第 27 卷 第 3 期
2003 年 5 月

水 生 生 物 学 报
ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA

Vol. 27, No. 3
May, 2003

两种多糖对日本沼虾酚氧化酶活力的影响

昌鸣先[1,2] 陈孝煊[1]

(1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 在饲料中分别添加 1‰的云芝多糖和虫草多糖, 对日本沼虾进行投喂, 通过连续测定日本沼虾血清中的酚氧化酶活力, 研究两种多糖对日本沼虾免疫机能的作用。结果表明, 在平均水温为 23.8℃±3.8℃时, 云芝组、虫草组分别较对照组提高了 34.52%、84.62%; 在平均水温为 10.8±2.4℃时, 云芝组和虫草组分别较对照组提高了 30.02%、5.12%, 因而云芝多糖和虫草多糖能明显地增强日本沼虾血清的酚氧化酶活力。另经实验表明, 在王雷所确立的酚氧化酶活力的检测条件下, 其 PO 活力为 8.3units/mL, 而在 Horowitz 所确立的检测条件下, 其 PO 活力为 290units/mL, 并且后者检测方法重复性好, 能较好地反映日本沼虾的免疫状态。

关键词: 酚氧化酶活力; 云芝多糖; 虫草多糖; 日本沼虾

中图分类号: S966.12 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)03-0269-04

甲壳动物的酚氧化酶原激活系统(Prophenoloxidase activating system, PPO)是一种与脊椎动物补体系统类似的酶级联系统, 其识别和防御作用在甲壳动物的非专一性免疫反应中发挥着重要作用[1,2]。Thornqvist 等人研究表明, 甲壳动物酚氧化酶原激活系统中的某些蛋白质可能起着类似调理素的作用[3]; 还有一些研究表明, 酚氧化酶原系统可被β-1,3-葡聚糖、脂多糖、肽聚糖、十二烷基磺酸钠、加热或 Ca^{2+} 浓度下降所活化[4]。在甲壳动物的酚氧化酶原激活系统中, 研究得较多的是中国对虾(*Penaeus chinensis*)和淡水螯虾(*Astacus astacus*), 如王雷等研究了中国对虾体内酚氧化酶活性测定的方法和条件, 并以数种天然口服药物免疫对虾, 检测了酚氧化酶活力作为衡量对虾免疫状态指标的可行性[5]; 罗日祥报道了中国对虾血细胞中酚氧化酶的存在及各种因子对其活力特性的影响[6]; 李天道等研究中国对虾感染弧菌后, 其血清中酚氧化酶的存在、活力及其影响因素[7]; Aspán 等人研究了螯虾的酚氧化酶原激活系统[8] 等, 而日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*), 作为一种重要的淡水养殖对象, 其免疫功能的研究却未见报道。本文利用从云芝菌体和冬虫夏草中分离的与β-葡聚糖有类似结构和性质的云芝多糖和虫草多糖作为饵料添加剂, 比较了不同检测方法下日本沼虾血清的酚氧化酶的活力, 旨在确定日本沼虾酚氧化酶活力的最适检测方法以及云芝多糖和虫草多糖对日本沼虾酚氧化酶活力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验虾及饲养 日本沼虾, 体重 2.5—3g, 购于武汉大东门集贸市场, 选择体态正常, 健康无病的个体饲养于水族箱中(65cm×45cm×34cm), 每组实验用虾 80—100 只, 自然水温。每天下午投饵一次, 投饵量以第二天上午略有剩余为准。对照组投喂基础饲料, 试验组投喂含有多糖的饲料。

1.2 多糖及药饲的制作 虫草多糖胶囊(北京金弼康科技公司生产, 批号: 990310)和云芝多糖胶囊(南京老山制药有限公司生产, 批号: 990403)购买于武汉医药药品商店。虫草多糖胶囊的功效成分及含量(每 100g 含量)为: 虫草多糖 ≥4g; 虫草素(3′-脱氧腺苷) ≥20mg; 甘露醇 ≥4g; 硒(以 Se 计) 20—40μg。云芝多糖胶囊的主要成分为具有生理活性的蛋白多糖物质, 其功效成分及含量说明书上未标明。称取饲料量 1‰的虫草多糖和云芝多糖胶囊物拌入基础饲料中研磨、混匀, 然后制成颗粒状, 日光下晒干、备

收稿日期: 2002-09-28; 修订日期: 2002-11-08

基金项目: 武汉市重点科技项目

作者简介: 昌鸣先(1972—), 女, 湖北省武汉市人; 研究生; 研究方向: 鱼类寄生虫与免疫学。本文承蒙聂品研究员提出宝贵意见, 在此致谢!

通讯作者: 陈孝煊, email: chenxx@mail.hzqu.edu.cn

用。

1.3 取血 投喂多糖前和投喂多糖后的第1、4、7、14、21以及28d分别取样。用无菌注射器从虾围心腔取血,将血液置于无菌的离心管中,于4℃冰箱过夜,第2d低速离心,析出的血清用于酚氧化酶活力的测定。由于血清量的限制,实验重复一次,每次取样5只,结果取平均值。

1.4 酚氧化酶活力的测定 对酚氧化酶活力的测定,有两种方法。一种是参照Horowitz和Shen方法,将3.9mL、0.1mol/L, pH为6.0的磷酸钾缓冲液(PBS)与1mL、0.01mol/L的L-dopa及100μL酶液于室温下混匀,在30℃孵育后,测其490nm下的光密度值;一种参照Pye方法,将0.58mL, 0.1mol/L, pH为6.0的磷酸钾缓冲液与0.2mL, 40umoL羟脯氨酸乙酯, 0.2mL, 20umoL的4-甲基邻苯二酚以及20μL酶液混合,在30℃孵育5min后,测其520nm下的光密度值。王雷在参照Ashida和Horowitz方法的基础上加以改进,确定了中国对虾酚氧化酶活力的测定方法,并被大多学者所采用。表1所示的是Horowitz和王雷PO测定方法反应混合物中各个试剂的加入量。

表1 酚氧化酶活力测定的试剂加入量

Tab.1 The reagent expense for the measurement of PO activity

方法 Method	试剂(mL)		
	PBS	L-dopa (0.01mol/mL)	血清
王雷等	3	0.1	0.1
Horowitz	3.9	1	0.1

2 结果与讨论

2.1 日本沼虾血清中酚氧化酶活力的检测

对王雷和Horowitz所确立的两种方法进行比较,发现运用Horowitz方法测出的PO活力(其值为290units/mL)显著高于运用王雷方法测出的PO活力(其值为8.3units/mL),并且其被用于检测日本沼虾血清中酚氧化酶活力时,不仅敏感度高(即加入微量的血清亦能检测出活力),而且重复性好,能较好地反映日本沼虾的免疫状态;而运用王雷方法,所测出的PO活力低,有时甚至检测不出PO活力,因而Horowitz方法更适于日本沼虾酚氧化酶活力的测定。

2.2 SDS对日本沼虾血清酚氧化酶活力的影响

关于酚氧化酶存在的部位,不同的学者有不同的看法,Saul等[10]认为,酚氧化酶主要存在于血浆中,Soderhall等人认为,在自然状态下,酚氧化酶以酶原形式存在于甲壳动物的血细胞中[1];王雷等人认为,中国对虾血细胞中的PO主要以proPO形式存在,proPO激活后表现其活力,血清中也存在PO,但不以proPO形式存在[5,11]。本实验测定了日本沼虾血清中的PO活力以及加入SDS以后的PO活力,从图2可以看出,日本沼虾血清中存在PO活力,加入SDS对其影响不大,可见该酶在血清中不是以酶原的形式存在,这与王雷的报道一致。

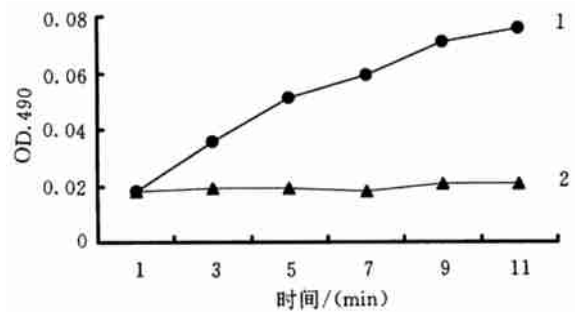

图1 在两种不同方法下测定的PO活力

Fig.1 PO activity under two methods

1. Horowitz方法(Horowitz's method);
2. 王雷方法(Wangler's method)

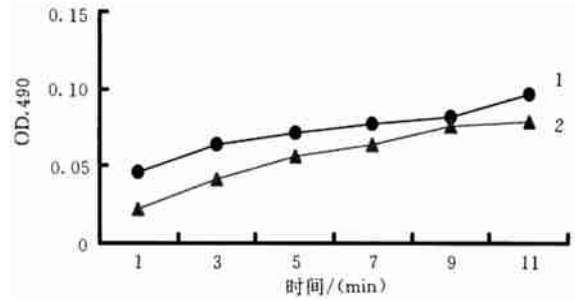

图2 SDS对日本沼虾血清酚氧化酶活力的影响

Fig.2 Effect of SDS on the activity of phenoloxidase in the haemolymph of *M. nipponense*

1. 加入SDS; 2. 未加入SDS

2.3 两种多糖对日本沼虾血清酚氧化酶活力的影响

经成对数据的t检验分析,在适宜的水温下,云芝多糖和虫草多糖对日本沼虾血清酚氧化酶活力有显著的增强作用。在平均水温较高时,日本沼虾摄食旺盛,云芝多糖和虫草多糖对日本沼虾血清的酚氧化酶活力增强作用显著:在实验期间,水温为23.8±3.8℃时,对照组、云芝组、虫草组的酚氧化酶活力分别为238.5±61.93、320.83±69.38、440.33±138.09(采用Horowitz方法),试验组的酚氧化酶活力均显著高于对照组(t检验,$t_n > t_{0.05(n-1)}$)。详见表

2。而在平均水温较低时, 日本沼虾很少摄食或不摄食, 云芝多糖和虫草多糖对日本沼虾血清的酚氧化酶活力没有明显的增强作用; 当水温为 10.78 ± 2.43 ℃时, 对照组、云芝组、虫草组的酚氧化酶活力分别为 166 ±55.82、215.83 ±45.10、174.5 ±57.23 (采用 Horowitz 方法), 试验组和对照组的酚氧化酶活力无显著差异(t 检验, $t_n < t_{0.05(n-1)}$)。

由于实验是云芝多糖和虫草多糖对日本沼虾免疫机能影响的一部分, 血清酚氧化酶活力是和抗菌活力、溶菌活力同时测定的, 因而由于血淋巴量的限制, 酚氧化酶活力的测定不像其他活力, 采用多次重复, 因而对其每一次的 PO 活力没有进行不同组数的数据处理。本实验以不同天数的 PO 活力作不同组数的成对数据的 t 检验, 以比较两种多糖对日本沼虾酚氧化酶活力的总体影响。虽然 PO 活力随口服天数的不同可能呈现一定的动力学变化, 但在实验条件相同以及设置对照组的情况下, 对不同天数的 PO 活力作成对数据的 t 检验是可行的。

表 **2**　两种多糖对日本沼虾血清酚氧化酶活力的影响

Tab. 2　Effects of two kinds of polysaccharide on the phenoloxidase in the hemolymph of *M. nipponense*

水温 23.8 ± 3.8 ℃ 时间(d)	酚氧化酶活力(units/mL)			水温 10.78 ± 2.43 ℃ 时间(d)	酚氧化酶活力(units/mL)		
	对照组 Control	云芝组 Polystictus	虫草组 Cordyceps		对照组 Control	云芝组 Polystictus	虫草组 Cordyceps
1	198	315	295	0	230	175	200
4	200	365	323	1	125	170	125
7	290	370	339	4	128	240	127
14	160	200	530	7	128	190	125
21	263	385	530	14	140	235	260
28	320	290	625	21	245	285	210

关于多糖对甲壳动物酚氧化酶活力的影响, 已有一些研究者对此进行了研究。Lee 等从龙虾血细胞中纯化出的一种脂多糖和 β-1, 3-葡聚糖结合蛋白, 能诱导酚氧化酶原系统的激活[12]; Soderhall 和 Hall 研究发现, 低剂量的脂多糖能增强龙虾血细胞酚氧化酶活力, 而高剂量的脂多糖却起抑制作用[13]。本研究表明, 云芝多糖和虫草多糖对日本沼虾血清中的酚氧化酶活力亦有一定的增强作用。

参考文献:

[1] Söderhäll K, Cerenius L Johansson M W. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defense [J]. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994, **12**: 155—161

[2] Söderhäll K, Cerenius L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity [J]. *Curr. Opin. Immunol.* 1998, **10**: 23—28

[3] Thornqvist PO, Johansson MW, Soderhall K. Opsonic activity of cell adhesion proteins and beta-1, 3-glucan binding proteins from two crustaceans [J]. *Dev Comp Immunol.* 1994, **18**(1): 3—12

[4] Meng FL, Zhang Y Z, Kong J. The research review of prophenoloxidase activating systems in crustacean [J]. *Oceanolgia et Limnologia Sinica,* 1999, **30**(1): 110—115. [孟凡伦, 张玉臻, 孔健, 等. 甲壳动物的酚氧化酶原激活系统的研究评价[J]. 海洋与湖沼, 1999, **30**(1): 110—115]

[5] Wang L, Li G Y, Mao Y X. Measuring methods and variations of some haemolymph factors in *penaeus chinensis* after their oral ingestion of immuno drugs [J]. *Oceanolgia et Limnologia Sinica.* 1995, **26**(1): 34—41. [王雷, 李光友, 毛远兴. 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[J]. 海洋与湖沼, 1995, **26**(1): 34—41]

[6] Luo R X. Induction of immunity substance in *Penaeus chinensis* by Chinese herbal medcine. Oceanolgia et Limnologia Sinica [J]. 1997, **28**(6): 573—578. [罗日祥. 中药制剂对中国对虾免疫活性物的诱导作用[J]. 1997, **28**(6): 573—578]

[7] Li T D, Yu J, Yu K K. Studies on the phenoloxidase in the serum of *penaeus chinensis* [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology.* 1998, **1**: 51—55. [李天道, 于佳, 俞开康. 中国对虾血清中酚氧化酶活力的研究[J]. 海洋湖沼通报, 1998, **1**: 51—55]

[8] Aspán A, Huang T S. Cerenius L, Söderhäll, K. cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 939—943

[9] Horowitz NH, Shen S. Neurospora tyrosinae[J]. *J, Boil Chem*, 1952, 197: 573—520

[10] Saul S J. The majority of prophenoloxidase in the hemolymph of *Manduca sexta* is present in the plasma and not in the hemocytes [J]. *Dev Comp Immune*, 1985, **11**: 479—485

[11] Wang L, Li G Y, Mao Y X. Studies on the activities and characteristics of the antibacterial, bacteriolysis and phenoloxidase in the haemolymph of Penaeus chinensis [J]. *Oceanolgia et Limnologia Sinica*, 1995, **26**(2): 179—185. [王雷, 李光友, 毛远兴. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究. 海洋与湖沼, 1995, **26**(2): 179—185]

[12] Lee SY, Wang R, Soderhall K. A lipopolysaccharide- and beta-1, 3-

glucan binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish Pacifastacus leniusculus. Purification, characterization, and cDNA cloning [J]. *J Biol Chem*. 2000, **275**(2): 1337—1343

[13] Soderhall K, Hall L. Lipopolysaccharide induced activation of the prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1984, **797**: 99—104

EFFECTS OF TWO KINDS OF POLYSACCHARIDE ON THE PHENOLOXIDASE ACTIVITY IN *MACROBRACHIUM NIPPONENSE*

CHANG Ming-Xian[1,2] and CHEN Xiao-Xuan[1]

(1. *College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan* 430070;

2. *Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072)

Abstract: *Macrobrachium nipponense*, 2.5—3g in body weight, was bought from aquaculture market in Wuhan, and then cultured in laboratory tank (65cm × 45cm × 34cm). The shrimps were kept in the tank for 7 days and fed with diet containing 1‰ Polysticus and Cordyceps polysaccharide. The haemolymph was then taken from the heart of *M. Nipponense* which were cultured for 1, 4, 7, 14, 21, 28 days to determine the phenoloxidase (PO) activity. The results were as follows:

1. Acording to Wang Lei's method, the PO activity was 8.3 units/mL, while the PO activity was 290 units/mL by the Horowitz's method. Besides the high sensitivity, the latter had a better repetition than the former. Therefore, the Horowitz's method was better for responding the immune state of *M. nipponense*.

2. PO activity could be tested in the haemolymph of *M. nipponense*. There was little effect on the PO activity by adding SDS. It was clear that in the haemolymph PO was not present by the form of zymogen.

3. At high temperature (for example 23.8 ±3.8 ℃), *M. nipponense* had a vigorously ingestion, the PO activity of Polystictus and Cordyceps groups increased about 34.52% and 84.62%. Polystictus and Cordyceps polysaccharide had remarkable enhancement on the PO activity. While the increase of PO activity was 30.02% and 5.12% respectively in low water temperature. The enhancement of polysaccharide on the PO activity was not significant.

The increase of PO activity indicated that Polystictus and Cordyceps polysaccharide could improve nonspecific immunity of the shrimps, which would be useful as a potential immunostimulant.

Key words: Phenoloxidase activity; Polystictus polysaccharide; Cordyceps polysaccharide; *Macrobrachium nipponense*