

文章编号:1000-0615(2012)04-0546-07

DOI:10.3724/SP.J.1231.2012.27707

## 盐度升高对中华绒螯蟹几种非特异性免疫因子的影响

王瑞芳<sup>1,2</sup>, 庄平<sup>1,2\*</sup>, 冯广朋<sup>2</sup>, 章龙珍<sup>2</sup>, 黄晓荣<sup>2</sup>, 贾小燕<sup>2,3</sup>

(1. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062;

2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室, 上海 200090;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 采用逐步增盐法, 结合生物酶学测定, 研究了从淡水升高盐度到 7、14、21、28 和 35 对二秋龄雌、雄中华绒螯蟹血清总蛋白、氧合血蓝蛋白含量及碱性磷酸酶(AKP)、超氧化物歧化酶(SOD)、酚氧化酶(PO)活力的影响。结果显示, 随着盐度的升高, 中华绒螯蟹的血清总蛋白、氧合血蓝蛋白含量逐渐降低; AKP 活性先略升高, 而后逐渐降低; 与雄蟹的 PO 活力逐渐降低相比, 雌蟹的 PO 活力先降低, 当盐度高于 21 后维持稳定水平; SOD 活性先略降低, 盐度高于 21 被激活。除 SOD 外, 雌蟹血清各测定指标均显著高于雄蟹( $P<0.05$ )。研究结果表明, 盐度接近或超过 28 将显著影响中华绒螯蟹 3 种免疫酶的活性及总蛋白和氧合血蓝蛋白的含量, 进而影响其免疫防御能力。

**关键词:** 中华绒螯蟹; 盐度; 免疫酶; 氧合血蓝蛋白; 性别差异; 生殖洄游

**中图分类号:** Q 958.11; S 917.4

**文献标志码:** A

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)属甲壳纲, 十足目(Decapoda), 绒螯蟹属(*Eriocheir*), 群体自然分布以长江中下游为主<sup>[1]</sup>。生长在淡水湖泊中的中华绒螯蟹在完成青春期蜕壳后必需向河口或近海进行生殖洄游, 在河口产出的蚤状幼体变态发育成为幼蟹时又开始向上进行索饵洄游, 这种复杂的生活史使其成为国内外甲壳类渗透压调节生理研究的模式物种<sup>[2-4]</sup>。到目前为止, 国内外已对中华绒螯蟹幼体及成体适应淡水生活的生理、生化机制进行了较多研究<sup>[2, 4, 5-7]</sup>, 但对成蟹生殖洄游重新适应河口半咸水或海水环境的生理研究较少。

免疫因子已被作为重要指标用于评估环境应激对动物健康状况影响。对虾、蟹类的研究表明, 盐度变化影响血淋巴总血细胞数(THC)、呼吸爆发力(respiratory burst)以及免疫酶活性<sup>[8-10]</sup>等相关免疫因子。研究表明, 污染物<sup>[11-12]</sup>、温度<sup>[13-14]</sup>、氨氮<sup>[15]</sup>

等胁迫显著影响中华绒螯蟹的多种免疫指标, 进而对其健康造成不利影响。而关于盐度这一最重要的生态因子是否影响中华绒螯蟹的免疫参数以及成熟蟹生殖洄游重新适应升高盐度的调节过程国内外很少见报道。

国内外对甲壳类渗透压调节及相关生理功能的研究多采用雄蟹, 而对雌蟹的研究极为缺乏。对中华绒螯蟹而言, 雌、雄交配后雄蟹已完成使命, 而雌蟹在抱卵后仍需进行后期幼体的孵化。因此, 相对而言, 雌蟹可能需要更强的免疫力才能抵抗在幼体孵化过程中不利生物及非生物因子的胁迫。鉴于以上背景, 本试验以洄游高峰期中华绒螯蟹为试验材料, 通过逐步增盐法, 研究了雌、雄中华绒螯蟹几种重要免疫因子(总蛋白、血蓝蛋白、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶、酚氧化酶)对盐度升高的响应。探讨中华绒螯蟹成蟹重新适应半咸水

收稿日期: 2011-08-27 修回日期: 2011-12-12

资助项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(200903048-07, 201203065); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(东海水产研究所 2011M08); 国家“九七三”计划(2010CB429005); 长江口重要渔业资源养护与利用关键技术集成与示范(201203065)

通讯作者: 庄平, E-mail: pzhuang@online.sh.cn

<http://www.scxuebao.cn>

或海水环境时的免疫调节以及免疫参数的性别差异, 以期为中华绒螯蟹生殖洄游、产卵场的保护及其相关生态学研究提供基础资料, 同时为评估长江口盐度变化对中华绒螯蟹繁殖的潜在影响提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验用中华绒螯蟹于 2010 年 11 月 3 日(洄游高峰期)捕于江阴市八圩码头附近(120°27'S, 31°95'W, 盐度<0.5, 水温 19 °C)。选取健康、附肢无残缺的雌、雄蟹各 80 只于当天运至实验室, 按照性别分别暂养于 8 个圆形树脂玻璃缸(直径 1 m, 高 80 cm)中。雌、雄蟹的平均体质量分别为(102.03±7.49) g、(116.23±14.03) g, 平均壳宽分别为(62.18±11.63) mm, (62.58±2.61) mm。暂养 1 周后开始试验。

### 1.2 试验用水及管理

暂养期间用水为经百诺肯净水器过滤并曝气 24 h 以上的自来水。暂养及试验期间每隔两天按照体质量 1% 投喂新鲜螺肉一次, 第二天早上吸出残饵及粪便。暂养期间在吸出残饵后同时更换 1/3 新鲜曝气自来水。实验过程中持续充氧, 保持自然光照周期。水温(18±1) °C, 溶解氧>6 mg/L, 总氨氮<0.2 mg/L。水深保持 15 cm 以上, 并用瓦片为蟹搭建藏匿场所。

### 1.3 试验设计

试验设置 7、14、21、28 和 35 共 5 个盐度组及淡水对照组。暂养 1 周后从各暂养缸随机挑选健康、附肢无残缺的雌、雄蟹各 60 只分别随机分养在 6 个同等规格的圆形玻璃缸中。适应 3 d 后从雌、雄组分别随机选取 9 只蟹作为淡水组试验样品, 同时其余各组开始升高盐度, 每天升高盐度 3~4。达到设定试验盐度后, 在此盐度下维持 3 d, 从雌、雄组分别选取 9 只蟹。其余各组继续升高盐度, 依次类同, 试验共持续 16 d, 取样前 48 h 停止投饵。试验盐度通过在自来水中添加一定量的海水晶调节而成, 并用手持式折光盐度计进行校准。试验过程中无蟹死亡。

**血淋巴采集** 采样时将蟹在冰水中麻醉 30 min, 捞出后吸干体表水分, 用 2 mL 一次性无菌注射器从第 3 或第 4 步足基部关节处采集血淋巴, 采集的血淋巴快速注入 1.5 mL 无菌离心管中并放入 -80 °C 冰箱中保存备用。测定时将血淋巴在冰上

解冻, 用无菌针头划破血凝块, 8 000 r/min, 4 °C, 离心 20 min, 析出的血清用于各试验指标的测定。

**检测指标及测定方法** 氧合血红蛋白含量的测定参照 Chen 等<sup>[16]</sup>的紫外分光光度法。总蛋白含量、AKP、SOD 活性均采用试剂盒(南京建成生物工程研究所)并严格按照说明书进行测定。SOD 活性测定时将离心后血清用 0.86% 生理盐水稀释 20 倍, 取样量为 50 μL。PO 活力的测定以 L-dopa 为底物, 参照 Ashida<sup>[17]</sup>的方法进行。

### 1.4 统计方法

试验数据以平均值±标准误(mean±SE)表示, 用单因素方差分析(One-Way ANOVA)及 Tukey's HSD 法对不同盐度组测定指标进行多重比较。将所有试验组雌、雄蟹血清各测定指标分别作为整体, 用 T-test 分析雌、雄各免疫因子差异的显著性。对血清总蛋白与氧合血红蛋白含量进行相关性分析。所有数据均采用 SPSS 11.5 软件进行分析, 统计方法中显著性水平平均定义为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 盐度升高对中华绒螯蟹血清总蛋白以及氧合血红蛋白含量的影响

从淡水逐步升高盐度到 35, 雌、雄蟹血清总蛋白含量分别从(113.38±3.75) mg/L 和(103.28±2.80) mg/L 降低到(88.00±5.034) mg/L 和(78.22±4.83) mg/L (图 1)。氧合血红蛋白含量从(1.72±0.06) mmol/L 和(1.51±0.11) mmol/L 分别降低到(1.37±0.07) mmol/L 和(1.11±0.08) mmol/L (图 2)。其中盐度升高到 28 时, 雌、雄蟹血清中总蛋白含量均显著低于淡水组( $P<0.05$ ), 盐度升高到 35 时显著低于淡水组、盐度 7、14 组( $P<0.05$ )。雌蟹血清中氧合血红蛋白含量在盐度升高到 35 时与淡水组相比表现出显著性差异( $P<0.05$ ), 随着盐度的升高雄蟹血清中氧合血红蛋白含量虽呈现下降趋势但未表现出显著性( $P>0.05$ )。

T-test 结果表明, 雌蟹血清中总蛋白及氧合血红蛋白含量均显著高于雄蟹( $P<0.05$ )。血清总蛋白与氧合血红蛋白含量存在显著的相关性(雌性: 相关系数为 0.991,  $P=0.000$ ; 雄性: 相关系数为 0.943,  $P=0.005$ )。

### 2.2 盐度升高对中华绒螯蟹血清 AKP 活性的影响

随着盐度的升高, 雌、雄蟹血清中 AKP 活性均在盐度升高到 7 时略上升, 随后逐渐降低(图 3)。盐

度升高到28和35时,雌蟹血清AKP活性显著低于盐度7组( $P<0.05$ ),雄蟹血清AKP活性显著低于盐度7和14组( $P<0.05$ ),其余各盐度组间AKP活性均无显著性差异( $P>0.05$ )。T-test结果表明,雌蟹血清中AKP活性显著高于雄蟹( $P<0.001$ )。

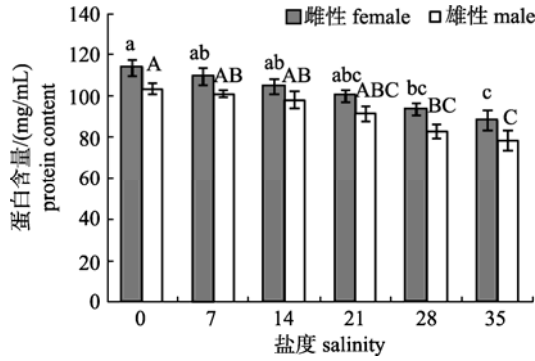


图1 盐度升高对雌、雄中华绒螯蟹血清总蛋白含量的影响

不同小写字母代表各盐度组雌蟹血清总蛋白含量存在显著差异( $P<0.05$ ),反之则差异不显著( $P>0.05$ ),大写字母则代表雄蟹,下同。

Fig. 1 Serum protein content in female and male *E. sinensis* in response to elevated salinities

Different lowercase letter indicates significant differences among salinities in females, a capital letter denotes in males ( $P<0.05$ ), the same below.

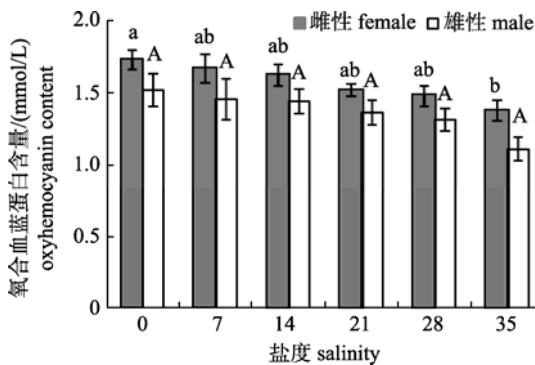


图2 盐度升高对雌、雄中华绒螯蟹血清氧合血蓝蛋白含量的影响

Fig. 2 Serum oxyhemocyanin content in female and male *E. sinensis* in response to elevated salinities

2.3 盐度升高对中华绒螯蟹血清SOD活性的影响

雌、雄蟹血清中SOD活性从淡水逐步升高到盐度21的过程中略呈降低趋势,但各盐度组间无显著性差异( $P>0.05$ ),盐度高于21时SOD被激活。到35时雌、雄血清SOD活性均达到最高值,此时雌蟹SOD活性显著高于盐度7、14和21组( $P<0.05$ ),雄蟹SOD活性显著高于盐度21组( $P<0.05$ ),其余各盐度组间无显著性差异( $P>0.05$ )。T-test结果表明,雄蟹血清中SOD活性显著高于雌蟹( $P<0.001$ ) (图4)。

2.4 盐度升高对中华绒螯蟹血清PO活力的影响

随着盐度的升高,雌蟹血清PO活力从淡水时的(0.23±0.03) U/mL显著降低到盐度21时的(0.12±0.03) U/mL( $P<0.05$ ),之后保持在这一水平(图5)。雄蟹血清PO活力随着盐度的升高呈现出逐渐下降的趋势,从淡水时的(0.17±0.02) U/mL降低到盐度

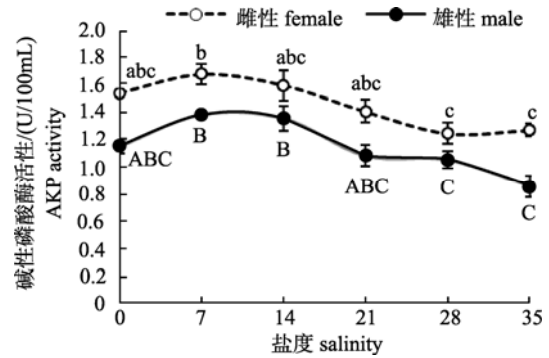


图3 盐度升高对雌、雄中华绒螯蟹血清碱性磷酸酶(AKP)活性的影响

Fig. 3 Serum alkaline phosphatase activities in female and male *E. sinensis* in response to elevated salinities

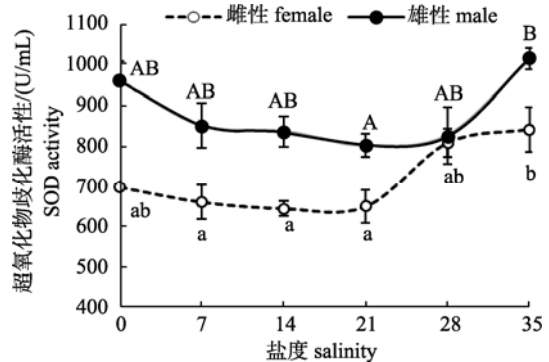


图4 盐度升高对雌、雄中华绒螯蟹血清超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

Fig. 4 Serum superoxide dismutase activities in female and male *E. sinensis* in response to elevated salinities

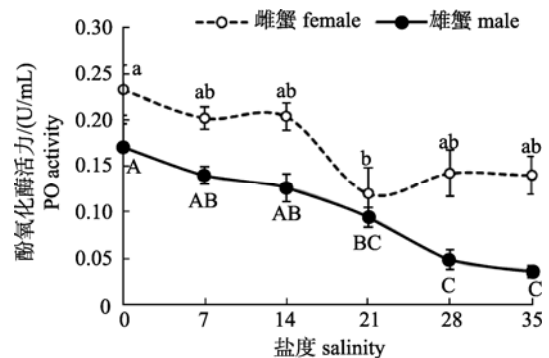


图5 盐度升高对雌、雄中华绒螯蟹血清酚氧化酶(PO)活力的影响

Fig. 5 Serum phenoloxidase activities in female and male *E. sinensis* in response to elevated salinities

35时的(0.03±0.00) U/mL( $P<0.05$ ), 盐度达到21时PO活力显著低于淡水组, 盐度高于21时PO活力显著低于淡水、盐度7、14组( $P<0.05$ )。T-test结果表明, 雌蟹血清PO活力显著高于雄蟹( $P<0.001$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 盐度对中华绒螯蟹血清总蛋白及氧合血蓝蛋白含量的影响

氧合血蓝蛋白是一种呼吸蛋白, 属于血蓝蛋白的一种。血淋巴中血蓝蛋白含量对动物的健康状况起着很好的指示作用<sup>[18-19]</sup>, 其含量受到性别、蜕壳周期、营养状态、盐度等的影响<sup>[20]</sup>。在甲壳动物血淋巴中血蓝蛋白的含量占总蛋白含量的60%~95%<sup>[20-22]</sup>。本试验中雌、雄蟹血清总蛋白和氧合血蓝蛋白含量随着盐度的升高呈现一致降低的趋势且二者存在显著的相关性, 表明血蓝蛋白与总蛋白之间存在着紧密的联系, 血蓝蛋白在总蛋白含量中占有重要的地位。

研究表明,  $\text{Na}^+$ 和 $\text{Cl}^-$ 是甲壳类血淋巴中最重要的渗透压调节物, 对十足目多种对虾的研究发现 $\text{Na}^+$ 和 $\text{Cl}^-$ 约占总渗透压的76%~94%<sup>[23]</sup>。除主要离子外, 游离氨基酸也是组成体内渗透压的重要成分, 特别在高盐环境下对体内高渗状态的维持发挥着重要作用<sup>[24-25]</sup>。本试验中盐度升高引起血清总蛋白含量降低与对中华绒螯蟹<sup>[6, 26]</sup>和淡水罗氏沼虾(*Marobrachium rosenbergi*)的研究结果一致<sup>[27-28]</sup>。血淋巴蛋白含量对盐度的响应在中华绒螯蟹也是可逆的, 即盐度降低引起血淋巴蛋白含量升高<sup>[26]</sup>。虽然目前对血淋巴中游离氨基酸的来源还存在争论, 但可以确定至少部分是来源于血淋巴蛋白的水解<sup>[29]</sup>。因此, 本试验中血清蛋白含量随着盐度的升高而降低可能主要是由于血淋巴中部分蛋白分解为游离氨基酸用于提高渗透压, 维持血淋巴的高渗状态。

本试验中氧合血蓝蛋白含量随着盐度的升高而降低, 其原因也可能与总蛋白含量降低一致, 部分血蓝蛋白分解为游离氨基酸, 发挥其渗透压调节的功能<sup>[29]</sup>, 用于维持体内的高渗环境。此外, 对血蓝蛋白与氧结合特性的研究表明盐度升高、无机离子含量增加会提高甲壳类血蓝蛋白与氧的亲合力<sup>[18]</sup>, 高的氧亲合力使得同等代谢强度下机体对血蓝蛋白的需求量降低。因此本试验中血蓝蛋白含

量的降低也可能与盐度的升高提高了血蓝蛋白与氧的亲合力有关。再者, Li等<sup>[30]</sup>指出凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)氧合血蓝蛋白水平较高与氧摄入和 $\text{CO}_2$ 排出水平较高有关。中华绒螯蟹在淡水中为了维持体内较高的渗透压, 需要从外界水体中主动吸收 $\text{Na}^+$ 和 $\text{Cl}^-$ , 而离子的主动吸收需要消耗一定的能量, 机体需要较高的代谢水平才能完成这一过程。随着盐度的升高, 体内外渗透压差逐渐降低, 用于渗透压调节所需的能量降低, 其代谢水平也相应降低。因此, 本试验中氧合血蓝蛋白含量的降低也可能与盐度升高后用于渗透压调节的能量降低, 氧摄入和 $\text{CO}_2$ 排出降低有关。此外, 近年来发现血蓝蛋白除了具有载氧特性外, 还具有酚氧化酶活性、抗菌肽活性和凝集活性的免疫特性<sup>[31]</sup>, 因此, 本试验中血淋巴血蓝蛋白含量的降低同样会降低机体的免疫功能。

#### 3.2 盐度对中华绒螯蟹血清免疫酶活性的影响

磷酸酶不仅是生物体内的重要代谢调控酶, 也是溶酶体的标志酶, 是吞噬细胞杀菌的物质基础, 能形成水解酶体系, 破坏和消除侵入体内的异物, 达到机体防御的功能<sup>[32]</sup>。酚氧化酶原系统是甲壳动物重要的免疫防御和识别系统, 而酚氧化酶作为该系统的终端酶在甲壳动物体液免疫因子中占有重要的地位<sup>[33]</sup>, 其在机体内发挥着识别异物、促进血细胞的吞噬和包掩、介导凝集与凝固、产生杀菌物质等重要的作用。超氧化物歧化酶是生物机体抗氧化酶系统中重要的一种抗氧化酶, 在体内发挥着清除超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^-$ )保护机体免受损伤的重要作用。这3种酶活性的变化可以反应机体免疫功能的强弱。

本研究结果表明, 在0~21的盐度范围内, 随着盐度的升高血清中3种免疫酶活性呈现下降的趋势, 但除21盐度组PO活力显著低于淡水组外, 其余2种酶活性无显著变化。表明在盐度0~21的范围内升高盐度对中华绒螯蟹亲蟹的免疫力影响较小。盐度达到28时, 雌、雄血清AKP与雄蟹PO活力分别显著低于盐度7组、淡水组和盐度7、14组, 表明盐度升高到28已影响机体免疫酶的活性, 导致免疫力降低。这种影响也体现在SOD上, SOD活性在盐度达到28时开始升高, 表明体内自由基增多, 需要激活抗氧化酶以消除体内过多的自由基, 保护机体免受自由基侵害。综合3种免疫酶活性的变化表

明,盐度接近或高于28对会对中华绒螯蟹的非特异性免疫功能造成显著影响。本试验中显著影响免疫酶活性的最低盐度与其等渗点一致<sup>①</sup>,表明环境盐度达到或高于等渗点影响血清中免疫酶的活性及免疫功能的发挥。虽然中华绒螯蟹成蟹具有极强的广盐性,可以在海水中存活。人工繁殖时雌、雄蟹可以在8~33的盐度范围内进行配对<sup>[34]</sup>。但交配最适盐度仍在半咸水(7~22)范围之内,这也与张烈士等<sup>[35]</sup>对长江口中华绒螯蟹繁殖场环境调查的结果即产卵场盐度范围为5~22相吻合。由此可见,盐度较高虽然不影响中华绒螯蟹的存活,但并不是繁殖的最适盐度范围。中华绒螯蟹在低盐环境下具有极强的调高体内渗透压的能力,但在高盐下其低渗调节能力较弱<sup>[36]</sup>。与海水相比,亲蟹可能更适应半咸水环境,相反高盐度导致体内渗透平衡紊乱,引起机体代谢功能失调,非特异性免疫功能可能受到影响。

### 3.3 中华绒螯蟹几种免疫因子的性别差异

雌蟹血清总蛋白、氧合血蓝蛋白含量显著高于雄蟹,这一结果与多数对虾蟹类的研究结果不同。Engel等<sup>[37]</sup>研究了环境条件变化对蓝蟹(*Callinectes sapidus*)血蓝蛋白含量的影响,指出血蓝蛋白含量与性别无关。另有学者研究发现蜕壳间期的日本囊对虾(*Penaeus japonicas*)仔虾<sup>[22]</sup>、凡纳滨对虾<sup>[38]</sup>、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)<sup>[21]</sup>、17~48 g的罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)<sup>[20]</sup>血淋巴血蓝蛋白及总蛋白含量不存在性别差异。而Cheng等<sup>[20]</sup>认为体质量超过50 g的雌性罗氏沼虾血淋巴氧合血蓝蛋白含量高于雄性个体,本试验结果与此报道结果一致。血淋巴蛋白、血蓝蛋白含量是否存在性别差异可能主要与雌、雄个体大小、栖息地环境、营养状况、性腺发育等有关。潘伟槐等<sup>[39]</sup>研究表明生殖期雌性日本沼虾(*Macrobrachium nipponese*)腹肌LDH酶活性明显高于雄性,本试验中所用中华绒螯蟹处于生殖洄游高峰期,血淋巴中卵黄蛋白原含量较高可能是引起其雌蟹血清蛋白含量高于雄蟹的一个重要原因。

本研究结果发现,雌蟹血清中AKP活性和PO活力显著高于雄蟹,这与赵青松等<sup>[40]</sup>发现的性腺发

育在I、II期的拟穴青蟹雌蟹血清中AKP活性高于雄蟹相似。较高的免疫酶活性表明雌蟹免疫力高于雄蟹。免疫酶活性的性别差异可能是雌、雄在生殖过程中发挥作用不同的表现。雌雄交配后,雄蟹已完成使命,而雌蟹仍然担负着幼体孵化的重任,相对而言,雌蟹需要更强的免疫力才能有效抵抗在幼体孵化过程中环境因子(温度、盐度、低氧)胁迫和细菌、病毒、寄生虫的侵袭,保证幼体孵化的顺利进行。本试验在11月份进行,此时雄蟹性腺已经发育成熟,肝胰腺的营养物质更多的转移到性腺中,储存能量的降低导致其免疫力低下,而雌蟹的性腺发育晚于雄蟹,营养物质还未完全转移。因此雌、雄性腺发育速度的差异也可能造成其免疫力的不同。本试验中雄性血清SOD活性显著高于雌性,这与潘伟槐等<sup>[39]</sup>报道的雄性日本沼虾心肌组织中SOD活性高于雌性相一致,免疫酶活性存在性别差异的原因以及是否与性腺发育相关还需进一步探讨。

综上所述,5种免疫相关因子的含量或活性存在性别差异。升高水体盐度降低中华绒螯蟹血清总蛋白与氧合血蓝蛋白含量且影响免疫酶活性,盐度接近或超过28对免疫因子的影响表现出显著性,进而影响其免疫防御能力。本研究提示,较高的盐度可能会通过影响成熟中华绒螯蟹的免疫功能而对其繁殖活动造成潜在的不利影响,但对此尚需进一步深入研究。

### 参考文献:

- [1] 李晨虹,李思发. 中国大陆沿海六水系绒螯蟹(中华绒螯蟹和日本绒螯蟹)群体亲缘关系:形态判别[J]. 水产学报, 1999, 23(4): 337-342.
- [2] Péqueux A, Gilles R. The transepithelial potential difference of isolated perfused gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis* acclimated to freshwater [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 1988, 89(2): 163-172.
- [3] Mo J L, Devos P, Trausch G. Dopamine as a modulator of ionic transport and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in the gills of the Chinese crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Journal of Crustacean Biology, 1998, 18(3): 442-448.
- [4] Péqueux A, Marchal A, Wanson S, et al. Kinetic characteristics and specific activity of gill  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase

①Wang R F, Zhuang P, Zhang L Z, et al. Osmo-ionic regulation and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, carbonic anhydrase activities in mature Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* exposed to elevated salinities. Crustaceans (under review).

- in the euryhaline Chinese crab, *Eriocheir sinensis*, during salinity acclimation [J]. *Marine Biology Letters*, 1984, 5(1): 35–45.
- [5] 吕富. 环境因子对中华绒螯蟹渗透压调节的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学: 2002: 17–25.
- [6] Cieluch U, Anger K, Charmantier-Daures M, *et al.* Salinity tolerance, osmoregulation, and immunolocalization of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in larval and early juvenile stages of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (Decapoda, Grapsoidea) [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2007, 329(3): 169–178.
- [7] Wang F I, Chen J C. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(5): 671–681.
- [8] 陈宇锋, 艾春香, 林琼武, 等. 盐度胁迫对锯缘青蟹血清及组织、器官中 PO 和 SOD 活性的影响[J]. *台湾海峡*, 2007, 26(4): 569–575.
- [9] 郑萍萍, 王春琳, 宋微微, 等. 盐度胁迫对三疣梭子蟹血清非特异性免疫因子的影响[J]. *水产科学*, 2010, 34(11): 634–638.
- [10] 李康. 阿特拉津和毒死蜱对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的毒性效应研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2005.
- [11] 顾顺樟. 硫化物对中华绒螯蟹雌性亲体胁迫效应的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2007.
- [12] 宋林生, 季延宾, 蔡中华, 等. 温度骤升对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)几种免疫化学指标的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35(1): 74–77.
- [13] 洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 不同温度胁迫方式对中华绒螯蟹免疫化学指标的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2007, 13(6): 818–822.
- [14] 黄鹤忠, 李义, 宋学宏, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)免疫功能的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2006, 37(3): 198–205.
- [15] Novo M S, Miranda R B, Bianchini A. Sexual and seasonal variations in osmoregulation and ionoregulation in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Crustacea, Decapoda) [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2005, 323(2): 118–137.
- [16] Chen J C, Cheng S Y. Hemolymph oxygen content, oxyhemocyanin, protein levels and ammonia excretion in the shrimp *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite [J]. *Journal of Comparative Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1995, 164(7): 530–535.
- [17] Ashida M. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Archives of Biochemistry Biophysics*, 1971, 144(2): 749–762.
- [18] Weiland A L, Mangum C P. The influence of environmental salinity on hemocyanin function in the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 1975, 193(3): 265–273.
- [19] Chen J C, Cheng S Y. Hemolymph  $\text{PCO}_2$ , hemocyanin, protein level and urea excretions of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia [J]. *Aquatic Toxicology*, 1993, 27(3–4): 281–292.
- [20] Cheng W, Liu C H, Cheng C H, *et al.* Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of *Macrobrachium rosenbergii* in relation to size and molt stage [J]. *Aquaculture*, 2001, 198(3–4): 387–400.
- [21] Chen J C, Chia P G. Oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels in the hemolymph of *Scylla serrata* in relation to size and molt cycle [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1997, 217(1): 93–105.
- [22] Chen J C, Cheng S Y. Studies on haemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 1993, 106(2): 293–296.
- [23] Castille F L, Lawrence A L. The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 1981, 68(1): 75–80.
- [24] Abe H, Okuma E, Amano H, *et al.* Effects of seawater acclimation on the levels of free D- and L-alanine and other osmolytes in the Japanese mitten crab *Eriocheir japonicus* [J]. *Fish Science*, 1999, 65(6): 949–954.
- [25] Abe H, Okuma E, Amano H, *et al.* Role of free D- and L-alanine in the Japanese mitten crab *Eriocheir japonicus* to intracellular osmoregulation during downstream spawning migration [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 1999, 123(1): 55–59.
- [26] Gilles R. Effects of osmotic stresses on the protein concentration and pattern of *Eriocheir sinensis* blood [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 1977, 56(2): 109–1141.
- [27] Armstrong D A, Strange K, Crowe J, *et al.* High salinity acclimation by the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Uptake of exogenous ammonia and changes in endogenous nitrogen compounds [J]. *The Biological Bulletin*, 1981, 160(3): 349–365.
- [28] Tan C H, Choong K Y. Effect of hyperosmotic stress on hemolymph protein, muscle ninhydrinpositive substances and free amino acids in *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 1981, 70(4): 485–489.
- [29] Péqueux A. Osmotic regulation in crustaceans—Review [J]. *Journal of Crustacean Biology*, 1995, 15(1): 1–60.

- [30] Li E C, Chen L Q, Zeng C, *et al.* Growth, body composition, respiration and ambient ammonia nitrogen tolerance of the juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at different salinities [J]. *Aquaculture*, 2007, 265(1-4): 385-390.
- [31] 潘鲁青, 金彩霞. 甲壳动物血蓝蛋白研究进展[J]. *水产学报*, 2008, 32(3): 485-491.
- [32] 刘树青. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用[J]. *海洋与湖沼*, 1999, 30(3): 278-283.
- [33] 孟凡伦, 张玉臻, 孔键, 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): 110-116.
- [34] 成永旭, 王武, 李应森. 河蟹的人工繁殖和育苗技术[J]. *水产科技情报*, 2007, 34(2): 73-75.
- [35] 张烈士, 朱传龙, 杨杰, 等. 长江口河蟹繁殖场环境调查[J]. *水产科技情报*, 1988(1): 3-7.
- [36] 顾保全, 王幽兰, 左嘉客. 不同发育时期中华绒螯蟹血淋巴渗透压分析 [J]. *动物学报*, 1990, 36(2): 165-171.
- [37] Engel D W, Brouwer M, McKenna S. Hemocyanin concentrations in marine crustaceans as a function of environmental conditions [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1993, 93(3): 235-244.
- [38] Cheng W, Liu C H, Yan D F, *et al.* Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* in relation to size and molt stage [J]. *Aquaculture*, 2002, 211(1-4): 325-339.
- [39] 潘伟槐, 祝尧荣, 黄文光, 等. 日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 成体组织三种同工酶的研究[J]. *绍兴文理学院学报*, 2001, 21(4): 43-46.
- [40] 赵青松, 秦方锦, 李长红, 等. 3 种海产蟹类血淋巴酶活性的初步研究[J]. *宁波大学学报:理工版*, 2009, 22(1): 33-38.

## Changes in non-specific immune parameters of mature Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) in response to elevated salinities

WANG Rui-fang<sup>1,2</sup>, ZHUANG Ping<sup>1,2\*</sup>, FENG Guang-peng<sup>2</sup>, ZHANG Long-zhen<sup>2</sup>,  
HUANG Xiao-rong<sup>2</sup>, JIA Xiao-yan<sup>3</sup>

(1. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Resources and Ecology, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Mature Chinese mitten crabs, *Eriocheir sinensis*, are exposed to brackish water or coastal waters as an obligatory part during adult reproductive migration. In this study, we investigated the changes in serum total protein and oxyhemocyanin contents, alkaline phosphatase (AKP), superoxide dismutase (SOD) and phenoloxidase (PO) activities in both mature male and female *E.* when in freshwater and after step-wise acclimation to the following salinities: 7, 14, 21, 28, 35. Increasing salinities caused a gradual decrease in serum total protein and oxyhemocyanin contents. Serum AKP activity was elevated slightly at 7, thereafter it dropped slowly by the end of experiment. Serum SOD activity showed a slight decrease after increase of salinity until 21, it was activated above 21. Serum PO activity decreased gradually with the increase of salinity in males; however, it maintained a stable level above 21 in females. All tested parameters in serum except for SOD were significantly higher in females than those in males. It is suggested that elevated salinity induced a decrease in serum total protein and oxyhemocyanin contents. Serum immune enzyme activities in mature *E. sinensis* will be affected when the salinity was near to or above 28, which could exert a negative effect on reproduction. Further studies are needed to understand the biochemical adaptation of mature *E. sinensis*, during their reproductive migration acclimation to elevated salinities. Sex differences should not be ignored.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; salinity; immune enzyme; oxyhemocyanin; sex difference; reproductive migration

**Corresponding author:** ZHUANG Ping. E-mail: pzhuang@online.sh.cn