

不同种海胆体腔细胞类型及体液中的酶活力

丁 君^{1,2}, 常亚青², 王长海¹, 李海芳², 于亚男², 曹学彬²

(1. 大连理工大学 环境与生命学院 生物科学与工程系, 辽宁 大连 116024; 2. 大连水产学院 农业部海洋水产增养殖学与生物技术重点开放实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要:以中国主要经济海胆马粪海胆(*Hemicentrotus Pulcherrimus*)、虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)、光棘球海胆(*Strongylocentrotus nuda*)、紫海胆(*Anthracidaris crassispina*)以及杂交种海胆—马粪海胆(♀)×虾夷马粪海胆(♂)、虾夷马粪海胆(♀)×光棘球海胆(♂)、马粪海胆(♀)×紫海胆(♂)和紫海胆(♀)×光棘球海胆(♂)为对象,进行海胆的血细胞及体液中酶活力的研究。结果表明,海胆血细胞可分为4类,分别为色素细胞、纤毛游走细胞、变形吞噬细胞和无色球形细胞,比例分别为4.56%—10.96%、9.69%—12.18%、76.40%—85.36%和0.35%—1.03%;海胆血细胞体外有凝聚和吞噬现象。不同种海胆体液中酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)、超氧化物歧化酶(SOD)和溶菌酶(LSZ)的酶活力测定结果显示,紫海胆血清中各种酶的活性都较高,其中碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶活性在6种海胆中都是最高的,分别为2.871 U/mg和182.149 U/mL。马粪海胆(♀)×虾夷马粪海胆(♂)的溶菌酶活性最高,为0.085 U/mL;虾夷马粪海胆(♀)×光棘球海胆(♂)的酸性磷酸酶活性最高,为1.070 U/mg,但差异均不显著($P>0.05$)。[中国水产科学, 2006, 13(1): 33—38]

关键词:海胆;体腔细胞;酶活力

中图分类号:Q959.268 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)01-0033-06

随着海胆养殖规模的不断扩大及养殖环境污染的日趋严重,海胆病害问题受到关注,同时,从抗生素药物的安全性、抗药性和对水环境的不良影响等方面考虑,研究海胆的免疫机制以及有效提高其本身抗病能力的方法,越来越受到各国研究者的重视。

目前,关于海洋无脊椎动物细胞及体液免疫的研究主要集中在软体动物和甲壳动物中。在软体动物中,血细胞是机体防御反应的主要作用因素,软体动物的体液免疫是非特异性的血淋巴中的一些酶及调节因子,如溶菌酶、葡萄糖苷酶、凝集素等^[1]。Cheney^[2]将瓣鳃纲软体动物的血细胞分为8类,认为吞噬是软体动物一种重要的防御机制。甲壳动物的免疫防御功能主要依赖于血细胞的吞噬、包掩等细胞免疫反应,但对血细胞的分类及各自的功能尚无定论,甲壳动物的体液免疫主要是血淋巴中的一些酶和调节因子,如酚氧化酶原激活系统、溶血素、凝集素、溶菌酶、蛋白酶抑制剂等^[3]。

有关海胆免疫学方面的研究报道相对较少, Edds^[4]通过对紫海胆的体腔液进行蔗糖密度梯度

离心,将海胆的体腔液细胞进行了分类;李霞等^[5]研究了虾夷马粪海胆体腔细胞的类型和功能。国内至今还未见到有关海胆体液免疫方面的报道。本研究选取中国4种主要经济海胆及其杂交海胆为对象,研究其体腔细胞类型及体液中的酶活力。其目的是通过测定杂交海胆与亲本海胆体腔液中各类细胞的数量及各类酶的活性,研究海胆的免疫机制,为有效提高其本身的抗病能力探寻理论依据;同时比较亲本海胆与杂交海胆的免疫活性,明确杂交海胆是否在细胞或体液免疫活性方面优于亲本对照海胆(杂交海胆在生长方面已表现出生长优势),为杂交海胆的大规模养殖提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用亲海胆取自大连市凌水养殖厂,杂交海胆及亲本海胆的苗种生产和培育均在农业部海洋水产增养殖学与生物技术实验室活体室进行,实验期间沙滤海水流水培育,饵料为新鲜海带(*Laminaria*

收稿日期:2005-01-24; 修订日期:2005-06-01。

基金项目:国家“863”计划资助项目(2002AA628170);农业部海洋水产增养殖学与生物技术重点实验室开放课题资助项目(K2003-08)。

作者简介:丁 君(1973-),女,博士生,从事海洋生物技术研究。Jdkg1119@vip.sina.com

通讯作者:常亚青。E-mail: yqchang@dlfu.edu.cn

japonica)和石斑(*Ulva pertusa*),水温控制在16~17℃。实验用海胆均为2龄海胆,平均壳径为:虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*) 37.19 mm、马粪海胆(*Hemicentrotus Pulcherrimus*) 32.84 mm、紫海胆(*Anthocardia crassispina*) 32.89 mm、光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*) 38.21 mm、马粪海胆(♀)×虾夷马粪海胆(♂)(以下简称H·S海胆) 31.43 mm、虾夷马粪海胆(♀)×光棘球海胆(♂)(以下简称S·S海胆) 38.14 mm、马粪海胆(♀)×紫海胆(♂)(以下简称H·A海胆) 48.20 mm和紫海胆(♀)×光棘球海胆(♂)(以下简称A·S海胆) 42.07 mm。实验时间为2004年5~6月。

1.2 方法

1.2.1 体腔细胞分类计数与凝聚现象观察 用1 mL灭菌注射器从海胆围口膜处斜插入海胆体腔内,吸取体腔液滴于干净载玻片上,麦克奥迪-生物显微镜下观察海胆体腔液中的各类细胞并拍照。用血球计数板常规计数方法记录相关细胞数;同时,显微镜下观察海胆体腔细胞的凝聚现象并拍照。

1.2.2 体腔细胞体外吞噬功能的观察 取海胆体腔液于2 000 r/min离心10 min,取上清液调干酵母2 h后1 000 r/min离心10 min,弃上清。用无菌海水将沉淀部分配制成0.25 mg/mL的悬液备用,将酵母悬液400 μL与等量无菌海水加入无菌试管中,再加入用1:1无菌海水稀释的海胆体腔液,混匀,显微镜下观察、拍照。

1.2.3 海胆血清的收集 用1 mL灭菌注射器(4℃预冷)从海胆围口膜处斜插入海胆的体腔内,吸取体腔液加入到5 mL离心管中(4℃预冷),冷冻离心机3 000 r/min离心10 min,取上清,移入2 mL冻存管中超低温冰箱-70℃保存,用于酶活力测定。

1.2.4 海胆血清中酶活力的测定

(1)酸性磷酸酶(ACP)与碱性磷酸酶(ALP)活性:采用磷酸苯二钠法。酶活单位定义为每100 mL血清在37℃与基质作用60 min,产生1 mg酚者为1金氏单位^[6]。

(2)超氧化物歧化酶(SOD)活性:采用连苯三酚自氧化法,以每毫升反应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。

酶活力(U/mL) =

$$\left(\frac{0.06 - A_{525nm}/min}{0.06} \times 100\% \right) / 50\% \times \frac{V_{总}}{V_{样}} \times n^{[7]}$$

式中, $V_{总}$ 为反应液总体积, $V_{样}$ 为样品体积, n 为稀释倍数。

(3)溶菌酶(LSZ)活力:以溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)为底物,溶菌活力 $U = (A_0 - A)/A_0^{[8]}$

每种酶的测定选用30个海胆个体。

2 结果

2.1 体腔细胞分类及计数

海胆体腔细胞类型见图1。

根据观察结果,将海胆体腔细胞分为4种类型即:色素细胞、纤毛游走细胞、变形吞噬细胞和无色球形细胞。

色素细胞,细胞呈红色,内有大量红色色素颗粒,直径为 $(8.10 \pm 0.3) \mu m$ 。

纤毛游走细胞,细胞膜表面布满纤毛,直径为 $(6.79 \pm 0.2) \mu m$,以旋转的方式作快速运动。

变形吞噬细胞,形状不定,能伸出伪足(图1),运动缓慢,直径为 $(7.46 \pm 0.2) \mu m$,细胞内有颗粒物。

无色球形细胞,无色透明,圆形或椭圆形,长径为 $(12.29 \pm 0.5) \mu m$,数量较少。

不同种海胆体腔细胞数量及比例见表1。

从表1中可知,变形吞噬细胞在不同种海胆体腔液中所占的比例都最大,为76.4%~85.3%,其次为纤毛游走细胞、色素细胞和无色球形细胞。不同种海胆中同类细胞的比例也不同,但差异均不显著($P > 0.05$)。

2.2 变形吞噬细胞吞噬酵母过程及细胞凝聚现象

图2显示变形吞噬细胞吞噬酵母的过程。吞噬细胞先靠近酵母细胞(图2中发亮的白色颗粒)(a),伸出伪足逐渐包围酵母细胞(b),然后细胞膜融合将酵母细胞包入其中(c),吞噬后,有些变形吞噬细胞会破裂,一个变形吞噬细胞可吞噬多个酵母细胞。

海胆离体的体腔细胞有明显的凝聚现象,表现为大量变形吞噬细胞聚团,发生凝聚的细胞少则3~5个,多则几十个,肉眼即可见凝聚的细胞团。在凝聚过程中,首先是变形吞噬细胞伸出细长的突起(伪足),彼此勾连,随后,突起部分缩短变粗,将细胞拉拢,积聚在一起,凝聚的细胞团中可见大量色素细胞及少量游走细胞,凝聚块中的色素细胞会破裂,色素颗粒释放到周围的体腔液中,将其染成深色。离体后体腔细胞发生凝聚反应的速度与温度有关,温度越高凝聚反应越快,用4℃无菌海水1:4(体积比)稀释体腔液,凝聚反应速度将明显减慢。

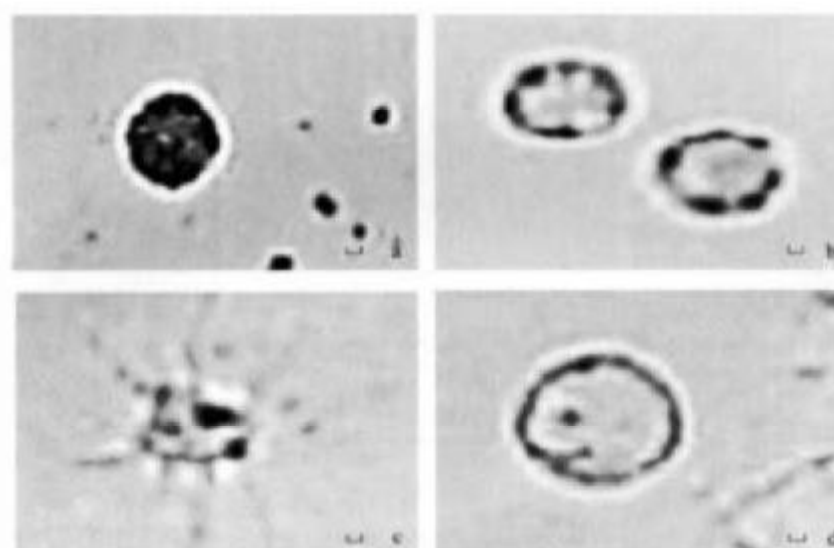
bar = 1 μm

图1 海胆体腔细胞类型

a: 色素细胞; b: 纤毛游走细胞; c: 变形吞噬细胞; d: 无色球形细胞;

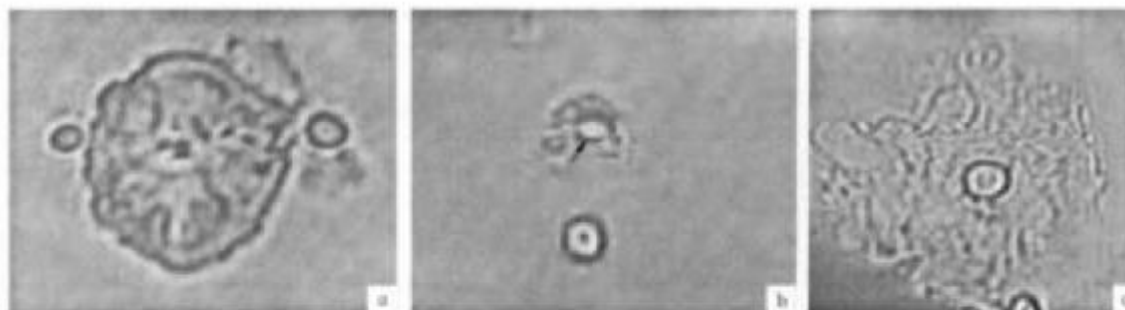
Fig.1 Coelomocyte type of coelomic fluid in sea urchins

a: Pigment cells; b: Vibratile cells; c: Amoeboid phagocytes; d: Colorless spherule cell

表1 不同种海胆体腔细胞数量及比例

Tab.1 Cell number and proportion of coelomic fluid in sea urchins

海 胆 Sea urchin	色素细胞 Pigment cell		纤毛游走细胞 Vibratile cell		变形吞噬细胞 Amoeboid phagocytes		无色球形细胞 Colorless spherule cell	
	$\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$	%	$\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$	%	$\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$	%	$\times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$	%
虾夷马粪海胆 <i>S. intermedius</i>	5.45	8.23	6.71	10.12	53.41	80.62	0.68	1.03
马粪海胆 <i>H. pulcherrimus</i>	4.50	4.56	9.58	9.72	84.17	85.36	0.35	0.35
紫海胆 <i>A. crassispina</i>	9.00	10.76	9.50	11.35	64.58	77.18	0.59	0.71
光棘球海胆 <i>S. nudus</i>	7.92	9.69	7.92	9.69	65.42	80.10	0.42	0.51
H·S海胆 <i>H. Pulcherrimus</i> $\times$ <i>S. intermedius</i>	5.00	6.45	9.17	11.83	62.92	81.18	0.42	0.54
S·S海胆 <i>S. intermedius</i> $\times$ <i>S. nudus</i>	8.25	10.96	9.17	12.18	57.50	76.40	0.35	0.46
H·A海胆 <i>H. Pulcherrimus</i> $\times$ <i>A. crassispina</i>	7.15	7.57	9.72	10.30	77.14	81.75	0.36	0.38
A·S海胆 <i>A. crassispina</i> $\times$ <i>S. nudus</i>	7.50	8.26	9.58	10.56	73.33	80.80	0.35	0.38

图2 海胆吞噬细胞吞噬酵母过程($\times 400$)

a: 吞噬细胞趋近酵母; b: 吞噬细胞包围酵母; c: 吞噬细胞吞入酵母

Fig.2 Amoeboid phagocytes of sea urchin phagocytize yeast ($\times 400$)

a: The amoeboid phagocytes approach yeast; b: The amoeboid phagocytes envelop yeast; c: The amoeboid phagocytes englobe yeast

2.3 酶活力

表2列出了6种海胆血清中酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)、超氧化物歧化酶(SOD)和溶菌酶(LSZ)的酶活力。

从表2中可以看出,不同种海胆体腔液中的酶

活力之间存在差异。综合分析,紫海胆血清中4种酶的活性都较高,H·S海胆的溶菌酶,S·S海胆的酸性磷酸酶活性是所测6种海胆中最高的,但不同种海胆间各种酶的活性差异均不显著($P>0.05$)。其他几种杂交海胆因数量不足,不作统计比较。

表2 不同种海胆体腔液中酶活力测定结果

Tab.2 Enzymatic activities of coelomic fluid in different sea urchins

 $\bar{X} \pm SE$

海胆 Sea urchin	ACP/(U·mg ⁻¹)	ALP/(U·mg ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	LSZ/(U·mL ⁻¹)
虾夷马粪海胆 <i>Strongylocentrotus intermedius</i>	0.917 ± 0.231	1.362 ± 0.331	113.202 ± 10.221	0.057 ± 0.013
马粪海胆 <i>Hemicentrotus Pulcherrimus</i>	0.993 ± 0.251	1.157 ± 0.284	144.820 ± 9.658	0.069 ± 0.019
紫海胆 <i>Anthodidaris crassispina</i>	1.014 ± 0.248	2.871 ± 0.947	182.149 ± 13.528	0.080 ± 0.024
光棘球海胆 <i>Strongylocentrotus nudus</i>	0.826 ± 0.332	0.869 ± 0.255	155.762 ± 19.236	0.045 ± 0.010
H·S海胆 <i>H. Pulcherrimus</i> × <i>S. intermedius</i>	0.873 ± 0.211	1.195 ± 0.213	166.710 ± 18.547	0.085 ± 0.014
S·S海胆 <i>S. intermedius</i> × <i>S. nudus</i>	1.070 ± 0.233	1.275 ± 0.391	109.213 ± 12.123	0.071 ± 0.021

3 讨论

3.1 海胆免疫细胞种类及功能

Edds^[4]将紫海胆体腔液中的细胞按密度由大到小分为:红色球形细胞(red spherule cells)、无色球形细胞(colorless spherule cells)、纤毛细胞(vibratile cells)、低、高密度噬菌细胞(low/high density phagocytes);李霞等^[5]认为,海胆含有两类体腔细胞即变形吞噬细胞和色素细胞。

将海胆体腔中的细胞按形态和功能分为4类,与Edds通过蔗糖密度梯度离心得到的结论基本一致,李霞等在实验中未发现无色球形细胞。本实验中发现无色球形细胞,但数量较少,比例在1%以下。李霞等认为在海胆体腔液中具鞭毛和淀粉核,运动速度极快的细胞是一种纤毛类的原生动物,本研究发现在海胆体腔液中具纤毛,能做快速旋转运动的细胞不止一种,有的还具一根或两根明显的鞭毛,怀疑为原生动物。本实验仅将不具鞭毛,周身具

细密纤毛,大小一致,数量大且恒定的一类定为纤毛游走细胞进行分类统计。实验发现几种海胆的体腔细胞数量及比例差异不显著。

研究中发现海胆体腔中的变形吞噬细胞具有软体动物和甲壳类吞噬细胞相似的结构特点和功能,能够吞噬酵母细胞,离体的变形细胞能发生凝集反应,因此认为,变形吞噬细胞是海胆的免疫细胞之一。另外,李霞等通过色素细胞释放色素颗粒实验发现,色素细胞释放的色素颗粒能覆盖创面防止细菌进一步入侵,因此认为色素细胞也是起免疫防御作用的细胞^[5]。纤毛游走细胞和无色球形细胞的功能目前还不清楚。

在海胆的体腔液中还发现过一些原生动物^[5],一些患病海胆体腔液存在大量寄生虫而未见任何细胞,原生动物或寄生虫可能是通过受损伤的管足经水管系统进入体腔液中的,而海胆的管足经常会受到损伤,少量外界环境物质进入也可使海胆体腔液的组成与酶的含量受到一定的影响,这也可能是不同研究者所观测的海胆体腔液细胞类型、比例和酶活力结果不同的原因之一。

3.2 海胆的体液免疫因子

水解酶类是无脊椎动物中重要的非特异性免疫手段,包括磷酸酶和溶菌酶等。在栉孔扇贝的血清、血细胞和肝脏提取液中均发现有酸性磷酸酶的活性。碱性磷酸酶常见于运输活跃的质膜上,可通过改变细菌表面的结构而增强其异己性,起调理素的作用,同时对软体动物贝壳的形成有重要的作用。溶菌酶存在于血细胞或由血细胞释放到血清,它不仅可使病原体细胞壁溶解,还能部分或全部抑制其存活或正常发育。超氧化物歧化酶是广泛存在于需氧和耐氧生物体各组织中的重要抗氧化酶,能作为活性氧清除剂参与清除体内自由基 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 ,以消除 $O_2^{\cdot-}$ 等的中间产物对细胞的毒害,并能够增强吞噬细胞的防御能力和机体的免疫功能^[9]。

刘树青等^[10]报道了中国对虾(*Penaeus chinensis*)中ALP、LSZ和ACP的作用(实验采用方法与本实验相同),检测得到中国对虾ACP平均活性为5.5 U/mg,ALP平均活性为1.0 U/mg,LSZ的平均活性为0.20 U/mL。牟海津等^[11]在研究免疫多糖对栉孔扇

贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响时(实验方法与本实验相同),检测得到栉孔扇贝血清中ACP平均活性为0.37 U/mg,ALP平均活性为0.5 U/mg,SOD的平均活性为13.4 U/mL,本实验测得的不同种海胆血清中ACP的活性低于对虾而高于栉孔扇贝;ALP的活性稍高于对虾,均是栉孔扇贝的2倍;SOD的活性远高于栉孔扇贝;LSZ的活性为对虾的1/2~1/3。

实验中所测各种海胆的酶活性差异均不显著,但紫海胆体液中各种酶的活性均较高,这与紫海胆在繁殖季节中不易发病这一现象相符。在以后的实验中将进一步探讨免疫多糖及细菌对不同种海胆免疫功能的影响。

参考文献:

- [1] 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):449-452.
- [2] Chenery D P. A summary of invertebrate leucocyte morphology with emphasis on blood elements of the manila clam, *Tapes amurensis* [J]. Biol Bull, 1971, 140 (3):353-368.
- [3] 徐海圣,徐步进. 甲壳动物细胞及体液免疫机理的研究进展[J]. 大连水产学院学报,2001,16(1):50-55.
- [4] Edds K T. Cytobiology of echinoid coelomocytes. I. Diversity and characterization of cell types[J]. J Invert Pathol, 1993, 61: 173-178.
- [5] 李霞,王斌,刘静,等. 虾夷马粪海胆体腔细胞的类型及功能[J]. 中国水产科学,2003,10(5):381-385.
- [6] 宋善俊. 临床医师手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1991. 185-200.
- [7] 邓碧玉,袁勤生,李文杰. 改良得连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法[J]. 生物化学与生物物理进展,1991, 18(2):163.
- [8] 王雷,李光友,毛远兴,等. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J]. 海洋与湖沼,1994,25(5):486-481.
- [9] 孙虎山,李光友. 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[J]. 海洋与湖沼,2000,31(3): 259-265.
- [10] 刘树青,江晓路,牟海津. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用[J]. 海洋与湖沼,1999,30(3): 278-283.
- [11] 牟海津,江晓路,刘树青,等. 免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 青岛海洋大学学报,1999,29(3):463-468.

Coelomocyte types and enzyme activities of coelomic fluid in sea urchins

DING Jun^{1,2}, CHANG Ya-qing², WANG Chang-hai¹, LI Hai-fang², YU Ya-nan², CAO Xue-bin²

(1. Department of Biotechnology, School of Environment & Biological Science & Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China; 2. Dalian Fisheries University, Key Laboratory of Mariculture and Biotechnology, Ministry of Agriculture, Dalian 116023, China)

Abstract: With the enlargement of cultural areas and the seriousness of pollution in cultural environment, the problems of sea urchins disease have drawn much attention. More and more immunity mechanism were studied to improve the disease resistance of sea urchin. Coelomocyte types and enzyme activities of coelomic fluid in important economic sea urchins and hybridization sea urchins such as *Hemicentrotus Pulcherrimus*, *Strongylocentrotus intermedius*, *Strongylocentrotus nudus*, *Anthocidaris crassispina* and *H. Pulcherrimus*(♀) × *S. intermedius*(♂) (H·S sea urchin), *S. intermedius*(♀) × *S. nudus*(♂) (S·S sea urchin), *H. Pulcherrimus*(♀) × *A. crassispina*(♂) (H·A sea urchin), *A. crassispina*(♀) × *S. nudus* (A·S sea urchin), were researched.

Hybridization sea urchins were produced and all sea urchins were cultured in Key Laboratory of Mariculture and Biotechnology, Ministry of Agriculture. The results showed that there were four kinds of cells in the coelom, which are pigment cells, colorless spherule cells, vibratile cells and amoeboid phagocytes; different kinds of cells account for different proportion in coelom, which were 4.56% – 10.96%, 9.69% – 12.18%, 76.40% – 85.36% and 0.35% – 1.03% respectively. The amoeboid phagocytes had the abilities to agglutinate in vitro and swallow yeast. This paper also reports the activities of ACP, ALP, SOD and LSZ in the different kinds of sea urchins. The results showed that the activities of ALP and SOD in *Anthocidaris crassispina* were higher than the other species, which were 2.871 U/mg and 182.149 U/mL. The LSZ activities of H·S sea urchin group (0.085 U/mL) and the ACP activities of S·S sea urchin (1.070 U/mg) were the highest in all tested species, but the differences aren't significant. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1): 33 – 38]

Key words: sea urchins; coelomocyte; enzyme activities

Corresponding author: CHANG Ya-qing. E-mail: yqchang@dlfu.edu.cn