

# 一种复方中草药免疫增强剂对牙鲆免疫力及抗病力的影响<sup>\*</sup>

刁菁, 王友红, 王淑娴, 于晓清, 许拉, 王晓璐, 李乐, 盖春蕾, 叶海斌, 樊英<sup>\*\*</sup>

(山东省海洋生物研究院, 山东省海水养殖病害防治重点实验室, 山东青岛 266104)

**摘要:**为研究中草药复方制剂对牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 免疫力及抗病力的影响, 实验基于中草药药物功效与配伍原则, 研制出一种复方中草药免疫增强剂(YLK), 配方包含黄芪、茯苓、党参、蒲公英、鱼腥草、白花蛇舌草、金银花、玉竹、甘草、五味子等; 将复方中草药分别以1%(W:W)和3%(W:W)的添加量拌入基础配合饲料中, 连续投喂牙鲆30 d, 然后用迟钝爱德华氏菌 *Edwardsiella tarda* 攻毒, 分别于攻毒后24 h和72 h取鱼血清进行免疫相关酶活性测定, 同时在攻毒后6, 12, 24, 48, 72 h取鱼脾脏进行免疫相关基因表达水平的检测, 并观察记录鱼体的累计死亡情况。结果表明, 在迟钝爱德华氏菌感染后24 h和72 h, 3%中草药添加组的牙鲆血清中碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)、酸性磷酸酶(Acid Phosphatase, ACP)、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)以及溶菌酶(Lysozyme, LSZ)活性水平均显著高于仅投喂基础饲料的对照组; 1%中草药添加组除ALP活性以外, 其他3种酶活水平也显著高于对照组( $P < 0.05$ ), 2组不同中草药添加组鱼体血清酶活整体上差异不显著性; 荧光定量PCR检测结果显示, 各投喂组牙鲆脾脏组织中白介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素6(IL-6)、TCR $\alpha$ 受体及C型溶菌酶基因表达量均出现不同程度的上调, 而2个中草药投喂组牙鲆在感染后多个时间点的基因表达水平均高于单独投喂饲料组的牙鲆( $P < 0.05$ ); 添加3%中草药和1%中草药对牙鲆抗迟钝爱德华氏菌感染的相对保护率分别为34.2%和26.3%。研制的复方中草药制剂具有明显的免疫增强效果, 能显著提高牙鲆抗迟钝爱德华氏菌感染能力, 研究结果将为水产养殖中草药防病技术研究提供重要参考。

**关键词:** 中草药 免疫增强剂 酶活性 免疫相关基因 牙鲆

中图分类号: S948 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2020)02-0137-08

DOI: 10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20200603.001

## 0 引言

随着我国海水鱼工业化养殖的迅速发展, 集约化

的生产方式和养殖环境的恶化, 导致鱼类病害种类增多、暴发频率升高、危害程度加重, 成为制约我国鱼类养殖业健康发展的重要因素之一<sup>[1]</sup>。应用抗生素、消

<sup>\*</sup> 山东省重点研发计划(2018GHY115033, 2016CYJS04A01-3)和山东省海洋与渔业科技创新计划项目(2017YY15)资助。

### 【作者简介】

刁菁(1981—), 女, 副研究员, 博士, 主要从事水产动物医学研究, E-mail: doro530@sina.com。

### 【\*\*通信作者】

樊英(1980—), 女, 副研究员, 主要从事水产动物医学研究, E-mail: fy\_fy123@126.com。

### 【引用本文】

刁菁, 王友红, 王淑娴, 等. 一种复方中草药免疫增强剂对牙鲆免疫力及抗病力的影响[J]. 广西科学院学报, 2020, 36(2): 137-144.

DIAO J, WANG Y H, WANG S X, et al. Effects of a Compound Chinese Herbal Immune Enhancer on the Immunity and Disease Resistance in Japanese Flounders *Paralichthys olivaceus* [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2020, 36(2): 137-144.

毒剂等化学药物是水产养殖过程中病害防控的重要手段,但是其弊端也日益显现:化学药物的大量使用不仅会造成水产品药物残留,还能诱导病原微生物产生耐药性、造成水体污染等<sup>[2]</sup>。由于鱼类发病原因复杂,病原混合感染情况日益严重,特别是病毒性疾病暴发比例升高,传统的化学药物已不能起到有效的防治作用,鱼病防治难度不断加大<sup>[3]</sup>。为保证鱼类养殖业稳定可持续发展,满足消费者对绿色水产品的需求,保障养殖环境的清洁,研筛绿色安全高效的鱼病防控药物十分紧迫。中草药是自然界中可被人类直接药用的植物、动物以及矿物等的统称,在中医医疗中的应用具有悠久的历史,其天然高效、无残留、无毒副作用、无耐药性等特点引起人们的广泛关注<sup>[4-5]</sup>。近年来,中草药作为饲料添加剂在水产养殖动物疾病防治中的应用日益广泛,不仅显示出良好的抗菌、抗病毒和杀虫特性,还具有提高机体免疫力、促生长、抗应激、提高繁殖力等多种功效<sup>[6-9]</sup>。Wu等<sup>[10]</sup>研究发现苦参 *Sophora flavescens* 醇提取物能提高尼罗罗非鱼 *Oreochromis niloticus* 血清中溶菌酶活性,促进其非特异性免疫反应,显著增强其对链球菌的抗病能力;Haetrakul等<sup>[11]</sup>发现在鲤鱼 *Cyprinus carpio* 感染鲤疱疹病毒 3 型(CyHV-3)前后注射鳄嘴花 *Clinacanthus nutans* 叶片醇提取物具有显著的抗病毒作用;张耀武等<sup>[12]</sup>将黄芪、茯苓、金银花等组成的中草药复方经水煎及超微粉碎后添加在饲料中连续投喂 60 d,结果发现添加 0.5% 的复方中草药制剂对黄颡鱼的生长、血细胞的吞噬活性、溶菌酶活力影响显著。牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 是我国北方海水养殖经济鱼类的重要代表种。牙鲆养殖过程中的疾病种类多,在苗种培育及养成期均有发生,使牙鲆养殖业遭受巨大经济损失<sup>[13]</sup>。本研究基于中草药药物功效与配伍原则,研制出一种中草药复方免疫增强剂,通过投喂试验研究其对牙鲆抗细菌感染的效果,同时从免疫酶活及免疫基因水平分析复方中草药免疫增强剂对牙鲆免疫力的影响。研究结果将为海水鱼中草药防病技术研究提供重要参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株及试验动物

致病性迟钝爱德华氏菌 *Edwardsiella tarda* 由山东省海水养殖病害防治重点实验室从患病牙鲆中分离保存;健康牙鲆购自日照某养殖场,体长约(13±

1) cm,体重(30±5) g。

#### 1.1.2 试剂和耗材

中草药复方(YLK)由山东省海水养殖病害防治重点实验室根据中草药的药物功效和配伍原则研发,配方主要包括黄芪、茯苓、党参、蒲公英、鱼腥草、白花蛇舌草、金银花、玉竹、甘草、五味子等,中草药微粉由山东亚康药业股份有限公司加工制备,粉碎粒度为 80%,通过 200 目筛;RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒均购于 TaKaRa 公司;胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB)购自北京陆桥技术有限责任公司;免疫相关酶活性测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;其他试剂购自上海生工生物工程公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 中草药投喂试验

选取 240 尾健康牙鲆,随机分成 3 组,每组 80 尾,分别饲养于 3 m<sup>3</sup> 水槽内,连续充氧,每天换水 1 次,养殖水温(21±1)℃,暂养 15 d 后开始投喂试验,投喂配合颗粒饲料。其中,实验组 1 和实验组 2 拌饲投喂中草药复方 YLK 微粉,按每公斤配合颗粒饲料分别添加 10 g 和 30 g 配置成 1%(W:W)和 3%(W:W)的中草药饲料,对照组仅投喂配合颗粒饲料,每日早晚各投喂 1 次,投饵量为鱼体重的 4%,连续投喂 30 d。

#### 1.2.2 攻毒和取样

将迟钝爱德华氏菌接种于 TSB 中,28℃ 培养 12 h 后,6 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀,用 0.9% 无菌生理盐水洗 2 遍,将细菌重悬并调整浓度为 5×10<sup>7</sup> CFU/mL (10 倍菌株半致死浓度),对投喂后 31 d 的各实验组进行攻毒处理,每尾鱼经腹腔注射 0.1 mL 菌悬液。攻毒后各实验组鱼分别平均分为两组,每组 40 尾,其中一组用于观察鱼体死亡情况,另外一组用于组织取样。取样组在攻毒前及攻毒后 6,12,24,48,72 h 分别取鱼体的脾脏,在攻毒前及攻毒后 24 h 和 72 h 取鱼血清,每个时间点每组取 3 尾鱼。血清的取样方式为尾静脉取血,室温放置 2 h 后,转入 4℃ 过夜,次日于 4℃ 下 3 000 g 离心 15 min,取上清-20℃ 保存;将鱼体解剖后用无菌剪刀剪下脾脏并切成 0.5 cm 小块置于 RNAlater 中保存;血清和脾脏分别用于免疫相关酶活性及免疫相关基因表达水平的检测。攻毒后连续 14 d 观察记录鱼体的累计死亡情况,并计算中草药饲料投喂组的相对保护率,相对保护率(%)=(1-实验组死亡率/对照组死亡

率)×100%。

### 1.2.3 免疫相关酶活性的测定

利用酶活检测试剂盒检测鱼体血清中4种非特异性酶活活性,包括血清中碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)、酸性磷酸酶(Acid phosphatase, ACP)、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)以及溶菌酶(Lysozyme, LSZ)活性检测,检测流程参照南京建成试剂盒说明书进行。

### 1.2.4 免疫相关基因表达水平测定

采用荧光定量PCR检测免疫相关基因的应答变化。具体方法如下:以RNA提取试剂盒提取不同攻毒组各时间点牙鲈脾脏组织的总RNA,以High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit反转录合成cDNA第一链。设计特异性扩增牙鲈白介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白介素6(IL-6)、TCR $\alpha$ 受体及C型溶菌酶的引物(表1),以延伸因子1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )作为内参基因,利用SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>,在CFX96实时荧光定量PCR检测系统(Bio Rad, USA)中进行反应,所有反应均设置3个重复,热循环条件如下:95 $^{\circ}$ C预变性10 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40个循环;应用CFX96 Manager软件分析实验数据。以各投喂组攻毒前样品作为参照,计算各基因在免疫后不同时间点的相对表达量。

表1 本研究所使用的引物及其序列信息

Table 1 Sequences of primers used in this study

引物 Primer	序列信息 Sequence information (5'→3')
EF-1 $\alpha$ F	CTCGGGCATAGACTCGTGGT
EF-1 $\alpha$ R	CATGGTCGTGACCTTCGCTC
IL-1 $\beta$ F	CAGCACATCAGAGCAAGACAACA
IL-1 $\beta$ R	TGGTAGCACCCGGCATTCT
IL-6 F	CAGCTGCTGCAAGACATGGA
IL-6 R	GATGTTGTGCGCCGTCATC
TCR $\alpha$ F	GGTCTGATGCTTCACAGTGTGAG
TCR $\alpha$ R	ACCGCCGATCTTTCTTCA
C-type lysome F	TGTCATTGTGGCGATCAAATG
C-type lysome R	GCTCCGATCCCGTTTGG

### 1.3 数据分析

实验所得数据结果以平均数±标准误差(Mean±SDE)表示。数据的统计分析采用SPSS 17.0软件进行单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 投喂中草药 YLK 对牙鲈血清中免疫相关酶活性的影响

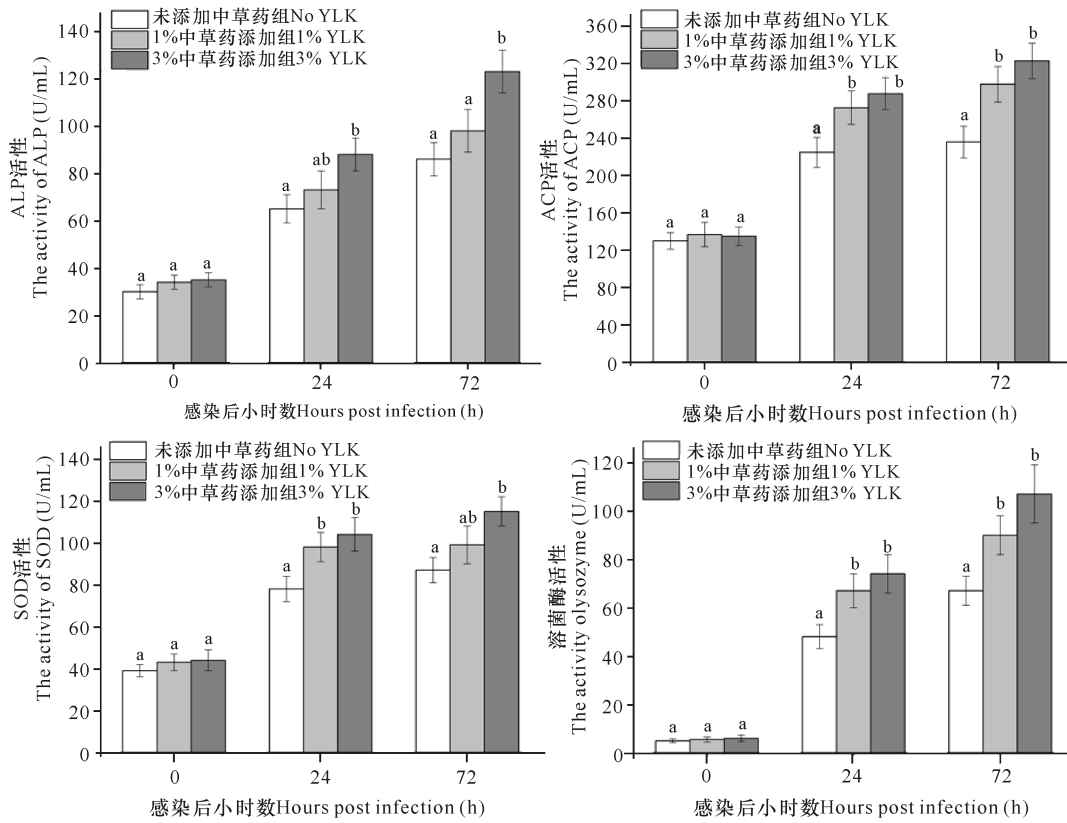
酶活检测结果显示,在迟钝爱德华氏菌攻毒后,各实验组鱼体血清中ACP、ALP、SOD和LSZ活性水平均表现出不同程度的升高趋势(图1),攻毒后24 h酶活水平显著高于攻毒前,其中3%中草药添加组在感染后24 h和72 h,4种酶的活性水平均显著高于对照组,而1%中草药添加组除ALP活性以外,其他3种酶活水平也显著高于对照组。另外,两种不同比例中草药添加组鱼体血清中酶活整体上没有显著性差异,仅在感染后72 h 3%中草药添加组的ALP活性显著高于1%中草药添加组。

### 2.2 投喂中草药 YLK 对牙鲈脾脏中免疫相关基因表达水平的影响

荧光定量PCR检测结果如图2显示,各投喂组牙鲈在迟钝爱德华氏菌攻毒后,脾脏组织中4种免疫相关基因表达量整体上均出现不同程度的上调,而两个不同比例中草药添加组牙鲈在免疫后多个时间点的基因表达水平均高于单独投喂饲料组的牙鲈。其中,投喂中草药组能较强地诱导IL-1 $\beta$ 基因的表达,在攻毒后48 h表达量达到最高值,且显著高于对照组,然后逐渐下调;IL-6基因在攻毒后72 h内均呈现显著的上调表达,其中对照组和1%中草药添加组在攻毒后24 h达到最大值,3%中草药添加组在攻毒后48 h达到最大值,然后出现缓慢下调;TCR $\alpha$ 基因和C型溶菌酶基因在攻毒后72 h内均发生上调表达,分别在攻毒后48 h和24 h达到最高值,然后缓慢下降,且投喂中草药组显著高于单独投喂饲料组。比较两个中草药添加组牙鲈脾脏组织中4种免疫相关基因表达量,3%中草药添加组比1%中草药添加组更能诱导更高水平的基因表达。

### 2.3 投喂中草药 YLK 对牙鲈抗迟钝爱德华氏菌感染能力的影响

攻毒试验发现,不同投喂组牙鲈在注射感染迟钝爱德华氏菌后,均出现不同程度的死亡情况(图3),其中对照组在感染后12 d达到死亡高峰,累积死亡率为95%,3%中草药添加组和1%中草药添加组分别在感染后10 d和11 d达到死亡高峰,累积死亡率分别为62.5%和70%。通过公式计算,添加3%中草药和1%中草药对牙鲈抗迟钝爱德华氏菌感染的相对保护率分别为34.2%和26.3%。



不同字母标注代表组间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )

Different letters indicates the significant difference between two groups ( $P < 0.05$ )

图1 中草药 YLK 对血清中非特异免疫酶活性的影响

Fig. 1 The effect of Chinese herbal formula YLK on non-specific enzyme activity in sera

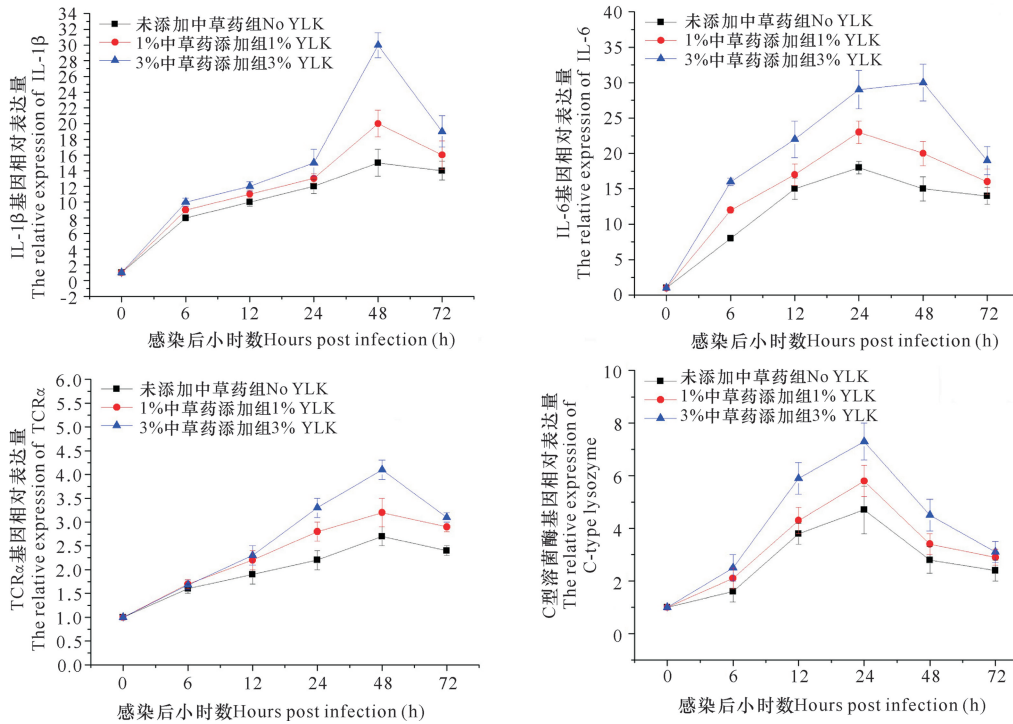


图2 中草药 YLK 对脾脏中免疫相关基因表达水平的影响

Fig. 2 The effect of Chinese herbal formula YLK on the immune-related genes in spleen

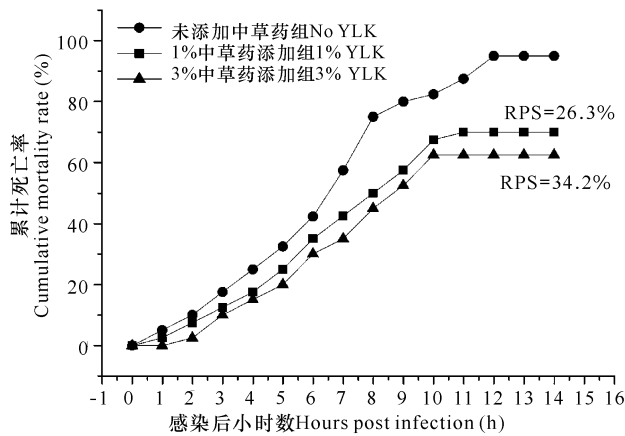


图3 不同投喂组在迟钝爱德华氏菌攻毒后的累积死亡率

Fig. 3 The cumulative mortality rates of Japanese flounders challenged with *Edwardsiella tarda*

### 3 讨论

#### 3.1 中草药 YLK 对牙鲆血清非特异免疫功能的影响

鱼类属于较低等的脊椎动物,非特异性免疫是其抵抗疾病的重要屏障,当非特异免疫力降低时,鱼类疾病发生概率大大增加。鱼类血清中的溶菌酶(LSZ)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)以及超氧化物歧化酶(SOD)等活性酶类,是其重要的体液免疫因子,也是反映鱼类非特异免疫力的重要指标。LSZ 广泛存在于鱼类黏液、组织器官分泌液、血清以及吞噬细胞溶酶体中,能水解细菌细胞壁中的肽聚糖导致细菌溶解,还具有激活补体作用,在抗感染免疫过程中具有重要的作用<sup>[14]</sup>;ALP 和 ACP 是吞噬细胞溶酶体酶的重要组成部分,其水解作用可以将病原体破坏降解,在非特异细胞免疫中发挥作用<sup>[15]</sup>;SOD 则是鱼体抗自由基损伤的关键抗氧化酶,在机体氧化与抗氧化平衡中起到至关重要的作用,能够指示鱼体的整体免疫功能<sup>[16]</sup>。已有研究表明,不同的中草药配方拌饲投喂鱼体均能不同程度地提高鱼体的非特异性酶活水平。李霞等<sup>[17]</sup>投喂添加含黄芪、白术、防风、百部、仙鹤草、土茯苓等复方中草药后,牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 碱性磷酸酶活性和溶菌酶活性含量随中草药添加浓度和投喂时间的增加而增多;Wu 等<sup>[18]</sup>发现在饲料中添加车前草和鱼腥草可有效提高军曹鱼 *Rachycentron canadum* 超氧化物歧化酶活性、活性氧生成及溶菌酶活性等非特异性免疫指标。Chen 等<sup>[19]</sup>发现黄连素可使团头鲂 *Megalobrama amblycephala* 的酸性磷酸酶、溶菌酶活性和补体

C3 含量等免疫指标明显提高。白东清等<sup>[20]</sup>研究表明长期连续投喂适宜水平的黄芪多糖能有效地促进黄颡鱼 *Pelteobagrus fulvidraco* 体内 SOD、LSZ 活力。本研究也同样发现,中草药 YLK 投喂组牙鲆在人工感染迟钝爱德华氏菌后血清中 ACP、ALP、SOD 和 LSZ 活性水平显著高于对照组水平,表明本研究研制的中草药配方 YLK 可显著提升牙鲆的非特异免疫水平。然而不同中草药添加组之间没有显著性差异,说明在饲料中添加 1% 中草药即能较好地激活和提高鱼体免疫酶及抗氧化酶活性,增强鱼体非特异免疫功能。

#### 3.2 中草药 YLK 对牙鲆免疫相关基因表达水平的影响

病原在入侵鱼体后会引发免疫相关基因的上调或下调表达,基因表达水平的高低能够反映鱼体的免疫应答水平,可作为疫苗及免疫增强剂效果评价的重要指标。例如,白细胞介素家族是由单核细胞、淋巴细胞及其他细胞所产生的一类非常重要的细胞因子,IL-1 $\beta$  作为 IL 家族重要的一员,是最早表达的一类炎性细胞因子,它能诱导淋巴细胞的生长以及分泌一些细胞因子来增强免疫应答,起到抗细菌、病毒、肿瘤的作用;IL-6 是一种功能广泛的多效性细胞因子,可调节淋巴细胞的增殖与分化,具有调节免疫应答、急性期反应及造血功能,在机体的抗感染免疫反应中起重要作用<sup>[21-22]</sup>。T 细胞受体(TCR)是 T 细胞的表面标志,作为 T 细胞识别和结合内/外源性抗原的表面分子,TCR 在免疫应答和免疫调节中发挥着重要的作用<sup>[23]</sup>。我们在前期研究中发现脂多糖与  $\beta$  葡聚糖对迟钝爱德华氏菌亚单位疫苗具有免疫促进效果,能够显著上调免疫后牙鲆脾脏组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TCR $\alpha$  及 C 型溶菌酶等 6 种免疫相关基因表达量<sup>[24]</sup>;石和荣等<sup>[25]</sup>在投喂的基础饲料中添加由板蓝根、黄芩、黄芪、忍冬藤、白芷和甘草组成的复合中草药添加剂,可以提高虎龙杂交石斑鱼肾脏和脾脏中白细胞介素  $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、干扰素  $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) 和热休克蛋白 70(HSP70)免疫相关基因的表达量;高风英等<sup>[26]</sup>利用生物素标记基因检测罗氏沼虾溶菌酶基因表达产物含量,结果表明经弧菌感染后,溶菌酶基因多个靶器官的表达量均比未经感染弧菌的罗氏沼虾高,说明病原菌感染可使体内溶菌酶基因转录量增加,溶菌酶基因在非特异性免疫中有着直接作用。本研究发现各投喂组牙鲆在迟钝爱德华氏菌攻毒后,脾脏组织中 4 种免疫相关基因表达量整体上均出现不同程度的

上调,而两个中草药投喂组牙鲆在免疫后多个时间点的基因表达水平均显著高于单独投喂饲料组的牙鲆,说明添加的中草药制剂能显著提升牙鲆的免疫应答水平,而其与鱼体的抗病能力存在密切相关性。

### 3.3 中草药 YLK 对牙鲆抗病原菌感染能力的提升

将不同功效的中草药依据中医理论配伍形成的中草药复方制剂,可以通过协同作用表现出杀灭病原、增强机体免疫系统功能、抗炎和抗应激以及补充营养促进生长等多重功效,从而对水产养殖动物疾病的预防和治疗发挥作用。李超等<sup>[27]</sup>研究发现在基础饲料中添加由黄芪、党参、板蓝根、大黄等组成的中草药复方制剂投喂草鱼后,其吞噬细胞活力、血清溶菌活力、血清抗菌活力等均显著升高,草鱼对多子小瓜虫及嗜水气单胞菌的抗感染能力均得到提升;马爱敏等<sup>[28]</sup>用分别含连翘、猪苓、黄芩、茯苓和黄连水提取物的配合饵料饲喂美国红鱼 *Sciaenops ocellatus*,其结果表明投喂含有黄芩和茯苓的药饵可使美国红鱼的体长增长率和相对增质量率显著提高,美国红鱼血液白细胞的吞噬活性和血清溶菌酶活性显著提高,利用哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi* 人工感染美国红鱼后黄芩组的相对免疫保护率最高达 88.9%。本研究基于药物特性和中药配伍法则,选取补益类中草药黄芪、茯苓、党参等及清热解毒类中草药蒲公英、鱼腥草、白花蛇舌草、金银花等,形成 1 种复方中草药免疫增强剂 YLK,研究发现通过拌饲投喂 YLK,可显著降低牙鲆感染迟钝爱德华氏菌后的死亡率,显示出良好的免疫保护效果,且随着中草药添加量的增加,免疫保护效果更优。结合本研究对于牙鲆血清免疫相关酶活性及免疫相关基因表达水平的检测结果,分析中草药 YLK 中的活性成分可能通过直接的抗菌作用、增强单核细胞或中性粒细胞的吞噬功能、促进溶菌酶的分泌及活力、促进细胞因子的产生以及抗炎促消化等作用,提高牙鲆非特异性免疫功能,增强鱼体对病原的防御力。然而,目前对于中草药作用机理的深入研究不足,缺少完善的中草药研筛技术体系,限制中草药在水产养殖动物病害中的精准研发。大力开展中草药活性成分功能分析以及中草药与水产养殖动物机体间的相互作用机理研究,将有力推动中草药在水产病害防治领域发展应用。

## 4 结论

中草药作为中国传统瑰宝,具有天然、高效、毒副作用小、抗药性不显著、资源丰富等优点,兼有药性和

营养性,是替代抗生素解决目前水产养殖病害问题的有效途径之一,已广泛应用于水产病害防治领域。本研究根据中药药理作用,研制出一种中草药复方免疫增强剂,通过投喂试验发现其具有明显的免疫增强效果,能显著提高牙鲆抗迟钝爱德华氏菌感染能力,研究结果将为水产养殖中草药防病技术研究提供重要参考。

### 参考文献

- [1] 雷霖霖. 中国海水养殖大产业架构的战略思考[J]. 中国水产科学, 2010, 17(3): 600-609.
- [2] RICO A, SATAPORNVANIT K, HAQUE M M, et al. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: A critical review [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2012, 4(2): 75-93.
- [3] TORANZO A E, MAGARIÑOS B, ROMALDE J L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems [J]. *Aquaculture*, 2005, 246(1-4): 37-61.
- [4] 丁自勉, 石凤敏. 中国中草药饲料添加剂的现状与展望 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2013, 15(3): 446-454.
- [5] 李鹏飞, 余庆, 罗永巨, 等. 广西水产疫病防控技术体系建设与水产养殖业高质化生态发展展望 [J]. *广西科学院学报*, 2019, 35(3): 161-165.
- [6] 戈贤平, 缪凌鸿, 刘波. 中草药增强水生动物免疫和抗病能力的研究进展 [J]. *中国渔业质量与标准*, 2015, 5(6): 1-7.
- [7] 周疆, 郑凯妮, 朱斐. 中草药在水产动物免疫上的应用 [J]. *浙江农林大学学报*, 2019, 36(2): 406-414.
- [8] REVERTERA M, BONTEMPS N, LECCHINI D, et al. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives [J]. *Aquaculture*, 2014, 433: 50-61.
- [9] PU H Y, LI X Y, DU Q B, et al. Research progress in the application of Chinese herbal medicines in aquaculture: A Review [J]. *Engineering*, 2017, 3(5): 731-737.
- [10] WU Y R, GONG Q F, FANG H, et al. Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(1): 220-227.
- [11] HAETRAKUL T, DUNBAR S G, CHANSUE N. Antiviral activities of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau extract against Cyprinid herpesvirus 3 in koi (*Cyprinus carpio koi*) [J]. *Journal of Fish Disease*, 2018, 41(4): 581-587.

- [12] 张耀武, 郑建武, 李文辉, 等. 复方中草药制剂对黄颡鱼生长和非特异性免疫功能的影响[J]. 水产科学, 2010, 29(4): 225-228.
- [13] 肖国华, 王玉梅, 朱青杰, 等. 牙鲆流行病学调查研究[J]. 河北渔业, 2007(10): 44-46, 54.
- [14] 郑清梅, 吴锐全, 叶星. 水产动物溶菌酶的研究进展[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(4): 483-487.
- [15] 张明明, 王雷, 王宝杰, 等. 凡纳滨对虾碱性磷酸酶和酸性磷酸酶基因的克隆、表达及盐度应答效应[J]. 海洋科学, 2017, 41(1): 83-95.
- [16] 郭勤单, 王有基, 吕为群. 温度和盐度对褐牙鲆幼鱼渗透生理及抗氧化水平的影响[J]. 水生生物学报, 2014, 38(1): 58-67.
- [17] 李霞, 马驰原, 李雅娟, 等. 中草药对牙鲆免疫力的影响[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(3): 60-67.
- [18] WU Y S, CHEN Y Y, UENG P S, et al. Effects of medicinal herbs "*Plantago asiatica*", "*Houttuynia cordata*" and "*Mentha haplocalyx*" on non-specific immune responses of cobia (*Rachycentron canadum*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 58: 406-414.
- [19] CHEN Q Q, LIU W B, ZHOU M, et al. Effects of berberine on the growth and immune performance in response to ammonia stress and high-fat dietary in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 55: 165-172.
- [20] 白东清, 吴旋, 郭永军, 等. 长期投喂黄芪多糖对黄颡鱼抗氧化及非特异性免疫指标的影响[J]. 动物营养学报, 2011, 23(9): 1622-1630.
- [21] 王惠菊. 鱼类 ILF2 和 IL-21 基因克隆与表达研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [22] 潘雪霞, 邵健忠, 项黎新, 等. 鱼类几种新型免疫因子的研究进展[J]. 水产学报, 2005, 29(2): 263-269.
- [23] CASTRO R, BERNARD D, LEFRANC M P, et al. T cell diversity and TcR repertoires in teleost fish [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(5): 644-654.
- [24] DIAO J, YE H B, YU X Q, et al. Adjuvant and immunostimulatory effects of LPS and  $\beta$ -glucan on immune response in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2013, 156: 167-175.
- [25] 石和荣, 何琪, 吕晴霁, 等. 饲料中添加复方中草药或核苷酸对虎龙杂交石斑鱼生长和免疫的影响[J]. 水产学杂志, 2019, 32(6): 41-47.
- [26] 高风英, 叶星, 白俊杰, 等. 罗氏沼虾 18S rRNA 基因生物素标记探针的制备及应用[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 124-127.
- [27] 李超, 张其中, 朱成科, 等. 增强草鱼免疫功能的复方中草药免疫增强剂筛选[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2012, 37(4): 121-129.
- [28] 马爱敏, 闫茂仓, 常维山, 等. 5 种中草药对美国红鱼生长和免疫机能的影响[J]. 海洋科学, 2009, 33(12): 96-102.

## Effects of a Compound Chinese Herbal Immune Enhancer on the Immunity and Disease Resistance in Japanese Flounders *Paralichthys olivaceus*

DIAO Jing, WANG Youhong, WANG Shuxian, YU Xiaoqing, XU La, WANG Xiaolu, LI Le, GAI Chunlei, YE Haibin, FAN Ying

(Shandong Key Laboratory of Disease Control in Mariculture, Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao, Shandong, 266104, China)

**Abstract:** In order to study the effect of Chinese herbal medicine compound preparation on *Paralichthys olivaceus* immunity and disease resistance, based on the efficacy and compatibility of Chinese herbal medicine, the experiment developed a compound Chinese herbal medicine immune enhancer. The formula contained *Astragalus membranaceus*, *Poria cocos*, *Codonopsis pilosula*, *Taraxacum mongolicum*, *Houttuynia cordata*, *Herba Hedysotis diffusae*, *Lonicera japonica*, *Polygonatum odoratum*, *Glycyrrhiza uralensis* and *Schisan-*

*dra chinensis* etc. The compound Chinese herbal medicines were mixed into the basic compound feed at the dosages of 1% (W : W) and 3% (W : W) respectively, and were continuously fed to flounder for 30 d. Then the fish was challenged by intramuscular injection with *Edwardsiella tarda*. The fish serum was taken at 24 h and 72 h after challenge to measure the activity of immune related enzymes. At the same time, at 6, 12, 24, 48, 72 h after challenge, the spleen of the fish was taken to detect the expression level of immune-related genes, and the cumulative death of the fish was observed and recorded. The results showed that 24 h and 72 h after *E. tarda* infection, in the serum of *P. olivaceus* in the 3% Chinese herbal supplement group, the activity levels of alkaline phosphatase (ALP), acid phosphatase (ACP), superoxide dismutase (SOD) and lysozyme (LSZ) were significantly higher than that in control group fed only by basic feed. In addition to the ALP activity in the 1% Chinese herbal medicine addition group, the other three enzyme activities were also significantly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in serum enzyme activity between the two groups with different Chinese herbal medicines. The results of fluorescent quantitative PCR showed that the expression levels of interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6), TCR $\alpha$  receptor and C-type lysozyme genes in the spleen tissue of *P. olivaceus* in each feeding group were up-regulated to varying degrees. However, the gene expression level of *P. olivaceus* in the two Chinese herbal medicine fed groups at multiple time points after infection was higher than that of the *P. olivaceus* group fed alone ( $P < 0.05$ ). The relative protection rates of adding 3% Chinese herbal medicine and 1% Chinese herbal medicine to *P. olivaceus* against *E. tarda* infection were 34.2% and 26.3%, respectively. These results indicated that the Chinese herbal formula could enhance the immunity of flounders and significantly improve the resistance of flounder to the infection of *E. tarda*, which could provide an important reference for the research on the disease prevention technology of Chinese herbal medicine in aquaculture.

**Key words:** Chinese herbal medicine, immuno-enhancer, enzyme activity, immuno-related gene, Japanese flounder

责任编辑:米慧芝



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxkxyxb@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkxyxb/ch>