

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15153

高温胁迫对刺参耐高温群体和普通群体主要免疫酶活力的影响

刘石林^{1,2}, 茹小尚¹, 徐勤增², 柏雨岑², 李静³, 张立斌², 杨红生²

1. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003;
2. 中国科学院 海洋研究所, 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 山东东方海洋科技股份有限公司, 山东 烟台 264003

摘要: 以定向选育的刺参(*Apostichopus japonicus*)耐高温品系子三代(F3 组)和未经选育的普通刺参(C 组)1 龄幼参[(13.6±1.8) g/头]为研究对象, 在室内模拟池塘夏季高温环境, 比较了两个群体在 25℃、27℃、29℃、31℃、32℃ 和 33℃ 6 个温度梯度下体壁抗氧化酶(SOD、CAT 和 T-AOC)、水解酶(ACP 和 AKP)和溶菌酶(LSZ)活力的差异。结果表明, 在抗氧化酶活力方面, F3 和 C 组刺参 SOD 活力均随温度的升高呈先升高后降低的趋势, 且当温度为 31℃ 和 32℃ 时 F3 组 SOD 活力显著高于 C 组($P<0.05$); F3 组 CAT 活力在实验温度范围内均高于 C 组, 且当温度为 27~31℃ 和 33℃ 时差异显著($P<0.05$); F3 组 T-AOC 活力在各温度下均显著高于 C 组($P<0.05$)。在水解酶活力方面, F3 组的 ACP 活力在各温度下均高于 C 组, 且除 31℃ 外, 其余温度下均差异显著($P<0.05$); F3 组 AKP 活力在 25℃、27℃ 和 31℃ 下显著高于 C 组($P<0.05$), 其余温度下差异不显著。F3 和 C 组 LSZ 活力均随水温的上升呈先升高后降低的趋势, 且在 27~31℃ 范围内 F3 组 LSZ 活力显著高于 C 组($P<0.05$)。结果表明, 经过定向选育的耐高温品系 F3 对高温的耐受能力获得了提高, 实验结果为耐高温刺参良种选育提供了理论依据。

关键词: 刺参; 耐高温品系; 抗氧化酶; 水解酶; 溶菌酶

中图分类号: S963.71

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)02-0344-08

温度是影响刺参(*Apostichopus japonicus*)生长和发育的重要因素, 超过适温范围后, 刺参会停止活动而进入“夏眠”状态^[1]。在中国的主要刺参养殖区, 夏眠时间一般在 100 d 左右, 其间刺参消化道萎缩、体重减轻^[2], 各种消化酶活力发生改变^[3], 甚至发生如 2013 年夏季因池塘高温、低氧导致刺参大面积死亡的现象, 这不仅给刺参养殖生产带来严重的经济损失, 也给刺参产业的健康发展敲响了警钟。因此, 培育具有耐高温特性的刺参品种是解决刺参产业发展的有效途径, 也是刺参良种选育的重要方向。

温度胁迫是物种进化的动力之一, 长期的温度变化很容易引起物种分化甚至新物种的形成^[4]。

将被选生物置于胁迫环境中进行淘汰选择, 存留抗性个体进行累代选育也是选择育种的传统方法, 以高温为胁迫因子进行耐高温性状的选择育种已在酵母(*Saccharomyces genus*)^[5]、坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)^[6]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[7-8]等物种的选育中获得了良好的研究进展。

生物在对高温适应的过程中, 逐渐改变机体代谢水平和生理状态, 这是一种积极的适应和调节过程。我们前期的研究结果表明, 与未经选育的野生刺参群体相比, 选育的耐高温群体在高温胁迫下具有更好的耐受能力, 而且从高温下的存活率、热休克蛋白表达量等生物学角度验证了高温耐受性的可遗传性^[9-10], 但有关高温胁迫对刺参耐高

收稿日期: 2015-04-16; 修订日期: 2015-05-22。

基金项目: 国家 863 计划项目—高值海珍品良种培育(2012AA10A412); 山东省农业良种工程课题—速生抗病耐高温刺参良种选育。

作者简介: 刘石林(1977—), 男, 硕士, 从事刺参良种选育研究. E-mail: shliu72@126.com

通信作者: 杨红生, 研究员, 博士生导师. E-mail: hshyang@qdio.ac.cn

温品系免疫功能的影响尚缺乏研究报道。因此,本研究以选育的刺参耐高温品系 F₃ 群体和未经选育的普通刺参群体为研究对象,在室内模拟池塘夏季高温环境,比较研究了两个群体在高温胁迫条件下体壁抗氧化酶、水解酶以及溶菌酶活力指标的变化和差异,以期为高温胁迫下刺参的适应机制和耐高温刺参品种选育效果评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

在刺参高温夏眠期,收集仍处于摄食活动的大规格刺参(200 g/头以上)组成基础群体,进行子代苗种培育。在子代浮游幼体阶段、平均规格分别为 100000 头/kg、10000 头/kg 和 1000 头/kg 时,分别进行高温淘汰和大规格苗种选择,各阶段苗种淘汰率均保持在 50% 左右,并在夏眠期选择仍在摄食的大规格个体作为子代种参,实施累代选育。

实验在 2014 年 6 月中旬进行,选择耐高温品系 F₃ 群体(F₃ 组)和未经选育的普通刺参对照群体(C 组)1 龄幼参,各 200 头,鲜体重为(13.6±1.8) g。实验前,幼参置于 4.5 m³ 水泥池中暂养 7 d,自然水温(24±0.5)℃,每天按时定量投喂人工饲料(鼠尾藻、马尾藻、海带粉和海泥等)。

1.2 实验设计

恒温系统由 3 个 0.3 m³ 的塑料水箱组成,其中一个水箱为升温箱,内置控温仪进行升温和控温,升温水通过小型潜水泵注入另 2 个苗种受试箱,受试箱的水利用水位差通过虹吸管自动流回升温箱,保证各受试水箱水温的一致性,水温波动控制在 0.2℃ 以内。刺参暂养结束后,停止投喂人工饲料,再经过 2 d 的静养,待刺参肠道内粪便基本排出完毕后,将两个群体的刺参转移至恒温系统内,每组设置 4 个平行,每个受试箱放 2 个平行,每个平行放养 50 头。实验共设 25℃、27℃、29℃、31℃、32℃ 和 33℃ 6 个温度梯度,升温幅度为 0.5℃/(12 h),达到每个设定温度并维持恒温 12 h 后,开始取样。每个平行随机取 5 头刺参,将体表色素层用解剖刀切除后,取少量体壁组织样本保存在-80℃超低温冰箱备用。

1.3 免疫指标测定

利用南京建成生物工程研究所试剂盒及其说明进行以下免疫指标的测定,测定指标为:超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、总抗氧化能力(T-AOC)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)和溶菌酶(LSZ)。

1.4 数据处理

应用 SPSS13.0 软件统计耐高温群体(F₃ 组)和普通对照群体(C 组)的 SOD、CAT、T-AOC、ACP、AKP 和 LSZ 平均值和标准差($\bar{x} \pm SD$),并对数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和多重比较(Duncan),以 $P < 0.05$ 作为差异显著的标志。

2 结果与分析

2.1 超氧化物歧化酶(SOD)

不同处理温度下 C 组和 F₃ 组刺参体壁 SOD 活力变化如图 1 所示,可以看出,温度对两个群体的 SOD 活力影响显著($P < 0.05$)。(1)C 组: SOD 活力随着温度的升高有整体下降的趋势,且 27℃ 时的 SOD 活力显著高于 31~33℃ 的 SOD 活力。(2)F₃ 组: SOD 活力随着温度的升高呈先升高后降低的趋势,29℃、31℃ 和 32℃ 时的 SOD 活力显著高于 25℃、27℃ 和 33℃ 的 SOD 活力。(3)C 组和 F₃ 组之间:当胁迫温度为 31℃ 和 32℃ 时, F₃ 组 SOD 活力显著高于 C 组($P < 0.05$),其他温度下两组差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 过氧化氢酶(CAT)

由刺参体壁 CAT 活力变化(图 2)可以看出,温度对两组刺参体壁 CAT 活力影响显著($P < 0.05$),均随着温度的升高呈下降的趋势。(1)C 组: CAT 活力在温度为 25℃ 时最高,且与其他温度下的 CAT 活力差异显著($P < 0.05$); 33℃ 时的 CAT 活力显著低于 25℃、27℃ 和 29℃ 的 CAT 活力($P < 0.05$)。(2)F₃ 组: 温度为 25℃ 下的 CAT 活力显著高于 32℃ 和 33℃ 下的 CAT 活力($P < 0.05$), 27℃ 和 29℃ 下的 CAT 活力显著高于 33℃ 下的 CAT 活力($P < 0.05$)。(3)C 组和 F₃ 组之间: F₃ 组 CAT 活力均高于 C 组,且在 27℃、29℃、31℃ 和 33℃ 的胁迫温度下差异显著($P < 0.05$)。

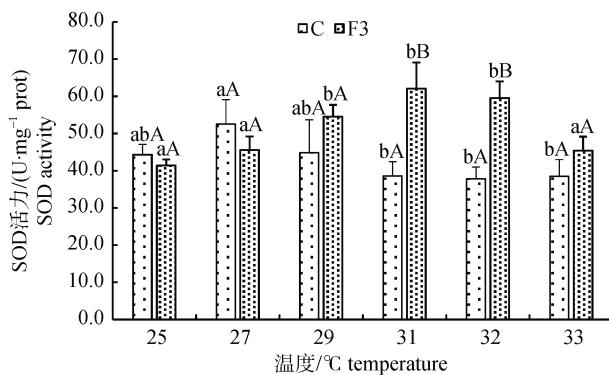


图1 不同温度胁迫下刺参体壁SOD活力变化

不同小写字母表示同一群体内不同处理温度间免疫酶活力差异显著($P<0.05$)，不同大写字母表示同一温度下C组和F3组免疫酶活力差异显著($P<0.05$)。C: 普通刺参; F3: 耐高温品系子三代。

Fig. 1 SOD activity of sea cucumber at different temperatures
Different lowercase letters indicate significant difference at different temperatures in the same group ($P<0.05$), and different capital letters indicate significant difference between group C and F3 at the same temperature ($P<0.05$). C: wild population; F3: F_3 of breeding population.

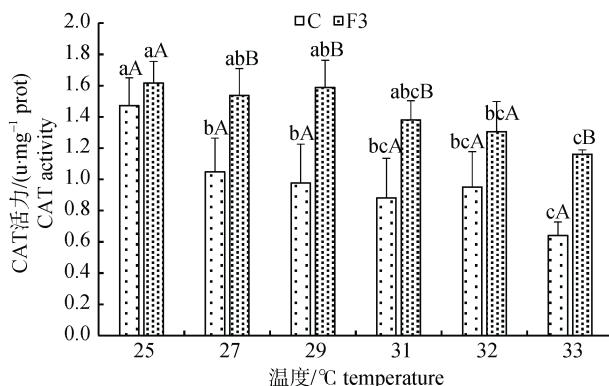


图2 不同温度胁迫下刺参体壁CAT活力变化

不同小写字母表示同一群体内不同处理温度间免疫酶活力差异显著($P<0.05$)，不同大写字母表示同一温度下C组和F3组免疫酶活力差异显著($P<0.05$)。C: 普通刺参; F3: 耐高温品系子三代。

Fig. 2 CAT activity of sea cucumber at different temperatures
Different lowercase letters indicate significant difference at different temperatures in the same group ($P<0.05$), and different capital letters indicate significant difference between group C and F3 at the same temperature ($P<0.05$). C: wild population; F3: F_3 of breeding population.

2.3 总抗氧化能力(T-AOC)

由图3可以看出，随着胁迫温度的升高，C组和F3组T-AOC活力均呈下降的趋势，且温度对两组刺参体壁T-AOC活力影响显著($P<0.05$)。

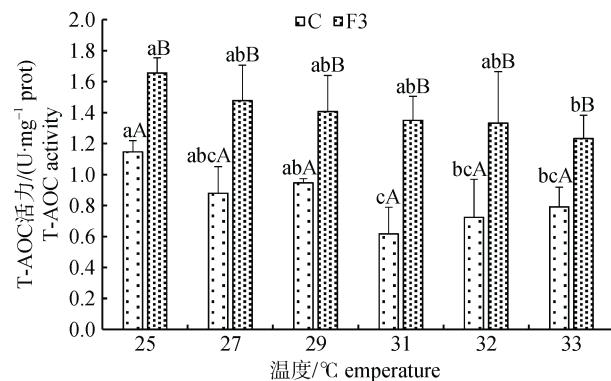


图3 不同温度胁迫下刺参体壁T-AOC活力变化

不同小写字母表示同一群体内不同处理温度间免疫酶活力差异显著($P<0.05$)，不同大写字母表示同一温度下C组和F3组免疫酶活力差异显著($P<0.05$)。C: 普通刺参; F3: 耐高温品系子三代。

Fig. 3 T-AOC activity of sea cucumber at different temperatures
Different lowercase letters indicate significant difference at different temperatures in the same group ($P<0.05$), and different capital letters indicate significant difference between group C and F3 at the same temperature ($P<0.05$). C: wild population; F3: F_3 of breeding population.

(1)C组: T-AOC活力在25℃时最高，且显著高于31℃、32℃和33℃下的T-AOC活力($P<0.05$)；31℃下的T-AOC活力最低，但与32℃和33℃下的T-AOC活力差异不显著($P>0.05$)。(2)F3组: 25℃下T-AOC的活力显著高于33℃($P<0.05$)。(3)C组和F3组之间: F3组T-AOC活力均显著高于C组T-AOC活力($P<0.05$)。

2.4 酸性磷酸酶(ACP)

由图4可以看出，随着温度的升高，C组和F3组ACP活力均呈下降的趋势，温度对两组ACP活力均影响显著($P<0.05$)。(1)C组: 在25~31℃下ACP活力变化不大，33℃下的ACP活力最低，且与25~31℃下的ACP活力差异显著($P<0.05$)。

(2)F3组: 25℃和27℃下的ACP活力显著高于32℃和33℃下的ACP活力($P<0.05$)。(3)C组和F3组之间: F3组ACP活力均高于C组，且除31℃外，其余温度下的ACP活力在两组之间均差异显著($P<0.05$)。

2.5 碱性磷酸酶(AKP)

由刺参体壁碱性磷酸酶(AKP)活力变化(图5)可以看出，(1)C组: 随着温度的升高，除31℃下

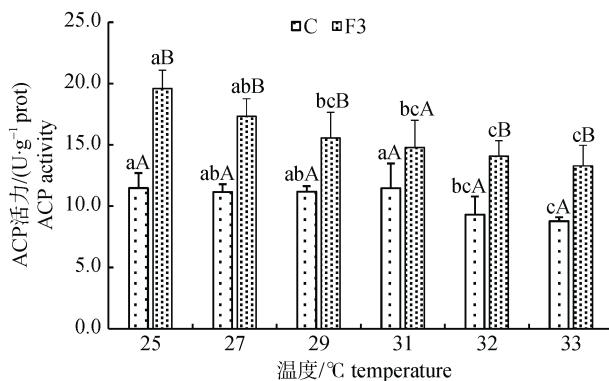


图4 不同温度胁迫下刺参体壁ACP活力变化

不同小写字母表示同一群体内不同处理温度间免疫酶活力差异显著($P<0.05$)，不同大写字母表示同一温度下C组和F3组免疫酶活力差异显著($P<0.05$)。C: 普通刺参; F3: 耐高温品系子三代。

Fig. 4 ACP activity of sea cucumber at different temperatures. Different lowercase letters indicate significant difference at different temperatures in the same group ($P<0.05$), and different capital letters indicate significant difference between group C and F3 at the same temperature ($P<0.05$). C: wild population; F3: F₃ of breeding population.

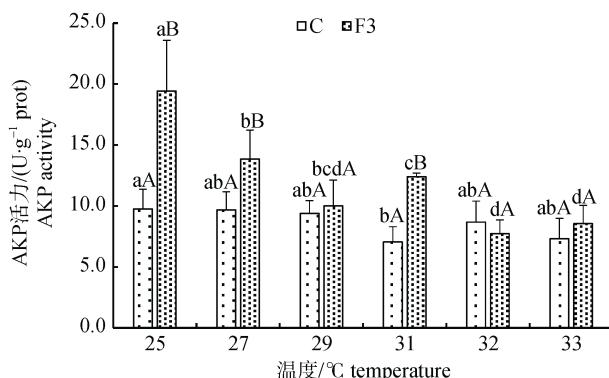


图5 不同温度胁迫下刺参体壁AKP活力变化

不同小写字母表示同一群体内不同处理温度间免疫酶活力差异显著($P<0.05$)，不同大写字母表示同一温度下C组和F3组免疫酶活力差异显著($P<0.05$)。C: 普通刺参; F3: 耐高温品系子三代。

Fig. 5 AKP activity of sea cucumber at different temperatures. Different lowercase letters indicate significant difference at different temperatures in the same group ($P<0.05$), and different capital letters indicate significant difference between group C and F3 at the same temperature ($P<0.05$). C: wild population; F3: F₃ of breeding population.

AKP活力显著低于25℃外($P<0.05$)，其他温度下的AKP活力相互之间差异不显著($P>0.05$)。(2)F3组：温度的升高对AKP活力下降影响显著($P<0.05$)，25℃下的AKP活力最高，27℃的AKP活力次之，32℃和33℃下的AKP活力最低，且相

互间差异显著($P<0.05$)。(3)C组和F3组之间：在25℃、27℃和31℃下，F3组AKP活力均显著高于C组AKP活力($P<0.05$)，其余温度下的AKP活力两组之间差异不显著($P>0.05$)。

2.6 溶菌酶(LSZ)

由刺参体壁溶菌酶(LSZ)活力变化(图6)可以看出，两组LSZ活力均随温度的升高呈先升高后下降的趋势，温度对LSZ活力变化影响显著($P<0.05$)。

(1)C组：温度为25℃时的LSZ活力最低，且显著低于27~33℃下的LSZ活力($P<0.05$)；27~33℃下的LSZ活力相互之间差异不显著($P>0.05$)，32℃时的LSZ活力最高。(2)F3组：31℃下的LSZ活力最高，且显著高于除29℃外其他温度下的LSZ活力；25℃下LSZ活力最低，且显著低于其他温度下的LSZ活力。(3)C组和F3组之间：27℃、29℃和31℃下，F3组LSZ活力均显著高于C组($P<0.05$)，其余温度下两组之间差异不显著($P>0.05$)。

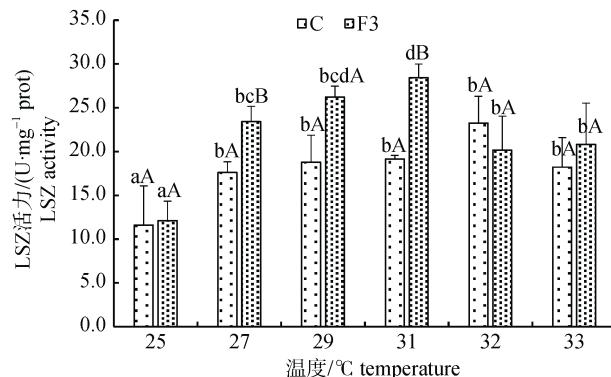


图6 不同温度胁迫下刺参体壁LSZ活力变化

不同小写字母表示同一群体内不同处理温度间免疫酶活力差异显著($P<0.05$)，不同大写字母表示同一温度下C组和F3组免疫酶活力差异显著($P<0.05$)。C: 普通刺参; F3: 耐高温品系子三代。

Fig. 6 LSZ activity of sea cucumber at different temperatures. Different lowercase letters indicate significant difference at different temperatures in the same group ($P<0.05$), and different capital letters indicate significant difference between group C and F3 at the same temperature ($P<0.05$). C: wild population; F3: F₃ of breeding population.

3 讨论

3.1 高温胁迫对耐高温群体和普通群体抗氧化能力的影响

温度通过影响生物体新陈代谢反应速率从而

调控其能量收支、生长发育、酶活水平和抗病能力。刺参属于变温动物，水温的变化会对机体免疫产生直接的影响，特别是在胁迫环境中，体内产生的大量活性氧(O_2^- 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 等)会对机体造成氧化损伤和免疫机能破坏，此时，机体抗氧化防御酶系统(如 SOD 和 CAT 等)启动免疫应答^[11-13]，可有效清除体内活性氧，维持生物正常生命活动，因此，测定 SOD 和 CAT 活力可以了解机体的免疫能力^[14-15]。总抗氧化能力(T-AOC)反映机体抗氧化酶系统和非酶促系统对外来胁迫的免疫能力，是衡量机体抗氧化系统功能与生物健康程度的综合性指标^[16-17]。刺参体壁不但是抵御外来病原的第一道物理防线，其中的免疫酶也发挥着重要的作用^[18-19]。相关研究表明，在刺参进入夏眠过程中($16^{\circ}C$ 上升至 $26^{\circ}C$)，机体的 SOD 和 CAT 活力上升，持续 $26^{\circ}C$ 胁迫下又回落至较低水平^[20]。王天明等^[21]的研究结果表明，相对于低温活跃期，高温夏眠期刺参呼吸树中 Cu/Zn-SOD 基因表达量出现上调，而 CAT 基因表达量出现显著下降。锄足蟾在高温夏眠期间肝 CAT 活力也显著低于低温活动状态，而 SOD 活力相对升高^[22]。

本研究中，在 $25\sim33^{\circ}C$ 的高温胁迫下，选育的耐高温群体和普通群体 SOD 活力均呈现先升高后降低的趋势，但耐高温群体在 $32^{\circ}C$ 时 SOD 活力最高，而普通群体在 $27^{\circ}C$ 时 SOD 活力最高，耐高温群体 SOD 活力最高表达出现滞后性特征。两个群体 CAT 和 T-AOC 活力均随温度的升高而下降，这与高温环境中的刺参^[13]和锄足蟾(*Scaphiopus couchii*)^[22]对应酶活力的变化基本一致，说明随着胁迫温度的升高和时间的延长，刺参体内积累的活性氧对抗氧化酶活力产生了抑制作用。但相对于普通群体刺参，耐高温群体抗氧化酶活力在高温胁迫下仍保持较高的表达水平，因此，耐高温群体在高温胁迫时仍具有较强的保护机体免受氧化损伤的能力。

3.2 高温胁迫对耐高温群体和普通群体磷酸酶活力的影响

磷酸酶包括酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)，普遍存在于动植物体内，是两种参与免

疫防御的重要水解酶，可催化各种含磷化合物的水解过程^[23]。ACP 是巨噬细胞溶酶体的标志酶，也是巨噬细胞内最有代表性的水解酶之一，可消化分解异物颗粒。AKP 对底物的专一性要求较低，在碱性条件下可使磷酸单脂水解生产乙醇和磷酸，起到解毒的功能，同时与营养物质的消化吸收密切相关^[24]，而且在机体抵抗疾病、免疫反应和细胞损伤与修复过程中起着重要的作用，在饲料中添加免疫多糖可显著提高磷酸酶的活性，提高机体免疫力^[25]。本研究中，随着胁迫温度的升高和时间的延长，两个群体的 ACP 和 AKP 活力均呈现逐渐降低的趋势，这与刺参在干露^[13]、饥饿和夏眠^[26]等胁迫条件下酶活力随时间的变化趋势基本一致，因此，长时间的高温胁迫会显著抑制刺参体壁中 ACP 和 AKP 的活力，出现免疫疲劳，降低刺参机体的免疫防御能力。但从两个群体磷酸酶活力的差异可以看出，耐高温群体 ACP 活力在 $25\sim33^{\circ}C$ 的温度下总体显著高于普通群体，并且 AKP 活力在 $25\sim31^{\circ}C$ 时也高于普通群体，这种变化表明，相对于未经选育的普通群体，经过高温定向选育的耐高温群体在高温胁迫下仍可保持较强的免疫防御能力。

3.3 高温胁迫对耐高温群体和普通群体溶菌酶活力的影响

溶菌酶(LSZ)广泛存在于动物及植物体内，是吞噬细胞杀菌的物质基础，也是非特异性免疫的重要组成部分^[27]，可使外源性细菌细胞裂解，也可激活机体内吞噬细胞的活性，达到机体防御的功能。相关研究表明，温度对溶菌酶活力变化影响显著，随着温度的升高，机体内溶菌酶活力有升高的趋势^[28-29]，在饲料中添加免疫多糖也可以提高 LSZ 活性，提高机体免疫力^[25]。在刺参夏眠的过程中(6~10 月)，LSZ 活力也呈现逐渐升高的趋势^[30]，这与本研究中 LSZ 活力变化趋势相一致；但随着温度的进一步升高(超过 $32^{\circ}C$)，机体免疫系统处于崩溃边缘，LSZ 活力也逐渐降低，与 Wang 等^[31]在 $32^{\circ}C$ 下处理 6~12 h 后刺参体腔液 LSZ 活力显著降低的趋势相类似。以上结果表明，一定范围的温度胁迫可以激活刺参机体内溶菌酶

活力, 增强机体对胁迫的免疫反应, 但超过耐受范围(包括温度和时间因素)时, 机体的免疫系统遭到破坏, 机体处于濒死状态, LSZ 酶活力降低。从两个群体的 LSZ 活力差异可以看出, 在 25~33℃的高温胁迫下, 耐高温群体仍可保持较高的 LSZ 活力水平, 表明选育的耐高温群体对高温胁迫能够更有效地做出免疫调节反应, 保护机体免受损伤, 表现出对高温胁迫的较强适应性。

参考文献:

- [1] Chen J X. Present status and prospects of sea cucumber industry in China[J]. FAO Fisheries Technical Paper, 2004, 26: 25–38.
- [2] Yuan X T, Yang H S, Chen M Y, et al. Research advances in aestivation of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka): a review[J]. Marine Sciences, 2007, 31(8): 88–90. [袁秀堂, 杨红生, 陈慕雁, 等. 刺参夏眠的研究进展[J]. 海洋科学, 2007, 31 (8): 88–90.]
- [3] Gao F, Yang H S, Xu Q, et al. Effect of water temperature on digestive enzyme activity and gut mass in sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka), with special reference to aestivation[J]. Chin J Oceanol Limnol, 2009, 27(4): 714–722.
- [4] He L, Yu H, Yuan L C, et al. Advances in molecular ecology of biological temperature adaption[J]. Subtropical Agriculture Research, 2014, 10(3): 205–211. [何璐, 虞泓, 袁理春, 等. 生物温度适应的分子生态学研究进展[J]. 亚热带农业研究, 2014, 10(3): 205–211.]
- [5] Chen Y F, Wang Z X, Wang C X, et al. Preliminary study on isolation, identification and ethanol fermentation of thermo-tolerant yeast[J]. Microbiology China, 2003, 30: 24–27. [陈叶福, 王正祥, 王晨霞, 等. 耐高温酵母株的分离、鉴定及其酒精发酵初步研究[J]. 微生物学通报, 2003, 30: 24–27.]
- [6] Lü F, Yan X H, Liu C J, et al. Selection of a high-temperature tolerant strain of *Porphyra haitanensis* and its cultivation in sea area[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(4): 457–462. [吕峰, 严兴洪, 刘长军, 等. 坛紫菜耐高温品系的选育与海区中试[J]. 上海海洋大学学报, 2010, 19(4): 457–462.]
- [7] Liu B S, Zhang T S, Kong J, et al. Estimation of genetic parameters for growth and upper thermal tolerance traits in turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(11): 1601–1606. [刘宝锁, 张天时, 孔杰, 等. 大菱鲆生长和耐高温性状的遗传参数估计[J]. 水产学报, 2011, 35(11): 1601–1606.]
- [8] Ma A J, Huang Z H, Wang X A, et al. The selective breeding of thermal tolerance family and appraisal of performance in turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(4): 797–804. [马爱军, 黄智慧, 王新安, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)耐高温品系选育及耐温性能评估[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 797–804.]
- [9] Xu D X, Sun L N, Liu S L, et al. Polymorphisms of heat shock protein 90 (Hsp90) in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* and their association with heat-resistance[J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 41(2): 428–436.
- [10] Zhao H, Liu S L, Yang H S, et al. The study on thermo tolerance of juvenile offspring *Apostichopus japonicus* (Selenka) with directive breeding[J]. Marine Sciences, 2014, 38(9): 1–6. [赵欢, 刘石林, 杨红生, 等. 刺参高温定向选育群体子一代耐温性状的分析[J]. 海洋科学, 2014, 38(9): 1–6.]
- [11] Hermes-Lima M, Storey J M, Storey K B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails[J]. Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol, 1998, 120(3): 437–448.
- [12] Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants[J]. Exp Physiol, 1997, 82 (2): 291–295.
- [13] Tian X L, He R P, Qian Y, et al. Effects of desiccation on non-specific immune indices in sea cucumber *Apostichopus japonicus* under different temperatures[J]. Hebei Fisheries, 2014(7): 21–26, 35. [田相利, 何瑞鹏, 钱园, 等. 干露胁迫对刺参体壁非特异性免疫的影响[J]. 河北渔业, 2014(7): 21–26, 35.]
- [14] Kong X H, Wang G Z, Ai C X, et al. Comparative study on total antioxidative capability and SOD activity in different organs and tissues of mud crab *Scylla serrata*[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2003, 22(4): 469–474. [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.]
- [15] Zhao B L. Oxygen Free Radicals and Natural Antioxidants[M]. Beijing: Science Press, 1999. [赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999.]
- [16] de Oliveira U O, da Rosa Araújo A S, Belló-Klein A, et al. Effects of environmental anoxia and different periods of re-oxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*[J]. Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Mol Biol, 2005, 140(1): 51–57.
- [17] Zenteno-Savin T, Saldivar R, Ahuejote-Sandoval M. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp[J]. Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol, 2006, 142(3): 301–308.
- [18] Li J Y. The immunological characters and pathogenic study of cultured *Apostichopus japonicus*[D]. Qingdao: Ocean

- University of China, 2007. [李继业. 养殖刺参免疫学特征与病害研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.]
- [19] Nie Z L, Li X, Xin T. Histological and histochemical examination of body wall of sea cucumber *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2007, 22(3): 184–187. [聂竹兰, 李霞, 辛涛. 仿刺参体壁的组织学和组织化学[J]. 大连水产学院学报, 2007, 22(3): 184–187.]
- [20] Ji T T, Dong Y W, Dong S L. Growth and physiological responses in the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka: Aestivation and temperature[J]. Aquaculture, 2008, 283(1–4): 180–187.
- [21] Wang T M, Yang H S, Su L. Transcriptional regulation of antioxidant enzymes in respiratory tree of sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Selenka) during aestivation[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35 (8): 1172–1181. [王天明, 杨红生, 苏琳. 刺参呼吸树抗氧化防御酶类基因在夏眠期的表达特征[J]. 水产学报, 2011, 35 (8): 1172–1181.]
- [22] Grundy J E, Storey K B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation damage in estivating toads, *Scaphiopus couchii*[J]. J Comp Physiol B-Biochem System Environ Physiol, 1998, 168(2): 132–142.
- [23] Bull H, Murray P G, Thomas D, et al. Acid phosphatases[J]. Mol Pathol, 2002, 55(2): 65–72.
- [24] Zhang R Q, Chen Q X, Zheng W Z, et al. Inhibition kinetics of green crab *Sylla serrata* alkaline phosphatase activity by dithiothreitol or 2-mercaptoethanol[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2000, 32(8): 865–872.
- [25] Liu Y, Kong W L, Jiang G L, et al. Effects of two kinds of immunopolysaccharide in the activities of immunoenzymes in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(5): 787–793. [刘云, 孔伟丽, 姜国良, 等. 2种免疫多糖对刺参组织主要免疫酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2008, 15(5): 787–793.]
- [26] Du R B, Zang Y Q, Tian X L, et al. Growth, metabolism and physiological response of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus* Selenka during periods of inactivity[J]. J Ocean Univ, 2013, 12(1): 146–154.
- [27] Johanson P T. The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*) III. In vitro reaction to bacteria[J]. J Invertebr Pathol, 1969, 13(1): 42–62.
- [28] Cheng C F, Ji G L. Bacteriolytic substances in serum, skin and intestine mucus of grass carp[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 1992, 11(3): 276–279. [陈昌富, 纪国良. 草鱼的血清、体表和肠黏液中溶菌物质活性及其特性[J]. 华中农业大学学报, 1992, 11(3): 276–279.]
- [29] Langston A L, Hoare R, Stefansson M, et al. The effect of temperature on non-specific defence parameters of three strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 12(1): 61–76.
- [30] Wang F Y, Yang H S, Gabr H R, et al. Immune condition of *Apostichopus japonicus* during aestivation[J]. Aquaculture, 2008, 285: 238–243.
- [31] Wang F Y, Yang H S, Gao F, et al. Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*[J]. Comp Biochem Physiol A-Mol Integr Physiol, 2008, 151(4): 491–498.

Effects of high-temperature stress on several immune enzyme activities of *Apostichopus japonicus* thermotolerant and normal species

LIU Shilin^{1,2}, RU Xiaoshang¹, XU Qinzeng², BAI Yucen², LI Jing³, ZHANG Libin², YANG Hongsheng²

1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

3. Shandong Oriental Ocean Sci-Tech Co. Ltd., Yantai 264003, China

Abstract: Temperature has a significant effect on the growth, reproduction, distribution and abundance of sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). The suitable temperature range for this species is 5–20°C, and the optimum growth range is 10–16°C, which fluctuates depending on size. When the water temperature exceeds the optimal range, *A. japonicus* stops feeding and goes into aestivation. In recent years, as global warming has intensified, slow growth, malformation and high mortality of marine animals have been observed frequently because of high temperatures. High seawater temperatures during summer 2013 resulted in significant economic losses in the *A. japonicus* aquaculture industry in China. Therefore, breeding *A. japonicus* resistant to high temperatures is required urgently. In this study, we used 1-year-old juveniles (13.6 g±1.8 g) from a directed breeding population (F3 group) and a wild population (C group) as the experimental animals. High temperatures as in ponds in summer were imitated (25°C, 27°C, 29°C, 31°C, 32°C and 33°C, increasing by 0.5°C every 12 h). The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), lysozyme (LSZ) and total antioxidant capacity (T-AOC) of *A. japonicus* in F3 and C groups were determined and compared after 12 h thermal stimulus at different temperatures. The results showed that temperature had a significant influence on the SOD, CAT, ACP, AKP and LSZ activities, and T-AOC. The SOD activities of the F3 and C groups initially showed an upward trend, but declined as the temperature increased from 25°C to 33°C. The activity of SOD in the F3 group was significantly higher than in group C ($P<0.05$) at 31°C and 32°C. The CAT activity and T-AOC declined in both groups as temperature increased from 25°C to 33°C. The CAT activity in the F3 group was higher than in group C at every temperature level, and the difference was significant when the temperature was 27°C, 29°C, 31°C and 33°C ($P<0.05$). The T-AOC in group F3 was significantly higher than in group C ($P<0.05$) at temperature ranges from 25°C to 33°C. The ACP and AKP activities in both groups declined as temperature increased; the ACP activity in group F3 was significantly higher than in group C ($P<0.05$), except at 31°C; and the AKP activity in group F3 was significantly higher than in group C ($P<0.05$) when the temperature was 25°C, 27°C and 31°C. The LSZ activity showed an initial upward trend and then declined as the temperature increased in both groups; the activity in the F3 group was significantly higher than in group C at 27°C, 29°C and 31°C. The results indicated that the immune capacity of thermotolerant *A. japonicus* to high-temperature stress has improved after three generations of directed breeding. This study provides useful information for further research on selective breeding of *A. japonicus*. The rate of global warming is increasing, and the average temperature of the earth's surface is predicted to rise by 1.5–6.0°C by the end of the present century, according to the 2007 report by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Therefore, biological studies of organisms, including *A. japonicus*, under high-temperature stress are urgently required.

Key words: *Apostichopus japonicus*; thermotolerance; antioxidant enzyme; hydrolase; lysozyme

Corresponding author: YANG Hongsheng. E-mail: hshyang@qdio.ac.cn