

四种不同添加物对仿刺参非特异性免疫力和肠道免疫基因 *Aj-p105*、*Aj-p50*、*Aj-rel* 和 *Aj-lys* mRNA 表达的影响

阳 钢¹, 田相利^{1*}, 董双林¹, 彭 墨², 王栋栋¹, 张 凯¹

(1. 中国海洋大学水产学院,海水养殖教育部重点实验室,山东 青岛 266003;

2. 江西农业大学动物科学技术学院,江西 南昌 330045)

摘要: 本实验研究了饲料中添加酵母多糖(6.3 g/kg)、马氏副球菌(10^9 cfu/kg)、大黄(25.0 g/kg)和氟苯尼考(15.0 mg/kg)4种添加物对仿刺参[初始体质量(4.68 ± 0.36)g]非特异性免疫力以及肠道组织免疫相关基因 *Aj-p105*、*Aj-p50*、*Aj-rel* 和 *Aj-lys* mRNA 表达的影响。每个处理分别设置 5 个重复,以投喂未添加上述任何成份的基础饲料组作为空白对照,养殖实验周期为 60 d。结果发现,饲料中添加马氏副球菌能显著提高仿刺参体腔细胞的吞噬活性和呼吸爆发活力,而添加酵母多糖可以显著提高仿刺参体腔细胞的吞噬能力,但是添加氟苯尼考显著降低了仿刺参体腔细胞的呼吸爆发活力;而在仿刺参中肠肠道组织中,酵母多糖和马氏副球菌处理组免疫基因 *Aj-p105* 和 *Aj-p50* mRNA 的表达均大幅上调,显著高于对照组。其中,酵母多糖添加组增幅分别为 43.2% 和 63.1%,马氏副球菌添加组的增幅分别为 49.8% 和 48.0%。马氏副球菌添加组中免疫基因 *Aj-lys* 的表达显著高于对照组,增幅为 46.4%;大黄添加组中 *Aj-p105* mRNA 的表达量显著高于对照组,而氟苯尼考添加组中 *Aj-p50*、*Aj-rel* 和 *Aj-lys* 的 mRNA 表达量相对于对照组均显著下降。研究表明,饲料中适当添加酵母多糖和马氏副球菌可有效提高仿刺参非特异性免疫力,而饲料中抗生素氟苯尼考的添加会降低仿刺参非特异性免疫力。

关键词: 仿刺参; 酵母多糖; 马氏副球菌; 大黄; 氟苯尼考; 非特异性免疫

中图分类号: Q 785; S 968.9

文献标志码: A

仿刺参 (*Apostichopus japonicus*), 也称为刺参, 是我国北方经济效益很高的增养殖种类之一。2013 年, 我国刺参养殖面积为 18.2 万 hm^2 , 产量达到 17.1 万 $\text{t}^{[1]}$ 。然而, 随着刺参养殖业的发展, 高密度工厂化养殖以及饵料过度投喂所引发的水质环境恶化, 导致刺参病害大面积暴发, 在一定程度上严重制约了该产业的可持续发展。为预防和治疗刺参出现的病害, 抗生素类是被频繁使用的药物之一, 但也容易引发刺参体内细菌耐药性、免疫力下降以及食品安全等诸多问题^[2-4]。目前, 如何通过提高刺参(水产养殖动物)自身的免疫能力来应对疾病发生的研究成为热点。

近年来, 大量研究通过传统的方法在免疫水平上证实了免疫增强剂^[5-6]、益生菌^[7-9]和中草药^[10-11]能有效提高水产动物的非特异性免疫力, 但这些物质激发机体免疫系统的机制还不清楚, 而通过分子学技术如实时定量 PCR 技术探究免疫增强剂影响养殖动物的免疫机理是一种途径。NF- κ B 信号通路是非特异性免疫中最为重要的途径, 其控制着包括抗菌肽、细胞因子、活性氧生成酶(ROS)、活性氮生成酶(RNS)等在内的许多免疫基因的表达^[12-13]。核转录因子 NF- κ B 作为一类重要的信号传导与调控因子, 是 NF- κ B 信号通路中的核心, 在介导动物非特异性免疫反应过

收稿日期:2014-10-26 修回日期:2014-12-05

资助项目:“十二五”国家科技支撑计划(2011BAD13B03);山东省杰出青年基金(JQ201009);青岛市关键攻关计划(12-6-1-6-hy)

通信作者:田相利, E-mail: xianglitian@ouc.edu.cn

程中起着重要作用^[14]。目前在哺乳动物中发现5种NF- κ B转录因子:RelA(p65),RelB,c-Rel,NF- κ B1(p105/p50)和NF- κ B2(p100/p52),在果蝇中存在3种NF- κ B同源体:Dorsal,Dif和Relish。Wang等^[15]首次克隆出刺参NF- κ B信号通路的3个基因:p105、p50、rel。另外,溶菌酶(lysozyme)作为一种高效的天然抗菌活性物质,是水产动物最重要的体液免疫因子之一,可以有效清除进入体内的病原菌,在天然免疫防御中发挥着重要的作用。

仿刺参属于无脊椎动物,不像脊椎动物那样具有比较完善的免疫机制,其体内主要以非特异性免疫为主,尤其是体腔细胞的吞噬功能和呼吸爆发等组成了抵御细菌、病毒侵入的坚固防线^[16]。同时,仿刺参的身体结构组成非常简单,肠道是其体腔内最主要的器官,几乎占据了体腔内绝大部分空间。尽管肠道的基本功能是消化食物和吸收营养,但同时还具有免疫功能,以保护养殖动物免受致病原的入侵^[17]。Dalmo等^[18]认为,饲料添加免疫增强剂后可以提高肠道免疫反应从而提高养殖动物的抗病力,以保护养殖动物免受致病原的入侵,但其免疫调节机制非常复杂,有关其免疫系统的调控规律及其原理仍还未知。

本实验研究了饲料中添加酵母多糖、马氏副球菌(*Paracoccus marcusii*)、大黄(*Rhei Radix et Rhizoma*)和氟苯尼考等添加物对仿刺参相关免疫能力的影响,包括体腔细胞的吞噬活性和呼吸爆发活力,以及肠道组织的细胞免疫基因 *Aj-p105*、*Aj-p50*、*Aj-rel* 和体液免疫基因 *Aj-lys* mRNA 表达的影响,旨在探索酵母多糖、马氏副球菌、大黄和氟苯尼考对仿刺参非特异性免疫能力的影响,从而为水产养殖业的可持续发展提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 实验动物和实验地点

仿刺参幼参购于青岛市鳌山卫镇诚信育苗场。幼参运回后,暂养于1000 L玻璃钢水槽中。在实验开始之前,仿刺参在盐度28.0~31.0;水温17.5~18.5℃条件下驯化15 d。驯化期间每天于18:00足量投喂人工配合粉末饲料。本实验以海泥(20%)、红鱼粉(10%)和马尾藻粉(70%)为基础原料制成含16.1%饲料干重的粗蛋白和0.87%饲料干重的粗脂肪的基础饲料。驯化结束

后,挑选规格均匀、大小相似的健康仿刺参250头用于实验,仿刺参的初始体质量为(4.68±0.36)g。

仿刺参养殖实验在中国海洋大学鳌山卫实验基地室内水族箱中进行,水族箱的体积为50 L左右(53 cm×28 cm×34 cm)。

1.2 实验设计和饲料配方

本研究设计了4个不同的添加物处理,分别是酵母多糖(PO)、马氏副球菌(PM)、大黄(RH)和氟苯尼考添加组(FL),以不添加任何上述成分的基础饲料作为对照组(CT)。每个处理设置5个重复,每个重复随机投放10头仿刺参。在基础饲料的基础之上,酵母多糖的添加浓度为6.3 g/kg^[19],马氏副球菌(DB11)添加浓度为10⁹ cfu/kg(现配现用)^[20],大黄的添加浓度为25.0 g/kg^[21-22];氟苯尼考添加浓度为15.0 mg/kg,氟苯尼考的添加量则是依据产品使用说明书中建议剂量和使用方式所设计的。

实验用马氏副球菌(DB11)由本实验室从刺参养殖池塘和刺参肠道筛选而来^[23],经2116E液体培养基24 h后使用用于本研究;酵母多糖由山东宏河圣齐生物工程有限公司提供,该产品中 β -葡聚糖有效含量为24.0%;大黄由北京同仁堂提供,委托青岛黄海制药股份有限公司加工成微粉(过320 μ m)后添加,大黄素有效含量0.93%;氟苯尼考购自山东鲁抗动物药业有限公司,氟苯尼考有效含量为99.0%。饲料制备之前,饲料主要原料海泥、鱼粉和马尾藻先粉碎,过320 μ m筛网,再按配比从小到大逐级定量均匀混合,较大的混合物进入V型搅拌机充分混合25 min,制成混合均匀的粉末状饲料。使用时与适量的水混合后以不分散的团状形态投喂给仿刺参。

1.3 养殖实验管理

购回的仿刺参经过实验室条件驯化后,随机分配到25个水族箱中进行养殖实验。其中,氟苯尼考添加组先投含氟苯尼考饲料5 d,然后改投基础饲料投喂15 d(即20 d为一个投喂周期),其余处理组全程不变更饲料。实验期间,每天按照仿刺参体重的10.0%投喂刺参饲料1次(18:00)。养殖过程中根据吃食情况适当调整用量,以饱食为准,及时清除残饵和粪便。整个养殖实验持续60 d(表1)。

表 1 实验中仿刺参的初始体质量和末体质量
Tab. 1 The initial weight and final weight of sea cucumber (*A. japonicus*)

指标 index	组别 group				
	CT	PO	PM	RH	FL
初体质量/g initial weight	4.71 ± 0.03	4.68 ± 0.02	4.66 ± 0.01	4.64 ± 0.01	4.66 ± 0.02
末体质量/g final weight	11.45 ± 0.54 ^a	13.46 ± 0.84 ^a	15.37 ± 0.46 ^b	14.44 ± 1.24 ^{ab}	11.27 ± 0.42 ^a

注:表中相同字母表示不同处理间差异不显著($P > 0.05$)。CT:对照组;PO:酵母多糖组;PM:马氏副球菌处理组;RH:大黄组;FL:氟苯尼考组

Note: Data with the same letters are not significantly different ($P > 0.05$). CT: control group; PO: yeast polysaccharide group; PM: *Paracoccus marcusii* group; RH: rhubarb group; FL: florfenicol group

1.4 样品采集和测定

样品采集及处理 养殖实验结束后,各处理的每个重复随机采集 3 头仿刺参用 1 mL 无菌注射器预先吸入抗凝剂(0.02 mol/L EGTA, 0.48 mol/L NaCl, 0.019 mol/L KCl, 0.068 mol/L Tris-HCl, pH = 7.6)自海参腹腔抽取体腔液,至抗凝剂与体腔液的体积比为 1:1。部分抗凝剂体腔液直接用于体腔细胞的计数、吞噬活性和呼吸爆发活力的测定。每个重复随机采集 5 头仿刺参解剖取肠道中肠组织作为一个样品,液氮速冻, -80 °C 保存。

仿刺参体腔细胞计数 将 50 μL 仿刺参体腔液加入到 150 μL 戊二醛固定液中进行固定,用血球计数板在 10 × 40 倍显微镜下进行体腔细胞计数,计算出仿刺参体腔细胞的密度。

体腔细胞吞噬活性 仿刺参体腔细胞的吞噬活性采用吞噬中性红的方法进行测定^[24-25],并略有改动,取 100 μL 仿刺参体腔细胞抗凝液加入到 96 孔板中,让体腔细胞贴壁 30 min 后,弃上清,然后加入中性红,待体腔细胞吞噬中性红 30 min 后,再轻轻洗去未被体腔细胞吞噬的中性红,在 96 孔板中加入细胞裂解液对仿刺参体腔细胞裂解 20 min,用全波长酶标仪 540 nm 下测定吸光值(OD₅₄₀),结果以每 10⁶ 个体腔细胞的吸光值表示仿刺参体腔细胞吞噬能力的高低。

体腔细胞呼吸爆发活力 根据 Song 等^[26]方法作相应修改。在 96 孔板中先加入 50 μL 0.2% 多聚赖氨酸 (poly-L-lysine, Sigma) 增加 96 孔板的吸附能力,然后加入 100 μL 抗凝仿刺参体腔液,离心 10 min (300 × g, 4 °C) 后去除上清,然后加入 100 μL (1 μg/mL) PMA (phorbol myristate acetate, Sigma),温育 30 min (37 °C) 后加入 100 μL 0.3% NBT (nitroblue tetrazolium, Sigma),在 37 °C 下,温育 30 min 后,经离心 10 min (560 × g, 4 °C),去除上清后加入 200 μL 100% 甲醇终止反

应 (10 min),经离心 10 min (700 × g), 4 °C,去除上清,再用 70% 甲醇洗涤 3 次,离心去除上清后,室温下晾干。干燥后,加入 120 μL 2 mol/L KOH 和 140 μL DMSO (二甲基亚砜),充分溶解孔内物质;在全波长酶标仪中测定溶液在 630 nm 下的吸光值(OD₆₃₀),仿刺参体腔细胞呼吸爆发活力以每 10⁶ 个体腔细胞的吸光值大小来表示。

肠道组织样品总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成 采用 RNAiso Plus (TaKaRa) 提取仿刺参中肠组织的总 RNA,总 RNA 的完整性和纯度用凝胶电泳检测。按照 PrimeScriptTM RT 试剂盒 (TaKaRa) 操作说明合成 cDNA 第一链。

实时荧光定量 PCR 检测免疫基因的表达

用定量仪器为实时定量 PCR 仪 (Mastercycler ep realplex, Eppendorf, Germany) 采用 SYBR Green I 方法对免疫基因 *Aj-p105*、*Aj-p50*、*Aj-rel* 和 *Aj-lys* mRNA 表达水平进行检测 (表 2)。定量 PCR 的体系为 25 μL,其中 0.5 μL 上下游引物

表 2 内参和目的基因定量引物
Tab. 2 Primers of internal reference and target genes

目的基因 gene	引物名称 primer	序列 primer sequences (5'-3')
<i>β-actin</i>	actin-F	5'-TTATGCTCTTCCTCACGCTATCC-3'
	actin-R	5'-TTGTGGTAAAGGTGTAGCCTCTCTC-3'
<i>Aj-p105</i>	p105-F	5'-GCAACACACCCCTCCATCTT-3'
	p105-R	5'-TCTTCTTCGCTAACGTACACACC-3'
<i>Aj-p50</i>	p50-F	5'-TCCTATCGGTCTGAATCTTCCAA-3'
	p50-R	5'-TTTCTCCCTTTCTGGCTATGTTC-3'
<i>Aj-rel</i>	rel-F	5'-TGAAGGTGGTATGCGTCTGG-3'
	rel-R	5'-TTGGGCTGCTCGTTATG-3'
<i>Aj-lys</i>	lys-F	5'-AGGGAGGTAGTCTGGATGGA-3'
	lys-R	5'-GCGCAAATCCTCACAGGTA-3'

注:本实验中所选用的定量引物参考 Wang 等^[15]

Notes: Quantitative primer in this experiment selected reference the study of Wang, et al. ^[15]

(10 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL 第一链 cDNA 12.5 μL 2 \times SYBR Premix Ex TaqTM II (Takara) 和 10.5 μL 的 DEPC 水。实时定量 PCR 的程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 持续 2 min 1 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 持续 10 s,退火温度 60 $^{\circ}\text{C}$ 持续 10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 持续 20 s,共计 40 个循环。之后,绘制熔解曲线以检验每个 PCR 反应只有一个 PCR 产物。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法测定目的基因的表达量,实验所得数据通过统计软件 SPSS 16.0 采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 Duncan 氏多重检验法进行统计分析($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 4 种添加物对仿刺参非体腔细胞非特异性免疫力的影响

饲料中添加酵母多糖(PO)和马氏副球菌(PM)可以显著提高仿刺参体腔细胞的吞噬能力($P < 0.05$),但大黄组(RH)与对照差异不显著($P > 0.05$);氟苯尼考组(FL)仿刺参体腔细胞的吞噬能力最弱,但与对照组无显著性差异($P > 0.05$)。饲料中添加酵母多糖和大黄均对仿刺参体腔细胞的呼吸爆发活力无显著影响($P > 0.05$),但马氏副球菌组(PM)的呼吸爆发活力显著高于对照组($P < 0.05$);氟苯尼考组中仿刺参体腔细胞的呼吸爆发活力最低,显著低于对照组($P < 0.05$)(图 1)。

2.2 4 种添加物对仿刺参肠道免疫基因 *Aj-p105*、*Aj-p50*、*Aj-rel* 和 *Aj-lys* mRNA 表达量的影响

酵母多糖(PO)、马氏副球菌组(PM)和大黄组(RH)仿刺参肠道组织中 *Aj-p105* 基因表达水

平显著高于对照组(CT)($P < 0.05$),分别提高了 43.2%、49.8% 和 24.0%。氟苯尼考组(FL)组仿刺参肠道组织中 *Aj-p105* 的表达水平则显著低于其它处理组($P < 0.05$),与对照组相比降低了 20.0%,但未达到显著水平($P > 0.05$)(图 2-a)。

酵母多糖组(PO)和马氏副球菌组(PM)中仿刺参肠道组织 *Aj-p50* 基因表达水平显著高于对照组(CT)($P < 0.05$),分别提高了 63.1% 和 48.0%;大黄组(RH)仿刺参肠道组织中 *Aj-p50* 基因表达水平高于对照组(CT),但差异并未达到显著水平($P > 0.05$);氟苯尼考(FL)组仿刺参肠道组织中 *Aj-p50* 的表达水平则显著低于对照组(降低了 37.9%)($P < 0.05$)(图 2-b)。

酵母多糖组(PO)、马氏组(PM)和大黄组(RH)仿刺参肠道组织中 *Aj-rel* 基因的表达水平均与对照组(CT)不存在显著差异($P > 0.05$)。氟苯尼考组(FL)仿刺参肠道组织中 *Aj-rel* 基因的表达水平却显著低于对照组(降低了 61.1%)($P < 0.05$)(图 2-c)。

马氏副球菌组(PM)和酵母多糖组(PO)仿刺参肠道组织中 *Aj-lys* 基因的表达水平显著高于对照组(CT)($P < 0.05$),增幅为 46.4%;酵母多糖组(PO)仿刺参肠道组织中 *Aj-lys* 基因的表达水平高于对照组(CT),增幅为 33.4%,但差异未达到显著性水平($P > 0.05$);大黄组(RH)仿刺参肠道组织中 *Aj-lys* 基因的表达水平与对照组(CT)没有显著差异($P > 0.05$)。而氟苯尼考组(FL)仿刺参肠道组织中 *Aj-lys* 基因的表达水平则显著低于对照组(降低了 62.6%)($P < 0.05$)(图 2-d)。

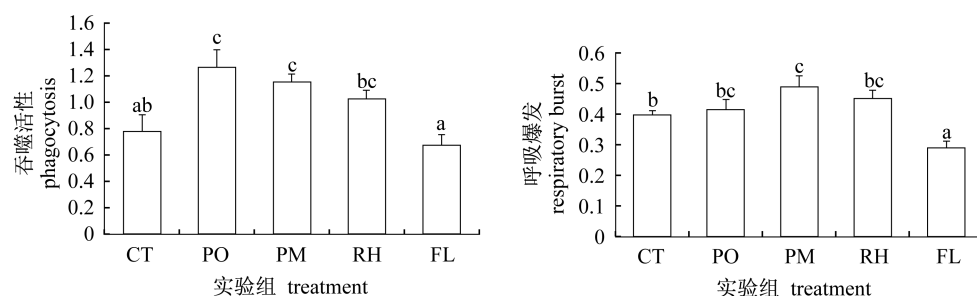


图 1 4 种添加物对仿刺参体腔细胞非特异性免疫力的影响

图中相同字母表示不同处理间差异不显著($P > 0.05$)。CT. 对照组; PO. 酵母多糖组; PM. 马氏副球菌处理组; RH. 大黄组; FL. 氟苯尼考组。下图注释同此

Fig. 1 Effects of four different additives on innate immunity of sea cucumber

Data with the same letters are not significantly different ($P > 0.05$). CT. control group; PO. yeast polysaccharide group; PM. *Paracoccus marcusii* group; RH. rhubarb group; FL. florfenicol group. The same as the following

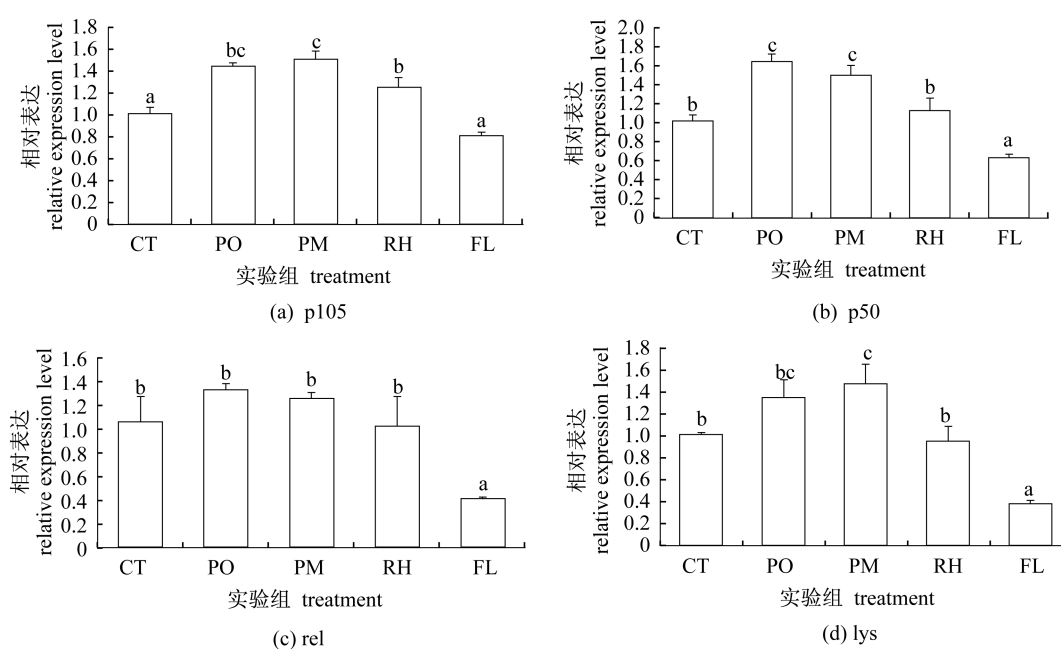


图2 *Aj-p105*、*Aj-p50*、*Aj-rel* 和 *Aj-lys* 基因在中肠肠道组织中的相对表达量

Fig. 2 Relative mRNA levels of *Aj-p105*, *Aj-p50*, *Aj-rel* and *Aj-lys* genes in the mid-intestinal tissue

3 讨论

刺参的体腔细胞是机体防御各种病原侵袭的主要屏障之一,是刺参抵抗外来微生物感染和受伤后防御的第一道防线^[27]。体腔细胞主要通过吞噬作用杀灭外源病原微生物,同时在发生细胞吞噬时伴有典型的呼吸爆发现象并产生活性氧,包括超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)和羟自由基(OH^{\cdot})等^[28]。这些活性氧对病原微生物具有强大的杀伤功能并具有强烈的细胞毒性作用,在无脊椎动物抵御外来物质中起到重要作用^[29]。细胞吞噬和呼吸爆发作为非特异性免疫力的指标被广泛应用于评价水产动物的机体免疫能力^[30-32]。已有研究表明,NF- κ B 信号通路的原始功能是激活机体非特异性免疫反应,通路中的转录因子可以被多种刺激物激活,激活后的 NF- κ B 参与诱导包括溶菌酶在内的 150 多种目的基因的表达^[33]。转录因子 *Aj-p105/p50* 和 *Aj-rel* 均具有一个 N 端 rel 同源结构域(RHD),通过这一结构与 DNA 结合,作为开关调控各种下游基因的表达,诸如趋化因子、细胞因子和粘附因子等,这些因子是先天性免疫中应对病原微生物的重要免疫因子^[34]。溶菌酶既是一种主要的消化酶,也是一种重要的防御免疫因子。它可以通过切断肽聚糖

中 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰氨基葡萄糖之间的 β -1,4 糖苷键,使细菌溶解死亡,从而清除侵入体内的病原菌^[35]。这样,通过测定溶菌酶基因 *Aj-lys* mRNA 表达量,可以在一定程度上衡量刺参的非特异性免疫水平。因此,通过研究机体 *Aj-p105*、*Aj-p50*、*Aj-rel* 和 *Aj-lys* mRNA 的表达量变化情况能在一定程度上探知机体发生非特异性免疫的机理。已有研究表明,在刺参的 NF- κ B 信号通路中,转录因子 *Aj-rel* 可以分别和 *Aj-p105* 和 *Aj-p50* 形成二聚体,而且一旦转录因子 *Aj-p50* 和 *Aj-rel* 进入核内后可以形成二聚体,并调控相关基因的表达^[15]。

酵母多糖因含有 β -葡聚糖,可提高水产动物免疫力,而益生菌的免疫作用主要体现在对肠道粘膜免疫功能的影响和调节^[36],通过其细胞膜外的鞭毛蛋白^[37]、肽聚糖^[38]以及分泌的细胞因子^[39]等被肠道粘膜细胞表面的受体识别,进而激活宿主的免疫系统以提高机体的免疫力;大黄中含有大黄素,其化学名称为 1,3,8-三羟基-6-甲基蒽醌,具有抗氧化及清除氧自由基和免疫调节功能。关于酵母多糖添加提高机体免疫力的研究,已在斑节对虾 (*Penaeus monodon*)^[40]、刺参^[5,19]、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[6,41]、暗纹东方鲀 (*Takifugu obscurus*)^[42] 和牙鲆 (*paralichthys*

olivaceus)^[43]等水产动物中有相关报道。饲料中添加大黄或大黄素可以有效提高刺参^[44]、克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*)^[45] 和团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*)^[22,46]等水产动物的非特异性免疫能力。本实验发现,饲料中添加投喂酵母多糖和马氏副球菌均可显著提高仿刺参体腔细胞的吞噬能力,马氏副球菌能有效增强仿刺参体腔细胞的呼吸爆发活力。可以看出,添加马氏副球菌对仿刺参体腔细胞非特异性免疫力提高效果最佳,这一结果与 Yan 等^[20]结果一致。

肠道的基本功能是消化食物和吸收营养,但同时也是机体重要的免疫组织,是近年来免疫学研究热点之一^[47-48]。Dalmo 等^[18]的研究认为,饲料中添加免疫增强剂后可以提高肠道免疫反应从而提高水产养殖动物的抗病力,以保护养殖动物免受致病原的入侵。刺参的身体结构组成非常简单,肠道是其体腔内最主要的器官,几乎占据了体腔内绝大部分空间,但关于肠道免疫在刺参的整个机体免疫中的位置和作用,目前还鲜见研究报告。本实验比较了仿刺参肠道 *Aj-p105*、*Aj-p50*、*Aj-rel* 和 *Aj-lys* 基因表达水平对饲料中添加酵母多糖、马氏副球菌和大黄的响应。可以看出,酵母多糖和马氏副球菌可显著提高仿刺参肠道组织中 *Aj-p105* 和 *Aj-p50* 基因的表达量,同时马氏副球菌对仿刺参 *Aj-lys* 基因的表达水平也具有显著促进作用,这一结果与体腔细胞的吞噬能力和呼吸爆发活性的响应趋势基本一致。不过 *Aj-rel* 基因在投喂酵母多糖、马氏副球菌和大黄的仿刺参肠道组中的表达水平与对照组相比差异均不显著,因此,推测在 NF- κ B 信号通路中,转录因子 *Aj-p105/p50* 可能属于限制性因子,而转录因子 *Aj-rel* 则可能是一个非限制性因子。本研究认为,酵母多糖和马氏副球菌可能是通过刺激肠道组织中 *Aj-p105* 和 *Aj-p50* 基因的表达,加强了信号在 NF- κ B 信号通路的转导调控下游包括溶菌酶基因 *Aj-lys* 在内的相关免疫基因的表达来提高肠道的免疫反应,进而提高了仿刺参体腔细胞的吞噬能力和呼吸爆发活力,最终增强仿刺参的非特异性免疫力。值得注意的是,4种添加物比较,仿刺参肠道组织对大黄添加的响应有所不同。肠道组织中 *Aj-p105* 基因的表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$),但下游基因 *Aj-p50* 和 *Aj-lys* 的表达水平与对照组间差异不显著。据推测,大黄对仿

刺参免疫力的影响可能异于其他水产动物,或大黄对仿刺参免疫力的促进作用可能弱于其他研究的水产动物,但具体机制还有待于进一步研究。

氟苯尼考为甲砒霉素的单氟衍生物,化学名称 D(+)-苏-1-对甲砒基苯基-2-二氯乙酰基-3-氟丙醇,因其均有广谱、高效、安全和动物专用等特点被广泛应用于水产养殖。本实验发现,投喂过氟苯尼考的仿刺参体腔细胞的吞噬能力和呼吸爆发活力在所有处理组均处于最低水平,且呼吸爆发活力显著低于对照组。同时,仿刺参中肠道组织中 *Aj-p105*、*Aj-p50*、*Aj-rel* 和 *Aj-lys* 基因的表达在所有处理中也处于最低水平,其中 *Aj-p50*、*Aj-rel* 和 *Aj-lys* 基因的表达量显著低于对照组。这一结果表明,饲料中添加氟苯尼考可能会导致仿刺参肠道 *Aj-p105*、*Aj-p50*、*Aj-rel* 和 *Aj-lys* 基因的表达受到一定抑制。

综上所述,饲料中添加马氏副球菌和酵母多糖可以显著提高仿刺参的体腔细胞非特异性免疫力,中草药大黄对仿刺参免疫提高的效果则相对要弱于前两者,而抗生素氟苯尼考的使用则会导致仿刺参自身免疫力不同程度的下降。

参考文献:

- [1] Fisheries Bureau of Ministry of Agriculture. China fishery statistical yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013. [农业部渔业局, 2013 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2013.]
- [2] Zhang J H, Lu C P. Effects of aeromonas hydrophila biofilm on the drug resistance [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2003, 43(4): 498 - 502. [张吉红, 陆承平. 嗜水气单胞菌生物被膜对其耐药性的影响. 微生物学报, 2003, 43(4): 498 - 502.]
- [3] Ren X, Pan L, Wang L. Effect of florfenicol on selected parameters of immune and antioxidant systems, and damage indexes of juvenile *Litopenaeus vannamei* following oral administration [J]. Aquaculture, 2014, 432: 106 - 113.
- [4] Wang Y S, Qian L M, Chen C S, et al. Effect of antibiotic and probiotics on nonspecific immune system of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2008, 27(2): 161 - 167. [王永胜, 钱鲁闽, 陈昌生, 等. 抗生素和有益微生物对凡纳滨对虾非特异性免疫效应的研究. 台湾海峡, 2008, 27(2): 161 - 167.]
- [5] Gong K, Wang B J, Liu M, et al. Effect of all-

- nutrient broken yeast on nonspecific immunity and intestinal flora of sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(4): 641 - 646. [宫魁, 王宝杰, 刘梅, 等. 全营养破壁酵母对仿刺参非特异性免疫及肠道菌群的影响. 中国水产科学, 2012, 19(4): 641 - 646.]
- [6] Shen W Y, Yang H J, Ke H F, *et al.* Effect of β -glucan on enzyme activity of immunity in pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Fisheries Science, 2007, 26(7): 381 - 383. [沈文英, 阳会军, 柯慧芬, 等. β -葡聚糖对凡纳滨对虾免疫相关酶活性的影响. 水产科学, 2007, 26(7): 381 - 383.]
- [7] Heo W S, Kim Y R, Kim E Y, *et al.* Effects of dietary probiotic, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Aquaculture, 2013, 376: 20 - 24.
- [8] Nayak S K. Probiotics and immunity: A fish perspective [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(1): 2 - 14.
- [9] Sun Y, Liu F, Song X L, *et al.* Effects of adding probiotics in the feed on non-specific immune gene expression and disease resistance of *litopenaeus vannamei* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(4): 845 - 851. [孙艳, 刘飞, 宋晓玲, 等. 饲料中添加益生菌对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 非特异免疫基因表达量和抗病力的影响. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 845 - 851.]
- [10] Li C, Zhang Q Z, Yang Y Y, *et al.* Effect of different doses of compound Chinese herbal immunostimulant in feed on the growth and immune function of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(4): 534 - 540. [李超, 张其中, 杨莹莹, 等. 不同剂量复方中草药免疫增强剂对草鱼生长性能和免疫功能的影响. 上海海洋大学学报, 2011, 20(4): 534 - 540.]
- [11] Li H, Zhang T E, Li Q. Influence of compound Chinese herbal medicine on non-specific immunity of turbot *Scophthalmus maximus* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2013, 28(2): 115 - 120. [李华, 张太娥, 李强. 复方中草药对大菱鲆非特异性免疫力的影响. 大连海洋大学学报, 2013, 28(2): 115 - 120.]
- [12] Dixit V, Mak T W. NF- κ B signaling: Many roads lead to Madrid [J]. Cell, 2002, 111(5): 615 - 619.
- [13] Ghosh S, May M J, Kopp E B. NF- κ B and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses [J]. Annual Review of Immunology, 1998, 16(1): 225 - 260.
- [14] Pal S, Wu J, Wu L P. Microarray analyses reveal distinct roles for Rel proteins in the *Drosophila* immune response [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2008, 32(1): 50 - 60.
- [15] Wang T, Sun Y, Jin L, *et al.* *Aj-rel* and *Aj-p105*, two evolutionary conserved NF- κ B homologues in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) and their involvement in LPS induced immunity [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(1): 17 - 22.
- [16] Zhang Q, Mai K S, Zhang W B, *et al.* Effects of dietary selenoyeast and Vitamin E on growth, immunity and disease resistance of sea Cucumbers (*Apostichopus japonicus* Selenka) [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23: 1745 - 1755. [张琴, 麦康森, 张文兵, 等. 饲料中添加硒酵母和维生素 E 对刺参生长, 免疫力及抗病力的影响. 动物营养学报, 2011, 23: 1745 - 1755.]
- [17] Pitman R S, Blumberg R S. First line of defense: The role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system [J]. Journal of Gastroenterology, 2000, 35: 805 - 814.
- [18] Dalmo R A, Bøggwald J. β -glucans as conductors of immune symphonies [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25: 384 - 396.
- [19] Zhao Y, Ma H, Zhang W, *et al.* Effects of dietary β -glucan on the growth, immune responses and resistance of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* against *Vibrio splendidus* infection [J]. Aquaculture, 2011, 315(3): 269 - 274.
- [20] Yan F J, Tian X L, Dong S L, *et al.* Growth performance, immune response, and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* fed a supplementary diet of the potential probiotic *Paracoccus marcusii* DB11 [J]. Aquaculture, 2014, 420: 105 - 111.
- [21] Liu B, Xie J, Ge X, *et al.* Effects of anthraquinone extract from *Rheum officinale* Bail on the growth performance and physiological responses of *Macrobrachium rosenbergii* under high temperature stress [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(1): 49 - 57.
- [22] Zhang Y, Liu B, Ge X, *et al.* The influence of various feeding patterns of emodin on growth, non-specific immune responses, and disease resistance to *Aeromonas hydrophila* in juvenile Wuchang bream

- (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 36(1):187-193.
- [23] Yan F J, Tian X L, Dong S L, *et al.* Isolation, identification and characterization of a low-temperature degrading bacterium [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2011, 41(3):24-30. [闫法军, 田相利, 董双林, 等. 一株低温降解菌的分离鉴定及其降解特性研究. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2011, 41(3):24-30.]
- [24] Cao Q Z, Lin Z B. Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2004, 25: 833-838.
- [25] Zhang Q, Ma H, Mai K, *et al.* Interaction of dietary *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on the growth performance, non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(2):204-211.
- [26] Song Y L, Hsieh Y T. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances; Analysis of reactive oxygen species [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1994, 18(3):201-209.
- [27] Xing J, Leung M F, Chia F S. Quantitative analysis of phagocytosis by amoebocytes of a sea cucumber, *Holothuria leucospilota* [J]. *Invertebrate Biology*, 1998, 117(1):67-74.
- [28] Babior B M. The role of oxygen radicals in microbial killing by phagocytes [M]. Springer, 1980: 339-354.
- [29] Coteur G, Warnau M, Jangoux M, *et al.* Reactive oxygen species (ROS) production by amoebocytes of *Asterias rubens* (Echinodermata) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12(3):187-200.
- [30] Ai Q H, Xu H, Mai K S, *et al.* Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea* [J]. *Aquaculture*, 2011, 317(1):155-161.
- [31] Zhang Q, Tan B, Mai K, *et al.* Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae) [J]. *Aquaculture Research*, 2011, 42(7):943-952.
- [32] Zhao Y, Zhang W, Xu W, *et al.* Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* T13 on growth, immunity and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(5):750-755.
- [33] Pahl H L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors [J]. *Oncogene*, 1999, 18(49):6853-6866.
- [34] Wang T T. Cloning and expression of three immune genes in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* and their involvement in immunity [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2012. [汪婷婷. 刺参三种免疫基因的克隆, 表达及功能研究. 大连: 大连理工大学, 2012.]
- [35] Lee W J, Brey P T. Isolation and characterization of the lysozyme-encoding gene from the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Gene*, 1995, 161(2):199-203.
- [36] Boder P, Chcialowski A. Immunomodulatory effect of probiotic bacteria [J]. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 2009, 3(1):58-64.
- [37] Luo J, Li W, Duan Y F, *et al.* Host discriminates between probiotics and pathogens: Impact of toll like receptor 5-flagellin interaction and evolution [J]. *Microbiology China*, 2014, 7:19. [罗佳, 李薇, 段云峰, 等. Toll 样受体 5 和鞭毛蛋白的相互作用影响宿主区分病原菌和益生菌. *微生物学通报*, 2014, 7:19.]
- [38] Zhang W M, Wang H F, Liu J X. Mechanism of action of probiotic function of *Lactobacilli* [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(3):389-396. [章文明, 汪海峰, 刘建新. 乳酸杆菌益生作用机制的研究进展. *动物营养学报*, 2012, 24(3):389-396.]
- [39] Suzuki C, Kimoto-Nira H, Kobayashi M, *et al.* Immunomodulatory and cytotoxic effects of various *Lactococcus* strains on the murine macrophage cell line J774. 1 [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 123(1):159-165.
- [40] Thitamadee S, Srisala J, Taengchaiyaphum S, *et al.* Double-dose β -glucan treatment in WSSV-challenged shrimp reduces viral replication but causes mortality possibly due to excessive ROS production [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(2):478-484.
- [41] Bai N, Gu M, Zhang W B, *et al.* The effects of yeast β -glucan derivatives on the immune responses of the haemocytes of white shrimp *Litopenaeus vannamei*

- [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(4): 642-650. [白楠, 谷珉, 张文兵, 等. 酵母葡聚糖衍生物对凡纳滨对虾血细胞免疫反应的影响. *水生生物学报*, 2014, 38(4): 642-650.]
- [42] Wang Y H, Yang X Y, Guo Z L, *et al.* Effect of β -glucan on the non-specific immunity and growth of *Takifugu obscurus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(6): 1247-1256. [王永宏, 杨小玉, 郭正龙, 等. β -葡聚糖对暗纹东方纯幼鱼非特异性免疫及生长性能的影响. *中国水产科学*, 2013, 20(6): 1247-1256.]
- [43] Wang H T, Zhang P J. Effects of recombinant yeast on the non-specific immune activities of *paralichthys olivaceus* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2000, 31(6): 631-635. [王宏田, 张培军. 重组酵母菌对牙鲆非特异性免疫能力的影响. *海洋与湖沼*, 2000, 31(6): 631-635.]
- [44] Zhang Y F. Pharmacokinetics studies on rhein in *Apostichopus japonicus* and *Penaeus vannamei* and effects of rhubarb on non-specific immune in *Apostichopus japonicus* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2011. [张元发. 大黄酸在刺参, 南美白对虾体内的代谢及大黄对刺参的免疫影响. 青岛: 中国海洋大学, 2011.]
- [45] Yang W W, Shen M F, Liu W B, *et al.* Effects of emodin on the growth, non-specific immunity liver antioxidation and digestive enzymes of *Procambarus clarkii* [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 29(6): 1405-1410. [杨维维, 沈美芳, 刘文斌, 等. 大黄素对克氏螯虾生长, 免疫, 肝脏抗氧化以及肠道消化酶的影响. *江苏农业学报*, 2013, 29(6): 1405-1410.]
- [46] Ming J H, Xie J, Xu P, *et al.* Effects of emodin, vitamin C and their combination on growth, physiological and biochemical parameters, disease resistance and two HSP70 s mRNA expression of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(9): 1447-1459. [明建华, 谢骏, 徐跑, 等. 大黄素, 维生素 C 及其配伍对团头鲂生长, 生理生化指标, 抗病原感染以及两种 HSP70 s mRNA 表达的影响. *水产学报*, 2010, 34(9): 1447-1459.]
- [47] Fukatsu K. Impact of the feeding route on gut mucosal immunity [J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 2014, 17(2): 164-170.
- [48] Paul N, Chakraborty S, Sengupta M. Lead toxicity on non-specific immune mechanisms of freshwater fish *Channa punctatus* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 152: 105-112.

Effects of four different additives on non-specific immunity and expression of intestinal immune gene (*Aj-p105*, *Aj-p50*, *Aj-rel* and *Aj-lys*) in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*)

YANG Gang¹, TIAN Xiangli^{1*}, DONG Shuanglin¹, PENG Mo², WANG Dongdong¹, ZHANG Kai¹

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. School of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: A 60-d feeding experiment was conducted to investigate the effects of basic diet with four different additives of yeast polysaccharide (6.3 g/kg), *Paracoccus marcusii* (10^9 cfu/kg), rhubarb (*Rheiradix et Rhizoma*, 25.0 g/kg) and florfenicol (15.0 mg/kg) on non-specific immunity and expression of intestinal immune gene (*Aj-p105*, *Aj-p50*, *Aj-rel* and *Aj-lys*) in sea cucumber [*Apostichopus japonicus*, mean initial body weight (4.68 ± 0.36) g]. Five groups of sea cucumbers were fed with the basal diet (control group), basal diet with yeast polysaccharide, *P. marcusii*, rhubarb, and florfenicol supplementation, respectively. Each diet was randomly fed to five tanks at a density of 10 sea cucumbers per tank. The results showed that the phagocytosis and respiratory burst activities of the coelomocytes of sea cucumber fed diets with *P. marcusii* supplementation were significantly higher than those in the control group. Dietary yeast polysaccharide supplementation significantly enhanced the phagocytosis activity of the coelomocytes compared with the control group. However, the respiratory burst activity of the coelomocytes in the florfenicol group was significantly lower than that in the control group. At transcriptional level, the relative expression of *Aj-p105* and *Aj-p50* genes in mid-intestine tissue of sea cucumber in yeast polysaccharide and *P. marcusii* groups were significantly higher than those in the control group with increase of 43.2% and 63.1% in yeast polysaccharide group, and with increase of 49.8% and 48% in *P. marcusii* group, respectively. The relative expression of *Aj-lys* gene in *P. marcusii* group was significantly higher than that in the control group with an increase of 46.4%. The relative expression of *Aj-p105* in rhubarb group was significantly higher than that in the control group. While the expression of *Aj-p50*, *Aj-rel* and *Aj-lys* genes in mid-intestine of sea cucumber in florfenicol group was significantly decreased compared to the control group. In summary, these results suggested that dietary yeast polysaccharide and *P. marcusii* would enhance the non-specific immunity of sea cucumber, but feeding florfenicol may have an opposite effect.

Key words: *Apostichopus japonicus*; yeast polysaccharide; *Paracoccus marcusii*; rhubarb; florfenicol; non-specific immunity

Corresponding author: TIAN Xiangli. E-mail: xianglitian@ouc.edu.cn