

日本对虾溶血素的活性测定及性能研究^{*}

牟海津 江晓路 刘树青 管华诗

(青岛海洋大学水产学院 青岛 266003)

提要 于1997年10—11月,以青岛市红岛养殖场养殖的日本对虾为材料,采用分光光度法对其血淋巴中的溶血素进行活性检测,研究多种理化因子对其溶血性能的影响,以及日本对虾溶血素经细菌和虫草多糖肌肉注射刺激后的活性变化。结果表明,日本对虾溶血素的活性同对虾的健康状况密切相关。该溶血素经60℃以下处理溶血作用有所增强,在pH=5—9时溶血活性最高,Ca²⁺、Fe²⁺可增强溶血作用。注射大肠杆菌(2×10^7 cells / 尾)和虫草多糖能够诱导日本对虾溶血素的产生,使溶血活性有所提高;而注射哈维氏弧菌(7×10^7 cells / 尾)会导致对虾发病,降低溶血素的活性。

关键词 日本对虾 溶血素 血淋巴

学科分类号 Q592.1

溶血素作为一种非特异性的免疫防御因子,已经在多种无脊椎动物的血清中被发现(Canicatti *et al.*, 1993; Canicatti, 1989; Hatakeyama *et al.*, 1994; Rottini *et al.*, 1995),但有关甲壳类动物溶血素的研究甚少,所见报道仅限于美洲马蹄蟹(Armstrong *et al.*, 1992)、龙虾(高健等, 1992)等。目前认为,甲壳动物的免疫反应主要包括血细胞的吞噬包裹、血淋巴凝集、沉淀以及释放酚氧化酶和黑色素等作用,而溶血作用在甲壳动物的免疫防御中也发挥了重要的作用,可能与体液的杀菌活性以及酚氧化酶原的激活系统有关(王雷等, 1992)。本文报告日本对虾溶血素的活性测定及性能研究结果,以期为甲壳动物的免疫机能研究提供资料。

1 材料和方法

1.1 日本对虾血淋巴液的制备

实验于1997年10—11月进行。实验用虾取自青岛市红岛养殖场养殖的日本对虾(*Penaeus japonicus*) (体长为14—16cm),心脏穿刺抽取血淋巴液,经3000r / min离心5min,除去沉淀血细胞,取出上清液于-20℃保存。

1.2 日本对虾溶血素的活性测定

参照脊椎动物溶血素的测定方法(陈勤, 1996)。

用Alsever's液采集新鲜鸡血,离心(2000r / min, 5min)洗涤后,用生理盐水制成3%的红细胞悬液,取2ml悬液与0.5ml稀释10倍日本对虾血淋巴液混合均匀,间歇振荡

^{*} 国家攀登计划B资助项目, PDB-6-6-3号。牟海津, 男, 出生于1973年3月, 硕士, 讲师, E-mail:fst@ouqd.edu.cn
收稿日期: 1997-12-29, 收修改稿日期: 1998-05-21

25℃, 保温 1h, 在对照管中加入 2ml 鸡红细胞悬液和 0.5ml 生理盐水, 与实验管同时保温。取出后立即冰浴以终止反应, 经 2 000r / min 离心后获得上清液。以对照管上清液作空白, 于 540nm 处测光密度值(OD), 以 540nm 下的 OD 值增加 0.001 定义为 1 个溶血活性单位(U)。

1.3 理化因素对日本对虾溶血素活性的影响

1.3.1 温度 日本对虾血淋巴液分别经 20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃ 和 80℃ 处理 20min 后, 检测其对鸡红细胞的溶血活性。

1.3.2 pH 值 将日本对虾血淋巴液分别用不同 pH 值的生理盐水稀释 10 倍, 4℃ 处理 10min 后, 取 0.5ml 稀释液与 2ml 鸡红细胞悬液混合反应, 检测其溶血活性。

1.3.3 二价金属离子 将待测血淋巴液与鸡红细胞悬液混合后, 向反应液中分别加入少量的 CaCl₂、FeCl₂、MgCl₂、CuCl₂、ZnCl₂ 和 MnCl₂ 等, 使其终浓度达到 10mmol / L, 向对照组加入生理盐水, 检测其对溶血活性的影响。

1.4 细菌性刺激对日本对虾溶血素活性的影响

实验用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 为本实验室保藏菌种, 哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 为大连水产学院从患病中国对虾体内分离鉴定得到的病原菌。分别配制大肠杆菌悬液 (2 × 10⁸ cells / ml) 和哈维氏弧菌悬液 (7 × 10⁸ cells / ml) 于日本对虾第三、四腹节处进行肌肉注射, 对照组采用生理盐水注射, 注射量均为 0.1ml / 尾。对虾于实验缸中暂养, 每隔 24h 取 10 尾对虾抽取血淋巴液混合, 测定溶血活性。

1.5 虫草多糖对日本对虾溶血素活性的影响

实验用虫草多糖为从北虫草中分离提取的胞外多糖。将虫草多糖配制成浓度为 1.0% 的溶液, 肌肉注射日本对虾, 对照组采用生理盐水注射, 注射量为 0.1ml / 尾。每隔 24h 取 10 尾对虾抽取血淋巴液混合, 测定溶血活性。

2 结果

2.1 日本对虾血淋巴液中溶血素的活性

实验发现, 日本对虾血淋巴液对鸡红细胞具有一定的溶血作用, 溶血活性为 68U。另外, 作者还在对虾养殖场和实验室暂养缸中发现有濒死病虾, 病虾头胸甲及附肢变红, 侧翻于池底。抽取虾血进行溶血活性的测定, 结果发现濒死对虾血淋巴液的溶血活性大大降低。自然养殖濒死虾和实验室暂养濒死虾的血淋巴液的溶血活性分别为 7U 和 23U。

2.2 理化因素对溶血素活性影响的实验结果

结果见表 1。由表 1 可知, 日本对虾的溶血素经 30—60℃ 处理 20min 后, 活性会有不

表1 温度(℃)、pH值和二价金属离子对日本对虾溶血素活性(U)的影响

Tab.1 The effect of temperature, pH and divalent metal cations on the activity of hemolysin of *P. japonicus*

处理温度	未处理	20	30	40	50	60	70	80			
溶血活性	66	64	81	107	150	141	—	—			
pH值	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
溶血活性	20	21	20	53	45	50	47	51	18	16	8
金属因子	Ca ²⁺	Fe ²⁺	Mg ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Mn ²⁺					对照组
溶血活性	109	162	61	29	72	48					63

注: “—”表示血淋巴液发生凝固, 无法检测

同程度的增强,当温度达到 70—80℃ 时,血淋巴液会发生变性凝固,无法检测。当 pH = 5—9 时,溶血素的活性较强。在溶血反应液中添加少量的二价阳离子,会对溶血活性造成一定的影响,Ca²⁺、Fe²⁺ 可使溶血作用增强;而 Mg²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺ 则对溶血作用的影响不大,甚至会有所抑制。

2.3 细菌性刺激对日本对虾溶血素活性的影响

分别用大肠杆菌和哈维氏弧菌注射刺激日本对虾后,每隔 24h 取对虾抽取血淋巴液,检测溶血素活性的变化情况,结果见表 2。

表2 经大肠杆菌和哈维氏弧菌刺激后,日本对虾溶血素活性(U)的变化情况

Tab.2 The activities variation of hemolysin of *P. japonicus* stimulated by *E.coli* and *V. harveyi*

时间(h)	0	24	48	72	96
注射大肠杆菌	55	52	82	85	71
注射哈维氏弧菌	55	62	38	27	25
对照组(注射生理盐水)	55	60	52	58	50

2.4 虫草多糖对日本对虾溶血素活性的影响

用虫草多糖注射刺激日本对虾后,每隔 24h 取对虾抽取血淋巴液,进行溶血素活性的测定,结果见表 3。

表3 经虫草多糖刺激后,日本对虾溶血素活性(U)的变化情况

Tab.3 The activities variation of hemolysin of *P. japonicus* stimulated by cordycepic polysaccharide

时间(h)	0	24	48	72	96
注射虫草多糖	55	89	127	141	130
对照组(注射生理盐水)	55	60	52	58	50

3 讨论

3.1 脊椎动物中的溶血作用是在补体的参与下,抗体与异物红细胞之间发生的一种特异性免疫反应。在无脊椎动物的血液中,溶血作用主要依靠血细胞的吞噬、包裹作用来完成,但在多种无脊椎动物的血清中也发现有溶血素的存在。溶血素是无脊椎动物免疫防御系统中的一种重要的非特异性免疫因子,其作用可能类似于脊椎动物的补体系统,可溶解破坏异物细胞、参与调理作用(Canicatti, 1988),并可能与无脊椎动物体液的杀菌作用以及酚氧化酶原的激活系统有关(王雷等,1992; Armstrong *et al*, 1992),且无脊椎动物溶血素进行溶血作用的特异性范围一般较广(Tripp *et al*, 1991)。Hatakeyama 等(1994)发现,刺瓜参(*Cucumaria echinata*)体内的溶血素可以对兔、人血细胞产生溶血作用,但对鸡、马等动物血细胞无作用,并认为,这种溶血作用是由溶血素与脊椎动物血细胞表面的特异性糖链结合后,使细胞膜发生破坏溶解而造成的。

本实验结果表明,日本对虾血淋巴液中具有溶血素,能够对鸡红细胞产生溶血作用。该溶血素的活性大小同对虾的体质有密切关系,濒死对虾溶血素的活性明显低于健康对虾。因此,溶血素可能作为日本对虾免疫系统的重要组成部分,在免疫防御活动中发挥作用。溶血活性也可被用作检测对虾健康状况的一项定量指标。

3.2 无脊椎动物体内的溶血素一般为热不稳定性,溶血作用需要 Ca²⁺ 的参与(Canicatti, 1990),例如海蜇(Rottini *et al*, 1995)、海葵(Malpezzi *et al*, 1991)、海蜗牛(Kamiya *et*

al, 1991)等。而棘皮动物 *Marthasterias glacialis* 体液中的溶血因子为热稳定性,且不需要阳离子的参与,其活性可为鞘磷脂所抑制(Canicatti, 1989),*Cucumaria echinata* 体内的溶血活性在 $\text{pH} = 7-10$ 时随 pH 值的增高而增强,在 $\text{pH} < 6.5$ 时活性几乎完全丧失(Hatakeyama *et al.*, 1995)。另外,海蜗牛(Kamiya *et al.*, 1991)、*Marthasterias glacialis* (Canicatti, 1989)等动物体内检测到的溶血素被认为是蛋白质成分。

本实验发现,日本对虾溶血素经 $30-60^\circ\text{C}$ 处理后,活性会有所增强,继续升高温度,血淋巴液发生变性凝固,形成淡蓝色结块,使实验无法进行,因此,该溶血素的热稳定性有待于通过合理实验进行进一步验证。日本对虾溶血素的作用范围为 $\text{pH} = 5-9$,在 $\text{pH} \leq 4$ 或 $\text{pH} \geq 10$ 的情况下,溶血活性很弱,说明偏酸性或偏碱性的环境均会对日本对虾溶血素的活性造成较大程度的破坏作用。在反应液中加入少量的 Ca^{2+} 和 Fe^{2+} ,能适当增强日本对虾溶血素的溶血作用,说明这两种离子可能是溶血素进行溶血活动所必需的。

3.3 大肠杆菌的刺激在一定程度上可以增强日本对虾血淋巴中溶血素的活性,对虾经大肠杆菌悬液注射后 48h,溶血素活性明显增强,至 96h 活性有所下降,但仍高于对照组。这说明日本对虾的溶血素具有一定的可诱导性,外源刺激物的诱导可以使血淋巴中的溶血素浓度有所提高,在病原微生物的清除和杀灭活动中发挥积极作用。Leippe 等(1988)认为,贻贝(*Mytilus edulis*)血淋巴中的溶血素是由血细胞分泌产生的,Canicatti(1988)也发现,棘皮动物 *Holothuria polii* 的阿米巴状细胞可以产生两种溶血素:一种为热不稳定性,自然状态下存在于血淋巴中;另一种为热稳定性,经免疫刺激后产生,这两种溶血素都能作用于异物细胞表面并将其破坏溶解掉。日本对虾血淋巴溶血活性的提高可能也与细菌刺激促进了血细胞的溶血素分泌有关,细菌侵入到对虾血淋巴中后,刺激血细胞迅速做出免疫反应,分泌产生溶血素等免疫活性物质,抑制或杀灭细菌,从而达到免疫防御的目的。这一结论有待于进一步证实。

本实验所用哈维氏弧菌为 1993 年辽宁地区中国对虾暴发性流行病的主要病原之一,人工感染中国对虾的致死率达 100%(马悦欣等,1995)。在本实验中,日本对虾经哈维氏弧菌刺激后 24h,溶血活性略有升高,可能与对虾体内免疫系统的激活有关。随后,溶血活性便逐渐降低直至 96h,而且,在此期间,不断有对虾发病死亡,可见这种细菌同样可引起日本对虾的致病,能够降低溶血素等免疫因子的活性,从而破坏对虾的体质,最终导致发病死亡。

3.4 虫草多糖是一种高分子的胞外糖蛋白,对高等生物具有明显的免疫增强作用和免疫调节作用。日本对虾经虫草多糖注射刺激后,溶血素活性大大增强,24h 时溶血活性即比对照组高出 48%,至 72h 时溶血活性达到最高。说明这种多糖进入虾体后,能够诱导溶血素的产生,提高溶血素在血淋巴液中的浓度,从而增强日本对虾的免疫功能。因此,在对虾养殖中,使用虫草多糖等免疫增强药物,有望对增强对虾的体质,减少病害的发生起到一定的作用。

参 考 文 献

- 马悦欣,李 华,陈 营,1995. 1993 年中国对虾暴发性流行病细菌病原学研究. 大连水产学院学报, 10(2): 1-8

- 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
- 陈 勤, 1996. 抗衰老研究实验方法. 北京: 中国医药科技出版社, 344—348
- 高 健, 李跃华, 1992. 甲壳类的体液免疫因子及其环境作用. 水产养殖, 6: 21—23
- Armstrong P B, Armstrong M T, Quigley J P, 1992. A hemolytic activity in the blood of the American horseshoe crab, *Limulus polyphemus* that resembles the mammalian complement system. Biol Bull Mar Biol Lab Woods Hole, 183(2): 378—379
- Canicatti C, 1988. The lytic system of *Holothuria polii*: a review. Boll Zool, 55(3): 139—144
- Canicatti C, 1989. Evolution of the lytic system in echinoderms II. naturally occurring hemolytic activity in *Marthasterias glacialis* coelomic fluid. Comp Biochem physiol, 93A(3): 587—591
- Canicatti C, 1990. Hemolysins: pore-forming proteins in invertebrates. Experientia, 46(3): 239—244
- Canicatti C, Roch P, 1993. Erythrocyte membrane structural features that are critical for the lytic reaction of *Spirographis spallanzani* coelomic fluid hemolysin. Comp Biochem Physiol, 105C(3): 401—407
- Hatakeyama T, Kohzaki H, Nagatomo H *et al*, 1994. Purification and characterization of four Ca super (2+)—dependent lectins from the marine invertebrate, *Cucunaria echinata*. J Biochem Tokyo, 116(1): 209—214
- Hatakeyama T, Nagatomo H, Yamasaki N *et al*, 1995. Interaction of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* with the erythrocyte membrane. J Biol Chem, 270(8): 3 560—3 564
- Kamiya H, Muramoto K, Goto R, 1991. Naturally occurring hemolysin in the marine snail *Tugali gigas*. Bull Jap Soc Sci Fish, 57(11): 2 109—2 113
- Leippe M, Renwrandt L, 1988. Release of cytotoxic and agglutinating molecules by mytilus hemocytes. Dev Comp Immunol, 12(2): 297—308
- Malpezzi E L A, Freitas J C, 1991. Hemolytic activity of the nematocyst venom from the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. Braz J Med Biol Res, 24(12): 1 245—1 249
- Rotini G, Gusmani L, Parovel E *et al*, 1995. Purification and properties of a cytolytic toxin in venom of the jellyfish *Carybdea marsupialis*. Toxicon, 33(3): 315—326
- Tripp M R, Hackett K, 1991. Defense mechanisms of *Geukensia demissa*. J Shellfish Res, 10(1): 278—279

STUDIES ON ACTIVITIES' DETERMINATION AND PROPERTIES OF HEMOLYSIN OF *PENAEUS JAPONICUS*

MOU Hai-jin, JIANG Xiao-lu, LIU Shu-qing, GUAN Hua-shi

(Fishery College, Ocean University of Qingdao, Qingdao, 266003)

Abstract Hemolymph was collected by heart puncture from cultured *Penaeus japonicus* with a body length of 14—16cm from Hongdao prawn culturing farm in Qingdao from October to November, 1997. Hemolytic activity of hemolymph against chicken red blood cells was detected by colorimetric analysis. The effects of some physical and chemical factors such as heat, pH value, divalent metal cations on the hemolytic activity were studied. Having been stimulated by intramuscular injection with *Escherichia coli* and *Vibrio harveyi*, the prawns were nursed in the glass tanks in laboratory. Hemolymph was collected every 24h and changes in hemolytic activity were detected. Cordycepic polysaccharide extracted from *Cordyceps militaris* was used as immunopotentiator. 1.0% polysaccharide was injected intramuscularly into the prawns. The hemolymph was collected every 24h for the study

of the induced change in hemolytic activity. The results are described below.

The hemolymph of *P. japonicus* possesses hemolytic activity against the red blood cells of chicken. Hemolysin acts as an important component in the immune system of *P. japonicus*. The activity of hemolysin is closely related to the health status of *P. japonicus*. There is a significant drop in the hemolytic activity of moribund prawn. Hence, the hemolytic activity could be used as a prawn's health index.

The activity of hemolysin could be improved to some extent under the treatment at 60°C for 20min. When the temperature went up over 70°C, the hemolymph began to denature and solidify. The pH range of hemolytic action was from 5 to 9. Hemolytic activity was also enhanced by Ca^{2+} and Fe^{2+} , but not by Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} .

Injection with 2×10^7 bacteria *E. coli* could induce the production of hemolysin in the hemolymph of *P. japonicus*. The increase in hemolysin would be favorable to sterilization and elimination of bacteria in the hemolymph, so as to protect the prawn against the disease. However, with injection of 7×10^7 bacteria *V. harveyi*, the activity of hemolysin of *P. japonicus* increased a little only at 24h, then dropped rapidly till 96h. At the same time, the prawns were caught by the disease and became moribund. As a kind of immunological polysaccharide, injected cordycepic polysaccharide could also induce the production of hemolysin in the hemolymph, enhance the hemolytic activity, and strengthen the prawn's health and immune function. Therefore, the polysaccharide could be used in the prawn's culture to reduce the occurrence of diseases.

Key words *Penaeus japonicus* Hemolysin Hemolymph

Subject classification number Q592.1