

贻贝(*Mytilus edulis*)发育早期酸性和碱性磷酸酶活性*

孙虎山^① 王宜艳 梁建光 冉镇 曾鹏 韩强

(鲁东大学生命科学学院 烟台 264025)

提要 采用组织化学和分光光度技术对贻贝卵、胚胎和早期幼虫酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)活性进行了定位和定量研究,以探讨贝类早期发育过程中的免疫防御机制。组织化学显示,从卵细胞到D型面盘幼虫各个时期都呈ACP和AKP阳性,卵细胞中阳性颗粒较大且分布比较均匀,受精卵中央着色较深,卵裂期核区呈强阳性且大分裂球内阳性颗粒较多,原肠胚和担轮幼虫外层细胞阳性较强,面盘幼虫外套膜边缘膜、内脏团和面盘基部呈强阳性。生化测定ACP和AKP活力,均是卵细胞最低,随着发育酶活力逐步提高,其中ACP活力在受精后和囊胚期明显提高,囊胚期达到最高峰,其后又略有下降;AKP活力在卵裂期、担轮幼虫和面盘幼虫提高较大,面盘幼虫期酶活力最高。ACP和AKP可能在贻贝的发育早期抵抗病原生物侵染方面发挥重要作用。

关键词 贻贝,发育,胚胎,幼虫,酸性磷酸酶,碱性磷酸酶

中图分类号 Q26

双壳贝类的胚胎和幼虫时期对环境的胁迫是最敏感的,对细菌等病原生物的易感性高于成体(Lane *et al.*, 2000; Luna-Gonzalez *et al.*, 2002; Ringwood, 1992)。人工育苗可为贝类胚胎和幼虫提供适宜的环境,极大地提高了苗种的成活率,但是育苗过程中也时常出现胚胎和幼虫感染病原菌,造成胚胎孵化率降低、幼虫大量死亡,给贝类苗种生产造成巨大经济损失(Robert *et al.*, 1996; Sugumar *et al.*, 1998)。为了提高苗种的成活率,可采用为胚胎和幼虫提供最适的生活环境及添加抗菌性物质的办法解决(Robert *et al.*, 1999; Torkildsen *et al.*, 2002),但对贝类发育早期适应环境和抵抗病原生物感染的机制却所知甚少。Elston等(1980)首次报道了牡蛎 *Crassostrea virginica* 幼虫体腔内的吞噬细胞具有吞噬细菌的能力, Rudneva(1999)报道了贻贝 *Mytilus galloprovincialis* 等多种海洋动物的发育早期存在抗氧化防御系统, Luna-Gonzalez 等(2003, 2004)采用生化方法对太平洋牡蛎等双壳贝类发育早期及成贝血淋巴内的酚氧化酶和多种水解酶

活性进行了研究。酸性磷酸酶(EC3.1.3.2 ACP)和碱性磷酸酶(EC3.1.3.1 AKP)在成贝的免疫防御中发挥重要作用(Pipe, 1999; 孙虎山等, 2002)。有关贻贝(*Mytilus edulis*)胚胎和幼虫 ACP 和 AKP 活性的研究未见报道。作者采用组织化学和分光光度技术对贻贝胚胎及早期幼虫中的 ACP 和 AKP 活性进行了定位和定量研究,以期为贝类发育早期免疫防御机制的研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验于2006年3月进行。贻贝(*Mytilus edulis*)购于烟台水产品市场。壳长55—60mm,室内养于充气的水族箱中;海水为取自烟台近海的砂滤水,盐度为31.36, pH 8.0;小球藻和扁藻混合投喂,水温逐步由11℃提高到15℃,每天升温不超过1℃。实验所用β-甘油磷酸钠购自Sigma公司,其余试剂均为国产分析纯试剂。

* 国家重点基础研究发展规划项目(973)资助, G1999012005号。

① 通讯作者:孙虎山,博士,教授, E-mail: s_hushan@163.com

收稿日期:2006-09-15, 收修改稿日期:2006-12-05

1.2 方法

1.2.1 胚胎和幼虫的获取 暂养亲贝水温升至 15℃ 后, 自海水中取出亲贝 50 只, 湿润的环境中干露 30min, 放入过滤充气的海水中, 注意观察亲贝精卵排放情况, 根据精卵形态和排放方式的不同, 将雌、雄亲贝分开暂养。取适量精液加入卵液中, 将精、卵液混合, 受精后静置去上清, 加入新海水, 重复洗卵 3 次。每隔 30—50min, 取样在显微镜下观察, 记录其各个发育时期并取材制片。第 1 极体期到桑椹期, 每期取样 50—100 粒, 直接涂片。囊胚到 D 型面盘幼虫期, 取样用少量戊二醛固定液杀死, 3000r/min 离心 10min, 幼虫经浓缩后涂片。涂片标本置室温下干燥, 2.5%戊二醛固定 30min。另分别取部分卵、受精卵、16 细胞期胚胎、囊胚、原肠胚、担轮幼虫和 D 型面盘幼虫, 玻璃匀浆器内匀浆, 10000r/min 离心 10 min, 得胚胎或幼虫的破碎上清, 马上用于酶活力的测定或 4℃ 下存放不超过 1h。

1.2.2 组织化学 ACP 和 AKP 的组织化学显示均采用 Gomori 的金属盐沉淀法(賁长恩等, 2001)。镀铅法显示 ACP, 固定后的材料用 50mmol/L pH 5.0 的醋酸缓冲液冲洗 3 次, 每次 15min, 孵育液中孵育 1h, 蒸馏水冲洗, 用 1%硫化氨反应 1min。钙钴法显示 AKP, 作用液中孵育 60min 后, 再放入 0.05mol/L 的冷的 $Pb(NO_3)_2$ 中处理 10min, 蒸馏水冲洗, 用 1%硫化氨反应 1min。均设反应液中不加底物 β -甘油磷酸钠空白对照。脱水透明后树脂封片, 显微观察并摄影。

1.2.3 生化测定 ACP 和 AKP 的生化测定均采用磷酸苯二钠法(王继贵等, 1996)。ACP 活力测定: 1ml pH 4.9 0.2mol/L 柠檬酸缓冲液中加入 0.1ml 样品, 置 37℃ 水浴中 5min, 加入预温至 37℃ 的基质液 0.01mol/L 磷酸苯二钠 1ml, 混匀, 置 37℃ 水浴准确保温 30min, 加入碱性溶液(4.2g $NaHCO_3$ 和 0.1g 4-氨基安替吡林溶于 100ml 双蒸水中, 加入 100ml 0.5mol/L NaOH, 混匀)2ml, 再加入铁氰化钾溶液(0.25g 铁氰化钾和 1.7g 硼酸各溶于 50ml 双蒸水后, 2 液混合)3ml。对照管最后加样品。510nm 下测光吸收值, 查酚含量标准曲线得产生酚量。用经 0.1mol/L 硫代硫酸钠标准溶液滴定法标定的重蒸酚配制酚标准溶液, 替代样品制作酚含量标准曲线。酶比活力单位的定义: 以每 mg 蛋白每 min 产生 1 μ g 酚所需要的酶量作为一个酶活力单位。AKP 活力的测定: 1ml pH 10 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液中加入样品 0.1ml, 置 37℃ 水浴中 5min, 加入预温至 37℃ 的 0.01mol/L 磷酸苯二钠

1ml, 混匀, 置 37℃ 水浴准确保温 15min, 加入铁氰化钾溶液 3ml。510nm 下测光吸收值。用与 ACP 活力测定相同的酚标准溶液替代样品制作酚含量标准曲线。酶比活力单位的定义与 ACP 活力测定相同。蛋白含量的测定采用 Folin-酚试剂法, 以牛血清蛋白为标准蛋白。

2 结果

2.1 ACP 的组织化学定位

结果显示从卵细胞到 D 型面盘幼虫各个时期都呈 ACP 阳性反应, 阳性反应部位呈棕褐色。卵细胞 ACP 阳性颗粒分布比较均匀, 且颗粒较大, 核区常透明(图 1a); 受精卵 ACP 阳性颗粒较未受精卵多而密集, 且颗粒较细小(图 1b); 2 细胞期细胞中央区域 ACP 阳性颗粒较多, 大分裂球较小分裂球内颗粒多着色较深(图 1c); 4 和 8 细胞期每个分裂球内 ACP 阳性颗粒在其细胞核外周较多, 各分裂球之间的界限明显, 大分裂球内明显较小分裂球阳性颗粒多(图 1d、e); 16、32 细胞期和桑椹期仍可观察到 ACP 阳性颗粒在核外周较多, 但分布范围逐步扩大(图 1f、g、h); 囊胚期可看到中央透明的囊胚腔, 靠近囊胚腔的部位着色较深, 也可看到部分分裂球内核外周着色最深(图 1i); 原肠胚期胚体 ACP 阳性颗粒在每个细胞分布相对较均匀, 外层细胞较内层细胞阳性稍强一些(图 1j); 担轮幼虫中部细胞内 ACP 阳性颗粒较多(图 1k); D 型面盘幼虫 ACP 阳性颗粒在外套膜和内脏团集中分布, 面盘基部颗粒也较多(图 1l)。

2.2 AKP 的组织化学定位

结果显示从卵细胞到 D 型面盘幼虫各个时期都呈 AKP 阳性反应, 阳性反应部位呈棕褐色。卵细胞 AKP 阳性颗粒分布较均匀, 颗粒较大, 核区阳性较弱(图 2a); 受精卵中央区域 AKP 阳性颗粒较多, 外周较少(图 2b); 2 和 4 细胞期每个细胞中部着色较深, 其中大分裂球内存在较多的 AKP 阳性颗粒, 颗粒较细小(图 2c、d); 8、16 和 32 细胞期核区呈 AKP 强阳性, 细胞内其他区域呈阳性(图 2e、f、g); 桑椹胚每个细胞的核区 AKP 阳性仍较强, 而其他区域阳性明显增强(图 2h)。囊胚因囊胚腔的出现而中央区域着色较浅, 细胞靠近囊胚腔的一侧 AKP 阳性较强(图 2i)。原肠胚和担轮幼虫外层细胞 AKP 阳性明显较内层强(图 2j、k); D 型面盘幼虫外套膜的边缘部分、内脏团和面盘基部呈 AKP 强阳性, 其他部位呈弱阳性(图 2l)。

2.3 ACP 活力

贻贝卵细胞、受精卵、卵裂期胚胎、囊胚、原肠胚、担轮幼虫和早期 D 型面盘幼虫 ACP 活力的生化测定结果见图 3。由图 3 可以看出, 卵细胞酶活力最低, 为 $(9.76 \pm 0.52)U/mg \text{ prot.}$ 。卵受精后 ACP 活力明显提高, 是受精前的 2 倍多。卵裂期胚胎 ACP 活力高于受精卵, 但提高较小。囊胚的 ACP 活力较卵裂

期又有较大的提高, 达到贻贝发育早期的最高峰, 是卵细胞的 3 倍多。原肠胚 ACP 活力仍较高, 也是卵细胞的 3 倍多, 但较囊胚略有下降。担轮幼虫和 D 型面盘幼虫 ACP 活力随着发育逐步下降, 但仍高于卵裂期以前各期。

2.4 AKP 活力

贻贝 D 型面盘幼虫前发育早期 7 个时期胚胎或

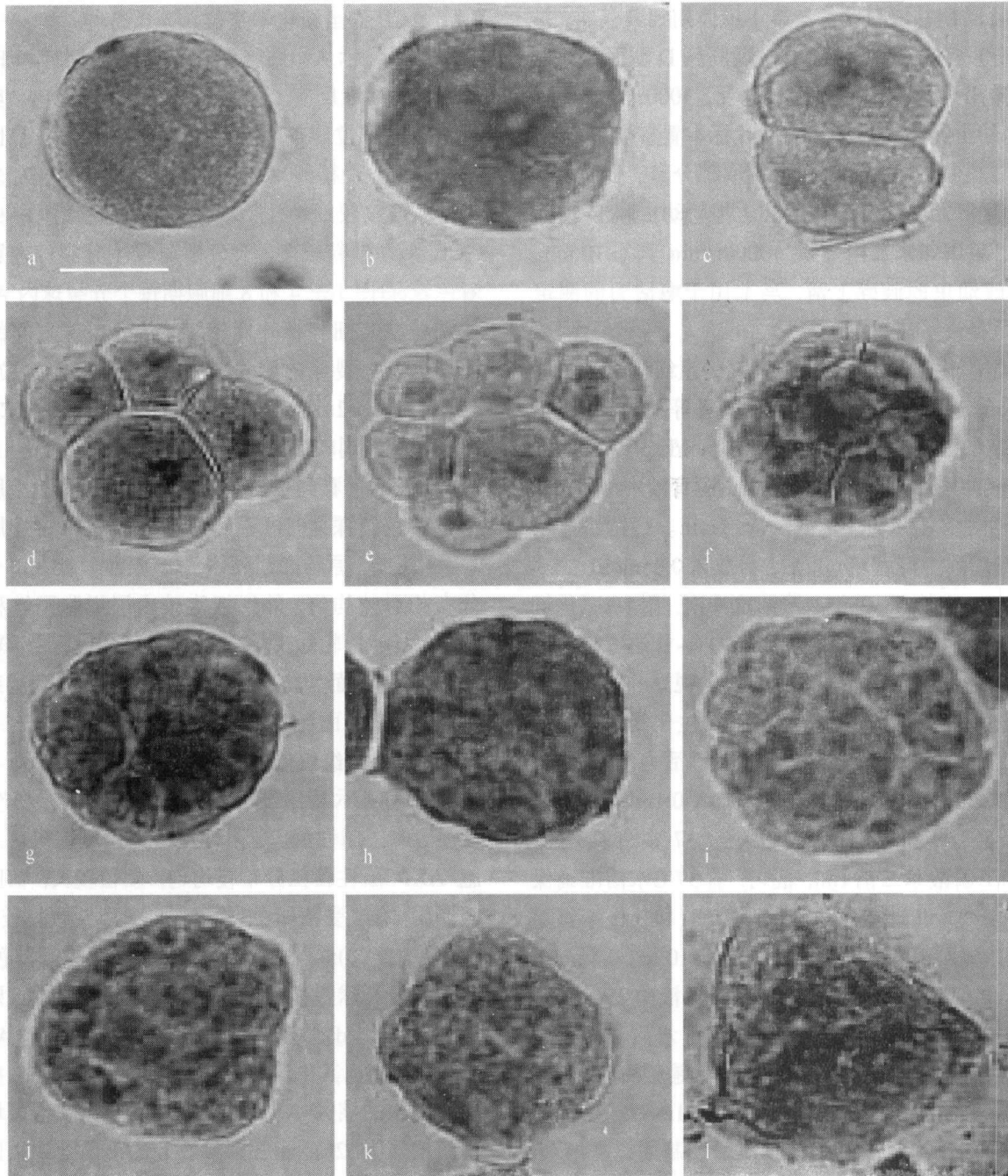


图 1 贻贝发育早期 ACP 的组织化学定位

Fig.1 Histochemical localization of ACP of *M. edulis* in early development stage

a. 卵细胞; b. 受精卵; c. 2 细胞期; d. 4 细胞期; e. 8 细胞期; f. 16 细胞期; g. 32 细胞期; h. 桑椹胚; i. 囊胚;
j. 原肠胚; k. 担轮幼虫; l. D 型面盘幼虫。图内标尺为 $20 \mu\text{m}$

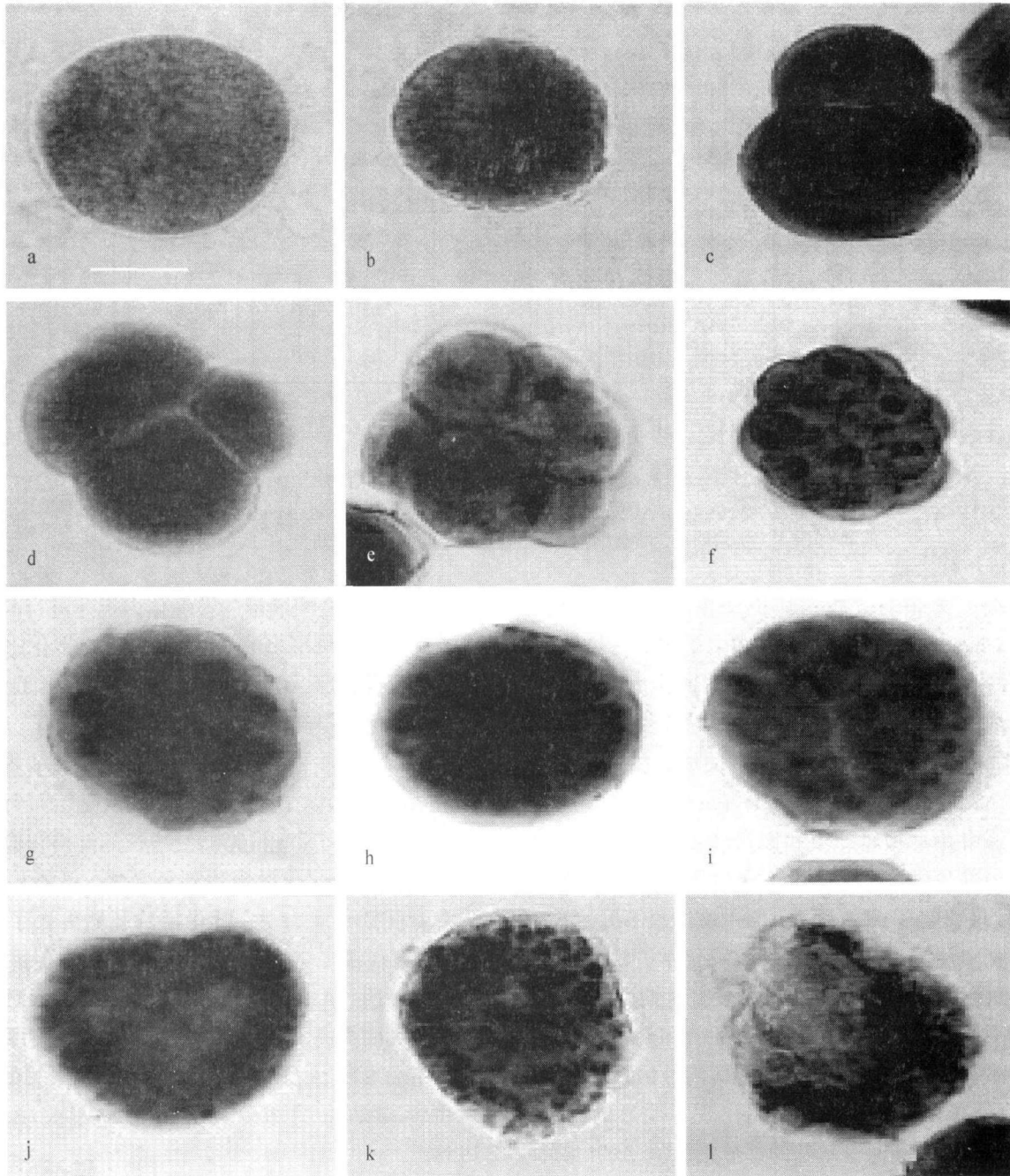


图2 贻贝发育早期 AKP 的组织化学定位

Fig.2 Histochemical localization of AKP of *M. edulis* in early development stage

a. 卵细胞; b. 受精卵; c. 2 细胞期; d. 4 细胞期; e. 8 细胞期; f. 16 细胞期; g. 32 细胞期; h. 桑椹胚; i. 囊胚; j. 原肠胚; k. 担轮幼虫; l. D 型面盘幼虫。图内标尺为 20 μm

幼虫的 ACP 活力生化测定结果见图 3。由图 3 可以看出, 卵细胞 AKP 活力最低, 随着发育酶活力逐步提高。受精卵 AKP 活力高于卵细胞, 但提高较小。卵裂期胚胎 AKP 活力较受精卵提高较大。囊胚和原肠胚 AKP 活力较其前一个发育时期提高也较小。担轮幼虫 AKP 活力明显提高, 达到卵细胞的 2.7 倍, 原肠胚的 1.6 倍。D 型面盘幼虫 AKP 活力又有明显的提高, 可达卵细胞的 3.6 倍。

3 讨论

ACP 和 AKP 广泛分布于动物组织, 有关贝类成贝此 2 种酶的研究已有不少报道, ACP 主要定位于溶酶体和内膜系统, 是溶酶体的标志酶, 在分解清除被吞噬的异物方面发挥重要作用(Pipe, 1999); AKP 主要定位于活跃运输的膜上, 也见于小泡体、高尔基复合体及线粒体上, 不仅参与碳酸钙的分泌和积聚, 而且

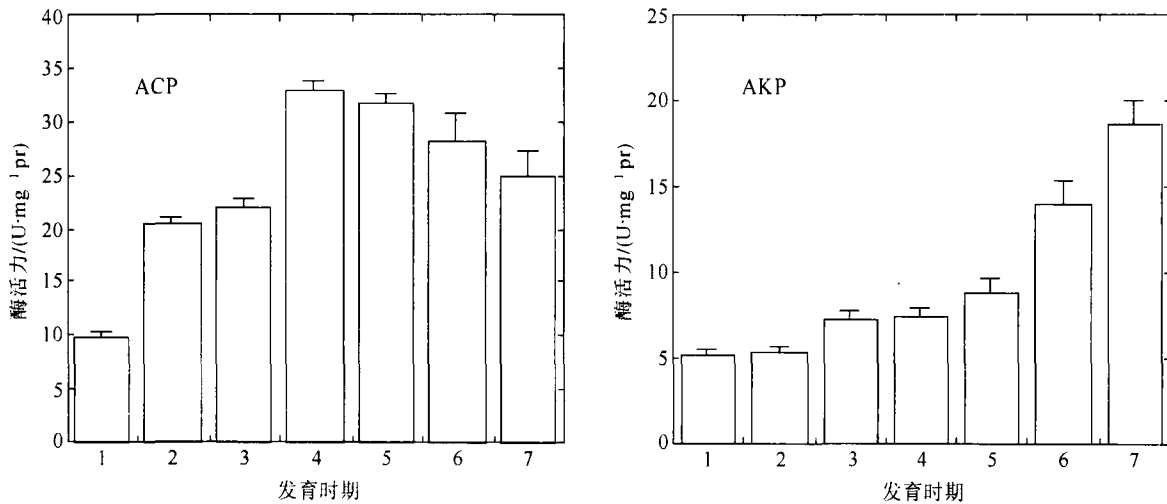


图3 贻贝发育早期 ACP 和 AKP 活力

Fig.3 Activity of ACP and AKP of *M. edulis* in early development stage

1. 卵细胞, 2. 受精卵, 3. 卵裂期, 4. 囊胚, 5. 原肠胚, 6. 担轮幼虫, 7. D型面盘幼虫

还与贝类壳角蛋白等蛋白质的分泌有关(Beedham, 1958)。Cheng(1992)还认为磷酸酶可通过改变细菌表面的结构, 增强其异己性, 起调理素的作用, 从而加速吞噬细胞的吞噬和异物的降解速度, 因此在贝类的免疫防御中发挥重要的作用。有关贝类胚胎和幼虫 ACP 和 AKP 的研究报道较少。Dyrynda 等(1995)用胰蛋白酶等将贻贝担轮幼虫和面盘幼虫解离成单细胞后筛选出部分细胞, 再用组织化学方法显示细胞中的酶, 发现细胞呈 ACP 阴性, 与本文结果不同。作者在本研究中用同一种动物贻贝组织化学方法整体显示从卵细胞到 D 型面盘幼虫各个发育时期内的 ACP, 结果均呈阳性, 并且担轮幼虫前胚胎和幼虫的每一个细胞都呈 ACP 阳性, 只是细胞间阳性的强弱不同, ACP 的分布在面盘幼虫期开始出现了明显的分化, 外套膜、内脏团和面盘基部的部分细胞呈 ACP 强阳性, 其他区域的细胞呈弱阳性或阴性, 生化测定也证实了 ACP 的存在。Luna-Gonzalez 等(2004)也用生化测定方法证实牡蛎担轮幼虫和面盘幼虫内存在 ACP。是胰蛋白酶酶解过程对 ACP 的组化显示有影响或可破坏 ACP 阳性细胞, 还是幼虫细胞分离后只筛选出了阴性细胞, 其原因有待深入探讨。Murdoch 等(1988)对实厚蛤 *Spisula solidissima* 胚胎 AKP 时间和空间的表达的研究表明, 光镜组化定位显示 AKP 在大分裂球内阳性较强, 在本研究中也观察到了相似的情况。作者在本研究中还观察到卵细胞受精后尤其是卵裂后期 ACP 和 AKP 在每个分裂球的细胞核区域阳性最强, 推断可能受精过程促进了 ACP 和 AKP 基因的表达, 而细胞核周围内质网和核糖体丰富, 核内转录的

大量 mRNA 在核周围的核糖体内迅速进行翻译, 合成了比周围区域更多的 ACP 和 AKP。生化定量测定结果显示受精卵 ACP 和 AKP 活力高于卵细胞, 尤其是 ACP 活力提高较大, 也说明受精促进了 ACP 和 AKP 基因的表达, 并且随着发育酶活力逐步提高, 与 Murdoch 等(1988)在实厚蛤得到的从受精卵到担轮幼虫 AKP 的活力呈现线形持续增长的结果相似。ACP 活力在囊胚期明显增强达到最高峰, 可能与贻贝胚胎在囊胚期孵化有关, 孵化后的胚胎失去了卵膜的保护, 细胞直接与外界接触, 环境的胁迫促进了 ACP 基因的表达。AKP 活力在担轮幼虫和 D 型面盘幼虫期有较大的提高, 与 Murdoch 等(1988)在实厚蛤得到的担轮幼虫期 AKP 活力迅速提高的结果相似, 其原因可能与幼虫变态及胚壳的形成有关(Beedham, 1958)。

Dyrynda 等(1995)总结了海洋无脊椎动物幼虫的宿主防御机制, 认为包括如下 4 个方面: 幼虫吞噬细胞的吞噬作用, 溶菌酶等抗微生物活性, 细胞溶解因子等细胞毒活性, 次生代谢毒素等化学防御。后 3 个方面可以统一归类为化学防御机制, 但是因化学防御已是一个专用的词汇, 一般是专指像海绵和珊瑚等动物形成的有毒性的次级代谢产物的防御作用(Lindquist, 2002), 因此归类为分子防御系统(Rudneva, 1999)可能更好一些。另外, 活性氧等自由基、抗氧化系统、溶菌酶以外的其他水解酶、氧化酶等也属于分子防御系统的组成部分, 在无脊椎动物早期生活史中发挥重要的防御作用。原生动物、腔肠动物和扁形动物等低等无脊椎动物结构简单, 无血细胞,

只能依靠分子防御系统抵抗外来生物的侵蚀。贝类原肠胚以前的各个发育阶段无吞噬细胞的分化,也只能依靠分子防御系统抵抗外来生物的侵蚀。本研究结果表明,贻贝卵、胚胎及早期幼虫体内存在 ACP 和 AKP 两种水解酶,这两种酶可能在其发育早期抵抗病原生物侵染方面发挥重要作用。

参 考 文 献

- 王继贵, 邓宝爱, 周衍权等, 1996. 临床生化检验. 长沙: 湖南科学技术出版社, 391—400
- 孙虎山, 李光友, 2002. 硒化卡拉胶和酵母葡聚糖对栉孔扇贝血淋巴中两种水解酶活力的影响. 海洋与湖沼, 33(3): 245—249
- 贲长恩, 李叔庚, 王上平等, 2001. 组织化学. 北京: 人民卫生出版社, 427—429
- Beedham G E, 1958. Observation on the mantle of the lamellibranchia. *Quart Micr Sci*, 99: 188—197
- Cheng T C, 1992. Selective induction of release of hydrolases from *Crassostrea virginica* hemocytes by certain bacteria. *J Invertebr Pathol*, 59: 197—200
- Dyrynda E A, Pipe R K, Ratcliffe N A, 1995. Host defence mechanisms in marine invertebrate larvae. *Fish Shellfish Immunol*, 5: 569—580
- Elston R, Leibovitz L, 1980. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oyster, *Crassostrea virginica*. *Can J Fish Aquat Sci*, 37: 964—978
- Lane E, Birkbeck T H, 2000. Species specificity of some bacterial pathogens of bivalve mollusks is correlated with their interaction with bivalve haemocytes. *J Fish Dis*, 23: 275—279
- Lindquist N, 2002. Chemical defense of early life stages of benthic marine invertebrates. *J Chem Ecol*, 28(10): 1987—2000
- Luna-Gonzalez A, Maeda-Martinez A N, Ascencio-Valle F *et al*, 2004. Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol*, 16: 287—294
- Luna-Gonzalez A, Maeda-Martinez A N, Sainz J C *et al*, 2002. Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. *Dis Aquat Organ*, 49: 221—226
- Luna-Gonzalez A, Maeda-Martinez A N, Vargas-Albores F *et al*, 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve mollusks. *Fish Shellfish Immunol*, 15: 275—282
- Murdoch S E, Showman R M, 1988. Temporal and spatial expression of embryonic alkaline phosphatase activity in the surf clam, *Spisula solidissima*. *Cell Differ Dev*, 25(3): 213—221
- Pipe R K, 1999. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *J Histochemical*, 22: 595—603
- Ringwood A H, 1992. Comparative sensitivity of gametes and early developmental stages of a sea urchin species (*Echinometra mathaei*) and a bivalve species (*Isognomon californicum*) during metal exposures. *Arch Environ Contam Toxicol*, 22: 288—295
- Robert R, Gerard A, 1999. Bivalve hatchery technology: The current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquatic Living Resources*, 12: 121—130
- Robert R, Miner P, Nicolas J L, 1996. Mortality control of scallop larvae in the hatchery. *Aquaculture International*, 4: 305—313
- Rudneva I I, 1999. Antioxidant system of Black Sea animals in early development. *Comp Biochem Physiol*, 122(C): 265—271
- Sugumar G, Nakai T, Hirata Y *et al*, 1998. *Vibrio splendidus* biobar II as the causative agent of bacillary necrosis of Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Organ*, 33: 111—118
- Torkildsen L, Coyne R, Samuelsen O B *et al*, 2002. Treatment of the early life stages of scallop (*Pecten maximus*) with antimicrobial agents; searching for an alternative to chloramphenicol. *Aquaculture International*, 10: 399—409

ACID AND ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITY IN MUSSEL *MYTILUS EDULIS* IN EARLY DEVELOPMENT STAGE

SUN Hu-Shan, WANG Yi-Yan, LIANG Jian-Guang, RAN Zhen, ZENG Peng, HAN Qiang

(College of Life Science, Ludong University, Yantai, 264025)

Abstract At present, mollusk immunity for adult animals has been extensively investigated; however, very little is known on the defense mechanisms in early life stages of mollusk. Therefore, acid phosphatase (ACP) and alkaline phosphatase (AKP) in oocyte, embryo, and early larva of mussel *Mytilus edulis* were analyzed by histochemical localization and spectrophotometric methods in this study.

The histochemical localization results show that both ACP and AKP presented positive reactions in oocyte, fertilized egg, embryo, trochophore, and veliger larva of early stage. However, the reactions were weaker in oocyte, the region of nucleus, than in cytoplasm; the positive granules in cytoplasm distributed evenly in bigger size than those in other stages. The positive reaction of ACP in fertilized egg was more intensive than in oocyte; the AKP positive granules in the central region of fertilized egg were larger than those in the surface layer. In cleavage stage, the region of nucleus presented strong positive ACP and AKP reactions, and the positive granules in blastomere were bigger in size and quantity than those of the other. In gastrula and trochophore, the positive ACP and AKP reactions were strong in the surface layer, and also strong in early veliger larva, the margin of mantle, visceral mass, and basal portion of velum.

In addition, the ACP and AKP activities were found in oocyte, embryo and early larva by biochemical methods, in the lowest level in oocyte among all the stages; and during the development stages followed, the enzyme activity levels increased. The activity levels of ACP increased considerably after fertilization, and reached the highest level in the blastula stage. AKP activity was at higher levels in cleavage, trochophore, and early veliger larva stages, highest in the early veliger larva.

Therefore, ACP and AKP are active in the early life stages of mussel *M. edulis* but in significantly different activity levels in different development stages. ACP and AKP may play an important role in preventing pathogens for mussel *M. edulis* in embryo and early larva stages.

Key words *Mytilus edulis*, Development, Embryo, Larva, Acid phosphatase, Alkaline phosphatase