

亚硝酸盐对红螯光壳螯虾不同组织免疫相关酶活性及超微结构的影响

吕晓燕, 李嘉尧, 方燕, 郭占林, 赵云龙, 李恺*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要:应用透射电镜技术,结合生物酶测定,研究了水体中不同浓度亚硝酸盐胁迫下红螯光壳螯虾肝胰腺、鳃和肌肉组织中免疫相关酶的活性变化,以及对肝胰腺和鳃的形态学影响。结果显示,与对照组相比,亚硝酸盐胁迫下,3种组织的ACP、AKP、SOD以及GSH-PX的活性都显著降低($P < 0.05$);随着亚硝酸盐浓度增加,酶活力呈现降低的趋势;鳃组织 Na^+ 、 K^+ -ATPase和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATPase的活性也显示出随亚硝酸盐浓度升高而降低的趋势。超微结构显示,随着亚硝酸盐浓度增加,鳃角质层受损、断裂;上皮细胞排列疏松、空泡化;细胞器变形;鳃腔内也出现空泡化现象,血细胞变形。肝胰腺上皮细胞排列杂乱无章,细胞裂解,空泡化;微绒毛受损、断裂,肝小管间距扩大、结缔组织变得稀薄,血细胞变形;高浓度组R细胞的脂滴减少,核膜解体,细胞膜破裂,空泡化加剧;F细胞的核糖体减少,空泡化加剧,内质网水肿。研究说明亚硝酸盐对红螯光壳螯虾3种组织的免疫相关酶活产生影响,并损伤肝胰腺和鳃的形态学结构,影响其生物学功能。

关键词:红螯光壳螯虾;亚硝酸盐;免疫相关酶;超微结构

中图分类号:S 917

文献标识码:A

红螯光壳螯虾(*Cherax quadricarinatus*)俗称澳洲淡水龙虾,属甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、拟河虾科、光壳虾属,原产于澳大利亚,是目前世界上主要养殖的淡水经济虾类之一。我国于1992年引进试养,并对其繁殖生物学、胚胎学和病害防治等方面进行了较为全面的研究^[1-3]。近年来,随着人工育苗技术的突破,成虾养殖规模的扩大,以及环境的恶化,养殖红螯光壳螯虾所面临的水体理化因素带来的压力越来越大,因此,如何调控水质,进行生态养殖显得尤为重要。亚硝酸盐是集约化虾蟹养殖环境中重要的污染成分,是氨氧化成硝酸盐整个过程的中间产物,也是制约人工育苗苗种成活率的主要因子,为此国内外很多学者对亚硝酸盐的毒性作用和机理进行了探索研究^[4-8],特别是近年来免疫相关酶活性的检测已成为甲壳动物毒理学研究的常用手段^[7-10],但至今罕有亚硝酸盐对红螯光壳螯虾毒

性作用相关的研究报道。本文应用透射电镜技术,结合酶学方法,较为详细地研究了环境中不同浓度的亚硝酸盐胁迫下,红螯光壳螯虾肝胰腺、鳃和肌肉组织内免疫相关酶的活性变化,以及对肝胰腺和鳃的形态学影响,以期了解水体中亚硝酸盐污染对红螯光壳螯虾的毒性作用,并为其科学养殖和水质管理提供理论参数。

1 材料与方法

1.1 试验分组与管理

2009年7月10日至8月10日,在上海市金山区漕泾特种水产养殖公司进行实验。选取四肢完整、健康的红螯光壳螯虾幼虾个体,体长4.50~5.50 cm,体重2.63~3.40 g。实验前所有实验用虾均用商业饲料驯养1周后备用,自然光照,饲养水用暴气2 d以上的自来水,盐度范围为0.30~0.36,水温保持在27℃左右,连续增氧(溶氧

收稿日期:2010-08-05 修回日期:2010-09-16

资助项目:上海市科委重大计划项目(08DZ1906401);上海市科委富民工程项目(09DZ1912900)

通讯作者:李 恺, Tel:021-62233580, E-mail:kaili@bio.ecnu.edu.cn

5.54 ~ 5.73 mg/L)。每日傍晚投喂虾体湿重 3% 左右的饵料,次日上午吸去粪便、残饵。

根据养殖水体通常的亚硝酸盐 (NaNO_2) 污染浓度和亚硝酸盐对红螯光壳螯虾的半致死浓度^[5,11-12],本实验分设 6 组亚硝酸盐浓度,分别为 0 (对照组),0.3,1.5,3.0,4.5 和 6.0 mg/L,每组下设 3 个平行,每个平行随机挑取 20 只幼虾,于 300 L 的水族箱内饲养 2 周,使用的水族箱和箱底放置的瓦片均用高锰酸钾浸泡消毒。分组实验虾饲养管理同上述,去除粪便、残饵,并添加相应浓度的损耗饲养水。

1.2 酶活性测定

样品虾用冰块麻醉,解剖取其肝胰腺、鳃和去壳的腹部肌肉组织,液氮速冻带回实验室,置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

蛋白含量测定 准确称取 6 个组 3 个组织的样品各 0.2 g,按质量体积比 1:9 加入预冷的生理盐水制备成 10% 的组织匀浆,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,用于下述各消化酶活力的测定。以考马斯亮兰法测定组织蛋白浓度 (试剂盒购自南京建成生物工程研究所)。

酶活测定 根据试剂盒说明,测量虾肝胰腺、鳃和肌肉 3 种组织的酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 的活性以及鳃组织离子转运通道 (Na^+ , K^+ -ATPase、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase) 的活性。其中,ACP 是以每克组织蛋白在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位;AKP 是以每克组织蛋白在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位;SOD 是以每毫克组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位 (U);GSH-PX 规定为每毫克蛋白质,每分钟扣除非酶反应的作用,使反应体系中 GSH 浓度降低 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 为一个酶活力单位; Na^+ , K^+ -ATPase 和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 都规定为每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。

1.3 数据分析

所测数据以 SPSS 18.0 软件进行数据统计分析,采用 One-Way ANOVA 法进行显著性检验。

1.4 透射电镜实验

各取高 (6.0 mg/L)、中 (3.0 mg/L)、低 (0.3

mg/L) 亚硝酸盐浓度组及对照组的鳃和肝胰腺组织,用 2.5% 的戊二醛 (pH 7.4,用 PBS 液配制) 固定,PBS 液漂洗后,2.0% 的饿酸再固定,乙醇系列脱水,丙酮置换,Epon812 包埋,超薄切片,厚度为 70 nm,用 HITACHI-600 型透射电镜观察拍照。

2 结果

2.1 亚硝酸盐胁迫下红螯光壳螯虾免疫相关酶的活性变化

随着亚硝酸盐浓度增加,肝胰腺和鳃组织 ACP 的活性逐渐下降,组间差异显著 ($P < 0.05$) (表 1);在 0.3 mg/L 的亚硝酸盐胁迫下,肌肉中 ACP 的活性加强,以后随着浓度的增大而降低,组间差异显著 ($P < 0.05$)。随着亚硝酸盐浓度升高,肌肉组织中 AKP 活性逐渐下降,组间差异显著 ($P < 0.05$);肝胰腺组织 AKP 活性也呈逐渐降低的趋势,中浓度 (3.0 mg/L) 有短暂升高,组间差异显著 ($P < 0.05$);鳃组织随着亚硝酸盐浓度增加,AKP 活性降低,有显著差异 ($P < 0.05$)。

随着亚硝酸盐浓度升高,肌肉中 SOD 活性逐渐降低,差异显著 ($P < 0.05$);肝胰腺组织 SOD 活性在中浓度下活性最大,其次是对照组,其他浓度组的活性都小于对照组,组间差异显著 ($P < 0.05$);鳃组织 SOD 活性逐渐降低,只有在中浓度下短暂升高,各组间有差异显著 ($P < 0.05$)。肌肉和肝胰腺组织中 GSH-PX 活性随亚硝酸盐浓度增加先降低后升高再降低,组间差异显著 ($P < 0.05$),且对照组活性最大;鳃组织 GSH-PX 的活性先增加再降低,1.5 mg/L 和 3.0 mg/L 浓度组间无显著性差异 ($P > 0.05$),其余组间差异显著 ($P < 0.05$)。另外,鳃组织中 Na^+ , K^+ -ATPase 活性随亚硝酸盐浓度增加而逐渐降低,差异显著 ($P < 0.05$); Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 的活性先降低后有短暂升高,组间差异显著 ($P < 0.05$),且对照组的活性最高。

2.2 亚硝酸盐胁迫下红螯光壳螯虾肝胰腺和鳃组织的超微结构变化

红螯光壳螯虾鳃的形态学变化 透射电镜显示,红螯光壳螯虾的鳃由鳃壁和鳃腔两部分组成;鳃壁由角质层、上皮细胞层和基膜组成;鳃腔则主要由腔内的血细胞组成。

对照组的鳃角质层明显分为内外两层,其中外层光滑而连续,内层致密度较高。上皮细胞排

列整齐而紧密,与角质层相联处的上皮细胞内含有较多的线粒体,而且线粒体生长旺盛,常呈拉伸

状(图版 I -1),正常的鳃腔内血细胞,形态规则,边缘平滑(图版 I -2)。

表 1 亚硝酸盐胁迫下红螯光壳螯虾 3 种组织的免疫相关酶的活性变化
Tab. 1 The variation of the activity of immune-related enzymes under nitrite stress in three tissues for *C. quadricarinatus*

酶 enzyme	组织 tissue	亚硝酸盐浓度(mg/L) concentration of nitrite					
		0	0.3	1.5	3	4.5	6
酸性磷酸酶 ACP	肌肉 muscles	13.02 ± 0.005 8 ^a	5.61 ± 0.005 8 ^c	6.85 ± 0.011 6 ^b	5.16 ± 0.010 0 ^d	4.06 ± 0.010 0 ^e	3.85 ± 0.005 8 ^f
	肝胰腺 hepatopancreas	139.06 ± 0.036 1 ^a	107.85 ± 0.023 1 ^b	101.54 ± 0.040 0 ^c	80.28 ± 0.011 6 ^d	60.46 ± 0.036 1 ^e	55.45 ± 0.035 1 ^f
	鳃 gills	78.30 ± 0.015 3 ^a	58.18 ± 0.011 6 ^b	50.29 ± 0.020 0 ^c	47.81 ± 0.010 0 ^d	37.72 ± 0.017 3 ^e	25.30 ± 0.005 8 ^f
碱性磷酸酶 AKP	肌肉 muscles	10.24 ± 0.011 6 ^a	8.25 ± 0.005 8 ^b	6.94 ± 0.010 0 ^c	3.19 ± 0.005 8 ^d	2.13 ± 0.005 8 ^e	2.25 ± 0.010 0 ^f
	肝胰腺 hepatopancreas	92.58 ± 0.015 3 ^a	44.49 ± 0.010 0 ^b	25.24 ± 0.010 0 ^d	31.12 ± 0.005 8 ^e	14.30 ± 0.005 8 ^e	13.60 ± 0.011 6 ^f
	鳃 gills	83.36 ± 0.015 3 ^a	42.33 ± 0.010 0 ^b	41.32 ± 0.011 6 ^c	20.00 ± 0.005 8 ^f	20.67 ± 0.010 0 ^d	20.33 ± 0.015 3 ^e
超氧化物歧化酶 SOD	肌肉 muscles	81.59 ± 0.005 8 ^a	76.55 ± 0.152 8 ^b	57.35 ± 0.152 8 ^c	52.15 ± 0.010 0 ^d	41.53 ± 0.010 0 ^e	25.27 ± 0.015 3 ^f
	肝胰腺 hepatopancreas	33.22 ± 0.005 8 ^b	35.42 ± 0.015 3 ^a	31.34 ± 0.015 3 ^c	29.45 ± 0.010 0 ^d	21.29 ± 0.010 0 ^f	22.49 ± 0.015 3 ^e
	鳃 gills	105.21 ± 0.015 3 ^a	99.16 ± 0.015 3 ^b	93.68 ± 0.010 0 ^d	94.60 ± 0.015 3 ^e	87.59 ± 0.010 0 ^e	76.53 ± 0.015 3 ^f
谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-PX	肌肉 muscles	25.77 ± 0.010 0 ^a	22.60 ± 0.015 3 ^c	24.87 ± 0.011 6 ^b	19.32 ± 0.015 3 ^d	19.15 ± 0.015 3 ^e	17.53 ± 0.005 8 ^f
	肝胰腺 hepatopancreas	43.60 ± 0.011 6 ^a	40.84 ± 0.015 3 ^d	43.27 ± 0.010 0 ^b	41.08 ± 0.015 3 ^e	39.79 ± 0.015 3 ^e	25.84 ± 0.015 3 ^f
	鳃 gills	45.29 ± 0.020 8 ^b	49.59 ± 0.015 3 ^a	41.34 ± 0.020 0 ^c	41.35 ± 0.010 0 ^e	36.75 ± 0.015 3 ^d	34.15 ± 0.005 8 ^f
Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	鳃 gills	6.75 ± 0.015 3 ^a	6.68 ± 0.015 2 ^b	5.39 ± 0.025 2 ^c	5.23 ± 0.015 3 ^d	4.17 ± 0.015 3 ^e	3.91 ± 0.010 0 ^f
Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -ATPase	鳃 gills	3.33 ± 0.015 3 ^a	3.10 ± 0.015 3 ^b	2.80 ± 0.005 8 ^c	2.60 ± 0.020 8 ^d	2.04 ± 0.015 3 ^f	2.13 ± 0.015 3 ^e

注:同行肩注小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

Notes: Data in the same column with different letters indicates significant difference ($P < 0.05$).

在亚硝酸盐胁迫下,低浓度组(0.3 mg/L)较之对照组未出现明显变化,角质层仍为整齐的双层膜。中浓度组(3.0 mg/L)鳃角质层受损较为严重,弯曲、变薄,边缘不整齐,内外层角质分辨不清;上皮细胞的内质网水肿,线粒体数目减少,胞内出现空泡化现象(图版 I -5);血细胞形态变得不规则,细胞膜破裂,核破裂,细胞内染色加深(图版 I -3)。高浓度组(6.0 mg/L)角质层受损更加严重,出现断裂现象(图版 I -4, I -6);上皮细胞排列疏松,且没有规则(图版 I -4, I -6),上皮细胞细胞器数目减少,或者是细胞破裂(图版 I -6);血细胞破裂溶解,数目减少(图版 I -7);另外,鳃腔内也出现了很多空泡化现象(图版 I -8)。

红螯光壳螯虾肝胰腺的形态学变化 十足类动物肝胰腺是两侧对称的分枝管状腺。每条小管由基膜和上皮组成。上皮由 4 类细胞构成,即分泌细胞(B 细胞)、吸收细胞(R 细胞)、原纤维细胞(F 细胞)和胚胎细胞(E 细胞)^[13-14]。

观察发现,对照组上皮细胞为单层柱状上皮细

胞,表面具微绒毛,排列整齐,无断裂现象(图版 II-1)。亚硝酸盐胁迫下,和鳃组织一样,低浓度组未出现形态学的改变。中浓度组的肝小管整体结构不变;而上皮细胞的排列变得杂乱无章,微绒毛也出现受损现象,不规则、不整齐(图版 II-4)。高浓度组肝小管的整体结构仍旧不受影响(图版 II-5);但微绒毛受损更加严重,排列极其不规则,且有些位置微绒毛断裂(图版 II-5);上皮细胞大都裂解,内容物释放,空泡化严重(图版 II-5);基膜也变得不整齐,并且肝小管间的距离扩大,中间的结缔组织变得稀薄,血细胞变形,或者是裂解(图版 II-6);另外,高浓度组 R 细胞的脂滴减少,核膜解体,细胞膜破裂,空泡化严重(图版 II-7),F 细胞的粗面内质网减少,滑面内质网增加,核糖体减少,也出现空泡化现象,内质网轻微水肿(图版 II-8)。

3 讨论

3.1 亚硝酸盐胁迫对红螯光壳螯虾酶活的影响 磷酸酶 (ACP、AKP) 酸性磷酸酶 (acid

phosphatase, ACP)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)广泛存在于各种生物体内,具防御、离子分泌、免疫调节等重要生理作用^[15]。其中,ACP是在酸性条件下催化磷酸单酯水解的酶,在免疫防御中可作为细胞吞噬作用的重要组成部分,破坏和消除侵入体内的异物;AKP是一种膜结合蛋白,它在机体的骨化过程,营养物质的消化、吸收和转运过程中以及细胞调控过程中起重要作用^[8-9,16]。因此,磷酸酶的活性变化一定程度上指示了动物体免疫系统的受损情况。在本研究中,亚硝酸盐胁迫下,3个组织的ACP和AKP较之对照组都有显著性降低($P < 0.05$);AKP与ACP的活性变化的走势相似,虽然在个别浓度组有短暂的酶活升高,但是随着浓度的增加,有明显的降低趋势,尤其在中、高浓度组,亚硝酸盐对红螯光壳螯虾的ACP和AKP的活力影响极其显著。

亚硝酸盐的强氧化性可能影响ACP的磷酸基团转移,干扰了ACP正常的催化效率,使ACP的活性下降。AKP的活性变化可能是亚硝酸盐使血淋巴酸碱平衡向酸性偏离,抑制了AKP的生理功能和活性水平。另外,本文研究表明,ACP和AKP具有组织特异性;测得的ACP和AKP的活性大小顺序为肝胰腺 > 鳃 > 肌肉,这与3种器官在代谢过程中的特点是息息相关的。有关亚硝酸盐对红螯光壳螯虾组织、器官中ACP、AKP活性影响的具体作用机制尚不了解。

抗氧化酶(SOD、GSH-PX) 当细菌等异物侵染动物体,会被吞噬细胞吞噬,引起呼吸爆发,进而会产生大量的活性氧自由基,它能攻击周围的生物分子,使蛋白变性,脂类过氧化以及DNA断裂^[17],最终可导致机体老化,抗病能力下降甚至死亡。许多研究证明,环境污染,如亚硝态氮浓度升高可导致机体活性氧的增加^[18]。超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)作为机体抗氧化体系的重要组分,在正常生理状态下,可联合清除活性自由基,保护动物体免受自由基的伤害。因此,抗氧化酶是甲壳动物机体非特异性免疫的一个重要方面,一定程度上可反映机体的健康状况^[19]。SOD活性可作为ROS水平甚至是免疫系统的指示因子,甲壳动物体内自由基数目增多,则SOD活性升高^[20]。

在亚硝酸盐胁迫下,SOD、GSH-PX两种抗氧

化酶活性相较于对照组显著下降,高浓度组活性变化尤其明显,这说明高浓度组酶活受损严重,导致机体清除超氧阴离子的能力下降。个别组在低浓度的亚硝酸盐胁迫下较之对照组活性暂时升高,表现为“毒性兴奋效应”,这可能是因为低浓度的刺激使酶产生了应激反应,抗氧化体系被诱导而活性增强,清除过多的自由基,这也是一种对外界胁迫主动调节的机制。但是,当亚硝酸盐超过一定的阈值或者是长期处于胁迫条件下,抗氧化体系则不能及时地清除自由基,自由基则会对细胞产生氧化损伤,抗氧化体系也受到破坏,表现为活性持续降低。另外,实验的其他因素(如pH,温度),可能也有一定的影响,使实验数据呈现一定的不稳定性。

在正常生理状态下,代谢产生的活性氧可以由机体的抗氧化防御系统清除。本实验中,亚硝酸盐胁迫超过了一定的阈值,使抗氧化系统不能及时清除自由基,自由基对细胞产生氧化损伤,抗氧化系统被破坏,酶活性降低。

红螯光壳螯虾鳃部离子转运通道(Na^+ , K^+ -ATPase、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase)甲壳动物的鳃是渗透压和离子调节的重要场所和主要器官。 Na^+ , K^+ -ATPase广泛存在于生物体中,是甲壳动物进行渗透调节和离子交换过程最重要的酶。鳃组织中离子转运型上皮细胞是渗透调节和离子转运的主要场所^[21-22]。 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase在甲壳动物的蜕皮过程中起着重要的作用^[23]。

实验结果表明,红螯光壳螯虾鳃组织中 Na^+ , K^+ -ATPase的活性随着亚硝酸盐浓度的增加而降低, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase的活性也有明显的降低趋势。这说明在亚硝酸盐胁迫下,鳃部正常的生理过程受到抑制,细胞内化合物的合成和释放可能受到影响,进而鳃部的离子转运水平下降,从而使载体蛋白 Na^+ , K^+ -ATPase、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase的活性降低,进一步影响鳃部上皮的跨膜运输过程,长期亚硝酸盐过高,势必加重危害鳃部的生理功能,因此也会导致鳃部细胞结构、形态和功能的异常,这一点在本文超微结构研究中也得到了证明。

3.2 亚硝酸盐胁迫对肝胰腺和鳃组织超微结构的影响

鳃组织 鳃是甲壳动物进行呼吸、排泄及渗透压调节的器官,它直接与水体接触,易受环境

的影响及病害的损伤^[24]。鳃丝上皮细胞的角质层变性,将直接影响鳃中气体交换的过程^[25]。本实验电镜结果显示,亚硝酸盐胁迫下,红螯光壳螯虾鳃组织的结构变化较为显著,分别对角质层,上皮细胞层的排列,以及鳃腔内血细胞和膨大细胞的形态产生了影响,并且随着亚硝酸盐浓度的增大,鳃上皮细胞层出现崩溃的现象,可以推测高浓度亚硝酸盐胁迫下,直接影响了鳃上皮细胞的渗透调节等生理功能。同时甲壳动物鳃致密的角质层是阻止水中各种小型生物体(如细菌、藻类、原生动物等)侵蚀鳃表皮细胞的有效屏障^[26],角质层的破坏使虾蟹容易感染细菌和病毒,从而使组织受到侵蚀,进而影响其他的生理活动,尤其是对呼吸作用影响深远。另外,鳃腔内的血细胞除了输送氧气外,还有保卫作用,可将侵入的病原微生物吞噬,进行细胞内杀灭,因此,血细胞结构的破坏和数目的减少,会影响鳃组织输送氧气的生理功能,以及其免疫方面的作用。这点在本文酶活实验中也得到证明。

肝胰腺组织 肝胰腺又名中肠腺,是十足目甲壳动物消化系统的重要组分,在合成和分泌消化酶、消化和吸收营养物质,以及动物的排泄、蜕皮周期等方面发挥着重要作用^[13]。同时,肝胰腺又是解毒器官,对有害物质十分敏感,破坏了肝胰腺其R和E细胞的结构会呈空泡化^[27]。

本实验结果中,R细胞在高浓度组脂滴减少,核膜解体,细胞膜破裂,空泡化加剧,而颜素芬等^[13]超微结构观察证实,甲壳动物的R细胞具有吸收脂肪和储存脂肪和一些金属颗粒等功能。因此,亚硝酸盐胁迫下,干扰了R细胞正常储存脂肪的生理功能,因而势必对整个肝胰腺的生理功能造成一定的影响。F细胞中有大量发达的粗面内质网和核糖体,主要功能是合成消化酶,然后外排到肝小管内,或再运至胃中或中肠内起细胞外消化作用。因此,本实验发现F细胞的粗面内质网减少,滑面内质网增加,核糖体减少,空泡化加剧,内质网有轻微水肿现象,势必也会影响其合成消化酶的作用。可以推想,R细胞和F细胞产生的生理结构的变化,可以使肝胰腺的生理作用受损,从而使虾的生命力减弱。粗面内质网及核糖体是蛋白质类物质合成场所,它的病变也会直接影响肝胰腺的合成功能。从总体上讲肝胰腺的病变导致了其合成、吸收功能紊乱或丧失,进而破

坏了整个有机体的新陈代谢^[28],影响虾蟹的成活率。另外,肝小管的上皮细胞的排列变得杂乱无章,尤其在高浓度组,细胞大都裂解,内容物释放,空泡化严重,微绒毛也变得不整齐,甚至有断裂,这足以说明亚硝酸盐对肝胰腺的组织结构有损害,并影响其生理功能。

3.3 红螯光壳螯虾养殖过程中对水体亚硝酸盐的毒性评价

亚硝酸盐是氨转化成硝酸过程的中间产物。通常认为,亚硝酸盐在一定浓度范围内对水产动物无毒害,国家渔业水质标准也未对其进行限制。舟山市海洋与渔业局水质标准,亚硝酸钠浓度 ≤ 0.3 mg/L,崇明农业网推荐养殖水体亚硝酸盐浓度 ≤ 0.15 mg/L。本文超微结构观察发现,0.3 mg/L的鳃组织和肝胰腺组织没有受到毒性的影响;而酶活实验结果表明,0.3 mg/L的水体亚硝酸盐浓度下,免疫相关酶活性即受到一定的抑制,尤其是ACP和AKP,低浓度下在3种组织中都受到了显著的抑制。这说明,0.3 mg/L的水质标准也处于有危害潜力的区域,尤其是室内循环水集约化养殖中,亚硝酸盐将随养殖时间增加而积累,浓度逐渐增大。在养殖池塘,尤其是高密度精养塘中,投饵、施肥、残渣分解及生物代谢,产生的氨一旦硝化作用受阻,亚硝酸态氮就会在水中积累^[29];其毒害作用主要是通过破坏血红蛋白,将亚铁血红蛋白转变为高铁血红蛋白,失去携带氧的功能,从而使鱼类窒息、死亡^[5,30]等。由此可见,低浓度的亚硝酸盐胁迫对虾类的毒害作用也是不容忽视的。

参考文献:

- [1] 潘晓艺,沈锦玉,曹铮,等.红螯光壳螯虾主要病害的研究进展[J].水产科学,2009,28(8):485-488.
- [2] 罗文,赵云龙,曾错,等.红螯光壳螯虾胚胎发育过程中的生化成分变化(英)[J].水产学报,2007,31(3):303-310.
- [3] 李贵雄.澳洲淡水龙虾人工繁殖试验研究[J].齐鲁渔业,2007,24(3):19-20.
- [4] 罗静波,曹志华,温小波,等.亚硝酸盐氮对克氏原螯虾仔虾的急性毒性效应[J].长江大学学报:自科版,2005,29(11):64-66.
- [5] 林祥日,黄少涛.氨、亚硝酸盐对鳗和鳖的毒害[J].鱼类病害研究,1998,20(12):37-40.
- [6] Hong M L, Chen L Q, Qin J G, et al. Acute tolerance and metabolic responses of Chinese mitten crab

- (*Eriocheir sinensis*) juveniles to ambient nitrite [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 2009, 149(3):419-426.
- [7] Wang W N, Wang A L, Zhang Y J, *et al.* Effects of nitrite on lethal and immune response of *Macrobrachium nipponense* [J]. *Aquaculture*, 2004, 232:679-686.
- [8] 王玥,胡义波,姜乃澄,等. 氨态氮、亚硝态氮对罗氏沼虾免疫相关酶类的影响[J]. *浙江大学学报:理学版*, 2005, 32(6):698-705.
- [9] 谭树华,何艳,谢佳,等. 高浓度 Zn^{2+} 对克氏原螯虾几种免疫学相关指标的影响[J]. *生态与农村环境学报*, 2007, 23(4):67-71.
- [10] Sang H M, Kyle T, Fotedar R. Dietary supplementation of mannan oligosaccharide improves the immune responses and survival of marron, *Cherax tenuimanus* (Smith, 1912) when challenged with different stressors [J]. *Fish & Shellfish Immunol*, 2009, 27(2):341-348.
- [11] 彭自然,臧维玲,高杨,等. 氨和亚硝酸盐对凡纳滨对虾幼虾的毒性影响[J]. *上海水产大学学报*, 2004, 13(3):274-278.
- [12] Liu H, Avault J W, Medley P. Toxicity of ammonia and nitrite to juvenile redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens) [J]. *Freshwater Crayfish*, 1995, 10:249-255.
- [13] 颜素芬,姜永华,陈昌生. 中国龙虾早期叶状幼体肝胰腺的显微与超微结构[J]. *水产学报*, 2005, 29(6):737-744.
- [14] 邹国祥,侯颖一,谭金山. 对虾肝胰腺的微细结构[J]. *海洋水产研究*, 1993, (14):97-103.
- [15] 白秀娟,卢伙胜,张冰. 亚硝酸盐对茂名海域文昌鱼生长及磷酸酶、酚氧化酶的影响[J]. *齐鲁渔业*, 2009, 26(8):7-9.
- [16] 杨玉姣,王国良,金珊,等. 环境胁迫对对虾免疫系统的影响研究[J]. *水产科学*, 2006, 25(12):652-655.
- [17] Halliwell B, Gutteridge J M C. Free radicals in biology and medicine [M]. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.
- [18] Lackner R. Fish ecotoxicology [M]. Basel, Switzerland: Birkhauser Publishers, 1998:203-224.
- [19] 陈萍,李健,李吉涛,等. 不同地理群体三疣梭子蟹非特异性免疫功能的比较[J]. *中国农学通报*, 2008, 24(11):496-498.
- [20] Steve W R, Dalto D A, Kramer S, *et al.* Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 2001, 130(2):289-303.
- [21] 李文艳,康现江,穆淑梅,等. 镉对虾蟹毒性效应的研究进展[J]. *水产科学*, 2008, 27(1):47-50.
- [22] 郭春雨,管越强,刘波兰,等. 温度、pH 和盐度对克氏原螯虾鳃 Na^+ , K^+ -ATPase 活性的影响[J]. *动物学杂志*, 2007, 42(6):96-102.
- [23] 曾媛媛. 环境因子对拟穴青蟹生理生化影响[D]. 厦门:厦门大学, 2009.
- [24] 卢建平. 日本沼虾鳃细胞的超微结构[J]. *东海海洋*, 2001, 19(3):19-21.
- [25] 汝少国,李永琪,刘晓云,等. 久效磷对中国对虾细胞超微结构的影响Ⅲ. 对鳃的毒性效应[J]. *应用生态学报*, 1997, 8(6):655-658.
- [26] 顾志峰,王文,杜开和,等. 中华绒螯蟹鳃的组织及超微结构[J]. *湖泊科学*, 2000, 12(2):182-184.
- [27] 成永旭. Zn^{2+} 对中华绒螯蟹溞状幼体肝胰腺超微结构的影响[J]. *动物学研究*, 2000, 21(5):343-347.
- [28] 李霞,何幽峰,李华,等. 正常和患红腿黄鳃病的中国对虾肝胰脏组织学研究[J]. *大连水产学院学报*, 1992, 7(1):11-15.
- [29] 王明学,吴卫东,刘福军. Cl^- 和 Ca^{2+} 对亚硝酸盐氮作用于草鱼种毒性的影响[J]. *华中农业大学学报*, 1997, 16(2):172-178.
- [30] 陈瑞明. 铵态氮和亚硝酸盐氮对鳊鱼苗的急性毒性试验[J]. *水利渔业*, 1998(1):17-20.

Nitrite stress on immune-related enzymes and the ultrastructure in different tissue of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*)

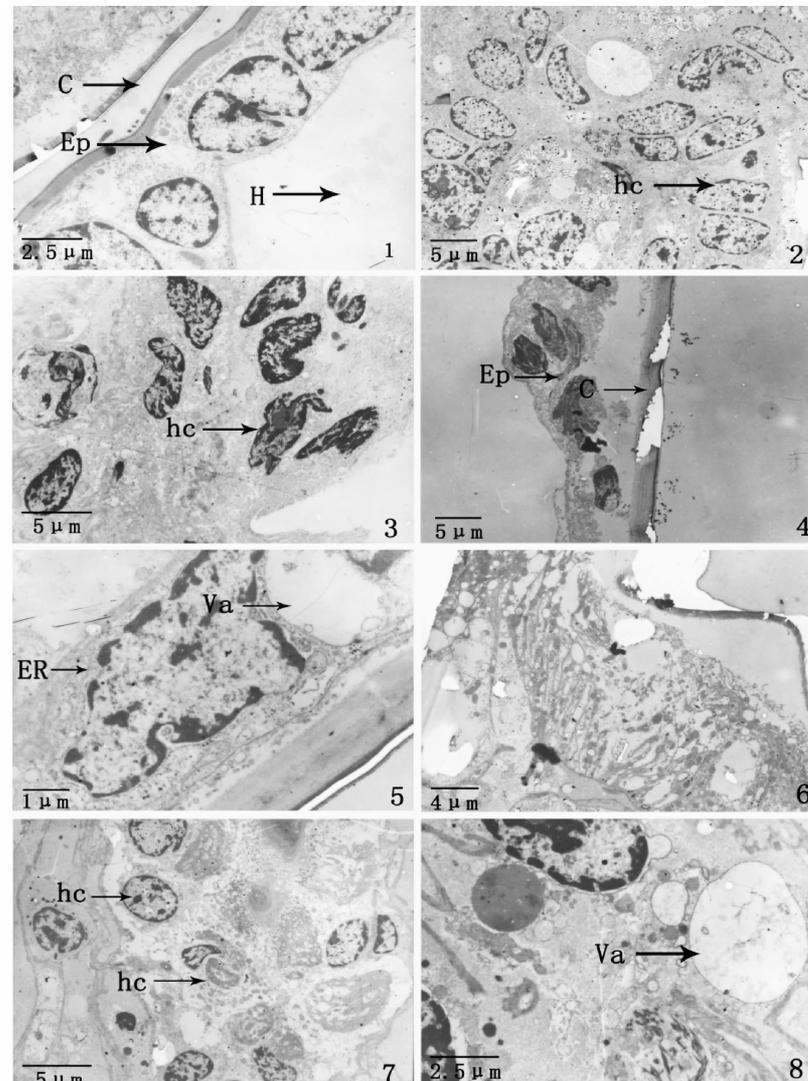
LV Xiao-yan, LI Jia-yao, FANG Yan, GUO Zhan-lin, ZHAO Yun-long, LI Kai*

(Life Science College, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: The technique of transmission electron microscopy combined with enzymatic methods was used to analyse the variations of the immune-related enzymes activity in hepatopancreas, gills and muscles, and to compare the morphological changes of the hepatopancreas and gills of redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, under different concentrations of nitrite stress. The results showed that the activity of ACP, AKP, SOD and GSH-PX in three tissues under the stress of nitrite were significantly lower ($P < 0.05$) compared with control group; with the increase of the nitrite concentration, the activity of enzymes was decreased gradually substantially; the activity of Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase in gills was also decreased with the increase of nitrite concentration. Ultrastructure analysis showed that the cuticle of gills was damaged or even disintegrated with the increase of nitrite concentration; epithelial cell was loosely arranged, and the phenomenon of vacuolization was emerged; morphological changes were also obviously found in organelles; the phenomenon of vacuolization was emerged in haemocoel, and hemocytes were deformed. Hepatopancreatic epithelial cells were arranged in haphazard, or even with cell lysis and severe vacolation phenomenon; microvilli were structural damaged, some broken, the distance between the hepatopancreatic tubules was expanded, connective tissues became thin, and hemocytes deformations were found; in high concentration, the lipid droplets of R cells were reduced, nuclear membrane was disintegrated, cell membrane was ruptured and vacolation was increased; in F cells, the rough endoplasmic reticulum was reduced, smooth endoplasmic reticulum was increased, ribosomes was decreased, vacolation was increased and endoplasmic reticulum edema was emerged. In summary, the activity of immune-related enzymes was influenced by the nitrite stress, and the morphological structures of the hepatopancreas and gills were also affected, as well as their biological functions.

Key words: *Cherax quadricarinatus*; nitrite; immune-related enzymes; ultrastructure

Corresponding author: LI Kai. E-mail: kaili@bio.ecnu.edu.cn

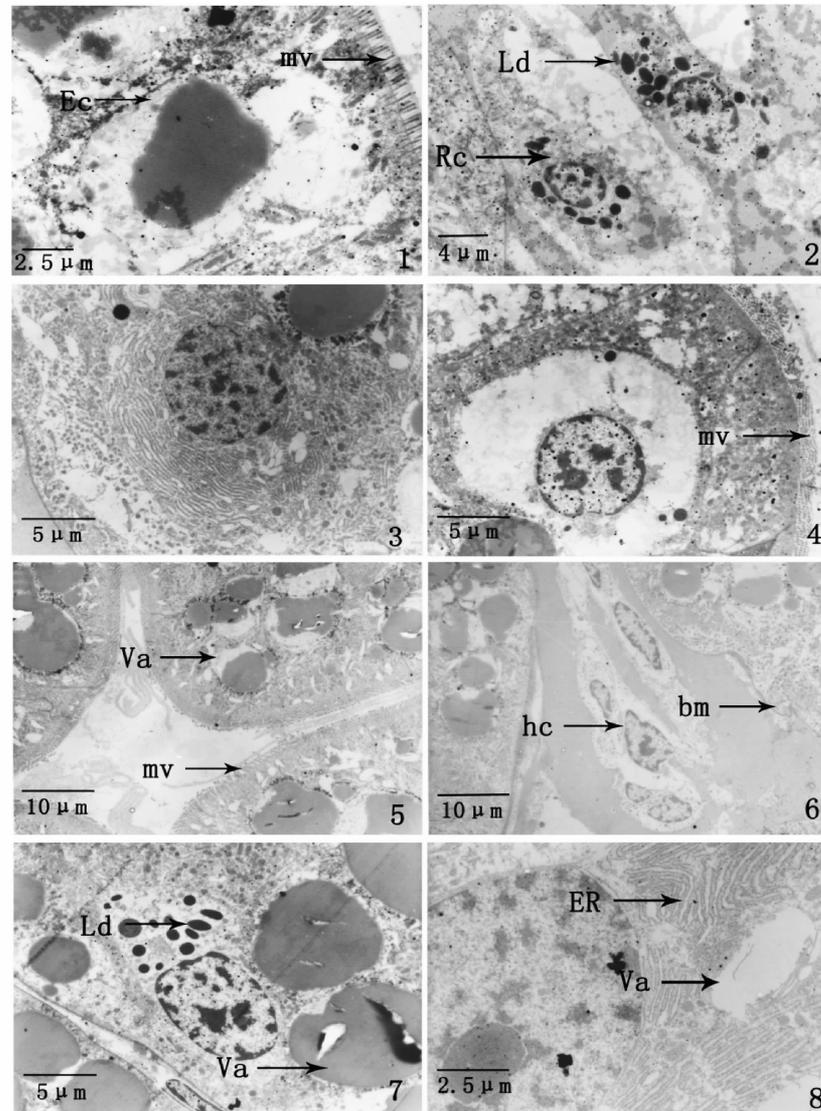


图版 I 亚硝酸盐胁迫下鳃的超微结构变化

1. 对照组上皮细胞层、角质层、鳃腔; 2. 对照组鳃腔内正常的血细胞; 3. 中浓度组血细胞; 4. 高浓度组角质层断裂, 上皮细胞层排列混乱; 5. 中浓度组上皮细胞出现空泡化现象, 内质网水肿, 线粒体数目减少; 6. 高浓度组上皮细胞层和角质层受到严重破坏; 7. 高浓度组血细胞破裂溶解; 8. 高浓度组鳃腔内出现的空泡化现象。

Plate I Nitrite stress on the ultrastructure of gills

1. Epithelium, cuticle, and haemocoel of control group; 2. The normal hemocytes in haemocoel of control group; 3. Hemocytes in medial concentration group; 4. Rupture of cuticle, epithelial lamina arranged chaos in high concentration group; 5. Epithelial cells in medial concentrations group with the phenomenon of vacuolation, endoplasmic reticulum edema, the number of mitochondria reduced; 6. Epithelial lamina and cuticle of high concentration group severely damaged; 7. Hemocytes in high concentration group ruptured or hemocytolysis; 8. Haemocoel vacuolated in high concentration group.



图版 II 亚硝酸盐胁迫下肝胰腺的超微结构变化

1. 对照组肝小管的单层柱状上皮细胞,表面具有整齐的微绒毛; 2. 对照组的 R 细胞,内有脂滴; 3. 对照组的 F 细胞; 4. 中浓度组肝小管上皮细胞; 5. 高浓度组肝小管整体观; 6. 高浓度组肝小管间结缔组织、血细胞和基膜; 7. 高浓度组 R 细胞; 8. 高浓度组 F 细胞。

Ep: 上皮细胞层; C: 角质层; H: 鳃腔; hc: 血细胞; Va: 空泡; ER: 内质网; Ec: 单层柱状上皮细胞; mv: 微绒毛; Rc: R 细胞; Ld: 脂滴; bm: 基膜。

Plate II Nitrite stress on the ultrastructure of hepatopancreas

1. The simple columnar epithelial cells of the hepatopancreatic tubules in control group, neat microvilli were on the surface; 2. R cells in control group, and lipid droplets were found; 3. F cells in control group; 4. The epithelial cells of the hepatopancreatic tubules in medial concentrations group; 5. The holistic view of hepatopancreatic tubules in high concentration group; 6. Connective tissue between the hepatopancreatic tubules, hemocytes and Basement membranes; 7. R cells in high concentration group; 8. F cells in high concentration group.

Ep: epithelial lamina; C: cuticle; H: haemocoel; hc: hemocyte; Va: vacuoles; ER: endoplasmic reticulum; Ec: the simple columnar epithelial cells; mv: microvilli; Rc: R cell; Ld: lipid droplets; bm: basement membranes.