

增强草鱼免疫功能的复方中草药免疫增强剂筛选^①

李超¹, 张其中^{1,2}, 朱成科¹,
陈霞¹, 李春涛¹, 王志坚¹, 罗芬³

1. 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 水产科学重庆市市级重点实验室, 淡水生物生殖与发育教育部重点实验室, 西南大学 生命科学学院, 重庆 400715;
2. 暨南大学 水生生物研究所, 广州 510632;
3. 宁德师范高等专科学校 生物系, 福建 宁德 352100

摘要: 选取 920 尾草鱼, 平均体质量为(62.15±9.78) g, 随机分成 4 个组, 每组 230 尾鱼, 其中 1 个对照组(投喂基础饲料), 3 个试验组(投喂含中草药免疫增强剂的饲料: 基础饲料中分别添加 20 g/kg 中草药免疫增强剂 1(T₁), 2(T₂)和 3(T₃)). 每组分别在第 0,7,14,21 和 28 d 采样测定免疫指标, 饲养 30 d 后进行人工感染试验. 结果表明各试验组较对照组在吞噬细胞吞噬活力、血清溶菌活力、血清抗菌活力、血清超氧化物歧化酶(SOD)活力和血清过氧化物酶(POD)活力方面均显著升高($p<0.05$). T₁组、T₂组和 T₃组抗多子小瓜虫感染的免疫保护率分别为 0, 100%±0.00%和 42.50%±6.61%. T₁组、T₂组和 T₃组对注射嗜水气单胞菌的免疫保护率分别为 15.37%±8.36%, 78.43%±8.77%和 63.06%±3.37%. 研究表明在基础饲料中添加 2%复方 2 可显著提高草鱼的免疫功能和抗病力($p<0.05$), 在 3 种试验复方中效果最佳, 在生产中有应用价值.

关键词: 中草药免疫增强剂; 草鱼; 免疫指标

中图分类号: Q959.46+8

文献标志码: A

随着水产养殖集约化程度的提高, 鱼类病害频繁发生, 严重阻碍水产养殖业的健康发展, 因此病害防治始终贯穿着水产养殖业的始终. 防治水产病害主要有 2 条途径, 即药物防治和免疫预防. 前者一直是病害控制的主要措施, 但因其残留影响食品安全, 同时也造成环境污染, 应用逐步受到限制^[1]; 后者有 2 种方式, 即用免疫疫苗预防特定疾病和用免疫增强剂全面提高鱼类免疫力预防各种疾病发生. 目前可以应用的疫苗种类非常有限, 无法满足预防疾病的需要, 而免疫增强剂在养殖周期中能避免药物对水环境的污染, 保障水产品质量安全, 越来越受到水产界的欢迎^[2]. 所以, 免疫增强剂是现代水产养殖业中不可缺少的防控疾病的饲料添加产品.

中草药毒副作用小, 易分解, 无残留, 无致癌、致畸、致突变作用, 已在我国人、畜和禽上使用多年, 效果显著^[3-5]. 目前有少量研究显示, 中草药确实能增强鱼类细胞免疫和体液免疫, 从而增强其抗病力^[6-7]. 这些工作说明中草药免疫增强剂在鱼类养殖上具有巨大的应用前景.

草鱼 *Ctenopharyngodon idellus* 是中国重要的养殖经济鱼类^[8], 病害日益严重, 而目前还没有一个针对草鱼疾病的疫苗被批准使用, 为了预防疾病发生, 筛选对草鱼抗病的中草药免疫增强剂迫在眉睫.

① 收稿日期: 2010-11-23

基金项目: 重庆市科技攻关计划资助项目(CSTC2010AC1116), 广东省海洋与渔业局科技推广资助项目(A200899H02, A200901H02), 广州市科技支撑计划资助项目(2008Z1-E141).

作者简介: 李超(1985-), 男, 四川资中人, 硕士研究生, 主要从事水生动物免疫学研究.
通信作者: 张其中, 教授.

1 材料与方法

1.1 试验用鱼及饲养管理

试验用草鱼初始体质量为(62.15±9.78) g, 体质健康, 购于重庆北碚歇马养殖场. 试验开始前用基础饲料驯养草鱼 2 周, 以适应环境和试验饲料. 试验开始后, 每天于 8:00 和 17:00 投喂 2 次, 每次投喂量为鱼体质量的 2%~3%, 并根据生长和摄食情况作调整. 每天于 9:00 和 18:00 换水 2 次, 换水同时吸污. 无小瓜虫源的水泥池(长×宽×高=5 m×2.5 m×1 m) 24 h 不间断充气. 养殖期间水温为 22~24 °C, pH 值为 7.6±0.5, 溶解氧为 6.7~7.4 mg/L. 饲养时间为 30 d.

1.2 中草药免疫增强剂的制备

各配方组成见表 1, 各配方中每味优质中草药在 60 °C 烘箱中干燥后称取 5 g(2 次质量误差范围在 1%~5%之间), 先用 800 mL 蒸馏水浸泡 30 min, 再煮沸 20 min, 最后文火煎熬 30 min, 药物经 3 次煎熬、合并、浓缩至所需要体积(200 mL 单位体积的原药质量为 0.25 g/mL), 放入 4 °C 冰箱待用.

表 1 各复方的中草药组成种类

复方 1			复方 2			复方 3		
植物名称	科名	供试部位	植物名称	科名	供试部位	植物名称	科名	供试部位
黄芪 <i>Astragalus membranaceus</i>	豆科	根	黄芪 <i>Astragalus membranaceus</i>	豆科	根	黄芪 <i>Astragalus membranaceus</i>	豆科	根
黄芩 <i>Scutellaria baicalensis</i>	唇形科	根	大蒜 <i>Allium sativum</i>	百合科	鳞茎	灵芝 <i>Ganoderma lucidum</i>	多孔菌科	全株
山楂 <i>Crataegus pinnatifide</i>	蔷薇科	果实	山楂 <i>Crataegus pinnatifide</i>	蔷薇科	果实	山楂 <i>Crataegus pinnatifide</i>	蔷薇科	果实
党参 <i>Radix Codonopsis</i>	桔梗科	根	芦荟 <i>Aloe barbadensis</i>	独尾草科	茎	枸杞 <i>Lycium chinense</i>	茄科	果实
茯苓 <i>Poria cocos</i>	多孔菌科	菌核	白术 <i>Atractylodes maerocephala</i>	菊科	根、茎	淫羊藿 <i>Epimedium brevicornum</i>	小檗科	茎、叶
板蓝根 <i>Isatis indigotica</i>	爵床科	根、茎	板蓝根 <i>Isatis indigotica</i>	爵床科	根、茎	鱼腥草 <i>Houttuynia cordata</i>	三白草科	茎、叶
大黄 <i>Rheum palmatum</i>	蓼科	根、茎	金银花 <i>Lonicera japonica</i>	忍冬科	花	五加皮 <i>Acanthopanax gracilistylus</i>	五加科	根皮
甘草 <i>Glycyrrhiza glabra</i>	豆科	根、茎	当归 <i>Angelica sinensis</i>	伞形科	根	甜橙皮 <i>Citrus aurantium</i>	芸香科	果实皮
淫羊藿 <i>Epimedium brevicornum</i>	小檗科	茎、叶	菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	菊科	花	菊花 <i>Chrysanthemum morifolium</i>	菊科	花
乌梅 <i>Fructus mume</i>	蔷薇科	果实	桑枝 <i>Mamulus mori</i>	桑科	茎	丹参 <i>Salviae milnorrhizae</i>	唇形科	根、茎

1.3 试验药饵饲料制备

以“通威 152 浮性饲料”为基础饲料, 将制备好的中草药免疫增强剂用喷壶均匀喷洒在饲料颗粒上, 放在 30 °C 烘箱中风干, 以备. 各组功能饲料的成分组成见表 2.

表 2 各组功能饲料的成分组成

组别	基础饲料/g	中草药免疫增强剂/mL
对照组	2 500	—
T ₁ 组	2 500	复方 1 汁剂(200)
T ₂ 组	2 500	复方 2 汁剂(200)
T ₃ 组	2 500	复方 3 汁剂(200)

1.4 病原体的准备

1.4.1 嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 活菌液的制备

将嗜水气单胞菌接种于普通肉汤固体培养基(牛肉膏 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 5.0 g、K₂HPO₄

0.8 g, 琼脂粉 20 g、加蒸馏水至 1000 mL, pH=7.2), 28 °C 培养 24 h, 用无菌生理盐水洗脱菌苔, 参照麦氏比浊法^[9]测定细菌体积单位, 置于 4 °C 冷藏备用。

1.4.2 多子小瓜虫 *Ichthyophthirius multifiliis* 成虫的收集和幼虫的培养

从严重感染多子小瓜虫的草鱼体表刮下小瓜虫成虫于培养皿中, 用吸管吸取成虫置另一盛干净蒸馏水的培养皿中, 在 23 °C 下培养 20 h, 吸取感染性幼虫^[10], 离心浓缩, 并参照文献^[11]用蒸馏水把幼虫体积单位调整为 2 000 个/mL(现收集现用, 以免影响幼虫感染活力)。

1.5 试验设计

920 尾健康草鱼被随机分为 4 组, 其中 1 个对照组, 每组 230 尾鱼。组间鱼体质量差异不具有统计学意义($p>0.05$)。驯化 2 周后, 第 3 周开始对照组继续用基础饲料喂养, 其余 3 组分别用添加 2%(中草药占饲料的重量百分比)不同配方中草药免疫增强剂的饲料喂养, 每组分别在第 0, 7, 14, 21, 28 天随机取 6 尾供试鱼, 测定免疫指标。喂养至第 30 天, 将每组剩余的鱼分别随机分成 6 个平行组, 每组 30 尾, 进行多子小瓜虫(3 个平行重复组)和嗜水气单胞菌(另 3 个平行重复组)人工感染试验。

1.6 免疫功能测定

1.6.1 吞噬功能测定

从草鱼尾静脉无菌采血, 用肝素钠抗凝。参照罗琳等^[12]的方法处理, 染色后在 Nikon ECLIPSE 80i 显微镜 1 000 倍油镜下观察, 计数 100 个吞噬细胞, 记录结果。

按下式计算吞噬百分比(Phagocytosis percentage, PP)和吞噬指数(Phagocytic index, PI)。

$$PP = (N_{100}/100) \times 100\%, \quad PI = N_1/N_2$$

式中, N_{100} 指 100 个吞噬细胞中参与吞噬的细胞数; N_1 指被吞噬的细胞总数; N_2 指参与吞噬的吞噬细胞数。

1.6.2 溶菌酶活力测定

以溶壁微球菌 *Micrococcus lysodeikticus* 冻干粉(sigma M0508)为底物, 用 0.1 mol/L, pH=6.2 的磷酸盐缓冲液(PBS)配成一定体积分数的底物菌悬液($OD_{570} \approx 0.3$)。参照朱忠勇^[13]的方法, 取 3 mL 底物菌悬液与 50 μ L 待测血清于试管中混合, 测其在 570 nm 处的 OD 值(A_0)。然后将试液移入 37 °C 水浴中保温 30 min, 取出后立即置于冰浴中 10 min, 终止反应, 测其在 570 nm 处的 OD 值(A)。溶菌酶活力按下式计算:

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

1.6.3 抗菌活力测定

用 0.1 mol/L, pH=6.4 的磷酸钾盐缓冲液制备大肠杆菌菌悬液, 先取 3 mL 该悬液 ($OD_{570} = 0.3 \sim 0.5$) 于试管内冰浴, 再分别加入 50 μ L 草鱼抗凝血混匀, 测其在 570 nm 处的 OD 值(A_0)。然后将试液移入 37 °C 温育 30 min, 取出后立刻放入冰箱(4 °C)10 min, 终止反应, 测其在 570 nm 处的 OD 值(A)^[14]。重复测量 10 次。

抗菌活力按下式计算:

$$U_a = \sqrt{\frac{A_0 - A}{A}}$$

1.6.4 超氧化物歧化酶(SOD)活力测定

超氧化物歧化酶(SOD)活力用南京建成生物工程研究所 SOD 试剂盒(测总)测定。

1.6.5 过氧化物酶(POD)活力测定

在 96 孔酶标板中加入血清(20 μ L/孔), 然后加入 180 μ L 显色缓冲液(7.3 g 一水柠檬酸, 11.86 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 定容至 1 000 mL), 置于酶标仪中, 读取 490 nm 处的 OD 值(A_0)。再向样品所在孔中加 20 μ L 显色液(4 mg 邻苯二胺, 4 μ L 30% H_2O_2 , 配成 10 mL 显色液), 摇匀后放入酶标仪中, 避光显色 15 min, 读取 490 nm 处的 OD 值(A_1)。血清 POD 的活力以 $A_{POD} = A_1 - A_0$ 计算^[14]。

1.7 人工感染试验

1.7.1 感染多子小瓜虫

在盛有 20 L 水的白色桶中(充气), 每组 30 尾鱼用体积单位为 2 000 个/mL 多子小瓜虫感染性幼虫

50 mL 人工感染 1 h, 再将鱼连同感染用水一起倒入无小瓜虫源的玻璃缸(长×宽×高=60 cm×42 cm×34 cm)中饲养, 每天记录各组死亡鱼数, 观察症状, 确认死因^[15], 直到连续 7 d 均无死亡情况为止. 计算每天的累积死亡率和最终的免疫保护率(Relative percentage survival, RPS).

1.7.2 感染嗜水气单胞菌

180 尾健康草鱼被随机分成 6 组, 5 个试验组和 1 个对照组, 每组 30 尾. 5 个试验组每尾健康鱼腹腔分别注射体积单位为 1.0×10^5 CFU/mL, 1.0×10^6 CFU/mL, 1.0×10^7 CFU/mL, 1.0×10^8 CFU/mL 和 1.0×10^9 CFU/mL 的嗜水气单胞菌 *A. hydrophila* 活菌液 0.2 mL^[16], 对照组每尾健康鱼注射 0.2 mL 0.65% 无菌生理盐水. 根据改良寇氏法^[17]计算 10 d 的半致死值 LD₅₀. 然后参考半致死值确定各组每尾试验鱼腹腔注射体积单位均为 8.2×10^7 CFU/mL 的嗜水气单胞菌活菌液 0.2 mL, 每天记录各组死亡鱼数, 解剖检查死亡鱼, 分离细菌, 确认死因^[18], 直到连续 7 d 均无死亡情况为止. 计算每天的累积死亡率和最终的免疫保护率(RPS).

死亡率 = [(试验初鱼数 - 试验结束鱼数) / 试验初鱼数] × 100%

免疫保护率 = [(对照组死亡率 - 试验组死亡率) / 对照组死亡率] × 100%

1.8 数据处理

数据以平均值±标准差(X±SD)表示, 用 SPSS17.0 软件包进行显著性检验.

2 试验结果

2.1 对草鱼吞噬细胞吞噬活力的影响

投喂中草药免疫增强剂后, 草鱼吞噬细胞吞噬功能显著提高, 表现为吞噬细胞的吞噬百分比和吞噬指数上升. 吞噬百分比和吞噬指数在第 7 天到第 28 天各试验组都显著高于对照组 ($p < 0.05$), 第 14 天各试验组的吞噬百分比和吞噬指数都达到最大值, 并且 T₂ 组效果最显著, 其次是 T₃ 组(图 1、图 2).

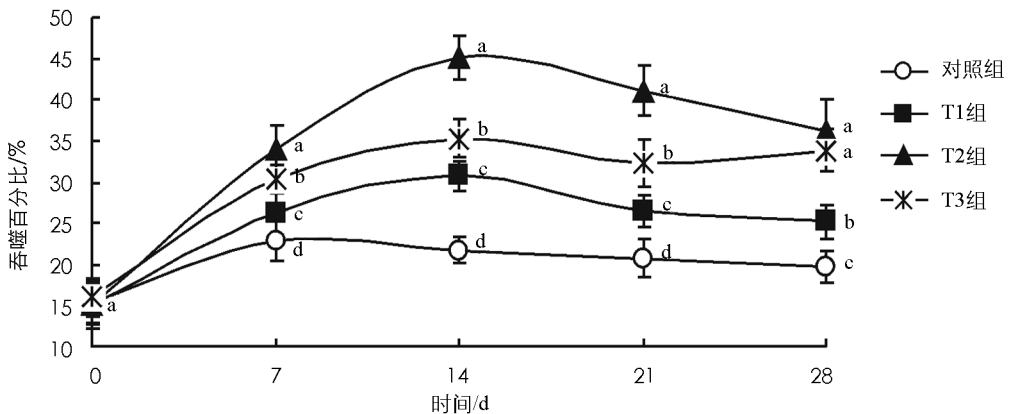


图 1 草鱼吞噬细胞的吞噬百分比

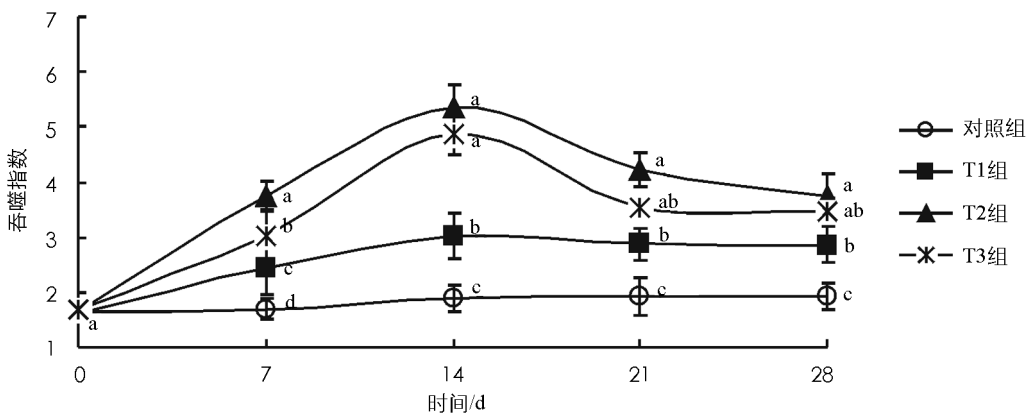


图 2 草鱼吞噬细胞的吞噬指数

2.2 对草鱼血清溶菌活力的影响

饲料中添加中草药免疫增强剂投喂草鱼,各试验组血清溶菌活力在第14天显著高于对照组2倍以上($p < 0.05$).试验组间差异不具有统计学意义.在其余时间点,各试验组与对照间差异不具有统计学意义(图3).总体变化趋势是先升高后下降, T_1 组血清溶菌活力为0.274~0.693 U/mL, T_2 组为0.309~0.737 U/mL, T_3 组为0.309~0.635 U/mL.

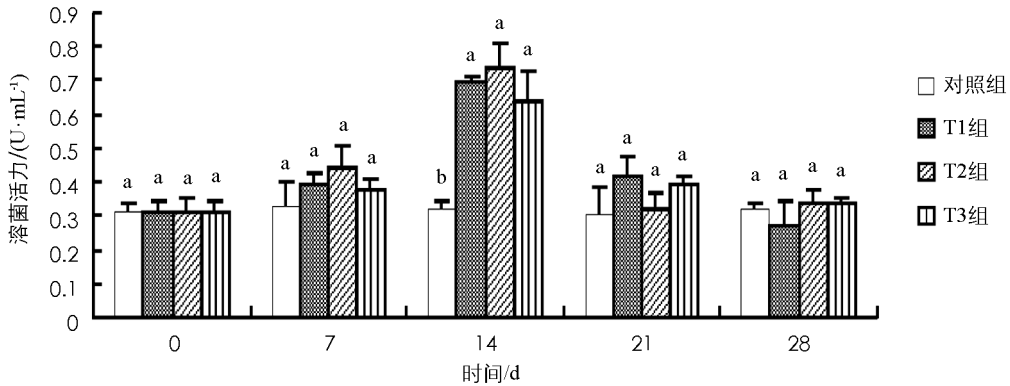


图3 草鱼血清溶菌活力

2.3 对草鱼血清抗菌活力的影响

饲料中添加中草药免疫增强剂的草鱼,其血清抗菌活力在第14天时 T_2 组和 T_3 组显著高于对照组($p < 0.05$),且 T_3 组显著高于 T_2 组,效果最好,而 T_1 组与对照间差异不具有统计学意义,其余各时间点试验组间及其与对照间差异均不具有统计学意义(图4).总体变化趋势是先下降后上升再下降. T_1 组血清抗菌活力为0.0829~0.1945 U/mL, T_2 组血清抗菌活力为0.1121~0.2575 U/mL, T_3 组血清抗菌活力为0.0734~0.3453 U/mL,3组血清抗菌活力均有显著性变化($p < 0.05$).

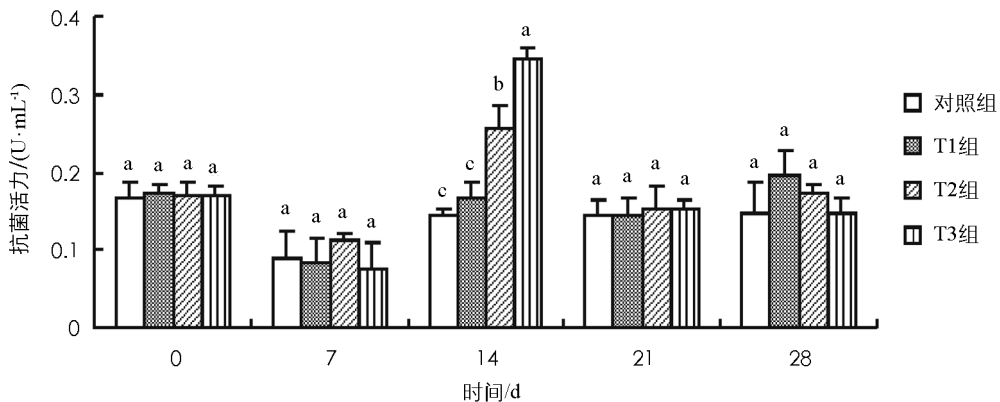


图4 草鱼血清抗菌活力

2.4 对草鱼血清超氧化物歧化酶(SOD)活力的影响

饲料中添加中草药免疫增强剂的草鱼血清超氧化物歧化酶(SOD)活力在除第0天和第7天外的其余时间点显著高于对照(图5).第14天 T_1 和 T_3 组显著高于对照($p < 0.05$),而 T_2 组与对照间差异不具有统计学意义.第21天 T_2 和 T_3 组显著高于对照组($p < 0.05$),而 T_1 组与对照间差异不具有统计学意义($p > 0.05$).第28天 T_1 和 T_2 组显著高于对照组($p < 0.05$),而 T_3 组与对照间差异不具有统计学意义.试验期间,对照组SOD活力为64.04~92.46 U/mL. T_1 组SOD活力为70.38~114.61 U/mL, T_2 组为70.38~114.53 U/mL, T_3 组为70.38~103.1 U/mL.

2.5 对草鱼血清过氧化物酶(POD)活力的影响

饲料中添加中草药免疫增强剂的草鱼血清过氧化物酶(POD)活力,仅 T_3 组在第21天显著高于对照组($p < 0.05$),在第28天显著高于对照、 T_1 和 T_2 组($p < 0.05$),而 T_1 和 T_2 组在28d的试验中,与对照间

差异均不具有统计学意义(图 6). 试验期间, 对照组 POD 活力为 0.190~0.459 U/mL, T₁ 组为 0.226~0.480 U/mL, T₂ 组为 0.209~0.565 U/mL, T₃ 组为 0.325~0.565 U/mL.

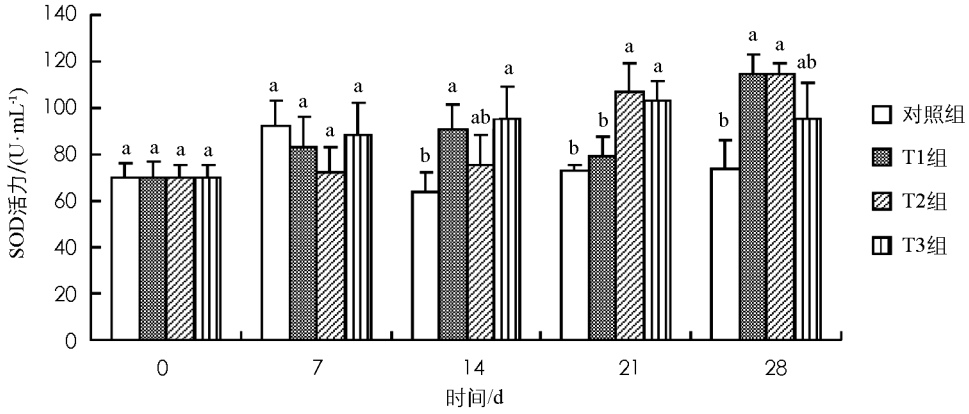


图 5 草鱼血清超氧化物歧化酶(SOD)活力

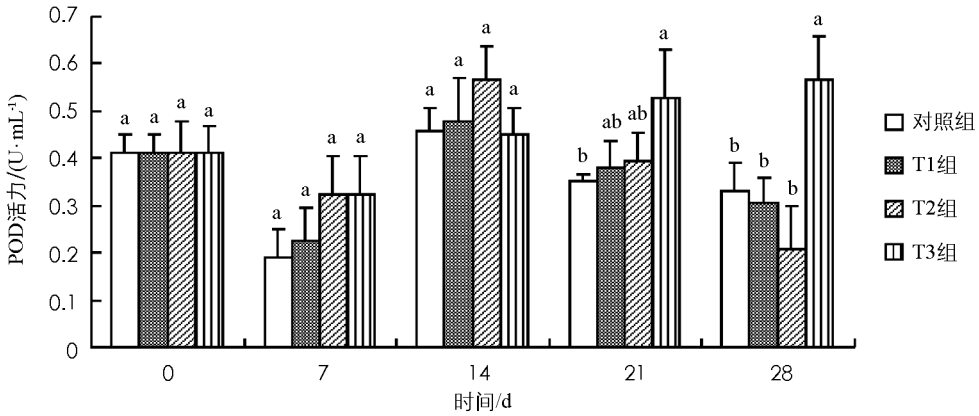


图 6 草鱼血清过氧化物酶(POD)活力

2.6 嗜水气单胞菌对健康草鱼的人工感染实验结果

根据嗜水气单胞菌对健康草鱼的人工感染实验结果(表 3), 参照改良寇氏法^[17]计算出 10 d 的半致死值 LD₅₀ 为 1.1×10⁷ CFU/mL.

表 3 嗜水气单胞菌对健康草鱼的人工感染实验结果

分组	菌液体积单位 (CFU·mL ⁻¹)	剂量 /mL	鱼数 /尾	感染 10 d 内每日死亡尾数						死亡总数	死亡率 /%	
				1	2	3	4	5	6			10
1	1.0×10 ⁹	0.2	30	6	20	4	0	0	0	0	30	100.0
2	1.0×10 ⁸	0.2	30	4	15	8	1	0	0	0	28	93.3
3	1.0×10 ⁷	0.2	30	2	3	2	1	1	0	0	9	30.0
4	1.0×10 ⁶	0.2	30	0	2	3	0	0	0	0	5	16.7
5	1.0×10 ⁵	0.2	30	0	2	0	0	0	0	0	2	6.7
对照	0.65% NaCl	0.2	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.7 饲喂中草药免疫增强剂的草鱼对人工感染病原的抵抗效果

饲喂草鱼中草药免疫增强剂 30 d, 感染嗜水气单胞菌 17 d 后, T₁ 组、T₂ 组和 T₃ 组的累积死亡率分别为 76.67%, 20% 和 33.33%, 其中 T₂ 组和 T₃ 组的累积死亡率极显著低于对照组(90%) ($p < 0.01$), T₁ 组、T₂ 组和 T₃ 组的免疫保护率分别为 15.37%, 78.43% 和 63.06% (图 7). 感染小瓜虫 18 d 后, T₁ 组、T₂ 组和 T₃ 组的累积死亡率分别为 100%, 0 和 53.33%, 其中 T₂ 组和 T₃ 组的累积死亡率极显著低于对照组(93.33%) ($p < 0.01$), T₁ 组、T₂ 组和 T₃ 组的免疫保护率分别为 0, 100% 和 42.50% (图 8).

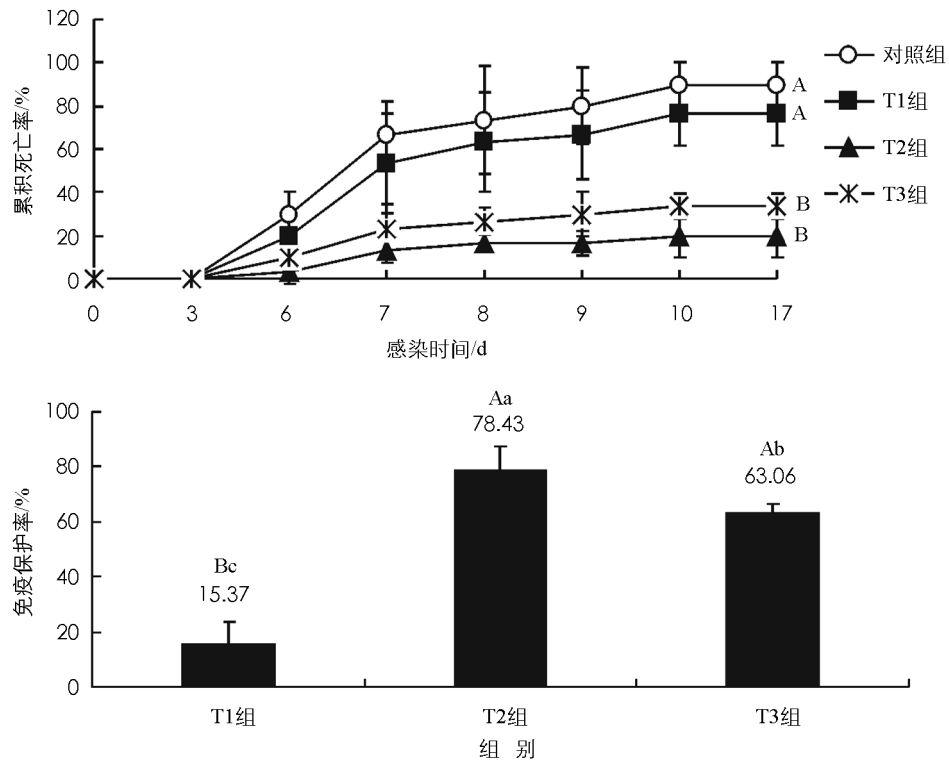


图 7 用嗜水气单胞菌攻毒后的草鱼累积死亡率和免疫保护率

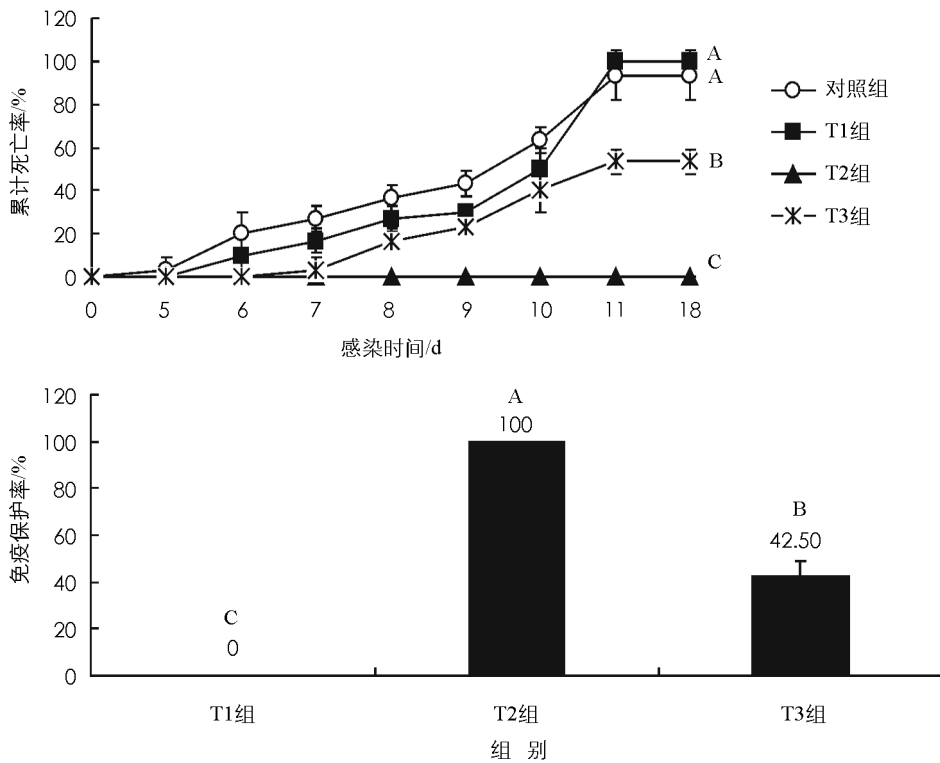


图 8 用小瓜虫攻毒后的草鱼累积死亡率和免疫保护率

3 讨 论

3.1 复方中草药免疫增强剂提高草鱼免疫功能的途径

本研究发现 3 种复方中草药免疫增强剂均能提高草鱼的免疫功能, 其效果由高到低依次为复方 2、复

方 3、复方 1. 其增强免疫功能的主要途径有 2 条: ①通过提高吞噬活力、血清溶菌活力和血清抗菌活力方式增强鱼体免疫功能. 本试验发现投喂 3 种复方中草药免疫增强剂 14 d 后均能提高吞噬活力、血清溶菌活力和抗菌活力, 这与黄芪和金银花^[6]能提高罗非鱼白细胞吞噬活力和血清溶菌活力; 党参、刺五加、黄芪和鱼腥草^[19]能提高鲫鱼吞噬活力、溶菌活力和抗菌活力等研究结果一致. ②通过提高血清超氧化物歧化酶(SOD)和血清过氧化物酶(POD)活力来增强鱼体的抗氧化保护能力, 从而进一步提高鱼体免疫功能. 本试验表现为投喂各复方后, 各试验组分别在不同的时间点提高了血清 SOD 活力和血清 POD 活力. 有文献报道过氧化物酶(POD)^[14]和超氧化物歧化酶(SOD)^[1]的主要功能是对生物体起保护作用, 其活力的高低与生物体的免疫水平密切相关. 这说明 3 种复方中草药免疫增强剂均可通过提高草鱼的抗氧化保护能力这一途径, 增强草鱼的免疫功能. 这与金银花等复方中草药^[1]能提高牙鲆血清 SOD 活力来增强机体免疫功能的结果一致.

3.2 复方中草药免疫增强剂提高草鱼抗病力分析

草鱼常患细菌性疾病和寄生虫类疾病, 本试验用嗜水气单胞菌和小瓜虫 2 种病原体检验中草药免疫增强剂对草鱼抗病力的效果. 结果表明复方 2 和复方 3 都能提高草鱼对嗜水气单胞菌和多子小瓜虫的抗病力, 其中复方 3 效果一般, 复方 2 效果最好, 且抗小瓜虫比抗嗜水气单胞菌效果更佳. 其原因可能是: ①复方 2 含有抗寄生虫的生物碱活性成分^[20]; ②复方 2 能激活草鱼巨噬细胞杀伤细菌和寄生虫的功能^[21]; ③复方 2 不仅能通过增强非特异免疫反应水平来提高对小瓜虫和嗜水气单胞菌的抵抗力, 还可能让草鱼皮肤分泌有效阻止小瓜虫对鱼体感染的粘液或产生能杀灭小瓜虫的特异性抗体. 这与黄芪多糖和香菇多糖^[22]均能促进鲤鱼非特异性免疫反应和特异性免疫反应的研究结果一致.

从试验的 3 种复方中草药免疫增强剂对草鱼各项免疫指标的影响和对 2 种病原体感染的抗病效果来看, 复方 2 能显著提高草鱼的免疫力和抗病力, 建议连续投喂 14~21 d, 其在中生产中的应用前景广阔.

参考文献:

- [1] 王吉桥, 孙永新, 张剑诚. 金银花等复方草药对牙鲆生长、消化和免疫能力的影响 [J]. 水产学报, 2006, 30(1): 90-96.
- [2] 黄洪敏, 邵健忠, 项黎新. 鱼类免疫增强剂的研究现状与进展 [J]. 水产学报, 2005, 29(4): 552-559.
- [3] CHOW C, LEUNG K N. In Vitro and in Vivo Immunomodulating and Immunorestorative Effects of Astragalus Membranaceus [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2007, 113(1): 132-141.
- [4] YANG Long-sheng, HU Yuan-liang, XUE Jia-bin, et al. Compound Chinese Herbal Medicinal Ingredients Can Enhance Immune Response and Efficacy of RHD Vaccine in Rabbit [J]. Vaccine, 2008, 26(25): 4451-4455.
- [5] SUN Jun-ling, HU Yuan-liang, WANG De-yun, et al. Immunologic Enhancement of Compound Chinese Herbal Medicinal Ingredients and Their efficacy Comparison with Compound Chinese Herbal Medicines [J]. Vaccine, 2006, 24(13): 2343-2348.
- [6] ARDÓ L, YIN Guo-jun, XU Pao, et al. Chinese Herbs (Astragalus Membranaceus and Lonicera Japonica) and Boron Enhance the Non-specific Immune Response of Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) and Resistance Against *Aeromonas Hydrophila* [J]. Aquaculture, 2008, 275(1-4): 26-33.
- [7] 陈孝煊, 吴志新, 殷居易, 等. 大黄、穿心莲、板蓝根和金银花对异育银鲫非特异性免疫功能的影响 [J]. 中国水产科学, 2003, 10(1): 36-40.
- [8] 倪达书, 汪建国. 草鱼生物学与疾病 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [9] 沈 萍, 范秀容. 微生物学实验 [M]. 第 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 160-167.
- [10] 张其中, 张占会, 陈达丽, 等. 水温对多子小瓜虫孵化及幼虫活力的影响 [J]. 生态科学, 2010, 29(2): 116-120.
- [11] 鈕 超, 张其中, 罗 芬, 等. 20 种中草药杀灭离体小瓜虫的药效研究 [J]. 淡水渔业, 2010, 40(1): 55-60
- [12] 罗 琳, 陈孝煊, 蔡雪峰. 穿心莲对草鱼血液吞噬细胞吞噬活性的影响 [J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(1): 33-34.
- [13] 朱忠勇. 实用医学检验学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1997: 795-805.
- [14] 李 飞, 张其中, 赵海涛. 氨氮对南方鲇两种抗氧化酶和抗菌活力的影响 [J]. 淡水渔业, 2005, 35(6): 11-15.
- [15] 陈达丽, 张其中, 王志坚, 等. 长吻鮠幼鱼小瓜虫病的组织学观察 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2004, 29(2):

278—280.

- [16] 孙翰昌, 耿晓修, 张 芬, 等. 肠型点状产气单胞菌口服疫苗对草鱼的免疫保护效应研究 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(9): 115—118.
- [17] 邹玉霞, 张培军, 莫照兰, 等. 大菱鲆出血病病原菌的分离和鉴定 [J]. 高技术通讯, 2004, 14(4): 89—93.
- [18] 罗 琳, 俞开康, 孟庆显. 尼罗罗非鱼对嗜水气单胞菌的免疫反应 [J]. 西南农业大学学报, 1998, 20(1): 86—89.
- [19] 艾春汉, 邹金虎, 喻运珍, 等. 6种中药对鲫非特异性免疫效果的影响 [J]. 淡水渔业, 2009, 39(1): 76—79.
- [20] 潘清清, 钱 东, 刘 问, 等. 中药免疫增强剂在甲壳动物病害防空中的应用 [J]. 水产养殖, 2008, 29(3): 18.
- [21] 唐 玫, 马广智, 徐 军. 鱼类免疫学研究进展 [J]. 免疫学杂志, 2002, 18(3): 112—116.
- [22] 曹丽萍, 丁炜东, 张 柳, 等. 香菇多糖和黄芪多糖对鲤免疫细胞的活性和 IL-1 β 体外诱生表达的影响 [J]. 水产学报, 2008, 32(4): 628—635.

Identification of Compound Chinese Herbal Immunostimulants Enhancing the Immunity of Grass Carp (*Ctenopharyngodon Idellus*)

LI Chao¹, ZHANG Qi-zhong^{1,2}, ZHU Cheng-ke¹,
CHEN Xia¹, LI Chun-tao¹, WANG Zhi-jian¹, LUO Fen³

1. Key Laboratory Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, Key Laboratory of Aquatic Organism Reproduction and Development (Ministry of Education),

School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Hydrobiology Institute of Ji'nan University, Guangzhou 510632, China;

3. Biology Department, Ningde Teachers College, Ningde Fujian 352100, China

Abstract: Nine hundred and twenty healthy grass carp at the average weight of 62.15 ± 9.78 g are randomly chosen and divided into four groups (230 carp in each group). Of the four groups of grass carp, one group serves as contrast group (which are fed with the basic fodder) and the other 3 trial groups (groups T1, T2 and T3), which are fed with basal diets supplemented with 20 g/kg of the compound immunostimulant 1, 2 and 3, respectively. The carp in control group are fed with just basal diet (without compound immunostimulants). Each group is randomly sampled at 0, 7, 14, 21 and 28 days to detect the periphery blood immune parameters. Challenge experiment is carried out on the thirtieth day. The results are as follows: The activity in phagocyte phagocytic, serum lysozyme, serum antibacterial, SOD, and POD in serum is all significantly ($p < 0.05$) enhanced in the group T1, group T2, and group T3 when compared with the control group. When grass carp are injected with live *Aeromonas hydrophila*, the relative percentage survival (RPS) of the fish was $15.37\% \pm 8.36\%$, $78.43\% \pm 8.77\%$, and $63.06\% \pm 3.37\%$ for group T1, T2 and T3, respectively. While grass carp was challenged with theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*, the relative percentage survival (RPS) of the fish is 0, $100\% \pm 0.00\%$, and $42.50\% \pm 6.61\%$ for groups T1, T2, and T3, respectively. This research indicates that basal diet which is added 2% of Chinese herbal immunostimulant 2 can significantly improve the immune function and disease resistance of grass carp ($p < 0.05$). It can be concluded that Chinese herbal immunostimulant 2 is the most effective immunostimulant in the 3 test compound products.

Key words: Chinese herbal immunostimulant; *Ctenopharyngodon idellus*; immune parameters