

长牡蛎胚胎和早期幼虫非特异性酯酶和过氧化物酶的组织化学研究

孙虎山, 王宜艳, 韩 强, 吴蒙蒙, 考红娟

(鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要: 采用组织化学方法对长牡蛎(*Crassostrea gigas*)胚胎和早期幼虫中的非特异性酯酶(non-specific esterase, NSE)和过氧化物酶(oxidase, POD)进行定位研究, 以探讨贝类胚胎和幼虫发育过程中的免疫防御机制。组织化学显示, NSE和POD均广泛存在于长牡蛎的胚胎和幼虫中, 自卵细胞开始就已存在。NSE和POD在各个发育时期分布和含量不同, 精子呈极弱的NSE和POD阳性; 未受精的卵呈强阳性, 但酶在细胞内的分布不均匀, 核区颜色较浅; 2至32细胞期细胞内酶的分布较均匀; 桑葚期、囊胚期、原肠期以及担轮幼虫和早期面盘幼虫期不同细胞间酶的强弱有差异。在胚胎发育前期显色较深, 呈强阳性, 表明此2种酶的活性较高; 发育至后期颜色变浅, 呈弱阳性, 表明酶的活性降低; 幼虫期酶活性有增强的趋势。[中国水产科学, 2006, 13(6): 897-901]

关键词: 长牡蛎; 胚胎; 幼虫; 非特异性酯酶; 过氧化物酶; 组织化学

中图分类号: Q959.215

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2006)06-0897-05

长牡蛎(*Crassostrea gigas*)又名太平洋牡蛎, 是中国沿海的主要养殖贝类之一^[1]。海产贝类胚胎发育和幼虫发育均在海水中进行, 胚胎和幼虫以卵膜或裸露的体表直接与海水接触。而海水中含有大量病原生物, 它们均必须具备抵抗病原生物感染的能力, 但不同发育时期的免疫防御机制有所不同, 尤其与成贝的差异较大。研究贝类胚胎和幼虫发育过程中的免疫防御机制, 建立一些免疫学指标, 对具有抗逆性贝类苗种的培育有指导意义。有关贝类胚胎和幼虫免疫防御机制的研究, 国外仅有个别报道, 国内还未见报道。Antonio等^[2]于2003年测定了长牡蛎等4种双壳贝类幼虫、稚贝匀浆液和成贝血淋巴中酚氧化酶的活力, 在4种双壳贝类幼虫匀浆液中均没有检测到酚氧化酶活力, 在长牡蛎和*Nodipecten subnodosus* 2种稚贝的匀浆液中发现有酚氧化酶活力, 而在4种成贝血细胞和血清中均检测到酚氧化酶活力。2004年Antonio等^[3]又对长牡蛎体内水解酶活力随个体发育的变化进行了生化测定。实验表明, 除卵母细胞外, 在其胚胎、幼虫、稚贝和成贝中均发现有溶菌酶活力, 其中在成贝血淋巴中酶活力较高。非特异性酯酶(non-specific esterase, NSE)和过氧化物酶(oxidase, POD)在无特异性免疫的贝类

成贝的免疫防御中发挥重要作用^[4-5]。有关贝类胚胎和幼虫NSE和POD的研究, 国内外均未见报道。

本研究采用组织化学方法对长牡蛎胚胎和早期幼虫中的NSE和POD进行研究, 以期探讨贝类发育过程中的免疫防御机制, 为贝类的免疫学研究积累材料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验于2005年4~5月进行, 长牡蛎购于烟台水产品市场。平均壳高80~110 mm, 壳长50~60 mm, 室内养于充气的水族箱中, 小球藻和扁藻混合投喂, 水温逐步由15℃提高到22℃, 升温促熟。实验所用3,3-二氨基联苯胺(DAB)购自Fluka公司, 其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 胚胎和幼虫的获取 将长牡蛎室内暂养15 d左右, 水温升至20~22℃, 解剖取出少量生殖腺压片观察, 当雌性生殖腺内全为成熟的卵和雄性生殖腺内主要为成熟的精子时, 即可取材做为胚胎发育和幼虫发育观察所用的材料。取性成熟的长牡蛎20只, 解剖取出雌、雄生殖腺, 分别在少量海水

收稿日期: 2006-02-28; 修订日期: 2006-04-13.

基金项目: 国家“973”计划资助项目(G1999012005).

作者简介: 孙虎山(1962-), 男, 博士, 教授, 主要从事贝类免疫学研究. E-mail: s_hushan@163.com

中剪碎,加入经过滤充氧的海水洗出卵或精子。卵液用100目滤网过滤,将组织碎块除去,滤液静置沉淀后去上清,加入新海水,重复洗卵3次。取经静置的精子上清液,加入卵液中,将精、卵液混合,受精后静置去上清,加入新海水,重复洗卵3次。每隔30~50 min,取样在显微镜下观察,记录其各个发育时期特征并取材制片。第1极体期到囊胚期,每期取样50~100粒,直接涂片,晾干。自原肠期开始,取样用少量戊二醛固定液杀死,3 000 r/min离心10 min,幼虫经浓缩后涂片,晾干。

1.2.2 NSE 和 POD 组织化学显示 涂片标本置室温下干燥,NSE的组织化学显示采用偶氮偶联法^[6],冷丙酮-福尔马林固定液固定0.5 min,蒸馏水冲洗后,浸入pH 5.8的偶氮对品红作用液中,37℃,反应40 min。POD的组织化学显示采用DAB法^[7],干燥后的涂片用2.5%戊二醛固定15 min,以0.1 mol/L pH 7磷酸缓冲液(PBS)洗3次,每次15 min,浸入DAB作用液中,37℃,反应2 h。涂片经蒸馏水冲洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,树胶封片,光镜观察并拍照。

2 结果

2.1 胚胎和早期幼虫 NSE 组织化学定位

NSE组织化学定位显示长牡蛎精子为黄色,呈极弱的NSE阳性。未受精卵为红色,呈NSE强阳性,分布常不均匀,核区红色较浅,可看出此时细胞核相对较大(图版I-1)。从受精卵直到D型面盘幼虫期也均呈NSE强阳性,其中4细胞期到桑葚期红色略浅。受精卵内NSE分布均匀,核变小直到无法观察到(图版I-2)。第1极体和第2极体期,极体排出的部位红色较浅呈弱阳性,其他部位分布均匀(图版I-3)。第1次分裂前的极叶期,伸出的极叶呈较弱的阳性(图版I-4)。2细胞(图版I-5)、4细胞(图版I-6)、8细胞(图版I-7)、16细胞(图版I-8)卵裂各期,因细胞间分裂缢缩处呈阴性,因此细胞分界明显,每个细胞内NSE分布较均匀。其中一个大细胞阳性相对较强,其余小细胞阳性相对较弱。桑葚期因细胞太小,细胞间呈NSE阴性的细胞分界已不如卵裂早期清晰,细胞阳性的强弱也出现差异,有的细胞颜色浅,有的细胞颜色深,并且大都在细胞外缘颜色较深(图版I-9)。囊胚期NSE阳性增强,细胞间有阳性强弱的差异,可看到红色较浅的囊胚腔,囊胚腔周缘阳性较强,囊

胚后期长出纤毛,在卵膜内转动(图版I-10)。原肠胚NSE阳性进一步增强,细胞阳性的强弱差异也进一步增大,可看到因植物极细胞内陷形成的原口,此期幼虫自卵膜中孵出,在海水中游动(图版I-11)。担轮幼虫(图版I-12)和早期D型面盘幼虫似原肠胚NSE阳性很强,其中壳腺和胚壳处阳性较弱,面盘附近阳性相对更强。

2.2 胚胎和早期幼虫 POD 组织化学定位

POD组织化学定位显示长牡蛎精子为浅棕色,呈极弱的POD阳性。未受精卵为深棕色,呈POD强阳性,分布常不均匀,尤其在卵的周边及卵核外周颜色较深,也可看出此时细胞核相对较大(图版I-13)。卵受精后全变为球形,同时生出一层透明的受精膜,核变小,深棕色强阳性POD颗粒明显减少,但分布均匀(图版I-14)。极体期极体排出的部位棕色较浅呈弱阳性,其他部位呈强阳性,其中在细胞最边缘处颜色最深(图版I-15)。极叶形成期伸出的极叶呈较弱的阳性(图版I-16)。2细胞(图版I-17)、4细胞(图版I-18)、8细胞(图版I-19)、16细胞(图版I-20)卵裂各期,细胞间分裂缢缩处呈POD弱阳性,细胞分界明显,POD阳性物质分布较均匀。桑葚期细胞分界仍明显,但POD不再均匀分布,有的细胞棕色较深,有的细胞棕色较浅(图版I-21)。囊胚期细胞分界已不明显,POD分布不均匀,其中外周阳性较强(图版I-22)。原肠胚内POD阳性物质进一步减少,棕色变浅,并且分布不均匀,其中在外周和原肠部位阳性较强(图版I-23)。担轮幼虫(图版I-24)和早期D型面盘幼虫POD阳性物质又开始增多,分布更不均匀,其中壳腺和胚壳处阳性很弱,面盘附近组织等部位阳性相对较强。

3 讨论

组织化学家将芳香基酯酶(A-酯酶, EC3.1.1.2)、羧酸酯酶(B-酯酶, EC3.1.1.1)和乙酰酯酶(C-酯酶, EC3.1.1.6)3种底物特异性不强的酶合称NSE,该酶能水解许多含有羧酯键、硫酯键、芳酯键、酰胺键的内源性及其外源性物质,具有参与药物及毒物等的生物转化、脂质代谢、蛋白质代谢、信号传导和维持生物膜结构的完整性等功能^[8]。同时NSE作为一种溶酶体水解酶,在成贝非特异性免疫防御、水解清除异物方面也发挥重要的作用^[4]。不仅贝类血淋巴中含有NSE,而且所有的器官组织

内均含有大量的 **NSE**, 尤其在各类组织的上皮组织中含有最高, 因此在阻止病原菌进入机体过程中起重要作用^[9]。POD 是贝类成贝体内参与非特异性免疫的一种重要的氧化酶, 血细胞内的 POD 与 H_2O_2 和卤化物(Cl^- 、 Br^- 等)组成了抵抗病原微生物的强有力的体系, H_2O_2 的杀菌作用可因 POD 和卤化物的存在而极大的加强, 并产生杀菌作用更强的次氯酸^[10-11]。与 **NSE** 的分布相似, POD 也分布于贝类成贝与外界接触的上皮组织中, 与其中的 **NSE** 等免疫防御因子形成了贝类的一道天然防线, 起着“门户”的作用, 将外界的病原微生物在组织的表层内即被清除, 以免病原微生物侵入贝类的机体^[12]。本研究表明, **NSE** 和 POD 广泛分布于长牡蛎胚胎发育和幼虫发育各个时期。NSE 和 POD 自长牡蛎卵细胞开始就已存在, 并且呈强阳性, 而精子呈极弱的阳性, 在其早期胚胎发育过程中, 随着发育的进行, **NSE** 和 POD 阳性反应有减弱的趋势, 说明早期胚胎内的该 2 种酶是来自母体, 在卵细胞形成过程中就已产生并积累在卵细胞质内。牡蛎等海洋双壳贝类在繁殖期将精和卵排放到海水中, 在海水中受精和发育, 而自然海水中存在大量的病原生物, 来自母体的 **NSE** 和 POD 等免疫因子在保护早期胚胎免受病原生物感染方面起重要作用。

自然海水中除了各种病原生物外, 物理和化学环境也比较复杂, 并且变化较大, 因此自然条件下, 牡蛎等双壳贝类的胚胎和幼虫成活率很低, 人工育苗时所用海水经砂滤等方法除菌, 并可控制适宜的物理和化学环境条件, 可大大提高胚胎和幼虫的成活率, 因此人工育苗期间海水严格除菌及保持物理和化学环境条件的适宜与稳定对单位水体多出苗种是非常重要的。孵化前的胚胎因有一层薄的卵膜保护, 抗感染的能力相对较强; 孵化后的胚胎或幼虫, 牡蛎等部分双壳贝类在原肠胚期孵化, 其他双壳贝类则在担轮幼虫期孵化, 因缺少了卵膜的保护, 被感染的几率大大增加, 因此孵化后的胚胎或幼虫的育

苗管理应更为严格。由于实验条件的限制, 本研究长牡蛎胚胎发育最终只发育到早期 D 形面盘幼虫, 因此 D 形面盘幼虫、壳顶幼虫、稚贝和幼贝体内 **NSE** 和 POD 的分布情况未做观察, 有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 王如才, 王昭萍, 张建中. 海水贝类养殖学[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 1993. 72-116.
- [2] Luna-González A, Maeda-Martínez A N, Ascencio-Valle F, et al. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs[J]. Fish & Shellfish Immunol, 2003, 15(4): 275-282.
- [3] Luna-González A, Maeda-Martínez A N, Ascencio-Valle F, et al. Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*[J]. Fish & Shellfish Immunol, 2004, 16(3): 287-294.
- [4] 孙虎山, 王宜艳, 王慧丽. 栉孔扇贝血淋巴中酯酶活性及其性质[J]. 中国水产科学, 2006, 11(1): 39-44.
- [5] 孙虎山, 李光友. 栉孔扇贝血淋巴中酚氧化酶和髓过氧化物酶活性[J]. 中国水产科学, 1999, 6(2): 9-13.
- [6] 贲长恩, 李叔庚, 王士平, 等. 组织化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 294-310.
- [7] Okun M R, Edelstein M L, Hamada O N G, et al. Histochemical differentiation peroxidase-mediated from tyrosinase-mediated formation in mammalian tissue[J]. Histochemie, 1970, 23: 295-309.
- [8] 唐景荣, 孙曼. 人羧酯酶的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(2): 113-117.
- [9] 孙虎山, 王宜艳, 孙修勤, 等. 栉孔扇贝酸性 α -醋酸萘酯酶的组织化学研究[J]. 高技术通讯, 2003, 13(8): 91-94.
- [10] Anderson R S. Hemocyte derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusca[J]. Dev Comp Immunol, 1994, 18: 89-96.
- [11] Schlenk D, Martinez P G, Livingstone P R. Studies on myeloperoxidase activity in the common mussel, *Mytilus edulis* L[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1991, 99C(1/2): 63-68.
- [12] 王宜艳, 孙虎山, 孙修勤, 等. 栉孔扇贝鳃和唇瓣过氧化物酶活性[J]. 中国水产科学, 2003, 10(3): 254-257.

Histochemistry studies of non-specific esterase and peroxidase on embryo and early larva of oyster *Crassostrea gigas*

SUN Hu-shan, WANG Yi-yan, HAN Qiang, WU Meng-meng, KAO Hong-juan

(College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: The non-specific esterase (NSE) and peroxidase (POD) on embryo and early larva of *Crassostrea gigas* were studied by histochemical localization method. The aim of the present study was to probe into the immune mechanism in the development process of mollusk's embryo and larva. The results showed that both NSE and POD existed in the egg cells, embryo or early larva of *C. gigas*. In different development stages the distributions and activities of NSE and POD were different. Unfertilized egg cell presented strong positive reactions of NSE and POD, with the distribution of the enzymes in the cell ununiform and the nucleus' colour lighter than other areas. The distribution of NSE and POD in a cell were relatively uniform from 2-cell stage to 32-cell stage. NSE and POD presented different activities in different stages of morula, blastula, gastrula and trochophore larva. On the other hand, the spermatozoon presented extremely weak NSE and POD positive reaction. The presented colour in cells was lighter and lighter during the period of embryo development, indicating the activities of NSE and POD were getting lower and lower. It suggests that these two kinds of enzymes may come from mother's body, the enzymes are accumulated in the egg cytoplasm in the forming process of the egg cell. In the larva stage the enzymes activities tend to be stronger again. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6): 897–901]

Key words: *Crassostrea gigas*; embryo; larva; non-specific esterase; peroxidase; histochemistry

Corresponding author: SUN Hu-shan. E-mail: s_hushan@163.com

图版说明

图版 I 长牡蛎胚胎和早期幼虫 NSE 和 POD 的组织化学定位

1~12: 长牡蛎胚胎和早期幼虫 NSE 的组织化学定位. 13~24: 长牡蛎胚胎和早期幼虫 POD 的组织化学定位.

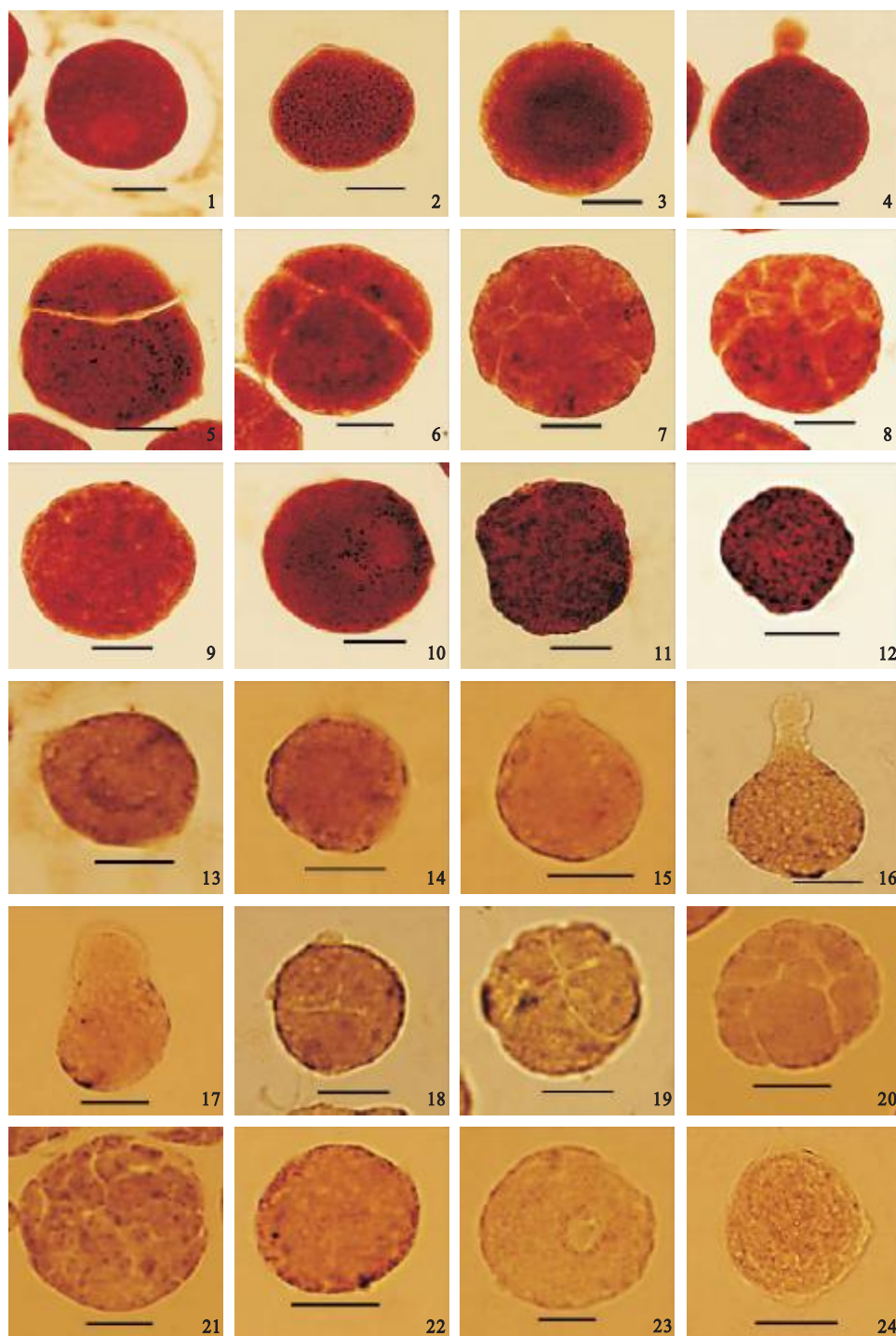
1、13: 未受精卵. 2、14: 受精卵. 3、15: 极体期. 4、16: 第1极叶形成期. 5、17: 2细胞期. 6、18: 4细胞期. 7、19: 8细胞期. 8、20: 16细胞期. 9、21: 桑葚期. 10、22: 囊胚. 11、23: 原肠胚. 12、24: 担轮幼虫. 图中标尺均为 20 μm.

Plate I Histochemical localization of NSE and POD on embryo and early larva of *Crassostrea gigas*

1–12: Histochemical localization of NSE on embryo and early larva of *Crassostrea gigas*. 13–24: Histochemical localization of POD on embryo and early larva of *Crassostrea gigas*. 1, 13: Unfertilized egg cell. 2, 14: Fertilized egg cell. 3, 15: Poly body stage. 4, 16: The first polar lobe stage. 5, 17: 2-cell stage. 6, 18: 4-cell stage. 7, 19: 8-cell stage. 8, 20: 16-cell stage. 9, 21: Morula stage. 10, 22: Blastula stage. 11, 23: Gastrula stage. 12, 24: Trochophore larva. Bar = 20 μm

孙虎山等:长牡蛎胚胎和早期幼虫非特异性酯酶和过氧化物酶的组织化学研究

SUN Hu-shan et al: Histochemistry studies of non-specific esterase and peroxidase on embryo and early larva of oyster *Crassostrea gigas*



图版 I Plate I

(图版 I 说明见文后 Explanation of Plate I is at the end of the text)