

白斑综合征病毒对红螯光壳螯虾幼虾肝胰腺 免疫酶活性及其超微结构的影响

左迪, 王丹丽, 孙婷, 王兰梅, 赵云龙*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要: 利用生物化学方法和电镜技术, 研究人工注射免疫多糖及 WSSV 对红螯光壳螯虾幼虾肝胰腺 POD、LSZ、SOD、PO 的活性变化及肝胰腺超微结构的影响。试验分对照组、实验组 I (注射 WSSV)、实验组 II (注射免疫多糖)、实验组 III (注射免疫多糖 48 h 后注射 WSSV) 4 组, 结果显示, 随着处理时间的增加, 实验组 I 与对照组相比 POD、PO、LSZ 活性均呈现明显降低趋势 ($P < 0.01$), 而 SOD 活性呈现先升高后降低的趋势 ($P < 0.01$); 实验组 II 的螯虾 4 种酶活性呈现先升后降, 与对照组相比酶活性增加 ($P < 0.05$); 实验组 III 4 种酶活性均高于实验组 I ($P < 0.05$), 但与对照组相比 SOD、POD、LSZ 活性降低 ($P < 0.01$)。红螯光壳螯虾幼虾肝胰腺组织由肝小管组成, 肝小管由基膜和上皮细胞组成。超微结构显示, 对照组螯虾幼虾肝胰腺单层柱状上皮细胞的表面微绒毛排列整齐, 各细胞器结构完整; 实验组 I 上皮细胞微绒毛受损、断裂, 核膜解体, 细胞核破裂, 粗面内质网断裂; 实验组 II 上皮细胞粗面内质网核糖体增多; 实验组 III 与实验组 I 相比, 细胞核结构完整, 粗面内质网肿胀, 线粒体部分畸变。结果说明感染 WSSV 的幼虾肝胰腺形态结构受损, 并进一步影响其生物学功能。人工注射免疫多糖能提高幼虾免疫相关酶活性, 在一定程度上能抵抗 WSSV 的侵染。

关键词: 红螯光壳螯虾; 肝胰腺; 酶活性; 超微结构; 白斑综合征病毒

中图分类号: S 917; Q 248

文献标志码: A

红螯光壳螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 原产地澳大利亚, 该虾具生长快、适应性强等养殖优势, 同时肉鲜味美, 胆固醇低, 是世界上较名贵的淡水经济虾之一。我国于 1992 年引进试养, 随着养殖规模的扩大, 近年来在江苏、浙江等地相继暴发了红螯光壳螯虾白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 病害, 发病螯虾死亡率可达 80%, 严重制约了该虾养殖产业的发展^[1-3]。WSSV 是水产养殖中危害最为严重的病毒病原之一, 在全球范围内流行, 且宿主范围广, 几乎涉及所有水生甲壳动物^[4]。针对 WSSV 的研究已有相关报道: WSSV 宿主与致病机制^[5-6], 水体养殖环境与 WSSV 感染^[7], 感染后对虾相关免疫因子的变化^[8]等, 这些研究涉及了斑节对虾 (*Penaeus*

monodon)、中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)、克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 和罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 等, 而对红螯光壳螯虾的研究则很少有报道。此外, 根据虾蟹 WSSV 发病现状, 国内外学者从酵母中提取的免疫多糖以激活虾类的非特异性免疫系统, 并已证明在中国对虾、虎虾 (*Metapenaeus ensis*)、斑节对虾等物种中具有提高其特异性免疫活性作用^[9-11]。

红螯光壳螯虾与其他甲壳动物虾蟹一样, 其幼体与成体相比而言对水环境的变化更为敏感且脆弱, 控制病害和提高幼虾自身免疫力是养殖稳产高产的关键之一。肝胰腺又名中肠腺, 是十足目甲壳动物消化系统的重要组成部分, 也是重要

收稿日期: 2011-07-12 修回日期: 2011-10-24

资助项目: 上海市科学技术委员会重大科研资助项目 (08DZ1906401); 上海市教育委员会科研创新项目 (11CX18); 公益性行业 (农业) 科研专项经费项目 (200903056)

通讯作者: 赵云龙, E-mail: ylzhao@bio.ecnu.edu.cn

的解毒器官^[12]。通过研究 WSSV 及免疫多糖对红螯光壳螯虾幼虾免疫相关酶活性的影响,以及幼虾肝胰腺超微结构的变化,探讨免疫多糖对幼虾自身免疫机能的作用,旨在为红螯光壳螯虾防御 WSSV 的感染提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用虾取自上海市金山区漕泾特种水产实验场,体长 4.5 ~ 5.5 cm,体质量 2.83 ~ 3.40 g。试验前暂养一周,每天定时投喂饵料 1 次,换水 1/3 ~ 1/2,水温 26 °C 左右,连续充氧。

WSSV 病毒由浙江省淡水水产研究所鱼类免疫与健康重点开放实验室惠赠(病样来源于江苏某红螯光壳螯虾养殖场,由该实验室分离鉴定和保存),该实验室将感染后病虾的血淋巴、鳃、肝胰腺、胃组织按 1:10 比例加入无菌生理盐水在组织匀浆器中匀浆, -18 °C 冰箱过夜保存,待解冻后经高速台式离心机以 6 000 r/min 离心 5 min 及 10 000 r/min 离心 10 min,再经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, -80 °C 保存上清液。

免疫多糖(酵母细胞壁)购自湖北安琪酵母公司,其中 β-葡聚糖 ≥ 29%, α-甘露聚糖肽 ≥ 20%, 肽类及蛋白质 ≥ 30%, 几丁质 ≥ 2%, 用生理盐水配制成浓度为 2.0% 的免疫多糖溶剂,灭菌后备用。

1.2 实验方法

选取肢体完整,活力强的幼虾作为实验用虾,分设对照组、实验组 I、实验组 II、实验组 III 4 组。实验前取保存的病毒上清液,经人工感染健康红螯光壳螯虾以复壮 WSSV, 30 ~ 50 μL/尾,攻毒后 3 ~ 5 d,采集各发病虾的血淋巴反复冻融,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液用于后续实验。实验组 I、实验组 II 分别于第 1、2 腹节肌肉每尾注射 50 μL 病毒上清液和 2.0% 的免疫多糖溶剂,实验组 III 注射 50 μL 2.0% 的免疫多糖溶剂,48 h 后注射 50 μL 病毒液,对照组注射等量灭菌的 PBS (pH 7.4)。每个实验组设 3 个平行,每个平行实验用虾 30 尾。实验期间的养殖管理与暂养期相同。

1.3 样品处理

注射后的红螯光壳螯虾幼虾于 0、6、12、24、48、72 h 时从对照组和实验组各取 6 尾,冰醉解剖

肝胰腺,用预冷的超纯水(4 °C, pH 7.0)清洗,滤纸吸干称重后冰浴匀浆,加入预冷灭菌的 0.86% 的生理盐水,配制成 $m(\text{组织}):V(\text{生理盐水}) = 1:9$ 的肝胰腺组织匀浆液,4 °C 冷冻条件下 4 000 r/min 离心 10 min,弃上层脂肪和底部沉淀,所得上清液用于蛋白质含量、过氧化物酶(peroxidase, POD)、溶菌酶(lysozyme, LSZ)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、酚氧化酶(phenoloxidase, PO)活性的测定。SOD 的测定采用 1% 的组织液,PO 采用 2% 的组织液,LSZ 采用 5% 的组织液,POD 采用 10% 的组织液。

1.4 样品测定

POD 活性测定采用 POD 测定试剂盒,其活力单位定义为 37 °C 条件下,每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1 μg 的底物酶量为一个酶活力单位。SOD 活性测定采用 SOD 试剂盒(黄嘌呤氧化酶法),其活力单位定义为在 37 °C 条件下,1 mg 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 1 个 SOD 活力单位(U)。LSZ 活性采用 LSZ 检测试剂盒,计算公式:LSZ 含量 = (测定管透光度 UT_2 - 测定管透光度 UT_0) / (标准管透光度 ST_2 - 标准管透光度 ST_0) × 标准管浓度 (200 U/mL) × 样本测试前稀释倍数。PO 活性测定,以 L-多巴为底物,将 10 μL 肝胰腺组织液加入 96 孔酶标板中,在各孔中加入 200 μL 磷酸盐缓冲液(浓度 0.1 mol/L、pH 6.0)、10 μL 浓度为 0.01 mol/L 的 L-多巴液,振荡 4 次,在酶标仪中每隔 4 分钟读取 490 nm 处的吸光值。酶活力以试验条件下, OD_{490} 时每分钟增加 0.001 为 1 个酶活力单位^[13]。蛋白含量测定以考马斯亮蓝测定组织蛋白。酶活性测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.5 透射电镜

各取实验时间 72 h 的对照组、实验组 I、实验组 II、实验组 III 的螯虾肝胰腺组织,2.5% 的戊二醛(pH 7.4)固定,PBS 液漂洗后,2.0% 的饿后固定,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。

1.6 数据分析

实验所测数据以 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。

2 结果

实验 72 h 后的对照组和实验组 II 全部存活,实验组 III 存活率为 63%,实验组 I 存活率仅为 6.67%。感染 WSSV 的红螯光壳螯虾幼虾体表头胸甲、腹部甲壳及附肢无明显白色斑点,反应迟钝,螯肢无力,基本不摄食。接近死亡的红螯光壳螯虾血淋巴不凝固、微红,头胸甲易剥离,鳃丝轻微肿胀,肝胰腺颜色呈浅褐色,腹节肌肉苍白,断肢。对照组和实验组 II 的螯虾未见异常症状。

2.1 免疫多糖及 WSSV 对红螯光壳螯虾幼虾 POD 活性的影响

实验组 I POD 活性呈现降低趋势,6~24 h 与对照组差异显著($P < 0.05$),48、72 h 与对照组差异极显著($P < 0.01$);实验组 II POD 活性呈现先升后降的趋势,6、12 h 与对照组相比差异显著($P < 0.05$),24、48 h 差异极显著($P < 0.01$),但 72 h 与对照组差异不显著($P > 0.05$);实验组 III POD 活性变化趋势与实验组 I 相同,低于对照组,但要显著高于实验组 I ($P < 0.05$) (图 1)。

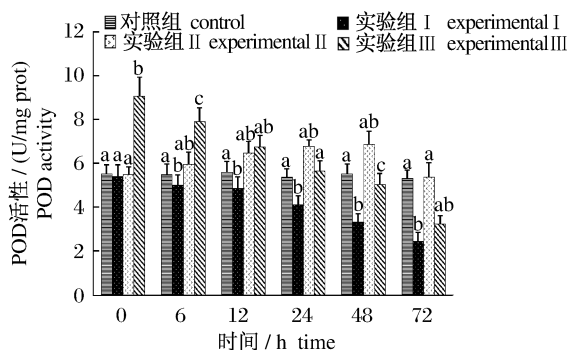


图 1 免疫多糖及 WSSV 对红螯光壳螯虾 POD 活性的影响

Fig. 1 Effects of immune polysaccharide and WSSV on POD activities in the hepatopancreas of *C. quadricarinatus*

2.2 免疫多糖及 WSSV 对红螯光壳螯虾幼虾 LSZ 活性的影响

实验组 I LSZ 活性在 12、24 h 时低于对照组 ($P < 0.05$),48、72 h 时极显著低于对照组 ($P < 0.01$);实验组 II LSZ 活性先升后降,在 12、24 h 时酶活性显著高于对照组 ($P < 0.01$),但 72 h 时酶活性差异不显著 ($P > 0.05$),说明免疫剂在短时间内可提高溶菌酶活性;实验组 III LSZ 活性呈

现先降低,48 h 后升高的趋势,12~72 h 明显低于对照组 ($P < 0.01$),至 72 h 酶活性高于实验组 I ($P < 0.05$) (图 2)。

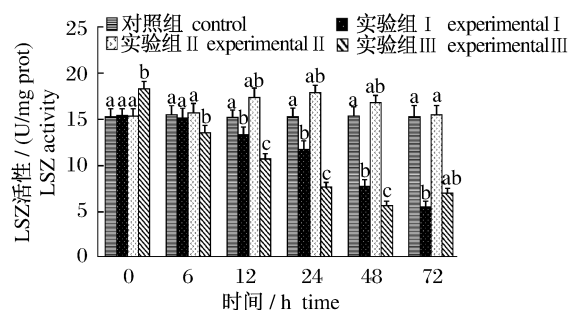


图 2 免疫多糖及 WSSV 对红螯光壳螯虾幼虾 LSZ 活性的影响

Fig. 2 Effects of immune polysaccharide and WSSV on LSZ activities in the hepatopancreas of *C. quadricarinatus*

2.3 免疫多糖及 WSSV 对红螯光壳螯虾幼虾 SOD 活性的影响

不同于 POD、LSZ 活性变化,实验组 I SOD 活性呈现先升后降的趋势,6、12 h SOD 活性显著高于其他 3 组 ($P < 0.01$),24~72 h SOD 活性降低,72 h 该酶活性明显低于对照组 ($P < 0.01$);实验组 II SOD 活性增强,24 h 酶活性极显著高于对照组 ($P < 0.01$),72 h 酶活性则显著高于对照组 ($P < 0.05$);实验组 III SOD 活性呈现降低趋势,6~12 h 与对照组差异不大,24~72 h 酶活性显著低于对照组 ($P < 0.01$),但 72 h 酶活性高于实验组 I ($P < 0.05$) (图 3)。

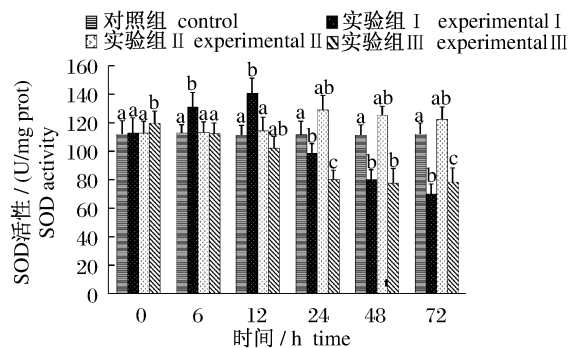


图 3 免疫多糖及 WSSV 对红螯光壳螯虾幼虾 SOD 活性的影响

Fig. 3 Effects of immune polysaccharide and WSSV on SOD activities in the hepatopancreas of *C. quadricarinatus*

2.4 免疫多糖及 WSSV 对红螯光壳螯虾幼虾 PO 活性的影响

实验组 I 幼虾 PO 活性呈现降低趋势,6 h 酶活性显著低于对照组 ($P < 0.05$),12、24、48、72 h 极显著低于对照组 ($P < 0.01$);实验组 II PO 活性呈现先升后降趋势,6、12、24 h 极显著高于对照组 ($P < 0.01$),48、72 h PO 活性降低,但仍高于对照组 ($P < 0.05$);实验组 III 随时间变化,PO 活性呈现先升后降的趋势,6、12 h 酶活性极显著高于对照组 ($P < 0.01$),24 h 后酶活性降低,72 h 极显著低于对照组 ($P < 0.01$),但酶活性均高于实验组 I,且差异显著 ($P < 0.05$) (图 4)。

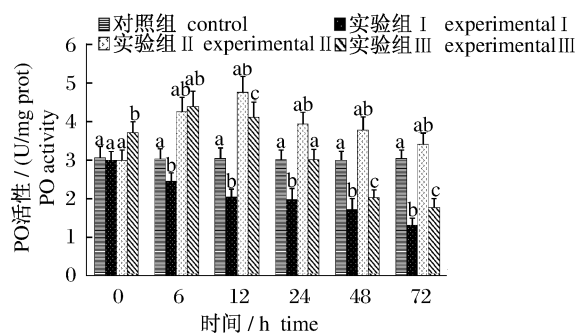


图 4 免疫多糖及 WSSV 对红螯光壳螯虾 PO 活性的影响

Fig. 4 Effects of immune polysaccharide and WSSV on PO activities in the hepatopancreas of *C. quadricarinatus*

2.5 免疫多糖及 WSSV 对红螯光壳螯虾幼虾肝胰腺超微结构的影响

对照组肝小管上皮细胞结构完整,细胞核内染色质均匀分布(图版-1),微绒毛排列紧密且整齐(图版-2),其内质网呈现扁平囊状(图版-3),线粒体呈椭球形,内嵴明显(图版-4)。与对照组相比,实验组肝小管上皮细胞的核膜破裂并出现异染色质化(图版-5),微绒毛受损,排列杂乱,边缘处断裂(图版-6),内质网断裂成片状,无明显的囊状结构(图版-7),线粒体畸变,线粒体膜边缘模糊,内嵴不明显(图版-8)。实验组 II 肝小管上皮细胞细胞核内染色质分布均匀(图版-9),微绒毛排列紧密,微绒毛附近有大量线粒体(图版-10),内质网结构完整,核糖体清晰可见(图版-11),线粒体形状规则(图版-12)。实验组 III 肝小管上皮细胞核肿胀,异染色质化明显(图版-13),微绒毛排列不整齐(图版-14),内质网水肿,部分断裂呈

片状(图版-15),线粒体形状不规则,细胞内有空泡化现象产生(图版-16)。

3 讨论

3.1 免疫多糖及 WSSV 对红螯光壳螯虾酶活性的影响

免疫系统防御能力的高低,直接影响水生生物体的抗病能力。利用免疫多糖提高水产养殖动物自身免疫功能,抵抗和预防传染性疾病,已被国内外众多学者所关注^[14-15]。肝胰腺是甲壳动物体内主要的解毒器官和脂肪存储器官,在一定程度上可抵御异物的侵染^[16],同时其 POD、LSZ、SOD、PO 与多种生理代谢和免疫反应有关,酶活力的大小在一定程度上可体现红螯光壳螯虾幼虾抗病力的强弱。

POD 是广泛分布于生物体内的重要酶类之一,参与多种生理代谢反应,对于防止生物分子损伤和增强机体免疫力有重要作用,因此用过氧化酶的活性可推断水生生物的生理状态^[17]。Sung 等^[18]用酵母中提取的 β -1,3-葡聚糖溶液浸泡斑节对虾,发现供试虾不仅对创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)有抗感染力,而且虾体内的 POD 活性明显上升。本实验中,红螯光壳螯虾幼虾注射免疫多糖刺激后,实验组 II 肝胰腺 POD 活性在 24、48 h 明显增加,但 72 h 酶活性趋于正常状态,略高于对照组 ($P > 0.05$),说明免疫多糖在短期内提高螯虾的抗病毒能力有显著作用。注射 WSSV 的实验组 I 幼虾酶活性明显降低,而先注射免疫多糖后注射 WSSV 的实验组 III 幼虾与实验组 I 相比,POD 活力显著高于实验组 I,也说明免疫多糖在一定程度上能够增加红螯光壳螯虾幼虾的免疫力。

LSZ 是重要的抗菌蛋白之一,可以溶解细菌细胞壁中的粘多糖,水解革兰氏阳性菌细胞壁中的乙酰氨基多糖,破坏和消除侵入虾体的异物,对致病菌有抑制作用^[19-20]。本实验人工注射免疫多糖后,螯虾肝胰腺 LSZ 活性升高,实验组 III 酶活性也高于实验组 I ($P < 0.05$)。其作用方式可能是酵母免疫多糖的细胞成分或者代谢产物刺激了红螯光壳螯虾幼虾非特异性免疫应答,促使溶菌酶的含量增加,溶菌酶活性增强,提高了幼虾的免疫能力。

当细菌、病毒等异物侵染甲壳动物体时,非特

异性免疫系统中的吞噬细胞会产生大量的自由基, SOD 具有消除自由基的功能,相应地 SOD 活性会提高^[21]。本实验在人工注射免疫多糖后,红螯螯虾幼虾体内 SOD 活力均有不同程度的升高,在 WSSV 感染下,实验组 I SOD 也呈现先升后降的特点,这种现象支持了 Stebbing^[22]所说的“毒物兴奋效应”,即在低浓度毒物胁迫下动物出现的免疫力增益现象,是机体一种保护性反应,但随着 WSSV 不断增殖,生物体抗氧化体系遭到破坏,酶活性持续降低,同时自由基不能及时清除,正常生理功能失调,螯虾的代谢功能和免疫功能衰退和紊乱,乃至死亡。72 h 实验组 I 酶活性显著低于对照组($P < 0.01$);实验组 II 与对照组相比,酶活性增加;实验组 III 与实验组 I 相比,酶活性也提高,进一步表明了人工注射免疫多糖能提高幼虾免疫相关酶活性,增加了螯虾幼虾的抗病力。

PO 是一种氧化还原酶,在甲壳动物体内以酚氧化物酶原的形式存在,在虾非特异性免疫系统中起重要的异物识别和防御功能^[23],能够被一些多糖或蛋白质激活而转变成活性的酚氧化物酶^[24]。酚氧化物酶激活系统对于抵抗病害,维持甲壳动物无菌性体液十分重要^[25]。本实验中螯虾在免疫多糖刺激下,实验组 II 肝胰腺的 PO 活性明显升高,而实验组 I PO 活性明显低于对照组,实验组 III 与实验组 I 相比,PO 活性则明显要高于实验组 I ($P < 0.05$)。以上研究结果说明免疫多糖可能激活了酚氧化物酶原系统,在一定程度上增强了幼体抵抗力,也能有效抑制 WSSV 的侵染。

3.2 免疫多糖及 WSSV 对红螯光壳螯虾幼虾肝胰腺超微结构的影响

红螯光壳螯虾幼虾肝胰腺由众多的肝小管组成,肝小管由基膜和上皮细胞组成,是消化系统的重要组成部分。肝胰腺细胞内粗面内质网发达,游离的核糖体和酶原颗粒具有蛋白合成、贮存作用^[26-27]。实验组 II 由于免疫多糖的作用使肝小管上皮细胞内粗面内质网核糖体增多,促进了消化酶的合成以及分泌等功能,在增强肝胰腺生理功能的同时,在一定程度上提高了幼虾的抗病能力;而受 WSSV 感染的实验组 I 螯虾幼虾肝小管上皮细胞细胞核破裂,内容物释放,线粒体畸变,粗面内质网断裂,使消化酶的合成受阻,同时微绒毛受损,减弱了肝胰腺分泌和对营养物质的吸收

功能,致使肝胰腺整体生理功紊乱或丧失,进而破坏整个有机体的代谢机能,使幼虾抵抗力下降,甚至死亡;实验组 III 的幼虾肝小管上皮细胞结构较完整,细胞核未见明显破裂现象,但粗面内质网水肿,细胞内有空泡化现象产生,说明肝胰腺的生理功能也已受到一定程度的影响,但影响程度要低于实验组 I。同时结合本研究酶活性测定结果,可以得出人工注射免疫剂能够提高幼虾抵抗力,对 WSSV 的侵染有一定的抵御作用。

参考文献:

- [1] 李红,孟凡丽,田华梅,等. 红螯螯虾人工养殖技术 [C]. 上海:上海市动物学会 1999 年年会论文集, 1999:116-119.
- [2] 潘晓艺,沈锦玉,曹铮,等. 红螯螯虾主要病害的研究进展[J]. 水产科学,2009,28(28):485-488.
- [3] 郝贵杰,沈锦玉,徐洋,等. WSSV 单抗的制备及其在红螯螯虾病毒病检测中的应用[J]. 集美大学学报:自然科学版,2009,14(2):120-125.
- [4] Zhan W B, Zhang L F, Wang Y H, et al. White spot syndrome virus (WSSV) infection to crabs [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2000,39:153-158.
- [5] 闰冬春. 对虾白斑综合征病毒(WSSV)宿主研究进展[J]. 海洋湖沼通报,2007(1):136-140.
- [6] 李一宁,梁艳,黄捷,等. 对虾白斑综合征病毒分子致病机制的研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(7):3533-3536.
- [7] 李奕雯,曹煜成,李卓佳,等. 养殖水体环境与对虾白斑综合症关系的研究进展[J]. 海洋科学进展, 2008,26(4):532-538.
- [8] 雷质文,黄捷,杨冰,等. 感染白斑综合症病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究[J]. 中国水产科学,2001,8(4):46-51.
- [9] 宋之琦,潘亚均,杨庆,等. 免疫多糖及有益微生物制剂在南美白对虾红体综合症及病害防治中的初步应用[J]. 现代渔业信息,2007,22(11):18-20.
- [10] 仲伟静,王安利. 对虾免疫多糖的研究进展[J]. 水产科学,2009,28(8):482-484.
- [11] Hou W Y, Chen J C. The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005,19(2):127-138.
- [12] 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.

- [13] Ashida M. Purification and characterization of prephenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1971, 144(2): 749-762.
- [14] 王雷, 李光友, 毛远兴, 等. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J]. 海洋与湖沼, 1994, 25(5): 486-491.
- [15] 王国霞, 黄艳华, 周晔, 等. 乳酸菌对凡纳滨对虾幼虾生长性能、消化酶活性和非特异性免疫的影响[J]. 动物营养学报, 2010, 22(1): 228-234.
- [16] Gimenez AV F, Fenucci J L, Petriella A M. The effect of vitamin E on growth, survival and hepatopancreas structure of the Argentine red shrimp *Pleoticus muelleri* Bate (Crustacea, Penaeidea) [J]. Aquaculture, 2004, 35(12): 1172-1178.
- [17] 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): 652-654.
- [18] Sung H H, Yang Y L, Song Y L, et al. Enhancement of microbidalacity in the tiger-shrimp *P. monodon* via immunostionmulation [J]. Journal of Crustacean Biology, 1996, 16(2): 278-284.
- [19] 李光友, 王青. 中国对虾血细胞及其免疫研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26(6): 591-596.
- [20] 刘树清, 江晓路, 牟海津, 等. 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.
- [21] 姚翠鸾, 王维娜, 王安利. 水生动物体内超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 海洋科学, 2003, 27(10): 18-21.
- [22] Stebbing A R D. Hormesis—The stimulation of growth by low levels of inhibitors [J]. Science of The Total Environment, 1982, 22(1): 213-234.
- [23] Ashida M, Soderhll K. The prophenoloxidase activating system in crayfish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 1984, 77(1): 21-26.
- [24] Sritunyalucksana K, Sithisarn P, Withayachumnarnkul B, et al. Activation of prophenoxoxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999(9): 21-30.
- [25] 孟凡伦, 张玉臻, 孔健, 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): 110-115.
- [26] 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.
- [27] Vogt G, Storch V, Quinito E T, et al. Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diets in *Penaeus monodon* (Decapoda) [J]. Aquaculture, 1985, 48(1): 1-12.

WSSV stress on the immunoe-related enzyme and ultrastructure of hepatopancreas in juvenile *Cherax quadricarinatus*

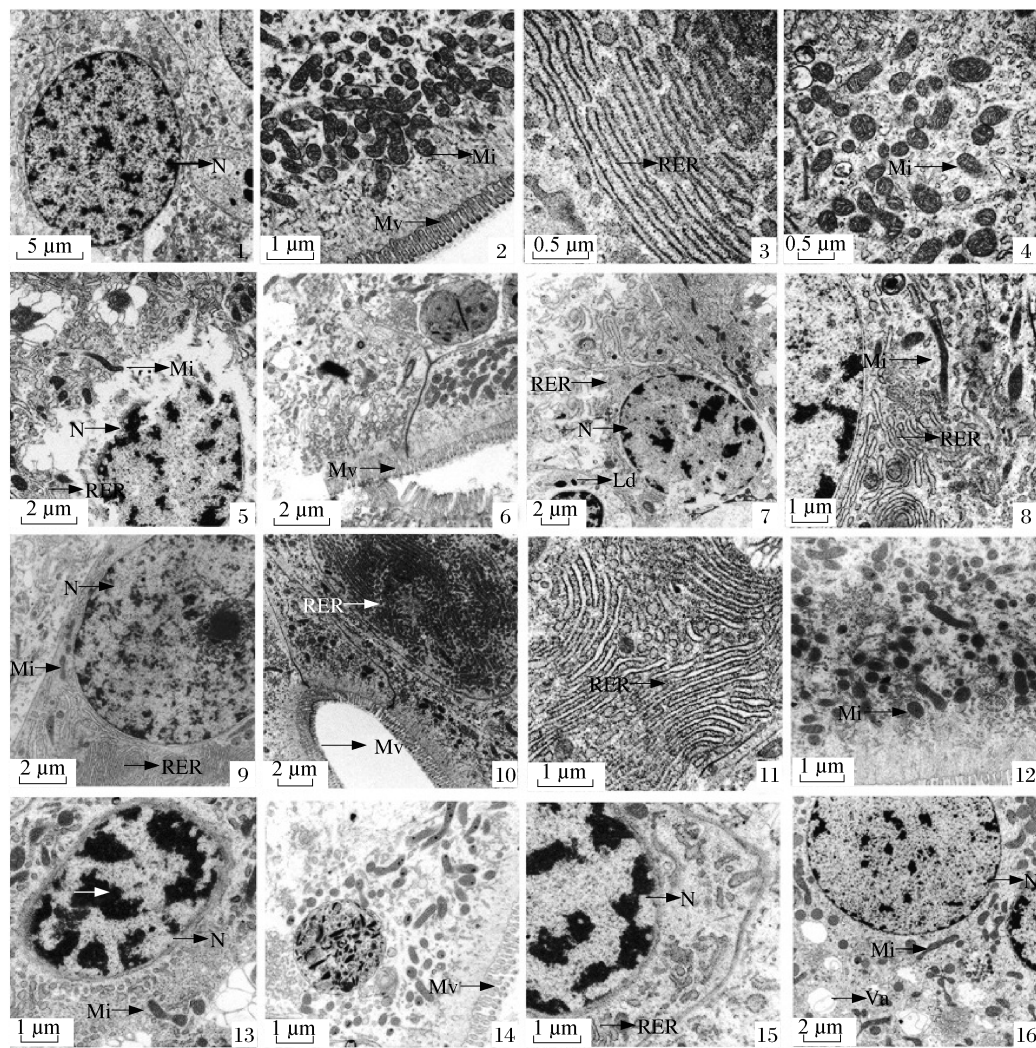
ZUO Di, WANG Dan-li, SUN Ting, WANG Lan-mei, ZHAO Yun-long*

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: In present study, the enzymatic activities of the peroxidase (POD), lysozyme (LSZ), superoxide dismutase (SOD) and phenoloxidase (PO) have been monitored by use of biochemical techniques. Meanwhile, the transmission electron microscopy (TEM) method has been applied to compare the morphological changes in hepatopancreas of juvenile redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, under two experimental conditions: one manual injection of immune polysaccharide; two White Spot Syndrome Virus (WSSV) stress exposure. Four experimental groups have been set up in this study: control group [with PBS (pH 7.4) injection]; experimental group I (with WSSV injection); experimental group II (with immune polysaccharides injection); experimental group III (with immune polysaccharides injection first and with WSSV injection after 48 hours). The results of biochemical studies showed that: in comparison with the control group, the activities of POD, PO, LSZ in experimental group I were decreasing significantly ($P < 0.01$) in 72 hours. In contrast, the activity of SOD in experimental group I was increasing first and then decreasing, the enzyme activity was significantly lower ($P < 0.01$) in 72 hours; in the experimental group II, the enzymatic activities of POD, PO, LSZ, SOD were all increasing first and then decreasing. Their enzymatic activities were all higher than the control group ($P < 0.05$). In detail, the SOD and LSZ activity reached the threshold after 24 hours immune polysaccharide injection, the POD had the highest activity in 48 hours, the maximum activity of PO reached after 12 hours injection; experimental group III, the enzymatic activities of POD, PO, LSZ, SOD were all higher than experimental group I ($P < 0.05$) after 72 hours exposure. However, in comparison with the control group, the SOD, POD, LSZ activities were decreasing, with only PO enzymatic activity increasing first and then decreasing, four enzymes, activities were all decreasing significantly ($P < 0.01$) in 72 hours in contrast with the control group. Four enzymatic activities in experimental group II is greater than control group and enzyme activity in experimental group III is greater than experimental group I and this proves a direct evidence that the immune polysaccharide injection can improve the resistance of juvenile prawn to WSSV and be able to actively suppress the infection with WSSV. Moreover, the morphological study in hepatopancreas of *C. quadricarinatus* showed that: in control group, the hepatopancreas is composed of liver-tubules, the liver-tubules is made up of simple columnar epithelium cells and basement layers, with the simple columnar epithelial cells the neat microvilli on the surface and the liver-tubules epithelial cells structurally-complete. In experimental group I, the mitochondria were seriously harmed and had abnormality; the karyotheca disassembly, substance external flow in nucleolus and cell nucleus become torn, at the same time the cell nucleus had the chromosome heterochromatin phenomenon. In addition, more serious of the rough endoplasmic reticulum becoming split liminated structure and ribosome is to reduce in experimental group I; In experimental group II, the cell nucleus chromatin uniform distribution on the rough endoplasmic reticulum (RER) ribosome showed an increase; In experimental group III, RER become tumescence and few split. Meanwhile, the number of vesica increased, and the vacuole were also found increased. Certain portion of mitochondria turned into abnormality, regular ellipse or length structure mitochondria develop into irregular. Our results indicate that WSSV stress can damage the ultrastructure of hepatopancreas in juvenile *C. quadricarinatus*, and further influence the normal physiological function of *C. quadricarinatus*. Present study by biochemical techniques and TEM method further shows that the immune polysaccharides can promote the resistance of juvenile prawn to the WSSV infection.

Key words: *Cherax quadricarinatus*; hepatopancreas; enzymatic activity; ultrastructure; white spot syndrome virus (WSSV)

Corresponding author: ZHAO Yun-long. E-mail: ylzhao@bio.ecnu.edu.cn



图版 WSSV 对红螯光壳螯虾幼虾肝胰腺超微结构的影响

1. 对照组肝小管上皮细胞结构完整; 2. 对照组肝小管上皮微绒毛排列整齐; 3. 对照组肝小管上皮细胞内质网呈扁平囊状; 4. 对照组肝小管上皮线粒体呈椭球状; 5. 实验组 I 肝小管上皮细胞, 核膜破裂; 6. 实验组 I 肝小管上皮细胞微绒毛排列杂乱; 7. 实验组 I 肝小管上皮细胞内质网断裂; 8. 实验组 I 肝小管上皮细胞线粒体畸变; 9. 实验组 II 肝小管上皮细胞染色质分布均匀; 10. 实验组 II 肝小管上皮细胞微绒毛排列整齐; 11. 实验组 II 肝小管上皮细胞内质网上附着大量核糖体; 12. 实验组 II 肝小管上皮细胞线粒体形状规则; 13. 实验组 III 肝小管上皮细胞异染色质化严重, 白色箭头示异染色质化; 14. 实验组 III 肝小管上皮微绒毛排列不整齐; 15. 实验组 III 肝小管上皮细胞内质网部分断裂; 16. 实验组 III 肝小管上皮细胞空泡化出现。

Ld: 脂滴; Mi: 线粒体; Mv: 微绒毛; N: 细胞核; Va: 空泡; RER: 粗面内质网。

Plate WSSV stress on the ultrastructure of hepatopancreas in juvenile *C. quadricarinatus*

1. The liver-tubules epithelial cells in control group structurally-complete; 2. In control group the liver-tubules epithelial cells with neat microvilli were on the surface; 3. The liver-tubules epithelial cells endoplasmic reticulum make up of tubular channels and flattened sacs in control group; 4. The liver-tubules epithelial cells in control the mitochondria is spheroidicity; 5. The liver-tubules epithelial cells in experimental group I cells nucleus broken; 6. In experimental group I irregularity microvilli were on the liver-tubules epithelial cells surface; 7. The liver-tubules epithelial cells RER were rupture in experimental group I; 8. In experimental group I the mitochondria become abnormality at liver-tubules epithelial cells; 9. In experimental group II the chromatin uniform distribution in nucleus; 10. In experimental group II the liver-tubules epithelial cells with neat microvilli were on the surface; 11. The rough endoplasmic reticulum (RER) were found gathered at liver-tubules epithelial cells in experimental group II and attachment a great deal ribosomal; 12. The mitochondria shape regular in experimental group II at liver-tubules epithelial cells; 13. The nucleus n appearance serious heterochromatin phenomena at liver-tubules epithelial cells in experimental group III the arrowhead of white express heterochromatinization; 14. In experimental group III liver-tubules epithelial cells microvilli rank of irregularity; 15. In experimental group III liver-tubules epithelial cells a portion RER rupture; 16. The liver-tubules epithelial cells in experimental group III show itself the vacuole.

Ld: lipid droplet; Mi: mitochondria; Mv: microvilli; N: nucleus; Va: vacuole; RER: rough endoplasmic reticulum.