



壳寡糖改善珍珠龙胆石斑鱼非特异性免疫能力的机制

陈嘉俊¹, 石韞玉², 施斐¹, 黎烽¹, 邹翠云¹, 徐子正¹,
张梦兰¹, 卢志杰¹, 秦真东^{1*}, 林鑫^{1*}

(1. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心,
广州市水产疫病与水禽养殖重点实验室, 广东广州 510225;
2. 吉林大学珠海学院, 药学与食品科学学院, 广东珠海 519041)

摘要: 为研究壳寡糖 (OCS) 对珍珠龙胆石斑鱼非特异性免疫能力的影响及作用机制, 实验通过在基础实验饲料中分别添加 0(对照组)、200、400 和 800 mg/kg 的壳寡糖投喂珍珠龙胆石斑鱼 4 周, 综合分析壳寡糖对石斑鱼免疫调控作用的影响。实验首先检测了壳寡糖对鱼体内免疫及抗菌相关酶活性的影响。结果显示, 投喂壳寡糖后显著提高珍珠龙胆石斑鱼谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、溶菌酶 (LZM)、过氧化氢酶 (CAT)、碱性磷酸酶 (AKP)、谷草转氨酶 (AST) 和谷丙转氨酶 (ALT) 的活性。其次, 添加壳寡糖可显著提高珍珠龙胆石斑鱼头肾占比。为进一步探究壳寡糖对珍珠龙胆石斑鱼的免疫调控作用, 本实验通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 检测珍珠龙胆石斑鱼头肾中免疫基因的表达情况。结果显示, 壳寡糖对炎症具有双向调控作用, 低剂量壳寡糖会激活炎症因子基因 *IL-6* 和 *IL-1 β* 的表达, 而高剂量壳寡糖会通过 NF- κ B 途径抑制 *IL-6*、*IL-1 β* 和 *TNF- α* 的表达。最后, 通过哈维氏弧菌攻毒实验检测了壳寡糖对珍珠龙胆石斑鱼的免疫保护作用, 结果显示, 壳寡糖能通过 NF- κ B 细胞通路抑制炎症因子 mRNA 的表达, 同时显著抑制了细胞凋亡相关基因的表达。研究表明, 壳寡糖的添加可促进珍珠龙胆石斑鱼的生长, 提高其非特异性免疫, 具有一定的免疫保护作用。本研究为壳寡糖在水产养殖中的应用提供理论参考, 同时为珍珠龙胆石斑鱼的疫病防控提供依据。

关键词: 珍珠龙胆石斑鱼; 壳寡糖; 非特异性免疫; 免疫保护

中图分类号: S 942.1

文献标志码: A

随着我国水产养殖业的不断发展及高度集约化养殖的不断深入, 养殖水域环境不断恶化, 导致多种疫病频发。为了减少疫病带来的经济损失, 养殖户盲目大量使用抗生素药物导致产生越来越严重的耐药性问题, 同时直接或者间接地威胁人类的健康。因此, 寻求一种既能控制疫病、又能减轻环境污染的新型产品刻不容缓。甲壳素是自

然界含量仅次于纤维素的天然多糖, 主要来源于甲壳动物的外骨骼。壳寡糖 (oligochitosan, OCS) 是甲壳素经过高浓度 NaOH 脱乙酰化形成壳聚糖后, 再经酶促反应降解后形成的产物^[1-2]。壳寡糖是氨基葡萄糖和 N-乙酰氨基葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键链接的低聚物, 通常含有 2~10 个氨基葡萄糖, 聚合度 ≤ 20 , 分子量小于 3 ku^[3]。由于壳寡糖聚合

收稿日期: 2021-01-04 修回日期: 2021-02-06

资助项目: 广东省海洋与渔业厅项目 (GDME-2018C006, D21822202); 中国-东盟海上合作基金 (CAMC-2018F)

第一作者: 陈嘉俊 (照片), 从事水产动物病害免疫研究, E-mail: 465135058@qq.com

通信作者: 秦真东, 从事水产动物免疫学研究, E-mail: qinzhendongsc@163.com;

林鑫, 从事水产动物立体养殖疾病流行规律与综合防控研究, E-mail: linli@zhku.edu.cn



度低、水溶性好、易于被肠道吸收、在体内不积累,并且兼具如抗炎、抗肿瘤、抗菌和抗氧化等多种生物活性,被誉为人体第六大生命元素^[4-8]。近些年随着对壳寡糖的深入研究,发现壳寡糖能够促进动物机体免疫效果的提升,在农学、医学等行业中应用并获得良好成效。本团队长期从事壳寡糖的免疫机制研究,在世界上首次克隆了鱼类甘露糖受体,包含草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)^[9]、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)^[10]、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[11]、苏门答腊细须鲃(*Leptobarbus hoevenii*)^[12]和斜带石斑鱼(*Epinephelus daemeli*)。进一步研究表明,甘露糖受体能识别末端为甘露糖、海藻糖、N-乙酰葡萄糖胺等残基的糖类,从而激活机体的呼吸暴发和其他免疫活性^[13-17]。研究表明在饲料中添加一定量的壳寡糖可增强多种水产养殖品种比如黄颡鱼^[18]、团头鲂^[13]、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)^[19]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[20]、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)^[21]、异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)^[22]及黄河鲤(*Cyprinus carpio*)^[23]等的机体生长性能、抗菌和抗氧化能力,从而达到抵抗疫病的目的,因此壳寡糖作为一种新型免疫增强剂,在水产行业中可做为具有抗生素作用的新型饲料添加剂。

珍珠龙胆石斑鱼 [*E. fuscoguttatus*(♀)×*E. lanceolatu*(♂)] 又称龙虎斑或珍珠斑,是通过杂交所获得的石斑鱼新品种,其肉质鲜嫩、营养丰富、成长迅速、抗病力强,是一种具有较高开发利用价值的优良养殖品种^[24-25]。目前珍珠龙胆石斑鱼主要在我国广东、福建、海南等地集中养殖,能够很好地适应池塘、网箱及工厂化的高密度养殖,因此深受养殖户的喜爱。随着珍珠龙胆石斑鱼高密度养殖的迅速推广,近年来其养殖疫病频发^[26],严重制约了珍珠龙胆石斑鱼的健康养殖。其中,哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是水产养殖中常见的致病菌之一,可感染多种海水鱼类^[27]和贝类^[28]等,对水产养殖业健康发展造成严重威胁。目前,国内对于珍珠龙胆石斑鱼的疫病发生案例、针对措施以及生长和免疫增强剂的相关报道较少,而在饲料中添加壳寡糖能否提高珍珠龙胆石斑鱼免疫效果,达到抗病的目的尚未被研究。

本实验以珍珠龙胆石斑鱼为研究对象,通过在其饲料中添加不同剂量的壳寡糖,从生长性能、抗氧化相关酶活性、炎症因子及 *NF-κB* 相关基因

表达等方面研究壳寡糖对珍珠龙胆石斑鱼生长和免疫的调节作用。研究结果可为壳寡糖在水产养殖中的应用提供依据,并为我国水产养殖业健康发展提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康珍珠龙胆石斑鱼 [体质量 (10.5±0.12) g] 购自广东省海洋渔业实验中心养殖基地,壳寡糖(脱乙酰度>90%)购自广东省惠州市长龙生物技术有限公司,基础饲料购自广东越群海洋生物研究开发有限公司。哈维氏弧菌为本实验室分离和保存。

1.2 实验分组和饲喂管理

珍珠龙胆石斑鱼共 450 尾,将其随机分为 4 组,饲养于规格为 5 m × 5 m × 5 m 的户外水泥池中,分别投喂含不同剂量壳寡糖(0、200、400 和 800 mg/kg)的实验饲料,每个处理设置 3 个重复,每日饱食投喂 2 次,持续 4 周。

1.3 血清采集

实验结束后,禁食 24 h,从网箱中随机捞取 6 尾实验鱼,经 100 mg/kg 的 MS-222 麻醉后,用无菌注射器从尾静脉中取血,室温沉降 2 h 后分离血清,置于 -80 °C 保存。

1.4 头肾体指数测定

实验通过头肾体指数(HK-BI)探究壳寡糖对头肾组织的影响^[29]。先称量实验鱼体质量,然后摘取头肾并放入生理盐水中稍加清洗,用吸水纸吸干后立刻称量,记录数据后按照公式进行计算。

$$\text{头肾体指数}(\%) = \frac{\text{头肾重量}}{\text{体质量}} \times 100\%$$

1.5 苏木精-伊红(H.E)染色观察头肾组织变化

投喂实验结束后,采集头肾组织并通过 4% 多聚甲醛固定 24 h。固定后的组织依次放入苏木素和伊红染色剂中染色并冲洗,通过 75%、85%、90% 和 95% 乙醇梯度脱水,将脱水后的头肾组织用石蜡在 -20 °C 冻台上进行包埋处理,随后修正蜡块进行切片,切片厚度为 4 μm。将蜡片晾干后用中性树胶封片,显微镜镜检观察头肾组织变化。

1.6 血清和组织酶活性测定

为检测壳寡糖对珍珠龙胆石斑鱼抗氧化和抗

凋亡作用的影响, 测定珍珠龙胆石斑鱼血清中谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、碱性磷酸酶 (AKP)、溶菌酶 (LZM)、过氧化氢酶 (CAT) 及头肾中 caspase-3 酶的活性。采用试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 进行测定, 测定方法按照试剂盒说明书进行。

1.7 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测免疫相关基因表达

为进一步探究壳寡糖对珍珠龙胆石斑鱼的免疫调控作用, 实验通过 qRT-PCR 检测投喂壳寡糖后珍珠龙胆石斑鱼免疫相关基因的表达, 主要包括肿瘤坏死因子 α 基因 (*TNF- α*)、白细胞介素 6 基因 (*IL-6*)、白细胞介素 1 β 基因 (*IL-1 β*)、白细胞介素 8 基因 (*IL-8*) 及 NF- κ B 细胞通路相关基因 *I κ B- α* 和 *p65*。根据 RNAiso Plus 试剂 (TaKaRa, 大连) 说明书提取头肾组织总 RNA, 并用 Nano-2000 微量分光光度计 (杭州奥盛仪器有限公司) 检测 RNA 纯度和浓度。RNA 按照反转录试剂盒 (Vazyme, 南京) 说明书合成 cDNA, 放入 -20°C 备用。

qRT-PCR 反应体系和反应程序参照 UltraST-BR Mixture (Vazyme, 南京) 试剂说明书, 反应在 qTOWER3 touch3 荧光定量 PCR 仪中进行, 其中免疫相关基因及 *β -actin* 内参基因设置 3 次重复, 引物序列见表 1, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。

1.8 哈维氏弧菌感染实验

通过哈维氏弧菌感染实验检测壳寡糖对珍珠龙胆石斑鱼头肾组织免疫保护的作用。通过前期预实验得知哈维氏弧菌感染珍珠龙胆石斑鱼的半致死浓度为 1.01×10^6 CFU/g。将哈维氏弧菌接种于 LB 培养基中, 28°C 培养过夜后, 用生理盐水洗涤 2 次, 调整细菌浓度为 1×10^7 CFU/mL 备用。投喂实验结束后, 随机从每组网箱中选取 6 尾实验鱼, 用无菌注射器通过腹腔注射哈维氏弧菌菌液 200 μL 进行感染实验, 空白组注射 200 μL 生理盐水, 感染 24 h 后采集头肾组织备用。

1.9 数据分析

实验数据均以平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示 ($n=6$), 显著性差异分析采用 SPSS 26.0 软件的单因素方差分析 (One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。最终结果用 Graphpad prism 8 软件进行作图。

表 1 实验所用引物

引物名称 primers	序列(5'-3') sequences
<i>β-actin</i> F	GACATCAAGGAGAAGCTGTG
<i>β-actin</i> R	TGCTGTTGTAGGTGGTCTCGT
<i>FADD</i> -F	CCTCGTCAACATTAACGACAGGAC
<i>FADD</i> -R	CAGCAGCTCCCTACCATTTCATCC
<i>Fas</i> -F	GGTCGGGTTCAAGTCGTT
<i>Fas</i> -R	GCCTTCACTGCGTCCTCT
<i>Bax</i> -F	AACCAACAAGAAGCTGGCACA
<i>Bax</i> -R	GAGAAGATGAAACGGACGGC
<i>IL-1β</i> -F	AACCTCATCATCGCCACACA
<i>IL-1β</i> -R	AGTTGCCACAAACCGAACAC
<i>IL-6</i> -F	CCGACAGCCCGACAGG
<i>IL-6</i> -R	CTGCTTTTCGTGGCGTTT
<i>IL-8</i> -F	GCCGTCAGTGAAGGGAGTCTAG
<i>IL-8</i> -R	ATCGCAGTGGGAGTTTGCA
<i>TNFα</i> -F	GTGTCCTGCTGTTTGCTTGGTA
<i>TNFα</i> -R	CAGTGTCGACTTGATTAGTGCTT
<i>IκBα</i> -F	TGTTCTCGCTGACCAATCTGT
<i>IκBα</i> -R	CCACTGAATGTCATCATAACCCAC
<i>NFκB-p65</i> -F	CAACGACACCACTAAGACCCAC
<i>NFκB-p65</i> -R	GTCACCAATGAGATGCGAACA

2 结果

2.1 壳寡糖对珍珠龙胆石斑鱼免疫指标的影响

血清免疫指标的影响 饲喂含不同剂量壳寡糖的实验饲料 30 d 后检测血清中 AST、ALT、GSH-Px、LZM、酸性磷酸酶 (ACP)、AKP、CAT 和超氧化物歧化酶 (SOD) 酶活性变化情况。结果显示, 添加 400 和 800 mg/kg 壳寡糖组中的 AST、ALT、GSH-Px 活性显著增加 ($P < 0.05$) (图 1-a~c)。AKP 活性在 200 ($P < 0.05$) 和 400 mg/kg 组 ($P < 0.01$) 均呈现显著增加 (图 1-f)。LZM 和 CAT 活性在 3 组壳寡糖处理中均显著增加 (图 1-d, g) ($P < 0.05$)。而 SOD 在各组别中均无明显差异 (图 1-h)。

壳寡糖提高珍珠龙胆石斑鱼头肾体指数 投喂珍珠龙胆石斑鱼不同添加量壳寡糖实验饲料后, 头肾体指数结果显示, 添加 200 和 400 mg/kg 壳寡糖组头肾体指数呈现显著差异 ($P < 0.05$), 添加 800 mg/kg 壳寡糖头肾体指数呈现极显著差异 ($P < 0.01$) (图 2)。

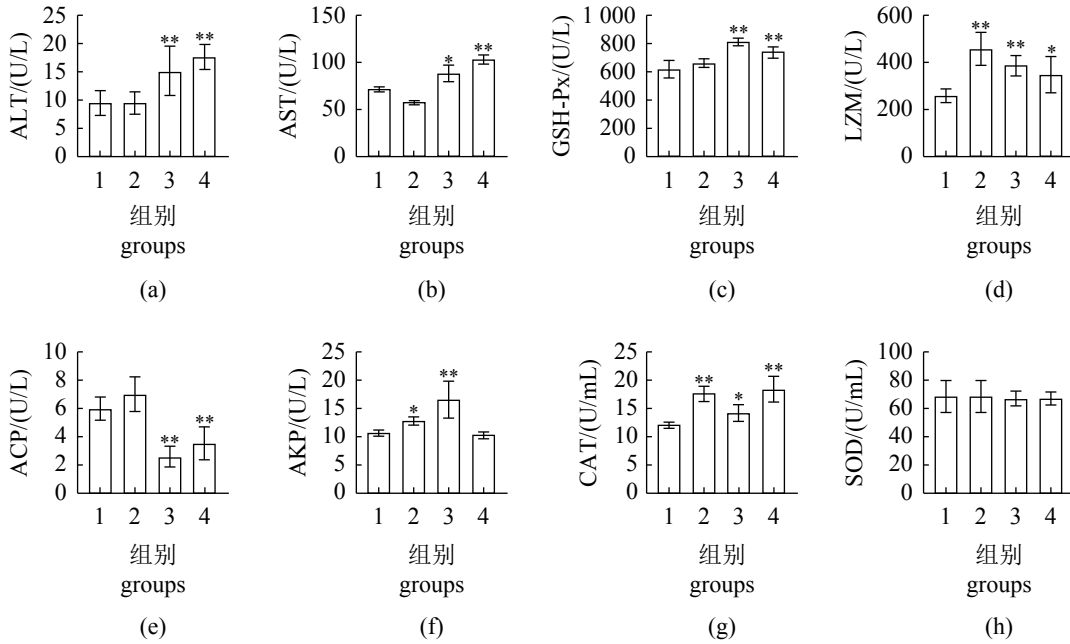


图 1 不同剂量壳寡糖对珍珠龙胆石斑鱼血清非特异性免疫的影响

1. 空白, 2. 200 mg/kg 壳寡糖添加剂, 3. 400 mg/kg 壳寡糖添加剂, 4. 800 mg/kg 壳寡糖添加剂; 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 下同

Fig. 1 Effect of non-specific immune indices in the serum of *E. fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatu* (♂) fed with different concentrations of OCS

1. control, 2. 200 mg/kg OCS, 3. 400 mg/kg OCS, 4. 800 mg/kg OCS; compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, the same below

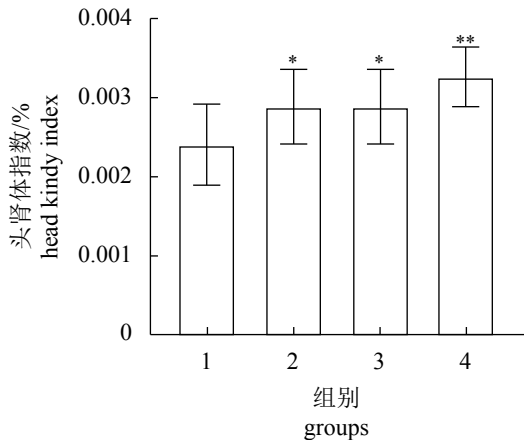


图 2 饲喂不同浓度壳寡糖的珍珠龙胆石斑鱼头肾体指数

Fig. 2 Effect of head kidney index of *E. fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatu* (♂) treated with different dosages of OCS

2.2 壳寡糖对珍珠龙胆石斑鱼免疫因子的双向调控作用

投喂壳寡糖后, 珍珠龙胆石斑鱼炎症因子、*NF-κB* 相关基因的表达水平结果显示, 与正常组相比, 200 mg/kg 壳寡糖组 *IL-6* 和 *IL-1β* 均显著升高 ($P < 0.05$), *TNF-α* 显著降低 ($P < 0.05$)(图 3-a~c);

添加 400 mg/kg 壳寡糖组 *TNF-α*、*IκBα*、*NF-κB/Rel* (*NFκB-p65*) 呈现显著下降 ($P < 0.05$)(图 3-c~e; 添加 800 mg/kg 壳寡糖组 *IL-1β*、*TNF-α*、*IκBα*、*NFκB-p65* 均呈现显著下降 ($P < 0.01$)(图 3-b~e)。

2.3 壳寡糖的免疫保护作用

壳寡糖对哈维氏弧菌感染后珍珠龙胆石斑鱼免疫因子表达的影响 壳寡糖投喂结束后, 通过哈维氏弧菌感染珍珠龙胆石斑鱼实验检测壳寡糖的免疫保护效果。感染哈维氏弧菌后, 不同剂量壳寡糖投喂珍珠龙胆石斑鱼炎症因子和 *NF-κB* 细胞通路相关基因表达结果显示, 与对照组相比, 添加 200 mg/kg 壳寡糖组炎症因子表达量无明显变化 (图 4); 添加 400 和 800 mg/kg 壳寡糖组 *IL-6*、*IL-8*、*TNF-α*、*IL-1β*、*IκBα*、*NFκB-p65* 均呈现极显著下降 ($P < 0.01$)。

壳寡糖对哈维氏弧菌感染后珍珠龙胆石斑鱼头肾的保护作用 哈维氏弧菌感染后, 不同壳寡糖添加量饲料投喂珍珠龙胆石斑鱼后头肾组织 H.E 染色切片结果显示, 对照组头肾组织出现大量空洞、明显坏死崩解现象, 细胞界限不清晰 (图版-1)。与其他组相比, 添加 800 mg/kg 壳寡糖组头肾组织最为完整, 空洞少, 细胞界限清晰

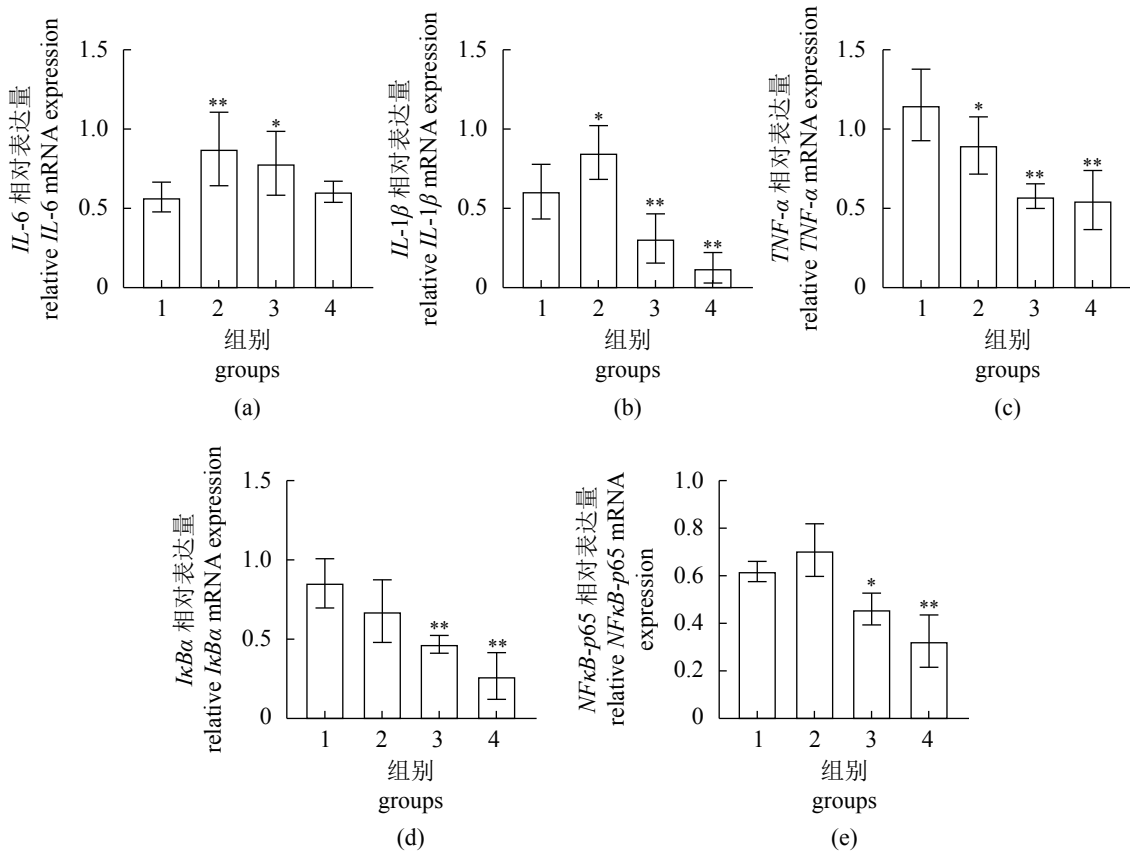


图3 不同浓度壳寡糖添加量对珍珠龙胆石斑鱼头肾组织炎症因子(a~c)和NFκB通路相关基因(d~e)的检测

Fig. 3 Detection of inflammatory cytokines (a-c) and NFκB genes (d-e) in the head kidney of *E. fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatu* (♂) fed with different concentration OCS

(图版-4)。

壳寡糖抑制哈维氏弧菌感染珍珠龙胆石斑鱼后头肾的细胞凋亡。哈维氏弧菌感染后,不同壳寡糖添加量饲料投喂珍珠龙胆石斑鱼后凋亡相关基因和头肾组织Caspase-3活性测定结果显示,在饲料中添加400和800 mg/kg壳寡糖可显著降低凋亡相关基因*Fas*、*Bax*和*FADD*的表达($P < 0.05$)(图5-a~c)。同时在饲料中添加200和400 mg/kg的壳寡糖能显著降低Caspase-3的活性($P < 0.05$),添加800 mg/kg壳寡糖能极显著降低Caspase-3的活性($P < 0.01$)(图5-d)。

3 讨论

近年来壳寡糖作为绿色饲料添加剂已有相关报道,并广泛应用到水产养殖行业中。本实验中,在珍珠龙胆石斑鱼饲料中添加不同剂量的壳寡糖,能够显著提高珍珠龙胆石斑鱼的血清酶活性,从而提高珍珠龙胆石斑鱼的非特异性免疫能力。ACP和AKP是2种重要的磷酸酶,参与如通透性、

生长和细胞分化、蛋白质合成和营养物质的吸收摄取及运输矿物质吸收等多种功能^[30]。投喂适当剂量壳寡糖后,石斑鱼ACP和AKP活性显著提高,表明壳寡糖可以促进石斑鱼营养物质的摄取和吸收,这与吉富罗非鱼(*O. niloticus* GIFT)实验结果相一致。ALT活性升高表明氨基酸代谢旺盛,其合成代谢增强,蛋白质分解减弱,有利于氮在体内的沉积,而AST活性升高则说明尿素生成加快,从而降低了氨基酸代谢产物对机体的毒害^[31]。研究表明,在饲喂壳寡糖后,ALT和AST均显著提高,说明投喂壳寡糖后改善了珍珠龙胆石斑鱼的体内代谢情况。SOD、CAT和GSH-Px是机体抗氧化系统重要的组成部分,主要是清除超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)和过氧化氢(H_2O_2)在内的超氧化物自由基^[32],从而保护机体免受氧化损伤^[33-34],在对花鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[34]的研究中发现,饲料中添加0.2%壳寡糖可显著提高SOD和CAT的活性,起抗氧化的作用,在凡纳滨对虾^[35]的研究中发现,当凡纳滨对虾投喂壳寡糖后血清中

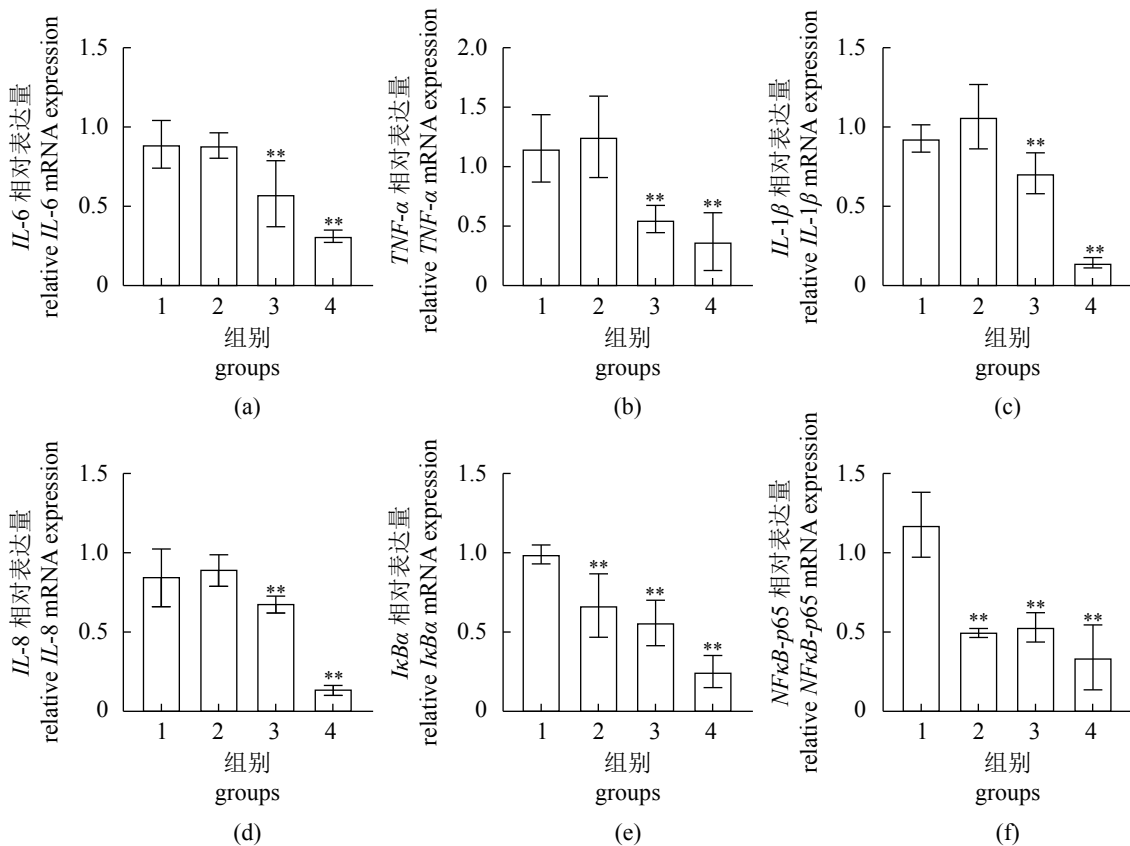


图 4 哈维氏弧菌感染珍珠龙胆石斑鱼后炎症因子 (a~d) 和 NF κ B 通路相关基因 (e~f) 的检测

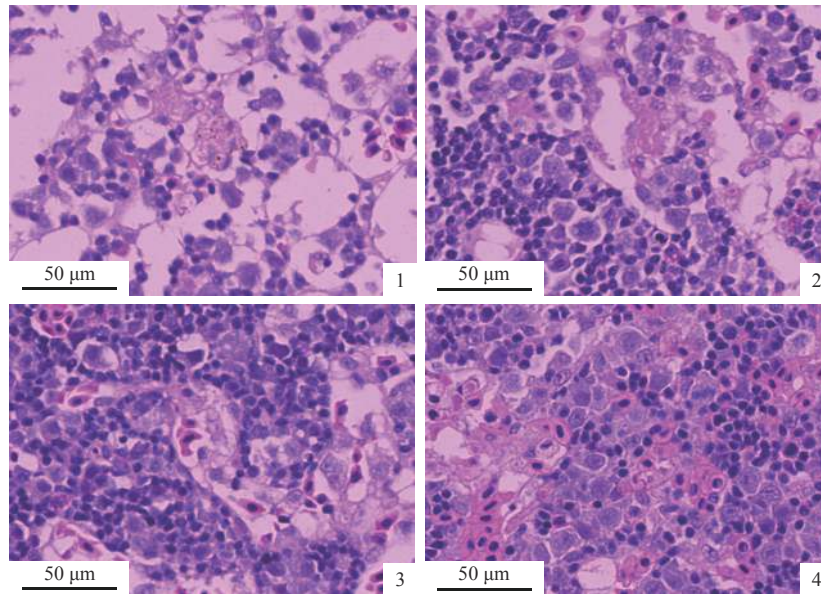
Fig. 4 Detection of inflammatory cytokines (a-d) and NF κ B genes (e-f) after *V. harvey* infection with *E. fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatu* (♂) fed with different concentration OCS

SOD 活性并无显著变化,但在肝胰腺抗氧化酶检测中 SOD 活性显著提高。而在本实验中,在投喂壳寡糖后石斑鱼 GSH-Px 和 CAT 显著提高,说明壳寡糖可能主要通过提高 CAT 和 GSH-Px 的活性来改善石斑鱼的抗氧化能力。LZM 活性是在壳寡糖对鱼类免疫系统影响的报道中最常被观测到的指标,有研究发现壳寡糖对溶菌酶活性具有显著促进作用^[18],在对大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[36] 的研究中发现,在饲料中适量添加壳寡糖可使机体内 LZM 显著升高,而投喂壳寡糖后,可有效提高 LZM 活性,增强机体抗菌活性。

目前已有研究发现,投喂壳寡糖可提高鱼体生长性能,比如在对建鲤 (*Cyprinus carpio* var. *jian*)^[37] 幼鱼和异育银鲫的研究中发现,在饲料中添加壳寡糖可以显著提高鱼体的生长性能。在本实验中给珍珠龙胆石斑鱼投喂添加不同浓度壳寡糖的饲料后,石斑鱼头肾体指数随着壳寡糖的浓度增大而增大。脾脏和头肾是鱼类中重要的免疫器官,也是血细胞发生、抗体生成和粒细胞生成的重要

场所,头肾体指数的上升可能与壳寡糖提高鱼体非特异性免疫能力相关。

炎症相关因子在迅速响应病原体感染和激活免疫细胞以应对细菌攻击方面起着关键作用^[38]。本实验通过使用壳寡糖饲喂珍珠龙胆石斑鱼,在肾组织中检测到相关炎症因子,发现投喂低剂量壳寡糖可提高炎症反应,而高剂量则抑制体内的炎症,这与本实验室早期研究壳寡糖投喂罗非鱼激活炎症因子相关实验^[21] 有相似之处。NF- κ B 信号通路是免疫细胞调控细胞因子表达的重要通路,而复合的 NF- κ B-I κ B 在细胞质中处于稳定的状态,但当巨噬细胞受到刺激时 I κ B 将会磷酸化与 NF κ B 分离,随后被蛋白酶降解,一旦 NF- κ B 从细胞质进入到细胞核,免疫相关基因将会被启动,炎症因子表达量将会上升^[39-40]。多项研究表明,壳寡糖通过 NF- κ B 细胞途径调控下游炎症因子的释放,在小鼠 (*Mus musculus*) RAW264.7 细胞中壳寡糖通过抑制 NF- κ B 细胞通路中 p65 的激活来阻断 LPS 所诱导的炎症因子的上升^[41]。投喂壳



图版 哈维氏弧菌感染后珍珠龙胆石斑鱼头肾组织 H.E 染色切片

1~4 分别表示 0、200、400 和 800 mg/kg 壳寡糖添加量饲料饲喂的珍珠龙胆石斑鱼头肾组织的形态变化

Plate Photomicrographs of the head kidney of *E. fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatu* (♂) treated with different dosages of OCS after being challenged with *V. harvey* by H.E staining

1-4 shows the tissue of head kidney of *E. fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatu* ♂ treated with 0, 200, 400 and 800 mg/kg of OCS after being challenged with *V. harvey*, stained by H.E

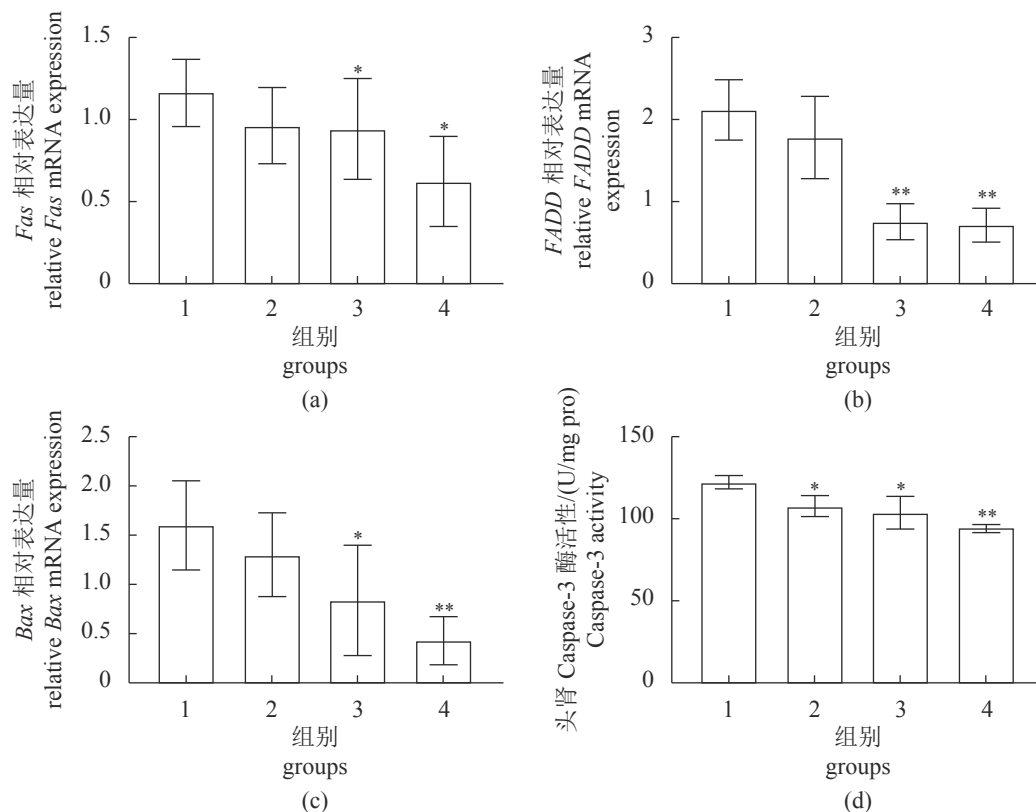


图 5 哈维氏弧菌感染珍珠龙胆石斑鱼后对凋亡基因 (a~c) 和 Caspase-3 活性 (d) 测定

Fig. 5 Detection of apoptotic genes (a-c) and Caspase-3 activities (d) after *V. harvey* infection with *E. fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatu* (♂) fed with different concentration OCS

寡糖后,可能是由于高浓度壳寡糖阻止了 *p65* 转录和向细胞核内移动,从而抑制了炎症因子的产生^[42],而壳寡糖如何控制 *p65* 表达量下降的原因还需进一步实验探明。在饲料中添加适量壳寡糖可提高异育银鲫^[43]对嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的抵抗能力。而在体外实验中,小鼠巨噬细胞 RAW264.7 经过壳寡糖预孵育后可通过有效降低由 LPS 所引起的炎症反应^[44]。为验证壳寡糖的免疫保护机制,本实验中采用哈维氏弧菌对珍珠龙胆石斑鱼进行攻毒实验。攻毒后,珍珠龙胆石斑鱼炎症明显被抑制,说明壳寡糖通过 NF- κ B 途径有效抑制了由哈维氏弧菌侵染机体后所引起的炎症反应,进一步证明了壳寡糖的抗炎机制。

炎症因子大量存在是导致细胞凋亡的重要因素之一,本研究结果表明,高剂量的壳寡糖可以限制抑制炎症因子的表达,为进一步验证壳寡糖的添加是否可以抑制细胞凋亡的发生,实验通过 qRT-PCR 检测了凋亡相关基因和炎症因子基因,发现凋亡相关基因表达量和 Caspase-3 活性下降。根据上述研究结果模拟了以下信号通路:壳寡糖作用于细胞膜表面甘露糖受体,抑制 *p65* 入核,从而导致 NF- κ B 信号通路受到抑制,抑制下游炎症因子的表达,促进抗氧化/氧化酶的表达,降低机体氧化损伤,细胞凋亡受到抑制。综上所述,在饲料中添加壳寡糖可提高珍珠龙胆石斑鱼非特异性免疫、提高生长性能以及降低弧菌感染后所引起的炎症反应和细胞凋亡。本研究结果为壳寡糖在水产中的应用提供了理论参考,也为水产健康养殖提供参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 杨靖亚,郑雯静,李诗怡.壳寡糖的制备及生物活性研究进展[J].国际药学研究杂志,2020,47(7):502-507.
Yang J Y, Zheng W J, Li S Y. Preparation and bioactivity of chitosan oligosaccharide: research advances[J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2020, 47(7): 502-507 (in Chinese).
- [2] 段静,刘广鑫,董晏君,等.解淀粉芽孢杆菌Hz-1510壳聚糖酶基因的克隆、重组表达及其活性[J].水产学报,2017,41(10):1552-1561.
Duan J, Liu G X, Dong Y J, et al. Cloning, expression and activity analysis of chitosanase from *Bacillus amyl-*
- oliquefaciens* Hz-1510[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(10): 1552-1561 (in Chinese).
- [3] Wan J, Jiang F, Xu Q S, et al. New insights into the role of chitosan oligosaccharide in enhancing growth performance, antioxidant capacity, immunity and intestinal development of weaned pigs[J]. RSC Advances, 2017, 7(16): 9669-9679.
- [4] 潘珍,程冬冬,位晓娟,等.壳五糖对骨肉瘤细胞抗肿瘤作用的研究[J].国际骨科学杂志,2020,41(2):114-120.
Pan Z, Cheng D D, Wei X J, et al. Antitumor effect of the pentamer of chitooligosaccharide on osteosarcoma cells[J]. International Journal of Orthopaedics, 2020, 41(2): 114-120 (in Chinese).
- [5] Fernandes J C, Tavarina F K, Soares J C, et al. Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems[J]. Food Microbiology, 2008, 25(7): 922-928.
- [6] Liaqat F, Eltem R. Chitooligosaccharides and their biological activities: a comprehensive review[J]. Carbohydrate Polymers, 2018, 184: 243-259.
- [7] Zhao D, Wang J T, Tan L J, et al. Synthesis of N-furoyl chitosan and chito-oligosaccharides and evaluation of their antioxidant activity *in vitro*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 59: 391-395.
- [8] 吴玉潇,徐海涛,高云华,等.壳寡糖的生物活性研究进展[J].明胶科学与技术,2015,35(3):128-132.
Wu Y X, Xu H T, Gao Y H, et al. Research progress on production of chitooligosaccharides[J]. The Science and Technology of Gelatin, 2015, 35(3): 128-132 (in Chinese).
- [9] Wang L, Liu L C, Zhou Y, et al. Molecular cloning and expression analysis of mannose receptor C type 1 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 43(1): 54-58.
- [10] Liu X L, Tang X C, Wang L, et al. Molecular cloning and expression analysis of mannose receptor in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(7): 4601-4611.
- [11] 刘小玲,王虹,樊启学,等.黄颡鱼甘露糖受体基因的克隆和功能分析[J].水产学报,2017,41(7):1036-1043.
Liu X L, Wang H, Fan Q X, et al. Cloning and functional analysis of mannose receptor from Chinese yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. Journal of Fish-

- eries of China, 2017, 41(7): 1036-1043 (in Chinese).
- [12] 何昕, 秦真东, 张凯, 等. 苏丹鱼甘露糖受体的基因克隆表达和免疫特性[J]. 水产学报, 2020, 44(3): 378-390.
He X, Qin Z D, Zhang K, *et al.* Cloning, expression and immune features of Sultan fish (*Leptobarbus hoevenii*) mannose receptor[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(3): 378-390 (in Chinese).
- [13] Liu L C, Zhou Y, Zhao X H, *et al.* Oligochitosan stimulated phagocytic activity of macrophages from blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) associated with respiratory burst coupled with nitric oxide production[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 47(1): 17-24.
- [14] Wu C S, Zhao X H, Sarath B V, *et al.* Distribution of mannose receptor in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) during the embryonic development and its immune response to the challenge of *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 78: 52-59.
- [15] Zhao X H, Liu L C, Hegazy A M, *et al.* Mannose receptor mediated phagocytosis of bacteria in macrophages of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) in a Ca^{2+} -dependent manner[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 43(2): 357-363.
- [16] Zheng F F, Asim M, Lan J F, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of mannose receptor in zebra fish (*Danio rerio*) during infection with *Aeromonas sobria*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(5): 10997-11012.
- [17] 郝明君. 壳聚糖对团头鲂吞噬细胞功能的调节及其作用机理研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
Xi M J, Modulation of the activity of Wuchangbream (*Megalobrama amblycephala*) phagocytes and research on function mechanism by chitosan[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University 2013 (in Chinese).
- [18] 李明波, 沈凡, 崔庆奎, 等. 壳寡糖对杂交黄颡鱼“黄优1号”(黄颡鱼♀×瓦氏黄颡鱼♂)生长性能与免疫机能的影响[J]. 水生生物学报, 2020, 44(4): 707-716.
Li M B, Shen F, Cui Q K, *et al.* Effects of dietary chitosan oligosaccharide on growth performance and immunity of hybrid yellow catfish "Huangyou No. 1" *Tachysurus fulvidraco*♀×*Tachysurus vachelli*♂[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2020, 44(4): 707-716 (in Chinese).
- [19] 张诗雨, 谢梦琪, 许荔立, 等. 壳寡糖对克氏原螯虾消化酶活性、肠道菌群结构、血清非特异性免疫指标及抗病力的影响[J]. 动物营养学报, 2020, 32(12): 5864-5874.
Zhang S Y, Xie M Q, Xu L L, *et al.* Effects of chitosan oligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora structure, serum non-specific immune indices and disease resistance of *Procambarus clarkii*[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(12): 5864-5874 (in Chinese).
- [20] 陈伟军, 朱传忠, 杨新冬, 等. 壳寡糖对凡纳滨对虾生长、抗氧化能力和肠道结构的影响[J]. 饲料研究, 2019, 42(12): 23-27.
Chen W J, Zhu C Z, Yang X D, *et al.* Effect of chitosan oligosaccharides on growth performance, oxidation resistance and intestinal structure of *Litopenaeus vannamei*[J]. Feed Research, 2019, 42(12): 23-27 (in Chinese).
- [21] Shi F, Qiu X L, Nie L J, *et al.* Effects of oligochitosan on the growth, immune responses and gut microbes of tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 106: 563-573.
- [22] 孙飞, 何杰, 叶元土, 等. 壳寡糖对异育银鲫生长性能、肠道组织结构和非特异性免疫功能的影响[J]. 动物营养学报, 2018, 30(12): 5153-5163.
Sun F, He J, Ye Y T, *et al.* Effects of chitosan oligosaccharide on growth performance, intestinal structure and non-specific immune function of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*)[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018, 30(12): 5153-5163 (in Chinese).
- [23] 范超杰, 熊建利, 吕成才, 等. 饲料中壳寡糖含量对黄河鲤鱼幼鱼血液参数的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医(上半月), 2019(5): 161-164.
Fan C J, Xiong J L, Lü C C, *et al.* Effects of dietary oligosaccharide content on blood parameters of juvenile yellow river carp[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2019(5): 161-164 (in Chinese).
- [24] Song S G, Chi S Y, Tan B P, *et al.* Effects of fishmeal replacement by *Tenebrio molitor* meal on growth performance, antioxidant enzyme activities and disease resistance of the juvenile pearl gentian grouper (*Epinephelus lanceolatus*♂×*Epinephelus fuscoguttatus*♀)[J]. Aquaculture Research, 2018, 49(6): 2210-2217.
- [25] 陈星星, 柯爱英, 潘齐存, 等. 珍珠龙胆石斑鱼营养成分分析与品质评价[J]. 海洋湖沼通报, 2018(1): 90-95.
Chen X X, Ke A Y, Pan Q C, *et al.* Nutritional composition analysis and quality evaluation of pearl gentian grouper (*Epinephelus lanceolatus*)

- ents analysis and nutritive value evaluation of ♀*Epinephelus fuscoguttatus* × ♂*E. lanceolatus*[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2018(1): 90-95 (in Chinese).
- [26] 王宝珍, 葛辉. 珍珠龙胆石斑鱼(*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂)幼鱼溃疡病病原分离及鉴定分析[J]. 渔业研究, 2019, 41(6): 494-501.
- Wang B Z, Ge H. Isolation and identification of pathogen from juvenile pearl gentian grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*♀×*E. lanceolatus*♂) with skin ulcer disease[J]. Journal of Fisheries Research, 2019, 41(6): 494-501 (in Chinese).
- [27] 崔婧, 范雪亭, 刘文竹, 等. 华南地区海水养殖鱼类主要弧菌病原的分离与鉴定[J]. 海南大学学报(自然科学版), 2014, 32(3): 244-251.
- Cui J, Fan X T, Liu W Z, et al. Isolation and identification of *Vibrios* pathogens of marine cultured fishes in Southern China[J]. Natural Science Journal of Hainan University, 2014, 32(3): 244-251 (in Chinese).
- [28] 刘连生, 闫茂仓, 林志华, 等. 引起文蛤暴发性死亡病原菌的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1): 71-77.
- Liu L S, Yan M C, Lin Z H, et al. Pathogens isolation and identification of eruptive epidemic disease in *Meretrix meretrix*[J]. Microbiology, 2009, 36(1): 71-77 (in Chinese).
- [29] 季益平, 匡思雯, 袁子, 等. 银鲳脾脏和头肾的形态与组织学特征[J]. 宁波大学学报(理工版), 2020, 33(4): 1-5.
- Ji Y P, Kuang S W, Yuan Z, et al. Morphological and histological characteristics of spleen and head-kidney of *Pampus argenteus*[J]. Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering), 2020, 33(4): 1-5 (in Chinese).
- [30] He W G, Rahimnejad S, Wang L, et al. Effects of organic acids and essential oils blend on growth, gut microbiota, immune response and disease resistance of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 70: 164-173.
- [31] Yan Q, Xie S, Zhu X, et al. Dietary methionine requirement for juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii*[J]. Aquaculture Nutrition, 2007, 13(3): 163-169.
- [32] 张春暖, 王爱民, 刘文斌, 等. 饲料脂肪水平对梭鱼脂肪沉积、脂肪代谢酶及抗氧化酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20(1): 108-115.
- Zhang C N, Wang A M, Liu W B, et al. Effects of dietary lipid levels on fat deposition, lipid metabolize enzyme and antioxidant activities of *Chelon haematocheilus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(1): 108-115 (in Chinese).
- [33] 唐蕾, 傅明骏, 赵超, 等. 斑节对虾含硒谷胱甘肽过氧化物酶基因全长克隆及表达分析[J]. 水产学报, 2016, 40(11): 1664-1673.
- Tang L, Fu M J, Zhao C, et al. Full-length cDNA cloning and expression analysis of selenium-dependent glutathione peroxidase from *Penaeus monodon*[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(11): 1664-1673 (in Chinese).
- [34] 胡晓伟, 上官静波, 黎中宝, 等. 饲料中添加壳寡糖对花鲈(*Lateolabrax japonicus*)幼鱼的生长、消化和血清生化指标的影响[J]. 海洋学报, 2018, 40(2): 69-76.
- Hu X W, Shangguan J B, Li Z B, et al. Effects of dietary chitosan oligosaccharide on the performance, digestion and serum biochemical indexes of the juvenile Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*)[J]. Haiyang Xuebao, 2018, 40(2): 69-76 (in Chinese).
- [35] Rahimnejad S, Yuan X L, Wang L, et al. Chitooligosaccharide supplementation in low-fish meal diets for pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): effects on growth, innate immunity, gut histology, and immune-related genes expression[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 80: 405-415.
- [36] 蔡胜昌, 张利民, 张德瑞, 等. 壳寡糖与低聚木糖对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)幼鱼生长、体组成和血液生化指标的影响[J]. 渔业科学进展, 2015, 36(6): 29-36.
- Cai S C, Zhang L M, Zhang D R, et al. Effects of chitosan oligosaccharide and xylo-oligosaccharide on the growth performance, body composition and serum biochemistry of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Progress in Fishery Sciences, 2015, 36(6): 29-36 (in Chinese).
- [37] 黄鑫玮, 杨莎莎, 刘毅, 等. 壳寡糖对幼建鲤生长性能、脂肪代谢、非特异性免疫功能和肠道健康的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(7): 2106-2114.
- Huang X W, Yang S S, Liu Y, et al. Effect of dietary chitosan on growth performance, lipid metabolism, non-specific immune function and intestinal health of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *jian*)[J]. Chinese

- [Journal of Animal Nutrition](#), 2015, 27(7): 2106-2114 (in Chinese).
- [38] Yin Z, Lam T J, Sin Y M. Cytokine-mediated antimicrobial immune response of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defence against *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1997, 7(2): 93-104.
- [39] Beinke S, Ley S C. Functions of NF- κ B1 and NF- κ B2 in immune cell biology[J]. [Biochemical Journal](#), 2004, 382(2): 393-409.
- [40] Wei W, Xiao H T, Bao W R, *et al.* TLR-4 may mediate signaling pathways of *Astragalus* polysaccharide RAP induced cytokine expression of RAW264.7 cells[J]. [Journal of Ethnopharmacology](#), 2016, 179: 243-252.
- [41] Yoon H J, Moon M E, Park H S, *et al.* Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells[J]. [Biochemical and Biophysical Research Communications](#), 2007, 358(3): 954-959.
- [42] Li Y, Liu H T, Xu Q S, *et al.* Chitosan oligosaccharides block LPS-induced O-GlcNAcylation of NF- κ B and endothelial inflammatory response[J]. [Carbohydrate Polymers](#), 2014, 99: 568-578.
- [43] 陈云波, 华雪铭, 周洪琪, 等. 壳聚糖对异育银鲫生长及抗菌能力的影响[J]. *上海水产大学学报*, 2006, 15(2): 243-246.
Chen Y B, Hua X M, Zhou H Q, *et al.* Effect of chitosan on growth and resistance to infection of *Aeromonas hydrophila* of allogynogenetic silver crucian carp[J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, 15(2): 243-246 (in Chinese).
- [44] Ma P, Liu H T, Wei P, *et al.* Chitosan oligosaccharides inhibit LPS-induced over-expression of IL-6 and TNF- α in RAW264.7 macrophage cells through blockade of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI3K/Akt signaling pathways[J]. [Carbohydrate Polymers](#), 2011, 84(4): 1391-1398.

Mechanism of oligochitosan improving non-specific immunity of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatu* (♂)

CHEN Jiajun¹, SHI Yunyu², SHI Fei¹, LI Feng¹, ZOU Cuiyun¹, XU Zizheng¹,
ZHANG Menglan¹, LU Zhijie¹, QIN Zhendong^{1*}, LIN Li^{1*}

(1. Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center, Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, College of Animal Sciences and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

2. School of Pharmacy and Food Science, Zhuhai College of Jilin University, Zhuhai 519041, China)

Abstract: The immunomodulatory effect of oligochitosan has been demonstrated in several fishes. However, the underlying mechanisms of oligochitosan (OCS) on immune regulation responses are not well characterized. Here, to investigate the effect of OCS on the non-specific immunity and the mechanism of action in *Epinephelus fuscoguttatus*(♀)×*E. lanceolatu* (♂), the feeding trial in this study was conducted in quadruplicates with the control diet supplemented with OCS at different concentrations (0, 200, 400 and 800 mg/kg) for four weeks, in order to explore the effects of OCS on the immunomodulation of grouper. Subsequently, the effects of OCS on the immune and antibacterial enzyme activities were examined. The results showed that feeding OCS could significantly improve the enzymatic activities of glutathione peroxidase, lysozyme, catalase, alkaline phosphatase, glutamate transaminase and glutamate transaminase in grouper, but had no significant effect on superoxide dismutase. The addition of OCS could significantly increase the weight of the head kidney of grouper. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to further address the immunomodulation stimulated by OCS, the results showed that the expression levels of *IL-6* and *IL-1β* were significantly up-regulated from head kidney by the addition of lower concentrations of OCS, by contrast, addition of higher concentration of OCS inhibited the expression of *IL-6*, *IL-1β* and *TNF-α* via NF-κB pathway. It means that OCS has a bidirectional effect on inflammation in the grouper. The immunoprotective effect of OCS on grouper was detected by the *Vibrio harveyi* challenge test. When the groupers were challenged with *V. harveyi*, the H. E staining results showed that the morphology of head kidney in groupers fed with different concentrations was greatly improved compared with the control group, especially in 800 mg/kg OCS concentration group. Also inflammatory cytokines such as *IL-6*, *TNF-α*, *IL-1β* and NF-κB pathway genes significantly declined in qRT-PCR from kidney of groupers, indicating that OCS could inhibit the inflammation response of mRNA expression inflammatory factors via NF-κB signaling pathway. Additionally, it significantly inhibited the expression of apoptosis-related genes like *Fas*, *FADD*, *Bax* and *Caspase-3* activity. Taken together, appropriate addition of dietary OCS could improve the growth and innate immunity of grouper so as to play a role in the immune protection of the grouper against the infection of *V. harveyi*. Our results shed a new light on the application of OCS in aquaculture, and paved a new way for the prevention and control of the diseases of grouper.

Key words: *Epinephelus fuscoguttatus*(♀)×*Epinephelus lanceolatu*(♂); oligochitosan; non-specific immunity; immune protection

Corresponding authors: QIN Zhendong. E-mail: qinzhendongsc@163.com;

LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn

Funding projects: Foundation of Guangdong Provincial Marine and Fisheries Bureau (GDME-2018C006, D21822202); China-ASEAN Maritime Cooperation Fund (CAMC-2018F)