

## 感染溶藻弧菌对日本蟳肝胰腺免疫功能的影响

张萌萌, 宁俊佳, 徐善良, 王春琳, 王丹丽\*

(宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211)

**摘要:**为探讨日本蟳感染溶藻弧菌的致病机理,采用溶藻弧菌人工感染健康日本蟳,分析了感染前后日本蟳肝胰腺 PO、SOD 和 LSZ 活性变化及注射免疫多糖后的免疫保护率,并研究了细胞超微结构的病理组织学。结果表明:日本蟳感染溶藻弧菌后,肝胰腺中 PO、SOD 和 LSZ 的活性均受到不同程度的影响,感染 6~12 h,3 种酶的活性均有一个上升的过程,但之后随着时间的延长呈现下降趋势;免疫感染组因感染弧菌前注射了免疫多糖,日本蟳肝胰腺中 PO、SOD 和 LSZ 酶活性均显著高于感染组的酶活性,感染 7 d 后的免疫保护率高达 72.73%,表明免疫多糖可提高酶的活性,使机体的抗病菌能力增强。超微结构显示:对照组日本蟳肝胰腺细胞结构形态正常,上皮细胞表面的微绒毛排列整齐,各细胞器结构完整;免疫组内质网、糖原颗粒和线粒体丰富,微绒毛排列致密;感染组肝胰腺组织受到明显的损伤,细胞和部分微绒毛脱落、受损;线粒体和粗面内质网变形、水肿或仅剩一空泡;核高度异染色质化,核膜破裂。与感染组相比,免疫后感染组具有形态结构较正常的细胞核、整齐致密的微绒毛和丰富的溶酶体,但依然可见水肿的内质网和狭长畸变的线粒体。

**关键词:**日本蟳;溶藻弧菌;肝胰腺;免疫酶活性;免疫保护率;超微结构

**中图分类号:**S 917.1

**文献标志码:**A

日本蟳 (*Charybdis japonica*) 别名海蟳、石蟹等,隶属甲壳纲 (Crustacea)、十足目 (Decapoda)、梭子蟹科 (Portunidae)、蟳属 (*Charybdis*)。于中国、日本、朝鲜和东南亚等国沿海岛礁区及浅海水域均有广泛分布。其肉味鲜美、营养丰富、生长快,并具有清热、滋补、消肿等功效,为经济价值较高的中型海产蟹类<sup>[1]</sup>。国内外学者已对其胚胎发育、生态习性、摄食习性和人工育苗及养殖技术进行了研究<sup>[1-4]</sup>。随着水产养殖业的迅速发展,各种养殖病害也日趋影响日本蟳养殖产业的发展。其中溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 是危害最大的病原菌之一,弧菌是一类可引起肠道感染的条件致病菌,其在自然海区有广泛分布,宿主覆盖面广,虾、蟹等各种水生动物易感染患病,甚至死亡<sup>[5]</sup>,给日本蟳养殖业常造成严重的经济损失<sup>[6-7]</sup>,由该菌引起的甲壳类疾病颇受关注<sup>[6]</sup>。

现阶段弧菌病的防治对抗生素和化学药物的依赖还很大,但滥用药物会引起一系列的环境问题,特别是诱使病原菌产生耐药性,甚至威胁人类的健康<sup>[8-9]</sup>。综合防治的有效手段之一是提升日本蟳自身免疫和抗病机能,已有相关学者对该病的流行病学、病原检测及预防进行了研究<sup>[10-12]</sup>。但针对日本蟳病害的研究鲜见报道,基础研究已明显落后于生产实践。肝胰腺作为甲壳动物的代谢中心主要起着营养物质储存、解毒以及滤出外来异物的功能<sup>[13]</sup>,细菌侵入甲壳动物体内会损害肝胰腺等组织器官,并能引起其生理功能的改变<sup>[6]</sup>。因此本研究向健康日本蟳体内注射溶藻弧菌悬液,分析人工感染前后日本蟳肝胰腺中酚氧化酶 (phenoloxidase, PO)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和溶菌酶 (lysozyme, LSZ) 的活性及注射免疫多糖后的免疫保护率,并研究了其

收稿日期:2015-04-07 修回日期:2015-08-01

资助项目:国家级科研专项(2012AA10A409);宁波市创新团队专项(2011B81003);宁波大学“水产”浙江省重中之重开放基金(xkzsc1409)

通信作者:王丹丽, E-mail:wangdanli@nbu.edu.cn

超微结构的病理组织学,以期为深入探讨日本鳎感染溶藻弧菌的致病机理及养殖生产中感染溶藻弧菌的预防提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验用蟹

实验用日本鳎于2010年3月至4月采捕于浙江宁波近岸海域(29°45' N、121°50' E),个体质量(50.5 ± 5.0)g,挑选健康完整的个体暂养于实验室水箱,实验前暂养7 d,实验期间,饲养条件稳定,温度(22 ± 2) °C,盐度25 ± 2,循环水,24 h连续充气,每天投喂饲料2次,次日吸污,清除残饵。

### 1.2 免疫多糖

免疫多糖从湖北安琪酵母有限公司购得(酵母细胞壁),此产品含有肽类及蛋白质(30.0%)、β-葡聚糖(29.0%)和α-甘露聚糖肽(20.0%)等成分。0.5%免疫多糖溶液用生理盐水配制而成,灭菌后备用。

### 1.3 溶藻弧菌悬液制备

溶藻弧菌菌种由宁波大学微生物重点实验室提供, -80 °C保存备用。注射前先活化接种于LB斜面培养基上,恒温培养24 h,洗落菌苔制备成菌悬液。采用麦氏比浊法初步估算注射的溶藻弧菌悬液浓度为10<sup>8</sup> CFU/mL。为得精确浓度,将菌悬液稀释成8个浓度梯度,取最小3个浓度梯度,采用静置平板法重复3次,28 °C恒温培养48 h,计算菌落数,得出浓度为4.25 × 10<sup>8</sup> CFU/mL。

### 1.4 实验分组

将实验日本鳎随机分为4组,每组3个重复,每个重复3只。于日本鳎第3步足基膜处进行注射。对照组:0.15 mL 0.85%的无菌生理盐水/只;免疫组:0.15 mL 0.5%的免疫多糖溶液/只;感染组:0.15 mL 0.85%的无菌生理盐水/只,24 h后注射0.15 mL 溶藻弧菌悬液/只;免疫感染组:注射0.15 mL 0.5%免疫多糖溶液/只,免疫24 h后注射0.15 mL 溶藻弧菌悬液/只;免疫保护率实验感染组和免疫后感染组分别3个重复,每个重复15只蟹。

### 1.5 肝胰腺提取液的制备

分别在注射后0、6、12、24、72和120 h解剖实验蟹取肝胰腺,准确称取0.5 g,按重量体积比加无菌生理盐水于Precellys24多功能样品匀质器(Bertin公司,法国)中匀浆,制备成10%的组

织匀浆,于4 °C条件下,以3 500 r/min离心10 min,除去沉淀后即为本鳎的肝胰腺组织提取液。感染组和免疫感染组实验中,注射溶藻弧菌前取样为0 h对照组。

### 1.6 酶活测定

PO的活性测定 以0.01 mol/L的L-dopa(上海伯奥生物科技公司,GB1009)为特异性底物,参照Ashida<sup>[14]</sup>的方法进行。测定时将100 μL待测酶液及100 μL 0.01 mol/L的L-dopa于28 °C恒温水浴中混匀,反应40 min后加入3 mL预冷的0.1 mol/L的磷酸钾缓冲液(pH 6.0)。

OD和LSZ的活性测定 测定SOD和LSZ酶活力的试剂盒购于南京建成生物工程研究所。酶活力测定均用可见分光光度计(Spectrumlab 22pc, Lengquang Tech.)。组织匀浆粗提液中蛋白含量采用南京建成生物工程研究所考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒测定。

### 1.7 电镜样品制备及观察

取未感染弧菌0 h组及实验72 h的免疫组、感染组和免疫感染组的活体日本鳎的肝胰腺分割成约1 mm<sup>3</sup>的小块,经过2.5%戊二醛和1%锇酸双固定后,置于冰箱中4 °C保存,样品经乙醇系列脱水,环氧树脂Epon812包埋后,利用RMC Power Tome XL超薄机切片,采用醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染法对切片染色后,通过日立H-7650型透射电镜观察样品并拍照、记录结果。

### 1.8 免疫保护率

健康日本鳎体内注射7.14 × 10<sup>8</sup> CFU/mL的溶藻弧菌悬液,之后连续7 d观察并记录各组死亡情况。计算免疫保护率:

免疫保护率(%) = (对照组死亡率 - 免疫组死亡率) / 对照组死亡率 × 100%

### 1.9 数据分析

利用SPSS 14.0软件进行数据统计分析,以平均值 ± 标准差(mean ± SD)表示实验数据,采用One-Way ANOVA法和Duncan氏检验法分别进行显著性检验和多重比较。

## 2 结果

### 2.1 日本鳎感染溶藻弧菌后肝胰腺中免疫相关酶活性变化

溶藻弧菌感染后PO活性的变化 与对照组相比,注射弧菌后感染组和免疫感染组日本鳎肝

胰腺 PO 活性在 24 h 内均明显升高 ( $P < 0.05$ ),并在 6 和 12 h 时活力达到最高值,分别为 325.13 和 416.33  $U/10^3$ ,约为对照组的 1.81 ~ 2.27 倍(图 1)。随着感染时间延长,PO 活性迅速下降。从图中可见注射免疫多糖后的免疫组肝胰腺的 PO 活性均呈显著上升趋势 ( $P < 0.05$ )。免疫感染组由于在感染弧菌前注射了免疫多糖,使 PO 活性在感染各时间段总体明显高于感染组 ( $P < 0.05$ )。

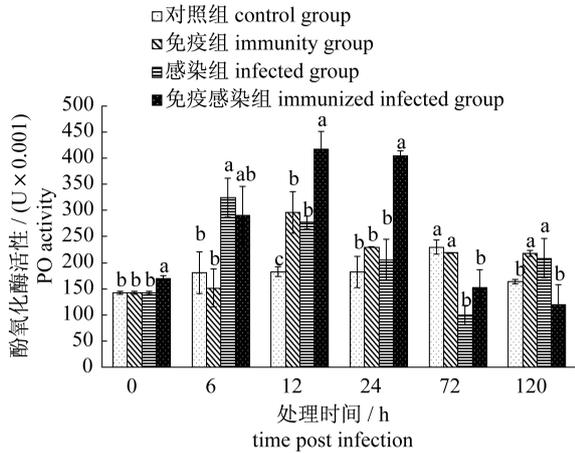


图 1 溶藻弧菌感染对日本蟳肝胰腺 PO 活性的影响  
 Fig. 1 Effect of infection by *V. alginolyticus* on PO activities in *C. japonica* hepatopancreas

Different superscripts (a, b, c) have significant differences above bar chart ( $P < 0.05$ ), the same below

溶藻弧菌感染后 SOD 活性的变化 注射免疫多糖后肝胰腺 SOD 活性高于对照组 ( $P < 0.05$ ),与感染组相比,免疫感染组的肝胰腺 SOD 活性明显维持在一个较高的水平 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。

两感染组 SOD 活性均有一个先上升再下降的过程。感染组和免疫感染组在 12 h 达到最高值,分别为 35.22 和 61.55  $U/mg$  prot,是对照组的 1.51 倍和 2.64 倍。同样随着感染时间延长,SOD 活性呈下降趋势。

溶藻弧菌感染后 LSZ 活性的变化 免疫感染组肝胰腺 LSZ 活性至 12 h 时达到最高值,分别为对照组和感染组的 1.44 倍和 3.73 倍;感染组肝胰腺 LSZ 活性在 6 h 时达最高值后呈下降趋势;免疫组 LSZ 活性呈先下降后上升趋势,在 24 h 达到最高值;免疫感染组由于在感染弧菌前注射了免疫多糖,使 LSZ 活性总体上明显高于感染组 ( $P < 0.05$ ,图 3)。

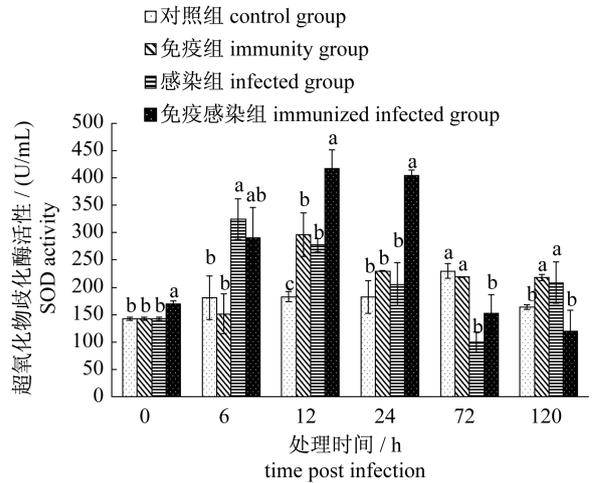


图 2 溶藻弧菌感染对日本蟳肝胰腺 SOD 活性的影响  
 Fig. 2 Effect of infection by *V. alginolyticus* on SOD activities in *C. japonica* hepatopancreas

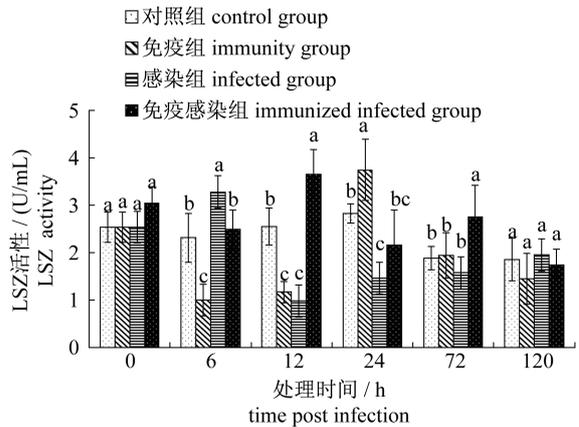


图 3 溶藻弧菌感染对日本蟳肝胰腺 LSZ 活性的影响  
 Fig. 3 Effect of infection by *V. alginolyticus* on LSZ activities in *C. japonica* hepatopancreas

## 2.2 免疫多糖(酵母细胞壁)对日本蟳免疫保护率的影响

日本蟳注射溶藻弧菌 7 d 后,直接感染的日本蟳组死亡率高达 73.33%,免疫感染组的死亡率仅为 20.0%,明显低于感染组 ( $P < 0.05$ ),主要由于感染弧菌前注射免疫多糖起到了保护作用,免疫保护率达到 72.73% (图 4)。

## 2.3 日本蟳感染溶藻弧菌后肝胰腺的超微结构

对照组日本蟳肝胰腺中,上皮细胞形态正常,细胞核内染色质均匀,含有丰富滑面内质网,且有大量核糖体附于粗面内质网上(图版-1);单层柱状上皮细胞内含丰富的扁平囊状内质网(图版

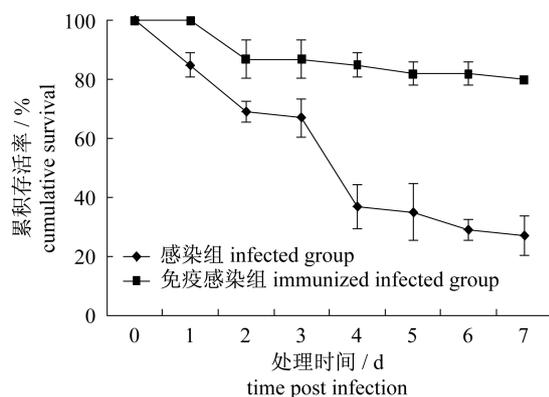


图4 日本螯感染溶藻弧菌后的累积存活率

Fig. 4 Cumulative survival of *C. japonica* challenged with *V. alginolyticus*

-2);肝小管上皮细胞表面整齐排列着大量微绒毛,线粒体和糖原颗粒分布于微绒毛基部(图版-3,4);免疫组上皮细胞形态比较正常,内质网、线粒体和糖原颗粒含量较丰富(图版-5,6);微绒毛排列致密且有较多线粒体和糖原颗粒分布于其基部(图版-7,8);感染组中细胞核变形、异染色质化严重(图版-9);线粒体双层膜裂解,内嵴断裂甚至部分消失,细胞排列杂乱(图版-10);细胞结构空泡化,微绒毛排列杂乱(图版-11);细胞核异染色质化,核膜部分裂解,内质网严重水肿,囊泡化(图版-12);免疫感染组细胞较正常,内质网水肿(图版-13);微绒毛排列较整齐,细胞质稀薄,线粒体畸变狭长(图版-14);微绒毛排列整齐致密,溶酶体含量丰富(图版-15)。

### 3 讨论

#### 3.1 感染溶藻弧菌对日本螯肝胰腺中 PO、SOD 和 LSZ 活性的影响

酚氧化酶原(proPO)激活系统是一个复杂酶级联反应体系,类似于脊椎动物的补体系统<sup>[15]</sup>,由丝氨酸蛋白酶和其他因子组成,在甲壳动物免疫中发挥着重要的作用,PO活性可以作为一项免疫指标来衡量甲壳动物的免疫状态<sup>[16]</sup>。本实验研究中,感染溶藻弧菌6h时,肝胰腺PO活性明显高于对照组( $P < 0.05$ ),说明短时间内溶藻弧菌刺激可以诱导酚氧化酶原系统,该系统在丝氨酸蛋白酶激活后释放酚氧化酶,使得PO活性开始上升,随着感染时间的延长,溶藻弧菌增殖,越来越多的弧菌侵入日本螯肝胰腺中,细胞吞噬、包裹作用等已不能消除所有的病原体,导致日本螯

自身的免疫机制受损,因此6h后PO活性明显下降。免疫感染组12h达到最大峰值,12~72h均高于感染组( $P < 0.05$ ),这也说明注射免疫多糖可以增强机体的免疫力,从而增强抗病力。相似的研究结果有Xu等<sup>[17]</sup>注射免疫多糖能提高日本螯对溶藻弧菌感染的免疫能力,Wang等<sup>[18]</sup>注射甲壳素(chitin)和壳聚糖(chitosan)能提高凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)对感染溶藻弧菌的免疫力。

SOD清除超氧自由基的能力强,是机体内非常重要的抗氧化酶,可防止生物分子损伤。弧菌进入动物体内后进行生命活动会产生大量自由基,抗氧化酶不能及时清除,酶活性将受到影响,对机体造成氧化损伤,表现出毒理症状<sup>[19]</sup>,所以SOD活性的变化可作为一个生物标志物来研究弧菌对生物体的毒性效应。当虾蟹机体受到的逆境胁迫程度较轻时,SOD活性被诱导,起积极保护作用,当逆境胁迫超过一定限度时,反而会抑制SOD活性<sup>[20]</sup>。本研究显示,感染12h后,免疫感染组日本螯肝胰腺中的SOD活性比对照组上升了62.21%,感染组比对照组上升了33.76%,可见在注射后酶活性逐渐升高,但随感染时间的延长SOD活性均呈下降趋势,这是因为最初在弧菌的诱导下日本螯机体内产生大量自由基,SOD酶活性被激发增强以清除过量的自由基,但随着有害游离自由基的不断积累,超出了SOD的清除能力,继而造成机体代谢失调、抗氧化系统机能紊乱,导致SOD活性下降<sup>[21]</sup>。这与陈萍等<sup>[22]</sup>用溶藻弧菌感染三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)后肝胰腺组织中SOD活性随着感染时间的延长而显著降低的研究结果一致,也和翟秀梅等<sup>[23]</sup>用弧菌感染凡纳滨对虾的研究结果一致。

LSZ是吞噬细胞杀菌的物质基础,能水解革兰氏阳性细菌细胞壁中粘肽的乙酰氨基多糖,破坏入侵的病原体,从而保护生物体。本研究中2个感染组肝胰腺LSZ活性的变化与PO和SOD活性的变化趋势基本一致,即LSZ活性在12h内均明显升高,之后呈下降趋势。与黄旭雄等<sup>[24]</sup>用弧菌感染中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)后腹肌中LSZ活性的变化相一致、也与Misra等<sup>[25]</sup>用弧菌感染罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)后血淋巴LSZ活性变化和Xu等<sup>[17]</sup>对日本螯感染溶藻弧菌后鳃LSZ活性变化的研

究报道一致。

以上酶活性的研究结果体现了免疫相关酶的活性在一定程度上反映了机体免疫机能状态,健康的日本鳊体内微生态处于动态平衡,当注射了病原菌后,逐渐打破了日本鳊体内的微生态平衡,激发了日本鳊的免疫系统产生免疫应答,加速合成免疫相关酶,酶活性被诱导激活,但随着弧菌侵入机体时间延长,导致日本鳊免疫防御机能下降,使这些免疫相关酶活力大幅度下降,进而引起日本鳊出现死亡。免疫增强剂通过活化自身的免疫机能而显示机体的防御效果,本研究中,注射免疫多糖后再受病毒感染的日本鳊,在肝胰腺中3种酶活性与感染组相比基本上都维持在一个较高的水平,免疫感染组7d后的死亡率明显低于直接感染组( $P < 0.05$ )免疫保护率,达到72.73%。曹剑香等<sup>[26]</sup>对凡纳滨对虾和苏永腾等<sup>[27]</sup>对罗氏沼虾的免疫保护率研究也得到了相似的结果。上述结果表明免疫增强剂可增强动物免疫抵抗力,对虾蟹具有免疫保护作用,可防御弧菌感染<sup>[17,20,28-30]</sup>。

### 3.2 免疫多糖及溶藻弧菌感染对日本鳊肝胰腺细胞超微结构的影响

肝胰腺能够合成和分泌消化酶并吸收和贮存营养物质,组成了消化系统的重要部分,同时也是生物体内重要的解毒器官。对虾肝胰腺中的分泌细胞和吸收细胞分别完成消化和吸收功能<sup>[31]</sup>。分泌细胞内的溶酶体可将外源颗粒物质包裹,通过外排作用将其排至肝管腔,后经消化道排出体外,但这种解毒机制是非常有限的。日本鳊在人工感染溶藻弧菌72h后,免疫相关酶活性大幅度下降,机体的免疫防御机能受损,与此相呼应的是日本鳊肝胰腺细胞结构也发生了显著的变化。如微绒毛减少以至消失,线粒体受损变形,膜破裂,部分嵴断裂消失等。线粒体双层膜裂解、内嵴断裂或消失,致使消化酶合成受阻,影响机体代谢;肝管上皮细胞和微绒毛排列杂乱或受损,肝胰腺分泌与吸收功能变弱;细胞结构空泡化,核膜部分裂解,内质网严重水肿,囊泡化;细胞核高度异染色质化,由该部位的基因转录活性显著降低引起。这些病变致使肝胰腺吸收和合成功能紊乱或丧失,破坏机体新陈代谢,导致机体抵抗力下降甚至死亡,降低日本鳊的存活率。本研究发现,与对照组相比,注射免疫多糖后日本鳊肝胰腺细胞

形态变化不明显,内质网数量增加。酶原颗粒、粗面内质网和游离核糖体参与蛋白质合成及贮存过程并起重要作用<sup>[32]</sup>,肝胰腺是蛋白质合成、脂肪和糖原颗粒贮存的重要器官,在免疫多糖刺激下,肝胰腺合成消化酶,细胞脂滴数量增加,糖原颗粒丰富,表明免疫多糖增强肝胰腺合成消化酶、储存脂肪和糖原的能力,提升肝胰腺生理功能,一定程度上增强了机体免疫力,结果与樊廷俊等<sup>[29]</sup>对日本鳊,以及黄旭雄等<sup>[24]</sup>对中国明对虾的研究结论相一致。与感染组相比,免疫感染组细胞核形态较正常,微绒毛排列整齐致密,溶酶体丰富,但部分线粒体受损变形,畸变,核膜部分裂解,细胞质较稀薄,内质网水肿,表明该组肝胰腺细胞已受到损害,只是受损程度低于直接感染组,日本鳊的机体生理功能也将减弱。综合分析酶的活性和细胞超微结构的研究结果,可得出人工向日本鳊注射免疫增强剂能够提高其抵御溶藻弧菌侵染的能力,降低机体受损程度。

### 参考文献:

- [1] Xu X H, Xu J T, Yan B L, et al. Technique of artificial breeding for *Charybdis japonica* [J]. China Fisheries, 2009, (2): 48 - 49. [许星鸿,徐家涛,阎斌伦,等.日本鳊人工育苗技术.中国水产,2009,(2):48-49.]
- [2] Jiang W M, Meng T X, Chen R S, et al. Diet of *Charybdis japonica* (A. Milne-Edwards) and *Portunus trituberculatus* (Miers) in the Bohai Sea [J]. Marine Fisheries Research, 1998, 19(1): 53 - 59. [姜卫民,孟田湘,陈瑞盛,等.渤海日本鳊和三疣梭子蟹食性的研究.海洋水产研究,1998,19(1):53-59.]
- [3] Wang C L, Xue L Y, Liu F Y, et al. Preliminary experimental study of *Charybdis japonica* ecology and feeding habits [J]. Shandong Fisheries, 1998, 15(3): 18 - 20. [王春琳,薛良义,刘凤燕,等.日本鳊实验生态及摄食习性的初步研究.齐鲁渔业,1998,15(3):18-20.]
- [4] Xu X H, Xu J T, Yan B L, et al. Studies on the technique for seed rearing and the culture of *Charybdis japonicus* [J]. Shandong Fisheries, 2010, 27(1): 28 - 30. [许星鸿,徐家涛,阎斌伦,等.日本鳊人工增养殖技术.齐鲁渔业,2010,27(1):28-30.]
- [5] Moriarty D J W. The role of microorganisms in aquaculture ponds [J]. Aquaculture, 1997, 151(1 -

- 4);333-349.
- [6] Gonzalez E N, Blackstone G M, DePaola A. Characterization of a *Vibrio alginolyticus* strain, isolated from Alaskan oysters, carrying a hemolysin gene similar to the thermostable direct hemolysin related hemolysin gene (trh) of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(12):7925-7929.
- [7] Tseng I T, Chen J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2004, 17(4):325-333.
- [8] Si Y. Abuse of antibiotics and aquatic food safety [J]. Ocean World, 2008, (12):19-21. [思源. 抗生素滥用与水产食品安全. 海洋世界, 2008, (12):19-21.]
- [9] Zhang L M, Wang J Y, Li P Y, et al. Safety and application of antibiotics in aquaculture [J]. Animals Breeding and Feed, 2007, (11):26-29. [张利民, 王际英, 李培玉, 等. 抗生素在水产养殖上的安全性与应用问题. 养殖与饲料, 2007, (11):26-29.]
- [10] Xia Z P. An epidemiological investigation on food poisoning caused by *Vibrio alginolyticus* in Island tourism spot [J]. Zhejiang Journal of Preventive Medicine, 2008, 20(12):6-7. [夏追平. 海岛旅游区溶藻弧菌食物中毒的流行病学调查. 浙江预防医学, 2008, 20(12):6-7.]
- [11] Wen C Q, Xue M, He H, et al. Isolation and identification of two pathogenic strains associated with Vibriosis of shrimp larvae [J]. Microbiology China, 2008, 35(3):346-352. [温崇庆, 薛明, 何红, 等. 两株对虾幼体弧菌病原的分离和鉴定. 微生物学通报, 2008, 35(3):346-352.]
- [12] Balehona M C, Andreu M J, Bordas M A, et al. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt head sea bream (*Sparus aurata* L.) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(11):4269-4275.
- [13] Chen Y F, Ai C X, Lin Q W, et al. Effect of salinity stress on the activities of phenoloxidase and superoxide dismutase of the serum, tissue and organ of mud crab, *Scylla serrata* [J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2007, 26(4):569-575. [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. 台湾海峡, 2007, 26(4):569-575.]
- [14] Ashida M. Purification and characterization of pre-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1971, 144(2):749-762.
- [15] Wang L, Li G Y. Progress on the researches of humoral immunity of crustacean [J]. Marine Sciences, 1992, 5(3):18-19. [王雷, 李光友. 甲壳动物的体液免疫研究进展. 海洋科学, 1992, 5(3):18-19.]
- [16] Tao B H, Hu C H, Ren C H. The immunological protection of *Vibrio* vaccine to *Penaeus monodon* and *Penaeus japonicus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(6):564-569. [陶保华, 胡超群, 任春华. 弧菌疫苗对斑节对虾和日本对虾免疫预防的作用. 水产学报, 2000, 24(6):564-569.]
- [17] Xu S L, Wang D L, Jia C Y, et al. Effects of *Vibrio alginolyticus* infection on immuno-enzyme activities and ultrastructure of *Charybdis japonica* gills [J]. Aquaculture, 2013, (396-399):82-88.
- [18] Wang S H, Chen J C. The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2005, 19(3):191-204.
- [19] Hukmark D, Steiner H, Rasmussen T, et al. Purification and properties of three inducible bacterial protein from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* [J]. European Journal of Biochemistry, 1980, 106(1):7-16.
- [20] Raa J. A review of the use of non specific immune stimulants to reduce the impact of the WSSV [C] // Newman S G. Fifth Ecuadorian Aquaculture Conference. Lynnwood: Aquaculture, 1999, 28-30.
- [21] Winston G W, Di Giulio R T. Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organism [J]. Aquatic Toxicology, 1991, 19(2):137-161.
- [22] Chen P, Li J T, Li J, et al. Effect on antioxidant enzyme system of *Portunus trituberculatus* infected by *Vibrio alginolyticus* [J]. Marine Sciences, 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.]
- [23] 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 Ocean 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.]
- [24] Huang X X, Zhou H Q, Song L P. The effect of acute infection on the innate immune activities of the

- Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [ J ]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, 31 ( 3 ): 325 - 331. [ 黄旭雄, 周洪琪, 宋理平. 急性感染对中国明对虾非特异免疫水平的影响. *水生生物学报*, 2007, 31 ( 3 ): 325 - 331. ]
- [ 25 ] Misra C K, Das B K, Pradhan J, *et al.* Changes in lysosomal enzyme activity and protection against *Vibrio* infection in *Macrobrachium rosenbergii* ( De Man ) post larvae after bath immunostimulation with  $\beta$  - glucan [ J ]. *Fish and Shellfish Immunol*, 2004, 17 ( 4 ): 389 - 395.
- [ 26 ] Cao J X, Jian J C, Wu Z H. Effect of *Vibrio alginolyticus* vaccine on *Penaeus vannamei* immunity [ J ]. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2004, 24 ( 6 ): 11 - 17. [ 曹剑香, 简纪常, 吴灶和. 溶藻弧菌疫苗对凡纳滨对虾免疫功能的影响. *湛江海洋大学学报*, 2004, 24 ( 6 ): 11 - 17. ]
- [ 27 ] Su Y T, Liu B, Zhou Q L, *et al.* Influence of anthraquinones extracted from *Rheum officinale* Bail promoting *Macrobrachium rosenbergii*'s resistance to *Vibrio anguillarum* [ J ]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32 ( 3 ): 455 - 463. [ 苏永腾, 刘波, 周群兰, 等. 大黄蒽醌提取物对罗氏沼虾抗鳗弧菌感染的研究. *水产学报*, 2008, 32 ( 3 ): 455 - 463. ]
- [ 28 ] Chen G F, Song X L, Huang J, *et al.* Effects of A3 $\alpha$  peptidoglycan on growth of *Penaeus vannamei* larvae and resistance to virus [ J ]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11 ( 5 ): 448 - 455. [ 陈国福, 宋晓玲, 黄健, 等. A3 $\alpha$  肽聚糖对凡纳对虾幼体生长及抗病毒感染力的影响. *中国水产科学*, 2004, 11 ( 5 ): 448 - 455. ]
- [ 29 ] Fan T J, Yu M M, Yang L L, *et al.* Effects of four kinds of immunostimulants on phenoloxidase and hemocytes of crab *Charybdis japonica* [ J ]. *Periodical of Ocean University of China: Natural Science*, 2009, 39 ( 3 ): 421 - 428. [ 樊廷俊, 于苗苗, 杨玲玲, 等. 四种免疫促进剂对日本鳎酚氧化酶和血细胞的影响. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2009, 39 ( 3 ): 421 - 428. ]
- [ 30 ] Suphantharika M, Khunrae P, Thanardkit P, *et al.* Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$  - glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon* [ J ]. *BioreSource Technology*, 2003, 88 ( 1 ): 55 - 60.
- [ 31 ] Zhang K J. Toxication of  $Zn^{2+}$  and  $NH_3$  on hepatopancreas of *Penaeus orientalis* [ J ]. *Journal of Fisheries of China*, 1993, 17 ( 1 ): 52 - 59. [ 张克俭. 锌和氨氮对对虾肝胰腺的毒性作用. *水产学报*, 1993, 17 ( 1 ): 52 - 59. ]
- [ 32 ] Vogt G, Storch V, Quinito E T, *et al.* Midgut gland as monitor organ for the nutritional value of diets in *Penaeus monodon* ( Decapod ) [ J ]. *Aquaculture*, 1985, 48 ( 1 ): 1 - 12.

## Effect of *Vibrio alginolyticus* infection on immune function of *Charybdis japonica* hepatopancreas

ZHANG Mengmeng, NING Junjia, XU Shanliang, WANG Chunlin, WANG Danli\*

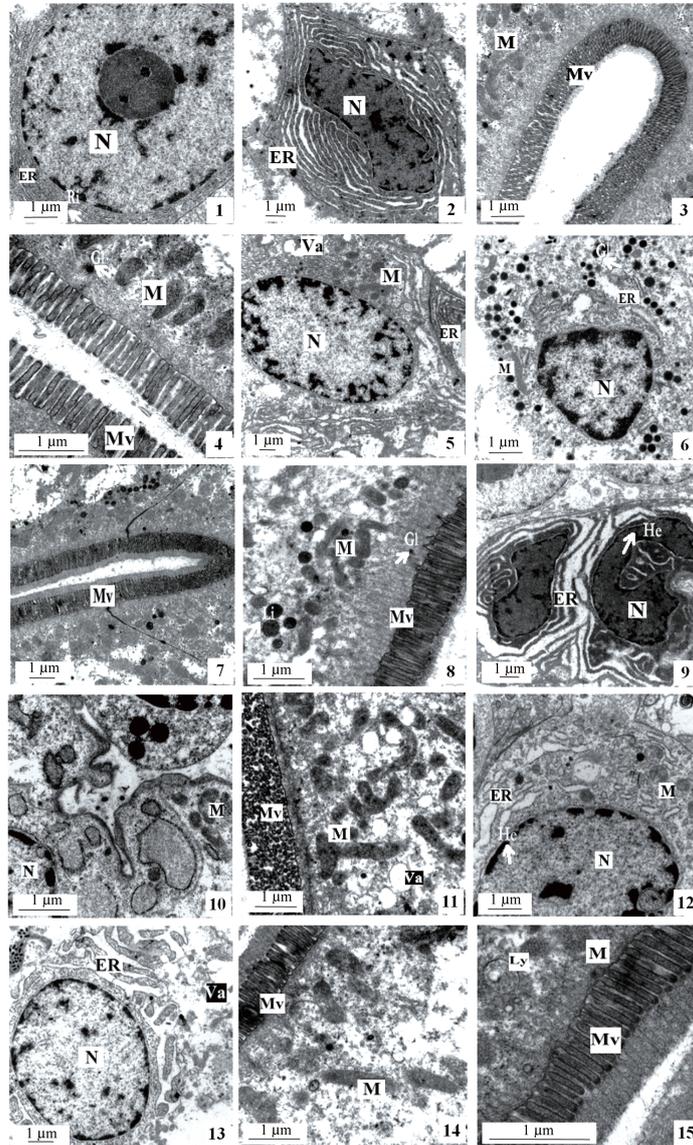
(College of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** *Charybdis japonica* is widely distributed along the coasts of China, Japan, Korea and Southeast Asia. Desired for its good taste as well as being rich in protein and low in cholesterol, this crab is currently one of the most important commercially farmed crabs in the world due to its rapid growth and easy culture methods. During the last two decades with the constantly expanding scale of aquaculture and the rapid development of intensive culture techniques in China, the environmental and health problems in *C. japonica* cultures have resulted in outbreak of infectious diseases. The worldwide shrimp/crab culture industry has suffered significant economic losses due to diseases mainly caused by vibrios, particularly *Vibrio alginolyticus*, one of the most detrimental pathogens widely disseminated in crabs. In recent years, the treatment of bacterial diseases of aquatic animals has relied on application of large quantities of antibiotics, which not only causes development of drug resistant pathogens but also presents a health risk to humans. Improving immunity and disease resistance in crustaceans is one of the fundamental measures for preventing and controlling disease. In this study, the pathogenic mechanism of a Gram – negative bacterium *Vibrio alginolyticus* in the stone crab *Charybdis japonica* was explored by investigating activities of enzymes related to innate immune function during infection, i. e. phenoloxidase (PO), superoxide dismutase (SOD) and lysozyme (LSZ). Four groups of crabs were tested by intramuscular injection of *C. japonica*: control group, normal saline; immunity group, 0.5% polysaccharide; infected group, normal saline plus *V. alginolyticus* challenge 24 h later; immunized infected group, 0.5% polysaccharide plus *V. alginolyticus* challenge 24 h later. After 6 – 12 h of exposure to *V. alginolyticus*, the activities of PO, SOD and LSZ increased in *C. japonica* hepatopancreas, but then decreased over longer infection time. Interestingly, enzyme activities in crabs treated with polysaccharides before *V. alginolyticus* challenge were higher than those in infected group, showing an immunoprotective rate of 72.73% at 7 days after exposure. This phenomenon suggested that the polysaccharides could enhance the organism's antiviral defenses by improving activities of immunoenzymes. Morphological examination by transmission electron microscopy revealed significant damage in the hepatopancreas of *V. alginolyticus* – infected crabs, showing parts of the hepatopancreas epithelium and microvilli were reduced in number and size or damaged. Meanwhile, morphology of the mitochondria and rough endoplasmic reticulum (RER) changed. Moreover, heterochromatinized nuclei could be seen in hemocytes with ruptured nuclear membranes. The structure of hepatopancreas nuclei in immunized infected group was normal compared with that in infected group, and the microvilli arranged densely in neat rows. The lysosomes in hepatopancreas cell of immunized infected group increased; however, droptical endoplasmic reticulum, thin cytoplasm and distorted mitochondria could still be seen.

**Key words:** *Charybdis japonica*; *Vibrio alginolyticus*; hepatopancreas; immune enzymes activity; immune protection rate; ultrastructure

**Corresponding author:** WANG Danli. E-mail: wangdanli@nbu.edu.cn

**Funding projects:** National research projects (2012AA10A409); the Innovation Team Project of Ningbo, China (2011B81003); the Open Fund of Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Aquaculture in Ningbo University (xkzsc1409)



图版 溶藻弧菌感染前后日本鳎肝胰腺的超微结构观察

1. 对照组,示细胞结构形态正常; 2. 对照组,示内质网丰富; 3. 对照组,示微绒毛排列整齐; 4. 对照组,示微绒毛基部线粒体丰富; 5. 免疫组,示内质网丰富; 6. 免疫组,示糖原颗粒(箭头)和线粒体丰富; 7. 免疫组,示微绒毛排列整齐、致密; 8. 免疫组,示微绒毛基部较多线粒体; 9. 感染组,示细胞核变形、异染色质化严重(箭头); 10. 感染组,示细胞排列杂乱; 11. 感染组,示细胞结构空泡化,微绒毛排列杂乱; 12. 感染组,示内质网水肿、囊泡化严重; 13. 免疫感染组,示内质网轻微水肿; 14. 免疫感染组,示线粒体畸变,微绒毛排列较整齐; 15. 免疫感染组,示微绒毛排列致密

N:细胞核; Ri:核糖体; ER:内质网; Mv:微绒毛; M:线粒体; He:异染色质化; Gl:糖原颗粒; Va:空泡; Ly:溶酶体

**Plate Ultrastructural observation on hepatopancreas of *C. japonica* infected by *V. alginolyticus***

1. control group, normal cell morphology; 2. control group, rich endoplasmic reticulum; 3. control group, microvilli arranged in neat rows; 4. control group, abundant mitochondria under microvilli; 5. immunity group, endoplasmic reticulum richly; 6. immunity group, glycogen granules (arrow) and mitochondria richly; 7. immunity group, microvilli arranged in neat rows; 8. immunity group, more mitochondria under microvilli; 9. infected group, deformed nucleus and nucleus heterochromatinization seriously (arrow); 10. infected group, cells arranged in disorder; 11. infected group, microvilli cluttered and vacuolized cell structure; 12. infected group, cell structure with central vacuole, microvilli arranged messily; 13. immunized infected group, endoplasmic reticulum with slight edema; 14. immunized infected group, microvilli arranged compact and distorted mitochondria; 15. immunized infected group, microvilli with dense arrangement

N: nucleus; Ri: ribosome; ER: endoplasmic reticulum; Mv: microvilli; M: mitochondria; He: heterochromatin; Gl: glycogen granule; Va: vacuoles; Ly: lysosome