

钙黄绿素标记刺参的效果及其对刺参抗氧化酶活力的影响

赵鹏^{1,2}, 杨红生^{1*}, 王晓宇¹, 林承刚¹, 李湘萍¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 海洋生态与环境重点实验室, 山东 青岛 266071;

2. 国家海洋信息中心, 天津 300171)

摘要: 使用钙黄绿素标记刺参稚参, 在 Nikon 80i 荧光显微镜波长 450 ~ 490 nm 激发光下观察其对刺参骨片的标记情况; 研究了钙黄绿素浓度和染色时间对刺参抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-Px 活力的影响。结果表明: 钙黄绿素能够标记刺参体壁、触手、管足、疣足真皮表层的骨片。实验中, 钙黄绿素浓度对 SOD 和 GSH-Px 的活力无显著影响, 浓度在 1 000 mg/L 时明显抑制 CAT 活力。染色时间对 3 种抗氧化酶活力有显著影响。染色时间 × 浓度交互作用对 SOD 和 CAT 活力有显著影响。钙黄绿素浓度在 750 mg/L, 染色时间在 24 h 左右, 对 3 种抗氧化酶的影响较小。

关键词: 刺参; 荧光标记; 抗氧化酶; 钙黄绿素

中图分类号: Q 959.269

文献标识码: A

刺参 (*Apostichopus japonicus*) 是经济价值很高的海水养殖对象, 属棘皮动物门 (Echinodermata), 海参纲 (Holothuroidea), 楯手目 (Aspidochirotida), 刺参科 (Stichopodidae), 主要分布于北太平洋沿岸浅海^[1]。开展刺参的增殖放流工作, 有助于缓解市场需求和刺参资源可持续利用之间的矛盾。对增殖放流的刺参进行有效标记, 有助于科学评估增殖放流效果, 研究其在自然环境中的生长情况、存活率和分布, 并为在野外开展刺参行为学研究提供便利^[2-3]。然而, 刺参体壁柔软, 缺乏明显的钙质骨骼, 对异物有排异反应, 故难以使用传统标记方法对其进行标记。

国内尚未见有关海参标记的报道。在国外, MERCIER 等^[4] 和 SHIELL^[5] 介绍了一种在海参表皮刻画记号方法, 该方法主要是用刀片在海参体壁刻数字或记号进行标记。该种标记在刻画后的几周内消退, 不能有效地标记海参。在已有研究中, 很难通过植入外源标记物的方法标记海参。外源标记通常被海参排出体外或者引起坏疽^[2]。在体壁缝入的标签, 植入的塑料 T-bar 标签和橡胶标记物等都会在短时间内被海参排出体外或者

因海参体壁再生而不能被观察到^[3,6-7]。UTHICKE 等^[8] 介绍了一种基因标记方法, 该方法使用 DNA 指纹图谱技术识别海参个体, 但这种方法价格昂贵, 操作复杂, 不适宜大规模应用。

海参纲生物真皮表层分布有细小的内骨骼—骨针 (spicule 或 ossicle)。骨片大小、形态因种类而异, 并且十分稳定, 因而是海参分类上最重要的依据^[1]。骨片的化学成分为碳酸钙, 因此, 可尝试使用能和钙结合的物质标记海参。

近年来国外学者使用钙黄绿素、四环素等能和钙结合的荧光染料标记鱼类、软体动物、棘皮动物和纽虫动物等海洋生物^[9-14]。与其它方法相比, 荧光染料标记操作简便, 节省成本, 对生物影响较小。然而过高的浓度、过长的浸泡时间等都可能对被标记生物产生急性或慢性毒害作用, 影响生物的生长、发育、行为, 甚至造成死亡^[10,15]。

生物体在外源物质的胁迫下处于应激状态, 体内会产生大量活性氧 ($O_2^- \cdot$ 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2), 对生物体造成氧化损伤, 导致机体 DNA 断裂、脂质过氧化等^[16]。此时细胞内的抗氧化酶系统会启动, 对活性氧自由基进行清除, 以达到抵御氧化损

收稿日期: 2010-10-07 修回日期: 2010-12-25

资助项目: 国家“十一五”科技支撑计划 (2006BAD09A02); 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2006AA10A411); 国家海洋局海洋公益性重点项支目 (200805069); 创新研究群体科学基金项目 (40821004)

通讯作者: 杨红生, E-mail: hshyang@126.com

伤的目的^[17]。主要的抗氧化酶包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等。它们在机体免疫防护、抗逆等方面具有重要作用。

PURCELL 等^[7]曾使用钙黄绿素成功标记了热带的糙海参(*Holothuria scabra*),但未研究钙黄绿素对海参抗氧化酶活力的影响。美国联邦医药管理局已批准针对钙黄绿素的新兽药研究申请(INADA),准许钙黄绿素用于供食用的动物饲养活动^[5]。本文旨在探讨使用钙黄绿素标记温带海参——刺参的可行性,并通过研究钙黄绿素浓度和浸泡时间对刺参抗氧化酶 SOD、CAT 和 GSH-Px 活力的影响,确定对刺参抗氧化酶系统影响较小的染色时间和染色剂浓度值的范围,为探寻安全、有效的刺参标记技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物 刺参稚参,取自山东青岛黄岛海参育苗场。实验前,置于实验室流水水槽内暂养 7 d。实验在 2009 年 12 月 31 日-2010 年 3 月 15 日之间进行,实验期间,流水水槽内水温 9~11℃。实验期间,刺参饵料为海泥和益参宝混合饵料(比例 2:1)。

实验药品 钙黄绿素(calcein),橙色结晶性粉末,有金属光泽;溶于水,水溶液呈黄色,有绿色荧光;分子式 $C_{30}H_{26}N_2O_{13}$,结构式见图 1。本研究使用的钙黄绿素结晶粉末购自上海晶纯试剂有限公司。使用时,用过滤海水配制成所需浓度溶液。

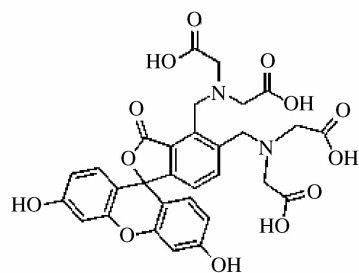


图 1 钙黄绿素分子结构式

Fig. 1 Molecular structure of calcein

1.2 实验方法

染色及检测标记的方法 取 30 头健康刺参(3.45 ± 1.34) g 暂养在流水水槽中,禁食 24~

48 h,连续充入空气。配制浓度为 200 mg/L 的钙黄绿素染料海水溶液 1 L;将刺参在染料溶液中浸泡 24 h,期间连续充空气,停止喂食。染色后,将刺参放回流水水槽中。

染色结束 0、3、5、7 d 后,对荧光标记进行检测。使用手术刀片刮取小米粒大小刺参的体壁真皮表层组织,铺在载玻片上,滴加 1~2 滴 10% NaClO 水溶液;待组织溶解后(10~20 min),滴加蒸馏水 1~2 滴进行稀释,加盖玻片;在 Nikon 80i 荧光显微镜波长 450~490 nm 的激发光下观察,使用 Nikon Ds-Fi1 数码相机拍照。

抗氧化酶活力的测定 参考 PURCELL 等^[18]研究中使用的钙黄绿素溶液浓度,设 50、200、400 mg/L 为正常染色时的钙黄绿素染色液浓度。并设置 500、750、1 000 mg/L 为高浓度钙黄绿素染色液,以研究高浓度钙黄绿素对刺参的毒性。染色时间设置为 8、24、48、72 h,染色方法同染色及检测标记的方法。

每个染色时间×染色剂浓度处理组随机选取 3 头刺参,置于 -20℃ 冰箱冷冻。取样时,用纱布擦干体表水分,用清洁的眼科剪(预先用硝酸溶液浸泡,洗净烘干待用)在冰盘上剪取刺参肛门端体壁 0.20 g。加 9 倍匀浆介质(pH 7.4, 0.01 mol/L Tris-HCl, 0.01 mol/L 蔗糖, 0.000 1 mol/L EDTA2Na 溶液),冰浴条件下用组织匀浆机匀浆(12 000 r/min, 10 s/次,间歇停止 30 s,连续 3~5 次)。组织匀浆经冷冻离心机离心后(4℃, 1 000 g,离心 10 min;取上清液,4℃,13 000 g,离心 30 min),取上清液进行酶活力测定。

使用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测试 SOD、CAT、GSH-Px、总蛋白。测定结果用 U/mg prot 表示。

1.3 统计方法

使用 SPSS 16.0 对实验数据进行统计。对原始数据进行 Kolmogorov-Smirnov 检验,检验其是否服从正态分布,对不服从正态分布的数据进行对数转换或平方根转换。对染色剂浓度和染色时间对酶活力的影响进行双因素方差分析。数据用平均值±标准差表示,以 $P < 0.05$ 作为显著水平。

2 结果

2.1 钙黄绿素的染色效果

染色后立即刮取管足、触手、疣足真皮层表层

组织,在荧光显微镜 450 ~ 490 nm 激发波长下观察,未发现染色骨片;染色后 3 d,在 3 个平行样品中,仅在 1 个样品中观察到极少数骨片发出微弱绿色荧光;染色后 5 d,可观察到部分骨片发出荧光,但荧光强度较弱;染色结束 7 d,已较容易观察到骨片,包括桌形穿孔板、X 体、触手的支持杆、管足末端的端板等发出绿色荧光(图 2 ~ 图 4),但骨片个体间着色情况有差异,有些骨片发出的荧光较弱(图 3-B),甚至难以观察(图 2-A)。

支持水管系统的支持杆(图 2)呈杆状,分布于管足、触手、疣足柄部,数量较少;管足端板(图 3)呈筛状,仅分布在管足末端,个体大,容易观察;桌形体、穿孔板、X 体骨片(图 4)大量分布在真皮组织表层,检测时很容易观察到。

2.2 钙黄绿素对刺参抗氧化酶活力的影响

钙黄绿素对刺参 SOD 的影响 不同处理浓度对刺参 SOD 活力无显著影响($P > 0.05$)。

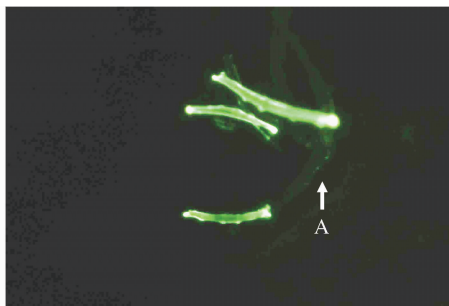


图 2 钙黄绿素染色的触手支持杆
Fig. 2 Supporting rods of tentacles marked by calcein

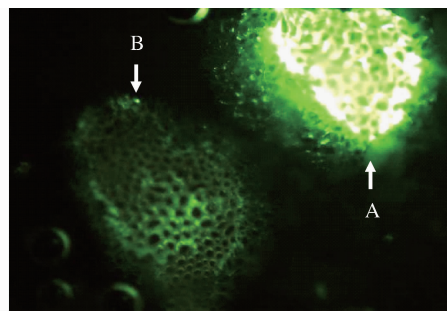


图 3 钙黄绿素染色的管足端板
Fig. 3 Disc supporting ossicles on tip of podia marked by calcein

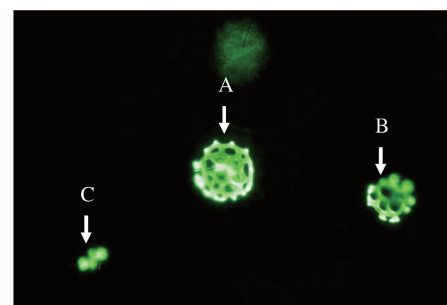


图 4 钙黄绿素染色的体壁中桌形体(A)、穿孔板(B)、X 体(C)
Fig. 4 Table (A), button (B), X-shaped (C) ossicles in body wall marked by calcein

染色时间 72 h 处理组刺参 SOD 活力显著低于其他处理($P < 0.05$)。染色时间 × 浓度交互作用对刺参 SOD 活力有显著影响($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 钙黄绿素对刺参 SOD 活力的影响
Tab. 1 Effect of calcein on SOD activity of *A. japonicus*

浓度(mg/L) concentration	染色时间(h) time				U/mg prot
	8	24	48	72	
正常浓度 normal	50	25.73 ± 14.35 ^{ax}	23.88 ± 7.64 ^{ax}	24.39 ± 3.10 ^{ax}	19.12 ± 3.13 ^{bx}
	200	69.97 ± 39.53 ^{ax}	/ *	28.30 ± 2.08 ^{ax}	17.07 ± 2.96 ^{bx}
	400	133.17 ± 27.51 ^{ax}	30.08 ± 4.53 ^{ax}	30.96 ± 0.74 ^{ax}	27.13 ± 2.41 ^{bx}
高浓度 high	500	90.30 ± 34.35 ^{ax}	27.23 ± 2.06 ^{ax}	29.78 ± 3.17 ^{ax}	15.29 ± 0.65 ^{bx}
	750	26.51 ± 2.92 ^{ax}	28.19 ± 6.78 ^{ax}	24.91 ± 1.29 ^{ax}	5.22 ± 3.33 ^{bx}
	1 000	18.42 ± 6.54 ^{ax}	34.05 ± 7.71 ^{ax}	21.57 ± 8.00 ^{ax}	15.40 ± 6.76 ^{bx}

注:a, b, c 表示 SOD 活力在染色时间处理间有显著差异($P < 0.05$); x, y, z 表示 SOD 活力在浓度处理间有显著差异($P < 0.05$)。* 24 h × 200 mg/L 处理组样品缺失(下同)。

Notes: a, b and c indicate significant difference of SOD activity among immersion time treatments ($P < 0.05$); x, y and z indicate significant difference of SOD activity among concentration treatments ($P < 0.05$). * Sample of 24 h × 200 mg/L treatment is absent. (the same below).

钙黄绿素对刺参 CAT 的影响 浓度为 1 000 mg/L 的处理组刺参 CAT 活力显著低于其他浓度处理组($P < 0.05$)。染色时间 8 h 的处理组 CAT 活力显著高于其他处理($P < 0.05$), 染色

时间 24 h 的处理组 CAT 活力显著高于 48 h 处理组($P < 0.05$)。染色时间 × 浓度交互作用对 CAT 活力有显著影响($P < 0.05$)(表 2)。

表 2 钙黄绿素对刺参 CAT 活力的影响
Tab. 2 Effect of calcein on CAT activity of *A. japonicus*

浓度(mg/L) concentration		染色时间(h) time				U/mg prot
		8	24	48	72	
正常浓度 normal	50	39.91 ± 20.12 ^{cx}	3.69 ± 2.16 ^{ax}	18.61 ± 7.22 ^{bx}	17.54 ± 7.92 ^{abx}	
	200	28.97 ± 18.00 ^{cx}	/	31.76 ± 10.48 ^{bx}	4.61 ± 3.32 ^{abx}	
	400	48.51 ± 41.51 ^{cx}	8.34 ± 5.37 ^{ax}	9.18 ± 1.12 ^{bx}	5.71 ± 4.14 ^{abx}	
高浓度 high	500	34.60 ± 2.49 ^{cx}	8.33 ± 5.34 ^{ax}	8.32 ± 4.23 ^{bx}	5.23 ± 0.34 ^{abx}	
	750	10.19 ± 5.57 ^{cx}	3.78 ± 1.65 ^{ax}	11.02 ± 8.43 ^{bx}	10.76 ± 2.57 ^{abx}	
	1 000	6.73 ± 4.06 ^{cy}	10.97 ± 6.07 ^{ay}	4.56 ± 3.60 ^{by}	8.15 ± 6.21 ^{aby}	

注:a,b,c 表示 CAT 活力在染色时间处理间有显著差异($P < 0.05$);x,y,z 表示 CAT 活力在浓度处理间有显著差异($P < 0.05$)。
Notes:a,b and c indicate significant difference of CAT activity among immersion time treatments($P < 0.05$);x,y and z indicate significant difference of CAT activity among concentration treatments($P < 0.05$).

钙黄绿素对刺参 GSH-Px 的影响 浓度对 显著高于 48 h 处理组($P < 0.05$)。染色时间 × 浓度交互作用对刺参 GSH-Px 活力无显著影响($P > 0.05$)。染色时间 24 h 处理组刺参 GSH-Px 活力

表 3 钙黄绿素对刺参 GSH-Px 活力的影响
Tab. 3 Effect of calcein on GSH-Px activity of *A. japonicus*

浓度(mg/L) concentration		染色时间(h) time				U/mg prot
		8	24	48	72	
正常浓度 normal	50	343.47 ± 183.70 ^{abx}	160.77 ± 84.16 ^{ax}	144.17 ± 30.97 ^{bx}	105.54 ± 64.44 ^{abx}	
	200	259.94 ± 35.68	/	262.83 ± 36.11 ^{bx}	237.68 ± 138.48 ^{abx}	
	400	209.42 ± 54.59	204.43 ± 26.52 ^{ax}	99.29 ± 24.03 ^{bx}	135.52 ± 78.91 ^{abx}	
高浓度 high	500	213.70 ± 92.69 ^{abx}	174.26 ± 68.65 ^{ax}	49.55 ± 12.03 ^{bx}	96.25 ± 36.83 ^{abx}	
	750	136.46 ± 68.76 ^{abx}	302.62 ± 90.73 ^{ax}	50.45 ± 5.48 ^{bx}	68.85 ± 6.98 ^{abx}	
	1 000	131.74 ± 16.26 ^{abx}	168.20 ± 118.00 ^{ax}	28.21 ± 3.06 ^{bx}	105.66 ± 21.40 ^{abx}	

注:a,b,c 表示 GSH-Px 活力在染色时间处理间有显著差异($P < 0.05$);x,y,z 表示 GSH-Px 活力在浓度处理间有显著差异($P < 0.05$)。
Notes:a,b and c indicate significant difference of GSH-Px activity among immersion time treatments($P < 0.05$);x,y and z indicate significant difference of GSH-Px activity among concentration treatments($P < 0.05$).

3 讨论

3.1 钙黄绿素标记刺参的效果

钙黄绿素可标记刺参体壁、水管系统真皮组织(管足、触手、疣足)表层骨片,并在荧光显微镜 460 ~ 490 nm 波长激发光下检出。染色后的刺参不能立即检出荧光标记,这是因为钙黄绿素先与游离的钙离子结合,结合了钙黄绿素的钙离子经吸收沉积在钙质骨骼(骨片)上。刚染色的刺参,结合了钙黄绿素的钙离子尚未沉积到骨片上,因此此时不能检出荧光标记或荧光微弱(图 3-B);经过一段时间的代谢,结合了钙黄绿素的钙离子逐渐沉积到刺参骨片上,骨片在激发光下发出的荧光逐渐增强。同一刺参个体不同骨片之间标记的效果也不尽相同,这是因为只有发育中的骨片才会被染色,而发育成熟的骨片停止生长,不能为钙黄绿素所标记^[9]。这也是选择稚参作为标记

对象的原因。

与注射等方法相比,通过浸泡对刺参进行染色在操作方便、成本较低的同时,对刺参的刺激也很小,不易引起刺参的排脏、活动异常等反应。检测时只需刮取少量真皮表层组织,对刺参的刺激很小,形成的创口可在一周之内愈合,不影响刺参外观。PURCELL 等^[7]检测糙海参(*H. scabra*)骨片着色时,所需组织仅有几平方毫米。

3.2 钙黄绿素对刺参抗氧化酶活力的影响

WINSTON 等^[17]认为当机体受到外源刺激后,会诱导产生活性氧产物,从而导致机体的氧化损伤(如氧化多不饱和脂肪酸导致脂质过氧化或者 DNA 损伤)。此时抗氧化系统酶会在清除活性氧自由基,抵御氧化损伤等方面发挥作用。

SOD 和 CAT 是生物体内重要的抗氧化酶,SOD 将代谢或外界刺激产生的有毒物质 $O_2^- \cdot$, 催化歧化反应生成 H_2O_2 ,CAT 再将 H_2O_2 分解成

为 H_2O 与 O_2 , 从而维持细胞和机体的正常生理活动。本研究中, 刺参 CAT 活力在高浓度钙黄绿素溶液中降低, 并随着染色时间的增长逐渐降低, 这一方面可能是由于高浓度钙黄绿素溶液或长时间浸泡对刺参机体形成氧化压力, 刺参体内产生大量的 H_2O_2 大量消耗掉 CAT; 另一方面可能是抗氧化系统酶防御能力降低或被抑制, 不能产生足够的 CAT 以补充消耗掉的酶^[19]。而 SOD 活力不受钙黄绿素浓度影响, 只在染色时间较长 (72 h) 时受到抑制, 与 CAT 活力变化并不一致。SOD 活力在长时间浸泡下受到抑制, 可能是长时间浸泡抑制和损伤了 SOD 酶系统。SOD 活力和 CAT 活力变化并不一致可能是由于 H_2O_2 除来自于 SOD 的歧化反应外, 还可能来自于氨基酸或细胞色素 P450 氧化酶的反应^[20]。这种现象在其他生物的研究中也有发现, 如污水处理 15 d 后的文蛤 (*Mercenaria mercenaria*), SOD 活力未被诱导, 而 CAT 活力显著升高^[21]; 在农药对罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 肝脏抗氧化酶活力影响的研究也有类似的发现^[22]。

GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶。硒是 GSH-Px 酶系的组成成分, 它能催化 GSH 变为 GSSG, 使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物, 同时促进 H_2O_2 的分解, 从而保护细胞膜的结构和功能不受过氧化物的干扰及损害^[23]。经钙黄绿素染色的刺参, GSH-Px 活力随染色时间增长先下降后升高, 这可能是由于钙黄绿素导致刺参体内产生大量的 H_2O_2 , 消耗掉 GSH-Px, 随着时间的延长, 刺参抗氧化自由基防御系统被激活, 补充 GSH-Px 以清除掉 H_2O_2 和 $O_2^- \cdot$ 。

染色时间 \times 浓度交互作用对刺参组织匀浆 SOD 和 CAT 活力有显著影响。虽然交互作用对刺参酶活力的作用机制尚有待进一步探明, 但从预实验和实验结果来看, 使用高浓度钙黄绿素 (750、1 000 mg/L) 染色时, 染色初期 (8、24 h), 刺参贴壁较好, 但后期 (48、72 h) 有化皮现象, 部分刺参贴壁能力较差。此外, 在预实验中, 不连续充气的处理组, 刺参大部分在 24 h 内死亡, 而饱和和充气的处理组, 刺参贴壁能力良好。因此, 在实际操作中, 要重视浓度、染色时间和其他理化因子交互作用对刺参的影响。

从实验结果中可以看出, 刺参对染色剂浓度

的耐受性较强, 3 组正常浓度处理组之间, SOD、CAT、GSH-Px 活力均无显著差异。高浓度处理组, 只有浓度为 1 000 mg/L 处理组, CAT 活力受到明显抑制。可见, 浓度小于 750 mg/L 的钙黄绿素对刺参组织匀浆中抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-Px 没有明显的影响。虽然染色时间对 3 种抗氧化酶活力的影响较为复杂, 但可以肯定的是长时间的染色, 对 3 种抗氧化酶活力有显著的负面影响。而染色时间过短无法有效标记刺参。因此, 染色时间应控制在 24 h 左右。

参考文献:

- [1] 廖玉麟. 中国动物志——海参纲 [M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] CONAND C. Methods of studying growth in holothurians (bêche-de-mer), and preliminary results from a bêche-de-mer tagging experiment in New Caledonia [J]. Fish Newsletter, 1983, 26 (3): 31–38.
- [3] BATTAGLENE S C, BELL J D. Potential of the tropical Indo-Pacific sea cucumber, *Holothuria scabra*, for stock enhancement [A] // Stock Enhancement and Sea Ranching. Oxford: Blackwell Science, 1999: 478–490, 606.
- [4] MERCIER A, BATTAGLENE S C, HAMEL J F. Periodic movement, recruitment and size-related distribution of the sea cucumber *Holothuria scabra* in Solomon Islands [J]. Hydrobiologia, 2000, 440 (1–3): 81–100.
- [5] SHIELL G R. Effect of invasive tagging on the activity of *Holothuria whitmaei* (Echinodermata: Holothuroidea): A suitable mark-recapture method for short-term field studies of holothurian behaviour [J]. Mar Fresh B, 2006, 39 (2): 153–162.
- [6] REICHENBACH N. Ecology and fishery biology of *Holothuria fuscogilva* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Maldives, Indian Ocean [J]. Bull Mar Sci, 1999, 64 (1): 103–113.
- [7] PURCELL S W, BLOCKMANS B F, NASH W J. Efficacy of chemical markers and physical tags for large-scale release of an exploited holothurian [J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2006, 334 (2): 283–293.
- [8] UTHICKE S, BENZIE J A H. A genetic fingerprint recapture technique for measuring growth in 'unmarkable' invertebrates: negative growth in commercially fished holothurians (*Holothuria nobilis*) [J]. Mar Ecol Prog Ser, 2002, 241 (16):

- 221 - 226.
- [9] STRICKER S A. The ultrastructure and formation of the calcareous ossicles in the body wall of the sea cucumber *Leptosynapta Clarki* (Echinodermata, Holothuroidea) [J]. *Zoomorphol*, 1985, 105 (4) : 209 - 222.
- [10] WILSON C A, BECKMAN D W, DEAN J M. Calcein as a fluorescent marker of otoliths of larval and juvenile fish [J]. *Tran Am Fish Soc*, 1987, 116 (4) : 668 - 670.
- [11] DAY R W, WILLIAMS M C, HAWKES G P. A comparison of fluorochromes for marking abalone shells [J]. *Mar Freshw Res*, 1995, 46 (3) : 599 - 605.
- [12] STEWART B. Growth dynamics of the radial shields of the euryalid snake star *Astrobrachion constrictum* (Echinodermata; Ophiuroidea) [J]. *Invertebr B*, 1996, 115 (4) : 321 - 330.
- [13] KAEHLER S, MCQUAID C D. Use of the fluorochrome calcein as an in situ growth marker in the brown mussel *Perna perna* [J]. *Mar Biol*, 1999, 133 (3) : 455 - 460.
- [14] PURCELL S W, SIMUTOGA M. Spatio-temporal and size-dependent variation in the success of releasing cultured sea cucumbers in the wild [J]. *Rev Fish Sci*, 2008, 16 (1 - 3) : 204 - 214.
- [15] BUMGUARDNER B W, KING T L. Toxicity of oxytetracycline and calcein to juvenile striped bass [J]. *T Am Fish S*, 1996, 125 (1) : 143 - 145.
- [16] SILVA A M M, NOVELLI E L B, FASCINELI M L, *et al.* Impact of an environmentally realistic intake of water contaminants and superoxide formation on tissues of rats [J]. *Environ Pollut*, 1999, 105 (2) : 243 - 249.
- [17] WINSTON G W, DI GIULIO R T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms [J]. *Aquat Toxicol*, 1991, 19 (2) : 137 - 161.
- [18] PURCELL S W, BLOCKMANS B F. Effective fluorochrome marking of juvenile sea cucumbers for sea ranching and restocking [J]. *Aquaculture*, 2009, 296 (3 - 4) : 263 - 270.
- [19] FRIDOVICH I. Oxygen toxicity: a radical explanation [J]. *J Exp Biol*, 1998, 201 (8) : 1203 - 1209.
- [20] 周常义, 严重玲, 黄成, 等. 三唑磷对泥蚶急性毒性及血清 SOD, CAT 酶活性的影响 [J]. *海洋科学*, 2004, 28 (12) : 43 - 48.
- [21] NASCI C, DA ROS L, CAMPESAN G, *et al.* Clam trans-plantation and stress-related biomarkers as useful tools for assessing water quality in coastal environments [J]. *Mar Pollut Bull*, 1999, 39 (1 - 12) : 255 - 260.
- [22] ELIF O O, NEVIN U. Combined effects of 2, 4-D and az-inphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2000, 127C (3) : 291 - 296.
- [23] 马森. 谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽转硫酶研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2008, 29 (10) : 53 - 55.

Marking sea cucumber *Apostichopus japonicus* with calcein and its effects on antioxidant system

ZHAO Peng^{1,2}, YANG Hong-sheng^{1*}, WANG Xiao-yu¹, LIN Cheng-gang¹, LI Xiang-ping¹

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology,

Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. National Marine Data & Information Service, Tianjin 300171, China)

Abstract: To evaluate effectiveness of enhancing and restocking stock of sea cucumber *Apostichopus japonicus*, it is necessary to find an effective and secure way to mark sea cucumber's soft body wall which rejects external objects and heals up quickly. In this study, juveniles of sea cucumber (3.45 ± 1.34) g were immersed in calcein (200 mg/L) for 24 h, and their ossicles were examined under Nikon 80i fluorescence microscope to judge calcein's effectiveness. Then, influence of calcein concentration (normal concentrations including 50, 200, 400 mg/L; and high concentrations including 500, 750, 1 000 mg/L) and immersion time (8, 24, 48, 72 h) on antioxidant enzymes SOD, CAT, and GSH-Px were studied to test its security. The results revealed that ossicles in upper layer of dermis of sea cucumber's body wall, tentacle, podia and parapodia could be dyed by calcein, and showed green under fluorescence microscope with optical filter (λ : Ex 450 – 490 nm) 7 days after being immersed in calcein solution. Brightness of stained ossicles was diversified because of immersion duration and ossicles' maturation degree. In this study, both normal and high concentrations of calcein had no significant impact on activities of SOD and GSH-Px ($P > 0.05$), while activity of CAT was restrained in 1 000 mg/L concentration treatment ($P < 0.05$). Immersion duration had significant impact on activities of all three enzymes. Activity of SOD was significantly lower in the 72 h treatment than in other ones ($P < 0.05$); activity of CAT declined with increasing immersion duration; and activity of GSH-Px in the 24 h treatment was significantly higher than in the 48 h one ($P < 0.05$). Interaction between immersion duration and calcein concentration had significant impact on activities of SOD and CAT ($P < 0.05$), and showed no significant effect on that of GSH-Px ($P > 0.05$). The result indicated that calcein concentration lower than 750 mg/L and immersion time around 24 h influenced activity of all three enzymes less and marked ossicles effectively for examining. It is still necessary to take other factors such as oxygen into consideration for sea cucumber's survival.

Key words: *Apostichopus japonicus*; fluorescent marking; antioxidant enzyme; calcein

Corresponding author: YANG Hong-sheng. E-mail: hshyang@126.com