

多糖对中国对虾免疫功能的影响*

江晓路 刘树青 张朝晖 管华诗

(青岛海洋大学水产学院, 266003)

摘要 用海藻多糖(PV911)和北虫草多糖(CP)作为饵料添加剂饲喂中国对虾20 d后,测定对其血细胞的吞噬功能和体液免疫因素的影响。结果表明:PV911和CP可明显提高中国对虾血细胞的吞噬能力、吞噬细胞的吞噬率、血清SOD的活力和酚氧化酶的活力,对溶菌酶的活性也有一定的提高作用。说明具有生物活性的多糖类物质可刺激对虾机体免疫功能的提高。

关键词 多糖,中国对虾,吞噬功能,体液免疫

对虾免疫功能的研究在对虾血液的抗菌、溶菌作用及相关酶类方面的报道较多^[1],对虾受外源性物质刺激后,血液中抗菌、溶菌活性及相关酶活性的变化情况也有报道^[2]。有关免疫多糖饲喂对虾体内吞噬细胞的吞噬功能的影响方面的研究一直未见报道。虽然已证实了对虾血细胞的吞噬功能,但由于没建立起一套测定吞噬功能的方法和显示方法,而一直不能测定其吞噬活力和吞噬率。本研究用体外孵育和体内循环血细胞的吞噬方法,测定了养殖中国对虾和以免疫多糖为饵料添加剂饲喂的中国对虾吞噬细胞的吞噬率,以及经免疫多糖饲喂后对血清中相关酶活力的影响。免疫多糖PV911和CP在哺乳动物中已证实能够增强特异性免疫和非特异性免疫功能^[3-5],可大大增强小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力及对细胞免疫和体液免疫的功能,对中国对虾也体现出类似的生物学活性。

1 材料和方法

1.1 材料

养殖中国对虾购自城阳养虾场,体长8~10 cm。实验在青岛海洋大学水产学院太平角实验基地。白色念珠菌(*Candida albicans*),经麦芽汁培养基上活化后用生理盐水洗脱,制成灭活细胞悬液

($2 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$)。饲料:青岛海洋大学水产学院对虾饲料配方中加0.2%多糖,作为因素影响饲料,同时设对照组。

1.2 方法

本实验设PV911、CP 2个实验组和1个对照组。每组30尾对虾,每天饲喂2次(过剩给量)、换水2次,水温24~26℃,24 h通气,喂养20 d进行测定。血清的制备:每组取10尾虾,每尾虾取0.5 ml心脏血,待血液凝固后,3 000 r/min离心10 min,即得血清。

1.2.1 中国对虾血细胞吞噬功能的测定

(1)TTC还原法^[6] 将TTC(氯化三苯四氮唑蓝)用Hank's液配成0.01%的溶液,每尾虾注射0.02 ml。40 min取心脏血,常规涂片后甲醇固定,用Wright's液染色5 min。体外实验取TTC 1 ml与抗凝血液1 ml混匀后共同孵育(28℃ 1h)。涂片后固定,染色,观察吞噬结果。以每100个血细胞中吞噬TTC细胞数为吞噬百分率。

(2)吞噬细胞的花环试验^[7] 把制备好的白色念珠菌悬液与同体积的抗凝血细胞混匀后于28℃下孵育30 min,滴片观察形成花环细胞数,每个血细胞吸附2个以上的白色念珠菌(包括2个)为1个花环,每次计数100个血细胞,以形成花环的血细胞数为形成花环的百分率。

1.2.2 溶菌酶活力的测定^[8] 以溶壁微球菌(*Mi-*

收稿日期:1997-04-28

* 国家科委攀登B计划(PDB 6-6-3)资助。

crococcus luteus)冻干粉为底物,用 0.1 mol/L, pH 6.4 的磷酸钾盐缓冲液配成底物悬液(O. D_{570 nm} = 0.3),取 3 ml 该悬液于试管内置冰浴中,再加入 50 μl 待测血清,混合,测 A 值。然后将试液移入 37 ℃ 温浴中作用 30 min,取出后再置冰浴 10 min 以终止反应,测其 A₀ 值。溶菌活力 = (A₀ - A)/A

1.2.3 SOD 活力测定^[7] 连苯三酚在碱性条件下能迅速自氧化。测定时,于 4.5 ml 50 mmol/L pH 8.3 磷酸缓冲液中加入 10 μl 50 mmol/L 连苯三酚,迅速摇匀,倒入光径 1 cm 的比色杯中,在 325 nm 波长下每隔 20 s 测 A 值 1 次,要求自氧化速率每分钟 O.D 值变化约 0.07。酶活性测定方法与上相同,在加入连苯三酚前,加入待测 SOD 样,测得数据按下式计算酶活性:

$$\text{酶活性} = \frac{0.07 - A_{325}/\text{min}}{0.07 \times 50\%} \times 100\% \times \text{反应液体积} \times \frac{\text{样液稀释倍数}}{\text{样液体积}}$$

酶活单位定义:每 ml 反应液中,每 min 抑制连苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量为 1 个酶活单位(U/ml)。

1.2.4 酚氧化酶活力测定 以 L-Dopa 为底物,参照 Ashida(1971)的方法进行。将 3 ml 0.1 mol/L pH 6.0 的磷酸缓冲液与 100 μl 0.01 mol/L 的 L-Dopa 及 100 μl 待测血清于室温下混匀,每次间隔 2 min 读取在 490 nm 波长下的光密度值。以 A₄₉₀ 对反应时间作图,以试验条件下每分钟 A₄₉₀ 增加 0.001 定义为 1 个酶活单位。

2 结果

2.1 中国对虾血细胞吞噬功能的测定

血细胞的吞噬功能是对虾机体最重要的非特异性的细胞免疫,本实验使用 TTC,其氧化态为无色可溶性物质,被吞噬细胞吞噬后在细胞内还原为红

表 1 多糖对中国对虾吞噬功能的影响

Table 1 Effects of polysaccharide on phagocytic activity of *P. chinensis*

组别 group	剂量/% dose	对虾尾数 no. of prawns	细胞数 no. of cells	吞噬百分率/% phagocytic rate
对照 control	-	10	100 × 10	21.5
PV911	0.2	10	100 × 10	30.2
CP	0.2	10	100 × 10	33.2

色不溶性三苯甲腈,对照组与试验组的吞噬百分率见表 1。

以上结果表明在中国对虾的饲料中添加多糖,能够明显增强中国对虾血细胞的吞噬作用。

2.2 吞噬细胞的花环试验

同一份血样进行了中国对虾血细胞与白色念珠菌的花环试验,结果见表 2。

表 2 多糖对中国对虾血细胞形成花环的影响

Table 2 Effects of polysaccharide on blood roses' forming in *P. chinensis*

组别 group	剂量/% dose	对虾尾数 no. of prawns	细胞数 no. of cells	花环数 no. of roses	花环率/% rete of roses
对照 control	-	10	100 × 10	322	32.2
PV911	0.2	10	100 × 10	381	38.1
CP	0.2	10	100 × 10	368	36.8

形成花环率的高低可表示血细胞粘附异物细胞的能力,多糖能够增强中国对虾血细胞的粘附能力。

2.3 多糖对中国对虾血清中一些酶活性的影响

与体液免疫相关的溶菌酶、SOD、酚氧化酶活力测定结果见表 3。

表 3 多糖对中国对虾血清中一些酶活性的影响

Table 3 Effects of polysaccharide on activities of some enzymes in serum of *P. chinensis*

酶种类 enzyme	组别 * group	对虾尾数 no. of cells	酶活力 activity
溶菌酶 lysozyme	1	10	0.014
	2	10	0.024
	3	10	0.028
超氧化物歧化酶 superoxide dismutase	1	10	118 * *
	2	10	204 * *
	3	10	239 * *
酚氧化酶 phenoloxidase	1	10	4.00
	2	10	4.50
	3	10	4.25

* 1. 对照组 control; 2. PV911; 3. CP; * * 酶比活性,即 U/mg 蛋白 specific enzyme activity, U/mg protein.

3 讨论

3.1 海藻多糖和真菌多糖对免疫功能的影响已在高等生物中进行过试验,证明了其对特异性免疫和非特异性免疫的增强作用。本实验结果表明,这 2 种多糖对中国对虾的非特异性免疫功能有较明显的影响。因此,可以考虑用一些免疫增强剂等与免疫

有关的因素来增强对虾的免疫力。饲养过程中,试验组的死亡率明显低于对照组,表明了试验因素对试验组对虾的抗逆性有一定影响,有关作用机制尚待进一步研究。

3.2 目前,还没有一套准确测定对虾血细胞吞噬功能的方法,本试验中采用的 TTC 法和花环法对对虾体内吞噬细胞的吞噬活性的测定重复性好、操作简单。吞噬过程在体内进行,能比较真实地反映吞噬细胞的活性。实验证明,同样条件下,体内吞噬率高于体外,本实验对照组的体外吞噬率结果约为 10%,这是由体外细胞的活性降低和环境条件的差别所致。有关对虾体外吞噬细胞吞噬能力的测定方法和条件尚待进一步研究。

3.3 免疫花环的形成和特异性抗体有关,也与血细胞对异物的粘附性有关,对虾在这方面的相互作用机制还需进一步研究,但无论是特异性的,还是非特异性的,都代表了识别异物的能力和吞噬细胞的活性。这种形成花环的血细胞与吞噬 TTC 的细胞是同一种细胞,故可作一检测指标。

3.4 因甲壳类的血细胞至今无系统的分类方法,所以本实验中测定的中国对虾血细胞的吞噬率和形成

花环率均为全血细胞计数,而高等生物的吞噬率计数的是吞噬细胞数,因此吞噬率比较高。

参 考 文 献

- 1 王雷,李光友.口服免疫药物对中国对虾病害防治作用的研究.海洋与湖沼,1994,25(5):486~490
- 2 王雷,李光友,毛远兴.中国对虾血淋巴中的抗菌,溶菌活力与酚氧化物酶活力的测定及其特性研究.海洋与湖沼,1995,26(2):179~185
- 3 王文涛.海藻硫酸多糖对小鼠淋巴细胞增殖反应及白细胞介素 2 产生的影响.中药理学通讯,1992,3:47~50
- 4 林培英.两种人工虫草菌丝体对免疫功能的影响.中药药理与临床,1989,5(1):39~41
- 5 藏其中.虫草多糖的药理作用.中草药,1985,16(7):306~309
- 6 全国中等卫生学校适用教材(微生物学及检验技术)编写组.微生物技术及检验技术.广东:广东人民出版社,1981.110~111
- 7 陈勤.抗衰老研究实验方法.北京:中国医药科技出版社,1996.369~428
- 8 陈奇.中药药理实验方法.北京:人民卫生出版社,1994.239~240
- 9 Smith D M, Dall W. Blood protein, blood volume and extracellular space relationship in two *Penaeus* spp. J Exp Mar Biol Ecol, 1982, 63:1~15

Effects of polysaccharides on immunological activities of *Penaeus chinensis*

Jiang Xiaolu Liu Shuqing Zhang Zhaohui Guan Huashi

(Fisheries College, Ocean University of Qingdao, 166003)

Abstract *Penaeus chinensis* were fed with the diet containing alga polysaccharide PV911 and Cordyceps militaris polysaccharide (CP) for 20 d. The results show that PV911 and CP can significantly enhance the phagocytic activity of blood cells, the potency of SOD and phenoloxidase in the serum of *P. chinensis*, and obviously promote the phagocytic rate of phagocytic cells, slightly improve the lysozyme activity. All those indicate that polysaccharide with biological activity can stimulate the improvement of immune function in *P. chinensis*.

Key words polysaccharide, *Penaeus chinensis*, phagocytic activity, body liquid immunology