcus lysolei*, Sigma)冻干粉为底物,参照 Ellis^[12]方法进行测定。将底物按 0.2 mg · mL⁻¹溶于 0.05 mol · L⁻¹的磷酸钠盐缓冲液(pH 6.2)中混匀。取 1.9 mL 该菌悬液与 100 μ L 待测

血清于试管中迅速混匀,于 25 ℃ 在 530 nm 处分别测定其在 0.5 min 时 A_0 值和 4.5 min 时 A 值。每分钟每毫升血清吸光值下降 0.001 定义为 1 个溶菌酶活力单位。

替代补体溶血活性(ACH50)活力测定 以兔红细胞(RaRBC)为目标细胞,以 EGTA-Mg-GVB 为反应缓冲液参照 Yano 等^[13]方法进行测定。将保存在 Alsever 氏液中的兔红细胞用缓冲液 EGTA-Mg-GVB 冲洗 3 遍,并用该缓冲液将其浓度调至 2×10^8 cell·mL⁻¹。将待测血清用 EGTA-Mg-GVB 缓冲液准确稀释至适宜浓度(通过预实验确定稀释倍数为 20 倍)。取稀释血清 0.1 ~ 0.25 mL 加入离心管中,同时向各管加入 0.1 mL 兔红细胞悬液(整个操作过程在冰浴中进行)。所有操作结束后,将离心管置于 26 ℃ 水浴锅中孵育 90 min,期间不断摇动。反应结束后将离心管从水浴锅中取出,立即放入冰浴中终止反应。然后向每管加入 3.15 mL 生理盐水,100% 溶血对照管加入 3.4 mL 蒸馏水,离心 5 min (1600 × g),立即测定各管在 414 nm 的吸光值。样品溶血度由相应的吸光值除以 100% 溶血对照管的吸光值得得(Y)。将 $Y/(1-Y)$ 对应的相应血清体积 X(mL)在对数纸上作图,将产生 50% 溶血时对应的血清体积计作 K,则样品的 ACH(50)由下式计算:ACH(50) = $1/K \times$ 血清稀释倍数 $\times 1/2$ (该实验是在原方法的 50% 量上进行的,所以结果乘以 1/2)

1.4 统计分析

采用 SPSS 11.5 for Windows 对所得数据进行方差分析,若差异达显著,则进行 Tukey 多重比较,显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 饲料中添加肽聚糖对大黄鱼成活率和特定生长率的影响

饲料中添加肽聚糖对大黄鱼成活率和特定生长率有显著影响($P < 0.05$)(表 1)。经过 8 周生长实验后,饲料中添加肽聚糖组大黄鱼成活率分别为 95.8% 和 95.0% 显著高于对照组(88.3%)($P < 0.05$),并且添加 100 mg·kg⁻¹ 和 500 mg·kg⁻¹ 肽聚糖处理组大黄鱼成活率差异不显著($P > 0.05$)。实验中大黄鱼的特定生长率与成活率有相似的规律,即投喂添加肽聚糖饲料组的大

黄鱼特定生长率(1.44%·d⁻¹和 1.41%·d⁻¹)显著高于对照组(1.12%·d⁻¹)($P < 0.05$),而摄食添加肽聚糖饲料的两组大黄鱼的特定生长率无显著差异($P > 0.05$)。

表 1 饲料中添加肽聚糖对大黄鱼生长和成活率的影响

fed experimental diets for 8 weeks		means ± S.E.	
饲料组 dietary treatments	成活率(%) survival	特定生长率(%·d ⁻¹) SGR	
Diet 1 (0 mg·kg ⁻¹)	88.3 ± 0.8 ^b	1.12 ± 0.02 ^b	
Diet 2 (100 mg·kg ⁻¹)	95.8 ± 0.8 ^a	1.44 ± 0.10 ^a	
Diet 3 (500 mg·kg ⁻¹)	95.0 ± 1.4 ^a	1.41 ± 0.06 ^a	
ANOVA			
P 值 P value	0.005	0.027	
F 值 F value	14.600	6.957	

注:表中所给数据为平均数及 3 个重复的标准误,平均数后不同的上标表示差异显著($P < 0.05$)。ANOVA 表示单因素方差分析。下同

Notes: Values are means and standard errors of three replicates. Means with different superscripts have significant differences ($P < 0.05$). ANOVA: one-way analysis variance. The same as follows

2.2 饲料中添加肽聚糖对大黄鱼非特异性免疫力的影响

本实验通过血液白细胞吞噬指数、血清溶菌酶活力和替代补体途径活力 3 个指标来反映饲料中添加肽聚糖对大黄鱼非特异性免疫力的影响(表 2)。饲料中添加肽聚糖实验组大黄鱼血液白细胞吞噬指数(分别为 1.67 和 1.63)显著高于对照组(1.28)($P < 0.05$),而在两个添加水平(100 mg·kg⁻¹和 500 mg·kg⁻¹肽聚糖)之间大黄鱼血液白细胞吞噬指数无显著差异($P > 0.05$)。血清溶菌酶活力和吞噬指数有相似的规律,即添加肽聚糖的两组之间大黄鱼血清溶菌酶活力(分别为 174.58 和 171.40 units·mL⁻¹)无显著差异($P > 0.05$),但都显著高于对照组(112.71 units·mL⁻¹)($P < 0.05$)。而本实验中大黄鱼血清替代补体活力随着饲料中肽聚糖添加量的增加而显著升高(从 124.61 units·mL⁻¹到 182.12 units·mL⁻¹)。

2.3 饲料中添加肽聚糖对攻毒后大黄鱼累积死亡率的影响

哈维氏弧菌攻毒 10 d 后,对照组大黄鱼累积死亡率为 64.3%,显著高于添加 100 mg·kg⁻¹和 500 mg·kg⁻¹肽聚糖实验组(25.0 和 25.7%)($P < 0.05$)(图 1),但累积死亡率在两个添加水平之间并未出现显著差异($P > 0.05$)。

表2 饲料中添加肽聚糖对大黄鱼非特异性免疫力的影响

饲料组 dietary treatments	吞噬指数 PI	溶菌酶活力 (units·mL ⁻¹) LA	补体活力 (units·mL ⁻¹) ACH50
Diet 1 (0 mg·kg ⁻¹)	1.28 ± 0.05 ^b	112.71 ± 6.93 ^b	124.61 ± 6.56 ^c
Diet 2 (100 mg·kg ⁻¹)	1.67 ± 0.04 ^a	174.58 ± 3.92 ^a	155.05 ± 3.34 ^b
Diet 3 (500 mg·kg ⁻¹)	1.63 ± 0.05 ^a	171.40 ± 4.56 ^a	182.12 ± 7.44 ^a
ANOVA			
P 值 P value	0.002	< 0.001	0.002
F 值 F value	19.707	43.280	22.658

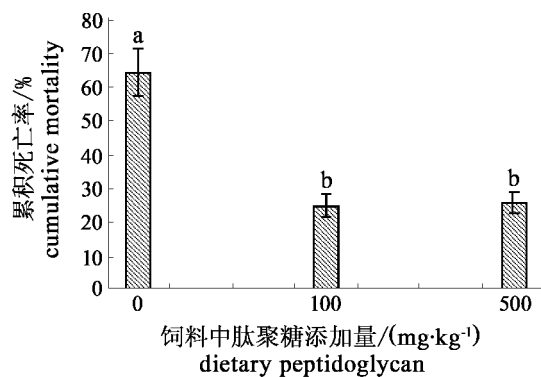


图1 饲料中添加肽聚糖对攻毒后大黄鱼累积死亡率的影响

Fig.1 Cumulative mortality of 10 days in large yellow croaker fed experimental diets for 8 weeks after challenge with *Vibrio harveyi*

柱形图表示的数据为平均数及3个重复的标准误。其上方不同的标注表示差异显著 ($P < 0.05$)

The columns and bars represent means and standard errors of three replicates. The bars with different labels have significant differences ($P < 0.05$)

3 讨论

经过8周的生长实验,饲料中添加肽聚糖提高了实验鱼的成活率和特定生长率,这与以前的研究结果相类似。Itami等^[14]以肽聚糖投喂日本对虾(*Penaeus japonicus*),经过95d的生长实验发现肽聚糖可以提高对虾的生长。Boonyaratpalin等^[15]在对斑节对虾(*Penaeus monodon*)的研究中也发现投喂肽聚糖显著地提高了对虾的生长和成活率。而关于肽聚糖促进实验动物生长的原因目前尚没有合理的解释。

吞噬细胞是鱼类非特异性免疫系统中的关键因子,在防御外来微生物感染过程中发挥重要作用,

因此吞噬作用成为衡量鱼类非特异性免疫力的重要指标。在本实验中摄食肽聚糖的大黄鱼血液白细胞的吞噬指数显著高于对照组。已有的研究表明,投喂肽聚糖可以显著提高实验黄尾■(*Seriola quinqueradiata*)^[16]、日本对虾^[14]和斑节对虾^[15]的白细胞吞噬指数。已有研究证明,哺乳动物的巨噬细胞、单核细胞和嗜中性细胞的细胞膜上存在肽聚糖的受体,因而肽聚糖可以激活这些细胞的吞噬作用^[17-18]。而有关肽聚糖增强水产动物白细胞吞噬作用的机理,也有学者进行了相关的研究。Kono和Sakai^[19]在对牙鲆的研究后推测,肽聚糖是通过刺激牙鲆产生巨噬细胞激活蛋白1- α 而激活巨噬细胞的吞噬作用,这主要是由于注射肽聚糖可以诱导牙鲆肾脏巨噬细胞激活蛋白1- α 前体基因的表达。

血清溶菌酶活力和替代补体途径活力也是评价鱼类非特异性免疫力的常用指标。在本实验中,添加肽聚糖的实验组大黄鱼血清溶菌酶活力均显著高于对照组,但在两添加水平之间无显著差异,而血清替代补体途径活力则随着饲料中肽聚糖含量的增加呈直线上升趋势。在哺乳动物中,溶菌酶由单核细胞和嗜中性细胞等类型的细胞产生^[8]。在给小鼠注射葡聚糖后发现小鼠血液中溶菌酶活力增强^[20],Di Luzio^[21]认为这是由于葡聚糖增强了单核细胞或巨噬细胞的分泌作用,或者增加了这些细胞的数目。Lunde和Robertson^[22]以葡聚糖和脂多糖刺激体外培养的大西洋鲑巨噬细胞,并诱导其产生胞外溶菌酶,由此推测激活的鱼类巨噬细胞可以产生血清溶菌酶。在本实验中,大黄鱼血清溶菌酶活力与白细胞的吞噬指数有相似的规律,这说明大黄鱼溶菌酶的产生也可能是肽聚糖激活了吞噬细胞所致。而从本实验结果可以看出,血清补体与溶菌酶活力的变化规律存在一定差异,这可能是由于不同免疫指标对肽聚糖的反映存在差异所致。这一结果与Engstad等^[23]在大西洋鲑(*Salmo salar*)上的研究结果相类似,该研究发现给大西洋鲑注射葡聚糖后其血清溶菌酶和替代补体表现出不同的活力趋势。Robertson^[8]认为这是由于溶菌酶和补体活力存在着不同的诱导机制。

攻毒实验是免疫增强剂效果最直观的反应方式。已有的研究表明,口服肽聚糖能够增强黄尾■抵抗肠球菌(*Enterococcus seriolicida*)感染的

能力^[16],也能增强虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)抵抗致病弧菌(*Vibrio anguillarum*)的能力^[24]。以肽聚糖投喂日本对虾和斑节对虾,可以提高其抗弧菌和白斑综合征病毒感染的能力^[14-15]。哈维氏弧菌是大黄鱼弧菌病的主要致病菌之一,对网箱养殖大黄鱼危害严重^[25-26],目前尚没有应对这种病原菌的特效药物,因此预防病原菌感染尤为重要。本实验攻毒结果表明,摄食肽聚糖后大黄鱼抵抗哈维氏弧菌感染的能力显著增强,这与吞噬指数、溶菌酶活力和替代补体活力等反映非特异性免疫力的指标有着相似的规律。因此可以认为大黄鱼摄食肽聚糖后通过提高机体的非特异性免疫力从而增强抵抗病原菌感染的能力。

在本实验中,饲料中添加肽聚糖能提高大黄鱼生长、非特异性免疫力和抗病力,这说明肽聚糖可以作为一种安全高效的口服免疫增强剂应用于大黄鱼的养殖。

参考文献:

- [1] Aoki T. Chemotherapy and drug resistance in fish farms in Japan [M]//Shariff M, Subasighe R P, Arthur J R, (Eds.). Diseases in Asian Aquaculture Vol. 1. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 1992: 519 - 529.
- [2] Robertsen B, Rørstad G, Engstad R, et al. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls [J]. J Fish Dis, 1990, 13: 391 - 400.
- [3] Sakai M. Current research statue of fish immunostimulant [J]. Aquaculture, 1999, 172: 63 - 92.
- [4] Fenichel R L, Chirigos M A. Immune modulation agents and their mechanisms [J]. Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- [5] 王秀华,黄 ■,宋晓玲. 免疫增强剂—肽聚糖在对虾养殖中的应用[J]. 海洋水产研究, 2004, 24(1): 69 - 74.
- [6] Madigan M T, Martinko J M, Parker J. Biology of Microorganisms, 8th ed [M]. Prentice Hall International, Inc, 1997.
- [7] Stewart-Tull D E. Immunostimulation with peptidoglycan or its synthetic derivatives [J]. Progress in Drug Research, 1988, 32: 305 - 328.
- [8] Robertsen B. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9: 269 - 290.
- [9] 闻玉梅,陆德源. 现代微生物学(第2版)[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1992: 1 - 2.
- [10] Martello L B, Friedman C S, Tjeerdema R S. Combined effects of pentachlorophenol and salinity stress on phagocytic and chemotactic function in two species of abalone[J]. Aquatic Toxicology, 2000, 49: 213 - 225.
- [11] Barracco M A, Medeiros I D, Moreira F M. Some haemato immunological parameters in the mussel *Perna perna* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9: 387 - 404.
- [12] Ellis A E. Lysozyme assays [M]//Stolen J S, Fletcher D P, Anderson BS, Roberson BS, editors. Techniques in Fish Immunology. Fair Haven, USA: SOS Publications, 1990: 101 - 103.
- [13] Yano T. Assays of hemolytic complement activity [M]//Stolen J S, Fletcher T C, Anderson D P, et al, Eds. Techniques in Fish Immunology Fair Haven, NJ: SOS Publications, 1992: 131 - 141.
- [14] Itami T, Asano M, Tokushige K, et al. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum* [J]. Aquaculture, 1998, 164: 277 - 288.
- [15] Boonyaratpalin S, Boonyaratpalin M, Supamattaya K, et al. Effects of peptidoglycan (PG) on growth, survival, immune responses, and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* [M]//Shariff M, Subasighe R P, Arthur J R, Eds. Diseases in Asian Aquaculture, vol. 11. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 1995: 469 - 477.
- [16] Itami T, Kondo M, Uozu M, et al. Enhancement of resistance against *Enterococcus seriolicida* infection in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* (Temminck and Schlegel), by oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum* [J]. J Fish Dis, 1996, 19: 185 - 187.
- [17] Wright S D, Ramos R A, Tobias P S, et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein [J]. Science, 1990, 249: 1431 - 1433.
- [18] Gupta D, Kirkland T N, Viriyakosol S. et al. CD14 is a cellactivating receptor for bacterial peptidoglycan [J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271: 23310 - 23316.
- [19] Kono T, Sakai M. The analysis of expressed genes in the kidney of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*,

- injected with the immunostimulants peptidoglycan [J]. *Fish and shellfish immunology*, 2001, 11: 357 – 366.
- [20] Kokoshis P L, Di Luzio N R. Serum lysozyme: an index of macrophage function [J]. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, 1979, 25: 85 – 99.
- [21] Di Luzio N R. Lysozyme, glucan-activated macrophages and neoplasia [J]. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, 1979, 26: 67 – 81.
- [22] Lunde H, Robertsen B. The complement component C3 is produced by hepatocytes and behaves as an acute-phase protein in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., after injection of β -glucan [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1997, 21: 150.
- [23] Engstad R E, Robertsen B, Frivold E. Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1992, 2: 287 – 297.
- [24] Matsuo K, Miyazano I. The influence of long-term administration of peptidoglycan on disease resistance and growth of juvenile rainbow trout [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1993, 59: 1377 – 1379.
- [25] 林克冰, 周 宸, 刘家富, 等. 海水养殖大黄鱼病原菌研究[J]. *海洋科学*, 1999, 4: 58 – 62.
- [26] 毛芝娟, 刘国勇, 陈昌福. 大黄鱼溃疡病致病菌的初步分离与鉴定[J]. *安徽农业大学学报*, 2002, 29(2): 178 – 181.

Effects of dietary peptidoglycan on growth and non-specific defence of *Pseudosciaena crocea*

ZHANG Chun-xiao^{1,2}, MAI Kang-sen¹, AI Qing-hui¹,
DUAN Qing-yuan¹, ZHANG Lu¹, LI Hui-tao¹, WAN Jun-li¹

(1. Key Laboratory of Mariculture, Education Ministry of China, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. The Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: A feeding experiment was conducted to examine the effects of dietary peptidoglycan on growth, non-specific immunity and disease resistance for large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. The basal diet was supplemented with 0, 100 and 500 mg·kg⁻¹ peptidoglycan, respectively, to formulate three experimental diets. Each diet was fed to triplicate groups of fish in seawater floating cages (1.5 m × 1.5 m × 2.0 m), and each cage was stocked with 40 fish (with initial weight of 30.8 ± 1.33 g). Fish were fed twice daily (05:00 and 17:30) to apparent satiation for 8 weeks. The water temperature fluctuated from 27.5 to 30.5 °C, the salinity from 34 to 35‰ and dissolved oxygen content was approximately 7 mg·L⁻¹ during the experimental period. Results showed that survival and growth were significantly ($P < 0.05$) affected by dietary peptidoglycan. Fish fed diets with 100 and 500 mg·kg⁻¹ peptidoglycan supplementation had significantly ($P < 0.05$) higher survival (95.8% and 95.0%) than the control group (88.3%). Specific growth rate (SGR) in fish fed the diets with peptidoglycan (1.44%·d⁻¹ and 1.41%·d⁻¹, respectively) was significantly ($P < 0.05$) higher compared with the control group (1.21%·d⁻¹). Phagocytic index (PI) and lysozyme activity (LA) of fish fed the diets with peptidoglycan were also higher than those of control group, and there were no significant ($P > 0.05$) differences between two peptidoglycan supplementation groups. However, alternative complement pathway activity (ACH50) significantly ($P < 0.05$) increased with increasing dietary peptidoglycan. The results of *Vibrio harveyi* challenge showed that the fish fed diets with peptidoglycan supplementation had significantly lower cumulative mortality (25.0% and 25.7%, respectively) than the control group (64.3%). The results suggested the dietary peptidoglycan significantly improved the growth, non-specific immunity and disease resistance of large yellow croaker. Therefore, peptidoglycan could become a safe and efficacious immunostimulate supplemented to the diets for large yellow croaker.

Key words: *Pseudosciaena crocea*; peptidoglycan; specific growth rate; non-specific immunity; cumulative mortality