

中国对虾血细胞凝集素的性能研究*

牟海津 江晓路 刘树青 王慧谧 管华诗

(青岛海洋大学水产学院, 青岛 266003)

摘要 对中国对虾(*Penaeus chinensis*)的血细胞凝集素部分性能的研究结果表明, 中国对虾的血淋巴中存在可凝集多种脊椎动物血细胞的因子—血细胞凝集素, 凝集活力的大小同中国对虾的健康状况有密切关系, 发病对虾体内的凝集素活力明显下降。该凝集素具有较强的热稳定性, 100℃处理 20 min 仍具活性; 并且具有广泛的 pH 作用范围, 可在 pH 3~11 产生凝集作用; 适当增加盐度(18~36)可以提高该凝集素的凝集活性; 其活性还会被 EDTA 强烈抑制; 但对 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等离子和多种糖类不敏感。在中国对虾血细胞的细胞膜上未发现有凝集鸡红细胞的活性物质。

关键词 中国对虾, 血细胞凝集素, 血淋巴

近年来, 随着淡海水养殖业的迅速发展, 养殖虾蟹类的病害的日益严重, 甲壳动物免疫学开始受到重视。到目前为止, 已在 40 多种甲壳类动物体内发现血细胞凝集素的存在, 如龙虾、蟹等^[1~3], 在血淋巴中可引起异物颗粒聚集, 在体外可选择凝集脊椎动物血细胞和细菌。不少学者认为, 凝集作用是许多无脊椎动物免疫防御的主要机能之一。凝集素作为一种非特异性识别因子, 识别自身和异己成分, 包括外来入侵的病原菌, 并可通过凝集、包围、调理、促进吞噬等方式将其排出体外; 另外, 凝集素还参与止血、凝固、物质运输及创伤修复等一系列作用^[1,4]。但目前对于甲壳动物凝集素的形成、具体反应机理和作用等的研究尚不十分明确。

本文对中国对虾(*Penaeus chinensis*)血淋巴中的血细胞凝集素的部分性质进行分析, 以期为中国对虾免疫防御机制的研究奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 中国对虾血淋巴液的制备

实验用虾取自青岛红岛养殖场养殖的中国对虾, 心脏穿刺抽取血淋巴液, 经 3 000 r/min 离心 5

min, 除去沉淀血细胞, 取出上清液, -20℃保存。

1.2 血细胞凝集试验

用 Alsever's 液采集鸡、小鼠、兔等动物血液, 离心洗涤后获得血红细胞。凝集试验采用试管凝集法, 待测的中国对虾血淋巴液用生理盐水进行二倍梯度稀释后, 取 0.2 ml 与 0.2 ml 红细胞悬液(10^9 /ml)混合均匀, 于 25℃保温 40 min, 检测有无凝集块形成, 以形成明显凝集块的最高血清稀释度作为血清的凝集效价。

1.3 凝集素的热稳定性

中国对虾的血淋巴液分别经 40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、80℃、100℃处理 20 min 后, 加入鸡红细胞悬液, 检测凝集活性的变化。

1.4 pH 对凝集活性的影响

待测血淋巴液用不同 pH 值的生理盐水进行梯度稀释后, 与鸡红细胞悬液混合, 进行凝集反应, 检测不同 pH 条件下, 中国对虾血淋巴的凝集活性。

1.5 盐度、EDTA、二价金属离子对凝集活性的影响

待测血淋巴液用不同 NaCl 浓度的盐水进行稀释后, 检测对鸡红细胞的凝集活性。

待测血淋巴液用含有不同浓度的 EDTA 的生理盐水稀释后, 与鸡红细胞悬液混合, 检测 EDTA

收稿日期: 1997-11-28

* 国家攀登计划 B“海洋生物优抗研究”资助项目, 编号: 6-6-3

对凝集活性的抑制作用。

将待测血淋巴液与鸡红细胞悬液混合后, 向反应液中分别加入少量 CaCl_2 、 MgCl_2 、 MnCl_2 , 终浓度达到 10 mmol/L, 检测二价金属离子对凝集作用的影响。

1.6 糖类对凝集活性的抑制作用

选取 12 种单糖或寡糖: D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖、D-果糖、D-木糖、D-山梨醇、L-鼠李糖、L-岩藻糖、L-阿拉伯糖、蔗糖、乳糖、纤维二糖, 分别用生理盐水制成 400 mmol/L、40 mmol/L、4 mmol/L 3 个浓度的溶液, 各取 0.1 ml, 分别与 0.1 ml 的对虾血淋巴液混合, 室温放置 2 h 后, 再分别加入 0.2 ml 鸡红细胞悬液, 检测凝集效果。

1.7 中国对虾血细胞膜吸附的凝集因子的检测

取中国对虾血液离心除去上清液, 沉淀血细胞, 用生理盐水多次洗涤后制成细胞悬液, 反复冻融破碎细胞, 制得细胞膜粗制品, 经二倍梯度稀释后, 与鸡红细胞混合, 25℃ 保温 40 min, 检测有无凝集现象发生。

2 结果

2.1 中国对虾血淋巴液的血细胞凝集活性的检测

中国对虾的血淋巴液对鸟、小鼠、兔等动物的红细胞均有一定程度的凝集活性(表 1)。另外, 在红岛养殖场的 1[#]、2[#] 虾池还采集到患有败血症的中国对虾, 取其血淋巴液进行凝集试验, 发现凝集效价明显低于健康虾。

表 1 健康与发病中国对虾的血淋巴凝集效价比较

Table 1 Comparison of hemagglutinating activities of hemolymph between healthy prawn and ill prawn

血细胞来源 source of red blood cells	健康虾 healthy prawn	1 [#] 池发病虾 ill prawn from pool 1	2 [#] 池发病虾 ill prawn from pool 2
鸡 chicken	16	4	4
小鼠 mouse	32	4	8
兔 rabbit	8	2	4

2.2 环境因素对中国对虾血淋巴液凝集活性的影响

中国对虾血淋巴液中的血细胞凝集素具有相当的热稳定性, 经 40~55℃ 处理 20 min 后, 仍具有很强的凝集活性, 经 60~100℃ 处理 20 min 后, 血淋巴液发生变性凝固, 仅有少量液体残留(约占血淋巴液

总体积的 1/4), 取残留液稀释后与等量的鸡红细胞悬液发生反应, 发现残留液仍有一定的凝集活性(见表 2)。

中国对虾的血细胞凝集素具有广泛的 pH 作用范围, 在 pH 3~11 范围内可不同程度地凝集鸡红细胞; pH 7~9 时凝集效果最佳; 在 pH 1 时血液会发生变性, 凝固成块(见图 1)。

表 2 中国对虾血细胞凝集素的热稳定性

Table 2 Heat stability of prawn hemagglutinin

处理温度/℃ treatment	未处理的 non-treated	40	45	50	55	60	80	100
凝集效价 agglutination titers	16	8	8	8	8	4 [*]	4 [*]	4 [*]

* 所测为凝固残留液的凝集效价。Hemagglutination titers of the remaining fluid of agglutination.

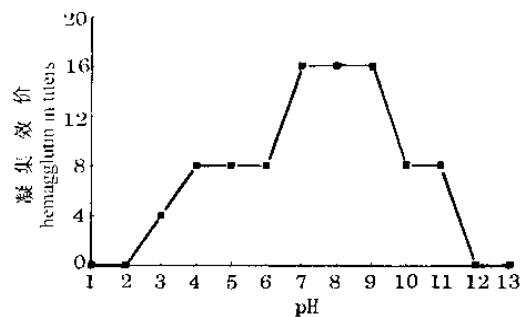


图 1 不同 pH 条件下中国对虾血淋巴的凝集效价

Fig.1 Hemagglutinating activities at different pH

盐度对中国对虾的血细胞凝集素的活性具有一定的影响作用, 当反应液中的盐度达到 18~36 时, 凝集活性有所增强, 继续提高 NaCl 浓度, 凝集活性又开始下降(表 3)。

表 3 在不同盐度条件下中国对虾血淋巴的凝集效价

Table 3 Hemagglutinating activities of hemolymph at different salinities

盐度 salinity	6	12	18	24	36	48	60	对照(生理盐水) control
凝集效价 agglutination titers	16	16	32	32	32	16	16	16

EDTA 会抑制中国对虾血淋巴的凝集活性, 当反应液中的 EDTA 终浓度达到 16 mmol/L 时, 凝集活性被完全抑制(表 4)。

表 4 EDTA 对中国对虾血淋巴凝集作用的抑制

Table 4 Hemagglutination inhibition of hemolymph by EDTA

EDTA 终浓度 mmol/L final concentration of EDTA	64	32	16	8	4	2	0
血清的凝集现象 agglutination	-	-	-	+	+	+	+

向反应液中分别加入终浓度为 10 mmol/L 的 CaCl_2 、 MgCl_2 、 MnCl_2 , 结果血淋巴对鸡红细胞的凝集效价保持不变, 并未发生凝集抑制或增强现象。反应液中分别加入 12 种糖类后, 血淋巴的凝集活性也没有任何抑制现象发生。

2.3 中国对虾血细胞膜吸附的凝集因子的检测结果

用不同稀释浓度的中国对虾血细胞膜制品对鸡、小鼠、兔等动物的血细胞进行凝集试验时, 均未发现有凝集现象的发生。

3 讨论

(1) 中国对虾血淋巴液中含有血细胞凝集素, 可以凝集多种脊椎动物的血细胞。在其它实验中, 我们也在扇贝、毛蚶、贻贝、牡蛎、蛤蜊、缢蛏、斑节对虾等多种甲壳动物和软体动物的血清中发现有血细胞凝集素。血细胞凝集素作为一种具有独特生理活性的物质, 在无脊椎动物体内可能广泛存在, 并且在这些动物的免疫活动和其它生理活动中发挥重要作用^[1,2]。目前一般认为, 凝集素在甲壳类动物的免疫反应中主要是充当识别因子, 用于识别侵入机体内的外源异物, 并发挥凝集作用。另外, 凝集素还具有高度的调理作用, 可在吞噬细胞和异物颗粒间形成分子连接, 促进吞噬细胞对异物的吞噬作用, 从而达到免疫防御的目的^[1,4]。

实验中发现, 患病对虾血淋巴液对各种动物血细胞的凝集活性明显低于健康虾。由此可见, 凝集素的反应活性同体质有密切关系, 血淋巴液的血细胞凝集活性可用来作为检测中国对虾健康状况的一项定量指标。

(2) 中国对虾血淋巴液的主要成分为蛋白质, 因此, 经 60~100℃ 处理 20 min 后, 会发生变性凝固; 但少量未发生凝固的残留液体对鸡红细胞仍具有一定的凝集活性, 说明中国对虾的血细胞凝集素不是纯蛋白质成分, 可能是一种热稳定的糖蛋白。我们在栉孔扇贝体内也曾发现有热稳定性的血细胞凝集素存在。而巨大石房蛤 (*Saxidomus giganteus*)^[5],

美洲巨蜆 (*Crassostrea virginica*)^[6~8] 等产生的凝集素在 65~80℃ 容易失活。

中国对虾的血细胞凝集素具有广泛的 pH 作用范围, 这与已报道的多数无脊椎动物如美洲巨蜆^[6] 的凝集素的作用特点相似^[6]。

本次实验发现, 在一定范围内增加盐度, 可以提高中国对虾血淋巴的凝集效价。Tamplin 等^[6] 在研究美洲巨蜆的血清对霍乱弧菌的凝集作用时也曾发现, 适当增加反应液的盐度 (24~30), 可以提高凝集效价。

无脊椎动物血细胞凝集素在进行凝集活动时, 常常需要一些二价金属离子的参与^[1]。中国对虾的血细胞凝集素对 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等离子则不够敏感, 而金属离子螯合剂 EDTA 可以明显抑制其凝集活性, 说明在中国对虾血淋巴液的凝集活动中, 二价金属离子仍然是必不可少的。

血细胞凝集素可与多种糖类发生特异性结合, 凝集反应也常常被这些糖类所抑制^[1]。糖类抑制实验中, 所选的 12 种单糖和寡糖均未表现出凝集抑制现象, 原因是中国对虾的血细胞凝集素表面的糖基结合位点与所选的糖类之间不存在亲和性, 但并不排除该凝集素会为其它糖类所抑制的可能。凝集素能够选择凝集脊椎动物血细胞和某些微生物细胞, 并充当识别因子, 是由于凝集素表面携带有特异性糖基决定簇的受体, 可根据颗粒物质表面的糖基组成来区分“自己”和“异己”^[9]。因此, 研究糖类的凝集抑制作用对于弄清血细胞凝集素的具体作用机理是十分必要的。

(3) 在中国对虾血细胞的细胞膜上没有发现凝集因子的存在。因此, 中国对虾的血细胞凝集素可能仅仅游离并存在于血淋巴液中, 而未与血细胞发生吸附。Vasta^[10] 曾在美洲巨蜆的血清中发现有 2 种血细胞凝集素: 一种游离存在于牡蛎的血清中; 另一种可以牢固地吸附在牡蛎血细胞的细胞膜上, 这种细胞膜结合型的血细胞凝集素能够凝集马、猫、小鼠等多种动物的血细胞, 推断这种细胞膜结合型的凝集素可能会在异物识别中提供受体位点, 以促进牡蛎血细胞同外源异物间的结合, 从而有利于异物的排除, 增强了免疫功能。

关于中国对虾的血细胞凝集素的分离纯化、产生机制以及它在免疫中的地位尚有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 陈皓文, 等. 外源凝集素——水产动物御敌的有力兵器. 黄渤海海洋, 1995, 13(3): 61~70
- 2 高健, 李跃华. 甲壳类的体液免疫因子及其环境作用. 水产养殖, 1992, 6: 21~23
- 3 Cornick J W, Stewart J E. Partial characterization of a natural agglutinin in the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*. J Inver Pathol, 1973, 21: 255~261
- 4 Lackie A M. Invertebrate immunity. Parasitology, 1980, 80: 393~412
- 5 Johnsen H M. Human blood group A₁ specific agglutinin of the butter clam *Saxidomus giganteus*. Science, 1964, 146(23): 548~549
- 6 Li M F, Flemming C. Hemagglutinins from oyster hemolymph. Canadian J Zoology, 1967, 45: 1 225~1 234
- 7 Tamplin M L, Fisher W S. Occurrence and characteristics of agglutination of *Vibrio cholerae* by serum from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Appl Environ Microb, 1989, 55(11): 2 882~2 887
- 8 Tripp M R. Hemagglutinin in the blood of the oyster *Crassostrea virginica*. J Inver Pathol, 1966, 8: 478~484
- 9 Sharon N, Lis H. Lectins: Cell - agglutinating and sugar - specific proteins. Science, 1972, 177: 949~959
- 10 Vasta G R. A cell membrane - associated lectin of the oyster hemocyte. J Inver pathol, 1982, 40: 367~377

Properties of hemagglutinin in hemolymph of *Penaeus chinensis*

Mou Haijin Jiang Xiaolu Liu Shuqing Wang Huimi Guan Huashi
(Fisheries College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

Abstract A preliminary study was carried out on the properties of hemagglutinin in the hemolymph of *Penaeus chinensis*. The results showed that the hemagglutinin of *P. chinensis* could agglutinate the red blood cells of kinds of vertebrates, such as chicken, mouse and rabbit. Hemagglutinating activity was closely related to the health state of *P. chinensis*. There was a marked drop in the hemagglutinating activity of ill prawn. But this hemagglutinin was thermostable that it can keep active after heated at 100 °C for 20 min. It also showed activity over a wide range of pH between 3 and 11, with the optimum pH at 7~9. High salinities (18~36) could enhance the activity. The activity was inhibited by EDTA, but not affected by the divalent metal cations nor the simple sugars tested. No substance with hemagglutinating activity to chicken red blood cells was found on the hemocyte membrane of *P. chinensis*.

Key words *Penaeus chinensis*, hemagglutinin, hemolymph