

# 灵芝多糖对黄颡鱼免疫细胞活性的影响

吴 旋,白东清,杨 广,宁 博,张雪涛,孙立卓

(天津农学院水产科学系,天津市水产生态及养殖重点实验室,国家级实践教学示范中心,天津 300384)

**摘要:**选取 540 尾黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*),连续投喂含不同水平灵芝多糖(300,600,900,1 200,1 500 mg/kg)的配合饲料 8 周。而后采用 Percoll 密度梯度离心等技术,对黄颡鱼头肾巨噬细胞与外周血白细胞进行分离纯化,使用 NBT 还原法、Griesse 试剂显色法与 MTT 法测定头肾巨噬细胞呼吸爆发活性与外周血白细胞的增殖能力,探讨灵芝多糖对黄颡鱼免疫细胞活性的影响。结果表明,灵芝多糖各水平组均能显著提高黄颡鱼头肾巨噬细胞的氧呼吸爆发活性和外周血白细胞的增殖能力( $P < 0.01$ );投喂灵芝多糖饲料后,各组头肾巨噬细胞氮呼吸爆发活性虽有提高,但只有 1 200~1 500 mg/kg 水平组为极显著提高( $P < 0.01$ )。灵芝多糖可以有效提高黄颡鱼免疫细胞的活性。

**关键词:**黄颡鱼;灵芝多糖;免疫细胞活性;呼吸爆发;细胞增殖

中图分类号:S963.736 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2011)03-0195-04

## Effects of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides on the Activation of Immunological Cells of the Yellow Catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)

WU Xuan, BAI Dong-qing, YANG Guang, NING Bo, ZHANG Xue-tao, SUN Li-zhuo

(Tianjin Key Laboratory of AQU-Ecology and Aquaculture, National Demonstration Center of Teaching Practice, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** In this test, 540 yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) were selected, and fed with different levels of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides (300, 600, 900, 1 200, 1 500 mg/kg diet, respectively) for 8 weeks. Then the head kidney macrophages and peripheral blood leukocytes of yellow catfish were separated by Percoll continuous density gradient centrifugation. NBT reduction, Griesse reagent coloration and MTT assay were respectively used to evaluate the respiratory burst activity of head kidney macrophages and proliferation of peripheral blood leukocytes, in order to discuss the effects of GLP on the activation of immunological cells of yellow catfish. The results showed that: the activity of oxygen respiratory burst activity of head kidney macrophages and the activity of proliferation of peripheral blood leukocytes of every levels of GLP group were extremely enhanced ( $P < 0.01$ ). Although the nitrogen respiratory burst activities of every level of GLP group were increased, only activities of 1 200~1 500 mg/kg GLP groups were obviously improved ( $P < 0.01$ ). As a result, *Ganoderma lucidum* polysaccharides could effectively enhance the activation of immunological cells of the Yellow catfish.

**Key words:** Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*); *Ganoderma lucidum* polysaccharides; Activation of immunological cells; Respiratory burst activity; Proliferation

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)是我国传统的淡水养殖品种,在分类学上隶属于鲇形目、鮠科、黄颡鱼属<sup>[1]</sup>。因其肉质细嫩、肉味鲜美而广受消费者喜爱<sup>[2]</sup>。近年来,随着集约化养殖程度不断提高,黄颡鱼疾病日趋频繁,并造成了很大的经济损失。而治疗用抗生素等药物会带来水体污染、耐药性增强、

富集作用加剧等许多负面影响。

目前,中草药多糖以其安全、高效、低毒等优点用于预防和治疗水产动物疾病,但在黄颡鱼上应用还未见报道。鉴于此,本研究采用口服免疫的方法,对黄颡鱼投喂含不同水平灵芝多糖(*Ganoderma lucidum* polysaccharides, GLP)的饲料,通过检测其头

收稿日期:2011-02-11

基金项目:天津市教委资助项目(2008ZD21);天津市农委资助项目(201004040)

作者简介:吴 旋(1984-),女,辽宁锦州人,硕士,主要从事水产动物营养与饲料学研究。

通讯作者:白东清(1970-),女,河北迁安人,教授,博士,硕士生导师,主要从事水产动物营养与饲料学的教学和研究工作。

肾巨噬细胞的呼吸爆发活性与外周血白细胞的增殖能力,以探讨防病机制,并为今后黄颡鱼免疫细胞活性与疫病防治等研究提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验鱼及养殖条件 2 龄健康黄颡鱼 540 尾取自天津农学院养殖渔场,平均体重( $60 \pm 5$ ) g,平均体长( $19 \pm 3$ ) cm。

试验鱼饲养于架设在养殖池中的  $1.5 \text{ m} \times 1.5 \text{ m} \times 1 \text{ m}$  的 18 个网箱中,每箱随机投放黄颡鱼 30 尾(雌雄各半)。灵芝多糖设 5 个水平组添加于饲料中,分别为 300 600 900 1 200 1 500 mg/kg,每组 3 个平行,以投喂不添加多糖的基础饲料组(粗蛋白 38% 粗水分 12% 粗灰分 12% 粗脂肪 3%) 为对照。试验期间水温保持在( $26 \pm 2$ ) °C,每天连续充氧,试验期间每天换水 1/3 左右。日投饵率为 2%,投喂 3 次/d。

1.1.2 多糖的制备 试验所用的灵芝粗多糖购于陕西方晟生物科技有限公司,采用水提醇沉淀法<sup>[3]</sup>进一步制备高纯度多糖。多糖采用 Sevage 法<sup>[4]</sup>去除蛋白,采用透析法<sup>[5]</sup>去除小分子杂质,活性炭吸附法<sup>[6]</sup>去除色素,最终采用苯酚-硫酸法<sup>[4]</sup>测定多糖的有效含量。灵芝多糖经过逐步分离纯化后,最终的纯度大于 90%。

1.1.3 试剂 L-45 培养基、脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)、Hanks 溶液、佛波豆寇乙酸脂(Phorbolmyristate acetate, PMA)、硝基蓝四氮唑(NBT)、肝素钠、超氧化物歧化酶标准品和噻唑兰(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT) 购于 SIGMA 公司;新生小牛血清和购自于 GIBCO 公司;链霉素/青霉素购于北京鼎国生物技术有限责任公司;硅石-聚乙烯吡咯烷酮(Phytohaemagglutinin, percoll)、细胞培养板购于 Pharmacia 公司;Griesse 试剂购于上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 黄颡鱼头肾巨噬细胞与外周血白细胞的分离 使用 MS-222 麻醉后,采用 Bayne 方法分离黄颡鱼头肾巨噬细胞<sup>[7]</sup>。使用 Percoll 密度梯度法<sup>[8]</sup>分离头肾巨噬细胞,并使用台盼蓝进行细胞活性检测计数,以确保活细胞的数量大于 90%,调整细胞浓度为  $1.0 \times 10^7$  cell/mL。27°C 培养备用。在无菌的条件下进行尾静脉抽血,外周血白细胞的分离方法同头肾巨噬细胞。

1.2.2 免疫细胞活性指标检测 头肾巨噬细胞氧呼吸爆发活性的测定采用 NBT 法<sup>[9]</sup>。每个多糖水平组细胞设 7 个平行,以添加 LPS(500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的细胞液作为阳性对照,以检测细胞在培养过程中的活性。使用酶联免疫检测仪,在 620 nm 下,测定吸光度值。每个水平检测 6 尾鱼。

头肾巨噬细胞氮呼吸爆发活性的测定采用 Griesse 试剂法<sup>[10]</sup>,其他操作同氧呼吸爆发活性的测定。在 540 nm 下测定吸光值。每个水平检测 6 尾鱼。

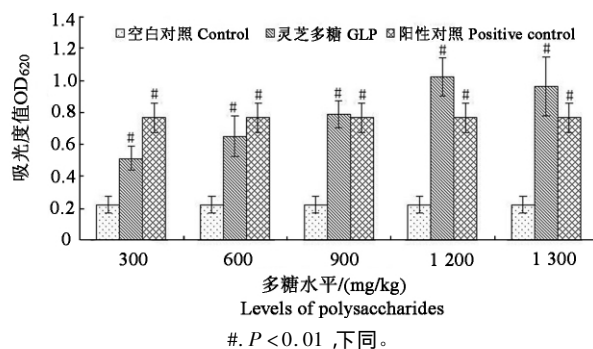
外周血白细胞的增殖采用 MTT 法检测<sup>[11]</sup>,每个多糖水平组细胞设 12 个平行,以添加 LPS(500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的细胞液作为阳性对照,培养 24 h 后,在 570 nm 的波长下测定各孔光吸收值,记录结果。每个水平检测 6 尾鱼。

1.2.3 数据处理 试验数据用平均值  $\pm$  标准误差表示,数据分析采用 SPSS17.0 软件包中的单因素方差分析(one-way-ANOVA)。P 值取 0.01 和 0.05。

## 2 结果与分析

### 2.1 灵芝多糖对黄颡鱼头肾巨噬细胞氧呼吸爆发活性的影响

用含有不同水平的灵芝多糖的饲料投喂黄颡鱼 8 周后,检测其头肾巨噬细胞氧呼吸爆发活性,发现阳性对照组(LPS 作用组)能显著提高头肾巨噬细胞氧呼吸爆发活性,说明试验过程中培养的细胞状态正常;灵芝多糖各水平组均能够极显著地提高头肾巨噬细胞的氧呼吸爆发活性( $P < 0.01$ ),且 300 ~ 1 200 mg/kg 试验组头肾巨噬细胞的氧呼吸爆发活性随多糖水平的增加而提高;1 500 mg/kg 多糖组氧呼吸爆发活性略有下降,但与 1 200 mg/kg 组差异不大( $P > 0.05$ ) (图 1)。可见,灵芝多糖水平为 1 200 mg/kg 对黄颡鱼头肾巨噬细胞氧呼吸爆发活性的提高效果最为显著。



#.  $P < 0.01$ , the same followed.

图1 灵芝多糖对黄颡鱼头肾巨噬细胞氧呼吸爆发活性的影响  
Fig. 1 The effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on oxygen respiratory burst activity of yellow catfish head kidney macrophages

## 2.2 灵芝多糖对黄颡鱼头肾巨噬细胞氮呼吸爆发活性的影响

投喂含有不同水平的灵芝多糖饲料 8 周后, 黄颡鱼头肾巨噬细胞氮呼吸爆发活性变化见图 2。与图 1 相似, 阳性对照组( LPS 作用组) 巨噬细胞氮呼吸爆发活性明显提高; 与对照相比, 黄颡鱼头肾巨噬细胞氮呼吸爆发活性随灵芝多糖水平的增加而提高, 但只在 1 200 ~ 1 500 mg/kg 时提高效果明显 ( $P < 0.01$ ), 且两个高水平组间活性变化不大 ( $P > 0.05$ )。可见, 从头肾巨噬细胞氮呼吸爆发活性提高角度上分析, 选择 1 200 mg/kg 灵芝多糖水平添加到饲料中较适宜。

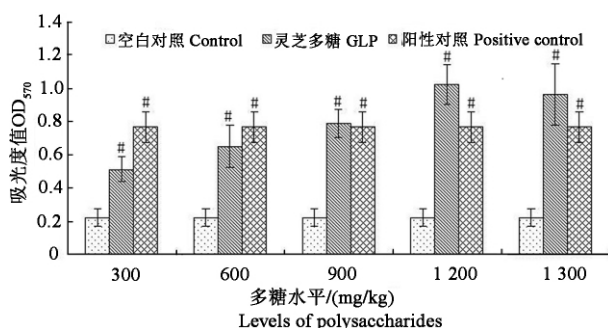


图 2 灵芝多糖对黄颡鱼头肾巨噬细胞氮呼吸爆发活性的影响

Fig.2 The effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on nitrogen respiratory burst activity of yellow catfish head kidney macrophages

## 2.3 灵芝多糖对黄颡鱼外周血白细胞增殖的影响

用含有不同水平的灵芝多糖饲料投喂黄颡鱼 8 周后, 黄颡鱼外周血白细胞增殖活性明显提高, 其中阳性对照组( LPS 作用组) 外周血白细胞增殖明显提高; 与对照组相比, 灵芝多糖各水平组均能极显著提高黄颡鱼外周血白细胞的增殖能力 ( $P < 0.01$ ); 且 900 ~ 1 500 mg/kg 水平组外周血白细胞增殖能力高于阳性对照组, 其中两个高水平组极显著高于阳性对照 ( $P < 0.01$ ), 以 1 200 mg/kg 水平组最为明显( 图 3)。可见, 从提高黄颡鱼外周血白细胞增殖角度考虑, 饲料中添加灵芝多糖适宜水平为 1 200 mg/kg。

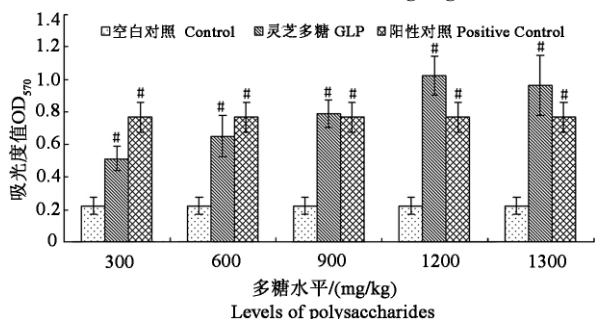


图 3 灵芝多糖对黄颡鱼外周血白细胞增殖能力的影响

Fig.3 The effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on proliferation of peripheral blood leukocytes of yellow catfish head kidney macrophages

## 3 讨论

### 3.1 多糖对动物细胞氧呼吸爆发活性的影响

中草药多糖能有效提高机体免疫力, 增强氧呼吸爆发活性。Yin 等<sup>[12]</sup>发现, 鲤鱼投喂含 0.5% 的灵芝多糖饲料 1 周后能显著地提高鲤鱼头肾巨噬细胞的氧呼吸爆发活性, 含 0.5% 的灵芝多糖与疫苗合并组在第 5 周也能显著地提高头肾巨噬细胞的氧呼吸爆发活性; 李哲<sup>[13]</sup>发现灵芝多糖能使小鼠巨噬细胞产生明显的氧呼吸爆发活性; László Ardó 等<sup>[14]</sup>曾报道, 分别用含 0.1% 的黄芪多糖或含 0.1% 金银花提取物的饲料投喂尼罗罗非鱼 1 ~ 4 周, 鱼中性粒细胞的氧呼吸爆发活性均高于对照组; 曹丽萍等<sup>[15]</sup>使用香菇多糖对鲤鱼头肾巨噬细胞进行离体培养, 得出香菇多糖能显著提高细胞的氧呼吸爆发活性, 且水平为 10  $\mu\text{g/mL}$  和 100  $\mu\text{g/mL}$  时提高作用极显著; 李军等<sup>[16]</sup>发现云芝多糖经腹腔注射小鼠后, 能增强其巨噬细胞氧呼吸爆发活性, 并对叔丁基氢过氧化物引起的损伤具有良好的抵抗力。

本试验结果表明, 不同水平的灵芝多糖添加到饲料中投喂黄颡鱼后, 其头肾巨噬细胞氧呼吸爆发活性显著提高, 这与上述研究结论相呼应。

### 3.2 多糖对动物细胞氮呼吸爆发活性的影响

NO 是 Science 评选出的明星分子, 已经成为国内外研究的热点。基于此, 国内外学者也正致力于中草药多糖诱导机体产生氮呼吸爆发活性方面的研究。Yin 等<sup>[17]</sup>研究发现, 黄芪多糖与脂多糖混合后对鲤鱼头肾巨噬细胞进行体外培养, 与对照组相比能显著的提高头肾巨噬细胞的氮呼吸爆发活性; 曹丽萍等<sup>[15]</sup>通过试验证明, 黄芪多糖较之空白对照组能够显著的提高鲤鱼巨噬细胞的氮呼吸爆发活性; 据游育红<sup>[18, 19]</sup>研究, 灵芝多糖与灵芝多糖肽均能促进小鼠腹腔的 iNOS 含量, 可增加巨噬细胞 NO 产生; 周娅<sup>[20]</sup>发现枸杞多糖灌胃与腹腔注射均可明显增加小鼠腹腔巨噬细胞中的 NO 诱生量及胞内溶菌酶的活性; 崔东安<sup>[21]</sup>通过试验得出, 与对照组相比, 蕨麻多糖能显著地诱导和激活体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞产生 NO, 并使 IL-1 $\beta$  和 TNF 产生呈剂量依赖性增加; 芦荟多糖能促进体外培养小鼠的巨噬细胞 iNOS 基因表达, 从而促进细胞 NO 合成和释放<sup>[22]</sup>。本试验得出灵芝多糖能提高黄颡鱼头肾巨噬细胞氮呼吸爆发活性, 与上述研究结果相一致。

### 3.3 多糖对动物外周血白细胞增殖活性的影响

白细胞是鱼类非特异性免疫系统中的一个重要组成部分, 承担着对病原菌的吞噬和杀菌作用<sup>[23]</sup>。

国内外学者对鱼类白细胞方面已进行大量工作,但关于中草药多糖对鱼类白细胞增殖方面的报道相对较少。李建军<sup>[24]</sup>发现,灵芝多糖能显著提高荷瘤小鼠血液中白细胞、淋巴细胞数量;张群<sup>[25]</sup>研究发现,灵芝多糖能促进小鼠巨噬细胞与淋巴细胞增殖。曹丽萍等<sup>[26]</sup>使用香菇多糖对鲤鱼外周血细胞进行离体培养,以检测其白细胞的增殖效果,结果表明,香菇多糖能显著提高外周血白细胞的增殖能力;Yin等<sup>[17]</sup>使用黄芪多糖水溶液对鲤鱼头肾巨噬细胞进行体外培养,结果显示巨噬细胞的增殖能力得到显著提高。本试验得出灵芝多糖能提高黄颡鱼外周血白细胞增殖能力,与上述研究结果可以相互印证。

由此可见,适宜水平的灵芝多糖能有效地促进机体非特异性免疫力的增强,可作为免疫增强剂添加到饲料中。

#### 参考文献:

- [1] 黄峰,严安生,熊传喜,等. 黄颡鱼的含肉率与鱼肉营养评价[J]. 淡水渔业, 1999, 29(10): 3-6.
- [2] 沈建中. 黄颡鱼的生物学特性及其养殖技术[J]. 养殖与饲料, 2002(3): 250-258.
- [3] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 124-178.
- [4] Staub A M. Removal of proteins from polysaccharides[J]. Methods Carbohydr Chem, 1965, 23: 55.
- [5] 林树钱,王赛贞,林志彬,等. 草蓼与段木栽培灵芝活性成分的分离与鉴定—多糖成分的提取、纯化及性质[J]. 中草药, 2003, 34(10): 872-874.
- [6] 臧晋,黄开勋. 液体深层培养中灵芝多糖的提取和纯化[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(4): 135-137.
- [7] Bayne C J. Pronephric leucocytes of *Cyprinus carpio*: Isolation, separation and characterization[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1986, 12: 141-151.
- [8] Shim K J, Jung K H, Chung M K, et al. Development of an in vitro environmental monitoring system by using immune cells[J]. J Health Sci, 2002, 48(2): 130-133.
- [9] Secombes C J. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity[C] // Stolen J S, Fletcher T C, Anderson D P, et al. Techniques in fish immunology III. NJ: SOS Publications, 1990: 138-154.
- [10] Green L C, Wagner D A, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids[J]. Anal Biochem, 1982, 126: 131-138.
- [11] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay[J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55-63.
- [12] Yin G J, Ardó L, Thompson K D, et al. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish Shellfish Immunology, 2008, 27(5): 26-33.
- [13] 李哲. 灵芝活性成分抗肿瘤作用机制的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [14] Ardó L, Yin G J, Xu P, et al. Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lonicera japonica*) and boron enhance the non-specific immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and resistance against *Aeromonas hydrophila* [J]. Aquaculture, 2008, 275: 26-33.
- [15] 曹丽萍,丁炜东,张柳,等. 香菇多糖和黄芪多糖对鲤鱼免疫细胞的活性和 IL-1 $\beta$  体外诱导表达的影响[J]. 水产学报, 2008, 4(32): 628-634.
- [16] 李军,周玫,陈暖. 活性氧对巨噬细胞呼吸爆发影响及云芝多糖的保护作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19(5): 361-365.
- [17] Yin G J, Wiegertjes G, Li Y M. Effect of *Astragalus radix* on proliferation and nitric oxide production of head kidney macrophages in *Cyprinus carpio*: an in vitro study[J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(28): 628-634.
- [18] 游育红,林志彬. 灵芝多糖(GLPP)对一氧化氮合酶(iNOS)的影响[J]. 中国药理通讯, 2003, 3(20): 51.
- [19] 游育红,林志彬. 灵芝多糖肽对小鼠腹腔巨噬细胞一氧化氮产生的影响[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(12): 1398-1401.
- [20] 周娅,佟书娟,王宁萍,等. 枸杞多糖对小鼠巨噬细胞内酶活性及 NO 诱导的影响[J]. 山东中医杂志, 2000, 19(6): 361-362.
- [21] 崔东安. 蕨麻多糖对吞噬细胞功能及免疫功能低下小鼠的免疫调节功能研究[D]. 兰州: 兰州畜牧与兽药研究所, 2008.
- [22] 侯敢,黄迪南,杨明,等. 芦荟多糖对小鼠腹腔巨噬细胞 NO 生成和 iNOS 酶活性的影响[J]. 湖南中医学院学报, 2006, 26(3): 20-22.
- [23] 板田腾信. 鱼类免疫的免疫系[J]. 北海道水产孵化场研报, 1988, 43: 11-35.
- [24] 李建军. 灵芝多糖免疫调节作用与抗肿瘤作用的关系及作用机制的研究[D]. 广州: 第一军医大学, 2007.
- [25] 张群. 灵芝多糖抗肿瘤作用的免疫分子机制研究[D]. 广州: 第一军医大学, 2006.
- [26] 曹丽萍,丁炜东,张柳,等. 香菇多糖对鲤鱼离体培养免疫细胞的活性调节作用[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(4): 616-621.