

栉孔扇贝血淋巴中酚氧化酶和髓过氧化物酶活性*

孙虎山

李光友

(烟台师范学院,烟台 264025) (国家海洋局第一海洋研究所,青岛 266003)

摘要 用电镜细胞化学和分光光度技术对栉孔扇贝血淋巴中的酚氧化酶(PO)和髓过氧化物酶(MPO)进行了研究。结果表明:细胞质中直径分别为300~430 nm和130~200 nm的大、小2种颗粒呈PO强阳性;次级溶酶体和小颗粒呈MPO强阳性。生化测定,血清中存在PO和MPO活性,血细胞仅有MPO活性。以TMB为底物测得血清中不依赖卤素的MPO活力为107.2 U,以二乙醇胺为底物测得血清中依赖卤素的MPO活力为53.6 U。血清中PO和MPO的最适pH分别为6.0和6.5,最适温度分别为45℃和35℃。

关键词 栉孔扇贝,酚氧化酶,髓过氧化物酶,酶活性,血淋巴

酚氧化酶(EC 1.10.3.1;PO)和髓过氧化物酶(EC 1.11.1.7;MPO)是动物体内参与免疫防御的2种重要氧化酶。有关双壳贝类PO和MPO方面的研究国外较少^[1,2],而国内还未见此方面的报道。有关栉孔扇贝(*Chamys farreri*)血淋巴中此2种酶的研究,国内外均未见报道。本文采用电镜细胞化学技术,对我国养殖产量最高的海洋双壳贝类—栉孔扇贝血细胞中的PO和MPO活性进行了定位定性研究,并用分光光度法对此2种酶的活性及其部分性质进行了定量研究。以期为搞清贝类的免疫机理积累资料。

1 材料和方法

1.1 材料

栉孔扇贝为胶州湾人工养殖的3龄贝,壳长45~55 mm,室内水族箱中饲养。用2 ml注射器和5号针头从心耳或闭壳肌血窦中取血。实验所用L-多巴、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)和二乙醇胺(DEA)为Sigma公司产品。3,3'-二氨基联苯胺(DAB)为Fluka公司产品。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法和步骤

电镜细胞化学显示PO采用Coles等的方法^[1],血细胞在10% Bakers 福尔马林钙和2% NaCl等量混合液中固定30 min并经PBS洗涤后,在以多巴为底物的作用液中反应2 h(30℃)。显示MPO采用DAB法^[3],血细胞用2.5%戊二醛固定30 min并用PBS洗涤后,先后在以DAB为底物的预孵液和反应液(30℃)孵育30 min和60 min。 O_5O_4 后固定,酒精脱水,Epon包埋,Ultracut E超薄切片机切片,日立JEM-1200X型电子显微镜观察及摄影,加速电压60 kV。以不加底物做为阴性对照。

PO活性的生化测定参照Ashida^[4]的方法。MPO活性的生化测定采用3种底物。以DAB为底物参照Coles等^[1]的方法;以TMB为底物用Andrews等^[5]的方法;以DEA为底物用Schlenk等^[2]的方法。酶活单位统一定义为:每毫克蛋白每分钟使OD值增加0.001作为1个酶活单位(U)。血液经3 000 r/min离心10 min,分离出血清用于酶活测定;所得血细胞加入与血清等量的双蒸水,溶血后2 000 r/min离心10 min,取上清液用于细胞内酶活测定。温度和pH对酶活影响的测定是在样液中加入预温至一定温度或一定pH的缓冲液等,立即测定酶活力。蛋白含量测定采用Lowry等^[6]的福林—酚试剂法。

收稿日期:1998-10-16

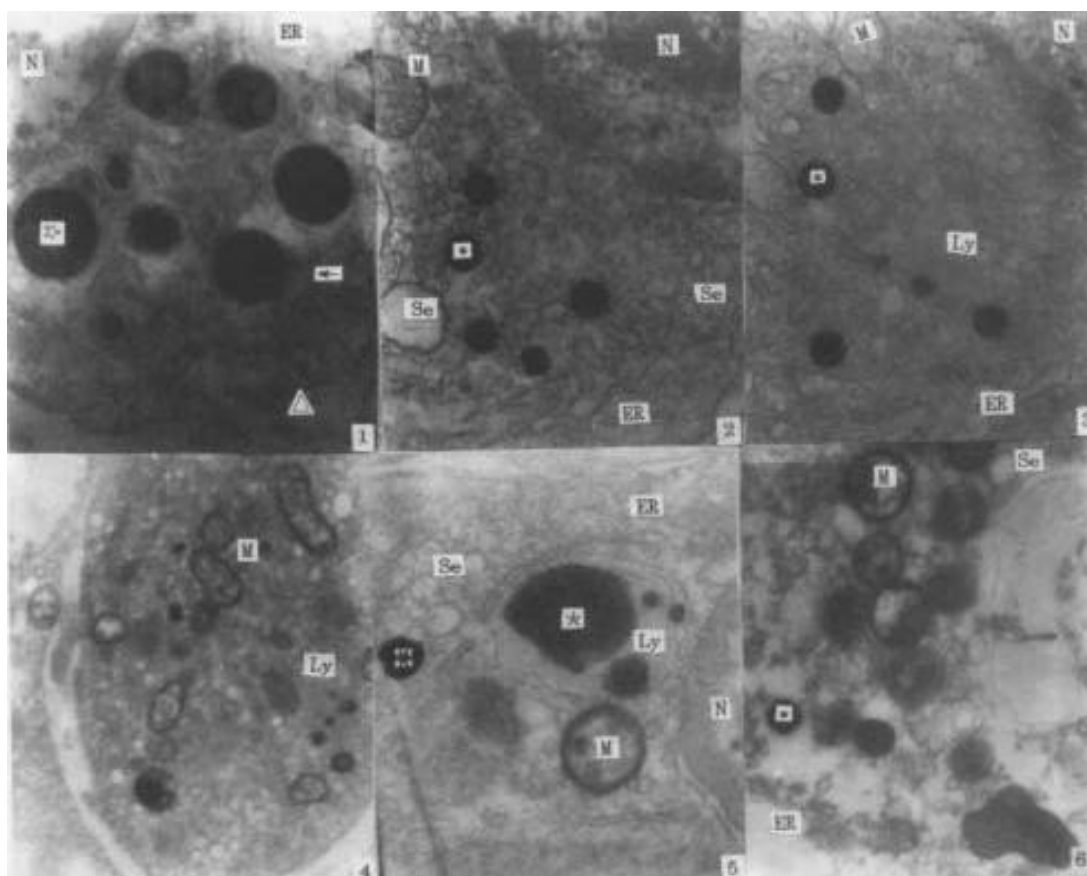
* 国家攀登计划资助项目,PDB 6-6-3号

2 结果

2.1 PO 和 MPO 的电镜细胞化学定位

透射电镜观察显示,在细胞质中的大小 2 种颗粒呈 PO 强阳性,大颗粒多为圆形,直径 300~430 nm,颗粒的电子致密度有密有疏。部分大颗粒有单位膜包围(图版 I-1)。小颗粒也多为圆形,直径 130~200 nm,电子致密度较均匀,并高于大颗粒(图版 I-2)。部分溶酶体内有少量颗粒也呈较强 PO 阳性(图版 I-3)。核膜、内质网、空泡膜和线粒体膜等膜系统呈 PO 弱阳性(图版 I-2,3)。次

级溶酶体和小颗粒呈 MPO 强阳性(图版 I-4,5)。一个溶酶体内常有多个大小不同的电子致密颗粒,圆形或形状不规则,电子致密度有密有疏(图版 I-5)。残余小体也呈 MPO 强阳性(图版 I-6)。分布于线粒体内膜及嵴的细胞色素氧化酶也可利用 DAB 作为底物,虽经 PB 长时间冲洗,也未能使内源细胞色素 C 完全流失,因此线粒体也呈强阳性,图版 I-4 中可看到因切面不同而呈不同形状的线粒体。呈 MPO 阳性细胞中常有丰富的线粒体。核膜、内质网、高尔基体和空泡膜呈 MPO 弱阳性(图版 I-5,6)。



图版 I Plate I

1~3 PO 细胞化学定位, $\times 30$ k。Cytochemical localisation of PO. ☆ 示 PO 强阳性大颗粒 Showing large strongly positive granules of PO. △ 示质膜 Showing plasma membrane. ↑ 示包围大颗粒的空泡单位膜 Showing the membrane surrounded with large granules. * 示 PO 阳性小颗粒 Showing small granules of positive reaction of PO.

4~6 MPO 细胞化学定位, $\times 20$ k, $\times 40$ k, $\times 25$ k。Cytochemical localisation of MPO. * 示溶酶体内 MPO 强阳性颗粒 Showing strongly positive reaction of MPO in lysosome ◆ 示 MPO 强阳性小颗粒 Showing small strongly positive granules of MPO.

N 核 Nucleus; ER 内质网 Endoplasmic reticulum; M 线粒体 Mitochondria; Se 小空泡 Small vesicles; Ly 溶酶体 Lysosome; MF 残余小

体 Residual body.

2.2 血细胞和血清中的 PO 和 MPO 活性

血细胞和血清中的 PO 和 MPO 活性测定结果见表 1。结果表明,血清中既有 PO 又有 MPO 活性,而血细胞中仅有 MPO 而未检测到 PO 活性。

表 1 栉孔扇贝血细胞和血清中 PO 和 MPO 活性

Table 1 Activities of PO and MPO in haemocytes and haemolymph of *C. farreri*

酶 enzymes	血细胞 haemocytes	血清 serum
PO 活力/U activities of PO	0	26.8 ± 0.8
MPO 活力/U activities of MPO *	156.7 ± 19.8	45.0 ± 8.2

注:活力值为平均值 ± 标准误。Activities are $\bar{X} \pm SD (n = 5)$.

* DAB 作为底物。Using DAB as the substrate.

2.3 不同底物对血清 MPO 活性的影响

采用 DAB、TMB 和 DEA 3 种不同底物测定的血清中 MPO 活性结果见表 2。结果表明,以 TMB 为底物得到的不依赖卤素的 MPO 活力平均值为 107.2 U,以 DAB 为底物测得的活力值 101.4 U,也应是不依赖卤素的 MPO,两种方法得到的数值相近,以 DEA 为底物测得的依赖卤素的 MPO 活力为 26.8 U,换用醋酸缓冲液(ACB),pH 4.3 时酶活力增至 53.6 U。

表 2 不同底物对栉孔扇贝血清 MPO 活性的影响

Table 2 Effects of different substrates on the activities of MPO in haemolymph of *C. farreri*

底物 substrate	DAB	TMB	DEA(PB)	DEA(ACB)
MPO/U	101.4 ± 18.2	107.2 ± 21.5	26.8 ± 9.3	53.6 ± 10.7

注:活力值为平均值 ± 标准误。Activities are $\bar{X} \pm SD (n = 5)$.

2.4 pH 对血清中 PO 和 MPO 活性的影响

在不同 pH 条件下测定血清中 PO 和 MPO 活性,结果见图 1 和图 2。图 1 可见,血清中 PO 的最适 pH 为 6.0,低于或高于 6.0,酶活力均迅速下降,pH 7.5 时已检测不到 PO 活性。由图 2 可以看出,血清中 MPO 的最适 pH 为 6.5,pH 低于或高于 6.5 酶活力均迅速下降,pH 高于 7.5 时,酶活力下降速度稍变缓。

2.5 温度对血清中 PO 和 MPO 活性的影响

在不同温度下血清中 PO 和 MPO 活性的测定结果见图 3 和图 4。由图 3 看出,PO 的最适温度为

45℃,高于 45℃,PO 活力迅速下降,低于 45℃,PO 活力下降相对较慢。图 4 显示 MPO 的最适温度为 35℃。

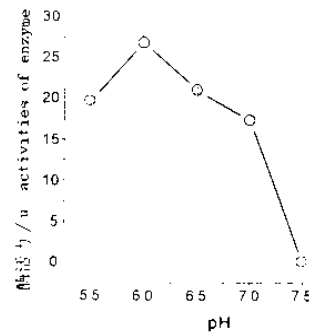


图 1 pH 对栉孔扇贝血清 PO 活性的影响

Fig. 1 Effects of pH on the activities of PO in haemolymph of *C. farreri*

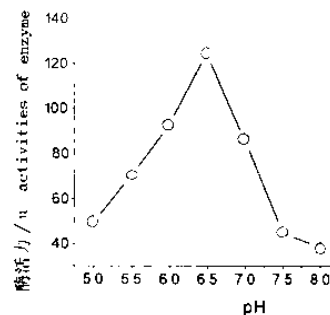


图 2 pH 对栉孔扇贝血清 MPO 活性的影响

Fig. 2 Effects of pH on the activities of MPO in haemolymph of *C. farreri*

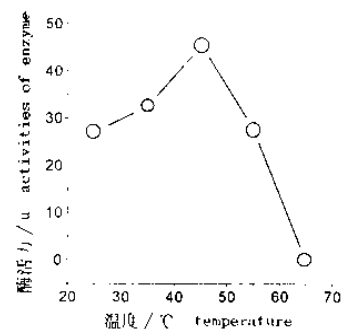


图 3 温度对栉孔扇贝血清 PO 活性的影响

Fig. 3 Effects of temperature on activities of PO in haemolymph of *C. farreri*

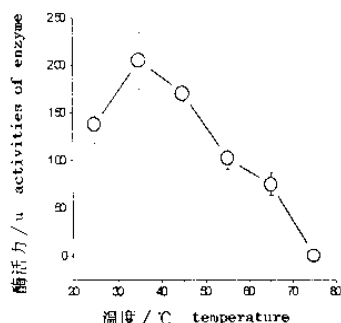


图 4 温度对栉孔扇贝血清 MPO 活性的影响

Fig. 4 Effects of temperature on activities of MPO in haemolymph of *C. farreri*

3 讨论

电镜细胞化学技术显示栉孔扇贝血细胞中存在 PO 活性。呈强阳性的大小 2 种颗粒与 Pipe 等^[7]用免疫组化法显示贻贝血细胞中过氧化物酶体的标志酶—过氧化氢酶时所观察到的 2 种颗粒大小和形状相近,小颗粒与我们显示 MPO 时见到的小颗粒大小和形状也基本一致,说明小颗粒属过氧化物酶体。过氧化物酶体是由内质网形成的,其内的酶是在糙面内质网上合成的,我们观察到内质网及与其相关的膜系统呈弱的 MPO 阳性符合此观点。本文过氧化物酶体呈强的 MPO 阳性,次级溶酶体(包括残余小体)也呈 MPO 强阳性,核膜、内质网和小空泡膜等呈 MPO 弱阳性,与在高等动物得到的结果相似^[3]。Coles 等显示贻贝血细胞中的 PO 和 MPO, PO 只定位于嗜伊红的大颗粒中,而 MPO 仅定位于嗜中性的小颗粒中^[1]。与我们的结果相似之处是大颗粒呈 PO 阳性而不呈 MPO 阳性。其它方面差别较大,是动物种类不同还是其它原因有待于深入研究。Okun 等^[8]认为 MPO 也可氧化多巴成为黑色素,小颗粒呈 PO 阳性是否因这一原因,还需要特异的酶抑制实验证实。

本文得到的 PO 的最适 pH 为 6.0,此结果与 Ashida^[4]用蚕得到的最适 pH 一致。而 Coles 等^[1]和 Simpson 等^[9]得到的贻贝和白对虾的最适 pH 分

别为 7.4 和 7.5。Simpson 等^[9]认为 PO 的同工酶可能有不同的适宜 pH,并且认为不同来源或采用不同底物时,PO 的最适 pH 可有较大的变动。本文得到的 PO 最适温度为 45℃,此结果与 Simpson 等^[9]得到的白对虾的最适温度一致。Ashida 等^[10]在研究温度对螯虾 proPO 激活作用的影响时,得到的最适温度为 65℃,我们采用与其相同的测定法,即采用二甲胍酸钠缓冲系统,在低于 65℃ 时,得到的结果与 Ashida 等的结果相似,但得到的酶活力值要比采用 PB 缓冲系统时得到的数值高许多倍,并且发现,高于 65℃ 时,酶活力仍随温度的升高而增加,说明二甲胍酸钠对 PO 活性测定系统有很大的影响,其原因还有待于深入研究。

参 考 文 献

- 1 Coles J A, et al. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Fish Shellfish Immunol, 1994, 4:337~352
- 2 Schlenk D, et al. Studies on myeloperoxidase activity in the common mussel, *Mytilus edulis* L. Comp Biochem Physiol, 1991, 99C(1/2): 63~68
- 3 小川和郎,等. 酶组织细胞化学技术. 上海:上海医学出版社, 1989. 57~58
- 4 Ashida M. Purification and characterization of perphenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. Archs Biochem Biophys, 1971, 144:749~762
- 5 Andrews P C, et al. Quantitative determination of myeloperoxidase using tetramethylbenzidine as substrate. Anal Biochem, 1982, 127: 346~350
- 6 Lowry O H, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951, 193:265~275
- 7 Pipe R K, et al. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. Fish Shellfish Immunol, 1993, 3:221~233
- 8 Okun M R, et al. Histochemical differentiation of peroxidase-mediated from tyrosinase-mediated melanin formation in mammalian tissues. Histochemie, 1970, 23:295~309
- 9 Simpson B K, et al. Phenoloxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): Purification and some properties. J Agric Food Chem, 1987, 35:918~921
- 10 Ashida M, et al. The prophenoloxidase activating system in crayfish. Comp Biochem Physiol, 1984, 77B(1):21~26

Phenoloxidase and myeloperoxidase activity in the haemocytes and serum of *Chlamys farreri*

Sun Hushan

(Yantai Normal College, Yantai 264025)

Li Guangyou

(The First Institute of Oceanography SOA, Qingdao 266003)

Abstract The phenoloxidase (PO) and myeloperoxidase (MPO) in the haemocytes and haemolymph of the *Chlamys farreri* were studied with the method of cytochemical localisation using electron - microscopy and spectrophotometer. The results show that 2 kinds of granules, 300 ~ 430 nm and 130 ~ 200 nm in diameter, in cytoplasm are strongly positive to PO. The secondary lysosomes and the small granules are strongly positive to MPO. The results of biochemical test show that there are PO and MPO in haemolymph and there is only MPO in haemocytes. PO is present in an inactive form (proPO) in haemocytes. The enzyme activities of MPO in haemocytes is 3.5 fold as much as those in the haemolymph. Halide - independent MPO in haemolymph is 107.2 U using TMB as the substrate, and halide - dependent MPO in haemolymph is 53.6 U using diethanolamine as the substrate. The optimum pH of PO and MPO in haemolymph are 6.0 and 6.5 and the optimum temperatures of PO and MPO in haemolymph are 45 °C and 35 °C.

Key words *Chlamys farreri*, phenoloxidase, myeloperoxidase, enzymatic activity, haemolymph