

环境因子和免疫刺激对香港牡蛎免疫指标的影响

王佳雯^{1,2}, 卢洁², 姚托², 叶灵通², 王江勇³

(1. 天津农学院水产学院, 天津 300384; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所/农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300; 3. 惠州学院, 广东 惠州 516007)

摘要: 病害问题已严重威胁香港牡蛎 (*Crassostrea hongkongensis*) 养殖业的发展, 寻找适用于香港牡蛎健康评价的生物标志物, 对预防其病害具有重要的实用价值。该研究以盐度胁迫、氨氮胁迫、免疫刺激以及干露胁迫为实验条件, 研究不同因素胁迫下香港牡蛎肝胰腺中免疫因子的变化情况, 以期找出 1~2 个香港牡蛎对环境因子变化敏感的免疫指标。结果显示, 过氧化氢酶 (CAT) 活性在低盐 (盐度 3) 和高盐 (盐度 30) 胁迫下均显著上升 ($P<0.05$), 高盐胁迫还导致超氧化物歧化酶 (SOD) 和一氧化氮合酶 (NOS) 活性显著升高 ($P<0.05$)。高浓度氨氮 ($60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 胁迫导致 CAT 活性显著降低 ($P<0.05$), 而酸性磷酸酶 (ACP) 和 SOD 活性在高浓度和低浓度氨氮 ($6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 胁迫下均显著升高 ($P<0.05$)。哈维弧菌 (*Vibrio harveyi*) 和脂多糖刺激均显著抑制 CAT 活性 ($P<0.05$)。此外, CAT 活性在 4 和 25 °C 干露条件下随胁迫时间增加, 呈下降、上升再下降的显著变化趋势 ($P<0.05$)。因此, 香港牡蛎肝胰腺中 CAT 对环境变化的敏感程度优于其他免疫指标, 可能是香港牡蛎健康相关的评价指标。

关键词: 香港牡蛎; 环境因子胁迫; 抗氧化酶; 免疫指标

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Effects of environmental factors and external stimulus on immune indexes of *Crassostrea hongkongensis*

WANG Jiawen^{1,2}, LU Jie², YAO Tuo², YE Lingtong², WANG Jiangyong³

(1. College of Fisheries, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384; 2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300, China; 3. Huizhou University, Huizhou 516007, China)

Abstract: Disease problems have seriously threatened the development of *Crassostrea hongkongensis* aquaculture. Thus, finding suitable biomarkers for *C. hongkongensis* health assessment is important for preventing *C. hongkongensis* diseases. We investigated the effects of salinity stress, ammonia stress, immune stimulation and air exposure stress on the immune indexes of *C. hongkongensis*. The results show that the CAT activity increased significantly under both low-salt (Salinity 3) and high-salinity (Salinity 30) stress ($P<0.05$). High-salt stress also increased SOD and NOS activities significantly ($P<0.05$). The stress of high concentration of

收稿日期: 2021-01-30; 修回日期: 2021-03-19

资助项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”专项 (2019YFD0900105); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (2017YB22); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系资助; 中国水产科学研究院创新团队项目 (2020TD42, 2021SD05); 天津市水产生态及养殖重点实验室开放基金 (TJAE201807); 惠州学院教授、博士启动项目 (2020JB065); 2020 年省级乡村振兴战略专项资金 (渔业产业发展) (粤财农〔2020〕4); 广东省贝藻类产业技术体系 (2021KJ146)

作者简介: 王佳雯 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为渔业生物病害。E-mail: 798468880@qq.com

通信作者: 卢洁 (1987—), 男, 博士, 助理研究员, 从事渔业生物病害研究。E-mail: lujie@scsfi.ac.com

王江勇 (1971—), 男, 博士, 研究员, 从事渔业生物病害研究。E-mail: wjy104@163.com

ammonia nitrogen ($60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) caused a significant decrease in the CAT activity ($P < 0.05$), while the activities of ACP and SOD increased significantly under both high and low concentration of ammonia nitrogen ($6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) stress ($P < 0.05$). Both *Vibrio harveyi* and lipopolysaccharide stimulation inhibited the CAT activity significantly ($P < 0.05$). In addition, the CAT activity during air-exposure stress at 4 and 25 °C showed a significant decreasing trend ($P < 0.05$). Therefore, CAT is more sensitive to environmental changes than other immunological indicators, which may be a health-related evaluation index of *C. hongkongensis*.

Key words: *Crassostrea hongkongensis*; Environmental stress; Antioxidant enzymes; Immune indexes

环境胁迫会影响贝类代谢及能量收支平衡,使免疫相关酶活性下降,降低机体免疫防御能力,影响贝类的生长和存活^[1-2]。氨氮是贝类蛋白质代谢的分解产物,当养殖水体中亚硝酸盐浓度过高时,容易对水生动物体内的酶起到催化作用。氨氮常以离子氨和非离子氨的形式存在于水体中,非离子氨具有脂溶性能够穿过细胞膜^[3],因此还会影响细胞膜的稳定性,使贝类生长受到抑制^[4]。盐度是影响水生动物生理代谢、分布等的重要环境因子之一^[5]。贝类能适应一定的盐度范围,并根据盐度的高低来调节自身渗透压,从而保持正常的生长繁殖,若超出适应范围,则会影响其正常的生理代谢^[6]。弧菌是普遍存在的海洋细菌^[7],水产养殖中危害最大的细菌性疾病是由弧菌属细菌引起的^[8],其胞外产物是主要的致病因子^[9]。脂多糖(LPS)是革兰氏阴性细菌细胞壁的组成部分,具有免疫调节作用,是贝类非特异性免疫的重要激活剂^[10],可激活巨噬细胞活性增强机体吞噬能力。干露会影响贝类生长代谢,离开水体后,贝类的呼吸功能受到抑制^[11],长期暴露在空气中会导致贝类氧化应激^[12],甚至死亡。与其他不利环境条件一样,干露可引起活性氧(Reactive oxygen species, ROS)过量,造成脂质和蛋白质氧化,导致各种疾病的发生^[13-14],还会影响细胞内免疫相关酶活性的变化。

中国是世界水产养殖第一大国,2019年贝类总产量约 $1\,439 \times 10^4 \text{ t}$,其中牡蛎产量居贝类总产量之首,约 $522 \times 10^4 \text{ t}$ ^[15]。香港牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)主要分布在长江以南^[16],是我国南方海域重要的养殖品种,其含有丰富的蛋白质,肉味鲜美,具有较高的医药价值^[17-18]。香港牡蛎在我国牡蛎养殖业中占有重要地位^[16],是两广地区牡蛎养殖中最主要的种类。在养殖或运输过程中,降雨干旱导致的生理环境急剧变化,长时间的空气暴露和温度波动等均会使牡蛎受到多种环境压力。急性的物理应激会影响牡蛎的免疫功能,造成免疫酶活性降低,进而导致其成活率下降,这是牡蛎大规模

死亡的原因之一^[19-20]。

研究证实,盐度^[21]、氨氮^[22]的改变,干露状态^[23]及弧菌感染^[24]等应激刺激会引起贝类体内代谢发生重要变化,对其免疫指标产生显著影响。免疫相关酶活性是评估环境应激下贝类健康状态的重要指标^[25],可反映贝类氧化应激水平的免疫反应,对于了解贝类的健康状况及其对外界环境的适应性具有重要意义。为探究环境因子胁迫对香港牡蛎免疫指标的影响,本研究采用氨氮、干露、盐度胁迫和弧菌感染香港牡蛎,测定了各种胁迫条件下香港牡蛎肝胰腺组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、碱性磷酸酶(AKP)、酸性磷酸酶(ACP)、总抗氧化能力(T-AOC)、一氧化氮合酶(NOS)、过氧化物酶(POD)活性与丙二醛(MDA)含量的变化,旨在找出香港牡蛎对环境因子变化敏感的1~2个免疫指标,揭示香港牡蛎在适应环境因子胁迫过程中免疫指标的变化规律,监测香港牡蛎的生态健康养殖,为其养殖推广提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用香港牡蛎购于广州市黄沙水产市场,实验个体为同一环境条件下养殖的牡蛎,体质量为 $(115.18 \pm 16.45) \text{ g}$ 。实验在中国水产科学研究院南海水产研究所进行。实验前牡蛎在水族缸暂养1周,暂养温度为 $(25 \pm 1) \text{ }^{\circ}\text{C}$,盐度为20,氨氮质量浓度低于 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,pH为 8.1 ± 0.1 ,暂养期间连续充气,每天定时投饵、换水。

1.2 实验方法

1.2.1 氨氮胁迫实验设计 通过预实验,在确定香港牡蛎96 h氨氮胁迫半致死浓度为 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的基础上,设置 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (对照组)、 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (低氨氮组)和 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (高氨氮组)3个浓度梯度。向各实验组添加氯化铵(NH_4Cl),使水体氨氮终浓度与实验设置浓度相同。每隔8 h使用E-1456水质分析

仪(德国 Dechem-Tech.GmbH 公司)检测各水体的氨氮浓度,将其调整为实验设计的氨氮浓度。每个浓度设3个平行,每组15只香港牡蛎,进行24 h的胁迫实验。所有组的水温、盐度、充气量等养殖条件均与暂养期间相同。

1.2.2 盐度胁迫实验设计 实验设置3个盐度梯度^[26],其中盐度20为对照组,盐度30为高盐组,盐度3为低盐组,每个盐度均设3个平行,每个平行15只香港牡蛎。实验水体由自来水加海水晶混匀调制,实验前水体均充分曝气。牡蛎在盐度胁迫后的72 h随机取样。所有组的水温、pH、充气量等养殖条件均与暂养期间相同。

1.2.3 免疫感染实验设计 实验设置哈维弧菌(*Vibrio harveyi*)组、LPS组、对照组,对照组注射无菌养殖海水50 μL ,实验组分别注射50 μL 哈维弧菌($10^7 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)菌液和LPS($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)溶液,进行24 h感染实验。每组均设3个平行,每个平行15只香港牡蛎。所有组的水温、pH、充气量等养殖条件均与暂养期间相同。

1.2.4 干露胁迫实验设计 将香港牡蛎分别置于25和4 $^{\circ}\text{C}$ 下干露处理7 d,并在第0、第1、第3、第5和第7天取样。2个温度均设3个平行,每个平行50只香港牡蛎。温度25和4 $^{\circ}\text{C}$ 分别由培养箱和冰箱控制。

1.3 样品采集与保存

4个胁迫实验均采用同一方法取样,即从每个平行中随机取出3只香港牡蛎,每组共9只,分离出肝胰腺,液氮速冻后于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存待用。

1.4 指标测定

1.4.1 样品处理 将所取样品与匀浆介质(0.86%的生理盐水)以质量:体积=1:9($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)比例在冰水浴条件下机械匀浆,制备成10%的组织匀浆。之后2500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液进行相关免疫指标测定。免疫酶活的测定均采用南京建成科技有限公司生产的试剂盒,实验操作均按照试剂盒说明书进行。

1.4.2 ACP和AKP活性测定 以微量酶标法测定ACP(货号A060-2)和AKP(A059-2)活性,ACP和AKP分解磷酸苯二钠,产生游离酚和磷酸,酚在碱性溶液中与4-氨基安替吡啉作用经铁氰化钾氧化生成红色醌衍生物,根据红色深浅可以测定酶活性的高低。

1.4.3 MDA含量测定 用硫代巴比妥酸法

(TBA法)测定MDA含量(A003-1),过氧化脂质降解产物中的MDA可与TBA缩合,形成红色产物,在532 nm处有最大吸收峰,可计算出MDA含量。

1.4.4 SOD活性测定 以羟胺法测定SOD活性(A001-3),通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生 $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{O}_2^-$ 与羟胺反应产物经显色剂作用呈紫红色,而SOD对 $\cdot\text{O}_2^-$ 专一性抑制,利用实验组与对照组的吸光值差异,即可计算出样品的SOD活性。

1.4.5 T-AOC活性测定 以微板法(ABTS法)测定T-AOC(A015-1-1),2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)在适当的氧化剂作用下氧化成绿色的 ABTS^+ ,在抗氧化物存在时, ABTS^+ 的产生会被抑制,在405或734 nm处测定 ABTS^+ 的吸光度即可测定比计算出样品T-AOC。

1.4.6 CAT活性测定 以可见光法测定CAT活性(A007-1-1),CAT分解过氧化氢(H_2O_2)的反应可通过加入钼酸铵而迅速中止,剩余的 H_2O_2 与钼酸铵作用产生一种淡黄色的络合物,通过A-5082 TACAN酶标仪(奥地利 Tecan 有限公司)在405 nm处测定其生成量,可计算出CAT的活性。

1.4.7 NOS活性测定 以比色法测定NOS活性(A014-2),NOS催化L-Arg和分子氧反应生成一氧化氮(NO),NO与亲核性物质生成有色化合物,在530 nm波长下测定吸光度,根据吸光度的大小可计算出NOS活性。

1.4.8 POD活性测定 以比色法测定POD活性(A084-1-1),利用POD催化 H_2O_2 反应的原理,通过测定420 nm处吸光度单独变化得出其酶活性。

1.5 数据分析

采用SPSS 20.0软件对免疫指标进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。组间差异采用Duncan's多重比较分析, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 氨氮胁迫下香港牡蛎肝胰腺中免疫酶活性的变化

方差分析表明氨氮胁迫对香港牡蛎ACP活性具有显著影响(图1-a),高浓度组和低浓度组中香港牡蛎ACP活性均显著高于对照组($P<0.05$),SOD活性与ACP活性变化一致(图1-d)。对照组MDA显著高于低氨氮组($P<0.05$,图1-c)。POD活性随氨氮浓度升高而降低(图1-h),T-AOC也有相似的变化趋势(图1-e),但均无显著差异($P>$

0.05)。此外, CAT 活性随氨氮浓度的增加而下降, 高浓度氨氮组 CAT 活性显著低于对照组 ($P<0.05$, 图 1-f)。

2.2 盐度胁迫下香港牡蛎肝胰腺中免疫酶活性的变化

在不同盐度的环境中, 香港牡蛎肝胰腺中 ACP、AKP、T-AOC 和 POD 活性及 MDA 含量均无显著变化 ($P>0.05$, 图 2)。在高盐度胁迫下, SOD 活性显著高于对照组 ($P<0.05$, 图 2-d), 高盐度也显著诱导 NOS 活性上升 ($P<0.05$, 图 2-g)。与其他

酶活相比, 无论是在低盐度还是高盐度中, 实验组 CAT 活性均显著高于对照组 ($P<0.05$, 图 2-f)。

2.3 免疫感染后香港牡蛎肝胰腺免疫酶活性的变化

ACP、SOD 活性及 MDA 含量在 2 种免疫刺激过程中均无显著变化 (图 3)。LPS 组的 AKP 活性显著高于哈维弧菌组 ($P<0.05$, 图 3-b)。哈维弧菌免疫感染组 T-AOC 活性显著低于对照组和 LPS 组 ($P<0.05$, 图 3-e), LPS 组 NOS 活性显著高于对照组和哈维弧菌组 ($P<0.05$, 图 3-g)。此外, 2 种免

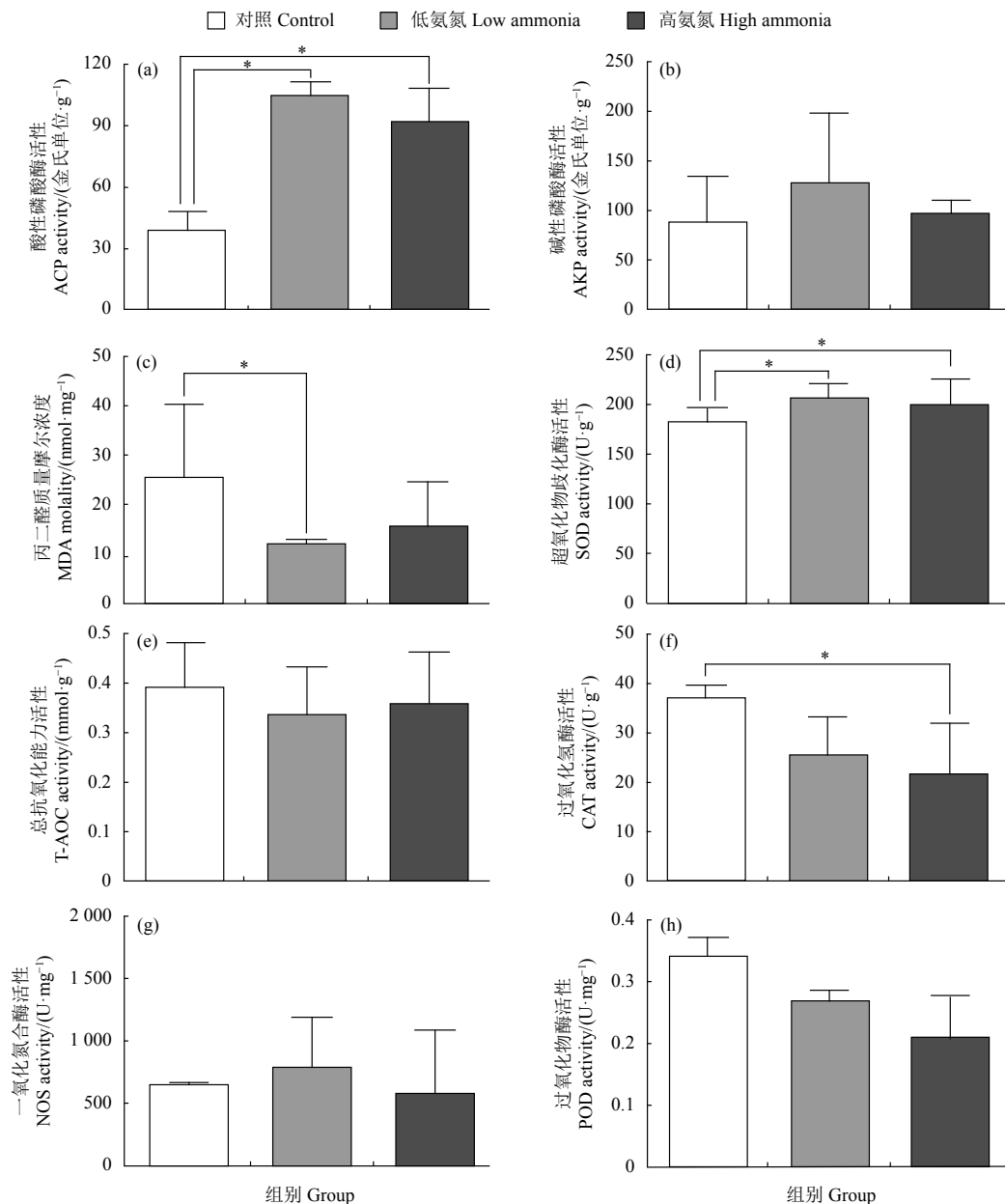


图1 氨氮胁迫对香港牡蛎肝胰腺免疫酶活性的影响

*. 实验组和对照组在胁迫后同一时间点的显著差异 ($P<0.05$), 图 2、图 3 同此

Figure 1 Effects of ammonia stress on immune enzyme activity in hepatopancreas of *C. hongkongensis*

*. Significant difference between experimental group and the control group at the same time ($P<0.05$). The same case in Figure 2 and Figure 3.

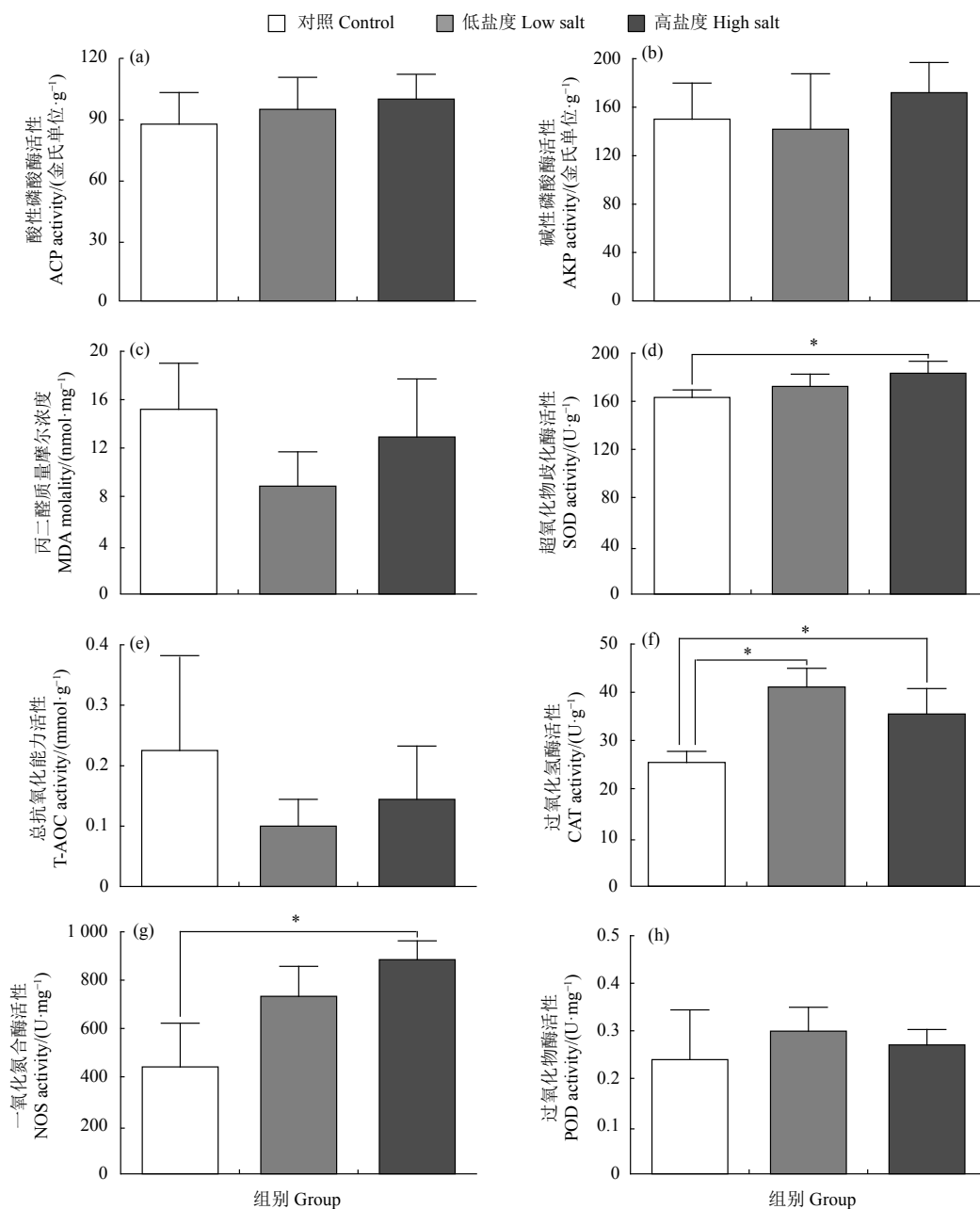


图2 盐度胁迫对香港牡蛎肝胰腺中免疫酶活性的影响

Figure 2 Effects of salinity stress on immune enzyme activity in hepatopancreas of *C. hongkongensis*

疫刺激均显著降低了香港牡蛎肝胰腺组织中 CAT 活性 ($P<0.05$, 图 3-f)。对照组 POD 活性均高于 2 个实验组, 且显著高于 LPS 组 ($P<0.05$, 图 3-h)。

2.4 干露条件下香港牡蛎肝胰腺中 CAT 活性的变化

干露实验前后, 香港牡蛎肝胰腺中 CAT 活性有显著差异, 即干露初期 (0 d) 与干露后期 (7 d) 相比显著下降 ($P<0.05$)。25 ℃ 干露第 3 天, CAT 活性显著低于干露第 0 和第 5 天 ($P<0.05$, 图 4-a)。温度为 4 ℃, 随着干露时间持续, CAT 活性有显著差异 (图 4-b)。香港牡蛎肝胰腺中 CAT 活性在第 1 和第 7 天时显著低于干露初期 ($P<0.05$), 在

第 3 天, 与干露第 7 天相比 CAT 活性又有显著上升 ($P<0.05$)。

3 讨论

代谢过程中, 环境胁迫导致生物机体的生理环境发生变化, 使其体内自由基数量增加。自由基可以通过各种还原反应保护有机体, 但过量则造成机体损害, 导致组织损伤^[27]。抗氧化酶 (T-AOC、CAT、SOD) 参与机体对自由基的初级抗氧化保护, 这些酶在免疫应答和代谢过程中产生, 以防止脂肪酸氧化, 减少 ROS 对机体的毒性作用, 并保

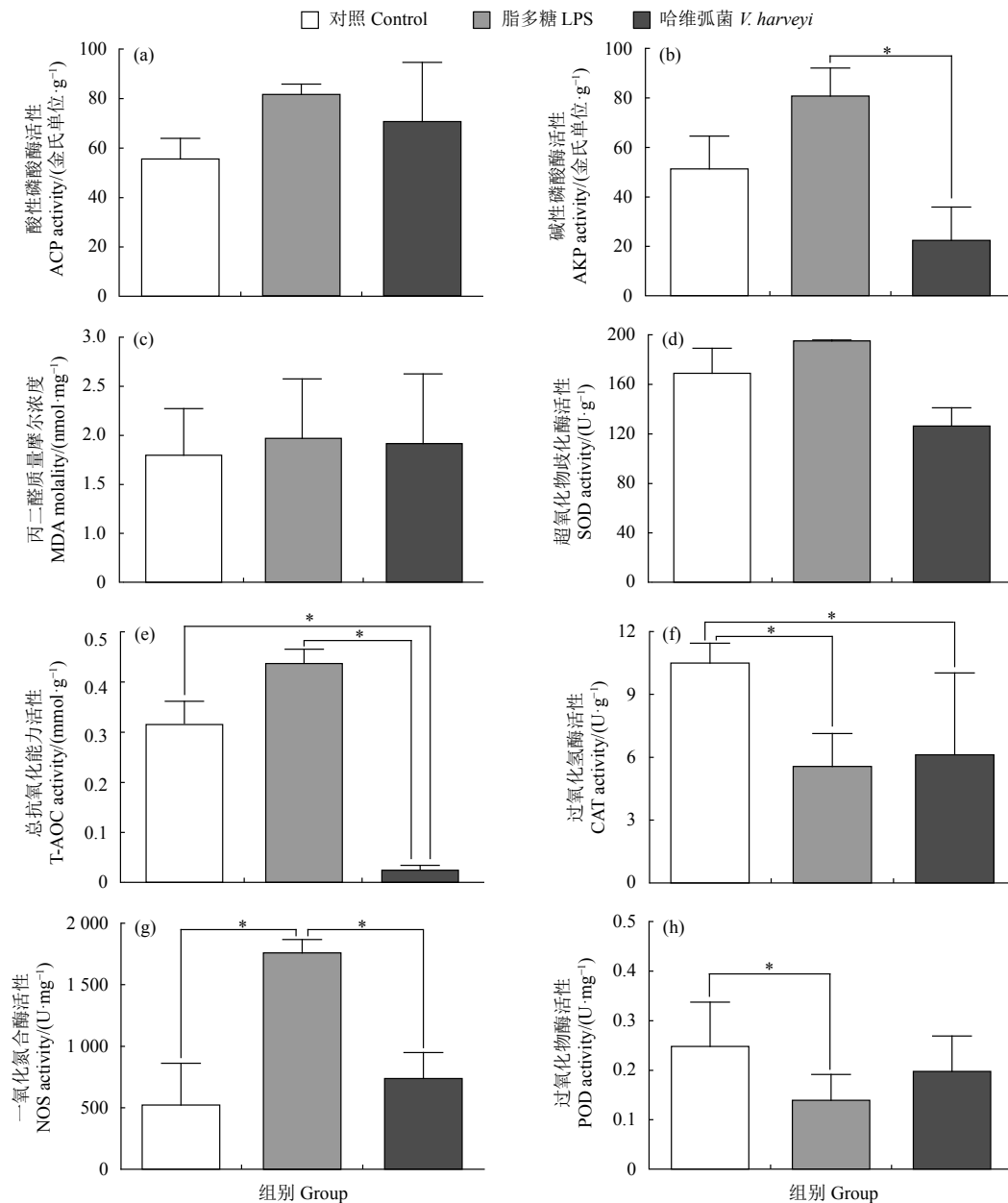


图3 免疫刺激对香港牡蛎肝胰腺中免疫酶活性的影响

Figure 3 Effects of immune stimulation on immune enzyme activity in hepatopancreas of *C. hongkongensis*

护生物体免受氧化损伤^[28]。

贝类因缺乏获得性免疫系统,其防御机制主要依赖于先天免疫反应。ACP 和 AKP 均为水生动物中重要的溶酶体酶,既可参与非特异性免疫作用^[29],也可参与各种代谢过程,如解毒、代谢、大分子生物合成等。本研究中各种浓度氨氮均诱导了 ACP 活性显著升高 ($P<0.05$)。研究发现,短期内的氨氮胁迫会诱导中华小长臂虾 (*Palaemonetes sinensis*) 体内 ACP 活性显著上升^[30]。栗志民等^[22]报道在低浓度氨氮 ($1.25\sim 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 条件下,马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 血清中 ACP 活性随氨氮浓度的

增加而升高,从而有效提高了机体的抗病力和免疫力,这与本实验结果一致;但在高浓度氨氮 ($20\sim 40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 下,马氏珠母贝的 ACP 活性随氨氮浓度增加而急剧下降,这与本研究中高浓度氨氮组的变化有所不同。原因可能是本实验的采样时间点 (24 h) 与前者 (72 h) 不同,短时间的氨氮胁迫不会使香港牡蛎出现免疫疲劳,故未观察到下降趋势。因此,肝胰腺中 ACP 活性增加可能是香港牡蛎为维持自身酸碱平衡和离子平衡而通过去磷酸化应激反应来主动调节和适应短期氨氮胁迫的结果。AKP 是非特异性磷酸单酯酶,主要作用于细胞跨膜运输

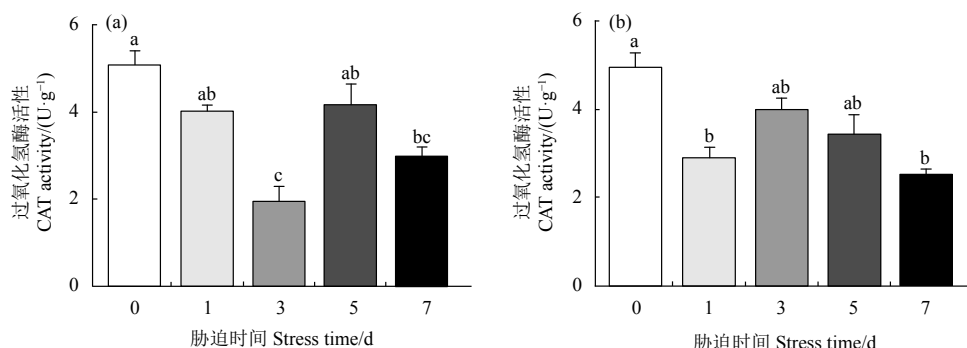


图4 25 °C (a) 和4 °C (b) 干露条件对香港牡蛎肝胰腺中免疫酶活性的影响

不同小写字母代表各时间点实验组间存在显著差异 ($P < 0.05$)

Figure 4 Effects of air exposure conditions at 25 °C (a) and 4 °C (b) on immune enzyme activity in hepatopancreas of *C. hongkongensis*

Different lowercase letters indicate significant difference between the experimental groups at different time ($P < 0.05$).

过程,是所有动物细胞所固有的质膜酶,但在氨氮、盐度及免疫刺激下,牡蛎肝胰腺组织中 AKP 活性变化均不显著。王帅等^[31]研究表明低盐胁迫对中国血蛤 (*Hiatula chinensis*) AKP 的影响不显著。本研究中,可能是由于过大的环境压力致使香港牡蛎的 AKP 活性受到抑制,而诱导需要一定的反应时间,也可能是由于机体免疫系统受到了严重损害。

MDA 含量可以反映机体的脂质过氧化速率和强度,也能间接反映组织过氧化损伤程度,是反映机体抗氧化潜在能力的重要参数。氨氮胁迫下香港牡蛎体内 MDA 含量显著下降 ($P < 0.05$),SOD 活性显著上升。本研究结果与 Florence 等^[32]报道的金属对紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 和长牡蛎 (*C. gigas*) 脂质过氧化影响的结果相似,这可能是因为包括 SOD 在内的体内抗氧化酶体系增强,限制了 MDA 的生成。

SOD 广泛存在于机体中,可以将 $\cdot\text{O}_2^-$ 转化为 O_2 和 H_2O_2 ,在机体氧化应激反应中起重要作用。本研究中,低氨氮组和高氨氮组 SOD 活性均呈现显著诱导作用 ($P < 0.05$),与方斑东风螺 (*Babylonia areolata*)^[33]的研究结果相似;在盐度胁迫下,高盐度组牡蛎肝胰腺中的 SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$),这与马氏珠母贝^[22]的研究结果一致。因此,SOD 活性升高可能是因为氨氮或盐度等环境胁迫因子使牡蛎体内 $\cdot\text{O}_2^-$ 生成增加,进而诱导了牡蛎自身机体的免疫防御机制,使 SOD 活性显著上调,催化 $\cdot\text{O}_2^-$ 发生歧化反应以保持体内抗氧化系统的动态平衡。

T-AOC 主要用于清除体内过量的 ROS,从而

保护机体免受损害,是反映机体总抗氧化能力的重要综合性指标。在感染哈维弧菌后,香港牡蛎肝胰腺的 T-AOC 活性显著下降 ($P < 0.05$)。研究发现,金属蛋白酶的胁迫会使大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) T-AOC 活性显著降低^[34]。金属蛋白酶属于毒力因子,有较强致病性,哈维弧菌中也存在该蛋白酶。由此推测,哈维弧菌中金属蛋白酶的胁迫使得香港牡蛎体内积累了过量的 ROS,导致其肝胰腺中 T-AOC 活性受到抑制,进而抑制了香港牡蛎机体的抗氧化系统。

NOS 催化 L-精氨酸合成 NO,NO 具有强大的免疫调节作用,参与机体免疫调控^[35]。在高盐度胁迫下,NOS 活性显著升高 ($P < 0.05$)。与对照组相比,LPS 组的 NOS 活性也显著升高 ($P < 0.05$)。LPS 可诱导炎症因子并通过 NF- κB 等转录途径激活大量基因,实现机体的免疫应答^[36]。Shen 等^[37]研究表明 LPS 可诱导细胞中 NOS 的表达和 NO 的产生,能够刺激细胞中的 NF- κB 通路。蒋秋芬^[38]对贝类 NO 系统研究发现,在 LPS 刺激下 NOS 活性与 NO 含量显著升高,进一步证实了 NO 系统参与贝类的免疫防御过程。因此,本研究中 NOS 在被诱导后合成大量的 NO,参与到 LPS 诱发的免疫防御调节。

POD 作为一种抗氧化酶,可以催化 H_2O_2 和其他底物反应,消耗 H_2O_2 ,在机体氧化应激条件下发挥重要作用。本研究中,LPS 明显抑制了 POD 活性 ($P < 0.05$),而哈维弧菌组却无显著变化。Saleem 等^[39]发现牡蛎具有识别不同微生物抗原的能力,且能作出不同的机体反应,原因可能是香港牡蛎在分别注射 LPS 和哈维弧菌后免疫酶活性存在差

异。在盐度胁迫下, POD 活性较其他抗氧化酶敏感性较低, 这一结果与 Liu 等^[40]的相似。

不同于 POD, CAT 主要催化 H_2O_2 转化为 H_2O , 从而达到消耗 H_2O_2 的目的^[41], 保持体内代谢平衡。本研究表明, 氨氮胁迫和免疫刺激均使 CAT 活性下降, 但盐度胁迫导致 CAT 活性上升。随着氨氮浓度的增加, 香港牡蛎 SOD 和 ACP 活性呈升高趋势, 高氨氮组 CAT 活性显著降低 ($P<0.05$), 对方斑东风螺^[33]的研究也有相似结果, 这可能是由于氨氮浓度上升, 使机体大量产生 $\cdot\text{O}_2^-$ 等超氧化产物, 诱导 SOD 活性升高将其转化为 O_2 和 H_2O_2 , 但 $\cdot\text{O}_2^-$ 对机体也存在抑制作用, 大量 $\cdot\text{O}_2^-$ 使 CAT 活性难以升高甚至降低; 金属蛋白酶具有抑制大菱鲆血清 CAT 活性的作用^[34], 这与本研究中哈维弧菌感染实验的结果一致, 原因可能是蛋白酶破坏了香港牡蛎体内的免疫系统, 并诱导 ROS 在体内积累使 CAT 活性下降。LPS 也可以导致 ROS 的产生, 从而诱导炎症和氧化应激。本研究中 LPS 诱导的 ROS 含量超过了机体的耐受程度, 因未能及时清除使得 CAT 活性降低。在盐度胁迫下, 实验组中 CAT 活性均显著高于对照组 ($P<0.05$)。李庭古^[42]研究指出, 盐度会影响虾蟹类的渗透压, 虾蟹类主要通过改变代谢状况来适应不同的盐度环境。本实验与上述研究结果相似, 在渗透压主动调节过程中, 需要排出多余的盐分或水分来调节渗透压。此外, 当机体内外存在较高渗透压梯度时, 呼吸器官首先受到损伤, 诱导细胞内氧自由基含量增加, 这时需要更多的 CAT 来减少氧自由基对机体造成的损害。

通过上述 3 个胁迫实验, 可以推测香港牡蛎在受到环境因子胁迫时, CAT 可能适合作为环境监测的潜在生物标记物。为了验证这一个假设, 本研究检测了不同温度与不同时间点干露胁迫下香港牡蛎肝胰腺中 CAT 活性的变化, 发现长时间干露胁迫会降低香港牡蛎的非特异性免疫力, 使 CAT 活性发生显著变化, 这与 Cui 等^[23]对白仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) 的研究结果类似。从本实验结果可以看出 2 个温度的干露胁迫 CAT 活性均呈下降、恢复、再下降趋势, 虽然大体变化趋势相近, 但存在时间上的差异变化。在 4 °C 干露实验组中, 由于温度骤变使 CAT 活性在第 1 天显著降低; 25 °C 干露实验组在第 3 天 CAT 活性才显著降低, 原因可能是当机体处于不利环境因素条件下,

体内抗氧化酶活性受到限制。表明极端温度的干露胁迫对香港牡蛎机体的损伤程度更高, 因为 25 °C 是香港牡蛎适宜生存的温度, 即使是在干露条件下其体内酶活性也并未从开始就剧烈变化, 而是有一个延缓的趋势。不利因素在时间的加持下逐渐激发体内的抗氧化应激系统, 致使 CAT 活性上升。4 °C 实验组第 3 与第 7 天相比 CAT 活性差异显著, 25 °C 实验组第 3 天 CAT 活性显著高于第 5 天。随着时间延长, 牡蛎体内自由基的清除速率不及产生速率, 致使自由基大量积累, 破坏了体内抗氧化系统的动态平衡, 导致 CAT 活性下降。这可能是 7 d 干露后 CAT 活性比 0 d 显著降低的主要原因。CAT 活性在不同温度与时间的干露胁迫下表现出敏感性, 验证了 CAT 适合作为环境监测的潜在生物标记物这一观点。

4 结论

本研究表明, 抗氧化酶是香港牡蛎在外界因子胁迫下一种敏感的生理指标。环境因子胁迫会增加体内的自由基含量, 刺激机体产生抗氧化防御反应, 而自由基在体内积累过度会产生毒害作用。由此得出结论, 香港牡蛎肝胰腺的 CAT 适合作为监测环境因子胁迫的潜在生物标记物, 用于监测环境因子胁迫下香港牡蛎的氧化应激反应。

参考文献:

- [1] 时少坤. 环境因子对贝类几种免疫因子影响的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013: 48-50.
- [2] 陈慕雁, 杨红生. 贝类生态免疫研究进展 [M]. 北京: 科学出版社, 2007: 140-152.
- [3] QIU L, SHI X, YU S, et al. Changes of ammonia-metabolizing enzyme activity and gene expression of two strains in shrimp *Litopenaeus vannamei* under ammonia stress[J]. Front Physiol, 2018, 9: 211.
- [4] 张焕, 宋国斌, 齐晓陆, 等. pH 和氨氮对魁蚶稚贝生长与存活的影响 [J]. 中国农业信息, 2013(13): 139-140.
- [5] NORDLIE F G. Influences of body mass, temperature, oxygen tension, and salinity on respiratory oxygen consumption of cypripinodontoid fishes of three families[J]. Rev Fish Biol Fish, 2014, 24(1): 269-315.
- [6] 李敏, 郑伊诺, 许凯伦, 等. 盐度胁迫对泥蚶存活率及 3 种酶活力的影响 [J]. 浙江农业科学, 2018, 59(4): 650-657.
- [7] ROUX F L, WEGNER K M, POLZ M F, et al. Oysters and vibrios as a model for disease dynamics in wild animals[J]. Trends Microbiol, 2016, 24(7): 568-580.
- [8] 梁箫, 张亚, 刘钰珠, 等. 灿烂弧菌对厚壳贻贝免疫指标和消化

- 酶活性的影响[J]. 水产学报, 2018, 42(9): 1438-1445.
- [9] 沈锦玉, 李新华, 潘晓艺, 等. 哈维氏弧菌的主要致病因子及其特性分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2011, 37(2): 142-148.
- [10] 徐翊轩, 战文斌, 邢婧. 温度与脂多糖对栉孔扇贝血细胞吞噬活力的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2015, 45(6): 31-38.
- [11] 段海宝, 茆双, 杜楠, 等. 干露胁迫对青蛤呼吸代谢及抗氧化相关酶活力的影响[J]. 海洋科学, 2020, 44(3): 42-49.
- [12] GU Z F, WEI H J, CHENG F, et al. Effects of air exposure time and temperature on physiological energetics and oxidative stress of winged pearl oyster (*Pteria penguin*)[J]. Aquacult Rep, 2020, 17(4): 384-392.
- [13] ZHOU J L, WANG Y X, WANG W N, et al. Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. J Therm Biol, 2010, 35(6): 284-289.
- [14] TANIA Z, SALDIerna R, AHUEJOTE-SANDOVAL M. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp[J]. Comp Biochem Phys C, 2006, 142(3/4): 301-308.
- [15] 农业农村部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴 2020[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 17.
- [16] 张跃环, 王昭萍, 闫喜武, 等. 香港巨牡蛎与长牡蛎间杂交及早期杂种优势分析[J]. 水产学报, 2012, 36(9): 1358-1366.
- [17] 秦艳平, 张跃环, 周颖力, 等. CB 与 6-DMAP 诱导香港牡蛎三倍体的效果比较[J]. 水产学报, 2017, 41(2): 250-257.
- [18] 陈惠源, 蔡俊鹏. 牡蛎的营养药用价值及其开发利用[J]. 中药材, 2005, 28(3): 172-174.
- [19] GAGNAIRE B, FROUIN H, MOREAU K, et al. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 20(4): 536-547.
- [20] MALHAM S K, COTTER E, O'KEEFFE S, et al. Summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: the influence of temperature and nutrients on health and survival[J]. Aquaculture, 2009, 287(1/2): 128-138.
- [21] 余智彩, 贾真, 彭业韶, 等. 盐度胁迫对香港牡蛎部分生化指标的影响[J]. 海洋科学, 2019, 43(3): 40-45.
- [22] 栗志民, 申玉春, 王淑敏, 等. 氨氮胁迫对马氏珠母贝免疫活性的影响[J]. 广东海洋大学学报, 2011, 31(4): 52-57.
- [23] CUI Y, HOU Z, REN Y, et al. Effects of aerial exposure on oxidative stress, antioxidant and non-specific immune responses of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* under low temperature[J]. Fish Shellfish Immunol, 2020, 101(6): 58-65.
- [24] 何婷婷. 哈维氏弧菌胁迫下不同规格皱纹盘鲍和绿盘鲍免疫应答研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2018: 53-57.
- [25] 姜妮妮. 扇贝和皱纹盘鲍对温度变化的生理响应研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2017: 8-9.
- [26] 时少坤, 王瑞旋, 王江勇, 等. 盐度胁迫对近江牡蛎几种免疫因子的影响[J]. 南方水产科学, 2013, 9(3): 26-30.
- [27] 董莎莎, 聂鸿涛, 闫喜武. 贝类低温胁迫响应机制研究进展[J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(3): 457-462.
- [28] YANG C, HAO R, DENG Y, et al. Effects of protein sources on growth, immunity and antioxidant capacity of juvenile pearl oyster *Pinctada fucata martensii*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2017, 67(8): 411-418.
- [29] LIANG S, LUO X, YOU W, et al. The role of hybridization in improving the immune response and thermal tolerance of abalone[J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 39(1): 69-77.
- [30] 包杰, 姜宏波, 程慧, 等. 氨氮对中华小长臂虾的急性毒性及非特异性免疫指标的影响[J]. 水生生物学报, 2017, 41(3): 516-522.
- [31] 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.
- [32] FLORENCE G, AGNÈS J, VINCENT T, et al. Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*)[J]. Aquat Living Resour, 2002, 15(1): 61-66.
- [33] 谭春明, 赵旺, 吴开畅, 等. 氨氮胁迫对方斑东风螺六种免疫酶活性的影响[J]. 海洋科学, 2019, 43(4): 8-15.
- [34] 李杜文, 华智杰, 张文香, 等. 金属蛋白酶对大菱鲆血清抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响[J]. 海洋科学, 2019, 43(4): 52-60.
- [35] 张亚. 一氧化氮在厚壳贻贝变态发育和免疫中的作用研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018: 3-5.
- [36] 熊训浩, 谢莉萍, 张荣庆. LPS 和 IL-2 对合浦珠母贝血细胞 INOS 活性的影响[J]. 科技导报, 2007, 25(13): 45-48.
- [37] SHEN S, YU S, BINEK J, et al. Distinct signaling pathways for induction of type II NOS by IFN γ and LPS in BV-2 microglial cells[J]. Neurochem Int, 2005, 47(4): 298-307.
- [38] 蒋秋芬. 贝类 NO 系统及其在神经内分泌免疫调节网络中的作用机制研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2013: 74-77.
- [39] SALEEM A, SHAM V N, DAVID A R. Induction of phenoloxidase and other immunological activities in Sydney rock oysters challenged with microbial pathogen-associate molecular patterns[J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23(6): 1196-1208.
- [40] LIU W, ZHANG C, LIU S. Effects of phthalate ester treatment on seed germination and antioxidant enzyme activities of *Phaseolus radiatus* L.[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2014, 92(5): 621-624.
- [41] 杜俊俏, 刁晓平, 郑鹏飞, 等. 砒暴露对马氏珠母贝鳃和肝胰腺抗氧化酶活性的影响[J]. 生态环境学报, 2013, 22(10): 1711-1716.
- [42] 李庭古. 盐度对克氏原螯虾幼虾生长的影响[J]. 水产科学, 2009, 28(8): 465-467.