

皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的研究*

张 峰

(大连水产学院养殖系, 大连 116023)

李光友

(国家海洋局第一海洋研究所, 青岛 266003)

张培军

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

摘 要 在体外条件下用不同刺激物(海洋酵母细胞和酵母聚糖)对皱纹盘鲍血细胞进行刺激,测定血细胞吞噬活动中经历呼吸爆发产生活性氧的化学发光反应。结果表明,皱纹盘鲍血细胞经刺激诱导吞噬活动中有明显的呼吸爆发现象和很强的活性氧产生。不同的刺激物产生的化学发光强度不同;同一种刺激物的不同处理和不同浓度对血细胞产生活性氧的化学发光强度的影响不同。刺激物经皱纹盘鲍自体血清调理和未经调理对血细胞刺激所产生的化学发光强度不同。SOD 和 NaN_3 对血细胞吞噬过程中活性氧产生的化学发光有抑制作用。皱纹盘鲍血细胞在吞噬防御反应中能够通过产生活性氧对外源病原进行杀灭。

关键词 皱纹盘鲍, 血细胞, 活性氧, 吞噬作用, 呼吸爆发, 化学发光

Allen 等^[1]1972 年报道了哺乳动物血细胞吞噬过程中伴随有呼吸爆发现象和产生化学发光现象,开创了检测血细胞吞噬活动的化学发光法。他们证实呼吸爆发是调理化的颗粒激活了嗜中性白细胞的己糖酸支路的代谢,增加糖酵解和耗氧,产生超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($\text{OH}\cdot$)和单线态氧($^1\text{O}_2$)4 种活性氧。血细胞吞噬时的化学发光反应与呼吸爆发时的杀菌活动有关,这些活性氧有很强的杀菌功能,可以单独或同溶酶体酶等结合抵抗外源病原微生物的入侵,活性氧产生的强弱直接反映了血细胞杀菌机能的强弱^[2,3]。化学发光是测定吞噬细胞呼吸爆发活性氧产生最有效的工具^[4]。国外研究证实贝类血细胞吞噬时有典型的呼吸爆发现象并能够产生活性氧。国内关于贝类血细胞吞噬时活性氧产生的研究还未见报道。本文利用化学发光法研究了皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)血细胞体外吞噬过程中活性氧的产生,了解血细胞吞噬活动中的化学发光现象,为确定其血

细胞吞噬机能和细胞免疫指标提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 皱纹盘鲍 1998 年 7 月 20 日取自大连碧龙湾珍品有限公司,规格 4~5 cm,暂养于大连水产学院海水养殖楼循环充气水槽中,水温 18~24℃。每天投喂海带和配合饵料 1 次。

1.1.2 试剂及配制 Luminol(3-氨基邻苯二甲酰肼, Sigma 公司产品)储存液按 Scott 和 Klesius 的方法^[5]。使用时 Luminol 储存液同无菌过滤海水按浓度 10^{-7} mol/L 配制,即配即用。Zymosan 和 SOD(超氧化物歧化酶)为 Sigma 公司产品; NaN_3 为海泰生物技术(青岛)有限公司分装。无菌过滤海水用 0.45 μm 微孔滤膜过滤沙滤海水而得。

1.1.3 吞噬颗粒及其调理 以干酵母细胞(2~4 μm)为吞噬颗粒,用无菌过滤海水离心洗两次,重新悬浮浓度约为 10^8 ml⁻¹ 备用。酵母细胞用 50% 的鲍血清室温下调理 2 h。Zymosan 用无菌过滤海水分别稀释成 1、0.5 mg/ml,调理方法同酵母细胞。

1.2 采血及血淋巴的制备

收稿日期:1998-10-16

* 国家攀登计划项目资助 PD6-6-3

用5 ml注射器抽取3~5只鲍的血淋巴与过滤无菌海水按1:1比例混合放入表皿内制备成混合血淋巴备用。稀释的血淋巴用5%的戊二醛固定,血球计数板计数。

1.3 化学发光样品制备及测定方法

1.3.1 血淋巴(血细胞)化学发光 测定仪为LS-5801型液体闪烁计数器(Beckman公司),使用单光子测定程序,室温下测定。液闪测定管内加入混合血淋巴(ca. $5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, $n > 3$) 200 μl ,测定未刺激的血淋巴的基础发光5~10 min为记录的起始值($t = 0$),再加入发光剂Luminol 100 μl (10^{-7} mol/L)和刺激物(Zymosan或酵母细胞)100 μl ,然后记录发光值(cpm)。

1.3.2 血细胞的分离和血清的制备及其化学发光测定 混合血淋巴($n > 3$) 200 g离心10 min分离血细胞。化学发光测定:血细胞(无菌过滤海水重新悬浮离心的血细胞 ca. $5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) 200 μl ,酵母细胞(10^8 ml^{-1}) 100 μl 和Luminol 100 μl ;血清200 μl ,酵母细胞(10^8 ml^{-1}) 100 μl 和Luminol 100 μl 样品。

1.3.3 剂量反应及不同处理的样品制备 测定血细胞吞噬不同浓度的Zymosan和干酵母细胞的化学发光,Zymosan经血细胞调理及未经调理分别配制成1.0、0.5 mg/ml和1 mg/ml。酵母细胞经调理后备制成 10^7 、 10^6 、 10^5 和 10^4 ml^{-1} 4种浓度。酵母细胞经调理后配制成 10^7 ml^{-1} 及热杀死酵母细胞经调理配制成 10^7 ml^{-1} 。

1.3.4 抑制剂样品制备及SOD影响血细胞吞噬的测定 Zymosan 100 μl ,混合血淋巴200 μl ,Luminol 100 μl 和SOD 100 μl (100 IU/ml),对照用100 μl 无菌过滤海水代替SOD。 NaN_3 抑制影响测定:100 μl NaN_3 (5 mmol/L),Zymosan 100 μl ,混合血淋巴200 μl ,Luminol 100 μl ,对照省略 NaN_3 ,在化学发光接近峰值时加入100 μl NaN_3 测定抑制效果。

2 结果及讨论

2.1 血淋巴、血细胞和血清化学发光及血清的调理作用

由图1可见,血淋巴和血细胞加入Zymosan之后都有明显的化学发光现象,血清未见化学发光现象。表明皱纹盘鲍同高等哺乳动物的血细胞相同,吞噬活动产生的活性氧是产生化学发光的唯一来源。为证实吞噬活动的发生,化学发光测定后光镜检查血细胞吞噬情况,可见血细胞质内1~4个酵母

细胞,可以断定皱纹盘鲍血细胞吞噬时伴随有呼吸爆发和活性氧产生的现象。尽管其血淋巴(血细胞和血清)和分离的血细胞(血细胞和过滤水)内的血细胞数目基本相同,但血淋巴的发光强度(峰值约 $5800 \times 10^3 \text{ cpm}$)明显高于分离的血细胞(峰值约 $3100 \times 10^3 \text{ cpm}$)。这可能是血淋巴中的血清对血细胞有调理特性增强了刺激物对血细胞的刺激作用,提高了血细胞吞噬活力的结果。椎实螺(*Lymnaea stagnalis*)血细胞吞噬时活性氧产生的化学发光,血淋巴的化学发光强度明显高于分离血细胞的是血淋

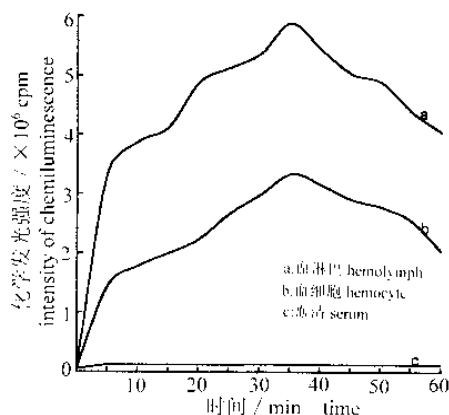


图1 皱纹盘鲍血淋巴、血细胞和血清的化学发光

Fig.1 Chemiluminescence of total hemolymph, hemocytes and serum of *H. discus*

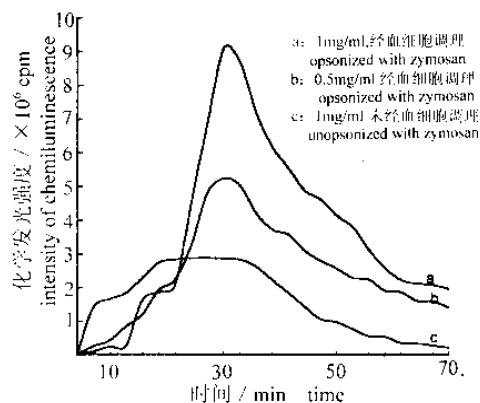


图2 不同处理及不同浓度Zymosan对皱纹盘鲍血细胞吞噬化学发光的影响

Fig.2 Chemiluminescent response of *H. discus* hemocytes to Zymosan

巴中的血清在起作用^[6]。血清的调理作用在贝类

血细胞的吞噬活动中具有重要的作用^[7]。由图 2 可见,未经和经调理过的 Zymosan 虽然浓度相同(1 mg/ml),但诱导血细胞吞噬时所产生的化学发光强度却有明显差别,这也证明了血清调理的特性。

2.2 不同浓度的酵母聚糖和酵母细胞对皱纹盘鲍血细胞化学发光的影响

图 2 和图 3 显示不同浓度的酵母聚糖和酵母细

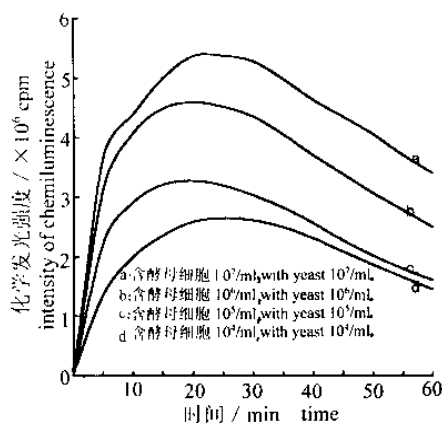


图 3 不同浓度酵母细胞对皱纹盘鲍血细胞吞噬化学发光的影响

Fig.3 The effect of different concentrations of yeast cells on the chemiluminescence of *H. discus* hemocytes

2.3 不同处理的刺激物对皱纹盘鲍血细胞化学发光的影响

结果显示,同样经过血清的调理,热杀死的酵母细胞比活的酵母细胞所诱导皱纹盘鲍血细胞产生化学发光强度要低(图 5)。失去了运动能力的酵母细胞明显降低了酵母细胞和吞噬细胞之间的接触频率,从而导致了化学发光强度的下降^[6]。

2.4 抑制剂对皱纹盘鲍血细胞化学发光的影响

图 6 可见, SOD 的存在明显抑制了 zymosan 诱导的血细胞吞噬过程中所产生的化学发光强度。SOD 能够催化超氧阴离子(O_2^-)发生歧化反应从而清除 O_2^- ,使血细胞吞噬的化学发光强度明显下降^[6,9,10]。图 7 显示, NaN_3 在血细胞吞噬反应起始时和吞噬活动过程中的加入都强烈的抑制血细胞的化学发光。已知 NaN_3 是髓过氧化物酶的抑制剂,同时也是单线态氧(1O_2)的清除剂,所以 NaN_3 的存在对血细胞的吞噬化学发光活动有损害^[6,11,12]。 NaN_3 并不影响血细胞产生超氧阴离子(O_2^-)^[6],但

胞影响皱纹盘鲍血细胞吞噬的化学发光强度。化学发光强度随着刺激物浓度的增加而升高,可以认为血细胞的吞噬活力与刺激物之间存在着剂量依赖关系,这种关系同吞噬细胞与刺激物之间相接触的频率有关^[1]。由图 4 可见,刺激物的浓度与血细胞化学发光的强度呈现出良好的线性关系。

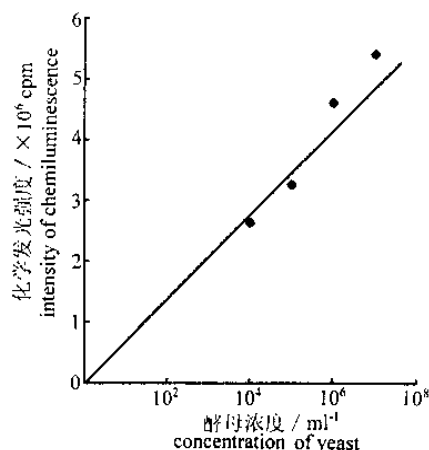


图 4 酵母细胞浓度与皱纹盘鲍血细胞吞噬化学发光强度的线性关系

Fig.4 The linear relationship between yeast cells and the intensity of chemiluminescence of *H. discus* hemocytes

影响血细胞吞噬时的化学发光,说明血细胞的化学发光是由多种活性氧释放的综合表现。

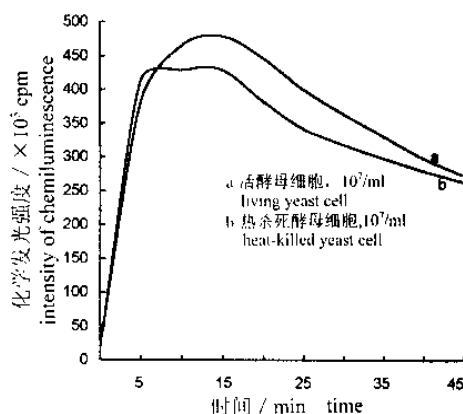


图 5 热杀死和活酵母细胞对皱纹盘鲍血细胞吞噬化学发光的影响

Fig.5 Chemiluminescence response of *H. discus* hemocytes to living or heat-killed yeast cells

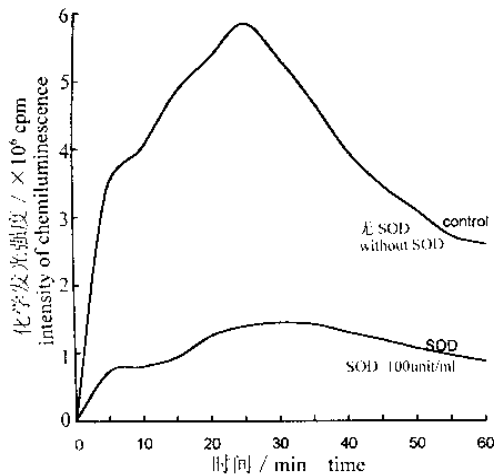


图 6 SOD 对皱纹盘鲍血细胞吞噬化学发光的影响

Fig. 6 The effect of SOD on the chemiluminescence of *H. deiscus* hemocytes induced by yeast cells

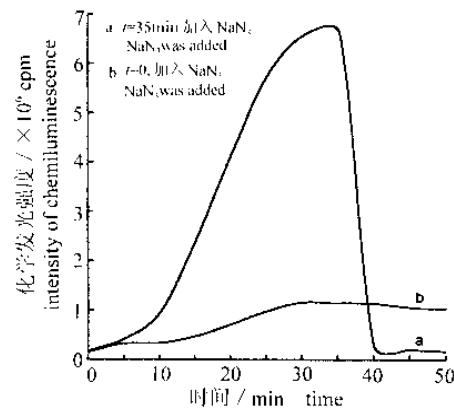
图 7 NaN_3 对皱纹盘鲍血细胞吞噬化学发光的影响

Fig. 7 The effect of NaN_3 on the chemiluminescence generated by *H. deiscus* hemocytes phagocytosing zymosan

3 结语

已知无脊椎动物的免疫为非特异性的, 血细胞的吞噬机能是低抗感染的第一道防线, 也是体内主要的免疫方式。本研究结果表明, 皱纹盘鲍血细胞象哺乳动物多形核白细胞 (PMN) 一样受到刺激进行吞噬时伴随有呼吸爆发生活性氧的特点, 证明皱纹盘鲍血细胞吞噬时具有能够释放活性氧, 进行杀菌的功能。用化学发光分析法研究鲍血细胞吞噬的化学发光反应与呼吸爆发时的杀菌活性之间的关系, 对了解鲍细胞免疫机制有着重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Allen R C, et al. Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1972, 47: 679 ~ 684
- 2 Welch W D, et al. Analysis and comparison of the luminol - dependent chemiluminescence responses of alveolar macrophages and neutrophils. *J Reticuloendothel Soc*, 1980, 28: 275 ~ 283
- 3 Horan T D, et al. Association of neutrophil chemiluminescence with

microbicidal activity. *Clin Immunol Immunopathol*, 1982, 22: 259

- 4 De Chatelet I. R, et al. Mechanism of the lumino - dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J Immunol*, 1982, 129: 1589 ~ 1593
- 5 Scott A L, et al. Chemiluminescence: A novel analysis of phagocytosis in fish. *Dev Biol Stand*, 1981, 49: 243 ~ 254
- 6 Dikkeboom R, et al. Hemocytes of the Pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive form of oxygen. *J Invertebr Pathol*, 1987, 49: 321 ~ 331
- 7 Sminia T, et al. The role of serum factors in phagocytosis of foreign particles by blood cells of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Dev Comp Immunol*, 1979, 3: 37 ~ 44
- 8 Webb L S, et al. Inhibition of phagocytosis - associated chemiluminescence by superoxide dismutase. *Infect Immun*, 1974, 9: 1051 ~ 1056
- 10 李益新, 等. 人粒细胞吞噬功能与活性氧的关系研究. *生物化学与生物物理进展*, 1986, 1: 41 ~ 44
- 11 Klebanoff S J et al. Hydrogen peroxide utilization in myeloperoxidase deficient leukocytes: A possible microbicidal control mechanism. *J Clin Invest*, 1971, 50: 2226 ~ 2234
- 12 Hodgson E K, et al. The production of superoxide radical during the decomposition potassium peroxochromate (V). *Biochemistry*, 1974, 13: 3811 ~ 3815

Study on the gereration of reactive oxygen species by hemocytes in *Haliotis discus*

Zhang Feng

(Dalian Fisheries College, Dalian 116023)

Li Guangyou

(First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266003)

Zhang Peijun

(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract The hemocytes of *Haliotis discus* are stimulated in vitro with various particulate agents (yeast cells and zymosan) so as to observe the chemiluminescence (CL) caused by the reactive oxygen species (ROS). The results indicate that the hemocytes of *H. discus* will undergo an obvious burst of respiratory and generate severe active oxygen when they are stimulated in vitro to begin their phagocytic activity. With different stimulators, or with the same stimulator under its different treatment and concentrations, the hemocytes show different degree of CL, also, they generate different degree of CL with yeast cells opsonized or nonopsonized by the *H. discus* serum. SOD and NaN_3 can inhibit the CL caused by ROS during the phagocytosis. It comes to the conclusion that the hemocytes of *H. discus* can generate ROS to kill their pathogens in the phagocytic defensive reaction.

Key words *Haliotis discus*, hemocyte, reactive oxygen species (ROS), phagocytosis, respiratory burst, chemiluminescence

《淡水渔业》2000 年征订启事

跨入新世纪, 迎来《淡水渔业》连续出版 30 年(1971 创刊), 为更好地满足广大读者的需求, 促进我国淡水渔业的发展, 2000 年本刊将有三变三不变:

三变

内容变: 以刊登淡水渔业实用生产技术为主, 适当报道具有实用价值的科研新成果, 更加贴近渔业生产, 贴近渔民。

版式变: 栏目编排更加灵活实用, 根据渔业生产实践, 设置多种栏目。如“池塘养殖”、“大水面增养殖(包括‘三网’养殖)”、“水产病害防治”、“饲料和肥料”、“鱼类育种”、“渔业动态信息”等。

外观变: 设计更加新颖, 纸张、印刷、装订质量将有较大提高。

三不变

刊期不变: 2000 年仍为月刊, 每月 5 日出版, 信息丰富快捷。

定价不变: 为照顾广大新老读者, 本刊每期定价仍为 3 元, 全年 12 期 36 元。

订阅方式不变: 为方便广大读者, 仍采用两种订阅方式: ①可在当地邮局订阅, 邮发代号为 38-32, 国内统一刊号为 CN42-1138/S。②可直接汇款到杂志社订阅(随时可订阅全年杂志)。联系地址: 湖北省荆州市江汉北路, 邮政编码: 434000, 电话: (0716)8212277-3017, 传真: (0716)8228212。