

栉孔扇贝血淋巴中酯酶活性及其性质

孙虎山, 王宜艳, 王慧丽

(烟台师范学院 生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要:采用紫外分光光度法测定栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)血淋巴中酯酶的活性,并研究底物、抑制剂、激活剂、温度、pH对酯酶活力的影响及酶的热稳定性。结果表明,栉孔扇贝血清与血细胞中均存在酯酶,且血细胞中的酶活力高于血清。血清与血细胞中酯酶的最适作用底物有所不同,血清中为 α -醋酸萘酯,而血细胞中为 α -丁酸萘酯。当以 α -醋酸萘酯为底物时,血清中酯酶的最适温度为45℃,最适pH值为7.5;以 α -丁酸萘酯为底物时,血清中酯酶的最适温度为40℃,最适pH值为8.0。以 α -醋酸萘酯及 α -丁酸萘酯为底物分别测定酶的热稳定性时,酶活力变化相似,在20℃时活力最高,而后缓慢下降。栉孔扇贝血淋巴中酯酶属中温型中性酶类,低温下较稳定,底物专一性不强,血清中的酯酶可能来自血细胞,该酶在贝类的免疫防御中可发挥重要的作用。
[中国水产科学, 2006, 13(1): 39~44]

关键词:栉孔扇贝; 血淋巴; 酯酶; 酶活性

中图分类号:Q959.215 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)01-0039-06

血淋巴中溶酶体酶的水解作用是贝类攻击和清除异物的一种重要免疫防御机制,已报道的重要的水解酶包括溶菌酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和非特异性酯酶^[1~3]。酯酶是能使脂肪族酯和芳香族酯发生水解作用的酶的总称,根据国际生化联合会酶委员会的分类^[4],从EC3.1.1.1至EC3.1.1.20共20种酶均属于酯酶,组织化学家将芳香基酯酶(A-酯酶,EC3.1.1.2)、羧酸酯酶(B-酯酶,EC3.1.1.1)和乙酰酯酶(C-酯酶,EC3.1.1.6)3种底物特异性不强的酶合称非特异性酯酶,而将脂(肪)酶(EC3.1.1.3)、乙酰胆碱酯酶(EC3.1.1.7)和胆碱酯酶(EC3.1.1.8)等称为特异性酯酶。酯酶广泛存在于生物体的各种组织细胞内,具有参与脂类代谢、蛋白质代谢、解毒和信号传导等多种功能^[5]。有关酯酶的研究,在农学、医学和环境科学中研究报道较多^[6~7]。关于贝类酯酶的研究,国外已有少量报道,并证实非特异性酯酶也属于溶酶体酶,与其他的水解酶如溶菌酶和酸性磷酸酶等一样在贝类的免疫防御中发挥重要的作用^[1]。有关栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)酯酶的研究,国内外均未见报道。本研究采用生物化学方法,对栉孔扇贝血淋巴中酯酶活性及其性质进行研究,以为丰富贝类免疫学积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用栉孔扇贝为烟台芝罘湾人工养殖的3龄贝,共50只,壳长45~55 mm,室内水族箱砂滤海水充气暂养。实验所用 α -醋酸萘酯、 α -丁酸萘酯、 β -月桂酸萘酯、4-甲基伞形酮乙酯、乙酰胆碱、丁酰胆碱、 β -苯丙酸、毒扁豆碱、L-半胱氨酸、乙二醇单甲醚(EGME)、对-氯汞苯甲酸(PCMB)为Sigma公司产品,二甲胂酸钠为Fluka公司产品,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 血清及血细胞制备

用2 mL注射器和5号针头从扇贝闭壳肌血窦中取血,每次实验取5只扇贝的血淋巴后混合。3 000 r/min离心10 min,移出上清,即得血清。所得沉淀即血细胞中加入与血清等量的双蒸水,低渗法溶血后6 000 r/min离心10 min,所得破碎血细胞上清和新制备的血清立即测定酯酶活力,未立即测定的样品置4℃冰箱中保存,不超过24 h。

1.3 酯酶活力测定

酯酶活力的测定采用Walter等^[8]的紫外分光光度法,略有改进,换用了不同的缓冲液。底物 α -醋酸萘酯浓度为50 mmol/L,以EGME为溶剂,-20℃下

收稿日期:2005-03-03; 修訂日期:2005-05-28。

基金项目:国家“973”计划资助项目(G1999012005)。

作者简介:孙虎山(1962~),男,教授,博士,主要从事贝类免疫学研究, E-mail:s_hushan@163.com

可保存4个月。20 μL底物储存液加0.2 mol/L的二甲肿酸钠-HCl缓冲液(pH 6.4)2 880 μL后,再加扇贝的血清或血细胞上清液100 μL,摇匀,20℃下反应10 min,1 cm光径石英比色皿于235 nm下测其OD值。每个样品设5只平行管。以经纯化的α-萘酚制作标准曲线。酶活力采用国际单位(IU),即在标准条件下,每分钟水解产生1 μmol α-萘酚所需的酶量作为1个酶活力单位。酶的比活力单位的定义:每毫克蛋白质每分钟水解产生1 μmol α-萘酚所需的酶量作为1个酶活力单位(U)。蛋白含量的测定采用福林-酚试剂法,以牛血清白蛋白为标准制作标准曲线。

1.4 酶性质的研究

1.4.1 底物对酶活力的影响 分别以α-醋酸萘酯、α-丁酸萘酯、β-月桂酸萘酯、4-甲基伞形酮乙酯、乙酰胆碱和丁酰胆碱作为底物,均用EGME配制50 mmol/L底物储存液,实验步骤及测定条件与上述1.3酶活力测定相同。

1.4.2 抑制剂和激活剂对酶活力的影响 先将各种抑制剂和激活剂用0.2 mol/L的二甲肿酸钠-HCl缓冲液(pH 6.4)配成母液,然后加入各测定管中,使它们在反应体系中的浓度各达到:10 mmol/L β-苯丙酸、10 mmol/L EDTA、1 mmol/L L-半胱氨酸、1 mmol/L CuSO₄、1 mmol/L Pb(NO₃)₂、0.1 mmol/L 毒扁豆碱和0.1 mmol/L PCMB,以α-醋酸萘酯为作用底物测定酯酶活力。

1.4.3 pH对酶活力影响 分别以α-醋酸萘酯和

α-丁酸萘酯为底物,以0.2 mol/L二甲肿酸钠-HCl为缓冲液时,pH值分别为4.4、5.0、5.4、6.0、6.4、7.0和7.4,以0.2 mol/L Tris-HCl为缓冲液时,pH值分别为7.0、7.5、8.0、8.5和9.0,温度均为20℃。

1.4.4 温度对酶活力影响 也分别以α-醋酸萘酯和α-丁酸萘酯为底物,分别采用pH 7.5和pH 8.0,0.2 mol/L Tris-HCl缓冲液,加样后分别在20℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、60℃和70℃恒温水浴中保温反应。

1.4.5 酶热稳定性研究 血清先分别在20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃和80℃恒温水浴中保温10 min后再用于酶活力的测定,测定条件除反应温度为20℃外,其他条件与温度对酶活力影响的实验相同。

1.5 统计方法

蛋白质含量和酶活力测定标准曲线的制作,均采用直线回归,得直线回归方程。酶活力测定,按t分布计算,得平均值±标准差。

2 结果

2.1 血淋巴中酯酶活力

栉孔扇贝血清和血细胞中酯酶活力的测定结果见表1。由表1可见,栉孔扇贝血清与血细胞中均存在酯酶,且血细胞中的酶活力高于血清。血清4℃保存24 h后酶活力丧失1%以下,样品在24 h内测定其酯酶活力,对测定结果影响不大。

表1 栉孔扇贝血淋巴中酯酶活力($n=5$)

Tab. 1 Activity of esterase in haemolymph of *Chlamys farreri* ($n=5$)

$\bar{x} \pm SD$

样品 Sample	血清 Serum	血细胞 Haemocytes	4℃存24 h 血清 4℃, 24 h serum
酶活力/IU Enzyme activity	15.1 ± 0.4	19.5 ± 0.9	15.0 ± 0.3
酶比活力/(U·mg ⁻¹ prot) Specific enzyme activity	12.1 ± 0.3	15.7 ± 0.7	11.9 ± 0.5

注:二甲肿酸钠-HCl缓冲液, pH 6.4, 20℃。

Note: Sodium cacodylate buffer, pH 6.4, 20℃.

2.2 底物对血淋巴中酯酶活力的影响

6种不同底物对血清中酯酶活力影响的测定结果见图(1-a)和图(1-b)。由图1可知,用不同的底物测定血清中酯酶活力时,酶活力从高到低的顺序为:α-醋酸萘酯、α-丁酸萘酯、乙酰胆碱、β-月桂酸萘酯、4-甲基伞形酮乙酯、丁酰胆碱。在此6种底物中用于测定血清中酯酶活力的最适底物为α-

-醋酸萘酯。6种不同底物对血细胞中酯酶活力影响的测定结果见图(1-b)。由图(1-b)可知,血细胞中酯酶活力从高到低的顺序为:α-丁酸萘酯、α-醋酸萘酯、丁酰胆碱、乙酰胆碱、β-月桂酸萘酯、4-甲基伞形酮乙酯。在此6种底物中用于测定血细胞中酯酶活力的最适底物为α-丁酸萘酯。

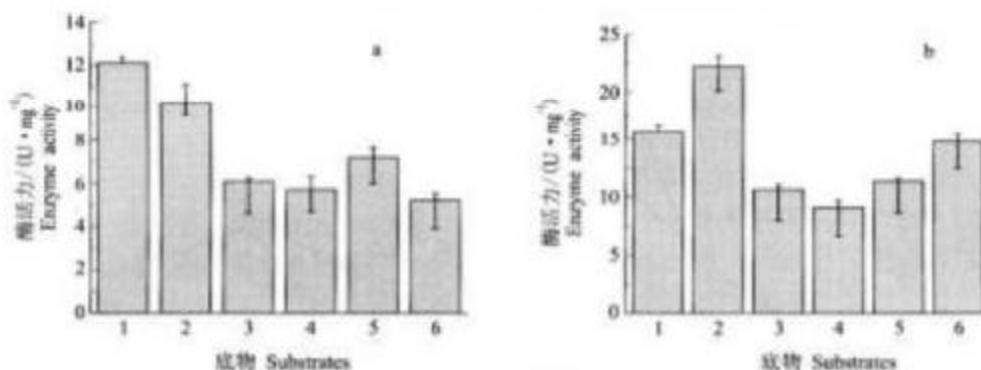


图 1 底物对栉孔扇贝血清(a)、血细胞(b)中酯酶活力的影响($n=5$)
注:二甲胂酸钠-HCl缓冲液, pH 6.4, 20℃。1:α-醋酸萘酚;2:α-丁酸萘酚;3:β-萘酚醋酸酯;4:4-甲基伞形酮乙酯;
5:乙酰胆碱;6:丁酰胆碱。

Fig. 1 Effects of substrates on esterase activity in serum (a) and haemocytes (b) of *Chlamys farreri* ($n=5$)

Note: Sodium cacodylate buffer, pH 6.4, 20℃. 1: α -Naphthyl acetate (α -NA); 2: α -Naphthyl butyrate (α -NB);
3: β -Naphthyl laurate; 4: 4-Methyl umbellifera; 5: Acetylcholine; 6: Butyrylcholine.

2.3 抑制剂和激活剂对血清中酯酶活力的影响

以 α -醋酸萘酚为底物时, 测定抑制剂和激活剂对栉孔扇贝血清中酯酶活力影响的测定结果如图 2 所示。10 mmol/L EDTA 对酶活力起明显的抑制作用。10 mmol/L β -苯丙酸、1 mmol/L L-半胱氨酸和 0.1 mmol/L 毒扁豆碱均对酶活力起激活作用, 其中 0.1 mmol/L 毒扁豆碱处理组酶活力最高。另外, 经 1 mmol/L CuSO₄、1 mmol/L Pb(NO₃)₂ 和 0.1 mmol/L PCMB 处理的 3 组未检测到酶活力, 酶被完全抑制, 在图 2 中未标明。

2.4 pH 对血清中酯酶活力的影响

pH 对栉孔扇贝血清中酯酶活力影响的测定结果见图 3 和图 4。由图 3 和图 4 可见, 作用底物为 α -醋酸萘酚时, 酶活力的最适 pH 值为 7.5; 底物为 α -丁酸萘酚时, 酶活力的最适 pH 值为 8.0。低于此 2 个值时, 酶活力下降速度较快, 当高于这 2 个值时, 酶活力下降相对较慢。并且用 2 种底物测定酶活力时, 均在 pH 5.0 的酸性区域还有一个小的峰。pH 4.5-6.5 时用底物 α -醋酸萘酚测定得到的酶活力高于用 α -丁酸萘酚作底物, 而 pH 7.0-9.0 时结果正好相反, 即用 α -丁酸萘酚作底物酶活力较高。pH 值相同的条件下, 用 Tris-HCl 缓冲液较用二甲胂酸钠-HCl 为缓冲液酶活力要高。

2.5 温度对血清中酯酶活力的影响

温度对酶活力影响的测定结果如图 5 所示。

由图 5 可以看出, 采用 Tris-HCl 缓冲液, α -醋酸萘酚为底物, pH 7.5 时, 最适温度为 45℃; 而 α -丁酸萘酚为底物, pH 8.0 时, 最适温度为 40℃。

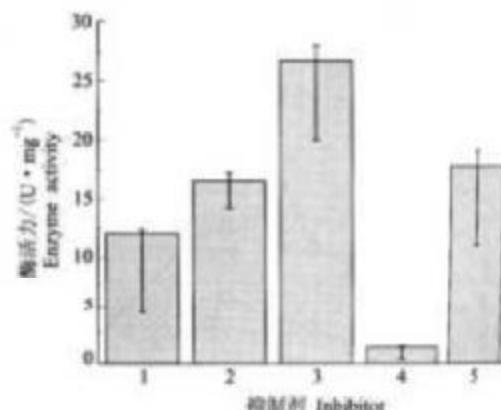
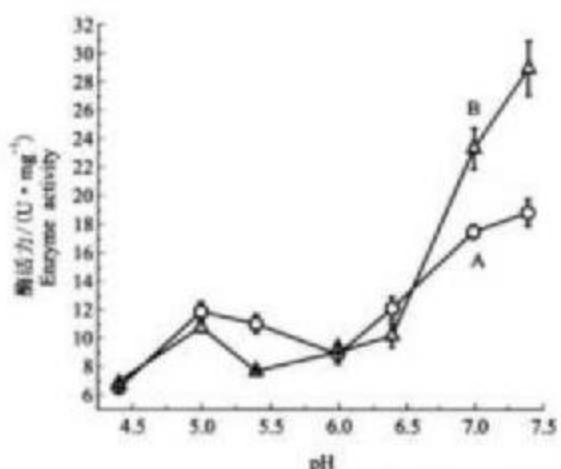


图 2 抑制剂和激活剂对栉孔扇贝血清中酯酶活力的影响($n=5$)

注:二甲胂酸钠-HCl缓冲液, pH 6.4, 20℃。1:对照;2:10 mmol/L β -苯丙酸;3:0.1 mmol/L 毒扁豆碱;4:10 mmol/L EDTA;5:1 mmol/L L-半胱氨酸。

Fig. 2 Effects of inhibitor and activator on esterase activity in serum of *Chlamys farreri* ($n=5$)

Note: Sodium cacodylate buffer, pH 6.4, 20℃. 1: Control; 2: 10 mmol/L β -Phenylpropionic acid; 3: 0.1 mmol/L Physostigmine; 4: 10 mmol/L EDTA; 5: 1 mmol/L L-Cysteine.

图3 pH对栉孔扇贝血清中酯酶活力的影响($n=5$)

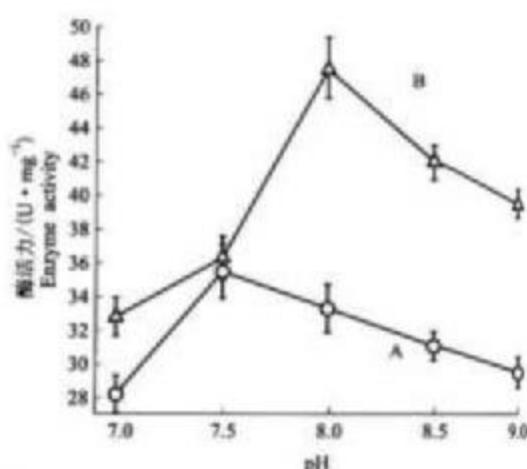
注:二甲胂酸钠-HCl缓冲液,20℃。曲线A和B分别以 α -醋酸萘酚和 α -丁酸萘酚为底物。

Fig.3 Effects of pH on esterase activity in serum of *Chlamys farreri* ($n=5$)

Note: Sodium cyanodide buffer, 20℃. The substrates for curves A and B are α -NA and α -NB.

2.6 血清中酯酶的热稳定性

血清中酯酶对热的稳定性的测定结果如图6所示。分别以 α -醋酸萘酚和 α -丁酸萘酚为底物测

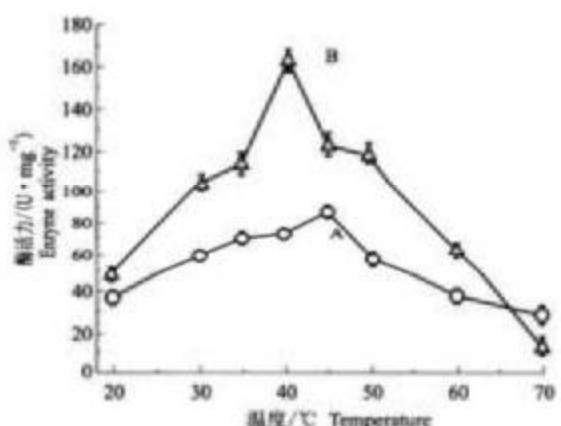
图4 pH对栉孔扇贝血清中酯酶活力的影响($n=5$)

注:Tris-HCl缓冲液,20℃。曲线A和B分别以 α -醋酸萘酚和 α -丁酸萘酚为底物。

Fig.4 Effects of pH on esterase activity in serum of *Chlamys farreri* ($n=5$)

Note: Tris-HCl buffer, 20℃. The substrates for curves A and B are α -NA and α -NB.

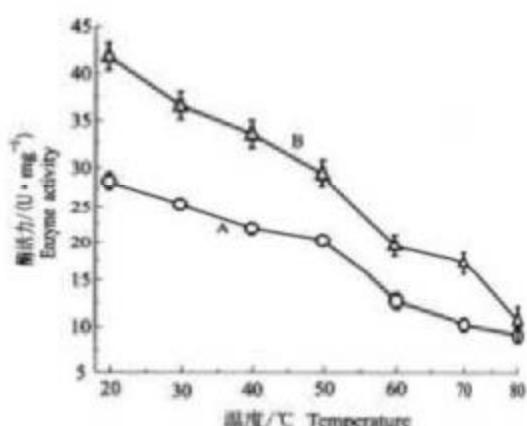
定时,酯酶活力变化相似,在20℃时活力最高,而后逐渐下降;升至80℃时,酶活力丧失约75%。

图5 温度对栉孔扇贝血清中酯酶活力的影响($n=5$)

注:Tris-HCl缓冲液,曲线A和B分别以 α -醋酸萘酚和 α -丁酸萘酚为底物,pH分别为7.5和8.0。

Fig.5 Effects of temperature on esterase activity in serum of *Chlamys farreri* ($n=5$)

Note: Tris-HCl buffer. The substrates for curves A and B are α -NA and α -NB, pH 7.5 and 8.0.

图6 栉孔扇贝血清中酯酶的热稳定性($n=5$)

注:Tris-HCl缓冲液,曲线A和B分别以 α -醋酸萘酚和 α -丁酸萘酚为底物,pH分别为7.5和8.0。

Fig.6 Heat stabilities of esterase in serum of *Chlamys farreri* ($n=5$)

Note: Tris-HCl buffer. The substrates for curves A and B are α -NA and α -NB, pH 7.5 and 8.0.

3 讨论

3.1 酯酶的类型

酯酶是一个复杂的酶群,它们的类型鉴定目前常依据对底物、抑制剂和激活剂的不同反应进行,贾长恩等^[4]在组织化学中列出了鉴定酯酶所用的底物、抑制剂和激活剂及其部分酯酶的反应特征。对照本研究结果进行分析,栉孔扇贝血清中的酯酶不受0.1 mmol/L 毒扁豆碱的抑制,说明其可能不含羧酸酯酶;不受10 mmol/L β-苯丙酸的抑制说明可能不含乙酰酯酶;被1 mmol/L CuSO₄、1 mmol/L Pb(NO₃)₂ 和 0.1 mmol/L PCMB 完全抑制,被10 mmol/L EDTA 部分抑制,被1 mmol/L L-半胱氨酸激活,并且可用4-甲基伞形酮乙酯作为底物,说明含芳香基酯酶。同时说明在3种非特异性酯酶中可能主要含芳香基酯酶。另外,在以β-月桂酸萘酯、丁酰胆碱和乙酰胆碱分别作底物时,血清也均具有酯酶活性,说明其内可能还含有脂(肪)酶、胆碱酯酶和乙酰胆碱酯酶。

3.2 酯酶的性质

本研究表明,以α-醋酸萘酯和α-丁酸萘酯为底物时,栉孔扇贝血清酯酶的最适pH值分别为7.5和8.0。与Walter等^[8]对人单核细胞酯酶研究,用磷酸缓冲液α-醋酸萘酯和α-丁酸萘酯为底物时,得到的最适pH值分别为8.0和7.2左右略有差异。与Miller等^[9]在研究兔肝羧酸酯酶时,用磷酸缓冲液和Ellan's试剂得到的最适pH8.0基本一致。实验中还发现,酶活测定在pH5.0附近还有一个较小峰值,与Walter等^[8]用2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)作缓冲液α-丁酸萘酯为底物得到的pH6.0处有一小峰相似。其中,缓冲液的种类也对酯酶活力有较大影响,其原因有待于进一步研究。以α-醋酸萘酯和α-丁酸萘酯为底物时,最适温度分别为45℃和40℃,说明该酶为中温型酶。冷藏和热稳定性实验表明,该酯酶低温下非常稳定,而高温下不很稳定,提取制备该酶时应在低温下操作。该酯酶被Cu、Pb、Ag、Hg等重金属抑制,同时又被络合物EDTA抑制,说明该酯酶的作用可能需要某种金属离子的参与。0.1 mmol/L 毒扁豆碱和10 mmol/L β-苯丙酸对血清中酯酶不仅不起抑制作用反而起激活作用,其原因和机理需要进一步研究。

3.3 酯酶的功能及其应用

已有研究表明,酯酶能水解许多含有肽键、硫酯键、芳酯键、酰胺键的内源性及外源性物质,具有参与药物及毒物等的生物转化、脂质代谢、蛋白质代谢、信号传导和维持生物膜结构的完整性等功能^[5],贝类体内的酯酶是否具有上述功能,有待于深入的研究。作为溶酶体水解酶的一种,酯酶在非特异性免疫防御、水解清除异物方面也发挥重要的作用^[10]。在已做过的多种双壳贝类中均含有较其他动物更为丰富的酯酶,不仅血淋巴中含有酯酶,而且所有的器官组织内均含有大量的酯酶,在各器官中肝脏的酯酶含量最高,在各类组织中上皮组织酯酶含量最高^[10],因此,贝类体内的酯酶可能在其代谢和免疫防御等方面发挥较其他类动物更为重要的作用。本研究表明,栉孔扇贝血淋巴中的酯酶主要为芳香基酯酶,此类酶又称有机磷抗性酯酶,可破坏某些有机磷,如能水解对氧磷等有机磷农药,从而使之成为无毒的水溶性产物。扇贝等双壳贝类的主要食物是滤食单细胞藻类,海水中的有机磷农药等有毒物质通过单胞藻的浓缩被大量带入贝类体内,酯酶的解毒作用可能是其最重要的功能之一。另外,海洋中大量的扇贝、贻贝、牡蛎等双壳贝类可能在清除有机磷农药等有毒物质方面发挥着重要的作用,从而减轻农药等对海洋的污染。

参考文献:

- Ebie A F. Seasonal distribution of alkaline and acid phosphatase and nonspecific esterase in the normal and diseased American oyster as revealed by enzyme histochemistry[J]. Am Zoolist, 1966, 6:339.
- 孙虎山,李光友.栉孔扇贝血淋巴中ACP和AKP活性及其电镜细胞化学研究[J].中国水产科学,1999,6(4):6-9.
- 孙虎山,李光友.碘化卡拉胶和酵母葡聚糖对栉孔扇贝血淋巴中两种水解酶活力的影响[J].海洋与湖沼,2002,33(3):245-249.
- 贾长恩,李叔庚,王士平,等.组织化学[M].北京:人民卫生出版社,2001:294-310.
- 唐景荣,孙曼.人胶原酶的研究进展[J].生物化学与生物物理进展,1996,23(2):113-117.
- 郑健,周志俊,侯雪梅,等.慢性有机磷农药接触对胰岛素活力的影响[J].工业卫生与职业病,2003,31(2):68-71.
- 刘新,贾艳萍,马思波.东亚飞蝗山西两地种群脂肪特性比较研究[J].昆虫学报,2005,48(1):24-30.
- Walter M, Joseph Y. An Ultraviolet Spectrophotometric Assay for α-Naphthyl Acetate and α-Naphthyl Butyrate Esterase [J]. Analytical Biochemistry, 1981, 115: 188-193.

- [9] Miller S K, Main A R, Rush R S. Purification and physical properties of oligomeric and monomeric carboxylesterase from rabbit liver[J]. J Biol Chem, 1980, 255: 7 161-7 167.
- [10] 孙虎山, 王宜艳, 张维勤, 等. 鲍孔扇贝酸性 α -脂酰基脂酶的组织化学研究[J]. 高技术通讯, 2003, 8: 91-94.

Activities and properties of esterases in haemolymph of scallop *Chlamys farreri*

SUN Hu-shan, WANG Yi-yan, WANG Hui-li

(College of Life Science, Yantai Normal University, Yantai 264025, China)

Abstract: Esterases are a large and diverse group of hydrolases that hydrolyze numerous substrates including esters and certain nonester substrates. In this study, the activity and property of esterases in haemolymph of scallop *Chlamys farreri* were assayed with spectrophotometric method. The activity of esterases in both serum and haemocytes of *Chlamys farreri* was detected, and the activity of esterases in serum was higher than that in the haemocytes. The optimum substrate of esterases in serum was α -naphthyl acetate, but in haemocytes was α -naphthyl butyrate. Several inhibitor or activator had effect on activity of esterases in serum with the substrate being α -naphthyl acetate. The esterases activity was inhibited fully, respectively by 1 mmol/L CuSO₄, 1 mmol/L Pb(NO₃)₂, 0.1 mmol/L PCMB and pronouncedly by 10 mmol/L EDTA. The esterases activity was enhanced by 10 mmol/L β -phenylpropionic acid, 1 mmol/L L-cysteine, 0.1 mmol/L physostigmine, and the highest activity was obtained with physostigmine. As the substrate of esterases in serum was α -naphthyl acetate, the optimum temperature for the reaction was 45 °C, and the optimum pH was 7.5; and as the substrate of esterases in serum was α -naphthyl butyrate, the optimum temperature was 40 °C, and the optimum pH was 8.0. The thermal stability of esterases in serum was similar with either α -naphthyl acetate or α -naphthyl butyrate being substrate, and the esterases thermal stability was the highest at the temperature of 20 °C, and the thermal stability became descending with the temperature increasing, and the enzyme activity value was decreased by 75% after the serum was incubated at 80 °C for 10 min.

The results suggest that the activity levels of esterases in haemolymph of *Chlamys farreri* is stable at low temperature. The substrate specificity of the esterase is not strict. The esterases in serum may come from haemocytes. The esterases in haemolymph of *Chlamys farreri* may play an important role in protection from pathogens. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1): 39-44]

Key words: *Chlamys farreri*; haemolymph; esterase; enzyme activity