

肽聚糖制剂对南美白对虾体液免疫因子的影响

王秀华, 宋晓玲, 黄 健

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘 要:按一定梯度配制5种含不同水平肽聚糖制剂的饲料,投喂南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*),35 d后取实验对虾血样,用于测定血清中酚氧化酶活力、磷酸酶活力、溶菌活力及超氧化物歧化酶活力。结果显示,饲料中肽聚糖质量分数为 500×10^{-6} 的实验组,对虾血清中酚氧化酶活力最高,肽聚糖质量分数为 $2\,500 \times 10^{-6}$ 的实验组,对虾血清中酸性磷酸酶与碱性磷酸酶活力最高,肽聚糖对对虾的血清溶菌活力影响不明显($P > 0.05$)。由此表明饲料中添加适量(质量分数 500×10^{-6} 左右)的肽聚糖制剂可使对虾体液免疫因子总体活力达到较高水平,饲料中肽聚糖制剂含量过高对对虾非特异免疫力的作用效果反而不佳。南美白对虾血清中酚氧化酶活力对饲料中肽聚糖含量变化较敏感,可作为肽聚糖使用效果的评价指标之一。

关键词 南美白对虾;肽聚糖制剂;免疫因子;酚氧化酶;磷酸酶;溶菌;超氧化物歧化酶

中图分类号 S945.4

文献标识码 A

文章编号 1005-8738-(2004)01-0026-05

自1993年至今,频繁发生的对虾病毒病一直是影响对虾养殖产业发展的首要问题。由于对该病缺乏有效的防治药物,国内外学者拟通过应用免疫增强剂,提高对虾自身非特异免疫力,以达到增强对虾抗病力的目的^[1-5]。肽聚糖(Peptidoglycan, PG)是取自微生物细胞壁的复合糖化物,为一种重要的免疫增强剂。研究结果表明,某些具有特定来源、结构的肽聚糖可对多种动物的免疫系统产生不同的免疫调节作用^[6]。

肽聚糖在对虾养殖中的应用研究尚处在起步阶段,具体的应用参数及衡量肽聚糖效能的对虾非特异免疫学指标的建立尚未见报道。本研究通过观察对虾口服不同剂量的肽聚糖制剂后,血清中与机体非特异免疫相关的几种重要酶类活性的变化,探讨肽聚糖提高对虾非特异免疫力的效果与影响途径,旨在建立评价肽聚糖使用效果的生物学指标,确定肽聚糖用于对虾饲料中的适宜添加剂量,以及推广免疫增强剂肽聚糖的应用提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验虾 南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*),平均体长(5.5 ± 0.6) cm,于2002年7月

23日取自青岛市崂山区王哥庄对虾高健康养殖示范场,经核酸探针斑点杂交检测技术检测,确认未携带白斑综合症病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)。实验前暂养7 d,期间日投喂饲料4次,换水1次,换水量约1/3,连续充气,水温 $24 \sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$,盐度29, pH 7.9。

1.1.2 饲料配制 按表1配制各种实验饲料。肽聚糖为本实验室制品,其中精制肽聚糖是以细菌细胞壁为原料,经纯化处理后得到的产物,实验中用作肽聚糖制剂实验的参照组(按每100 g湿菌可提纯干细胞壁1 g的比例推算,质量分数 10×10^{-6} 的纯化肽聚糖相当于质量分数 $1\,000 \times 10^{-6}$ 的粗制肽聚糖)。

1.2 方法

1.2.1 分组 实验分6组,分别投喂1~6号饲料,每组设3个平行实验,实验水槽有效水体为 $0.27\text{ m}^2 \times 0.7\text{ m}$,每个水槽内养殖对虾18尾,实验期间日投喂4次,各实验组连续投喂4 d,实验饲料后改为连续喂3 d对照饲料,循环至实验结束。其他管理与暂养期相同。

1.2.2 采集对虾血淋巴 投喂实验饲料35 d后,每组随机取对虾9尾(3×3 尾平行),用一次性注射器(1 mL)从对虾的心脏抽取血淋巴,注入无菌的

收稿日期:2003-07-21; 修订日期:2003-09-05。

基金项目:国家“863”计划项目资助(2003AA622060)。

作者简介:王秀华(1969-),男,责任副研究员,硕士,从事水产养殖动物病害及免疫学研究。E-mail: aqadis@public.qtl.sd.cn

表1 实验饲料的组成成分

Table 1 Ingredient of shrimp diet in the experiment

组别 Group	成分 Ingredient
1	原料粉 + 20×10^{-6} 粗制 PG* Raw material + 20×10^{-6} crude PG*
2	原料粉 + 100×10^{-6} 粗制 PG Raw material + 100×10^{-6} crude PG
3	原料粉 + 500×10^{-6} 粗制 PG Raw material + 500×10^{-6} crude PG
4	原料粉 + $2\,500 \times 10^{-6}$ 粗制 PG Raw material + $2\,500 \times 10^{-6}$ crude PG
5	原料粉 + 10×10^{-6} 精制 PG** raw material + 10×10^{-6} Refined PG**
6	对照(原料) Control(Raw material)

注:1. 粗制 PG* - 指以湿菌重量计算添加量,且 PG 中含有菌体全部组成成分;精制 PG** - 指以干细菌细胞壁重量计算添加量。2. 原料粉成分(以 100 g 计):面粉 3 g,玉米粉 3 g,豆饼 25 g,鱼粉 30 g,花生饼 25 g,虾糠 10 g, Na_2HPO_4 0.34 g, MgSO_4 0.3 g, NaH_2PO_4 0.96 g, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 0.2 g,复合维生素 1.2 g,褐藻酸钠 1 g

Note: 1. Crude PG* means PG contained the component of whole bacterial, and the weight of PG was weighed by wet bacterial; Refined PG** means the weight of PG was weighed by dry purified bacterial cell wall.

2. Ingredient of raw material (100 g): Flour 3 g, Corn flour 3 g, Soybean cake 25 g, Fishmeal 30 g, Peanut cake 25 g, Dried small shrimps 10 g, Na_2HPO_4 0.34 g, MgSO_4 0.3 g, NaH_2PO_4 0.96 g, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ 0.2 g, multiple vitamin 1.2 g, Sodium alginate 1 g.

1.5 mL 离心管中,4℃冰箱中过夜,次日用无菌针头划破血凝块,析出血清用于各项指标的测定。

1.2.3 酚氧化酶(PO)活力 以 L-dopa 为底物,采用改进的 Ashida^[7] 方法,按以下步骤进行测定:于 96 孔酶标板中,将 300 μL 的 0.1 mol/L, pH 6.0 的磷酸钾盐缓冲液与 10 μL 0.01 mol/L 的 L-dopa 及 10 μL 血清于室温下混匀,之后置于多通道分光-荧光光度计 TECAN SAFIRE 中(TECAN Austria GmbH 制造),设定温度 28℃,固定吸收波长 490 nm,按照每 2 min 测量 1 次,测量 10 次,测其血清酶动力学 OD 值。以 OD₄₉₀ 对反应时间作图,以实验条件下每分钟 OD 值增加 0.001 定义为 1 个酶活力单位。

1.2.4 碱性磷酸酶(ALP)活力 应用碱性磷酸酶检测试剂盒(南京建成生物工程研究所生产),反应于 96 孔酶标板中,用多通道分光-荧光光度计 TECAN SAFIRE 测量各反应体系中的 OD 值,各试剂及血清的使用量为试剂盒规定用量的 1/10。

ALP 活性定义为:100 mL 血清在 37℃ 与底物

作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位。

1.2.5 酸性磷酸酶(ACP)活力 应用酸性磷酸酶检测试剂盒(南京建成生物工程研究所生产),反应于 96 孔酶标板中,用多通道分光-荧光光度计 TECAN SAFIRE 测量各反应体系中的 OD 值,各试剂及血清的使用量为试剂盒规定量的 1/10。

ACP 活性定义为:100 mL 血清在 37℃ 与底物作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位。

1.2.6 溶菌活力(lysozyme activity) 以溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)冻干粉(南京建成生物工程研究所生产)为底物,参照王雷等^[8]方法,按以下步骤进行:用 0.1 mol/L pH 6.4 的磷酸钾盐缓冲液,配制底物悬液(OD₅₇₀ 为 0.3~0.5)。置 96 孔板于冰台上,加入底物悬液(300 μL /孔),再加入 5 μL 血清混匀,于多通道分光-荧光光度计 TECAN SAFIRE 中,设定温度 37℃,固定吸收波长 570 nm,按照每 2 min 测量 1 次,测量 15 次,测定各反应体系的吸光值 A。

溶菌活力 $U_L = (A_{\text{终值}} - A_{\text{初值}}) / A_{\text{终值}}$ 。

1.2.7 超氧化物歧化酶(T-SOD)活力 用超氧化物歧化酶测定试剂盒测定(南京建成生物工程研究所生产)。

SOD 活力定义为:每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 的量为 1 个亚硝酸盐单位(NU)。

$$A_{\text{SOD}} = \frac{A_c - A_d}{A_c} \div 50\% \times d$$

式中: A_{SOD} 为 SOD 活力,单位 NU/mL; A_c 为对照管吸光度; A_d 为测定管吸光度; d 为稀释倍数。

2 结果

2.1 PO 活力

从各实验组中取对虾血淋巴,测定其 PO 活力,结果见图 1。从图 1 可见,所有添加肽聚糖制剂的实验组中,对虾血清中的 PO 活力的平均值均高于对照组的平均值,且饲料中肽聚糖的添加量在 $(20 \times 10^{-6}) \sim (500 \times 10^{-6})$, PO 活力随添加量的增大而增加,当 PG 的质量分数高达 $2\,500 \times 10^{-6}$ 时,PO 值出现降低。表明饲料中高含量的肽聚糖对提高对虾血清中的 PO 活力并不能达到最佳效果。对各组间的差异显著性分析表明:各组对虾血淋巴中的 PO 活力大小如下: $\text{PO}_{500} > \text{PO}_{100} > \text{PO}_{20} (P < 0.05)$, $\text{PO}_{500} > \text{PO}_{2500} = \text{PO}_{10(\text{纯化})} > \text{PO}_0 (P < 0.05)$, $\text{PO}_{100} >$

PO_0 , PO_{100} , PO_{2500} 及 $PO_{10(纯化)}$ 之间的差异不显著 ($P > 0.05$), PO_{20} 与 PO_0 之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

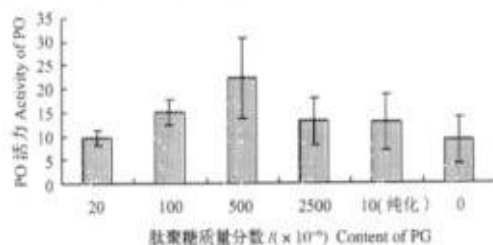


图1 各实验组南美白对虾血淋巴中 PO 活力

Fig. 1 Serum phenoloxidase activity in different test groups of *Litopenaeus vannamei*

2.2 ALP 活力

各组实验对虾血淋巴中 ALP 活力如图 2 所示, 结果显示: 饲料中肽聚糖添加量在 $(20 \times 10^{-6}) \sim (2500 \times 10^{-6})$, 对虾血淋巴中 ALP 活力随肽聚糖质量分数的增加而增强。质量分数为 10×10^{-6} 纯化的肽聚糖对 ALP 的作用效果高于普通肽聚糖制剂质量分数为 100×10^{-6} 的一组, 而低于含量为 500×10^{-6} 的一组。对上述结果进行显著性分析表明, 肽聚糖添加剂量为 500×10^{-6} 与 2500×10^{-6} 的实验组对虾血淋巴的 ALP 活力显著高于对照组的对虾 ALP 活力 ($P < 0.05$)。肽聚糖使用剂量为 20×10^{-6} , 100×10^{-6} , 10×10^{-6} 及对照组 (0×10^{-6}) 4 个组间对虾血清 ALP 差异不显著 ($P > 0.05$)。

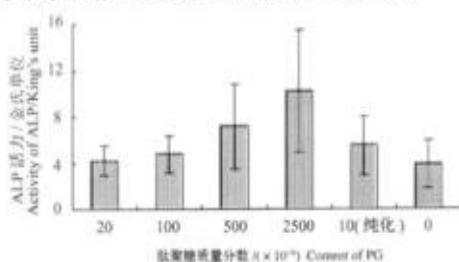


图2 各饲料组南美白对虾血淋巴中 ALP 活力

Fig. 2 Activity of alkaline phosphatase in serum of *Litopenaeus vannamei* in different test groups

2.3 ACP 活力

各实验组中对虾血清中的 ACP 活力如图 3 所示, 从图中结果可以看出, 饲料中肽聚糖添加剂量在 $(20 \times 10^{-6}) \sim (2500 \times 10^{-6})$ 内, 均能不同程度的提高对虾血淋巴中 ACP 活力, 且 ACP 活力随饲料中

PG 浓度的增加而增大。差异显著性分析显示: 饲料中肽聚糖添加质量分数为 500×10^{-6} , 2500×10^{-6} 及纯化肽聚糖组 (10×10^{-6}) 3 组的对虾血淋巴中的 ACP 活性均显著高于对照组对虾血淋巴中的 ACP 活力 ($P < 0.05$), 其他各组间对虾血淋巴中 ACP 活力差异不显著 ($P > 0.05$)。

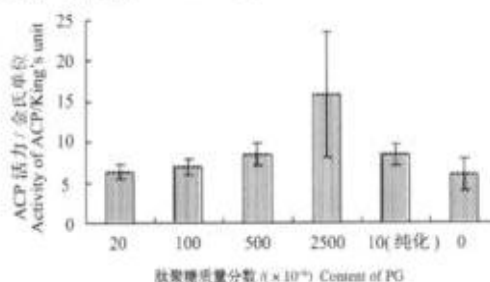


图3 各饲料组南美白对虾血淋巴中 ACP 活力

Fig. 3 Acid phosphatase activity in serum of *Litopenaeus vannamei* in different test groups

2.4 T-SOD 活力

饲料中肽聚糖添加剂量与对虾血淋巴中 T-SOD 活力的影响不大, 如图 4 所示, 从图中可以看出肽聚糖添加剂量为 100×10^{-6} 及 500×10^{-6} 的 2 个实验组, 对虾血淋巴中的 T-SOD 的活力略高于对照组, 但与对照组的差异不明显 ($P > 0.05$); 肽聚糖添加剂量过低 (20×10^{-6}) 或过高 (2500×10^{-6}) 都可使对虾血淋巴中 T-SOD 活力略低于对照组, 但与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。显著性分析表明: 添加质量分数为 20×10^{-6} 及纯化肽聚糖组的对虾血淋巴 T-SOD 活力均显著低于添加质量分数为 100×10^{-6} 及 500×10^{-6} 组对虾的血淋巴 T-SOD 活力 ($P < 0.05$)。结果显示在饲料中添加不同剂量的肽聚糖对对虾 T-SOD 活力产生微弱效果。

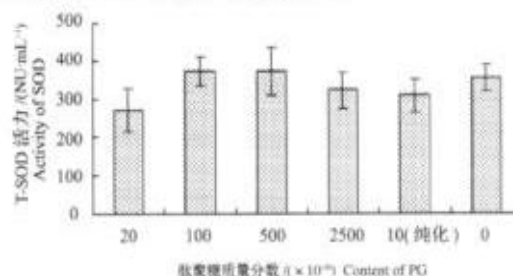


图4 各饲料组南美白对虾血淋巴中 T-SOD 活力

Fig. 4 Total superoxide dismutase activities in serum of *Litopenaeus vannamei* in different test groups

2.5 溶菌活力

各实验组的对虾血淋巴中的溶菌活力如图5所示,可以看出,饲料中添加不同剂量的肽聚糖都能提高对虾血淋巴溶菌活力,但存在非规律性的变化,统计分析显示:各组之间的差异性不显著($P > 0.05$),即不同剂量的肽聚糖对对虾血淋巴溶菌活力的提高均无明显的促进作用。

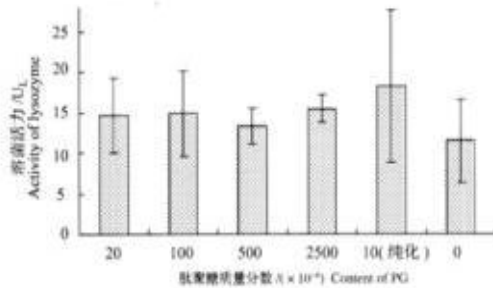


图5 各饲料组南美白对虾血淋巴溶菌活力

Fig. 5 Lysozyme activity in serum of *Litopenaeus vannamei* in different test groups

3 讨论

南美白对虾摄食一定剂量的肽聚糖后,其血淋巴中的PO、ALP、ACP活力都有相应的提高,而T-SOD及溶菌活力受影响的程度不大,该结果与日本对虾摄食肽聚糖后相应的酶活力的变化结果相似,即日本对虾在摄食肽聚糖后,血淋巴中PO、ALP、ACP的酶活力比对照组有显著提高,而T-SOD、溶菌活力等酶活力的提高效果不明显^[1,2]。

对虾机体在抵抗入侵的病原生物过程中,主要依靠其非特异免疫防御系统来清除异物,该系统由参与免疫反应的血淋巴细胞和体液因子组成,在多种体液因子中,PO、T-SOD、溶菌酶、磷酸酶等酶活力高低常被用做衡量对虾免疫活力高低的参照指标^[4,8-10]。从实验结果看,肽聚糖只对部分体液免疫因子产生积极影响,而且对不同免疫因子的最佳作用剂量有差别。对虾以酚氧化酶原激活系统(proPO系统)为防御中心,proPO具有识别外来物并联系增强与抗病有关的一些反应^[11-12]。该系统中的因子以非活化状态存在于血细胞的颗粒中,微量的肽聚糖可以将proPO系统激活,酚氧化酶本身

可以催化酚转化为黑色素,黑色素及中间产物对某些病原体具有杀伤作用^[6,13]。以L-DOPA为底物,检测血淋巴中PO活力的高低,可以判断proPO系统被激活的程度。由于PO具有重要的免疫功能,同时其活力对肽聚糖使用剂量敏感,因此选择评价肽聚糖使用效果的对虾生理指标时,PO活力是一个较理想的参数。

实验范围内,高添加量肽聚糖($2\ 500 \times 10^{-6}$)对对虾血清中磷酸酶活力具有最佳作用,而该浓度条件下,对虾血清中PO活力却低于肽聚糖添加量为 500×10^{-6} 时的活力,由此可以说明:应用肽聚糖于对虾养殖,其使用效果需进行多因子综合评价。实验者在进行肽聚糖提高南美白对虾抗病毒病效果的研究中发现,人工感染对虾白斑综合症病毒(WSSV)16 d后,肽聚糖添加剂量为 500×10^{-6} 的实验组中,对虾的存活率显著高于肽聚糖添加剂量为 $2\ 500 \times 10^{-6}$ 的实验组,也高于剂量低于 500×10^{-6} 的其他各组的对虾存活率(另文发表),综合分析后认为:饲料中肽聚糖制剂适宜的添加剂量应在 500×10^{-6} 左右(以湿菌重量计)。

参考文献:

- [1] 孟凡伦,马桂荣,孔健. 乳链球菌SB900肽聚糖对中国对虾免疫功能的影响[J]. 山东大学学报(自然科学版), 1999, 34(1): 8-93.
- [2] 江晓路,刘树青,张朝晖,等. 多糖对中国对虾免疫功能的影响[J]. 中国水产科学, 1999, 6(1): 66-68.
- [3] 王雷,李光友,毛远兴,等. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J]. 海洋与湖泊, 1994, 25(4): 486-492.
- [4] Sritunyaluksana K, Sithisarn P, Withayachumnamkul B, et al. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9: 21-30.
- [5] Itami T, Asano M, Tokushige K, et al. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*[J]. Aquaculture, 1998, 164: 277-288.
- [6] 王秀华,黄健,宋晓玲. 免疫增强剂——肽聚糖在对虾养殖中的应用[J]. 海洋水产研究, 2003, 24(1): 69-74.
- [7] Ashida M. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. Arch Biochem Biophys, 1971, 144: 749-762.
- [8] 王雷,李光友,毛远兴. 中国对虾血淋巴中的溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究[J]. 海洋与湖泊, 1995, 26(2): 179-185.

1) 王秀华,宋晓玲,黄健. 肽聚糖对日本对虾免疫因子作用(I)[J]. 高技术通讯, 待刊.

2) 王秀华,等. 肽聚糖对日本对虾免疫因子作用(II)[J]. 待刊.

- [9] Campa-Córdova A I, Hernandez-Saavedra N Y, Ascencio F. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 2002, 133: 557-565.
- [10] 雷质文, 黄 健, 杨 冰, 等. 感染白斑综合症病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究[J]. 中国水产科学, 2001, 8(4): 46-51.
- [11] Soderhall K. Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition mechanism of arthropods. A review [J]. Dev Comp Immunol, 1982, 6: 601-611.
- [12] 宋宏红, 谢允廷, 宋延令. 虾子的防御系统与抗病力的增强[J]. 养鱼世界(台), 1995(2): 22-23.
- [13] 张 尧, 宋延令. 甲壳类血球细胞的免疫功能及其交互作用[J]. 中国水产(台), 1993(483): 7-14.

Effects of peptidoglycan (PG) preparation on humoral immune factors of *Litopenaeus vannamei*

WANG Xiu-hua, SONG Xiao-ling, HUANG Jie

(Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The American white shrimp *Litopenaeus vannamei* were collected from a culture farm in Qingdao at the body length (5.5 ± 0.6) cm. Tested by nucleic probe, the shrimp were proved healthy without white spot syndrome virus (WSSV). Six added levels of peptidoglycan (PG) were designed which were mixed with the raw diets. The period was 35 d. The added levels of PG were 20, 100, 500, 2 500 mg (crude PG)/kg (raw diets) and 10 mg (refined diets)/kg (raw diets) and control (raw diets). The data indicated that in the group of PG added level at 500 mg/kg the activity of PO was the highest ($P < 0.05$). Both activities of ALP and ACP in the group of 2 500 mg/kg were the highest ($P < 0.05$). Neither activities of SOD nor lysozyme in the serum of shrimp from all test groups was significant higher than those in control ($P > 0.05$). The results proved that an adequate added level of PG (e.g. 500 mg/kg) could increase the activities of the immune factors in shrimp to a high level, but the higher added level would not have good effect on the non-specific immunity in shrimp. The potential possibility for PG used in shrimp culture is to improve the immunity against disease and the optimum added level of PG in the diet is about 500 mg (crude PG)/kg (raw diets).

Key words: *Litopenaeus vannamei*; peptidoglycan (PG) preparation; humoral immune factors; PO; ALP; ACP; SOD