

鳃弧菌感染对日本鳎部分免疫活性因子的影响

王洪斌^{1,2}, 成明³, 吴琴¹, 李士虎¹, 阎斌伦²

(1. 淮海工学院海洋学院, 江苏连云港 222005; 2. 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏连云港 222005;
3. 连云港市荣盛生物科技有限公司, 江苏连云港 222005)

摘要:对日本鳎 (*Charybdis japonica*) 进行鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 悬液和生理盐水 (对照) 注射感染, 研究其血清免疫因子超氧化物歧化酶 (SOD)、酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP)、过氧化氢酶 (CAT) 活性的变化, 并对试验结果进行统计学分析。结果表明, 注射鳃弧菌悬液组 SOD 活性 12、24、48 h 均高于对照组, 48 h 达到最高; CAT 活性 12、24 h 增加非常明显, 12 h 达最高; AKP 活性 5、12、24 h 都有增加, 均高于对照, 24 h 最高; ACP 活性 12 h 开始上升, 24 h 达最高。在人工感染鳃弧菌 48 h 内, 日本鳎体内的免疫因子发生了明显的变化, 血清中 SOD、ACP、AKP、CAT 活性在不同时间段均有显著升高趋势, 高于对照组水平。

关键词:日本鳎; 鳃弧菌; 免疫活性

中图分类号: Q175 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2012)03-0112-04

近年来, 海水养殖业发展迅速, 导致养殖水域富营养化进程加快, 弧菌类为主的各种致病菌以水体中的悬浮物为载体, 导致生物的诸多病害发生, 给养殖产业带来了巨大损失; 其中, 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 被认为是重要的病原菌 (肖慧等, 1999; 吴后波和潘金培, 2001; 杨慧等, 2006)。关于其致病机制国外已有许多报道, 如产生胞内或胞外毒素、质粒介导的铁结合系统 (Iron uptake system)、对血清杀菌活力的抗性等 (Norqvist et al, 1990)。已有研究证实, 鳃弧菌能产生对金鱼 (*Carassius auratus*)、日本鳎 (*Anguilla japonica*) 致命的外毒素, 引起鲑 (*Oncorhynchus*) 出血性败血症并伴随大面积组织损伤。目前, 水产养殖普遍使用药物来控制各种疾病, 在一定程度上发挥了积极作用, 但抗生素等药物的长期使用, 会使病原对这些药物产生抗药性, 而且对环境会造成严重的污染和破坏; 另外, 药物残留还会对食用者构成潜在的威胁 (樊甄皎等, 2007)。

日本鳎 [*Charybdis japonica* (A. Milne-Edwards)] 属梭子日本鳎科、梭子日本鳎亚科、鳎属, 是一种大型海产食用鳎类, 生活于潮间带有水草、泥沙的水底或潜伏于石块下, 为沿岸定居性种类, 广泛分布于我国四海及日本、朝鲜、东南亚等沿海岛礁区和

浅海水域。近年来, 由于资源量下降, 对日本鳎的资源增殖工作引起人们的重视 (刘洪军等, 2000; 王春琳等, 2005)。随着日本鳎人工育苗及养殖规模扩大, 需要研究其病害防控措施。目前, 关于鳃弧菌引起日本鳎病害的文章鲜有报道。本试验以日本鳎为材料, 研究受鳃弧菌人工感染后, 其血清中超氧化物歧化酶 (SOD)、酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP)、过氧化氢酶 (CAT) 等部分免疫因子的活性变化, 探讨该菌与日本鳎免疫系统间的相互作用关系, 旨在为日本鳎的病害免疫防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品

健康日本鳎于 2009 年 10 月取自江苏连云港市赣榆东方水产养殖公司, 个体规格均匀 (100 g 左右), 暂养于玻璃水族箱 (0.6 m × 0.4 m × 0.3 m) 中, 室温 24 h 通气, 每日换水 1 次。

1.2 菌株

鳃弧菌菌株由本实验室保存, 2216E 培养基活化, 调节菌液浓度为 7×10^8 CFU/mL 备用。

1.3 人工注射感染

选择健康、大小均匀的日本鳎, 设试验组和对照组各 30 只, 试验组每只日本鳎用无菌微量注射器从腹腔注入 200 μ L 鳃弧菌菌液, 对照组按同样方法注射等量生理盐水。

1.4 取样

注射后 5、12、24、48、72 h 取 6 只日本鳎, 用无菌兰芯注射器, 从第三步足基部采血 300 μ L, 置于

收稿日期: 2010-12-23

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划重大项目 (2006BAD09A01); 江苏省海洋生物技术重点实验室开放基金 (2007HS016)。

作者简介: 王洪斌, 1966 年生, 男, 副教授, 理学硕士, 主要从事微生物学及基因工程教研工作。E-mail: whbvirus@126.com

1.5 mL 无菌 Eppendorf 离心管中(加 EDTA 抗凝剂 100 μ L: 15% EDTA 钠盐水溶液), 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存 24 h, 将血淋巴以 5 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 去沉淀, 上层血清保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.5 免疫指标的测定

超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、过氧化氢酶(CAT)的活性测定均采用江苏南京建成生物研究所生产的试剂盒, 具体测定方法参考说明书进行。

1.5.1 SOD 活性 采用黄嘌呤氧化酶法测定, SOD 活性定义为每 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50.0% 时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位(U)。

1.5.2 ACP 和 AKP 活性测定 采用 Kruzel(1982)的磷酸苯二钠法, 酶活力的计算采用金氏单位, 每 100 mL 待测样品在 37 $^{\circ}$ C 与基质液作用 15 min, 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位。

1.5.3 CAT 活性 CAT 活性测定采用周强和曹春艳(2001)的方法进行。CAT 分解 H₂O₂ 的反应可通过加入钼酸铵而迅速终止, 剩余的 H₂O₂ 与钼酸铵作用产生一种淡黄色的化合物, 在 405 nm 处测定其生成量, 计算其活力。

1.6 数据处理

将每个时间点 6 只试验日本鳗的测量数据求平均数, 得出每个时间点的免疫指标值。对注射鳗弧菌悬液组与对照组比较得出结果。

2 结果与分析

2.1 日本鳗人工感染鳗弧菌后外观症状的变化

试验日本鳗在注射鳗弧菌悬液后 48 h 内, 从外观上看不出任何变化, 行走有力、运动正常, 对外界刺激反应敏感, 72 h 后出现反应迟钝, 对刺激反应不太敏感, 120 h 后日本鳗全部死亡。在整个试验周期内, 对照组日本鳗外观、活力均正常, 120 h 后仅死亡 1 只。

2.2 SOD 的测定

鳗弧菌悬液感染日本鳗后, 其血清中的 SOD 逐渐上升, 结果见图 1-A。SOD 活性 12 h 有升高趋势, 活性高于对照组, 48 h 升至最高, 然后逐渐降低, 至第 72 h 降至最低, 与对照组平行。注射菌悬液的本日本鳗在 72 h 后已处于反应迟钝状态; 而注射生理盐水组的 SOD 值至第 24 h 略有下降, t 检验显示, 试验组 24、48 h 与对照组有显著差异($P < 0.05$)。

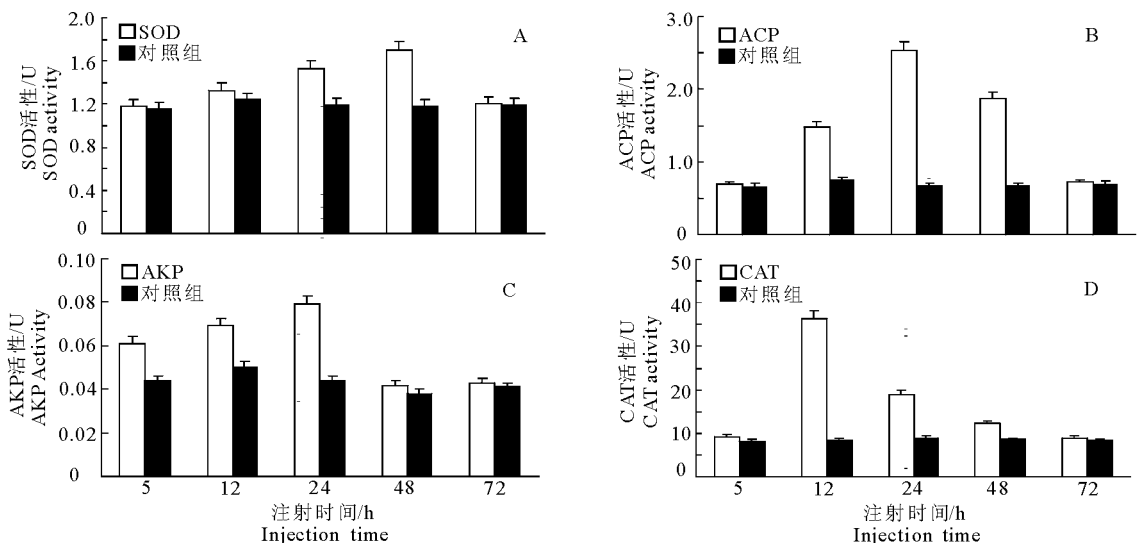


图 1 日本鳗感染鳗弧菌后酶活性的变化

Fig. 1 Changes of enzymes activity after injection of *V. anguillarum*

2.3 ACP 的测定

注射菌悬液的本日本鳗 ACP 活性 5 h 前基本没有变化, 与对照组平行, 结果见图 1-B。12 h 明显上升, 至 24 h 达最高, 维持至 48 h, 试验组均高于对照组, 然后下降, 72 h 与对照组平行, 最高时接近正常水平 2 倍多。注射生理盐水的日本鳗 ACP 活性比

较稳定, t 检验显示, 试验组 12、24、48 h 与对照组相比差异极显著($P < 0.01$), 其它时间差异不显著。

2.4 AKP 的测定

注射菌悬液的本日本鳗 AKP 活性变化基本同 ACP 变化趋势, 结果见图 1-C。 t 检验显示, 试验组 5、12 h 与对照组差异显著($P < 0.05$), 24 h 的结果

差异极显著($P < 0.01$),其它时间差异不显著。

2.5 CAT的测定

注射菌悬液的日本鳎 CAT 活性增强,12 h 之内迅速增加,然后开始下降,试验组 12、24 h 均高于对照组,特别是 12 h 的酶活性高于对照组 3 倍之多;对照组变化不大; t 检验显示,试验组 12、24 h 与对照组差异极显著($P < 0.01$),48 h 的差异显著($P < 0.05$),其它时间差异不显著。结果见图 1-D。

3 讨论

3.1 免疫应答的种间差异

免疫系统极其复杂,不管是低等生物还是高等生物,都存在着宿主对外来入侵者的防御和修复自身组织损伤的机制;然而,在无脊椎动物中,表现出来的这种机制是属于先天性的自然免疫,对各种外来的侵染物反应没有特异性,反应类型大多类似于吞噬作用,如无体腔动物的吞噬阿米巴细胞(*Phagocytic amoebocytes*)、软体动物(Mollusca)和节肢动物(Arthropoda)的血细胞都担负着对外来抗原吞噬功能。节肢动物的免疫系统能识别范围广泛的外来物质并对其产生积极地应答,当然这种应答与脊椎动物免疫应答相距甚远,在昆虫纲(Insect)和甲壳纲(Crustacea)中虽然关于异种的识别有一些研究,但还很不清楚。有学者提出,美国蜚蠊(*Periplaneta americana*)的同种异体表皮移植,排斥反应在第 7 天发生,并有特异性记忆(于善谦等,1999)。

3.2 SOD 与活性氧自由基的清除

本试验以鳎弧菌的菌悬液直接腹腔注射人工感染日本鳎,试验过程中,在小型玻璃钢中通气换水,120 h 死亡率对照组为 10%,试验组为 100%,说明这种试验方式及对日本鳎生存无不利影响。丁秀云等(1996)对皱纹盘鲍血淋巴中的 SOD 活力进行检测,发现皱纹盘鲍在注射细菌后,SOD 活力降低;王淑红等(2004)利用弧菌感染杂色鲍也发现 SOD 活性显著降低。本试验中,日本鳎在注射鳎弧菌菌悬液后,SOD 活性 12 h 有升高趋势,活性高于对照组,48 h 升至最高,然后逐渐降低,至第 72 h 降至最低(低于对照组)。在正常情况下,SOD 清除活性氧自由基,保护动物免受自由基伤害;注射菌悬液后,在细菌的诱导下产生大量的自由基,SOD 酶活性也在自由基的诱导下随之升高,以清除过量的自由基,因此在注射后出现了酶活性逐渐升高,但日本鳎在清除细菌的过程中产生大量的自由基,清除自由基对 SOD 的消耗超过了日本鳎的生理能力,因此酶活性

又逐渐下降。

3.3 ACP、AKP 和 CAT 活性的变化

吞噬前、吞噬中和吞噬后的各种水解酶同样具有重要作用。ACP 是巨噬细胞溶酶体的标志酶,在体内直接参与磷酸基团的转移和代谢,在血细胞进行吞噬和包囊反应中,会伴随有 ACP 的释放(翟玉梅等,1998);AKP 是生物体内的一种重要的代谢调控酶,直接参与磷酸基团的转移,可催化所有磷酸单酯及磷酸基团的转移反应,在免疫反应中发挥作用(孙虎山和李光友,2002)。本次试验发现,日本鳎注射鳎弧菌后,其体内 ACP、AKP 活性 5 h 开始升高,24 h 最高,升高趋势维持至 48 h,试验组均高于对照组,说明鳎弧菌对日本鳎的 ACP 和 AKP 活性有明显的刺激作用,激发了日本鳎的免疫反应。CAT 可清除过氧化氢,从而保护动物本身免受伤害,以维持正常生理活动。本试验中,CAT 活性增强,12 h、24 h 均高于对照组,特别 12 h 酶活性高于对照组 3 倍之多,说明 CAT 在防御细菌感染过程中发挥了非常积极的作用;但与王淑红等(2004)得出的试验结果不同,这可能与贝类和甲壳类对不同病原菌的反应有关,具体原因有待进一步研究。

参考文献

- 丁秀云,李光友,翟玉梅. 1996. 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,27(4):362-367.
- 樊甄姣,杨爱国,吕振明,等. 2007. 鳎弧菌注射对栉孔扇贝免疫活性的影响[J]. 南方水产,3(6):52-55.
- 刘洪军,戴玉蓉,张富君,等. 2000. 日本鳎人工育苗及养殖技术研究[J]. 海洋科学,24(8):23-27.
- 孙虎山,李光友. 2002. 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[J]. 海洋与湖沼,33(3):245-249.
- 王春琳,陈建青,叶晓园,等. 2005. 日本鳎的营养成分组成分析[J]. 营养学报,27(1):81-83.
- 王淑红,王艺磊,张朝霞,等. 2004. 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,11(1):37-40.
- 吴后波,潘金培. 2001. 弧菌属细菌及其所致海水养殖动物疾病[J]. 中国水产科学,8(1):89-93.
- 肖慧,李军,王祥红,等. 1999. 鲈鱼苗烂鳃、烂尾病病原菌的研究[J]. 青岛海洋大学学报,29(1):87-93.
- 杨慧,陈吉祥,公衍军,等. 2006. 致病性鳎弧菌 W-1 外膜蛋白 ompU 基因克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. 中国海洋大学学报,36(S1):105-108.
- 于善谦,王洪海,朱乃硕,等. 1999. 免疫学导论(第 1 版)

- [M]. 北京: 高等教育出版社; 269 - 273.
- 翟玉梅, 丁秀云, 李光友. 1998. 软体动物血细胞及体液免疫研究发展[J]. 海洋与湖沼, 29(5): 558 - 561.
- 周强, 曹春艳. 2001. 血清过氧化氢酶的比色测定[J]. 哈尔滨医科大学学报, 35(6): 473 - 474.
- Kruzel M. 1982. Acid phosphatase of potato tubers: purification properties, sugar and amino acid composition [J]. Acta Biochim Pol, 29(3): 321 - 323.
- Norqvist A, Bo Norrman B, Wolf - Watz H. 1990. Identification and characterization of a Zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *V. anguillarum* [J]. Infect & Immun, 58(11): 3731 - 3736.

(责任编辑 万月华)

Changes of Some Immunoactive Enzymes in *Charybdis japonica* Infected with *Vibrio parahemolyticus*

WANG Hong-bin^{1,2}, CHENG Ming³, WU Qin¹, LI Shi-hu¹, YAN Bin-lun²

- (1. College of Marine Sciences, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, P. R. China;
2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang 222005, P. R. China;
3. Lianyungang Rongsheng Biotechnology Co. Ltd, Lianyungang 222005, P. R. China)

Abstract: *Charybdis japonica* (A. Milne-Edwards) was infected with *Vibrio anguillarum* through injection, using normal saline as parallel control. The variations in activities of serum immunity factors including superoxide dismutase (SOD), acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), peroxide catalase (CAT) were assayed. Statistical analysis showed that SOD activity in the infected *C. japonica* increased in 12 h, 24 h, 48 h after injection, higher than that in the control group, and reached maximum in 48 h. The CAT activity increased significantly and reached maximum in 12 h. The AKP activity increased in 5 h, 12 h, 24 h, higher than that in the control group, and reached maximum in 24 h. The ACP activity begun to rise in 12 h, and reached highest activity in 24 h. The results indicated that in 48 h of artificial *V. anguillarum* infection, sero-immunity factors in *C. japonica* varied significantly. The activities of SOD, ACP, AKP, and CAT in blood serum increased significantly in different time periods and were higher than that in the control group.

Key words: *Charybdis japonica* (A. Milne-Edwards); *Vibrio parahemolyticus*; immunoactive