

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2015.140506

## 低盐急性胁迫对仿刺参相关生理指标的影响

庚宸帆, 田焱, 张宇鹏, 常亚青, 宋坚

大连海洋大学 农业部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连, 116023

**摘要:** 通过模拟仿刺参养殖池塘雨季的盐度变化, 选用 2 龄仿刺参(*Apostichopus japonicus*)为研究对象, 刺参体重(16.93±3.08) g, 研究盐度骤降及胁迫恢复对仿刺参体腔液相关生理指标的影响。盐度先由 30 以每 6 h 变化 3 个盐度的速度下降至 18, 然后在盐度 18 保持 96 h, 随后盐度以相同速度上升恢复至 30, 并保持 24 h。结果显示, 各盐度取样点间仿刺参体腔液渗透压、体腔液总蛋白浓度、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>浓度与盐度的变化趋势一致, Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>浓度均在盐度下降到 18 时达到最低值, 分别为(131.15±14.42) mmol/L, (6.08±0.24) mmol/L 和(141.76±2.13) mmol/L; 而 Ca<sup>2+</sup>浓度一直呈上升趋势。体腔液中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活力在盐度 18 并保持 4 d 后显著高于其他组( $P<0.05$ ), 盐度对其体腔液中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活力的影响与体腔液渗透压变化趋势不一致。盐度胁迫对谷丙转氨酶活力无显著影响。结果表明, 盐度胁迫对仿刺参渗透调节能力有显著影响, 实验中体腔液渗透压与体腔液 Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>浓度有一定的相关性。盐度胁迫对仿刺参的呼吸代谢产生的影响不显著。研究结果为丰富仿刺参适应环境盐度的机制提供基础资料, 为进一步了解盐度胁迫下刺参的生理生态学特征以及今后的刺参增养殖生产提供参考。

**关键词:** 刺参; 低盐; 生理指标; Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶; 谷丙转氨酶

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2015)04-0666-09

盐度是影响海洋无脊椎动物生理生态学最重要的环境因子之一, 与海洋动物的渗透压调节、生长、发育关系密切。不同盐度下水产动物表现出不同的适应状态。降低海水盐度会使军曹鱼(*Rachycentron canadum* Linnaeus)鳃 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶适度减少但无明显相关性<sup>[1]</sup>。斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)在适应不同低盐环境时, 其鳃 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活力均呈先升高后降低的趋势<sup>[2]</sup>。史氏鲟(*Acipenser schrenckii*)在不同盐度下经驯化后, 其血清渗透压及血清 Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>浓度变化趋势基本一致, 都随盐度的增加而增加<sup>[3]</sup>。盐度变化导致大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)幼鱼血清中谷丙转氨酶活性有显著差异, 血清总蛋白含量随盐度变化不大, 血糖含量也发生变化<sup>[4]</sup>。

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)属狭盐性海洋生物, 海水盐度变化会影响其正常生长发育, 导致病害发生<sup>[5]</sup>。国内外关于刺参盐度方面的研究已有一些报道, 王吉桥等<sup>[6]</sup>、董晓亮等<sup>[7]</sup>、田丹<sup>[8]</sup>研究了刺参在盐度胁迫下超氧化物歧化酶(SOD)、溶菌酶(LYZ)、酸性磷酸酶(ACP)等免疫相关酶活力的变化。袁秀堂等<sup>[9]</sup>、薛素燕等<sup>[10]</sup>、包杰等<sup>[11]</sup>研究了盐度对刺参呼吸和排泄方面的影响。结果表明, 仿刺参具有一定的渗透调节能力。尽管国内外学者对刺参盐度方面的研究较多, 但对低盐胁迫下其体腔液各离子变化、酶活性等方面的研究尚不多见。王冲等<sup>[12]</sup>的研究结果显示, 低盐度胁迫比高盐度胁迫对刺参存活、生长的影响更大。外环境变化会引起刺参体腔液渗透压改

收稿日期: 2014-12-05; 修订日期: 2015-01-29.

基金项目: 国家自然科学基金项目(41106128); 国家 863 计划项目(2012AA10A412); 辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划项目(LJQ2012064).

作者简介: 庚宸帆(1990-), 硕士研究生, 研究方向动物遗传育种与繁殖. E-mail: gengchenfan@163.com

通信作者: 田焱, 副教授, 博士, 硕士研究生导师, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: tianyi@dlou.edu.cn

变, 继而影响刺参体细胞的离子交换<sup>[13]</sup>、导致蛋白质损伤和蛋白质合成受阻<sup>[14-16]</sup>从而相关酶的活性也受到了严重的影响<sup>[17]</sup>, 并伴有“吐肠排脏”等不适应现象发生<sup>[18]</sup>。

池塘养殖海参是中国北方海参养殖的主要模式之一。但江河入海口附近的海水池塘, 雨季易受到江河径流的影响, 池塘中的海水可能数日处于低盐状态, 对养殖产业造成较大威胁。本实验以盐度为单因素, 通过海水盐度的变化研究了仿刺参在应激状态下几个生理指标的变化。探讨低盐急性刺激下成年刺参其体腔液生理生化指标的变化, 同时也检测了仿刺参的渗透压调节功能及对盐度变化的应激反应。以为生产实践中更好地理解仿刺参对环境变化的适应机制提供理论指导和科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

选取 2 龄健康刺参为实验材料, 刺参的湿重为(16.93±3.08) g, 取自辽宁旅顺龙王塘附近海域, 暂养于大连海洋大学北方海水增养殖重点实验室。

实验使用的主要仪器有: Gonotec Osmomat 030 冰点渗透压仪, Olympic 电子显微镜, Epoch biotech 酶标仪, 96 孔板(JET BIOFIL) 96well, Hitachi 高速冷冻离心机, 电子天平, 恒温水浴箱, YSI 多参数水质分析仪, 超声波细胞粉碎机。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 实验材料养殖条件** 实验刺参在容积为 300 L 的养殖水槽中暂养, 使用沙滤的天然海水和曝气 24 h 以上的自来水调节养殖用水至目标盐度。胁迫期间刺参养殖水温: 23.8~24.1℃, pH 为 7.9~8.3, 持续充气, 保持溶解氧含量在 3.6 mg/L 以上。每天定时换水、清理粪便和残饵、投喂饲料 1 次, 投喂量约为体重的 5%。实验饲料为鼠尾藻粉、海泥、鱼粉等比例充分混合成的海参配合饲料。

**1.2.2 实验设计** 实验根据海水养殖池塘遭遇暴风雨从而导致盐度变化的情况设计盐度胁迫实验, 实验组设置为 3 个阶段: 第一阶段(模拟突降大雨): 盐度由正常海水盐度(31.09±0.12)降至

18, 每 6 h 降 3 个盐度(取正常盐度体腔液作为对照, 记作 30D。24D 和 18D, 分别表示盐度下降至 24 和 18 后 6 h 的取样时点); 第二阶段盐度维持在 18 并保持 96 h 后取样一次(记作 18U); 第三阶段(低盐胁迫后养殖池塘换水)盐度由 18 升至 30, 每 6 h 升高 3 个盐度(记作 24U 和 30U, 分别表示盐度上升至 24 和恢复至 30 的取样的点)。每次取样前称量体重, 每个盐度设计 3 个平行对照。如图 1 所示, 在各取样时点各随机取 3 头仿刺参, 用 1 mL 无菌注射器以较小角度慢慢插入刺参体壁, 避免针头插到其他内脏而堵塞针头, 抽取其体腔液于 1.5 mL 离心管内, 样品于 -80℃ 冰箱保存备用。

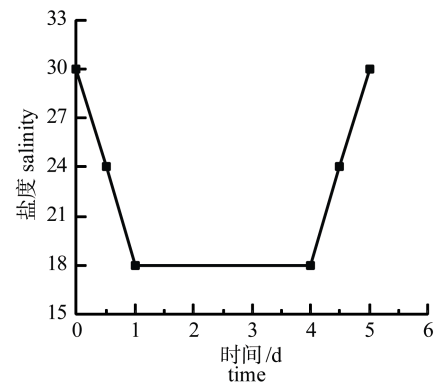


图 1 盐度变化模式图

Fig. 1 Diagram of the salinity change patterns

**1.2.3 体腔液主要离子浓度和蛋白浓度的测定** 使用南京建成生物工程研究所的试剂盒测定钠离子、钾离子、钙离子、氯离子和蛋白质浓度。每个取样点抽取 3 头刺参体腔液样品, 每个样品做 3 个平行对照。

(1) 钠离子的测定。原理: 在分散剂和除干扰剂的存在下,  $\text{Na}^+$  与 6-氢氧化锶钾形成均一的浊度。用酶标仪在 630 nm 波长测定其 OD 值。计算公式:

$$[\text{Na}^+](\text{mmol/L}) = \frac{\text{测定孔OD值} - \text{空白孔OD值}}{\text{标准孔OD值} - \text{空白孔OD值}} \times$$

标准品浓度(140 mmol/L) × 样本测试前稀释倍数

(2) 钾离子的测定。原理: 在碱性介质中, 经蛋白沉淀剂处理后的血清样本中的  $\text{K}^+$  与四苯

硼钠(NA-TPB)反应产生混浊并稳定的悬浮液。用酶标仪在 450 nm 下测定 OD 值。计算公式与钠离子相同,其中标准品浓度为 0.4 mmol/L。

(3) 钙离子的测定。原理: 样本中  $\text{Ca}^{2+}$  在碱性溶液中与甲基百里香酚蓝(MTB)结合,生成蓝色络合物;通过酶标仪 610 nm 与同样处理的钙标准品进行比较。计算公式与钠离子相同,其中标准品浓度为 1 mmol/L。

(4) 氯离子的测定。采用硫氰酸汞处理  $\text{Cl}^-$  形成有色络合物,其颜色的深度与  $\text{Cl}^-$  浓度成正比,480 nm,酶标仪测定各孔 OD 值。计算公式同钠离子,其中标准品浓度为 20 mmol/L。

(5) 蛋白浓度的测定。使用考马斯亮蓝法测定体腔液中的总蛋白浓度。计算公式:

$$\text{样品蛋白浓度(g/L)} = \frac{\text{测定孔OD值} - \text{空白孔OD值}}{\text{标准孔OD值} - \text{空白孔OD值}} \times$$

标准品浓度(0.563 g/L)

**1.2.4 体腔液渗透压测定** 取不同取样时点 15  $\mu\text{L}$  体腔液样品于 50  $\mu\text{L}$  离心管中,使用 Gonotec Osmomat 030 冰点渗透压仪检测,同时检测不同盐度阶段的养殖海水渗透压。渗透压用质量渗透浓度来表示,即 1 kg 溶剂中含 1 mmol 溶质为 1 个渗透压单位(mOsmol/kg)。

**1.2.5 体腔液  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP 酶 (NKA)和谷丙转氨酶活力的测定** 将储存于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中的体腔液样品用超声细胞粉碎机粉碎。检测采用超微量  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP 酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),样品中蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝染色测试盒(南京建成生物工程研究所)。以每小时每毫升体腔液蛋白中的 ATP 分解成 ADP 产生 1  $\mu\text{mol}$  无机磷的量为 1 个 ATP 酶活力单位(U/mg prot)。计算公式:

$$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase 活力(U/mg prot)} = \frac{\text{测定孔OD值} - \text{空白孔OD值}}{\text{标准孔OD值} - \text{空白孔OD值}} \times 6 \times 7.8 / \text{待测样本蛋白浓度(mg prot/mL)}$$

谷丙转氨酶(ALT),采用微板法测 ALT 酶活力,酶标仪 510 nm 下读取 OD 值,计算出绝对 OD 值(绝对 OD 值=测定 OD 值-对照 OD 值)并查找标

准曲线,计算出 ALT 酶活力,用卡门氏单位(U/L)表示。

### 1.3 数据分析

利用 EXCEL 和 SPSS 13.0 软件对数据进行处理,计量数据均用平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )表示,对不同盐度模式下各指标之间的差异采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)并使用 Duncan 多重比较法检验组间差异,差异显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

刺参急性低盐胁迫实验中,无死亡个体出现。在盐度降低至 24 后,刺参出现一头轻微化皮,一头石灰环处变白。胁迫期间,刺参体色变暗、摄食能力减退、活力较差,身体多舒展状态,每次调节盐度后部分伴随摇头症状。

### 2.1 低盐胁迫下刺参体腔液各离子浓度的变化

低盐胁迫后刺参体腔液各离子浓度结果见表 1,胁迫过程中刺参体腔液中的  $\text{Na}^+$  浓度整体表现为先下降后上升的趋势,在正常盐度时,  $\text{Na}^+$  含量为  $(215.69 \pm 9.83)$  mmol/L,仿刺参在从正常海水浓度降到盐度为 18 并保持盐度 18 的 4 d 内,  $\text{Na}^+$  含量逐渐下降,在取样时点 18U 达到低谷  $(131.15 \pm 14.42)$  mmol/L ( $P < 0.05$ ) 之后缓慢上升,最后回升到  $(209.58 \pm 5.85)$  mmol/L。盐度由 30 逐渐下降到 18 的过程中,仿刺参体腔液中  $\text{K}^+$  浓度也随之下降 ( $P < 0.05$ ),在维持盐度 18 的 96 h 中,  $\text{K}^+$  含量保持相对稳定,18D 和 18U 间差异不显著 ( $P > 0.05$ ),后随着盐度的上升而上升,恢复到  $(7.97 \pm 0.20)$  mmol/L 与胁迫前的  $(8.21 \pm 0.38)$  mmol/L 相比差异不显著 ( $P > 0.05$ )。经盐度胁迫后,其体腔液中  $\text{Cl}^-$  含量出现了先降低后升高的变化,由表 1 可以看出,30D 组与 30U 组、24D 组与 24U 组、18D 组与 18U 组,体腔液中氯离子浓度差异不显著 ( $P > 0.05$ )。  $\text{Cl}^-$  变化趋势与盐度变化趋势一致。  $\text{Ca}^{2+}$  的初始浓度为  $(3.78 \pm 0.49)$  mmol/L,胁迫过程中,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度整体呈现上升趋势,实验结束海水盐度恢复至正常海水盐度时,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为  $(6.28 \pm 0.85)$  mmol/L,同初始浓度差异显著 ( $P < 0.05$ )。

表 1 低盐胁迫对仿刺参体腔液各离子浓度的影响  
Tab. 1 Effects of low salinity on the variations of ionic concentrations of sea cucumber

$n=3; \bar{x} \pm SD; \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

离子 ion	取样时机 sampling stage					
	30D	24D	18D	18U	24U	30U
Na <sup>+</sup>	215.69±9.83 <sup>d</sup>	179.84±4.15 <sup>bc</sup>	167.40±5.94 <sup>b</sup>	131.15±14.42 <sup>a</sup>	189.94±12.96 <sup>bcd</sup>	209.58±5.85 <sup>cd</sup>
K <sup>+</sup>	8.21±0.38 <sup>b</sup>	6.13±0.15 <sup>a</sup>	6.08±0.24 <sup>a</sup>	6.09±0.48 <sup>a</sup>	7.16±0.58 <sup>ab</sup>	7.97±0.20 <sup>b</sup>
Ca <sup>2+</sup>	3.78±0.49 <sup>a</sup>	4.87±0.96 <sup>ab</sup>	4.38±0.35 <sup>ab</sup>	4.40±0.32 <sup>ab</sup>	5.92±0.31 <sup>b</sup>	6.28±0.85 <sup>b</sup>
Cl <sup>-</sup>	171.65±1.38 <sup>c</sup>	158.24±1.38 <sup>b</sup>	141.76±2.13 <sup>a</sup>	142.53±3.04 <sup>a</sup>	159.39±2.68 <sup>b</sup>	168.97±3.70 <sup>c</sup>

注: 同一行中标有不同字母的数值间存在显著差异( $P<0.05$ )。30D: 正常盐度(31.09±0.12)体腔液; 24D: 盐度由正常海水盐度(31) 降至 24 (每 6 h 降 3 个盐度)后 6 h 取样; 18D: 盐度由正常海水盐度(31) 降至 18 (每 6 h 降 3 个盐度)后 6 h 取样。

Note: Data with different letters in the same row indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

30D: coelomic fluid at salinity (31.09±0.12); 24D: sampling 6 h later after salinity declining from 31 to 24 (declining rate at 3/6 h); 18D: sampling 6 h after salinity declining from 31 to 18 (declining rate at 3/6 h).

## 2.2 低盐胁迫对仿刺参体腔液渗透压的影响

仿刺参体腔液渗透压随周围海水盐度的变化而变化(图 2)。在正常盐度时, 刺参体腔液渗透压为(910.67±15.34) mOsmol/L 与正常盐度养殖海水渗透压 892 mOsmol/L 相差不大。随盐度的降低, 体腔液渗透压也随之降低, 最低点出现在 18D 为 (520.67±18.67) mOsmol/L; 养殖海水渗透压在 18U 最低为 466 mOsmol/L。盐度上升至 24 和 30 时, 刺

参体腔液的渗透压分别为(682.67±2.19) mOsmol/L 和(870±6.93) mOsmol/L。在 30U 处, 海水渗透压为 875 mOsmol/L。对照组刺参的体腔液渗透压显著高于处于盐度 18 和 24 时的刺参体腔液渗透压 ( $P<0.05$ )。养殖海水渗透压与刺参体腔液渗透压均随盐度的变化而变化, 基本维持等渗状态。

## 2.3 低盐胁迫对仿刺参体腔液中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶及蛋白质浓度的影响

各取样点仿刺参体腔液 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活力随时间的变化趋势如图 3 所示。盐度胁迫 24 h 后 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活力开始升高, 到盐度 18 并维持 72 h 后, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性显著高于其他组( $P<0.05$ ), 达到(1.39±0.19) U/mg prot。当盐度开始上升, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活力急速下降到(0.24±0.03) U/mg prot, 当盐度恢复到正常海水盐度的过程中, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活力又一次升高, 达到(0.91±0.08) U/mg prot。

不同盐度胁迫时间点体腔液总蛋白浓度随时间变化的情况如图 4 所示。体腔液总蛋白初始浓度为(1.01±0.10) gprot/L。在盐度逐渐下降到 24 时, 体腔液总蛋白浓度迅速下降( $P<0.05$ ), 继续下降到盐度 18 并维持 96 h 后, 达到最低为(0.45±0.05) gprot/L, 与 18D 点无显著差异( $P>0.05$ )。随后海水盐度开始上升, 体腔液总蛋白浓度也升高并趋于稳定, 最终达到(0.71±0.07) gprot/L。

## 2.4 低盐胁迫对仿刺参体腔液谷丙转氨酶的影响

低盐胁迫过程中, 谷丙转氨酶活力变化于 (10.13±0.77) ~ (20.71±4.22) U/L。通过单因素方差分析, 各取样时点间均不存在显著差异( $P>0.05$ )(图 5)。

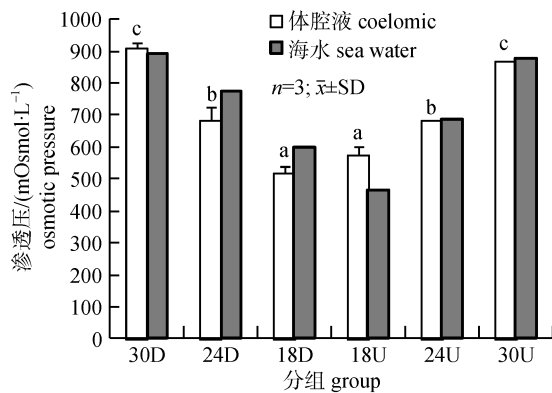


图 2 低盐胁迫下仿刺参体腔液渗透压和养殖海水渗透压的变化

柱上不同字母表示不同实验组间存在显著差异( $P<0.05$ )。30D: 正常盐度(31.09±0.12)体腔液; 24D: 盐度由正常海水盐度(31) 降至 24 (每 6 h 降 3 个盐度)后 6 h 取样; 18D: 盐度由正常海水盐度(31) 降至 18 (每 6 h 降 3 个盐度)后 6 h 取样。

Fig. 2 The osmotic pressure of the rearing water and the coelomic fluid in *Apostichopus japonicus* during the period of low salinity change.

Histogram bars with different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

30D: coelomic fluid at salinity (31.09±0.12); 24D: sampling 6 h later after salinity declining from 31 to 24 (declining rate at 3/6 h); 18D: sampling 6 h after salinity declining from 31 to 18 (declining rate at 3/6 h).

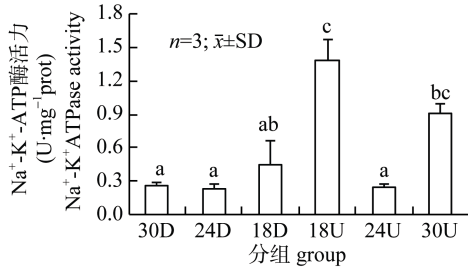


图3 低盐急性胁迫对仿刺参体腔液Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶的影响  
柱上不同字母表示不同实验组间存在显著差异( $P<0.05$ )。30D: 正常盐度(31.09±0.12)体腔液; 24D: 盐度由正常海水盐度(31) 降至 24 (每 6 h 降 3 个盐度)后 6 h 取样; 18D: 盐度由正常海水盐度(31) 降至 18 (每 6 h 降 3 个盐度)后 6 h 取样。

Fig. 3 The effect of acute low salinity stress on the activities of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in the coelomic fluid of *Apostichopus japonicus*. Histogram bars with different letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

30D: coelomic fluid at salinity (31.09±0.12); 24D: sampling 6 h later after salinity declining from 31 to 24 (declining rate at 3/6 h); 18D: sampling 6 h after salinity declining from 31 to 18 (declining rate at 3/6 h).

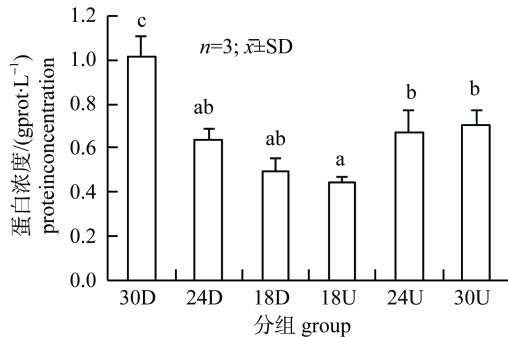


图4 低盐急性胁迫对仿刺参体腔液总蛋白浓度的影响  
柱上不同字母表示不同实验组间存在显著差异( $P<0.05$ )。30D: 正常盐度(31.09±0.12)体腔液; 24D: 盐度由正常海水盐度(31) 降至 24 (每 6 h 降 3 个盐度)后 6 h 取样; 18D: 盐度由正常海水盐度(31) 降至 18 (每 6 h 降 3 个盐度)后 6 h 取样。

Fig.4 The effect of acute low salinity stress on the concentration of total protein in the coelomic fluid of *Apostichopus japonicus*. Histogram bars with different letters in the same row indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

30D: coelomic fluid at salinity (31.09±0.12); 24D: sampling 6 h later after salinity declining from 31 to 24 (declining rate at 3/6 h); 18D: sampling 6 h after salinity declining from 31 to 18 (declining rate at 3/6 h).

### 3 讨论

#### 3.1 低盐胁迫对仿刺参体腔液渗透压和离子浓度的影响

盐度是反映水中无机离子含量的综合指标,

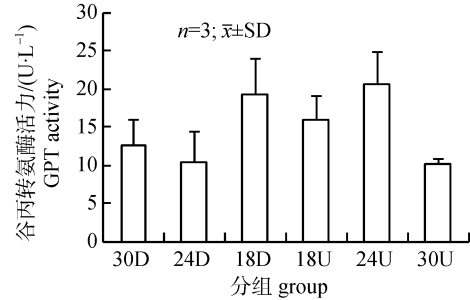


图5 低盐急性胁迫对仿刺参体腔液谷丙转氨酶活性的影响

30D: 正常盐度(31.09±0.12)体腔液; 24D: 盐度由正常海水盐度(31) 降至 24 (每 6 h 降 3 个盐度)后 6 h 取样; 18D: 盐度由正常海水盐度(31) 降至 18 (每 6 h 降 3 个盐度)后 6 h 取样。

Fig. 5 The effect of acute low salinity stress on the activities of GPT in the coelomic fluid of *Apostichopus japonicus*. 30D: coelomic fluid at salinity (31.09±0.12); 24D: sampling 6 h later after salinity declining from 31 to 24 (declining rate at 3/6 h); 18D: sampling 6 h after salinity declining from 31 to 18 (declining rate at 3/6 h).

水生动物对盐度的适应一般围绕其等渗点进行渗透压调节, 而渗透压调节是一需要耗费能量的生理过程<sup>[19]</sup>。龚海滨等<sup>[20]</sup>的研究结果表明, 仿刺参适宜生长的盐度为 20~35, 最适生长盐度为 25~30。本实验设计的盐度变化的下限 18 接近仿刺参耐受盐度范围的临界点, 并且盐度的连续变化过程与自然条件下仿刺参渗透状态相似, 能够反映低盐胁迫对仿刺参各生理指标的影响及适应过程。Dong 等<sup>[21]</sup>、Wang 等<sup>[5]</sup>的研究表明, 当海水盐度由正常海水盐度变化到其他盐度时, 仿刺参体腔液渗透压变化迅速, 本实验结果表明盐度变化与刺参体腔液渗透压关系密切。当仿刺参处于盐度逐渐降低的环境中, 外界水环境渗透压低于体腔液渗透压, 水会通过渗透压差进入体内。当盐度升高, 为维持渗透压平衡, 仿刺参通过渗透作用排出多余的水分。这说明仿刺参适应生存环境中盐度变化的最直接、最重要的方法是通过体腔液渗透压的改变来实现的。说明仿刺参是通过调节体腔液渗透压使之与养殖海水渗透压接近, 来以较低的能耗维持渗透压平衡。

渗透压的改变是由无机离子(Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>等)和自由氨基酸等渗透压效应物含量的变化引起的。仿刺参体内的离子浓度低于或高于体外海水

盐度时, 通过吞饮海水、减少尿量、排出离子等方式来调节渗透压<sup>[22]</sup>。在低盐胁迫时, 细胞内外液中存在的各种带电离子的这一系列变化可能与低盐胁迫这一外界刺激而引起的膜电位的改变有关<sup>[23]</sup>。 $\text{Na}^+$ 和 $\text{Cl}^-$ 的含量与体腔液渗透压的变化趋势一致, 与沈永龙等<sup>[24]</sup>对瘤背石磺(*Onchidium struma*)及徐力文等<sup>[1]</sup>对军曹鱼(*Rachycentron canadum* Linnaeus)的研究结果相一致。本试验中, $\text{K}^+$ 浓度变化规律与盐度呈正相关, 这与 Sampaiola 等<sup>[25]</sup>对比目鱼(*Paralichthys orbignyanus*)的研究结果相似。但在瘤背石磺和军曹鱼的研究中 $\text{K}^+$ 浓度变化并不规律。由于细胞在维持渗透压平衡的过程中, 保持细胞内高 $\text{K}^+$ 浓度、细胞外高 $\text{Na}^+$ 浓度<sup>[26]</sup>。有报道显示, $\text{K}^+$ 主要存在于细胞内来维持渗透压平衡<sup>[27]</sup>, 如在实验盐度条件下细胞膜依然保持完整, 体腔液中的 $\text{K}^+$ 浓度变化是不显著的。本试验的研究结果表明, $\text{K}^+$ 与 $\text{Na}^+$ 和 $\text{Cl}^-$ 浓度随盐度变化都呈先降低后升高趋势, 说明了在实验盐度条件下仿刺参体腔液样品中体腔细胞细胞膜遭到破坏, 导致 $\text{K}^+$ 在体液中游离分布。

$\text{Ca}^{2+}$ 在水生动物生理和生化过程中均发挥着重要作用, 如肌肉收缩、神经传导、细胞膜的渗透、以及细胞间和细胞内的信号传递等<sup>[28]</sup>。关于 $\text{Ca}^{2+}$ 信号在植物细胞适应逆境的调节作用的研究较多, 如杜氏盐藻(*Dunaliella salina*)细胞在遭受低渗盐胁迫处理时, 其细胞膜上受体发生感应, 受体接到信号后, 经过膜上一系列磷酸酶化反应激活膜上的 $\text{Ca}^{2+}$ 通道<sup>[29]</sup>。关于水产动物受外界环境刺激下体液 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的研究不多, 仿刺参体腔液 $\text{Ca}^{2+}$ 方面的研究未见报道。本研究结果显示, 随环境盐度的先降低再升高, 仿刺参体腔液 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度一直呈现上升趋势, 说明在盐度胁迫适应过程中, 有 $\text{Ca}^{2+}$ 介导的渗透信号参与盐度适应过程, 且盐度胁迫下细胞膜的完整性得到一定程度的损伤, 导致细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 不断外流。 $\text{Ca}^{2+}$ 通道发挥作用参与维持刺参受盐度胁迫后的渗透压平衡。从离子通道及信息调控机制来看, 盐度变化导致的膜电位改变是通过离子通道的激活与失活来实现

的, 并且胞内信息分子在膜电位和/或 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 各类通道间通过复杂且精准的相互协调最终使细胞内外各离子浓度达到稳定状态<sup>[30]</sup>。也充分说明了仿刺参可能是通过渗透调节和离子调节适应周围环境盐度的变化。

### 3.2 低盐胁迫对仿刺参体腔液 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶的影响

$\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶作为仿刺参渗透压调节中离子交换的关键酶, 主要功能是参与细胞内外 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 跨膜转运, 使细胞内外的离子浓度处于相对稳定的生理平衡状态<sup>[22]</sup>。史氏鲟<sup>[3]</sup>和俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedtii*)<sup>[29]</sup>盐度驯化过程中 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活力变化趋势相似, 都呈现先下降, 后上升。随着盐度的降低, 斜带石斑鱼 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活力呈先上升, 再降低, 后趋于稳定的趋势<sup>[2]</sup>。在不同盐度条件下, 瘤背石磺不同部位 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活力变化趋势不一致<sup>[24]</sup>。可见不同物种, 生物有机体不同部位的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活力随盐度变化会有不同的反应机制。仿刺参盐度调节的研究工作相对较少, 海水硬骨鱼类的渗透压调节研究工作相对详尽<sup>[30]</sup>, 因为硬骨鱼类其器官的功能非常完善, 如海水硬骨鱼类的鳃丝氯细胞或者哺乳动物的肾脏, 主要执行动物体内的渗透调节; 而仿刺参目前还没有发现明确的渗透调节器官。本试验中, 胁迫开始 24 h 后, 盐度由正常海水盐度下降到盐度为 18 时, 仿刺参体腔液 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活力被激活, 推测在外界盐度环境刺激下仿刺参开始进行主动渗透压调节。 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活力增加, 为渗透调节, 离子转运等提供能量。在盐度维持在 18 的 3 d 中, $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活力显著上升, 说明仿刺参在盐度 18 的环境中需要大量的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶来提供能量, 推测可能与仿刺参的盐度适应机制有关。在这种极限环境下, 为了维持体内环境的稳定, 刺参体腔液 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶分泌活动异常活跃。盐度开始上升后, $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活力先下降后上升, 通过酶活力的变化进而改变了细胞膜的通透性, 进而有效控制离子的流入与流出, 从而使体液和细胞的渗透压达到平衡。说明在低盐胁迫下, 仿刺参能快速适应环境变化并及时进行适应性调节。



### 3.3 低盐胁迫对仿刺参体腔液谷丙转氨酶活力的影响

谷丙转氨酶为仿刺参呼吸代谢酶之一,是体内重要的转氨酶,参与体内转氨基作用,在非必需氨基酸的合成和蛋白分解代谢中起重要的中介作用。刘伟等<sup>[4]</sup>模拟大麻哈鱼幼鱼降海洄游水域环境盐度,对大麻哈鱼血清中的谷丙转氨酶活力进行测定,淡水组比其他盐度组高 2~5 倍,综合大麻哈鱼血清中总蛋白、总胆汁酸等指标以及肝脏组织切片结果的测定,表明长期生活在淡水中对其肝脏器官造成损伤。从实验结果可以看出,刺参体腔液在盐度 18 和胁迫到 24U 的阶段,转氨酶活力的升高表明刺参体内氨基酸代谢旺盛。谷丙转氨酶虽有变化,但不显著,可能是因为刺参不像硬骨鱼类等稍高等动物有鳃和肝脏等功能分化细致的组织器官来对机体进行精密调控,导致环境盐度的改变并不能对仿刺参的呼吸代谢机能产生显著的影响。

#### 参考文献:

- [1] Xu L W, Feng J, Guo Z X, et al. Effect of salinity on hematology and gill  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase activity of juvenile cobia, *Rachycentron canadum* Linnaeus[J]. Marine Environmental Science, 2008, 27(6): 602-606. [徐力文, 冯娟, 郭志勋, 等. 盐度对军曹鱼稚鱼血液生理生化及鳃  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase 活性的影响[J]. 海洋环境科学, 2008, 27(6): 602-606.]
- [2] Yu D G, Yang Y Q, Wang H Y, et al. The effect of salinity change on physiology and biochemistry of *Epinephelus coioides*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(5): 719-726. [余德光, 杨宇晴, 王海英, 等. 盐度变化对斜带石斑鱼生理生化因子的影响[J]. 水产学报, 2011, 35(5): 719-726.]
- [3] Zhao F, Zhuang P, Zhang L Z, et al. The influence of salinity acclimation on activity of  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase in branchial epithelium, concentration of ions and osmolarity in serum of *Acipenser schrenckii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(4): 444-449. [赵峰, 庄平, 章龙针, 等. 盐度驯化对史氏鲟鳃  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATP 酶活力、血清渗透压及离子浓度的影响[J]. 水产学报, 2006, 30(4): 444-449.]
- [4] Liu W, Zhi B J, Zhan P R, et al. Effects of salinity on haematological biochemical indices and liver tissue in juvenile *Oncorhynchus keta*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2010, 21(9): 2411-2417. [刘伟, 支兵杰, 战培荣, 等. 盐度对大麻哈鱼幼鱼血液生化指标及肝组织的影响[J]. 应用生态学报, 2010, 21(9): 2411-2417.]
- [5] Wang Q L, Yu S S, Qin X C, et al. Combined effects of acute thermal and hypo-osmotic stresses on osmolality and hsp70, hsp90 and sod expression in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka[J]. Aqua Intern, 2014, 22(3): 1149-1161.
- [6] Wang J Q, Zhang Y X, Jiang Y S, et al. Effects of abrupt decline in salinity on growth, immunity and histological structure of respiratory trees in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2009, 24(5): 387-392. [王吉桥, 张筱堉, 姜玉声, 等. 盐度骤降对幼仿刺参生长、免疫指标及呼吸树组织结构的影响[J]. 大连水产学院学报, 2009, 24(5): 387-392.]
- [7] Dong X L, Li C L, Zhao B, et al. Effects of low salinity stress on the activities of non-specific immune enzymes and antibacterial activity of sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2013, 34(3): 82-87. [董晓亮, 李成林, 赵斌, 等. 低盐胁迫对刺参非特异性免疫酶活及抗菌活性的影响[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(3): 82-87.]
- [8] Tian D. Study on immune activity of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in different weight and salinity[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013: 1-84. [田丹. 不同体重和不同盐度条件下仿刺参(*Apostichopus japonicus*)免疫活性的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013: 1-84.]
- [9] Yuan X T, Yang H T, Zhou Y, et al. Salinity effect on respiration and excretion of sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2006, 37(4): 348-354. [袁秀堂, 杨红生, 周毅, 等. 盐度对刺参呼吸和排泄的影响[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(4): 348-354.]
- [10] Xue S Y, Fang J G, Mao Y Z, et al. Effects of salinity on the respiration and ammonia excretion of sea cucumber *Apostichopus japonicus* under high temperature[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(6): 975-980. [薛素燕, 方建光, 毛玉泽, 等. 高温下不同盐度对刺参幼参和 1 龄参呼吸排泄的影响[J]. 中国水产科学, 2009, 16(6): 975-980.]
- [11] Bao J, Jiang H B, Dong S L, et al. Comparison of oxygen consumption rate and ammonia-N excretion rate between green type and red type *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(11): 1589-1696. [包杰, 姜宏波, 董双林, 等. 红刺参和青刺参耗氧率与排氨率的比较研究[J]. 水产学报, 2013, 37(11): 1589-1696.]
- [12] Wang C, Tian Y, Chang Y Q. Effect of salinity stress on immune enzyme activity of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. Journal of Agricultural Science and Technol-

- ogy, 2013, 15(3): 163–168. [王冲, 田焱, 常亚青, 等. 盐度胁迫对刺参非特异性免疫酶的影响[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(3): 163–168.]
- [13] Herrera F C, Herrera M I, López I. Further studies on the partial double Donnan: Is isosmotic KCl solution isotonic with cells of respiratory trees of the holothurian *Isoetichopus badionotus* Selenka[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2000, 247: 139–152 .
- [14] Diehl W J. Osmoregulation in echinoderms [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 1986, 84(2): 199–205.
- [15] Yancey P H, Clark M E, Hand S C., et al. Living with water stress: evolution of osmolyte systems[J]. Science, 1982, 217: 1214.
- [16] Meng X L, Dong Y W, Dong S L, et al. Mortality of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka, exposed to acute salinity decrease and related physiological responses: Osmoregulation and heat shock protein expression[J]. Aquaculture, 2011, 316(1–4): 88–92.
- [17] Zheng H, Li B, Rong X J, et al. Effects of salinity and dissolved oxygen variation on the non-specific immune response of *Apostichopus japonicus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 33(1): 118–124. [郑慧, 李彬, 荣小军, 等. 盐度和溶解氧对刺参非特异性免疫酶活性的影响[J]. 渔业科学进展, 2014, 33(1): 118–124.]
- [18] Zang Y Q. Ecological and physiological mechanisms on typical environmental factors in sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012: 1–133. [臧元奇. 刺参(*Apostichopus japonicus* Selenka)对典型环境胁迫的生理生态学响应及其机制研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012: 1–133.]
- [19] Chen Y, Gao F, Liu G S, et al. The effects of temperature, salinity and light cycle on the growth and behavior of *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(5): 687–692. [陈勇, 高峰, 刘国山, 等. 温度、盐度、光照周期对刺参生长及行为的影响[J]. 水产学报, 2007, 31(5): 687–692.]
- [20] Gong H B, Wang Y B, Deng H, et al. Tolerance of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) to salinity[J]. Fisheries Science, 2009, 28(5): 284–286. [龚海滨, 王耀兵, 邓欢, 等. 仿刺参对盐度的耐受能力研究[J]. 水产科学, 2009, 28(5): 284–286.]
- [21] Dong Y W, Dong S L, Meng X L. Effects of thermal and osmotic stress on growth, osmoregulation and Hsp70 in sea cucumber (*Apostichopus japonicus* Selenka)[J]. Aquaculture, 2008, 276(1–4): 179–186.
- [22] Wang M L, Li C, Yang M, et al. Effects of salinity on osmotic adjustment of sea cucumber[J]. Fishery Modernization, 2014, 41(1): 6–9. [王茂林, 李岑, 杨敏, 等. 盐度对仿刺参存活和  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性的影响[J]. 渔业现代化, 2014, 41(1): 6–9.]
- [23] Chen C H, Zhou T, Yun H, et al. Research Advances on Voltage-gated Sodium Channels Disease[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 30(13): 5995–5999. [陈程浩, 周桃, 云慧, 等. 电压门控钠离子通道疾病的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2013, 30(13): 5995–5999.]
- [24] Shen Y L, Ge X P, Huang J T, et al. Effects of salinity on  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity, the osmolality of pericardial cavity fluid and peritoneal fluid and ion content in *Onchidium struma*[J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(6): 851–857. [沈永龙, 戈贤平, 黄金田, 等. 盐度对瘤背石磺不同部位  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性、围心腔液和腹腔液渗透压及离子含量的影响[J]. 水产学报, 2013, 37(6): 851–857.]
- [25] Sampaio L A, Bianchini A. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2002, 269: 187–196.
- [26] Zhang L Y. Effects and the osmoregulation mechanisms of calcium and magnesium concentrations and salinity acclimatization on serum osmolality of juvenile *Paralichthys olivaceus*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010: 1–152. [张灵燕. 钙镁离子浓度及盐度驯化对褐牙鲆幼鱼血清渗透压的影响及其渗透调节机制的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010: 1–152.]
- [27] Chen H, Chen S L, Jiang J G. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  channel block on glycerol metabolism in *Dunaliella salina* under hypoosmotic and hyperosmotic stresses [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28613.
- [28] Liu J S. Cell Information and Regulation[M]. The Second Edition. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2004: 107–148. [刘景生. 细胞信息与调控[M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004: 107–148.]
- [29] Qu L, Zhuang P, Zhang L Z, et al. Influence of salinity change on serum osmolality, ions and gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in juvenile Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(2): 243–251. [屈亮, 庄平, 章龙珍, 等. 盐度对俄罗斯鲟幼鱼血清渗透压、离子含量及鳃丝  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活力的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 243–251.]
- [30] Zhang C J, Shi Z H, Wang J G, et al. On salinity-related effects on osmoregulation mechanism in marine teleost[J]. Marine Fishries, 2013, 35(1): 108–116. [张晨杰, 施兆鸿, 王建刚, 等. 盐度影响海水硬骨鱼类渗透压调节机理的研究与展望[J]. 海洋渔业, 2013, 35(1): 108–116.]



## Effects of acute low salinity stress on the physiological indices of *Apostichopus japonicus*

GENG Chenfan, TIAN Yi, ZHANG Yupeng, CHANG Yaqing, SONG Jian

Key Laboratory of Mariculture & Stock Enhancement in North China Sea, Ministry of Agriculture, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

**Abstract:** To investigate the adaptation mechanisms of sea cucumbers to low salinity environments, physiological indices were measured in the coelomic fluid of *Apostichopus japonicus* under acute low salinity stress. Test specimens weighed ( $16.93 \pm 3.08$ ) g ( $\bar{x} \pm \text{SE}$ ) in body weight. Experiments simulated the salinity changes observed in culture ponds in the rainy season. Salinity was gradually lowered from 30 to 18 ppt at a rate of 0.5 ppt/h, where it was maintained for 96 h. Salinity was then increased back to 30 at the same rate, where it was maintained for 24 h. The osmotic pressure of the coelomic fluid was measured directly with a cryoscopic osmometer. Other physiological indices were measured using the corresponding test kits. The results showed that trends of variation in the osmotic pressure, total protein concentration, and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Cl}^-$  concentrations of the coelomic fluid were consistent with the changes in salinity. The close relationship of osmotic pressure and water salinity indicate that sea cucumbers osmoregulate their coelomic fluid to approximate levels of environmental salinity. Minimum concentrations of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  [(131.15 $\pm$ 14.42) mmol/L, (6.0 $\pm$ 0.24) mmol/L, and (141.76 $\pm$ 2.13) mmol/L, respectively] occurred at 18 ppt. After salinity was returned to normal levels (30 ppt), the three indices showed no significant difference from the control group ( $P < 0.05$ ). Experimental  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations were maintained at higher levels than in the control group, which varied from (3.78 $\pm$ 0.49) mmol/L to (6.28 $\pm$ 3.69) mmol/L (mean $\pm$ SE). The  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase activity of the coelomic fluid over 4 d at 18 ppt was significantly higher than at other salinities ( $P < 0.05$ ), indicating activation of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase activity under salinities of 18. This result demonstrated that the osmoregulatory system of the sea cucumber was activated in external environments of low salinity. Variation in  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase activity can alter membrane permeability to maintain the balance of osmotic pressure between the extra and intracellular environments. Compared with the control group, the total protein concentration in the coelomic fluid initially decreased, followed by an increase to a steady value that was then maintained for the duration of the experimental period. Glutamate pyruvate transaminase activity of the coelomic fluid, which can indirectly reflect the condition of protein metabolism, showed no significant change under differing salinities. This result indicated that changes in salinity had little effect on the respiratory metabolism of the sea cucumber and that sea cucumbers can adapt to changes in the external salinity. Osmolarity of the coelomic fluid was strongly dependent on the concentrations of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$ . This experimental work on the adaptation of sea cucumbers to environmental salinity furthers understanding of sea cucumber physiology and ecology and will inform future work on the aquaculture of sea cucumbers.

**Key words:** *Apostichopus japonicus*; low salinity; physiological indices;  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase; glutamate pyruvate transaminase

**Corresponding author:** TIAN Yi. E-mail: tianyi@dlou.edu.cn