

文章编号:1000-0615(2001)03-0197-06

中国对虾血淋巴凝集素的血凝活性与促噬活性

彭其胜, 郭文场, 杨振国, 王玉平, 田相利

(解放军军需大学动物科技系, 吉林 长春 130062)

摘要:1999年8月,运用血凝活性测定法分别检测中国对虾血淋巴凝集素、血淋巴液、血细胞、肌肉、肠、肝胰腺和甲壳的血凝活力,并运用吖啶橙血细胞吞噬测定法检测血细胞的吞噬活力,同时测定了经注射中国对虾副粘病毒提纯液后血淋巴凝集素血凝活力及血淋巴液抗菌活力、酚氧化酶活力、溶菌活力。结果表明,血淋巴凝集素主要分布在血淋巴液和血细胞中;该凝集素对人(A、B、O型)、鸡和兔红细胞及其醛化红细胞的凝集具有一定专一性;对血细胞吞噬异物具有促进功能;注射副粘病毒提纯液后,血淋巴凝集素凝集活力变化和血淋巴液抗菌活力、酚氧化酶活力、溶菌活力变化相一致。

关键词:中国对虾;血淋巴凝集素;血凝活性;促噬活性

中图分类号:Q464;S917 **文献标识码:**A

Hemagglutinating activity and facilitated phagocytosis of *Penaeus chinensis* hemolymph agglutinin

PENG Qi-sheng, GUO Wen-chang, YANG Zhen-guo, WANG Yu-ping, TIAN Xiang-li

(Faculty of Animal Sciences and Veterinary Medicine,

The Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract: In August, 1999, hemoagglutinating method was applied to measure hemagglutinating activity of *Penaeus chinensis* hemolymph agglutinin (HA), hemolymph, hemocyte, muscle, gut, crust and hepatopancreas respectively. Meanwhile, acridine orange (AO) method was used to measure the phagocytosis activity of hemocyte of cultured *P. chinensis*. This paper also deals with measurement of HA hemagglutinating, antibacterial, bacteriolytic, and phenoloxidase (PO) activity of hemolymph after injection of the purified solution of penaeid shrimp paramyxovirus-like virus. The following results have been obtained: (1) HA is mainly in hemolymph and hemocyte of *P. chinensis*. (2) HA is able to agglutinate specially human A, B, O-type, rabbit, chicken erythrocytes or aldehyde-erythrocytes, respectively. (3) HA is able to facilitate phagocytosis of the hemocytes of *P. chinensis*. (4) The same change was found among HA hemagglutinating, antibacterial, bacteriolytic and PO activity of hemolymph after injection of the purified solution of penaeid shrimp paramyxovirus-like virus.

Key words: *Penaeus chinensis*; hemolymph agglutinin; hemagglutinating activity; facilitated phagocytosis

收稿日期:2000-07-25

资助项目:中国人民解放军总后军需部课题(960312)

第一作者:彭其胜(1969-),男,湖北潜江人,硕士,讲师,主要从事水产微生物及免疫学研究。E-mail:pqs@qjip.wjgw.net

凝集素(agglutinin)是指所有非免疫原的能凝集细胞或沉淀含糖大分子的蛋白质或糖蛋白。它首次被发现于蓖麻籽抽提液中,距今已有一百多年。早年在研究凝集素作用时,人们的注意力主要集中在它们的外源作用,如促使细胞凝集和细胞有丝分裂。近年来,随着纯化的凝集素种类增加,人们注意到它在机体内的生理功能,如细胞与细胞间的粘附,受体介导的胞饮。更重要的是,人们发现海产无脊椎动物血淋巴中存在的凝集素具有替代免疫球蛋白的功能,并在识别异物等机体防御中发挥着重要作用^[1]。目前,国内外有关中国对虾(*Penaeus chinensis*)的血淋巴凝集素(hemolymph agglutinin, HA)的研究尚少^[2-4],本文对中国对虾血淋巴凝集素的部分性质进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1999年8月12日,从青岛海洋大学红岛养殖场购得供试验用的健康中国对虾200尾(体长:10~15cm,体重:20~25g),暂养3d后,随机分组,每组7尾,置于30cm×40cm×40cm玻璃缸内,水温20~25℃,24h充气,水深30cm,每3天换30%体积的净化天然海水,早、晚各投喂1次,食后清除残饵。

1.2 分组试验

实验分为3组,每组7尾。第1组置于正常条件下养殖;第2组注射20 μ L对虾生理盐水^[5];第3组注射20 μ L中国对虾副粘病毒提纯液^[6]。分别24h、72h、144h后取对虾血淋巴液做各项活力测定。

1.3 中国对虾血淋巴液的制备

用经高压灭菌的1mL、5号针头注射器,从中国对虾围心腔内抽取血样,置于2mL eppendorf管,经3000 r·min⁻¹离心10min,吸出上清液(血淋巴液),-20℃保存。

1.4 中国对虾血细胞稀释液和血细胞破碎上清液的制备

参照文献[7]的方法进行,实验中稍作修改。

试剂:肝素,对虾生理盐水参照文献[5]的配方,缓冲液1、缓冲液2、缓冲液3按文献[7]的配方。所有试剂置于4℃冰箱保存,现用现取。

方法:用装有0.1mL干素灭菌的1mL、5号针头注射器抽取对虾全血,置于4℃冰箱1~2h,加入缓冲液13000 r·min⁻¹离心10min,弃上清液,沉淀加入缓冲液2,进行3000 r·min⁻¹离心10min,弃上清液,重复该步骤2次,沉淀加入缓冲液33000 r·min⁻¹离心10min,弃上清液,沉淀加入对虾生理盐水,3000 r·min⁻¹离心10min,沉淀为对虾血细胞,加入对虾生理盐水至原全血2倍即为对虾血细胞稀释液,反复冻融对虾血细胞就得到了血细胞破碎上清液,用于测定血凝活力。

1.5 中国对虾肠、甲壳、肌肉、肝胰腺抽提液的制备

分别取出一小块肠、甲壳、肌肉、肝胰腺用滤纸将血淋巴液或水尽量吸净,在pH7.2的0.9%生理盐水中按1:3(w/v)匀浆,10000 r·min⁻¹离心6min,保留上清液,上清液用于测定血凝活力。

1.6 血淋巴凝集素的分离、纯化

通过(NH₄)₂SO₄盐析、DEAE-sepharose离子梯度层析、S-200-HR凝胶层析从中国对虾血淋巴液中纯化出PCA^[8]。

1.7 血凝活性测定

以 Alsever's 液为抗凝剂分别采取鸡、兔、牛、马、羊、鼠及人的(A、B、O型)血,用0.9%生理盐水充分洗涤^[9],然后 $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3min,弃去上清液,重复4次洗涤,最后1次 $2\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3min,用0.9%生理盐水配制成2%的红细胞悬液,置于4℃冰箱,备用。

参考文献^[9]的方法将上述动物红细胞制成10%醛化红细胞。使用前经0.9%生理盐水充分洗涤,然后 $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心2次,弃去上清液,每次3min,用0.9%生理盐水配制成2%的红细胞悬液,置于4℃冰箱,备用。

测定HA凝集活力时,先用0.9%生理盐水将HA稀释至原血淋巴体积,以后步骤同其它物质凝集活力测定:在微型“V”型血凝板上,用0.9%生理盐水 $25\ \mu\text{L}$ 对 $25\ \mu\text{L}$ 待测物进行倍比稀释,加入相应的红细胞,在微型振荡器上振荡1min后,室温下静置1h或在4℃冰箱静置4h,观察结果。如红细胞不发生凝集,则在“V”型板的孔内,红细胞沉于V型孔底形成一界线清晰的红色小点;如果发生凝集则红细胞之间形成一似网络状扩散的红斑块。

1.8 中国对虾血细胞吞噬活性测定

参照文献^[10]的方法进行,实验中稍作修改。

吞噬用菌制备:用磷酸盐缓冲液生理盐水(PBSS, $0.02\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.2)洗涤金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,由本系微生物教研室提供)胰蛋白胨肉汤培养物($37\ \text{C}$ 18~24h), $2\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5min,弃上清,重复离心洗涤菌体2次。用PBSS经620nm 751分光光度计读数调节金黄色葡萄球菌浓度至每毫升 $10^6\sim 10^7$ 个,该菌体悬液置于4℃冰箱备用。

吞噬:实验分为5组。第1组,在1支10mL离心管中加入1.0mL对虾生理盐水和0.1mL HA,混匀后置 $30\ \text{C}$ 振摇2h,之后加入4℃对虾生理盐水^[5]3.0mL, $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3min,分别收集上清液和沉淀,测定上清液的酚氧化酶活力和对醛化鸡红细胞的凝集活力,沉淀用于测定吞噬活力;第2组,在1支10mL离心管中加入1.0mL血细胞稀释液和0.1mL HA,其余步骤同第1组;第3组,在1支10mL离心管中加入0.5mL金黄色葡萄球菌悬液和0.1mL HA,其余步骤同第1组;第4组,在1支10mL离心管中加入0.5mL金黄色葡萄球菌悬液和1.0mL血细胞稀释液,其余步骤同第1组;第5组,在1支10mL离心管中加入0.5mL金黄色葡萄球菌悬液、1.0mL血细胞稀释液和0.1mL HA,其余步骤同第1组。

染色:取上述沉淀,加入0.28%吖啶橙染液,染色1min, $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3min,弃上清,沉淀用对虾生理盐水 $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 3min离心洗涤2次,弃上清,沉淀悬浮在对虾生理盐水,置于4℃冰箱备检。

吞噬活力计算:用紫外显微镜计数100个血细胞,吞噬活力(%)=有吞噬作用的细胞数/100×100。

1.9 活力测定

中国对虾血淋巴液抗菌活力、酚氧化酶活力、溶菌活力测定参照文献^[11]的方法进行。

2 结果

2.1 血淋巴凝集素及中国对虾几种组织血凝活性测定

中国对虾几种组织中只有血细胞破碎上清液和血淋巴液对动物红细胞具有凝集活性,且血淋巴液对实验的九种红细胞的凝集活性相同;HA对人(A、B、O型)、兔和鸡红细胞的凝集活力都是128:1,且高于对牛、鼠、羊和马红细胞的凝集活力,表现出一定专一性(表1)。

表 1 HA 及中国对虾几种组织对动物红细胞的血凝情况

Tab.1 Hemagglutinating activity of HA and several tissues of *P. chinensis* to erythrocytes from different animal

凝集原	红 细 胞								
	人 A	人 B	人 O	牛	鼠	兔	鸡	羊	马
血淋巴凝集素	128:1	128:1	128:1	8:1	16:1	128:1	128:1	4:1	8:1
血淋巴液	32:1	32:1	32:1	32:1	32:1	32:1	32:1	32:1	32:1
破碎上清液	8:1	8:1	8:1	2:1	4:1	8:1	8:1	2:1	2:1
肌肉	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
肠	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
肝胰腺	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
甲壳	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1

2.2 血淋巴凝集素和中国对虾血淋巴液对醛化动物红细胞血凝活性的测定

实验结果显示,HA 和血淋巴液对醛化红细胞与未醛化红细胞凝集活力保持不变(表 2)。同时,在实验中我们还发现用 4℃ 冰箱保存一年的醛化鸡红细胞测定 HA 和血淋巴液的凝集活力与采用新鲜鸡红细胞测定,结果相同(分别为 128:1、32:1)。因此,可用醛化鸡红细胞作为 HA 凝集活力测定红细胞。

2.3 血淋巴凝集素的促噬活性

从第 2、3 组可以看出,上清液中 HA 含量减少,从而导致 HA 凝集活力比第 1 组低,说明 HA 不仅能与对虾血细胞结合,也能与金黄色葡萄球菌结合;而且 HA 与血细胞结合后,活化了虾血细胞,从而导致了第 2 组酚氧化酶活力升高;第 4 组中,血细胞表现出一定吞噬活力,酚氧化酶活力比第 1 组升高很小,说明血细胞被活化的程度很小,因而导致吞噬活力明显低于第 5 组;第 5 组中,加入 HA 后,酚氧化酶活力明显比第 1 组升高,HA 凝集活力下降,表明 HA 与血细胞和金黄色葡萄球菌结合后,活化了血细胞,促进了血细胞对菌体细胞的吞噬(表 3)。

2.4 血淋巴液中的活力变化情况

组 1 与 2 组的凝集活力、酚氧化酶活力、抗菌活力、溶菌活力无显著差异,3 组与 1、2 组凝集活力、酚氧化酶活力、抗菌活力、溶菌活力有显著差异;注射中国对虾副粘病毒提纯液后对虾血淋巴液中的 HA 凝集活力、酚氧化酶活力、抗菌活力和溶菌活力都趋向降低(表 4)。

表 2 HA 和中国对虾血淋巴液对醛化动物红细胞血凝情况

Tab.2 Hemagglutinating activity of HA and hemolymph to different aldehyde-erythrocytes

凝集原	醛化红细胞				
	人 A	人 B	人 O	兔	鸡
血淋巴凝集素	128:1	128:1	128:1	128:1	128:1
血淋巴液	32:1	32:1	32:1	32:1	32:1

表 3 吞噬活力、酚氧化酶活力和凝集活力测定

Tab.3 Measurement of phagocytosis, PO and hemagglutinating activity

活力测定	组别				
	1	2	3	4	5
吞噬活力	0	0	0	8%	43%
酚氧化酶活力	0	1.2	0.1	0.2	1.4
凝集活力	16:1	4:1	2:1	2:1	8:1

表 4 注射中国对虾副粘病毒提纯液后中国对虾血淋巴液中的
HA 凝集活力、酚氧化酶活力、抗菌活力和溶菌活力测定

Tab.4 Measurement of HA, PO, antibacterial and bacteriolytic activity in the hemolymph of
P. chinensis after injection of the purified solution of penaeid shrimp paramyxovirus-like virus

组别	取样时间 (h)	活力测定			
		凝集活力	酚氧化酶活力	抗菌活力	溶菌活力
1	24	128:1	4.01	0.201	0.032
	72	128:1	4.12	0.205	0.037
	144	128:1	4.03	0.202	0.040
	24	32:1	4.09	0.209	0.030
2	72	128:1	4.01	0.209	0.040
	144	128:1	4.00	0.204	0.037
	24	1:1	3.01	0.151	0.010
3	72	8:1	2.11	0.162	0.090
	144	8:1	1.20	0.170	0.008

3 讨论

HA、血淋巴液和血细胞破碎上清液凝集相同的红细胞,只是凝集活力不一样,由于虾体内其它组织没有发现凝集活性,可以说明 HA 主要存在于血淋巴液和血细胞中。牟海津等^[4]认为中国对虾的血细胞膜上没有凝集素,凝集素存在于血淋巴液中,可能由于作者采用对虾血细胞凝集素粗提液的制备方法和他不同,因而在对虾血细胞中检测出凝集素。James 和 David Jr^[12]认为龙虾(*Homarus americanus*)血细胞和血淋巴液含有相同凝集素,这种凝集素可与某些脊椎动物红细胞结合,Hall 观点与作者一致。至于中国对虾血淋巴液中的 PCA 是否由血细胞释放,尚需进一步实验。

血淋巴液对人(A、B、O型)、牛、鼠、兔、鸡、羊和马红细胞凝集没有选择性,HA 对这些红细胞凝集具有一定的选择性,导致这种结果可能是由于血淋巴液中含有多种凝集素,血淋巴液对红细胞凝集可能是多种凝集素对红细胞凝集的综合表现。表 2 说明,红细胞醛化过程中其上结合凝集素的糖苷键并没有被破坏,可以用醛化红细胞来测定 HA 和血淋巴液的凝集活力。实验还表明,用醛化鸡红细胞测定血淋巴液和 HA 的凝集活力稳定,可能是由于鸡红细胞膜比较厚,醛化后易保存且糖苷键不易被破坏。目前,国内采用洗涤的新鲜红细胞来测定凝集素凝集活力^[2-4]的方法,费时、费工,如改用醛化红细胞测定凝集活力,会带来方便。

凝集素促进无脊椎动物血细胞吞噬作用表现在两个方面:一方面是凝集素结合在异物上为血细胞识别,从而诱导对异物的吞噬,另一方面是凝集素促进血细胞活化,从而诱导血细胞中各种酶类释放,将入侵的异物灭活^[1]。本实验表明,HA 具有促噬活性,能促进对虾血细胞对异物的吞噬。这与 James 和 David Jr^[12]认为龙虾的凝集素能促进血淋巴细胞的吞噬功能的观点一致,但是,目前尚不清楚 HA 促进血细胞吞噬异物的机理。

在确立中国对虾非特异免疫指标时,王雷等^[11]通过测定血淋巴液中的酚氧化酶活力、抗菌活力、溶菌活力来反应对虾的免疫状况。但是,由于对虾不象其它高等动物可以连续抽取血样,而且实验对虾之间的体质有差异。因此,向中国对虾注射一定剂量副粘病毒后,HA 凝集活力变化和酚氧化酶活力、抗菌活力、溶菌活力变化的一致性,只能是一种定性趋势,结合 HA 对异物吞噬具有调理作用,能否提出 HA 凝集活力可以作为一项中国对虾非特异免疫指标,尚需进一步实验。

实验中得到了卢强博士提供中国对虾副粘病毒提纯液、岳玉环博士大力支持,谨致谢意。

参考文献:

- [1] 陈昌福. 海产无脊椎动物淋巴液植物凝集素与机体防御[J]. 鱼类病害研究, 1998, 20(3-4): 58-59.
- [2] 罗日祥. 中国对虾凝集活力及弧菌的诱导动力学[J]. 海洋学报, 1997, 19(4): 117-120.
- [3] 罗日祥. 中药制剂对中国对虾免疫活性物的诱导作用[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(6): 573-576.
- [4] 牟海津, 江晓路, 刘树青, 等. 中国对虾血细胞凝集素的性能研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 32-35.
- [5] Cornick J W, Stewardt J E. Lobster (*Homarus americanus*) haemocytes: classification, differential counts and associated agglutinin[J]. J Invertebr Pathol, 1978, 31: 194-196.
- [6] 岳玉环, 黎诚耀, 杨振国, 等. 中国对虾副粘病毒样病毒的细胞分离培养[J]. 中国兽医学报, 1997, 17(3): 306-307.
- [7] Ashida M, Kenneth Söderhäll. The prophenoloxidase activating system in crayfish[J]. Comp Biochem Physiol, 1984, 77B(1): 21-26.
- [8] 彭其胜, 郭文场, 杨振国, 等. 中国对虾血淋巴液中的凝集素[J]. 中国水产科学, 2000, 7(4): 14-18.
- [9] 王世若, 王兴龙, 韩文瑜. 现代动物免疫学[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1996. 354-358.
- [10] 杜爱芳, 蔡渭明, 于 涟. 中国对虾血细胞吞噬功能的研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(2): 1-5.
- [11] 王 雷, 李光友, 毛远兴. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化活力的测定及其特性研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(2): 179-184.
- [12] James L H, David T R Jr. Heterogeneity of lobster agglutinins II. specificity of agglutinin-erythrocyte binding[J]. Biochemistry, 1974, 13(4): 828-832.

《水产学报》编委会五届一次会议在大连召开

2001年6月13日,《水产学报》编辑部假借中国水产学会会员代表大会召开之际,在美丽的海滨城市大连召开了《水产学报》五届一次编委会议。会议由周应祺主任委员主持,编辑部主任卢怡同志首先就《水产学报》近年来的工作情况和取得的成绩作了简要汇报,并对今后的工作提出了一些设想。编委们根据学报工作面临的形势与任务进行了热烈的讨论。在肯定了学报这几年来所取得的成绩的同时,提出了许多建设性的意见。编辑部根据会议讨论的意见,制订出了新的工作计划,并印发给各位编委。

《水产学报》编辑部