

·研究简报·

## 免疫多糖对日本对虾血清酶活性的影响\*

The effects of immunity polysaccharide on some enzyme activities of *Penaeus japonicus* serum

刘树青 江晓路 牟海津 管华诗

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

关键词 免疫多糖, 日本对虾, 血清, 酶活性

Key words immunity polysaccharide, *Penaeus japonicus*, serum, enzyme activities

近年来,随着对虾养殖业的不断发展,病害防治已成为目前重要的研究方向,从免疫学的角度对虾病进行防治研究,已有成功的报道<sup>[1,2]</sup>。利用天然活性物质——海藻多糖和北虫草多糖作为免疫激活剂对日本对虾(*Penaeus japonicus*)进行腹腔注射,分别在24、48、72、96、120 h后取血清测定LSZ、ACP、POD的活性及血清蛋白含量的变化。通过实验证明,北虫草多糖及海藻多糖能够作为免疫药物促进对虾机体非特异性免疫机能的增强,提高溶菌酶、酸性磷酸酶、过氧化物酶等体液性因子的活性。因此,我们选择这2种免疫多糖刺激对虾机体后检测4种指标的变化,以进一步探讨天然活性物质的免疫促进作用机理,开发新的对虾免疫药物。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 实验用虾 1997年10月从青岛红岛镇养殖场购得日本对虾,体长16 cm,通气培养于玻璃缸(0.2 m<sup>3</sup>)中,水温25℃,每天换水1次。

1.1.2 菌种 溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)由青岛海洋大学食品工程系食品微生物室提供。

1.1.3 多糖的配制 用生理盐水配制1.0%的海藻多糖和1.0%北虫草多糖,灭菌后备用。

#### 1.2 方法

1.2.1 实验分组及预处理 实验分海藻多糖、北虫草多糖和空白对照共3组,多糖浓度均为1.0%,每组试验虾45尾。

试验组均从对虾第3泳足处用1ml注射器5号针头斜插至体腔内注射,2种多糖各注射0.2 ml,对照组注射等量生理盐水。24 h后开始取血,以后每隔24 h取血1次,试验周期为120 h。采血方法:用兰芯注射器,自头胸甲后插入心脏取血,

每次取8尾虾的血清合并,置于具螺帽5 ml试管中。-20℃冰箱过夜,备用。

1.2.2 溶菌酶(LSZ)活力的测定<sup>[2]</sup> 经2次活化的溶壁微球菌,接种于液体培养基内进行摇床培养48 h,取出经4 000 r/min离心5 min收集菌体,并用0.1 mol/L, pH 6.4的磷酸缓冲液稀释至A<sub>570</sub> = 0.3,配成底物悬液供测试用。在此规定条件下,溶菌活力  $U = (A_0 - A) / A_0$ 。

1.2.3 酸性磷酸酶(ACP)活力的测定 按照磷酸苯二钠法测定ACP<sup>[3]</sup>。ACP活力定义:每100 ml血清在37℃与底物作用60 min,产生1 mg酪者为1U。

1.2.4 过氧化物酶(POD)活力的测定 按Worthington法测定POD<sup>[4]</sup>。POD活力(U/ml) =  $(E_{510} \times 3 \times 10) / (6.58 \times 0.1)$ 。

1.2.5 蛋白质含量的测定 按照亮兰法测定蛋白质<sup>[5]</sup>。蛋白质含量(mg/ml) = (测定管OD × 标准血清浓度) / 标准管OD。

### 2 结果与讨论

#### 2.1 溶菌酶的水解作用

测定结果见表1,注射免疫多糖后,对虾血清中LSZ活力明显提高,96 h时达最高水平。

表1 日本对虾血清中溶菌酶活力

Table 1 The lysozyme activities in the serum of *P. japonicus*

组别 group	时间/h time				
	24	48	72	96	120
海藻多糖 seaweed polysaccharide	0.20	0.24	0.26	0.41	0.17
北虫草多糖 <i>C. militaris</i> polysaccharide	0.24	0.24	0.27	0.53	0.21
对照 control	0.20	0.25	0.15	0.25	0.13

天然活性物质北虫草多糖及海藻多糖对日本对虾机体均有

收稿日期:1998-01-19

\* 国家攀登B计划“海养生物优抗研究”资助项目,编号6-6-3

明显的免疫刺激作用,在一定程度上提高了机体的非特异性免疫功能。溶菌酶是吞噬细胞杀菌的物质基础,能水解革兰氏阴性细菌细胞壁中粘肽的乙酰氨基多糖,使之裂解并释放出来,形成一个水解酶体系,破坏和消除侵入体内的异物,达到机体防御的功能。本研究发现,免疫多糖可作为一种广谱非特异免疫促进剂,增强对虾机体抗病能力。

## 2.2 酸性磷酸酶的水解作用

从测定结果(表2)可看出,对照组不同作用时间的酶活性无显著差异;而试验组的 ACP 活力明显增高。

表2 日本对虾血清中酸性磷酸酶

Table 2 The acid phosphatase activities in the serum of *P. japonicus*

组别 group	时间/h time				
	24	48	72	96	120
海藻多糖 seaweed polysaccharide	15	13	15	22	10
北虫草多糖 <i>C. militaris</i> polysaccharide	19	14	17	25	16
对照 control	7	7.5	2.5	5.5	4.0

以上数据显示,北虫草多糖和海藻多糖适量注射于对虾体内的,确能显著增强其 ACP 的活性。ACP 是催化磷酸单酯水解的酶类,在酸性下,可使磷酸单酯水解生成酚和磷酸,在体内直接参与磷酸基团的转移和代谢。实验证明,我们采用的 2 种免疫多糖可以认为是良好的免疫促进剂,从 ACP 的活性增强可以推断 ACP 的功能之一是加速物质的摄取和转运,为 ATP 磷酸化提供更多所需的无机磷酸。免疫多糖的刺激可以促进 ACP 参与对虾细胞中的物质代谢,提高非特异性免疫机能。从本实验表 2 所示数据显示,日本对虾机体的免疫系统被两种多糖激活后,其 ACP 活力水平在 96 h 最强,可以断定,这一时间是它的最高活力值,其酶蛋白的合成与酶活力的调节都是在此阶段内实现的。

## 2.3 过氧化物酶的还原作用

从表 3 可以看出,注射两种多糖后的 POD 活力较对照组普遍增高,在 96 h 时分别为对照组的 1.76 和 1.55 倍,延长 1 d 的 POD 活力又下降。

表3 日本对虾血清中过氧化物酶

Table 3 The peroxide activities in the serum of *P. japonicus*

组别 group	时间/h time				
	24	48	72	96	120
海藻多糖 seaweed polysaccharide	1.50	2.10	1.64	2.64	1.73
北虫草多糖 <i>C. militaris</i> polysaccharide	1.64	2.05	1.68	2.33	1.96
对照 control	1.23	1.34	1.40	1.50	1.46

POD 是生物体中重要的酶类之一,参与多种生理代谢反

应<sup>[6]</sup>,对细胞生理代谢过程中产生的活性氧具有清除作用。而日本对虾血清中 POD 的研究在国内文献中尚未见报道。本实验中对虾血清中过氧化物酶随时间的变化,反映出这 2 种免疫多糖刺激对虾机体后血清 POD 活力明显增高,提示 POD 活力的增强与减弱与日本对虾机体免疫系统有某种相关性,可以作为一种免疫指标来进行检测。

## 2.4 血清中蛋白质含量的变化

从测定结果(表4)看,各实验组的蛋白质含量较对照组都有所提高。实验组在 48 h 时出现较高水平,北虫草多糖组和海藻多糖组分别为对照组的 1.44 和 1.39 倍。推断该结果可能是由对虾机体代谢与合成系统受免疫多糖激活所致。

表4 日本对虾血清中蛋白质含量

Table 4 The protein contents in the serum of *P. japonicus*

组别 group	时间/h time				
	24	48	72	96	120
海藻多糖 seaweed polysaccharide	4.54	4.89	4.40	4.05	3.99
北虫草多糖 <i>C. militaris</i> polysaccharide	4.27	5.04	4.50	4.16	3.96
对照 control	3.28	3.51	3.39	3.20	3.43

表 4 实验结果证实血清蛋白含量的提高可以使血清中溶菌物质、杀菌物质含量升高,从而提高虾自身的抗病能力<sup>[7]</sup>,这一点与溶菌活性测定中的结论相同。

多糖是一种广谱的非特异性免疫促进剂,目前已成为一类重要的天然活性物质,随着研究海洋生物方法的不断改进及现代化分离技术的有效使用,天然产物化学及其生物活性的研究日趋广阔。本文所采用的北虫草中含有虫草酸、虫草素、虫草多糖等多种生物活性物质,其免疫药理研究已发现具有多方面的免疫调节作用,主要是增强巨噬细胞的吞噬作用,增强体液免疫。海藻多糖是海藻中重要组成部分,除了具有传统的工业价值外,近年来研究表明它还具有多种生物活性及药用功能<sup>[8]</sup>,具有多种免疫功能及抗肿瘤、抗病毒作用。我们从免疫学的角度对日本对虾的免疫功能和提高自身抗病力进行了研究,将两种天然免疫多糖注射于对虾体内,证实可明显提高血清溶菌酶、酸性磷酸酶、过氧化物酶及血清蛋白的总体水平,尤其是溶菌酶和酸性磷酸酶在日本对虾血液和血细胞中担负着机体防御的重要功能,这些酶类对提高对虾的抗病力均有显著影响。随着研究的不断深入,天然活性物质——北虫草多糖和海藻多糖将作为免疫药物增强甲壳类生物的抗性而独树一帜。

## 参 考 文 献

- 王雷,李光友. 甲壳动物体液免疫研究进展. 海洋科学, 1992, 3: 18-19