



核苷酸對九孔非特異性免疫力之影響

許晉榮、劉君誠、吳承憬

水產試驗所海水繁養殖研究中心

前言

九孔是無脊椎動物，牠們沒有後天免疫系統，而是經由先天的非特異性免疫系統的作用，產生抗病力去對抗外來病菌或原生動物的入侵 (Bachère et al., 1995; Söderhäll and Cerenius, 1998; 劉及麥, 2003; 劉等, 2003)。這些非特異性免疫系統包括細胞性因子 (cellular effectors) 及體液性因子 (humoral effectors) 兩部分。細胞性因子指的是血細胞，在九孔體內的血細胞大體上仍可分為顆粒球 (granulocyte) 及透明球 (hyalinocyte) 兩大類，它們參與了貝類體內的傷口修復、吞噬、呼吸爆發、炎症等反應 (Chen et al., 1996; 王, 2007; 饒等, 2007a, b); 體液性因子則指經由刺激血細胞產生種種水解酶、抗菌肽、凝集素等所產生的各種抗病效果 (Cheng et al., 2004a, b; 王等, 2004; 陳等, 2004; 張等, 2004; 王等, 2005; 李等, 2005; 饒等, 2006)。

核苷酸 (nucleotide) 是細胞內的主要成分，又是構成 DNA 及 RNA 的單體，在細胞結構、代謝、能量與功能調節等方面都具有重要作用，但由於動物體內自己能夠合成，所以過去一直被視為非必要營養素。可是最近的研究卻顯示外源，也就是添加核苷酸於飼料中，對於家畜、禽的成長、發育、抗緊迫及免疫功能等都所有助益 (王, 2002; 許

及王, 2004)。此種添加效果在魚蝦類亦然，餵食含有核苷酸的飼料同樣可以促進牠們成長及提高抗緊迫與疾病的能力 (Hertrampf, 2003; Hertrampf and Mishra, 2006; Li and Gartin, 2006; Li et al., 2007)。不過核苷酸做為免疫增強物質 (immunostimulants)，在貝類是否可以產生相同的功效，則未見相關研究證實。因此本實驗擬在飼料中添加不同劑量之核苷酸，以了解其對九孔非特異性免疫功能的影響。

材料及方法

本試驗所使用之九孔為本所海水繁養殖研究中心自行生產之 1 年貝，蓄養於室內 300 公升圓形塑膠桶內，水桶聯接循環過濾系統。每個桶內放 40 隻九孔，分別餵食含有不同劑量 (0%、0.1%、0.2% 與 0.4%) 之核苷酸混合物 (商品名 Vannogen, Chemoforma, Switzerland, 內含 RNA、nucleotide 及其前驅物) 的飼料及龍鬚菜，各二重複。實驗前、餵食 4、8 週後之體型如圖 1 所示。餵食 4、8 週時隨意選取 5 隻九孔測量體型與採血。血淋巴液抽取後，先測定總血淋巴球數，方法如丁等 (1996)。剩下之血淋巴液在 4°C 下以 5,000 g，離心 15 分鐘後，取上清液，冷凍於 -85°C 中，日後進行蛋白質、酸性磷酸酶 (acid phosphatase, ACP)、鹼性磷酸酶

(alkaline phosphatase, ALP) 及酚氧化酶活性 (phenoloxidase, PO) 的分析。血中蛋白質是以蛋白質折射器直接測定；酸性磷酸酶及鹼性磷酸酶活性則是以商用測試套組測之 (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Germany); 酚氧化酶活性根據 Chen et al. (2005) 略加修正, 以 L-DOPA 為酵素受質, 將上清液與 0.1 M potassium phosphate 緩衝液 (pH 6.0) 及 0.01 M L-DOPA 等量混合, 等待 5 分鐘後, 在 490 nm 波長下讀取光密度質 5 分鐘, 以 O.D_{490nm} 對反應時間作圖, 每 min⁻¹ 增加 0.001 定度為一酵素活性單位 (U)。

結果及討論

八週實驗結束, 餵食龍鬚菜與含核苷酸混合物 0%、0.1%、0.2% 及 0.4% 飼料組之死亡率極低, 分別為 1.25%、2.5%、0% 及 2.5%。餵食核苷酸混合物的九孔在體型上略遜於餵食龍鬚菜者, 在第 4 週的採樣, 餵食 0% 者與餵食龍鬚菜者在體重上出現明顯差異 ($p < 0.05$) (圖 1)。鮑魚飼料成分一般來說含有較高的蛋白質 (20–50%) 與較低的油脂 (1.5–5.3%) 及纖維質 (Fleming et al., 1996; 譚等, 1999), 而本試驗之飼料蛋白質含量約 30%, 油脂在 4% 左右, 均在此範圍內。很多實驗都顯示外源性核苷酸可以促進家畜、禽及魚蝦類的成長 (王, 2002; 許及王, 2004; Hertrampf, 2003; Hertrampf and Mishra, 2006; Li and Gartin, 2006), 但本實驗結果卻顯示, 在成長上, 餵食人工飼料的九孔體型, 特別是在體重方面, 略遜於餵食龍鬚菜者, 部分

原因固然可能是取樣偏差所造成, 但也可能是九孔仍未完全適應人工飼料所致。另外, 我們也不能完全排除外源核苷酸並沒有促進成長的可能性。Li and Gartin (2007) 就發現外源核苷酸對於紅鼓魚 (*Sciaenops ocellatus*) 稚魚的成長只有短期的促進效果 (餵食的第 1 週), 之後效果就不顯著了。

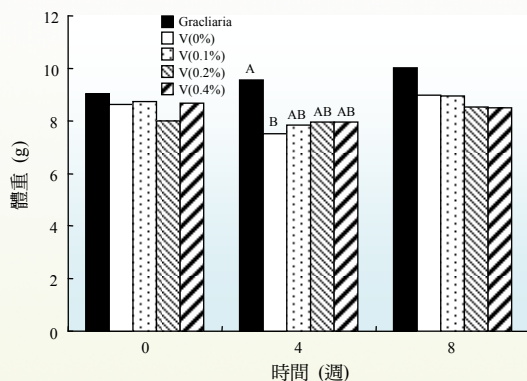


圖 1 分別餵食含有不同劑量(0%、0.1%、0.2%與 0.4%)的核苷酸混合物飼料及龍鬚菜九孔實驗前、餵食 4、8 週後之體重比較

鮑類的血細胞具有吞噬細菌及產生呼吸爆發的能力 (王, 2007); 而其水解酶在清除外源異物, 包括菌類及病毒, 也發揮極大的作用 (丁等, 1996; 柯等, 2004; 王等, 2004; 王等, 2005), 特別是酸性磷酸酶的作用尤為重要 (劉等, 2003)。在某些染病的貝類血淋巴中會發現濃度較高的蛋白質, 此可能與貝類需要合成較高量的抗菌蛋白有關 (Ordás et al., 2000)。餵食核苷酸混合物可以促進魚、蝦類的非專特異性免疫力 (Li and Gatlin, 2006)。在本實驗中, 餵食龍鬚菜九孔的總血球數在第 4 週時高於餵食核苷酸混合物各組, 而餵食核苷酸混合物的血球數基本上隨著餵食劑量增加有上升的趨勢; 在第 8 週時, 餵食核苷酸混合物飼料各組的血球

數反而高於餵食龍鬚菜者，又以 0.2% 組最高。不過不論在第 4、8 週時的採樣，餵食龍鬚菜者與各餵食核苷酸混合物者間的差異都未達顯著水準 ($p > 0.05$) (圖 2)。

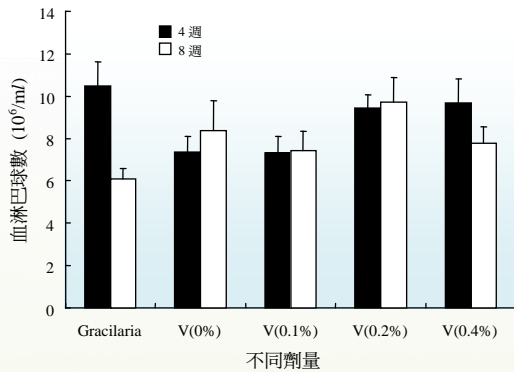


圖 2 分別餵食含有不同劑量(0%、0.1%、0.2%與0.4%)的核苷酸混合物飼料及龍鬚菜九孔在第 4、8 週後之血淋巴球數比較

餵食各組飼料九孔的體液免疫酵素的比較如圖 3—5 所示，酸性磷酸酶及鹼性磷酸酶不論在餵食龍鬚菜組與餵食核苷酸混合物各組間都未達顯著差異 ($p > 0.05$)。但在酚氧化酶活性方面，雖然在第 4 週採樣時，餵食核苷酸混合物者沒有顯著高於餵食龍鬚菜者；但餵食核苷酸混合物 0.1% 以上各組，在第 8 週時，酵素活性都大於餵食龍鬚菜者，且隨著劑量增加有上升的趨勢，在餵食 0.2% 和 0.4% 組與龍鬚菜者間的差異已達到顯著水準 ($p < 0.05$)。血中蛋白質含量在各組間則沒有顯著差異。由本實驗來看，餵食添加 0.1—0.4% 核苷酸飼料，對九孔成長方面並沒有促進效果；但其對九孔的先天非特異性免疫力有提升的效果，特別是在酚氧化酶活性方面，在餵食後第 8 週時會顯著高於餵食龍鬚菜者，由此結果來判斷，核苷酸混合物適當的添加劑量約在 0.1—0.2% 左右。

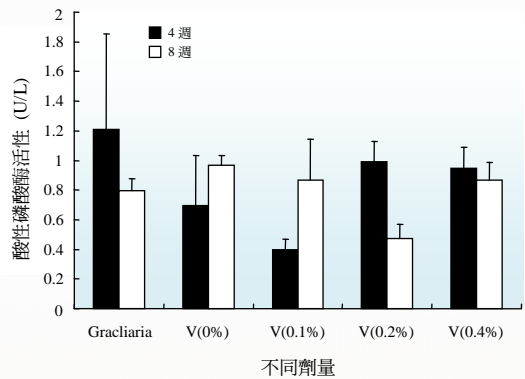


圖 3 分別餵食含有不同劑量(0%、0.1%、0.2%與0.4%)的核苷酸混合物飼料及龍鬚菜九孔在第 4、8 週後之酸性磷酸酶活性比較

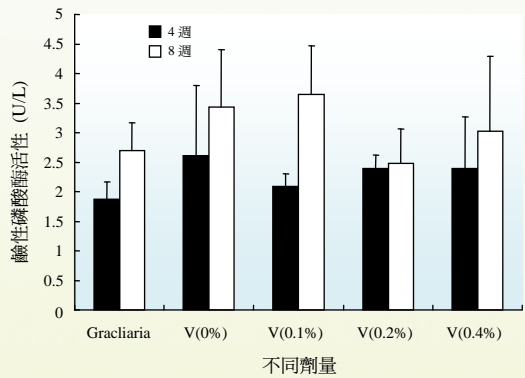


圖 4 分別餵食含有不同劑量(0%、0.1%、0.2%與0.4%)的核苷酸混合物飼料及龍鬚菜九孔在第 4、8 週後之鹼性磷酸酶活性比較

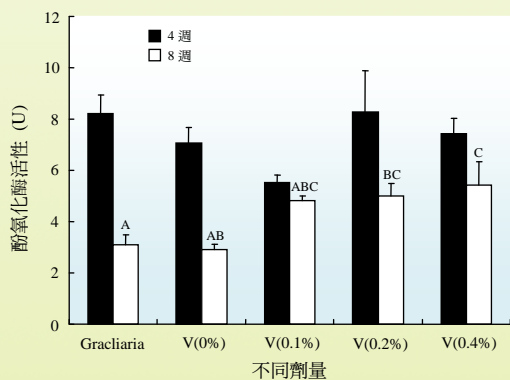


圖 5 分別餵食含有不同劑量(0%、0.1%、0.2%與0.4%)的核苷酸混合物飼料及龍鬚菜九孔在第 4、8 週後之酚氧化酶活性比較。圖形上方有不同字母代表有顯著差異