

文章编号: 1000-0615(2001)05-0419-05

插核手术对合浦珠母贝免疫水平的影响

周畅¹, 谢莉萍², 张荣庆²

(1. 清华大学生物科学与技术系, 北京 100084; 2. 清华大学海洋科学与工程研究中心, 北京 100084)

摘要:对插核手术前后合浦珠母贝血清的超氧化物歧化酶(SOD)活力、溶菌活力和抗菌活力以及血细胞的吞噬活性进行了比较研究。结果表明:插核手术后贝血清的SOD活力明显上升,溶菌、抗菌活力明显下降,血细胞的吞噬活性降低,化学发光的各种参数显著改变,说明贝的体液和细胞免疫水平都明显降低。据此推断手术贝的免疫力低下是导致手术贝高死亡率的最根本原因。

关键词:合浦珠母贝;插核技术;免疫水平

中图分类号:S917 **文献标识码:**A

Effect of pearl-nucleus-inserting operation on immune level in *Pinctada fucaca*

ZHOU Chang¹, XIE Li-ping², ZHANG Rong-qing²

(1. Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2. Center for Ocean Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: SOD, bacteriolytic and antibiotic activity in serum as well as phagocytosis of hemocytes in *Pinctada fucaca* (Dunker) were investigated with chemiluminescence. The results showed that after pearl-nucleus-inserting operation, the activity of SOD increased; however, the bacteriolytic and antibiotic activity, and phagocytosis ability decreased significantly. It suggests that the operation results in lower immune level of the shellfish, which further induces higher mortality rate of the operated animals.

Key words: *Pinctada fucaca*; pearl-nucleus-inserting operation; immune level

合浦珠母贝 (*Pinctada fucaca* Dunker) 是培育海水珍珠的主要种类,人工育珠插核手术后的死亡率较高,已成为困扰珍珠养殖业发展的大问题。如何建立一套有效的贝类免疫水平的评价体系,据此筛选针对性的免疫调节剂提高手术贝的免疫力,就成了迫切需要解决的问题。

贝类的免疫为非特异性的低等免疫,有细胞免疫与体液免疫两种方式。已有研究表明,贝类的吞噬细胞在防御有害生物入侵时,能够产生具有强烈杀菌作用的各种活性氧,同时伴有微弱闪光现象^[1,2],从而在免疫防御反应中发挥了重要的作用。化学发光的强弱可反映血细胞吞噬活性的强弱,即血细胞杀菌机能的强弱。目前,化学发光法已在生物和医学研究领域得到广泛应用^[3]。国内外有关的研究工作多集中于扇贝、鲍鱼等经济贝类^[4,5],合浦珠母贝的相关研究还未见报道。

收稿日期:2000-08-17

基金项目:国家海洋“863”资助项目(819-02-03)

第一作者:周畅(1976-),男,湖北武汉人,清华大学在读博士研究生,从事贝类免疫的分子机制的研究。Tel:010-62772900, E-mail:rqzhang@mail.tsinghua.edu.cn

本文分别从细胞和体液免疫两个方面分析比较了插核手术前后合浦珠母贝免疫力的变化,将血细胞吞噬过程中的化学发光作为细胞免疫的重要指标,溶菌和抗菌活力作为综合免疫能力的定性说明,将超氧化物歧化酶(SOD)活力作为体液免疫的主要参照;以期建立一种评价贝类免疫水平的方法体系,为今后进一步研究合浦珠母贝的免疫机理奠定基础,为筛选免疫增强剂提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

合浦珠母贝由北海市珍珠总公司养殖场提供,室内养殖缸内人工海水暂养,水温 16℃,pH 8.2,比重 1.020,盐度 32。大肠杆菌(*Escherichia coli*)由本系微生物实验室提供,LB 培养基 37℃斜面培养。溶壁微球菌(*Micrococcus lysolei*)冻干粉,由于中科院微生物所提供,2号培养基 25℃斜面培养。酿酒酵母细胞(*Saccharomyces cerevisiae*)由本系微生物实验室提供,LB 培养基 30℃斜面培养。

磷酸钾盐缓冲液:1 mol·L⁻¹ pH 6.4; K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液:pH 8.30;邻苯三酚:50mmol·L⁻¹。鲁米诺(Luminol)储存液浓度为 0.01mol·L⁻¹,于 4℃冰箱内保存,使用时鲁米诺储存液同无菌过滤海水按 1:25 比例稀释,终浓度为 1×10⁻⁴mol·L⁻¹,即配即用。无菌过滤海水用 0.45μm 微孔滤膜过滤人工海水而得。分光光度计为 UV-754;恒温箱为 DK-8A 型;超微弱化学发光测定仪为 BPCL-2-G 型(中科院生物物理所研制)。

1.2 方法

SOD 活力测定:采用邻苯三酚自氧化法,25℃下,于 4.5mL 50mmol·L⁻¹,pH 8.30 的 K₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液加入 10 μL 50mmol·L⁻¹连苯三酚,迅速摇匀后,在 325nm 下每 30s 测 A 值一次,要求自氧化速率在 0.070 OD·min⁻¹左右。酶活性测定方法与上相同,在加入连苯三酚前,加入待测血清 10 μL。一个酶活单位(μ·mL⁻¹)定义为每毫升反应液中,每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50%的酶量。

抗菌活力的测定:用 2mL 注射器和 5 号针头从贝的心耳中取血,并装入小离心管中。5 000r·min⁻¹ 离心 5min,取上面的血清测定。用 0.1mol·L⁻¹,pH 6.4 的磷酸钾盐缓冲液从固体斜面上将大肠杆菌冲下,作为底物,并配成一定浓度的悬浊液(OD_{570nm} = 0.3~0.5)。取 3mL 该悬液于试管内并置于冰浴中,再加入 50μL 待测血清,混匀,测其保温前在 570nm 波长处的光密度(A₀)。然后将试液移入 37℃温浴 30min,取出后立刻置于冰浴内 10min,以终止反应,测其经温浴后的试液 570nm 处的光密度(A)值。

抗菌活力参考文献[6],其计算公式为 $U_a = (A_0 - A)^{1/2}$ 。

溶菌活力的测定:以溶壁微球菌干粉为底物,用 0.1mol·L⁻¹,pH 6.4 的磷酸钾盐缓冲液配成底物悬液(OD_{570nm} = 0.3~0.5)。取 3mL 该悬液于试管内并置于冰浴中,再加入 50 μL 待测血清,混合,测 A₀ 值。然后将试液移入 37℃温浴 30min,取出后立刻置于冰浴内 10min,以终止反应,测其 A 值。

溶菌活力计算公式为: $U_L = (A_0 - A)/A$

化学发光样品制备及测定方法:测量用血细胞:生理浓度下的血淋巴离心除去血清后用无菌过滤海水重新悬浮所得(正常状况下浓度为:5×10⁶血细胞·mL⁻¹;其它情况则还原为初始生理浓度,即抽取 1mL 血淋巴,海水洗涤悬浮后仍为 1mL)。测量用血清:生理浓度下的血淋巴离心除去血细胞所得。测量用全血:使用抽取的血淋巴。

以上所有样品均为血淋巴抽取后 1h 开始测量;手术贝的血淋巴是手术后 1h 抽取;每个测量样品均为多个(n>3)贝抽取的血淋巴或血清的混合。

吞噬颗粒为调理后的酿酒酵母细胞:室温下酿酒酵母细胞(2~4μm)经待测贝血清调理 25~30min 后,用无菌过滤海水离心洗两次,最后用无菌过滤海水重新悬浮浓度为每毫升 10⁸。

使用 BPCL-2-G 型超微弱化学发光测定仪测定血细胞、血清及血淋巴的化学发光。室温(25℃)下测量杯中加入待测样品 200 μL,测定样品的基础发光 1min 后,再加入发光剂鲁米诺 200 μL(4×10⁻⁴mol·

L^{-1})和刺激物(10^8 个 $\cdot mL^{-1}$)酵母细胞)200 μL ,测量开始,计算机记录下光子计数值[$counts \cdot (10s)^{-1}$]。测量的数据曲线经过格式转换,Excel 图表工具处理,得到文中的数据曲线。

2 结果与讨论

2.1 贝血清的 SOD 活力

正常状况下的免疫水平被认为是机体较好的水平,因此形成了“基线”,而即将死亡的贝所体现的状况被认为是机体极限的水平,因此形成了“底线”。而居于其中的手术效果则明确的反映了机体的耐受能力。SOD 活力测量结果如表 1 所示。

表 1 插核手术前后以及即将死亡的贝 SOD 活力对比

Tab.1 Comparison of SOD activity on several conditions

组号	正常贝	手术贝	即将死亡贝
1	27.3	60.6	211.2
2	10.3	104.6	167.1
3	26.2	76.3	226.5
4	54.5	119.1	197.2
平均值 \pm 标准差	29.6 \pm 18.3	90.2 \pm 26.5	200.5 \pm 25.3

注:每一组数据都是多个贝($n > 3$)血清混合后测得。

从表 1 的结果可以看出,插核手术的确极大地影响了合浦珠母贝的免疫水平。正常贝的 SOD 水平远远低于插核手术后的贝,更加远远低于即将死亡的贝。这与贝类的生理及病理状况是看似矛盾的。当机体处于正常水平时,外源的病原微生物很少能感染机体,所以即使有吞噬的过程发生,活性氧也会被及时清除,因此 SOD 的“表现”活性较低,浓度也不高;而在病理条件下,SOD 活力反而上升,尤其是插核手术后贝体较平时更易于被感染,免疫反应也较平时微弱和迟钝,这可能因手术贝和即将死亡贝血细胞和其内的各种细胞器在这样的生理条件下均受极大伤害,以至于破裂而导致平时溶解外源微生物的酶极有可能“破茧而出”,使血清中 SOD 浓度升高,活力急剧上升;贝死亡后,这些酶的活力又会迅速下降,这显然是因为维持酶活性的酸碱平衡的环境已经不可逆地被破坏的缘故。

在其它水生低等无脊椎动物的免疫研究中还常常提到血清的酚氧化酶活性。但是在合浦珠母贝的实验中我们发现,从闭壳肌中抽取的血清酚氧化酶活性极低,已无法体现活性变化。因此,我们推测在合浦珠母贝体内,至少是局部血清中,酚氧化酶并不是体液免疫的主要酶类,或者说在体液免疫中并不发挥主要的作用。这一点与其亲缘关系较近的其它物种是明显区别的。

2.2 贝血清的溶菌、抗菌活力

除了体液因子作用以外,细胞免疫是软体动物的主要免疫方式,在血细胞的吞噬过程中有大量的细胞因子参与,而且伴随有活性氧的释放。溶菌和抗菌活力实际上是细胞和体液免疫的综合体现。插核手术前后的贝血清溶菌抗菌活力的对照见表 2。即将死亡的贝溶菌和抗菌活力太低,使用这种方法的测量结果已经趋于零,故结果未列出。

从表 2 中可以看出,插核手术后血清的溶菌抗菌活力显著降低,临近死亡的贝基本无法检测到,这是符合机体免疫的规律和特点的。正常状况下,溶菌抗菌活力的大小反映了机体对外源微生物侵染的防御能力,因此处于较高的活性状态。插核手术后溶菌活力降低的详细的机理还需进一步深入研究。

2.3 化学发光曲线的参数设定

化学发光测定法直接记录了血细胞吞噬过程中的化学发光的动态过程和趋势。

表2 插核手术前后的贝血清溶菌抗菌活力的对照

Tab.2 Comparison of oyster's bacteriolytic and antibiotic activity before and after operation

组号	溶菌活力		抗菌活力	
	正常贝	手术贝	正常贝	手术贝
1	0.064	0.038	0.189	0.141
2	0.066	0.014	0.189	0.115
3	0.063	0.012	0.215	0.119
4	0.063	0.037	0.210	0.114
平均值±标准差	0.064±0.002	0.025±0.014	0.201±0.014	0.122±0.013

注:每一组数据都是多个贝(n>3)血清混合后测得。

为了排除仪器及其他因素的干扰,首先测定了仪器本底、空白对照、全血和血清的化学发光曲线,数据统计结果见表3。从中可以清楚的看到:仪器本底的平均值低于10,峰值低于20。此外,空白、全血以及血清的化学发光平均值低于40,峰值低于50,而且变化幅度不大,因此可以认为血细胞对于活性氧的产生起主要作用。为此,在实验过程中,我们把20光子计数·(10s)⁻¹作为一个基线来描述样品的化学发光。为了更准确地分析、研究化学发光曲线的结果和变化规律,特引进如下参数。

空白测量时间(Tc):未加入酵母细胞和鲁米诺之前的测量时间;响应时间(Tr):加入酵母细胞和鲁米诺至化学发光达到峰值的时间;饱和吞噬强度(Is):化学发光峰值点的光子计数;有效吞噬时间(Te):每10s内的光子计数高于40的时间累计;有效吞噬能力(Pe):有效吞噬时间内的光子计数累计;总吞噬能力(Pt):加入酵母细胞和鲁米诺后至曲线再次回到基线的光子计数累计。

空白测量时间提供了统一的极限标准;响应时间反映了血细胞识别酵母细胞的能力和速度;饱和吞噬强度反映了体系中血细胞的最大吞噬能力,间接反映了体系中参与吞噬作用的细胞比例;有效吞噬时间、有效吞噬强度和总吞噬强度反映了血细胞吞噬作用的维持时间和水平。将有效吞噬时间的基准定在每10s内的光子计数高于40,是因为要扣除血清、全血测量结果的影响,使化学发光曲线完全反映血细胞的吞噬能力。

表3 仪器本底、空白、全血和血清的对照

Tab.3 Chemiluminescence of instrument background, whole blood, serum and control

	仪器本底	无血细胞对照	无酵母对照	正常全血	正常血清
测量时间(s)	590	1290	1780	580	1080
峰值[光子计数·(10s) ⁻¹]	20	38	50	47	36
化学发光总量(光子计数)	558	3316	4440	1902	2067
平均值[光子计数·(10s) ⁻¹]	9.3	25.7	24.94	32.79	19.14

注:每一组数据都是多个贝(n>3)血细胞混合后测得。

2.4 正常贝与手术贝血清及血细胞的化学发光比较

手术前后贝血清的化学发光比较见表4,其中峰值和平均值虽然变化不大,但也可间接地说明机体组织已发生变化。已有研究表明,机体病变与血清的发光变化具有相关性,炎症反应时,由于活性氧增加,氧化血中脂质,可使血清自发化学发光增高。

插核手术前后血细胞吞噬发光曲线见图1,为了进一步比较分析二者之间的差异,表5列出了测量曲线的参数对比,可结合曲线清楚地分析插核手术前后免疫水平的变化。

表4 正常贝与手术贝血清的化学发光比较

Tab.4 Comparison of chemiluminescence of serum of normal and operated oyster

	正常贝血清	手术贝血清
测量时间(s)	1080	610
峰值[光子计数·(10s) ⁻¹]	36	46
化学发光总量(光子计数)	2067	1726
平均值[光子计数·(10s) ⁻¹]	19.14	28.3

注:每一组数据都是多个贝(n>3)血细胞混合后测得。

在图1中可以观察到手术贝血细胞化学发光曲线在鲁米诺和酵母细胞加入后的前一两个数据处出现一个较为尖锐的“峰”,而正常贝的曲线则没有。我们认为这是血细胞体系中累积的活性氧多少的表征,主要是血细胞和鲁米诺的局部浓度、混合和扩散速度造成的,并不影响实验结果。

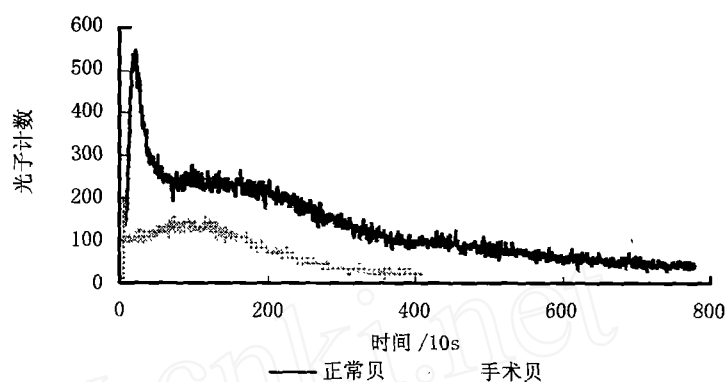


图1 插核手术前后贝血细胞化学发光曲线

Fig.1 Comparison of chemiluminescence curves of hemocytes before and after operating

插核手术后,血细胞化学发光曲线发生了很大的变化,具体表现为上述各参数的变化:手术后血细胞的响应时间变为正常的7倍,饱和吞噬强度下降到正常的25%,有效吞噬时间为40%,有效吞噬能力为25%,总吞噬能力为30%。这说明手术后1h的血细胞无论是从识别外源微生物的能力,或者说参与吞噬作用的血细胞比例,吞噬作用的维持时间和水平上都显著地下降。响应时间的数倍延长,饱和吞噬强度、有效吞噬时间和能力以及最大吞噬能力的降低都说明了血细胞吞噬活性的降低。

表5 正常贝与手术贝的化学发光参数比较
Tab.5 Comparison parameters of chemiluminescence of normal and operated oyster

	正常贝血细胞	手术贝血细胞
空白测量时间(T_c)	60	60
响应时间(T_r)	160	1180
饱和吞噬强度(I_s)	547	149
有效吞噬时间(T_e)	7430	2700
有效吞噬能力(P_e)	103995	26798
总吞噬能力(P_t)	105015	30606

此外,手术贝血细胞的吞噬活性下降与其血清的SOD活力的明显上升具有一定的相关性。已有研究表明,吞噬细胞的杀菌能力活力可被SOD及过氧化氢酶所抑制,可能是由于手术后贝血清中SOD活力的上升导致了血细胞吞噬活性的降低。当然,导致血细胞吞噬活性降低的原因是多方面的,也可能是由于手术后组织损伤细胞破裂而释放出一些细胞因子,改变了膜电位和各种离子通透性的变化,进而抑制了血细胞的吞噬活性,有关问题还需要进一步深入研究。

综上所述,插核手术后合浦珠母贝血清的溶菌和抗菌活力以及血细胞的吞噬活性都明显下降,说明贝的体液和细胞免疫水平都明显降低。由此可以推断手术贝免疫力低下是导致其高死亡率的最根本原因。这一发现为筛选新型的免疫增强剂及其在实践中的应用提供了理论依据。

本文部分实验曾得到大连水产学院张峰副教授的帮助,谨致谢意。

参考文献:

- [1] 胡天喜,陈 记,陈克明,等.发光分析与医学[M].上海:华东师范大学出版社,1990.10-25.
- [2] Daniele Nocel, Evelyne Bachere, Eric Mialhe. Phagocytosis Associated Chemiluminescence of Hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia)[J]. Dev Comp Immun, 1993, 17:483-493.
- [3] Li H T, Zhao B L, Hou J W, et al. Two-Peak Kinetic Curve of the Chemiluminescence in Phorbol-Induced Macrophage[J]. Bioch Bioph Res Commun, 1996, 223:311-314.
- [4] 丁秀云,李光友,翟玉梅.皱纹盘鲍经诱导后血淋巴中一些因子变化的研究[J].海洋湖沼,1996,27(4):362-367.
- [5] 张 峰,李光友,张培军.皱纹盘鲍血细胞活性氧的研究[J].中国水产科学,1999,(3):36-40.
- [6] 王 雷,李光友,毛远兴,等.中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力测定及其特性研究[J].海洋与湖沼,1995,26(2):179-185.