

刺参免疫防御机制研究进展

叶海斌, 樊英*, 李天保, 李乐, 王晓璐 (山东省海水养殖病害防治重点实验室, 山东省海洋生物研究院, 山东青岛 266104)

摘要 在参考国内外刺参免疫防御机制研究的基础上, 综述了刺参免疫防御系统的相关特征, 以期通过各种免疫调节手段达到防病、治病的效果, 促进刺参养殖业的发展。

关键词 刺参; 免疫; 防御机制; 评价体系

中图分类号 S947.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)16-0027-03

Study Progress on Immunity Defense Mechanism of *Apostichopus japonicus*

YE Hai-bin, FAN Ying, LI Tian-bao et al (Key Laboratory for the Prevention and Control of Seawater Aquaculture in Shandong Province, Marine Biology Institute of Shandong Province, Qingdao, Shandong 266104)

Abstract The paper summarized some characters of immunity about *Apostichopus japonicus* on the basis of researches on immunity defense mechanism of *Apostichopus japonicus* at home and abroad, and we could study a variety of immune means to improve the disease resistance effect, so promote the development of healthy aquaculture in *Apostichopus japonicus*.

Key words *Apostichopus japonicus*; Immunity; Defense mechanism; Evaluation system

海参纲属棘皮动物门, 种类甚多, 全世界约 1 200 种, 其中我国约 140 种, 可食用海参 20 多种, 其中 10 种具有较高的经济价值^[1-3]。根据海参背面是否有圆锥肉刺状的疣足分为“刺参类”和“光参类”两大类, 其中刺参类主要是刺参科种类, 刺参科包括仿刺参、梅花参、绿刺参和花刺参, 人们俗称中的刺参即是仿刺参, 或称灰刺参、灰参, 其品质最佳。随着人们生活水平和保健意识的提高, 刺参的营养价值和保健作用越来越受到重视和应用。近年来, 刺参需求量的日益增加引发了各种各样的问题^[4-5]。海参的过度捕捞致使海洋种群数量日趋减少, 自然资源面临枯竭; 海参养殖业规模扩大化、方式多样化的热潮致使养殖环境承受力下降, 养殖过程中出现的病害状况越来越重; 不同来源的污染和药物的滥用致使海参种苗质量下降, 食用安全质量受到威胁, 进一步加剧了市场应求和资源供求之间的矛盾, 成为海参养殖业健康快速发展的障碍。故通过提高刺参自身的免疫能力达到防病治病的效果是海参健康养殖和高效生产最有效的根本解决办法, 对刺参免疫防御系统的研究迫在眉睫。

在自身免疫防御系统中非特异性免疫起主要作用, 各式各样的体腔细胞构成刺参的细胞免疫系统, 体腔液中的多种免疫因子则形成体液免疫系统, 二者共同实行机体的免疫功能。其中, 体液免疫是刺参防御病害入侵的主要免疫反应, 体腔液作为刺参最重要的免疫组织之一, 具有抗菌特性^[6]、酚氧化酶活性^[7]等免疫学特性。了解海参的免疫系统有利于开展细胞和分子免疫水平的研究。笔者主要对刺参体腔液中的免疫系统进行综述, 为刺参健康养殖提供基础, 更为开发新型高效的免疫增强剂提供平台。

1 体腔细胞

刺参体腔液中包含各种体腔细胞, 分类多样化, 无统一标准。Eliseikina 等^[8]将刺参体腔细胞分为祖细胞、变形细

胞、空泡细胞、小桑葚细胞、I、II、III型的桑葚细胞、结晶细胞、颤动细胞; 廖玉麟^[9]将海参纲体腔细胞分为淋巴细胞、吞噬细胞、无色桑葚细胞、血细胞、纺锤细胞和结晶细胞, 指出并非所有海参都存在这 6 种细胞。刘晓云等^[10]用电镜技术将刺参体腔细胞分为大颗粒细胞、小颗粒细胞、透明细胞和淋巴样细胞。李华等^[11]通过大量活体、滴片、光镜和电镜观察, 将仿刺参体腔细胞分为 6 类: 淋巴样细胞、球形细胞、变形细胞、纺锤细胞、透明细胞、结晶细胞, 球形细胞又分为 I、II、III 型球形细胞; 体腔中还存在血细胞, 血细胞数量 (Total haemocyte counts, THC) 是重要的生理状态指标, 与机体免疫力相关。从免疫机制角度而言, 当其受外界环境变化刺激或病原体感染后体腔细胞即开始活跃起来, 通过多种途径起到免疫防护的作用。

对于缺乏特异性免疫系统的刺参而言, 细胞的吞噬作用是内部免疫的第一道防线, 是棘皮动物抵抗异物入侵最基本的细胞防御机制。刺参小淋巴细胞可分化成吞噬细胞和桑葚细胞, 可通过各种方式形成吞噬细胞, 伸出的较多伪足可凝集成块, 发挥吞噬功能^[12]。邱芳蕾等^[13]研究淡水底栖硅藻对刺参的效果试验时以细胞吞噬率作为检测指标, 很好地验证了细胞免疫功能的提升。吞噬相关技术日渐成熟, 针对刺参的免疫增强剂效果试验中细胞吞噬率可作为反映机体免疫状况的重要指标。细胞吞噬活性指数同样可衡量刺参体腔细胞的吞噬能力, 叶海斌等^[14]利用该项指标研究了溶藻胶弧菌脂多糖对大菱鲆白细胞吞噬活性的影响, 为细胞非特异性免疫研究提供了理论依据。在无脊椎动物中也存在一种类似于脊椎动物调理素样物质, 在吞噬细胞和外源物之间起到识别和黏附的作用, 促进异物结合到吞噬细胞膜的受体上, 增强吞噬作用, 间接地加强了机体的免疫力。麦康森等^[15]通过凝胶过滤层析和质谱分析等方法分离鉴定出一种具有凝集特性的刺参调理素样分子, 增强该物质的结合作用仍在深入研究中。

2 呼吸爆发及活性氧杀菌体系

体腔细胞吞噬异物, 呼吸爆发产生大量的活性氧 (O_2^- 、

作者简介 叶海斌 (1976—), 男, 山东青岛人, 副研究员, 从事水产动物健康养殖及病害防控研究。* 通讯作者, 副研究员, 从事水产动物健康养殖及病害防控研究。

收稿日期 2018-02-12

OH、O₂ 和 H₂O₂),具有广泛的杀菌作用,破坏细菌毒素、乙肝表面抗原等。近年来,活性氧体系作为机体免疫状况的重要指标研究已确立,张峰等^[16]最先对无脊椎动物血细胞吞噬过程中产生的活性氧进行了研究,流式细胞术对酵母诱导海参的吞噬作用中产生的活性氧可进行定量测定。棘皮动物免疫防御机制中的活性氧研究相对薄弱,国内尚未见关于刺参的深入研究。目前应用检测的技术包括细胞色素 C 还原法、二氨基联苯胺(DAB)检测法、比色法及化学发光法。活性氧的强弱直接反映血细胞的杀菌机能,可作为细胞免疫力的检测指标^[17]。

3 一氧化氮杀菌体系

一氧化氮杀菌机制有2种:一是作用于微生物的关键代谢酶,抑制代谢酶的活性或使其失活而发挥杀菌作用;另一种是通过和氧自由基作用生成强氧化剂,从而起到杀菌作用。截至目前,有关一氧化氮体系的研究已经进入了全新阶段,在对虾免疫学研究中的地位和作用已有相关报道,并综合阐述了一氧化氮合成酶系统在水产养殖病害防御中的作用。姜国建等^[18]研究表明,WSSV感染中国明对虾能够显著诱导其血细胞一氧化氮合成酶 NOS 的表达。随着 WSSV 在中国明对虾体内的增殖及对血细胞的破坏,使得 NOS 活性显著降低,对虾也趋于死亡,故认为 NOS 活性能够作为反映对虾健康状况的有效指标,且进一步利用硝基蓝四唑(NBT)还原法和血细胞形态法对 NOS 进行了鉴定。通过 NO 非特异性免疫功能的研究,诱导调节 NOS 的表达来改变 NO 在水产动物体内的含量,从而增强水产动物自身抗病能力,减少抗菌药物的使用,对提高水产动物的免疫力和水产品的品质具有重要作用。应用于该体系鉴定的方法还有 DAF-2 法,基于抗原与抗体反应的多克隆抗体法,以及采用组织化学和免疫组化技术进行定位研究等。鉴于其他水产动物的应用,该项检测指标亦可应用于刺参免疫研究。

4 活性酶

研究表明,水产动物血细胞及体液中含有大量与免疫防御功能相关的酶类(如溶菌酶、磷酸酶、过氧化物酶、脂酶、蛋白酶、葡萄糖苷酶等),外来病原体在刺参体内的消除降解过程即视为酶解过程,通过内外调节手段改变动物体内酶水平可间接影响机体免疫能力。溶菌酶水平和活性已成为免疫学研究中重要的反映指标。当外界物质刺激吞噬细胞,溶菌酶基因复制作用于微生物细胞壁,形成水解酶体系,从而破坏和消除入侵异物,达到防御和杀菌的作用。研究证实,黄芪能够增强机体内超氧化物歧化酶活性,减少脂质过氧化物生成,加强机体的抗病能力。目前,各种活性酶的检测方法较多,在不同水产动物中应用广泛,针对刺参的相关免疫研究也很多^[19-22],均不同程度地反映了活性酶的免疫促进作用。

5 凝集素和溶血素

凝集素也是血淋巴的常见成分。凝集素作为软体动物体内参与体液免疫的非特异免疫因子,在免疫防御活动中发挥对异物成分的识别、调理和促进吞噬等重要作用。在机体

受到外界某免疫刺激后,凝集效价明显升高。从防病治病角度而言,凝集素效价也是反映免疫系统的重要指标之一。故凝集素在海参免疫研究方面具有广阔的前景,是防病治病的有效途径。

作为一种糖结合蛋白,凝集素最大的特点是能识别糖蛋白和糖脂,特别是细胞膜中复杂的碳水化合物结构,凝集变异细胞,防御病原体入侵。棘皮动物体内同样存在凝集素,在海参 *Stichopus japonicus* 中发现了2种不同的钙离子依赖型(C型)凝集素。Jans 等^[12]从海参体腔液中分离出一种由体腔细胞释放的分子量 220 kD 的凝集素,这种凝集素能提高体腔细胞黏附性并促进体腔细胞向外来物质聚集,起到保护机体的作用。李丹彤等^[23]从刺参中分离纯化得到凝集素并对其性质进行研究,结果表明,凝集素可有效去除外来异物,但作为御敌的有力武器有待进一步探究。

6 类补体样物质

补体系统是机体免疫防御机制的重要组成部分,在整个免疫系统中发挥重要作用。研究表明,棘皮动物体内可能存在补体旁路免疫机制,目前此类研究较少。张峰等^[24-25]利用酶联化学发光免疫检测技术能够检测到仿刺参体腔液中含有补体类似物,其中 C₃ 含量为(6.58±1.40) μg/mL, C₄ 含量为(0.67±0.30) μg/mL;同时,采用3种补体检测方法首次对仿刺参体内补体类似物进行检测,并对补体类似物 AjC₃ 和 AjC₄ 进行了活性探究。结果显示,仿刺参体腔液、体腔液上清及体腔细胞中的补体溶血活性与正常人补体溶血活性相差很小,且接近于人体血清正常值(50~100 U/mL),健康仿刺参体内含有很高的补体活性,具有类似于高等动物补体系统的免疫机制,为研究其病害发生过程中体内的免疫机理提供了理论依据。补体含量及补体溶血活性作为刺参免疫功能的评价指标已得到验证;补体系统的存在及活性研究在棘皮动物海胆中也被证实。

7 细胞因子

近年来,随着分子生物学技术的快速发展,发现了更多的免疫相关基因。翟钰等^[26]筛选出刺参补体 AjC₃ 活性相关 miRNA;汪婷婷^[27]对刺参 NF-κB 信号通路中的 *Aj-rel* 和 *Aj-p105* 基因进行了克隆鉴定,并进行了蛋白表达以及功能研究。同时,C型凝集素^[28]、铁蛋白(ferritin)^[29]等刺参免疫相关基因均有报道。在无脊椎动物中发现白细胞介素是其体内重要的免疫调节蛋白,同时承担免疫防御机制中介质的作用,此外还参与机体的多种生理及病理反应。2015年7月16日,中国科学院海洋研究所宣布完成了刺参基因组测序和组装工作,这一成果对刺参生物学和遗传育种研究具有重要科学意义,为深化刺参免疫学基础研究、揭示刺参免疫防御机理提供了技术支撑。

8 小结

目前,有关刺参免疫机制的研究在国内外尚处于不成熟阶段,需要进一步探索。随着分子生物学技术的发展,虽然对刺参的免疫研究取得了一定成果,但部分免疫机制研究不够透彻,导致很多防御机制尚未知。另外,针对目前严重的

病害状况,更深入地了解刺参的免疫机制,是解决这一问题的关键,为防治病害和健康养殖提供基础数据。

参考文献

- [1] 姜金忠,刘富聪.海参的养殖及病害防治技术(上)[J].科学养鱼,2006(1):77.
- [2] 姜金忠,刘富聪.海参的养殖及病害防治技术(下)[J].科学养鱼,2006(2):77.
- [3] 孙永欣,王吉桥,汪婷婷,等.海参防御机制的研究进展[J].水产科学,2007,26(6):358-361.
- [4] 张春云,王印庚,荣小军,等.国内外海参自然资源、养殖状况及存在问题[J].海洋水产研究,2004,25(3):89-97.
- [5] 王印庚,荣小军.我国刺参养殖存在的主要问题与疾病综合防治技术要点[J].齐鲁渔业,2004,21(10):29-32.
- [6] 丛聪,蒋经伟,董颖,等.仿刺参体腔液的抗菌特性[J].水产学报,2014,38(9):1548-1556.
- [7] 王轶南,穆晓虎,封妮莎,等.仿刺参体腔液中酚氧化酶活性的分析[J].大连海洋大学学报,2013,28(4):319-322.
- [8] ELISEIKINA M G, MAGARLAMO V 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.
- [9] 廖玉麟.中国动物志:棘皮动物学 海参纲[M].北京:科学出版社,1997.
- [10] 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.
- [11] 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):207-213.
- [12] JANS D, DUBOIS P, JANGOUX M. Defensive mechanisms of holothurians (Echinodermata): Formation, role, and fate of intracoelomic brown bodies in the sea cucumber *Holothuria tubulosa* [J]. Cell Tissue Res, 1995, 283(1):99-106.
- [13] 邱芳蕾,邹宁,王海娜,等.淡水底栖硅藻对刺参的饵料效果[J].生命科学仪器,2017,5(10):16-18.
- [14] 叶海斌,朱安成,张涛,等.溶藻胶弧菌脂多糖对大菱鲆白细胞吞噬活

- 性的影响[J].齐鲁渔业,2006,23(3):34-36.
- [15] 麦康森,孟繁伊,马洪明,等.在仿刺参体腔液中发现新的调理素样分子[J].中国工程科学,2009,11(10):108-114.
- [16] 张峰,李光友,张培军.皱纹盘鲍血细胞活性氧产生的研究[J].中国水产科学,1999,6(3):36-40.
- [17] SUN Y X, JIN L J, WANG T T, et al. Polysaccharides from *Astragalus membranaceus* promote phagocytosis and superoxide anion (O_2^-) production by coelomocytes from sea cucumber *Apostichopus japonicus* in vitro [J]. Comp Biochem Physiol Part C, 2008, 147(3): 293-298.
- [18] 姜国建,于仁诚,王云峰,等.中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血细胞中一氧化氮合酶的鉴定及其在白斑综合症病毒感染过程中的变化[J].海洋与湖沼,2004,35(4):342-350.
- [19] 樊英,王淑娟,叶海斌,等.黄芪多糖对仿刺参非特异性免疫功能的影响[J].水产科学,2010,29(6):321-324.
- [20] 严芳,胡伟,李成林,等.饲料中添加活性酵母制剂对刺参生长、免疫力和抗病力的影响[J].动物营养学报,2017,29(2):583-589.
- [21] 李继业.养殖刺参免疫学特征与病害研究[D].青岛:中国海洋大学,2007.
- [22] 憨素连,王福强,王晶,等.复合益生菌对刺参非特异性免疫和抗病力的影响[J].安徽农业科学,2015,43(36):94-96,101.
- [23] 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.
- [24] 张峰,王海峰,官晶,等.仿刺参体腔液补体类似物化学发光免疫检测[J].核农学报,2007,21(4):413-416.
- [25] 张峰,官晶,王海峰,等.仿刺参补体类似物活性的测定[J].大连水产学院学报,2007,22(4):246-248.
- [26] 翟钰,曹雁惠,张峰,等.刺参补体 A₃C₃ 活性相关 mRNA 的筛选与初步研究[J].大连海洋大学学报,2015,30(6):585-591.
- [27] 汪婷婷.刺参三种免疫基因的克隆、表达及功能研究[D].大连:大连理工大学,2012.
- [28] 薛壮,李慧,孙鹤,等.刺参 C 型凝集素(AJL)基因的克隆及原核表达分析[J].大连海洋大学学报,2015,30(6):610-615.
- [29] 杨爱馥,周遵春,孙大鹏,等.仿刺参铁蛋白 *ferritin* 基因的序列分析及表达[J].水产学报,2010,34(6):890-897.

(上接第 16 页)

1 类包含 7 个规格的卷烟,编号分别为 5、9、6、11、12、10、7;第 2 类包含 4 个规格的卷烟,编号分别为 2、3、1、4;第 3 类包含 11 个规格的卷烟,编号分别为 21、28、24、27、20、30、22、23、25、26、29;第 4 类包含 8 个规格的卷烟,编号分别为 14、15、19、8、13、16、17、18;分类结果与市场上对不同卷烟的评价基本一致。

运用灰色局势决策法解决了灰色关联度法需要构建参考品种的难点,克服了传统方差分析和回归分析等方法仅从单一指标入手导致的偏颇,能够多层次综合多个目标性状,客观、全面地反映每一个目标的特征,做出参试材料的优劣排序,提高了评价的准确性。同时,灰色局势决策原理易懂,计算简便,方便掌握和运用,因此,可将其作为卷烟质量评价的综合量化评价方法。同时,在实际工作和生产中,利用灰色局势决策方法对参试材料进行评价时,应根据生产实际科学合理地确定各指标权重,从而有利于更准确、合理地评价参选材料。

聚类可以客观地反映参试卷烟的品质特征,也能一定程度上反映卷烟间的相互关系,从而分辨出不同类别的卷烟。

利用灰色局势决策方法并结合聚类分析,能够对不同规格卷烟质量有较为全面、客观的评价,为卷烟质量评价提供了新的思路和方法。

参考文献

- [1] 于建军.卷烟工艺学[M].北京:中国农业出版社,2003.
- [2] 左天觉.烟草的生产、生理和生物化学[M].朱尊权,等译.上海:上海远东出版社,1993.
- [3] 王瑞新.烟草化学[M].北京:中国农业出版社,2003.
- [4] 刘思峰,杨英杰,吴利丰,等.灰色系统理论及其应用[M].北京:科学出版社,1999.
- [5] 邓聚龙.农业系统灰色理论与方法[M].济南:山东科学技术出版社,1988:179-194.
- [6] 郭永忠,杨彩霞,邹军,等.灰色局势决策在玉米品种综合评价中的应用[J].西北农业学报,2007,16(4):92-95.
- [7] 何利剑,王胜爱,邵秋红,等.灰色系统理论在棉花育种中的应用[J].种子,2004,23(7):66-67.
- [8] 郭瑞林,鲁道文,吴向峰,等.玉米杂交种灰色综合评判方法的研究[J].玉米科学,2003,11(3):39-41.
- [9] 刘艳霞,丁永乐,陈贵岭,等.用灰色系统理论对烤烟品种综合评估[J].河南职业技术学院学报,2001,29(3):24-26.
- [10] 邱林,田水娥,汪学全.多目标灰色局势群决策模型及应用[J].华北水利水电学院学报,2005,26(1):4-6.
- [11] 雷铁拴.灰色系统理论在农业上的应用[M].郑州:河南科学技术出版社,1996.