

腹注甘草粗提物对鲫免疫力的影响^{*}

王文博^{1, 2}, 林小涛¹, 方平³, 夏磊³, 齐长宝³

(1. 暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300;

3. 中国水产科学研究院, 北京 100039)

摘 要: 对中药甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 进行了粗提, 将粗提物用无菌生理盐水按 $w=0.5\%$ 和 $w=2\%$ 的浓度配成针剂腹注鲫鱼 (*Carassius auratus*), 在第 3、7、14、21、28 天采样检测免疫指标。结果显示, 低剂量组血清溶菌酶活性无明显变化, 仅在第 14 天显著高于对照组 ($P<0.05$), 高剂量组呈上升趋势, 从第 7 天开始到最后一次采样, 每次均显著高于对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。药物组血清杀菌活性在实验前期升高, 到中后期停止上升趋势, 保持一个较高水平, 且高剂量组比低剂量组上升幅度要大, 最大值为 $(74.9\pm18.4)\%$ 。血液淋巴细胞计数方面, 低剂量组呈波浪型变化, 在第 7 天时每毫升血液中淋巴细胞总数为 $(32.8\pm8.5)\times10^6$ 个, 对照组为 $(22.2\pm4.9)\times10^6$ 个, 经检验, $P<0.01$, 而高剂量组先升后降, 第 14 天达到最大值 $(33.1\pm10.2)\times10^6$ 个, 显著高于对照组 ($P<0.01$)。药物组血液白细胞吞噬活性在每次采样都略高于同期对照组, 但只有在第 21 d 时高剂量组与对照组显示出了差异 ($P<0.05$), 分别为 $(45.8\pm6.1)\%$ 和 $(31.5\pm5.1)\%$ 。药物组脾脏重量指数在各时期均与对照组无显著性差异。实验表明, 鲫鱼腹注该甘草粗提物后, 其免疫力在一定程度上得到了增强。

关键词: 甘草; 粗提物; 腹注; 鲫鱼; 免疫力

中图分类号: Q942.1 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2007) 04-0084-05

甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 为多年生草本植物, 又名甜草根、红甘草、粉甘草、粉草等, 主要产于新疆、内蒙、甘肃等地, 是传统常用中草药之一。甘草性平味甘, 在临床上具有缓急止痛、调和诸药、缓和药性等功效。其有效成分主要为甘草多糖、甘草甙类化合物、甘草甜素 (又称甘草酸)、甘草次酸等。其中, 甘草多糖由鼠李糖、葡聚糖、阿拉伯糖和半乳糖组成, 并以葡聚糖为主链^[1]。

目前, 在临床医学上对甘草的研究较多, 主要以小白鼠为实验材料, 例如, 甘草可使小鼠白细胞总数, 尤其是中性粒细胞和单核细胞数明显增加^[2], 甘草多糖对正常小鼠淋巴细胞体外增殖有促进作用等^[3]。也有将甘草应用于家禽养殖和畜牧业的报道, 比如用甘草作为饲料添加剂, 可提高肉鸡的进食欲望, 降低能耗^[4], 促进山羊 T 淋巴细胞转化率, 增强其细胞免疫功能等^[5]。然而, 对甘草应用于水产养殖业的研究却鲜见报道, 而且

都是采取生药拌饲直接投喂的方法, 这样虽然简便易行, 但由于生药中含有大量的无效成分, 往往造成药效不稳定、结果难以重复, 而且这样也不利于对药理展开深入研究。本实验采用一种已获专利的、改进的抽提工艺, 对甘草免疫成分进行粗提, 并制备针剂腹注鲫鱼, 研究了该粗提物对鱼体的免疫调节作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

鲫鱼 (*Carassius auratus*) 购自北京房山繁育场, 平均体质量为 (28.42 ± 7.28) g。实验期间水温约 $(25\pm3)^{\circ}\text{C}$, 每天早晚各投饵一次, 每次投饵量为体质量的 $2\%\sim3\%$ 。

溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 冻干粉购自 Sigma 公司。

甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) 饮片购自北京永兴中药饮片有限公司。

^{*} 收稿日期: 2006-11-01

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2006B20301026); 广东省重大科技攻关资助项目 (2003A2030504); 中国博士后科学基金资助项目 (第 39 批); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目 (2007TS16)

作者简介: 王文博 (1976 年生), 男, 博士后; 通讯联系人: 林小涛; E-mail: tlqx@jnu.edu.cn

1.2 药剂的制备

与北京中医药大学合作，采用水提醇沉法按文献 [6] 提取工艺对甘草多糖及甙类化合物进行粗提。简言之，甘草饮片置 10 倍量 $\varphi=95\%$ 酒精中， $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 回流醇洗，除杂。酒精废液 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发，回收。药渣经蒸馏水浸提，过滤，弃药渣。水提液加乙醇以 $4\,000\text{ r/min}$ 离心沉淀 20 min 弃上清，将离心所得浸膏蒸干，研磨成粉， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备存。将甘草粗提粉用无菌生理盐水按 $w=0\%$ 、 0.5% 和 2% 的质量分数配成针剂。

1.3 分组及采样

同源同批鲫鱼被随机分配到 6 个玻璃水族箱（每个容积约 100 L ）中，对照组、低剂量组和高剂量组各 2 个水族箱，每箱 50 尾。对照组所有鱼腹注无菌生理盐水，低剂量组腹注 $w=0.5\%$ 甘草针剂，高剂量组腹注 $w=2\%$ 甘草针剂，每尾均注射 0.3 mL 。

分别在腹注后第 3、7、14、21、28 天采样，实验前对照组不进行任何处理，在实验之前（0 d）采样。每次每箱取 10 尾。采样时，先称体质量，之后用一次性医用注射器于尾静脉抽血，最后取脾脏称量。

1.4 检测项目

1.4.1 血清溶菌酶活性 按 Panty^[7] 所述分光光度计法检测。 $5\text{ }\mu\text{L}$ 血清加入 3 mL M lysodektyl 菌液中，测定波长为 540 nm 。以 1 min 内吸光值下降 0.001 为 1 个活性单位（U）。

1.4.2 血清杀菌活性 方法参照文献 [8]，略作修改。 $w=0.5\%$ 盐水制备嗜水气单胞菌（*Aeromonas hydrophila*）悬液，用分光光度计将浓度调整为 $10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。 $50\text{ }\mu\text{L}$ 血清加入到等量菌悬液中， $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 h 之后，将混合液倍比稀释，不同稀释度各取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 加于平板培养基上， $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，计算平皿菌落数（Colony Forming Units，CFUs）。用 $50\text{ }\mu\text{L}$ 盐水代替 $50\text{ }\mu\text{L}$ 血清加入等量菌悬液作为阳性对照。结果用杀菌百分率表示：杀菌百分率（%）=（1-实验组 CFUs / 阳性对照 CFUs） $\times 100$

1.4.3 血液淋巴细胞计数 将少量全血用 Giemsa 染液做 30 倍稀释，取 1 滴加于血球计数板（型号：XB-K-25）上，显微镜下统计淋巴细胞数目，将结果换算为每毫升血液中所含淋巴细胞总数。

1.4.4 血液白细胞吞噬活性 取全血以 600 r/min 离心 10 min 收集白细胞层，用 RPMI1640 细胞培养液（Gibco）将浓度调整至 10^5 个/mL 备用。实验菌株为 *A. hydrophila* 吞噬步骤按 Rad^[9] 所述。

显微镜下计数 100 个白细胞中吞噬细菌的白细胞数，按下式求出吞噬百分率：吞噬百分率（%）=（吞噬细菌的白细胞数 / 100） $\times 100$

1.4.5 脾脏质量指数 脾脏质量与体质量之比即为脾脏质量指数。

2 结果

2.1 血清溶菌酶活性

腹注甘草提取物后鲫鱼血清溶菌酶活性变化如图 1 所示。整体而言，低剂量组无明显变化，仅在第 14 天显著高于对照组（ $P<0.05$ ），分别为 $(132.5\pm30.3)\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $(108.5\pm40.8)\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。高剂量组呈上升趋势，从第 7 天开始到最后一次采样，每次均显著高于对照组（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ）。

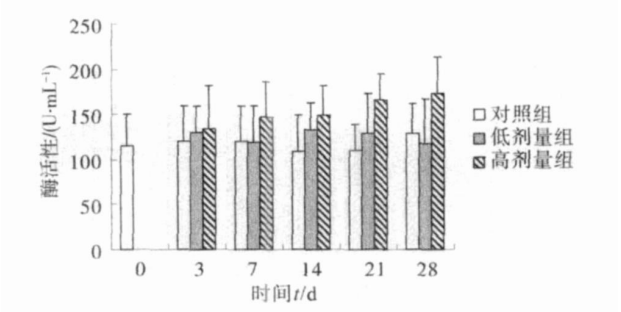


图 1 腹注甘草提取物对鲫鱼血液溶菌酶活性的影响
Fig 1 The effect of intraperitoneal injection of *G. uralensis* Fish extract on the activity of lysozyme in *Carassius auratus* serum
(对照组药量: 0%; 低剂量组: 0.5%; 高剂量组: 2%)

2.2 血清杀菌活性

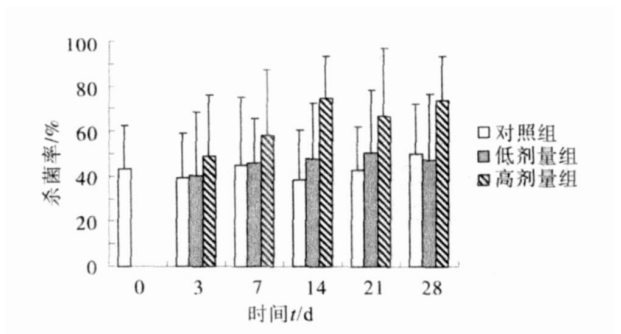


图 2 腹注甘草提取物对鲫鱼血清杀菌活性的影响
Fig 2 The effect of intraperitoneal injection of *G. uralensis* Fish extract on the bactericidal activity in *Carassius auratus* serum
(对照组药量: 0%; 低剂量组: 0.5%; 高剂量组: 2%)

从图 2 可以看出，低剂量组和高剂量组整体变

化趋势基本相同，即在实验前期杀菌活性升高，到中后期停止上升趋势，保持一个较高水平。不同的是，高剂量组比低剂量组上升幅度要大，而且低剂量组自始至终没有与对照组显示统计学差异，而高剂量组在第 7 天明显高于对照组（ $P<0.05$ ），在第 14、21 及 28 天都十分显著的高于同期对照组（ $P<0.01$ ）。

2.3 血液淋巴细胞计数

低剂量组呈波浪型变化（图 3），在第 7 天时血液中淋巴细胞总数为 $(32.8 \pm 8.5) \times 10^6$ 个 / mL，对照组为 $(22.2 \pm 4.9) \times 10^6$ 个 / mL，经检验， $P<0.01$ 。在第 14 和 28 天，低剂量组也显著高于对照组（ $P<0.01$ ）。高剂量组先升后降，且升幅大于降幅，最大值为 $(33.1 \pm 10.2) \times 10^6$ 个 / mL，显著高于对照组（第 14 天； $P<0.01$ ）。

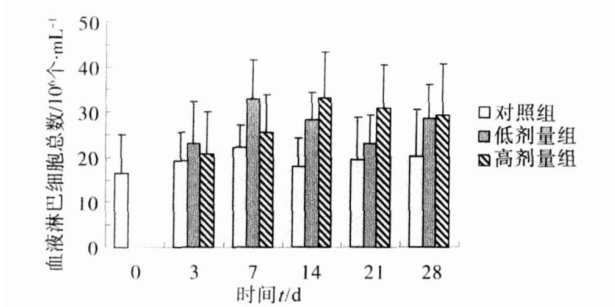


图 3 腹注甘草提取物对鲫鱼血液淋巴细胞计数的影响
Fig. 3 The effect of intraperitoneal injection of G. uralensis Fish extract on lymphocyte count in Carassius auratus b bod
(对照组药量: 0%; 低剂量组: 0.5%; 高剂量组: 2%)

2.4 血液白细胞吞噬活性

腹注甘草提取物后鲫鱼血液白细胞吞噬活性变化如表 1 所示。虽然低剂量组和高剂量组在每次采样都略高于同期对照组，但只有在第 21 天时高剂量组与对照组显示出了差异（ $P<0.05$ ），其它时期药物组与对照组均无统计学差异。

2.5 脾脏质量指数

经统计分析，低剂量组和高剂量组脾脏质量指数在各时期均与对照组无显著性差异（表 2）。

3 讨论

甘草是我国传统草药，具有多种功效，在提高机体抵御病原入侵方面效果显著，因此被广泛应用于临床治疗。已知甘草对金黄色葡萄球菌、溶血链球菌、结核杆菌、白喉杆菌等蛋白质的合成、核糖核酸及脱氧核糖核酸的形成均有强烈的抑制作用^[10]。

表 1 腹注甘草提取物对鲫鱼血液白细胞吞噬活性的影响¹⁾
Tab. 1 The effect of intraperitoneal injection of G. uralensis Fish extract on phagocytic percent of leucocytes in Carassius auratus b bod

实验组别	吞噬率 /%					
	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
实验前	33.2	—	—	—	—	—
对照组	±6.1	—	—	—	—	—
对照组	—	33.5 ±4.3	35.3 ±4.9	35.2 ±4.1	31.5 ±5.1	34.4 ±6.6
低剂量组	—	35.4 ±6.9	40.2 ±6.1	43.8 ±5.8	40.5 ±7.7	39.2 ±8.3
高剂量组	—	42.2 ±5.5	40.4 ±4.5	43.3 ±8.6	45.8 ±6.1*	42.4 ±5.5

1) 对照组药量: 0%; 低剂量组: 0.5%; 高剂量组: 2%
* 表示与对照相比有显著差异（ $P<0.05$ ）

表 2 腹注甘草提取物对鲫鱼脾脏质量指数的影响¹⁾
Tab. 2 The effect of intraperitoneal injection of G. uralensis Fish extract on spleen weight index of Carassius auratus

实验组别	脾脏质量指数 /10 ⁻³					
	第 0 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
实验前	0.82	—	—	—	—	—
对照组	±0.05	—	—	—	—	—
对照组	—	0.62 ± 0.06	0.67 ± 0.05	0.59 ± 0.05	0.72 ± 0.08	0.64 ± 0.06
低剂量组	—	0.57 ± 0.07	0.64 ± 0.06	0.62 ± 0.08	0.66 ± 0.10	0.68 ± 0.07
高剂量组	—	0.70 ± 0.05	0.68 ± 0.11	0.71 ± 0.13	0.74 ± 0.06	0.73 ± 0.08

1) 对照组药量: 0%; 低剂量组: 0.5%; 高剂量组: 2%

在血清溶菌酶检测中，使用的底物为溶壁微球菌（M. lysodeikticus），它可通过溶解细胞壁而使细胞裂解死亡。从溶菌酶结果（图 1）来看，高剂量组呈明显上升趋势，而低剂量组无明显变化，说明按 2% 药物浓度注射鲫鱼后，对机体溶菌酶溶解 M. lysodeikticus 菌产生了增强作用。在杀菌实验中，我们使用了嗜水气单胞菌（A. hydrophila），它是淡水养殖鱼类细菌性败血症（Bacterial hemorrhagic septicemia）的病原^[11]。根据血清杀菌结果（图 2）显示，药物组在实验前期杀菌活性升高，到中后期停止上升趋势，保持一个较高水平，说明此甘草粗提针剂有效的激活了血清中各种免疫因子对 A. hydrophila 菌的杀灭。陈超然等^[12]实验表明，在中华鳖（P. sinensis）饲料中添加一定剂量的甘草素，饲喂一段时间后，中华鳖免疫应答水平得到增强，

受 *A. hydrophila* 菌人工感染后死亡率下降。至于甘草抑制或杀死 *Myxobolus* 菌和 *A. hydrophila* 菌的作用机理，还有待深入研究。除了甘草，还有一些应用于水产业中的中草药也能有效促进鱼虾体内免疫因子的活性。昌鸣先等^[13]在饲料中添加虫草多糖饲喂日本沼虾（*Macrobrachium nipponense*），结果药物组的杀菌活性、溶菌活力以及酚氧化酶活性等均高于对照组，表明虫草多糖能显著增强日本沼虾的非特异性免疫力。罗日祥^[14]将中草药添加到对虾（*Penaeus orientalis*）饲料中，结果激活了对虾的非特异性免疫功能，促使血凝素活力和溶菌活力升高。

鱼类的免疫系统除了溶菌酶、补体、抗体、溶血素、转铁蛋白、C—反应蛋白等不具备细胞结构的免疫因子之外，还有两类免疫细胞，即介导特异性免疫反应的 T、B 淋巴细胞，以及参与非特异性免疫反应的吞噬细胞，包括单核细胞、巨噬细胞和各种粒细胞^[15]。图 3 显示，低剂量组在第 7、14 和 28 天以及高剂量组在第 14、21 和 28 天的血液淋巴细胞总数均显著高于同期对照组（ $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ），说明此甘草粗提物有效的刺激了淋巴细胞的分裂增殖。类似地，刘霞等^[16]报道甘草多糖对正常小鼠体外淋巴细胞增殖具调节作用。杨英等^[5]将甘草浸膏副产品制成饲料添加剂，饲喂绒山羊后发现对山羊 T 淋巴细胞转化率具有较好的促进作用，进而提示该饲料添加剂能提高机体的细胞免疫作用。然而，在我们进行的另一项研究中，将该甘草粗提物添加到基础饲料制成药饵投喂鲫鱼后，并未发现对血液淋巴细胞的增殖起很大作用（待发表），提示给药途径的不同可能会对机体产生不同的免疫保护效果。在细胞免疫方面，通常涉及两个问题：一是参与免疫应答的免疫细胞数量，二是免疫细胞的生物活性。在表 1 中，虽然药物组血液白细胞吞噬活性略高于对照组，但并无统计学差异。而也有研究表明，甘草多糖口服制剂和注射制剂在刺激小鼠巨噬细胞吞噬功能方面优于正常对照组^[17]，在饲料中添加适量的甘草素能提高中华鳖稚鳖血液白细胞吞噬活性^[12]。在本实验中，甘草针剂未对免疫器官——脾脏产生影响，药物组脾脏重量指数未发生显著变化（表 2），可能与给药方式、剂量及作用时间等因素有关。

总体来看，鲫鱼腹注该甘草粗提物后，血清溶菌酶活性、血清杀菌活性、血液淋巴细胞计数等免疫参数都有所改善，表明鲫鱼免疫力在一定程度上得到了增强。

参考文献：

[1] 国家中医药管理局科技教育司. 中药药理学[M]. 北京：中国中医药出版社，1997：98

[2] 贺新怀，席孝贤. 甘草对机体免疫功能的影响[J]. 陕西中医函授，1994，2：10—13

[3] 聂小华，尹光耀，史宝军. 甘草有效成分体外抗肿瘤活性和免疫活性的研究[J]. 中药材，2003，26(7)：507—509

[4] 王丽荣，张海棠，刘保国，等. 甘草多糖的提取及其对肉仔鸡生长性能的影响[J]. 饲料工业，2004，25(8)：44—45

[5] 杨英，巴音木仁，白音，等. 甘草浸膏副产品饲料添加剂对阿尔巴斯绒山羊免疫功能及产绒量影响[J]. 中兽医学杂志，2000，1：5—6

[6] 李爱华，王文博，吴玉深，等. 刺五加在水产养殖中的应用[J]. CN ZL02115834.7，2004—10

[7] PARRY R M, CHANDAN R C, SHAHANIK M. A rapid and sensitive assay of muramidase[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine，1965，119：383—386

[8] ANSWORTH A J, RICE C D, XUE L. Immune responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus* (Rafinesque)) after oral or intraperitoneal vaccination with particulate or soluble Edwardsiella ictaluri antigen[J]. Journal of Fish Diseases，1995，18：397—409

[9] RAFIQ M, SARDER I K M D, et al. Immune responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) clones. I. Non-specific responses[J]. Developmental and Comparative Immunology，2001，25：37—46

[10] LI W, ASADA Y, YOSHIKAWA T. Antimicrobial flavonoids from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures[J]. Planta Medica，1998，64：746—747

[11] 徐伯亥，殷战，吴玉深，等. 淡水养殖鱼类暴发性传染病致病细菌的研究[J]. 水生生物学报，1993，17：259—266

[12] 陈超然，陈晓辉，陈昌福. 口服甘草素对中华鳖稚鳖抗嗜水气单胞菌感染的作用[J]. 华中农业大学学报，2000，19(6)：577—580

[13] 昌鸣先，陈孝煊，吴志新，等. 虫草多糖对沼虾的免疫机能的影响[J]. 华中农业大学学报，2001，20(3)：275—278

[14] 罗日祥. 中药活性制剂对中国对虾免疫活性物的诱导作用[J]. 海洋与湖沼，1997，28(6)：573—577

[15] STRANGE R J, SCHRECK C B. Anesthetic and handling stress on survival and cortisol concentration in Yearling Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. Journal of Fisheries Research Board of Canada，1978，35：345—349

[16] 刘霞，谢建新，李艳，等. 甘草多糖免疫功能的研究

- [J]. 中国公共卫生, 2004 20 (5): 572—573
- 胞吞噬功能的影响[J]. 中医药学刊, 2003 21(2): 254—255
- [17] 郑尧, 何景华, 高建华, 等. 甘草多糖对小鼠巨噬细

Effect of Intraperitoneal Injection of Liquorice Extract on the Immunity of Crucian

WANG Wen-bi², LI Xiao-mo, FANG Ping, XIA Lei, QI Chang-bao

(1. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. South China Sea Fisheries Research Institute, the Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 3. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The traditional Chinese medicine—liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) was roughly extracted in this study. Then the extract was dissolved in sterile saline at the doses of 0.5% and 2% to inject crucian (*Carassius auratus*) intraperitoneally, which were subsequently sampled at day 3, 7, 14, 21 and 28 to examine their immune indexes. The results exhibited that the serum lysozyme activity of low dose group showed a higher value than that of control group only at day 14 ($P < 0.05$), and no difference was found at other times. The serum lysozyme activity of high dose group increased and was higher than that of control group at every sampling except for day 3 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Serum bactericidal activity of medicine groups rose at the beginning of the experiment and stopped rising at the middle and end of the experiment, keeping a relatively high level. Furthermore, the increase extent of high dose group was greater than that of low dose group, with the maximum being $(74.9 \pm 18.4)\%$. As to lymphocyte count, the value of low dose group was $(32.8 \pm 8.5) \times 10^6$ lymphocytes per milliliter blood, while that of control group was $(22.2 \pm 4.9) \times 10^6$. A difference between them was shown ($P < 0.01$). The value of high dose group increased and then decreased, with the peak value $(33.1 \pm 10.2) \times 10^6$ appeared at day 14, which was much higher than that of control group ($P < 0.01$). Phagocytic Percent of leucocytes of medicine groups were a little higher than that of control group at every sampling, but there was found a difference between high dose group and control group only at day 21 ($P < 0.05$), and the value was $(45.8 \pm 6.1)\%$ and $(31.5 \pm 5.1)\%$, respectively. As to spleen weight index, there was no difference between medicine groups and control groups at all times. The present study indicated that the immune functions of crucian were enhanced to some extent after injection with this kind of liquorice extract.

Key words: liquorice; extract; intraperitoneal injection; crucian; immunity