



乳酸乳球菌 Q-9 胞外多糖对鲤先天免疫应答、 抗氧化活性和抗病性能的影响

冯军厂, 蔡忠良, 陈永艳, 常绪路, 刘慧芬, 赵燕静, 张建新*

(河南师范大学水产学院, 河南省水产动物养殖工程技术研究中心,
水产动物疾病控制河南省工程实验室, 河南 新乡 453007)

摘要: 为研究乳酸乳球菌 Q-9 胞外多糖 (exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* Q-9, EPS-9) 对鲤免疫应答、抗氧化活性以及抗嗜水气单胞菌性能的影响, 实验将提取并纯化的 EPS-9 (250、500 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与鲤头肾细胞体外共培养, 检测头肾细胞的增殖能力和吞噬活性, 以及孵育液中一氧化氮 (NO) 和细胞因子的合成量。将 300 尾健康鲤 [(47.66 \pm 0.43) g] 随机分为 5 组, 对照组 (阴性和阳性) 灌喂无菌的磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS), 处理组分别灌喂不同浓度的 EPS-9 (250、500 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 1 次/天, 连续处理 7 d 后取血液和肝胰腺组织。随后, 阳性组和处理组腹腔注射嗜水气单胞菌, 阴性组用无菌 PBS 处理, 感染 24 h 后取血液和肝胰腺组织。分别检测血清中 NO 和细胞因子的合成量, 及溶菌酶 (LZM) 和碱性磷酸酶 (AKP) 的活性; 肝胰腺组织中的抗氧化 (T-AOC、T-SOD、CAT、GSH、GSH-Px 和 MDA) 指标。体外结果显示, EPS-9 能显著增强鲤头肾细胞的增殖能力和吞噬活性, 并提高 NO、促炎细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6) 和抗炎细胞因子 (IL-10 和 TGF- β) 的合成量。体内结果显示, 与阴性对照组相比, EPS-9 灌喂处理能显著上调血清中 NO 和促炎细胞因子的合成量, LZM 和 AKP 活性, 以及肝胰腺的抗氧化水平。嗜水气单胞菌感染后, NO、促炎细胞因子的合成量及 LZM、AKP 的活性均显著低于阳性对照组。但无论感染与否, EPS-9 处理组血清中抗炎细胞因子的合成量均显著升高。研究表明, EPS-9 在体内和体外均具备提高鲤的非特异性免疫、抗氧化活性和抗病原菌感染的能力, 可作为一种安全有效的添加剂应用于水产养殖。

关键词: 鲤; 乳酸菌胞外多糖; 免疫应答; 抗氧化活性; 抗病能力

中图分类号: S 917.1

文献标志码: A

益生菌因可提高生长性能和抗氧化水平, 及增强先天免疫应答而在水产养殖中得到了广泛应用^[1]。益生菌的应用可以有效减少抗生素在水产养殖中的使用, 从而减少耐药菌的产生、宿主体内药物残留的发生率及其他副作用^[2], 因此, 对水产动物使用益生菌成为替代抗生素的非常有效的措施^[3-4]。近年来, 越来越多的研究

人员关注益生菌的次生代谢产物, 如胞外多糖 (exopolysaccharides, EPS)^[5-7]。EPS 具有独特的理化性质和生物活性而被应用于食品、医药和其他工业产品中, 这激发了人们探索和发现新的 EPS 的兴趣^[7]。

多糖是一种免疫刺激剂, 可通过多种途径增强宿主的免疫调节能力, 帮助宿主抵抗外界

收稿日期: 2020-02-03 修回日期: 2020-04-26

资助项目: 国家自然科学基金青年基金 (31902361); 河南师范大学培育基金 (2017PL19); 河南省高等学校重点科研项目 (19B240003); 河南省重点科技攻关项目 (182300410011)

通信作者: 张建新, E-mail: zjxlq@163.com

环境胁迫^[3,5]。EPS是一种高分子量的长链聚合物,主要通过微生物的代谢产生,包括蓝藻、真菌和细菌^[8]。乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)由于其合成的生物高聚物具有公认安全的特殊性质,在EPS产生菌中引起了独特的研究兴趣^[9]。过去的几十年,来源于LAB的EPS对宿主免疫和抗氧化活性的调节作用已被广泛研究^[10]。例如,来源于干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei* WXD030)菌株的胞外多糖L-EPS可通过增强RAW264.7细胞的增殖和吞噬活性以及诱导NO、TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的产生而发挥调节免疫应答的作用^[5]。罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri* Mh-001)产生的EPS通过降低RAW264.7小鼠巨噬细胞中TNF- α 的表达而显示出有益的生理效应^[10]。分离于母乳中的6株鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)产生的EPS在DPPH自由基、羟基和超氧阴离子自由基清除,还原能力的增强和金属螯合活性等实验中显示出较强的抗氧化活性^[6],体外还表现出抗肿瘤和抗菌活性^[6]。然而,来源于乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)的EPS对水产动物免疫调节、抗氧化活性和抗病作用的报道甚少。

在以往的研究中,根据筛选标准从健康鲤(*Cyprinus carpio*)肠道内容物中分离获得3株乳酸乳球菌^[11]。其中菌株Q-9对鲤具有较好的促生长和免疫调节作用^[12]。因此,假设乳酸乳球菌Q-9胞外多糖(EPS-9)同样具有免疫调节、抗氧化活性和抗病原菌感染的功能。为验证这一假设,实验通过对鲤肝胰腺和血清中主要免疫相关基因表达、酶活性和抗氧化能力的检测,系统研究EPS-9对鲤体内和体外的免疫调节和抗氧化活性,研究结果对拓展乳酸菌胞外多糖在水产养殖动物中的应用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

菌株Q-9从鲤肠道内容物中分离获得,根据生理特性和16S *rDNA*序列分析被鉴定为乳酸乳球菌^[12]。实验过程中,菌株Q-9在MRS培养基中37℃静置培养24h。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila* Ah01)在LB培养基中37℃条件下180 r/min振荡培养16h。

1.2 头肾细胞的分离与处理

将健康鲤[(47.66±0.43)g]麻醉,在无菌条件

下取出头肾并分离其单核细胞/巨噬细胞^[13],培养于RPMI-1640培养基(10%胎牛血清, GIBCO, USA; 100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素, Sigma, USA),调整细胞浓度后加入24孔细胞培养板(Corning, USA; 2×10⁶个/mL)。用不同浓度的EPS-9(0、250、500和1 000 μ g/mL)在28℃孵育细胞,24h后检测孵育液中细胞因子和NO的合成量。

1.3 头肾细胞的增殖能力和吞噬活性的检测

为探讨EPS-9对鲤头肾细胞增殖能力和吞噬活性的影响,用不同浓度的EPS-9(0、250、500和1 000 μ g/mL)处理24孔细胞培养板中的头肾细胞(2×10⁶个/mL)。分别采用MTT试剂盒(南京建成生物工程研究所)和中性红染色的方法进行检测,具体操作步骤参照前期的相关研究^[14-15]。

1.4 体内实验

实验鱼和饲养条件 实验用鱼购买于“河南省水产技术推广站水产养殖基地,中牟,河南”。进行体内实验之前,通过喂食商业饲料,将鱼驯化2周。随后,将300尾大小相近[(47.66±0.43)g]的健康鲤随机分入15个300L的养殖桶(20尾/桶)。每天投喂3次(09:00、13:00和17:00)至明显饱腹。实验过程中,每天更换30%的水,持续供氧,水温保持(26±1)℃,光周期为12h。

饲喂和攻毒处理 将15个养殖桶随机分为5组,每组3个平行,进行灌喂处理。第一组(阴性对照)和第二组(阳性对照)分别给予0.1 mL磷酸盐缓冲液(PBS);剩余3组分别给予0.1 mL不同浓度(250、500和1 000 μ g/mL)的EPS-9,每天1次,连续灌喂7d后,每桶随机抽取6尾鱼,麻醉取样。随后,将每个养殖桶中的剩余鱼(阴性对照组除外)腹腔注射100 μ L嗜水气单胞菌Ah01(LD₅₀=5×10⁶ CFU/mL)。阴性对照组注射100 μ L无菌PBS。养殖条件同上,感染24h后收集样品。

样品收集 灌喂7d和腹腔注射24h后,每桶随机抽取6尾鱼,经MS-222麻醉处理后尾静脉采集血液,离心(4℃,3 000×g,30 min)分离收集血清。随后对鱼进行解剖,分离肝胰腺。所有样品均于-80℃保存,备用。

1.5 NO的检测

参照说明书,使用总一氧化氮测定试剂盒(Beyotime,上海,中国)测定孵育液和血清中的NO水平。使用EnSpire 2300酶标仪(PE EnSpire,

USA) 在 490 nm 处测定吸光度。根据亚硝酸钠 5 倍稀释制备的标准曲线估算 NO 浓度。

1.6 抗氧化相关指数的测定

为检测 EPS-9 在鲤体内的抗氧化作用, 使用相应的试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 测定肝胰腺中总抗氧化能力 (T-AOC), 丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH)、超氧化物歧化酶 (T-SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性。详细操作参照说明书。

1.7 免疫相关指标的测定

为评估 EPS-9 的免疫调节活性, 使用本实验室制备多克隆抗体^[16]检测孵育液和血清中细胞因子的合成量, 具体的检测步骤参照前期的相关研究^[15]。此外, 根据试剂盒 (南京建城生物工程研究所) 提供的说明书, 测定血清溶菌酶 (LZM) 和碱性磷酸酶 (AKP) 的活性。

1.8 数据分析

实验中所有的数据均采用平均值±标准差的形式呈现 ($n=6$)。显著性分析采用 SPSS 25.0 软件的 One-Way ANOVA 中 Scheffe 指标, 显著性水平设为 $P<0.05$ 。

2 结果

2.1 EPS-9 对鲤头肾细胞增殖能力和吞噬活性的影响

EPS-9 对鲤头肾细胞增殖能力和吞噬活性的检测结果显示, 处理组头肾细胞的增殖能力和吞噬活性均显著高于对照组 ($P<0.05$), 并表现出先增加后降低的趋势, 尤其是在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, EPS-9 的促进作用分别是对照组的 1.65 倍和 1.41 倍 (图 1, 图 2)。表明 EPS-9 在检测的浓度范围内对鲤头肾细胞具有促进作用。

2.2 NO 含量的检测

EPS-9 体内和体外对 NO 含量影响的检测结果显示, EPS-9 孵育头肾细胞 24 h 后, 仅在最高浓度处理组孵育液中 NO 的含量显著高于对照组 ($P<0.05$, 图 3)。EPS-9 灌喂处理后, 除低浓度 (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理组外, 其他处理组血清中 NO 的含量均显著高于阴性对照组 ($P<0.05$, 表 1)。嗜水气单胞菌感染能显著增加血清中 NO 的含量 [阳性对照组, (22.32±1.18) $\mu\text{mol}/\text{L}$], 但 EPS-9 处理组能显著降低由嗜水气单胞菌引起的 NO 增加量

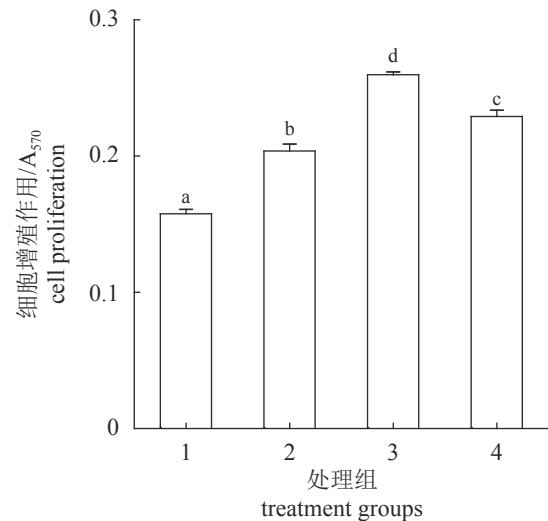


图 1 EPS-9 对鲤头肾细胞增殖能力的影响

1. 对照组, 2. 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EPS-9 处理组, 3. 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EPS-9 处理组, 4. 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EPS-9 处理组; 图中不同字母表示差异显著 ($P<0.05$); 下同

Fig. 1 Effect of EPS-9 on the proliferation of head kidney cells of *C. carpio*

1. control group, 2. 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of EPS-9 treatment group, 3. 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of EPS-9 treatment group, 4. 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of EPS-9 treatment group; different letters indicate statistical difference ($P<0.05$); the same below

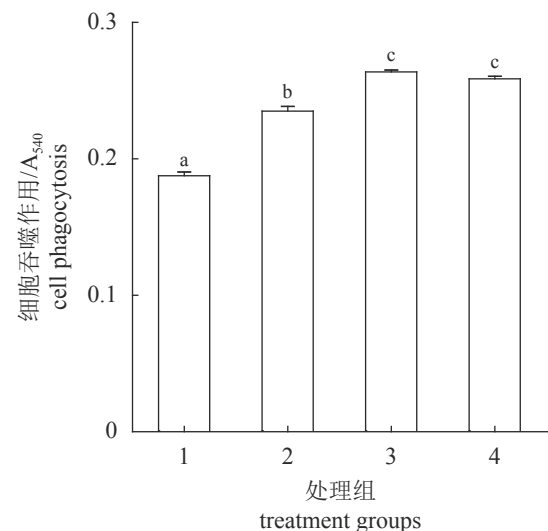


图 2 EPS-9 对鲤头肾细胞吞噬活性的影响

Fig. 2 Effect of EPS-9 on the phagocytosis of head kidney cells of *C. carpio*

($P<0.05$), 并呈浓度依赖型 (表 1)。特别在高浓度 (1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理组, NO 的生成量降低了 71.85%, 与阴性对照组相比无显著性差异 ($P>0.05$, 表 1)。

2.3 EPS-9 对抗氧化相关指标的影响

EPS-9 对抗氧化指标影响的检测结果显示,

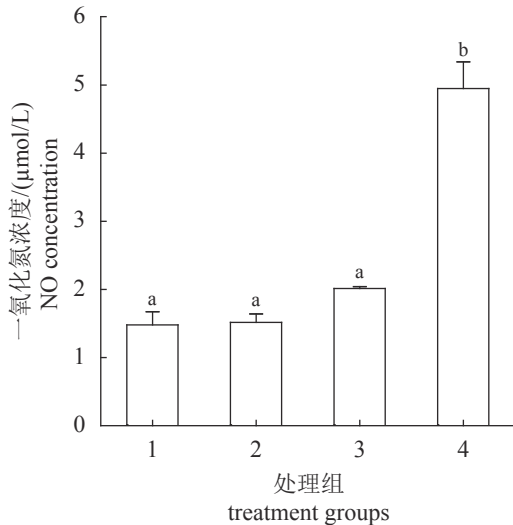


图3 EPS-9诱导鲤头肾细胞合成NO的检测
Fig. 3 Effect of EPS-9 induced nitric oxide (NO) production in head kidney cells of *C. carpio*

灌喂处理7 d后, 处理组肝胰腺中T-AOC的含量, T-SOD、GSH-Px和CAT的活性与对照组相比均呈现先增加后降低的趋势, 并且活性最高组均显著高于对照组 ($P < 0.05$, 图4-a~d)。处理组的GSH水平均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 但不同处理组之间无显著性差异 ($P > 0.05$, 图4-e)。相反, EPS-

9处理组能显著降低MDA的水平, 并呈浓度依赖型 ($P < 0.05$, 图4-f)。

2.4 EPS-9对头肾细胞细胞因子分泌的影响

通过检测头肾细胞孵育液中促炎细胞因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)和抗炎细胞因子(IL-10、TGF- β)的合成量, 评价EPS-9的体外免疫调节活性。结果显示, 不同浓度EPS-9处理组中待测细胞因子的合成量均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其中IL-6、IL-10和TGF- β 的合成呈浓度依赖型, 并且最高浓度处理组IL-6、IL-10和TGF- β 的合成量分别为对照组的1.61、1.64、1.94倍。TNF- α 和IL-1 β 的合成量呈现先增加后降低的趋势, 其最高合成量分别为对照组的1.88和1.34倍 ($P < 0.05$, 表2), EPS-9在体外具有显著的免疫调节作用。

2.5 EPS-9对血清细胞因子分泌的影响

细胞因子在免疫过程中起关键作用, 因此, 通过检测血清中细胞因子的合成变化可评估EPS-9的体内免疫调节活性。结果显示, EPS-9对这些细胞因子有着不同的调节作用(表3)。灌喂处理7 d后, EPS-9能显著增加促炎细胞因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的合成量 ($P < 0.05$), 且呈剂量依

表1 ESP-9灌胃及攻毒后鲤血清NO浓度及LZM、AKP活性的检测

Tab. 1 Effects of EPS-9 or/and *A. hydrophila* on the NO concentration, LZM and AKP activities in the serum of *C. carpio*

处理 treatments	一氧化氮/($\mu\text{mol/L}$) NO	溶菌酶/(U/mL) LZM	碱性磷酸酶/(U/mL) AKP
灌喂处理7 d gavage treatment (7 d)			
对照组 control group	4.60 \pm 0.70 ^a	73.41 \pm 3.82 ^a	1.12 \pm 0.01 ^a
250 $\mu\text{g/mL}$ EPS-9处理组 250 $\mu\text{g/mL}$ of EPS-9 treatment group	4.98 \pm 0.46 ^a	83.90 \pm 5.61 ^a	1.21 \pm 0.01 ^b
500 $\mu\text{g/mL}$ EPS-9处理组 500 $\mu\text{g/mL}$ of EPS-9 treatment group	9.27 \pm 1.47 ^b	204.49 \pm 7.34 ^c	1.49 \pm 0.05 ^c
1 000 $\mu\text{g/mL}$ EPS-9处理组 1 000 $\mu\text{g/mL}$ of EPS-9 treatment group	9.82 \pm 2.11 ^b	130.34 \pm 5.50 ^b	1.69 \pm 0.02 ^d
攻毒处理24 h challenge treatment (24 h)			
阴性对照组 negative control	4.72 \pm 0.76 ^a	72.37 \pm 3.82 ^a	1.14 \pm 0.01 ^a
阳性对照组 positive control	22.32 \pm 0.91 ^d	179.78 \pm 7.34 ^c	3.17 \pm 0.03 ^d
250 $\mu\text{g/mL}$ EPS-9+嗜水气单胞菌处理组 250 $\mu\text{g/mL}$ of EPS-9+ <i>A. hydrophila</i> treatment group	16.44 \pm 1.14 ^c	158.80 \pm 5.90 ^b	1.81 \pm 0.06 ^c
500 $\mu\text{g/mL}$ EPS-9+嗜水气单胞菌处理组 500 $\mu\text{g/mL}$ of EPS-9+ <i>A. hydrophila</i> treatment group	11.88 \pm 1.85 ^b	149.81 \pm 9.24 ^b	1.24 \pm 0.05 ^b
1 000 $\mu\text{g/mL}$ EPS-9+嗜水气单胞菌处理组 1 000 $\mu\text{g/mL}$ of EPS-9+ <i>A. hydrophila</i> treatment group	6.28 \pm 0.70 ^a	76.40 \pm 6.62 ^a	1.13 \pm 0.01 ^a

注: 灌喂处理和攻毒处理两组数据单独分析, 表中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Notes: the data of gavage treatment and challenge treatment were analyzed, respectively, different letters indicate statistical difference ($P < 0.05$), the same below

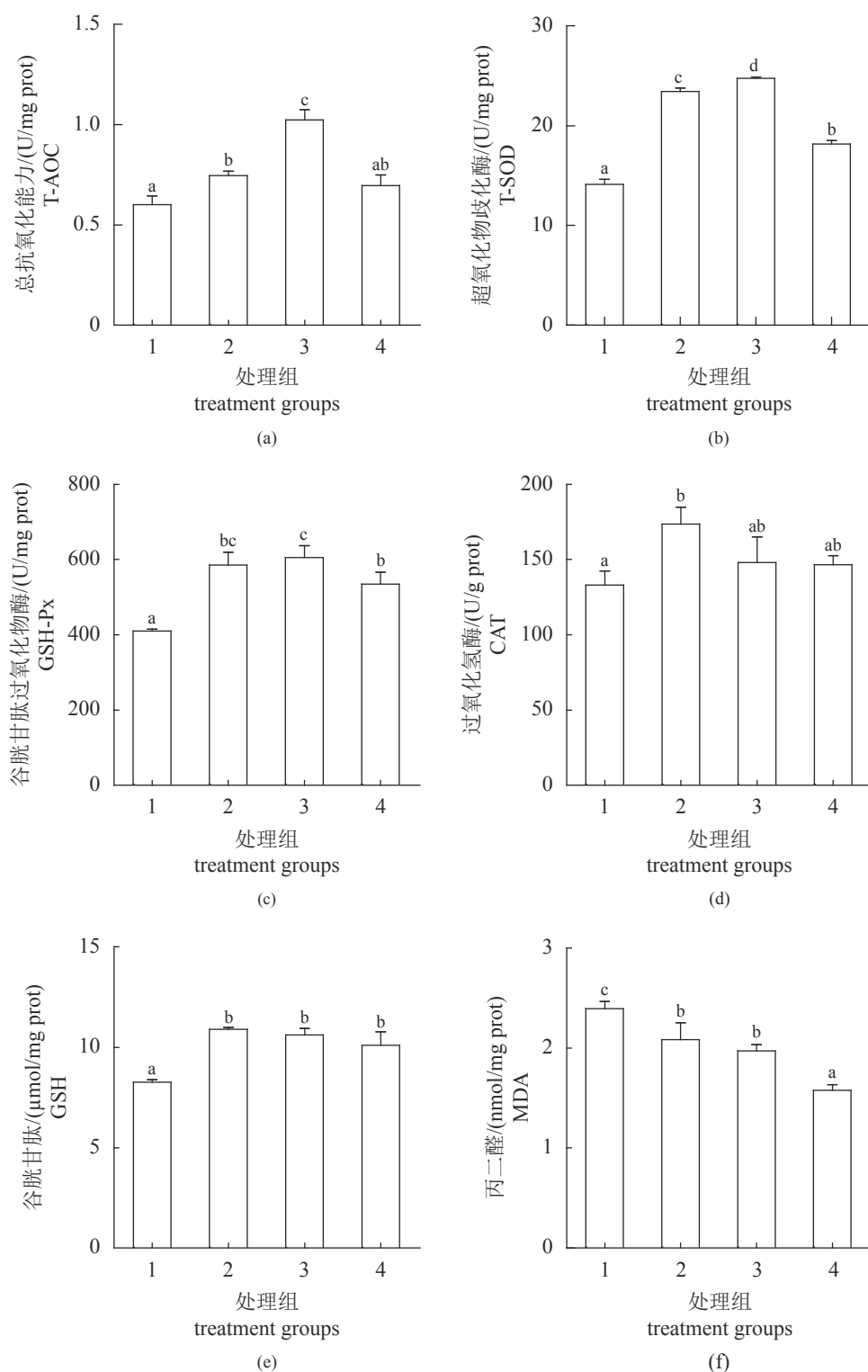


图 4 EPS-9 对鲤肝胰腺抗氧化指标的检测

Fig. 4 Effects of EPS-9 on the levels of antioxidant substances in the hepatopancreas of *C. carpio*

赖型。此外, EPS-9 能显著提高抗炎细胞因子 IL-10 和 TGF- β 的表达水平 ($P < 0.05$), 并且 TGF- β 的表达模式与促炎细胞因子相似, 而 IL-10 的合成量呈现逐渐下降的趋势。

通过检测嗜水气单胞菌感染后血清中细胞因子的合成量, 进一步探讨 EPS-9 对宿主免疫系统的调节作用 (表 3)。与阴性对照组相比, 嗜水气单胞菌感染后促炎细胞因子和抗炎细胞因子

表 2 EPS-9 对鲤头肾细胞分泌细胞因子含量的检测
 Tab. 2 Effects of EPS-9 on the secretion of cytokines in the head kidney cells of *C. carpio* pg/mL

分组 groups	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-10	TGF- β
对照组 control group	7.38 \pm 0.58 ^a	489.29 \pm 6.85 ^a	24.49 \pm 2.16 ^a	20.61 \pm 0.61 ^a	84.82 \pm 4.04 ^a
250 μ g/mL EPS-9处理组 250 μ g/mL of EPS-9 treatment group	10.39 \pm 0.85 ^b	654.49 \pm 9.31 ^c	32.29 \pm 1.69 ^b	26.60 \pm 1.39 ^b	116.76 \pm 3.87 ^b
500 μ g/mL EPS-9处理组 500 μ g/mL of EPS-9 treatment group	13.88 \pm 0.28 ^c	573.69 \pm 10.90 ^b	34.63 \pm 2.58 ^b	32.43 \pm 0.93 ^c	133.71 \pm 5.79 ^b
1 000 μ g/mL EPS-9处理组 1 000 μ g/mL of EPS-9 treatment group	10.30 \pm 0.95 ^b	569.39 \pm 23.50 ^b	39.48 \pm 2.05 ^c	33.85 \pm 0.27 ^c	164.41 \pm 5.60 ^c

表 3 ESP-9 灌胃及攻毒后血清细胞因子分泌的检测
 Tab. 3 Effects of EPS-9 or/and *A. hydrophila* on the cytokines secretion in the serum of *C. carpio* pg/mL

处理 treatments	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-10	TGF- β
灌喂处理7 d gavage treatment (7 d)					
对照组 control group	2.68 \pm 0.33 ^a	28.98 \pm 2.32 ^a	19.45 \pm 1.38 ^a	35.02 \pm 0.95 ^a	233.52 \pm 13.08 ^a
250 μ g/mL EPS-9处理组 250 μ g/mL of EPS-9 treatment group	4.65 \pm 0.34 ^b	48.86 \pm 4.02 ^b	31.46 \pm 1.51 ^b	77.73 \pm 1.22 ^c	316.33 \pm 8.65 ^b
500 μ g/mL EPS-9处理组 500 μ g/mL of EPS-9 treatment group	5.29 \pm 0.57 ^b	60.23 \pm 8.04 ^b	33.81 \pm 3.16 ^b	71.38 \pm 2.61 ^b	321.89 \pm 2.12 ^b
1 000 μ g/mL EPS-9处理组 1 000 μ g/mL of EPS-9 treatment group	11.43 \pm 0.95 ^c	80.11 \pm 4.64 ^c	39.25 \pm 1.61 ^c	66.40 \pm 3.28 ^b	365.59 \pm 5.14 ^c
攻毒处理24 h challenge treatment (24 h)					
阴性对照组 negative control	2.68 \pm 0.33 ^a	28.98 \pm 2.32 ^a	19.45 \pm 1.38 ^a	35.02 \pm 0.95 ^a	233.52 \pm 13.08 ^a
阳性对照组 positive control	12.04 \pm 0.91 ^d	85.80 \pm 4.64 ^d	41.27 \pm 1.66 ^c	59.60 \pm 1.57 ^c	531.75 \pm 4.35 ^c
250 μ g/mL EPS-9+嗜水气单胞菌处理组 250 μ g/mL of EPS-9+ <i>A. hydrophila</i> treatment group	6.54 \pm 1.21 ^c	51.39 \pm 2.36 ^c	30.33 \pm 1.94 ^b	52.34 \pm 1.25 ^b	443.58 \pm 20.46 ^b
500 μ g/mL EPS-9+嗜水气单胞菌处理组 500 μ g/mL of EPS-9+ <i>A. hydrophila</i> treatment group	4.82 \pm 0.66 ^{bc}	37.82 \pm 1.95 ^b	23.29 \pm 1.75 ^a	54.71 \pm 0.84 ^b	453.85 \pm 18.01 ^b
1 000 μ g/mL EPS-9+嗜水气单胞菌处理组 1 000 μ g/mL of EPS-9+ <i>A. hydrophila</i> treatment group	3.37 \pm 0.86 ^{ab}	31.50 \pm 1.95 ^a	22.59 \pm 1.64 ^a	73.54 \pm 1.01 ^d	525.06 \pm 7.26 ^c

的合成量显著升高 ($P < 0.05$)。然而, 与阳性对照组相比, EPS-9 处理组的促炎细胞因子合成量呈剂量依赖型降低 ($P < 0.05$)。尤其在高浓度 (1 000 μ g/mL) 处理组, TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的合成量与阴性对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。而 EPS-9 处理组仍显著增加 IL-10 和 TGF- β 的水平, 并呈剂量依赖型 ($P < 0.05$), 且高浓度 (1 000 μ g/mL) 处理组 IL-10 的合成量显著高于阳性对照组 ($P < 0.05$)。

2.6 EPS-9 对血清 LZM 和 AKP 活性的影响

灌喂处理 7 d 后, 处理组血清中 LZM 的活性与对照组相比呈现先增加后降低的趋势, 与对照组和低浓度处理组相比, 500 和 1 000 μ g/mL 处理组血清 LZM 的活性显著升高 ($P < 0.05$, 表 1)。而 AKP 活性呈现逐渐增加的趋势, 并且处理

组血清 AKP 的活性均显著高于对照组 ($P < 0.05$, 表 1)。嗜水气单胞菌感染后, 血清 LZM 和 AKP 活性显著降低 ($P < 0.05$, 表 1), 并呈浓度依赖型, 特别是高浓度处理组, LZM 和 AKP 活性与阴性对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$, 表 1)。

3 讨论

EPS 是益生菌与宿主生物相互作用的媒介^[5]。尽管益生菌在改善鱼的生长性能、饲料利用率和免疫应答以及调节肠道菌群方面的作用在过去几十年得到了广泛的研究^[17-19], 但分离于乳酸乳球菌的 EPS 对鲤作用的研究未见报道。研究表明, EPS 能显著增强宿主的非特异性免疫应答^[5, 20]。非特异性免疫反应的增加可以提高鱼类对环境胁迫的抵抗力^[21], 保护宿主免受真菌、细

菌、寄生虫和病毒等多种潜在入侵生物的侵害^[22]。因此, 本实验旨在研究 EPS-9 对鲤免疫应答、抗氧化活性和抗病性能的影响。

单核/巨噬细胞分布在所有多细胞生物体内相对保守的细胞中, 是天然免疫系统中的关键细胞^[23-24]。该类细胞的增殖能力和吞噬活性是其最重要的两个功能^[25], 它们的生存状态直接影响非特异性免疫应答功能^[26], 因此, 检测免疫细胞对多糖的反应是非常重要的。研究表明, 黄芪多糖脂质体 APSL 和乳酸菌多糖 EPS-2 能分别提高大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 和鲤头肾巨噬细胞吞噬活性^[15, 27]。本实验中, EPS-9 能显著增强鲤头肾免疫细胞的增殖能力和吞噬活性(图 1 和图 2), 并呈浓度依赖型。此外, 在乳酸杆菌胞外多糖中观察到相似的结果^[5, 28]。

研究表明, NO 能启动免疫系统, 是炎症调节的介质^[29]。它可与吞噬细胞呼吸暴发产生的超氧阴离子反应, 产生强氧化剂、过氧亚硝酸盐(ONOOH), 从而杀死或抑制病原微生物的生长, 因此, NO 是生物体抗感染免疫中的一个关键细胞防御因子^[30]。前期研究显示, 黄芪多糖 APS 及其脂质体 APSL 均能明显提高大黄鱼头肾巨噬细胞 NO 的生成^[27], 金银花多糖 HP-02 对鲤也表现出类似的作用^[14]。在本研究中, 单独使用不同浓度的 EPS-9 或嗜水气单胞菌可诱导高水平的 NO 生成(图 3, 表 1), 但是过量的 NO 会造成过度胁迫的状态, 从而给宿主带来一定的危害。而用 EPS-9 处理能够相应减少嗜水气单胞菌引起的 NO 合成量(表 1)。这些结果表明 EPS-9 可通过调节 NO 的产生来保护机体。同样, 前期的一些研究也表明益生菌和多糖在体外和体内能够调节 NO 的合成^[26, 31-32]。

机体防御系统的抗氧化能力与健康密切相关。防御系统包括酶系统和非酶系统, 如 T-AOC、T-SOD、GSH-Px 和 CAT 属于酶系统。酶系统的保护性抗氧化主要通过 3 种途径进行: ①消除自由基和活性氧以避免脂质过氧化^[33-34]; ②过氧化物的分解和过氧化物链的阻断^[35]; ③去除可催化氧化的金属离子^[36]。此外, GSH 和 MDA 也是常见的抗氧化检测指标^[37-38]。来源于乳酸菌的 EPS 发挥抗氧化的能力在体外和体内均已被广泛研究。例如, 饲料中添加黄芪多糖 APS 能显著提高大菱鲂 (*Scophthalmus maximus*) 和大黄鱼幼体中 T-AOC、T-SOD 和 GSH-Px 的活性^[39-40], 同时

降低大黄鱼血清中 MDA 的含量^[27, 40]。在 H₂O₂ 损伤的 Caco-2 细胞模型中, 植物乳杆菌 WLPL04 的 EPS 显著抑制了活性氧和 MDA 水平的增加, 并增强了 Caco-2 细胞中抗氧化相关酶 (SOD、CAT 和 GSH-Px) 的活性和基因 (SODS、GSH-Px) 的表达^[41]。此外, 增加血清和/或肝胰腺中 SOD 和 CAT 的活性, 降低 MDA 的含量是乳酸菌来源的 EPS 抗氧化作用的重要证据^[42-43]。本研究中观察到 EPS-9 具有类似的抗氧化能力, 它能显著增强肝胰腺中 T-SOD、CAT 和 GSH-Px 的活性, 增加 T-AOC、GSH 的浓度, 及降低 MDA 的含量(图 4)。结果表明, EPS-9 对鲤具有较好的抗氧化作用。

众所周知, 硬骨鱼类依赖非特异性免疫过程增强其免疫应答和抗病原体感染的的能力^[44], 因此, 非特异性免疫是硬骨鱼类防御的一道重要免疫屏障^[45-46]。细胞因子在此过程中起着关键作用, 一旦被诱导, 就会触发免疫系统的应答, 有助于增强免疫反应。因此, 细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 和 TGF- β 的检测常被用来评估机体的免疫反应^[47-48]。在本研究中, 经 EPS-9 处理的鲤在体外(表 2)和体内(表 3)均能显著诱导促炎细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6) 和抗炎细胞因子 (IL-10、TGF- β) 的表达, 表明 EPS-9 可诱导鲤非特异性免疫反应, 进而促进对入侵病原体的免疫应答。与本研究相似的结果表明, 黄芪多糖 APS 及其脂质体 APSL 能通过上调大黄鱼头肾细胞及大菱鲂宿主促炎细胞因子的表达而发挥免疫调节作用^[27, 39]。来源于干酪乳杆菌 *L. casei* WXD030 菌株的 L-EPS 能显著诱导 RAW264.7 细胞合成 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6^[5]。长双歧杆菌 *Bifidobacterium longum* W11 产生的胞外多糖能增加外周血单核细胞 (PBMCs) 中 IL-6 和 IL-10 的合成^[49]。而一旦先天免疫系统被激活, 激活状态就会被控制在一个相对健康、恒定的水平(内稳态)^[50]。本研究还发现 EPS-9 可以通过下调嗜水气单胞菌感染鲤的促炎细胞因子水平和上调其抗炎细胞因子水平来维持相对稳定的免疫应答(表 3), 这对嗜水气单胞菌感染鲤后仍维持一定的存活率有积极的影响^[12]。

LZM 是一种碱性酶, 能水解存在于细菌细胞壁肽聚糖中 N-乙酰氨基葡萄糖酸和 N-乙酰氨基葡萄糖胺残基之间的化学键, 将不溶性黏多糖分解为可溶性糖肽, 并导致细胞壁碎片的释

放和细菌的溶解^[51]。AKP 是一种典型的水解酶, 参与入侵毒素和污染物解毒的消除, 作为溶酶体酶的一部分, 在甲壳动物的免疫系统中起着积极的作用^[52]。因此, LZM 和 AKP 是缺乏适应性免疫系统宿主抵御病原体和氧化应激的关键组分^[53], 它们是反映胁迫或疾病状况的重要先天免疫参数^[54-55]。在本研究中, 用 EPS-9 处理的鲤血清中 LZM 和 AKP 活性显著升高(表 1)。类似的, 日粮中添加海藻硫酸多糖 SPG 和黄芪多糖 APS 能分别显著提高虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 和大菱鲂体内 LZM 活性^[39, 56]。日粮中的黄芪多糖 APS 还能显著提高大黄鱼幼体 AKP 活性^[40]。在食用酵母多糖的海参中, LZM 和 AKP 活性也有所提高^[57]。此外, EPS-9 处理降低了由嗜水气单胞菌引起的 LZM 和 AKP 的活性, 其调节模式与本实验 NO 相似。

总之, EPS-9 在细胞和宿主水平上具有较好的免疫调节作用。它不仅能提高免疫细胞的增殖能力和吞噬活性, 而且能诱导细胞释放细胞因子和 NO, 提高鲤体内抗氧化物质的含量和 LZM、AKP 活性。此外, 在病原菌感染过程中, EPS-9 对嗜水气单胞菌也有抵抗作用。以上结果表明, EPS-9 可作为一种安全有效的免疫增强剂应用于水产养殖中。

参考文献 (References):

- [1] Wang A R, Ran C, Wang Y B, *et al.* Use of probiotics in aquaculture of China: a review of the past decade[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 734-755.
- [2] Vieco-Saiz N, Belguesmia Y, Raspoet R, *et al.* Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 57.
- [3] Vaseeharan B, Thaya R. Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture[J]. *Aquaculture International*, 2014, 22(3): 1079-1091.
- [4] Akhter N, Wu B, Memon A M, *et al.* Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 733-741.
- [5] Xiu L, Zhang H C, Hu Z P, *et al.* Immunostimulatory activity of exopolysaccharides from probiotic *Lactobacillus casei* WXD030 strain as a novel adjuvant *in vitro* and *in vivo*[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2018, 29(1): 1086-1105.
- [6] Rajoka M S R, Jin M L, Zhao H B, *et al.* Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk[J]. *LWT*, 2018, 89: 638-647.
- [7] Rani R P, Anandharaj M, Ravindran A D. Characterization of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus gasseri* FR4 and demonstration of its *in vitro* biological properties[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 109: 772-783.
- [8] Schmid J, Sieber V, Rehm B. Bacterial exopolysaccharides: Biosynthesis pathways and engineering strategies[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 496.
- [9] Ahmed Z, Wang Y P, Anjum N, *et al.* Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirano-faciens* ZW3 isolated from Tibet kefir-Part II[J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 30(1): 343-350.
- [10] Chen Y C, Wu Y J, Hu C Y. Monosaccharide composition influence and immunomodulatory effects of probiotic exopolysaccharides[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 133: 575-582.
- [11] Ganguly N K, Bhattacharya S K, Sesikeran B, *et al.* ICMR-DBT guidelines for evaluation of probiotics in food[J]. *Indian Journal of Medical Research*, 2011, 134(1): 22-25.
- [12] Feng J C, Chang X L, Zhang Y R, *et al.* Effects of *Lactococcus lactis* from *Cyprinus carpio* L. as probiotics on growth performance, innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 73-81.
- [13] Jiang J, Zhao W Y, Xiong Q X, *et al.* Immune responses of channel catfish following the stimulation of three recombinant flagellins of *Yersinia ruckeri* *in vitro* and *in vivo*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 73: 61-71.
- [14] Feng J C, Chang X L, Zhang Y R, *et al.* Characterization of a polysaccharide HP-02 from Honeysuckle flowers and its immunoregulatory and anti-*Aeromonas hydrophila* effects in *Cyprinus carpio* L.[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 140: 447-483.
- [15] Feng J C, Cai Z L, Chen Y Y, *et al.* Effects of an exopolysaccharide from *Lactococcus lactis* Z-2 on innate immunity of channel catfish (*Cyprinus carpio* L.)[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 126: 105-115.

- immune response, antioxidant activity, and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in *Cyprinus carpio* L.[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 324-333.
- [16] 冯军厂, 常绪路, 朱振祥, 等. 鲤细胞因子多克隆抗体的制备及检测[J]. *水产学报*, 2018, 42(10): 1615-1625. Feng J C, Chang X L, Zhu Z X, *et al.* Preparation and detection of cytokines polyclonal antibodies of *Cyprinus carpio*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(10): 1615-1625(in Chinese).
- [17] Giri S S, Yun S, Jun J W, *et al.* Therapeutic effect of intestinal autochthonous *Lactobacillus reuteri* P16 against waterborne lead toxicity in *Cyprinus carpio*[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1824.
- [18] Hoseinifar S H, Hossein M, Paknejad H, *et al.* Enhanced mucosal immune responses, immune related genes and growth performance in common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles fed dietary *Pediococcus acidilactici* MA18/5M and raffinose[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 94: 59-65.
- [19] Dawood M A O, Koshio S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: a review[J]. *Aquaculture*, 2016, 454: 243-251.
- [20] Ren Y L, Zheng G Q, You L J, *et al.* Structural characterization and macrophage immunomodulatory activity of a polysaccharide isolated from *Gracilaria lemaneiformis*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 33: 286-296.
- [21] Chen Y L, Chen L Q, Qin J G, *et al.* Growth and immune response of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) fed diets containing different lipid sources[J]. *Aquaculture Research*, 2016, 47(6): 1984-1995.
- [22] Momeni-moghaddam P, Keyvanshokoo S, Ziaei-nejad S, *et al.* Effects of mannan oligosaccharide supplementation on growth, some immune responses and gut lactic acid bacteria of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings[J]. *Veterinary Research Forum*, 2015, 6(3): 239-244.
- [23] Kohchi C, Inagawa H, Hino M, *et al.* Utilization of macrophages in anticancer therapy: the macrophage network theory[J]. *Anticancer Research*, 2004, 24(5C): 3311-3320.
- [24] Martins V M R, Simões J, Ferreira I, *et al.* *In vitro* macrophage nitric oxide production by *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk. inflorescence polysaccharides[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 157: 176-184.
- [25] Gordon S. Phagocytosis: an immunobiologic process[J]. *Immunity*, 2016, 44(3): 463-475.
- [26] Shu Y, Liu X B, Ma X H, *et al.* Immune response mechanism of mouse monocytes/macrophages treated with κ -carrageenan polysaccharide[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2017, 53: 191-198.
- [27] Zhang W N, Zhang M X, Cheng A Y, *et al.* Immunomodulatory and antioxidant effects of Astragalus polysaccharide liposome in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 100: 126-136.
- [28] Liu C F, Tseng K C, Chiang S S, *et al.* Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91(12): 2284-2291.
- [29] Gao S X, Liu C H, Qu S F, *et al.* Non-cell *Corynebacterium parvum* generated by nanotechnology: a promising immunomodulator with less side effects[J]. *International Immunopharmacology*, 2007, 7(10): 1334-1342.
- [30] Villamil L, Figueras A, Aranguren R, *et al.* Non-specific immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), experimentally infected with a pathogenic *Vibrio Pelagius*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2003, 26(6): 321-329.
- [31] Gao X L, Zhang M, Li X, *et al.* The effects of feeding *Lactobacillus pentosus* on growth, immunity, and disease resistance in *Haliotis discus hannai* Ino[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 78: 42-51.
- [32] Birhanu B T, Lee J S, Lee S J, *et al.* Immunomodulation of *Lactobacillus pentosus* PL11 against *Edwardsiella tarda* infection in the head kidney cells of the Japanese eel (*Anguilla japonica*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 54: 466-472.
- [33] Zhang L, Fan J F, He J Y, *et al.* Regulation of ROS-NF- κ B axis by tuna backbone derived peptide ameliorates inflammation in necrotizing enterocolitis[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(8): 14330-14338.
- [34] Kim E, Han S Y, Hwang K, *et al.* Antioxidant and cytoprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-(3'-O-methyl) gallate[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(16): 3993.
- [35] Mukai K, Teramoto A, Qiu X C, *et al.* Gene structure and cDNA sequence of 2-Cys peroxiredoxin in the harmful algal bloom species *Chattonella marina* and its gene transcription under different light intensities[J].

- European Journal of Phycology, 2018, 53(1): 29-38.
- [36] Olivera S, Hu C, Nagananda G S, *et al.* Multipurpose composite for heavy metal sorption, antimicrobial, and antioxidant applications[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2019, 16(4): 2017-2030.
- [37] Chen S J, Yu Y Y, Gao Y J, *et al.* Exposure to acute ammonia stress influences survival, immune response and antioxidant status of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) pretreated with diverse levels of inositol[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 89: 248-256.
- [38] Zafar N, Khan M A. Growth, feed utilization, mineralization and antioxidant response of stinging catfish *Heteropneustes fossilis* fed diets with different levels of manganese[J]. *Aquaculture*, 2019, 509: 120-128.
- [39] Sun Y K, Wang X, Zhou H H, *et al.* Dietary Astragalus polysaccharides ameliorates the growth performance, antioxidant capacity and immune responses in turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 99: 603-608.
- [40] Liu Y T, Miao Y Q, Xu N, *et al.* Effects of dietary *Astragalus* polysaccharides (APS) on survival, growth performance, activities of digestive enzyme, antioxidant responses and intestinal development of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) larvae[J]. *Aquaculture*, 2020, 517: 734752.
- [41] Liu Z Q, Dong L Y, Jia K Y, *et al.* Sulfonation of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 exopolysaccharide amplifies its antioxidant activities *in vitro* and in a Caco-2 cell model[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(7): 5922-5932.
- [42] Guo Y X, Pan D D, Li H, *et al.* Antioxidant and immunomodulatory activity of selenium exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(1): 84-89.
- [43] Pan D D, Mei X M. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 80(3): 908-914.
- [44] Sowmya R, Sachindra N M. Enhancement of non-specific immune responses in common carp, *Cyprinus carpio*, by dietary carotenoids obtained from shrimp exoskeleton[J]. *Aquaculture Research*, 2015, 46(7): 1562-1572.
- [45] Li C, Ren Y C, Jiang S H, *et al.* Effects of dietary supplementation of four strains of lactic acid bacteria on growth, immune-related response and genes expression of the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 74: 69-75.
- [46] Sun Y, He M W, Cao Z J, *et al.* Effects of dietary administration of *Lactococcus lactis* HNL12 on growth, innate immune response, and disease resistance of humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 82: 296-303.
- [47] Habijanic J, Berovic M, Boh B, *et al.* Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* and the effects of its polysaccharides on the production of human cytokines TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 and IL-17[J]. *New Biotechnology*, 2015, 32(1): 85-95.
- [48] Hu Z Y, Wu B Q, Meng F H, *et al.* Impact of molecular hydrogen treatments on the innate immune activity and survival of zebrafish (*Danio rerio*) challenged with *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 554-560.
- [49] Inturri R, Mangano K, Santagati M, *et al.* Immunomodulatory effects of *Bifidobacterium longum* W11 produced exopolysaccharide on cytokine production[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2017, 18(11): 883-889.
- [50] Gordon S, Martinez F O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions[J]. *Immunity*, 2010, 32(5): 593-604.
- [51] Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(2): 137-151.
- [52] Zhao L L, Yang X Z, Cheng Y X, *et al.* Effects of histamine on survival and immune parameters of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2014, 31(3): 827-834.
- [53] Callewaert L, Michiels C W. Lysozymes in the animal kingdom[J]. *Journal of Biosciences*, 2010, 35(1): 127-160.
- [54] Abdel-Tawwab M, Abbass F E. Turmeric powder, *Curcuma longa* L., in common carp, *Cyprinus carpio* L., diets: growth performance, innate immunity, and challenge against pathogenic *Aeromonas hydrophila* infection[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2017, 48(2): 303-312.
- [55] Hoseinifar H S, Zou H K, Paknejad H, *et al.* Non-specific immune responses and intestinal immunity of common carp (*Cyprinus carpio*) fed jujube (*Ziziphus jujube*)
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- fruit extract[J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(9): 2995-3003.
- [56] Safavi S V, Kenari A A, Tabarsa M, *et al.* Effect of sulfated polysaccharides extracted from marine macroalgae (*Ulva intestinalis* and *Gracilariopsis persica*) on growth performance, fatty acid profile, and immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2019, 31(6): 4021-4035.
- [57] Yang G, Tian X L, Dong S L, *et al.* Effects of dietary rhubarb, *Bacillus cereus*, yeast polysaccharide, and florfenicol supplementation on growth, intestinal morphology, and immune responses of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)[J]. *Aquaculture International*, 2016, 24(2): 675-690.

Effects of an exopolysaccharide from *Lactococcus lactis* Q-9 on innate immune response, antioxidant activity, and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in *Cyprinus carpio*

FENG Junchang, CAI Zhongliang, CHEN Yongyan, CHANG Xulu,
LIU Huifen, ZHAO Yanjing, ZHANG Jianxin*

(College of Fisheries, Engineering Technology Research Center of Henan Province for Aquatic Animal Cultivation,
Engineering Lab of Henan Province for Aquatic Animal Disease Control, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: To investigate the effects of the oral administration of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* Q-9 (EPS-9) on the immunoregulatory properties, antioxidant activities and resistance against *Aeromonas hydrophila* in *Cyprinus carpio*, the purified EPS-9 (250, 500 and 1 000 µg/mL) were co-cultured with the head kidney cells of *C. carpio*. The proliferation and phagocytosis activities of the head kidney cells, and the concentration of nitric oxide (NO) and cytokines in the culture medium were determined. Next, 300 *C. carpio* [(47.66±0.43) g] were randomly divided into five groups; the two control groups (negative and positive) were administered sterile PBS and the three treatment groups were administered different concentrations of EPS-9 (250, 500 and 1 000 µg/mL) for seven days. Subsequently, the positive and treatment groups were infected with *A. hydrophila*, and the negative group was treated with sterile PBS for 24 h. The concentration of NO, cytokines, lysozyme (LZM) and alkaline phosphatase (AKP) in serum, the antioxidative indexes (T-AOC, T-SOD, CAT, GSH, GSH-Px, MDA) in the hepatopancreas of the *C. carpio* were tested. We observed that EPS-9 could significantly enhance the proliferation and phagocytosis activities, besides inducing the production of NO, pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β, IL-6) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF-β) *in vitro*. The *in vivo* experimental results revealed that EPS-9 significantly enhanced NO production, protein levels of pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β, IL-6), LZM and AKP activities in the serum, and the antioxidant level in the hepatopancreas compared to that observed in the negative group prior to *A. hydrophila* infection. NO, pro-inflammatory cytokines, LZM and AKP activities were significantly lower than that in the positive group after infection. However, whether infected or not, the expression of anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF-β) increased significantly in the EPS-9-treated groups. Therefore, the results suggested that EPS-9 could enhance the non-specific immunity, antioxidant activities and anti-*A. hydrophila* activity of *C. carpio* *in vitro* and *in vivo*, and could be used as a safe and effective feed additive in aquaculture.

Key words: *Cyprinus carpio*; *Lactobacillus* exopolysaccharide; immune response; antioxidant activity; disease resistance

Corresponding author: ZHANG Jianxin. E-mail: zjxlq@163.com

Funding projects: Youth Program of National Natural Science Foundation of China (31902361); Cultivation Fund Project of Henan Normal University (2017PL19); Key Research Projects of Henan Higher Education Institutions (19B240003); Key Technology Research Project of Henan Province (182300410011)