

氨氮胁迫对三疣梭子蟹酚氧化酶原系统和免疫指标的影响

岳峰¹, 潘鲁青¹, 谢鹏¹, 李健²

(1. 中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 以三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)为研究对象, 研究氨氮胁迫对其酚氧化酶原系统和免疫指标的影响。实验分0 mg/L、1 mg/L、5 mg/L、20 mg/L氨氮处理组, 分别于0 h、6 h、12 h、24 h、48 h取样并进行相关指标测定。结果表明: 氨氮胁迫对三疣梭子蟹血淋巴多巴胺含量、血细胞数量、血细胞酚氧化酶原(proPO)活力和mRNA表达以及抗菌、溶菌活力的影响显著($P < 0.05$)。各处理组血淋巴多巴胺含量于6 h达到最大值, 12 h后恢复至对照组水平; 各处理组血细胞数量均呈明显下降趋势, 除20 mg/L氨氮处理组半颗粒细胞、总细胞数量表现为逐渐下降趋势外, 其他处理组3类血细胞和总细胞数量分别于12 h或24 h时降至最低值, 然后保持稳定。各处理组上述指标分别呈明显下降、升高、下降和峰值变化趋势, 其中1 mg/L处理组血细胞proPO活力在12 h后恢复至对照组水平, 而mRNA表达与对照组差异不显著, 其他处理组血细胞proPO活力和mRNA表达分别于12 h、6 h后保持稳定; 各处理组抗菌活力于6 h或12 h达到最小值, 然后恢复至对照组水平, 而溶菌活力在24 h后趋于稳定, 且1 mg/L处理组与对照组无明显差异。各处理组血细胞数量、proPO活力、溶菌活力在稳定后均与氨氮浓度呈明显的负相关性, 而血细胞proPO mRNA表达呈显著正相关性。由此可见, 三疣梭子蟹在氨氮胁迫下血细胞数量、proPO活力和mRNA表达以及免疫指标表现出明显的时间剂量效应性, 具有显著的免疫毒性效应。本研究旨在为三疣梭子蟹养殖水环境调控和病害防治提供基础依据。[中国水产科学, 2010, 17(4): 761-770]

关键词: 氨氮胁迫; 三疣梭子蟹; 酚氧化酶原系统; 免疫指标

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)04-0761-10

氨氮是养殖水环境中重要的污染胁迫因子, 主要由养殖动物的残饵、排出的代谢废物等有机物分解产生, 能直接损害养殖动物的鳃组织, 并渗入血淋巴中产生毒害作用, 严重影响养殖动物的呼吸、免疫等生理功能, 最终抑制其生长和存活^[1-3]。已有研究表明, 甲壳动物在氨氮胁迫下血细胞数量减少, 免疫力下降, 对病原菌的易感性明显提高^[4-13], 而目前有关甲壳动物在氨氮胁迫下免疫毒性机制方面的研究甚少。

甲壳动物免疫机制以非特异性免疫反应为主, 主要由血细胞和由血细胞释放到血淋巴中的多种活性因子如酚氧化酶原激活系统(proPO系统)、溶菌酶和抗菌肽等来完成, 其中proPO系统在免疫识别和防御中起着

关键作用^[14]。三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)是中国沿海重要的养殖蟹类, 近年来氨氮胁迫已成为诱发虾蟹类病害的重要因素^[6-7, 11, 15]。本研究对氨氮胁迫下三疣梭子蟹血淋巴多巴胺含量、血细胞数量、酚氧化酶原活力和mRNA表达以及抗菌、溶菌活力所受影响进行探讨, 分析氨氮对三疣梭子蟹的免疫毒性机制, 旨在为三疣梭子蟹养殖水环境调控和病害防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用三疣梭子蟹于2008年11月购自青岛市沙子口码头, 体色正常, 健康活泼, 全甲宽(12.2±

收稿日期: 2009-11-12; 修订日期: 2009-12-09.

基金项目: 国家863计划项目(2006AA10A406); 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-06-0597).

作者简介: 岳峰(1986-), 男, 硕士研究生, 主要从事甲壳动物环境生理学的研究. E-mail: phy@ouc.edu.cn

通讯作者: 潘鲁青, 教授. E-mail: panlq@ouc.edu.cn

0.58) cm, 甲长(5.7 ± 0.19) cm, 体质量(104.8 ± 9.6) g。实验前暂养10 d, 海水盐度为31, pH 8.2, 温度(15 ± 0.5) °C, 连续充气, 日换水2次, 换水量为1/2 ~ 2/3, 并按体质量的10%投喂新鲜的菲律宾蛤仔。

1.2 实验梯度设置

根据Chen和钟硕良等测定海水养殖池塘底层水的氨氮浓度分别为0 ~ 46 mg/L和0.01 ~ 29.3 mg/L^[16-17], 实验设置4个梯度, 氨氮质量浓度分别为0 mg/L(自然海水、对照组)、1 mg/L、5 mg/L、20 mg/L, 各梯度采用10 g/L的氯化铵溶液进行调节。采用次溴酸盐氧化法测定氨氮浓度, 实测值分别为(0.08 ± 0.01) mg/L、(1.20 ± 0.08) mg/L、(5.37 ± 0.10) mg/L、(21.26 ± 0.35) mg/L。实验前将暂养在自然海水中健康的三疣梭子蟹饥饿48 h后, 随机移入各实验梯度中, 在每个塑料水槽(136 cm×90 cm×70 cm)分别放三疣梭子蟹15只, 每个梯度均设3个平行组, 实验期间不投喂饵料, 养殖管理与暂养期间完全相同, 换水时分别加入相应氨氮浓度的养殖用水。实验期间三疣梭子蟹无死亡现象, 取样时间分别为0 h、6 h、12 h、24 h、48 h。

1.3 样品制备

1.3.1 血淋巴的采集 每个水槽随机取3只蟹, 用消毒的5号针头和2 mL注射器从三疣梭子蟹第三步足基关节软膜处插入血窦取血, 注射器中预先吸入1 mL已灭菌的预冷抗凝剂(0.45 mol/L 氯化钠、0.1 mol/L 葡萄糖、0.03 mol/L 柠檬酸三钠、0.026 mol/L 柠檬酸、0.01 mol/L EDTA二钠, pH 7.45), 血淋巴与抗凝剂的最终体积比为1:1。将抽取的3只蟹抗凝血淋巴样品在离心管中混匀, 取0.1 mL直接用于血细胞数量的测定, 1 mL用于血细胞溶解产物(HLS)的制备, 3 mL用于血细胞总RNA的提取。

1.3.2 血浆和血细胞溶解产物的制备 取1 mL抗凝血淋巴样品, 于4 °C下700 g离心10 min, 取蓝色上清液, 保存于-80 °C用于免疫指标的测定; 将沉于底部的血细胞用1 mL无菌的柠檬酸-二甲砷酸钠缓冲液(0.01 mol/L 二甲砷酸钠、0.45 mol/L 氯化钠、0.10 mol/L 柠檬酸三钠, pH 7.0)缓慢重悬, 4 °C下

700 g离心10 min, 倾去上清液, 用1 mL 无菌的二甲砷酸钠缓冲液(0.01 mol/L 二甲砷酸钠、0.45 mol/L 氯化钠、0.01 mol/L 氯化钙、0.026 mol/L 氯化镁, pH 7.0)重悬后, 在冰浴中以20 W×30%功率超声波破碎1 min, 在4 °C下15 000 g离心20 min, 取上清液即为HLS, 用于酚氧化酶原活力的测定。

1.3.3 血细胞总RNA的提取 取3 mL抗凝血淋巴样品, 于4 °C下700 g离心10 min, 倾去蓝色上清, 将收集的血细胞沉淀加入1 mL Trizol, 按照Trizol[®]试剂(Invitrogen[™])使用说明操作提取血细胞总RNA, 经RNase-Free DNase(TaKaRa)消化去除总RNA样品中的DNA, 用紫外可见光分光光度计(Ultrospec 2100pro, Amersham, Sweden)进行定量检测, 另取1 μL总RNA样品进行1%琼脂糖凝胶电泳以鉴定其完整性, 确认RNA完整后, -80 °C保存, 用于酚氧化酶原mRNA表达的测定。

1.4 实验指标的测定

1.4.1 血细胞数量测定 血细胞数量测定采用血球计数板在Olympus相差显微镜下直接计数的方法, 取0.1 mL抗凝血淋巴样品与0.1 mL的10%甲醛于Eppendorf离心管中混匀, 固定30 min后, 取混匀血淋巴置于血球计数板上, 观察、计数半颗粒细胞(Semi-granular cells, SGC)、颗粒细胞(Granular cells, GC)、透明细胞(Hyaline cells, HC)和总血细胞(Total haemocyte cells, THC)数量。

1.4.2 多巴胺含量测定 采用荧光分光光度法^[18-19]测定血淋巴中单胺类神经递质多巴胺(DA)含量, 操作如下:

取超纯水、DA标准应用液(精确称取DA 12.385 mg溶于50 mL 0.01 mol/L盐酸中, 临用时用0.01 mol/L盐酸稀释至1 μg/mL)及血浆各0.1 mL, 用超纯水按体积比1:10稀释后, 加入经玻璃蒸馏器重蒸馏的酸性正丁醇4 mL, 再加入0.5 mL 0.05 mol/L 硼酸缓冲液(pH 9.0)、10 mg 氯化钠晶体, 充分振荡5 min, 700 g离心10 min, 取上清3.0 mL, 加入正庚烷3.0 mL、0.1 mol/L盐酸0.5 mL, 振荡, 离心, 吸取下层水相0.5 mL并用水补足1 mL, 各管均加入0.01 mol/L EDTA溶液

2.4 mL, 0.5 mol/L 碘溶液 0.1 mL, 充分混匀, 静置 2 min 后加入 0.7 mol/L 碱性亚硫酸钠 0.2 mL, 放置 4 min, 各管最后加入预冷的 5 mol/L 乙酸 0.2 mL, 摇匀, 于 80 ℃ 水浴中加热 5 min, 用冷水浴冷却, 各管加入 0.1 mL 7.25 mol/L 磷酸, 混匀, 放入沸水中水浴 15 min, 冷水冷却后在激发波长 325 nm, 发射波长 375 nm 下测定 DA 荧光强度。

血淋巴中 DA 含量的计算公式如下:

$$\text{DA 含量} = \frac{F_i - F_b}{F_s - F_b} \times D_i \times D_c$$

F_i : 样品管的荧光读数; F_b : 空白管的荧光读数;
 F_s : 标准管的荧光读数

D_i : 抗凝血的稀释倍数; D_c : 标准液的浓度

1.4.3 血细胞酚氧化酶原活力的测定 血细胞酚氧化酶原活力的测定参照 Hernández-López 等^[20]的方法, 以 L-DOPA 为底物, 将 0.1 mL 血细胞溶解产物样品与 0.1 mL 牛胰蛋白酶溶液 (0.1 mg/mL) 加入 96 孔酶标板中, 在 25 ℃、黑暗条件下孵育 30 min, 然后加入 0.1 mL L-DOPA (2 mg/mL) 溶液, 孵育 10 min 后, 立即放入酶标仪中, 在 490 nm 下每间隔 2 min 测定光密度 (OD) 值, 共测定 30 min。血细胞酚氧化酶原活力单位定义为: 在实验条件下每分钟每毫克蛋白使 OD₄₉₀ 增加 0.001 为 1 个酶活力单位 ($\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pr}$)。蛋白含量测定参照 Bradford 考马斯亮蓝法。

1.4.4 酚氧化酶原 mRNA 表达的测定

(1) 第一链 cDNA 的合成。以总 RNA 为模板, oligo dT 为引物合成 cDNA 第一链。采用 20 μL 反转录体系, 取总 RNA 样品 2 μg、0.5 μg/μL oligo dT 2 μL, 加 DEPC 处理水补足至 13 μL, 70 ℃ 变性 5 min, 冰浴骤冷 5 min 后, 加入 5×RT Buffer 4 μL、2.5 mmol/L dNTP Mixture 2 μL、

M-MLV (Promega) 1 μL, 42 ℃ 逆转录 60 min, 在 90 ℃ 下 10 min 使 M-MLV 失活终止反应。

(2) 半定量 PCR 法检测酚氧化酶原 mRNA 表达。根据本实验室提交的三疣梭子蟹血细胞酚氧化酶原 (proPo) 基因部分序列 (GenBank: FJ432697) 及 β -actin 基因部分序列 (GenBank: FJ641977) 设计引物, 并由上海生工生物工程技术服务有限公司合成 (表 1)。以上述合成的 cDNA 为模板, 优化退火温度、循环数等, 获得适宜的实验参数, 最终确立 PCR 扩增反应体系为: 10×Taq Buffer 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP Mixture 2 μL, 上、下游引物各 1 μL, cDNA 模板 2 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 加灭菌超纯水至 25 μL; 反应条件为: 95 ℃ 预变性 3 min, 94 ℃ 变性 30 s、50 ℃ (proPO) /55 ℃ (β -actin) 退火 45 s、72 ℃ 延伸 45 s, proPO 基因循环数为 31, β -actin 循环数为 25, 72 ℃ 延伸 7 min 后冷却至 4 ℃。每个样品的 proPO 基因和 β -actin 分管扩增。反应结束后, 取 8 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像分析系统下观察、照相。利用 AlphaEaseFC 分析软件对 PCR 产物进行半定量分析。以目的基因灰度值/内参 β -actin 灰度值的比值表示 proPO 基因 mRNA 的相对表达水平。

1.4.5 抗菌、溶菌活力的测定 分别以鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 菌悬液和溶壁微球菌 (*Micrococcus lysolei*) 冻干粉为底物, 采用 Hultmark 等^[21]改进的方法。取 3 mL 用 0.1 mol/L, pH 6.4 磷酸钾盐缓冲液配成的菌悬液置于冰浴中, 加入 50 μL 待测血浆, 于 570 nm 波长处测 A_0 值, 然后移入 37 ℃ 水浴中孵育 30 min, 取出后立即置于冰浴中 10 min 终止反应, 测其 A 值。抗菌活力 (U_a)、溶菌活力 (U_L) 分别按下式计算:

表 1 三疣梭子蟹血细胞酚氧化酶原基因和 β -actin 基因的引物序列
Tab. 1 Sequence of primers for haemocyte proPO and β -actin genes of swimming crab *P. trituberculatus*

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	PCR 产物长度 /bp PCR product length
酚氧化酶原 Haemocyte proPO β -actin	Forward primers: 5'-CAGCTGGCATAAGTACAT-3'	551
	Reverse primers: 5'-ACCCACATCCGCAGAAAT-3'	
	Forward primers: 5'-CTGGGACGACATGGAGAAGAT-3'	358
	Reverse primers: 5'-ACCACGCTCGGTCAGGATT-3'	

$$U_a = (A_0 - A) / A$$

$$U_L = (A_0 - A) / A$$

1.5 数据处理与分析

所有实验数据均以3个平行组数据的平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示;并采用单因素方差分析(ANOVA)和Duncan检验法统计分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 氨氮胁迫对三疣梭子蟹血淋巴多巴胺含量、血细胞数量的影响

氨氮胁迫对三疣梭子蟹血淋巴多巴胺含量、3

类血细胞和总血细胞数量影响显著($P < 0.05$),而对照组无明显变化(图1、图2)。各处理组多巴胺含量在12 h内呈明显的峰值变化($P < 0.05$),于6 h达到最大值,12 h后均恢复至对照组水平。各处理组血细胞数量均呈明显下降趋势,然后趋于稳定或持续下降,其中1 mg/L、5 mg/L处理组半颗粒细胞、总细胞数量分别于12 h、24 h时达到最低值,然后保持稳定,而20 mg/L处理组表现为逐渐下降趋势;各处理组颗粒、透明细胞数量分别于12 h、24 h降至最低值,然后趋于稳定。各处理组血细胞数量在稳定后,均与氨氮浓度呈明显负相关($P < 0.05$)。

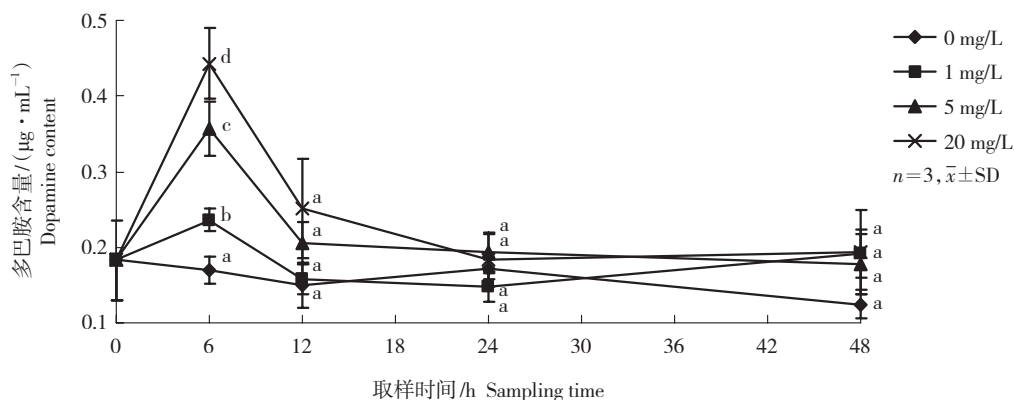


图1 氨氮胁迫对三疣梭子蟹血淋巴多巴胺含量的影响

图中不同字母表示同一时间段处理间差异显著($P < 0.05$);反之则差异不显著($P > 0.05$)。

Fig. 1 Time course changes of the haemolymph dopamine concentrations of swimming crab *P. trituberculatus* exposed to ambient ammonia. Different letters mean significant difference among treatments at 0.05 levels in the same sampling time.

2.2 氨氮胁迫对三疣梭子蟹血细胞酚氧化酶原活力和mRNA表达的影响

氨氮胁迫对三疣梭子蟹血细胞proPO活力和mRNA表达影响显著($P < 0.05$),而对照组无明显变化(图3、图4)。各处理组血细胞proPO活力和mRNA表达分别呈明显下降、升高趋势。其中1 mg/L处理组血细胞proPO活力在12 h后趋于稳定,稳定后恢复至对照组水平,而proPO mRNA表达与对照组差异不显著;5 mg/L、20 mg/L处理组血细胞proPO活力和mRNA表达分别于12 h、6 h后趋于稳定,稳定后与氨氮浓度分别呈明显负、正相关性($P < 0.05$)。

2.3 氨氮胁迫对三疣梭子蟹血淋巴抗菌、溶菌活力的影响

氨氮胁迫对三疣梭子蟹血淋巴抗菌、溶菌活力的影响显著($P < 0.05$),而对照组无显著变化(图5)。各处理组血淋巴抗菌活力呈明显的峰值变化,1 mg/L、5 mg/L和20 mg/L处理组分别于6 h、12 h达到最小值,然后分别于12 h、24 h后趋于稳定,并恢复至对照组水平;而各处理组血淋巴溶菌活力分别呈峰值变化或下降趋势,其中1 mg/L处理组于12 h达到最小值,24 h后保持稳定,且与对照组无明显差异,其他处理组于24 h达到最小值,24 h后趋于稳定,稳定后与氨氮浓度呈明显负相关($P < 0.05$)。

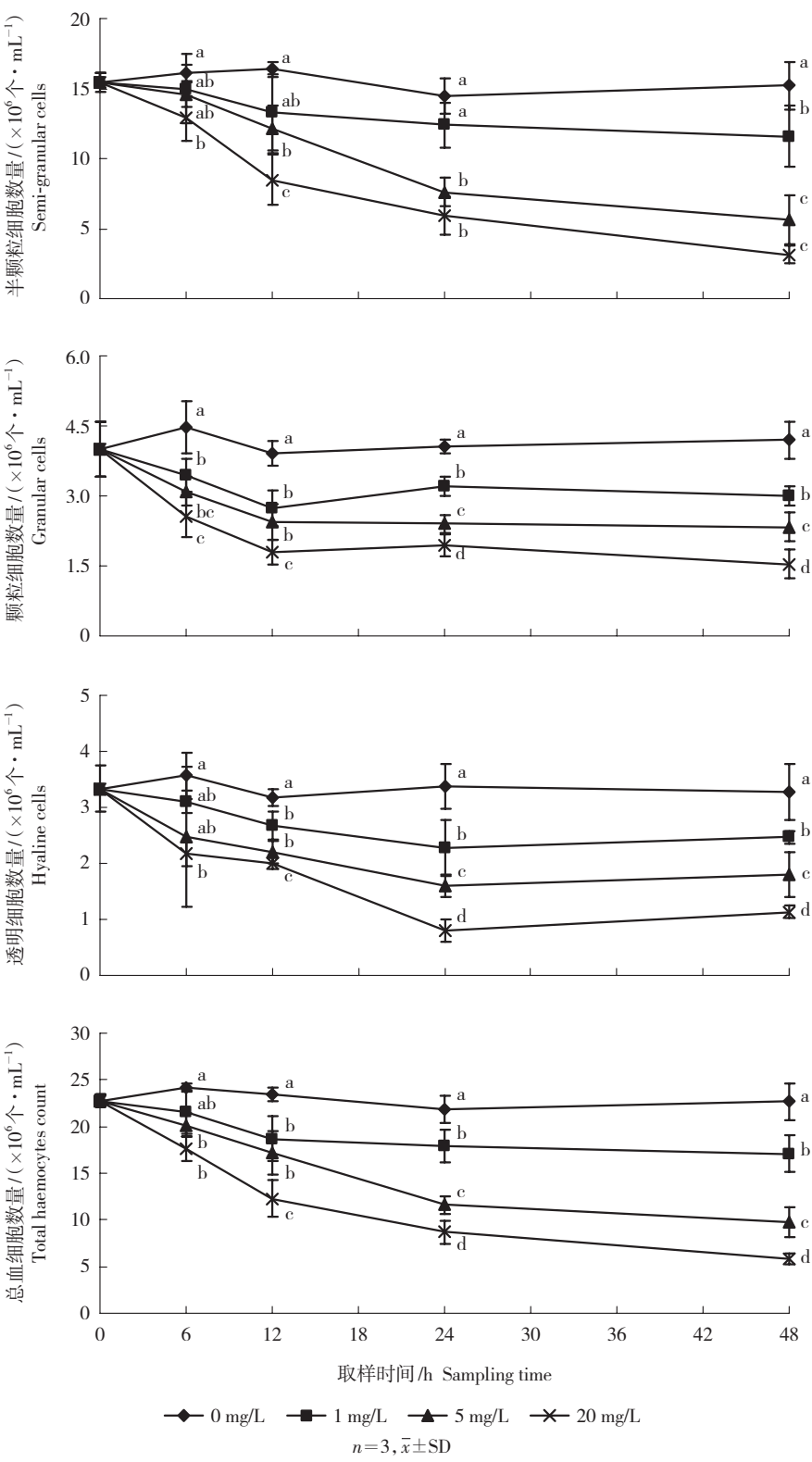


图2 氨氮胁迫对三疣梭子蟹血细胞数量的影响
图中不同字母表示同一时间段处理间差异显著($P < 0.05$); 反之则差异不显著($P > 0.05$).
Fig. 2 Time course changes of the haemocyte count of swimming crab *P. trituberculatus* exposed to ambient ammonia
Different letters means significant difference among treatment at 0.05 levels in the same sampling time.

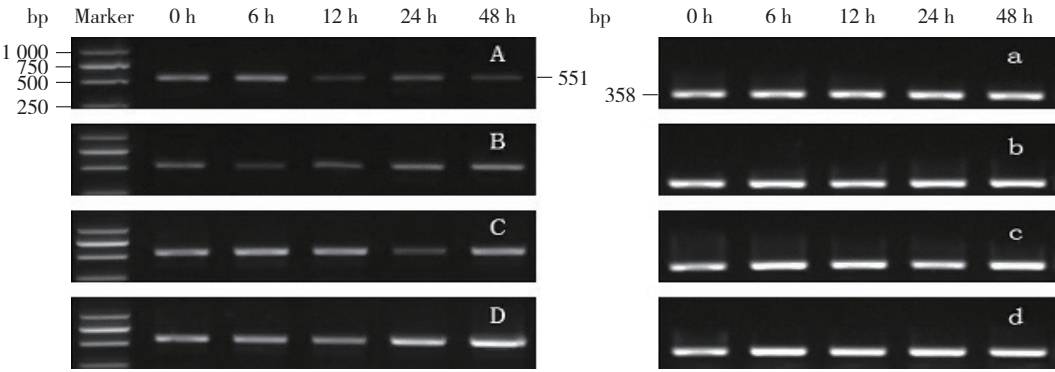


图3 三疣梭子蟹在氨氮胁迫下血细胞酚氧化酶原mRNA 表达的电泳图谱
A: 0 mg/L, B: 1 mg/L, C: 5 mg/L, D: 20 mg/L; a-d 分别为对应的 β -actin.

Fig. 3 Electrophoresis results of haemocyte proPO mRNA expression of swimming crab *P. trituberculatus* exposed to ambient ammonia
A: 0 mg/L, B: 1 mg/L, C: 5 mg/L, D: 20 mg/L; a-d are the corresponding β -actin.

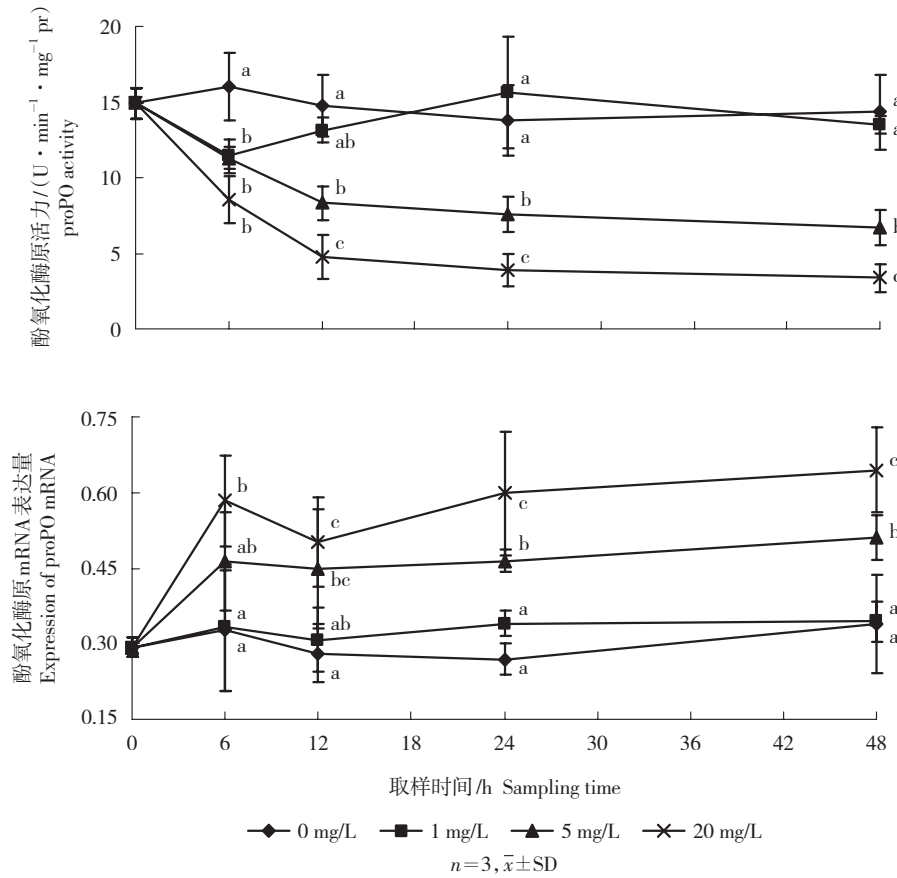


图4 氨氮胁迫对三疣梭子蟹血细胞酚氧化酶原活力和mRNA 表达的影响
图中不同字母表示同一时间段处理间差异显著 ($P < 0.05$); 反之则差异不显著 ($P > 0.05$).

Fig. 4 Time course changes of the haemocyte proPO activity and expression of proPO mRNA of swimming crab *P. trituberculatus* exposed to ambient ammonia
Different letters means significant difference among treatment at 0.05 levels in the same sampling time.

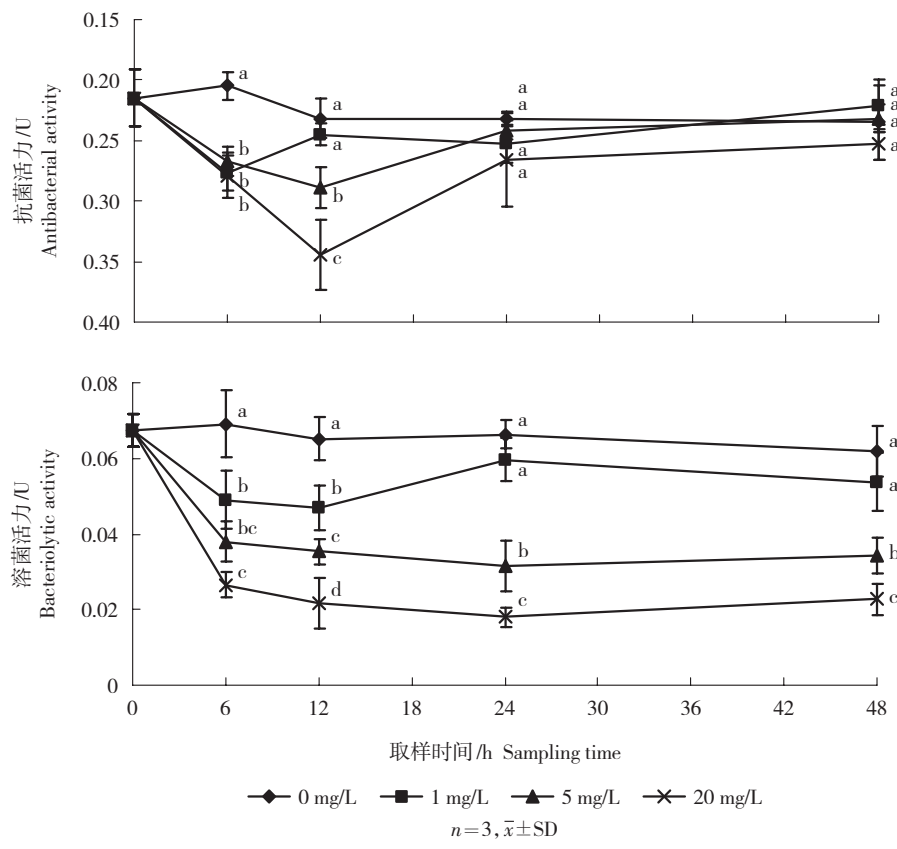


图5 氨氮胁迫对三疣梭子蟹血淋巴抗菌、溶菌活力的影响
图中不同字母表示同一时间段处理间差异显著 ($P<0.05$); 反之则差异不显著。

Fig. 5 Time course changes of the haemolymph antibacterial and bacteriolytic activity of swimming crab *P. trituberculatus* exposed to ambient ammonia
Different letters means significant difference among treatment at 0.05 levels in the same sampling time.

3 讨论

3.1 三疣梭子蟹在氨氮胁迫下酚氧化酶系统的响应过程

甲壳动物 proPO 系统以非活化状态存在于血细胞 (颗粒细胞、半颗粒细胞) 颗粒内, 其中酚氧化酶原大部分存在于颗粒细胞中, 当病原入侵时, 半颗粒细胞与极微量微生物多糖结合, 启动脱颗粒并释放少量的酚氧化酶原等, 引起颗粒细胞的胞吐作用, 释放大量的酚氧化酶原组分, 通过细胞间的信息传递, 进一步介导 2 类血细胞的脱颗粒, 迅速启动和扩大对外界因素的免疫应答^[22-23]。许多学者研究显示氨氮作为一种外源刺激或胁迫, 能引起甲壳动物血细胞数量变化, 在短时间内启动 proPO 系统, 血细胞 proPO 活力降低, 免疫力下降, 这与在适量异物入侵

下甲壳动物血细胞 proPO 活力下降, 免疫力增强的观点不符^[24-25]。由此提出甲壳动物在氨氮胁迫下血细胞酚氧化酶系统如何响应, 尤其是在病原入侵和氨氮胁迫下 proPO 系统的启动机制是否一致的问题。

已有研究表明, 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 在环境 (盐度、温度) 变化下, 血淋巴多巴胺含量在 1 d 内呈峰值变化, 血细胞数量、proPO 活力在 1 d 内显著降低, 然后均趋于稳定, 同时半颗粒、颗粒细胞数量和 proPO 活力的变化呈现出明显的时序性^[26-27]。Cerenius 等^[28]研究发现, 注射海藻多糖短时间 (0.5 ~ 6 h) 内, 欧洲螯虾 (*Astacus astacus*) 的总血细胞数量和半颗粒细胞数量明显下降, 颗粒细胞数量略有增加, proPO mRNA 表达显著升高。本研究表明, 三疣梭子蟹在氨氮作用下血淋巴多巴胺含量在 6 h 达到最大值,

12 h后恢复至对照组水平;除20 mg/L处理组半颗粒细胞数量呈逐渐下降外,1 mg/L、5 mg/L处理组半颗粒细胞和各处理组颗粒细胞数量均于12 h降至最低值,然后趋于稳定;血细胞proPO活力、mRNA表达在1 mg/L处理组表现为峰值(6 h)变化后恢复至对照组水平并与对照组无明显差异,而5 mg/L、20 mg/L处理组分别呈下降、升高趋势,于12 h、6 h后保持稳定;同时各指标均与氨氮浓度呈明显的负、正相关性。这说明三疣梭子蟹在氨氮胁迫下血淋巴多巴胺含量与3类血细胞数量、proPO活力和mRNA表达变化均呈现出明显的时间效应性,而且甲壳动物在环境胁迫与病原入侵下血细胞proPO系统的激活过程基本一致。作者推测三疣梭子蟹在氨氮胁迫下产生应激反应,神经内分泌系统分泌生物胺等内分泌因子,诱发启动了proPO系统,释放酚氧化酶原组分,proPO mRNA表达增加,合成新的proPO,以维持血细胞proPO系统的免疫响应,这与病原入侵具有不同的启动机制,也是机体代谢上的一种免疫应激适应。目前有关甲壳动物在环境胁迫下酚氧化酶系统启动机制方面尚无定论,还有待于进一步研究证实。

3.2 氨氮胁迫对三疣梭子蟹免疫指标的影响

据Cheng等^[10-11]报道,罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*) 在氨氮(0.06 ~ 3.18 mg/L)胁迫7 d时,血细胞酚氧化酶原活力显著降低,吞噬活力和细菌清除率明显下降,对病原菌的易感性明显提高,死亡率增加。Verghese等^[12]研究显示,在氨氮(3 mg/L)胁迫24 h后,波纹龙虾(*Panulirus homarus*) 血细胞数量下降50%,酚氧化酶原活力显著降低;黄鹤忠等^[13]研究表明中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 在氨氮(5 mg/L)胁迫10 d时,血细胞数量、溶菌活力显著下降。本研究表明,三疣梭子蟹在氨氮胁迫下总血细胞数量、proPO和溶菌活力明显下降,其中1 mg/L处理组溶菌活力与对照组差异不显著,其他处理组在24 h后保持稳定,且与氨氮浓度呈明显的负相关性;抗菌活力呈现峰值变化,于6 h或12 h达到最小值,24 h后恢复至对照组水平,这与上述研究结果基本一致。由此说明三疣梭子蟹在氨氮胁迫下免疫指

标表现出显著的时间、剂量效应性,而氨氮对三疣梭子蟹抗菌、溶菌活力的影响不同,在短时间内表现为明显的免疫毒性效应,经过一段时间免疫适应调节后抗菌活力恢复,而溶菌活力依然受到抑制。另有研究表明,在氨氮胁迫(10 mg/L或30 mg/L)24 h时,日本对虾(*Penaeus japonicus*)、斑节对虾(*P. monodon*)和凡纳滨对虾血淋巴氨氮含量明显升高,血细胞膜通透性改变、自溶性明显提高,血蓝蛋白含量显著降低,耗氧量显著增加^[29-33];同时Destoumieux-Garzon等^[34]从凡纳滨对虾的血浆中分离纯化一种阴离子抗菌肽(PvHct),并证明PvHct是由血蓝蛋白的C-末端降解产生,注射溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)6 h后血浆中PvHct的含量显著增加。作者认为,三疣梭子蟹在氨氮胁迫下,由于血细胞膜系统受到损伤,也可能血细胞启动了自溶机制,从而导致血细胞数量下降,酚氧化酶原大量释放,抗菌、溶菌活力下降,产生明显的免疫毒性效应,而后抗菌活力的恢复可能是由于对虾因应激反应,血蓝蛋白降解产生新的抗菌肽类物质,表现出抗菌活性所致。因此,血细胞数量和血淋巴溶菌活力可作为三疣梭子蟹在氨氮胁迫下免疫毒性的评价指标。

参考文献:

- [1] Rebelo M F, Rodriguez E M, Santos E A. Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea-Decapoda) following acute exposure to ammonia [J]. Comp Biochem Physiol, 2000, 25C: 157-164.
- [2] Chen J C, Lin C Y. Oxygen consumption and ammonia-N excretion of *Penaeus chinensis* juveniles exposed to ambient ammonia at different salinity levels [J]. Comp Biochem Physiol, 1992, 102C: 287-291.
- [3] Koo J G, Kim S G, Jee J H. Effects of ammonia and nitrite on survival, growth and moulting in juvenile tiger crab, *Orithyia sinica* (Linnaeus) [J]. Aqu Res, 2005, 36: 79-85.
- [4] Hong M L, Chen L Q, Sun X J, et al. Metabolic and immune responses in Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) juveniles exposed to elevated ambient ammonia [J]. Comp Biochem Physiol, 2007, 145C: 363-369.
- [5] 姜令绪, 潘鲁青, 肖国强. 氨氮对凡纳滨对虾免疫指标的影响

- [J]. 中国水产科学, 2004, 11 (6): 537-541.
- [6] 孙舰军, 丁美丽. 氨氮对中国对虾抗病力的影响[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30 (3): 267-272.
- [7] Liu C H, Chen J C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 16: 321-334.
- [8] Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in crustacean [J]. Aquaculture, 2000, 191: 121-131.
- [9] Jiang G J, Yua R C, Zhou M J. Modulatory effects of ammonia-N on the immune system of *Penaeus japonicus* to virulence of white spot syndrome virus [J]. Aquaculture, 2004, 241: 61-75.
- [10] Cheng W, Chen J C. The virulence of *Enterococcus* to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress [J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 12: 97-109.
- [11] Cheng W, Chen S M, Wang F I, et al. Effects of temperature, pH, salinity and ammonia on the phagocytic activity and clearance efficiency of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* to *Lactococcus garvieae* [J]. Aquaculture, 2003, 219 (1-2): 111-121.
- [12] Verghese B, Radhakrishnan E V, Padhi A. Effect of environmental parameters on immune response of the Indian spiny lobster, *Panulirus homarus* (Linnaeus, 1758) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23: 928-936.
- [13] 黄鹤忠, 李义, 宋学宏, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫功能的影响[J]. 海洋与湖沼, 2006, 7 (3): 198-205.
- [14] Söderhäll K, Cerenius L. Crustacean immunity [J]. Ann Rev Fish Dis, 1992, 2: 3-23.
- [15] 王建平, 余晓巍, 周志强, 等. 宁波市三疣梭子蟹主要病害流行特征及应对措施[J]. 河北渔业, 2008, 9: 49-53.
- [16] Chen J C, Liu P C, Lin Y T. Super intensive culture of red-tailed shrimp *Penaeus penicillatus* [J]. J World Aqu Soc, 1988, 19: 127-131.
- [17] 钟硕良, 陈月忠, 林克冰, 等. 虾池底质中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 S^{2-} 和异养细菌含量的变化及其相关性研究[J]. 台湾海峡, 1997, 16 (4): 449-454.
- [18] Zatta P. Dopamine, noradrenaline and serotonin during hypo-osmotic stress of *Carcinus maenas* [J]. Mar Biol, 1987, 96: 479-481.
- [19] Wang H Y, Sun Y, Tang B. Study on fluorescence property of dopamine and determination of dopamine by fluorimetry [J]. Talanta, 2002, 57 (5): 899-907.
- [20] Hemández L J, Gollas G T, Vargas A F. Activation of prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) [J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 113C: 61-66.
- [21] Hultmark D, Steiner H, Rasmussen T, et al. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* [J]. Eur J Biochem, 1980, 106: 7-16.
- [22] Perazzolo L M, Barracco M A. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors [J]. Dev Comp Immunol, 1997, 21: 385-395.
- [23] Söderhäll K. Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods [J]. Boll Zool, 1992, 59: 141-151.
- [24] Chiu C H, Guu Y K, Liu C H, et al. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23: 364-377.
- [25] Macey B M, Rathburn C K, Thibodeaux L K, et al. Clearance of *Vibrio campbellii* injected into the hemolymph of *Callinectes sapidus*, the Atlantic blue crab: The effects of prior exposure to bacteria and environmental hypoxia [J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25: 718-730.
- [26] Pan L Q, Hu F W, Jing F T, et al. The effect of different acclimation temperatures on the prophenoloxidase system and other defence parameters in *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25: 137-142.
- [27] 刘慧杰, 潘鲁青, 胡发文. 凡纳滨对虾在盐度变化下免疫机能评价的研究[J]. 海洋湖沼通报, 2008, 2: 159-166.
- [28] Cerenius L, Bangyeekhun E, Keyser P, et al. Host prophenoloxidase expression in freshwater crayfish is linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* [J]. Cell Microb, 2003, 5 (5): 353-357.
- [29] Chen J C, Cheng S Y, Chen C T. Changes of haemocyanin, protein and free amino acid levels in the haemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient ammonia [J]. Comp Biochem Physiol, 1994, 109A: 339-347.
- [30] Chen J C, Cheng S Y. Hemolymph PCO_2 , hemocyanin, protein levels and urea excretions of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia [J]. Aqu Toxicol, 1993, 27: 281-292.
- [31] Racotta I S, Roberto H H. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei* to ambient ammonia [J]. Comp Biochem Physiol, 2000, 125A: 437-443.
- [32] 聂月美, 邵庆均. 氨氮对虾的免疫影响及其预防措施[J]. 中国饲料, 2006, 10: 28-31.
- [33] 胡义波, 王玥, 姜乃澄. 氨态氮、亚硝态氮对罗氏沼虾血细胞及超微结构的影响[J]. 浙江大学学报, 2005, 32 (6): 691-697.
- [34] Destoumieux-Garzon D, Saulnier D, Garnier J, et al. Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 47070-47077.

Effects of ammonia exposure on prophenoloxidase system and immune parameters of swimming crab *Portunus trituberculatus*

YUE Feng¹, PAN Luqing¹, XIE Peng¹, LI Jian²

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The object of this study was to evaluate the effects of ammonia on prophenoloxidase system and immune parameters of swimming crab *Portunus trituberculatus*. The crabs were exposed to different ammonia levels: 0 mg/L (nature seawater or control), 1 mg/L, 5 mg/L and 20 mg/L NH_4Cl for 48 h and sampled randomly at 0 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h. The results indicated that ammonia exposure had a significant effect on dopamine (DA) concentration, haemocyte count, proPO activity, proPO mRNA expression, antibacterial and bacteriolytic activities of the crabs ($P < 0.05$). DA concentration in haemolymph of the experimental groups increased until 6 h, then recovered to the same level as control after 12 h. Total haemocyte count (THC) and differential haemocyte count (DHC) decreased significantly. THC and semi-granular cell count of the crab exposed to 20 mg/L ammonia decreased during 48 h exposure time. The haemocyte count of the other groups decreased until 12 h or 24 h, and then became stable. The proPO activity, proPO mRNA level and bacteriolytic activity showed significant decrease, increase and decrease trends respectively during the 48 h exposure. The proPO activity of 1 mg/L group recovered to control level after 12 h, and no significant difference of mRNA expression was observed between 1 mg/L group and control. The activity of proPO and mRNA expression of 5 mg/L and 20 mg/L groups became stable at 12 h and 6 h. Bacteriolytic activities became stable after exposed to ammonia for 24 h, meanwhile, 1 mg/L group recovered to control level. Antibacterial activity reached the minimum at 6 h or 12 h, having no significant difference with control. Haemocyte count, proPO activity and bacteriolytic activity in experimental groups were negatively related with ammonia concentration after stabilized, while proPO mRNA level showed a positive relation. It is concluded that ammonia exposure has the effects to decline the haemocyte count, proPO activity, proPO mRNA expression, antibacterial and bacteriolytic activities on crab *P. trituberculatus* which can cause deleterious effects on the immune system. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 761–770]

Key words: ammonia exposure; *Portunus trituberculatus*; prophenoloxidase system; immune parameters

Corresponding author: PAN Luqing. E-mail: panlq@ouc.edu.cn