

预防刺参腐皮综合征复方中药的筛选及体内药效评价

庞明海 王春元 王印度 李成华 廖梅杰 张正 荣小军 李彬 刘妮

SCREENING AND EVALUATION OF THE *IN VIVO* PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF TRADITIONAL CHINESE HERBAL FORMULAS FOR THE PREVENTION OF SKIN ULCER SYNDROME IN SEA CUCUMBER *APOSTICHOPUS JAPONICUS*

PANG Ming-Hai, WANG Chun-Yuan, WANG Yin-Geng, LI Cheng-Hua, LIAO Mei-Jie, ZHANG Zheng, RONG Xiao-Jun, LI Bin, LIU Ni

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2024.2024.0038>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

仿刺参“化皮病”体壁组织DNA甲基化的MSAP分析

ANALYSIS OF DNA METHYLATION IN THE BODY WALL OF SEA CUCUMBER *APOSTICHOPUS JAPONICUS* WITH SKIN ULCERATION BY THE METHYLATION-SENSITIVE AMPLIFIED POLYMORPHISM (MSAP)

水生生物学报. 2017, 41(3): 637–642 <https://doi.org/10.7541/2017.81>

不同温度下恩诺沙星及其代谢物在斑点叉尾各组织中的残留及消除规律比较

STUDIES ON ELIMINATION DYNAMICS OF ENROFLOXACIN RESIDUES AND ITS METABOLITES IN CHANNEL CATFISH AT TWO DIFFERENT WATER TEMPERATURES

水生生物学报. 2017, 41(4): 781–786 <https://doi.org/10.7541/2017.97>

黄颡鱼拟态弧菌的鉴定、毒力相关因子及药敏特性

IDENTIFICATION, VIRULENCE-RELATED FACTORS, AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *VIBRIO MIMICUS* FROM YELLOW CATFISH, *PELTEOBAGRUS FULVIDRACO*

水生生物学报. 2020, 44(4): 799–810 <https://doi.org/10.7541/2020.096>

副溶血弧菌高效消毒剂的筛选及PHMG防治对虾AHPNS的应用研究

SCREEN OF DISINFECTANT AGAINST *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* AND THE APPLICABLE EVALUATION OF PHMG IN PREVENTING *LITOPENAEUS VANNAMEI* AHPNS

水生生物学报. 2020, 44(2): 252–260 <https://doi.org/10.7541/2020.030>

美洲黑石斑迟缓爱德华氏菌分离、鉴定及致病性研究

ISOLATION, IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY OF THE PATHOGENIC BACTERIUM FROM *CENTROPRISTIS STRIATA*

水生生物学报. 2020, 44(1): 143–152 <https://doi.org/10.7541/2020.017>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2024.2024.0038

预防刺参腐皮综合征复方中药的筛选及体内药效评价

庞明海^{1,2} 王春元² 王印庚² 李成华¹ 廖梅杰² 张正²
荣小军² 李彬² 刘妮²

(1. 宁波大学海洋学院, 宁波 315211; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 崂山实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 青岛 266071)

摘要: 为开发防治刺参腐皮综合征的复方中药, 从14种中药中筛选出对灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)有明显抑制作用的单味中药, 并通过正交实验确定最佳抗菌复方FF-Z (诃子:五倍子:穿心莲:川芎=15 g:2 g:10 g:5 g)。在饲料中分别添加10、20、30和40 g/kg的复方FF-Z作为试验组, 不含复方FF-Z的饲料为对照组, 并以含恩诺沙星粉20 g/kg的饲料为药物对照组, 连续投喂刺参10d, 继而用终浓度为 10^7 CFU/mL的灿烂弧菌进行浸浴攻毒, 以观察预防保护效果。结果显示, 灿烂弧菌对复方FF-Z极敏感, 抑菌圈直径可达(23.10±0.62) mm, 最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)值分别为7.81和15.63 mg/mL; 与阴性对照组相比, 复方FF-Z各剂量组刺参的SOD、ACP和AKP活性显著提高, 且优于药物对照组。在灿烂弧菌感染后, 复方FF-Z各剂量组处理的刺参发病时间比阳性对照组推迟2d, 其中复方FF-Z 20 g/kg组、FF-Z 30 g/kg组和FF-Z 40 g/kg组刺参的20d发病率分别为22.08%、22.14%和14.58%, 显著低于阳性对照组的84.45%。组织病理学观察结果表明, 添加30 g/kg复方FF-Z的饲料能够有效减轻灿烂弧菌入侵引起的刺参组织炎症反应, 从而起到保护作用。研究证明, 复方FF-Z能够显著提高刺参的免疫和抗病力, 对灿烂弧菌引起的腐皮综合征具有良好的预防保护效果, 能延缓该病的发病进程并降低发病率。

关键词: 腐皮综合征; 灿烂弧菌; 中药复方; 恩诺沙星; 体外抑菌; 刺参

中图分类号: S947.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2024)07-1130-11



刺参(*Apostichopus japonicus*)也称仿刺参, 具有较高的营养和药用价值, 是我国海参养殖产业中的主养品种^[1], 2022年我国养殖海参产量达到24.9万吨^[2]。然而, 随着刺参养殖规模逐步扩大和集约化程度不断提高, 病害问题日趋凸显, 其中刺参腐皮综合征(Skin ulcer syndrome, SUS)的暴发每年造成数十亿元的经济损失, 是刺参养殖过程中最常见、危害最严重的疾病^[3], 已成为制约刺参养殖产业稳定发展的重要瓶颈。

自2003年2月山东省首次发生刺参腐皮综合征后, 该病于2004年开始在北方沿海大规模暴发。近年来, 随着全球气候变化、种质退化、病原区系特

征变化等问题的出现, SUS的发生已呈现常态化趋势^[4, 5]。据报道, 细菌是引起刺参SUS的重要致病原, 其中灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)及杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)等, 均可引起刺参SUS, 且该病具有发病快、传染性强、死亡率高特点, 一旦暴发会给刺参养殖业带来巨大经济损失^[6-8]。目前, 该病一般采用抗生素、微生态制剂和消毒剂联合应用进行防治, 随着化学药物的不合理使用易产生环境污染、药物残留、细菌耐药性增强等问题^[9], 给病害防治带来新的挑战, 因此,

收稿日期: 2024-01-29; **修订日期:** 2024-02-27

基金项目: 国家重点研发计划(2023YFD2400704); 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)(2023CXGC010410); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2023TD29)资助 [Supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD2400704); the Key Research and Development Program of Shandong Province (2023CXGC010410); Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2023TD29)]

作者简介: 庞明海(1997—), 硕士研究生; 主要从事水产病害防控研究。E-mail: minghaipang@163.com

通信作者: 王印庚, 研究员; E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

研发绿色高效的替抗药物已成为刺参病害防控的首要任务。

中药具有多成分、多靶点、多功能的特点,在防治水产动物疾病、提高机体免疫功能、促进生长等方面已经得到广泛应用^[10-16]。本课题组前期通过灿烂弧菌、假交替单胞菌、哈维氏弧菌和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的体外抑菌实验,筛选出抑菌效果较好的穿心莲、川芎等单味中药^[17],在此基础上,本实验通过体外抑菌试验优化筛选出了一种抗菌效果良好的中药复方,再以灿烂弧菌浸浴感染刺参,验证该复方中药的预防保护效果,旨在为刺参腐皮综合征的有效防控提供新渔药和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试病原菌 灿烂弧菌(*V. splendidus*) KL-1菌株由中国水产科学研究院黄海水产研究所病研室分离自典型SUS患病刺参^[3]。挑取纯化后的单个菌株,接种于TSB液体培养基中,于28℃、180 r/min的振荡培养箱震荡培养12—16h,取对数生长期($A_{600}=0.5—0.7$,浓度约为 10^7 CFU/mL)的菌液进行试验。

受试药物及含药饲料制备 穿心莲(*Andrographis paniculata*)、大青叶(*Isatis indigotica* Fort.)、川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.)、金银花(*Lonicera japonica* Thunb.)、五倍子(*Rhus chinensis* Mill.)、丁香(*Eugenia caryophyllata* Thunb.)、诃子(*Terminalia chebula* Retz.)、五味子(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.)、黄连(*Coptis chinensis* Franch.)、大黄(*Rheum palmatum* L.)、香薷(*Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyl.)、艾叶(*Artemisia argyi* Lévl. et Vant)、苦参(*Sophora flavescens* Aiton)、徐长卿(*Vincetoxicum pycnostelma* Kitag.)共14种中药饮片,均购自河北全泰药业有限公司(生产批号均为220601,规格为1 kg)。单味中药提取制备:中药饮片粉碎后过150目网筛,称取药材粉末5 g,以1:70的比例加入350 mL常温蒸馏水,浸泡3h,然后加热提取2h,过滤,并将滤液减压浓缩至10 mL,制成生药含量为500 mg/mL的药液,121℃灭菌20min,冷却后分装,4℃保存备用^[17]。复方中药提取液制备:将药材分别粉碎,按比例称取混合,以上述方法提取、浓缩,制成生药含量分别为500 mg/mL(复方FF1-FF9)和1000 mg/mL(复方FF-Z)的药液,备用。含药饲料的配制:分别取复方FF-Z药液10、20、30和40 mL,均匀喷洒于1 kg海参饲料上,再用藻胶黏合剂(海藻酸钠:水=10 g:90 mL)充分黏合,干燥,即得到添加复

方FF-Z生药含量分别为10、20、30和40 g/kg的含药饲料。

实验动物 刺参购于青岛瑞滋集团发展有限公司养殖场,选择规格整齐(60 ± 5) g/头,健康的个体,于300 L水槽中暂养5d后用于本实验。实验用水为洁净的天然海水,试验期间水温16.5—18.0℃,pH 7.0—8.5、盐度25—32,溶解氧 ≥ 5.0 mg/L。在驯养期间按照刺参体重的0.5%进行投喂,每天换水1次,换水量约为1/3,驯养5d后进行正式实验。

试剂耗材及对照药物 实验中溶菌酶(Lysozyme, LZM)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、酸性磷酸酶(Acid phosphatase, ACP)和碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)等指标的检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。恩诺沙星粉(水产用),购自山东某GMP兽药厂,含量规格为5%。

1.2 方法

体外抑菌 采用牛津杯法检测灿烂弧菌对14种单味中药的敏感程度^[18],取直径90 mm的培养皿平板于超净台中倒入经加热融化的TSB培养基(1.5%琼脂)7—9 mL,均匀摊布静置凝固后,向平板中等分置入牛津杯,再倒入经加热融化的TSB培养基(1%琼脂)10—15 mL,紫外灭菌后用无菌镊子将牛津杯取出,形成带孔的培养基平板。吸取100 μ L菌悬液(1×10^7 CFU/mL),用灭菌棉棒在带孔平板上均匀涂布,之后向孔中加入100 μ L中药提取液,正置放入28℃恒温培养箱中过夜培养16h,游标卡尺测定抑菌圈直径,实验重复3次,取均值判定药物抑菌能力强弱,判定标准:抑菌直径 ≥ 20 mm为极敏感“+++”, $15\text{ mm}\leq$ 抑菌直径 <20 mm为高敏“++”, $10\text{ mm}\leq$ 抑菌直径 <15 mm为中敏“+”,抑菌直径 <10 mm为低敏或无效“—”^[19]。

正交试验与复方配伍 将单味中药体外抑菌筛选出的诃子、五倍子与本课题组前期研究^[17]筛选出的穿心莲、川芎结合,作为正交实验的4因素,并参考《中国兽药典》2020版(二部)各药材的

表1 正交设计复方配伍因素水平

Tab. 1 Orthogonal design of compatibility factor level of compound prescription (g)

水平名称 Level name	诃子 <i>Terminalia chebula</i> (A)	五倍子 <i>Rhus chinensis</i> (B)	穿心莲 <i>Andrographis paniculata</i> (C)	川芎 <i>Ligusticum chuanxiong</i> (D)
水平1 Level 1	5	2	10	5
水平2 Level 2	10	4	20	10
水平3 Level 3	15	6	30	15

用量设置3水平(表 1), 通过正交表 $L_9(3^4)$ 构建得到9个组方(FF1-FF9), 暂不考虑各因素之间的交互作用, 在药材提取后测定其抑菌圈直径、最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)。正交试验重复3次。

最小抑菌浓度(MIC)与最低杀菌浓度(MBC) 采用改良微量二倍稀释法^[20]测定单味中药和中药复方提取液对灿烂弧菌的MIC值。取96孔细胞培养板, 每孔加入TSB培养基100 μ L, 在第一排中加入待测药液100 μ L, 往下依次稀释成终浓度为250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、3.91和1.95 mg/mL的含药培养基, 然后向每孔中加入100 μ L菌液(1×10^7 CFU/mL), 最后再向每个孔中加入10 μ L的1%红四氮唑溶液, 每组3个重复。最后2列为对照组: 阳性对照(TSB培养基+灿烂弧菌)及阴性对照(TSB培养基+无菌水)。于28℃恒温培养箱中培养, 当阳性对照组出现显色变化时, 记录每列中变色孔的前一排所对应的药液浓度, 即为MIC。从上述未变色的每个孔中吸取100 μ L液体, 分别涂布于无菌TSB固体培养基平板并标记对应的药液浓度, 于28℃恒温培养箱中倒置培养24h, 未出现细菌生长的平板所对应的浓度, 即为MBC^[20]。

1.3 复方中药对刺参腐皮综合征的预防效果

实验分组及处理 随机选取暂养5d后规格相近的420头健康刺参, 将其平均分成7组, 分别为阴性对照组(NC组, 普通饲料)、阳性对照组(PC组, 普通饲料)、4个复方FF-Z药物组(饲料中分别添加10、20、30和40 g/kg的复方中药, 记为FF-Z 10 g/kg组、FF-Z 20 g/kg组、FF-Z 30 g/kg组和FF-Z 40 g/kg组)及药物对照组(En组, 含恩诺沙星粉20 g/kg的饲料), 每组3个重复, 每个重复20头刺参, 于90 L海水水体中进行试验。各组每天投喂1次, 每次按刺参体重的1%进行投喂, 连续投喂10d。

攻毒实验 参照Chang等^[21]的攻毒方法, 并略作适当调整。各试验组在停药采样后, 除NC组外, 其余各组将剩余刺参在灿烂弧菌终浓度为 10^7 CFU/mL的海水中浸浴感染24h, 之后各组每天均投喂普通饲料, 并吸底、换水, 观察记录刺参患腐皮综合征的发病情况及发病症状, 观察期为20d。

样品采集与分析 分别在给药0、4d、7d和10d, 从每组中随机选取刺参3头, 用无菌纱布擦拭体表后置于冰板上, 用无菌注射器抽取1 mL刺参体腔液于1.5 mL无菌离心管中, 4℃, 5000 r/min条件下离心10min, 取上清, 用于LZM、SOD、ACP和AKP的测定, 不能及时检测的样本-80℃下保存。在观察期结束后, 从每组中取刺参5头, 解剖后取体

壁、纵肌和肠道于固定液中固定, 用于组织病理学观察。

1.4 数据分析

实验数据以“平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)”表示, 采用SPSS 26.0软件对实验数据进行统计分析, 将数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA)后, 使用Prism 9.0绘图软件制图。

2 结果

2.1 单味中药抑菌效果

如表 2所示, 药物浓度均为500 mg/mL时, 诃子、五倍子、丁香对灿烂弧菌的抑菌圈直径大于20 mm (极敏感); 其中诃子、五倍子的抑菌圈直径大于25 mm, 其MIC和MBC分别为12.5和25 mg/mL, 在所有测试单味药物中抑菌效果最佳; 灿烂弧菌对五味子、黄连、香薷和艾叶为高敏, 对徐长卿、苦

表 2 单味中药抑菌效果

Tab. 2 *In vitro* bacteriostatic effect of the different traditional Chinese herbals

单味中药 Chinese herbal	抑菌圈直径 Bacteriostatic circle (mm)	相对敏感度 Relative sensitivity	MIC (mg/ mL)	MBC (mg/ mL)
穿心莲 <i>Andrographis paniculata</i>	14.65 $\pm$ 0.29	+	12.5	25
大青叶 <i>Isatis indigotica</i>	11.86 $\pm$ 0.19	+	25	>50
川芎 <i>Ligusticum chuanxiong</i>	12.81 $\pm$ 0.17	+	25	25
金银花 <i>Lonicera japonica</i>	12.41 $\pm$ 0.10	+	25	>50
五倍子 <i>Rhus chinensis</i>	25.60 $\pm$ 0.51	+++	12.5	25
丁香 <i>Eugenia caryophyllata</i>	21.05 $\pm$ 0.08	+++	25	50
诃子 <i>Terminalia chebula</i>	26.50 $\pm$ 0.69	+++	12.5	25
五味子 <i>Schisandra chinensis</i>	16.04 $\pm$ 0.32	++	12.5	50
黄连 <i>Coptis chinensis</i>	19.80 $\pm$ 0.20	++	25	50
大黄 <i>Rheum palmatum</i>	13.2 $\pm$ 0.11	+	25	>50
香薷 <i>Elsholtzia ciliata</i>	15.03 $\pm$ 0.31	++	50	>50
艾叶 <i>Artemisia argyi</i>	18.17 $\pm$ 0.74	++	25	50
苦参 <i>Sophora flavescens</i>	—	—	>50	>50
徐长卿 <i>Vincetoxicum pycnostelma</i>	—	—	>50	>50

注: “+++”. 抑菌直径 ≥ 20 mm为极敏感, “++”. 15 mm $\leq$ 抑菌直径 < 20 mm为高敏, “+”. 10 mm $\leq$ 抑菌直径 < 15 mm为中敏, “—”. 抑菌直径 < 10 mm为低敏或无效

Note: “+++”. the diameter of inhibition is superior or equal to 20 mm, the sensibility is extreme sensitivity; “++”. the diameter of inhibition is from 15 to 20 mm, the sensibility is high sensitivity; “+”. diameter of inhibition is from 10 to 15 mm, the sensibility is medium sensitivity; “—”. the diameter of inhibition is smaller than 10 mm, and the sensibility is insensitivity

参不敏感, 对其余中药为中敏。

2.2 中药复方筛选

正交表 $L_9(3^4)$ 构建得到的9个组方(FF1-FF9), 提取后进行体外抑菌、MIC与MBC测定(表3)。药物浓度为500 mg/mL时, 以抑菌圈直径作为评价指标, 极差分析结果显示, 3次正交试验影响抑菌圈直径的因素顺序分别为 $C>B>A>D$ 、 $A>B>C>D$ 和 $D>A>C>B$, 3次正交试验极差分析结果显示, 各中药的最佳配比均为 $A_3B_1C_1D_1$, 即复方FF-Z (诃子:五倍子:穿心莲:川芎=15 g:2 g:10 g:5 g)的抑菌效果最好; 3次方差分析结果表明, 4个因素均为非显著因素, 可以按照极差分析结果进行各药物比例筛选。

将复方FF-Z按比例称取药材提取后, 再进行3次体外抑菌验证试验。结果显示, 复方FF-Z的3次抑菌圈平均直径为 (23.10 ± 0.62) mm, MIC与MBC值分别为7.81和15.63 mg/mL, 复方FF-Z的抑菌效果优于FF1- FF9 (表3)。因此, 可选择复方FF-Z进一步开展体内药效评价研究。

2.3 复方中药对刺参体液免疫酶活性的影响

以不同剂量的复方FF-Z投喂刺参, 分别在开始

投喂的0、4d、7d和10d采集刺参体腔液, 检测复方FF-Z对刺参体腔液LZM的影响(图1)。实验开始前刺参的LZM含量较高, 给药10d内, 添加复方FF-Z不同剂量组中刺参的LZM呈现出不同程度的变化, 总体上呈现先下降后上升的趋势。当给药4d时, 添加恩诺沙星(En组)与复方FF-Z 20 g/kg组刺参的LZM活性较高, 但与各组无显著差异($P>0.05$); 给药10d时, 复方FF-Z 30 g/kg组与复方FF-Z 40 g/kg组刺参的LZM达到了最高值, 但与其他各组差异均不显著($P>0.05$)。

复方FF-Z对刺参SOD活力影响显著(图2)。随药物投喂时间的延伸, 添加不同剂量复方FF-Z组刺参的SOD均呈现出逐渐上升的趋势。其中复方FF-Z 30 g/kg组刺参的SOD活力在4d、7d和10d均极显著高于其余各组($P<0.01$); 在第10天时, 不同剂量复方FF-Z组刺参的SOD活力达到最大值, 且均极显著高于NC组。

复方FF-Z各剂量组对刺参体腔液ACP活力的影响在不同时间段内变化差异较大(图3)。复方FF-Z 10 g/kg组刺参的ACP活力在给药4d时达到最

表3 中药复方的抑菌圈直径、MIC与MBC

Tab. 3 *In vitro* bacteriostatic circle, minimal inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) of the different herbal compounds

复方 Herbal compound	诃子 <i>Terminalia chebula</i> (A)	五倍子 <i>Rhus chinensis</i> (B)	穿心莲 <i>Andrographis paniculata</i> (C)	川芎 <i>Ligusticum chuanxiong</i> (D)	抑菌圈直径 Bacteriostatic circle (mm)				MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
					<i>k</i>	<i>k'</i>	<i>k''</i>	均值Average		
FF-1	1	1	1	1	20.10	19.80	19.67	19.86±0.22	15.63	31.25
FF-2	1	2	2	2	18.06	18.01	18.10	18.06±0.05	15.63	31.25
FF-3	1	3	3	3	18.56	18.38	18.50	18.48±0.09	62.50	125.00
FF-4	2	1	2	3	18.53	18.15	18.72	18.47±0.29	15.63	31.25
FF-5	2	2	3	1	18.37	17.73	18.53	18.21±0.42	15.63	15.63
FF-6	2	3	1	2	19.43	18.69	18.73	18.95±0.42	15.63	31.25
FF-7	3	1	3	2	19.32	19.31	18.93	19.19±0.22	15.63	31.25
FF-8	3	2	1	3	19.31	19.03	19.27	19.20±0.15	15.63	31.25
FF-9	3	3	2	1	19.84	19.60	20.00	19.81±0.20	15.63	31.25
k_1 /Average 1	18.907	19.317	19.613	19.437						
k_2 /Average 2	18.777	18.580	18.810	18.937						
k_3 /Average 3	19.490	19.307	18.750	18.830						
极差 <i>R</i>	0.713	0.737	0.863	0.637						
k'_1 /Average 1	18.730	19.087	19.173	19.043						
k'_2 /Average 2	18.190	18.257	18.587	18.670						
k'_3 /Average 3	19.313	18.890	18.473	18.520						
极差 <i>R'</i>	1.123	0.830	0.700	0.523						
k''_1 /Average 1	18.757	19.107	19.223	19.400						
k''_2 /Average 2	18.660	18.633	18.940	18.587						
k''_3 /Average 3	19.400	19.077	18.653	18.830						
极差 <i>R''</i>	0.740	0.474	0.570	0.813						
FF-Z	15 g	2 g	10 g	5 g	23.80	22.60	22.90	23.10±0.62	7.81	15.63

高值, 且与NC组差异极显著($P<0.01$); 在给药7d时, 复方FF-Z 20 g/kg组刺参的ACP达到最高值, 与其他各组差异极显著($P<0.01$); 复方FF-Z 30 g/kg组和复方FF-Z 40 g/kg组刺参的ACP活力随投喂时间的延长呈现出先下降后上升的趋势, 且在给药10d时达到最高值, 此时复方FF-Z 30 g/kg组与其他各组差异极显著($P<0.01$)。

由图4可知, 复方中药对刺参体腔液AKP活力的影响随时间变化差异明显。复方FF-Z 10 g/kg组、复方FF-Z 20 g/kg组及复方FF-Z 30 g/kg组刺参的AKP活力随投喂时间的延长呈现出先升高、后下降、再升高的趋势, 而复方FF-Z 40 g/kg组则随时间的变化呈现出先下降后上升的趋势; 在给药4d时, 复方FF-Z 10 g/kg组、复方FF-Z 20 g/kg组、复方FF-Z 30 g/kg组和En组极显著高于NC组($P<0.01$);

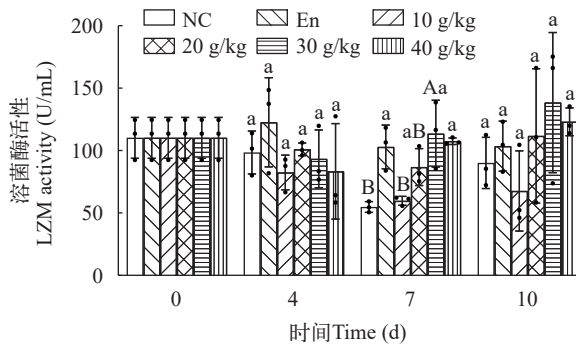


图1 复方FF-Z各剂量组对刺参体腔液LZM活力的影响

Fig. 1 Effects of different doses of compound FF-Z on LZM activity in coelomocytes of *Apostichopus japonicus*

不同小写字母表示存在显著差异($P<0.05$), 不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$); 下同

The different lowercase letters represent the significant difference ($P<0.05$), and the different capital letters indicate extremely significant differences ($P<0.01$); the same applies below

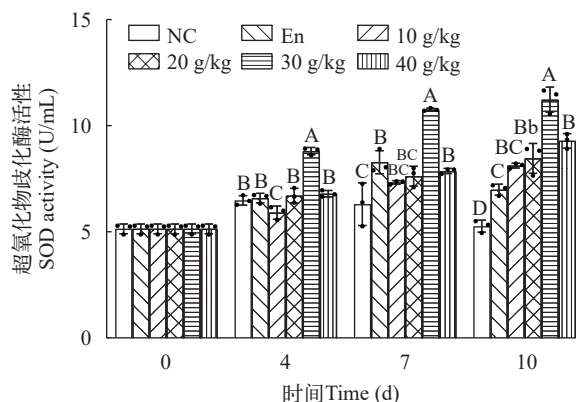


图2 复方FF-Z各剂量组对刺参体腔液SOD活力的影响

Fig. 2 Effects of different doses of compound FF-Z on SOD activity in coelomocytes of *Apostichopus japonicus*

在给药10d时, 4个复方FF-Z剂量组的AKP极显著高于NC组和En组, 且复方FF-Z各剂量组刺参的AKP活力与中药剂量呈正相关。

2.4 攻毒试验结果

在预防给药期结束后, 除阴性对照组(NC组)外, 其余各组刺参均以灿烂弧菌浸浴攻毒24h, 并连续观察20d。在攻毒后5d, 阳性对照组(PC组)最早出现SUS前期症状, 表现为附着力丧失、口部肌肉呈现透明松弛状并无法闭合; 在攻毒后7d, 刺参活力下降、摄食减少、体表黏液增多, 并且开始出现小面积溃疡点, 发病率达到19.64%; 在攻毒后10d, 刺参体表开始出现了大面积溃烂并死亡的个体, 累计发病率为63.69%; 在攻毒后20d, PC组累计发病率达到84.45%。而在整个试验期内, NC组刺参表现正常, 未出现发病或死亡情况, 证明本次采用灿烂弧菌浸浴感染成功。

2.5 复方中药对刺参的预防保护

各组刺参在停药浸浴攻毒后, 进行了连续20d的观察(图5)。在攻毒后5d, 恩诺沙星组(En组)出现

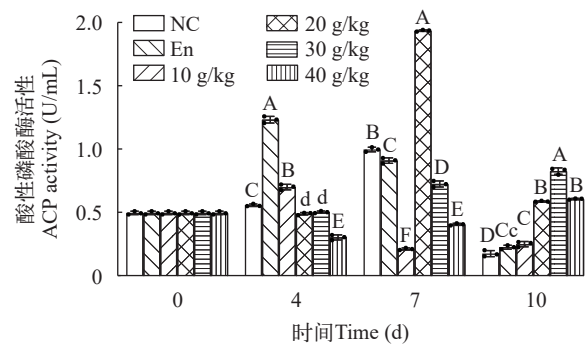


图3 复方FF-Z各剂量组对刺参体腔液ACP活力的影响

Fig. 3 Effects of different doses of compound FF-Z on ACP activity in coelomocytes of *Apostichopus japonicus*

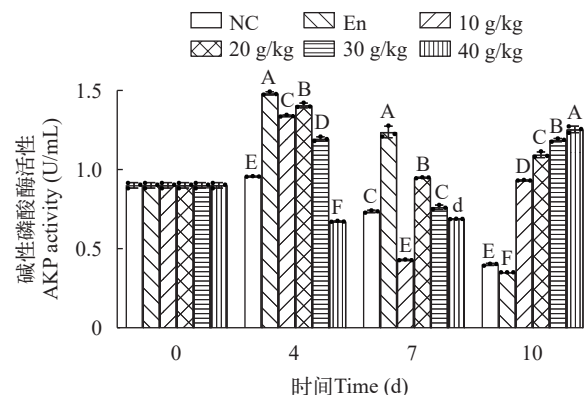


图4 复方FF-Z各剂量组对刺参体腔液AKP活力的影响

Fig. 4 Effects of different doses of compound FF-Z on AKP activity in coelomocytes of *Apostichopus japonicus*

了与PC组相似的SUS症状;在攻毒后7d, 复方FF-Z各剂量组的刺参开始出现SUS症状, 但与PC组相比发病时间较晚、症状较轻, 其中复方FF-Z 20 g/kg组、复方FF-Z 30 g/kg组和复方FF-Z 40 g/kg组刺参的发病率均显著低于PC组和En组($P<0.05$);在攻毒后20d, En组发病率为78.75%, 而复方FF-Z 20 g/kg组、复方FF-Z 30 g/kg组和复方FF-Z 40 g/kg组的发病率分别为22.08%、22.14%和14.58%, 均显著低于PC组和En组($P<0.05$)。

各组的存活率经统计结果显示, 攻毒后10d刺参开始出现死亡, 而攻毒后11—15d为患腐皮综合征刺参的死亡高峰期, 在攻毒后16d, 刺参存活率趋于稳定, 复方FF-Z各剂量组均高于PC组的78.61%和En组的87.5%, 其中复方FF-Z 40 g/kg组的存活率最高, 为97.92%, 复方FF-Z的其余3个剂量组存活率均为93.75%;在攻毒后20d, 各组存活率保持不变(图6)。

2.6 组织病理观察分析

通过对各实验组刺参的酶活、发病率、存活

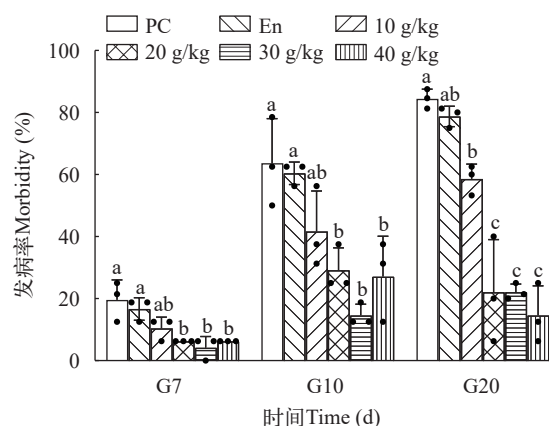


图5 攻毒后复方FF-Z各组刺参SUS的发病率

Fig. 5 Morbidity of the SUS in *Apostichopus japonicus* under different doses of compound FF-Z after challenging ($n=3$)

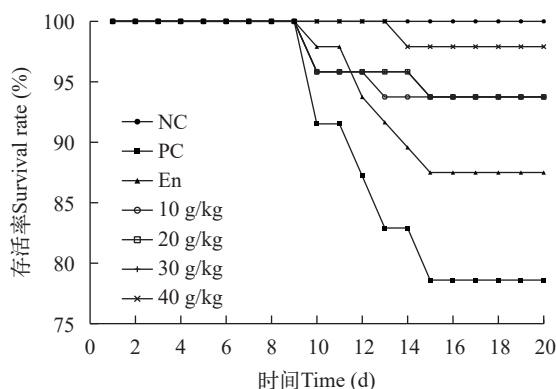


图6 攻毒后复方FF-Z各组刺参的存活率

Fig. 6 Survival rate of SUS in different doses of compound FF-Z after challenging ($n=3$)

率等指标分析可得, 复方FF-Z 20、30和40 g/kg剂量的药效均相对较好, 其中以复方FF-Z 30和40 g/kg剂量的药效更好, 基于生产成本考虑, 选取复方FF-Z 30 g/kg组与NC、PC和En组刺参的体壁、纵肌、肠道进行组织切片观察(图版I)。观察发现, 经灿烂弧菌感染后, 患病刺参体壁中出现大量炎症细胞聚集, 形成炎症反应区, 从而导致部分细胞的核固缩、裂解和出现深染现象(图版I-A); 患病刺参肌肉出现坏死性病变, 主要表现为肌束的肌膜破碎、肌束间的间隙扩大并出现大量组织碎片(图版I-B); 患病刺参肠黏膜上皮呈现出浅表性坏死, 细胞核肿胀崩解, 上皮细胞坏死脱落(图版I-C)。NC组的体壁、纵肌和肠道组织排列整齐, 着色均匀, 组织结构基本正常。在药物的干预下, 刺参组织的感染病变程度和炎症反应均比PC组较轻, 且复方FF-Z 30 g/kg组的组织健康程度优于En组。这表明复方FF-Z在一定程度上能够减轻因灿烂弧菌感染引起的组织炎症反应, 且药效优于水产用恩诺沙星粉。

3 讨论

3.1 复方中药对腐皮综合征致病菌的抑杀作用

中药治疗水产动物疾病已成为当前的研究热点, 其中对刺参疾病防控的研究亦有相关报道。王印庚等^[17]研究发现, 复方中药穿心莲:大青叶:金银花:川芎=2:1:3:2比例的水提物, 对灿烂弧菌、假交替单胞菌、哈维氏弧菌和恶臭假单胞菌具有良好的抑制作用; 侯文久等^[22]通过体外抑菌试验发现, 复方诃子:石榴皮:丹参:丁香=2:1:1:1的配比对另一种腐皮综合征致病菌—黄海希瓦氏菌(*Shewanella marisflavi*)亦有明显的抑制效果; 姚刚等^[23]研究提出, 复方五倍子+乌梅在安全浓度范围内可作为刺参细菌性疾病的治疗药物使用; 还有学者提出, 诃子、白芍、甘草以1:1:1的比例组方对溶藻弧菌有良好的抑杀效果^[19]。药物联合抑菌试验结果显示, 五倍子、诃子对维氏气单胞菌的FIC值为1.0^[24], 对奇异变形杆菌的FIC值为0.56^[25], 均表现为相加作用, 诃子提取物的主要抑菌成分为多酚、诃子酸等^[26], 而五倍子提取物的主要抑菌成分为酚酸类、鞣质类等^[27], 因此二者表现出相加作用可能与其有效成分相近有关。本研究通过14种中药对灿烂弧菌的体外抑菌筛选和正交实验, 结果发现, 灿烂弧菌对复方FF-Z(诃子:五倍子:穿心莲:川芎=15 g:2 g:10 g:5 g)极敏感, 复方FF-Z的MIC与MBC值分别为7.81和15.63 mg/mL, 低于诃子、五倍子单味中药的MIC与MBC值, 在所有测试药物中抑菌效果最佳, 表明本研究所筛选出来的复方FF-Z中各药味之

间可能存在协同增效作用。

3.2 复方中药提高刺参体液免疫活性

刺参体内的非特异性免疫因子如酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶(LZM)等,在刺参受到外来病原感染时会起到解毒、抗病和增强机体抗氧化能力的作用^[28]。有研究表明,在日常投喂中添加中药能够促进刺参生长、提升免疫和抗病力^[29,30];中药与益生菌制成的复合微生态制剂,可以改善养殖水质、促进幼参生长,同时提高刺参的AKP、ACP、LZM和SOD活性^[31];此外,关于中药提取物对刺参非特异性免疫的影响研究发现,在饲料中添加黄芪多糖能够显著提高刺参体腔细胞的吞噬、抗氧化和非特异性免疫能力^[32],饲料中添加人参茎叶提取物可以显著提高刺参的免疫和抗病力^[33]。在本实验中,投喂不同剂量的复方FF-Z饲料10d后,复方FF-Z的4个剂量组刺参的SOD、ACP和AKP活性均显著高于对照组(NC组),而恩诺沙星作为水产养殖中广谱抗生素类药物,其对刺参非特异性免疫的提升效果不及FF-Z中药复方。因此,建议在养殖过程中,添加复方FF-Z拌饲投喂,可以起到提高刺参免疫和增强抗病力的作用。

3.3 复方中药对腐皮综合症的预防效果

传统预防和控制水产动物细菌性疾病的药物多以抗生素和化学药品为主,然而随着抗生素在水产养殖中使用的不断增加,随之而来的药物残留、细菌耐药性增强及养殖水体环境遭到破坏等问题,给细菌性疾病的防治带来困难^[34]。而中药源于自然,易降解、无残留,安全又环保,此外,中药中富含生物碱、有机酸、皂角苷及多糖类物质等活性成分,可以起到提高机体免疫、增强机体对抗病原的免疫应答和抵抗病原入侵的作用^[35-38]。研究发现,拌饲投喂黄芪多糖60d,能够显著降低灿烂弧菌感染刺参的发病率^[32];在饲料中添加人参茎叶提取物并连续投喂30d,能够提高灿烂弧菌感染刺参的健康程度,降低刺参发病风险^[33]。本实验结果显示,以复方FF-Z 20-40 g/kg的剂量连续投喂10d,中药组刺参的发病率较阳性对照组降低73.8%—82.7%,成活率较阳性对照组提高19.3%—24.6%,预防效果优于恩诺沙星对照组,这与饲料中添加中药可以显著提高刺参非特异性免疫结果的趋势相一致,表明在饲料中投喂复方FF-Z可通过提高刺参机体的免疫功能达到提高刺参的抗病力和成活率;在灿烂弧菌感染后,复方FF-Z组刺参的发病时间相较于NC组推迟了2d,表明复方FF-Z可以延缓刺参发病进程。研究发现,在奇异变形杆菌致小鼠腹泻病理模型的

治疗试验中,诃子、五倍子提取物组合连续内服5d,不仅可以促进肠黏膜修复因子EGF、EGFR和TGF-1的表达修复肠道黏膜损伤,还能降低炎症因子IL-1 β 、TNF- α 和IL-6的表达以减缓肠道组织炎症性症状^[25]。而在本实验中,通过组织病理学观察也发现,添加复方FF-Z 30 g/kg,能够有效减轻病原菌入侵感染组织引起的炎症反应,起到保护组织的作用,这与上述文献研究结果相近。综上所述,复方FF-Z不仅可以起到抗菌消炎、增强刺参免疫和抗病力的作用,同时还可以延缓刺参腐皮综合症的发病进程,减轻刺参SUS发病症状,表明复方FF-Z对灿烂弧菌感染引起的刺参腐皮综合征具有良好的预防效果。

4 结论

本实验通过体外抑菌、体内药效和病理观察等研究,筛选获得了一种新的中药复方,该复方中药对灿烂弧菌具有良好的抑杀作用,同时对刺参的免疫、抗病力和组织保护均有显著性作用。推荐在日常养殖中定期添加复方FF-Z 20—30 g/kg拌饲投喂,可以起到提高刺参免疫力和预防腐皮综合征发生的作用。今后将根据中医辨证论治的传统理论,研究复方各药味间的配伍关系,并进行药物的抗菌机制解析,同时进一步深入研究复方FF-Z对腐皮综合症的治疗效果和使用时机,为开发刺参专用新渔药提供理论依据和技术支撑。

参考文献:

- [1] Ru X, Zhang L, Li X, *et al.* Development strategies for the sea cucumber industry in China [J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2019, 37(1): 300-312.
- [2] Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Technology, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China Fishery Statistical Yearbook-2023 [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023: 23-28. [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会编制. 中国渔业统计年鉴-2023 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2023: 23-28.]
- [3] Li H, Guo Qiao G, Gu J, *et al.* Phenotypic and genetic characterization of bacteria isolated from diseased cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* in north-eastern China [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2010, 91(3): 223-35.
- [4] Becker P, Gillan D, Lanterbecq D, *et al.* The skin ulceration disease in cultivated juveniles of *Holothuria scabra* (Holothuroidea, Echinodermata) [J]. *Aquaculture*, 2004, 242(1-4): 13-30.
- [5] Deng H, He C, Zhou Z, *et al.* Isolation and pathogenicity

- of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. *Aquaculture*, 2009, **287**(1-2): 18-27.
- [6] Wang Y G, Fang B, Zhang C Y, *et al.* Etiology of skin ulcer syndrome in cultured juveniles of *Apostichopus japonicus* and analysis of reservoir of the pathogens [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, **13**(4): 610-616. [王印庚, 方波, 张春云, 等. 养殖刺参保苗期重大疾病“腐皮综合征”病原及其感染源分析 [J]. 中国水产科学, 2006, **13**(4): 610-616.]
- [7] Zhang W, Li C, Guo M. Use of ecofriendly alternatives for the control of bacterial infection in aquaculture of sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. *Aquaculture*, 2021(545): 737185.
- [8] Wang Y T, Wang Y G, Zhang G B, *et al.* The effect of six disinfectants on the causative pathogens of skin ulcer syndrome in *Apostichopus japonicus* [J]. *Marine Fisheries Research*, 2008, **29**(6): 90-94. [王友涛, 王印庚, 张国兵, 等. 几种消毒剂对养殖刺参“腐皮综合征”主要致病细菌杀灭试验的研究 [J]. 海洋水产研究, 2008, **29**(6): 90-94.]
- [9] Yan Q Q, Li B, Liao M J, *et al.* Distribution characteristics of antibiotic resistant bacteria and antimicrobial resistant genes in the intestine of cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) seedlings in Shandong Province [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, **41**(04): 134-143 [闫倩倩, 李彬, 廖梅杰等. 山东主要刺参养殖区幼参肠道抗生素耐药菌及耐药基因分布特征 [J]. 渔业科学进展, 2020, **41**(4): 134-143.]
- [10] Yan M C, Chen S B, Shan L Z, *et al.* Selection of 22 kinds of Chinese herbal medicines on bacteriostasis in vitro on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio splendidus* [J]. *Journal of Hydroecology*, 2010, **31**(2): 95-98. [闫茂仓, 陈少波, 单乐州, 等. 22味中草药对创伤弧菌和灿烂弧菌体外抑菌作用筛选 [J]. 水生态学杂志, 2010, **31**(2): 95-98.]
- [11] Wang C Y, Li Z B, Sun Y Z, *et al.* Effects of Chinese herbal medicines mixture on growth performance digestive enzyme activity immune response of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2018, **24**(2): 683-693.
- [12] Wang Y S, Li H, Yi L Y, *et al.* Soya saponins on growth, immunity and intestinal health of yellow catfish hybrid (*Pelteobagrus fulvidraco* ♀ × *Pelteobagrus vachelli* ♂) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, **47**(9): 1386-1395. [王岳松, 李鸿, 矣林圆, 等. 大豆皂甙对杂交黄颡鱼生长、免疫及肠道健康的影响 [J]. 水生生物学报, 2023, **47**(9): 1386-1395.]
- [13] Song X, Feng Z, Zhang Y, *et al.* Regulation of dietary astragalus polysaccharide (APS) supplementation on the non-specific immune response and intestinal microbiota of sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019(94): 517-524.
- [14] Bai R X, Hua L H, Liu H K, *et al.* Dietary extraction of *Atractylodes macrocephala* Koidz on growth performance, health and disease resistance of *Macrobrachium nipponense* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2024, **48**(1): 86-98. [白茹雪, 花罗海, 刘昊昆, 等. 饲料中添加白术提取物对日本沼虾生长、健康和抗病力的影响 [J]. 水生生物学报, 2024, **48**(1): 86-98.]
- [15] Zhao L, Liang J, Liu H, *et al.* Yinchenhao Decoction ameliorates the high-carbohydrate diet induced suppression of immune response in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2022(125): 141-151.
- [16] Fan Y, Li L, Yu X Q, *et al.* Effect of *Codonopsis pilosula* as an immunopotentiator on intestinal bacterial community composition of *Apostichopus japonicus* [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, **27**(2): 638-646. [樊英, 李乐, 于晓清, 等. 免疫增强剂党参对仿刺参肠道菌群结构的影响 [J]. 动物营养学报, 2015, **27**(2): 638-646.]
- [17] Wang Y G, Leng M, Chen X, *et al.* In vitro bacteriostatic effect of Chinese herbs against causative pathogens of skin ulcer syndrome in sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2009, **30**(2): 1-7. [王印庚, 冷敏, 陈霞, 等. 中草药对刺参腐皮综合征病原菌的体外抑菌试验 [J]. 渔业科学进展, 2009, **30**(2): 1-7.]
- [18] Zhang C L, Li J N, Wang X S, *et al.* Drug resistance analysis of common pathogens of aquatic animals and bacteriostasis activity assay of Chinese herb medicine *in vitro* [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2007, **19**(2): 152-155. [张传亮, 李瑾年, 汪兴生, 等. 水产动物常见病原菌的耐药性分析及中草药体外抑菌活性的检测 [J]. 中国微生态学杂志, 2007, **19**(2): 152-155.]
- [19] Xu X J, Li X H, Ma Y F, *et al.* Effects of traditional Chinese compound prescription and antibiotics treating in *Vibrio alginolyticus* diseases of *Epinephelus coioides* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, **43**(5): 1338-1346. [徐晓津, 李秀华, 马一帆, 等. 复方中草药及其与抗生素联用对斜带石斑鱼溶藻弧菌病的治疗效果 [J]. 水产学报, 2019, **43**(5): 1338-1346.]
- [20] Wang Y S, Zhao Y N, Zhai Y Y, *et al.* Six kinds of traditional Chinese medicine alcohol extract and water extract on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* antibacterial effect evaluation [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2020, **56**(5): 62-65. [王悦尚, 赵亚楠, 翟云逸, 等. 6种中药醇和水提取物对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抗菌效果评价 [J]. 中国兽医杂志, 2020, **56**(5): 62-65.]
- [21] Chang M, Li B, Liao M, *et al.* Differential expression of miRNAs in the body wall of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* under heat stress [J]. *Frontiers in Physiology*, 2022(13): 929094.
- [22] Hou W J, Yang F Y, Wang W X. *In vitro* bacteriostatic effect of Chinese herbs against causative pathogens of

- skin ulcer syndrome in sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, **29**(5): 76-80. [侯文久, 杨凤影, 王维新. 中草药对刺参腐皮综合症病原菌的抑菌试验 [J]. 中国农学通报, 2013, **29**(5): 76-80.]
- [23] Yao G, Li Q, Fu L, *et al.* Acute toxicity of several Chinese herbal medicines to juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2017, **32**(2): 161-166. [姚刚, 李强, 付雷, 等. 几种中草药对刺参幼参的急性毒性试验 [J]. 大连海洋大学学报, 2017, **32**(2): 161-166.]
- [24] Zhang H Q, Shang B D, Zhang X P, *et al.* The antibacterial effect of 31 kinds of Chinese herbal medicines and their compounds on *Aeromonas veronii* in vitro [J]. *Freshwater Fisheries*, 2022, **52**(3): 74-81. [张桓桥, 商宝娣, 张效平, 等. 31种中草药及其复方对维氏气单胞菌体外抑菌研究 [J]. 淡水渔业, 2022, **52**(3): 74-81.]
- [25] Feng Y S. Effect of *Galla chinensis* combined with *Chebula fructus* extract on diarrhea induced by bovine *Proteus mirabilis* in mice [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2023: 7-19. [冯玉树. 五倍子联合诃子提取物对牛源奇异变形杆菌致小鼠腹泻的疗效研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023: 7-19.]
- [26] Avula B, Wang Y H, Wang M, *et al.* Simultaneous determination and characterization of tannins and triterpene saponins from the fruits of various species of *Terminalia* and *Phyllanthus emblica* using a UHPLC-UV-MS method: application to Triphala [J]. *Planta Medica*, 2013, **79**(2): 181-188.
- [27] Sivamaruthi B S, Ramkumar V S, Archunan G, *et al.* Biogenic synthesis of silver palladium bimetallic nanoparticles from fruit extract of *Terminalia chebula*—in vitro evaluation of anticancer and antimicrobial activity [J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2019(51): 139-151.
- [28] Liu Z M, Ma Y X, Yang Z P, *et al.* Immune responses and disease resistance of the juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* induced by *Metschnikowia* sp. C14 [J]. *Aquaculture*, 2012(368-369): 10-18.
- [29] Sun Y, Jin L, Wang T, *et al.* Polysaccharides from *Astragalus membranaceus* promote phagocytosis and superoxide anion (O_2^-) production by coelomocytes from sea cucumber *Apostichopus japonicus* in vitro [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 2007, **147**(3): 293-298.
- [30] Chen X R, Zhang W B, Mai K S, *et al.* Effects of dietary glycyrrhizin on growth, immunity of sea cucumber and its resistance against *Vibrio splendidus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(4): 731-738. [陈效儒, 张文兵, 麦康森, 等. 饲料中添加甘草酸对刺参生长、免疫及抗病力的影响 [J]. 水生生物学报, 2010, **34**(4): 731-738.]
- [31] Zhai A B. Effects of compound probiotics for juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) growth, water quality and immune-related enzymes [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2017: 11-27. [翟奥博. 复合微生态制剂对刺参幼参生长、水质及免疫相关酶的影响 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2017: 11-27.]
- [32] Wang T, Sun Y, Jin L, *et al.* Enhancement of non-specific immune response in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) by *Astragalus membranaceus* and its polysaccharides [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, **27**(6): 757-762.
- [33] Guo J, Yu J, Chen Y L, *et al.* Effects of ginseng stem and leaf extracts on the growth, immunity and the resistance to diseases in sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, **39**(6): 1085-1092. [郭琨, 俞军, 陈永亮, 等. 人参茎叶提取物对刺参生长、免疫及抗病力的影响 [J]. 水生生物学报, 2015, **39**(6): 1085-1092.]
- [34] Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment—a review: -part II [J]. *Chemosphere*, 2009, **75**(4): 435-441.
- [35] Chen H H, Tu C L, Tang Y, *et al.* Effects of compound Chinese herbs on growth, digestive enzyme, immunologic factors and WSSV-resistant capacity of *Litopenaeus vannamei* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, **41**(11): 1766-1778. [陈辉辉, 涂晨凌, 唐杨, 等. 复方中草药对凡纳滨对虾生长、消化酶和免疫因子活性及抗WSSV的影响 [J]. 水产学报, 2017, **41**(11): 1766-1778.]
- [36] Yin G, 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*, 2009, **26**(1): 140-145.
- [37] Li R, Du Y, Ma H, *et al.* Wound healing at the body wall of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* by Chinese herbal treatment [J]. *Aquaculture Research*, 2021, **52**(2): 693-701.
- [38] Pu H, Li X, Du Q, *et al.* Research progress in the application of Chinese herbal medicines in aquaculture: a review [J]. *Engineering*, 2017, **3**(5): 731-737.

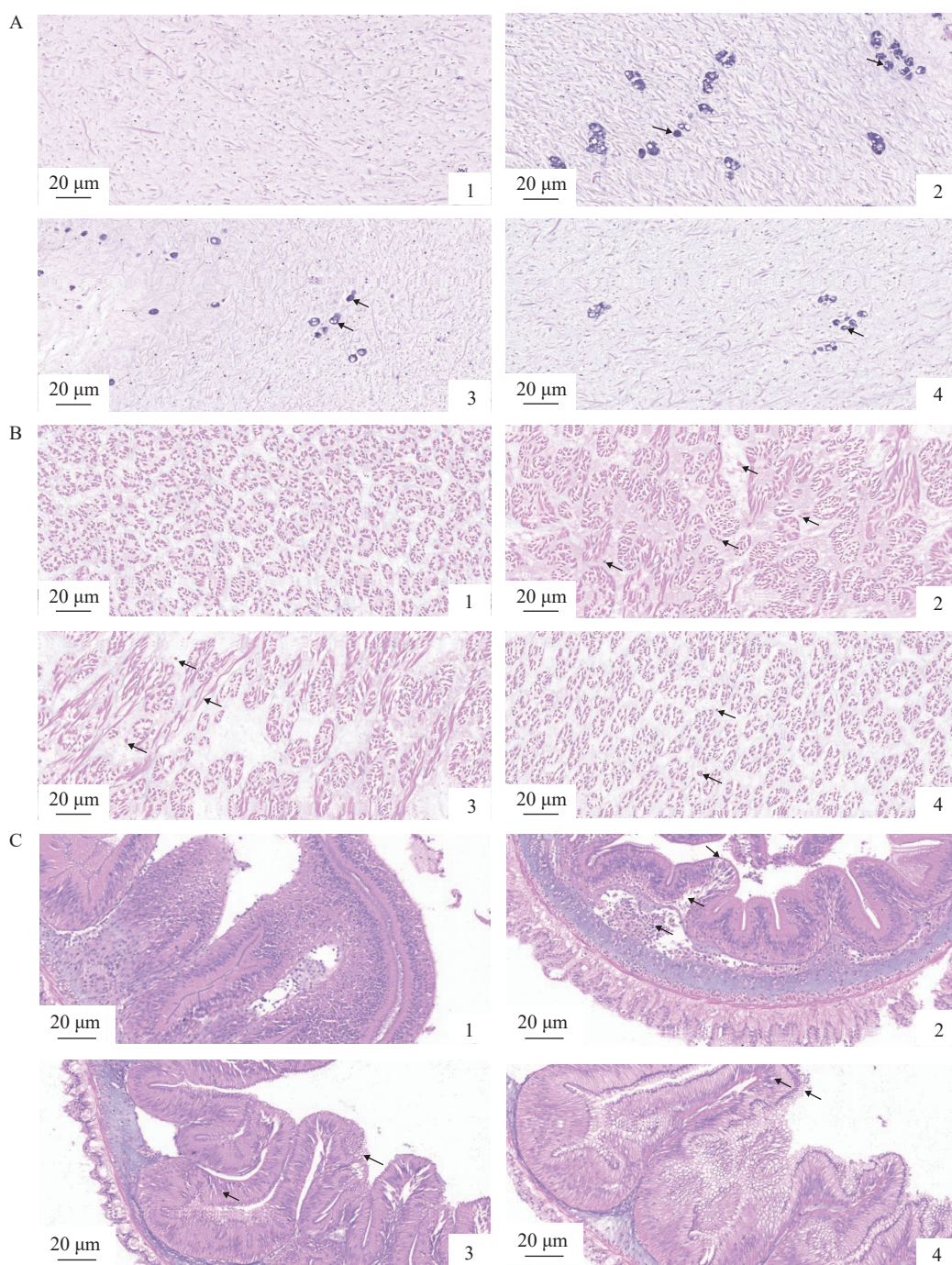
SCREENING AND EVALUATION OF THE *IN VIVO* PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF TRADITIONAL CHINESE HERBAL FORMULAS FOR THE PREVENTION OF SKIN ULCER SYNDROME IN SEA CUCUMBER *APOSTICHOPUS JAPONICUS*

PANG Ming-Hai^{1,2}, WANG Chun-Yuan², WANG Yin-Geng², LI Cheng-Hua¹, LIAO Mei-Jie²,
ZHANG Zheng², RONG Xiao-Jun², LI Bin² and LIU Ni²

(1. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Laoshan Laboratory, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: In order to develop a herbal compound medicine for the prevention and treatment of skin ulcer syndrome (SUS) in the sea cucumber *Apostichopus japonicus*, we screened single herbs with significant inhibitory effects on *Vibrio splendidus* from a pool of 14 herbs. The most promising antimicrobial herbal compound, FF-Z (comprising *Terminalia chebula*, *Rhus chinensis*, *Andrographis paniculata*, and *Ligusticum chuanxiong* in a ratio of 15 g:2 g:10 g:5 g), was optimally selected using an orthogonal experiment. Subsequently, 420 healthy sea cucumbers were randomly divided into 7 groups: Negative control group (NC group, normal feed), Positive control group (PC group, normal feed), Enrofloxacin control group (En group, feed containing enrofloxacin powder at 20 g/kg), and four FF-Z treatment groups (with feed containing FF-Z at 10, 20, 30, and 40 g/kg, respectively). Following ten consecutive days of feeding, *V. splendidus* dip bath with a final concentration of 10^7 CFU/mL was administered to all groups except the NC group. The results showed that *V. splendidus* exhibited high sensitivity to the herbal compound FF-Z, with an inhibition circle diameter reaching (23.10 ± 0.62) mm and MIC and MBC values of 7.81 and 15.63 mg/mL, respectively. Sea cucumbers in all FF-Z dosage groups significantly increased ($P < 0.01$) activities of SOD, ACP, and AKP, surpassing those of the En group. Following *V. splendidus* infection, the onset of SUS in the FF-Z dosage groups occurred 2d later than that in the NC group. Moreover, the final incidence rates of SUS in the 20, 30, and 40 g/kg FF-Z groups were 22.08%, 22.14%, and 14.58%, respectively, which were lower than that in the PC group (84.45%). Pathological tissue section analysis showed that the addition of FF-Z at 30 g/kg effectively reduced inflammatory reactions caused by pathogenic bacteria invasion into infected tissues, thereby protecting sea cucumber tissues. The study demonstrates that the herbal compound FF-Z enhances immunity and disease resistance in sea cucumber, providing effective prevention and protection against skin ulcer caused by *V. splendidus*. It retards the morbidity process and reduces the SUS morbidity rate.

Key words: Skin ulcer syndrome; *Vibrio splendidus*; Chinese herbal compound; Enrofloxacin; *In vitro* bacteriostatic; *Apostichopus japonicus*



图版 I 刺参体壁、纵肌和肠道组织切片

Plate I Histological examination of the body wall, muscle, and intestine of *A. japonicus*

1—4分别表示健康刺参NC组、患病刺参PC组、En组、复方FF-Z 30 g/kg组。A、B、C分别代表刺参体壁、纵肌和肠道。其中黑色箭头表示炎症细胞浸润, 细胞核固缩、碎裂, 细胞崩解坏死; 肌纤维细胞核固缩, 肠黏膜上皮组织坏死, 肠腔中出现脱落坏死黏膜上皮细胞, 形成较大空隙

1—4 means the healthy *A. japonicus* NC group, the diseased *A. japonicus* PC group, the En group, and the compound FF-Z content 30 g/kg group. The A, B, and C represent the body wall, muscle, and intestinal tract of *A. japonicus* respectively. The black arrow indicates inflammatory cell infiltration, nuclear condensation, fragmentation, cell disintegration and necrosis, muscle fiber nuclear condensation, intestinal mucosal epithelial tissue necrosis, and exfoliated and necrotic mucosal epithelial cells in the intestinal cavity, forming a large gap