

中国对虾血细胞吞噬活动中 超氧阴离子(O_2^-)的产生

王宝杰^{1,2}, 王雷¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要:用 Zymosan A 对中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 血细胞进行体外刺激, 用 NBT 还原法测定血细胞吞噬活动中产生 O_2^- 的过程。结果表明, 中国对虾血细胞在经刺激诱导的吞噬活动中有明显的呼吸爆发和 O_2^- 的产生; 不同浓度的 Zymosan A 对血细胞产生 O_2^- 的影响不同。Zymosan A 在 0.25 ~ 1.0 mg/mL 时随质量浓度的增加, 产生 O_2^- 的量也增加, 但当 Zymosan A 质量浓度继续增加到 1.5 和 2.0 mg/mL 时, 产生 O_2^- 的量反而下降。用同一浓度的 Zymosan A 对不同密度血细胞进行刺激产生 O_2^- 的强度也不同, 随着密度的增加, 血细胞产生 O_2^- 的量增加。SOD、NEM 和碘代乙酰胺 (Iodoacetamide) 对血细胞吞噬过程中 O_2^- 的产生有抑制作用; Hg^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 5 种重金属离子也能抑制血细胞产生 O_2^- ; 不同个体的中国对虾血细胞产生 O_2^- 的能力不同。NBT 还原法测定中国对虾血细胞吞噬时产生的 O_2^- 可以作为检测对虾免疫状态的指标。

关键词:中国对虾; 血细胞; 吞噬作用; 超氧阴离子(O_2^-)

中图分类号: Q959.223

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2003)01-014-05

在免疫系统进化过程中, 利用活性氧作为杀伤分子的氧化性杀菌机制代表了一种古老的自然免疫反应, 无论是植物还是动物中都存在这种防御机制。它主要是指吞噬细胞的呼吸爆发产生具有强大的杀菌活性的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$, 1O_2 等), 从而杀灭外来异物。研究表明活性氧产生的强弱直接反映了血细胞杀菌机能的强弱^[1-2]。甲壳动物的呼吸爆发已得到证实, 利用高铁细胞色素 C 还原法, Bell 等^[3]证实了蟹 *Careinus maenas* 血细胞中 O_2^- 的产生。在斑节对虾 *Penaeus monodon*, Song 等^[4]用 2 种不同的方法—NBT 还原法和化学发光法来验证 ROS 的产生, 得到了 2 种不同的结果。Marcelo 等^[5]利用 NBT 还原法对凡纳对虾 (*Penaeus vannamei*) 血细胞产生 O_2^- 进行了研究, 第 1 次建立了实验最佳参数。

NBT 还原法已经广泛应用于测定细胞中 O_2^- 的产生, 相对于其他方法而言, NBT 还原法灵敏度稍差, 但是却具有快速、简便、可大量地进行样品分析的优点。本文利用 NBT 还原法研究中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 血细胞体外吞噬过程中 O_2^- 的产生, 旨在确定其血细胞吞噬机能和细胞免疫指标提供科学依据。

1 材料及方法

1.1 试剂

1.1.1 CM 缓冲液 参照文献[6]配方调整, 0.45 mol/L NaCl, 5.5 mmol/L KCl, 0.4 mmol/L NaH_2PO_4 , 13 mmol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 mmol/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2 mmol/L 谷氨酰胺。pH 7.4, 0.22 μm 滤膜过滤除菌。

1.1.2 酵母聚糖 (Zymosan A, Sigma) 超氧化物歧化酶 (SOD, Sigma), N-乙基顺丁烯二酰亚胺 (N-ethylmaleimide, NEM), 碘代乙酰胺 (Iodoacetamide), NBT 储存液均按文献[5]的方法进行配制, 酵母聚糖悬液的储存质量浓度为 2 mg/mL, 其他试剂在进行实验时均用 CM 缓冲液稀释到一定浓度。

1.1.3 重金属溶液的配制 $HgCl_2$ 、 $K_2Cr_2O_4$ 、 $Pb(NO_3)_2$ 、

收稿日期: 2002-02-05.

基金项目: 国家“九七三”课题资助项目 (G1999012005).

作者简介: 王宝杰 (1976-), 男, 硕士生, 从事无脊椎动物免疫学研究. Tel: 0532-2898722. E-mail: wangbaojie@ms.qdio.ac.cn

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、 $ZnCl_2$,用双蒸水配制成1 mg/mL重金属化合物母液,测定时按实验浓度用CM缓冲液稀释使用。

1.2 实验动物及取血

中国对虾由山东日照市水产研究所提供,体长13~15 cm,暂养于循环充气水槽中,水温9~15℃,每天投喂配合饲料。

血淋巴从位于第1腹节的血窦中抽取,用盛有预冷(4℃)抗凝剂1 mL的注射器抽取血淋巴约1 mL。用台盼蓝染色计数,在血细胞存活率达90%以上时,可用于实验。

1.3 超氧阴离子(O_2^-)的测定

参照 Song^[4] 和 Marcelo Muñoz^[5] 的 NBT 还原法并进行一定修改后用于实验($n \geq 3$)。

1.3.1 Zymosan A 质量浓度对血细胞产生 O_2^- 的影响 用6种不同质量浓度的 Zymosan A (0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL) 对中国对虾的血细胞(5×10^6 /mL)进行刺激,然后测定血细胞产生 O_2^- 的情况。

1.3.2 不同密度的血细胞悬液 O_2^- 的产生 将不同密度的血细胞悬液(1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 /mL)加入96孔酶标板中,用1 mg/mL Zymosan A 进行刺激后,测定血细胞产生 O_2^- 的情况。

1.3.3 抑制剂对血细胞产生 O_2^- 的影响 各抑制剂浓度分别为, SOD 75、150、300 U/ μ L, NEM 为 1、3、5 mmol/L, 碘代乙酰胺为 1、10、20 mmol/L, 上述各浓度的抑制剂均用CM缓冲液稀释而成。实验时每孔加入50 μ L 抑制剂溶液,比较不同浓度的抑制剂对血细胞产生 O_2^- 的影响。

1.3.4 重金属离子对血细胞产生 O_2^- 的影响 将 $HgCl_2$ 、 $K_2Cr_2O_4$ 、 $Pb(NO_3)_2$ 、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、 $ZnCl_2$ 的母液用CM缓冲液稀释成10、50、100、200 mg/L 的实验用液,实验时每孔加入50 μ L 重金属离子溶液,比较不同质量浓度的重金属离子对血细胞产生 O_2^- 的影响。

1.3.5 不同个体的中国对虾血细胞产生 O_2^- 的情况 随机挑选10条中国对虾,取血后将血细胞密度调为 5×10^6 /mL,用1 mg/mL Zymosan A 进行刺激后,测定不同个体的中国对虾血细胞产生 O_2^- 的情况。

2 结果

2.1 Zymosan A 对血细胞产生 O_2^- 的影响

结果见图1。由图1可知,Zymosan A 在0.25~1.0 mg/mL 随着浓度的增加血细胞产生 O_2^- 的量也在增加,

当 Zymosan A 质量浓度达到1.0 mg/mL 时血细胞产生 O_2^- 的量达到最大,当 Zymosan A 质量浓度继续增加到1.5和2.0 mg/mL 时血细胞产生 O_2^- 的量反而下降。

2.2 不同密度的血细胞悬液产生 O_2^- 的情况

结果显示(图2),随着密度的增加,血细胞产生 O_2^- 的量也增加。

2.3 不同抑制剂对血细胞产生 O_2^- 的影响

2.3.1 SOD 的抑制作用 结果表明,向反应体系中加入SOD,对血细胞产生 O_2^- 具有抑制作用。当SOD的浓度达到300 U/mL 时,其抑制效果最明显(见图3)。

2.3.2 NEM 和碘代乙酰胺的抑制作用 NEM 和碘代乙酰胺均能抑制中国对虾血细胞吞噬过程中产生 O_2^- 的能力,随着 NEM 和碘代乙酰胺浓度的增加,其对血细胞产生 O_2^- 的抑制作用也在增强(见图3)。

2.4 重金属离子对血细胞产生 O_2^- 的影响

结果表明, Hg^{2+} 、 Cr^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 5种重金属离子均能抑制血细胞吞噬过程中 O_2^- 的产生。并且抑制作用有浓度依赖的特点,随着重金属离子浓度的增加而加强(见图4)。

2.5 不同个体中国对虾血细胞产生 O_2^- 的情况

对10只中国对虾进行血细胞 O_2^- 产生的定量分析,每只对虾所取的血细胞数目相同,NBT还原法所显示的血细胞产生 O_2^- 的能力具有很大的个体差异(见图5)。

3 讨论

3.1 Zymosan A 对血细胞产生 O_2^- 的影响

Zymosan A 是从酵母细胞壁中提取的一种蛋白—糖复合物,可以刺激血细胞发生呼吸爆发。一定浓度范围内(0.25~1.0 mg/mL) Zymosan A 刺激血细胞产生 O_2^- 的能力随着 Zymosan A 浓度的增加而增强。可能是因为随着浓度的增加,Zymosan A 刺激发生呼吸爆发的血细胞的数目及强度都有所增加,因而表现出 NBT 还原法所测的 O_2^- 的增加。当 Zymosan A 的质量浓度为1.0 mg/mL 时达到最强的刺激效果。随着 Zymosan A 的浓度的继续增加,血细胞 O_2^- 的产生反而呈下降趋势。一般来说,血细胞通过吞噬作用清除进入到血淋巴中的外来异物,而当入侵的病原体数量过多以至无法被单个的血细胞所吞噬时就以多个血细胞形成结节来完成^[7]。本实验中 Zymosan A 的浓度的增加相当于外来异物数量的增

多。作者认为当其增加到一定程度时,血细胞就以形成结节的方式来清除异物。此时血细胞的呼吸爆发处于被抑制状态,这样同时也可以避免呼吸爆发过度所产生的大量活性氧对生物体本身造成氧化损伤。至于血细胞如何识别外来入侵物的数量并启动何种免疫反应方式的机制尚需进一步研究。

3.2 不同密度的血细胞产生 O_2^- 的情况

3 种不同密度的血细胞(1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 /mL),随着密度的增加,血细胞产生 O_2^- 的量也增加。最终确定下面实验中使用血细胞密度为 5×10^6 /mL,主要是因为该实验组产生 O_2^- 的量比较少,同时与对照组相比,差别不是很显著。而弃用 1×10^7 /mL 的实验组主要是因为需要细胞数目过大,使实验材料的需要量增加。

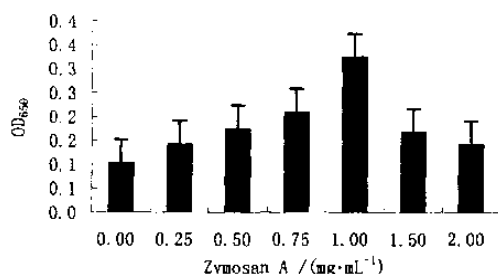


图 1 不同浓度的 Zymosan A 对血细胞产生 O_2^- 的影响

Fig.1 Effects of Zymosan A under different concentrations on O_2^- production

3.3 抑制剂对血细胞产生 O_2^- 的影响

SOD 是一种特异性清除 O_2^- 的抗氧化酶,它能够催化 O_2^- 发生歧化反应从而清除 O_2^- 。加入一定浓度的 SOD 可以清除血细胞吞噬过程中所产生的 O_2^- ,使 NBT 还原法所测定的 O_2^- 的产生量有所下降。NEM 是一种可以导致 NADPH 氧化酶失活的抑制剂^[8], NADPH 氧化酶是催化产生 O_2^- 的最主要的酶,大量的 NADPH 在 NADPH 氧化酶或其他氧化酶的催化下,使分子氧还原成 O_2^- 。所以在 NEM 达到一定浓度时,就可以完全抑制这种反应。碘代乙酰胺可以阻断糖酵解途径,从而抑制呼吸爆发^[9]。所以碘代乙酰胺可以抑制血细胞吞噬过程产生 O_2^- 。通过抑制实验证明了中国对虾血细胞在吞噬过程中伴随有呼吸爆发产生 O_2^- 的现象存在。

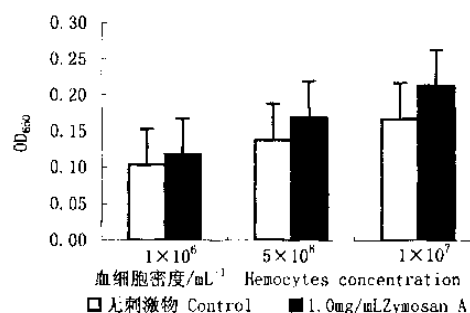


图 2 不同密度血细胞产生 O_2^- 的情况

Fig.2 O_2^- production of different hemocytes density

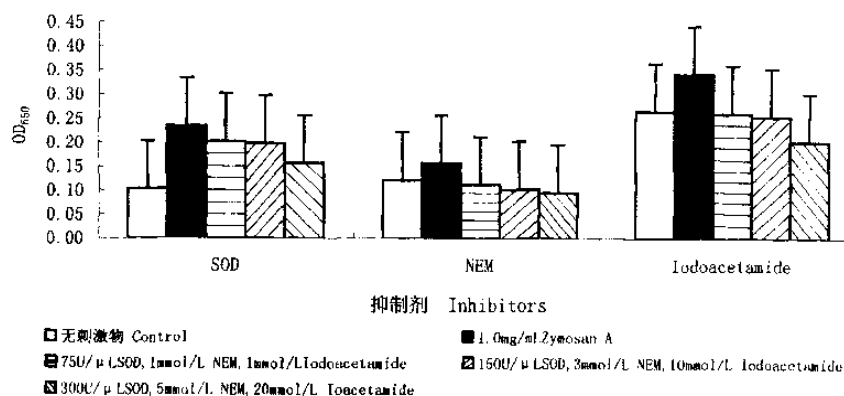
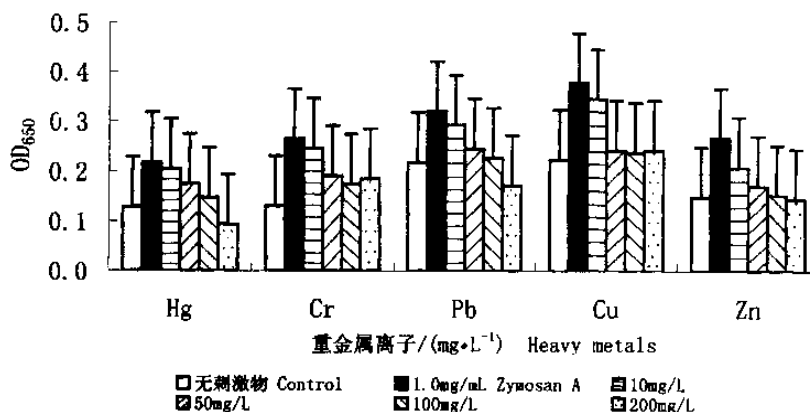
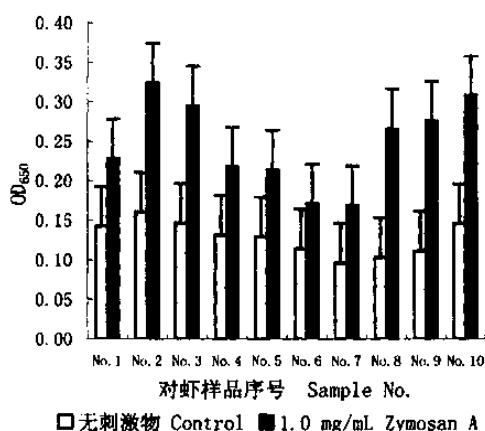


图 3 不同抑制剂对血细胞产生 O_2^- 的影响

Fig.3 Effects of different inhibitors on O_2^- production

图4 重金属离子对血细胞产生 O_2^- 的影响Fig.4 Effects of heavy metals on O_2^- production图5 不同个体的中国对虾血细胞产生 O_2^- 的情况Fig.5 Variations of O_2^- production among different individuals

3.4 重金属离子对血细胞产生 O_2^- 的影响

实验表明, Hg^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 5种重金属离子对中国对虾血细胞吞噬过程中产生 O_2^- 的能力具有不同程度的抑制作用。国内外的一些研究也表明重金属可以抑制血细胞的化学发光反应。本文的结果可以肯定,重金属能抑制或破坏中国对虾的氧化性杀菌机制,其抑制的机理估计与重金属可以使酶失活有关。因为 O_2^- 的产生需要NADPH氧化酶等一系列酶的催化,重金属离子可能会抑制酶的活性甚至使其失活,从而抑制了血细胞吞噬过程中产生 O_2^- 的能力。该结果表明了海洋中的重金属污染物会通过抑制活性氧杀菌的方式来削弱中国对虾的免疫功能。

3.5 不同个体的中国对虾血细胞产生 O_2^- 的情况

不同个体的中国对虾血细胞吞噬过程中在产生 O_2^- 的能力上差异很大。很多因素会影响对虾产生 O_2^- 的能力,例如生理及免疫状态。实际上, O_2^- 的产生已被调整用来评估化学和生物复合物对对虾血细胞的吞噬能力的影响,而且在应用时使用一定的计算公式,并不直接使用酶标仪所测的吸光值。Sung等^[10]使用3种不同的免疫增强剂对斑节对虾进行了浸浴实验,然后对一些免疫指标进行检测,这些方法中包括NBT还原法检测 O_2^- 的产生。他们所使用的公式为: O_2^- 的产率 = OD_{650} 经过处理的对虾的血细胞/ OD_{650} 对照组的血细胞,将其作为指数来比较3种不同的免疫增强剂对对虾免疫功能的影响。Fischer等^[11]也通过对虾饲料中分别添加Aqua-mos和SP6042种免疫增强剂,喂养后,对一些免疫指标进行检测以研究2种免疫增强剂对凡纳对虾的免疫系统的作用。其 O_2^- 的产生的指数的计算公式为NBT指数 = $[(OD_{650}$ 刺激后的血细胞 - OD_{650} 对照组的血细胞) - 1] / $[(OD_{650}$ 刺激后的血细胞 - OD_{650} 对照组的血细胞) $_{max}$ - 1] $\times 100\%$ 。NBT还原法的定量分析和血细胞产生活性氧的能力已被认为是在细胞和组织水平对生物体免疫地位进行评估的功能性指标。所以可以在生产和科研中应用NBT还原法对中国对虾的免疫状态进行评价。

4 结语

已知无脊椎动物的免疫方式为非特异性的,血细胞的吞噬作用是其主要的免疫防御方式,特别对于急性感染,由于 O_2^- 能够迅速产生,从而使得 O_2^- 的产生在杀灭外来病原体时显得更为重要。本实验结

果表明了中国对虾血细胞在吞噬外来异物的过程中伴随有呼吸爆发产生 O_2^- 的现象,证明中国对虾血细胞吞噬时具有释放活性氧进行氧化性杀菌的功能。用 NBT 还原法测定中国对虾血细胞吞噬时产生 O_2^- 可以作为对对虾的免疫状态进行检测的指标,具有很好的应用前景。

参考文献:

- [1] Welch W D, Devlin P. Analysis and comparison of the luminal-dependent chemiluminescence response of alveolar macrophages and neutrophils[J]. J Reticuloendothel Soc, 1980, 28: 273 - 283.
- [2] Heran T D, English D, Mepherston T A. Association of neutrophil chemiluminescence with microbicidal activity [J]. Clin Immunol Immunopathol, 1982, 22: 259.
- [3] Bell K L, Smith V J. In vitro superoxide production by hyaline cells of the crab *Callinectes maenas* (L.) [J]. Dev Comp Immunol, 1993, 17: 211 - 219.
- [4] Song Yen-ling, Hsieh Y T. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species [J]. Dev Comp Immunol, 1994, 18(3): 201 - 209.
- [5] Marcelo Muñoz, Ricardo Codoño, Jenny Rodríguez, et al. Measurement of reactive oxygen intermediate production in hemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei* [J]. Aquaculture, 2000, 191: 89 - 107.
- [6] Chang Cheng-fang, Chen Hong-yung, Su Mao-Sen, et al. Immunomodulation by dietary β -1,3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2000, 10: 505 - 514.
- [7] Gillespie J P, Bailey A M, Cobb B, et al. Fungi as elicitors of insect immune response [J]. Arch Insect Biochem Physiol, 2000, 44: 49 - 68.
- [8] Akard L P, English D, Gabig T C. Rapid deactivation of NADPH-oxidase in neutrophils: continuous replacement by newly activated enzyme sustains the respiratory burst [J]. Blood, 1988, 72: 322 - 327.
- [9] Pick E, Chiron J, Mizel D, et al. A rapid densitometric microassay for nitroblue tetrazolium reduction and application of the micro to macrophages [J]. J Reticuloendothel Soc, 1981, 30: 581 - 593.
- [10] Sung H H, Yang Y L, Song Y L. Enhancement of microbicidal activity in the Tiger shrimp *Penaeus monodon* via immunostimulation [J]. J Crust Biol, 1996, 16(2): 278 - 284.
- [11] Fischer A, Arias J, Motte E, et al. Effect of Aqua-mos and SP604 on the immune system of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* [A]. Aquaculture 2001: Book of Abstracts [M]. World Aquaculture Society, 2001, 226.

Production of superoxide anions (O_2^-) in phagocytosis of *Penaeus chinensis*

WANG Bao-jie^{1,2}, WANG Lei¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The hemocytes of *Penaeus chinensis* were stimulated in vitro by Zymosan A and the production of superoxide (O_2^-) was detected by nitroblue tetrazolium (NBT) reduction assay. The results indicate that the hemocytes of *P. chinensis* can have an obvious burst of respiratory and generation of O_2^- during the phagocytic activity after the stimulation. Zymosan A at different concentration has different effects on the O_2^- production that when Zymosan A is at 0.25 - 1.0 mg/mL, the O_2^- production increases with the increase of Zymosan A concentration, and when Zymosan A at 1.5-2.0 mg/mL, the O_2^- production decreases. When Zymosan A is at the same concentration, the stimulated hemocytes at different cell dense can generate different amount of O_2^- . SOD, NEM and Iodoacetamide can inhibit the hemocyte activity of NBT reduction during the phagocytosis of hemocytes, and the other five metal ions like Hg^{2+} , Cr^{3+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} also have the same function. The abilities of O_2^- generation among the individuals of *P. chinensis* are highly different. It suggests that the hemocytes of *P. chinensis* could generate reactive oxygen species like O_2^- to kill their pathogens in the phagocyte defensive reaction.

Key words: *Penaeus chinensis*; hemocytes; phagocytosis; O_2^-