



## 饲料中间隔添加壳寡糖对仿刺参生长、非特异性免疫和消化的影响

李肖凡, 王荣月, 黄冲, 汤金伟, 刘娟\*, 黎睿君\*  
(大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁大连 116023)

**摘要:** 壳寡糖是良好的免疫增强剂, 但在水生动物中的应用还十分有限。本研究通过间隔投喂的方式研究壳寡糖对仿刺参生长性能、非特异性免疫能力、消化能力、组织学和抗病力的影响。实验挑选体重  $(18.51 \pm 0.28)$  g 的仿刺参, 对照组饲喂基础饲料, 实验组以 3 天 1 次的饲喂频率饲喂含 0.5% 壳寡糖的饲料, 其余时间饲喂基础饲料, 连续投喂 8 周后, 检测该饲喂方式下仿刺参生长性能、非特异性免疫能力、肠道消化酶、肠道和呼吸树组织学、肠道免疫基因表达情况以及对灿烂弧菌的抗病力。结果显示, 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率极显著提高了仿刺参的脏壁比和肠壁比; 在免疫指标方面, 显著提高了仿刺参体腔细胞的吞噬活性和呼吸爆发能力, 极显著提高了肠道的酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP)、溶菌酶 (LZM) 和总一氧化氮合酶 (T-NOS) 活性, 其中肠道 AKP 和 LZM 活性分别提高了 70.06% 和 156%, 肠道 *Aj-lyz* 基因表达量极显著提高了 22.04%; 抗氧化指标结果显示, 实验组极显著提高了仿刺参体腔细胞过氧化氢酶 (CAT) 活性, 而体腔细胞和肠道的丙二醛 (MDA) 含量无显著差异。组织学结果显示, 该饲喂频率极显著提高了仿刺参前肠肌肉层厚度和浆膜层厚度, 中肠和后肠的皱襞高度和宽度。灿烂弧菌攻毒结果表明, 实验组仿刺参的相对保护率达到 66.67%。研究表明, 3 天 1 次的饲喂频率能够一定程度上提高仿刺参的生长性能, 非特异性免疫酶、消化酶活性, 并明显改善肠道结构。研究结果可为壳寡糖对仿刺参作用机制的研究及投喂频率的确定提供数据支撑和理论依据。

**关键词:** 仿刺参; 壳寡糖; 饲喂频率; 免疫酶; 抗氧化; 组织学

中图分类号: S 942.1

文献标志码: A

仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 在分类学上隶属于楯手目 (Aspidochirotida) 刺参科 (Stichopodidae) 仿刺参属 (*Apostichopus*), 其经济价值和保健价值很高<sup>[1]</sup>。随着养殖规模和密度的不断增大, 水产养殖病害频发<sup>[2]</sup>。免疫增强剂可以提高水产动物免疫力<sup>[3]</sup>, 其中壳寡糖 (chitosan oligosaccharide, COS) 被证实是一种安全有效的免疫增强剂。

COS 是由几丁质脱乙酰基后得到的产物, 广泛存在于虾、蟹、昆虫等的外壳及真菌细胞壁中, 其代谢产物不具有毒性, 具有可生物降解, 抗病原微生物等活性, 同时, 因其优良性质, 被广泛应用于医疗<sup>[4]</sup>、植物抗病<sup>[5]</sup> 和动物养殖中<sup>[6]</sup>。COS 在水产动物中的作用及对生长性能的研究已被广泛开展。饲料中添加 COS, 可提高锦鲤 (*Cyprinus*

收稿日期: 2023-10-24 修回日期: 2023-11-29

资助项目: 辽宁省教育厅高等学校基本科研面上项目 (JYTS20230487)

第一作者: 李肖凡 (照片), 从事水产养殖动物免疫增强剂的效果及作用机理研究,

E-mail: lixiaofan1921@163.com

通信作者: 刘娟, 从事水产养殖动物免疫增强剂的效果及作用机理研究, E-mail: liujuan@dlou.edu.cn;

黎睿君, 从事水生经济动物病害防治与免疫学研究, E-mail: liruijun@dlou.edu.cn



*carpio*) 和卵圆鲷(*Trachinotus ovatus*) 的生长、免疫力和对病原菌的抗病能力<sup>[7-8]</sup>。饲料中添加 0%~1% 不同含量的 COS 饲喂 8 周, 均能改善杂交石斑鱼的生长、肠道健康和对抗维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 的抗病性<sup>[9]</sup>。Wang 等<sup>[10]</sup> 研究表明, COS 具有触发草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 体液免疫的潜在作用, 同时也可促进天然 IgM 的分泌。刘美思等<sup>[11]</sup> 研究表明, COS 可有效提高仿刺参幼参的生长性能和免疫酶活性。然而长期饲喂免疫增强剂, 可能会使机体产生免疫疲劳或免疫抑制现象<sup>[12]</sup>。有研究表明, 在连续饲喂仿刺参壳寡糖 28 d 后, 各免疫指标呈先升高后降低的趋势<sup>[13]</sup>。进行间隔饲喂的情况下, 仿刺参的免疫指标和对照组相比显著增强<sup>[14]</sup>。

因此免疫增强剂在水产养殖中饲喂频率的探索非常重要。有许多研究通过荧光定位方式, 探究壳寡糖在机体内的吸收动力学<sup>[15-16]</sup>。张朋朋等<sup>[17]</sup> 通过高效液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 检测方法, 检测到 48 h 后壳三糖在 Sprague Dawley (SD) 大鼠尿液、粪便中的排泄率分别为 7.15% 和 72.80%。Ouyang 等<sup>[18]</sup> 研究表明, 12 h 内, 主要集中在团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 肠道中的 COS 逐渐被吸收和代谢。因此, 不同物种吸收分布时间有一定差异性。关于壳寡糖在仿刺参体内的吸收动力学研究较少。

本实验室前期通过荧光定位实验研究, 明确添加 0.5% 壳寡糖饲喂仿刺参 3 d 后, 绝大多数 COS 能够被吸收代谢。因此, 本实验以仿刺参为研究对象, 验证 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率对仿刺参生长、非特异性免疫力、抗病力以及肠道和呼吸树组织学的影响, 以期壳寡糖在仿刺参的健康养殖中的应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验饲料及养殖管理

壳寡糖标准品, 脱乙酰度 > 95%, 聚合度 2~10, 平均相对分子质量 < 1 500 u, 由中国科学院大连化学物理研究所提供。基础饲料由海泥与配合饲料以 2 : 1 (质量比) 的比例混合过筛, 壳寡糖饲料由基础饲料添加 0.5% 的壳寡糖混合均匀, 两种饲料分别制粒, 晾晒完成后, -20 °C 保存备用。

养殖实验在大连海洋大学黄海校区进行。健康仿刺参购自大连宝发海珍品有限公司, 暂养

1 周, 养殖期间水温 16~18 °C, pH 值为 8.00±0.15, 盐度为 30, 水体 24 h 充氧, 每日 18 时饱食投喂体重 4% 的基础饲料, 早上 9 时吸除残饵和粪便, 并换总水量 1/3 的海水。本研究获得了大连海洋大学实验动物伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守大连海洋大学伦理规范, 并按照大连海洋大学伦理委员会制定的规章制度执行。

### 1.2 实验方法与样品采集

将 204 头仿刺参 [平均体重 (18.51±0.28) g] 随机分为 2 组, 每组设 3 个平行, 每个平行 34 头。对照组每日饱食饲喂基础饲料, 实验组每 3 天饱食投喂 1 次壳寡糖饲料, 其余时间饱食投喂基础饲料, 持续 8 周。

养殖实验结束后, 禁食 24 h, 每个平行随机抽取 3 头仿刺参作为混合样本, 进行免疫指标测定。收集体腔液, 以体积比 1 : 1 加入抗凝剂 (0.48 mol/L NaCl、0.019 mol/L KCl、0.02 mol/L EGTA、0.068 mol/L Tris-HCl, pH 7.6), 一部分将体腔细胞浓度稀释至  $2 \times 10^6$  个/mL 后, 直接用于吞噬活性和呼吸爆发测定。另一部分用超声破碎仪 (22 kHz, 25×6 s, 0 °C) 破碎后, 4 000 r/min, 4 °C, 离心 10 min, 所得上清液 -80 °C 保存, 用于免疫酶和抗氧化酶的测定。收集肠道和呼吸树, 分别称重, 以质量比 1 : 9 的比例加入预冷 PBS (磷酸盐缓冲液, pH 7.6) 进行匀浆。随后将匀浆液移入 1.5 mL 离心管中, 4 °C, 7 000 r/min, 离心 20 min, 所得上清液于 -80 °C 保存, 用于免疫酶、抗氧化酶和消化酶活性测定。同时, 每个平行随机抽取 3 头海参, 收集肠道和呼吸树, 用 4% 多聚甲醛固定液固定 48 h, 用于组织切片制作。每个平行另随机抽取 3 头海参, 迅速取肠道组织置于无酶离心管中, 放入液氮速冻, -80 °C 保存, 用于 RNA 提取及相关基因测定。

### 1.3 生长性能

相关生长指标计算公式:

$$\text{增重率 (weight gain rate, WGR, \%)} = (W_t - W_0) / W_0 \times 100\%$$

$$\text{特定生长率 (specific growth rate, SGR, \% / d)} = (\ln W_t - \ln W_0) / t \times 100\%$$

$$\text{脏壁比 (ratio of visceral weight to body wall weight, VBR, \%)} = W_v / W_b \times 100\%$$

$$\text{肠壁比 (ratio of intestine weight to body wall weight, IBR, \%)} = W_i / W_b \times 100\%$$

存活率 (survival rate, SR, %) =  $N_t / N_0 \times 100\%$   
 式中,  $N_0$  为初始头数,  $N_t$  为终末头数,  $W_0$  为初始体重 (g),  $W_t$  为终末体重 (g),  $t$  为实验天数 (d),  $W_v$  为内脏重 (g),  $W_i$  为肠道重 (g),  $W_b$  为体壁重 (g)。

#### 1.4 体腔细胞吞噬活性和呼吸爆发

吞噬活性和呼吸爆发参考文献, 分别采用中性红方法和氮蓝四唑 (NBT) 还原法测定<sup>[19]</sup>。

#### 1.5 酶活性测定

采用考马斯亮蓝法测定组织匀浆液蛋白质浓度<sup>[20]</sup>, 用于后续肠道和呼吸树组织酶活性计算。体腔细胞、肠道和呼吸树的非特异性免疫酶和抗氧化酶指标均采用南京建成生物工程研究所生产的检测试剂盒和酶标仪 (Molecular Devices, 美国) 测定。非特异性免疫指标包括酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP)、溶菌酶 (LZM) 和总一氧化氮合酶 (T-NOS) 的活性。抗氧化指标包括超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性、总抗氧化能力 (T-AOC) 和丙二醛 (MDA) 含量。严格按照试剂盒提供的说明书进行试验操作, 参照试剂盒说明书中的计算公式换算成相应含量或酶活性。其次, 测定肠道的消化酶。采用福林酚法<sup>[21]</sup>、3,5-二硝基水杨酸显色法<sup>[21]</sup> 和橄榄油乳化液法<sup>[22]</sup>, 分别检测肠道蛋白酶、淀粉酶和脂肪酶活性。

#### 1.6 肠道、呼吸树组织学切片

固定后的样品经梯度酒精脱水、透明、浸蜡和包埋, 在室温下切成 5  $\mu\text{m}$  切片。经脱蜡, 苏木精-伊红 (H.E) 染色后, 中性树脂封片。肠道每组选取 5 张不连续的切片, 每张切片随机选取 8 个位点, 测量各组织层的厚度。呼吸树随机选择有代表性的切片进行观察并拍照。利用 Image Pro Plus 6.0 软件进行肠道切片定量。

#### 1.7 实时荧光定量 PCR

仿刺参肠道总 RNA 提取参照莫纳试剂盒说明书 (Monad)。使用酶标仪测定提取的 RNA 浓度, 用 1% 琼脂糖凝胶检测 RNA 质量。提取的总 RNA 用 Prime Script™ 反转录试剂盒 (TaKaRa) 将上述提取到的 RNA 样品反转录成 cDNA。实时荧光定量 PCR 实验使用实时定量 PCR 仪 (Eppendorf) 对仿刺参肠道免疫相关基因 *Aj-tlr3*、*Aj-c3*、*Aj-lyz*、*Aj-sod*、*Aj-rel* mRNA 的相对表达水平进行检测 (表 1), 引物均于生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 本实验中所选用的定量引物参考

表 1 内参和目的基因定量引物

Tab. 1 Primers of internal reference and target genes		
目的基因 gene	引物名称 primer	序列 primer sequence (5'-3')
<i><math>\beta</math>-actin</i>	<i>actin-F</i>	TGGCGTGAGGAAGAGCAT
	<i>actin-R</i>	CATTCAACCCTAAAGCCAACA
<i>Aj-lyz</i>	<i>lyz-F</i>	GTGTCTGATGTGGCTGTGCT
	<i>lyz-R</i>	TTCCCCAGGTATCCCATGAT
<i>Aj-sod</i>	<i>sod-F</i>	CGATGATAATGGTGTGGCTAGTGT
	<i>sod-R</i>	TAAATCGTCAACCCTTCGTG
<i>Aj-tlr3</i>	<i>tlr3-F</i>	TTGAAGCGTTGGATTTG
	<i>tlr3-R</i>	GGACCGATGTTGGAGATA
<i>Aj-c3</i>	<i>c3-F</i>	AGAACCAGAGGTCTTACTTGGTG
	<i>c3-R</i>	AAACTGCTCCCTGACTCTCCTTT
<i>Aj-rel</i>	<i>rel-F</i>	TGAAGTGGTATGCGTCTGG
	<i>rel-R</i>	TTGGGCTGCTCGTTATG

文献<sup>[23-24]</sup>。实验体系为 SYBR® Premix Ex Taq™ (Monad) 10  $\mu\text{L}$ , cDNA (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 7.2  $\mu\text{L}$ , 引物 F (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ ; 引物 R (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ 。基本反应程序为 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环。采用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法计算目的基因的相对表达量。

#### 1.8 攻毒实验

养殖实验结束后, 实验组和对照组分别随机选取 15 头仿刺参, 进行病原菌攻毒实验。病原菌为灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*) (登录号: AM422807), 来自大连市海珍品疾病防控重点实验室。攻毒前经过活化和复壮, 测定 LD<sub>50</sub> 为 10<sup>8</sup> CFU/mL。将菌液密度调至 2 $\times$ 10<sup>8</sup> CFU/mL, 采用腹腔注射法, 向仿刺参体内注射菌液 0.1 mL。于水槽中养殖, 观察 14 d 内的死亡情况。攻毒期间两组仿刺参分别以养殖实验时的饲喂方式进行投喂。

#### 1.9 数据分析

实验数据采用平均数 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, 分别通过 Excel 2019、SPSS 22.0 和 Origin 2019 软件进行统计分析与绘图。采用独立样本 T 检验比较组间差异性, 以  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 间隔投喂壳寡糖对仿刺参生长性能的影响

经过 8 周的养殖实验, 仿刺参的初始体重、

终末体重、增重率、特定生长率、脏壁比、肠壁比、存活率见表 2。3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率对仿刺参增重率、特定生长率、存活率无显著影响 ( $P>0.05$ )。与对照组相比, 间隔投喂壳寡糖可极显著提高仿刺参的脏壁比和肠壁比 ( $P<0.01$ )。

表 2 间隔投喂壳寡糖对仿刺参生长性能的影响

Tab. 2 Effects of COS feeding frequency once every 3 days on growth performance of *A. japonicus*

指标 indexes	对照组 control group	实验组 treatment group
初始体重/g initial body weight	18.51±0.28 <sup>a</sup>	18.50±0.29 <sup>a</sup>
终末体重/g final body weight	34.75±3.16 <sup>a</sup>	35.44±2.86 <sup>a</sup>
增重率/% WGR	87.50±14.28 <sup>a</sup>	90.80±12.62 <sup>a</sup>
特定生长率/(%/d) SGR	1.12±0.14 <sup>a</sup>	1.15±0.12 <sup>a</sup>
脏壁比/% VBR	16.37±0.09 <sup>A</sup>	17.48±0.12 <sup>B</sup>
肠壁比/% IBR	3.65±0.04 <sup>A</sup>	4.13±0.05 <sup>B</sup>
存活率/% SR	88.24±5.88 <sup>a</sup>	86.27±3.40 <sup>a</sup>

注: 表中不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ), 不同大写字母表示差异极显著 ( $P<0.01$ ), 下同。  
Notes: Different lowercases stand for significant differences ( $P<0.05$ ), different capital letters stand for mean significant differences ( $P<0.01$ ), the same below.

## 2.2 间隔投喂壳寡糖对仿刺参体腔细胞吞噬活性和呼吸爆发的影响

间隔投喂壳寡糖对仿刺参体腔细胞吞噬活性和呼吸爆发的影响见表 3。与对照组相比, 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率可显著提高仿刺参体腔细胞的吞噬活性和呼吸爆发能力 ( $P<0.05$ )。

## 2.3 间隔投喂壳寡糖对仿刺参非特异性免疫酶活性的影响

间隔投喂壳寡糖对仿刺参体腔细胞、肠道、呼吸树非特异性免疫酶活性的影响见表 4。3 天 1

表 3 间隔投喂壳寡糖对仿刺参体腔细胞吞噬活性和呼吸爆发的影响

Tab. 3 Effects of COS feeding frequency once every 3 days on phagocytic activity and respiratory outburst of coelomocytes of *A. japonicus*

指标 indexes	对照组 control group	实验组 treatment group
吞噬活性 phagocytic activity	0.29±0.07 <sup>a</sup>	0.46±0.06 <sup>b</sup>
呼吸爆发 respiratory outburst	0.33±0.04 <sup>a</sup>	0.45±0.01 <sup>b</sup>

次的壳寡糖饲喂频率对仿刺参体腔细胞、肠道、呼吸树 ACP、AKP、LZM、T-NOS 活性有不同程度的影响。与对照组相比, 该方式饲喂壳寡糖显著提高了体腔细胞的 ACP 活性 ( $P<0.05$ ), 极显著提高了肠道的 ACP 活性 ( $P<0.01$ ), 较对照组分别提高 62.83% 和 42.12%, 但对呼吸树的 ACP 活性无显著影响 ( $P>0.05$ )。3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率极显著提高了体腔细胞和肠道的 AKP 活性 ( $P<0.01$ ), 显著提高了呼吸树的 AKP 活性 ( $P<0.05$ ), 分别提高了 20.88%、70.06% 和 50.05%。同时, 该饲喂方式能显著提高体腔细胞的 LZM 活性 ( $P<0.05$ ), 极显著提高了肠道和呼吸树的 LZM 活性 ( $P<0.01$ ), 分别提高 58.27%、156.00% 和 30.84%。该方式能显著提高体腔细胞的 T-NOS 活性 ( $P<0.05$ ), 极显著提高肠道的 T-NOS 活性 ( $P<0.01$ ), 较对照组分别提高 24.27% 和 43.65%。

## 2.4 间隔投喂壳寡糖对仿刺参抗氧化酶的影响

间隔投喂壳寡糖对仿刺参体腔细胞、肠道、呼吸树抗氧化酶活性的影响见表 5。3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率对仿刺参体腔细胞、肠道、呼吸树的 SOD、CAT、T-AOC 活性和 MDA 含量有不同程度的影响。与对照组相比, 间隔饲喂壳寡糖极

表 4 间隔投喂壳寡糖对仿刺参体腔细胞、肠道、呼吸树非特异性免疫酶的影响

Tab. 4 Effects of COS feeding frequency once every 3 days on non-specific immunoenzyme activities in coelomocytes, intestine and respiratory tree of *A. japonicus*

指标 indexes	体腔细胞 coelomocytes		肠道 intestine		呼吸树 respiratory tree	
	对照组 control group	实验组 treatment group	对照组 control group	实验组 treatment group	对照组 control group	实验组 treatment group
ACP (U/mL; U/mg prot)	93.83±1.13 <sup>a</sup>	152.78±12.03 <sup>b</sup>	44.35±0.48 <sup>A</sup>	63.03±1.00 <sup>B</sup>	49.84±16.64 <sup>a</sup>	37.47±15.00 <sup>a</sup>
AKP (U/mL; U/mg prot)	341.93±23.34 <sup>A</sup>	413.34±2.73 <sup>B</sup>	251.98±9.30 <sup>A</sup>	428.51±38.20 <sup>B</sup>	1 679.89±92.36 <sup>a</sup>	2 520.67±138.68 <sup>b</sup>
LZM (U/mL; U/mg prot)	1.39±0.23 <sup>a</sup>	2.20±0.06 <sup>b</sup>	6.57±0.17 <sup>A</sup>	16.84±0.54 <sup>B</sup>	10.83±0.29 <sup>A</sup>	14.17±0.30 <sup>B</sup>
T-NOS (U/mL; U/mg prot)	5.15±0.21 <sup>a</sup>	6.40±0.92 <sup>b</sup>	5.43±0.17 <sup>A</sup>	7.80±0.78 <sup>B</sup>	4.77±0.55 <sup>a</sup>	3.90±0.49 <sup>a</sup>

注: 各指标后有 2 个单位, 第 1 个为体腔细胞所对应单位, 第 2 个为肠道和呼吸树所对应的单位, 下同。  
Notes: There are 2 units after each index, the first is the unit corresponding to the coelomocytes, and the second is the unit corresponding to the intestine and respiratory tree; the same below.

显著提高了仿刺参体腔细胞 CAT 活性 ( $P<0.01$ ), MDA 含量无显著影响 ( $P>0.05$ ). 较对照组提高了 208%, 而对 SOD 和 T-AOC 活性、

表 5 间隔投喂壳寡糖对仿刺参体腔细胞、肠道、呼吸树抗氧化酶的影响

Tab. 5 Effects of COS feeding frequency once every 3 days on antioxidant enzyme activities in coelomocytes, intestine and respiratory tree of *A. japonicus*

指标 indexes	体腔细胞 coelomocytes		肠道 intestine		呼吸树 respiratory tree	
	对照组 control group	实验组 treatment group	对照组 control group	实验组 treatment group	对照组 control group	实验组 treatment group
SOD (U/mL; U/mg prot)	94.03±1.61 <sup>a</sup>	91.93±0.21 <sup>a</sup>	53.61±3.38 <sup>a</sup>	59.83±1.39 <sup>a</sup>	58.61±6.17 <sup>a</sup>	61.91±8.06 <sup>a</sup>
CAT (U/mL; U/mg prot)	0.86±0.04 <sup>a</sup>	2.63±0.18 <sup>b</sup>	145.58±10.52 <sup>a</sup>	146.98±9.88 <sup>a</sup>	148.70±10.90 <sup>a</sup>	147.16±10.98 <sup>a</sup>
T-AOC (U/mL; U/mg prot)	1.43±0.11 <sup>a</sup>	1.68±0.12 <sup>a</sup>	0.90±0.33 <sup>a</sup>	1.03±0.34 <sup>a</sup>	0.39±0.14 <sup>a</sup>	0.42±0.13 <sup>a</sup>
MDA (nmol/mL; nmol/mg prot)	0.87±0.14 <sup>a</sup>	0.77±0.14 <sup>a</sup>	7.55±1.17 <sup>a</sup>	6.21±1.10 <sup>a</sup>	2.81±0.29 <sup>a</sup>	3.15±0.54 <sup>a</sup>

### 2.5 间隔投喂壳寡糖对仿刺参肠道消化酶活性的影响

间隔投喂壳寡糖对仿刺参肠道消化酶活性的影响见表 6。与对照组相比, 该方式饲喂壳寡糖极显著提高了仿刺参肠道蛋白酶活性 ( $P<0.01$ ), 显著提高了仿刺参肠道脂肪酶活性 ( $P<0.05$ ), 分别提高了 27.92% 和 11.41%, 对仿刺参肠道淀粉酶活性有提高, 但无显著差异 ( $P>0.05$ )。

### 2.6 壳寡糖对仿刺参组织学的影响

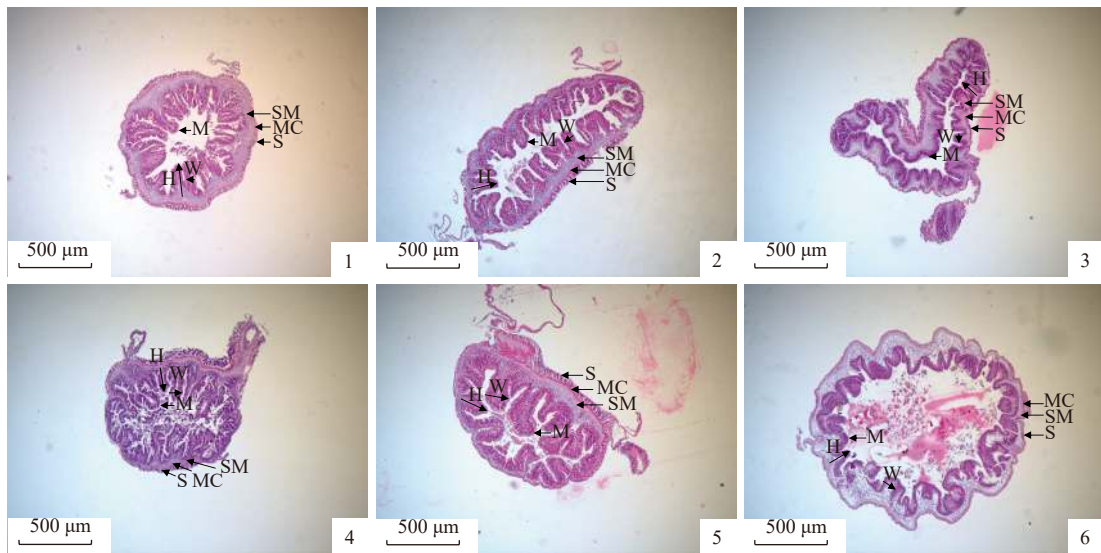
组织切片显示, 仿刺参肠道由内向外依次为黏膜层、黏膜下层、肌层、浆膜层 (图版 I)。与

表 6 间隔投喂壳寡糖频率对仿刺参肠道消化酶活性的影响

Tab. 6 Effects of COS feeding frequency once every 3 days on the intestinal digestive enzyme activities of *A. japonicus*

指标 indexes	对照组 control group	实验组 treatment group
蛋白酶 protease	9.67±0.55 <sup>a</sup>	12.37±0.50 <sup>b</sup>
脂肪酶 lipase	17.27±0.71 <sup>a</sup>	19.24±0.69 <sup>b</sup>
淀粉酶 amylase	0.13±0.02 <sup>a</sup>	0.16±0.01 <sup>a</sup>

对照组相比, 实验组仿刺参肠道结构更规则, 肠绒毛和肌肉层更完整 (图版 I)。肠道切片定量数据如图 1 所示, 与对照组相比, 3 天 1 次的壳寡

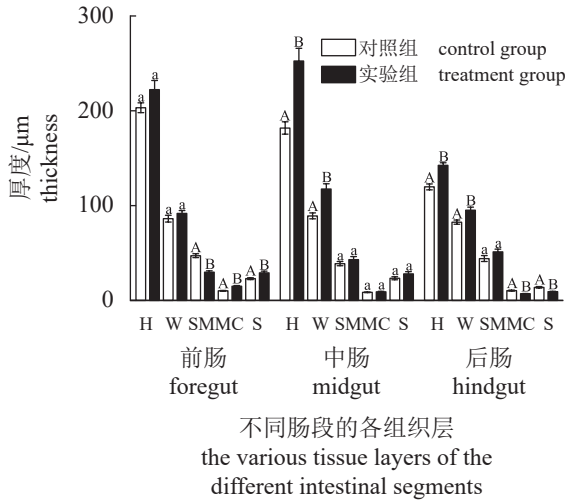


图版 I 间隔投喂壳寡糖对仿刺参肠道组织学的影响

1-3 分别为对照组前、中、后肠, 4-6 分别为实验组前、中、后肠, H. 皱襞高度, W. 皱襞宽度, M. 黏膜层, SM. 黏膜下层, MC. 肌肉层, S. 浆膜层, 下同。

Plate I Effects of COS feeding frequency once every 3 days on the intestinal histology of *A. japonicus*

1-3. foregut, midgut and hindgut of the control group, respectively; 4-6. foregut, midgut and hindgut of treatment group. H. fold height, W. fold width, M. mucosa, SM. submucosa, MC. muscularis, S. serosa, the same below.



**图 1** 间隔投喂壳寡糖对仿刺参肠道形态参数的影响  
图中不同小写字母表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 不同大写字母表示组间差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 下同。

**Fig. 1** Effects of COS feeding frequency once every 3 days on intestinal morphological parameters of *A. japonicus*

Different lowercases stand for significant differences within groups ( $P < 0.05$ ), and different capital letters stand for mean significant differences within groups ( $P < 0.01$ ), the same below.

糖饲喂频率极显著地提高了仿刺参前肠肌层和浆膜层厚度 ( $P < 0.01$ ), 中肠皱襞高度和宽度 ( $P < 0.01$ ), 后肠皱襞高度和宽度 ( $P < 0.01$ ) (图 1)。

仿刺参呼吸树呈树状分布于体腔中, 其管壁由外向内依次是体腔上皮层、肌层、血管、内皮层和中央腔<sup>[25]</sup>。实验组和对照组相比, 形态上无明显变化 (图版 II)。在 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率下, 仿刺参呼吸树体腔上皮层的细胞排列紧密, 肌肉层界限清晰完整, 轻微加厚, 血管中含有大

量细胞, 内皮层细胞呈脊状向中央腔凸起, 中央腔较大且明显 (图版 II)。

### 2.7 间隔投喂壳寡糖对仿刺参肠道免疫相关基因的影响

间隔投喂壳寡糖对仿刺参肠道 5 个免疫相关基因相对表达量的影响如图 2 所示。3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率极显著提高了仿刺参肠道中 *Aj-tilr3*、*Aj-c3*、*Aj-lyz*、*Aj-sod*、*Aj-rel* mRNA 的相对表达量 ( $P < 0.01$ ), 分别提高了 41.87%、42.95%、22.04%、14.40% 和 86.51%。

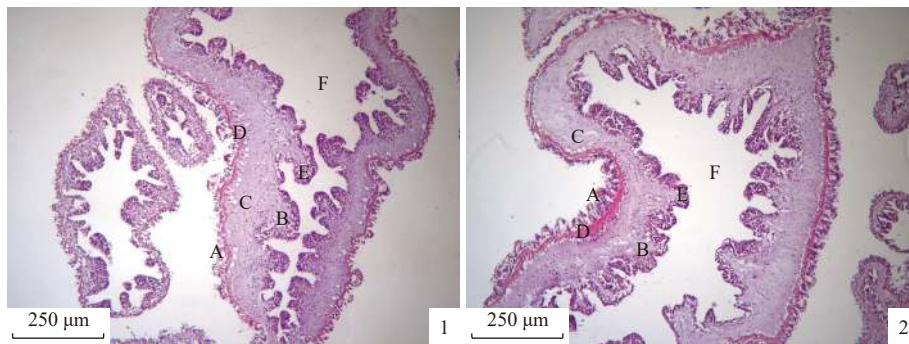
### 2.8 间隔投喂壳寡糖对仿刺参抗病力的影响

灿烂弧菌攻毒后, 仿刺参的存活率见图 3。与对照组相比, 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率可以提高仿刺参的存活率, 其存活率由 53.33% 提高至 66.67%。

## 3 讨论

### 3.1 间隔投喂壳寡糖对仿刺参生长的影响

本研究发现, 在 3 天 1 次的饲喂频率下, 0.5% 壳寡糖能极显著提高仿刺参的脏壁比和肠壁比 ( $P < 0.01$ ), 但对仿刺参的增重率和特定生长率没有显著影响, 与 Wang 等<sup>[23]</sup> 研究有一定差异。本研究与徐贵珠<sup>[26]</sup> 的研究相似, 其在饲料中添加 COS 饲喂 60 d 后, 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 的肝胰脏重量、肠道重量显著升高。推测壳寡糖促进生长的机理可能是通过诱导肠道消化酶的表达, 促进营养物质的分解; 诱导消化器官的生长发育, 促进小分子物质的吸收, 进而提高生长性



**图版 II** 间隔投喂对仿刺参呼吸树组织学的影响

1. 对照组呼吸树, 2. 实验组呼吸树, A. 体腔上层, B. 内皮细胞, C. 血管, D. 肌层, E. 细胞分泌物, F. 中央腔。

**Plate II** Effects of COS feeding frequency once every 3 days on the histology of the respiratory tree of *A. japonicus*

1. respiratory tree of the control group, 2. respiratory tree of the treatment group. A. coelothelial cell; B. endothelial cell; C. haemocoel; D. muscular layer; E. secretion of endothelial cell; F. center antrum.

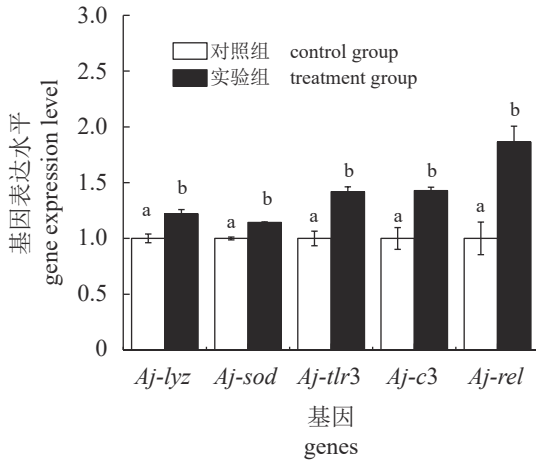


图2 间隔投喂壳寡糖对仿刺参肠道5个基因相对表达量的影响

*Aj-lyz*. 溶菌酶, *Aj-sod*. Cu-Zn 超氧化物歧化酶, *Aj-tnr3*. Toll 样受体3, *Aj-c3*. 补体3, *Aj-rel*. rel 基因。

Fig. 2 Effects of COS feeding frequency once every 3 days on relative expression of five genes in intestine of *A. japonicus*

*Aj-lyz*. lysozyme, *Aj-sod*. Cu-Zn superoxide dismutase, *Aj-tnr3*. Toll-like receptor 3, *Aj-c3*. Complement 3, *Aj-rel*. rel gene.

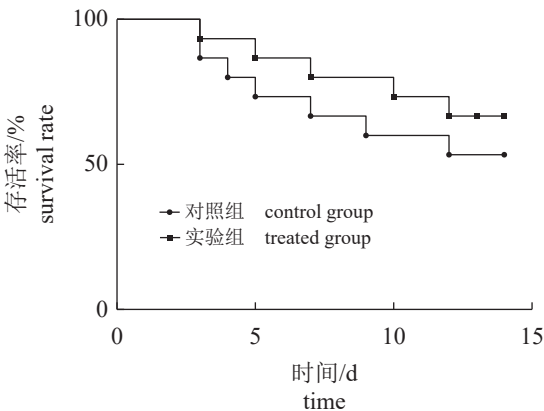


图3 间隔投喂壳寡糖对注射灿烂弧菌的仿刺参存活率的影响

Fig. 3 Effects of COS feeding frequency once every 3 days on the survival rate of *A. japonicus* after challenge test

能。壳寡糖对不同水产动物生长性能会产生不同的影响<sup>[3]</sup>, 针对不同养殖动物的具体作用机制有待进一步研究。

### 3.2 间隔投喂壳寡糖对仿刺参体腔细胞吞噬活性和呼吸爆发的影响

体腔细胞的吞噬作用是仿刺参吞噬和清除外来物质的重要手段, 属于体内防御机制的第一道防线<sup>[27-28]</sup>。仿刺参体腔液中变形细胞和球形细胞

具有吞噬功能, 同时, 免疫细胞在激活吞噬状态时会产生呼吸爆发作用, 释放大量的超氧阴离子和强氧化物 ( $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 具有广泛杀菌和清除异物的功能<sup>[29]</sup>。有报道称, 0.5% 壳寡糖饲喂 1 周可激活仿刺参体腔细胞吞噬活性, 在饲喂 4 周内呼吸爆发活性保持在较高水平<sup>[13]</sup>。1% 壳寡糖饲喂仿刺参 10 d 后, 显著提高了体腔细胞的吞噬活性和吞噬过程中呼吸爆发活性<sup>[30]</sup>。本研究结果与其相似, 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率可显著提高仿刺参体腔细胞的吞噬活性和呼吸爆发能力 ( $P < 0.05$ )。推测水溶性的壳寡糖分子本身也具有一定的免疫原性, 能够与仿刺参体腔细胞表面受体蛋白相结合, 进而激发信号传导, 诱导一系列免疫反应, 提高仿刺参体腔细胞吞噬活性, 产生较多的超氧阴离子, 从而提高仿刺参的免疫能力。

### 3.3 间隔投喂壳寡糖对仿刺参非特异性免疫指标的影响

棘皮动物缺乏脊椎动物中的特异性免疫, 因此非特异性免疫能力在仿刺参的免疫防御中发挥着极其重要的作用。本研究中, 壳寡糖可通过提高仿刺参体腔细胞、肠道、呼吸树非特异性免疫酶和抗氧化酶活性, 加强肠道相关免疫基因的表达, 最终提高仿刺参的非特异性免疫能力。ACP 和 AKP 都是溶酶体酶的标志酶, ACP 可通过水解作用将表面带有磷酸酯的异物破坏, 从而加快吞噬细胞对异物的吞噬和降解速率, AKP 能通过改变病原菌的表面结构, 发挥调理素的作用<sup>[31]</sup>。本研究中, 壳寡糖间隔投喂可极显著提高肠道的 ACP 活性和体腔细胞、肠道的 AKP 活性 ( $P < 0.01$ ), 这与刘均玲等<sup>[32]</sup> 和苏鹏等<sup>[33]</sup> 的研究结果相近。溶菌酶是一种碱性蛋白, 不仅能够通过破坏细菌细胞壁的肽聚糖部分防御病害, 而且还有消化和滤食海洋细菌的作用<sup>[34]</sup>。在本研究中, 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率显著提高了体腔细胞 LYM 活性 ( $P < 0.05$ ), 极显著提高了肠道和呼吸树的 LYM 活性 ( $P < 0.01$ ), 这与李明波等<sup>[35]</sup> 的研究结果相近。同时, 实验组肠道 *Aj-lyz* 基因表达量极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 与酶活性测定趋势一致, 说明 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率可通过促进溶菌酶活性提高仿刺参的免疫能力。生物体内催化 NO 生成的 NOS 包括神经型 NOS、诱导型 NOS 和内皮型 NOS, 共 3 个亚型, 其中免疫刺激物能诱导

iNOS 产生大量 NO, 之后产生多种类型的活性氮中间体作为杀菌分子, 杀灭细菌、真菌等病原微生物, 进而增强机体非特异性免疫功能<sup>[36]</sup>。本研究中, 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率极显著提高肠道 T-NOS 活性 ( $P<0.01$ ), 显著提高体腔细胞和呼吸树的 T-NOS 活性 ( $P<0.05$ ), 这与刘美思等<sup>[11]</sup>的研究结果相近。综上所述, 该饲喂频率的壳寡糖能刺激仿刺参的免疫系统发挥功能。SOD 和 CAT 是抗氧化防御体系中重要的功能酶, 可相互关联清除活性氧自由基<sup>[37]</sup>。本研究中, 3 天 1 次的壳寡糖饲喂方式极显著提高了仿刺参体腔细胞 CAT 活性 ( $P<0.01$ ), 并且极显著提高仿刺参肠道 *Aj-sod* 基因的表达量 ( $P<0.01$ )。因此, 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率对仿刺参的抗氧化能力有一定的促进作用。海参免疫因子是宿主抵御病原菌入侵的主要受体。这些免疫因子包括溶菌酶、模式识别蛋白、Toll 样受体、补体 C3 等可能参与海参先天免疫系统的体液因子<sup>[38]</sup>。Toll 样受体是 I 型整体膜糖蛋白家族, 主要作用于信号传导, 在先天免疫中起着关键作用。在仿刺参中, TLR3 在各组织中广泛表达, 并参与对革兰氏阴性菌和 dsRNA 病毒的免疫应答<sup>[39]</sup>。补体是免疫系统的重要组成部分, 在维持内部环境的平衡和细菌感染的免疫应答中发挥着关键作用<sup>[40]</sup>。肠道是机体重要的消化和免疫组织, 本研究中, 间隔饲喂壳寡糖可极显著提高仿刺参肠道 *Aj-tlr3*、*Aj-c3* 和 *Aj-rel* 基因的相对表达水平 ( $P<0.01$ ), 这一结果与肠道非特异性免疫酶活性的响应趋势基本一致。

### 3.4 间隔投喂壳寡糖对仿刺参消化酶的影响

水产动物消化酶活性的高低能反映其从饲料中消化利用营养物质的能力和效率, 进而影响水产动物的生长和发育情况。壳寡糖对不同水产动物肠道和胰腺的消化酶活性有着不同的作用效果。本研究中, 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率下, 仿刺参肠道蛋白酶活性极显著高于对照组 ( $P<0.01$ ), 肠道脂肪酶活性显著高于对照组 ( $P<0.05$ ), 说明此时脂肪和蛋白质为仿刺参提供更多能量, 脂肪酶和蛋白酶活性升高。淀粉酶活性与对照组无显著差异, 说明碳水化合物作为能量物质的转换相对较少, 因此淀粉酶活性变化不大。饲料中添加壳寡糖可提高红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)<sup>[33]</sup>、珍珠龙胆石斑鱼 [*Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatus* (♂)]<sup>[41]</sup>、花鲈

(*Lateolabrax japonicus*)<sup>[42]</sup> 和克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)<sup>[43]</sup> 的消化酶活性, 在本研究中, 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率也显著提高了仿刺参肠道脂肪酶和蛋白酶活性, 因此 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率较为可行。

### 3.5 间隔投喂壳寡糖对仿刺参组织学的影响

本实验中, 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率提高了仿刺参肠道结构的完整性, 并且对仿刺参肠道的绒毛高度和肌层厚度有很好的改善作用。肠道是仿刺参对营养物质消化吸收的主要场所, 饮食中的物质可以被胃肠道细胞利用, 并刺激局部结构的变化<sup>[44]</sup>。同时, 肠道形态变化能反映和评估肠道的功能和肠道的健康状态。肠道绒毛高度及宽度、微绒毛数量及密度、肌层厚度等是影响动物对营养物质进行吸收的重要因素<sup>[45]</sup>。本研究中, 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率极显著提高了前肠肌层和浆膜层厚度 ( $P<0.01$ ), 以及中肠肠道绒毛高度和宽度 ( $P<0.01$ ), 肠绒毛排列规则, 发育形态较好。说明该饲喂频率下的壳寡糖有利于仿刺参肠道消化面积的增加, 提高营养物质的吸收效率, 其机制可能是通过促进肠道黏液的分泌, 从而保护肠道绒毛的完整性不被破坏。有研究表明, 海参可通过呼吸树吸收溶解在水中的营养物质<sup>[46]</sup>。本研究中, 与对照组相比, 实验组仿刺参呼吸树形态无显著变化, 因此, 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率不会破坏仿刺参呼吸树的结构和完整性。

### 3.6 间隔投喂壳寡糖对仿刺参抗病力的影响

灿烂弧菌是严重威胁仿刺参养殖业持续健康发展的重要病原菌之一, 间隔饲喂壳寡糖可提高仿刺参对灿烂弧菌的抗病力。攻毒后的存活率能直观地评价动物机体的免疫抗病能力<sup>[47-48]</sup>。本实验中, 3 天 1 次的壳寡糖饲喂频率提高了攻毒后仿刺参的存活率, 这同非特异性免疫酶指标结果相似。在攻毒后, 实验组和对照组均在同一天开始出现死亡, 3 天 1 次的壳寡糖饲喂并未延后死亡开始出现的时间, 可能是样本量较少, 未体现出延缓死亡的效果。但在存活率上, 实验组表现更好。有研究证明, 壳寡糖能提高吉富罗非鱼 (*GIFT Oreochromis niloticus*) 对嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 的抗病力<sup>[49]</sup>, 增强珍珠龙胆石斑鱼抗哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 的能力<sup>[50]</sup>, 增强仿刺参抗灿烂弧菌的能力<sup>[18]</sup>, 本研究中实验组能提高攻毒后刺参的存活率, 说明 3 天 1 次的



壳寡糖饲喂频率对仿刺参具有一定的保护作用。结合已有研究, 推测这种免疫作用极有可能和肠道、体腔细胞的先天免疫活动有关<sup>[51]</sup>, 同时通过直接作用于致病菌细胞膜或通过产生活性氧以抑制其生长<sup>[4]</sup>。

#### 4 结论

综上所述, 以3天1次的频率饲喂添加量为0.5%的壳寡糖, 能够提高仿刺参生长、免疫、抗氧化能力, 改善其肠道功能及形态学特征。因此, 养殖中适宜以该方式饲喂仿刺参, 以提高其免疫能力。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [1] 郭盈莹, 丁燕, 徐飞飞, 等. 海参中主要生物活性成分研究进展 [J]. 食品科学, 2014, 35(15): 335-344.  
Guo Y Y, Ding Y, Xu F F, *et al.* Progress in research on main bioactive constituents of sea cucumber[J]. Food Science, 2014, 35(15): 335-344 (in Chinese).
- [2] 李成华. 刺参腐皮综合征发生的分子调控机制研究进展 [J]. 大连海洋大学学报, 2021, 36(3): 355-373.  
Li C H. Research progress on molecular regulation mechanism of skin ulcer syndrome in sea cucumber *Apostichopus japonicus*: a review[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2021, 36(3): 355-373 (in Chinese).
- [3] Mohan K, Rajan D K, Ganesan A R, *et al.* Chitin, chitosan and chitooligosaccharides as potential growth promoters and immunostimulants in aquaculture: a comprehensive review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 251: 126285.
- [4] Anil S. Potential medical applications of chitooligosaccharides[J]. *Polymers*, 2022, 14(17): 3558.
- [5] Liu Y, Yang H H, Wen F, *et al.* Chitooligosaccharide-induced plant stress resistance[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 302: 120344.
- [6] 刘纯铭, 余曼荣, 肖定福. 壳寡糖的生理功能及其在动物生产上的应用研究进展 [J]. *家畜生态学报*, 2023, 44(6): 1-7.  
Liu C M, Yu M R, Xiao D F. Research progress on physiological function of chitosan oligosaccharide and its application in animal production[J]. *Acta Ecologicae Animalis Domastici*, 2023, 44(6): 1-7 (in Chinese).
- [7] Lin S M, Mao S H, Guan Y, *et al.* Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*)[J]. *Aquaculture*, 2012, 342-343: 36-41.
- [8] Lin S M, Mao S H, Guan Y, *et al.* Dietary administration of chitooligosaccharides to enhance growth, innate immune response and disease resistance of *Trachinotus ovatus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(5): 909-913.
- [9] Chen G F, Yin B, Liu H Y, *et al.* Supplementing chitosan oligosaccharide positively affects hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *E. lanceolatus* ♂) fed dietary fish meal replacement with cottonseed protein concentrate: effects on growth, gut microbiota, antioxidant function and immune response[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2021, 8: 707627.
- [10] Wang J, Wu C S, Hu Y Z, *et al.* Plasmablasts induced by chitosan oligosaccharide secrete natural IgM to enhance the humoral immunity in grass carp[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 281: 119073.
- [11] 刘美思, 程立坤, 罗希, 等. 两种海洋寡糖对仿刺参免疫活性的影响 [J]. *海洋渔业*, 2016, 38(1): 51-56.  
Liu M S, Cheng L K, Luo X, *et al.* Influence of two marine oligosaccharides on the immune activity of juvenile sea cucumber[J]. *Marine Fisheries*, 2016, 38(1): 51-56 (in Chinese).
- [12] 赵德鹏, 宋林生, 刘瑞, 等. 持续投喂 CpG ODNs 添加饲料引起中华绒螯蟹的免疫疲劳和肝胰腺损伤 [C]// 中国食品科学技术学会第十二届年会暨第八届中美食品业高层论坛论文集. 大连: 中国食品科学技术学会, 2015: 444-445.  
Zhao D P, Song L S, Liu R, *et al.* Immune-fatigue and hepatopancreas injury induced by continuous CpG ODNs-supplemented diet in Chinese mitten crab, *Eriocheirsinensis*[C]//Abstracts of Food Summit in China 2015 & 12th Annual Meeting of CIFST. Dalian: Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015: 444-445 (in Chinese).
- [13] 党慧凤, 张腾, 黎睿君, 等. 饲料中添加壳寡糖对仿刺参肠、触手、体壁、体腔液免疫指标的影响 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2019(9): 21-30.  
Dang H F, Zhang T, Li R J, *et al.* Effect of adding chitooligosaccharide on immunological indexes of intest-

- ine, tentacles, body wall and coelomic fluid of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2019(9): 21-30 (in Chinese).
- [14] 白楠. 凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei*、仿刺参 *Apostichopus japonicus* 免疫增强剂使用频率和免疫疲劳的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.  
Bai N. The research on frequency of administration of immunostimulants and immunity fatigue for white shrimp *Litopenaeus vannamei* and sea cucumber *Apostichopus japonicus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010 (in Chinese).
- [15] 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).
- [16] 郑子明, 王凯平, 潘祥林, 等. 荧光标记多糖及其体内药理学应用进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(6): 659-664.  
Zheng Z M, Wang K P, Pan X L, et al. Polysaccharide fluorescent labeling and its application in pharmacokinetics study *in vivo*[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2021, 41(6): 659-664 (in Chinese).
- [17] 张朋朋, 于明明, 吕志华. 壳三糖在大鼠体内的组织分布和排泄研究 [J]. 中国海洋药物, 2022, 41(4): 73-79.  
Zhang P P, Yu M M, Lü Z H. Tissue distribution and excretion study of chitotriose in rats[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2022, 41(4): 73-79 (in Chinese).
- [18] Ouyang A T, Zhang M W, Yuan G L, et al. Chitooligosaccharide boosts the immunity of immunosuppressed blunt snout bream against bacterial infections[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 242: 124696.
- [19] 韩丽蓉, 徐玮, 汪东风, 等. 壳寡糖对刺参生长、免疫反应和抗病力的影响 [J]. 中国海洋大学学报 (自然科学版), 2014, 44(3): 34-39.  
Han L R, Xu W, Wang D F, et al. Effect of dietary chitosan oligosaccharide on the growth, immune response and resistance against *Vibrio splendidus* infection of sea cucumber[J]. Periodical of Ocean University of China, 2014, 44(3): 34-39 (in Chinese).
- [20] 王孝平, 邢树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究 [J]. 天津化工, 2009, 23(3): 40-42.  
Wang X P, Xing S L. Determination of protein quantitation using the method of Coomassie Brilliant Blue[J]. *Tianjin Chemical Industry*, 2009, 23(3): 40-42(in Chinese).
- [21] 何伟聪, 董晓慧, 谭北平, 等. 益生菌对军曹鱼幼鱼生长性能、消化酶和免疫酶活性的影响 [J]. 动物营养学报, 2015, 27(12): 3821-3830.  
He W C, Dong X H, Tan B P, et al. Effects of probiotics on growth performance, digestive enzyme and immune enzyme activities of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*)[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(12): 3821-3830 (in Chinese).
- [22] 滕宏飞, 王丹静, 徐青, 等. 橄榄油乳化法测定脂肪酶活性的优化研究 [J]. 食品工业, 2011, 32(6): 80-83.  
Teng H F, Wang D J, Xu Q, et al. Optimization study of olive oil emulsification method determining lipase activity[J]. *The Food Industry*, 2011, 32(6): 80-83 (in Chinese).
- [23] Wang R Y, Li X F, Tang J W, et al. Dietary effect chitosan nanoparticles on growth performance, immunity and resistance against *Vibrio splendidus* in the sea cucumber *Apostichopus japonicas*[J]. *Aquaculture Reports*, 2023, 30: 101625.
- [24] Wang T T, Sun Y X, Jin L J, et al. *Aj-rel* and *Aj-p105*, two evolutionary conserved NF- $\kappa$ B homologues in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and their involvement in LPS induced immunity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(1): 17-22.
- [25] 田秀慧, 徐英江, 郑伟云, 等. 氨基脲胁迫下刺参的组织学和酶学反应 [J]. 现代食品科技, 2020, 36(1): 35-42.  
Tian X H, Xu Y J, Zheng W Y, et al. Semicarbazide exposure induces histological damage and enzymatic reactions in *Apostichopus japonicas*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(1): 35-42 (in Chinese).
- [26] 徐贵珠. 壳寡糖和茶多糖对中华绒螯蟹生长性能、免疫和抗氧化能力的影响 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2014.  
Xu G Z. Effect of chitosan oligosaccharide and tea polysaccharide on growth, immune response and antioxidative of *Eriocheir sinensis*[D]. Ya'an: Sichuan Agriculture University, 2014 (in Chinese).

- [27] 赵爽, 袁超, 万籁声, 等. 壳寡糖对热带糙海参 (*Holothuria scabra*) 体腔细胞吞噬活性影响 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(8): 3237-3240.  
Zhao S, Yuan C, Wan L S, *et al.* Effect of COS on phagocytic activity of coelomic cell of tropical sea cucumber (*Holothuria scabra*) [J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(8): 3237-3240 (in Chinese).
- [28] 任媛, 李强, 王轶南, 等. 棘皮动物体腔细胞的研究进展 [J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(2): 91-97.  
Ren Y, Li Q, Wang Y N, *et al.* Research advances on coelomocyte of Echinodermata [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2019, 21(2): 91-97 (in Chinese).
- [29] 吴芳丽, 王月, 尚跃勇, 等. 水生无脊椎动物血淋巴细胞分类及免疫研究进展 [J]. 大连海洋大学学报, 2016, 31(6): 696-704.  
Wu F L, Wang Y, Shang Y L, *et al.* Current progress of research on classification and immunity of hemocytes in aquatic invertebrates: a review [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2016, 31(6): 696-704 (in Chinese).
- [30] Liu L Z, Wang M Y, Wei C, *et al.* Effects of dietary poly- $\beta$ -hydroxybutyrate supplementation on the growth, non-specific immunity, and intestinal microbiota of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 855938.
- [31] 刘洪展, 郑风荣, 孙修勤, 等. 氨氮胁迫对刺参几种免疫酶活性的影响 [J]. 海洋科学, 2012, 36(8): 47-52.  
Liu H Z, Zheng F R, Sun X Q, *et al.* Effect of exposure to ammonia nitrogen stress on immune enzyme of holothurian *Apostichopus japonicus* [J]. Marine Sciences, 2012, 36(8): 47-52 (in Chinese).
- [32] 刘均玲, 康静玮, 符中环, 等. 壳寡糖对海南热带糙海参免疫相关酶的影响 [J]. 海洋科学, 2017, 41(12): 26-31.  
Liu J L, Kang J W, Fu Z H, *et al.* Effect of COS on immune factors in the Hainan tropical sea cucumber *Holothuria scabra* [J]. Marine Sciences, 2017, 41(12): 26-31 (in Chinese).
- [33] 苏鹏, 潘金露, 韩雨哲, 等. 壳寡糖对红鳍东方鲀血液指标和非特异性免疫指标的影响 [J]. 大连海洋大学学报, 2016, 31(1): 37-43.  
Su P, Pan J L, Han Y Z, *et al.* Effects of dietary chitosan on hematological parameters and non-specific immunity of redfin puffer *Takifugu rubripes* [J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2016, 31(1): 37-43 (in Chinese).
- [34] Yu W, Yang Y K, Chen H M, *et al.* Effects of dietary chitosan on the growth, health status and disease resistance of golden pompano (*Trachinotus ovatus*) [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, 300: 120237.
- [35] 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*♀ × *T. vachelli*♂ [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(4): 707-716 (in Chinese).
- [36] 常杰, 牛化欣, 张文兵. 刺参免疫系统及其免疫增强剂评价指标的研究进展 [J]. 中国饲料, 2011(6): 8-12.  
Chang J, Niu H X, Zhang W B. Research advance in immune system of *Apostichopus japonicus* Selenk and its immunostimulants [J]. *China Feed*, 2011(6): 8-12 (in Chinese).
- [37] 方春华, 乔琨, 刘智禹, 等. 海洋生物中抗氧化酶的研究进展 [J]. 渔业研究, 2016, 38(4): 331-342.  
Fang C H, Qiao K, Liu Z Y, *et al.* The research progress of antioxidant enzymes in marine organisms [J]. Journal of Fisheries Research, 2016, 38(4): 331-342 (in Chinese).
- [38] Xue Z, Li H, Wang X L, *et al.* A review of the immune molecules in the sea cucumber [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(1): 1-11.
- [39] Sun H J, Zhou Z C, Dong Y, *et al.* Identification and expression analysis of two Toll-like receptor genes from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(1): 147-158.
- [40] Liu H Z, Zheng F R, Sun X Q, *et al.* Construction of cDNA library from intestine, mesentery and coelomocyte of *Apostichopus japonicus* Selenka infected with *Vibrio* sp. and a preliminary analysis of immunity-related genes [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2012, 11(2): 187-196.
- [41] 陈嘉俊, 石韞玉, 施斐, 等. 壳寡糖改善珍珠龙胆石斑鱼非特异性免疫能力的机制 [J]. 水产学报, 2022, 46(1): 95-106.  
Chen J J, Shi Y Y, Shi F, *et al.* Mechanism of oligochitosan improving non-specific immunity of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatus* (♂) [J].

- Journal of Fisheries of China, 2022, 46(1): 95-106 (in Chinese).
- [42] 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]. Acta Oceanologica Sinica, 2018, 40(2): 69-76 (in Chinese).
- [43] 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).
- [44] 樊英, 于晓清, 李乐, 等. 不同免疫增强剂对仿刺参肠道消化酶活性及组织结构的影响 [J]. 水产学杂志, 2014, 27(4): 46-51, 59.  
Fan Y, Yu X Q, Li L, *et al.* Effect of different immunostimulants on digestive enzyme activities and histological structure in intestine of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2014, 27(4): 46-51, 59 (in Chinese).
- [45] 王涵, 王浩娜, 赵业. 刺参肠道组织结构及消化酶活性分析 [J]. 大连海洋大学学报, 2022, 37(5): 823-829.  
Wang H, Wang H N, Zhao Y. Histological structure and digestive enzyme activity of intestine in sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2022, 37(5): 823-829 (in Chinese).
- [46] Martínez-Milián G, Olvera-Novoa M A, Toledo-Cuevas E M. Novel findings in sea cucumber's digestive capacities: enzymatic activities in the respiratory tree, implications for aquaculture[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2021, 52(6): 1259-1272.
- [47] 黄旭雄, 周洪琪. 甲壳动物免疫机能的衡量指标及科学评价 [J]. 海洋科学, 2007, 31(7): 90-96.  
Huang X X, Zhou H Q. The parameters reflecting immune state of crustacea and its scientific evaluation[J]. Marine Sciences, 2007, 31(7): 90-96 (in Chinese).
- [48] 韩梦瑶, 王晓梅, 王占旗, 等. 天然活性多糖在水产动物养殖中的应用 [J]. 水产学杂志, 2021, 34(4): 85-92.  
Han M Y, Wang X M, Wang Z Q, *et al.* Application of natural active polysaccharide in aquaculture[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2021, 34(4): 85-92 (in Chinese).
- [49] 孙立威, 文华, 蒋明, 等. 壳寡糖对吉富罗非鱼幼鱼生长性能、非特异性免疫及血液学指标的影响 [J]. 广东海洋大学学报, 2011, 31(3): 43-49.  
Sun L W, Wen H, Jiang M, *et al.* Effect of dietary chitosan on growth performance, non-specific immunity and hematological parameters of juvenile GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2011, 31(3): 43-49.
- [50] Zhang Y L, Tan H M, Wei G B, *et al.* The effect of chitosan oligosaccharide as an immune enhancer against *Vibrio harveyi* in pearl gentian grouper (♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus lanceolatus*)[J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(2): 541-546.
- [51] 胡睿同, 陈昊楠, 张家豪, 等. 壳寡糖对水产动物生理活性影响的研究进展 [J]. 饲料研究, 2023, 46(6): 123-127.  
Hu R T, Chen H N, Zhang J H, *et al.* Research progress on effect of chitosan oligosaccharides on physiological activity of aquatic animals[J]. Feed Research, 2023, 46(6): 123-127 (in Chinese).

## Effects of feeding chitosan oligosaccharide intermittently on growth, non-specific immunity activities and disease resistance of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)

LI Xiaofan, WANG Rongyue, HUANG Chong, TANG Jinwei, LIU Juan\*, LI Ruijun\*  
(College of Fish and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** Chitosan oligosaccharide (COS) is a potent immunopotentiator, but rarely used in aquaculture. The aim of this study is to investigate the effect of feeding COS intermittently on growth, non-specific immune indices, digestive enzyme activities, histological and disease resistance of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *A. japonicus* [mean body weight (18.51±0.28) g] were first fed for 8 weeks by two groups (control group, *A. japonicus* were fed with basal diet; treatment group, sea cucumbers were first fed with basal diet added 0.5% COS for 1 day and then fed with basal diet for 2 days). Growth performance, non-specific immune enzyme activities, intestinal enzyme activities, the structure of the respiratory tree, intestines, expression of intestinal immune gene and immune response were measured to investigate the effects of feeding frequency with COS once every 3 days of sea cucumber *A. japonicus*. The results indicated that treatment group had significantly higher ratio of visceral weight to body wall weight (VBR) and ratio of intestine weight to body wall weight (IBR) ( $P<0.01$ ). Phagocytic activity and respiratory outburst of coelomocytes in treatment group were significantly higher than those in control group ( $P<0.05$ ). The activities of enzymes such as acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), lysozyme (LZM) and total nitric oxide synthase (T-NOS) of intestine in treatment group increased significantly ( $P<0.01$ ) and the activities of AKP and LZM of intestine in treatment group increased by 70.06% and 156%, respectively. The mRNA relative expression of *Aj-lyz* gene ( $P<0.01$ ) of intestine in treatment group were significantly higher than that in control group, and the relative expression level of *Aj-lyz* gene of intestine in treatment group increased by 22.04%, respectively. The activity of catalase (CAT) of coelomocytes in treatment group was significantly higher than that in control group ( $P<0.01$ ), but the content of malondialdehyde (MDA) of coelomocytes and intestine showed no significant difference between the two groups ( $P>0.05$ ). Compared with the control group, the muscularis and serosa in foregut, fold height and fold width in midgut and hindgut were significantly increased in treatment group ( $P<0.01$ ). We found that the survival rate of the sea cucumber *A. japonicus* against infection with *Vibrio splendidus* was higher in the treatment group, with a relative protection rate of 66.67%. Above all, the feeding frequency of once every 3 days for COS is recommended to promote the growth performance, non-specific immunity and immune response of the *A. japonicus*. This study provides theoretical support for follow-up research.

**Key words:** *Apostichopus japonicus*; chitosan oligosaccharide; feeding frequency; immunoenzyme; antioxidant capacity; histology

**Corresponding authors:** LIU Juan. E-mail: [liujuan@dlou.edu.cn](mailto:liujuan@dlou.edu.cn);

LI Ruijun. E-mail: [liruijun@dlou.edu.cn](mailto:liruijun@dlou.edu.cn)

**Funding projects:** Basic Scientific Research Project of Higher Education Institutions of Liaoning Province (JYTMS20230487)