

注射 L- 精氨酸和环磷酰胺对杂色鲍血清 NO 水平、NOS 活性及免疫指标的影响

王广军, 谢骏, 余德光, 胡朝莹, 杜旭彤, 唐丽花

(中国水产科学研究院 珠江水产研究所, 热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380)

摘要: 对杂色鲍(*Haliotis diversicolor*) 分别按每 kg 体质量注射 250 mg、500 mg 和 1 000 mg 的 L- 精氨酸和 5 mg、10 mg、20 mg 的环磷酰胺。每隔 5 d 足部肌肉注射 1 次, 共注射 3 次。第 16 天检测其血清中 NO 含量以及 NOS 活性的变化情况。同时采用注射环磷酰胺的方法(剂量为 10 mg/kg 体质量), 对杂色鲍血清中 NOS 活性进行负调控, 分别在注射后 3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、96 h 对血清 NO 水平和血清 NOS、超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP) 以及溶菌酶(LZM) 活性进行测定, 并探讨它们之间的相关性。结果显示, 注射 500 mg/kg 的 L- 精氨酸可以显著提高实验鲍血清中 NO 水平和 NOS 活性, 而注射 10 mg/kg 的环磷酰胺则可以显著降低实验鲍血清中 NO 水平和 NOS 活性。血清中 NOS 活性与 ACP、AKP 以及 LZM 等活性的相关系数分别为 0.807 4、0.829 2 和 0.740 8, 相关显著($P<0.05$) 或极显著($P<0.01$), NO 与 SOD 及 LZM 的相关系数分别为 0.930 2 和 0.941 3, 相关极显著($P<0.01$)。实验结果为人工调控鲍体内的 NO 含量、增强其自身的非特异性免疫功能, 从而提高鲍的抵抗疾病的能力提供了科学依据, 同时也证明 NO 和 NOS 可以作为评价鲍免疫功能强弱的指标。[中国水产科学, 2008, 15(6): 902-909]

关键词: 杂色鲍; 精氨酸; 环磷酰胺; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

中图分类号: Q952

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)06-0902-08

一氧化氮(Nitric oxide, NO) 是一种新发现的生物信使分子、效应分子和免疫调节分子, 其生成依赖于氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)。NO 广泛分布于生物体的各个器官和组织中, 参与机体多种重要的生理病理活动^[1], NO 的产生异常与临床多种疾病的发生发展有着密切的关系^[2]。在医学界, 已经通过测量 NO 和 NOS 的高低作为评价人类疾病发生、发展以及衡量免疫水平高低的一个重要指标^[3-8]。在水产动物方面, 王广军等^[9]对杂色鲍(*Haliotis diversicolor*) 血细胞中 NOS 活性进行了鉴别, 姜国建等^[10]对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) 血细胞中 NOS 活性进行了鉴定, 上述研究结果证实了两者的血细胞存在着 NOS 活性; 朱宏友等^[11-12]研究了温度和盐度突变等外界环境的刺激, 可引起凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 血清中 NO 和 NOS 呈现规律性的变化。Tafalla 等^[13]研究了 NO 与出血性败血症病毒(VHSV) 之间的相互作用, 结果表明

VHSV 感染大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) 头肾巨噬细胞时其 NO 产物会上调, 添加 NOS 抑制剂(L-NAME) 能显著抑制头肾巨噬细胞 NO 的产生; Ottaviani 等^[14]采用大肠杆菌感染紫贻贝(*Mytilus edulis*) 和田螺(*Cipangopaludina chinensis*) 时发现, 大肠杆菌能诱导这两种动物血细胞 NOS 的表达并产生大量的 NO, 而且产生的 NO 有利于细菌聚集在血细胞的周围, 从而提高杀灭细菌的效率。但国内尚无以 NO 和 NOS 作为水产动物免疫功能强弱评价指标的相关报道。如何调节机体中 NO 水平, 使免疫反应向着有利于机体的方向发展, 也是科学家们进一步研究的课题。

免疫抑制药物环孢菌素 A 可以抑制诱导型 NOS(inducible NOS, iNOS) 的诱导, 糖皮质激素作为经典的抗炎免疫抑制剂, 目前已被证实可选择性抑制 iNOS 活性^[15]。环磷酰胺(Cyclophosphamide, CY) 是人体和其他哺乳动物免疫中常用的一种免疫抑制剂, 它能够抑制免疫系统, 使其处于稳定的

收稿日期: 2007-12-12; 修订日期: 2008-06-27.

基金项目: 广东省自然科学基金项目资助[鲍一氧化氮途径免疫机理的研究(031818)].

作者简介: 王广军(1973-), 男, 副研究员, 硕士. 主要从事水产动物健康养殖与免疫研究. Tel: (020)81616311; E-mail: wgj5810@163.com

抑制状态^[16]。但关于环磷酰胺对 NO 和 NOS 是否也起抑制作用未见报道。L- 精氨酸 (L-Arginine) 是合成 NO 的酶促底物, 增加 L- 精氨酸的含量可以促进 NO 的合成速度。本实验研究了注射环磷酰胺和 L- 精氨酸对杂色鲍血清中 NO 和 NOS 的影响情况, 并比较了 NO 和 NOS 与超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, AKP)、酸性磷酸酶 (Acid phosphatase, ACP) 以及溶菌酶 (Lysozyme, LZM) 等常用免疫指标的关系, 为进一步探讨人为调控 NO 和 NOS 的含量, 使免疫反应朝着有利于提高鲍免疫能力的方向发展以及探讨 NO 和 NOS 作为免疫功能强弱评价指标的可行性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 杂色鲍 取自深圳市龙岗区南澳镇某养鲍场, 壳长 (6.13 ± 0.81) cm, 壳宽 (3.93 ± 0.22) cm、体质量为 (22.78 ± 2.55) g。杂色鲍取回后于珠江水产研究所深圳海水试验基地暂养 10 d, 按常规方法投喂江蓠 (*Gracilaria verrucosa*) 饲养, 挑选健康、外观无明显病症的个体用于实验。

1.1.2 实验药品 环磷酰胺 (CY) 由上海华联制药有限公司生产, L- 精氨酸为上海丽珠生物技术公司生产, NO 及 NOS 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。其他试剂均为分析纯或者化学纯。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计 实验鲍蓄养于 120 L 的圆形塑料桶中, 有效水体 80~100 L, 每桶放入 10 只鲍为 1 组。L- 精氨酸分 3 个注射剂量, 分别按每 kg 体质量注射 250 mg (G1)、500 mg (G2) 和 1 000 mg (G3)。每个剂量设 3 个重复。每 5 天注射 1 次, 连续 3 次。对照组注射生理盐水 (0.9%)。注射方法采用足部注射, 注射剂量控制在 0.1 mL/只。在第 3 次注射后第 6 天, 从腹足中央切开腹足肌, 用清洁的 2.5 mL 一次性注射器吸取血淋巴液, 每次每组随机取 3 只。所取血淋巴液置于 4 °C 冰箱过夜后, 4 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液标记后放在 -20 °C 冰箱中待测。

环磷酰胺也分别设计 3 个实验剂量, 5 mg/kg 体质量 (G4)、10 mg/kg 体质量 (G5) 和 20 mg/kg 体质量 (G6)。注射方法和血清处理方法同上。每

10 只鲍为 1 组, 每个剂量设 3 个重复。

另取若干试验鲍, 每 kg 体质量注射环磷酰胺为 10 mg。对照组注射等剂量磷酸缓冲液 (Phosphate buffer solution, PBS)。暂养方法、注射方法和部位同上。分别在注射后 3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 96 h, 从腹足中央切开腹足肌吸取血淋巴液, 处理方法同上。每次取 3 只。

1.2.2 检测指标与方法

(1) NO 水平的测定: 采用硝酸还原酶法^[17]。NO 化学性质活泼, 体内代谢转化为硝酸盐和亚硝酸盐, 两者之和就是 NO 准确水平。

(2) NOS 活性测定: 采用化学比浊法^[18]。NOS 催化 L- 精氨酸与分子氧反应生成 NO, NO 与亲核物质生成有色化合物。NOS 酶活力单位定义: 37 °C 时每 mL 血清每 min 催化生成 1 nmol NO 为一个酶活力单位。

(3) SOD 活性: 采用黄嘌呤氧化酶法测定^[19]。SOD 活性定义: 每 mL 反应液中 SOD 活性抑制率达到 50% 时所反应的 SOD 量为 1 个 SOD 活性单位 (U)。

(4) AKP 和 ACP 活性: 参照磷酸苯二钠法测定^[20]。AKP 活性定义: 100 mL 血清中 37 °C 条件下与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位; ACP 活性定义: 100 mL 血清中 37 °C 条件下与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位。

(5) LZM 活性: 采用比浊法^[21]。即在一定浓度的浑浊菌液中, 由于溶菌酶水解细胞壁黏多肽使细菌裂解浓度降低, 透光度增加。可根据浊度变化来推测溶菌酶的含量。

1.3 数据分析

所有数据均采用 SPSS11.0 进行统计分析, 利用方差分析 (ANOVA) 来检验各组之间的显著性, 并采用 Duncan's 法进行多重分析, $P < 0.05$ 为显著性水平, $P < 0.01$ 为极显著水平。所有的数据结果以平均值 $\pm$ 标准偏差 ($\bar{X} \pm SE$) 表示。

2 结果与分析

2.1 不同剂量 L- 精氨酸对鲍血清 NO 含量的影响

注射不同剂量的 L- 精氨酸对杂色鲍血清中 NO 含量有明显的促进作用 (图 1)。各实验组和对照组之间存在显著差异 ($P < 0.05$), 但 G2 和 G3 组间不存在显著差异 ($P > 0.05$)。

2.2 不同剂量L-精氨酸对鲍血清NOS活力的影响

与NO含量变化一样,NOS活性的变化也是随着L-精氨酸剂量的增加而增加(图2)。G1

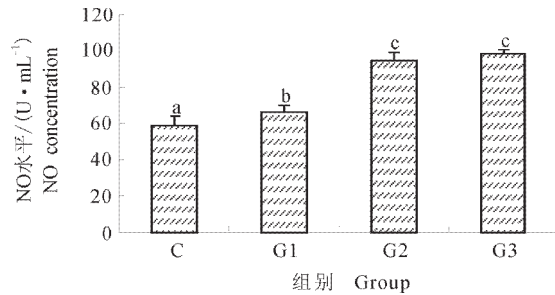


图1 注射不同剂量L-精氨酸对鲍血清NO水平的影响

C: 对照组; G1: 注射L-精氨酸剂量为250 mg/kg 体质量; G2: 注射L-精氨酸剂量为500 mg/kg 体质量; G3: 注射L-精氨酸剂量为1 000 mg/kg 体质量; 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 1 Effects of different doses of L-Arginine on NO concentration in serum of *Haliotis diversicolor*

C: Control group; G1: Injection L-Arginine with the dose of 250 mg/kg; G2: Injection L-Arginine with the dose of 500 mg/kg; G3: Injection L-Arginine with the dose of 1 000 mg/kg; Different letters indicate significant difference at $P<0.05$.

2.3 不同剂量环磷酰胺对鲍血清NO水平的影响

注射不同剂量环磷酰胺对杂色鲍血清中NO的含量有显著影响(图3)。除了G4组与对照组无显著差异外($P>0.05$), G5和G6组随环磷酰胺剂量的增加鲍血清NO的含量显著降低,与对照组相比有显著差异($P<0.05$)。

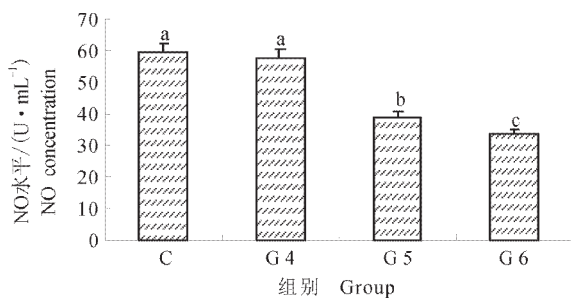


图3 注射不同剂量环磷酰胺对鲍血清NO水平的影响

C: 对照组; G4: 注射环磷酰胺剂量为5 mg/kg 体质量; G5: 注射环磷酰胺剂量为10 mg/kg 体质量; G6: 注射环磷酰胺剂量为20 mg/kg 体质量; 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 3 Effects of different doses of CY on NO concentration in serum of *Haliotis diversicolor*

C: Control group; G4: Injection CY with the dose of 5 mg/kg; G5: Injection CY with the dose of 10 mg/kg; G6: Injection CY with the dose of 20 mg/kg; Different letters indicate significant difference at $P<0.05$.

组和对照组虽然存在着一定的差异,但不显著($P>0.05$),而G2和G3组与对照组和G1组之间均存在显著差异($P<0.05$)。

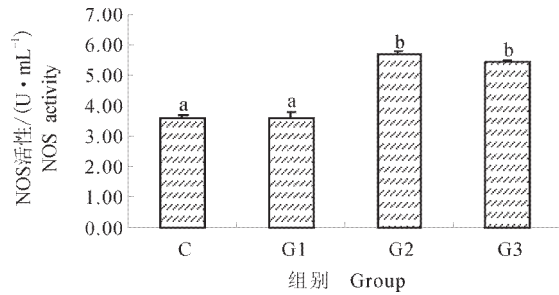


图2 注射不同剂量L-精氨酸对杂色鲍血清NOS活力的影响

C: 对照组; G1: 注射L-精氨酸剂量为250 mg/kg 体质量; G2: 注射L-精氨酸剂量为500 mg/kg 体质量; G3: 注射L-精氨酸剂量为1 000 mg/kg 体质量; 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 2 Effects of different doses of L-Arginine on NOS activity in serum of *Haliotis diversicolor*

C: Control group; G1: Injection L-Arginine with the dose of 250 mg/kg; G2: Injection L-Arginine with the dose of 500 mg/kg; G3: Injection L-Arginine with the dose of 1 000 mg/kg; Different letters indicate significant difference at $P<0.05$.

2.4 不同剂量环磷酰胺对鲍血清NOS活力的影响

注射不同剂量的环磷酰胺对鲍血清NOS有显著影响(图4)。NOS活性随着环磷酰胺剂量的增加而下降。G4和对照组在0.05水平存在显著差异($P<0.05$)。G5和G6组与对照组和G4之间均存在极显著差异($P<0.01$),但G5、G6组二者之间不存在差异($P>0.05$)。

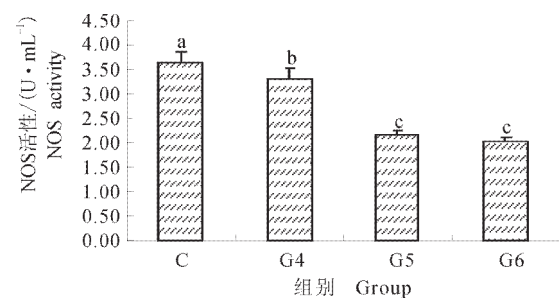


图4 注射不同剂量环磷酰胺对鲍血清NOS活力的影响

C: 对照组; G4: 注射环磷酰胺剂量为5 mg/kg 体质量; G5: 注射环磷酰胺剂量为10 mg/kg 体质量; G6: 注射环磷酰胺剂量为20 mg/kg 体质量; 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$).

Fig. 4 Effects of different doses of CY on NOS activity in serum of *Haliotis diversicolor*

C: Control group; G4: Injection CY with the dose of 5 mg/kg; G5: Injection CY with the dose of 10 mg/kg; G6: Injection CY with the dose of 20 mg/kg; Different letters indicate significant difference at $P<0.05$.

2.5 注射环磷酰胺后不同时间鲍血清NO水平的变化

用环磷酰胺注射杂色鲍后,其血清 NO 水平逐渐下降(图5),注射后3 h 为 $(50.62 \pm 2.33) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 6 h 为 $(38.58 \pm 1.93) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 12 h 后达到 $(21.30 \pm 2.85) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 24 h 为 $(12.35 \pm 0.53) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 48 h 达到最低,为 $(10.19 \pm 0.93) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 之后开始慢

慢回升,96 h 已回升到 $(30.25 \pm 1.42) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而注射 PBS 的鲍,其 NO 在实验期间变化不大,稳定在 $52.16 \sim 56.79 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间。 t 检验显示注射环磷酰胺组和 PBS 组的 NO 水平在注射后的各个采样时间点均存在显著差异 ($P < 0.05$)。

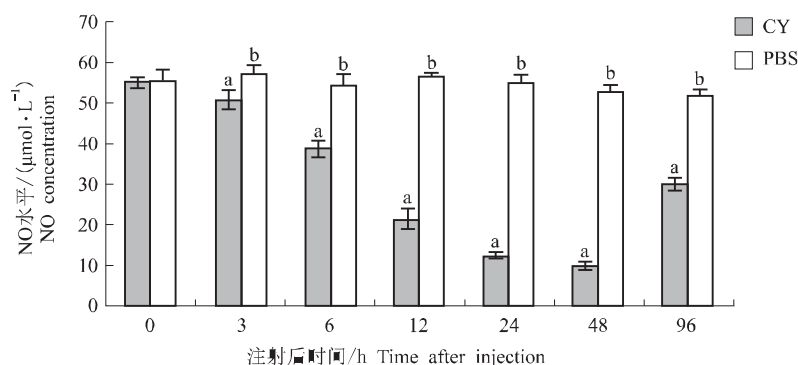


图5 注射环磷酰胺和 PBS 后杂色鲍血清 NO 水平的变化

不同字母表示同一实验时间内实验组与对照组的 NO 水平差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 NO concentration in abalone serum after injection of CY and PBS

Different letters indicate significant differences of NO concentration between treated group and control ($P < 0.05$).

2.6 注射环磷酰胺后不同时间鲍血清NOS活性的变化情况

用环磷酰胺注射杂色鲍后,其血清 NOS 活性逐渐下降(图6),3 h 为 $(3.02 \pm 0.22) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 6 h 为 $(2.60 \pm 0.08) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 12 h 后下降到 $(2.36 \pm 0.18) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 24 h 为 $(2.08 \pm 0.16) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 48 h 为

$(2.88 \pm 0.19) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 至 96 h 时已经达到注射前的水平。注射 PBS 的鲍 NOS 比较稳定,在注射后的 3~6 h 略有升高,不过很快就降为注射前的水平。 t 检验显示,除 96 h 无显著差异外,其余各采样点都存在显著差异 ($P < 0.05$)。

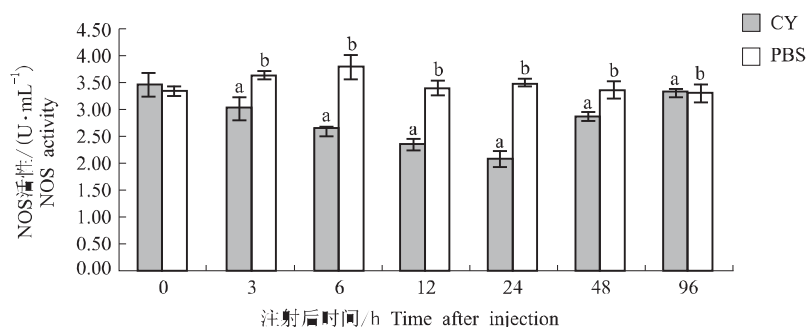


图6 注射环磷酰胺和 PBS 后杂色鲍血清 NOS 活性的变化

不同字母表示图中同一实验时间内实验组与对照组的 NOS 活性水平差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 6 NOS activity in abalone serum after injection of CY and PBS

Different letters indicate significant differences of NOS activity between treated group and the control ($P < 0.05$).

2.7 注射环磷酰胺后不同时间鲍血清SOD活性的变化

用环磷酰胺注射杂色鲍后,其血清 SOD 活性变化情况如表 1 所示,注射后 3 h 略有上升,为 $(185.72 \pm 12.15) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,但与注射前相比差异不显著 ($P>0.05$),至 6 h 时下降到 $(160.27 \pm 9.68) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,12 h 后为 $(147.11 \pm 5.86) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,24 h 为 $(112.01 \pm 3.07) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,48 h 达到最小值,为 $(84.16 \pm 11.52) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,至 96 h 时已经开始回升,为 $(132.60 \pm 7.19) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。注射 PBS 的鲍血清中 SOD 活性比较稳定,在注射后的 12 h 略有升高,不过很快就降为注射前的水平。 t 检验显示,除注射后 3 h 外,各个时间段两组之间均存在显著差异 ($P<0.05$)。

2.8 注射环磷酰胺后不同时间鲍血清ACP活性的变化

用环磷酰胺注射杂色鲍后,其血清 ACP 逐渐下降(表 1),3 h 为 (4.59 ± 0.39) 金氏单位,6 h 为 (4.43 ± 0.51) 金氏单位,12 h 后达到 (3.40 ± 0.52) 金氏单位,24 h 回升到 (3.87 ± 0.25) 金氏单位,48 h 升至 (4.29 ± 0.71) 金氏单位,至 96 h 时为 (4.54 ± 0.34) 金氏单位。注射 PBS 的鲍血清 ACP 在 48 h 内比较稳定,到达 96 h 时略有升高。 t 检验显示,除

注射后 3 h 外,各个时间段两组之间均存在显著差异 ($P<0.05$)。

2.9 注射环磷酰胺后不同时间鲍血清AKP活性的变化

用环磷酰胺注射杂色鲍后,其血清 AKP 活性变化情况与 ACP 活性变化情况极为相似,(表 1),在 12 h 以内逐渐下降,24 h 时已经开始回升,96 h 已经恢复注射前的水平。注射 PBS 的鲍血清 AKP 一直比较稳定。 t 检验显示,12 h 和 24 h 时存在显著差异 ($P<0.05$)。

2.10 注射环磷酰胺后不同时间鲍血清LZM活性的变化

用环磷酰胺注射杂色鲍后,其血清 LZM 活性在 24 h 以内逐渐下降,24 h 达到最小值,为 $(20.59 \pm 3.19) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,48 h 时已经开始回升,96 h 与 48 h 基本持平,但仍未恢复到注射前的水平。注射 PBS 的杂色鲍血清 LZM 活力在 3 h 略有上升,达到 $(55.51 \pm 7.19) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,24 h 有所下降,为 $(48.04 \pm 4.33) \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$,但幅度不是太大(图 4-6)。 t 检验注射环磷酰胺组和 PBS 组的 LZM 活性在注射后的各个采样时间点均存在显著差异 ($P<0.05$),详见表 1。

表 1 注射环磷酰胺和 PBS 后杂色鲍血清 SOD、ACP、AKP 和 LZM 活性的变化
Tab. 1 SOD, ACP, AKP and LZM activities in abalone serum after injection of CY and PBS

注射后时间/h After injection	SOD/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)		ACP/ 金氏单位		AKP/ 金氏单位		LZM/($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	实验组 Trial	对照组 Control	实验组 Trial	对照组 Control	实验组 Trial	对照组 Control	实验组 Trial	对照组 Control
0	180.59 $\pm$ 10.04	180.59 $\pm$ 2.04	4.68 $\pm$ 0.07	4.66 $\pm$ 0.05	3.70 $\pm$ 0.41	3.59 $\pm$ 0.37	50.98 $\pm$ 2.08	50.79 $\pm$ 2.96
3	185.72 $\pm$ 12.15	183.94 $\pm$ 5.69	4.59 $\pm$ 0.39	4.68 $\pm$ 0.12	3.73 $\pm$ 0.51	3.82 $\pm$ 0.33	45.69 $\pm$ 2.66*	55.51 $\pm$ 7.19
6	160.27 $\pm$ 9.68*	186.17 $\pm$ 5.84	4.43 $\pm$ 0.15*	4.70 $\pm$ 0.14	3.52 $\pm$ 0.27	3.67 $\pm$ 0.28	38.23 $\pm$ 1.56*	53.53 $\pm$ 1.56
12	147.11 $\pm$ 5.86*	183.05 $\pm$ 6.22	3.40 $\pm$ 0.32*	4.68 $\pm$ 0.35	2.94 $\pm$ 0.29*	3.85 $\pm$ 0.29	25.49 $\pm$ 2.07*	49.61 $\pm$ 1.22
24	112.51 $\pm$ 3.07*	180.14 $\pm$ 4.83	3.87 $\pm$ 0.25*	4.69 $\pm$ 0.18	3.19 $\pm$ 0.32*	3.80 $\pm$ 0.09	20.59 $\pm$ 3.19*	48.04 $\pm$ 4.33
48	84.16 $\pm$ 11.52*	182.15 $\pm$ 8.15	4.29 $\pm$ 0.17*	4.64 $\pm$ 0.09	3.62 $\pm$ 0.31	3.73 $\pm$ 0.12	29.22 $\pm$ 1.4*	51.17 $\pm$ 3.85
96	132.6 $\pm$ 7.19*	179.92 $\pm$ 7.16	4.54 $\pm$ 0.34*	4.72 $\pm$ 0.05	3.68 $\pm$ 0.29	3.83 $\pm$ 0.35	31.18 $\pm$ 1.56*	54.02 $\pm$ 4.29

注:“*”表示同一实验时间内实验组与对照组的 SOD、ACP、AKP 和 LZM 活性差异显著 ($P<0.05$)。

Note: “*” indicates significant differences of SOD, ACP, AKP and LZM between treated group and control ($P<0.05$).

2.11 NO和NOS与各免疫指标之间的相关性分析

对杂色鲍血清 NO 和 NOS 与 SOD、AKP、ACP、LZM 的相关性进行了分析,结果如表 2 所示。统计分析表明,血清 NOS 与 SOD、AKP、ACP

和 LZM 等常用免疫指标显示出良好的相关性,与 LZM 相关显著 ($P<0.05$),与 AKP、ACP 相关极显著 ($P<0.01$)。NO 与 SOD 及 LZM 的相关极显著 ($P<0.01$),但与 ACP、AKP 相关不显著 ($P>0.05$)。

表 2 杂色鲍血清 NO 和 NOS 与各免疫指标的相关系数

Tab. 2 Correlation coefficient of immune index of abalone

n=18

	SOD	ACP	AKP	LZM
NOS	+0.3707	+0.8074**	+0.8292**	+0.7408*
NO	+0.9302**	+0.6605	+0.5624	+0.9413**

注: * 表示相关显著 $P<0.05$, ** 表示相关极显著 $P<0.01$.

Note: * indicates significant correlation; ** indicates highly significant correlation.

3 讨论

作为一种新发现的信使分子和免疫调节因子, NO 的研究近年来得到广泛的发展^[22-25]。NO 的生成依赖于 NOS。L- 精氨酸是 NO 合成的酶促底物。在底物浓度较低时,随着底物浓度的增加,反应速度与底物浓度成正比关系,产物的浓度在一定时间内也相应地成倍增加^[26]。因此 G1 组与对照组之间存在显著差异。但随着底物浓度的增加,反应随之表现为混合反应或零级反应。表现为 G2、G3 组虽然与 G1、对照组之间存在显著差异,但两者之间却没有显著差异。此外,宋淑珍等^[27]在研究 L- 精氨酸对哮喘大鼠 NO 水平的影响时指出, L- 精氨酸并不影响 iNOS 表达,可能是通过增强结构型 NOS (constitutive NOS, cNOS) 的表达,从而产生内源性 NO。至于本次注射 L- 精氨酸是否也是诱导了 cNOS 而非 iNOS 的表达,尚需要进一步研究。

环磷酰胺是一种免疫抑制剂,它能够抑制免疫系统。它通过改变 DNA 的合成,干扰细胞繁殖而起作用。血液中的白细胞最容易受环磷酰胺的影响。目前,已有许多关于环磷酰胺作为免疫抑制剂的研究,并以此复制免疫抑制动物模型,如陈勇等^[15]采用每 kg 鱼体质量的鱼注射 10 mg 的环磷酰胺,可降低白细胞的数量、体外培养外周血 B 淋巴细胞分泌的 IgM、IFN- α 含量下降等,并认为该剂量是建立异育银鲫 (Allogynogenetic silver crucian carp) 实验性免疫抑制模型的适宜剂量;赵喜新等^[28]通过对小鼠腹腔注射环磷酰胺研究发现,在注射 4 h 后,可将骨髓中处于增殖期的各种血细胞杀灭或部分杀灭,这时骨髓就会出现一个短暂的抑制期;唐超明等^[29]采用注射环磷酰胺后表现出有效地免疫抑制,为器官移植提供了实用性的免疫动物模型;马玲等^[30]研究表明,环磷酰胺可以有效地降低小鼠体液免疫功能。本次实验结果表明,注射环磷酰胺可以显著降低杂色鲍血清 NO 水平和 NOS 活性以

及其他免疫指标 (SOD、ACP、AKP 以及 LZM) 的活性,证实注射环磷酰胺可以建立杂色鲍实验性免疫抑制动物模型。同时,也从一个侧面证明 NO 和 NOS 与动物免疫有关。

水产动物的免疫机能大都较低,主要是非特异性免疫系统。研究表明 NO 可抑制和杀伤病毒、细菌、真菌以及寄生虫的感染,在免疫中起着重要的作用^[22]。但 NO 在免疫应答中有着十分广泛而复杂的作用。正常而适度的 NOS 表达有助于宿主抗感染和抗肿瘤,但 NOS 的过度表达,导致 NO 产生过量时,又会促发免疫病理过程,造成组织细胞损伤^[25]。如何人为地诱导调节组织中 NO 水平,使体内 NO 处于最佳水平范围,使免疫反应向着有利于机体的方向发展,一直是广大水产科技工作者关注的热点问题。本实验的结果表明,在生产实践中,可以通过注射、投喂或者浸泡 L- 精氨酸或环磷酰胺等来提高或抑制动物体内 NOS 的活性,从而人为地调控 NO 在水产动物体内的含量,使其机体内的免疫水平处于最佳状态,进而提高水产动物的自身抗病能力,减少养殖过程中疾病的发生。

由于不具备特异性免疫系统,无脊椎动物不能像脊椎动物那样利用事先接触抗原而受到保护^[31]。然而无脊椎动物的出现早于脊椎动物,所以从长期存在来看,它们必须拥有一个有效的防御体系,即先天的、非特异性的免疫系统,无脊椎动物可以通过血细胞等细胞因子以及多种体液免疫因子的共同作用,用来对付异物的入侵^[32]。Cheng 等^[33]认为,软体动物及低等无脊椎动物的溶酶体酶是一种可诱导的“保护性”体液因子,起着与高等动物获得性体液免疫相似的作用,然而这些酶的存在是先天性的,属非特异性免疫因子,其活性的高低反映了软体动物非特异性免疫水平的强弱。SOD、ACP、AKP 以及 LZM 都属于溶酶体酶,在机体防御过程中起积极作用^[34],其活性的高低可以反映出免疫功

能的强弱。通过 NO 和 NOS 与 SOD、LZM、ACP、AKP 的相关性分析,结果表明 NO 与 SOD 以及 LZM, NOS 与 ACP、AKP 以及 LZM 等免疫指标存在着良好的相关性,说明 NO 和 NOS 可以作为评价软体动物非特异性免疫功能强弱的一个指标。

NO 除了具有调节血流、血压的作用外,还是一种神经信使分子,并在免疫防御中起重要作用。对人类医学 NO 的研究表明,血管内皮细胞合成的 NO,具有舒张血管、抑制血小板聚集并粘附于血管内皮的作用。根据对软体动物 NO 及 NOS 的比较研究表明:(1) 软体动物不同种类都存在 NO 依赖性信号通路,NO 生理功能的实现主要通过 cGMP 介导;(2) NO 信号分子的一个主要生理功能是反馈调节作用,可以通过对其他经典递质功能的影响而达到精细调节的目的;(3) 血细胞中的 NOS 主要受外界刺激后诱导形成,其产物 NO 是软体动物机体防御系统的一种重要成分^[35]。

注射环磷酸胺后,鲍血清中不同酶活性出现最低值的时间各不相同,NO 是否首先作为一种信使分子的作用,通过传导一种信号调动其他免疫因子后,继而才起免疫作用,还是有其他原因,尚需要进一步研究。

致谢:感谢深圳农科中心水产应用研究所唐天礼工程师在杂色鲍购置与养护方面给予的帮助,感谢上海海洋大学硕士研究生乌兰同学在测试分析方面的帮助。

参考文献:

- [1] 钟慈声,孙安阳.一氧化氮的生物医学[M].上海:上海医科大学出版社,1997: 28-33.
- [2] Varela A F, Runge A, Lunge A, et al. Nitric oxide and prostacyclin inhibit fetal platelet aggregation: A response similar to that observed in adults[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1992, 167: 1 599.
- [3] Harrison D G. Endothelial dysfunction in the coronary microcirculation: A new clinical entity or an experimental finding[J]. *J Clin Invest*, 1993, 91: 1-9.
- [4] Marc J, Semigran M J, Cockrill B A, et al. Hemodynamic effects of inhaled nitric oxide in heart failure[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1994, 24: 982-988.
- [5] 郭志刚,翁昌鸿,刘伊丽,等.冠心病、高血压病人血浆丙二醛、一氧化氮、组织型纤溶酶原激活剂及其抑制物的变化[J]. *中国循环杂志*, 1996, 7(11): 435-441.
- [6] Quyyumi A, Oanou R, Panza J, et al. Endothelial dysfunction in patients with chest pain and normal coronary arteries[J]. *Circulation*, 1992, 86: 1 864-1 871.
- [7] Luscher T F, Vanhoutte P M. Dysfunction of the release of endothelium-derived relaxing factor. IN: Simionescu N, Simionescu M, eds *Endothelial cell dysfunctions*. New York: Plenum Press, 1992: 65-94.
- [8] Casino P R, Kilcoyne C M, Quyyumi A A, et al. The role of nitric oxide in endothelium dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients[J]. *Circulation*, 1993, 88: 2 541-2 547.
- [9] 王广军,谢骏,余德光,等.杂色鲍血细胞中一氧化氮合酶活性的鉴别[J]. *海洋水产研究*, 2007, 28(6): 7-12.
- [10] 姜国建,于仁诚,王云峰,等.对虾血细胞中一氧化氮合成酶鉴定与分析方法研究[J]. *中国水产科学*, 2004, 11(3): 177-184.
- [11] 朱宏友,王广军,余德光,等.水温骤降后凡纳滨对虾血清中 NO、NOS 水平及对溶血弧菌的敏感性[J]. *大连水产学院学报*, 2006, 21(1): 46-50.
- [12] 朱宏友,王广军,余德光,等.盐度变化对凡纳滨对虾一氧化氮合酶水平及病原敏感性的影响[J]. *湛江海洋大学学报*, 2005, 25(6): 90-93.
- [13] Tafalla C, Figueras A, Novoa B. Role of nitric oxide on the replication of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1999, 72: 249-256.
- [14] Ottaviani E, Paeman L R, Cadet P, et al. Evidence for nitric oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes[J]. *Eur J Pharmacol*, 1993, 248: 319-324.
- [15] 吴绍熙,郭宁如.大环内酯类免疫抑制剂研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2001, 10(8): 566-569.
- [16] 陈勇,周洪琪,余奇文,等.异育银鲫实验性免疫抑制模型的建立[J]. *水产学报*, 2005, 29(2): 227-231.
- [17] 郑辉,颜萃萃.血清一氧化氮测定方法[J]. *福建医科大学学报*, 1997, 31(4): 452-454.
- [18] 王成彬,田亚平.大鼠脑组织中一氧化氮合酶测定[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1996, 23(6): 548-551.
- [19] 阎家麒,朱琰.修饰 SOD 活性测定方法[J]. *日用化学工业*, 1993(5): 26-28.
- [20] 李蓬秋,张学军.糖尿病患者血清抗酒石酸酸性磷酸酶及骨碱性磷酸酶活性测定及意义[J]. *医学科技*, 1998(2): 17-18.
- [21] 谢秩勋,谢冰.大鼠血清溶菌酶活性测定及在热暴露环境下临床应用的探讨[J]. *中国兽医科技*, 1995, 25(12): 32-33.
- [22] 王天云.一氧化氮:新发现的一种信使分子[J]. *生物学通报*, 1999, 34(12): 40.
- [23] Chan J, Xing Y, Magliozzo R S, et al. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages[J]. *J Exp Med*, 1992, 175: 1 111-1 122.

- [24] 陈晋文,孙长凯,黄远桂.一氧化氮合酶的若干研究进展[J].生物化学与生物物理研究进展,1996,23(4):293-297.
- [25] Mayer B, Henmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells[J]. Trends Biochem Sci, 1997, 22: 477-481.
- [26] 沈同.生物化学:上册[M].北京:人民教育出版社,1980.
- [27] 宋淑珍,田亚平,王成彬,等. L-精氨酸对哮喘大鼠一氧化氮水平的影响[J]. 军医进修学院学报,2005,26(5):326-328.
- [28] 赵喜新,阎杜海,王和平,等.环磷酰胺引致的小鼠白细胞减少模型及动力学分析[J].上海实验动物科学,1998,18(1):12-14.
- [29] 唐超明,李议贤.环磷酰胺免疫抑制小鼠模型的建立及其在肾包膜下移植中的应用[J].山西临床医学杂志,2000,9(9):685-687.
- [30] 马玲,王红梅,闫向东.免疫失衡动物模型复制初探[J].中国食品卫生杂志,2001,13(6):11-13.
- [31] 余燕萍,石安静.贝类血细胞研究进展[J].动物学杂志,1998,33(5):40-44.
- [32] 周永灿,潘金培.贝类血细胞和体液的防御研究进展[J].水产学报,1997,21(4):44-454.
- [33] Cheng T C. The role of lysosomes in molluscan cellular response to immunologic challenge[J]. Comp Pathobiol, 1978, (4): 59-71.
- [34] 王宏田,张培军.重组酵母菌对牙鲆非特异性免疫能力的影响[J].海洋与湖沼,2000,31(6):631-635.
- [35] 王晓安,蒋小满,郑哲民.软体动物的一氧化氮及其合酶的研究进展[J].动物学杂志,2003,38(6):97-103.

Effects of injecting L-Arginine and cyclophosphamide on serum NO concentration, NOS activity and other immune index in *Haliotis diversicolor*

WANG Guang-jun, XIE Jun, YU De-guang, HU Zhao-ying, DU Xu-tong, TANG Li-hua

(Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding and Cultivation, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: With the development of abalone culture, more and more epidemic disease broke out frequently, which made heavy losses. The common drugs and methods used in controlling epidemic disease had no obvious effect. The ability of aquatic animal to resist the disease can be enhanced by using immune technique to stimulate their immune system, and it proved to be a fundamental way to control the disease. The nitric oxide (NO), which is produced during the conversion of L-arginine to L-citrulline by NO synthase (NOS), is a free radical biological messenger with numerous functions, including regulation of vascular tone, cellular signaling, being ubiquitous in all living organs and tissues. It takes part in many important physiological and pathological reactions, and can kill the bacteria, fungi, parasite or virus non-specifically with improving the non-specific immune function. In recent years, studies on NO have been gotten on very quickly in life science field, but little research has been focused on NO of the abalone. To study the effects of injection L-Arginine and Cyclophosphamide on serum NO concentration and NOS activity of *Haliotis diversicolor* Reeve, different dose of L-Arginine (0, 250, 500, 1 000 mg per kg body weight abalone) and Cyclophosphamide (0, 5, 10, 20 mg per kg body weight abalone) were respectively injected into the foot muscle of *Haliotis diversicolor* every 5 days for three times in present study. The NO concentration and NOS activity in the serum were detected on the 16th day. After injection of Cyclophosphamide (with the dose of 10 mg/kg at 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h and 96 h after injection), the NO, NOS, SOD, ACP, AKP and LZM activities were examined, and the correlation between them was analyzed. The results showed that compared to control group, L-Arginine (with dose 500 mg/kg) could induce an up-regulation the NO concentration and NOS activity, but Cyclophosphamide (with dose 10 mg/kg) could decrease the NO concentration and NOS activity. And the correlation coefficient between NOS and AKP, ACP, LZM activities was 0.8074, 0.8292 and 0.7408 respectively, which had significant correlation or marked significant correlation. The correlation coefficient between NO and SOD, LZM activities was 0.9302 and 0.9413 respectively. In practice, in order to enhance the non-immunology function of abalone and strengthen its ability to resist the disease, the NO in vivo could be induced and regulated artificially by using the L-Arginine or Cyclophosphamide. And the NO/NOS could be regarded as the immune index to evaluate the immune function of abalone. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (6): 902-909]

Key words: Diversicolor abalone (*Haliotis diversicolor*); L-Arginine; cyclophosphamide; nitric oxide (NO); nitric oxide synthase (NOS)