

文章编号: 1000- 0615(2002)03- 0285- 04

• 研究简报 •

## 中国对虾淋巴器的酚氧化酶

刘晓云<sup>1</sup>, 张志峰<sup>2</sup>, 姜 明<sup>1</sup>, 王静凤<sup>2</sup>, 廖承义<sup>2</sup>

(1. 青岛海洋大学测试中心, 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋大学生命学院, 山东 青岛 266003)

关键词: 中国对虾; 淋巴器; 病毒; 酚氧化酶; 髓样结构

中图分类号: Q26; S917 文献标识码: A

### The phenoxidase in lymphatic organ of *Penaeus chinensis*

LIU Xiao-yun<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-feng<sup>2</sup>, JIANG Ming<sup>1</sup>, WANG Jing-feng<sup>2</sup>, LIAO Cheng-yi<sup>2</sup>

(1. Test Center of Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China;

2. College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** The activity and location of phenoxidase (PO) in lymphatic organ of *Penaeus chinensis* were studied by enzyme cyto-chemical technique of electronic microscope. The results showed: 1. Few PO positive reaction in lymphatic organ of health individual was observed. 2. In the sick, the activity of PO in lymphatic organ appeared in different degree. Observed by electronic microscope, the multiplying and expanding of smooth endoplasmic reticulum in the endothelial cell of lymphatic tubules were induced by virus invading. Meanwhile, the activity of PO appeared; Many PO positive granular and myelinefigure existed in the cells of lymphatic tubule wall; In the exterior lymphatic tubule, the quantity of virus reduced obviously. PO positive granular in the hemal sinuses can be found secreted from tubule cell. It is inferred: (a) PO can destroy virus. (b) Lymphatic tubules have the effects of filtering haemolymph and secreting PO granular.

**Key words:** *Penaeus chinensis*; lymphatic organ; virus; phenoxidase; myelinefigure

酚氧化酶(phenoxidase, PO)作为一个类补体系统<sup>[1]</sup>在甲壳动物中的作用日益受到人们的重视,国内外学者在酚氧化酶与免疫的关系方面作了许多工作。一致的看法是,微生物细胞壁中的多糖成份可激活酚氧化酶原系统<sup>[2]</sup>。甲壳动物血细胞中的酚氧化酶原系统被激活后可促进血细胞的吞噬与包裹,介导凝集和凝固,产生杀菌物质<sup>[1-4]</sup>。但对于PO与病毒的关系则研究较少,在被病毒感染的对虾组织中直观地显示PO活性及PO对病毒的作用目前尚未见报道。对虾淋巴器被认为是对虾的免疫器官<sup>[5,6]</sup>。本工作以健康和患病中国对虾的淋巴器为材料,运用酶细胞化学技术,在透射电镜下显示淋巴器中的PO形态及酶活性反应部位,比较正常淋巴器和被病毒感染的淋巴器细胞中PO活性的差异,观察PO对病毒的作用,以进一步认识PO在甲壳动物免疫反应中发挥的作用以及淋巴器在对虾免疫反应中所起的作用。

收稿日期: 2001-04-29

资助项目: 国家重点基础研究发展规划项目资助(G1999012005)

作者简介: 刘晓云(1960-),女,山东青岛人,硕士,高级工程师,从事海洋生物细胞生物学研究。Tel: 0532-2032447

通讯作者: 张志峰(1964-),女,山东青岛人,博士,从事海洋无脊椎动物发育生物学研究。Tel: 0532-2031647, E-mail: zzfp107@mail.

ouqf.edu.cn

©1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

# 1 材料和方法

## 1.1 实验材料

由青岛市四方路水产品市场购得健康和有病的成体中国对虾用于实验。

## 1.2 方法

参照 Coles 氏的方法见文献[7],并稍作修改。活体解剖出中国对虾淋巴器官,于 10% Baker 氏福尔马林钙中预固定 1h,0.1MPBS 漂洗,将样品切成 40~60 $\mu\text{m}$  薄片,分别进入 PO 孵育液和对照液中反应 1.5h(PO 孵育液: L-多巴 10mg、NaCl 0.2g、0.1mol $\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 10mL,对照液中去掉 L-多巴)。0.1mol $\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 漂洗。经孵育后的样品按常规超薄切片技术继续处理。Nova 超薄切片机超薄切片,醋酸双氧铀染色, H-7000 透射电子显微镜观察、拍照。

# 2 结果

中国对虾的淋巴器是一个外包结缔组织膜,内部充满小管的组织结构<sup>[5]</sup>。在患病对虾的淋巴器中病毒从淋巴小管腔面的内皮细胞侵入,并见内皮细胞游离面膜内陷,病毒陷入细胞中,在小管腔的基膜中排列着许多球形病毒颗粒,细胞质中也常见数个或数十个病毒颗粒聚集在一起,共同被膜包被。受病毒感染的内皮细胞最明显的亚显微形态特征是滑面内质网(smooth endoplasmic reticulum, SER)增生、扩张、线粒体丰富,并且在 SER 膜上常表现弱的 PO 阳性反应(图版-8)。

在淋巴小管管壁中间部分的细胞中,有许多 PO 阳性反应颗粒(图版-1),这些颗粒常常与病毒颗粒相接触(图版-2)。在病毒颗粒聚集的区域,出现散在的、不定型的 PO 阳性反应产物,病毒颗粒结构变得不甚清晰,呈模糊状(图版-3)。往往在这些细胞中开始出现大量强弱不一的呈 PO 阳性反应的髓样小体(图版-4、5),与此同时,线粒体上也表现出 PO 阳性反应(图版-6),并在一些髓样小体中可见残余的线粒体结构(图版-7)。

在淋巴小管外缘部位的细胞中,出现了许多含有 PO 阳性产物的次级溶酶体(secondary lysosome, LyII)。在这些溶酶体中有时可见到病毒颗粒(图版-9)。与细胞中出现大量 PO 阳性反应的 LyII 相对应的是这一区域细胞中的病毒颗粒明显减少,带膜的 PO 阳性颗粒仍时常见到,并可见管壁细胞向血窦中分泌 PO 阳性颗粒(图版-10)。

在健康对虾中,淋巴小管的内皮细胞中不表现 SER 增生和 SER 膜的阳性反应,也很少看到 PO 阳性反应的颗粒。

在去掉底物的对照组样品中,淋巴小管管壁细胞的 SER、圆形颗粒和髓样小体均为 PO 阴性。

# 3 讨论

有人认为,淋巴器作为对虾的免疫器官,具有滤过杀菌作用,病菌、病毒等异物经输入淋巴管进入淋巴器,淋巴器进行免疫反应,杀死进入淋巴器的异物,由此完成对有害异物的滤过作用<sup>[6]</sup>。本论文着重讨论患病对虾的淋巴器受病毒感染后,细胞中 PO 的变化及其对病毒的作用,以验证对虾淋巴器具有对异物的过滤作用。

电镜观察发现,淋巴小管中病毒颗粒最多的地方是在小管腔面内皮细胞的游离面上,其次是内皮细胞中。内皮细胞受病毒感染后, SER 增生并伴有扩张现象。细胞生物学理论认为, SER 膜上含有大量的氧化酶,对外来毒物具有解毒作用<sup>[8]</sup>。受病毒感染的内皮细胞中增生的 SER 是淋巴小管对入侵病毒最初的一种免疫反应。

观察中发现,呈 PO 阳性反应的 SER 在扩张后会发折皱变形。脊椎动物中补体系统活化的结果,是形成膜攻击复合物,可造成细胞膜系统的溶解。酚氧化酶原激活系统被认为是类补体系统。在我们所观察的受病毒感染的内皮细胞中, PO 首先作用于内膜系统,随着内膜系统被破坏,细胞中出现大量的髓样结构。Cheng<sup>[9]</sup>在对双壳类血细胞的研究中,把髓样结构称作消化膜。我们通过酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)孵育反应,显示这种髓样结构上有 ACP 阳性反应。因此推测这些 PO 和 ACP 均表现阳性的髓样结构是在酚氧化酶原激活系统对细胞内的膜系统起破坏作用之后,溶酶体酶加入其中,发挥消化作用的产物。上述这种细胞超微结构的改变,将导致病毒蛋白的合成功能受到破坏。另一方面,线粒体中的 PO 阳性反应及呈 PO 阳性反应的髓样结构中的线粒体残体,提示我们,病毒感染细胞后, PO 也对线粒体造成一定程度的破坏,从而破坏病毒蛋白合成过程中的供能系统。

在淋巴小管壁中间部位的细胞中, PO 阳性颗粒最多,并常常看到 PO 阳性颗粒对病毒颗粒的作用过程。PO 阳性颗粒通过与病毒颗粒接触,释放其内容物,随之在病毒颗粒上看到散在的 PO 阳性反应产物,并见病毒颗粒结构变得模糊。管华诗<sup>[6]</sup>、李天道等<sup>[10]</sup>认为:酚氧化酶及其级联反应产物具有杀菌作用。从我们的观察结果看,有活性的 PO 具有溶解

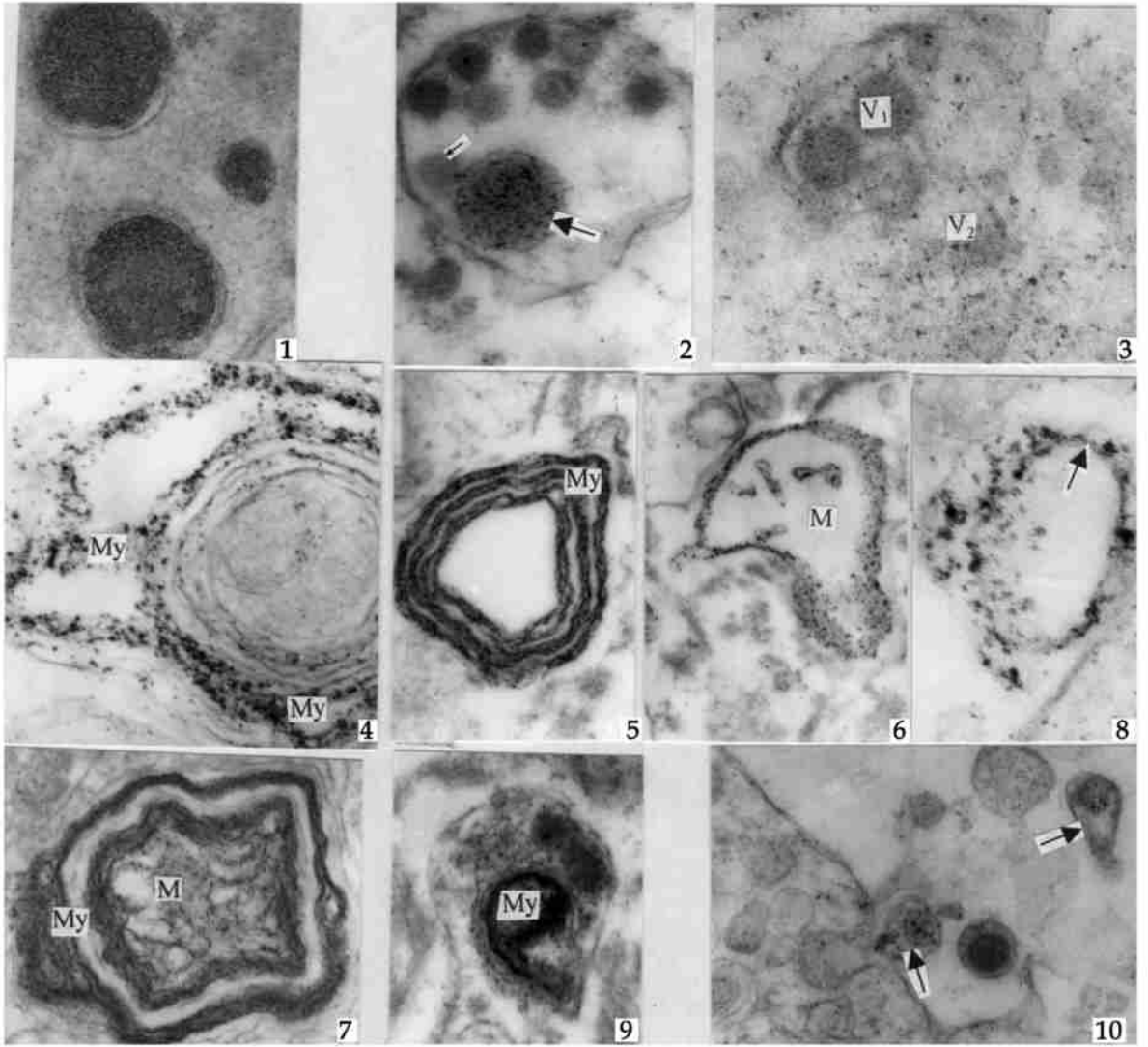
病毒的作用。

在淋巴小管最外层的细胞中,随着许多含有 PO 和 ACP 阳性反应产物的次级溶酶体 (LyII) 的出现,病毒颗粒数量明显减少。在某些 LyII 中(图版-9),还可看到正在进行的 PO 对病毒颗粒的破坏作用。表明这些 LyII 是 PO 和 ACP 共同对病毒发挥作用后的产物。观察中还发现,淋巴小管外层细胞的细胞游离面可以胞吐的方式向血窦中排放 PO 阳性颗粒。表明淋巴小管具有向血淋巴分泌 PO 的功能。

综上所述,病毒侵入对虾淋巴器后,先从淋巴小管内皮细胞进入小管壁,引起内皮细胞中 SER 增生,扩张、变形,随之出现大量髓样结构,使合成病毒蛋白所需的细胞内膜系统大量被破坏,限制了病毒蛋白的合成。在淋巴小管壁最外层的细胞中,病毒颗粒已非常少见,大量呈 PO 和 ACP 阳性反应的 LyII 出现在这些小管外层的细胞中。表明淋巴小管受病毒感染后,小管细胞中的 PO 通过破坏细胞内膜系统和直接溶解病毒,起到了破坏、杀死进入淋巴小管的病毒的作用。由此证明了淋巴小管具有过滤淋巴液的作用。

### 参考文献:

- [1] Soderhall K.  $\beta$ 1,3- Glucan enhancement of protease activity in crayfish hemocyte lysate[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1983, 74B: 221- 224.
- [2] Soderhall K, Smith V J. Separation of the hemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods[J]. *Dev Comp Immune*, 1983, 7: 229- 239.
- [3] Luo R X, Jiang Y X, Li G Y. Studies on the phenoloxidase activities in homocytes of the shrimp[J]. *Experiments and Techniques*, 1996, 6: 1 - 3. [罗日祥, 姜玉香, 李光友. 中国对虾血细胞中酚氧化酶活力研究[J]. *实验与技术*, 1996, 6: 1- 3.]
- [4] Wang L, Li G Y. Advance in the studies of humoral immunity in crustaceans[J]. *Marine Sciences*, 1992, 3: 18- 19. [王雷, 李光友. 甲壳动物的体液免疫研究进展[J]. *海洋科学*, 1992, 3: 18- 19.]
- [5] Liu X Y, Liu S Q, Jiang M. Observation and Research on the Structure and Function of lymphoid organ of *Penaeus chinensis* [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1999, (29):167- 171. [刘晓云, 刘树青, 姜明. 中国对虾类淋巴器结构观察及功能探讨[J]. *青岛海洋大学学报*, 1999. (29): 167- 171.]
- [6] Guan H S. Immunology, cell cultivation and disease studies of marine cultural animals[M]. Shandong Science and Technology Press, 1994. 4: 337- 352 [管华诗. 海水养殖动物的免疫、细胞培养和病毒研究[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1999. 1- 31.]
- [7] Coles J A, Pipe R K. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis* [J]. *Fish Shellfish Immunology*, 1994, 4: 337- 352.
- [8] Luo S Q. *Medicine cell biology*[M]. Beijing: Military Medicine Science Press, 1998. 74- 75. [罗深秋. *医学细胞生物学*[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 74- 75.]
- [9] Cheng T C. Bivalves[A]. In: *Invertebrate blood cells* (Ratcliffe N A, Rowley A F. eds)[M]. Acad Press, London, 1981. 233- 300.
- [10] Li T D, Yu J, Yu K K. Studies on the phenoloxidase activities in the serum of *Penaeus chinensis* [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1998, 51- 56. [李天道, 于佳, 俞开康. 中国对虾血清中酚氧化酶活力研究[J]. *海洋湖沼通报*, 1998, 51- 56.]



图版说明 Explanation of Plate

1. 淋巴小管管壁细胞中的PO 阳性反应颗粒; 2. 示 PO 阳性反应颗粒(粗箭头)与病毒颗粒(细箭头)相接触; 3. 示 PO 的作用使病毒颗粒结构变得模糊不清(V1: 病毒颗粒; V2: 结构模糊的病毒颗粒); 4. 淋巴小管管壁细胞中 PO 阳性反应的髓样结构(My); 5. 淋巴小管管壁细胞中呈 PO 强阳性反应的髓样结构(My); 6. 淋巴小管管壁细胞中 PO 阳性反应的线粒体(M); 7. 内含残余线粒体的 PO 阳性反应的髓样结构; 8. 内皮细胞中呈 PO 阳性反应的内质网(箭头); 9. 示淋巴小管外缘细胞中被膜包围在一起的呈 PO 阳性反应的 LyII 和未被彻底破坏的病毒; 10. 淋巴小管外缘细胞向血窦(sin)中排放 PO 阳性反应物质(箭头)。

1. PO positive reaction granular in the cell of lymphatic tubule wall,  $\times 22k$ ; 2. Showing PO positive reaction granular(thick arrow) contacting with virus granular(thin arrow),  $\times 60k$ ; 3. Showing the action of PO obscuring the structure of virus granular (V1: virus granular; V2: unclear structure of virus granular),  $\times 80k$ ; 4. Myelinfiqure of PO positive reaction in the cell of lymphatic tubule wall,  $\times 7k$ ; 5. Myelinfiqure of PO strong positive reaction in the cell of lymphatic tubule wall,  $\times 40k$ ; 6. mitochondria of PO positive reaction in the cell of lymphatic tubule wall,  $30k$ ; 7. Myelinfiqure containing mitochondria residue of PO positive reaction,  $\times 22k$ ; 8. Endoplasmic reticulum of PO positive reaction in the endothelial cell,  $\times 30k$ ; 9. Showing LyII of positive reaction surrounded by membrane in the cells of exterior lymphatic tubule and incompletely destroyed virus granular (arrow),  $\times 36k$ ; 10. Cells in exterior lymphatic tubule secreting PO positive reaction substance into hemal sinus (arrow),  $\times 45k$ .