

维生素C和E合用对中华鳖幼鳖非特异性免疫功能的影响

周显青^{1,2} 牛翠娟¹ 孙儒泳¹

(1 北京师范大学生命科学学院; 生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 北京 100875;

2 首都医科大学实验动物科学部, 北京 100054)

摘要: 本研究旨在探讨维生素C和E合用对中华鳖幼鳖非特异性免疫功能的影响。实验设5组, 5组饵料中维生素C和E的添加量依次为0和0mg/kg(对照组); 250和50mg/kg(实验I组); 2500和250mg/kg(实验II组); 250和250mg/kg(实验III组); 2500和250mg/kg(实验IV组)。喂食4周, 取其血液, 测定中华鳖血细胞的吞噬率、血清溶菌活力、杀菌活力、补体C3和C4。结果表明, 实验II—IV组, 血细胞吞噬率和血清杀菌活力明显高于对照组, 实验IV组明显高于其他4组, 并且维生素C和E之间有明显的协同作用。血清溶菌活力和补体C3的含量, 在实验I—IV组明显高于对照组, 实验IV组明显高于其他4组。补体C4在实验I—IV组明显高于对照组, 但实验I—IV组间没有明显差别, 维生素C和E间也没有协同作用。

关键词: 中华鳖; 维生素C; 维生素E; 吞噬率; 溶菌活力; 杀菌活力; 补体C3; 补体C4

中图分类号: Q958.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2004)04-0356-05

维生素C和E对机体免疫功能影响的研究, 以往多是分别单独进行。二者联合使用的研究报道较少。维生素C和E联用, 明显提高了小鼠的胸腺重量, 并且明显大于仅给予VE的小鼠的重量, 但维生素C和E间没有明显的协同促进作用。^[1]。维生素C和E单独或联合使用, 均能促进母鸡淋巴细胞的增殖, 而且二者联合使用增殖反应最强, 但二者之间没有协同作用^[2]。在鱼类的研究中发现, 维生素C和E联合使用, 对其白细胞的吞噬作用有协同促进作用^[3]。关于两栖和爬行动物, 迄今未见维生素C和E联合使用的研究报道。鉴于各种营养素的作用彼此相互联系, 因此本研究拟探讨维生素C和E联合添加对中华鳖免疫功能的影响, 对二者间的相互关系进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物和驯化 中华鳖(*Trionyx sinensis*)幼鳖购于北京顺义县天竺甲鱼养殖场, 买回后饲养于实验室玻璃缸内。水温控制在30±1℃, 光照为自

然光照。每天下午6:00投食一次, 将饵料加少量水合成面团后投喂, 投饵量以使动物达到饱足并有少量剩余为准。投饵2h后取出剩余饵料, 并进行换水, 所换水为预先加温至30±1℃的水。所用饲料为北京佳伟生物技术有限公司生产的全价稚鳖饲料, 饲料中除了没有添加维生素C和E外, 其他其营养成分和能值见周显青等^[4]。在此条件下驯养3周, 使其适应实验室环境条件后再开始实验。

1.2 实验设计 选用60只健康的中华鳖幼鳖(体重范围为103.4—214g), 将其随机分成5组。每组12只分设两个平行, 分别置于60×30×40cm的玻璃缸中。由于幼鳖外观上难以区分雌雄, 因此本研究不分性别。5组动物的饵料除了维生素C和E的添加量不同外, 其他营养成分同驯化时相同。5组饵料中维生素C和E的添加量见表1。实验期间饵料存放在-20℃的冰箱中, 每天喂食前4h从冰箱中取出。其他实验条件的控制与驯化时相同。实验进行4周后, 每缸取一半幼鳖断头处死, 收集血液在4℃条件下离心制备血清, 血清存放在-20℃冰箱中, 以

收稿日期: 2003-10-10; 修订日期: 2003-11-13

基金项目: 国家自然科学基金资助(编号: 30271014)

作者简介: 周显青, 女, 山东省诸城市人; 博士, 副教授; 主要从事动物生理生态和营养生理方面的研究

通讯作者: 牛翠娟

备下列指标的测定。另一半中华鳖留作应激研究。

表 1 饲料中维生素 C 和 E 的添加量

Tab. 1 The supplementation of Vitamin C and E in diet

组别	VE(mg/kg 饲料)	Vc(mg/kg 饲料)
对照组	0	0
I 组	50	250
II 组	50	2500
III 组	250	250
IV 组	250	2500

1.3 血细胞吞噬作用的测定 按王安利等^[5]人的方法进行测定。将高效活性干酵母放在 2% 的蔗糖水溶液中, 用盐酸调 pH 3—4, 30℃水浴 2h, 然后再煮沸 0.5h 将其杀死。离心除去上清液, 再用无菌生理盐水洗两次, 除去上清液, 最后将酵母菌用无菌生理盐水配成浓度为 $2 \times 10^{[8]}$ 个/mL 的悬液。

取血 40μL 滴于塑料凹孔板中, 然后加肝素 20μL, 酵母菌悬液 20μL, 混匀, 放入密封的湿盒内, 于 37℃培养箱中培养 30min。期间每隔 10min 取出凹孔板摇一次, 培养结束后充分摇匀。然后将鳖血涂片, 甲醇固定 3min 姬姆萨染色 10min, 在显微镜下观察计数。计数 100 个血细胞, 记下吞噬酵母菌的细胞数, 按下列公式计算血细胞吞噬率:

$$\text{血细胞吞噬率} = \frac{\text{吞噬酵母的血细胞数}}{100 \text{ 个细胞}} \times 100\%$$

1.4 血清溶菌活力的测定 以溶壁微球菌(*Micrococcus lysoleikticus*)冻干粉为底物, 按照 Hultmark 等^[6]和王雷等^[7]人的方法进行。将底物用 0.1mol/L, pH=6.4 的磷酸钾盐缓冲液配成一定浓度的悬液 ($O.D_{570} \approx 0.3$)。取 3mL 该悬液与 50μL 待测血清于试管中混匀, 测定其水浴前在 570nm 处的光密度值 (A_0), 然后将其置于 37℃水浴保温 30min, 取出后立即置冰浴中 10min 以终止反应, 测定其保温后在 570nm 处的光密度值 (A)。溶菌活力 U1 按下列公式计算:

$$U1 = (A_0 - A) / A$$

1.5 血清杀菌活力的测定 以副溶血弧菌(*Vibro parahaemolyticus*)为底物, 采用王伟庆等^[8]人的方法。将底物用 0.1mol/L, pH=6.4 的磷酸钾盐缓冲液配

成一定浓度的菌悬液 ($O.D_{570} = 0.35—0.5$)。取 3mL 该悬液与 50μL 待测血清于试管中混匀, 测其在 570nm 处的光密度值 (A_0), 然后置于 37℃水浴保温 30min, 取出后立刻置于冰浴中 10min 以终止反应, 测其在 570nm 处的光密度值 (A)。杀菌活力按下式计算:

$$U_k = [(A_0 - A) / A]^{1/2}$$

1.6 血清补体 C3 和 C4 含量的测定 采用伊利康生物技术有限公司生产的试剂盒, 分别按要求加入各试剂及血清后, 在 37℃水浴 10min, 用透射比浊法在 722 型紫外分光光度计 340nm 波长处读取测定管和标准管的光密度值 (A), 以计算补体 C3 和 C4 的含量。

1.7 数据分析 采用 STATISTICA 统计软件包中两因素方差分析和 Duncan 多重比较对所得数据进行分析处理, $P < 0.05$ 即认为有差异显著性。所有的结果均以平均值±标准差来表示。

2 结果

2.1 血细胞吞噬率的变化

两因素方差分析表明, 维生素 C 和 E 合用对中华鳖血细胞的吞噬率有明显影响 ($P < 0.01$), 并且二者之间有明显的协同促进作用 ($F = 4.80, P = 0.04$)。Duncan 多范围检验表明, I 组与对照组间没有明显不同 ($P > 0.05$), II—IV 组中华鳖血细胞的吞噬率明显高于对照组 ($P < 0.05$), 实验 IV 组明显高于其他 4 组 ($P < 0.05$) (图 1)。

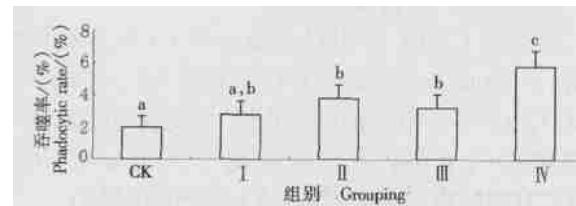


图 1 维生素 C 和 E 合用对中华鳖幼鳖血细胞吞噬率的影响
(均值±标准差)

Fig. 1 Effect of the combination of vitamin C and E on phagocytic rate of blood cell in juvenile soft shelled turtle (M±SD)

2.2 血清溶菌活力的变化

维生素 C 和 E 合用对血清溶菌活力影响显著 ($P < 0.05$), 二者之间协同作用明显 ($F = 4.51, P = 0.045$)。I—IV 组血清溶菌活力明显高于对照组 ($P < 0.05$), IV 组明显高于其他 4 组 ($P < 0.05$) (图 2)。

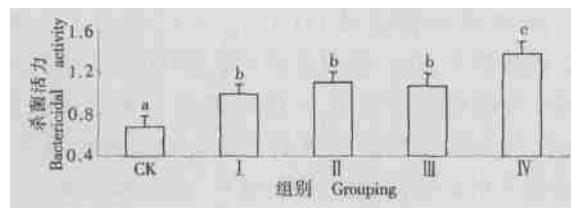


图2 维生素C和E合用对中华鳖幼鳖血清杀菌活力的影响
(均值土标准差)

Fig. 2 Effect of the combination of vitamin C and E on serum bactericidal activity in juvenile soft shelled turtle ($M \pm SD$)

2.3 血清杀菌活力的变化

维生素C和E合用对中华鳖血清杀菌活力有明显影响($P < 0.01$),二者之间有明显交互作用($F = 4.79$, $P = 0.39$)。II—IV组血清杀菌活力明显高于对照组($P < 0.05$),IV组高于其他4组($P < 0.05$),但I组与对照组间没有明显不同($P > 0.05$)(图3)。

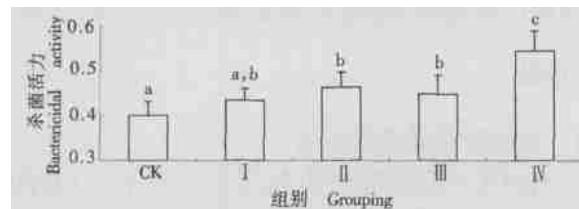


图3 维生素C和E合用对中华鳖幼鳖血清杀菌活力的影响
(均值土标准差)

Fig. 3 Effect of the combination of vitamin C and E on serum bactericidal activity in juvenile soft shelled turtle ($M \pm SD$)

2.4 血清补体C3含量的变化

维生素C和E合用对血清补体C3含量的影响显著($P < 0.05$),二者的交互作用明显($F = 4.40$, $P = 0.047$)。I—IV组中华鳖血清补体C3的含量明显高于对照组($P < 0.05$),IV组明显高于其他4组($P < 0.05$),其他各组间无明显差异($P > 0.05$)(图4)。

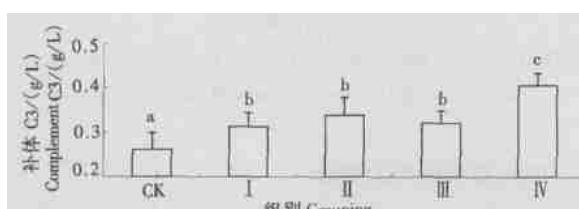


图4 维生素C和E合用对中华鳖幼鳖血清补体C3含量的影响
(均值土标准差)

Fig. 4 Effect of the combination of vitamin C and E on content of serum complement C3 in juvenile soft shelled turtle ($M \pm SD$)

2.5 血清补体C4含量的变化

I—IV组中华鳖血清补体C4含量明显高于对照组($P < 0.01$),但I—IV组间没有明显不同($P > 0.05$)。两因素方差分析表明,维生素C和E合用对补体C4没有显著影响($P > 0.05$),二者间没有协同作用($F = 0.750$, $P = 0.395$)(图5)。

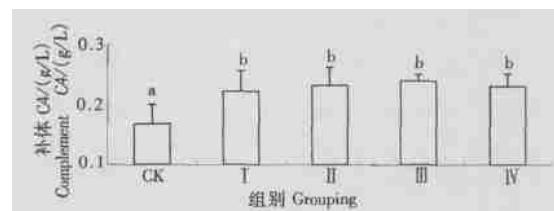


图5 维生素C和E合用对中华鳖幼鳖血清补体C4含量的影响(均值土标准差)

Fig. 5 Effect of the combination of vitamin C and E on content of serum complement C4 in juvenile soft shelled turtle ($M \pm SD$)

3 讨论

3.1 维生素C和E合用对中华鳖血细胞吞噬作用的影响

吞噬细胞的功能需要一定量的抗氧化剂和氧自由基来维持^[9]。Mulero等^[3]对金头鲷(*Sparus aurata* L.)的研究发现,金头鲷白细胞的移动和吞噬作用随维生素C和E的添加而增强,二者合用对其吞噬作用有协同促进影响。本实验结果表明,维生素C和E合用能明显促进中华鳖血细胞的吞噬作用,在维生素C和E的最高剂量组,血细胞的吞噬作用最强,并显著高于其他组,二者合用有明显的协同效应。维生素C和E的协同作用,可能是由于维生素C和E的混合添加,互相提高了对方在体内组织中的含量(周显青等,待发表),进而协同促进了吞噬细胞的吞噬作用。维生素C有氧化和抗氧化的两重性,体外实验证明,在维生素E缺乏时,它能加速脂质体过氧化作用,是一个助氧化剂,然而在维生素E存在时就能逆转维生素C的这种氧化作用^[10, 11]。另一方面,红细胞内抗坏血酸盐不仅能降低维生素E的利用,并且可能恢复红细胞膜中的维生素E的活性,而血浆中的维生素C能防止低密度脂蛋白中维生素E的氧化^[12]。

3.2 维生素C和E合用对中华鳖血清溶菌活力和杀菌活力的影响

关于维生素C和E合用对机体血清溶菌活力和杀菌活力的影响迄今未见报道。本结果表明,在维生素C和E的最高剂量组,中华鳖血清溶菌活力

和杀菌活力最强, 并且明显高于其他组, 二者合用有明显协同作用。这可能是由于维生素 C 和 E 的合用, 交互促进了体内维生素 C 和 E 的含量, 促进了分泌溶菌酶和杀菌活性物质的分泌细胞的分泌活性, 从而增强了溶菌活力和杀菌活力。

3.3 维生素 C 和 E 合用对中华鳖血清补体 C3 和 C4 含量的影响

研究表明, 维生素 C 和 E 合用, 对中华鳖补体 C3 的合成有明显的协同作用, 在维生素 C 和 E 的最高剂量组, 补体 C3 含量最高, 并且明显高于其他组; 但二者合用对补体 C4 却没有此影响, 而维生素 C 和 E 的缺乏则能抑制补体 C4 的产生。维生素 C 和 E 联用对补体 C3 的协同作用, 可能是由于它们相互促进了对方在肝脏中的含量, 促进了肝细胞的功能所致, 因为补体的主要合成部位是肝脏。刘晓冬等^[13]对老龄小鼠的研究发现, 维生素 E 单独及与维生素 C 联合应用, 均能明显降低其肝脏和血清中脂质过氧化物和肝细胞凋亡的发生率, 提高肝细胞的增殖能力, 而且维生素 C 和 E 对降低脂质过氧化物有协同效应。至于维生素 C 和 E 联用对补体 C4 合成没有影响, 则可能是因为实验所用的维生素 C 和 E 的剂量没有满足促进补体 C4 合成所需要的剂量。

综上所述, 除了血清补体 C4 外, 维生素 C 和 E 合用对中华鳖幼鳖的非特异性免疫功能有明显的协同促进作用, 并且在维生素 C 和 E 的最高剂量组到达各自的最大值。这说明在本实验范围内, 饲料中添加 2500mg/kg 维生素 C 和 250mg/kg 的维生素 E 能达到中华鳖的最佳免疫效果。

参考文献:

- [1] Liu J, Gong D Z, Jiang L P, et al. Effects of Vitamin E and Vitamin E in Combination with Vitamin C and/or Vitamin B2 on Immune Function in Mice [J]. *Acta Public Health Sinica*, 1998, **17**(5): 289—291. [刘军, 宫德正, 姜丽平, 宋淑云, 仲来福. 维生素 E 及其与维生素 C 和/或 B2 联用对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中国公共卫生学报, 1998, **17**(5): 289—291]
- [2] Puthongsiripom U, Scheideler S E, Sell J L, et al. Effects of vitamin E and C supplementation on performance, in vitro lymphocyte proliferation, and antioxidant status of laying hens during heat stress [J]. *Poul Sci.*, 2001, **80**(8): 1190—1200
- [3] Mulero V, Esteban M A, Meseguer J. Effects of in vitro addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) phagocytes [J]. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1998, **66**(2): 185—199
- [4] Zhou X Q, Niu C J, Li Q F. The effects of light intensity on daily food consumption and specific growth rate of the juvenile soft shelled turtles, *Trionyx sinensis* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1998, **44**(2): 157—161 [J]. [周显青, 牛翠娟, 李庆芬. 光照强度对中华鳖稚鳖摄食和生长的影响 [J]. 动物学报, 1998, **44**(2): 157—161]
- [5] Wang A L. The technical study on prevention and control of the epidemic viral disease of *Penaeus chinensis*. [D]. Beijing Normal University, 1997, 31—32. [王安利. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)病毒性流行病防治技术研究. 北京师范大学, 1997, 31—32]
- [6] Huemark D. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal protein from hemolymph of immunized pupae of *Hydrolphora cecropia* [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1980, **106**: 7—16
- [7] Wang L, Li G Y, Mao Y X, et al. Study of effect of immune medicine by oral on the prevention and cure of disease in culture *Penaeus chinensis* [J]. *Oceanol. Limnol. Sinica*, 1994, **25**(5): 486—491. [王雷, 李光友, 毛远兴, 等. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究. 海洋与湖沼, 1994, **25**(5): 486—491]
- [8] Wang W Q, Li A J. Effect of vitamin C on the immune function of *Penaeus chinensis* [C]. Thesis Collection of Animal Nutrition. Beijing: Chinese Agriculture University Press, 1996, 53—58. [王伟庆, 李爱杰. 1996b. 维生素 C 对中国对虾(*Penaeus chinensis*)免疫功能的影响 [C]. 动物营养研究论文集. 北京: 中国农业大学出版社, 1996, 53—58]
- [9] Del Rio M, Ruedas G, Medina S, et al. Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro [J]. *Life Sci.*, 1998, **63**(10): 871—881
- [10] Fukuzawa K, Gebicki J M. Oxidation of α -alpha tocopherol in micelles and liposomes by the hydroxyl, perhydroxyl, and superoxide free radicals [J]. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1983, **226**(1): 242—251.
- [11] Liebler D C, Kling D S, Reed D J. Antioxidant protection of phospholipid bilayers by α -tocopherol [J]. *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**(26): 12114—12119
- [12] May J M. Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte [J]. *Biosci.*, 1998, **3**: 1—10
- [13] Liu X D, Ma S M, Guo Y, et al. Effect of VE, VE+VC on apoptosis in liver of aging mice [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 1999, **21**(4): 405—408. [刘晓冬, 马淑梅, 郭英, 等. 维生素 E 及其联合维生素 C 对老龄小鼠肝细胞凋亡的影响. 营养学报, 1999, **21**(4): 405—408]

EFFECTS OF THE COMBINATION OF VITAMIN C AND E ON NON SPECIFIC IMMUNE FUNCTION IN JUVENILE SOFT-SHELLED TURTLES *TRIONYX SINENSIS*

ZHOU XiarrQing^{1,2}, NIU Cuī Juan¹ and SUN RuYong¹

(1. Ministry of Education key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, Institute of life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875;

2 Department of Laboratory Animal Science, Capital Medical University, Beijing 100054)

Abstract: The study was conducted to investigate the effect of the combination of vitamin C and E on non specific immune function in juvenile soft-shelled turtle. The turtles were fed combination of vitamin C and E at the dosages of 0 and 0mg/ kg diets (control group), 250 and 50mg/ kg diets(experiment I group), 2500 and 50mg/ kg diets(experiment II group), 250 and 250mg/ kg diets(experiment III group), 2500 and 250mg/ kg diets(experiment IV group) diets, respectively. The blood in turtles were collected after 4 weeks, and the phagocytic rate of blood cell, serum bacteriolytic activity, bactericidal activity, levels of complement C3 and C4 were analyzed. The results showed that the phagocytic rate of blood cell and serum bacteriolytic activity in the three of experiment II — IV were significantly higher than that of control, and experiment IV group significantly was higher than the other 4 groups. Serum bactericidal activity and level of complement C3 in the four groups of experiment I — IV were significantly higher than control group, and experiment IV group significantly was higher than the other 4 groups. Positive interaction effects of the two vitamins on the phagocytic rate of blood, serum bacteriolytic activity, bactericidal activity and the level of complement C3 were observed. The level of complement C4 in the four groups of experiment I — IV was significantly higher than that of control, while there was no significant difference among the four groups of experiment I — IV. No interaction effects of the two vitamins on complement C4 was observed.

Key words: Soft shelled turtle; Vitamin C; Vitamin E; phagocytic rate; Bacteriolytic activity; Bactericidal activity; Complement C3; Complement C4