

皱纹盘鲍经诱导后血淋巴中 一些因子变化的研究*

丁秀云 李光友[†] 翟玉梅

(山东大学生物系, 济南 250100)

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 于1995年11月在山东荣成大鱼岛鲍鱼养殖厂采集皱纹盘鲍, 以大肠杆菌、弧菌为诱导物, 将鲍分为三组分别进行注射, 在注射后的5, 18, 32, 50h 分别取鲍血淋巴, 测定其抗菌、溶菌、酚氧化酶和超氧化物歧化酶活力, 并研究注射组各项活力的变化规律。实验结果表明, 适当的刺激可增加皱纹盘鲍的抗病能力。

关键词 皱纹盘鲍 血淋巴 溶菌 抗菌 酚氧化酶 超氧化物 歧化酶活力

Cushing (1971) 用一种革兰氏阴性菌 EMB-1 作为诱导源, 对红鲍、粉红鲍、黑鲍进行注射诱导, 研究了它们的免疫反应, 而对于皱纹盘鲍在注射不同诱导源后它的免疫防御系统发生的反应, 未见有报道。本文报道皱纹盘鲍血淋巴中的抗菌、溶菌、酚氧化酶和超氧化物歧化酶(SOD)活力, 以期为衡量皱纹盘鲍的身体机能状态和确定免疫指标提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 皱纹盘鲍 (*Haliotis discus Hannai*) 于1995年11月10日取自荣城市大鱼岛鲍鱼养殖厂, 规格为5—6cm, 养于通气水体中, 水温在10—13℃。每日清晨换水一次, 投喂海带。

1.1.2 菌种 大肠杆菌(*E. coli*)抗链霉素种, 由青岛海洋大学提供, 用LB培养基于37℃下培养。弧菌(*Vibrio* sp.), 从中国对虾病虾中分离出的致病菌, 用牛肉膏、蛋白胨、酵母汁及海水配成培养基, 于25℃培养。

1.1.3 无菌海水 用孔径为0.45μm的醋酸纤维素膜过滤并高压灭菌。

1.2 注射感染

将鲍分成三组, 每组4只。1组, 注射过滤的无菌海水, 为对照组; 2组, 注射大肠杆菌悬液(1×10^8 cell/ml); 3组, 注射弧菌(6.4×10^7 cell/ml)。将大肠杆菌和弧菌分

* 国家攀登计划B“海洋生物优抗研究”项目资助基金, PD-BO-3。丁秀云, 女, 出生于1970年11月, 硕士生。

收稿日期: 1995年12月25日, 接受日期: 1996年2月3日。

别接种于固体斜面培养基上, 培养 24—36h。使用前在 40—50℃ 下活化 30min, 用无菌过滤海水洗下, 镜检计数, 并用无菌海水调到所需浓度。注射时用 100 μ l 微量注射器, 在鲍的腹足部分(中线偏右侧)注射, 每只鲍注射 50 μ l。

1.3 取血

用 1ml 注射器, 5 号针头插入鲍的心脏取血, 由于血量太少, 再用刀片将鲍的腹足从中间切开, 吸取渗出的蓝色血液。将吸取的血液置于小离心管中于 4℃ 过夜, 然后将析出的蓝色血清直接倾出, 进行各项测定。

1.4 方法与步骤

1.4.1 抗菌活力测定 采用 Hultmark 等人(1980)改进的方法。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冲下, 作为底物, 并配成一定浓度的悬浊液(O.D_{570nm}=0.3—0.5)。取 3ml 该悬液于试管内置于冰浴中, 再加入 50 μ l 待测血清, 混匀, 测其保温前试液在 570nm 波长处的光密度(A_0)值。然后将试液移入 37℃ 温浴中置 30min, 取出后立刻再置于冰浴内 10min, 以终止反应, 测其经温浴后的试液

在 570nm 波长处的光密度(A)值, 抗菌活力 u_a 按 $\sqrt{\frac{A_0-A}{A}}$ 式计算。

1.4.2 溶菌活力测定 以溶壁微球菌(*Micrococcus lysolei*)冻干粉为底物, 按 Hultmark 等人(1980)改进的方法进行。用 0.1mol/L, pH=6.4 的磷酸钾盐缓冲液配成底物悬液(O.D_{570nm}≈0.3), 取 3ml 该悬液于试管内置冰浴中, 再加入 50 μ l 待测血清, 混合, 测 A_0 值。然后将试液移入 37℃ 温浴中置 30min, 取出后再置于冰浴中 10min, 以终止反应, 测其 A 值。溶菌活力 u_L 按 $\frac{A_0-A}{A}$ 式计算。

1.4.3 酚氧化酶活力测定 以 L-DOPA 为底物, 参照 Ashida(1971)的方法进行。将 3ml 0.1 mol/L, pH=6.0 的磷酸钾盐缓冲液与 100 μ l 的 0.01mol/L 的 L-DOPA 及 100 μ l 待测血清, 于室温下混匀, 每次间隔 2min 读取在 490nm 波长下的光密度值。以 O.D_{490nm} 对反应时间作图, 以试验条件下, 每次分钟 O.D_{490nm} 增加 0.001 定度为一个酶活单位。

1.4.4 SOD 活力测定 连苯三酚自氧化速率的测定, 在 25℃ 下, 于 4.5ml 50mmol/L, pH=8.30 的 K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液中加入 10 μ l 50mmol/L 连苯三酚, 迅速摇匀, 倒入光径 1cm 的比色杯内, 在 325nm 波长下每隔 30s 测 A 值一次, 要求自氧化速率在 0.070 O.D./min 左右。酶活性测定, 测定方法与上相同, 在加入连苯三酚前, 加入待测 SOD 样, 测得数据按下式计算酶活性:

$$\text{酶活性} = \frac{0.070 - A_{325\text{nm}} / \text{min}}{0.070 \times 50\%} \times 100\% \times \text{反应液总体积} \times \frac{\text{样液稀释倍数}}{\text{样液体积}}$$

酶活单位定义: 每毫升反应液中, 每分钟抑制连苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量定义为一个酶活单位(u/ml)。

1.4.5 血细胞计数 将抽出的血液用 10% 中性福尔马林固定, 血球计数板计数。

2 结果及讨论

未注射及注射几种不同物质后, 皱纹盘鲍血淋巴中抗菌、溶菌、酚氧化酶、SOD 活力

和血细胞数目的测定结果见表 1、表 2、表 3 及表 4。

表 1 正常鲍血淋巴中抗菌、溶菌、酚氧化酶和 SOD 活力(u /ml)以及血细胞数目的测定结果

Tab.1 The antibacterial, bacteriolytic, phenoloxidase, SOD activities, and the blood cell number in the haemolymph of uninjected *H. discus* Hannai

测量项目	抗菌活力	溶菌活力	酚氧化酶活力	SOD 活力	血细胞数目 (cell /ml)
测量结果	0.251	0.533	0.700	215.150	1.490×10^7

表 2 注射几种不同物质后皱纹盘鲍血淋巴中抗菌、溶菌活力的测定结果(u /ml)

Tab.2 The antibacterial and bacteriolytic activities in the haemolymph of *H. discus* Hannai after injection

取 样 时 间 (h)		5			18			32			50		
组 别		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
抗 菌 活 力	A_0	0.440	0.440	0.440	0.390	0.520	0.425	0.496	0.230	0.580	0.660	0.680	0.681
	A	0.378	0.384	0.358	0.385	0.480	0.424	0.436	0.490	0.500	0.630	0.660	0.650
	u_a	0.405	0.382	0.358	0.114	0.289	0.049	0.371	0.378	0.400	0.218	0.174	0.218
溶 菌 活 力	A_0	0.340	0.248	0.371	0.320	0.270	0.185	0.250	0.287	0.282	0.305	0.340	0.321
	A	0.350	0.236	0.483	0.332	0.290	0.145	0.186	0.140	0.190	0.192	0.232	0.240
	u_L	0.345	0.157	1.197	0.408	0.366	0.115	0.344	1.050	0.484	0.589	0.467	0.338

表 3 注射几种不同物质后皱纹盘鲍血淋巴中酚氧化酶、SOD 活力的测定结果(u /ml)

Tab.3 The phenoloxidase and SOD activities in the haemolymph of *H. discus* Hannai after injection

测 量 项 目	组 别	取 样 时 间 (h)			
		5	18	32	50
酚 氧 化 酶 活 力	1	0.83	3.00	1.00	2.25
	2	0.75	2.10	0.12	0.55
	3	0.25	1.25	0.60	0.50
SOD 活 力	1	396.65	206.63	187.14	160
	2	184.49	235.22	38.98	108
	3	92.24	202.94	41.47	108

2.1 几种不同物质对皱纹盘鲍血淋巴中溶菌、抗菌活力的诱导作用

从表 1 可以看出, 在注射后 0— 5h, 注射弧菌的 3 组, 其溶菌活力从本底水平 (0.533) 升到最高点 (1.197), 然后在 5— 18h 内又降到最低点 (0.115)。注射大肠杆菌的 2 组在注射后 18— 32h, 溶菌活力从最低点 (0.145) 升到最高 (1.050), 而注射无菌海水的 1 组则无太大的变化。这说明大肠杆菌和弧菌两种不同的微生物都能诱导鲍增加溶菌酶的

表4 注射几种不同物质后皱纹盘鲍血液血细胞数目的变化

Tab.4 The changes of the blood cell number in haemolymph of *H. discus* Hannai after injection

测量项目	组别	取 样 时 间 (h)			
		5	18	32	50
血细胞数 (cell/ml)	1	1.058×10^7	2.535×10^7	1.375×10^6	7.000×10^6
	2	1.174×10^7	3.750×10^6	8.200×10^6	1.858×10^7
	3	1.055×10^7	3.350×10^6	1.858×10^7	1.380×10^7

量,提高溶菌活力。而且在实验浓度下,弧菌的诱导效果比大肠杆菌好。但这两种微生物诱导产生溶菌酶又是不同步的,其机制有待于进一步探讨。溶菌酶(Lysozyme, EC 3·2·1·17·)是非特异性免疫系统的重要成员,在无脊椎动物免疫中起重要作用,对于外来异物的侵入,能够非特异性的诱导出溶菌酶。Cheng等人(1975)的实验表明,在受到革兰氏阳性菌刺激的蛤 *Mercenaria mercenaria* 的血淋巴中,由活跃吞噬细菌的血细胞将溶菌酶释放到血淋巴中,使溶菌活力升高。软体动物的溶菌酶作用于革兰氏阳性菌细胞壁中粘多糖的 β -1.4糖苷键。而大肠杆菌和弧菌是革兰氏阴性菌,细胞壁中粘多糖含量较少,但也能诱导出较高的溶菌活力,可能还有其它因子起作用,其机制有待于进一步研究证实。

本实验用大肠杆菌和弧菌为诱导源,注射到鲍体内,在注射后的0—5h和8—32h,二个实验组(2,3组)和对照组的抗菌活力都有所升高。在注射后0—5h,注射大肠杆菌组的抗菌活力从本底水平(0.251)达到最高(0.382),而注射弧菌组在注射后32h升高最高(0.400)(表2),这与在其它动物中的诱导结果不同(王雷等,1995)。说明这两种微生物对鲍的抗菌能力均有诱导作用,而且弧菌的诱导效果略好。我们知道,无脊椎动物不具有特异性免疫系统,不能特异性地产生抗体,对外来物质的刺激主要表现为吞噬反应和产生一系列抗菌物质(Boman,1982)。本实验用弧菌和大肠杆菌做诱导源能诱导鲍血淋巴中抗菌活力升高,可能是诱导出与昆虫中诱导出的抗菌肽、介质等类似的抗菌物质,其性质怎样,有待于进一步研究。

2.2 两种微生物对鲍血淋巴中酚氧化酶活力的影响结果

实验表明,鲍血淋巴中有酚氧化酶存在,但活力很低(表3)。在注射后5—18h,3个组的血淋巴中的酚氧化酶活力均由较低的本底水平(0.70)升到各自的最高点。但从总体上看,注射大肠杆菌组和注射弧菌组的酚氧化酶活力均低于对照组。说明酚氧化酶活性与病害的入侵有一定的关系。我们知道,酚氧化酶原激活系统是在甲壳动物和一些昆虫的血细胞中发现的,是由丝氨酸蛋白酶及其它因子组成的一个复杂酶级联系统(proPO系统)。在这种级联反应中所产生的一系列活性物质,可通过多种方式参与宿主的防御反应,包括提供调理素,促进血细胞吞噬作用、包裹作用和结节形成,以及介导凝集和凝固、产生杀菌物质等。这种类补体途径在甲壳动物免疫中起重要作用。据Söderhäll等人(1982)的观点,酚氧化酶原激活系统受到异物刺激后,活性酚氧化酶可粘附到异物表面,起到识别调理作用。所以酚氧化酶活力在异物侵入一定时间内升高,然后下降。本实验在鲍中得到的结果与之一致。与中国对虾相比,鲍血淋巴中酚氧化酶活力较低,

是由于物种的原因, 还是实验方法上的原因, 有待于进一步研究。

2.3 SOD 活力的测定结果及其变化

实验结果表明, 对照组 SOD 活力在注射后 0—5h 由本底水平(215.00)升到最高(396.65), 随着时间的延长, SOD 活力逐渐降低, 而实验组(2组、3组)在总体上低于对照组, 呈下降趋势。这说明在本实验的注射浓度和注射剂量下, 大肠杆菌和弧菌对鲍血淋巴中的 SOD 活力没有诱导作用, 而是使其降低。SOD(EC·1·15·1·1·)是重要的抗氧化酶, 在清除氧自由基, 防止其致生物分子损伤方面发挥重要作用。林林等(1995)¹⁾的实验表明, 在外界胁迫条件下, 中国对虾血淋巴中的 SOD 活力下降。本实验的结果也说明了 SOD 活力与病源微生物入侵有关。

2.4 注射几种不同物质后血液中血细胞数目的变化

从表4可以看出, 在注射后5—18h, 对照组血细胞数目达到最高(2.535×10^7 cell/ml), 而注射弧菌组在注射后32h升到最高(1.858×10^7 cell/ml), 注射大肠杆菌组在注射50h后其血细胞数达到最高。血细胞数目发生这样的变化和血淋巴中体液因子发生的变化相关联。在受到外来异物刺激时, 无脊椎动物的主要表现之一就是血细胞的吞噬反应(叶孝经, 1990)。本实验中血细胞数目的这种变化可能与细胞吞噬外来异物有关系。

3 结 语

弧菌是一种海洋条件致病菌, 当海水养殖动物受伤、体弱、抗病力降低、环境条件恶化时, 弧菌会乘隙而入, 引起虾贝等各种海水动物的严重疾病。本实验采用大肠杆菌和弧菌注射鲍后, 在注射浓度分别为 1×10^8 cell/ml 和 6.4×10^7 cell/ml, 注射剂量为 50 μ l 的条件下, 对鲍血淋巴中的溶菌、抗菌、酚氧化酶活力均有不同程度的诱导作用, 对鲍体内的防御起到有益的刺激作用。Ottaviani 等(1986)报道了用金黄色葡萄球菌, 在不同的时间间隔, 经一种淡水蜗牛 *Planorbis corneus* (L.) 连续注射时发现, 在第二次和第三次注射后, 蜗牛体内清除菌的速率增加; Bayne(1983)发现, 重复注射细菌后, 随着一些体液因子活性增加, 蜗牛体内防御能力增强。为此, 对于鲍, 如找到一种合适的刺激物(如细菌类、多糖类), 并用适宜的浓度连续刺激, 使其对外界刺激物的免疫能力增加, 这对于增强鲍抵御病害的能力是很重要的。

参 考 文 献

- 王雷等, 1995, 海洋与湖沼, 26(2): 179—185.
 叶孝经, 1990, 海洋水产研究丛刊, 32: 13—18.
 Ashida, M., 1971, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113: 562—568.
 Bayne, C. J., 1983, *The Mollusca*, Vol.5, *Physiology*, Part 2, ed. by Saleuddin, A. S. M. et al., Academic Press (New York), pp. 407—486.
 Boman, H. G., 1982, *Immune Reaction to Parasites*, Gustav Fischer Verlag (New York), pp. 211—222.
 Cheng T. C. et al., 1975, *J. Invert. Pathol.*, 25: 261—265.
 Cushing, J. E., 1971, *J. Invert. Pathol.*, 17: 446—448.

1) 林林等, 1995, 有机污染对水环境生态效应及中国对虾内环境的影响。

- Hultmark, D. et al., 1980, *Eur. J. Biochem.*, **106**: 7—16.
- Ottaviani, E. et al., 1986, *Comp. Biochem. Physiol.*, **85A** (1): 91—95.
- Söderhäll, K. et al., 1982, *Dev. Comp. Immun.*, **6**: 601—611.
- Söderhäll, K. et al., 1984, *Biochem. Biophys. Acta*, **797**: 99—104.

STUDY ON THE CHANGES OF SOME FACTORS IN HAEMOLYMPH OF INDUCED *HALIOTIS DISCUS HANNAI*

Ding Xiuyun, Li Guangyou¹, Zhai Yumei

(Department of Biology, Shandong University, Jinan 250100)

¹(Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

Abstract Specimens of *Haliotis discus Hannai* were collected from Rongcheng, Shandong Province in November 1995. The levels of antibacterial, acteriolytic, phenoloxidase and superoxide dismutase (SOD) activities and the blood cell number in the haemolymph of *Haliotis discus Hannai* were tested at 5, 18, 32, 50h after injection with filtered seawater (controlled group), with *E. coli*, and with *Vibrio* sp. The results showed that those infected with *E. coli* had significant elevations in bacteriolytic activity in the serum at 32h after injection: those infected with *Vibrio* sp. had the highest level at 5h after injection. This proved that the two kinds of bacteria could induce elevations in bacteriolytic activity in the haemolymph of *Haliotis discus Hannai*. It is suggested that infection with *Vibrio* sp. and *E. coli* could induce elevations in antibacterial activity and blood cell number, but that the effect of infection with the two kinds of bacteria on phenoloxidase and SOD activities was not obvious. All these proved that proper stimulus can increase the immune protency of *H. discus Hannai*.

Key words *Haliotis discus Hannai* Haemolymph antibacterial Bacteriolytic Phenoloxidase SOD activity