

斑节对虾血淋巴细胞对鳃弧菌的清除作用

郭志勋, 冯 娟, 王江勇

(中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘要:通过检测注入斑节对虾(*Penaeus monodon*)血淋巴内的鳃弧菌(*Vibrio anguillarum* H)浓度,血淋巴细胞浓度和血淋巴细胞的组成变化,研究斑节对虾血淋巴细胞对进入体内细菌的清除作用。实验显示,斑节对虾能够迅速清除注入其体内的鳃弧菌。注射鳃弧菌悬液($10^7 \sim 10^8$ CFU/mL) 5 min后,血淋巴中可检测到的鳃弧菌浓度是 $(1.4 \pm 0.6) \times 10^8$ CFU/mL,而2 h后所检测到的鳃弧菌的浓度仅相当于前者的3.1%。7天后,仅在部分个体的血淋巴中检测到少量鳃弧菌。伴随着血淋巴液内鳃弧菌的减少,对虾的血淋巴细胞浓度发生变化。鳃弧菌注入对虾体内5 min后,血淋巴细胞浓度为 $(3.51 \pm 1.69) \times 10^7$ /mL,注射后2 h时达到最低值,为 $(2.39 \pm 1.76) \times 10^7$ /mL,然后逐步恢复,注射后48 h达到 $(3.97 \pm 1.60) \times 10^7$ /mL。对照组血淋巴细胞浓度起初略微降低,然后逐步增加,在2 h达到最大值后又逐渐降低;除注射后48 h外,对照组血淋巴细胞浓度始终高于实验组。鳃弧菌注入斑节对虾体内后,不同的细胞种类呈现出不同的变化规律:在注射后2 h,对照组透明细胞占总细胞数的比例显著高于实验组,对照组半颗粒细胞的含量低于实验组。注射鳃弧菌后10 min,血淋巴中颗粒细胞的相对含量显著降低,此时实验组的颗粒细胞相对含量也低于对照组。而对于降解细胞细胞核的相对含量,实验组和对照组表现出了显著不同的变化趋势。在对照组中,24 h内其含量一直在降低,而后恢复;而对照组却在注射10 min时达到最高值,而后遵循对照组类似的变化。[中国水产科学,2006,13(1):28-32]

关键词:斑节对虾;血淋巴细胞;鳃弧菌;清除作用

中图分类号:S917.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)01-0028-05

斑节对虾(*Penaeus monodon*)是最常见的养殖品种之一。然而,在对虾养殖业迅速发展的同时,虾病也不断发生。在虾病的预防和治疗中,使用化学药物和抗生素的潜在危害越来越受到人们的关注,利用疫苗和免疫增强剂来调节对虾的生理机能,加强其自身防御,提高对疾病的抵抗力成为目前研究的热点之一^[1-4]。

异物清除是免疫反应的最终目标,Martin等^[5]研究了锐角单肢虾(*Sicyonia ingentis*)对注入其血淋巴内蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、绿色气球菌(*Aerococcus viridians*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)的清除过程及在此过程中血淋巴细胞浓度的变化。另外,有研究者利用免疫组织化学技术跟踪溶藻弧菌^[6]、鳃弧菌(*V. anguillarum*)^[7]、创伤弧菌(*V. vulnificus*)^[8]在斑节对虾不同器官的密度变化来研究其对弧菌的清除机理。血淋巴细胞是甲壳动物免疫系统的重要组成部分,同异物识别、凝

集作用、吞噬作用等多种免疫功能密切相关^[9],在异物的清除中发挥了非常重要的作用。目前关于对虾血淋巴细胞的报道多集中在对血淋巴细胞的特征、分类描述及其功能的研究上^[10-13],关于斑节对虾对活菌的清除规律以及在清除过程中血淋巴细胞的反应鲜有报道。本实验通过研究斑节对虾对注入体内的鳃弧菌的清除作用及在此过程中血淋巴细胞浓度和种类组成的变化,探讨斑节对虾对侵入体内异物的清除机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用虾及养殖用水 从虾苗场购买斑节对虾虾苗(体长约1 cm),在实验室内养至体重为 (3.28 ± 1.12) g,选取大小均匀的个体96尾随机平均分成2组,分别作为实验组和对照组,暂养于配备有循环水系统的水族箱中。水族箱内养殖海水为人工配制海水,容积为144 L,水温28.5℃,盐度20。

收稿日期:2005-02-24; 修订日期:2005-06-03。

基金项目:广东省科技攻关重点项目(A3050304);中国水产科学研究院科研基金项目(2001-2-5)。

作者简介:郭志勋(1970-),男,硕士,主要从事病害防治和营养免疫研究。E-mail: Gzxhxcn1@163.com

1.1.2 实验细菌 鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum* H), 本实验室保存菌株。

1.2 注射液制备

实验用鳃弧菌接种于装有含 1% NaCl 的 BHI (brain heart infusion) 培养基的锥形瓶中, 28 ℃ 培养 6 h, 然后用 PBS (NaCl 1.0 g, KCl 0.02 g, KH_2PO_4 0.02 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.144 g, 加 H_2O 至 1 L) 缓冲液稀释至 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL, 细菌悬浊液的吸光值 ($\text{OD}_{570\text{nm}}$) 为 0.8~1.0。把稀释后的细菌悬液分成 2 份, 一份用作注射液, 另一份以 3 000 r/min 离心 5 min, 上清液用 0.22 μm 的无菌微孔滤膜过滤除菌, 滤液用作对照注射液。把对照注射液涂布平板, 28 ℃ 培养 24 h, 以确保无菌。

1.3 注射和采血

用一次性注射器把鳃弧菌注射液以及鳃弧菌对照注射液分别注入对虾第二腹节的血窦中, 注射剂量每只虾为 0.1 mL。注射后的对照组和实验组对虾分别养在装有循环水系统的小网箱中。在注射后 5 min, 10 min, 2 h, 24 h, 48 h 和 168 h, 用装有约 0.1 mL 抗凝剂 (19.3 mmol/L 柠檬酸钠, 239.8 mmol/L NaCl, 182.5 mmol/L 葡萄糖, 6.2 mmol/L EDTA, pH 7.3)、容积为 1 mL 的注射器在注射位置的另一侧采血, 并称重空注射器、装有抗凝剂的注射器、采血后的注射器的质量, 以确定混合液中血淋巴的含量, 每次实验组和对照组各取 8 尾虾。血样置于 1.5 mL 离心管里冰浴保存。

1.4 血淋巴细胞浓度

用 Baker 血球计数板计数血淋巴细胞浓度。

1.5 血淋巴细胞的种类组成

血淋巴细胞用含 2% 福尔马林的抗凝剂固定, 4 ℃, 3 000 r/min 离心 10 min, 用抗凝剂重新悬浮至 10^6 mL^{-1} , 转移到微孔载玻片上, 保湿盒内 4 ℃ 保温 1 h, 使血细胞附着, 倒掉上清液, PBS 缓冲液洗涤, 风干, HE 染色, 光镜观察 ($\times 1000$)。根据细胞的形状、细胞核质比以及细胞质中嗜酸性颗粒的特征来判定透明细胞、半颗粒细胞、颗粒细胞和裸露细胞核。透明细胞核质比大, 细胞质透明, 无嗜酸性颗粒; 半颗粒细胞核质比较小, 细胞质中有较少的嗜酸性颗粒; 颗粒细胞核质比小, 细胞质中充满较大的嗜酸性颗粒; 裸露细胞核为血淋巴细胞降解后形成的, 无细胞质。分别计数透明细胞、半颗粒细胞、颗粒细胞及裸露细胞核的数量, 每孔共数 500 个细胞, 计算

各类细胞占总血淋巴细胞数的比例。

1.6 对细菌的清除作用

50 μL 血淋巴用 1% NaCl 溶液系列稀释或直接涂布在含有 1% NaCl 的 BHI 平板上, 28 ℃ 培养 24 h 后计数。用单位体积血淋巴中鳃弧菌的浓度表示斑节对虾对细菌的清除作用。

1.7 统计分析

利用 SPSS 11.0 中的 t -检验对数据进行统计分析, 差异显著水平为 5%。

2 结果

2.1 斑节对虾对鳃弧菌的清除作用

斑节对虾可以非常迅速地清除注入其血淋巴中的鳃弧菌, 结果见图 1。在注射后 5 min, 血淋巴中可检测到的细菌浓度是 $(1.4 \pm 0.6) \times 10^6$ CFU/mL; 2 h 后, 可检测到的细菌浓度仅达到 5 min 时的 3.1%, 为 $(4.3 \pm 8.0) \times 10^5$ CFU/mL, 显著降低 ($P < 0.05$); 直到实验结束时, 在某些个体的血淋巴中仍能检测到少量鳃弧菌的存在, 在对照组的血淋巴中没有检测到鳃弧菌。

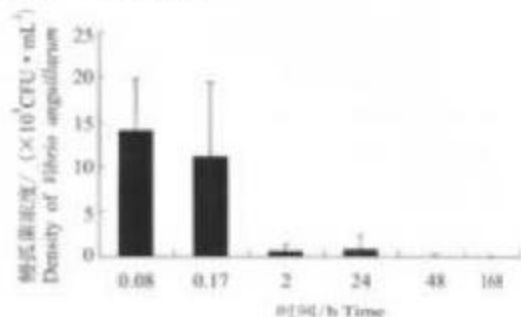


图1 注射鳃弧菌后血淋巴中鳃弧菌浓度的变化

Fig.1 Kinetics of *Vibrio anguillarum* density in the haemolymph post-injection

2.2 血淋巴细胞浓度

如图 2 所示, 鳃弧菌注入斑节对虾的血淋巴 5 min, 血淋巴细胞浓度为 $(3.51 \pm 1.69) \times 10^7$ /mL, 之后逐渐降低, 在 2 h 达到最低, 为 $(2.39 \pm 1.76) \times 10^7$ /mL; 然后, 又逐渐恢复, 48 h 后达到 $(3.97 \pm 1.60) \times 10^7$ /mL, 略微超过注射后 5 min 时的水平。注射后 5 min, 对照组的血淋巴细胞浓度为 $(4.18 \pm 1.28) \times 10^7$ /mL, 先稍微降低, 然后升高, 注射后 2 h 达到最高, 为 $(4.63 \pm 2.24) \times 10^7$ /mL; 除注射后 48 h 外, 对照组血淋巴细胞浓度始终高于实验组。

相对于实验组,对照组血淋巴细胞浓度变化相对平稳,降低幅度小,恢复快。在整个实验过程中,各组间差异不显著($P>0.05$)。

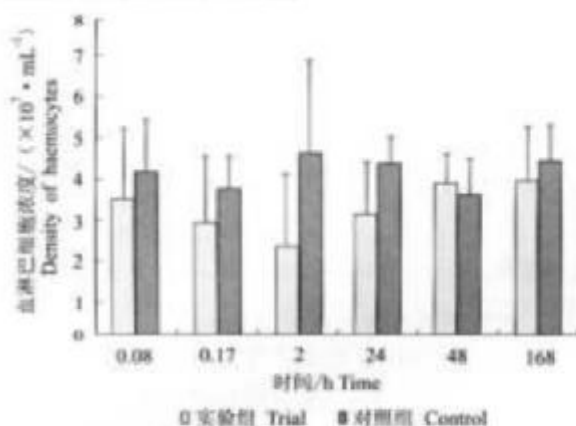


图2 注射鳃弧菌后血淋巴细胞浓度的变化

Fig.2 Kinetics of haemocytes density after *Vibrio anguillarum* injection

2.3 血淋巴细胞的种类组成

如图3所示,在注射鳃弧菌后2 h,对照组透明细胞占总细胞数的比例显著高于实验组($P<0.05$),此时对照组半颗粒细胞的含量低于实验组。注射鳃弧菌后10 min,血淋巴中颗粒细胞的相对含量显著降低($P<0.05$),然后恢复,此时实验组的颗粒细胞相对含量也低于对照组。而降解细胞细胞核的相对含量,实验组和对照组表现出了不同的变化趋势。在对照组中,其含量降低一直到注射后24 h,而后恢复;而实验组却在注射10 min时达到最高值,以后遵循对照组类似的变化,在注射后48 h达到最低,显著低于其他值($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 斑节对虾对鳃弧菌的清除规律

本研究结果表明,斑节对虾能够在2 h内非常迅速地清除进入体内的97%的鳃弧菌,但直到实验结束时,在某些个体中仍检测到鳃弧菌的生存。同样的实验结果其他作者也有报道,Adams^[6]发现斑节对虾能够在4 h内清除注入体内的99%的热灭活溶藻弧菌,直到注射或菌浴后的第5天,血淋巴中还能检测到少量的细菌。锐角单肢虾^[5]能够清除注入血淋巴内的4种细菌(蜡状芽孢杆菌、绿色气球菌、溶藻弧菌和荧光假单胞菌),其中,蜡状芽孢杆菌

和绿色气球菌在20 min中内被完全清除,而溶藻弧菌和荧光假单胞菌在1 h后还能分别检测到23%和7.8%^[5]。这些研究结果说明对虾对细菌的应激反应能力非常有效,在很短的时间内可以调动机体的免疫系统,显著地降低细菌的数量,维持机体的正常和平衡。但是对于某些对虾个体为什么不能充分清除进入体内的细菌,还需要进一步的深入研究。

3.2 鳃弧菌清除过程中血淋巴细胞浓度的变化

注入细菌后,血淋巴细胞浓度伴随着鳃弧菌的清除而降低(图2),并且同鳃弧菌的清除相一致(图1),而当血淋巴中细菌的浓度降低到一定水平时,又逐渐恢复。本研究中注射细菌后2 h,97%的细菌被清除出循环系统,血淋巴细胞浓度达到最低值。同其他甲壳动物一样,斑节对虾血淋巴细胞通过吞噬、凝集、包裹以及结节作用清除进入体内的细菌^[7]。在细菌的清除过程中,循环系统中自由血细胞的数量急剧地减少^[5]。但是,血淋巴细胞的丰度是否影响甲壳动物对进入体内细菌的清除能力,不同的作者得出了不同的结论。例如:Martin等^[5]发现血细胞的减少不影响锐角单肢虾对细菌的清除,而Persson等^[14]却认为体内自由血淋巴细胞的减少导致淡水蟹对病原的易感性升高。在本研究中,在实验组与对照组之间以及注射后的不同时间之间,斑节对虾的血淋巴细胞浓度没有显著的差异。作者认为这是由于所注射的菌株对斑节对虾的低致病性造成的,预备实验发现,当注射浓度超过 10^8 CFU/mL时才导致斑节对虾死亡。这同Johnson等^[15]的关于寄主对无毒、无侵袭性的细菌仅做出微弱的、不充分的防御反应的论断是一致的。

3.3 鳃弧菌清除过程中血淋巴细胞百分比组成的变化

细菌注入斑节对虾体内后,不同种类的血淋巴细胞所占总细胞数的比例呈现出不同的变化规律(图3)。这是由于各种细胞在对虾的免疫反应中所起的作用不同和反应时间不同造成的。甲壳动物的透明细胞的主要功能是吞噬作用;半颗粒细胞的主要功能是在吞噬、结节以及包裹作用,并且能够合成和释放酚氧化酶原的基本因子,在异物识别、酚氧化酶原系统的激活中发挥部分作用;颗粒细胞的主要作用是合成和释放酚氧化酶原激活系统的基本因子,在此系统的激活中起主要作用,但需由半颗粒细胞释放的物质来激活^[16]。3种血淋巴细胞在凝集作用中都发挥一定的作用。在此过程中由于各种因

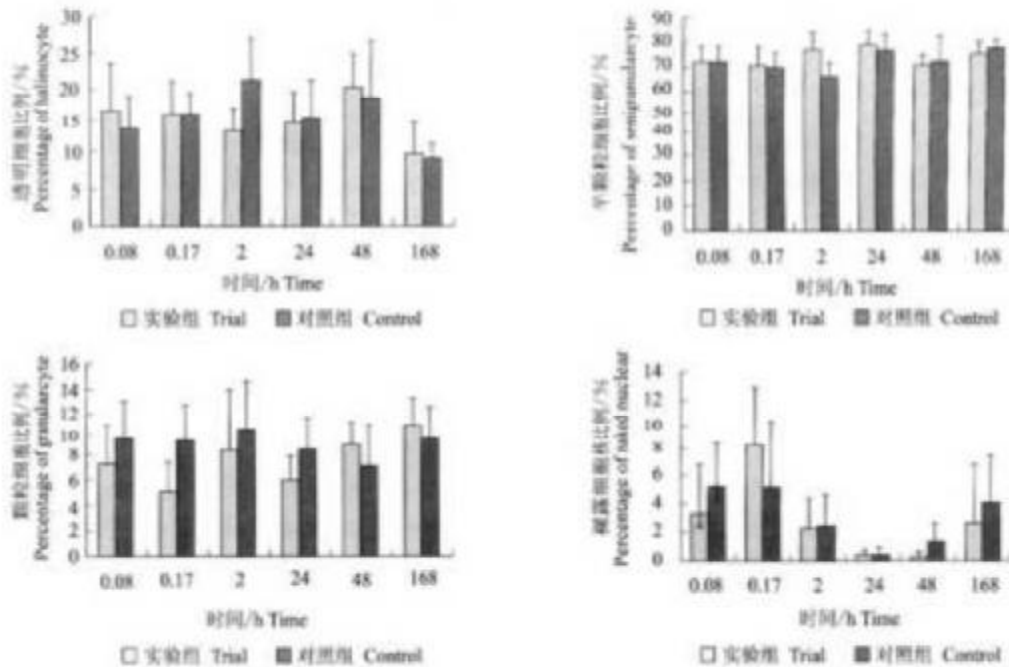


图3 注射鳃弧菌后血淋巴细胞的种类组成变化

Fig.3 The percentage variation of the different type of haemocyte after bacterin-injection

素的综合作用而导致细胞膜解体,细胞质释放,产生裸露的细胞核,它们将作为异物被免疫系统清除出去。

从图2和图3可以看出,血淋巴细胞对注射人体内的细菌和胞外产物的反应不同,并且细胞种类不同,反应也不同。作者认为对照组注射液的主要异物是胞外产物,这些物质是可溶的,溶解在里面的细菌代谢产物和胞壁物质激活了对虾的免疫反应,异源性较低,毒性较小而没有引起或引起较弱的后续免疫反应,所涉及的血淋巴细胞数量和种类较少;而细菌菌体是颗粒性物质,异源性较高,不仅激活了酚氧化酶原激活反应,而且,其余后续反应如凝集、吞噬、结节以及包裹作用都被激活,涉及的淋巴细胞数量和种类较多,影响较大,死亡较多,导致裸露细胞核比例升高。血淋巴中裸露细胞核相对数量的变化趋势说明两种注入物都有促进血淋巴细胞代谢的作用。

4 小结

斑节对虾能够非常迅速地清除进入体腔内的鳃弧菌,在此过程中血淋巴细胞发挥了重要的作用,但不同种类的细胞反应不同,血淋巴细胞的数量随鳃

弧菌的清除而降低,如果侵入体内的细菌不足以使对虾死亡,减少的血淋巴细胞在细菌侵入体内后48 h左右得到恢复。细菌及其代谢产物等异物进入斑节对虾能够激活对虾的免疫体系,促进对血淋巴中异物(包括死亡的血细胞)的清除作用。

参考文献:

- [1] Iwami T, Takashi Y, Nakamura Y. Efficacy of vaccination against vibriosis in cultured kuruma prawns *Penaeus japonicus* [J]. J Aqu Anim Health, 1989, 1: 238-242.
- [2] 许兵,纪伟尚,徐怀超,等. 麦胚凝集素促进对虾免疫功能的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1992, 22(4): 29-34.
- [3] Alabi A O, Jones D A, Latchford J W. The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi* [J]. Aquaculture, 1999, 178: 1-11.
- [4] Chang C F, Su M S, Chen H Y, et al. Effect of dietary 1,3-glucan on resistance to white spot syndrome virus (WSSV) in postlarval and juvenile *Penaeus monodon* [J]. Dis Aqu Org, 1999, 36: 163-168.
- [5] Martin G G, Pyle C, Huse J E, et al. Clearance of bacteria injected into the haemolymph of the Penaeid Shrimp, *Squilla* [J]. J Invert Pathol, 1993, 62: 308-315.
- [6] Adams A. Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species [J]. Fish and Shellfish Immunology, 1991, 1: 59-70.

- [7] Guo Z X, K van de IJnck, M Botterbloem. Distribution of bacteria injected in body of giant black shrimp, *Penaeus monodon* [J]. Chin J Oceanol Limnol, 2004, 22(2): 186-191.
- [8] Alday-sanz V, Roque A, Turnbull J F. Clearing mechanism of *Vibrio vulnificus* biotype I in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. Dis Aqua Org, 2002, 48: 91-99.
- [9] Söderhäll K, Cerenius L. Crustacean immunity[J]. Annual Rev of Fish Disease, 1992; 3-23.
- [10] 杜爱芳, 蔡晋明, 于 进. 中国对虾血细胞吞噬功能的研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(2): 1-6.
- [11] 叶燕玲, 陈宽智. 中国对虾血细胞超微结构、分类及计数[J]. 青岛海洋大学学报, 1993, 23(2): 35-42.
- [12] Braak C B T, Faber R, Boon J H. Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) haemolymph[J]. Comp Haematol Int, 1996, 6: 194-203.
- [13] Tsing A, Arcier J-M, Brehelin M. haemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry and hemograms[J]. J Invertebr Pathol, 1989, 53: 64-77.
- [14] Persson M, Cerenius L, Söderhäll K. The influence of haemocyte number on the resistance of the fresh crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci* [J]. J Fish Dis, 1987, 10: 471-477.
- [15] Johnson P T, Steward J E, Arie B. Histopathology of *Aeromonas viridans* var. *Homari* infection (Gaffkemia) in lobster, *Homarus americanus*, and a comparison with histological reactions to a Gram-negative species, *Pseudomonas penaei* [J]. J Invert Path, 1981, 38: 127-148.
- [16] Söderhäll K, Johnson M W, Smith V J. Internal defense mechanisms[A]. Freshwater crayfish: Ecology, management and exploitation[C]. Portland: Timber Press, 1988, 213-235.

Clearance of *Vibrio anguillarum* by haemocytes in giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* in vivo

GUO Zhi-xun, FENG Juan, WANG Jiang-yong

(South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: The clearance of vibrio by haemocytes of giant black shrimp (*Penaeus monodon*) in vivo was studied by detection of bacteria density, haemocyte density and the composition of the different types of haemocytes in the haemolymph after *V. anguillarum* was injected into the haemolymph of *P. monodon*. The body weight of shrimp cultured in the lab was (3.28 ± 1.12) g, and the density of the injected bacteria solution was $10^7 - 10^8$ CFU/mL. The results showed that injected bacteria were removed from the haemolymph of the shrimp rapidly. Nearly 97% was eliminated within 2 h after bacteria-injection comparing to what could be detected in 5 minutes after injection. Low levels of bacteria were observed until 7 days after injection in some individuals.

The haemocytes density declined with the time of bacteria clearance and reached its minimum level of $(2.39 \pm 1.76) \times 10^7$ /mL at 2 h after the injection, then it reached $(3.97 \pm 1.60) \times 10^7$ /mL after 48 h. For the control group, the haemocytes density slightly declined at first, then increased; at 2 h after injection, it reached its maximum, then declined gradually. Except at 48 h after injection, the haemocytes density of shrimp in the control group was slightly higher than that in the experiment group, although the differences were not significant. The responses of the various types of haemocytes were different: at 2 h after injection, the relative proportion of the haline cells in the shrimp of the experiment groups was significantly lower than that of the control group, while that of the semi-granular cells was relatively high; 10 min after bacteria injection, the relative proportion of the granular cells of the experiment group declined significantly, and it was lower than that of the control group. The ratio changes of the naked haemocyte nucleus in the experiment group were different from that in the control group. In the control group, it declined until 24 h after injection and restored, while it increased firstly and reached maximum at 10 min after injection in the experiment group, after that, its change trend was similar to that in the control group. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1): 28-32]

Key words: *Penaeus monodon*; haemocyte; *Vibrio anguillarum*; clearance