

栉孔扇贝血淋巴中 ACP 和 AKP 活性及其电镜细胞化学研究*

孙虎山

李光友

(烟台师范学院,烟台 264025)

(国家海洋局第一海洋研究所,青岛 266003)

摘要 用电镜细胞化学和分光光度技术对栉孔扇贝血淋巴中的酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)的研究结果表明,溶酶体呈强的 ACP 阳性;AKP 阳性颗粒常沿细胞膜分布;部分细胞 ACP 阳性颗粒较多,且靠近细胞膜,胞浆中也有分布。生化测定结果表明,血细胞和血清中均存在 ACP 和 AKP 活性,且血清中的 2 种酶的酶活力均高于血细胞中,血清中 ACP 和 AKP 的最适 pH 分别为 4.4 和 10.3,最适温度分别为 35℃ 和 55℃。

关键词 栉孔扇贝,酸性磷酸酶,碱性磷酸酶,酶活性,血淋巴

酸性磷酸酶(EC 3.1.3.2;ACP)和碱性磷酸酶(EC 3.1.3.1;AKP)是动物体内参与免疫防御等活动的 2 种重要的水解酶^[1]。对海洋双壳类 ACP 和 AKP 的研究,国外已有部分报道^[1],而国内还未见报道。有关栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)血淋巴中 2 种酶活性的研究,国内外均未见报道。本文用电镜细胞化学技术对栉孔扇贝血细胞中的 ACP 和 AKP 进行了定位定性研究,并用分光光度法对血细胞和血清中 2 种酶的活性及其部分性质进行了定量研究,以期搞清栉孔扇贝的免疫机理积累资料。

1 材料和方法

栉孔扇贝为胶州湾内人工养殖的 3 龄贝,壳长 45~55 mm,室内水族箱饲养。用 2 ml 注射器和 5 号针头从心耳或闭壳肌血窦中取血。实验所用的 β -甘油磷酸钠和二甲胂酸钠为 SIGMA 公司产品,其它试剂均为国产分析纯。

电镜细胞化学显示 ACP 采用 Gomori 法^[2],血细胞在 2.5% 戊二醛中固定 30 min,0.1 mol/L 二甲胂酸钠缓冲液洗涤 1 h,30℃ 孵育液中孵育 2 h,二甲

胂酸钠缓冲液洗 15 min,1% OsO₄ 后固定,酒精脱水,Epon 包埋,Ultracut E 型超薄切片机切片,日立 JEM-1200EX 型电子显微镜观察及摄影。加速电压 60 kV。显示 AKP 采用金属盐法^[1],孵育液中孵育 2 h 后,用 0.1 mol/L 巴比妥钠缓冲液洗 15 min,再放入 0.05 mol/L 的冷 Pb(NO₃)₂ 中处理 10 min,其它步骤与显示 ACP 步骤相同。均以孵育液中不加底物 β -甘油磷酸钠做为阴性对照。

ACP 的生化测定采用苯磷酸二钠法^[1],AKP 采用金氏法^[3]。酶活单位均采用国际单位。

血液经 3 000 r/min 离心 10 min,分离出血清用于酶活测定,所得血细胞加入与血清等量的双蒸水,溶血后 2 000 r/min 离心 10 min,取上清液用于酶活测定。蛋白含量测定采用 Lowry^[4]的福林-酚试剂法。

2 结果

2.1 ACP 和 AKP 的电镜细胞化学定位

透射电镜观察显示,血细胞内溶酶体呈强 ACP 阳性(图版 I-1,2),其形状常不规则,大小差别也较大,内有高电子密度颗粒,有的颗粒较多,几乎充满整个溶酶体;有的颗粒较少,小的圆形颗粒在溶

收稿日期:1998-10-16

* 国家攀登计划资助项目,PDB 6-6-3

体内呈不均匀分散分布。接近圆形的溶酶体,其直径为 200~400 nm。细胞质中的部分小泡及内质网呈弱 ACP 阳性,有少量阳性颗粒(图版 I-2)。

AKP 主要定位于细胞膜上(图版 I-3),沿细胞膜有分散分布的高电子密度颗粒。在少部分细胞内 AKP 阳性颗粒较多,除了靠近细胞膜较多外,高电子密度颗粒也分布于细胞基质中及小泡体和高尔基体的膜上(图版 I-4),线粒体和溶酶体的内部无阳性颗粒。

2.2 血细胞和血清中的 ACP 和 AKP 活性

测定结果见表 1。血细胞和血清中均具有 ACP 和 AKP 两种酶活性,并且血清中此 2 种酶活力高于血细胞中。血清中 ACP 活力是血细胞中的 1.7 倍,AKP 活力是血细胞中的 2.7 倍。

表 1 栉孔扇贝血细胞和血清中 ACP 和 AKP 活性(37℃)
Table 1 Activities of ACP and AKP in haemocytes and serum of *C. farreri* mU

酶 enzyme	血细胞 haemocytes	血清 serum
ACP	3.68±0.96	6.26±1.24
AKP	6.07±0.72	16.17±0.83

* 活性值平均值±标准误差 Activities are $\bar{X} \pm SD(N=5)$

2.3 pH 对血清中 ACP 和 AKP 活性的影响

在不同 pH 条件下测定血清中 ACP 和 AKP 活性,结果见图 1 和图 2。图 1 可见,血清中 ACP 的最适 pH 为 4.4,其适宜 pH 范围比较窄,高于或低于 pH 4.4,其酶活力均迅速下降,且低于 pH 4.4 时下降速度更快一些。由图 2 可见,血清 AKP 的最适 pH 为 10.3。高于 pH 10.3 和低于 pH 9.1 时,酶活力下降速度较快;pH 在 10.3~9.1 之间时,酶活力下降速度相对较慢。

2.4 温度对血清中 ACP 和 AKP 活性的影响

不同温度下血清中 ACP 和 AKP 活性的测定结果见图 3、4。图 3 显示,ACP 的最适温度为 35℃,25~35℃ 酶活性较高,相对较平稳。低于 15℃ 或高于 35℃,酶活力值下降速度较快。在 55℃ 下,酶活力约丧失 87%;65℃ 时,酶活性完全丧失。从图 4 可见,AKP 的最适温度为 55℃;高于 55℃,酶活力迅速下降;65℃ 时,酶活力丧失约 66%;75℃ 时,酶活力几乎完全丧失;低于 55℃ 时,酶活力下降速度相对较慢。

3 讨论

3.1 ACP 和 AKP 在细胞内的定位

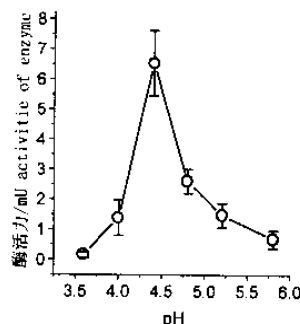


图 1 pH 对栉孔扇贝血清 ACP 的影响(37℃)

Fig.1 Effects of pH on the activities of ACP in serum of *C. farreri*

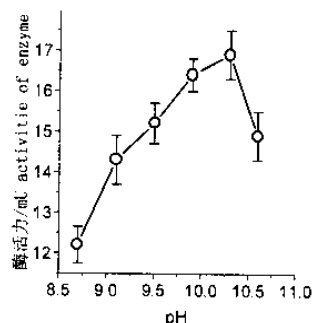


图 2 pH 对栉孔扇贝血清 AKP 的影响(37℃)

Fig.2 Effects of pH on the activities of AKP in serum of *C. farreri*

ACP 是溶酶体的标志酶,主要存在于溶酶体内,本实验显示栉孔扇贝血细胞内的 ACP 也主要分布于溶酶体内。溶酶体内的水解酶是在糙面内质网上合成的,经小泡的转运并经高尔基复合体,最终到滑面内质网形成溶酶体,因此,ACP 亦见于与溶酶体形成有关的细胞器^[2],我们观察到内质网、小泡呈弱的 ACP 阳性与上述观点一致。

AKP 在动物的多数组织细胞中仅局限在质膜上,但在某些细胞如癌细胞中,也见于小泡体、高尔基复合体及线粒体上^[2]。扇贝血细胞 AKP 主要定位于质膜。少部分 AKP 阳性颗粒较多的血细胞内,AKP 也分布于细胞基质中及小泡体和高尔基体的膜上,显示 AKP 将扇贝血细胞分为阳性颗粒较少的、仅质膜上有大量阳性颗粒的和细胞质中具大量

阳性颗粒的 3 类细胞。此 3 类细胞是否具有不同的功能并且是否可做为扇贝血细胞分类的依据之一,

尚有待于深入研究。

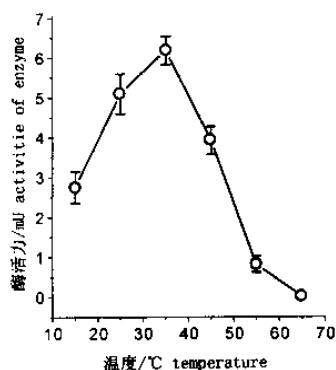


图 3 温度对栉孔扇贝血清 ACP 的影响(pH 4.5)

Fig. 3 Effects of temperature on the activities of ACP in serum of *C. farreri*

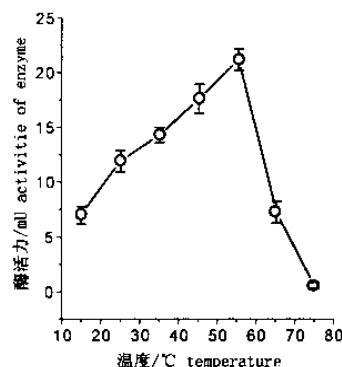


图 4 温度对栉孔扇贝血清 AKP 的影响(pH 10.0)

Fig. 4 Effects of temperature on the activities of AKP in serum of *C. farreri*

3.2 ACP 在扇贝免疫防御中的作用

血细胞的吞噬作用和包裹化作用是无脊椎动物主要的免疫防御机制。细胞、酵母及可溶性蛋白等异物进入机体,很快被血细胞吞噬,形成吞噬泡,并与初级溶酶体融合成为次级溶酶体。在次级溶酶体内被水解酶包括 ACP 消化降解^[5]。当外来异物的直径大于 10 μm 时,血细胞可将其包围形成包裹,释放 ACP 等水解酶将异物分解^[6]。ACP 等水解酶不仅存在于细胞内,而且存在于血浆中,从而形成了一个水解酶体系^[1]。当细菌进入体内^[7]或有寄生虫寄生^[8]等时,血清和血细胞中的 ACP 活性显著增强。本研究证实,ACP 在血细胞溶酶体中活性较强。生化法在血细胞和血清中均检测到 ACP 活性,说明 ACP 在扇贝免疫防御中可能也发挥重要作用。本文生化测定结果表明,血细胞中的 ACP 和 AKP 活性均低于血清中的酶活性,可能是因用 DDW 溶血对 ACP 和 AKP 有一定的破坏作用。另外, Jyothirmayi 等^[9]在测定淡水螺 *Lymnaea luteola* 各种组织中的 ACP 和 AKP 活性时发现,消化腺和外套膜内的该两种酶活性比血淋巴中的高许多倍。血清中的 ACP 和 AKP 是否部分来自其它组织细胞,有待于进一步的实验证实。

参 考 文 献

- 1 Pipe R K. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem J*, 1990, 22: 595~603
- 2 Gomori G. *Microscopic histochemistry. Principles and practice*. Chicago: Chicago University Press, 1952. 189
- 3 王继贤,等. 临床生化检验. 长沙:湖南科学技术出版社, 1996. 391~393
- 4 Lowry O H, et al. Protein measurement with the Folin phenol-reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193:265~275
- 5 Cheng T C, et al. An electron microscope study of the fate of bacteria phagocytized by granulocyte of *Crassostrea virginica*. *Contemp Top Immunobiol*, 1974, 4:25~35
- 6 Lackie A M. Invertebrate immunity. *Parasitology*, 1980, 80: 393~412
- 7 Cheng T C. Selective induction of release of hydrolases from *Crassostrea virginica* hemocytes by certain bacteria. *J Invertebr Pathol*, 1992, 59:197~200
- 8 Cheng T C, et al. Acid phosphatase in the granulocytic capsules formed in strains of *Biomphalaria glabrata* totally and partially resistant to *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol*, 1977, 7:467~472
- 9 Jyothirmayi G N, et al. Possible origin of hemolymph phosphatases in trematode infected and in noninfected snails. *J Invertebr Pathol*, 1988, 52:373~379

The activities and their electron microscopic cytochemistry study of AKP and ACP in haemolymph of *Chlamys farreri*

Sun Hushan

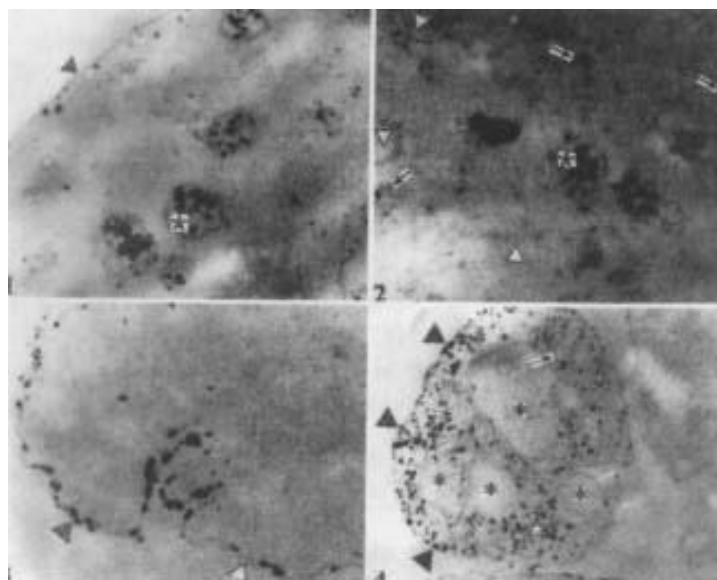
(Yantai Normal College, Yantai 264025)

Li Guangyou

(The First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266003)

Abstract The acid phosphatase (ACP) and alkaline phosphatase (AKP) in the haemocytes and serum of scallop *Chlamys farreri* were studied by cytochemical localisation with electron microscope and spectrophotometer. The results show that the lysosomes are strongly positive of ACP with irregular and different-sized shapes, in which there are granules with high electron density. But the endoplasmic reticulum and some small vesicles in the cytoplasm are weakly positive of ACP. The AKP is mainly located on plasma membrane, along which distribute granules of high electron density scatteringly. In a few cells there are more AKP-positive granules and there are granules of high electron density in cell matrix, vesicles and on membrane of Golgi body. There are no positive granules inside the lysosomes and mitochondria. The results of biochemical measure show that there are ACP and AKP in both haemocytes and serum and the activities of ACP and AKP in serum are 1.7 times and 2.7 times as many as those in haemocytes, respectively. The optimum pH for ACP and AKP in serum are 4.4 and 10.3 and the optimum temperatures for ACP and AKP are 35°C and 55°C in serum.

Key words *Chlamys farreri*, ACP, AKP, enzymatic activity, haemolymph



图版 I Plate I

- 1,2 ACP 细胞化学定位, $\times 30\ 000$. ACP cytochemical localization. ▲示细胞膜。Cell membrane. ★示 ACP 呈强阳性的溶酶体。Lysosome strongly positive of ACP. ↑示 ACP 呈弱阳性的内质网。Endoplasmic reticulum weakly positive of ACP. Vesicle weakly positive of ACP.
- 3,4 AKP 细胞化学定位, $\times 25\ 000$, $\times 30\ 000$. AKP cytochemical localization. ▲示沿细胞膜分布的 AKP 强阳性颗粒。Granule distributing along the cell membrane, strongly positive of AKP. △示细胞膜。Cell membrane. *示大型细胞器。Macro-organelle. ↑示小空泡。Vesicle. ☆示胞浆中 AKP 阳性颗粒。Granule in cytoplasm, positive of AKP.