

## 副溶血弧菌对斑节对虾非特异性免疫酶活性的影响

段亚飞, 张家松\*, 董宏标, 王 芸, 张真真

(中国水产科学研究院南海水产研究所,农业部南海渔业资源开发利用重点实验室,  
农业部水产品加工重点实验室,广东 广州 510300)

**摘要:** 为了研究副溶血弧菌对斑节对虾非特异性免疫酶活性的影响,分别对斑节对虾注射生理盐水和副溶血弧菌,于不同时间点测定肝胰腺和鳃中的总抗氧化能力(T-AOC)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)和溶菌酶(LSZ)的活性变化。结果显示,与对照组相比,感染副溶血弧菌后,肝胰腺和鳃中 T-AOC 活性分别于 12 和 6 h 达到最大值( $P < 0.05$ ),随后逐渐降低;肝胰腺中 ACP 活性于 3 h 显著升高,随后逐渐降低,并于 24 h 达到最小值( $P < 0.05$ ),而鳃中 ACP 活性于 12 h 达到最大值,随后逐渐降低,并于 48 h 显著低于对照组( $P < 0.05$ );肝胰腺和鳃中 ALP 活性整体均呈现出先升高后下降的趋势,但未出现显著低于对照组的现象;肝胰腺和鳃中 LSZ 活性均于 3 h 显著升高至最大值( $P < 0.05$ ),随后逐渐恢复至初始水平。研究表明,副溶血弧菌感染对斑节对虾非特异性免疫酶活有显著影响,对其机体免疫防御系统有明显的破坏作用。

**关键词:** 斑节对虾; 副溶血弧菌; 总抗氧化能力; 酸性磷酸酶; 碱性磷酸酶; 溶菌酶

**中图分类号:** S 943

**文献标志码:** A

斑节对虾(*Penaeus monodon*)俗称草虾、虎虾等,是中国和东南亚一带重要养殖虾类,具有个体大、食性杂和生长快等特点<sup>[1]</sup>。近年来,随着集约化养殖及生态环境的不断恶化,虾类疾病频繁暴发,如主要由弧菌(*Vibrio* spp.)引起的对虾“早期死亡综合症”(early mortality syndrome, EMS)或“急性肝胰腺坏死综合症”(acute hepatopancreas necrosis syndrome, AHPND),给中国对虾养殖业造成了严重的经济损失,制约了虾类养殖业的进一步发展<sup>[2-4]</sup>。

弧菌是一类广泛分布于近岸及河口海水中的病原菌,其致病性受到宿主生理状态和水质环境的综合影响,故又称为条件致病菌<sup>[5]</sup>。当养殖动物受伤、体弱、抗病力降低和环境条件恶化时,弧菌会乘虚而入,造成动物体内微生态紊乱,从而导致动物发病和死亡<sup>[6]</sup>。对虾和其他无脊椎动物一样,免疫系统不完善,主要依靠非特异性免疫来防御各种病原的感染,维持机体正常的生理状

态<sup>[7]</sup>。总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)是用于衡量机体抗氧化防御系统功能状况的综合性指标,主要用于分解和清除体内代谢过程中产生的多余的活性氧,保护机体免受损伤<sup>[8]</sup>。酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)是动物体内参与免疫防御的 2 种重要水解酶<sup>[9]</sup>。溶菌酶(lysozyme, LSZ)是甲壳动物体内重要的抗菌蛋白,能够通过破坏细菌细胞壁中的肽聚糖而杀灭病原菌,其活性的变化可以作为衡量机体免疫功能状态的重要指标<sup>[10]</sup>。

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种常见的水产动物致病菌,其能引起鱼类体表溃疡和出血性败血等症状,同时也会导致对虾“红腿病”和“烂鳃病”的发生<sup>[11-13]</sup>。研究表明,副溶血弧菌是导致 AHPND 疾病发生,继而引起 EMS 暴发的主要诱因<sup>[14-15]</sup>,而且具有对虾死亡速度快、传播范围广的特点,与以往报道的弧菌引起的病

收稿日期:2014-04-23 修回日期:2014-05-28

资助项目:国家科技支撑计划(2011BAD13B10);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(中国水产科学研究院南海水产研究所)(2014TS15,2012YD02);广东省海洋渔业科技推广专项(A201101E02)

通信作者:张家松, E-mail: jiasongzhang@hotmail.com

害明显不同。注射剂量为  $10^6$  cfu/mL 的副溶血弧菌感染后 24 h, 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 的死亡率高达 80%<sup>[15]</sup>。翟秀梅等<sup>[16]</sup> 通过研究副溶血弧菌对凡纳滨对虾生理生化指标的影响表明, 副溶血弧菌感染破坏了虾体的免疫系统, 导致免疫机能的损坏。然而, 目前关于副溶血弧菌感染对斑节对虾免疫酶活性影响的研究未见报道, 而对虾生理和疾病诱发的监测指标的筛选则尤为重要。本研究通过对健康斑节对虾进行副溶血弧菌注射感染, 研究感染后不同时间点的肝胰腺和鳃中免疫相关酶 T-AOC、ACP、ALP 和 LSZ 的活性变化, 初步探讨病原菌感染对斑节对虾非特异性免疫功能的影响, 以期对斑节对虾免疫机理研究和病害防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

健康斑节对虾取自中山衍生水产养殖有限公司, 体长 ( $10.81 \pm 0.45$ ) cm, 体质量 ( $5.65 \pm 0.34$ ) g。暂养于 200 L 的 PVC 桶中, 每桶 30 尾, 暂养 1 周。养殖水温 25 °C, 盐度 15, pH 8.5, 持续充氧, 每天换水 1/3, 投喂配合饲料。

实验用副溶血弧菌为广州利洋水产科技有限公司惠赠, 于感染实验前 1 d 进行菌种活化, 经 2611E 液体培养基扩大培养后离心取沉淀, 用无菌生理盐水稀释为  $1 \times 10^8$  cfu/mL 的菌悬液, 4 °C 保存备用。

### 1.2 副溶血弧菌感染实验

随机挑选暂养 1 周的健康斑节对虾分为 2 组, 对照组和感染组, 每组 30 尾, 每组 3 个平行。感染组每尾于对虾第 2 腹节部位注射副溶血弧菌悬液 20  $\mu$ L, 对照组于相同部位注射等体积 0.86% 无菌生理盐水。各组分别于注射后 0、1.5、3、6、12、24 和 48 h 取肝胰腺和鳃组织, 用于酶活性的测定, 每个时间点取 6 尾。

### 1.3 样品制备

取肝胰腺和鳃组织于预冷的 0.86% 生理盐水中进行漂洗, 去除组织液, 滤纸拭干, 称重后置于离心管中。按照 1:10 (W/V) 加入预冷的 0.86% 生理盐水进行超声粉碎。将制备好的 10% 组织匀浆液于 2 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 -80 °C 保存备用, 用于组织酶活性的测定。

### 1.4 酶活性的测定

T-AOC、ACP、ALP 和 LSZ 活性和组织蛋白

含量测定均采用南京建成生物研究所研制的试剂盒进行。

37 °C 时, 每分钟每毫克组织蛋白, 使反应体系的吸光度 (OD) 值每增加 0.01 时, 定义为 1 个 TOC 单位; ACP 活性测定采用磷酸苯二钠法, 以每克组织蛋白在 37 °C 与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位; ALP 活性测定采用磷酸苯二钠法, 以每克蛋白在 37 °C 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位; LSZ 活性测定采用比浊法; 组织蛋白含量测定采用考马斯亮蓝法。

### 1.5 数据分析

所得实验数据均以平均值  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示, 用 SPSS 11.0 进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA),  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 副溶血弧菌感染对斑节对虾存活的影响

斑节对虾感染副溶血弧菌 6 h 时出现反应症状, 并开始出现死亡现象, 24 h 的累积存活率达 81%。感染 48 h 后, 感染组对虾活力减弱, 反应迟钝, 摄食量减少, 出现大量死亡, 累积存活率为 62% (图 1)。濒临死亡的对虾肌肉呈乳白状, 部分对虾肝胰腺有轻微糜烂现象。对照组对虾则活力正常, 摄食积极, 未出现死亡。

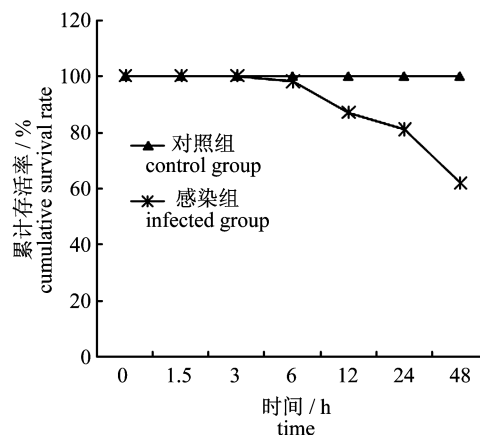


图 1 斑节对虾感染副溶血弧菌后的累积存活率  
Fig. 1 Cumulative survival rate of *P. monodon* after *V. parahaemolyticus* challenge

### 2.2 副溶血弧菌感染对斑节对虾 T-AOC 活性的影响

与对照组相比, 感染副溶血弧菌 3 h 后, 斑节对虾肝胰腺和鳃中 T-AOC 活性均显著上升, 并分别于 12 和 6 h 达到最大值, 分别为对照组的 5.70

和 3.15 倍 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。虽然肝胰腺中 T-AOC 活性于 6 h 出现下降现象,但仍显著高于对照组 ( $P < 0.05$ );随后于 24 h 再次下降,并于 48 h

回落至对照组水平(图 2-a)。而鳃中 T-AOC 活性于感染后 12 h 开始下降,并于 24 h 到达最低值,为对照组的 0.33 倍 ( $P < 0.05$ ) (图 2-b)。

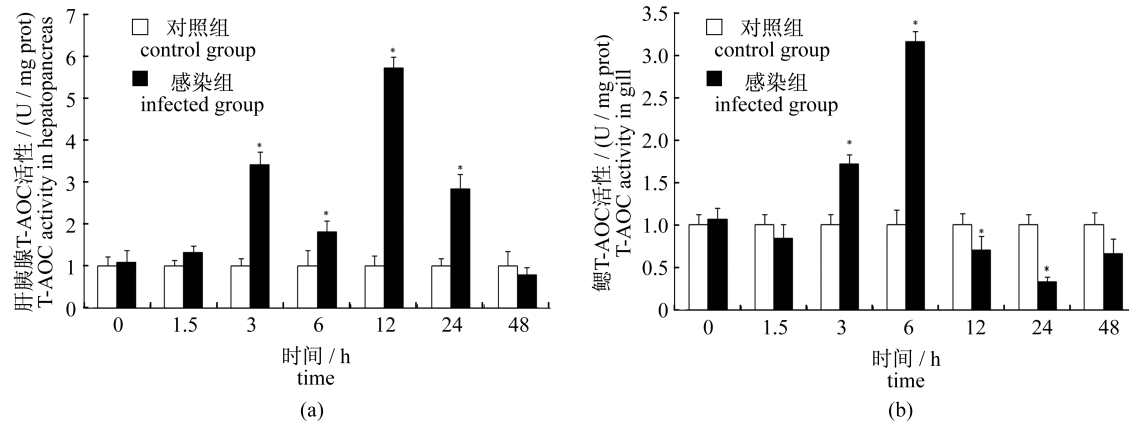


图 2 副溶血弧菌感染对斑节对虾肝胰腺 (a) 和鳃 (b) 中 T-AOC 活性的影响

\* 表示同一时间点内组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同

Fig. 2 T-AOC activity in hepatopancreas (a) and gill (b) of *P. monodon* after *V. parahaemolyticus* challenge

\* indicated significant differences ( $P < 0.05$ ) between two groups in the same time. The same below

### 2.3 副溶血弧菌感染对斑节对虾 ACP 活性的影响

感染副溶血弧菌后,与对照组相比,肝胰腺中 ACP 活性于感染后 3 h 出现显著上升现象,为对照组的 1.27 倍 ( $P < 0.05$ );随后 ACP 活性逐渐下降,并于 24 h 达到最小值,为对照组的 0.33

倍;然后于 48 h 再次上升,但仍显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 3-a)。鳃中 ACP 活性于感染后 3 h 开始上升,并于 12 h 达到最大值,为对照组的 1.71 倍 ( $P < 0.05$ );随后 ACP 活性开始下降,于 48 h 达到最小值,为对照组的 0.56 倍 ( $P < 0.05$ ) (图 3-b)。

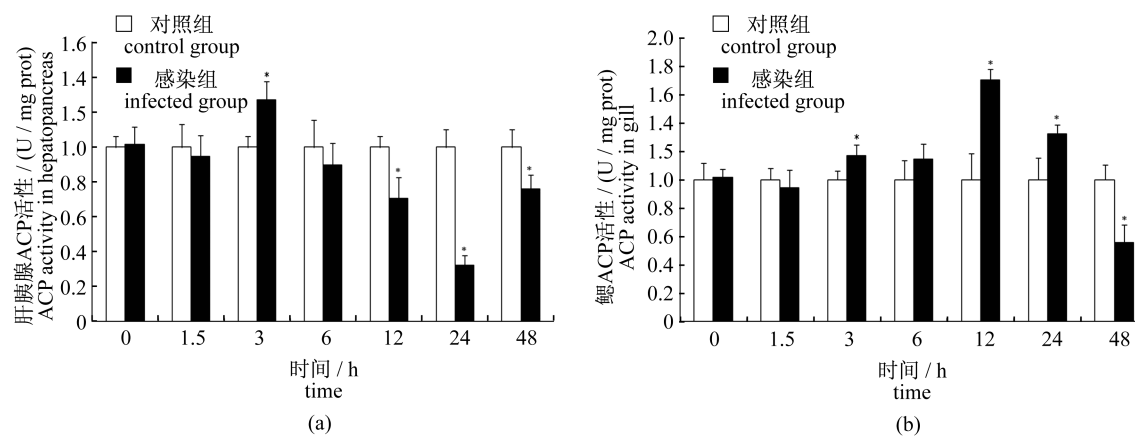


图 3 副溶血弧菌感染对斑节对虾肝胰腺 (a) 和鳃 (b) 中 ACP 活性的影响

Fig. 3 ACP activity in hepatopancreas (a) and gill (b) of *P. monodon* after *V. parahaemolyticus* challenge

### 2.4 副溶血弧菌感染对斑节对虾 ALP 活性的影响

斑节对虾肝胰腺和鳃中的 ALP 活性在副溶血弧菌感染后的变化趋势基本相同,整体均呈现出先升高后下降的趋势(图 4)。肝胰腺中 ALP

活性于感染 6 h 达到最大值,为对照组的 2.90 倍;然后于 12 和 24 h 下降,但仍显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 4-a)。而鳃中 ALP 活性于 3 h 即达到最大值,为对照组的 1.71 倍 ( $P < 0.05$ );随后活性下降,变化趋势相对较为平缓(图 4-b)。

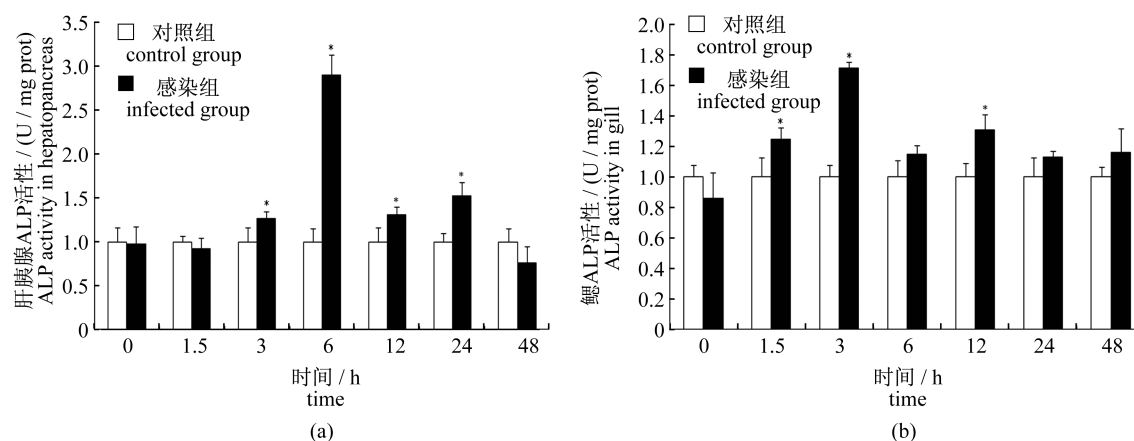


图4 副溶血弧菌感染对斑节对虾肝胰腺(a)和鳃(b)中ALP活性的影响

Fig. 4 ALP activity in hepatopancreas (a) and gill (b) of *P. monodon* after *V. parahaemolyticus* challenge

### 2.5 副溶血弧菌感染对斑节对虾LSZ活性的影响

肝胰腺中LSZ活性于感染后1.5 h即开始显著上升,并于3 h达到最大值,为对照组的4.90倍( $P < 0.05$ );然后于6和12 h显著下降,但仍高

于对照组( $P < 0.05$ );最后于24和48 h恢复至初始水平(图5-a)。鳃中LSZ活性于3 h上升至最大值,在6 h出现轻微下降后,其活性于12 h再次升高( $P < 0.05$ );随后于24 h开始下降,与对照组差异不显著( $P > 0.05$ )(图5-b)。

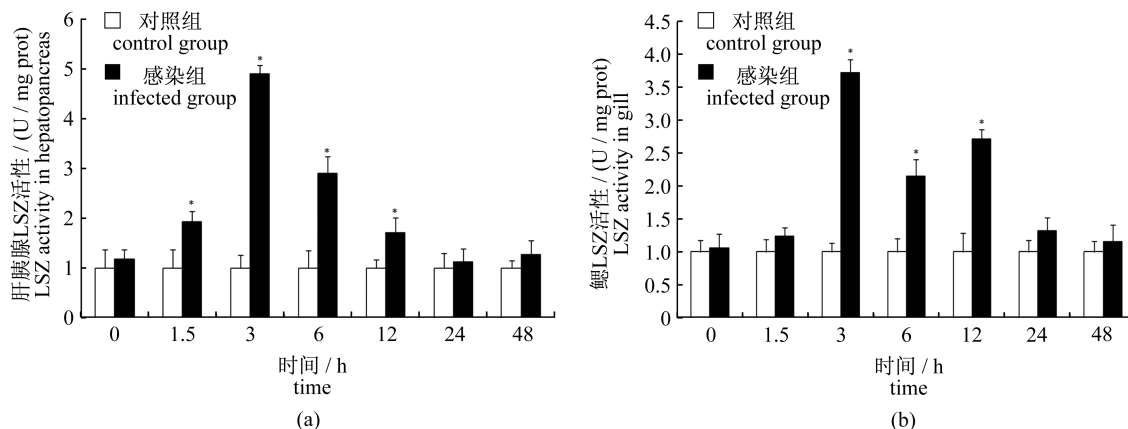


图5 副溶血弧菌感染对斑节对虾肝胰腺(a)和鳃(b)中LSZ活性的影响

Fig. 5 LSZ activity in hepatopancreas (a) and gill (b) of *P. monodon* after *V. parahaemolyticus* challenge

## 3 讨论

### 3.1 副溶血弧菌对斑节对虾T-AOC活性的影响

弧菌在入侵动物机体的过程中,机体会产生大量具有杀菌作用的活性氧(reactive oxygen species, ROS),但过量的ROS可以通过作用于DNA、不饱和脂肪酸和蛋白质等,造成机体氧化损伤,从而引起机体病变<sup>[17]</sup>。因此,甲壳动物在长期的进化过程中,体内形成了一套抗氧化防御系统,用于清除体内多余的活性氧,保护机体免受

损伤<sup>[18]</sup>。T-AOC可以代表和反映机体抗氧化酶系统和非酶促系统对外来刺激的代偿能力以及机体自由基代谢的状态,用于衡量机体抗氧化系统功能状况<sup>[19]</sup>。

陈萍等<sup>[20]</sup>研究表明,感染溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)后的三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)机体内抗氧化酶活性降低,脂质过氧化物水平升高,使得三疣梭子蟹抗氧化能力下降。翟秀梅等<sup>[16]</sup>利用不同浓度的副溶血弧菌对凡纳滨对虾进行感染,结果表明,随着副溶血弧菌浓度的增加,肝胰腺中SOD活性呈下降趋势。本

研究中,斑节对虾肝胰腺和鳃中 T-AOC 的活性于感染初期显著上升,表明机体抗氧化系统起到了清除机体多余活性氧的作用。但随着感染时间的延长,肝胰腺和鳃中 T-AOC 活性显著下降,表明副溶血弧菌产生的毒性效应消耗了大量的抗氧化物质,机体内过量的活性氧不能及时清除,降低了机体的抗氧化防御能力。

### 3.2 副溶血弧菌对斑节对虾 ACP 和 ALP 活性的影响

当外来病原体经过吞噬作用进入机体后,与细胞内的溶酶体融合,最终被各种水解酶消化分解<sup>[21]</sup>。ACP 和 ALP 属于磷酸单酯水解酶类,在无脊椎动物非特异免疫系统中具有重要作用<sup>[9]</sup>。ACP 是巨噬细胞内溶酶体的标志酶,在细胞吞噬和包围化的免疫防御中发挥作用,达到将侵入体内的异物破坏和清除的目的<sup>[22]</sup>。ALP 是溶酶体酶的重要组分,其作为膜结合蛋白可以直接参与磷酸基团的转移、机体蛋白质的合成和钙磷代谢等过程<sup>[23]</sup>。

研究表明,患“乳化病”的三疣梭子蟹组织中 ALP 活性显著降低<sup>[24]</sup>;感染溶藻弧菌后,三疣梭子蟹组织中 ACP 和 ALP 活性与对照组相比均不断下降<sup>[25]</sup>。而吴垠等<sup>[26]</sup>研究发现,患病的中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血清中 ALP 活性明显升高,且不同发病期其变化幅度不同,重症期的变化幅度显著高于发病初期。王玥等<sup>[27]</sup>认为,罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)在氨氮的作用下也表现出 ACP 和 ALP 活性升高的现象,推测可能是由于组织细胞坏死引起细胞核溶酶体破裂,ACP 和 ALP 渗出导致其表现出较高的活力。相似的酶活升高现象在感染 WSSV 的中国明对虾中也有发现<sup>[28]</sup>。但本研究中,ACP 和 ALP 活性在感染副溶血弧菌后均出现先升高再下降的现象,其中 ACP 活性在感染后期显著低于对照组。因此,推测 ACP 和 ALP 活性的提高是斑节对虾应对弧菌入侵机体的一种免疫防御机制,但弧菌随着感染时间的延长而迅速繁殖,导致对虾处于病理状态,超出了对虾机体的免疫调节限度,其机体细胞的物质代谢过程发生紊乱,免疫系统受到损伤,最终死亡。

### 3.3 副溶血弧菌对斑节对虾 LSZ 活性的影响

LSZ 是甲壳动物机体内重要的非特异性免疫因子,其作为吞噬细胞杀菌的物质基础,能水解细

菌细胞壁肽聚糖中 N-乙酰葡萄糖胺与 N-乙酰胞壁酸之间的  $\beta$ -1,4-糖苷键,从而使细菌细胞裂解死亡<sup>[11]</sup>。王雷等<sup>[29]</sup>以溶壁微球菌(*Micrococcus lysoleikticus*)冻干粉为底物进行中国明对虾血淋巴溶菌活力研究时发现,中国明对虾正常生理状态下其血淋巴中具有较强的溶菌活力,而濒死状态下其溶菌活性则基本丧失,由此认为,溶菌活力可以作为免疫指标用于衡量对虾机体的免疫功能状态。

翟秀梅等<sup>[16]</sup>用副溶血弧菌感染凡纳滨对虾后发现,对虾肝胰腺和肌肉组织中 LSZ 活性随菌液浓度的增加呈现先升高后下降的变化趋势。三疣梭子蟹被溶藻弧菌感染后 24 h,其血淋巴和肝胰腺中 LSZ 活性显著升高,随之下降<sup>[25]</sup>。本研究中,斑节对虾感染副溶血弧菌后,其肝胰腺和鳃中 LSZ 活性呈现先升高后下降的现象,与中国明对虾感染鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)后组织 LSZ 活性变化趋势基本一致<sup>[30]</sup>。当副溶血弧菌侵入斑节对虾体内,使得对虾免疫系统得到激活并产生了免疫反应,促进了抗菌蛋白和溶菌蛋白的合成,从而提高了溶菌酶的活性。而在感染后期,由于机体处于感染后的恢复期,且弧菌大量繁殖导致机体细胞受到损伤,使得溶菌酶活性下降。本研究结果表明,适量的低浓度弧菌诱导可以提高对虾组织的溶菌酶活性。

凡纳滨对虾感染高浓度副溶血弧菌时,其组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和 LSZ 活性大幅度下降,因而翟秀梅等<sup>[16]</sup>推测副溶血弧菌感染破坏了对虾机体的免疫系统,导致免疫机能的损坏,防病、抗病能力下降,进一步导致虾体患病,甚至死亡。本研究中,感染组对虾组织中 T-AOC 的活性于感染后期显著下降,可能是由于副溶血弧菌侵入虾体后,伴随着吞噬,引起呼吸暴发,产生了大量有害的自由基,造成机体抗氧化系统功能紊乱,进而破坏对虾的机体免疫系统。已有的研究表明,活性氧过度积累可破坏细胞电子传递链、线粒体膜电位及 ATP 能量产生,进而导致细胞的呼吸障碍,严重时甚至引起细胞的凋亡或者坏死,降低机体的抗氧化能力<sup>[31]</sup>。而本研究中,副溶血弧菌感染是否造成斑节对虾组织发生细胞凋亡或坏死,仍需进一步通过组织切片进行分析。此外,有相关报道表明,副溶血弧菌是引起对虾 AHPND 发生的病原体,使得对虾肝胰腺先萎缩后肿胀,严重糜烂,最终导致对虾死亡<sup>[15]</sup>。

综上所述,副溶血弧菌感染对斑节对虾肝胰腺和鳃中 T-AOC、ACP、ALP 和 LSZ 活性有显著影响,随着感染时间的延长会导致免疫酶活性下降,进而影响对虾的非特异性免疫系统。斑节对虾的 T-AOC、ACP、ALP 和 LSZ 对入侵机体的副溶血弧菌反应较为敏感,可以作为免疫反应的生化指标,但相较而言,T-AOC 和 LSZ 更优。而本研究中,同一免疫酶在不同的感染研究中表现出不同的活性变化趋势,其可能与弧菌种类、感染剂量、虾的种类及规格等因素有关<sup>[32]</sup>。本研究有助于了解副溶血弧菌对斑节对虾机体生理生化方面的影响,为对虾免疫机制及疾病防治的深入研究提供重要的理论依据。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Yang Q B, Jiang S, Huang J H, *et al.* The compensatory growth of *Penaeus monodon* after starvation[J]. South China Fisheries Science, 2013, 9 (5):25 - 31. [杨其彬,姜松,黄建华,等. 斑节对虾的饥饿试验和补偿生长. 南方水产科学, 2013, 9 (5):25 - 31.]
- [ 2 ] Flegel T W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2012, 110(2):166 - 173.
- [ 3 ] Panakorn S. Opinion article: more on early mortality syndrome in shrimp [J]. Aquaculture Asia Pacific, 2012, 8(1):8 - 10.
- [ 4 ] Halder S, Chatterjee S, Asakura M, *et al.* Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* (Non-D<sub>1</sub> and O<sub>139</sub>) from moribund shrimp (*Penaeus monodon*) and experimental challenge study against post larvae and juveniles[J]. Annals of Microbiology, 2007, 57(1):55 - 60.
- [ 5 ] Flores-Miranda M D C, Luna-González A, Campa-Córdova A I, *et al.* Microbial immunostimulants reduce mortality in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio sinaloensis* strains [J]. Aquaculture, 2011, 320(1 - 2):51 - 55.
- [ 6 ] Moriarty D J W. The role of microorganisms in aquaculture ponds [J]. Aquaculture, 1997, 151(1 - 4):333 - 349.
- [ 7 ] Duan Y F, Liu P, Li J T, *et al.* Molecular responses of calreticulin gene to *Vibrio anguillarum* and WSSV challenge in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 36(1):164 - 171.
- [ 8 ] Wu F J, Xue Y, Liu X F, *et al.* The protective effect of eicosapentaenoic acid-enriched phospholipids from sea cucumber *Cucumaria frondosa* on oxidative stress in PC12 cells and SAMP8 mice [J]. Neurochemistry International, 2014, 64:9 - 17.
- [ 9 ] Du J, Zhu H X, Liu P, *et al.* Immune responses and gene expression in hepatopancreas from *Macrobrachium rosenbergii* challenged by a novel pathogen spiroplasma MR - 1008 [J]. Fish Shellfish Immunology, 2013, 34(1):315 - 323.
- [ 10 ] Xu S L, Wang D L, Jia C Y, *et al.* Effects of *Vibrio alginolyticus* infection on immune-related enzyme activities and ultrastructure of *Charybdis japonica* gills [J]. Aquaculture, 2013, 396 - 399:82 - 88.
- [ 11 ] Sudheesh P S, Xu H S. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases [J]. Aquaculture, 2001, 196(1 - 2):37 - 46.
- [ 12 ] Fan J F, Song L C, Wang B, *et al.* Preliminary study on one pathogenic bacterium-*Vibrio parahaemolyticus* associated with red body disease in *Litopenaeus vannamei* [J]. Marine Science, 2006, 30(4):40 - 44. [樊景凤,宋立超,王斌,等. 一株引起凡纳滨对虾红体病的病原菌 - 副溶血弧菌的初步研究. 海洋科学, 2006, 30(4):40 - 44.]
- [ 13 ] Yu Y, Ning X B. The risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in prawn [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(3):184 - 186. [俞莺,宁喜斌. 对虾副溶血弧菌的风险评估. 现代食品科技, 2006, 22(3):184 - 186.]
- [ 14 ] Tran L, Nunan L, Redman R M, *et al.* Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2013, 105:45 - 55.
- [ 15 ] Joshi J, Srisala J, Truong V H, *et al.* Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) [J]. Aquaculture, 2014, 428 - 429:297 - 302.
- [ 16 ] Zhai X M, Wang B, Mao L J, *et al.* The effects of physiological and biochemical index for *Penaeus vannamei* infected with *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2007, 16(2):162 - 168. [翟秀梅,王斌,毛连菊,等. 副溶血弧菌对南美白对虾生理生化指标的影响. 上海水产大学学报, 2007, 16(2):162 - 168.]
- [ 17 ] Mathew S, Kumar K A, Anandan R, *et al.* Changes in

- tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon* [J]. Comparative Biochemistry Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology, 2007, 145(3): 315 - 320.
- [18] Duan Y F, Liu P, Li J T, *et al.* cDNA cloning, characterization and expression analysis of peroxiredoxin 5 gene in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda* [J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40(12): 6569 - 6577.
- [19] Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, *et al.* Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state [J]. Pharmacological Reviews, 2002, 54(2): 271 - 284.
- [20] Chen P, Li J T, Li J, *et al.* effect on antioxidant enzyme system of *Portunus trituberculatus* infected by *Vibrio alginolyticus* [J]. Marine Science, 2009, 33(5): 59 - 63. [陈萍, 李吉涛, 李健, 等. 溶藻弧菌对三疣梭子蟹抗氧化酶系统的影响. 海洋科学, 2009, 33(5): 59 - 63.]
- [21] Press O W, DeSantes K, Anderson S K, *et al.* Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and arboxylic ionophores I [J]. Cancer Research, 1990, 50(4): 1243 - 1250.
- [22] Yang C, Kong J, Wang Q, *et al.* Heterosis of haemolymph analytes of two geographic populations in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(1): 62 - 70.
- [23] Zhang M, Wang L, Guo Z Y, *et al.* Effect of lipopolysaccharide and *Vibrio anguillarum* on the activities of phosphatase, superoxide dismutase and the content of hemocyanin in the serum of *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Marine Sciences, 2004, 28(7): 22 - 25. [张明, 王雷, 郭振宇, 等. 脂多糖和弧菌对中国对虾血清磷酸酶、超氧化物歧化酶和血蓝蛋白的影响. 海洋科学, 2004, 28(7): 22 - 25.]
- [24] Chen Y E, Wang G L, Jin S, *et al.* Enzyme activities in *Portunus trituberculatus* with emulsification disease [J]. Fisheries Science, 2006, 25(9): 448 - 451. [陈寅儿, 王国良, 金珊, 等. 三疣梭子蟹患“乳化病”后几种保护酶活力的变化. 水产科学, 2006, 25(9): 448 - 451.]
- [25] Chen P, Wang Q Y, Li J, *et al.* Effects on lysozyme and phosphatase activities of *Portunus trituberculatus* infected by *Vibrio alginolyticus* [J]. Progress in Fishery Sciences, 2009, 30(2): 78 - 82. [陈萍, 王清印, 李健, 等. 溶藻弧菌对三疣梭子蟹溶菌酶和磷酸酶活性的影响. 渔业科学进展, 2009, 30(2): 78 - 82.]
- [26] Wu Y, Xing D L, Zhu G Q, *et al.* Hemopathologic of a baculovirus-caused epidemic disease of *Penaeus chinensis* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1998, 5(3): 53 - 57. [吴垠, 邢殿楼, 祝国芹, 等. 中国对虾暴发性流行病的血液病理研究. 中国水产科学, 1998, 5(3): 53 - 57.]
- [27] Wang Y, Hu Y B, Jiang N C. Effects of ammonia N and nitrite N on immune enzymes of *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Journal of Zhejiang University: Science Edition, 2005, 32(6): 698 - 705. [王玥, 胡义波, 姜乃澄. 氨态氮、亚硝态氮对罗氏沼虾免疫相关酶类的影响. 浙江大学学报: 理学版, 2005, 32(6): 698 - 705.]
- [28] Zhang Z F, Shao M Y, HoKang K Y. Changes of enzyme activity and hematopoiesis in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis* (Osbeck) induced by white spot syndrome virus and zymosan A [J]. Aquaculture Research, 2005, 36(7): 674 - 681.
- [29] Wang L, Li G Y, Mao Y X. Studies on the activities and characteristics of the antibacteria, bacteriolysis and phenoloxidase in the haemolymph of *Penaeus chinensis* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1995, 26(2): 179 - 185. [王雷, 李光友, 毛远兴. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究. 海洋与湖沼, 1995, 26(2): 179 - 185.]
- [30] Yao C L, Wu C G, Xiang J H, *et al.* The lysosome and lysozyme response in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* to *Vibrio anguillarum* and laminarin stimulation [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2008, 363(1 - 2): 124 - 129.
- [31] Wang Y, Li J, Li J T, *et al.* Effects of pH stress on antioxidant system enzyme activities and gene expression of *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(3): 556 - 564. [王芸, 李健, 李吉涛, 等. pH胁迫对中国明对虾抗氧化系统酶活力及基因表达的影响. 中国水产科学, 2011, 18(3): 556 - 564.]
- [32] Luo C X, Huang X X, Li S, *et al.* Expressions of Toll receptor, IMD and lysozyme mRNA in the gills of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after acute challenge with *Vibrio alginolyticus* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(1): 189 - 196. [罗词兴, 黄旭雄, 李桑, 等. 溶藻弧菌感染后凡纳滨对虾鳃组织免疫相关基因的表达. 中国水产科学, 2014, 21(1): 189 - 196.]

## The non-specific immune response of *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge

DUAN Yafei, ZHANG Jiasong\*, DONG Hongbiao, WANG Yun, ZHANG Zhenzhen

(Key Laboratory of South China Sea Fishery Resources Exploitation & Utilization, Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** To study the effect of *Vibrio parahaemolyticus* challenge on the non-specific immune function of *Penaeus monodon*, healthy *P. monodon* [average body weight ( $5.65 \pm 0.34$ ) g] were used to determine the changes of non-specific immune enzyme activities in hepatopancreas and gill tissues after being injected with sterile 0.86% normal saline and *V. parahaemolyticus*. Activities of total antioxidant capacity (T-AOC), acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (ALP) and lysozyme (LSZ) were measured at different sampling time points. The results showed that: compared with the control group, after being challenged with *V. parahaemolyticus*, T-AOC activities in hepatopancreas and gill were both increased to the peak value at 12 and 6 h ( $P < 0.05$ ), respectively, and then decreased gradually. ACP activities in hepatopancreas were up-regulated significantly at 3 h ( $P < 0.05$ ), then decreased gradually and reached the lowest level at 24 h ( $P < 0.05$ ). In gill, ACP activities were increased to the maximum at 12 h, and then decreased gradually to a lower level than the control at 48 h ( $P < 0.05$ ). ALP activities in hepatopancreas and gill both showed a downward tendency after rising first in general, but did not exhibit the phenomenon of significantly lower than the control group. LSZ activities in hepatopancreas and gill both increased significantly to the peak level at 3 h, and then returned to the control group level gradually. The results indicated that *V. parahaemolyticus* challenge had noticeable impact on non-specific immune enzyme activities of *P. monodon*, and significant destructive effect to the shrimp's immune system.

**Key words:** *Penaeus monodon*; *Vibrio parahaemolyticus*; total antioxidant capacity; acid phosphatase; alkaline phosphatase; lysozyme

**Corresponding author:** ZHANG Jiasong. E-mail: jiasongzhang@hotmail.com