

## 皂角苷对大菱鲆非特异免疫的增强作用

韩 雯<sup>1,2</sup>, 王秀华<sup>2\*</sup>, 王玉娟<sup>2</sup>, 王 锐<sup>2</sup>, 李 晨<sup>2</sup>, 黄 健<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266001;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 为评价皂角苷增强鱼类非特异免疫效果, 分别用浓度为 0、15 和 35 mg/L 的皂角苷浸泡大菱鲆, 分析了浸泡后 6、12、24、48 和 72 h 时大菱鲆白细胞的吞噬活力、血清补体旁路途径溶血活性、血清与黏液中溶菌酶活性、抑菌活性与碱性磷酸酶 (AKP) 活性及血清总蛋白浓度。结果显示, 皂角苷低浓度组 (15 mg/L) 与高浓度组 (35 mg/L) 大菱鲆白细胞吞噬活力分别在浸泡后 12 与 24 h 出现显著的增高 ( $P < 0.05$ )。实验组大菱鲆血清中补体旁路途径溶血活性除低浓度组在 12 与 24 h 较对照组低外, 其他检测时段均高于对照组 ( $P < 0.05$ )。血清溶菌酶活性最高值出现在低浓度组浸泡后 6 h 时, 黏液中未能检测出。不同时间点各组大菱鲆黏液抑菌活力变化幅度较大, 两实验组黏液抑菌活力在浸泡后 6 与 12 h 时较对照组提高, 两个实验组间无差异 ( $P > 0.05$ )。血清中 AKP 活力高峰值出现在浸泡后 6 与 12 h, 该时段 AKP 的活力显著高于对照组, 且实验组间存在差异 ( $P < 0.05$ ), 而黏液中 AKP 高峰值出现在 12 h, 该时段 AKP 的活力显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 实验组间无差异。浸泡皂角苷后 6 h 高浓度组血清中蛋白浓度达到最高值, 除 12 h 时各组差异不显著外 ( $P > 0.05$ ), 24 ~ 72 h 高浓度组中血清蛋白含量均高于低浓度及对照组 ( $P < 0.05$ )。研究表明, 皂角苷具有提高鱼类非特异免疫水平的效果。

**关键词:** 大菱鲆; 皂角苷; 吞噬活力; 补体旁路途径溶血活性; 抗菌活力; 溶菌活力; 碱性磷酸酶; 总蛋白

**中图分类号:** S 943

**文献标志码:** A

海水鱼类养殖是我国沿海渔业经济的重要组成部分, 2012 年养殖产量已突破 100 万吨<sup>[1]</sup>, 但由于目前我国海水鱼类养殖在水质、苗种、饲料及药物使用等方面尚存诸多欠缺, 导致养殖鱼类疾病发生频繁<sup>[2]</sup>。为了促进鱼类养殖产业的健康发展, 研究通过提高鱼类的自身免疫水平, 达到预防疾病发生的目的成为鱼病防控的重要发展方向之一。鱼类免疫系统包括特异免疫与非特异免疫, 非特异免疫是鱼类抵抗病原感染的第一道防线, 在抵抗病原感染的早期防御中具有重要的作用<sup>[3]</sup>, 提高鱼类的非特异免疫可以显著增强对细菌病、病毒病及寄生虫的防御效果<sup>[4-5]</sup>。

皂角苷 (saponin) 是多种植物中含有一种以多环式化合物为配基的配糖体的总称, 在植物

中广泛分布<sup>[6-7]</sup>, 皂角苷由皂苷元和糖、糖醛酸或其他有机酸组成, 根据皂苷元的分子结构可将皂角苷分为甾体皂苷和三萜皂苷两类, 三萜皂苷具有佐剂活性<sup>[8]</sup>, 已被用于高效疫苗佐剂的研制<sup>[9]</sup>, 皂角苷用于水产养殖, 不仅能够提高鱼类浸泡疫苗免疫保护率<sup>[10-11]</sup>, 刺激鱼类生长<sup>[12]</sup>, 还可增强对虾非特异免疫力<sup>[13]</sup>, 因而显示出其在水产养殖领域具有潜在应用价值。

为了揭示皂角苷在鱼类浸泡疫苗免疫中的佐剂机理, 在前期实验确定了皂角苷的安全浓度及有效使用浓度的基础上<sup>[10-11]</sup>, 本实验以大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 为实验对象, 从非特异免疫途径, 研究了皂角苷浸泡大菱鲆后, 对鱼体的非特异免疫增强作用, 以期全面评价皂角苷的生物学活性。

收稿日期: 2014-02-28 修回日期: 2014-03-31

资助项目: 国家自然科学基金 (31172440); 黄海水产研究所级基本科研业务费项目 (20603022013009); 泰山学者建设工程专项经费

通信作者: 王秀华, E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

大菱鲆体长(10.0 ± 0.2) cm, 购自烟台某大菱鲆苗种公司, 实验前在暂养池暂养1周, 养殖用水为过滤海水, 盐度30.0, 温度(16 ± 0.5) °C, pH 7.8 ± 0.2。期间投喂颗粒饲料, 日投饵按照体质量的2%投喂, 整个实验过程连续充气。皂角苷(Saponins, 纯度大于99.8%) 购自 Alfa Aesar 公司, 该产品提取自皂皮树(*Quillaja saponaria*)。

### 1.2 实验分组

皂角苷浸泡大菱鲆于18个45 cm × 40 cm × 50 cm的水族箱中进行, 有效水体45 L, 参考皂角苷用作佐剂使用时的有效浓度及安全浓度, 分别设置皂角苷浓度为0、15和35 mg/L 3个组(每组6个平行), 每组浸泡大菱鲆40尾, 分6个时间点取样, 每次取样6尾鱼, 其中3尾用于血清、黏液的制备, 另外3尾用于白细胞的提取。大菱鲆浸泡方法参照皂角苷作为疫苗佐剂使用时的方法<sup>[10-11]</sup>, 将大菱鲆置于相应浓度皂角苷海水溶液中, 浸泡1 h后, 之后移入清水中养殖, 并分别在浸泡完成后的6、12、24、36、48和72 h进行样品采集。

### 1.3 样品的提取和制备

**血清的制备** 每个采样时间点每组每次随机取3尾鱼, 用无菌注射器于大菱鲆尾静脉采集等体积血液, 置于无菌离心管, 室温放置1 h后4 °C过夜, 4 °C 3 000 × g离心10 min后分别取等量上清液混合, 保存于-80 °C待用。

**黏液的制备** 参考陈昌福等<sup>[14]</sup>、Irie等<sup>[15]</sup>和Palaksha等<sup>[16]</sup>的方法, 将取过血的鱼用洁净海水冲洗鱼体表, 再用灭菌生理盐水洗涤2次, 用吸水纸吸除多余水分。用玻片从鱼体鳃盖后缘向后刮取体表黏液, 置于Eppendorf管, 分别加入等体积生理盐水混匀, 4 °C 10 000 × g离心30 min, 每组3尾取等量上清液混合。-80 °C保存备用。

**血液的抽取和白细胞的分离** 每个采样点每次每组随机取3尾大菱鲆, 采集血液分别置于等体积的阿氏液( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.80 g,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  0.055 g,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  2.05 g, NaCl 0.42 g, 蒸馏水 100 mL, pH 6.1, 115 °C灭菌30 min, 4 °C保存)。加入等量的RPMI-1640细胞培养液(Hyclone, 美国), 配成单细胞悬液后静置1 h。之后缓慢加到已经配制好的具有明显分层的Percoll(Pharmacia, 美国)不

连续密度梯度离心管中, 4 °C, 840 × g离心30 min。收集不同密度Percoll界面处的白细胞层, 用细胞洗涤液(PBS + 5%胎牛血清)重悬后离心(4 °C, 640 × g, 5 min), 洗涤3次备用。

### 1.4 白细胞吞噬活力

参照Zhang等<sup>[17]</sup>方法, 将在2216E培养基上培养16 h的鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)用PBS洗下离心(10 000 × g, 5 min), 用L-15培养基重悬。在65 °C水浴灭活1 h。将灭活的细菌加入溶有FITC的(终浓度为100 μg/mL)二甲基亚砜(DMSO)溶液中, 30 °C孵育1 h后用PBS洗5次, 然后用L-15培养液重悬调至浓度为 $1 \times 10^8$ 个/mL做为标记的鳃弧菌悬液。取100 μL标记好的菌液加入到1 mL浓度为 $10^6$ 个/mL的白细胞悬液中, 混匀后于28 °C培养1 h。之后将孵育后的白细胞460 × g离心10 min, 用PBS洗3次, 收集沉淀加入1 mL 0.125%的台盼蓝孵育5 min淬灭胞外荧光。经PBS洗3次后重悬的细胞用流式细胞仪(Partec GmbH, Munster, 德国)进行分析, 以皂角苷浓度0 mg/L浸泡组大菱鲆白细胞为对照。首先在FSC和SSC二维点阵图选取白细胞区域, 然后再以FL1(FITC)直观柱状图统计该区域FITC阳性(吞噬标记鳃弧)的白细胞, 每份样品检测10 000个白细胞, 比较浸泡皂角苷后不同时刻、不同皂角苷浓度浸泡组的FITC阳性白细胞数, 以每10 000个白细胞吞噬鳃弧菌的个数代表白细胞吞噬活力, 每组测3个平行求平均值。

### 1.5 补体旁途径溶血活性(ACH50)

补体旁途径溶血活性的测定方法参照Yano<sup>[18]</sup>。以兔红血细胞作为溶血细胞, 以含 $\text{Mg}^{2+}$ 及明胶的EGTA( $\text{EGTA-Mg}^{2+}$ -GVB)作为 $\text{Ca}^{2+}$ 的螯合剂, 封闭经典补体途径。将保存在阿氏液中的兔红血细胞用EGTA- $\text{Mg}^{2+}$ -GVB缓冲液洗涤3遍, 用同样的缓冲液将其浓度调至 $3 \times 10^8$ 个/mL。取7支试管, 前6支试管中分别加入0、50、90、125、150和250 μL的EGTA- $\text{Mg}^{2+}$ -GVB, 然后每管加入用EGTA- $\text{Mg}^{2+}$ -GVB稀释20倍的鱼血清至250 μL; 第7支试管(100%溶血对照管)中加入3 400 μL蒸馏水。于每一试管中加入100 μL浓度为 $3 \times 10^8$ 个/mL的兔红血细胞。20 °C温育90 min后, 用3 150 μL的生理盐水稀释(第7支试管除外), 1 600 × g离心5 min取上清液, 于414 nm处测其OD值(以未加血清的6

号试管作为空白对照管)。样品的溶血活性由相应的吸光值除以 100% 溶血对照管的吸光值求出 ( $Y$ )。以  $Y/(1-Y)$  的对数为横坐标,以对应的血清体积  $x$  (mL) 对数为纵坐标作图,将产生 50% 溶血时的血清体积记为  $K$ 。ACH50 =  $1/K$  血清稀释倍数 (units/mL)。每组测 3 个平行求平均值。

### 1.6 溶菌酶活力

血清及黏液中溶菌酶活力测定方法参照 Hutchinson 等<sup>[19]</sup>。用磷酸钾盐缓冲液 (0.1 mol/L、pH = 6.4) 将溶壁微球菌 (*Micrococcus lysolei*) 配制成底物悬液 ( $OD_{570nm} = 0.3 \sim 0.5$ )。在酶标板中加入 190  $\mu$ L 预冷的该悬液与 10  $\mu$ L 待测样品,混匀,测其 570 nm 处的吸光值  $A_0$ ,移入 37  $^{\circ}$ C 水浴中作用 30 min 后,立即置于冰水浴中 10 min,以终止反应,测其吸光度值  $A_L$ 。 $U_L = (A_0 - A_L)/A_0$ 。每组测 3 个平行求平均值。

### 1.7 抑菌活力测定

血清和黏液抑菌活力的测定采用凝胶平板拮抗法,具体操作参照 Dalmo 等<sup>[20]</sup>方法,选用鱼类病原菌鳃弧菌作为实验用菌,在 2216E 海水培养基平板上涂板,用直径为 0.6 cm 的滤纸片在血清和黏液中浸泡 1 h,然后黏贴在平板上,在 28  $^{\circ}$ C 培养箱中培养 16 ~ 20 h,测量抑菌圈直径代表抑菌活力大小,每组测 3 个平行求平均值。

### 1.8 AKP 活力

实验中各组织碱性磷酸酶 (AKP) 活力采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒进行测定,每组测 3 个平行求平均值。

### 1.9 血清总蛋白浓度的测定

血清蛋白含量的测定采用 Bradford<sup>[21]</sup>的方法,用考马斯亮蓝做指示剂,用牛血清白蛋白溶液作标准,595 nm 处测 OD 值,绘制标准曲线。样品蛋白浓度由标准曲线求得样品,结果以 mg/mL 计,每组测 3 个平行求平均值。

### 1.10 数据分析

本实验采用 SPSS 16.0 软件对实验数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。如果有显著性差异,再做 Duncan 多重比较。显著水平采用 0.05,若  $P < 0.05$ ,则表示有显著性差异,应用 Excel 2007 软件作图。

## 2 结果

### 2.1 白细胞吞噬活力

大菱鲆白细胞吞噬活力检测二维图及直观柱状图分别见图 1-a 与图 1-b。各组 FITC 阳性白细胞统计分析结果见图 2。可知在浸泡皂角苷后 6 h 时,实验组与对照组 (皂角苷浓度 0 mg/L) 间白细胞吞噬活力显著无差异 ( $P > 0.05$ )。12 h 时低浓度组 (15 mg/L) 显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),两实验组间差异不明显 ( $P > 0.05$ )。24 h 时高浓度组 (35 mg/L) 显著高于低浓度组与对照组 ( $P < 0.05$ ),低浓度组与对照组无差异。在 36、48 及 72 h 时,各组间均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。表明两个浓度的皂角苷对大菱鲆白细胞的吞噬活力均具有促进作用,提高吞噬活力的最佳时间出现在浸泡后 12 ~ 24 h 内,且高浓度组较低浓度组效果更明显。

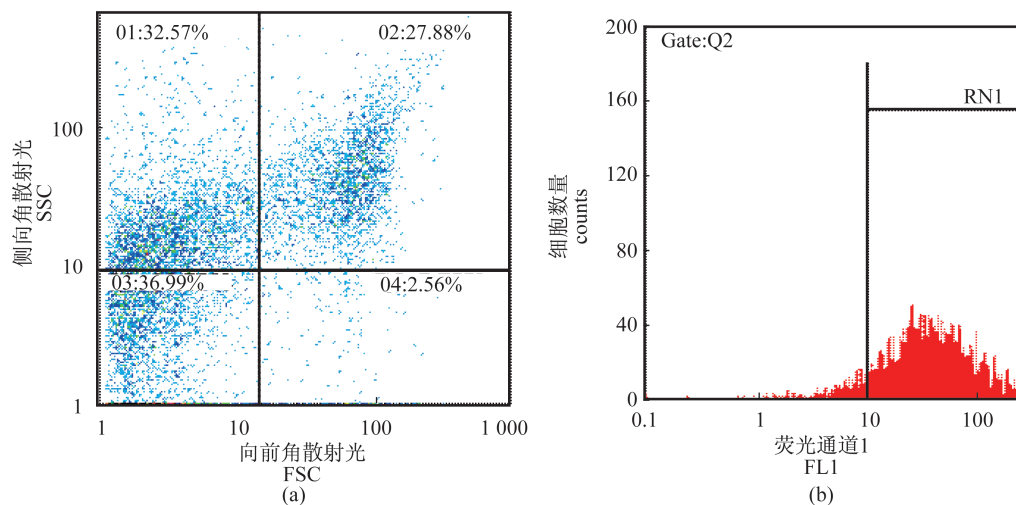


图 1 大菱鲆白细胞吞噬 FITC 标记鳃弧菌流式细胞仪检测图

(a) FSC 和 SSC 二维点阵图; (b) 白细胞区域 Q2 对应的 FL1 (FITC) 直观柱状图

Fig. 1 Detection figure of FITC-labeled *V. anguillarum* phagocytized by turbot leukocyte

(a) two-dimensional lattice figure of FSC and SSC; (b) histogram correspond to leukocyte zone Q2 in (a)

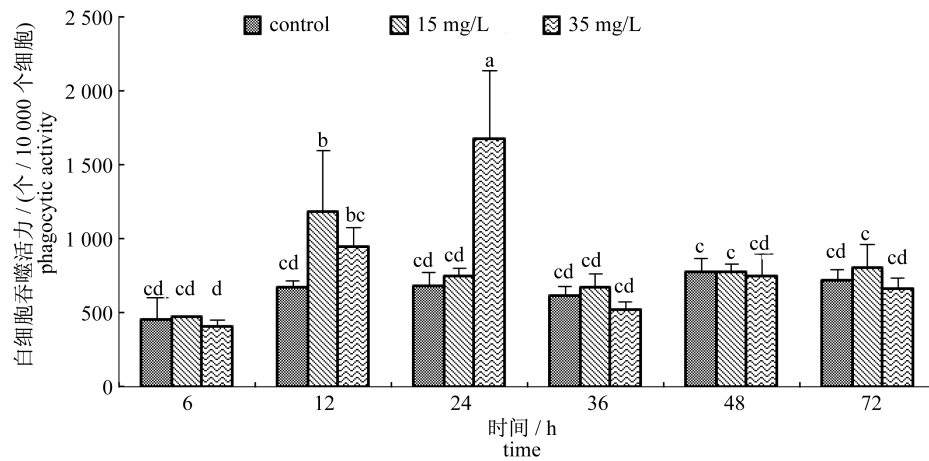


图2 不同浓度皂角苷浸泡大菱鲂后白细胞吞噬活性

图中不同字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 以下图中注释同此

Fig. 2 Phagocytic activity of leucocytes of turbot after immersion in different concentration of saponin

Bars with different letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ). The same as the following

### 2.2 血清补体旁路途径溶血活性

在浸泡后 6、36、48 和 72 h 4 个时间点, 两个皂角苷浓度组的补体活力均高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而在浸泡后的 12 及 24 h 时, 高溶血活性组均出现在高皂角苷浓度组 (35 mg/L), 而低浓

度组 (15 mg/L) 的血清旁路途径溶血活性低于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。综合分析显示, 大菱鲂血清补体旁路途径溶血活性处于变动状态, 高浓度组在各检测点均高于对照组, 而低浓度组有波动, 空白组中不同时间点也有较大波动。

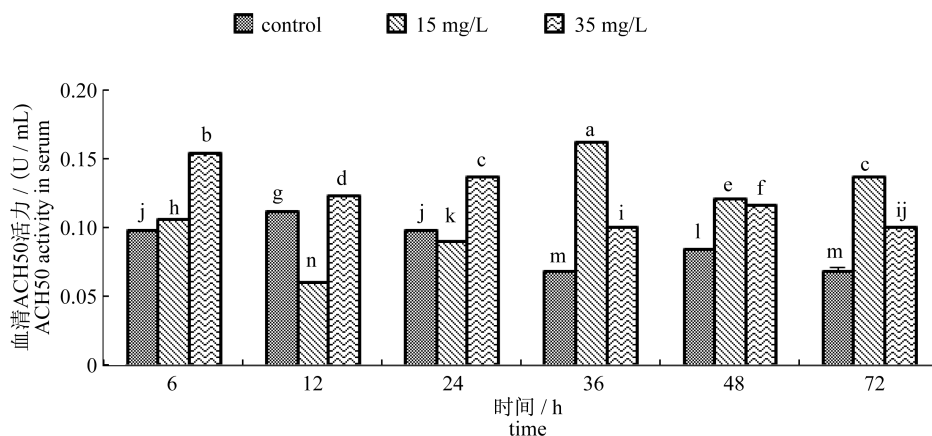


图3 不同浓度皂角苷浸泡大菱鲂后血清补体旁路途径溶血活性

Fig. 3 ACH50 activity of serum of turbot after immersion in different concentration of saponin

### 2.3 血清及黏液中溶菌酶活力

在浸泡 6 h 后, 浸泡皂角苷的 2 个实验组中的溶菌活力均显著高于对照组, 且低浓度组 (15 mg/L) 高于高浓度组 (35 mg/L 组) ( $P < 0.05$ ) (图 4)。12 h 后低浓度组显著高于高浓度组与对照组 ( $P < 0.05$ ), 高浓度组 (35 mg/L) 与对照差异不显著 ( $P > 0.05$ )。到 24 h 时两个实验组间无差别, 但均高于对照组 ( $P < 0.05$ )。到 36 h 时实

验组与对照组各组间无差异 ( $P > 0.05$ )。48 h 时高浓度组高于其他两组 ( $P < 0.05$ ), 但低浓度组与对照组无差异 ( $P > 0.05$ )。到 72 h 时两实验组间未表现出差异, 但均高于对照组 ( $P < 0.05$ )。整体结果显示, 采用皂角苷浸泡大菱鲂后, 对大菱鲂血清溶菌酶具有提高的趋势, 最高值出现在低浓度组浸泡后 6 h 时。分析各组大菱鲂黏液溶菌酶活力, 结果未能测出其活力存在。

## 2.4 抑菌活力测定

浸泡后 6 h,两实验组中黏液抑菌活力较对照开始上升,且高浓度组(35 mg/L)显著高于对照组( $P < 0.05$ )(图 5)。12 h 时两实验组均显著高于对照组,实验组间差异不显著( $P > 0.05$ )。24 h 时对照组与低浓度组(15 mg/L)两组差异不明显( $P > 0.05$ ),但均显著高于高浓度组( $P < 0.05$ )。36 h 时实验与对照各组间差异不显著

( $P > 0.05$ )。到 48 h 时 15 组和 35 mg/L 组显著高于对照组( $P < 0.05$ )。72 h 时各组间差异不显著( $P > 0.05$ )。采用相应的方法分析血清抑菌活力,结果未能检测出血清的抑菌活力。实验结果表明大菱鲆体表黏液中存在较强的抑制鳃弧菌的活性物质,在浸泡皂角苷后 12 h 内,黏液中抑菌活力呈现显著提高,大菱鲆黏液中的抑菌活性处于变动状态。

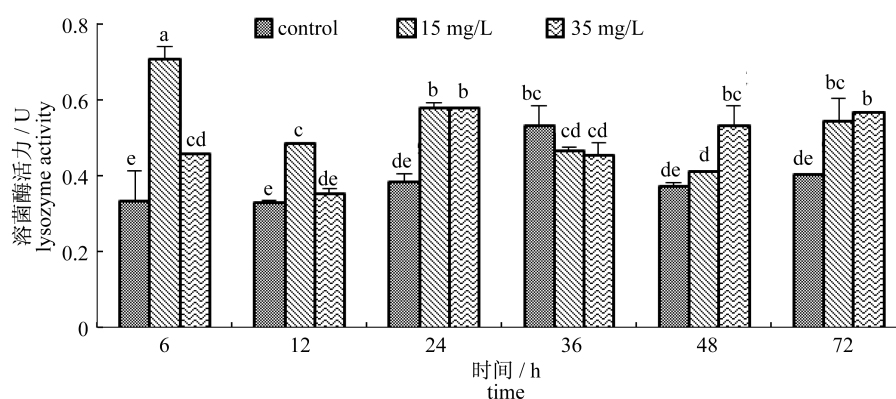


图 4 不同浓度皂角苷浸泡大菱鲆后血清溶菌酶活力

Fig. 4 Lysozyme activity of serum in turbot after immersion in different concentration of saponin

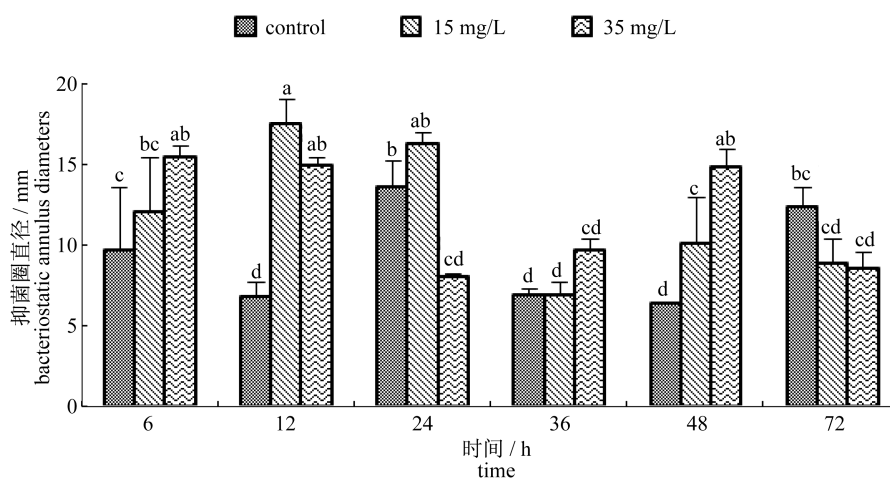


图 5 不同浓度皂角苷浸泡大菱鲆后体表黏液抑菌活力

Fig. 5 Antibacterial activity of skin mucus of turbot after immersion in different concentration of saponin

## 2.5 AKP 活力

在浸泡后的 6、12 及 72 h 时,两实验组中 AKP 活力均显著高于对照组( $P < 0.05$ ),最高值出现在 6 及 72 h 的高浓度组(图 6)。在 24、36 和 48 h 时,实验及对照组间差异不明显( $P > 0.05$ )。在检测的时间内,对照组一直处于平稳状态。两个实验组中高浓度组在 6~48 h 内 AKP 活力呈现逐渐下降的趋势,低浓度组在呈现先升高后下降趋势。两实验组在 72 h 时,出现了突然的

升高。

大菱鲆黏液中 AKP 活力的变化如图 7 所示。仅在浸泡皂角苷后 12 h 时,两实验组中 AKP 活力显著高于对照组( $P < 0.05$ ),其余各时间点,实验与对照各组间均没有明显差异( $P > 0.05$ )。

## 2.6 血清总蛋白含量

在浸泡后 6 h,高浓度组(35 mg/L)和低浓度组(15 mg/L)均高于对照组,且高浓度组高于低浓度组( $P < 0.05$ )(图 8)。之后在 72 h 范围内,

各组大菱鲂血清中的总蛋白总体保持相对稳定, 除了在 12 h 时, 各组间差别不明显外, 其他时段但高浓度组高于低浓度组与对照组 ( $P < 0.05$ )。 低浓度组与对照组差别不大 ( $P > 0.05$ )。

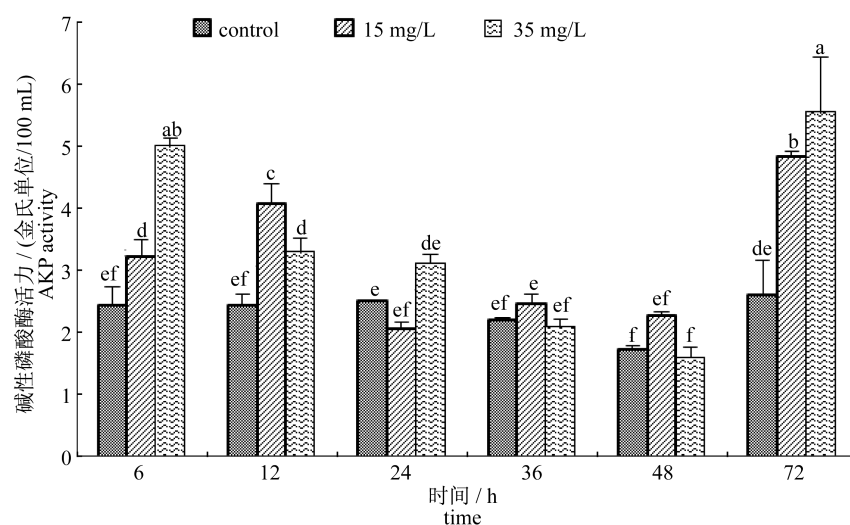


图 6 不同浓度皂角苷浸泡大菱鲂后血清中 AKP 活力

Fig. 6 AKP activity in serum of turbot after immersion in different concentration of saponin

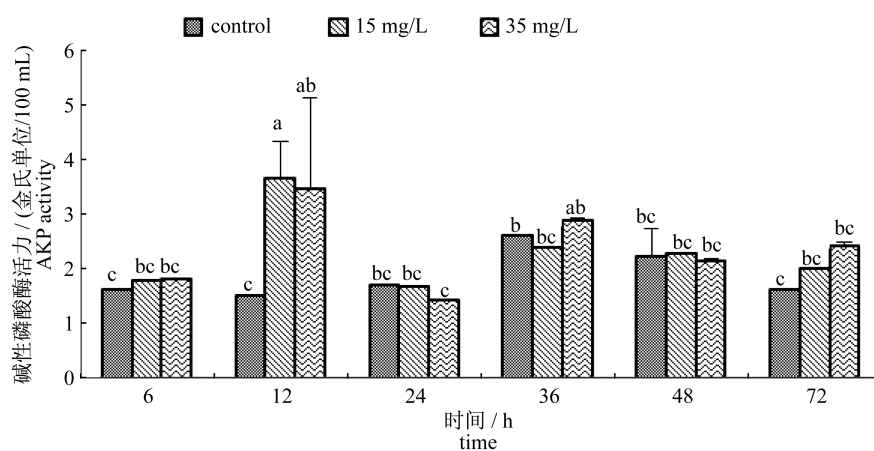


图 7 不同浓度皂角苷浸泡大菱鲂后体表黏液中 AKP 活力

Fig. 7 AKP activity in skin mucus of turbot after immersion in different concentration of saponin

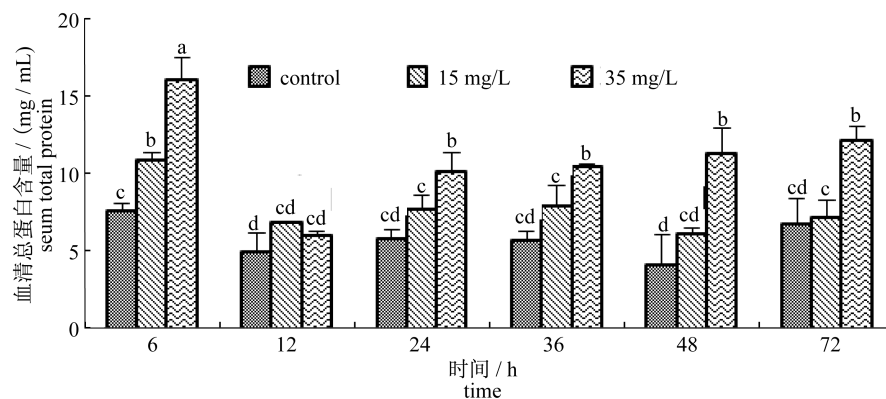


图 8 不同浓度皂角苷浸泡大菱鲂后血清中总蛋白含量

Fig. 8 Total protein in the serum of turbot after immersion in different concentration of saponin

### 3 讨论

鱼类的非特异免疫系统是由体表黏液、黏膜细胞、血细胞及网状内皮组织组成的一道复杂防线<sup>[20]</sup>,在防御各种病原入侵及清除体内病原过程中发挥关键作用,是鱼类免疫系统中的重要组成部分<sup>[22]</sup>。已有研究发现通过口服营养因子 Vc、细胞壁提取物如肽聚糖、药用植物如黄芪 (*Astragalus membranaceus*)、姜 (*Zingiber officinale*)、白槲寄生 (*Viscum album*) 等均可提高鱼类的非特异免疫力<sup>[23-26]</sup>。本研究应用分离自皂树皮的皂角苷浸泡大菱鲆,同样表现出了促进大菱鲆非特异免疫力效果,显示一定浓度皂角苷可以显著提高大菱鲆白细胞吞噬活力、血清补体旁路途径溶血活性、黏液抑菌活力、血清溶菌活力等,且浓度不同,效果存在差别。尽管皂角苷对鱼类具有溶血毒性<sup>[27]</sup>,但本研究所选用的浸泡浓度及时间选择基于前期疫苗佐剂的研究基础,在本实验条件下大菱鲆未表现出明显的不适。

白细胞吞噬活力是衡量鱼类非特异免疫力高低的一个重要指标,吞噬作用是清除入侵鱼体病原的主要途径。鱼类的白细胞中中性粒细胞、巨噬细胞及 B 细胞等均具有吞噬活性,鱼类白细胞吞噬活力可以通过投喂免疫刺激物如酵母葡聚糖、壳聚糖等得到提高<sup>[28]</sup>。皂角苷由于来源不同,生物活性存在差异。用一定浓度的薯蓣皂苷作用小鼠巨噬细胞,可以增强其吞噬活性<sup>[8]</sup>,而用甘草皂苷投喂鳊 (*Seriola quinqueradiata*),可增强抗肠球菌感染能力,但不能提高巨噬细胞吞噬活性<sup>[28]</sup>。结果表明,用低浓度的皂树皂角苷 (15 mg/L) 浸泡大菱鲆,在浸泡后 12 h 可以检测到外周血中白细胞的吞噬活力增强,而用高浓度 (35 mg/L) 浸泡,在浸泡后 24 h 检测到高的白细胞吞噬活力。类似的研究也表明,用低浓度的同种皂角苷 (1 和 2 mg/L) 浸泡凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*),发现在浸泡 24 h 时即可增强透明细胞对溶藻弧菌的吞噬活力<sup>[13]</sup>。表明采用皂角苷提高鱼类白细胞吞噬活力,受皂角苷结构、浸泡浓度及时间等多重因素影响。

鱼类的体表黏液中含有溶菌酶、碱性磷酸酶、组织蛋白酶等多种酶类,不同鱼类由于生活环境不同,各种酶的活性存在差异<sup>[29]</sup>。溶菌酶在鱼类天然免疫系统中承担重要的免疫防御功能,已经

在很多鱼类的脾脏、肝、肌肉、皮肤、黏液、卵中被发现,且在有些野生鱼类中有较高表达水平<sup>[17,30]</sup>。鱼类黏液的溶菌酶活力在 -20 °C 下具有良好的稳定性,可以保存一年以上,而来自血清的溶菌酶活力稳定性差<sup>[17]</sup>。本研究中分析了浸泡皂角苷后大菱鲆血清及黏液中溶菌酶活性,发现皂角苷对大菱鲆血清中的溶菌酶具有增强效果,但未能从大菱鲆黏液中检测到该酶的活力存在,推测该原因,认为可能与实验条件的改变及皂角苷的体外刺激有关,有研究表明温度、应激等均可导致溶菌酶活力改变<sup>[31]</sup>。

鱼类血液中含有多种酶类、免疫球蛋白等蛋白成分,血液中总蛋白浓度的高低是衡量鱼体的生理状态的指标之一,相对稳定的蛋白浓度表明鱼体生理状态平稳<sup>[32-33]</sup>,本实验分析了皂角苷浸泡大菱鲆后血清蛋白水平,结果显示在浸泡后 6 h 时,两个浓度的实验组中,血清总蛋白浓度高于对照组,表明鱼体的生理状态发生改变,而在 12 h 之后,低浓度组与对照组保持在同一水平,反映出低浓度组大菱鲆恢复到正常水平,说明低浓度的皂角苷没有对鱼类生理机能带来较大的伤害,从血液指标上反映出该浓度水平对大菱鲆具有较好的生物安全性。而高浓度组在浸泡后 12 h 时,血清总蛋白的升高,推测该浓度下可能导致部分血细胞溶血,血细胞中的蛋白释放入血液中,增加了血清蛋白的浓度,相关现象有待后续研究。

本研究分析了大菱鲆浸泡不同浓度皂角苷后血液与体表黏液中主要非特异免疫因子活力变化,综合各因子活力变化趋势发现,大菱鲆白细胞吞噬活力、血清溶菌活力、黏液抑菌活力、血清与黏液中碱性磷酸酶等主要非特异免疫因子增强的时段多集中在浸泡后 24 h 内,与大菱鲆浸泡皂角苷的时间较短有关。大菱鲆短时间浸泡皂角苷后尽管提高非特异免疫作用的时间较短,但作为佐剂使用时,可以有效促进疫苗抗原呈递,发挥佐剂效果<sup>[34]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] The Ministry of Agriculture Fisheries Bureau. Chinese yearbook of fishery statistics [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2012: 28. [农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2012: 28.]
- [2] Lei J L, Liu X F, Guan C T. Turbot culture in China

- for two decades: Achievements and prospect [ J ]. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33 ( 4 ): 123 - 130. [ 雷霖霖, 刘新富, 关长涛. 中国大菱鲆养殖 20 年成就和展望—庆祝大菱鲆引进中国 20 周年 [ J ]. 渔业科学进展, 2012, 33 ( 4 ): 123 - 130. ]
- [ 3 ] Langevin C, Aleksejeva E, Passoni G, *et al.* The Antiviral Innate Immune Response in Fish: Evolution and Conservation of the IFN System [ J ]. Journal of Molecular Biology, 2013, 425 ( 24 ): 4904 - 4920.
- [ 4 ] Chang J H, Block T M, Guo J T. The innate immune response to hepatitis B virus infection: Implications for pathogenesis and therapy [ J ]. Antiviral Research, 2012, 96: 405 - 413.
- [ 5 ] Jones S R M. The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish [ J ]. Development and Comparative Immunology, 2001, 25: 841 - 852.
- [ 6 ] Wang Z Q. Research progress on extraction technology of Panaxnotoginseng [ J ]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2009, 15 ( 9 ): 69 - 71. [ 王忠全. 三七总皂甙提取工艺研究进展 [ J ]. 中医药导报, 2009, 15 ( 9 ): 69 - 71. ]
- [ 7 ] Shang Y, Zhang C Q. Inhibiting effects and its mechanisms of ginsenoside Rg1 on human gastric cancer cell line *in vitro* [ J ]. Chinese Journal of Cell Biology, 2011, 33 ( 3 ): 269 - 274. [ 商义, 张才全. 人参皂甙 Rg1 对体外人胃癌细胞增殖的抑制作用及机制 [ J ]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33 ( 3 ): 269 - 274. ]
- [ 8 ] Zhang X F, Cui Y, Huang J J. Immuno-stimulating properties of diosgenylsaponins isolated from *Paris polyphylla* [ J ]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007, 17: 2408 - 2413.
- [ 9 ] Wang B. ISCOMATRIX™ adjuvant: a potent inducer of humoral and cellular immune responses [ J ]. International Journal of Biologicals, 2005, 28 ( 5 ): 204 - 207. [ 王斌. ISCOMATRIX™ 佐剂: 细胞和体液免疫应答的有效诱导剂 [ J ]. 国外医学预防诊断治疗用生物制品分册, 2005, 28 ( 5 ): 204 - 207. ]
- [ 10 ] Wang X H, Huang J, Zhao W W, *et al.* The application and using method of specific immunopotentiator for fish soak vaccine [ P ]. [ 王秀华, 黄健, 赵伟伟, 等. 鱼类浸泡疫苗特异免疫增强剂及其应用和使用方法, 中国, ZL 200910255825.7 [ P ]. 2012 - 12 - 12. ]
- [ 11 ] Wang Y J. Immune effect of two adjuvants on turbot (*Scophthalmus maximus*) vaccine against *Vibrio anguillarum* delivered by immersion. [ D ]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012: 43 - 59. [ 王玉娟. 两种佐剂对大菱鲆鳃弧菌浸泡疫苗免疫效果的影响 [ D ]. 上海: 上海海洋大学, 2012: 43 - 59. ]
- [ 12 ] Francis G, Makkar H P S, Becker K. Quillaja saponins—a natural growth promoter for fish [ J ]. Animal Feed Science and Technology, 2005, 121: 147 - 157.
- [ 13 ] Su B K, Chen J C. Effect of saponin immersion on enhancement of the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus* [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24: 74 - 81.
- [ 14 ] Chen C F, Luo Y L, Cai B. Effects of water temperature on lysozyme activity of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* C. et V. ) [ J ]. Journal of Fishery Sciences of China, 1996, 3 ( 3 ): 24 - 30. [ 陈昌福, 罗宇良, 蔡冰. 实验水温对草鱼溶菌酶活性的影响 [ J ]. 中国水产科学, 1996, 3 ( 3 ): 24 - 30. ]
- [ 15 ] Irie T, Watarai S, Kodama H. Humoral immune response of carp (*Cyprinus carpio*) induced by oral immunization with liposome-entrapped antigen [ J ]. Developmental & Comparative Immunology, 2003, 27: 413 - 421.
- [ 16 ] Palaksha K J, Shin G W, Kim Y R, *et al.* Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24: 479 - 488.
- [ 17 ] Zhang J, Chen L, Sun L. SmLMWPTP, a teleost low molecular weight protein tyrosine phosphatase, inhibits the immune response of peripheral blood leukocytes in a manner that depends on the conserved P-loop [ J ]. Developmental and Comparative Immunology, 2013, 40: 103 - 111.
- [ 18 ] Yano T. Assays of hemolytic complement activity [ J ]. Techniques in Fish Immunology, 1992, 43: 131 - 141.
- [ 19 ] Hutchinson T H, Manning J M. Seasonal trends in serum lysozyme activity and total protein concentration in dab (*Limanda limanda* L. ) sampled from Lyme Bay. UK [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 1996, 6: 473 - 482.
- [ 20 ] Dalmo R A, Ingebrigtsen K, Bøggwald J. Non-specific defense mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES) [ J ]. Journal of Fish Diseases, 1997, 20: 241 - 273.
- [ 21 ] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the



- quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [ J ]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248 - 254.
- [ 22 ] Magnadóttir B. Innate immunity of fish ( overview ) [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20: 137 - 151.
- [ 23 ] Liao C Y, Shao L, Wang X X. Influence of dietary vitamin C on non-specific immunity of larval and juvenile *Symphysodon aequifasciatus* [ J ]. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(3): 54 - 59. [ 廖畅宇, 邵力, 王旭霞. 饲料中维生素 C 对七彩神仙鱼仔幼鱼非特异性免疫的影响 [ J ]. 渔业科学进展, 2012, 33(3): 54 - 59. ]
- [ 24 ] Zhou J, Song X L, Huang J, et al. Effects of dietary supplementation of A3 $\alpha$ -peptidoglycan on innate immune responses and defense activity of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [ J ]. Aquaculture, 2006, 251: 172 - 181.
- [ 25 ] Liu J H, Wang H Z, Wang W Y. Astragalus on *Cynoglossus semilaevis* study on the impact of immune activity [ J ]. Feed Industry, 2011, 32(2): 19 - 23. [ 刘金海, 王宏志, 王文阳. 黄芪对半滑舌鲷非特异免疫活性的影响 [ J ]. 饲料工业, 2011, 32(2): 19 - 23. ]
- [ 26 ] Dügenci S K, Arda N, Candan A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish [ J ]. Journal of Ethnopharmacology, 2003, 88: 99 - 106.
- [ 27 ] Wang Y J, Wang X H, Han W, et al. Hemolysis of turbot (*Scophthalmus maximus*) blood cell with *Quillaja saponaria* saponin [ J ]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(7): 1073 - 1080. [ 王玉娟, 王秀华, 韩雯, 等. 皂角苷对大菱鲆血细胞的溶血作用 [ J ]. 水产学报, 2013, 37(7): 1073 - 1080. ]
- [ 28 ] Masahiro Sakai. Current research status of fish immunostimulants [ J ]. Aquaculture, 1999, 172: 63 - 92.
- [ 29 ] Su B K, Chen J C. Effect of saponin immersion on enhancement of the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus* [ J ]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24: 74 - 81.
- [ 30 ] Subramanian S, MacKinnon S L, Ross N W. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology (Part B), 2007, 148: 256 - 263.
- [ 31 ] Lange S, Gudmundsdottir B K, Magnadóttir B. Humoral immuneparameters of cultured Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) [ J ]. Fish Shellfish Immunology, 2001, 11: 523 - 535.
- [ 32 ] Shailesh Saurabh, P K Sahoo. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system [ J ]. Aquaculture Research, 2008, 39: 223 - 239.
- [ 33 ] Schreck C B, Moyle P B. Methods for fish biology [ M ]. Maryland: American Fisheries Society, 1990: 451 - 490.
- [ 34 ] Fast M D, Sims D E, Burka J F, et al. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology (Part A), 2002, 132: 645 - 657.
- [ 35 ] Wang R. Effect of saponins on the presentation of antigens in the mucosal tissue of turbot [ D ]. Qingdao: Ocean University of China, 2014: 25 - 44. [ 王锐. 皂角苷佐剂对大菱鲆黏膜组织抗原呈递的影响 [ D ]. 青岛: 中国海洋大学, 2014: 25 - 44. ]

## Effect of saponin on non-specific immunity of turbot (*Scophthalmus maximus*)

HAN Wen<sup>1,2</sup>, WANG Xiuhua<sup>2\*</sup>, WANG Yujuan<sup>2</sup>, WANG Rui<sup>2</sup>, LI Chen<sup>2</sup>, HUANG Jie<sup>2</sup>

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** In order to evaluate the effect of saponin, extracted from *Quillaja saponaria*, on non-specific immunity of turbot *Scophthalmus maximus*, fish was immersed in seawater containing saponin at concentration of 0, 15 and 35 mg/L respectively for 1 h. No-specific immune parameters including leukocytes phagocytic activity, ACH50 and total protein of serum, activities of lysozyme, antibacterial and AKP in serum and skin mucus were analyzed 6, 12, 24, 48 and 72 h after the treatment. The results show that the leukocyte phagocytic activity in the lower concentration group (15 mg/L) at 12 h and in the higher concentration group (35 mg/L) at 24 h was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). ACH50 in two treatment groups at each testing time were significantly higher than that in control group except the ACH50 in the lower concentration group at 12 h and 24 h ( $P < 0.05$ ). The highest lysozyme activities in serum appeared in the lower concentration group at 6 h, but no ACH50 could be detected in skin mucus. Antibacterial activity in each group changed with time, but it was improved obviously in the two treatment groups at 6 h and 12 h after the immersion, also no difference between the higher and lower saponin groups ( $P > 0.05$ ). Antibacterial activity in serum was too low to be detected. AKP activity of serum in two treatment groups was significantly higher than that in the control at 6 and 12 h respectively ( $P < 0.05$ ), furthermore, obvious differences were found between the two treatment groups. AKP activity of skin mucus in two treatment groups was significantly higher than that in the control at 12 h ( $P < 0.05$ ), but no differences were found between the two treatment groups ( $P > 0.05$ ). Serum total protein in higher concentration group reached the highest value at 6 h, then came to the same level with low concentration group and control group at 12 h. From 24 to 72 h, serum total protein in higher concentration group was remarkably higher than that in the lower concentration and control group. The results indicate that saponin could enhance the non-specific immunity of turbot.

**Key words:** *Scophthalmus maximus*; saponin; phagocytic activity; antibacterial activity; lysozyme activity; AKP; total protein

**Corresponding author:** WANG Xiuhua. E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn