

盐度渐变对杂交鲍免疫因子的影响

时少坤^{1,2}, 王瑞旋¹, 王江勇¹, 姜敬哲¹, 刘广锋¹, 张晗^{1,2}

(1.中国水产科学院南海水产研究所/广东省渔业生态环境重点实验室/农业部南海渔业资源开发利用重点实验室,
广东广州 510300;2.上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

摘要:采用逐渐改变盐度的方法,结合相关免疫酶学测定方法,研究盐度由34渐变至16、22、28、40后,48 h内杂交鲍[皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino, ♀)×日本盘鲍(*H. discus discus* Ino, ♂)]血清超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、碱性磷酸酶(AKP)、溶菌酶(LZM)、抗菌活力(Ua)的变化规律,旨在研究盐度渐变对杂交鲍免疫相关因子的影响。结果显示,盐度28、34(对照)组5种免疫因子变化均不显著。盐度40组,AKP活力极显著低于对照组;CAT活力显著升高,而后逐渐降低,最终显著低于对照组;LZM活力下降后逐渐稳定在一个显著低于对照组的值。盐度22组,AKP活力有下降的趋势,在48 h时显著低于对照组。盐度16组SOD、AKP、LZM、Ua均有下降的趋势,并且在48 h时均显著低于对照组;整个试验过程中,CAT活力均显著低于对照组。结果表明,盐度接近或高于40及接近或低于16将显著影响杂交鲍5种免疫因子的活力,进而影响其免疫力。

关键词:盐度;杂交鲍;免疫因子;抗菌活力

中图分类号:S944.4

文献标识码:A

文章编号:1004-874X(2013)12-0136-04

Effects of salinity change on immune factors of hybrid abalone (*Haliotis discus hannai* Ino)

SHI Shao-kun^{1,2}, WANG Rui-xuan¹, WANG Jiang-yong¹, JIANG Jing-zhe¹, LIU Guang-feng¹, ZHANG Han^{1,2}

(1.South China Sea Fisheries Research Institute, China Academy of Fishery Sciences/Key Lab. of Fishery Ecology
and Environment, Guangdong Province/Key Lab. of South China Sea Fishery Resources Exploitation
& Utilization, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510300, China;
2.College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Hybrid abalones [*Haliotis discus hannai* Ino(♀)×*H. discus discus* Ino(♂)], were exposed to different salinity in their all life, but how immune parameters changed when the salinity changed was still uncertain. In this study, we investigated the changes of serum superoxide dismutase (SOD), alkaline phosphatase (AKP), catalase (CAT), lysozyme (LZM) and bactericidal (Ua) activities when the salinity stepwise changed from 34 to 16, 22, 28, 40 within 48 h. It aimed to study effects of gradient salinity on immune-related factors. The results showed that five immune factors change was not significant at salinity 28, 34 (control group) during the experiment. In salinity 40 group, AKP activity was significantly lower than the control group in all experiment, CAT activity significantly increased at first and then gradually decreased, significantly lower than the control group at last level, LZM activity declined and gradually stayed stable at a significantly lower value than the control group at last. In salinity 22 group, AKP activity had a downward trend, and significantly lower than the control group at 48 h. In salinity 16 group, SOD, AKP, LZM activity and bactericidal activities had a downward trend, significantly lower than the control group at 48 h, CAT vitality was significantly lower than the control group in all detection periods. The results indicated that when the salinity closed to or higher than 40 and closed to or below 16, the activity of serum immune factors even immunity in hybrid abalone were significantly influenced.

Key words: salinity; *Haliotis discus hannai* Ino; immune factors; bactericidal activities

鲍(*Haliotis* sp.)是狭盐性海生软体动物,生活在盐度较高的海域;其营养丰富,味道鲜美,被列为“八珍”之首,在世界多个国家均有人工饲养。过去,在我国作为鲍养殖对象的是分布在黄海、渤海的皱纹盘鲍(*H. discus hannai* Ino)和分布于东南沿海的杂色鲍(*H. diversicolor* Reeve)^[1]。然而,随着鲍养殖规模的不断扩大和集约化生产,以及养殖环境的不断恶化,皱纹盘鲍^[2-3]和杂色鲍^[4-6]相继出现了严重的病害,对鲍养殖业造成了不良影响。杂交鲍[皱纹

盘鲍(*H. discus hannai* Ino, ♀)×日本盘鲍(*H. discus discus* Ino, ♂)]因在增长率、生存、食物转化率和胁迫抗性(如温度和疾病)等方面的优点,受到广大养殖户的普遍欢迎,现已成为我国最广泛的养殖品种^[7]。

免疫因子已被作为重要指标应用于评估环境应激对动物健康状况的影响^[8]。对其他贝类的研究表明,盐度变化影响血淋巴噬菌活力(phagocytic capacity)、呼吸爆发力(respiratory burst)以及免疫酶活性^[9-10]等相關免疫因子。关于鲍的研究表明,温度^[11]、氨氮^[12]、溶解氧^[13]等胁迫显著影响杂色鲍的多项免疫指标,进而对其健康产生不良影响。而关于盐度这一重要环境因子是否影响杂交鲍的免疫因子,以及盐度改变对杂交鲍免疫因子变化规律的影响,国内外尚未见报道。因此,本试验以杂交鲍为材料,通过逐步改变盐度的办法,研究杂交鲍几种重要免疫因子[超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、碱性磷酸酶(AKP)、

收稿日期:2013-04-17

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-48);广东省农业攻关项目(2010B20201014)

作者简介:时少坤(1987-),男,在读硕士生,E-mail:shaokun1717@163.com

——通讯作者:王江勇(1971-),男,博士,研究员,E-mail:wjy104@163.com

溶菌酶(LZM)、抗菌活力(Ua)]对盐度渐变的响应,探讨杂交鲍对不同盐度的免疫调节,了解杂交鲍对盐度的适应情况,以期为鲍的健康养殖及育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

健康杂交鲍 (*H. discus hannai* Ino) 200 只,体长 2.55 (± 0.15) cm、体重 2.15 (± 0.38) g, 2012 年 4 月购自广东省汕尾市粤顺鲍鱼养殖场,网袋装好后,置于带有冰袋的泡沫盒中带回实验室;将鲍在空气中放置一段时间后,暂养于试验室水槽(1 m \times 0.6 m \times 0.5 m)中,暂养 5 d 后开始试验。

1.2 试验用水及管理

暂养期间用水为砂滤海水,盐度 34 (± 0.4),水温 20.1 (± 0.7) °C, pH 值 8.24 (± 0.15),溶解氧 > 6.0 mg/L,持续充气,循环水。暂养期间每天傍晚投喂适量鲍配合饲料,第 2 d 吸出残饵及粪便,并更换约 1/3 的新鲜海水,及时清除死亡鲍个体。试验期间水温、pH 值、溶解氧保持不变。

1.3 试验设计

设 4 个试验组,盐度分别为 16、22、28 和 40,对照组盐度为 34(自然海水)。试验过程中每天改变盐度 3,2 d 后盐度改变至 28 和 40 时作为盐度 28 和 40 试验组;4 d 后盐度改变至 22 时作为盐度 22 试验组;之后,每天以速度为 2 的盐度降低,盐度降至 16 时作为盐度 16 试验组。盐度渐变期间按暂养时的方式管理。每组设 3 个平行,每个平行 10 只鲍,分别养于 50 cm \times 30 cm \times 40 cm 的水族缸(水深约 10 cm)中。低盐海水(盐度 16、22 和 28)用砂滤天然海水与曝气 24 h 的自来水混合配制,高盐(40)海水用过滤天然海水加海水晶(广州市海神水族科技服务公司)混合配制。

至设定盐度后,分别于 1、6、12、24、48 h 取样,每试验组每个重复随机取 2 只鲍,每组每次 6 只。采用割腹足的方法取血。吸水纸吸干鲍腹足表面的水后,用手术刀将鲍腹足轻轻划破,然后用 0.2 mL 移液器吸取伤口溢出的血淋巴,将血淋巴迅速置于预冷的 1.5 mL 离心管中,每只鲍血淋巴为 1 个样,然后加入等体积 PBS 液(pH 值 7.4),混匀,3 000 r/min,4°C 低温离心 10 min, 取上清置于-80°C 超低温冰箱中保存,备用。

1.4 指标测定

SOD、CAT、AKP 活力均采用测定试剂盒(南京建成生物工程研究所生产)检测,并严格按照说明书方法进行,SOD 检测时的最佳取样量为 50 μ L。LZM 和抗菌活力的检测参照 Hultmark 等^[1]的方法,并加以改进;LZM 活力检测以溶壁微球菌(*Micrococcus lysoleikticus*)冻干粉(广东省微生物研究所)为底物,抗菌活力检测以大肠杆菌(*E. coli*,本实验室提供)稀释液为底物。

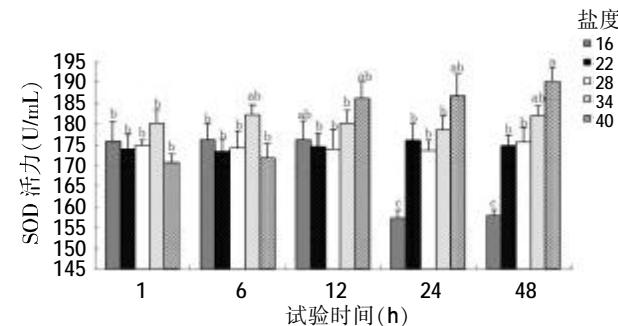
1.5 数据处理

结果用平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,试验数据使用 SPSS17.0 和 Excel 2007 统计分析,用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Duncan's 多重比较法对组间进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 盐度渐变对杂交鲍血清 SOD 活力的影响

由图 1 可知,盐度 22、28 及对照组在整个试验过程中 SOD 活力稳定,各组之间均无显著差异。盐度 16 组 SOD 活力随时间的变化有下降的趋势,12 h 前与对照组均无显著差异,24、48 h 时大幅下降,与对照组均有显著差异。盐度 40 组 SOD 活力逐渐上升,至 48 h 时已显著高于 1 h 和 6 h 时,同一时间点与对照组相比差异均不显著。



小写英文字母不同者表示同一时间点差异显著,图 2-图 5 同
图 1 各试验组杂交鲍血清 SOD 活力

2.2 盐度渐变对杂交鲍血清 CAT 活力的影响

盐度 22、28 和对照组 CAT 活力各组间均无显著差异(图 2)。盐度 16 组各时间点间差异不显著,每一时间点与相对对照组均有显著差异。盐度 40 组 CAT 活力呈下降趋势,最后稳定于较低值,1、6、24 h 和 48 h 分别是相对对照组的 1.9、1.8、0.34、0.25,与对照组均有显著差异。

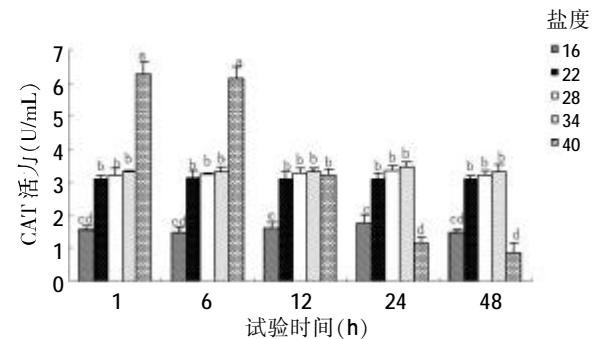


图 2 各试验组杂交鲍血清 CAT 活力

2.3 盐度渐变对杂交鲍血清 AKP 活力的影响

如图 3 所示,盐度 28 组与对照组 AKP 活力在整个试验过程中比较稳定,各组间均无显著差异。盐度 16 组 AKP 活力有下降趋势,1、6 h 和 48 h 分别是相对对照组的 1.2、1.2、0.69 倍,与对照组均有显著差异,12 h 和 24 h 与对照组均无显著差异。盐度 22 组 AKP 活力 48 h 时与对照组有显著差异,其他时间与对照组均无显著差异。盐度 40 组 AKP 活力下降显著,除 12 h 和 24 h 无显著差异外,其他各时间点均有显著差异;与对照组均有显著差异。

2.4 盐度渐变对杂交鲍血清 LZM 活力的影响

由图 4 可知,盐度 22、28 和对照组 3 组之间均无显著差

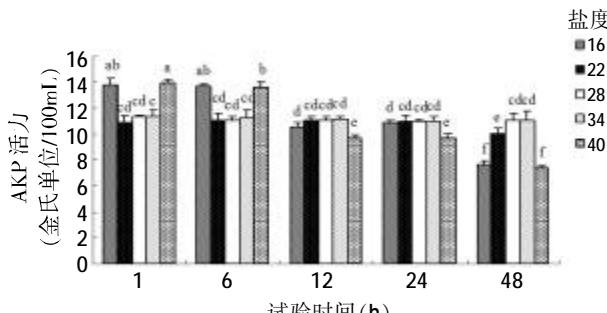


图 3 各试验组杂交鲍血清 AKP 活力

异。盐度 16 组 1、6 h 和 12 h 时与对照组无显著差异, 24、48 h 时下降显著, 与对照组有显著差异; 1、6 h 和 12 h 之间无显著差异, 与 24、48 h 有显著差异, 24 h 和 48 h 差异不显著。盐度 40 组下降显著, 各组与对照组均有显著差异, 1 h 与其他各时间点有显著差异, 其他各时间点无显著差异。

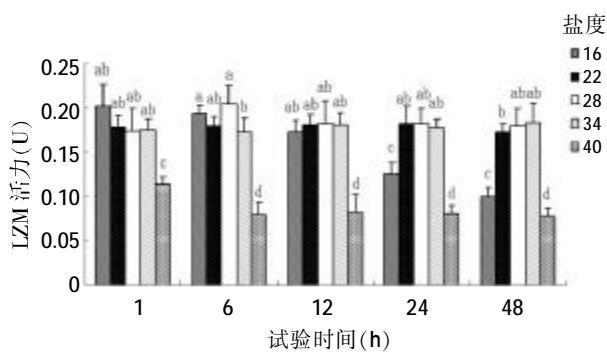


图 4 各试验组杂交鲍血清 LZM 活力

2.5 盐度渐变对杂交鲍血清 Ua 的影响

图 5 结果显示, 盐度 22、28、40 和对照组均无显著差异。盐度 16 组 1、6、12 h 与对照组无显著差异, 24 h 时下降显著, 24 h 与 48 h 时与对照组有显著差异, 24 h 与 48 h 无显著差异。

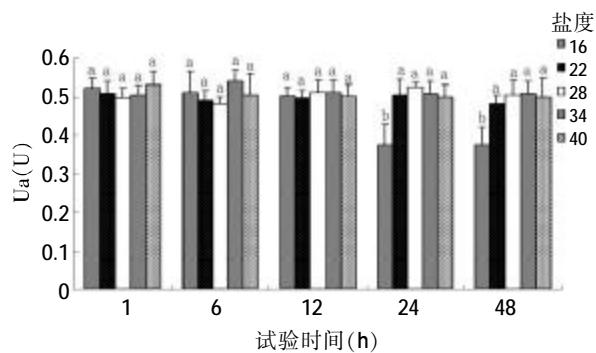


图 5 各试验组杂交鲍血清 Ua 活力

3 结论与讨论

3.1 盐度渐变对鲍血清抗氧化酶体系的影响

SOD 和 CAT 是存在于生物体内的两个重要的抗氧化防御性功能酶^[15], 与生物机体的免疫保护、健康状况、环境应激等相关, 可用来评判机体的非特异性免疫能力^[16]。SOD 与 CAT 具有协同作用^[17], CAT 可将 SOD 生成的产物 H₂O₂ 催化生成水和氧气, 以消除 O²⁻ 等的中间产物对细胞

的毒害^[18]。

本试验结果表明, 盐度 22、28 和 40 组杂交鲍血清的 SOD 活力与对照组无显著差异, 低盐组(盐度 16)在 12 h 之前与对照组无显著差异, 说明渐变条件下, 盐度对杂交鲍 SOD 活力影响不显著; 但 24 h 后盐度 16 组 SOD 活力均显著低于对照组, 这与虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*)^[19] 和栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)^[19] SOD 在受到盐度胁迫后活力下降后逐渐恢复的变化趋势不同, 可见杂交鲍在低盐条件下免疫力较弱, 但在高盐条件下其免疫力可能相对较强, 因为盐度 40 组 SOD 活力有逐渐上升的趋势。CAT 活力的研究表明, 低盐和高盐对杂交鲍血清 CAT 活力影响显著, 这与盐度对中国血蛤 (*Hiatula chinensis*) CAT 影响不显著不同^[20], 这可能与狭盐性的杂交鲍与广盐性的中国血蛤对盐度变化的适应能力有关。低盐条件下 CAT 活力稳定在一个显著小于对照组的水平, 与盐度胁迫条件下许氏平鲉 (*Sebastodes schlegeli*) CAT 活力较低相似^[21], 推测是因为长期的高强度低盐胁迫导致鲍产生“免疫疲劳”, 使 CAT 活力维持在较低水平。高盐条件下 CAT 活力 6 h 时前显著上升, 以保护机体细胞免受氧自由基的伤害, 24 h 和 48 h 时显著低于对照组, 可能与其他发挥抗氧化作用的相互协调有关, 是杂交鲍对高盐的一种适应性调节。

3.2 盐度渐变对鲍血清 AKP 活力的影响

AKP 是生物体内的一种重要的代谢调控酶, 同时也是软体动物溶酶体酶的重要组成部分, 在免疫反应中发挥作用^[22-23], 可清除体内异物。本试验结果表明, 小幅度的盐度变化对杂交鲍血清 AKP 活力影响不显著, 高盐(盐度 40)和低盐(盐度 16)组 AKP 活力在 1 h 和 6 h 时出现一个峰值, 之后显著下降, 与冯娟^[24]等研究的军曹鱼 (*Rachycentron canadum*) 血清中 AKP 活力与盐度呈明显正相关不同, 这可能与两个物种对盐度的免疫调节机制不同有关, 需进一步探讨。盐度变化后短期内鲍血清中 AKP 活力的升高可能是机体对不适条件的应激反应, 但长时间处于盐度胁迫下, 鲍非特异免疫系统受到一定的抑制, 血淋巴中某些机制被破坏或是血细胞自溶后转变成异物而消耗了大量的免疫因子, 导致 AKP 活力下降^[25]。

3.3 盐度渐变对鲍血清 LZM 活力和 Ua 的影响

抗菌、溶菌活力的测定可以作为衡量免疫功能及机体状态的指标^[26]。LZM 是一种碱性蛋白, 能通过溶解细菌细胞壁的肽聚糖, 而使细菌细胞壁破损, 进而细胞崩解^[27]。其活力是反映动物非特异性免疫功能的重要生理指标之一^[28-29]。由本试验结果可以看出, 盐度 16 组在 24 h 之后其 LZM 和抗菌活力均显著低于对照组; 盐度 40 组 LZM 活力均与对照组有差异, 说明杂交鲍在低盐和高盐胁迫下, 机体可能需要支付更多的能量来维持身体渗透压的平衡, 进而使某些生物合成机制被破坏, 导致其 LZM 和抗菌活力的降低; 而相对高盐而言, 鲍在低盐条件下其抗病力更低一些, 这与 Cheng 等^[30]研究的九孔鲍在低盐条件下, 更易感染致病菌而死亡的结果相似。

综上所述, 在盐度渐变条件下, 盐度接近或低于 16、接近或高于 40 对杂交鲍免疫因子影响显著, 进而影响其

免疫防御能力;杂交鲍对低盐的耐受能力更弱一些。本研究提示,在养养殖过程中,应避免盐度低于 22 或高于 40,以免对杂交鲍的养殖造成不利影响。

参考文献:

- [1] 赵洪恩.鲍的增养殖[M].沈阳:沈阳出版社,1999:4.
- [2] 叶林,俞开康,王如才,等.皱纹盘鲍幼鲍溃烂病病原菌的研究[J].中国水产科学,1997,4(4):43-48.
- [3] 李霞,王斌,刘淑范,等.皱纹盘鲍“裂壳病”的病原及组织病理研究[J].水产学报,1998,22(1):61-66.
- [4] 张朝霞,王军,苏永全,等.闽南养殖九孔鲍暴发性流行病的病原研究[J].厦门大学学报(自然科学版),2003,42(3):363-369.
- [5] 刘广锋,周世宁,徐力文,等.杂色鲍幼苗“急性死亡脱落症”病原菌分析[J].中国水产科学,2006,13(4):655-661.
- [6] 王江勇,刘广锋,徐力文,等.杂色鲍幼苗“掉板症”病因的探讨[J].海洋湖沼通报,2008(3):161-167.
- [7] Fabiola Lafarga de la Cruz, Cristian Gallardo-Escarrate. Intraspecies and interspecies hybrids in *Haliotis*: natural and experimental evidence and its impact on abalone aquaculture[J]. Aquaculture, 2011, 3(2):74-99.
- [8] 王瑞芳,庄平,冯广朋,等.盐度升高对中华绒螯蟹几种非特异性免疫因子的影响[J].水产学报,2012,36(4):546-552.
- [9] 刘美剑,常亚青,杨芸菲,等.盐度渐变对虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)免疫指标的影响[J].中国农业科技导报,2011,13(3):129-135.
- [10] Marco M, Valerio M, Maria G M. Combined effects of temperature and salinity on functional responses of haemocytes and survival in air of the clam *Ruditapes philippinarum*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 30(4-5):1024-1030.
- [11] Cheng Winton, Hsiao I-Shan, Hsu Chih-Hung, et al. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 17(3):235-243.
- [12] Cheng Winton, Hsiao I-Shan, Hsu Chih-Hung, et al. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 17(3):193-202.
- [13] Cheng Winton, Hsiao I-Shan, Hsu Chih-Hung, et al. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio*
- [14] parahaemolyticus[J]. Aquaculture, 2004, 232(1/2/3/4):103-115.
- [15] Hultmark D. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* [J]. Insect Immune, 1974(10): 136-145.
- [16] 陈昌生,王淑红,纪德华,等.氯氮对九孔鲍过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活力的影响[J].上海海洋大学学报,2001,10(3):218-222.
- [17] 孔祥会,王桂忠,艾春香,等.锯缘青蟹不同器官组织中总抗氧化能力和 SOD 活性的比较研究[J].台湾海峡,2003,22(4):469-474.
- [18] 李桂峰,钱沛峰,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.
- [19] 马洪明,刘晓伟,麦康森,等.盐度突降对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)抗病力指标的影响[J].高技术通讯,2006,16(7):746-751.
- [20] 王帅,高如承,温扬敏,等.盐度突变对中国血蛤非特异性免疫酶活性的影响[J].江苏农业科学,2008(5):213-215.
- [21] 王晓杰,张秀梅,李文涛.盐度胁迫对许氏平鲉血液免疫酶活力的影响[J].海洋水产研究,2005,26(6):17-21.
- [22] 周永灿,潘金培.贝类细胞和体液的防御机制研究进展[J].水产学报,1997,21(4):49-54.
- [23] 陈竞春,石安静.贝类免疫生物学研究概况[J].水生生物学报,1996,20(1):74-78.
- [24] 冯娟,徐力文,林黑着,等.盐度变化对军曹鱼稚鱼相关免疫因子及其生长的影响[J].中国水产科学,2007,14(1):120-126.
- [25] 刘树清,江晓路,牟海津,等.免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物的作用[J].海洋与湖沼,1999,30(3):278-283.
- [26] 王江勇,郭志勋,冯娟,等.杂色鲍血细胞免疫特点及免疫功能的研究[J].热带海洋学报,2010,29(3):71-76.
- [27] 刘志鸿,牟海津,王清印.软体动物免疫相关酶研究进展[J].海洋水产研究,2003,24(3):82-96.
- [28] 付媛媛,李健,陈萍,等.黄芩苷增强中国对虾组织免疫和解毒代谢能力[J].渔业科学进展,2011,32(4):102-111.
- [29] Nilsen I W, Myrnes B, Edvar Dsen R B, et al. Urochordates carry multiple genes for goose-type lysozyme and no genes for chicken- or invertebrate-type lysozymes [J]. Cell Mol Life Sci, 2003,60(10):2210-2218.
- [30] Cheng W, Juang F M, Chen J C. The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004,16(3):295-306.

(上接第 135 页)

- [7] 黄锦炉,汪开毓,姜婷婷,等.嗜水气单胞菌部分生物学特性的研究[J].2010,25(6):506-510.
- [8] 吴中明,王欢,敖弟书,等.大鲵的迟钝爱德华菌感染[J].遵义医学院学报,2007,30(4):464-466.
- [9] 耿毅,汪开毓,李成伟,等.蛙病毒感染致养殖大鲵大规模死亡的电镜观察及 PCR 检测[J].中国兽医学报,2010,40(8):817-821.
- [10] Geng Y, Wang K Y, Zhou Z Y, et al. First report of a ranavirus associated with morbidity and mortality in fanned Chinese giant salamanders (*Andrias davidianus*) [J]. J Comp Pathol, 2010,145:95-102.

- [11] 江育林,张曼,景宏丽,等.患病中国大鲵中分离到一株虹彩病毒及其特性的研究[J].病毒学报,2011,27(3):274-282.
- [12] 高正勇,曾令兵,肖汉兵,等.大鲵虹彩病毒理化及生物学特性研究[J].淡水渔业,2012,42(5):17-21.
- [13] 周勇,曾令兵,孟彦,等.大鲵虹彩病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].中国兽医学报,2012,36(5):772-778.
- [14] 徐景峨,余波,文正常,等.大鲵致病性嗜水气单胞菌的分离鉴定与药敏试验[J].畜牧与兽医,2010,42(3):56-58.
- [15] 余波,徐景峨,谭诗文,等.大鲵细菌性败血症病原的分离鉴定与药敏特性[J].中国兽医杂志,2011,47(1):30-31.