

温度骤升对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 几种免疫化学指标的影响*

宋林生 季延宾 蔡中华 方敏 苏建国 崔朝霞 李太武

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

(宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211)

提要 以中华绒螯蟹为材料,将水体温度从 14℃ 骤然升到 28℃,然后在升温后 9h 内测定中华绒螯蟹肝胰腺中过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性和丙二醛(MDA)的含量以及血细胞的吞噬能力,比较温度变化对这些指标的影响。结果表明,肝胰腺中 CAT 和 SOD 的活性在温度升高后马上出现显著降低,在 6h 后开始趋于稳定;MDA 的含量在升温后随着时间的延长逐步增加;血细胞的吞噬力和吞噬指数在温度升高后有所增加并于 3h 时达到最高,然后逐渐下降到温度升高前的水平。该结果表明,温度的骤然升高会影响机体的生理功能和机体的免疫防御能力,导致自由基代谢的紊乱,这可能是诱导病害发生的环境因素之一。

关键词 中华绒螯蟹,温度升高,过氧化氢酶,超氧化物歧化酶,丙二醛,细胞吞噬

中图分类号 Q958.8

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)又名河蟹,因其营养丰富、味道鲜美而深受人们喜爱,是我国重要的水产养殖品种之一。自 20 世纪 80 年代以来,中华绒螯蟹养殖业发展迅速,到 2000 年全国养殖产量已超过 100 000t,年产值达 120—150 亿元,已成为水产养殖支柱产业之一(崔朝霞等, 2003)。但随着中华绒螯蟹养殖规模的不断扩大,各种疾病日趋严重,给养殖产业造成了巨大损失。流行病学调查结果表明,中华绒螯蟹的大部分病害都发生在春夏季,尤其是在环境条件发生剧烈变化以后,更是病害暴发的高峰,如大风或大雨过后温度的骤然升高往往是发生病害的关键时刻。而水温达到 28℃ 时,似乎是中华绒螯蟹发生病害并大批死亡的敏感温度。尽管目前人们已经发现温度变化与病害发生之间的相关性,但在温度急剧升高后如何引起病害发生乃至造成死亡的原因还不清楚。本文通过改变水体温度,从 14℃ 骤然升高到 28℃,然后在不同时间测定中华绒螯蟹肝胰腺中过氧化氢酶(Catalase, CAT)、超氧

化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)的酶活性和丙二醛(Malondialdehyde, MDA)的含量以及血液中溶菌酶(Lysozyme, LSZ)的活性和血细胞的吞噬能力,比较温度变化对这些免疫化学指标的影响,分析探讨造成蟹在温度急剧升高后易发病的原因,从而为蟹疾病的预防及快速诊断提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用中华绒螯蟹采自山东省中华绒螯蟹繁育中心,为 1 龄蟹,平均重 40g 左右,体质健壮,在室内暂养 20 天后进行实验。

1.2 方法

1.2.1 培养温度的改变 用普通型加热棒和控温仪将水温由 14℃ 迅速升到 28℃。分别于加热后 0 (对照组)、1、3、6 和 9h 取样进行免疫指标的测定。

1.2.2 样品制备 从蟹螯足的基节和底节之间未钙化的部分用注射器采集体液,加入 1% 肝素抗凝剂备用。将蟹的肝胰脏组织切成小块置于 50ml

* 国家重点基础研究发展规划项目(973), G1999012007 号; 国家高技术研究发展计划(863), 2002AA626020 号; 国家自然科学基金资助项目, 40276045 号。宋林生, 博士, 研究员, 博士生导师, E-mail: lshsong@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2003-02-24, 收修改稿日期: 2003-08-05

离心管中并加入 pH6.4 1/15mol/L 的 PBS 缓冲液, 冰上匀浆, 匀浆液以 4℃ 20000r/min 离心 2h, 弃沉淀, 将上清液于 -80℃ 保存备用。

1.2.3 蛋白含量测定 按照考马氏亮兰 (Coomassie Brilliant Blue G-250) 法进行(Harris *et al*, 1990; 吴冠芸等, 2000; 李娟等, 2000)。以牛血清白蛋白为标准品, 绘制标准曲线, 根据标准曲线测得样品的蛋白质含量。

1.2.4 CAT 的测定 采用硫代硫酸钠滴定法(李柏林等, 1989; 方允中等, 1989)。CAT 的活性定义为: 在 5ml 的反应体系中, 30℃ 反应 10min, 每消耗 0.01mmol 的 H₂O₂ 为一个 CAT 活力单位。

1.2.5 SOD 的测定 超氧化物歧化酶的活性参照硝基四唑氮蓝 (nitrotetrazolium blue, NBT) 还原法(宋林生等, 2002; 王传文等, 2000) 进行。以 SOD 酶标准品(Sigma) 绘制出标准曲线, 然后根据测得样品的 OD 值及标准曲线的线性回归方程推算出样品 SOD 的活性。最后除以各自的蛋白含量, 即得 SOD 的比活力, 以 U/mg protein 表示。

1.2.6 MDA 的测定 MDA 含量采用硫代巴比妥酸(2-Thiobarbituric Acid, TBA) 比色法进行测定(宋林生等, 2002; 王传文等, 2000)。首先绘制标准曲线, 然后根据样品的 OD 值及标准曲线推算出样品的 MDA 含量, 最后除以各自的蛋白含量, 即得 MDA 的比含量, 以 $\mu\text{TBP}/\text{mg protein}$ 表示。

1.2.7 血细胞吞噬能力的测定 血细胞的吞噬能力从吞噬细胞率和吞噬指数两个方面进行测定和比较, 具体过程参照杨景山(1992) 的方法进行。取 1.2ml 含有抗凝剂的全血, 加入 15 μl 枯草芽孢杆菌菌悬液(菌浓度为 1×10^8 细胞/ml), 混匀, 30℃ 水浴 1h, 制成血涂片, 干燥后甲醇固定, 姬姆萨染色。计数 100 个血细胞, 数出参与吞噬的细胞个数以及每个细胞吞噬细菌的个数。

吞噬细胞率 = 参与吞噬的细胞数/血细胞总数 $\times 100\%$

吞噬指数 = 每个吞噬细胞平均吞噬的细菌数

2 结果

2.1 蟹肝胰腺 CAT 活性在骤然升温后的变化

采用硫代硫酸钠滴定法对温度骤然升高后中华绒螯蟹肝胰腺中 CAT 活性进行测定(表 1)。测定结果表明, 温度骤然升高后, CAT 的活性迅速下降, 温度升高后的 6h 内, 变化极为显著, 6h 后变化趋于稳定, 6h 以后到 9h CAT 的活性没有发生显著变化。

2.2 蟹肝胰腺 SOD 酶活性的变化

与 CAT 酶的活性变化相似, 蟹肝胰腺中 SOD 酶的活性在温度升高后急剧下降(表 1)。温度升高 1h 后, SOD 酶的活性已经显著低于对照组 ($P < 0.05$), 在温度升高后的 3h 内, SOD 酶活性的下降幅度很大, 3h 后和对照的差异极显著 ($P < 0.01$)。随后下降的幅度变小并随时间延长趋于稳定在一定的范围内。

2.3 肝胰腺中 MDA 的含量变化

蟹肝胰腺中 MDA 的含量在升温后逐渐升高(表 1), 尽管升温后 3h 时 MDA 的含量并不显著高于对照组 ($P > 0.05$), 但 6h 后其含量则极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。从表 1 还可以看到温度升高 6h 后 MDA 的含量仍在增加并且增加的幅度更大。

2.4 血细胞吞噬能力的变化

血细胞的吞噬能力在温度骤然升高后发生了明显变化(表 1), 吞噬细胞率和吞噬指数的变化规律基本相似。升温后, 细胞吞噬率开始增加, 在 3h 后达到最高 ($P < 0.01$), 然后逐渐下降, 最后保持在与对照基本相同的水平。吞噬指数在升温后也开始增加, 3h 达到最高, 此时与对照组有显著差异 ($P < 0.05$), 随时间延长开始下降, 并逐渐接近对照组的水平。

表 1 不同实验组总蛋白质、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、丙二醛和吞噬能力的测定结果

Tab. 1 The results of gross protein, activity of CAT and SOD, the content of MDA, and phagocytosis

时间 (h)	总蛋白 (mg/ml)	MDA 的含量 ($\mu\text{TBP}/\text{mg pr}$)	CAT 的活性 (U/mg 蛋白)	SOD 的活性 (U/mg 蛋白)	吞噬细胞率 (%)	吞噬指数
0	7.929 \pm 0.532	14.209 \pm 1.250	9.607 \pm 0.442	6.218 \pm 0.179	31 \pm 3.741	3.645 \pm 0.512
1	7.551 \pm 0.468	16.094 \pm 1.399	7.273 \pm 0.418	5.178 \pm 0.243	47 \pm 5.888	3.830 \pm 0.681
3	7.896 \pm 0.645	17.631 \pm 0.733	5.720 \pm 0.403	1.705 \pm 0.274	51.333 \pm 2.357	5.214 \pm 0.636
6	8.177 \pm 0.334	18.114 \pm 1.192	2.268 \pm 0.134	1.026 \pm 0.122	34.000 \pm 3.559	3.392 \pm 0.793
9	8.120 \pm 0.766	22.428 \pm 2.742	2.366 \pm 0.011	0.734 \pm 0.211	35.000 \pm 4.899	3.743 \pm 0.777

3 讨论

3.1 温度骤升对河蟹抗氧化能力的影响

低等水生生物是变温动物,环境温度对其生长发育影响很大,尤其是温差的急剧变化,不仅会对机体的生理代谢以及免疫能力等方面造成显著影响,甚至威胁到养殖生物的生命。养殖生产的实践表明,大多数海水养殖生物的危害都发生在温度较高的季节,并且在温度发生急剧变化时更易发生病害。本研究用中华绒螯蟹为材料,将养殖水体的温度从 14℃ 急剧升高到 28℃,然后在升温后的 9h 内对肝胰腺中 SOD 和 CAT 的活性、MDA 的含量以及血细胞的吞噬能力进行测定和比较。探讨温度变化对中华绒螯蟹免疫化学指标的影响,分析温差在病害发生中可能的作用。

过氧化氢酶 CAT 和超氧化物歧化酶 SOD 是机体抗氧化,清除自由基的主要酶类(孙虎山等, 2000),其中 CAT 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毒性物质 H_2O_2 迅速催化分解为 H_2O 和 O_2 ,清除过氧化氢,而防止羟自由基的形成。SOD 酶属于金属蛋白酶,是最重要的特异性 O_2^- 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 O_2^- 的调控。SOD 酶与过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽还原酶(GSH-R)等结合,可有效地清除体内 O_2^- 、 H_2O_2 及 ROOH 等活性氧,终止氧自由基对机体氧化的连锁反应。体内 SOD 和 CAT 的酶活力下降,标志着机体清除自由基的能力下降。MDA 是脂质过氧化的最终产物,它反映了机体受氧化损伤的程度。动态性检测 SOD、CAT 和 MDA,能比较准确地反映机体内自由基的代谢情况及组织的氧化损伤情况,对判断机体的健康状况以及免疫防御能力具有重要价值。

本研究结果显示,温度从 14℃ 骤然升高到 28℃ 以后,河蟹肝胰腺中的 CAT 酶和 SOD 酶的活性急剧下降,CAT 酶在 6h 后基本达到最低并趋于稳定;而 SOD 酶在 3h 后就下降到最低,这两种酶在温度改变前后活性差异极为显著。温度升高后 SOD 和 CAT 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,使超氧阴离子自由基、过氧化氢、单态氧和羟自由基等自由基急剧增加,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。同时,中华绒螯蟹肝胰腺中 MDA 的含量在温度升高后也逐步增加,一直到升温后 9h 还在继

续增加。温度骤升后 MDA 含量的增加说明机体受温差刺激后,导致抗氧化系统紊乱,机体受到了氧化损伤;MDA 在体内的积累比 SOD 和 CAT 的下降略微滞后,这与温度骤升后,导致机体抗氧化系统受损,引起脂质氧化代谢产物的上升的推论是一致的。自由基引起机体的氧化损伤后,会引起细胞膜中不饱和脂肪酸和磷脂的比例发生改变及膜内蛋白的破坏;残存的自由基与膜内巯基基团结合,致多种酶失活,导致细胞发生肿胀、变性甚至死亡,从而使机体的免疫能力下降(Rovin *et al.*, 1993; 金惠铭等, 2002)。这可能是中华绒螯蟹在温度急剧上升后容易发病的一个重要原因。

3.2 温度骤升对河蟹免疫能力的影响

温度升高对血细胞的吞噬能力也有一定的影响,温度骤然升高后,血细胞的吞噬能力在短时间内有所升高,但随后又马上开始下降并基本保持在升温前的水平(表 1)。吞噬作用是机体清除异物的重要途径之一,温度骤然升高可能在一定程度对血细胞的吞噬作用有激发作用,使得在短时间内吞噬细胞率和吞噬指数都有所增加。但吞噬细胞在吞噬过程中会大量消耗氧,会引发呼吸爆发作用,呼吸爆发的结果导致活性氧大量产生和氧化代谢产物的增加。这些强氧化剂一方面可以杀伤异物,对机体产生保护作用,但同时这些物质的大量产生也会损伤自身的组织和细胞。

本研究的结果表明,温度的骤然升高会造成养殖生物自由基代谢的紊乱,使得机体内自由基大量积累,从而损害了机体细胞和组织正常的生理和免疫防御能力,进而容易感染病原生物或者在携带了病原生物时容易发病。这一结果也将有助于了解环境因素对机体抗氧化能力的影响,评估体内氧化代谢的情况以及对机体的损害程度。这对于判断养殖动物的免疫状态和病情诊断以及病害防治都具有重要的参考价值。

致谢 山东中华绒螯蟹繁育有限公司丁茂昌为本研究提供实验材料,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王传文,杨银香,赵相宝,2000 消化性溃疡患者血浆 MDA 和红细胞 SOD 水平的测定. 实用医学杂志, 16(2): 133
方允中,李文杰,1989. 自由基与酶——基础理论及其在生物学和医学中的应用. 北京: 科学出版社, 129
孙虎山,李光友,2000. 栉孔扇贝血淋巴中超氧化物歧化酶和过氧

- 化氢酶活性及其性质的研究. 海洋与湖沼, 31(3): 259—265
- 李娟, 张耀庭, 曾伟等, 2000. 应用考马斯亮兰法测定总蛋白含量. 中国生物制品学杂志, 13(2): 118—120
- 李柏林, 梅慧生, 1989. 燕麦叶片衰老与活性氧代谢的关系. 植物生理学报, 15(1): 6—12
- 吴冠芸, 潘华珍, 吴, 2000. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册. 北京: 科学出版社, 166—167
- 宋林生, 苏建国, 崔朝霞等, 2002. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 幼蟹上岸病的免疫学研究. 海洋与湖沼, 33(6): 657—662
- 杨国光, 黄雯, 2000. 血中过氧化脂质降解产物丙二醛(MDA)含量简易测定. 广东卫生防疫, 26(2): 16—17
- 杨景山, 1992. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 6: 21—31
- 金惠铭, 卢建, 殷莲华, 2002. 细胞分子病理生理学. 郑州: 郑州大学出版社, 236—259
- 徐军发, 凌天翼, 唐俊杰, 1998. 用 NBT 还原法检测细菌无细胞溶解物中 SOD 活性. 广东医学院学报, 16(1—2): 12—14
- 崔朝霞, 相建海, 周岭华等, 2003. 中华绒螯蟹三倍体群体早期生长及营养的研究. 海洋与湖沼, 34(1): 19—25
- 翟玉梅, 丁秀云, 李光友, 1998. 软体动物血细胞及体液免疫研究进展. 海洋与湖沼, 29(5): 558—562
- Harris E L V, Angal S, 1990. Protein purification methods. New York: IRL Press, 15—17
- Rovin J D, Stamler J S, Loscalzo J *et al.*, 1993. Sodium nitroprusside, an endothelium-derived relaxing factor congener, increases platelet cyclic GMP levels and inhibits epinephrine exacerbated *in vivo* platelet thrombus formation in stenosed canine coronary arteries. J Cardiovasc Pharmacol, 22(4): 626—631

THE IMMUNOCHEMICAL VARIATION OF MITTEN HAND CRAB *ERIOCHEIR SINENSIS* AFTER THE INCREMENT OF TEMPERATURE

SONG Lin-Sheng, JI Yan-Bin¹, CAI Zhong-Hua, FANG Min,

SU Jian-Guo, CUI Zhao-Xia, LI Tai-Wu²

(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

(*Life Science and Technology School, Ningbo University, Ningbo, 315211*)

Abstract In order to determine the effect of temperature change on the immune system of the mitten hand crab (*Eriocheir sinensis*), antioxidative and immune parameters were measured within 9 hours of a sudden rise of culture temperature (14°C—28°C). The superoxide dismutase (SOD) in the hepatopancreas was detected by NBT (nitroterazolium blue) approach. Compared with the control group, the SOD activity dropped rapidly ($P < 0.05$) only one hour after the temperature increased. The activity of SOD declined significantly ($P < 0.01$) and then became stable within 3 hours of the temperature increased. After 6 hours it was still lower than that of the control group. Similar to the SOD, the catalase (CAT) activity also declined suddenly when the temperature increased. The CAT activity declined significantly within 6 hours of the temperature increase then showed stable tendencies, showing no obvious change between 6—9 hours. The concentration of malondialdehyde (MDA) in the hepatopancreas was measured using TBA (2-Thiobarbituric Acid) methods. In contrast to the changes in SOD and CAT, the content of MDA increased after the temperature increase. Within 6 hours of the increase the content of MDA rose significantly ($P < 0.01$). After 9 hours it continued to rise. The rate and the index of phagocytic both rose, reaching their peak level within 3 hours of the temperature change, before dropping to their original levels. These results indicated that the rapid increment of temperature could result in metabolic maladjustment of free radicals and have profound effects on physiological and immune functions of the body. This could be one of the important ecological factors inducing the outbreak of disease.

Key words *Eriocheir sinensis*, Temperature increment, Superoxide dismutase, Catalase, Malondialdehyde, Phagocytosis