

栉孔扇贝血清中的免疫因子的研究*

牟海津 江晓路 王慧谥 刘树青 管华诗

(青岛海洋大学水产学院, 青岛 266003)

摘要 本文对栉孔扇贝血清的细菌凝集活性、抑菌活性和溶菌活性进行研究。选用24种细菌和真菌进行凝集试验,发现栉孔扇贝血清能够对金黄色葡萄球菌和代远洋弧菌产生凝集作用,血清的细菌凝集作用经数种细菌刺激没有发生改变,说明这种凝集作用是不可诱导的。栉孔扇贝的血清对某些细菌的生长有一定的抑制作用,但在体外彻底杀灭细菌的效果极差,经大肠杆菌和副溶血弧菌刺激后,抑菌效果基本不变。栉孔扇贝血清还具有一定的溶菌作用,而且大肠杆菌的刺激可以明显提高这种溶菌作用。

关键词 栉孔扇贝,血清,免疫反应,细菌凝集,抑菌,溶菌

目前对软体动物免疫机能的研究较少,一般认为软体动物不具有特异性的免疫球蛋白,但它们能以各自不同的方式来识别和抵御外来入侵的病原体,包括血细胞的吞噬包裹、血淋巴凝集、释放酚氧化酶和黑色素以及溶酶体酶的水解作用等^[1],体液免疫和细胞免疫两者相互配合、共同作用。软体动物血淋巴中的凝集因子在对外来异物的识别、防御、凝集及调理吞噬中发挥重要作用,并可能参与止血、凝固、物质运输及创伤修复等一系列生理作用^[2]。在软体动物体液中,具有抑菌和溶菌活性的因子对抵御病原微生物的入侵,抑制和杀灭入侵的病原微生物也起到了积极的作用^[3]。本文对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)血清中的细菌凝集活性及抑菌、溶菌活性进行测定,并研究了经细菌刺激后其活性的变化情况,以期对栉孔扇贝等软体动物的免疫机能能有更为明确的认识。

1 材料和方法

1.1 栉孔扇贝血清的制备

选取健康栉孔扇贝,撬开贝壳,用滤纸吸除水分后,割开闭壳肌抽取血液,血液经3 000 r/min离心

5 min,除去沉淀血细胞,即得其血清。-20℃保存。

1.2 细菌因素对栉孔扇贝机体的刺激

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、代远洋弧菌(*Vibrio pelagius*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)分别用含0.3%甲醛的生理盐水制成菌悬液,保温24 h杀菌后,用无菌生理盐水稀释至 5×10^8 /ml,注射闭壳肌以刺激栉孔扇贝,菌液注射量0.03 ml/只,对照组注射等量无菌生理盐水。养殖3 d后抽取血清备用,分别记作S血清、V₁血清、V₂血清、E血清。

1.3 血清对细菌、真菌的凝集作用

选取24种细菌和真菌,用无菌生理盐水制成菌悬液(浓度为 1.0×10^9 ml⁻¹),与等量的2倍梯度稀释的栉孔扇贝血清混合,经37℃保温6 h,然后移至4℃过夜,检测血清对菌体细胞的凝集作用。

1.4 血清对细菌、真菌生长的抑制作用

血清经微孔滤膜过滤除菌后,用滤纸片浸透,置于涂布有各种细菌或真菌的培养基表面,培养24 h后,检测并记录纸片周围是否形成抑菌圈。

1.5 血清的杀菌活性

取大肠杆菌、副溶血弧菌、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)制成菌悬液(浓度约 1.0×10^5 ml⁻¹),与等量血清(对照组采用生理盐水)混合,25℃保温2 h,并不停振荡,然后取反应液分别涂布

收稿日期:1997-09-04

* 本研究为国家攀登计划B“海养生物优抗研究”资助项目,编号PDB 6-6-3

相应培养基平板,测菌数。

1.6 血清的溶菌活性

将四联微球菌(*Micrococcus tetragenus*)振荡培养24 h后,离心洗涤制成菌悬液,作为检测血清溶菌活性的底物。实验方法参照王雷等^[4]。取3 ml菌悬液与0.2 ml待测血清混合均匀,测定570 nm处的光密度值(A_0),然后37℃水浴保温30 min,取出后立即冰浴10min以终止反应,测定光密度值(A)。溶菌活力 U 按下式计算: $U = (A_0 - A)/A$

2 结果与分析

2.1 栉孔扇贝血清对细菌和真菌的凝集活性

对22种细菌和2种真菌的凝集作用见表1。结果表明,栉孔扇贝血清对金黄色葡萄球菌和代远洋弧菌具有明显的凝集作用,凝集效价分别达到4和8;对其它细菌和真菌则没有作用。

表1 栉孔扇贝血清对细菌和真菌的凝集活性

Table 1 Agglutinating activities of serum in *C. farreri* to bacteria and fungi

菌种 strains	凝集效价 agglutination titer	菌种 strains	凝集效价 agglutination titer
<i>S. aureus</i>	4	<i>V. pelagius</i>	8
<i>E. aerogenes</i>		<i>V. flurialis</i> I	
<i>Pseudomonas vulgaris</i>		<i>V. flurialis</i> III	
<i>B. subtilis</i>		<i>V. neresis</i>	
<i>E. coli</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>	
<i>M. tetragenus</i>		<i>V. campbellii</i>	
<i>V. cholerae</i> serogroup non-O1		<i>V. natriegens</i>	
<i>V. incinnatiensis</i>		<i>V. harveyi</i>	
<i>V. mediterranei</i>		<i>V. ordalii</i>	
<i>Aeromonas hydrophila</i>		<i>V. aestuarianus</i>	
<i>S. cerevisiae</i>		<i>V. diazotrophicus</i>	
<i>C. albicans</i>		<i>V. orientalis</i>	

用金黄色葡萄球菌、代远洋弧菌、副溶血弧菌、大肠杆菌4种细菌注射刺激栉孔扇贝后,血清的细菌凝集活性不变,对副溶血弧菌、在肠杆菌也不产生凝集作用(表2)。

2.2 栉孔扇贝血清的抑菌、杀菌活性

栉孔扇贝血清对13种细菌真菌的抑菌实验结果见表3。检测表明,栉孔扇贝血清可以在不同程度上抑制某些细菌的生长,但抑菌活力较低,多数实验的抑菌圈不很明显,对酿酒酵母则不产生抑制作用。经副溶血弧菌或大肠杆菌刺激后,栉孔扇贝血清的抑菌活力变化不大,有时会略有降低。

表2 细菌刺激对血清凝集作用的影响

Table 2 Bacterial agglutination of serum in *C. farreri* stimulated by bacteria

菌种 strains	S血清 S serum	V ₁ 血清 V ₁ serum	V ₂ 血清 V ₂ serum	E血清 E serum	对照 control
<i>S. aureus</i>	4	4	4	4	4
<i>V. pelagius</i>	8	8	8	8	8
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-

表3 栉孔扇贝血清的抑菌作用

Table 3 Bacteriostasis of serum in *C. farreri*

菌种 strains	正常血清 normal serum	E血清 E serum	V ₂ 血清 V ₂ serum
<i>S. aureus</i>	++	+	+
<i>B. subtilis</i>	(+)	(+)	(+)
<i>E. coli</i>	(+)	(+)	(+)
<i>M. tetragenus</i>	+	+	+
<i>P. vulgaris</i>	-	-	-
<i>E. aerogenes</i>	+	(+)	(+)
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	-
<i>V. flurialis</i> I	(+)	(+)	(+)
<i>V. pelagius</i>	-	-	-
<i>V. natriegens</i>	+	(+)	+
<i>V. hydrophila</i>	-	-	-
<i>A. hydrophila</i>	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-

注:(+)代表结果不稳定。Means this result is not stable.

对栉孔扇贝血清的杀菌活性的检测发现,经栉孔扇贝血清处理2 h后,菌液浓度反而有所升高,而且血清的浓度越高,最后得到的菌液浓度越高,看不到有任何杀菌活性存在的迹象(表4)。

表4 栉孔扇贝血清的杀菌作用

Table 4 Bactericidal action of serum in *C. farreri*

组别 group	血清终浓度 final concentration of serum	血清处理2 h后的菌液浓度/ $\times 10^5$ bacterial concentration after treated with serum for 2 h		
		<i>E. coli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>S. cerevisiae</i>
1	1:2	3.5	2.1	1.0
2	1:8	2.9	1.8	1.1
3	1:16	2.8	1.8	1.0
对照组 control		2.2	1.4	0.9

2.3 栉孔扇贝血清的溶菌活性

栉孔扇贝血清具有一定的溶菌活性,而经大肠杆菌刺激后的栉孔扇贝血清的溶菌活性有所增强,经副溶血弧菌刺激后的栉孔扇贝血清的溶菌活性则无变化(表5)。

表 5 栉孔扇贝血清的溶菌作用

溶菌活性 bacteriolytic activities	正常血清 normal serum	E 血清 E serum	V ₂ 血清 V ₂ serum
A ₀	0.333	0.333	0.333
A	0.296	0.257	0.296
U	0.125	0.296	0.125

3 讨论与小结

(1)许多无脊椎动物的体液中发现有外源凝集素(Lectin),能够选择凝集脊椎动物血细胞和某些微生物细胞,是无脊椎动物免疫防御系统的主要组成之一。外源凝集素可以充当识别因子,识别外来入侵的异物^[1,5],并通过凝集、包围等作用直接将其排出体外。另外,外源凝集素具有高度的调理作用,促使血细胞更易吞噬外来颗粒^[2,5]。Tamplin^[6]曾选用 79 株细菌检测弗吉尼亚巨蛎(*Crassostrea virginica*)血清的凝集活性,发现该血清对霍乱弧菌具有明显的凝集作用,这种凝集活性可以被链霉蛋白酶、EDTA、粘蛋白及胎球蛋白所抑制,血清经 80℃ 处理 30 min,凝集活性也会有所下降,而提高盐度(24~30)则会使血清的凝集活性增强。Ueda R 等^[7]在日本刺龙虾(*Panulirus japonicus*)的血淋巴中检测到对弧菌属和假单胞菌属的部分细菌有凝集活性的物质。Olafsen J A 等^[8]在太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)的血淋巴中也检测到能够对某些脊椎动物血细胞和鳗弧菌(*V. anguillarum*)产生凝集作用的物质,并认为这种活性对于提高牡蛎的免疫防御机能和对体内细菌的清除有重要作用。

本次实验中发现栉孔扇贝血清对金黄色葡萄球菌和菌代远洋弧菌具有明显的凝集作用,分别用金黄色葡萄球菌、代远洋弧菌、副溶血弧菌和大肠杆菌菌悬液注射刺激栉孔扇贝后,其血清的细菌凝集活性没有变化,对副溶血弧菌、大肠杆菌也不发生凝集。由此可见,栉孔扇贝血清中的细菌凝集因子可能是组成性的,是不可诱导的,这一观点是与目前无脊椎动物免疫学理论相一致的。而 Hardy^[9]发现,牡蛎经细菌刺激后凝集活性会有所提高。由于本次实验中,扇贝注射间隔 3 d 后采血,因此免疫效应产物是否尚未产生有待于进一步证实。

在其它实验中,我们还发现栉孔扇贝血清中具有血细胞凝集素,可凝集鸡、小鼠、鹌鹑等多种动物血细胞。目前尚未确证细菌凝集活性和血细胞凝集

活性是否为同一种物质所产生。

(2)栉孔扇贝血清在体外具有一定的抑菌活性,对金黄色葡萄球菌、四联微球菌、产气杆菌(*E. aerogenes*)、漂浮弧菌(*V. natriegens*)等具有明显的抑菌作用,对普通变形菌(*P. vulgaris*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、副溶血弧菌、代远洋弧菌及酿酒酵母等则不起作用。总体来看,栉孔扇贝血清对陆生细菌的抑制效果要比对海洋细菌的效果明显;对革兰氏阳性细菌的抑制效果要比对革兰氏阴性细菌的效果明显,实验中所选用的 3 株革兰氏阳性细菌(金黄色葡萄球菌、四联微球菌、枯草杆菌 *B. subtilis*)均表现出抑制现象。在贝类养殖中,有时会发生由弧菌、气单胞菌或假单胞菌等革兰氏阴性菌引起的疾病,这与血清对这些细菌的抑菌活性较低有一定的关系。经副溶血弧菌或大肠杆菌注射刺激后,栉孔扇贝血清的抑菌活力不见提高,有时甚至会有所降低,说明栉孔扇贝血清中的抑菌因子具有稳定性。

另外,栉孔扇贝血清在体外不仅不具备杀灭细菌和真菌的活力,反应液中的血清反而为菌体的生长提供营养物质,使反应的菌液浓度大于对照组。因此,栉孔扇贝的血清只能起到抑菌作用,即抑制细菌的生长繁殖和在体内的进一步扩散,但不具有单独杀灭细菌的能力,细菌的最终消除与消灭离不开吞噬、溶解等免疫机能的共同作用。Tamplin^[6]用相同方法检测弗吉尼亚巨蛎血清对霍乱弧菌和创伤弧菌(*V. vulnificus*)的杀菌作用后,得出的结论也基本一致。而 Ueda 等^[10]在多种沿海甲壳动物的血淋巴中检测到杀菌活性,而且对弧菌属细菌的杀菌活性要更高一些,经 45~60℃ 处理后,这种杀菌活性便可完全丧失。

(3)栉孔扇贝血清还具有一定的溶菌活性,这种活性也是栉孔扇贝的免疫防御系统的重要组成部分。目前已经发现,溶菌酶在鱼类的血清中普遍存在,对各种微生物病原体具有重要的防御作用,并且鱼类溶菌酶的浓度及活性与外界环境条件有较大关系,例如,给鱼静脉注射墨汁后 5 min,血清中溶菌酶的浓度即增加 50%^[11]。在多种贝类的组织器官中也发现有溶菌酶的存在,在贻贝(*Mytilus edulis*)的消化器官中,溶菌酶的活性最高^[1]。在本实验中,栉孔扇贝经适量大肠杆菌(1.5×10^7 /只)注射刺激后,血清的溶菌活性明显增强,可见适当的诱导也可以提高栉孔扇贝血清的溶菌活力。推断认为,血

清中的溶菌酶可能来自于血浆中的血细胞,外源刺激则会影响血细胞的溶菌酶产生。而 Cheng 等^[12]认为,弗吉尼亚巨蛎和硬壳蛤(*M. mercenaria*)体内的溶菌酶最初起源于晶杆。另外,栉孔扇贝经副溶血弧菌刺激后,扇贝血清的溶菌活力没有变化,这一点与王雷等^[4]对中国对虾血清溶菌活性的研究结果有相似之处。

因此,尽管目前在栉孔扇贝的机体中并没有发现特异性免疫系统的存在,但外界刺激仍有可能对其免疫功能产生一定的诱导作用,这种诱导作用的大小是与诱导源的特性及化学结构紧密相关的。

栉孔扇贝血清中具有多处免疫活性因子,能够在体外进行细菌凝集作用、抑菌作用和溶菌作用,在对抗病原菌等外来异物入侵的过程中,发挥着重要的作用。对于栉孔扇贝血清中的免疫因子的具体作用机制及产生机理,则有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 陈竞春,石安静.贝类免疫生物学研究概况.水生生物学报,1996,20(1):74~78
- 2 陈皓文,孙丕育,宋庆云.外源凝集素——水产动物御敌的有力武器.黄渤海海洋,1995,13(3):61~70
- 3 Lackie A M. Invertebrate immunity. Parasitology, 1980, 80: 393~412
- 4 王 雷,李光友,毛远兴.中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究.海洋与湖沼,1995,26(2):179~185
- 5 Renwantz L, A Stahmer. Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of Lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. J Comp Physiol, 1983, 149: 535~544
- 6 Tamplin M L, W S Fisher. Occurrence and characteristics of agglutination of *Vibrio cholerae* by serum from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Appl Environ Microbiol, 1989, 55(11): 2 882~2 887
- 7 Ueda R, et al. Bactericidal activities of the hemolymph of the Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus*. Crustaceana, 1994, 67(2): 256~258
- 8 Olafsen J A, et al. Agglutinin activity in Pacific oyster *Crassostrea gigas* hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge. Dev Comp Immunol, 1992, 16(2): 123~138
- 9 Hardy S W, et al. Aspects of cellular and humoral defense mechanisms in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. in: J B Solomon, J D Horton (ed). Developmental immunobiology. Amsterdam; Elsevier/North-Holland Publishing Co, 1977. 59~66
- 10 Ueda R, et al. Naturally occurring agglutinin in the hemolymph of Japanese coastal crustacea. Bull Jap Soc Sci Fish, 1991, 57(1): 69~78
- 11 陈奖励,何昭阳,赵 文.水产微生物学.北京:农业出版社,1993. 322~323
- 12 Cheng T C, et al. Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *C. virginica* and *M. mercenaria*. Comp Biochem Physiol, 1975, 52B: 443~447

Studies on immune factors in the serum of *Chlamys farreri*

Mou Haijin Jiang Xiaolu Wang Huimi Liu Shuqing Guan Huashi

(Fishes College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

Abstract Bacterial agglutination, bacteriostasis and bacteriolysis of the serum of *Chlamys farreri* were studied, and 24 strains of bacteria and fungi were selected for the agglutination test. The *C. farreri* serum could agglutinate *Staphylococcus aureus* and *Vibrio pelagius*. After the *C. farreri* serum was stimulated by kinds of bacteria, its bacterial agglutinating activities didn't change, which meant the agglutinating activity was not induced. The *C. farreri* serum could prohibit some bacteria, but hardly did so in vitro. After the serum of *C. farreri* was stimulated by *Escherichia coli* or *V. parahaemolyticus*, its bacteriostatic activities didn't change. In addition, the serum had bacteriolytic activity, and the activity could be enhanced by stimulating of *E. coli*.

Key words *Chlamys farreri*, serum, immune reaction bacterial agglutination, bacteriostasis, bacteriolysis