

香菇多糖和黄芪多糖对鲤免疫细胞的活性和 IL-1 β 体外诱导表达的影响

曹丽萍¹, 丁炜东¹, 张柳², Galina Jeney³, 徐跑¹, 殷国俊¹

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心农业部水生动物遗传育种和

养殖生物学重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;

2. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

3. Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation, Anna light 8, Szarvas H-4440, Hungary)

摘要: 为了探讨香菇和黄芪多糖对鲤免疫细胞的免疫活性作用, 采用 Percoll 密度离心等技术, 对鲤的头肾巨噬细胞和外周血白细胞进行分离纯化, 并离体培养, 从细胞和分子水平上研究了香菇和黄芪多糖的免疫调节作用。巨噬细胞和外周血白细胞分别体外暴露不同浓度的黄芪多糖和香菇多糖后, 采用 MTT 法测定它们对鲤外周血白细胞增殖的影响; NBT 还原法和 Griess 试剂显色法测定对头肾巨噬细胞的呼吸爆发的影响; 实时定量 PCR 法测定头肾巨噬细胞细胞因子 IL-1 β 诱导表达的影响。结果显示, 黄芪和香菇多糖作用头肾巨噬细胞 24 h 后, 香菇多糖浓度为 1, 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时能显著诱导巨噬细胞的氧爆发活性, 黄芪多糖则没有显著的诱导作用; 黄芪和香菇多糖作用头肾巨噬细胞 96 h 后, 香菇多糖低浓度时对细胞的氮呼吸爆发活性无显著影响, 黄芪多糖浓度 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 能显著诱导氮呼吸爆发活性, 而在浓度为 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 两者均表现为高浓度抑制作用; 两者作用外周血白细胞 24 h 后, 香菇多糖浓度为 100, 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和黄芪多糖浓度为 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时都能显著促进鲤外周血淋巴细胞的增殖; 两种多糖作用头肾巨噬细胞 24 h 后能显著增强 IL-1 β 的体外诱导表达。结果表明黄芪多糖和香菇多糖对离体培养鲤免疫细胞有明显活性作用, 对鲤非特异性免疫和特异性免疫具有促进作用。

关键词: 鲤; 多糖; 巨噬细胞; IL-1 β

中图分类号: S 963. 73

文献标识码: A

近年来, 大规模高密度水产养殖造成的水环境污染, 致使水产病害日趋严重, 特别是病毒性疾病造成的损失更加惊人。为了防治水产动物疾病, 抗生素被大量应用于水产养殖, 由此引起的抗药性和药物残留等问题使得抗生素的使用在国内外许多国家都受到越来越严格的限制。因此寻求能有效防治水产动物疾病、替代或减少抗生素在水产养殖上使用的药物就显得非常必要和紧迫。

免疫增强剂是替代或减少抗生素预防鱼病的另一种有效手段, 它主要通过非特异性免疫应答来增强鱼类的免疫抗病力。与免疫接种相比, 它适用于多种鱼类, 并可以控制多种疾病。20 世纪 80 年代以来, 国外学者已发现 10 多种天然和人工合成的物质可以促进水产动物的非特异性免疫应答, 从而增强其抗病力^[1-2]。近年来我国在此方面的研究也日益增加, 其中对多糖的研究最为广

收稿日期: 2007-11-11

资助项目: 中匈(牙利)国际合作项目(第三期)(CHN-27/2006); 国际科学基金(AA13611-R); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心)资助项目(2007JBFA06, 2007JBFC05)

作者简介: 曹丽萍(1977-), 女, 江苏无锡人, 硕士, 从事水生生物细胞培养及相关免疫学方面的研究。E-mail: caolp@ffrc.cn

通讯作者: 殷国俊, E-mail: yingj@ffrc.cn

泛,20世纪60年代后作为免疫促进剂而引起人们的关注。研究表明多糖对免疫系统具有重要调节作用,主要表现为免疫刺激和免疫增强,能诱导多种细胞因子,增强机体内抗氧化系统功能,具有良好的抗病毒、抗肿瘤和抗衰老作用。黄芪多糖(Astragalus polysaccharide, APS)和香菇多糖(Lentinan, LNT)是其中研究的比较透彻的两种,具有抗病毒、抗肿瘤、调节免疫功能和促进干扰素生成等功能,受到了人们的重视,目前已有大量的产品面世并已经应用于临床上。

目前,免疫增强剂对鱼类免疫调节机理的研究主要通过养殖试验来进行,停留在个体水平上,且周期长,效果差。而体外试验具有条件可控性强,重复性好,使用材料少,耗时短等优点,人用和兽(陆生动物)用中草药免疫增强剂的开发已广泛通过免疫细胞的体外试验来筛选。本研究以头肾细胞和外周血白细胞为研究对象来研究中草药多糖的免疫调节,使中草药对鱼类免疫调节的研究深入到细胞水平;同时首次在体外研究中草药对鱼类免疫相关基因的表达,使中草药对鱼类免疫调节机理的研究深入到分子水平,在细胞和分子水平上探讨香菇和黄芪多糖对鲤免疫调节的机理。这对减少水产养殖中抗生素的使用,保护环境,全面提升水产品的质量,具有非常重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

实验鱼和免疫增强剂 试验用鲤来自中国水产科学院淡水渔业研究中心渔场,体质健康无伤,6月龄,体重150 g左右,将试验鱼消毒,饲养于循环水系统中,25℃,每天投食商品饲料两次。

黄芪多糖和香菇多糖粗制粉购自于无锡正大畜禽有限公司,采用水煮醇沉法^[3],略加修改处理。称取粗粉各100 g加于100 mL无菌水中,水浴,100℃加热溶解30 min,待完全冷却后,350 g,10 min,20℃离心,弃沉淀。上清用无水分析乙醇沉淀至终浓度为80%,静置,过夜。次日,用两层纱布滤出沉淀,并用无水乙醇洗沉淀,2~3次。40℃烘箱中烘干沉淀,干燥后研磨过筛,备用。提取物用5% FCS-L-15培养基(1% S/P, 0.2% heparin and 5% FCS)配成1, 10, 100和1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度,用0.22 μm 的过滤器过滤,备用。

试剂 L-15培养基、LPS(脂多糖)、HBSS溶液、硅石-聚乙炔吡咯烷酮(phytohaemagglutinin, percoll)、佛波豆寇乙酸酯(phobol myristate acetate, PMA)、硝基蓝四氮唑(NBT)、链霉素/青霉素(streptomycin/penicillin)、肝素(heparin)和噻唑兰[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT]购于SIGMA公司;新生小牛血清(FCS)和细胞培养板购自于GIBCO公司;总RNA抽提试剂盒及实时荧光定量PCR试剂盒购自于Takara公司。

1.2 鲤头肾巨噬细胞的分离和外周血白细胞的分离

鲤头肾巨噬细胞的分离 鲤头肾巨噬细胞的分离采用Bayne方法^[4]。随机抽取鲤,MS-222麻醉后,采血。在无菌的条件下,剖取鲤头肾,并研磨。研磨液通过100目尼龙网,滤过液加入到34%/51%的Percoll分离液的液面上,4℃,350 g离心25 min,得液面交界处的巨噬细胞。细胞在4℃,2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min条件下洗涤两次,可使巨噬细胞含量进一步提高。台盼蓝法进行细胞活性检测并计数,其中巨噬细胞含量超过90%,调整细胞浓度为 $10^7\text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$,接种到96孔板上,每孔100 μL ,27℃培养2 h后,洗去未贴壁细胞,加入100 μL /孔5% FCS-L-15(1% S/P, 0.2% heparin和5% FCS),27℃培养备用。

鲤外周血白细胞的分离 随机抽取鲤,MS-222麻醉后,用0.1% KMnO_4 进行体表消毒后再用75%酒精棉球擦洗;在无菌的条件下进行尾静脉抽血,全血与0.1% FCS-L-15(1% S/P, 0.2% heparin和0.1% FCS)培养基按1:1比例稀释后,取适量缓缓加入到已盛有60%的Percoll分离液的离心管中,4℃,2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,得60%液面交界处的白细胞,处理方法同鲤头肾巨噬细胞的分离。

1.3 免疫指标的检测

氧爆发活性(超氧阴离子)的测定 待用细胞换用不同浓度的多糖培养,每个浓度设8个重复,同时设空白对照组和阳性对照组(500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS作用组),27℃培养24 h。加1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的NBT(含1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的PMA),每孔100 μL ,27℃避光作用1 h,甲醇固定后加入120 mL的DMSO和140 mL的2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的KOH,

620 nm 测定吸光值。4 条鱼重复。

氮爆发活性(一氧化氮)的测定 同超氧阴离子的测定方法,多糖作用 96 h。将上清液(75 μL)转移到另一细胞培养板,加入 Griss 试剂(1% 磺胺,0.1% 奈乙二胺二盐酸盐,2.5% 磷酸),540 nm 测定吸光值。4 条鱼重复。

外周血白细胞增殖的测定(MTT 法) 同超氧阴离子的测定方法,多糖作用 24h。倾去上清,用 EDTA 把细胞消化下来,将每孔的细胞转移到另一个干净的 96 孔板上 2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,倾去上清,每孔加 100 μL 5% FCS-L-15 和 20 μL MTT 27 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h。倾去上清,每孔加 150 μL DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解选择 570 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,记录结果。4 条鱼重复。

1.4 实时荧光定量 PCR 法测定免疫相关基因 IL-1 β 的体外诱生表达

调节细胞浓度 $1 \times 10^7 \text{ cell}\cdot\text{L}^{-1}$,24 孔细胞培养板每孔加 600 μL ,贴壁 2 h 后,换含有不同浓度多糖的 5% FCS-L-15 培养基,同时设定空白组培养 24 h。倒出培养液,HBSS 洗 1 次,提取总 RNA,反转录合成 cDNA。根据 GenBank 中鲤 IL-1 β 基因的序列设计引物进行扩增,以 β -actin 为内标,进行实时荧光定量分析。

用 Takara 公司生产的 RNAiso Reagent (Total RNA 提取试剂盒)提取细胞总 RNA,采用分光光度法测定提取的总 RNA 含量及纯度,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.0。以 Oligo(dT)为引物,cDNA 的合成;实时荧光定量 PCR 反应按照 Takara 公司生产的 ExScriptTM RT-PCR Kit (Perfect Real Time; SYBR Green I)进行。基因特异引物及内参 β -actin 引物分别按照鲤 IL-1 β 和 β -actin 基因序列采用 Prime5 软件合成,IL-1 β 的上游引物:5' - CAACATTCGTGTCGAG - 3',下游引物:5' - AAGTTTGTGGTTTCGGG - 3'; β -actin 的上游引物:5' - ACTACCTCATGAAGATCCTG - 3',下游引物:5' - TTGCTGATCCACATCTGCTG - 3'。4 条鱼重复。

1.5 数据分析

实验数据用平均值 \pm 标准误表示,数据分析采用 SPSS 11.5 软件包中的单因素方差分析 (one-way -ANOVA)处理,对样本之间进行 t 检验。 P 值取 0.01 和 0.05。

2 结果

2.1 免疫指标的检测

氧爆发活性(超氧阴离子)的测定 不同浓度的黄芪和香菇多糖作用头肾巨噬细胞 24 h 后,对细胞氧呼吸爆发活性的影响见图 1。从图中可见,阳性对照组(LPS 作用组)能显著提高细胞的氧呼吸爆发活性,说明经检测的离体培养的细胞状态是正常的;香菇多糖能够显著提高细胞的氧呼吸爆发活性,在浓度为 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时 $P < 0.05$,浓度 10,100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时 $P < 0.01$;黄芪多糖作用组与空白对照组相比,不同的作用浓度均能提高细胞的氧呼吸爆发活性,但是无显著差异性。

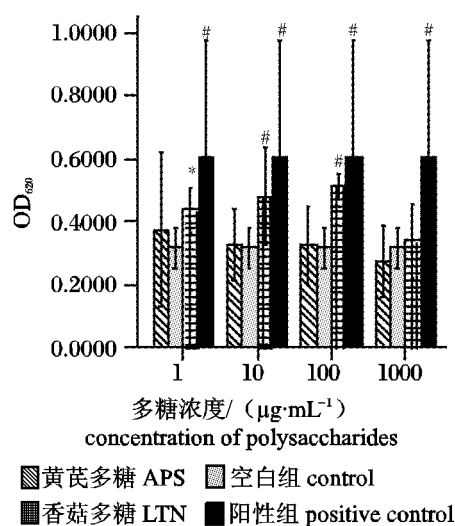


图 1 黄芪和香菇多糖对鲤头肾细胞氧呼吸爆发活性的影响

Fig. 1 Detection of superoxide anion in *Cyprinus carpio* HK macrophages by the induction of Lentinan and Astragalus polysaccharides

* $P < 0.05$, # $P < 0.01$

氮爆发活性(一氧化氮)的测定 不同浓度的黄芪和香菇多糖作用头肾巨噬细胞 96 h 后,对细胞氮呼吸爆发活性的影响见图 2。阳性对照组能显著提高细胞的氮呼吸爆发活性,说明经检测的离体培养的细胞状态是正常的;香菇多糖作用组与空白对照组相比,低浓度时对细胞的氧呼吸爆发活性无显著影响,浓度为 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时显著抑制了细胞的氮呼吸爆发活性, $P < 0.01$;黄芪多糖作用组与空白对照组相比,能够显著提高细胞的氮呼吸爆发活性,浓度为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ $P <$

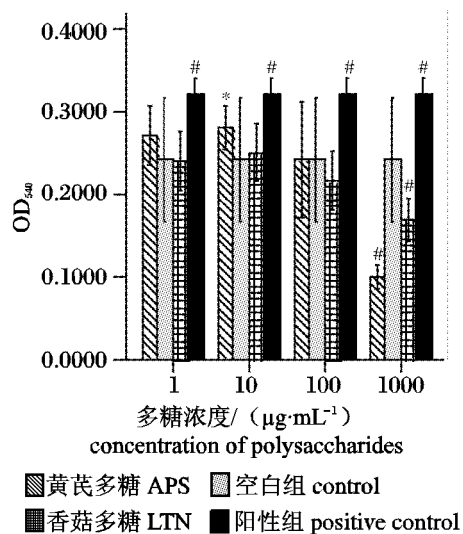


图2 黄芪和香菇多糖对鲤头肾巨噬细胞氮呼吸爆发活性的影响

Fig. 2 Reduction of nitric oxide of *Cyprinus carpio* HK macrophages by the induction of Lentinan and Astragalus polysaccharides

* $P < 0.05$, # $P < 0.01$

0.05,但当浓度提高为 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时显著抑制了细胞的氮呼吸爆发活性, $P < 0.01$ 。

外周血白细胞增殖的测定(MTT法) 不同浓度的黄芪和香菇多糖作用外周血白细胞细胞24 h后,对细胞增殖能力的影响见图3。阳性对照组能显著提高细胞的增殖能力,说明经检测的

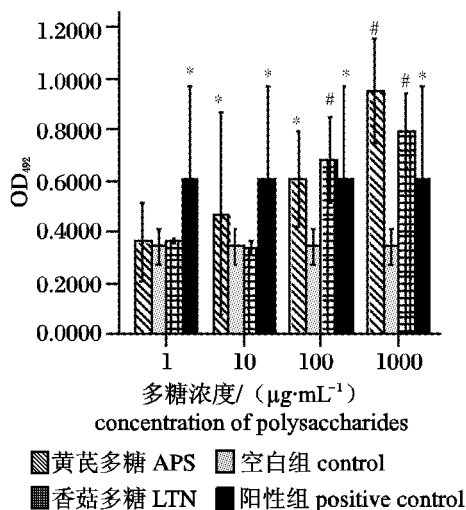


图3 黄芪和香菇多糖对鲤白细胞增殖的影响

Fig. 3 Proliferation of peripheral blood leukocytes by the induction of Lentinan and Astragalus polysaccharides

* $P < 0.05$, # $P < 0.01$

离体培养的细胞状态是正常的;香菇多糖作用组与空白对照组相比,能够显著提高细胞增殖能力,浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时 $P < 0.01$;黄芪多糖作用组与空白对照组相比,同样能够显著提高细胞的增殖能力,浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时 $P < 0.05$, 浓度 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时 $P < 0.01$ 。

2.2 实时荧光定量PCR法测定免疫相关基因IL-1 β 的体外诱导表达

不同浓度的多糖作用头肾巨噬细胞24 h后,一个实验组中不同浓度多糖作用的细胞收集为一个样品,抽提总RNA,进行反转录,得到各样品的cDNA;应用实时定量PCR得到各样品的Ct值,以鲤的 β -actin为内参,对各样品的Ct值均一化处理,通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法求得各样品的mRNA的相对含量,结果见图4。与空白对照组相比,香菇多糖作用组($P < 0.01$)和黄芪多糖作用组($P < 0.05$)均能显著诱导细胞因子IL-1 β 的表达。

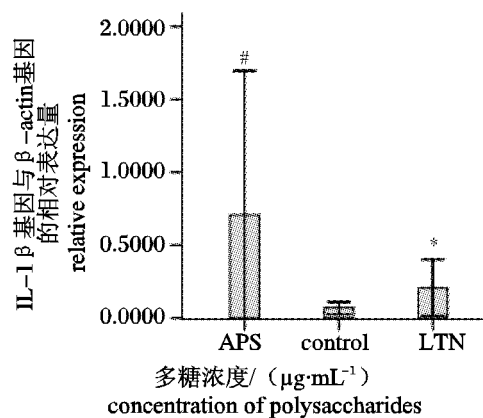


图4 黄芪和香菇多糖对免疫相关基因IL-1 β 的体外诱导表达的影响

Fig. 4 The expression of interleukin-1 β in the *Cyprinus carpio* by Lentinan and Astragalus polysaccharides

* $P < 0.05$, # $P < 0.01$

3 讨论

3.1 呼吸爆发活性的测定

香菇和黄芪多糖作为免疫促进剂作用于鲤离体培养的头肾巨噬细胞24 h和96 h后,分别测定其氧呼吸爆发活性和氮呼吸爆发活性。结果显示香菇多糖浓度为 $1, 10, 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时可以显著提高巨噬细胞的氧呼吸爆发活性;黄芪多糖浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 可以显著提高巨噬细胞的氮呼吸

爆发活性;同时在对巨噬细胞的氮呼吸爆发活性的测定中发现,香菇和黄芪多糖高浓度时表现为NO的生成抑制作用。以上结果显示香菇和黄芪多糖在合适的作用浓度范围内,可以通过促进巨噬细胞的呼吸爆发活性免疫功能,提高抵抗力。巨噬细胞是鱼类最重要的免疫活性细胞之一,在识别、吞噬外来病原微生物,处理和呈递抗原,激活淋巴细胞启动特异性免疫应答以及分泌免疫因子等方面发挥重要作用^[5-7],其活性与功能是反映和评价鱼类免疫水平的重要指标,因此对于M ϕ 活性与功能的测定已成为鱼类免疫学、鱼类免疫药物筛选、鱼类环境与免疫毒理学等研究的重要内容^[8-9]。在以哺乳动物为主的M ϕ 活化机制研究中发现,当M ϕ 受抗原或细胞因子等的激发后,可出现呼吸爆发作用而产生大量O₂⁻、H₂O₂和NO,从而共同完成对病原菌的杀伤作用。鱼类M ϕ 存在同样的活化机制^[10]。丁航等^[11]发现香菇多糖免疫作用机理可能是通过提高iNOS活性和NO的生成有关;殷国俊等^[12]将黄芪作用于鲤离体头肾巨噬细胞,观察其对巨噬细胞的增殖和产生一氧化氮的影响,发现黄芪水提取液不仅能刺激巨噬细胞的增殖,还能协同脂多糖增强头肾中免疫细胞的功能;程富胜等^[13]研究黄芪多糖对小鼠腹腔巨噬细胞NO生成的影响,结果表明黄芪多糖通过显著促进NO的生成来调节免疫功能,这些结论与本次实验结果是一致的。

实验中在对巨噬细胞的氮呼吸爆发活性的测定中发现,随着香菇和黄芪多糖作用浓度的增加,对细胞的氮呼吸爆发活性均表现为高浓度抑制作用,两者浓度为1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时均显著抑制了细胞的氮呼吸爆发活性,结果表明在合适的作用浓度范围内,多糖可以通过促进巨噬细胞的氮爆发活性来增强机体的非特异性免疫功能,但随着浓度的提高,推测可能表现出了另外一种作用机制,主要为细胞毒作用,这还有待于进一步研究。

3.2 外周血白细胞增殖的测定

通过体外外周血白细胞增殖实验,结果表明香菇多糖浓度为100和1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时能够显著提高细胞的增殖能力;黄芪多糖浓度为10, 100和1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时同样能够显著提高细胞增殖能力。鱼类白细胞对病原菌的吞噬和杀菌作用,是鱼类非特异性免疫的一个重要方面^[14],许多学者对鱼类血液白细胞的免疫活性

进行了研究。Yin等^[15]发现饲料中添加0.1%和0.5%的黄芪可以显著提高罗非鱼血清溶菌酶的活性和白细胞的吞噬活性;简纪常等^[16]将黄芪、当归、党参、马兜铃、板蓝根和甘草按一定的比例混合制成药饵,在饲料中添加1%的药饵能显著提高建鲤血液中中性粒细胞和巨噬细胞的数量,增强其血清溶菌酶的活力,等等。这与本研究的实验结果是一致的,表明这两种多糖对鲤离体培养的外周血白细胞具有活性作用。

3.3 实时荧光定量PCR法测定免疫相关基因IL-1 β 的体外诱导表达

实时荧光定量PCR法显示香菇和黄芪多糖作用头肾巨噬细胞24 h后能显著增强IL-1 β 的体外诱导表达。中草药作为免疫促进剂对免疫细胞免疫相关基因的研究在人医、兽医上较为深入。香菇多糖能增强小鼠脾单核细胞和人血单核细胞中IL-2、IF- α 基因的表达^[17];体内注射灵芝多糖可以显著增强小鼠脾细胞IL-1 α 、IL-1 β 和TNF α 基因的表达,同时可以显著提高腹腔巨噬细胞IL-1 β 、TNF α 和M-CSF基因的表达^[18];黄芪水提取液能刺激RAW 264.7巨噬细胞IL-1 α 、IL-1 β 和IL-6 mRNA的表达^[19];黄芪多糖则能通过激活NF- κ B/Rel来刺激体外培养的RAW264.7巨噬细胞iNOS基因的表达^[20];香菇多糖增强巨噬细胞的杀菌作用,并诱导IL-12、TNF- α 、IFN- γ 的产生^[21]。而与哺乳动物相比,鱼类的免疫系统发育还不完善,对鱼类或离体培养鱼类免疫细胞相关基因的研究国内外的报道很少。本实验中香菇和黄芪多糖能显著促进鲤IL-1 β 基因的诱导表达,与在哺乳动物上的研究是一致的,进一步证明了虽然中药多糖调节免疫、抗肿瘤的作用机制是多方位、多环节的,但其促诱导多种细胞因子仍作为一重要部分贯穿其中,香菇和黄芪多糖可以通过促进细胞因子的表达来提高机体的特异性免疫,从而增强机体的抗病能力。

IL-1 β 基因是T-cell和巨噬细胞激活后由巨噬细胞分泌,通过诱导淋巴细胞的生长和增殖及刺激免疫和炎症应答反映效应细胞来增强细胞介导的免疫应答作用,在炎症反映中起着关键作用^[22];重组的IL-1 β 基因还可以增强疫苗的免疫作用^[23],是特异性和非特异性免疫反映中最重要的细胞因子之一。近几年借助基因组的方法已经获得了红鲟、鲤和河内鲈等硬骨鱼类的IL-1 β 基

因序列^[24-26]。其中作为2倍体鱼类河内鲈发现了两条IL-1 β 基因,在4倍体鲤、金鱼和红鲮上也曾有报道出现了两条IL-1 β 基因^[26],但是对于2倍体鲤是否存在同样这种情况,及中草药作为免疫促进剂对可能存在的另外IL-1 β 基因的免疫刺激作用还有待进一步研究。

4 小结

香菇和黄芪多糖作为免疫促进剂对鲤离体培养的头肾巨噬细胞和外周血白细胞作用后,香菇多糖能显著诱导巨噬细胞的氧爆发活性;黄芪多糖能显著诱导氮呼吸爆发活性,同时两者均对巨噬细胞NO生成表现出高浓度抑制作用;香菇和黄芪多糖都能显著促进鲤外周血淋巴细胞的增殖;两种多糖作用头肾巨噬细胞后能显著增强IL-1 β 的体外诱导表达。结果表明黄芪多糖和香菇多糖对离体培养鲤免疫细胞有明显活性作用,对鲤非特异性免疫和特异性免疫具有促进作用。

参考文献:

- [1] Raa J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds [C]// Cruz-Suárez L E, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar, *et al.* (Eds.): *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 2000, 19-22.
- [2] Masahiro S. Current research status of fish immunostimulants [J]. *Aquaculture*, 1999, 172: 63-92.
- [3] 倪艳, 苏强, 刘霞. 黄芪多糖水煎, 提取工艺的优化试验研究[J]. *中国中药杂志*, 1998, 23(5): 284-286.
- [4] Bayne C J. Pronephric leucocytes of *Cyprinus carpio*: isolation, separation and characterization [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1986, 12: 141-151.
- [5] Secombes C J. Macrophage activation during experimental allergic orchitis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Dev Com Immun*, 1986, 10: 539-546.
- [6] 裴品. 鱼类非特异性免疫研究的新进展 [J], *水产学报*, 1997, 21(1): 69-73.
- [7] Weeks-Perkins B A, Ellis A E. Chemotactic responses of Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages to virulent and attenuated strains of *Aeromonas salmonicida* [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 1995, 5: 313-323.
- [8] Weeks B A, Warinner J E, Mason P L, *et al.* Influence of toxic chemicals on the chemotactic response of fish macrophages [J]. *J Fish Biol*, 1986, 28(5): 653-658.
- [9] Haaparanta A, Valtonen E T, Hoffmannr, *et al.* Do macrophage centers in freshwater fishes reflect the differences in water quality? [J]. *Aquat Toxicol*, 1996, 34(3): 253-272.
- [10] Chung S C, Secombes J. Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1988, 89B(3): 539-544.
- [11] 丁航, 侯敢, 周克元. 香菇多糖对巨噬细胞一氧化氮和一氧化氮合酶活性的影响[J]. *广东药学*, 2003, 13(4): 32-33.
- [12] 殷国俊, Geert W, Li Y M, 等. 黄芪对鲤头肾中巨噬细胞的增殖和一氧化氮产量的影响: 离体研究(英文)[J]. *水产学报*, 2004, 28(6): 628-632.
- [13] 程富胜, 胡庭俊, 梁纪兰, 等. 黄芪多糖对小鼠腹腔巨噬细胞一氧化氮生成的影响[J]. *中兽医医药杂志*, 2001, 3: 3-4.
- [14] 板田腾信. 鱼类免疫と免疫系[J]. *北海道水产孵化场研报*, 1988, 43: 11-35.
- [15] Yin G J, Jeney G, Racz T, *et al.* Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of *tilapia*, *Oreochromis niloticus* [J]. *Aquaculture*, 2006, 253: 39-47.
- [16] 简纪常, 吴灶和. 中草药对建鲤非特异性免疫功能的影响[J]. *大连水产学院学报*, 2002, 17(2): 114-119.
- [17] Liu M Q, Li J Z, Kong F Z, *et al.* Induction of immunomodulating cytokines by a new polysaccharide-peptide complex from culture mycelia of *Lentinus edodes* [J]. *Immunopharmacology*, 1998, 40(3): 187-198.
- [18] Ooi Linda S M, Ooi Vincent E C, Fung M C, *et al.* Induction of gene expression of immunomodulatory cytokines in the mouse by polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Curt; Fr.) P. Karst (Aphylllophoromycetidae) [J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2002, (4): 27-35.
- [19] Lee Y S, Han O K, Park C W, *et al.* Pro-inflammatory cytokine gene expression and nitric oxide regulation of aqueous extracted *Astragali radix* in RAW 264.7 macrophage cells [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, (100): 289-294.
- [20] Lee K Y, Jeon Y J. Macrophage activation by

- polysaccharide isolated from *Astragalus membranaceus* [J]. International Immunopharmacology, 2005, (5): 1225 - 1233.
- [21] Cohen-Kupiec R, Broglie K E, Friesem D. Chet Imolecular characterization of a novel β -1, 3 exo-glucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum* [J]. Gene, 1991, 226: 147 - 154.
- [22] Kullberg B J, van der Meer J W M. Cytokines in the treatment of infectious diseases: options for the modulation of host defense [J]. Kluwer Dordrecht, 1995.
- [23] Nash, A D, Lofthouse S A, Barcham G J, et al. Recombinant cytokines as immunological adjuvants [J]. Immunol Cell Biol, 1993, 71: 367 - 379.
- [24] Zou J, Cunningham C, Secombes C J. The rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* interleukin-1 beta gene has a differ organization to mammals and undergoes incomplete splicing [J]. Eur J Biochem, 1999, 259: 901 - 908.
- [25] Engelsma M Y, Stet R J, Schipper H, et al. Regulation of interleukin 1 beta RNA expression in the common carp *Cyprinus carpio* L [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25: 195 - 203.
- [26] Wang Y P, Wang Q, Baoprasertkul P, et al. Genomic organization, gene duplication, and expression analysis of interleukin-1 β in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Molecular Immunology, 2006, 43: 1653 - 1664.



上海海洋大学 在职人员攻读硕士学位招生简介

上海海洋大学是工程硕士和农业推广硕士专业学位授予单位。从 80 年代初,学校就开展了研究生的培养,已为国家培养了大批硕士、博士研究生。

工程硕士招生领域有食品工程和机械工程两个领域,主要涉及食品学院与工程学院。食品学院拥有上海高校中唯一的食品类二级学科博士点,食品科学与工程为一级学科硕士点,同时也是上海市特色重点学科,学院拥有一大批世界先进的仪器设备,一支师资队伍完整、人员结构合理的学术队伍,长期以来在食品保藏与加工、食品安全检测、食品生物技术、废弃物的综合利用,以及海洋药物和生理活性成分等方面进行了深入的研究,取得了大量的研究成果,学院综合实力在国内同类高校中已跃居一流水平;工程学院是在我校 1912 年成立时所设渔机科基础上发展而成的传统特色学院,具有较强的科研实力,拥有较宽的研究领域和良好的科研基础,主要研究方向涉及现代制造技术、现代农业和渔业装备及相关控制技术等领域,在水产养殖环境监测、渔业工程与自动化领域取得了一系列的成果。

农业推广硕士招生领域有渔业、农村与区域发展、食品加工与安全 and 农业信息化四个领域。我校是全国首批(2000 年)试点招收和培养农业推广硕士的单位之一,涉及水产与生命学院、海洋科学学院、经济管理学院、食品学院和信息学院。水产与生命学院现有水产养殖学、水生生物学、海洋生物学及水域环境学等四个学科,设有博士后科研流动站和水产养殖、水生生物学 2 个博士点,其中水产养殖学科被评为国家级重点学科,同时也是农业部和上海市的重点学科,几十年办学过程中,学院取得了丰硕的科研成果,涌现出一批在国内外有一定影响的著名学者;海洋科学学院自捕捞学科 1986 年获得硕士研究生培养资格以来,现有捕捞学、渔业资源 2 个硕士点,捕捞学、渔业资源 2 个博士点及博士后科研流动站,已为我国渔业生产、教育、科研和管理部门培养和输送了大批优秀的高级专业人才;经济管理学院是以培养经济、管理类应用型人才,以渔业经济与管理学科为特色的经济管理类学院,经过 20 余年发展,已形成完备的学士、硕士、博士人才培养格局;信息学院拥有先进的教学设施和良好的教育环境,具有多个现代化机房和专业实验室,在教学、科研、学生素质教育等方面取得了丰硕的成果。

招生对象: 在职工程技术或工程管理人员,或在学校从事工程技术与工程管理教学的教师;具有农业推广与农村发展相关实践经验的在职人员。采取进校不离岗的培养方式,利用业余时间上课。

咨询电话: 021 - 65710727 传真: 021 - 65710727

地址: 上海市军工路 334 号上海海洋大学研招办(邮编: 200090)

欢迎广大在职人员前来报考!

**Effects of the activation of immunological cells and the expression of
interleukin-1 β in the *Cyprinus carpio* after stimulation
by Lentinan and Astragalus polysaccharides**

CAO Li-ping¹, DING Wei-dong¹, ZHANG Liu², Galina Jeney³, XU Pao¹, YIN Guo-jun¹

(1. Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of
Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Science, Wuxi 214081, China;

2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

3. Research Institute for Fisheries, Aquaculture and Irrigation, Anna light 8, Szarvas H-4440, Hungary)

Abstract: The polysaccharides in Chinese herbs have been showing to have immunomodulating effects in terrestrial animals, however, the mechanism of the immunomodulating effects of Chinese herbal polysaccharides in fish has not been studied and clarified, especially in the cellular and molecular levels. To investigate the *in vitro* immunomodulating effects of Lentinan and Astragalus polysaccharides in fish, the macrophages and the peripheral blood leukocytes were isolated from the head kidney and blood of *Cyprinus carpio* through Percoll gradient density centrifugation. The cells were cultured and stimulated with different concentrations of Astragalus polysaccharides and Lentinan, the proliferation of the peripheral blood granulocytes, respiratory burst of macrophage and IL-1 β mRNA expression of macrophages were analyzed by MTT, NBT reduction, Griess reaction and Real time PCR respectively. Results showed that proliferation of peripheral blood leukocytes after 24 h incubation with Astragalus polysaccharides at 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and Lentinan at 100, 1 000 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was markedly stimulated. Lentinan at 1, 100, 1 000 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ could induce superoxide anion in macrophages markedly, while Astragalus polysaccharides had no effect. Reduction of nitric oxide of head kidney macrophages (HK macrophages) after 96 h incubation with polysaccharides showed that Astragalus polysaccharides at 10 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ had conspicuous effect on nitrogen burst activity of macrophages but Astragalus polysaccharides had no effect, moreover both Astragalus polysaccharides and Lentinan at 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ inhibited thenitrogen burst activity at higher doses. The expression of interleukin-1 β in the HK macrophages after 24 h stimulation by the two polysaccharides showed that Astragalus polysaccharides and Lentinan could stimulate IL-1 β expression in carp head kidney. The conclusion is that Astragalus polysaccharides and Lentinan could stimulate the proliferation and respiratory burst activities of the immune cells in carp and upregulate the IL-1 β expression in carp head kidney macrophages, hence modulate the non-specific immune responses in carp. The effect of herbal polysaccharides on the cytokine gene expression of macrophages in fish is first reported in this paper. However, more cytokines need to be studied in the future.

Key words: *Cyprinus carpio*; polysaccharides; immunological cells; IL-1 β