

栉孔扇贝鳃和唇瓣过氧化物酶活性

王宜艳¹, 孙虎山¹, 孙修勤², 李光友²

(1. 烟台师范学院 生命科学学院, 山东 烟台 264025; 2. 国家海洋局 第一海洋研究所, 山东 青岛 266061)

摘要:采用组织化学、电镜细胞化学和分光光度技术对栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 鳃和唇瓣内的过氧化物酶 (EC1.11.1.7; POD) 进行研究, 以探讨扇贝的鳃和唇瓣在免疫防御中的作用。组织化学显示, 鳃轴、鳃丝和唇瓣上皮细胞均呈 POD 强阳性, 结缔组织呈弱阳性; 病毒感染后酶活力逐步增强。电镜细胞化学定位表明, 鳃和唇瓣上皮细胞内有数量和大小不等的 POD 强阳性颗粒, 阳性颗粒多为圆形, 直径为 150 ~ 220 nm; 次级溶酶体也呈 POD 强阳性; 内质网和空泡膜等细胞内膜系统以及细胞表面的微绒毛和纤毛呈 POD 弱阳性。结缔组织中部分血细胞呈 POD 强阳性。鳃轴上皮细胞内 POD 高电子密度阳性颗粒较少, 而低电子密度阳性颗粒较多; 主鳃丝上皮细胞内 POD 阳性颗粒较少, 普通鳃丝上皮细胞内 POD 高电子致密阳性颗粒和呈 POD 强阳性的次级溶酶体均较多; 唇瓣上皮细胞内 POD 阳性颗粒较鳃的略少。生化测定显示, 鳃轴的 POD 酶活力最高, 鳃丝次之, 唇瓣最低; 病毒感染 24 h 后, 各部分的酶活力均显著增强。栉孔扇贝鳃和唇瓣内大量的 POD 可在抵抗病原微生物感染方面发挥重要的作用。

关键词:栉孔扇贝; 鳃; 唇瓣; 过氧化物酶

中图分类号:Q26; Q959.215 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)06-0513-06

双壳贝类的鳃和唇瓣都具有选食和运输食物的功能^[1], 其结构上都是由一层上皮细胞中间夹着少量结缔组织组成, 并均通过外套腔直接与水环境接触, 因此鳃和唇瓣的组织尤其是上皮组织也都应具备抵抗病原微生物感染的能力。有关双壳贝类的鳃和唇瓣的研究, 多集中在其形态结构方面^[2-3], 有关其抵抗病原菌感染方面的研究尚未见报道。本研究采用组织细胞化学和生物化学方法, 对在贝类免疫防御中发挥重要作用的过氧化物酶 (POD)^[4-5]在栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 鳃和唇瓣内的活性进行了研究, 以期对贝类免疫学研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

栉孔扇贝为芝罘湾内人工养殖的 2 龄健康贝, 壳高 40 ~ 60 mm, 水族箱中暂养。每日换水 1 次, 水温 20 ~ 21 °C。实验所用病毒由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赠送, 是从胶洲湾大批量死亡期的患病栉孔扇贝体内提取的一种非包涵体球状病毒。实验所用 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 为 Fluka 公司

产品。3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 为 Sigma 公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 组织化学

切断栉孔扇贝的闭壳肌, 去掉一片贝壳, 用新鲜海水将内脏团冲洗干净, 切下一部分鳃和唇瓣, 冰冻切片, 切片厚度 8 μm。2.5% 的戊二醛液中固定 30 min。以 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (PBS) 洗 3 次, 每次 15 min。显示 POD 采用 DAB 法^[6], 作用液中 1.5 h, 以不加底物做为阴性对照。甲基绿复染, 空气干燥, 二甲苯透明, 树脂封片。光镜观察并摄影。

1.3 电镜细胞化学

取栉孔扇贝鳃和唇瓣, 在少量 0.1 mol/L PBS 配制的 2.5% 戊二醛中修块, 2.5% 戊二醛固定 30 min。0.1 mol/L 的 PBS 洗 3 次, 每次 15 min。组织块先后以 DAB 为底物的预解液和反应液 (30 °C) 孵育 30 min 和 60 min^[6]。OsO₄ 后固定, 酒精、丙酮脱水, Epon 包埋, Ultracut E 超薄切片机切片, 日立 JEM-1230X 型电子显微镜观察及摄影, 加速电压 80 kV。以不加底物做为阴性对照。

1.4 生化测定

取栉孔扇贝的鳃轴、鳃丝和唇瓣各 1 g, 各加

收稿日期: 2004-01-06; 修订日期: 2004-03-22。

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (G1999012005); 山东省中青年学术骨干资助项目。

作者简介: 王宜艳 (1964-), 女, 副教授, 主要从事无脊椎动物免疫学研究。E-mail: yiyangwang@163.com

5 mL预冷的(4℃)2% NaCl,玻璃匀浆器放冰块上匀浆,4 500 r/min的转速离心10 min,取上清液用于酶活力的测定。POD活力的测定采用Andrews等^[7]的方法。TMB为底物。作用条件:pH 6.8, 37℃。酶活力单位定义为:每毫克蛋白每分钟使655 nm下的OD值增加0.001作为1个酶活力单位(U)。

1.5 病毒感染

选健壮无损伤的栉孔扇贝50只,随机分成实验组和对照组,每组25只,分别养于室内水族箱中,水温18~20℃,每天换水一次。取经分离纯化的球状病毒上清液,用2%氯化钠溶液稀释100倍,按每个个体注射100 μL的剂量用微量进样器从栉孔扇贝闭壳肌后背缘注射,对照组注射等量的2%氯化钠溶液。分别于6 h、24 h和72 h时取鳃和唇瓣进行冰冻切片用于POD的组织化学显示。另于24 h时取鳃和唇瓣匀浆用于POD的生化测定。

1.6 蛋白含量测定和数据处理

蛋白含量的测定采用Lowry等^[8]的Folin-酚试剂法,以牛血清蛋白为标准蛋白。生化测定实验结果统计处理采用*t*检验。

2 结果

2.1 组织化学定位

栉孔扇贝的鳃为丝鳃型,新月形,位于内脏囊的两侧,前端从唇瓣末端开始,向后一直延伸到肛门稍后的地方。每一侧的鳃又分为内外两瓣,每一鳃瓣由许多并列的、与鳃轴垂直的鳃丝组成。POD在鳃轴上皮细胞中呈强阳性反应(+++),而结缔组织呈弱阳性(+)(图版I-1)。部分较细的普通鳃丝的上皮细胞呈POD强阳性(+++),大部分鳃丝呈阳性(++)或弱阳性(+),较粗的主鳃丝内的结缔组织呈弱阳性(+)(图版I-2);并且POD在近鳃轴的鳃丝基部阳性较强,随着鳃丝离开鳃轴距离的增大,其酶活性减弱。

唇瓣位于口唇的外侧,鳃的前方,左右各有内外唇瓣一对,内外唇瓣相对的一面,具有以口角为圆心的同心弧状沟和嵴,其向外的一面平滑而无沟嵴。POD在唇瓣的上皮细胞中均呈强阳性反应(+++),在其下的结缔组织中呈弱阳性(+)。在近口角唇瓣基部的上皮细胞酶活性更强,且酶的分布由外向内逐渐减少(图版I-3)。内外唇瓣相对一面沟嵴处上皮细胞的酶活性较平滑面上皮细胞的酶活性

强,结缔组织内的血细胞也呈POD强阳性(图版I-4)。

感染病毒的扇贝于6 h开始即出现染病症状,并逐渐加重。闭壳肌开闭无力,对外界刺激反应迟钝;外套膜无光泽,外套膜附着肌与贝壳脱离,整个外套膜向壳顶方向收缩;足丝易脱落;24 h后感染严重的个体鳃丝开始糜烂,并陆续死亡。组织化学显示POD,鳃和唇瓣中POD的分布位置与正常个体基本一致,但由6 h、24 h再到72 h随着病毒感染时间的延长,阳性部位的颜色逐步加深,由棕色到深棕色再到黑色,尤其外上皮的变化比较明显,说明酶活力逐步增强。

2.2 电镜细胞化学定位

透射电镜观察显示,栉孔扇贝鳃和唇瓣的上皮细胞均呈POD强阳性,结缔组织中则仅有部分血细胞呈POD强阳性。上皮细胞的胞质中均有数量和大小不等的POD强阳性颗粒,阳性颗粒多为圆形,直径为150~220 nm,少数形状不规则。颗粒的电子密度有密有疏,同一个颗粒的电子密度一般是一致的。次级溶酶体也呈POD强阳性,且大小、形状和电子密度差别较大。内质网和空泡膜等细胞内膜系统以及细胞表面的微绒毛和纤毛呈POD弱阳性。分布于线粒体内膜及嵴的细胞色素氧化酶也可利用DAB作为底物,虽经PBS长时间冲洗,也未能使内源细胞色素C完全流失,因此线粒体也呈POD强阳性。

鳃轴上皮细胞内POD高电子密度阳性颗粒较少,而低电子密度阳性颗粒较多,且后者多分布在近外缘的细胞质中;空泡较多,微绒毛和纤毛丰富(图版I-5)。线粒体丰富,嵴较少(图版I-6)。

主鳃丝上皮细胞内POD阳性颗粒较少,线粒体、微绒毛和纤毛均丰富(图版I-7)。普通鳃丝上皮细胞内POD高电子致密阳性颗粒较多(图版I-8、10),呈POD强阳性的次级溶酶体也较多,一个溶酶体内常有多块不规则的高电子密度颗粒,空泡、微绒毛和纤毛也很丰富(图版I-8);线粒体丰富,并且其内的嵴也丰富(图版I-9)。

唇瓣上皮细胞内POD阳性颗粒较鳃的略少,空泡、微绒毛和纤毛也很丰富,但微绒毛和纤毛POD阳性较鳃的强,且其基部即细胞外表面常有大量呈POD强阳性的小颗粒(图版I-11),细胞内也有少量呈POD强阳性的溶酶体(图版I-12)。

2.3 生化测定结果

栉孔扇贝鳃和唇瓣 POD 生化测定结果见表 1。由表 1 可以看出,鳃轴的酶活力最高,鳃丝次之,唇瓣最低,酶活力分别为:111.98 U、74.40 U 和 41.38

U。病毒感染 24 h 时,鳃轴、鳃丝和唇瓣的 POD 活力均高于对照组, t 检验时均为 $P < 0.01$,均差异极显著。

表 1 栉孔扇贝鳃和唇瓣中 POD 活力*

Table 1 Peroxidase activity in gill and labial palps of scallop *Chlamys farreri**

$\bar{X} \pm SE$

器官 Organ	正常个体 POD 活力 U Activity of POD in normal scallop	病毒感染实验 POD 活力 U Activity of POD in scallop after injection with viruses	
		对照组 Control	实验组 Experiment
鳃轴 Branchial axis	111.98 $\pm$ 2.17	132.67 $\pm$ 7.33	216.12 $\pm$ 13.23
鳃丝 Branchial filaments	74.40 $\pm$ 4.12	81.32 $\pm$ 2.55	135.45 $\pm$ 8.27
唇瓣 Labial palps	41.38 $\pm$ 3.15	45.78 $\pm$ 2.94	79.38 $\pm$ 5.16

* pH 6.8, 37 °C; n = 5

3 讨论

3.1 POD 组织细胞化学定位

本研究用电镜细胞化学技术显示栉孔扇贝鳃和唇瓣内的 POD,呈强阳性的小颗粒与孙虎山等^[5]在栉孔扇贝血细胞中见到的直径 130 ~ 200 nm 的阳性颗粒大小基本一致,而比 Coles 等^[9]在显示贻贝血细胞 POD 时发现的大小两种阳性颗粒略小一些。从形态、大小及内容物性质分析,应属于过氧化物酶体^[10]。POD 还定位于次级溶酶体中,与高等动物细胞溶酶体内含有 POD 相似^[6]。与过氧化物酶体及溶酶体形成有关的内质网、高尔基体甚至核膜和小空泡膜等膜系统也呈 POD 弱阳性,说明了过氧化物酶体、溶酶体和膜系统之间是紧密联系的。

3.2 贝类鳃和唇瓣 POD 的免疫防御作用

POD 是动物体内参与非特异性免疫的一种重要的氧化酶。Anderson^[11]研究表明,贝类血细胞内的 POD 与 H₂O₂ 和卤化物 (Cl⁻、Br⁻ 等) 似高等动物,组成了一个抗细菌及其他微生物的强有力的体系, H₂O₂ 的杀菌作用可因 POD 和卤化物的存在而极大的加强,并产生杀菌作用更强的次氯酸。孙虎山等^[5, 12]证实此抗菌体系也存在于栉孔扇贝体内。本研究表明栉孔扇贝鳃和唇瓣表皮细胞及结缔组织内的血细胞均存在 POD,表皮细胞内的 POD 也应具有类似的抗菌杀菌功能。贝类的鳃和唇瓣直接以表皮细胞的质膜与外界接触,本身必须具备抵抗病

原体感染的能力,本研究通过组织化学的方法显示贝类体内凡是与外界接触的部位,均呈现强阳性反应,并且着色深浅与这些部位与外界接触的程度呈正向变化,尤其是病毒感染后 POD 活力明显增强,这说明,POD 等酶参与形成了贝类的一道天然防线,起着“门户”的作用,将外界的病原微生物在组织的表层内即被清除,以免其侵入内部。本研究还观察到鳃和唇瓣上皮细胞外表面常有大量呈 POD 强阳性的小颗粒,说明其上皮细胞内的 POD 可向体外分泌,成为体表粘液层的重要组成部分,从而成为贝类抗感染的第一道屏障。已有的研究表明,贝类体内仅有少部分血细胞存在 POD,而鳃和唇瓣表皮细胞中 POD 含量很大,表皮细胞内的 POD 是否会释放到为开管式循环的贝类的血淋巴中在体内发挥作用,还有待于进行深入研究。

参考文献:

- [1] 蔡英亚,张英,魏若飞.贝类学概论[M].上海:上海科学技术出版社,1995:57-111.
- [2] 邓道贵,李瑞芝.褶纹冠蚌鳃的组织学和扫描电镜观察[J].水产学报,2002,26(4):301-306.
- [3] 绳秀珍,王德秀,任素莲,等.栉孔扇贝和太平洋牡蛎的唇瓣结构[J].中国水产科学,2001,8(1):15-17.
- [4] Schlenk D, Martinez P G, Livingstone D R. Studies on myeloperoxidase activity in the common mussel, *Mytilus edulis* L.[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1991, 99C: 63-68.
- [5] 孙虎山,李光友.栉孔扇贝血淋巴中酚氧化酶和髓过氧化物酶活性[J].中国水产科学,1999,6(2):9-13.

- [6] Okun M R, Edelstein M L, Hamada O N G, et al. Histochemical differentiation peroxidase-mediated from tyrosinase-mediate formation in mammalian tissue[J]. *Histochemie*, 1970, 23: 295 – 309.
- [7] Andrews P C, Krinsky N I. Quantitative determination of myeloperoxidase using tetramethylbenzidine as substrate[J]. *Anal Biochem*, 1982, 127: 346 – 350.
- [8] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L. Protein measurement with the Forlin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 93: 265 – 275.
- [9] Coles J A, Pipe R K. Phenoloxidase acting the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1994, 4: 337 – 352.
- [10] Pipe R K, Livingstone D R. Antioxidant enzymes associated with the blood cell, and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1993, 3: 221 – 233.
- [11] Anderson R S. Hemocyte derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusca[J]. *Dev Comp Immunol*, 1994, 18: 89 – 96.
- [12] 孙虎山, 李光友. 免疫多糖对栉孔扇贝血淋巴中氧化酶活力的影响[J]. *高技术通讯*, 2001, 11(5): 10 – 12.

Peroxidase activity in gill and labial palps of scallop *Chlamys farreri*

WANG Yi-yan¹, SUN Hu-shan¹, SUN Xiu-qin², LI Guang-you²

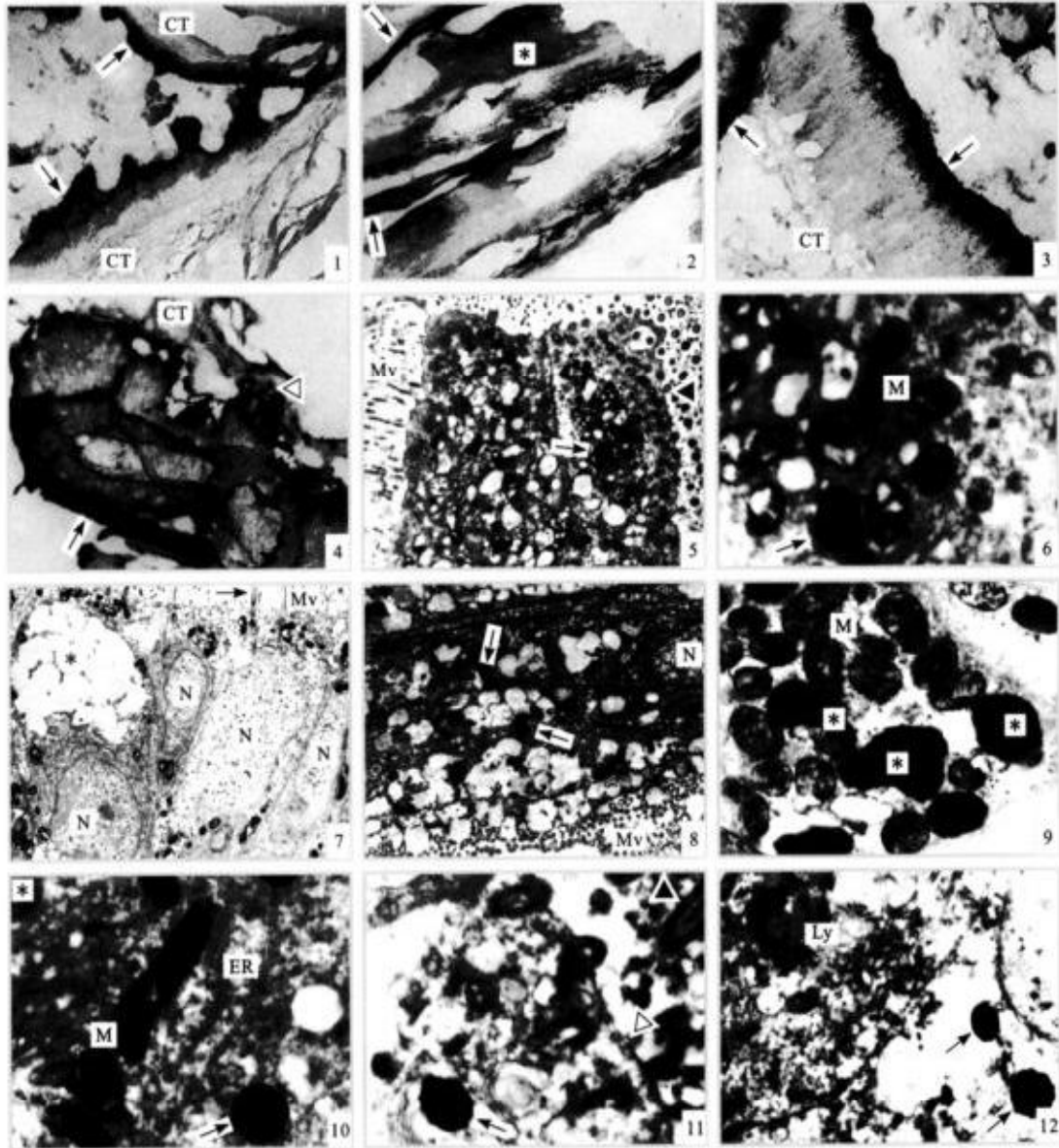
(1. College of Life Science, Yantai Normal University, Yantai 264025, China; 2. First Institute of Oceanography, State Ocean Administration, Qingdao 266061, China)

Abstract: The peroxidase (EC1.11.1.7, POD) in gill and labial palps of scallop *Chlamys farreri* were studied with histochemical, cytochemical and spectrophotometric method. The aim of this study was to probe into the role of gill and labial palps in immunological defense of scallop. The results of histochemical localization showed that all of the epithelial cells of branchial axis, branchial filaments and labial palps presented strong POD positivity; the connective tissue of branchial axis, branchial filaments and labial palps presented weakly positive to POD. The results of cytochemical localization under electron microscope were as follows: POD-strong positive granules were found in cytoplasm of epithelial cells in the gill and the labial palps; the number and the size of POD-strong positive granules in the epithelial cells were not alike; most granules were round with 150 – 220 nm in diameter. Secondary lysosomes presented strong POD positivity too. Endomembrane system such as endoplasmic reticulum, vacuole membrane presented weakly positive of POD. Cilia and microvilli on the surface of the epithelial cells in the gill and the labial palps presented weakly positive of POD. Part of blood cells in connective tissue presented strong POD positivity. The number of POD positive granules with high electron density was fewer than the number of POD positive granules with low electron density in the epithelial cells of branchial axis. POD positive granules in the epithelial cells of main gill filaments were not rich. POD positive granules with high electron density in the epithelial cells of ordinary gill filaments were rich. Secondary lysosomes which present strong POD positivity in the epithelial cells of ordinary gill filaments were rich too. The number of POD positive granules in the epithelial cells of labial palps was fewer than in the gill. The enzyme activity of POD in the tissue of branchial axis, branchial filaments and the labial palps were assayed by biochemical test. The POD activities in the tissue of branchial axis, branchial filaments and labial palps were respectively 111.98 U, 74.40 U and 41.38 U (pH 6.8, 37 °C). The levels of POD activity was the highest in branchial axis and was the lowest in the labial palps. After injection with the viruses, the POD activities of experimental groups in gill and labial palps at 24 h were higher than that of control groups. The results of POD determinations suggest that POD in the gill and the labial palps may play an important role in protection from pathogens in *Chlamys farreri*.

Key words: *Chlamys farreri*; gill; labial palps; peroxidase

王宜艳等:栉孔扇贝鳃和唇瓣过氧化物酶活性

WANG Yi-yan et al: Peroxidase activity in gill and labial palps of scallop *Chlamys farreri*



图版 I 栉孔扇贝鳃和唇瓣过氧化物酶细胞化学定位

Plate I Cytochemical localization of peroxidase in gill
and labial palps of *Chlamys farreri*

(图版 I 说明见下页 The explanation of Plate I at the next page)

图版 I 说明

1. POD 强阳性鳃轴上皮(↑). × 250.
2. POD 阳性普通鳃丝(↑)和主鳃丝(*). × 250.
3. POD 强阳性唇瓣基部上皮(↑). × 250.
4. POD 强阳性唇瓣沟嵴处上皮(↑)和血细胞(△). × 250.
5. 鳃轴上皮细胞, 示 POD 阳性颗粒(↑)和纤毛(▲). × 5 000.
6. 鳃轴上皮细胞内 POD 阳性颗粒(↑). × 20 000.
7. 主鳃丝上皮细胞, 示纤毛(↑)和分泌细胞(*). × 3 000.
8. 普通鳃丝上皮细胞内 POD 阳性颗粒(↑). × 5 000.
9. 普通鳃丝上皮细胞, 示 POD 阳性颗粒(*). × 12 000.
10. 普通鳃丝上皮细胞, 示 POD 阳性低电子密度颗粒(*)和高电子密度颗粒(↑). × 12 000.
11. 唇瓣上皮细胞, 示 POD 阳性颗粒(↑), 纤毛(▲)和细胞外 POD 阳性小颗粒(△). × 20 000.
12. 唇瓣上皮细胞内 POD 阳性颗粒(↑). × 10 000.

CT - 结缔组织, ER - 内质网, Ly - 溶酶体, M - 线粒体, Mv - 微绒毛, N - 细胞核.

Explanation of Plate I

1. POD strong positive epithelia (↑) of branchial axis. × 250.
2. POD positive ordinary gill filaments (↑) and main gill filaments (*). × 250.
3. POD strong positive epithelia (↑) of the base of labial palps. × 250.
4. POD strong positive epithelia (↑) of the groove of labial palps and blood cells (△). × 250.
5. POD positive granules (↑) and cilia (▲) in epithelial cells of branchial axis. × 5 000.
6. POD positive granules (↑) in epithelial cells of branchial axis. × 20 000.
7. Cilia (↑) and secreting cell (*) in epithelial cells of main gill filaments. × 3 000.
8. POD positive granules (↑) in epithelial cells of ordinary gill filaments. × 5 000.
9. POD positive granules (*) in epithelial cells of ordinary gill filaments. × 12 000.
10. POD positive granules with low electron density (*) and POD positive granules with high electron density (↑) in epithelial cells of ordinary gill filaments. × 12 000.
11. POD positive granules (↑), cilia (▲) and extracellular POD small positive granules (△) in epithelial cells of labial palps. × 20 000.
12. POD positive granules (↑) in epithelial cells of labial palps. × 10 000.

CT - connective tissue, ER - endoplasmic reticulum, Ly - lysosome, M - mitochondrion, Mv - microvilli, N - nucleus.