

文章编号:1000-0615(2000)06-0549-05

聚甘露糖醛酸对中国对虾免疫相关酶活性和溶菌溶血活性的影响

刘 岩, 江晓路, 吕 青, 管华诗

(青岛海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003)

摘要:在中国对虾的血清、肌肉和肝胰腺提取液中有酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)、过氧化物酶(POD),其中,ACP和ALP在肝脏中的活性最高。采用1.0%的聚甘露糖醛酸多糖作为免疫药物,对中国对虾进行注射刺激后,发现血清中的溶菌和溶血活性有显著提高;肝胰腺中的ACP和ALP活性也有明显增加,在72h,ACP活性由对照组的 $3.21\text{U}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ 提高到 $9.69\text{U}\cdot 100\text{mL}^{-1}$,ALP活性由 $4.09\text{U}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ 提高到 $13.2\text{U}\cdot 100\text{mL}^{-1}$,而血清和肌肉中这两种酶活性的变化不很明显。在血清、肝胰腺和肌肉中POD活性变化不明显。聚甘露糖醛酸多糖具有一定的增强中国对虾免疫活性的作用。

关键词:中国对虾;聚甘露糖醛酸多糖;免疫活性

中图分类号:S942.5 **文献标识码:**A

Effects of manuronate polysaccharide on enzymes of *Penaeus chinensis* related with immune and hemolysis

LIU Yan, JIANG Xiao-lu, LU Qing, GUAN Hua-shi

(Fisheries College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

Abstract: Acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (ALP) and peroxidase were found in the serum, meat and hepatopancreas extract of *Penaeus chinensis*. The activities of ACP and ALP in the hepatopancreas were highest among the serum, meat and hepatopancreas. After *Penaeus chinensis* were stimulated by injection with 1.0% polymannuronic acids, the activities of bacteriolysis and hemolysis in the serum increased, meat and the activities of ACP and ALP in the hepatopancreas enhanced obviously. ACP activity increased from $3.21(\text{U}\cdot 100\text{mL}^{-1})$ of control group to $9.69(\text{U}\cdot 100\text{mL}^{-1})$ and ALP activity increased from $4.09(\text{U}\cdot 100\text{mL}^{-1})$ to $13.2(\text{U}\cdot 100\text{mL}^{-1})$ after 72 hours. However, the activities of these two enzymes in the serum and meat extract remained stable. The activities of POD in serum, and hepatopancreas changed little. So manuronate polysaccharide could strengthen the immunological competence of *Penaeus chinensis*, and possessed some developmental value in aquatic culture.

Key words: *Penaeus chinensis*; manuronate polysaccharide; immunological activity

多糖被认为是一种广谱的非特异性免疫促进剂,能够增强人体的细胞免疫和体液免疫功能,可激活巨噬细胞,促进抗体的形成,激活补体及诱导产生干扰素等^[1]。而利用免疫多糖来提高养殖生物的免疫

收稿日期:2000-02-20

资助项目:九五科技攻关项目(96-C02-01)

作者简介:刘 岩(1971-),女,山东,博士生,天然产物化学。Tel:0532-2032290,E-mail: foodmic@ouqd.edu.cn

功能和机体防御能力,从而达到防治疾病的目的,已经为越来越多的研究工作者所重视。王雷等^[2]利用富含多糖、生物碱及氨基酸等成分的数种免疫药物制成饵料,对中国对虾进行投喂,发现中国对虾的发病率和死亡率显著降低,体内的抗菌、溶菌活力及酚氧化酶活力等免疫指标均有所提高。刘恒等^[3]利用由海藻中提取的与微生物多糖有类似结构和性质的免疫多糖作为饵料添加剂,投喂南美白对虾后,对虾的抗病能力和免疫活性也有不同程度的提高。海藻多糖是一种从海藻中分离提取的高分子活性物质,具有增强免疫功能、抗肿瘤、抗病毒及抗凝血等多种生物活性^[4]。

有关对虾体液免疫机制的研究目前较少。越来越多的研究成果表明,对虾体液因子在机体免疫防御过程中起到了十分重要的作用,包括溶酶体酶的水解作用、释放酚氧化酶和黑色素、血淋巴凝集及产生溶血素等^[5-7]。在对养殖对虾的病害防治中,许多学者开始从免疫学角度进行研究,试图寻找一些能够提高养殖品种免疫功能和抗病能力的药物。多糖作为一种非特异性免疫促进剂,在水产养殖业中逐渐得到开发和应用。本文对中国对虾体内的 ACP、ALP、POD 酶活性进行分析,并研究了经免疫多糖刺激后,中国对虾体内这些酶活性的变化情况,以期对对虾的免疫防御机制有更为深入的认识,并为养殖对虾的病害防治工作提供理论依据和实践基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验用虾

选择体长为 6~7cm 的健康养殖中国对虾,由青岛红岛养殖场提供。

1.1.2 鸡红细胞

无菌采集鸡红细胞,置于 4 倍的 Alsever's 溶液中,4℃ 冰箱保存备用。

1.1.3 实验用菌种

白色念珠菌(*Candida albicans*)在麦芽汁斜面上活化,备用。

1.1.4 聚甘露糖醛酸多糖

由青岛海洋大学食品科学基础实验室提供。用生理盐水配制浓度为 1.0% 的聚甘露糖醛酸多糖溶液(annuronate polysaccharide, MP),灭菌后备用。

1.2 方 法

1.2.1 中国对虾的处理方法

选取个体大小相近的养殖中国对虾,采用对虾腹部体腔注射的方法,实验组注射聚甘露糖醛酸多糖溶液 $0.1\text{mL}\cdot\text{尾}^{-1}$,对照组注射等量的无菌生理盐水,每组 20 尾对虾。

1.2.2 对虾血清提取液的制备

在 24h,48h,72h 取对虾 20 尾,从心脏抽取血液,置于离心管中,在 4°C , $3500\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min 后,取上清液即为对虾血清。

1.2.3 对虾肝胰腺和肌肉提取液的制备

取 20 尾对虾的肝胰腺和部分肌肉,称重后于冰浴中匀浆,加入无菌生理盐水,使浓度达到 $0.1\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 4°C , $3500\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min 后,除去沉淀后获得对虾的肝胰腺和肌肉组织提取液。

1.2.4 酶活性的测定

酸性磷酸酶的测定采用磷酸苯二钠法^[8]。以每 100mL 血清在 37°C 与底物作用 60min,产生 1mg 酚者定义为一个酶活力单位。

碱性磷酸酶的测定采用磷酸苯二钠法^[8]。以每 100mL 血清在 37°C 与底物作用 15min,产生 1mg 酚

者定义为一个酶活力单位。

过氧化物酶按照 Worthington 法测定^[9]: $POD \text{ 活性} (U \cdot mL^{-1}) = (E_{510} \times 3 \times 10) / (6.58 \times 0.1)$ 。

溶菌酶活性的测定:将经二次活化的溶壁微球菌,接种于液体培养基内进行摇床培养 48h,取出后离心,收集菌体。用 $0.1 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 (pH = 6.4) 稀释至 $A_0 = 0.303$, 配成底物悬液供测试用。在此条件下,溶菌活性 $(U \cdot mL^{-1}) = (A_0 - A) / A$ 。(A₀ 为保温前的光吸收值,A 为保温后的光吸收值)。

1.2.5 溶血活力测定

将保存于 Alsever's 液中的鸡红细胞用无菌生理盐水洗涤数次后配制成 3% 的红细胞悬液(按压积体积计算)。取 2.5mL 红细胞悬液加入 0.1mL 血清,对照组用 0.1mL 的生理盐水代替血清,37℃ 保温 30min,立即冰浴,3000r·min⁻¹ 离心 5min,上清液于 540nm 处测光吸收值,离心的肝组织液代替血清测肝胰腺的溶血活性。溶血素含量(homolysin concentration)表示为:所测 OD 值 × 30(被测样品稀释倍数)。

2 实验结果

2.1 聚甘露糖醛酸多糖对养殖中国对虾血清溶菌活性的影响

测定注射 1% 聚甘露糖醛酸多糖对中国对虾血清的溶菌活性影响结果见图 1。聚甘露糖醛酸多糖对养殖中国对虾血清的溶菌活性具有很显著的增强作用。1% 的剂量能在短时间内使其活力大增,并可维持较长时间。在 24h 溶菌活性达到高峰,到 72h 仍维持较高水平,说明聚甘露糖醛酸多糖可直接进入血淋巴而影响其活力,体腔注射聚甘露糖醛酸多糖对中国对虾血清的溶菌功能有刺激提高的作用,影响结果显著。

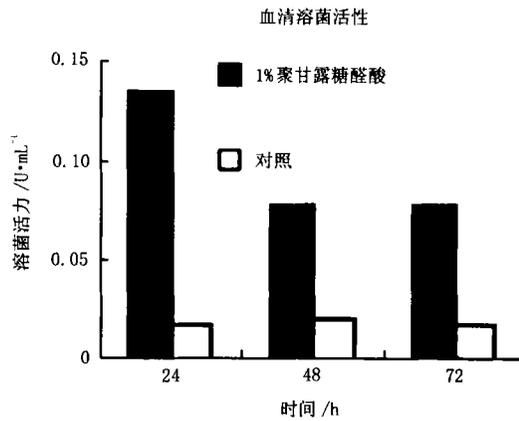


图 1 注射聚甘露糖醛酸多糖对养殖中国对虾血清溶菌活性的影响
Fig.1 Effects of injected mannuronate on the activity of bacteriolysis of *P. chinensis*

2.2 聚甘露糖醛酸多糖对养殖中国对虾溶血活性的影响

聚甘露糖醛酸多糖对养殖对虾血清的溶血活性具有明显的提高作用(图 2)。体腔注射聚甘露糖醛酸多糖可在 24h 时血清溶血能力由 3.03 提高到 3.45,到 72h 仍维持较高水平。对虾的溶血素除血清中含有外,肝胰腺中也含有大量的溶血素,其溶血能力远高于等量的血清,所以本实验中也同时测定聚甘露糖醛酸多糖对肝胰腺溶血作用的影响,结果显示聚甘露糖醛酸多糖对肝胰腺的溶血活力几乎没有影响。

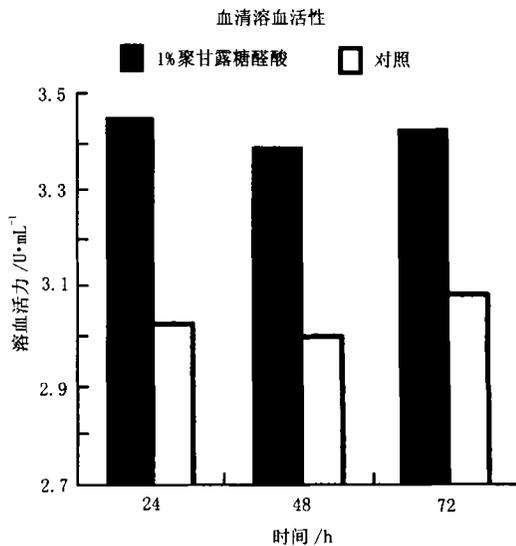


图 2 注射聚甘露糖醛酸多糖对养殖中国对虾溶血素的影响
Fig.2 Effects of injected mannuronate on the activity of hemolysis of *P. chinensis*

2.3 聚甘露糖醛酸多糖对中国对虾酸性、碱性磷酸酶活性的影响

2.3.1 对酸性磷酸酶的作用

中国对虾经聚甘露糖醛酸多糖注射刺激后,肝胰腺中的 ACP 活性大大增强,24h 后即达到较高水

平,72h达到最高。血清与肌肉的 ACP 酶活性与对照组相近(表 1)。

2.3.2 对碱性磷酸酶的作用

中国对虾的血清、肌肉及肝脏提取液中均具有碱性磷酸酶,且其活性在这三种组织中的分布与酸性磷酸酶较为相似,即在肝脏中活性最高,肌肉和血清中的活性较低,这与高等动物体内的 ALP 分布情况也有相似之处。对虾经聚甘露糖醛酸多糖注射后,肝胰腺中的 ALP 活性明显增强,24h 后的酶活性即达到 12.3U,是对照组的 3 倍以上,48h 活性达到最高,为 13.6U;72h 仍维持较高水平,而血清和肌肉中的 ALP 活性变化不大。

表 1 聚甘露糖醛酸多糖对中国对虾体内
酸性磷酸酶活性的影响

Tab.1 Effects of mannan polysaccharide
on ACP activities of *P. chinensis*

取样部位	实验组别	ACP 活性(U·100mL ⁻¹)		
		24h	48h	72h
血清	聚甘露糖醛酸多糖	0.37	0.48	0.56
	对照	0.37	0.25	0.49
肝胰腺	聚甘露糖醛酸多糖	6.82	6.40	9.69
	对照	3.52	3.53	3.21
肌肉	聚甘露糖醛酸多糖	0.33	0.28	0.31
	对照	0.27	0.26	0.25

表 2 聚甘露糖醛酸多糖对中国对虾体内
碱性磷酸酶活性的影响

Tab.2 Effects of mannan polysaccharide
on ALP activities of *P. chinensis*

取样部位	实验组别	ALP 活性(U·100mL ⁻¹)		
		24h	48h	72h
血清	聚甘露糖醛酸多糖	0.50	0.60	0.63
	对照	0.36	0.42	0.45
肝胰腺	聚甘露糖醛酸多糖	12.3	13.6	13.2
	对照	4.12	4.25	4.09
肌肉	聚甘露糖醛酸多糖	0.45	0.41	0.44
	对照	0.36	0.42	0.45

2.4 聚甘露糖醛酸多糖对中国对虾过氧化物酶活性的影响

聚甘露糖醛酸多糖注射刺激对虾后血清中 POD 活性变化不大,肝胰腺中 POD 活性有所降低(表 3)。

表 3 聚甘露糖醛酸多糖对中国对虾体内
过氧化物酶活性的影响

Tab.3 Effects of mannan polysaccharide
on POD activities of *P. chinensis*

取样部位	实验组别	ALP 活性(U·100mL ⁻¹)		
		24h	48h	72h
血清	聚甘露糖醛酸多糖	0.760	0.608	0.314
	对照	0.740	0.577	0.322
肝胰腺	聚甘露糖醛酸多糖	0.304	0.101	0.182
	对照	1.17	0.97	0.547

3 讨论

在选用聚甘露糖醛酸多糖为免疫增强剂对养

殖中国对虾免疫功能的影响实验过程中,实验结果表明聚甘露糖醛酸多糖在对对虾血清的溶血活性、溶菌活性及酸、碱性磷酸酶活性方面的影响显著。从对虾血液循环特点来看,血液为开放式循环,所以注射到体腔的多糖可迅速进入血流,直接影响到血液相关的一些免疫因素。本次实验表明体腔注射聚甘露糖醛酸多糖对中国对虾的免疫功能具有一定的调节提高作用。

(1) 从溶菌活性来看,体腔注射聚甘露糖醛酸多糖对中国对虾的溶菌作用显著,维持时间长,可能会在停止给药后维持较高水平,有利于提高对虾的抗菌抵御病害的能力。

(2) 溶血素是指对虾血清中能够溶解脊椎动物血红细胞的物质,是其非特异性免疫因素之一,是甲壳动物的体液性免疫因素之一,其具有溶解脊椎动物红细胞的功能,代表了其识别和排除异种细胞的能力,对虾肝胰腺中表现出很高的活力。对肝胰腺溶血活性的影响规律与血清有所不同的是聚甘露糖醛酸多糖对肝胰腺的溶血活性几乎没有影响,其机理有待进一步讨论。

(3) 酸性磷酸酶是高等动物体内巨噬细胞溶酶体的标志酶,在体内直接参与磷酸基团的转移和代谢^[10],主要存在于人体的肝脏、脾脏、红细胞、骨髓等部位^[11]。在软体动物体内,溶酶体酶一般具有防御和消化的双重作用,溶酶体酶的水解作用成为机体攻击异物的主要机制之一^[5],其主要来源是血淋巴和血细胞^[12]。而酸性磷酸酶是吞噬溶酶体的重要组成部分,在血细胞进行吞噬和包囊反应中,会伴随有酸性磷酸酶的释放^[13]。Cheng^[14]认为,软体动物的 ACP 主要来源于粒细胞的颗粒体,在酸性环境中,

ACP可以通过水解作用将表面带有磷酸酯的异物破坏降解掉。本次实验发现,中国对虾的血清、肝胰腺和肌肉提取液中均具有酸性磷酸酶的活性,其中肝胰腺中的酶活性最高,血清和肌肉 ACP 活力较低。Cheng^[15]认为,软体动物体内的溶酶体酶是一种可诱导的“保护性”体液因子,起着与高等动物的获得性体液免疫相似的作用,但是这些酶在软体动物体内是先天性存在的,诱导作用只能提高其合成的数量和活性。

(4) 碱性磷酸酶几乎存在于高等动物的各个组织中,在肠上皮、肝脏、白细胞、成骨细胞等部位尤其丰富,ALP 主要来源于肝脏和骨骼^[11]。ALP 是生物体内的一种重要的代谢调控酶,直接参与磷酸基团的转移,参与钙磷代谢,在脊椎动物的骨化作用中起重要作用^[16]。在多种软体动物的体内也发现有碱性磷酸酶,与贝类壳角蛋白等蛋白质的分泌相关,并可参与蛋白质的合成,同时也作为软体动物溶酶体酶的重要组成部分,在免疫反应中发挥作用^[5,12]。

(5) POD 普遍存在于动物、植物及微生物中,是生物体内重要的酶类之一,参与多种生理代谢反应,国内文献中对虾血清中 POD 的研究较少报道^[17]。根据 POD 催化过氧化氢与供氢体之间的氧化反应的特性,可以用 4-氨基安替吡啉作氢供体,测定 510nm 吸光度的增大值,以跟踪 4-氨基安替吡啉的氧化反应。

对虾免疫机制的研究是合理有效防治对虾疾病的根本和依据。目前养殖对虾的病害发生率较高,且病因越来越复杂,在这种情况下,提高养殖品种的健康状况和抗病能力是解决虾类疾病的重要手段,多糖在水产养殖中的应用逐渐得到开发。本次实验采用的聚甘露糖醛酸多糖可以明显提高中国对虾肝胰腺中的 ACP、ALP 活性以及溶菌溶血活性,对于增强对虾的免疫活性具有积极作用。而有关 ACP、ALP、POD、溶血素和溶菌酶等在对虾免疫防御反应中的地位、具体作用及其诱导产生机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] 李光友. 中国对虾疾病与免疫机制[J]. 海洋科学,1995,4:1-3
- [2] 王雷,李光友,毛远兴,等. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J]. 海洋与湖沼,1994, 25(5):486-491.
- [3] 刘恒,李光友. 免疫多糖对养殖南美白对虾作用的研究[J]. 海洋与湖沼,1998, 29(2):113-118.
- [4] 徐明芳,高孔荣,刘婉乔. 海藻多糖及其生物活性[J]. 水产科学,1996, 15(6):8-10.
- [5] 江晓路,刘树青,牟海津. 真菌多糖对中国对虾血清及淋巴细胞免疫活性的影响[J]. 动物学研究,1999,20(1):41-45.
- [6] 牟海津,江晓路,刘树青. 双壳贝类血清中凝集素性能初步研究[J]. 青岛海洋大学学报,1999, 29(2):249-254.
- [7] Feng S Y. Cellular defense mechanism of oysters and mussels[J]. Am Fish Soc Spec Public, 1988, 18:153-168.
- [8] 宋善俊. 临床医师手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1991. 185-187,199-200.
- [9] 钱嘉渊(译). 酶的测定方法[M]. 北京:中国轻工出版社,1992.276-278.
- [10] 王鑫,马桂荣,郑宝灿,等. SL-维生素对小白鼠体重及其单核吞噬细胞功能的影响[J]. 微生物学报,1995, 35(6):455-459.
- [11] 朱忠勇. 实用医学检验学[M]. 北京:人民军医出版社,1997. 368-378.
- [12] 周永灿,潘金培. 贝类细胞和体液的防御机制研究进展[J]. 水产学报,1997, 21(4):449-454.
- [13] Lackie A M. Invertebrate immunity[J]. Parasitology, 1980, 80 :393-412.
- [14] Cheng T C. The role of lysosomal hydrolases in molluscan cellular response to immunologic challenge[J]. Comp Pathobiol, 1978, 4 :59-71.
- [15] Cheng T C. The role of lysosomes in molluscan inflammation[J]. Am. Zool., 1983, 23 :129-144.
- [16] 张洪渊,刘克武,石安静,等. 背角无齿蚌碱性磷酸酶的分离、纯化及其动力学研究[J]. 水生生物学报,1996, 20(1):57-62.
- [17] 刘树青,江晓路,牟海津. 免疫多糖对中国对虾血清磷酸酶、过氧化物酶及溶菌酶活性的作用[J]. 海洋与湖沼. 1999,30(5):278-283.