

口服免疫药物后中国对虾某些血 淋巴因子的测定及方法研究*

王 雷 李光友 毛远兴

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 于 1991 年 4—9 月,以海捕中国对虾亲虾及养殖中国对虾为材料,运用单向免疫扩散(SRID)方法测定对虾血淋巴免疫因子,并采用经改进后的 Horowitz 等人的方法测定对虾体内的酚氧化酶(PO)活性,目的在于运用该两种方法对口服不同免疫药物的养殖对虾的血淋巴免疫因子及 PO 活力进行测定。对亲虾和养殖对虾口服不同免疫药物前后的测定结果表明,几种情况下的对虾血淋巴中均存在类似 IgM 的因子,血细胞中存在酚氧化酶原(proPO)并可被激活;正常对虾的血淋巴中存在 PO 活力;口服免疫药物可以刺激 IgM, proPO, PO 活力发生变化。研究初步表明,血淋巴因子的 SRID 测定及 PO 活力测定可作为衡量对虾免疫状态的定性指标。

关键词 中国对虾 口服免疫 血淋巴因子 单向免疫扩散 酚氧化酶

解决虾病问题的根本途径之一在于提高对虾的自身免疫力,增强其抗病机能。根据国内外在人体及其他动物免疫学的研究成果,许多天然药物所含的复杂成份,包括多糖、生物碱、酮类、萜类、内酯、皂甙、有机酸等,口服后可有效地刺激机体的免疫系统,从而增强抗病能力(白立志,1989; Diamantstein et al., 1982)。由于以前对甲壳动物免疫研究较少,对虾经口服免疫药物后,药物的作用机理、免疫系统的激活方式及免疫功能的衡量指标等,均缺乏了解。

叶淑芳(1991)曾尝试用测定人体免疫球蛋白的方法检测对虾体液中的类似物质,试验结果表明, IgM, IgG, IgA 均显现阳性。但众所周知,无脊椎动物中没有免疫球蛋白,因此,上述结果有待进一步探讨。另外,瑞典的 Söderhäll 等人(王雷等,1992; Söderhäll, 1983; Söderhäll et al., 1983, 1988)在对螯虾 *Astacus astacus* 的研究中发现,在对异物识别等免疫反应中,起关键作用的是甲壳动物血细胞内的酚氧化酶原系统,该系统中的成份被激活后可促进血细胞的吞噬与包裹、介导凝集和凝固,产生杀菌物质等。

本文旨在研究中国对虾血淋巴免疫因子,及其体内酚氧化酶活性测定的方法和条件,并以数种天然药物口服免疫对虾,探讨运用所研究的方法、所测定的几项因子作为衡量对虾免疫状态指标的可行性。

1 材料与方 法

* 中国科学院“八五”重大应用研究项目, A08920813 号。王雷,男,出生于 1966 年 2 月,博士。
收稿日期: 1993 年 7 月 21 日,接受日期: 1994 年 5 月 4 日。

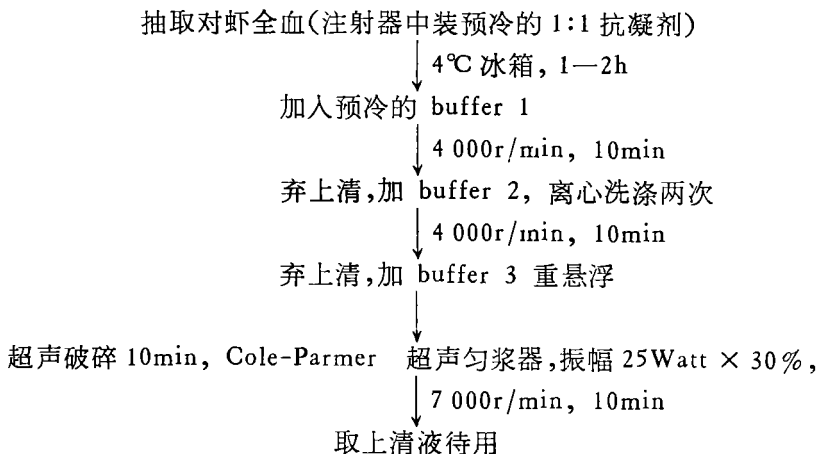
1.1 试验用虾 以中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 为试验材料。正常的产卵前海捕亲虾于 1991 年 4 月 22 日购于本所水族楼, 平均体长 19cm, 暂养于通气、流动海水的水槽中, 投喂冰冻杂色蛤。病虾系 1991 年 5 月 25 日取自中科院海洋研究所石老人基地的产卵后亲虾, 患有严重“红腿病”。养殖对虾于 1991 年 8 月 12 日和 9 月 2 日购于青岛黄岛虾场, 体长约 8cm, 暂养于通气水槽中, 投喂配合饵料。

1.2 血淋巴免疫因子的单向免疫扩散 (SRID) 测定方法和条件 免疫单扩散定量检测板, 购于中国人民解放军总参管理局卫生处, 用于检测人血清中的 IgM, IgA, IgG (Ig 为免疫球蛋白; M, A, G 为球蛋白的不同类型), C₃ (补体), C₄, CRP (C-反应蛋白) 共 6 种。

1.2.1 测定步骤 取血清, 以无菌的 2ml 注射器及 5 号针头自对虾头胸甲后插入心脏取血, 置于 Eppendorf 离心管中, 于 4℃ 过夜, 低速离心使血清析出。用微量加样器点样, 每孔点样 10μl (IgM 检测板为 20μl)。每一检测板上有 8 孔, 一般以间隔方式共点 4 个孔以利于观察。处理及测量, 参照北京医学院微生物学教研组(1980)方法进行。点样后置水平湿盒内放置 48h, 扩散反应完毕后, 于板下衬以黑纸, 使光线从两侧斜射, 从板背后的刻度上直接读出沉淀环直径。

1.2.2 试验项目 运用 SRID 方法对正常亲虾的血清、正常亲虾在不同温度的血清、不同稀释度的正常与患病亲虾的血清、正常与患黑鳃病养殖对虾的血清中的血淋巴免疫因子共 4 项进行测定。

1.3 酚氧化酶 (PO) 活力的测定方法 试剂见表 1。制备对虾血细胞破碎上清液步骤如下图。



对虾血清的制备同 1.2 中的取血清步骤。参照 Horowitz (1952) 及 Ashida (1971) 的测定方法, 并根据试验的需要加以调整。各种试剂加入量见表 2。将各试剂在试管内混匀, 于室温下每隔 2min 读取一次 490nm 处的光密度值。以 O.D.₄₉₀ 对时间 (min) 作图。以试验条件下每分钟 O.D.₄₉₀ 增加 0.001 为一个酶活力单位。

测定正常亲虾血细胞破碎上清液中的及加入激活剂以后的 PO 活力、养殖对虾血清中的及加入激活剂以后的 PO 活力。

1.4 口服免疫药物后, 养殖对虾血淋巴中免疫因子和 PO 活力测定方法 养殖对虾分

表 1 中国对虾血淋巴 PO 活力测定用试剂

Tab. 1 Reagents for the measurement of PO activity in the haemolymph of *P. chinensis*

名 称	组 成	参考文献
抗凝剂	0.14mol/L NaCl, 0.1mol/L葡萄糖, 30mmol/L柠檬酸钠, 26mmol/L柠檬酸, 10mmol/L EDTA, pH = 4.6	Sodérhäll 等(1983)
缓冲液 1 (buffer 1)	0.01mol/L 二甲胂酸钠, 0.1mol/L 柠檬酸钠, 0.1mol/L Na-EDTA, 0.25mol/L 蔗糖, pH = 6.8	Ashida 等(1984)
缓冲液 2 (buffer 2)	0.01mol/L 二甲胂酸钠, 0.25mol/L 蔗糖, 5mmol/L Na-EDTA, pH = 7.0	Ashida 等(1984)
缓冲液 3 (buffer 3)	0.01mol/L 二甲胂酸钠, 5mmol/L CaCl ₂ , 1.5mol/L NaCl, pH = 7.0	Ashida 等(1984)
PO 测定底物	0.01mol/L L-dopa	Horowitz 等(1952)
PO 测定缓冲液 (PBS)	0.1mol/L 磷酸钾缓冲液, pH = 6.0	Horowitz 等(1952)
proPO 激活剂 ¹⁾	1% SDS (十二烷基硫酸钠)	Söderhäll 等(1983)

1) proPO 为酚氧化酶原。

表 2 中国对虾血细胞破碎上清液或血清中 PO 活力测定的试剂加入量

Tab. 2 The reagent expense for the measurement of PO activity in the serum or supernatant of homogenized haemocyte of *P. chinensis*

测定项目	试 剂 (ml)				
	PBS	L-dopa (0.01mol/L)	上清液 (血清)	蒸馏水	SDS (1%)
对照	3	0.1	0	0.4 (0.2)	0
未加 SDS 的试样	3	0.1	0.2 (0.1)	0.2 (0.1)	0
加入 SDS 的试样	3	0.1	0.2 (0.1)	0	0.2 (0.1)

括号内数字为血清的测定结果。

别养于室外 8 个 120cm × 60cm × 50cm 的通气水槽中,每缸 25 条,每天换水 2 次,投配合饵料 2 次。每两缸为一组,共分 4 组。1 组: 投喂基础饵料。2 组: 饵料中加入 2% A 药物。3 组: 饵料中加入 2% B 药物。4 组: 饵料中加入 200 × 10⁻⁶C 药物。基础饵料由鱼粉、花生饼、麸皮、面粉、鲜杂鱼等配成。药饵系将药物直接加入原料中。用手摇绞肉机挤压成型,日光下晒干。从 9 月 5 日开始试验,9 月 8 日起取血清,并进行免疫因子及 PO 活力测定,方法见 1.2, 1.3。每 3 天取一次血样,至 9 月 23 日结束共取得 6 组数据。

2 结果与讨论

2.1 SRID 测定的方法、条件及适用性研究结果 见表 3—表 5 及图版 1。在上述各

表 3 正常中国对虾亲虾血淋巴及其在不同温度下的 SRID 测定结果¹⁾Tab. 3 Result of SRID measurement of haemolymph of parent prawns *P. chinensis* in different temperatures

测定项目		检测板						
		IgA	IgM	IgG	C ₃	C ₄	CRP	
测定次数	第一次	8.5 +	12 +++	9.5 -	9.5 ±	9 +	10 -	
	第二次	11 -	14 +++	11 -	11.5 -	10.5 +	11.5 -	
不同温度	37℃	10.5 -	12.5 +++	10 -	10 -	9.5 ±	11 -	
	室温	10 -	12 +++	10.5 -	10 +	9.5 -	10.5 -	
	4℃	48h	8.5 -	10 ++	8.5 -	8.5 -	8 -	8.5 -
		72h	9.5 +	12 +++	10 -	9.5 +	9 +	10 -

1) 沉淀环直径单位为 mm; - 示不清楚; + 示清晰度。表 4—表 5 同。

表 4 正常中国对虾亲虾与患病亲虾不同血淋巴稀释度的 SRID 测定结果

Tab. 4 Result of SRID measurement of haemolymph in different dilution of normal and diseased parent prawns *P. chinensis*

测定项目		检测板					
		IgA	IgM	IgG	C ₃	C ₄	CRP
正常新虾	原血清	10 +	11 ++	7.5 -	8 -	10 ++	9 +
	1/2 稀释血清	8.5 -	无	6 +	无	6 ++	6 -
患病亲虾	原血清	9 -	9.5 +	7.5 -	无	9 +	8 -
	1/2 稀释血清	7.5 +	8.5 +	6.5 -	无	6.5 +	6.5 -

1) 无, 表示未显色, 无沉淀圈。表 5 同。

项 SRID 测定时观察到, 虽然各板经染色后均显示一定大小的沉淀环, 但各环的直径差异并不大; 虽然直径差异不大, 但不同沉淀环边缘的清晰程度差别却很显著。IgM 检测板中的沉淀环均十分清晰; C₃ 和 C₄, IgA, IgG, CRP 检测板上的沉淀环则较模糊。这就产生了两个问题: 第一, 测量的准确度受到影响, 只能近似地取沉淀环的外缘和内缘之间的平均值, 这造成数据的重复性及规律性较弱。第二, 测量结果的真实性的真实性需进一步探讨。正如前言中所述, 无脊椎动物中没有免疫球蛋白是确定的事实, 因此不排除这种可能性; 由于血清蛋白自然扩散入琼脂板内, 漂洗时未被洗去而被染色, 造成发生免疫沉淀反应的

表 5 正常养殖、患病养殖中国对虾的 SRID 测定结果

Tab. 5 Result of SRID measurement of normal and diseased cultured prawns *P. chinensis*

测定项目	检 测 板					
	IgA	IgM	IgG	C ₃	C ₄	CRP
正常养殖对虾	无	15 +++	12 —	11 ±	12 +	10 —
黑鳃养殖对虾	10.5 —	13.5 +++	11.5 —	10.5 —	11.5 +	无

“假象”。但抗原与抗体的结合具有高度专一性,从各表中 IgM 检测板中的沉淀环极为清晰这一点又不能全部断定为假象。为此,作者推断,在免疫系统进化史研究中,无脊椎动物只有简单的细胞吞噬等防御手段,到了低等脊椎动物如软骨鱼及八目鳗,开始有弥散的淋巴系统,出现了 IgM 样的大分子抗体,一直发展到哺乳动物,其抗体的进化顺序为 IgM → IgG → IgA → IgD → IgE。因此,由于进化的连续性,作为最早出现的免疫球蛋白 IgM,在无脊椎动物中可能存在其结构类似物,由于无脊椎动物抗原决定簇与之相似,故与抗 IgM 抗体可发生一定的结合沉淀反应。其它免疫球蛋白随着进化程度的提高而与无脊椎动物的体液因子相差较远,故不发生或发生极其微弱的沉淀反应。

根据 Söderhäll 等(1983)的研究结果,甲壳动物中的 proPO 激活系统无论从组成、激活方式还是从免疫功能上,都非常类似于哺乳动物中的补体系统,故称之为“类补体途径”。根据人体免疫学研究成果(刘华等译,1979),补体系统的旁路途径是在进化中保留下来的一种原始途径。因此,有可能在 proPO 激活系统中找到补体成份 C₃,C₄ 的类似物。故在检测板上可能发生弱的结合沉淀反应。

从表 3 可看出,4℃ 扩散效果最佳,但所需时间较长。试验中发现,在 37℃ 扩散时,检测板上出现大量水珠,影响观察测定。而室温下扩散效果与 4℃ 相近,且操作简便。因此,选定室温下进行扩散反应。

从表 4 可看到,正常亲虾的 SRID 沉淀环要略大于患病亲虾,如正常亲虾原血清 IgM 沉淀环为 11mm,而患病亲虾原血清的为 9.5mm,推测这种类 IgM 因子可能与对虾的机体状态及免疫功能有关。从血清稀释度的对比看,IgM,IgG,IgA 沉淀环的清晰度以原血清为佳,而 C₃,C₄,CRP 沉淀环的清晰度以 1/2 稀释血清为佳。这可能与它们在对虾血淋巴中的不同含量有关。在以后的测定中需根据不同测定项目选择不同的血清稀释度。

从表 5 可看到,正常养殖对虾与患黑鳃病的养殖对虾其各项 SRID 结果相差不大,说明本试验中的黑鳃病对虾可能系体表感染,尚未影响到血淋巴因子的改变。另外,对比亲虾测定结果,养殖对虾的 SRID 结果高于亲虾,如养殖对虾的 IgM 沉淀环为 15mm,而亲虾的几次测定分别为 11,12,12.5mm;养殖虾的 C₄ 沉淀环为 12mm,而亲虾的分别为 9,9.5,10mm。这说明,SRID 测定可反映机体的免疫状况,8—9cm 的养殖对虾正处于生长旺盛时期,体内各项因子活力较高,而亲虾产卵前后,身体状况下降,故结果不同。

上述各项 SRID 测定为研究甲壳动物的体液免疫因子提供了参考,但作为衡量对虾

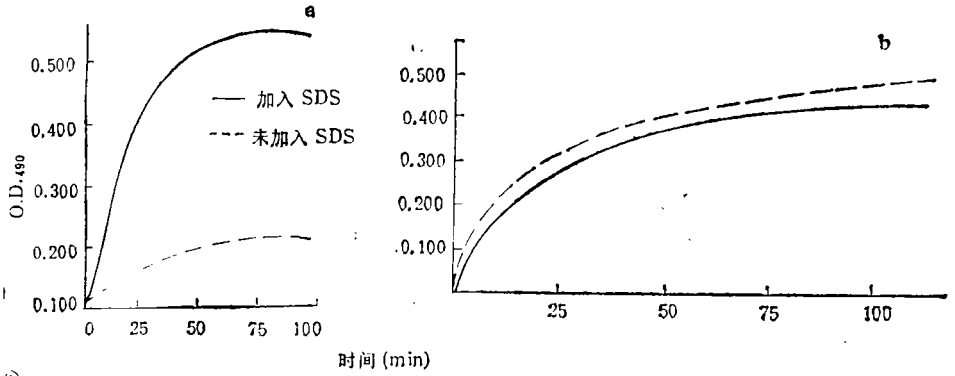


图 1 正常中国对虾亲虾血细胞破碎上清液中的 PO 活力(a)和
养殖中国对虾血清中 PO 活力(b)

Fig. 1 Result of measurement of PO activity in supernatant of homogenized haemocyte of parent prawns (a) and serum of cultured prawns *P. chinensis* (b)

表 6 养殖中国对虾口服不同免疫药物后其血淋巴中 IgM 的 SRID测定结果
和 PO 活力测定结果

Tab. 6 Result of SRID measurement of IgM-like factor and PO activity in the haemolymph of cultured *P. chinensis* after taking oral immuno drugs

IgM 中的 SRID (直径: mm)

日期(月·日)		09.8	09.11	09.14	09.17	09.20	09.23
组别	对照	14.50	15.00	14.50	14.25	13.75	14.00
	A 药物	15.25	15.50	15.50	16.00	15.50	14.50
	B 药物	15.75	15.50	15.00	16.50	16.50	15.50
	C 药物	14.25	13.75	14.00	15.00	14.00	13.75

PO 活力 (units)

组别	对照	10.5	8.3	12.2	10.8	10.6	10.4
	A 药物	25.2	19.7	13.8	10.4	11.8	12.4
	B 药物	31.9	24.5	20.8	14.6	12.0	13.8
	C 药物	10.8	9.8	10.0	8.0	6.6	7.8

免疫功能状态的定量检测指标尚有待进一步探讨。在口服免疫试验中,只选择了 IgM 作为检测指标并结合其他测定加以分析。

2.2 对虾血淋巴 PO 活力的测定结果及其指标功用 正常亲虾血细胞破碎上清液的 PO 测定及加入激活剂 SDS 以后的 PO 反应的动力学曲线比较,见图 1a。养殖对虾血清中的 PO 测定与加入 SDS 以后的 PO 反应动力学曲线见图 1b。由图 1a 看出,血细胞破碎上清液中加入 SDS 后,酶活力大大高于未加 SDS 组。很显然,对虾血细胞中的 PO 主要以酶原形式存在,被激活后才能表现其活力,这与 Söderhäll 在淡水螯虾中的试验结果相类似(1983)。但也有报道,PO 主要存在于血浆中 (Saul et al., 1985)。由图 1b 看出,养殖对虾血清中存在 PO 活力,加入 SDS 对其影响不大,可见该酶在血清中不

是以酶原形式存在。另据报道,某些物理因素如取血操作可激活 proPO (Ashida et al., 1983); proPO 在一定条件下还可“自发”激活,像图 1a 中未加 SDS 时表现的酶活性可能属此原因。因此,有关该酶的不同存在形式、存在部位以及激活所需条件等尚未确定。但血清中的 PO 测定比较简单,而且影响因素少,适于作为一项指标研究对虾的免疫功能状态。

2.3 养殖对虾口服数种免疫药物后血淋巴因子的测定结果 其血淋巴中 IgM 的 SRID 测定及 PO 活力测定结果,见表 6。

从表 6 中可看出, IgM 沉淀环的变化规律性不明显,这主要与上面讨论的对虾血淋巴中的类 IgM 物质与免疫检测板中的抗 IgM 抗体呈弱结合有关。但从表中可粗略判断,口服 A, B 免疫药物的对虾,其血淋巴中的类 IgM 因子高于对照组;而口服 C 药物的与对照相近。这为免疫药物的作用大小、药物的选择提供了依据。由此可进一步断定类 IgM 的 SRID 测定,适于做对虾免疫功能的定性衡量参考而不适于作为定量指标。

由表 6 中可看出,口服免疫药物 A 和 B 后,对虾的 PO 活性大大高于对照组的;而口服 C 药物后对虾的 PO 活性与对照的相近,甚至低于对照组。这与运用 SRID 方法测定的结果相一致。但从表中可以发现,随着时间的推移,PO 活力逐渐降低,这种现象在另外的试验中也有出现¹⁾,因此,PO 活力与对虾免疫功能是否呈正相关性,有待于更深入的研究。

3 结语

上述结果表明,中国对虾血清中的类 IgM 因子及 PO 活力与机体的免疫功能有直接相关性,因此,本研究所探索的测定方法可用以评价对虾免疫系统的状况。但从测定结果看,上述测定方法比较适于作为一种定性指标而不易精确定量。尽管如此,本研究为从生理生化角度研究对虾免疫系统以及筛选有实用价值的对虾免疫药物提供了有价值的结果。本试验所用的 A, B 两种药物富含多糖、生物碱和有机酸,经 SRID 测定和 PO 活力测定判断,这两种药物经口服后可刺激对虾的免疫系统。这为从免疫角度防治对虾病害提供了方法。

参 考 文 献

- 王雷、李光友,1992,甲壳动物的体液免疫研究进展。海洋科学,3:18—19。
 白立志,1989,中草药饲料添加剂大有前途,饲料工业,12:59。
 北京医学院微生物学教研组,1980,实验免疫学,人民卫生出版社(北京),58—61。
 叶淑芳,1991,中国对虾体液免疫实验方法的探讨,海洋科学,6: 66—67。
 Ashida, M., 1971, Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*., *Arch. Biochem. Biophys.*, 144:749—762。
 Ashida, M. et al., 1983, Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell walls or by β -1, 3-glucans in plasma of the silkworm *Bombyx mori*., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113:562—568。
 Ashida, M., Söderhäll, K., 1984, The prophenoloxidase activating system in crayfish, *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B:21—26。
 Diamantstein, J. et al., 1982, An immunological adjuvant and a polyclonal B-Lymphocyte activator, *Int. Archs. Allergy. Appl. Immun.* 68:377—379。
 Horowitz, N. H., Shen, S. C., 1952, *Neurospora tyrosinae*, *J. Biol. Chem.*, 197:513—520。

1) 王雷、李光友,1993,“口服免疫型药物对养殖中国对虾作用的研究”。(待刊)

- Hyde, R. M., Patnode, R. A., 刘华等译, 1979, 免疫学, 科学出版社(北京), 106—113.
- Saul, S. J. et al., 1985, The majority of pro-phenoloxidase in the hemolymph of *Manduca sexta* is present in the plasma and not in the hemocytes, *Dev. Comp. Immun.*, **11**:479—485.
- Söderhäll, K., 1983, β 1,3-Glucan enhancement of protease activity in crayfish hemocyte lysate, *Comp. Biochem. Physiol.*, **74B**: 221—224.
- Söderhäll, K., Smith, V. J., 1983, Separation of the hemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, *Dev. Comp. Immun.*, **7**:229—239.
- Söderhäll, K. et al., 1988, The properties and purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances the activation of haemocyte prophenoloxidase by a β 1,3-Glucan, *Insect Biochem.*, **18**:323—330.

MEASURING METHODS AND VARIATIONS OF SOME HAEMOLYMPH FACTORS IN *PENAEUS CHINENSIS* AFTER THEIR ORAL INGESTION OF IMMUNO DRUGS

Wang Lei, Li Guangyou, Mao Yuanxing
(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071*)

ABSTRACT

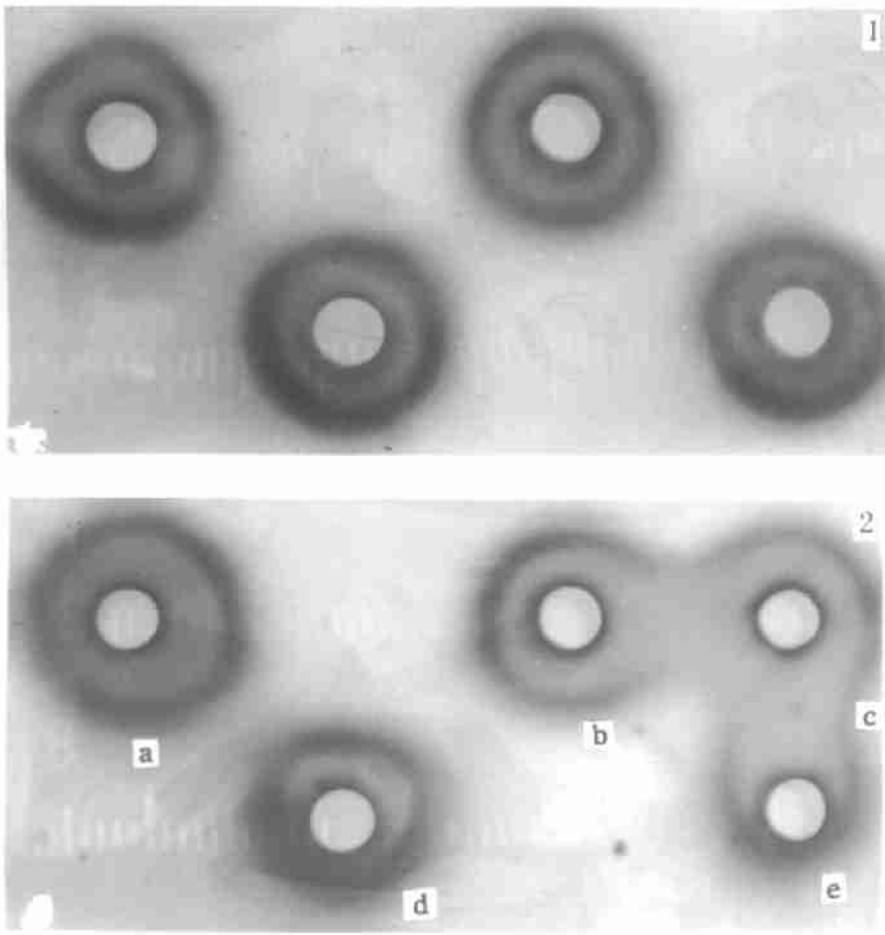
From April to September, 1991, the single radial immunodiffusion (SRID) method was applied to determine the haemolymph factors in wild parent prawns and cultured ones, including diseased ones, the phenoloxidase (PO) activity was measured and its features studied after immuno drugs were orally ingested by the prawns. The results are given below.

1. IgM-like substances existed in the haemolymph (which was most probably the primitive form of IgM in mammals); PO existed in haemocytes in the form of proenzyme and also exhibited activity in the normal serum of the prawns.

2. After three kinds of natural drugs (extracted from land and marine plants) were taken orally by the cultured prawns, the content of haemolymph factors increased and PO activity decreased. The immune system of *P. chinensis* could apparently be activated by two of those oral immuno drugs.

3. SRID determination of IgM-like substances and measurement of PO activity may be used as references to compare the immuno function of prawns.

Key words *Penaeus chinensis* Oral immunization Haemolymph factor
Single radial immunodiffusion Phenoloxidase



图版 I 中国对虾血淋巴在 IgM 检测板上形成的 SRID 沉淀环

Plate I The SRID ring formed by the haemolymph of *P. chinensis* in the IgM Plate

1. 正常中国对虾亲虾血淋巴的 SRID 测定结果。 2. 正常与患病中国对虾亲虾以不同血清稀释度的 SRID 测定结果, a. 正常亲虾, 原血清; b,c. 患病亲虾, 原血清; d. 正常亲虾, 1/2 稀释血清; e. 患病亲虾, 1/2 稀释血清。