

甲壳动物酚氧化酶活力及其 在养殖中的应用

黄辉洋 李少菁 王桂忠

(厦门大学海洋系, 厦门 361005)

摘要 甲壳动物酚氧化酶在入侵微生物的刺激下被激活, 参与机体的防御反应, 因此与机体的免疫状态有一定的相关。本文从作用机理、测定方法和应用几个方面综述了甲壳动物酚氧化酶的研究动态, 并对未来的研究前景进行展望, 以期研究虾蟹类的病害防治提供参考。

关键词 甲壳动物 酚氧化酶 作用机理 测定方法

十足目甲壳动物一直是渔业生产、研究的重要对象。近年来虾蟹等养殖种的病害问题日益突出, 严重影响了养殖业的发展。因此, 国内外学者更加重视对其进行免疫学研究, 探讨提高机体抗菌力的各种免疫学途径, 并力图找到便于监测其免疫机能状态的指标。

甲壳动物免疫反应包括细胞免疫和体液免疫, 两者密切相关: 血细胞既是细胞免疫的担当者, 又是体液免疫因子的提供者。本文就酚氧化酶原激活系统——体液免疫因子之一的研究动态做一简要综述。

1 甲壳动物酚氧化酶的作用机理

1.1 酚氧化酶的作用

甲壳动物的酚氧化酶原(prophenoloxidase activating system, proPO 系统)是由丝氨酸蛋白酶和其他因子组成的复杂酶级联。外来异物能特异性地引发该酶级联, 从而实现对异物的初始识别。级联反应的结果是生成有活性的酚氧化酶(phenoloxidase, O-联苯酚-氧氧化酶, E.C. 1.10.3.1)(简作PO)参与宿主的防御反应——包括释放具有调理作用的粘性蛋白, 促进血细胞的吞噬和包裹, 产生多种因子介导凝结和凝固, 以及产生杀菌物质等。一般认为甲壳动物的proPO系统的作用相当于脊椎动物的补体系统^[1,2]。血细胞溶胞产物上清液(hemocyte lysate supernatant, HLS)或血清中的酚氧化酶活性可以以L-多巴作为底物, 用分光光度法检测催化产物在490nm的吸光值。

1.2 酚氧化酶的激活

正常状态下, 甲壳动物血细胞的酚氧化酶PO主要以酶原形式存在于颗粒细胞与半颗粒

收稿日期: 1999-04-06; 收修改稿日期: 1999-09-20

细胞中；当对异物发生反应时释放到血淋巴中被激活从而表现其活力。血淋巴中也测得PO活力，但由于实验中的取血操作也可能有激活作用，对其存在形式(酶原或酶，或两者共存)尚不能肯定。

微量的微生物多糖成分就可激活proPO系统，如： β -1,3-葡聚糖、脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)、肽聚糖(peptidoglycan,PG)；另外，胰蛋白酶、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,SDS)，加热对proPO系统的激活也常见报道^[3-8]。

不同引物的激活机制也不尽相同，例如：加入一种丝氨酸蛋白酶的抑制剂时， β -1,3-葡聚糖无法诱导proPO转化为PO，而SDS和加热则仍能诱导转化。另外，自然养殖环境试验中，濒死对虾血淋巴的PO活力高于正常对虾。推测甲壳动物体内存在不同的酚氧化酶原激活机制^[5]。

Gollas-Galvan等(1997)^[9]研究 Ca^{2+} 对加州对虾*Penaeus californiensis*的proPO系统的激活作用。他们认为， Ca^{2+} 并非直接作用于proPO转化为PO，而是参与激活proPO系统的活化酶(proPO activating enzyme,PPAE)。自然条件下，proPO系统的激活包括2个步骤：(1)微生物刺激血细胞脱颗粒作用PPAE和proPO被释放出来；(2)血浆 Ca^{2+} 激活PPAEPPAE将proPO(不显活性)激活为PO(显活性)。

罗日祥等(1996)^[4]用一定浓度的 Ca^{2+} 处理血细胞提取液，可使PO活力增加。用1%SDS处理血细胞提取液，PO活力比正常值大10~15倍。但以一定浓度的 Ca^{2+} 加1%SDS处理血细胞提取液时，测定的PO值仅比正常值大5~6倍。据推测，SDS遇到 Ca^{2+} 后生成不溶性的SDS钙盐。

在Ashida&Soderhall(1984)^[6]的实验中，只有在高于45℃时proPO才能被热激活；而最适温度为58℃，且在3min内即可迅速完成热激活作用。Chisholm&Smith(1992)^[10]也发现，温度由50℃升到60℃时，PO活力呈上升趋势；70℃的温度组中，PO活力下降；100℃的温度组PO活力可忽略不计。罗日祥等(1996)^[4]研究了温度对中国对虾*P. chinensis*的PO活力的影响：在25℃到65℃的温度范围内，55℃时测得的PO活力最高。据Chisholm&Smith(1994)^[11]考察海水环境温度对岸蟹*Carcinus maenas*血细胞抗菌活力的结果，除了在温度最高的8月(平均16℃)和最低的2月(平均3.3℃)抗菌活力明显下降，整年中*C.maenas*都表现出相当的抗菌活力。温度很有可能是通过影响血细胞数目，进而影响到血细胞溶解物中的蛋白水平，最终反映在抗菌活力的水平上。

1.3 影响因子

浅海十足目甲壳动物在高潮位时活动有所增强，受伤机率也随之增大。在新鲜捕获的*Carcinus maenus*中，血细胞数与潮位有关；高潮位时血细胞总数最多。由此，释放至血浆的proPO增多，残留在细胞内的贮量减少。Hauton等(1995)^[12]首次报道了*C.maenus*的PO活力具有潮汐节律变动性：在实验室模拟的半日潮(潮位移动距离0.90m)试验组中，PO活力与潮位呈明显负相关，体现了一种潮汐节律性。在“高”潮位时，proPO在血细胞内的贮量减少。因此，在现场实测时，必须在相同的潮时进行，以排除潮时不同所产生的影响和保证实验数据具有可比性。

Hauton等(1997)^[13]在英国南安普敦水域沿岸生态系中连续13个月调查*C.maenus*的PO活力变动情况，同时记录多种环境因子，如水温、盐度、水体总悬浮颗粒、有机物含量和细菌种群数等的变化情况。全年中细菌的高峰值明显对应着PO活力的高峰值；PO活力表明了对潜

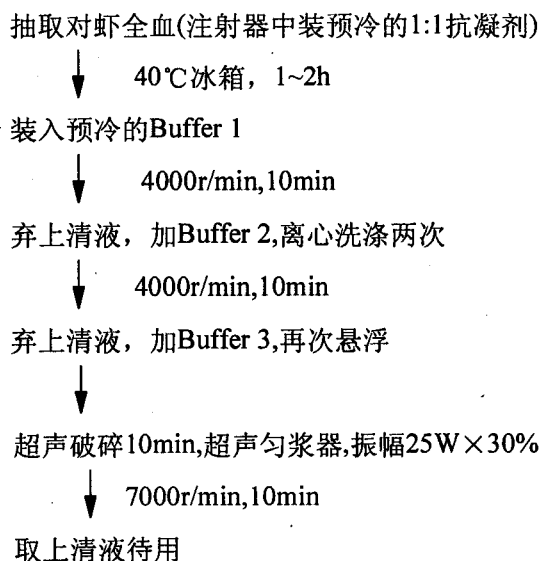
在的宿主生物的免疫程度。但是, 水中细菌丰度是体外病原压力的反映, 而PO活力更可能反映了已侵入动物体内的病原压力。因此, 将水体细菌丰度与体内的病原量联系起来, 将更具有指示意义。

PO活力单位是以每毫克蛋白吸光值的变化来表达的, 因此一般认为与血细胞数并无直接相关。Hauton等(1997)^[14]认为, 尽管如此, 出于一种直观的推测, 随着血细胞, 尤其是吞噬性的透明细胞(又称无颗粒细胞)首先从循环系统移出, PO也类似地从循环系统移出, 在鳃丝被氧化隔离出来, 黑化正在成形中的菌/血细胞节, 以及诱导透明细胞的噬菌作用。在以亚致死剂量弧菌活体感染*C.maenas*的试验中, 24h内血细胞有所下降, 酚氧化酶也暂时下降; 经7d培养后, 血细胞下降幅度甚于对照组, 而PO活力则恢复至接近对照组第一天的水平。

Vergas-Albores等(1993)^[15]根据加州对虾*Penaeus californiensis*血淋巴的渗透压、离子强度和pH设计了一份抗凝剂。以防止在取血过程中发生细胞溶解、脱颗粒和凝集作用。NaCl浓度是维持细胞足够的渗透压所必须的, 并依生物种类而异, 例如在螯虾中是140mmol/L, 在加州对虾中是450mmol/L; 抗凝剂中NaCl浓度应模拟生物体自身血淋巴中的浓度。抗凝剂的pH会影响脱颗粒作用, 进而影响所测得的PO活力大小。为将细胞的活化作用减至最小, 同时还要考虑适宜的操作温度。

2 甲壳动物酚氧化酶的测试方法

对虾一般从其头胸甲后插入心脏取血; 处于蜕皮间期的蟹从其螯足的基节和底节之间未钙化的细胞膜处取血。以王雷等(1995)^[21]制备对虾细胞破碎上清液的步骤为例, 过程如下:



其中, 3份缓冲溶液(pH7.0)分别为: Buffer 1: 0.01mol/L二甲胍酸钠, 0.1mol/L柠檬酸钠, 0.1mol Na-EDTA, 0.25mol/L蔗糖; Buffer 2: 0.01mol/L二甲胍酸钠, 0.25mol/L蔗糖, 5mmol/L Na-EDTA; Buffer 3: 0.01mol/L二甲胍酸钠, 5mmol/L CaCl₂, 1.5mol/L NaCl。

酚氧化酶活力的测定,一般是参照Ashida(1971)^[17]的方法进行。将3mL0.1mol/L,pH6.0的磷酸钾盐缓冲液与100 μ L0.01mol/L的L-多巴及100 μ L血清于室温下混匀,每间隔2min读取在490nm波长下的光密度值。以试验条件下每分钟O.D.₄₉₀增加0.001定义为一个酶活力单位。

3 甲壳动物酚氧化酶的应用

proPO激活系统识别的非己信号,可以是微生物或寄生虫表面携带或释放的。革兰氏阴性菌和真菌所携带的非己信号分别是脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)和 β -1,3-葡聚糖(glucans)。这两种物质即使在浓度很低(10^{-9} ~ 10^{-10} g/mL)的情况下,也能特异激活proPO系统,使之发生一系列化学效应,终产物为PO。Smith&Soderhali(1983)^[7]将一定剂量的昆布多糖(一种 β -1,3-葡聚糖)分别对淡水螯虾*Asiaticus asiaticus*和岸蟹*Carcinus maenas*进行体外添加和体内注射,均观察到免疫活动的发生。此外,LPS诱导淡水螯虾血细胞proPO系统的活化、 β -1,3-葡聚糖对加州对虾*Penaeus californiensis*的proPO系统的活化作用均见报道。

许多实验表明:适量病原体的抗原的存在能激活实验虾蟹的免疫反应,有利于提高机体的抗菌力和应激力,而且能维持一段时间。这在实践中有重要意义。Sung等(1994)^[1]报道,曾浸泡于真菌的葡聚糖溶液(0.5~1.0mg/mL)的斑节对虾*Penaeus monodon*,与对照组相比,在浸浴感染时对弧菌*Vibrio vulnificans*就表现出较高的存活率。这一保护性的效果可延续到浸泡后的第18天。附带的测定表明,处理过的虾血细胞中PO活力增强。文章据此提出“免疫刺激(immunostimulation)的概念。Sung等(1996)^[1]将实验室暂养的斑节对虾浸泡于热致死的弧菌悬浮液;经该处理过的虾,与对照组相比,PO活力增加了13倍。

诱导剂量的高低也影响着免疫力。适量的诱导,有助于提高免疫力;而当诱导剂量达到一定程度后,会降低其活力并导致得病直至死亡。王雷等(1995)用两种浓度(1.2×10^8 个/mL、 3.6×10^8 个/mL)注射感染对虾,发现前一个浓度组的对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力大大高于对照组;而后一个浓度组的对虾,抗菌、溶菌活力不如前者,甚至低于未经注射感染的对虾组。李光友、王青(1995)应用化学发光法对中国对虾血细胞吞噬活性进行研究,反应体系中脂多糖浓度低于10 μ g/mL时,对其吞噬活性有激活和加强作用;但浓度高于该值时,对对虾血细胞有毒性。李天道等(1998)^[3]以不同浓度的弧菌菌悬液注射对虾,小剂量弧菌不仅不会使对虾致病,反而会诱导对虾提高免疫力,血清中PO活力增高,而且能保持一定时间;当注射剂量达到水体中弧菌致病的临界值(10^5 CFU/mL)时,PO活力最高;只有当体内弧菌达到一定程度后,才能对对虾的免疫力造成负面影响。

通过免疫刺激提高虾、蟹的免疫能力,并可维持一定时间(从几天到几个月的报道均可见),这在实践中有重要意义。具体应用中要确定能产生最大免疫能力的诱导剂量,还需要结合虾、蟹的个体差异和实际操作等多种试验条件。目前还未见相关报道。

4 甲壳动物免疫力的研究展望

广泛用于研究及实践的甲壳动物免疫力的指示剂还包括:

1) 转引自Hauton et al.(1997)

- a) 血淋巴中的过氧化氢可用于指示噬菌力^[14]。
- b) 感染黑斑病的对虾, 血清蛋白含量明显减少, 而葡萄糖含量急剧增大, 这可作为中国对虾感染黑斑病的一种血液化学监测指标^[17]。
- c) 检测中国对虾血细胞吞噬功能的丫啶橙检验法, 可同时直观地观测中国对虾血细胞对金黄色葡萄球菌的吞噬和杀伤情况^[18]。
- d) 间接荧光抗体诊断技术, 不仅可用于发病的感染对虾, 也可用于检测带菌状态或未发病的感染对虾^[19]。
- e) 应用医学上的化学发光法定量测定中国对虾血细胞的吞噬活性^[20]。
- f) 运用单向免疫扩散法(SRID)测定对虾血淋巴免疫因子, 作为衡量免疫状态的定性指标^[21]。

利用人工条件诱导提高甲壳动物自身的免疫力, 也是各种养殖动物病害防治的重要方向。口服免疫多糖、注射中药制剂^[22]、在饵料中添加维生素C多聚磷酸酯(LAPP)^[23]都有提高防病能力的功效。利用基因工程技术, 通过选择具有免疫基因的抗病个体, 也是虾、蟹免疫学研究的新途径。

参考文献

- 1 李光友. 中国对虾疾病与免疫机制. 海洋科学, 1995, (4): 1~3
- 2 王雷、李光友. 甲壳动物的体液免疫研究进展. 海洋科学, 1992, (3): 18~19
- 3 李天道等. 中国对虾血清中酚氧化酶活力研究. 海洋湖沼通报, 1998, (1): 51~56
- 4 罗日祥等. 中国对虾血细胞中酚氧化酶活力研究. 海洋科学, 1996, (6): 1~3
- 5 王雷等. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究. 海洋与湖沼, 1995, 26(2): 179~185
- 6 Ashida M, Soderhall K. The prophenoloxidase activating system in crayfish, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1984, 77B: 21~26
- 7 Smith V J, Soderhall K. β -1,3-Glucan activation of crustacean hemocytes in vitro and in vivo, *Biol. Bull.*, 1983, 164: 299~314
- 8 Hernandez-Lopez J et al. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes), *Comp. Biochem. Physiol.*, 1996, 113C: 61~66
- 9 Gollas-Galvan T et al, Effect of calcium on the prophenoloxidase system activation of the brown shrimp, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1997, 117A: 419~425
- 10 Chisholm J R S, Smith V J. Antibacterial activity in the haemocytes on the shore crab, *Carcinus maenas*, *JMBA*, 1992, 72: 529~542
- 11 Chisholm J R S, Smith V J. Variation of antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*, with temperature, *JMBA*, 1994, 74: 979~982
- 12 Hauton C et al. Circatidal rhythmicity in the activity of the phenoloxidase enzyme in the common shore crab, *Carcinus maenas*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1995, 111B: 347~352
- 13 Hauton C et al. In situ variability in phenoloxidase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*(L), *Comp. Biochem. Physiol.*, 1997, 117B: 267~271
- 14 Hauton C et al. The effects of a live in vivo pathogenic infection on aspects of the immunocompetence of the common shore crab, *Carcinus maenas*(L), *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 1997, 211: 115~128
- 15 Vargas-Albore F et al. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*), *Comp. Biochem. Physiol.* 1993, 106A(2): 299~303
- 16 Ashida M. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*, *Archs Biochem. Biophys.* 1971, 144: 749~762
- 17 罗日祥. 中国对虾血淋巴蛋白质、葡萄糖含量的研究. 海洋与湖沼, 1996, 27(5): 476~479
- 18 杜爱芳等. 中国对虾血细胞吞噬功能的研究. 中国水产科学, 1997, 4(2): 1~5

- 19 张晓华等.中国对虾弧菌病的间接荧光抗体诊断技术研究.海洋与湖沼, 1997,28(6):604-610
20 李光友、王青.中国对虾血细胞及其免疫研究.海洋与湖沼, 1995,26(6):591-596
21 王雷等.口服免疫药物后中国对虾某些血淋巴因子的测定及方法研究.海洋与湖沼, 1995,26(1):34-41
22 罗日祥.中药制剂对中国对虾免疫活性物的诱导作用.海洋与湖沼, 1997,28(6):573-577
23 王伟庆、李爱杰.LAPP对中国对虾生长、缺氧耐受力及免疫抵抗力的影响.海洋湖沼通报, 1996,(1):42-49

作者简介:黄辉洋,女,1973年7月生。在读博士生,专业为海洋生物学,主攻方向为浮游生物学。已发表论文2篇。

Studies on the Crustacean Phenoloxidase Activity and its Application

Huang Huiyang, Li Shaojing and Wang Guizhong

Oceanography Department, Xiamen University, Xiamen 361005

Abstract The phenoloxidase in crustacean is activated by the invading microbes, and is involved in the defense reaction, thus having certain relation with the immune condition of the animals. This paper summarizes the function and measurement of the crustacean phenoloxidase, as well as its application in aquaculture. The prospects of the research have also been anticipated.

Keywords crustacean ; phenoloxidase ; function measurement