

研究简报

育珠蚌酸性磷酸酶活力与免疫反应关系的研究

魏 炜 张洪渊 石安静

(四川大学生命科学学院 成都 610064)

THE STUDY OF RELATIONSHIP BETWEEN ACID PHOSPHATASE
ACTIVITY AND OYSTER DEFENCE

WEI wei, ZHANG Hong-yuan and SHI An-jing

(College of life science, Sichuan University, Chengdu 610064)

关键词: 背角无齿蚌; 酸性磷酸酶; 活力; 防御反应

Key words: *A nodonta woodiana*; Acid Phosphatase; Activity; Defence中图分类号: S966. 22⁺ 3 文献标识码: A 文章编号: 1000- 3207(2001) 04- 0413- 03

酸性磷酸酶(Acid Phosphatase, 简称 ACPase, EC. 3. 1. 3. 2) 是在酸性条件下催化磷酸单酯水解的酶。研究表明, ACPase 主要参与磷酸酯的代谢, 此外, 其中的一部分还执行一些重要的生物学功能, 包括代谢调节、能量转化以及信号传导等^[1]。

在对 ACPase 进行的过程中, 人们发现作为溶酶体的标志酶, ACPase 与溶酶体生理功能的正常发挥密切相关^[2]。溶酶体的基本功能是对生物大分子的强烈消化作用, 以维持细胞的正常代谢活动^[3]。细胞中衰老的细胞器及衰老或死亡的细胞都将被溶酶体中的各类水解酶清除。如果某一种水解酶缺失, 就有可能使细胞成分与结构得不到更新, 影响细胞的代谢, 从而引起疾病。此外, 某些宿主可以识别并吞噬入侵的病毒或细菌, 在溶酶体作用下将其杀死并进一步降解。此时, 包括 ACPase 在内的溶酶体中的各种水解酶活力和含量都会明显改变。但迄今为止, 育珠蚌在这些方面的研究还鲜见报道, 因此本文模拟育珠手术对蚌体进行损伤后观察外套膜中 ACPase 活力的变化, 并比较了不同水体酸碱度和 CuSO_4 浓度对 ACPase 活力变化的影响, 旨在揭示人工育珠手术和环境因素与蚌类免疫防御反应及健康程度的关系, 为珍珠养殖和病虫害防治提供参考资料和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 背角无齿蚌【*A nodonta woodiana* (Heude)】取自成都郊区大面镇池塘。对硝基苯磷酸二钠(pNPP)系德国 Merck 公司产品; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 酶活力测定 按照酸性磷酸酶的活力测定方法进行^[4]。

1.3 蚌体损伤后 ACPase 活力变化研究 取健康且个体大小基本一致的二龄蚌 60 只, 用 9 号针头在其左右外套膜边沿各扎 30 个小孔, 然后放入池中继续喂养。分别于 5, 10, 20, 30, 40, 50d 各取出 10 只, 测

收稿日期: 2000- 01- 27; 修订日期: 2000- 04- 05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 编号: 39770586

作者简介: 魏炜(1969—), 女, 江苏南京人; 硕士, 讲师; 从事蛋白质化学的研究

定其外套膜中 ACPase 的活力大小。以未损伤的为对照(活力大小为 1),与此相比较得相对活力。以相对活力作为纵坐标,时间为横坐标作图。

1.4 杀虫剂 CuSO₄ 对蚌 ACPase 活力的影响 分别用含 1.56、3.13、4.69、6.25 × 10⁻⁶ mol/L CuSO₄ 流动的池水饲养背角无齿蚌(各 20 只)10d 后,每组取 10 只河蚌测定其外套膜中 ACPase 的活力大小。另 10 只放回正常水体中恢复性饲养,20d 后测定其外套膜中 ACPase 的活力大小。以未经 CuSO₄ 处理的为对照(活力大小为 1),与此相比较得相对活力。以相对活力作为纵坐标, CuSO₄ 浓度为横坐标作图。

1.5 水体 pH 值对蚌 ACPase 活力的影响 分别用 pH3—10 的流动池水(每日调节四次 pH 值)饲养背角无齿蚌(每组 20 只),10d 后每组取 10 只蚌测定其外套膜中 ACPase 的活力大小。另 10 只放回正常水体中(pH7.0)恢复性饲养 20d 后测定其外套膜中 ACPase 活力大小。以水体 pH7 的一组为对照(活力大小为 1),与此相比较得相对活力。以相对活力作为纵坐标, pH 值大小为横坐标作图。以上实验内容均进行重复试验。

2 结果

2.1 损伤后 ACPase 的活力变化

背角无齿蚌损伤后 ACPase 的活力呈上升趋势,在 30d 时达到最高,然后逐渐下降,50d 时下降至接近正常水平(图 1)。

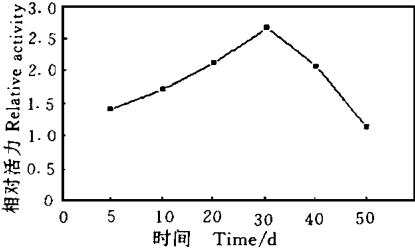


图 1 损伤后 ACPase 的活力变化曲线
Fig. 1 The chang curve of ACPase activity after operation

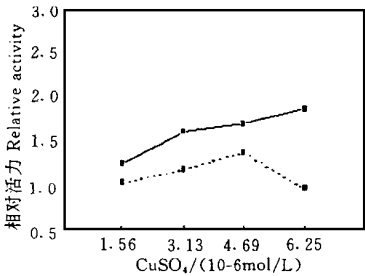


图 2 水体 CuSO₄ 浓度对 ACPase 活力影响曲线
Fig. 2 The effect of copper sulfate concentrations on ACPase activity
—■—■—恢复前 (Before restore)
...□...□...恢复后 (After restore)

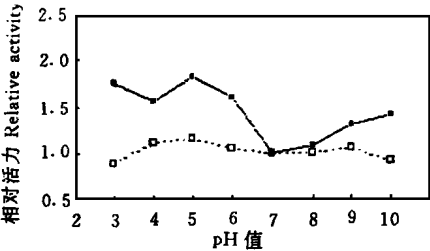


图 3 水体 pH 值对 ACPase 活力影响曲线
Fig. 3 The effect of pH of water on ACPase activity
—■—■—恢复前 (Before restore)
...□...□...恢复后 (After restore)

2.2 水体中 CuSO₄ 浓度大小对 ACPase 活力的影响

随着 CuSO₄ 浓度的增加, ACPase 活力逐渐升高,蚌在正常水体中恢复一段时间后, ACPase 的活力下降趋于正常值,但是高浓度 CuSO₄ (6.25 × 10⁻⁶ mol/L) 不仅造成 60% 的蚌死亡, 且经正常水体恢复饲养后, 其 ACPase 的活力降至正常值以下(图 2)。

2.3 水体 pH 值对 ACPase 活力的影响

实验结果显示, pH3.0、pH4.0 和 pH10 三个实验组中分别有 60%、50% 和 30% 的死亡率。在酸性 pH 条件下, ACPase 的活力随 pH 值的降低而升高, 而在碱性 pH 条件下 ACPase 的活力变化无酸性 pH 明显, pH8 几乎未对 ACPase 的活力造成影响, pH9 一组活力有所升高。蚌在正常水体恢复饲养一段时间后, ACPase 活力均趋于正常值, 但经过极端 pH 值(pH3.0 和 pH10) 水体饲养的蚌, 其 ACPase 的活力下降至正常水平以下(图 3)。

3 讨论

3.1 ACPase 活力变化与蚌免疫防御反应有关

模拟育珠手术对蚌外套膜进行大量创伤后,发现其中的 ACPase 随损伤后天数的增加,酶活力呈上升趋势,30d 后达到最高值,然后逐渐下降,至 50d 时接近正常水平。胡曦璇等曾用组织化学方法观察到育珠蚌手术后珍珠囊形成过程中 ACPase 活力有与此相似的变化趋势。这似乎表明 ACPase 与损伤后蚌的免疫作用密切相关。通常情况下,贝类抵御外来生物感染首先是靠皮肤、外骨骼以及体表的粘液和抗菌性分泌物等,一旦组织遭受损伤,如本实验中造成的创伤,使得病原生物能够轻易地穿越外部屏障进入机体内部,机体的保护只能依靠内部防御机制的作用,而贝类的内部防御机制主要依赖于血细胞的细胞免疫机制,其中吞噬作用是贝类的一种主要防御方式。机体遭受机械损伤导致外来病原生物侵入体内,巨噬性血细胞会加以识别将其吞噬并进行胞内降解,起主要作用的是血细胞释放的包括 ACPase 在内的溶酶体酶。事实上这种防御机制的特征是外来病原生物激活了溶酶体中以酸性磷酸酶为主体的一系列的水解酶,使得这些酶活力大大提高,共同对异源物质进行降解破坏以保护机体。随时间的迁移,外来病原生物对机体的不良影响被逐渐消除,此时包括 ACPase 在内的溶酶体酶也就可能恢复到正常水平。由此得出结论,ACPase 的活力变化确实反映了贝类的这种防御机制。

3.2 ACPase 活力变化还可能是蚌病理反应的表现

目前我国鱼类和淡水育珠蚌人工养殖中,普遍施用硫酸铜作为杀虫剂和水体清洁剂,但铜作为一种重金属离子,对生物体的生理机能有不良影响。但当铜水平超过生理极限时,却会对贝类造成不可逆的伤害,甚至导致死亡。因此在恢复饲养一段时间后,低浓度 CuSO_4 处理过的实际蚌会因为水体中不利环境因素的逐渐消失,而使由此诱导产生的 ACPase 活力上升的现象也逐渐消失,ACPase 的活力趋向于下降至正常水平。但经 $6.25 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ CuSO_4 饲养的蚌,其 ACPase 活力却下降至正常值以下,这可能是蚌遭受重金属离子严重毒害后机体中毒后的病理反应。

将蚌在不同 pH 水体中放养后的实验表明,pH5、pH6、pH9 这三组的结果类似于低浓度 CuSO_4 对 ACPase 的影响。pH 过高或过低都会对蚌的器官造成严重伤害,甚至使其死亡,如 pH3、pH4、pH10 这三组中均有较大比例的蚌死亡。有关酸性水对水生生物的影响报道较多,张甫英等曾在研究酸性水对几种淡水鱼类的毒性影响时发现^[5],酸性水主要对鱼的鳃组织伤害较大,可以降低鳃表面氧的扩散速率,进而妨碍气体交换,甚至造成鱼的死亡。此外,低 pH 水还可能会抑制鱼类的离子主动吸收,使离子交换和酸碱平衡紊乱,导致鱼的健康状况下降,本实验的观察中也见到了相同的影响。

由此看来,无论是遭受机械损伤还是生存环境的恶化,都会使蚌类 ACPase 的活力发生变化。因此 ACPase 的活力大小有可能作为贝类养殖环境监测和病理变化的一种检测指标。

参考文献:

- [1] Strivastava R, Gupta M N. Acid Phosphatase [J]. *J. Scientific Industrial Research*. 1986, **45**: 402—412
- [2] Cheng T C. The role of lysosomes in molluscan inflammation [J]. *Am Zool*. 1983, **23**: 129—144
- [3] 翟中和. 细胞生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995, 141—142
- [4] 蒋传葵. 工具酶的活力测定[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982, 62
- [5] 张甫英, 李辛夫. 酸性水对几种主要淡水鱼类的影响[J]. 水生生物学报. 1997, **21**: 40—47