

## 中国对虾血细胞吞噬功能的研究\*

杜爱芳 蔡渭明 于 涟

(浙江农业大学, 杭州 310029)

**摘 要** 本研究建立了检测中国对虾血细胞吞噬功能的吖啶橙检测法。该检测法可同时直观地观察中国对虾血细胞对金黄色葡萄球菌的吞噬和杀伤情况;一项试验可同时获得吞噬和杀伤百分率,吞噬和杀伤指数四个指标。用本法研究四种免疫增强剂对对虾血细胞吞噬功能的作用,结果表明,他们均可提高血细胞对金葡萄的吞噬活力以及血淋巴中的溶菌活力和酚氧化酶活力,但经统计学分析,结合攻毒试验的结果,浙农I号和湖州I号的免疫效果优于湖州II号和湖州III号。

**关键词** 中国对虾,血细胞,吞噬功能,检测方法,免疫增强剂

节肢动物和甲壳动物缺乏免疫球蛋白,然而,他们拥有一种开放循环系统,通过血细胞的吞噬、包裹、形成细胞结、凝集等作用来清除入侵的病原和外来异物<sup>[5]</sup>。但是,在以细胞免疫为主的低等甲壳动物,目前尚无可靠的、简便易行的用于评价细胞免疫功能的检测方法。本研究通过免疫增强药物的筛选,来建立吖啶橙检测法(AO),以定量检测中国对虾(*Penaeus chinensis*)血细胞的吞噬功能,为研究虾类免疫系统及其功能,以及临床上筛选免疫增强药物提供理论依据。同时,用在节肢动物中业已成熟的溶菌酶和酚氧化酶(PO)测定法,平行检测了血淋巴中的溶菌活力和酚氧化酶活力<sup>1)</sup>,以验证AO法的正确性和可靠性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 场址和概况

于1995年6~8月在浙江省海洋水产研究所养殖试验场进行中国对虾免疫试验。该场的12个虾塘,全部自然纳水,水质条件较好。选1号塘(黑鲷与对虾混养,面积10亩)搭网箱进行试验。共5个网箱,每个网箱水体为1米<sup>3</sup>,养殖体长5~6cm的对虾150尾。

#### 1.2 免疫增强药物筛选试验

**1.2.1 试验分组** 共设5个组,其中A~D组为试验组,E组为对照。将待选的4种免疫药物(湖州I、II、III号和浙农I号,均为复合中草药等生物活性制剂,分别为A、B、C、D组)

收稿日期:1996-03-01。

1) 沈锦玉等,中国对虾某些免疫指标的测定及其免疫防治初步研究,另文发表。

\* 本研究系浙江省八五攻关项目之一。在试验过程中,得到了浙江省海洋水产研究所的大力支持,谨此致谢。

按 1%、1%、1% 和 0.2% 的比例分别拌入基础饵料中, 对照组仅为基础饵料。所有饵料均制成颗粒状。

**1.2.2 药物投放** 口服给药, 每天早晚各 1 次, 每次每只网箱投料 30 克。试验开始后, 饵料量根据虾数递减情况投放, 以不留残饵为度。

**1.2.3 取样** 各组(包括对照组)投饵后的第 3 天开始取样检测, 以后每隔两天检测 1 次, 共检测 7 次。每次所取样本均供以下试验用。

**1.2.4 攻毒试验** 将从病虾肝胰脏分离的溶藻弧菌作为试验用菌。在投饵料后第 22 天(测样结束)进行攻毒试验, 细菌浓度为  $6 \times 10^5$  个/毫升, 以 0.05 毫升/尾剂量在背侧第 4、5 腹节间肌肉注射, 攻毒后随时观察并记录结果。按公式: (对照组死亡率 - 试验组死亡率) / 对照组死亡率  $\times 100\%$  计算免疫保护率。

### 1.3 血细胞吞噬活力检测

参照 Enright 和 Jeffers<sup>[3]</sup>介绍的方法进行, 试验中稍作修改。

**1.3.1 仪器和材料** 37℃ 恒温振荡培养箱, 高速台式离心机, 紫外显微镜(BHS Olympus), 分光光度计(720 型), 手掀式计数器、冰瓶、试管、离心管、移液管、移液器、载玻片、镜油等。

**1.3.2 试剂** 磷酸盐缓冲生理盐水(PBSS, 0.02M pH7.2); 生理盐水, 参照 Smith<sup>[6]</sup>生理盐水配方配制; pH7.2 0.28% AO - PBSS; 抗凝剂参照 Söderhäll<sup>[7]</sup>配方配制, 并稍作修改。

**1.3.3 培养基** 胰蛋白胍肉汤, 按常规配制。

**1.3.4 吞噬用菌株** 病原性金黄色葡萄球菌, 由本教研室提供。

#### 1.3.5 方法

(1) 吞噬用菌制备 用 PBSS 洗涤金葡菌胰蛋白胍肉汤培养物(37℃ 18 ~ 24hr), 2500rpm 离心 5 分钟, 弃上清, 重新悬浮洗涤菌体 2 次。用 25ml PBSS 悬浮菌体细胞, 620nm 分光光度计读数, 并调节菌体细胞浓度至  $10^6 \sim 10^7$  个/毫升, 其光密度值为 0.065。经平板倾注法计数, 该悬液的活菌数为  $6 \times 10^6$  个/毫升。用台盼蓝排除法证实, 制备后的细菌存活率为 98%。置细菌悬液于 4℃ 冰箱备用。

(2) 采血 注射器吸取抗凝剂 0.2ml, 从对虾头胸甲后插入心脏抽血。抽血后再加生理盐水使之与血液等量。

(3) 吞噬 在 10ml 离心管中加入 1.0ml 全血、0.5ml 细菌悬液和 0.3ml 生理盐水, 混匀后置 37℃ 振荡温育。培养后加入冷生理盐水 3ml, 混匀, 2000rpm, 离心 3 分钟, 弃上清。

(4) 染色 取上述吞噬物沉淀, 加入 1ml AO 染液, 充分混匀, 染色 1 分钟。2000rpm 离心 3 分钟, 弃上清, 用生理盐水悬浮菌体细胞, 置冰浴待检。

(5) 计数 用紫外显微镜计数 100 个细胞, 记录细胞活性(吞噬的或没有吞噬的)以及吞噬细胞内死的(红色)和活的(绿色)细菌数。

(6) 判定结果 吞噬百分率: 有吞噬作用的细胞数/被计数的细胞总数  $\times 100\%$ ; 杀伤百分率: 含杀死细菌的细胞数/被计数的细胞总数  $\times 100\%$ ; 吞噬指数: 细胞内总菌数(死菌 + 活菌)/计数 100 个细胞; 杀伤指数: 100 个细胞内死菌数/100 个细胞内总菌数(死菌 + 活菌)。检测血细胞吞噬活力时, 平行检测血淋巴中的溶菌活力和酚氧化酶活力

## 2 结果与分析

### 2.1 对虾免疫保护率 结果见表 1。

经卡方检验, 各试验组与对照组的死亡率有极显著差异( $P < 0.01$ ), 而各试验组间差异

不显著。说明各组药物均可有效地保护对虾免受溶藻弧菌病原的感染。

表 1 中国对虾免疫保护率结果

Table 1 The results of protective rate of *P. chinensis*

|                        | A     | B     | C     | D    | 对照 Control |
|------------------------|-------|-------|-------|------|------------|
| 总 数 Total              | 20    | 20    | 20    | 15   | 20         |
| 死亡数 Dead number        | 2     | 3     | 3     | 2    | 19         |
| 死亡率(%) Mortality       | 10    | 15    | 20    | 13.3 | 95         |
| 保护率(%) Protective rate | 89.47 | 84.21 | 78.95 | 86   | 0          |

## 2.2 血细胞吞噬试验

### 2.2.1 血细胞吞噬百分率 结果见表 2。

表 2 血细胞吞噬百分率

Table 2 The percent phagocytosis of *P. chinensis* hemocytes (%)

| 组别<br>Groups | 批次(Batches) |    |    |    |    |    |    | $\bar{X} \pm S\bar{X}$ | 差异显著性*<br>Statistical significance |
|--------------|-------------|----|----|----|----|----|----|------------------------|------------------------------------|
|              | 1           | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  |                        |                                    |
| A            | 64          | 72 | 79 | 81 | 82 | 81 | 82 | 77.3 ± 2.58            | a A                                |
| B            | 62          | 67 | 76 | 79 | 81 | 80 | 81 | 75.1 ± 2.87            | a A                                |
| C            | 65          | 76 | 78 | 78 | 78 | 77 | 78 | 75.7 ± 1.81            | a A                                |
| D            | 65          | 74 | 79 | 82 | 81 | 81 | 82 | 77.7 ± 2.37            | a A                                |
| 对照 Control   | 60          | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 59.9 ± 0.14            | b B                                |

\* 凡有相同标记字母,即为差异不显著;不同标记字母的,即为差异显著;小写字母表示  $\alpha = 0.05$  显著水平;大写字母表示  $\alpha = 0.01$  显著水平。下同。

从表 2 可知,各试验组的血细胞吞噬率显著高于对照组的吞噬率( $P < 0.01$ ),表明四种药物经对虾口服后,可明显地提高血细胞的吞噬能力。但四种药物提高血细胞吞噬率的能力差异不显著。

### 2.2.2 血细胞杀伤百分率 结果见表 3。

表 3 血细胞杀伤百分率

Table 3 The percent killing of *P. chinensis* hemocytes (%)

| 组别<br>Groups | 批次(Batches) |    |    |    |    |    |    | $\bar{X} \pm S\bar{X}$ | 差异显著性*<br>Statistical significance |
|--------------|-------------|----|----|----|----|----|----|------------------------|------------------------------------|
|              | 1           | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  |                        |                                    |
| A            | 56          | 66 | 70 | 73 | 73 | 72 | 72 | 68.86 ± 2.33           | a A                                |
| B            | 53          | 60 | 64 | 68 | 71 | 69 | 70 | 65.00 ± 2.47           | b A                                |
| C            | 57          | 65 | 66 | 66 | 67 | 66 | 66 | 64.71 ± 1.30           | b A                                |
| D            | 62          | 64 | 67 | 72 | 72 | 71 | 71 | 68.43 ± 1.56           | a A                                |
| 对照 Control   | 51          | 50 | 51 | 48 | 50 | 49 | 50 | 49.86 ± 0.40           | c B                                |

从表 3 可知,各试验组与对照组的杀伤率间均有极显著差异( $P < 0.01$ ),说明经各药物处理后,血细胞对金葡菌有明显的杀伤效果。在各试验组间,A、D 组的杀伤率显著高于 B、C 组( $P < 0.05$ ),提示 A、D 组药物经对虾口服后提高血细胞对金葡菌的杀伤能力优于 B、C

组。

### 2.2.3 血细胞吞噬指数 结果见表 4。

表 4 血细胞吞噬指数

Table 4 The phagocytic index of *P. chinensis* hamocytes

| 组别<br>Groups | 批次(Batches) |     |     |     |     |     |     | $\bar{X} \pm S\bar{X}$ | 差异显著性<br>Statistical significance |
|--------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------------|-----------------------------------|
|              | 1           | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   |                        |                                   |
| A            | 84          | 97  | 115 | 118 | 124 | 122 | 124 | $112 \pm 5.86$         | a A                               |
| B            | 74          | 84  | 101 | 106 | 115 | 114 | 115 | $101.3 \pm 6.18$       | b AB                              |
| C            | 82          | 94  | 101 | 102 | 103 | 101 | 102 | $97.9 \pm 2.87$        | b B                               |
| D            | 85          | 101 | 112 | 119 | 121 | 122 | 122 | $111.7 \pm 5.30$       | a A                               |
| 对照 Control   | 76          | 77  | 75  | 77  | 76  | 76  | 77  | $76.3 \pm 0.29$        | c C                               |

从表 4 可知,各试验组与对照组的吞噬指数间有极显著差异( $P < 0.01$ )。在各试验组间,A、D 组极显著地高于 C 组( $P < 0.01$ ),也显著地高于 B 组( $P < 0.05$ ),说明各组药物经对虾口服后可明显地提高血细胞的吞噬指数,而且 A、D 组药物提高血细胞吞噬指数的能力明显地好于 C 组药物,也好于 B 组药物。

### 2.2.4 血细胞杀伤指数 结果见表 5。 5

表 5 血细胞杀伤指数

Table 5 The killing index of *P. chinensis* hamocytes

| 组别<br>Groups | 批次(Batches) |       |       |       |       |       |       | $\bar{X} \pm S\bar{X}$ | 差异显著性<br>Statistical significance |
|--------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|-----------------------------------|
|              | 1           | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     |                        |                                   |
| A            | 77.38       | 83.51 | 81.74 | 83.05 | 81.45 | 81.97 | 81.45 | $81.51 \pm 0.75$       | ab A                              |
| B            | 82.43       | 82.33 | 78.22 | 81.13 | 80.87 | 80.70 | 80.87 | $81.08 \pm 0.60$       | ab A                              |
| C            | 81.71       | 84.04 | 80.20 | 80.39 | 80.58 | 80.20 | 80.39 | $81.07 \pm 0.53$       | ab A                              |
| D            | 87.06       | 83.17 | 81.25 | 81.51 | 80.99 | 80.33 | 80.15 | $82.21 \pm 0.87$       | a A                               |
| 对照 Control   | 81.58       | 77.92 | 84.00 | 76.62 | 78.95 | 78.95 | 77.92 | $79.42 \pm 2.42$       | b A                               |

从表 5 可知,D 组的杀伤指数与对照组有显著差异( $P < 0.05$ ),其余各试验组与对照组无显著差异。说明 D 组药物经对虾口服后,可明显地提高血细胞的杀伤指数,而其余各组药物则提高不明显。

## 3 讨论

**3.1 检测方法的建立** 中国对虾养殖业的迅速发展以及用免疫增强药物防治中国对虾病害的发展趋势,迫切需要了解和研究中国对虾的免疫系统及其功能状态。节肢动物和甲壳动物虽然没有免疫球蛋白,但它们可通过血细胞的作用来抵抗寄生菌的感染并排除血液循环中的异物。因此通过检测其血细胞的吞噬功能或通过检测参与防御反应、存在于血细胞或血浆中的免疫因子,可直接或间接地反映机体的免疫功能状态。在哺乳动物,用以评价细胞及其功能的免疫学技术很多,而且比较成熟完善<sup>[2,4,10,11]</sup>。在节肢动物,特别是在昆虫免疫研究中,溶菌酶活性测定已是一个成熟的测定方法。在中国对虾的免疫研究中,王雷等<sup>[1]</sup>首先应用了该测定方法。而 PO 则由于与无脊椎动物的防御反应有关而广泛用于评价

节肢动物和甲壳动物的免疫机能状态<sup>[5,8,9]</sup>。然而这些用于检测甲壳动物免疫功能的方法,均缺乏直观效果,比如无法确认血细胞是否吞噬了细菌(或异物),吞噬了多少,吞噬后是否被杀死等。本研究用 AO 法检测中国对虾血细胞的吞噬活性,在客观地展示其对金葡菌的吞噬情况和杀伤情况的同时,一项实验可同时得出吞噬和杀伤百分率,吞噬和杀伤指数 4 个不同的检测指标,从不同角度反映机体的免疫功能状态,克服了现有技术中不能同时研究吞噬作用和杀伤能力的缺陷。而且用 AO 法测得的结果与免疫保护试验的结果相一致,也与平行检测溶菌活力和 PO 活力的结果相符合,说明了 AO 法的正确性和可靠性。本研究用哺乳动物中应用的 AO 法检测中国对虾免疫功能,这在国内外迄今未见公开报道,对于以细胞免疫为主的低等甲壳动物来说具有重要意义。

**3.2 AO 法的实用意义** AO 法至少有以下两方面的实用价值。一是可直观地定量检测中国对虾血细胞的吞噬功能,为研究虾类免疫系统及其功能提供方法和理论依据。二是可用于免疫增强药物的筛选。本试验提示,所筛选的四种药物中,浙农 I 号和湖州 I 号两药物可明显地提高中国对虾的免疫功能,但需进一步扩大试验,以早日应用于生产。

#### 参 考 文 献

- [1] 王雷等, 1994. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究. 海洋与湖泊, 25(5): 486 - 491.
- [2] Anne M. D. et al., 1984. Determination of phagocytosis of <sup>32</sup>P - labeled *Staphylococcus aureus* by bovine polymorphonuclear leukocytes. Am. J. Vet. Res., 45(4): 786 - 789.
- [3] Enright F. M. and Jeffers G. W., 1984. In laboratory techniques of veterinary clinical immunology (Edited by Barta O.), PP: 58 - 65. Springfield Illinois USA
- [4] Que P. G. et al., 1967. *In vitro* bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous diseases of childhood. J. Clin. Invest, 46: 668 - 679.
- [5] Ratcliffe N. A. et al., 1985. Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances. Int. Rev. Cytol., 97: 183 - 350.
- [6] Smith V. J. and Ratcliffe N. A., 1978. Host defence reactions of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.), *in vitro*. J. Mar Biol. Assoc. U. K., 58: 367 - 379.
- [7] Söderhäll K. and Smith V. J., 1983. Separation of the hemocyte population of *Carcinus maenas* and other decapods, and prophenoloxidase distribution. Devl. Comp. Immunol., 7: 229 - 239.
- [8] Söderhäll K. and Smith V. J., 1986. In immunity in invertebrates. PP: 208 - 223. Springer Verlag, Berlin.
- [9] Söderhäll K., 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization arecognition mechanism of arthropods? Dev. Comp. Immunol. 6: 601 - 611.
- [10] Songhua Hu et al., 1992. Influence of medicinal herbs on phagocytosis by bovine neutrophils. J. Vet. Med. 39A: 593 - 599
- [11] Waltman C. et al., 1984. in laboratory techniques of veterinary clinical immunology. PP: 43 - 52. Springfield Illinois USA.

## PHAGOCYTOSIS OF *PENAEUS CHINENSIS* HAEMOCYTES

Du Aifang Cai Weiming Yu Lian  
(Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

**ABSTRACT** Acridine orange method (AO) was established to measure the phagocytic activity of *Penaeus chinensis* haemocytes. The method could be used to assay both phagocytosis and bacteria – killing simultaneously. Percent phagocytosis, percent bacteria – killing, phagocytic index and bacteria – killing index could be obtained by one observation. AO was used to assay the effects of 4 immunopotentiating products on the phagocytosis and killing of *staphylococcus aureus* by *P. chinensis* haemocytes. The results showed that the 4 products could increase the phagocytic capacity of haemocytes and phenoloxidase and bacteriolytic activities in haemolymph. Zhenong I and Huzhou I were significantly better than Huzhou II and Huzhou III in immunopotentiating activities. Bacteria challenge experiment supported the results.

**KEYWORDS** *Penaeus chinensis*, Haemocyte, Phagocytosis, Survey method, Immunopotentiator