

研究简报

## 黄芪对中华鳖免疫和抗酸应激能力的影响

周显青<sup>1,2</sup> 牛翠娟<sup>1</sup> 孙儒泳<sup>1</sup>

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

2. 首都医科大学动物科学部, 北京 100054)

### THE EFFECTS OF *RADIX ASTRAGALI* ON IMMUNITY AND ANTI-STRESS ABILITY IN SOFT SHELLED TURTLES( *TRIONYX SINENSIS* )

ZHOU Xianqing<sup>1,2</sup>, NIU Cuijuan<sup>1</sup> and SUN Ruyong<sup>1</sup>

(1. Ministry of education key laboratory for biodiversity science and ecological engineering,

Institute of life sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875;

2. Department of Animal Sciences, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054)

关键词: 黄芪; 中华鳖; 免疫; 应激

**Key words:** *Radix astragali*; *Trionyx sinensis*; Immunity; Stress

中图分类号: Q958.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)01-0110-03

黄芪是中医常用益气药之一。近些年的研究表明,黄芪具有免疫调节和对抗不利环境等功能。它不仅能促进小鼠脾淋巴细胞的增殖,提高IL-2的产生<sup>[1]</sup>,而且能增强大鼠的抗缺氧作用<sup>[2]</sup>,对抗镉引起的大鼠淋巴细胞转化率的下降<sup>[3]</sup>。中华鳖是名贵的经济水产动物,在养殖过程中,经常面临水质污染和温度波动等环境因素的变化,这对中华鳖的生长和存活极为不利。鉴于这种情况,在饵料中添加黄芪,以水质pH为应激源,探讨黄芪对中华鳖免疫和抗应激能力的影响,以期通过黄芪的添加改善中华鳖的免疫和抗应激能力,提高中华鳖的生存能力,同时也为黄芪的药理研究提供一些基础数据。

#### 1 材料和方法

**1.1 实验动物和驯化** 实验用中华鳖幼鳖(*Trionyx sinensis* Wiegmann)购于北京顺义县天竺甲鱼养殖场,饲养于实验室玻璃缸内。每天下午6:00投食一次,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。水温控制在30±1℃,光照为室内自然光照。在此条件下驯养3周后再开始实验。驯养期间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,其营养成分和能值见周显青等<sup>[4]</sup>。由于幼鳖外观上难以区分雌雄,因此本研究不分性别。

**1.2 实验设计** 选24只健康的中华鳖幼鳖(体重范围在89.4—164.0g),在室内驯化3周,将其分成2组,每组12只分设2个平行,分置于60×30×40cm的玻璃缸中。其中一组不加黄芪(对照组),另一组在其饵料中添加5%的黄芪(实验组)。饵料存放在-20℃的冰箱中,每天喂食前4h从冰箱内取出。其他实验条件同驯化时相同。实验进行4周后,每缸取一半幼鳖断头处死,收集血液制备血清。之后,用盐酸将缸中水pH7.9调至pH5,24h后将另一半中华鳖作同样的处理,然后按下面所述方法进行各指标的测定。

**1.3 酵母菌液的制备** 将高效活性干酵母放在2%的蔗糖水溶液中,用盐酸调pH3—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2×10<sup>8</sup>个/mL的悬液。

**1.4 血细胞的体外培养及涂片、计数** 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<sup>[5]</sup>。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:

收稿日期: 2002-02-24; 修订日期: 2002-08-28

基金项目: 国家自然科学基金资助(No. 39370121)

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方面的研究

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

1.5 血清溶菌活力的测定 以溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus* Fleming) 冻干粉为底物, 按照 Hultmark 等人<sup>[6]</sup>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  $U_l$  按下列公式计算:

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

1.6 血清杀菌活力的测定 以副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus* Sakazaki et al.) 为底物, 采用王伟庆等<sup>[7]</sup>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:

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

1.7 血清中皮质醇含量的测定 采用北京福瑞生物工程公司生产的皮质醇放射免疫分析药盒进行测定。实验所得数据用 STATISTICA 统计软件包中 t test for independent samples 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 中华鳖幼鳖血细胞吞噬率的变化 黄芪对中华鳖幼鳖血细胞吞噬率有明显促进作用 ( $p < 0.01$ )。酸应激后, 对照组血细胞吞噬率有明显下降 ( $p < 0.05$ ), 黄芪添加组血细胞吞噬率在应激前后没有显著差异 ( $p > 0.05$ ), 并且仍明显高于应激后的对照组 ( $p < 0.01$ ) (表 1)。

表 1 黄芪对中华鳖幼鳖应激前后血细胞吞噬率的影响( $M \pm SD$ )

Tab 1 The effect of *Radix astragali* on specific growth rate and phagocytic rate of blood cells in unstress and stress juveniles soft shelled turtles

组别 Different group	黄芪添加量 Supplement <i>Radix astragali</i>	初始体重 Initial weight (g)	吞噬率 Phagocytic rate 应激前 (%)	应激后 (%)	p 值
对照组	0	121.65 ± 11.1	3.5 ± 1.05 <sup>a</sup> (n= 6)	2.17 ± 0.98 <sup>a</sup> (n= 6)	0.046
实验组	饲料的 5%	107.05 ± 5.02	9.4 ± 2.70 <sup>b</sup> (n= 5)	6.83 ± 2.32 <sup>b</sup> (n= 6)	0.126

注: 同一列上标不同者差异显著; p: 概率 (Probability); n: 样本数 (Sample size)

2.2 中华鳖幼鳖血清溶菌活力的变化

黄芪添加组血清溶菌活力明显高于对照组 ( $p < 0.05$ )。酸应激后, 对照组血清溶菌活力明显下降 ( $p < 0.05$ ), 黄芪添加组在应激前后没有明显变化 ( $p > 0.05$ ), 仍明显高于应激后的对照组 ( $p < 0.01$ ) (表 2)。

2.3 中华鳖幼鳖血清杀菌活力的变化

黄芪明显促进了中华鳖血清杀菌活力 ( $p < 0.01$ )。酸应激使对照组和黄芪添加组血清杀菌活力有明显下降 ( $p < 0.05$ ), 对照组下降更为明显 ( $p < 0.01$ ); 但黄芪添加组仍明显高于对照组 ( $p < 0.01$ ) (表 2)。

表 2 黄芪对中华鳖幼鳖应激前后血清溶菌活力和杀菌活力的影响 (均值±标准差)

Tab. 2 The effect of *Radix astragali* on serum bacteriolytic activity and bactericidal activity in unstress and stress juveniles soft shelled turtles ( $M \pm SD$ )

组别 Different group	溶菌活力 Bacteriolytic activity			p 值	杀菌活力 Bactericidal activity			p 值
	应激前	应激后			应激前	应激后		
对照组	0.090 ± 0.043 <sup>a</sup> (n= 6)	0.040 ± 0.036 <sup>a</sup> (n= 6)	0.047		0.504 ± 0.029 <sup>a</sup> (n= 6)	0.357 ± 0.040 <sup>a</sup> (n= 6)	0.00003	
实验组	0.177 ± 0.047 <sup>b</sup> (n= 5)	0.123 ± 0.046 <sup>b</sup> (n= 5)	0.103		0.606 ± 0.061 <sup>b</sup> (n= 5)	0.472 ± 0.074 <sup>b</sup> (n= 5)	0.014	

注: 同一列上标不同者差异显著; p: 概率 (Probability); n: 样本数 (Sample size)

表 3 黄芪对非应激和应激中华鳖幼鳖血清皮质醇含量的影响 (均值±标准差)

Tab 3 The effect of *Radix astragali* on serum cortisol content in unstress and stress juveniles soft shelled turtles ( $M \pm SD$ )

组别 Different group	皮质醇 Cortisol		p 值
	应激前	应激后	
对照组	20.132 ± 3.289 (n= 6)	30.109 ± 5.062 <sup>a</sup> (n= 5)	0.003
实验组	15.906 ± 7.812 (n= 6)	16.464 ± 5.825 <sup>b</sup> (n= 5)	0.898

注: 同一列上标不同者差异显著; p: 概率 (Probability); n: 样本数 (Sample size)

2.4 中华鳖幼鳖血清皮质醇含量的变化

黄芪对中华鳖血清皮质醇含量没有显著影响, 对照组和黄芪添加组血清皮质醇的含量没有明显差别 ( $p > 0.05$ )。酸应激使对照组血清皮质醇含量有明显上升 ( $p < 0.01$ ), 而黄芪添加组在应激前后没有显著差异 ( $p > 0.05$ ), 但明显低于应激后的对照组 ( $p < 0.01$ )。

3 讨论

3.1 黄芪对中华鳖幼鳖血细胞吞噬率的影响

血细胞的吞噬作用是机体免疫系统抵抗病原菌的第一道

防线,对机体起着重要的保护作用。在哺乳动物的研究中发现,黄芪能提高染尘大鼠肺泡巨噬细胞的吞噬功能<sup>[8]</sup>,对抗<sup>60Co $\gamma$</sup> 射线所致的小鼠白细胞的减少<sup>[9]</sup>,提高小鼠的耐缺氧能力<sup>[10]</sup>。本研究表明,黄芪不仅能提高中华鳖血细胞的吞噬作用,而且对酸应激导致的血细胞的吞噬能力的下降有对抗作用。黄芪促进吞噬细胞吞噬作用的机制目前尚不清楚,但它的现代药理研究证实其具有降低自由基的产生和增加对自由基的净化能力。黄芪对酸应激导致的血细胞吞噬作用的下降的对抗作用,可能还与酸应激后皮质醇的变化有关。因为注射皮质醇能抑制银大麻哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*)吞噬细胞的吞噬能力,而本研究的结果显示,酸应激后对照组血清皮质醇含量明显上升,而黄芪添加组在应激前后没有显著差异。

### 3.2 黄芪对中华鳖血清溶菌活力和杀菌活力的影响

本研究表明,黄芪对中华鳖血清溶菌活力和杀菌活力有明显的促进作用。中华鳖表现溶菌活力的因子可能是溶菌酶,溶菌酶是由单核细胞、巨噬细胞和嗜中性细胞产生的能溶解细胞壁、具有抗氧化作用的酶。黄芪可能是由于增强了分泌溶菌酶细胞的分泌活性促进了溶菌酶的分泌,进而提高了血清溶菌活力。至于表现杀菌活力的是何种体液因子以及细胞免疫的关系等,还需要进一步探讨。

酸应激能导致中华鳖血清溶菌活力明显下降,而黄芪的添加对这种下降有明显的对抗作用。这可能与黄芪对应激引起的皮质醇的抑制有关。黄芪苷对皮质醇所致的小鼠淋巴细胞减少、脾脏重量减轻均有明显改善作用<sup>[9]</sup>。

酸应激能明显降低中华鳖的血清杀菌活力,黄芪的添加对血清杀菌活力的下降有部分抵抗作用。这说明杀菌活力对应激较敏感,它可能是检测应激对免疫功能影响的较为灵敏的非特异性免疫指标。

### 3.3 黄芪对中华鳖血清皮质醇含量的影响

石瑞如等对大鼠的研究发现,黄芪能提高老年大鼠血浆皮质醇的含量,但对中年大鼠没有明显影响。本研究表明,黄芪对中华鳖幼鳖血清皮质醇的含量没有影响。这些结果显示,黄芪对血清皮质醇的影响可能还与动物的年龄有关。

许多研究证明,应激能引起机体不同水平的内分泌功能发生变化。皮质醇是应激反应级联中所分泌的最后一种激素。在鱼类的研究中发现,不同环境因素能引起血浆皮质醇浓度的升高。如运输和酸应激能提高虹鳟血浆中皮质醇的含量。而在爬行动物迄今未见这方面的报道。本研究表明,酸应激能导致中华鳖血清皮质醇含量的升高,而黄芪的添加对皮质醇的升高有抑制作用,但其机理尚需进一步研究。

综上所述,黄芪能促进中华鳖的非特异性免疫功能;酸应激对其免疫功能有抑制作用,但却提高了血清皮质醇的含量;黄芪的添加不仅对酸应激所致的内分泌功能的紊乱有调整作用,而且对酸应激所致的免疫功能低下有保护作用。

### 参考文献:

[1] Zhang Q H, Lin Z B. The effects of serum containing radix astragali on

lymphocyte proliferation and production of IL-2[J]. Pharmacology and clinics of Chinese materia medica, 1998, 14 (4): 17—20. [张群豪,林志彬.含黄芪血清对淋巴细胞增殖及IL-2产生的影响[J].中药药理与临床,1998,14(4):17—20]

- [2] He X H, Li C Y, Yu S Z. Protective effects of radix astragali against anoxic damages of neurons[J]. Chin. J. Neurol., 1998, 31 (4): 204—206. [何小华,李承晏,余绍祖.黄芪的抗神经细胞缺氧作用[J].中华神经科杂志,1998,31(4):204—206]
- [3] Wang Q, Yao S M. The Interference from radix astragali to the effects of cadmium on cellular immune function in rat[J]. Occupation and Health, 1999, 15 (1): 5—6. [王强,姚素梅.黄芪对镉引起大鼠细胞免疫功能影响的干预[J].职业与健康,1999,15(1):5—6]
- [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. [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*. The Doctoral thesis of 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.北京师范大学博士学位论文,1997,31—32]
- [6] Hultmark D, Steiner H, Rasmussen T, Boman H G. In immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalephora cecropia*[J]. Eur. J. Biochem., 1980, 106: 7—16
- [7] Wang W Q, Li A J. The effects of vitamin C on immune function in the prawn (*Penaeus chinensis*) [C]. The Thesis Collection of Animal Nutrition. Beijing: Beijing agriculture University Press, 1996, 53—58. [王伟庆,李爱杰.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]
- [8] Cao G W, Sun X T, Sheng J C, Zhao H R, Xie J A, Luo L, Zhang J, Li J. The effects of ginseng and radix astragali function of alveolus macrophage in pneumoconiosis rats[J]. Chinese Public Health, 1999, 15 (12): 1064. [曹贵文,孙秀田,盛景春,赵洪如,谢继安,罗莉,张娟,李杰.人参、黄芪对染尘大鼠肺泡巨噬细胞功能的影响[J].中国公共卫生,1999,15(12):1064]
- [9] Zhang Y D, Xu Q E, Zhang X J, Wang S Q, Shen J P, You L F. The Anti-leukocytopenic and antistress effects of Astragalus saponins on mice[J]. J. Nanjing Medical College, 1992, 12 (3): 244—247. [张银娣,徐勤娥,张小洁,王素琴,沈建平,尤丽芬.黄芪苷升高白细胞及抗应激作用的研究[J].南京医学院学报,1992,12(3):244—247]
- [10] Cheng H H, A X R. The study of Chinese medicinal radix astragali against anoxia[J]. J. Qinghai Med., 1999, 29 (10): 18—19. [程海花,阿祥仁.中药黄芪抗缺氧作用的研究[J].青海医学杂志,1999,29(10):18—19]