

# 大蒜及薑黃對四絲馬鮫 Mx 基因表現之影響



郭錦朱、林冠宏、張博淵、賴哲翊

水產試驗所東港生技研究中心

## 前言

魚類的免疫系統分為特異性免疫系統(又稱調適性免疫系統)及非特異性免疫系統(又稱先天性免疫系統),與哺乳動物相比,魚類的特異性免疫反應差、免疫球蛋白有限、淋巴細胞增殖低及免疫記憶力弱,以致較難發揮長期保護魚體之效能 (Magnadóttir, 2006)。而非特異性免疫系統對魚類而言則比特異性免疫系統來得重要 (MacKenzie et al., 2004),是免疫激活物質保護魚體之主要抗病機制,其防禦機制包括廣效的抗菌物質、吞噬作用、非典型補體 (nonclassical complement) 的活化和細胞激素 (cytokine) 的釋放等 (Muñoz et al., 2019)。其中,細胞激素是免疫系統分泌的化學物質,可刺激生物體組織製造其他物質來增強免疫力,也可促進細胞增生、活化補體、促進吞噬作用、導引白血球移動方向、摧毀癌細胞或其他標的物,干擾素 (interferon) 即為其一 (Roy et al., 2015)。脊椎動物的干擾素防禦機制為抵抗病原的重要防線,它藉由啟動下游蛋白的合成來抑制病毒的複製或直接殺滅病原,至少有三種以上的抗病原蛋白受到干擾素的調控,而抗黏液病毒 (myxovirus-resistant, Mx) 蛋白就屬其一 (Haller et al., 1979)。

## Mx 基因

Mx 蛋白屬於鳥苷三磷酸酶 (guanosine triphosphatases, GTPases),於細胞內參與病原體的防禦與控制,首在小鼠體內發現;1962年 Lindenmann 以黏液病毒(亦稱甲型流感病毒)感染小鼠而發現干擾素誘導 Mx 基因表現的非特異性免疫防禦病毒的產物而命其名,也發現其不只可拮抗一種病毒在細胞內複製,在哺乳動物、雞、魚皆可表現。魚類的 Mx 基因首在 1989 年被 Staeheli 等發現,其利用老鼠的 Mx1 DNA 探針偵測到河鱸 (*Perca fluviatilis*) 具有 Mx 同源性片段,且以 poly [I:C] (polyinosinic acid-polycytidylic acid) 和病毒感染後,這片段的 mRNA 在鱒魚肝臟細胞有明顯增加現象;也就是說, Mx 基因可作為宿主被病毒感染或干擾素產生的指標基因 (Casani et al., 2009; Chen et al., 2006; Ohta et al., 2011)。近年來,許多魚類 Mx 基因也陸續被發表,包括虹鱒 (*Oncorhynchus mykiss*) (Trobridge et al., 1995)、大西洋鮭魚 (*Salmo salar*) (Robertsen et al., 1997)、牙鯁 (*Paralichthys olivaceus*) (Lee et al., 2000)、庸鱈 (*Hippoglossus hippoglossus*) (Jensen et al., 2000)、河豚 (*Takifugu rubripes*) (Yap et al., 2003)、美洲河

鯰 (*Ictalurus punctatus*)、斑馬魚 (*Danio rerio*) (Altmann et al., 2004)、金頭鯛 (*Sparus aurata*) (Tafalla et al., 2004)、點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) (Chen et al., 2006)、稀有鮡 (*Gobiocypris rarus*) (Su et al., 2009)、草魚 (*Ctenopharyngodon idella*) (Jinhui et al., 2011) 等。

很多研究報告都顯示，細胞或魚類被病原感染或以免疫製劑誘發後，Mx 基因及其蛋白會被大量表現和合成，而提高對病原的抗病力；如謝 (2008) 利用大量表現石斑魚 Mx (gMx) 蛋白之石斑魚細胞株來探討 gMx 蛋白的抗病毒功能，結果發現大量表現 gMx 蛋白之石斑魚細胞株在受到神經壞死病毒感染後之活存率較一般細胞株高、病毒抗原蛋白會延遲出現且表現量較少，病毒的產量也較低。Aamri 等 (2015) 以瓶鼻海豚鏈球菌 (*Streptococcus iniae*) 感染歐洲海鱸 (*Dicentrarchus labrax*)，結果發現頭腎的 Mx 基因表現量顯著提高，並於 48 小時達到高峰。Roy 等 (2016) 以親水性產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 及其胞外膜蛋白 OmpC 分別注入白鯉 (*Cirrhinus mrigala*) 後，檢測 Mx 基因的表現，結果發現 Mx 基因在脾臟、頭腎、肝臟、腸、鰓、肌肉及腦都被大量表現；接受病原攻擊者的 Mx 基因在各組織器官的表現量分別於注射後 2–5 天達到高峰；而注射 OmpC 者，除脾臟為第 3 天外，其餘皆在第 2 天達表現高峰。此外，免疫激活物質也可刺激此免疫反應，如 Park 等 (2017) 以雞冠花 (*Celosia cristata*) 及胡蘿蔔 (*Raphanus sativus*) 萃取物投餵牙鯪 3 天，其 Mx 基因表現於第 2 天達高峰；以病

毒性出血性敗血症病毒 (viral hemorrhagic septicemia virus) 攻擊，其抗病力也顯著高於對照組。Falco 等 (2013) 以  $\beta$ -葡聚醣 ( $\beta$ -glucan) 投餵鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 25 天，結果發現會提高其 Mx 基因之表現；以病毒進行攻擊，Mx 基因的表現量更被大幅提升。

## 大蒜及薑黃對四絲馬鮫 Mx 基因表現的影響

大蒜 (*Allium sativum*) 和薑黃 (*Curcuma longa*) 自古以來就被人類作為食材及醫藥品，很多研究報告皆顯示其可增強魚的免疫力；如郭等 (2019) 證實大蒜及薑黃可有效提升四絲馬鮫 (*Eleutheronema tetradactylum*) 的溶菌酶及超氧化物歧化酶活性 (superoxide dismutase activity)；Sahu 等 (2007, 2008) 報導，大蒜及薑黃可提高露斯塔野鯪 (*Labeo rohita*) 的白血球數、溶菌酶及血清殺菌活性；Nya 和 Austin (2009, 2011) 發現，大蒜可提高虹鱔的白血球數、淋巴球數、吞噬作用、溶菌酶及血清殺菌活性；Aly 等 (2008) 及 Metwally (2009) 證實大蒜可增加尼羅吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*) 的單核球數、吞噬作用及超氧化物歧化酶活性；Jahanjoo 等 (2018) 發現，大蒜可增加矛鯛 (*Sparidentex hasta*) 的溶菌酶、補體及超氧化物歧化酶活性；Panprommin 等 (2011) 報導，薑黃可提高尼羅吳郭魚的介白素 (interleukin) 1 $\beta$ 及介白素 8；此外，薑黃亦可活化尖齒鬍鯰及鯉魚 (*Cyprinus carpio*) 的溶菌酶 (Adeshina et al., 2017; Abdel-Tawwab

& Abbass, 2017)。

鑑於魚體內 Mx 基因的表現與拮抗病原的抗病力具正相關，為瞭解大蒜及薑黃對四絲馬鮫之 Mx 基因表現量之影響，本研究以不含生藥 (對照組) 與分別添加 3% 大蒜及 3% 薑黃之飼料投餵四絲馬鮫 (均重  $74.8 \pm 6.8$  g)，投餌量分為魚體重的 3% 及 4% 二種。4 週後，剖取頭腎，以 novel total RNA mini kit (NovelGene, Taiwan, ROC) 萃取 RNA，再以 iTaq universal SYBR Green one-step kit (Bio-Rad Laboratories, USA) 將 mRNA 反轉錄為 cDNA，再以此 cDNA 為模板，加入引子 (表 1) 及 iTaq universal SYBR Green one-step kit，進行即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)，並以 StepOne™ 系統 (Applied Biosystems, USA) 分析 Mx 基因，RT-PCR 所得數據以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method 方式做相對定量分析 (Livak & Schmittgen, 2001)，使用的內部控制組 (endogenous control) 為 elongation factor-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) 基因。試驗結果如圖 1 所示，以投餌量 3% 的大蒜添加組及投餌量 4%

的薑黃添加組之 Mx 基因表現量最高 ( $p < 0.01$ )，顯示以劑量 67 mg 大蒜/kg 魚體重/天或 90 mg 薑黃/kg 魚體重/天投餵四絲馬鮫 28 天，可有效提高魚的 Mx 基因表現量，並進而增進對病原的抗性。

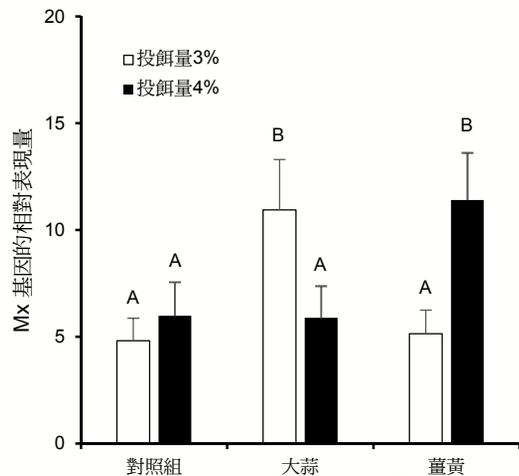


圖 1 以不含生藥 (對照組)、添加 3% 大蒜及 3% 薑黃的飼料各以投餌量為魚體重 3% 及 4% 投餵四絲馬鮫 4 週後之 Mx 基因表現量

## 結語

大蒜及薑黃對四絲馬鮫免疫反應的調控，除了可以有效提高 Mx 基因表現之外，郭等 (2019) 亦證實可促進該魚的溶菌酶、超氧化物歧化酶活性，並增強魚對瓶鼻海豚鏈球菌感染症之抗病力達 50% 以上。因此，建議於疫病好發及氣候變化劇烈時節，先以含 3% 大蒜或 3% 薑黃的飼料投餵四絲馬鮫 4 週，將可有效提高魚對不佳環境的耐受力及對病原的抗病力，降低養殖魚爆發疫病之機會，同時也可減少藥物的使用，提高漁民收益。

表 1 RT-PCR 所用基因之引子序列

| 基因            | 引子序列 (5'-3')                 |
|---------------|------------------------------|
| Mx            | FW: AAGACAAGAAACCATCAGCTTGGT |
|               | RV: CACCTCCTGTGCCATCTTCA     |
| EF-1 $\alpha$ | FW: GATGGGCAAGGGCTCCTT       |
|               | RV: CGCTCGGCCTTCAGTTTGT      |