

大肠杆菌感染后栉孔扇贝血淋巴中 7 种酶活力的变化*

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 于 1998 年 11 月对栉孔扇贝注射大肠杆菌,分别于 1,15,30 h 测定了栉孔扇贝血清和血细胞中参与免疫防御的水解、氧化和抗氧化酶的活力。结果表明,大肠杆菌激发后,血清实验组的 ACP 活力在 1 h 时显著高于对照组,15 h 和 30 h 时极显著地高于对照组;血细胞实验组的 ACP 活力仅在 15 h 时极显著地高于对照组。血清和血细胞实验组与对照组的 AKP 活力除了血清 30 h 时差异极显著外均为差异不显著。除了血细胞实验组的溶菌酶活力在 15 h 时极显著地高于对照组外其他组均差异不显著。血清实验组的 PO 活力在 1,15,30 h 时均极显著地高于对照组;血细胞中无 PO 活力。血清实验组与对照组的 MPO 活力均差异不显著;而血细胞中却均差异极显著。血清中 SOD 活力均差异不显著;血细胞中 SOD 活力则在 15 h 和 30 h 时极显著地高于对照组。血清中 CAT 活力在 1 h 时极显著地高于对照组,而在 15 h 和 30 h 时则显著地低于对照组;血细胞中 CAT 活力在 1 h 和 15 h 时均极显著地高于对照组,而在 30 h 时则显著低于对照组。

关键词 大肠杆菌,栉孔扇贝,血淋巴,酶活力

Cheng 等 1975 年用巨大芽孢杆菌(*Bacillus megasporus*)感染帘蛤(*Mercenaria mercenaria*)后发现可诱导

* 国家攀登计划 B 资助项目 PDB6-6-3 号。

收稿日期:1999-04-25;修回日期:1999-06-08

其血淋巴中溶菌酶的释放。Cheng 1992 年用不同的细菌感染弗吉尼亚牡蛎 (*Crassostrea virginica*) 后发现细菌对其血淋巴中酸性磷酸酶等有选择诱导作用, 其中大肠杆菌可提高其水解酶的活力。国内还未见有关细菌对双壳贝类感染方面的研究报道。有关大肠杆菌感染后栉孔扇贝血淋巴中酶变化的研究国内外均未见报道。本文选用我国养殖量最大的栉孔扇贝做为实验材料, 在注射大肠杆菌感染后, 测定了其血清和血细胞参与其免疫反应的 3 种水解酶、2 种氧化酶和 2 种抗氧化酶的活力, 以期得到细菌感染后栉孔扇贝血淋巴中酶活力的变化规律, 弄清不同酶之间的相互关系, 为研究双壳贝类的免疫功能及作用机制, 丰富和发展贝类免疫学, 提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验于 1998 年 11 月进行, 从青岛麦岛海珍品养殖场购买栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*), 体长 45~55 mm。养于室内充气的水族箱中, 水温 15~18 ℃。实验所用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 由烟台师范学院生物系提供, L-多巴 (L-DOPA) 和二乙醇胺为 Sigma 公司产品, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法与步骤

大肠杆菌用 LB 培养基于 37 ℃ 下培养 36 h, 使用前在 40~50 ℃ 下活化 30 min, 用经高压灭菌的无菌过滤海水洗下, 镜检计数, 并用无菌海水调至浓度为 6.8×10^7 细胞/ml。按 2 μ l/g 体重用微量进样器从闭壳肌背缘注射, 对照组按 2 μ l/g 体重注射无菌海水。分别于 1 h, 15 h 和 30 h 时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 Cheng 等 1974 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 的酶量作为一个酶活力单位。酚氧化酶 (PO) 活力的测定采用 Ashida 1974 年的方法, 依赖卤素的髓性过氧化物酶 (MPO) 活力的测定采用 Schlenk 等 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 的酶量做为一个酶活力单位。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% 的酶量做为一个酶活力单位。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 (吸光度 OD 为 0.50~0.55) 的相对量做为一个酶活力单位。蛋白质含量的测定采用 Lowry 等 1951 年的福林酚试剂法。实验结果统计处理采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 大肠杆菌激发后栉孔扇贝血淋巴中 3 种水解酶活力的变化

注射大肠杆菌后, 血清和血细胞中的 ACP, AKP 和溶菌酶活力的测定结果见表 1。结果表明, 血清实验组的 ACP 活力均高于对照组, 1 h 时差异显著, 15 h 和 30 h 时差异极显著; 血细胞实验组的 ACP 活力在 1 h 时低于对照组且差异不显著, 15 h 时高于对照组且差异极显著, 30 h 时也高于对照组但差异不显著。血清和血细胞实验组的 AKP 活力在 1 h 和 15 h 时均高于对照组, 但均差异不显著; 而在 30 h 时, 均低于对照组, 且血清中差异极显著。除了血细胞实验组的溶菌酶活力在 15 h 时高于对照组差异极显著外, 其他实验组与对照组均差异不显著。

2.2 大肠杆菌激发后血淋巴中 2 种氧化酶活力的变化

注射大肠杆菌后, 血清和血细胞中 PO 和 MPO 活力的测定结果见表 2。结果表明, 血清实验组的 PO 活力在 1 h, 15 h 和 30 h 时均高于对照组, 且均差异极显著; 血细胞中无 PO 活力。血清中 MPO 活力在 1 h, 15 h 和 30 h 时实验组与对照组均差异不显著; 血细胞实验组的 MPO 活力在 1 h, 15 h 和 30 h 时均高于对照组, 且均差异极显著。

2.3 大肠杆菌激发后血淋巴中 SOD 和 CAT 2 种抗氧化酶活力的变化

注射大肠杆菌后, 血淋巴中 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, 15 h 和 30 h 时实验组与对照组差异均不显著; 血细胞实验组的 SOD 活力在 1 h, 15 h 和 30 h 时均高于对照组, 在 1 h 时差异不显著, 而在 15 h 和 30 h 时差异极显著。血清实验组的 CAT 活力在 1 h 时高于对照组, 且差异极显著, 而在 15 h 和 30 h 时低于对照组, 且分别差异极显著和显著; 血细胞实验组 CAT 活力在 1 h 和 15 h 时均高于对照组, 且均差异极显著, 而在 30 h 时却低于对照组, 且差异显著。

表 1 注射大肠杆菌后栉孔扇贝血淋巴中 3 种水解酶活力的测定结果

Tab. 1 The activities of three kinds of hydrolases in haemolymph of *C. farreri* after injection of *E. coli*

时间 (h)	1	15	30
血清 ACP 实验组 (mU)	3.92±0.43	4.99±0.61	8.60±0.42
血清 ACP 对照组 (mU)	3.07±0.46	0.51±0.26	0.66±0.28
<i>P</i>	<0.05	<0.01	<0.01
血细胞 ACP 实验组 (mU)	2.28±0.56	6.24±1.06	2.55±0.64
血细胞 ACP 对照组 (mU)	2.92±0.51	2.84±0.24	2.07±0.00
<i>P</i>	>0.05	>0.01	>0.05
血清 AKP 实验组 (mU)	2.04±0.21	3.03±0.25	2.98±0.30
血清 AKP 对照组 (mU)	2.21±0.22	2.85±0.25	3.84±0.32
<i>P</i>	>0.05	>0.05	<0.01
血细胞 AKP 实验组 (mU)	4.36±0.42	3.36±0.32	8.25±0.79
血细胞 AKP 对照组 (mU)	4.01±0.38	3.03±0.29	9.13±0.74
<i>P</i>	>0.05	>0.05	>0.05
血清溶菌酶实验组 (U)	4.39±2.85	7.79±3.59	9.98±4.15
血清溶菌酶对照组 (U)	5.30±1.68	7.13±3.19	9.13±3.88
<i>P</i>	>0.05	>0.05	>0.05
血细胞溶菌酶实验组 (U)	21.46±2.92	92.43±20.65	31.44±10.50
血细胞溶菌酶对照组 (U)	19.75±4.39	46.72±15.46	33.07±7.39
<i>P</i>	>0.05	<0.01	>0.05

注:活力值为平均值±标准误差,表 2,表 3 同。

表 2 注射大肠杆菌后栉孔扇贝血淋巴中 2 种氧化酶活力的测定结果

Tab. 2 The activities of two kinds of oxidant enzymes in haemolymph of *C. farreri* after injection of *E. coli*

时间 (h)	1	15	30
血清 PO 实验组 (U)	5.97±0.61	3.87±0.21	8.30±0.45
血清 PO 对照组 (U)	3.46±0.38	2.41±0.08	2.66±0.05
血细胞 PO 实验组 (U)	0	0	0
血细胞 PO 对照组 (U)	0	0	0
血清 MPO 实验组 (U)	5.67±1.16	4.06±1.42	22.07±1.69
血清 MPO 对照组 (U)	7.18±1.02	4.83±1.69	20.53±1.92
血细胞 MPO 实验组 (U)	283.84±4.32	168.89±7.95	188.07±4.76
血细胞 MPO 对照组 (U)	184.78±9.14	149.60±5.43	166.08±11.60

表 3 注射大肠杆菌后栉孔扇贝血淋巴中 2 种抗氧化酶活力的测定结果

Tab. 3 The activities of two kinds of antioxidant enzymes in haemolymph of *C. farreri* after injection of *E. coli*

时间 (h)	1	15	30
血清 SOD 实验组 (U)	11.04±0.49	12.28±0.60	15.61±0.71
血清 SOD 对照组 (U)	9.36±1.06	13.10±0.71	15.58±0.76
<i>P</i>	>0.05	>0.05	>0.05
血细胞 SOD 实验组 (U)	6.74±1.19	7.51±0.00	6.83±0.80
血细胞 SOD 对照组 (U)	3.88±2.19	2.33±0.83	3.75±0.00
<i>P</i>	>0.05	<0.01	<0.01
血清 CAT 实验组 (U)	2.63±0.36	2.64±0.51	3.99±0.62
血清 CAT 对照组 (U)	1.85±0.01	6.49±0.67	4.03±0.81
<i>P</i>	<0.01	<0.01	>0.05
血细胞 CAT 实验组 (U)	15.47±1.31	35.51±4.74	8.99±0.04
血细胞 CAT 对照组 (U)	12.13±0.09	15.48±0.07	10.38±3.43
<i>P</i>	<0.01	<0.01	>0.05

3 讨论

本文用大肠杆菌激发后测定栉孔扇贝血清和血细胞中的 7 种酶的活力。发现血清中 ACP 活力显著提高,而血细胞中的 ACP 活力仅在 15 h 时显著提高。说明大肠杆菌既可以促进 ACP 的释放,又可以促进血细胞中 ACP 的产生。Cooper-Willis 1979 年用从海水中分离出的一种细菌“SWA”激发 *Patella vulgata* 时发现可使其血清和血细胞中的 ACP 活力均有提高,与本文结果基本一致。Foley 等 1977 年也观察到帘蛤血细胞在吞噬细菌时可通过脱颗粒的方式将水解酶释放到血清中,从而使水解酶在血细胞和血清中构成了一个水解酶体系。本文测定的溶菌酶活力仅血细胞中有显著的提高,而在血清中与对照组差异不显著,此结果与 Cheng 1975 年用巨大芽孢杆菌激发帘蛤可促进溶菌酶从血细胞释放到血清的结果不同,这可能是不同细菌的选择诱导作用不同及实验动物不同所致,有待于进一步的比较研究。

Cheng 等 1974 年指出细菌等异源物质进入动物体内,可激发一系列的免疫反应,对于没有产生抗体机构的双壳贝类来说,吞噬作用在其防御机制中就具有更为重要的作用。在吞噬前、吞噬过程中和吞噬后,各种水解酶、氧化酶和抗氧化酶发挥重要的作用。

Cheng 1975 年认为血清中的 ACP 具有类似调理素的功能,可改变细菌等的表面结构,增强其异己性,从而加快对异物的识别、吞噬和清除。水解酶多数位于溶酶体中,因此又被称为溶酶体酶。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。Anderson 1994 年指出伴随吞噬,产生大量的活性氧,具有杀菌作用,其中 H_2O_2 的杀菌作用可因 MPO 和卤素的存在而极大地加强。本文血细胞中依赖卤素的 MPO 活力显著提高,也说明 MPO 在防御大肠杆菌入侵中发挥重要作用。Pipe 等 1993 年指出活性氧对双壳类本身也有毒害作用,需要及时清除,SOD 和 CAT 等抗氧化酶分别可清除 O_2^- 和 H_2O_2 等。本文中 SOD 和 CAT 活力的提高也证明了其在栉孔扇贝防御中的作用。关于大肠杆菌激发后栉孔扇贝血清和血细胞中几种酶活力的变化规律不同的原因及不同酶之间的关系等还有待于深入的研究。

参考文献

- 1 丁秀云、李光友等。海洋与湖沼,1996,27(4):362~367
- 2 王继贵、邓宝爱等。临床生化检验。长沙:湖南科学技术出版社,1996。391~393

ACTIVITY CHANGE OF SEVEN ENZYMES IN HAEMOLYMPH IN SCALLOP *Chlamys farreri* AFTER CHALLENGE WITH *Escherichia coli*

SUN Hu-shan¹ LI Guang-you²

(¹Yantai Normal College 264025)

(²The First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao, 266003)

Received: Apr., 25, 1999

Key Words: *Escherichia coli*, *Chlamys farreri*, Haemolymph, Enzyme activity

Abstract

Seven kinds of hydrolytic, oxidant and antioxidant enzymes participating in the immune defense in the haemolymph of *Chlamys farreri* were assayed at 1, 15 and 30 h after challenge with *Escherichia coli* in November, 1998. The results show that the ACP activities of experimental groups in serum were much higher than that of control groups at 1, 15 and 30 h. The ACP activities of experimental groups in haemocytes were much higher than that of control groups only at 15 h. The differences of AKP activities of experimental and control groups in serum and haemocytes were not obvious

cept the group of serum at 30 h. The differences of lysozyme activities of experimental and control groups in serum and haemocytes were not notable except the group of haemocytes at 15 h. The PO activities of experimental groups in serum were much higher than that of control groups at 1, 15 and 30 h. There were no activities of PO in haemocytes. The differences of MPO activities of experimental and control groups in serum were not notable, but the differences in haemocytes were very significant. The differences of SOD activities in serum were not notable, but the differences in haemocytes at 15 and 30 h were very notable. The CAT activities of experimental groups in serum or in haemocytes were much higher than that of control groups at 1 h or at 1 and 15 h.