

L-精氨酸对凡纳滨对虾体液免疫因子的影响

朱春华, 李广丽, 吴天力, 师尚丽, 吴灶和

(广东海洋大学 水产学院, 广东省水产经济动物病原生物学和流行病学重点实验室, 广东 湛江 524025)

摘要: 用添加不同剂量 *L*-精氨酸(*L*-arg)的饲料投喂凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 测定其血淋巴液中一氧化氮(NO)含量以及一氧化氮合成酶(NOS)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)和超氧化物歧化酶(SOD)活力, 并检测其对病原体的抗病力。结果显示: *L*-arg 显著提高血淋巴液中 NO 含量, 且变化趋势与 NOS、AKP 活性升高趋势相一致; 中等剂量(质量分数为 1%) *L*-arg 显著提高血淋巴液中 SOD 和 ACP 活性, 但高剂量(质量分数为 1.5%)、低剂量(质量分数为 0.5%) *L*-arg 对血淋巴液中 SOD(高剂量除外)和 ACP 活性影响不显著。副溶血弧菌人工感染后, 中剂量 *L*-arg 组(1%)对虾死亡率最低, 高剂量(1.5%)、低剂量组(0.5%)次之, 对照组死亡率最高, 各剂量 *L*-arg 组死亡率与对照组相比差异显著。表明饲料中添加适量 *L*-精氨酸可使对虾体液免疫因子总体活力达到较高水平, *L*-精氨酸含量过高对对虾非特异免疫力的作用效果反而不佳。

关键词: 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*); *L*-精氨酸; 一氧化氮合成酶; 酸性磷酸酶; 碱性磷酸酶; 超氧化物歧化酶

中图分类号: S945.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)02-0055-05

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)又称南美白对虾, 是我国南方地区的重要养殖对象。近年来, 随着对虾的“桃拉病”、“白斑病”等疾病在南方地区大面积爆发, 虾病成为制约对虾养殖业发展的瓶颈。目前虾病仍是采用药物防治为主, 但大量使用药物不仅破坏了养殖水环境的生态平衡, 而且还导致某些病原体对药物产生了耐药性而无法有效地控制疾病的发生。同时, 药物的使用还给人类食品安全造成了隐忧。因此, 通过提高动物的自身免疫力防止疾病发生, 成为目前最为安全、有效, 而且最具前景的途径之一。

目前普遍认为甲壳类动物缺乏脊椎动物所具有的特异性免疫, 仅具有非特异的细胞防御和体液免疫, 主要依赖血细胞吞噬、水解酶、氧化酶、活性氧和一氧化氮合成酶(NOS)系统等, 非特异性地杀伤细菌、真菌、寄生虫及病毒, 对甲壳类动物免疫防御起重要的调节作用。国内外学者多采用脂多糖、葡聚糖、灭活弧菌等免疫增强剂提高对虾自身非特异性免疫力, 并取得了较好效果^[1~7]。

精氨酸是动物的必需氨基酸之一, 它参与体内多种营养物质的合成与代谢, 同时精氨酸又是一种免疫调节剂。目前在脊椎动物方面已开展较多的有关精氨酸的营养与免疫调节作用的研究^[8,9]。但是在水生甲壳动物方面主要集中在精氨酸的需求量, 对精氨酸的免疫调节作用的研究较少^[10,11]。本研究尝试在对虾饲料中添加不同剂量的 *L*-精氨酸, 研究对虾口服 *L*-精氨酸后, 血淋巴液中与机体非特异免

疫相关的一氧化氮含量以及一氧化氮合成酶(NOS)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)和超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化, 探讨 *L*-精氨酸提高对虾非特异免疫力的效果与影响途径, 为虾类传染性疾病的综合防治研究奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验用对虾

凡纳滨对虾购自湛江市东海岛广华虾苗场, 体长 6.8~8.5 cm, 体质量 9~12 g, 对虾在昼夜充气的水泥池中暂养 7 d 后, 选择健康的凡纳滨对虾进行实验, 实验在该场的育苗车间进行。

1.2 实验设计

在基础饲料(蛋白质、脂肪和灰分的质量分数分别为 38%、6%和 9%; 精氨酸质量分数为 1.8%)中分别添加由羧甲基纤维素(CMC)包被的质量分数分别为 1.5%、1%和 0.5%的 *L*-精氨酸, 配制成高、中、低三个不同梯度的对虾实验饲料。将凡纳滨对虾随机分成 4 组, 实验组分别投喂含 *L*-精氨酸高、中、低三种剂量的实验饲料, 对照组投喂基础饲料原份制成的饲料。实验在 300 L 的实验水槽中进行, 每个

收稿日期: 2008-04-01; 修回日期: 2008-05-19

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(5011783)

作者简介: 朱春华(1967-), 男, 副教授, 湖南益阳人, 主要从事水产经济动物增殖学教学和研究工作, 电话: 0759-2339348, E-mail: zhuch@gdou.edu.cn

水槽放 50 尾凡纳滨对虾, 每组设 3 个平行。实验期间昼夜充气, 平均水温 $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, pH 7.6~8.0, 盐度 28 ± 2 , 每天投饵 3 次。

按实验设计连续投喂 4 周后, 每组随机取 12 尾凡纳滨对虾, 在第四步足基部血窦处抽取血淋巴, 经 4 000 r/min 低温离心 5 min, 吸取上清液, 置于 -20°C 冰箱备用。

取样后在剩余的凡纳滨对虾中随机抽取 20 尾进行攻毒实验。采用腹部肌肉注射, 每尾虾注射浓度为 1×10^8 个/mL 的副溶血弧菌 100 μL , 注射后 24、96、168 h 统计各组的死亡率, 观察凡纳滨对虾在投喂 *L*-精氨酸后对病原体的抗病力。实验用副溶血弧菌由广东省水产经济动物病原生物学和流行病学重点实验室提供。

1.3 体液免疫指标的测定

一氧化氮(NO)、一氧化氮合成酶(NOS)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)和超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒分别购自南京建成生物工程研究所, 测定方法参照试剂盒说明进行。

NOS 试剂盒以每毫升血淋巴液每分钟生成 1 μmol NO 定义为一个酶活力单位, 表示为 U/mL; SOD 试剂盒采用黄嘌呤氧化酶法, 以每 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个活力单位, 表示为 U/mL; ACP 试剂盒采用酸性条件下的苯磷酸二钠分解法, 以 100 mL 血淋巴液在 37°C 与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚作为 1 个活力单位, 表示为 U/100 mL; AKP 试剂盒采用碱性条件下的苯磷酸二钠分解法, 以 100 mL 血淋巴液在 37°C 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚作为 1 个金氏单位, 表示为金氏单位/100 mL。NO 试剂盒的测定采用硝酸还原酶法。

1.4 统计分析

凡纳滨对虾血淋巴液中各免疫指标数值采用平均值士标准误(mean $\pm$ S.E)表示。用 SPSS12.0 统计软件中 Duncan's 新复极差法检验各组之间的差异, 当 $P < 0.05$ 时表示差异显著。

2 结果

2.1 凡纳滨对虾血淋巴液中 NOS 活性和 NO 含量的变化

凡纳滨对虾投喂含不同剂量 *L*-精氨酸的饲料 4 周后, 高剂量(质量分数 1.5%)、中剂量(质量分数

1%) 组血淋巴液中 NOS 活性明显升高($P < 0.05$), 而低剂量(质量分数 0.5%) 组 NOS 活性虽升高, 但与对照组相比差异不显著。NO 含量的变化与 NOS 活性升高趋势相一致, 且三个剂量组与对照组之间有显著差异。NO 含量以及 NOS 活性的变化与 *L*-精氨酸剂量具有明显的剂量依存关系(图 1)。

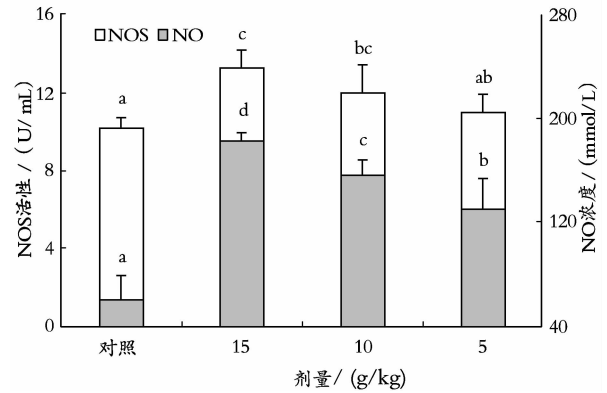


图 1 不同剂量 *L*-arg 对凡纳滨对虾血淋巴液中 NOS 活性和 NO 含量的影响

Fig. 1 Effect of *L*-arg on serum NO concentration and NOS activity in *Litopenaeus vannamei*

注: 图中 a、b、c、d 表示数据之间差异显著性, 下同

Values with different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) within the data

2.2 凡纳滨对虾血淋巴液中 SOD 活性的变化

凡纳滨对虾投喂 *L*-精氨酸 4 周后, 高、中剂量组血淋巴液中 SOD 活性显著升高($P < 0.05$), 且以中剂量 *L*-精氨酸促 SOD 效果最为显著, 低剂量 *L*-精氨酸虽然可在一定程度上提高血淋巴液中 SOD 活性, 但效果较高、中剂量差, 且与对照组相比无显著差异(图 2)。

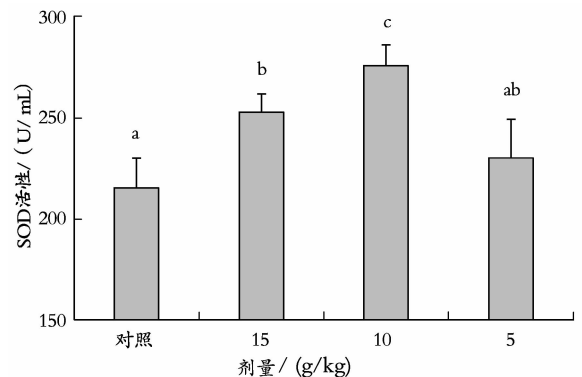


图 2 不同剂量 *L*-arg 对凡纳滨对虾血淋巴液中 SOD 活性的影响

Fig. 2 Effect of *L*-arg on serum SOD activity in *Litopenaeus vannamei*

2.3 凡纳滨对虾血淋巴液中 ACP 和 AKP 活性的变化

投喂 *L*-精氨酸后,凡纳滨对虾血淋巴液中磷酸酶 ACP 和 AKP 的变化趋势不完全一致。中、低剂量 *L*-精氨酸明显促进凡纳滨对虾血淋巴液中 ACP 活性,但高剂量 *L*-精氨酸反而使血淋巴液中 ACP 活性降低(图 3);而三种剂量 *L*-精氨酸都能促进凡纳滨对虾血淋巴液中 AKP 活性,但低剂量 *L*-精氨酸促进 AKP 活性升高的效果不显著($P>0.05$,图 4)。

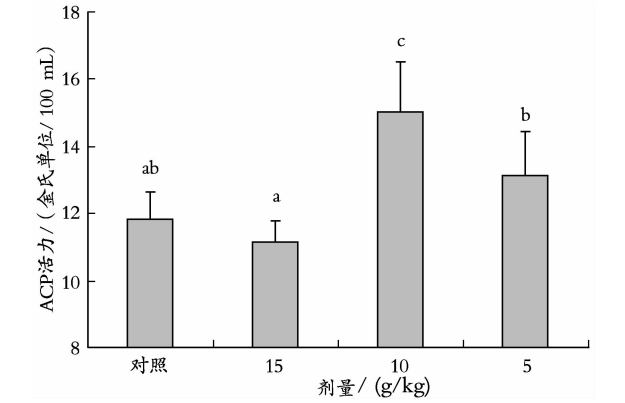


图 3 不同剂量 *L*-arg 对凡纳滨对虾血淋巴液中 ACP 活性的影响

Fig. 3 Effect of *L*-arg on serum ACP activity in *Litopenaeus vannamei*

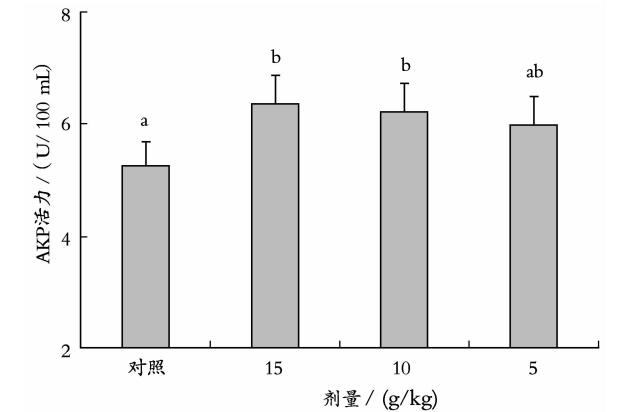


图 4 不同剂量 *L*-arg 对凡纳滨对虾血淋巴液中 AKP 活性的影响

Fig. 4 Effect of *L*-arg on serum AKP activity in *Litopenaeus vannamei*

2.4 人工感染副溶血弧菌后各实验组凡纳滨对虾的死亡率

连续投喂 4 周添加 *L*-精氨酸饲料的凡纳滨对虾,人工感染副溶血弧菌,24 h 后中、低剂量组死亡率较低;经过 96 h 和 168 h 后,对照组与各处理组之间死亡率出现明显差异,表现为中剂量组凡纳滨对虾死亡率较低,高、低剂量组次之,而对照组死亡率最高(表 1)。

表 1 人工感染副溶血弧菌后凡纳滨对虾的死亡率

Tab. 1 Mortality rate of *litopenaeus vannamei* due to *Vibrio parahaemolyticus* infection

组别	死亡率(%)		
	攻毒后 24 h	攻毒后 96 h	攻毒后 168 h
对照组	16.9±2.7 ^a	39.0±3.6 ^d	67.7±2.5 ^d
1.5% <i>L</i> -arg	16.3±6.1 ^a	28.3±1.5 ^c	50.0±3.4 ^c
1% <i>L</i> -arg	3.2±2.8 ^b	9.6±0.5 ^a	22.7±2.0 ^a
0.5% <i>L</i> -arg	8.1±2.7 ^b	18.9±2.6 ^b	33.3±3.4 ^b

3 讨论

精氨酸在动物体内的免疫调节作用主要通过两个代谢途径:NO 途径和精氨酸酶途径。NO 途径是指精氨酸在 NOS 作用下生成瓜氨酸和 NO,而精氨酸酶途径则是催化精氨酸生成尿素和鸟氨酸^[11]。NOS 是动物体内合成 NO 的关键限速酶。根据 NOS 来源及催化特性的不同,可分为内皮型 NOS (eNOS),神经型 NOS (nNOS),以及诱导型 NOS (iNOS)。前两者统称结构型(cNOS),为多种细胞所固有,而后者在一般生理状态下不表达,只有在细胞因子等诱导条件下表达,其催化产生的 NO 是巨噬细胞杀伤肿瘤细胞和病原微生物的主要物质。NO 广泛分布于生物体的各器官,参与机体多种重要的生理和病理活动,如血流调节、血栓形成、神经传导、生殖过程等,它不但是血液循环、神经传递及免疫杀伤的生理学信使,而且还是许多病理状态下的活性介质。NO 既是肿瘤免疫、微生物免疫的效应分子,又是多种免疫细胞的调节因子,还可以通过非特异性杀伤细菌、真菌、寄生虫及病毒等,增强机体的非特异性免疫功能。小剂量的 NO 可作为第二信使和细胞间的信息交换载体在机体中发挥重要作用,但大剂量的 NO 则可产生细胞毒性作用而引起动物死亡^[12~14]。

本研究发现,凡纳滨对虾血淋巴液中 NOS 活性和 NO 含量变化与 *L*-精氨酸有明显的剂量依存关系。饲料中添加适量 *L*-精氨酸可诱导产生适度的 NOS 表达,从而产生适度的 NO 含量,增强机体的非特异性免疫功能,提高宿主抵抗病菌侵袭的能力,降低对虾死亡率。但高剂量 *L*-精氨酸可能诱导 NOS 表达过度,导致 NO 产生过量,过量的 NO 又通过某些化学反应生成多种毒性衍生物或毒性代谢产物,

当体内合成这些毒性产物的量超过了机体所能清除的限度,就会对机体的特定组织和器官造成损伤,从而促发一系列病理过程,最终导致动物死亡。很多实验业已证明,动物自身免疫性疾病、败血症休克、心肌缺血等疾病均与 iNOS 表达有关^[13]。

超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内一种重要的抗氧化酶,是活性氧自由基的天然消除剂,在防御机体衰老及防止生物分子损伤等方面具有极为重要的作用^[16]。本研究中,凡纳滨对虾投喂 L-精氨酸后高、中剂量组血淋巴中 SOD 活性明显升高,且中剂量 L-精氨酸促 SOD 升高效果最为显著,表明中剂量组消除活性氧由基的功能最强,这与攻毒后中剂量组死亡率最低的结果也完全吻合。本研究结果与刘恒等^[7]用免疫多糖投喂南美白对虾后,肌肉组织匀浆中的 SOD 活性提高并增强其免疫机能的结果,以及江晓路等^[3]对中国对虾、牟海津等^[15]对栉孔扇贝的研究结果相一致。

ACP 和 AKP 均为磷酸单酯酶,广泛存在于动物体内,直接参与磷酸基团的转移与磷酸脂的代谢。ACP 和 AKP 作为溶酶体的重要组成部分和标志酶,在免疫反应中,两种磷酸酶活力常被用来作为判断虾类免疫能力的指标之一^[3]。本实验中,除高剂量 L-精氨酸使血淋巴中 ACP 活性稍降低外,其他剂量的 L-精氨酸都使血淋巴中 ACP 和 AKP 活性升高,表明二者对异源物质进行降解破坏的能力增强,ACP 在血细胞进行吞噬和包裹反应中,通过水解作用将表面带有磷酸酯的异物破坏或降解,同时,AKP 可加速物质的转运和摄取,为 ADP 转化为 ATP 提供更多所需的无机磷,从而起到增强非特异性功能,保护机体的作用。某些多糖类物质在增强对虾体质和免疫功能的过程中,也已观察到血淋巴中 ACP 和 AKP 活性的提高^[6]。但本实验中,高剂量 L-精氨酸组血淋巴中 ACP 活性受到部分抑制,原因尚有待进一步研究。

综上所述,饲料中添加适量 L-精氨酸可使对虾体液免疫因子总体活力达到较高水平,L-精氨酸含量过高对对虾非特异免疫力的作用效果反而不佳。

参考文献:

[1] 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(4):486-492.

- [2] Hami T,Asano M,Tokushige K,*et al.* Enhancement of disease-resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum* [J]. **Aquaculture**, 1998,164:277-288.
- [3] 江晓路,刘树青,张朝晖,等. 多糖对中国对虾免疫功能的影响[J]. 中国水产科学,1999,6(1):66-68.
- [4] 昌鸣先,陈孝煊. 两种多糖对日本沼虾酚氧化酶活力的影响[J]. 水生生物学报,2003,27(3):269-272.
- [5] 王秀华,宋晓玲,黄健. 肽聚糖制剂对南美白对虾体液免疫因子的影响[J]. 中国水产科学,2004,11(1):26-30.
- [6] 刘树清,江晓路,牟海津,等. 免疫多糖对中国对虾血淋巴液溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶性的作用[J]. 海洋与湖沼,1999,30(3):278-284.
- [7] 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.
- [8] 袁中彪,陈代文. 精氨酸的免疫作用[J]. 中国饲料,2003,6:35-36.
- [9] Carmelo N J, Bobbi L- H. Arginine and immunity: a unique perspective[J]. **Biomed Pharmacother**, 2002, 56: 471-482.
- [10] 周凡,邵庆均. 水产动物精氨酸需求的研究进展[J]. 广东饲料,2007,16(2):26-27.
- [11] 占秀安,刘平,王永侠. 对虾的氨基酸营养研究进展[J]. 水产科学,2007,26(3):175-178.
- [12] Moncada S, Palmer R M J, Higgs E A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology[J]. **Pharmacol Rev**, 1991, 43:109-142.
- [13] Ignarro L J. Physiology and pathophysiology of nitric oxide[M]. *Kidney Int*, 1996. 55:S2-5.
- [14] Wildhirt S M, Dudek R R, Suzuki H, *et al.* Involvement of inducible nitric oxide synthase in the inflammatory process of myocardial infarction [J]. **Int J Cardiol**, 1995, 50: 253-261.
- [15] 牟海津,江晓路,刘树清,等. 免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 青岛海洋大学学报,1999,29(3):463-468.
- [16] 姚翠鸾,王维娜,王安利. 水生动物体内超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 海洋科学,2003,27(10):18-21.

Effects of *L*-arginine on the humoral immunizing factors of *Litopenaeus vannamei*

ZHU Chun-hua, LI Guang-li, WU Tian-li, SHI Shang-li, WU Zao-he

(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Provincial Key Laboratory of Pathogen Biology and Epidemiology of Aquatic Economic Animals of Guangdong, Zhanjiang 524025, China)

Received: Apr. ,01,2008

Key words: *Litopenaeus vannamei*; *L*-arginine; NOS; ACP; AKP; SOD

Abstract: The American white shrimp *Litopenaeus vannamei* of the body length 6.8~8.5 cm was collected from a culture farm in Zhanjiang. One control group (raw diets) and three levels of *L*-arginine (*L*-arg) groups were designed. The levels of *L*-arginine added in the raw diets were 1.5%, 1% and 0.5%, respectively. The period was 4 weeks. Humoral immunizing factors such as NOS, NO, ACP, AKP and SOD, as well as the sensitivity of the shrimp to *Vibrio parahaemolyticus* were investigated. The results showed that *L*-arginine at doses from 0.5% to 1.5% induced the increase of serum NO levels, which were in accordance with the increase of serum NOS and AKP levels. Both serum SOD and ACP levels increased significantly in the 1% *L*-arg -fed group, however, there was no significant difference in SOD(except for SOD in 1.5% *L*-arg -fedgroup) and ACP levels in 1.5% and 0.5% *L*-arg -fed groups. The lowest death rate was found in 1% *L*-arg-fed group, then in the 0.5% and 1.5% *L*-arginine-fed groups, and the highest death rate was found in the control group under infection *V. parahaemolyticus*. There was a significant difference in death rate between the control group and the *L*-arg-fed groups. The results suggested an adequate added level of *L*-arginine (e. g. 1%) could increase the activities of the immune factors in shrimp up to a high level, but the higher added level would not have a good effect on the non-specific immunity in shrimp.

(本文编辑:康亦兼)