

高盐胁迫对黄边糙鸟蛤(*Trachycardium flavum*) 呼吸排泄和免疫酶活性的影响*

唐保军^① 邹 雄 尹 飞

(中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090)

摘要 为了探讨急性高盐胁迫对黄边糙鸟蛤(*Trachycardium flavum*)生理代谢和免疫酶活性的影响,分析了盐度自 31 骤升至 37 后 2、12、24、48 和 72 h 黄边糙鸟蛤耗氧率、排氨率和不同组织 Na^+/K^+ -ATP 酶、超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)的活性。结果显示,处理后 2 h 耗氧率先降低,然后逐渐升高,在 24 和 72 h 显著高于对照组($P<0.05$);排氨率在 2 h 极显著降低($P<0.01$),且在各时间点均低于对照组。外套膜、肝胰腺中 Na^+/K^+ -ATP 酶活力在 12 h 显著降低($P<0.05$),肌肉和鳃中活力与对照组无显著差异。外套膜、肝胰腺和鳃中 SOD 活力在 24 h 达到最高值,显著高于对照组($P<0.05$),其后逐渐降低;肌肉中 SOD 活力在 48 h 达到最高值后降低。外套膜和鳃中 ACP 活力先升高后降低,肝胰腺中 ACP 活力显著降低($P<0.05$)后逐渐升高,肌肉中 ACP 活力与对照组无显著差异。肝胰腺和鳃中 ALP 活力先降低后显著升高($P<0.05$),与对照组相比,外套膜和肌肉中 ALP 活力无显著差异。结果表明,急性高盐胁迫对黄边糙鸟蛤的代谢水平和免疫酶活性均有显著影响且表现出时间效应性,高盐胁迫对免疫酶活性的影响具有组织特异性。

关键词 黄边糙鸟蛤;高盐胁迫;耗氧率;排氨率; Na^+/K^+ -ATP 酶;免疫酶活性

中图分类号 S944.4 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2017)02-0143-08

盐度是决定海洋生物分布并影响其生长、存活的重要环境因子。沿海近岸地区,尤其是河口附近,因为潮汐、降雨、高温干旱或人类活动等影响,经常发生不同程度的海水盐度波动。目前,大多数海洋经济贝类分布或养殖于潮间带、滩涂或河口地区,盐度变化可能会对贝类造成不同程度的胁迫(Gagnaire *et al.*, 2006; Carregosa *et al.*, 2014)。

盐度胁迫会影响贝类的免疫功能,增加贝类感染疾病的风险。Reid 等(2003)研究发现,菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)血细胞 THC 随盐度升高而升高。高盐胁迫下,鸡帘蛤(*Chamelea gallina*)的细胞

吞噬活性降低(Matozzo *et al.*, 2007)。随盐度上升,牡蛎(*Crassostrea virginica*)对寄生虫 *Perkinsus marinus* 和 *Haplosporidium nelsoni* 的感染率和死亡率也上升(Ford *et al.*, 1988; Chu *et al.*, 1993)。盐度胁迫还会影响海水贝类的呼吸、摄食以及生长(Navarro *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2005),贝类需要调整生理活动以适应盐度的改变。研究表明,免疫反应需要消耗能量,免疫功能的变化也会导致机体能量代谢的改变(Roch, 1999; Rolff *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012)。因此,生理代谢变化可以在一定程度上反应海水贝类所受到的胁迫。

在复杂多变的近海环境中,贝类进化产生了独特

*“十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD13B0903)和中国水产科学研究院基本科研业务费(2016HY-ZD0102)共同资助 [This work was supported by National Key Technology Support Program (2011BAD13B0903), Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2016HY-ZD0102)].

① 通讯作者:唐保军,副研究员, E-mail: bjtang@yeah.net

收稿日期: 2015-12-09, 收修改稿日期: 2016-01-18

的逆境适应机制(Zhang *et al.*, 2012), 了解这些机制对于海水贝类资源保护、新品种选育具有重要意义。黄边糙鸟蛤(*Trachycardium flavum*)分布于我国广东、广西和海南潮间带, 是一种重要的经济贝类(唐保军等, 2010)。受海表蒸发等因素影响, 广东、海南沿海海水盐度会出现异常升高, 有时达 34 以上(叶龙飞, 1988; 袁淑尧等, 1998), 此时, 黄边糙鸟蛤会遭遇高盐胁迫。本研究通过测定高盐胁迫下代谢率和免疫相关酶活性的变化, 探讨黄边糙鸟蛤的盐度胁迫适应机制, 为该贝类的养殖和资源保护提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

黄边糙鸟蛤采自海南文昌沿海, 取回实验室后挑选大小一致的个体[壳高为(50.35±2.64) mm, 体重为(46.51±6.91) g], 清除表面附着物后放入 2000 L 玻璃钢桶暂养 14 d, 桶底铺 10 cm 厚细砂, 暂养期间, 海水盐度为 31.0±0.5, 通过室内空调控制水温为(26.0±0.5)°C, 每天换水 1/2, 早晚各投喂 1 次小球藻(*Chlorella pyrenoidsa*)和金藻(*Isochrysis galbana*)的混合藻液。

1.2 盐度处理

取暂养的黄边糙鸟蛤 150 只, 平均分为 2 组, 一组仍在盐度为 31 的海水中作为对照, 另外一组直接转入盐度为 37 的海水中。将海水晶溶于水配制成高浓度盐水, 经脱脂棉过滤后调节海水盐度至 37, 盐度用比重计和温度计测定。实验持续 72 h, 期间每天换水 1/2。于实验开始后 2、12、24、48 和 72 h 测定耗氧率和排氨率。每个时间点取 3 只黄边糙鸟蛤, 分别取肝胰腺、鳃、外套膜和斧足肌肉样品, 于-80°C 保存, 用于组织酶活分析。

1.3 耗氧率和排氨率的测定

用静水法测定耗氧率和排氨率。每个 1.5 L 塑料呼吸瓶内放 1 只黄边糙鸟蛤, 虹吸式注入实验用水后密封, 26°C 水浴, 每个时间点分别设 3 个平行和 1 个空白对照。因每次实验持续 2 h, 故测得的耗氧率和排氨率分别为处理后 1-3、11-13、23-25、47-49 和 71-73 h 内的均值。实验结束后用虹吸法取水样分析, 解剖实验用蛤, 取软体部于 65°C 烘干 24 h, 称量组织干重。

(1) 采用 Winkler 法(Stickland *et al.*, 1968)测定水中的溶解氧含量, 根据下式计算耗氧率:

$$R = V \times (O_0 - O_t) / (W \times t)$$

式中, R 为单位体重耗氧率, O_0 和 O_t 分别为实验结束时空白对照组和实验组水中的溶解氧浓度(mg/L), V 为呼吸瓶体积(L), W 为蛤组织干重(g), t 为实验持续时间(h)。

(2) 采用次溴酸盐氧化法(Solorzano, 1969)测定水中的氨氮含量, 根据下式计算排氨率:

$$E = V \times (N_t - N_0) / (W \times t)$$

式中, E 为单位体重排氨率, N_0 和 N_t 分别为实验结束时空白对照组和实验组水中的氨氮浓度($\mu\text{g/L}$), V 为呼吸瓶体积(L), W 为蛤组织干重(g), t 为实验持续时间(h)。

1.4 酶活测定

1.4.1 样品制备 各组织样品于 4°C 解冻后, 分别按质量体积比加入 9 倍预冷的生理盐水(150 mmol/L NaCl, pH=7.4)匀浆。制备好的匀浆液以 2500 r/min、4°C 离心 15 min, 取上清液用于酶活分析。

1.4.2 酶活力测定 分析测定上清液中 Na^+/K^+ -ATP 酶、超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP)的活力, 各酶活力均采用试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定, 具体测定方法按照试剂盒说明书进行。采用考马斯亮蓝法测定上清液蛋白浓度。 Na^+/K^+ -ATP 酶活力定义为每小时每毫克组织蛋白中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷(Pi)的量为 1 个活力单位。SOD 活力定义为每毫克组织蛋白在 1 ml 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为 1 个活力单位。ACP 活力定义为 30 min 内产生 1 mg *p*-硝基酚为 1 个活力单位。ALP 活力定义为 15 min 内产生 1 mg *p*-硝基酚为 1 个活力单位。

1.5 数据处理

实验数据采用平均值±标准差(Mean±SD)表示。采用 SPSS 11.5 统计软件对数据进行独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 高盐胁迫对呼吸排泄的影响

盐度 37 处理后 2 h, 黄边糙鸟蛤的耗氧率低于对照组, 其后逐渐上升, 至 48 h 达到最大值(图 1), 在 24 和 72 h 显著高于对照组($P < 0.05$)。处理组黄边糙鸟蛤 2 h 时耗氧率显著低于 24、48 和 72 h 时的耗氧率($P < 0.05$)。排氨率在处理后 2 h 极显著低于对照组($P < 0.01$), 其后逐渐升高。处理组 2 h 的排氨率显著高于其他时间点($P < 0.05$)。

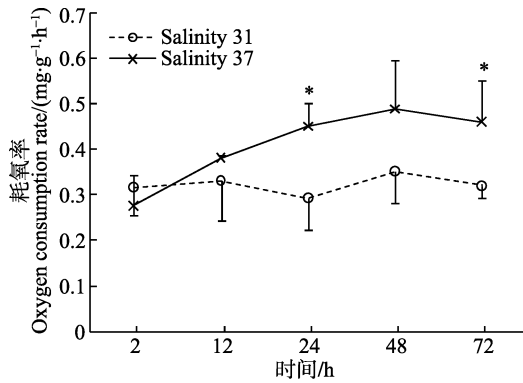


图 1 高盐胁迫下黄边糙鸟蛤耗氧率变化

Fig.1 Variation of oxygen consumption rate of *T. flavum* under hypersaline stress

*表示对照组与处理组有显著差异, 下同

* indicated significant difference between the control and treatment, the same as below

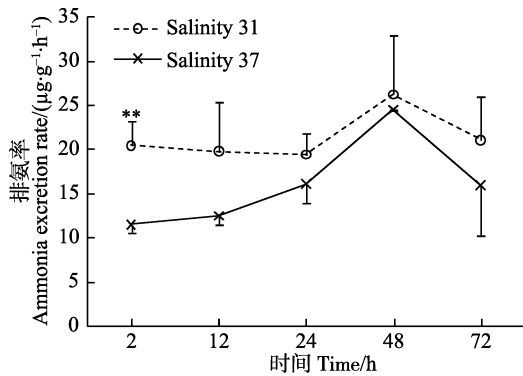


图 2 高盐胁迫下黄边糙鸟蛤排氨率变化

Fig.2 Variation of ammonia excretion rate of *T. flavum* under hypersaline stress

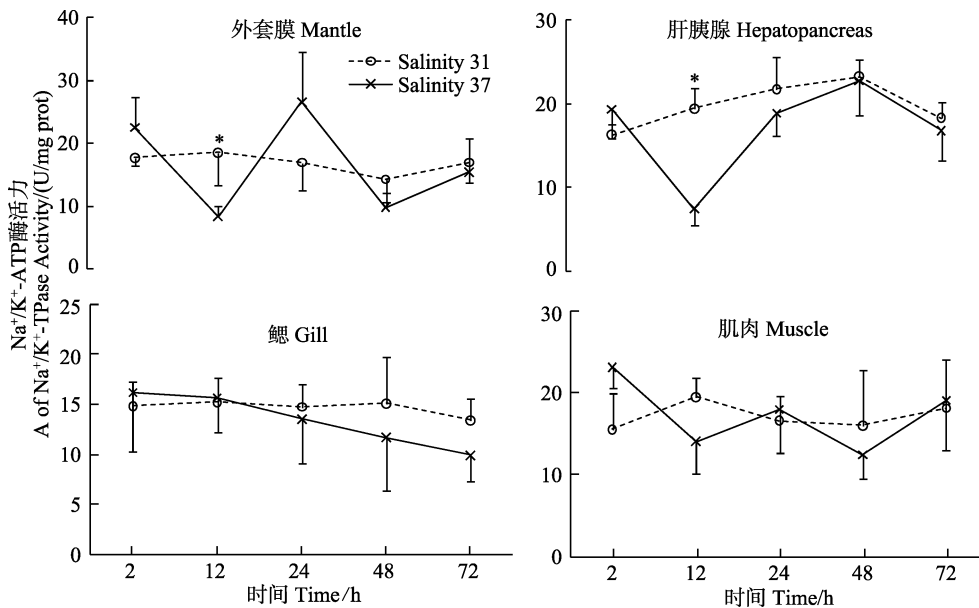


图 3 高盐胁迫下黄边糙鸟蛤不同组织 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力变化

Fig.3 Variation of Na⁺/K⁺-ATPase activity in different tissues of *T. flavum* under hypersaline stress

2.2 高盐胁迫对 Na⁺/K⁺-ATP 酶活性的影响

由图 3 可知, 盐度 37 处理后 2 h, 外套膜、肝胰腺中 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力在 12 h 显著低于对照组 ($P < 0.05$), 在其他各时间点与对照组无显著差异。肌肉和鳃中 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力与对照组无显著差异。盐度胁迫后, 外套膜、肝胰腺和肌肉中不同时间点之间 Na⁺/K⁺-ATP 酶活力有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.3 高盐胁迫对免疫相关酶活性的影响

盐度 37 处理后, 各组织中 SOD 活力呈先升高后下降的趋势(图 4)。处理后 2 h, 与对照组相比, 各组织中 SOD 活力下降, 其后逐渐升高; 24 h, 肝胰腺中 SOD 活力极显著高于对照组 ($P < 0.01$); 至 72 h, 各组织中 SOD 活力降至对照组水平。盐度处理后, 各组织中不同时间点之间 SOD 活力存在显著差异 ($P < 0.05$)。

高盐度胁迫下, 黄边糙鸟蛤外套膜和鳃中 ACP 活力呈先升高后降低的趋势, 在 24 h 显著高于对照组 ($P < 0.05$), 在 48 和 72 h 下降(图 5)。肝胰腺中 ACP 活力在 12 h 显著低于对照组 ($P < 0.05$), 随后逐渐升高, 在 72 h 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 肌肉中 ACP 活力无显著差异。肝胰腺中 ACP 活力显著高于其他各组织 ($P < 0.01$)。高盐胁迫下, 各组织中不同时间点之间 ACP 活力出现显著变化 ($P < 0.05$)。

盐度 37 处理后, 与对照组相比, 黄边糙鸟蛤外套膜和肌肉中 ALP 活力无显著差异(图 6)。鳃中 ALP 活力在 2 h 和 12 h 极显著低于对照组 ($P < 0.01$), 其后

升高, 在 48 h 显著高于对照组($P<0.01$)。肝胰腺中 ALP 活力变化趋势与鳃相似, 在 24 h 和 72 h 显著高于对照组($P<0.05$)。肝胰腺中 ALP 活力显著高于其他各组织($P<0.01$)。盐度处理后, 各组织中不同时间点之间 ALP 活力出现显著变化($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 代谢率

当外界盐度发生突然改变时, 海水贝类通过关闭贝壳保护内部组织免受伤害(Pierce, 1971)。Brown 等(1981)报道, *Bullia digitalis* 在盐度升高或降低时会关

闭水管。本研究中, 盐度处理初期, 黄边糙鸟蛤贝壳开放程度明显降低, 这可能是导致 2 h 耗氧率下降的原因。盐度胁迫条件下, 呼吸率的降低也是贝类在不利环境中保存能量的一种方式(Brown *et al*, 1990)。为了维持内环境的稳定, 当环境改变时, 海水无脊椎动物会进行生理补偿(Bayne, 1973、1998; McMahon *et al*, 1991)。补偿后, 如果新的稳定态与环境改变之前一致, 说明补偿是完全的; 如果新的稳定态与之前的不一致, 说明补偿不完全, 仍然存在环境胁迫(Bayne, 1973)。本研究中, 耗氧率 12 h 后逐渐升高, 可能是贝类对盐度改变的生理补偿所致。唐保军等(2010)的研究中, 盐度缓慢升至 36、40 并暂养 7 d 后, 黄边

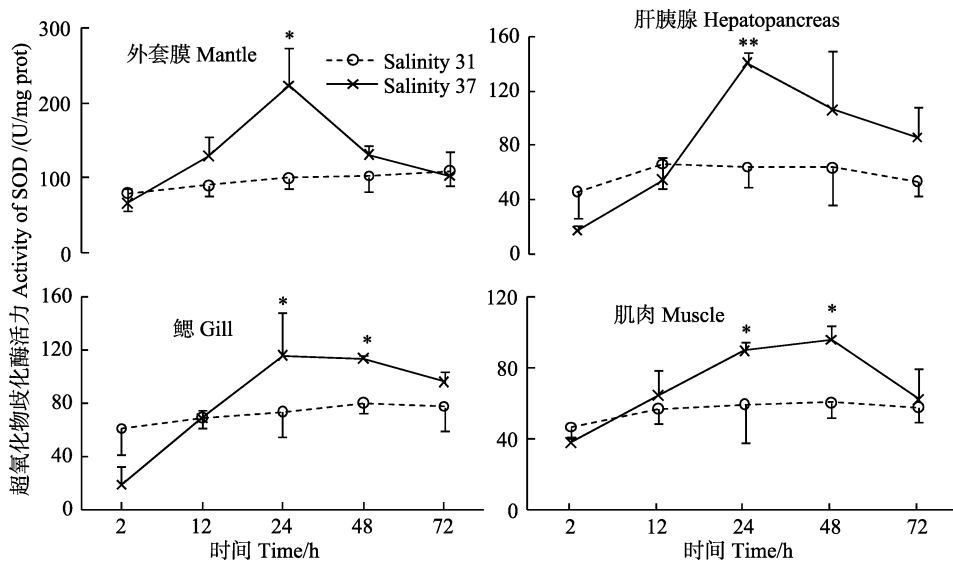


图 4 高盐胁迫下黄边糙鸟蛤不同组织超氧化物歧化酶活力变化
Fig.4 Variation of SOD activity in different tissues of *T. flavum* under hypersaline stress

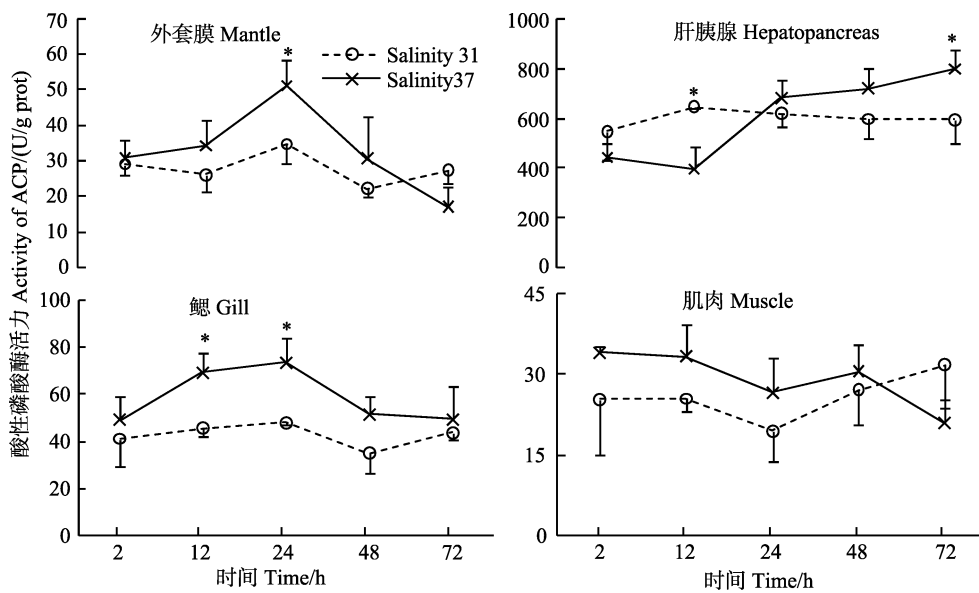


图 5 高盐胁迫下黄边糙鸟蛤不同组织酸性磷酸酶活力变化
Fig.5 Variation of ACP activity in different tissues of *T. flavum* under hypersaline stress

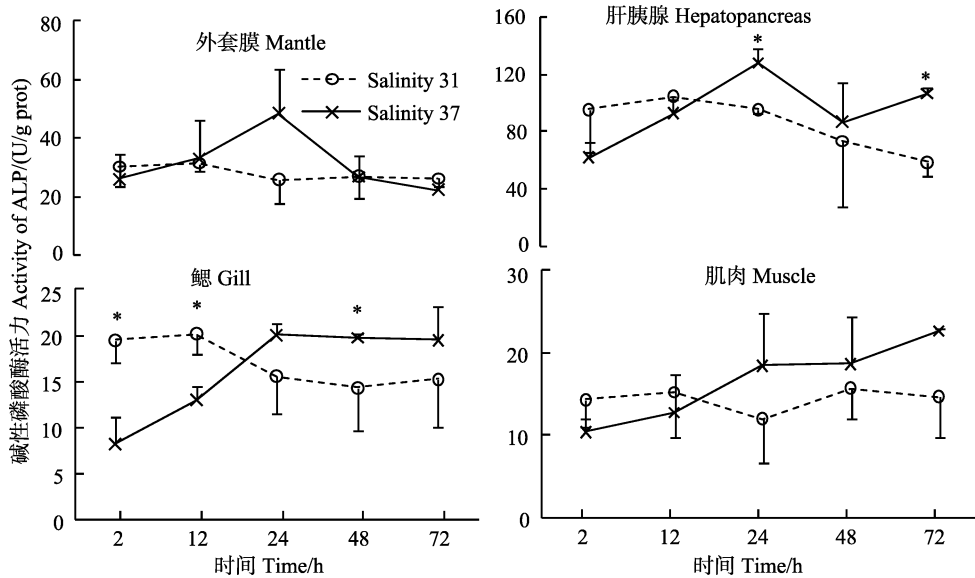


图 6 高盐胁迫下黄边糙鸟蛤不同组织碱性磷酸酶活力变化

Fig.6 Variation of ALP activity in different tissues of *T. flavum* under hypersaline stress

糙鸟蛤耗氧率与对照组(盐度 32)无显著差异,表明达到完全补偿需要的时间与盐度胁迫程度有关,具体机制需要进一步研究。

作为主要的氮代谢终产物,氨离子参与海水动物渗透调节(Silvia *et al.*, 2004)。本研究中,高盐度处理后,排氨率下降,这与之前慢性盐度胁迫下的研究报道一致(唐保军等, 2010)。其他贝类中也有类似报道:织纹螺(*Nassarius festivus*)从盐度 25 转入 30、35 后 72 h,排氨率下降(Cheung, 1997)。在高盐度胁迫下,双壳贝类组织细胞体积缩小并快速合成游离氨基酸,以应对高渗透压(Baginski *et al.*, 1977),首先合成丙氨酸,其后为甘氨酸、牛磺酸等(Baginski *et al.*, 1977; Henry *et al.*, 1980; Deaton *et al.*, 1985)。丙氨酸的合成需要将游离铵离子固定转化为丙酮酸酯或 2-酮戊二酸,游离铵离子来自尿酸代谢、蛋白降解以及代谢氨等(Zurburg *et al.*, 1981)。本研究中,在 2 h,排氨率显著低于对照组,可能因为黄边糙鸟蛤通过对代谢氨氮的重新利用以应对高渗透胁迫;随着内环境逐渐达到新的平衡状态,排氨率也逐渐上升;至 72 h 排氨率又下降,表明机体尚未达到稳定态。对照组黄边糙鸟蛤的排氨率在 48 h 出现上升,可能为个体差异所致,多重比较显示,各时间点之间排氨率无显著差异。

Na^+/K^+ -ATP 酶对维持细胞中 Na^+ 、 K^+ 稳态发挥着重要作用,可有效调节和维持机体渗透压(Cheng *et al.*, 2002; 沈永龙等, 2013)。本研究中,外套膜、肝胰腺中 Na^+/K^+ -ATP 酶活力在 12 h 显著低于对照组,表明 Na^+/K^+ -ATP 酶参与黄边糙鸟蛤渗透稳态(Osmolality homeostasis)调节。高盐度下 Na^+/K^+ -ATP 酶活力降低

的现象在其他贝类中也有报道。盐度自 23 骤升至 26 后,青蛤(*Cyclina sinensis*)鳃中 Na^+/K^+ -ATP 酶活力下降,在第 15 天达到最小值后逐渐回升趋于平稳,但仍低于初始值(林昕昕等, 2012)。盐度自 30 升至 35、40 后,魁蚶(*Anadara broughtonii*)稚贝鳃中 Na^+/K^+ -ATP 酶活力下降,分别在 24 h 和 12 h 出现最小值后回升,但均低于对照组(蔡星媛等, 2015)。

3.2 免疫酶活性变化

环境突然变化会影响海水无脊椎动物的免疫功能,激活机体的 NADPH 氧化酶系统,导致耗氧率上升(呼吸暴发),产生大量活性氧(ROS)。活性氧能够杀伤异物,但也会损害机体的膜组织、DNA 和酶等(Roch, 1999; Finkel *et al.*, 2000)。SOD 是机体抗氧化防御系统的重要组成部分,可清除体内活性氧自由基(Hermes-Lima *et al.*, 1998)。Monari 等(2007)报道,盐度自 34 升至 40 后,鸡帘蛤血清中 Cu/Zn-SOD 活力升高。将仿刺参(*Apostichopus japonicas*)自盐度 30 转入盐度 35 海水中,其体腔液中 SOD 活力在 3 h 极显著升高($P < 0.01$),其后下降至对照组水平(Wang *et al.*, 2008)。本研究中,各组织中 SOD 活力均呈现“先降低再回升,然后下降”的变化规律,说明胁迫初期黄边糙鸟蛤体内自由基浓度降低,进而黄边糙鸟蛤产生应激反应,体内生成大量自由基, SOD 等抗氧化酶被诱导激活以清除过多的自由基。

ACP 和 ALP 是重要的水解酶,具有促进血细胞吞噬、清除异物的作用(Cheng, 1978)。本研究中,胁迫初期黄边糙鸟蛤肝胰腺、鳃中 ACP 和 ALP 活力先降低,

表明高盐度胁迫影响了黄边糙鸟蛤的免疫酶活性。这与盐度骤升后近江牡蛎(*C. hongkongensis*)血淋巴 ALP 活力的变化一致(时少坤等, 2013)。酸性磷酸酶还是检测溶酶体的标志酶(Cajaraville *et al*, 2000), ACP 活力的变化, 表明高盐度胁迫影响了溶酶体的稳定性。

本研究还发现, 黄边糙鸟蛤的免疫反应具有组织特异性。对照组黄边糙鸟蛤外套膜 SOD 活力显著高于其他组织($P<0.05$), 肝胰腺中 ACP 和 ALP 活力显著高于其他组织($P<0.05$)。这种组织差异性在其他贝类中也有报道。紫贻贝(*Mytilus edulis*)鳃中 SOD 活力较高(Manduzio *et al*, 2004), 而褐贻贝(*Perna perna*)鳃和肝胰腺中 SOD 活力相当(Almeida *et al*, 2005)。浅沟蛤(*Scrobicularia plana*)肝胰腺中 ACP 和 ALP 活力较高, 其次为鳃、足、水管和外套膜(Mazorra *et al*, 2002)。这种组织差异性可能与蛋白的合成、转运有关, 具体的机制需要借助免疫细胞化学、原位杂交等技术进一步开展研究。

参 考 文 献

- Almeida EA, Bainy ACD, Dafre AL, *et al*. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 318(1): 21–30
- Baginski RM, Pierce SK. The time course of intracellular free amino acid accumulation in tissues of *Modiolus demissus* during high salinity adaptations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1977, 57(4): 407–412
- Bayne BL. The physiology of suspension feeding by bivalve molluscs: An introduction to the Plymouth “TROPHEE” workshop. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1998, 219(1): 1–19
- Bayne BL. The responses of three species of bivalve mollusc to declining oxygen tension at reduced salinity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*, 1973, 45(3): 793–806
- Brown AC, McLachlan A. *Ecology of sandy shores*. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, 1990
- Brown AC, Meredith FL. The effects of salinity changes on respiration in the sandy-beach whelk *Bullia digitalis* (Dillwyn). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*, 1981, 69(3): 599–601
- Cai XY, Zhang XM, Tian L, *et al*. Effect of salinity stress on hemolymph osmolality and gill Na^+/K^+ -ATPase activity of juvenile ark shell (*Anadara broughtonii*). *South China Fisheries Science*, 2015, 11(2): 12–19 [蔡星媛, 张秀梅, 田璐, 等. 盐度胁迫对魁蚶稚贝血淋巴渗透压及鳃 Na^+/K^+ -ATP 酶活性的影响. *南方水产科学*, 2015, 11(2): 12–19]
- Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J, *et al*. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. *Science of the Total Environment*, 2000, 247(2): 295–311
- Carregosa V, Figueira E, Gil AM. Tolerance of *Venerupis philippinarum* to salinity: Osmotic and metabolic aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2014, 171(3): 36–43
- Cheng TC. The role of lysosomal hydrolases in molluscan cellular response to immunologic challenge. *Invertebrate Models for Biomedical Research*. Springer US, 1978, 59–71
- Cheng W, Yeh SP, Wang CS, *et al*. Osmotic and ionic changes in Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* at different salinity levels. *Aquaculture*, 2002, 203(3): 349–357
- Cheung SG. Physiological and behavioural responses of the intertidal scavenging gastropod *Nassarius festivus* to salinity changes. *Marine Biology*, 1997, 129(2): 301–307
- Chu FLE, La Peyre JF, Burrenson CS. *Perkinsus marinus* infection and potential defense-related activities in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: Salinity effects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1993, 62(3): 226–232
- Deaton LE, Hilbish TJ, Koehn RK. Hyper-osmotic volume regulation in the tissues of the mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*, 1985, 80(4): 571–574
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000, 408(6809): 239–247
- Ford SE, Haskin HH. Comparison of *in vitro* salinity tolerance of the oyster parasite, *Haplosporidium nelsoni* (MSX) and hemocytes from the host, *Crassostrea virginica*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*, 1988, 90(1): 183–187
- Gagnaire B, Frouin H, Moreau K, *et al*. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish and Shellfish Immunology*, 2006, 20(4): 536–547
- Henry RP, Mangum CP, Webb KL. Salt and water balance in the oligohaline clam, *Rangia cuneata* II. Accumulation of intracellular free amino acids during high salinity adaptation. *Journal of Experimental Zoology*, 1980, 211(1): 11–24
- Hermes-Lima M, Storey JM, Storey KB. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 120(3): 437–448
- Lin TT, Lai QF, Lu JX, *et al*. Effects of abrupt variations in salinity on the Na^+/K^+ -ATPase activity in gills of *Cyclina sinensis*. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2012, 32(1): 54–58 [林听听, 来琦芳, 陆建学, 等. 盐度突变对青蛤(*Cyclina sinensis*)鳃 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响. *广东海洋大学学报*, 2012, 32(1): 54–58]
- Manduzio H, Monsinjon T, Galap C, *et al*. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis*

- collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquatic Toxicology*, 2004, 70(1): 83–93
- Matozzo V, Monari M, Foschi J. Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina*. Part I. alterations in immune responses. *Marine Biology*, 2007, 151(3): 1051–1058
- Mazorra MT, Rubio JA, Blasco J. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 131(2): 241–249
- McMahon BR, Burggren WW, Pinder AW, *et al.* Air exposure and physiological compensation in a tropical intertidal chiton, *Chiton stokesii* (Mollusca: Polyplacophora). *Physiological Zoology*, 1991, 64(3): 728–747
- Monari M, Serrazanetti GP, Foschi J, *et al.* Effects of salinity on the clam *Chamelea gallina* haemocytes. Part II: Superoxide dismutase response. *Marine Biology*, 2007, 151(3): 1059–1068
- Nakamura Y, Hashizume K, Koyama K. Effects of salinity on sand burrowing activity, feeding and growth of the clams *Macra veneriformis*, *Ruditapes philippinarum* and *Meretrix lusoria*. *Journal of Shellfish Research*, 2005, 24(4): 1053–1059
- Navarro JM, Gonzalez CM. Physiological responses of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* to decreasing salinities. *Aquaculture*, 1998, 167(3): 315–327
- Pierce SK. Volume regulation and valve movements by marine mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology*, 1971, 39(1): 103–117
- Reid HI, Soudant P, Lambert C. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 56(3): 249–258
- Roch P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 1999, 172(1): 125–145
- Rolff J, Siva-Jothy M. Invertebrate ecological immunology. *Science*, 2003, 301(5632): 472–475
- Shen YL, Ge XP, Huang JT, *et al.* Effects of salinity on Na^+/K^+ -ATPase activity, the osmolality of pericardial cavity fluid and peritoneal fluid and ion content in *Onchidium struma*. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(6): 851–857 [沈永龙, 戈贤平, 黄金田, 等. 盐度对瘤背石磺不同部位 Na^+/K^+ -ATP 酶活性、围心腔液和腹腔液渗透压及离子含量的影响. *水产学报*, 2013, 37(6): 851–857]
- Shi SK, Wang RX, Wang JY, *et al.* Effects of salinity stress on immune factors of *Crassostrea hongkongensis*. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(3): 26–30 [时少坤, 王瑞璇, 王江勇, 等. 盐度胁迫对近江牡蛎几种免疫因子的影响. *南方水产科学*, 2013, 9(3): 26–30]
- Silvia GJ, Antonio URA, Francisco VO, *et al.* Ammonia efflux rates and free amino acid levels in *Litopenaeus vannamei* postlarvae during sudden salinity changes. *Aquaculture*, 2004, 233(1): 573–581
- Solorzano L. Determination of ammonia in natural waters by the phenylhypochlorite method. *Limnology and Oceanography*, 1969, 14: 799–801
- Stickland JDH, Parsons TR. A practical handbook of seawater analysis. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada*, 1968, 67: 1–11
- Tang BJ, Yan WG, Wang H, *et al.* Effects of salinity on oxygen consumption and ammonia-N excretion rate of different-size of *Trachycardium flavum*. *Marine Fisheries*, 2010, 32(1): 30–34 [唐保军, 闫文罡, 王慧, 等. 盐度对不同规格黄边糙鸟蛤呼吸排泄的影响. *海洋渔业*, 2010, 32(1): 30–34]
- Wang FY, Yang HS, Gao F, *et al.* Effects of acute temperature or salinity stress on the immune response in sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2008, 151(4): 491–498
- Wang XQ, Wang LL, Zhang H, *et al.* Immune response and energy metabolism of *Chlamys farreri* under *Vibrio anguillarum* challenge and high temperature exposure. *Fish and Shellfish Immunology*, 2012, 33(4): 1016–1026
- Ye LF. Standing tidal waves and salinity mixing in the Qinglan Estuary, Hainan Island. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1988(3): 9–14 [叶龙飞. 海南岛清澜河口的驻波型潮波和盐度混和. *海洋湖沼通报*, 1988(3): 9–14]
- Yuan SY, Deng JZ. Temperature and salinity thermal structures in the northern South China Sea—III. spatial and temporal salinity distribution characteristics in the northern South China Sea. *South China Sea Research and Development*, 1998(2): 28–36 [袁淑尧, 邓九仔. 南海北部的温盐热结构——III. 南海北部盐度时空分布特征. *南海研究与开发*, 1998(2): 28–36]
- Zhang GF, Fang XD, Guo XM, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 2012, 490(7418): 49–54
- Zurburg W, De Zwaan A. The role of amino acids in anaerobiosis and osmoregulation in bivalves. *Journal of Experimental Zoology*, 1981, 215(3): 315–325

Effects of Acute Hyperosmotic Stress on Metabolic Rates and Immune-Related Enzymatic Activities in Clam (*Trachycardium flavum*)

TANG Baojun^①, ZOU Xiong, YIN Fei

(East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090)

Abstract To investigate the effects of acute hypersaline stress on the physiological metabolism and immunity of clam *Trachycardium flavum*. The oxygen consumption rate, ammonia excretion rate and activities of Na⁺/K⁺-ATPase, superoxide dismutase (SOD), acid phosphatase (ACP) and alkaline phosphatase (ALP) in different tissues were measured at 2, 12, 24, 48 and 72 h as water salinity increased from 31 to 37. Results showed that the oxygen consumption rate of clams in treatment group decreased at 2 h and then gradually increased, and was significantly higher than the control group at 24 and 72 h ($P < 0.05$). The ammonia excretion rate significantly decreased ($P < 0.01$) at 2 h and was lower than the control group at all time points. At 12 h, the clams showed significant lower Na⁺/K⁺-ATPase activity ($P < 0.05$), but no significant difference of Na⁺/K⁺-ATPase activity in muscle was found between the control and treatment groups. SOD activities in mantle, hepatopancreas and gill reached maximum values at 24 h, which was significantly higher than the control group ($P < 0.05$), and then decreased; SOD activity in muscle reached a peak at 48 h and then declined. ACP activity in mantle and gill showed similar variation as SOD. ACP activity was significantly reduced ($P < 0.05$) and then gradually rose. No significant difference of enzymatic activity in muscle was found between the control and treatment groups. ALP activity in hepatopancreas and gill decreased followed by significant increase ($P < 0.05$). Compared with the control group, no significant difference of enzymatic activity in mantle and muscle was found. The results suggested that acute hypersaline stress significantly affected the metabolism and immunity of *T. flavum*, and such effects varied with time. The impact of hypersaline on the immune enzymatic activities is tissue-specific.

Key words *Trachycardium flavum*; Hyperosmotic stress; Oxygen consumption rate; Ammonia excretion rate; Na⁺/K⁺-ATPase; Immune-related enzymes activity

① Corresponding author: TANG Baojun, E-mail: bjtang@yeah.net