

·研究简报·

病毒感染后杂色鲍部分血清免疫因子的变化

王江勇^{1,2}, 郭志勋¹, 冯娟¹, 潘金培², 陈毕生¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300; 2. 中国科学院南海海洋研究所, 广东广州 510301)

摘要:对杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve)进行病毒悬液和 PBS(对照)注射感染, 研究其血清免疫因子 SOD、ACP、AKP、MPO 活性的变化, 并对实验结果进行统计学分析。结果表明, (1)注射病毒悬液组 SOD 活性变化为逐渐上升, 至 8 h 后达到最高点, 然后逐渐下降; 对照组 SOD 活力呈下降趋势, 8 h 后上升, 12 h 后恢复至初始水平, 二者结果差异均为显著或极显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 (2)注射病毒悬液组 ACP 与 AKP 活性的变化为: 36 h 前变化不大, 48 h 后明显上升; 对照组 ACP 和 AKP 活性变化不大, 二者结果除了第 48 小时外, 差异均不显著($P > 0.05$)。 (3)注射病毒悬液组 MPO 活性在第 1 小时内上升, 然后逐渐下降, 第 8 小时下降到最低点, 随后逐渐上升; 对照组在第 1 小时内下降, 然后逐渐上升, 第 12 小时升至最高点, 然后逐渐下降, 48 h 后与正常鲍活性基本一致。t 检验显示, 这两组结果在第 1、4、8、24、36、48 h 差异显著或极显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 在第 2、12 小时差异不显著。结果显示, 在人工感染病毒 48 h 内, 杂色鲍体内的免疫因子发生了明显的变化, 血清中 SOD 活性降低, ACP 及 AKP 活性显著升高, MPO 活性显著升高。

关键词:病毒感染; 超氧化物歧化酶; 酸性磷酸酶; 碱性磷酸酶; 髓性过氧化物酶; 杂色鲍

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)03-0344-04

杂色鲍(*Haliotis diversicolor* Reeve)在集约式、高密度、工厂化养殖过程中发生的流行性鲍病^[1-3], 使许多养殖场遭受了重大经济损失, 如 1999~2000 年, 福建、广东等地多个养殖场鲍鱼相继暴发病毒性疾病, 直接经济损失过亿元。世界上对鲍类病毒病的报道较少, Otsu 等^[4]利用电镜观察到患病鲍(*Haliotis discus discus*)神经干附近的细胞质中存在类病毒粒子。Nakatsugawa 等^[5]从患病鲍鲍初级培养的血细胞中分离到与反转录病毒形状和大小类似的病毒粒子。李霞等^[6]在患“裂壳病”的皱纹盘鲍(*H. discus haianus*)中发现一种球状病毒, 王江勇等^[7]报道了杂色鲍中有类似但个体较大的病毒。以前的研究主要针对病害的发生机理、流行特征以及防治方法, 较少涉及免疫反应机理。国外对海水贝类有关方面的研究主要集中在贻贝(*Mytilus edulis*)、美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)、太平洋牡蛎(*C. gigas*)、蛤类(*Ruditapes decussatus*)的免疫机理的研究^[8-14], 国内有关报道主要集中于免疫促进剂对贝类酶活性的影响^[15-16], 而对疾病感染和免疫因子的关系研究较少, 也有学者^[17-19]利用细菌注射鲍后, 研究其血淋巴中免疫因子的变化。

本实验利用杂色鲍为材料进行病毒人工感染后, 研究其血清中超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷

酸酶(AKP)、髓性过氧化物酶(MPO)等部分免疫因子的变化, 探讨病毒和鲍免疫系统间的相互作用关系, 以期为鲍病的免疫防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品

健康杂色鲍于 2004 年取自从未发过病的广东省潮阳兴业养殖有限公司, 壳长 4~6 cm。病鲍于 2002~2003 年取自广东省汕尾市发生暴发性流行病的几个养殖场, 壳长 4~6 cm, 保存于 -70℃ 冰箱中。

1.2 病毒悬液的制备

常规解剖病鲍, 取内脏软组织部分, 剪碎后, 置组织匀浆器中 4℃ 研磨适度, 加入 pH7.6 的 PBS, 在冷冻离心机中 4℃ 以 5 000 r/min 离心 15 min, 弃沉淀, 上清液以 8 000 r/min 离心 30 min, 弃沉淀, 上清液加入双抗溶液(青霉素+链霉素), 终浓度皆为 1 000 U/mL, 0.22 μm 细菌过滤器过滤, 滤液为病毒悬液。

1.3 人工注射感染

用微量注射器, 从足肌分别注射病毒悬液, 共 150 健康鲍, 注射剂量为 0.1 mL/只。另用等剂量的 PBS 注射健康鲍

收稿日期: 2004-07-01; 修订日期: 2004-12-02。

基金项目: 广东省省科技厅重大招标项目资助(2K305301N)。

作者简介: 王江勇(1971-), 男, 硕士, 主要从事海水生物病害研究工作, E-mail: wjy606@scba.com

通讯作者: 陈毕生, E-mail: chenbs309@163.com

150只,作为对照组。两组鲍饲养于10个具内循环装置的玻璃缸内,充气,水温为20℃。

1.4 取样

注射后1 h、4 h、8 h、12 h、24 h、36 h、48 h,分别取15只鲍,用腹足创伤法分别收集血淋巴于1.5 mL 无菌 eppendorf 管中。将血淋巴以5 000 r/min、4℃离心10 min,去沉淀,上层血清保存于-70℃冰箱中备用。

1.5 免疫指标的测定

AKP、ACP、SOD、MPO的活性测定均采用江苏省南京建成生物研究所生产的试剂盒,具体测定方法参考说明书进行。

1.5.1 SOD 活性 采用黄嘌呤氧化酶法测定,SOD活性定义:每毫升反应液中SOD抑制率达50.0%时所对应的SOD量为一个SOD活力单位(U)。

1.5.2 AKP 和 ACP 活性 按照磷酸苯二钠法测定,AKP活性定义:100 mL血清在37℃条件下与基质作用15 min产生1 mg 酚为1个金氏单位;ACP活性定义:100 mL血清在37℃条件下与基质作用30 min产生1 mg 酚为1个金氏单位。

1.5.3 MPO 活性 采用连菌香胺法测定,MPO活性定义:每毫升血清在37℃的反应体系中 H_2O_2 被分解1 μ mol为1个酶活力单位。

1.6 数据处理

将每个时间点15只试验鲍的测量数据求平均数,得出每个时间点的免疫指标值。对注射病毒悬液组与对照组进行不同方差的两组均值是否相等的 t 检验,得出结果。

2 结果与分析

2.1 杂色鲍人工感染后外观症状的变化

实验鲍在注射病毒悬液后24 h内,从外观上看不出任何变化,附着有力、运动正常,对外界的刺激反应敏感,36 h后,在玻璃缸内出现少量泡沫,48 h后,出现大量泡沫,鲍的反应迟钝,附着不稳,很容易从缸壁上剥离下来。

在整个实验周期内,对照组(注射PBS)的鲍外观、活力均正常,缸内水质清洁,未出现泡沫。

2.2 血清中SOD的变化

用病毒悬液感染杂色鲍后,其血清中的SOD逐渐上升(图1),至第8小时,达到最高点,然后逐渐下降,在第24小时到第36小时之间,下降最快,第36小时至第48小时,SOD活性变化不大。36 h后,玻璃缸中出现少量泡沫,注射病毒悬液的鲍在52 h(未取样)后基本处于濒死。而注射PBS的鲍,其SOD值呈下降趋势,至第8小时突然上升,第12小时下降至正常水平,12 h后基本趋于平缓,回复到注射前水平。 t 检验显示注射病毒悬液和注射PBS组的SOD结果差异均为显著或极显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.3 血清中ACP活性的变化

注射病毒悬液的鲍ACP活性先有所下降(图2),第4小时上升,第8小时后下降,以后呈逐步上升趋势,在鲍死亡前

几小时内,ACP活性大幅度上升,接近正常水平的3倍。注射PBS的鲍ACP活性比较稳定,在第8小时有所升高(为5.35 U/mg), t 检验显示48 h后两组结果差异显著($P<0.05$),其他时间差异不显著($P>0.05$)。

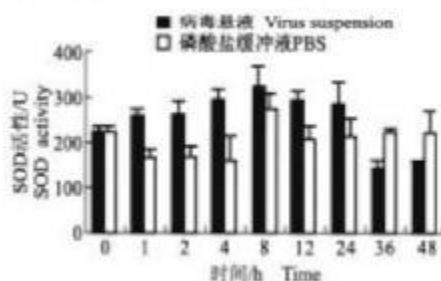


图1 注射病毒悬液和PBS后SOD活性的变化
Fig.1 Changes of SOD activity in serum after challenged by virus and PBS

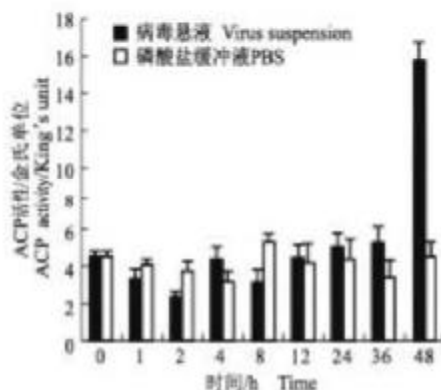


图2 注射病毒悬液和PBS后ACP活性的变化
Fig.2 Changes of ACP activity in serum after challenged by virus and PBS

2.4 血清中AKP活性的变化

注射病毒悬液的鲍在第1、2小时,AKP活性逐渐下降(图3),第4小时后突然升高,第8小时又下降,以后逐渐上升,48 h后为正常鲍的3倍左右;而注射PBS的鲍ACP活性,在24 h内变化不大,之后逐渐上升, t 检验显示在4 h后两组结果差异显著($P<0.05$),其余时间这两组结果差异不显著($P>0.05$)。

2.5 血清中MPO活性的变化

注射病毒悬液的鲍MPO活性在第1小时上升(图4),然后慢慢下降,第8小时下降到最低点,然后逐渐上升,第48小时达最高值。注射PBS的鲍MPO活性变化正好与实验组相反,在第1小时下降,然后逐渐上升,第12小时升至最高点,然后逐渐下降,第48小时与正常鲍活性基本一致。 t 检验显示这两组结果在第1、4、8、24、36、48小时差异显著或极显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$),在第2、12小时差异不显著($P>0.05$)。

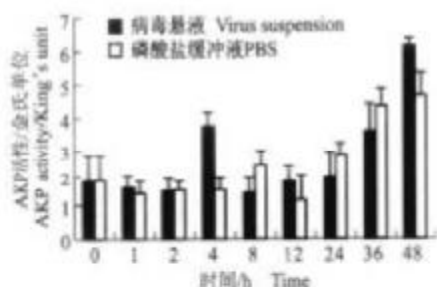


图3 注射病毒悬液和 PBS 后 AKP 活性的变化

Fig.3 Changes of AKP activity in serum after challenged by virus and PBS

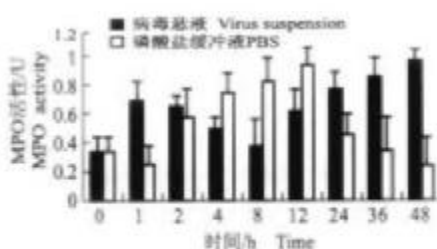


图4 注射病毒悬液和 PBS 后 MPO 活性的变化

Fig.4 Changes of MPO activity in serum after challenged by virus and PBS

3 讨论

由于不具有特异性免疫系统,无脊椎动物不能像脊椎动物一样利用事先接触抗原而受到保护。

然而无脊椎动物的出现早于脊椎动物,所以从它们的长期存在来看,它们必须拥有一个有效的防御系统,即先天的、非特异性的免疫系统。无脊椎动物可以通过血细胞等细胞因子以及多种体液免疫因子的共同作用,用来对付异物的入侵^[6]。

鲍在病毒感染后 24 h 内,从外观上看不出任何变化;36 h 后,在玻璃缸内出现少量泡沫,说明鲍体内某些器官组织对病毒侵袭产生了病理性的损伤反应;48 h 后,出现大量泡沫,这个时候血淋巴量大大减少。而对对照组的鲍外观、活力均正常。鲍体内的免疫反应是从异物一侵入就开始,其免疫因子的变化也是从此时开始的。至 36 h 出现泡沫,说明病毒已经突破了鲍的防御体系—非特异性免疫系统的保护,而引发致病症状。

丁秀云等^[17]对皱纹盘鲍血淋巴中的 SOD 活力进行检测,发现皱纹盘鲍在注射细菌后,SOD 活力降低。王淑红等^[18]利用弧菌感染杂色鲍也发现 SOD 活性显著降低,牟海津等^[15]用免疫多糖对栉孔扇贝进行注射刺激后,其血清中的 SOD 活性显著提高。本实验中,杂色鲍在注射病毒悬液后,8 h 内,SOD 活性从初始水平(222.96)升至最高(321.08),然后逐渐降低,至第 48 小时降至最低(低于初始水平)。在正常情况下,SOD 清除活性氧自由基,保护动物

免受自由基伤害;当注射病毒悬液后,在病毒的诱导下产生大量的自由基,SOD 酶活性也在自由基的诱导下随之升高,以清除过量的自由基,因此在注射后出现了酶活性逐渐升高,但鲍在清除病毒的过程中产生大量的自由基,清除自由基对 SOD 的消耗超过了鲍的生产能力,因此酶活性又逐渐下降。对照组的 SOD 活性变化恰恰相反,PBS 进入体内后刺激血细胞,使得 SOD 的活性水平出现上升,而由于 PBS 对鲍基本没有毒性,最后又降至初始水平。

牟海津等^[15]用免疫多糖对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)进行注射刺激后,其血清中的 AKP,AKP 活性显著提高,王淑红等^[18]利用弧菌注射杂色鲍后,其 AKP 活性在 24 h 时显著提高。本实验中,注射病毒悬液组组的 AKP 活性在第 1 小时至第 36 小时之间没有显著变化,说明血细胞不断释放 AKP,参与病毒的清除,在血清中达到动态平衡。感染鲍没有出现肉眼可见的变化,到 48 h 后,ACP 活力突然升高,说明病毒已经感染细胞,血细胞内的溶酶体被大量释放到血清中,ACP 也随之大量进入血清中,活性相应升高,伴随感染鲍出现的临床症状为肌肉萎缩、附着不牢等。而注射 PBS 的对照组鲍血清中 AKP 活性变化不明显。

牟海津等^[15]用免疫多糖对栉孔扇贝进行注射刺激后,其血清中的 AKP 活性显著提高,王淑红等^[18]利用弧菌注射杂色鲍后,其 AKP 活性在 8 h 和 48 h 显著升高。本实验中 AKP 活性在第 4 小时(3.75)后出现明显的升高,在第 48 小时(6.11)后与初始水平(1.89)相比出现了较大幅度的升高。

MPO 是动物体内参与免疫防御的重要氧化酶^[19,20]。MPO、H₂O₂ 和卤化物组成了抗细菌及其他微生物体系,在无脊椎动物的非特异性免疫中发挥极为重要的作用。孙虎山等^[26]研究表明,免疫促进剂不仅可促进栉孔扇贝血细胞中 MPO 向血清中释放,并可促进 MPO 在血细胞内的产生,免疫多糖对栉孔扇贝血淋巴中 MPO 的活力有增强作用;王宜艳等^[20]研究发现中国对虾口服复合免疫药物后,血清中 MPO 活力明显增高。本实验结果显示,注射病毒悬液短时间(1 h)促进 MPO 大量释放入血清中,MPO 在体内参与抗病毒作用,8 h 后血清中的 MPO 活性降至最低点,随后又逐渐升高,说明病毒悬液促进了 MPO 在血细胞的生产并逐渐释放进血清中。

在养殖贝类的病害防治过程中,化学药物和抗生素的使用对环境和食品安全存在着潜在的危害,这对水产病害防治技术研究提出了更高的要求,免疫防治成为目前研究的热点之一,因此对贝类自然防御体系的认识是非常必要的。本文针对鲍病毒感染后一些免疫因子的变化进行了初步探讨,为今后杂色鲍的非特异性免疫研究以及在生产实际中应用免疫技术防治病害提供参考。

参考文献:

- [1] 宋振荣,纪荣兴,熊素芬,等.引起九孔鲍大量死亡的一种球状病毒[J].水产学报,2000,24(5):463-467.

- [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] 方 莹,黄印尧,颜江华,等.东山九孔鲍病毒病原的分离观察[J].台湾海峡,2002,21(2):199-203.
- [4] Otsu R, Suzuki K. Virus-like particles detected from juvenile abalones (*Nordotis discus discus*) reared with an epizootic fatal wasting disease [J]. Invertebrate Pathology, 1997, 70: 167-168.
- [5] Nakatsugawa T, Nagai T, Hiyu K, et al. A virus isolated from juvenile Japanese black abalone *Nordotis discus discus* affected with amyotrophy [J]. Dis Aquat Org, 1999, 36: 159-161.
- [6] 李 霞,王 斌,刘淑范,等.皱纹盘鲍“裂壳病”的病原及组织病理的研究[J].水产学报,1998,22(1):61-66.
- [7] 王江勇,陈华生,冯 娟,等.杂色鲍裂壳病球状病毒的初步观察[J].热带海洋,2000,12:63-67.
- [8] Carballal M J, Azevedo C, Villalba A. Enzyme characterization of the circulating haemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. J Invertebr Pathol, 1997, 70: 96-105.
- [9] Coles J A, Pipe R K. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis* [J]. Fish Shellfish Immunol, 1994, 4: 337-352.
- [10] Luna-Gonzalez A, Maeda-Martinez A N, Vargas-Albore F, et al. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve mollusks [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 15: 275-282.
- [11] La Peyre J F, Chaf-L E, Meyers J M. Haemocytic and humoral activities of eastern and Pacific oysters following challenge by the protozoan perkinsus marinus [J]. Fish Shellfish Immunol, 1995, 5: 179-190.
- [12] Lopez C, Carballal M J, Azevedo C, et al. differential phagocytic ability of the circulating haemocyte types of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia) [J]. Dis Aquat Org, 1997, 30(3): 209-215.
- [13] Pipe R K, Forte C, Livingstone D R. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussels *Mytilus edulis* [J]. Fish Shellfish Immunol, 1993, 3: 221-233.
- [14] Wootton E C, Pipe R K. Structural and functional characterization of the blood cells of the bivalve mollusc, *Scrobicularia plana* [J]. Fish shellfish Immunol, 2003, 15: 249-262.
- [15] 牟海津,江晓路,刘树青,等.免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响[J].青岛海洋大学学报,1999,29(3):463-468.
- [16] 孙虎山,李光友.免疫多糖对栉孔扇贝血淋巴中氧化酶活性的影响[J].高技术通讯,2001,5:10-12.
- [17] 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].海洋与湖泊,1996,27(4):362-367.
- [18] 王淑红,王艺磊,张朝霞,等.弧菌和大肠杆菌感染对杂色鲍无细胞血淋巴中几种酶活性的影响[J].中国水产科学,2004,11(1):37-40.
- [19] 周永灿.海洋贝类病害及其研究进展[J].海南大学学报自然科学版,2000,18(2):207-212.
- [20] 王宜艳,孙虎山,李光友.复合免疫药物对中国对虾血淋巴氧化酶和抗氧化酶活性的影响[J].海洋科学进展,2002,2(3):79-83.

Changes of immune factors in serum of *Haliotis diversicolor* Reeve infected by virus

WANG Jiang-yong^{1,2}, GUO Zhi-xun¹, FENG Juan¹, PAN Jin-pei², CHEN Bi-sheng¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Guangzhou 510300, China; 2. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract: The activities of SOD, ACP, AKP and MPO in serum of abalones *Haliotis diversicolor* Reeve were studied after the abalones were infected by virus at dosage of 0.1 mL/ind and PBS. The results showed that after the abalone were infected by virus, the SOD activity in serum ascended gradually, reaching culmination after 8 h, then descended gradually. SOD activity in control group (PBS) descended gradually at first, and then ascended after 8 h, descending gradually to normal level after 12 h. The statistical results showed significant difference ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). ACP and AKP activities in the serum of abalones infected by virus got a little change within 36 h, ascended significantly at 48 h, and those of control group got a little change during the experiment period. There was no significant difference between experiment trials and controls. MPO activity ascended within 1 h after the infection, then descended to nadir at 8 h, and began to ascend gradually. MPO activity in control group descended at 1 h, then ascended to culmination at 12 h, afterwards descended to normal level at 48 h. The statistical results showed there was significant difference between two groups at 1 h, 4 h, 8 h, 24 h, 36 h, 48 h, there was no significant difference between two groups at 2 h, 10 h. The results showed that immune factors changed a lot such as SOD activity which descended and the activities of ACP, AKP, and MPO which ascended at 48 h after the abalones were infected.

Key words: virus infection; SOD; ACP; AKP; MPO; *Haliotis diversicolor* Reeve

Corresponding author: CHEN Bi-sheng. E-mail: chenbs309@163.com