

文章编号:1000 - 0615(2006)02 - 0236 - 05

-1,3-葡聚糖及其羧甲基衍生物对海湾扇贝免疫功能的影响

杨文鸽^{1,2}, 薛长湖², 徐大伦¹, 黄晓春¹, 欧昌荣¹

(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211;

2. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要:对海湾扇贝注射酵母 -1,3-葡聚糖及不同取代度的羧甲基葡聚糖(包括 CMG 1、CMG 2、CMG 3 和 CMG 4, 取代度分别为 0.335、0.556、0.732 和 0.857), 分别于注射后 24、48 和 72 h 测定血清蛋白含量及血清和血细胞中酚氧化酶(PO)、超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶(LSZ)活力, 比较 -1,3-葡聚糖及羧甲基葡聚糖对扇贝免疫功能的影响。结果显示:1) 与对照组相比, 葡聚糖组血清蛋白含量无显著变化, CMG 2、CMG 3 和 CMG 4 组注射后 48 h 有显著提高;2) 葡聚糖和 CMG 4 可以迅速持久地增加扇贝血清 PO 活力, CMG 的取代度越大, 提高血细胞 PO 活力的能力越强;3) 在提高扇贝血淋巴 SOD 活性作用中, CMG 4 组效果要优于其余试验组;4) CMG 4 组注射后 24、48 h, 血清 LSZ 活力分别有极显著和显著提高, 72 h 后所有试验组与对照组无显著差异, CMG 3 组注射后 24 h 血细胞 LSZ 活力极显著增加, CMG 4 组注射后 24、48 和 72 h 有显著提高。表明羧甲基化不但提高了葡聚糖的水溶性, 而且影响其对扇贝的免疫增强效果, 取代度为 0.857 的 CMG 4 对扇贝的免疫增强效果最为显著。

关键词: 海湾扇贝; -1,3-葡聚糖; 羧甲基葡聚糖; 超氧化物歧化酶; 酚氧化酶; 溶菌酶

中图分类号: S942 **文献标识码:** A

The effect of -1,3-glucan and its carboxymethylated derivatives on the immunological function in *Argopecten irradians*

YANG Wen-ge^{1,2}, XUE Chang-hu², XU Da-lun¹, HUANG Xiao-chun¹, OU Chang-rong¹

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. College of Food Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: *Argopecten irradians* were stimulated by injection with -1,3-glucan and its carboxymethyl-glucan (CMG) with different degrees of substitution (DS) (including CMG 1, CMG 2, CMG 3 and CMG 4 with DS of 0.335, 0.556, 0.732 and 0.857, respectively). The immunological stimulation activity of -1,3-glucan and CMG was compared by determining the contents of the serum protein and phenoloxidase (PO), superoxide dismutase (SOD), lysozyme (LSZ) activity in the serum and blood corpuscle of *Argopecten irradians* after injection for 24, 48 and 72 h, respectively. The results showed as follows: 1) Compared with the control, the serum protein contents had no significant differences in *Argopecten irradians* injected with -1,3-glucan. After injection for 48 h, the serum protein contents in group CMG 2, CMG 3 and CMG 4 were significantly higher than those in the control. 2) -1,3-glucan and CMG 4 could quickly enhance the PO activity in the serum. The bigger DS of CMG, the higher immunological stimulation activity on the PO activity in the blood corpuscle. 3) CMG 4 group was more effective on adding the SOD activity in the serum and blood corpuscle of *Argopecten irradians*. 4) After injection with CMG 4 for 24 h and 48 h, the LSZ activity in the serum was very significantly higher and higher than that in the control respectively, but there were no significant differences in each treatment at 72 h

收稿日期:2005-03-07

资助项目:宁波市科技局青年基金项目(02J20102-19)

作者简介:杨文鸽(1966-),女,浙江诸暨人,副教授,硕士,主要从事生物化学与食品科学研究。Tel:0574-87600569, E-mail: yangwenge@nbu.edu.cn

通讯作者:薛长湖, E-mail: xuech@mail.oud.edu.cn

after injection. As far as the LSZ activity in the blood corpuscle, CMG 3 group was very significantly higher than that in the control at 24 h after injection, and CMG 4 group was significantly higher at 24, 48, 72 h after injection. The results indicated that carboxymethyl modification could not only enhance the water-solubility of -1,3-glucan, but also affect the immunological function. CMG 4 with DS of 0.857 had the most obvious effect on the immunological function in *Argopecten irradians*.

Key words: *Argopecten irradians*; -1,3-glucan; carboxymethyl-glucan(CMG); superoxide dismutase(SOD); phenoloxidaes(PO); lysozyme(LSZ)

扇贝是我国海水养殖的主要贝类之一,近年由于病害增多、养殖环境恶化以及自身抗病力下降,养殖成活率有所降低。虽然抗生素的使用能在一定程度上缓解疾病的发生,但往往容易造成药物残留、水体正常微生物种群失调、耐药性微生物增加、养殖动物内脏机能损伤等一系列不良后果。扇贝等无脊椎动物不能产生免疫球蛋白,缺乏抗体介导的特异性免疫反应,只能通过血细胞的吞噬作用、血清的凝集作用及血清中各种因子的抑菌与杀菌作用等非特异性免疫反应来抵御外来病原的侵害^[1]。在养殖贝类的病害防治中,许多学者开始将多糖作为一种非特异性免疫促进剂,研究较多的有海藻多糖、脂多糖、肽聚糖及酵母葡聚糖^[2,3]。酵母葡聚糖能提高鱼类的溶菌酶产量和巨噬细胞的杀菌活性,促进吞噬细胞产生大量超氧化物及增加血液中白血球数量,增加鱼体抗病能力^[4-6],孙虎山等研究发现酵母葡聚糖也能极显著地增强栉孔扇贝血淋巴中酸性磷酸酶的活力^[7]。然而综合比较酵母葡聚糖及其不同取代度的羧甲基衍生物对海湾扇贝血清蛋白含量及血清和血细胞中酚氧化酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶活力的影响,国内外均未见报道。本文通过对海湾扇贝注射酵母-1,3-葡聚糖和不同取代度的羧甲基葡聚糖,探讨葡聚糖及其羧甲基衍生物作为扇贝免疫促进剂的有效性,为更深入认识贝类的免疫防御机制、养殖贝类的病害防治和健康养殖工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

海湾扇贝(*Argopecten irradians*),3-4月采自沿海养殖场,体长为50~55mm。-1,3-葡聚糖由实验室利用啤酒废酵母制备,透析冻干,羧甲基化后得到羧甲基葡聚糖(CMG),其取代度分别为CMG1为0.335,CMG2为0.556,CMG3为0.732和CMG4为0.857。

溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)购于中国科学院微生物菌种保藏中心,菌株号为1.643。三羟甲基氨基甲烷、L-dopa和肝素钠为Sigma公司产品,其余为国产分析纯试剂。

1.2 扇贝血清及血细胞提取液的制备

-1,3-葡聚糖和CMG经紫外线照射后用无菌生理盐水配制成0.50%的溶液或悬浮液。选取个体大小相近的扇贝,按 $5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 体重剂量用微量注射器从扇贝闭壳肌背后缘注射样品液,对照组注射等量的无菌生理盐水,养于室内水族箱中。分别于注射后24、48和72h各从6只扇贝闭壳肌血窦中取血约1.5mL, $3000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 冷冻离心10min,移出血清,在血细胞中加入与血清等量的双蒸水,溶血后 $3000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10min,上清液即为血细胞提取液。扇贝血清及血细胞提取液分别用于酶活测定,各指标测定的样本数 $n=6$ 。

1.3 实验指标的测定

蛋白含量测定 Folin-酚法^[8]。

酚氧化酶(phenoloxidase,PO)活力测定

按Ashida^[9]的方法,将200 μL 待测酶液和200 μL 0.02 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的L-dopa于试管中混合,30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应30min,加入2.6mL预冷的磷酸钾缓冲液(0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH6.0)终止反应,测 $\text{OD}_{490\text{nm}}$,以实验条件下每分钟 $\text{OD}_{490\text{nm}}$ 增加0.001定义为1个酶活力单位。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活力的测定 改进的连苯三酚自氧化法^[10]。

溶菌酶(lysozyme,LSZ)活力测定 按照Hultmark^[11]方法进行测定,以溶壁微球菌冻干粉为底物,二次活化接种于PGY液体培养基上,摇床培养48h,离心收集菌体,将菌体用0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸钾盐缓冲液(pH6.4)配成一定浓度的悬液($\text{OD}_{570\text{nm}}=0.3$),取该悬液3mL与50 μL 酶液混匀,570nm测初始光密度值(A_0),后置于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温,取出后立即在冰浴中放置10min以终止反应,测570nm光密度值(A)。

溶菌酶活力 (U_L) = $(A_0 - A) / A$

1.4 数据处理

采用成组双样本均值分析 (t 检验) 方法, 比较试验组与对照组样本之间的差异。图例中 Glucan 代表 -1,3-葡聚糖, CMG 代表不同取代度羧甲基葡聚糖, * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

2 结果与讨论

2.1 -1,3-葡聚糖及羧甲基葡聚糖对扇贝血清蛋白含量的影响

扇贝注射 -1,3-葡聚糖及不同取代度 CMG, 分别在注射后 24, 48 和 72 h 测得其血清蛋白含量 (图 1)。血清蛋白包括细胞因子、粘附分子、炎症因子以及各种行使杀菌功能的酶和蛋白质, 是一个重要的免疫指标。当机体受到刺激时, 这些蛋白分子从细胞中释放出来, 使血清中杀菌物质含量升高, 从而提高自身抗病能力。

从图 1 可看出, 扇贝注射 -1,3-葡聚糖后, 72 h 内血清蛋白含量没有显著变化, 与空白组基本相同。CMG 的影响随取代度不同而不同, 与空白组相比, 注射 24 h 后 CMG 1 和 CMG 3 组血清蛋白含量略有下降, 但均无显著差异, CMG 2 和 CMG 4 组与对照组基本相同; 在 48 和 72 h 时 CMG 2 和 CMG 3 组分别与空白对照组差异显著 ($P < 0.05$), 但两组的变化趋势又有差别, CMG 2 组的蛋白含量在 48 h 到最大, 随之下降; CMG 3 组蛋白含量却持续增高。而 CMG 1 组和 CMG 4 组仅在 48 h 与对照相比有所增加, 72 h 后差别不明显。

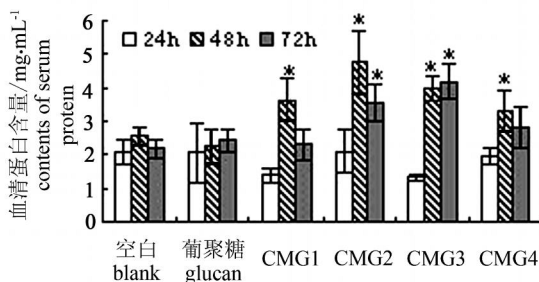


图 1 -1,3-葡聚糖及羧甲基葡聚糖对扇贝血清蛋白含量的影响

Fig. 1 Effect of -1,3-glucan and CMG on the contents of serum protein of *A. irradians*

2.2 -1,3-葡聚糖及羧甲基葡聚糖对扇贝血淋巴 PO 活力的影响

注射 -1,3-葡聚糖和 CMG 4 后 24 和 48 h 时血清 PO 比活力持续高于对照组, 差异极显著 ($P < 0.01$), 在 72 h 后又与对照组持平 (图 2)。CMG 1、CMG 2 和 CMG 3 组仅在 48 h 后极显著高于对照组, 24 和 72 h 与空白组无显著差异。表明 -1,3-葡聚糖和 CMG 4 可以迅速持久地增加血清 PO 比活力。

注射 CMG 24 h 后血细胞中 PO 比活力极显著提高, 并且随着羧甲基取代度的增高, CMG 对扇贝血细胞 PO 活力的影响增加, CMG 4 组对血细胞 PO 活力的极显著性影响持续到 72 h (图 3)。

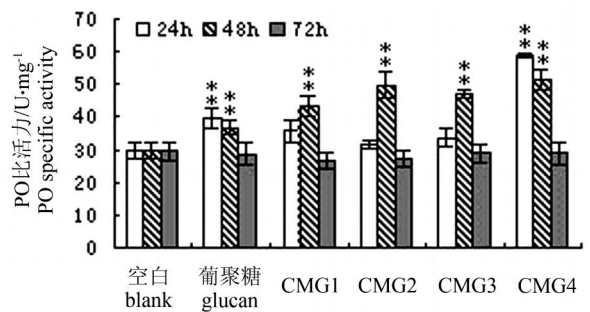


图 2 -1,3-葡聚糖及羧甲基葡聚糖对扇贝血清 PO 活力的影响

Fig. 2 Effect of -1,3-glucan and CMG on the PO activity in serum of *A. irradians*

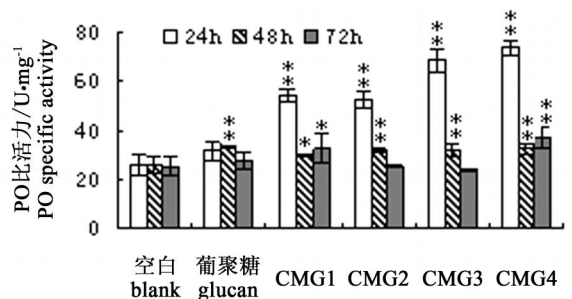


图 3 -1,3-葡聚糖及羧甲基葡聚糖对扇贝血淋巴 PO 活力的影响

Fig. 3 Effect of -1,3-glucan and CMG on the PO activity in blood corpuscle of *A. irradians*

在无脊椎动物中, 酚氧化酶原激活系统是被普遍认可的行使非特异性免疫反应的分子系统, 当无脊椎动物受到异物攻击后, 储存于细胞内的酚氧化酶原就被激活, 激活过程可能是前体被蛋

白酶切割,构象发生改变,激活后 PO 就具有活性,将进一步激发脱颗粒作用、细胞粘附作用、调理作用以及活性氧负离子释放引起呼吸爆发,从而提高机体防御能力^[12]。

PO 以酶原形式存在于甲壳动物血细胞中,血细胞受刺激后该酶原被激活表现出活性,与血细胞的吞噬、包囊、以及血淋巴的抗菌活性和对外源物质的识别有关。由图 2 和图 3 可以看出,CMG 对扇贝血细胞 PO 的影响比对血清 PO 的影响迅速,说明在扇贝中 PO 以酶原形式存在于血细胞中,受 CMG 刺激后逐渐释放到血清中。就各样品对扇贝血淋巴的影响显著性和持续时间上看,CMG 4 明显优于葡聚糖组和其余 CMG 组。

葡聚糖和 CMG 在激活 PO 酶原系统的过程中,可能是通过与细胞膜上的葡聚糖受体结合,将信号传递到细胞内,激活蛋白酶从而引发 PO 酶原系统。在与受体的结合过程中,葡聚糖和 CMG 分子的构象是影响其功能发挥的重要因素。随着羧甲基取代度的升高,CMG 对扇贝 PO 酶活影响越显著,免疫促进作用的增加是否与葡聚糖的水溶性随羧甲基取代度的升高而升高,是否与更多羧甲基基团的引入引起的构象变化有关还有待进一步研究。

2.3 -1,3-葡聚糖及羧甲基葡聚糖对扇贝血淋巴 SOD 活力的影响

作为机体免疫系统的重要指标,SOD 在清除活性氧自由基,防止生物分子损伤,增强吞噬细胞的吞噬能力中发挥重要作用。由图 4 可见,扇贝注射 -1,3-葡聚糖和 CMG 后血清 SOD 活性迅速受到影响,但持续时间不长。注射 -1,3-葡聚糖和 CMG 1 后 24h 时 SOD 活性较对照组有显著提

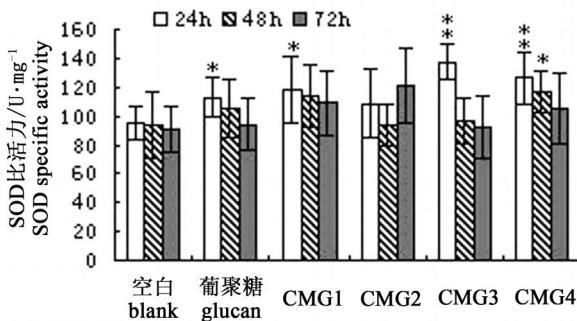


图 4 -1,3-葡聚糖及羧甲基葡聚糖对扇贝血清 SOD 活力的影响

Fig. 4 Effect of -1,3-glucan and CMG on the SOD activity in serum of *A. irradians*

高 ($P < 0.05$),CMG 2 组虽然也有升高,但不显著,CMG 3 和 CMG 4 组 24 h 后 SOD 活性有极显著提高 ($P < 0.01$),注射 48 h 后只有 CMG 4 组显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

在血细胞中的变化如图 5 所示,-1,3-葡聚糖、CMG 1、CMG 2 和 CMG 3 组 SOD 比活无显著变化,仅 CMG 4 组在 24 h 和 72 h 较对照组有显著提高 ($P < 0.05$)。因此在提高扇贝血淋巴 SOD 活性作用中,CMG 4 的效果要优于 -1,3-葡聚糖组和其余 CMG 组。

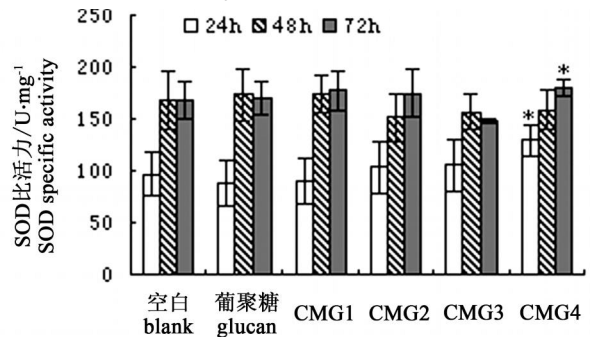


图 5 -1,3-葡聚糖及羧甲基葡聚糖对扇贝血细胞 SOD 活力的影响

Fig. 5 Effect of -1,3-glucan and CMG on the SOD activity in blood corpuscle of *A. irradians*

2.4 -1,3-葡聚糖及羧甲基葡聚糖对扇贝血淋巴 LSZ 活力的影响

注射 -1,3-葡聚糖、CMG 1 和 CMG 3 后 24 h 时 LSZ 比活较对照组有显著提高 ($P < 0.05$),CMG 2 组升高不显著(图 6);与对照组相比,扇贝注射 CMG 4,24 h 后 LSZ 活力呈极显著提高 ($P < 0.01$),48 h 后仍显著高于对照组 ($P < 0.05$),72 h 后所有组与对照组没有显著差异。

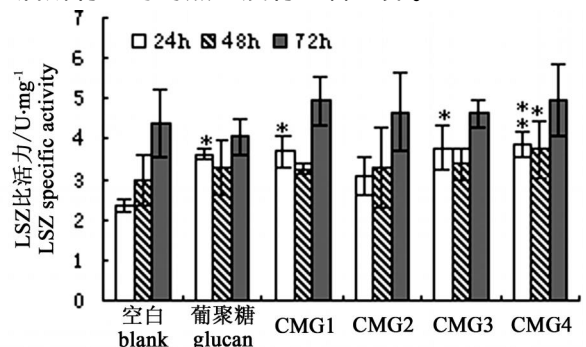


图 6 -1,3-葡聚糖及羧甲基葡聚糖对扇贝血清 LSZ 活力的影响

Fig. 6 Effect of -1,3-glucan and CMG on the LSZ activity in serum of *A. irradians*

比较血细胞中各组 LSZ 活力,如图 7 所示,与对照组相比,CMG 3 分别于 24 和 48 h 极显著增加 ($P < 0.01$),72 h 时没有显著差异;CMG 4 组在 24、48 和 72 h 均显著提高 ($P < 0.05$)。

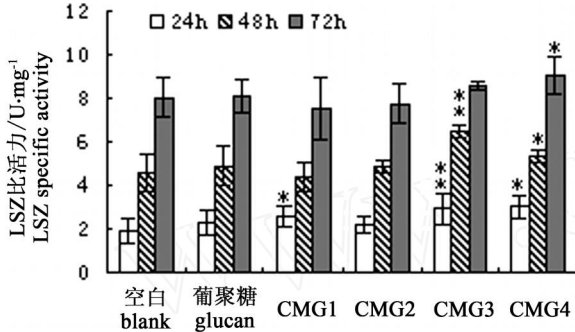


图 7 -1,3-葡聚糖及羧甲基葡聚糖对扇贝血细胞 LSZ 活力的影响

Fig.7 Effect of -1,3-glucan and CMG on the LSZ activity in blood corpuscle of *A. irradians*

溶菌酶能水解革兰氏阳性细菌的细胞壁中粘肽的乙酰氨基多糖并使之裂解被释放出来,形成一个水解酶体系,破坏和消除侵入体内的异物,从而担负起机体防御的功能^[13],同时对真菌、寄生虫以及病毒也具有破坏作用。因此,溶菌酶对扇贝抵抗各种病原体的侵袭具有重要意义。综合比较 -1,3-葡聚糖和 4 种不同取代度 CMG 对扇贝血淋巴溶菌酶活性的影响,CMG 4 对扇贝血清 LSZ 影响显著,且可以使药效发挥时间相对延长。

3 小结

-1,3-葡聚糖对水产动物具有较强的免疫激活作用,能提高虹鳟、大西洋鲑和舌鳎等鱼类溶菌酶活性、补体活性、巨噬细胞杀菌活力,增强巨噬细胞和血细胞超氧化物活力。但在实际使用时 -1,3-葡聚糖的水不溶性常带来诸多不便,而羧甲基化是普遍采用的提高葡聚糖水溶性的改性方法。

以血清蛋白含量、血清和血细胞 PO、SOD 和 LSZ 比活力变化为指标,比较 -1,3-葡聚糖及不同取代度的 CMG 对扇贝免疫功能的影响,在本实验范围内可以看出随着羧甲基化程度的提高,葡聚糖对扇贝免疫力影响增加,取代度为 0.857

的羧甲基葡聚糖对扇贝免疫功能的影响最为显著,且药效发挥时间较长。

参考文献:

- [1] 周永灿,潘金培. 贝类细胞和体液的防御机制研究进展[J]. 水产学报,1997,21(4):449-454.
- [2] 牟海津,江晓路,刘树青,等. 免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶,碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 青岛海洋大学学报,1999,29(3):463-468.
- [3] 王秀华,宋晓玲,黄. 肽聚糖制剂对南美白对虾体液免疫因子的影响[J]. 中国水产科学,2004,11(1):26-30.
- [4] Anderson D P, Siwichi A K. Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion[J]. The Prog Fish Cult, 1996, 56(3): 258-261.
- [5] Brattgjerd S, Evensen O, Lauve A. Effect of injected yeast glucan on the activity of macrophages in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., as evaluated by *in vitro* hydrogen peroxide production and phagocytic capacity[J]. Immunology, 1994, 83(4): 288-294.
- [6] Kawakami H, Shinohara N, Sakai M. The non-specific immunostimulation and adjuvant effects of *Vibrio anguillarum* bacterin, M-glucan, chitin and Freund's complete adjuvant against *Pasteurella piscicida* infection in yellowtail[J]. Fish Path, 1998,33(3):283-292.
- [7] 孙虎山,李光友. 硒化卡拉胶和酵母葡聚糖对栉孔扇贝血淋巴中两种水解酶活性的影响[J]. 海洋与湖沼,2002,33(3):245-249.
- [8] 厉朝龙. 生物化学与分子生物学实验技术[M]. 杭州:浙江大学出版社,2000. 44-45.
- [9] Ashida M. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. Arch Biochem Biophys, 1997,144:749-762.
- [10] 常雅宁. 两种连苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶的比较[J]. 药物分析杂志,2001,5:328-331.
- [11] Hultmark D. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*[J]. Insect Immune,1974,10:136-145.
- [12] Smith V J, Brown J H, Hauton C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? [J]. Fish & Shellfish Immunology,2003,15:71-90.
- [13] Wang S Y, Hsu M L, Hsu H C, et al. The antitumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes [J]. International Journal of Cancer,1997,70(6):699-705.