

低剂量对虾白斑综合征病毒粗提液对斑节对虾体内 潜伏期病毒及血细胞的影响

张涛^{1,2}, 郭志勋¹, 黄建华¹, 杨丽诗¹, 温为庚¹, 杨其彬¹, 江世贵^{1*}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东省渔业生态环境重点实验室,

农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 利用含 3×10^3 、 6×10^2 、 2×10^2 copies/mL 的对虾白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 粗提液和 PBS 液人工注射感染携带病毒量约 1×10^5 copies/g 的斑节对虾, 通过实时定量 PCR 法、显微镜观察法研究了感染后斑节对虾发病死亡率、肌肉内 WSSV 含量及总血淋巴细胞数和不同种类血细胞的比例组成变化。结果表明, 3 种浓度下斑节对虾累积死亡率分别为 $93.33\% \pm 2.89\%$ 、 $56.67\% \pm 5.77\%$ 和 $45.00\% \pm 5.00\%$, 对照组没有发生死亡。注射 3×10^3 copies/mL 的浓度组, 在注射后 30 min 时, 对虾肌肉内的病毒含量达到最低值 (3.54×10^4 copies/g), 而后持续上升至 48 h 时达到最高值 (3.12×10^8 copies/g) 后再次下降; 另两个感染组, 在注射后 1 h 时, 肌肉内病毒含量达到最低值 (分别为 1.11×10^5 、 9.54×10^4 copies/g), 在感染后 6 h 时出现一个次高值 (分别为 1.58×10^5 、 1.11×10^5 copies/g), 而后又降低, 在 48 h 时达到最高值 (分别为 1.48×10^7 、 5.46×10^6 copies/g) 后下降; 对照组对虾肌肉内病毒含量没有出现显著变化。不同感染浓度组, 斑节对虾总血淋巴细胞数波动幅度和出现峰值的时间不同, 特别是注射 3×10^3 copies/mL 组, 对虾总血淋巴细胞数在 12 和 48 h 时出现极低值 (分别为 3.48×10^6 、 4.05×10^6 /mL); 3 个感染组除个别时间点外, 对虾总血淋巴细胞数的变化规律与肌肉中 WSSV 的扩增规律成负相关。4 个处理组, 半粒细胞比例在感染初期呈现明显上升的趋势, 后期比例虽有起伏但均维持在较高水平; 颗粒细胞和透明细胞比例在感染初期均呈现明显下降的趋势, 中期均略有上升, 但后期颗粒细胞比例显著低于初期, 而透明细胞比例则与初期无显著性差异。

关键词: 斑节对虾; 白斑综合征病毒; 低剂量感染; 死亡率; 实时定量 PCR; 血淋巴细胞

中图分类号: Q 175; S 945.1

文献标志码: A

对虾白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 是对全球对虾养殖业危害最大的病原之一^[1]。1992 年首次在台湾发现这种病毒, 随后在马来西亚、印度尼西亚、泰国、日本、菲律宾、韩国及美国部分地区也相继发现类似病害^[2-5]。WSSV 宿主广泛, 传染性强, 致病率高, 7~10 d 致对虾死亡率高达 80%~100%^[6]。仅 WSSV 爆发的十年内所造成的经济损失就高达 700 亿美元, 严重危害着对虾养殖业的发展^[7-8]。

研究发现对虾白斑综合征的爆发与对虾体内 WSSV 含量密切相关。Durand 等^[9]用注射剂量为 1×10^4 和 1×10^5 copies WSSV 以及浸泡剂量为 1×10^5 copies WSSV 感染对虾时发现, 只有当对虾体内病毒浓度达到一定数量时, 如凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 为 1.6×10^6 copies/ng DNA、细角滨对虾 (*Penaeus stylirostris*) 为 $4.3 \times 10^6 \sim 3.0 \times 10^7$ copies/ng DNA、斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 为 2.1×10^3 copies/ng DNA

收稿日期: 2011-12-05 修回日期: 2012-02-20

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-47); 广东省海洋渔业科技推广专项 (A201101B03); 农业部“九四八”计划资助项目 (2010-Z10)

通讯作者: 江世贵, E-mail: jiangsg@21cn.com

时对虾才会死亡;当体内病毒量低于相应数值时,对虾不会死亡,仍可正常生长且不表现任何临床症状。简旭凤^[10]报道对虾感染 10^{-1} WSSV 粗提液后死亡时携带病毒的数量超过 1×10^5 copies/g。孙成波等^[11]用 6.0×10^4 、 1.2×10^4 、 6.0×10^3 copies WSSV 注射凡纳滨对虾和斑节对虾,发现不同死亡时间两种对虾携带病毒量的范围为 $1.6 \times 10^5 \sim 4.3 \times 10^8$ copies/g。孟宪红等^[12]在分析“黄海 2 号”投喂感染 WSSV 后体内病毒量变化时发现,当病毒量低于 10^5 copies/ng DNA 时不会导致“黄海 2 号”中国对虾死亡。

携带少量 WSSV 的对虾不会死亡,对虾在自然状态下广泛存在 WSSV 潜伏感染。有学者^[13-14]采用巢氏 PCR 检测技术对斑节对虾和凡纳滨对虾养殖池进行监测,发现第一步 PCR 为阴性而第二步 PCR 为阳性的个体所在池塘均能成功养殖至商品规格。邱德全等^[15]利用 2 步 PCR 技术对广东湛江和阳西地区 32 家养殖场的斑节对虾虾苗进行了 WSSV 检测,结果有 25% 的虾苗携带病毒。雷质文等^[16]从不同发病状态的养殖池随机采集中国对虾,运用斑点杂交和组织病理学方法研究发现,在未发病池对虾中 91.1% 处于潜伏感染、发病池幸存个体的 96.5% 处于潜伏感染、发病后幸存虾池的 15.6% 个体处于潜伏感染。孙成波等^[17]报道养殖过程中凡纳滨对虾 WSSV 携带量最高为 9.7×10^5 copies/g,斑节对虾最高携带量为 9.5×10^5 copies/g,但是没有爆发白斑综合征。

低度感染 WSSV 状态下并不一定引起对虾爆发性死亡,携带少量病毒的对虾能够继续生存;研究报道^[18],环境因素(如水体温度、盐度、溶氧、氨氮、pH 以及台风等)的改变能够诱发携带 WSSV 的对虾白斑综合征的爆发,但是携带 WSSV 的对虾二次低剂量感染该病毒所出现的结果尚未见报道。本实验研究了低剂量对虾白斑综合征病毒粗提液对斑节对虾体内潜伏期 WSSV 的影响以及发病早期斑节对虾总血淋巴细胞数和不同种类血细胞的比例组成变化。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验在南海水产研究所三亚热带水产研究中心陵水站完成。实验用斑节对虾购自海南省三亚某养虾池塘,体长为 (15.07 ± 1.31) cm,体质量为

(20.08 ± 2.56) g,经荧光定量 PCR 检测发现对虾体内携带约 1×10^5 copies/g 的白斑综合征病毒。对虾购回后在 1 000 L 的桶中暂养 1 周,暂养期间对虾活力正常,没有出现死亡。实试验期间水温为 $28.5 \sim 30.5$ °C,盐度为 $30.0 \sim 32.0$,pH 为 $7.8 \sim 8.2$,溶氧为 $6.6 \sim 7.0$ mg/L。

1.2 病毒注射液制备及定量

取症状明显的斑节对虾作为病原(PCR 检测阳性,超低温保存),实验前取其肌肉组织 0.1 g,加入 1 mL PBS(136.9 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10.1 mmol/L Na_2HPO_4 , 1.8 mmol/L K_2HPO_4 ,pH 为 7.4)冰浴研磨, $10\ 000$ r/min 离心 20 min 后取上清液系列稀释至 10^{-9} , 0.45 μm 滤膜过滤。病毒稀释液部分用于注射,部分于 -20 °C 冷冻保存。荧光定量 PCR 检测发现实验所用 3 个浓度 WSSV 注射液的病毒浓度分别为 3×10^3 、 6×10^2 和 2×10^2 copies/mL,感染浓度相当于 7.5、1.5、0.5 copies/g 对虾组织。

1.3 实验分组及取样

实验分为观察组和取样组,均设 3×10^3 、 6×10^2 和 2×10^2 copies/mL 及 PBS 4 个处理组,每尾虾的注射量为 50 μL ,保持正常日常管理。观察组每个处理 3 个平行,每个平行 20 尾虾,用于记录实验对虾的死亡情况;取样组每个处理注射 120 尾对虾,在注射后 15、30 min、1、3、6、12、24、48、72 h 分别用 1 mL 注射器在对虾围心腔处取血并注入装有抗凝剂(19.3 mmol/L 柠檬酸钠, 239.8 mmol/L NaCl, 182.5 mmol/L 葡萄糖, 6.2 mmol/L EDTA,pH 为 7.3)的 1.5 mL 离心管中(取血前称取空离心管及装有抗凝剂的离心管的质量),取血后称取含血淋巴的离心管的总质量,以确定血淋巴的含量^[19]。每个处理组各个采样点各取 8 尾虾,血样保存于 4 °C 冰箱。取血后的对虾编号保存于 -20 °C 冰箱,运回实验室后保存于 -80 °C,做病毒定量检测。

1.4 WSSV 的实时定量 PCR 检测

标准品的制备 参照孙双双等^[20]的方法制备重组质粒标准品,用核酸分析仪测定重组质粒的 DNA 浓度,根据拷贝数公式计算重组质粒的拷贝数。

拷贝数公式为拷贝数(copies/ μL) = 质粒浓度($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) $\times 10^{-6}$ \times 阿伏加德罗常数/重组质粒分子量。式中,阿伏加德罗常数为 6.02×10^{23} ,重

组质粒的分子量 = 一个碱基对的平均分子量 (660 g/mol) × 重组质粒的总长度 (bp)。

将标准品进行 10 倍系列梯度稀释, 最终稀释到 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10$ copies/ μL 8 个浓度。

WSSV 引物和 Taqman 探针 参照 Sritunyalucksana 等^[21]的方法, 在上海生物工程有 限公司合成 WSSV 引物和 Taqman 探针。

real-time PCR 循环参数 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 共进行 40 个循环。

1.5 总血淋巴细胞数和种类组成

总血淋巴细胞数 用血球计数板计数总血 淋巴细胞数 (total haemocyte count, THC)。每尾 虾血样计数 4 次, 取平均值。

总血淋巴细胞数 (/mL) = $N \times 10^4 \times n$ 。式 中, N : 中央大方格的总数 (即 0.1 μL 的总数); $N \times 10^4$: 1 mL 的总数; n : 血淋巴的稀释倍数。

血淋巴细胞种类组成 血淋巴细胞用含 4% 福尔马林的抗凝剂固定, 4 °C, 3 000 r/min 离 心 10 min, 用抗凝剂重新悬浮至 10^6 /mL, 转移到 微孔载玻片上, 保湿盒内 4 °C 保温 1 h 使血细胞 附着, 倒掉上清液, 用 PBS 缓冲液洗涤、风干, H. E 染色, 光镜观察 ($\times 1\ 000$)。参照郭志勋等^[19] 的方法计数 3 种血细胞的数量, 每孔数 200 个细 胞, 计算 3 种血细胞占总淋巴细胞数的比例。

1.6 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计分 析, 采用 One-Way ANOVA 对实验结果进行方差分 析, 采用 Duncan 法进行多重比较, 取 $P < 0.05$ 为差

异显著性水平, 在 Excel 2007 上绘制相关图表。

2 结果

2.1 标准曲线的绘制

8 个浓度标准品的 RT-PCR 产物荧光吸收皆 呈现典型的“S”形扩增曲线, 由回归方程可见, 起 始模板浓度与循环数 (C_i) 值之间呈现良好的线 性关系, 相关系数 $R^2 = 0.999$, 实验数据满足衰减 的线性程度 (图 1)。

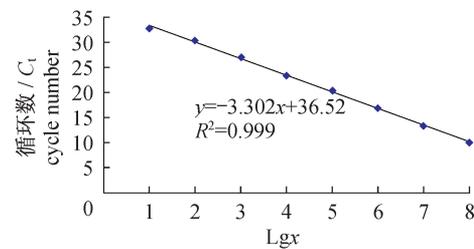


图 1 重组质粒的标准曲线

x 标准品的浓度为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10$ copies/ μL 。

Fig. 1 Standard curve of recombinant plasmid

$\times 1 \times 10^8 \sim 1 \times 10$ copies/ μL standard.

2.2 斑节对虾感染 WSSV 后的发病规律

人工感染 24 h 后, 部分对虾活力减弱, 离群孤 游, 对外界的刺激反应迟钝; 感染 30 h 后部分对 虾出现侧躺, 触碰仍可缓慢游动, 出现死亡迹象; 感 染 50 h 后, 部分虾体变红, 头胸甲膨大易剥离, 血 液变稀, 血凝力下降, 出现死亡高峰, 部分对虾有 明显的症状; 感染 60 h 以后的对虾, 通体伴有明显 的白斑。对照组对虾活动正常, 没有出现死亡。

如图 2 和图 3 所示, 3 个 WSSV 感染浓度下 斑节对虾都出现了两个死亡高峰, 其中 3×10^3

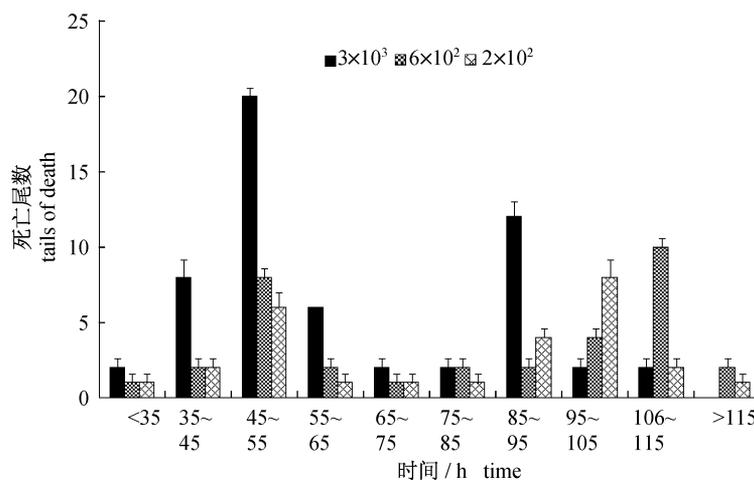


图 2 3 种 WSSV 浓度感染下斑节对虾的死亡情况

Fig. 2 The death number of *P. monodon* post infection with three dosage of WSSV solution

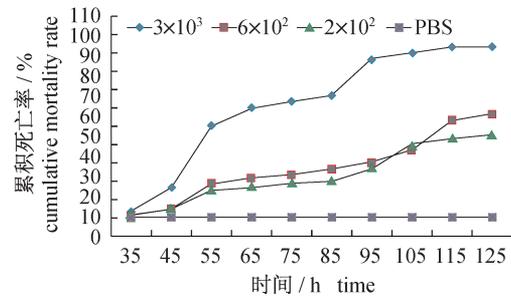


图3 感染不同浓度的 WSSV 后斑节对虾的累积死亡率
Fig. 3 Cumulative mortality of *P. monodon* after injection with different dosage of WSSV solution

copies/mL 浓度组,对虾在第 45~55 小时出现第一个死亡高峰,死亡率为 $33.33\% \pm 2.89\%$;第 85~90 小时出现第二个死亡高峰,死亡率为 $20.00\% \pm 5.00\%$,以后逐渐降低,总累积死亡率为 $93.33\% \pm 2.89\%$ 。 6×10^2 copies/mL 浓度组,对虾在第 45~55 小时出现第一个死亡高峰,死亡率为 $13.33\% \pm 2.89\%$;第 105~115 小时出现第二个死亡高峰,死亡率为 $16.66\% \pm 2.89\%$,以后逐渐降低,总累积死亡率为 $56.67\% \pm 5.77\%$ 。 2×10^2 copies/mL 浓度组,对虾在第 45~55 小时出现第一个死亡高峰,死亡率为 $10.00\% \pm 5.00\%$;第 95~105 小时出现第二个死亡高峰,死

亡率为 $13.33\% \pm 5.77\%$,以后逐渐降低,总累积死亡率为 $45.00\% \pm 5.00\%$ 。3 个 WSSV 感染浓度之间对虾总累积死亡率差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 感染 WSSV 后不同时间斑节对虾肌肉内病毒含量

如图 4 所示,3 个感染 WSSV 浓度组,对虾肌肉内 WSSV 含量均出现先降低再升高的趋势,都在感染后 48 h 时达到最大值,与同组中其他时间点 WSSV 含量存在显著差异 ($P < 0.05$),然后又降低。 3×10^3 copies/mL 浓度组,对虾肌肉内的病毒含量在注射后 30 min 时,达到最低值 (3.54×10^4 copies/g, $P < 0.05$),而后持续上升至 48 h 时达到最高值 (3.12×10^8 copies/g) 后再次下降;而 6×10^2 和 2×10^2 copies/mL 两个浓度组,在感染后 1 h 时肌肉内病毒含量出现最低值 (1.11×10^5 、 9.54×10^4 copies/g),6 h 时出现一个次高值 (1.58×10^5 、 1.11×10^5 copies/g) 后又降低,48 h 时达到最高值 (1.48×10^7 、 5.46×10^6 copies/g) 后下降;对照组对虾肌肉内病毒含量没有出现显著变化 ($P > 0.05$)。濒死对虾肌肉内病毒含量为 $(8.87 \pm 3.25) \times 10^{10}$ copies/g,而存活对虾为 $(3.35 \pm 1.85) \times 10^6$ copies/g。

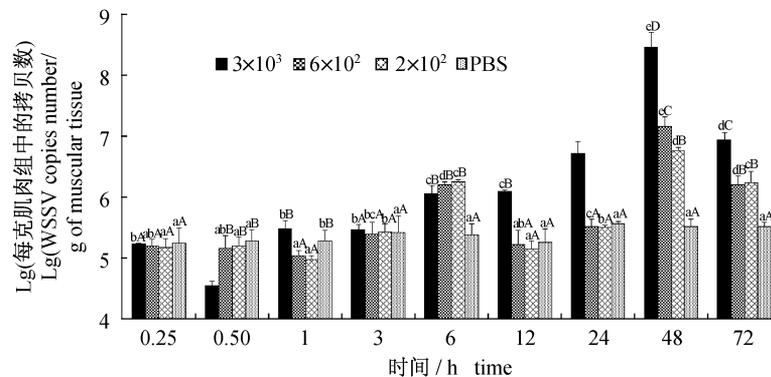


图4 感染不同浓度的 WSSV 后不同时间斑节对虾肌肉内病毒含量

不同小写字母表示同一 WSSV 浓度下不同时间点时 WSSV 含量差异显著, $P < 0.05$; 不同大写字母表示同一时间点不同 WSSV 浓度间 WSSV 含量差异显著, $P < 0.05$; 图中数值为 Lg(WSSV 含量)。

Fig. 4 The WSSV quantity of *P. monodon* at different time post-injection with different dosage of WSSV solution

Different small letters mean the same WSSV concentrations at different time points, WSSV quantity significant proportion, $P < 0.05$; Different letters indicate the same time points between different WSSV concentration significant WSSV quantity, $P < 0.05$; numerical value in the figure is Lg(WSSV quantity).

2.4 斑节对虾感染 WSSV 后的总血淋巴细胞数变化

如图 5 所示, 3×10^3 和 6×10^2 copies/mL 两个浓度组的总血淋巴细胞数起初较为稳定,3 h 时

出现低峰值 (9.66×10^6 、 7.07×10^6 /mL), 随后逐渐上升至 6 h 后波动规律出现差异; 3×10^3 copies/mL 浓度组在 12 h 和 48 h 时出现两个最低值 (3.48×10^6 、 4.05×10^6 /mL), 而 6×10^2

copies/mL 浓度组 12 h 后持续上升至 48 h 后下降; 2×10^2 copies/mL 浓度组总血淋巴细胞数在 1 h 时出现最低值 (1.09×10^7 /mL), 后逐渐上升至 24 h 后下降。注射 PBS 的对照组总血淋巴细胞数起初较为稳定, 在 1 h 时出现最低值 (1.01×10^7 /mL), 而后起伏上升至 48 h 时达到最大值后

下降。3 个感染 WSSV 浓度组, 总血淋巴细胞数的变化规律与 WSSV 的扩增规律存在一定的关系; 3×10^3 copies/mL 浓度组除 6 和 24 h 外, 6×10^2 copies/mL 浓度组除 48 h 外, 2×10^2 copies/mL 浓度组除 24 h 外, 总血淋巴细胞数的变化规律与 WSSV 的扩增规律成负相关。

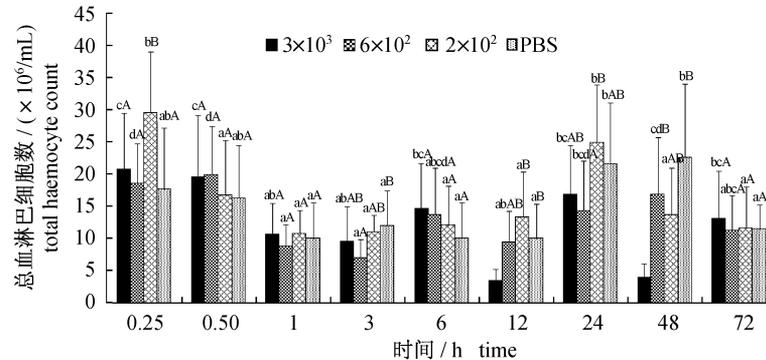


图5 感染不同浓度的 WSSV 后不同时间斑节对虾总血淋巴细胞数变化

不同小写字母表示同一 WSSV 浓度下不同时间点时总血淋巴细胞数差异显著, $P < 0.05$; 不同大写字母表示同一时间点不同 WSSV 浓度间总血淋巴细胞数差异显著, $P < 0.05$ 。

Fig. 5 THC variation of *P. monodon* at different time post-injection with different dosage of WSSV solution

Different small letters mean the same WSSV concentrations different time points, THC significant proportion, $P < 0.05$; Different letters indicate the same time points between different WSSV concentration significant THC, $P < 0.05$.

2.5 斑节对虾感染 WSSV 后的血淋巴细胞种类组成变化

如图 6 所示, 感染不同浓度的 WSSV 后, 斑节对虾不同种类的血淋巴细胞占总细胞数的比例呈现不同的变化规律。以半粒细胞所占比例最大, 其在 3×10^3 copies/mL 浓度组和 PBS 组初期呈现明显上升的趋势, 后期比例虽有起伏但均维持在较高水平; 而 6×10^2 和 2×10^2 copies/mL 浓度组初期均显著上升, 达到高值后均出现波动, 但其在不同组之间的波动幅度与出现峰值的时间不同。除 6×10^2 copies/mL 浓度组外, 其余组 72 h 时对虾半粒细胞比例均显著高于初期水平 ($P < 0.05$)。

粒细胞比例在 3×10^3 copies/mL 浓度组和 PBS 组初期均显著下降, 后期 3×10^3 copies/mL 浓度组出现小幅波动后逐渐上升至 24 h 后下降, 而 PBS 组在 6 h 出现了极低值后显著上升至 12 h 后下降; 而在 6×10^2 和 2×10^2 copies/mL 浓度组初期略微上升后下降, 6×10^2 copies/mL 浓度组在 12 h 达到高值后下降, 而 2×10^2 copies/mL 浓度组分别在 12 h 和 48 h 时出现高值。4 个处理组 72 h 时粒细胞比例均显著低于初期水

平 ($P < 0.05$)。

3 个注射 WSSV 组和 PBS 组透明细胞的比例初期均显著下降, 随后出现波动, 但不同组的波动幅度和出现峰值的时间不同。除 3×10^3 copies/mL 外, 其余 3 组 72 h 时 4 个处理组透明细胞比例均与初期水平差异不显著 ($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 低剂量 WSSV 粗提液对潜伏期斑节对虾死亡及体内 WSSV 增殖的影响

研究表明^[13-17], WSSV 可以在对虾体内潜伏感染, 携带少量病毒的对虾可以继续生存而不引起爆发性死亡。潜伏感染是病毒感染的一种静止状态, 当对虾因受到外源刺激而引发机体免疫反应时, 可能会引起对虾体内病毒扩增而发病, 并且有助于病毒的传播。本实验人工感染斑节对虾的 WSSV 浓度为 7.5、1.5、0.5 copies/g, 相对于实验对虾本身的病毒携带量 10^5 copies/g 至少低 10 000 倍, 但如此低剂量的 WSSV 却引起了实验斑节对虾死亡, 作者认为低剂量的 WSSV 粗提液感染可能打破了对虾体内潜伏感染的平衡状态。而对虾体内病毒的增殖是由低剂量的 WSSV 激

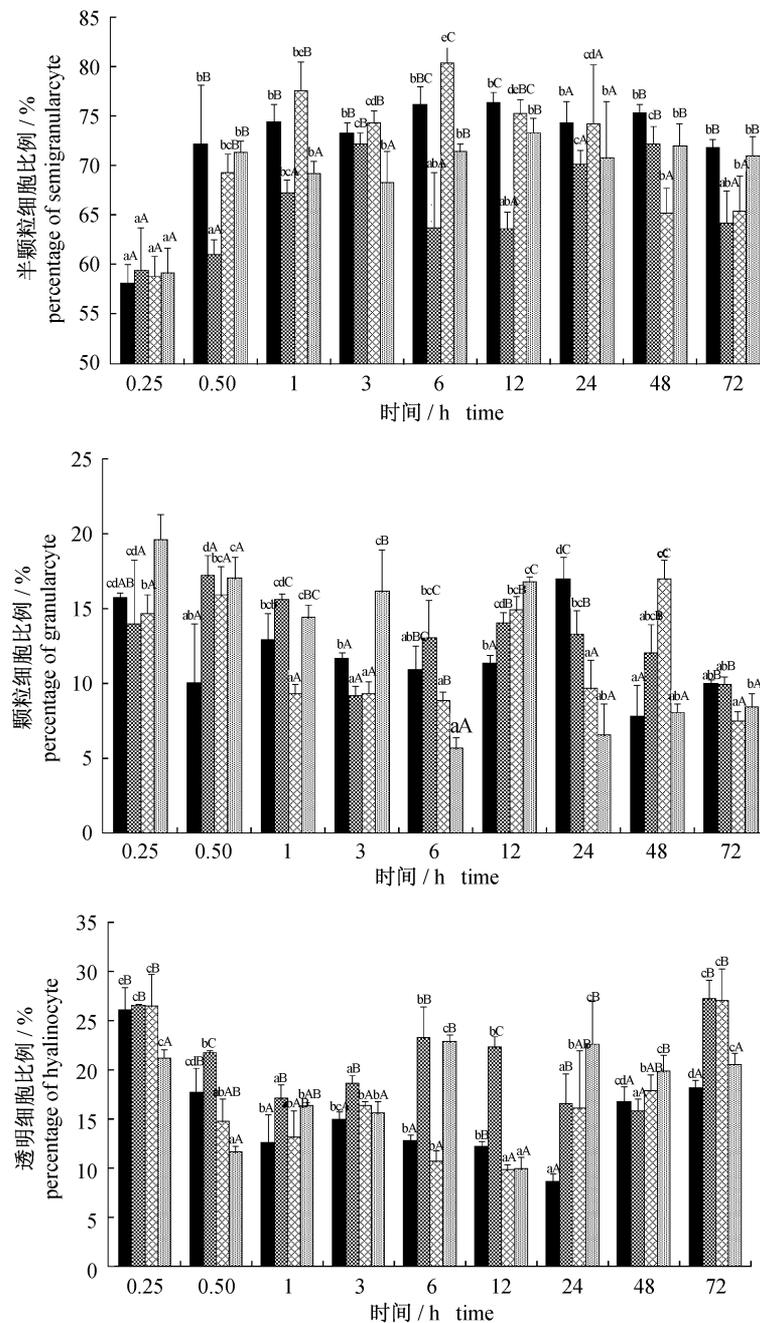


图 6 感染不同浓度的 WSSV 后不同时间斑节对虾血淋巴细胞种类组成变化

不同小写字母表示同一 WSSV 浓度下不同时间点时血淋巴细胞比例差异显著, $P < 0.05$; 不同大写字母表示同一时间点不同 WSSV 浓度间血淋巴细胞比例差异显著, $P < 0.05$ 。

Fig. 6 The percentage variation of different types of haemocyte of *P. monodon* at different time post-injection with different dosage of WSSV solution

Different small letters mean the same WSSV concentrations different time points, blood lymphocytes significant proportion, $P < 0.05$; Different letters indicate the same time points between different blood lymphocytes WSSV concentration significantly different proportion, $P < 0.05$.

活了体内携带病毒的扩增还是抑制了对虾的免疫机能所致,抑或是二者兼而有之尚有待进一步研究。

3 种低剂量的 WSSV 感染时斑节对虾均出现了两个死亡高峰。低剂量感染 WSSV 后,对虾体内病毒含量在 45 ~ 55 h 增殖到最大峰值,此时体

质相对较弱的对虾率先死亡,出现第一个死亡高峰;之后体质较强的对虾机体免疫系统与 WSSV 继续互相作用,最终部分对虾机体内 WSSV 的破坏占据主动,出现第二个死亡高峰,这与黄永春^[22]选育凡纳滨对虾抗 WSSV 特性的研究结果相似。 3×10^3 copies/mL 浓度组第二个死亡高峰出现时间较另两组略微提前,且第一个死亡高峰强度大于第二个死亡高峰强度,而另两组正好相反。此外,高浓度组的总累积死亡率显著高于低浓度组。

比较 3 种浓度 WSSV 感染后不同时间对虾体内病毒含量的变化发现,当对虾受到 3×10^3 copies/mL WSSV 刺激后,迅速作出较强的免疫防御反应,在 30 min 时出现最低病毒含量 3.54×10^4 copies/g(显著低于实验对虾本身携带病毒量 1×10^5 copies/g),随后病毒大量增殖,病毒增殖速度强于机体对病毒的破坏程度,因此病毒含量持续上升至 48 h。虾体受到更低剂量的 WSSV 刺激后,引发的机体免疫程度也相对较弱,虾体病毒含量在 1 h 时出现最低,略晚于 3×10^3 copies/mL 感染组;初期病毒增殖程度相对较弱,加之较强的机体免疫程度,因此病毒含量在上升至 6 h 后呈现下降趋势;后期当病毒对机体的破坏程度强于机体的防御程度时,病毒含量持续上升至 48 h。因此体质相对较弱的对虾在 48 h 左右出现第一个死亡高峰,但体质较强的对虾体内病毒含量在 72 h 时又显著下降。实验结束后仍然存活的对虾体内病毒含量为 $(3.35 \pm 1.85) \times 10^6$ copies/g,比孙成波等^[17]报道高位池养殖过程中斑节对虾体内病毒含量 (9.5×10^5 copies/g)略高。

3.2 潜伏期斑节对虾感染低剂量 WSSV 粗提液后总血淋巴细胞数变化规律

甲壳动物的体液中不具有免疫球蛋白,缺乏由抗体介导的免疫反应,但是存在着天然的可诱导的非特异性免疫防御系统,包括细胞免疫和体液免疫。在抵御外来病原生物侵袭的防御反应中,血细胞既是细胞免疫的担当者,又是体液免疫因子的提供者,因此认为血细胞在对虾非特异性免疫防御反应中起着主要作用^[23]。

对虾感染 WSSV 后,病毒会破坏循环系统中的血细胞,同时造血组织会产生血细胞补充到循环系统中;血细胞总数的多少取决于 WSSV 的破

坏与造血组织再造程度的强弱^[23]。已有研究表明,宿主感染 WSSV 后血细胞数量较感染前明显降低^[23-25],可能是血细胞为了抵抗外来病原,通过趋化作用迁移至病原体密集的部位,造成血淋巴中血细胞减少的缘故^[24];也有研究发现凡纳滨对虾及宽大太平螯虾 (*Pacifastacus leniusculus*) 随 WSSV 感染时间延长,血细胞数量呈现先升高后降低的趋势^[23,26]。本研究显示,在 72 h 内总血淋巴细胞数呈现先降低后升高再降低的总体趋势。 3×10^3 copies/mL 浓度组在 12 和 48 h 后出现两个极低点(感染浓度越高,总血淋巴细胞数的最低值越小),作者认为感染 WSSV 12 h 时血细胞为了抵抗外来病原,在病原体密集部位聚集,造成血淋巴中血细胞减少;而 48 h 时病毒粒子处于指数扩增后期,在血细胞内大量增殖,严重破坏血细胞;同时病毒感染了造血组织,使其产生的血淋巴细胞数量远没有病毒破坏的程度大;另外,宿主为防御病毒而引发的细胞凋亡也是 48 h 时血淋巴细胞数量急剧减少的原因之一。实验中濒死虾的总血淋巴细胞数显著低于其余状态下对虾总血淋巴细胞数,这一结果与上述理论吻合。在感染初期 15 min 时, 3×10^3 与 6×10^2 copies/mL 组总血淋巴细胞数显著低于 2×10^2 copies/mL 组,作者认为对虾机体受到相对较强的 WSSV 刺激后血细胞集中于病毒感染部位,造成血淋巴中血细胞减少。不同 WSSV 浓度感染下,总血淋巴细胞数的变化规律与 WSSV 的扩增规律有着一定的关系: 3×10^3 copies/mL 浓度下除 6 和 24 h 外、 6×10^2 copies/mL 浓度下除 48 h 外、 2×10^2 copies/mL 浓度下除 24 h 外,总血淋巴细胞数的变化规律与 WSSV 的扩增规律成负相关。

3.3 潜伏期斑节对虾感染低剂量 WSSV 粗提液后血细胞种类组成变化

根据血细胞的核质比,胞质中颗粒存在与否,颗粒的数量、大小和分布以及细胞大小等把对虾血细胞分为 3 类:透明细胞(hyaline cell)、半颗粒细胞(semi-granular cell)和颗粒细胞(granular cell)^[27]。李光友^[28]认为透明细胞不仅缺少大的细胞质颗粒,而且还缺乏酚氧化酶活性,其主要作用是吞噬功能;半颗粒细胞含有数目可变的小细胞质颗粒和少量的酚氧化酶原,该类细胞通过与微生物脂多糖、 β -1-3-葡聚糖、肽聚糖、胰蛋白等结合而导致脱颗粒,活跃的脱颗粒作用与异物识

别的能力有关,因此认为它是防御反应的关键细胞;颗粒细胞内含大的颗粒以及大量酚氧化酶原组分,这类细胞不具有吞噬性。Söderhäll 等^[29]认为在宿主细胞的防御反应中这 3 种细胞可能具有协同作用:半颗粒细胞在异己物质的刺激下发生胞吐作用,释放酚氧化物酶原系统的组分,这种组分既可以刺激透明细胞的吞噬能力,又可以刺激颗粒细胞释放更多的酚氧化酶系统的组分,从而对细胞免疫反应发生作用。

在健康对虾体内 3 类血细胞分别有相对稳定的比例和数量,当对虾患病后,3 类血细胞的比例和数量会发生比较复杂的变化^[26]。Van de Braak 等^[24]利用原位杂交和大颗粒斑节对虾血细胞单抗相联的免疫组化技术显示,血细胞离开了循环系统,且进入了有 WSSV 感染细胞的组织,对虾造血组织中的颗粒细胞数量减少。Hose 等^[30]发现蓝对虾在抵抗溶藻弧菌感染的过程中,半颗粒细胞和透明细胞增多,而颗粒细胞减少;Wang 等^[31]在 WSSV 感染墨吉对虾后的血细胞中定位了病毒的位置,在透明细胞内没有发现 WSSV 粒子,而在半颗粒细胞与颗粒细胞的小泡中发现大量病毒粒子,且半颗粒细胞病毒含量更高,感染更快,对 WSSV 更敏感。张志栋等^[23]利用投喂方式感染凡纳滨对虾后,3 类血细胞的比例发生了不同程度的变化,其中颗粒细胞的比例呈现先增大后来稍有下降的趋势。本实验感染初期,半颗粒细胞比例明显上升,与前人研究结果基本一致;而颗粒细胞和透明细胞呈现显著下降的趋势,与前人结果存在差异,笔者认为可能与取样时间点的范围不同有关;后期 3 种细胞比例均呈现不同程度的变化,但波动幅度和出现峰值的时间存在差异。

参考文献:

- [1] 张家明,刘志昕. 对虾白斑综合征的研究进展[J]. 华南热带农业大学学报,2002,8(3):22-27.
- [2] Wang Y G, Hassan M D, Shariff M, *et al.* Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1999, 39(1):1-11.
- [3] Nadala E C, Loh P C. Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow-head virus of penaeid shrimp [J]. Virological Methods, 2000, 84(2):175-179.
- [4] Tsai M F, Lo C F, van Hulten M C, *et al.* Transcriptional analysis of the ribonucleotide reductase genes of shrimp white spot syndrome virus [J]. Virology, 2000, 277(1):92-99.
- [5] Lightner D V. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for disease of cultured penaeid shrimp [M]. Louisiana: Baton Rouge, 1996.
- [6] Nakano H, Koube H. Mass mortalities of cultured Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: epizootiological survey and infection trials [J]. Fish Pathology, 1994, 29(2):135-139.
- [7] Chou H Y, Huang C Y, Wang C H, *et al.* Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1995, 23(3):165-173.
- [8] Escobedo-Bonilla C M, Alday-Sanz V, Wille M, *et al.* A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus [J]. Journal of Fish Diseases, 2008, 31(1):1-18.
- [9] Durand S V, Lightner D V. Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp [J]. Journal of Fish Diseases, 2002, 25(7):381-389.
- [10] 简旭凤. 白斑综合征病毒 (WSSV) 原位 PCR 及定量 PCR 检测技术的建立 [D]. 广州: 中山大学, 2003:1-67.
- [11] 孙成波,何建国,黎子兰,等. 凡纳滨对虾和斑节对虾对 WSSV 敏感性的比较 [J]. 湛江海洋大学学报, 2006, 26(3):17-20.
- [12] 孟宪红. 中国对虾“黄海 2 号”对 WSSV 的抗病性分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010:57-73.
- [13] Lo C F, Leu J H, Ho C H, *et al.* Detection of baculovirus associated with spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1996, 25(1-2):133-141.
- [14] Withyachumnarnkul B. Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or-negative for white-spot syndrome virus (WSSV) [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1999, 39(1):21-27.
- [15] 邱德全,谢数涛,齐雪娟,等. 斑节对虾苗白斑综合征杆状病毒的检测和养殖跟踪 [J]. 湛江海洋大

- 学学报,1999,19(4):11-15.
- [16] 雷质文,黄捷,杨冰,等. 感染白斑综合征病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究[J]. 中国水产科学,2001,8(4):46-51.
- [17] 孙成波,李婷,王平,等. 高位池养殖对虾携带白斑综合征病毒变化[J]. 海洋通报,2009,28(2):116-120.
- [18] 李奕雯,曹煜成,李卓佳,等. 养殖水体环境与对虾白斑综合征关系的研究进展[J]. 海洋科学进展,2008,26(4):532-538.
- [19] 郭志勋,冯娟,王江勇. 斑节对虾血淋巴细胞对鳃弧菌的清除作用[J]. 中国水产科学,2006,13(1):28-32.
- [20] 孙双双,王亚军,唐杰,等. 实时荧光定量PCR检测凡纳滨对虾 proPO 基因标准曲线构建[J]. 生物技术通报,2011(2):131-135.
- [21] Sritunyalucksana K, Wannapapho W, Lo C F, *et al.* PmRab7 is a VP28-Binding protein involved in white spot syndrome virus infection in shrimp[J]. *Journal of Virology*,2006,80(21):10734-10742.
- [22] 黄永春. 凡纳滨对虾抗 WSSV 家系选育及抗病特性和遗传性状研究[D]. 广州:中山大学,2007:55-70.
- [23] 张志栋,战文斌,薛艳红,等. 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)感染白斑综合征病毒(WSSV)后大颗粒血细胞的变化[J]. 海洋与湖沼,2005,36(1):67-71.
- [24] van de Braak C B, Botterblom M H, Huisman E A, *et al.* Preliminary study on haemocyte response to white spot syndrome virus infection in black tiger shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*,2002,51(2):149-155.
- [25] Sahul Hameed A S, Sarathi M, Sudhakaran R, *et al.* Quantitative assessment of apoptotic hemocytes in white spot syndrome virus(WSSV)-infected penaeid shrimp, *Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*, by flow cytometric analysis[J]. *Aquaculture*,2006,256(1-4):111-120.
- [26] Jiravanichpaisal P, Bangyeekhun E, Söderhäll K, *et al.* Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*,2001,47(2):151-157.
- [27] 周晖,谢数涛. 四种对虾血细胞的分类和形态比较[J]. 湛江海洋大学学报,2005,25(4):84-87.
- [28] 李光友. 中国对虾疾病与免疫机制[J]. 海洋科学,1995(4):1-3.
- [29] Söderhäll K, Smith V J, Johansson M W. Exocytosis and uptake of bacterial by isolated haemocyte populations of two crustaceans; evidence for cellular cooperation in the defence reactions of arthropods [J]. *Cell and Tissue Research*,1986,245(1):43-49.
- [30] Hose J E, Martin G G, Tiu S, *et al.* Patterns of hemocyte production and release throughout the moult cycle in the penaeid shrimp *Sycionia ingentis* [J]. *Biological Bulletin*,1992,183(2):185-199.
- [31] Wang Y T, Liu W, Seah J N, *et al.* White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis* [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*,2002,52(3):249-259.

Influence of low dosage infection on WSSV in latent period and haemocyte of *Penaeus monodon*

ZHANG Tao^{1,2}, GUO Zhi-xun¹, HUANG Jian-hua¹, YANG Li-shi¹,
WEN Wei-geng¹, YANG Qi-bin¹, JIANG Shi-gui^{1*}

(1. Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Guangdong Province, Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Utilization, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The changes in mortalities of *Penaeus monodon* (with 1×10^5 copies/g WSSV), WSSV loads in muscle, THC and the percentage of different types of haemocyte were studied by injection with WSSV solution containing 3×10^3 , 6×10^2 , 2×10^2 copies/mL virus and PBS. Real-time PCR, and microscopical examination were used in this experiment. The results showed that the cumulative mortalities were $93.33\% \pm 2.89\%$, $56.67\% \pm 5.77\%$, $45.00\% \pm 5.00\%$ respectively, when the concentration of WSSV solution were 3×10^3 , 6×10^2 , 2×10^2 copies/mL. No death was observed in the PBS group. When the concentration of WSSV solution was 3×10^3 copies/mL, the virus load in the muscle reduced to minimum (3.54×10^4 copies/g) at 30 min post-injection, and reached its maximum (3.12×10^8 copies/g) at 48 h post-injection, then decreased again. For the other two experiment groups, the minimal virus load (1.11×10^5 , 9.54×10^4 copies/g) in the muscle was observed at 1 h post-injection and the highest virus load (1.48×10^7 , 5.46×10^6 copies/g) occurred at 48 h post-injection, but a second highest virus load (1.58×10^5 , 1.11×10^5 copies/g) appeared at 6 h post-injection. No significant changes were found in the WSSV load of the control group throughout the experiment. The fluctuation range and the peak time of total haemocyte count (THC) were different between different dosage of WSSV solution. Especially THC reduced to minimum (3.48×10^6 , 4.05×10^6 /mL) at 12 h and 48 h post-injection with 3×10^3 copies/mL solution. The variation of THC and WSSV load were negatively correlated except individual time points. Under all groups, the percentage of semi-granular cells showed upward trend obviously early post infection, but later remained at a high level although fluctuated; the percentage of granular and hyalinocyte cells showed downward trend early post-injection significantly, while increased slightly in the middle period, but the percentage of granular cells at the later stage of post-infection was significantly lower than that of early period, while the levels of hyaline cells between later and early stages of post-injection have no significant difference.

Key words: *Penaeus monodon*; white spot syndrome virus (WSSV); low dosage infection; mortality; real-time PCR; haemocyte

Corresponding author: JIANG Shi-gui. E-mail: jiangsg@21cn.com