

文章编号: 1674 - 5566(2014)04 - 0505 - 08

术前饥饿处理对马氏珠母贝血淋巴免疫机能的影响

李琼珍¹, 罗 帮¹, 张 立¹, 王有基²

(1. 广西壮族自治区水产科学研究院, 广西 南宁 530021; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘 要: 在室内养殖条件下研究了术前限食处理对马氏珠母贝血淋巴细胞密度、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、溶菌酶(LSZ)、酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)活性的影响。实验设置每天投喂一次和两天投喂一次两个处理组, 每天投喂两次为对照组, 分别在实验开始和第 1、2、3 和 4 周取样检测血淋巴免疫功能。结果显示: 限食 1 周后, 马氏珠母贝血细胞密度、SOD、CAT、LSZ、ACP 和 AKP 等酶活性均随限食程度的增加呈下降趋势, 2 个限食处理组的免疫参数较对照组明显下降, 并表现出显著性差异($P < 0.05$), 两天投喂一次处理组的各项免疫机能均显著低于对照组, 且这种趋势一直延续至第 4 周。据此推断, 限食可以显著降低插核手术贝的生理机能和免疫活性, 为马氏珠母贝育珠术前处理提供理论依据。

研究亮点: 珍珠贝育珠插核前一般要术前处理, 抑制其生理活动以利于插核。术前处理的育珠贝免疫功能是否下调目前未得到验证。本文从马氏珠母贝血淋巴免疫机能方面阐明了术前饥饿处理可以降低育珠贝的免疫功能, 验证了术前处理的理论依据, 为改进插核技术提供了理论支持。

关键词: 马氏珠母贝; 术前处理; 免疫机能; 血淋巴; 饥饿

中图分类号: S 968.3

文献标志码: A

马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 又称为合浦珠母贝, 隶属于软体动物门 (Mollusca), 双壳纲 (Bivalvia), 珍珠贝目 (Pterioidea), 珍珠贝科 (Pteriidae), 珠母贝属 (*Pinctada*), 广泛分布于广东、广西和海南等热带、亚热带海域。近几十年来海水珍珠养殖已成为广东、广西和海南沿海地区的水产支柱产业之一, 海水珍珠亦成为出口创汇的重要产品。一直以来, 马氏珠母贝的研究主要集中在遗传选育、插核育珠、珍珠层成分和成因等方面^[1]。虽然马氏珠母贝是当前培育海水珍珠的主要种类, 但近年来马氏珠母贝珍珠产业面临育珠技术陈旧、育珠期短、珍珠质量差、插核贝死亡率高、留核率低、育珠贝存活率和成珠率低等问题。为了马氏珠母贝珍珠产业持续发展, 亟需对术前处理和插核技术等方面进行系统研究。

术前处理是海水珍珠育珠工作中的重要技

术环节。未经术前处理的手术贝生理活动处于正常状态, 受到插核手术的突然刺激会使免疫和内分泌系统发生剧烈过激反应, 严重时造成手术贝过度衰弱, 甚至死亡。此外, 由于生殖腺丰满的手术贝对植核有妨碍, 植核效果差, 容易产生污珠、异形珠; 所以未经术前处理的手术贝在植核后死亡率高、留核率低、珍珠质量差。术前处理主要通过高密度养殖方法抑制母贝的摄食, 降低生理机能^[2]。经过术前处理的手术贝, 由于在处理过程中已将其生理活动逐步调节降低到对外界刺激不起重大反应的状态, 所以对植核手术的强烈刺激反应不大, 仍然能够维持全身生理活动的平衡协调, 当刺激过后恢复较快^[2]。然而, 在术前处理时期内育珠贝的免疫功能变化还未见有相关报道。本文从马氏珠母贝血淋巴免疫机能方面调查了术前处理后珠母贝免疫力的变化, 以期建立一种评价珍珠贝术前处理后免疫机

收稿日期: 2014-02-11 修回日期: 2014-04-07

基金项目: 广西水产畜牧兽医局渔业处 2013 年项目(2130106); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-48)

作者简介: 李琼珍(1966—), 女, 副研究员, 研究方向为贝类增殖。E-mail: lqv2173@aliyun.com

通信作者: 王有基, E-mail: yj_wang@shou.edu.cn

能变化的方法体系,更好地了解插核手术对贝体生理状态的影响,进而为改进插核技术、培育优质珍珠提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验贝类来源

实验用贝为广东海洋大学选育的珠母贝,珍珠层颜色深而多彩,贝龄为 1.5 龄,壳体完整,生长鳞片旺盛。贝质量(21.16 ± 3.96)g,壳高(54.08 ± 3.81)mm,壳长(49.62 ± 3.39)mm。挑选无损伤个体,洗刷去除表面的附着物,暂养于室内水泥池。暂养期间自然海水盐度为 28.6 ~ 29.1,水温 25.4 ~ 26.6 °C, pH 8.02 ~ 8.13, DO 6 mg/L 以上, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 低于 0.05 mg/L。每天投喂鲜活单胞藻[包括叉鞭金藻(*Dicrateria inornata*)、角毛藻(*Chaetoceros muelleri*)和扁藻(*Tetraselmis chui*)]2 次,叉鞭金藻、角毛藻和扁藻的投喂含量均为 5.0×10^4 /mL,日换水 1 次,每次换水 1/2,暂养 7 d 后进行实验。

1.2 实验方法

以插核前 2 种限食术前处理为实验条件,分为处理组 B 和 C, B 组为 1 天投喂 1 次组, C 组为 2 天投喂 1 次组, A 组为对照组, 1 天投喂 2 次, 以上投喂量均按照暂养期的投喂量进行。每个处理设置 3 个重复组, 实验在水体为 60 L 的水族箱中进行, 每个水族箱分别放置珠母贝 24 只, 所有组的盐度、水温、溶氧、饵料等养殖条件与暂养相同。实验于 2013 年 5 月 1 日开始, 进行 4 周, 在实验初始, 第 1、2、3、4 周每个养殖缸随机取 3 只贝检测免疫指标。用滤纸擦干贝壳表面的海水, 然后用 1 mL 无菌一次性注射器(0.45 mm × 16 mm 针头)从珠母贝后闭壳肌血窦取血, 置于 1.5 mL 的离心管中, 4 °C 下保存备用。用于血细胞计数的血液, 直接稀释后于显微镜下计数; 用于免疫活性测定的血液经离心机以转速 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液于 -80 °C 冷冻冰箱内保存用于各项免疫因子测定。实验前珠母贝性腺发育饱满, 实验后对照组性腺依然饱满, 处理组 B 性腺约为对照组的 1/4, 处理组 C 性腺基本消失。

血细胞数量的测定按 ALLAM 等^[3]方法, 血细胞数量的测定采用血球计数板在 Nikon E200 型光学显微镜下直接计数。血淋巴免疫参数的测定, 包括超氧化物歧化酶 (superoxide

dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和溶菌酶(lysozyme, LSZ)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)和酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)等 5 种酶活性的测定均采用江苏省南京建成生物研究所生产的试剂盒, 具体操作参照试剂盒说明书。

超氧化物歧化酶 SOD 活性: 采用黄嘌呤氧化酶法测定。SOD 活性定义: 每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位(U)。

过氧化氢酶(CAT)活性: 采用钼酸铵法测定。CAT 活性定义: 每毫升血清中每秒钟分解 1 μmol H_2O_2 的量为一个活性单位。

溶菌酶(LSZ)活性: 以 LSZ 含量来表示溶菌酶的活性, 采用比浊法, 在一定浓度的混浊液中, 由于溶菌酶水解细菌细胞壁粘多肽使细菌裂解浓度降低, 透光度增强, 根据浊度变化来推测溶菌酶的活性。

碱性磷酸酶(AKP)和酸性磷酸酶(ACP)活性: 采用磷酸苯二钠法测定。AKP 活性定义: 100 mL 血清在 37 °C 条件下与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位; ACP 活性定义: 100 mL 血清在 37 °C 条件下与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位。

1.3 统计分析

实验数据以平均值 ± 标准差 (Means ± SD) 表示, 对限食处理产生的免疫学影响采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 运用 Tukey 多重比较检验组间显著性差异, 显著性水平为 0.05, 数据分析采用 SPSS 16.0 软件进行。

2 结果

2.1 血细胞密度的变化

图 1 显示, 马氏珠母贝血细胞密度随限食程度的增加呈下降趋势, 方差分析表明, 实验开始时血细胞密度组间无差异, 之后限食对血细胞密度的变化影响显著 ($P < 0.05$)。在限食 1 周后, 两实验组血细胞密度分别较对照组 (13.72×10^5 /mL) 显著下降, 且 2 天投喂 1 次组显著低于 1 天投喂 1 次组。在第 2、3 和 4 周的检测中, 方差分析结果依然是组间呈现显著性差异, 趋势和第 1 周类似。

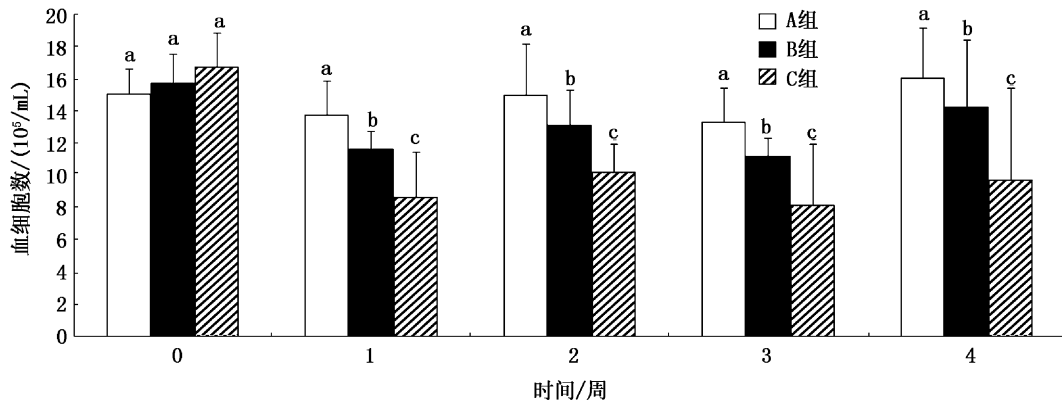


图1 限食处理后马氏珠母贝血细胞数量的变化

Fig.1 Change of total hemocyte counts of the pearl oyster after starvation

A组为对照组,1天投喂2次组;B组为1天投喂1次组;C组为2天投喂1次组;不同小写字母表示差异显著。图2-6同。

2.2 血清 SOD 活性的变化

从图2可知,在限食1周后,两实验组血清SOD活性随限食程度增加而明显下降,2天投喂

1次组均显著低于对照组和1天投喂1次组。但是1天投喂1次组与对照组之间没有显著性差异,这种趋势一直延续至实验结束。

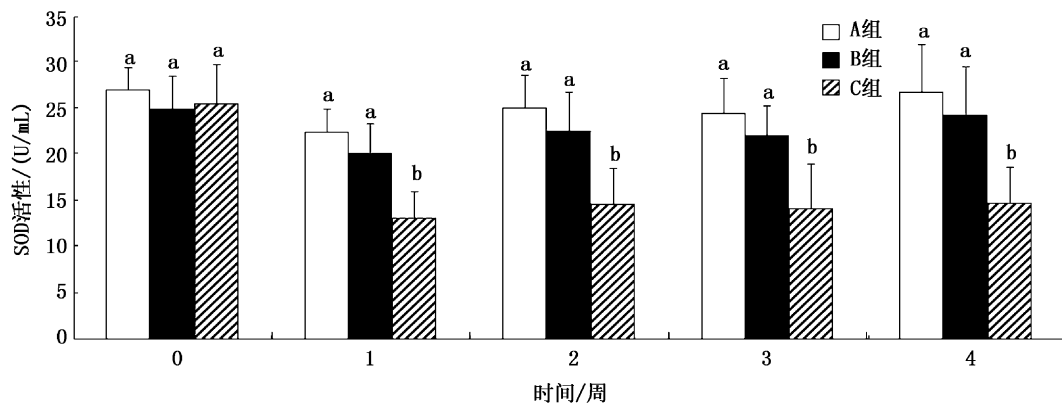


图2 限食处理后马氏珠母贝血清 SOD 活性的变化

Fig.2 Change of serum SOD activities of the pearl oyster after starvation

2.3 血清 CAT 活性的变化

方差分析表明,限食对马氏珠母贝血清CAT活性具有显著影响($P < 0.05$)。如图3所示,在限食1周后,马氏珠母贝血清CAT活性显著低于对照组,但对对照组与1天投喂1次组,以及1天投喂1次组与2天投喂1次组之间都没有显著性差异。2周后,2天投喂1次组CAT活性显著低于对照组和1天投喂1次组。第3周时,2个限食组都显著低于对照组。第4周时,3个组之间显著性差异明显,从对照组至2天投喂1次组CAT活性依次下降。

2.4 血清 LSZ 活性的变化

图4表明,限食对马氏珠母贝血清LSZ活性

影响显著($P < 0.05$)。1周后马氏珠母贝血清LSZ活性随限食强度的增加而降低,3个组之间差异显著,在限食一周后,2天投喂1次组血清溶菌酶活性下降较大,不到对照组的一半。在之后的3次采样测试中,情况和1周后的基本一致。

2.5 血清 ACP 活性的变化

图5表明,经过限食处理后,马氏珠母贝血清ACP活性随限食程度的增加而下降,且组间呈现显著性差异。2天投喂1次组较对照组下降超过了一半以上,在4次取样检测中的趋势基本都是相同的。

2.6 血清 AKP 活性的变化

图6显示,经过限食处理后,马氏珠母贝血

清 AKP 活性也随限食程度的增加而下降,且组间呈现显著性差异,表现趋势与 ACP 基本一致。可以观察到 2 个处理组的 ACP 活性在一周后显著

下降,在之后的 3 次测试中,虽然低于对照组,但是呈现出缓慢上升的趋势。

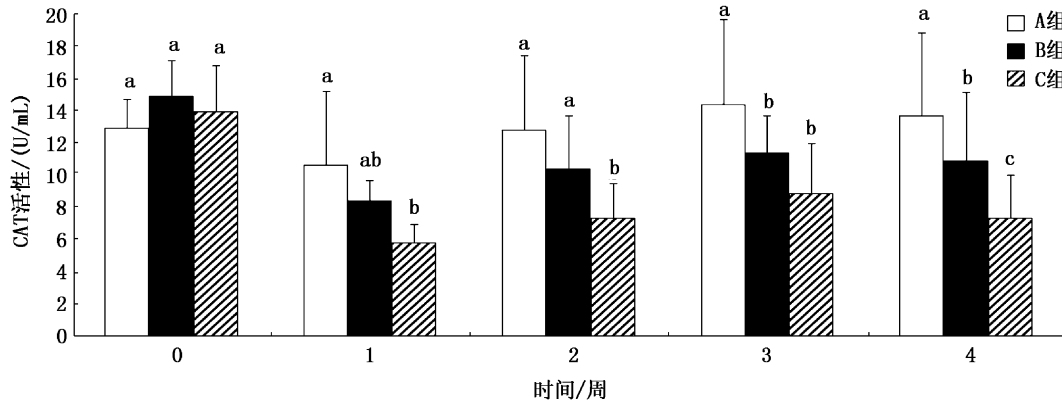


图 3 限食处理后马氏珠母贝血清 CAT 活性的变化

Fig. 3 Change of serum CAT activities of the pearl oyster after starvation

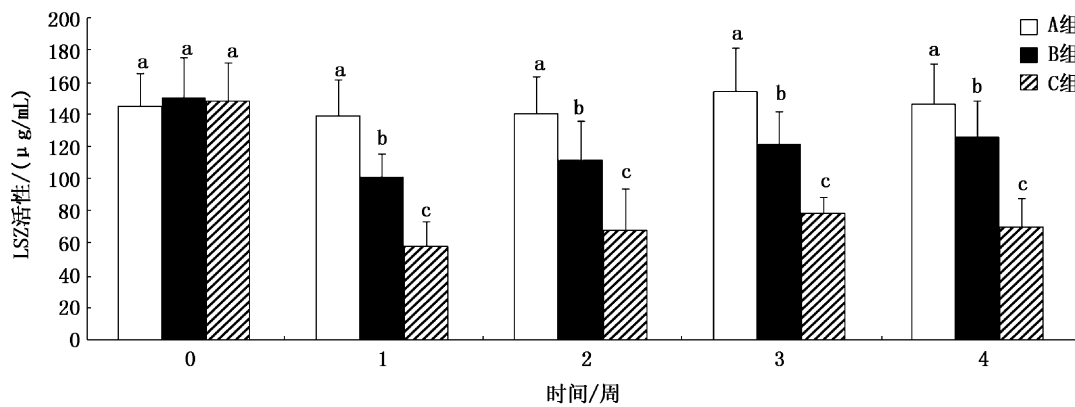


图 4 限食处理后马氏珠母贝血清 LSZ 活性的变化

Fig. 4 Change of serum LSZ activities of the pearl oyster after starvation

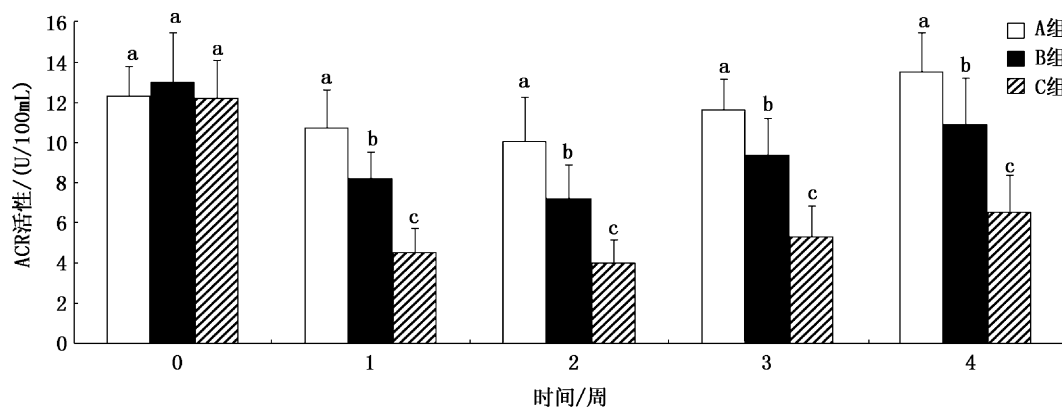


图 5 限食处理后马氏珠母贝血清 ACP 活性的变化

Fig. 5 Change of serum ACP activities of the pearl oyster after starvation

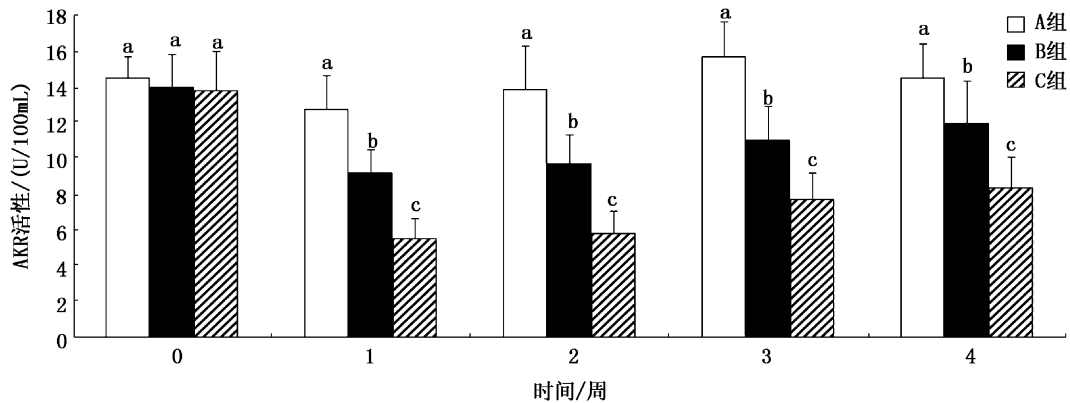


图6 限食处理后马氏珠母贝血清 AKP 活性的变化

Fig. 6 Change of serum AKP activities of the pearl oyster after starvation

3 讨论

珍珠贝育珠术前处理包含两方面内容:一为促使插核母贝排精产卵,或削弱性腺的发达程度;二为适当抑制母贝的活动,降低生理机能,使其处于适于插核施术的状态^[4]。未经术前处理的手术贝生理活动处于正常状态,当受到插核手术的突然刺激机体会发生异常的过量反应,造成手术贝过度衰弱,甚至死亡。所以未经术前处理的手术贝在植核后死亡率高、留核率低、珍珠质量差。而经过术前处理的手术贝,其生理活动已经被逐步调节降低到对外界的刺激不起强烈反应的状态,对植核手术的强烈刺激反应不大,仍然能够维持全身生理活动的平衡协调,当刺激过后恢复较快,并且手术贝对小片的拮抗作用较小^[4]。经过术前处理,可以明显提高手术贝的成活率、成珠率,以及珍珠质量^[1]。

目前在珍珠生产上使用的术前处理方法主要有抑制性腺发育和促进性腺排放。邓陈茂等^[1]和劳赞等^[5]报道了马氏珠母贝人工育珠过程中,手术贝经过控制海水流量、饵料等术前处理,珍珠产量和珍珠质量明显提高。谢绍河等^[6]通过调整养殖密度和水体透明度,也就是控制食物的供应,达到抑制大珠母贝活力和性腺发育,经预前处理的手术贝,休养期平均成活率达85%以上。可见,术前处理是珍珠贝人工育珠过程中提高育珠贝成活率与珍珠质量的有效途径。但是有关术前处理对珍珠贝免疫功能的影响到目前为止鲜见报道。本研究对术前处理的马氏珠母贝血淋巴抗氧化酶活性、免疫水平的变化等生

化生理指标进行了研究,为插核术前处理的免疫评估和生理适应提供了基础资料。

饥饿影响动物生理功能、能量代谢、免疫防御能力等^[7-8],尤其对于软体动物,较低等的免疫系统和复杂多变的环境,在饥饿的状况下使其更易受到氧化胁迫,常伴随有活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的产生,并引发脂质过氧化^[9]。通常生物体会利用抗氧化防御系统对ROS进行清除,以减轻对机体的损害,如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等^[10]。营养条件的改变会引起一些氧化代谢产物和抗氧化酶类的改变^[11],目前对水产动物饥饿与抗氧化的研究比较少,且不同的动物可能具有不同的反应^[12]。用抗氧化酶等相关指标作为生物标志物指示饥饿胁迫对鱼类的影响有少量研究^[12-14],而有关食物缺乏对贝类造成的氧化胁迫及有关影响鲜见报道。仅薛明等^[15]研究了方斑东风螺(*Babylonia areolata*)不同饥饿期后再投喂过程中足肌、肝胰腺的抗氧化体系相关指标变化;李石磊等^[16]研究了虾夷扇贝在饥饿处理后,血液中血细胞总数、血细胞吞噬水平、酸性磷酸酶、过氧化物歧化酶的变化。本研究通过限食处理降低珠母贝的生理活动水平,在这个过程中研究其血液免疫指标的变化,这在珍珠贝育珠中为首次研究术前处理对贝类免疫系统的影响。本研究结果显示限食降低了贝类的血淋巴免疫功能,与薛明和李石磊等研究结果类似。

贝类的免疫属于非特异性免疫,血淋巴细胞是其防御系统的重要部分,参与吞噬、血细胞凝

集、结节形成、炎症和伤口修复等免疫反应^[17-18],血淋巴细胞密度常常随着贝类自身生理状况和周围水体环境的变化而改变,常用作机体健康状况的评定指标之一^[19]。贝类血细胞的数量可能因种类不同而存在较大的差异,即使同一种类也可能因不同的年龄、生理状态、环境胁迫及不同研究方法而出现较大差异^[20-21]。已有研究表明,低温、低盐等环境胁迫因素可使对虾血细胞数量降低 40%~56.3%^[16]。温度突变和污染物等环境变化可导致扇贝的血细胞总数发生改变^[22-23]。本实验中健康马氏珠母贝血淋巴中细胞平均密度为 $(13.72 \pm 1.15) \times 10^5/\text{mL}$,限食处理后血淋巴细胞密度最多降低至 $(8.16 \pm 1.74) \times 10^5/\text{mL}$,可见限食处理对血淋巴细胞密度有显著性影响。这与虾夷扇贝受饥饿胁迫后血细胞总数不断减少一致^[16]。贝类的血淋巴细胞除具有免疫防御作用的同时还与机体的营养密切相关,长期的饥饿使扇贝体内营养匮乏,血淋巴细胞的死亡率升高。本试验结果表明,限食可导致珠母贝的血淋巴细胞死亡数量增加,而血淋巴细胞是贝类免疫防御系统的主体,饥饿下的血淋巴细胞死亡率的增加证明珠母贝免疫防御能力的下降。

所有的需氧生物体内均含有抗氧化酶系统和抗氧化物质组成的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,使自由基的产生与消除处于一种动态平衡,从而起到免除自由基对生物分子的损伤等作用^[24]。这个系统由一些可被氧化应激诱导的酶类组成,包括 SOD 和 CAT 等。SOD 是一种重要的抗氧化酶,广泛存在于需氧和耐氧生物体各组织中^[25],作用底物为超氧阴离子自由基,其活性随超氧阴离子自由基浓度的变化而变化,在维持生物体内超氧阴离子自由基产生与消除的动态平衡中起到极其重要的作用^[26-27],过氧化物歧化酶活性与生物的免疫水平密切相关。SOD 可催化 O_2^- 生成 H_2O_2 ,从而清除 O_2^- ,并能够增强吞噬细胞的防御能力和机体的免疫功能。CAT 在清除超氧自由基、 H_2O_2 和过氧化物以及阻止或减少羟基自由基形成等方面发挥重要作用。CAT 还能将 H_2O_2 进一步转变成 H_2O ,防止机体的损伤。因此,CAT 和 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抗氧化系统的变化^[28-29]。健康的生物

体,其内环境中的自由基产生与消除处于动态平衡。有研究表明^[30],当处于不利于生存的环境时,甲壳动物体内会释放一些毒性物质来自我保护,这些毒性物质中有一类是超氧阴离子,如短期饥饿后,日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) SOD 活力会升高,随后降低。本研究结果表明,马氏珠母贝血清 SOD 和 CAT 在限食的情况下,随限食程度的增加,两种酶的活性呈下降趋势,始终低于对照组。这可能由于饵料摄入的减少,引起血淋巴理化因子变化,从而改变其中与抗病力有关的酶活性。限食可能会增加贝类体内自由基数量如超氧阴离子,且贝类产生活性氧的速度远大于抗氧化酶活力增加的速度,未得到及时清除的自由基对细胞产生氧化伤害,抗氧化系统被破坏,使贝体内两种抗氧化酶活性明显降低,机体的免疫功能则受到抑制。

ACP 是动物体内参与免疫防御的重要水解酶之一,主要存在于颗粒细胞的溶酶体中,是溶酶体酶的标志酶,不仅在血细胞内起作用,还参与血细胞对异物的吞噬作用和包裹作用,该酶通过脱颗粒作用释放到血清中形成水解酶体系发挥作用^[31]。有研究表明^[32],ACP 对细菌等异物在溶酶体内的消化降解起重要作用。因此 ACP 活性在环境胁迫下的变化被认为是判断贝类免疫能力的指标之一。AKP 是一种含锌糖蛋白,是一种重要的代谢调控酶,直接参与磷酸基团转移和钙磷代谢,它可调控马氏珠母贝矿化,在生物矿化中起重要作用,同时,作为溶酶体酶的重要组分,在免疫中也可发挥重要作用^[33-34]。溶菌酶是一种碱性蛋白,在软体动物的许多组织器官中广泛存在。CHENG^[35]认为溶菌酶在软体动物的炎症反应活动中担负着重要作用。有研究显示虾夷扇贝饥饿后酸性磷酸酶活性显著下降^[16]。本研究结果表明,马氏珠母贝在限食情况下,随限食程度的增加,溶菌酶,ACP 和 AKP 活性下降,明显低于对照组。分析其原因,限食对马氏珠母贝血清溶菌酶,ACP 和 AKP 活性表现出一定程度的抑制作用,限食处理超出了贝体的免疫调节限度,表现出免疫疲劳或损伤,血清中这些酶活性的急剧下降是免疫功能下调的集中体现,故认为限食或饥饿可导致双壳类免疫能力降低。

综合马氏珠母贝插核前限食处理后第 1 周、2 周、3 周、4 周时血淋巴免疫相关指标变化情况,

研究结果显示术前限食处理后血淋巴细胞密度以及免疫相关酶的活性都发生了一定变化,说明术前限食处理马氏珠母贝非特异性免疫系统有所下降,手术后自我防御调节能力会有所减弱,因此会降低术后珠母贝的生理反应和免疫排斥,对插核育珠会起到较好的调节作用,本实验也验证了术前处理的理论依据。

参考文献:

- [1] 邓陈茂,童银洪,符韶. 马氏珠母贝的研究进展[J]. 现代农业科技,2009(2):204-206,210.
- [2] 邓陈茂,林养,杜涛,等. 马氏珠母贝的术前处理试验[J]. 湛江海洋大学学报,1995,15(1):6-9.
- [3] ALLAM B, ASHTON-ALCOX K A, FORD S E. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2001, 25(5/6):365-375.
- [4] 邓陈茂,梁飞龙,符韶,等. 马氏珠母贝术前处理与育珠研究[J]. 海洋湖沼通报,2010(4):124-128.
- [5] 劳赞,邓陈茂,梁盛. 马氏珠母贝术前处理的研究[J]. 水产科学,2003,22(4):27-29.
- [6] 谢绍河,梁飞龙,林伟财,等. 三角帆蚌和褶纹冠蚌培育附壳造型珍珠的术前处理及养殖模式研究[J]. 海洋湖沼通报,2012(4):89-95.
- [7] BAYNE B L. Aspects of the metabolism of *Mytilus edulis* during starvation [J]. *Netherlands Journal of Sea Research*, 1973,7:399-410.
- [8] 谢小军,邓利,张波. 饥饿对鱼类生理生态学影响的研究进展[J]. 水生生物学报,1998,22(2):181-188.
- [9] ROBINSON M K, RUSTUM R R, CHAMBERS E A, et al. Starvation enhances hepatic free radical release following endotoxemia [J]. *Journal of Surgical Research*, 1997,69:325-330.
- [10] 张克烽,张子平,陈芸,等. 动物抗氧化系统中主要抗氧化酶基因的研究进展[J]. 动物学杂志,2007,42(2):153-160.
- [11] 章承军,刘健,陈锦辉,等. 饥饿再投喂对缢蛏消化酶活力和抗氧化能力的影响[J]. 水产学报,2010,34(7):1106-1112.
- [12] MORALES A E, PÉREZ-JIMÉNEZ A, HIDALGO M C, et al. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2004,139(1/3):153-161.
- [13] PASCUAL P, PEDRAJAS J R, TORIBIO F, et al. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*) [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2003, 145(2):191-199.
- [14] BLOM S, ANDERSSON T B, FÖRLIN L, et al. Effects of food deprivation and handling stress on head kidney 17 α -hydroxyprogesterone 21-hydroxylase activity, plasma cortisol and the activities of liver detoxification enzymes in rainbow trout [J]. *Aquatic Toxicology*, 2000, 48:265-274.
- [15] 薛明,柯才焕,王德祥,等. 饥饿及恢复生长对方斑东风螺抗氧化体系的影响[J]. 中国水产科学,2010,17(2):281-288.
- [16] 李石磊,李文姬,付成东,等. 饥饿胁迫对虾夷扇贝几种免疫因子的影响[J]. 水产科学,2011,30(8):441-444.
- [17] SMITH V J, SODERHALL K. β -1,3-glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biological Bulletin*, 1983, 164(2):299-314.
- [18] WANG Y J, HU M H, CHIANG M W L, et al. Characterization of the subpopulation and immune-related parameters of hemocytes in the green-lipped mussel *Perna viridis* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 32(3):381-390.
- [19] TSENG I T, CHEN J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2004, 17(4):325-333.
- [20] THOMPSON R J, BAYNE M N M, MOORE T H, et al. Hamolymph volume, changes in the biochemical composition of the blood and cytological responses of the digestive cells in *Mytilus californianus* Conrad induced by nutritional, thermal and exposure stress [J]. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology*, 1978, 127(4):287-298.
- [21] WANG Y J, HU M H, SHIN P K S, et al. Immune parameter changes of hemocytes in green-lipped mussel *Perna viridis* exposure to hypoxia and hyposalinity [J]. *Aquaculture* 2012, 356/357(8):22-29.
- [22] HANNAM M L. Immune function in the Arctic scallop, *Chlamys islandica*, following dispersed oil exposure [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 92(3):187-194.
- [23] CHEN M Y. Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge [J]. *Aquaculture*, 2007, 271(1/4):479-487.
- [24] 栗志民,申玉春,王淑敏,等. 氨氮胁迫对马氏珠母贝免疫活性的影响[J]. 广东海洋大学学报,2011,31(4):52-57.
- [25] PIPE R K, PORTE C, LIVINGSTONE D R. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1993, 3(3):221-233.
- [26] HOROWITZ N H, SHEN S. *Neurospora tyrosinae* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1952, 197(2):573-520.
- [27] CHUNG M H. Free Radical [J]. *Biology and Medicine*, 1972, 12(6):523-539.
- [28] BURGENT T, BOEQUEUE G, PORTE C, et al. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1996, 131:125-141.
- [29] PETERS I D, LIVINGSTONE D R. Antioxidant enzyme

- activities in embryologic and early larval stages of turbot [J]. *Journal of Biology*, 1996, 49 (5): 986 - 997.
- [30] 李志华. 饥饿对日本沼虾生长和部分免疫功能的影响 [J]. *上海水产大学学报*, 2008, 16(1):16 - 21.
- [31] PIPE R K. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis* [J]. *Histochemistry Journal*, 1990, 22 (11): 595 - 603.
- [32] CHENG T C. Selective induction of release of hydrolases from *Crassostrea virginica* hemocytes by certain bacteria [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1992, 59(2):197 - 200.
- [33] 林静瑜, 谢莉萍. EDTA 对合浦珠母贝碱性磷酸酶活性的影响 [J]. *集美大学学报:自然科学版*, 2004, 9(4):313 - 316.
- [34] 马孝甜, 纪丽丽, 白阳, 等. 手术对马氏珠母贝生化指标的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(6):400 - 403.
- [35] CHENG T C. The role of lysosomes in molluscan inflammation [J]. *American Zoologist*, 1983, 23(1):129 - 144.

Effects of starvation on immune function of hemolymph in pearl oyster *Pinctada martensii* during pre-operation

LI Qiong-zhen¹, LUO Bang¹, ZHANG Li¹, WANG You-ji²

(1. *Guangxi Institute of Fisheries, Nanning 530021, Guangxi, China*; 2. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*)

Abstract: Effects of starvation on immune function of hemolymph in *Pinctada martensii* during pre-operation were investigated under laboratory conditions, including total hemocyte counts (THC), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), lysozyme (LSZ), acid phosphatase (ACP) and alkaline phosphatase (AKP). There were three treatments in the experiments: feeding once daily, feeding once two days, and feeding twice daily as a control. Hemolymph was sampled at the beginning of the experiment, and 1, 2, 3, 4 weeks to evaluate the immune functions. The results showed THC, SOD, CAT, LSZ, ACP and AKP activities decreased with the increase of fasting degree after one week fasting, immune parameters of the two fasting treatments significantly reduced compared with the control group, and displayed significant difference ($P < 0.05$). All immune parameters in feeding once two days treatment were lower than those of the control treatment, and the trend lasted for four weeks. Therefore, starvation can significantly reduce the physiological functions and immune functions, and this paper can provide theoretical basis for the pre-operation of pearl culture.

Key words: *Pinctada martensii*; pre-operation; immune functions; hemolymph; starvation