

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20121219001

周作强, 丁晴晴, 刘其根, 等. 缺氧对贝类的胁迫效应及其对免疫系统的影响[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(3): 324-330

Zhou Z Q, Ding Q Q, Liu Q G, et al. Stresses of hypoxia and its effects on immune system of bivalve [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(3): 324-330 (in Chinese)

缺氧对贝类的胁迫效应及其对免疫系统的影响

周作强, 丁晴晴, 刘其根, 王有基, 胡梦红*

上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 基于缺氧对贝类养殖的危害, 从贝类免疫系统角度总结了近年来围绕缺氧胁迫对其细胞免疫和体液免疫系统的相关因子影响的研究。从缺氧对与细胞免疫功能相关的血细胞总数(THC)、吞噬活性和细胞活性氧(ROS)含量, 以及参与体液免疫的溶酶体酶、抗氧化酶、抗氧化因子、酚氧化酶等多种免疫因子的影响, 概括了缺氧对贝类免疫系统影响的一般规律。本文不仅能为衡量贝类所在水域的环境变化提供科学依据, 还能为围绕贝类在缺氧胁迫下生理适应性机制的相关研究奠定基础。

关键词: 缺氧; 贝类; 细胞免疫; 体液免疫

文章编号: 1673-5897(2013)3-324-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Stresses of Hypoxia and Its Effects on Immune System of Bivalve

Zhou Zuoqiang, Ding Qingqing, Liu Qigen, Wang Youji, Hu Menghong*

College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Received 19 December 2012 accepted 20 February 2013

Abstract: Hypoxia is considered to be one of the most important stressors to aquaculture. The recent studies related to the effects of hypoxia on cellular immunity and humoral immunity of bivalve were summarized. Total hemocyte counts (THC), phagocytic activity, cellular reactive oxygen species (ROS), lysosomal enzyme, antioxidant enzyme, antioxidant factors and phenol oxidase enzymes were used to systematically explore the negative physiological responses of bivalves under hypoxia condition from immunology aspect. This paper will provide basic data for monitoring environmental changes of natural habitats of bivalve, and for studying physiological adaptability mechanisms of bivalve to hypoxia.

Keywords: hypoxia; bivalve; cellular immunity; humoral immunity

近年来, 盲目追求高密度养殖使得贝类生存环境恶化, 进而引发扇贝^[1-2]、九孔鲍(*Haliotis diversicolor aquatilis*)^[3]、蛤蜊^[4]和牡蛎^[5]等高死亡率, 从而导致经济贝类产量大幅下降。随着水体富营养化

引发的一系列生态问题的出现, 如有毒水华藻类、水体缺氧等^[6-7], 水体富营养化受到各国学者的广泛关注。其中, 与水体富营养化相伴出现的水体缺氧问题已被证实是导致我国烟台海域扇贝大规模死亡

收稿日期: 2012-12-19 录用日期: 2013-02-20

基金项目: 国家自然科学基金(31202015); 上海海洋大学博士启动基金(B-8812-10-0001-0196); 上海海洋大学2012年度上海大学生创新活动计划项目(B-5106-12-0012)

作者简介: 周作强(1988-), 男, 硕士, 研究方向为贝类生理学, E-mail: zqzhou7015@126.com;

* 通讯作者(Corresponding author) E-mail: mhhu@shou.edu.cn

的主要原因^[8]。Cheng等^[9]的研究也表明,较低溶氧条件(低于 $2.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)会导致九孔鲍大量死亡。

水体溶氧是水生动物的重要限制因子之一^[10],大量研究表明,水体缺氧将影响到贝类的行为^[11]、耗氧率^[12-13]、新陈代谢^[14-15]、存活率^[16-17]和生长^[18],以及贝类的免疫应答^[9]等诸多方面。长时间暴露在缺氧环境中将对贝类免疫系统及抗病能力造成严重损害,甚至导致贝类死亡^[9,19-20]。

贝类属于无脊椎动物,其体内不具备特异性免疫系统,没有特异性免疫淋巴细胞、抗体、免疫球蛋白,也没有二次免疫过程,仅具有血细胞介导的较为完善的非特异免疫系统^[21]。然而贝类可以通过一些异于脊椎动物的独特免疫机制来抵抗外界病原体的侵入,同时能够进行异己物质的识别^[22-23],贝类的这种免疫机制可以分为细胞免疫与体液免疫。本文概括了国内外有关缺氧胁迫对贝类免疫系统影响及其机理的研究进展,将为贝类养殖学以及病害学领域的深入研究提供基础理论依据。

1 缺氧对贝类细胞免疫的影响

1.1 缺氧对血细胞总数(THC)的影响

贝类血细胞涉及到吞噬作用、呼吸爆发、包裹作用、炎症反应以及伤口愈合等一系列免疫防御反应^[24]。因此,血细胞在缺乏特异性免疫以及免疫记忆功能的双壳贝类防御系统中的作用至关重要^[25-26]。病毒、污染物以及环境等胁迫因子不仅影响循环血细胞的数量,还影响其活力。当然,循环血细胞和非循环血细胞处于一个动态平衡中,循环血细胞的数量受血细胞在血淋巴与组织间的迁移以及细胞裂解或增值的双重影响^[27]。

大量研究证实,贝类THC与水体溶氧浓度正相关。Chen等^[28]的研究证实,栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)THC会随溶氧浓度的降低而逐渐减少,并且在溶氧降至 $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时下降46%,显著低于对照组。同样,在 $2.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶氧条件下暴露24h,九孔鲍THC下降27%^[9]。Yu等^[19]的研究也表明,缺氧会导致四角蛤蜊(*M. veneriformis*)THC水平的下降。Wang等^[29]的研究证实,在3种不同盐度条件下缺氧组($1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)翡翠贻贝(*Perna viridis*)血淋巴中的THC始终低于正常溶氧组($6.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),该实验中THC的异变除以上所提到的血细胞溶解或扩散外,还可能与盐度导致血淋巴中自由水的渗透有关。THC的下降势必导致免疫功能退化^[26]。血淋巴中THC的下降可能是血细胞快速向外周组织扩散所

致,例如贝类在产卵期间会出现大量血细胞向生殖腺迁移现象^[30-32]。现有的研究还不能确定缺氧是否会刺激血细胞的外渗。缺氧导致的THC减少是由血细胞裂解还是血细胞迁移引起还需深入研究。

Matozooa等^[30]指出,缺氧胁迫会导致鸡帘蛤(*Chamelea gallina*)的THC降低,但暴露于缺氧条件下24h的处理组经过24h的正常溶氧处理后,其THC可恢复到正常水平;而暴露于缺氧条件下48h的处理组经过24h的正常溶氧处理后,其THC仍显著低于正常水平。空气暴露(缺氧)被证实会导致四角蛤蜊THC显著下降,24h空气暴露(由于贝类只能利用溶解于水中的氧气,因此空气暴露则表示处在一种完全无氧的状态)处理组在放回正常溶氧的海水24h后,THC能完全恢复。但是48h缺氧处理组在24h复氧条件下暴露,THC只能得到部分恢复^[19]。类似的情况也在鸡帘蛤^[33]和翡翠贻贝^[29,34]的实验中出现。可见短时间的空气暴露导致贝类THC的下降具有可恢复性,而随着暴露时间的延长(如超过48h)这种可恢复性会逐渐减弱,甚至出现死亡现象。

1.2 缺氧对吞噬作用的影响

贝类的细胞免疫主要通过吞噬作用完成,吞噬作用在控制和杀灭入侵异物上起到了关键作用^[27,35-36]。血细胞吞噬作用过程主要包括:识别趋化、粘附、内吞和杀灭消化4个阶段。研究表明,在 $2.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶氧条件下暴露24h以及 $3.57\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶氧条件下处理12h均会导致九孔鲍吞噬活性的显著下降^[9]。Wang等^[29]的研究结果表明,缺氧组($1.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)翡翠贻贝在不同盐度条件下均低于正常溶氧组($6.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。当四角蛤蜊^[19]暴露在缺氧环境中超过24h后其吞噬活性也会降低。在贻贝中^[37]这种下降趋势明显来得更快,只需暴露于缺氧条件下30min,其细胞吞噬活性就显著下降。

Pampanin等^[33]的研究表明,鸡帘蛤的吞噬活性在缺氧条件下暴露1d后会出现下降,并且这种下降至少需要3d时间才能完全恢复。鸡帘蛤的吞噬活性在2个缺氧处理组(暴露时间分别为24和48h)中均出现显著下降,而24h复氧处理后24h缺氧处理组吞噬活性稍高于对照组,但48h缺氧处理组并未表现出恢复的迹象^[33]。缺氧将导致四角蛤蜊吞噬效率显著下降。24h空气暴露处理组在放回海水中24h后几乎能完全恢复。但是48h缺氧处理组经24h复氧后,只有THC和酚氧化酶(PO)水平得到部分恢复^[19]。Wang等^[34]的研究也表明,

在 20°C 条件下,相对于正常溶氧组(6.0 mg·L⁻¹) 缺氧组(1.5 mg·L⁻¹) 翡翠贻贝血细胞的吞噬效率显著降低,然而转移到正常溶氧 24 h 后 这种降低可以完全恢复。

虽然导致吞噬作用衰退现象的机理还不是很清楚,但能够肯定的是缺氧确实影响了贝类的吞噬能力,并且这种衰退恢复较慢,恢复能力随着缺氧暴露时间的延长而减弱。

1.3 缺氧对活性氧(ROS)含量的影响

血细胞中的颗粒细胞在环境胁迫、微生物或异物刺激下会出现呼吸爆发,伴随大量的胞毒活性氧产生,例如超氧阴离子($\cdot O_2^-$)、过氧化氢(H₂O₂)、单线态氧、羟自由基、硝酸盐超氧化物阴离子和超卤化物等。这些活性氧可造成细胞的膜损伤、DNA 断裂、酶抑制和氨基酸氧化等毒性效应^[38]。虽然活性氧具有极强的杀毒灭菌能力,但过多的活性氧会导致生物氧化应激,使细胞损伤、突变、死亡,免疫功能下降等^[39-40]。

缺氧胁迫对贝类细胞活性氧含量的影响是正面还是负面还存在一定争议^[9,41-42]。Cheng 等^[9]发现,在 2.05 mg·L⁻¹ 溶氧条件下暴露 24 h 会导致台湾九孔鲍细胞中 ROS 含量下降。Yu 等^[19]的研究结果也证实,缺氧会导致四角蛤蜊细胞中 ROS 含量显著下降。类似的结果也出现在翡翠贻贝的缺氧实验中^[34]。然而,也有研究表明,急性缺氧胁迫会使扇贝血细胞 ROS 含量出现升高的现象,例如扇贝在 25°C 空气暴露 2 h 或者 17°C 下空气暴露 24 h 时,其细胞中 ROS 含量显著上升,在 5°C 条件下缺氧处理组经 24 h 恢复后扇贝的 ROS 含量显著高于其恢复之前含量甚至比最初水平还要高^[43]。Wang 等^[34]的研究表明,翡翠贻贝在 30°C 下缺氧(1.5 mg·L⁻¹) 处理 24 h,其血细胞中 ROS 含量显著高于正常溶氧组(6.0 mg·L⁻¹)。

尽管上述文献表明,缺氧会影响贝类细胞中 ROS 的产生,但其影响机制尚不明确。Lacoste 等^[44]报道,牡蛎(*Crassostrea gigas*) 的免疫应答由血淋巴中去甲肾上腺素(软体动物主要的儿茶酚胺类物质)的释放来调节。去甲肾上腺素的释放,不仅对一系列的细胞免疫应答有抑制效果还能明显减少 ROS 的产生。Yu 等^[19]关于四角蛤蜊缺氧胁迫对其免疫应答影响的实验,虽然没有测定去甲肾上腺素的含量,但仍可以依据实验结果推测,缺氧胁迫引发的去甲肾上腺素的释放可能导致 ROS 产量的下降并伴随着超氧化物歧化酶(SOD)活性的下降。

2 缺氧对贝类体液免疫因子的影响

体液免疫和细胞免疫是贝类免疫机制的两个方

面。体液免疫作为贝类的重要免疫防御手段,是依靠血清中的一些非特异性酶和调节因子来进行。目前已确定的体液免疫因子主要包括溶酶体酶、抗氧化酶、抗氧化因子、酚氧化酶、髓性过氧化物酶(MPO)、凝集素、调理素、抗菌肽、应激蛋白和细胞因子类似物等^[39]。其中溶酶体酶和抗氧化防御系统在免疫防御中起着至关重要的作用。大多数体液免疫因子是由贝类血细胞产生并分泌到血淋巴中发挥防御功能的,由此可见体液免疫和细胞免疫是相互联系、协同作用的。

2.1 缺氧对贝类溶酶体酶类的影响

溶酶体酶类主要来源于血细胞和血淋巴,由血细胞的溶酶体与质膜融合后分泌到胞外。贝类溶酶体酶主要包括溶菌酶(LSZ)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)等。

2.1.1 缺氧对溶菌酶(LSZ)的影响

LSZ 是几种革兰氏阳性和阴性菌的主要杀菌剂^[29,45]。LSZ 在吞噬作用过程中,由贝类的血细胞合成并分泌到血淋巴中^[46]。LSZ 是贝类非特异性免疫的重要组成部分。由于溶酶体中的蛋白酶、氨肽酶、脂肪酶、葡萄糖苷酶等还能消化蛋白质、脂肪和糖类,使得溶酶体兼有防御和消化的双重功能^[39]。因此 LSZ 活性可作为评价贝类健康状况以及防御系统活力的一个重要指标^[47]。

有研究表明,在缺氧胁迫下硬壳蛤的 LSZ 活性表现出下降趋势^[48]。Wang 等^[29]也发现,暴露于缺氧条件下(24、48 和 72 h)会导致翡翠贻贝 LSZ 活性的降低,但只有暴露于缺氧条件下 24 h 的翡翠贻贝能恢复 LSZ 的活性。河蚬不同溶氧梯度胁迫实验表明,在第 7 天时,各组的 LSZ 活性均升高,而富氧组(11.0 mg·L⁻¹)的 LSZ 活性最高,显著高于对照组(8.0 mg·L⁻¹)和低氧组(2.0 mg·L⁻¹)。随着胁迫时间的延长,各组 LSZ 活性均降低;到第 21 天时,3 个组的 LSZ 活性均低于实验前的水平。富氧组和低氧组在应激下的溶菌酶活性均高于对照组,富氧组的 LSZ 活性始终高于低氧组的水平,这可能与水体中各种微生物的生长变化有关^[49]。在翡翠贻贝的实验中,发现缺氧组(1.5 mg·L⁻¹) LSZ 活性显著低于正常溶氧组(6.0 mg·L⁻¹)^[34]。

翡翠贻贝 24 和 48 h 缺氧处理后,血细胞裂解产物中与脱细胞血淋巴中的溶菌酶活性均出现显著下降^[29]。经 24 h 复氧后,血细胞裂解产物中的溶菌酶活性仍然显著低于对照组和缺氧组,而血清中的溶菌酶活性显著高于对照组。相反,48 h 缺氧处

理组,虽然经 24 h 的恢复处理,但 LSZ 活性仍然都显著低于对照组^[29]。

2.1.2 缺氧对磷酸酶的影响

酸性磷酸酶(ACP)作为溶酶体的标志性酶,在免疫反应中起到杀灭和消化病原微生物的作用。碱性磷酸酶(ALP)属于多功能酶,参与贝类免疫反应,并在免疫反应中与超氧化物歧化酶和酸性磷酸酶具有紧密的联系^[50-51]。在较低溶氧水平(4.5 和 2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)条件下 7 d 内,栉孔扇贝 ACP 活性没有显著变化,之后出现下降,直至显著低于正常水平^[28]。在感染病原菌的实验中,发现淡水光滑双脐螺(*Biomphalaria glabrata*)血清中的 ACP 水平有所上升^[52]。只有在 2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶氧条件下处理 12 h 栉孔扇贝 ALP 活性才出现显著更高的水平,而其他不同氧溶度处理以及不同的取样时间的 ALP 活性都在小范围内波动^[28]。大量研究表明,在贝类免疫应答中 SOD、ACP 和 ALP 是紧密相关的^[50-51]。因此,可通过检测 THC、SOD 活性、ACP 活性和 ALP 活性来监控贝类在不同氧溶度梯度下的免疫应答。

2.2 缺氧对贝类抗氧化防御系统的影响

抗氧化防御系统主要由酶抗氧化酶和抗氧化物因子两部分构成,在抗氧化防御过程中两者相互联系,协同作用。抗氧化酶主要有超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽转移酶(GST)和酚氧化酶(PO)等^[9]。抗氧化物因子主要包括谷胱甘肽(GSH)、维生素 A、维生素 C、维生素 E、 β -胡萝卜素和尿酸等。

2.2.1 缺氧对 SOD 的影响

在免疫应答中,SOD 作为消除自由基团的主要酶,对于减少宿主细胞的氧化损伤是必不可少的^[53-54]。胡晓等^[55]对背角无齿蚌(*Anodonta woodiana*)和三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)血淋巴 SOD 的研究显示,活性氧可能在河蚌的正常生命活动中发挥重要功能,而 SOD 则是一切需氧有机体清除 $\text{O}_2\cdot$,保护机体免受氧化伤害的关键酶,其活性与生物的免疫功能密切相关。

Chen 等^[28]指出,在较高氧溶度水平(8.5 或 6.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)条件下,栉孔扇贝 SOD 活性在整个实验过程中都维持的相当稳定。而在较低溶氧水平(4.5 或 2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),其 SOD 活性呈现出峰形变化趋势,12 h 前呈显著上升趋势,之后出现显著下降,直至正常水平以下。Santovito 等^[56]报道称,低溶氧会降低地中海贻贝消化腺中 SOD 的活性。河蚬的溶

氧梯度实验也符合这一规律^[49]。

2.2.2 缺氧对 GPx 的影响

贝类 GPx 主要存在于鳃组织中。由于 GPx 更倾向于除去 SOD 歧化 $\cdot\text{O}_2^-$ 产生的 H_2O_2 ,故在不同溶氧梯度下贝类鳃中 GPx 活性与 SOD 活性紧密相关^[56]。但是这 2 种抗氧化酶在消化腺中含量较少,故不存在相关性^[56]。许友卿等^[57]发现,在缺氧条件下 8 h 后皱纹盘鲍 SeGPx 基因的表达量是正常情况下的 16.8 倍,这可能与缺氧导致的 ROS 含量增加有关。

2.2.3 缺氧对 CAT 的影响

与 SOD 以及 GPx 不同,CAT 参与去除食物消化过程中产生的 H_2O_2 ,因此消化腺 CAT 含量高于鳃组织中的 CAT 含量。CAT 活性与 SOD 活性存在一定的相关性^[56]。例如,在对皱纹盘鲍 CAT 的研究中,缺氧处理 2 h 后皱纹盘鲍 CAT 基因表达量出现少量上升,之后又缓慢减少,这一变化趋势与 SOD 的基因表达量的变化趋势相吻合^[57]。

2.2.4 缺氧对酚氧化酶(PO)的影响

PO 是一种具有氧化活力的铜蛋白酶,作为酶类氧化蛋白酶之一,在贝类的防御系统中扮演着重要的角色。当机体受到损伤时,作为贝类一系列免疫防御因子级联反应的最后一个组件—PO 将由免疫感受态血细胞释放到血淋巴中^[58]。在开放式的贝类循环系统中,能及时反应、识别异物并通过防卫机制阻止伤口异物的入侵,防止血液流失等^[59]。四角蛤蜊在缺氧条件下表现出较低的 PO 活性,表明在缺氧环境中四角蛤蜊的免疫功能减退,此时其将变得更容易被病原菌感染^[19]。台湾九孔鲍 PO 活性在 3.57 和 2.05 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶氧条件下出现显著升高,分别升高 38% 和 69%^[9]。Moullac 等^[60]推测这可能与 PrPO 系统等离子体抑制剂数量的减少有关。

3 结 语

综上所述,在缺氧条件下 THC 的下降往往伴随着吞噬活性以及 ROS 含量的下降^[19]。吞噬作用涉及到呼吸爆发过程所伴随的活性氧的产生;呼吸爆发中活性氧的产生水平又取决于血淋巴中的循环血细胞含量,反过来活性氧含量又会影响到血细胞的存活率。由此推测,在缺氧胁迫下贝类细胞免疫系统中血细胞总数、吞噬活性以及呼吸爆发的异变都是联动的,且都呈现出下降的趋势。体液免疫中 SOD 活性受呼吸爆发伴随的 ROS 的产生所诱导,在缺氧胁迫早期阶段 SOD 活性会有所上升^[29,48],而随着呼

吸爆发的减弱以及循环血细胞总数的下降 SOD 活性也会迅速下降,在这个过程中贝类鳃组织中的 CAT 和 GSH - Px 活性几乎与 SOD 活性保持一致步调^[61]。缺氧环境中溶菌酶活性的降低直接影响吞噬效率,而溶菌酶又由循环血细胞分泌产生。因此,缺氧胁迫对贝类体液免疫系统的负面影响与细胞免疫系统的基本保持一致。因此,缺氧胁迫将导致贝类免疫系统的衰退,大量文献显示 24 h(临界点)以内缺氧胁迫对贝类免疫系统的负面影响是可逆的,即这种强度的缺氧胁迫在贝类免疫系统的承受范围之内,当暴露于缺氧环境超过一定时间,缺氧胁迫就可能对贝类细胞免疫系统造成不可逆损伤,甚至导致贝类的死亡^[19,29,43]。

近年来,由于我国贝类尤其是淡水珍珠蚌养殖规模的迅速扩大,导致水体严重富营养化,水华频发,致使水体中贝类急性缺氧。因此,研究贝类在缺氧环境下免疫功能的变化具有重要的生产实践意义。目前,有关缺氧对贝类免疫系统影响的研究尚有报道,但是与其他环境因子共同影响贝类的交互作用的研究还很少,而有毒物质例如水华藻类爆发所产生的生物毒素——微囊藻毒素与缺氧交互作用对贝类的研究还属空白。然而在实际生产中往往又是多因素胁迫共同存在,其间的关系或者协同或者拮抗也可能相互独立。因此,研究多因素对贝类免疫功能的影响应该成为今后贝类毒理生理学的主要研究方向。

通讯作者简介:胡梦红(1982—),女,海洋生物与环境科学博士,讲师,主要研究方向为水生动物生理生态学。

参考文献:

- [1] Yu R, Wang R, Tian C, et al. Discussion on the high mortality and its prevention in scallop, *Chlamys farreri* [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1998, 71(3): 69-72
- [2] Zhang J. Reasons of the mortality and its prevention in scallops, *Chlamys farreri* [J]. *Fisheries Science*, 1999, 18(1): 44-46
- [3] Lee K, Liu P, Chen C, et al. The implication of ambient temperature with outbreak of vibriosis in cultured small abalone *Haliotis diversicolor supertexta* (Lischke) [J]. *Journal of Thermal Biology*, 2001, 26(6): 585-587
- [4] Ministry of Land, Transport and Maritime Affairs (MLTM). Statistics and Annual Report [R]. Seoul: The South Korean Government, 2007
- [5] Malham K, Cotter E, O'Keeffe S. Summer mortality of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in the Irish Sea: The influence of temperature and nutrients on health and survival [J]. *Aquaculture*, 2009, 287(1-2): 128-138
- [6] Karim M R, Sekine M, Ukita M. Simulation of eutrophication and associated occurrence of hypoxic and anoxic condition in a coastal bay in Japan [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45(1-2): 280-285
- [7] Aguiar M C V, Neto A B J, Rangel M C. Eutrophication and hypoxia in four streams discharging in Guanabara Bay, RJ, Brazil, a case study [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2011, 62(8): 1915-1919
- [8] Wu Y, Zhou C, Zhang Y, et al. Evolution and caused of formation of *Gymnodinium sanguineum* bloom in Yantai Sishili Bay [J]. *Journal of Oceanography and Limnology*, 2001, 32(2): 159-167
- [9] Cheng W, Liu C, Cheng S, et al. Effect of dissolved oxygen on the acid-base balance and ion concentration of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* [J]. *Aquaculture*, 2004, 231(1-4): 573-586
- [10] Thursby G. Cape Cod to Cape Hatteras [M]. Washington DC: U S Environmental Protection Agency, 2000: 2-29
- [11] Tallqvist M. Burrowing behaviour of the Baltic clam *Macoma balthica*: Effects of sediment type, hypoxia and predator presence [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2001, 212: 183-191
- [12] Harris O, Maguire B, Edwards J, et al. Low dissolved oxygen reduces growth rate and oxygen consumption rate of juvenile greenlip abalone, *Haliotis laevigata donovan* [J]. *Aquaculture*, 1999, 174(3-4): 265-278
- [13] De Zwaan A, Cortesi P, van den Thillart G, et al. Marine Coastal Eutrophication [M]. Amsterdam: Elsevier, 1992: 1029-1039
- [14] Willson L, Burnett E. Whole animal and gill tissue oxygen uptake in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*: Effects of hypoxia, hypercapnia, air exposure, and infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus* [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2000, 246(2): 223-240
- [15] Churchill A, Storey B. Metabolic responses to freezing and anoxia by the periwinkle *Littorina littorea* [J]. *Journal of Thermal Biology*, 1996, 21(1): 57-63
- [16] Sagasti A, Schaffner C, Duffy E. Effects of periodic hypoxia on mortality, feeding and predation in an estuarine epifaunal community [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2001, 258(2): 157-183
- [17] Baker S M, Mann R. Effects of hypoxia and anoxia on larval settlement, juvenile growth, and juvenile survival of the oysters *Crassostrea virginica* [J]. *Biological Bulletin*, 1992, 182(2): 265-269

- [18] 顾孝连, 徐兆礼. 河口及近岸海域低氧环境对水生动物的影响[J]. 海洋渔业, 2009, 31(4): 426-437
Gu X L, Xu Z L. A review on the effects of hypoxia on aquatic animals in estuaries [J]. Marine Fisheries, 2009, 31(4): 426-437 (in Chinese)
- [19] Yu J H, Choi M C, Park K I, et al. Effects of anoxia on immune functions in the surf clam *Macraa veneriformis* [J]. Zoological Studies, 2009, 49(1): 94-101
- [20] Vosloo A, Laas A, Vosloo D. Differential responses of juvenile and adult South African abalone (*Haliotis midae* Linnaeus) to low and high oxygen levels [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2013, 164(1): 192-199
- [21] Bayne C J. Molluscan Immunobiology [M]// Saleuddin A S M, Wibur K M. The Mollusca 5, Physiology, Part 2. New York: Academic Press, 1983: 407-486
- [22] Kuchel P, Raftos A, Birch D, et al. Haemocyte morphology and function in the Akoya pearl oyster, *Pinctada imbricate* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2010, 105(1): 36-48
- [23] Cheng W, Liu C, Hsu J, et al. Effect of hypoxia on the immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 13(5): 351-365
- [24] Volety K, Oliver M, Genthner J, et al. A rapid tetrazolium dye reduction assay to assess the bactericidal activity of oyster (*Crassostrea virginica*) haemocytes against *Vibrio parahemolyticus* [J]. Aquaculture, 1999, 172(1): 205-222
- [25] Coles A, Farley R, Pipe K. Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1995, 22(1): 59-65
- [26] Ordás M C, Ordás A, Beloso C, et al. Immune parameters in carpet shell clams naturally infected with *Perkinsus atlanticus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2000, 10(7): 597-609
- [27] Pipe K, Coles A. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve mollusks [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1995, 5(8): 581-595
- [28] Chen J, Mai K, Ma H, et al. Effects of dissolved oxygen on survival and immune responses of scallop (*Chlamys farreri* Jones et Preston) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(3): 272-281
- [29] Wang Y J, Hu M H, Cheung S G, et al. Immune parameter changes of hemocytes in green-lipped mussel *Perna viridis* exposure to hypoxia and hyposalinity [J]. Aquaculture, 2012, 356-357: 22-29
- [30] Matozova V, Monarib M, Foschib J, et al. Exposure to anoxia of the clam *Chamelea gallina*: I. Effects on immune response [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2005, 325(2): 163-174
- [31] Suresh K, Mohandas A. Effect of sublethal concentrations of copper on haemocyte number in bivalves [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1990, 55(3): 325-331
- [32] Matozova V, Da Ros L, Ballarin L, et al. Functional response of haemocytes in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice: Fishing impact and seasonal variations [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2003, 60(8): 949-958
- [33] Pampanin M, Ballarin L, Carotenuto L, et al. Air exposure and functionality of *Chamelea gallina* haemocytes: Effects on haematocrite, adhesion, phagocytosis and enzyme contents [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 2002, 131(1): 605-614
- [34] Wang Y J, Hu M H, Shin P K S, et al. Immune responses to combined effect of hypoxia and high temperature in the green-lipped mussel *Perna viridis* [J]. Marine Pollution Bulletin, 2011, 63(5): 201-208
- [35] Cheng T, Sullivan J. Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes [J]. Marine Environmental Research, 1984, 14(1): 305-315
- [36] Ratcliffe N A, Rowley A F, Fitzgerald S W, et al. Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances [J]. International Review of Cytology, 1985, 97(1): 183-350
- [37] Malagoli D, Casarini L, Sacchi S, et al. Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2007, 23(1): 171-177
- [38] Anderson S, Paynter T, Burrenson M. Increased reactive oxygen intermediate production by hemocytes withdrawn from *Crassostrea virginica* infected with *Perkinsus marinus* [J]. The Biological Bulletin, 1992, 183(3): 476-481
- [39] 杜丽, 张巍, 陆逵, 等. 贝类免疫机制研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(3): 77-81
Du L, Zhang W, Lu K, et al. Progress on immunological mechanism in mollusks [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2008, 29(3): 77-81 (in Chinese)
- [40] Green T J, Dixon T J, Devic E, et al. Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(5): 799-810
- [41] Zelko N, Folz J. Extracellular superoxide dismutase functions as a major repressor of hypoxia-induced erythropoietin gene expression [J]. Endocrinology,

- 2005, 146(1): 332–340
- [42] Boyd N, Burnett E. Reactive oxygen intermediate production by oyster hemocytes exposed to hypoxia [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1999, 202(22): 3135–3143
- [43] Chen M, Yang H, Delaporte M, et al. Immune responses of the scallop *Chlamys farreri* after air exposure to different temperatures [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, 345(1): 52–60
- [44] Lacoste A, Malham S K, Cueff A, et al. Noradrenaline modulates hemocyte reactive oxygen species production via beta-adrenergic receptors in the oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2001, 25(4): 285–289
- [45] Monari M, Matozzo V, Foschi J, et al. Effects of high temperature on functional responses of haemocytes in the clam, *Chamelea gallina* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 22(1): 98–114
- [46] Cheng T C, Rodrick G E, Foley D A, et al. Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1975, 25(2): 261–265
- [47] Chu F, La J. Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*) [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1989, 54(2): 224–232
- [48] Hawkins E, Brooks D, Brooks S. The effect of tidal exposure on aspects of metabolic and immunological activity in the hard clam *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 1993, 140(2): 225–228
- [49] 徐钢春, 顾若波, 闻海波, 等. 环境胁迫对河蚶溶菌酶和超氧化物歧化酶活性的影响 [J]. *安徽农业大学学报*, 2007, 34(1): 74–78
- Xu G C, Gu R B, Wen H B, et al. Effects of environmental stress on lysozyme and superoxide dismutase of *Corbicula fluminea* (Müller) [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2007, 34(1): 74–78 (in Chinese)
- [50] Liu S L, Jiang X L, Hu X K, et al. Effects of temperature on non-specific immune parameters in two scallop species: *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) and *Chlamys farreri* (Jones & Preston 1904) [J]. *Aquaculture Research*, 2004, 35(7): 678–682
- [51] Mu H, Jiang X, Liu S, et al. Effects of immunopolysaccharide on the activities of acid phosphatase, alkaline phosphatase and superoxide dismutase in *Chlamys farreri* [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1999, 29(3): 463–468
- [52] Cheng C, Dougherty J. Ultrastructural evidence for the destruction of *Schistosoma mansoni* sporocysts associated with elevated lysosomal enzyme levels in *Biomphalaria glabrata* [J]. *Journal of Parasitology*, 1989, 75(6): 928–941
- [53] Zhang Z, Shao M, Kang K. Changes of enzyme activity and hematopoiesis in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck) induced by white spot syndrome virus and zymosan [J]. *Aquaculture Research*, 2005, 36(7): 674–681
- [54] Campa-Córdova I, Hernández-Saavedra Y, Ascencio F. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2002, 133(4): 557–565
- [55] 胡晓, 张洪渊, 刘克武. 背角无齿蚌和三角帆蚌血淋巴超氧化物歧化酶的初步研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 1999, 36(1): 178–180
- Hu X, Zhang H Y, Zhang K W. Preliminary studies of sod activities in the haemolymph of *Anodonta woodiana* Heude and *Hyriopsis cumingee* Lea [J]. *Journal of Sichuan University: Natural Science Edition*, 1999, 36(1): 178–180 (in Chinese)
- [56] Santovito G, Piccinni E, Cassini A, et al. Antioxidant responses of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to environmental variability of dissolved oxygen [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2005, 140(3): 321–329
- [57] 许友卿, 吴卫君, 蒋伟明, 等. 温度对贝类免疫系统的影响及其机理研究进展 [J]. *水产科学*, 2012, 31(3): 176–180
- Xu Y Q, Wu W J, Jiang W M, et al. Effect of temperature on immune system and the mechanism in shellfish [J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(3): 176–180
- [58] Aladaileh S, Rodney P, Nair S V, et al. Characterization of phenoloxidase activity in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 2007, 148(4): 470–480
- [59] 王文琪, 徐申波, 姜令绪, 等. 双壳类生物免疫力的研究进展 [J]. *海洋科学*, 2006, 30(1): 69–74
- Wang W Q, Xu S B, Jiang L X, et al. Advances in the studies on immunity of bivalves [J]. *Journal of Marine Science*, 2006, 30(1): 69–74 (in Chinese)
- [60] Moullac G L, Soyez C, Saulnier D, et al. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, 8(8): 621–629
- [61] 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 Part B*, 2009, 154(4): 387–395