

# 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\*

刘树青 江晓路 牟海津 王慧谥 管华诗

(青岛海洋大学水产学院 青岛 266003)

**提要** 于1997年9月在青岛红岛养殖场采集中国对虾,给对虾腹腔注射不同剂量的海藻多糖和北虫草多糖后,用生化法测定其血清中的溶菌酶(LSZ)、碱性磷酸酶(ALP)、酸性磷酸酶(ACP)和过氧化物酶(POD)活性的动力学变化。结果表明,注射1.0%北虫草多糖及1.0%海藻多糖48h后,对虾血清中的LSZ活性由对照组的0.25U/ml分别增至0.88U/ml和0.75U/ml,POD活性由对照组的0.11U/mg分别增至2.2U/mg和1.96U/mg;注射72h后,ALP活性由对照组的1.2U/mg分别增至48U/mg和25U/mg,ACP活性由对照组的4.5U/mg增至30U/mg和17U/mg,而血清蛋白的变化较为稳定。LSZ、ALP和ACP的活性变化最为显著,说明海藻多糖和北虫草多糖作为免疫药物能够增强中国对虾的免疫功能。

**关键词** 免疫多糖 中国对虾 溶菌酶 磷酸酶 过氧化物酶

**学科分类号** Q55

80年代以来的研究证明,北虫草多糖具有增强巨噬细胞吞噬功能和拮抗免疫抑制剂的作用(江晓路等,1998)。海藻多糖是海藻中高分子碳水化合物,具有多种生物活性,可起到增强免疫、诱导细胞分化、抗肿瘤及抗病毒的作用(徐明芳等,1996)。近年来,从免疫学角度对虾病进行防治研究已有成功的报道(王雷等,1994)。海藻多糖和北虫草多糖均为免疫物质,经腹腔注射于中国对虾体内后,血淋巴中各种酶(溶菌酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、过氧化物酶)的活性变化以及作为免疫因子来衡量对虾免疫状态的指标,迄今未见报道。本文报告两种免疫多糖对中国对虾免疫功能的研究结果,以期探讨这些酶活性与对虾机体免疫水平的相关性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

中国对虾(*Penaeus chinensis*)于1997年9月1日从青岛市红岛镇养殖场购得,体长为12—14cm,分养于玻璃缸(0.2m<sup>3</sup>)中,通气,水温维持在25℃,每天换水1次。溶壁微球菌(*Micrococcus lysolei*)由青岛海洋大学食品工程系食品微生物室提供。用生理盐水配制0.5%、1.0%、1.5%的海藻多糖及1.0%的北虫草多糖,灭菌后备用。

\* 国家攀登计划B资助项目,PD B-6-6-3号。刘树青,女,出生于1954年3月,工程师,E-mail: fst@ouqd.edu.cn

收稿日期:1997-11-04,收修改稿日期:1998-07-17

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及预处理** 实验分为 5 组, 每组各 50 尾虾, 其中对照 1 组、海藻多糖 3 组(分别注射上述 3 种浓度的海藻多糖)、北虫草多糖 1 组(注射 1.0% 北虫草多糖)。对照组对虾各在体腔内注射 0.1ml 生理盐水; 所有实验组对虾均从第三泳足处用 1ml 注射器(5 号针头)斜插注射至体腔, 注射上述各浓度的多糖各 0.1ml, 24h 后开始取血, 以后每隔 24h 取血 1 次, 实验周期为 72h。采血时用蓝芯注射器, 自头胸甲后插入心脏取血, 每次取 15 尾虾的血液, 合并后立即置于 5ml 具塞试管中, 置于  $-15^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜, 备用。

**1.2.2 溶菌酶(LSZ)活性的测定** 按王雷等(1994)将经二次活化的溶壁微球菌, 接种于液体培养基内进行摇床培养 48h, 取出后离心, 收集菌体。用  $0.1\text{mol/L}$  的磷酸盐缓冲液( $\text{pH} = 6.4$ )稀释至  $A_{570} = 0.3$ , 配成底物悬液供测试用。在此法规定条件下, 溶菌活性( $\text{U/ml}$ ) =  $(A_0 - A) / A$ 。

**1.2.3 碱性磷酸酶(ALP)和酸性磷酸酶(ACP)活性的测定** 按照磷酸苯二钠法(宋善俊, 1991)操作, ALP 和 ACP 活性定义为: 每 100ml 血清在  $37^{\circ}\text{C}$  与底物作用 15min 或 60min, 产生 1mg 酚者为 1U。

**1.2.4 过氧化物酶(POD)活性的测定** 按照沃辛通(Worthington)法测定(施特尔马赫, 1992)。POD 活性( $\text{U/ml}$ ) =  $(E_{510} \times 3 \times 10) / (6.58 \times 0.1)$ 。

**1.2.5 蛋白质含量的测定** 按照考马氏(Coomassie)亮兰法测定蛋白质含量(陈勤, 1996)。在此法规定的条件下, 蛋白质含量( $\text{mg/ml}$ ) = (测定管 OD / 标准管 OD)  $\times$  标准血清浓度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 免疫多糖对溶菌酶的作用

由表 1 可知, 注射免疫多糖后, 对虾血清中 LSZ 活性显著提高, 其中注射 1.0% 海藻多糖实验组及 1.0% 北虫草多糖实验组的 LSZ 活性在 48h 可分别达到  $0.75\text{U/ml}$  和  $0.88\text{U/ml}$ , 而对照组的 LSZ 活性平均在  $0.20\text{U/ml}$  左右。

表1 中国对虾血清中溶菌酶活性测定结果  
Tab.1 The lysozyme activity in serum of *P. chinensis*

组别	多糖浓度 (%)	溶菌酶活性(U/ml)		
		24h	48h	72h
对 照	0.0	0.13	0.25	0.23
	0.5	0.30	0.53	0.30
海藻多糖	1.0	0.54	0.75	0.27
	1.5	0.65	0.71	0.31
北虫草多糖	1.0	0.51	0.88	0.33

海藻多糖和北虫草多糖作为天然免疫药物, 对中国对虾机体均有明显的免疫刺激作用, 可在一定程度上提高机体的非特异性免疫功能。溶菌酶是吞噬细胞杀菌的物质基础, 体内许多组织和体液中都含有溶菌酶, 血清溶菌酶主要来自血液中, 是一种碱性蛋白, 能水解革兰氏阳性细菌的细胞壁中粘肽的乙酰氨基多糖并使之裂解被释放出来, 形成一个水解酶体系, 破坏和消除侵入体内的异物, 从而担负起机体防御的功能(陈竞春等, 1996)。

本实验结果表明,对虾血清溶菌酶活性在注射免疫多糖后 48h 最强,至 72h 减弱,至于延长时间内是否继续出现高活性值,尚需进一步研究。

## 2.2 免疫多糖对磷酸酶的作用

由表 2 可知,对照组作用时间不同,对虾血清磷酸酶活性无显著差异,ALP 平均为 1.0U / mg,ACP 平均为 5.5U / mg。而实验组的 ALP 活性在 72h 达到最高值,海藻多糖组 (1.0%) 和北虫草多糖组分别达到 25U / mg 和 48U / mg; 同样,实验组随着作用时间的延长,对虾血清的 ACP 活性至 72h 也有显著提高,尤其是注射海藻多糖 (1.0%) 和北虫草多糖的对虾,其血清 ACP 活性分别可达到 17U / mg 和 30U / mg。

以上数据显示,给中国对虾适量注射海藻多糖和北虫草多糖,确能显著增强其血清中 ALP 和 ACP 的活性。ALP 是催化磷酸单酯水解的酶类,在碱性条件下,可使磷酸单酯水解生成乙醇和磷酸。本实验采用磷酸苯二钠为底物的金氏法,在碱性环境中可使 ALP 水解磷酸苯二钠,释出酚和磷酸。在碱性溶液中酚与 4-氨基安替吡啉作用,经铁氰化钾氧化而成红色醌的衍生物,根据红色深浅确定 ALP 的活性。实验证明,本文所采用的两种免疫多糖可作为良好的免疫促进剂,从 ALP 的活性增强可以推断 ALP 的功能之一是加速物质的摄取和转运,为 ADP 磷酸化形成 ATP 提供更多所需的无机磷酸。在活体内碱性磷酸酶作为磷蛋白磷酸酶起重要作用(周定刚等, 1993)。由于免疫多糖刺激,ALP 参与对虾细胞中的物质代谢,使对虾的非特异性免疫功能增强。

ACP 是巨噬细胞溶酶体的标志酶,能催化磷酸单酯水解,与 ALP 的反应机理相似,只是在酸性条件下作用于磷酸苯二钠,使之水解,释出酚和磷酸,在体内直接参与磷酸基团的转移和代谢。由表 2 可知,对虾机体的免疫系统被海藻多糖及北虫草多糖激活后,其 ACP 活性持续提高,但增值不如 ALP 的活性强,这可能与中国对虾机体的免疫机制——机体防御反应有关,尚需实验论证。

表 2 中国对虾血清中碱性磷酸酶 (ALP) 和酸性磷酸酶 (ACP) 活性测定结果

Tab.2 The alkaline phosphatase and acid phosphatase activity in serum of *P. chinensis*

组别	多糖浓度 (%)	ALP活性 (U/mg)			ACP活性 (U/mg)		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h
对照	0.0	0.5	1.3	1.2	5.5	6.5	4.5
海藻多糖	0.5	3.5	5.5	6.5	8.5	7.5	14.0
	1.0	5.0	9.0	25.0	6.5	13.0	17.0
	1.5	1.5	4.0	4.5	7.0	14.5	16.0
北虫草多糖	1.0	10.0	27.0	48.0	9.0	15.0	30.0

## 2.3 免疫多糖对过氧化物酶的作用

由表 3 可知,注射多糖后,实验组对虾血清的 POD 活性较对照组普遍增高,尤其是注射海藻多糖 (1.0%) 及北虫草多糖实验组的 POD 活性在 48h 分别为 1.96U / mg 和 2.20U / mg,而对对照组的平均活性为 0.10U / mg 左右。

POD 数值较对照组的增值变化虽然不如 LSZ 增值那样显著,但初步断定可以以此作为一种指标来衡量对虾的体内免疫状态与免疫多糖的作用。POD 普遍存在于动物、植物及微生物中,是生物体中重要的酶类之一,参与多种生理代谢反应(齐放军等, 1993),对虾

血清中 POD 的研究在国内文献中尚未见报道。根据 POD 可以催化过氧化氢与供氢体之间的氧化反应这一特性,可以用 4-氨基安替吡啉作供氢体,测定 510nm 处吸光度的增大值,以此跟踪 4-氨基安替吡啉的氧化反应。本实验作了初步研究数据表明,经两种免疫多糖刺激后,对虾血清中的 POD 活性明显增高,可以通过提高动物血液中过氧化物酶活性,减少自由基对正常细胞的损伤,对细胞生理代谢过程中产生的活性氧具有清除作用,从而提高机体的解毒免疫功能和防病抗病能力。因此 POD 可以作为一种免疫指标来进行检测,以期确定其活性与对虾机体免疫系统有某种相关性。

#### 2.4 免疫多糖对血清中蛋白质含量的作用

由表 3 可知,各实验组的蛋白质含量较对照组都有提高,对照组的平均水平在 3.16mg/ml,1.0% 海藻多糖实验组在 48h 的蛋白质含量为 3.32mg/ml,1.0% 的北虫草多糖实验组在 48h 的蛋白质含量提高至 3.48mg/ml,其它实验组蛋白质含量也有不同程度的增加。

本实验中采用 Coomassie 亮蓝法使 G-250 染料与血清蛋白质结合生成深蓝色化合物,在 595nm 处有最大吸收值,在一定范围内,其吸光度与蛋白质含量呈线性关系,可用分光光度法定量测定其血清中蛋白水平。有实验结果表明,血清蛋白含量的提高可以使血清中溶菌物质、杀菌物质含量升高,从而提高虾的自身抗病能力(周遵春等,1994),这一点已在本文关于溶菌活性测定中有同样结论。另外,通过本实验测定 5 项结果看,血清蛋白含量的变化相对比其它 4 项结果稳定。

表3 中国对虾血清中过氧化物酶(POD)活性和蛋白质含量测定结果

Tab.3 The peroxidase activity and protein content in serum of *P. chinensis*

组别	多糖浓度 (%)	POD 活性(U/mg)			蛋白质含量(mg/ml)		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h
对照	0.0	0.10	0.11	0.95	3.11	3.20	3.17
海藻多糖	0.5	1.41	1.50	1.36	3.13	3.26	3.22
	1.0	1.87	1.96	1.87	3.13	3.32	3.21
	1.5	1.60	1.80	1.55	3.16	3.28	3.23
北虫草多糖	1.0	1.96	2.20	1.96	3.24	3.48	3.24

### 3 结语

多糖是一种非特异性免疫促进剂,目前已成为一类重要的天然活性物质。海藻多糖是一种免疫多糖,已有动物实验证明其是一种具有多种免疫功能的物质,具有抗菌、抗癌作用;北虫草中含有虫草酸、虫草素、虫草多糖等多种生物活性物质,经免疫药理研究已发现其具有多方面的免疫调节作用。本实验初步证实,这两种天然免疫多糖注射于对虾体内后,可明显提高血清溶菌酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、过氧化物酶及血清蛋白的总体水平,尤其是溶菌酶和碱性、酸性磷酸酶在甲壳类血液和血细胞中担负着机体防御的重要功能,这些因素对提高对虾抗病力均有不同程度的促进作用,可望成为防治虾病的有效药物。

## 参 考 文 献

- 王 雷, 李光友, 毛远兴等, 1994. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究. 海洋与湖沼, 25(5): 486—481
- 江晓路, 葛蓓蕾, 1998. 北虫草菌 Y<sub>3</sub>胞内与胞外多糖的免疫药理研究. 青岛海洋大学学报, 28(2): 192—197
- 齐放军, 贾敬芬, 李继胜, 1993. 脱壁酶液诱导植物细胞产生过氧化物酶抑制因子的研究. 实验生物学报, 26(3): 281—286
- 宋善俊主编, 1991. 临床医师手册. 上海: 上海科学技术出版社, 185—200
- 陈 勤主编, 1996. 抗衰老研究实验方法. 北京: 中国医药科技出版社, 606—607
- 陈竞春, 石安静, 1996. 贝类免疫生物学研究概况. 水生生物学报, 20(1): 74—78
- 周定刚, 郑维明, 钟妮娜, 1993. 催产时鳊卵磷酸酶活性的变化及其与排卵的关系. 水生生物学报, 17(2): 145—148
- 周遵春, 孙建明, 吴 垠等, 1994. 不同饲养条件下中国对虾血清蛋白、血脂、血糖含量变化的初步研究. 水产科学, 13(5): 9—11
- 徐明芳, 高孔荣, 刘婉乔, 1996. 海藻多糖及其生物活性. 水产科学, 15(6): 8—10
- 施特尔马赫 B 著, 钱嘉渊译, 1992. 酶的测定方法. 北京: 中国轻工业出版社, 276—278

## EFFECTS OF IMMUNOPOIYSACCHARIDE ON LSZ, ALP, ACP AND POD ACTIVITIES OF *PENAEUS CHINENSIS* SERUM

LIU Shu-qing, JIANG Xiao-lu, MOU Hai-jin, WANG Hui-mi, GUAN Hua-shi  
(Fishery College, Ocean University of Qingdao, Qingdao, 266003)

**Abstract** *Penaeus chinensis* with a body length of 12—14cm were bought from Hongdao prawn culturing farm in Qingdao in September, 1997. The prawns were nursed in the glass tanks in laboratory. Seaweed polysaccharide and *Cordyceps militaris* polysaccharide with various concentration were injected intraperitoneally into the bodies of *P. chinensis*. Hemolymph was collected by heart puncture from the rear of cephalothorax at 24h, 48h, 72h after the injection. The activities of LSZ, ALP, ACP, POD and the content of total protein in the hemolymph were determined.

The results show that after *P. chinensis* was stimulated by seaweed polysaccharide and *Cordyceps militaris* polysaccharide, all the activities in the hemolymph increased. Two kinds of immunopolysaccharide could be used as non-special immunopotentiator to enhance the immunological functioning of *P. chinensis* and its defensive ability to pathogen. This study may represent a new application of immune polysaccharide to the prevention and cure of the prawn disease.

After the injection of 1.0% seaweed polysaccharide and *Cordyceps militaris* polysaccharide for 48h, the activities of LSZ increased from 0.25U/ml of the control group to 0.75U/ml and 0.88U/ml separately, then decreased rapidly at 72h. The activities of ALP enhanced slightly at 24h and 48h, and increased from 1.2U/mg of the control group to 25U/mg and 48U/mg separately at 72h. The activities of ACP increased gradually too, changed from 4.5U/mg of the control group to

17U/mg and 30U/mg at 72h. The activities of POD increased to a maximum value at 48h, were 1.96U/mg and 2.20U/mg from 0.11U/ml of the control group, and dropped a little at 72h. However, the content of protein in hemolymph was stable. Because of the effects of polysaccharide on the phagocytosis of phagocytes, the activities of LSZ, ALP, ACP, POD increased in varying degrees. It shows that these enzyme activities were related closely with the immunity of *P. chinensis* and could be used as an index of detecting the prawn's health and immunological competence. As two kinds of immune drugs, seaweed polysaccharide and *Cordyceps militaris* polysaccharide could be favourable to the activities of LSZ, ALP, ACP in the hemolymph of *P. chinensis* and could enhance the metabolic capability. So two kinds of polysaccharide possessed some application value in the prevention and cure of prawn disease.

**Key words** Immunopolysaccharide *Penaeus chinensis* Lysozyme Phosphatase Peroxidase

**Subject classification number** Q55

## 《海洋与湖沼》学报简介

《海洋与湖沼》学报遵循科学技术要面向经济建设的宗旨,倡导不同学术观点的争鸣,开展国内外学术交流,以繁荣学术、提高研究水平;报道最新科研成果,为促进科学技术的发展和加速社会主义现代化建设服务;发挥老科学家的指导作用、中年科技人员的骨干作用,热情扶植青年学者,以利于科技人才的尽快成长,从而不断壮大科技力量。

《海洋与湖沼》学报,系海洋湖沼科技领域综合性的学术刊物,以报道基础研究、应用基础研究论文为主,同时重视应用研究、开发研究成果的发表;论文涉及水圈范围内的物理学、化学、地质学、环境学、生物学等学科及其分支学科的研究报告、研究简报、高新技术、学术争鸣、综述、学术简讯、科学家简介、书评等栏目。对于发明创造和同国计民生有重大关系的研究成果、带有崭新学术观点的论文,特别是青年学者的优秀论文,将予以优先刊登。

《海洋与湖沼》学报选登学科前沿和生长点的论文,以及发明创造、国家自然科学基金资助项目、国家重大攻关项目、各部委基金资助项目、填补空白项目的研究成果,尤其欢迎不同学术观点交锋的论文。对具重大创见性的自选课题的论文同样重视。

《海洋与湖沼》学报于1957年创刊,由中国海洋湖沼学会主办,中国科学院海洋研究所承办。第一任主编为中国科学院院士、第三世界科学院院士曾呈奎教授,第二任主编为中国科学院院士、中国科学技术协会全国委员会委员刘瑞玉研究员,现任主编为中国科学院院士、国际第四纪委员会亚太地区副主席、中国海洋湖沼学会理事长秦蕴珊研究员。由于一向注重高水平、高质量,为学术交流、国家建设、人才成长作出引人注目的贡献,因而刊物在国内外均享有较高声誉。1988—1996年获省部级以上优秀科技期刊奖8项,最高为国家二等奖。双月刊,定价:12.00元。

全国各地邮局发行,邮发刊号CN37-1149。

本刊编辑部