

壳聚糖和益生菌对异育银鲫非特异免疫功能及血清甲状腺激素、皮质醇水平的影响

陈勇^{1,2}, 华雪铭², 周洪琪^{2*}, 张冬青³

(1. 南京晓庄学院生物化工与环境学院, 江苏 南京 211171;

2. 上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用重点开放实验室, 上海 201306;

3. 上海交通大学医学院, 上海 200025)

摘要:为探讨壳聚糖和益生菌是否通过甲状腺激素、皮质醇对异育银鲫的非特异免疫功能的进行调控, 试验以基础饲料为对照, 在基础饲料中分别添加0.50%壳聚糖A、0.50%壳聚糖B、0.20%益生菌以及0.50%壳聚糖A与0.05%益生菌的混合物制备试验饲料, 饲养异育银鲫64 d后, 测定各组鱼外周血白细胞数量及其分类、白细胞吞噬活性、脾脏溶菌酶活性、脾脏淋巴细胞转化能力; 同时采用放射免疫分析法测定异育银鲫血清中三碘甲腺原氨酸(T_3)、甲状腺素(T_4)及皮质醇含量。结果表明, 饲料中添加壳聚糖、益生菌或其混合物对异育银鲫白细胞总数无显著影响, 但是可显著提高异育银鲫外周血淋巴细胞数量、白细胞吞噬活性和脾脏溶菌酶活性($P < 0.05$), 显著降低外周血多形核细胞数量($P < 0.05$)。除了壳聚糖A能够显著提高异育银鲫脾脏B淋巴细胞转化能力之外, 其余试验组的脾脏T、B淋巴细胞转化能力均与对照组无显著差异($P > 0.05$)。同时发现饲料中添加壳聚糖、益生菌或其混合物可以显著提高异育银鲫血清中 T_3 的含量($P < 0.05$)、显著降低异育银鲫血清中皮质醇的含量($P < 0.05$), 除了壳聚糖B对异育银鲫血清中 T_4 的含量无显著影响($P > 0.05$)之外, 其余均可显著降低异育银鲫血清中 T_4 的含量($P < 0.05$)。因此, 壳聚糖、益生菌可能通过提高血清 T_3 水平、降低血清皮质醇水平增强异育银鲫的非特异免疫功能。

关键词:异育银鲫; 壳聚糖; 益生菌; 非特异免疫; 免疫调节; 皮质醇; 甲状腺激素

中图分类号:S 942.5

文献标识码:A

疾病制约着水产养殖业的发展。一些学者的研究发现, 壳聚糖和益生菌能够调节鱼类的免疫功能, 对鱼类具有较好的抗病效果^[1-3]。甲状腺激素调控鱼类的代谢、生长、免疫、中枢神经系统的发育、行为等生命活动。皮质醇能调节物质代谢、免疫功能、心血管系统及渗透压等。甲状腺激素和皮质醇的功能、合成和分泌及其与受体的亲和性都受到鱼的营养状况、饲料成分等诸多因素的影响^[4-5]。

本研究以壳聚糖和益生菌作为异育银鲫饲料的添加剂, 检测其对异育银鲫非特异免疫功能

和血清甲状腺激素、皮质醇激素水平的影响, 旨在探讨其通过甲状腺激素及皮质醇对鱼类非特异免疫功能的调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

二龄异育银鲫购自上海市南汇水产养殖场, 体重为(78.31 ± 2.15) g, 体质健壮, 无病无伤。壳聚糖由上海海洋大学食品学院提供, 壳聚糖A和壳聚糖B的含量为100%, 壳聚糖A分子量较小, 壳聚糖B分子量较大。益生菌由复旦大学遗

收稿日期:2009-12-11 修回日期:2010-03-04

资助项目:上海市科委重点攻关项目(013212101);南京晓庄学院生态学重点学科;博士启动基金(2005NXY58);上海市重点学科建设基金项目(Y1101)

通讯作者:周洪琪, E-mail: Hqzhou@shou.edu.cn

传所提供,由枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)和嗜热球状芽孢杆菌(*Bacillus thermosphaericus*)混合而成,总活菌数不少于 3.0×10^9 CFU/g。

1.2 设计

以基础饲料(鱼粉 10.0%、豆粕 20.0%、菜籽粕 20.0%、次粉 25.0%、玉米粉 17.5%、啤酒酵母 5.0%、植物油 1.0%、复合添加剂 1.5%;粗蛋白含量为 31.12%、粗脂肪含量为 6.52%、粗灰分含量为 8.48%)为对照,试验饲料为基础饲料中分别添加 0.50% 壳聚糖 A、0.50% 壳聚糖 B、0.20% 益生菌、0.50% 壳聚糖 A 与 0.05% 益生菌的混合物,共 5 个饲料组,每组 3 个重复。

1.3 饲养

饲养试验在上海海洋大学南汇水产养殖实验场进行,将试验鱼随机分到 15 个水泥池(5.0 m × 2.0 m × 0.6 m)中,每池 50 尾。每天按体重的 3% 分 3 次(8:30、12:30、16:30)投喂每种饲料,并根据水温、水质、摄食情况适当调整,尽量让投喂的饲料全部吃完不留残饵。每天充气,不定期吸污、换水。饲养试验共进行 64 d,整个试验期间水温为室温(21 ~ 35 ℃),DO > 5 mg/L, NH₃-N < 0.3 mg/L,各池水质基本一致。

1.4 测定

64 d 的饲养试验结束,用麻醉剂(1/10000 MS222)将试验鱼麻醉后,每组随机取 10 尾鱼的血液和脾脏待测,每尾鱼的血细胞、血清、脾脏分别为 1 个样本。

外周血白细胞数量及分类 每尾鱼取全血 10 μL,用鱼用血细胞稀释液将全血稀释 200 倍,在 100 × 光镜下进行白细胞计数。每尾鱼另取全血 1 滴涂片,自然干燥,经瑞氏染色后在 400 × 光镜下依细胞及细胞核的形态和染色进行分类计数。

外周血白细胞吞噬活性 将白色葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)于 37 ℃ 培养 24 h 后隔水煮沸 10 min,再用无菌生理盐水稀释至 3×10^9 CFU/mL。取每尾鱼抗凝全血 100 μL 加入 20 μL 白色葡萄球菌液,混匀后 26 ℃ 孵育 30 min,取白细胞层一滴推片,风干后瑞氏染色,干燥后 400 × 光镜下计数,计算吞噬率及吞噬指数。

吞噬率(%) = 100 个白细胞中吞噬细菌的白细胞数/100 × 100

吞噬指数 = 100 个参与吞噬的白细胞内吞噬的细菌数/100

脾脏溶菌酶 称取脾脏组织若干,用 0.1 mol/L、pH 6.4 的磷酸缓冲液以 5 倍体积稀释匀浆,1 000 r/min 离心 10 min,取上清液(脾脏细胞悬液)备用。将溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)在 37 ℃ 条件下培养 24 h 后,用上述缓冲液稀释至波长 570 nm 时吸光度为 0.3 的菌悬液。将 5 mL 菌悬液与 0.01 mL 脾脏细胞悬液充分混合,测定其 570 nm 波长下的吸光度为 A_0 ,37 ℃ 水浴 30 min,取出后冰浴 10 min 以终止反应,再测定此条件下的吸光度为 A ,溶菌酶活性 $U = (A_0 - A)/A$ 。

脾脏 T、B 淋巴细胞转化能力 淋巴细胞的分离 无菌条件下取每尾鱼脾脏,放入 RPMI1640 培养液中,用棉签将脾脏挤压过 200 目不锈钢网筛后,4 000 r/min 离心 10 min,沉淀细胞悬于 RPMI1640 培养液中,用 Ficoll-Hypaque 细胞分层液(比重 1.082 g/mL)进行水平式密度梯度离心,吸取单个核细胞层,递经洗涤离心重悬,分离淋巴细胞并调整细胞浓度为 6×10^5 个/mL。

采用同位素法测定脾脏 T、B 淋巴细胞转化能力 将淋巴细胞接种于 96 孔圆底板,每孔 100 μL,加入等量的刺激原 PHA(10 μg/mL)或 LPS(20 μg/mL),在 5% CO₂ 培养箱中 29 ℃ 培养,PHA 组培养 72 h,LPS 组培养 120 h,培养后均加入 20 μL ³H-TdR(1.85×10^9 Bq/L),16 h 之内收集细胞,纤维滤纸法制备样品,用液体闪烁计数器测定每分钟脉冲数(cpm),结果以刺激指数(stimulation index, SI)表示。

SI = 添加刺激原组 cpm/未添加刺激原组 cpm

SI(PHA)为 T 淋巴细胞刺激指数,SI(LPS)为 B 淋巴细胞刺激指数。

血清三碘甲状腺原氨酸(T₃),甲状腺素(T₄)水平 使用上海放射免疫分析技术有限公司(同济大学放射免疫研究所)生产的 T₃、T₄ 试剂盒,采用放射免疫分析法(RIA)测定血清 T₃、T₄ 水平。按 0、0.25、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 和 8.0 ng/mL 配制 T₃ 标准液,按 0、1.25、2.5、3.75、5、7.5、10、15、20 和 40 ng/mL 配制 T₄ 标准液,用 SN-695 型智能放免 γ 测量仪进行 γ 计数测定,建立 T₃ 和 T₄ 标准曲线,依据标准曲线计算

血清 T_3 和 T_4 含量。

血清皮质醇水平 使用上海放射免疫分析技术有限公司(同济大学放射免疫研究所)生产的皮质醇试剂盒,采用放射免疫分析法测定血清皮质醇水平。按 0、2.5、5、10、20、40 和 80 ng/mL 配制皮质醇标准液,用 SN-695 型智能放免 γ 测量仪进行 γ 计数测定性,依据皮质醇标准曲线计算血清皮质醇含量。

1.5 统计方法

数据用 ANOVA 进行方差分析、Duncan 氏进行多重比较,试验结果用平均值 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 壳聚糖和益生菌对异育银鲫白细胞数量、分类及吞噬活性的影响

对照组异育银鲫白细胞数量为 $3.82 \times 10^4 / \text{mm}^3$,淋巴细胞、多形核细胞和单核细胞分别占外周血白细胞总数的 51.10%、34.40% 和 14.40%。白细胞吞噬率和吞噬指数分别为 44.43% 和 3.72。

饲料中添加壳聚糖和益生菌对异育银鲫白细胞数量无显著影响,对异育银鲫外周血白细胞的分类和吞噬活性有显著影响(表 1、表 2)。添加壳聚糖和益生菌均可显著提高异育银鲫外周血淋巴细胞数量($P < 0.05$)。0.20% 益生菌组的淋巴细胞数量最多,比对照组提高 21.90%,0.50% 壳聚糖 A 组与 0.20% 益生菌组无显著差

异($P > 0.05$),比对照组提高 19.80%。0.50% 壳聚糖 B 组、壳聚糖 A 和益生菌混合添加组分别比对照组提高 15.90% 和 18.90%。添加壳聚糖和益生菌均可显著降低异育银鲫外周血多形核细胞数量($P < 0.05$)。0.50% 壳聚糖 A 组多形核细胞数量最少,比对照组降低 20.80%。0.50% 壳聚糖 B 组、0.20% 益生菌组、壳聚糖 A 和益生菌混合添加组分别比对照组降低 14.80%、13.90% 和 11.90%。壳聚糖 A 组和壳聚糖 B 组异育银鲫外周血单核细胞数量与对照组无显著差异($P > 0.05$),添加 0.20% 益生菌、壳聚糖 A 和益生菌混合物均可显著降低异育银鲫外周血单核细胞数量($P < 0.05$),分别比对照组降低 7.90% 和 6.90%。添加壳聚糖和益生菌均可显著提高异育银鲫外周血白细胞的吞噬率($P < 0.05$)。0.50% 壳聚糖 A 组、0.50% 壳聚糖 B 组、壳聚糖 A 和益生菌混合添加组、0.20% 益生菌组分别比对照组提高 6.42%、5.37%、3.95% 和 6.41%。4 个试验组之间无显著差异。添加壳聚糖和益生菌均可显著提高异育银鲫外周血白细胞的吞噬指数($P < 0.05$)。0.50% 壳聚糖 A 组白细胞的吞噬指数最高,比对照组提高 19.62%,显著高于其它 3 个试验组。0.50% 壳聚糖 B 组、壳聚糖 A 和益生菌混合添加组、0.20% 益生菌组的吞噬指数分别比对照组提高 10.48%、7.80% 和 10.22%,3 组之间无显著差异。

表 1 壳聚糖和益生菌对异育银鲫外周血白细胞分类的影响

Tab.1 Effect of chitosan and probiotics on leucocytes differential count in peripheral blood %

组别 group	淋巴细胞 lymphocyte	多形核细胞 polymorphocyte	单核细胞 monocyte
对照 control	51.10 \pm 2.9 ^d	34.40 \pm 2.5 ^a	14.40 \pm 0.7 ^{ab}
0.50% 壳聚糖 B 0.50% chitosan B	67.00 \pm 2.4 ^c	19.60 \pm 1.7 ^c	13.40 \pm 2.1 ^b
0.50% 壳聚糖 A 0.50% chitosan A	70.90 \pm 2.0 ^{ab}	13.60 \pm 1.7 ^d	15.60 \pm 0.9 ^a
0.50% 壳聚糖 A + 0.05% 益生菌 0.50% chitosan A + 0.05% probiotics	70.00 \pm 0.9 ^b	22.50 \pm 0.8 ^b	7.50 \pm 1.0 ^c
0.20% 益生菌 0.20% probiotics	73.00 \pm 1.1 ^a	20.50 \pm 0.5 ^c	6.50 \pm 1.1 ^c

注:表中同列不同的上标字母表示差异显著($P < 0.05$),下同。

Notes: Means in the same row with diferent superscripts indicate significant ($P < 0.05$), the same below.

表2 壳聚糖和益生菌对异育银鲫白细胞数量、吞噬活性及脾脏溶菌酶活性的影响
Tab.2 Effect of chitosan and probiotics on leucocyte count, leucocyte phagocytic activity, and lysozyme activity of spleen

组别 group	白细胞数量($10^3/\text{mm}^3$) leucocyte count	白细胞吞噬率(%) phagocytic percentage	白细胞吞噬指数 phagocytic index	脾脏溶菌酶活性(U) lysozyme activity
对照 control	3.82 ± 0.16^a	44.43 ± 3.44^b	3.72 ± 0.25^c	0.038 ± 0.007^d
0.50% 壳聚糖 B 0.50% chitosan B	3.60 ± 0.13^a	49.80 ± 3.95^a	4.11 ± 0.12^b	0.162 ± 0.021^c
0.50% 壳聚糖 A 0.50% chitosan A	3.72 ± 0.45^a	50.85 ± 2.93^a	4.45 ± 0.31^a	0.208 ± 0.043^b
0.50% 壳聚糖 A + 0.05% 益生菌 0.50% chitosan A + 0.05% probiotics	3.77 ± 0.44^a	48.38 ± 2.26^a	4.01 ± 0.22^b	0.250 ± 0.036^a
0.20% 益生菌 0.20% probiotics	3.79 ± 0.38^a	50.84 ± 2.04^a	4.10 ± 0.19^b	0.186 ± 0.077^{bc}

2.2 壳聚糖和益生菌对异育银鲫脾脏溶菌酶活性的影响

对照组脾脏溶菌酶活性为 0.038 U。壳聚糖和益生菌均可显著提高异育银鲫脾脏溶菌酶活性(表2)。0.50% 壳聚糖 A 组、0.50% 壳聚糖 B 组、壳聚糖 A 和益生菌混合添加组、0.20% 益生菌组的脾脏溶菌酶活性分别比对照组提高 447.37%、326.32%、557.89% 和 389.47% ($P < 0.05$), 壳聚糖 A 和益生菌混合添加组脾脏溶菌酶活性显著高于壳聚糖 A、益生菌单独添加组,

壳聚糖 A 组溶菌酶活性显著高于壳聚糖 B 组。

2.3 壳聚糖和益生菌对异育银鲫脾脏 T、B 淋巴细胞转化能力的影响

对照组脾脏 T 淋巴细胞刺激指数为 1.03, B 淋巴细胞刺激指数为 1.16。添加 0.50% 壳聚糖 A 对异育银鲫脾脏 B 淋巴细胞转化能力有显著影响, 刺激指数比对照组提高 54.31%。其它各组的脾脏 B 淋巴细胞刺激指数与对照组无显著差异($P > 0.05$)。各试验组的脾脏 T 淋巴细胞转化能力与对照组也无显著差异(表3)。

表3 壳聚糖和益生菌对异育银鲫脾脏 T、B 淋巴细胞转化能力的影响
Tab.3 Effect of chitosan and probiotics on transformation of lymphocytes in spleen

组别 Group	脾脏 T 淋巴细胞刺激指数(SI) SI of T lymphocyte in spleen	脾脏 B 淋巴细胞刺激指数(SI) SI of B lymphocyte in spleen
对照 control	1.03 ± 0.09^{ab}	1.16 ± 0.01^b
0.50% 壳聚糖 B 0.50% chitosan B	1.27 ± 0.06^a	1.22 ± 0.20^b
0.50% 壳聚糖 A 0.50% chitosan A	1.34 ± 0.33^a	1.79 ± 0.26^a
0.50% 壳聚糖 A + 0.05% 益生菌 0.50% chitosan A + 0.05% probiotics	0.82 ± 0.01^b	1.13 ± 0.11^b
0.20% 益生菌 0.20% probiotics	0.95 ± 0.03^{ab}	1.12 ± 0.12^b

2.4 壳聚糖和益生菌对异育银鲫血清 T_3 、 T_4 、皮质醇水平的影响

壳聚糖和益生菌对异育银鲫血清 T_3 、 T_4 、皮质醇水平有显著影响(表4)。对照组异育银鲫血清 T_3 水平为 1.06 ng/mL。壳聚糖、益生菌或二者混合物对异育银鲫血清 T_3 水平均有显著影响($P < 0.05$), 4 个试验组的血清 T_3 水平均显著高于对照组。0.50% 壳聚糖 B 组、0.50% 壳聚糖 A 组、壳聚糖 A 和益生菌的混合添加组、0.20% 益

生菌组分别比对照组提高 59.43%、71.70%、118.87%、91.51%, 4 组之间无显著差异($P > 0.05$)。对照组异育银鲫血清 T_4 水平为 5.67 ng/mL。除了 0.50% 壳聚糖 B 组之外, 其它 3 组血清 T_4 水平显著低于对照组。0.50% 壳聚糖 A 组、壳聚糖 A 和益生菌的混合添加组、0.20% 益生菌组分别比对照组降低 33.16%、41.09%、38.27%, 3 组之间无显著差异($P > 0.05$)。对照组异育银鲫血清皮质醇水平为 121.20 ng/mL。

壳聚糖或益生菌对异育银鲫血清皮质醇水平均有显著影响($P < 0.05$)。4 个试验组血清皮质醇水平均显著低于对照组。0.50% 壳聚糖 B 组、

0.50% 壳聚糖 A 组、壳聚糖 A 和益生菌的混合添加组、0.20% 益生菌组分别比对照组降低 36.51%、41.23%、19.21%、42.77%。

表 4 壳聚糖和益生菌对异育银鲫血清 T_3 、 T_4 、皮质醇水平的影响
Tab.4 Effect of chitosan and probiotics on T_3 , T_4 and cortisol in serum

组别 group	T_3	T_4	皮质醇 cortisol ng/mL
对照 control	1.06 ± 0.34 ^b	5.67 ± 1.77 ^a	121.20 ± 22.31 ^a
0.50% 壳聚糖 B 0.50% chitosan B	1.69 ± 0.56 ^a	4.74 ± 1.47 ^{ab}	76.95 ± 27.74 ^{bc}
0.50% 壳聚糖 A 0.50% chitosan A	1.82 ± 0.79 ^a	3.79 ± 0.86 ^b	71.23 ± 19.89 ^c
0.50% 壳聚糖 A + 0.05% 益生菌 0.50% chitosan A + 0.05% probiotics	2.32 ± 0.41 ^a	3.34 ± 1.12 ^b	97.92 ± 23.26 ^b
0.20% 益生菌 0.20% probiotics	2.03 ± 0.59 ^a	3.50 ± 1.94 ^b	69.36 ± 17.22 ^c

3 讨论

3.1 壳聚糖和益生菌对异育银鲫白细胞数量及吞噬活性的影响

鱼体具有复杂、有效的防御体系抵御外界微生物、病原体的侵入。在细胞免疫中,白细胞起着重要的作用。本试验壳聚糖和益生菌对异育银鲫外周血白细胞总数虽然无显著影响,但是提高了淋巴细胞的数量,减少了多形核细胞的数量。淋巴细胞是免疫应答过程中起核心作用的免疫活性细胞,在免疫应答中,淋巴细胞可以分泌抗体和淋巴细胞因子。一些学者就壳聚糖、益生菌对鱼类淋巴细胞数量影响的研究得到相似的结果,虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 摄食益生菌^[6]、用壳聚糖浸泡俄罗斯鲟 (*Acipenser gueldenstaedti*)^[7] 均能显著增加淋巴细胞的数量。本试验壳聚糖和益生菌虽然使多形核细胞的数量减少,可能是白细胞的机能代偿作用,其吞噬活性显著增强。对虹鳟、俄罗斯鲟的研究得到了相似的结果, Siwicki 等^[8] 给虹鳟摄食壳聚糖,白细胞的吞噬活性也显著提高, Kolman 等^[7] 用壳聚糖浸泡俄罗斯鲟,白细胞的吞噬活性也显著提高。本试验壳聚糖 A 对异育银鲫淋巴细胞数量、白细胞吞噬活性的影响均优于壳聚糖 B,可见分子量小的壳聚糖对于细胞免疫具有较好的增强效果。

3.2 壳聚糖和益生菌对异育银鲫脾脏溶菌酶活性的影响

溶菌酶是较为重要的水解酶之一。主要作

用于细菌细胞壁的粘多糖,同时对真菌、寄生物以及病毒也有破坏作用^[9]。本试验免疫增强剂均能提高脾脏溶菌酶活性,与壳聚糖在异育银鲫^[10]、益生菌在虹鳟^[11]的应用效果相似,壳聚糖 A 对脾脏溶菌酶活性影响显著高于壳聚糖 B,这与对小鼠血清溶菌酶的研究结果一致^[12];另外,壳聚糖 A 与益生菌混合添加对脾脏溶菌酶活性影响又显著高于其单独添加的效果,说明壳聚糖与益生菌之间至少具有允许作用,是否存在协同作用还有待于进一步的研究。鱼体中溶菌酶的产生与哺乳动物相似,主要由嗜中性粒细胞和单核细胞产生,少量由巨噬细胞产生^[13]。虽然本试验的多形核细胞和部分单核细胞的数量减少,由于吞噬活性的提高,白细胞的机能代偿作用,溶菌酶活性则伴随着吞噬作用的增强而提高。溶菌酶活性的提高能使鱼的抗感染能力尤其是抗细菌感染的能力显著提高。

3.3 壳聚糖和益生菌对异育银鲫淋巴细胞转化能力的影响

淋巴细胞转化率能反映出体内淋巴细胞的功能状态^[3]。本试验对照组脾脏 T、B 淋巴细胞转化率不同于暗纹东方鲀 (*Fugu obscurus*)^[14]、鲤 (*Cyprinus carpio*)^[15],这可能是鱼的种类、组织淋巴细胞分化程度的差异所致。本试验 0.50% 壳聚糖 A 能够促进淋巴细胞的增殖和转化,等量的壳聚糖 B 却不能够促进淋巴细胞的增殖和转化,由此看来,壳聚糖的分子量对鱼类细胞免疫的影响较大,分子量小的具有较好的免疫增强效果。

3.4 壳聚糖和益生菌对异育银鲫血清 T_3 、 T_4 、皮质醇水平的影响

异育银鲫虽然摄食等蛋白、等能饲料,由于饲料中添加壳聚糖或益生菌能够提高消化酶活性^[16],因此提高了异育银鲫对饲料蛋白质和能量的利用。鱼类的营养对甲状腺激素的分泌和5'-单脱碘酶的活性有显著影响^[17-18],蛋白质是影响甲状腺激素产生的重要因子^[4]。美洲红点鲑(*Salvelinus fontinalis*)摄食低蛋白饲料时血清 T_4 水平下降,向 T_3 的转化率降低^[19]。饥饿不仅使虹鳟血清 T_3 、 T_4 水平下降,也会使肝脏的5'-单脱碘酶的活性降低^[20]和 T_3 核受体数量减少^[21]。恢复摄食后,5'-单脱碘酶的活性与饲料蛋白质含量呈正相关,摄食低蛋白饲料的虹鳟肝脏5'-单脱碘酶的活性低于摄食高蛋白饲料组^[18], T_3 水平与5'-单脱碘酶的活性随摄食量的增加而提高^[20]。所以,壳聚糖或益生菌可能是通过提高异育银鲫的营养水平,提高了肝脏5'-单脱碘酶的活性和 T_3 核受体的数量,促进了 T_4 向 T_3 的转化,使血清 T_3 水平升高、 T_4 水平降低,从而提高了甲状腺激素的活性及其生理功能。

鱼类的营养对皮质醇的分泌也有显著影响。虹鳟饲料中含有一定量的色氨酸可以抑制应激反应中血清皮质醇含量的升高^[5];V_C和V_E合用也能抑制中华鳖(*Trionyx sinensis*)酸应激反应中血清皮质醇含量的升高,但二者间无协同作用^[22];高剂量的维生素E对中华鳖血清皮质醇有抑制作用^[23],而维生素E的缺乏,能导致金头鲷(*Sparus auratus*)血清皮质醇含量升高,生长率和存活率下降^[24]。本试验饲料中添加壳聚糖或益生菌也可能是异育银鲫可利用的蛋白质和能量水平的提高抑制了血清皮质醇的水平。

3.5 T_3 、 T_4 、皮质醇对异育银鲫免疫功能的调控

甲状腺激素对鱼类的免疫功能具有调节作用。用 T_4 浸泡斑马鱼(*Danio rerio*),可以促进斑马鱼胸腺的发育和Reg-1(作为成熟淋巴细胞的标记)的表达^[25];在饲料中添加一定量的 T_3 可以提高南亚野鲮(*Labeo rohita*)嗜中性粒细胞活性和免疫球蛋白含量,对嗜水气单胞菌的抗感染能力也显著提高^[26];在饲料中添加适量的甲状腺素能够显著提高草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)白细胞吞噬活性和头肾、脾脏的溶菌酶活性、一氧化氮含量^[27];平鲷(*Rhabdosargus sarba*)感染弧菌后

血清 T_3 、 T_4 含量下降^[28]。

硬骨鱼类的皮质醇对免疫系统亦具有调节作用。皮质醇可降低虹鳟对疾病的抵抗力^[29]。皮质醇可抑制大西洋鲑(*Salmo salar*)的免疫应答,包括吞噬作用和淋巴细胞的有丝分裂,还能减少抗体的产生及IgM的效价^[30]。皮质醇可抑制银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)T、B样淋巴细胞的增殖^[31]。在鲤应激反应中皮质醇能介导B样淋巴细胞的吞噬作用,将B样淋巴细胞从血液中清除,皮质醇可抑制吞噬细胞的吞噬作用^[32-34]。

本试验激素水平与异育银鲫非特异免疫功能变化的一致性说明甲状腺激素、皮质醇对异育银鲫免疫功能也具有调节作用;壳聚糖或益生菌使异育银鲫血清 T_3 水平升高、皮质醇水平降低,通过激素的调控提高了异育银鲫的免疫功能。

参考文献:

- [1] 华雪铭,周洪琪,张冬青,等.多糖和益生菌对暗纹东方鲀免疫功能的调节[J].水产学报,2006,30(2):230-235.
- [2] 陆清儿,刘新轶,李行先,等.壳聚糖及其复合物对三角鲂血清生化指标及免疫功能的影响[J].中国水产科学,2007,14(7):72-77.
- [3] 华雪铭,周洪琪,张冬青,等.壳聚糖和益生菌对暗纹东方鲀抗病力和免疫功能的影响[J].水产学报,2007,31(4):478-486.
- [4] Eales J G, Maclatchy D L, Higgs D A, et al. The influence of dietary protein and caloric content on thyroid function and hepatic thyroxine 5'-monodeiodinase activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Can J Zool, 1992, 70, 1526-1535.
- [5] Olivier L, Vilchez I M, Pottinger T G, et al. Time-course of the effect of dietary L-tryptophan on plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. J Experimental Biol, 2003, 206, 3589-3599.
- [6] Irianto A and Austin B. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) [J]. J Fish Dis, 2002, 25, 333-342.
- [7] Kolman H, Siwicki A K, Kolman R. The effect of natural immunomodulators applied in immersion on non-specific immune responses in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti* Brandt) [J]. Arch Ryb

- Pol; Arch Pol Fish, 1998, 6(2): 391-410.
- [8] Siwicki A K, Anderson D P, Rumsey G L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1994, 41, 125-139.
- [9] 丁燊. 罗非鱼溶菌酶活力的研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2002, 22(3): 3-7.
- [10] 张耀武, 郭黛健, 陈万光. 壳聚糖对异育银鲫生长及非特异性免疫功能的影响[J]. 水利渔业, 2008, 28(4): 50-52.
- [11] Panigrahi A, Kiron V, Kobayashi T, et al. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2004, 102(4): 379-388.
- [12] 丁辉景, 张力, 蒋春茂, 等. 两种壳聚糖对小鼠增重和免疫功能影响的试验研究[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(11): 13-16.
- [13] 安利国, 冯程强, 刑维贤, 等. 灭活疫苗对鲤鱼血清溶菌酶和腹腔吞噬细胞活性的作用[J]. 山东师范大学学报, 1999, 14(2): 175-179.
- [14] 华雪铭, 周洪琪, 余奇文, 等. 环磷酰胺和嗜水气单胞菌对暗纹东方纯免疫抑制的研究[J]. 现代免疫学, 2004, 24(6): 494-498.
- [15] 陈昌福. 柱状嗜纤维菌脂多糖对鲤不同组织中离体培养淋巴细胞转化率的影响[J]. 华中农业大学学报, 1998, 17(1): 66-70.
- [16] 陈勇, 周洪琪, 冷向军, 等. 壳聚糖对异育银鲫生长和消化酶的影响[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 440-445.
- [17] Leatherland J F. Reflection on the thyroidology of fishes: from molecules to humankind[J]. Guelph Ichthyol Rev, 1994, 2, 61-67.
- [18] Leatherland J F, Farbridge K J. Chronic fasting reduces the response of the thyroid to growth hormone and TSH, and alters the growth hormone-related changes in hepatic 5'-monodeiodinase activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1992, 87(3): 342-353.
- [19] Higgs D A, Eales J G. Influence of diet composition on radiothyroxine kinetics in brook trout *salvelinus fontinalis* (Mitchill) [J]. Can J Zool, 1979, 57, 396-402.
- [20] Sweeting R M and Eales J G. The effects of starvation and food intake on hepatic thyroxine 5'-monodeiodinase activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Can J Zool, 1992, 70, 1516-1525.
- [21] Bres O, Cyr D G, Eales J G. Factor influencing the affinity and capacity of T₃-binding sites in hepatic nuclei of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. J Exp Zool, 1998, 254, 63-71.
- [22] 周显青, 牛翠娟, 孙儒泳. 维生素 E 对中华鳖幼鳖生长、肝脏维生素 E 以及血清皮质醇含量的影响[J]. 动物学报, 2003, 49(1): 40-44.
- [23] 周显青, 谢孟峡, 牛翠娟, 等. 维生素 C 和 E 合用对应激和非应激中华鳖幼鳖生长、肝脏维生素 C 和 E 以及血清皮质醇含量的影响[J]. 动物学报, 2004, 50(2): 158-164.
- [24] Montero D, Tort L, Robaina L, et al. Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus auratus*) juveniles [J]. Fish & Shellfish Immunol, 1997, 11, 473-490.
- [25] Lam S H, Sin Y M, Gong Z, et al. Effects of thyroid hormone on the development of immune system in zebrafish [J]. Gen Comp Endocrinol, 2005, 142(3): 325-335.
- [26] Shao P K. Immunostimulating effect of triiodothyronine; dietary administration of triiodothyronine in rohu (*Labeo rohita*) enhances immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* infection [J]. J Appl Ichthyol, 2003, 19: 118-122.
- [27] 华雪铭, 闫大伟, 周洪琪. 壳聚糖通过甲状腺激素对草鱼免疫功能的调节[J]. 中国水产科学, 2008, 15(4): 630-636.
- [28] Deane E B, Li J, Woo N Y S. Hormonal status and phagocytic activity in sea bream infected with vibriosis [J]. Comp Biochem Physiol Part B, 2001, 129: 687-693.
- [29] Fevolden S E, Refstie T, Røed K H. Disease resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for stress response [J]. Aquaculture, 1992, 104(1-2): 19-29.
- [30] Epselid S, Lükken G B, Steiro K, et al. Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunol, 1996, 6: 95-110.
- [31] Maule A G, Schreck C B. Changes in numbers of leukocytes in immune organs of juvenile coho salmon after acute stress or cortisol treatment [J]. J Aquat Anim Health, 1990, 2: 298-304.
- [32] Weyts F A A, Flik G, Rombout J H, et al. Cortisol induces apoptosis in activated B cells, not in other lymphoid cells of the common carp, *Cyprinus carpio*

- L[J]. *Dev Comp Immunol*, 1998, 22: 551–562.
- [33] Weijts F A A, Kemenade B V, Flik G, *et al.* Conservation of apoptosis as an immune regulatory mechanism: effects of cortisol and cortisone on carp lymphocytes[J]. *Brain Behav Immunol*, 1997, 11: 95–105.
- [34] Weijts F A A, Flik G, Rombout J H, *et al.* Immune-endocrine interactions in fish: cortisol induces apoptosis in specific carp leukocytes[J]. *Dev Comp Immunol*, 1997, 21(2): 153–162.

Effects of chitosan and probiotics on non-specific immune function and the levels of serum thyroid hormone and cortisol in allogynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*)

CHEN Yong^{1,2}, HUA Xue-ming², ZHOU Hong-qi^{2*}, ZHANG Dong-qing³

(1. Department of Life Science, Nanjing Xiaozhuang College, Nanjing 211171, China;

2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Medical School, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

Abstract: In order to probe that chitosan and probiotics may regulate immune function of allogynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) by the pathway of triiodothyroxine (T_3), tetraiodothyroxine (T_4) and cortisol in fish, allogynogenetic silver crucian carp (initial weight of 78.31 ± 2.15 g) were fed with control and tested diets which were control diet with 0.50% chitosan A, 0.50% chitosan B, 0.20% probiotics, the complex of 0.50% chitosan A and 0.05% probiotics respectively. The number, differential count and phagocytic activity of peripheral blood leucocyte, lysozyme activities in spleen, lymphocyte proliferation in spleen were measured after 64 d feeding period. The T_3 , T_4 , cortisol levels in serum were assessed by means of radio-immunoassay. Results showed that the supplement with chitosan, probiotics, or the complex of chitosan and probiotics had no notable influence on the number of peripheral blood leucocyte ($P > 0.05$), but it could enhance the lymphocyte count, phagocytic percentage, phagocytic index and lysozyme activity in spleen ($P < 0.05$), and decrease the polymorphocyte count remarkably ($P < 0.05$). The supplement with chitosan, probiotics, or the complex of chitosan and probiotics had no notable influence on transformation of lymphocyte in spleen ($P > 0.05$) but the supplement with 0.5% chitosan A could increase transformation of B lymphocyte in spleen ($P < 0.05$). The supplement with chitosan, probiotics, or the complex of chitosan and probiotics could increase the serum T_3 level ($P < 0.05$) and decrease the serum cortisol and the serum T_4 remarkably ($P < 0.05$) except that the supplement with 0.50% chitosan B had no notable influence on the amount of T_4 ($P > 0.05$). Thus it can be seen that chitosan and probiotics might regulate immune function of allogynogenetic silver crucian carp by the pathway of increase in serum T_3 and decrease in serum cortisol.

Key words: allogynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*); chitosan; probiotics; non-specific immunity; immunomodulation; cortisol; thyroid hormone

Corresponding author: ZHOU Hong-qi. E-mail: hqzhou@shou.edu.cn