

哈维氏弧菌和溶藻弧菌对大黄鱼 6 种酶活性的影响

洪婧妮, 毛 勇, 苏永全, 王 军*

(厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 以哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)和溶藻弧菌(*Vibrio anguillarum*)分别对大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)进行病原接种实验, 24 h 后测定肝、脾、鳃的碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)、酸性磷酸酶(Acid phosphatase, ACP)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、溶菌酶(Lysozyme, LSZ)和酚氧化酶(Phenoloxidase, PO)活性. 结果表明: 弧菌入侵 24 h 后, 与吞噬作用相关的水解酶 ACP、AKP 变化不显著, 肝脏溶菌酶 LSZ 活性降低, 出现典型病症, 可能是由于应激反应引起非特异性免疫功能下降所致; 抗氧化酶 CAT、SOD 变化显著, 对清除代谢产生的活性氧有重要作用; 6 种酶中, LSZ、CAT、SOD 和 PO 对病原反应敏感, 适合作为 2 种弧菌入侵的检测指标.

关键词: 哈维氏弧菌; 溶藻弧菌; 大黄鱼; 酶活性

中图分类号: S 943

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2009)03-0418-05

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)是我国最重要的海水养殖种类之一, 但是随着养殖业的迅速发展, 密集的养殖模式导致大黄鱼养殖病害频发, 严重影响了养殖效益. 哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)和溶藻弧菌(*Vibrio anguillarum*)都是诱发大黄鱼弧菌疾病的主要病原菌^[1-2], 通过口或伤口感染, 可致使大黄鱼肌肉溃烂化脓以及内脏器官的严重病变^[3]或引起败血症而导致病鱼死亡^[4]. 目前, 2 种病原菌的致病机理尚在研究之中.

本文以哈维氏弧菌和溶藻弧菌菌悬液分别注射接种健康大黄鱼, 检测病原接种后大黄鱼不同组织的碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶和酚氧化酶活性变化, 探讨 6 种酶的免疫防御作用, 筛选对病原反应较敏感的指标, 为大黄鱼病害的免疫防治提供参考资料和理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

取宁德养殖场的健康大黄鱼, 体长(26.83±1.17) cm, 体质量(329.85±55.73) g.

1.2 致病菌来源

哈维氏弧菌为本实验室保存菌株(编号: TS2 628); 溶藻弧菌菌株(编号: Grop01)由厦门出入境检验检疫局提供.

1.3 病原接种实验

菌株接种于 2% NaCl 的 LB 琼脂培养基, 27℃ 培养 24 h, 用 0.85% 的生理盐水洗脱菌落, 经比浊法计数, 调整浓度至 5×10^8 CFU/mL, 用于人工病原接种实验.

选取健康实验鱼, 于消毒水体中暂养 7 d, 温度 20~21℃, 盐度 1.020, pH 7.2~7.8, 弱光照, 每天换水, 并添加 20% 的水.

待实验鱼稳定后, 选状况良好的个体随机分为 3 组, 每组 100 尾, 第 1 组腹腔注射溶藻弧菌, 每尾鱼注射 5×10^8 CFU/mL 菌液 0.5 mL; 第 2 组腹腔注射哈维氏弧菌, 每尾鱼注射 5×10^8 CFU/mL 菌液 0.5 mL; 第 3 组为对照组注射同等剂量的生理盐水.

1.4 取 样

注射弧菌 24 h 后, 从各组选取 3 尾鱼, 其中实验组选取体表病症明显的实验鱼, 分别取肝、脾、鳃, 分装于 eppendorf 管中, 液氮罐中保存.

1.5 样品处理

取适量肝、脾、鳃组织, 经灭菌的生理盐水润洗, 用滤纸吸干后称量, 加入 9 倍体积的 0.85% 的生理盐水, 冰浴下以电动匀浆机匀浆, 4℃ 超低温离心(12 000 r/min) 20 min, 取上清液分装于 eppendorf 管中, 于超低温冰箱(-80℃)中保存.

1.6 酶活性测定

碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP, EC 3.1.3.1): pNpp 底物法^[5], 酶活性单位定义为: 每分钟分解 1 μmol pNPP 所需的酶量为 1 单位;

酸性磷酸酶(Acid phosphatase, ACP, EC 3.1.3.

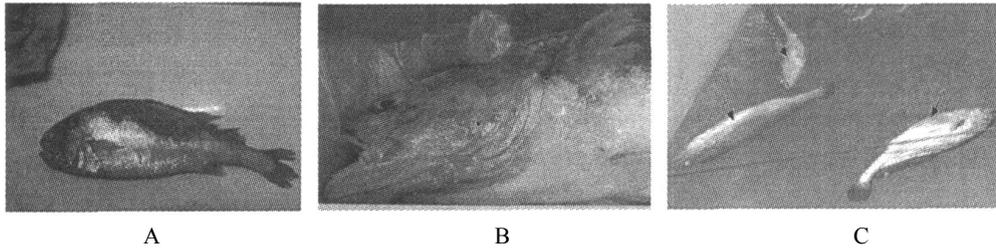


图 1 病原接种 24 h 后体表出现病症的实验鱼

A. 鱼体溃烂; B. 鳃充血、胸鳍溃瘍; C. 鱼仰浮于水面

Fig. 1 Symptoms of the *Pseudosciaena crocea* at 24 th hour after injected with *Vibrio*

2): pNpp 底物法^[5], 酶活性单位定义为: 每分钟分解 1 Lmol pNPP 所需的酶量为 1 单位;

过氧化氢酶(Catalase, CAT, EC 1. 11. 1. 6): 钼酸铵显色法^[6], 酶活性单位定义为: 每分钟分解 1 Lmol 过氧化氢为 1 单位;

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD, EC 1. 15. 1. 1): 邻苯三酚自氧化法^[7], 酶活性单位定义为: 每毫克反应液中, 每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50%时的酶量;

溶菌酶(Lysozyme, LSZ, EC 3. 2. 1. 17): 采用 Hultmark 等人改进的方法^[8], 酶活性单位定义为: 以每毫克酶粗提液蛋白每分钟使混合液吸光度降低的数值来表示溶菌酶的比活力;

酚氧化酶(Phenoloxidase, PO, EC 1. 14. 18. 1): 采用王雷的方法^[9]加以改进, 酶活性单位定义为: 以每分钟增加 0. 001 定义为 1 单位.

1. 7 数据处理

用 SPSS(13. 0) 数据分析软件单因素方差分析处理数据.

2 实验结果

2. 1 病原接种实验后大黄鱼病症

注射 2 种弧菌 24 h 后, 对实验大黄鱼进行解剖及病症观察, 与对照组实验鱼相比较, 2 组病原接种大黄鱼中均有部分个体出现伤口周围鳞片脱落, 鳃充血、胸、腹鳍溃瘍, 鱼体发白, 呼吸困难和仰浮于水面等弧菌病典型病症出现(图 1).

2. 2 病原接种试验后酶活性的变化

取哈维氏弧菌和溶藻弧菌病原接种试验后体表出现明显病变的实验鱼和对照组大黄鱼的肝组织、脾组织和鳃组织进行 6 种酶的活性测定.

2. 2. 1 ACP 活性

对 3 种组织样品的 ACP 活性测定结果(图 2) 表明, 对照组大黄鱼脾脏的 ACP 活性最高, 为 31. 20, 肝

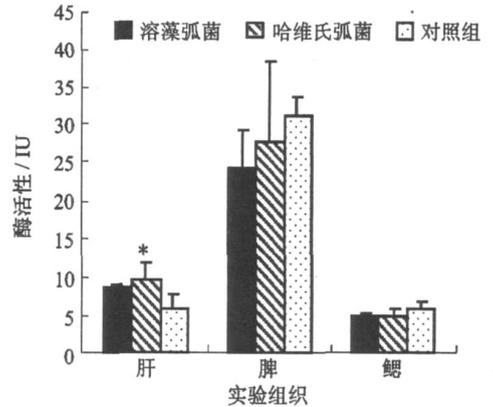


图 2 2 种弧菌对大黄鱼不同组织 ACP 活性的影响

/ * 0 表示该组于对照组差异显著($p < 0. 05$); / * * 0 表示该组与对照组差异极显著($p < 0. 01$), 下同

Fig. 2 Effect of *Vibrio* on acid phosphatase activity of *P. crocea*

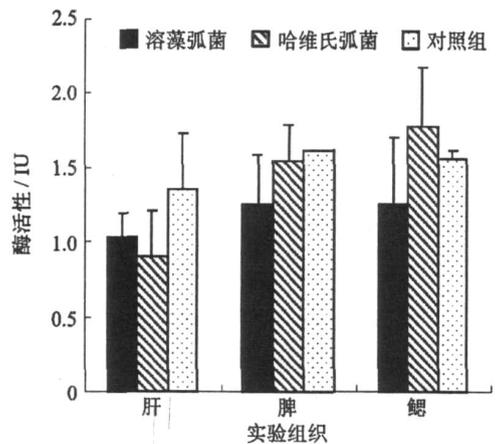


图 3 2 种弧菌对大黄鱼不同组织 AKP 活性的影响

Fig. 3 Effect of *Vibrio* on alkaline phosphatase activity of *P. crocea*

脏和鳃组织分别为 5. 97 和 5. 95, 明显低于脾组织. 分别注射 2 种病原菌后, 脾脏和鳃组织的 ACP 活性呈下降趋势, 肝脏的 ACP 活性呈上升趋势, 其中注射哈维氏弧菌实验鱼的 ACP 活性显著提高($p < 0. 05$).

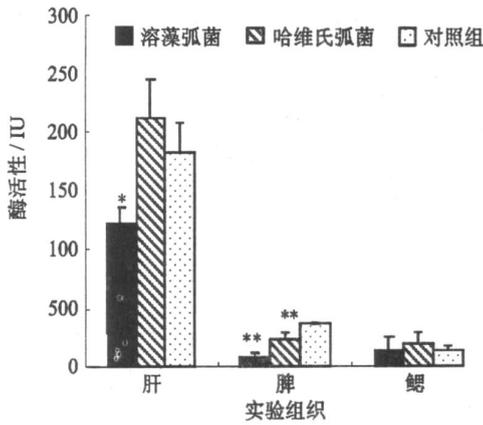


图 4 2 种弧菌对大黄鱼不同组织 CAT 活性的影响
Fig. 4 Effect of Vibrio on catalase activity of *P. crocea*

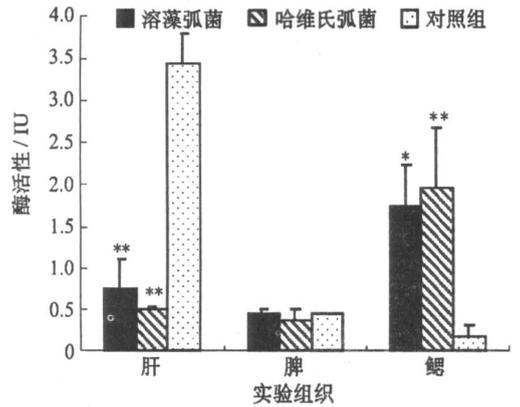


图 5 2 种弧菌对大黄鱼不同组织 SOD 活性的影响
Fig. 5 Effect of Vibrio on superoxide dismutase activity of *P. crocea*

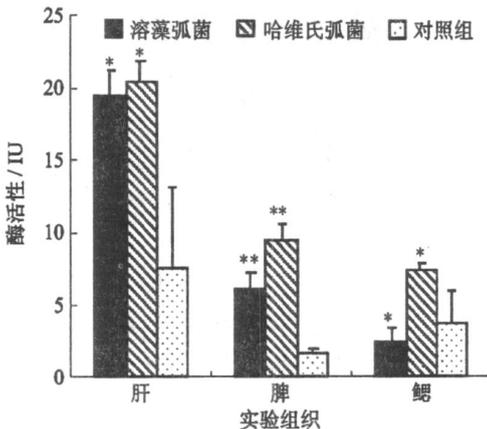


图 6 2 种弧菌对大黄鱼不同组织 LSZ 活性的影响
Fig. 6 Effect of Vibrio on lysozyme activity of *P. crocea*

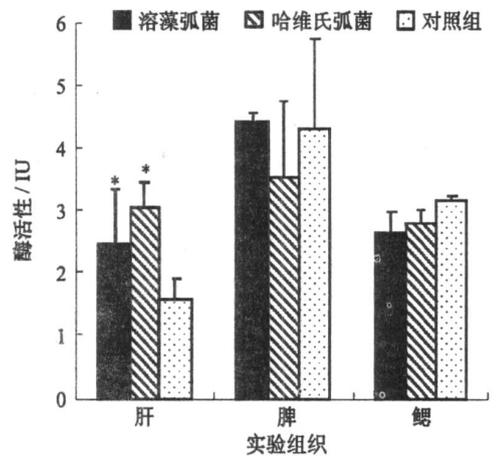


图 7 2 种弧菌对大黄鱼不同组织 PO 活性的影响
Fig. 7 Effect of Vibrio on phenoloxidase activity of *P. crocea*

2.2.2 AKP 活性

3 种组织样品的 AKP 活性测定结果(图 3)表明, 对照组大黄鱼各组织中 AKP 活性差异不大, 实验组除了注射哈维氏弧菌实验鱼鳃组织的 AKP 活性略提高外, 其余各组织的 AKP 活性都略为下降, 但均无显著差异。

2.2.3 CAT 活性

从图 4 可见, 对照组大黄鱼肝脏的 CAT 活性最高, 为 181.54, 显著高于脾脏和鳃组织的 37.63 和 13.52。2 种病原接种试验后, 实验鱼鳃组织的 CAT 活性均稍呈上升趋势; 脾组织的 CAT 活性均呈极显著下降趋势; 肝组织中, 注射哈维氏弧菌实验鱼的 CAT 活性略升高, 注射溶藻弧菌实验鱼的 CAT 酶活性显著降低($p < 0.05$)。

2.2.4 SOD 活性

图 5 表明, 对照组大黄鱼肝脏的 SOD 活性为 7.64, 明显高于鳃组织和脾组织的 3.62 和 1.60。2 种病原菌感染后, 3 个组织的 SOD 活性均发生了显著改变, 其中肝组织的 SOD 活性均显著提高($p < 0.05$);

脾组织的 SOD 活性均极显著升高($p < 0.01$); 鳃组织的 SOD 活性表现为, 注射哈维氏弧菌的 SOD 活性显著升高($p < 0.05$), 注射溶藻弧菌实验鱼 SOD 酶活性显著降低($p < 0.05$)。

2.2.5 LSZ 活性

图 6 可见, 同 CAT 活性一样, 对照组大黄鱼 3 种组织中 LSZ 活性也同样表现为肝组织的活性 > 脾组织的活性 > 鳃组织的活性, 分别为 3.43、0.44 和 0.19。分别注射 2 种病原菌后, 鳃组织的 LSZ 活性均显著或极显著高于对照组, 脾组织的 LSZ 活性无显著变化, 肝组织的 LSZ 活性均表现出极显著降低($p < 0.01$)。

2.2.6 PO 活性

图 7 表明, 对照组大黄鱼脾组织、鳃组织和肝组织的 PO 活性分别为 4.30、3.15 和 1.55, 无显著差异。实验组大黄鱼鳃组织的 PO 活性均略呈下降趋势, 脾脏的 PO 活性无显著变化, 肝脏的 PO 活性均显著升高

($p < 0.05$).

3 讨论

3.1 2 种弧菌对溶酶体酶活性的影响

弧菌进入鱼体后, 首先引起机体非特异性免疫应答, 伴随着吞噬细胞的吞噬作用, 溶酶体分泌溶酶体酶, 以防御弧菌对鱼体造成的损伤. 溶酶体酶主要包括 ACP、AKP 和 LSZ, 在非特异性免疫应答中起着重要作用.

对照组 ACP 活性在脾组织中显著高于肝和鳃, 是由于脾组织含有大量的淋巴细胞、巨噬细胞和噬黑色素细胞, 酸性磷酸酶作为高等动物体内巨噬细胞溶酶体的标志酶, 在脾组织中含量较丰富^[10]. 而病原菌作为生物应激因子, 在入侵鱼体后, 引起了一系列的应激反应, 其中包括免疫系统的变化^[11-12]. 已有研究表明, 应激对鱼类的非特异性免疫细胞具有抑制作用, 造成吞噬细胞的吞噬能力降低^[13-14]. 本实验中, 感染病原 24 h 的大黄鱼, 除了溶藻弧菌组 ACP 活性在肝组织中有显著升高外, 注射 2 种弧菌对脾、鳃组织的 ACP 活性及 3 个组织的 AKP 活性都无显著影响, 可能是由于鱼体的应激抑制了吞噬作用, 伴随吞噬作用而释放的水解酶并未被大量激活所致, 但还需进一步证实.

溶菌酶是主要的非特异性免疫因子, 它的活性改变了反应机体免疫水平. 本实验中, 注射 2 种病原弧菌后, 大黄鱼肝脏的 LSZ 活性均显著降低, 表示在应激状态下, 鱼体非特异性免疫水平下降, 王文博^[15]、Hutchinson^[16] 和陈昌福^[17] 等也发现应激会抑制溶菌酶活性, 与本实验结果相同. 在鳃组织中 LSZ 酶活性显著增高的原因有待进一步研究.

3.2 2 种弧菌对酚氧化酶和抗氧化酶的影响

酚氧化酶是无脊椎动物重要的免疫因子, 酚氧化酶原 (proPO) 被激活再产生黑色素的过程伴随呼吸爆发^[18]. 在鱼类酚氧化酶的研究中都发现 PO 酶活性在异物入侵时有所提高^[19-23]. 本实验实验组大黄鱼肝脏的 PO 酶活性的显著提高, 说明应激反应并未抑制 PO 活性, 它在应激状态下, 依然产生了免疫防御作用. 而机体的自由基爆发可能也有部分是由于 PO 被激活引起的.

异物入侵会引起机体代谢异常, 从而产生大量的自由基, 而吞噬作用也会伴随产生大量活性氧, 引起呼吸爆发. 过氧化氢酶与超氧化物歧化酶共同组成了生物体内活性氧防御系统, 在清除超氧自由基和过氧化物、阻止或减少羟基自由基形成等方面发挥重要作用^[24].

本实验中, 抗氧化酶 CAT 和 SOD 的活性在肝组织中显著高于脾、鳃组织. 这是由于肝脏是主要的解毒器官, 能够把进入组织的有害物质转化为无毒的成分, 并排出体外, 以清除异物对机体的伤害, 这个过程中, 会产生大量的活性氧, 另外, 肝脏中脂类含量丰富, 携带大量自由基^[25]. 基于这些特点, 肝脏需要较强的抗氧化系统以维持正常生理状态.

注射弧菌后, 大黄鱼的 CAT 和 SOD 活性在肝、脾组织中有显著变化. 脾组织中 SOD 酶活性显著增高而 CAT 酶活性则受到抑制, 肝组织和鳃组织的 SOD 和 CAT 活性变化趋势也不相同, 这表明生物体内的氧化酶保护系统是一个相互制约、互相作用的有机整体, 异物入侵后, 它们通过酶活性的不同变化维持一定的动态平衡以抵抗外界损害, 这与王春琳^[26] 和 Doytotte^[27] 等的研究结论相同.

本文研究结果表明, 大黄鱼的 CAT、SOD、PO 和 LSZ 对入侵体内的 2 种病原菌反应较敏感, 在非特异性免疫的启动和效应过程也发挥积极作用, 可能成为养殖大黄鱼弧菌病早期检测的参考指标.

参考文献:

- [1] 金珊, 王国良, 赵青松, 等. 海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的流行病学研究[J]. 水产科学, 2005, 24(1): 17-19.
- [2] 林克冰, 周宸, 刘家富, 等. 海水网箱养殖大黄鱼病原菌研究[J]. 海洋科学, 1999(4): 58-62.
- [3] 杨少丽, 王印庚, 董树刚. 海水养殖鱼类弧菌病的研究进展[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(4): 75-83.
- [4] 鄢庆枇, 苏永全, 王军, 等. 溶藻弧菌脂多糖对大黄鱼的毒性与免疫保护性试验[J]. 台湾海峡, 2003, 22(2): 163-167.
- [5] 蒋传葵. 工具酶的活力测定[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982.
- [6] 周强, 曹春. 血清过氧化氢酶的比色测定[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2001, 35(6): 473-474.
- [7] 陈田飞, 吴大洋, 李春峰. 家蚕冷冻精液超氧化物歧化酶 (SOD) 活性分析[J]. 蚕学通讯, 2004, 24(4): 9-14.
- [8] 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.
- [9] 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): 34-42.
- [10] 孙德文, 詹勇, 许梓荣. 鱼类免疫系统的研究进展[J]. 水利渔业, 2002, 22(6): 17-19.
- [11] Barton B A, Iwama G K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response

- and effects of corticosteroids[J]. *Annual Rev Fish Dis*, 1991, 1: 3- 26.
- [12] 刘小玲. 应激对黄颡鱼非特异性免疫细胞的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- [13] Weeks B A, Warinner J E. Functional evaluation of macrophages in fish from a polluted estuary[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1986, 12: 313- 320.
- [14] Prophete C, Carlson E A, Li Y, et al. Effects of elevated temperature and nickel pollution on the immune status of Japanese medaka [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 21: 325- 334.
- [15] 王文博, 汪建国, 李爱华, 等. 拥挤胁迫对草鱼非特异性免疫能的影响[J]. *水产学报*, 2004, 28(2): 139- 144.
- [16] Hutchinson T H, Manning M J. Seasonal trends in serum lysozyme activity and total protein concentration in dab (*Limanda limanda* L.) sampled from Lyme Bay, U. K [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1996, 6: 473- 482.
- [17] 陈昌福, 罗宇良, 蔡冰, 等. 饲养水温对草鱼溶菌酶活性的影响[J]. *中国水产科学*, 1996, 3(3): 24- 30.
- [18] 李国荣, 张士瑾, 李红岩, 等. 酚氧化酶研究概况——特性、功能、分布和在胚胎发育中的变化[J]. *海洋科学*, 2003, 27(4): 4- 8.
- [19] 简纪常, 叶剑敏, 吴灶和. 溶藻弧菌脂多糖对石斑鱼免疫功能的影响[J]. *水生生物学报*, 2004, 28(1): 103- 105.
- [20] 刘云, 孙峰, 王丹. 免疫增强剂对鲫鱼非特异性免疫功能的影响[J]. *海洋科学*, 2004, 28(9): 42- 45.
- [21] 鄢庆彬, 苏永全, 王军, 等. 口服免疫添加剂对养殖大黄鱼免疫机能影响的初步研究[J]. *集美大学学报: 自然科学版*, 2001, 6(2): 134- 137.
- [22] 刘睿智, 郑裕辉, 王重刚. 苯并(a)芘、三丁基锡及其混合物对褐菖鲉酚氧化酶活力的影响[J]. *海洋环境科学*, 2007, 26(4): 305- 308.
- [23] 杨文鸽, 黄晓春, 李花霞, 等. 葡聚糖与其羧甲基衍生物对养殖大黄鱼非特异免疫作用[J]. *浙江农业学报*, 2006, 18(1): 16- 20.
- [24] 刘冰, 梁婵娟. 生物过氧化氢酶研究进展[J]. *中国农学通报*, 2005, 21(5): 223- 224, 232.
- [25] 方允中, 李文杰. *自由基与酶[M]*. 北京: 科学出版社, 1994: 67- 69.
- [26] 王春琳, 丁爱侠. 硫酸铜蓄积对日本鳟体内保护酶系统的影响[J]. *大连水产学院学报*, 2005, 20(4): 278- 282.
- [27] Doyt A, Cossu C, Jacquin M, et al. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental of field exposure in the gills and the digestive gland of the fresh water bivalve *Unionidae* [J]. *Aquatic Toxicology*, 1997, 39(2): 93- 110.

Effects of *Vibrio harveyi* and *V. anguillarum* on Enzymes Activities in Different Organs of Large Yellow Croaker (*Pseudosciaena crocea*)

HONG Jing²ni, MAO Yong, SU Yong²quan, WANG Jun^{*}

(College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The activities of alkaline phosphatase (AKP), acid phosphatase (ACP), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), lysozyme (LSZ), and phenoloxidase (PO) were investigated in different organs at 24th hour after the *Pseudosciaena crocea* was injected with *Vibrio harveyi*, *Vibrio anguillarum* and normal saline (control group) respectively. The result showed that, except the activities of ACP from the group injected with *Vibrio anguillarum* were higher than those in control group, the activities of ACP and ALP in the other groups were not significantly different from the control. Meanwhile, the activities of LSZ in liver were lower than that of the control observably, maybe due to the non-specific immunity was restrained by stress reactions. In conclusion, the activities of LSZ, CAT, SOD and PO changed significantly, in terms of that they could be the indicators of vibrios infection.

Key words: *Vibrio harveyi*; *Vibrio anguillarum*; *Pseudosciaena crocea*; enzymatic activities