

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)感染对青蛤(*Cyclina sinensis*)磷酸酶活性的影响*

宋欣 张丽岩 高玮玮 潘宝平^①

(天津师范大学化学与生命科学学院 细胞遗传与分子调控天津市重点实验室 天津 300387)

摘要 对 500 个成体青蛤分别用鳃弧菌和生理盐水注射,在感染后 3h、6h、12h、24h 和 36h 分别取不同处理组的肝胰脏、鳃和闭壳肌组织,测定上述样品的碱性磷酸酶(ALP)及酸性磷酸酶(ACP)活性,分析鳃弧菌对青蛤体内免疫相关酶活性的影响。结果表明,鳃弧菌感染组的 ALP 与 ACP 活性从高到低依次为肝胰脏>鳃>闭壳肌,其中青蛤肝胰脏和鳃组织中 ALP 和 ACP 活性均有显著升高的趋势,并且在 12h 时达到最高,与对照组差异显著($P<0.05$),随后呈现下降趋势。而青蛤闭壳肌组织中感染组 ALP 和 ACP 活性与对照组之间没有显著差异($P>0.05$)。鳃弧菌对青蛤的磷酸酶活性影响较大,对其免疫防御系统有明显的刺激作用。

关键词 青蛤, 鳃弧菌, 碱性磷酸酶(ALP), 酸性磷酸酶(ACP)

中图分类号 Q789

青蛤(*Cyclina sinensis* Gmelin, 1791)是我国习见的海产经济动物,由于其肉质细嫩鲜美,营养丰富,是我国南北沿海地区人们喜爱的鲜食贝类,目前已成为重要的海水养殖对象之一。近年来,随着青蛤养殖规模的日益扩大和养殖密度的显著提高,有关青蛤大面积死亡的现象已有报道(曹华, 2004)。

早在 1987 年, Egidius 就曾指出海洋弧菌属中的鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是引起水产养殖动物病害的最严重病原微生物之一(Egidius, 1987)。王兰萍等(2007)在分析了滩涂青蛤养殖群体体内细菌菌群后指出,弧菌属是养殖青蛤体内菌群组成中的优势类群。从现有的文献资料看来,关于鳃弧菌感染贝类方面已有一些报道(梁玉波等, 2000; 邓欢等, 2003; 樊甄姣等, 2007),有关鳃弧菌对青蛤感染及其对免疫因子活性影响尚未见正式报道。本研究通过鳃弧菌的感染试验,分析青蛤不同组织磷酸酶活性的变化,探索青蛤的病源微生物及其毒害机理,为贝类疾病防控提供有价值的实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

活体青蛤(*Cyclina sinensis*)于 2008 年 5 月采自天津大港滩涂,选取形态指标没有显著差异个体 500 枚,其壳长平均值为(29.32±1.53)mm,壳高平均值为(29.17±1.64)mm,壳宽平均值为(18.12±0.42)mm。样品暂养于人工海水中(海水密度 1.020—1.040g/cm³,水温 20—23℃,盐度 28—31, pH 7.0),持续曝气,每天投喂 5‰的小球藻,一周后进行感染试验。

1.2 方法

1.2.1 感染试验 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)用 2216E 培养基于 28℃下培养 24h 后,用灭菌生理盐水脱洗,浓度调至 1×10^8 cell/ml。采用随机分组方法,每次试验均设 3 个平行组。将暂养的青蛤用无菌注射器从闭壳肌处注入 50μl/只鳃弧菌菌液;对照组用等量的无菌生理盐水注射。处理后分别于 3h、6h、12h、24h、36h 时取出等数量样品,解剖取肝胰脏、鳃和闭

* 天津市科委应用基础与前沿技术重点项目资助, 09JCZDJC19300 号; 天津市科委应用基础研究面上项目资助, 06YFJMJC11800 号。宋欣, 硕士研究生, E-mail: songxin_6@yahoo.com.cn

通讯作者: 潘宝平, 博士, 教授, E-mail: panbaoping@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-05-17, 收修改稿日期: 2009-07-18

壳肌组织, 准确称取组织质量, 迅速放入液氮冷冻备用。试验期间的其他环境条件、饲养管理同于暂养条件。

1.2.2 酶液制备 取出冷冻后样品在预冷的匀浆器中进行匀浆, 按质量体积比 1 : 9 加入预冷生理盐水, 分装于 50ml 的离心管中, 在 4℃、4500r/min 速度离心 15min, 取上清液即为粗酶提取液, 将该组织匀浆液稀释为 1% 和 5% 浓度, 分别用于蛋白浓度和酶活性的测定。

1.2.3 酶活性测定 实验所用酶及可溶性蛋白(考马斯亮蓝法)试剂盒均购自南京建成生物研究所。碱性磷酸酶(ALP)和酸性磷酸酶(ACP)活性均采用 Kruzel(1982)磷酸苯二钠法, 以每克组织蛋白在 37℃ 与基质分别作用 15min 和 30min, 产生 1mg 酚为一个酶活力单位。

1.2.4 数据处理 实验数据输入 MS-Excel 初步计算并绘制曲线, 采用 SAS 统计分析软件进行单因素方差分析和独立性 *t* 检验。

2 结果

青蛤分别注射鳃弧菌菌液和生理盐水后, 不同组织中 ALP 活性和 ACP 活性变化基本一致, 其磷酸

酶活性从高到低依次为肝胰脏>鳃>闭壳肌。

2.1 鳃弧菌对肝胰脏磷酸酶活性的影响

青蛤注射生理盐水和鳃弧菌后, 不同侵染时间青蛤的肝胰脏组织中磷酸酶活性变化见图 1。在该组织中 ALP 和 ACP 活性的变化趋势基本相同, 均随着时间的延长先升高后逐渐降低, 其中在 12h 时两种酶的活性达到最高, 分别达到(391.765±16.517)U/mg 和 (286.166±12.895)U/mg, 与对照组出现显著性差异 ($P<0.05$), 随着时间的延长, 两种的酶活性呈现振荡走低趋势。但与 ACP 不同的是, 24h 时感染组 ALP 活性与对照组之间依然存在显著性差异 ($P<0.05$)。

2.2 鳃弧菌对鳃组织磷酸酶活性的影响

青蛤鳃弧菌侵染组与对照组在不同时间鳃组织中磷酸酶活性变化见图 2, 其鳃组织中 ALP 和 ACP 活性的变化趋势基本相同, 均随着侵染时间的延长, 呈现先升高后降低的趋势, 并在 12h 时活性达到最高值, 分别为(55.263±7.411)U/mg 和 (84.054±2.158)U/mg; 随着时间的延长, 两者的酶活性均有所降低。其中 ALP 活性在 3h 和 6h 时感染组与对照组无显著性差异 ($P>0.05$); 12h 时骤然增加, 与对照组出现显著差异; 随后酶活性逐步下降。另外, ACP 活性

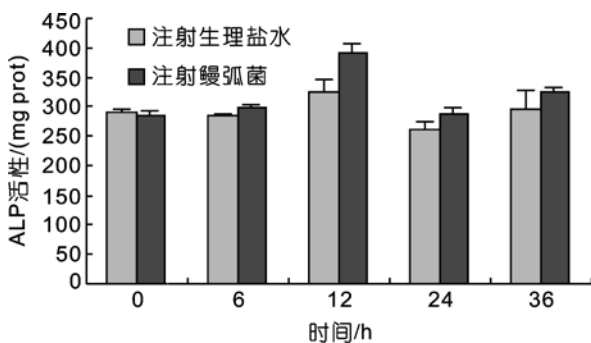


图 1 鳃弧菌注射后肝胰脏中磷酸酶活性的变化

Fig.1 Changes in ALP and ACP activity in hepatopancreas after injection of *V. anguillarum*

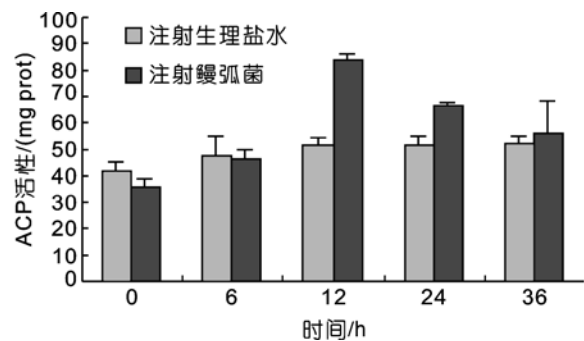
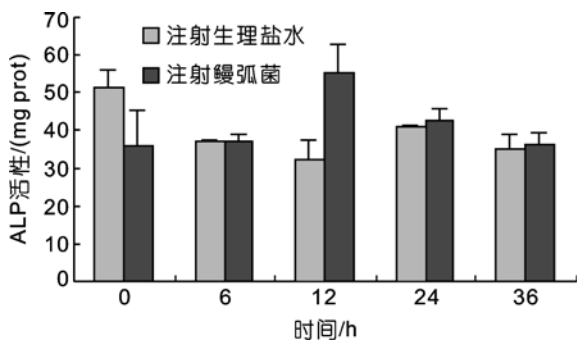
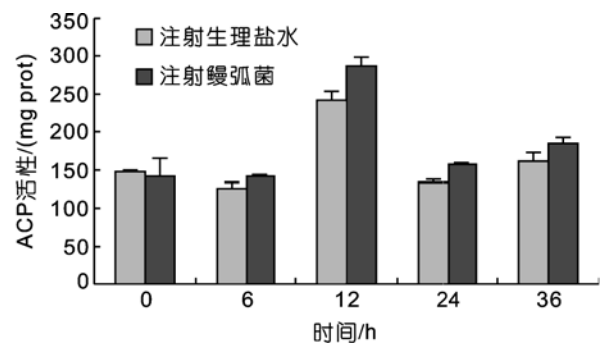


图 2 鳃弧菌注射后鳃中磷酸酶活性的变化

Fig.2 Changes in ALP and ACP activity in gill after injection of *V. anguillarum*

在 3h 和 6h 时侵染组与对照组差异不显著($P>0.05$); 12h 时侵染组酶活性急剧升高, 并与对照组出现极为显著差异($P<0.01$); 24h 时仍然与对照组差异显著($P<0.05$); 36h 后逐渐回落, 与对照组差异不明显($P>0.05$)。

2.3 鳃弧菌对青蛤闭壳肌组织磷酸酶活性的影响

不同感染时间青蛤闭壳肌组织中磷酸酶活性的变化见图 3。青蛤闭壳肌组织中 ALP 活性明显低于 ACP 活性, 差距达到一个数量级水平, 可能与组织特性有关。侵染组的 ALP 和 ACP 活性平均值分别为 2.312U/mg 和 45.454U/mg, 但均与对照组没有出现显著性差异($P>0.05$)。

2.4 鳃弧菌对青蛤磷酸酶活性影响的综合分析

鳃弧菌感染青蛤后, 青蛤体内各组织磷酸酶活性的平均值 t 检验见表 1。在肝胰脏组织中 12h 时 ALP 和 ACP 活性侵染组明显高于对照组, 出现显著性差异, 其中 ALP 在 24h 时活性仍然很高, 与对照组存在显著性差异; 鳃组织中 ALP 与 ACP 的活性在 12h 时最高, ALP 活性与对照组有显著性差异, ACP 活性与对照组出现极显著性差异。ACP 活性在 24h 时仍然较高, 与对照组差异明显。在青蛤闭壳肌组织中侵染组与对照组的 ALP 和 ACP 活性均没有统计学意义。

3 讨论

目前, 我国的贝类养殖方式存在着严重的缺陷(张国范等, 1999), 其中以种质严重衰退, 病害频繁发生问题最为突出。近年来, 有关弧菌引起海产经济动物病害的报道较多, 如郑国兴等(1991)、沈亚林等(1993)、刘军义(1996)、李清禄等(2001)、莫照兰等(2002)、You 等(2007)、Kim 等(2008), 其中, 以鳃弧菌侵袭海水养殖鱼类、贝类及甲壳类动物致病的报道居多。

软体动物没有特异性免疫系统, 其免疫活动主要依赖非特异性免疫来防御各种各样病原的感染, 维持机体的健康和正常的生命活动。除细胞免疫外, 软体动物的体液性免疫主要包括血淋巴的溶菌作用、凝集作用、溶血作用等。体液免疫因子包括血淋巴中的各类抗菌因子、血凝因子、细胞激活因子、识别因子、凝聚素、溶血素及溶菌酶等各种具有免疫活性的酶类。这些免疫因子通过凝聚、沉淀、溶解等方式抑制病原体的生长及扩散, 或者直接将其杀灭并排出体外。其中, 与免疫有关的一些酶的活力高低能够体现机体的免疫状态, 它们会由于机体受到异物或病原的感染而发生剧烈变化。酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)是动物体内参与免疫防御的两种重要水解酶(肖克宇等, 2007), 其中, ACP 广泛分布于动物组织中, 在大部分组织中定位于溶酶体中, 是溶酶体的标志酶。在缺乏特异性免疫球蛋白的软体动物体内, 酸性磷酸酶的作用显得尤为重要, 它能够通过水解作用将表面带有磷酸酯的异物破坏, 从而达到预防病原体感染的目的, 并可修饰或改变外来异物的表面分子组成, 从而增强血细胞对异物的识别, 起到调理的作用, 加快吞噬细胞对异物的吞噬和降解速度(Cheng, 1978; Lackie, 1980)。ALP 主要定位于动物细胞的质膜上, 是动物的一种重要的代谢调控酶, 它能够调节膜运输, 催化所有的磷酸单酯及磷酸基团的转移反应。在贝类中, ALP 还与钙吸收、膜的吸收和转运以及角蛋白等的分泌相关。此外, ALP 也作为动物溶酶体酶的重要组成部分, 在免疫反应中发挥作用(谢莉萍等, 2000)。

本研究结果显示, 首先, 青蛤的肝胰脏、鳃和闭壳肌组织中均具有上述两种磷酸酶的活性分布。在应对鳃弧菌侵染的免疫状态下, 试验组的肝胰脏及鳃的酶活力参数明显高于对照组, 并且出现显著性差

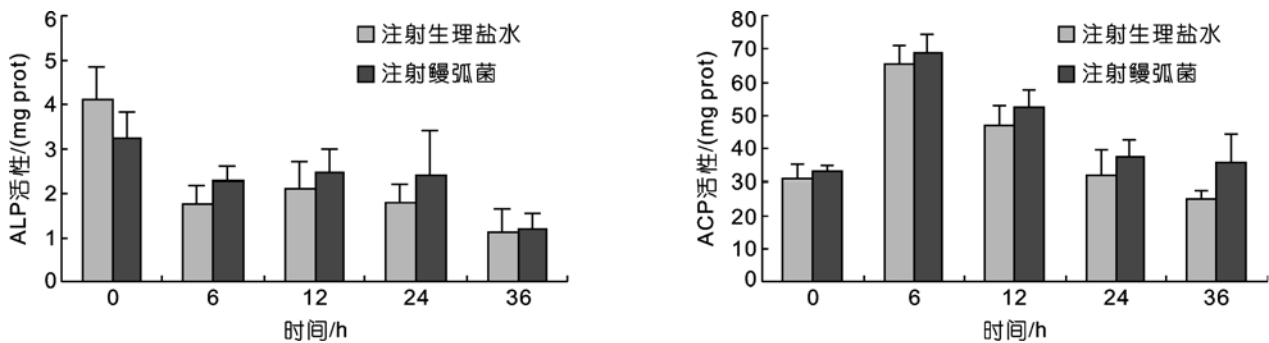


图 3 鳃弧菌注射后闭壳肌中磷酸酶活性的变化

Fig.3 Changes in ALP and ACP activity in muscle after injection of *V. anguillarum*

表 1 鳃弧菌对青蛤磷酸酶活性影响的分析
Tab.1 The effect of *V. anguillarum* on phosphatase enzyme activity of *C. sinensis*

注射时间(h)	肝胰脏		鳃		闭壳肌	
	ALP	ACP	ALP	ACP	ALP	ACP
3	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—
12	*	*	*	**	—	—
24	*	—	—	*	—	—
36	—	—	—	—	—	—

注:表中*表示与对照组差异显著($P<0.05$),**表示与对照组差异极显著($P<0.01$)

异($P<0.05$),说明鳃弧菌对青蛤参与免疫活动的磷酸酶活性有较强的刺激作用。其次,青蛤被鳃弧菌感染后,两种磷酸酶活性一般在 12h 左右达到峰值,而后会逐步下降。其结果可能与 Cheng(1983)提出的有机体在接触细菌后,提高溶酶体酶以诱导体液免疫因子并释放到血清有关。但随着贝类体内病原物被凝聚、分解、吞噬等作用的完成,其酶的活力逐步回落。该结果能够为探索青蛤的免疫反应周期和免疫应答机制提供一定的参考数据。此外,鳃弧菌感染试验发现,青蛤不同组织在免疫反应中的酶活力不同,其中以肝胰脏中的酶活性最高,鳃组织次之,而闭壳肌组织变化不明显,可能与不同组织特性及其磷酸酶含量有关。本研究与樊甄姣等(2007)鳃弧菌对栉孔扇贝免疫活性影响的研究结果相近,有关磷酸酶活性变化的机制有待于深入研究。另外,试验中对照组注射的等量的灭菌生理盐水,亦使青蛤两种磷酸酶的活性发生变化,其原因可能与注射液与青蛤血淋巴有一定差别所导致的应激反应。总之,磷酸酶是衡量机体免疫机能和健康状况的重要指标,在贝类免疫防御方面起着重要的作用。本研究有助于了解青蛤在病原体感染下的免疫应答反应周期,为进一步探索贝类免疫机制及疾病防控途径提供有价值的实验数据。

参 考 文 献

王兰萍,耿荣庆,陈燕等,2007. 滩涂养殖青蛤体内细菌菌群的初步分析. 江苏农业科学, (2): 152—153

- 邓欢,陈隼,刘权恕等,2003. 养殖海湾扇贝弧菌病的研究. 应用与环境生物学报, 9(5): 517—521
- 刘军义,1996. 广西沿海文蛤及其生境中细菌菌群的初步调查. 水产科技情报, 23(2): 80—83
- 沈亚林,于业绍,1993. 副溶血弧菌对文蛤的致病性及其防治. 水产学报, 17(3): 249—252
- 肖克宇,邓时铭,向建国等,2007. 水产动物免疫与应用. 北京: 科学出版社, 89—96
- 张国范,李霞,1999. 我国养殖贝类大规模死亡的原因分析及防治对策. 中国水产科学, 9: 34—39
- 李清禄,陈强,2001. 海水网箱养殖大黄鱼细菌性病原鉴定与感染治疗研究. 应用与环境生物学报, 7(5): 489
- 郑国兴,李何,黄宁宇等,1991. 文蛤病原菌(溶藻弧菌)的分离与性状及病文蛤组织的电镜观察. 水产学报, 15(2): 85—95
- 莫照兰,茅云翔,陈师勇等,2002. 一株牙鲆皮肤溃烂症病原菌的鉴定. 微生物学报, 42(3): 263—269
- 曹华,2004. 沿海滩涂青蛤死亡原因及对策. 中国水产, (4): 57—58
- 梁玉波,杨波,王立俊等,2000. 辽宁黄海沿岸水域增养殖贝类病害发生机理和防治对策. 海洋环境科学, 19(1): 5—10
- 谢莉萍,林静瑜,肖锐等,2000. 合浦珠母贝碱性磷酸酶的分离纯化与性质研究. 海洋科学, 24(10): 37—40
- 樊甄姣,杨爱国,吕振明等,2007. 鳃弧菌注射对栉孔扇贝免疫活性的影响. 南方水产, 3(6): 52—55
- Cheng T C, 1978. The role of lysosomal hydrolases in molluscan cellular response to immunologic challenge. Comp Pathbiol, 4: 59—71
- Cheng T C, 1983. The role of lysosomal in molluscan inflammation. Am Zool, 23(1): 129—144
- Egidius E, 1987. Vibriosis: pathogenicity and pathology, a review. Aquaculture, 67: 15—28
- Kim D G, Bae J Y, Hong G E *et al*, 2008. Application of the *rpoS* gene for the detection of *Vibrio anguillarum* in flounder and prawn by polymerase chain reaction. Journal of Fish Diseases, 31(9): 639—647
- Kruzel M, 1982. Acid phosphatase of potato tubers purification properties, sugar and amino acid composition. Acta Biochim Pol, 29(3): 321—326
- Lackie A M, 1980. Invertebrate immunity. Parasitology, 80: 393—412
- You J L, Xue X L, Cao L X *et al*, 2007. Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. Applied Microbiology and Biotechnology, 76(5): 1137—1144

EFFECT OF *VIBRIO ANGUILLARUM* ON ACTIVITY OF PHOSPHATASE IN *CYCLINA SINENSIS*

SONG Xin, ZHANG Li-Yan, GAO Wei-Wei, PAN Bao-Ping

(College of Chemistry and Life Science, Tianjin Key Laboratory of Cyto-Genetical and Molecular Regulation,
Tianjin Normal University, Tianjin, 300387)

Abstract In this study, *Vibrio anguillarum* and normal saline were injected separately into 500 adult clams (*Cyclina sinensis*). At 3h, 6h, 12h, 24h, and 36h after injection, hepatopancreas, gills, and adductor muscle tissues of the samples in different treatment groups were collected, and alkaline phosphatase (ALP) and acid phosphatase (ACP) activities were measured in order to reveal the relationship between *V. anguillarum* injection and immune-related response. The results show that after the injection, ALP and ACP activities in the clam tissue were, in a descending order, hepatopancreas > gill > adductor muscle tissue. After the injection, the activities in hepatopancreas and gill tissues increased significantly, and reached its highest level at 12h and then decreased. In the adductor muscle tissues, the activities showed no significant difference compared with the control group. Our research shows that *V. anguillarum* has noticeable impact on phosphatase of *C. sinensis* and significant stimulating effect to the clam's immune system.

Key words *Cyclina sinensis*, *Vibrio anguillarum*, Alkaline phosphatase (ALP), Acid phosphatase (ACP)