

维生素C对胡子鲶 *Claris fuscus* 细胞活性和血清因子的影响*

李桂峰, 钱沛锋, 孙际佳, 郭云贵, 赵典惠
(华南农业大学动物科学学院水产养殖系, 广东 广州 510642)

摘要: 在饲料中分别添加 $w/10^{-3}$ 为 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 维生素 C (V_C)。在饲喂胡子鲶 *Claris fuscus* 的第 12、24、36 和 52 天后, 分别测定血液中白细胞吞噬活性、血清蛋白质质量浓度; 在第 24 天, 测定血液中淋巴细胞活性; 在第 12 天和第 52 天, 测定血清抗蛋白酶物质比活性; 在第 24 天和第 52 天, 测定血清 VC 质量浓度。结果表明, 在饲料添加 V_C 不能提高胡子鲶白细胞的吞噬指数 (PI); 对吞噬能力 (PC) 有影响; 对淋巴细胞活性有明显的增强功能; 血清抗蛋白酶物质比活性基本不受 V_C 的影响; 对血清蛋白质质量浓度有明显的提高作用; 而对血清中 V_C 质量浓度却有明显的降低作用。

关键词: V_C ; 胡子鲶; 细胞活性; 血清因子

中图分类号: S965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 05-0075-05

鱼类非特异性免疫系统在鱼类抵抗病害的侵袭中起着重要的作用。鱼体的屏障结构、吞噬细胞、NK 类细胞、体液与组织中分布的非特异性免疫因子等共同作用, 形成了鱼体非特异性免疫能力^[1]。 V_C 作为鱼类生长必需的营养, 也是一种提高鱼体抗病力、预防病害发生有效的免疫增强剂。国内外许多学者对 V_C 在鱼类细胞免疫和体液免疫的作用做了大量的研究^[2], 许多报道都证实了其对提高非特异性免疫能力的有效性。但 V_C 对胡子鲶 *Claris fuscus* 非特异性免疫能力的影响至今尚未有报道。本文研究了 V_C 对胡子鲶白细胞功能、淋巴细胞功能和体液一些因子的影响, 并探讨了 V_C 对胡子鲶的免疫增强作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料和日常管理

选取体长约 15 cm, 体质量 20~25 g 的胡子鲶, 按在基础饲料中添加 V_C ($w/10^{-3}$) (水产专用, 罗氏有限公司生产, 有效成分为 35%) 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 分成 5 组, 每组 3 个重复, 每组 50 尾鱼。基础料营养组成 ($w/\%$) 为粗蛋白 30.27, 粗纤维 5.20, 钙 0.85, 总磷 1.03, 赖氨酸 1.54, 蛋氨酸 0.43, 蛋+胱 0.76, 粗脂肪 0.47。每天投喂 3 次, 早中晚各 1 次。每天按体质量的 3%~4% 投料。

实验期间水温 25~32℃。

1.2 抗凝血和血清的制作

在实验的第 12、24、36 和 52 天, 尾静脉取血分为 2 份, 1 份加抗凝剂做成抗凝血, 1 份不加抗凝剂, 离心取血清, 分别用于各指标的检测。

1.3 白细胞吞噬活性实验

参照 Salati 等^[3]和 Roy A. Dalmo 等^[4]方法。

取 1 mL 胡子鲶新鲜抗凝血, 4 000 r/min 10 min。吸取两层中间的白细胞层和一部分红细胞层 0.1 mL, 加 0.1 mL 1.0×10^9 个/mL 的甲醛灭活鲁氏不动杆菌^[3]液, 室温下放置 1 h, 期间间隙摇动混合液。吸取混合液制成血涂片, 每组做 9 张, 自然风干, 甲醇固定, 吉姆萨染色, 显微镜下观察, 数 100 个吞噬白细胞。计算吞噬指数 (PI) 和吞噬能力 (PC)。

$PI = (100 \text{ 个具吞噬能力的白细胞中参与吞噬的细胞数} \div 100) \times 100\%$

$PC = (100 \text{ 个具吞噬能力的白细胞中吞噬多于 5 个细菌的细胞数} \div 100) \times 100\%$

1.4 总 T 玫瑰花环实验

参照徐贵卿等^[5]方法。

按常规方法分离血液淋巴细胞, 用 Hanks 调其至 1×10^7 个/mL。取淋巴细胞液 0.1 mL, 加入 0.1 mL 吸收灭活小牛血清和 SRBC (1×10^7 个/mL) 液

* 收稿日期: 2004-12-24

基金项目: 国家科技攻关重点资助项目 (2001BA804A31, 2004BA508B18); 广东省科技攻关资助项目 (2002C20309, 2004A20508001)

作者简介: 李桂峰 (1963 年生), 男, 副教授; E-mail: gfl@scau.edu.cn

0.1 mL, 混匀放室温 (不高于 37 ℃) 作用 5 min 后再离心 5 min 于 4 ℃ 保存过夜。取出后按常规染色和观察计数。数 200 个淋巴细胞, 能结合 3 个以上 SRBC 即为玫瑰花环形成细胞, 计算百分率。

1.5 血清蛋白质质量浓度的测定

采用考马斯亮蓝法^[6]。

1.6 抗蛋白酶物质比活性的测定

参照文献 [7] 的方法。把 PBS 的剂量加大至 4 mL, 其它操作同。以每 mg 蛋白每 min 使胰蛋白酶活力降低的数值表示抗蛋白酶物质的比活性。

计算公式为: $E = \frac{(\Delta A_1 - \Delta A_2)}{30 m}$

式中, m : 血清蛋白质质量浓度; 30: 代表反应时间; 用 PBS 作空白对照 (单位: U/min, 以每 mg 蛋白计)。

1.7 血清 V_c 质量浓度的测定

采用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定, 操作按说明书进行。

V_c 质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$) = $[(A \text{ 样品管} - A \text{ 空白管}) / (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times \text{标准管质量浓度} (6 \mu\text{g/mL}) \times \text{稀释倍数}$ 。

1.8 结果分析

全部数据用 SPSS11.0 进行生物统计学分析。

2 结 果

2.1 V_c 对白细胞吞噬指数的影响

从表 1 可见, 在第 12 天, 只有 $w = 2.0 \times 10^{-3}$ 组的 PI 明显高于对照组 ($P < 0.05$); 第 36 天时, 除 $w = 1.0 \times 10^{-3}$ 组明显高于对照组外, 各实验组与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$); 在第 24 天和第 52 天, 各实验组与对照组相比差异均不显著。

表 1 胡子鲶血液白细胞白吞噬指数¹⁾
Tab.1 Phagocytic index of white blood cell of *Claris fuscus* %

时间	$w/10^{-3}$				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
第 12 天	41.18 ± 3.71 ^a	55.79 ± 0.88 ^a	47.34 ± 9.09 ^{ab}	57.25 ± 7.75 ^a	75.22 ± 3.79 ^c
第 24 天	72.00 ± 11.7	70.95 ± 2.12	69.18 ± 7.75	69.19 ± 0.96	70.68 ± 6.68
第 36 天	40.34 ± 4.51 ^a	46.15 ± 1.47 ^{ab}	53.09 ± 3.55 ^b	47.19 ± 5.50 ^{ab}	48.15 ± 1.15 ^{ab}
第 52 天	35.16 ± 2.03	32.98 ± 2.32	35.50 ± 3.97	38.66 ± 4.78	29.58 ± 4.13

1) a, b, c 表示差异显著性, 字母相同表示差异不显著, 字母不同表示差异显著

2.2 V_c 对白细胞吞噬能力的影响

由图 1 可知, 在第 12 天, $w = 1.0 \times 10^{-3}$ 组和 $w = 2.0 \times 10^{-3}$ 组的 PC 明显高于对照组 ($P < 0.05$)。在第 24 天, 只有 $w = 1.0 \times 10^{-3}$ 组的明显高于对照组 ($P < 0.05$)。第 36 天时, 各实验组的吞噬活力分别为 7.5、7.0、7.13 和 7.9%, 都明显高于对照组 5.5% ($P < 0.05$)。在第 52 天, 除 $w = 1.0 \times 10^{-3}$ 组外, 各实验组均明显高与对照组 ($P < 0.05$)。

2.3 T 淋巴细胞花环实验结果

在第 24 天, 除 $w = 0.5 \times 10^{-3}$ 组外, 其它 3 个实验组的花环形成率都显著高于对照组 (图 4)。

2.4 V_c 对血清蛋白质质量浓度的影响

从图 5 可知, 在第 12、24 和 52 天, 各实验组的血清蛋白质质量浓度都明显高与对照组; 第 36 天, 除 $w = 0.5 \times 10^{-3}$ 组外, 各实验组的蛋白质量浓度都明显高于对照组 ($P < 0.05$)。

2.5 V_c 对血清抗蛋白酶物质比活性的影响

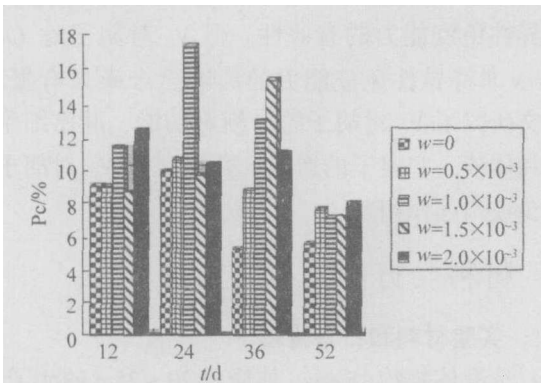


图 1 胡子鲶血液白细胞的吞噬能力
Fig.1 Phagocytic capabilities of white blood cell of *Claris fuscus*

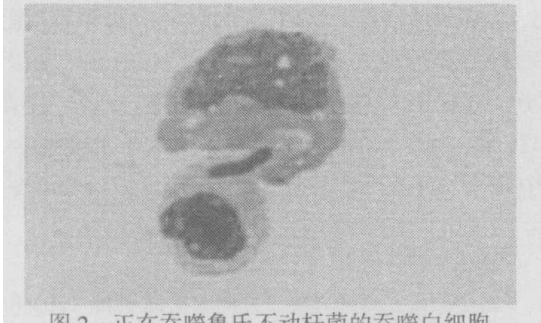


图 2 正在吞噬鲁氏不动杆菌的吞噬白细胞
Fig.2 The phagocytic white blood cell of swallowing of *Acinetobacter lwoffii*

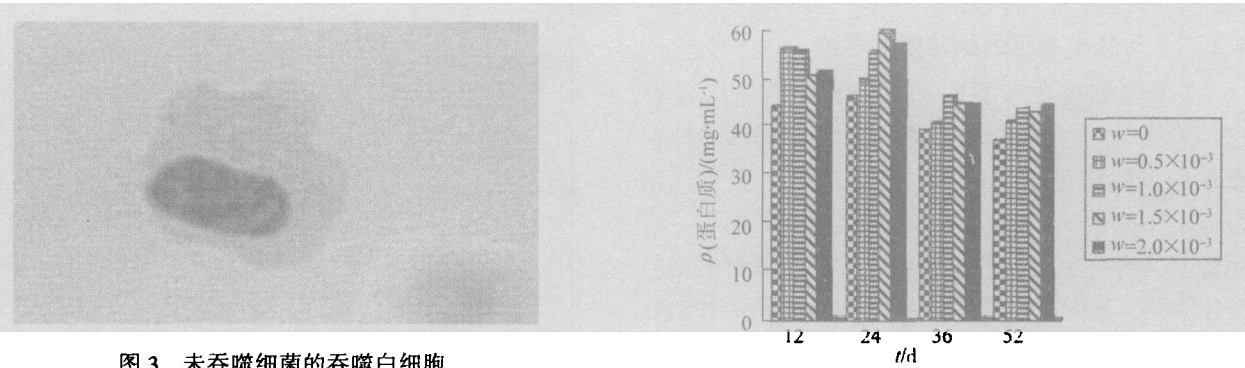


图 3 未吞噬细菌的吞噬白细胞

Fig.3 The phagocytic white blood cell of not swallowing of *Acinetobacter lwoffii*

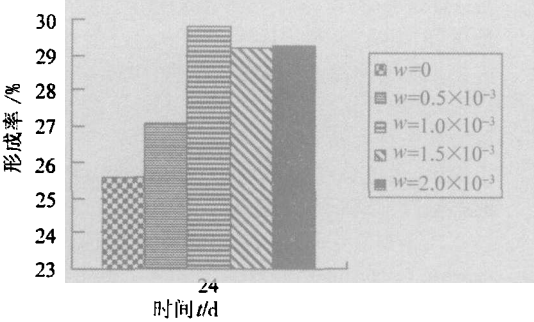


图 4 胡子鲶 T 淋巴细胞花环形成率

Fig.4 The percentage of erythrocyte active rosette of T lymphocyte of *Claris fuscus*

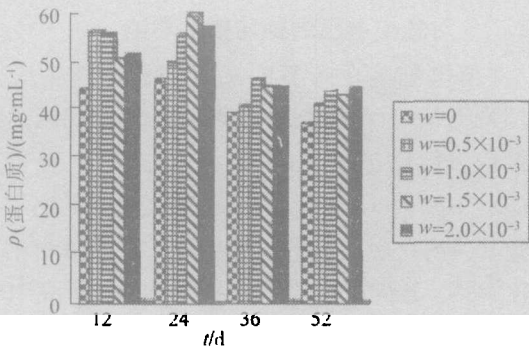


图 5 胡子鲶血清蛋白质质量浓度

Fig.5 Protein contents in the serum of *Claris fuscus*

表 2 显示，在第 12 天，除 $w = 2.0 \times 10^{-3}$ 的抗蛋白酶物质比活性明显高于对照组外，其它实验组的数值与对照组差异不显著；在第 52 天， $w = 2.0 \times 10^{-3}$ 组的数值最大，但各组之间的数值差异不显著。

2.6 V_C 对血清中 V_C 质量浓度的影响

表 3 显示，第 24 天时，除 $w = 2.0 \times 10^{-3}$ 组血清中 V_C 质量浓度明显低于对照 ($P < 0.05$) 外，各组之间的数值差异不显著；在第 52 天，各实验组血清中 V_C 质量浓度明显低于对照组。

表 2 胡子鲶血清抗蛋白酶物质的比活性¹⁾

Tab.2 Specific activities of antiprotease in serum of *Claris fuscus*

$w/10^{-3}$	0	0.5	1.0	1.5	2.0
第 12 天	1.87 ± 0.32^a	2.25 ± 0.38^a	1.90 ± 0.40^a	2.06 ± 0.31^a	3.88 ± 0.49^b
第 52 天	2.46 ± 0.44	2.48 ± 0.36	2.55 ± 0.40	2.68 ± 0.53	3.43 ± 0.60

1)以每 mg 蛋白计;a,b 表示差异显著性,字母相同表示差异不显著,字母不同表示差异显著

表 3 胡子鲶血清 V_C 质量浓度¹⁾

Tab.3 Vitamin C contents in the serum of *Claris fuscus*

$w/10^{-3}$	0	0.5	1.0	1.5	2.0
第 24 天	7.91 ± 0.06^a	8.08 ± 0.11^a	7.90 ± 0.01^a	8.22 ± 0.18^a	5.30 ± 0.06^b
第 52 天	13.63 ± 0.33^a	8.70 ± 0.13^{bc}	10.24 ± 0.17^c	8.99 ± 0.17^{bd}	8.31 ± 0.15^c

1)a,b,c,d,e 表示差异显著性,字母相同表示差异不显著,字母不同表示差异显著

3 讨 论

3.1 V_C 对鱼类吞噬细胞功能的影响

有关 V_C 对鱼类白细胞吞噬活性的研究结果报道不一。Y. LI and R.T. Lovell^[8] 研究表明海鲶鱼摄入含有不同剂量 V_C 的日粮后，吞噬细胞的吞噬指数 (PI) 明显高于无添加组，而吞噬百分数 (PP) 却不受 V_C 的影响。Roberts 等^[9] 对比目鱼、Verlhav 等(1998)对虹鳟的研究也表明，高 w (V_C) ($> 2.0 \times 10^{-3}$) 能明显增强鱼体吞噬细胞的吞噬活力。但也有许多研究结果表明 V_C 与吞噬细胞的吞噬作用

无关。如石斑鱼饵料中添加 w 为 $0.5 \times 10^{-3} \sim 2.0 \times 10^{-3}$ 的 V_C ，其鱼体内的血液白细胞组成、白细胞吞噬活力和头肾白细胞活力均不受 V_C 的影响^[10]。美洲河鲶对爱德华氏菌的吞噬活性不受 V_C 的影响^[8]。有关 V_C 对吞噬细胞功能影响的研究结果不同，与 V_C 添加量、鱼种和不同环境条件等因素有关。本研究发现胡子鲶血液白细胞吞噬指数不受 V_C 的影响，而对其吞噬能力有影响。这说明 V_C 只能提高胡子鲶血液中个别吞噬细胞的吞噬活性，而对吞噬细胞功能的总体水平提高无作用。

3.2 V_C 对鱼类淋巴细胞功能的影响

T淋巴细胞在鱼类的头肾和外周血中大量存在。关于 V_C 对鱼类淋巴细胞功能的影响国内外曾有报道,但结果不尽一致。Hardie等^[11]报道,用 2.750×10^{-3} 高 $w(V_C)$ 饲喂鲑鱼26个星期后,能刺激其体内巨噬细胞的活化因子,导致淋巴细胞的分化增殖。Hardie在对虹鳟注射 V_C 的研究中也发现同样的结果,淋巴细胞增殖明显高于无添加组,而且巨噬细胞的活化因子(MAF)的分泌也比添加量较少的组要高得多^[12]。但是T Wahli等^[13]在研究混合使用 V_C 和 V_E 对虹鳟免疫和抗病力的影响中发现,单独使用 $w = 2.0 \times 10^{-3} V_C$ 对鱼体的淋巴细胞增殖无效,而混合 $w = 2.0 \times 10^{-3} V_C$ 和 $w = 0.8 \times 10^{-3} V_E$ 却明显提高淋巴细胞的增殖。 V_C 对胡子鲶血液中T淋巴细胞活性有明显的促进作用,但并非 V_C 剂量越高其有效性越好。

3.3 V_C 对血清其它因子的影响

血清蛋白质质量浓度也可以间接反映鱼体免疫水平的高低,这与血清中免疫相关酶活性的提高有关。刘栋辉等^[14]研究发现 V_C 能明显提高斑节对虾血清蛋白质水平。本研究结果显示, V_C 能有效提高胡子鲶血清蛋白质质量浓度,添加的 V_C 剂量与体内的 V_C 质量浓度有一定的关系。与刘栋辉的结论较一致。王道尊等^[15]报道异育银鲫血浆的 V_C 质量浓度随饲料中的添加的 V_C 量增加而上升。J.Ortunxo等^[16]在金头鲷上也发现了饲料中 V_C 量与鱼体血清 V_C 量呈正相关的类似结果。但王道尊^[17]的又一报道却显示,青鱼组织的 V_C 质量浓度不受添加 V_C 的剂量的影响。本研究结果发现胡子鲶体内 V_C 质量浓度与饲料的 V_C 添加量有成反比的趋势,与以上两种结论有所不同。出现这种结果与 V_C 是水溶性Vit,不能在鱼体内储存有关,并且高质量浓度的 V_C 添加量对鱼体吸收 V_C 功能有抑制的作用。关于 V_C 对鱼体抗蛋白酶物质比活性的研究国内未见报道,王宏田^[7]研究发现重组酵母菌能明显提高牙鲆血清抗蛋白酶物质的活性。而本研究却发现除 2.0×10^{-3} 高质量分数 V_C 有作用外,其它质量浓度对其无任何影响,这与鱼体本身和所研究的添加物不同有关。

参考文献:

- [1] 聂品. 鱼类非特异性免疫研究的新进展[J]. 水产学报, 1997, 21(1): 69-73.
- [2] SAKAI M. Immunostimulants used in fish research[J]. Aquaculture, 172: 63-72.
- [3] SALATI F, IKEDA Y, KUSUDA R. Effect of Edwardsiella tarda lipopoly saccharida immunization on phagocytosis in the eel[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1987, 53(2): 201-204.
- [4] DALMO RA, SELJELID R. The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulphated laminaran [$\beta(1,3)$ -D-glucan] on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., macrophages in vitro[J]. Journal of Fish Diseases, 1995, 18: 175-185.
- [5] 徐贵卿, 王学忠. 利用玫瑰花环实验对鸡外周血液T、B淋巴细胞的检测[J]. 畜牧与兽医, 1984(6): 160-162.
- [6] 周建新. 现代医学生物学实验基础教程[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2001: 32-34.
- [7] 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[J]. 2000, 31(60): 631-635.
- [8] LI Y, LOVELL R T. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish[J]. American Institute of Nutrition, 1985: 123-130.
- [9] ROBERTS M L, DAVIES S J, PULSFORD A L. The influence of ascorbic acid on non-specific immunity in the turbot (*Scophthalmus maximus* L.)[J]. Fish Shellfish Immunol, 1995, 5: 27-38.
- [10] 秦启伟, 吴灶和, 周永灿, 等. 饲料维生素C对青石斑鱼的非特异性免疫调节作用[J]. 热带海洋, 2000, 19(1): 58-63.
- [11] HARDIE L J, FLETCHER T C, SECOMBES C J. The effect of dietary Vitamin C on immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. Aquaculture, 1991, 95: 201-214.
- [12] 石军, 陈安国, 张云刚. 维生素C对水产动物免疫促进作用的机理[J]. 中国饲料, 2002(19): 22-23.
- [13] WAHLI T, VERLHAC V, GABAUDAN J, et. al., Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J]. Journal of Fish Disease, 1998, 21: 127-137.
- [14] 刘栋辉, 阳会军, 刘永坚. β -葡聚糖和维生素C对斑节对虾生长和抗病力的效果[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2002, 41(4): 59-62.
- [15] 王道尊, 冷响军. 异育银鲫对维生素C需要量的研究[J]. 上海水产学报, 1996(5): 240-245.
- [16] ORTUNXO J, ESTEBAN M A, MESEGUER J. Effect of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9: 429-443.
- [17] 王道尊, 陈琳. 青鱼对抗坏血酸-2-硫酸酯吸收利用性能的利用[J]. 水产科技情报, 1996, 23(4): 151-158.

(下转第83页)

that of control. Meanwhile, the percentage of CD^{+4} T cells was greatly increased, while the percentage of CD^{+8} T cells has not been influenced, which results in improvement of the CD^{+4} T/ CD^{+8} T ratio, contributing to the immunity re-equilibrium of tumor-bearing mice. Therefore, *Ganoderma* Mycelium Alkaline Extraction directly stimulate the proliferation of murine spleen lymphocytes and the phagocytosis of peritoneal macrophages both in vitro and in vivo, but the efficiency depends on dosages and treatment duration.

Key words: *Ganoderma* Mycelium; spleen cells; macrophage; T-lymphoid cells

(上接第 78 页)

Effects of Vitamin C on Cellular Activities and Serum Factors of *Claris fuscus*

LI Gui-feng, QIAN Pei-feng, SUN Ji-jia, GUO Yun-gui, ZHAO Dian-hui

(Faculty of Aquaculture, College of Amino Science, SCAU, Guangzhou 510642, China)

Abstract: *Clarias fuscus* were fed with diets containing 0 (control) 500, 1000, 1500 and 2000 mg/kg vitamins C for 12, 24, 36 or 52 days. The leucocyte phagocytic activities and the serum protein contents were evaluated respectively at each one of the assayed times. Meanwhile, the lymphocyte activities at day 24, the antiprotease activities at day 12 and 52, and the serum vitamin C levels at day 24 and 52 were also examined respectively. The results demonstrate that vitamin C could enhance the phagocytic activities slightly, stimulate obviously T lymphocyte activities but the effect was not therefore directly dose-dependent, and also effectively increase the serum protein contents of fish. However, the phagocytic index was not affected. The serum vitamin C levels of fish were inversely proportional to the doses of vitamin C and the antiprotease activities were not affected by vitamin C.

Key words: vitamin C; *Claris fuscus*; cellular activities; serum factors