

脂多糖对栉孔扇贝血清和血细胞中 7 种酶活力的影响*

孙虎山¹ 李光友²

(¹ 烟台师范学院 264025)

(² 国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266003)

提要 实验于 1998 年 1~10 月进行。栉孔扇贝注射脂多糖后,分别于 1,15 和 30 h 测定了其血清和血细胞中 7 种参与免疫防御的水解酶、氧化酶和抗氧化酶的活力。结果表明,血清实验组的酸性磷酸酶(ACP)活力在 1,15 和 30 h 时,血细胞实验组在 1 h 时显著高于对照组。血清和血细胞实验组的碱性磷酸酶(AKP)活力仅在 1 h 时,溶菌酶活力分别在 1 h 和 15 h 时显著高于对照组。血细胞中无酚氧化酶(PO)活性。血清实验组的 PO 活力在 1 h 时,髓过氧化物酶(MPO)活力在 1 和 15 h 时显著高于对照组。血清和血细胞实验组的超氧化物歧化酶(SOD)活力在 1 h 时,过氧化氢酶(CAT)活力在 1,15 和 30 h 时均显著高于对照组。结果证实,脂多糖对栉孔扇贝血清和血细胞中溶菌酶,ACP,AKP,PO,MPO,SOD 和 CAT 7 种酶的活力均有激活加强作用。

关键词 脂多糖,栉孔扇贝,血清,血细胞,酶活力

脂多糖作为免疫激活剂常用于免疫学研究和临床医学中。脂多糖在新兴学科无脊椎动物免疫学研究中的应用较少,已有研究证明,脂多糖可提高对虾

* 国家攀登计划 B 资助项目 PDB 6-6-3 号。

收稿日期:1999-04-26;修回日期:1999-5-06

血细胞的吞噬活性^[3]和贻贝等的酚氧化酶活力。有关脂多糖对栉孔扇贝血清和血细胞中酶活力的影响,国内外尚未见报道。本文选用人工养殖的栉孔扇贝 *Chlamys farreri* 作实验材料。注射脂多糖后,于不同时间测定其血清和血细胞中 7 种参与免疫防御的水解酶、氧化酶和抗氧化酶的活力,以得到脂多糖对贝类血清和血细胞中与其免疫有关的酶活力影响的规律,从而为弄清贝类的免疫机理积累资料,并为将脂多糖做为免疫激活剂应用于贝类养殖业增强其免疫能力、预防病害提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

于 1998 年 1~10 月,从青岛麦岛海珍品养殖场购买健康的栉孔扇贝,体长 45~55 mm。实验所用脂多糖(LPS)为 Sigma 公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法与步骤

用无菌海水将脂多糖配成 0.2% 的溶液。按每克体重 5 μg 的剂量用微量进样器从扇贝闭壳肌背缘注射 LPS。对照组注射等量的无菌海水。养于室内水族箱中。分别于 1, 15 和 30 h 从闭壳肌血窦中取血, 3 000 r/min 的转速离心 10 min, 移出血清, 血细胞中加入与血清等量的双蒸水, 溶血后 3 000 r/min 的转速离心 10 min, 取上清液用于酶活力测定。

酸性磷酸酶(ACP)活力的测定采用 Kruzel 等 1982 年的苯磷酸二钠法, 碱性磷酸酶(AKP)活力的测定采用金氏法^[2], 酶活力的计算采用国际单位。溶菌酶活力的测定采用 Chang 等 1975 年的方法, 以每毫克蛋白质每分钟使微球菌液的 OD 值降低 0.001 的酶量做为一个酶活力单位(U)。酚氧化酶(PO)活力的测定采用 Ashida 1971 年的方法, 依赖卤素的髓过氧化物酶(MPO)活力的测定采用 Schlenk 1991 年的二乙醇胺法, 以每毫克蛋白质每分钟使 OD 值增加 0.001 的酶量作为一个酶活力单位(U)。超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定采用邻苯三酚自氧化法^[1], 以每毫克蛋白质每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量作为一个酶活力单位(U)。过氧化氢酶(CAT)活力的测定采用 Marks 等 1933 年的方法, 以每克蛋白质每秒钟分解底物过氧化氢(吸光率 OD 为

0.50~0.55)的相对量做为一个酶活单位(U)。结果统计采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 LPS 对血淋巴中 3 种水解酶活力的影响

注射 LPS 后, 血清和血细胞中 ACP, AKP 和溶菌酶活力的测定结果见表 1。结果表明, 血清实验组在 1, 15 和 30 h 时的 ACP 活力均高于对照组, 且均差异极显著。血细胞实验组 ACP 活力在 1 h 时高于对照组, 且差异极显著; 在 15 h 时也高于对照组, 但差异不显著; 在 30 h 时低于对照组, 且差异显著。血清和血细胞中的 AKP 活力在 1 h 均为实验组高于对照组, 且差异极显著; 15 和 30 h 时, 差异均不显著。血清中溶菌酶活力在 1 h 时实验组高于对照组, 且差异极显著; 而在 15 和 30 h 时差异不显著。血细胞中溶菌酶活力则是在 1, 15 和 30 h 时实验组均高于对照组, 但只在 15 h 时差异极显著, 而在 1 和 30 h 时差异不显著。

2.2 LPS 对血淋巴中 2 种氧化酶活力的影响

注射 LPS 后, 血清和血细胞中 PO 和 MPO 活力的测定结果见表 2。结果表明, 血清中 PO 活力在 1 h 时实验组高于对照组, 且差异极显著; 在 15 和 30 h 时实验组均低于对照组, 且差异显著。血细胞中无 PO 活性。血清中 MPO 活力在 1 和 15 h 时实验组均高于对照组, 且差异极显著; 而在 30 h 时实验组却低于对照组, 且差异显著。血细胞中 MPO 活力在 1 和 15 h 时实验组均低于对照组, 且差异极显著; 而在 30 h 时实验组却高于对照组, 但差异不显著。

2.3 LPS 对血淋巴中 2 种抗氧化酶活力的影响

注射 LPS 后, 血清和血细胞中 SOD 和 CAT 活力的测定结果见表 3。结果表明, 血清中 SOD 活力在 1 h 时实验组高于对照组, 且差异极显著; 而在 15 和 30 h 时实验组均低于对照组, 且分别差异显著和极显著。血细胞中 SOD 活力在 1 h 时实验组高于对照组, 且差异显著; 而在 15 和 30 h 时实验组与对照组差异均不显著。血清中 CAT 活力在 1, 15 和 30 h 时实验组均高于对照组, 其中 15 h 时差异极显著, 1 和 30 h 时差异显著。血细胞中 CAT 活力在 1, 15 和 30 h 时, 实验组也均高于对照组, 其中 1 和 30 h 时差异极显著, 15 h 时差异显著。

表 1 注射 LPS 后栉孔扇贝血清和血细胞中 3 种水解酶活力的测定结果

Tab. 1 The activities of three kind of hydrolase in serum and haemocytes of *Chlamys farreri* after injection of LPS

时间(h)	1	15	30
血清 ACP 实验组(mU)	3.76±0.56	3.84±0.34	5.18±0.70
血清 ACP 对照组(mU)	2.61±0.29	2.83±0.20	3.05±0.41
P	<0.01	<0.01	<0.01
血细胞 ACP 实验组(mU)	3.61±0.56	4.84±1.42	1.77±0.98
血细胞 ACP 对照组(mU)	1.43±0.32	3.17±1.18	3.47±0.57
P	<0.01	>0.05	<0.05
血清 AKP 实验组(mU)	2.60±0.22	2.30±0.20	2.08±0.00
血清 AKP 对照组(mU)	1.96±0.17	2.12±0.18	2.28±0.22
P	<0.01	>0.05	>0.05
血细胞 AKP 实验组(mU)	5.86±0.00	9.64±0.95	6.08±0.75
血细胞 AKP 对照组(mU)	4.36±0.38	8.23±0.84	5.46±0.67
P	<0.01	>0.05	>0.05
血清溶菌酶实验组(U)	27.72±4.86	16.07±2.93	14.30±2.23
血清溶菌酶对照组(U)	19.04±1.83	14.31±2.70	15.58±1.97
P	<0.05	>0.05	>0.05
血细胞溶菌酶实验组(U)	33.68±9.19	86.42±7.03	22.70±4.28
血细胞溶菌酶对照组(U)	21.87±7.77	49.36±4.50	15.70±4.96
P	>0.05	<0.01	>0.05

注:活力值为平均值±标准误差 Activities are $\bar{X} \pm SD$ (n=5),表 2、表 3 同。

表 2 注射 LPS 后栉孔扇贝血清和血细胞中两种氧化酶活力的测定结果

Tab. 2 The activities of two kinds of oxidant enzymes in serum and haemocytes of *C. farreri* after injection of LPS

时间(h)	1	15	30
血清 PO 实验组(U)	2.55±0.05	2.17±0.04	1.99±0.04
血清 PO 对照组(U)	1.89±0.00	2.26±0.04	2.26±0.04
P	<0.01	<0.05	<0.05
血细胞 PO 实验组(U)	0	0	0
血细胞 PO 对照组(U)	0	0	0
P	—	—	—
血清 MPO 实验组(U)	6.91±1.26	7.78±2.08	3.16±1.05
血清 MPO 对照组(U)	4.72±0.00	3.07±1.03	6.03±0.00
P	<0.01	<0.01	<0.01
血细胞 MPO 实验组(U)	140.74±8.11	110.77±9.23	138.95±11.23
血细胞 MPO 对照组(U)	164.21±9.06	167.37±7.74	133.41±7.76
P	<0.01	<0.01	>0.05

表 3 注射 LPS 后栉孔扇贝血清和血细胞中两种抗氧化酶的活力的测定结果

Tab. 3 The activities of two kinds of antioxidant enzymes in serum and haemocytes of *C. farreri* after injection of LPS

时间(h)	1	15	30
血清 SOD 实验组(U)	21.10±0.65	15.41±0.58	12.91±0.33
血清 SOD 对照组(U)	14.83±0.49	17.60±0.53	17.17±1.08
P	<0.01	<0.05	<0.01
血细胞 SOD 实验组(U)	40.02±1.53	45.71±0.00	33.32±3.02
血细胞 SOD 对照组(U)	33.82±2.17	37.55±5.90	34.38±1.57
P	<0.05	>0.05	>0.05
血清 CAT 实验组(U)	1.93±0.25	5.34±0.38	4.04±0.36
血清 CAT 对照组(U)	1.46±0.36	2.48±0.01	2.95±0.40
P	<0.05	<0.01	<0.05
血细胞 CAT 实验组(U)	22.89±2.39	27.06±5.52	19.42±0.08
血细胞 CAT 对照组(U)	14.30±1.43	15.54±0.03	13.99±0.34
P	<0.01	<0.05	<0.01

3 讨论

LPS 是位于革兰氏阴性细菌细胞壁外膜的一种由类脂和多糖链组成的物质;具有毒性和免疫学活性两类生物学作用。在免疫学活性方面,LPS 具有诱发对感染的非特异抗性、巨噬细胞激活、佐剂活性、有丝分裂原活性、肿瘤坏死活性和诱生白细胞介素、肿瘤坏死因子及干扰素等细胞因子的活性。研究表明,LPS 可提高栉孔扇贝血清或血细胞中水解酶、氧化酶和抗氧化酶的活力,说明 LPS 也可提高其非特异性免疫能力。

吞噬作用在贝类免疫防御中具有极为重要的作用。异物被吞入细胞后就与溶酶体融合,最终被各种水解酶消化分解。比较重要的水解酶包括:ACP,AKP 和溶菌酶等。水解酶不仅存在于细胞内,而且可通过脱颗粒的方式分布于血清中,从而形成了一个水解酶体系。研究表明,注射 LPS 后 ACP,AKP 和溶菌酶的活力均高于注射无菌海水的对照组,说明作为免疫刺激剂的 LPS 能促进栉孔扇贝血细胞内水解酶的形成,并可能具有促使血细胞脱颗粒的作用。但对此 3 种酶的作用时间不同,其原因有待进一步的研究。

本研究证明,血细胞中无 PO 活性。作者在过去

的工作中经 Bakers 福尔马林钙处理血细胞,再用电镜细胞化学法显示 PO,定位于部分血细胞的大颗粒中,说明血细胞内 PO 是以酶原的形式存在。LPS 可显著提高血清中的 PO 活力,说明 LPS 可使血细胞脱颗粒并对酶原有激活作用。

吞噬作用引起呼吸突发,产生大量的 O_2^- 和 H_2O_2 等活性氧,具有一定的杀菌作用,同时也对动物本身有毒害作用,需及时清除,SOD 和 CAT 等抗氧化酶发挥了重要作用。研究表明,LPS 可提高栉孔扇贝血淋巴中 SOD 和 CAT 的活力,对 SOD 的促进作用较早(1 h),而对 1,15 和 30 h 时 CAT 活力均有促进作用。相对作用较晚,可能与 CAT 是以 SOD 的作用产物 H_2O_2 作为底物有关。

参考文献

- 1 丁秀云、李光友、翟玉梅。海洋与湖沼,1996,27(4):362~367
- 2 王继贵、邓宝爱、周衍权等。临床生化检验。长沙:湖南科学技术出版社,1996。391~393
- 3 李光友、王青。海洋与湖沼,1995,26(6):591~597

EFFECTS OF LIPOPOLYSACCHARIDE ON ENZYMES IN SERUM AND HAEMOCYTES OF *Chlamys farreri*

SUN Hu-shan¹ LI Guang-you²

(¹Yantai Normal College, 264025)

(²First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, 266003)

Received: Apr. 26, 1999

Key Words: Lipopolysaccharide, *Chlamys farreri*, Serum, Haemocytes, Activity of enzyme

Abstract

Seven kinds of hydrolytic, oxidant and antioxidant enzymes participating in the immune defence in the haemolymph of *Chlamys farreri* were assayed at 1, 15 and 30 h after injection with lipopolysaccharide (LPS) from January to October, 1998. The results were as follows: The ACP activities of experimental groups in serum or haemocytes were much higher than that of control groups at 1, 15 and 30 h or at 1 h. The AKP activities of experimental groups in serum and haemocytes were much higher than control group only at 1 h. The lysozyme activities of experimental groups in serum or

haemocytes were much higher than control groups at 1 h or at 15 h. There were no activities of PO in haemocytes. The PO or MPO activities of experimental groups in serum were much higher than control groups at 1 h or at 15 h. The SOD or CAT activities of experimental groups in serum and haemocytes were much higher than control group at 1 h or at 1, 15 and 30 h. It was suggested that LPS could stimulated and enhance the activities of lysozyme, ACP, AKP, PO, MPO, SOD and CAT.