

## 虾夷马粪海胆 (*Strongylocentrotus intermedius*) 体腔液的酚氧化酶活性分析

王轶南, 刘学伟, 刘艳萍, 常亚青

(大连海洋大学, 农业部海洋水产增养殖学重点实验室, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 分别测定虾夷马粪海胆血浆和体腔细胞溶解上清液 (CLS) 中的酚氧化酶 (PO) 活性以及不同刺激物对其酚氧化酶原系统 (proPO) 的激活效果, 并初步分析了患病虾夷马粪海胆体腔液中酚氧化酶活性的变化。结果显示: 虾夷马粪海胆体腔液的 PO 主要分布于血浆中, 且个体差异较大, 血浆中 PO 活性为  $48.28 \pm 6.69$  U, CLS 中 PO 活性为  $2.24 \pm 1.81$  U; proPO 存在于体腔细胞中, 含量较少, 其被  $1 \text{ mg/mL}$  Trypsin 及  $100 \text{ mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$  激活后, PO 活性分别提高  $2.24$  U 和  $7.86$  U, LPS、SDS、 $\text{CaCl}_2$  和甲醇等对酚氧化酶原无明显激活效果; 虾夷马粪海胆感染细菌后体腔液的酚氧化酶活性为  $12.90 \pm 2.03$  U, 相较于健康海胆 ( $30.63 \pm 2.21$  U) 显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而在  $100 \text{ mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$  作用下酚氧化酶活性提高  $4.19 \pm 1.96$  U, 相较于健康海胆 ( $2.76 \pm 1.15$  U) 明显升高 ( $P < 0.05$ )。研究结果为虾夷马粪海胆及其他棘皮动物的免疫防御机制的深入研究提供了基础。  
**关键词:** 虾夷马粪海胆; 体腔液; 酚氧化酶 (PO); 酚氧化酶原 (proPO)

doi:10.3969/j.issn.1008-0864.2011.02.19

中图分类号: Q959.268.3

文献标识码: A

文章编号: 1008-0864(2011)02-0116-05

## Analysis of Phenoloxidase Activity in the Coelomic Fluid of *Strongylocentrotus intermedius*

WANG Yi-nan, LIU Xue-wei, LIU Yan-ping, CHANG Ya-qing

(Dalian Ocean University, Key Laboratory of Mari-culture, Ministry of Agriculture, Liaoning Dalian 116023, China)

**Abstract:** Phenoloxidase (PO) activity and proPO induction in plasma and coelomocyte lysate supernatant (CLS) of *Strongylocentrotus intermedius* was detected, and the effect of disease on the enzyme activities of sea urchin was analyzed. The results showed that PO of the coelomic fluid of *S. intermedius* was mainly distributed in plasma, and the PO activity in plasma was  $48.28 \pm 6.69$  U, that in CLS was  $2.24 \pm 1.81$  U; and proPO existed in CLS was at very low level. After being activated by  $1 \text{ mg/mL}$  Trypsin and  $100 \text{ mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$ , the PO activity increased  $2.24$  U and  $7.86$  U, respectively. The LPS, SDS,  $\text{CaCl}_2$  and methanol had no obviously inductive effect; and the PO activity of bacteria-infected *S. intermedius* was  $12.90 \pm 2.03$  U, which declined significantly ( $P < 0.05$ ) comparing with that of the healthy ones ( $30.63 \pm 2.21$  U). While the PO activity of diseased *S. intermedius* increased  $4.19 \pm 1.96$  U after induced by  $100 \text{ mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$ , which increased significantly ( $P < 0.05$ ) comparing with that of the healthy ones ( $2.76 \pm 1.15$  U). The above results provide basis for further studies on immune defense mechanism of *S. intermedius* and other Echinodermata animals.

**Key words:** *Strongylocentrotus intermedius*; coelomic fluid; phenoloxidase (PO); prophenoloxidase (proPO)

无脊椎动物一种主要的先天性免疫防御反应是入侵病原以及受损组织的黑化, 这一重要过程是在酚氧化酶 (phenoloxidase, PO) 的控制与精密调控下进行的。在无脊椎动物中, PO 一般以无活性的酶原形式即酚氧化酶原 (prophenoloxidase,

proPO) 存在, 其经过一系列过程激活转变成有活性的 PO<sup>[1-3]</sup>。酚氧化酶及其因子构成了复杂的酶级联反应系统——酚氧化酶原激活系统 (pro-PO activating system), 该系统是一种重要的防御系统, 同时还是一种类似于脊椎动物补体系统的

收稿日期: 2010-10-20; 修回日期: 2010-11-15

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006AA10A411); 国家自然科学基金项目 (30972269); 辽宁省优秀青年人才基金项目 (2005203001); 辽宁省计划项目 (2007203004) 资助。

作者简介: 王轶南, 助理研究员, 主要从事水产动物病害与免疫学研究。E-mail: wisteriayn@gmail.com。通讯作者: 常亚青, 教授, 博士生导师, 主要从事水产动物遗传育种和养殖研究。Tel: 0411-84762695; E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

模式识别系统<sup>[2]</sup>。PO 及 proPO 的生物化学、免疫学和分子生物学特性的研究一直以来受到广泛关注。目前的研究多集中于节肢动物门中的昆虫类、甲壳类和软体动物门,水产动物中主要的研究对象是虾蟹类和贝类<sup>[4-11]</sup>。对于处在无脊椎动物向脊椎动物演化阶段的棘皮动物而言,目前仅确认波罗的海海星 (*Asterias rubens*)<sup>[12]</sup>、冠海胆 (*Diadema antillarum*)<sup>[12]</sup> 和管海参 (*Holothuria tubulosa*)<sup>[13]</sup> 中存在酚氧化酶活性,未见对其他种的研究报道,有关其酚氧化酶原系统的激活特性、分布等情况尚不明确。

虾夷马粪海胆 (又称中间球海胆, *Strongylocentrotus intermedius*) 原产于日本北海道和俄罗斯的远东等地沿海,由于其性腺色泽好、味道鲜美,在国际市场上很受欢迎,是海胆中经济价值最高的种类之一。该种 1989 年由大连水产学院引进我国,随后进行了养成、人工育苗及增殖的研究和推广工作,目前,虾夷马粪海胆已成为我国最主要的海胆养殖种类<sup>[14]</sup>。本文首次对虾夷马粪海胆的酚氧化酶进行研究,探讨其分布及酶原激活特性,并初步分析患病海胆体腔液中酚氧化酶活性的变化,研究结果为虾夷马粪海胆免疫防御机制的深入研究及其他棘皮动物的相关研究提供了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

健康虾夷马粪海胆取自大连海洋大学农业部海洋水产增殖学重点开放实验室,海胆直径 3~4 cm、体重 18~26 g。L-多巴 (3,4-dihydroxyphenylalanine, L-dopa)、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、胰蛋白酶 (Trypsin)、二甲胍酸钠 (sodium cacodylate) 购自 BBI 公司;十二烷基硫酸钠 (SDS) 购自上海生工生物工程有限公司;蛋白质浓度测定试剂盒购自南京建成生物工程有限公司。

### 1.2 血浆和体腔细胞溶解上清液的制备

取海胆 5 枚,分别从围口膜处抽取体腔液,离心 (600 × g, 15 min, 4℃),取上清,置 1 L 0.01 mol/L 二甲胍酸钠缓冲液 (CAC, 0.01 mol/L 二甲胍酸钠, 0.45 mol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 26 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0) 中 4℃ 透析 24 h,期间更换 3 次透析液;体腔细胞沉淀洗涤 2 次后用 CAC

重悬并将 5 枚海胆样品混合,使用超声波破碎仪 (宁波新芝, JY92-II DN) 破碎细胞 (200 W, 5 min, 4℃),离心 (1 000 × g, 15 min, 4℃),上清液即为体腔细胞溶解上清液 (coelomocyte lysate supernatant, CLS)。将处理后的血浆及 CLS 保存至 -80℃ 备用。

### 1.3 PO 活性分析

PO 活性测定采用分光光度法,通过测定底物 L-dopa 被氧化形成多巴色素过程中光密度的变化来进行定量研究。试验中 PO 活性的测定在 96 孔酶标板上进行<sup>[9]</sup>,用酶标仪 (Biotek, Epoch) 测定。取 100 μL 血浆或 CLS 加入 50 μL L-dopa (3 mg/mL),每隔 2~5 min 测定 OD<sub>492</sub>,每个样品做 3 个平行。以牛血清白蛋白作为标准蛋白质,采用蛋白质浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度。PO 活力以每分钟每毫克蛋白质光密度值增加 0.001 为 1 个酶活力单位 (U)。

### 1.4 proPO 激活及活性测定

取 100 μL 血浆或 CLS,加入 50 μL 激活剂,未激活对照加入 50 μL CAC,37℃ 孵育 15 min 后加入 50 μL L-dopa 后按上述方法测定 PO 活性。以 PO 活力相对未激活对照的提高程度来衡量 ProPO 的活性<sup>[15]</sup>。激活剂包括:LPS (1 mg/mL), SDS (1 mg/mL), Trypsin (1 mg/mL), 甲醇 (50%), CaCl<sub>2</sub> (100 mmol/L) 和 MgCl<sub>2</sub> (100 mmol/L)。

### 1.5 患病海胆与健康海胆体腔液酚氧化酶活性比较

取本实验室分离自大连地区患病虾夷马粪海胆的强壮弧菌 (*Vibrio fortis*, 7.2 × 10<sup>7</sup> cells/mL) 经围口膜注射感染健康海胆 10 枚,感染 48 h 后,海胆停止摄食、不吸附、围口膜区发黑,随机抽取 5 枚海胆的体腔液,冻融 2 次,离心 (1 000 × g, 15 min, 4℃) 后按上述方法测定 PO 活性,并以激活剂处理后测定 proPO 活性。以注射无菌 PBS 海胆的体腔液作为对照。

## 2 结 果

### 2.1 PO 活性

海胆的血浆与 L-dopa 作用后 OD<sub>492</sub> 明显升高,其反应速率在大约 70 min 后逐渐降低 (图 1)。以 OD<sub>492</sub> 的平均增加速率计算 PO 活性发现,虾夷马粪海胆血浆的 PO 活性为 48.28 ±

6.69 U。海胆的 CLS 与 L-dopa 作用后  $OD_{492}$  仅在 10 min 内略有升高, 计算获得 PO 活性为  $2.24 \pm 1.81$  U。上述结果表明, 虾夷马粪海胆体腔液中的 PO 主要存在于血浆中, 且个体差异较大。

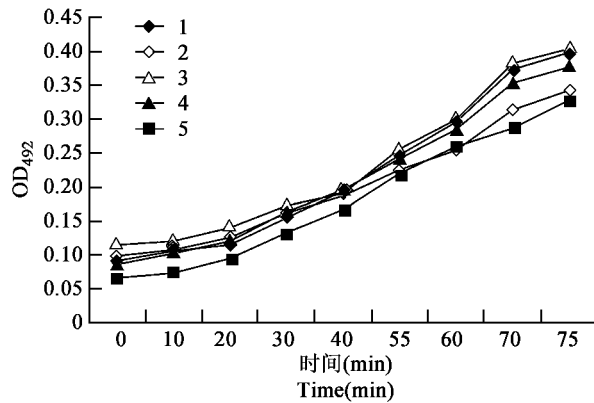


图1 虾夷马粪海胆血浆与 L-dopa 作用后  $OD_{492}$  变化

Fig. 1  $OD_{492}$  change in the reaction between L-dopa and plasma of *Strongylocentrotus intermedius*.

1~5 分别代表所检测海胆。

1~5 were 5 urchins tested in the experiment.

## 2.2 激活剂对 proPO 的作用

海胆的血浆与 LPS、SDS、Trypsin、甲醇、 $CaCl_2$  和  $MgCl_2$  等作用后, PO 活性无明显变化, 未检测到 proPO。CLS 与 1 mg/mL Trypsin 及 100 mmol/L  $MgCl_2$  作用后 PO 活性与对照相比均出现显著升高 ( $P < 0.05$ ), 酶反应在 10 min 左右完成, PO 活性分别提高 2.24 U 和 7.86 U。CLS 与 LPS、SDS、 $CaCl_2$ 、甲醇和异丙醇作用后 PO 活性无明显增加, 其中 SDS 与甲醇作用后 PO 活性还略有降低 (图 2)。上述结果表明, 虾夷马粪海胆体腔液中的 proPO 存在于体腔细胞中, 其含量较少可被 Trypsin 和  $Mg^{2+}$  激活, 且后者激活效果更明显。

## 2.3 患病海胆与健康海胆体腔液酚氧化酶活性比较

海胆感染细菌 48 h 后围口膜区变黑, 体腔液亦多呈紫色或紫黑色。患病海胆与健康海胆体腔液的 PO 活性分别为  $12.90 \pm 2.03$  U 和  $30.63 \pm 2.21$  U (图 3); 在 100 mmol/L  $MgCl_2$  作用下, 患病海胆与对照海胆体腔液的 PO 活性分别提高  $4.19 \pm 1.96$  U 和  $2.76 \pm 1.15$  U (图 4)。应用 SPSS 17.0 软件对所得数据进行统计分析发现, 患病海胆与健康海胆相比, PO 活性显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而 proPO 活性显著升高 ( $P < 0.05$ )。

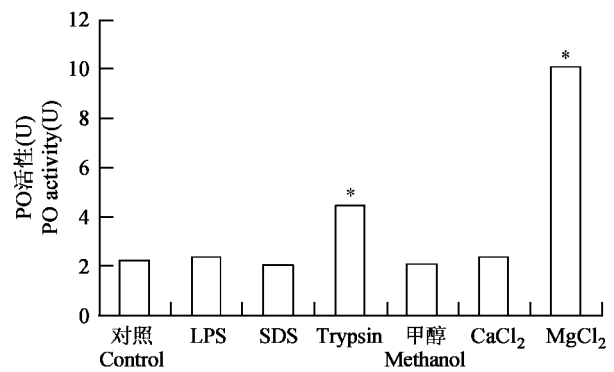


图2 不同激活剂作用后虾夷马粪海胆 CLS 中 PO 活性比较

Fig. 2 Phenoloxidase activity in different activators treated coelomocyte lysate of *S. intermedius*.

\* 代表与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )

\* Indicates significant difference compared with control group ( $P < 0.05$ ).

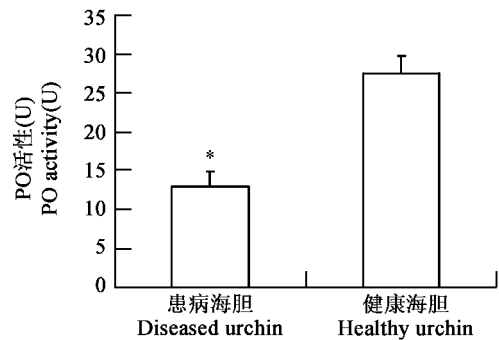


图3 患病与健康虾夷马粪海胆体腔液 PO 活性比较 (每组 5 枚海胆)

Fig. 3 Comparison of PO activity between diseased and healthy *S. intermedius* (5 urchins in each group).

\* 代表与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )

\* Indicates significant difference compared with control group ( $P < 0.05$ ).

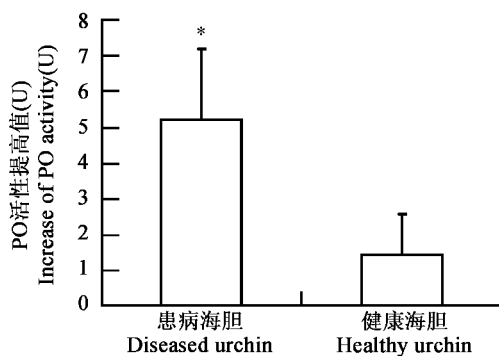


图4 患病与健康虾夷马粪海胆体腔液的 proPO 活性比较 (每组 5 枚海胆)

Fig. 4 Comparison of proPO activity between diseased and healthy *S. intermedius* (5 urchins in each group).

\* 代表与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )

\* Indicates significant difference compared with control group ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

#### 3.1 虾夷马粪海胆体腔液中 PO 及 proPO 的定位

无脊椎动物血淋巴或体腔液中 PO 及 proPO 的定位是酚氧化酶相关研究的一个基本问题<sup>[1]</sup>, 而有关棘皮动物体腔液中 PO 及 proPO 的定位目前尚未见报道。一般认为无脊椎动物的 proPO 主要存在于血细胞中, 其在颗粒细胞、半颗粒细胞、类绛色细胞和含晶细胞等亚细胞中合成<sup>[16~18]</sup>。本文研究结果显示, 虾夷马粪海胆体腔液中的 proPO 存在于体腔细胞中, 与相关研究一致, 但具体分布于哪(几)种类型细胞中还有待于进一步研究。然而, 体腔液中的 proPO 可能由于体腔液抽取、外界环境变化等引起的免疫防御而诱导激活, 也可能由于离心、超声破碎等外部机械作用造成 proPO 蛋白构象变化进而激活。因此实验所检测的 proPO 活性可能低于实际值, 不排除上清中存在 proPO 的可能性。

研究发现, 太平洋牡蛎、江珧等的血浆和血细胞中均有 PO 活性<sup>[3]</sup>; 中华绒螯蟹、凡纳滨对虾和蟑螂血淋巴中的 PO 主要存在于血细胞中, 血浆无 PO 活性或含量较低<sup>[1,3,9]</sup>; *Bombyx mori*, *Manduca sexta* 和 *Sarcophaga bullata* 等昆虫的 PO 活性则存在于血浆中<sup>[1]</sup>。本文研究结果表明在虾夷马粪海胆体腔液中, PO 主要存在于血浆中, CLS 中 PO 活性非常低。

#### 3.2 虾夷马粪海胆体腔液中 proPO 的激活

proPO 可以被一些化合物激活而转变成具有活性的 PO, 已报道的激活剂有多糖、蛋白酶、去垢剂、二价阳离子, 以及有机溶剂等几大类, 其中 LPS、Trypsin、SDS、CaCl<sub>2</sub> 和 MgCl<sub>2</sub> 等较为常见<sup>[2,19]</sup>。不同来源的 proPO 所适应的激活剂不尽相同, 如 Trypsin 可激活克氏原螯虾、圣保罗对虾等多种动物中的 proPO, 但对凡纳滨对虾、斑节对虾中的 proPO 则无明显激活效果<sup>[6~9,19]</sup>。目前针对棘皮动物 proPO 的激活特性的研究非常少, 仅有报道称管海参体腔液中的 proPO 可被胰蛋白酶激活并对钙离子敏感<sup>[13]</sup>。本文研究发现 Trypsin 和 MgCl<sub>2</sub> 对虾夷马粪海胆体腔液中的 proPO 具有

激活作用, 与管海参相近。而 LPS、SDS、甲醇和 CaCl<sub>2</sub> 等未检测到明显的 proPO 激活效果, 原因可能是虾夷马粪海胆 proPO 的激活特性较为特殊, 也可能是因为 proPO 含量过低或在操作过程中部分自发激活, 而实验中酚氧化酶的反应体系较小而未检测到。

#### 3.2 患病虾夷马粪海胆体腔液中 PO 及 proPO 的变化

PO 具有多种功能, 参与黑色素形成、伤口愈合并在宿主的防御反应中发挥功能<sup>[2]</sup>。PO 通常以非激活状态的 proPO 形式存在, 当病原体侵入时, proPO 系统中的相关识别蛋白与病原体中相关保守分子结合, 经丝氨酸蛋白酶活化及水解使 proPO 释放出小肽转变为具有活性的 PO, 从而激活整个 proPO 系统, 并进而形成黑色素及诱导其他免疫功能, 以消灭外源侵害<sup>[19]</sup>。多项研究显示, 在病原侵染或外源刺激后 proPO 系统被激活, 宿主的 PO 活性增加, 同时 proPO 基因转录水平也明显升高<sup>[1,20]</sup>。

虾夷马粪海胆感染细菌后体腔液中的酚氧化酶原系统发生了显著变化, 体腔液中的 proPO 活性升高, 表明在病原刺激下, 细胞内 proPO 基因表达上调, proPO 合成量加大。然而, 海胆感染细菌后体腔液中的 PO 活性明显降低, 与以往研究不同, 其差异可能是刺激阶段不同所致。感染 48 h 后取样时已达到细菌感染的后期, PO 通过产生黑色素沉积、包囊和黑化等方式限制入侵异物进而被大量消耗。本文中被感染海胆围口膜区变黑、体腔液呈紫黑色等现象可能正是由于 PO 作用产生大量黑色素所致。在已有研究报道中, “斑点病”<sup>[21]</sup>、“黑嘴病”<sup>[22]</sup>、“红斑病”<sup>[23]</sup> 等海胆疾病也多具有围口膜、棘刺基部发黑的症状, 并时或伴有紫黑色溢出物, 海胆的这一类“黑化”病症表现可能与体腔液酚氧化酶原系统的作用密切相关。

#### 参 考 文 献

- [1] 庞秋香, 庞书香, 赵博生. 酚氧化酶及其酶原的研究进展 II——免疫学特性、细胞定位及其功能[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(7): 1385-1388.
- [2] 李国荣, 张士瑾, 李红岩, 等. 酚氧化酶研究概况 I——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.

- [3] 吴曙,王淑红,王艺磊,等. 软体动物和甲壳动物酚氧化酶的研究进展[J]. 动物学杂志, 2009, 44(5): 137-146.
- [4] Ko C F, Chiou T T, Vaseeharan B. Cloning and characterisation of a prophenoloxidase from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*[J]. Dev. Comp. Immunol., 2007, 31(1): 12-22.
- [5] Gao H W, Li F H, Dong B, et al.. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase (proPO) cDNA from *Fenneropenaeus chinensis* and its transcription injected by *Vibrio anguillarum*[J]. Mol. Biol. Rep., 2009, 36: 1159-1166.
- [6] AsPan A, Huang T S, Cerenius L, et al.. cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92: 939-943.
- [7] Sung H H, Chang H J, Her C H, et al.. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*[J]. J. Invert. Pathol., 1998, 71: 26-33.
- [8] Hellio C, Anne B N, Gagnaire B, et al.. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a proPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*(Thunberg) *in vitro*[J]. Fish Shellfish Immunol., 2007, 22: 433-440.
- [9] 刘凯. 南美白对虾血细胞中酚氧化酶原系统的激活[J]. 动物医学进展, 2009, 30(1): 27-32.
- [10] 叶星, 郑清梅, 白俊杰, 等. 短沟对虾和斑节对虾酚氧化酶原基因的克隆和序列分析[J]. 海洋与湖沼, 2003, 134(15): 533-540.
- [11] 孙虎山, 李光友. 栉孔扇贝血淋巴中酚氧化酶和髓过氧化物酶活性[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2): 9-13.
- [12] Smith V J, Söderhäll K A. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates [J]. Dev. Comp. Immunol., 1991(4): 251-261.
- [13] Roch P, Canicatti C, Sammarco S. Tetrameric structure of the active phenoloxidase evidenced in the coelomocytes of the echinoderm *Holothuria tubulosa* [J]. Comp. Biochem. Physiol., 1992, 102(2): 349-355.
- [14] 常亚青, 丁君, 宋坚, 等. 海参、海胆生物学研究与养殖[M]. 北京: 海洋出版社, 2004.
- [15] 尹丽红, 王琛柱, 钦俊德. 棉铃虫血淋巴酚氧化酶活性的微量测定[J]. 昆虫知识, 2001, 38(2): 121-124.
- [16] Cerenius L, Bangyeekhun E, Keyser P, et al.. Host prophenoloxidase expression in freshwater crayfish in linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*[J]. Cell Microb., 2003, 5(5): 353-357.
- [17] Iwama R, Ashida M. Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx Mori* [J]. Insect Biochem., 1986, 16(3): 547-555.
- [18] Waltzer L, Bataille L, Peyrefitte S, et al.. Two isoforms of serpent containing either one or two GATA zinc fingers have different roles in *Drosophila* haematopoiesis [J]. EMBO J., 2002, 21(20): 5477-5486.
- [19] Söderhäll K, Cerenius L. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates [J]. Immunol. Rev., 2004, 198: 116-126.
- [20] Song Y L, Yu C I, Lien T W, et al.. Haemolymph responses of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus [J]. Fish Shellfish Immunol., 2003, 14(4): 317-331.
- [21] Kenichi T, Takahiro H, Motohiro S, et al.. Isolation and pathogenicity of the causative bacterium of spotting disease of sea urchin *Strongylocentrotus intemedius* [J]. Fisheries Sci., 1997, 63(2): 249-252.
- [22] 李太武, 徐善良, 王仁波, 等. 虾夷马粪海胆黑嘴病的初步研究[J]. 海洋科学, 2000, 24(3): 41-43.
- [23] 王斌, 李岩, 李霞, 等. 中间球海胆“红斑病”病原弧菌致病机理的研究[J]. 大连水产学院学报, 2005, 20(1): 11-15.