

溶藻弧菌对三疣梭子蟹溶菌酶和磷酸酶活性的影响

陈 萍 王清印 李 健* 李吉涛 刘 淇 刘 萍

(中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘要 将健康的三疣梭子蟹(平均体重 $176 \pm 21.3\text{g}$)分别注射生理盐水和溶藻弧菌,在感染后 0、24、48 和 72h 分别采集不同处理组梭子蟹的血淋巴、肌肉和肝胰腺组织,测定其中的溶菌酶(LSZ)、酸性磷酸酶(ACP)及碱性磷酸酶(ALP)活性,研究溶藻弧菌对三疣梭子蟹体内免疫相关酶活的影响。结果表明,感染组梭子蟹血淋巴 LSZ 活性在感染后 24h 显著高于对照组($P < 0.05$),随后活性显著降低($P < 0.05$);肌肉和肝胰腺组织中 LSZ 活性在感染 24h 有稍微上升的趋势,但是随着感染时间的延长其活性又逐渐下降,且在感染 48h 后分别显著低于对照组($P < 0.05$)。感染组梭子蟹不同组织中 ACP 和 ALP 酶活随着感染时间的延长均呈下降的趋势,且感染 48h 后显著低于对照组($P < 0.05$)。试验表明,三疣梭子蟹感染溶藻弧菌后对机体免疫相关酶活指标的影响较大,导致机体免疫防御能力的减弱。

关键词 三疣梭子蟹 溶藻弧菌 溶菌酶 酸性磷酸酶 碱性磷酸酶

中图分类号 Q55 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)02-0078-05

Effects on lysozyme and phosphatase activities of *Portunus trituberculatus* infected by *Vibrio alginolyticus*

CHEN Ping WANG Qing-yin LI Jian* LI Ji-tao LIU Qi LIU Ping

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT Healthy *Portunus trituberculatus* (averaging body weight $176 \pm 21.3\text{g}$) were used to determine the changes of the immunity enzyme activities in haemolymph, muscle and hepatopancreas tissue after the crabs were injected with 0.9% NaCl solution (Control) and *Vibrio alginolyticus*. The relative immunity indicators were measured at 0h, 24h, 48h and 72h after the infection. The results showed that: The lysozyme (LSZ) activity of heamolymph increased significantly ($P < 0.05$) in *V. alginolyticus* infected crabs in the initial 24h, but at 48h and 72h the activity reduced significantly ($P < 0.05$) below the control level. The LSZ activities of muscle and hepatopancreas decreased significantly after infection ($P < 0.05$). Both the ACP and ALP activities reduced significantly in the heamolymph, muscle and hepatopancreas tissue of infection group respectively ($P < 0.05$). However, the control crabs did not experience any significant variation in LSZ, ACP and ALP activities in all the tissues. The results of this study

国家 863 计划项目(2006AA10A406)、中国博士后科学基金项目(20080431220)和山东省博士后创新项目(200702012)共同资助

* 通讯作者。E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

收稿日期:2008-03-28;接受日期:2008-05-28

作者简介:陈 萍(1978-),女,博士后,主要从事海水养殖遗传育种研究。E-mail: chenping@ysfir.ac.cn, Tel: (0532)85826690

indicated that immunity enzyme in *P. trituberculatus* infected by *V. alginolyticus* was induced more significantly, which accompanied by weakened immunity ability of the crabs.

KEY WORDS *Portunus trituberculatus* *Vibrio alginolyticus* Lysozyme (LSZ)
Acid phosphatase (ACP) Alkaline phosphatase (ALP)

三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* 广泛分布于中国、朝鲜和日本等海域,其中我国分布最广,主要在山东半岛、浙江、广西、广东、福建和南海等水域,是我国重要的渔业捕捞对象和海水养殖对象(堵南山 1993)。随着三疣梭子蟹养殖规模的不断扩大和养殖环境的污染,各种病害也接踵而至,近几年由病原菌引起的“牙膏病”给梭子蟹养殖业带来了重大经济损失(魏育红等 2001)。目前,有关“牙膏病”的病原鉴定、病理和组织生理变化的研究国内已有不少报道(刘 淇等 2007;施 慧等 2005;许文军等 2003),但有关病原体入侵蟹体时,机体的生理生化指标变化的研究不多。因此,作者通过对三疣梭子蟹进行溶藻弧菌人工感染后,测定其血淋巴和体组织中溶菌酶和磷酸酶免疫相关酶活在不同感染时间的变化规律,旨在探讨这些酶参与免疫防御的作用机制,以期在三疣梭子蟹免疫机理的深入研究和病害防治工作提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

三疣梭子蟹饲养于黄海水产研究所小麦岛试验基地,平均体重 176 ± 21.3 g,每只蟹单笼饲养,每 5 只蟹置于 1 个 200 L PVC 桶中饲养,持续充气,试验期间水温保持在 25°C 左右,每天喂料换水 1 次。

1.2 方 法

1.2.1 病原菌的分离

菌株 PX25,分离自山东潍坊池塘养殖的患有“牙膏病”的三疣梭子蟹的体组织,并经生理生化特征测定和 16SrRNA 基因序列相似性分析将该病原菌鉴定为溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus* (刘 淇等 2007)。

1.2.2 感染实验设计

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,配置成 2×10^8 cell/ml 浓度。从每只三疣梭子蟹第 3 对步足基部注射 $300 \mu\text{l}$ 作为感染组;对照组注射等体积无菌生理盐水,在梭子蟹注射感染后 0、24、48 和 72h 分别采集样品用于酶活测定,每个采样时间点每组各取 5 只三疣梭子蟹。

1.2.3 样品制备

血淋巴制备。用注射器从三疣梭子蟹第 3 或第 4 步足基部插入取血淋巴,置于 Eppendorf 管中 4°C 过夜,经冷冻高速离心吸出血清待测。

肌肉、肝胰腺匀浆。分别迅速取三疣梭子蟹的肌肉和肝胰腺 -80°C 冷冻保存,测定时取组织样称重,肌肉和肝胰腺样品分别加入 3.5 倍和 10 倍的 0.1 mol/L 磷酸钾盐缓冲液 (pH 6.4),低温匀浆、离心 (4°C , $5 \times 10^4 \text{ r/min}$, 10 min),分别取上清液用于酶活测定。

1.3 样品分析

溶菌酶 (LSZ) 活性用 Hultmark 等 (1980) 改进方法进行。以溶壁微球菌冻干粉为底物,用 0.1 mol/L (pH 值 6.4) 的磷酸钾盐缓冲液配制成一定浓度的底物悬液 ($\text{OD}_{570} = 0.3$),在此法规定条件下,溶菌活性:

$$(U/\text{ml}) = (A_0 - A) / A$$

酸性磷酸酶 (ACP) 活性采用 Kruzel (1982) 磷酸苯二钠法,以每 100ml 血清在 37°C 与底物作用 60min,产生 1mg 酚者定义为 1 个酶活力单位。试剂购自南京建成生物工程研究所。

碱性磷酸酶 (ALP) 活性采用 Kruzel (1982) 磷酸苯二钠法,以每 100ml 血清在 37°C 与底物作用 15min,产

生 1mg 酚者定义为 1 个酶活力单位。试剂购自南京建成生物工程研究所。

组织匀浆粗提液中蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 比色法进行蛋白定量,参照 Bradford (1976)方法稍加改进后进行测定。牛血清白蛋白(Bovine serum albumin,BSA,购于 AMRESCO 公司)作为标准蛋白。

1.4 数据处理

所有实验结果数据均为 5 个样品的平均值 \pm SD,结果用 Student's t-test 检验进行组间差异比较, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

感染组梭子蟹在整个感染试验期间肌肉组织没有发现“牙膏病”肌肉白浊的典型症状,但是感染 24h 以后梭子蟹停止采食,感染 48h 开始出现死亡。对照组梭子蟹的采食量在整个试验期没有减少,并且试验期间没有死亡。

2.1 溶藻弧菌对三疣梭子蟹溶菌酶(LSZ)活性的影响

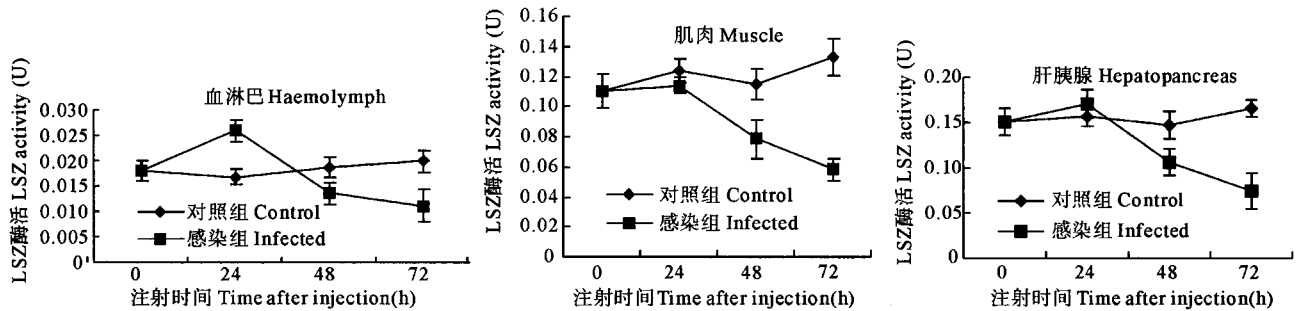


图 1 对照组和感染溶藻弧菌试验组的梭子蟹血淋巴、肌肉和肝胰腺中 LSZ 活性的变化

Fig. 1 Variation in LSZ activities in haemolymph, muscle and hepatopancreas of control and infected crabs

由图 1 可见,感染组梭子蟹血淋巴中 LSZ 活性在感染 24h 时显著高于对照组($P < 0.05$,图 1),而在感染 48h 和 72h 活性显著下降,并且低于对照组的正常水平($P < 0.05$);肌肉和肝胰腺组织 LSZ 活性在感染 24h 时有升高的趋势,但与对照组比差异不显著($P > 0.05$),随着感染时间的延长,酶活性又显著下降且低于对照组($P > 0.05$);注射生理盐水的对照组各组织器官中 LSZ 活性在不同的采样时间没有显著的变化($P > 0.05$)。

2.2 溶藻弧菌对三疣梭子蟹酸性磷酸酶(ACP)活性的影响

三疣梭子蟹注射生理盐水和溶藻弧菌后,不同免疫时间梭子蟹体内 ACP 酶活变化见图 2。不同组织中 ACP 活性分布不同,从大到小依次为肝胰腺>血淋巴>肌肉,对照组蟹各组织 ACP 活性在不同的采样时间变化不大($P > 0.05$);而溶藻弧菌感染的梭子蟹各组织中 ACP 活性随着感染时间的延长而降低,其中肝胰腺组织 ACP 活性在感染 24h 开始显著低于对照组($P < 0.05$),而血淋巴和肌肉组织 ACP 活性在感染 48h 以后与对照组差异显著($P < 0.05$)。

2.3 溶藻弧菌对三疣梭子蟹碱性磷酸酶(ALP)活性的影响

对照组和感染组三疣梭子蟹血淋巴、肝胰腺和肌肉中 ALP 活性随着采样时间的变化见图 3。不同组织中 ALP 活性不同,肝胰腺中最高,肌肉组织中活性最低;与 ACP 在体组织中的分布状况一致;感染试验组梭子蟹血淋巴、肌肉和肝胰腺组织中 ALP 活性从感染 48h 后随着感染时间的延长均显著降低($P < 0.05$),与感染后梭子蟹各组织中 ACP 的变化趋势相似。对照组各组织的 ALP 活性在不同的采样时间没有显著差异($P > 0.05$)。

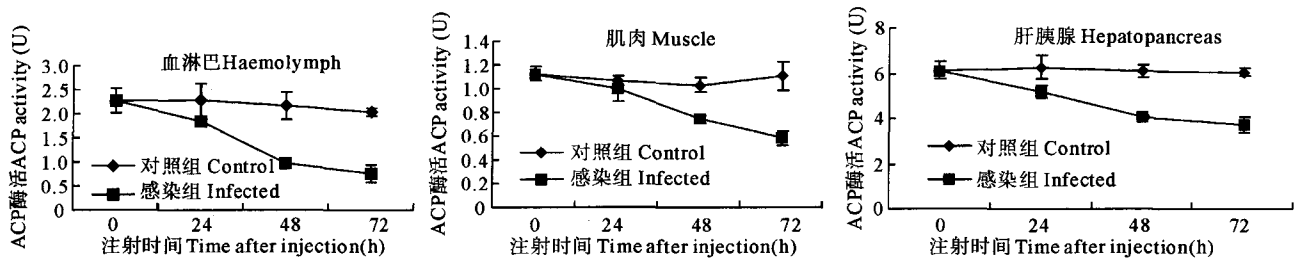


图 2 对照组和感染溶藻弧菌试验组的梭子蟹血淋巴、肌肉和肝胰腺中 ACP 活性的变化

Fig. 2 Variation in ACP activities in haemolymph, muscle and hepatopancreas of control and infected crabs

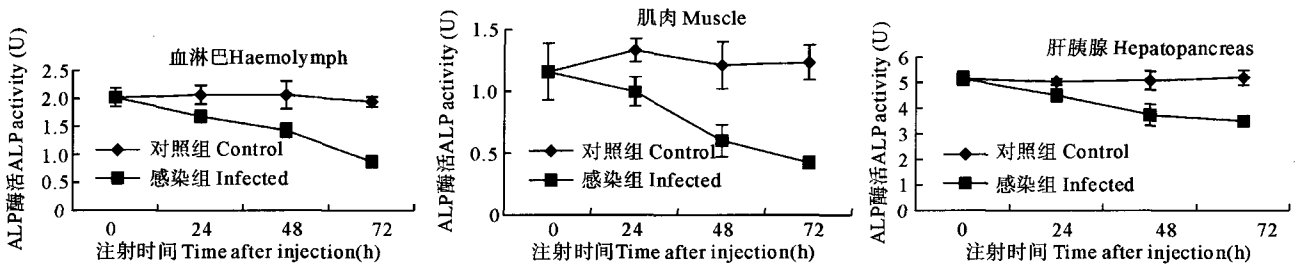


图 3 对照组和感染溶藻弧菌试验组的梭子蟹血淋巴、肌肉和肝胰腺中 ALP 活性的变化

Fig. 3 Variation in ALP activities in haemolymph, muscle and hepatopancreas of control and infected crabs

3 讨论

弧菌是海水环境中的常在菌群,广泛分布在自然海区,是一种条件致病菌,当养殖动物受伤、体弱、抗病力降低和环境条件恶化时,弧菌会乘虚而入,引起蟹、虾等各种水产动物的严重疾病,甚至死亡(Moriarty 1997)。健康三疣梭子蟹体内的微生态处于动态平衡,当注射了病原体溶藻弧菌后,逐渐打破梭子蟹体内的微生态平衡,导致梭子蟹免疫防御机能下降。本试验中感染组的梭子蟹注射溶藻弧菌 48h 后开始出现死亡的结果也说明,三疣梭子蟹在感染溶藻弧菌后可以引起死亡率增加。

LSZ 是吞噬细胞杀菌的物质基础,在甲壳动物的免疫防御中起重要作用。它能够水解革兰氏阳性细菌的细胞壁,破坏入侵体内的异物,从而担负起机体防御的功能(陈竞春等 1996)。翟秀梅等(2007)用副溶血弧菌对南美白对虾进行感染试验发现对虾死亡率与感染时间、浓度呈正相关,且肝脏、肌肉溶菌酶(LSZ)酶活性随弧菌浓度的增加呈下降的趋势;黄旭雄等(2007)报道,弧菌感染的幼虾 LSZ 活性极显著的降低。而本试验中,三疣梭子蟹在注射溶藻弧菌 24h 后,其血淋巴 LSZ 活性显著高于对照组,这种现象可能与 LSZ 在体内的作用和机体免疫反应有关。当弧菌进入三疣梭子蟹体内,触发了梭子蟹免疫系统并产生免疫反应,促进抗菌蛋白和溶菌蛋白的生物合成,从而提高了机体的溶菌酶活力。而在溶藻弧菌感染后期,可能由于三疣梭子蟹血淋巴中的某些合成机制被破坏或血细胞自溶后某些细胞组分可能变成异物,需要消耗大量免疫因子,导致血细胞数量减少,溶菌活力下降(蔡完其等 1994)。

磷酸酶又称磷酸单酯水解酶,是可以催化各种含磷化合物水解的酶类,根据它们催化作用的最适 pH 特性,可分为酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)。酸性磷酸酶是吞噬溶酶体的重要组成部分,在血细胞进行吞噬和包裹反应中,会伴随有酸性磷酸酶的释放,在体内直接参与磷酸基团的转移和代谢(Lackie 1980),主要存在于动物的肝脏、脾脏、红细胞和骨髓等部位(朱忠勇 1997)。本试验发现,梭子蟹肝胰腺中 ACP 活性最高,其次是血淋巴和肌肉,这与高等动物体内 ACP 在各组织中的分布情况基本一致。ACP 在体内直接参与磷酸基团的转移和代谢,有利于其参与机体细胞中的物质代谢,为 ADP 磷酸化提供更多所需的无机磷酸,促进其生长,从而提高其免疫力(牟海津等 1999)。本试验中在受到溶藻弧菌感染后,三疣梭子蟹各组织器官的 ACP 活性随着感染时间延长持续降低,可能是由于感染溶藻弧菌后导致机体细胞的物质代谢过程紊乱,影响

梭子蟹的免疫机能。

ALP 是生物体内的一种重要的代谢调控酶,直接参与磷代谢,亦与 DNA、RNA、蛋白质和脂质等的代谢有关;它对钙质的吸取、磷酸钙沉积、骨骼形成、甲壳素分泌与形成都发挥着重要的作用,对虾、蟹类生存、生长有特别重要的意义(孙虎山等 1999);同时也作为溶酶体酶的重要组成部分,在免疫反应中发挥作用(陈国富等 2007)。本研究发现三疣梭子蟹肝胰腺、血淋巴和肌肉组织提取液中均具有碱性磷酸酶,且在肝胰腺中活性最高,血淋巴次之,肌肉组织的活性最低,与 ACP 活性的组织分布较为相似;同时本试验发现三疣梭子蟹经感染溶藻弧菌后,各组织中 ALP 活性降低,且在感染后期降低显著,试验结果与陈寅儿等(2006)测定的患“牙膏病”的三疣梭子蟹的 ALP 酶活显著降低的结果一致,并且与弧菌感染其他水产动物如大黄鱼(鄢庆彬等 2007)、扇贝(樊甄姣等 2007)的试验结果也基本一致,分析原因可能是由于本试验中三疣梭子蟹在感染溶藻弧菌后对机体有一定的诱导免疫作用,但是时间很短,随着感染时间的延长,溶藻弧菌迅速扩繁,机体的免疫防御机能受损,致使酶活显著的降低;这与感染组三疣梭子蟹的采食量减少、死亡率高的结果一致。

LSZ、ACP 和 ALP 是衡量机体免疫机能和健康状况的重要指标,在甲壳类机体防御方面担负着重要功能,本研究结果表明,随着溶藻弧菌感染时间的延长会引起三疣梭子蟹这些免疫相关酶活的大幅度下降,使得非特异性免疫系统遭到损伤,进而引起三疣梭子蟹出现死亡,这一结果有助于我们了解溶藻弧菌对三疣梭子蟹机体生理生化方面的影响,为其免疫机制及疾病防治的进一步研究提供重要的参考依据。

参 考 文 献

- 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
- 刘 淇,李海燕,王 群,刘 萍,戴芳钰,李 健. 2007. 梭子蟹牙膏病病原菌——溶藻弧菌的鉴定及其系统发育分析. 海洋水产研究, 28(4): 9~13
- 朱忠勇. 1997. 实用医学检验学. 北京: 人民军医出版社, 368~378
- 牟海津,江晓路,刘树青. 1999. 免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活力的影响. 青岛海洋大学学报, 29(3): 463~468
- 许文军,徐汉祥,金海卫,张学舒,罗海忠,徐国辉. 2003. 梭子蟹乳化疗病原的研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 22(3): 209~213
- 陈竞春,石安静. 1996. 贝类免疫生物学研究概况. 水生生物学报, 20(1): 74~78
- 陈国福,宋晓玲,黄 捷,周 进,王秀华. 2007. A3 α -肽聚糖对凡纳滨对虾磷酸酶及细胞内酚氧化酶活性的影响. 海洋水产研究, 28(1): 59~64
- 陈寅儿,王国良,金 珊,李 政. 2006. 三疣梭子蟹患“乳化疗”后几种保护酶活力的变化. 水产学报, 25(9): 445~451
- 施 慧,许文军,徐汉祥. 2005. 梭子蟹酵母菌人工感染实验和组织病理学初步研究. 海洋水产研究, 26(2): 48~52
- 堵南山. 1993. 甲壳动物学(下). 北京: 科学出版社, 882~883
- 黄旭雄,周洪琪,宋理平. 2007. 急性感染对中国对虾非特异免疫水平的影响. 水生生物学报, 31(3): 325~331
- 鄢庆彬,张俊杰,邹文政,陈 强,庄峙厦,王小如. 2007. 人工感染溶藻弧菌对大黄鱼免疫功能的影响. 水产学报, 31(2): 250~256
- 翟秀梅,王 斌,毛连菊,郭 郁,桂远明. 2007. 副溶血弧菌对南美白对虾生理生化指标的影响. 上海水产大学学报, 16(2): 162~168
- 蔡完其,陆宏达. 1994. 患暴发性病毒病的中国对虾肝胰腺病理变化. 上海水产大学学报, 3(1): 27~33
- 樊甄姣,杨爱国,吕振明,刘志鸿. 2007. 鳃弧菌注射对栉孔扇贝免疫活性的影响. 南方水产, 3(6): 52~55
- 魏育红,仁 宇,朱越雄. 2001. 蟹类的病毒性和细菌性疾病研究进展. 内陆水产, 26(2): 42~43
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. J. Anal. Biochem. 72: 248~254
- Hultmark, D., and Steiner, H. 1980. Studies on the method of lysozyme measurement in serum. Eur. J. Biochem. 106: 7~16
- Kruzel, M. 1982. Acid phosphatase of potato tubers purification properties, sugar and amino acid composition. Acta. Biochim. Pol. 29(3): 321~321
- Lackie, A. M. 1980. Invertebrate immunity. Parasitology, 80: 393~412
- Moriarty, D. J. W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture, 151: 333~349
- Zhang, Z. F., Shao, M. Y., and Kang, K. H. 2005. Changes of enzyme activity and hematopoiesis in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck) induced by white spot syndrome virus and zymosan A. Aquaculture Research, 36(7): 674~681