



鱼腥草对无乳链球菌引起吉富罗非鱼肝脏损伤的修复作用

祝璟琳¹, 季桓涛², 肖 炜¹, 李大宇¹, 邹芝英¹,
杨 弘^{1*}, 李庆勇³, 朱德兴³

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,

农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;

2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

3. 广东省惠州市渔业研究推广中心, 广东 惠州 516002)

摘要: 为探讨池塘种植鱼腥草对无乳链球菌引起吉富罗非鱼肝脏损伤的修复作用, 在养殖池塘中分别种植 0%(对照组)、5%、10% 和 15% 池塘面积的鱼腥草, 养殖 90 d 后进行无乳链球菌人工感染, 分别在感染后 0、24、48 和 72 h 采集吉富罗非鱼肝脏, 进行肝脏生化、抗氧化性能、组织病理和热休克蛋白 70 基因 (*HSP 70*) 表达研究。结果显示, 感染后 48 和 72 h 对照组肝脏谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 活性最高, 种植鱼腥草各组吉富罗非鱼肝脏 ALT 活性在感染前后均无显著性变化, 感染后 72 h, 10% 组吉富罗非鱼肝脏 AST 活性已恢复到感染前水平。抗氧化指标显示, 种植鱼腥草能减缓链球菌感染引起吉富罗非鱼肝脏总抗氧化能力 (T-AOC) 下降, 显著提高肝脏中超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT) 和一氧化氮合酶 (NOS) 等抗氧化酶的活性, 增加自由基清除能力, 减少脂质过氧化丙二醛 (MDA) 的产生。组织病理学观察显示, 对照组吉富罗非鱼感染后 48 h 肝窦明显淤血, 肝索排列紊乱, 肝细胞脂肪变性, 而各种种植鱼腥草组吉富罗非鱼在感染后仅表现为肝细胞明显嗜酸, 肝窦轻度扩张。定量 PCR 结果显示, 每组吉富罗非鱼肝脏 *HSP 70* 表达量在感染后都显著升高, 感染后各时间点对照组吉富罗非鱼肝脏的 *HSP 70* 表达量均显著高于鱼腥草种植组。研究表明, 种植鱼腥草能显著改善链球菌感染所造成的吉富罗非鱼肝脏 AST 和 ALT 上升, 提高抗氧化应激能力, 减轻链球菌感染引起的病理损伤; 吉富罗非鱼通过肝脏 *HSP 70* 高表达促进受损蛋白质的早期修复与降解, 种植鱼腥草具有抗炎作用和提高鱼体抵御病原菌的能力。

关键词: 吉富罗非鱼; 鱼腥草; 无乳链球菌; 组织病理; 热休克蛋白 70

中图分类号: S 942

文献标志码: A

我国是罗非鱼 (*Oreochromis spp.*) 产量和出口量最大的国家, 随着养殖集约化程度的提高, 鱼类受到缺氧、高温等环境应激的影响, 可导致鱼体免疫应答受到抑制并易于感染病原菌。有研究表明, 池塘水环境因子的波动引起的应

激和链球菌病的暴发密切相关^[1]。因此, 改善池塘养殖环境显得尤为重要。目前, 罗非鱼养殖户通过水面种植空心菜、药用植物等, 池塘中混养凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 和鳊 (*Aristichthys nobilis*)

收稿日期: 2019-05-07 修回日期: 2019-07-09

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-46); 中国水产科学研究院院级基本科研业务费专项 (2020TD37); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2017JBFZ03); 水产原良种保种选育和亲本更新 (2130135)

通信作者: 杨弘, E-mail: yanghong@ffrc.cn

等方式,提高水体自净能力,减少高浓度氨氮、亚硝酸盐和病原菌胁迫,减少鱼体发病率和死亡率^[2]。其中药用植物在水产养殖中具有替代抗生素和免疫预防剂的潜力,它们可以整株或部分(叶或根)以提取物化合物、饲料添加剂等形式,单独或与益生菌及其他免疫刺激剂混合使用^[3]。鱼腥草(*Houttuynia cordata*)为三白草科(Saururaceae)蕺菜属(*Houttuynia* Thunb.)植物,含有生物碱、黄酮类、精油和多糖等免疫活性物质,具有抗病毒、抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗氧化等多种药理活性^[4-5]。史丽娜等^[6]研究表明,鱼腥草浮床可较好地促进罗非鱼池塘水体的自净能力,提高罗非鱼非特异免疫能力和成活率。郑尧等^[7]发现,养殖池塘水面种植鱼腥草能显著增强养殖吉富罗非鱼(GIFT *O. niloticus*)胆汁中IgM、TRF、TNF- α 和EGF等免疫因子的活性,并降低吉富罗非鱼感染链球菌的几率。

肝脏是鱼体内重要的代谢器官,参与体内的消化、代谢、排泄、解毒及免疫等功能,对鱼体生长和健康至关重要。鱼体内的抗氧化防御系统包含酶促和非酶促两个体系,酶促体系包括超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶,保护细胞和细胞膜免受氧化损伤^[8]。氧化应激会引起宿主炎症反应,造成组织损伤和疾病,组织切片技术是观察鱼体组织病理变化的重要方法^[9]。研究发现,热休克蛋白70(HSP70)作为一种非特异性的细胞内源性保护蛋白,在防止应激引起的细胞损害,恢复受损的细胞等方面发挥重要作用^[10]。前期研究已表明,养殖池塘种植鱼腥草可显著降低罗非鱼人工感染无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)后的死亡率,推荐鱼腥草的最佳种植比例为10%^[11],但其机制尚不完全清楚。本实验研究了池塘种植鱼腥草对吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏生化、抗氧化性能、组织病理和HSP70表达的影响,以期阐明池塘种植鱼腥草对无乳链球菌引起吉富罗非鱼肝脏损伤的修复效果。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验鱼为吉富罗非鱼,在广东惠州渔业研究推广中心基地的3个池塘中设置面积为50 m²(5 m×10 m)隔水网箱12个,网箱材质为不透水

帆布,每个网箱中水深约为1.6 m,内设1个增氧机。在网箱中聚氯乙烯制成的浮床(2 m×2 m)上种植鱼腥草,株高约20 cm,间距为20 cm,每3个网箱设为一组,鱼腥草种植面积分别为0、2.5、5和7.5 m²,即设置为隔离网箱面积的0%(对照组)、5%、10%和15%。每个网箱每天投喂1次,投饲量为鱼体质量的3%,养殖90 d后吉富罗非鱼体质量为(297±63) g。

1.2 人工感染实验

无乳链球菌编号为WC1535,由珠江水产研究所惠赠,通过前期实验确定半致死浓度为 5.8×10^7 CFU/mL,按照已有方法^[1]配置浓度为 2.2×10^8 CFU/mL菌悬液,菌悬液浓度通过OD₆₀₀值推算而来。每尾吉富罗非鱼腹腔注射无乳链球菌悬液0.3 mL,每一个种植面积设3个重复,每桶鱼20尾,实验期间溶解氧保持在5 mg/L,不投喂。感染实验期间水温(30±1) °C,天气晴朗。

1.3 感染鱼的采样和处理

腹腔注射无乳链球菌后,于感染后0、24、48和72 h随机取6尾吉富罗非鱼,MS-222(200 mg/L)深度麻醉后迅速取肝脏并分成2份,1份放入液氮中,用于抗氧化指标测定;1份用RNAlater固定,用于HSP70定量表达检测。另取感染前(0 h)和感染后48 h从每组处理中取出的2尾吉富罗非鱼的肝脏用波恩氏液固定,用于组织病理观察。

1.4 肝脏抗氧化指标检测

肝脏匀浆液离心吸取上清液后待测,蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝法:准确称取组织重量,按质量(M , g):体积(V , mL)=1:9的比例加入生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,2 500 r/min,离心10 min,将上清液用生理盐水稀释后测定相关指标。谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)和一氧化氮合酶(NOS),均采用南京建成生物工程研究所有限公司生产的试剂盒测定,具体操作步骤参考试剂盒说明书。

1.5 组织病理学观察

按照已有方法^[1]从固定液中取出固定好的肝脏组织,用70%乙醇洗涤至无色,随后组织

依次在 70%、80%、90%、95% 和 100% (2 次) 的乙醇中进行梯度脱水; 然后在 100% 乙醇: 二甲苯 (1:1, $V:V$) 透明 30 min, 二甲苯溶液中再次透明 2 次; 石蜡包埋; 连续石蜡切片, 厚度为 4~7 μm ; 展片和烘片后, 将切片放入二甲苯及梯度乙醇中脱蜡和水化; 苏木精—伊红 (H.E) 染色后将切片放入梯度酒精中脱水和透明; 中性树胶封片后 80i 显微镜 (尼康) 观察并拍照保存。

1.6 总 RNA 的抽提及 cDNA 的合成

将冻存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中的肝脏样品取出, 放入 Scieintz-48 型高通量组织研磨机 (宁波新芝生物科技股份有限公司) 中研磨匀浆。按照 TRIzol 试剂使用说明书提取总 RNA。提取的 RNA 经 Nanodrop 超微量紫外分光光度计 (Thermo 公司) 测定 RNA 的浓度及 A_{260}/A_{280} , 并用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。按照 PrimeScriptTM RT 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司) 说明书合成 cDNA。

1.7 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 分析

目标基因和内参基因引物序列见表 1。在 7900HT Fast Real Time PCR 仪 (ABI 公司) 上进行 qRT-PCR 检测。反应体系 (20 μL): 10 μL 2 \times SYBR Green I real-time PCR Master Mix (Toyobo 公司), 2 μL cDNA 模板, 0.6 μL 的引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 40 个循环; 用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析计算 HSP 70 mRNA 的相对表达量。

表 1 引物列表

Tab. 1 Sequences of primers

基因 genes	引物序列 primers sequence	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ annealing temperature
HSP 70	F: 5'-CATCGCCTACGGTCTGGACAA-3'	59
	R: 5'-TGCCGTCTTCAATGGTCAGGAT-3'	
β -actin	F: 5'-CCACACAGTGCCCATCTACGA-3'	59
	R: 5'-CCACGCTCTGTCAGGATCTTCA-3'	

1.8 数据分析

所有数据用 Excel 2016 软件初步处理后, 用 SPSS 19 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 当差异显著时 ($P<0.05$), 则进行 Duncan's 多重比较, 用 Graph Pad Prism 5 软件作图。肝脏抗氧化数据以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 定量数据以平均值 \pm 标准误 (mean \pm SE) 表示。

2 结果

2.1 池塘种植鱼腥草对吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏 ALT 和 AST 的影响

感染前吉富罗非鱼肝脏 ALT 活性各组之间无显著性差异, 感染后 48 h 对照组肝脏 ALT 活性显著高于 5% 组和 15% 组 ($P<0.05$); 对照组吉富罗非鱼肝脏 ALT 活性在感染后 48 h 显著升高 ($P<0.05$), 5%、10% 和 15% 组中吉富罗非鱼肝脏 ALT 活性在感染前后无显著变化 (图 1-a)。

感染前 10% 组的吉富罗非鱼肝脏 AST 活性显著高于 5% 和 15% 组 ($P<0.05$), 但感染后 48 h 各组之间无显著性差异, 感染后 72 h 对照组吉富罗非鱼肝脏 AST 活性则为最高; 对照组吉富罗非鱼肝脏 AST 活性在感染后 24 h 显著升高 ($P<0.05$), 感染后 72 h 达到峰值, 5% 和 15% 组的吉富罗非鱼肝脏 AST 活性在感染后 24 h 显著升高 ($P<0.05$), 10% 组的吉富罗非鱼肝脏 AST 活性在感染后 48 h 才显著升高 ($P<0.05$), 在感染后 72 h 即恢复至感染前水平 (图 1-b)。

2.2 池塘种植鱼腥草对吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏 T-AOC 和 SOD 的影响

感染前各组之间吉富罗非鱼肝脏 T-AOC 无显著性差异 ($P>0.05$), 感染后 72 h 10% 组的肝脏 T-AOC 显著低于 5% 和 15% 组 ($P<0.05$); 对照组肝脏 T-AOC 在感染后 48 h 显著降低 ($P<0.05$), 此时各种植鱼腥草组的肝脏 T-AOC 没有显著性变化, 5% 组的肝脏 T-AOC 在感染后 72 h 显著升高 ($P<0.05$) (图 2-a)。

感染前吉富罗非鱼肝脏 SOD 活性随鱼腥草种植面积的增加而显著降低 ($P<0.05$), 但感染后各组之间的 SOD 活性无显著差异; 15% 组吉富罗非鱼肝脏 SOD 活性在感染后 48 h 显著升高 ($P<0.05$), 其余 3 组吉富罗非鱼肝脏 SOD 活性在感染后没有显著变化 (图 2-b)。

2.3 池塘种植鱼腥草对吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏 GSH-Px 和 CAT 的影响

对照组和 5% 组吉富罗非鱼肝脏 GSH-Px 活性感染前和感染 48 h 后显著高于 10% 和 15% 组 ($P<0.05$), 但感染后 24 和 72 h 各鱼腥草种植组吉富罗非鱼肝脏 GSH-Px 活力无显著差异; 对照组吉富罗非鱼肝脏 GSH-Px 活性在感染前后没有显著性变化, 5% 组的吉富罗非鱼 GSH-Px 活性在

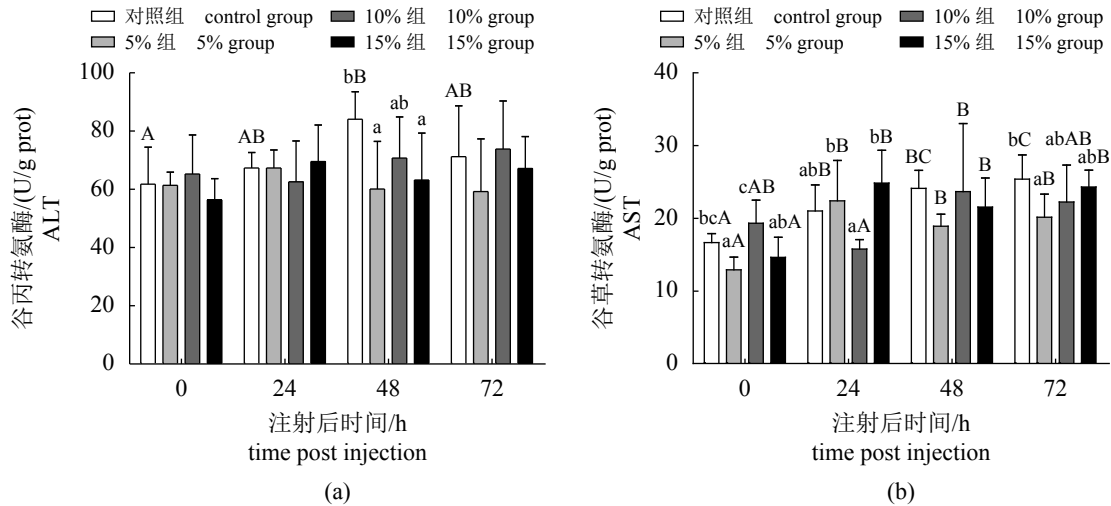


图 1 各鱼腥草组吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏 ALT(a) 和 AST(b) 的变化

图中不同大写字母表示同一鱼腥草种植面积下，吉富罗非鱼在感染后不同时间点差异显著 ($P<0.05$)；不同小写字母表示不同鱼腥草种植面积下，吉富罗非鱼在感染后相同时间点差异显著 ($P<0.05$)；下同

Fig. 1 Change of different groups of *H. cordata* on hepatic ALT (a) activity and AST (b) activity of GIFT *O. niloticus* strain infected by *S. agalactiae*

Different capital letters indicate significant differences ($P<0.05$) among different time points in the same area of pond-planted *H. cordata* in Duncan's test; different small letters indicate significant differences ($P<0.05$) in the different area of pond-planted *H. cordata* at the same time point in Duncan's test; the same below

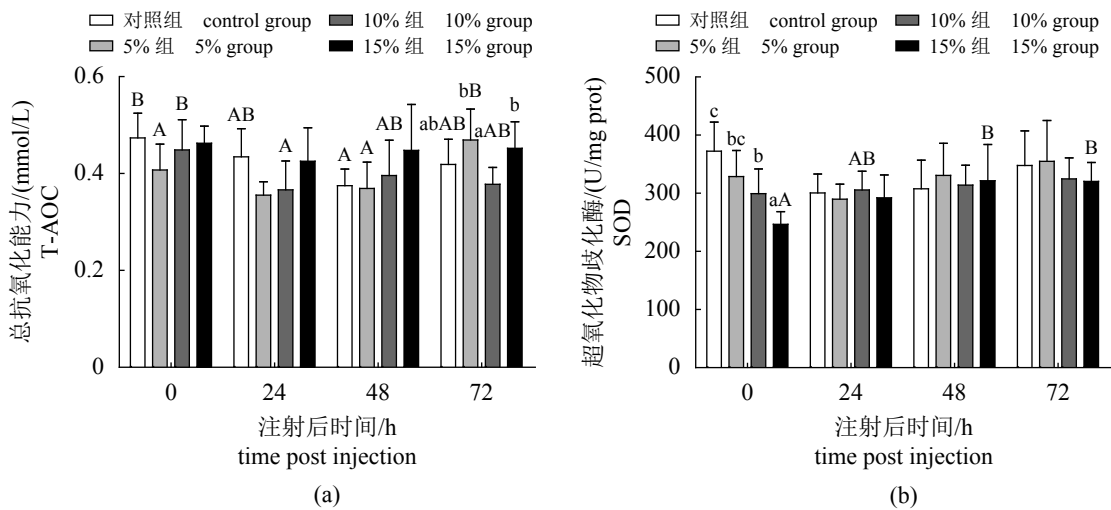


图 2 各鱼腥草组吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏 T-AOC (a) 和 SOD (b) 的变化

Fig. 2 Effect of pond-planted *H. cordata* on hepatic T-AOC activity (a) and SOD activity (b) of *O. niloticus* GIFT strain infected by *S. agalactiae*

感染后 72 h 显著升高 ($P<0.05$)，10% 组的吉富罗非鱼 GSH-Px 活性在感染后 24 h 显著升高 ($P<0.05$)，而后降低再升高，15% 组的吉富罗非鱼 GSH-Px 活性在感染后 48 h 显著升高 ($P<0.05$) (图 3-a)。

感染前吉富罗非鱼肝脏 CAT 活性随鱼腥草种植面积的增加而显著降低 ($P<0.05$)，感染后 48 h 对照组吉富罗非鱼肝脏 CAT 活性显著高于 15%

组 ($P<0.05$)，对照组、5% 和 10% 组吉富罗非鱼肝脏 CAT 活性在感染后 48 h 显著升高 ($P<0.05$)，15% 组在感染后 24 h 显著升高 ($P<0.05$)，对照组和 5% 组在感染后 72 h 恢复至感染前水平，10% 和 15% 组 CAT 活性在感染后 72 h 依然显著高于感染前水平 ($P<0.05$) (图 3-b)。

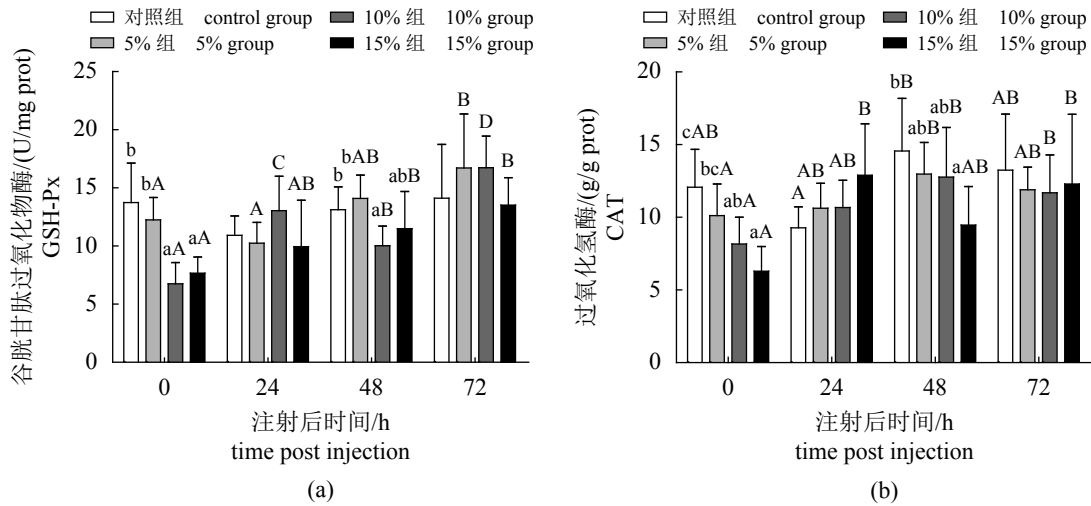


图 3 各鱼腥草组吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏 GSH-Px (a) 和 CAT (b) 的变化

Fig. 3 Effect of pond-planted *H. cordata* on hepatic GSH-Px activity (a) and CAT activity (b) of GIFT *O. niloticus* strain infected by *S. agalactiae*

2.4 池塘种植鱼腥草对吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏 MDA 和 NOS 的影响

感染前各组吉富罗非鱼之间肝脏 MDA 含量无显著性差异 (P<0.05), 感染后 48 h 15% 组吉富罗非鱼肝脏 MDA 含量显著低于其余 3 组, 感染后 72 h 各组吉富罗非鱼 MDA 含量均显著高于感染前 (P<0.05), 鱼腥草种植组吉富罗非鱼肝脏 MDA 含量显著低于对照组 (P<0.05)(图 4-a)。

感染前各组之间肝脏 NOS 活性无显著性差异 (P>0.05), 5% 组肝脏 NOS 活性在感染后 72 h 显著高于感染后 24 h (P<0.05), 10% 组的肝脏 NOS

活性在感染后 48 h 显著升高 (P<0.05), 对照组和 15% 组的肝脏在感染前后的 NOS 活性则无显著变化 (图 4-b)。

2.5 池塘种植鱼腥草对吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏组织病理的影响

每组吉富罗非鱼感染前 (0 h) 肝脏组织结构均正常, 肝小叶、中央静脉及胆管结构完整, 肝板层次清晰, 肝窦未见明显淤血, 无扩张。肝细胞结构完整, 胞界清晰, 排列整齐而紧密, 呈索状排列, 细胞核清楚可见。对照组 (0% 组) 感染后 48 h 肝窦明显淤血, 肝索排列紊乱, 肝细

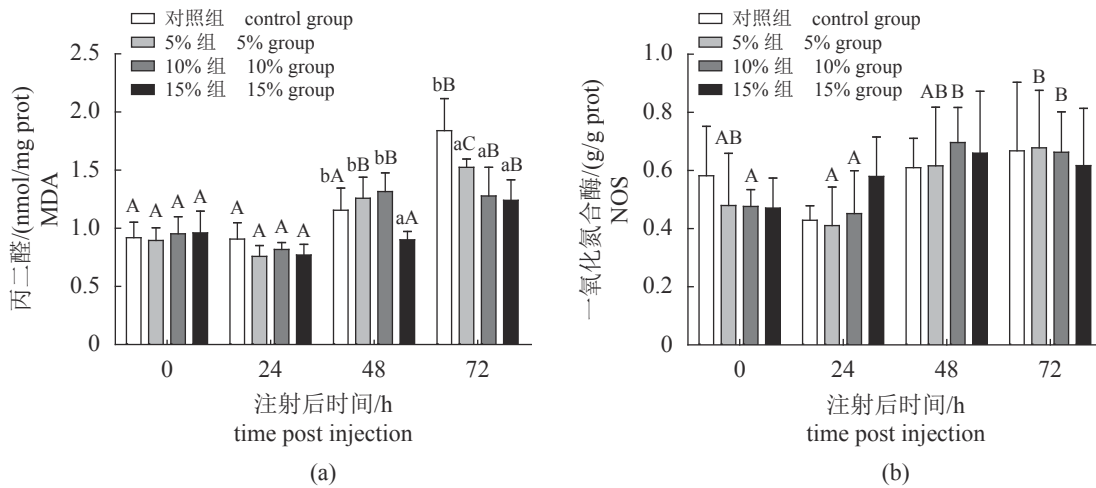


图 4 各鱼腥草组吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏 MDA (a) 和 NOS (b) 的变化

Fig. 4 Effect of pond-planted *H. cordata* on hepatic MDA level (a) and NOS activity (b) of GIFT *O. niloticus* strain infected by *S. agalactiae*

胞脂肪变性, 种植鱼腥草组(5%、10%和15%组)的吉富罗非鱼在感染后48 h肝细胞胞浆明显嗜酸性, 肝窦轻微扩张(图版)。鱼腥草对吉富罗非鱼肝脏病理性损伤有明显的改善作用。

2.6 池塘种植鱼腥草对吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏 HSP 70 表达的影响

感染前各组之间吉富罗非鱼肝脏 HSP 70 mRNA 表达量无显著性差异 ($P>0.05$), 感染后各时间点对照组的 HSP 70 表达量均显著高于鱼腥草种植组 ($P<0.05$)。对照组吉富罗非鱼肝脏 HSP 70 mRNA 表达量在感染后 24 h 显著升高 ($P<0.05$), 之后维持逐渐增高的趋势, 5%组、10%和15%组吉富罗非鱼肝脏 HSP 70 表达量分别在感染后 48、72 和 24 h 显著升高 ($P<0.05$); 感染后 72 h 10%组显著高于 5%组和 15%组 ($P<0.05$), 15%组肝脏 HSP 70 表达量恢复到感染前水平(图 5)。

3 讨论

3.1 池塘种植鱼腥草对吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏损伤的影响

肝脏是鱼体内氨基酸代谢的主要场所, ALT 和 AST 是反映肝脏损伤的重要指示酶^[12]。Chen 等^[13]研究表明吉富罗非鱼感染创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 和海豚链球菌 (*S. iniae*) 后肝脏病理受损, 严重程度和 ALT、AST 呈正相关。在本研究中, 感染前各组之间吉富罗非鱼肝脏 ALT 活性无显著性差异, 对照组感染后 48 和 72 h 肝脏 ALT 和 AST 活性最高, 说明对照组吉富罗非鱼在无乳链球菌感染下引起了肝脏损伤, 而种植鱼腥草各组 ALT 活性在感染前后均无显著性变化, 10%组吉富罗非鱼感染后 72 h AST 活性已恢复到感染前水平, 说明种植鱼腥草能显著改善链球菌感染所造成的肝脏 AST、ALT 上升, 对肝损伤有一定的修复作用, 10%组效果最佳。Chen 等^[14]研究同样发现, 鱼腥草水煮液能显著改善由乙酰氨基酚所造成的肝脏 AST 和 ALT 活性上升, 保护肝脏抗拒对乙酰氨基酚诱发小鼠的急性肝损伤。

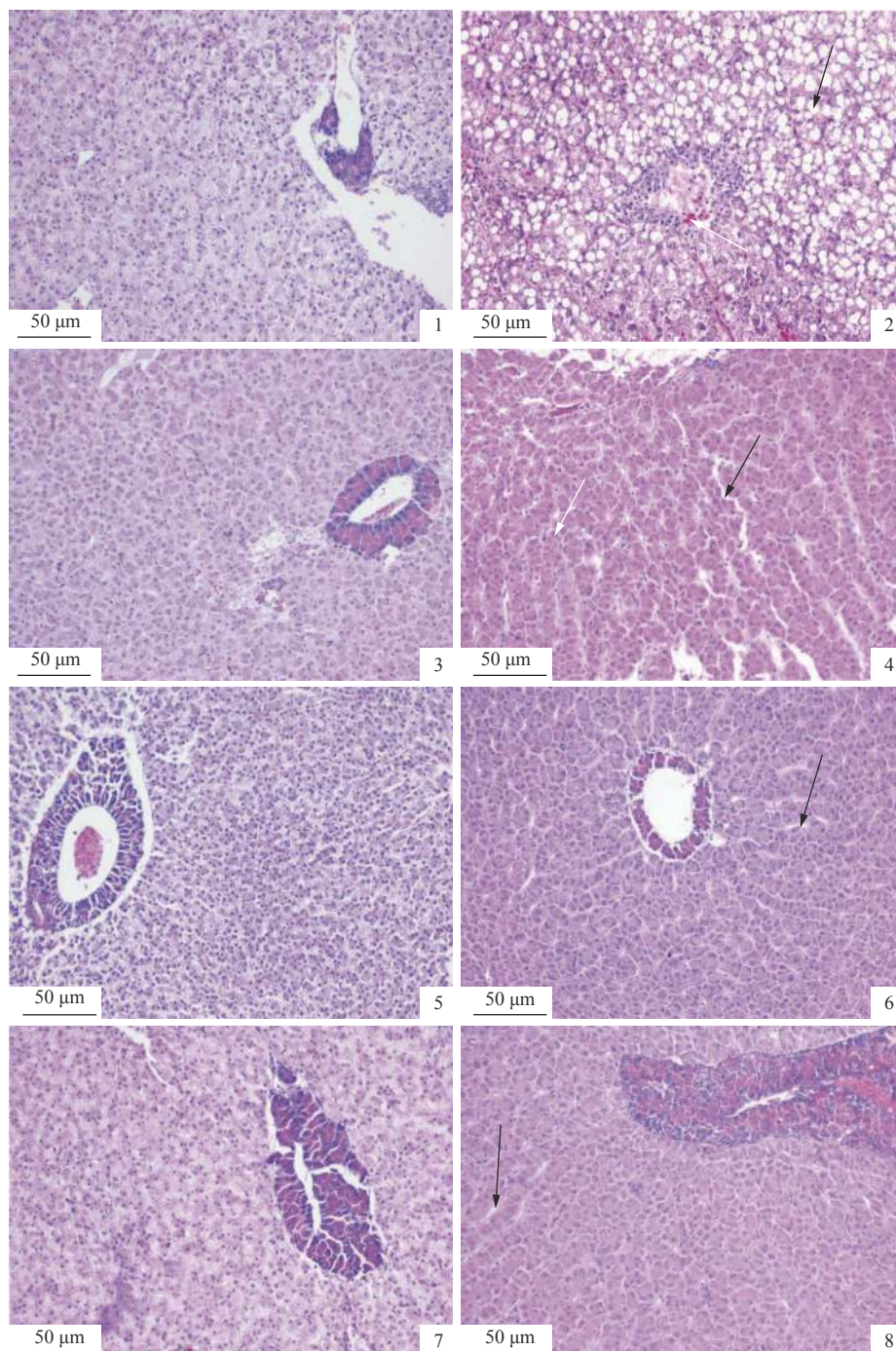
3.2 池塘种植鱼腥草对吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏抗氧化性能的影响

机体抗氧化能力强弱的防御系统与健康密切相关, 抗氧化能力包括酶和非酶抗氧化活性。

抗氧化酶是免疫系统的一部分, 包括 T-AOC、SOD、GSH-Px、CAT 和 MDA 等, 它们构成了生物体对自由基的第一道酶防御机制^[8]。T-AOC 是机体对抗氧自由基的主要体系, 是机体内抗氧化能力的综合体现^[12]。感染前各组之间吉富罗非鱼 T-AOC 没有显著性差异, 对照组吉富罗非鱼感染后 48 h 肝脏 T-AOC 显著降低, 说明无乳链球菌感染会导致 T-AOC 水平显著降低。T-AOC 水平的下降是病理状态的重要体现, 是机体活性氧水平增加的重要表征^[15]。而此时各鱼腥草组的吉富罗非鱼肝脏 T-AOC 无显著性变化, 说明种植鱼腥草减缓了吉富罗非鱼感染链球菌后肝脏 T-AOC 的下降。

各种抗氧化酶的协同作用对于自由基的有效解毒至关重要, SOD 与超氧阴离子作用, 产生 H_2O_2 和 O_2 , 而 GSH-Px 和 CAT 可以快速地将 H_2O_2 分解成 H_2O 和 O_2 , 使自由基维持在较低水平, 减少脂质超氧化物损伤^[16]。当鱼体感染致病菌后, 其肝脏抗氧化体系中的相关酶通常表现为基因的上调或活性增加, 从而保护肝脏免受氧化应激损伤^[17]。本研究中 15%组的吉富罗非鱼肝脏 SOD 活性在感染后 48 h 显著升高。这与鱼腥草显著提高军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) SOD 活性的结果一致^[18]。对照组吉富罗非鱼肝脏 GSH-Px 活性在感染前后无显著变化, 种植鱼腥草可提高肝脏抗氧化能力, 表现为 5%、10%和 15%组吉富罗非鱼肝脏 GSH-Px 活性分别在感染后 72、24 和 48 h 显著上升, 10%和 15%组吉富罗非鱼肝脏 CAT 活性感染后 72 h 显著升高。在以往的研究中也观察到类似的结果, Elabd 等^[19]研究表明, 甘草 (*Glycyrrhiza glabra*) 和黄芪 (*Astragalus membranaceus*) 显著提高了黄鲈 (*Perca flavescens*) 的 SOD、GSH-Px、CAT 和溶菌酶活性。这可能归因于这些药用植物的活性成分, 鱼腥草的抗氧化活性可能是因为存在几种多酚和挥发油^[4-5]。

MDA 是脂质过氧化过程的终产物, 其含量的升高是脂质过氧化反应增强、脂质过氧化物增多的表现, 可以直接用来评价机体的氧化损伤程度^[20]。本研究中感染后 72 h 各组吉富罗非鱼 MDA 含量都显著性高于感染前, 说明链球菌感染造成了鱼体氧化损伤; 但鱼腥草种植组吉富罗非鱼肝脏 MDA 含量显著低于对照组, 说明种植鱼腥草具有抗脂质过氧化活性。鱼腥草的



图版 各鱼腥草组对吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏组织病理变化的影响

1. 0% 组肝脏对照; 2. 0% 组肝脏感染后 48 h 肝窦明显淤血 (白色箭头), 肝索排列紊乱, 肝细胞脂肪变性 (黑色箭头); 3. 5% 组肝脏对照; 4. 5% 组肝脏感染后 48 h 肝细胞胞浆明显嗜酸 (白色箭头), 肝窦轻度扩张 (黑色箭头); 5. 10% 组肝脏对照; 6. 10% 组肝脏感染后 48 h 肝细胞胞浆嗜酸, 肝窦轻度扩张 (黑色箭头); 7. 15% 组肝脏对照; 8. 15% 组肝脏感染后 48 h 肝细胞胞浆轻微嗜酸, 肝窦轻度扩张 (黑色箭头)

Plate Effect of pond-planted *H. cordata* on histopathological change in liver of GIFT *O. niloticus* strain infected by *S. agalactiae*

1. the liver control in 0% group; 2. hepatic sinusoid congested obviously (white arrow), hepatic cord arranged irregularly, hepatocyte macrovesicular steatosis at 48 hour post injection(hpi) in 0% group; 3. the liver control in 5% group; 4. the hepatocyte cytoplasm is markedly eosinophilic (white arrow) and the hepatic sinus is slightly dilated (black arrow) at 48 hpi in 5% group; 5. the liver control in 10% group; 6. the hepatocyte cytoplasm is eosinophilic and the hepatic sinus is slightly dilated (black arrow) at 48 hpi in 10% group; 7. the liver control in 15% group; 8. the hepatocyte cytoplasm is slightly eosinophilic and the hepatic sinus is slightly dilated (black arrow) at 48 hpi in 15% group

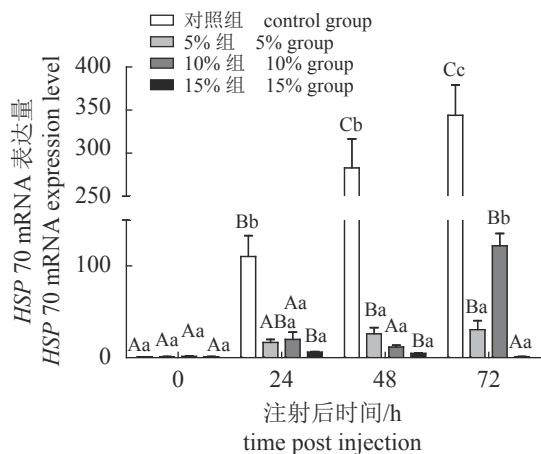


图5 池塘种植鱼腥草对感染无乳链球菌后吉富罗非鱼肝脏 *HSP 70* mRNA 表达量的影响

Fig. 5 Effect of pond-planted *H. cordata* on liver *HSP 70* mRNA expression level of GIFT *O. niloticus* infected by *S. agalactiae*

水浸提取液也具有类似功能, Chen 等^[14]发现鱼腥草水煮液能减缓抗氧化活性 (GSH、GSH-Px、SOD 和 CAT) 的下降, 抑制肝脏脂质过氧化 MDA 的产生。NOS 活性及 NO 的产生是动物体内氧化代谢的一项重要指标, NOS 可以通过催化 L-精氨酸与 O₂ 生成 NO, NO 除了作为第二信使分子外, 还有杀菌的作用^[21-22]。感染前各组之间吉富罗非鱼肝脏 NOS 活性没有显著差异, 10% 组的吉富罗非鱼肝脏 NOS 活性在感染后 48 h 显著升高。Yao 等^[22]在对凡纳滨对虾的研究中也得到类似的结果, 认为 NOS 可能在对虾对病原感染的防御中起重要作用。

3.3 池塘种植鱼腥草对吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏组织病理的影响

肝脏是鱼类重要的代谢器官, 观察其组织结构是研究肝脏功能和病理变化的重要手段^[9, 23]。本研究中对对照组吉富罗非鱼感染后 48 h 肝脏表现出明显的病理损伤, 和不同品种罗非鱼自然或人工感染无乳链球菌后的肝脏病理学变化一致^[24-25], Zamri-Saad 等^[25]报道自然感染无乳链球菌的红罗非鱼其肝脏显示血管充血, 内皮肿胀和血栓形成。祝璟琳等^[26]研究表明, 自然感染无乳链球菌后的尼罗罗非鱼出现肝脏充血、细胞索紊乱、肝细胞肿胀、严重空泡变性和炎性细胞浸润等症状。吉富罗非鱼和奥尼罗非鱼 [*O. niloticus*(♀) × *O. aureus*(♂)] 人工感染无乳链球菌后肝索排列紊乱, 肝细胞水肿变性, 而奥利亚罗非鱼和埃及尼罗罗非鱼肝脏中大面积肝细胞脂肪变性, 引

起肝功能障碍^[24]。各种植鱼腥草组吉富罗非鱼在感染后仅表现为肝细胞嗜酸, 肝窦轻度扩张, 未见明确炎症反应及组织坏死, 也未见不同鱼腥草种植面积对于肝组织结构及细胞形态有明显影响, 说明池塘种植鱼腥草能显著减轻链球菌感染引起的病理损伤。

3.4 池塘种植鱼腥草对吉富罗非鱼感染无乳链球菌后肝脏 *HSP 70* 表达的影响

HSP 70 主要作为分子伴侣参与蛋白质代谢、细胞凋亡等生命活动, 具有高度保守的序列, 在一定的胁迫范围内 *HSP 70* 被诱导能够大量表达, 形成保护性机制^[27]。强俊等^[28]研究发现, 吉富罗非鱼和新吉富罗非鱼感染海豚链球菌 24 h 后肝脏 *HSP 70* 表达量较高, 48 h 时开始下降。本研究中各组吉富罗非鱼肝脏 *HSP 70* 分别在感染后 24、48 和 72 h 后显著升高, 但只有对照组在感染后维持逐渐增高的趋势。*HSP 70* 的高表达也在感染嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[29], 花鳗鲡 (*Anguilla marmorata*)^[30] 和鲤 (*Cyprinus carpio*)^[31] 中被报道。*HSP 70* 的升高有助于促进变性蛋白的重新折叠, 并靶向降解受损蛋白, 有利于保护或促进受损蛋白质的早期修复^[32]。

此外, 细菌刺激后诱导产生大量的 *HSP 70* 还可能参与了鱼类的免疫反应, *HSP 70* 具有免疫调控作用, 兼有促炎和抑炎特性^[27, 32-33]。鱼腥草可以降低炎症的促炎和抗炎细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-4、IL-6 和 IL-8) 和自由基的水平^[4]。TNF- α 和 IL-1 β 等促炎性细胞因子协同控制细胞内病原体复制来抵御感染, 但过度的持续炎症在清除病原的同时, 也对机体造成严重的损伤^[34-35]。本研究中感染后各时间点对照组的 *HSP 70* 表达量均显著高于鱼腥草种植组; 感染后 72 h 10% 组显著高于 5% 组和 15% 组。Zhang 等^[36]研究表明, 草鱼 *HSP 70* 通过快速调节促炎性细胞因子表达, 增强鱼体抵抗病原细菌的免疫力; 通过对抑炎因子 IL-10 持续的调控来保护机体。已证明鱼腥草在体内和体外均具有影响炎症和氧化应激相关调控机制的能力, 其主要抑制 NF- κ B/MAPK 途径, 降低炎性细胞因子和趋化因子水平, 具有抗炎作用和提高鱼体抵御病原菌的能力^[4-5]。

4 结论

本研究表明, 种植鱼腥草能显著改善因链

球菌感染所造成的吉富罗非鱼肝脏 AST、ALT 上升, 保护罗非鱼肝脏抗拒急性肝损伤; 具有提高吉富罗非鱼抗氧化应激能力, 减缓链球菌感染引起 T-AOC 下降, 显著增加肝脏中 SOD、GSH-Px、CAT 和 NOS 等抗氧化酶的活性, 增加自由基清除能力, 减少脂质过氧化 MDA 的产生, 对无乳链球菌诱导的急性氧化应激损伤具有保护作用; 种植鱼腥草能显著减轻链球菌感染引起的病理损伤; 吉富罗非鱼通过肝脏 HSP 70 高表达参与受损多肽的重新折叠, 促进受损蛋白的降解与清除, 鱼腥草具有抗炎作用和提高鱼体抵御病原菌的能力。

参考文献:

- [1] 祝璟琳, 李大宇, 邹芝英, 等. 高温应激下无乳链球菌感染对尼罗罗非鱼血清生化指标和组织病理的影响[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 445-456.
Zhu J L, Li D Y, Zou Z Y, et al. The impact of high temperature stress on serum biochemical parameters and histopathology of *Oreochromis niloticus* infected by *Streptococcus agalactiae*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(3): 445-456(in Chinese).
- [2] 杨弘. 罗非鱼高效养殖模式攻略 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
Yang H. Strategy for efficient culture of tilapia [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015 (in Chinese).
- [3] Van Hai N. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review[J]. *Aquaculture*, 2015, 446: 88-96.
- [4] Shingnaisui K, Dey T, Manna P, et al. Therapeutic potentials of *Houttuynia cordata* Thunb. against inflammation and oxidative stress: a review[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 220: 35-43.
- [5] Fu J G, Dai L, Lin Z, et al. *Houttuynia cordata* Thunb: a review of phytochemistry and pharmacology and quality control[J]. *Chinese Medicine*, 2013, 4(3): 101-123.
- [6] 史丽娜, 可小丽, 刘志刚, 等. 鱼腥草浮床对养殖水质及罗非鱼非特异免疫力的影响[J]. 生态科学, 2015, 34(4): 105-113, 130.
Shi L N, Ke X L, Liu Z G, et al. Effect of *Houttuynia cordata* floating-bed on water quality and non-specific immunity of GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Ecological Science*, 2015, 34(4): 105-113, 130(in Chinese).
- [7] 郑尧, 胡庚东, 裘丽萍, 等. 浮床栽培鱼腥草对吉富罗非鱼血清免疫因子的影响[J]. *生态与农村环境学报*, 2017, 33(10): 950-954.
Zheng Y, Hu G D, Qiu L P, et al. Effects of cultivation of *Houttuynia cordata* on floating beds on serum immune factors of GIFT tilapia[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2017, 33(10): 950-954(in Chinese).
- [8] Yilmaz S. Effects of dietary caffeic acid supplement on antioxidant, immunological and liver gene expression responses, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Aeromonas veronii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 86: 384-392.
- [9] Behera B K, Pradhan P K, Swaminathan T R, et al. Emergence of tilapia lake virus associated with mortalities of farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) in India[J]. *Aquaculture*, 2018, 484: 168-174.
- [10] Metzger D C H, Hemmer-Hansen J, Schulte P M. Conserved structure and expression of hsp70 paralogs in teleost fishes[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics*, 2016, 18: 10-20.
- [11] 季桓涛, 祝璟琳, 杨弘, 等. 池塘种植鱼腥草对罗非鱼链球菌抗病力影响及机理研究[J]. 淡水渔业, 2019, 49(2): 71-77.
Ji H T, Zhu J L, Yang H, et al. The effects and mechanism streptococcus of planting *Houttuynia cordata* resistance on tilapia in pond[J]. *Freshwater Fisheries*, 2019, 49(2): 71-77(in Chinese).
- [12] Zhou C P, Ge X P, Lin H Z, et al. Effect of dietary carbohydrate on non-specific immune response, hepatic antioxidative abilities and disease resistance of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 41(2): 183-190.
- [13] Chen C Y, Wooster G A, Bowser P R. Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate[J]. *Aquaculture*, 2004, 239(1-4): 421-443.
- [14] Chen W T, Yang C L, Yin M C. Protective effects from *Houttuynia cordata* aqueous extract against acetaminophen-induced liver injury[J]. *BioMedicine*, 2014, 4(1): 24-28.
- [15] Peng X Y, Kong B H, Yu H Y, et al. Protective effect of whey protein hydrolysates against oxidative stress in d-galactose-induced ageing rats[J]. *International Dairy Journal*, 2014, 34(1): 80-85.
- [16] Hayyan M, Hashim M A, AlNashef I M. Superoxide ion: generation and chemical implications[J]. *Chemical Reviews*, 2016, 116(5): 3029-3085.

- [17] 石洪玥, 张菡, 孙学亮, 等. 两种致病菌对杂交东方鲷非特异性免疫和抗氧化指标影响[J]. *东北农业大学学报*, 2017, 48(2): 83-89.
Shi H Y, Zhang H, Sun X L, *et al.* Effect of nonspecific immune response and anti-oxidation of hybrid puffer infected by two pathogens[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2017, 48(2): 83-89(in Chinese).
- [18] Wu Y S, Chen Y Y, Ueng P S, *et al.* Effects of medicinal herbs "*Plantago asiatica*", "*Houttuynia cordata*" and "*Mentha haplocalyx*" on non-specific immune responses of cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 58: 406-414.
- [19] Elabd H, Wang H P, Shaheen A, *et al.* Feeding *Glycyrrhiza glabra* (liquorice) and *Astragalus membranaceus* (AM) alters innate immune and physiological responses in yellow perch (*Perca flavescens*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 54: 374-384.
- [20] Requena J R, Fu M X, Ahmed M U, *et al.* Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions[J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1996, 11(Suppl 5): 48-53.
- [21] Mayer B, Andrew P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1998, 358(1): 127-133.
- [22] Yao C L, Ji P F, Wang Z Y, *et al.* Molecular cloning and expression of NOS in shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(3): 453-460.
- [23] Amal M N A, Zamri-Saad M, Iftikhar A R, *et al.* An outbreak of *Streptococcus agalactiae* infection in cage-cultured golden pompano, *Trachinotus blochii* (Lacépède), in Malaysia[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2012, 35(11): 849-852.
- [24] 祝璟琳, 邹芝英, 李大宇, 等. 四个罗非鱼选育品种抗链球菌病能力差异研究[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(6): 1232-1241.
Zhu J L, Zou Z Y, Li D Y, *et al.* Study on resistant difference among four bleeding species of tilapia *Oreochromis* spp. following *Streptococcus agalactiae* challenge[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2017, 41(6): 1232-1241(in Chinese).
- [25] Zamri-Saad M, Amal M N A, Siti-Zahrah A. Pathological changes in red tilapias (*Oreochromis* spp.) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2010, 143(2-3): 227-229.
- [26] 祝璟琳, 邹芝英, 李大宇, 等. 尼罗罗非鱼无乳链球菌病的病理学研究[J]. *水产学报*, 2014, 38(11): 1937-1944.
Zhu J L, Zou Z Y, Li D Y, *et al.* Pathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) naturally infected by *Streptococcus agalactiae*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(11): 1937-1944(in Chinese).
- [27] Tsan M F, Gao B C. Heat shock proteins and immune system[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2009, 85(6): 905-910.
- [28] 强俊, 杨弘, 王辉, 等. 海豚链球菌感染对不同品系罗非鱼血液生化指标和肝脏HSP 70 mRNA表达的影响[J]. *水产学报*, 2012, 36(6): 958-968.
Qiang J, Yang H, Wang H, *et al.* Studies on blood biochemical indices and expression of hepatic HSP 70 mRNA of different tilapia strains artificially challenged with *Streptococcus iniae*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(6): 958-968(in Chinese).
- [29] Liu B, Xu P, Brown P B, *et al.* The effect of hyperthermia on liver histology, oxidative stress and disease resistance of the Wuchang bream, *Megalobrama amblycephala*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 52: 317-324.
- [30] Liang F F, Zhang G S, Yin S W, *et al.* The role of three heat shock protein genes in the immune response to *Aeromonas hydrophila* challenge in marbled eel, *Anguilla marmorata*[J]. *Royal Society Open Science*, 2016, 3(10): 160375.
- [31] Shahi N, Ardó L, Fazekas G, *et al.* Immunogene expression in head kidney and spleen of common carp (*Cyprinus carpio* L.) following thermal stress and challenge with Gram-negative bacterium, *Aeromonas hydrophila*[J]. *Aquaculture International*, 2018, 26(3): 727-741.
- [32] Roberts R J, Agius C, Saliba C, *et al.* Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2010, 33(10): 789-801.
- [33] Heck T G, Schöler C M, De Bittencourt P I H. HSP 70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain?[J]. *Cell Biochemistry & Function*, 2011, 29(3): 215-226.
- [34] Haugland Ø, Mercy I S, Romøren K, *et al.* Differential expression profiles and gene structure of two tumor necrosis factor- α variants in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(7): 1652-1663.
- [35] Herath H M L P, Elvitigala D A S, Godahewa G I, *et al.* Molecular characterization and comparative expression analysis of two teleostean pro-inflammatory cytokines, *IL-1 β* and *IL-8*, from *Sebastes schlegelii*[J]. *Gene*, 2016, 575(2): 732-742.

- [36] Zhang A Y, Guo Y F, Zhang S N, *et al.* Cytokine effects and cellular signaling pathways of grass carp HSP 70 in head kidney leukocytes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 550-556.

Protective effects from *Houttuynia cordata* against *Streptococcus agalactiae*-induced liver injury of GIFT *Oreochromis niloticus* strain

ZHU Jinglin¹, JI Huantao², XIAO Wei¹, LI Dayu¹, ZOU Zhiying¹,
YANG Hong^{1*}, LI Qingyong³, ZHU Dexing³

- (1. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;
2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;
3. Fisheries Research and Extension Center of Huizhou, Huizhou 516002, China)

Abstract: In order to study the effect of *Houttuynia cordata* planting in ponds on the repair of liver damage of GIFT *Oreochromis niloticus* caused by *Streptococcus agalactiae*, *H. cordata* were planted in culture ponds with 0% (control group), 5%, 10% and 15% of the pond area, respectively. After 90 days of culture, GIFT *O. niloticus* were artificially challenged by *S. agalactiae*. The livers were collected at 0, 24, 48 and 72 hours post infection (hpi), and the liver biochemistry, antioxidant activity, histology and HSP 70 expression were studied. The results showed that the activities of ALT and AST in the control group were the highest at 48 and 72 hpi. The activity of ALT in each *H. cordata* planting group had no significant change before and after infection. At 72 hpi, the activity of AST in 10% group returned to the level before infection. The antioxidant index showed that planting *H. cordata* could slow down the decrease of T-AOC in liver caused by streptococcal infection. It helps to significantly elevate the activity of antioxidant enzymes in liver, such as SOD, GSH-Px, CAT and NOS, and increase the scavenging ability of free radicals. It also reduced the levels of lipid peroxidation products(MDA). Histopathology showed that the hepatic sinuses in the control group were obviously congested, the hepatic cord was disordered and the hepatocytes were steatosis at 48 hpi, while *O. niloticus* in all planting *H. cordata* groups showed only eosinophilia and slight dilatation of hepatic sinuses after infection. The results of quantitative PCR showed that the expression of HSP 70 in the liver of GIFT *O. niloticus* in each group increased significantly after infection, and the expression of HSP 70 in the control group was significantly higher than that in the *H. cordata* planting group at each time point after infection. The results showed that *H. cordata* planting markedly protected liver against subsequent *S. agalactiae*-induced oxidative and inflammatory injury via slowing the rise of ALT and AST, increasing activity of antioxidant enzymes. It effectively reduce the pathological damage caused by streptococcal infection. GIFT *O. niloticus* promoted the early repair and degradation of damaged protein through the high expression of HSP 70. Planting *H. cordata* has anti-inflammatory effect and improves the ability of fish to resist pathogenic bacteria.

Key words: GIFT *Oreochromis niloticus*; *Houttuynia cordata*; *Streptococcus agalactiae*; histopathology; HSP 70

Corresponding author: YANG Hong. E-mail: yanghong@ffrc.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-46); Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2020TD37); Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes (2017JBFZ03); Aquatic Original Breeding and Parent Renewal (2130135)