

溶藻弧菌对三疣梭子蟹抗氧化酶系统的影响

陈萍, 李吉涛, 李健, 刘淇, 刘萍

(中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:从患乳化病的养殖三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)体组织内分离出病原菌——溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*),通过肌肉注射的方式对三疣梭子蟹进行感染实验,对照组注射等量的生理盐水,在感染后0、24、48和72 h分别采集不同处理组三疣梭子蟹的血淋巴、肌肉和肝胰腺组织,测定溶藻弧菌对其各组织抗氧化相关酶活的影响。结果表明:注射生理盐水的对照组三疣梭子蟹体组织中抗氧化酶和MDA含量在不同的采样时间变化不显著($P>0.05$)。与对照组比较,三疣梭子蟹感染溶藻弧菌后血淋巴、肌肉和肝胰腺组织中SOD活性随着感染时间的延长显著降低($P<0.05$)。在感染溶藻弧菌24 h时血淋巴和肝胰腺组织中GSH-px活性有增强的趋势($P>0.05$),随后在感染48 h后GSH-px活性显著降低($P<0.05$);感染组各体组织中的MDA含量均随着感染时间的延长而显著上升($P<0.05$)。结果显示梭子蟹感染溶藻弧菌后机体消除氧化过程自由基的抗氧化酶活降低,脂质过氧化物水平升高,使得抗氧化防御能力下降。

关键词:三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*);溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*);抗氧化酶活;脂质过氧化物

中图分类号:S968.25

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2009)05-0059-05

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)广泛分布于中国、朝鲜、日本等海域,其中我国分布最广,主要在山东、浙江、广西、广东、福建沿海等水域,因其食用价值高、生长快、产量高,具有重要的经济价值,已经成为我国重要的渔业捕捞对象和海水养殖对象^[1]。但近年来,由于养殖规模的不断扩大、养殖环境的污染等损害了三疣梭子蟹免疫防御系统,导致自身的抗病力下降,对病害的易感性增加,疾病频繁发生,例如近几年由弧菌引起的“乳化病”给三疣梭子蟹养殖业带来了重大经济损失。目前,研究工作者已经对该病的流行病学、病原鉴定及防治进行了相关的研究^[2~5],但是有关患病梭子蟹体内生化病理的报道尚不多见。弧菌在动物体内进行生物作用过程会产生过量的自由基,导致机体抗氧化酶活性发生变化,对机体造成氧化损伤,表现毒理症状^[6~8],因此抗氧化酶活性的变化可以作为弧菌对生物体所产生的毒性效应的生物标志物之一。本研究利用从患病的养殖三疣梭子蟹体组织内分离出病原菌——溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)^[9],对健康三疣梭子蟹进行溶藻弧菌人工感染后,测定感染后不同时相体组织中的超氧化物歧化酶(Superoxide dimutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-px)以及丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量的变化,以探讨三疣梭子蟹感染溶藻

弧菌后不同体组织抗氧化酶活性效应的影响,为三疣梭子蟹疾病的防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

三疣梭子蟹饲养于黄海水产研究所小麦岛试验基地,平均体质量 $176\text{ g}\pm 21.3\text{ g}$,每只蟹单笼饲养,每5只蟹置于一个200 L PVC桶中饲养,持续充气,水温 25°C 左右,暂养2周后进行试验,每天喂料换水一次。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离

菌株PX25,本实验室分离自山东潍坊池塘养殖的患有“乳化病”的三疣梭子蟹的体组织,经回接感染证实为该病的病原菌^[9],经生理生化特征测定和16SrRNA基因序列相似性分析将该病原菌鉴定为溶藻弧菌^[10]。

收稿日期:2008-10-06;修回日期:2008-11-20

基金项目:国家863计划项目(2006AA10A406);山东省博士后创新项目(200702012);中国博士后科学基金项目(20080431220)

作者简介:陈萍(1978-),女,山东诸城人,博士,研究方向为甲壳动物免疫学,电话:13658664831, E-mail: chenping@ysfri.ac.cn;李健,通信作者, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

1.2.2 感染实验设计

将溶藻弧菌接种于 TSA 琼脂固体培养基上扩大培养 24 h 后,用无菌生理盐水清洗,配制成 2×10^8 个/mL 浓度梯度。从三疣梭子蟹第三对步足基部注射 300 μ L 作为感染组;对照组注射等体积无菌生理盐水,在梭子蟹注射感染后 0、24、48、72 h 分别采集对照组和感染组样品用于酶活测定,每个采样时间点每个处理各取 10 只三疣梭子蟹用于试验。

1.2.3 样品制备

血淋巴制备 用注射器从三疣梭子蟹第三或第四步足基部插入取血淋巴,置于 Eppendorf 管中 4 $^{\circ}$ C 过夜,经冷冻高速离心吸出血清待测。

肌肉、肝胰腺匀浆 分别迅速取三疣梭子蟹的肌肉和肝胰腺-80 $^{\circ}$ C 冷冻保存,测定时肌肉和肝胰腺样品分别加入 3.5 倍和 10 倍的 0.1 mol/L 磷酸钾盐缓冲液(pH6.4),低温匀浆、离心(4 $^{\circ}$ C, 5×10^3 r/min, 10 min),分别取上清液用于酶活测定。

1.3 样品分析

SOD 酶活测定采用黄嘌呤氧化法的改进——羟胺法^[11];以每 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个酶活力单位(U/mL)。试剂购自南京建成生物工程研究所。

GSH-px 酶活测定采用 5,5'-二硫代硝基苯甲酸(DTNB)比色法^[6];以每 mg 组织蛋白每分钟扣除酶促反应作用,使反应体系中 GSH 降低 1 μ mol/L 为一个酶活力单位(U/(mg·min))。试剂购自南京建成生物工程研究所。

MDA 的测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法^[12];试剂购自南京建成生物工程研究所。

组织匀浆粗提液中蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 比色法进行蛋白定量,参照 Bradford^[13]方法稍加改进后进行测定。牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA, AMRESCO 公司)为标准蛋白。

1.4 数据处理

数据统计与分析采用 SPSS 11.0 软件,结果以平均数 \pm 标准误差表示,感染组和对照组间的差异性分析采用 Student's t-test 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

三疣梭子蟹感染溶藻弧菌 24 h 以后采食量开始减少,感染 48 h 开始出现死亡,感染 96 h 后梭子蟹死亡率达到 100%,因此 72 h 后没有进行采样;而对照组三疣梭子蟹的采食量在整个试验期没有变化,并且试验期间没有死亡。这表明溶藻弧菌感染试验是有效的。

2.1 溶藻弧菌对三疣梭子蟹体组织 SOD 活性的影响

图 1 为对照组和感染溶藻弧菌试验组的梭子蟹血淋巴、肌肉和肝胰腺中 SOD 活性的变化。

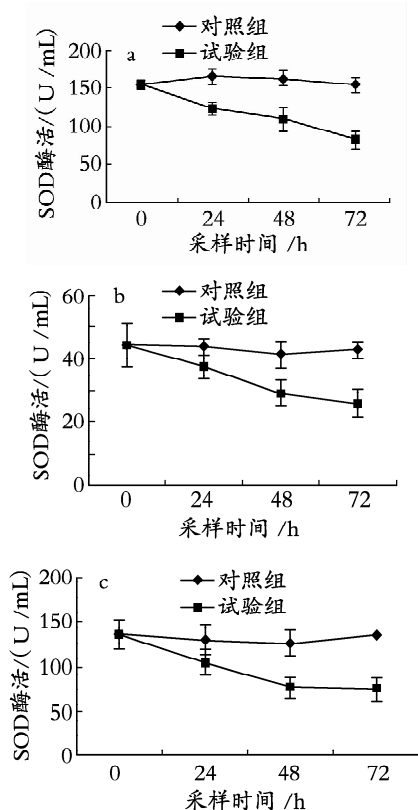


图 1 对照组和感染溶藻弧菌试验组的梭子蟹血淋巴 (a)、肌肉 (b) 和肝胰腺 (c) 中 SOD 活性的变化

Fig. 1 Changes in SOD activities in haemolymph (a), muscle (b) and hepatopancreas (c) of control and infected crabs

由图 1 可以看出:血淋巴、肌肉、肝胰腺中 SOD 活性在各组织分布不相同,从大到小依次为血淋巴>肝胰腺>肌肉。感染溶藻弧菌后三疣梭子蟹血淋巴、肌肉和肝胰腺组织中 SOD 活性随着感染时间的延长均显著下降 ($P < 0.05$),且在感染 48 h 内降低速度最快。注射生理盐水的对照组梭子蟹各组织器官中 SOD 活性在感染后不同时相没有显著差异 ($P > 0.05$)。

2.2 溶藻弧菌对三疣梭子蟹体组织 GSH-px 活性的影响

从三疣梭子蟹不同体组织中 GSH-px 酶活的测定结果(图 2)来看,梭子蟹不同组织中 GSH-px 活性各异,从大到小依次为肝胰腺>肌肉>血淋巴,注射生理盐水的对照组各组织 GSH-px 活性在不同的采样时间没有显著变化 ($P > 0.05$)。感染溶藻弧菌的梭子蟹血淋巴和肝胰腺组织 GSH-px 酶活在感染

24 h时分别稍微或显著高于对照组,而在感染 48 h 后 GSH-px 酶活在这两种组织中均迅速降低,且显著低于对照组 ($P < 0.05$);感染组梭子蟹肌肉组织中 GSH-px 酶活在感染 24 h 开始出现下降的趋势,并且随着感染时间的延长显著下降 ($P < 0.05$)。

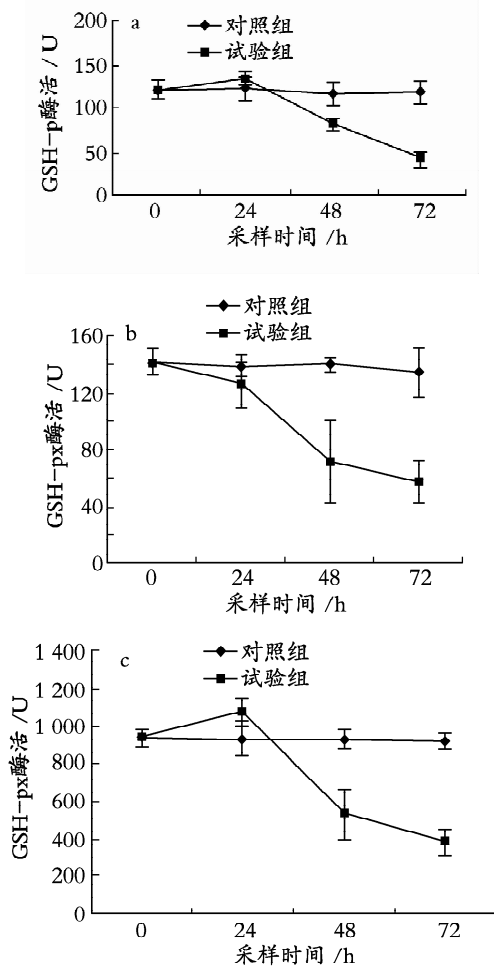


图2 对照组和感染溶藻弧菌试验组的梭子蟹血淋巴(a)、肌肉(b)和肝胰腺(c)中 GSH-px 活性的变化
Fig. 2 Changes in GSH-px activities in haemolymph (a), muscle (b) and hepatopancreas (c) of control and infected crabs

2.3 溶藻弧菌对三疣梭子蟹体组织 MDA 含量的影响

三疣梭子蟹血淋巴、肝胰腺和肌肉中脂质过氧化物(MDA)含量不同时间点的变化见图3。由图可以看出,不同组织中 MDA 含量不同,肝胰腺中最高,血淋巴中含量最低;对照组各组织的 MDA 含量在不同的采样时间没有显著差异 ($P > 0.05$);试验组梭子蟹肝胰腺和肌肉组织中 MDA 含量在感染 24 h 与对照组差异不显著 ($P > 0.05$),而后随着感染时间的延长显著升高 ($P < 0.05$);血淋巴中 MDA 的含量

在感染溶藻弧菌后显著升高 ($P < 0.05$),感染 72 h 时的含量比对照组增加了 1 倍多。

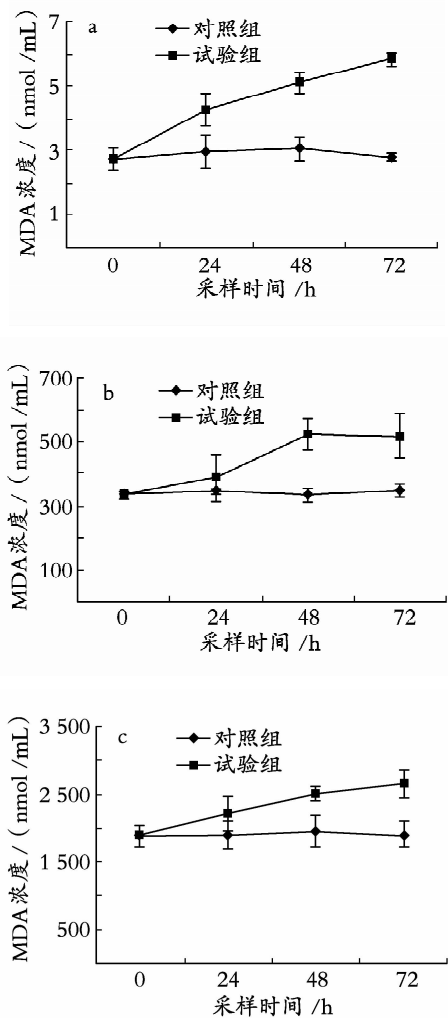


图3 对照组和感染溶藻弧菌试验组的梭子蟹血淋巴(a)、肌肉(b)和肝胰腺(c)中 MDA 含量的变化
Fig. 3 Changes in MDA content in haemolymph (a), muscle (b) and hepatopancreas (c) of control and infected crabs

3 讨论

研究表明,机体的抗氧化防御系统作为需氧生物体内活性氧自由基清除、防止过氧化损伤的主要保护机制,负责清除组织细胞代谢产生的活性氧自由基,使之始终维持较低水平而不致在体内聚积,以保护生物体内功能大分子不被氧化破坏,保持机体正常的生理功能^[8]。SOD 和 GSH-px 是动物机体的主要抗氧化酶,它们的含量和活性影响机体内的活性氧自由基水平以及脂质过氧化终末代谢产物 MDA 含量。

本研究中,SOD 活性在不同的组织中含量不同,

说明 SOD 存在明显的组织差异性,这是由于肝胰腺是三疣梭子蟹的脂类代谢中心,该组织积累了较多的脂肪酸,需要较强的抗氧化酶体系,以保证肝胰腺的正常生理功能^[6]。感染组蟹体组织 SOD 酶活显著降低,可能是由于感染溶藻弧菌后产生有害的游离自由基的作用,使得机体抗氧化系统机能紊乱,代谢失调,酶活性下降^[14]。本试验结果与翟秀梅等^[7]用副溶血弧菌感染南美白对虾对体组织 SOD 活性降低的变化趋势一致。溶藻弧菌感染后,产生的较多的自由基,机体需要增加抗氧化酶活来消除这些自由基,但是这时机体组织的抗氧化状态反而较差,使得抗氧化系统失败。

与对照组比,感染溶藻弧菌初期梭子蟹血淋巴和肝胰腺组织中 GSH-px 活性显著高于正常水平,而在感染后期其活性显著降低。GSH-px 是细胞内清除过氧化物的关键酶,酶活性的高低反应了细胞过氧化物的多少及膜脂质过氧化程度。Mathew 等^[8]用白斑病毒感染斑节对虾发现,体组织 GSH-px 酶活显著降低,而本试验梭子蟹在溶藻弧菌感染后血淋巴和肝胰腺酶活在感染初期先升高,而感染后期显著降低。这可能是梭子蟹在弧菌感染后产生大量的自由基,为中和这些自由基而发生氧化反应,使得 GSH-px 活性上升;而在感染的后期,由于溶藻弧菌的作用 GSH-px 酶活受到抑制,产生的自由基不能及时清除,导致过氧化物的生成过多,降低机体的抗氧化防御能力^[15]。

MDA 是细胞脂质过氧化的代谢产物,其含量的高低反映了机体细胞受自由基攻击的程度。抗氧化系统失败与脂质过氧化和由此引发的组织损害有着密切的关系^[6],本试验感染组梭子蟹体组织脂质过氧化产物 MDA 含量增加与组织中抗氧化酶活性降低而导致的免疫防御损害相适应,这也与陈寅儿等^[16]报道三疣梭子蟹患“乳化病”后体组织 MDA 含量增加的结果一致。感染溶藻弧菌后体内自由基积累,加剧了膜质过氧化,使膜的结构和功能遭受破坏,进而引起一系列生理生化代谢紊乱,导致机体抗氧化机能的损害^[14]。

本研究结果显示三疣梭子蟹感染溶藻弧菌后体组织的抗氧化酶和脂质过氧化 MDA 含量发生明显变化,SOD、GSH-px 酶作为内源活性氧清除剂,在溶藻弧菌感染初期可以清除体内过量的活性氧,维持活性氧代谢平衡,保护膜结构,从而使动物机体在一定程度上减缓病菌胁迫,但是这种作用是有限度的,随着感染时间的延长,抗氧化酶活性可能因为中毒而被抑制。因此,抗氧化酶 SOD 和 GSH-px 酶活及 MDA 含量的变化在一定程度上反映了溶藻弧菌对

机体抗氧化防御系统的损伤作用,可以作为三疣梭子蟹疾病诊断的重要生化指标。

参考文献:

- [1] 戴爱云,杨思谅,宋玉枝,等. 中国海洋蟹类[M]. 北京:海洋出版社,1986. 213-214.
- [2] 吴友吕,刘士忠. 三疣梭子蟹死因探讨[J]. 东海海洋,1998,13(2): 37-41.
- [3] 许文军,徐汉祥,金海卫,等. 梭子蟹“乳化病”病原的研究[J]. 浙江海洋学院学报,2003,22(3): 209-213.
- [4] 王国良,金珊,李政,等. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)乳化病的组织病理和超微病理研究[J]. 海洋与湖沼,2006,37(4): 297-304.
- [5] Ewen J G, Thorogood R, Karadas F, et al. Influences of carotenoid supplementation on the integrated antioxidant system of a free living endangered passerine, the hihi (*Notiomysticincta*) [J]. *Comp Biochem Physiol* (A), 2006, 143(2): 149-154.
- [6] Sulochana K N, Biswas I, Ramakrishnan S. Eales' disease increased oxidation and peroxidation products of membrane constituents chiefly lipids and decreased antioxidant enzymes and reduced glutathione in vitreous [J]. *Curr Eye Res*, 1999, 19: 254-259.
- [7] 翟秀梅,王斌,毛连菊,等. 副溶血弧菌对南美白对虾生理生化指标的影响[J]. 上海水产大学学报,2007,16(2): 163-168.
- [8] Mathew S, Ashok Kumar K, Anandan R, et al. Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon* [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2007, 145(3): 315-320.
- [9] 刘淇,王学忠,戴芳钰,等. 梭子蟹溶藻弧菌病的初步研究[J]. 齐鲁渔业,2007,24(9): 1-3.
- [10] 刘淇,李海燕,王群,等. 梭子蟹牙膏病病原菌-溶藻弧菌的鉴定及其系统发育分析[J]. 海洋水产研究,2007,28(4): 9-13.
- [11] 王珉,李洪,朱红枫. 改良的黄嘌呤氧化酶-羟胺法检测血清 SOD 活性[J]. 川北医学院学报,2003,18(2): 92-93.
- [12] Ohkawa H, Ohishi N, Tagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction [J]. *Anal Chem*, 1979, 51: 351-358.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding [J]. *J Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [14] Winston G W, Di Giulio R T. Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organism [J]. *Aquat Toxicol*, 1991, 24: 143-152.
- [15] Dandapat J, Chainy G B N, Rao K J. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn *Macrobrachium*

chium rosenbergii [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2003, **136**(3): 221-233.

后几种保护酶活力的变化 [J]. 水产科学, 2006, **25**(9): 448-452.

[16] 陈寅儿, 王国良, 金珊, 等. 三疣梭子蟹患“乳化病”

Effect on antioxidant enzyme system of *Portunus trituberculatus* infected by *Vibrio alginolyticus*

CHEN Ping, LI Ji-tao, LI Jian, LIU Qi, LIU Ping

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Oct. , 6, 2008

Key words: *Portunus trituberculatus*; *Vibrio alginolyticus*; Antioxidant enzyme system; Lipid peroxidation

Abstract: The present study examined the changes occurring in the antioxidant defence status in haemolymph, muscle hepatopancreas and tissue of *Portunus trituberculatus* infected by *Vibrio alginolyticus*. It is a kind of bacteria -*V. alginolyticu* that was isolated from tissue of diseased *P. trituberculatus* farmed under natural conditions. The healthy crabs were infected with *V. alginolyticu* by intramuscular injection of the isolated bacteria and 0.9% Nacl solution as a control respectively. Activities of superoxide dimutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-px) and levels of lipid peroxides (MDA) were measured at 0 h, 24 h, 48 h and 72 h following the infection. The results showed: The control crabs did not exhibit any significant variation in SOD, GSH-px and MDA activities in the tissues. However, *V. alginolyticu* infection induced a significant decrease of SOD activities in haemolymph, and muscle hepatopancreas of infected crabs compared with the control ($P < 0.05$). The GSH-px activities of the haemolymph and hepatopancreas were higher at 24 h after infection, whereas decreased significantly in the last course of infection compared with the control ($P < 0.05$). The MDA levels of different tissues were increased significantly in infected crabs with the infection time ($P < 0.05$). The results of this study indicated that the tissue antioxidant enzyme activities in *P. trituberculatus* infected by *V. alginolyticu* were decreased and were consistent with MDA level. The antioxidant defence system of crab was destroyed, and the abilities of preventing disease and disease resistance declined.

(本文编辑:康亦兼)