

朱晓莹, 孟 霄, 姚海洋, 等. 盐度变化对单环刺螠非特异性免疫的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(12): 197–200.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.12.044

盐度变化对单环刺螠非特异性免疫的影响

朱晓莹¹, 孟 霄¹, 甘宏涛¹, 刘统昊¹, 姚海洋¹, 徐 驰¹, 丁 寅¹, 阙义进¹, 许星鸿^{1,2}

(1. 淮海工学院海洋生命与水产业学院, 江苏连云港 222005; 2. 江苏省海洋资源开发研究院, 江苏连云港 222005)

摘要:在温度为 15 ℃、pH 值为 8 条件下, 测定由初始盐度 2.5% 变化至不同盐度(1.5%、2.0%、3.0%、3.5%) 对单环刺螠非特异性免疫指标(血细胞密度、SOD 和 ACP 活力、MDA 含量)的影响。试验结果表明, 盐度变化后, 血细胞密度在 48 h 内和盐度呈显著正相关; 各试验组 SOD 活力呈先升后降的趋势, 而 MDA 含量表现为先降后升, 且 MDA 含量与 SOD 活力呈显著负相关($r = -0.969, P < 0.05$); ACP 活力则呈现 2 种变化趋势, 盐度 1.5% 和 2.0% 2 组先降后升再降, 盐度 3.0% 和 3.5% 2 组先升后降。至处理 96 h, 盐度 1.5% 和 3.5% 2 组的血细胞密度、SOD 和 ACP 活力显著低于对照组, 而 MDA 含量显著高于其他各组($P < 0.05$)。盐度 2.0% ~ 3.0% 为单环刺螠较适宜的环境条件, 盐度 1.5% 和 3.5% 条件下其免疫力显著下降, 以低盐环境影响更为明显。

关键词:盐度变化; 单环刺螠; 非特异性免疫; 血细胞

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)12-0197-03

单环刺螠(*Urechis uniconeus*)主要分布于俄罗斯、日本、朝鲜以及我国黄渤海沿岸, 是我国沿海存在的唯一无管螠目物种^[1]。单环刺螠肉质鲜美、营养丰富, 其必需氨基酸组成符合人体的吸收比例要求, 并富含二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DPA)及 Fe、Zn 等微量元素, 提取物中还有一定的抗肿瘤和提高免疫力作用, 因此具有较高的经济价值及良好的开发利用前景^[2]。目前, 对单环刺螠的研究主要集中于纤溶酶的分离纯化和溶栓作用提取物的分析、硫化物的应激代谢以及人工繁育等方面^[3-5], 而有关环境因子对单环刺螠免疫功能影响的报道相对较少。本研究观察了不同盐度条件下单环刺螠免疫相关指标的变化, 旨在探讨单环刺螠对盐度的生理调节机制, 为人工养殖水环境调控提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料

单环刺螠体长(15.1 ± 1.5) cm、体质量(31.2 ± 4.2) g, 于 2017 年 4 月购自江苏省连云港市水产品市场, 采用循环养殖系统暂养 7 d。暂养条件为: 盐度 2.5%, pH 值 = 8, 水温 15 ℃, 自然光照, 连续充气, 日投喂 2 次藻液。选择大小相近、体表无损伤且活力强者用于试验。

1.2 试验设计

本试验初始盐度为 2.5%, 设对照组为 2.5%, 试验组分别为 1.5%、2.0%、3.0%、3.5%。并采用曝气自来水和海水

晶配制所需盐度的人工海水, pH 值为 8。每组设 3 个平行, 每个平行随机放 20 条单环刺螠, 于 40 cm × 30 cm × 30 cm 水族缸中饲养, 水温、饵料、充气等养殖条件与暂养时相同。每天定时换水 1 次, 每次换水 50%。每个平行分别于 6、12、24、48、72、96 h 取 3 条单环刺螠, 用蒸馏水冲洗, 滤纸吸干体表水分, 进行解剖并取其血液, 保留部分全血用于测定血细胞密度, 另一部分于 4 ℃、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液血清, 于 -80 ℃ 保存, 进行测定其他免疫相关指标。

1.3 检测方法

用血球计数板计算血细胞密度, 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力采用连苯三酚自氧化法测定^[6], 酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)活力、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量和样品蛋白含量参考南京建成生物工程研究所试剂盒说明进行测定。

1.4 数据分析

试验数据以“平均值 ± 标准差”表示, 采用 SPSS 18.0 软件进行单因子方差分析, LSD 多重比较和 Duncan's 检验, 显著水平设为 0.05。

2 结果与分析

2.1 盐度变化对单环刺螠血细胞密度的影响

由图 1 可知, 处理 6 h 时, 各组血细胞密度和盐度呈显著正相关($r^2 = 0.955, P < 0.05$), 以盐度 1.5% 组血细胞密度(1.20×10^8 个/mL)最低, 仅为盐度 3.5% 组的 67%。处理 12 h 时, 各试验组血细胞密度均有所上升, 以盐度 3.0%、3.5% 组升高幅度较大, 并显著高于盐度 2.5% 组, 而盐度 1.5% 组血细胞密度虽有所回升, 但仍显著低于其他各组($P < 0.05$)。随处理时间的延长, 盐度 1.5%、3.0%、3.5% 组血细胞密度呈现下降趋势, 至处理 48 h 时, 各组血细胞密度和盐度仍呈显著正相关($r = 0.987, P < 0.05$)。处理 96 h 后, 以盐度 1.5% 组血细胞密度最低, 盐度 3.5% 组次之, 而盐度 2.0%、2.5%、3.0% 组的血细胞密度组间差异不显著($P > 0.05$)。

收稿日期: 2018-02-08

基金项目: 江苏省海洋资源开发研究院开放基金(编号: JSIMR201602); 连云港“521”高层次人才培养工程项目(编号: KK18027); 江苏省连云港市科技局现代农业项目(编号: CN1411); 淮海工学院研究生科研创新项目(编号: 5508201601)。

作者简介: 朱晓莹(1992—), 女, 甘肃天水人, 研究方向为海洋生物学。

通信作者: 许星鸿, 博士, 教授, 研究方向为海洋生物与环境。

E-mail: xhxu119@163.com。

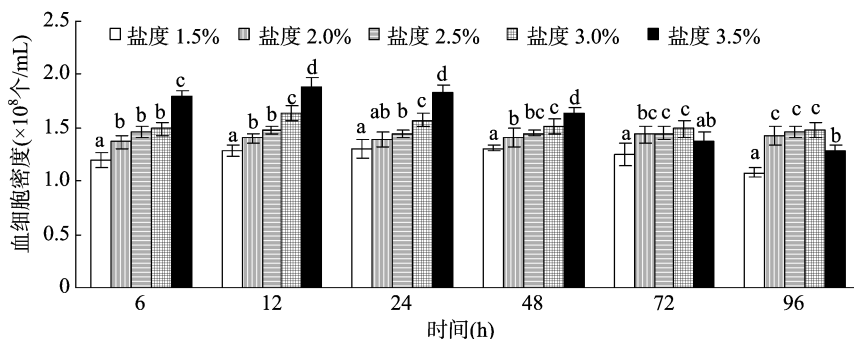


图1 盐度变化对单环刺螨血细胞密度的影响

2.2 盐度变化对单环刺螨 SOD 活力的影响

由图 2 可知,盐度变化对单环刺螨 SOD 活力的影响显著。除盐度 2.5% 组 SOD 活力略有波动外,其他组均呈先升后降趋势。处理 6 h,盐度 3.5% 组 SOD 活力显著高于其他组,处理 48 h 后升至最高值,随后下降。盐度 1.5% 和 2.0% 2 组 SOD

活力上升幅度较小,于处理 24 h 升至最高。盐度 3.0% 组 SOD 活力在处理 6 h 时无明显变化,随着处理时间延长亦逐渐升高,至处理 48 h 升至最高,且上升幅度最大。处理 96 h 后,盐度 1.5% 和 3.5% 2 组 SOD 活力显著低于其他试验组 ($P < 0.05$),较盐度 2.5% 组分别下降 54.53% 和 45.65%。

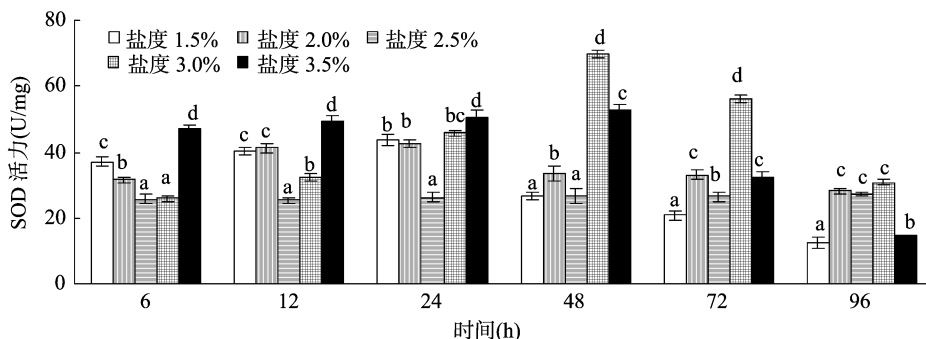


图2 盐度变化对单环刺螨 SOD 活力的影响

2.3 盐度变化对单环刺螨 MDA 含量的影响

由图 3 可知,盐度变化后各试验组 MDA 含量均呈先降后升的趋势,以盐度 3.5% 组 MDA 含量下降最为明显。盐度 1.5% 和 3.5% 2 组、盐度 2.0% 和 3.0% 2 组分别于处理 24、

48 h 时降至最低,随后逐渐上升。至处理 96 h,以盐度 1.5% 组 MDA 含量最高,盐度 3.5% 组次之,其他 3 个试验组间相近 ($P > 0.05$),且 MDA 含量与 SOD 活力呈显著负相关 ($r = -0.969, P < 0.05$)。

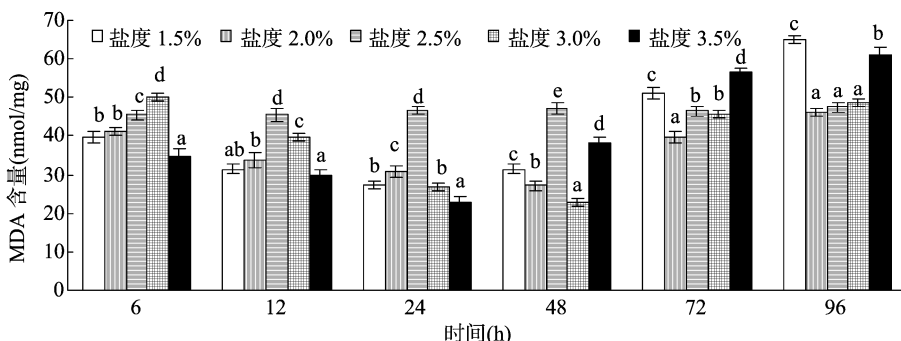


图3 盐度变化对单环刺螨 MDA 含量的影响

2.4 盐度变化对单环刺螨 ACP 活力的影响

由图 4 可知,盐度变化后,单环刺螨 ACP 活力呈现 2 种变化趋势,由初始盐度 2.5% 下降至 1.5% 和 2.0%,ACP 活力呈现先降后升再降的趋势;而由盐度 2.5% 升高至 3.0% 和 3.5%,ACP 活力则呈现先升后降趋势。盐度 1.5% 和 2.0% 2 组在处理 6 h 后,ACP 活力显著低于对照组,随后回升,至处理 24 h 后升至最高值后下降。盐度 3.0% 组和 3.5% 组 ACP 活力分别处理 72、48 h 后升至最高,以盐度 3.0% 组上升幅度最大。处理 96 h 后,以盐度 3.0% 组 ACP 活力最高,盐度

1.5% 和 3.5% 2 组显著低于对照组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 盐度变化对单环刺螨血细胞密度的影响

无脊椎动物血细胞是其免疫功能的主要实施者,血细胞在发挥吞噬功能时还会释放一些免疫因子,与血淋巴中的其他免疫因子互相协同以抵御外来病原对机体的侵害^[7]。据报道,盐度变化对血细胞有显著影响,降低和升高都会导致血细胞减少,而低盐度条件下血细胞减少更为显著^[8-9]。但

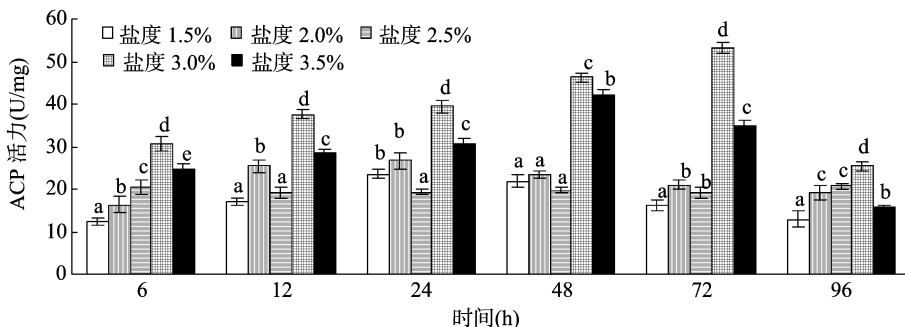


图4 盐度变化对单环刺螯 ACP 活力的影响

Reid 等研究发现,盐度在 2.0% ~ 4.0% 范围内,菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 血细胞密度在盐度为 2.0% 时减少,在盐度为 4.0% 时显著增多^[10]。本结果表明,盐度变化对单环刺螯血细胞密度有显著影响,短期内高盐度 3.5% 组单环刺螯血细胞密度显著增多,这与 Reid 等的高盐度胁迫下血细胞密度显著增多的研究结果^[10]一致。随着处理时间的延长,盐度 2.0%、2.5% 和 3.0% 组的血细胞密度无显著差异,但盐度 1.5% 和 3.5% 2 组血细胞密度显著低于其他试验组,与 Zhao 等对凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的研究结果^[11]相近。在处理 6 ~ 48 h,单环刺螯的血细胞密度和盐度呈显著正相关,这可能由于盐度变化后,机体处于低渗或高渗环境中,为调整内外渗透压的平衡而导致血细胞密度变化。长时间胁迫下,盐度 15 和 35 两组血细胞密度显著降低,表明单环刺螯处于不适宜盐度环境下其免疫力受到较大的影响。

3.2 盐度变化对单环刺螯 SOD 活力和 MDA 含量的影响

生物体在新陈代谢过程中会产生活性氧自由基,对机体可造成氧化损伤,而 SOD 可以清除过量的自由基,对保护机体免受自由基损害起着重要作用^[12]。Wang 等将盐度由 2.5% 变化至 0.5%、1.5% 和 3.5% 后 96 h,凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 血液 SOD 活力分别下降 52%、27% 和 24%^[13]。郑慧等研究发现,盐度变化会引起刺参 (*Apostichopus japonicus*) 体腔液 SOD 活力降低^[14]。本研究结果表明,盐度的升高或降低都会使单环刺螯 SOD 活力呈先升后降的趋势,表明机体在遭遇盐度突变时,会引发一系列生理应激反应,产生过量的氧自由基,诱发 SOD 活性增强,以降低盐度突变对机体的氧化损伤,增强免疫能力和对盐度突变的耐受能力,与高杉等对大竹蛏 (*Solen grandis*) 的研究结果^[15]一致。盐度变化 96 h 后,盐度变化幅度较大的 15 和 35 两组 SOD 活力显著下降,表明机体的渗透调节负担过重会导致其抗氧化系统受损,尤以低盐的影响更为显著。

MDA 是生物膜中多不饱和脂肪酸在活性氧自由基攻击下而引发脂质过氧化的产物,其含量能够直接反应体内脂质过氧化的强度和速率,可广泛用于氧化应激中自由基产生和生物膜氧化损伤程度的评价指标^[16]。季延滨等将草胡子鲇 (*Clarias lazera*) 的水体盐度升高 96 h 后,其血清 MDA 含量显著升高^[17]。盐度变化后单环刺螯 MDA 含量均呈先降后升的趋势,以盐度 1.5% 和 3.5% 2 组变化幅度较大,表明低盐度短时间的盐胁迫能引起机体应激反应,适当提高其免疫力,而长时间高盐度变化会造成较大的氧化损伤。本研究中 MDA 含量与 SOD 活力呈显著负相关,故可将 SOD 活力和 MDA 含

量的长期变化用于评价盐度变化下单环刺螯的免疫状态。

3.3 盐度变化对单环刺螯 ACP 活力的影响

ACP 是在酸性条件下,催化磷酸单酯水解的酶为溶酶体的标志酶,在溶酶体发挥正常生理功能及机体免疫中起重要作用^[18]。印度明对虾 (*Fenneropenaeus indicus*) 在盐度变化后其 ACP 活力均呈先升后降的趋势,于 72 h 升至最高^[19]。在盐度 2.5%、3.5%、4.0% 下,刺参体腔液 ACP 活力于 10 d 达到最高值后下降^[14]。本研究中,由盐度 2.5% 升高至 3.0%、3.5%,单环刺螯 ACP 活力先升后降,与上述研究结果相近。盐度 3.0% 组 ACP 活力升高幅度最大,且处理 96 h 后仍然显著高于盐度 2.5% 组,表明适当的盐度变化可刺激机体的免疫力有所提高。而由初始盐度 2.5% 下降至 1.5% 和 2.0%,单环刺螯 ACP 活力表现为先下降,表明机体处在低盐环境下,进行渗透压调节需要消耗更多能量从而影响其免疫力。盐度变化 96 h 后,盐度 2.0% 组 ACP 活力与盐度 2.5% 组相近,表明适当的盐度下降后,机体通过一段时间调整可达到新的渗透平衡;而盐度 1.5% 和 3.5% 2 组 ACP 活力显著低于对照组,表明过低和过高的盐度都会对机体免疫力产生不利影响。

综上所述,盐度变化对单环刺螯非特异性免疫有较大影响,盐度 2.0% ~ 3.0% 为单环刺螯较适宜的环境条件,盐度 1.5% 和 3.5% 条件下其免疫力显著下降,以低盐环境下影响更为明显。在适当范围内,机体可通过自身的调节来适应环境中的盐度变化,但盐度的变化幅度较大会使机体的生理机能遭受胁迫,免疫力下降,可能引起疾病暴发。因此,在单环刺螯的养殖过程中,养殖水环境的盐度变化不容忽视,尤其是连续降雨造成养殖水体的盐度急剧下降时要注意及时换水。

参考文献:

- [1] 李 诺,宋淑莲,唐永政. 单环刺螯[J]. 生物学通报,1998(8): 13-15.
- [2] 刘海梅,王苗苗,赵 芹. 单环刺螯体腔肌酶解产物的营养评价及其溶解性分析[J]. 食品与机械,2016(5): 20-23.
- [3] 蒋仲青,刘万顺,韩宝芹,等. 单环刺螯纤溶酶的分离纯化及溶栓活性的初步研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版),2009,39(增刊1): 138-142.
- [4] Ma X Y, Liu X L, Zhou D, et al. The NF- κ B pathway participates in the response to sulfide stress in *Urechis unicinctus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 58: 229-238.
- [5] 许星鸿,霍 伟,孟 霄,等. 单环刺螯人工育苗及养殖技术[J]. 科学养鱼,2016(2): 44-45.
- [6] 高继国,郭春敏. 普通生物化学教程实验指导[M]. 北京:化学

袁 锐,方 苹,倪金伟,等. 江苏地区 1 株锦鲤疱疹病毒的鉴定[J]. 江苏农业科学,2019,47(12):200-203.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.12.045

江苏地区 1 株锦鲤疱疹病毒的鉴定

袁 锐,方 苹,倪金伟,刘训猛,陈 静,吴亚锋,王晶晶,陈 辉
(江苏省水生动物疫病预防控制中心,江苏南京 210036)

摘要:对我国江苏地区养殖锦鲤暴发性鲤疱疹病毒病(koiherpes virus disease,简称 KHVD)的病原进行鉴定。2018 年 5 月,江苏省一锦鲤养殖场暴发不明原因传染疾病,病鱼肝、脾、肾脏中未分离到细菌。透射电镜观察发现大量球状病毒粒子。提取自然发病鱼的鳃、肾、脾、肝组织 DNA 作为模板进行 PCR 检测,结果显示为阳性。Blast 比对结果显示,扩增序列与锦鲤疱疹病毒(koi herpesvirus,简称 KHV)胸苷激酶(thymidine kinase,简称 TK)基因和 KHV DNA 聚合酶(SPH)基因核苷酸序列同源性为 99%。对病毒株的 TK 基因全长序列进行系统发育分析,证实该毒株属于 KHV 亚洲型毒株。

关键词:锦鲤;锦鲤疱疹病毒;病毒鉴定;系统进化分析

中图分类号:S941.41⁺² **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)12-0200-04

鲤疱疹病毒病(koiherpes virus disease,简称 KHVD)是由锦鲤疱疹病毒(Koi herpesvirus,简称 KHV)引起锦鲤和鲤鱼及其普通变种的一种急性、接触性传染病,该病被我国农业部列为二类动物疫病,对鲤鱼和锦鲤的养殖危害极大,致死率高达 80%~100%^[1-3]。其病原 KHV 是双链 DNA 病毒,基因组全长为 295 kb^[4],编码 164 个开放阅读框,KHV 有多种基因

型,目前已完成全基因组测序的分离株有日本株(KHV-J)、美国株(KHV-U)、以色列株(KHV-I)以及在我国分离的 KHV-GZ11,其中,KHV-U、KHV-I 和 KHV-GZ11 的相似性较高^[4-5]。目前,我国国内报道并成功分离的 KHV 毒株有辽宁株(KHV-cj)、广州株(KHV-GZ1301)、黑龙江株(KHV-hlj)等^[6-8]。现有研究表明,KHV 是一种具有高传染性、高发病率和高死亡率的病毒性疾病,可感染任何年龄的锦鲤与鲤鱼,其典型临床症状是行动迟缓、食欲不振、体表尤其是皮肤和鳍基部出现出血症状,严重者眼球凹陷、鳃苍白并伴有中度至严重的坏死,感染后 7~10 d 开始出现死亡^[9-11]。由于 KHVD 流行范围广,危害大,已经引起我国及世界多个国家的高度重视^[12]。

2018 年 5 月,江苏省苏州地区一锦鲤养殖场发生大面积

收稿日期:2018-11-06

基金项目:2018 年农业部水生动物重大疫病监测与防治项目。

作者简介:袁 锐(1986—),男,江苏南京人,硕士研究生,工程师,研究方向为水生动物病害。E-mail:yr8624@163.com。

通信作者:陈 辉,研究员,研究方向为水生动物病害。E-mail:Chenhuijsbf@163.com。

工业出版社,2009:105-108。

[7]刘雪兰,余为一. 甲壳动物免疫因子的研究进展[J]. 水生生物学报,2003,27(4):418-421。

[8]Lin Y C,Chen J C,Li C C,et al. Modulation of the innate immune system in white shrimp *Litopenaeus vannamei* following long-term low salinity exposure[J]. Fish & Shellfish Immunology,2012,33(2):324-331。

[9]de Zoysa M,Whang I,Lee Y,et al. Transcriptional analysis of antioxidant and immune defense genes in disk abalone (*Haliotis discus discus*) during thermal, low-salinity and hypoxic stress[J]. Comparative Biochemistry and Physiology,2009,154(4):387-395。

[10]Reid H I,Soudant P,Lambert C,et al. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* [J]. Diseases of Aquatic Organisms,2003,56(3):249-258。

[11]Zhao Q,Pan L,Ren Q,et al. Effect of salinity on regulation mechanism of neuroendocrine-immunoregulatory network in *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immunology,2016,49:396-406。

[12]Halliwell B,Gutteridge J C. Free radical in biology and medicine [M]. 2nd ed. Oxford:Clarendon Press,1989。

[13]Wang F I,Chen J C. Effect of salinity on the immune response of

tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* [J]. Fish & Shellfish Immunology,2006,20(5):671-681。

[14]郑 慧,李 彬,荣小军,等. 盐度和溶解氧对刺参(*Apostichopus japonicus*)非特异性免疫酶活性的影响[J]. 渔业科学进展,2014,35(1):118-124。

[15]高 杉,周遵春,董 颖,等. 盐度及 pH 突变对大竹蛏稚贝抗氧化酶活性的影响[J]. 大连海洋大学学报,2017,32(1):62-67。

[16]Lepage G,Munoz G,Champagne J,et al. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography[J]. Analytical Biochemistry,1991,197(2):277-283。

[17]季延滨,孙学亮,陈成勋. 盐度对革胡子鲶部分抗氧化指标的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):233-235。

[18]翟中和. 细胞生物学[M]. 4 版. 北京:高等教育出版社,2011:130-134。

[19]Vaseeharan B,Ramasamy P,Wesley S G,et al. Influence of acute salinity changes on biochemical, hematological and immune characteristics of *Fenneropenaeus indicus* during white spot syndrome virus challenge[J]. Microbiology Immunology,2013,57(6):463-469。