



外源因子介导调控 ROS 对中国鲎血淋巴细胞参数的影响

徐 镇^{1,2}, 江宁锦^{1,2}, 何锦锋³, 台宗光⁴,
朱全刚⁴, 王有基^{1,2}, 胡梦红^{1,2*}

(1. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;

2. 上海海洋大学, 上海水产养殖工程技术研究中心, 上海 201306;

3. 北海市产品质量检验所, 广西北海 536000;

4. 上海市皮肤病医院, 上海 200443)

摘要: 以鲎血为主要原料制备鲎试剂是我国鲎资源开发的关键产业链。我国鲎种群数量逐年下降, 为实现鲎资源的保护和可持续利用, 开展对中国鲎造血作用机理的相关研究刻不容缓。实验向中国鲎体内注射 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 和灭活鳃弧菌 (V), 比较注射后 0、6、12、24、48 h 时中国鲎的血淋巴细胞总数、活性氧含量及非特异性免疫酶活性变化。结果显示, 与对照组相比, 注射 NAC 后血淋巴细胞总数 (THC)、活性氧 (ROS) 活性和丙二醛 (MDA) 含量均有下降趋势, 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、总抗氧化酶 (T-AOC)、溶菌酶 (LZM)、碱性磷酸酶 (AKP) 活性均有升高趋势。NAC 与不同浓度 V 共同刺激下, THC、ROS、MDA 含量相对仅注射 NAC 的下降有所减缓, 其他酶活性有所升高。而血蓝蛋白 (HC) 在整个实验中无明显变化。6~48 h, NAC 组的 THC、ROS 与 V 组、NAC 和 V 共刺激组相比呈降低趋势, 共同刺激下 SOD 活性显著高于其他组。48 h, NAC、V 及共刺激下 CAT、T-AOC 组间无显著差异, 但均高于对照组。NAC+10⁶ V 的 MDA 含量在 48 h 时最低, AKP 活性在 12~48 h 呈升高趋势, 而 NAC 组的 LZM 活性在 48 h 最高。注射 NAC 可降低 THC、ROS, 共刺激可缓和下降, V 组 THC、ROS 升高, 但其余血淋巴参数均提高。研究表明, NAC 和 V 均能刺激中国鲎血淋巴细胞的免疫功能; 机体内的 ROS 含量对中国鲎血淋巴细胞增殖及再生起着重要作用。

关键词: 中国鲎; N-乙酰半胱氨酸; 鳃弧菌; 血淋巴细胞; 血化学指标

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

全世界现存鲎共有 3 属 4 种, 我国有中国鲎 (*Tachypleus tridentatus*) 和圆尾鲎 (*Carcinoscorpius rotundicauda*) 两种^[1]。以鲎血为主要原料制备鲎试剂已成为我国鲎资源开发利用的主要产业, 因此对鲎的需求量越来越大, 近年来有研究表明中国鲎数量逐年下降^[2]。为实现鲎资源的

保护和可持续利用, 加强对采血鲎血淋巴细胞的快速恢复有望减少对鲎野生资源的损耗。鲎血淋巴细胞经发育、成熟、增殖、定向及分化等一系列复杂过程, 再生形成新的血淋巴细胞参与机体的免疫防御体系^[3]。相关研究显示, 在哺乳动物和果蝇体内, 活性氧 (ROS) 的升高诱导

收稿日期: 2020-11-06 修回日期: 2020-12-19

资助项目: 2017 北海市“十三五”海洋经济创新发展示范项目 (Bhshf006)

第一作者: 徐镇 (照片), 从事中国鲎血淋巴细胞快速恢复研究, E-mail: 2941186928@qq.com

通信作者: 胡梦红, E-mail: mhhu@shou.edu.cn



了造血干细胞的分化^[4]。Ito等^[5]指出小鼠机体造血细胞中的ROS可促进体内造血干细胞的增殖分化；Junkunlo等^[6]指出淡水龙虾的造血组织在增殖过程中产生的ROS可促进其造血作用；Huang等^[7]推测厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)中ROS含量的升高可能是弥补其血细胞数量的减少，表明机体活性氧含量升高可促进机体血细胞的增殖分化。相关研究表明，ROS作为细胞重要的信号分子，在细胞增殖的信号转导过程中起着重要的调控作用^[3]，它可通过氧化还原作用改变细胞周期相关信号分子的活性及功能，进而调节细胞的增殖和分化^[8]。为进一步明确ROS在造血过程中所发挥的作用，本研究采用可降低ROS水平的ROS清除剂乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)来探究ROS含量对中国鲎血淋巴细胞的增殖及再生的影响。

乙酰半胱氨酸是一种小分子物质，极易被肠道消化吸收进入细胞代谢，它是谷胱甘肽的前体物质，可在体内脱去乙酰基生成半胱氨酸，最终合成谷胱甘肽(glutathione, GSH)^[9]。NAC作为一种活性氧自由基清除剂，可以清除体内过多的自由基^[10]。此外，NAC具有免疫调节作用，如可提高体内GSH含量，GSH具有较高还原能力，故可提高机体组织的抗氧化能力^[11]，也可通过激活细胞外信号通路来减缓细胞凋亡^[10]。在鱼类中，NAC可作为饲料添加剂，提高尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)的抗氧化能力和生长性能^[12]。鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是一种常见的水产动物致病菌^[13]。水产动物通过接种灭活鳃弧菌，可有效预防细菌性、病毒性疾病。段亚飞等^[13]的研究表明，斑节对虾(*Penaeus monodon*)感染鳃弧菌后其体内的总抗氧化能力(T-AOC)、溶菌酶活性(LZM)、一氧化氮含量(NO)等免疫相关酶的指标均呈降低趋势，而向中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)体内注射灭活鳃弧菌后，其体内的血细胞数量及酚氧化酶活性均升高，故灭活鳃弧菌疫苗也可能提高水产动物的免疫力^[14]。本研究中，以NAC作为活性氧抑制剂，灭活鳃弧菌作为免疫增强剂，探究NAC与不同浓度灭活鳃弧菌单独刺激和共刺激条件下中国鲎血淋巴细胞参数的影响及活性氧含量的变化，从而推断活性氧是否影响中国鲎血淋巴细胞增殖和再生过程。

1 材料与方法

1.1 实验动物和实验条件

实验的开展秉持我国《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T-35892-2018)的要求和准则进行，遵从实验动物福利伦理要求。北海市兴龙生物制品有限公司提供未采血中国鲎作为实验成鲎，采捕自广西北海野生中国鲎在2 d内送至上海海洋大学生态实验室进行暂养，实验结束后将其放生回原采捕基地，从采捕到实验结束的时间为2019年8—11月。实验开始前，中国鲎暂养7 d，暂养期间每天18:00投喂100 g的菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)，自然水温20~24℃，盐度28~31，pH 8.0~8.2，溶解氧6~8 mg/L，光周期12 h(自然光6:00—18:00)。由于6—9月是鲎的繁殖季节，为避免繁殖对雌鲎的生理影响，本实验选用雄鲎作为实验对象，随机挑选附肢完整、无寄生虫、体质量相近的雄鲎18只[初始体质量为(1375.57±150.24) g，前体宽为[(26.41±1.49) cm]，分为6组，每组3只个体重复，分别在成鲎第六步足侧面的薄膜处注射1 mL实验溶液[①0.85%生理盐水、②150 mg/mL NAC、③10⁵ CFU/mL灭活鳃弧菌(10⁵ V，V代表灭活鳃弧菌)、④10⁶ CFU/mL灭活鳃弧菌(10⁶ V)、⑤0.5 mL 150 mg/mL NAC+0.5 mL 10⁵ CFU/mL灭活鳃弧菌(NAC+10⁵ V)、⑥0.5 mL 150 mg/mL NAC+0.5 mL 10⁶ CFU/mL灭活鳃弧菌(NAC+10⁶ V)]。

实验试剂NAC(纯度99%，LabTop，上海源叶生物)溶解在0.85%的无菌生理盐水中配置成相应浓度的工作液。每组鲎分别饲养于单独的移动鱼池中(长2 m、宽1 m、高0.9 m)，且在鱼池中的3只鲎尾巴上分别扎个数不同的橡皮筋，以分辨每只鲎。实验周期为2 d，实验期间环境条件同暂养时保持一致。

1.2 灭活鳃弧菌菌悬液的制备

鳃弧菌来自上海海洋大学水产与生命学院病原库菌种保藏中心。将菌种接种于固体培养基(蛋白胨20 g/L、牛肉粉5 g/L、氯化钠5 g/L、琼脂粉15 g/L)中，28℃培养24 h，挑取单菌落至液体培养基(LB肉汤培养基：酵母粉、胰蛋白胨、氯化钠)中振荡培养24 h，使细菌生长达到对数期，之后菌液在6 000 r/min、4℃离心15 min，取上清液，无菌磷酸盐缓冲液(PBS，pH

7.4) 清洗沉淀 3 次, 最后以含 1% 甲醛 (体积浓度) 的 PBS 重悬, 4 °C 放置 48 h, 平板培养检测无活菌存在, 再以 PBS 离心洗涤 3 次后调整菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL, 4 °C 保存备用。当开始注射实验时, 需将浓度为 1×10^8 CFU/mL 的菌液用上述 PBS 溶液分别稀释到 1×10^5 和 1×10^6 CFU/mL 备用。

1.3 样品采集

分别于注射后第 0、6、12、24 和 48 小时采集中国鲎血样, 采集血样前后用 70% 酒精消毒采血部位, 选用 22G 针头的 2 mL 注射器插入鲎背甲中缝处抽取血淋巴液, 选用血淋巴液: 抗凝剂=2:3 的比例抽取 0.8 mL 血淋巴液转移至含 1.2 mL 预冷 1 mmol/L Propranolol 抗凝剂的 2 mL 无菌离心管中, 每只鲎血淋巴样本取 3 份, 一份测定 THC、ROS 含量; 另 2 份在 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 10 min 后取上清液, 一份在 -20 °C 保存, 测定血浆中抗氧化酶和非特异性免疫酶活性; 一份在 4 °C 保存, 测定 HC 含量。

1.4 血淋巴液指标测定

血淋巴细胞总数 每组取新鲜血淋巴样本 2 mL, 迅速混匀, 吸取 50 μ L, 用血球计数板在显微镜 (LW100T, 测维, Tansoole, China) 下观察血细胞, 并计算血淋巴细胞 (THC) 的总数 (个/mL)。

活性氧含量 以 DCFH-DA 作为活性氧 (ROS) 的特异性荧光染料分析 ROS 含量。取 THC 悬液 200 μ L, 加入 5 μ L 终浓度为 10 μ mol/L 的 DCFH-DA 作为荧光探针, 室温条件下遮光孵育 30 min, 4 °C、1000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 用 PBS 缓冲液洗 3 遍后重悬, 再用 200 目筛网过滤后上荧光酶标仪 (Synergy H1, BioTek, USA) 进行检测。结果以 10 000 个细胞表示其相对荧光强度, 即 200 μ L 荧光强度/200 μ L 细胞数。

抗氧化酶活性 超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、总抗氧化能力 (T-AOC)、丙二醛 (MDA)、溶菌酶 (LZM)、碱性磷酸酶 (AKP) 的测定采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒。SOD、T-AOC、MDA、AKP 采用酶标仪 (Synergy H4, Biotek, USA) 进行测定, CAT、LZM、HC 采用可见光分光光度计 (SP-1920UV-VIS, 上海, 中国) 进行测定。

血蓝蛋白浓度 取血浆样品 10 μ L, 加入 990 μ L 稀释液 (10 mmol/L CaCl₂, 50 mmol/L Tris-

HCl pH=8.0), 在 334 nm 下测定光密度值 (OD)。

$$\text{血蓝蛋白浓度 (mg/mL)} = 2.33 \times \text{OD}_{334} \times 1001.5$$

1.5 数据分析

结果用平均值 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 使用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, Levene 氏检验对数据进行方差齐性检测, Shapiro-Wilk 氏检验检测数据的正态分布。用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 检测同一时间条件下或同一处理组条件下、不同处理组之间或不同时间点间各免疫参数的差异。使用 XLSTAT[®] 2014 软件对所有 THC 免疫参数进行主成分分析 (PCA), 利用测量参数和观察值绘制双平面图。

2 结果

实验期间, 各组中国鲎无死亡。实验结束时 (第 48 小时), 各组成鲎体质量为 (1 374.07 \pm 150.26) g, 前体宽度为 (26.39 \pm 1.50) cm, 与实验开始时 (第 0 小时) 无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.1 THC 指标

实验过程中, 同一药物的条件下, 注射 NAC 组的 THC 在 24~48 h 显著降低。10⁵ V 组在 6 h 时显著升高, 48 h 时显著降低后与对照组间无显著差异。10⁶ V、NAC+10⁵ V 和 NAC+10⁶ V 组在 6~12 h 时 THC 显著升高后恢复至正常水平; 同一时间的条件下, NAC 在 6~48 h 的 THC 数目均显著降低。NAC 组在 24 h 显著低于其余各组 (图 1)。

2.2 ROS

实验过程中, 同一药物条件下, 注射 NAC 组 ROS 呈下降趋势, 在 12 h 显著降低后无明显变化; 10⁵ V 组在 6~12 h 先升高后呈下降趋势, 在 24~48 h 与对照组间无显著差异; 10⁶ V 组在 6~12 h 显著升高, 24~48 h 有降低趋势, 但均显著高于对照组; NAC+10⁵ V 和 NAC+10⁶ V 组在 0~48 h 无显著差异。同一时间条件下, 注射 NAC 组的 ROS 在 6~48 h 均显著降低。其中在第 6 小时, 10⁵ V 和 10⁶ V 组的 ROS 含量显著高于 NAC+10⁵ V 和 NAC+10⁶ V 组; 第 12~48 小时, 10⁶ V 组的 ROS 含量均显著高于 NAC+10⁵ V 和 NAC+10⁶ V 组 (图 2)。

2.3 SOD

实验过程中, 同一药物条件下, 注射 NAC 组在 12~48 h 显著升高; 10⁵ V 组在 12 h 时的 SOD

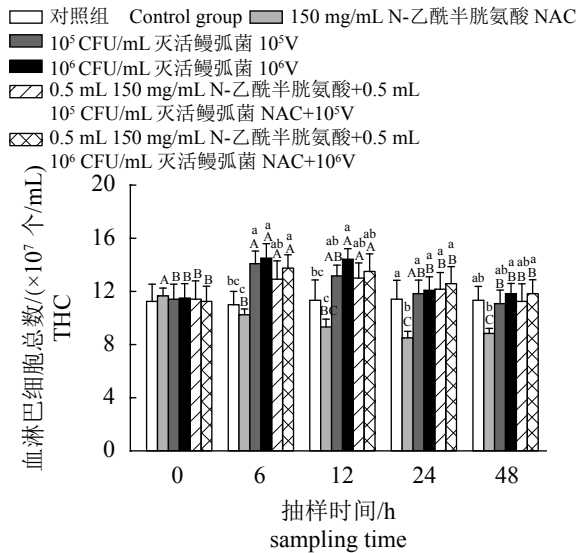


图1 不同注射时间下的血淋巴细胞总数

不同大写字母表示同一实验组不同注射时间差异显著 ($P < 0.05$), 不同小写字母表示同一时间6个实验组间差异显著 ($P < 0.05$), 下同

Fig. 1 Total hemopoietic lymphocytes count at different injection time

Different capital letters indicate significant difference at different time injected in the same experimental group ($P < 0.05$), different lowercase letters indicate significant difference among six experimental groups at the same time ($P < 0.05$), the same below

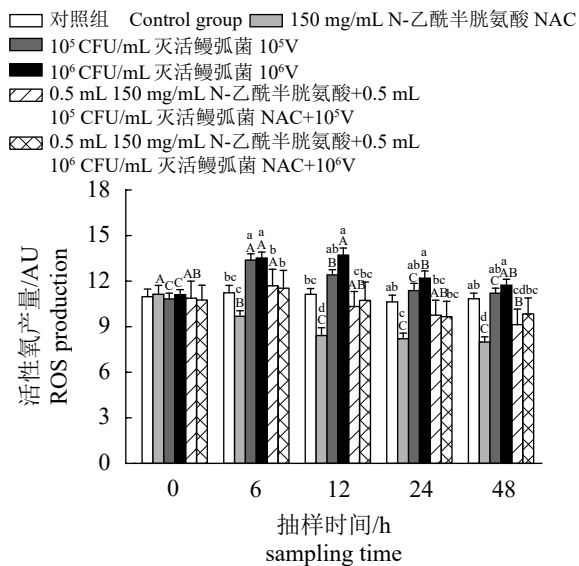


图2 不同注射时间下的活性氧产量

Fig. 2 Production of reactive oxygen species at different injection time

活性显著升高, 其他组间无显著差异; 10^6 V、NAC+ 10^5 V 和 NAC+ 10^6 V 组在 6~48 h 均显著升高, 但组间无显著差异。同一时间条件下, NAC+ 10^5 V 和 NAC+ 10^6 V 组在 6~48 h 均显著高于其他

组, 但二者间无显著差异; NAC、 10^5 V 和 10^6 V 组在 6~48 h 的 SOD 活性和对照组相比均有升高趋势, 但三者间无显著差异 (图3)。

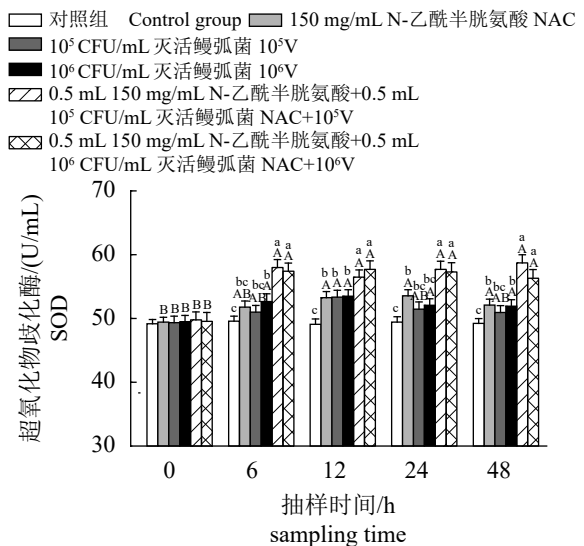


图3 不同注射时间下的超氧化物歧化酶含量

Fig. 3 Content of superoxide dismutase at different injection time

2.4 CAT

实验过程中, 同一药物条件下, 注射 NAC 组在 12~24 h 显著升高后恢复至正常水平; NAC+ 10^5 V 组在 24 h 显著升高; 10^5 V、 10^6 V 和 NAC+ 10^6 V 组在 12 h 的 CAT 活性均显著升高, 其他时间点无显著差异。同一时间条件下, 不同组 6 h 无显著差异。12 h 时, NAC+ 10^6 V 组达最大值, 显著高于 NAC、 10^5 V 和 NAC+ 10^5 V 组; 24 h 时, 10^6 V、NAC+ 10^5 V 和 NAC+ 10^6 V 组显著高于 10^5 V 和对照组; 48 h 时, 不同处理组均显著高于对照组, 但不同处理组间无显著差异 (图4)。

2.5 T-AOC

实验过程中, 同一药物条件下, 与对照组相比, 注射 NAC、 10^5 V 和 10^6 V 组的 T-AOC 活性均在 12 h 显著升高后无明显变化; NAC+ 10^5 V 和 NAC+ 10^6 V 组分别在 12 和 6 h 显著升高后无明显变化。同一时间条件下, NAC 组在 6、12 和 48 h 时的 T-AOC 能力显著升高; 24 h 时, 不同处理组间无显著差异, 但均显著高于对照组 (图5)。

2.6 MDA

实验过程中, 同一药物条件下, 注射 NAC 组在 24 h 显著降低; 10^6 V、NAC+ 10^5 V 和 NAC+

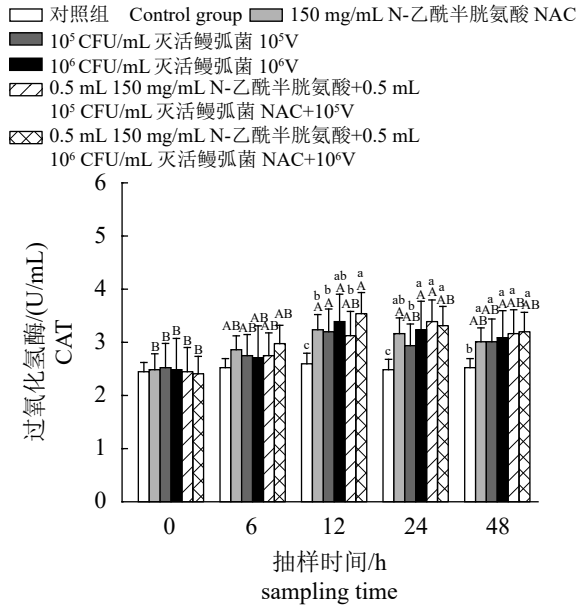


图 4 不同注射时间下的过氧化氢酶含量

Fig. 4 Catalase content at different injection time

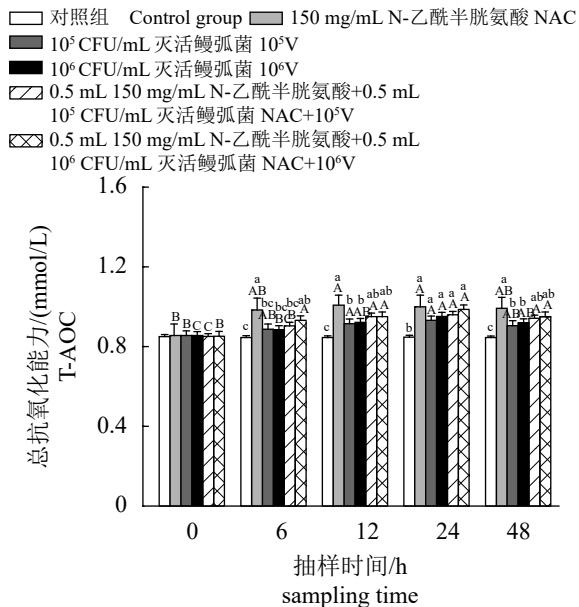


图 5 不同注射时间下的总抗氧化能力

Fig. 5 Total antioxidant capacity at different injection time

10⁶ V 组在 24 h 显著降低后无明显变化。同一时间的条件下, 在 6 h 时, 10⁶ V、NAC+10⁵ V 和 NAC+10⁶ V 组显著低于其他组, 且这 3 组间无显著差异; 12 和 24 h 时, 不同组间无显著差异, 但均低于对照组; 48 h 时, 与对照组相比, NAC+10⁶ V 组显著降低 (图 6)。

2.7 LZM

实验过程中, 同一药物条件下, 注射 NAC

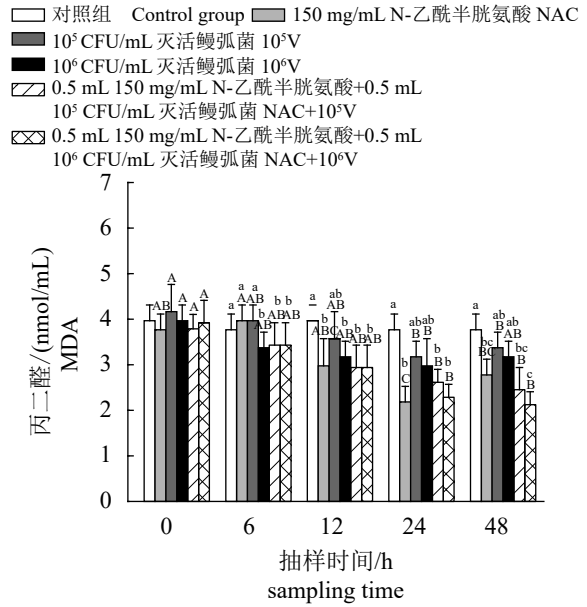


图 6 不同注射时间下的丙二醛含量

Fig. 6 Malonyldialdehyde content at different injection time

和 10⁶ V 组在 12 h 显著升高后无明显变化; 10⁵ V、NAC+10⁵ V 和 NAC+10⁶ V 组在 24 h 均显著升高, 其他组间无显著差异; 同一时间条件下, 在 6 h 时, NAC+10⁵ V 和 NAC+10⁶ V 组显著高于对照组; 在 12 h 时, NAC 和 10⁶ V 组均显著高于对照组; 在 24 h 时, NAC、NAC+10⁵ V 和 NAC+10⁶ V 组均显著高于对照组; 在 48 h 时, NAC 组显著高于 10⁵ V 和对照组 (图 7)。

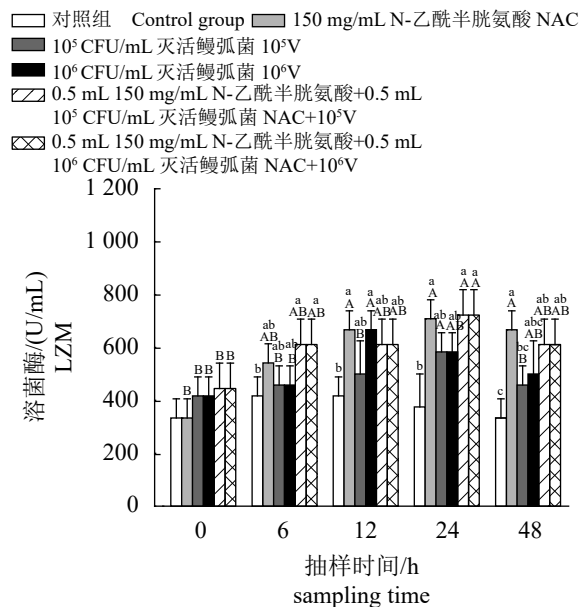


图 7 不同注射时间下的溶菌酶含量

Fig. 7 Lysozyme content at different injection time

2.8 AKP

实验过程中，同一药物条件下，NAC、NAC+10⁵ V 和 NAC+10⁶ V 组在 24 h 显著升高后无明显变化；10⁵ V 和 10⁶ V 组在 0~48 h 时无显著变化。同一时间条件下，NAC+10⁶ V 组在 12~48 h 时显著升高，其他组间无显著差异；在 6 h 时，各组间无显著差异；在 12 h 时，NAC 和 NAC+10⁶ V 组显著高于对照组 (图 8)。

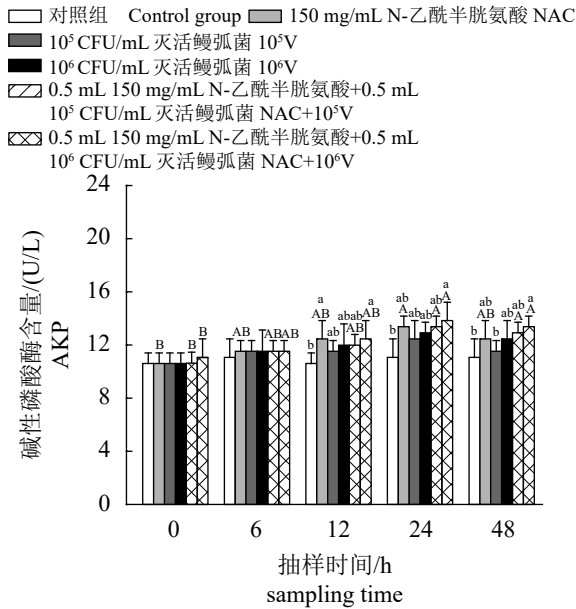


图 8 不同注射时间下的碱性磷酸酶含量
Fig. 8 Alkaline phosphatase content at different injection time

2.9 HC

在 0~48 h，注射不同药物组间的 HC 含量无显著变化 (图 9)。

2.10 相关性和 PCA 分析

通过实验对比分析得出，ROS 含量与 THC 之间的散点图中， $r=0.8015$ ， $P<0.0001$ ，呈极显著的极强线性正相关 ($|r|>0.8$ ， $P<0.01$)。NAC、灭活鳃弧菌组不同时间对中国鲎血淋巴参数的主成分分析表明，在实验期间，不同处理组和时间这两个主成分占总成分的 86.52%，对免疫的主效应显著。PC1 占总方差的 64.75%，描述了不同处理组对血淋巴细胞各免疫功能参数的影响，表明对照组与不同处理组之间存在显著差异，代表了在 NAC 和灭活鳃弧菌不同处理条件下的特异性反应，因为对照组与其他处理组呈水平分离状态。PC2 占总方差的 21.77%，代

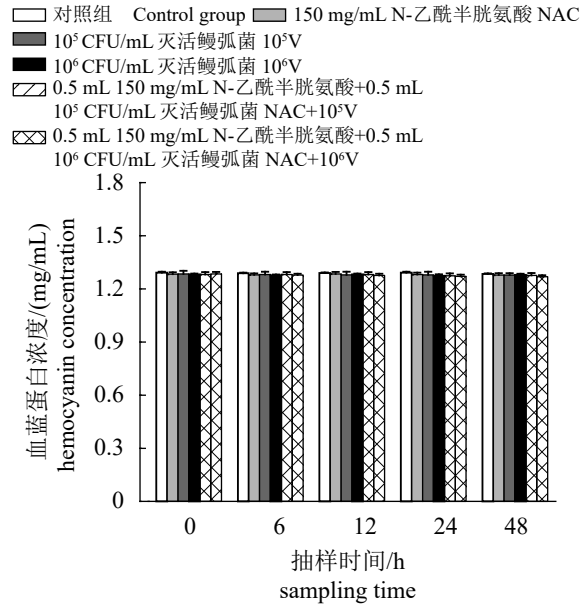


图 9 不同注射时间下的血蓝蛋白浓度
Fig. 9 Hemocyanin concentration under different injection time

表了不同处理组在不同时间的特异性响应，因为 NAC 和灭活鳃弧菌的处理组与对照组在这个轴呈分离状态。图中 THC、ROS、MDA、HC 和 SOD、CAT、T-AOC、LZM、AKP 呈负相关 (图 10)。

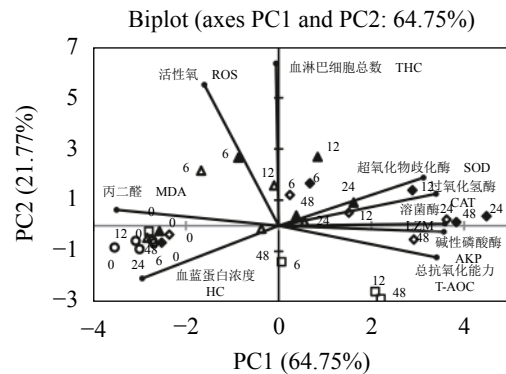


图 10 主成分分析 (PCA)

由主成分分析 (PCA) 产生的双标图，对 6 个不同处理的所有测量变量和 5 个时间点进行积分。○. 对照组，□. 150 mg/mL NAC，△. 10⁵ CFU/mL *V. anguillarum*，▲. 10⁶ CFU/mL *V. anguillarum*，◇. 0.5 mL 150 mg/mL NAC+0.5 mL 10⁵ CFU/mL *V. anguillarum*，◆. 0.5 mL 150 mg/mL NAC+0.5 mL 10⁶ CFU/mL *V. anguillarum*，显示了变量的负荷和实验条件的分数

Fig. 10 PCA analysis

Biplot originating from principal component analysis (PCA) integrating all measured variables and five time points at six different treatments; ○. control group; □. 150 mg/mL NAC, △. 10⁵ CFU/mL *V. anguillarum*, ▲. 10⁶ CFU/mL *V. anguillarum*, ◇. 0.5 mL 150 mg/mL NAC+0.5 mL 10⁵ CFU/mL *V. anguillarum*, ◆. 0.5 mL 150 mg/mL NAC+0.5 mL 10⁶ CFU/mL *V. anguillarum*. Both the loadings of the variables and the scores of the experimental conditions were displayed

3 讨论

实验采用 NAC 单刺激、灭活鳃弧菌单刺激及二者共刺激, 研究其对中国鲎血淋巴细胞的 THC、ROS、SOD、CAT、T-AOC、MDA、LZM、AKP 和 HC 的影响。结果显示, 注射 NAC 可降低中国鲎血淋巴细胞的 THC 和 ROS, 而 NAC 和灭活鳃弧菌共刺激可减缓下降趋势, 两种方式均可增强血淋巴免疫功能。

THC 是反映甲壳动物免疫水平的重要指标, 血淋巴细胞主要通过吞噬、包裹等细胞免疫产生 ROS、NO 和抗菌肽等免疫分子, 在甲壳动物的免疫应答中起着关键作用^[15]。实验结束时, 注射 NAC 可降低中国鲎血淋巴细胞数, 而灭活鳃弧菌单刺激及二者共刺激条件下, 先升高, 后恢复至正常水平, 推测 NAC 与灭活鳃弧菌结合可能具有缓解血淋巴细胞总数降低的功能, 这可能与实验期间注射灭活鳃弧菌后 THC 数目有所升高有关。贾志浩^[3]研究表明, 在中华绒螯蟹体内注射 NAC 后 THC 显著降低, 注射嗜水气单胞菌后 THC 升高, 而共刺激后 THC 显著低于细菌组, 表明共刺激条件下可抑制单刺激时的变化趋势, 这与本研究的结果一致。

ROS 是一种化学性能比氧活泼的含氧化合物, 在免疫防御机制中起着消灭病原微生物的作用^[16]。研究表明, 造血细胞中的 ROS 可促进造血干细胞的增殖分化^[5]。本研究中, 注射 NAC 可降低中国鲎体内 ROS 含量, PCA 分析中显示 ROS 和 THC 在坐标轴同一侧, 表明 THC 数目也呈降低趋势, 因此推测中国鲎体内 ROS 含量与血淋巴细胞增殖、再生有关。研究表明, 低浓度的 ROS 可参与细胞内的信号转导通路的调节, 进而维持机体的生理代谢^[17]。贾志浩^[3]研究表明, 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 造血组织中 ROS 含量降低会抑制造血细胞的增殖及新生血淋巴细胞的释放, 与本研究相似。而在克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 中, 造血组织 ROS 含量升高可启动造血作用及释放新生血细胞的信号^[6]。Lee 等^[18]指出 NAC 也可减少线粒体 ROS 的产生, 保护肠上皮细胞免受氧化损伤。

在抗氧化酶体系中, SOD 催化超氧阴离子 (O_2^-) 和氢离子 (H^+) 生成氧气 (O_2) 和过氧化氢 (H_2O_2), H_2O_2 被 CAT 还原生成水使其含量降低, 避免机体内活性氧和羟基自由基含量的升高,

保护细胞避免过氧化氢中毒, 从而提高机体免疫机能^[19]。实验结束时, 发现注射 NAC、灭活鳃弧菌及共刺激条件下均可提高机体 SOD 活性, 维持正常的生理功能及代谢, 进而提高机体免疫防御机制^[20]。Liu 等^[21]研究表明 NAC 可提高大鼠肺组织中 SOD 活性, 增强肺组织的抗氧化能力。而 CAT 作为生物体免疫防御机制中的关键酶, 和 SOD 共同消除生物体内多余的氧自由基^[22]。本实验中, 注射 NAC、灭活鳃弧菌及共刺激条件下均可提高机体 CAT 活性且变化趋势相似, 可能是由于中国鲎受 NAC、灭活鳃弧菌刺激后体内产生过多 H_2O_2 或在 SOD 的氧化应激条件下导致 H_2O_2 升高^[23]。

T-AOC 作为衡量机体抗氧化酶体系和非酶促体系功能的综合指标, 用于检测机体抗氧化应激状况^[24]。本研究中的抗氧化酶体系包括 SOD 和 CAT, 实验结束时, T-AOC 的变化与 THC、SOD、CAT 变化趋势相似。Turchini 等^[25]指出 T-AOC 活性反映抗氧化合成的能力, T-AOC 活性高, 说明清除 ROS 的能力强, 进而维持正常生理功能, 本研究中 NAC 降低 ROS 含量, 而机体仍保持自身清除 ROS 的机能, 从而提高鲎机体的 T-AOC 活性, 与本研究结果相符。

MDA 是活性氧自由基与多不饱和脂肪酸反应产生的氧化产物, 可反映脂质过氧化程度, 被认为是细胞膜氧化损伤的重要指标^[26]。本实验结果显示, 注射 NAC 和鳃弧菌后均可降低中国鲎 MDA 含量, 这可能因为 NAC 清除机体内过多自由基, 避免 MDA 在体内累积导致对机体产生损伤作用, 进而维持机体抗氧化酶体系动态平衡^[27]。有研究表明, 水产动物受细菌刺激后, 饲料中添加 NAC 可增强抗氧化酶活性及降低肝脏和血浆中 MDA 含量, 这与本研究的结果相似^[12]。

LZM 是先天免疫反应中的重要调节因子, 具有抵抗细菌和病毒等的作用^[28], 也是外来刺激对机体免疫毒性的重要参数^[21]。目前, 关于 NAC 对 LZM 的研究机制尚不清楚, 但可从 NAC 对中华绒螯蟹的氧化应激保护作用^[29]的研究中推测出鲎体内 LZM 升高的原因可能与 NAC 的结构及功能有关, 可能是鲎机体将 NAC 视为外来刺激后激活体内 LZM 免疫因子发挥作用, 或 LZM 与其他免疫酶共同作用维持鲎体内氧化-抗氧化动态平衡, 激活抗氧化酶系统, 从而促进 LZM 活性升高^[13,30]。

AKP 是参与杀灭病原菌和细胞外入侵物的典型水解酶, 大多数磷酸酶位于细胞溶酶体中, 在甲壳动物的免疫应答中起关键作用^[31]。本实验表明 NAC 可提高机体 AKP 活性。关于 NAC 引起 AKP 变化的原理尚无相关研究, 但从 AKP 的功能中可推测 NAC 作为 ROS 抑制剂, 虽然使机体内 ROS 含量降低, 但为维持机体内 ROS 与免疫酶、抗氧化酶体系的动态平衡, 却不可避免地会引起其他因子入侵机体, 对机体产生不利影响。此外 AKP 还具有杀灭细胞外入侵物的功能^[32]。

血蓝蛋白是甲壳动物特有的含铜呼吸蛋白, 其浓度可用来评估甲壳动物的健康状态^[33]。研究表明, 当甲壳动物受到外界刺激时, 会启动相应机制来增加血蓝蛋白含量, 进而参与机体免疫防御, 与 Pan 等^[34]发现甲壳动物感染对虾白斑综合征 (WSSV) 后血蓝蛋白基因上调的结果一致。本研究中, 不同处理组间 HC 无显著变化, 可能是实验周期相对较短, 实验过程中氧和铜元素无明显变化或变化不明显, 故对 HC 的变化还需进一步研究。

4 结论

为了探究 NAC、灭活鳃弧菌及二者共同刺激对中国鲎血淋巴相关免疫参数的影响, 使用 PCA 对不同处理组的中国鲎相关免疫参数进行了分析, 结果表明 NAC 可降低中国鲎的 THC、ROS 和 NAC, 与 V 共刺激可缓和下降趋势。而注射灭活鳃弧菌可提高中国鲎的 THC、ROS, 且所有处理组的抗氧化酶活性和免疫酶活性均升高, 说明 NAC 降低中国鲎体内 ROS 含量时, 机体内血淋巴细胞含量也降低; 而 NAC 和灭活鳃弧菌共同作用时, ROS、THC 的下降趋势低于 NAC 组, 推测 ROS 含量对中国鲎血淋巴细胞增殖及再生起着重要作用。

徐镇和江宁锦为共同第一作者

参考文献 (References):

[1] Hu M H, Kwan B K Y, Wang Y J, *et al.* Population structure and growth of juvenile horseshoe crabs *Tachypleus tridentatus* and *Carcinoscorpius rotundicauda* (Xiphosura) in southern China[M]//Carmichael R, Botton M, Shin P, *et al.* Changing global perspectives on horseshoe crab biology, conservation and man-

agement. Cham: Springer, 2015: 167-180.

- [2] 朱俊华, 吴宙, 冯炳斌, 等. 全球中华鲎资源保护现状及对策建议[J]. *生物多样性*, 2020, 28(5): 621-629.
Zhu J H, Wu Z, Feng B B, *et al.* Global conservation of *Tachypleus tridentatus*: present status and recommendations[J]. *Biodiversity Science*, 2020, 28(5): 621-629(in Chinese).
- [3] 贾志浩. 中华绒螯蟹造血组织及造血作用机理的研究 [D]. 青岛: 中国科学院大学 (中国科学院海洋研究所), 2018.
Jia Z H. Characterization of hematopoietic tissue and hematopoietic regulatory mechanism of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[D]. The University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences), 2018 (in Chinese).
- [4] Gao H J, Wu X R, Simon L T, *et al.* Antioxidants maintain e-cadherin levels to limit drosophila prohemocyte differentiation[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107768.
- [5] Ito K, Hirao A, Arai F, *et al.* Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells[J]. *Nature Medicine*, 2006, 12(4): 446-451.
- [6] Junkunlo K, Söderhäll K, Söderhäll I, *et al.* Reactive oxygen species affect transglutaminase activity and regulate hematopoiesis in a crustacean[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(34): 17593-17601.
- [7] Huang X Z, Lin D H, Ning K, *et al.* Hemocyte responses of the thick shell mussel *Mytilus coruscus* exposed to nano-TiO₂ and seawater acidification[J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 180: 1-10.
- [8] Hameed L S, Berg D A, Belnoue L, *et al.* Environmental changes in oxygen tension reveal ROS-dependent neurogenesis and regeneration in the adult newt brain[J]. *eLife*, 2015, 4: e08422.
- [9] Wu G Y. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition[J]. *Amino Acids*, 2009, 37(1): 1-17.
- [10] Zafarullah M, Li W Q, Sylvester J, *et al.* Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2003, 60(1): 6-20.
- [11] 谭灵琳. N-乙酰半胱氨酸对肉仔鸭抗氧化功能、组织能量代谢及肠道形态结构的影响 [D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2015.
Tan L L. Effects of N-acetylcysteine on antioxidative capacity, energy status and intestinal mucosal morphological structure in ducks[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2015 (in Chinese).
- [12] Xie S W, Zhou W W, Tian L X, *et al.* Effect of N-acetylcysteine and glycine supplementation on growth performance, glutathione synthesis, anti-oxidative and immune ability of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 233-241.

- [13] 段亚飞, 董宏标, 王芸, 等. 鳃弧菌感染对斑节对虾免疫相关指标的影响[J]. *海洋科学*, 2015, 39(9): 44-50.
Duan Y F, Dong H B, Wang Y, *et al.* The non-specific immune related indexes response of *Penaeus monodon* to *Vibrio anguillarum* challenge[J]. *Marine Sciences*, 2015, 39(9): 44-50(in Chinese).
- [14] 汪小锋, 樊廷俊, 丛日山, 等. 几种免疫促进剂对中国对虾血细胞数量、形态结构以及酚氧化酶产量和活性的影响[J]. *水产学报*, 2005, 29(1): 66-73.
Wang X F, Fan T J, Cong R S, *et al.* Effects of several immunostimulants on the number, ultrastructure of hemocytes and the yield, activities of phenoloxidase in *Penaeus chinensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2005, 29(1): 66-73(in Chinese).
- [15] Boehm T. Evolution of vertebrate immunity[J]. *Current Biology*, 2012, 22(17): 722-732.
- [16] Buonocore G, Perrone S, Tataranno M L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species[J]. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 2010, 15(4): 186-190.
- [17] Shen H M, Pervaiz S. TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution[J]. *The FASEB Journal*, 2006, 20(10): 1589-1598.
- [18] Lee S I, Kang K S. N-acetylcysteine modulates lipopolysaccharide-induced intestinal dysfunction[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 1004.
- [19] Sui Y M, Hu M H, Shang Y Y, *et al.* Antioxidant response of the hard shelled mussel *Mytilus coruscus* exposed to reduced pH and oxygen concentration[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 137: 94-102.
- [20] Bigorgne E, Foucaud L, Lapied E, *et al.* Ecotoxicological assessment of TiO₂ byproducts on the earthworm *Eisenia fetida*[J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159(10): 2698-2705.
- [21] Liu J, Pan L Q, Zhang L, *et al.* Immune responses, ROS generation and the haemocyte damage of scallop *Chlamys farreri* exposed to Aroclor 1254[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(3): 422-428.
- [22] Wu C L, Zhang W B, Mai K S, *et al.* Effects of dietary zinc on gene expression of antioxidant enzymes and heat shock proteins in hepatopancreas of abalone *Haliotis discus hannai*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2011, 154(1): 1-6.
- [23] Hermes-Lima M, Zenteno-Savín T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2002, 133(4): 537-556.
- [24] O'Brien P J, Slaughter M R, Swain A, *et al.* Repeated acetaminophen dosing in rats: adaptation of hepatic antioxidant system[J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2000, 19(5): 277-283.
- [25] Turchini G M, Francis D S, Senadheera S P S D, *et al.* Fish oil replacement with different vegetable oils in Murray cod: evidence of an "omega-3 sparing effect" by other dietary fatty acids[J]. *Aquaculture*, 2011, 315(3-4): 250-259.
- [26] Li Y H, Wei L, Cao J R, *et al.* Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation[J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 234-240.
- [27] Hu N, Tu X R, Li K T, *et al.* Changes in antioxidant enzyme activities and malondialdehyde (MDA) content of rice with blast resistance induced by Ag-antibiotic 702[J]. *Plant Diseases and Pests*, 2017, 8(2): 34-38.
- [28] Jash C, Kumar G S. Binding of alkaloids berberine, palmatine and coralyne to lysozyme: a combined structural and thermodynamic study[J]. *RSC Advances*, 2014, 4(24): 12514-12525.
- [29] Han F L, Qi C L, Lin Z D, *et al.* Improvement of dietary N-acetylcysteine on growth inhibition and intestinal damage induced by β -conglycinin in juvenile Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*)[J]. *Aquaculture*, 2020, 514: 734504.
- [30] Adeyemi J A. Oxidative stress and antioxidant enzymes activities in the African catfish, *Clarias gariepinus*, experimentally challenged with *Escherichia coli* and *Vibrio fischeri*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40(2): 347-354.
- [31] Hong Y H, Yang X Z, Yan G W, *et al.* Effects of glyphosate on immune responses and haemocyte DNA damage of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 71: 19-27.
- [32] Zhao Y C, Ma H M, Zhang W B, *et al.* Effects of dietary β -glucan on the growth, immune responses and resistance of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* against *Vibrio splendidus* infection[J]. *Aquaculture*, 2011, 315(3-4): 269-274.
- [33] Coates C J, Kelly S M, Nairn J. Possible role of phosphatidylserine-hemocyanin interaction in the innate immune response of *Limulus polyphemus*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(2): 155-163.
- [34] Pan D, He N H, Yang Z Y, *et al.* Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2005, 29(2): 103-112.

Effect of ROS mediated regulation by exogenous factors on hemopoietic lymphocytes parameters of *Tachypleus tridentatus*

XU Zhen^{1,2}, JIANG Ningjin^{1,2}, HE Jinfeng³, TAI Zongguang⁴,
ZHU Quangang⁴, WANG Youji^{1,2}, HU Menghong^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Beihai Product Quality Testing Institute, Beihai 536000, China;

4. Shanghai Skin Disease Hospital, Shanghai 200443, China)

Abstract: The population size of horseshoe crab is decreasing year by year in China. In order to achieve the protection and sustainable utilization of horseshoe crab resources, it is urgent to study the hematopoietic mechanism of the horseshoe crab, and to make the rapid recovery of hemopoietic lymphocytes from the horseshoe crab. Therefore, strengthening the recovery of horseshoe crabs blood lymphocytes is expected to reduce the loss of horseshoe crabs wild resources. In this study, N-acetylcysteine (NAC) and *Vibrio anguillarum* (V) were injected into horseshoe crab to compare the changes of reactive oxygen content and non-specific immuno enzyme activity in total lymphocytes of Chinese horseshoe crab at 0, 6, 12, 24, 48 hours after injection. The results showed that compared with the control group, the total hemocyte counts (THC), reactive oxygen species (ROS), malonyldialdehyde (MDA) of horseshoe crabs after NAC injection showed downward trends, while the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), total antioxidant capacity (T-AOC), lysozyme (LZM), and alkaline phosphatase (AKP) showed upward trends. Under the stimulation of NAC and *V. anguillarum* at different concentrations, the decrease trend of THC, ROS, MDA in horseshoe crab was slowed down compared with single injection of NAC, while the activities of other enzymes were increased. However, HC showed no significant change during the whole experiment. At 6-48 hours, THC, ROS in the NAC group showed a decreasing trend compared with the *V. anguillarum* group and Co-stimulation groups between NAC and *V. anguillarum*, the SOD activity of NAC and *V. anguillarum* was significantly higher than other groups. At 48 hours, CAT, T-AOC showed no significant difference at the NAC group, *V. anguillarum* group and co-stimulation groups, but both of them were significantly higher than the control group. The NAC+10⁶V group had the lowest MDA in 48 hours. The activity of AKP increased from 12 to 48 hours, and the activity of LZM in NAC group was the highest at 48 hours. There is a negative correlation between THC, ROS, MDA, HC and SOD, CAT, T-AOC, LZM, AKP. NAC can lower the value of horseshoe crab THC, ROS, NAC and co-stimulation with the *V. anguillarum* can mitigate the decline. However, the above results showed that inactivated *V. anguillarum* can increase THC, ROS of horseshoe crab, and antioxidant and immunoenzyme activities were increased in all treatment groups. Therefore, it can be concluded that NAC can reduce THC, ROS of horseshoe crab and co-stimulation of N-acetylcysteine with *V. anguillarum* can alleviate the decreasing trend, however, inactivated *V. anguillarum* could increase THC, ROS of horseshoe crab, and the activity of antioxidant and immunoenzyme was increased in all treatment groups. This indicated that when NAC reduced ROS content in horseshoe crab, hemolytic cells in the body also decreased, while NAC combined with *V. anguillarum* inactivated, ROS, THC decreased less than the NAC group. It can be concluded that NAC and *V. anguillarum* can stimulate the immune functions of horseshoe crabs, meanwhile, ROS may play an important role in the proliferation and regeneration of blood lymphocytes of the horseshoe crabs.

Key words: *Tachypleus tridentatus*; N-acetylcysteine; *Vibrio anguillarum*; hemopoietic lymphocytes; blood chemical index

Corresponding author: HU Menghong. E-mail: mhhu@shou.edu.cn

Funding project: 2017 Beihai City 13th Five-Year Plan Marine Economic Innovation and Development Demonstration Project (Bhsfs006)