

氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响

洪美玲^{1,2}, 陈立侨¹, 顾顺樟¹, 刘超¹, 龙章强¹, 张伟¹

(1. 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062; 2. 海南师范大学 生物系, 海南海口 571158)

摘要:以中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)为研究对象,蟹初始体质量为(71.25±1.13)g。设计对照组(不额外添加氨氮,水中本底氨氮质量浓度约为1mg/L)、低浓度组(10mg/L NH₄Cl)、中浓度组(50mg/L NH₄Cl)、高浓度组(100mg/L NH₄Cl)4种不同的氨氮质量浓度,分别于胁迫的第1天、3天、5天、15天抽取血淋巴进行相关免疫指标测定,并观察氨氮胁迫15d后对肝胰腺组织结构的影响。结果表明:(1)3个处理组的血细胞密度(DHC)在胁迫初期(第1天和第3天)均显著低于对照组($P<0.05$);在胁迫第5天,各组血细胞密度均升至最高;但至第15天时,高浓度组的DHC下降,显著低于对照组($P<0.05$)。低浓度的氨氮胁迫在短期内可促进超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性,高浓度的氨氮胁迫却抑制其活性;随胁迫时间延长,SOD活性变化趋势与DHC相似,CAT活性在胁迫第5天时出现显著下降($P<0.05$),且3个氨氮处理组显著低于对照组($P<0.05$),而第15天时各组之间差异不显著。丙二醛(MDA)含量随胁迫时间延长而不断增加,不同浓度的氨氮胁迫使MDA增加速度不同,浓度越高,MDA在体内积累量越大;(2)与对照组相比,3个氨氮处理组的中华绒螯蟹在遭受氨氮胁迫15d后,其肝胰腺B细胞数量均减少,转运泡体积明显增大,细胞核增大且数量增多;而且在高浓度组中,中华绒螯蟹的部分肝小管基膜破裂、细胞结构模糊,少量细胞核解体。结论认为,随着氨氮胁迫浓度的增加和胁迫时间的延长,中华绒螯蟹DHC逐渐下降,MDA含量逐渐增加,机体非特异性免疫防御系统遭到损伤,同时机体细胞和组织受到伤害甚至出现死亡。研究结果从免疫学与形态学的角度阐明了氨氮胁迫对中华绒螯蟹的毒害机制。[中国水产科学,2007,14(3):412-418]

关键词:氨氮胁迫;中华绒螯蟹;免疫指标;B细胞

中图分类号:Q959.223

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2007)03-0412-07

随着水产动物高密度精养体系的出现,养殖密度增大,投食过多使得养殖水体中代谢产物、有机物含量剧增,因而导致氨氮含量严重超标,已经成为养殖业中普遍存在的问题^[1]。氨氮对甲壳动物毒害机制的研究主要集中在生长^[2]、渗透调节^[3]、代谢^[4]等方面,而对免疫系统影响方面的研究至今尚未见报道。免疫系统在机体抵御外界不良环境时发挥着至关重要的作用,若免疫力下降,机体对病原的敏感性将提高,这将直接或间接地影响养殖生产^[5],因此研究氨氮胁迫对甲壳动物免疫系统的影响显得尤为重要。由于甲壳动物缺乏特异性免疫,所以对其免疫功能的研究主要集中在抗氧化能力方面。众多研究表明,抗氧化酶活性及其丙二醛含量已成为评价生物体健康状况的重要指标,也是重要的免疫评价指标^[6-8]。同时,肝胰腺是甲壳动物重要的解毒器官,其组织结构的变化在一定程度上可反映出机体对环境

的适应性改变^[9]。因此,本研究拟选用具有重要经济价值的中华绒螯蟹为对象,从免疫学和组织学角度入手,研究亚致死浓度下氨氮胁迫对其相关免疫指标和肝胰腺组织结构的影响,旨在探讨氨氮对中华绒螯蟹的毒害机制,为中华绒螯蟹的健康养殖提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

中华绒螯蟹于2005年9月一次性购于上海市铜川路水产批发市场,暂养于华东师范大学生物站,两周后再进行随机分组,挑选体色正常、健康活泼的雌性个体,体质量为(71.25±1.13)g,用于正式实验。预实验得知,该批蟹96h-LC₅₀为325.07mg(NH₄Cl)/L,故本实验共设计4个浓度组:高浓度(HC)组,100mg/L;中浓度(MC)组,50mg/L;低浓

收稿日期:2006-10-17; 修订日期:2006-12-21.

基金项目:国家自然科学基金(30271012,30300265);上海市优秀学科带头人计划(05XD14005);高等学校博士点专项基金(20040269011);上海市科委基础重大专项(06DJ14003);浙江省重大科技攻关农业项目(2005C12006-01).

作者简介:洪美玲(1976-),女,讲师,在职博士生,研究方向:水生生物学. E-mail:meilinghong_cnu@yahoo.com.cn

通讯作者:陈立侨. E-mail:lqchen@bio.ecnu.edu.cn

度(LC)组,10 mg/L;对照组,不额外添加氨氮,水中氨氮本底浓度为1 mg/L。氨氮质量浓度通过50 g/L NH_4Cl 母液进行调节,且各组重复3次。实验用水为经充分曝气且除氯的自来水,实验期间水温为(23±2)℃,pH值为7.45±1.53,溶解氧为6.0~6.5 mg/L。每天于上午8:00、下午4:00各投喂1次螺蛳,并于中午12:00换掉养殖水的1/6,换水时分别加入对应氨氮浓度的养殖用水,并进行适当的浓度和pH调节。在实验过程中,每隔4 h用奈氏试剂法测定氨氮浓度,4个组的氨氮质量浓度由高到低分别为(98.87±0.14)mg/L、(50.12±0.21)mg/L、(10.08±0.11)mg/L、(1.0±0.02)mg/L。

1.2 实验方法

1.2.1 相关免疫指标的测定

分别于胁迫后第1天、3天、5天、15天,从各实验组取出6只个体,冷冻麻醉后,用消毒的5号针头和1 mL注射器从中华绒螯蟹第三步足基部血窦处抽取血淋巴进行相关免疫指标的测定。注射器中预先加入已消毒的预冷抗凝剂(氯化钠510 mmol/L;葡萄糖100 mmol/L;柠檬酸200 mmol/L;柠檬酸钠30 mmol/L;乙二醇四乙酸二钠10 mmol/L;pH 7.3),使血液与抗凝剂最终体积比为1:1,血液置于冰箱(4℃)中保存,用于血细胞计数的样品,在离心管中混匀后,观察计数;其他血液样品则经低速冷冻离心(4 000 r/min,4℃)20 min后,将析出的血浆倾出,进行免疫指标测定。

血细胞密度(DHC)测定采用血球计数板在Olympus光学显微镜下直接计数。

SOD活性测定采用丁秀云等^[10]的连苯三酚自氧化法,酶活单位定义:每毫克蛋白每分钟抑制连苯三酚自氧化速率达50%的酶量定义为1个酶活

单位(U/mg prot)。

CAT的测定采用Marks^[11]的过氧化氢法,酶活单位定义:每毫克蛋白每分钟分解底物过氧化氢的相对量定义为1个酶活单位(U/mg prot)。

MDA的测定采用南京建成试剂盒,具体方法见使用说明。

总蛋白浓度参照Bradford^[12]测定方法,以牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA)(购于AMRESCO公司)为标准蛋白。

1.2.2 肝胰腺的组织切片

于胁迫后第15天,分别从各实验组取出3只个体,冷冻麻醉后,冰上解剖,迅速从每只蟹的相同部位取出适量肝胰腺,固定于Bouin氏液中,24 h后,常规石蜡包埋切片,厚度为5 μm,HE染色,OLYMPUS-2显微镜观察拍照。

1.3 数据处理与分析

所有实验数据均以 $\bar{X} \pm \text{SE}$ 表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。同一采样时间点3个氨氮处理组与对照组之间的比较采用LSD法进行,而在相同氨氮浓度组内,不同采样时间点之间的多重比较则采用Duncan法进行,差异显著临界值均为0.05。实验结果均用SPSS13.0软件进行统计与分析。

2 结果与分析

2.1 氨氮胁迫对中华绒螯蟹相关免疫指标的影响

由表1可知,3个氨氮处理组在胁迫的第5天,DHC最高,但与对照组之间差异不显著($P > 0.05$)。在胁迫的第1天和第3天,DHC显著低于对照组($P < 0.05$),而到第15天时,仅HC组显著低于对照组($P < 0.05$)。

表1 不同浓度的氨氮胁迫对中华绒螯蟹血细胞密度DHC的影响
Tab.1 Effect of ambient ammonia on DHC in haemolymph of *E. sinensis*

天数/d Days	分组(氨氮质量浓度) Group (NH_4^+ -N concentration)			
	LC(10 mg/L)	MC(50 mg/L)	HC(100 mg/L)	Control(1 mg/L)
1	156.50±3.80**	161.60±6.89**	146.25±6.57**	215.00±12.81
3	236.00±6.72**	220.10±6.61**	174.75±6.76**	248.00±5.58
5	271.42±11.89 ^c	261.10±43.35 ^b	230.17±21.13 ^b	229.50±8.10
15	232.00±13.52 ^{bc}	210.75±18.92 ^b	150.33±9.04**	251.60±16.51

注:同行中*号表示同一采样时间不同浓度氨氮胁迫组与对照组相比差异显著($P < 0.05$);同列内不同字母表示同一氨氮胁迫组不同时间点差异显著($P < 0.05$)。

Note: Values with asterisks in the same line indicate significant differences with respect to the control($P < 0.05$); values with different letters in the same column indicate significant differences among different days under same ambient ammonia exposure($P < 0.05$).

在氨氮胁迫第5天时,3个处理组的SOD活性与对照组之间差异不显著($P > 0.05$)。在其他采样时间

点,MC组和HC组的SOD活性均显著低于对照组($P < 0.05$),而LC组的SOD活性在胁迫第1天时显

著高于对照组($P < 0.05$)。随胁迫时间延长,其活性在各时间点与对照组相比均无显著差异($P > 0.05$),表现出先显著下降再上升然后再下降的波动现象,但见表 2。

表 2 不同浓度的氨氮胁迫对中华绒螯蟹血淋巴 SOD 活性的影响

Tab. 2 Effects of ambient ammonia on SOD activity in haemolymph of *E. sinensis*

$n=9; \bar{X} \pm SE; U/mg \text{ prot}$

天数/d Days	分组(氨氮质量浓度) Group (NH_4^+ -N concentration)			
	LC(10 mg/L)	MC(50 mg/L)	HC(100 mg/L)	Control(1 mg/L)
1	322.11±38.94**	187.56±12.17**	132.29±16.46**	211.99±21.73
3	223.42±15.64 ^{bc}	192.24±12.98**	184.88±10.76 ^{ab} *	239.71±10.79
5	314.54±34.02 ^{ab}	283.79±16.83 ^b	227.46±28.09 ^b	242.32±25.71
15	206.77±25.13 ^c	155.13±8.73**	138.82±4.09**	233.50±11.00

注:同行中*号表示同一采样时间不同浓度氨氮胁迫组与对照组相比差异显著($P < 0.05$);同列内不同字母表示同一氨氮胁迫组不同时间点差异显著($P < 0.05$)。

Note: Values with asterisks in the same line indicate significant differences with respect to the control($P < 0.05$); values with different letters in the same column indicate significant differences among different days under same ambient ammonia exposure($P < 0.05$).

在胁迫第 1 天和第 3 天,LC 组和 MC 组的 CAT 活性显著高于对照组,而 HC 组却显著低于对照组($P < 0.05$)。3 个处理组的 CAT 活性在胁迫第 5 天时均降至最低,与对照组之间存在显著差异

($P < 0.05$)。至第 15 天时,LC 组和 MC 组的 CAT 活性显著上升,但 3 个处理组与对照组之间均不存在显著差异($P > 0.05$),见表 3。

表 3 不同浓度的氨氮胁迫对中华绒螯蟹血淋巴 CAT 活性的影响

Tab. 3 Effects of ambient ammonia on CAT activity in haemolymph of *E. sinensis*

$n=9; \bar{X} \pm SE; U/mg \text{ prot}$

天数/d Days	分组(氨氮质量浓度) Group (NH_4^+ -N concentration)			
	LC(10 mg/L)	MC(50 mg/L)	HC(100 mg/L)	Control(1 mg/L)
1	4.44±0.11**	3.20±0.17**	1.59±0.19**	2.47±0.15*
3	3.50±0.13 ^b *	3.69±0.32**	1.41±0.10 ^{ab} *	2.46±0.26*
5	1.30±0.17 ^c *	0.88±0.10 ^b *	1.12±0.14 ^b *	2.09±0.13 ^{ab}
15	2.08±0.26 ^d	1.83±0.40 ^c	1.36±0.14 ^{ab}	1.98±0.30 ^b

注:同行中*号表示同一采样时间不同浓度氨氮胁迫组与对照组相比差异显著($P < 0.05$);同列内不同字母表示同一氨氮胁迫组不同时间点差异显著($P < 0.05$)。

Note: Values with asterisks in the same line indicate significant differences with respect to the control($P < 0.05$); values with different letters in the same column indicate significant differences among different days under same ambient ammonia exposure($P < 0.05$).

随胁迫时间的延长,各处理组 MDA 含量均不断增加,LC 组在胁迫第 5 天和第 15 天时 MDA 含量显著高于对照组($P < 0.05$),亦显著高于第 1 天和第 3 天的含量($P < 0.05$);而 MC 组和 HC 组的

MDA 含量在胁迫后第 3 天就显著高于第 1 天,与对照组之间亦存在显著差异($P < 0.05$)。而在胁迫的不同时间段中,HC 组 MDA 含量均为最高(表 4)。

表 4 不同浓度的氨氮胁迫对中华绒螯蟹血淋巴 MDA 含量的影响

Tab. 4 Effects of ambient ammonia on MDA level in haemolymph of *E. sinensis*

$n=9; \bar{X} \pm SE; nmol/mg \text{ prot}$

天数/d Days	分组(氨氮质量浓度) Group (NH_4^+ -N concentration)			
	LC(10 mg/L)	MC(50 mg/L)	HC(100 mg/L)	Control(1 mg/L)
1	12.70±0.60*	16.10±1.96*	31.95±2.67**	17.12±1.15
3	18.12±1.21*	24.82±1.99 ^b *	44.81±3.79 ^b *	16.64±0.70
5	28.18±3.28 ^b *	31.25±2.68 ^{bc} *	58.30±4.83 ^c *	20.61±2.72
15	27.61±4.00 ^b *	34.10±2.36 ^c *	63.08±4.55 ^c *	22.40±3.49

注:同行中*号表示同一采样时间不同浓度氨氮胁迫组与对照组相比差异显著($P < 0.05$);同列内不同字母表示同一氨氮胁迫组不同时间点差异显著($P < 0.05$)。

Note: Values with asterisks in the same line indicate significant differences with respect to the control($P < 0.05$); values with different letters in the same column indicate significant differences among different days under same ambient ammonia exposure($P < 0.05$).

2.2 氨氮胁迫对中华绒螯蟹肝胰腺组织结构的影响

对照组中华绒螯蟹的肝小管基膜较厚,细胞结构正常,仅可见到极少量的转运泡(图版 I-1)。用不同浓度的 NH_4Cl 处理,15 d 后,中华绒螯蟹的肝胰腺结构发生了不同程度的变化。在 LC 组中,B 细胞数量减少,转运泡数量增多,体积增大;基膜增厚;柱状上皮细胞的细胞质内出现许多空泡(图版 I-2)。在 MC 组中,肝小管 B 细胞的转运泡数量进一步增多、体积增大,几乎占据了管壁的绝大部分,大的转运泡把细胞核挤成弯月状;部分肝小管的上皮细胞结构模糊;部分黑色素沉积于肝小管上;肝小管间的血细胞数量增多(图版 I-3)。在 HC 组中,B 细胞中转运泡的絮状物质更多;柱状上皮细胞的细胞质颜色加深,部分细胞解体,细胞核固缩、破碎,管腔内出现许多细胞碎片,少数肝小管的基膜甚至破裂,细胞内的物质外泄,细胞结构损伤严重(图版 I-4)。

3 讨论

3.1 氨氮胁迫对中华绒螯蟹相关免疫指标的影响

氨氮是水产养殖系统中普遍存在的有害物质,对水生生物的作用机理较为复杂。高浓度的氨氮可影响动物体内酶的催化作用和细胞膜的稳定性,进而破坏排泄系统和渗透压的平衡^[10,13]。此外,氨氮胁迫还将导致动物体内免疫系统功能失常^[14]。中华绒螯蟹的免疫调节机制属于非特异性免疫,血细胞在免疫系统中发挥着重要作用,既是细胞免疫的担当者,又是体液免疫因子的提供者^[5]。血细胞密度总是随着自身的生理状况及周围水体环境条件的改变而不断发生变化,因此,常被用作机体健康状况的评定指标之一^[15]。在本研究中,血细胞密度随氨氮浓度的增加而降低,说明机体的免疫力下降,动物处于近乎于亚健康状况中,这与孙舰军等^[16]的研究报道相一致。本研究还发现,在一定的胁迫强度内,血细胞数下降到一定程度后逐渐回升,这可能是部分组织细胞迁移至循环系统,从而导致血细胞密度呈现周期性的波动变化^[17]。当氨氮浓度超过一定范围后,组织细胞的迁移途径受到影响,机体可出现不可逆转的损伤,致使血细胞密度大大降低^[17],因此,在本研究中,高浓度氨氮胁迫作用 15 d 后,血细胞密度显著低于对照组($P < 0.05$)。

动物在发生胁迫反应时,产生大量的活性氧,活

性氧对机体的影响具有双重性,低浓度的活性氧对机体的防御功能具有积极作用,但过多的活性氧积存于体内将对机体造成氧化损伤。SOD 和 CAT 是生物体内两种相互关联的抗氧化酶,可联合清除活性氧自由基。在本研究中,低浓度的氨氮胁迫在短期内提高了 SOD 和 CAT 活性,但高浓度的氨氮胁迫却抑制了这两种酶的活性,说明低浓度的氨氮胁迫在短期内对机体的防御能力具有一定的促进作用。Stebbing^[18]认为这可能是毒物低浓度条件下的一种增益效应,是其在无毒情况下的刺激现象,并称之为“毒物兴奋效应”(Poison-intoxication effect),而在高浓度下的抑制效应可能与活性氧自由基已超过自身的清除阈值而引起如上所说的氧化损伤有关。随着胁迫时间的延长,低浓度的增益效应消失,导致抗氧化酶活性下降或与对照组差异不显著。

与此同时,过多的活性氧将使机体脂质过氧化程度加剧,脂质过氧化的代谢产物将急剧增加,而丙二醛是脂质过氧化的代谢产物之一,亦被广泛用作氧化应激中细胞膜氧化损伤的评价指标之一^[19]。在本研究中,血淋巴丙二醛的含量随着氨氮浓度的增加而增加,并随时间的延长,在体内的累积量不断增加,提示氨氮胁迫下丙二醛的积累而造成的氧化损伤可能是氨氮对中华绒螯蟹产生毒害作用的主要原因。

3.2 氨氮胁迫对中华绒螯蟹肝胰腺组织结构的影响

甲壳动物的肝胰腺主要由 4 种细胞构成: E-细胞(胚细胞)、B-细胞(分泌细胞)、R-细胞(吸收细胞)、F-细胞(纤维细胞)。通常认为 E 细胞是一种未分化的胚性细胞,其功能是通过分裂和分化产生其他类型的肝细胞,从而补充一些退化消耗的细胞。B 细胞不仅具有分泌作用,还具有吸收营养物质的功能;R 细胞除有吞噬作用外,还可储存脂肪和糖原;F 细胞的功能仍存在争议^[20]。肝小管中各种细胞的比例在不同的胁迫反应中有不同的变化趋势: 马氏沼虾(*Macrobrachium malcolmsonii*) 在经受硫丹(10.6 ng/L)暴露 21 d 后,每根肝小管的 R 细胞急剧增多^[21];而颗粒张口蟹(*Chasmagnathus granulatus*) 在饲喂一定剂量微囊藻毒素(17.6 ng/d)的 7 d 后,肝小管的 B 细胞减少^[22]。在本研究中,中华绒螯蟹肝胰腺在经受氨氮胁迫 15 d 后,与对照组相比,3 个处理组中肝小管中 B 细胞数量均减少,转运泡体积却明显增大,分析推断这种增大的转运泡内

可能积存了含有氨氮的物质,可将之转运至体外以解除部分氨氮毒性,但此假设还有待于进一步验证。此外,Køhler 等^[23]在研究三叶真蟹(*Carcinus maenas*)肝胰腺的解毒功能时发现,在 F/B 的过渡细胞中存在一种 P-糖蛋白,它可消除部分化合物的毒性。但在氨氮胁迫中是否有此 P-糖蛋白存在还需进一步研究。

中华绒螯蟹在不同氨氮浓度中,肝胰腺组织结构的变化具有一定的差别。在低浓度的氨氮组中,肝胰腺的基膜增厚,这可能是动物在胁迫过程中产生的胶原纤维和黑色素所引起的,这种增厚是机体对应激物的自我防御的体现,Jiravanichpaisal 等^[24]的研究结果也证实了这一点。在中浓度的氨氮组中,肝小管上可见部分黑色素的沉积,Pinho 等^[22]对颗粒张口蟹(*Chasmagnathus granulatus*)进行微囊藻毒素添加时亦发现类似现象。黑色素及其形成过程中的中间产物均为高活性物质,可抑制病原体胞外蛋白酶和几丁质酶的活性,从而在伤口愈合、抑制甚至杀死病原体方面发挥着重要作用^[25],这也说明适当浓度的氨氮胁迫可在一定程度上促进甲壳动物的免疫能力。但随着氨氮浓度的进一步升高,肝细胞出现坏死现象,管壁细胞与基膜分离,严重时管壁破裂,这说明高浓度的氨氮胁迫已破坏了肝胰腺的组织结构,进而会影响到肝胰腺的正常生理功能。

参考文献:

- [1] Chen J C, Kou C T. Nitrogenous excretion in *Macrobrachium rosenbergii* at different pH levels[J]. *Aquaculture*, 1996, 144: 155—164.
- [2] Kasturi R, Lutz A, Peter C. Ammonia toxicity and its effect on the growth of the South African abalone *Haliotis midae* Linnaeus[J]. *Aquaculture*, 2006, 261: 678—687.
- [3] Rebelo M F, Santos E A, Monserrat J M. Ammonia exposure of *Chasmagnathus granulatus* (Crustacea, Decapoda) Dana, 1851; accumulation in haemolymph and effects on osmoregulation[J]. *Comp Biochem Physiol A*, 1999, 122: 429—435.
- [4] Racotta I S, Hernandez-Herrera R. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia[J]. *Comp Biochem Physiol A*, 2000, 125: 437—443.
- [5] Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in crustaceans[J]. *Aquaculture*, 2000, 191: 121—131.
- [6] Bebianno M J, Company R, Serafima A, et al. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields [J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 75: 354—373.
- [7] 孔祥会,王桂忠,李少菁,等.低温驯化下锯缘青蟹肝胰腺的抗氧化效应及 ATPase 活性变化[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(6): 708—713.
- [8] Brouwer M, Brouwer T H. Biochemical defense mechanisms against copper-induced oxidative damage in the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 351(2): 257—264.
- [9] Papathanassiou E, King P E. Effects of starvation on the fine structure of the hepatopancreas in the common prawn *Palaeomon serratus* (Pennat) [J]. *Comp Biochem Physiol A*, 1984, 77: 243—249.
- [10] 丁秀云,李光友,翟玉梅,等.皱纹盘鲍经诱导后血淋巴中一些因子变化的研究[J]. *海洋与湖沼*, 1996, 27(4): 362—367.
- [11] Marks G W, Fox D L. The inactivation of mussel catalase by oxygen[J]. *J Biol Chem*, 1993, 103: 269—283.
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248—254.
- [13] 丁美丽,林林,李光友,等.有机污染对中国对虾体内外环境影响的研究[J]. *海洋与湖沼*, 1997, 28(1): 7—12.
- [14] 樊甄姣,刘志鸿,杨爱国.氨氮对栉孔扇贝血淋巴活性氧含量和抗氧化酶活性的影响[J]. *海洋水产研究*, 2005, 26(1): 23—27.
- [15] Tseng I T, Chen J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress[J]. *Fish Shellf Immunol*, 2004, 17: 325—333.
- [16] 孙舰军,丁美丽.氨氮胁迫对中国对虾抗病力的影响[J]. *海洋与湖沼*, 1999, 30(3): 267—272.
- [17] Pascual C, Sánchez A, Sánchez A, et al. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males; the effect of an extreme temperature[J]. *Aquaculture*, 2003, 218: 637—650.
- [18] Stebbing A R D. Hormones is the stimulation of growth by low levels of inhibitors[J]. *Sci Tot VI*, 1982, 22(1): 213—234.
- [19] Lepage G, Mnuoz G, Champagne J, et al. Preparative steps for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography [J]. *Anal Biochem*, 1991, 197: 277—283.
- [20] 李富花,李少菁.锯缘青蟹幼体肝胰腺的观察研究[J]. *海洋与湖沼*, 1998, 29(1): 29—32.
- [21] Bhavan P S, Geraldine P. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan[J]. *Aquatic Toxicology*, 2000, 50: 331—339.
- [22] Pinho G L L, de Rosa C M, Yunes J S, et al. Toxic effects of microcystins in the hepatopancreas of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae) [J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2003, 135: 459—468.
- [23] Køhler A, Lauritzen B, Jansen D, et al. Detection of P-glycoprotein mediated MDR/MXR in *Carcinus maenas* hepatopancreas by immuno-gold—silver labeling[J]. *Mar Environ Res*, 1998,

46:411-414.

[24] Jiravanichpaisal P, Miyazaki T. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger prawn *Penae-*

us monodon[J]. *J Aquat Anim Health*, 1994, (6):27-35.

[25] 徐海圣,徐步进. 甲壳动物细胞及体液免疫机理的研究进展[J]. 大连水产学院学报, 2001, 16(1):49-57.

Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

HONG Mei-ling^{1,2}, CHEN Li-qiao¹, GU Shun-zhang¹, LIU Chao¹, LONG Zhang-qian¹, ZHANG Wei¹

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China; Departement of Biology, Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

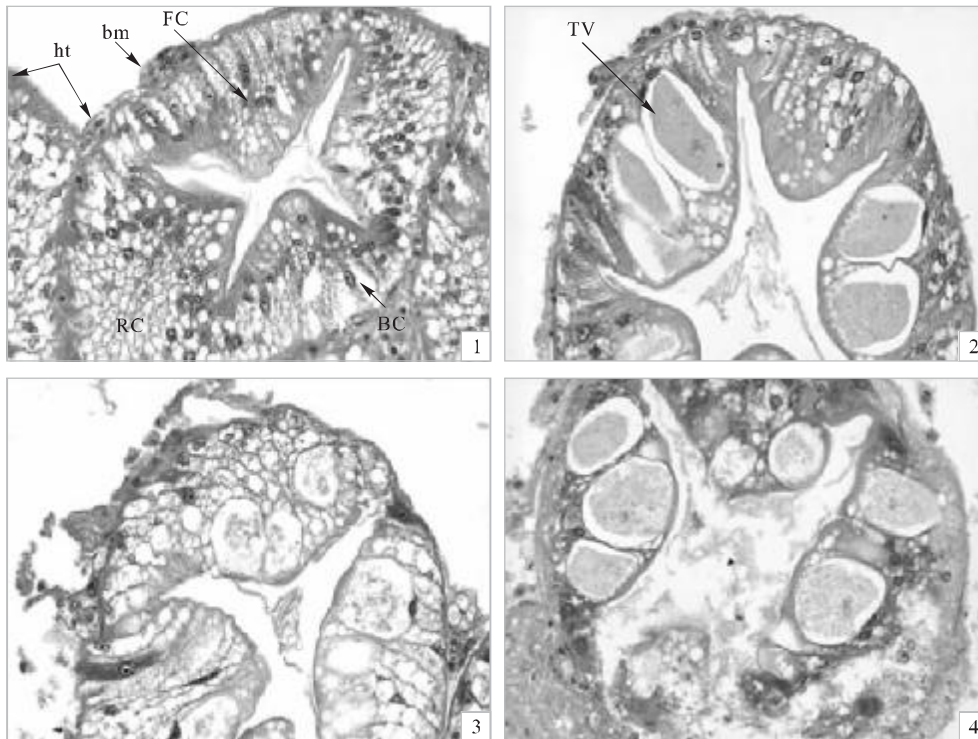
Abstract: In intensive culture system, accumulation of ammonia-N, which is the principal end-product of nitrogenous metabolism, has deleterious effects on aquatic animals. The relationship between ambient ammonia and immunity capacity in aquatic animals is well-documented, but there is a dearth of information relating to the immune and histological alterations induced by ambient ammonia from *Eriocheir sinensis*. In the present study, the effects of ambient ammonia on the immune response of *E. sinensis* body weight (71.25 ± 1.13 g), was investigated. The crabs were allocated to four groups with different $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ levels: 10 mg/L (LC group), 50 mg/L (MC group) and 100 mg/L (HC group), which were obtained by diluting 50 g/L NH_4Cl , and the control (basic concentration of 1 mg/L NH_4Cl). The relative immunity indicators of haemolymph were measured on days 1, 3, 5 and 15 following the stress and histological structure of hepatopancreas was observed on day 15. The results were as follows: (1) After 1-3 days treatment with ammonia exposure, density of hemocyte cell (DHC) in these three treatments decreased significantly compared with control ($P < 0.05$). With time elapsed, DHC peaked on day 5 and there was no significant difference among different treatments ($P > 0.05$). However, on day 15, DHC in group HC was lower significantly than that in control ($P < 0.05$). Within short time (within 1 day) following the stress, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity were stimulated in LC group while inhibited in HC group. After 5 d, the change of SOD activity was similar to that of DHC. Whereas CAT activity dropped to the lowest on day 5, and significant difference presented in these three treatments compared with control ($P < 0.05$). Progressive increases in malondialdehyde (MDA) level was observed with time elapsed. Moreover, the augmentation of MDA changed with different concentration of ambient ammonia-N that the higher concentration, the more augmentation of MDA; (2) the histological structure of hepatopancreas was affected by ammonia exposure. In these three treatments, the number of B cells of hepatopancreas decreased while the transferred vacuoles increased, and nucleus were deformed with its numbers increasing. The basement membranes of some hepatopancreas tubular in HC group were so ruptured that substances in cells leaked. The cellularity was dim and nucleus were karyorhexised. Such alterations could affect vital physiological functions, such as absorption, storage and secretion of the hepatopancreas, which in turn could ultimately affect the survival and growth of *E. sinensis*. Therefore, the results indicate that ammonia exposure can affect the immunity function and histological structure, which will provide the theoretical basis for the mechanism of ammonia stress on crabs. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3):412-418]

Key words: ammonia-N; *E. sinensis*; immunity indicators; B cells

Corresponding author: CHEN Li-qiao. E-mail: lqchen@bio.ecnu.edu.cn

洪美玲等: 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响

HONG Mei-ling et al: Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)



图版 I 不同浓度的氨氮胁迫对中华绒螯蟹肝胰腺组织结构的影响

1. 对照组, $\times 400$.
 2. 10 mg/L NH_4Cl 处理 15 d 后的肝胰腺, 转运泡几乎占了整个小管, $\times 400$.
 3. 50 mg/L NH_4Cl 处理 15 d 后的肝胰腺, 细胞结构模糊, 基膜破裂; 肝小管间的血细胞数量增多, $\times 400$.
 4. 100 mg/L NH_4Cl 处理 15 d 后的肝胰腺, 部分小管细胞解体, 细胞核固缩、破碎, 使管腔内出现许多细胞碎片, 细胞受害极其严重, $\times 400$.
- BC; B 细胞; bm; 基膜; EC; E 细胞; FC; F 细胞; ht; 肝小管; TV; 转运泡; RC; R 细胞.

Plate I Effects of ambient ammonia on histological structure of hepatopancreas in *E. sinensis*

1. Typical organization of hepatopancreas of *E. sinensis* in control group, $\times 400$.
 2. Ambient ammonia induced alterations in the histoarchitecture of the hepatopancreas of *E. sinensis* presence of larger volume of transferred vacuoles (TV) in the hepatopancreas tubules of test crabs exposed to 10 mg/L NH_4Cl , $\times 400$.
 3. Ambient ammonia induced alterations in the histoarchitecture of the hepatopancreas of *E. sinensis*. The basement membranes in the hepatopancreas tubules were so ruptured that substances in cells were leaked and hemocytes increased between the hepatopancreas tubules of test crabs exposed to 50 mg/L NH_4Cl , $\times 400$.
 4. Ambient ammonia induced alterations in the histoarchitecture of the hepatopancreas of *E. sinensis*. Necrotic hepatopancreas tubule lost its epithelia cells and containing tissue debris in the lumen of test crabs exposed to 100 mg/L NH_4Cl , $\times 400$.
- BC; B cell; bm; Basement membranes; EC; E cell; FC; F cell; ht; Hepatopancreas tube; TV; transferred vacuoles; RC; R cell.