

文章编号: 1000- 0615(2003)05- 0415- 05

七种常见养殖鱼血清胰酶抑制活性的比较

黄素文, 陆承平

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: α_2 巨球蛋白能结合并抑制蛋白酶的活性, 但不抑制该蛋白酶对人工合成的小分子底物的酶活。利用这一特性, 选择胰酶的一种有色小分子底物 BAPNA, 建立 BAPNA 比色检测法, 对 7 种常见养殖鱼: 草鱼、鲫、鲢、胡子鲇、鳙、加州鲈和黄鲢的血清胰酶抑制活性进行了比较, 胰酶抑制活性由高到低依次为: 草鱼 > 鲫 > 黄鲢 > 鳙 > 鲢 > 胡子鲇 > 加州鲈; α_2 巨球蛋白活性由高到低依次为: 黄鲢 > 草鱼 > 胡子鲇 > 加州鲈 > 鳙 > 鳙 > 鲫; 黄鲢和草鱼的 α_2 巨球蛋白活性明显高于其他几种鱼的 α_2 巨球蛋白活性。

关键词: α_2 巨球蛋白; 胰酶抑制活性

中图分类号: Q55; S917 文献标识码: A

Serum trypsin-inhibitory activity in seven species of cultured fish

HUANG Su-wen, LU Cheng-ping

(Key Lab of Animal Disease Diagnostics and Immunology, Ministry of Agriculture,
Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The trypsin-inhibitory activity of the seven cultured fish species, *Ctenopharyngodon idellus*, *Carassius auratus*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Clarias fuscus*, *Aristichthys nobilis*, *Micropterus salmonoides* and *Monopterus albus* were investigated. Individual fish were bled and the trypsin inhibitory activity analysed using an arginine-aniline dye ester as colorimetric substrate. Results indicated the total trypsin inhibitory decreased from *Ctenopharyngodon idellus* through *Carassius auratus*, *Monopterus albus*, *Aristichthys nobilis*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Clarias fuscus* and *Micropterus salmonoides* with the lowest level. Analysis of the α_2 -macroglobulin activity indicated a ranking with decreasing concentration of *M. albus*, *C. idellus*, *C. fuscus*, *M. salmonoides*, *H. molitrix*, *A. nobilis* and *C. auratus*. The results showed that *M. albus* had the highest α_2 -macroglobulin activity, whereas *C. idellus* possess a higher level of trypsin-inhibitory activity than the other five species.

Key words: α_2 -macroglobulin; trypsin-inhibitory activity

非特异性免疫机制是鱼类抵抗病原菌的第一道防线, 主要包括微生物生长抑制剂、酶抑制剂、细胞溶素、凝集素和沉淀素等^[1]。病原菌侵入宿主时常会释放出一些酶来帮助其穿透宿主组织并获取其所需的养分。而宿主组织和血液中含有的各种酶抑制剂就会发挥作用, 这些抑制剂包括蛋白酶抑制剂, 其中 α_2 巨球蛋白(α_2 -macroglobulin, α_2 M)是最重要的蛋白酶抑制剂之一^[1,2]。 α_2 M 具有维持内环境稳定和

收稿日期: 2002-05-27

作者简介: 黄素文(1972-), 男, 浙江衢县人, 硕士, 主要从事鱼类病原微生物学研究。Tel: 025- 4395328, E-mail: huangsuw@sina.com.cn

通讯作者: 陆承平(1945-), 男, 上海人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事兽医微生物与免疫学研究。Tel: 025- 4430825, E-mail: dvmi@njau.edu.cn

保护宿主免受病原菌胞外蛋白酶损伤的双重功效,几乎所有的蛋白酶都能被 α_2 巨球蛋白抑制,同时它是血清中唯一能抑制杀鲑气单胞菌胞外蛋白酶的抗蛋白酶成分^[3]。

α_2 M 与其他蛋白酶抑制剂作用机理不同,并非通过直接作用于蛋白酶的活性中心来灭活蛋白酶。这一特性将 α_2 M 与其他蛋白酶抑制剂区分开来。 α_2 M 分子中有一个“诱饵区”,当蛋白酶作用于“诱饵区”时, α_2 M 的空间构象就会发生变化,像笼子一样将蛋白酶“捕获”,蛋白酶的天然大分子底物无法接近蛋白酶活性中心,所以不能被水解;而人工合成的小分子底物 BAPNA 能够进入这个笼子,仍可以被降解产生黄色的对硝基胺^[4]。因此, α_2 M 的检测可以直接用全血清而无需分离。本文检测了 7 种常见养殖鱼血清的胰酶抑制活性,主要目的是为了比较这 7 种鱼的 α_2 M 活性。

1 材料和方法

1.1 实验用健康鱼

购自南京卫岗农贸市场:草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) 每尾 1.0~1.5kg,加州鲈(*Micropterus salmoides*) 每尾 0.2~0.3kg,黄鳝(*Monopterus albus*) 约每尾 0.1kg,鳙(*Aristichthys nobilis*) 每尾 1.0~1.5kg,鲫(*Carassius auratus*) 每尾 0.1~0.2kg,胡子鲇(*Clarias fuscus*) 每尾 0.2~0.3kg,鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*) 每尾 0.5~1.0kg,无菌尾动脉采血,分离血清,-20℃保存备用。

1.2 试剂

胰酶(Sigma 公司,批号:80K7656)用 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl(pH8.2) 缓冲液配成 $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度;BAPNA(N α -Benzoyl-DL-arginine-nitroaniline HCl, BAPNA, Sigma 公司,批号:69H0959)溶于 85℃的纯水中,浓度为 $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,0.22 μm 的滤膜过滤去除沉淀,冷却至 28℃备用,每次用时需新鲜配制。

1.3 α_2 M 的检测

血清样品(10 μL)与一定量的浓度为 $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胰酶(0、2、4、6、8、10、12、14、16 μL) 28℃反应 10min,再加入 0.5mL 胰酶底物 BAPNA($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和一定量的 $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl(pH8.2) 使其终体积为 0.85mL,28℃反应 25min,最后用 30% 冰乙酸 150 μL 终止反应(冰水浴条件下),410nm 测吸光值。以吸光值为纵坐标,胰酶的量横坐标作图。按图 1 所示回归分析鱼血清中 α_2 M 含量和全血清胰酶抑制量^[5]。标准曲线的测定为只加胰酶不加血清,其他条件同上。本次实验每种鱼分别取 3 个样本,每个样本设 1 个重复。

2 结果

鱼血清抑制胰酶降解 BAPNA 的曲线分 3 个阶段(图 1):起始,添加胰酶的量很少,随着胰酶量的增加,结合在 α_2 M 上的胰酶量也不断增加,降解 BAPNA 的活性就不断变大,曲线呈上升趋势;而当所有的 α_2 M 能结合胰酶的位点都饱和后,其他的胰酶抑制剂开始发挥作用,这时降解活性不再随胰酶量的变化而改变,曲线趋向平稳;最后当胰酶的量超出血清的最大抑制量范围时,这时,降解活性又随胰酶量的增加而变大,曲线又呈直线上升态势。通过这个检测,就可以同时计算出 α_2 M 和全血清结合的胰酶的量。

对第二阶段的曲线作回归分析,作回归分析直线 B,与标准曲线的交点对应的 X 轴的值就是 α_2 M 所能结合的胰酶的量。同样,对最后一阶段的曲线作回归分析便可以推算出全血清所能结合的胰酶的量(图 2)。

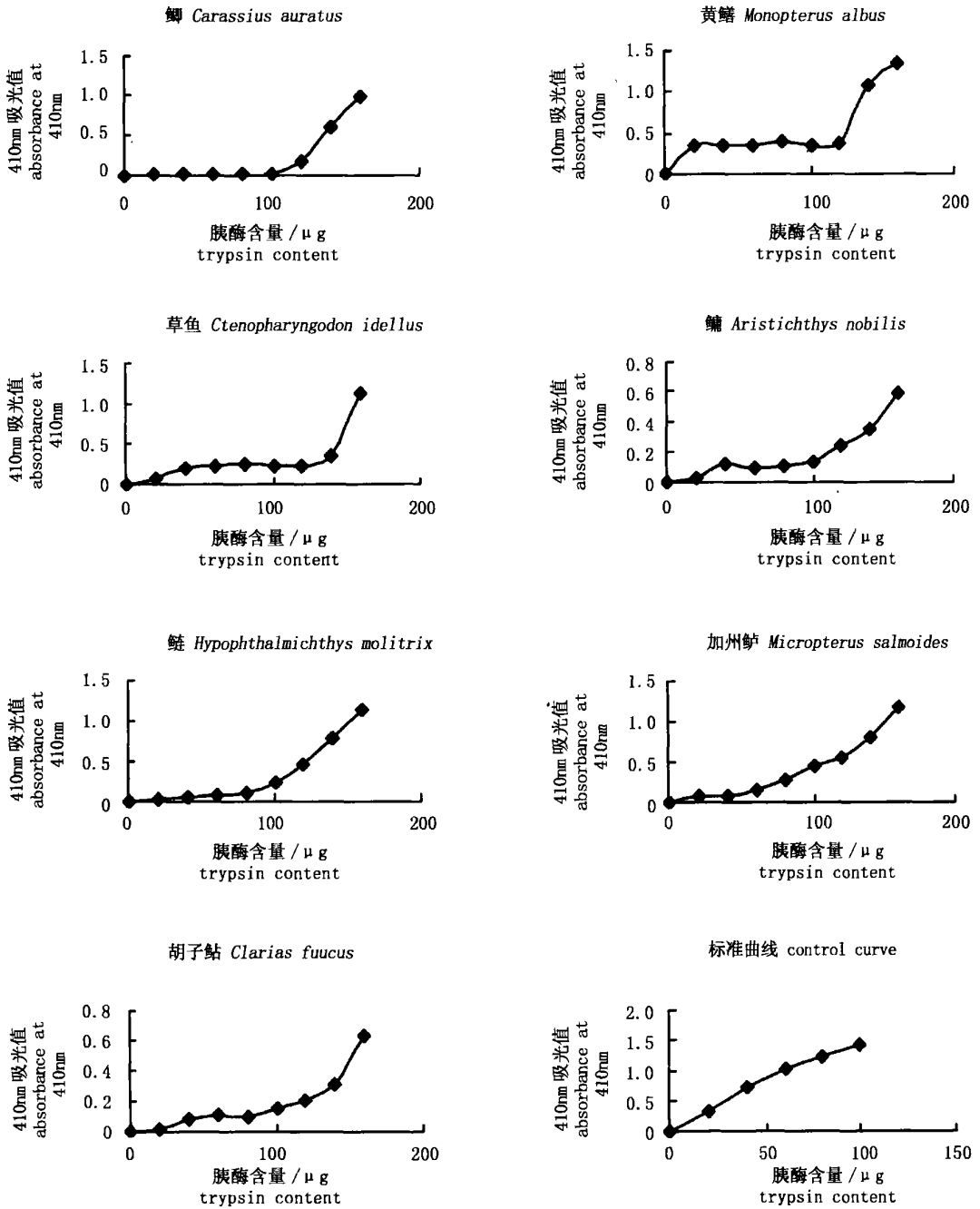


图 1 7 种鱼血清抑制胰酶降解 BAPNA 曲线图

Fig. 1 Trypsin activity determined by the hydrolysis of BAPNA after incubation with fish serum from seven different species

根据统计分析, 7种常见养殖鱼的 α_2M 的胰酶结合量由高到低依次为: 黄鳢> 草鱼> 胡子鲇> 加州鲈> 鲢> 鳙> 鲫, 黄鳢和草鱼的较高, 鲫的最低; 全血清的胰酶结合量的高低顺序为草鱼> 鲫> 黄鳢> 鳙> 鲢> 胡子鲇> 加州鲈, 草鱼、鲫和黄鳢的较高, 而加州鲈的最低(表1)。经差异显著性分析, 黄鳢 α_2M 的胰酶结合量显著高于草鱼($P < 0.05$), 极显著高于其它5种鱼($P < 0.01$); 草鱼 α_2M 的胰酶结合量极显著高于胡子鲇、加州鲈、鲢、鳙、鲫($P < 0.01$); 鲫 α_2M 的胰酶结合量最低($P < 0.01$)(表2)。

3 讨论

α_2M 是存在于人和动物体内的一种大分子糖蛋白, 具有多种功能^[1,2,6]。国内关于人等高等动物的 α_2M 的研究报道较多, 但尚未涉及鱼类动物的 α_2M 。孙建和等^①在研究嗜水气单胞菌时, 发现草鱼血清对嗜水气单胞菌有抑制作用。习彩霞和陆承平^[2]进一步研究草鱼对嗜水气单胞菌的天然抗性成分, 发现草鱼血清中存在 α_2M , 且能抑制嗜水气单胞菌胞外蛋白酶的活性, 推测草鱼对嗜水气单胞菌的天然抗性可能与 α_2M 有关^[2]。

表1 7种鱼血清中 α_2M 所能抑制胰酶的量 and 全血清所能抑制胰酶的量

Tab.1 Value of α_2M and total trypsin-inhibitory activity

mg mL⁻¹

鱼的种类 fish species	α_2M 抑制的胰酶量 α_2M trypsin-inhibitory capacity	全血清抑制的胰酶量 total trypsin-inhibitory capacity
黄鳢 (<i>M. albus</i>)	2.13 ± 0.073	11.97 ± 0.101
草鱼 (<i>C. idellus</i>)	1.18 ± 0.024	13.6 ± 0.032
胡子鲇 (<i>C. fuscus</i>)	0.433 ± 0.031	8.19 ± 0.058
加州鲈 (<i>M. salmonoides</i>)	0.386 ± 0.047	4.84 ± 0.027
鲢 (<i>H. molitrix</i>)	0.345 ± 0.032	8.77 ± 0.043
鳙 (<i>A. nobilis</i>)	0.196 ± 0.013	9.14 ± 0.057
鲫 (<i>C. auratus</i>)	0.135 ± 0.021	12.22 ± 0.23

表2 7种鱼血清中 α_2M 所能抑制胰酶量的比较

Tab.2 Probability matrix for the pairwise comparison of the α_2M estimates among seven species

	黄鳢 <i>M. albus</i>	草鱼 <i>C. idellus</i>	胡子鲇 <i>C. fuscus</i>	加州鲈 <i>M. salmonoides</i>	鲢 <i>H. molitrix</i>	鳙 <i>A. nobilis</i>	鲫 <i>C. auratus</i>
黄鳢 <i>M. albus</i>	1						
草鱼 <i>C. idellus</i>	< 0.05	1					
胡子鲇 <i>C. fuscus</i>	< 0.01	< 0.01	1				
加州鲈 <i>M. salmonoides</i>	< 0.01	< 0.01	> 0.05	1			
鲢 <i>H. molitrix</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.05	> 0.05	1		
鳙 <i>A. nobilis</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.05	< 0.05	< 0.05	1	
鲫 <i>C. auratus</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.05	< 0.05	< 0.05	> 0.05	1

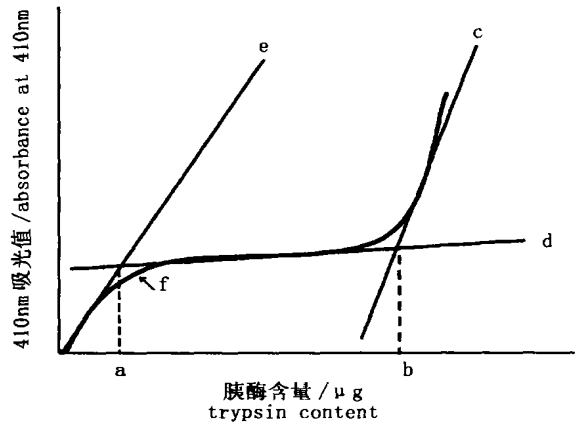


图2 α_2 巨球蛋白和全血清结合胰酶量的回归分析

Fig.2 Graphical showing application of statistical of data curve to produce estimates of the value for α_2 macroglobulin and total trypsin-inhibitory activity

注: a: α_2M 结合胰酶的量; b: 全血清结合胰酶的量; c: 回归分析直线 A; d: 回归分析直线 B; e: 标准曲线; f: 胰酶抑制曲线
Notes: a: α_2M trypsin-inhibitory capacity; b: total trypsin-inhibitory capacity; c: regression line A; d: regression line B; e: control curve; f: results curve

① 孙建和等. 草鱼血清对嗜水气单胞菌的天然抗性物质的发现, 全国兽医微生物学与病毒学学术研讨会论文汇编, 1994.

嗜水气单胞菌胞外蛋白酶是嗜水气单胞菌重要的毒力因子之一,可以帮助该菌穿透宿主的防护屏障并释放出其生长所需的营养成分,同时引起宿主的败血症。储卫华和陆承平^[7]利用转座子 Tn916 诱变得嗜水气单胞菌胞外蛋白酶缺失株,发现该缺失株对鲫的致病力大大降低;以该缺失株作为疫苗具有良好的保护作用,这表明抑制嗜水气单胞菌胞外蛋白酶的活性就可以有效地控制该菌的感染。草鱼的 α_2M 能抑制嗜水气单胞菌胞外蛋白酶,且活性较高,约为鲫的 16 倍,进一步证实了为什么草鱼对嗜水气单胞菌不易感而鲫易感。

Freedman^[8]在研究杀鲑气单胞菌时有类似发现,美洲红点鲑易感染杀鲑气单胞菌,虹鳟不易感,比较两者的 α_2M 活性,结果表明,不易感性与 α_2M 有关,虹鳟 α_2M 对杀鲑气单胞菌的胞外蛋白酶的抑制作用几乎是美洲红点鲑的 10 倍。 α_2M 独特作用方式和抑蛋白酶的广谱性表明它是一种重要的血清非特异性免疫因子,对不同鱼类 α_2M 进行比较,有助于认识它们对嗜水气单胞菌等病原菌存在的天然抗性。

参考文献:

- [1] Zhang Y A, Nie P. Humoral immune factors of fish: a review[J]. J Fish China, 2000, 24(4): 376- 381. [张永安, 聂品. 鱼类体液免疫因子研究进展[J]. 水产学报, 2000, 24(4): 376- 381.]
- [2] Alexander J B, Ingram G A. Nonspecific defense mechanisms of fish[J]. Ann Rev Fish Dis, 1992, 2: 249- 279.
- [3] Ellis A E. Inhibition of the *Aeromonas salmonicida* extracellular protease by α_2 -macroglobulin in serum of rainbow trout[J]. Microbial Pathogenesis, 1987, (3): 167- 177.
- [4] Starkey P M, Barrett A J. Evolution of α_2 -macroglobulin[J]. Biochem J, 1982, 205: 97- 104.
- [5] Ellis A E. Serum antiproteases in fish [J]. Techniques in Fish Immunology, 1990: 95- 99.
- [6] Xi C X, Lu C P. Proteinase inhibitory and mucous secrets being of resistance in grass carp to *Aeromonas hydrophila*[D]. Master Thesis, Nanjing Agricultural University, 2000. [习彩霞, 陆承平. 草鱼血清对嗜水气单胞菌天然抗性成分的研究[D]. 南京农业大学硕士学位论文, 2000.]
- [7] Chu W H, Lu C P. Screening the reduced virulent protease deficient mutant of *Aeromonas hydrophila* by Tn916 transposon insertions[J]. [储卫华, 陆承平. 筛选用转座子 Tn916 诱变的具有免疫原性的嗜水气单胞菌胞外蛋白酶缺失株[J]. 水产学报, 2001, 25(3): 244- 248.]
- [8] Freedman S J. The role of α_2 macroglobulin in fununcubsis: a comparison of rainbow trout and brook trout[J]. Comp Biochem Physiol, 1991, 98B(4): 549- 553.