CpG ODN-1670体外处理对中华绒螯蟹血细胞酚氧化酶及其酶原的影响

李红霞[1],俞菊华[1],李义[2],徐跑[1]

(1.中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心,农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室,江苏 无锡 214081;
2.苏州大学 生命科学学院,江苏 苏州 215123)

摘要:分别使用5 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、75 μg/mL和100 μg/mL剂量的CpG体外处理中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)血细胞,检测了胞内外酚氧化酶(phenoloxidase,PO)活性的相对变化,进一步采用Real Time PCR方法分析了胞内酚氧化酶原(prophenoloxidase, proPO)基因的相对表达情况。结果表明,25 μg/mL剂量的CpG ODN-1670可以有效促进酚氧化酶原的表达以及增强胞内外酚氧化酶活性($P<0.05$),ODN-1670增强酚氧化酶活性的途径是经由促进胞内酚氧化酶原的表达,合成新的酚氧化酶原颗粒实现的。此外,本研究使用几种细胞信号转导的激活剂或抑制剂处理中华绒螯蟹离体血细胞,通过检测血细胞内外酚氧化酶(PO)活性的变化探讨了ODN-1670触发proPO激活系统的信号转导途径,结果表明,其信号转导途径可能包含了G-蛋白介导的蛋白激酶C(PKC)途径,而酪氨酸蛋白激酶(RTK)途径对ODN-1670触发proPO激活系统的活化进行负调控。本研究旨在为深入探讨中华绒螯蟹的免疫功能和防卫机理奠定基础。[中国水产科学,2010,17(4):639-648]

关键词:中华绒螯蟹;CpG ODN-1670;酚氧化酶;信号转导

中图分类号:Q959;S94 **文献标识码**:A **文章编号**:1005-8737-(2010)04-0639-10

作为甲壳动物非特异性免疫的重要组成部分,酚氧化酶(phenoloxidase, PO)已经引起越来越多学者的重视。酚氧化酶一般以无活性的酚氧化酶原(prophenoloxidase, proPO)形式存在于体内[1]。酚氧化酶、酚氧化酶原及其因子在甲壳动物体内的构成是一个复杂的酶级联反应系统,即酚氧化酶原激活系统(prophenoloxidase-activated system)。一旦遇到适合的外界刺激[2-5],该系统即可活化,使得无活性的酶原经过系列级联反应转化为有活性的酚氧化酶,再经由包被等免疫反应,最终达到免疫保护的目的。随着分子生物技术的日益完善,罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)[6]、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)[7]及中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)[8]的酚氧化酶原mRNA已经被陆续克隆分离出来,其序列特征及结构也得到了分析研究。同时也对经过不同外界刺激后酚氧化酶原mRNA表达进行了监测。CpG寡脱氧核苷酸(CpG-oligodeoxynucleotides, CpG-ODN),是人工合成的含有CpG基因序列的寡聚脱氧核糖核苷酸,能够模拟细菌DNA,具有免疫刺激活性。近年来在水产动物中的研究表明,CpG-ODNs在体内外均能有效刺激鱼类的免疫功能[9-13],是一种新型的免疫增强剂。作者以往的研究也发现,CpG ODNs可以有效增强中华绒螯蟹的血清溶菌酶、酸碱性磷酸酶[14]、呼吸暴发活性、过氧化物酶及超氧化物歧化酶的活性[15]。Chuo等[16]研究发现,CpG ODN-2006能增强罗氏沼虾血细胞溶解上清(hemocyte lysate supernatant, HLS)中的PO活性。但迄今为止,尚未见有关CpG ODNs对中华绒螯蟹酚氧化酶影响

收稿日期:2009-11-23;**修订日期**:2009-12-15.
基金项目:农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放课题(BM2007-04);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2007JBFB10);农业行业专项优质蟹种规模化繁育与养殖示范(nyhyzx07-045).
作者简介:李红霞(1982-),女,硕士,实习研究员,主要从事水生生物技术研究. E-mail:hongxialy@126.com
通讯作者:俞菊华(1966-),女,研究员,主要从事水生生物技术研究. E-mail:yujh@ffrc.cn

的报道。本研究探讨了CpG ODN-1670体外处理对中华绒螯蟹血细胞胞内外酚氧化酶活性的变化及胞内酚氧化酶原的表达情况，并在此基础上选用了几种细胞信号转导激活剂和抑制剂，探讨了ODN-1670触发中华绒螯蟹酚氧化酶原激活系统的过程，即相关信号转导机制，旨为探明中华绒螯蟹的免疫功能和防卫机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验中华绒螯蟹均购自江苏省无锡市中桥菜市场。

CpG ODN-1670（鱼的合适免疫刺激序列：5′–ACC GAT AAC GTT GCC GGT GAC G–3′），上海生工生物工程公司合成，全硫代修饰，聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）纯化，纯度99.99%；氟化钠，G蛋白激活剂；佛波酯［佛波醇–12–肉豆蔻酸盐–13–醋酸盐（PMA）］，磷酸激酶C（PKC）激活剂；白屈菜赤碱（Chelerythrine，简称Che），PKC抑制剂；三羟基异黄酮（Genistein，简称Gen），酪氨酸蛋白激酶抑制剂；不含酚红的M-199培养基。

1.2 方法

1.2.1 血细胞的制备及处理 随机选取6只中华绒螯蟹，使用一次性注射器于蟹第3或第4步足的基关节膜处抽取血淋巴，将血淋巴与ACD抗凝剂以体积比1∶1混匀于1.5 mL Eppendorf管内，1 000 r/min（4 ℃）离心10 min，取血细胞沉淀物悬浮于M-199培养液中，调节血细胞浓度至5×10^6个细胞/mL。用台盼蓝排除实验判断细胞悬浮液中活细胞的百分率，存活率达85%以上的细胞悬液用于后续实验。取血细胞沉淀物分别用含有0 μg/mL、5 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、75 μg/mL、100 μg/mL剂量ODN-1670的等体积（400 μL）M-199培养液处理30 min，处理完毕后分为2份，1份用于测定胞内外酚氧化酶PO活性，1份用于检测酚氧化酶原proPO的mRNA的表达。

1.2.2 血细胞破碎物上清液（HLS）的制备及酚氧化酶（PO）活性测定 参照Sung等[17]的方法作适当改进。将血细胞沉淀物用0.5 mL 4 ℃预冷的无菌的0.01 mol/L PBS溶液（pH 7.0）重新悬浮，在0 ℃下（置冰水浴中）用超声波匀浆（每次5 s，共5次），然后12 000 r/min离心20 min（4 ℃），所得上清液即为血细胞破碎物上清液（HLS）。参照Sung等[18]方法，用96孔平底酶标板，分别测定胞外培养液和HLS中的PO活性。将一份样品均分为2份子样品，1份子样品用于测定受刺激后的PO活性（stimulated PO activity，PO_S）；另1份经胰蛋白酶溶液处理后测定总PO活性（total PO activity，PO_T）。

1.2.3 不同浓度CpG ODN-1670体外处理酚氧化酶原mRNA的相对表达 根据Yunchao Gai等[8]分离的中华绒螯蟹proPO mRNA全序列（gi：152003265）设计1对定量PCR引物F：GACTGTGAAAGCGGCCCTTAGTA R：TTGCTTCCCATTTGCTTCTGTTG。收集经5 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL剂量ODN-1670处理的中华绒螯蟹血细胞沉淀物，使用Trizol Reagent（Promega）Kit抽提总RNA，使用RNase-free Dnase处理以消除样品中的DNA污染。UV分光光度计（Eppendorf BioPhotometer）测定OD_{260}/OD_{280}（1.9～2.0）以判定所抽提RNA质量。用500 ng总RNA，以oligodT-AP为引物，根据AMV试剂盒（Takara）使用说明进行RT反应，反应总体积为10 μL。然后以此RT液为模板进行Real time PCR。反应条件为：95 ℃ 5 min，然后，95 ℃ 15 s，58 ℃ 20 s，72 ℃ 30 s，40次循环，最后72 ℃ 3 min，4 ℃保存。PCR仪为Eppendorf mastercycler personal。Real-time PCR仪为BIO-RAD的MJ Mini型。对取得的数据用动力学法[19]进行分析。

1.2.4 CpG ODN-1670与几种细胞信号转导的激活剂或抑制剂处理 血细胞的制备同上，取血细胞沉淀物分别用等体积（200 μL）的含下述物质：（1）ODN-1670；（2）激活剂；（3）抑制剂；（4）ODN-1670与各试剂联合处理的M-199处理30 min。处理完毕后，收集上清液（胞外培养液）测定胞外PO活性；收集血细胞沉淀物制备血细胞破碎物上清液（HLS）测定胞内PO活性，测定方法同上。本实验均以相对PO活性（relative activity，RA）来比较各处理的效应。

RA＝处理组PO活性 / 对照组PO活性。

1.2.5　数据处理　每份样品平行检测3次，所有实验数据包括测得的2种类型的PO活性（POS和POT），用统计软件SPSS13.0进行ANOVA（方差分析）和Tukey's检验法进行多重比较，$P<0.05$表示差异显著。

2　结果与分析

2.1　CpG ODN-1670体外刺激中华绒螯蟹血细胞对酚氧化酶的影响

2.1.1　对中华绒螯蟹血细胞内外PO_S和PO_T活性的影响　ODN-1670对蟹血细胞PO_S和PO_T活性的影响如图1所示，与对照组相比，5个实验组的胞内、外PO_S及胞内PO_T均增加，并基本呈现剂量依赖性；其中，25 μg/mL以上组的胞内、外PO_S和50 μg/mL以上组的胞内PO_T活性均显著增加（$P<0.05$）。与此相对，各实验组的胞外PO_T则随ODN-1670浓度的增加而呈下降的趋势，其中100 μg/mL组的胞外PO_T活性显著低于对照组和5 μg/mL组（$P<0.05$）。

2.1.2　对中华绒螯蟹血细胞内酚氧化酶原mRNA（proPO mRNA）相对表达的影响　ODN-1670对蟹血细胞内酚氧化酶原表达的影响见图2。由图2可知，与对照组相比，25 μg/mL剂量的ODN-1670可以有效促进胞内proPO mRNA的表达。实验条件下，各处理中ODN-1670浓度越高，胞内酚氧化酶原的相对表达量越高，呈现出较明显的剂量依赖性。

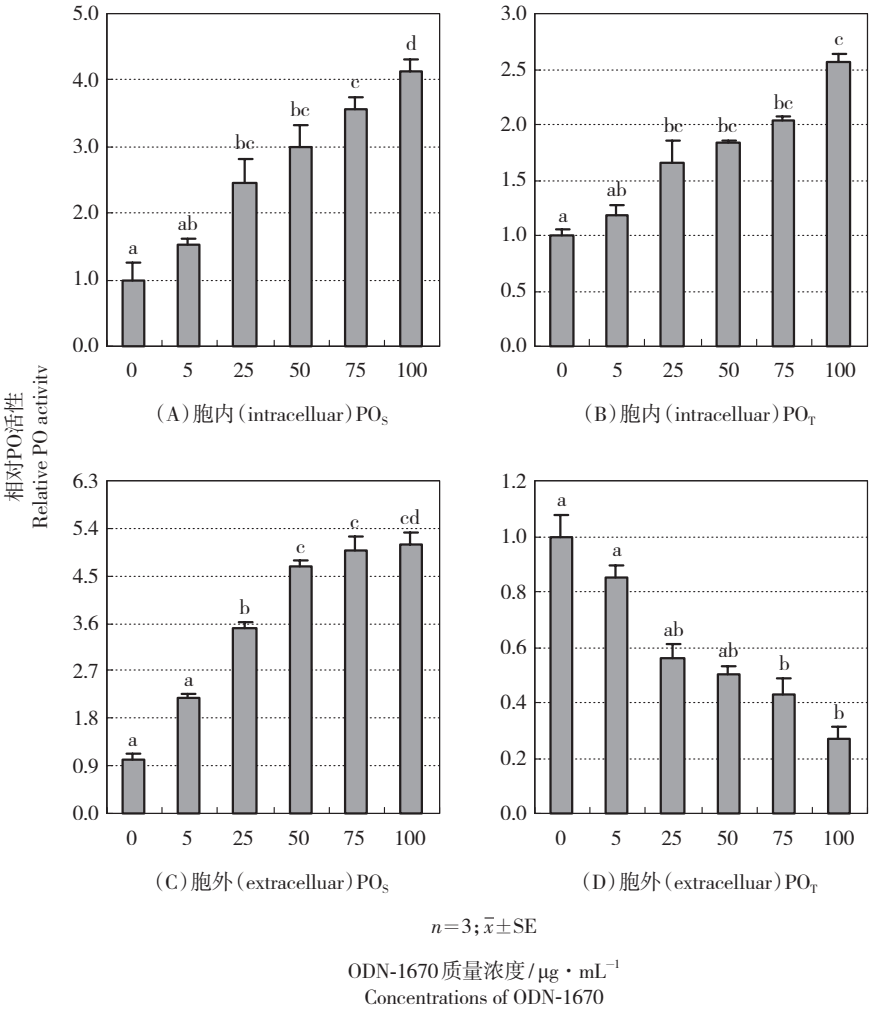


图1　ODN-1670处理后中华绒螯蟹血细胞酚氧化酶活性

a. PO_S：为经ODN刺激后的PO活性；PO_T：为总PO活性. b. 柱上不同字母表示处理间差异显著（$P<0.05$）.

Fig. 1　Relative phenoloxidase activity after the treatments with different doses of ODN-1670

a. PO_S: simulated PO activity by ODN; PO_T: total PO activity; b: significant difference ($P<0.05$) among the values with a different lower case letter above the bars.

2.2 G–蛋白激活剂氟化钠(NaF)对ODN-1670诱导的总酚氧化酶(POT)活性的影响

G–蛋白激活剂氟化钠(NaF)对ODN-1670诱导的POT活性的影响结果如图3所示,与对照组相比,5 mmol/L的NaF可使胞内、外PO_T活性都增加,但只能使胞外PO_T活性显著增加($P<0.05$)。血细胞经5 mmol/L的NaF和50 μg/mL的ODN-1670联合处理30 min,胞内POT活性显著高于对照组,但与单用ODN-1670处理组和单用NaF处理组间无显著差异;NaF和ODN-1670联合处理组的胞外PO_T活性显著高于ODN-1670处理组,但与NaF处理组及对照组没有显著差异。

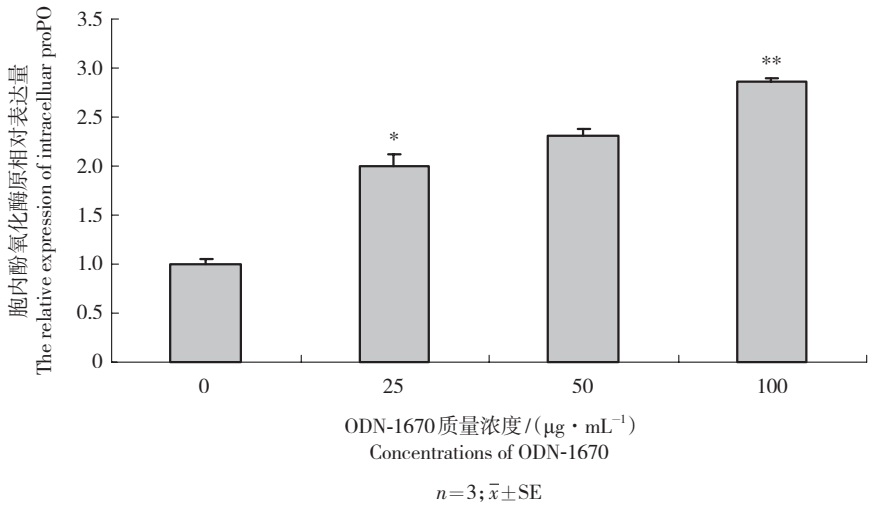


图2 ODN-1670处理后中华绒螯蟹血细胞胞内酚氧化酶原mRNA的相对表达情况

*表示与空白组相比差异显著($P<0.05$); **表示与空白组相比差异极显著($P<0.01$)

Fig. 2 Relative expression of intracellular proPO mRNA after the treatments with different doses of ODN-1670

* denotes significant difference between the treatment and control ($P<0.05$); ** denotes significant difference among the treatment and control ($P<0.01$).

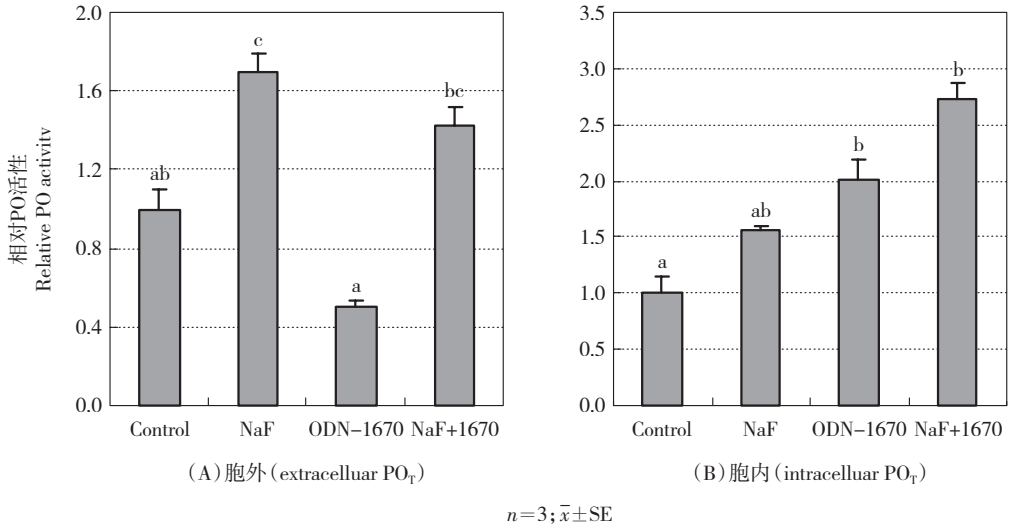


图3 G–蛋白激活剂氟化钠对ODN–1670诱导的相对总酚氧化酶(PO_T)活性的影响

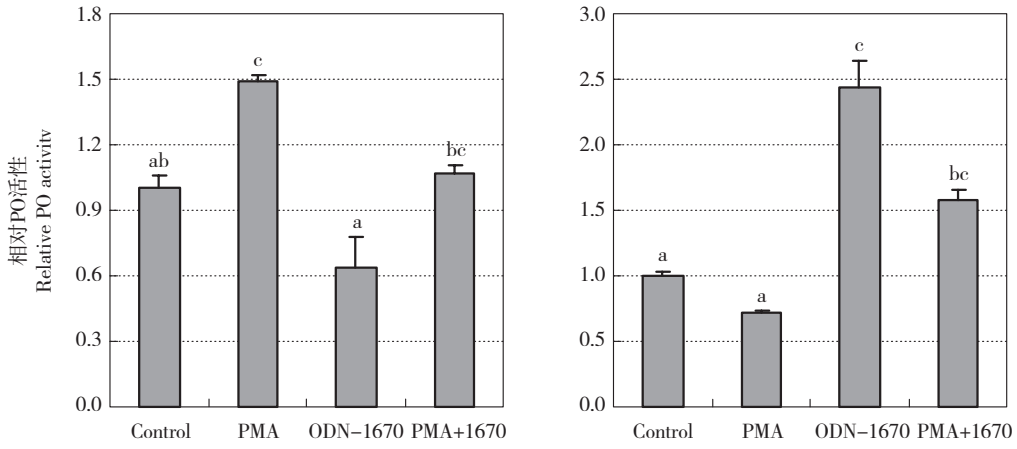
a. PO_S: 为经ODN刺激后的PO活性; PO_T: 为总PO活性. b. 柱上不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$). c. M–199培养液: 对照; 氟化钠(NaF): 5 mmol/L; ODN–1670: 50 μg/mL.

Fig. 3 Relative total phenoloxidase activity (PO_T) after haemocytes were treated with G-protein-activator sodium fluoride and ODN–1670

a. PO_S: simulated PO activity by ODN; PO_T: total PO activity; b: significant difference ($P<0.05$) between the values with a different lower case letter above the bars. c. M–199 medium: control ; sodium fluoride: 5 mmol/L; ODN–1670: 50 μg/mL.

2.3　PKC激活剂佛波酯（PMA）对CpG ODNs诱导的总酚氧化酶（POT）活性的影响

PKC激活剂佛波酯（PMA）对CpG ODNs诱导的PO_T活性的影响结果见图4。与对照组相比，PMA（10 μmol/L）处理组的胞外PO_T活性显著升高（$P<0.05$），胞内PO_T活性降低，但差异不显著。ODN-1670与PMA联合处理组的胞外PO_T活性较ODN-1670单独处理组显著提高，但仍显著地低于PMA单独处理组（$P<0.05$），与对照组相比则差异不显著。与此相对，联合处理组的胞内PO_T活性则显著地高于PMA单独处理组，同时显著地低于ODN-1670单独处理（$P<0.05$）。



（A）胞外（extracelluar）PO_T　　（B）胞内（intracelluar）PO_T

$n=3$；$\bar{x}\pm SE$

图4　PKC激活剂佛波酯对ODN−1670诱导的总酚氧化酶（PO_T）活性的影响

a. PO_S：为经ODN刺激后的PO活性；PO_T：为总PO活性. b. 柱上不同字母表示处理间差异显著（$P<0.05$）. c. M−199培养液：对照；佛波酯（PMA）：10 μmol/L；ODN−1670：50 μg/mL.

Fig. 4　Relative total phenoloxidase activity（PO_T）after haemocytes were treated by phosphokinase C（PKC）-activator phorbol ester PMA and ODN−1670

a. PO_S: simulated PO activity by ODN; PO_T: total PO activity; b: significant difference ($P<0.05$) between the values with a different lower case letter above the bars. c. M−199 medium: control; PMA: 10 mmol/L; ODN−1670: 50 μg/mL.

2.4　PKC抑制剂白屈菜赤碱（Che）对CpG ODNs诱导的酚氧化酶（PO）活性的影响

PKC抑制剂白屈菜赤碱（Che）对CpG ODNs诱导的酚氧化酶（PO）活性的影响结果见图5。由图可见，10 μmol/L的Che处理组的胞内、胞外PO_S降低，胞内PO_T活性上升，但与对照组相比差异均不显著；与此相对，胞外PO_T则显著下降（$P<0.05$）。血细胞经Che和ODN-1670联合处理30 min，与Che单独处理组相比，胞外PO_S显著上升，但仍显著地低于ODN-1670单独处理组（$P<0.05$），与对照组则无显著差异；联合处理组的胞内PO_S也有所上升，但与Che单独处理组、对照组之间没有显著差异，它们均显著地低于ODN-1670单独处理组（$P<0.05$）。与此同时，联合处理组的胞外PO_T活性虽较Che单独处理组略有上升，但仍显著地低于对照组和ODN-1670单独处理组（$P<0.05$）。联合处理组的胞内PO_T活性则是所有处理中最高的，与对照组相比差异显著（$P<0.05$），但与Che单独处理组、ODN-1670单独处理组相比差异不显著。

2.5　酪氨酸激酶抑制剂三羟基异黄酮（Gen）对ODN-1670诱导的酚氧化酶（PO）活性的影响

酪氨酸激酶抑制剂三羟基异黄酮（Gen）对CpG-ODNs诱导的酚氧化酶（PO）活性的影响结果见图6。中华绒螯蟹血细胞经15 μmol/L的Gen处理，胞内、外

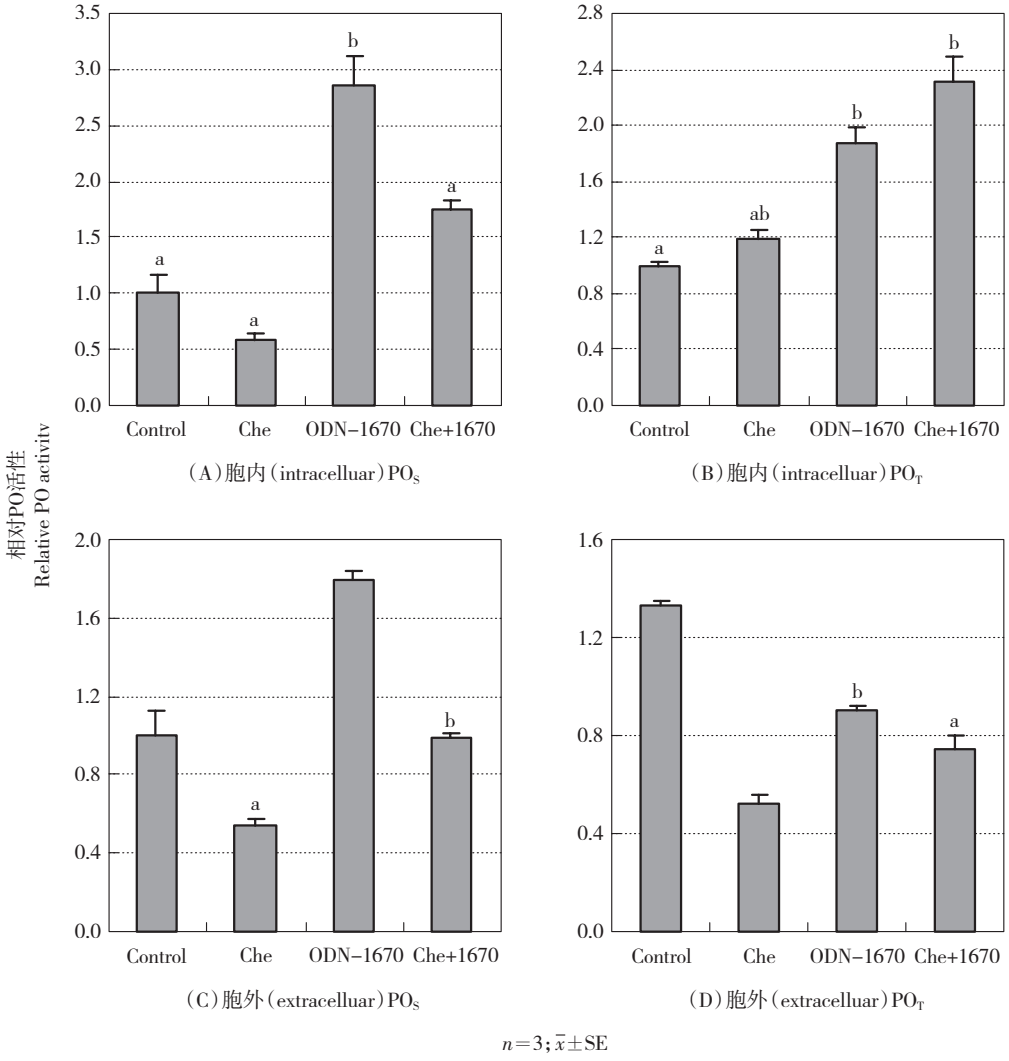


图5 PKC抑制剂白屈菜赤碱对ODN-1670诱导的酚氧化酶(PO)活性的影响

a. PO_S: 为经ODN刺激后的PO活性; PO_T: 为总PO活性. b. 柱上不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$). c. M-199培养液: 对照; 白屈菜赤碱(Che): 10 μmol/L; ODN-1670: 50 μg/mL.

Fig. 5 Relative phenoloxidase activity (PO) after haemocytes were treated by PKC-inhibitor chelerythrine and ODN-1670

a. PO_S: simulated PO activity by ODN; PO_T: total PO activity; b: significant difference ($P<0.05$) between the values with a different lower case letter above the bars. c. M-199 medium: control; Che: 10 mmol/L; ODN-1670: 50 μg/mL.

PO_S均上升,其中胞内PO_S显著上升($P<0.05$); 胞外PO_T活性也显著上升($P<0.05$),但胞内PO_T活性下降,不过与对照组并无显著差异。血细胞经Gen和ODN-1670联合处理30 min,胞内、外PO_S活性均为所有处理组中的最高值,显著高于对照组,胞外PO_S活性还显著地高于Gen单独处理组。联合处理组的胞外PO_T活性显著高于ODN-1670单独处理组($P<0.05$)。联合处理组的胞内PO_T活性与ODN-1670单独处理组相近,显著高于Gen单独处理组和对照组($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 CpG ODN-1670体外刺激对中华绒螯蟹血细胞酚氧化酶活性及其酶原mRNA表达的影响

酚氧化酶原主要存在于甲壳动物的颗粒细胞中,在外源物质的诱导下最终形成具有杀菌能力的酚氧化酶(PO)。PO活性的变化常用作为判断受试甲壳动物免疫力强弱的指标。本实验结果显示,实验剂量的ODN-1670处理中华绒螯蟹血细胞,可使胞内、外PO_S增加,并基本呈现剂量依赖性。这与Chuo等[16]报道

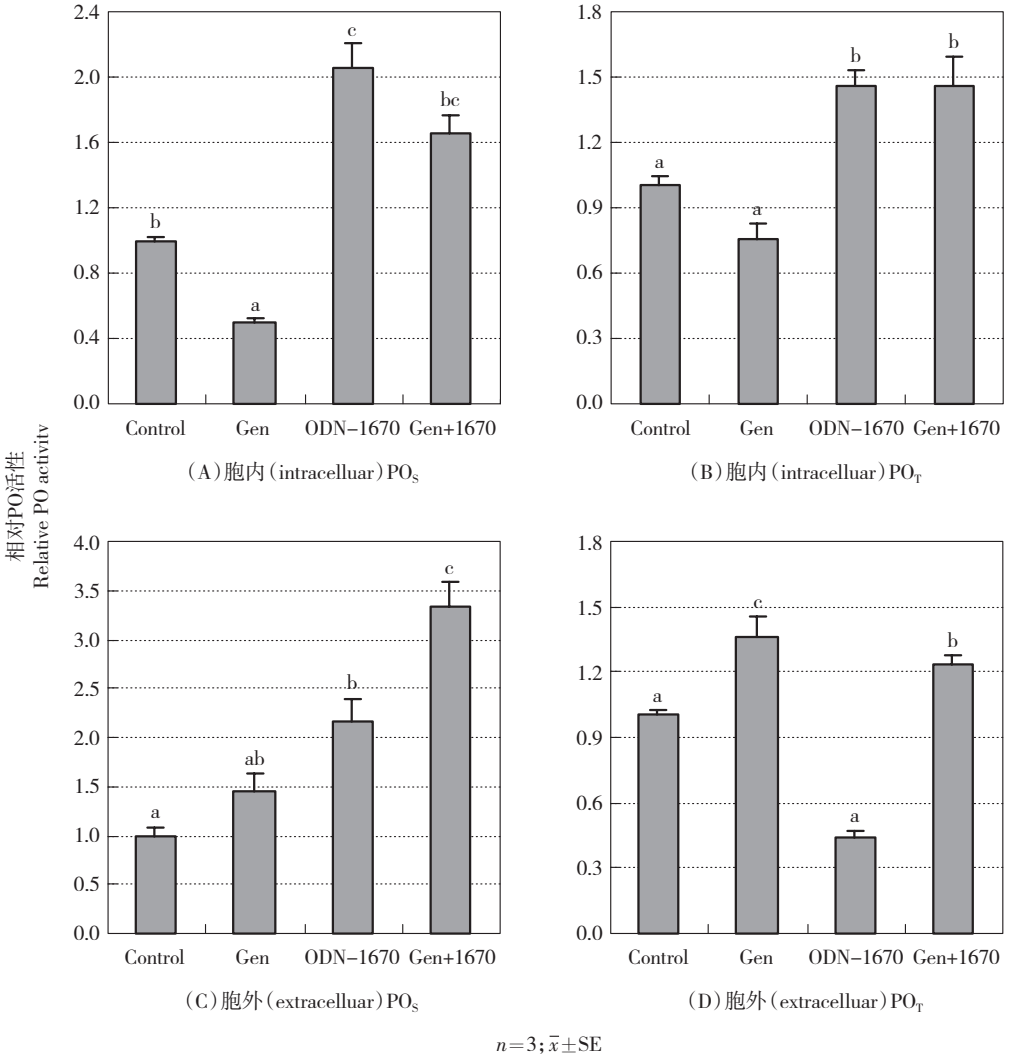


图6　酪氨酸激酶抑制剂三羟基异黄酮对ODN–1670诱导的酚氧化酶(PO)活性的影响

a. PO$_S$：为经ODN刺激后的PO活性；PO$_T$：为总PO活性. b.柱上不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$). c. M–199培养液：对照；三羟基异黄酮(Gen)：15 μmol/L；ODN–1670：50 μg/mL.

Fig. 6　Relative phenoloxidase activity (PO) after haemocytes were treated by tyrosine kinase-inhibitor genistein and ODN–1670

a. PO$_S$: simulated PO activity by ODN; PO$_T$: total PO activity; b: significant difference ($P<0.05$) between the values with a different lower case letter above the bars. c. M–199 medium: control; Gen: 15 mmol/L; ODN–1670: 50 μg/mL.

的ODN-2006对罗氏沼虾血细胞胞内、胞外PO活性的影响结果相一致。本研究还发现，实验剂量的ODN-1670使血细胞胞内PO$_T$活性上升，胞外PO$_T$活性下降；据此，ODN-1670可促进血细胞内外已有的proPO转化为PO，可能还可以促进血细胞内新的proPO的合成，但它对proPO颗粒的释放似乎具有抑制作用。Lu Kaun-Yu等[6]认为，对proPO非特异性防御系统进行检测时，在可靠性、灵敏性和定时采样方面proPO mRNA的变化比PO活性的变化更为有效。因此本实验采用Real time RT-PCR方法检测了经ODN-1670处理后血细胞内proPO mRNA的相对表达情况，实验结果表明，与对照组相比，实验剂量的ODN-1670可以有效促进胞内proPO的合成。加上关于PO活性测定结果，可以看出实验剂量的ODN-1670是通过促进胞内合成新的proPO来增强胞内外PO活性的。

3.2　CpG ODN-1670诱导中华绒螯蟹酚氧化酶激活系统活化的过程

为了能同时检测血细胞的胞内、胞外的受刺激

后的PO(PO_S)活性和总PO(PO_T)活性，参考Chuo等[16]的方法，经适当改进后，选择了几种分别属于PKC及酪氨酸激酶的激活剂或抑制剂单独处理或与ODN-1670联合处理蟹血细胞，用于ODN-1670触发中华绒螯蟹proPO系统的信号转导途径的研究。NaF是一种G-蛋白激活剂。中华绒螯蟹血细胞经其处理后，血细胞胞内、外PO_T增加。二者联合处理后，胞外PO_T活性显著高于ODN-1670单独处理组，胞内PO_T活性达到处理间最高值。这表明NaF可协助增强ODN诱导proPO转化为PO，诱导血细胞脱颗粒，G-蛋白可能参与了proPO系统的活化过程。中华绒螯蟹血细胞用PKC激活剂佛波酯(PMA)单独处理，胞内PO_T下降，胞外PO_T显著增加。联合处理则使得血细胞的胞外PO_T显著增加，而胞内PO_T显著下降，说明PKC途径活化，血细胞脱颗粒即酚氧化酶原由胞内释放到胞外的效果显著；而当在血细胞活细胞悬液中添加PKC抑制剂白屈菜赤碱(Che)则有效抑制了血细胞脱颗粒现象。这些结果表明，ODN-1670触发的中华绒螯蟹血细胞proPO激活系统的信号转导途径中可能包含有PKC途径。与Chuo等[16]的实验结果一致，本实验中三羟基异黄酮(Genistein)与ODN-1670的处理结果表明，酪氨酸激酶途径对于ODN-1670所触发的proPO激活系统起负调控作用。

Takeshita等[20]研究证明，Toll样受体9(Toll-Like Receptor 9，TLR9)与CpG DNA 的识别有关。TLR9的大量表达能显著地提高CpG DNA 进入内体的量；对CpG DNA 无反应的细胞，转染了TLR9 后，则产生了反应性；CpG DNA首先可能通过TLR9蛋白介导或者直接吸附内化进入胞内包在核内体中，被酸化后降解并释放，与胞质内受体蛋白结合，在短时间内引起多种信号的传递过程。Rodriguez等[21]与Baoprasertkul等[22]分别研究了虹鳟Toll样受体3基因的特征以及斑点叉尾鮰的Toll样受体3和TICAM基因在接种了鲇爱德华氏菌后的种类特异性表达，这些研究都证明鱼类体内同样存在着某些序列高度保守的Toll样受体家族的蛋白。笔者推测在甲壳动物体内可能也存在着某种Toll受体。Chuo等[23]在研究ODN-2006引发罗氏沼虾酚氧化酶激活系统信号转导途径中推测，CpG ODN可能是透过直接与细胞膜上的一种100 kD大小的蛋白质分子结合后借由G蛋白活化一定的信号通路引发对血细胞的刺激作用。由此可见，其报道的蛋白有可能就是Toll受体类蛋白。所以笔者推测中华绒螯蟹血细胞胞膜上也许亦存在着某种Toll受体。综上所述，ODN-1670可能首先与细胞膜上的某种Toll受体类蛋白结合，然后经过G-蛋白介导的PKC途径触发中华绒螯蟹血细胞proPO激活系统，同时经由酪氨酸激酶途径进行负调控。有关ODN-1670可能抑制细胞脱颗粒以及中华绒螯蟹血细胞proPO激活系统信号转导的细节尚需进一步深入研究。

参考文献：

[1] Brookrnan J L, RatclifeN A, RoMey A F. Studies on theactivation of the pmphenoloxidase system of insects by bacterial cell wall components [J].Insect Biocem, 1989, 19: 47–57.

[2] 孟凡伦，张玉臻，孔 健，等. 甲壳动物中的酚氧化酶原激活系统研究评价[J].海洋与湖沼，1999，30(1)：110–115.

[3] Soderhall K, Hall L. Lipopolysacharide induced activation of the prophenolocidase activating system in crayfish haemocyte [J]. Biochem Biophys Acra, 1984, 797: 99–104.

[4] Soderhall K. β-1, 3-glucan enhancement of protease activity in crayfish hemocyte lysate [J]. Comp Biochem Physicl, 1983, 74B(2): 221–224.

[5] Soderhall K, Unestam T. Activation of crayfish serum prophenoloxidase in arthropod immunity: the spcificicy of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins [J]. Can J Microbiol, 1979, 25: 406–414.

[6] Lu Kaun-Yu, Huang Yen-Tung, Lee Hsiu-Hua, et al. Cloning the prophenoloxidase cDNA and monitoring the expression of proPO mRNA in prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) stimulated in vivo by CpG oligodeoxynucleotides [J]. Fish Shellfish Immunol, 2006(20): 274–284.

[7] Ko Chi-Fong, Chiou Tzu-Ting, Vaseeharan Baskaralingam, et al. Cloning and characterisation of a prophenoloxidase from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata* [J]. Dev Comp Immunol, 2007(31): 12–22.

[8] Gai Yunchao, Zhao Jianmin, Song Linsheng, et al. A

prophenoloxidase from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*: Gene cloning, expression and activity analysis [J]. Fish Shellfish Immunol, 2008(24): 156–167.

[9] Jørgensen J B, Johansen A, Stenersen B, et al. CpG oligodeoxynucleotides and plasmid DNA stimulate Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to produce supernatants with antiviral activity [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25: 313–321.

[10] Jørgensen J B, Zou J, Johansen A, et al. Immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides stimulate expression of IL-1 h and interferon-like cytokines in rainbow trout macrophages via a chloroquine-sensitive mechanism [J]. Fish Shellfish Immunol, 2001, 11: 673–682.

[11] Bauer S, Kirschning C J, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species specific CpG motif recognition [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 9 237–9242.

[12] Takeshita F, Leifer C A, Gursel I, et al. Cutting edge: role of toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells [J]. J Immunol, 2001, 167: 3 555–3 558.

[13] Oumouna M, Jaso-Friedmann L, Evans D L. Activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) with synthetic oligodeoxynucleotides and bacterial genomic DNA: binding specificity and identification of unique immunostimulatory motifs [J]. Dev Comp Immunol, 2002, 26: 257–269.

[14] 李红霞，李义，刘永贵，等. CpG 寡脱氧核苷酸对中华绒螯蟹3种血清酶活性的影响 [J]. 饲料工业，2007，39(1)：252–257.

[15] 李红霞，李义，俞菊华，等.CpG 寡脱氧核苷酸对中华绒螯蟹非特异性免疫指标的影响 [J].中国水产科学，2008，15(5)：801–807.

[16] Chuo C P, Liang S M. Signal transduction of the prophenoloxidase activating system of prawn haemocytes triggered by CpG oligodeoxynucleotides [J]. Fish Shellfish Immunol, 2005, 18: 149–162.

[17] Sung H H, Chang H J, Her C H, et al. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii* [J].Invertebr Pathol, 1998, 71: 26–33.

[18] Sung H H, Huang Y T, Hsiao L T. Phenoloxidase activity of Macrobrachium rosenbergii after challenge with two pathogens: *Aeromonas veronii* and *Lactococcus garvieae* [J]. Fish Pathol, 2004, 39: 1–8.

[19] Liu W H, Saint D A.Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 294: 347–353.

[20] Takeshita F, Leifer C A, Gursel I, et al. Cutting edge: role of toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells [J]. J Immunol, 2001, 167: 3555–3558.

[21] Baoprasertkul P, Peatman E, Somridhivej B, et al. Toll-like receptor 3 and TICAM genes in catfish: species-specific expression profiles following infection with *Edwardsiella ictaluri* [J]. Immunogenetics, 2006, 58: 817–830.

[22] Rodriguez M F, Wiens G D, Purcell M K, et al. Characterization of Toll-like receptor 3 gene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Immunogenetics, 2005, 57: 510–519.

[23] Chuo Che-pei. Signal Transduction of Prophenoloxidase Activating System of Prawn Haemocytes Triggered by CpG Oligodeoxynucleotides [D]. 台湾：东吴大学，2002：1–95.

Effects of CpG ODN-1670 processing *in vitro* on the hemocyte PO and proPO of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*

LI Hongxia[1], YU Juhua[1], LI Yi[2], XU Pao[1]

(1. Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2. College of Life Sciences, Suzhou University, Suzhou 215123, China)

Abstract: Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) hemocyte was treated *in vitro* with different concentrations of CpG ODN-1670 at 0 μg/mL, 5 μg/mL, 25 μg/mL, 50 μg/mL, 75 μg/mL and100 μg/mL in this study. Both intracellular and extracellular relative phenoloxidase (PO) activity (including stimulated activity PO_S and total activity PO_T) were measured, The intra-and extra-celluar PO_S of 25 μg/mL upward treatments and intracellular PO_T of 50 μg/mL upward treatments were significantly enhanced ($P<0.05$); the extracelluar PO_T of all treatments were assumed to be decreased followed the concentration of ODN-1670. These results meant ODN-1670 could induce the transduction of proPO into PO, but it might have some inhibition on the releasing of proPO to outside, which needed further study. Then we monitored the relative expression of prophenoloxidase (proPO) mRNA using real time RT-PCR. The results indicated that 25 μg/mL ODN-1670 could promote relative expression of proPO mRNA significantly ($P<0.05$), which suggested new proPO granules synthesize inside of cell. And the PO activity induced by ODN-1670 was enhanced through new synthesis of proPO. In addition, several activators or inhibitors for specific signaling components were applied to treat the exsomalized crab hemocytes cultured in M-199 medium. Detected the intra- or extra-celluar PO activity, we discussed which signal transduction pathway was involved in the ODN-1670 activating proPO system in Chinese mitten crab. The results showed that ODN-1670 could activate the proPO system. It could enhance the PO activity through promoting synthesis of new proPO and transducting of proPO to PO (the activating form). The signaling pathway of the proPO system activation stimulated by ODN-1670 meight include G-protein mediated PKC way, and was negatively regulated via the tyrosine kinase pathway. Some Toll-Like Receptors might exsit in the cell membrane, and the first step of ODN-1670 active proPO system was to combine with this Toll-Like Receptor protein then activate G-protein mediated pathway. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 639–648]

Key words: *Eriocheir sinensis*; CpG ODN-1670; phenoloxidase; signaling pathway

Corresponding author: YU Juhua. E-mail: yujh@ffrc.cn