

弧菌和大肠杆菌感染对杂色鲍无细胞血淋巴中几种酶活力的影响

王淑红¹, 王艺磊¹, 张朝霞², 翁朝红¹, 邹志华¹, 张子平³

(1. 集美大学水产生物技术研究所, 水产学院; 福建 厦门 361021; 2. 厦门大学海洋环境学院, 福建 厦门 361005;

3. 美国密歇根州立大学水产与野生生物系, 密歇根 美国)

摘要:将杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)注射感染大肠杆菌(*E. coli*)和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*),在感染后第4、8、12、24、48、96、192小时分别采集无细胞血淋巴,测定碱性磷酸酶(ALP)、酸性磷酸酶(ACP)和超氧化物歧化酶(SOD)的活力。结果表明,弧菌组ACP的活力在第24小时比对照组显著增高;弧菌组的ALP与对照组相比,在第8小时显著增高,第48小时极显著升高,第96小时显著下降。弧菌组的SOD活力在24小时与对照组相比显著降低。而大肠杆菌组ALP、ACP和SOD的活力跟对照组相比,各个时相均无显著差异。由此可见,杂色鲍对致病菌和非致病菌可能有着不同的免疫机制。

关键词:杂色鲍;碱性磷酸酶;酸性磷酸酶;超氧化物歧化酶

中图分类号:S944.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)01-0037-04

杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)是我国海水养殖贝类的主要品种之一。但在鲍人工养殖迅速发展的同时,大规模暴发性死亡现象经常发生,造成了巨大的经济损失^[1-2]。为了解决人工养殖鲍的严重病害问题,有必要进行鲍的免疫学基础研究。目前有关鲍的免疫机制研究较少,国内外仅有少量文献报道^[3-8]。国外的研究多侧重自然环境压力^[7]和机械干扰^[8]对鲍的吞噬、活性氧、凝集反应等免疫学指标的测定。国内有关贝类的免疫学研究则多关注一些细菌如大肠杆菌^[3]和河流弧菌^[4]引起的水解酶、氧化酶和抗菌活力等免疫因子的变化,未见致病菌与非致病菌感染对鲍免疫机制的比较研究。本实验以杂色鲍为实验材料,经致病菌和非致病菌感染后,研究其血淋巴中碱性磷酸酶(ALP)、酸性磷酸酶(ACP)和超氧化物歧化酶(SOD)活力在不同免疫时相的变化规律,旨在探讨这3种酶参与免疫防御的作用机制,以期对杂色鲍的免疫机理有更深入的认识,为进一步研究杂色鲍的分子免疫学机制提供参考资料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

收稿日期:2003-10-08; 修订日期:2003-10-29.

基金项目:国家“863”高技术研究发展计划项目(2002AA629220).

作者简介:王淑红(1969-),女,讲师,从事水生生态毒理学和水产动物生理学研究. E-mail: shwang@jmu.edu.cn

通讯作者:张子平. E-mail: zipingen@msu.edu

杂色鲍购自东海田实业有限公司鲍鱼养殖场,于集美大学水产学院海水养殖场暂养3周后开始实验。每20只鲍置一水箱(30 cm × 17 cm × 24 cm),充气,水温(25 ± 1.50)℃,海水比重1.020。每天早晚吸污、换水,投喂海带各1次,投喂量为体重的10%~15%。选择健康、活力强的鲍,体长(4.50 ± 0.50)cm,体重(7.55 ± 2.10)g。从腹足注射50 μL菌液,菌浓度为6.7 × 10⁷ cell/mL,对照组注射0.9% NaCl。

ALP、ACP、SOD及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品。

大肠杆菌(*E. coli*)和副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)由厦门大学张朝霞老师提供。

1.2 无细胞血淋巴的制备

分别在杂色鲍注射感染后第4、8、12、24、48、96、192小时用解剖刀片将鲍鱼的腹足割开,抽取血液,150 g离心5 min,得无细胞的血淋巴,-70℃保存,用于酶活性测定。每个时相、每组取20只鲍鱼。

1.3 ALP和ACP的测定

将试剂盒的测定方法改进,以适用微量血淋巴(10 μL)和多样本的测定。其原理参照金氏法^[9],用96微孔板于550 nm处测定产物的吸光度。ALP酶

活力单位定义为每 mg 蛋白在 37 ℃ 与基质作用 15 min 产生酚的摩尔数。ACP 酶活力单位定义为每 mg 蛋白在 37 ℃ 与基质作用 30 min 产生酚的摩尔数。

1.4 超氧化物歧化酶活力测定

参照黄嘌呤氧化酶法^[10],将超氧化物歧化酶测定试剂盒的方法加以改进,以适用微量血淋巴和多样本的测定,此法用 96 孔微孔板和酶标仪于 550 nm 处测定产物的吸光度值。亚硝酸盐单位 (NU) 定义为每 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量,酶活力为每 mg 蛋白所对应的亚硝酸盐单位。

1.5 蛋白浓度的测定

参照 Bradford^[11] 法,改进蛋白测定试剂盒的测定方法,以适用微量血淋巴和多样本的测定。该方法用 96 微孔板于 620 nm 处测定产物的吸光度。

1.6 数据处理

结果均用平均值 $\pm$ 标准偏差来表示,并用 *T* 检验对弧菌组和大肠杆菌组与对照组的数据进行统计学分析,以 $P \leq 0.05$ 为显著性水平,以 $P \leq 0.01$ 为极显著性水平。

2 结果

2.1 大肠杆菌和副溶血弧菌感染后杂色鲍无细胞血淋巴中 ALP 活力的变化

杂色鲍注射生理盐水、大肠杆菌和副溶血弧菌后,在不同时相血淋巴中 ALP 活力变化见图 1。经方差分析,8 小时弧菌组 ALP 活力比生理盐水组和大肠杆菌组显著升高 ($P \leq 0.05$),48 小时弧菌组的 ALP 活力极显著升高 ($P \leq 0.01$)。而 96 小时的注射弧菌组杂色鲍血淋巴中 ALP 活力比生理盐水组和大肠杆菌组显著下降。大肠杆菌组 ALP 的活力跟对照组相比,各个时相均无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.2 大肠杆菌和副溶血弧菌感染后杂色鲍无细胞血淋巴中 ACP 活力的变化

由图 2 可知,24 小时弧菌组 ACP 活力比生理盐水组和大肠杆菌组有所增高。经统计分析,弧菌组 ACP 活力与生理盐水组和大肠杆菌组相比存在显著性差异 ($P < 0.05$)。其他时相各组之间 ACP 活力无统计学差异。

2.3 大肠杆菌和副溶血弧菌感染后杂色鲍无细胞血淋巴中 SOD 活力的变化

经大肠杆菌、弧菌诱导后,杂色鲍无细胞血淋巴超氧化物歧化酶活力的变化结果见图 3。经过统计

分析,24 小时弧菌组的 SOD 活力极显著地低于对照组,其他时相则没有显著差异。大肠杆菌组在各个免疫时相与对照组都没有显著差异。

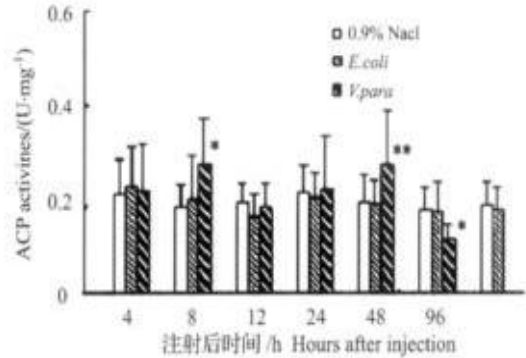


图1 大肠杆菌和副溶血弧菌感染后杂色鲍无细胞血淋巴中 ALP 活力的变化

Fig. 1 Time course of ALP activity in cell free hemolymph following bacterial challenge

* Significant difference. ** Highly significant difference. $n = 20$

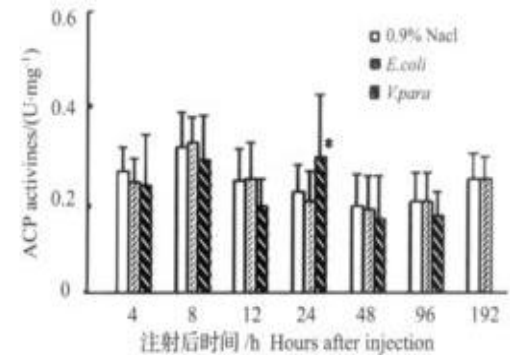


图2 大肠杆菌和副溶血弧菌感染后杂色鲍无细胞血淋巴中 ACP 活力的变化

Fig. 2 Time course of ACP activity in cell free hemolymph following bacterial challenge

* Significant difference. ** Highly significant difference. $n = 20$

3 讨论

副溶血弧菌是海水中的常见菌群,为条件致病菌,可引起鱼类、虾和贝类的弧菌病,其致病力取决于宿主的抗病力、环境条件和海水中的细菌数量。张朝霞等^[1]的研究表明,副溶血弧菌对杂色鲍有较强的毒性,病情传播速度快,病程短,危害严重。为确定参与免疫反应的功能蛋白包括水解酶、氧化酶、抗氧化酶和凝集素的变化,我们以副溶血弧菌感染

杂色鲍,并选择同为海水常见菌群的大肠杆菌同时感染,以区别鲍对致病菌和非致病菌的免疫反应。

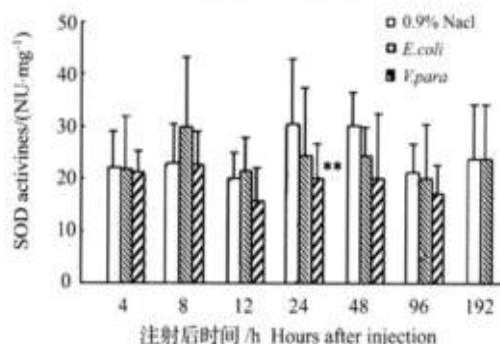


图3 大肠杆菌和副溶血弧菌感染后杂色鲍血淋巴中 SOD 活力的变化

Fig. 3 Time course of SOD activity in cell free hemolymph following bacterial challenge

* Significant difference. ** Highly significant difference. $n = 20$

Cheng^[12]认为,软体动物的 ACP 主要来源于粒细胞的颗粒体,在细胞进行吞噬和包被反应中,会伴随 ACP 的释放^[13],在酸性环境中 ACP 可以通过水解作用将表面带有磷酸脂的异物破坏降解。Foley^[14]等 1977 年也观察到帘蛤血细胞在吞噬细菌时可通过脱颗粒的方式将水解酶释放到血淋巴中,从而使水解酶在血细胞和血淋巴中构成一个水解酶体系。本研究结果表明,杂色鲍经注射诱导后,生理盐水组和大肠杆菌组的活力变化趋势基本相同,两组之间无统计学差异。说明大肠杆菌对杂色鲍 ALP 和 ACP 无诱导作用。这与孙虎山等^[15]对大肠杆菌感染栉孔扇贝的研究结果不同:感染大肠杆菌组的扇贝,血淋巴中 ACP 活力在第 1、15、30 小时显著高于对照组,ALP 活力在 30 h 显著高于对照组。这可能由于不同贝类对病原菌的反应不同,具体原因还有待进一步研究。本实验弧菌组鲍鱼的 ALP 和 ACP 活力变化波动较大,ALP 在 8 小时和 48 小时比对照组显著提高,ACP 在 24 小时比对照组显著提高。这说明副溶血弧菌对 ALP 和 ACP 的活力有一定的诱导作用,激发了鲍的免疫反应。

Feng^[16]认为贝类血淋巴中溶酶体酶(含溶菌酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶等)酶活力的提高除了是一种机体防御反应外,也可能是一种被动的病理显示。本实验弧菌组血淋巴中 ALP 的活力在 96 小时比对照组和大肠杆菌组显著降低,ACP 的活力在 48

小时之后也有所降低,说明随着感染时间的延长,细菌繁殖得越来越多,机体免疫防御机能已由最初的诱导转为受损,防御能力下降,进而将使机体发生病变,甚至死亡。作者在进行实验过程中也发现,随着时间的延长,弧菌感染组的腹足呈现明显的组织学病变,附着能力大大降低,死亡率较高,至 192 小时已无样品可采。而对照组和大肠杆菌组无任何异常现象,至实验结束无一死亡(数据未显示)。

伴随着吞噬,引起呼吸爆发,产生大量的 O_2 和 H_2O_2 等活性氧,这些活性氧自由基可杀灭细菌也会对生物本身造成伤害。SOD 可清除超氧阴离子自由基,减少活性氧对贝类本身的毒害。本实验中弧菌组的 SOD 活力在各个时相其平均值都低于对照组,呈下降趋势,24 小时弧菌组的 SOD 活力极显著地低于对照组。说明在这个时相中,弧菌对杂色鲍的 SOD 产生了强烈的抑制作用。这与丁秀云等^[3]的研究结果部分一致。她们以大肠杆菌、弧菌为诱导物,测定皱纹盘鲍血淋巴中的 SOD 活力,结果发现大肠杆菌和弧菌对鲍血淋巴中的 SOD 活力不是诱导,而是使其降低。而本实验中,大肠杆菌组的 SOD 活力与对照组相比在各个时相都无显著差异,与丁秀云等^[3]的研究结果不尽相同,但与孙虎山^[15]的有关栉孔扇贝的研究结果一致:注射大肠杆菌后,扇贝血清感染组与对照组的 SOD 活力相比差异不显著。作者认为,弧菌组 SOD 活力的负诱导应该也是鲍鱼的一种免疫反应:SOD 的抑制可使血淋巴中的超氧自由基存留时间延长,有利于杀灭入侵的细菌。

实验过程中,作者加大了取样量(本实验每个数据都是 20 个鲍的统计结果),改进了试剂盒的测定方法,用 96 孔板和酶标仪读数以适应大量样品的测定并减少操作误差。从 ALP、ACP 和 SOD 3 种酶活力的数据可以看出,杂色鲍的个体差异较大,致使各组实验数据规律性并不明显。尽管如此,应用统计学分析,仍可看出大肠杆菌组与副溶血弧菌组的显著不同,即:在本实验的注射浓度下,这 3 种酶在大肠杆菌组各个免疫时相与对照组相比都无统计学差异,而弧菌组的某些免疫时相与对照组差异显著,说明杂色鲍对致病菌和非致病菌可能有着不同的免疫机制,值得进一步探讨。此外,ALP、ACP 和 SOD 酶活力变化作为鲍鱼免疫反应的生化指标,具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] 张朝霞,王 军,张燕南,等. 东山九孔鲍细菌性疾病研究[J].

- 台湾海峡, 2001, 20(2): 193-201.
- [2] 张朝霞, 王 军, 苏永泉, 等. 九孔鲍爆发性流行病的病原及病理[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(4): 949-956.
- [3] 丁秀云, 李光友, 翟玉梅. 皱纹盘鲍经诱导后血淋巴中一些因子变化的研究[J]. 海洋与湖沼, 1996, 27(4): 362-367.
- [4] 李太武, 丁明进, 相建海, 等. 皱纹盘鲍对河流弧菌-Ⅱ苗免疫的研究[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(4): 27-31.
- [5] Lebel J M, Giani W, Favrel P, et al. Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusc, *Haliotis tuberculata* [J]. Biol Cell, 1996, 86: 67-72.
- [6] Chen J H. Hemolymph collection in (*Haliotis diversicolor*) [J]. Acta Zool Taiwan, 1996, 7: 61.
- [7] Martello L B, Friedman C S, Tjeerdema R S. Combined effects of pentachlorophenol and salinity stress on phagocytic and chemotactic function in two species of abalone [J]. Aquat Tox, 2000, 49: 213-225.
- [8] Shelagh K M, Arnaud L, Florence G, et al. Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata* [J]. J Exp Zool, 2003, 295A: 136-144.
- [9] 崔福生. 医学生化检验手册[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1981, 272-273.
- [10] 鲁文胜. 超氧化物歧化酶的测定方法及其应用[J]. 六安师专学报, 1999, 15(2): 62-65.
- [11] 奥斯伯 F, 金斯顿 R E, 莱德曼 J G, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 332.
- [12] Cheng T C. The role of Lysosomes in molluscan cellular response to immunologic challenge [J]. Comp Pathobiol, 1978, 4: 59-71.
- [13] 翟玉梅, 丁秀云, 李光友. 软体动物血细胞及体液免疫研究进展[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(5): 558-561.
- [14] Foley D A. Interaction of molluscs and foreign substances; the morphology and behavior of hemolymph cells of the American oyster, *Crassostrea virginica*, invitro [J]. J Invertebr Pathol, 1972, 19: 383-394.
- [15] 孙虎山, 李光友. 脂多糖对栉孔扇贝血淋巴和血细胞中7种酶活力的影响[J]. 海洋科学, 1999, 4: 54-58.
- [16] Feng S Y. Cellular defense mechanism of oysters and mussels [J]. Am Fish Soc Spec Public, 1988, 18: 153-168.

Activities of selected enzymes in cell free haemolymph from abalone (*Haliotis diversicolor*) injected with *E. coli* or *Vibrio parahaemolyticus*

WANG Shu-hong¹, WANG Yi-lei¹, ZHANG Zhao-xia², WENG Chao-hong¹, ZOU Zhi-hua¹, ZHANG Zi-ping³

(1. Fishery College, Aquaculture Biotechnology Institute, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Oceanary Department, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Department of Fisheries and Wildlife, Michigan State University, USA)

Abstract: Healthy *Haliotis diversicolor* were collected, body length (4.50 ± 0.50) cm and bodyweight (7.55 ± 2.10) g. Cell free haemolymph was extracted at 4th, 8th, 12th, 24th, 48th, 96th and 192th hours after the *H. diversicolor* was injected with *E. coli*, *V. parahaemolyticus*, and 0.9% NaCl solution (control group) respectively. The activities of alkaline phosphatase, acid phosphatase and superoxide dismutase were investigated. The results showed that the activities of ACP from abalone injected with *V. parahaemolyticus* were significantly higher than that in control at 24th hour after injection. The activities of ALP from abalone injected with *V. parahaemolyticus* were notable higher than that in control at 8th and 48th hours after injection. The activities of SOD in cell free haemolymph from *V. parahaemolyticus* group were significant lower than that in control at 24 h, while decreased significantly at 96 th hour. There is no statistic difference between *E. coli* group and control at each sampling time for the three enzymes. These results may indicate that the abalone immune defence shows different responses to pathogenic or nonpathogenic bacteria, although the mechanism by which they might be capable of distinguishing such differences remains unclear.

Key words: *Haliotis diversicolor*; ACP; ALP; SOD

Corresponding author: ZHANG Zi-ping. E-mail: zipingen@msu.edu