

不同体质量仿刺参免疫活性的研究

田 丹, 姜国良, 刘 云

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 通过研究不同体质量仿刺参(*Apostichopus japonicus*)的免疫活性, 为仿刺参生长中免疫指标的建立提供依据。实验选取了 50、100、150 g 左右的仿刺参各 10 只, 测定其体腔细胞数量、各细胞类群比例及部分免疫酶活性。结果表明: 不同体质量的仿刺参, 其体腔细胞数量及各细胞类群、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)具有显著性变化, 而体腔液中酚氧化酶(PO)活性极低。体质量 150 g 左右仿刺参的细胞数量和 SOD 活性较其他两组都明显升高, 细胞类群也有明显变化($P < 0.017$), 但 POD 活性显著降低($P < 0.05$)。不同体质量的仿刺参免疫活性具有显著性差别, 说明了仿刺参免疫组分在生长过程中不断变化, 免疫防御能力在各阶段有所差别。

关键词: 仿刺参; 体质量; 免疫活性

中图分类号: S963.73

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2013)10-0047-06

仿刺参(*Apostichopus japonicus*), 俗名海参(sea cucumber), 属于棘皮动物。在亚洲一些国家如中国、俄罗斯、日本等被认为是最有经济价值的物种而广泛用于海水养殖业。然而, 近几年为了解决养殖规模的不断增大、刺参高密度养殖的过速发展及养殖水环境的日益恶化^[1]而造成的刺参病害等问题, 抗生素类药物被大量使用, 这不仅带来了药物残留、抗药性等问题, 也污染了环境, 成为当前海参养殖业急需解决的难题之一。面对这个问题, 学者们将目光逐渐转向了研究仿刺参的自身免疫系统^[2-3], 期待通过提高刺参自身免疫能力减少病害和损失。

目前, 对于仿刺参免疫系统的研究尚处在起始阶段, 因其不具备特异性免疫, 故多是关于免疫细胞、免疫因子及相关酶的研究报道。体腔细胞是细胞免疫主要承担者, 因此体腔细胞也是众多学者研究的一个热点。Eliseikina 等^[4]利用电镜技术对仿刺参体腔细胞进行了分类并探讨了参与吞噬作用的细胞类群; 李华等^[5]采用活体观察、染色和电镜技术进一步研究了仿刺参体腔细胞并将仿刺参体腔细胞分为了 6 大类: 淋巴样细胞、球形细胞、透明细胞、变形细胞、纺锤细胞和晶体细胞。而体腔液中含有一些参与免疫反应的重要因子、免疫酶等, 在免疫防御中也具有重要作用。张峰等^[6]研究了几种理化因子对仿刺参体腔液补体溶血活性的影响; 李丹彤等^[7]进行了仿刺参凝集素的分离纯化与性质的研究; 王方雨等^[8]监测了 SOD、CAT、LSZ 等几种酶在一年中

的活性变化。虽然取得了一定的成果, 但是关于仿刺参的免疫机制及免疫系统发展的研究仍然缺乏。

本实验研究了体质量与仿刺参免疫系统的关系, 探讨了随体质量的增加, 仿刺参各生长阶段部分免疫组分的变化, 本研究为进一步弄清仿刺参免疫机制以及仿刺参免疫指标的建立提供了基础实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及设计

健康仿刺参全部购自青岛南山水产市场。实验设 3 个体质量梯度(50 g $\pm$ 10.62 g、100 g $\pm$ 8.78 g、150 g $\pm$ 7.32 g), 分别为 1、2、3 号组, 每组 10 只仿刺参, 进行各项免疫指标的测定。

1.2 样品的采集

买回后, 用洁净海水清洗仿刺参表面(无吐脏个体), 滤纸擦净后, 于冰浴下解剖, 取其体腔液, 部分加入等体积的抗凝液(0.02 mol/L EGTA, 0.48 mol/L NaCl, 0.019 mol/L KCl, 0.068 mol/L Tris-HCl, pH7.6^[9]), 用于体腔细胞计数与分类。剩余部分于 4℃ 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液分装, 于-20℃保存, 用于酚氧化酶(PO)和超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定。另用

收稿日期: 2013-02-24; 修回日期: 2013-06-22

作者简介: 田丹(1988-), 女, 土家族, 湖南湘西人, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物材料的提取与应用, 电话: 18765266880, E-mail: tiandan118@126.com; 刘云, 通信作者, 电话: 0532-82031839, E-mail: liuyun@ouc.edu.cn

0.85%生理盐水溶解沉淀, 于 0℃ 22 kHz 下, 超声波破碎 25 s, 再于 4℃ 12 000 r/min 下, 离心 10 min 取上清液, 于-80℃保存, 用于过氧化物酶(POD)活性的测定。

1.3 测定方法

1.3.1 体腔细胞计数与分类

计数 采用血球计数板在光镜(尼康 E200)下直接计数的方法。每个个体质量复统计 3 次, 取平均值。

分类 采用陈静等^[10]染色方法制作滴片, Wright's-Giemsa 染色, 于光镜下进行分类, 统计各类细胞的数量。

1.3.2 过氧化物酶(POD)含量的测定

POD 活性采用沃辛通(Worthington)法^[11], 进行测定。POD 活性(U/mg)=($E_{510nm} \times 3 \times 10$)/(6.58 × E_w), E_w 为 0.1 mL 反应液中蛋白含量。蛋白浓度的测定采用考马斯亮兰法^[12]。

1.3.3 超氧化物歧化酶(SOD)活力的测定

采用南京建桥生物公司试剂盒测定。SOD 活力定义为在 1mL 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位(U)。

1.3.4 酚氧化酶(PO)活力的测定

参照樊廷俊等^[13]的方法测定, 稍作修改。以 L-DOPA 为底物, 1%SDS 为激活剂, 加入待测酶液, 于 28℃水浴中反应 30 min 后, 加入预冷的磷酸钾缓冲液, 并于 490 nm 每 2 min 测定一次吸光值。以每分钟每毫克蛋白吸光值增长 0.001 定义为一个酶活力单位(U)。

1.4 数据处理与分析

数据均以各组的平均值±标准误差(Means±SE)表示, 用单因素方差分析(One-way ANOVA)和多重比较、秩和检验及卡方检验进行统计学分析; $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极其显著。

2 实验结果

2.1 仿刺参体腔细胞的类型及比例

根据染色结果, 作者将仿刺参体腔细胞分为了 6 种类型: 淋巴样细胞、颗粒细胞、变形细胞、透明细胞、纺锤细胞和晶体细胞, 各种细胞形态简述如下。

淋巴样细胞: 相比其他细胞较小, 大小约为 2~5 μm, 呈球形或卵圆形, 核质比大, 部分有丝状伪足(图 1-1a)。

透明细胞: 呈球状或者卵圆形, 大小约为 3~9 μm, 核为规则球形, 居中或者偏离中心。核质比较淋巴样细胞小, 无颗粒(图 1-1)。

变形细胞: 形状不定或者不规则, 大小约为 2.5~5 μm, 核呈球形、偏位, 有许多丝状伪足(图 1-2, 1-3), 部分染色后缩回胞质中。

颗粒细胞: 呈球形或椭圆形, 大小约为 4~10 μm, 胞质中含有许多颗粒, 胞质嗜碱性或者酸性或中性(图 1-4, 1-5, 1-6)。

晶体细胞: 呈长方形或菱形, 长径约为 5~9 μm, 短径约为 3~4.5 μm, 无内含物(图 1-7)。

纺锤细胞: 两端尖, 呈纺锤形, 细胞长径约为

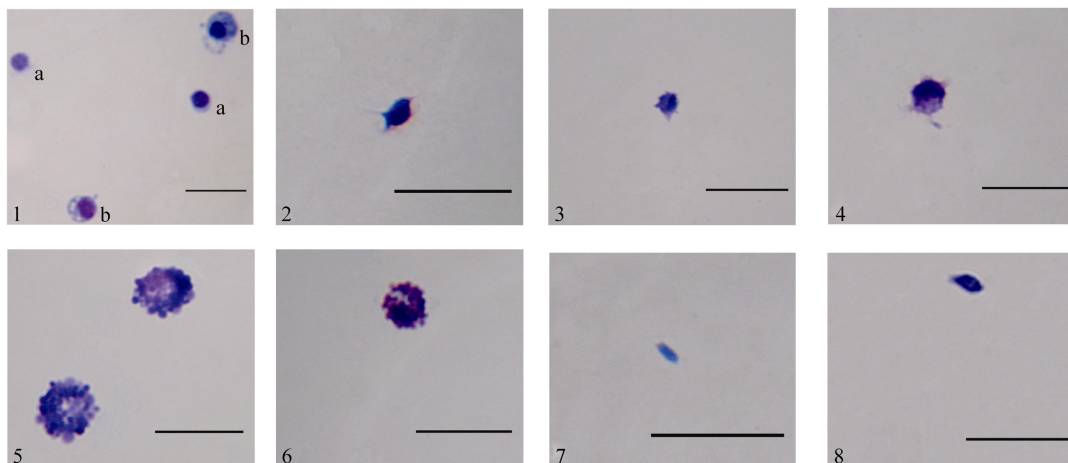


图 1 仿刺参体腔细胞类型及形态(Wright's-Giemsa 染色)

Fig. 1 The types and morphology of coelomocytes in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) by Wright's-Giemsa staining
1.a. 淋巴样细胞, b. 透明细胞; 2~3. 变形细胞; 4~6. 颗粒细胞, 其中 4 为嗜中性颗粒细胞, 5 为嗜碱性颗粒细胞, 6 为嗜酸性颗粒细胞;
7. 晶体细胞; 8. 纺锤细胞; 标尺大小为 10 μm
1.a. Lymphoid-like cell, b. Hyaline cell; 2~3. Amoebocyte; 4~6. Granulocyte, 4. Neutrophilic granulocyte, 5. Basophilic granulocyte, 6. Eosinophilic granulocyte; 7. Crystal cell; 8. Fusiform cell, bars = 10 μm

5~8 μm , 短径约为 2~2.5 μm , 细胞核圆形, 位于细胞近中心(图 1-8)。

染色后不同体质量各类细胞所占比例如表 1 所示, 因纺锤细胞和晶体细胞比例较小, 合并为其他细胞。不同体质量仿刺参的体腔细胞比例总体趋势

上相同, 都是淋巴样细胞>颗粒细胞>变形细胞>透明细胞>其他细胞, 但不同体质量各细胞类型所占比例不同。体质量 150 g 左右仿刺参体腔细胞各类型组成与体质量 50 g 和 100 g 左右具有明显差异 ($P<0.017$)。

表 1 不同体质量仿刺参体腔细胞各类型比例

Tab.1 The proportion of various types of coelomocytes in different group of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) with different body weight (%)

组号	淋巴样细胞	颗粒细胞	变形细胞	透明细胞	其他细胞
1 ^a	33.5	26.6	20.2	18.1	1.5
2 ^a	32.3	31.7	15.3	18.9	1.8
3 ^b	37.7	30.7	19.0	11.3	1.3

注: 表中标有不同字母的项, 表示经卡方检验具有显著性差异 ($P<0.017$)

2.2 不同体质量仿刺参的体腔细胞数量

仿刺参体腔细胞数量的变化如图 2 所示。实验结果表明, 不同体质量仿刺参的体腔细胞数量有显著差别 ($P<0.05$), 150 g 左右仿刺参的细胞数量明显高于 50 g 和 100 g 左右仿刺参的细胞数量 ($P<0.017$)。

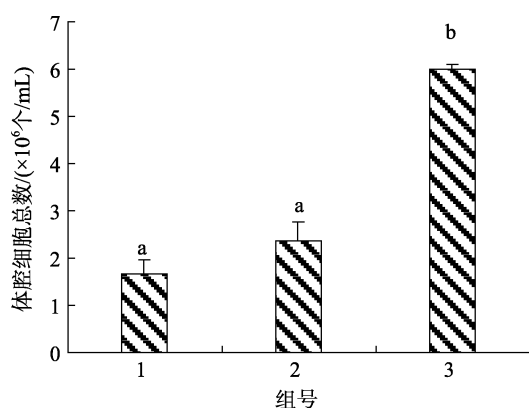


图 2 不同体质量仿刺参的体腔细胞总数

Fig. 2 The total coelomocytes numbers in different sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) with different body weight

图中标有不同字母的列, 表示经秩和检验具有显著性差异 ($P<0.017$) Columns with different letters are significantly different ($P<0.017$) as determined by Kruskal-Wallis tests

2.3 不同体质量仿刺参的酚氧化酶(PO)、过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)活性

仿刺参 POD 和 SOD 活性检测结果如图 3 和图 4 所示。实验结果表明, POD 活性在 150 g 左右仿刺参中最低 ($P<0.05$), 而 100 g 和 50 g 之间没有明显的差异。SOD 活性随体质量增加呈升高趋势, 150 g 左右

的仿刺参活性最强 ($P<0.05$)。而上清液中 PO 活性很低, 在 2~4 单位, 故不做统计。

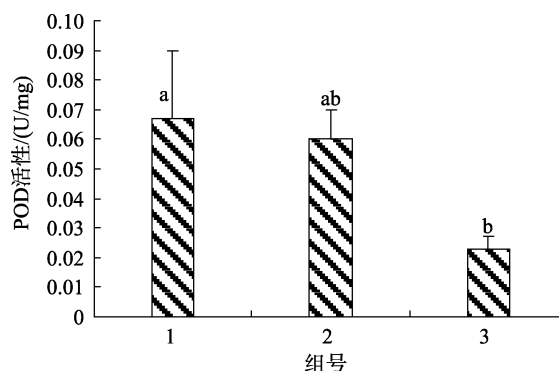


图 3 不同体质量仿刺参的过氧化物酶活性

Fig. 3 The POD activity in different sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) with different body weight

图中标有不同字母的列, 表示经多重比较具有显著性差异 ($P<0.05$) Columns with different letters are significantly different ($P<0.05$) as determined by post Hoc multiple comparisons

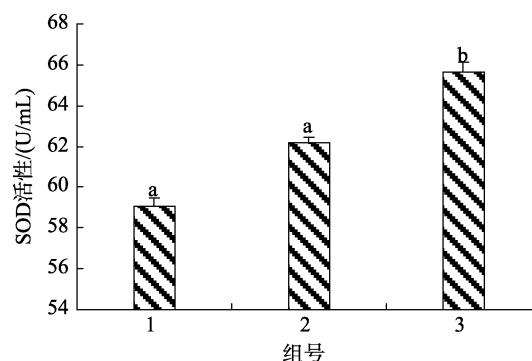


图 4 不同体质量仿刺参的超氧化物歧化酶活性

Fig. 4 The SOD activity in different sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) with different body weight

图中标有不同字母的列, 表示经多重比较具有显著性差异 ($P<0.05$) Columns with different letters are significantly different ($P<0.05$) as determined by Post Hoc Multiple Comparisons

3 讨论

仿刺参属于棘皮动物,其防御机制是通过细胞和体液免疫反应完成的^[14]。目前,具有经济价值的仿刺参主要是 50 g 到 150 g,属于 1 龄至 3 龄^[15],虽然仿刺参可因密度、社会等级和遗传等因素造成个体差异^[16],但由于体质量与生长具有一定相关关系,能在一定程度上反应出动物的发育状况及免疫能力。因此主要研究此体质量范围内仿刺参的免疫活性变化,不仅对开发饲料添加剂以增强仿刺参的免疫力,进而预防和减少此阶段的病害,提高经济效益具有重要意义,也能为仿刺参免疫机制的研究提供一些基础数据。

体腔细胞是仿刺参免疫系统的重要组成部分,其数量是重要的生理状态指标,与机体免疫力相关^[5]。本实验结果表明,个体越大,仿刺参体腔细胞数量越多,说明其免疫系统发育的越完善,免疫能力越强。实验结果虽与李华等^[5]统计的仿刺参体腔细胞数量在同一数量级,但比其结果少了 1/3,这可能与取样环境不同或者实验人员不同有关。

体腔细胞也是棘皮动物参与免疫反应的效应细胞,是棘皮动物抵抗外来微生物和受伤后防御的第一道防线^[14]。目前,对于仿刺参体腔细胞的分类还没有统一的标准,但淋巴样细胞、变形细胞、球形细胞被普遍认为是主要的仿刺参体腔细胞类群,另外还有晶体细胞、纺锤细胞等类群。本实验中,作者将仿刺参体腔细胞分为了 6 大类,这基本与李华等^[5]对仿刺参体腔细胞分类相似,但作者将具有颗粒的细胞命名为颗粒细胞而不是球形细胞,主要是由于颗粒细胞的命名更与刘晓云等^[17]对仿刺参体腔细胞显微观察分类及 Eliseikina 等^[4]提到的桑椹胚细胞一致。另外,本实验中观察到颗粒细胞染色后存在嗜酸性和嗜碱性的情况,也与李华等^[5]结果有差别。

各体腔细胞比例的统计结果表明,淋巴样细胞、颗粒细胞、变形细胞和透明细胞为仿刺参体腔细胞的主要类群,共占总数的 98%以上,这与李华等^[5]、刘晓云等^[17]、Ramírez-Gómez 等^[18]对仿刺参各类型体腔细胞比例统计的结果都存在较大差别,这可能与采用的方法不同有关。实验结果也表明,在体质量 150 g 左右,仿刺参体腔细胞各类型的比例发生明显变化,淋巴样细胞比例上升达到 37%,颗粒细胞和变形细胞总比例也上升到 50%。李华等^[5]认为淋巴样细胞可能类似于祖细胞,可继续分化为部分其他类型体腔细胞,但本实验中体质量最重组的淋巴样细

胞比例高于其他组,因此作者认为淋巴样细胞可能在受到某些刺激后能够向部分其他细胞类型分化,但不应认为其就是祖细胞。而变形细胞和球形细胞则被认为是与吞噬作用相关的两类细胞^[4-5],这两类细胞比例的上升表明了仿刺参吞噬活性的增强,免疫能力的提高。

SOD及POD都是无脊椎动物机体内的重要的抗氧化酶^[1],它们能够及时清除吞噬细胞呼吸爆产生的活性氧自由基,从而使机体免受损伤。本实验中,POD活性随体质量呈下降趋势,在150g左右的仿刺参中最低,而SOD活性在150g左右的仿刺参中最高,说明了随着仿刺参免疫系统的发育,抗氧系统发生了较明显的变化,在发育早期POD发挥重要作用,而随着仿刺参的生长,SOD逐渐成为主要的抗氧化酶。

PO在无脊椎动物先天性免疫防御反应中占有重要位置,其能精密调控入侵病原以及受损组织的黑化,从而起到防御作用。酚氧化酶活性的研究,多集中于甲壳类、软体动物等,关于棘皮动物酚氧化酶的研究较少,仅虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)、冠海胆(*Diadema antillarum*)和管海参(*Holothuria tubulosa*)等^[19]证实体内存在酚氧化酶活性。本实验中,在体腔液中检测到的酚氧化酶活性极低,可能是方法不够灵敏或者实验材料中酚氧化酶含量太少的原因。

综上所述,不同体质量仿刺参的免疫活性存在显著性差异,尤其是体腔细胞数量及类群比例、SOD和POD活性方面有较大变化,这说明可能仿刺参在不同阶段免疫系统中起主要作用的各项免疫组分不同,而在体质量最大组中淋巴样细胞、颗粒细胞和变形细胞比例的增大,SOD活性的增强,也表明仿刺参随体质量的增加,免疫系统逐步完善,其免疫活性有一定的增强。

参考文献:

- [1] 常杰,牛化欣,张文兵,等.刺参免疫系统及其免疫增强剂评价指标的研究进展[J].中国饲料,2011,6:8-12.
- [2] Wang T T, Sun Y X, Jin L J, et al. Enhancement of non-specific immune response in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) by *Astragalus membranaceus* and its polysaccharides [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2009, 27: 757-762.
- [3] Zhang Q, Ma H M, Mai K S, et al. Interaction of dietary

- Bacillus subtilis and fructooligosaccharide on the growth performance, non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2010, 29: 204-211.
- [4] Eliseikina M G, Magarlamov T Y. Coelomocyte Morphology in the Holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae)[J]. Russian Journal of Marine Biology, 2002, 28(3): 197-202.
- [5] 李华, 陈静, 陆佳, 等. 仿刺参体腔细胞和血细胞类型及体腔细胞数量研究[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 208-213.
- [6] 张峰, 张莉. 几种理化因子对仿刺参体腔液补体溶血活性的影响[J]. 大连水产大学学报, 2009, 24(4): 300-304.
- [7] 李丹彤, 宋亮, 钟莉, 等. 刺参凝集素的分离纯化及其性质[J]. 水产学报, 2005, 29(5): 654-658.
- [8] 王方雨, 杨红生, 高菲, 等. 刺参体腔液几种免疫指标的周年变化[J]. 海洋科学, 2009, 33(7): 75-80.
- [9] Zhao Y C, Zhang W B, Xu W, et al. Effects of potential probiotic *Bacillus subtilis* T13 on growth, immunity and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2012, 1-6.
- [10] 陈静, 李华, 吴艳辉, 等. 仿刺参体腔细胞染色方法的研究[J]. 大连水产学院学, 2008, 23(2): 98-103.
- [11] 施特尔马 B. 酶的测定方法[M]. 钱嘉渊译. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 276-278.
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding[J]. Analyt Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [13] 樊廷俊, 汪小锋. 中国对虾(*Penaeus chinensis*)酚氧化酶的分离纯化及其部分生物化学性质[J]. 生物化学与生物物理学报, 2002, 34(5): 589-594.
- [14] 张峰. 棘皮动物体内防御机制的研究进展[J]. 大连水产大学学报, 2005, 20(4): 340-344.
- [15] 韩华. 不同年龄刺参体壁营养成分分析及评价[J]. 海洋环境科学, 2011, 30(3): 404-408.
- [16] Dong S L, Liang M, Gao Q F, et al. Intra-specific effects of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) with reference to stocking density and body size[J]. Aquaculture Research, 2010, 41(8): 1170-1178.
- [17] 刘晓云, 谭金山, 包振民, 等. 刺参体腔细胞的超微结构观察[J]. 电子显微学报, 2005, 24(6): 613-615.
- [18] Ramírez-Gómez F, Aponte-Rivera F, Méndez-Castaner L, et al. Changes in holothurian coelomocyte populations following immune stimulation with different molecular patterns[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2010, 29: 175-185.
- [19] 王轶南, 刘学伟, 刘艳萍, 等. 虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)体腔液的酚氧化酶活性分析[J]. 中国农业科技导报, 2011, 13(2): 116-120.

Study on immune activity of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) with different weight

TIAN Dan, JIANG Guo-liang, LIU Yun

(College of marine life sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Feb., 24, 2013

Key words: *Apostichopus japonicus*; body weight; immune activity

Abstract: In order to provide basis knowledge on immune system of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*), the immune activity in sea cucumber with different body weight were studied. Three groups of sea cucumbers (50 g, 100 g, and 150 g) were selected in the experiment (10 individuals each). The total coelomocytes numbers, the ratio of various types of coelomocytes and some immune enzyme activities were determined. The results showed that the body weight had a significant effect on total coelomocytes amount, the ratio of various types of coelomocytes, POD and SOD activity, while the PO activity in coelomic fluid of sea cucumber was extremely low. The total coelomocytes amount and SOD activity in 150 g group of sea cucumber were significantly higher than the other two groups, but the POD activity was significantly lower than the other two groups ($P < 0.05$). The ratio of various types of coelomocytes in 150 g group had significant difference compared to other groups ($P < 0.017$). In a word, the body weight had significant impacts on immune activity of sea cucumber. The immune components of sea cucumber changed in the process of development and the immune defense ability might vary in different stages.

(本文编辑: 梁德海)