

淇河鲫不同组织器官溶菌酶与抑菌活性比较

赵燕静, 武向敏, 蒋昕或, 江红霞, 孔祥会

(河南师范大学水产学院, 新乡 453007)

摘要:选择天然三倍体淇河鲫(*Carassius auratus* in Qihe River), 通过试验研究其不同组织器官溶菌酶和抑菌活性, 以了解淇河鲫不同组织器官的抗菌能力。结果表明, 淇河鲫不同组织器官溶菌酶和抑菌活性存在差异, 溶菌酶活性测定值依次为: 肝胰脏 > 肾脏 > 鳃 > 脑 > 肠 > 脾脏; 抑菌活性测定值依次为: 肝胰脏 > 肾脏 > 脑 > 鳃 > 肠 > 脾脏($P < 0.01$); 淇河鲫抗菌活性较高的组织为肝胰脏和肾脏, 且肝胰脏又极显著高于肾脏($P < 0.01$), 肾脏和鳃的抗菌能力极显著高于脾脏($P < 0.01$); 表明鱼类不同组织器官免疫能力和抗菌活性存在差异, 这种差异与组织器官的生理功能和抗病响应机制不同有关; 同时说明鱼类不同组织器官在致病菌干预过程中将发挥不同的作用。

关键词:淇河鲫; 溶菌酶; 抑菌活性; 组织器官

中图分类号: Q554 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2014)01-0087-04

淇河鲫(*Carassius auratus* in Qihe River)为鲤形目、鲤科、鲤亚科、鲫属, 产于豫北鹤壁淇河水域, 为天然三倍体鱼类; 其脊背厚度为一般鲫的2倍, 因而被称为双背鲫; 其生长速度快、个体大、营养丰富、口感良好。

溶菌酶(lysozyme)又称胞壁质酶或N-乙酰胞壁质聚糖水解酶, 是一种能水解细菌细胞壁上黏多糖1,4-糖苷键的碱性酶, 可导致微生物细胞溶解死亡(英辉等, 2008); 该酶具有抗菌、消炎、抗病毒等作用(Bukharin & Valyshev, 2006); 部分革兰氏阴性菌如埃希氏大肠杆菌、伤寒沙门氏菌也会受到溶菌酶的破坏(Alexander et al, 1980)。

近年来, 由于水质受到污染和环境遭到破坏, 淇河鲫养殖遭受众多传染性疾病的困扰, 其养殖业受到严重打击。渔民开始使用各种抗生素或添加剂以减少鱼病感染带来的经济损失。本试验通过测定淇河鲫的鳃、肝胰脏、肾脏、脾脏、肠等组织器官溶菌酶活性和抑菌活性, 分析其不同组织器官的抗菌能力, 以了解不同组织器官的生物学功能与抗菌机制, 为淇河鲫的疾病预防提供资料和依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取河南师范大学水产养殖基地的健康淇河鲫50尾, 体重(145 ± 5) g, 体长(22 ± 2) cm; 在实验室驯养1周, 养殖用水为曝气3 d的自来水, 温度(18 ± 2) °C, pH为(7.0 ± 0.1), 溶解氧为(6.0 ± 0.2) mg/L, 每天适量投喂。

霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)来自河南师范大学水产动物医学研究室。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理 取各组织器官0.2 g, 用0.75%生理盐水洗去浮血, 去除脂肪, 放入加有1.8 mL 0.9%生理盐水的预冷研钵内冰上研磨, 匀浆液4 °C, 12 000 g/min离心10 min, 取上清液备用。

1.2.2 溶菌酶活性测定 参考刘睿智(2006)的方法并进行相应的修改, 用0.067 mol/L的磷酸缓冲液将溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)冻干粉(南京建成生物有限公司)配制成0.2 mg/mL的菌悬液。

酶活测定:取0.1 mL组织液加3 mL菌悬液, 混匀, 立即于570 nm处测其OD值 A_1 ; 将混合液28 °C水浴30 min, 使其充分反应, 随后进行冰浴10 min以终止反应, 立即于570 nm处测其OD值 A_2 ; $A_1 - A_2$ 即溶菌酶所致的OD值变化。

溶菌酶活性定义为: 在28 °C、pH 6.4的条件下, 每1 g蛋白、每1 min使 A_{570} 下降0.001为1个活力单位。

收稿日期: 2013-09-05

基金项目: 河南省科技厅科技创新杰出青年计划(124100510017); 河南省水产学重点学科(2012)。

通讯作者: 孔祥会, 1968年生, 男, 博士, 教授, 研究方向为水产动物医学。E-mail: xhkong@htu.cn

作者简介: 赵燕静, 1991年生, 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类免疫和疾病控制。E-mail: yanjing217907@126.com

蛋白含量测定参照 Bradford 的方法(1976);以牛血清白蛋白(Bovine serum albumin,BSA 购于 Solarbio 公司)作为标准蛋白。

1.2.3 抑菌活性测定 制备霍乱弧菌菌悬液:菌液在 570 nm 处吸光度值为 0.870。

组织液滤纸片的制备及处理:直径为 1 cm 的圆滤纸,121℃ 高压蒸气灭菌 20 min,烘干;浸泡于组织液 2 h;同时将圆纸片浸泡于 0.75% 的生理盐水 2 h,进行阴性对照。

抑菌试验:将 0.3 mL 霍乱弧菌悬液加入灭菌的 LB 固体培养基培养皿中,用涂布棒涂布均匀;将处理的滤纸片贴入培养皿,每个培养皿 6 片,其中 1 个为阴性对照,滤纸片每种处理的组织液进行 3 次重复。霍乱弧菌置于生化培养箱,37℃ 培养 24 h,观察霍乱弧菌的生长,测定滤纸片的抑菌圈直径大小,比较不同组织器官抑菌活性。

1.3 数据处理

试验数据以平均值 ± 标准差 (M ± SD) 表示。采用单因素方差分析(One-way analysis of variance, ANOVA)进行统计学检验,利用 EXCEL 2010 进行统计分析。统计学显著性水平设定为: $P < 0.01$ 为差异极显著; $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 溶菌酶活性

通过测定溶菌酶与溶壁微球菌反应前后的吸光度值,根据吸光度差值计算不同组织器官的溶菌酶活性。淇河鲫不同组织器官溶菌酶活性测定值依次为:肝胰脏 > 肾脏 > 鳃 > 脑 > 肠 > 脾脏(图 1)。肝胰脏和肾脏的溶菌酶活性最高,对其进行单因素方差分析,肝胰脏溶菌酶活性极显著高于肾脏 ($P < 0.01$);对免疫器官肾脏和脾脏以及鳃进行单因素方差分析,鳃和肾脏的溶菌酶活性极显著高于

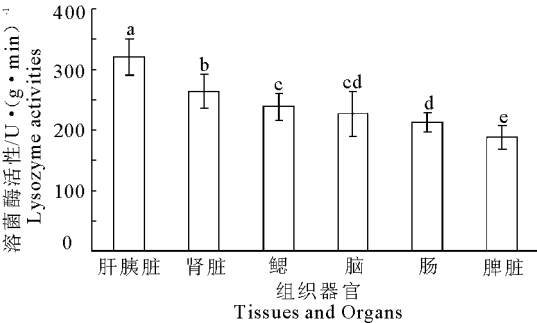


图 1 淇河鲫不同组织器官溶菌酶活性
Fig.1 Lysozyme activities in different tissues and organs of Carassius auratus in Qihe River

脾脏 ($P < 0.01$)。

2.2 抑菌活性

淇河鲫不同组织器官抑菌直径见图 2。抑菌圈直径大小依次为:肝胰脏 > 肾脏 > 脑 > 鳃 > 肠 > 脾脏。对抑菌活性较高的肝胰脏和肾脏进行单因素方差分析,肝胰脏抑菌活性极显著高于肾脏 ($P < 0.01$);对肾脏、脾脏和鳃之间进行统计学分析,鳃和肾脏的抑菌活性极显著高于脾脏 ($P < 0.01$)。

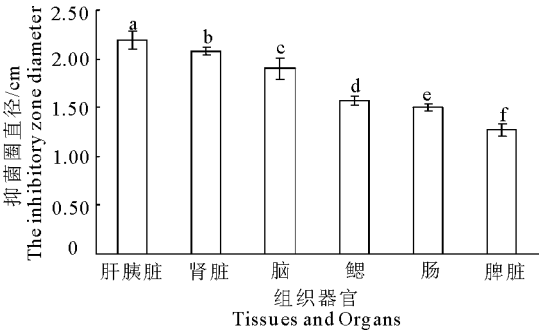


图 2 淇河鲫不同组织器官的抑菌活性
Fig.2 Antibacterial activities in different tissues and organs of Carassius auratus in Qihe River

3 讨论

3.1 溶菌酶的作用机理与活性大小

非特异性免疫系统在低等水生动物中所起的作用尤为重要,其原因在于低等水生动物的特异性免疫系统还不是很完善,与高等脊椎动物相比,更依赖于非特异性免疫系统(龙华,2005)。溶菌酶是一种作用于微生物细胞壁的水解酶,主要由嗜中性白细胞和单核细胞产生,少量由巨噬细胞生成。溶菌酶广泛存在于水生动物的血清、皮肤粘液和组织器官中,其含量可直接反映溶菌作用的强弱,在抗细菌感染方面有着重要的作用,是动物免疫系统中重要的非特异性免疫因子,因此常被作为评价机体免疫水平的重要指标之一(Christopher & Lena,2001;郑清梅等,2006)。

本试验测定淇河鲫的脑、鳃、肝胰脏、肾脏、脾脏和肠中溶菌酶活性,其活性高低依次为:肝胰脏 > 肾脏 > 鳃 > 脑 > 肠 > 脾脏。统计分析显示,肝胰脏和肾脏溶菌酶活性较高。肝胰脏作为机体重要的生理代谢场所和解毒器官,溶菌酶活性显著高于其它组织器官,说明其具有较强的抗菌能力;肾脏作为鱼类主要的免疫器官,其溶菌酶活性仅次于肝胰脏,可能是由于肾脏是白血球生成的主要器官,而鱼类溶菌酶主要是由嗜中性白细胞和单核细胞等白细胞产生

所致(Hansen,1997);鳃作为鱼类重要的呼吸器官,还具有分泌和排泄功能,虽然不是淋巴器官,但鳃和皮肤存在分散的淋巴细胞生发中心,具有淋巴细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞,可分泌溶菌酶(唐海蓉等,2006);脑是鱼类中枢神经系统,脑脊液中含有微量的单核细胞,因此检测到脑组织溶菌酶活性较低;鱼类肝胰脏、肾脏、鳃、肠粘膜、脾脏等组织器官中含有丰富的血细胞,血细胞能分泌溶菌酶进入这些组织中;肠黏膜尽管具有丰富的血细胞,但没有分泌溶菌酶的单核细胞和嗜中性粒细胞,所以含量较低(Hansen,1997);脾脏是鱼类红细胞、淋巴细胞和粒性白细胞生产、贮存和成熟的主要场所,是鱼类主要的免疫器官,除行使特异性免疫功能外,因其含有丰富的粒细胞和巨噬细胞,还具有分泌溶菌酶等抗菌肽,行使非特异性免疫的功能;但本试验测得脾脏的溶菌酶活性最低,这可能是由于其本身脾脏的功能所致,淇河鲫脾脏的造血功能与其它硬骨鱼类相比较弱,发挥免疫效应的过程较慢,且有人认为鱼类脾脏的抗体生成细胞来源于肾脏;同时也说明,与肾脏相比,脾脏在体液免疫中发挥的功能处于相对次要的位置(唐海蓉等,2006;谢碧文,2010;徐革锋,2012)。有研究显示,鲟(*Acipenser sturio*)和牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)脾脏中溶菌酶活性远远低于肾脏(王宏田等,2000;Subbotkina & Subbotkin,2003)。血液中的血细胞最丰富,在鱼体内各部位的循环流动使溶菌酶分布得更广,因而自身不能产生血细胞的组织同样可以含有溶菌酶。本试验中,淇河鲫的各组织器官均检测到溶菌酶的存在。

邱岭泉等(2011)对鲤(*Cyprinus carpio*)不同组织器官溶菌酶活性进行了研究,结果显示不同组织器官和血清溶菌酶活性大小依次为:肝胰脏>鳃>脾脏>血清,与本试验结果基本一致;刘金兰和李其雨(2011)研究澳洲银鲈(*Bidyanus bidyanus*)和鲫(*Carassius auratus*)不同组织和血清溶菌酶活性大小依次为:肾脏>血清>肠>脾脏>鳃,而黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)和黄鳝(*Monopterus albus*)的不同组织和血清溶菌酶活性大小依次为:肾脏>脾脏>肠粘膜>血清>鳃>体表黏液,表明不同的鱼类其不同组织器官溶菌酶活性不同,但亲缘关系较近鱼类组织间溶菌酶活性相近。本试验淇河鲫不同组织器官溶菌酶活性次序为:肾脏>鳃>肠>脾脏,与普通鲫的测定结果相似。

3.2 淇河鲫不同组织器官的抑菌机制

霍乱弧菌是一种人鱼共患的病原菌,虽然我国

已加强对国内各种水体霍乱弧菌的检测,但在水产品行业仍有散发的霍乱病例报道(王立平等,1997;杨鸞劼等,2006)。本试验分别测定了淇河鲫的脑、鳃、肝胰脏、肾脏、脾脏、肠组织液对霍乱弧菌的抑制性,结果表明淇河鲫的肝胰脏和肾脏对霍乱弧菌的抑制性最强,且肝胰脏>肾脏>脑>鳃>肠>脾脏($P<0.01$)。肝胰脏是鱼体重要的解毒器官,也是酶活反应中心,肾脏是鱼体最重要的免疫器官,因此二者对霍乱弧菌的抑制性最强;脑、鳃、肠和脾脏的抑菌圈较小,说明其对霍乱弧菌的抑制性较低,可能是其免疫功能较弱造成的。有研究显示,II型溶菌酶基因编码的蛋白具有潜在的抗菌活性(Mitra et al,2003)。本试验中,各组织器官对霍乱弧菌的抑制机制及是否有其它免疫分子参与,还有待进一步的研究确定。

综上所述,淇河鲫不同组织器官的溶菌酶活性和抗菌活性具有组织特异性,与不同组织器官所执行的生理功能有关;其组织器官中的溶菌酶活性与抑菌活性较为一致,表明淇河鲫肝胰脏和肾脏的免疫能力较强。在淇河鲫人工养殖和防病用药过程中,应避免对淇河鲫肝胰脏和肾脏产生损伤和影响,从而有助于保护其自身的免疫防护能力。

参考文献

- 刘金兰,李其雨. 2011. 4种养殖鱼类溶菌酶活性比较研究[J]. 天津农业科学,17(6):42-44.
- 刘睿智,郑榕辉,张纪亮,等. 2006. 苯并(a)芘、三丁基锡及其混合物对褐菖鲉溶菌酶活力的影响[J]. 厦门大学学报:自然科学版,45(2):253-256.
- 龙华. 2005. 水生动物10种非特异性免疫分子的研究进展[J]. 长江大学学报:自然科学版,2(11):67-74.
- 邱岭泉,王获,刘逊,等. 2011. 中草药对鲤不同组织溶菌酶活性的影响[J]. 水产学杂志,24(4):40-42.
- 唐海蓉,陈仕均,王选年. 2006. 鱼类免疫组织的研究进展[J]. 现代畜牧兽医,(9):52-54.
- 王宏田,徐永立,张培军. 2000. 假雄牙鲆不同组织中溶菌酶比活性的研究[J]. 海洋科学,24(10):7-8.
- 王立平,张晓华,刘镁,等. 1997. 中国对虾糠虾幼体病原菌(非O1群霍乱弧菌)的研究[J]. 中国水产科学,4(1):45-51.
- 谢碧文,张末丽,张耀光. 2010. 瓦氏黄颡鱼和岩原鲤脾脏的组织学观察[J]. 四川动物,29(2):212-214.
- 徐革锋,刘洋,牟振波,等. 2012. 细鳞鲑早期发育过程中免疫器官发生[J]. 中国水产科学,19(4):568-576.
- 杨鸞劼,俞菊华,陈辉,等. 2006. 暗纹东方鲀非O1霍乱弧菌的鉴定及毒力基因检测[J]. 水产学报,30(4):525

-530.

英辉,丛丽娜,朱蓓薇. 2008. 海参肠中溶菌酶的分离纯化及其酶学性质[J]. 大连工业大学学报,27(3):193-196.

郑清梅,吴锐全,叶星. 2006. 水生动物溶菌酶的研究进展[J]. 上海水产大学学报,15(4):483-487.

Alexander Jung, Albrecht E Sippel, Manuel Grez, et al. 1980. Exon encode functional and structural units of chicken lysozyme[J]. Pme Natl Acad Sci USA,77(10):5759-5763.

Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 72:248-254.

Bukharin O V, Valyshev A V. 2006. Microbial inhibitors of lysozyme[J]. Microbiol Epidemiol Immunobiol,4:8-13.

Christopher J B, Lena G. 2001. The acute phase response and innate immunity of fish[J]. Developmental and Comparative Immunology,25:725-723.

Hansen N E. 1997. Plasma Lysozyme-a measure of neutrophil turnover[J]. Acta Haematol,7(1):75-87.

Mitra A, foster F J, Rexroad T, et al. 2003. Molecular characterization of lysozyme type II gene in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*): evidence of gene duplication[J]. Anim Biotechnol, 14(1):7-12.

Subbotkina T A, Subbotkin M F. 2003. Lysozyme content in organs and blood serum in various species in the Volga River[J]. Evolutionary Biochemistry and Physiology, 39(5): 537-546.

(责任编辑 万月华)

Comparison of Lysozyme and Antibacterial Activity among Different Tissues and Organs of *Carassius auratus* in Qihe River

ZHAO Yan-jing, WU Xiang-min, JIANG Xin-yu, JIANG Hong-xia, KONG Xiang-hui

(College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, P. R. China)

Abstract: *Carassius auratus* in Qihe River, a natural triploid crucian carp, is an important commercial fish. To understand its antibacterial ability in various tissues and organs will be useful for preventing disease. In this study, lysozyme and antibacterial activities were measured in different tissues and organs of *C. auratus* in Qihe River. The results showed that lysozyme and antibacterial activities in various tissues and organs were different. The measured values of lysozyme activities were: hepatopancreas > kidney > gill > brain > intestine > spleen. Antibacterial activities were shown by the order of hepatopancreas > kidney > brain > gill > intestine > spleen, with significant difference among them ($P < 0.01$). Antibacterial activities in hepatopancreas and kidney were significantly higher than those in other tissues and organs, and the activity was significantly higher in hepatopancreas than in kidney ($P < 0.01$). The antibacterial ability in kidney and gill was significantly higher than that in spleen ($P < 0.01$). The research indicates there is difference in lysozyme and antimicrobial activity among the various tissues and organs of fish, which is resulted from the different physiological function of various tissues and organs. At the same time, it is suggested that different tissues and organs play different roles in the intervention process of pathogenic bacteria in fish.

Key words: *Carassius auratus* in Qihe River; lysozyme; antibacterial activity; tissues and organs