

刺参体腔液几种免疫指标的周年变化

王方雨^{1,2}, 杨红生¹, 高菲^{1,2}, 刘广斌^{1,2}

(1.中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2.中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要: 为了调查刺参(*Apostichopus japonicus*)免疫机能的周年变化, 初步探索刺参免疫的规律, 于2006年7月至2007年6月对刺参体腔液几种免疫指标进行了周年测定。结果显示, 周年内刺参体腔液内几种酶类显著变化的转折点为9月、10月, 1月, 2月、4月和5月。刺参体腔液几种酶类活性变化与温度和盐度等环境因素并不存在相关关系, 因此推测这些显著变化并不是单一的温度、盐度等环境因素作用的结果, 综合分析, 其变化原因可能与刺参的夏眠、生理及繁殖等因素的作用有关。

关键词: 刺参(*Apostichopus japonicus*); 免疫指标; 周年变化

中图分类号: S968

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)07-0075-06

近年来, 山东、辽宁等地的海参养殖规模扩展迅猛, 连片的海参养殖池塘随处可见。2007年, 仅青岛市刺参养殖面积2400 hm², 年养刺参2.5亿头, 年产商品参6000 t, 产值10亿元。目前, 国内刺参养殖规模不断扩大, 方式多种多样, 形成了海上沉笼养殖、池塘养殖、围堰养殖、浅海围网养殖、海底网箱养殖、人工控温工厂化养殖及参、鲍混养, 虾、参混养等多种养殖模式^[1,2]。当前在众多养殖模式中, 池塘养殖为最主要的养殖方式, 特别是20世纪90年代初对虾爆发疾病以来, 废弃的虾池, 经过改造用来养殖海参^[3]。

然而由于大量的刺参养殖池塘建在沿岸浅水区域, 一系列的问题也随之而来; 沿岸水体由于人类活动的严重影响, 水体的受污染情况也比较严重, 特别是沿岸围堰塘面积都较小, 大多靠潮水或简单动力来进行水交换, 造成水体交换量有限, 特别在天气剧烈变化的情况下, 养殖池塘水体的温度、盐度及pH等水环境条件都会产生巨大的变化, 严重影响了刺参的生长, 甚至会造成刺参的化皮、排脏反应, 引起刺参的死亡^[3]。因此, 进行刺参免疫机能的分析, 不仅可以了解刺参免疫机能的周年变化, 而且还可以进一步探讨其生态免疫机理。

1 材料和方法

1.1 样品采集

实验刺参取自青岛胶南古镇口湾, 采样养殖池塘属于沿岸围堰塘, 在高潮时, 塘内水深约1.0~1.2 m, 池底为半石底, 池底腐殖质丰富, 整个池塘养殖过程中不投喂其他人工饵料。实验在2006年7月到

2007年6月间进行, 每月上下旬进行两次现场采样, 每次采样重复8~10只。

在相应的取样时间点抽取实验刺参体腔液2.5 mL置于冻存管中, 立即用液氮保存, 取样结束后样品转移到-86℃超低温冰箱中保存以用来进行酶类测定。

1.2 样品测定

将冻存样品4℃下溶解, 376 g离心10 min, 取上清液用来进行酶类测定。超氧化物歧化酶(SOD)活性采用连苯三酚自氧化法测定^[4], 以每毫升体腔液中, 每分钟抑制连苯三酚自氧化速率达50%的酶量定义为一个活力单位。过氧化氢酶(CAT)活性采用Góth^[5]的方法测定, 每毫升体腔液每秒钟分解1 μmol的H₂O₂的量为一个活力单位。髓过氧化物酶(MPO)活性测定按Harrison^[6]的方法测定, 以每毫升离心体腔液在37℃的反应体系中H₂O₂被分解1 μmol为1个酶活力单位。溶菌酶(LSZ)活力测定采用陈昌福^[7]的方法测定; 以其透光率在每分钟内的下降速率定义为一个单位。

1.3 统计分析

应用分析软件SPSS11 for Windows对数据进行统计分析。数据均以平均数±标准误表示, 不同

收稿日期: 2008-05-30; 修回日期: 2008-08-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(40576073);

作者简介: 王方雨(1978-), 男, 河南南阳人, 博士, 主要从事养殖生态学, 电话: 0532-82898705, E-mail: sprinkle.w@126.com; 杨红生, 通信作者, E-mail: hshyang@ms.qdio.ac.cn

采样点的样品数据显著性差异用单因子方差分析 (ANOVA, Tukey 检验) 进行检验, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著的标志。

2 结果分析

在对刺参的几种免疫指标进行周年测定时发

现, 刺参体腔液内超氧化物歧化酶活性在 $69.20 \text{ U/mL} \pm 3.25 \text{ U/mL}$ (2006 年 10 月采样) 到 $88.10 \text{ U/mL} \pm 1.81 \text{ U/mL}$ (2007 年 2 月采样) 的范围之间变动。刺参体腔液内超氧化物歧化酶活性变动及统计结果见图 1。

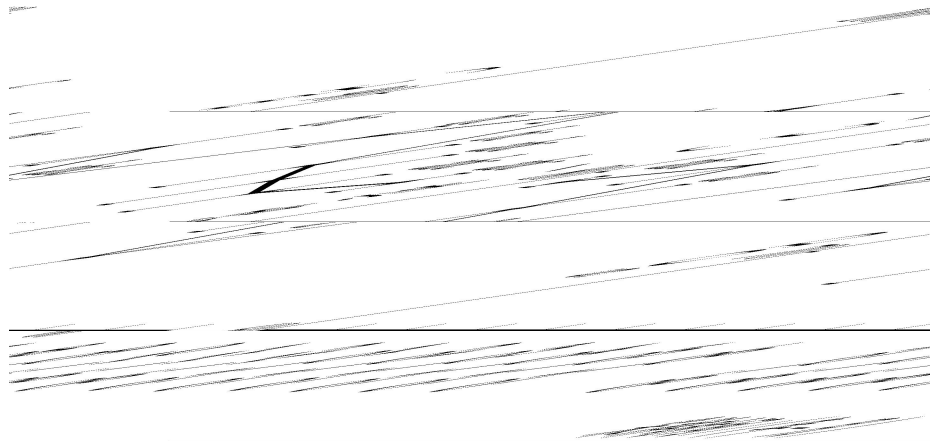


图 1 刺参体腔液 SOD 活性周年变化

Fig. 1 Annual changes of SOD in coelomic fluid of *A. japonicus*

不同字母代表不同采样点间差异显著 ($P < 0.05$), 以下同

Bars for the different times with different letters are significantly different ($P < 0.05$), the same below

在周年测定时, 刺参体腔液内过氧化氢酶活性在 $0.020 \text{ U/mL} \pm 0.03 \text{ U/mL}$ (2006 年 10 月采样) 到 $3.36 \text{ U/mL} \pm 0.54 \text{ U/mL}$ (2007 年 4 月采样) 的范围之间变动 (图 2)。周年测定结果显示, 刺参体腔液内过氧

化氢酶活性较明显地分为 2006 年 7~11 月和 2006 年 12 月至 2007 年 6 月两个阶段。但 2006 年 7 月测定值和 2007 年 6 月值有明显的差异, 可能为取样条件差异所致。

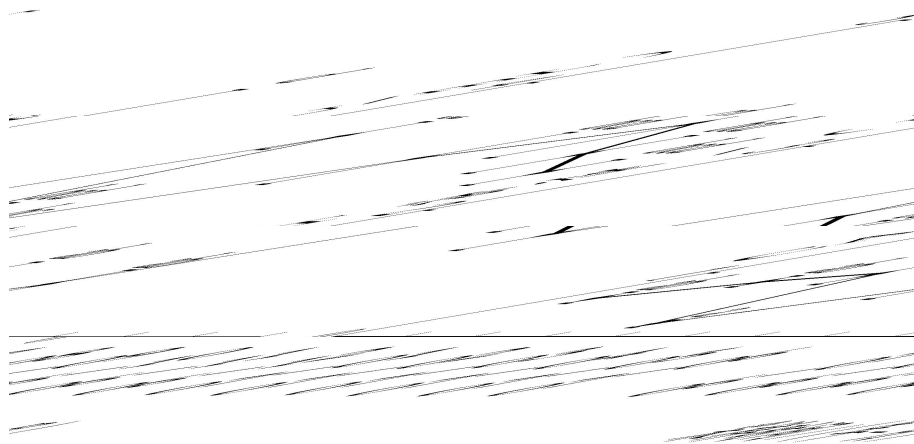


图 2 刺参体腔液 CAT 活性周年变化

Fig. 2 Annual changes of CAT in coelomic fluid of *A. japonicus*

周年测定结果显示, 刺参体腔液内髓过氧化物酶活性在 $24.44 \text{ U/mL} \pm 1.12 \text{ U/mL}$ (2007 年 4 月采样)

到 $65.66 \text{ U/mL} \pm 3.61 \text{ U/mL}$ (2006 年 9 月采样) 的范围之间变动 (图 3)。刺参体腔液内溶菌酶活性在 7.53

U/mL±0.86 U/mL(2007 年 2 月采样)到 84.62 U/mL±17.03 U/mL(2006 年 9 月采样)的范围之间变动(图 4)。

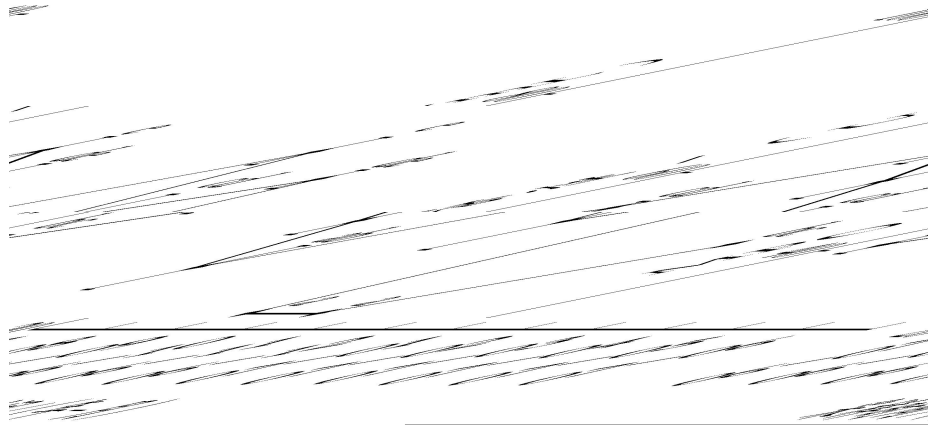


图 3 刺参体腔液 MPO 活性周年变化

Fig.3 Annual changes of MPO in coelomic fluid of *A. japonicus*

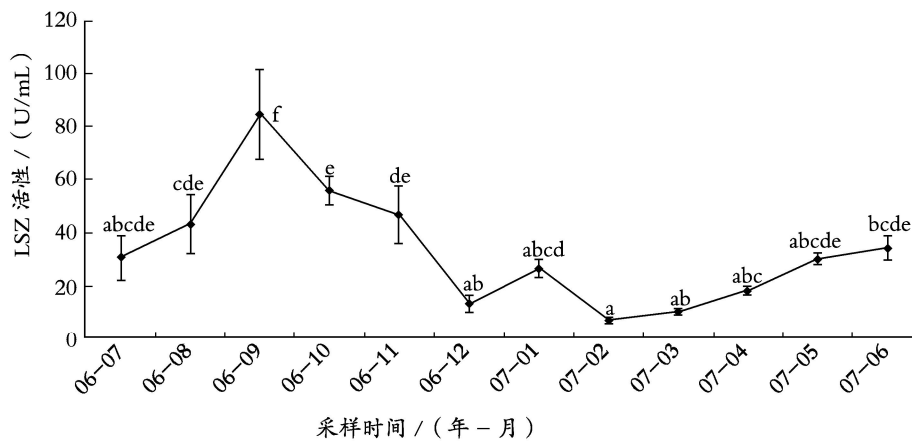


图 4 刺参体腔液 LSZ 活性周年变化

Fig.4 Annual changes of LSZ in coelomic fluid of *A. japonicus*

在周年测定过程中对取样池塘水体的温度和盐度也同时进行了测定(图 5)。结果显示,池塘水体温度最高为 2006 年 9 月份,最低为 2007 年 1 月份。

3 讨论

Regoli 等^[8]认为物种对环境突变的适应能力还取决于它产生的抗氧化物的能力。抗氧化系统中,超氧化物歧化酶和过氧化氢酶是最初的也是最重要的防御机制^[9]。过氧化氢酶在细胞内主要通过线粒体及过氧化氢体结合,它能将细胞代谢产生的有毒物质 H₂O₂ 迅速催化分解为 H₂O 和 O₂,清除过氧化氢,以防止羟自由基的形成;超氧化物歧化酶

属于金属蛋白酶,是最重要的特异性 O₂⁻清除剂,能阻断脂质过氧化作用,是抗氧化系统中关键性酶,也是机体免疫调节网络的重要组成部分,其活性受 O₂⁻的调控。超氧化物歧化酶与过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶等结合,可有效地清除体内 O₂⁻、H₂O₂ 及 ROOH 等活性氧,终止氧自由基对机体氧化的连锁反应。机体内超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的酶活力下降,标志有机体清除自由基能力下降^[10]。Yang^[11]研究了成体刺参在不同温度下的氧消耗率,结果发现在 20 时氧消耗率达到最高,随着温度的升高,氧消耗率逐渐下降。温度升高后超氧化物歧

化酶和过氧化氢酶等抗氧化酶活性的降低,标志着抗氧化系统受到一定程度的影响,使 O_2^- 、 H_2O_2 及 ROOH 等活性氧自由基急剧增加,它们直接作用于

细胞,损伤或破坏生物膜系统造成细胞结构和功能的损害。因此可以推测随着胁迫温度的升高,氧消耗率的下降,刺参体内抗氧化防御水平也降低。

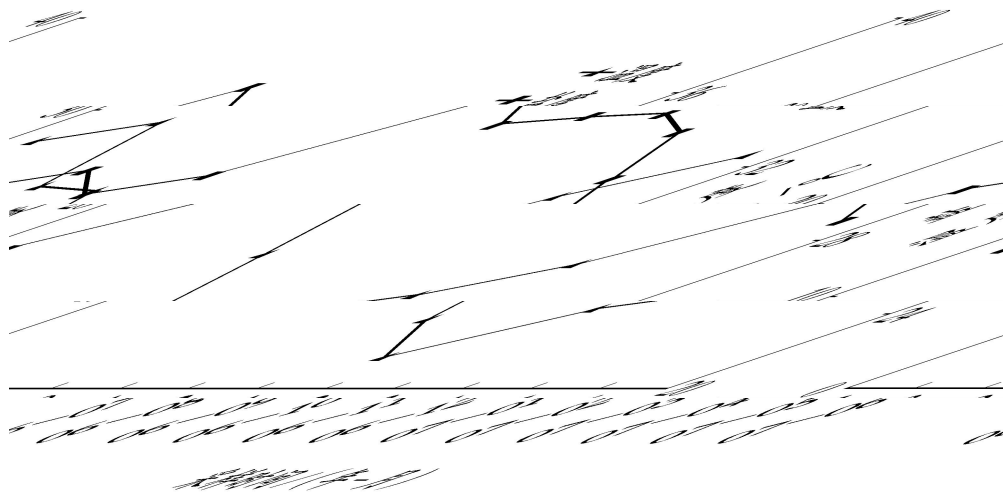


图 5 采样点水体的温度和盐度变化

Fig.5 Conditions of temperature and salinity in the sampling pond

溶菌酶广泛存在于脊椎动物、无脊椎动物,细菌及植物体内,它是非特异性免疫的重要组成部分^[12];使细菌细胞裂解并可能刺激机体内吞噬细胞的吞噬作用。温度对水产动物机体内溶菌酶的影响有着广泛研究;且普遍研究结果认为升高温度会造成机体内溶菌酶活性增强^[7, 12, 13]。

由于刺参主要生活于沿岸浅水区,且刺参养殖多为围堰养殖模式,因此在刺参的生长过程中要经受一些环境因子变化的影响,特别是水温和盐度变化。由于刺参养殖池中每天的水交换量达到 30%~50%,因此水温的最大变化可达^[15]。对刺参体腔液内几种酶的活性和温度及盐度进行相关性分析,结果并没有发现温度和盐度对酶类活性有显著的相关关系(表 1)。因此,影响刺参体腔液内酶类活性变化的因素可能并不是单一温度和盐度的改变。

周年测定结果显示,刺参体腔液内超氧化物歧化酶活性在 2007 年 2 月份显著升高,在 2006 年 10 月份显著降低;过氧化氢酶活性在 2007 年 4 月份显著升高,在 2006 年 10 月份显著降低;髓过氧化物酶活性在 2006 年 9 月份和 2007 年 1 月份显著升高,在 2007 年 4~5 月份显著下降;溶菌酶活性在 2006 年 9 月份显著升高,在 2007 年 2 月份显著下降。综合结果显示,一年内刺参体腔液内几种酶类显著变化的转折点为 9 月份、10 月份,1 月份,2

月份和 4、5 月份。

表 1 刺参体腔液几种免疫指标与温度、盐度的相关关系分析

Tab.1 Correlations between temperature and salinity in the sampling pond and immune parameters

参数	SOD	CAT	MPO	LSZ
温度	-0.486	-0.446	-0.109	0.55
盐度	0.363	0.550	0.036	-0.49

在中国大连的黄海北部海区,刺参消化管质量于 8 月下旬起急剧下降,即从 8 月份开始迅速退化、减耗,9 月末降到最低期,一直持续到 10 月末左右。

依崔相^[16]的研究测定消化管质量的最高、最低及中间值分别为 3 月 3 日、8 月 17 日和 12 月 2 日,其摄饵量及摄饵率也呈现相应的变化,消化管净质量与消化管内容物总质量季节变化比较明显。消化管净质量及消化内容物总质量从 8 月下旬起急剧下降,9 月末降到最低值。消化管净质量最低值出现的时间与生殖腺指数出现的时间是一致的。10 月末,消化管净质量又上升,从 11 月至翌年 7 月末,消化管净质量变化不大,其净质量值处在一个较高水平,其净质量的变化值可因个体大小及采捕地点的不同而略有不同。消化管净质量最低值出现的时间,正是刺参夏眠时间,在此期间因其不摄食,消

化管极度萎缩。

崔相^[16]研究了刺参的摄饵量的年间各月份变化同消化管质量及消化管腔容量一样呈周期性变化,最低值为8月份,最高值出现在2~3月份。

隋锡林^[17]对大连沿海(黄海北部)刺参生殖周期的研究结果表明,刺参生殖指数的季节变化,生殖腺指数从11月份开始逐渐增大,到翌年的7月初至8月中旬达到最高值,进入9月开始明显下降,9月末下降至最低值。

据资料记载^[17、18],刺参的产卵盛期,烟台、威海等地为5月上旬至6月末,北戴河为5月中旬至7月初,总之,因各地海水温度回升早晚有所不同,其产卵期也不同。

在本实验整个周年取样结果显示,7月份刺参的进食开始下降,活动减少,已经开始进入夏眠状态;到9月份,刺参消化道退化十分明显,已经是完全的夏眠状态;而到10月份,刺参已经基本开始活动,消化道也开始恢复;这一现场观察结果与刘永安^[19]的研究结果基本一致。

根据水温的监测显示,1月份是养殖水体一年中温度最低的月份。而到4~5月份,刺参的机体又开始为繁殖作准备。综合以前研究结果,可以得知9、10月份是刺参进入夏眠的重要阶段;1、2月份是其生活过程中水温最低的阶段;4、5月份则是其即将进行繁殖的阶段;因此刺参体腔液内几种酶类变化转折点的可能是刺参夏眠、生理及繁殖等各因素作用的结果。

参考文献:

[1] Sun H, Liang M, Yan J, *et al.* Nutrient requirements and growth of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* [A]. Lovatelli A, Conand C, Purcell S, *et al.* Advances in sea cucumber aquaculture and management [C]. Rome: FAO, 2004, 327-331.

[2] 张春云, 王印庚, 荣小军, 等. 国内外海参自然资源、养殖状况及存在问题[J]. 海洋水产研究, 2004, 25(3): 89-97.

[3] 常亚青, 隋锡林, 李俊. 刺参增养殖业现状、存在问题与展望[J]. 水产科学, 2006, 25(4): 198-201.

[4] 季健平, 吴再彬, 刘岐山, 等. 超氧化物歧化酶向量快速测定法[J]. 南京铁道医学院学报, 1991, 10(1): 27-30.

[5] Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range [J].

Clinica Chimica Acta, 1991, 196: 143-151.

[6] Harrison J E, Schultz J. Myeloperoxidase, confirmation and nature of heme-binding inequivalence. Resolution of a carbonyl-substituted heme[J]. *Biochemical Biophysics Acta*, 1978, 536: 341-349.

[7] 陈昌福, 纪国良. 草鱼的血清、体表和肠粘液中溶菌物质活性及其特性[J]. 华中农业大学学报, 1992, 11(3): 276-279.

[8] Regoli F, Cerrano C, Chierici, E, *et al.* Seasonal variability of prooxidant pressure and antioxidant adaptation to symbiosis in the Mediterranean demosponge *Petrosia ficiformis*[J]. *Marine Ecology-Progress Series*, 2004, 275: 129-137.

[9] Hermes-Lima M, Storey J M, Storey K B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 1998, 120: 437-448.

[10] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 61-63.

[11] Yang H S, Zhou Y, Zhang T, *et al.* Metabolic characteristics of sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka during aestivation[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2006, 330: 505-510.

[12] Johanson P T. The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*) O. III. *In vitro* reaction to bacteria[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1969, 13: 42-62.

[13] Langston A L, Hoare R, Stefansson M. The effect of temperature on non-specific defence parameters of three strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2002, 12(1): 61-76.

[14] 华育平, 刘红柏, 张颖. 温度、疾病感染对史氏鲟血清和各组织中溶菌酶水平的影响[J]. 东北林业大学学报, 2005, 33(3): 63-66.

[15] Dong YW, Ji T, Dong S L. Stress responses to rapid temperature changes of the juvenile sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka) [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2007, 6: 275-280.

[16] 崔相, 大岛泰雄. ナマニにみら水ろ“アオ”と“アカ”の形态おとび生态的差異について[J]. 日本水产学会誌,

- 1961, 27(2): 97-106. 科学出版社, 1997. 334-335.
- [17] 隋锡林. 刺参生殖周期的研究[J]. 水产学报, 1985, 9(4): 303-310. [19] 刘永安, 李馥馨, 宋本祥, 等. 刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)夏眠习性研究: I 夏眠生态特点的研究[J]. 中国水产科学, 1996, 3(2): 41-48.
- [18] 廖玉麟. 中国动物志, 棘皮动物门, 海参纲[M]. 北京:

Annual changes of immune enzymes in coelome fluid of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*

WANG Fang-yu^{1,2}, YANG Hong-sheng¹, GAO Fei^{1,2}, LIU Guang-bin^{1,2}

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: 30, May, 2008

Key words: sea cucumber; *Apostichopus japonicus*; immune enzyme; annual change

Abstract: In view of eco-immunology, immune enzymes in coelome fluid of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*, were investigated from July in 2006 to June in 2007. The data showed that turning points of enzyme changes were in September, October, January, February, April and May. The results showed that immune characters in coelomic fluid of *A. japonicus* might not solely be attributed to temperature and salinity. These data were complex and interesting. Considering the life characters of *A. japonicus*, the significant changes of enzymes activity might be associated with growth, reproduction, aestivation, and environment.

(本文编辑:张培新)