

# 脂多糖和弧菌对中国对虾血清磷酸酶、超氧化物歧化酶和血蓝蛋白的影响

张明<sup>1,2</sup>, 王雷<sup>1</sup>, 郭振宇<sup>1</sup>, 王宝杰<sup>1</sup>

(1 中国科学院海洋研究所生物工程中心, 山东青岛 266071; 2 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 于 2003 年 7~11 月实验研究了中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 在注射脂多糖 (LPS) 和弧菌刺激后一定时间内血清磷酸酶、超氧化物歧化酶和血蓝蛋白的变化情况。在实验期内, 注射弧菌后, 中国对虾体内酸性磷酸酶 (ACP) 的活性显著上升。LPS 和弧菌对超氧化物歧化酶的活性有一定的刺激作用。血蓝蛋白的含量, 在注射弧菌后有一定程度的上升。碱性磷酸酶在中国对虾血清中活性较低。

关键词: 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*); 血清; 磷酸酶; 超氧化物歧化酶; 血蓝蛋白; 刺激

中图分类号: Q 55 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)07-0022-04

解决大规模对虾疾病的根本途径是寻找免疫刺激剂提高对虾的自身免疫力, 而其前提是找到衡量对虾体质的免疫指标, 从而进行免疫刺激剂的筛选。然而关于甲壳动物的免疫机理研究较少, 同时又由于对虾个体采血量少、存在个体差异等原因, 所以这方面

---

收稿日期: 2004-03-05; 修回日期: 2004-04-30

基金项目: 国家 973 课题 (G1999012005)

作者简介: 张明 (1978-), 男, 山东烟台人, 硕士, 目前主要参与国家重点基础研究发展规划项目 (973), E-mail: zhangming@ms.qdio.ac.cn

还需要进行大量的工作。近几年通过借鉴在高等动物和昆虫免疫学研究中使用的方法,对中国对虾(*Penaeus chinensis*)的免疫指标开展了初步的研究。通过对中国对虾血清抗菌、溶菌以及酚氧化酶活力的检验,找到了能提高中国对虾免疫能力的多糖类物质<sup>[1]</sup>。同时发现真菌多糖能提高血细胞的吞噬能力、血清的溶血、溶菌以及凝集能力<sup>[2]</sup>。对血清中酶活力的检测,发现了海藻多糖和虫草多糖的免疫刺激功能<sup>[3]</sup>。作者通过注射 LPS 和弧菌进行刺激,测定了中国对虾体内的磷酸酶,超氧化物歧化酶的比活力以及血蓝蛋白含量在较短时间内的变化。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料与试剂

中国对虾购于青岛胶州养殖场,体长为 9.5~12cm,分养于玻璃钢水槽(约 1m<sup>3</sup>),实验前暂养 3d,24h 通气,水温为 20℃,盐度为 30。每天换水一次。鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)活化于 LB 培养基中,隔夜培养后用生理盐水洗下,调整菌浓度为 10<sup>8</sup>个/mL。对虾生理盐水:500mmol/L NaCl, 11.3mmol/L KCl, 13.3mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 26mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 23mmol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10mmol/L Hepes, pH 7.4。对虾抗凝剂采用 Vargas-Albores 的配方。LPS 购自 Sigma 公司,其余试剂为国产分析纯。酸性磷酸酶(ACP),碱性磷酸酶(AKP),超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒购自南京建成生物工程中心。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验分组与预处理

实验分为正常组、生理盐水对照组、注射 LPS 组和注射弧菌组。注射组分别在对虾腹尾处用微量注射器斜插入体腔注射。生理盐水组注射 50μL 生理盐水, LPS 注射 50μL (10μg/g 体质量), 弧菌每尾注射 50μL (10<sup>8</sup> 个/mL)。除正常组外,每组设计 7 个时间间隔,分别在刺激后的 15、30、60、120、240、480、960min 后从腹部采血。每个时间点取 6 只虾的血液,混合后待用。

#### 1.2.2 酶活力的测定

酸性磷酸酶试剂盒,采用酸性条件下的苯磷酸二钠分解法,以每毫克血清蛋白在 37℃与基质作用 30min 产生 1mg 酚作为比活力单位。

碱性磷酸酶试剂盒,采用碱性条件下的苯磷酸二钠分解法,以每毫克蛋白在 37℃与基质作用 15min 产生 1mg 酚作为比活力单位。

超氧化物歧化酶试剂盒采用黄嘌呤氧化酶法,以每毫克蛋白在 1 毫升反应液中 SOD 抑制率达到 50% 所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位。

#### 1.2.3 血蓝蛋白含量的测定

将 100μL 血清迅速用双蒸水稀释到 1mL,再用 10mm 石英比色皿在 335nm 处测吸光值<sup>[4]</sup>,以其近似地表示氧合血蓝蛋白的含量。

#### 1.2.4 蛋白含量的测定

考马斯亮兰法测定蛋白质浓度<sup>[5]</sup>。

## 2 实验结果

见图 1、2、3 图中横坐标的零时间点为正常对虾组。实验过程中注射弧菌组和 LPS 组死亡的对虾较多,造成弧菌组第 7 个时间点, LPS 组第 6 和第 7 个点没有对虾可以作为实验样品。LPS (10 μg/g) 在短时间内对 ACP 的影响不大(图 1),而弧菌组引起 ACP 活性显著上升。注射 LPS (μg/g) 或弧菌后, SOD 的比活力(图 2)相对于注射生理盐水组是上升的。LPS 对血蓝蛋白的影响不大(图 3),而注射弧菌后血蓝蛋白含量高于注射生理盐水组。实验过程中同样检测了每一实

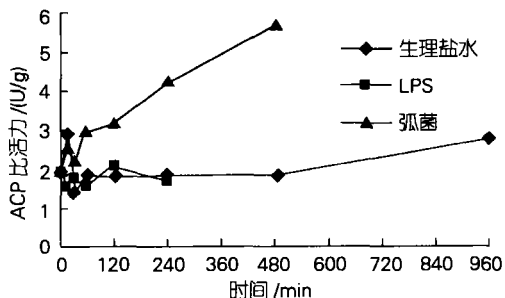


图 1 LPS 或弧菌对 ACP 的影响

Fig. 1 Effects of LPS or *V. anguillarum* on activity of ACP

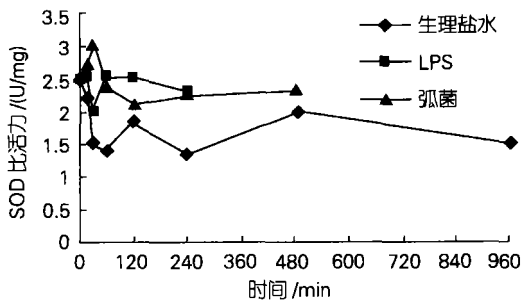


图 2 LPS 或弧菌对 SOD 的影响

Fig. 2 Effects of LPS or *V. anguillarum* on activity of SOD

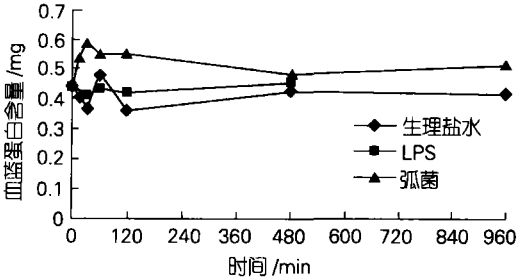


图 3 LPS 或弧菌对血蓝蛋白的影响

Fig. 3 Effects of LPS or *V. anguillarum* on hemocyanin

组血清的碱性磷酸酶活性,但由于活力太低,没有采用它作为一种指标。

### 3 实验讨论

对虾肝脏和血细胞中 ACP 和 SOD 活力测定受外界因素的影响很大,比如离心残留的血清影响、冻融细胞破碎的影响和实验处理过程中残留海水的影响等。所以,本实验只检测了血清中的酶活力。同时进行的组织特异性检验,发现碱性磷酸酶在血清中活性比较低,所以未把它作为血清指标。

本实验是在一个较短时间内测定血淋巴因子变化情况的,而目前国内进行的甲壳动物免疫指标研究,大多在较长时间内观察。作者认为,在较短时间内,可以看到相关血清因子的明显变化,而较长时间会有不同的反应,如注射弧菌后,免疫系统所发挥的杀菌作用造成大量自由基的产生,继而 SOD 酶活力升高,但在较长时间内,弧菌病肯定会破坏对虾的免疫系统。另一方面, LPS 刺激的剂量也是值得考虑的问题。实验注射的 LPS 按大约为  $10\mu\text{g/g}$  体质量的剂量,虽然会起到免疫刺激作用,但对对虾体质的威胁是显而易见的,在实验的后期大批的实验用虾死亡,这方面国外也有报道<sup>[10]</sup>。

酸性磷酸酶是由两个相同的亚单位构成的糖蛋白,在高等动物中存在于前列腺、肝、肾、骨等各种组织细胞中。当细胞损伤时,ACP 释放入血造成 ACP 含量升高。在高等动物中,血清 ACP 含量升高标志着免疫系统处于不利条件。而甲壳动物中的 ACP 来自于颗粒细胞的颗粒体,是溶酶体酶的标志酶。在注射 LPS 后对虾死亡前期 ACP 活力没有太大变化,而注射弧菌后 ACP 比活力明显上升,推测粒细胞中的溶酶体酶发挥了防御和杀菌作用,同时 ACP 在短时间

内的突然上升似乎是对虾免疫系统的一种应急反应,是否是因为血细胞破碎造成 ACP 的上升需进一步验证。

SOD 对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,该酶能清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受损伤。自由基主要是在细胞对异物的吞噬过程中产生的,过多的自由基对细胞和机体有很大的损伤, SOD 是清除自由基最重要的一种抗氧化酶。传统 SOD 测定的方法是邻苯三酚法,作者采用的试剂盒用黄嘌呤氧化法测定活力,得到了比邻苯三酚法稳定的结果,说明黄嘌呤氧化法也是一种测 SOD 活性的可靠方法。注射 LPS 后,血清的 SOD 活力明显高于生理盐水对照组。说明 LPS 能够提高机体的抗氧化能力。注射弧菌后的 SOD 活力也高于生理盐水对照组,原因是在感染弧菌后的短时间内细胞吞噬活性增强,用于杀菌的自由基大量产生,而 SOD 活力也随即升高用于清除大量产生的自由基。然而在较长的时间内 SOD 是否呈下降的趋势需进一步验证。丁秀云等<sup>[11]</sup>对皱纹盘鲍血淋巴的 SOD 活力进行检测,发现其在受到病原微生物侵染后, SOD 活力大大降低。

血蓝蛋白占甲壳动物血清总蛋白含量的  $60\% \sim 90\%$ <sup>[12]</sup>,在动物体内发挥着呼吸作用,为动物提供充足的氧量。血蓝蛋白在体外极易被氧化,同时氧化了的血蓝蛋白在  $335\text{nm}$  处有较高的吸光值,因此,可利用氧合血蓝蛋白的这一特性来检测血蓝蛋白的含量<sup>[13]</sup>。本实验采用  $335\text{nm}$  处的吸光值与总蛋白含量的比值作为参数,初步尝试了血蓝蛋白含量在注射 LPS 和弧菌条件下的变化情况。

多糖的免疫刺激功能早已得到证实<sup>[14]</sup>。然而单一多糖作为免疫药物的研究较少。实验采用 LPS 作为免疫刺激物发现,过量使用 LPS 对甲壳动物是非常不利的,本实验所采用的 LPS 剂量在  $10\mu\text{g/g}$  体质量,造成了许多对虾死亡,因此深入研究多糖的适宜剂量非常重要。

#### 参考文献

- 参考文献** 王雷,李光友,毛远兴,等.口服免疫型药物对中国对虾病害防治作用的研究<sup>[1]</sup> 海洋与湖沼, 1994 25 (5): 485-491
- 参考文献** 江晓路,刘树青.真菌多糖对中国对虾血清及淋巴细胞免疫和免疫活性的影响<sup>[2]</sup> 动物学研究, 1999 20 (1): 41-45
- 参考文献** 刘树青,江晓路,牟海津,等.免疫多糖对中国对虾血

- 清溶菌酶, 磷酸酶和过氧化物酶的作用 **报道** 海洋与湖沼, 1999 30(3): 278-283
- 报道** Nickerson K W, Van Holde K E. A comparison of molluscan and arthropod hemocyanin **报道** *Comp Biochem Physiol* 1971 38B: 855-872
- 报道** Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding **报道** *Anal Biochem* 1976 72: 248-254
- 报道** Sung H H, Kou G H, Song L. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) **报道** *Fish Pathol* 1994 29: 11-17
- 报道** 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 **报道** 海洋与湖沼, 1996 27(1): 362-367.
- 报道** Djangmah J S. The effects of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas and on blood-proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius) **报道** *Comp Biochem Physiol* 1970 32: 709-731
- 报道** Jeuniaux C. Hemolymph-Arthropod **报道** Florkin M, Scheer B J. *Chemical Zoology* **报道** New York: Academic Press 1971. 63-118

## Effect of lipopolysaccharide and *Vibrio anguillarum* on the activities of phosphatase, superoxide dismutase and the content of hemocyanin in the serum of *Fenneropenaeus chinensis*

ZHANG Ming<sup>1,2</sup>, WANG Lei<sup>1</sup>, GUO Zhen-yu<sup>1</sup>, WANG Bao-jie<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; <sup>2</sup> Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Mar. 5 2004

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; hemolymph; phosphatase; superoxide dismutase; hemocyanin; stimulation

**Abstract:** Hemolymph was collected by heart puncture from cultured prawn, *Fenneropenaeus chinensis*, with body length 9.5~12cm, from July to November, 2003. Alkaline phosphates activity in the serum was too low to be regarded an immunity index. After individual injection of lipopolysaccharide ( $10\mu\text{g/g}$ ) and *Vibrio anguillarum* ( $10^8\text{mL}$ ), activity of acid phosphatase (ACP), superoxide dismutase (SOD) and hemocyanin content were determined. Results showed that ACP activities was enhanced after injection of *Vibrio anguillarum*, SOD activity, however changed little through the same procedure. After *Fenneropenaeus chinensis* was stimulated by lipopolysaccharide ( $10\mu\text{g/g}$ ), activities of ACP and SOD enhanced slightly. The method of determining content of hemocyanin was first used in Chinese shrimp and its purpose as one tool to determine immunity of Chinese shrimp merits further investigation. At the same time, content of lipopolysaccharide should be given greater attention, as a concentration of  $10\mu\text{g/g}$  appeared to damage the shrimp's health.

(本文编辑:张培新)