

皱纹盘鲍血细胞吞噬发光的研究^{*}

张 峰 李光友

(国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266061)

提要 于 1998 年 7 月从大连碧龙海珍品有限公司购得人工养殖的皱纹盘鲍, 运用化学发光法研究在体外条件下利用 6 种活性氧清除剂 SOD(超氧化物歧化酶)、CAT(过氧化氢酶)、苯甲酸钠和 IMF(二甲基咪唑)、NBT(硝基四唑蓝)及金属螯合剂 EDTA(乙二胺四乙酸)等试剂对皱纹盘鲍血细胞吞噬活动中化学发光的产生和影响。结果表明, 活性氧清除剂对皱纹盘鲍血细胞的吞噬发光都有抑制作用, 说明皱纹盘鲍血细胞在吞噬活动中能够释放出活性氧、行使杀菌功能; 皱纹盘鲍血细胞释放的活性氧种类包括超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($OH\cdot$)和单线态氧(1O_2)。

关键词 皱纹盘鲍 血细胞 活性氧清除剂 活性氧 吞噬作用 化学发光

学科分类号 Q26

脊椎动物嗜中性白细胞等在吞噬活动中能够发生呼吸爆发(respiratory burst)现象, 产生多种活性氧(active oxygen species, ROS), 包括超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($OH\cdot$)和单线态氧(1O_2)等活性氧。这些活性氧可以对细菌等外来异物进行杀灭, 在抗菌、抗病毒、抗真菌和抗原生动物中起关键作用(Babior, 1980)。关于贝类血细胞产生活性氧的研究国外近年来已有报道(Pipe, 1992; Nakamura *et al.*, 1985; Anderson *et al.*, 1992; Greger *et al.*, 1995)。研究者们认为贝类血细胞的吞噬能力是杀菌的主要机制, 血细胞杀菌活力主要依赖于产生某些溶酶体酶和多种活性氧, 而 ROS 在杀菌尤其在抗寄生虫过程中起关键作用(Anderson *et al.*, 1998)。国内关于贝类血细胞产生活性氧的研究还未见报道。本文报道皱纹盘鲍血细胞产生活性氧过程、几种活性氧清除剂等试剂对皱纹盘鲍血细胞吞噬发光的影响结果、活性氧产生的种类, 以期为今后研究开发利用活性氧的抗病机制和筛选免疫活性物质提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*) 于 1998 年 7 月 20 日购自大连碧龙海珍品有限公司, 体长为 5—6 cm, 暂养于大连水产学院海水养殖楼循环充气水槽中, 水温为 18—24℃。每天投喂海带和配合饵料。

1.1.2 试剂及配制 发光剂 Luminol(3-氨基邻苯二甲酰肼, Sigma 公司) 储存液按

^{*} 国家攀登计划 B 资助项目, PD B6-6-3 号。张 峰, 男, 出生于 1957 年 4 月 19 日, 博士, 副教授, 通讯地址: 大连水产学院养殖系, 邮编: 116023, Fax: 0086-0411-4660163
收稿日期: 1998-10-30, 收修稿日期: 1999-06-13

Scott 等(1981)方法配制。活性氧清除剂: SOD(超氧化物歧化酶)、CAT(过氧化氢酶)为 Sigma 公司产品; Sodium benzoate(苯甲酸钠)为国产品, DMF(二甲基呋喃)为 Fluka 产品。其它试剂 NBT(硝基四唑蓝)和 EDTA(乙二胺四乙酸)为国产品。SOD、CAT 和 DMF 用过滤无菌海水配制。NBT、EDTA 和苯甲酸钠用双蒸水配制。过滤无菌海水用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤沙滤海水而得。

1.1.3 吞噬颗粒及其调理 以干酵母细胞(2—4 μ m)作为吞噬颗粒,用过滤无菌海水离心洗两次,再用 50%的鲍血清于室温下调理 2h。最后用过滤无菌海水离心洗两次重新悬浮,浓度约为 10⁸cell/ml,备用。

1.2 采血及血淋巴的制备

用 5ml 注射器抽取 3—5 只鲍的血淋巴,与过滤无菌海水按 1:1 比例混合放入表皿内制备成混合血淋巴备用。

1.3 化学发光样品的制备及测定方法

1.3.1 鲍血细胞化学发光 测定仪为 LS-5801 型液体闪烁计数器(Beckman 公司),使用单光子测定程序,室温下测定。液闪测定管(聚乙烯塑料管,Beckman 公司)内加入混合血淋巴 200 μ l(ca. 5 $\times$ 10⁶cell/ml, n > 6),将测定的未刺激血淋巴的基础发光 5—10min 作为记录的起始值(t =0)。再加入 Luminol 100 μ l(10⁻⁷mol/L)和酵母细胞 100 μ l,然后记录发光值 cpm(counts per min)。

1.3.2 6种清除剂和试剂对化学发光影响的测定 SOD 影响血细胞吞噬的测定: 100 μ l 酵母细胞, 200 μ l 混合血淋巴, 100 μ l Luminol 和 100 μ l SOD(终浓度为 100 μ g/ml),对照用 100 μ l 过滤无菌海水代替 SOD。其它活性氧清除剂和试剂测定方法均同 SOD。

2 结果

实验结果表明,除 Sodium benzoate(5mmol 浓度)对皱纹盘鲍血细胞吞噬的化学发光无明显抑制作用外,SOD、CAT、DMF 和 Sodium benzoate 活性氧清除剂及 NBT 和 EDTA 试剂对皱纹盘鲍血细胞吞噬的化学发光均有显著的抑制作用,见表 1 和表 2。

表 1 SOD、CAT 和 EDTA 对皱纹盘鲍血细胞吞噬发光的影响¹⁾

Tab.1 Effects of SOD, CAT and EDTA on chemiluminescence of phagocytosis of *Haliotis discus* Hannai hemocytes

组别	SOD(100 μ g/ml, n = 6)	CAT(100 μ g/ml, n = 5)	EDTA(1mmol, n = 6)
对照组	4 110. 33 $\pm$ 1091. 18	4 117. 17 $\pm$ 1 154. 94	849. 1 $\pm$ 410. 9
实验组	1 114. 75 $\pm$ 251. 00	2 161. 17 $\pm$ 844. 40	221. 6 $\pm$ 75. 5
P	< 0. 01	< 0. 01	< 0. 01

1) 所有清除剂或试剂的发光值(cpm)均为 $\times$ 10³,表 2 同

3 讨论与结语

3.1 SOD 和 NBT 对皱纹盘鲍血细胞吞噬发光的影响

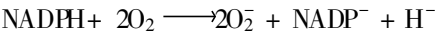
本研究表明, SOD 能有效地抑制皱纹盘鲍血细胞吞噬活动的化学发光强度(P < 0.01)(表 1)。SOD 是超氧阴离子(O₂⁻)的清除剂,能够催化 O₂⁻ 发生歧化反应而清除血细胞吞噬过程中产生的 O₂⁻,从而使血细胞的化学发光强度明显降低。相同的结果在人类

表 2 NBT、DMF 和 Sodium benzoate 对皱纹盘鲍血细胞吞噬发光的影响
Tab. 2 Effects of NBT, DMF and Sodium benzoate on chemiluminescence of phagocytosis of *Haliotis discus Hannai* hemocytes

NBT(<i>n</i> = 6)		DMF(<i>n</i> = 4)		Sodium benzoate(<i>n</i> = 6)	
对照组	935. 56±325. 38* *	对照组	1 248. 54±427. 56	对照组	1 265. 57±431. 39 5
4mg/ml	110. 33±27. 44* *	1mmol	851. 54±311. 63* *	5mmol	1 016. 28±437. 53
2mg/ml	266. 44±77. 69* *	5mmol	702. 09±224. 33* *	10mmol	851. 36±313. 49*
1mg/ml	464. 44±154. 49* *	10mmol	485. 73±190. 33* *	30mmol	806. 27±243. 25* *

* * 表示 $P < 0. 01$; * 表示 $P < 0. 05$

嗜中性白细胞, 以及蛤、扇贝、牡蛎等贝类的血细胞都有报道(李益新等, 1986; Le Gall *et al.*, 1991; Dikkeboom *et al.*, 1987; Greger *et al.*, 1995)。NBT 也能够抑制皱纹盘鲍血细胞吞噬过程的化学发光强度($P < 0. 01$)(表 2)。NBT 可以被 O_2^- 还原形成不溶性的细胞内蓝色甲胨(formazan)沉淀, 可能减少了激发 luminol 产生化学发光的 O_2^- 的数量而降低了发光强度, 这与贞洁巨牡蛎(*C. virginica*)(Anderson *et al.*, 1992)、一种荚蛭(*Siliqua patula*)和长巨牡蛎(*Crassostrea gigas*)(Greger *et al.*, 1995)的结果相同。从 SOD 和 NBT 抑制化学发光可以证明, 皱纹盘鲍血细胞在吞噬过程中能够产生 O_2^- 。血细胞吞噬过程中的呼吸爆发作用产生的 O_2^- 是由细胞膜上的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶负责催化的(Paul *et al.*, 1972), 反应过程如下:



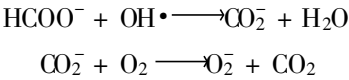
研究表明, O_2^- 是呼吸爆发作用中的最先产物(Segal *et al.*, 1979), O_2^- 本身不直接参与血细胞的杀菌活动, 但重要的是 O_2^- 能进一步反应产生 H_2O_2 , $OH\cdot$ 和 1O_2 来发挥它的杀菌作用(Klebanoff *et al.*, 1982)。

3.2 CAT 对皱纹盘鲍血细胞吞噬发光的影响

实验结果表明, 100μg/ml 的 Cat 明显地抑制皱纹盘鲍血细胞吞噬发光强度($P < 0. 01$)(表 1)。CAT 是 H_2O_2 的清除剂, 说明皱纹盘鲍血细胞的吞噬作用能产生 H_2O_2 。已证实, H_2O_2 是吞噬细胞呼吸爆发的产物, 它和酶结合形成最重要的抗菌系统: MPO- H_2O_2 - 卤素系统(Klebanoff, 1975)。这一抗菌系统已证实 在杀灭细菌、酵母、支原体、病毒和肿瘤细胞有特效。另外 H_2O_2 在没有 MPO 存在时也可以参与杀菌过程, H_2O_2 在有抗坏血酸和 Cu^{2+} 和 Co^{2+} 存在时也能形成有效的杀菌系统(Drath *et al.*, 1974), 甚至在缺少二价阳离子时, H_2O_2 和抗坏血酸一起也有一定的杀菌效果(Miller, 1969)。

3.3 Sodium benzoate 对皱纹盘鲍血细胞吞噬发光的影响

本研究表明, 10mmol 和 30mmol 的 Sodium benzoate 对皱纹盘鲍血细胞化学发光强度有抑制作用($P < 0. 05$, $P < 0. 01$)(表 2), 说明皱纹盘鲍血细胞在吞噬过程中能够产生 $OH\cdot$ 。Sodium benzoate 是 $OH\cdot$ 的清除剂, 可通过下列反应清除 $OH\cdot$:

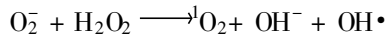


目前认为, $OH\cdot$ 是一个氧化能力很强的自由基, 参与杀菌活动是与脂类的过氧化作用

有关(Badwey *et al.*, 1980)。OH·能起脂类的过氧化作用,其机制是OH·能从不饱和脂类的烯丙基位夺取H⁺生成过氧化氢化合物(hydroperoxides)。脂类的过氧化作用会导致细胞膜和细胞器以及有关酶的严重破坏。另外OH·能与核酸反应,它可以不加选择地与嘌呤或嘧啶进行反应,吞噬细胞产生少量的OH·就能溶入被吞噬的细菌内破坏细菌的DNA从而达到杀菌的目的(Badwey *et al.*, 1980)。

3.4 DMF 对皱纹盘鲍血细胞吞噬发光的影响

DMF 对皱纹盘鲍血细胞化学发光强度有抑制作用($P < 0.01$) (表 2)。DMF 是典型的单线态氧(1O_2)的猝灭剂,说明皱纹盘鲍血细胞吞噬过程中 1O_2 的产生。 1O_2 是分子氧(基态)中两个未偶合电子的自旋方向颠倒后产生的激发态产物,反应活性很高。 1O_2 可以由 O_2 自发歧化产生,也可以由 O_2^- 和 H_2O_2 反应生成(李益新等, 1986):



上述反应称为 Haber- Weiss 反应。反应中还生成了活性很高的OH·。单线态氧(1O_2)也能参与脂类的过氧化作用。与OH·相反, 1O_2 能直接同多聚不饱和脂肪酸反应生成过氧化氢化合物。 1O_2 也能同核酸反应,但很有限度(Badwey *et al.*, 1980)。

3.5 EDTA 对皱纹盘鲍血细胞吞噬发光的影响

本研究表明,EDTA 对皱纹盘鲍血细胞化学发光强度有抑制作用($P < 0.01$) (表 1)。EDTA 是金属螯合剂,能减少血细胞周围游离 Ca^{2+} 的浓度。Greger 等(1995)认为, Ca^{2+} 是启动贝类血细胞吞噬作用和触发呼吸爆发形成所必需的二价阳离子,是细胞质膜上结合的和(或)细胞周围的二价阳离子迅速转移到细胞质的特殊位置的结果。这一假设,已被 O_2^- 的产生需要细胞外 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的存在而证实,各种离子载体在有外源 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 时,能够刺激血细胞的氧化代谢作用(Badwey *et al.*, 1980)。 Ca^{2+} 作为第二信使可使磷脂酶C、磷脂酶A2、磷脂酶D及 Ca^{2+} -钙调蛋白激酶活化,进一步通过蛋白质磷酸化作用促进细胞呼吸爆发产生。EDTA 络合 Ca^{2+} 则降低了血细胞的化学发光强度,表明 Ca^{2+} 对呼吸爆发具有调控作用。这一结果在人血细胞(康健等, 1992)、*Silene patula*和长巨牡蛎(*C. gigas*) (Greger *et al.*, 1995)血细胞吞噬实验中已得到证实。

本研究结果表明,皱纹盘鲍血细胞在吞噬过程中确有呼吸爆发现象,如同高等动物血细胞一样,能释放活性氧行使杀菌功能。通过活性氧清除剂和试剂的影响证明,皱纹盘鲍血细胞吞噬的化学发光是多种活性氧产生的综合表现。皱纹盘鲍血细胞在吞噬活动中释放的活性氧包括:超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基(OH·)和单线态氧(1O_2)等。皱纹盘鲍血细胞释放活性氧机制的查明,为今后开发和利用这种氧化性抗病机制、研究鲍病虫害以及筛选提高皱纹盘鲍血细胞免疫活性的免疫增效剂奠定了基础,在鲍病虫害的免疫防治研究中将会开辟一个新的领域。

参 考 文 献

- 李益新,董元林, 1986. 人粒细胞吞噬功能与活性氧的关系研究. 生物化学与生物物理进展, 1: 41—44
康健,安天义,陈晓琳等, 1992. 抗体包被瘤细胞膜引发人血多形核白细胞化学发光. 生物化学与生物物理进展, 19(6): 435—439

Anderson B S, Oliver L M, Brubacher L L. 1992. Superoxide anion generating by *Crassostrea virginica* hemocytes as measured

- by nitroblue tetrazolium reduction. J Invertebr Pathol, 59: 303—307
- Anderson R S, Brubacher L L, Calvo L R *et al.*, 1998. Effects of tributyltin and hypoxia on the progression of *Perkinsus marinus* infections and host defence mechanisms in oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). J Fish Dis, 21: 371—380
- Babior B M, 1980. The Role of Oxygen Radicals in Microbial Killing by Phagocytes. In: Sharra A J, Strauss R S ed. The Reticuloendothelial System. New York: Plenum, 339—354
- Badwey J A, Kamovsky M L, 1980. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. Ann Rev Biochem, 49: 695—726
- Dikkeboom R, Tijnagel J M G H, Mulder E C *et al.*, 1987. Hemocytes of pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive forms of oxygen. J Invertebr Pathol, 49: 321—331
- Drath D B, Karnovsky M L, 1974. Bactericidal activity of metal-mediated peroxide-ascorbate systems. Infect Immun, 10: 1077—1083
- Greger E A, Drum A S, Elston R A, 1995. Measurement of Oxidative activity in hemocytes of the Pacific razor clam, *Siliqua patula*, and the Oyster, *Crassostrea gigas*, using lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence. J Invertebr Pathol, 65: 48—60
- Klebanoff S J, 1975. Antimicrobial mechanisms in eutrophilic polymorpho-nuclear leukocytes. Semin Hematol, 12: 117—142
- Klebanoff S J, Henderson W R, Jong E C *et al.*, 1982. Cidal Mechanisms and Their Dependence on Hydrogen Peroxide. In: Karnovsky M L, Bolis L ed. Phagocytosis Past and Present. New York: Academic Press, 449—461
- Le Gall G, Bachere E, Chagot D *et al.*, 1991. Chemiluminescent analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific reckettsiales-like organisms. Dis Aquat Org, 11: 181—186
- Miller T E, 1969. Killing and lysis of gram negative bacteria through the synergistic effect of hydrogen peroxide, ascorbic acid, and lysozyme. J Bacteriol, 98: 949—955
- Nakamura M, Mori K M, Inooka S *et al.*, 1985. *In vitro* production of hydrogen peroxide by the amoebocytes of the scallop, *Patinpecten yessoensis* (Jay). Dev Comp Immunol, 9: 407—417
- Paul B B, Strauss R R, Jacobs A A *et al.*, 1972. Direct involvement of NADPH oxidase with the stimulated respiratory and hexose monophosphate shunt activities in phagocytizing leukocytes. Exp Cell Res, 73: 456—462
- Pipe R K, 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Dev Comp Immunol, 16: 111—122
- Segal A W, Jones O T G, 1979. The subcellular distribution and some properties of the cytochrome b component of the microbicidal oxidase system of human neutrophils. Biochem J, 182: 181—188
- Scott A L, Klesius P H, 1981. Chemiluminescence: A novel analysis of phagocytosis in fish. Dev Biol Stand, 49: 243—254

CHEMILUMINESCENCE OF PHAGOCYTOSIS OF *HALIOTIS DISCUS* HANNAI HEMOCYTES

ZHANG Feng, LI Guang-you

(First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, 266061)

Abstract Effects of scavengers Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Sodium benzoate, DMF of active oxygen species and some reagents, NBT, EDTA, on chemiluminescence of *Haliotis discus* Hannai (collected from Dalian in July 1998) hemocytes during phagocytosis were measured *in vitro*. In a manner resembling the respiratory burst of activated mammalian polymorphonuclear leukocytes, hemocytes of *Haliotis discus* Hannai generated active oxygen species during *in vitro* phagocytosis of yeast cells. The result that SOD can inhibit the chemiluminescence of *Haliotis discus* Hannai hemocytes during phagocytosis ($P < 0.01$) suggests that *Haliotis discus* Hannai hemocytes can generate superoxide anion (O_2^-), and NBT can decrease the chemiluminescence because the intracellular blue formazan deposition was reduced by O_2^- released by *Haliotis discus* Hannai Hemocytes ($P < 0.01$). Catalase (CAT) can inhibit the chemiluminescence of *Haliotis discus* Hannai hemocytes during phagocytosis ($P < 0.01$), which suggests that *Haliotis discus* Hannai hemocytes can generate hydrogen peroxide (H_2O_2). Sodium benzoate can inhibit the chemiluminescence of *Haliotis discus* Hannai hemocytes during phagocytosis ($P < 0.01, P < 0.05$), which suggests that *Haliotis discus* Hannai hemocytes can generate Hydroxyl radicals ($OH^\bullet$). 2,5-dimethylfuran (DMF) can inhibit the chemiluminescence of *Haliotis discus* Hannai hemocytes during phagocytosis ($P < 0.01$), which shows that *Haliotis discus* Hannai hemocytes can generate singlet oxygen (1O_2), and EDTA can inhibit the chemiluminescence of *Haliotis discus* Hannai hemocytes during phagocytosis ($P < 0.01$), which indicates that the divalent cation Ca^{2+} are required to initiate phagocytic and oxidative activity in *Haliotis discus* Hannai hemocytes.

Key words *Haliotis discus* Hannai Hemocytes Scavengers Active oxygen species (ROS) Phagocytosis Chemiluminescence

Subject classification number Q26