

應用多醣類增強蝦類免疫能力之研究

Application of Dietary β -1,3-glucan in Enhancing Immunocompetence of Prawn

張正芳
Cheng-Fang Chang

行政院農業委員會水產試驗所 生物技術組
Biotechnology Division, Fisheries Research Institute

摘 要

免疫刺激物的研究中以多醣類為最多，使用後之效果也最佳。如多醣類能活化甲殼類血淋巴球細胞的凝血作用及增加血淋巴球細胞的吞噬能力，並能加強甲殼類體內不同種類血淋巴球間功能上的連繫，以抵禦侵入體內的微生物，提高防禦系統的嚴密性。斑節蝦投給peptidoglycan與Schizophyllan可增強其血淋巴球細胞的吞噬能力與對海水弧菌的抵抗力。使用酵母菌抽出含 β -1,3-1,6-glucan之多醣類，刺激草蝦血淋巴球細胞後，會增加殺菌物質 H_2O_2 與 O_2^- 產生量與增強對病原弧菌感染的抵抗力，提高草蝦之活存率。飼料含真菌*Schizophyllum commune*的細胞壁所純化出之多醣類 (β -1,3-1,6-glucan) 的添加可增強草蝦血淋巴球吞噬能力及酚氧化酶、 O_2^- 與超氧岐化酶產生量，適時適量的使用能增強蝦苗與稚蝦抵抗弧菌與WSSV的感染，並提升種蝦蓄養與催熟期間之抗病力與存活。

台灣的草蝦 (*Penaeus monodon*) 養殖，自 1988 年遭受草蝦桿狀病毒 (*P. monodon* baculovirus, MBV) 與弧菌的嚴重感染，發生大量死亡以來，產量即由 95,000 公噸大幅下降至 9,000 公噸。雖然在 1991 年逐漸回升到 10000

公噸以上。但自 1992 年起又發生白點病 (white spot syndrome, WSS)，除造成草蝦大量死亡外，其它養殖蝦種，如斑節蝦及紅尾蝦也無法倖免。由台大魚病防治小組與各防疫單位綜合近年來之研究結果指出，白點症病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 與海水中的病原性弧菌，如：瘡傷弧菌 (*Vibrio vulnificus*)、副溶血性弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、哈維弧菌 (*V. harveyi*) 與 *V. damsela* 等所產生的毒素及對蝦體之強大病原性，是引發蝦類大量死亡之主要原因之一。因此，為克服養殖蝦類遭受病原的侵襲，除需設法維持良好的養殖環境以抑制養殖池中病原的滋生外，另則需強化蝦本身對病原的抵抗力。

甲殼類為開放式循環系統，其免疫機制以非特異性免疫反應 (nonspecific immune response) 為主，為立即而非緩慢誘發式的防禦反應，以應付病原入侵及擴散。甲殼類之防禦反應主要由血淋巴球細胞 (hemocytes) 產生之原酚氧化酵素激活系統 (prophenoloxidase system, proPO system) 來完成。因此蝦類之血淋巴球細胞在非特異性免疫功能中，扮演非常重要之角色。



甲殼類血淋巴球細胞，可利用密度梯度離心 (density gradient centrifugation) 技術依比重的不同而分離成三群：比重最大的是顆粒血球 (granular cell)，比重最小的是透明血球 (hyaline cell)，介於二者之間則是混合的透明血球和半顆粒血球 (semigranular cell)。各群血球不但在形態上有所區別，經由生化分析及功能方面的研究，也發現它們各具特性。

透明血球體積較小，核質比 (nucleus-to-cytoplasm ratio) 最高，不具有或有極微量的顆粒，能伸出偽足附著於玻片上，並具有吞噬作用與凝血能力 (Goldenberg *et al.*, 1984; Soderhall *et al.*, 1986; Martin *et al.*, 1991)。半顆粒血球大小及核質比均介於透明血球和顆粒血球之間，含有少數顆粒和數目最多的內質網，可伸出短而寬扁的偽足 (Mix and Sparks, 1980)。其顆粒中含有原酚氧化酵素系統 proPO system，可直接受到脂多醣類 (lipopolysaccharide) 或 β -1,3-glucan 的誘發而釋出血球內之顆粒 (Johansson and Soderhall, 1985)。未釋出顆粒前稍具吞噬能力，但顆粒釋出後則失去此功能。顆粒血球是最敏感的血淋巴球，能直接受到外在的刺激而活化。其體積最大、核質比最小、細胞核緻密並呈腎形或馬蹄形、含有大量顆粒。顆粒中亦含有原酚氧化酵素系統 (proPO system)，但並不直接受脂多醣類或 β -1,3-glucan 的刺激而釋出，它必須經由 β -1,3-glucan binding protein、或 76kDa 蛋白質的作用，才釋出顆粒。雖然會釋出顆粒，卻不像半顆粒血球般容易破裂 (Johansson and Soderhall, 1989; Barracco *et al.*, 1991)。

原酚氧化酵素系統 (proPO system) 是一種與補體系統相似的酵素系統 (complement-like enzyme cascade)，但與補體不同的是，系統的組成因子以非活化的狀態存在於血球的顆粒中，能被脂多醣類、 β -1,3-glucan、peptidoglycan、加熱或鈣離子濃度下降等而活化 (Johansson and Soderhall, 1985; Soderhall *et al.*, 1986)。經活化的 proPO

system 含有許多組成因子與酚氧化酵素 (phenoloxidase, PO)，可以活化甲殼類血淋巴球的免疫反應，包括：

- 一、可催化酚變為黑色素，而黑色素及其中間代謝產物可以殺死真菌。
- 二、透明血球的吞噬作用
- 三、顆粒血球和半顆粒血球內的顆粒釋出。
- 四、顆粒血球和半顆粒血球的附著作用。
- 五、半顆粒血球的包膜作用。
- 六、某些機制尚未明瞭的凝血作用。

許多微生物細胞壁，如真菌 (fungi)，酵母菌 (yeast) 與部分藻類細胞壁的抽出物—多醣類 (polysaccharides; β -glucans, β -1,3-glucans and β -1,6-linkage polyglucose) 能誘發哺乳類、魚類與甲殼類，甚至於植物等非專一性免疫系統產生防禦反應，加強抗病力 (Robertson *et al.*, 1994)。

免疫刺激物的研究中以多醣類 (glucan) 為最多，使用後之效果也最佳。如 glucan 能活化 horseshoe crab (*Limulus*) 血淋巴球細胞的凝血作用 (Ohno *et al.*, 1990) 及有效增加 *Astacus astacus* 與 shore crab (*Carcinus maenas*) 血淋巴球細胞的吞噬能力 (Smith and Soderhall, 1983)，並能加強 freshwater crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) 與 shore crab 體內不同種類血淋巴球間功能上的連繫，以抵禦侵入體內的微生物，提高防禦系統的嚴密性 (Soderhall *et al.*, 1986)。Itami *et al.* (1994) 則發現斑節蝦 (*P. japonicus* or *Marsupenaeus japonicus*) 投給 peptidoglycan 與 Schizophyllan (a β -1,3-glucan with a β -1,6-linked D-glucose residue) 可增強其血淋巴球細胞的吞噬能力與對海水弧菌的抵抗力。而 Song and Hsieh (1994)，Sung *et al.* (1994, 1996) 以酵母菌抽出含 β -1,3-1,6-glucan 之多醣類，刺激草蝦血淋巴球細胞後，會增加殺菌物質 H_2O_2 與 O_2^- 產生量與增強對病原弧菌感染的抵抗力，提高草蝦之存活率。另外，Song *et al.* (1997, 1998) 與 Huang and Song (1999) 等同樣利用上述之

Table 1. Survival of grass prawn, *Penaeus monodon* (20.4 ± 1.5 g) challenged with *Vibrio damsela* (7×10^4 CFU/g bw) after oral administration of β -1,3-glucan (BG) for 10 days

BG concentration (g/kg diet)	Time after challenge (%)				
	12 hr	24 hrs	48 hrs	96 hrs	192 hrs
0	70	70	20 ^a	0 ^a	0 ^a
0.2	100	90	90 ^b	90 ^b	90 ^b
2	90	90	90 ^b	90 ^b	90 ^b
10	100	100	100 ^b	100 ^b	100 ^b

Values within a column not sharing the same superscript are significantly different ($p < 0.05$). If no superscript appears, values are not different ($p > 0.05$).

Table 2. Survival of grass prawn, *Penaeus monodon* (18.4 ± 1.3 g) challenged with *Vibrio harveyi* (2×10^4 CFU/g bw) after oral administration of β -1,3-glucan (BG) for 10 days

BG concentration (g/kg diet)	Time after challenge (%)				
	12 hr	24 hrs	48 hrs	96 hrs	192 hrs
0	100	80	40 ^a	0 ^a	0 ^a
0.2	100	93	73 ^b	40 ^b	20 ^a
2	100	100	93 ^b	93 ^c	93 ^b
10	100	100	93 ^b	93 ^c	93 ^b

Values within a column not sharing the same superscript are significantly different ($p < 0.05$). If no superscript appears, values are not different ($p > 0.05$).

β -1,3-1,6-glucan，飼草蝦稚蝦或注射草蝦母蝦或浸泡無節幼蟲與後期幼蟲，發現均能夠增強草蝦抵抗WSSV感染的能力。

真菌 *Schizophyllum commune* 的細胞壁所純化出之多醣類 (β -1,3-1,6-glucan)，化學結構為 β -1,6-branched- β -1,3-glucans，含有可溶於水之 Schizophyllan 與不可溶於水之其他多醣。Schizophyllan 用於人類醫學，為對抗子宮頸癌與其他癌症及腫瘤的之免疫增強佐劑，配合放射線療法在臨床上有非常顯著之效果 (Furie, 1987)。1986 年開始被應用於水產動物，如鯉魚 (Yano *et al.*, 1989, 1991)、yellowtail (Matsuyama *et al.*, 1992) 與斑節蝦 (Itami *et al.*, 1994, 1998) 均可強化免疫能力，增強對細菌與病毒的抵抗力。由於養殖草蝦發生嚴重病原感染，為增強池蝦之免疫能力，減少疾病的發生，增進生長，提高活存率。本所以多醣，

針對草蝦進行一系列基礎免疫功能探討與增強免疫能力的研究。將本種多醣應用添加於草蝦飼料中，經長時間對草蝦免疫系統與抗菌能力進行試驗研究 (Su *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1996; Liao *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2000; 張等, 2002; Chang *et al.*, 2003)，發現：

- 一、連續口投含多醣飼料飼草蝦 18 週後，不會影響草蝦之生長。而添加量至少應需 2 g/kg diet，並且需連續飼 10 天以上，才能增強抵抗弧菌之感染。
- 二、飼料中添加多醣 2 g/kg diet 可強化草蝦抗 *V. damsela* 與 *V. harveyi* 感染能力 (Tables 1 & 2)。
- 三、多醣與多聚磷酸態維生素 C 混合添加於飼料中，對草蝦之抗弧菌能力有加成效果。

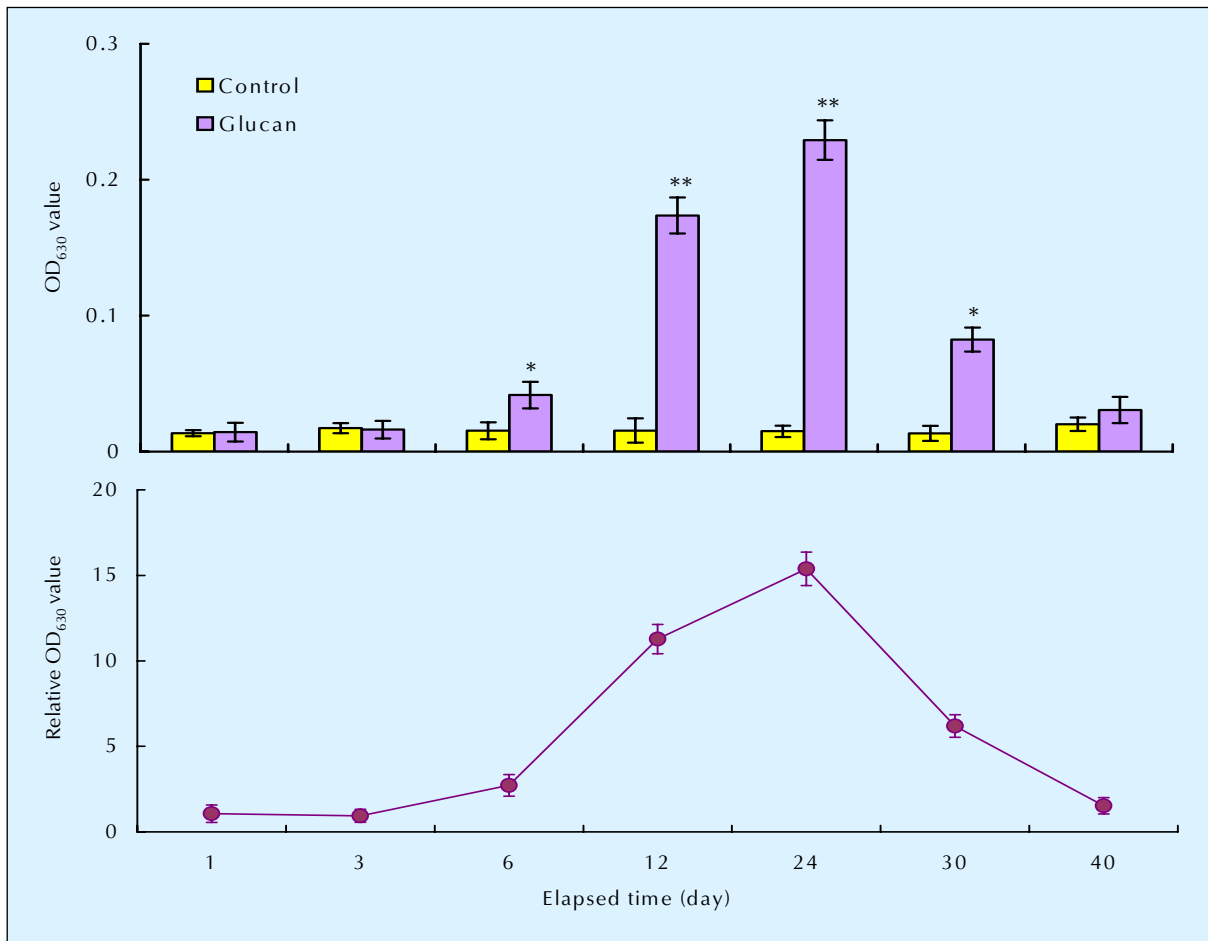


Fig. 1. Haemocyte production of O_2^- of brooder *Penaeus monodon* fed a diet that either contained or did not contain (control) β -1,3-glucan (glucan) for 40 days. (A): OD₆₃₀ value and (B): Relative OD₆₃₀ value. Relative OD₆₃₀ value = OD₆₃₀ value of fed-glucan group haemocytes / OD₆₃₀ value of control group haemocytes. Vertical bar indicates SEM. *: $p < 0.01$, **: $p < 0.001$.

四、飼草蝦種蝦含多醣 2 g/kg diet 飼料連續 20 天，可增強種蝦血淋巴球之附著、吞噬能力與 Superoxide anion 產生量及提高存活率 (Fig. 1)。

五、以添加多醣 2 g/kg diet 之飼料飼草蝦後期幼蟲 PL15 蝦苗 15 天可對強化草蝦苗抵抗白點症病毒 (WSSV) 之感染。

六、不同劑量之多醣 (0, 1, 2, 10, 20 g/kg diet) 飼料，分別飼草蝦 20 天後，對 WSSV 之抵抗能力，以添加 10 g/kg diet 組之存活率為最高 (Fig. 2)。並能增強蝦體血淋巴球吞噬能力及酚氧化酶、Superoxide

anion 與超氧歧化酶產生量。

綜合以上之結果，草蝦連續攝食 20 天多醣後，蝦體之免疫功能會達到最高點，而可持續 7 ~ 10 天。故在目前養殖草蝦正處於強烈病毒性疾病侵襲感染期間，建議添加多醣之養殖方式與策列如下：

一、在種蝦方面：

一方面配合 PCR 無病毒種蝦之篩選，另一方面發展人工催熟飼料，並配合多醣 2 g/kg diet 添加飼飼 20 天、休息 10 天方式，增強種蝦之免疫能力，培養出健康種蝦。

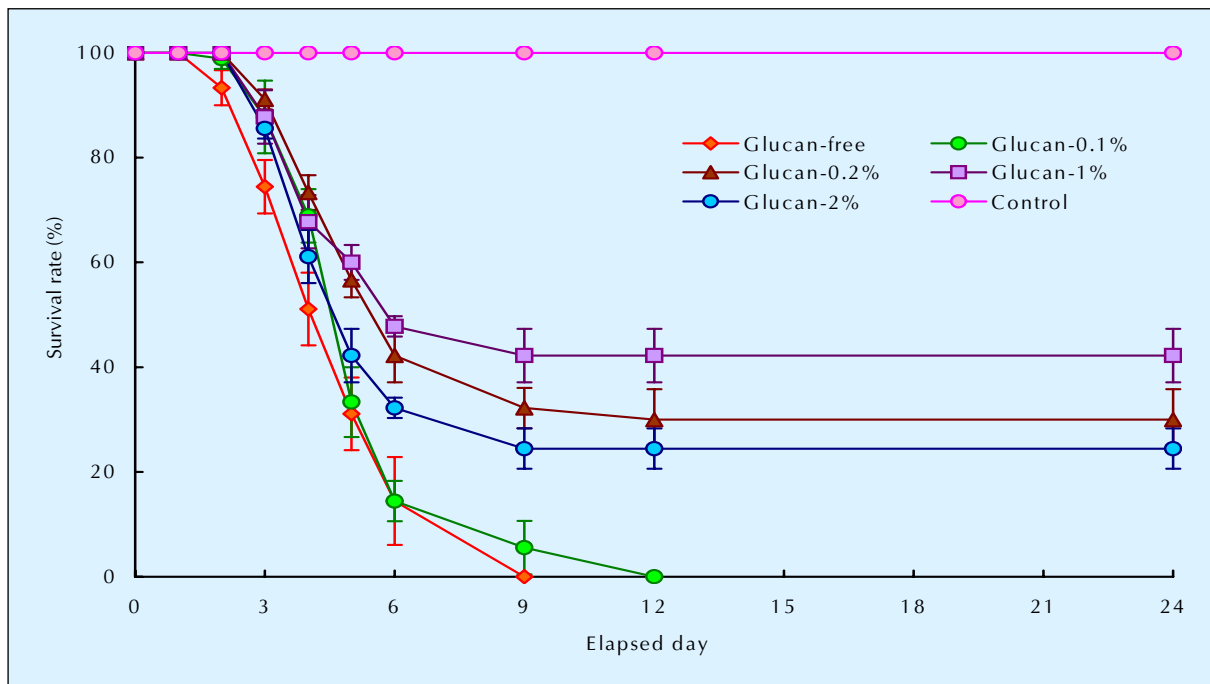


Fig. 2. Survival rates of *Penaeus monodon* fed on diets containing graded levels of β -1,3-glucan (glucan) for 20 days and then challenged by injection of WSSV. Blank control was not subjected to viral challenge. **: indicate significant ($p < 0.001$) difference in mean survival rates among five treatments.

二、在蝦苗方面：

多醣 2 g/kg die 可藉由浸泡方式或添加於微粒飼料中餵飼 5 ~ 10 天，以增強蝦苗之活力與對病原之抵抗能力，生產出健康蝦苗。

- 91 ~ 110天：添加多醣 2 g/kg diet 之飼料。
- 111 ~ 120天：不含多醣之飼料。
- 121 ~ 140天：添加多醣 2 g/kg diet 之飼料。

三、在池塘養殖方面：

放養前先以漂白水 50 ~ 100 ppm 消毒蝦池，再進行「做水」，待池水穩定才放養蝦苗。因草蝦在放養後30 ~ 90天之間，最易受WSSV感染，故建議添加多醣之養殖方式與策略如下：

- 放養一個月內養殖池中之天然餌料充足時儘可能不餵食餌料。
- 31 ~ 50天：添加多醣 10 g/kg diet 之飼料。
- 51 ~ 60天：不含多醣之飼料。
- 61 ~ 80天：添加多醣 10 g/kg diet 之飼料。
- 81 ~ 90天：不含多醣之飼料。

參考文獻

- 張正芳，楊佳宏，陳紫嫻，蘇茂森 (2002) 多醣類 β -1,3-glucan (from *Schizophyllum commune*) 應用於強化草蝦抵抗白點症病毒之研究. 水產研究, 10(1 & 2): 7-20.
- Barracco, M. A., B. Duvic and K. Soderhall (1991) The β -1,3-glucan binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus* when reacted with β -1,3-glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. Cell Tissue Res., 266: 491-497.
- Chang, C. F., H. Y. Chen, M. S. Su and I. C. Liao (2000) Immunodulation by dietary β -1,3-glucan in the brooders of the gross prawn *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol., 10: 505-514.



- Chang, C. F., M. S. Su, H. Y. Chen and I C. Liao (2003) Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, 15: 297-310.
- Chang, C. F., M. S. Su, H. Y. Chen and I C. Liao (1996). Vibriosis resistance and wound healing enhancement of *Penaeus monodon* by beta-1,3-glucan from *Schizophyllum commune* and polyphosphorylated L-ascorbic acid. *J. Taiwan Fish Res.*, 4: 43-54 (in Chinese with English abstract).
- Chang, C. F., M. S. Su, H. Y. Chen, C. F. Lo, G. H. Kou and I C. Liao (1999) Effect of dietary beta-1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, 36: 163-168.
- Furue, H. (1987) Biological characteristics and clinical effect of sizofilan (SPG). *Drugs of Today*, 23: 335-346.
- Goldenberg, P. Z., E. Huebner and A. H. Greenberg (1984) Activation of lobster hemocytes for phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.*, 43: 77-83.
- Huang, C. C. and Y. L. Song (1999) Maternal transmission of white spot syndrome associated virus (WSSV) in shrimp (*Penaeus monodon*). *Dev. Comp. Immunol.*, 23: 545-552.
- Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira, H. Igusa and M. Kondo (1994) Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3-glucan (Schizophyllan). *In The Third Asian Fisheries Forum* (L. M. Chou, A. D. Munro, J. J. Lam, T. W. Chen, L. K. Cheng, J. K. Ding, K. K. Hooi, H. W. Khoo, V. P. E. Phang, K. F. Shim and C. H. Tan eds.). Asian Fisheries Society, Manila, Philippine, 375-378.
- Itami, T., M. Asano, K. Tokushige, K. Kubono, A. Nakagawa, N. Takeno, H. Nishimura, M. Maeda, M. Kondo and M. Takahashi (1998). Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, 164: 277-288.
- Johansson, M. W. and K. Soderhall (1985) Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish hemocytes. *J. Comp. Physiol.*, 156: 175-181.
- Johansson, M. W. and K. Soderhall (1989) A cell adhesion factor from crayfish hemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cells. *Insect Biochem.*, 2: 183-190.
- Liao, I C., M. S. Su, C. F. Chang, B. Y. Her and T. Kojima (1996) Enhancement of the resistance of grass prawn *Penaeus monodon* against *Vibrio damsela* infection by beta-1,3-glucan. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 23: 109-116.
- Martin, G. G., J. E. Hose, S. Omori, C. Chong, T. Hoodbboy and N. Mckrell (1991) Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100B: 517-522.
- Matsuyama, H., R. E. P. Mangindaan and T. Yano (1992) Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture*, 101: 197-203.
- Mix, M. C. and A. K. Sparks (1980) Hemocyte classification and differential counts in the dungeness crab, *Cancer magister*. *J. Invertebr. Pathol.*, 35: 134-143.
- Ohno, N., Y. Emori and T. Yadomae (1990) Reactivity of *Limulus* amoebocyte lysate towards (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucans. *Carbohydr. Res.*, 207: 311-318.
- Robertsen, B., E. R. Engstad and J. B. Jorgensen (1994) β -Glucans as immunostimulants in fish. *Modul. Fish Imm. Res.*, 1: 83-99.
- Soderhall, K. and V. J. Smith (1983) Separation of the hemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and pro-phenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.*, 7: 229-239.
- Soderhall, K., V. J. Smith and M. W. Johansson (1986) Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods. *Cell Tissue Res.*, 245: 43-49.
- Song, Y. L. and Y. T. Hsieh (1994) Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Dev. Comp. Immunol.*, 18: 201-209.

- Song, Y. L., C. C. Huang, Y. F. Kao and C. I. Yu (1998) Application of yeast glucan to prevent diseases of culture shrimp (*Penaeus monodon*) in the field. In Research and Application of Biotechnology in Aquaculture, (N. H. Chao, C. I. Liang and H. W. Hsu eds.). Council of Agriculture, Taiwan, pp. 167-183.
- Song, Y. L., J. J. Liu, L. C. Chan and H. H. Sung (1997) Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Vaccinol., 90: 413-421.
- Su, M. S., K. F. Liu, C. F. Chang and I C. Liao (1995) Enhancement of gross prawn *Penaeus monodon* postlarvae viability by beta-1,3-glucan from *Schizophyllum commune*. J. Taiwan Fish. Res., 3: 125-132 (in Chinese with English abstract).
- Sung, H. H., G. H. Kou and Y. L. Song (1994) Vibriosis resistance induce by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Fish Pathol., 29: 11-17.
- Sung H. H., Y. L. Yang and Y. L. Song (1996) Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation. J. Crustacean Biol., 16: 278-284.
- Yano, T., R. E. P. Mangindaan and H. Matsuyama (1989) Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection by some β -1,3-glucans. Nippon Suisan Gakkaishi, 55: 1815-1819.
- Yano, T., H. Matsuyama and R. E. P. Mangindaan (1991) Polysaccharide-induced protection of carp, *Cyprinus carpio* L., against bacterial infection. J. Fish. Dis., 14: 577-582.