

甘草酸对中华绒螯蟹抗应激能力的影响

李美萱¹, 张赛赛³, 陈文博^{3*}, 任同军^{2*}

¹辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳

²大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连

³大连市海洋发展事务服务中心, 辽宁 大连

收稿日期: 2025年9月2日; 录用日期: 2025年11月22日; 发布日期: 2025年12月2日

摘要

为探究甘草酸对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)抗应激能力的影响, 进行了不同剂量甘草酸(Glycyrrhizic acid)对中华绒螯蟹免疫相关基因和试验设置3个不同剂量的甘草酸添加组(GA0.1, GA0.5, GA1), 即在基础饲料中分别添加0.1、0.5和1 mL/kg的甘草酸, 或在养殖水体中添加1 mL/L的甘草酸, 及1个对照组(不添加甘草酸), 对150只平均体质量为 (20 ± 5) g的中华绒螯蟹进行为期50天的养殖试验。试验结束后, 检测各组血淋巴和肝胰腺部分非特异性免疫指标、肠道结构和功能组织及免疫相关基因表达水平。结果表明: 与对照组相比, 摄入了GA的中华绒螯蟹存活率和增重率显著提高($P < 0.05$), 肠道皱壁和黏膜层显著增厚, 体内丙二醛(MDA)含量、谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)酶活性水平均显著降低($P < 0.05$), 免疫相关基因GPX、ALF-1、Crustin-2表达水平显著升高($P < 0.05$), 但在GA浓度1 mL/kg时下降。其中添加0.5 mL/kg GA饲料投喂中华绒螯蟹体内免疫指标变化最为显著, 并且酸性磷酸酶(ACP)、超氧化物歧化酶(SOD)活性水平较其他组显著升高($P < 0.05$)。研究表明, 在饲料中添加适量浓度甘草酸能够有效增强中华绒螯蟹抗应激能力, 为甘草酸在甲壳动物中的应用提供了数据支撑和理论支持。

关键词

甘草酸, 中华绒螯蟹, 抗应激能力

Effect of Glycyrrhizic Acid on the Stress Resistance of *Eriocheir sinensis*

Meixuan Li¹, Saisai Zhang³, Wenbo Chen^{3*}, Tongjun Ren^{2*}

¹College of Life Sciences, Liaoning University, Shenyang Liaoning

²College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian Liaoning

³Dalian Ocean Development Service Center, Dalian Liaoning

Received: September 2, 2025; accepted: November 22, 2025; published: December 2, 2025

*并列通讯作者。

文章引用: 李美萱, 张赛赛, 陈文博, 任同军. 甘草酸对中华绒螯蟹抗应激能力的影响[J]. 海洋科学前沿, 2025, 12(4): 191-203. DOI: 10.12677/ams.2025.124020

Abstract

To investigate the effect of glycyrrhizic acid on the stress resistance of *Eriocheir sinensis*, a 50-day culture experiment was conducted with 150 *Eriocheir sinensis* (average body weight: (20 ± 5) g), using three glycyrrhizic acid (GA) addition groups (GA0.1, GA0.5, GA1) and one control group (without GA). The GA addition groups were set as follows: 0.1, 0.5, and 1 mL/kg GA added to the basal diet, or 1 mL/L GA added to the culture water. After the experiment, non-specific immune indices in hemolymph and hepatopancreas, intestinal structure and functional tissues, and expression levels of immunity-related genes were detected. The results showed that compared with the control group, the survival rate and weight gain rate of *Eriocheir sinensis* fed with GA were significantly increased ($P < 0.05$), the intestinal folds and mucosal layer were significantly thickened, the content of malondialdehyde (MDA), and the activities of alanine aminotransferase (GPT) and aspartate aminotransferase (GOT) were significantly decreased ($P < 0.05$). The expression levels of immunity-related genes GPX, ALF-1, and Crustin-2 were significantly increased ($P < 0.05$), but decreased at a GA concentration of 1 mL/kg. Among them, the immune indices of *Eriocheir sinensis* fed with 0.5 mL/kg GA showed the most significant changes, and the activities of acid phosphatase (ACP) and superoxide dismutase (SOD) were significantly higher than those in other groups ($P < 0.05$). This study indicates that adding an appropriate concentration of glycyrrhizic acid to the diet can effectively enhance the stress resistance of *Eriocheir sinensis*, providing data and theoretical support for the application of glycyrrhizic acid in crustaceans.

Keywords

Glycyrrhizic Acid, *Eriocheir sinensis*, Stress Resistance

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*), 俗称河蟹, 经济附加值高, 产值巨大, 2024 年产量约 88.8 万吨, 是我国重要的甲壳类水产经济动物之一。近年来, 随着养殖规模的不断扩大, 养殖动物受到水环境、饲料及养殖管理等条件变化因素影响, 导致疾病频发甚至大量死亡。然而, 过量使用抗生素、化学药品和水体消毒剂, 会带来养殖环境的恶化, 致使养殖动物应激因素增多, 对生态环境和产业发展造成一定危害。因此, 探寻可以替代药物的免疫添加剂成为了亟待研究的方向, 研制水产免疫添加剂, 增强水产动物的抗应激能力, 对水产养殖产业绿色可持续发展具有极其重要的意义。

免疫添加剂是指一类能引起机体出现短暂免疫功能增强的物质, 主要包括维生素、微量元素、寡糖类、核苷酸、中草药等。其中, 中草药添加剂具有安全性高、功效多样、不易产生耐药性等特点, 有很大的发展潜力[1]。甘草酸(Glycyrrhizic acid, GA)是甘草的主要生物活性成分之一, 具有抗炎、抗肿瘤、抗过敏、抗病毒作用和抑菌作用等药理作用, 在临床治疗中广泛应用[2][3]。研究发现, 甘草酸可以有效的提高动物对疾病的抵抗力。例如, 在猪饲料中添加适量甘草酸能够有效抑制猪繁殖与呼吸综合征病毒(全称, PRRSV)[4]、猪急性腹泻综合症冠状病毒(全称, SADS-CoV)等病毒感染[5]。摄食甘草酸能够增强鸡巨噬细胞吞噬和清除细胞内沙门氏菌的能力, 减少鸡的疾病发生率[6][7]。此外也有研究表明甘草酸有益于生物肠道健康。甘草多糖可有效增加哺乳仔猪小肠绒毛高度和绒毛隐比[8]; 在小鼠中甘草通过修复肠黏膜屏

障损伤，治疗溃疡性结肠炎[9]。现阶段，在水产动物中，甘草酸也具有类似的功能。据报道，甘草酸能显著提高五条𩚑(*Seriola quinqueradiata*)对链状球菌(*Enterococcus seriola*)感染的抵抗能力[10]。饲料中添加甘草酸可显著提高大黄鱼和泥鳅幼鱼的存活和生长性能，并显著上调仔鱼的生长、发育、营养运输、免疫和抗氧化系统相关基因的表达[11] [12]。

目前已有研究证明，甘草酸对甲壳动物免疫性能有改善作用。在饲料中添加甘草酸可预防凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)白斑综合征，显著降低死亡率、减少病变[13]，显著提高小龙虾的生长性能、免疫应答、免疫相关基因表达和抗病力[14]。然而，甘草酸对中华绒螯蟹免疫功能的调节作用，目前尚未有系统研究报道。为此，本研究通过在其养殖水体或饲料中设置不同浓度梯度的甘草酸，通过检测 50 天后血淋巴和肝胰腺中五种免疫相关酶活性、免疫相关基因表达水平以及肠道结构和功能组织变化，探究甘草酸对中华绒螯蟹抗应激能力的影响，以期在甘草酸在中华绒螯蟹养殖中的应用提供科学参考。

2. 材料与方法

2.1. 材料

实验用中华绒螯蟹购买于中国江苏省连云港市某水产养殖场。选取湿重为 20.0 ± 5 g、甲壳完整无破损、步足无断肢和残缺、生理状态健康的个体在充分曝气的自来水中暂养 5 d。暂养期间每天投喂专用饲料两次，控制养殖水体保持温度 $25.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、pH 6.5~8.5、溶氧(DO) 5~8 mg/L，以保证试验用蟹充分适应实验环境。

2.2. 方法

2.2.1. 中华绒螯蟹养殖管理及实验饲料配置

将 150 只健康的中华绒螯蟹随机分为五组(对照组、浸泡组、GA0.1、GA0.5、GA1)，分别饲养于 5 个水箱内。向浸泡组的养殖水体中加入甘草酸(Catalysis, 西班牙)(养殖水体积: GA = 1000:1)充分混匀。三组饲料添加组(GA0.1, GA0.5, GA1)分别投喂添加了 0.1、0.5 和 1 mL/kg 的甘草酸的饲料，对照组和浸泡组投喂无添加的基础饲料。每天分两次投喂蟹体重 5%的饲料，上午 9:00 投喂每日总投喂量的 30%，下午 17:00 投喂每日总投喂量的 70%。每隔 2 天换一次水。实验周期为 50 d。

Table 1. Experimental feed formula and nutrient composition (dry weight)

表 1. 试验饲料配方及营养成分

组成配方 formula/%		营养水平 nutrient composition/%	
鱼粉	35.00	粗蛋白	44.8172
豆粕	25.00	天然脂质	7.8121
花生粕	16.00		
玉米淀粉	5.70		
豆油	4.00		
酵母	5.00		
纤维素	4.69		
胆固醇	0.3		
氯化胆碱	0.2		
乙硫巴酸盐	0.01		
维生素混合物 a	2.00		
矿物质混合物 b	2.00		
丙酸钙	0.10		

实验饲料的蛋白源主要为鱼粉、豆粕，脂肪源主要为豆油，粗蛋白含量约为 45%，粗脂肪含量约为 6%。试验饲料配方及营养成分见表 1。

1) 维生素混合物(mg/100 g 混合物): 维生素 A 420000 IU, 维生素 C 6000 mg, α -生育酚醋酸酯 2000 mg, 维生素 D3 120000 IU, 维生素 K 1000 mg, 维生素 B1 1000 mg, 维生素 B2 1000 mg, 维生素 B6 1600 mg, 维生素 B12 2 mg, 烟酸 5000 mg, 叶酸 400 mg, 肌醇 6000 mg, 生物素 10 mg, 泛酸钙 3500 mg。

2) 矿物混合物组成(g/kg 日粮): KCl 0.84 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g、 NaH_2PO_4 6.45 g、 KH_2PO_3 3 g、 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 7.95 g、 CaCO_3 3.15 g、 $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{CaO}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4.95 g、 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.36 g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1055 g、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1428 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0321 g、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0045 g、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.042 g、KI 0.0069 g。

2.2.2. 存活率和增重率统计

饲养试验结束后，将实验中华绒螯蟹禁食 24 h，在冰中压缩 10 min 诱导低温麻醉，用纱布拭去体表水分，测量 5 组中华绒螯蟹体重，统计每组中华绒螯蟹存活数量，计算存活率(SR)和增重率(WG)。增重率 = $100 \times [(\text{末重} - \text{初重})/\text{初重}]$ 。存活率 = $100 \times (\text{最终蟹数}/\text{初始蟹数})$ 。

2.2.3. 样品收集

为了评估血淋巴和肝胰腺的抗氧化能力和非特异性免疫指标，每组随机选取 3 只中华绒螯蟹采集血淋巴和肝胰腺。使用 1 ml 无菌注射器吸取少量抗凝剂润湿内壁，从中华绒螯蟹的头胸甲与第 3 步足交界处薄膜插入约 1~2 mm，将血淋巴与预冷的抗凝血溶液(9 g 葡萄糖，2.73 g 柠檬酸，13.14 g NaCl，4.41 g 柠檬酸三钠，1.681 g EDTA·2Na) 1:1 混合，置于 1.5 mL 无菌离心管中。立即离心 15 min (800 g 4℃)，收集上清液储存在-80℃冰箱中。分组采集适量肝胰腺保存于冻存管中，置液氮速冻后暂存于-80℃冰箱保存，做 RNA 提取和分析用。每只再取 0.3 g 肝胰腺，按组织重量：0.9%生理盐水 = 1:9 的比例混合，在冰水浴条件下机械匀浆，并以 2500 r/min 离心 10 min，取上清液置于 1.5 mL 离心管中，储存在-80℃，用于测定 ACP、MDA、GPT、GOT 等酶的活性。另外，用镊子取中肠，清除内容物后用 4%多聚甲醛固定，常温保存，用于送检研究中华绒螯蟹肠道结构和功能。

2.2.4. 酶活性检测

使用相应的商品化检测试剂盒(中国南京建成)对各组中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺样品中的酸性磷酸酶(ACP)、丙二醛(MDA)、谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)进行酶活性测定。比色后，查标准曲线，求得酶的活力单位。

(1) 酸性磷酸酶试剂盒采用微量酶标法测定，将肝胰腺匀浆上清和血清分别与显色底物混合，在 37℃ 下孵育 20 min，加入终止液后，通过精密酶标仪在 405 nm 处记录吸光度；

(2) 丙二醛试剂盒采用 TBA 法测定，将肝胰腺匀浆上清和血清分别与显色底物混合，95℃ 孵育 40 min，然后 3500~4000 r/min，离心 10 min，取上清液，用精密酶标仪在 532 nm 处记录吸光度；

(3) 谷丙转氨酶试剂盒采用微板法测定，将肝胰腺匀浆上清和血清分别与显色底物混合，在 37℃ 下孵育 30 分钟，加入终止液 37℃ 孵育 20 分钟后，通过精密酶标仪在 505 nm 处记录吸光度；

(4) 谷草转氨酶试剂盒采用微板法测定，将肝胰腺匀浆上清和血清分别与显色底物混合，在 37℃ 下孵育 30 分钟，加入终止液 37℃ 孵育 20 分钟后，通过精密酶标仪在 510 nm 处记录吸光度。

2.2.5. RNA 提取和 cDNA 合成

使用 TRIzol 试剂从 100 mg 肝胰腺组织中提取总 RNA，并通过 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量。确认未降解后按照反转录试剂盒(TransGen Biotech 公司，中国)说明书配制混合体系，使用 PCR 仪进行反转录，将 7 μL cDNA 模板与 1 μL Random Primer 在 200 μL PCR 联排管中混匀，65℃ 孵育 5 min。孵

育结束后加入 10 μ L 2 $\times$ TS Reaction Mix、1 μ L Transcript RI/RTMix、1 μ L gDNA Remover，依次设置程序 25 $^{\circ}$ C 10 min，42 $^{\circ}$ C 15 min，85 $^{\circ}$ C 5 s，程序结束后保持 4 $^{\circ}$ C 恒温。合成的 cDNA 产物在-20 $^{\circ}$ C 保存，用于 qRT-PCR 分析。

2.2.6. 实时荧光定量(qRT-PCR)分析

本研究所用引物序列见表 2。以中华绒螯蟹肝胰腺的 cDNA 为模板，按照荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR (全试金，中国)说明对各组中华绒螯蟹肝胰腺组织中 GPX、ALF、Crus2 的 mRNA 表达量进行定量分析。荧光定量 PCR 实验在 CFX96TM Real-Time System (Bio-Rad，美国)仪器上进行。实验采用 10 μ L 体系包括：SYBR Green Premix Ex Taq 7 μ L，上下游引物(10 μ M)各 1 μ L，cDNA 模板 2 μ L。配好体系充分混匀后，4 $^{\circ}$ C，低速离心 5 分钟。反应条件为两步法扩增程序：95 $^{\circ}$ C 变性 30 秒，95 $^{\circ}$ C 变性 5 秒，60 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒，设定上述循环 40 次，60 $^{\circ}$ C 采集荧光信号，循环结束后缓慢升温到 95 $^{\circ}$ C。使用稀释 10 $\times$ 的 cDNA 模板进行 qRT-PCR 实验，每个样品进行三次平行实验。以使用无添加基础饲料喂养的中华绒螯蟹肝胰腺表达的 *EsGPX*、*EsALF*、*EsCrus2* 基因 Ct 值作为对照，采用的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法来计算基因的相对表达量[15]。

Table 2. The sequences of primers used in this study
表 2. 本研究使用的引物

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
GPX-F	GACTACACCCCAGTGTGCACCA
GPX-R	TGATCCAGCCATTGTGATCCTC
ALF-1 qF	GACGCAGGAGGATGCTAAC
ALF-1 qR	TGATGGCAGATGAAGGACAC
Crus-2 qF	GCCCACCTCCCAAACCTAT
Crus-2 qR	GCAAGCGTCACAGCAGCACT

2.2.7. 肠道组织化学分析

取饲喂实验后的中华绒螯蟹中肠组织，经 4%多聚甲醛固定，固定状态良好。送武汉赛维尔生物科技有限公司进行分析处理。经脱水、包埋、切片、染色、封片最后镜检合格的样片。使用具有拍照功能的显微镜 Eclipse Ci-L (Nikon, Japan)记录样片中典型画面，使用图片观察和分析软件 Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, U.S.A)对采集到的图片进行详细分析。通过显微镜浏览切片或浏览数字切片，使用不同放大倍数的视野仔细观察组织切片情况，对切片中基本病理改变情况进行文字描述。对典型病变部位成像并在图中用箭头标识。

2.2.8. 统计分析方法

本研究的数据以均数 $\pm$ 标准差表示。采用 Graphpad Prism 9 进行图形绘制。所有数据采用 SPSS (IBM SPSS Statistics 26)软件进行了方差齐性检验和方差分析，并进行了 Duncan’s 多重比较，其中 $P < 0.05$ 代表具有显著差异。

3. 结果与分析

3.1. GA 对中华绒螯蟹生长免疫的影响

GA 对中华绒螯蟹的存活率与增重率的影响见表 3。与对照组相比，3 个 GA 饲料添加组(GA0.1, GA0.5,

GA1)和浸泡组的增重率和存活率均显著增加($P < 0.05$)，浸泡组的增重率显著高于其他组，达到对照组的2倍。但与浸泡组相比，GA0.5和GA1饲料添加组的存活率更高，且水质更清澈。

Table 3. Effects of GA on survival rate and weight gain rate of *Eriocheir sinensis*

表 3. 甘草酸对中华绒螯蟹存活率的影响

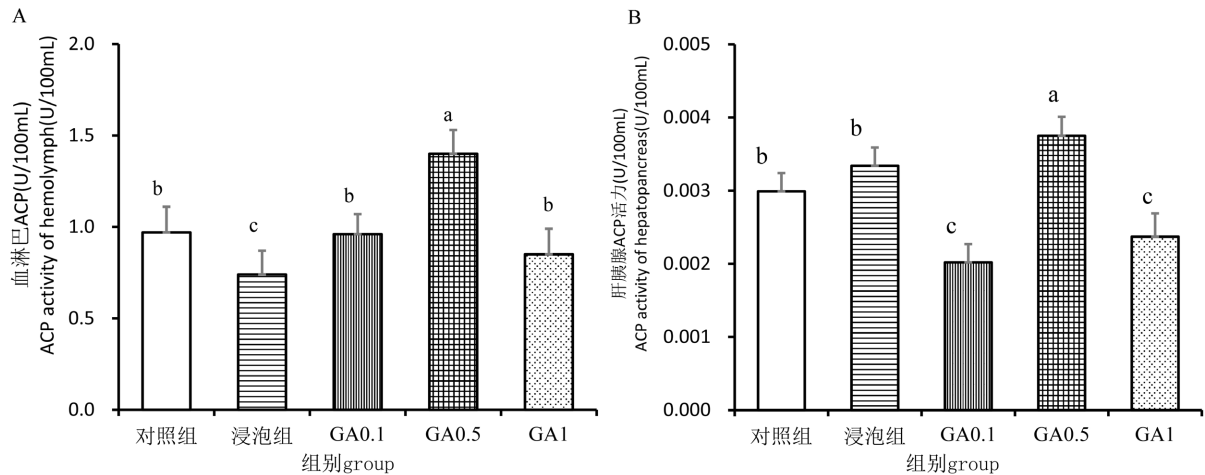
组别 Group	增重 weight gain rate/%	存活率 Survival rate/%
对照组	5.60 ± 3.35^b	46.67
浸泡组	11.70 ± 3.32^a	53.33
GA0.1	8.38 ± 2.57^b	56.67
GA0.5	8.20 ± 3.21^b	73.33
GA1	7.46 ± 2.08^b	76.67

GA0.1: GA 浓度为 0.1 mL/kg, GA0.5: GA 浓度为 0.5 mL/kg, GA1: GA 浓度为 1 mL/kg。同列中标有不同字母者表示组间有显著性差异($P < 0.05$)，标有相同字母者表示组间无显著性差异($P > 0.05$)，

3.2. GA 对中华绒螯蟹部分非特异性免疫指标的影响

3.2.1. 中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺中 ACP 活力水平变化

从图 1 可见，与对照组相比，饲料中加 0.5 mL/kg GA 喂养的中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺中 ACP 活力水平均显著升高($P < 0.05$)，而其他浓度无显著变化甚至降低。



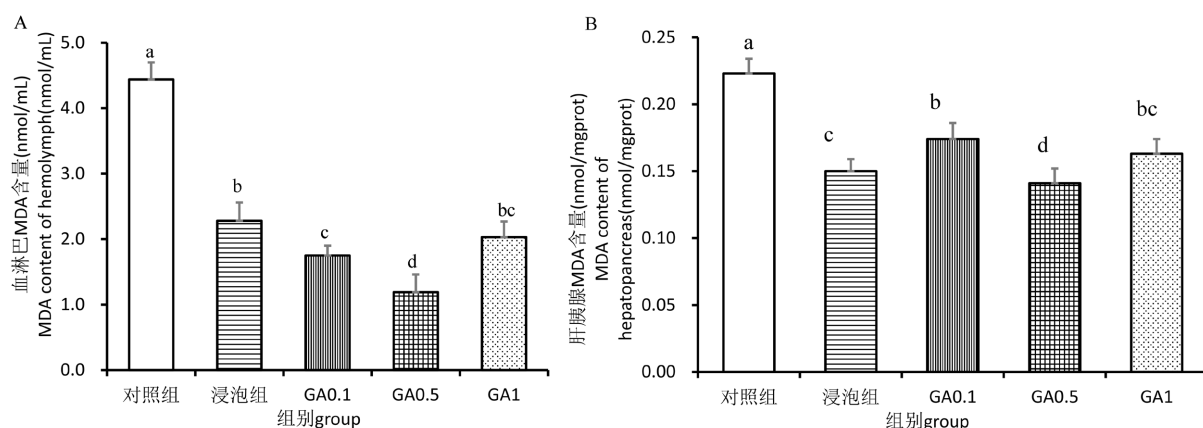
A——中华绒螯蟹血淋巴中 ACP 活力水平。B——中华绒螯蟹肝胰腺中 ACP 活力水平。

Figure 1. Variations in ACP activity in hemolymph and hepatopancreas of *Eriocheir sinensis* following 50-day dietary exposure to graded levels of GA

图 1. 添加不同浓度 GA 饲养 50 d 后中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺 ACP 活力变化

3.2.2. 中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺中 MDA 含量变化

从图 2 可见，与对照组相比，在 4 组使用添加了不同浓度 GA 饲料喂养的中华绒螯蟹体内，血淋巴和肝胰腺中 MDA 的含量均显著降低($P < 0.05$)，其中添加 0.5 mL/kg GA 组的 MDA 含量最低($P < 0.05$)。

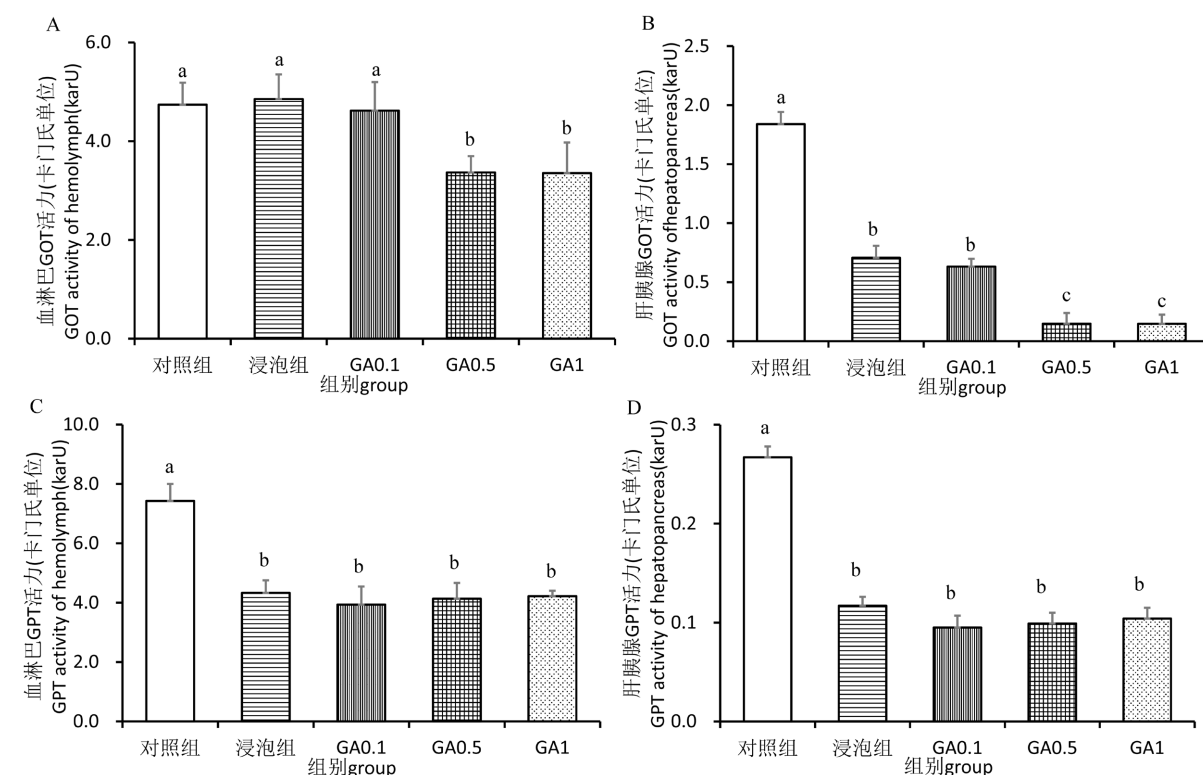


A——中华绒螯蟹血淋巴中 MDA 含量。B——中华绒螯蟹肝胰腺中 MDA 含量。

Figure 2. Alterations in hemolymph and hepatopancreatic malondialdehyde (MDA) levels in *Eriocheir sinensis* after 50-day GA administration at graded concentrations

图 2. 添加不同浓度 GA 饲养 50 d 后中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺中 MDA 含量变化

3.2.3. 中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺中 GPT 和 GOT 活力水平变化



A——中华绒螯蟹血淋巴中 GOT 活力水平。B——中华绒螯蟹肝胰腺中 GOT 活力水平。C——中华绒螯蟹血淋巴中 GPT 活力水平。D——中华绒螯蟹肝胰腺中 GPT 活力水平。

Figure 3. Changes of GOT and GPT activities in hemolymph and hepatopancreas of *Eriocheir sinensis* after feeding with different concentrations of GA for 50 days

图 3. 添加不同浓度 GA 饲养 50 d 后中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺 GOT 和 GPT 活力变化

从图 3 可见，与对照组相比，在中华绒螯蟹血淋巴中 0.5 mL/kg GA 和 1 mL/kg GA 饲料添加组 GOT

活力水平显著降低($P < 0.05$), 浸泡组与 0.1 mL/kg GA 添加组 GOT 活力水平无显著性差异; 而在中华绒螯蟹肝胰腺中, 4 个 GA 添加组的 GOT 活性均显著低于对照组($P < 0.05$), 其中在饲料中添加 0.5 mL/kg GA 和 1 mL/kg GA 对 GOT 活性影响效果比浸泡和添加 0.1 mL/kg GA 影响显著($P < 0.05$)。

从图 3 可见, 与对照组相比, 在 4 组使用添加了不同浓度 GA 饲料喂养的中华绒螯蟹体内, 血淋巴和肝胰腺中 GPT 的活力水平均显著降低($P < 0.05$), 而 GA 的浓度对 GPT 活性影响无显著差异。

3.2.4. 中华绒螯蟹肝胰腺中 SOD 活力水平变化

从图 4 可见, 与对照组相比, 在饲料中添加 0.5 mL/kg GA 的中华绒螯蟹肝胰腺中 SOD 活力水平显著提高($P < 0.05$), 而其他浓度实验组无显著差异甚至显著降低。

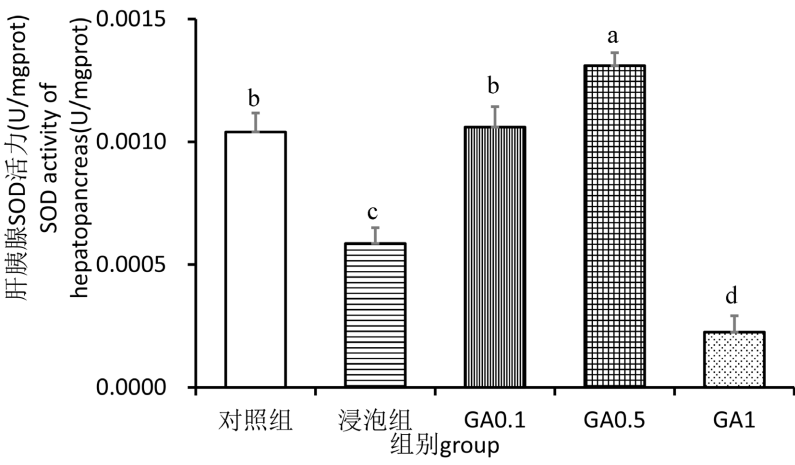


Figure 4. Alterations in hemolymph and hepatopancreatic superoxide dismutase (SOD) activity in *Eriocheir sinensis* after 50-day GA administration at graded concentrations

图 4. 添加不同浓度 GA 饲养 50 d 后中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺 SOD 活力变化

3.3. GA 对中华绒螯蟹肠道结构的影响

中华绒螯蟹皱壁厚度和黏膜层厚度由图 5、表 4 和表 5 可知, 与对照组相比, 4 个不同浓度 GA 添加组的皱壁厚度和黏膜层厚度均显著增厚。

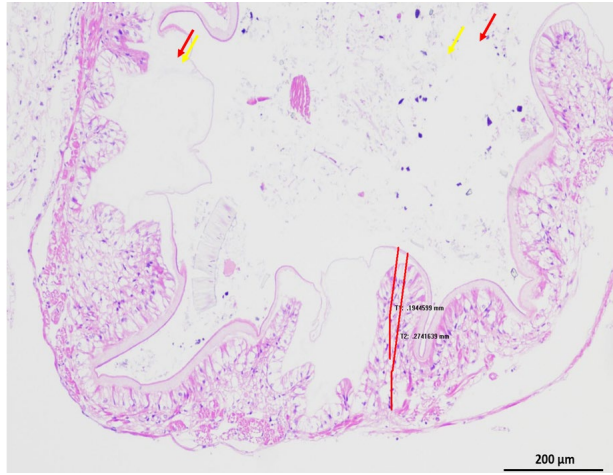


Figure 5. Wrinkle wall thickness and mucosal thickness of *Eriocheir sinensis*

图 5. 中华绒螯蟹皱壁厚度和黏膜层厚度

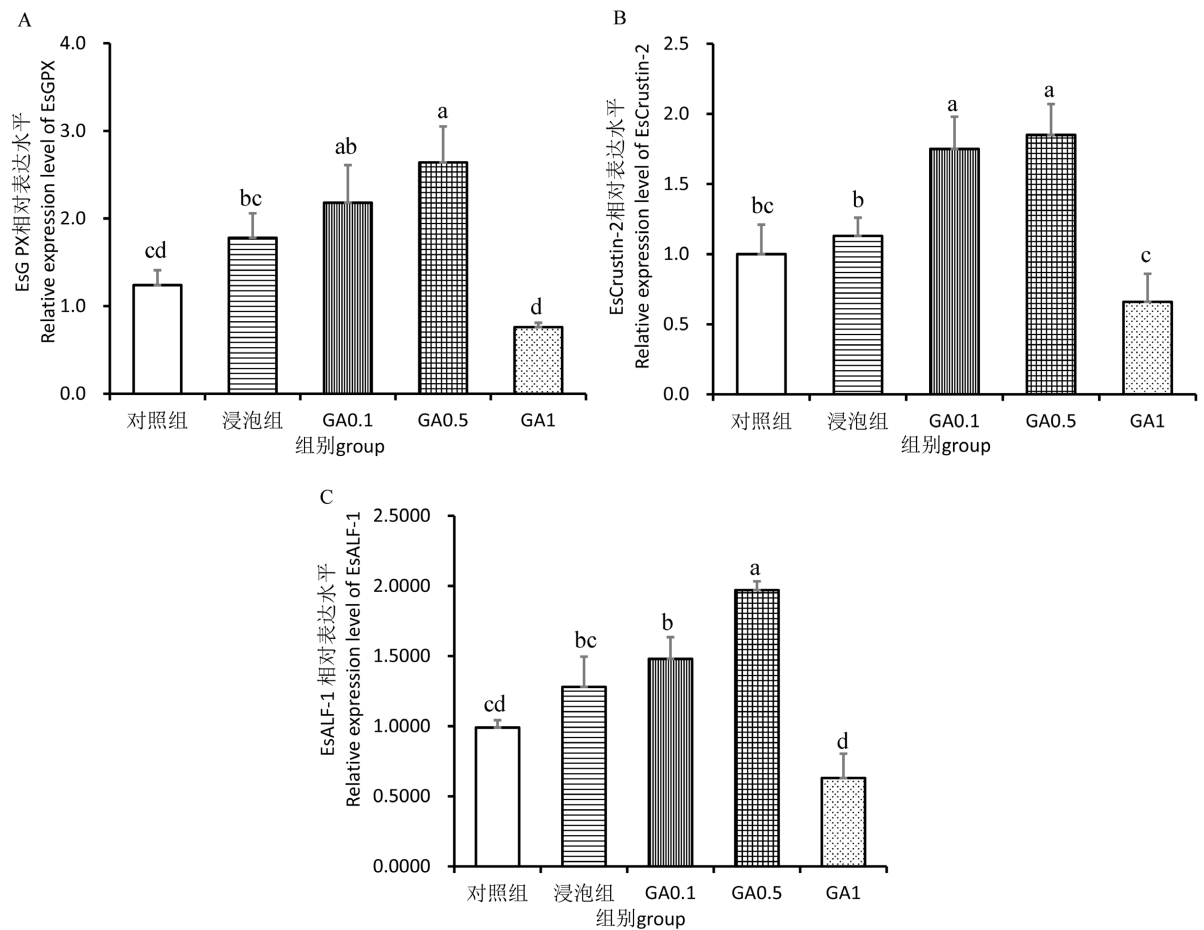
Table 4. Wrinkle wall thickness of *Eriocheir sinensis*
表 4. 中华绒螯蟹皱壁厚度

Name	皱壁厚度 Wrinkle wall thickness/mm					平均值
	1	2	3	4	5	
对照组	0.130687	0.234978	0.187995	0.24129	0.276711	0.214332
实验组	0.244074	0.303755	0.213392	0.251968	0.225585	0.247755

Table 5. Mucosal thickness of *Eriocheir sinensis*
表 5. 中华绒螯蟹黏膜层厚度

Name	黏膜层厚度 Mucosal thickness/mm					平均值
	1	2	3	4	5	
肠 1 100-1	0.166938	0.292097	0.217162	0.27968	0.387695	0.268714
肠 15 100	0.281524	0.267821	0.317373	0.423486	0.304192	0.318879

3.4. GA 对中华绒螯蟹免疫相关基因表达的影响



A——*EsGPX* 相对表达水平。B——*EsCrus2* 相对表达水平。C——*EsALF1* 相对表达水平。

Figure 6. Relative mRNA expression levels of immune-related genes in the hepatopancreas of *Eriocheir sinensis* following 50-day dietary supplementation with graded levels of GA

图 6. 饲喂不同浓度 GA 50 天后中华绒螯蟹肝胰腺免疫相关基因 mRNA 的相对表达水平

中华绒螯蟹肝胰腺中免疫相关基因的表达情况如图 6 所示。与对照组相比,在饲料中分别添加 0.1 mL/kg 和 0.5 mL/kg GA 的中华绒螯蟹肝胰腺中 *EsGPX*、*EsALF1*、*EsCrus2* 的 mRNA 表达量显著升高($P < 0.05$)。而在添加 1 mL/kg GA 时显著降低($P < 0.05$)。

4. 讨论

4.1. GA 对中华绒螯蟹生长免疫的影响

中草药添加剂可以间接或直接促进甲壳动物的生长,提高存活率和饲料利用效率[16]。本研究结果显示,草药提取物甘草酸 GA 作为饲料添加剂在饲料中混合投喂,浓度合适时(0.5 mL/kg)可以提高中华绒螯蟹的增重率和存活率,但这一现象背后的原理机制并不十分清晰。同样在其他水产动物中,有研究表明在饲料中添加甘草酸投喂刺参可以提高其生长速率并降低灿烂弧菌感染后导致的死亡率[17], L. Ocampo 等人研究发现投喂甘草酸制剂的对虾在 WSSV 攻毒后存活率显著提高[18], 饲料中添加 1.1%海带-甘草酸复方剂能促进异育银鲫对营养物质的消化吸收,一定程度提高增重率[19]。由此推测甘草酸可能通过抑制病原微生物感染或降低氧化应激来间接提高甲壳动物存活率,并通过提高消化酶的活力,促进营养物质的消化吸收和合成代谢,提高增重率。

4.2. GA 对中华绒螯蟹部分非特异性免疫指标的影响

酸性磷酸酶(ACP)是巨噬细胞溶酶体的标志酶,也是无脊椎动物吞噬溶酶体酶的重要组成部分,与物质代谢密切相关,可被外源物质诱导,在免疫反应中发挥重要作用。本研究结果显示,在饲料中添加 0.5 mL/kg GA,中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺中 ACP 活性显著增强。与本研究结果类似,Chen 等人发现饲料中添加 GA 能增强刺参中 ACP 的活性[17], Liu F. 等人的研究结果中指出,投喂添加 50、75、100 和 150 mg/kg GA 的饲料的克氏原螯虾血细胞和肝胰腺中 ACP 活性均显著提高[14]。

丙二醛(MDA)是一种高活性代谢产物,可与蛋白质、DNA 和脂质等生物分子形成共价加合物,导致细胞功能障碍和损伤。因此 MDA 含量可以反映机体脂质过氧化速率和强度,也能间接反映组织过氧化损伤程度。在本研究中,饲料中添加 GA 显著降低了中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺中的 MDA 含量。这与在建鲤[20]和克氏原螯虾[14]的研究中的结果相似。

谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)是动物体内重要的氨基转移酶,主要分布于线粒体,在蛋白质代谢中发挥关键作用。当肝脏受到损伤时,GPT 和 GOT 会释放到血液中,因此 GOT 和 GPT 活性可用于评估肝脏功能和疾病。本研究结果表明,饲料中添加 GA 可以显著降低中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺 GPT 和 GOT 活性。同样,在五条鲷中甘草酸能够降低血清中 GOT 和 GPT 活性并对鱼体肝脏状况有改善作用[21]。然而 GA 对甲壳动物 GOT 和 GPT 活性的影响尚未见报道。

超氧化物歧化酶(SOD)是一种重要的抗氧化酶,在细胞内广泛分布。它可以将超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)转化为氧气(O_2)和过氧化氢(H_2O_2),从而保护细胞免受氧化损伤。本研究结果显示,饲料中添加 GA 可以显著提高中华绒螯蟹血淋巴和肝胰腺 SOD 活性。在对虾研究中亦观察到类似规律:饲料中添加 150~200 mg/kg 甘草酸能显著提升凡纳滨对虾 SOD 活性,且呈现剂量依赖性增强效应[22]。这一发现与克氏原螯虾研究结果相印证——添加 75~100 mg/kg GA 能使克氏原螯虾体内 SOD 活性显著升高[14], 饲喂 200 mg GA 的鲢鱼 SOD 活性也显著升高[23]。而值得注意的是,当 GA 添加浓度过高时反而会对 SOD 活性产生抑制,在海带-甘草酸复方剂对异育银鲫的研究中也是如此[19]。这种添加低浓度 GA 有增强抗氧化作用,过高浓度产生抑制的现象有待进一步探究。

以上结果表明,在饲料中添加适量的 GA 可提高中华绒螯蟹机体的部分非特异性免疫酶活,从而增强机体的防御能力和免疫功能,减少养殖中病害的发生。

4.3. GA 对中华绒螯蟹肠道结构的影响

肠道组织对于甲壳动物的免疫防御功能意义重大, 其中皱襞高度和皱襞宽度是肠面积变化的特征, 皱襞高度的增加即肠道面积的增加, 意味着消化吸收能力增强[24]。而肠粘膜层厚度是一种免疫能力的指标, 其具有选择性渗透吸收营养物质和防御肠道内微生物及致炎因子入侵等屏障功能。有研究表明, 添加饲料添加剂(黄芪多糖、枸杞多糖、黄柏提取物等)能够增加仿刺参的肠粘膜层厚度[25]。并且在中华绒螯蟹中, 甘露寡糖已被证明能够显著增加肠道褶皱的高度[26]。在本研究中发现, 投喂 GA 后中华绒螯蟹肠道皱壁厚度和黏膜层厚度均出现显著增厚。同样有研究发现 GA 对肿瘤小鼠肠道黏膜具有修复作用[27], 能够减弱脱氧雪腐镰刀菌醇对仔猪肠道的伤害[28], 但甘草酸对甲壳动物肠道结构的作用研究尚少。分析其机制, GA 可能促进中华绒螯蟹肠道上皮黏液细胞的增殖, 同时改善肠道内 PH 为酶发挥活性提供了条件, 进而增强消化吸收能力和抗肠道感染能力。

4.4. GA 对中华绒螯蟹肝胰腺免疫相关基因 mRNA 表达水平的影响

GPX 基因编码的是谷胱甘肽过氧化物酶, 能够清除细胞内的过氧化氢等有害物质, 保护细胞免受氧化损伤。抗菌肽(AMPs)是一类广泛存在于生物体、具有广谱抗微生物活性的小分子多肽。抗脂多糖因子(ALF-1)和 Crustin-2 是甲壳动物抗菌肽的关键成员, 构成其免疫防御系统的重要组成部分。而中草药添加剂(如黄芪多糖)可以显著提高南美白对虾[29]和中华绒螯蟹[30]血淋巴和肝胰腺中 ALF-1 的表达水平。本研究发现添加了 GA 的中华绒螯蟹肝胰腺中 GPX、ALF-1、Crustin-2 的 mRNA 表达量显著升高, 且随着浓度的增加在一定范围内呈上升趋势。已有研究证明 GA 能够恢复烧伤导致的抗菌肽减少, 防止伤口感染[31]。然而 GA 添加量为 1 mL/kg 时三个基因 mRNA 表达量下降到和对照组没有差异的水平, 暂未得到解释。GA 适量添加能够通过提高 GPX 和过氧化氢酶的活性来调节细胞内抗氧化系统, 增强机体免疫防御[32]。但具体的作用机制尚不明晰, 有待进一步研究。

5. 结论

在饲料中添加或浸泡一定浓度的甘草酸能够显著提高中华绒螯蟹存活率和增重率, 降低体内丙二醛(MDA)含量, 抑制谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)酶活性水平, 增强免疫相关基因 GPX、ALF-1、Crustin-2 表达水平。其中添加 0.5 mL/kg GA 饲料投喂中华绒螯蟹体内免疫指标变化最为显著, 并且酸性磷酸酶(ACP)、超氧化物歧化酶(SOD)活性水平较其他组显著升高。研究表明在饲料中添加适量浓度甘草酸能够有效改善中华绒螯蟹的部分非特异性免疫指标并提高组织中免疫相关基因的相对表达量, 增强中华绒螯蟹抗应激能力, 且浓度为 0.5 mL/kg 时效果最佳。本研究为甘草酸作为一种饲料添加剂在甲壳动物中的应用提供了数据支撑和理论支持。

参考文献

- [1] 张新宇, 刘超男, 李光玉, 等. 抗生素替代物在畜禽生产中的应用研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2023, 59(3): 46-53.
- [2] 李想, 李冀. 甘草提取物活性成分药理作用研究进展[J]. 江苏中医药, 2019, 51(5): 81-86.
- [3] 邱泽钊, 沈铭, 陈玉娟, 等. 甘草酸的生物学功能及在动物生产中的应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(6): 30-35.
- [4] 胡安君. 苦参碱、甘草酸体外抗猪繁殖与呼吸综合征病毒机制研究[D]: [硕士学位论文]. 郑州: 河南农业大学, 2016.
- [5] 冯书凤, 时洪艳, 张记宇, 等. 甘草酸通过 HMGB1/TLR4/JNK 信号通路抗猪急性腹泻综合症冠状病毒感染的研究[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(10): 1076-1083.
- [6] Wang, B., Mao, Y., Gong, L., Xu, X., Jiang, S., Wang, Y., *et al.* (2018) Glycyrrhizic Acid Activates Chicken Macrophages and Enhances Their Salmonella-Killing Capacity *in Vitro*. *Journal of Zhejiang University-Science B*, **19**, 785-

795. <https://doi.org/10.1631/jzus.b1700506>
- [7] 王露露. 甘草酸在鸡毒支原体感染中的作用及机制研究[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- [8] 李建房. 甘草多糖对断奶仔猪生长性能和肠道健康的影响[D]: [博士学位论文]. 扬州: 扬州大学, 2022.
- [9] 衡宇. 甘草酸调节紧密连接蛋白修复溃疡性结肠炎肠黏膜屏障损伤的药理作用研究[D]: [硕士学位论文]. 西安: 第四军医大学, 2017.
- [10] Edahiro, T., Hamoguchi, M. and Kusuda, R. (1991) Suppressive Effect of Glycyrrhizin against Streptococcal Infection Promoted by Feeding Oxidized Lipids to Yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture Science*, **39**, 21-27.
- [11] Wang, Y., Xu, W., Zhang, J., Liu, J., Wang, Z., Liu, Y., *et al.* (2022) Effects of Glycyrrhizin (GL) Supplementation on Survival, Growth Performance, Expression of Feeding-Related Genes, Activities of Digestive Enzymes, Antioxidant Capacity, and Expression of Inflammatory Factors in Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*) Larvae. *Aquaculture Nutrition*, **2022**, Article ID: 5508120. <https://doi.org/10.1155/2022/5508120>
- [12] Li, S., Zou, J., Wang, X., Song, Z., Xu, Z. and Wang, Q. (2022) Effects of Glycyrrhizic Acid on Hatchability, Growth, and Physiological Responses of Farmed Dojo Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) during Early Life Stages. *Aquaculture*, **557**, Article ID: 738323. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738323>
- [13] Ocampo, L., Chavez, B., Tapia, G., Ibarra, C. and Sumano, H. (2014) Efficacy of a Pharmaceutical Preparation Based on Glycyrrhizic Acid in a Challenge Study of White Spot Syndrome in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, **428**, 280-283. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.005>
- [14] Liu, F., Shao, G., Tian, Q., Cheng, B., Shen, C., Wang, A., *et al.* (2021) Enhanced Growth Performance, Immune Responses, Immune-Related Gene Expression and Disease Resistance of Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkii*) Fed Dietary Glycyrrhizic Acid. *Aquaculture*, **533**, Article ID: 736202. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736202>
- [15] Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, **25**, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- [16] 孟楠, 胡骞, 金玉立, 等. 复方中草药制剂对克氏原螯虾生长、免疫功能及肝胰腺组织的影响[J]. 中国饲料, 2019(21): 60-65.
- [17] Chen, X., Zhang, W., Mai, K., Tan, B., Ai, Q., Xu, W., *et al.* (2010) Effects of Dietary Glycyrrhizin on Growth, Immunity of Sea Cucumber and Its Resistance against *Vibrio splendidus*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, **34**, 731-738. <https://doi.org/10.3724/sp.j.1035.2010.00731>
- [18] Kukurtcu, B. (2014) Efficacy of a Pharmaceutical Preparation Based on Glycyrrhizic Acid: In a Challenge Study of White Spot Syndrome in *Litopenaeus vannamei*. *International Aquafeed*, **17**, 10-11.
- [19] 董学兴, 黄金田, 杨文平, 等. 海带及甘草酸对异育银鲫生长、表观消化率和非特异性免疫的影响[J]. 饲料工业, 2011, 32(8): 26-28.
- [20] 曹丽萍. 建鲤急性肝损伤模型的构建及几种中草药饲料添加剂对肝脏的保护作用[D]: [博士学位论文]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- [21] Edahiro, T., Hamoguchi, M. and Kusuda, R. (1990) Effect of Glycyrrhizine against Streptococcal Infection of Young Yellow-Tail, *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture Science*, **38**, 239-243.
- [22] Chen, X., Mai, K., Zhang, W., Wang, X., Ai, Q., Xu, W., *et al.* (2010) Effects of Dietary Glycyrrhizin on Growth and Nonspecific Immunity of White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, **41**, 665-674. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2010.00409.x>
- [23] Harikrishnan, R., Devi, G., Van Doan, H., Jawahar, S., Balasundaram, C., Saravanan, K., *et al.* (2021) Study on Antioxidant Potential, Immunological Response, and Inflammatory Cytokines Induction of Glycyrrhizic Acid (GA) in Silver Carp against Vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology*, **119**, 193-208. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.09.040>
- [24] 伯若楠, 王晶, 刘晓盼, 等. 中药多糖作为免疫增强剂及其对肠道黏膜影响的研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(7): 2066-2073.
- [25] 樊英, 于晓清, 李乐, 等. 不同免疫增强剂对仿刺参肠道消化酶活性及组织结构的影响[J]. 水产学杂志, 2014, 27(4): 46-51+59.
- [26] 卢建挺. 几种免疫增强剂改善中华绒螯蟹幼蟹生长、抗氧化和免疫性能的研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 华东师范大学, 2019.
- [27] 韩子意, 白雪峰, 王钰璋, 等. 用于增强结肠癌化疗的肠道菌群葡萄糖醛酸酶响应甘草酸胶束[J]. 高分子学报, 2022, 53(6): 626-635.
- [28] Xu, X., Chang, J., Wang, P., Liu, C., Liu, M., Zhou, T., *et al.* (2023) Combination of Glycyrrhizic Acid and Compound Probiotics Alleviates Deoxynivalenol-Induced Damage to Weaned Piglets. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **256**, Article ID: 114901. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114901>

-
- [29] Zhai, Q., Li, J., Feng, Y. and Ge, Q. (2019) Evaluation of Combination Effects of Astragalus Polysaccharides and Florfenicol against Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease-Causing Strain of *Vibrio Parahaemolyticus* in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, **86**, 374-383. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.065>
- [30] 赵紫越. 黄芪多糖对中华绒螯蟹免疫功能的影响[D]: [硕士学位论文]. 天津: 天津科技大学, 2020.
- [31] Yoshida, T., Yoshida, S., Kobayashi, M., Herndon, D.N. and Suzuki, F. (2009) Pivotal Advance: Glycyrrhizin Restores the Impaired Production of B-Defensins in Tissues Surrounding the Burn Area and Improves the Resistance of Burn Mice to *Pseudomonas aeruginosa* Wound Infection. *Journal of Leukocyte Biology*, **87**, 35-41. <https://doi.org/10.1189/jlb.1208760>
- [32] Kao, T., Shyu, M. and Yen, G. (2008) Neuroprotective Effects of Glycyrrhizic Acid and 18 β -Glycyrrhetic Acid in PC12 Cells via Modulation of the PI3K/Akt Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 754-761. <https://doi.org/10.1021/jf802864k>