

pH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, 戴继勋¹, 董迎辉¹, 任建峰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:测定不同 pH(7.0, 7.3, 7.6, 8.5, 9.0)环境胁迫下栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)体内酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)及胞内活性氧含量(ROIs)等5种免疫指标的变化。结果表明,在 pH 高于正常组(pH 8.0)时,上述5种免疫指标均随 pH 的增加而明显升高;在 pH 低于正常组时情况稍复杂,4种酶活性均呈先上升后下降的趋势。ACP 在 pH 7.6 时酶活性上升至峰值,随后酶活性降低;ALP、SOD 和 CAT 活性均在 pH 7.3 时达峰值,随后酶活性降低;而胞内活性氧含量则随 pH 降低持续增加。实验结果表明, pH 对栉孔扇贝免疫活性有明显的刺激作用,且在一定范围内随刺激强度的增加呈现免疫活性的正调节;但在高强度 pH 刺激下,扇贝免疫活性呈现出负调节,这种负调节可能与高强度刺激引起的免疫机能疲劳或损伤有关。[中国水产科学, 2006, 13(4): 650-654]

关键词: pH; 栉孔扇贝; 免疫因子

中图分类号: Q959.213; S944.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2006)04-0650-05

大量研究成果表明,人工养殖栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)大规模死亡是由多种因素引起,其中养殖海区生态环境的恶化是一个重要因子^[1]。pH 是仅次于温度和盐度易于变化的一种海水生态环境因子,对水质和生物有多方面的影响。据研究,极端的 pH 环境可以造成水生生物血液酸碱平衡紊乱,血液离子调节机制丧失以及气体交换和血氧输送功能降低等生理危害,某些条件下甚至还能直接危及生物体的正常生存。在通常情况下,水体的 pH 很少单独对水生生物产生直接毒害,但在局部地区(如河口)或在特定环境条件下, pH 能够和其他环境因子协同作用,间接地对水生生物产生影响^[2],其中软体动物对这种影响最为敏感^[3]。因此研究水体 pH 对栉孔扇贝的影响,对弄清扇贝大规模死亡的原因及确定更为合理的扇贝养殖工艺都具有重要意义。本研究中测定了不同 pH 胁迫下栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶及胞内活性氧等5种免疫指标的变化,从免疫学角度探讨 pH 对扇贝产生损伤的机制,以期对扇贝的病害防治和环境适应性研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

栉孔扇贝于2004年3月购于青岛太平角海区,壳高6~7 cm,取回后暂养于实验室,投喂叉鞭金藻(*Dicrateria* sp.)和三角褐指藻(*Phaeodactylum tri-cornutum*)。1周后进行实验。

1.2 方法

1.2.1 实验设置 实验设置5个实验组和1个对照组,每组10只扇贝。每日换水1次,换水后实验组用 NaOH 和盐酸调节 pH,使其 pH 分别为 7.0, 7.3, 7.6, 8.5 和 9.0,对照组为正常海水(pH 8.0)。正常投喂和充氧,1周后取出各组扇贝,从闭壳肌取血,一部分加 1:1(体积比)的 MAS 抗凝剂,用于胞内活性氧的测定;一部分超低温离心 20 min,取上清,用于 CAT 和 SOD 活力测定。同时取肝脏,加入 1:2(质量/体积)的 0.85% 生理盐水匀浆,超低温离心 20 min,取上清,用于 ACP、ALP 活力的测定。

1.2.2 测定方法 ACP 和 ALP 活性的测定采用 Kruzel 等^[7]的磷酸苯二钠法,酶活力的计算采用金氏单位。每 100 mL 血清在 37 °C 与基质液作用 15 min,产生 1 mg 酚者为 1 个金氏单位。

收稿日期:2005-03-10; 修订日期:2005-06-27。

基金项目:国家高新技术研究发展计划资助项目(2001AA628070)。

作者简介:樊甄姣(1978-),女,硕士研究生,主要从事贝类免疫学的研究。

通讯作者:杨爱国。E-mail: Yangag@ynfri.ac.cn。

胞内活性氧含量的测定采用 Arnaud^[4]的 NBT 比色法,略加改良。

SOD 活性测定采用丁秀云等^[6]的连苯三酚自氧化法,酶活单位定义: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 1 个酶活单位(U/mL)。

CAT 活性测定采用周强等^[5]的方法进行。

2 结果

2.1 pH 胁迫对栉孔扇贝 ACP 活性的影响

在不同 pH 胁迫下,栉孔扇贝肝脏中 ACP 活性有明显的变化(图 1)。在 pH 高于对照(8.0)时,活性随 pH 增加而明显升高;在 pH 低于对照时,ACP 活性先随 pH 的降低而升高,在 pH 7.6 时,活性达到峰值,而后随 pH 降低活性下降。

2.2 pH 胁迫对栉孔扇贝 ALP 活性的影响

栉孔扇贝肝脏中 ALP 活性也随水体 pH 的变化而明显改变。如图 2 所示,碱性胁迫下,ALP 活性随 pH 的增加而持续升高;酸性胁迫下,ALP 活性

随 pH 的降低先逐步升高,在 pH 7.3 时活性达到峰值,而后略有降低。

2.3 pH 胁迫对栉孔扇贝胞内活性氧含量的影响

在 pH 高于正常值时,随 pH 胁迫强度的增加,栉孔扇贝胞内活性氧含量也持续增加,在 pH 低于正常值时,活性氧含量先有所降低而后一直上升(图 3)。

2.4 pH 胁迫对栉孔扇贝 SOD 活性的影响

随 pH 偏离对照组的增大,栉孔扇贝 SOD 活性发生明显变化(图 4)。碱性胁迫下,SOD 活性随 pH 的升高显著上升;酸性胁迫下,SOD 活性先随 pH 降低而升高,但在 pH 达到 7.0 时活性急剧下降并低于对照组。

2.5 pH 胁迫对栉孔扇贝 CAT 活性的影响

栉孔扇贝 CAT 活性随 pH 的增减有明显的变化(图 5)。在 pH 高于对照组时,CAT 活性随 pH 升高而增加;在 pH 低于对照组时,CAT 活性先随 pH 增加活性逐渐升高,在 pH 为 7.0 时活性急剧降低且低于对照。

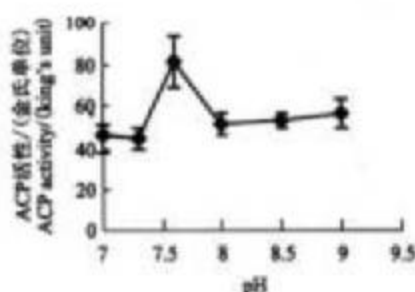


图 1 不同 pH 下 ACP 活性的变化

Fig.1 Changes of ACP activity at different pH

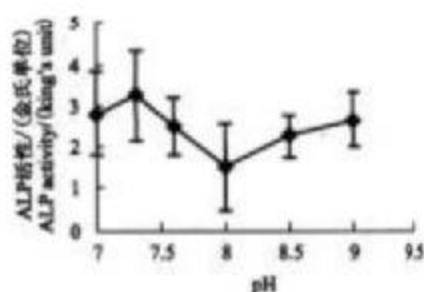


图 2 不同 pH 下 ALP 活性的变化

Fig.2 Changes of ALP activity at different pH

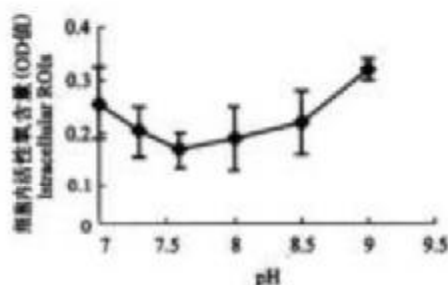


图 3 不同 pH 条件下胞内活性氧含量的变化

Fig.3 Changes of ROIs at different pH

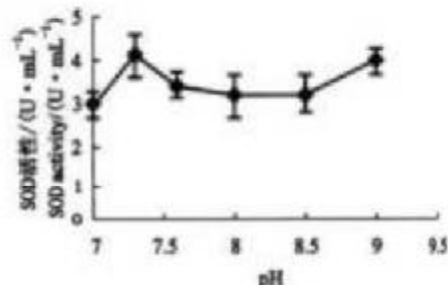


图 4 不同 pH 条件下 SOD 活性的变化

Fig.4 Changes of SOD activity at different pH

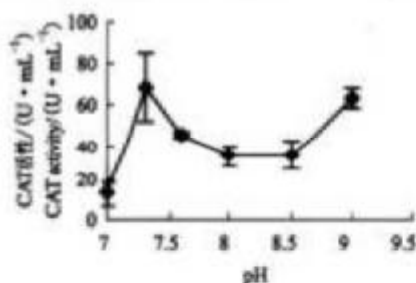


图5 不同 pH 条件下 CAT 活性的变化

Fig.5 Changes of CAT activity at different pH

3 讨论

3.1 pH 对栉孔扇贝水解酶活性的影响

酸性磷酸酶和碱性磷酸酶是软体动物体内两种非特异性免疫因子,在贝类免疫防御中具有重要的作用。Cheng^[8]认为,软体动物的 ACP 是吞噬溶酶体酶的重要组成部分,主要来源于粒细胞的颗粒体,在酸性环境中参与对带磷酸脂基团异物的降解。ALP 也是存在于溶酶体的一种磷酸单酯水解酶,在贝类中参与壳角蛋白等蛋白质的分泌及蛋白质的合成,同时也作为软体动物溶酶体酶的重要组成部分,在免疫反应中发挥作用^[9]。一直以来 ACP 和 ALP 被作为两种重要的免疫指标在动物免疫学中被广泛研究。孙虎山等^[9]先后报道了脂多糖、硝化卡拉胶和酵母葡聚糖对栉孔扇贝 ACP 和 ALP 活性的影响,发现这些物质都能使两种磷酸酶活性明显升高。Suresh 等^[10]报道了 Cu^{2+} 胁迫下贻贝血细胞酸性磷酸酶的活性变化,发现在低浓度胁迫下,酸性磷酸酶活性明显升高;魏伟等^[11]研究了 pH 对育珠蚌酸性磷酸酶活力的影响,发现在酸性 pH 条件下,ACP 的活力随 pH 值的降低而升高;而在碱性 pH 条件下 ACP 的活力随 pH 值的升高也有所升高。本研究也发现,pH 值对栉孔扇贝 ACP 和 ALP 的活性都有明显影响,随 pH 的急剧变化,两种水解酶的活性明显升高。这也与王维娜等^[12]在 pH 对对虾水解酶活力影响的实验中得出的结果一致。分析其原因,作者认为可能是扇贝处于 pH 突变环境中为维持自身酸碱平衡和离子平衡而采取的一种主动调节措施,当然也不排除 Feng 等^[13]所认为的贝类血淋巴中溶酶体酶(含溶菌酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶等)活力的提高除了是一种机体防御反应外,可能本身也是一种被动的病理显示。本研究中发现的在 pH 7.0

左右栉孔扇贝这两种酶所表现出的免疫疲劳或损伤,即两种磷酸酶活性突然降低可能就是这种病理现象的集中体现。其结果可能是机体免疫防御机能的进一步受损,甚至导致机体的死亡。

3.2 pH 对栉孔扇贝活性氧含量的影响

一般认为无脊椎动物由于免疫功能较低,且不具有获得性免疫。因此,血细胞的免疫作用被认为是无脊椎动物体内最主要的防御机制。无脊椎动物血细胞对其所吞噬的异源性物质的杀伤、清除作用,目前认为存在两种机制:(1)血细胞释放了溶酶体酶和其他一些溶细胞因子;(2)血细胞由呼吸爆发产生胞毒活性氧杀伤异物。因此,血细胞吞噬活动产生的活性氧水平就成了衡量软体动物免疫水平的又一重要指标。陈政强等^[14]在研究温度对不同类群鲍的免疫活性影响时发现,各类群鲍的呼吸爆发强度随温度不同而变化;Arnaud 等^[4]研究发现,牡蛎活性氧含量在机械刺激下呈现先上升后下降的趋势。本研究发现,水体 pH 突变也能有效地刺激栉孔扇贝活性氧的产生,其产生量随着 pH 偏离正常值的加剧而增加,即存在着剂量依赖关系。这种变化趋势与大多数环境化学物质对贝类活性氧含量的影响一致^[15],Stebbing^[16]将这种低毒物胁迫下出现的免疫力增益现象,称为“毒物兴奋效应”。

3.3 pH 对栉孔扇贝抗氧化酶活性的影响

与血细胞活性氧防御机制相适应的是贝类的抗氧化系统。由呼吸爆发产生的活性氧能够杀伤异物,但同时机体本身也是有毒害作用的,因此在所有的需氧生物体中,都具备抗氧化防御系统来防止内源代谢活性氧自由基的过量产生,这个系统通常由一些能够被氧化应激诱导的抗氧化酶类和抗氧化物质体系组成。其中超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)就是两种重要的组成部分。SOD 可催化 O_2^- 生成 H_2O_2 ,从而清除 O_2^- ,而 CAT 能催化 H_2O_2 生成水和氧气,因此 CAT、SOD 酶活性的变化在一定程度上能反映出机体在环境胁迫下免疫功能的变化。本研究发现,较低的 pH 胁迫可使扇贝血清中 SOD 和 CAT 活性明显升高;当 pH 过低(pH 7.0)时,两种抗氧化酶活性显著下降。这与马广智等^[17]在低 pH 对草鱼鳃和肝组织超氧化物歧化酶活性影响的实验中得出的结果相一致。Digilio^[18]认为,抗氧化酶既可由于污染的暴露而产生适应性诱导反应,也可由于污染的毒性作用而产生中毒反

应,即有机体内 SOD 和 CAT 含量降低。根据本实验结果推测,在正常情况下,扇贝体内的抗氧化系统和活性氧的产生达到一定的平衡,pH 突变时,扇贝体内产生大量的活性氧,使机体处于氧化应激状态,产生适应性诱导反应,活性提高,使二者达到一种新的动态平衡。但当 pH 处理酸度过大时,机体产生的大量活性氧已超过抗氧化系统的清除能力,进而造成氧化损伤,使抗氧化酶活性降低或丧失,甚至导致细胞的死亡。

3.4 pH 对栉孔扇贝免疫系统的损伤

近岸海水的 pH 是一个容易受影响的指标,且受影响因素较多,主要因素是淡水输入、工业污染、酸雨和浮游植物代谢等。酸性工业废水的排入,很容易使养殖区局部水域 pH 降低;酸雨的 pH 可达 4 以下^[19]。从本实验结果看,pH 对栉孔扇贝免疫活性有明显的刺激作用,可能是酸碱度的变化将体内酸碱平衡和离子交换平衡打乱,机体产生调节反应,各种免疫活性发生变化。当这种刺激作用进一步增强,超出了机体的免疫调节限度,就会导致免疫系统的受损,并最终导致机体死亡。

参考文献:

- [1] 王远隆,李美基,邱亮星,等. 养殖扇贝大规模死亡的原因及对策[J]. 海洋湖沼通报, 2001, 3: 63-69.
- [2] 王方国,刘金灿. 水体环境因子与对虾疾病关系[J]. 东南海洋, 1995, 10(4): 37-41.
- [3] 成广兴. 酸雨对水生生物的影响[J]. 安庆师范学院学报, 1999, 5(3): 108-110.
- [4] Arnaud L, Shalagh K M. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas* [J]. Development & Comparative Immunology, 2002, 26: 1-9.
- [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] 丁青云,李光友,翟玉梅. 皱纹盘鲍经诱导后血淋巴中一些因子变化的研究[J]. 海洋与湖沼, 1996, 27(4): 362-367.
- [7] Kruzel M. Acid phosphatase of potato tubers: purification properties, sugar and amino acid composition[J]. Acta biochim Pol, 1982, 29: 321.
- [8] Cheng T C. The role of Lysosomal in molluscan cellular response to immunologic challenge [J]. Comp Pathobiol, 1978, 4: 59-71.
- [9] 孙虎山,李光友. 硒化卡拉胶和酵母葡聚糖对栉孔扇贝血淋巴中两种水解酶活力的影响[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(3): 245-249.
- [10] Suresh P G, Reju M K, Monhanda A. Haemolymph phosphatase activity levels in two fresh-water gastropods exposed to copper [J]. Sci Tot Envir, 1993(Suppl.), 1: 265-1277.
- [11] 魏 炜,张洪渊,石安静. 育珠蚌酸性磷酸酶活力与免疫反应关系的研究[J]. 水生生物学报, 2001, 25(4): 413-415.
- [12] 王雄娜,孙国冰,王安利,等. 环境因子对日本沼虾消化酶和碱性磷酸酶的影响[J]. 应用生态学报, 2002, 13(9): 1153-1156.
- [13] Feng S Y. Cellular defense mechanism of oysters and mussels [J]. Am Fish Soc Spec Public, 1988, 18: 153-168.
- [14] 陈政强,陈昌生,战文斌. 不同类群九孔鲍免疫防御机制的比较[J]. 水产学报, 2004, 28(2): 189-194.
- [15] 张 峰. 贝类血细胞活性氧体内防御机制的研究进展[J]. 海洋科学, 1999(2): 16-19.
- [16] Stebbing A R D. Hormesis the stimulation of growth by low levels of inhibitors[J]. Sci Tot Envir, 1982, 22(1): 213-234.
- [17] 马广智,唐 放,徐 军. 低 pH 对草鱼鳃和肝组织超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响[J]. 中国水产科学, 2001, 8(1): 23-25.
- [18] Digilio R T, Washburn P C, Wenning R J, et al. Biochemical response in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress [J]. Envir Toxicol Chem, 1989, (8): 1103-1123.
- [19] 张光华,赵殿五. 酸雨[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989. 187-200.

Effect of pH on the immune factors of *Chlamys farreri*

FAN Zhen-jiao^{1,2}, YANG Ai-guo², LIU Zhi-hong², DAI Ji-xun¹, DONG Ying-hui, REN Jian-feng

(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 study is concerned with the changes of the activities of ACP, ALP, SOD, CAT and the content of reactive oxygen species (ROIs) of *Chlamys farreri* at different pH levels (7.0, 7.3, 7.6, 8.0, 8.5, 9.0). The results indicated that when the pH were higher than the control (pH 8.0), the five immune factors all went up with the increase of pH; when the pH values were lower than the control, the activities of the four enzymes all increased at first and then went down with the decrease of pH. The activity of ACP reached the peak at pH 7.6 and then decreased; the activities of ALP, SOD and CAT reached the peaks at pH 7.3 and then went down; but the content of ROIs always increased with the decrease of pH. The results implies pH can stimulate the immune activity significantly, and the immune activity appears positive accomodation with the increase of stimulation at a certain range; but when the stimulation increased, the immune activity shows negative stimulation, which maybe relate with the immune fatigue or immune damnification at high stimulation. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(4): 650 - 654]

Key words: pH; *Chlamys farreri*; immune factors

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