

研究简报

大黄与黄连对两种淡水虾血细胞吞噬活性的影响

陈孝煊 吴志新 张厚梅

(华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

EFFECT OF *RHEUM OFFICINALE* AND *COPTIS CHINENSIS* ON THE PHAGOCYTIC ACTIVITY IN THE HEMOCYTES OF CRAYFISH, *PROCAMBARUS CLARKII* AND *CHERAX QUADRICARINATUS*

CHEN Xiao-xuan, WU Zhi-xin and Zhang Hou-mei

(Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

关键词: 大黄; 黄连; 克氏原螯虾; 红螯螯虾; 血细胞; 吞噬活性

Key words: *Rheum officinale*; *Coptis chinensis*; *Procambarus clarkii*; *Cherax quadricarinatus*; Hemocytes; The phagocytic activity

中图分类号:S 945.4 文献标识码:A 文章编号: 1000-3207(2002)02-0201-004

在虾类的养殖中, 疾病的预防是非常重要的。中草药对海水养殖的中国对虾的免疫促进作用已有不少研究^[1-2], 但中草药制剂在淡水虾中的作用却未见报道。本实验通过采用大黄(*Rheum officinale*)和黄连(*Coptis chinensis*)对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)和红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)进行拌饵投喂, 以测定其是否能增强淡水虾免疫系统的活性并达到防病效果, 为在发展大面积养殖淡水虾时利用中草药防病提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验虾 红螯螯虾为华中农业大学水产试验站人工养殖的成虾, 体重 60—75g; 克氏原螯虾从狮子山集贸市场购买, 体重 30—50g。选择体态正常, 健康无病的个体, 分别饲养于室内水族箱(65×45×34cm)中, 饲养 7—10d 后开始实验。实验期间水温 22—25℃。

1.2 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)由本院微生物实验室保存提供。将金黄色葡萄球菌在肉汤培养基中 37℃ 振荡培养 24h 后, 离心集菌。用 0.15mol/L 无菌生理盐水洗涤 3 次, 将菌液悬浮于一定量的生理盐水中, 加入终浓度为 1.0% 的福尔马林, 25℃ 灭活 24h, 离心集菌。用生理盐水调整浓度为 3×

收稿日期: 2000-07-10; 修订日期: 2001-09-12

基金项目: 武汉市重点科技项目资助

作者简介: 陈孝煊(1962—), 男, 福建省连江县人; 理学硕士, 副教授; 研究方向: 鱼类病理学与水产微生物学

10^8 cfu/mL, 置 4℃ 冰箱保存备用。

1.3 弧菌(*Vibrio sp.*) 为从罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)中分离的一种病原菌,由本院微生物实验室保存提供。将弧菌在脑心浸液琼脂培养基上 28℃ 培养 24h 后,用 0.15mol/L 生理盐水洗下菌苔,并调整浓度为 4×10^6 cfu/mL, 用于活菌攻毒。

1.4 实验分组 实验分为 6 组, A: 投喂大黄的克氏原螯虾组; B: 投喂黄连的克氏原螯虾组; C: 投喂基础饲料的克氏原螯虾组(对照组); D: 投喂大黄的红螯螯虾组; E: 投喂黄连的红螯螯虾组; F: 投喂基础饲料的红螯螯虾组(对照组)。

1.5 药饲的制作与投喂 分别称取饲料量 1.0% 的大黄和黄连, 煎煮, 纱布过滤。将药液均匀喷洒在饲料中, 干燥后保存备用。以药饲分别投喂克氏原螯虾和红螯螯虾, 每天下午投饵一次, 投饵量以第二天上午略有剩余为准。对照组只投喂基础饲料。连续投喂 7d 后停止投喂药饲而改投基础饲料。

1.6 取血和血细胞吞噬活性测定 在用药饲后的第 1、4、7、14、21d 分别取样, 每组实验虾每次取样 4 只。用注射器吸取虾血抗凝剂^[3] 0.3mL, 从虾围心腔取血 0.3mL, 注入离心管中, 整个取血过程在 4℃ 进行。再加入 0.6mL 0.15mol/L 冷 NaCl 溶液, 摆匀, 加入 250μL 浓度为 3×10^8 cfu/mL 金黄色葡萄球菌悬液, 混匀后于 28℃ 保温 1h, 其间不断摇匀。再加入等量 0.15mol/L 冷 NaCl 溶液。2000r/min 离心 4min, 弃上清液。每个样品做 5 张涂片, 甲醇固定, Giemsa 染色, 油镜下观察计数。按下式计算血细胞吞噬百分比和吞噬指数。数据处理采用 t 测验。

$$\text{吞噬百分比 (PP)} = \frac{\text{100 个血细胞中参与吞噬的细胞数}}{100} \times 100$$

$$\text{吞噬指数 (PI)} = \frac{\text{细胞内总菌数}}{\text{被计数真吞噬作用的细胞数}}$$

1.7 攻毒试验 在实验开始后的第 21d 进行攻毒试验。弧菌浓度为 4×10^6 cfu/mL。以 0.1mL/只剂量在克氏原螯虾腹侧第 3-4 腹节间肌肉注射。攻毒后随时观察并记录虾死亡情况。以下式计算免疫保护率:

$$\text{免疫保护率} = \frac{\text{对照组死亡率} - \text{实验组死亡率}}{\text{对照组死亡率}} \times 100$$

2 结果

2.1 大黄和黄连对克氏原螯虾血细胞吞噬活性的影响

大黄和黄连对克氏原螯虾血细胞吞噬活性的影响结果见表 1。由表 1 可以看出, 投喂大黄和黄连后第 1d, 克氏原螯虾血细胞吞噬百分比和吞噬指数即开始上升, 与对照组均有极显著差异($P < 0.01$)。随着投喂时间的延长, 血细胞的吞噬活性还有一定的上升。在停药后, 血细胞的吞噬百分比和吞噬指数均有不同程度的下降, 但在第 21d 时仍显著高于对照组($P < 0.05$)。

表 1 投喂大黄和黄连后克氏原螯虾血细胞的吞噬活性($X \pm S_x$)

Tab. 1 The phagocytic activity of the hemocytes of *P. clarkii* after feeding *R. officinale* and *C. chinensis*

组别 Groups	吞噬活性 Phagocytic activity	投药后天数和吞噬百分比及吞噬指数(Days, PI and PP)				
		1	4	7	14	21
A	PP	67.1 ± 2.61	65.6 ± 1.04	65.0 ± 2.15	52.7 ± 0.91	41.6 ± 1.78
	PI	8.76 ± 0.52	9.80 ± 0.40	9.10 ± 0.14	6.01 ± 0.11	5.48 ± 0.24
B	PP	63.1 ± 3.07	66.1 ± 1.03	66.3 ± 1.06	40.7 ± 2.18	32.5 ± 1.36
	PI	8.80 ± 0.74	10.39 ± 0.59	10.38 ± 0.89	6.40 ± 2.40	5.10 ± 0.11
C	PP	33.2 ± 0.52	46.2 ± 0.61	46.2 ± 1.42	31.2 ± 0.59	25.2 ± 1.02
	PI	6.00 ± 0.23	6.70 ± 0.25	6.40 ± 0.14	4.92 ± 0.11	4.50 ± 0.11

2.2 大黄和黄连对红螯螯虾血细胞吞噬活性的影响

大黄和黄连对红螯螯虾血细胞吞噬活性的影响结果详见表2。由表2可以看出,在投喂大黄和黄连后不同时间以及停药后,实验组的吞噬活性均极显著或显著高于对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。但大黄组和黄连组在投药期间和停药后吞噬活性的变化却不尽相同,黄连组的吞噬活性在用药后第7d降低,而在停药后又有所升高。

表2 投喂大黄和黄连后红螯螯虾血细胞的吞噬活性($X \pm S_x$)

Tab. 2 The phagocytic activity of the hemocytes ¹ of *C. quadricarinatus* after feeding *R. officinale* and *C. chinensis*

组别 Groups	吞噬活性 Phagocytic activity	投药后天数和吞噬百分比及吞噬指数(Days, PI and PP)				
		1	4	7	14	21
D	PP	43.4 ± 1.41	59.7 ± 2.06	50.5 ± 1.55	44.6 ± 0.89	39.4 ± 2.06
	PI	7.20 ± 0.35	8.91 ± 0.36	9.20 ± 0.51	9.40 ± 0.43	6.72 ± 0.28
E	PP	63.1 ± 3.10	54.6 ± 1.23	43.1 ± 1.88	49.1 ± 0.89	51.4 ± 1.07
	PI	8.24 ± 0.13	8.85 ± 0.22	7.80 ± 0.28	9.12 ± 2.84	9.30 ± 1.24
F	PP	23.2 ± 1.80	33.9 ± 1.20	37.8 ± 1.82	32.9 ± 2.08	33.3 ± 1.13
	PI	4.05 ± 0.11	5.01 ± 0.23	4.70 ± 0.11	4.42 ± 0.05	5.06 ± 0.16

2.3 攻毒试验结果

攻毒后14d,对照组克氏原螯虾死亡率为73.3%,而实验组的死亡率均为0。详见表3。

表3 大黄和黄连对克氏原螯虾的免疫保护率

Tab. 3 The protective rate of *P. clarkii* after feeding *R. officinale* and *C. chinensis*

组别 Groups	虾数 Numbers	死亡数 Dead numbers	死亡率(%) Mortality %	免疫保护率 Protective rate
A	15	0	0	100
B	15	0	0	100
C	15	11	73.3	-

3 讨论

现已发现有200余种中草药具有免疫促进作用,实验初步表明中草药饲料添加剂对促进淡水鱼增重及病害防治具有良好的效果^[1]。中草药在对虾养殖的作用亦有较多报道,杜爱芳用4种复合中草药制剂对中国对虾进行投喂,经测定这4种制剂使对虾血细胞吞噬活性和对细菌的杀伤活性均显著高于对照组,免疫保护率也有提高^[1]。罗日祥用9种中草药配制的1号制剂(含等量的黄芪、猪苓、杜仲、枸杞子、鱼腥草、甘草、陈皮、茯苓和黄莲)和4种中草药配制的2号制剂(含等量的鱼腥草、枸杞子、陈皮和丹皮)对中国对虾进行投喂,结果表明,1号制剂对对虾的免疫系统有激活作用,且这种作用在一定时间范围内随着药饲投喂时间的延长而加强;2号制剂对对虾的免疫系统起抑制或破坏作用^[2]。据报道,大黄

1) 中国鱼病研究会编. 中国水产学会鱼病研究会第四次会员代表大会暨学术讨论会论文摘要汇编. 1997, 120-

中的多种成分对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌等多种病原菌具有抑制作用和抗肿瘤作用^[4]; 黄莲的主要成分黄莲素能增强白细胞和肝脏网状内皮系统的吞噬能力^[5], 并使脾脏收缩, 放出更多的吞噬细胞^[6]。本实验用 1.0% 的大黄和黄连拌饵投喂克氏原螯虾和红螯螯虾, 结果表明大黄和黄连均能增强克氏原螯虾和红螯螯虾血细胞的吞噬活性, 在克氏原螯虾还显示了对活弧菌攻毒有很好的免疫保护率, 说明大黄和黄连可以增强两种螯虾的非特异性免疫功能。

从实验结果可以看出, 在投喂药饲后的第 1d, 融虾血细胞的吞噬活性即有明显上升, 随着药饲投喂时间的延长, 吞噬活性有进一步的增强。在停药后吞噬活性有所降低。但仍显著高于对照组, 且攻毒结果表明在停药后 14d 的免疫保护率仍达到 100%。同时在实验中发现投喂黄连的实验组螯虾的血液颜色在第 4d 开始变黄, 停药后又恢复为淡青色。虽然并没有观察到对螯虾生存的影响, 但投喂黄连的红螯螯虾组的吞噬活性在第 7d 有所下降, 停药后又上升。因此, 可以认为药饲的投喂可以是阶段性的, 以 3~5d 为宜, 这样既可以增强虾的抗病能力, 又不至于对虾产生毒副作用。当然, 具体的用药剂量和时间还有待于进一步的研究。

李光友等认为, 中国对虾血细胞在离体条件下, 经适当处理, 能发生吞噬反应, 选择不同药饵养殖对虾, 测血细胞的吞噬活性, 可判定药饵对防治虾病、提高虾的抵抗力是否有效^[7]。本实验所测定的吞噬活性与其他学者的研究结果相比数值偏低^[1], 这可能是实验对象以及吞噬细菌的处理方法不同而造成的。本文所用的金黄色葡萄球菌经过 1% 福尔马林处理后对螯虾血细胞的吞噬活性可能会产生一定的影响。有学者认为细菌的死活、运动能力以及是否处于对数生长期等都会对血细胞的吞噬活性造成影响^[8]。

甲壳动物的免疫防疫存在着细胞防御和体液防御, 细胞防御主要表现为吞噬作用、团囊作用和结节形成。一般认为虾的血细胞分为 3 类: ①透明细胞; ②小颗粒细胞; ③颗粒细胞。有学者认为透明细胞和小颗粒细胞的吞噬能力较强^[9]。本实验是对全血细胞的吞噬活性进行测定的, 未对 3 种细胞加以区分。

参考文献:

- [1] 杜爱芳, 蔡渭明, 于涟. 中国对虾血细胞吞噬功能的研究(J). 中国水产科学, 1997, 4(2): 1~5
- [2] 罗日祥. 中药制剂对中国对虾免疫活性物质的诱导作用(J). 海洋与湖沼, 1997, 28(6): 573~578
- [3] 森胜义, 神谷久南. 水产动物的生体防御(M). 日本东京: 恒星社原生阁, 1995, 117~129
- [4] 国家医药管理局中草药情报中心站编. 植物药有效成分手册(M). 北京: 人民卫生出版社, 1986
- [5] 医用药理学编写组编. 医用药理学(M). 北京: 人民卫生出版社, 1982
- [6] 昌潍医学院药理学教研室主编. 简明药理学(M). 济南: 山东科学技术出版社, 1980
- [7] 李光友, 王青. 中国对虾血细胞及其免疫研究(J). 海洋与湖沼, 1995, 26(6): 591~597
- [8] Tomita T, Blumenthal E, Kanegasaki S. Phagocytic and chemiluminescent responses of mouse peritoneal macrophages to living and killed *Salmonella typhimurium* and other bacteria(J). Infect, Immun., 32: 1242~1248
- [9] 叶燕玲, 陈宽智. 中国对虾(*PENAEUS CHINENSIS*)血细胞超微结构、分类及计数(J). 青岛海洋大学学报, 1993, 23(2): 35~42