

文章编号: 1004 - 7271(2005)03 - 0238 - 04

副溶血弧菌对九孔鲍血清中一氧化氮及 一氧化氮合酶活力的影响

王广军, 谢 骏, 余德光

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘 要: 为了研究感染副溶血弧菌对杂色鲍体内一氧化氮(NO)及一氧化氮合酶(NOS)活力的影响, 分别对九孔鲍足部注射浓度为 5×10^5 CFU/mL、 5×10^6 CFU/mL 和 5×10^7 CFU/mL 的副溶血弧菌悬浮液(剂量为 0.1 mL/只), 在注射前及注射后 6 h、12 h、24 h、48 h、96 h、192 h 和 240 h 足部取血, 测定其血清中 NO 含量以及 NOS 活力的变化情况。结果表明, 注射副溶血弧菌后九孔鲍血清中 NO 含量及 NOS 活力显著高于对照组, 且 NOS 活力的最大值出现的较 NO 最大值早, 证明注射副溶血弧菌可以诱导九孔鲍血清内 NO 含量和 NOS 活力的升高。为今后研究 NO/NOS 系统在软体类免疫中的作用提供一些理论依据。在生产实践中, 可以通过诱导调节 NO 在鲍体内的含量, 增强其自身的非特异性免疫功能, 从而提高抵抗疾病的能力。

关键词: 九孔鲍; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 副溶血弧菌

中图分类号: S 944.1 **文献标识码:** A

Effects of *Vibrio parahaemolyticus* on serum nitric oxide concentration and nitric oxide synthase activity of *Haliotis diversicolor supertexta*

WANG Guang-jun, XIE Jun, YU De-guang

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510380, China)

Abstract: To study the effects of infecting *Vibrio parahaemolyticus* on serum nitric oxide (NO) concentration and nitric oxide synthase (NOS) activity of *Haliotis diversicolor supertexta*, three kinds of suspension containing 5×10^5 CFU/mL, 5×10^6 CFU/mL, 5×10^7 CFU/mL live *Vibrio parahaemolyticus* were injected into the foot muscle of *Haliotis diversicolor supertexta* (0.1 mL per abalone) respectively. The NO concentration and NOS activity in the serum were determined before injection and 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 96 h, 192 h and 240 h after injection. The results showed that compared to control group, injection of *vibrio parahaemolyticus* could induce an up-regulation of NO concentration and NOS activity. And the peak of NOS activity came earlier than the peak of NO concentration after injection. Up-regulation of NO concentration and NOS activity could be regarded as a response of hemocytes to the pathogen infection. The results of the experiment would provide some theoretical foundations for the further researches on the role which NO/NOS system plays in immunology of mollusc. In practice, in order to enhance the non-specific immunology function of abalone and strengthen its ability to resist the disease, the NO *in vivo* could be

收稿日期: 2004-12-27

基金项目: 广东省自然科学基金项目(031818)

作者简介: 王广军(1975-), 男, 山东梁山人, 助理研究员, 上海水产大学在职硕士研究生, 从事健康养殖与免疫研究。E-mail: gjwang

@prfri.ac.cn

induced and regulated artificially.

Key words: *Haliotis diversicolor supertexta*; nitric oxide; nitric oxide synthase; *Vibrio parahaemolyticus*

九孔鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)为一种暖水性贝类,是我国南方地区的重要养殖对象^[1]。随着九孔鲍养殖规模的不断扩大,病害的发生也越来越严重,严重影响了其养殖业的健康、持续发展^[2,3]。

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种新型生物信使分子,它广泛分布于生物体内各组织中,其生成依赖于—氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)^[4]。NO作为一种重要的信使分子、效应分子和免疫调节分子,近年来在免疫领域已经得到不断深入的研究^[5-9]。国内外关于NO的研究在人类和其他动物较为广泛,在水产方面也有了一定的进展^[10],但在鲍中还未见报道。为此,本文研究了注射副溶血弧菌后鲍体内NO/NOS的变化情况,为进一步研究NO/NOS系统在鲍非特异性免疫中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用鲍

实验用九孔鲍取自深圳市大亚湾核电站鲍鱼场,壳长为 5.98 ± 0.21 cm、壳宽为 3.80 ± 0.29 cm、体重为 21.65 ± 2.41 g。九孔鲍取回后于珠江水产研究所深圳海水试验基地暂养10 d,按常规方法投喂海藻饲养,外观无明显病症的个体用于实验。

1.1.2 实验药品

副溶血弧菌由本所鱼病室提供,NO及NOS测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计

实验鲍蓄养于120 L的圆形塑料桶中,有效水体80~100 L,每桶放入20只鲍为一组。分别注射 5×10^5 CFU/mL(低浓度组)、 5×10^6 CFU/mL(中浓度组)、 5×10^7 CFU/mL(高浓度组)三个浓度的副溶血弧菌悬浮液,对照组注射生理盐水。每组设三个平行。注射方法采用足部注射,注射剂量为0.1 mm/只。分别在注射前、注射后6 h、12 h、24 h、48 h、96 h、192 h和240 h,从腹足中央切开腹足肌,用清洁的2.5 mL一次性注射器吸取血淋巴液,每次每组随机取2只。所取血淋巴液置于4℃冰箱过夜后,4000 r/min离心5 min,吸取上清液标记后放在-20℃冰箱中待测。

1.2.2 检测指标与方法

NO测定采用硝酸还原酶法,NOS测定采用化学比浊法。具体步骤按测定试剂盒说明书进行。

酶活力单位定义:37℃时每毫升血清每分钟催化生成1 nmol NO为一个酶活力单位。

1.3 数据分析

数据采用SPSS统计软件进行处理分析,利用方差分析(ANOVA)来检验各组之间的显著性,并采用Duncan氏法进行多重分析, $P < 0.05$ 为显著性水平, $P < 0.01$ 为极显著性水平。

2 结果

2.1 注射不同浓度副溶血弧菌对鲍血清中NOS活力的影响

不同浓度副溶血弧菌注射九孔鲍以后,其血清中NOS的活力均有不同程度的变化。在注射后6 h,高浓度组NOS活力开始升高,并且与对照组有显著差异($P < 0.05$)。注射后12 h,各实验组NOS活力均达到最大值,并且与对照组之间存在极显著差异($P < 0.01$)。之后,NOS活力开始下降,至48 h,低浓度组和中浓度组与对照组无差异。72 h后,各实验组与对照组均无差异,并且降至注射前的水平(图1)。

2.2 注射不同浓度副溶血弧菌对鲍血清中 NO 含量的影响

注射不同浓度副溶血弧菌后,鲍血清内 NO 含量的变化,随着时间的变化而有一定的差异(图 2)。12 h 后开始升高,24 h 后实验组与对照组开始有极显著差异($P < 0.01$),48 h 达到最大值,至 192 h 已恢复到正常水平。同时,由图 1 及图 2 可以看出,NOS 活力的峰值较 NO 含量的峰值在注射副溶血弧菌后出现的早。可能是由于 NO 是在 NOS 催化作用下产生的。NOS 活力增加,随后 NO 含量才开始升高。

3 讨论

3.1 NO 与 NOS 的诱导生成

一氧化氮作为一种新型生物信使分子,广泛分布于生物体的各器官。它参与机体多种重要的生理病理活动,既是血液循环、神经传递及免疫杀伤的生理学信使,又是许多病理状态下的活性介质。它可以通过非特异性的方式杀伤细菌、真菌、寄生虫及病毒等,增强机体的非特异性免疫;也可控制机体的特异性免疫;还可以调节多种免疫活性介质,更为广泛地影响机体的免疫功能^[5-9]。NO 的生成依赖于—氧化氮合酶(NOS)。NOS 催化 L-精氨酸,体内合成内源性 NO,从而改变机体的免疫能力。NOS 有三种同工酶亚型:神经元型 NOS(neuronal NOS, nNOS, 也称 I 型);内皮细胞型 NOS(endothelial NOS, eNOS, III 型)和诱导型 NOS(inducible NOS, iNOS, II 型)。nNOS 和 eNOS 又称为构成型 NOS(configurable NOS, cNOS),广泛分布于神经和内皮,其活性依赖于 Ca^{2+} 。当 Ca^{2+} 升高时,cNOS 被活化催化合成少量的 NO,发挥神经信息传递和血管舒张效应。iNOS 在炎症和免疫刺激下才可表达^[11]。最近的研究发现,有许多细胞都可被诱导表达 iNOS,从而引起体内合成 NO。Zhuang 等^[12]研究发现 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的脂多糖(LPS)能引起巨噬细胞产生适量的 NO,通过用 LPS 诱导金鱼(*Carassius auratus*)和鲶(*Clarias gariepinus*)的巨噬细胞可产生 NO;在 LPS 联合巨噬细胞激活因子(MAF)诱导下真鲷(*Sparus aurata* L.)的巨噬细胞可产生 NO。进一步的研究表明,虹鳟(*Salmo gairdneri* R.)在人工感染细菌后,其体内的诱导型—氧化氮合酶(iNOS)可进行表达^[13]。Ottaviani 等^[14]证明紫贻贝(*Mytilus edulis*)在细菌 LPS 存在时可产生 NO,Franchini 等^[15]应用免疫细胞化学研究黑螺(*Viviparus ater*)表明,细菌存在时抗 NOS 抗体反应增加。姜国建等^[16]研究表明,中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)在感染白斑病毒时血细胞中 NOS 活力升高。本次实验结果表明,在注射副溶血弧菌后,九孔鲍血清内 NOS 活力及 NO 含量显著高于对照组,并且在注射一段时间后达到最大值,随后又恢复到正常水平,表明鲍体内诱导产生了 NO。所不同的是,NOS 活力最大值出现的时间较 NO 最大值出现的早。由此可见,弧菌感染后首先激活了鲍体内 NOS 免疫系统,从而产生 NO,提高机体的免疫力。NOS 活力的升高是机体对外来异物的一种免疫应答反应。

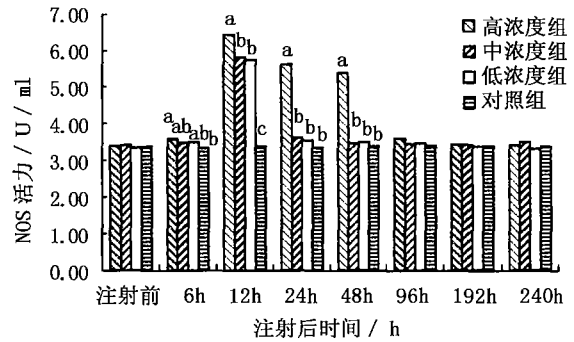


图 1 不同浓度副溶血弧菌对鲍血清内 NOS 活力的影响
Fig.1 Effect of different concentration of *V. parahaemolyticus* on NOS activity in serum of *Haliotis diversicolor supertexta*.
注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

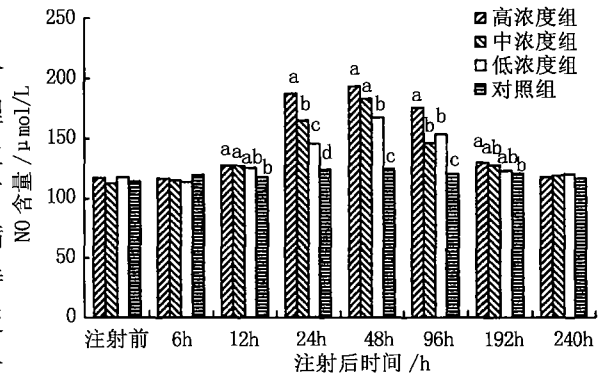


图 2 不同浓度副溶血弧菌对鲍血清中 NO 的影响
Fig.2 Effect of different concentration of *V. parahaemolyticus* on NO concentration in serum of *Haliotis diversicolor supertexta*.
注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

3.2 研究 NO/NOS 系统的意义

注射副溶血弧菌可以诱导鲍血清内 NO 含量及 NOS 活力的升高。为此,可以通过测定水产动物体内 NO/NOS 的变化情况来确定水产动物的健康状况或其免疫功能的升降,从而确定 NO/NOS 为新的免疫评价指标。事实证明,NO 作为评价人类健康状况的一个指标,已经在人类医学上广泛应用。

近年来,随着水产养殖业的发展,水产动物病害频繁发生。病害问题已成为制约水产养殖业持续发展的严重问题之一。常规的化学药物和抗生素难以治疗,且残留严重,对生态环境的影响日趋加重。且病原菌的耐药性增强,长期使用还会对人类的健康造成隐患。因此,在采取其他防治措施的同时,人们把注意力逐渐转移到如何调动或激活水产动物自身免疫系统,提高其非特异性免疫功能和抗病力,以达到预防和抵抗疾病的目的。水产动物的免疫机能大都较低,主要是非特异性免疫系统。研究表明 NO 可抑制和杀伤病毒、细菌、真菌以及寄生虫的感染,在免疫中起着重要的作用^[7,9]。在生产实践中,可以人为地诱导调节 NO 在水产动物体内的含量,增强水产动物的自身抗病能力,减少抗菌药物或化学药物的使用,从而提高水产品的产量和质量。研究水产动物的 NO/NOS 非特异性免疫,增强其自身的抗病能力,是符合人们对绿色水产品的需要,也是水产养殖业可持续发展的需要。

珠江水产研究所鱼病室石存斌副研究员对本文提出宝贵修改意见,在此深表谢意!

参考文献:

- [1] 严正凛. 九孔鲍的人工苗种生产技术[J]. 海洋科学, 2001, 25(5): 8-10.
- [2] 艾红, 李永振. 我国养殖鲍病害及防治研究现状[J]. 齐鲁渔业, 2003, 20(5): 30-32.
- [3] 陈信忠, 龚艳清. 我国鲍养殖病害研究进展[J]. 福建水产, 2002, (2): 8-13.
- [4] 王天云. 一氧化氮: 新发现的一种信使分子[J]. 生物学通报, 1999, 34(12): 40.
- [5] 罗高兴, 涂秋萍. 一氧化氮的免疫调节作用[J]. 上海免疫学杂志, 1996, 16(4): 245-247.
- [6] 赵红卫. 一氧化氮与免疫调节[J]. 上海免疫学杂志, 1996, 16(6): 373-375.
- [7] Bogdan G. Nitric oxide and the immune response[J]. Nat Immunol, 2001, (2): 907-916.
- [8] 钟慈声, 孙安阳. 一氧化氮的生物医学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1997. 28-33.
- [9] Moncada S, Palmer R, Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology[J]. Pharmacol Rev, 1991, 43: 109-142.
- [10] 王勇军, 王长法, 张士瑾. 水产动物中一氧化氮合酶的研究概况[J]. 海洋水产研究, 2003, 24(2): 88-94.
- [11] Chakravorty D, Hensel M. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens[J]. Microbes and Infection, 2003, (5): 621-627.
- [12] Zhuang J C, Wogan G N. Growth and viability of macrophage continuously stimulated to produce nitric oxide[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(10): 118-125.
- [13] Laing K J, Hardie L J, Aartsen W, et al. Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Dev Comp Immunol, 1999, 23: 71-85.
- [14] Ottaviani E, Paemen L R, Cadet P, et al. Evidence for nitric oxide production and utilization as a bactericidal agent by invertebrate immunocytes [J]. Eur J Pharmacol, 1993, 248: 319-324.
- [15] Franchini A, Fontanili P, Ottaviani E. Invertebrate immunocytes: relationship between phagocytosis and nitric oxide production [J]. Comp Biochem Physiol, 1995, 110: 403-407.
- [16] 姜国建, 于仁诚, 王云峰, 等. 中国明对虾 (*Penaeus chinensis*) 血细胞中一氧化氮合酶的鉴定及其在白斑综合症病毒感染过程中的变化[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(4): 343-350.