

中华绒螯蟹血清凝集素的生物学特性

刘雪兰,余为一,李谨年

(安徽农业大学 畜牧水产学院,安徽 合肥 230036)

摘要:将中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)血清凝集素与动物(蟹、鲫鱼、鸡、鸽、兔、鼠、人A、B、O型)红细胞和细菌(八叠球菌、嗜水气单胞菌、短小芽孢杆菌、大肠杆菌、葡萄球菌、假单胞菌和拟态弧菌)进行凝集反应。结果表明,中华绒螯蟹血清凝集素有明显的选择性,与小白鼠红细胞和八叠球菌的凝集活性最高($P < 0.01$)。血清凝集价在蟹个体之间变化范围较大,性别之间无显著差异($P > 0.05$)。10 mmol/L的 CaCl_2 和300 mmol/L的NaCl不影响凝集素与小鼠红细胞和细菌的凝集活性,600 mmol/L的NaCl可降低其活性。pH 5~9不影响蟹凝集素活性,但400 mmol/L的EDTA在pH 7.0可部分抑制其活性,100 mmol/L的EDTA在pH 5.0则可完全抑制其活性。在细菌刺激下,中华绒螯蟹血清凝集素活性在2 d达到峰值,随后逐步缓慢下降。接种细菌(八叠球菌)的数量($3.0 \times 10^8 \sim 9.0 \times 10^9$)显著影响血清凝集素的产生($P < 0.05$),而环境水温度(18~30℃)和蟹体质量(35~80 g)的影响则不显著($P > 0.05$)。[中国水产科学,2006,13(3):365~370]

关键词:中华绒螯蟹;血清凝集素;凝集价

中图分类号:Q959.223 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)03-0365-06

随着中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)养殖规模的不断扩大,蟹病亦日趋严重,蟹病防治成为养蟹业迫切而艰巨的任务。药物是目前蟹病防治的主要方法。由于滥用药物,造成抗药性、蟹品质下降和环境污染等不良后果。甲壳动物的凝集素是一种非常重要的免疫防御因子,能够识别和防御外源异物的人侵^[1-2]。有关中华绒螯蟹凝集素的研究,曹广力等^[3]报道了中华绒螯蟹血清中外源凝集素的凝集作用及其影响因素,但有关其生物学特性的研究报道尚不多见。为此,笔者对中华绒螯蟹血清凝集素的凝集谱、体内消长规律以及影响活性的因素等进行了研究,旨在探索提高中华绒螯蟹自身的免疫抵抗力,减少蟹疾病发生。

1 材料与方法

1.1 样品来源及蟹血清的制备

实验用中华绒螯蟹取自安徽省某养殖场。血清制备按刘雪兰等^[4]的方法。

1.2 动物红细胞和细菌凝集实验

分别采健康蟹(*T. sinensis*)、鲫(*C. auratus*)、鸡、

鸽、兔、鼠、人(A、B、O)型抗凝血,用生理盐水洗涤并配制成2%红细胞悬液。分别将嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*) (南京农业大学陆承平教授惠赠)、八叠球菌(*M. sarcina*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)、大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、恶臭假单胞菌(*P. putida*)和拟态弧菌(*V. mimicus*) 7种细菌(均为实验室保存)在LB固体培养基以适宜的温度进行培养,取接种环刮取菌苔,用生理盐水离心洗涤并配制成 1.2×10^9 CFU/mL细菌悬液。

在微量V型反应板上,用生理盐水稀释中华绒螯蟹血清样品(50 μL /孔),分别加入等量动物红细胞或细菌悬液(50 μL /孔),在振荡器上混匀,室温下静置1~2 h(与红细胞反应)或4℃静置2~4 h(与细菌反应)。所有凝集反应中的样品均设重复孔3个。凝集结果的判断:如蟹血清不与红细胞或细菌发生凝集,则红细胞或细菌沉积于“V”型板的孔底形成一个界线清晰光滑的小点,判断为“-”;如发生凝集,则在整孔底部形成一均匀不透明薄层,判断为“+”。以出现明显凝集的血清最高稀释度的倒数表示凝集价。

收稿日期:2005-06-20; 修订日期:2005-10-19.

基金项目:安徽省自然科学基金项目(99041355).

作者简介:刘雪兰(1973-),女,博士生,研究方向为预防兽医学和微生物.

通讯作者:余为一. E-mail: yuweiyi@ahau.edu.cn

1.3 Ca^{2+} 、 Na^{+} 、pH 和 EDTA 对凝集素活性的影响

分别配制含 0.75~12 mmol/L CaCl_2 的生理盐水、150~600 mmol/L NaCl 溶液和 pH 5~9 (0.05 mol/L) 的 PBS 和 400 mmol/L 的 EDTA 溶液作为稀释液,检测 Ca^{2+} 浓度和 Na^{+} 浓度、pH 和 EDTA 对凝集素活性的影响。

1.4 细菌接种

按常规方法培养细菌,收取的细菌经洗涤后用甲醛溶液(0.7%)灭活(37℃,24 h),用无菌生理盐水洗涤,并配制成细菌悬液。无菌检验后从中华绒

螯蟹第3步足基关节膜处注射细菌悬液。

1.5 影响凝集素消长因素的实验设计

按照生物统计学正交试验 $L_9(3^4)$ 设计原理^[5],设计了中华绒螯蟹体质量、水环境温度和细菌浓度三因素三水平(3×3)影响凝集素产生的实验(表1)。

1.6 数据处理与分析

每个实验组有 8~10 只中华绒螯蟹,所有实验数据均以平均值±标准差($\bar{X} \pm \text{SD}$)表示,组间通过 t 检验进行比较分析。中华绒螯蟹体质量、水环境温度和细菌浓度影响凝集素产生的实验数据用 SAS 软件进行方差分析。

表1 三因素三水平正交实验设计

Tab.1 A 3×3 design of orthogonal experiment for influencing factors

因素 Factor	分组 Group		
	1	2	3
平均体质量/g Mean body weight	35	60	80
水温/℃ Water temperature	18~19	24~25	29~30
细菌浓度/(CFU·mL ⁻¹) Concentration of bacteria	生理盐水	3.0×10^9	9.0×10^9

注:(1)在注射细菌前2天,将每个实验组的水温逐步升至所需的范围;(2)细菌选用八叠球菌,每组8~10只。

Note: (1)Before the injection, the water was gradually calorified to the experiment temperature for two days; (2)factor C *M. aurina*. Each group had 8~10 individuals of *E. sinensis*.

2 结果

2.1 中华绒螯蟹血清凝集素与部分动物红细胞的凝集反应特点

中华绒螯蟹血清凝集素与部分水生动物(鲫鱼和蟹)、禽(鸡、鸽)和哺乳动物(兔、鼠和人 A、B、O 型)红细胞的凝集特性结果如表2所示,中华绒螯蟹血清凝集素与鲫鱼和蟹红细胞无凝集性,而与鸡、

鸽、兔、鼠和人红细胞能够发生不同程度的凝集反应。其中,与鼠的红细胞凝集作用最强,与其他动物红细胞凝集效价的比较,差异极显著($P < 0.01$)。此外,不同个体的中华绒螯蟹,其血清凝集素的凝集价变化范围较大,如对鼠红细胞的凝集价为 128~2 048,对人 A 型红细胞的凝集价为 8~64。不同性别中华绒螯蟹的血清凝集素在凝集动物红细胞和细菌均无显著差异($P > 0.05$)。

表2 中华绒螯蟹血清凝集素与部分动物红细胞凝集反应的结果

Tab.2 Reaction of *E. sinensis* serum agglutini to the erythrocytes from other animals

红细胞种类 Erythrocytes		中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i>		
		雌 Female (n=8)	雄 Male (n=8)	$\bar{X} \pm \text{SD}$ (n=16)
人 Human	A 型 Type A	32.00±24.98	37.00±22.25	34.50±23.78
	B 型 Type B	33.00±19.77	35.00±18.73	34.00±19.29
	O 型 Type O	35.00±23.30	30.50±21.16	32.75±22.37
鼠 Mouse		1 392.00±852.51	1 312.00±761.98	1 352.00±809.50
兔 Rabbit		17.50±9.37	15.00±7.42	16.25±8.54
鸽 Pigeon		14.50±7.98	17.00±9.33	15.75±8.77
鸡 Chicken		8.00±4.90	10.00±4.89	9.00±5.01
蟹 <i>T. sinensis</i>		—	—	—
鲫 <i>C. auratus</i>		—	—	—

注:“—”表示反应呈阴性。

Note: “—” means negative reaction.

2.2 中华绒螯蟹血清凝集素与部分细菌凝集反应特点

如表3所示,中华绒螯蟹血清凝集素与大肠杆菌、短小芽孢杆菌等5种细菌无凝集作用;与八叠球菌和嗜水气单胞菌有不同程度的凝集作用;对八叠球菌的凝集价显著高于对嗜水气单胞菌的凝集价($P<0.01$)。

此外,中华绒螯蟹不同个体血清凝集素对同种细菌的凝集价的变化范围较大,如对八叠球菌的凝集价为4~32;而不同性别中华绒螯蟹血清凝集素的细菌谱相同,且凝集价无显著差异($P>0.05$)。

2.3 Ca^{2+} 、 Na^{+} 对中华绒螯蟹血清凝集素活性的影响

用含12 mmol/L、6 mmol/L、3 mmol/L、1.5 mmol/L、0.75 mmol/L、0 mmol/L CaCl_2 的溶液稀释蟹血清与鼠红细胞。反应结果表明,不同浓度 CaCl_2 样品和对照组的血清凝集价均为128,表明

Ca^{2+} 对凝集素的血凝活性无影响。

用含600 mmol/L、300 mmol/L和150 mmol/L NaCl的溶液稀释蟹血清与鼠红细胞。反应结果是其凝集价分别为64、256和256,表明300 mmol/L NaCl对中华绒螯蟹血清凝集鼠红细胞的活性没有影响作用,而当NaCl浓度达到600 mmol/L时,其活性降低至1/4。

2.4 pH与EDTA影响中华绒螯蟹血清凝集素活性的关系

pH在5.0~9.0时,对蟹血清凝集活性无影响(表4),而EDTA具有明显的降低凝集素活性作用。如表4所示,在pH 7.0时,400 mmol/L的EDTA明显抑制了凝集素活性;随着pH降低,EDTA抑制作用增强,在pH 5.0时,凝集活性可被完全抑制。

表5的结果显示,在pH 5.0的条件下,降低EDTA浓度,其抑制蟹血清凝集素活性作用也随之减弱。

表3 中华绒螯蟹血清凝集素与部分细菌凝集反应的结果
Tab.3 Reaction of *E. sinensis* serum agglutinin to some bacteria

细菌 Bacteria	雌 Female (n=8)	雄 Male (n=8)	$\bar{X} \pm \text{SD}$ (n=16)
八叠球菌 <i>M. sarcina</i>	11.50±4.66	14.00±8.49	12.75±6.96
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	3.50±0.87	3.00±1.00	3.25±0.9
短小芽孢杆菌 <i>B. pumilus</i>	—	—	—
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	—	—	—
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	—	—	—
恶臭假单胞菌 <i>P. putida</i>	—	—	—
拟态弧菌 <i>V. mimicus</i>	—	—	—

注:实验血清来源同表2;“—”表示阴性反应。

Note: The tested serum were shown in Tab.2; “—” means negative reaction.

表4 pH对EDTA(400 mmol/L)抑制中华绒螯蟹血清凝集素结合小鼠红细胞活性的影响

Tab.4 Influence of pH on inhibition of binding activity of *E. sinensis* serum agglutinin to mouse erythrocytes by EDTA(400 mmol/L)

EDTA/(mmol·L ⁻¹)	pH				
	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
0 (Control)	256	256	256	256	256
400	—	32	64	256	256

注:实验数据是同一微量反应板上重复3孔的结果。

Note: Data were obtained from three repetitions in microtiter plate.

表5 不同浓度的EDTA对中华绒螯蟹血清凝集素结合小鼠红细胞活性的抑制作用

Tab.5 Inhibition of binding activity of *E. sinensis* serum agglutinin to mouse erythrocytes by EDTA at pH 5.0

项目 Item	EDTA/(mmol·L ⁻¹)							
	6.25	12.5	25	50	100	200	400	0 (Control)
凝集效价 Titer	256	128	64	16	—	—	—	256

注:实验数据是同一微量反应板上重复3孔的结果。

Note: Data were obtained from 3 wells of repeated test in microtiter plate.

2.5 凝集效价的消长规律

在中华绒螯蟹被注射八叠球菌后,每隔2天连续检测血清凝集素对八叠球菌的效价。如表6所示,在注射细菌后,血清凝集效价迅速升高,第2天即达到峰值,随之逐渐下降,至第14天其凝集效价趋于正常水平。由此可知,中华绒螯蟹血清凝集素在外源异物(细菌)的刺激后,能迅速生成凝集素,但是很快下降,反映了其非特异性防御的特点。

表6 中华绒螯蟹血清凝集素活性的消长变化

Tab.6 Dynamics of *E. sinensis* serum agglutinin activity

时间/d	Time	凝集效价 Agglutinititer
1		144 ± 39.19
2		216 ± 77.97
4		184 ± 49.60
6		132 ± 49.15
8		82 ± 24.58
10		62 ± 23.24
12		51 ± 32.45
14		44 ± 16.97

注:环境温度 25℃。

Note: With a temperature at 25℃.

2.6 水温、体质量、细菌接种量对凝集素产生的影响

按照表1的实验设计,随机分成9组的中华绒螯蟹在注射前3天置相应温度环境喂养;接种八叠球菌,2d后采血清检测凝集价。方差分析如表7所示,环境温度在18~30℃,体质量在35~80g,各组中华绒螯蟹所产生的血清凝集素无明显差异($P > 0.05$),而注不同细菌浓度($3.0 \times 10^9 \sim 9.0 \times 10^9$ CFU/mL)的组间,血清凝集素效价差异明显($P < 0.05$)。

表7 正交实验的方差分析结果

Tab.7 Result of analysis of variance (AOV)

变异来源	Variable source	df	SS	MS	F	Pr > F
体质量	Body weight	2	0.27	0.14	2.05	0.13
温度	Temperature	2	0.19	0.10	1.44	0.24
细菌浓度	Concentration of bacteria	2	0.50	0.25	3.77*	0.03
误差	error	62	4.09	0.07		
总和	Corrected total	68	5.07			

3 讨论

3.1 甲壳动物凝集素对动物红细胞和细菌的结合

甲壳动物的凝集素是重要的防御因子,其凝集素与结合的动物红细胞和细菌有选择性。日本蟹(*Tachypleus tridentatus*)的血淋巴中5种凝集素,其中1种对人A、B和O型红细胞均无凝集作用,而其他4种凝集素对3种血型的红细胞有不同的凝集活性^[2];中国对虾(*Penaeus chinensis*)血淋巴凝集素对鸡、兔、鼠等多种动物红细胞有凝集活性^[6];而龙虾如 *Nephrops norvegicus* 血淋巴液中的LAG-2凝集素只对鼠红细胞有凝集活性^[7]。本研究获得的结果与曹广力等^[4]曾报道中华绒螯蟹血清凝集素的凝集谱相似。

3.2 凝集素产生的特点

罗日祥^[8]和王雷^[9]等分别用弧菌和免疫药物刺激中国对虾,发现可提高其血凝素的产生。Hardy^[10]发现,牡蛎经细菌刺激后凝集活性也会有所提高。但是,尽管栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)血清对金黄色葡萄球菌和代远洋弧菌(*V. pelagius*)具有明显的凝集作用,而用这2种细菌悬液注射刺激栉孔扇贝,其血清的细菌凝集活性却没有变化^[11]。本实验结果表明,体质量、性别和环境温度对凝集素产生的影响均无明显差异,与陈皓文等^[12]认为凝集素浓度变化不一定与年龄、性别相关的观点相符。但是蟹个体之间的差异极大,特别是注射刺激(细菌或生理盐水)可引起凝集素(1~2天内)迅速升高,并很快下降,表现出动物机体应激反应的特点。

3.3 影响凝集素结合因素与机理

凝集素与其他分子的结合主要是通过共价键,所以其凝集活性受到一些化学因素的影响。彭其胜等^[6]发现,虽然中国对虾凝集素对 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等不敏感,但其凝集反应可被二价金属离子螯合剂-EDTA所抑制,推测在中华绒螯蟹血清凝集素的凝集活动中, Ca^{2+} 或其他二价金属离子仍然是必不可少的^[13-16]。其机理可能是多方面的,如蟹凝集素需要 Ca^{2+} 以类钙调素的方式进行,而有的凝集素则是需要 Ca^{2+} 影响它们的分子构型。本研究中,中华绒螯蟹血清凝集素对 Ca^{2+} 不敏感,而金属离子螯合剂EDTA也可以抑制其血凝活性,表明二价金属离子仍是中华绒螯蟹凝集素活性的必要条件。

牟海津等^[17]报道,当反应液中的盐度在 18~36 时,中国对虾凝集素对动物红细胞凝集活性有所增强。Tamplin 等^[18]在研究美洲巨螯(*Crassostrea virginica*)的血清对霍乱弧菌(*V. cholerae*)的凝集作用时也曾发现,适当增加反应液的盐度,可以提高凝集素效价。本实验发现,将 NaCl 的浓度从 0.15 mol/L 提高到 0.30 mol/L,中华绒螯蟹血清凝集素对鼠红细胞的凝集没有影响,而 NaCl 浓度增加到 0.60 mol/L 时,其活性却降低。其机理可能是中性盐离子改变凝集素分子极性和电荷而影响其结合能力。

参考文献:

- [1] Kawabata S, Iwanaga S. Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab[J]. Dev Comp Immunol, 1999, 23(4-5): 391-400.
- [2] Seki N, Minano Y, Wai S N, et al. Horseshoe crab acetyl group - recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1999, 96(18): 10 086-10 091.
- [3] 曹广力,朱超雄,薛仁宇,等.中华绒螯蟹血清中外源凝集素的凝集作用及影响因素[J].水产养殖,1999,5:16-18.
- [4] 刘雪兰,余为一,李耀年.用鼠红细胞膜纯化中华绒螯蟹血清凝集素的研究[J].中国水产科学,2004,11(6):450-455.
- [5] 贵州农学院主编.生物统计附试验设计[M].北京:中国农业出版社,1986.300.
- [6] 彭其胜,郭文场,杨振国,等.中国对虾血淋巴液中的凝集素[J].中国水产科学,2001,7(4):14-18.
- [7] James L H, David T, Rowland J. Heterogeneity of lobster agglutinins. II. specificity of agglutinin - erythrocyte binding[J]. Biochemistry, 1974, 13(4): 828-832.
- [8] 罗日祥.中国对虾凝集素活力及弧菌的诱导动力学[J].海洋学报,1997,19(4):117-120.
- [9] 王雷,李光友,毛兴远.口服免疫药物后中国对虾某些血清巴因子的测定及方法研究[J].海洋与湖沼,1993,26(1):34-41.
- [10] Hardy S W. Aspects of cellular and humoral defense mechanisms in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[A]. Developmental immunobiology [M]. Amsterdam: Elsevier North Holland Publishing Co, 1977. 59-66.
- [11] 牟海津,江晓路,王慧霞,等.栉孔扇贝血清中的免疫因子的研究[J].中国水产科学,1999,6(2):33-36.
- [12] 陈皓文,孙丕喜,宋庆云.外源凝集素 - 水产动物释放的有力兵器[J].黄渤海海洋,1995,13(3):61-71.
- [13] Yeaton R W. Invertebrate lectins: I Occurrence[J]. Dev Comp Immunol, 1981, 5: 391-402.
- [14] Vasta G R, Hafiz A. Lectins from aquatic invertebrates: strategies and methods for their characterization[A]. Techniques in fish immunology-4 [M]. Washington: SCS Publications, 1995. 29: 241-258.
- [15] Hino K, Koji M, Rina G, et al. Lectins in the hemolymph of a starfish, *Asterina pectinifera*: purification and characterization[J]. Dev Comp Immunol, 1992, 11: 243-249.
- [16] Itzhak O, Erika C, Yona K. The role of C-type lectin in the innate immunity against pulmonary pathogens[J]. Adv Exp Med Biol, 2000, 479: 27-35.
- [17] 牟海津,江晓路,刘树青.中国对虾血细胞凝集素的性能研究[J].中国水产科学,1999,6(3):32-35.
- [18] Tamplin M L, Fisher W S. Occurrence and characteristics of agglutination of *Vibrio cholerae* by serum from the oyster, *Crassostrea virginica* [J]. Appl Environ Microb, 1989, 55(11): 2 882-2 887.

Biological characteristics of *Eriocheir sinensis* serum agglutinin

LIU Xue-lan, YU Wei-yi, LI Jin-nian

(College of Animal Science and Fisheries, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The serum was collected from health *Eriocheir sinensis*. Firstly, the binding abilities of the agglutinin to erythrocytes of several species of animals and bacteria were tested. The results showed that the agglutinin had different binding abilities to erythrocytes of chicken, pigeon, rabbit, mouse and human (types A, B and O). However, it could not bind to the erythrocytes of *C. auratus* and *T. sinensis*. The binding ability to erythrocytes of mouse was stronger than those of other animals, which had significant difference ($P < 0.01$). In addition the agglutinin could bind bacteria such as *M. sarcina* and *A. hydrophila* ($P < 0.01$), but couldn't bind *E. coli*, *B. pumilus*, *S. aureus*, *P. putida* nor *V. minicus*.

Secondly, the pattern of agglutinin production was examined, as well as the influencing factors on its production. *E. sinensis* were injected with bacteria (*M. sarcina*), and a peak value of serum agglutinin appeared after two days, then it declined gradually to normal level at day 14. This suggests that the agglutinin serving as a nonspecific preventive factor can rapidly respond to a heterogenous stimulator and keep only for a short phase in *E. sinensis* serum.

An experiment according to biostatistics principle was designed to examine the effects of three factors such as body weight, water temperature and concentration of bacteria on agglutinin production *in vitro*. The results showed that there was significant difference on agglutinin level produced among the groups injected with various concentrations of bacteria ($P < 0.05$), but no difference among the groups with body weight from 35 g to 80 g and under the conditions of water temperature from 18 °C to 30 °C ($P > 0.05$).

In addition, there was a greater individual diversity among *E. sinensis* in agglutinin titers binding *M. sarcina* from 4 to 32, mouse erythrocyte from 128 to 2 048 and human erythrocyte from 8 to 64, but no difference between male and female groups ($P > 0.05$).

Thirdly, the effects of some influencing factors on agglutinin activity were examined *in vitro*. Different concentrations of CaCl_2 (12 mmol/L, 6 mmol/L, 3 mmol/L, 1.5 mmol/L, 0.75 mmol/L, 0 mmol/L) could not change its binding activity to mouse erythrocyte. NaCl at 600 mmol/L could decrease agglutinin activity by three quarter, while NaCl at 300 mmol/L or 150 mmol/L had no effect on it.

E. sinensis serum agglutinin could keep its activity within a wide range from pH 5.0 to pH 9.0, however, the presence of high concentration of EDTA could influence its activity significantly. Under the presence of EDTA at 400 mmol/L the activity was partly lost at pH 7.0 and completely blocked at pH 5.0. Meanwhile, with other condition at the same pH value the effects of EDTA on agglutinin activity reduced when its concentration was lowered. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3): 365–370]

Key words: *Eriocheir sinensis*; serum agglutinin; agglutinin titer

Corresponding author: YU Wei-yi. E-mail: yuwei@ahau.edu.cn