

复方中草药对中华鳖肠道微生物菌群及非特异性免疫功能的影响

包宇航¹, 章新宇¹, 尹尚军¹, 张海琪², 徐洁皓¹

1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江宁波 315000

2. 浙江省淡水研究所/农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江湖州 313000

摘要: 研制一种可提高中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 免疫力的复方中草药, 探究其对肠道微生物菌群的调节作用, 以为中华鳖病害防治提供参考。将平均体质量为 (44.59±9.23) g的100只中华鳖分为两组, 对照组投喂基础饲料, 实验组投喂含2% (质量分数) 复方中草药的饲料, 连续投喂42 d。结果显示, 两组优势菌门相同, 但其所占比例存在差异: 实验组中华鳖肠道中软壁菌门、浮霉菌门和乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 等有益菌群丰度分别是对照组的32、2.25和4.12倍。利用 10^7 CFU·mL⁻¹浓度的嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 攻毒, 测定中华鳖血清内的溶菌酶 (LZM)、总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、碱性磷酸酶 (AKP) 和酸性磷酸酶 (ACP) 的活性。结果显示, 对照组和实验组的T-SOD、LZM、ACP及AKP活性均在第72小时达到峰值, 且实验组中华鳖血清中的4种酶在正常状态下及攻毒后的活性几乎均显著高于对照组, 除LZM在攻毒12 h后两组差异不显著外。研究表明, 复方中草药可有效优化中华鳖肠道微生物菌群结构, 具有一定的免疫增强效果, 应用前景良好。

关键词: 中华鳖; 中草药; 非特异性免疫; 肠道菌群

中图分类号: S 947.1

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Effects of Chinese herbal compound on intestinal microbiota and non-specific immune function of *Pelodiscus sinensis*

BAO Yuhang¹, ZHANG Xinyu¹, YIN Shangjun¹, ZHANG Haiqi², XU Jiehao¹

1. School of Biology and Environment, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315000, China

2. Zhejiang Freshwater Research Institute/Key Laboratory of Freshwater Fishery Healthy Farming, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Huzhou 313000, China

Abstract: We developed a Chinese herbal compound to improve the immunity of Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) and investigated its effect on the regulation of intestinal microflora, so as to provide references for its disease control. In this study, we divided 100 individuals of *P. sinensis* with an average body mass of (45.53±3.89) g into two groups. The control group (CG) was fed with a basal diet and the experimental group (CPG) was fed with a diet supplemented with 2% of compound herbs for 42 d. The results show that the dominant phylum was the same in both groups, but the proportion of each dominant bacterial phylum differed: the beneficial flora of Tenericutes, Planctomycetes and *Lactobacillus* in the intestine of the CPG group was 32, 2.25 and 4.12 times higher than that of the CG group, respectively. After being challenged by 10^7 CFU·mL⁻¹ of *Aeromonas hy-*

收稿日期: 2023-04-06; 修回日期: 2023-05-15

基金项目: 浙江省“三农六方”科技协作计划 (2021SNLF026); 浙江省水产新品种选育项目 (2021C02069-8-3); 宁波市重点技术研发项目 (2021Z009); 浙江省“生物工程”一流学科 (A类) 学生创新计划项目 (CX2021017)

作者简介: 包宇航 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中华鳖免疫防控。E-mail: 1620916838@qq.com

通信作者: 徐洁皓 (1988—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为中华鳖免疫防控。E-mail: xujiehao@zww.edu.com

drophila, the activity of lysozyme (LZM), total superoxide dismutase (T-SOD), alkaline phosphatase (AKP) and acid phosphatase (ACP) in serum of *P. sinensis* were determined. The results show that the activities of T-SOD, LZM, ACP and AKP in the CG and CPG groups reached the peak values at 72nd hour, and activities of the four enzymes in the serum of CPG group were significantly higher than those in CG group under the normal conditions and after the challenge, except for LZM, which was not significantly different when the two groups were challenged for 12 h. In conclusion, this Chinese herbal compound can effectively optimize the intestinal microflora of *P. sinensis* and has certain immune enhancing effects, which shows a application prospect.

Keywords: *Pelodiscus sinensis*; Chinese herbal compound; Non-specific immune function; Intestinal flora

中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 是我国重要的淡水水产养殖经济品种之一, 进行规模化养殖时, 因养殖密度过大、管理不当或养殖水质不佳等因素, 会导致各类病害频发。针对细菌性疾病, 目前主要依赖抗生素等化学药物进行治疗, 而抗生素滥用可能会导致耐药性危机和食品质量安全问题^[1-2]。因此, 世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 和联合国粮食及农业组织 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 提倡在水产养殖中预防性地使用天然免疫刺激剂以增强水产动物的免疫能力, 进一步预防和控制水产动物疾病, 同时避免对动物、人类健康及生态环境造成不良影响^[3-4]。

中草药是一种天然免疫刺激剂, 能作为饲料添加剂提高养殖动物的生长性能和免疫力, 具有一定的疾病预防作用, 有望成为抗生素类药物的替代品^[5-7]。Yang 等^[8] 在基础饲料中添加不同水平的黄芪多糖, 发现其可显著提高中华鳖的体质量增长率、生长率和成活率。复方中草药制剂由 2 种及 2 种以上的草药按一定比例混合而成, 可产生协同、相加或拮抗 3 种不同的作用效果^[9]。与单一草药相比, 合理配比的复方中草药制剂可提高养殖动物的抗菌能力、饲料利用率 and 生产性能^[10-11]。如饲料中添加金银花 (*Lonicera japonica thunb*)、人参 (*Panax ginseng*) 和山楂 (*Crataegus pinnatifida bunge*) 可有效提高牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 的生长率和饲料转化效率^[12]; 添加黄芪 (*Astragali radix*)、党参 (*Codonopsis radix*)、菊花 (*Flos chrysanthemi Indici*) 等可显著促进黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 的生长^[13]。Takaoba 等^[14] 采用神曲 (*Massa medicata*)、山楂、青蒿 (*Artemisia caruifolia buch*)、铁皮石斛 (*Dendrobium officinale kimura*) 及其复方剂饲喂真鲷 (*Pagrus major*) 幼鱼, 发现可促进其生长, 并提高其对鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 的抵抗力。

中华鳖作为卵生脊椎动物, 具有较为完善的免疫系统, 可通过非特异性或特异性免疫有效抵御病原体入侵^[15-16]。溶菌酶 (LZM)、酸性磷酸酶 (ACP) 是非特异性免疫相关的重要酶类, 且溶菌酶能直接杀死细菌或消化病原体^[17]。碱性磷酸酶 (AKP) 是水产动物免疫防御中重要的水解酶, 研究显示其参与文昌鱼 (*Branchiostoma tsingtauense*) 的抗菌免疫反应^[18]。肠道不仅是消化器官, 其黏膜免疫系统参与构成机体免疫的第一道防线^[19]。本研究通过在基础饲料中添加 2% (质量分数) 的复方中草药制剂饲喂中华鳖, 测定其血清中非特异性免疫酶活性, 同时利用 16S rDNA 高通量测序研究该复方制剂对中华鳖肠道菌群的影响, 探究中草药有效成分是否通过优化中华鳖肠道菌群、提高益生菌丰度等影响机体免疫力, 以为中华鳖的病害防治提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

实验用中华鳖购自浙江湖州某养殖场, 3 月龄健康中华鳖 100 只, 平均体质量为 (44.59±9.23) g。根据本实验室前期的研究结果, 采用处理成粉状的黄芪 10 g、鱼腥草 (*Houttuynia cordata thunb*) 10 g、五倍子 (*Rhus chinensis mill*) 10 g、金银花 10 g、白头翁 (*Pulsatilla chinensis regel*) 10 g、石榴皮 (*Punica granatum L*) 10 g、黄连 (*Coptidis rhizoma*) 5 g、山楂 15 g、艾叶 (*Artemisia argyi levl*) 10 g、羊栖菜多糖 10 g 混合后置于阴凉干燥处保存备用, 作为复方饲料添加剂。实验用基础饲料配方 (质量分数): 优质白鱼粉 20%、 α -淀粉 25%、啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 2%、发酵豆粕 30%、谷朊粉 20%、酶制剂 0.4%、氯化胆碱 0.2%、磷酸二氢钙 0.8%、维生素类 1%、矿物元素类 0.6%, 其营养组成 (质量分数) 为粗蛋白 48%、水分 10%、粗脂肪 3%、粗纤维 1.5%、粗灰分 17%、总磷 3%、赖氨酸 2%。

1.2 实验分组与处理

选取健康中华鳖 100 只, 随机分为 10 组, 1—5 组为对照组, 6—10 组为实验组, 每组 10 只, 为防止个体之间打架斗殴致死, 每组体质量差异在 10 g 以内。本次养殖采用恒温循环水养殖系统, 实验用水为曝气后的自来水, pH 7.3, 亚硝酸盐 ($\text{NO}_2\text{-N}$) 质量浓度为 $0.005 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 氨氮 ($\text{NH}_4\text{-N}$) 质量浓度为 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 水温维持在 $(28\pm 2)^\circ\text{C}$ 。其中, 对照组投喂配合饲料粉, 实验组使用复方中草药拌饲投喂, 每 1 kg 配合饲料粉添加复方中草药制剂 20 g, 定时定点投喂, 每天 2 次, 连续投喂 42 d 后进行肠道菌群和非特异免疫酶活性测定。

1.3 样品采集

1.3.1 肠道内容物采集

中华鳖喂养 42 d, 停饲 24 h 后, 从对照组和实验组随机各取 10 只中华鳖, 麻醉, 颈动脉放血后将鳖体解剖并剥离出肠道, 剪取小肠后段至直肠组织, 取出内容物至无菌离心管中, 对照组记为 CG1—CG10, 实验组记为 CPG1—CPG10, 样品送至杭州联川生物技术股份有限公司进行 16S rDNA 高通量测序。

1.3.2 血清采集

中华鳖喂养 42 d, 停饲 24 h 后, 在对照组和实验组随机各取 24 只, 以未处理中华鳖为 0 h, 其余鳖腹腔注射 $10^7 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 1 mL, 在攻毒后的第 12、第 24 和第 72 小时以颈动脉采血法取血, 每个时间点取 6 只。收集血液至 2 mL 离心管内, $8\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min, 分离血清和血细胞, 取上层血清。嗜水气单胞菌攻毒后的对照组命名为 CG0h、CG12h、CG24h、CG72h, 实验组命名为 CPG0h、CPG12h、CPG24h、CPG72h。

1.4 肠道微生物高通量测序分析

使用 E.Z.N.A.[®] Stool DNA Kit 提取试剂盒 (Omega Bio-Tek) 提取肠道内容物 DNA, 实验操作参照试剂盒说明书。以引物 5'-CCTACGGGNG-GCWGCAG-3' 和 5'-GACTACHVGGGTAT-CTAATCC-3' PCR 扩增样品中细菌 16S rDNA V3—V4 区序列, 利用 AMPure XT beads 回收试剂盒 [贝克曼库尔特国际贸易 (上海) 有限公司] 回收扩增产物。使用 Illumina 的文库定量试剂盒 (Illumina 公司) 对 PCR 产物进行定量测量, 并在每个

文库中添加正确比例的 Adaptor 和 Index 序列。合格的文库浓度应在 $2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上, 将合格文库进行梯度稀释, 使用 NaOH 变性为单链后, 将文库放入测序仪中进行 $2\times 250 \text{ bp}$ 的双端测序。选择 NovaSeq 6000 测序仪对文库进行测序分析。

根据 barcode 信息对样品进行数据拆分, 去除 RawData 的引物序列和平衡碱基序列后将每一对 paired-end reads 根据 overlap 区拼接合并成一条更长的 tag。对测序 reads 进行窗口法质量扫描, 将 read 从窗口起始到 3' 终止的部分截掉 (平均质量值低于 20 时), 去除截短后长度小于 100 bp 的序列、截短后 N (不确定模糊碱基) 的含量在 5% 以上的序列和嵌合体序列。将所得数据通过 DADA2 进行长度过滤和去噪, 获得 ASV (feature) 特征序列和 ASV (feature) 丰度表格再进行 Alpha 多样性分析。使用 SILVA 数据库统计各样本中各物种的丰度, 并采用 Fisher's exact test 和 Mann-Whitney U test 对各组之间进行差异分析。

LDA Effect Size (LEfSe) 分析利用 Kruskal-Wallis 秩和检验检测样本所含特征物种, 通过检测不同组间的物种丰度差异, 获得显著性差异物种。再利用 Wilcoxon 秩和检验检测所获得的显著性差异物种的所有亚种是否处于同一分类级别, 并使用线性判别分析 (Linear discriminant analysis, LDA) 得到最终的差异物种。通过 PICRUST2 软件标记基因序列并预测菌群功能丰度, 再利用 STAMP 进行差异分析。

1.5 非特异性免疫酶活性检测

根据各试剂盒说明书, 使用酶标仪对采集的血清样品进行总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、LZM、ACP 和 AKP 活性测定 (试剂盒均购于南京建成生物工程研究所)。

1.6 数据处理

采用 SPSS 19.0 软件进行单因子方差分析 (One-way ANOVA), $P<0.001$ 为差异极其显著, $P<0.01$ 为差异极显著, $P<0.05$ 为差异显著, $P>0.05$ 为无显著性差异。结果以 “平均值 \pm 标准误 ($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$)” 表示。

2 结果

2.1 复方中草药对中华鳖肠道菌群的影响

2.1.1 菌群 Alpha 多样性分析

中华鳖肠道菌群 Alpha 多样性指数如图 1 所

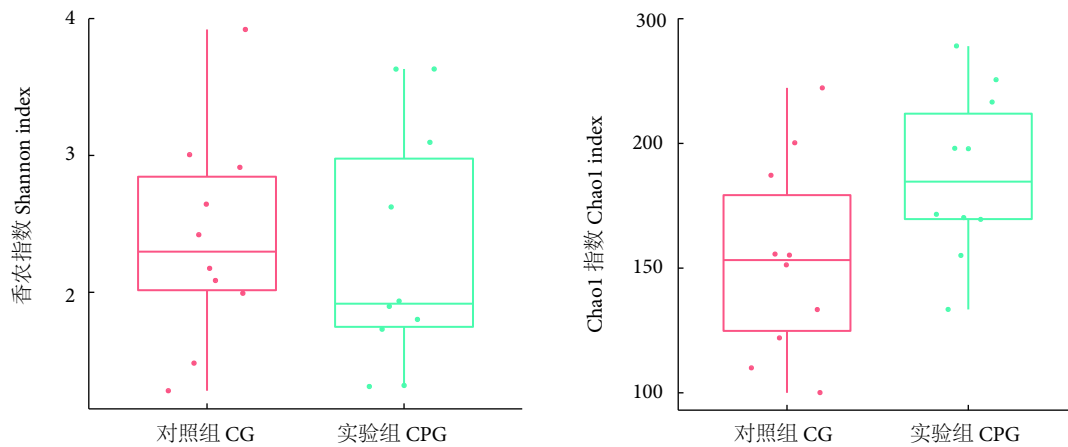


图1 Alpha 多样性指数 box 图

注: 对照组投喂基础饲料; 实验组投喂添加 2% 的复方中草药的饲料。后图同此。

Fig. 1 Alpha diversity index box chart

Note: CG. Feeding basal diet; CPG. Feeding diet with 2% of Chinese herbal compound. The same case in following figures.

示, Shannon 指数反映物种的相似性, 结果显示两组样品间的物种多样性无显著性差异 ($P>0.05$)。Chao1 指数反映物种的丰富度, 结果发现实验组特征数据的丰富程度显著高于对照组 ($P<0.05$)。

2.1.2 样品菌群门、属水平结构组成差异分析

中华鳖肠道菌群门水平组成如图 2 所示。对照组和实验组的优势菌门相同, 均为变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、梭杆菌门和软壁菌门等。然而, 对照组和实验组中每个优势门的占比存在差异。与对照组相比, 实验组的变形菌门、软壁菌门和浮霉菌门相对丰度明显升高。对照组, 变形菌门占 48.89%, 而实验组占比为 72.98%。此外, 实验组软壁菌门和浮霉菌门占比分别是对照组的 32 和 2.25 倍。实验组的蓝藻门和梭杆菌门菌群相对丰度占比降低, 分别为对照组的 26.47% 和 22.17%。

中华鳖肠道菌群属水平组成如图 3 所示, 对照组和实验组排名前 8 的优势菌属均为伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderi*)、*Romboutsia*、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、梭菌属 (*Clostridium*)、*Epulopiscium*、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*)、戴尔福特菌属 (*Delftia*) 和乳杆菌属 (*Lactobacillus*)。与对照组相比, 实验组 *Epulopiscium*、柠檬酸杆菌属和乳杆菌属的相对丰度升高, 占比分别是对照组的 4.66、55.9 和 4.12 倍; 而 *Romboutsia* 相对丰度在实验组占比降低, 为对照组的 12.67%。

2.1.3 样品菌群指示物种分析

利用 LEFse 分析对照组和实验组菌群差异, 获

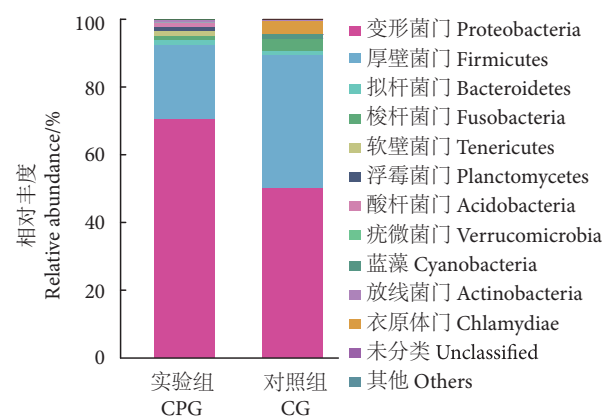


图2 对照组和实验组肠道菌群组成丰度差异 (门水平)

Fig. 2 Relative abundance of intestinal microflora composition of CG and CPG at genus level

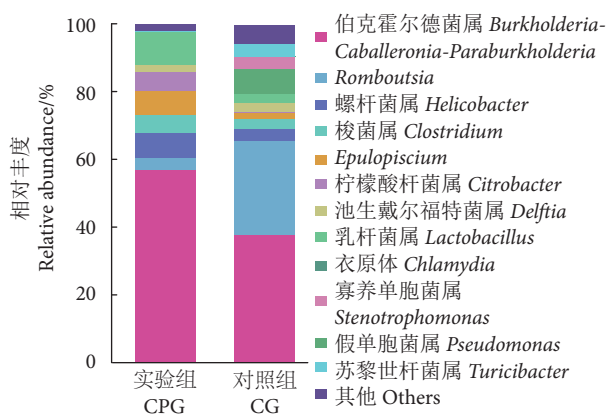


图3 对照组和实验组肠道菌群组成丰度差异 (属水平)

Fig. 3 Relative abundance of intestinal microflora composition of CG and CPG at genus level

得两组主要的特异性菌群, 作为各样品的指示种, 分析结果如图 4 所示。实验组的特异菌群为变形菌门的根瘤菌科、鞘脂单胞菌科、鞘脂单胞菌目及柠

檬酸杆菌属等菌群，对照组的特异菌群为 *Variovorax* 菌群。

2.1.4 样品菌群功能预测

通过 PICRUST2 预测实验组和对照组肠道菌群的可能功能 (图 5)，与对照组相比，实验组的脂代

谢、氨基酸合成、碳水化合物的代谢、蛋白质的合成、消化系统和免疫系统等功能显著强于对照组，具体体现在缬氨酸降解、磷脂酰甘油生物合成、鸟苷酸和腺苷酸合成、 β -丙氨酸合成、生物素合成、L-赖氨酸合成等途径。

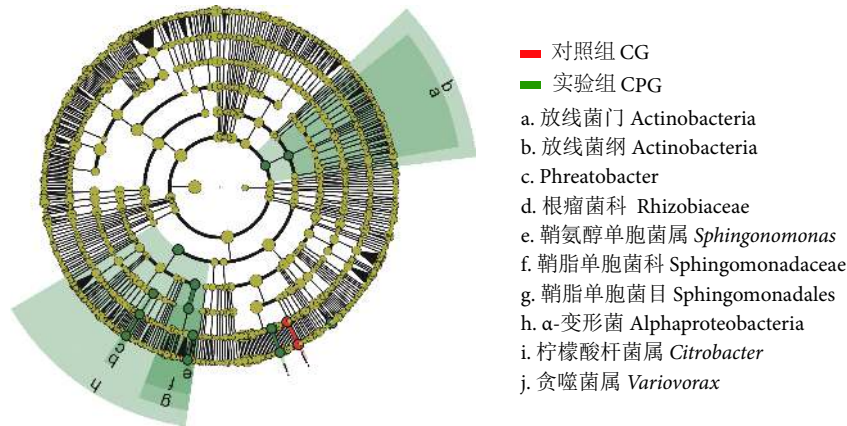


图4 对照组和实验组肠道菌群 LefSe 差异分析图

注：无显著差异的物种统一着色为黄色，差异物种跟随组进行着色，红色节点表示在红色组别中起到重要作用的微生物类群，绿色节点表示在绿色组别中起到重要作用的微生物类群；圆圈大小与微生物相对丰度成正比例关系。

Fig. 4 LefSe variance analysis of intestinal microflora of CG and CPG

Note: Species without significant differences are uniformly colored in yellow, and differential species are colored following the group; red nodes represent microbial taxa that play an important role in the red group, and green nodes represent microbial taxa that play an important role in the green group; the size of the circle is proportional to the relative abundance of microorganisms.

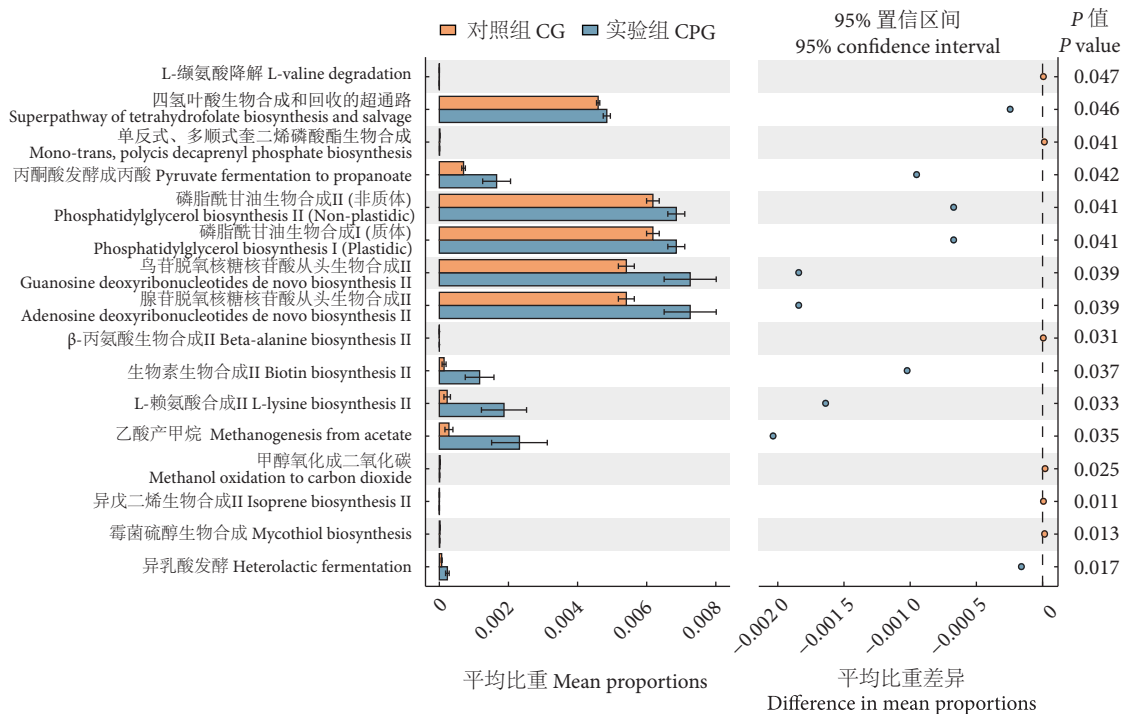


图5 对照组和实验组肠道菌群功能预测 STAMP 差异分析

注：左图所示为不同微生物功能预测在两组样本中的丰度比例，右图为 95% 置信度区间内微生物功能预测丰度的差异比例；左边纵坐标轴为不同的微生物功能预测分类。

Fig. 5 STAMP variance analysis of functional prediction of intestinal microflora of CG and CPG

Note: The left panel shows the proportion of abundance of different microbial functional predictions in the two groups of samples, and the right panel shows the proportion of differences in the abundance of microbial functional predictions within the 95% confidence interval; the left vertical axis shows different microbial functional prediction classifications.

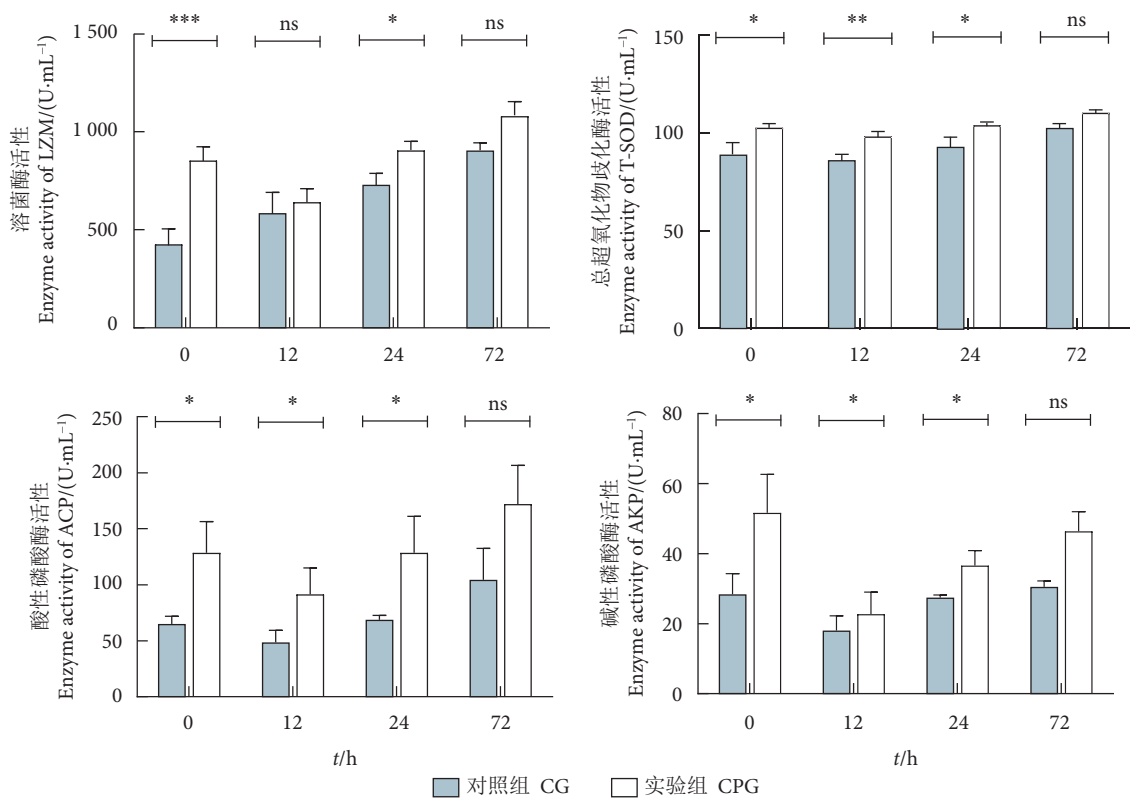


图6 复方中草药对嗜水气单胞菌刺激前后中华鳖血清中总超氧化物歧化酶、溶菌酶、酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性的影响
注: 误差线用标准误差值 ($n=6$) 表示; *, $P<0.05$, **, $P<0.01$, ***, $P<0.001$, ns 表示无显著性差异。

Fig. 6 Effect of Chinese herbal compound on T-SOD, LZM, ACP and AKP activity in serum of *P. sinensis* before and after *A. hydrophila* challenge
Note: The error bar is expressed by the SEM value ($n=6$); *, $P<0.05$, **, $P<0.01$, ***, $P<0.001$; ns. No significant differences.

2.2 复方中草药对中华鳖免疫酶指标的影响

中华鳖血清免疫酶活性测定结果显示, 实验组中华鳖血清中 T-SOD、LZM、ACP 及 AKP 4 种酶的初始活性均显著高于对照组 (图 6)。嗜水气单胞菌刺激后, 实验组和对照组的 T-SOD、LZM、ACP 3 种酶的活性均呈上升趋势: 实验组的 T-SOD、ACP 活性在第 12、第 24 小时显著高于对照组 ($P<0.05$), LZM 活性在第 24 小时显著高于对照组 ($P<0.05$), 但两组酶活性在第 72 小时无显著性差异。刺激后血清中 AKP 的酶活性先下降后升高, 实验组 AKP 活性在第 12、第 24 小时显著高于对照组 ($P<0.05$), 而两组在第 72 小时无显著性差异。

3 讨论

水生生物的肠道菌群与个体健康、免疫屏障、抵御感染能力等息息相关^[20]。肠道菌群的多样性可作为评估肠道健康的指标^[21]。本文通过 Shannon 指数来评估对照组和实验组中华鳖肠道菌群的多样性, 结果显示两组肠道菌群类别具有一定的共性, 均以变形菌门和厚壁菌门为主, 与其他水生

物肠道菌群的组成相似^[22]。据报道, 变形菌门可能有助于刺激机体免疫系统发育和维持机体正常的免疫功能^[23], 而厚壁菌门参与肠道黏膜功能的维持和肠道微生态环境的调节^[24], 因此推测它们可能在维持中华鳖的肠道菌群稳态中发挥重要作用。通过 Chao1 指数评估了两组中华鳖肠道菌群的丰富度, 结果表明饲喂复方中草药可使中华鳖肠道优势菌门占比发生变化。实验组中华鳖肠道中软壁菌门、浮霉菌门丰度均高于对照组, 即复方中草药对这些菌群的增殖具有促进作用。研究表明, 软壁菌门和浮霉菌门等有益菌群可以促进机体先天免疫相关的代谢功能, 且浮霉菌能产生一些抗菌化合物从而维持机体免疫功能^[25-26]。本研究检测发现, 实验组中华鳖先天性免疫酶活性高于对照组, 推测其可能与肠道中软壁菌和浮霉菌的存在和丰度相关。

从属水平对肠道菌群进一步分析, 发现添加复方中草药能促进中华鳖肠道中梭菌属、乳酸菌属等益生菌的菌群丰度。梭菌属是鱼类肠道常见菌属, 其可分解利用纤维素、单糖和木聚糖等糖类为宿主提供营养^[27-28]。从人类粪便样本中分离的梭菌能够

在结肠中积累调节性 T 细胞 (Regulatory T cells), 可影响中枢及外周神经系统作用于免疫细胞的信号, 从而抑制肠道炎症反应, 是肠道中的正向菌群^[29]。本研究中实验组梭菌属丰度是对照组的 1.62 倍, 表明中草药添加剂可以促进梭菌属的定殖, 优化肠道菌群结构。乳酸菌也是水产养殖常见的益生菌之一, 具有较强的黏附能力, 便于长期定殖于肠道, 通过增强肠道免疫屏障提高免疫能力, 促进机体生长^[30-31], 其功能已在尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*)、鲤 (*Cyprinus carpio*)、凡纳滨对虾 (*Penaeus vannamei*) 等水生动物中得到验证^[32-34]。乳酸菌属的乳球菌和乳杆菌可通过口服在舌齿鲈 (*Dicentrarchus labrax*) 的肠道内定殖, 其产生的乳酸菌素可作用于弧菌的细胞膜, 导致膜内物质和能量泄露, 从而达到抑菌效果^[35-36]。鲤饲料中添加复方中草药 (黄芪、鱼腥草、板蓝根、茯苓) 后, 肠道中乳酸菌的含量有所增加^[37], 这与本研究结果吻合。衣原体常以上皮囊肿形式引起呼吸系统感染, 是危害水产养殖的病原体之一^[38]。本研究显示, 实验组中衣原体在属水平的丰度占比降至对照组的 2.16%, 推测复方中草药的添加能够降低有害菌的菌群丰度, 但其作用机理需通过实验进一步挖掘。

肠道菌群及其代谢物通过改善宿主内分泌功能以维持机体生理稳态^[39]。通过对测序结果分析可知, 中华鳖肠道微生物主要参与类固醇激素合成、脂肪酸代谢和赖氨酸合成等代谢途径。对照组和实验组肠道菌群的功能预测分析结果显示, 实验组在代谢能力方面表现更突出。据报道, 氨基酸代谢、脂肪酸代谢、碳水化合物代谢等功能与氧化应激紧密相关^[40], 从钩吻 (*Gelsemium elegans*) 中提取的生物碱能够提高武昌鱼 (*Megalobrama amblycephala*) 肠道菌群的酶活性, 提高其代谢效率^[41], 这与本研究结果一致。此外, 实验组肠道菌群在氨基酸合成、蛋白质合成、消化系统和免疫系统等方面也表现出更强的功能。

T-SOD、LZM、ACP 和 AKP 是常用于评估水产动物非特异性免疫能力的指标酶。丁鉴锋等^[42]、Yin 等^[43]、Tae 等^[44]、Shalvei 等^[45] 分别以这 4 种酶为指标研究了不同配方或比例中草药添加对仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 幼参、斑节对虾 (*P. monodon*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 等水生

动物先天性免疫能力的影响。本研究发现, 嗜水气单胞菌攻毒激活中华鳖的非特异性免疫, 对照组和实验组 4 种酶的活性均在第 72 小时达到峰值。在正常状态下及刺激后, 实验组血清中的 T-SOD、LZM、ACP 及 AKP 的活性在第 0、第 12、第 24 小时均显著高于对照组, 实验组 LZM 的活力在第 0 和第 24 小时高于对照组, 但在第 12 小时无显著性差异, 推测该复方中草药饲喂后能够提高中华鳖的先天性免疫功能。中草药中的酚类化合物是一种重要的天然抗氧化剂, 可通过上调超氧化物歧化酶 (SOD) 等内源性抗氧化酶活性来维持机体内的氧化还原平衡, 防止自由基堆积和氧化损伤^[46-47]; 黄酮类、多糖类化合物可通过调节 TLRs 信号通路或激活巨噬细胞调控非特异性免疫相关酶的活性^[48-49]。刘红柏等^[37] 将黄芩、茯苓、板蓝根等制成复方中草药制剂, 与基础饲料混合投喂后可增强鲤的先天性免疫能力, 与本研究结果类似。

4 结论

本研究在饲料中添加复方中草药后, 对中华鳖肠道菌群及非特异性免疫功能进行分析, 结果表明复方中草药可以影响肠道菌群的构成与群落特征, 通过提高益生菌菌群丰度以优化肠道菌群结构, 从而提高机体的免疫能力, 故本复方中草药具有一定的应用前景。

参考文献:

- [1] SERRANO P H. Responsible use of antibiotics in aquaculture[M]. Rome: Information Division FAO, 2005: 3-4.
- [2] HOELZER K, WONG N, THOMAS J, et al. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence?[J]. BMC Vet Res, 2017, 13(1): 1-38.
- [3] REVERTER M, BONTEMPS N, D LECCHINI, et al. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives[J]. Aquaculture, 2014, 433: 50-61.
- [4] CUNHA J A D, HEINZMANN B M, BALDISSEROTTO B. The effects of essential oils and their major compounds on fish bacterial pathogens: a review[J]. Appl Microbiol Biot, 2018, 125(2): 56-72.
- [5] GIANNENAS I, SIDIROPOULOU E, BONOS E, et al. The history of herbs, medicinal and aromatic plants, and their extracts: past, current situation and future perspectives science direct[M]. London: Academic Press, 2020: 1-18.

- [6] KURALKAR P S, KURALKAR S V. Role of herbal products in animal production-an updated review[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 278(1): 42-46.
- [7] AWAD E, AWAAD A. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish[J]. Fish Shellfish Immunol 2017, 13(9): 1-22.
- [8] YANG Y B, AI X H, SONG Y, et al. Effect of astragalus polysaccharide on growth, immunity and disease resistance of *Trionyx sinensis*[J]. Chin Fish Qual Stand, 2018, 8(4): 58-65.
- [9] KHATTAB M S A, EL-ZAIAT H M, ABDELTAWAB A M, et al. Impact of lemongrass and galangal as feed additives on performance of lactating Barki goats[J]. J Dairy Sci, 2017, 12(2): 184-189.
- [10] KHOLIF A E, HASSAN A A, EL ASHRY G M, et al. Phytogetic feed additives mixture enhances the lactational performance, feed utilization and ruminal fermentation of Friesian cows[J]. Anim Biotechnol, 2021, 32(6): 708-718.
- [11] ELCOSO G, ZWEIFEL B, BACH A. Effects of a blend of essential oils on milk yield and feed efficiency of lactating dairy cows[J]. Appl Anim Behav, 2019, 35(3): 304-311.
- [12] 王吉桥, 孙永新, 张剑诚. 金银花等复方中草药对牙鲆生长、消化和免疫能力的影响 [J]. 水产学报, 2006, 30(1): 90-96.
- [13] 曲木, 黄成, 张宝龙, 等. 复方中草药对黄颡鱼生长、肉质及血清中补体 C3、补体 C4 含量的影响 [J]. 中国饲料, 2018, 19: 74-79.
- [14] TAKAOKA O, JI S C, ISHIMARU K, et al. Effect of rotifer enrichment with herbal extracts on growth and resistance of red sea bream, *Pagrus major* (Temminck et Schlegel) larvae against *Vibrio anguillarum*[J]. Aquac Res, 2011, 42(12): 1824-1829.
- [15] du PASQUIER L. The immune system of invertebrates and vertebrates[J]. Comp Biochem, 2001, 129(1): 1-15.
- [16] ROCH P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates[J]. Aquaculture, 1999, 172(1/2): 125-145.
- [17] ZHANG S C, WANG Z P, WANG H M. Maternal immunity in fish[J]. Dev Comp Immunol, 2013, 39(1/2): 72-78.
- [18] 王文军. 青岛文昌鱼碱性磷酸酶基因的克隆、表达与生物信息学分析 [D]. 烟台: 鲁东大学, 2021: 46-48.
- [19] CHEN Q S, SU Z H, CHEN X W. Morphological studies on cells involved in mucosal immunity of the intestine in the Chinese soft-shelled turtle[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(6): 65-81.
- [20] CHEN L G, HU C Y, LAI N L S, et al. Acute exposure to PBDEs at an environmentally realistic concentration causes abrupt changes in the gut microbiota and host health of zebrafish[J]. Environ Pollut Control, 2018, 240: 17-26.
- [21] OTT S J, MUSFELDT M, WENDEROTH D F, et al. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease[J]. Gut, 2004, 53(5): 685-693.
- [22] GHANBARI M, KNEIFEL W, DOMIG K J. A new view of the fish gut microbiome: advances from next-generation sequencing[J]. Aquaculture, 2015, 448: 464-475.
- [23] GOMEZ D, SUNYER J O, SALINAS I. The mucosal immune system of fish: the evolution of tolerating commensals while fighting pathogens[J]. Fish Shellfish Immunol, 2013, 35(6): 1729-1739.
- [24] JIN W Y, HAN K N, DONG S Y, et al. Modifications in gut microbiota and fermentation metabolites in the hindgut of rats after the consumption of galactooligosaccharide glycosylated with a fish peptide[J]. Food Funct, 2018, 9(5): 2853-2864.
- [25] GRAÇA A P, CALISTO R, LAGE O M. Planctomycetes as novel source of bioactive molecules[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1241.
- [26] FOYSAL M J, FOTEDAR R, SIDDIK M A B, et al. *Lactobacillus acidophilus* and *L. plantarum* improve health status, modulate gut microbiota and innate immune response of marron (*Cherax cainii*) [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 59-72.
- [27] LARSEN A. Studies on the microbiota of fishes and the factors influencing their composition[D]. Auburn: Auburn University, 2014: 67-68.
- [28] NELSON W C, STEGEN J C. The reduced genomes of Paracubacteria (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle[J]. Front Microbiol, 2015, 6: 713.
- [29] NARUSHIMA S, SUGIURA Y, OSHIMA K, et al. Characterization of the 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived Clostridia[J]. Gut Microbes, 2014, 5(3): 333-339.
- [30] MARTÍNEZ CRUZ P, IBÁÑEZ A L, MONROY H O A, et al. Use of probiotics in aquaculture[J]. Int Sch Res Notices, 2012, 1: 34-52.
- [31] GATESOUBE F J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments[J]. Adv Microb Physiol, 2008, 14(1/2/3): 107-114.
- [32] LARA F M, OLVERA N M A, GUZMÁN M B E, et al. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Aquaculture, 2003, 216(1/2/3/4): 193-201.
- [33] IBRAHIM A, RAMATU A S, ADEWALE Y A. Effect of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary supplement on nonspecific immune response and disease resistance in juvenile common carp, *Cyprinus carpio*[J]. J Northeast Agric Univ (English Edition), 2018, 25(2): 33-42.
- [34] WANG Y B, GU Q. Effect of probiotics on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response[J]. Mar Biol Res, 2010, 6(3): 327-332.
- [35] TORRECILLAS S, TEROVA G, MAKOL A, et al. Dietary phyto-genics and galactomannan oligosaccharides in low fish meal and fish oil-based diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: effects on gut health and implications on *in vivo* gut bacterial translocation[J]. PLoS One, 2019, 14(9): 20-22.
- [36] COTTER P D, ROSS R P, HILL C. Bacteriocins: a viable alternative to antibiotics?[J]. Nat Rev Microbiol, 2013, 11(2): 95-105.
- [37] 刘红柏, 张颖, 杨雨辉, 等. 5 种中草药作为饲料添加剂对鲤肠内

- 细菌及生长的影响[J]. 大连水产学院学报, 2004, 19(3): 16-17.
- [38] PAWLIKOWSKA-WARYCH M, DEPTUŁA W. Characteristics of chlamydia-like organisms pathogenic to fish[J]. J Appl Genet, 2016, 57(1): 135-141.
- [39] LEE W J, HASE K. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease[J]. Nat Chem Biol, 2014, 10(6): 416-424.
- [40] CURTIS H, BLASER M J, DIRK G, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome[J]. Nature, 2012, 486(7402): 207-214.
- [41] YE Q, FENG Y Y, WANG Z L, et al. Effects of dietary *Gelsemium elegans* alkaloids on intestinal morphology, antioxidant status, immune responses and microbiota of *Megalobrama amblycephala*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 94: 464-478.
- [42] 丁鉴锋, 包鹏云, 刘学森. 复方中草药添加剂对仿刺参 (*Stichopus japonicus*) 幼参免疫机能的影响[J]. 饲料工业, 2011, 32(18): 14-17.
- [43] YIN X L, LI Z J, YANG K, et al. Effect of guava leaves on growth and the non-specific immune response of *Penaeus monodon*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 40(1): 190-196.
- [44] TAEE H M, HAJIMORADLOO A, HOSEINIFAR S H, et al. Dietary Myrtle (*Myrtus communis* L.) improved non-specific immune-parameters and bactericidal activity of skin mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings[J]. Fish Shellfish Immunol, 2017, 64: 320-324.
- [45] SHALUEI F, NEMATOLLAHI A, NADERI F H R, et al. Effect of ethanolic extract of *Zingiber officinale* on growth performance and mucosal immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Aquac Nutr, 2017, 23(4): 814-821.
- [46] YAHFOUFI N, ALSADI N, JAMBI M, et al. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols[J]. Nutrients, 2018, 10(11): 11-34.
- [47] QUINTANS J S S, SHANMUGAM S, HEIMFARTH L, et al. Monoterpenes modulating cytokines: a review[J]. Food Chem Toxicol, 2019, 123: 233-257.
- [48] JIANG M, LI Z N, ZHU G X. Immunological regulatory effect of flavonoid baicalin on innate immune toll-like receptors[J]. Pharmacol Res, 2020, 158: 104-155.
- [49] CHEN F, HUANG G L. Preparation and immunological activity of polysaccharides and their derivatives[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 112: 211-216.