

文章编号:1674-7054(2010)04-0367-04

溶藻弧菌对华贵栉孔扇贝体内几种酶活性的影响

胡文婷¹, 张 凯², 刘海青¹, 韩泽新¹, 段秋红¹

(1. 海南大学 海洋学院 海洋生物实验教学中心, 海南 海口 570228; 2. 海南海灵化学制药有限公司, 海南 海口 570311)

摘要: 对华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)注射不同密度的溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*),于注射后6,12,18,48,72 h测定体内过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、碱性磷酸酶(ALP)和酸性磷酸酶(ACP)的活力。结果表明: 5×10^7 cell \cdot mL⁻¹, 5×10^8 cell \cdot mL⁻¹组血淋巴中CAT活性均有升高趋势,其中 5×10^8 cell \cdot mL⁻¹组在18 h极显著增加($P \leq 0.01$),24 h显著增加($P \leq 0.05$)。 5×10^8 cell \cdot mL⁻¹组SOD活性最初表现为抑制,在12 h和18 h显著低于对照组($P \leq 0.05$),24 h后明显升高, 5×10^7 cell \cdot mL⁻¹组与对照组相比差异不明显。肝脏中ALP活性在18 h与对照组相比, 5×10^8 cell \cdot mL⁻¹组极显著升高($P \leq 0.01$), 5×10^7 cell \cdot mL⁻¹组显著升高($P \leq 0.05$)。注射后ACP活性有明显升高的趋势, 5×10^8 cell \cdot mL⁻¹组在12 h和18 h显著高于对照组($P \leq 0.05$),且在注射后24 h 5×10^7 cell \cdot mL⁻¹, 5×10^8 cell \cdot mL⁻¹组活性均达到最高。

关键词: 华贵栉孔扇贝;溶藻弧菌;酶活性

中图分类号: S 944.4

文献标志码: A

华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*)属暖水性双壳类软体动物,广泛分布于我国广东、广西、福建东南沿海海域,它具有生长快、养殖周期短、经济效益显著的特点。病害防治是贝类大规模养殖中的重要问题,由于传统的抗生素和化学药品造成耐药性和环境污染,目前对贝类病害防治的研究热点逐渐转移到调动或激活贝类自身免疫系统,提高其非特异性免疫功能和抗病力上^[1]。

当病原体入侵贝体时,机体与免疫相关的一些生理生化指标往往会随之发生变化。巨大芽孢杆菌(*Bacill megaosomes*)感染可诱导帘蛤(*Mercenaria mercenaria*)血淋巴中溶菌酶的释放^[2]。细菌感染对氟吉尼亚牡蛎(*Crassostrea virginica*)血淋巴中酸性磷酸酶等有选择诱导作用^[3]。大肠杆菌和弧菌作为诱导物可增加皱纹盘鲍的抗病能力^[4-5]。溶藻弧菌广泛分布于各地海水及河口处,数量居海水类弧菌之首,对贝类具有较强的致病性。有关溶藻弧菌感染对华贵栉孔扇贝免疫活性的影响还未见报道。笔者通过对华贵栉孔扇贝进行溶藻弧菌人工感染,测定其血淋巴和体组织中免疫相关酶活性在不同感染时间的变化规律,以探讨贝类免疫防御的作用机制,旨在为研究贝类的免疫机理提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料 华贵栉孔扇贝采自海南儋州后水湾,壳高5~6 cm,取回后暂养于实验室,1周后进行实验。

1.2 方法

1.2.1 感染实验 将溶藻弧菌接种于TSA琼脂固体培养基上扩大培养24 h后,用无菌生理盐水清洗,经比浊法计数,调整密度至 5×10^7 cell \cdot mL⁻¹和 5×10^8 cell \cdot mL⁻¹,然后进行人工病原接种实验。

选生命力旺盛的华贵栉孔扇贝240只,随机分为3组,每组80只,试验组1注射 5×10^7 cell \cdot mL⁻¹溶藻弧菌,试验组2注射 5×10^8 cell \cdot mL⁻¹溶藻弧菌。用微量注射器从扇贝闭壳肌背后注入,每只10 μ L,对照组注射等量的无菌生理盐水($w = 0.85\%$)。在注射感染后6 h从闭壳肌取血,每次取扇贝10只,于低温离心20 min,取上清液用于过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性测定。同时取肝脏,加

收稿日期: 2010-10-07

作者简介: 胡文婷(1981-),女,山东曹县人,海南大学海洋学院讲师,硕士。

入2倍体积的生理盐水,制备肝组织匀浆,于低温离心20 min,取上清,用于酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)活性测定。

1.2.2 酶活性测定 SOD活性测定采用改进的连苯三酚自氧化方法^[6];CAT活性测定采用周强等的方法进行^[7];碱性磷酸酶(ALP)活性采用Kruzel磷酸苯二钠法^[8],以每100 mL血清在37℃与底物作用15 min,产生1 mg酚者定义为1个金氏单位;酸性磷酸酶(ACP)活性采用Kruzel磷酸苯二钠法^[8],以每100 mL血清在37℃与底物作用60 min,产生1 mg酚者定义为1个金氏单位。

2 结果与分析

2.1 注射溶藻弧菌对华贵栉孔扇贝CAT活力的影响 华贵栉孔扇贝注射溶藻弧菌后体内CAT活性随时间变化趋势,如图1所示,与注射生理盐水组相比,注射溶藻弧菌 $5 \times 10^8 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组血清中CAT活性均高于对照组,经统计学分析,18 h注射溶藻弧菌 $5 \times 10^8 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组的活力极显著高于对照组($P \leq 0.01$),24 h活力显著高于对照组($P \leq 0.05$),其他各时相均无显著差异($P > 0.05$)。 $5 \times 10^7 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组CAT的活力与对照组相比,各个时相均无显著差异。

2.2 注射溶藻弧菌对华贵栉孔扇贝SOD活力的影响 华贵栉孔扇贝注射溶藻弧菌后,体内SOD活性随时间变化趋势,如图2所示。

随着时间的增加溶藻弧菌 $5 \times 10^8 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组SOD的活性先减小后增大,在12 h达到最低值,24 h后随注射时间的延长明显提高。12 h和24 h SOD活力显著低于对照组,其他时相则没有显著差异。 $5 \times 10^7 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组SOD活性在12 h达到最低,但是与对照组相比,各个时相均无显著差异。

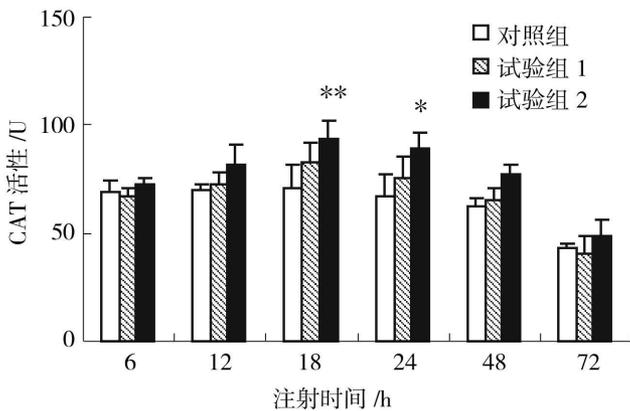


图1 注射溶藻弧菌后CAT活性的变化

“*”表示该组与对照组差异显著($p < 0.05$);

“**”表示该组与对照组差异极显著($p < 0.01$),下同

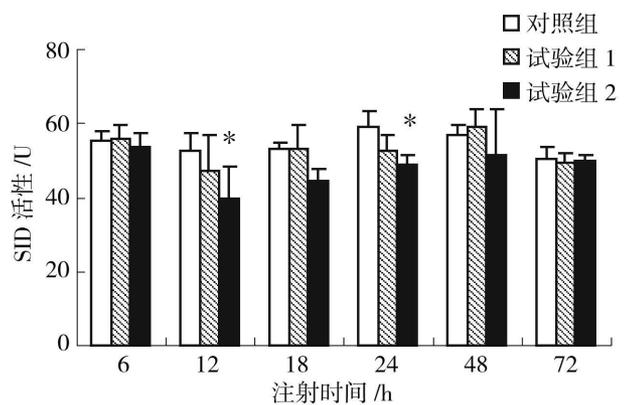


图2 注射溶藻弧菌后SOD活性的变化

2.3 注射溶藻弧菌对华贵栉孔扇贝ALP活力的影响 华贵栉孔扇贝注射生理盐水和溶藻弧菌后,在不同时相的血淋巴中ALP活力的变化见图3。溶藻弧菌 $5 \times 10^8 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组ALP活力在注射后6 h比生理盐水组显著升高,18 h ALP活力极显著升高。 $5 \times 10^7 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组ALP活力在注射后18 h显著升高。48 h后注射弧菌组华贵栉孔扇贝ALP活力虽略低于生理盐水组,但无显著差异。

2.4 注射溶藻弧菌对华贵栉孔扇贝ACP活力的影响 溶藻弧菌感染后,华贵栉孔扇贝体内ACP活性随时间变化趋势,如图4所示。结果表明,注射溶藻弧菌后,华贵栉孔扇贝体内ACP活性有明显升高的趋势。 $5 \times 10^8 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组在注射后24 h活性达到最高,然后逐渐下降,12 h和18 h活性显著高于对照组。 $5 \times 10^7 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组ACP的活力与对照组相比,各个时相均无显著差异。

2.5 感染溶藻弧菌的华贵栉孔扇贝的症状 感染组的华贵栉孔扇贝注射溶藻弧菌6 h后开始出现染病症状,并逐渐加重,闭壳肌开闭无力,对外界刺激反应迟钝。48 h后注射溶藻弧菌 $5 \times 10^8 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组的扇贝呈现明显的组织学病变,外套膜附着肌与贝壳脱离,足丝易脱落,开始出现死亡。

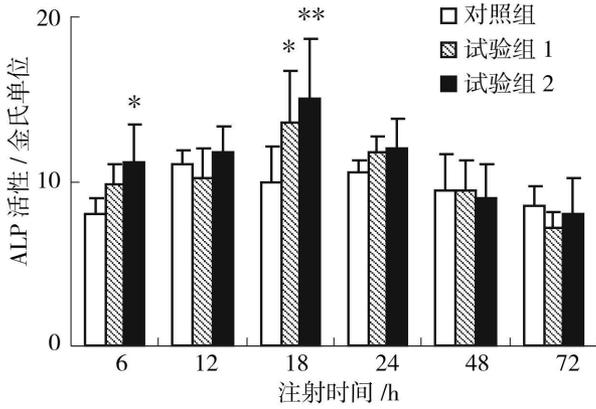


图3 注射溶藻弧菌后 ALP 活性的变化

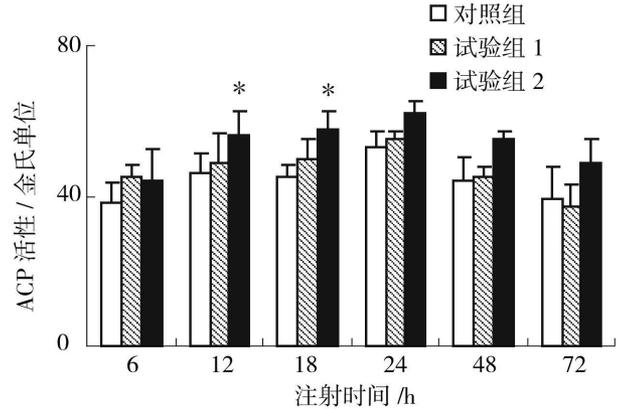


图4 注射溶藻弧菌后 ACP 活性的变化

3 讨论

适量病原体抗原的存在能激活水产动物的免疫反应,有利于提高机体的抗病能力和应激能力。溶藻弧菌是海水中的常见菌群,是海水鱼类弧菌病中危害最大的病原菌之一,常给水产养殖业造成巨大的经济损失^[9]。研究表明,以溶藻弧菌对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)^[10]、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)^[11]、凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)^[12]进行病原接种,均检测到与免疫相关的一些指标发生变化。已有一些学者利用溶藻弧菌疫苗接种黑鲷(*Sparus macrocephalus*)^[13]、牙鲆(*paralichthys olivaceus*)^[14]等海产动物,从而达到防治疾病的目的。

当有异源物质侵入贝体,将伴随着吞噬,引起呼吸爆发,产生大量具杀菌作用的氧自由基等活性氧,这些活性氧自由基在机体中具有双重作用,一方面能增强免疫,消灭细菌,杀死恶性细胞;另一方面,如果它在细胞中含量过多,反而会伤害正常细胞,导致细胞凋亡^[5]。贝类体内存在着 CAT 和 SOD 等保护酶系统,它们能够清除细胞内的自由基,减少活性氧对贝类本身的毒害,维持正常生理活动。在本实验中,注射 $5 \times 10^7 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $5 \times 10^8 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶藻弧菌后, CAT 活力都明显高于生理盐水对照组,随着时间的增加, CAT 的活性呈现先增大后减小的趋势,导致这种结果的原因可能是随着溶藻弧菌菌液的注入,病原菌刺激贝类的体液免疫系统,细胞吞噬活性增强,用于杀菌的活性氧大量产生,促进了分泌 CAT 的分泌细胞的分泌活性,用于清除大量产生的活性氧。随着体内溶藻弧菌被清除, CAT 的含量逐渐减小。而注射溶藻弧菌后对华贵栉孔扇贝 SOD 产生了一定的抑制作用, SOD 的活性最初表现为降低。降低主要原因可能是由于肝脏等器官受损,产生大量氧自由基,同时细胞氧耗增多, SOD 消耗也随之增多,机体抵抗力显著降低,抗氧自由基防御能力降低,不能产生足够的 SOD。同时这种抑制作用可使血淋巴中的超氧自由基存留时间延长,有利于杀灭入侵的细菌。随着时间的延长,免疫防御机能逐渐表现出诱导作用。

ACP 和 ALP 是衡量机体免疫机能和健康状况的重要指标,主要存在于颗粒细胞的溶酶体中,在细胞吞噬作用中,通过脱颗粒作用释放到血清中发挥作用^[15]。本试验研究结果发现,华贵栉孔扇贝注射溶藻弧菌后体内 ACP 和 ALP 活性升高,在持续一段时间后,活力开始逐渐下降。说明溶藻弧菌对华贵栉孔扇贝的 ACP 和 ALP 活性有明显的刺激作用,激发了扇贝的免疫反应。

笔者的研究表明,华贵栉孔扇贝的 CAT, SOD, ALP 和 ACP 对入侵体内的溶藻弧菌菌反应较敏感,作为免疫反应的生化指标,具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] ALABI A O, LATCHFORD J W, JONES D A. Demonstration of residual antibacterial activity in plasma of vaccinated *Penaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2000(187):15-34.
- [2] CHENG T C, RODRICK G E. Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Mercenaria* [J]. *Comp Biochem Physiol B*, 1975, 52(3):443-447.
- [3] CHENG T C. Selective induction of release of hydrolases from *Crassostrea virginica* hemocytes by certain bacteria [J]. *Invertebr*

- Pathol, 1992, 59(2):197-220.
- [4] 丁秀云,李光友,翟玉梅. 皱纹盘鲍经诱导后血淋巴中一些因子变化的研究[J]. 海洋与湖沼, 1996, 27(4):362-367.
- [5] 王淑红, 王艺磊, 张朝霞, 等. 弧菌和大肠杆菌感染对杂色鲍无细胞血淋巴中几种酶活力的影响[J]. 中国水产科学, 2004, 11(1):37-40.
- [6] 常雅宁. 两种连苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶的比较[J]. 药物分析杂志, 2001(5):328-31.
- [7] 周强, 曹春艳. 血清过氧化氢酶的比色测定[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2001, 35(6):473-474
- [8] KRUZEL M. Acid phosphatase of potato tubers: purification properties, sugar and amino acid composition[J]. Acta Biochim Pol, 1982, 29(3):321.
- [9] MORIARTY D J W. The role of microorganisms in aquaculture ponds[J]. Aquaculture, 1997, 151:333-349.
- [10] 洪婧妮, 毛勇, 苏永全, 等. 哈维氏弧菌和溶藻弧菌对大黄鱼6种酶活性的影响[J]. 厦门大学学报:自然科学版, 2009, 48(3):418-422.
- [11] 陈萍, 王清印, 李健, 等. 溶藻弧菌对三疣梭子蟹溶菌酶和磷酸酶活性的影响[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(2):78-82.
- [12] 刘文珍, 邱德全. 溶藻弧菌对凡纳滨对虾血清中一氧化氮及氧自由基的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2007, 27(3):60-63.
- [13] 王海芳, 孙际佳, 赵典惠, 等. 溶藻弧菌疫苗对黑鲷的免疫效果研究[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 29(1):97-100.
- [14] 程顺峰. 溶藻弧菌疫苗对牙鲆免疫效果的研究[J]. 青岛农业大学学报:自然科学版, 2009, 26(2):124-127.
- [15] 樊甄姣, 杨爱国, 吕振明, 等. 鳃弧菌注射对栉孔扇贝免疫活性的影响[J]. 南方水产, 2007, 3(6):52-55.

Effects of *Vibrio alginolyticus* on Enzymes Activities of *Chlamys nobilis*

HU Wen-ting¹, ZHANG Kai², LIU Hai-qing¹, HAN Ze-xin¹, DUAN Qiu-hong¹

(1. Experiment Teaching Center of Marine Biology, College of Marine Science, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Hailing Pharmaceutical Group, Haikou 570311, China)

Abstract: The activities of CAT, SOD, ALP and ACP of *Chlamys nobilis* were assayed at 6 h, 12 h, 18 h, 48 h and 72 h after challenged with *Vibrio alginolyticus* injection. The results showed that the CAT activities in haemolymph were higher in 5×10^7 cell \cdot mL⁻¹ and 5×10^8 cell \cdot mL⁻¹ groups than that in control group. The activity of CAT in 5×10^8 cell \cdot mL⁻¹ group increased extremely significantly at 18 h ($P \leq 0.01$) and significantly at 24 h ($P \leq 0.05$); the activity of SOD in 5×10^8 cell \cdot mL⁻¹ group were inhibited at first time and lower than that of control group at 12 h and 18 h significantly ($P \leq 0.05$), and increased after 24 h, there was no significant difference between 5×10^7 cell \cdot mL⁻¹ group and control group; compared with that of control group at 18 h, the activities of ALP in liver in 5×10^8 cell \cdot mL⁻¹ group increased extremely significantly ($P \leq 0.01$) and significantly at 24 h ($P \leq 0.05$); the activities of ACP in 5×10^8 cell \cdot mL⁻¹ group were increased significantly at 12 h and 18 h ($P \leq 0.05$), and the highest activity was attained at 24 h in 5×10^7 cell \cdot mL⁻¹ and 5×10^8 cell \cdot mL⁻¹ groups.

Key words: *Chlamys nobilis*; *Vibrio alginolyticus*; enzymatic activity