

低氧胁迫对九孔鲍免疫防御因子的影响

陈政强^{1,2,3}, 陈昌生^{2,3}, 战文斌^{1*}

(1. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003; 2. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021;

3. 集美大学福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要:为了解低氧胁迫条件下九孔鲍免疫防御因子的变化及机体抗病力变化, 将九孔鲍置于不同的溶解氧环境中, 观测相关免疫因子变化。结果显示, 在水温为(22.1±1.3) °C, 盐度为30.72±0.54, pH 值为 8.20±0.14 的海水环境中, 溶解氧含量由(7.49±0.14) mg/L 下调至(2.53±0.16) mg/L 后 120 h 内, 平均体质量为(14.25±2.21) g 的九孔鲍未见死亡, 而每只鲍注射 5.0×10^5 CFU 副溶血弧菌后 120 h 内实验鲍的累计死亡率高达 91.11%±7.70%, 比对照组(11.11%±3.83%)累计死亡率高出 80%, 血淋巴抑菌清除率下降至-(3340.47%±298.57%), 显而易见, 低氧胁迫使得九孔鲍拮抗副溶血弧菌感染的抵抗力显著下降。低氧(2.53±0.16) mg/L 胁迫下, 九孔鲍血淋巴细胞数量(THC)下降 30.62%±4.87%、血淋巴细胞吞噬率下降 62.77%±5.79%、呼吸爆发产生的超氧阴离子数量下降 22.21%±5.89%。低氧胁迫下九孔鲍血淋巴细胞内 MPO 活性上升(9.63%±7.59%)~(22.90%±13.73%)、CAT 活性提高(7.68%±6.83%)~(56.28%±13.96%), 反映出低氧胁迫下九孔鲍体内应激反应产生的物质氧化加剧, 血淋巴细胞内产生大量的活性氧自由基。溶解氧含量由(7.49±0.14) mg/L 下调至(4.51±0.12) mg/L 后九孔鲍已明显处于低氧胁迫和应激反应状态, 120 h 内的累计死亡率达到 37.78%±3.85%, 血淋巴抑菌率下降至 883.56%±123.22%; THC、血淋巴细胞吞噬率、呼吸爆发产生的超氧阴离子 O₂⁻ 数量等最大降幅分别达到 12.51%±6.59%、21.90%±15.84%、12.93%±5.74%; MPO 活性在原有水平的-(10.61%±4.20%)~(7.13%±6.45%)之间波动, CAT 活性在-(5.17%±18.08%)~(16.26%±10.85%)之间变化。

关键词: 九孔鲍; 低氧胁迫; 免疫应答; 易感性; 副溶血弧菌

中图分类号: Q 958.12; S 917.4

文献标志码: A

九孔鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)具有生长快、养殖周期短、摄食旺盛、对饵料要求低、能适应高温高盐环境等优点, 是我国闽、粤、台地区的主要养殖种类之一, 已形成规模化产业^[1-5]。陆基集约式养殖是当前九孔鲍的主要养殖方式, 即在陆地养成池中进行多层箱笼(multiple-tier basket systems)高密度养殖。该养殖方式的优点是养殖密度大、产能高、效益好, 但在高温季节时养殖水体容易出现缺氧现象, 导致九孔鲍爆发性死亡^[6]。

2000 年以来, 各养殖单位都经历了由副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)感染引起的集约式养成池内的九孔鲍和种苗培育池内的稚鲍大量死亡事件^[7-9], 养殖鲍的免疫机能和抗病力由此成为人们关注的焦点。

溶解氧是水生生物赖以生存的水环境中的一个重要生态因子, 也是影响九孔鲍生存和生长的一个重要因素。据报道^[10-11], 九孔鲍的最适生长盐度是 30~35, 最适生长温度是 24~30 °C; 九孔鲍需

收稿日期: 2011-09-03 修回日期: 2012-09-03
资助项目: 福建省自然科学基金项目(2006J0420)
通讯作者: 战文斌, E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn

氧量大于 3~4 mg/L, 最适宜生长的溶解氧含量是 5 mg/L 以上; 在盐度 32 条件下, 水温由 25 °C 提升至 30°C, 九孔鲍的耗氧率提高 1.3 倍。由于养成池内常有大量的残剩饵料及粪便等脏物因腐烂发酵而消耗大量溶解氧, 因此, 九孔鲍集约式养殖模式下的养成池内经常出现溶氧含量低甚至缺氧的现象。据报道^[11], 九孔鲍养殖环境中 DO 含量低于饱和值的 54%则引发机体免疫抵抗力下降和对副溶血弧菌易感性的上升。可见, 恰当的溶解氧管理有助于防止养殖鲍免疫机能减弱和抗病力下降。本实验就低氧环境条件对九孔鲍免疫防御因子的影响进行探讨, 目的是了解溶氧胁迫条件下九孔鲍的免疫防御因子的变化及机体抗病力变化, 为养殖生产管理提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用九孔鲍取自福建东山海田实业有限公司陆基工厂化养殖池, 实验鲍体色正常、健壮活泼, 体长 4.77~5.24 cm, 平均体长(5.11±0.26) cm; 体质量 12.52~19.76 g, 平均体质量(14.25±2.21) g。实验前, 在水温为(22.1±1.3) °C, 盐度为 30.72±0.54, pH 值为 8.20±0.14 的海水环境中饲养 15 d, 以求适应实验环境、恢复实验鲍体力。实验鲍暂养期间每日傍晚饲以江蓠, 微流水养殖并且不间断通气, 每日清晨吸污、换水并清理水槽一次。

用于注射感染实验鲍的病原菌为副溶血弧菌, 由集美大学水产学院病害防治学科病原研究室提供。使用前在 30 °C 条件下经 TSB(3%NaCl)培养基培养活化 24 h 后, 注射感染养殖九孔鲍使其恢复部分毒力, 24 h 后, 取被感染的九孔鲍血淋巴液涂布于 TCBS 培养基, 30 °C 条件下培养 24 h, 选取培育良好的菌落用除菌 PBS 制成菌悬液, 菌悬液浓度调至 1.0×10^8 CFU/mL, 4 °C 存放, 备用。

1.2 实验方法

低氧胁迫下九孔鲍抗感染能力观察 选择经暂养适应、体色正常、健壮活泼、大小相对均匀的实验鲍 180 只, 按每 45 只为一组分成 A、B、C、D 组, 分别饲养于容积为 400 L 的玻璃钢水槽内, 水槽内盛水 300 L, 每组共 3 个平行饲养单元, 各 15 只实验鲍。

采用氮气(N₂, Linde 气体)和氧气(O₂, Linde 气体), 24 h 内分别将 A 组和 D 组养殖水体内的溶解

氧(DO)含量逐渐向下调节至 2.5 mg/L, B 组调节至 4.5 mg/L, C 组调节至 7.5 mg/L。

A, B 和 C 各组九孔鲍每鲍腹足肌内注射浓度为 1.0×10^7 CFU/mL 的副溶血弧菌悬液 50 μL, 实际每鲍注射副溶血弧菌 5.0×10^5 CFU, 其中 A 组为溶解氧对照组; D 组为感染对照组, 每鲍注射 50 μL 的除菌 PBS, 连续饲养观察 5 d (120 h), 分别记录注射感染后 0、6、12、24、48、72、96 和 120 h 各组九孔鲍的死亡情况, 计算九孔鲍累计死亡率。

低氧胁迫下九孔鲍免疫防御因子活性观测 选择经暂养适应、体色正常、健壮活泼、大小相对均匀的实验鲍 216 只, 按每 72 只为一组的要求将九孔鲍分成 A、B、C 3 组, 每组设 3 个平行, 共 9 个饲养单元。每个饲养单元内放养 24 只实验鲍, 置于容积为 200 L 的塑料水槽内饲养, 水槽内盛水 150 L。C 组为对照组。

采用氮气(N₂, Linde 气体)和氧气(O₂, Linde 气体), 24 h 内分别将 A、B、C 3 个实验组养殖水体中的溶解氧(DO)含量逐渐调节至 2.5、4.5、7.5 mg/L。以 DO=7.5 mg/L 组为对照组。

分别在 DO 调节完成后 0、6、12、24、48、72、96 和 120 h 取样测定九孔鲍血淋巴细胞数量(THC)、血淋巴细胞内 O₂⁻水平、胞内 MPO 活性、胞内 CAT 活性、血淋巴细胞吞噬活性及血淋巴拮抗副溶血弧菌感染的清除效率等。其中, 每组各取 3 只实验鲍用于观测 THC, O₂⁻, MPO, CAT; 各组另行再取 3 只实验鲍, 每鲍注射 1.0×10^8 CFU/mL 的副溶血弧菌 50 μL, 实际每鲍注射 5.0×10^6 CFU, 注射后各自单独饲养 3 h, 然后, 从腹血窦抽取血淋巴, 分别测定血淋巴细胞吞噬活性和血淋巴抗菌清除效率。

试剂配制 PBS 的配制参照文献[12-14], 用作抗凝剂的阿氏液(Alsever's Solution)配制参照文献[14], 在吞噬活性测定中用作抗凝剂的改良阿氏液(Modified Alsever's Solution)的配制参照文献[15], 不含 Ca²⁺和 Mg²⁺的 Hank's 平衡盐溶液(Ca²⁺-and Mg²⁺-free HBSS)的配制参照文献[14]。

免疫防御因子测定 (1)九孔鲍血淋巴细胞总数(THC)测定。取 50 μL 血淋巴液, 注入等量的 10%中性甲醛固定, 混合均匀后用血细胞计数板在显微镜(Leica)下观察计数, 每份样品计数两次, 每次记录两个计数室中 5 个中方格的血细胞数, 结果

取平均值(平均值±标准差, $n=3$)。THC 由下式求得:

$$\text{THC}(\text{cell/mL}) = (\text{计数的血细胞数}/5) \times 25 \times 10 \times 1000 \times \text{血淋巴稀释倍数}$$

(2) 血淋巴细胞体内吞噬活性测定^[14-17]。取 100 μL 血淋巴, 加入 100 μL 除菌的抗凝剂(MAS), 混合均匀后取 50 μL 细胞悬液涂布于玻片表面, 10~15 min 后, 血细胞基本贴附于玻片上, 用除菌 PBS 小心清洗 2 次, 除去血淋巴液之后用甲醇固定, Giemsa 染色, 干燥后再用 1% 美兰复染, 油镜下观察计数吞噬百分率(phagocytic rate, PR), 结果取平均值(平均值±标准差, $n=3$)。

$$\text{吞噬百分率}(\text{PR}) = (\text{吞噬细胞数量}/\text{观测细胞数量}) \times 100$$

为提高九孔鲍血淋巴细胞的贴壁效果, 将事先洗净的洁净玻片经 160 $^{\circ}\text{C}$ 以上烘烤后冷却至室温, 在稀释的 L-多聚赖氨酸溶液中浸泡 5 min, 室温 18~26 $^{\circ}\text{C}$ 过夜晾干或置 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱内干燥 60 min。

(3) 血淋巴细胞呼吸爆发产生 O_2^- 水平的测定^[11, 13, 18]。采用 96 孔酶标板进行血淋巴细胞呼吸爆发活性测定, 酶标板检测孔事先镀以 0.2% L-多聚赖氨酸液, 晾干。每鲍取 300 μL 稀释(1/2)的血淋巴分别注入 3 个检测孔, 每孔注入 100 μL 血淋巴。300 \times g 离心 15 min, 弃上清。加入 100 μL 浓度为 4 mg/mL 的 β -1, 3-葡聚糖(Sigma), 27 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min。300 \times g 离心 15 min, 弃上清。100 μL PBS 漂洗 1 次, 立刻加入 100 μL 0.3% 的 NBT 溶液, 室温下反应 30 min。800 \times g 离心 10 min, 弃上清, 用 200 μL 无水甲醇固定, 再用 200 μL 70% 的甲醇漂洗 2 次, 晾干。形成的沉淀用 120 μL 2 mol/L 的 KOH 和 140 μL DMSO 溶解, 充分混匀后, 在 630nm 波长下用酶标仪测定光密度值(optical density at 630 nm, OD_{630})。

九孔鲍血淋巴细胞呼吸爆发表达为每 50 μL 血淋巴产生的 NBT 还原量(用 OD_{630} 表示), 检测结果取平均值(平均值±标准差, $n=3$)。

(4) 血淋巴细胞内 MPO 活性的测定^[18-19]。通过供氢体邻连茴香胺供氢后生成黄色化合物, 在 460 nm 处比色测定此产物的生成量, 从而推算出 MPO 的活力。选用南京建成生物工程研究所出品的 MPO 检测试剂盒, 检测方法略作修改:

每鲍取血淋巴 300 μL , 800 \times g 离心 15 min, 弃上清, 加入 300 μL 浓度为 4 mg/mL 的 β -1, 3-葡聚

糖(Sigma), 27 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min。800 \times g 离心 15 min, 弃上清, 用 100 μL 不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 Hank's 平衡盐溶液(Ca^{2+} -and Mg^{2+} -free HBSS)重新悬浮血细胞(浓缩 3 倍)。取 90 μL 血细胞悬液, 加入 10 μL 的阳离子表面活性剂十六烷基三甲基溴化胺 (CTAB 试剂三) 裂解血细胞, 27 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 20 min, 混匀后作为待检样本。取待检样本 80 μL , 加入 H_2O_2 (试剂四) 80 μL , 再加入显色剂 (四甲基联苯胺, TMB) 1 200 μL , 混合均匀后, 27 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min, 加入 20 μL 4 md/L H_2SO_4 (试剂七) 混匀, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下温浴 10 min 以中止显色反应, 随后立即取 250 μL , 测定 OD_{460} 。取 1 200 μL 蒸馏水 dH_2O 代替上述显色剂作为对照, 测定 OD_{460} , 每样检测重复 2 次, 结果取平均值。

每升血淋巴中的血细胞在 27 $^{\circ}\text{C}$ 反应体系中分解 1 μmol H_2O_2 为一个 MPO 活力单位(U), 按下列公式计算 MPO 活性:

$$\text{MPO 活性}(\text{U/L}) = [(\text{测定管 } \text{OD}_{460} - \text{对照管 } \text{OD}_{460}) / (11.3 \times \text{取样量})] / 3$$

每个实验组检测 3 只实验鲍, 结果取平均值(平均值±标准差, $n=3$)。

(5) 血淋巴细胞内过氧化氢酶(CAT)活性的测定^[20]。过氧化氢酶在一定条件下能直接分解其底物, 使其浓度下降, 则吸光度下降, 可用比色法测量。检测试剂选用南京建成生物工程研究所出品的 CAT 检测试剂盒, 检测方法略作修改。

每鲍取血淋巴 300 μL , 800 \times g 离心 15 min, 弃上清, 加入 300 μL 浓度为 4 mg/mL (in PBS) 的 β -1, 3-葡聚糖(Sigma), 27 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min。用 100 μL 除菌 PBS 重新悬浮血细胞(浓缩 3 倍)。-80 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融, 15 000 \times g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 取上清作为待检样本。取 100 μL 待检样本入 1.5 mL 的洁净离心管, 加入 500 μL 的试剂一(27 $^{\circ}\text{C}$ 预温), 再加入 50 μL 试剂二(27 $^{\circ}\text{C}$ 预温), 混合均匀后 27 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 min, 接着先后加入 500 μL 试剂三和 50 μL 试剂四, 立即混合均匀, 取 250 μL 混合液入 96 孔酶标板, 测定 OD_{405} , 重复测定 2 次, 结果取平均值。取等量蒸馏水 dH_2O 替换上述反应体系中的待检样本, 重新构建反应体系, 作为空白对照, 测定 OD_{405} , 重复测定 2 次, 结果取平均值。

过氧化氢酶活力单位定义: 每毫升血淋巴中的血细胞溶出物每秒分解产生 1 μmol 的 H_2O_2 量为

一个活力单位。按下列公式计算血细胞溶出物 CAT 活性:

$$\text{CAT 活力(U/L)} = \{ (\text{对照管 OD}_{405} - \text{测定管 OD}_{405}) \times 271 \times [1.0 \text{ mL} / (60 \text{ s} \times \text{取样量 mL})] \} / 3$$

每个实验组检测 3 只实验鲍, 结果取平均值 (平均值±标准差, n=3)。

(6) 九孔鲍血淋巴抗菌清除效率的测定^[11, 21]。取实验鲍血淋巴 50 μL, 1 500 × g 4 °C 离心 10 min, 除去底部沉淀血细胞, 注入除菌 PBS 450 μL, 混合均匀后取 50 μL 稀释后的血淋巴液均匀涂布于直径为 9 cm 的 TCBS 平板培养基上, 每样重复涂布 2 次, 共 3 个培养平板, 置 30 °C 环境条件下培养 24 h, 测算菌落形成单位数量(CFU/mL)。

九孔鲍血淋巴拮抗副溶血弧菌感染的清除效率表达为抑制百分率(PI), 按下式计算:

$$\text{PI} = 100 - (\text{实验组} / \text{对照组}) \times 100$$

每个实验组检测 3 只实验鲍, 结果取平均值 (平均值±标准差, n=3)。

统计分析 采用 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行单因子方差分析(ANOVA), 检验各实验组之间的差异显著性, 组内分析采用 Duncan 氏法进行多重比较, 差异显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同溶解氧条件下九孔鲍对副溶血弧菌感染的易感性

在养殖水体溶解氧含量充足[DO=(7.49±0.14) mg/L]的情况下, 注射感染 5.0×10^5 CFU 副溶血弧菌后 48~120 h, 九孔鲍会有少量的个体死亡, 累计死亡率为 2.22%~11.11%。养殖水体溶解氧下调至 (4.51±0.12) mg/L 之后, 九孔鲍在感染副溶血弧菌 24 h 后开始出现个体死亡, 死亡率 6.67%±6.67%, 48 h 后略有上升, 72、96、120 h 后九孔鲍累计死亡率跃升至 22.22%±3.85%、28.89%±3.85%、37.78%±3.85%。养殖水体溶解氧含量继续下调至 (2.53±0.16) mg/L 之后, 九孔鲍在非感染副溶血弧菌状态下未见个体死亡, 而感染副溶血弧菌的九孔鲍感染后 12 h 后便开始出现个体死亡, 48 h 后显著上升($P < 0.05$)至 24.44%±10.18%, 72、96、120 h 后九孔鲍累计死亡率高达 82.22%±3.85%、84.44%±3.85%、91.11%±7.70% (图 1)。养殖水体溶解氧含量对九孔鲍死亡率和出现个体死亡的时间

有显著的影响, 溶解氧下调至 2.5 mg/L 时, 九孔鲍感染副溶血弧菌后几乎不可存活。

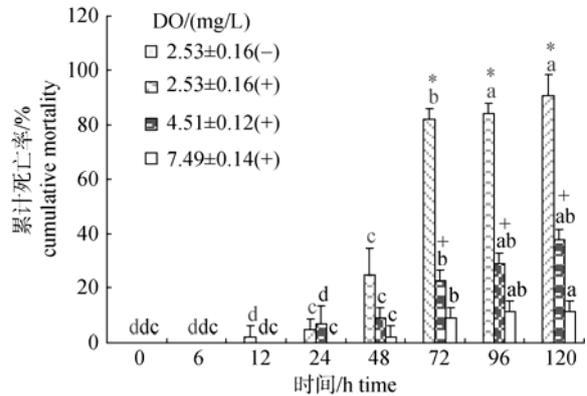


图 1 不同溶氧条件下九孔鲍对副溶血弧菌的易感性 +. 副溶血弧菌感染阳性; -. 阴性。

Fig. 1 Susceptivity of *H. diversicolor supertexta* infected by *V. parahaemolyticus* in different concentration of dissolved oxygen

+. positive; -. negative.

2.2 不同溶解氧条件下九孔鲍血淋巴细胞数量(THC)变化

水体中溶解氧含量充足达(7.49±0.14) mg/L 时, 九孔鲍血淋巴细胞数量为 (3.143±0.211~3.293±0.170) × 10⁶ cells/mL。当溶氧含量由 (7.49±0.14) mg/L 下降至 (4.51±0.12) mg/L, 12 h 后九孔鲍血淋巴细胞数量开始明显减少, 120 h 内血淋巴细胞数量下降 12.51%±6.59%; 水体溶解氧含量继续下降至 (2.53±0.16) mg/L, 12 h 后九孔鲍血淋巴细胞数量就出现显著下降, 120 h 后下降幅度达到 30.62%±4.87% (图 2)。

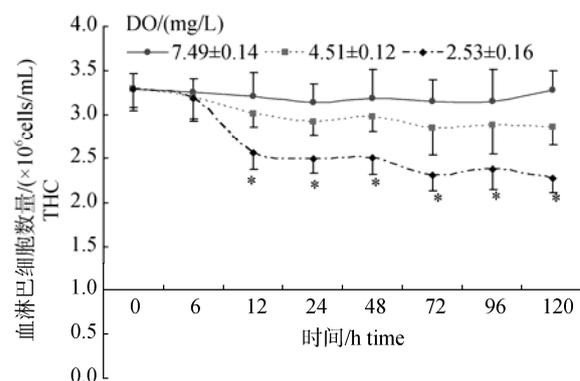


图 2 溶解氧含量对九孔鲍血淋巴细胞数量的影响
Fig. 2 Effects of different concentration of dissolved oxygen on the total haemocyte count (THC) in *H. diversicolor supertexta*

2.3 不同溶解氧条件下九孔鲍血淋巴细胞吞噬活性变化

九孔鲍血淋巴细胞吞噬活性受到水体中溶解氧含量的强烈影响。水体中 DO=(7.49±0.14)mg/L 时, 九孔鲍血淋巴细胞体内吞噬副溶血弧菌的吞噬百分率为(22.5%±5.27%)~(23.67%±3.55%)范围内, 溶氧下降至(4.51±0.12) mg/L 时, 12 h 内血淋巴细胞吞噬百分率变化不大, 24 h 后吞噬百分率下降 10.22%±15.79%, 48 h 后下降 20.14%±17.67%, 72~120 h 内, 九孔鲍血淋巴细胞吞噬百分率下降(18.52%±10.02%)~(21.90%±15.84%)之间波动。溶解氧下降至(2.53±1.2) mg/L 时, 12 h 后九孔鲍血淋巴细胞吞噬活性就下降 9.22%±16.25%, 72 h 后降幅达到 55.47%±5.51%, 120 h 后达到 62.77%±5.79%。

从图 3 可见, 溶解氧含量低于(4.51±0.12) mg/L 的低氧胁迫对九孔鲍血淋巴细胞吞噬活性产生的明显影响见于胁迫因子出现后 24 h, 强烈的胁迫影响多发生在 48 h 后。

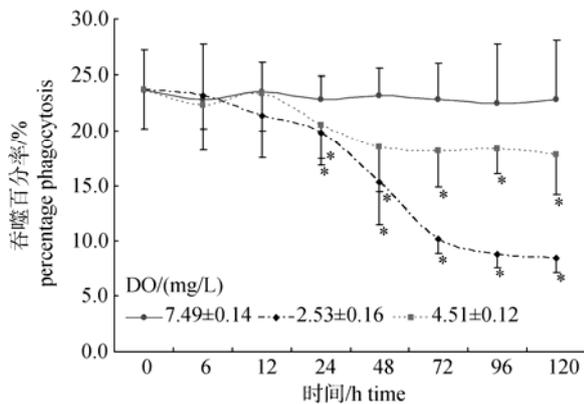


图 3 溶解氧含量对九孔鲍血淋巴细胞吞噬活性的影响
Fig. 3 Differences of phagocytic activity in the haemocytes of *H. diversicolor supertexta* among the groups exposure to various concentration of dissolved oxygen

2.4 不同溶解氧条件下九孔鲍血淋巴细胞呼吸爆发的变化

养殖水体中溶解氧含量由(7.49±0.14) mg/L 下调至(4.51±0.12) mg/L, 低氧作用下九孔鲍血淋巴细胞呼吸爆发产生的超氧阴离子 O_2^- 数量很快有所下降, 120 h 内下降幅度达到 12.93%±5.74%; 溶氧继续下调至(2.53±0.16) mg/L, 九孔鲍呼吸爆发水平在 12 h 内即有较大幅度下降, 达 14.99%±7.20%, 120 h 内下降的幅度可达 22.21%±5.89%。

相较于低氧胁迫对九孔鲍血淋巴细胞吞噬活性和血淋巴数量的影响, 低氧胁迫造成的九孔鲍呼吸爆发水平下降幅度似乎小一些 (图 4)。

2.5 不同溶解氧条件下九孔鲍血淋巴细胞内 MPO 活性的变化

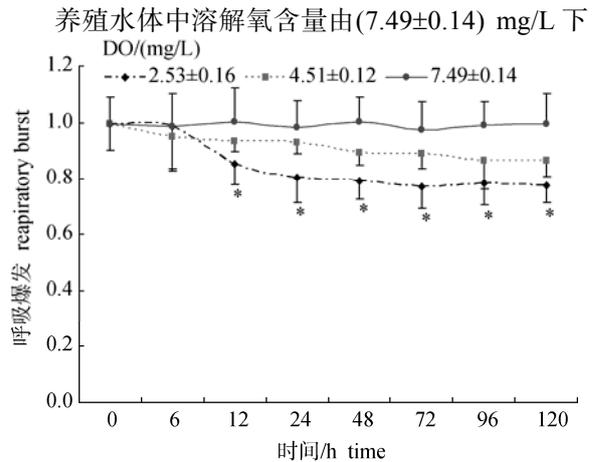


图 4 溶解氧对九孔鲍血淋巴细胞呼吸爆发水平的影响
Fig. 4 The values of respiratory burst in the haemocytes of *H. diversicolor supertexta* exposure to different concentration of dissolved oxygen

调至(4.51±0.12) mg/L, 低氧胁迫使九孔鲍血淋巴细胞内的 MPO 活性先扬后抑, 胁迫 12 h 内 MPO 在原有基础上略有提升, 12 h 后下降至原有水平之下, 总体上在原有水平的-(10.61%±4.20%)~(7.13%±6.45%)之间波动。而养殖水体中溶解氧含量由(7.49±0.14) mg/L 下调至(2.53±0.16) mg/L, 低氧胁迫使九孔鲍血淋巴细胞内的 MPO 活性有明显提高, 并随胁迫时间延长呈先上升而后下降的趋势, 实验期间, MPO 活性始终高于原有水平, 活性提升幅度在原有水平的(9.63%±7.59%)~(22.90%±13.73%)之间, 峰值出现在 24 h 后(图 5)。

2.6 不同溶解氧条件下九孔鲍血细胞内 CAT 活性变化

养殖水体中溶解氧含量由(7.49±0.14) mg/L 下调至(4.51±0.12) mg/L, 低氧胁迫 6 h 内使九孔鲍血淋巴细胞内的 CAT 活性明显提升, 高出原有水平 16.26%±10.85%, 随后逐渐下降至原有水平附近, 12~120 h 内波动幅度在原有水平的-(5.17%±18.08%)~(8.41%±6.06%), 彼此没有明显差异性, 与原有水平差异性也不大。养殖水体中溶解氧含量由(4.51±0.12) mg/L 继续下调至(2.53±0.16) mg/L, 低氧胁迫使九孔鲍血淋巴细胞内的 CAT 活性有明显提高, 提升幅度在原有水平的(7.68%±6.83%)~(56.28%±13.96%), 峰值出现在实验开始后 12 h(图 6)。

2.7 不同溶解氧条件下九孔鲍血淋巴抗菌清除效率变化

低氧胁迫使得九孔鲍血淋巴抗菌清除效率显著下降,随着胁迫时间的延长,抗菌清除率下降幅

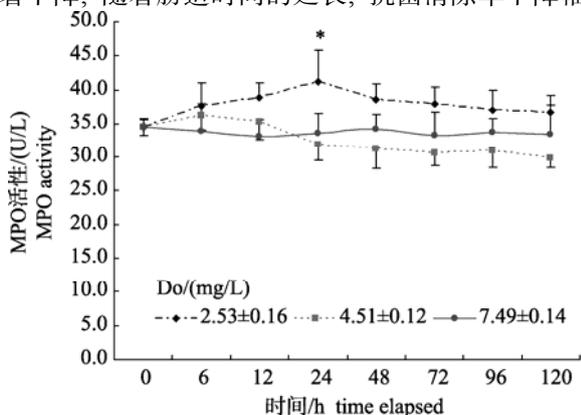


图5 溶解氧对九孔鲍血淋巴细胞 MPO 活性的影响
Fig. 5 The values of MPO activity in haemocytes of *H. diversicolor supertexta* exposure to various concentration of dissolved oxygen

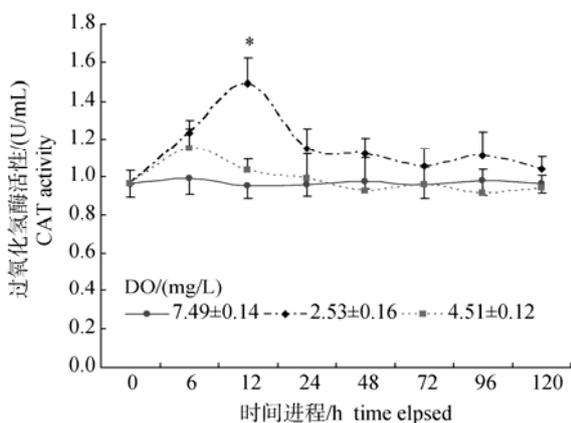


图6 溶解氧含量对九孔鲍血淋巴细胞内 CAT 活性的影响
Fig. 6 The CAT activity in the hemocytes of *H. diversicolor spertexta* exposure to different concentrations of dissolved oxygen

度越来越大。养殖水体内溶解氧由(7.49±0.14) mg/L 下调至(4.51±0.12) mg/L, 120 h 内九孔鲍血淋巴抑菌率下降至-(883.56%±123.22%); 养殖水体内溶解氧由(7.49±0.14) mg/L 下调至(2.53±0.16) mg/L, 120 h 内九孔鲍血淋巴抑菌率更跌落至-(3340.47%±298.57%), 胁迫时间由 12 h 延长至 24 h 和 48 h 延长至 72 h 期间, 九孔鲍抑菌清除效率下降比较明显(图 7)。

3 讨论

平均体质量为(14.25±2.21) g 的九孔鲍, 在水温为(22.1±1.3) °C, 盐度为 30.72±0.54, pH 值为

8.20±0.14, 溶解氧含量为(7.49±0.14) mg/L 的海水环境中,溶解氧含量由(7.49±0.14) mg/L 下调至(2.53±0.16) mg/L 后 120 h 内并未见到个体死亡, 而每鲍注射感染 5.0×10⁵ CFU 副溶血弧菌后 120 h 内

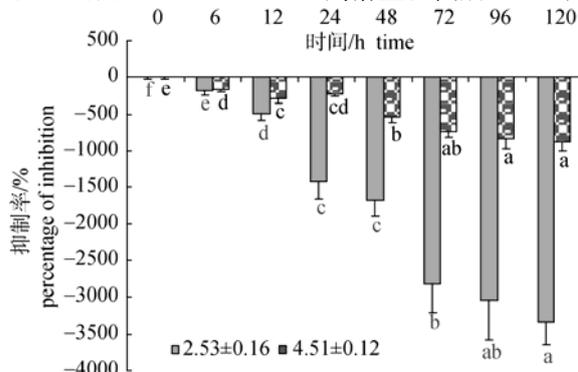


图7 不同溶氧含量下九孔鲍血淋巴抗菌清除效率
Fig. 7 Differences of clearance efficiency in the haemolymph of *H. diversicolor supertexta* exposure to different concentration of dissolved oxygen

的累计死亡率高达 91.11%±7.70%, 比对照组 11.11%±3.83%的累计死亡率高出 80%, 血淋巴的抑菌清除率下降至-(3 340.47%±298.57%), 由此可见, 低氧胁迫使得九孔鲍拮抗副溶血弧菌感染的抵抗力显著下降, 易感性大幅提升(图 1)。这一实验结果与 Cheng 等^[11]报道的结果基本一致。不过, Cheng 等^[11]指出, 养殖水体溶解氧由 7.70 mg/L 下降至 3.57 mg/L 后 72 h、下降至 2.05 mg/L 后 48 h 所有九孔鲍个体全部死亡, 与本实验结果有较大差异性, 这或许与实验鲍个体大小、所处的机能状态有关; 抑或是与实验中溶解氧的下调速度甚至养殖条件的调控有关, 具体原因有待进一步探讨。据报道, 在低氧胁迫(hypoxic condition)状态下, 蓝对虾(*Litopenaeus stylirostris*)对溶藻弧菌的易感性^[22]、斑节对虾(*Penaeus monodon*)对哈氏弧菌(*V. alginolyticus*)^[11]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和草虾(*Palaemonetes pugio*)对副溶血弧菌^[23]、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)对肠球菌(*Enterococcus*)^[15]的易感性皆上升, 这些实验结果反映出, 水生生物在低氧胁迫下抗病力显著性下降具有共同特点。

Yang 等^[11]指出, 九孔鲍适宜生长的溶解氧含量在 5.0 mg/L 以上, 本实验结果表明, 溶解氧含量由(7.49±0.14) mg/L 下调至(4.51±0.12) mg/L 后 120 h 内九孔鲍累计死亡率达到 37.78%±3.85%。

欧洲产的瘤鲍(*Haliotis tuberculata*)在震动胁迫

中先是出现血淋巴细胞数量减少、血淋巴细胞迁移活性下降、吞噬活性下降及超氧化物产物减少等现象^[24], 随后出现血淋巴细胞数量、血淋巴细胞迁移活性、吞噬活性回升至本底水平, 峰值出现在胁迫后 2~4 h。低氧胁迫下, 九孔鲍血淋巴细胞数量(THC)、血淋巴细胞吞噬活性及其产生的活性氧水平均下降(图 2~图 4), 这些构成了其抗病力下降的基础和其中的一部分原因。Cheng 等^[11]认为, 低氧胁迫下九孔鲍血淋巴细胞内酚氧化酶(PO)活性得到加强, 本实验也检测到, 低氧胁迫下九孔鲍血淋巴细胞内 MPO 活性上升、CAT 活性大幅提高(图 5 和图 6)。这些事实反映出, 低氧胁迫下九孔鲍体内应激反应产生的物质氧化加剧, 血淋巴细胞内产生大量的活性氧自由基。低氧胁迫下九孔鲍血淋巴细胞内 MPO 活性提升, 说明由呼吸爆发而产生的自由基 H_2O_2 转化为 OCI^- 的作用有所加强。一般认为, 在逆境胁迫下生物体内产生的 ROIs 是一类有害的氧化代谢中间产物, 是引起细胞结构和功能降低的主要原因^[25-26]。由此可以推测, 低氧胁迫下九孔鲍血淋巴细胞内 MPO 活性表达增强是机体应对因呼吸爆发而产生的超氧阴离子 O_2^- 数量减少的适应性结果, 而血淋巴细胞内 CAT 活性的大量表达则体现出九孔鲍对逆境胁迫的抵抗和适应机制。在应激反应过程中, 体内免疫因子过多的资源性消耗或许也是造成九孔鲍抗病力下降和个体累积死亡率暴发上升的一方面原因。

低氧胁迫下植物根系超氧阴离子 O_2^- 产生量大幅提升^[27], 而本实验结果及 Cheng 等^[11]的实验结果恰相反, 这是物种差异性造成还是实验方法不同产生的差别尚不得而知。不过, 低氧胁迫下九孔鲍氧化酶(PO 和 MPO)显著提升, 体内应激反应产生更多的超氧阴离子是具备物质基础的, 也符合生物通常的胁迫适应机理。

参考文献:

- [1] 高绪生. 鲍鱼[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2006: 33-49.
- [2] 候旭光. 世界重要鲍的生物学特征[J]. 齐鲁渔业, 1998, 15(4): 20-22.
- [3] 翟兴文. 九孔鲍养殖技术[J]. 水产养殖, 2002(2): 21.
- [4] Chen J C, Lee W C. Growth of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* fed on *Gracilaria tenuistipitata* and artificial diet in multiple-tier basket system [J]. Journal of Shellfish Research, 1999, 18: 627-635.
- [5] Cheng W T, Yeh S P, Wang C S. Osmotic and ionic changes in Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* at different salinity levels[J]. Aquaculture, 2002, 203: 349-357.
- [6] 冯显逵, 王绍琰. 九孔鲍工厂化养殖应警惕缺氧死亡[J]. 中国水产, 1999, (6): 38.
- [7] 陈月忠, 黄万红, 陈木. 闽粤地区鲍暴发性流行病的病因分析和流行病学研究[J]. 海洋科学, 2005, 29(8): 100-104.
- [8] 蔡俊鹏, 刘江涛, 王志. 引起南方九孔鲍苗大规模死亡的一株病原菌的分离鉴定及其致病性研究[J]. 水产科学, 2006, 25(7): 334-337.
- [9] Lee K K, Liu P C, Chen C Y, et al. The implication of ambient temperature with outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Lischke[J]. Journal of Thermal Biology, 2001, 26: 585-587.
- [10] Chen H C. Recent innovations in cultivation of edible mollusks in Taiwan with special reference to the small abalone *Haliotis diversicolor* and the hard clam *Metretrix lusoria*[J]. Aquaculture, 1984, 39: 11-27.
- [11] Cheng W, Li C H, Chen J C. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Aquaculture, 2004, 232: 103-115.
- [12] Jayasree S. Biological properties of a natural agglutinin in the hemolymph of Indian white prawn, *Penaeus indicus* H. Milne Edwards[J]. Aquaculture, 2001, 194: 245-252.
- [13] Song Y L, Yu C I, Lien T W, et al. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2003, 14: 317-313.
- [14] 林清华. 免疫学实验[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2004.
- [15] Cheng W T, Liu C H, Hsu J P, et al. Effect of hypoxia on the immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergui* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 13: 351-365.
- [16] Marcelo M, Ricardo C, Jenny R, et al. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*[J]. Aquaculture, 2000, 191: 89-107.
- [17] 杜爱芳. 中国对虾血细胞吞噬功能的研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(2): 1-5.
- [18] Song Y L, Hsieh Y T. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) haemocytes for generation of micro-

- cidal substances: analysis of reactive oxygen species[J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 1994, 18: 201–209.
- [19] Jesús O, Alberto C, Alejandro R, *et al.* Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2002, 85: 41–50.
- [20] 庞战军, 周玫, 陈媛. 自由基医学研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [21] Adams A. Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1991, 1: 59–70.
- [22] Le M G, Soyez C, Saulnier D, *et al.* Effect of hypoxia stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, 8: 621–629.
- [23] Mikulski C M, Burnett L E, Burnett K G. The effect of hypercapnic hypoxia on the survival of shrimp challenged with *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2000, 19: 301–311.
- [24] Malham S, Lacoste A, Gelebart F, *et al.* Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*[J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2003, 295: 136–144.
- [25] 高洪波, 郭世荣. 外源 γ -氨基丁酸对营养液低氧胁迫下网纹甜瓜幼苗抗氧化酶活性和活性氧含量的影响[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30(6): 651–659.
- [26] 汪天, 王素平, 郭世荣, 等. 植物低氧胁迫伤害与适应机理的研究进展[J]. *西北植物学报*, 2006, 26(4): 847–853.
- [27] 康云艳, 郭世荣, 段九菊. 低氧胁迫对不同耐性黄瓜品种根系抗氧化系统的影响[J]. *植物生理学通讯*, 2007, 43(4): 630–634.

Effect of hypoxia on the immune response of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to pathogen *Vibrio parahaemolyticus*

CHEN Zheng-qiang^{1,2,3}, CHEN Chang-sheng^{2,3}, ZHAN Wen-bin^{1*}

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

2. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

3. Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Fujian Province, Xiamen 361021, China)

Abstract: The abalone *Haliotis diversicolor supertexta* is the most important aquatic species in many marine farms in China. For the purpose of qualitative observation on the variation of immune defense and natural resistance of animals, the abalones were put into waters with different dissolved oxygen and some immune effectors involved in defense were detected. In this paper the immune response of the abalone and susceptibility to pathogen *Vibrio parahaemolyticus* under hypoxia stress condition were described. The abalones with an average body weight (14.25 ± 2.21) g could tolerate 120 hours for exposure to a hypoxic condition when dissolved oxygen was reduced from (7.49 ± 0.14) mg/L to (2.53 ± 0.16) mg/L without onset mortality occurred at a water temperature (22.1 ± 1.3) °C, and a salinity level of 30.72 ± 0.54 , and pH 8.20 ± 0.14 , but they suffered $91.11\% \pm 7.70\%$ cumulative mortality rate which was 80% higher than the control animals due to being challenged with *V. parahaemolyticus* at a dose of 5.0×10^5 cells per abalone, and a clearance efficiency in the haemolymph of *H. diversicolor supertexta* decreased to $-(334.47\% \pm 298.57\%)$ inhibition rate. Obviously, the resistance of the abalones to *V. parahaemolyticus* infection decreased and the susceptibility increased correspondingly under the hypoxic stress above, in which the total haemocytes counts (THC) and percentage of phagocytosis and the amount of superoxide anion (O_2^-) produced by respiratory burst decreased by $30.62\% \pm 4.87\%$, $62.77\% \pm 5.79\%$, and $22.21\% \pm 5.89\%$ respectively. That intracellular MPO activity and CAT activity went up from $9.63\% \pm 7.59\%$ to $22.90\% \pm 13.73\%$ and $7.68 \pm 6.83\%$ to $56.28\% \pm 13.96\%$ respectively while dissolved oxygen reduced from (7.49 ± 0.14) mg/L to (2.53 ± 0.16) mg/L suggests that the intracellular oxidation introduced by hypoxic stress response intensified and there must be much more oxyradicals. The trial abalones of *H. diversicolor supertexta* possessed a cumulative mortality rate of $37.78 \pm 3.85\%$ and a haemolymph inhibition rate of $-(883.56\% \pm 123.22\%)$, and the maximal downtrends of $12.51\% \pm 6.59\%$, $21.90\% \pm 15.84\%$, $12.93\% \pm 5.74\%$ in THC and percentage of phagocytosis and the amount of O_2^- production respectively, and a variation of MPO activity ranges from $-(10.61\% \pm 4.20\%)$ to $7.13\% \pm 6.45\%$ and CAT activity from $-(5.17\% \pm 18.08\%)$ to $16.26\% \pm 10.85\%$ while not only dissolved oxygen went down from (7.49 ± 0.14) mg/L to (4.51 ± 0.12) mg/L but also infection with *V. parahaemolyticus* occurred due to the obvious hypoxic stress.

Key words: *Haliotis diversicolor supertexta*; hypoxia; immune response; susceptibility; *Vibrio parahaemolyticus*

Corresponding author: ZHAN Wen-bin. E-mail: wbzhan@ouc.edu.cn