

文章编号:1000 - 0615(2005)01 - 0066 - 08

几种免疫促进剂对中国对虾血细胞数量、形态结构 以及酚氧化酶产量和活性的影响

汪小锋, 樊廷俊, 丛日山, 胡国斌

(中国海洋大学生命科学与技术学部海洋生物系, 山东 青岛 266003)

摘要:为了弄清免疫促进剂增强对虾自身免疫力的作用机理,利用脂多糖(LPS)、-葡聚糖(-1,3-glucan)、灭活哈维氏弧菌和灭活鳃弧菌对中国对虾血细胞的数量、形态结构以及酚氧化酶(phenoloxidase,PO)的产量与活性在刺激前后的变化进行了研究。研究表明,经-葡聚糖、脂多糖、灭活哈维氏弧菌和灭活鳃弧菌刺激后,中国对虾总血细胞的数量分别增多了83.4%、52.0%、73.4%和111.3%,其中,小颗粒细胞的数量分别增多了100.4%、67.3%、57.2%和102.9%,大颗粒细胞的数量分别增多了47%、10%、127%和173%;同时,PO的产量分别提高了81.3%、104.7%、29.2%和40.4%,但PO的单位酶活性在刺激前后没有显著变化。透射电镜(TEM)观察结果显示,中国对虾血细胞的超微结构在免疫刺激前后发生了不同程度的变化。在-葡聚糖和脂多糖刺激下,小颗粒细胞和大颗粒细胞内糙面内质网(RER)和游离核糖体数量明显增多,线粒体数量增加,细胞内分泌颗粒的数量大幅度减少;而透明细胞的超微结构在多糖刺激前后除RER及线粒体数量略有增加、核孔复合体数量明显增加外没有显著差异。经灭活哈维氏弧菌刺激后,对虾大颗粒细胞中RER增生显著并发生泡状化,核质比明显降低;小颗粒细胞中的RER也发生增生且呈泡状化,核质比略有降低;透明细胞中RER数量明显增加,线粒体数量显著增加,核质比明显下降;在灭活鳃弧菌刺激下,对虾透明细胞中游离核糖体和线粒体的数量明显增加,核质比下降;小颗粒细胞内RER的数量明显增多、潴泡体积扩大,细胞质中分泌颗粒的数量比对照组略有减少,核质比明显下降;大颗粒细胞的超微结构除游离核糖体数量有所增加外,变化并不显著。-葡聚糖和脂多糖主要用于小颗粒细胞和大颗粒细胞;而灭活鳃弧菌和哈维氏弧菌对大颗粒细胞、小颗粒细胞和透明细胞均有作用。

关键词:中国对虾; -葡聚糖; 多脂糖; 哈维氏弧菌; 鳃弧菌; 血细胞; 酚氧化酶

中图分类号:S917

文献标识码:A

Effects of several immunostimulants on the number, ultrastructure of hemocytes and the yield,activities of phenoloxidase in *Penaeus chinensis*

WANG Xiao-feng, FAN Ting-jun, CONG Ri-shan, HU Guo-bin

(Department of Marine Biology, Division of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: To study the stimulating mechanisms of immunostimulants in shrimp autogenous immunocompetence, the immunostimulating effects of -glucan, lipopolysaccharide (LPS), inactivated *Vibrio harveyi* and *Vibrio anguillarum* on the hemocytes and phenoloxidase (PO) from shrimp, *Penaeus chinensis*, were investigated in this study. After shrimps stimulated with lipopolysaccharide (LPS), -glucan, inactivated *Vibrio harveyi* and inactivated *Vibrio anguillarum*, the number of their overall hemocytes increased 83.4%, 52.0%, 73.4% and 111.3% respectively, in which the number of semigranular cells increased 100.4%, 67.3%, 57.2% and 102.9%, and the number of granular cells increased 47%, 10%, 127% and 173%, respectively. And the amount of PO increased 104.7%, 81.3%,

收稿日期:2003-09-15

资助项目:国家教育部高等学校骨干教师资助计划资助(No. 160004)

作者简介:汪小锋(1978-),男,江苏常州人,硕士研究生,专业方向为细胞生物学。E-mail: colanring@163.com

通讯作者:樊廷俊, Tel: 0532 - 2031637, E-mail: tjfan@ouc.edu.cn

30.1% and 40.4%, respectively, whereas the unit activity of PO remains almost the same before and after stimulation. Under the stimulation of β -glucan or LPS, the amount of rough endoplasmic reticulum (RER) of semigranular cells and granular cells increased greatly and with swelled cristae. And the number of free ribosomes and mitochondria increased obviously and the number of secretory vesicles decreased greatly. However, the ultrastructure of hyaline cells changed less before and after stimulation. Under the stimulation of inactivated *Vibrio anguillarum*, the amount of RER in semigranular cells and granular cells increased greatly. And the number of free ribosomes increased obviously in granular and hyaline cells. The number of mitochondria increased obviously and its nucleoplasmic ratio decreased in hyaline cells. Under the stimulation of inactivated *Vibrio harveyi*, the amount of RER and the number of mitochondria increased greatly and nucleoplasmic ratio decreased obviously in semigranular cells and granular cells. The amount of RER and the number of mitochondria increased obviously and nucleoplasmic ratio decreased in hyaline cells. Among the four kind of immunostimulants, β -glucan and LPS acted mainly on semigranular cells and granular cells, whereas inactivated *Vibrio harveyi* and *Vibrio anguillarum* acted on semigranular cells, granular cells and also hyaline cells. Therefore, it can be concluded that 1) the enhancement of shrimp autogenous immunocompetence is finally realized via increase of OP production instead of PO unit activity, 2) the enhancing mechanisms of polysaccharides and inactivated vibrios are different, 3) the enhancement of shrimp autogenous immunocompetence is finally realized via inducing RER hyperplasia in granular cells to increase PO production after stimulation by β -glucan and LPS, 4) the enhancement of shrimp autogenous immunocompetence is finally realized via stimulating the proliferation of granular cells to increase PO production after stimulation by inactivated *Vibrio harveyi* and *Vibrio anguillarum*, and 5) the immunostimulating effect of polysaccharides is much better than that of inactivated vibrios.

Key words: *Penaeus chinensis*; β -glucan; lipopolysaccharides (LPS); *Vibrio harveyi*; *Vibrio anguillarum*; hemocytes; phenoloxidase

在全球范围内,对虾传染性病害给对虾养殖业造成了巨大的经济损失,已成为限制对虾养殖业发展的主要因素之一。除直接研究病毒病的发病机理、快速诊断和治疗方法外,如何提高对虾免疫系统的自身防御能力则是探讨对虾养殖业疾病控制的另一个关键要素。

作为对虾抵御外来病原感染第一道防线的血细胞和作为对虾酚氧化酶原激活系统中主要成员的酚氧化酶,在对虾非特异性免疫系统中起着关键性作用。目前的研究结果表明,免疫促进剂能不同程度地提高对虾的自身免疫力,但多糖及灭活弧菌对中国对虾血细胞(数量与形态结构)及酚氧化酶(活性与产量)究竟有什么具体影响,国内外至今还没见报道。为了弄清免疫促进剂对中国对虾非特异性免疫系统的激活机制,本文选用脂多糖、 β -葡聚糖、灭活哈维氏弧菌和灭活鳃弧菌四种免疫促进剂对中国对虾进行了免疫刺激,并对这些促进剂对中国对虾血细胞数量与超微结构以及酚氧化酶活性与含量的影响进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 为海捕活虾,体长 18~22cm,购于青岛南山水产品市场。冷冻离心机,长沙科威实业有限公司产品;柱层析装置, Baxter 公司产品;Sephacryl 凝胶过滤柱 (1.1cm \times 45cm), Pharmacia 公司产品;Q Sepharose Fast Flow 强阴离子交换柱 (1.1cm \times 25cm), Pharmacia 公司

产品;UV730 紫外分光光度计,日本岛津公司产品;Centricon 10 浓缩离心管, Amicon 公司产品;E-200 型光学摄影显微镜,日本尼康公司产品;H-700 透射电子显微镜,日本日立公司产品。 β -葡聚糖 (β -1,3-glucan) 和脂多糖 (LPS) 为 Sigma 公司产品;所用化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

弧菌悬液的制备 哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 和鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 由中国海洋大学生物系微生物学研究室友情提供。两株弧菌接种于 2216E 培养基上,25 $^{\circ}$ C 恒温培养 48h 后,用 9mL 无菌对虾生理盐水洗下菌苔,加入终浓度为 0.5% 甲醛灭活 48h,离心 (5 000r \cdot min $^{-1}$, 20min) 收集弧菌沉淀,用无菌对虾生理盐水清洗两遍后,调节弧菌浓度至 10 5 ind \cdot mL $^{-1}$ 。

免疫促进剂处理中国对虾的方法 脂多糖 (0.2%) 和 β -葡聚糖 (0.2%) 按对虾每克体重 5 μ g 的剂量,灭活的哈维氏弧菌和鳃弧菌 (10 5 ind \cdot mL $^{-1}$) 按每尾对虾 0.1mL 的剂量,从中国对虾腹尾交接柔软处进行注射。对照组在相同部位注射 0.1mL 无菌对虾生理盐水。

中国对虾血细胞的获得 注射免疫促进剂 48h 后从心脏抽取对虾血液,加入 Alsever 抗凝剂 1mL,于离心管中充分混匀后,用血球计数板进行细胞计数。

透射电镜样品制备 注射免疫促进剂 48h 后从心脏抽取对虾血液,加入 Alsever 抗凝剂 1mL,离心 (6000r \cdot min $^{-1}$, 40min) 收集细胞,经对

虾生理盐水清洗 2 遍后,用预冷至 4 的戊二醛固定 2 次,每次 50min。然后进行锇酸后固定、树脂包埋、超薄切片、醋酸铀染色,用透射电镜 (TEM) 观察。

中国对虾酚氧化酶样品的制备 具体操作方法按樊廷俊等^[1]的方法进行。取各免疫注射组对虾的血淋巴各 2mL,离心 (10 000 r · min⁻¹, 50min, 4) 破碎细胞,用 1% SDS 激活后利用 Sephacryl S-100 凝胶过滤柱层析和 Q Sepharose Fast Flow 离子交换柱层析进行纯化,获得酚氧化酶纯化样品。

酚氧化酶活性测定以 0.02mol L⁻¹ L-DOPA 为特异性底物,参照 Ashida 等^[2]的方法进行。具体测定时,将 100μL 待测酶液及 100μL 0.02mol · L⁻¹ L-DOPA 于 28 恒温水浴中混匀,反应 40min 后,加入 1.3mL 预冷的 0.01mol L⁻¹ 的磷酸钾盐缓冲液 (pH6.0)。在此反应条件下,以 A₄₉₀ 值每分钟增长 0.001 定义为一个酶活力单位。

蛋白浓度测定采用 Marion 等^[3]的方法。浓度 2mg mL⁻¹ 的标准小牛血清蛋白 (BSA) 用 0.1 mL 20mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH7.0) 缓冲液进行倍比稀释,配制成标准溶液。各种待测酚氧化酶纯化样品和不同深度的 BSA 标准溶液各取 0.1mL。分别加入 2mL 考马斯亮蓝 G250 染液,充分混匀后于室温静置 5min,利用分光光度计测定各管的 OD595 值。对照用 0.1mL 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH7.0) 缓冲液替代待测酚氧化酶样品,其余条件完全相同。以不同 BSA 标准溶液的浓度 (mg · mL⁻¹) 为横轴,以其 OD595 值为纵轴,绘制出标

准曲线。

2 结果

2.1 4 种免疫促进剂对中国对虾血细胞数量的影响

在透射镜下共观察到了 3 种类型的中国对虾血细胞:小颗粒细胞 (semigranular cells)、大颗粒细胞 (granular cells) 和透明细胞 (hyaline cells),3 类血细胞在血细胞总数中所占有的数量比例分别为 77.5%、13.6% 和 8.9%。经脂多糖、-葡聚糖、灭活哈维氏弧菌和灭活鳃弧菌刺激后 48h。取血进行血细胞计数,结果表明,中国对虾总血细胞的数量分别增加了 83.4%、52%、73.4% 和 111.3%,其中,小颗粒细胞的数量分别增多了 100.4%、67.3%、57.2% 和 102.9%,大颗粒细胞的数量分别增多了 47%、10%、127% 和 173%,透明细胞在脂多糖和 -葡聚糖刺激前后没有显著变化,经灭活哈维氏弧菌和鳃弧菌刺激后其数量分别增多了 66.1% 和 85.7% (表 1)。

由表 1 可以看出,在经多糖刺激后,对虾透明细胞的数量与对照组相比没有明显差异,而经弧菌刺激后,透明细胞的数量与对照组相比则有大幅度增加。经过多糖和弧菌刺激后的中国对虾血淋巴中的小颗粒细胞的数量均有明显增加,尤其是在 -葡聚糖和灭活鳃弧菌刺激后,小颗粒细胞的数量分别增加了 100.4% 和 102.9%。与小颗粒细胞相似,大颗粒细胞的数量多糖刺激后的增加幅度要小于其在弧菌刺激后的增加幅度。

表 1 多糖和弧菌免疫促进剂对中国对虾血细胞数量的影响

Tab. 1 Effects of polysaccharides and vibrios on the number of hemocytes in *Penaeus chinensis*

($\times 10^6$ cell mL⁻¹)

血细胞数量 no. of hemocytes	对照 control	-葡聚糖 -1,3-glucan	脂多糖 LPS	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>
血细胞总数 total hemocyte number	6.27 ± 0.06	11.5 ± 0.11	9.53 ± 0.05	10.87 ± 0.10	13.25 ± 0.09
小颗粒细胞数量 no. of semigranular cells	4.86 ± 0.12	9.74 ± 0.08	8.13 ± 0.08	7.64 ± 0.07	9.86 ± 0.09
大颗粒细胞数量 no. of granular cells	0.85 ± 0.05	1.25 ± 0.07	0.95 ± 0.05	1.93 ± 0.06	2.32 ± 0.10
透明细胞数量 no. of hyaline cells	0.56 ± 0.07	0.51 ± 0.04	0.55 ± 0.04	0.93 ± 0.05	1.04 ± 0.08

注:血细胞计数用虾血样品来自 9 尾虾 (每组 3 尾,共分 3 组)

Notes: Hemocytes used for counting were collected from 9 shrimps (divided into 3 groups, 3 shrimps in each group)

2.2 4种免疫促进剂对中国对虾血细胞超微结构的影响

中国对虾经过 β -葡聚糖刺激48h后,其大颗粒细胞中糙面内质网(RER)的数量明显增多、潴泡体积扩大,细胞质中游离核糖体的数量也有明显增加,线粒体的数量增多、部分线粒体体积膨大、嵴的数量也有所增多,核孔复合体的数量略有增加,细胞质中分泌颗粒的数量大幅度减少(图版-1,2);小颗粒细胞内RER数量也明显增多、潴泡体积扩大,胞质中游离核糖体的数量也明显增生,线粒体的数量也有一定程度的增加,细胞质中分泌颗粒的数量明显减少(图版-3,4);透明细胞中RER及线粒体的数量略有增加,核孔复合体的数量明显增加(图版-5,6)。

经脂多糖刺激后,对虾大颗粒细胞和小颗粒细胞的超微结构变化与 β -葡聚糖刺激后非常类似,只不过引起了透明细胞RER与游离核糖体的增生(图版-1)。

经灭活哈维氏弧菌刺激后,对虾大颗粒细胞中RER增生显著并发生泡状化,核质比明显降低;小颗粒细胞中的RER也发生增生且呈泡状化,核质比略有降低;透明细胞中RER数量明显增加,线粒体数量显著增加,核质比明显下降(图版-2)。

在灭活鳃弧菌刺激下,对虾透明细胞中游离核糖体和线粒体的数量明显增加,核质比下降(图版-3)。小颗粒细胞内RER的数量明显增多、潴泡体积扩大,细胞质中分泌颗粒的数量比对

照组略有减少,核质比明显下降(图版-4);大颗粒细胞的超微结构除游离核糖体数量有所增加外,变化并不显著。

2.3 4种免疫促进剂对中国对虾酚氧化酶产量和酶活性的影响

经 β -葡聚糖、脂多糖、灭活哈维氏弧菌和灭活鳃弧菌刺激后,中国对虾PO的产量分别增加了81.3%、104.7%、29.2%和40.4%,其中,以 β -葡聚糖与脂多糖刺激PO产量增加的效果最为显著;中国对虾PO的总酶活性分别增加了79.4%、113%、37.8%和46.3%,以 β -葡聚糖和脂多糖刺激后PO总酶活性的增加幅度更为显著;但PO的单位酶活性在刺激前后没有显著差异(表2)。

3 讨论

3.1 4种免疫促进剂对中国对虾血细胞数量和超微结构的影响

经多糖和灭活弧菌对中国对虾进行免疫刺激后,血细胞的数量明显增加,尤其在 β -葡聚糖注射组中,血细胞的数量分别增加了83.4%和111.3%;在3类中国对虾血细胞中,小颗粒细胞在4个实验组中的数量均有大幅度的增加,暗示出小颗粒细胞在对虾免疫防御中的重要作用。经免疫刺激后,小颗粒细胞的糙面内质网数量的增多、潴泡体积的扩大以及核糖体数量的增多,均表明小颗粒细胞代谢旺盛、正在活跃合成蛋白质;其颗粒的减少可能是由于小颗粒细胞发生胞吐作用所致。

表2 4种免疫促进剂对中国对虾酚氧化酶产量和酶活性的影响

Tab.2 Effects of the immunostimulants on phenoloxidase yield in *Penaeus chinensis*

	对照 control	β -葡聚糖 -1,3-glucan	脂多糖 LPS	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>
PO 体积(mL) PO volume	0.50 \pm 0.00	0.50 \pm 0.00	0.50 \pm 0.00	0.50 \pm 0.00	0.50 \pm 0.00
蛋白浓度(mg \cdot mL $^{-1}$) protein concentration	1.71 \pm 0.02	3.10 \pm 0.01	3.50 \pm 0.03	2.21 \pm 0.02	2.40 \pm 0.03
蛋白含量(mg) protein content	0.86 \pm 0.02	1.55 \pm 0.01	1.75 \pm 0.03	1.11 \pm 0.02	1.20 \pm 0.03
总酶活性(A ₄₉₀ \cdot 10 $^{-3}$ \cdot min $^{-1}$) enzyme activity	320 \pm 3.61	574 \pm 2.65	682 \pm 3.00	441 \pm 7.77	468 \pm 2.65
单位酶活性(A ₄₉₀ \cdot 10 $^{-3}$ \cdot min $^{-1}$ \cdot mg $^{-1}$) unit enzyme activity	372.1 \pm 4.72	370 \pm 6.98	389.7 \pm 4.35	397.3 \pm 7.36	390.0 \pm 7.09

注:PO,酚氧化酶;0.5mL PO 纯酶来自9尾虾的1.5mL 虾血;酶活性测定以0.02mol L $^{-1}$ L-DOPA 为特异性底物

Notes: PO, phenoloxidase; 0.5mL PO was purified from 1.5mL hemolymph of 9 shrimps; Enzymatic activities were measured by using 0.02 mol \cdot L $^{-1}$ L-DOPA as a specific substrate

经灭活弧菌刺激后,大颗粒细胞和透明细胞的数量均有大幅度的增加,但在多糖处理组中它们的数量变化幅度稍小些,暗示多糖和灭活弧菌所激活的中国对虾血细胞的免疫反应途径有所不同。在脂多糖和 α -葡聚糖的刺激下,大颗粒细胞内糙面内质网数量的增多、溶泡体积的扩大、核糖体数量的明显增生、线粒体数量的增多等,均表明大颗粒细胞代谢异常旺盛、蛋白质的合成也非常活跃;此外,大颗粒细胞的核孔复合体的数量略有增多,可能与其基因表达活性的增强有关。另外,刺激后大颗粒细胞中颗粒数量的明显减少,很有可能是大颗粒细胞发生胞吐作用(脱颗粒)所致。在多糖和灭活弧菌刺激后,透明细胞超微结构没有发生显著变化,只是其线粒体的数量在灭活弧菌刺激后发生了明显的增多,但其具体意义还不清楚。

3.2 4种免疫促进剂对中国对虾PO产量与活性的影响

本文对中国对虾PO产量与活性变化的研究表明,脂多糖、 α -葡聚糖、灭活哈维氏弧菌和灭活鳃弧菌的免疫刺激均能显著提高中国对虾PO的总酶活性,特别是在 α -葡聚糖和脂多糖注射组中,PO的总酶活性分别增加了79.4%和131.1%。该结果进一步证实了多糖和灭活弧菌这些免疫促进剂能大幅度提高对虾PO的酶活性,达到激活对虾免疫反应的目的。同时,经免疫刺激后,中国对虾的PO产量也有大幅度提高,特别是经 α -葡聚糖和脂多糖刺激后,其PO的产量分别增加了81.3%和104.7%,但PO的单位酶活性并没有发生显著差异,表明中国对虾在接受多糖和灭活弧菌刺激后,主要是依靠PO产量增加而不是PO的单位酶活性来提高免疫活性、增强机体对病原的抵抗能力。从而证实了Smith等^[4]提出的“PO的活性与其蛋白浓度相关”的观点。

3.3 免疫刺激后血细胞在中国对虾免疫系统中所起的作用

在脂多糖和 α -葡聚糖的刺激下,大颗粒细胞和小颗粒细胞的蛋白质合成均变得非常活跃。鉴于proPO主要存在于大颗粒细胞内,因此所合成的蛋白质极有可能就是proPO。此外,大颗粒细胞核孔复合体数量的增多,可能与proPO基因表达活性的增强有关。由于小颗粒细胞所合成的蛋白质,多是一些参与免疫防御的蛋白质,包括酚氧

化酶原(prophenoloxidase, proPO)激活系统的一些相关组分,因此其经胞吐作用分泌出去的颗粒成分主要为proPO激活系统的一些组分。另据Söderhäll等^[5]报道,脱颗粒的小颗粒细胞还具有吞噬活性,可以通过吞噬反应来消除小体积的入侵物,而大体积的入侵物则通过包裹作用来清除。因此,在免疫刺激后,大颗粒细胞和小颗粒细胞的蛋白质合成量增加,大颗粒细胞的主要作用是合成大量的proPO,而小颗粒细胞的主要作用除直接的吞噬作用外主要合成proPO激活系统的一些组分,释放出这些组分后一方面会进一步刺激大颗粒细胞活跃合成proPO,另一方面将大颗粒细胞所分泌出的proPO激活成有活性的PO。由此可知,对虾要产生大量有活性的PO,提高自身免疫力,就必须依赖于大颗粒细胞和小颗粒细胞的密切配合。大颗粒细胞经多糖类免疫促进剂刺激后,其数量的增加幅度较小,但PO产量的增加幅度仍然很大,说明大颗粒细胞在多糖刺激下主要是通过其RER的大量增生来提高PO产量的。

在鳃弧菌和哈维氏弧菌刺激下,透明细胞在数量和超微结构上均发生了明显的变化,暗示透明细胞在弧菌刺激后的对虾免疫反应中也具有一定作用。据Hose等^[6]报道,甲壳类动物的透明细胞对其血淋巴凝集反应具有启动作用。鉴于透明细胞在免疫刺激后在数量和超微结构上也发生了不同程度的变化,表明其对血淋巴凝集反应的启动效率也发生了相应的改变,但这种推测还有待进一步证实。大颗粒细胞在鳃弧菌和哈维氏弧菌刺激下,数量大幅度增加,PO的产量也大幅度增加,但RER增生不甚显著,说明大颗粒细胞在灭活弧菌刺激下主要是通过其大量增殖来增加PO产量、提高对虾自身免疫力的。从而也纠正了Smith等^[4]提出的关于“PO的活性不与血细胞数量直接相关”的另一观点。

3.4 4种免疫促进剂对中国对虾免疫系统的作用机制

利用4种免疫促进剂对中国对虾血细胞数量与超微结构以及酚氧化酶活性与产量的研究表明, α -葡聚糖和脂多糖主要作用于小颗粒细胞和大颗粒细胞,而鳃弧菌和哈维氏弧菌对大颗粒细胞、小颗粒细胞和透明细胞均有作用。在多糖类免疫促进剂的刺激下,中国对虾小颗粒细胞的数量发生了大幅度增加,小颗粒细胞内proPO

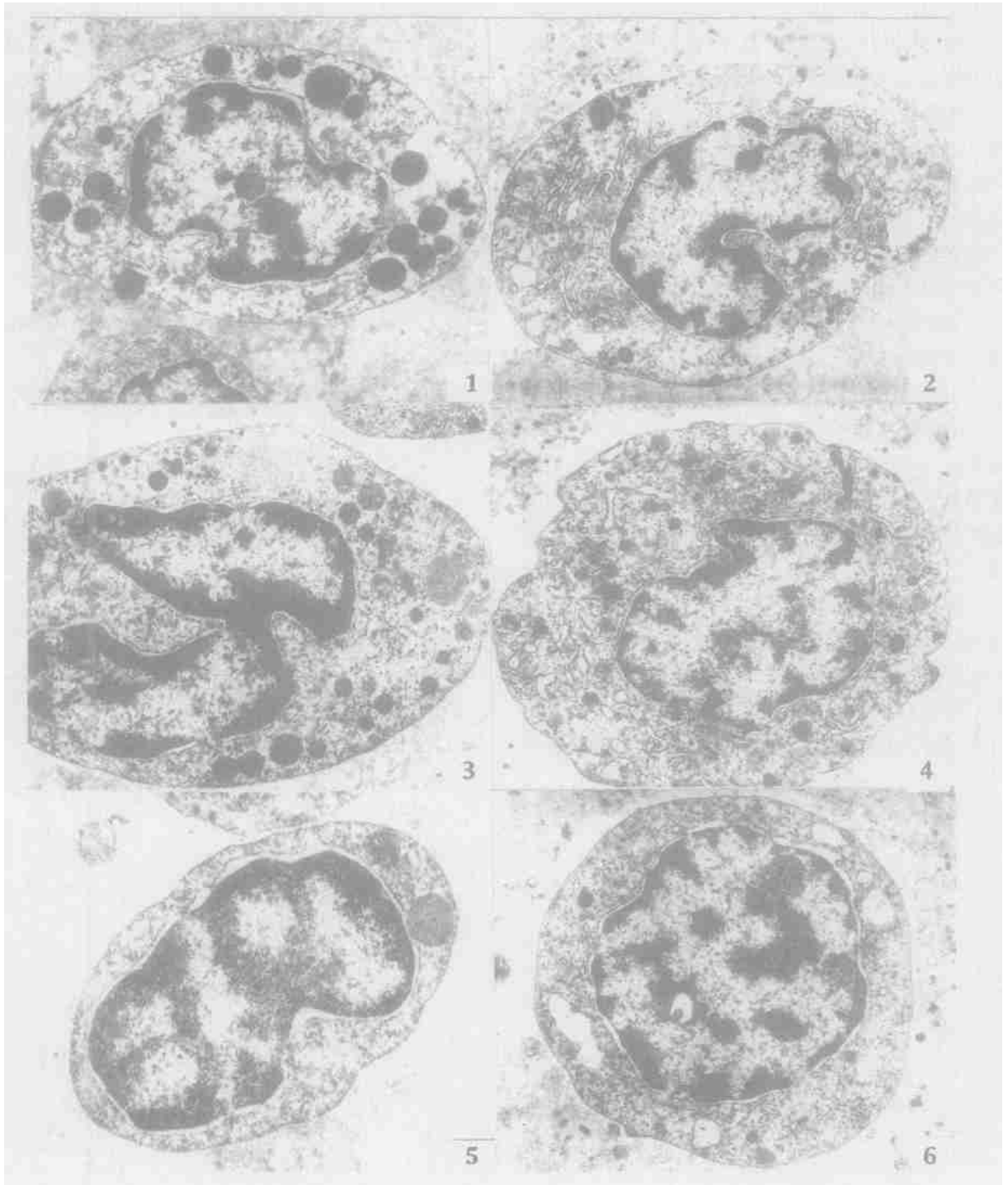
激活系统组分的合成量也大幅度增加;大颗粒细胞数量的增加幅度较小,但大颗粒细胞内 proPO 基因的表达活性增强,导致大颗粒细胞内 proPO 的合成量也大量增加;在小颗粒细胞的配合和刺激下,大颗粒细胞产生了大量 proPO 并被激活成活性 PO (在脂多糖和 -葡聚糖刺激下 PO 的产量分别增加了 104.7% 和 76%),从而大幅度提高了中国对虾的自身免疫力。在灭活弧菌的刺激下,中国对虾大颗粒细胞和小颗粒细胞的数量均发生了大幅度增加,只是小颗粒细胞数量的增加幅度较大颗粒细胞稍小些,proPO 的合成量虽然有所增加,但增加幅度要低于多糖类刺激下的增加幅度(在鳃弧菌和哈维氏弧菌刺激下 PO 的产量增加幅度分别只有 40.4% 和 29.2%)。因此,灭活弧菌虽然也能在一定程度上提高中国对虾的自身免疫力,但其免疫促进效果不如多糖类免疫促进剂。

综上所述,本文得出如下结论:1) 4 种免疫促进剂之所以能提高中国对虾的自身免疫力是因为它们能增加 PO 的产量而不是 PO 的单位酶活性;2) 多糖类与灭活弧菌类免疫促进剂提高中国对虾自身免疫力的作用机制是不同的;3) -葡聚糖和

脂多糖主要是通过刺激中国对虾大颗粒细胞内 RER 的大量增生,来大幅度提高 PO 的产量,提高对虾自身免疫力的;4) 灭活鳃弧菌和哈维氏弧菌主要是通过刺激中国对虾大颗粒细胞的大量增殖,来大幅度增加 PO 的产量,提高对虾自身免疫力的;5) 灭活弧菌对中国对虾自身免疫力的促进效果远不如多糖类免疫促进剂。

参考文献:

- [1] 樊廷俊,汪小锋. 中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 酚氧化酶的分
离纯化及其部分生物化学特性的研究[J]. 生物化学与生物
物理学报,2002,34(5):66-71.
- [2] Ashida M, Dohke K. Activation of prophenoloxidase by the
activating enzyme of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Insect
Biochem,1980,10:37-47.
- [3] Marion M B. A rapid and sensitive method for the quantitation of
microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-
dye binding[J]. Anal Biochem,1976,72:248-254.
- [4] Smith V J, Johnstone R A. Differential haemotoxic effect of PCB
congeners in the common shrimp *Crangon crangon* [J]. Comp
Biochem Physiol,1992,101:641-649.
- [5] Söderhäll K, Smith V J, Johansson M W. Exocytosis and uptake
of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans:
evidence for cellular cooperation in the defence reaction of
arthropods [J]. Cell Tissue Res,1986,245:43-49.
- [6] Hose J E, Martin G G, Gerard A S. A decapod hemocyte
classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and
function[J]. Biol Bull,1990,178(1):33-45.



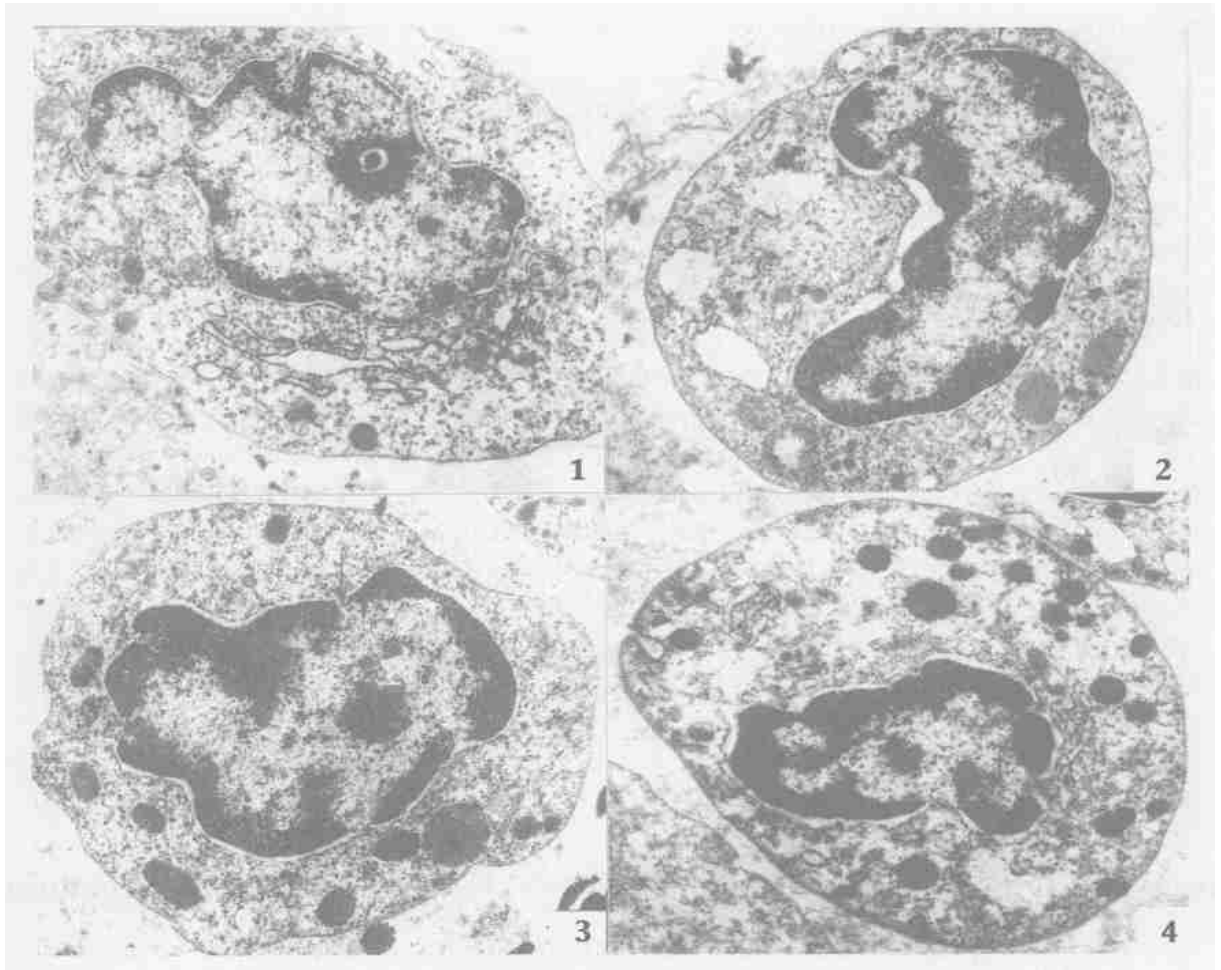
图版 Plate

β -葡聚糖刺激前后中国对虾 3 种血细胞的超微结构

The ultrastructure of the 3 types of shrimp hemocytes before and after β -glucan stimulation

1. 无刺激时大颗粒细胞的超微结构, $\times 7500$; 2. β -葡聚糖刺激后大颗粒细胞的超微结构, $\times 7500$; 3. 无刺激时小颗粒细胞的超微结构, $\times 9000$; 4. β -葡聚糖刺激后小颗粒细胞的超微结构, $\times 7500$; 5. 无刺激时透明细胞的超微结构, $\times 9000$; 6. β -葡聚糖刺激后透明细胞的超微结构, $\times 9000$

1. the ultrastructure of granular cells without any stimulation, $\times 7500$; 2. the ultrastructure of granular cells after stimulated by β -glucan, $\times 7500$; 3. the ultrastructure of semigranular cells without any stimulation, $\times 9000$; 4. the ultrastructure of semigranular cells after stimulated by β -glucan, $\times 7500$; 5. the ultrastructure of hyaline cells without any stimulation, $\times 9000$; 6. the ultrastructure of hyaline cells after stimulated by β -glucan, $\times 9000$



图版 Plate

脂多糖或弧菌刺激后中国对虾透明细胞和小颗粒细胞超微结构

The ultrastructures of shrimp hyaline cells and semigranular cells after LPS or vibrios stimulation

1. 脂多糖刺激后透明细胞的超微结构, $\times 9000$; 2. 哈维氏弧菌刺激后的透明细胞的超微结构, $\times 135000$; 3. 鳃弧菌刺激后透明细胞的超微结构, $\times 9000$; 4. 鳃弧菌刺激后小颗粒细胞的超微结构, $\times 7500$

1. The ultrastructure of hyaline cells after stimulated by LPS, $\times 9000$; 2. The ultrastructure of hyaline cells after stimulated by *Vibrio haneyi*, $\times 13500$; 3. the ultrastructure of hyaline cells after stimulated by *Vibrio anguillarum*, $\times 9000$; 4. the ultrastructure of semigranular cells after stimulated by *Vibrio anguillarum*, $\times 7500$