

·研究简报·

Cu²⁺对栉孔扇贝体内几种免疫因子的影响

樊甄姣^{1,2}, 杨爱国², 刘志鸿²

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:测定了栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)在不同浓度 Cu²⁺胁迫下酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)及过氧化氢酶(CAT)等3种酶活性的变化,并同时用组织化学的方法检测了其体内活性氧(ROS)含量的影响。结果表明,当 Cu²⁺在0.02 mg/L、0.05 mg/L、0.1 mg/L 3种质量浓度条件下,栉孔扇贝体内 ACP 和 AKP 活性均高于对照组,但随着 Cu²⁺浓度增加,酶活性有降低的趋势,当 Cu²⁺质量浓度达到0.2 mg/L时这2种酶活性均低于对照组。而 CAT 活性均高于对照组,且随着 Cu²⁺质量浓度增加而升高;活性氧含量的变化趋势与 CAT 活性变化趋势相似。这些数据说明 Cu²⁺对栉孔扇贝的免疫活性有明显影响。

关键词: Cu²⁺; 栉孔扇贝; 活性氧; 酶活力

中图分类号: Q959.215 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)06-0576-04

近年来,栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的大规模死亡问题已引起社会各界的广泛重视,根本原因是长期密集养殖导致养殖环境恶化,病原体大量滋生及栉孔扇贝抗病力下降等。重金属是海水养殖中普遍存在的污染物质, Cu²⁺是其中的重要组成部分。Rongier^[1]曾指出海水中的 Cu²⁺浓度对鱼类的免疫系统有明显的影响; Pipe^[2]通过对牡蛎(*Mytilus edulis*)免疫系统的研究,表明在 Cu²⁺的胁迫下牡蛎的各种免疫指标会有显著变化,但关于 Cu²⁺对栉孔扇贝免疫系统的研究,国内外至今还未见相关报道。

双壳贝类作为一种不具备产生抗体独立机制的生物,吞噬作用在其防御机制中起着重要作用。异物被吞入细胞后即与溶酶体融合,并最终被各种水解酶消化分解,这些水解酶中比较重要的有酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、溶菌酶等^[3]。同时吞噬作用也可引起呼吸爆发,在几秒中内氧的消耗可提高10~15倍,并伴随活性氧的产生。在正常的生理状态下,活性氧可为抗氧化系统控制,处于产生和消除的动态平衡下;但当生物处于逆境胁迫条件下,活性氧会大量产生,并损伤脂类、蛋白质、核酸等大分子,使细胞功能受到破坏,需及时清除,而这些额外氧的清除需过氧化氢酶(CAT)的作用。因此机体中 ACP、AKP 和 CAT 的含量及活性就可以很好地反映其免疫活性的变化。本研究测定了 ACP、AKP、CAT 活性在 Cu²⁺胁迫下的变化,并用细胞学的方法观察了活性氧含量随 Cu²⁺浓度变化的规律,以期了解 Cu²⁺对栉孔扇贝的免疫系统的影响,为海水养殖和海水污染治理提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

栉孔扇贝采自山东省青岛海区,壳高4~5 cm。取回后暂养于实验室,暂养水温为18℃,投喂新月菱形藻(*Nitzschia closterium*)和亚心型扁藻(*Tetraselmis suecica*),每天换水1次,1周后进行实验。

1.2 方法

将扇贝分成5组,每组10只扇贝,分别放入 Cu²⁺质量浓度为0.02 mg/L、0.05 mg/L、0.1 mg/L、0.2 mg/L的水箱中正常饲养,并设对照组。7 d后,从闭壳肌血窦取血,用于 CAT 活力的测定和活性氧产生情况的检测;同时取肝脏,加入1:2(质量体积比, mg/L)的0.85%生理盐水匀浆,于4℃ 11 000 r/min 离心20 min,取上清,用于 ACP、AKP 活力的测定。

活性氧的检测采用刘军权^[4]改进的 NBT 法; CAT 活力的测定采用过氧化氢法^[5]; ACP 和 AKP 活力的测定采用 Kruzel 等^[6]的磷酸苯二钠法,酶活力的计算采用金氏单位(单位定义:每100 mL血清在37℃与基质液作用15 min,产生1 mg 酚为1个金氏单位)。

2 结果

2.1 栉孔扇贝血细胞活性氧的 NBT 还原法检测

本研究采用 NBT 还原法检测了栉孔扇贝血细胞活性氧的产生。在有超氧阴离子存在时,浅黄色的 NBT 被还原成

收稿日期:2004-02-19; 修订日期:2004-03-24。

基金项目:国家“863”高技术研究发展计划资助项目(2001AA628070)。

作者简介:樊甄姣(1978-),女,硕士生,主要从事贝类免疫学的研究。

通讯作者:杨爱国, E-mail: yangag@ysfri.ac.cn

暗蓝色,形成在吞噬细胞内易观察到的不溶沉淀物 Formazan,如图1-A为NBT阴性细胞,血细胞呈浅粉色,无暗蓝色沉淀颗粒。图1-B、1-C为NBT阳性细胞,箭头示暗

蓝色沉淀 Formazan,其中图1-C示较高 Cu^{2+} 浓度下活性氧的产生情况,其阳性程度明显高于低 Cu^{2+} 浓度下产生的活性氧(图1-B)。

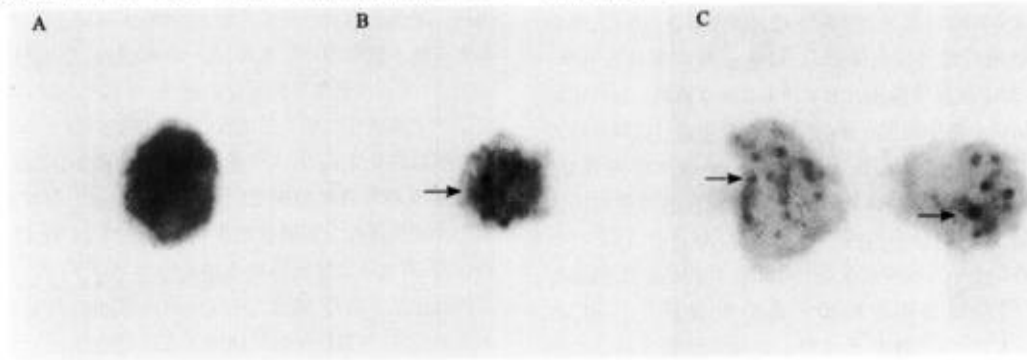


图1 NBT法检测活性氧的产生

A:对照, $\times 1500$; B:低 Cu^{2+} 浓度下活性氧的产生情况,暗蓝色沉淀 Formazan(箭头), $\times 1500$; C:高 Cu^{2+} 浓度下活性氧的产生情况,暗蓝色沉淀 Formazan(箭头), $\times 1500$ 。

Fig.1 Measurement of reactive oxygen species by NBT assay

A, Control, $\times 1500$; B, Reactive oxygen species in low Copper concentrations, Formazan (arrow head), $\times 1500$; C, Reactive oxygen species in high Cu^{2+} concentrations; Formazan (arrow head), $\times 1500$ 。

2.2 Cu^{2+} 对栉孔扇贝中 ACP、AKP 活力的影响

Cu^{2+} 胁迫 7 d 后,栉孔扇贝肝脏中 ACP 和 AKP 活力在 0.02 mg/L 时明显高于对照组,但随 Cu^{2+} 浓度的增加,酶活力呈下降趋势,在 0.2 mg/L 时酶活性低于对照。结果见图 2 和图 3。

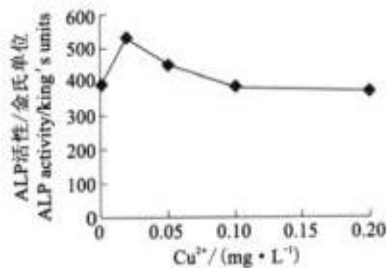


图2 Cu^{2+} 对栉孔扇贝 ACP 活力的影响

Fig.2 Activities of ACP in different Cu^{2+} concentrations

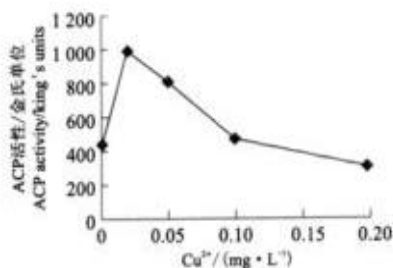


图3 Cu^{2+} 对栉孔扇贝 AKP 活力的影响

Fig.3 Activities of AKP in different Cu^{2+} concentrations

2.3 Cu^{2+} 对栉孔扇贝 CAT 活力的影响

Cu^{2+} 胁迫 7 d 后,栉孔扇贝血淋巴 CAT 活力随水体 Cu^{2+} 浓度的增加,酶活明显升高(图 4)。

2.4 Cu^{2+} 对栉孔扇贝血细胞活性氧产生的影响

Cu^{2+} 胁迫 7 d 后,栉孔扇贝血细胞活性氧含量的变化见图 5,在 Cu^{2+} 为 0.02 mg/L 时,NBT 法检测到的阳性细胞数略高于对照组,随 Cu^{2+} 升高,阳性细胞数明显增加。

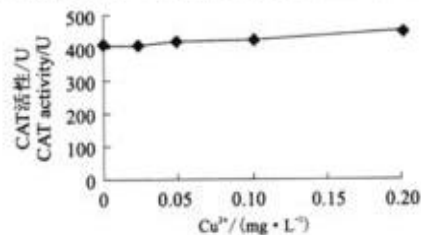


图4 不同 Cu^{2+} 浓度下的 CAT 活性

Fig.4 Activities of CAT in different Cu^{2+} concentrations

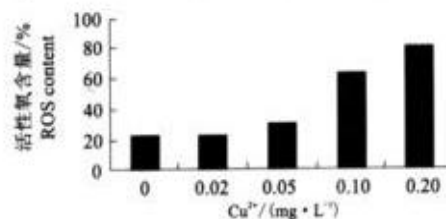


图5 Cu^{2+} 对栉孔扇贝活性氧的影响

Fig.5 Variation of reactive oxygen species in different Cu^{2+} concentrations

3 讨论

3.1 Cu^{2+} 对栉孔扇贝体内水解酶活性的影响

吞噬作用在贝类免疫防御中具有极为重要的作用,异物被吞入细胞后就与溶酶体结合,最终被各种水解酶分解,ACP 和 AKP 就是溶酶体内的 2 种重要的水解酶。这些水解酶不仅可以在血细胞内直接起作用,而且可通过脱颗粒的方式分布于血清中,从而形成了一个完整的水解酶体系。Cheng^[7]认为,ACP 和 AKP 对细菌等异物在溶酶体内的消化降解起重要作用;牟海津^[8]等也认为,ACP 和 AKP 在软体动物体的免疫反应中起着重要作用。本研究表明,低浓度 Cu^{2+} 对栉孔扇贝体内的水解酶活性起诱导作用,在 0.02 mg/L 的 Cu^{2+} 胁迫下,2 种水解酶活性明显高于对照组。这与 Suresh^[9]等在 Cu^{2+} 胁迫对贻贝血细胞酸性磷酸酶影响的研究中所得结果相一致。但随 Cu^{2+} 浓度增加,水解酶活性降低,0.2 mg/L 浓度时出现水解酶活性低于对照组的现象。说明较低浓度的 Cu^{2+} 能有效地刺激栉孔扇贝的免疫反应,而在较高浓度下对其免疫活性有一定的抑制作用,这可能与高浓度条件下 Cu^{2+} 对免疫器官所造成的损伤有关^[10]。

3.2 Cu^{2+} 对栉孔扇贝细胞呼吸爆发的影响

吞噬作用可引起呼吸爆发,其机理是:当血细胞接触外源物质后,激活了血细胞的 NADPH 氧化酶,从而增加氧耗量即引起呼吸爆发,并生成超氧阴离子自由基和单线态氧等活性氧。呼吸爆发产生的这些活性氧有很强的杀菌功能,可以单独或同溶菌酶等结合抵抗外源病原微生物的入侵,因此一定范围内活性氧产生的强弱直接反映了血细胞杀菌机能的强弱。虽然常报道的超氧阴离子的产生需呼吸爆发氧化酶的活性,但 Pipe^[11]证实 *Mytilus edulis* 血细胞 NBT 还原可以在无吞噬或其他刺激下进行。本实验用改良的 NBT 法检测了栉孔扇贝血细胞在不同 Cu^{2+} 浓度下活性氧的含量,结果表明,随着 Cu^{2+} 浓度增高,NBT 阳性细胞数明显增加,细胞内活性氧的数量也明显增多,这说明呼吸爆发有逐渐增强趋势,栉孔扇贝免疫系统在胁迫环境下发生了显著变化。

3.3 Cu^{2+} 对栉孔扇贝体内过氧化氢酶活性的影响

在正常的生理状态下,机体产生的活性氧具有一定的杀菌作用,但在逆境胁迫条件下机体通过呼吸爆发产生的大量活性氧对动物本身有一定的毒害作用,需及时清除,如不及时清除,会对机体造成氧化损伤,使机体老化,抗病能力下降。CAT 是重要的抗氧化酶,可催化过氧化氢生成水和氧气,所以 CAT 活力的变化在一定程度上能反映出机体在胁迫环境下的抗氧化系统的变化。实验结果表明,随 Cu^{2+} 浓度增加,CAT 活性逐渐提高。Dyrynda^[10]也认为在长期污染环境会导致抗氧化酶活性的升高,这与本实验结果一致。究其原因,可能是栉孔扇贝在 Cu^{2+} 胁迫环境下,氧自由基大量产生,机体处于过氧化状态,为保持抗氧化系统的动态平衡,抗氧化酶活力增加,才能消除机体产生的过量活性氧。

近年来,近海区污染日益严重,环境质量下降,尤以重金属最为突出,例如我国渤海锦州湾、北塘河口至大沽口一带、黄海大连湾、东海长江口、杭州湾和南海是重金属污染的高值区。重金属离子含量的超标,会对海水养殖业造成很大的危害。从本研究的结果来看,在一定范围内,当 Cu^{2+} 浓度增加时,可激活栉孔扇贝的免疫系统,但当 Cu^{2+} 浓度继续增加时会严重威胁栉孔扇贝的生长,甚至使机体死亡,本实验中,栉孔扇贝在 0.2 mg/L Cu^{2+} 质量浓度下饲养 7 d,其致死率达到了 40%就是很好的例证。这与 Anderson^[12]等对 Cu^{2+} 影响鱼类的抗菌能力的研究结果相一致。对于产生这种现象的原因,有人认为是机体处于逆境胁迫条件下,产生的活性氧浓度超过了伤害“阈值”,导致细胞内蛋白质、核酸、酶结构的氧化破坏,并最终导致机体的伤害甚至死亡。

参考文献:

- [1] Rongier F, Menuel A, Bogaudeau C, et al. Copper and zinc exposure of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan): Effects in experimental listeria infection[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1996, 34(2): 134-140.
- [2] Pipe R K, Coles J A. Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*[J]. *Aquatic Toxicology*, 1999, 46: 43-54.
- [3] 孙虎山,李光友.双壳贝类参与免疫防御的体液因子[J]. *海洋科学*, 2001, 25(4): 34-36.
- [4] 刘军权,周忠海.介绍一种 NBT 实验改进法[J]. *陕西医学检验*, 2002, 17(1): 54.
- [5] 周 强,曹春艳.血清过氧化氢酶的比色测定[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2001, 35(6): 473-474.
- [6] Kruzel M. Acid phosphatase of potato tubers: purification properties, sugar and amino acid composition[J]. *Acta biochim Pol*, 1982, 29: 321.
- [7] Cheng T C. Selective induction of release of hydrolases from *Crassostrea virginica* hemocytes by certain bacteria[J]. *Invertebro Pathol*, 1992, 59: 197-220.
- [8] 牟海津,江晓路.栉孔扇贝血清中的免疫因子的研究[J]. *中国水产科学*, 1999, 6(2): 33-36.
- [9] Suresh P G, Reju M K, Monhands A. Haemolymph phosphatase activity levels in two fresh-water gastropods exposed to copper[J]. *Science of the Total Environment*, 1993 (Suppl): 1 265-1 277.
- [10] Dyrynda E A, Pipe R K, Burt G R, et al. Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK[J]. *Aquatic Toxicology*, 1998, 45: 169-185.
- [11] Pipe R K. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel, *Mytilus edulis*[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1992, 16: 111-122.
- [12] Anderson S R, Dixon O W, Rodammer J E, et al. Suppression of antibody producing cell in rainbow trout spleen section exposed to the copper *in vitro*[J]. *J Aquat Anim Health*, 1989(1): 57-61.

Effects of Cu^{2+} on immune factors of *Chlamys farreri*

FAN Zhen-jiao^{1,2}, YANG Ai-guo², LIU Zhi-hong²

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: This article is concerned with how Cu^{2+} affects the immunocompetence of *Chlamys farreri* and how it induces scallop diseases. The experiment was carried out in the Yellow Sea Fisheries Research Institute from August to September 2003; the scallops were bought from Scallop Farm of Changdao, Shandong Province. Five groups were designed for testing and control samples, and in each group the same number of scallops were set and reared. The water was changed at 09:00 am and the diets were added in twice every day. After seven days, the blood and the livers of scallop were sampled for each examination. The intracellular reactive oxygen species were measured by histochemical method, and the enzyme activities were measured by spectrophotometer. The results showed that when Cu^{2+} concentrations were at 0.02 mg/L, 0.05 mg/L and 0.1 mg/L, the activities of ACP and AKP increased significantly compared to the control group, but the higher concentration of Cu^{2+} the less active the two enzymes. When the concentration reached 0.2 mg/L the activities of them went down even below the level of control group. While Cu^{2+} exposures seemed to increase the activity of CAT all the way, and with the increase of Cu^{2+} concentration, the CAT activity went up significantly. The response of the intracellular reactive oxygen species to Cu^{2+} stress was much like that of CAT. In conclusion, Cu^{2+} can influence the immunocompetence of *Chlamys farreri* greatly, and can increase its susceptibility to pathogen.

Key words: Cu^{2+} ; *Chlamys farreri*; reactive oxygen species; enzyme activity

Corresponding author: YANG Ai-guo. E-mail: yangag@ysfri.ac.cn