

# 不同细菌刺激后仿刺参体腔液中免疫相关酶的应答变化

蒋经伟<sup>①</sup> 丛 聪<sup>①②</sup> 董 颖<sup>①</sup> 周遵春<sup>①\*</sup>

① 辽宁省海洋水产科学研究院 大连 116023; ② 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116023

**摘要:** 为了解不同细菌刺激后仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 体腔液中免疫因子的应答变化, 分别用灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)、假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas nigrifacien*)、溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 和停乳链球菌 (*Streptococcus dysgalactiae*) 注射刺激仿刺参, 然后分别采用对硝基苯基磷酸酯 (pNPP) 底物法、氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 法、溶壁微球菌粉法和多巴络合物生成法对体腔液上清中的酸性磷酸酶 (ACP) 与碱性磷酸酶 (AKP)、超氧化物歧化酶 (SOD)、溶菌酶 (LYZ) 和酚氧化酶 (PO) 的活力进行了测定。结果显示, 灿烂弧菌刺激后, 酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活力显著升高, 而超氧化物歧化酶、溶菌酶和酚氧化酶活力显著降低; 哈维氏弧菌刺激后, 酸性磷酸酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶和酚氧化酶活力显著升高, 碱性磷酸酶活力变化不规律; 假交替单胞菌刺激后, 酸性磷酸酶、溶菌酶和酚氧化酶活力显著升高, 超氧化物歧化酶活力先升高后降低, 碱性磷酸酶活力变化不规律; 溶壁微球菌刺激后, 酸性磷酸酶和酚氧化酶活力显著升高, 超氧化物歧化酶活力先升高后降低, 溶菌酶活力先升高后降低, 而后在 72 h 恢复至对照水平, 碱性磷酸酶活力变化不规律; 停乳链球菌刺激后, 除碱性磷酸酶活力在 4 h 有所下降外, 其余免疫相关酶活力均显著升高。研究表明, 酚氧化酶是仿刺参非特异性免疫系统中最敏感、高效的免疫因子之一; 革兰氏阳性细菌与革兰氏阴性细菌之间在诱导仿刺参免疫因子应答变化上无明显规律性差异; 溶壁微球菌诱导溶菌酶的应答变化与灿烂弧菌、哈维氏弧菌、假交替单胞菌和停乳链球菌存在明显差异, 溶菌酶可能是仿刺参清除入侵溶壁微球菌的主要免疫因子; 灿烂弧菌诱导仿刺参免疫因子应答变化显著不同于其他 4 株细菌, 显示出本研究选取的 5 个免疫指标在预警灿烂弧菌病害上具有潜在应用价值; 停乳链球菌在仿刺参中具有作为免疫增强剂的潜在应用价值。

**关键词:** 仿刺参; 体腔液; 细菌; 免疫相关酶

**中图分类号:** Q175 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2015) 06-947-10

## The Variation of Immune-related Enzyme Activities in the Coelomic Fluid of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) after Challenge with Different Bacteria

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 31402336), 辽宁省科技计划项目 (No. 2015103044), 辽宁省海洋与渔业厅项目 (No. 201301, 201502);

\* 通讯作者, E-mail: zunchunz@hotmail.com;

**第一作者介绍** 蒋经伟, 男, 助理研究员; 研究方向: 海洋动物免疫; E-mail: weijingjiang@live.cn。

收稿日期: 2015-01-20, 修回日期: 2015-05-06 DOI: 10.13859/j.cjz.201506014

JIANG Jing-Wei<sup>①</sup> CONG Cong<sup>①②</sup> DONG Ying<sup>①</sup> ZHOU Zun-Chun<sup>①\*</sup>

<sup>①</sup> Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian 116023; <sup>②</sup> College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

**Abstract:** Our previous study showed that the supernatant of coelomic fluid from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) exhibited strong antibacterial activity to *Micrococcus lysodeikticus*, but had no obvious effects on the growth of *Vibrio splendidus*, *V. harveyi*, *Pseudoalteromonas nigrifacien* and *Streptococcus dysgadysgalactiae*. In order to study the variation of immune-related enzyme activities in *A. japonicus* coelomic fluid after different bacterial challenges, five bacteria (bacterial information was listed in Table 1) described above were injected into *A. japonicus*, respectively, and then the activities of acid phosphatase (ACP) and alkaline phosphatase (AKP), superoxide dismutase (SOD), lysozyme (LYZ) and phenoloxidase (PO) were determined using *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) method, nitro blue tetrazolium chloride (NBT) method, *M. lysodeikticus* powder method and dopachrome formation method, respectively. The experiments of enzymatic activities determination were performed in quadruplication, and the data were expressed as means  $\pm$  standard deviations (SD). Statistical analysis was carried out using the software SPSS 11.5. Differences in enzymatic activities between bacteria-challenged group and the control group were analyzed by one-way ANOVA. The level of significance was defined as  $P < 0.05$ . As shown in Fig. 1 - 5, the challenge of *V. splendidus* induced significant increase of acid phosphatase and alkaline phosphatase activities, but great decrease of superoxide dismutase, lysozyme and phenoloxidase activities; challenge with *V. harveyi* caused significant increase of acid phosphatase, superoxide dismutase, lysozyme and phenoloxidase activities and irregular variation of alkaline phosphatase activity; after challenge with *P. nigrifacien*, acid phosphatase, lysozyme and phenoloxidase activities increased significantly, superoxide dismutase activity increased firstly, and then decreased, and alkaline phosphatase activity exhibited irregular variation; after challenge with *M. lysodeikticus*, acid phosphatase and phenoloxidase activities increased, superoxide dismutase and lysozyme activities increased firstly, and then decreased, however, lysozyme activity returned to control level at 72 h post challenge, and alkaline phosphatase activity also exhibited irregular variation; the challenge of *S. dysgadysgalactiae* resulted in an inhibition on alkaline phosphatase activity at 4 h, but notable promotion on the activities of other determined enzymes. The results suggested that phenoloxidase was one of the most sensitive and efficient immune factors in *A. japonicus* innate immune system; no regular differences in the induction of *A. japonicus* immune factors were observed between Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria; between *M. lysodeikticus* and other four determined bacteria, the most significant difference was observed in the induction of lysozyme, and lysozyme might be the principle immune factor involved in the extermination of *M. lysodeikticus*; the variation of immune factors induced by *V. splendidus* differed greatly from those induced by other four bacteria, and the five immune factors selected in this study had potentials in the application for early warning of vibrio diseases; *S. dysgadysgalactiae* had potential in the application for immunostimulants in *A. japonicus*.

**Key words:** Sea cucumber (*Apostichopus japonicus*); Coelomic fluid; Bacteria; Immune-related enzymes

体腔液作为棘皮动物最重要的免疫组织之一, 通过其中含有的酸性磷酸酶 (acid phosphatase, ACP)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、溶菌酶 (lysozyme, LYZ)、酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 等免疫因子, 广泛参与针对不同病原的免疫应答 (Wang et al. 2008, 于明志等 2008, 刘洪展等 2012)。

无脊椎动物体内的不同免疫因子通常具有明显不同的免疫分工。酸性磷酸酶和碱性磷酸酶通过水解作用, 一方面可以修饰病原外部的分子结构, 从而增强机体对病原的吞噬作用, 另一方面可以水解病原表面的磷酸基团, 从而直接杀死或抑制病原体 (Xing et al. 2008)。超氧化物歧化酶能够清除机体吞噬或包裹病原体等过程中所产生的过量活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 防止过量活性氧对机体自身的氧化伤害, 同时, 在清除过量活性氧的过程中还能够催化超氧阴离子, 产生具有很高杀菌活性的  $H_2O_2$ , 直接参与杀菌、抑菌过程 (Pipe et al. 1994, Holmblad et al. 1999)。溶菌酶的主要作用是切断细菌细胞壁肽聚糖中 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间的  $\beta$ -1,4 糖苷键, 从而破坏细胞壁, 引起细菌裂解 (Wang et al. 2011)。酚氧化酶是无脊椎动物氧化杀伤系统中的重要免疫因子, 通过氧化酚类底物生成醌, 醌再经非酶促反应最终生成黑色素 (Cerenius et al. 2008)。黑色素和和非酶促反应中产生的活性中间代谢物不仅可以直接杀伤、抑制和凝集病原, 还可以促进包裹与吞噬、结节形成、血细胞迁移、损伤修复等多种免疫活动 (Hellio et al. 2007, Jiang et al. 2014)。

已有研究表明, 一些寡糖如褐藻寡糖 (江晓路等 2009)、 $\kappa$ -卡拉胶寡糖 (马悦欣等 2010) 和多糖如海藻硫酸多糖、壳聚糖 (刘云等 2008) 等可诱导仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 体内的酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶等免疫相关酶的活力显著升高, 具有免

疫增强剂的应用价值。不同细菌中也含有丰富的寡糖 (张键等 1995) 和多糖 (陈蕾蕾等 2010), 因此, 一些非病原菌刺激仿刺参后, 有可能激活仿刺参体内的免疫相关酶, 起到促进免疫力的作用。然而此类研究信息缺乏, 不同非病原菌对仿刺参免疫应答系统的影响值得深入研究和探讨。

在之前对仿刺参体腔液抗菌特性研究中发现, 仿刺参体腔液上清对溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 的生长有明显的抑制作用, 而对灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)、假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas nigrifacien*) 和停乳链球菌 (*Streptococcus dysgadysgalactiae*) 的生长无明显影响 (丛聪等 2014)。为了探索溶壁微球菌与其他不受仿刺参体腔液抑制的细菌之间、革兰氏阳性细菌与革兰氏阴性细菌之间以及不同种的细菌之间在引起仿刺参体腔液中免疫因子应答变化上是否有规律性的差异, 开展了不同细菌刺激后仿刺参体腔液中免疫相关酶的应答变化特点研究, 这对了解仿刺参的免疫特性、筛选病原感染生物标志物和具有潜在免疫增强剂应用价值的非病原菌以及建立仿刺参细菌性病害预警模型等均具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

仿刺参 270 只, 体重为  $(6.4 \pm 1.1)$  g, 取自辽宁省海洋水产科学研究院引育种中心, 于实验室暂养, 水温  $16 \sim 18^\circ\text{C}$ , pH  $8.3 \sim 8.5$ , 盐度 29, 1 周后使用。

### 1.2 实验菌株

使用灿烂弧菌、哈维氏弧菌、假交替单胞菌、溶壁微球菌、停乳链球菌作为实验细菌, 细菌浓度以单位体积液体中含有的菌落形成单位 (colony-forming units, cfu) 表示, 菌株信息见表 1。将上述 5 种细菌在  $28^\circ\text{C}$  150 r/min 的条件下培养至对数生长期后, 取各细菌培养悬液  $5\ 000\ \text{g}\ 4^\circ\text{C}$  离心 15 min, 弃上清, 用生理盐

表 1 菌株信息

Table 1 Bacteria information

细菌种类 Bacteria species	革兰氏属性 Gram identification	来源 Source	培养基 Medium
灿烂弧菌 <i>Vibrio splendidus</i>	革兰氏阴性 Gram-negative	仿刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	2216E
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	革兰氏阴性 Gram-negative	仿刺参 <i>A. japonicus</i>	2216E
假交替单胞菌 <i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	革兰氏阴性 Gram-negative	仿刺参 <i>A. japonicus</i>	2216E
溶壁微球菌 <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	革兰氏阳性 Gram-positive	美国模式培养物集存库 (编号: 4698) American type culture collection (Number: 4698)	2216E
停乳链球菌 <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	革兰氏阳性 Gram-positive	美国模式培养物集存库 (编号: 51499) American type culture collection (Number: 51499)	2216E

水分别重悬各细菌沉淀至终浓度为 $10^{11}$  cfu/L, 用于仿刺参体内注射刺激。

### 1.3 免疫刺激和体腔液上清的制备

实验共分为 6 组, 分别为对照组、灿烂弧菌组、哈维氏弧菌组、假交替单胞菌组、溶壁微球菌组和停乳链球菌组, 每组使用实验动物仿刺参 45 只。对照组中, 用 1 ml 灭菌注射器通过腹部向每只海参的体腔注射 50  $\mu$ l 生理盐水, 其余各实验组中, 用同样的方法向每只仿刺参注射 50  $\mu$ l 对应的细菌生理盐水悬液。注射后的 0 h、4 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h, 分别从对照组和各实验组中取 6 只海参, 解剖法获得体腔液。将同组内 6 只海参的体腔液混匀后, 经 4 $^{\circ}$ C 800 g 离心 15 min, 收集体腔液上清, 冻存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

### 1.4 仿刺参体腔液上清中免疫相关酶活力测定

酸性磷酸酶活力的测定采用对硝基苯基磷酸酯 (*p*-nitrophenyl phosphate, *p*NPP) 底物法 (González et al. 1994)。100  $\mu$ l 仿刺参体腔液上清与 2 ml 2 mmol/L 的 *p*NPP 溶液 (溶于 100 mmol/L、pH 4.5 的醋酸钠-醋酸缓冲液) 混匀后, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。孵育结束后, 向孵育混合物中加入 2.9 ml 100 mmol/L 的 NaOH 溶液, 然后使用分光光度计 (Alpha-1860A, 上海谱元仪器有限公司) 在 405 nm 波长下测定吸光

值。在 37 $^{\circ}$ C 与底物反应 30 min 产生 1 mg 对硝基苯酚定义为 1 个酶活力单位 (unit, U)。

碱性磷酸酶活力测定中, 除 *p*NPP 溶于甘氨酸-NaOH 缓冲液 (100 mmol/L, pH 9.5) 外, 其余操作以及酶活力单位定义同酸性磷酸酶活力测定方法 (González et al. 1994)。

超氧化物歧化酶活力测定采用氯化硝基四氮唑蓝 (nitro blue tetrazolium chloride, NBT) 法 (Beauchamp et al. 1971)。50  $\mu$ l 仿刺参体腔液上清与 3 ml 反应溶液 (13  $\mu$ mol/L 甲硫氨酸, 20  $\mu$ mol/L 核黄素, 0.75 mmol/L NBT, 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.8) 混匀后在 4 000 lx 荧光下照射 5 min (30 $^{\circ}$ C), 然后在 560 nm 波长下测定吸光值。在 1 ml 反应液中超氧化物歧化酶抑制率达 50% 定义为 1 个 U。

溶菌酶活力的测定采用溶壁微球菌粉法 (艾春香等 2008)。将溶壁微球菌粉 (南京建成) 用 0.1 mol/L、pH 6.4 的磷酸钾缓冲液配成底物悬液 ( $A_{570} = 0.3$ ), 取 3 ml 底物悬液于灭菌离心管中, 再加入 50  $\mu$ l 仿刺参体腔液上清, 混匀后在 570 nm 波长下测定吸光值  $A_1$ , 然后将混合物转移到 37 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 30 min, 取出后再在 570 nm 波长下测定吸光值  $A_2$ 。溶菌酶活力 (U) = ( $A_1 - A_2$ ) /  $A_2$ 。

酚氧化酶活力测定采用多巴络合物生成法 (Söderhäll 1981)。100  $\mu$ l 仿刺参体腔液上

清与 2.0 ml 15 mmol/L 左旋多巴溶液混匀后, 在 490 nm 波长下测定吸光值, 每隔 3 min 测一次, 共测 10 次。A<sub>490</sub> 每分钟增加 0.001 定义为 1 个 U。

蛋白浓度测定采用 Bradford 方法(Bradford 1976)。50 μl 仿刺参体腔液上清与 50 μl 0.15 mol/L NaCl 溶液混匀后加入 1 ml 考马斯亮蓝 G-250 测试液(25 mg 考马斯亮蓝 G-250, 12.5 ml 95% 乙醇, 25 ml 85% 磷酸, 用超纯水定容至 250 ml), 反应 5 min, 在 595 nm 波长下测定吸光值。使用牛血清白蛋白绘制蛋白浓度标准曲线, 蛋白浓度以 mg/L 为单位。

仿刺参体腔液上清中各免疫相关酶活力的大小以比活力(1 mg 蛋白样品中所含有的 U) 的形式表示, 单位为 U/mg。

### 1.5 数据分析

酶活检测实验均重复 4 次, 结果以平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示。数据使用 SPSS 11.5 进行单因素方差分析, 差异性显著定义为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果

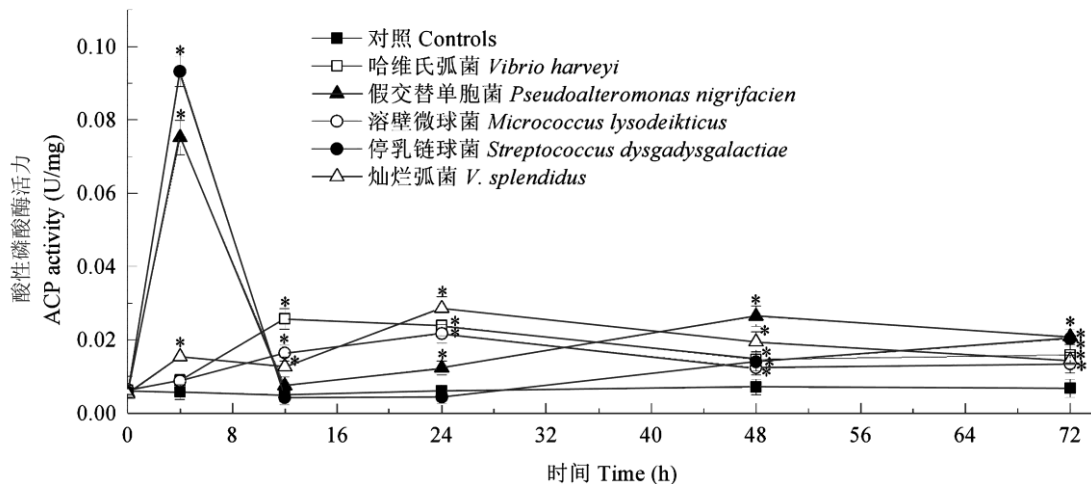


图 1 细菌刺激后体腔液中酸性磷酸酶 (ACP) 活力变化

Fig. 1 The variation of acid phosphatase (ACP) activity in the coelomic fluid of sea cucumber after challenge with bacteria

结果以平均值 ± 标准差表示,  $n = 4$ 。星号 “\*” 表示与对照相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。

The results were expressed as Means ± SD,  $n = 4$ . Asterisks “\*” indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) compared with control.

### 2.1 细菌刺激后体腔液中酸性磷酸酶活力变化

酸性磷酸酶活力测定结果显示, 哈维氏弧菌、灿烂弧菌和溶壁微球菌刺激后, 体腔液中酸性磷酸酶活力均明显高于对照组, 在 12 h、24 h、48 h 和 72 h 与对照相比差异显著 ( $P < 0.05$ ); 假交替单胞菌和停乳链球菌刺激后的 4 h, 体腔液中酸性磷酸酶活力急剧升高至对照组的 13 倍以上 (高于 0.07 U/mg), 在 12 h 恢复至对照水平, 随后在 48 h 和 72 h 又显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。

### 2.2 细菌刺激后体腔液中碱性磷酸酶活力变化

体腔液中碱性磷酸酶活力在灿烂弧菌刺激后的 4 h 和 12 h 与对照组水平相近, 在 24 h 和 48 h 显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而在 72 h 又恢复至对照水平; 其余 4 株细菌刺激后, 体腔液中碱性磷酸酶活力变化不规律, 但在 4 h 和 12 h 均明显低于对照组 (图 2)。

### 2.3 细菌刺激后体腔液中超氧化物歧化酶活力变化

灿烂弧菌刺激后, 体腔液中超氧化物歧化

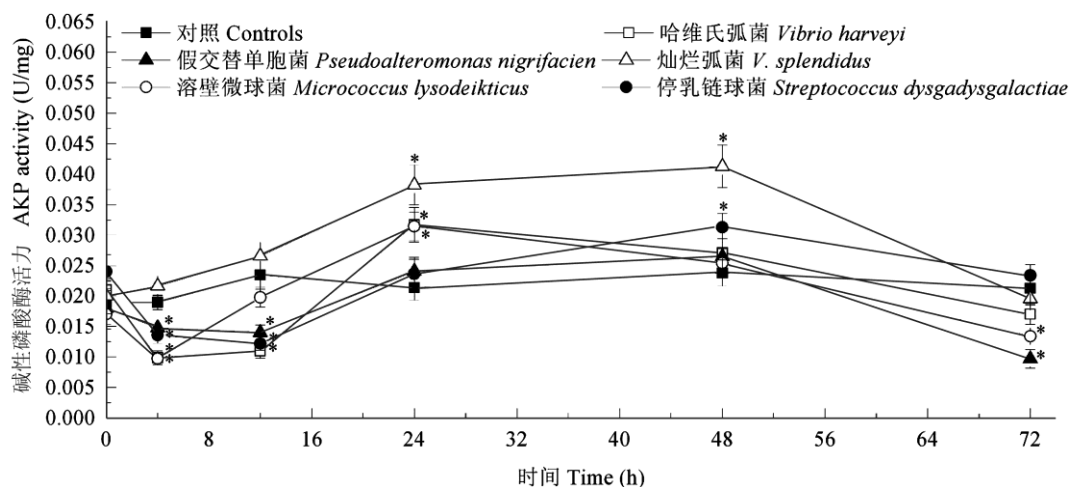


图 2 细菌刺激后体腔液中碱性磷酸酶 (AKP) 活力变化

Fig. 2 The variation of alkaline phosphatase (AKP) activity in the coelomic fluid of sea cucumber after challenge with bacteria

结果以平均值 ± 标准差表示, n = 4。星号 “\*” 表示与对照相比差异显著 (P < 0.05)。

The results were expressed as Means ± SD, n = 4. Asterisks “\*” indicate significant difference (P < 0.05) compared with control.

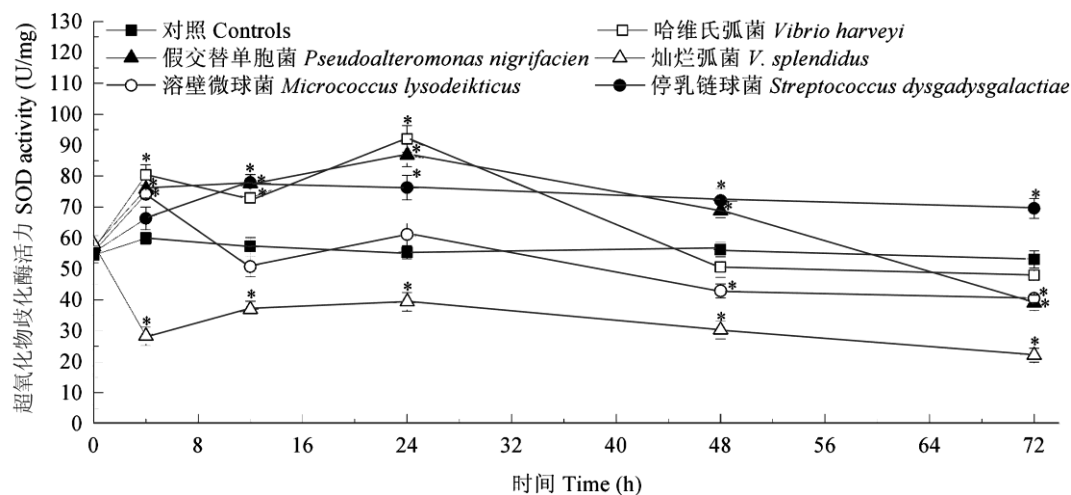


图 3 细菌刺激后体腔液中超氧化物歧化酶 (SOD) 活力变化

Fig. 3 The variation of superoxide dismutase (SOD) activity in the coelomic fluid of sea cucumber after challenge with bacteria

结果以平均值 ± 标准差表示, n = 4。星号 “\*” 表示与对照相比差异显著 (P < 0.05)。

The results were expressed as Means ± SD, n = 4. Asterisks “\*” indicate significant difference (P < 0.05) compared with control.

酶活力均显著低于对照组 (图 3); 哈维氏弧菌刺激后的 4 h、12 h 和 24 h, 体腔液中超氧化物歧化酶活力显著高于对照组 (P < 0.05), 随后在 48 h 和 72 h 又降至对照水平; 假交替单胞菌和溶壁微球菌刺激后 4 h, 体腔液中超氧化物歧

化酶活力显著高于对照组 (P < 0.05), 在 72 h 降至对照水平的 70% 左右; 停乳链球菌刺激后 12 h、24 h、48 h 和 72 h, 体腔液中超氧化物歧化酶活力显著高于对照组 (P < 0.05)。

#### 2.4 细菌刺激后体腔液中溶菌酶活力变化

灿烂弧菌刺激后 24 h、48 h 和 72 h 以及溶壁微球菌刺激后 48 h，体腔液中溶菌酶活力显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )；哈维氏弧菌、假交替单胞菌和停乳链球菌刺激后 4 h 和 12 h，体腔液中溶菌酶活力显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )，

但在 72 h 均恢复至对照水平 (图 4)。

### 2.5 细菌刺激后体腔液中酚氧化酶活力变化

酚氧化酶活力测定结果显示 (图 5)，灿烂弧菌刺激后，体腔液中酚氧化酶活力均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )；溶壁微球菌刺激后的 4 h、

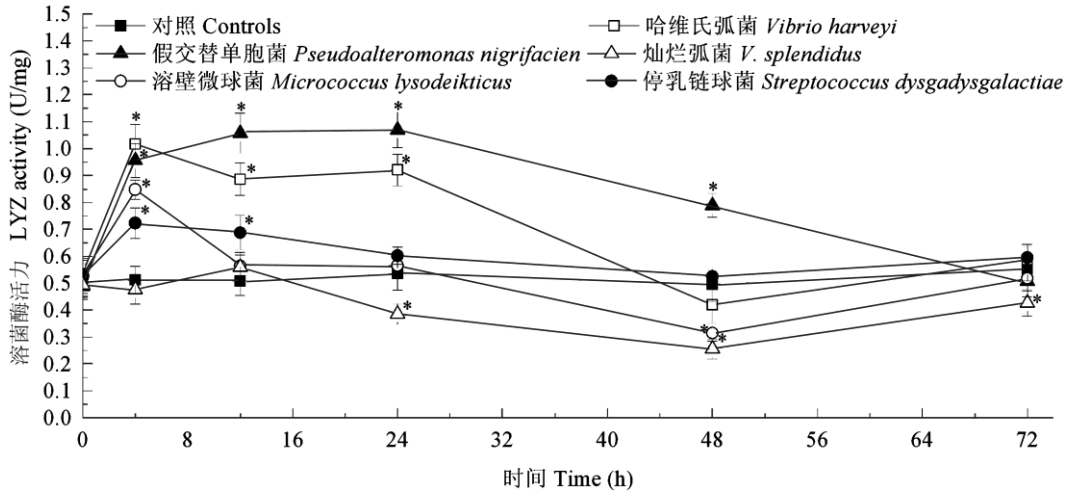


图 4 细菌刺激后体腔液中溶菌酶 (LYZ) 活力变化

Fig. 4 The variation of lysozyme (LYZ) activity in the coelomic fluid of sea cucumber after challenge with bacteria

结果以平均值 ± 标准差表示,  $n = 4$ 。星号 “\*” 表示与对照相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。

The results were expressed as Mmeans ± SD,  $n = 4$ . Asterisks “\*” indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) compared with control.

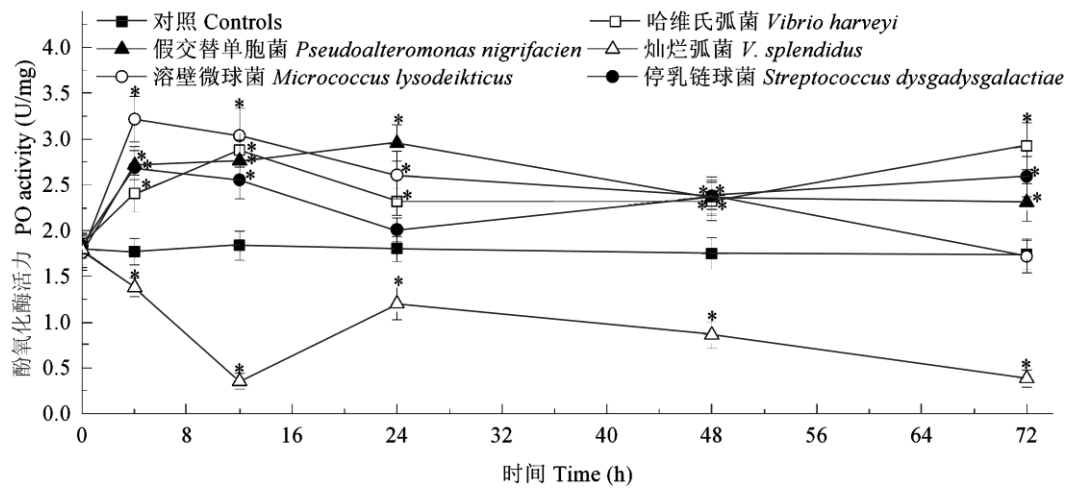


图 5 细菌刺激后体腔液中酚氧化酶 (PO) 活力变化

Fig. 5 The variation of phenoloxidase (PO) activity in the coelomic fluid of sea cucumber after challenge with bacteria

结果以平均值 ± 标准差表示,  $n = 4$ 。星号 “\*” 表示与对照相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。

The results were expressed as Means ± SD,  $n = 4$ . Asterisks “\*” indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) compared with control.

12 h、24 h 和 48 h，体腔液中酚氧化酶活力显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )，并在 72 h 恢复至对照水平；其余 3 株细菌刺激后，体腔液中酚氧化酶活力均明显高于对照组 (图 5)。

### 3 讨论

细菌是仿刺参的主要病原之一，仅在仿刺参腐皮综合症中鉴定出的细菌性病原就超过 8 种 (李强等 2013)。细菌性病害严重制约着仿刺参养殖业的健康发展。仿刺参属于无脊椎动物，缺乏特异性免疫系统，主要依靠其体内的免疫因子 (主要是酶) 来识别、抑制、杀伤和清除病原 (Wang et al. 2008, 刘洪展等 2012)。之前的研究发现，仿刺参体腔液对不同细菌有不同的抗菌活力 (丛聪等 2014)。

在酸性磷酸酶活力测定中，灿烂弧菌、哈维氏弧菌、假交替单胞菌、溶壁微球菌和停乳链球菌刺激后的仿刺参体腔液中酸性磷酸酶活力均显著升高，表明酸性磷酸酶积极有效参与仿刺参对上述 5 种细菌的免疫应答，并且假交替单胞菌和停乳链球菌刺激后 4 h，酸性磷酸酶活力急剧升高至对照水平的 13 倍以上，表明酸性磷酸酶在针对这两种细菌的早期免疫应答中可能起重要作用。弧菌诱导的酸性磷酸酶活力升高在其他一些海洋无脊椎动物中也有报道，例如在不同弧菌注射刺激后，中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) (张明等 2004)、青蛤 (*Cyclina sinensis*) (宋欣等 2010) 和栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) (樊甄姣等 2007) 体内的酸性磷酸酶活力均显著升高。碱性磷酸酶活力测定结果显示，灿烂弧菌刺激后仿刺参体腔液碱性磷酸酶活力显著升高，与鳗弧菌 (*V. anguillarum*) 刺激后的青蛤 (宋欣等 2010) 和栉孔扇贝 (樊甄姣等 2007) 中的结果相似，而其余 4 株细菌刺激后的早期 (4 h、12 h)，仿刺参体腔液中碱性磷酸酶活力均明显低于对照水平。这一结果表明，仿刺参的碱性磷酸酶可有效应答灿烂弧菌的入侵，但可能受到哈维氏弧菌、假交替单胞菌、溶壁微球菌和停乳链球菌

的抑制。超氧化物歧化酶既直接参与到病原的杀伤、抑制过程，又在机体杀伤、清除病原过程中起到自我保护的重要作用 (Pipe et al. 1994, Holmblad et al. 1999)，因此超氧化物歧化酶活力水平是反映机体免疫抵抗力的重要指标。在仿刺参中，不同细菌刺激后 4 h，体腔液超氧化物歧化酶活力变化明显，表明超氧化物歧化酶是仿刺参中的急性应激类蛋白，与曼氏无针乌贼 (*Sepiella maindroni*) 中的报道结果相似 (He et al. 2014)。此外，与紫贻贝 (*Mytilus edulis*) (Tanguy et al. 2013) 中的结果相似，灿烂弧菌刺激后仿刺参体腔液超氧化物歧化酶活力显著下降，表明注射的灿烂弧菌抑制了仿刺参超氧化物歧化酶系统的应答能力。溶壁微球菌和假交替单胞菌刺激后 4 h，仿刺参体腔液超氧化物歧化酶活力显著升高，但在刺激后 72 h，体腔液超氧化物歧化酶活力低于对照水平，表明这两种菌在刺激早期可引起仿刺参超氧化物歧化酶系统的应激反应，但随着时间的延长可能会削弱仿刺参超氧化物歧化酶系统的应答能力。停乳链球菌和哈维氏弧菌刺激后，仿刺参体腔液超氧化物歧化酶活力显著升高，表明仿刺参超氧化物歧化酶可有效应答这两种细菌的刺激，并且这两种细菌的刺激可以提高仿刺参的抗氧化自我保护能力。溶菌酶是无脊椎动物体内溶解、抑制细菌的重要免疫因子 (van Herreweghe et al. 2010)。在仿刺参中，哈维氏弧菌、假交替单胞菌和停乳链球菌刺激后，体腔液溶菌酶活力显著升高，而灿烂弧菌刺激后溶菌酶活力显著降低，表明仿刺参溶菌酶可有效应答哈维氏弧菌、假交替单胞菌和停乳链球菌的刺激，而且这几种菌的刺激可增强仿刺参的溶菌、抑菌能力，而灿烂弧菌会抑制仿刺参的溶菌应答反应。溶壁微球菌刺激后的溶菌酶应答变化与其他几株细菌明显不同，在刺激后 4 h，体腔液溶菌酶活力显著升高，而在 48 h 又显著降低，随后在 72 h 恢复到对照水平。溶壁微球菌是溶菌酶的靶细菌之一 (张文会 2003)。研究表明，仿刺参体腔液上清对溶壁微



球菌有显著的抗菌作用(丛聪等 2014), 因此可以推测, 前期溶菌酶活力升高可能是其应答系统的应激反应, 而随后溶菌酶活力的降低则可能是由于溶菌酶大量参与对溶壁微球菌的溶菌反应而消耗了体腔液上清中的溶菌酶, 在刺激后 72 h, 仿刺参的溶菌酶应答系统完成了对入侵溶壁微球菌的免疫应答, 因而溶菌酶恢复至对照水平。仿刺参酚氧化酶活力测定结果显示, 灿烂弧菌刺激后体腔液酚氧化酶活力显著降低, 而其余几株细菌刺激后体腔液酚氧化酶活力显著升高, 表明仿刺参酚氧化酶可有效应答哈维氏弧菌、假交替单胞菌、停乳链球菌和溶壁微球菌的刺激, 并且这几株菌的刺激同样可以提高仿刺参酚氧化酶的应答能力, 相反, 灿烂弧菌对仿刺参酚氧化酶应答系统有强烈的抑制作用。另外, 在 5 种细菌刺激后 4 h, 仿刺参体腔液上清中酚氧化酶活力均有显著变化, 表明酚氧化酶是仿刺参非特异性免疫系统中最敏感、高效的免疫因子之一。病原刺激后酚氧化酶的快速、显著变化在栉孔扇贝(Xing et al. 2008)、悉尼岩牡蛎(*Saccostrea glomerata*)(Butt et al. 2008)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)(Radha et al. 2013)和中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)(Dong et al. 2009)等水生无脊椎动物中均有报道, 显示出酚氧化酶在水生无脊椎动物中具有病原感染生物标志物的潜在应用价值。

综合比较, 在诱导仿刺参免疫因子应答变化上, 革兰氏阳性细菌与革兰氏阴性细菌之间未发现规律性的差异, 而受仿刺参体腔液抑制的溶壁微球菌与不受仿刺参体腔液抑制的灿烂弧菌、哈维氏弧菌、假交替单胞菌和停乳链球菌之间在诱导溶菌酶应答变化上差异明显, 显示出溶菌酶可能是仿刺参清除入侵溶壁微球菌的主要免疫因子, 与作者之前的推测一致(丛聪等 2014)。在受试的 5 株细菌之间, 灿烂弧菌诱导的仿刺参免疫因子应答变化显著不同于其他 4 株细菌, 显示出本研究选取的 5 个免疫指标在指示灿烂弧菌入侵、感染上具有一定的

特异性, 为以后的弧菌病害预警研究奠定了基础。此外, 灿烂弧菌对仿刺参超氧化物歧化酶、溶菌酶和酚氧化酶的显著抑制作用也表明, 该菌对仿刺参的免疫系统具有一定的适应性, 这也可能是仿刺参灿烂弧菌病害频发的主要原因之一。本研究还发现, 停乳链球菌刺激仿刺参后, 除碱性磷酸酶活力在早期有所下降外, 其余免疫相关酶活力均显著升高, 而停乳链球菌在仿刺参中尚无作为病原菌的报道, 因此停乳链球菌具有作为仿刺参免疫增强剂的潜在应用价值。研究表明, 一些寡糖(江晓路等 2009, 马悦欣等 2010)和多糖(刘云等 2008)可有效提高仿刺参体内免疫酶的活力水平, 停乳链球菌中究竟哪些多糖和寡糖成分在促进仿刺参免疫酶活力上发挥重要作用, 有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

- Beauchamp C, Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assays applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1): 276–287.
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1/2): 248–254.
- Butt D, Raftos D. 2008. Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(3): 299–306.
- Cerenius L, Lee B L, Söderhäll K. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29(6): 263–271.
- Dong C H, Zhao J M, Song L S, et al. 2009. The immune responses in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* challenged with double-stranded RNA. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(3): 438–442.
- González F, Fárez-Vidal M E, Arias J M, et al. 1994. Partial purification and biochemical properties of acid and alkaline phosphatases from *Myxococcus coralloides* D. *Journal of Applied Bacteriology*, 77(5): 567–573.

- He J Y, Chi C F, Liu H H. 2014. Identification and analysis of an intracellular Cu/Zn superoxide dismutase from *Sepiella maindroni* under stress of *Vibrio harveyi* and Cd<sup>2+</sup>. *Developmental & Comparative Immunology*, 47(1): 1–5.
- Hellio C, Bado-Nilles A, Gagnaire B, et al. 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22(4): 433–440.
- Holmblad T, Söderhäll K. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*, 172(1/2): 111–123.
- Jiang J W, Zhou Z C, Dong Y, et al. 2014. Characterization of phenoloxidase from the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Immunobiology*, 219(6): 450–456.
- Pipe R K, Porter C, Livingstone D R. 1994. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and hemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 3(3): 221–233.
- Radha S, Mullainadhan P, Arumugam M. 2013. Detection of two distinct types of hemolymphatic prophenoloxidase and their differential responses in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, upon infection by white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 376/379: 76–84.
- Söderhäll K. 1981. Fungal cell wall  $\beta$ -1, 3-glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surfaces of crayfish hemocyte lysate. *Developmental & Comparative Immunology*, 5(4): 565–573.
- Tanguy M, McKenna P, Gauthier-Clerc S, et al. 2013. Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 39(4): 419–429.
- van Herreweghe J M, Vanderkelen L, Callewaert L, et al. 2010. Lysozyme inhibitor conferring bacterial tolerance to invertebrate type lysozyme. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(7): 1177–1188.
- Wang F Y, Yang H S, Gao F, et al. 2008. Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 151(4): 491–498.
- Wang T T, Xu Y P, Liu W J, et al. 2011. Expression of *Apostichopus japonicus* lysozyme in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 77(1): 20–25.
- Xing J, Lin T T, Zhan W B. 2008. Variations of enzyme activities in the haemocytes of scallop *Chlamys farreri* after infection with the acute virus necrobiotic virus (AVNV). *Fish & Shellfish Immunology*, 25(6): 847–852.
- 艾春香, 陈立桥, 刘晓玲, 等. 2008. 维生素E对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 酚氧化酶、抗菌力和溶菌酶活性的影响. *海洋与湖沼*, 39(2): 119–123.
- 陈蕾蕾, 王未名, 祝清俊, 等. 2010. 细菌多糖的生物合成机制. *微生物学报*, 50(12): 1583–1589.
- 丛聪, 蒋经伟, 董颖, 等. 2014. 仿刺参体腔液的抗菌特性. *水产学报*, 38(9): 1548–1556.
- 樊甄姣, 杨爱国, 吕振明, 等. 2007. 鳃弧菌注射对栉孔扇贝免疫活性的影响. *南方水产*, 3(6): 52–55.
- 江晓路, 杜以帅, 王鹏, 等. 2009. 褐藻寡糖对刺参体腔液和体壁免疫相关酶活性变化的影响. *中国海洋大学学报*, 39(6): 1188–1192.
- 李强, 孙康泰, 张显昱. 2013. 刺参“腐皮综合症”研究进展. *中国农业科技导报*, 15(6): 40–45.
- 刘洪展, 郑风荣, 孙修勤, 等. 2012. 亚硝酸钠对刺参免疫反应中体腔液酶活力的影响. *水产学报*, 36(1): 98–105.
- 刘云, 孔伟丽, 姜国良, 等. 2008. 2种免疫多糖对刺参组织主要免疫酶活性的影响. *中国水产科学*, 15(5): 787–793.
- 马悦欣, 许珂, 王银华, 等. 2010.  $\kappa$ -卡拉胶寡糖对仿刺参溶菌酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响. *大连海洋大学学报*, 25(3): 224–227.
- 宋欣, 张丽岩, 高玮玮, 等. 2010. 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 侵染对青蛤 (*Cyclina sinensis*) 磷酸酶活性的影响. *海洋与湖沼*, 41(2): 254–258.
- 于明志, 王婷, 张峰. 2008. 罗氏海盘车 (*Asterias rollestoni* Bell) 体腔细胞及免疫功能的初步研究. *现代生物医学进展*, 8(8): 1452–1456.
- 张键, 毛建民, 蔡孟深. 1995. 革兰氏阴性细菌O抗原寡糖的研究. *化学通报*, (3): 25–30.
- 张明, 王雷, 郭振宇, 等. 2004. 脂多糖和弧菌对中国对虾血清磷酸酶、超氧化物歧化酶和血蓝蛋白的影响. *海洋科学*, 28(7): 22–25.
- 张文会. 2003. 从鸡蛋清中提取溶菌酶的研究. 北京: 北京化工大学硕士学位论文.