

硒化卡拉胶和酵母葡聚糖对栉孔扇贝 血淋巴中两种水解酶活力的影响^{*}

孙 虎 山

(烟台师范学院生物科学与技术系 烟台 264025)

李 光 友

(国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室 青岛 266061)

提要 对栉孔扇贝分别注射硒化卡拉胶和酵母葡聚糖后,采用生化方法,于 1h、15h 和 30h 分别测定栉孔扇贝血清和血细胞中 2 种参与免疫防御的水解酶酸性磷酸酶 (ACP) 和溶菌酶的活力。结果表明,注射硒化卡拉胶后,栉孔扇贝血清和血细胞中 ACP 活力在 1h 和 30h 时均为实验组显著高于对照组,溶菌酶活力也均在 1 和 30h 时实验组显著高于对照组。注射酵母葡聚糖后,ACP 活力在 1h、15h 和 30h 时均为实验组极显著地高于对照组,溶菌酶活力则均为实验组与对照组差异不显著。说明硒化卡拉胶对栉孔扇贝血淋巴中 ACP 和溶菌酶的活力均有增强作用,而酵母葡聚糖仅对其 ACP 活力有增强作用。

关键词 硒化卡拉胶,酵母葡聚糖,栉孔扇贝,血淋巴,水解酶

中图分类号 Q26

双壳贝类体内的水解酶在清除异物方面起重要的作用(孙虎山等,1999a, b)。由于双壳贝类体内没有产生抗体的机构,因此细胞吞噬作用在双壳贝类防御机制中就具有极为重要的意义(孙虎山等,2000;张峰等,2000;Pipe,1990)。异物被吞入细胞后即与溶酶体融合,最终被各种水解酶消化分解(Cheng *et al.*, 1974)。比较重要的水解酶包括:溶菌酶、酸性磷酸酶和非特异性酯酶等(Cheng *et al.*, 1975; Eble, 1966)。

硒多糖是一类广谱的非特异性免疫促进剂(索金良,1996),有关硒多糖对无脊椎动物免疫系统影响的研究较少。酵母葡聚糖作为免疫激活剂常用于免疫学研究中,这在新兴的无脊椎动物免疫学研究方面已有报道(Smith *et al.*, 1983)。有关硒多糖和酵母葡聚糖对栉孔扇贝血淋巴中酶活力的影响,国内外均未见报道。本文选用我国的一种主要人工养殖贝类栉孔扇贝作为实验材料,注射硒化卡拉胶和酵母葡聚糖后测定其血淋巴中 2 种参与免疫防御的水解酶的活力,以期得到硒化卡拉胶和酵母葡聚糖对栉孔扇贝血淋巴中水解酶活力影响的规律,为将硒化卡拉胶和酵母葡聚糖作为免疫激活剂应用于贝类养殖业、增强其免疫能力、预防病害提供理论依据。

^{*} 国家“973”课题资助项目, G1999012005 号。孙虎山,男,出生于 1962 年 8 月,博士,教授, E-mail: s_hushan@163.

1 材料与方法

1.1 材料

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)购于青岛麦岛海珍品养殖场,为三龄贝,体长为45—55mm。硒化卡拉胶由国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室提供,硒含量为99.57mg/g。实验所用酵母葡聚糖为Sigma公司产品,为从啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞壁中提取的 β -1,3-葡聚糖,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法与步骤

用无菌海水分别将硒化卡拉胶和酵母葡聚糖配成0.2%的溶液或悬浊液。按每克体重5 μ g的剂量用微量进样器从栉孔扇贝闭壳肌背后缘注射硒多糖溶液或酵母聚糖A悬浊液。对照组注射等量的无菌海水,养于室内水族箱中,分别于注射后1h、15h和30h各从5只扇贝闭壳肌血窦中取血约5ml,经3000r/min离心10min,移出血清,在血细胞中加入与血清等量的双蒸水,溶血后经3000r/min离心10min,取上清液用于酶活力测定。ACP活力测定采用Kruzel(1982)的苯磷酸二钠法,酶活力的计算采用国际单位。溶菌酶活力的测定采用Cheng等(1974)的方法,以每mg蛋白质每分钟使微球菌液在600nm下的OD值降低0.001的酶量作为一个酶活力单位(U)。蛋白质含量的测定采用Lowry等(1951)的福林-酚试剂法。实验结果统计处理采用T检验法。

2 结果

2.1 硒化卡拉胶对栉孔扇贝血淋巴中2种水解酶活力的影响

注射硒化卡拉胶后,血清和血细胞中ACP和溶菌酶活力的测定结果见表1。结果表明,实验组血清在1h和30h时的ACP活力高于对照组,且差异极显著,而在15h时却低于对照组,且差异不显著。实验组血细胞在1h、15h和30h时的ACP活力均高于对照组,但在1h和30h时差异极显著,而在15h时差异不显著。实验组血清在1h、15h和30h时的溶菌酶活力均高于对照组,1h时差异极显著,15h时差异不显著,30h时差异显著。实验组血细胞在1h、15h和30h时的溶菌酶活力也均高于对照组,且在1h和15h时差异极显著,在30h时差异显著。

表1 注射硒化卡拉胶后栉孔扇贝血淋巴中2种水解酶活力的测定结果^{D)}

Tab. 1 The activities of two kinds of hydrolytic enzymes in the haemolymph of *C. farreri* after injected seleno-carrageenan

2 种水解酶活力	时间(h)		
	1	15	30
实验组血清 ACP(mU)	4.89 $\pm$ 0.61	1.61 $\pm$ 0.43	9.69 $\pm$ 0.76
对照组血清 ACP(mU)	3.02 $\pm$ 0.41	1.85 $\pm$ 0.50	3.77 $\pm$ 0.22
P	< 0.01	> 0.05	< 0.01
实验组血细胞 ACP(mU)	4.52 $\pm$ 1.03	11.36 $\pm$ 2.85	14.81 $\pm$ 1.93
对照组血细胞 ACP(mU)	1.64 $\pm$ 0.00	9.63 $\pm$ 1.13	9.16 $\pm$ 0.98
P	< 0.01	> 0.05	< 0.01

续表			
2 种水解酶活力	时间(h)		
	1	15	30
实验组血清溶菌酶(U)	41. 33±5. 15	21. 06±3. 12	36. 99±9. 55
对照组血清溶菌酶(U)	18. 51±5. 52	15. 92±5. 56	20. 91±6. 93
<i>P</i>	< 0. 01	> 0. 05	< 0. 05
实验组血细胞溶菌酶(U)	68. 89±18. 87	56. 69±13. 26	52. 94±11. 52
对照组血细胞溶菌酶(U)	16. 91±9. 56	29. 76±6. 07	31. 00±6. 33
<i>P</i>	< 0. 01	< 0. 01	< 0. 05

1) 活力值为平均值±标准差, *n* = 5, 表2 同

2.2 酵母葡聚糖对栉孔扇贝血淋巴中 2 种水解酶活力的影响

注射酵母葡聚糖后, 血清和血细胞中 ACP 和溶菌酶活力的测定结果见表 2。结果表明, 血清和血细胞中 ACP 活力均为实验组高于对照组, 且差异都极显著。血清和血细胞中的溶菌酶活力除了血细胞 15h 一组外, 均为实验组高于对照组, 但差异都不显著。

表 2 注射酵母葡聚糖后栉孔扇贝血淋巴中 2 种水解酶活力的测定结果

Tab. 2 The activities of two kinds of hydrolytic enzymes in the haemolymph of *C. farrieri* after injected β -1, 3-glucan

2 种水解酶活力	时间(h)		
	1	15	30
实验组血清 ACP(mU)	7. 93±0. 36	10. 03±1. 07	4. 57±0. 51
对照组血清 APC(mU)	4. 02±0. 40	6. 24±0. 80	2. 30±0. 67
<i>P</i>	< 0. 01	< 0. 01	< 0. 01
实验组血细胞 ACP(mU)	3. 78±0. 95	6. 08±1. 01	6. 47±1. 62
对照组血细胞 ACP(mU)	0. 74±0. 39	1. 61±0. 82	1. 88±0. 94
<i>P</i>	< 0. 01	< 0. 01	< 0. 01
实验组血清溶菌酶(U)	8. 44±4. 40	7. 81±3. 91	22. 63±8. 59
对照组血清溶菌酶(U)	6. 60±5. 11	5. 86±1. 95	14. 70±9. 37
<i>P</i>	> 0. 05	> 0. 05	> 0. 05
实验组血细胞溶菌酶(U)	65. 29±13. 89	55. 11±12. 33	70. 45±9. 97
对照组血细胞溶菌酶(U)	53. 51±12. 66	63. 13±11. 50	65. 03±7. 71
<i>P</i>	> 0. 05	> 0. 05	> 0. 05

3 讨论

3.1 硒多糖的免疫促进作用

本研究表明, 硒化卡拉胶可显著提高栉孔扇贝血清和血细胞中 ACP 和溶菌酶 2 种参与其免疫防御的重要水解酶的活力, 说明硒化卡拉胶是一种可应用于栉孔扇贝的很好的免疫激活剂, 可增强其免疫能力。硒早已被联合国卫生组织确认为人体必需的微量元素, 具有抗肿瘤等多方面的功能, 但过量的无机硒又具有毒性。多糖是广谱的非特异性免疫促进剂, 可激活高等动物的巨噬细胞和淋巴细胞, 加强抗体和补体的生成(方积年, 1986)。

本文所用硒多糖是用亚硒酸根取代从红藻提取的多糖-卡拉胶分子上的硫酸根,使硒稳定地结合在红藻多糖分子上。硒多糖既可以作为有机硒制剂发挥硒的营养性作用而避免其毒性,又可以作为一种具有免疫功能的多糖,因此有望成为一种很有应用价值的免疫促进剂。

本文结果表明,硒化卡拉胶不仅能提高栉孔扇贝血细胞中的 ACP 和溶菌酶活力,而且还能提高血清中的 ACP 和溶菌酶活力,说明硒化卡拉胶既可以促进血细胞中 ACP 和溶菌酶的形成,又可以促进血细胞内的 ACP 和溶菌酶向血清中释放。Cheng(1992)认为血细胞脱颗粒是血细胞内的酶释放到血清的主要机制,因此硒化卡拉胶可能具有促进血细胞脱颗粒的作用。ACP 和溶菌酶是主要存在于溶酶体内的两种重要的水解酶,对细菌等异物在溶酶体内的消化降解起重要作用,血清中的 ACP 可改变细菌等的表面结构,增强其异己性,从而加快对异物的识别、吞噬和清除(Cheng *et al.*, 1975)。硒多糖可显著地提高栉孔扇贝血清和血细胞中 ACP 和溶菌酶的活力,因此硒多糖具有增强血细胞的吞噬能力及清除异物能力的作用。

3.2 酵母聚糖的免疫促进作用

酵母聚糖是从某些酵母细胞壁中分离出的一类多糖。酵母细胞壁主要由 D-葡萄糖聚糖和 D-甘露聚糖组成,前者主要是由葡萄糖以 β -D-(1 $\rightarrow$ 3) 键结合的,但也有的酵母具有 α -D-(1 $\rightarrow$ 3) 结合的单位。其中 β -1,3 葡聚糖在免疫学中最为常用。本文即是采用的从啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 细胞壁中提取的 β -1,3 葡聚糖。

本文结果表明,酵母葡聚糖可极显著地提高栉孔扇贝血清和血细胞中 ACP 的活力,说明对其免疫防御有显著的激活加强作用。关于酵母聚糖激活无脊椎动物免疫系统的机理,Duvic 等(1990, 1992)观察到鳌虾血浆中存在酵母聚糖的结合蛋白,在其血细胞膜上存在酵母聚糖结合蛋白受体,并已将此结合蛋白及其受体分离纯化。进入机体的酵母聚糖与血浆中的结合蛋白结合,再与血细胞的受体结合,引发一系列的免疫反应。酵母聚糖起调理素的作用,增强血细胞对异物的识别能力,从而提高了其吞噬能力(Soderhall *et al.*, 1986),促进血细胞对真菌等较大异物的包围杀伤(Hose *et al.*, 1989),引起血细胞凝结(Durlat, 1985),有利于血细胞趋向和杀伤异物及对伤口的修复。本文中酵母葡聚糖对扇贝血清和血细胞中溶菌酶的活力无显著影响,其原因有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 方积年, 1986. 多糖研究的现状. 药科学报, 21(12): 944—950
- 孙虎山, 李光友, 1999. 栉孔扇贝血淋巴中 ACP 和 AKP 活性及其电镜细胞化学研究. 中国水产科学, 6(4): 6—9
- 孙虎山, 李光友, 1999. 大肠杆菌感染后栉孔扇贝血淋巴中 7 种酶活力的变化. 海洋科学, 5: 40—44
- 孙虎山, 李光友, 2000. 栉孔扇贝血淋巴中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性及其性质的研究. 海洋与湖沼, 31(3): 259—265
- 张 峰, 李光友, 2000. 皱纹盘鲍血细胞吞噬发光的研究. 海洋与湖沼, 31(4): 386—391
- 索金良, 1996. 4-硒(代)硫酸脂多糖的抗肿瘤免疫调节作用及其机制研究. 生理科学进展, 27(1): 43—46
- Cheng T C, 1992. Selective induction of release of hydrolases from *Crassostrea virginica* hemocytes by certain bacteria. J Invertebr Pathol, 59: 197—200
- Cheng T C, Cali A, 1974. An electron microscope study of the fate of bacteria phagocytized by granulocytes of *Crassostrea virginica*. Contemp Top Immunobiol, 4: 25—35

- Cheng T C, Rodrick G E, 1974. Identification and characterization of lysozyme from the hemolymph of the soft-shelled clam, *Mya arenaria*. Biol Bull, 147: 311—320
- Cheng T C, Rodrick G E, 1975. Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. Comp Biochem Physiol, 52B: 443—447
- Durlat M, 1985. Clotting processes in Crustacea Decapoda. Bilo Rev, 60: 473—498
- Duvic B, Soderhall K, 1990. Purification and characterization of a β -1, 3-glucan binding protein from plasma of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. J Biol Chem, 265: 9327—9332
- Duvic B, Soderhall K, 1992. Purification and characterization of a β -1, 3-glucan binding protein membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Eur J Biochem, 207: 223—228
- Eble A F, 1966. Seasonal distribution of alkaline and acid phosphatase and nonspecific esterase in the normal and diseased American oyster as revealed by enzyme histochemistry. Am Zoologist, 6: 339
- Hose J E, Martin G G, 1989. Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Scyonia ingentis*. J Invertebr Pathol, 53: 335—346
- Kruzel M, 1982. Acid phosphatase of potato tubers: purification properties, sugar and amino acid composition. Acta Biochim Pol, 29: 321
- Lowry O H, Rosebrough N T, Farr A L *et al*, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 193: 265—275
- Pipe R K, 1990. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Histochem J, 22: 595—603
- Smith V J, Soderhall K, 1983. β -1, 3-glucan activation of crustacean haemocytes *in vitro* and *in vivo*. Biol Bull, 164: 299—314
- Soderhall K, Smith V J, Johansson M W, 1986. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: Evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods. Cell Tissue Res. 245: 43—49

THE EFFECTS OF SELENO-CARRAGENAN AND β -1, 3- GLUCAN ON THE ACTIVITIES OF HYDROLYTIC ENZYMES IN THE HAEMOLYMPH OF *CHLAMYS FARRERI*

SUN Hu-Shan

(Biological Science and Technology Department, Yantai Normal College, Yantai, 264025)

LI Guang-You

(Key Lab of Marine Bioactive Substances, State Oceanic Administration, Qingdao, 266061)

Abstract Two kinds of hydrolytic enzymes to participate in the immune defense in the haemolymph of *Chlamys farreri* were assayed at 1h, 15h and 30h after injection with seleno-carragennan or β -1, 3-glucan. After injection with seleno-carragennan, the acid phosphatase (ACP) activities of experimental groups in serum and haemocytes were much higher than that of control groups at 1 and 30h; the differences of lysozymal activities of experimental and control groups in serum and haemocytes were significant except the group in serum after 15h. After injection with β -1, 3-glucan, the ACP activities of experimental groups in serum and haemocytes were much higher than that of control groups at 1h, 15h and 30h; the differences of lysozymal activities of experimental and control groups both in serum and haemocytes were not significant at 1h, 15h and 30h. It was suggested that the Seleno-carragennan could enhance the activities of ACP and lysozyme in serum and haemocytes of *Chlamys farreri*, but the β -1, 3-glucan could only enhance the activities of ACP.

Key words Seleno-carragennan, β -1, 3-glucan, *Chlamys farreri*, Haemolymph, Hydrolytic enzyme