

口服投喂抗菌肽 Scygonadin 对黑鲷免疫及抗氧化指标的影响

吴曼丽 陈贝 刘洁 陈慧芸 彭会
(厦门大学环境与生态学院 福建厦门 361100)

摘要:本实验以黑鲷(*Sparus macrocephalus*)为研究对象,利用抗菌肽基因工程表达产物Scygonadin进行口服试验,探讨抗菌肽口服后是否对鱼体内免疫学指标或者抗氧化反应指标有影响。黑鲷空腹三天后,口服投喂不同浓度(0.2、0.4、0.8 mg/mL)的Scygonadin各100 μl,以PBS为对照组,采集不同时间点(6、12、24、48、72 h)血清及肝、肠组织样品,测定超氧化物歧化酶(SOD)、脂质过氧化(MDA)、一氧化氮合酶(NOS)、一氧化氮(NO)、谷胱甘肽(GSH)等抗氧化指标。实验结果表明黑鲷口服投喂基因工程表达产物Scygonadin对其免疫及抗氧化指标无显著性影响,表明口服抗菌肽Scygonadin不会影响鱼类的正常免疫功能,从而为抗菌肽在水产养殖业的应用提供了科学依据。

关键词:抗菌肽 Scygonadin 口服 免疫功能 安全性

中图分类号:R452

文献标识码:A

文章编号:1674-2060(2015)11-0004-04

Scygonadin是厦门大学首次于2006年报道从拟穴青蟹精浆中分离获得的一种新型的阴离子抗菌肽^[1],该抗菌肽是利用阳离子交换层析和反相高效液相层析技术从拟穴青蟹的精浆中获得的,分子量约为10.8 kDa。对该抗菌肽的基因序列、体内表达特性、抗菌机制及其功能已进行了大量研究^[2-3]。Scygonadin是首个在甲壳动物中发现的与生殖免疫相关的抗菌肽,具有重要的生殖免疫功能^[6,7],预示其在水产养殖业具有重要的应用价值。

自抗菌肽天蚕素于1981年发现后^[8],迄今在多种生物种类都有抗菌肽的研究报道,如从南非爪蟾(*Xenopus laevis*)皮肤中分离到防护素(magainin)^[9],在人的血液和尿液中发现的抗菌肽hepcidin^[10],从海洋生物亚洲鲎(*Tachypleus tridentatus*)提取纯化tachyplesin

^[11]。在病原菌对抗生素的耐药性日趋严重的情况下,抗菌肽将可能成为新的抗菌药物来源,其临床应用潜力很大^[12]。来源于细菌的两种抗菌肽gramicidin S与polymyxin B已经应用于治疗由*Pseudomonas aeruginosa*和*Acinetobacter baumannii*引起的感染^[13],IB-367是protegrin的一种类似物,被用于治疗囊性纤维变性病人由*Pseudomonas aeruginosa*引起的肺部感染^[14]。

抗菌肽在水产养殖业的应用遇到的很大问题是如何有效的使抗菌肽产品进入鱼类或其它水产动物体内,口服免疫是一个很重要的途径。蛋白可以在肠道内被完整的吸收到血清和动物组织中^[15],Romy Fischer等^[16]以乳铁蛋白为研究对象,通过灌胃给药的方式持续4周每天给成年小鼠灌胃牛乳铁蛋白(bLf),检测吸收的时间效

表1 灌胃 Scygonadin 对黑鲷血清、肠道、肝脏 MDA 含量的影响

	时间 time(h)	PBS 组 control	实验组 experiment groups (mg mL)		
			0.2	0.4	0.8
血清 (nmol mL)	6	24.14±7.24	32.14±7.07	36.90±11.80	18.36±3.88
	12	11.57±0.74	18.38±14.72	13.71±5.03	11.52±1.94
	24	10.28±7.60	14.50±5.02	8.57±5.23	9.52±1.58
	48	18.41±11.01 ^{ab}	28.69±16.06 ^b	15.79±7.37 ^{ab}	6.59±1.91 ^a
	72	10.68±1.48	10.20±6.68	10.34±2.69	9.91±6.52
肠道 (nmol mgprot)	6	2.58±0.85	7.39±4.32	3.53±1.69	6.17±2.96
	12	3.08±2.04	4.04±2.40	4.53±1.91	4.23±1.51
	24	2.85±1.54	3.74±2.04	4.14±1.69	7.23±2.62
	48	3.93±3.60	7.85±3.10	3.62±0.44	3.82±2.08
	72	2.96±2.15	5.32±4.73	4.76±2.74	10.25±5.21
肝脏 (nmol mgprot)	6	1.46±0.93	1.73±0.66 ^a	1.12±0.13	1.22±0.43
	12	0.77±0.59	0.74±0.07 ^b	0.93±0.18	0.91±0.24
	24	0.92±0.59	1.49±0.55 ^a	1.38±0.70	1.67±0.50
	48	1.08±0.32	0.77±0.26 ^b	1.22±0.18	1.28±0.84
	72	1.19±0.20	1.26±0.21 ^{ab}	1.23±0.27	1.29±0.25

注:同行上标或同列下标相同字母表示差异不显著(p>0.05);相邻字母表示差异显著(p<0.05)。

表2 灌胃 Scygonadin 对黑鲷肠道 NOS 影响

	时间 time (h)	PBS 组 control	实验组 experiment groups (mg mL)		
			0.2	0.4	0.8
肠道 (U mgprot)	6	1.53±0.25	2.37±0.20	1.51±0.20	2.48±1.01
	12	2.61±1.03	1.63±0.46	1.86±0.31	2.44±0.38
	24	1.09 ^{ab} ±0.35	1.59±0.53 ^a	1.74±0.44 ^{ab}	2.43±0.59 ^b
	48	2.47±1.11	1.45±0.41	1.55±0.14	2.56±0.96
	72	1.32±0.22	1.80±0.40	1.65±0.46	2.68±1.36

注:同表1。

表3 灌胃 Scygonadin 对黑鲷肝脏 NO 影响

	时间 time (h)	PBS 组 control	实验组 experiment groups (mg mL)		
			0.2	0.4	0.8
肝脏 ($\mu\text{mol gprot}$)	6	1.88 \pm 0.58	2.49 \pm 1.07	2.75 \pm 1.04	1.99 \pm 0.87
	12	1.97 \pm 0.41	2.18 \pm 0.86	2.68 \pm 1.70	1.56 \pm 0.39
	24	1.49 \pm 1.05	2.23 \pm 1.23	3.27 \pm 0.55	1.58 \pm 0.31
	48	2.45 \pm 0.35	3.34 \pm 1.23	3.23 \pm 0.86	3.57 \pm 1.24
	72	2.05 \pm 0.66	2.03 \pm 0.67	2.08 \pm 0.65	1.86 \pm 0.24

注:同表1。

表4 灌胃 Scygonadin 对黑鲷肝脏 SOD 影响

	时间 time (h)	PBS 组 control	实验组 experiment groups (mg mL)		
			0.2	0.4	0.8
肝脏 (U mgprot)	6	0.71 \pm 0.26	1.34 \pm 1.10	1.32 \pm 0.77	0.82 \pm 0.37 _a
	12	1.15 \pm 0.14	2.02 \pm 0.52	1.17 \pm 0.33	0.59 \pm 0.30 _a
	24	0.59 \pm 0.46	0.85 \pm 0.41	0.84 \pm 0.55	0.78 \pm 0.44 _a
	48	1.31 \pm 0.22	0.94 \pm 0.39	0.51 \pm 0.11	0.62 \pm 0.24 _a
	72	1.22 \pm 0.79	1.35 \pm 0.35	0.86 \pm 0.47	1.73 \pm 0.29 _b

注:同表1。

表5 灌胃 Scygonadin 对黑鲷肠道 GSH 影响

	时间 time (h)	PBS 组 control	实验组 experiment groups (mg/mL)		
			0.2	0.4	0.8
肠道 ($\mu\text{mol/mgprot}$)	6	0.51 \pm 0.29	0.59 \pm 0.33	2.10 \pm 1.62	0.44 \pm 0.26
	12	0.59 \pm 0.23	1.13 \pm 0.89	1.29 \pm 1.19	1.22 \pm 0.66
	24	1.33 \pm 1.57	3.36 \pm 2.97	2.05 \pm 1.36	1.29 \pm 1.01
	48	2.71 \pm 1.89	0.79 \pm 0.23	1.35 \pm 0.69	0.95 \pm 0.65
	72	1.78 \pm 2.16	1.31 \pm 1.58	0.76 \pm 0.70	0.44 \pm 0.19

注:同表1。

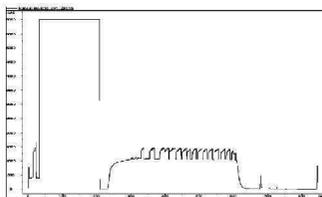


图1 亲和层析纯化获得 Scygonadin 的 UV₂₈₀ 图

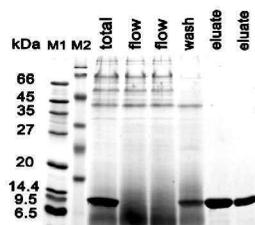


图2 Scygonadin 蛋白纯化前后 SDS-PAGE 图

应,以及组织积累药物模式。

在前期本实验室通过酵母系统成功表达 Scygonadin 基因,获得了 Scygonadin 基因工程表达产物的基础上,拟以 Scygonadin 表达产物口服海水养殖鱼类黑鲷,观察该抗菌肽进入鱼体内后对免疫相关因子以及抗氧化反应因子的影响,从而判断鱼类口服抗菌肽后是否影响整体的免疫状态,以期对抗菌肽的应用提供科学依据。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验所用黑鲷(20-30 g)购自厦门市漳浦渔排,暂养一周,空腹三天后,用于试验。

1.1.2 主要仪器和设备

电热恒温水浴锅(HWS26);恒温培养箱(DHG-P162);烘箱(DHG-P240)为上海一恒产品;-80超低温冰箱;Milli Q超纯水系

统为 Millipore 公司产品;Tecan Genesis 型自动酶标仪购自 Tecan 公司;Sartorius 电子天平;紫外分光光度计(Ultaspece 2100pro)为安玛西亚公司产品(现为 GE 公司)

1.1.3 试剂

Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究, CAT、MDA、MPO、NO、NOS 检测试剂盒购自 Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute;GSH(L-Glutathione reduced)购自 Japan Fluka;Micrococcus lysodeikticus 冻干细胞购自 USA SIGMA-ALDRICH;DTNB(5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid))购自 USA Fluka;氯化钠、磷酸氢二钾等其它常用试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 抗菌肽 Scygonadin 真核表达产物的获得

-80 °C 保存重组毕赤酵母 GS115(pPIC9K-Scygonadin)菌株(由本实验室保存)经真核表达、表达产物的纯化、洗脱蛋白的脱盐获得实验用抗菌肽 Scygonadin。

1.2.2 黑鲷灌胃方法及给药剂量

给药途径一般采取注射、口服、浸浴三种途径,本实验采用强制口服的方法,俗称灌胃。根据 Scygonadin 的抑菌、杀菌效力,计算出适宜的口服浓度。嗜水气单胞菌和荧光假单胞菌是黑鲷在养殖过程中的致病菌,以黑鲷对这两种菌的抑菌及抗菌浓度计算给药量。最后取 1.0 $\mu\text{g/g}$ 鱼重、2.0 $\mu\text{g/g}$ 鱼重、4.0 $\mu\text{g/g}$ 鱼重三个灌胃浓度。

1.2.3 实验分组和样品采集

以 PBS(pH=8.0)为对照组,灌胃 Scygonadin 剂量 0.2 mg/mL,

0.4 mg/mL, 0.8 mg/mL各100 μ L。每个浓度组设5个取样时间点: 6h、12h、24h、48h、72h, 平行样5尾。测量体长及体重, 尾部静脉取血液样品后, 剪断脊柱使鱼猝死。迅速解剖, 取肝脏、肠道等器官, 用无菌锡箔纸包好投入液氮中速冻, -80°C 超低温冰箱中保存备用。

1.2.4 酶指标测定方法

1.2.4.1 SOD测定方法

制备肝脏、肠道组织匀浆液。实验采用邻苯三酚法测SOD酶活性, 邻苯三酚在碱性条件下会发生自氧化, 释放 O_2^- , 中间产物不断变色: 黄棕色-绿色-黄色, 初始维持线性3-4分钟。SOD通过催化 O_2^- 与H $^+$ 结合, 阻止中间产物积累从而能够抑制邻苯三酚自氧化反应。

1.2.4.2 MDA测定方法

过氧化脂质降解产物中的丙二醛(MDA)可与硫代巴比妥酸(TBA)缩合, 形成红色产物, 在532 nm处有最大吸收峰。

1.2.4.3 NO测定方法

NO由于化学性质活泼在体内代谢转化为 NO_3^- 和 NO_2^- , 而 NO_2^- 又进一步转化为 NO_3^- , 利用硝酸还原酶特异性将 NO_3^- 还原为 NO_2^- , 通过显色反应测定其浓度的高低。

1.2.4.4 NOS测定方法

NOS催化L-Arg和分子氧反应生成NO, NO与亲核性物质生成有色化合物, 在530 nm波长下测定吸光度, 根据吸光度的大小计算出NOS活力。

1.1.4.5 GSH测定方法

GSH 测定用DTNB 分光光度法, 按Ernest Beutler等^[17]改进方法进行。

2 实验结果

2.1 抗菌肽 Scygonadin 真核表达产物的获得

本实验所用Scygonadin由毕赤酵母真核表达, 甲醇诱导后在培养上清中检测到目的蛋白Scygonadin, 并用亲和层析纯化表达产物。图1中为抗菌肽亲和层析纯化UV₂₈₀图; 图2为抗菌肽纯化后SDS-PAGE图。

2.2 灌胃不同浓度的抗菌肽 Scygonadin 对 MDA 含量的影响

从表1中可以看到, 在血清中, 灌胃不同浓度组与PBS组MDA含量相比, 均无显著性差异。48 h, 0.8 mg/mL浓度组中MDA含量与0.2 mg/mL浓度组相比, 有显著性降低($p < 0.05$)。同一浓度组不同时间点间比较, 0.4 mg/mL浓度组, 6 h时MDA含量与其它时间点相比有显著性差异($p < 0.05$), 6 h时MDA含量最高。0.8 mg/mL浓度组, 6 h时MDA含量与其它时间点相比有显著性差异($p < 0.05$), 6 h时MDA含量最高。

在肠道组织中, 各不同灌胃浓度组与PBS对照组相比, MDA含量无显著性差异。同一灌胃浓度组不同时间点之间比较, MDA含量也均无显著性差异。在肝脏组织中, 各不同灌胃浓度组与PBS对照组相比, MDA含量无显著性差异。同一浓度组不同时间点比较, 0.2 mg/mL浓度组, 6 h、24 hMDA含量与12 h、48 h相比, 有显著性差异($p < 0.05$)。

2.3 灌胃不同浓度的抗菌肽 Scygonadin 对 NOS 的影响

从表2可以看到, 在肠道组织中, 各不同灌胃浓度组与PBS对照组相比, 在24 h时, 0.8 mg/mL浓度组与PBS对照组相比一氧化氮合酶(NOS)活性有显著性上升($p < 0.05$), 同样, 0.8 mg/mL浓度组与0.2 mg/mL浓度组相比NOS有显著性上升($p < 0.05$)。同一灌胃

浓度组不同时间点之间比较, NOS活性也均无显著性差异。

2.4 灌胃不同浓度的抗菌肽 Scygonadin 对 NO 的影响

从表3可以看到, 在肝脏组织中, 各不同灌胃浓度组与PBS对照组相比, 一氧化氮(NO)含量无显著性差异; 但0.2 mg/mL及0.4 mg/mL浓度组在不同时间点与对照组相比, 有增加的趋势。同一灌胃浓度组不同时间点之间比较, NO含量也均无显著性差异。

2.5 灌胃不同浓度的抗菌肽 Scygonadin 对 SOD 的影响

从表4可以看到, 在肝脏组织中, 各不同灌胃浓度组与PBS对照组相比, SOD酶活性无显著性差异。同一灌胃浓度组不同时间点之间比较, 72 h时, 0.8 mg/mL浓度组 SOD酶活性与其它时间点相比有显著性提高($p < 0.05$), 其它浓度组无差异。

从表5中可以看出, 在肝脏组织中, 各不同灌胃浓度组与PBS对照组相比, 谷胱甘肽(GSH)含量无显著性差异。同一灌胃浓度组不同时间点之间比较, GSH含量也均无显著性差异。

2.6 灌胃不同浓度的抗菌肽 Scygonadin 对 GSH 的影响

3 讨论

3.1 抗菌肽 Scygonadin 对黑鲟免疫指标的影响

本实验通过测定肝脏NO、肠道NOS指标, 评价抗菌肽对黑鲟免疫能力的影响。

3.1.2 抗菌肽 Scygonadin 对一氧化氮(NO)的影响

NO具有抗菌、抗肿瘤、抗寄生虫及免疫调节、介导细胞毒效应的的作用, 是机体免疫的一个重要指标^[18]。在本实验中, 灌胃Scygonadin后, 0.2 mg/mL及0.4 mg/mL浓度组在不同时间点肝脏NO有升高, 但差异不显著($p > 0.05$); 灌胃0.8 mg/mL浓度组与对照组相比无显著升高, 可能由于NO与谷胱甘肽过氧化物酶及SOD之间的负相关性, 抗菌肽对NO的影响不显著^[19]。

3.1.3 抗菌肽 Scygonadin 对一氧化氮合酶(NOS)的影响

肠道NOS活性, 在24 h, 0.8 mg/mL浓度组与PBS对照组相比有显著性上升($p < 0.05$), 且与0.2 mg/mL浓度组相比也有显著性上升($p < 0.05$)。这个结果说明, NOS活性在24 h时达到最高, 而之后又下降, 且只在0.8 mg/mL浓度组时能显著诱导NOS活性的升高。

在灌胃后不同时间点, 除24 h外, 0.8 mg/mL浓度组NOS活性与PBS对照组相比均有升高, 但差异不显著($p > 0.05$); 另外两个浓度组均无显著性差异。这个结果与肝脏中NO含量的变化正好相反。在灌胃后不同时间点, 0.8 mg/mL浓度组NO含量与PBS对照组无差异; 而0.2 mg/mL及0.4 mg/mL与对照组相比均有升高, 但差异不显著($p > 0.05$)。结果表明, 灌胃0.8 mg/mL时, NOS活性上升, NO含量被抑制; 而灌胃低浓度组0.2 mg/mL及0.4 mg/mL, NOS活性没有被诱导, NO含量升高。这也解释了如3.1.2中所示为什么“灌胃0.8 mg/mL浓度组与对照组相比无显著升高, 而0.2 mg/mL及0.4 mg/mL浓度组在不同时间点肝脏NO有升高”的原因。由于NO来源于NOS, 低中浓度组NO含量的提高不是经过NOS的诱导, 可能有其它途径的来源, 存在多途径的相互协调^[20]。

3.2 抗菌肽 Scygonadin 对黑鲟抗氧化系统的影响

机体活细胞可产生氧自由基, 过量的氧自由基对机体有害, 机体中有一套有效的抗氧化系统可以用于清除氧自由基。保持机体内活性氧保持平衡状态, 不会对机体产生毒害作用。

本实验通过测定黑鲟血清、肝脏、肠道MDA含量, 肝脏SOD酶活性及肠道GSH含量来评价抗菌肽Scygonadin对黑鲟抗氧化系统的影响。

3.2.1 抗菌肽 Scygonadin 对超氧化物歧化酶(SOD)的影响

SOD对于整个机体的免疫功能及增强吞噬细胞防御能力有重要作用,与生物的免疫水平密切相关^[21]。在本实验中,肝脏组织中,同一灌胃浓度组不同时间点之间比较,0.8 mg/mL浓度组在72 h时的SOD酶活性与其它时间点相比有显著性增强($p < 0.05$)。说明灌胃0.8 mg/mL抗菌肽Scygonadin对机体SOD酶的活性有增强作用。这个实验结果支持了王一娟等^[21]在河蟹基础日粮中添加0.4‰的抗菌肽后,河蟹肝脏和肌肉中SOD活性显著增强($p < 0.05$)。

3.2.2 抗菌肽 Scygonadin 对丙二醛(MDA)的影响

丙二醛(MDA)是脂质过氧化物(LPO)的主要分解产物。本实验结果表明:血清中,中低浓度组与PBS对照组相比,MDA含量在不同时间点均有上升,但无显著性差异;而0.8 mg/mL组与PBS对照组MDA含量基本持平。这两个可能:一是灌胃低浓度抗菌肽产生一定量的MDA,而灌胃0.8 mg/mL抗菌肽Scygonadin不产生MDA;另一个可能是,低浓度组清除MDA的能力不如高浓度组,高浓度组抗氧化剂活性强清除了产生的MDA。在肠道和肝脏中的MDA含量结果表明,与PBS对照组相比,灌胃抗菌肽Scygonadin对组织MDA含量没有明显变化。最终结果表明,灌胃抗菌肽对于机体不会产生显著性的毒害作用影响,证明口服抗菌肽是安全的。

同一灌胃浓度组,不同时间点比较时,发现血清中,0.4 mg/mL、0.8 mg/mL组随着时间的延长,MDA含量有降低趋势。在6 h时MDA含量最高,随后的时间点有所降低,这说明,在抗菌肽进入体内短时间内(6 h)会产生一定的应激反应,而随着时间的延长,由于抗氧化酶在6 h后发挥作用降低机体自由基水平。在肠道中,无明显变化。在肝脏中,低浓度灌胃组在12 h、48 h与6 h时MDA含量相比有显著性下降,说明抗菌肽在肝脏中有一定的降低机体活性氧水平的功能。

4 结论

口服投喂不同浓度的抗菌肽对机体的NO、NOS有一定影响,但NO的变化不是完全与NOS的变化正相关,说明NO的来源可能有其它途径。口服投喂不同浓度的抗菌肽对于MDA含量的影响与PBS对照无显著性差异,说明抗菌肽Scygonadin对机体的不会产生显著性的毒害作用影响。同一浓度不同时间点的MDA含量对比结果表明,随着时间的延长,MDA含量有下降的趋势。说明抗菌肽长时间作用下,可降低机体MDA含量。

口服投喂不同浓度的抗菌肽Scygonadin对黑鲷免疫及抗氧化作用不显著。说明抗菌肽不会干扰机体的免疫状态,也不会作为外源物质对机体产生毒害作用。

参考文献

[1] Huang W S, Wang K J, Yang M. Purification and part characterization of a novel antibacterial protein Scygonadin, isolated from the seminal plasma of mud crab, *Scylla serrata* (Forsk., 1775) [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2006, 339: 37-42.
[2] Wang K J, Huang W S, Yang M, et al. A male-specific expression gene, encodes a novel anionic antimicrobial peptide, Scygonadin, in *Scylla serrata* [J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44: 1961-1968.
[3] 陈慧芸. 锯缘青蟹阴离子抗菌肽 SCY2 基因克隆、表达特性及其抗菌活性的研究[D]. 厦门大学, 2007.
[4] 王克坚. 海洋鱼类和青蟹抗菌肽 hepcidin 和 Scygonadin 的研究[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2011, 50(2).

[5] 彭会. 拟穴青蟹抗菌肽 Scygonadin 及联合多肽 Scy-hepc 的表达和抗菌、抗病毒功能研究[D]. 厦门大学, 2011.
[6] 许婉芳. 拟穴青蟹两种 Scygonadin 抗菌肽的表达特性及免疫机制的研究[D]. 厦门大学博士学位论文, 2008.
[7] Xu W F, Qiao K, Huang S P, et al. Quantitative gene expression and in situ localization of scygonadin potentially associated with reproductive immunity in tissues of male and female mud crabs, *Scylla paramamosain* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31: 243-251.
[8] Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity [J]. *Nature*, 1981, 292: 246-248.
[9] Zasloff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus*: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 5449-5453.
[10] Park C H, Valore E V, Waring A J, et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(11): 7806-7810.
[11] Miyata T, Tokunaga F, Yoneya T, et al. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity [J]. *J Biochem*, 1989, 106(4): 663-668.
[12] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms [J]. *Nature*, 2002, 415(6870): 389-395.
[13] Hancock R E W. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2001, 1(3): 156-164.
[14] Hancock R E W. Peptide antibiotics [J]. *The Lancet*, 1997, 349(9049): 418-422.
[15] Mclean E, Donaldson E M. Absorption of Bioactive Proteins by the Gastrointestinal Tract of Fish: A Review [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1990, 2: 1-11.
[16] Romy Fischer, Hajer Debbabi, Anne Blais, et al. Uptake of ingested bovine lactoferrin and its accumulation in adult mouse tissues [J]. *International Immunopharmacology*. 2007, 7: 1387-1393.
[17] Beutler E, Duron O, Kelly B M. Improved method for the determination of blood Glutathione [J]. *Lab & Clin. Med*, 1963, 61(5): 882-888.
[18] 王金合. 自由基的生物学特性及其与动物疾病的关系 [J]. *中国兽医科学*, 2009, 39(05): 465-470.
[19] Ricardo P. Severity of chronic chagas disease is associated with cytokine antioxidant imbalance in chronically infected individuals [J]. *Int J Parasitology*, 2003, 33(3): 293-299.
[20] 苏岭, 刘红柏, 王莅, 等. 四种复方中药和黄芪多糖对鲫鱼生长、组织中 NO 含量与 NOS 活性的影响 [J]. *水产学杂志*, 2010(3): 1005-1032.
[21] 汪益峰, 周维仁, 章世元, 等. 氨基酸平衡和外源酶对异育银鲫的生长、氮代谢及血液生化指标的影响 [J]. *江苏农业学报*, 2010, 26(1): 130-135.