

文章编号: 1004 - 7271(2008)04 - 0418 - 05

肌肉注射维生素 C 对三角帆蚌 血淋巴抗氧化酶活力的影响

陈友明, 李家乐, 白志毅

(上海海洋大学省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 200090)

摘要:在室内水族箱养殖条件下,研究了肌肉注射不同剂量维生素 C(Vc)对三角帆蚌血淋巴中3种主要抗氧化酶活力随时间的变化。结果表明:Vc对三角帆蚌血淋巴过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)3种酶的活性均有显著影响($P < 0.05$)。当Vc注射剂量分别为15 $\mu\text{g/g}$ 、30 $\mu\text{g/g}$ 和45 $\mu\text{g/g}$ 时,在注射后的12 h、24 h和48 h时间点,SOD酶的活性先升后降,GSH-PX酶的活性随Vc注射剂量的加大而降低,总体呈逐渐下降趋势,而CAT酶的活性随Vc注射剂量的加大而增强。

关键词:维生素 C;三角帆蚌;血淋巴;抗氧化酶

中图分类号:S 917 文献标识码:A

The effect of Vitamin C injection on the activities of antioxidant enzymes in the hemolymph of *Hypriopsis cumingii*

CHEN You-ming, LI Jia-le, BAI Zhi-yi

(The key laboratory of Aquatic Genetic Resources Excavation and Utilization conjunctive administrated
by Ministry of education and Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Studies were carried out on the effect of Vc on the activities of three major antioxidant enzymes in the hemolymph of *Hypriopsis cumingii* on the condition of indoor aquarium culture. The results showed that: Vc had a notable impact on the activities of Catalase (CAT), Superoxide dismutase (SOD) and Glutathione peroxidase (GSH-PX) enzymes ($P < 0.05$). Under the conditions of the injected doses of Vc 15 $\mu\text{g/g}$, 30 $\mu\text{g/g}$ and 45 $\mu\text{g/g}$, at 12 h, 24 h and 48 h after injecting, the activity of SOD enzyme would rise and then dropped, the activity of GSH-PX enzyme dropped down with the rise of injected dose of Vc, but always came down as a whole. However, the activity of CAT enzyme increased with the rise of injected dose of Vc.

Key words: Vitamin C; *Hypriopsis cumingii*; Hemolymph; Antioxidant enzymes

近年来,三角帆蚌的发病率呈上升趋势。人们在探究各种病原、病因和病理的同时,对免疫增强剂的研究越来越重视。有研究表明,贝类的某些非特异性免疫因子(如免疫相关酶)存在一定程度的可诱

收稿日期:2008-01-18

基金项目:国家科技支撑计划(2006BAD01A13);农业部农业结构调整重大技术研究专项项目(06-05-05B);上海市科委基础重大项目(06DJ14003)

作者简介:陈友明(1980-),男,江西高安人,硕士研究生,专业方向为水产动物种质资源与种苗工程。

通讯作者:李家乐, Tel: 021-65710216, E-mail: jlli@shou.edu.cn

导性,通过注射多糖类物质或诱导源(如大肠杆菌、弧菌)等^[1-4]可以增强免疫因子的存在浓度和免疫活力,提高机体的抗病力。维生素 C 是一种天然抗氧化剂,对维持机体正常代谢和生长、恢复组织创伤和抵御疾病侵袭等具有重要作用^[5]。它可以作为一种免疫刺激剂添加,用于提高水产动物对疾病的抵抗力^[6]。目前,国内有关 Vc 对贝类免疫因子的影响的研究多见于一些海水贝类^[7],而三角帆蚌中类似研究尚未见报道。本实验研究了 Vc 对三角帆蚌三种主要抗氧化酶活性的影响规律,为弄清贝类免疫作用机理积累资料,并为 Vc 作为免疫激活剂在贝类养殖防抗病中的应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 试验用蚌

实验所用三角帆蚌为 1⁺ 龄,取自浙江诸暨王家井镇珍珠养殖场,平均壳长 14.48 ± 0.25 cm,壳宽 3.86 ± 0.04 cm,壳高 11.81 ± 0.15 cm,体重 (294.1 ± 10.1) g。

试验前,将取回的三角帆蚌于暴气 96 h 以上的自来水中暂养 5 d 左右。试验时,移入水族缸(50 cm × 35 cm × 34 cm)中养殖,养殖期间不投喂,水温 $18 \text{ }^\circ\text{C} (\pm 0.4 \text{ }^\circ\text{C})$ 。

1.2 试剂配制

用生理盐水配制 4 mg/mL 浓度的维生素 C 注射液;磷酸盐缓冲液(67 mmol/L, pH = 7.4):取 Na_2HPO_4 7.60 g, KH_2PO_4 1.82 g,溶于 1 L 蒸馏水中,调 pH 至 7.4;基质液($65 \mu\text{mol/LH}_2\text{O}_2$):取 30% H_2O_2 3.69 mL 加 pH7.4 磷酸盐缓冲液至 500 mL;钼酸铵:称取 $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}]$ 20.2 g 溶于 500 mL 蒸馏水中。

1.3 实验分组与处理

设置 3 个实验组和 3 个相应的对照组,每组 5 枚三角帆蚌。实验组用维生素 C 注射液,按每克体重 15 μg 、30 μg 和 45 μg 的剂量用微量注射器从三角帆蚌的闭壳肌注射,对照组注射等量生理盐水,分别于注射后 12 h、24 h 和 48 h 从闭壳肌抽取血淋巴,4 $^\circ\text{C}$ 条件下,离心速度 3 000 r/min,15 min,取上清液,用于抗氧化酶活力的测定。

1.4 过氧化氢酶(CAT, Catalase)活力的测定

CAT 活力的测定参照[8-9]等的方法,基质液置于 37 $^\circ\text{C}$ 水浴 5 min,然后按下列步骤操作:

对照管加 1.0 mL 基质液,1.0 mL 钼酸铵,0.2 mL 血淋巴上清液;标准管加 1.0 mL 基质液,1.0 mL 钼酸铵,0.2 mL pH7.4 的磷酸盐缓冲液;测定管,加 0.2 mL 血淋巴上清液,1.0 mL 基质液,37 $^\circ\text{C}$ 准确水浴保温 60 s(秒表计)后,立即加入 1.0 mL 钼酸铵,摇匀,10 min 后于 405 nm 处 721 型分光光度计,5 mm 光径,蒸馏水调零,比色。

$\text{CAT 活力(U/L)} = [(A_{\text{对}} - A_{\text{测}})/A_{\text{标}}] \times 65 \times 1 \times 1\,000 / (0.2 \times 1\,000) = [(A_{\text{对}} - A_{\text{测}})/A_{\text{标}}] \times 325$
(式中 65 为标准管 H_2O_2 浓度,1 为 1.0 mL H_2O_2 体积,1 000 换算成 1 L 血淋巴上清液,0.2 mL 为上清液用量,1 000 为 μmol 换算成 mmol)。

CAT 活性的定义:每毫升血淋巴上清液每 1 分钟分解 1 μmol 的 H_2O_2 的量为一个酶活力单位。

1.5 超氧化物歧化酶(SOD, Superoxide dismutase)活力的测定

用超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(购自南京建成生物工程研究所),按试剂盒说明,测定三角帆蚌血淋巴中总 SOD(T-SOD)的活力。

SOD 活性的定义:每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位(U)。

1.6 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX, Glutathione peroxidase)活力的测定

用谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒(购自南京建成生物工程研究所),按试剂盒说明进行测定。GSH-PX 活性的定义:规定每 0.1 mL 血淋巴上清液在 37 $^\circ\text{C}$ 反应 5 min,扣除非酶促反应作用,使反

应体系中 GSH-PX 浓度降低 $1 \mu\text{mol/L}$ 为一个酶活力单位。

1.7 数据统计分析

实验数据用统计学方法进行处理,实验结果应用单因素方差分析和 Turkey 多重比较来进行差异显著性比较, $P < 0.05$ 表示差异达显著水平。所有统计分析均用 Excel 2003 和 SPSS 15.0 软件进行。

2 实验结果

2.1 Vc 对三角帆蚌血淋巴 CAT 活性的影响

注射 Vc 后,三角帆蚌血淋巴中 CAT 活性随注射时间的变化如表 1。

表 1 Vc 注射对三角帆蚌体内 CAT 活力的影响
Tab.1 The effect of Vc injection on the activity of CAT of *Hyriopsis cumingii*

注射时间	对照组	不同注射剂量下的 CAT 活力(U)		
		15 $\mu\text{g/g}$	30 $\mu\text{g/g}$	45 $\mu\text{g/g}$
12 h	20.014 \pm 1.306	9.425 \pm 2.430	12.567 \pm 1.231	23.040 \pm 3.658
24 h	16.989 \pm 3.356	6.982 \pm 0.585	13.265 \pm 2.153	17.235 \pm 1.463
48 h	25.832 \pm 3.148	6.793 \pm 2.521	15.360 \pm 1.953	17.701 \pm 3.145

由表 1 可以看出,Vc 注射剂量对 CAT 活力的影响较明显,在 12 h、24 h 和 48 h 时,注射剂量越小,CAT 活力越小,对三角帆蚌血淋巴中 CAT 活力的抑制能力越强。在三个注射剂量组中,除 45 $\mu\text{g/g}$ 实验组(12 h 和 24 h 时)稍高于对照组外,其它实验组 CAT 活力均低于对照组,同一剂量组内不同时间点的 CAT 活力没有明显变化($P > 0.05$),组间变化明显($P < 0.05$),这说明注射 Vc 对 CAT 活力的影响与注射时间无关,而与注射剂量有关。由此可见,注射 Vc 的剂量大于 45 $\mu\text{g/g}$ 时,对 CAT 活力具有一定的诱导作用,而小于 45 $\mu\text{g/g}$ 时,Vc 可以抑制 CAT 的活力。

2.2 Vc 对三角帆蚌血淋巴 SOD 活性的影响

注射 Vc 后,三角帆蚌血淋巴中 SOD 活性随注射时间的变化如表 2。

表 2 Vc 注射对三角帆蚌体内 SOD 活力的影响
Tab.2 The effect of Vc injection on the activity of SOD of *Hyriopsis cumingii*

注射时间	对照组	不同注射剂量下的 SOD 活力(U/mL)		
		15 $\mu\text{g/g}$	30 $\mu\text{g/g}$	45 $\mu\text{g/g}$
12 h	45.634 \pm 3.639	40.950 \pm 1.314	54.978 \pm 1.641	73.213 \pm 2.121
24 h	52.347 \pm 2.555	206.618 \pm 1.975	209.008 \pm 0.991	209.008 \pm 0.728
48 h	37.799 \pm 3.746	38.459 \pm 3.556	53.259 \pm 3.681	50.862 \pm 2.176

由表 2 可以看出,注射 Vc 后,在 24 h 时间点时,实验组 SOD 活力与对照组差异极显著($P < 0.01$),且显著高于同一注射剂量不同时间点的实验组。在同一时间点,不同剂量实验组组间 SOD 活力差异不显著,但 45 $\mu\text{g/g}$ 实验组与对照组差异显著;在 24 h ~ 48 h 时间点, SOD 活力由 24 h 时的 206.618、209.008 和 209.008 分别下降为 48 h 的 38.459、53.259 和 50.862,分别下降了 81.39%、74.52% 和 75.67%。由此可见,注射 Vc 后 0 ~ 48 h 内,Vc 对三角帆蚌血淋巴 SOD 活力影响效果明显,表现出先诱导后抑制的趋势。

2.3 Vc 对三角帆蚌血淋巴 GSH-PX 活性的影响

注射 Vc 后,三角帆蚌血淋巴中 GSH-PX 活性随注射时间的变化如表 3。

表 3 Vc 注射对三角帆蚌体内 GSH-PX 活力的影响
 Tab. 3 The effect of Vc injection on the activity of GSH-PX of *Hyriopsis cumingii*

注射时间	对照组	不同注射剂量下的 GSH-PX 活力(U)		
		15 μg/g	30 μg/g	45 μg/g
12 h	61.556 ± 1.936	85.333 ± 2.956	60.667 ± 2.906	54.000 ± 3.528
24 h	35.333 ± 2.561	48.000 ± 2.404	31.000 ± 2.906	21.000 ± 1.453
48 h	26.333 ± 3.284	34.000 ± 1.528	25.333 ± 1.453	12.667 ± 1.764

由表 3 可以看出,在实验条件下,只有注射剂量为 15 μg/g 的 GSH-PX 活力在 12 h、24 h 和 48 h 时均高于对照组,而对应的同一时间其它两个实验组 GSH-PX 活力均低于对照组,这说明 Vc 的注射剂量为 15 μg/g 时,三角帆蚌血淋巴中的 GSH-PX 活力最强,在三个注射剂量中,15 μg/g 为诱导 GSH-PX 活力的最佳注射剂量;相同时间时,随着注射剂量的加大, GSH-PX 活力反而降低,这说明较高剂量的 Vc 注射量对三角帆蚌血淋巴中的 GSH-PX 活力具有抑制作用。由此可见,Vc 对 GSH-PX 活力的影响存在诱导—抑制规律。

3 讨论

大多数水产动物(如鱼、虾类)都缺乏合成维生素 C 所需的 L-古洛糖酸内酯氧化酶(L-gulonolactone oxidase, GLO),因此它们对 Vc 的缺乏都很敏感^[5,10]。有关鱼类对维生素 C 需要量的研究,目前已有许多报道^[11-16],而有关贝类对维生素 C 需要量是否与鱼类的情况类似,国内相关报道很少,有待于深入研究。樊甄姣等^[7]认为注射不同剂量的 Vc 对栉孔扇贝体内 SOD 和 CAT 等的活性有显著的刺激作用,Vc 能有效增强栉孔扇贝的免疫活性。本实验通过注射不同剂量的 Vc,研究了三个注射剂量对三角帆蚌血淋巴中 SOD、CAT 和 GSH-PX 三种抗氧化酶的影响,得到的结论与樊甄姣等^[7]类似。徐大伦等^[1]、牟海津等^[2]、孙虎山等^[3]研究结果表明,多糖作为一种免疫促进剂通过肌肉注射的方法可以显著提高栉孔扇贝的免疫活性。这在一定程度上也说明注射一定剂量的 Vc 和采用注射免疫促进剂的方法均可有效提高贝类的免疫活性。

在贝类的非特异性免疫中,SOD、CAT 和 GSH-PX 等抗氧化酶对机体的氧化和抗氧化平衡起着至关重要的作用。CAT 和 SOD 主要作用是清除动物体内过量的自由基,形成酶抗氧化系统,且 SOD 的活性与生物的免疫水平密切相关^[4,17]。本研究结果表明,Vc 注射后 24 h,实验组 SOD 活性显著高于对照组,48 h 时 SOD 活性降低,这是因为 Vc 对三角帆蚌机体内的 SOD 活性有较强的诱导能力,SOD 在机体内发挥了很好的抗氧化作用,从而维持了动物体自身自由基的产生和清除的动态平衡。注射 Vc 组的 CAT 活性,除 45 μg/g 浓度组以外,其它实验组 CAT 活力均低于对照组,这是因为 Vc 在三角帆蚌体内很好的发挥了抗氧化作用,使自由基在尚未作用前就被清除了,从而导致了诱导性酶活性的降低。GSH-PX 主要清除 H₂O₂ 和脂质过氧化物,帮助阻止氢过氧化物和有机过氧化物的形成^[18],可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。本研究中发现,在三个不同的注射剂量组,注射 Vc 为 15 μg/g 时,诱导 GSH-PX 活力的能力最强。

从以上三个实验结果分析可知,注射 Vc 后,三角帆蚌体内三种抗氧化酶活力的表现有所不同,诱导 CAT 的能力最弱,诱导 SOD 的能力最强,诱导 GSH-PX 的能力居于两者之间。SOD 活性与 Vc 注射的剂量没有明显关系,可能是因为注射 Vc 剂量较高。而实验组 CAT 活性变化趋势与 SOD 相反,Vc 注射剂量增加,CAT 活性升高,不因注射时间长短而变化,15 μg/g 和 30 μg/g 实验组 CAT 活性均低于对照组。GSH-PX 活性一直下降,说明 Vc 在三角帆蚌机体抗氧化过程中起着重要作用,维持了自由基产生与消除的平衡。而 SOD 活性先升后降,说明 Vc 对三角帆蚌体内的 SOD 有一定的激活作用,Vc 可以作为 SOD 激活剂,至于激活 SOD 需要的最佳剂量还有待于进一步研究。

综上所述,Vc 能有效提高三角帆蚌机体的免疫活性,可以作为珠蚌养殖过程中防治疾病的营养刺激剂。其中以 Vc 注射剂量为 45 μg/g,注射后 24h 时,SOD 和 CAT 的活力较其它实验组效果好;而 Vc

注射剂量为 15 $\mu\text{g/g}$ 时, GSH-PX 的活力高于对照组和其它实验组。关于贝类对 Vc 的需求量是否因实验贝种类、个体大小、试验水温以及所用维生素 C 形式而存在差异还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 徐大伦, 黄晓春, 欧昌荣, 等. 浒苔多糖对华贵栉孔扇贝血淋巴中 SOD 酶和溶菌酶活性的影响[J]. 水产科学, 2006, 25(2): 72-74.
- [2] 牟海津, 江晓路, 刘树青, 等. 免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶_碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(3): 463-468.
- [3] 孙虎山, 李光友. 免疫多糖对栉孔扇贝血淋巴中氧化酶活力的影响[J]. 高技术通讯, 2001, 5: 10-12.
- [4] 丁秀云, 李光友, 翟玉梅. 皱纹盘鲍经诱导后血淋巴中一些因子变化的研究[J]. 海洋与湖沼, 1996, 27(4): 362-365.
- [5] Lightner D V, Hunter B, Magarelli P C, et al. Ascorbic acid: nutritional requirement and role in wound repair in *Penaeid shrimp* [J]. Proc World Maricult Soc, 1979, 10: 513-528.
- [6] 母学全, 王安利, 王维娜, 等. 维生素 C 对水产动物的功用及其保护方法[J]. 海洋科学, 2002, 26(3): 32-35.
- [7] 樊甄姣, 刘志鸿, 杨爱国, 等. Vc 对栉孔扇贝体内水解酶和抗氧化酶活性的影响[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(4): 12-16.
- [8] 程鲁京, 孟 泽. 钼酸铵显色法测定血清过氧化氢酶[J]. 临床检验杂志, 1994, 12(1): 6-9.
- [9] 李丹彤, 袁美云, 林春江, 等. 不同海藻凝集素对鲤免疫活性物的诱导作用[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2006, 29(3): 348-351.
- [10] 艾庆辉, 麦康森, 王正丽, 等. 维生素 C 对鱼类营养生理和免疫作用的研究进展[J]. 水产学报, 2005, 29(6): 857-861.
- [11] 李桂峰, 钱沛锋, 孙际佳, 等. 维生素 C 对胡子鲶血清免疫相关酶活性的影响[J]. 大连水产学院学报, 2004, 19(4): 301-305.
- [12] 谢一荣, 吴锐全, 谢 骏, 等. 维生素 C 水平对大口黑鲈抵抗嗜水气单胞菌感染的影响[J]. 水利渔业, 2007, 27(5): 102-104.
- [13] Gouillou-Coustans M F, Bergot P, Kaushik S J. Dietary ascorbic acid needs of common carp (*Cyprinus carpio*) larvae [J]. Aquaculture, 1998, 161: 453-461.
- [14] Shiau S Y, Hsu T S. Quantification of vitamin C requirement for juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* \times *Oreochromis aureus*, with l-ascorbyl-2-monophosphate-Na and l-ascorbyl-2-monophosphate-Mg [J]. Aquaculture, 1999, 175: 317-326.
- [15] Wang X J, Kim K W, Bai S C, et al. Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*) [J]. Aquaculture, 2003, 215: 203-211.
- [16] Xie Z G, Niu C J, Zhang Z B, et al. Dietary ascorbic acid may be necessary for enhancing the immune response in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), a species capable of ascorbic acid biosynthesis [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2006, 145(2): 152-157.
- [17] 张 峰, 李光友. 贝类血细胞活性氧体内防御作用的研究进展[J]. 海洋科学, 1999, 2: 16-19.
- [18] Oliveros L, Vega Lic V, Anzulovich A C, et al. Vitamin A deficiency modifies antioxidant defense and essential element contents in rat heart [J]. Nutrition Research, 2000, 8(20): 1139-1150.