

黄鳝 SOD, AKP, 补体 C3、C4 组织分布研究

郇志利¹, 毛盼¹, 何蓝波², 胡毅^{1,3}, 黄云¹, 戴振炎¹

- (1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南长沙 410128;
2. 四川农业大学动物科技学院, 四川雅安 625000;
3. 益阳益华水产品有限公司, 湖南益阳 413000)

摘要:以在水温 28 ± 3 °C 下饲养的黄鳝 (*Monopterus albus*) (37.35 ± 0.89 g) 为研究对象, 以酶学方法研究黄鳝不同免疫组织(血液、体表粘液、肝脏、肠道、肾脏、脾脏)中非特异性免疫相关酶(超氧化物歧化酶(SOD)、酸性和碱性磷酸酶(ACP、AKP)、补体 C3、C4)的分布情况。研究结果显示, 组织中 SOD 活性依次为: 肝脏 > 肾脏 > 脾脏 > 粘液 > 肠道 > 血液 ($P < 0.05$); ACP 活性依次为: 脾脏 > 肾脏 > 肝脏 > 肠道 > 血液、粘液; AKP 活性依次为: 肾脏 > 肝脏 > 脾脏 > 肠道 > 粘液 > 血液; 补体 C3 的含量依次为: 肝脏 > 肾脏 > 脾脏 > 肠道 > 血液、粘液; 补体 C4 的含量依次为: 肝脏 > 脾脏 > 肾脏 > 肠道 > 血液、粘液。由此可见, 超氧化物歧化酶和补体 C3、C4 主要分布于肝脏中, 碱性磷酸酶主要分布于肾脏中, 酸性磷酸酶主要分布于脾脏中; 而各种非特异性酶和物质在肠道、血液和粘液中也有少量分布。

关键词:黄鳝; 非特异性免疫酶; 组织分布

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1671-5322(2012)02-0056-04

黄鳝 (*Monopterus albus*), 属于合鳃目 (*Synbranchiformes*)、合鳃科、黄鳝属, 分布于亚洲东南部, 中国除西部高原及西北地区高原外, 全国各水域均有分布。黄鳝营养丰富, 肉质鲜美及独特的药用价值, 深受国内外消费者的青睐, 是我国大力推广养殖的重要名特优淡水水产品之一。目前, 我国黄鳝养殖产量已超过 23 万 t, 产值超过 100 亿元^[1]。

免疫系统是保护鱼体免受病原菌和微生物入侵的防御系统^[2], 也是鱼类维持正常生理功能的保障, 主要由免疫组织及器官、免疫细胞和体液免疫因子组成^[3]。鱼类是最早同时出现特异性免疫和非特异性免疫的脊椎动物, 与哺乳类相比, 其特异性免疫系统不发达, 因此鱼类更多依赖非特异性免疫来抵御病害生物的入侵和修复感染疾病后损伤的机体^[4]。而非特异性免疫主要由一些抗氧化酶如超氧化物歧化酶、磷酸酶及补体 C3、

C4 参与^[5-7], 且这些免疫应答都要通过其免疫器官、组织和系统的作用来表现^[3]。目前, SOD、AKP、ACP 和补体 C3、C4 研究分别在卵形鲳鲷 (*Trachinotus ovatus*)^[6], 虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[7], 云南高背鲫 (*Carassius auratus*)^[8] 等品种上已有相关报道, 而在黄鳝中尚未见报道。本试验通过检测黄鳝不同组织的部分非特异性免疫指标, 研究比较其在黄鳝不同组织中的分布情况, 以为黄鳝的免疫学研究及黄鳝健康养殖提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验黄鳝购自常德市西湖区黄鳝养殖场。其规格为: 体长 26.19 ± 0.17 cm, 体重 37.35 ± 0.89 g。在室内水箱 (70 cm × 50 cm × 30 cm) 中暂养 24 h, 水深 15 cm, 水为清澈的池塘水, 水箱水温

收稿日期: 2011-03-31

基金项目: 十一·五科技支撑计划项目 (2007BAD87B11); 公益性行业专项 (201003076); 湖南农业大学人才引进项目 (08YJ01)

作者简介: 郇志利 (1983-), 男, 山东泰安人, 硕士, 主要研究方向为水产动物营养与免疫。

通讯作者: 胡毅 (1974-), 男, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为水产动物营养与免疫。

(26 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 。然后挑选健康、规格整齐的黄鳝进行试验。

1.2 样品采集与分析

1.2.1 皮肤粘液

随机取 5 尾黄鳝,用蒸馏水分别冲洗鱼体,然后用干净的载玻片小心的将体表粘液刮下,分别置于 5 个 1.5 mL 无菌离心管中, -20°C 保存。

1.2.2 血液样品

随机选取 5 尾黄鳝,用 2 mL 无菌注射器从黄鳝尾静脉采血,血液分别置于 5 个 10 mL 离心管中, 4°C 静置过夜,之后 4°C , 4 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液, -20°C 保存。

1.2.3 肝脏、脾脏、肠道、肾脏样品

随机取 5 尾黄鳝分别置于冰盘处死,解剖,迅速采集肝脏、脾脏、肾脏、肠道。冰蒸馏水洗净,滤纸吸干,称重,捣碎组织加入 5 倍体积 (V/W) 预冷生理盐水,电动匀浆机于冰水浴中匀浆。然后将混合物于 6 000 r/min 高速冷冻离心机离心 10 min,取上清液, -20°C 冰箱内保存。测定时按需稀释, 24 h 内完成测定。超氧化物歧化酶 (SOD)、酸性磷酸酶 (ACP) 和碱性磷酸酶 (AKP) 均采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定,补体 C3、C4 采用浙江伊利康生物技术有限公司试剂盒测定。蛋白质含量以牛血清蛋白为标准,采用考马斯亮蓝法测定。

定义各项指标的单位如下: SOD 单位定义为

每毫克组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50 % 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位 (U); AKP 单位定义为每克组织蛋白在 37°C 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚的酶量为 1 个碱性磷酸酶活力单位 (U); ACP 单位定义为每克组织蛋白在 37°C 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚的酶量为 1 个酸性磷酸酶活力单位 (U)。补体 C3、补体 C4 含量用每克组织蛋白中所含补体 mg 来表示。SOD 活性单位为 U/mgprot, ACP、AKP 活性单位为 U/gprot, 补体单位为 mg/gprot。

1.3 数据统计分析

试验结果用平均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示,数据用 SPSS 17.0 软件进行 One - Way ANOVA 方差分析,当差异显著时 ($P < 0.05$),采用 Duncan's 进行多重检验。

2 结果

由表 1 可知,黄鳝不同组织超氧化物歧化酶活性依次为: 肝脏 > 肾脏 > 脾脏 > 粘液 > 肠道 > 血液。其中,肝脏中超氧化物歧化酶的活性最高,且与其他各组织均差异显著 ($P < 0.05$); 肾脏和脾脏中超氧化物歧化酶活性差异不显著,其活性仅次于肝脏 ($P < 0.05$); 粘液中超氧化物歧化酶活性次于肝脏、肾脏和脾脏,但显著高于肠道和血液 ($P < 0.05$)。

表 1 黄鳝不同组织中 SOD、ACP、AKP 活性及补体 C3、补体 C4 含量 (平均值 $\pm$ 标准差)

Table 1 The activities of SOD, ACP, AKP and the content of Complement C3, Complement C4 in different of tissues of *Monopterus albus* (mean $\pm$ SD)

指标 Index	SOD U/mgprot	ACP U/gprot	AKP U/gprot	补体 C3 mg/gprot	补体 C4 mg/gprot
血液 Blood	14.36 $\pm$ 0.18 ^a	24.28 $\pm$ 5.40 ^a	1.59 $\pm$ 0.53 ^a	2.95 $\pm$ 0.33 ^a	2.09 $\pm$ 0.29 ^a
粘液 Mucus	21.56 $\pm$ 0.30 ^c	22.38 $\pm$ 2.87 ^a	4.38 $\pm$ 1.09 ^b	1.94 $\pm$ 0.03 ^a	1.50 $\pm$ 0.14 ^a
肾脏 Kidney	39.70 $\pm$ 0.23 ^d	486.03 $\pm$ 4.22 ^d	218.95 $\pm$ 6.47 ^f	74.73 $\pm$ 8.04 ^d	30.10 $\pm$ 1.59 ^b
肝脏 Liver	43.80 $\pm$ 0.14 ^e	261.03 $\pm$ 1.67 ^c	113.69 $\pm$ 0.78 ^e	135.63 $\pm$ 5.21 ^e	93.13 $\pm$ 2.65 ^d
肠道 Intestine	19.65 $\pm$ 0.31 ^b	142.86 $\pm$ 2.16 ^b	23.13 $\pm$ 4.23 ^c	47.36 $\pm$ 3.56 ^b	28.88 $\pm$ 1.74 ^b
脾脏 Spleen	39.53 $\pm$ 0.11 ^d	720.66 $\pm$ 24.63 ^e	42.47 $\pm$ 0.41 ^d	64.78 $\pm$ 8.05 ^c	74.73 $\pm$ 7.26 ^c

注: 同列不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

不同组织中酸性磷酸酶活性依次为: 脾脏 > 肾脏 > 肝脏 > 肠道 > 血液、粘液。脾脏中酸性磷酸酶活性最高,且其活性显著高于与其他各组织中酸性磷酸酶的活性 ($P < 0.05$); 肾脏中酸性磷酸酶活性仅次于脾脏 ($P < 0.05$),其活性仍显著高于肝脏、肠道、血液和粘液 ($P < 0.05$); 肝脏酸

性磷酸酶活性次于脾脏和肾脏,但显著高于肠道、血液和粘液; 血液和粘液中酸性磷酸酶活性差异不显著。

不同组织中碱性磷酸酶的活性依次为: 肾脏 > 肝脏 > 脾脏 > 肠道 > 粘液 > 血液。不同组织间的 AKP 活性差异显著 ($P < 0.05$)。其中,肾脏中

碱性磷酸酶的活性最高,肝脏次之。

补体 C3 的含量依次为:肝脏 > 肾脏 > 脾脏 > 肠道 > 血液、粘液,肝脏、肾脏、脾脏、肠道和血液中补体 C3 的含量差异显著($P < 0.05$),血液和粘液中补体 C3 含量差异不显著($P > 0.05$);补体 C4 的含量依次为:肝脏 > 脾脏 > 肾脏 > 肠道 > 血液、粘液,肝脏的含量最高,且与其他各组织差异显著($P < 0.05$),脾脏中补体 C4 的含量仅次于肝脏,但与肠道、肾脏、粘液和血液中的含量差异显著,补体 C4 在肠道和肾脏中的含量差异不显著,但显著高于血液、粘液中的含量($P < 0.05$)。

3 讨论

本实验结果显示,黄鳝肝脏中 SOD 活性最高,且显著高于其他组织中的活性。这与鲈(*Silurus astotus*)^[9]、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)^[10]的结论相似,黄鳝是肉食性鱼类,它对饵料中蛋白、脂肪的含量要求高^[11],肝脏是蛋白质、脂肪等物质代谢的重要器官,同时降解机体所产生的代谢废物、毒素等有害物质^[8]。SOD 是生物体中重要的抗氧化酶,能阻断与修复机体内的氧自由基对细胞的损伤^[12]。SOD 在肝脏中活性高,可能与其不断清除各种物质在肝脏中旺盛代谢所产生的氧自由基有关。

AKP 是机体磷代谢中的重要水解酶,它能改变病原体表面结构进而增强巨噬细胞对病原体的识别和吞噬作用^[13]。ACP 在大部分组织中主要定位于溶酶体内,是溶酶体的标志酶^[14],且与动物的免疫活动有关^[6]。本实验结果表明,脾脏中的 ACP 活性最高,肾脏中次之,而 AKP 在肾脏中活性最高,肝脏中次之,说明 AKP、ACP 在黄鳝体内主要起免疫作用。Press 等在鲑鱼(*Salmo salar* L)^[15]的肾脏和脾脏中发现,AKP 是网状细胞的标志酶,ACP 是巨噬细胞的标志酶,区又君等^[6]在卵形鲳鲹的不同组织中发现,AKP 活性顺序为肾脏 > 中肠 > 肝脏 > 前肠,这些实验结果与本实验结果基本相似。而 ACP 在卵形鲳鲹的肝脏中活性最高,这与本实验结果有所差异。这可能与 AKP、ACP 在鱼类机体的不同组织中所起的功能不同而其活性不同有关^[16]。肾脏和脾脏均是鱼类重要的造血器官,它们含有许多造血组织和淋巴细胞、单核细胞、黑色素巨噬细胞、粒细胞等^[17-18]。鱼类肾脏和脾脏所含的单核细胞、巨噬细胞和粒细胞具有吞噬作用^[19]。异物被吞噬细

胞吞噬后,胞质颗粒和囊泡与之融合,同时其内所含的磷酸酶(AKP、ACP)、酯酶等水解酶释放出来,异物最终被水解^[20]。所以 ACP、AKP 在肾脏和脾脏中的活性较高。

补体是鱼类抵抗微生物感染的重要成分,激活后具有机体靶细胞溶解和调理作用^[19],而 C3、C4 是补体系统的主要成分。实验结果表明黄鳝的肝脏中的补体 C3、补体 C4 的含量最高,其他的组织中也能检测出补体 C3、C4,这与在鳕鱼(*Gadus morhua* L) 幼鱼^[21]、庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus* L) 幼鱼^[22]、虹鳟^[23]的结论相似,说明肝脏是补体分泌主要部位。而多斑狼鱼(*Anarhichas minor Olafsen*)的补体 C3 仅在肝脏中表达^[24],这可能与鱼种品种和生长环境有关。

鱼类的皮肤和消化道是病原入侵鱼体的门户^[3],鱼类上皮组织中含有黏液细胞、巨噬细胞、多种淋巴细胞^[25],而黄鳝是一种无鳞的鱼类,所以其皮肤在抗感染的第一道屏障中至关重要,鱼体黏液细胞分泌的黏液除了有效诱捕病原外,还含有补体、溶菌酶、SOD、AKP 等非特异免疫因子^[26-27]。上述非特异性免疫相关酶和物质在粘液中能检测出,说明黏液中这些非特异性保护物质与抗体分泌细胞所产生的抗体一道构成了抵抗病原微生物入侵的防线。鱼类的肠道不仅是消化和吸收营养物质的作用,还具有免疫的功能。鱼类肠道中虽然缺乏类似哺乳动物的淋巴集结,但其含有大量的淋巴细胞、黏液细胞、巨噬细胞和颗粒细胞等^[28]。在机体受到病原刺激时,巨噬细胞进行处理、呈递病原,淋巴细胞分泌特异性抗体,而机体产生的 SOD、AKP、ACP、补体 C3/C4 等非特异性免疫物质也参与其中^[18]。它们共同保护消化道上皮组织不被感染,防止病原体从消化道中穿透进入机体,所以非特异性免疫相关酶和物质在肠道中也可以检测出。

血液是维持动物生命活动的重要组织,其含有各种营养物质,以及机体代谢的产物、酶类、抗体、补体等,具有营养组织、调节器官活动和防御有害物质的作用^[29]。一般情况下,非特异性免疫指标均能在血液中检测出,实验的黄鳝血清中能检测出 SOD、AKP、ACP、补体 C3、补体 C4。用本实验方法测定这几种非特异性免疫物质活性和含量低于肝脏、脾脏和肾脏,说明这些免疫物质大部分来自各器官的细胞分泌。

参考文献:

- [1] 中国农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 35.
- [2] 艾庆辉, 麦康森. 鱼类营养免疫研究进展[J]. 水生生物学报, 2007, 31(3): 425 - 430.
- [3] 张奇亚, 桂建芳. 水生物病毒学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 1.
- [4] Anderson D P. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture[J]. Annual Review of Fish Disease, 1992, 2: 281 - 307.
- [5] Yu Z N, He X C, Fu D K. Two superoxide dismutase (SOD) with different subcellular localizations involved innate immunity in *Crassostrea hongkongensis* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31: 533 - 539.
- [6] 区又君, 罗奇, 李加儿. 卵形鲳鲅碱性磷酸酶和酸性磷酸酶的分布及其低温保存[J]. 南方水产科学, 2011, 7(2): 49 - 54.
- [7] Løfvoll M, Kilvik T, Boshra H, et al. Maternal transfer of complement components C3 - 1, C3 - 2, C3 - 3, C3 - 4, C4, C5, C7, Bf and Df to offspring in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Immunogenetics, 2006, 58: 168 - 179.
- [8] 余敏, 杨正荣, 曾琳, 等. 云南高背鲫鱼不同组织同工酶分析[J]. 动物学杂志, 2006, 41(6): 97 - 103.
- [9] 韩庆, 张建平, 陈小丹, 等. 洞庭湖鲂不同组织 SOD 同工酶的比较研究[J]. 生态学杂志, 2010, 3(3): 150 - 152.
- [10] 刘文彬, 陈合格, 张轩杰. 黄颡鱼不同组织中同工酶的表达模式[J]. 激光生物学报, 2003, 12(1): 98 - 101.
- [11] 杨代勤, 陈芳, 李道霞, 等. 黄鳝的营养素需要量及饲料最适能量蛋白比[J]. 2000, 7(2): 259 - 262.
- [12] Roche H, Bøge G. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical indexical[J]. Marine Environmental Research, 1996, 41(1): 27 - 43.
- [13] 宋文华, 张涛, 富丽静, 等. 大蒜素、枸杞多糖对草鱼血清非特异性免疫指标的影响[J]. 河北渔业, 2011(6): 12 - 18.
- [14] 王春梅, 黄晓峰, 杨家骥. 细胞超微结构与超微机构病理基础[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2004.
- [15] Press C M, Dannevig B, Landsverk H T. Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and non - lymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1994, 4(2): 79 - 93.
- [16] 孙秋静, 许燕, 张慧琦, 等. 凡纳对虾体内 ACP、AKP 酶的细胞化学定位[J]. 复旦学报: 自然科学版, 2007, 46(6): 947 - 951.
- [17] 卢全章. 草鱼 头肾免疫细胞超微结构的观察[J]. 1997, 21(2): 152 - 155.
- [18] 张永安, 孙宝剑, 聂品. 鱼类免疫组织和细胞的研究概况[J]. 水生生物学报, 2000, 24(6): 648 - 654.
- [19] 聂品. 鱼类非特异性免疫研究的新进展[J]. 水产学报, 1997, 21(1): 69 - 73.
- [20] Neumann N F, Stafford J L, Barreda D, et al. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25(8 - 9): 807 - 825.
- [21] Lange S, Bambir S, Dodds A W, et al. The ontogeny of complement component C3 in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) - an immunohistochemical study[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 16: 359 - 367.
- [22] Lange S, Slavko H B, Alister W D, et al. Complement component C3 transcription in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20, 20: 285 - 294.
- [23] Marie Løfvoll, Roy A. Dalmø, Jarl Bøggwald. Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 64: 721 - 731.
- [24] Ellingsen T, Strand C, Monsen E, et al. The ontogeny of complement component C3 in the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 18(5): 351 - 358.
- [25] 巩华, 吴淑勤, 潘厚军. 硬骨鱼类免疫机理研究概况[J]. 动物医学进展, 2006, 27(6): 24 - 28.
- [26] Palaksha K J, Shin G W, Kim Y R, et al. Evaluation of non - specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 24: 479 - 488.
- [27] Subramanian S, MacKinnon S, Ross N. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species[J]. Comparative Biochemistry and Physiology (Part B), 2007, 148: 256 - 263.
- [28] Press C M. The Morphology of the immune system in teleost fishes[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9: 309 - 318.
- [29] 程超, 费杭亮. 鳊鱼血液生理生化指标和流变学性质的研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(22): 6 805 - 6 806.

Practice Method of Reducing Soda Iron

YUAN Jiang

(Lianyungang Soda Plant, Lianyungang, Lianyungang Jiangsu 222042, China)

Abstract: The traditional method for reducing soda iron is to add sodium sulfate and magnesium chloride, but this method of soda ash production would cause the following negative effects: blocked furnace gas system, soda ash, effects of heavy ash production. According to the production practice, this paper put forward the new method to reduce soda iron: using non metal and corrosion resistance of metal materials, improving the neutralization of water concentration, reasonable cleaning alkali manufacturing cycle and stabilizing production conditions. By reducing the sodium sulfide dosage, prolonging the operation cycle of calcining furnace, the cost of production is reduced.

Keywords: Corrosion; role; affect; methods

(责任编辑: 沈建新)

(上接第 59 页)

Tissue Distribution of the Superoxide Dismutase, Phosphatases and Complement Components in *Monopterus albus*

HUAN Zhi-li¹, MAO Pan¹, HE Lian-bo², HUANG Yun¹, HU Yi^{1,3}, DAI Zheng-yan¹

- 1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha Hunan 410128, China;
- 2. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Yaan Sichuan 625000, China;
- 3. Yiyang Yihua Aquatic Products Co. Ltd, Yiyang Hunan 413000, China

Abstract: The *Monopterus albus* (average weight: 37.35 ± 0.89 g) were bred in the temperature of 28 ± 3 °C. The tissue distribution of immune-related enzymes including the superoxide dismutase (SOD), alkaline phosphatase (AKP), acid phosphatase (ACP), complement components C3 and C4 were examined with enzyme analytical method. The results showed that: The activity of SOD in different tissues was liver > kidney > spleen > mucus > Intestine > blood; the activity of ACP ranged as follows: spleen > kidney > liver > intestine > blood > mucus; the activity of AKP ranged as: kidney > liver > spleen > intestine > mucus > blood, the content of complement C3 was liver > kidney > spleen > intestine > blood > mucus, and complement C4 was liver > spleen > kidney > intestine > blood > mucus. Those results indicated that the activities of SOD, ACP, AKP and the content of complement components (C3, C4) in liver, kidney, spleen was higher than that of other tissues.

Keywords: *Monopterus albus*; SOD; AKP; ACP; complement components; tissue distribution

(责任编辑: 沈建新)