



干酪乳杆菌发酵人参茎叶提取物对锦鲤免疫及抗氧化功能的影响

孟欣, 于鹏, 单晓枫*, 钱爱东*

(吉林农业大学动物科学技术学院, 吉林 长春 130118)

摘要: 为了研究干酪乳杆菌发酵人参茎叶提取物对锦鲤的免疫及抗氧化功能的影响, 实验先用 3%、4%、5%、6% (记为 L3、L4、L5、L6) 的干酪乳杆菌菌液发酵人参茎叶提取物, 再分别添加到基础饲料 (记为 L0) 中, 对初始平均体重为 (25.00 ± 0.05) g 的锦鲤进行为期 5 周的饲喂实验。周期性取样, 采集锦鲤血清、肝脏、中肾、脾脏和全肠, 以检测相关免疫指标的变化。在饲喂实验结束后进行嗜水气单胞菌攻毒保护性实验。结果显示, 与 L0 组相比, L5 组碱性磷酸酶 (AKP)、免疫球蛋白 M (IgM)、溶菌酶 (LZM)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 含量显著升高, L5 组丙二醛 (MDA) 含量显著低于 L0 组。各组织中 *IL-10*、*TNF- α* 、*TGF- β* 、*IFN- γ* 、*IL-1 β* 基因表达水平均有不同程度的升高, 表现出时空差异, 其中 *IL-10* 的基因水平表达升高更为敏感。在攻毒保护性实验中, L5 组的存活率达到 30%, 相较于其他组而言存活率最高。研究表明, 本实验条件下, 当干酪乳杆菌的接种量为 5% 时, 人参茎叶提取物发酵对锦鲤的应用效果最好, 能够提高锦鲤抗氧化能力及免疫相关基因的表达, 并对降低嗜水气单胞菌的感染有较好的预防作用。

关键词: 锦鲤; 人参茎叶提取物; 干酪乳杆菌; 嗜水气单胞菌; 抗氧化; 免疫调节

中图分类号: S 942.1

文献标志码: A

锦鲤 (*Carassius auratus*) 又名草金鱼, 由于其花色似锦而得名, 是一种重要的观赏鱼类。饲用促生长抗生素在过去的数十年间对保障动物健康发挥了重要作用, 但大量使用抗生素会影响鱼的生长及代谢, 造成肠道菌群的失调, 影响观赏鱼的体色和健康, 导致水体耐药细菌产生^[1-2]。因此, 替抗产品的研究已引起广泛关注。

人参 (*Panax ginseng*) 为五加科 (Araliaceae) 人参属植物, 是中国传统的名贵中草药, 通常为人们所熟知的是人参的根^[3]。人参皂苷作为人参中重要的活性成分, 在人参中含量较多且种类丰富,

药理活性表明其普遍具有抗氧化、抗肿瘤、抗疲劳、调节肠道微生物功能等作用^[4]。我国作为人参栽培大国, 此前人参茎叶一般是作为废料丢弃, 但为了使人参的应用更为多元化, 人参资源尽可能地有效利用, 学者们开始对人参地上部分的化学成分以及相关药理作用进行研究^[5]。稀有皂苷相较于原型人参皂苷而言其生物活性更加多元化, 且更易被机体所吸收, 但其提取方式相对繁难^[6]。在人参的加工品中, 其功效最主要通过稀有皂苷的含量来评价, 因此, 现在已经有大量关于稀有皂苷转化的研究, 且发现人参茎叶所含皂苷

收稿日期: 2022-01-24 修回日期: 2022-04-07

资助项目: 吉林省教育厅项目 (JKH20210367KJ)

第一作者: 孟欣 (照片), 从事动物分子免疫学研究, E-mail: 984628904@qq.com

通信作者: 单晓枫, 从事水生生物病原学研究, E-mail: sxf1997@163.com;

钱爱东, 从事动物疫病与免疫学研究, E-mail: qianaidong0115@163.com



含量是人参各部位中最多的, 皂苷结构更具多样性, 可作为人参皂苷提取的重要资源。因此, 对于人参茎叶资源的利用不仅可以更好的发挥人参的地上价值, 同时可以减少资源浪费, 保护环境。

微生物发酵是中药材的重要炮制手段之一, 在发酵过程中利用微生物将中草药的有效成分更高效地分解出来, 增强或新添功效, 扩大治疗范围^[7]。与此同时, 通过发酵产生新的活性物质, 节约中药材资源的同时增加中药制剂的多元性及安全性^[8]。由于大多数水产动物无法分解组成中药材细胞壁的纤维素和半纤维素, 导致中药材的有效成分很难被鱼体吸收从而产生浪费^[9]。通过益生菌发酵中药技术可以有效地破坏中药材的细胞壁, 使活性成分溶解, 减少药物的用量。另外, 发酵所使用的益生菌还可以调节胃肠道菌群, 改善胃肠道功能, 控制肠道内腐败菌生长^[10]。因此, 益生菌发酵中药在鱼类养殖中的应用逐渐受到重视。

研究表明, 利用益生菌发酵中药的抑菌效果要比单独使用中药水提液或仅用益生菌的效果显著。同时有研究表明, 微生物可以通过去糖基化作用使人参固有皂苷向稀有皂苷转化, 增强人参的药理活性^[11]。随着人们对人参地上部分研究的不断深入, 学者们发现发酵后的人参茎叶中皂苷类成分之间会发生转化, Rg3、Rh2、Rh1 等稀有皂苷的水平有所升高^[12]。其中人参皂苷 Rg3 作为稀有皂苷已被证实可以抑制肿瘤生长, 改善心脏功能^[13]。目前对于益生菌发酵人参茎叶以及其有关活性成分作为饲料添加剂多应用于畜牧业, 在水产领域还尚未见报道, 对于发酵人参茎叶应用于水生动物时所使用的适配菌方面的研究还有待探究。因此, 本实验利用不同干酪乳杆菌 (*Lactocaseibacillus casei*) 菌液接种量作为发酵菌种对人参茎叶进行液体发酵, 将发酵产物与饲料均匀混合后进行动物体内实验, 评估其对于锦鲤免疫及抗氧化功能的影响, 同时筛选出在本实验条件下干酪乳杆菌在发酵人参茎叶提取物时的最佳接种量, 以期益生菌发酵人参茎叶在水生动物养殖中的应用中提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验选用干酪乳杆菌 ATCC393、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila* TPS-30) 均由吉林农业大

学预防兽医学实验室保存。人参茎叶提取物, 即人参茎叶总皂苷, 由吉林农业大学中药学院提供, 测得总皂苷含量 $\geq 80\%$, 采用水提取大孔吸附树脂富集方式制备。

1.2 细菌培养及实验饲料的制备

干酪乳杆菌的活化及培养 将干酪乳杆菌 ATCC393 于 MRS 固体培养基划线, 37 °C 厌氧条件下过夜培养, 接种单菌落于 MRS 液体培养基中, 37 °C 条件下厌氧培养 24 h。将菌悬液 5 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 并加入等量无菌磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 反复离心 3 次, 用平板计数的方法确定干酪乳杆菌的菌液浓度, 调整菌液浓度至 1×10^8 CFU/mL, 置于 4 °C 冰箱保存备用。

中药液制备 称取 4 份中药人参茎叶提取物 (8 g/份), 分别将其置于 4 个已灭菌 50 mL 的锥形瓶中, 每瓶加入 20 mL 蒸馏水, 保证中药提取物均溶于水后, 于 121 °C 下高压灭菌 20 min, 置于 4 °C 冰箱保存备用。

中药发酵液的制备 在 4 个已灭菌的 250 mL 锥形瓶中, 分别加入 200 mL pH 6.0 的 MRS 液体培养基, 随后按 3%、4%、5%、6% (干酪乳杆菌菌液体积/培养体系总体积) 的比例接种干酪乳杆菌菌液, 37 °C 厌氧条件下发酵 24 h 后, 即得到中药发酵液, 测得发酵液 pH 为 3.5。

饲料的制备 将 4 份中药发酵液分别与 1 kg 基础饲料混合均匀, 置于 37 °C 恒温箱烘干后, 即得到 4 种实验饲料, 干酪乳杆菌菌液接种量为 3%、4%、5% 和 6% 的饲料分别记为 L3、L4、L5 和 L6, 对照组饲喂基础饲料记为 L0, 置于 4 °C 下低温避光保存。基础饲料配方中鱼粉 35%、菜籽粕 20%、大豆 18%、小麦粉 18%、酵母粉 6%、氯化钠 1%、维生素 1%、矿物质 1%。营养成分分别为粗蛋白质 33%、粗纤维 8%、粗灰分 12%、粗脂肪 3%、水分 9%、总磷 1%、总赖氨酸 1.5%。

1.3 实验日常管理

实验用锦鲤购买于长春某鱼市, 初始平均体重为 (25.00 ± 0.05) g, 在吉林农业大学水产养殖基地控温单循环养殖系统中进行饲养。实验前 1 周使用高锰酸钾对鱼缸内进行全面消毒, 并提前 3 d 向其内注水。实验锦鲤入水前, 在 3% 浓度的盐水中浸洗消毒 10~15 min。在实验前 2 周使用基础饲料饲喂, 并观察健康情况。暂养期结束后, 挑

选出健康无病的锦鲤 250 尾, 并随机平均分配到 5 个圆柱形玻璃鱼缸内 ($r=40$ cm, $h=110$ cm, 每缸容量约为 550 L)。分别用上述 5 组饲料持续投喂 5 周, 日投饵率为锦鲤平均体重的 3%~4%, 每日分别在 8:00 和 17:00 投喂 2 次。实验在循环水系统中保持 24 h 持续供氧, 每天更换 1/3 的水, 保持养殖期间的水质指标, 水温设定为 27~29 °C, 溶解氧含量大于 5 mg/L, 氨氮值小于 0.02 mg/L。本研究获得了吉林农业大学实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守吉林农业大学伦理规范, 并按照吉林农业大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.4 样品收集与指标检测

样品收集 分别在养殖第 0、7、14、21、28 和 35 天进行取样, 每次取样前空腹 24 h, 每组随机抽取 3 尾鱼, 尾部静脉抽血, 将血液置于 37 °C 温箱 0.5 h 后, 4 °C 冰箱过夜, 4 °C、5 500 r/min 离心 15 min 后, 提取血清, 分装置于 -80 °C 冰箱中保存。无菌条件下采集脏器 (肝胰脏、脾脏、中肾、全肠), 液氮速冻后, 置 -80 °C 冰箱保存, 用于后续相关免疫指标的测定。

血清学指标检测 溶菌酶 (LZM)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP)、免疫球蛋白 M (IgM)、过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 以及丙二醛 (MDA) 均使用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒进行检测, 具体检测方法依照试剂盒说明书进行操作。

细胞因子表达量的测定 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 的方法检测锦鲤各脏器组织中 *IL-10*、*TNF- α* 、*TGF- β* 、*IFN- γ* 和 *IL-1 β* 的相关表达量。所需研钵均在烘干箱 170 °C 干热 4 h 后使用, 操作台为提 RNA 专用操作台, 枪头、离心管均为无 RNA-free。按 BioFlux 总 RNA 提取试剂盒说明书, 提取各脏器组织总 RNA, 将总 RNA 反转录为 cDNA, 置于 -80 °C 保存。以各组织的 cDNA 作为模板, 进行 qRT-PCR 操作, 反应体系 20 μ L: 2 \times Taq mix 10 μ L, 上下游引物各 1 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 无菌水补充至 20 μ L。反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 55~61 °C 退火 30 s (不同引物退火温度不同), 40 个循环。对照组样品作为参照, 每个样品设定 3 个重复, 内参基因选择 *β -actin* (表 1)。

1.5 攻毒保护性实验

饲喂实验结束后, 选择嗜水气单胞菌 TPS 进行攻毒实验。每组选择 20 尾规格相近的鱼, 每尾腹腔注射 1×10^8 CFU/mL 的嗜水气单胞菌 0.1 mL 后恢复投饵, 并记录攻毒后 14 d 内各组锦鲤的发病症状以及死亡情况, 初步检测不同干酪乳杆菌液接种量的发酵产物对锦鲤嗜水气单胞菌攻毒的保护效果。

1.6 数据分析

除攻毒保护性实验外, 其余结果均采用 SPSS 20.0 软件进行单因素方差分析, 若方差分析显著, 进一步利用 Duncan 氏进行多重比较, 显著水平设

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequence of qRT-PCR

基因 genes		引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	长度/bp size	登录号 accession no.	退火温度/°C T_m
<i>IL-10</i>	上游	GGAACGATGGGCAGATCAA	1 120	HQ259106.1	55
	下游	AACTGAAGGGGAAGGGGAAG			
<i>IL-1β</i>	上游	AACTGATGACCCGAATGGAAAC	1 283	AJ249137.1	57
	下游	CACCTTCTCCAGTCGTCAAA			
<i>TGF-β</i>	上游	CTGGCTCTTGCTCTTTCGTCT	1 134	EU086521	56
	下游	AAGGATGGGCAGTGGGTCT			
<i>TNF-α</i>	上游	TTATGTCGGTGCGCCTTC	490	EU069818.1	61
	下游	AGGTCTTCCGTTGTGCGCTTT			
<i>IFN-γ</i>	上游	AACAGTCGGGTGTCGCAAG	901	EU909368.1	58
	下游	TCAGCAAACATACTCCCCAG			
<i>β-actin</i>	上游	CAAGATGATGGTGTGCCAAGTG	1 471	AB039726.2	55
	下游	TCTGTCTCCGGCACGAAGTA			

定为 0.05。

2 结果

饲喂实验结束时, 各组体重均有增加, 平均体重为 (30.16±0.07)g。4 个饲喂发酵液组别存活率均为 100%, 体表健康, 活力正常, 摄食情况均较好, 每天 2 次投食可在 5~10 min 吃完。

2.1 不同发酵液对锦鲤血清生化指标的影响

与 L0 组相比, L4、L5 和 L6 组 AKP 活性均在整个实验期间有明显的上升趋势, 并显著高于

L0 组 ($P<0.05$); 其中 L5 组在第 35 天时达到 AKP 活性的最高值 (图 1)。L5 组 LZM 活性在第 28 天时 LZM 活性达到最高, 显著高于 L0 组 ($P<0.05$), 其他组别的上升趋势并不显著 ($P>0.05$)。各发酵液组间相比较, L5 组 SOD 活性上升最为明显, 从第 21 天开始呈现持续上升趋势, 并在第 35 天时达到最高, 显著高于 L0 组 ($P<0.05$), 其余 3 个发酵液组别的 SOD 活性在整个实验期间上升趋势并不显著 ($P>0.05$)。四个发酵液处理组的 CAT 活性均表现上升趋势, 其中 L5 组上升趋势最为显著, 在第 28 天时活性显著升高并达到最高值 ($P<0.05$)。

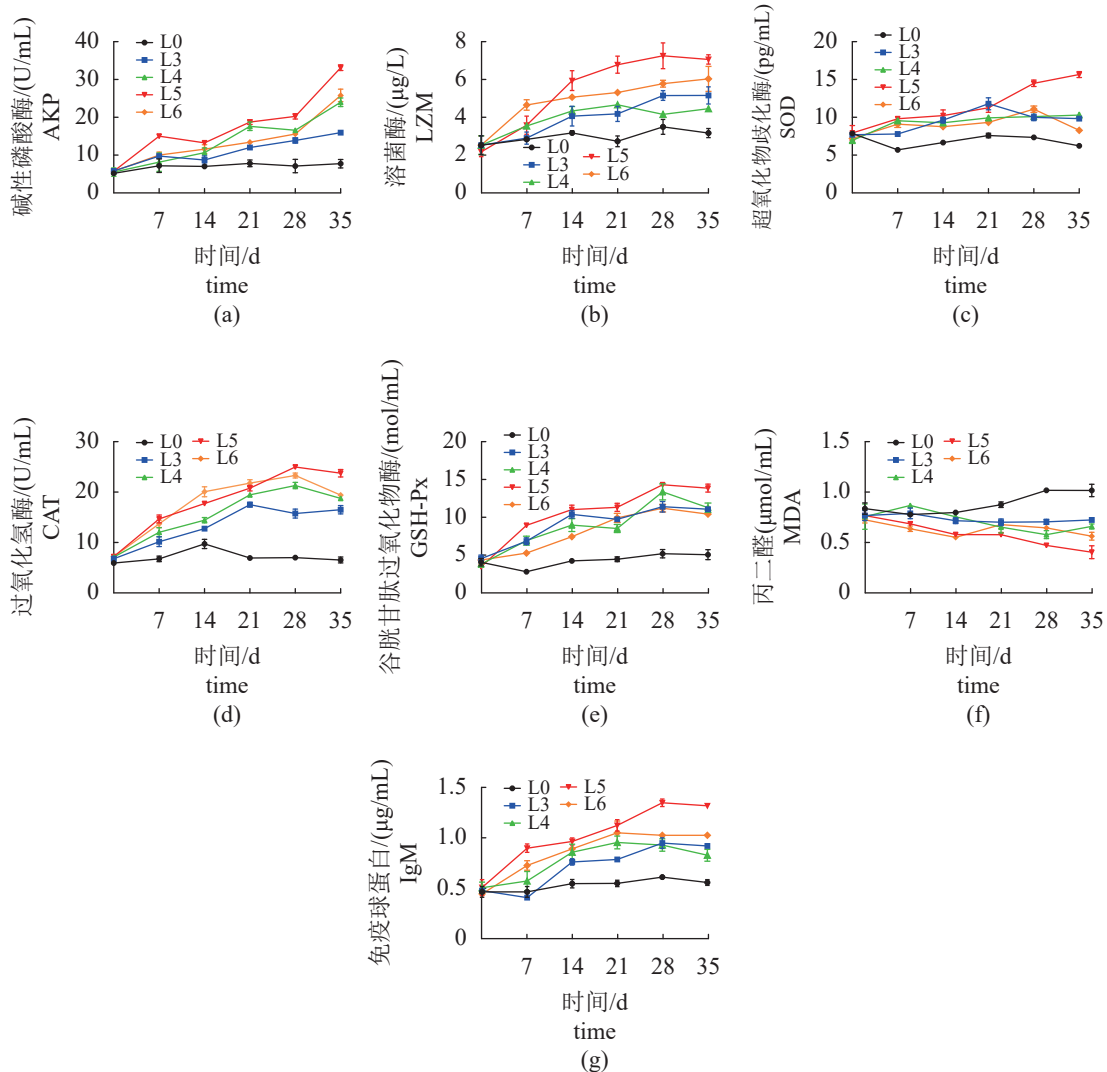


图 1 不同发酵液对锦鲤血清生化指标的影响

L0. 对照组, L3. 干酪乳杆菌接种量 3% 的发酵液, L4. 干酪乳杆菌接种量 4% 的发酵液, L5. 干酪乳杆菌接种量 5% 的发酵液, L6. 干酪乳杆菌接种量 6% 的发酵液; 下同。

Fig. 1 Effects of different fermentation products on serum biochemical parameters of *C. auratus*

L0. control group, L3. fermentation broth group with 3% inoculation amount of *L. casei*, L4. fermentation broth group with 4% inoculation amount of *L. casei*, L5. fermentation broth group with 5% inoculation amount of *L. casei*, L6. fermentation broth group with 6% inoculation amount of *L. casei*; the same below.

4组发酵液处理组别 GSH-Px 活性在整个实验期间均表现出不同程度的上升, 其中 L5 组上升最为明显, 并在第 28 天时达到最高值, 与 L0 组相比有显著差异 ($P<0.05$)。与 L0 组相比, 4 个发酵液处理组 MDA 含量均呈下降趋势, 但各组下降趋势并不显著 ($P>0.05$), 其中 L5 组在第 35 天时达到最低。各发酵液处理组的 IgM 活性均有上升趋势, 但并不明显 ($P>0.05$), 但 L5 组在第 28 天时 IgM 活性最高。

2.2 不同发酵液对锦鲤免疫相关基因表达的影响

发酵产物对锦鲤各脏器组织中不同免疫相关基因的表达量影响显著 (图 2)。在肝胰脏组织中, 与 L0 组相比, *IL-10* 和 *TNF- α* 基因表达水平整体随干酪乳杆菌菌液接种量的增加呈先上升后下降的趋势, L5 组均在第 35 天达到最高值, 表达量与 L0 组均有显著的差异 ($P<0.05$)。 *IFN- γ* 基因表

达量在 L6 组第 28 天时最高, 与 L0 组有显著的差异 ($P<0.05$)。四个经发酵液处理的组别中, *TGF- β* 基因表达水平均随时间的增加呈先上升后下降的趋势, 其中 L5 组在第 14 天时表达量达到最高值, 与 L0 组有显著差异 ($P<0.05$)。 *IL-1 β* 基因的表达量在第 21 天时 L5 组表达量最高, 显著高于 L0 组 ($P<0.05$)。

在脾脏组织中, *IL-10* 基因从第 21 天开始, L4 组、L5 组、L6 组有了显著的上升趋势 ($P<0.05$), 其中在第 28 天时 L5 组的基因表达量最高 (图 3)。 *TNF- α* 、*IFN- γ* 的基因表达量均随饲喂时间的增加呈现持续上升的趋势, 并在第 35 天时达到最高值, 其中 L5 组的 *TNF- α* 和 *IFN- γ* 基因表达水平均最高, 与 L0 组有显著的差异 ($P<0.05$)。 *IFN- γ* 的基因表达水平随着干酪乳杆菌菌液接种量的增加呈先上升后下降的趋势, 在浓度达到 5% 时表达量达到最高值, 同时第 35 天时 L4 组、L5 组、L6 组均显著高于 L0 组 ($P<0.05$), 其中 L5 组表达量最

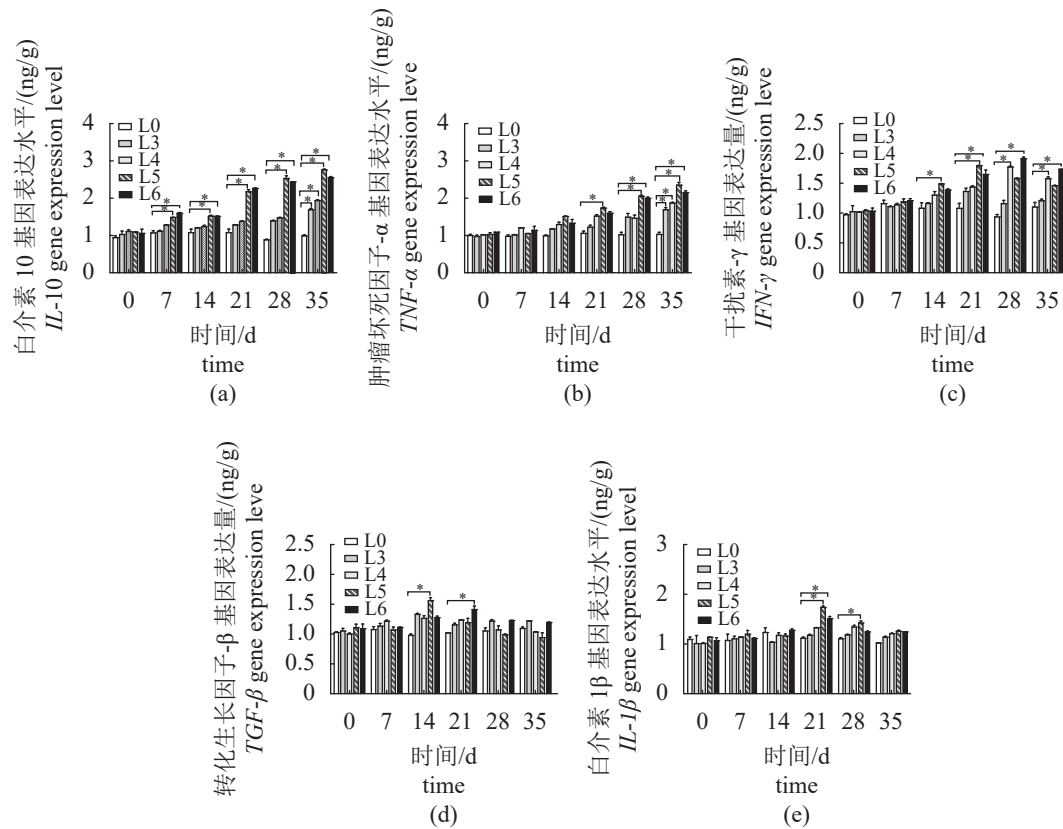


图 2 不同发酵液对锦鲤肝胰脏免疫炎症因子的 mRNA 表达水平的影响

* 代表具有显著差异, $P<0.05$, 下同。

Fig. 2 Effects of different fermentation products on the mRNA expression levels of immune inflammatory factors in the hepatopancreas of *C. auratus*

* means significant differences, $P<0.05$, the same below.

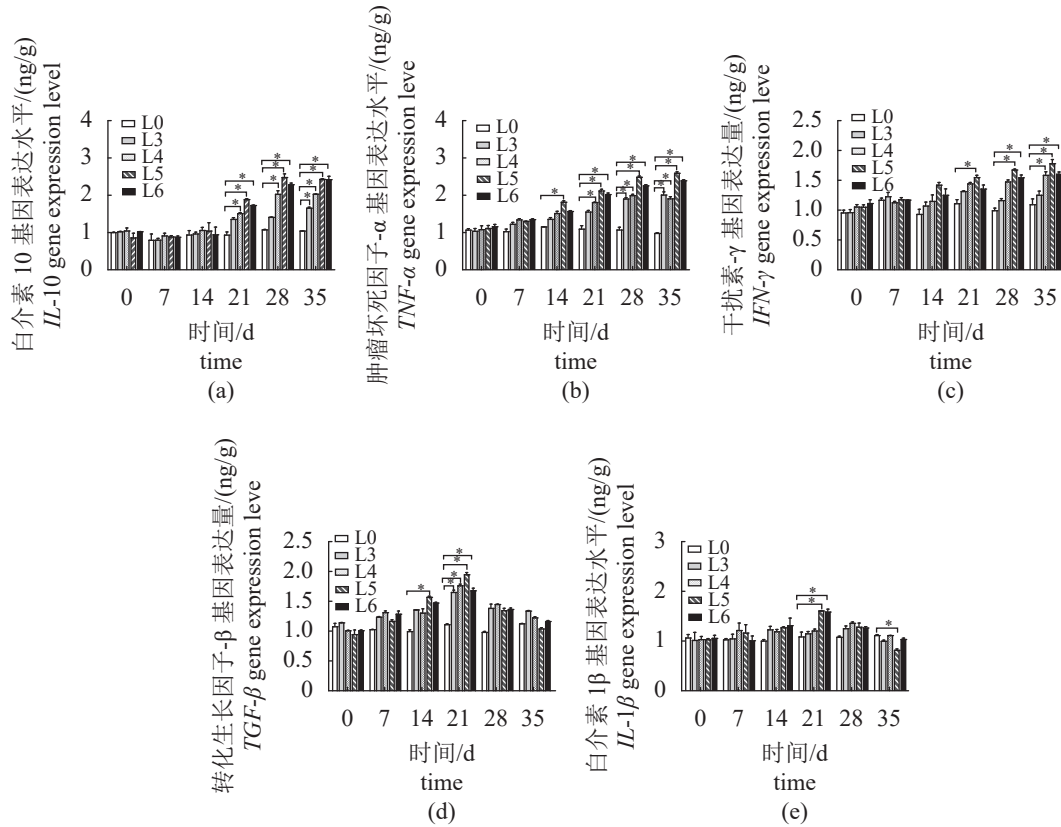


图3 不同发酵液对锦鲤脾脏免疫炎症因子的 mRNA 表达水平的影响

Fig. 3 Effects of different fermentation products on the mRNA expression levels of immune inflammatory factors in spleen of *C. auratus*

高。4个发酵液处理组 *TGF-β* 的基因表达水平整体随饲喂时间的增加呈先上升后下降的趋势, 均在第21天时达到最高, 其中L5组的表达量最高并于L0组有显著差异 ($P < 0.05$)。与L0组相比, 各组 *IL-1β* 基因表达水平随饲喂时间的增加呈先上升后下降的趋势, 其中L5组表达量与L0组有显著差异 ($P < 0.05$)。

在中肾组织中, *IL-10* 基因的表达量上升趋势最为敏感, 在第35天时4个发酵产物处理组均有显著的提高 ($P < 0.05$), 同时L5组 *IL-10* 基因的表达量最高(图4)。*TNF-α* 的基因表达水平随时间增加呈现持续上升的趋势, 在第35天时L4组、L5组、L6组均有明显的升高, 均显著的高于L0组 ($P < 0.05$), 其中L6组 *TNF-α* 的水平最高。*IFN-γ* 基因的表达水平在整个饲喂时间中呈先升高后下降的趋势, 并从第21天开始L5组、L6组的表达量均有明显上升, 与L0组有显著差异 ($P < 0.05$)。*TGF-β* 基因表达量在第21天时达到最高, 其中L5组、L6组均和L0组有显著差异 ($P < 0.05$)。*IL-1β* 基因在第21天时L6组与有显著的上升 ($P < 0.05$),

L5组在第28天时显著的高于L0组 ($P < 0.05$), 其他组别并无显著升高趋势 ($P > 0.05$)。

在全肠组织中, 与对照组相比, 发酵产物处理组 *IL-10*、*TNF-α* 和 *IFN-γ* 的水平随着干酪乳杆菌菌液接种量的升高而呈现先上升后下降的趋势, L5组表达量最高, 显著高于L0组 ($P < 0.05$); 并且均在第21天有了显著的升高, L5组均在第35天时达到最高值, 但其中 *IL-10* 的水平升高最为敏感。*TGF-β* 基因的表达水平在整个饲喂时间内呈先上升后下降的趋势, L5组第21天时达到最高水平, 与对照组有显著的差异 ($P < 0.05$)。*IL-1β* 基因的表达水平随着干酪乳杆菌菌液接种量的增加呈现先上升后下降的趋势, L5组表达量最高, 从第21天开始便显著的高于L0组 ($P < 0.05$)(图5)。

2.3 攻毒实验结果

攻毒实验结果显示, L0组在9d内全部死亡, 并且腹部出现肿胀, 体表出血, 解剖后发现腹腔内多脏器出现出血或化为血水等现象(图6)。L3组在13d内全部死亡, L5组的存活率相较于其他

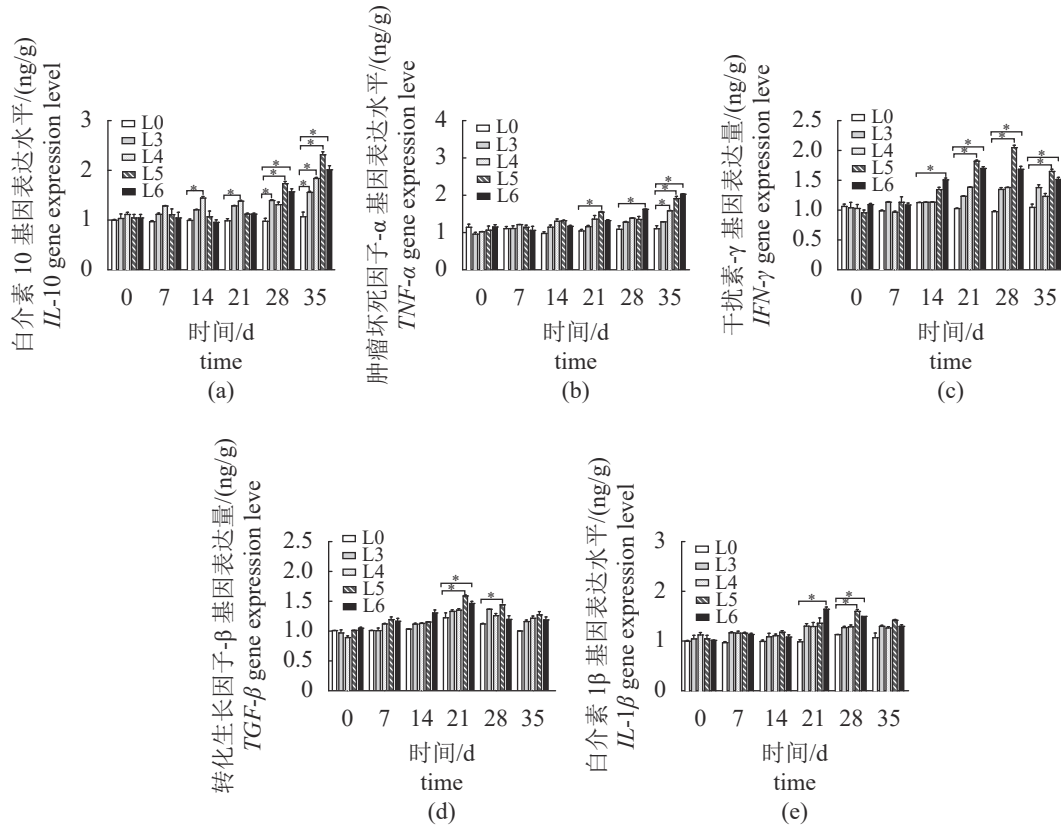


图4 不同发酵液对锦鲫中肾免疫炎症因子的 mRNA 表达水平的影响

Fig. 4 Effects of different fermentation products on the mRNA expression levels of immune inflammatory factors in mesonephridium of *C. auratus*

组而言最高, 达到 30%, L6 和 L4 组存活率分别为 20% 和 10%。

3 讨论

3.1 不同发酵液对于锦鲫血清生化指标的影响

体液免疫指标对于鱼生理和健康情况起着非常重要指示作用, 反映了机体营养和环境的变化。AKP、IgM 和 LZM 均在机体的非特异免疫防御中发挥着重要的作用, 在机体受到病毒侵害时可迅速分泌从而起到抵御病原的作用^[14]。AKP 是一种胞外金属酶类, 可加快吞噬细胞的吞噬, 提高水生动物机体免疫力^[15]。IgM 作为体液免疫重要组成部分, 是介导体液免疫的重要效应分子, 可与相应抗原特异性结合, 发挥体液免疫功能。LZM 是单核巨噬细胞的分泌酶, 可水解细胞壁中黏肽的乙酰氨基多糖并使之裂解, 破坏侵入机体的有害细菌, 从而帮助机体达到防御的目的^[16]。有研究表明, 乳酸菌作为饲料添加剂可以增加黏膜特异性免疫反应, 从而提高机体血清中 LZM 及 IgM

活性^[17-18]。Mohammadian 等^[19]研究中还发现饲料中添加干酪乳杆菌可以使鲤 (*Cyprinus carpio*) 血清 AKP 和 LZM 活性升高。有学者发现, 利用益生菌对于中药进行发酵同样可以提高鲤鱼抗感染能力以及非特异性免疫能力^[20]。本实验选择干酪乳杆菌对人参茎叶提取物进行发酵, 其发酵产物可以提高锦鲫血清中 AKP、IgM、LZM 活性, 在干酪乳杆菌接种量为 5% 时活性达到最高值。进一步说明该发酵产物能够激活锦鲫非特异性免疫应答, 分泌免疫相关酶类。

氧化应激是水生动植物发生疾病的主要原因之一, SOD、CAT 和 GSH-Px 作为机体抗氧化酶, 其活性的高低可以直接反映出机体的抗氧化水平^[21]。SOD 主要作用是将超氧阴离子转变为 H_2O_2 , 从而降低氧化毒性, 以阻止氧自由基对细胞造成伤害^[22]。GSH-Px 作为可以在机体分解的酶, 可以催化 GSH 和 H_2O_2 的反应, 将 H_2O_2 转变为 H_2O , 起到保护细胞膜结构和功能的完整的作用^[23]。CAT 则可以将 H_2O_2 转变为 H_2O 和 O_2 , 可以清除对机体有害的超氧自由基, 降低机体氧化应激反

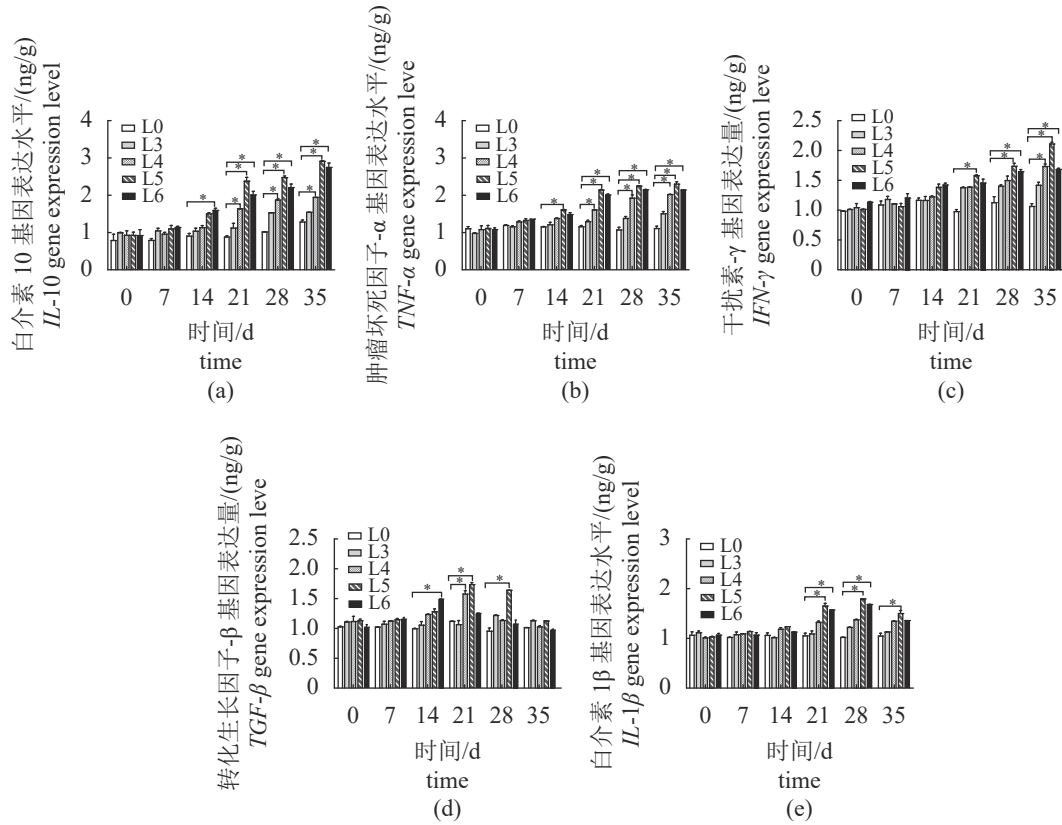


图 5 不同发酵液对锦鲤全肠免疫炎症因子的 mRNA 表达水平的影响

Fig. 5 Effects of different fermentation products on the mRNA expression levels of immune inflammatory factors in intestine of *C. auratus*

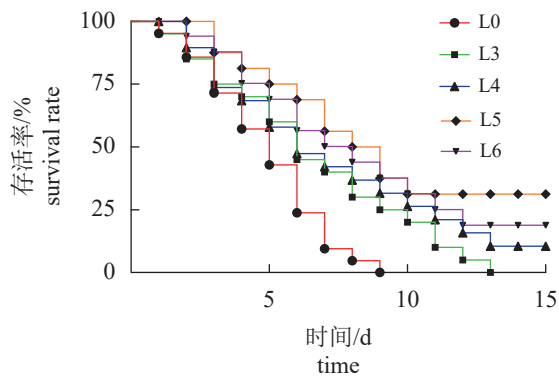


图 6 不同发酵液对锦鲤攻毒后存活率的影响

Fig. 6 Effects of different fermentation products on survival rate of *C. auratus* after challenge

应^[24]。MDA 是用于反映氧化损伤的典型参数, 具有细胞毒性, 会加剧细胞脂膜氧化, 其含量的高低间接的反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度^[25]。有研究表明, 鱼类肠道定植的乳酸菌具有抗氧化活性, 蔡红丹等^[26]在对点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 的研究中发现, 饲料中添加益生菌可以显著的提高鱼血清中 SOD 的活性。发酵人

参茎叶在畜牧业的应用相对较多, 牟柏德^[27] 在实验中添加酵母菌混合菌种发酵人参茎叶药渣, 发现蛋鸡产蛋的蛋黄中 SOD 和 GSH-Px 含量显著高于对照组, MDA 含量显著低于对照组。李艳娇等^[28] 研究发现, 饲喂添加发酵人参茎叶的饲料可提高小鼠 (*Mus musculus*) 血清中 SOD 的含量, 降低 MDA 的含量, 说明发酵人参茎叶可对机体的抗氧化能力有所提高。这也证实了人参茎叶在发酵后其产物中所包含的活性物质以及其药理作用更为丰富。本研究结果显示, 在饲料中添加干酪乳杆菌发酵人参茎叶产物可提高锦鲤血清中 SOD、CAT、GSH-Px 的活性, 降低 MDA 的含量。吕战旗等^[29] 研究发现, 利用黄体菌发酵丹参可显著提高丹参的抗氧化活性。屈青松等^[30] 研究发现, 利用发酵乳杆菌发酵人参, 发酵产物中皂苷含量均有一定升高, 可对人参皂苷进行转化, 人参匀浆 SOD 活性也较发酵前有所提高。在本研究也显示发酵后的人参茎叶对于锦鲤机体抗氧化能力有一定的促进作用, 猜测是发酵使人参茎叶中的皂苷发生转化, 稀有皂苷的含量升高, 发酵产物中多

物质共同作用所致。因为技术手段的限制, 本研究中未能对发酵前后的人参茎叶进行稀有皂苷的定量分析。

3.2 不同发酵液对于锦鲤免疫基因表达的影响

细胞因子具有调节先天性免疫、适应性免疫以及受损组织修复等作用, 可迅速响应病原体感染和激活免疫细胞以应对细菌的攻击^[31]。IL-10 作为机体的重要抗炎因子之一, 具有促使 B 细胞增殖分化及抗体分泌的效应, 是与免疫应答密切相关的调节因子^[32]。IL-10 和 IFN- γ 对于激活巨噬细胞活性和促进淋巴细胞增殖均具有调节作用, 是天然免疫系统的重要刺激因子, 常被用作免疫调节研究中的参考基因^[33]。TNF- α 能够提高中性粒细胞的吞噬能力, 诱导正常细胞增殖与分化, 在机体受到病毒和细菌的侵袭时能增加抗感染作用^[34]。IL-1 β 在机体损伤以及病原入侵时被活化, 能够独立杀菌或诱导细胞凋亡, 进而达到清除病原的功能^[35]。TGF- β 是新近发现的调节细胞生长和分化的活性多肽类物质, 对细胞的生长、分化和多种生理、病理过程发挥重要调节作用^[36]。本实验中各组织 IL-10、TNF- α 、TGF- β 、IFN- γ 、IL-1 β 的表达水平均有不同程度升高, 其中 IL-10 的表达水平升高更敏感。不同组织对于基因表达量响应的先后时间也有一定的不同, 在本实验条件下, 全肠组织对于各基因的响应均较快速, 除了 IFN- γ 基因外, 全肠组织中其他各基因的表达水平均在第 14 天时表现出显著的上升 ($P < 0.05$)。肝胰脏组织中对于 IL-10 水平的表达与其他组织相比更为快速, 从第 7 天开始干酪乳杆菌菌液接种量较高的组别便表现出显著的升高 ($P < 0.05$)。上述结果表明, 人参茎叶发酵液对机体的免疫调节可能存在时空差异。中药有效成分通常是经肠道菌群转化之后发挥肠道消炎的作用, 但考虑到鱼类个体肠道菌群的差异性以及肠道微生物的复杂性, 通过益生菌体外发酵后服用效果会更好^[37-38]。人参也具有调节肠道微生物的作用, 与益生菌发酵可以促进益生菌的生长, 抑制有害菌的生长^[39]。Jang 等^[40] 给予患有结肠炎的小鼠口服乳酸菌发酵红参, 发现其 TNF- α 以及相关炎症基因的表达有升高, 提高其药效的同时可以防治肠道炎症类疾病。鱼类与畜禽类动物相比, 消化道短, 消化能力弱, 肠道壁结构薄且简单, 更容易受到损伤, 所以对于鱼类肠道的健康应该受到重视^[41]。孔雨

昕等^[42] 利用 3 种乳酸菌饲喂乌鳢 (*Channa argus*) 发现其各组织中 IL-1 β 、IL-10 和 TNF- α 基因表达水平均有不同程度升高, 在肠道组织中均有促进作用。Kong 等^[43] 研究发现, 重组干酪乳杆菌经鲫鱼口服后, 鲫肝脏、脾脏、肾脏和肠中 IL-10、IL-1 β 、IFN- γ 和 TNF- α 水平在组织中显著上调, 提示重组干酪乳杆菌具有诱导细胞因子表达、增强先天免疫应答的能力, 与本研究结果相似。王雨珊等^[12] 研究发现, 发酵乳杆菌发酵人参后可以提高其中 Rg3 和 Rh2 等稀有人参皂苷的含量, 其中 Rg3 可显著改善肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡形态, Rh2 可抑制肝脏纤维化, 口服给药可以缓解小鼠酒精性肝损伤, 抑制肝胰脏炎症反应。说明发酵后的人参可以对肝胰脏有一定的保护作用。对于益生菌发酵中药在鱼类养殖中对于免疫相关因子的作用机制还有待进一步探究。

3.3 不同发酵液对于锦鲤攻毒后存活率的影响

研究发现, 嗜水气单胞菌是引起淡水鱼类绝大多数细菌性疾病的病原菌, 因此, 采用嗜水气单胞菌作为攻毒实验的感染菌株, 能较好地评价该发酵产物对于锦鲤抗病力的影响^[44]。通过攻毒保护性实验评价发酵产物的保护性, 结果显示, 发酵产物处理的组别存活率高于对照组的存活率, 其中 L5 组的存活率最高。表明干酪乳杆菌发酵产物对锦鲤具有保护作用, 可以一定程度抵抗病原菌感染, 当干酪乳杆菌的接种量为 5% 时发酵产物的保护效果最好。Harikrishnan 等^[44] 在金鱼 (*C. auratus*) 的研究中发现, 在摄食中草药后其对于嗜水气单胞菌的抵抗能力有所升高, 死亡率降低, 证实了中草药对于鱼体的免疫保护作用。覃初斌^[45] 在研究干酪乳杆菌对斑马鱼 (*Danio rerio*) 抵御气单胞菌感染的实验中发现, 干酪乳杆菌可以显著提高维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) 攻毒后斑马鱼的存活率, 说明益生菌作为饲料添加剂可以增强鱼体的免疫, 从而提高存活率。谢全喜等^[46] 发现, 在饲料中添加鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 发酵的中草药后, 能有效抵抗肉鸡对于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感染。Gu 等^[18] 发现, 利用乳酸杆菌发酵复方中药的抑菌效果要比单独使用中药水提液或仅用益生菌的效果显著, 并可以显著缓解大肠杆菌所引起的仔猪腹泻, 这也表明通过益生菌发酵中药可以提高其抗菌抗病毒作用。本研究中, 发酵液组对嗜水气单胞菌 (*A.*

hydrophila) 的抗感染能力增强, 推测由于酪乳杆菌、人参茎叶提取物中活性成分以及发酵所产生的新物质共同作用所致。研究表明, 人参茎叶皂苷即是免疫增强剂又是免疫调节剂, 能明显提高抗感染的能力^[47]。田丰群等^[48]发现, 人参茎叶皂苷体内治疗可使感染后的创伤小鼠死亡率明显降低, 表明其可以促进创伤后细胞的免疫功能, 进而增强机体对伤后感染的抵抗力。这也证实了人参茎叶对于机体的免疫保护作用具有一定的贡献。

4 结论

综上所述, 利用酪乳杆菌发酵人参茎叶, 其发酵产物可以提升锦鲤抗氧化以及先天免疫应答的能力, 并证实了该发酵产物可有助于鱼体较好的预防并降低嗜水气单胞菌的感染。本实验条件下 5% 为最佳酪乳杆菌接种量。有关益生菌发酵中药的相互作用机理还需进一步挖掘。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 葛玲瑞, 安建国, 刘科均, 等. 酵母菌和芽孢杆菌发酵饲料对草金鱼体色、消化及肠道菌群组成的影响[J]. 饲料研究, 2021, 44(9): 66-70.
Ge L R, An J G, Liu K J, *et al.* Effect of yeast and *Bacillus* fermentation feed on body color, digestion and intestinal flora composition of grass goldfish (*Carassius auratus* red var.) [J]. Feed Research, 2021, 44(9): 66-70 (in Chinese).
- [2] Yang K C, Qi X Z, He M S, *et al.* Dietary supplementation of salidroside increases immune response and disease resistance of crucian carp (*Carassius auratus*) against *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 106: 1-7.
- [3] 黄贻杰, 董林林, 尉广飞, 等. 抗人参根腐病生防菌剂的研发与评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(2): 182-190.
Huang Y J, Dong L L, Wei G F, *et al.* Development and evaluation of biocontrol agents against *Panax ginseng* root rot [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2022, 28(2): 182-190 (in Chinese).
- [4] 崔磊, 金护定, 尹成日. 人参总皂苷的发酵及其产物的抗癌活性研究[J]. 延边大学学报(自然科学版), 2014, 40(4): 314-319.
Cui L, Jin H D, Yin C R. Fermentation of ginseng total saponins and anticancer activity of fermentation products [J]. Journal of Yanbian University (Natural Science), 2014, 40(4): 314-319 (in Chinese).
- [5] 李俊峰, 刘千辉, 苏凤艳, 等. 人参茎叶对鹌鹑生长、免疫器官指数和血液生化指标的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(3): 31-36, 42.
Li J F, Liu Q H, Su F Y, *et al.* Effect of ginseng stem and leaf on growth performance, immune organ indices and blood biochemical indices of quail [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2017, 45(3): 31-36, 42 (in Chinese).
- [6] 曾露露, 丁传波, 刘文丛, 等. 人参稀有皂苷药理活性的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(3): 680-682.
Zeng L L, Ding C B, Liu W C, *et al.* Advances in pharmacological activities of ginseng rare saponins [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2018, 29(3): 680-682 (in Chinese).
- [7] 郭新, 闫子鹏, 李光辉, 等. 2种中药复方联合植物乳杆菌对抗生素相关性腹泻的缓解作用[J]. 山西农业科学, 2021, 49(2): 229-235.
Guo X, Yan Z P, Li G H, *et al.* Alleviation effect of two kinds of traditional chinese medicine compound combined with *Lactobacillus plantarum* on antibiotic-associated diarrhea [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2021, 49(2): 229-235 (in Chinese).
- [8] 耿欣. 发酵技术在中药研究中的应用[J]. 中医药信息, 2011, 28(4): 149-150.
Geng X. Application of fermentation technology in the study of Traditional Chinese Medicine [J]. Information on Traditional Chinese Medicine, 2011, 28(4): 149-150 (in Chinese).
- [9] 苗艳, 朱庆贺, 兰世捷, 等. 中药益生菌发酵在兽医临床中的研究进展[J]. 现代畜牧科技, 2021(9): 14-17, 22.
Miao Y, Zhu Q H, Lan S J, *et al.* Research progress of probiotics fermentation in veterinary clinic [J]. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 2021(9): 14-17, 22 (in Chinese).
- [10] 李一雪, 张尊琴, 宋虹. 多糖与益生菌相互作用研究进展[J]. 渤海大学学报(自然科学版), 2021, 42(3): 217-223.
Li Y X, Zhang Z Q, Song H. Research progress in the interaction between polysaccharides and probiotics [J]. 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- Journal of Bohai University (Natural Science Edition), 2021, 42(3): 217-223 (in Chinese).
- [11] 张晗. 人参皂苷 Rg1 通过抑制 NLRP1 炎症小体活化减轻 APP/PS1 小鼠的 A β 沉积和神经元损伤 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2021.
Zhang H. Ginsenoside Rg1 alleviates A β deposition and neuronal damage by inhibiting NLRP1 inflammasome activation in APP/PS1 mice[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2021 (in Chinese).
- [12] 王雨珊, 游颖, 李万丛, 等. 发酵乳杆菌发酵人参缓解酒精性脂肪肝损伤的研究[J]. 食品科技, 2018, 43(5): 59-66.
Wang Y S, You Y, Li W C, *et al.* Alleviation of alcoholic liver injury by fermented ginseng with *Lactobacillus fermentum*[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(5): 59-66 (in Chinese).
- [13] 王洪羽, 金宏, 刘威, 等. 人参皂苷Rg3抗肿瘤作用的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(68): 50-51.
Wang H Y, Jin H, Liu W, *et al.* Research progress of ginsenoside Rg3 antitumor effect[J]. World Latest Medicine Information, 2018, 18(68): 50-51 (in Chinese).
- [14] He M S, Liu G Y, Liu Y H, *et al.* Effects of geniposide as immunostimulant on the innate immune response and disease resistance in crucian carp[J]. *Aquaculture*, 2020, 529: 735713.
- [15] Ho C M, Ho M C, Shau W Y, *et al.* Isolated increase in serum alkaline phosphatase after liver transplantation: risk factors and outcomes analysis[J]. *International Journal of Surgery*, 2013, 11(1): 92-95.
- [16] Rauta P R, Nayak B, Das S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms[J]. *Immunology Letters*, 2012, 148(1): 23-33.
- [17] Pourgholam M A, Khara H, Safari R, *et al.* Dietary administration of *Lactobacillus plantarum* enhanced growth performance and innate immune response of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2016, 8(1): 1-7.
- [18] Gu W, Sun M J, Yang W T, *et al.* Effects of TCMs and *Lactobacillus* strains on immunosuppressed mice and bacteriostatic effect on *Escherichia coli* K88 after fermentation[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2019, 33(1): 1291-1302.
- [19] Mohammadian T, Nasirpour M, Tabandeh M R, *et al.* Synbiotic effects of β -glucan, mannan oligosaccharide and *Lactobacillus casei* on growth performance, intestine enzymes activities, immune-hematological parameters and immune-related gene expression in common carp, *Cyprinus carpio*: an experimental infection with *Aeromonas hydrophila*[J]. *Aquaculture*, 2019, 511: 634197.
- [20] 赵倩, 陈玉春, 高绪娜, 等. 枯草芽孢杆菌发酵中药制剂对鲤鱼生长性能、生化指标、抗氧化指标及抗感染能力的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(3): 724-731.
Zhao Q, Chen Y C, Gao X N, *et al.* Effect of fermented Chinese medicine preparation by *Bacillus subtilis* on growth performance, biochemical indices, antioxidant parameters and ability of anti-infection of common carp[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 44(3): 724-731 (in Chinese).
- [21] 孙全贵, 龙子, 张晓迪, 等. 抗氧化系统研究新进展[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(11): 2197-2200, 2190.
Sun Q G, Long Z, Zhang X D, *et al.* Novel progress in antioxidant system[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16(11): 2197-2200, 2190 (in Chinese).
- [22] 李琴, 毛双法, 李敏, 等. 石斛多糖保护中波紫外线损伤成纤维细胞的作用机制[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(8): 1284-1289.
Li Q, Mao S F, Li M, *et al.* Protective effect and mechanism of dendrobium on fibroblasts damaged by ultraviolet B[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2022, 26(8): 1284-1289 (in Chinese).
- [23] 杜美莲, 张善宝, 乔诚, 等. 益气活血方联合西药治疗慢性肾脏病对患者氧化应激及微炎症状态的影响[J]. 海南医学, 2021, 32(21): 2752-2755.
Du M L, Zhang S B, Qiao C, *et al.* Effects of Yiqi Huoxue recipe combined with western medicine on oxidative stress and micro-inflammatory status in patients with chronic kidney disease[J]. *Hainan Medical Journal*, 2021, 32(21): 2752-2755 (in Chinese).
- [24] 朱彦哲. 大黄牡丹汤治疗重症急性胰腺炎临床观察[J]. 中国中医药现代远程教育, 2021, 19(24): 81-83.
Zhu Y Z. Clinical observation on Dehuang Mudan decoction in the treatment of severe acute pancreatitis[J]. *Chinese Medicine Modern Distance Education of China*, 2021, 19(24): 81-83 (in Chinese).
- [25] 王荣, 吴成蓉, 李冰, 等. 槐米提取物对衰老模型小鼠运动能力的影响及机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 42(1): 1-7.

- 2021, 32(12): 1752-1756.
- Wang R, Wu C R, Li B, *et al.* Study on effects and mechanism of *Sophorae flos* extract on exercise performance of subacute aging model mice[J]. *Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology*, 2021, 32(12): 1752-1756 (in Chinese).
- [26] 蔡红丹, 莫坤联, 胡永华, 等. 饲料中添加复合芽孢杆菌对石斑鱼生长、免疫及肠道菌群的影响[J]. *饲料研究*, 2021, 44(21): 64-70.
- Cai H D, Mo K L, Hu Y H, *et al.* Effect of composite *Bacillus* on growth, immunity and gut microbiota of grouper (*Epinephelus coioides*)[J]. *Feed Research*, 2021, 44(21): 64-70 (in Chinese).
- [27] 牟柏德. 发酵人参茎叶药渣对蛋鸡生产性能、蛋品质及血液指标的影响 [D]. 延吉: 延边大学, 2015.
- Mou B D. The effect of feed additive of fermented ginseng leaf dregs on performance of hens, egg quality and blood parameters[D]. Yanji: Yanbian University, 2015 (in Chinese).
- [28] 李艳娇, 史焕, 孙景童, 等. 发酵人参茎叶对小白鼠消化率、生长及血液抗氧化能力的影响[J]. *饲料研究*, 2015(14): 72-74.
- Li Y J, Shi H, Sun Y T, *et al.* Digestibility, growth and effect of ginseng stem and leaf on mice Blood antioxidant capacity[J]. *Feed Research*, 2015(14): 72-74 (in Chinese).
- [29] 吕战旗, 常娟, 宁长申, 等. 益生菌发酵中草药的特性及在动物生产中的应用[J]. *中国饲料*, 2019(13): 66-69.
- Lv Z Q, Chang J, Ning C S, *et al.* Characteristics of probiotics fermented Chinese herbal medicine and its application in animal production[J]. *China Feed*, 2019(13): 66-69 (in Chinese).
- [30] 屈青松, 林峰, 赵崇妍, 等. 发酵乳杆菌发酵人参工艺优化及人参皂苷抗氧化活性测定[J]. *中成药*, 2020, 42(10): 2738-2743.
- Qu Q S, Lin F, Zhao C Y, *et al.* Optimization of fermentation process of ginseng by *Lactobacillus fermentum* and determination of ginsenoside antioxidant activity[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2020, 42(10): 2738-2743 (in Chinese).
- [31] 丰培金. 鱼类细胞因子研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 2005, 41(8): 44-46.
- Feng P J. Advances in the study of fish cytokines[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2005, 41(8): 44-46 (in Chinese).
- [32] 田佳鑫. 表达维氏气单胞菌 *flaA* 和 *flaB* 基因重组干酪乳杆菌的制备及免疫效果研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.
- Tian J X. Construction and immune efficacy of recombinant *Lactobacillus casei* expressing *flaA* and *flaB* of *Aeromonas veronii*[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [33] Xia Y, Lu M X, Chen G, *et al.* Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 76: 368-379.
- [34] 冯馨锐, 崔雨舒, 何志涛, 等. 肿瘤坏死因子- α 的生物学功能研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2019, 40(1): 66-68.
- Feng X R, Cui Y S, He Z T, *et al.* Advances in biological functions of tumor necrosis factor- α [J]. *Journal of Jilin Medical University*, 2019, 40(1): 66-68 (in Chinese).
- [35] 莫波, 雍鑫, 乔丽娟, 等. 白细胞介素-1 β 对结肠癌干细胞迁移及诱导上皮-间质转化的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(21): 2901-2904.
- Mo B, Yong X, Qiao L J, *et al.* Effect of interleukin-1 β on colon cancer stem cell metastasis and induces epithelial-mesenchymal transition[J]. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2021, 37(21): 2901-2904 (in Chinese).
- [36] 徐进, 杨波. miR-152-3p对血管平滑肌细胞的作用及其机制研究[J]. *川北医学院学报*, 2020, 35(4): 583-587, 615.
- Xu J, Yang B. Effects of miR-152-3p on vascular smooth muscle cells and the underlying mechanism[J]. *Journal of North Sichuan Medical College*, 2020, 35(4): 583-587, 615 (in Chinese).
- [37] 刘波, 张鹏翼, 孟祥璟, 等. 益生菌发酵中药方法概述及其应用研究进展[J]. *中国现代中药*, 2020, 22(10): 1741-1750.
- Liu B, Zhang P Y, Meng X J, *et al.* Research progress in probiotics fermentation methods of traditional Chinese medicine and its application[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2020, 22(10): 1741-1750 (in Chinese).
- [38] 陈柯源, 高艳, 郝宝成, 等. 益生菌发酵中药研究进

- 展[J]. 动物医学进展, 2019, 40(12): 74-78.
- Chen K Y, Gao Y, Hao B C, *et al.* Progress on probiotic fermentation traditional Chinese medicine[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2019, 40(12): 74-78 (in Chinese).
- [39] 厉颖, 李灿委, 范孟然, 等. 中药调控肠道菌群干预酒精性肝病的研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(6): 107-115.
- Li Y, Li C W, Fan M R, *et al.* Progress in research of traditional Chinese medicine for regulation of gut microbiota in patients with alcoholic liver disease[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2021, 31(6): 107-115 (in Chinese).
- [40] Jang S H, Park J, Kim S H, *et al.* Red ginseng powder fermented with probiotics exerts antidiabetic effects in the streptozotocin-induced mouse diabetes model[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2017, 55(1): 317-323.
- [41] 尹军霞, 陈瑛, 孟丽丽. 益生菌剂对鲫鱼肠道菌群影响的初步研究[J]. *水产科学*, 2007, 26(11): 610-612.
- Yin J X, Chen Y, Meng L L. The influences of probiotics on intestinal microflora in crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. *Fisheries Science*, 2007, 26(11): 610-612 (in Chinese).
- [42] 孔雨昕, 田佳鑫, 彭思博, 等. 3种乳酸菌对乌鳢生长、抗氧化及免疫功能的影响[J]. *水产学报*, 2021, 45(10): 1764-1774.
- Kong Y X, Tian J X, Peng S B, *et al.* Effects of three kinds of lactic acid bacteria on growth, antioxidant and immune functions of *Channa argus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(10): 1764-1774 (in Chinese).
- [43] Kong Y D, Li M, Tian J X, *et al.* Effects of recombinant *Lactobacillus casei* on growth performance, immune response and disease resistance in crucian carp, *Carassius auratus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 99: 73-85.
- [44] Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo M S. Herbal supplementation diets on hematology and innate immunity in goldfish against *Aeromonas hydrophila*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(2): 354-361.
- [45] 覃初斌. 干酪乳杆菌对斑马鱼抵御气单胞菌感染的分子机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- Qin C B. The molecular mechanism of *Lactobacillus casei* resistance against *Aeromonas* infection in zebrafish[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017 (in Chinese).
- [46] 谢全喜, 张建梅, 于佳民, 等. 鼠李糖乳杆菌发酵中草药复合枯草芽孢杆菌对黄羽肉鸡生长后期免疫性能及大肠杆菌感染的研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(6): 1523-1529.
- Xie Q X, Zhang J M, Yu J M, *et al.* Research *Lactobacillus rhamnosus* fermented herbal and *Bacillus subtilis* complex on immune performance, *E. coli* infection of broiler[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2016, 43(6): 1523-1529 (in Chinese).
- [47] 马春霞. 人参的药理作用及临床应用[J]. *社区医学杂志*, 2008, 6(10): 13-14.
- Ma C X. Pharmacological action and clinical application of Ginseng[J]. *Journal of Community Medicine*, 2008, 6(10): 13-14 (in Chinese).
- [48] 田丰群, 梁华平, 王正国, 等. 人参茎叶皂甙对创伤小鼠细胞免疫功能及感染后死亡率的影响[J]. *解放军医学杂志*, 1995, 20(4): 251-253.
- Tian F Q, Liang H P, Wang Z G, *et al.* Effects of ginsenoside on cellular immune function and mortality after infection in traumatized mice[J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 1995, 20(4): 251-253 (in Chinese).

Effects of ginseng stem and leaf extract fermented by *Lactobacillus casei* on growth, immunity and antioxidant function of *Carassius auratus*

MENG Xin, YU Peng, SHAN Xiaofeng*, QIAN Aidong*

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: As a major ginseng cultivator, China is among the top countries in the world in terms of total ginseng production each year. In order to diversify the use of ginseng resources, scholars have begun to study the pharmacological effects and active ingredients of ginseng stems and leaves. Studies have confirmed that probiotic fermentation of Chinese herbal medicine can significantly improve its efficacy, and the efficacy of fermented ginseng is better than feeding ginseng alone, and it has been concluded that ginseng can be fermented to improve its biological activity and enhance its efficacy after fermentation. However, not all microorganisms are suitable for fermentation of Chinese medicine, and the degree of suitability of microorganisms and Chinese medicine needs to be further explored. The application of fermented ginseng stems and leaves to aquatic animals has not been reported, and the research on the aptamer used for fermenting ginseng stems and leaves still needs to be studied. In order to study the effect of ginseng stem and leaf extract fermented by *Lactobacillus casei* on the immune and antioxidant function of *Carassius auratus*, the stem and leaf extract of ginseng was fermented with *L. casei* liquid of 3%, 4%, 5% and 6% (recorded as L3, L4, L5, L6), and then added to the basic feed (recorded as L0). The *C. auratus* with an initial average weight of (25.00±0.05) g was fed for five weeks. Periodic samples were collected from the serum, hepatopancreas, middle kidney, spleen and whole intestine of the *C. auratus* to detect the changes of relevant immune indexes. A protective test for *Aeromonas hydrophila* attack was performed at the end of the feeding trial. The results showed that alkaline phosphatase (AKP), immunoglobulin M (IgM), lysozyme (LZM), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities were significantly higher in the group with *L. casei* seed inoculation of 5% (L5 group) compared with the control group, and malondialdehyde (MDA) activity was significantly lower in the L5 group than in the L0 group. The gene expression levels of *IL-10*, *TNF- α* , *TGF- β* , *IFN- γ* , and *IL-1 β* were elevated to different degrees in all tissues, showing spatial and temporal differences, with the elevated gene level expression of *IL-10* being more sensitive. In the protective attack test, the L5 group had a survival rate of 30%, the highest survival rate compared to the other groups. Under the present experimental conditions, when the inoculum of *L. casei* was 5%, the fermentation of ginseng stem and leaf extract was the most effective for the application to *C. auratus*, which could improve the antioxidant capacity and the expression of immune-related genes, and had a better preventive effect on reducing the infection of *A. hydrophila*. This experiment adheres to the concept of turning waste into treasure and green safety, which provides a theoretical basis for the application of probiotic fermentation of traditional Chinese medicine in practical production.

Key words: *Carassius auratus*; ginseng stem and leaf extract; *Lactobacillus casei*; *Aeromonas hydrophila*; antioxidant; immune

Corresponding authors: SHAN Xiaofeng. E-mail: sxf1997@163.com;

QIAN Aidong. E-mail: qianaidong0115@163.com

Funding projects: Jilin Province Education Department Project (JJKH20210367KJ)