

中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究*

王雷 李光友 毛远兴

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 以海捕中国对虾亲虾(1992年4月捕)为材料,对其血淋巴中的抗菌、溶菌活力及酚氧化酶活力进行测定,并研究经注射大肠杆菌、海洋弧菌及酵母聚糖等刺激物以后,其活性的变化规律等。结果表明,适当的免疫刺激可提高对虾自身的抗病能力、为免疫药物的研制等提供科学依据。

关键词 中国对虾 血淋巴 抗菌 溶菌 酚氧化酶活力

关于昆虫血淋巴中抗菌物质的诱导源、分离鉴别、化学结构、产生的动力学及其抗菌谱研究等在国内外均已取得结论性成果(祁国荣等,1983;屈贤铭等,1984,1985;钟文彪等,1982;黄自然等,1981;Anderson et al., 1979; Hoffmann et al., 1981; Steiner et al., 1981)。在甲壳纲动物中,研究较多的有瑞典的 Kenneth 等人 (Fisher et al, 1983, Söderhäll et al., 1979, 1982, 1984)。他们研究了淡水螯虾的免疫系统,其重点集中于血细胞及血淋巴中的酚氧化酶原激活系统,认为酚氧化酶与血细胞的吞噬、包囊,血淋巴的抗菌活性及对外源物质的识别等均具一定关系,并详细研究了激活过程与诱导物的关系等。关于中国对虾血淋巴的抗菌、溶菌活力的测定,尚未见报道。作者对中国对虾血淋巴的抗菌、溶菌活力和酚氧化酶活力进行了测定并研究不同诱导源诱导后其活力的变化规律,以为免疫药物的研制提供科学依据,并为衡量对虾的身体机能状态及免疫药物的作用确立免疫指标。

1 材料与方 法

1.1 材料 于1992年4月17日在青岛近海采捕的中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 的产卵前成体亲虾,体长为18—20 cm,暂养于水体分别为 $70 \times 50 \times 80$ (cm³) 及 $120 \times 65 \times 70$ (cm³) 的通气水槽中,水温为13—14℃。每天上午、下午各换水一次。投喂冰冻杂色蛤。

大肠杆菌 (*E. coli* D31),由中国科学院上海生物工程中心屈贤铭先生提供,为抗链霉素菌种,用LB, E + B 及链霉素制成的培养基于37℃培养。弧菌87-1,由本所刘秀云先生提供,系从病虾心脏中分离所得的致病菌,用牛肉膏、蛋白胨、酵母膏及海水制成

* 中国科学院“八五”重大项目, A08920813 号。王雷,男,出生于1966年2月,博士。

收稿日期:1993年7月5日,接受日期:1994年5月4日。

的培养基于 25℃ 培养。

1.2 试剂 生理盐水, 参照黄道蟹 *Carcinus maenus* 生理盐水的配方 (Cornick et al., 1978), 根据中国对虾的体液性质略作调整, 以去离子水定容至 1 000ml, pH = 7.4。其组成如下:

NaCl	33.700g
CaCl ₂ · 6H ₂ O	2.830g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.193g
KCl	0.940g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	5.836g
Tris	6.060g
1mol/L HCl	42.50ml

酵母聚糖, Zymosan A 系 Sigma 产品, 用对虾生理盐水配成 0.1g/L 溶液, 置 4℃ 冰箱中备用。

1.3 方法与步骤 抗菌活力测定, 采用 Hultmark 等人 (Boman et al., 1974; Hultmark et al., 1980) 的改进方法。用 0.1mol/L, pH = 6.4 的磷酸钾盐缓冲液从固体斜面上将大肠杆菌洗下作为底物并配成一定浓度的悬浊液 (O.D.₅₇₀ = 0.3—0.5)。取 3ml 该悬液于试管内置冰浴中, 再加入 50μl 血清混匀, 测其保温前试液在 570nm 波长处的光密度 (A₀) 值。然后将试液移入 37℃ 温浴中 30 min, 取出后立刻再置于冰浴内 10 min 以终止反应, 测其经温浴后的试液在 570 nm 波长处的光密度 (A) 值。抗菌活力 U_a 按下式计算:

$$U_a = \sqrt{\frac{A_0 - A}{A}}$$

为消除血清中血蓝素的干扰, 用空白血清为对照, 于 570nm 处测其光密度值, 以校正 A₀, A 值。

溶菌活力测定, 以溶壁微球菌 (*Micrococcus lysolei*) 冻干粉 (Sigma) 为底物, 按 Hultmark 等人 (1980) 的改进方法进行。用 0.1mol/L, pH = 6.4 的磷酸钾盐缓冲液配成底物悬液 (O.D.₅₇₀ ≈ 0.3)。取 3ml 该悬液于试管内置冰浴中, 再加入 50μl 血清混匀, 测其 A₀ 值。然后将试液移入 37℃ 温浴中 30 min, 取出后立刻再置于冰浴中 10min 以终止反应, 测其 A 值。溶菌活力 U_L 按下式计算:

$$U_L = \frac{A_0 - A}{A}$$

酚氧化酶活力测定, 以 L-dopa 为底物, 参照 Ashida 的方法 (1971) 进行。将 3ml 的 0.1mol/L, pH = 6.0 的磷酸钾盐缓冲液与 100μl 的 0.01mol/L 的 L-dopa 及 100 μl 血清于室温下混匀, 每间隔 2min 读取在 490nm 波长下的光密度值。以 O.D.₄₉₀ 对反应时间 (min) 作图, 以试验条件下每分钟 O.D.₄₉₀ 增加 0.001 定义为一个酶活力单位。为简单起见, 本试验采用控制相同测定条件的办法, 直接用活力单位表示酶活性。

注射感染, 将感染用菌接种于固体斜面培养基上, 培养 24—36h。使用前在 40—50℃ 下活化 0.5h, 用无菌对虾生理盐水洗下, 镜检计数并用生理盐水调节到所需浓度。注射

时采用 1ml 注射器、4 号针头于对虾的腹尾交接处斜插注射。

取血,用 5ml 注射器、5 号针头自头胸甲后插入心脏抽取,置于 Eppendorf 离心管中于 4℃ 过夜,将析出的蓝色血清倾出或略为离心倾出,进行各项测定。

1.4 试验分组 正常养殖环境组,分别取正常对虾和自然条件下的濒死对虾的血清进行各项测定。

注射大肠杆菌试验组,将对虾分成 3 组,每组 3 条,每条虾注射量为 100 μ l。1 组,注射对虾生理盐水(对照);2 组,注射大肠杆菌悬液,1.2 \times 10⁸ 个/ μ l; 3 组,注射大肠杆菌悬液,3.6 \times 10⁸ 个/ml。注射后,分别于 36h 和 60h 取血,作各项活力测定。

注射不同物质试验组,将对虾分成 4 组,每组 9 条,每条虾注射量均为 100 μ l。1 组,注射对虾生理盐水(对照);2 组,注射大肠杆菌悬液,2.2 \times 10⁸ 个/ml; 3 组,注射弧菌 87—1 悬液,6.4 \times 10⁷ 个/ml; 4 组,注射酵母聚糖溶液,0.1g/L。注射后 48h 开始取血,然后每隔 24h 取血 1 次,试验时间为 144h,共测得 4 组数据。

2 结果

2.1 正常中国对虾与濒死中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力及酚氧化酶活力测定结果见表 1。另外在取血时可以观察到,正常对虾血淋巴液凝固速度快,一般在 3min 之内即可析出浅蓝色血清,而濒死对虾血淋巴液多数不易凝固,析出血清呈微红色。

表 1 正常养殖环境中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力及酚氧化酶活力测定结果

Tab. 1 Measurement of antibacterial, bacteriolytic and PO activities in the haemolymph of normal *P. chinensis*

种 类	抗 菌 活 力			溶 菌 活 力			酚氧化酶活力 (units)
	A_0	A	U_s	A_0	A	U_L	
正常对虾	0.590	0.561	0.228	0.300	0.287	0.045	18.7
濒死对虾	0.590	0.583	0.110	0.300	0.300	0	32.4

2.2 注射大肠杆菌后中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力及酚氧化酶活力测定结果见表 2。

表 2 注射大肠杆菌后中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力及酚氧化酶活力测定结果

Tab. 2 Measurement of antibacterial, bacteriolytic and PO activities in the haemolymph of *P. chinensis* after injected *E. Coli* D31

组 别	取样时间 (h)	抗 菌 活 力			溶 菌 活 力			酚氧化酶活力 (units)
		A_0	A	U_s	A_0	A	U_L	
1	36	0.405	0.381	0.251	0.311	0.276	0.127	19.2
	60	0.373	0.349	0.262	0.350	0.312	0.122	19.7
2	36	0.405	0.332	0.469	0.311	0.248	0.254	14.5
	60	0.373	0.273	0.605	0.350	0.289	0.211	10.7
3	36	0.405	0.390	0.196	0.311	0.290	0.072	12.5
	60	0.373	0.360	0.190	0.350	0.320	0.090	16.4

2.3 注射几种不同物质后中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力及酚氧化酶活力的测定结果 分别见表 3、表 4。由于 3 组在注射弧菌 6h 后,死亡 7 条,故只测定了 48h 一组数据。

表 3 注射几种不同物质后中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力的测定结果

Tab. 3 Measurement of antibacterial, bacteriolytic activities in the haemolymph of *P. chinensis* after injected several particles

组 别	取样时间 (h)	抗 菌 活 力			溶 菌 活 力		
		A_0	A	U_a	A_0	A	U_L
1	48	0.400	0.392	0.143	0.350	0.322	0.087
	72	0.501	0.482	0.198	0.349	0.327	0.067
	96	0.461	0.450	0.156	0.368	0.344	0.070
	144	0.438	0.424	0.182	0.360	0.335	0.075
2	48	0.400	0.386	0.190	0.350	0.318	0.101
	72	0.501	0.428	0.413	0.349	0.300	0.163
	96	0.461	0.329	0.633	0.368	0.307	0.199
	144	0.438	0.328	0.579	0.360	0.291	0.237
3	48	0.400	0.397	0.087	0.350	0.326	0.074
4	48	0.400	0.394	0.123	0.350	0.320	0.094
	72	0.501	0.488	0.163	0.349	0.296	0.179
	96	0.461	0.445	0.190	0.368	0.303	0.215
	144	0.438	0.430	0.136	0.360	0.300	0.200

表 4 注射几种不同物质后中国对虾血淋巴中的酚氧化酶活力的测定结果

Tab. 4 Measurement of PO activity in the haemolymph of *P. chinensis* after injected several particles

测量项目	取样时间 (h)	组 别			
		1	2	3	4
酚氧	48	20.1	14.3	9.2	13.3
化酶	72	17.3	12.0	—	10.3
活力	96	18.5	9.0	—	7.4
(units)	144	13.6	8.5	—	7.4

3 讨论与结语

3.1 抗菌、溶菌活力的测定可以作为衡量免疫功能及机体状态的指标 由正常养殖环境组试验结果(表 1) 可以看出,正常对虾和濒死对虾的血淋巴中均存在抗菌、溶菌活力及酚氧化酶活力,但两者有明显差异。濒死对虾的抗菌活力大大下降,并且检测不出溶菌活力。取血时可观察到濒死对虾的血清变为微红色,推断对虾的血细胞发生了自溶现象。推测活力下降的原因,一是某些生物合成机制被破坏;二是自溶后某些细胞组分由自身物质变成了异物(类似于人体中的“隐蔽抗原”),需消耗抗菌和溶菌因子来清除从而造成了活力下降,尤其是溶菌活力的下降。由此可见,抗菌、溶菌活力的测定不仅可作为免疫指标,而且对机体功能体态的衡量也是一个有价值的参考。

3.2 酚氧化酶活性的存在及其激活机制 表 1 中濒死对虾血清中的酚氧化酶活性 (32.4 units), 大大高于正常对虾 (18.7 units)。对于酚氧化酶的研究, 目前尚无统一认识。有一些学者 (Leonard et al., 1985; Söderhäll, 1982) 认为, 自然状态下, 酚氧化酶以酶原形式存在于甲壳动物的血细胞内, 当对异物发生反应时释放到血淋巴中并被激活从而表现其活性。而本试验结果表明, 正常对虾的血淋巴中也存在酚氧化酶活性, 这与 Saul 等 (1985) 所报道的酚氧化酶主要存在于血浆中的结果基本一致。但我们以前的试验, 对中国对虾血细胞中是否存在酚氧化酶原也作过探讨, 并证实了其存在¹⁾。另外, 某些物理因素如试验中的取血操作等也可能激活酚氧化酶原 (Ashida et al., 1983)。因此, 对虾血淋巴中的酚氧化酶活性, 是以酶的形式还是以酶原形式存在或是两种形式共存, 还是在血液凝固时由血细胞释放到血清中, 尚无法确定。推测可能在溶血过程中, 有部分酶或酶原释放到血清中并被激活, 从而造成酶活性增高。

3.3 诱导剂量对抗菌、溶菌活力和酚氧化酶活力的影响 由试验组结果 (表 2) 可以看出, 注射适量大肠杆菌 (1.2×10^8 个/ml) 后, 2 组对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力大大高于对照 (1) 组, 可见适当的诱导的确可以提高其活力。但诱导后 60h 的 U_a (0.605) 高于 36h 的 U_a (0.469), 而 60h 的 U_L (0.211) 低于 36h 的 U_L (0.254)。初步推断, 抗菌、溶菌活力的产生是不同步的, 即达到最高峰值时所需的时间不同; 可能有不同的诱导合成机制, 也许与诱导源种类、剂量等有很大关系。

注射大肠杆菌较大剂量 (3.6×10^8 个/ml) 的 3 组对虾, 其抗菌、溶菌活力均低于 2 组, 甚至低于对照组, 说明诱导剂量对抗菌、溶菌活力的产生至关重要。过量的感染会降低其活力并导致对虾得病直至死亡。在试验中也发现, 3 组对虾游动能力减弱, 取血时血淋巴不易凝固等。

经注射感染后, 2 组、3 组对虾血淋巴中的酚氧化酶活力均有降低, 证实其与病害入侵的免疫反应有一定相关性, 但还无法确定其对应关系。因为受取血条件限制, 每次试验一般只能取一条对虾血样进行测定或取数条对虾血样测定取其平均值, 无法象其它动物那样, 连续取样测定, 并且由于对虾体质差异较大, 影响了对其规律性的阐明。按照 Söderhäll 等人 (1979) 的观点, 酚氧化酶原被外源物激活后, 活性的酶可以粘附到异物表面, 起到识别和调理作用。因此, 其活力在异物侵入后一定时间内迅速降低, 本试验结果与之相同。由注射不同物质试验组的结果 (表 4) 也不难看出, 对照 (1) 组对虾血淋巴中的酶活力变化不大 (15—20units); 而经过不同物质注射感染, 2 组 (大肠杆菌)、3 组 (弧菌)、4 组 (酵母聚糖) 对虾中的酶活力迅速降低, 3 组在 24h 内降到 9.2units, 2 组和 4 组经 144h 最终分别降至 8.5units 和 7.4units。这与自然养殖环境试验中, 濒死对虾血淋巴中的酚氧化酶活力高于正常对虾的试验结果不同。Söderhäll 等 (1979) 在研究淡水螯虾 *Astacus astacus* 中酚氧化酶原的激活机制时发现, 由入侵物 (细菌、真菌等) 结构成分引发的酶原激活与正常生理条件下酶原的“自发”激活属于完全不同的两种机制, 其发生条件各不相同。由本试验结果推断, 中国对虾体内也存在着不同的酚氧化酶原激活机制,

3.4 不同诱导源的诱导作用 由不同物质感染组的试验结果 (表 3) 可以看出, 随着诱

1) 李光友、王雷, 1992, 中国对虾体内的酚氧化酶性质研究。

导源的不同,对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力变化规律也各不相同。注射大肠杆菌(2组)对抗菌、溶菌活力均有诱导作用, U_L 活性在96h即达到峰值,并且活性仍继续升高。酵母聚糖只诱导 U_L 的升高,其效果与大肠杆菌相近;而对抗菌活性(U_a)的影响不大,基本无诱导作用。有关此方面的详细机理尚有待进一步探讨。另外,本试验受取样数所限,未能确定经诱导后的抗菌、溶菌活力究竟可持续多长时间,而这一点对于对虾免疫的效果是至关重要的;但由试验结果可以看出,经感染诱导后,在3d之内抗菌、溶菌活力能保持在较高水平。据Steward(1987)的研究结果,龙虾经免疫后在4个月内仍有免疫力,这在生产实际中有重要意义。

3.5 注射感染部位的选择 本试验的注射感染部位选在腹尾交接的柔软处。实践证明,在此部位注射,对虾痛感轻,损伤小,几乎无死亡,且感染率高,适合作各种注射感染。本试验中,注射 6.4×10^7 个/ml弧菌的3组,在注射6h内几乎全部死亡。据报道,在水体中,弧菌致病的临界值为 10^5 个/ml。分析本试验组死亡原因,可能是注射剂量过大,感染发病率高所致。

关于对虾血淋巴中抗菌、溶菌活力诱导增加的机理,据推测可能与诱导源的不同化学结构有关,而各种致病菌细胞壁结构中所含有的多糖类有重要作用。因此多糖作为一种广谱的非特异免疫促进剂,在中国对虾病害的免疫防治研究中将会开辟一个全新的领域。

参 考 文 献

- 祁国荣等, 1983, 超声波诱导柞蚕蛹血淋巴产生抗菌物质, 科学通报, **28**(10): 622—624.
- 屈贤铭等, 1984, 注射大肠杆菌和超声波诱导蚕体同蚕蛹产生抗菌物质的比较研究, 昆虫学报, **27**(3): 268—272.
- 屈贤铭等, 1985, 大肠杆菌及聚肌胞核苷酸对柞蚕、家蚕蛹诱导产生溶菌酶、抗菌肽及凝集素的动力学, 昆虫学报, **28**(1): 1—7.
- 钟文彪等, 1982, 聚肌胞核苷酸及2', 5'-寡腺苷酸诱导家蚕对细胞质多角体病毒抑制作用的研究, 科学通报, **12**: 219—224.
- 黄自然、王少颀, 1981, 昆虫免疫研究进展, 华南农学院学报, **2**(1): 65—68.
- Anderson, R. S., Cook, M. L., 1979, Induction of lysozyme-like activity in the hemolymph and hemocytes of an insect, *Spodoptera eruidania* L., *Invertebr. Pathol.*, **33**: 197—293.
- Ashida, M., 1971, Purification and characterization of pro-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **144**: 749—762.
- Ashida, M. et al., 1983, Activation of prophenoloxidase by bacterial cell walls or by β 1,3-glucans in plasma of the silkworm *Bombyx mori*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **113**: 652—658.
- Boman, H. G. et al., 1974, Insect immunity I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia pupae*, *Infect Immun.*, **10**: 136—145.
- Cornick, J. W., Stewart, J. E., 1978, Lobster (*Homarus americanus*) haemocytes: classification, differential counts and associated agglutinin activity. *J. Invertebr. Pathol.*, **31**:194.
- Fisher, C. W., Brady, U. E., 1983, Activation properties and collection of hemolymph phenoloxidase of the American cockroach, *Periplaneta americana*, *Comp. Biochem. Physiol.* **75A**: 111—114.
- Hoffmann, D., Hultmark, D., Boman, H. G., 1981, Insect immunity: *Galleria mellonella* and other lepidoptera have cecropinlike factors active against gram-negative bacteria, *Insect Biochem.*, **11** (5): 537—548.
- Hultmark, D. et al., 1980, Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*, *Eur. J. Biochem.*, **106**: 7—16.
- Leonard, C. et al., 1985, The role of pro-phenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells, *J. Insect Physiol.*, **31**:789—799.
- Saul, S. J. et al., 1985, The majority of prophenoloxidase in the haemolymph of *Manduca sexta* is

- present in the plasma and not in the hemocytes, *Dev. Comp. Immune*, **11**: 479—485.
- Söderhäll, K., 1982, The prophenoloxidase activating system and melanization—a recognition mechanism of arthropods, A review, *Dev. Comp. Immune*, **6**: 601—611.
- Söderhäll, K., Hall, L., 1984, Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish *Haemocyte lysate*, *Biochim. Biophys. Acta*, **797**:99—104.
- Söderhäll, K., Unestam, T., 1979, Activation of crayfish serum prophenoloxidase in arthropod immunity. The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins, *Can. J. Microbiol.* **25**: 406—414.
- Steiner H. et al., 1981, Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity, *Nature (Lond.)*, **292**: 246—248.

STUDIES ON THE ACTIVITIES AND CHARACTERISTICS OF THE ANTIBACTERIA, BACTERIOLYSIS AND PHENOLOXIDASE IN THE HAEMOLYMPH OF *PENAEUS CHINENSIS*

Wang Lei, Li Guangyou, Mao Yuanxing

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071*)

ABSTRACT

In April, 1992, the antibacterial, bacteriolytic and PO activities in the haemolymph of wild parent prawns *Penaeus chinensis* were measured by spectrophotometer. After the injection of *E. Coli* D31, *Vibrio* sp. and Zymosan A as a stimulant, the pattern of these activities were also studied. The results showed that such activities exist in the haemolymph of both normal and injected prawns, but the activity in creation or decreation is closely related to the type and amount of the stimulants, representing the immune function of prawns. So the measurement of these activities might be used as quantitative criteria while studying the body condition, disease-resistant mechanism of prawns and the pharmacodynamic of immuno drugs. It also concluded that the immune potency of prawn could be increased by proper immuno stimulation to prevent and control various diseases.

Key words *Penaeus chinensis* Haemolymph Antibacteria Bacteriolysis Phenoloxidase activity