

## 高pH胁迫对克氏原螯虾的急性毒性和鳃、肝胰腺中酶活性及组织结构的影响

陶易凡<sup>1,2</sup>, 强俊<sup>2</sup>, 王辉<sup>3</sup>, 徐跑<sup>1,2\*</sup>, 马昕羽<sup>1</sup>, 赵文强<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心,

农业部淡水渔业与种质资源利用重点实验室, 江苏无锡 214081;

3. 淮阴师范学院生命科学学院, 江苏淮安 223300)

**摘要:** 研究了高pH胁迫对克氏原螯虾鳃、肝胰腺中酶活性的变化, 以及对鳃、肝胰腺组织结构的影响。在得出96 h LC<sub>50</sub>的基础上, 设置对照(pH7.6)和实验(pH10.2)2个pH处理组, 进行96 h高pH胁迫, 于胁迫后0、2、8、24和96 h测定鳃Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、延胡索酸还原酶(fumarate reductase, FRD)、肝胰腺超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)的活性以及丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量, 并采集完整的鳃、肝胰腺做组织切片观察。结果发现, 96 h LC<sub>50</sub> pH值为10.194。高pH应激后, 实验组鳃Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶、LDH和FRD的活性呈上升趋势, pH胁迫8 h后与对照组差异显著( $P < 0.05$ ); 随胁迫时间的延长, 实验组肝胰腺MDA含量的变化趋势与LDH和FRD相似, CAT活性呈先上升后下降趋势, SOD活性起初变化不大, pH胁迫24 h后出现明显下降( $P < 0.05$ )。鳃和肝胰腺的组织观察表明, 随着pH胁迫时间的延长, 鳃呼吸上皮细胞逐渐脱落, 角质层受损、破裂, 鳃叶受损程度逐渐加剧; 肝胰腺小管基膜破损, 小管内空泡增多、体积增大, 肝细胞细胞数量减少。研究表明, 高pH胁迫对克氏原螯虾代谢会产生影响, 同时导致氧化应激, 并会对鳃和肝胰腺的组织结构造成损伤, 影响其生物学功能。

**关键词:** 克氏原螯虾; pH; 半致死浓度; 酶活性; 组织切片

**中图分类号:** S 968.2

**文献标志码:** A

pH是反映水体水质状况的一个重要指标。水体pH过高或过低均会对水生生物造成危害。引起水体pH升高的原因主要有两个, 一是外源碱性污染物质注入, 二是白天光照充足时, 水生植物光合作用旺盛, 大量消耗水中CO<sub>2</sub>而使水体pH升高<sup>[1]</sup>。由于虾蟹等甲壳动物在养殖过程中需要投放大量水草为其提供蜕皮时的掩蔽场所, 因而白天水体中会有大面积水草进行光合作用, 这更易引起水体pH值的升高<sup>[2]</sup>。当水体pH偏离了水生生物生存的适宜pH范围时, 会引起水生生物

物的应激反应, 持续的应激会使其免疫防御功能受到影响<sup>[3-4]</sup>, 最终可能导致病害和死亡的发生。目前国内外已有一些关于高pH胁迫对虾蟹影响的报道。如Cheng等<sup>[5]</sup>研究认为罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)在高pH (pH 9.0~9.5)胁迫下对格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)的吞噬活性和清除效率显著降低, 虾体更容易受到格氏乳球菌的感染; 龚志等<sup>[6]</sup>发现高pH (pH 9.0~9.5)会使中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)产生氧化应激, 导致其体色变差; Wang等<sup>[7]</sup>认为高pH (pH 8.5)会

收稿日期: 2015-08-23 修回日期: 2016-07-05

资助项目: 江苏省农业科技自主创新项目(CX(14)2074)

通信作者: 徐跑, E-mail: Xup@ffrc.cn

造成中国明对虾(*Fennerpenaeus chinensis*)幼虾代谢抑制, 并显著降低其存活率。

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*), 俗称“小龙虾”, 隶属甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、螯虾科(Cambaridae)、原螯虾属(*Procambarus*), 是中国重要的水产经济养殖品种之一, 其生长速度快、肉味鲜美, 近几年来在国内消费市场的需求旺盛, 人工养殖规模扩展迅速。水体作为克氏原螯虾生存的环境, 水中不良环境因子的刺激会使克氏原螯虾产生应激反应并对其正常生长和繁殖造成影响, 而目前有关环境因子对克氏原螯虾影响的研究还不够完善, 关于pH胁迫对克氏原螯虾影响的研究更是鲜有报道<sup>[8]</sup>, 尚未见关于高pH胁迫对克氏原螯虾抗氧化应激、呼吸代谢以及组织结构变化影响的报道。

环境胁迫会造成生物体有氧代谢异常, 活性氧自由基的大量积累, 并最终形成过氧化终产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)<sup>[9]</sup>, 而机体内的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等抗氧化酶能及时清除氧自由基, 缓解氧自由基对机体的氧化损伤。故常把SOD、CAT、MDA指标的变化来反映机体受到的氧化胁迫。 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP酶广泛地存在于生物的细胞质膜上, 是构成 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ 泵活性的主要部分, 其主要功能是维持细胞质膜的离子通透性, 参与生物体的能量代谢、物质运输和氧化磷酸化等重要生化过程<sup>[10]</sup>。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和延胡索酸还原酶(fumarate reductase, FRD)是无氧代谢过程中两个重要的调节酶, 通过对 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP酶、LDH和FRD活性的测定可以从一定程度上反映环境胁迫对机体代谢产生的影响。

本实验首先确定高pH胁迫下克氏原螯虾96 h半致死浓度, 同时结合半致死pH浓度下,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP酶、LDH、FRD及SOD、CAT和MDA的变化趋势, 并应用光学显微镜观察不同时间段克氏原螯虾肝胰腺和鳃的组织结构变化, 从生理和组织水平探讨pH胁迫对克氏原螯虾的影响, 旨在为克氏原螯虾生态化养殖以及养殖过程中的水质管理提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

实验用的克氏原螯虾取自江苏省新大运生

态农业开发有限公司, 正式实验开始前先在圆形蓄养槽中暂养7 d(规格为直径1000 mm×1000 mm), 养殖水深10 cm, 每天早晚(8:00和17:00)各投喂野生小杂鱼碎块一次, 投喂量为虾体质量的3%~5%, 每天清理槽底部残饵与粪便并换水1/3左右, 以保证水质清洁。选择附肢完好、规格相近、健康无病的克氏原螯虾用于实验, 平均体质量(24.17±3.40) g、平均体长(7.96±0.40) cm。

实验用水为曝气72 h以上的自来水, 水温(18.26±1.13)°C, pH(7.616±0.03)。实验期间, 连续充气增氧以保证水中溶氧充足。

### 1.2 实验方法

**pH急性毒性实验** pH急性毒性实验开始前, 先通过预实验摸索浓度范围, 找出24 h全部死亡和96 h全部存活的pH浓度范围。正式实验设置5个pH处理组, pH分别为8.5、9.5、10.5、11.5、12.5。每个处理组设3个平行, 每个平行放10尾虾, 进行pH急性毒性实验。实验期间正常投喂, 并在投喂2 h后清除槽底部残饵和粪便, 换水1/2并调至相应pH浓度, 各pH水体水深均为10 cm, 每天观察克氏原螯虾的活动状况, 并及时捞出死虾, 记录24、48、72、96 h克氏原螯虾的死亡数。每天使用便携式pH计(梅特勒-托利多FG<sub>2</sub>)检测水中pH, 并用1 mol/L NaOH和1 mol/L HCl调节pH, 使其维持在设定pH水平。

**pH胁迫实验** 依据pH急性应激下克氏原螯虾96 h半致死浓度, 设置对照组(pH7.6)和高pH实验组(pH10.2), 每个处理组设3个平行。实验在6个圆形蓄养槽中进行, 每桶随机放入30尾体质良好、附肢完整的克氏原螯虾。高pH实验组和对照组水体深度均为10 cm, 每隔4小时测定并调整pH。实验期间, 克氏原螯虾的饲养管理与pH测定方式与pH急性毒性实验时相同。

**样品的采集与处理** 在pH胁迫实验期间, 分别于0、2、8、24、96 h采集样品, 每次从各桶中随机选取3尾进行解剖, 剖取的鳃和肝胰腺组织用生理盐水漂洗后, 立即放入Bouin氏液中固定, 然后用各级乙醇逐级脱水、包埋、切片, 经H.E染色后, 显微观察并拍照; 同时剖取0.1 g左右的鳃和肝胰腺组织用液氮速冻后, 于-70 °C保存, 用于酶活性的测定。

**样品酶活性的测定** 鳃和肝胰腺样品解冻后, 用预冷生理盐水冲洗, 滤纸吸干水分后称

重,加入4倍体积(*W/V*)预冷生理盐水研磨制成匀浆,鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、LDH、FRD,肝胰腺SOD、CAT的活性以及MDA的含量测定采用上海朗顿生物有限公司酶联免疫检测试剂盒(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA),按照试剂盒中的说明制备粗酶液。粗酶液置于4°C保存,在24 h内测定完毕。实验结果通过BioTek Eon™ 微孔板分光光度计进行读数。

### 1.3 数据分析

本实验采用直线回归法<sup>[11]</sup>求出克氏原螯虾96 h的pH半致死浓度(LC<sub>50</sub>)。pH胁迫同一时间点对照组和实验组间的差异采用SPSS 22.0独立样本*T*检验来检测,显著水平为 $P<0.05$ 。其余实验数据采用SPSS 22.0进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),当差异显著时,采用Duncan氏进行多重比较,显著水平为 $P<0.05$ 。实验结果均以 $\text{mean}\pm\text{SE}$ 来表示。

## 2 结果

### 2.1 克氏原螯虾急性中毒症状及96 h LC<sub>50</sub>的测定

高pH组(pH 10.5~12.5)克氏原螯虾由于水体pH的突变而显得躁动不安,不停向桶边缘爬动,想要逃离此水体,数小时后,虾活动减少,伏于水底,用玻璃棒触碰虾体,虾会迅速逃游。随后数小时,虾反应开始变得迟钝,尾部向内卷曲,用玻璃棒触碰虾体,不会迅速逃游,但能依靠附肢在水底缓慢移动。随着中毒程度的加深,虾体失去自身平衡能力,最终侧卧水底逐渐死去,虾死亡时,尾部蜷缩,附肢僵硬,

虾体颜色由健康时的淡紫色变成红色。pH 9.5组克氏原螯虾随着时间的推移,也出现了一定程度的上述中毒症状。pH 8.5组克氏原螯虾表现较为正常,行为活动与未应激前差异不大。不同pH值对克氏原螯虾死亡率的影响如表1所示,各时间点克氏原螯虾的死亡率随着水体pH值的升高而增加。当水体pH为8.5时,克氏原螯虾在胁迫96 h内未出现死亡,当pH为10.5时,克氏原螯虾在胁迫96 h时的死亡率超过50%,达到了53.33%。通过直线回归法求出克氏原螯虾96 h的pH半致死浓度(LC<sub>50</sub>)为10.194。

### 2.2 高pH胁迫对克氏原螯虾鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性的影响

高pH (pH 10.2)胁迫对克氏原螯虾鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性的影响显示,各时间点对对照组 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活力无明显变化( $P>0.05$ )(图1)。随着高pH胁迫时间的延长,实验组 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性呈现先上升后下降的变化趋势。胁迫8 h时,实验组 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活力与对照组差异显著( $P<0.05$ );胁迫24 h时,实验组 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活力达到最大值;胁迫96 h时,实验组 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活力有所下降,但仍与对照组存在显著差异( $P<0.05$ )。

### 2.3 高pH胁迫对克氏原螯虾鳃LDH和FRD活性的影响

高pH (pH 10.2)胁迫对克氏原螯虾鳃LDH活性影响显示,各时间点对对照组LDH活性无明显变化( $P>0.05$ )(图2)。随着高pH胁迫时间延长,实验组LDH活力呈逐渐上升的变化趋势。胁迫8 h时,实验组LDH活性出现上升且与对照组差异显著( $P<0.05$ )。随着胁迫时间的延长,实验组LDH

表 1 不同pH值对克氏原螯虾死亡率的影响

Tab. 1 The effect of different pH values on the mortality in *P.clarkii*

pH	不同时间克氏原螯虾的平均死亡率/% average mortality			
	24 h	48 h	72 h	96 h
8.5	0.00±0.00 <sup>Aa</sup>	0.00±0.00 <sup>Aa</sup>	0.00±0.00 <sup>Aa</sup>	0.00±0.00 <sup>Aa</sup>
9.5	0.00±0.00 <sup>Aa</sup>	10.00±0.00 <sup>Bb</sup>	16.67±0.03 <sup>Bc</sup>	20.00±0.00 <sup>Bc</sup>
10.5	16.67±0.03 <sup>Ba</sup>	20.00±0.00 <sup>Ca</sup>	33.33±0.03 <sup>Cb</sup>	53.33±0.03 <sup>Cc</sup>
11.5	63.33±0.03 <sup>Ca</sup>	100.00±0.00 <sup>Db</sup>	100.00±0.00 <sup>Db</sup>	100.00±0.00 <sup>Db</sup>
12.5	100.00±0.00 <sup>Db</sup>	100.00±0.00 <sup>Db</sup>	100.00±0.00 <sup>Db</sup>	100.00±0.00 <sup>Db</sup>

注:不同大写字母表示同一时间点不同处理之间的差异显著( $P<0.05$ ),不同小写字母表示同一处理不同时间点之间的差异显著( $P<0.05$ )  
Notes: The different capital letter superscripts mean significant differences ( $P<0.05$ ) with different treatment at the same time, The different small letter superscripts mean significant differences ( $P<0.05$ ) with the same treatment among different time

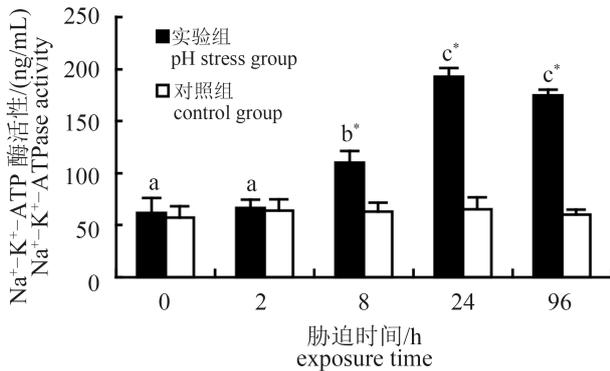


图1 高pH胁迫对克氏原螯虾鳃Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性的影响

不同小写字母表示存在显著差异( $P<0.05$ ),下同

Fig. 1 Effect of high pH stress on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in gill of *P. clarkii*

The different lower-cases mean significant difference

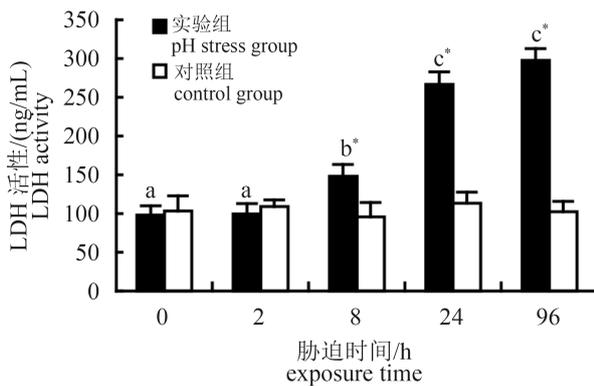


图2 高pH胁迫对克氏原螯虾鳃LDH活性的影响

Fig. 2 Effect of high pH stress on LDH activity in gill of *P. clarkii*

活性继续上升并在胁迫96 h达到最大值。

高pH (pH 10.2)胁迫对克氏原螯虾鳃FRD活性影响显示, 实验组FRD活性的变化趋势与实验组LDH活性变化趋势相似(图3)。随着胁迫时间的延长, 实验组FRD活性逐渐升高并在胁迫8 h后与对照组出现显著差异( $P<0.05$ )。

#### 2.4 高pH胁迫对克氏原螯虾肝胰腺SOD活性的影响

高pH (pH 10.2)胁迫对克氏原螯虾肝胰腺SOD活性的影响显示, 各时间点对照组SOD活性无明显变化( $P>0.05$ )(图4)。随着高pH胁迫时间延长, 实验组SOD活性呈逐渐下降的变化趋势。胁迫24 h后实验组SOD活性与对照组存在显著差异

( $P<0.05$ ), 但实验组胁迫96 h时SOD活性与实验组胁迫24 h时SOD活性相比不存在显著差异( $P>0.05$ )。

#### 2.5 高pH胁迫对克氏原螯虾肝胰腺CAT活性的影响

高pH (pH 10.2)胁迫对克氏原螯虾肝胰腺CAT活性的影响显示, 各时间点对照组CAT活性无明显变化( $P>0.05$ )(图5)。随着高pH胁迫时间延长, 实验组CAT活性呈先上升后下降的变化趋势。胁迫8 h时, 实验组CAT活性达到最大值且与对照组差异显著( $P<0.05$ ), 之后实验组CAT活性逐渐下降; 胁迫96 h时, 实验组CAT活力与对照组差异不显著( $P>0.05$ )。

#### 2.6 高pH胁迫对克氏原螯虾肝胰腺MDA含量的影响

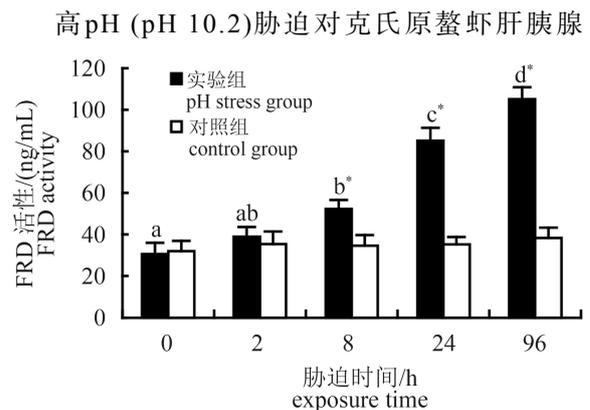


图3 高pH胁迫对克氏原螯虾鳃FRD活性的影响

Fig. 3 Effect of high pH stress on FRD activity in gill of *P. clarkii*

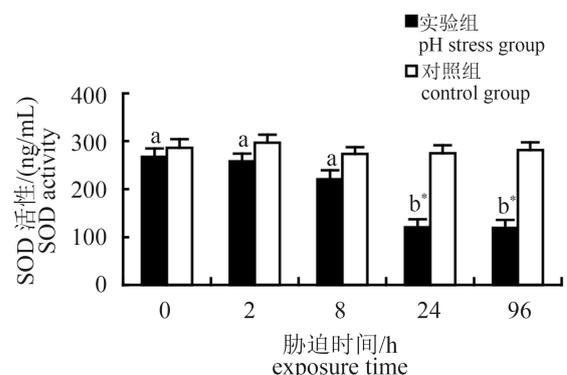


图4 高pH胁迫对克氏原螯虾肝胰腺SOD活性的影响

Fig. 4 Effect of high pH stress on SOD activity in hepatopancreas of *P. clarkii*

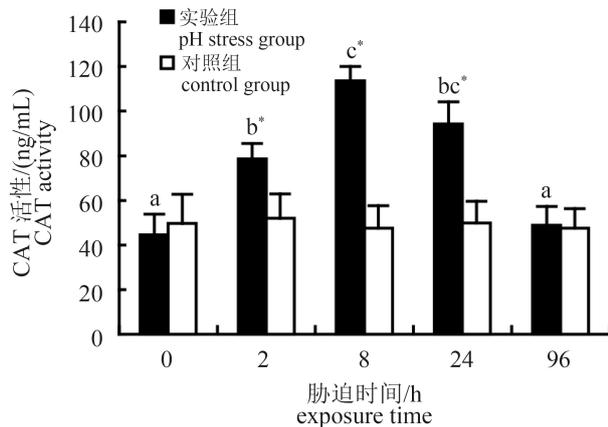


图5 高pH胁迫对克氏原螯虾肝胰腺CAT活性的影响

Fig. 5 Effect of high pH stress on CAT activity in hepatopancreas of *P. clarkii*

MDA含量的影响显示,各时间点对照组MDA含量无明显差异( $P>0.05$ )(图6)。随着高pH胁迫时间延长,实验组MDA含量呈逐渐上升的变化趋势。胁迫8 h后,实验组MDA含量与对照组存在显著差异( $P<0.05$ )且胁迫8、24、96 h实验组MDA含量之间也存在显著差异( $P<0.05$ )。

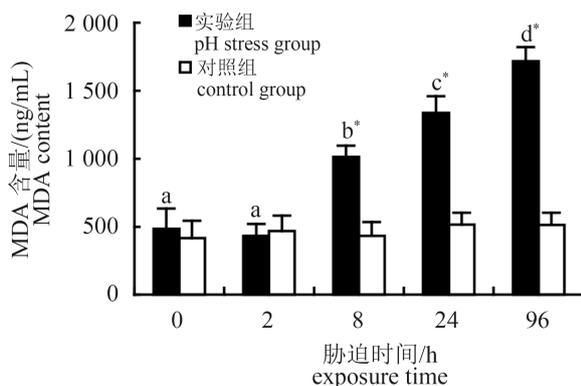


图6 高pH胁迫对克氏原螯虾肝胰腺MDA含量的影响

Fig. 6 Effect of high pH stress on MDA content in hepatopancreas of *P. clarkii*

## 2.7 高pH胁迫对克氏原螯虾鳃组织结构的影响

高pH (pH 10.2)胁迫前,克氏原螯虾鳃叶角质层外皮平滑完整,内部呼吸上皮细胞排列整齐,细胞轮廓清晰(图版 I -1)。胁迫2 h时,鳃叶结构相对正常,角质层平滑完整,呼吸上皮细胞结构清晰(图版 I -2)。胁迫8 h时,呼吸上皮细胞部分脱落,细胞排列疏松(图版 I -3)。胁迫24 h

时,呼吸上皮细胞大面积脱落,细胞数量明显减少(图版 I -4)。胁迫96 h时,角质层出现破裂,呼吸上皮细胞完全脱落,鳃叶结构受损严重(图版 I -5)。

## 2.8 高pH胁迫对克氏原螯虾肝胰腺组织结构的影响

高pH (pH 10.2)胁迫前,肝胰腺小管界限清晰,基膜完整,肝细胞排列紧密、细胞饱满(图版 II -1)。胁迫2 h时,肝胰腺小管结构相对正常,肝细胞结构清晰,但肝胰腺小管内部出现了少量空泡(图版 II -2)。胁迫8 h时,肝胰腺小管体积比高pH胁迫前明显增大,其内部空泡数量增多,体积增大,肝细胞排列紊乱(图版 II -3)。胁迫24 h时,肝胰腺小管界限模糊,肝细胞溶解,细胞数量明显减少(图版 II -4)。胁迫96 h时,肝胰腺小管坏死,基膜破裂,几乎观察不到完整的肝小管结构(图版 II -5)。

## 3 讨论

### 3.1 高pH胁迫对克氏原螯虾的急性毒性效应

pH作为水产养殖生产中重要的环境因子之一,pH的异常不仅会对水生生物的生长发育和生理状况产生直接影响,而且还能通过影响水环境中的氨氮、重金属离子等因素间接对水生生物的生长存活产生影响。我国渔业水质标准所规定的淡水pH在6.5~8.5范围的标准<sup>[12]</sup>,在本次pH急性毒性实验中,克氏原螯虾在pH 8.5的水体中存活96 h,并未出现死亡现象,这说明克氏原螯虾对水体pH变化有一定耐受性。杨富亿等<sup>[13]</sup>的研究表明日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)幼虾pH的96 h LC<sub>50</sub>为9.51,幼虾死亡时体色灰白,部分个体头胸甲、触角、步足、尾节卷曲,变软或有残缺。本实验中水体96 h的pH半致死浓度(LC<sub>50</sub>)为10.194,克氏原螯虾死亡时也出现了体色改变,尾部卷曲等症状,这说明甲壳动物对pH存在一定的耐受范围,高强度的pH刺激会对甲壳动物机体造成严重损伤。然而,本实验得到克氏原螯虾pH的96 h LC<sub>50</sub>要比杨富亿等<sup>[13]</sup>报道的日本沼虾幼虾pH的96 h LC<sub>50</sub>要高,这说明不同实验动物、不同规格可能会对结果产生一定的差异。

### 3.2 高pH胁迫对克氏原螯虾鳃Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性的影响

Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶广泛存在于生物的细胞质膜

上, 它通过水解ATP参与细胞膜两侧 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 离子的跨膜主动运输, 维持细胞内外 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 浓度的相对稳定, 对生物体的能量代谢、物质运输和氧化磷酸化等生化过程有着重要的意义<sup>[10]</sup>。目前, 已有一些关于盐度胁迫对甲壳动物鳃上皮 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶的报道<sup>[14-15]</sup>, 这些研究表明外界盐度变化与甲壳动物鳃上皮 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶直接相关, 而关于外界pH变化对甲壳动物 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶活力影响的研究相对较少。潘鲁青等<sup>[16]</sup>研究表明凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)鳃丝 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶活性随pH胁迫(pH 9.5)时间延长呈峰值变化, 表现为先上升后下降最后趋于稳定。本实验中, 克氏原螯虾鳃丝 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶活性随pH胁迫时间延长也呈现上升后下降的变化趋势, 这说明为了适应外界环境pH的变化, 维持体内pH平衡, 克氏原螯虾会在短时间内提升鳃 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶活性, 增强离子通透性, 与体内无机盐缓冲体系、鳃结构上的 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交换系统<sup>[16]</sup>一起来维持内环境pH的平衡。随着胁迫时间延长, 甲壳动物如果能够在一定程度下对pH的变化产生渗透适应性, 鳃 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶活性最终会趋于稳定。而本实验中克氏原螯虾鳃 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶活性在pH胁迫后期仍然处于较高的水平, 这可能是由于本次实验pH胁迫强度超过了克氏原螯虾的渗透调节能力, 体内离子平衡紊乱, 较高水平的 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶活性, 有助于维持鳃的离子平衡。

### 3.3 高pH胁迫对克氏原螯虾LDH和FRD活性的影响

LDH和FRD是糖代谢过程中的重要酶类, LDH可以催化丙酮酸转化为乳酸, 是机体无氧代谢的标志酶。FRD也是无氧代谢所需的酶, 其可以催化延胡索酸还原成琥珀酸, 并产生ATP为机体供能<sup>[17]</sup>。在本实验中克氏原螯虾鳃LDH和FRD活性随着pH胁迫时间的延长均呈现明显的上升趋势。在胁迫8 h时, 实验组鳃中较高的LDH和FRD活性表明克氏原螯虾呼吸代谢方式由于pH胁迫发生了一定的变化, 推测此时鳃组织获氧能力减弱, 组织出现缺氧。随着pH胁迫时间的延长, LDH和FRD活性继续上升, 这可能是由于胁迫后期克氏原螯虾组织缺氧加剧, 有氧代谢受到抑制, 机体需要较高无氧代谢水平来补充自身所需能量。管越强等<sup>[18]</sup>在硫化物胁迫对日本沼

虾呼吸代谢的影响中也有类似的报道, 硫化物胁迫下, 日本沼虾的有氧代谢难以维持, 只能通过激活无氧代谢的方式, 产生ATP为机体供能。

### 3.4 高pH胁迫对克氏原螯虾肝胰腺抗氧化指标的影响

环境胁迫对水生生物造成的生理效应可能通过氧化还原反应来表现<sup>[19]</sup>, 生物体在受到不利环境因子胁迫时体内会产生大量活性氧自由基, MDA是活性氧自由基作用于脂质发生过氧化反应的终产物, 它会引起蛋白质、核酸等生物大分子的交联聚合, 造成细胞损伤<sup>[9]</sup>。因此, 通过测定组织中MDA含量可以反映生物体内脂质过氧化水平, 从而间接反映出细胞氧化损伤的程度。任海等<sup>[20]</sup>在急性氨氮胁迫对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)抗氧化系统酶活性影响的研究中发现, 随着氨氮胁迫时间的延长, 脊尾白虾肝胰腺MDA含量呈现上升趋势, 本研究中也出现了类似实验结果。在胁迫2 h时, 实验组克氏原螯虾肝胰腺MDA含量与对照组相比差异不显著, 说明短期应激时负责清除这些活性氧自由基的抗氧化酶能够清理产生的氧自由基。然而, 随着胁迫时间的延长, 实验组肝胰腺MDA含量呈明显的上升趋势, 这可能是由于pH胁迫对克氏原螯虾抗氧化系统产生了一定的影响, 体内氧自由基未能被及时清理, 导致脂质过氧化反应加剧, MDA含量增加。

SOD和CAT作为生物体内两个重要的具有抗氧化防御功能的酶, 它们能有效地清除活性氧自由基, 减少细胞受到的氧化损伤, 维持机体正常的生理活动。在清除活性氧的过程中, SOD首先将 $\text{O}_2^-$ 歧化为 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和 $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 进一步通过CAT的催化生成对机体无害的 $\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{O}_2$ <sup>[21]</sup>, 从而防止 $\text{O}_2^-$ 对细胞造成氧化伤害。周东等<sup>[22]</sup>研究表明, 半致死低盐度胁迫下, 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)肝胰腺、鳃和肌肉中的SOD、CAT活性均呈下降趋势。环境胁迫较低时, 机体SOD和CAT活性提高有助于清除过多的活性氧自由基, 而当环境胁迫因子强度过高(半致死浓度)时, 机体抗氧化防御功能受损, 这会使得抗氧化酶活力下降<sup>[22]</sup>。在本实验中, 肝胰腺SOD活性在胁迫0~8 h内与对照组差异不显著, 说明胁迫初期机体抗氧化防御功能正常, 能够清理产生的氧自由基。随着胁迫时间的延长, 本实验中

肝胰腺SOD活性显著下降,表明高强度的pH胁迫使克氏原螯虾抗氧化能力受到一定抑制,未能及时清除的活性氧自由基可能会使机体产生氧化损伤。肝胰腺CAT活性短期胁迫时显著上升有助于清除过量的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。可能由于pH胁迫对虾体造成了一定的氧化损伤,胁迫8 h后肝胰腺SOD活性下降,由SOD歧化产生的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>减少,CAT活性也随之下降。

### 3.5 高pH胁迫对克氏原螯虾鳃组织结构的影响

鳃是甲壳动物进行呼吸、排泄和渗透压调节的器官,其直接与周围水环境相接触,易受到环境胁迫的影响而产生损伤,鳃结构的损伤往往会影响到甲壳动物的呼吸和渗透调节等生理活动<sup>[23]</sup>。本实验表明,高pH胁迫下克氏原螯虾鳃组织结构的变化较为明显,随着胁迫时间的延长,呼吸上皮细胞逐渐脱落坏死,角质层出现破损,鳃叶受损程度加剧。赵先银等<sup>[24]</sup>研究发现,高pH胁迫72 h (pH 9.2)后,中国明对虾、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)和日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)均出现鳃丝肿胀,上皮层增厚,部分区域出现粘连,局部空泡化的现象,其中中国明对虾鳃部损伤>凡纳滨对虾>日本对虾,这与本实验结果相似,说明高pH胁迫会对甲壳动物鳃组织造成损伤,而本实验中克氏原螯虾鳃叶损伤程度更高,可能是由于胁迫强度更高、胁迫时间更长所导致的。同时,本实验发现随着胁迫时间的延长,鳃叶内呼吸上皮细胞逐渐脱落坏死,由于呼吸上皮细胞的减少,可能导致克氏原螯虾与外界进行气体交换的能力逐渐减弱,造成虾体缺氧。本实验中,两个重要的无氧代谢酶LDH和FRD的活性随着胁迫时间的延长而逐渐升高也说明了这一点。在胁迫后期,由于鳃叶结构受损,虾体有氧呼吸机能受到抑制,提高无氧代谢水平可能有助于维持其基本生命活动。另外,在胁迫96 h时,鳃叶角质层出现破裂,虾体更容易受到细菌、病毒的感染,鳃叶内部组织失去角质层的保护更容易受到侵蚀,导致功能丧失,可能会降低克氏原螯虾存活率。

### 3.6 高pH胁迫对克氏原螯虾肝胰腺组织结构的影响

甲壳动物的肝胰腺具有脊椎动物肝脏、胰

脏和肠道等的功能<sup>[25]</sup>,是甲壳动物进行解毒、排泄和代谢的重要器官,该器官组织结构的变化反映了机体生理状态的改变<sup>[26]</sup>。克氏原螯虾的肝胰腺位于头胸部中央,心脏前方,肝胰腺小管是其结构和功能的基本单位,各小管由薄层结缔组织被膜包裹与分隔。本实验中,高pH胁迫对克氏原螯虾肝胰腺组织结构的影响主要表现为肝细胞数量减少、肝胰腺小管内部空泡增多、肝胰腺小管基膜破损。赵先银等<sup>[24]</sup>也在研究中发现,pH胁迫72 h (pH 9.2)会对对虾肝胰腺组织结构造成损伤,表现为部分肝小管破裂,细胞出现解体、细胞核消失。克氏原螯虾在硫酸锌慢性毒性胁迫下肝细胞空泡变性,结缔组织增生<sup>[27]</sup>。高浓度氨氮胁迫使得中华绒螯蟹肝胰腺内转运泡数量增多、体积增大,肝细胞出现坏死,管壁细胞与基膜分离,严重时管壁破裂<sup>[28]</sup>。这说明当外界胁迫因子浓度超过甲壳动物肝胰腺的解毒能力时,肝胰腺正常组织结构会遭到破坏,肝胰腺正常生理功能受到抑制。本实验中,随着pH胁迫时间的延长,肝胰腺组织结构受损加剧,肝胰腺SOD和CAT等抗氧化酶活性也受到影响,虾体抗氧化防御功能下降,导致了MDA的大量堆积,细胞氧化损伤加剧,这也说明了高pH胁迫通过影响肝胰腺的组织结构,抑制肝胰腺生理功能的发挥,从而可能会威胁到克氏原螯虾的生存。

### 参考文献:

- [1] 王传海,李宽意,文明章,等.苦草对水中环境因子影响的日变化特征[J].农业环境科学学报,2007,26(2):798-800.  
Wang C H, Li K Y, Wen M Z, et al. Effects of *Vallisneria asiatica* on water environmental factors and its diurnal variation[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2007, 26(2): 798-800(in Chinese).
- [2] 李兴辉.水草在虾蟹养殖中的利用[J].水产养殖,2010,31(3):20-22.  
Li X H. The application of waterweeds in Crustacean farming[J]. Journal of Aquaculture, 2010, 31(3): 20-22(in Chinese).
- [3] Le Moullac G, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea[J]. Aquaculture, 2000, 191(1-3): 121-131. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00422-1.
- [4] 刘小玲.鱼类应激反应的研究[J].水利渔业,2007,27(3):1-3.  
Liu X L. Studies on the emergency responses of

- fishes[J]. Reservoir Fisheries, 2007, 27(3): 1-3(in Chinese).
- [5] Cheng W, Chen J C. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2000, 10(4): 387-391. doi: 10.1006/fsim.2000.0264.
- [6] 龚志, 蔡春芳, 朱健明, 等. 高pH值对中华绒螯蟹抗氧化能力及虾青素沉积的影响[J]. 淡水渔业, 2015, 45(1): 20-24.
- Gong Z, Cai C F, Zhu J M, *et al.* Effects of high pH on antioxidant capacity and astaxanthin content in *Eriocheir sinensis*[J]. Freshwater Fisheries, 2015, 45(1): 20-24(in Chinese).
- [7] Wang W N, Wang A L, Chen L, *et al.* Effects of pH on survival, phosphorus concentration, adenylate energy charge and  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase activities of *Penaeus chinensis* Osbeck juveniles[J]. Aquatic Toxicology, 2002, 60(1-2): 75-83. doi: 10.1016/S0166-445X(01)00271-5.
- [8] 朱毅菲. 不同浓度氨氮、不同低pH突变对克氏原螯虾免疫功能的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.
- Zhu Y F. Effects of ammonia-N with different concentrations and different low pH values on immune functions of *Procambarus clarkii*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2006(in Chinese).
- [9] 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 1-24.
- Fang Y Z, Zheng R L. Theory and Application of Free Radical Biology[M]. Beijing: Science Press, 2002: 1-24(in Chinese).
- [10] Satyavathi C, Rao Y P. Inhibition of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in *Penaeus indicus* postlarvae by lead[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 2000, 127(1): 11-22. doi: 10.1016/S0742-8413(00)00130-4.
- [11] 张毓琪, 陈叙龙. 环境生物毒理学[M]. 天津: 天津大学出版社, 1993: 252-260.
- Zhang Y Q, Chen X L. Environmental Bio-Toxicology[M]. Tianjin: Tianjin University Press, 1993: 252-260(in Chinese).
- [12] 国家环境保护局. GB 11607-1989渔业水质标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 1990.
- State Environmental Protection Administration. GB 11607-1989 Water quality standard for fisheries[S]. Beijing: China Standard Press, 1990(in Chinese).
- [13] 杨富亿, 李秀军, 杨欣乔. 日本沼虾幼虾对碱度和pH的适应性[J]. 动物学杂志, 2005, 40(6): 74-79.
- Yang F Y, Li X J, Yang X Q. Adaptability of *Macrobrachium nipponense* juvenile to water alkalinity and pH[J]. Chinese Journal of Zoology, 2005, 40(6): 74-79(in Chinese).
- [14] Lucu Ć, Towle D W.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in gills of aquatic Crustacea[J]. Comparative Biochemistry and Physiology- Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2003, 135(2): 195-214.
- [15] 潘鲁青, 栾治华. 盐度对日本囊对虾仔虾生长发育和  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase活力的影响[J]. 水生生物学报, 2005, 29(6): 699-703.
- Pan L Q, Luan Z H. The effects of salinity on development and  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity of *Marsupenaeus japonicus* postlarvae[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(6): 699-703(in Chinese).
- [16] 潘鲁青, 刘志, 姜令绪. 盐度、pH变化对凡纳滨对虾鳃丝  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase活力的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(5): 787-790.
- Pan L Q, Liu Z, Jiang L X. The effect of salinity and pH changes on gill  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase activity of *Litopenaeus vannamei*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2004, 34(5): 787-790(in Chinese).
- [17] Schöttler U, Bennet E M. Annelids[M]//Bryant C. Metazoan Life without Oxygen. London: Chapman and Hall, 1991: 165-185.
- [18] 管越强, 王慧春, 李利. 硫化物胁迫对日本沼虾呼吸代谢和能量代谢酶的影响[J]. 生态环境学报, 2009, 18(6): 2017-2022.
- Guan Y Q, Wang H C, Li L. Effects of sulphide on the enzyme of respiratory metabolism and energy metabolism of *Macrobrachium nipponense*[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2009, 18(6): 2017-2022(in Chinese).
- [19] Ryter S W, Kim H P, Hoetzel A, *et al.* Mechanisms of cell death in oxidative stress[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2007, 9(1): 49-89. doi: 10.1089/ars.2007.9.49.
- [20] 任海, 李健, 李吉涛, 等. 急性氨氮胁迫对脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 抗氧化系统酶活力及 GPx 基因表达的影响[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(4): 647-655.
- Ren H, Li J, Li J T, *et al.* Effects of acute ammonia

- stresses on antioxidant enzyme activities and GPx gene expression in *Exopalaemon carinicauda*[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2014, 33(4): 647-655(in Chinese).
- [21] 叶继丹, 韩友文, 赵吉伟, 等. 喹乙醇对鲤肝胰脏抗氧化酶系统的影响[J]. 水产学报, 2004, 28(3): 231-235.  
Ye J D, Han Y W, Zhao J W, *et al.* Effects of dietary olaquinox on antioxidant enzymes system in hepatopancreas of *Cyprinus carpio*[J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(3): 231-235(in Chinese).
- [22] 周东, 母昌考, 宋微微, 等. 低盐胁迫对三疣梭子蟹组织中抗氧化酶和ATP酶活力的影响[J]. 生态科学, 2014, 33(4): 698-703.  
Zhou D, Mu C K, Song W W, *et al.* Effects of low salinity stress on the antioxidant enzyme and ATPase activities in tissues of swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. Ecological Science, 2014, 33(4): 698-703(in Chinese).
- [23] 卢建平. 日本沼虾鳃细胞的超微结构[J]. 东海海洋, 2001, 19(3): 19-24.  
Lu J P. Ultramicrostructure of the gill cells of *Macrobrachium nipponense*[J]. Donghai Marine Science, 2001, 19(3): 19-24(in Chinese).
- [24] 赵先银. pH胁迫对三种养殖对虾生理生化指标的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.  
Zhao X Y. Effects of pH stress on physiological and biochemical indexes in three species of shrimps[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011(in Chinese).
- [25] Caceci T, Neck K F, Lewis D D H, *et al.* Ultrastructure of the hepatopancreas of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda)[J]. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1988, 68(2): 323-337, doi: 10.1017/S002531540005222X.
- [26] 赵卫红, 王资生, 张余霞, 等. 雌二醇对日本沼虾肝胰腺的脂肪酸含量及组织结构的影响[J]. 海洋渔业, 2014, 36(6): 542-548.  
Zhao W H, Wang Z S, Zhang Y X, *et al.* Effects of estradiol on fatty acid composition and tissue structure of hepatopancreas in *Macrobrachium nipponense*[J]. Marine Fisheries, 2014, 36(6): 542-548(in Chinese).
- [27] 王权, 王建国, 陆宏达, 等. 硫酸锌慢性毒性胁迫下克氏原螯虾的组织病理[J]. 中国水产科学, 2012, 19(1): 126-137.  
Wang Q, Wang J G, Lu H D, *et al.* Chronic toxicity of zinc sulphate in *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(1): 126-137(in Chinese).
- [28] 洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 412-418.  
Hong M L, Chen L Q, Gu S Z, *et al.* Effects of ammonia exposure on immunity indicators of haemolymph and histological structure of hepatopancreas in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 412-418(in Chinese).

## Acute toxicity of high pH stress and its effect on enzymes activity and histological structure of gill and hepatopancreas in *Procambarus clarkii*

TAO Yifan<sup>1,2</sup>, QIANG Jun<sup>2</sup>, WANG Hui<sup>3</sup>, XU Pao<sup>1,2\*</sup>, MA Xinyu<sup>1</sup>, ZHAO Wenqiang<sup>1</sup>

(1. Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

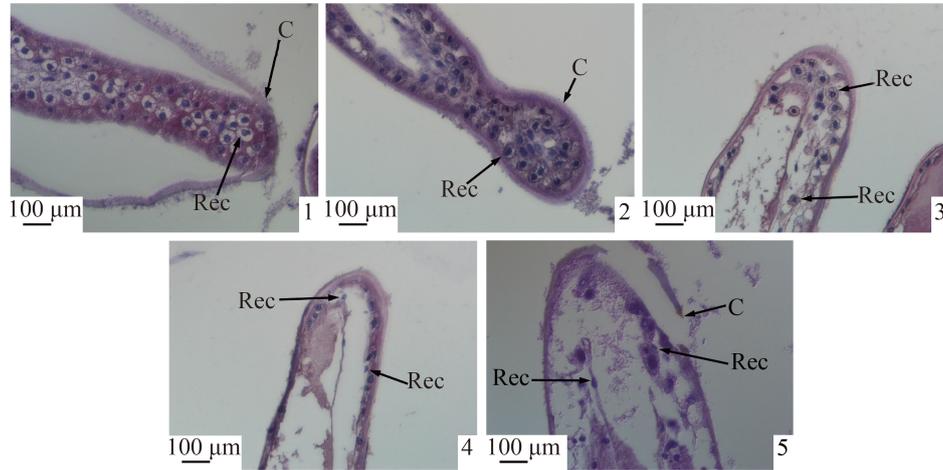
3. School of Life Science, Huaiyin Normal University, Huai'an 223300, China)

**Abstract:** In this study, the toxic mechanism of *Procambarus clarkii* responding to high pH stress was investigated through analyzing the effect of high pH on enzymes activity and histological structure of gill and hepatopancreas. Based on the 96 hours median lethal concentration, *Procambarus clarkii* were exposed to two pH levels: pH 7.6 (control group) and pH 10.2 (experimental group). Each group was respectively sampled for measuring activity of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, lactate dehydrogenase (LDH), fumarate reductase (FRD) in gill, measuring activity of superoxide dismutase (SOD), catalase(CAT) and content of malondialdehyde (MDA) in hepatopancreas, and observing the histological structure of gill and hepatopancreas at 0, 2, 8, 24, 96 h. The results showed that the value of pH LC<sub>50</sub> was 10.194 at 96h. Activity of gill Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, LDH, FRD in experimental group presented the trend of rising and were significantly higher than those in control group ( $P < 0.05$ ) after 8 h exposure. With pH stress time prolonging, the variation trend of malondialdehyde content in experimental group was similar to LDH and FRD. Activity of hepatopancreas CAT in experimental group presented the trend of rising firstly and declining afterward. Activity of hepatopancreas SOD was decreased significantly ( $P < 0.05$ ) after 24 h exposure. *Procambarus clarkii* exposed to high pH displayed histological alterations in the gill and hepatopancreas. Gill tissues showed respiratory epithelium cells were exfoliated gradually, and cuticle rupture. The hepatopancreas indicated basement membranes of hepatopancreas tubule were ruptured, the enlarged size and increased number of vacuoles in hepatopancreas tubule, and the number of hepatocytes was decreased distinctly. The results indicated that high pH stress will affect the metabolism of *Procambarus clarkii* and will arouse oxidative stress, The histological structure of gill and hepatopancreas will also be affected by high pH stress, as well as their biological functions.

**Key words:** *Procambarus clarkii*; pH; median lethal concentration; enzyme activity; tissue section

**Corresponding author:** XU Pao. E-mail: Xup@ffrc.cn

**Funding projects:** Agricultural Science and Technology Independent Innovation Fund of (CX(14)2074)

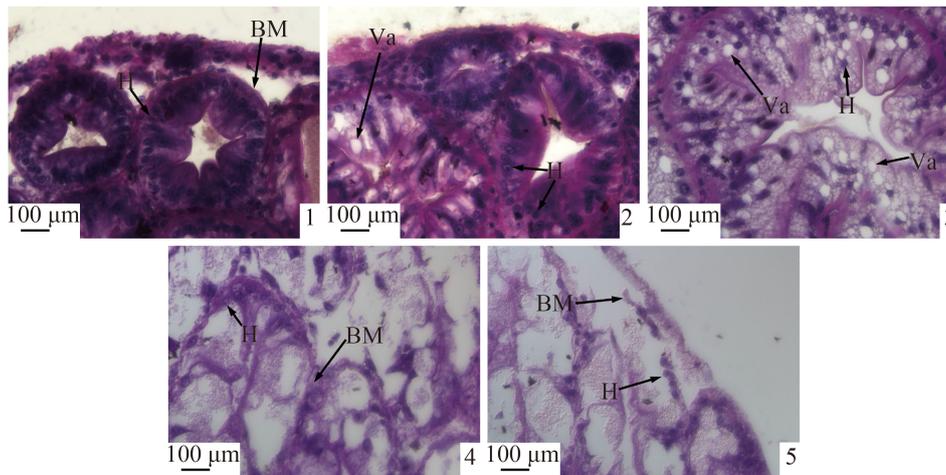


图版 I 高pH胁迫对克氏原螯虾鳃显微结构的影响

1. 高pH(pH 10.2)胁迫0 h(对照组鳃叶), 示角质层(C), 呼吸上皮细胞(Rec), 标尺100  $\mu\text{m}$ ; 2. 高pH胁迫2 h鳃叶, 示角质层平滑完整, 呼吸上皮细胞结构清晰, 标尺100  $\mu\text{m}$ ; 3. 高pH胁迫8 h鳃叶, 示呼吸上皮细胞部分脱落, 标尺100  $\mu\text{m}$ ; 4. 高pH胁迫24 h鳃叶, 示呼吸上皮细胞大面积脱落坏死, 细胞数量明显减少, 标尺100  $\mu\text{m}$ ; 5. 高pH胁迫96 h鳃叶, 示角质层出现破裂, 呼吸上皮细胞完全脱落, 鳃叶结构受损严重, 标尺100  $\mu\text{m}$

Plate I Effect of high pH stress on histological structure of gill in *P. clarkii*

1. Structure of normal gill(control, pH 10.2), showing cuticle(C), respiratory epithelium cells(Rec), bar=100  $\mu\text{m}$ ; 2. Structure of gill exposed to high pH(pH 10.2) at 2 h, showing cuticle was smooth and integrity, respiratory epithelium cellular structure was clear, bar=100  $\mu\text{m}$ ; 3. Structure of gill exposed to high pH at 8 h, showing part of respiratory epithelium cells were exfoliated, bar=100  $\mu\text{m}$ ; 4. Structure of gill exposed to high pH at 24 h, showing the majority of respiratory epithelium cells were exfoliated, the number of cells was decreased distinctly. bar=100  $\mu\text{m}$ ; 5. Structure of gill exposed to high pH at 96 h, showing cuticle rupture, respiratory epithelium cells were exfoliated, gill structure was damaged severely, bar=100  $\mu\text{m}$



图版 II 高pH胁迫对克氏原螯虾肝胰腺显微结构的影响

1. 高pH(pH 10.2)胁迫0 h(对照组肝胰腺小管, 示肝细胞(H), 基膜(BM), 标尺100  $\mu\text{m}$ ; 2. 高pH(pH 10.2)胁迫2 h肝胰腺小管, 示肝细胞结构清晰, 肝胰腺小管内部出现少量空泡, 标尺100  $\mu\text{m}$ ; 3. 高pH胁迫8 h肝胰腺小管, 示肝胰腺小管体积明显增大, 其内部空泡数量增多, 体积增大, 标尺100  $\mu\text{m}$ ; 4. 高pH胁迫24 h肝胰腺小管, 示肝胰腺小管界限模糊, 肝细胞坏死溶解, 细胞数量明显减少, 标尺100  $\mu\text{m}$ ; 5. 高pH胁迫96 h肝胰腺小管, 示肝胰腺小管基膜破裂, 肝胰腺小管结构受损严重, 标尺100  $\mu\text{m}$

Plate II Effect of high pH stress on histological structure of hepatopancreas in *P. clarkii*

1. Structure of normal hepatopancreas(control), showing hepatocytes(H) basement membranes(BM), bar=100  $\mu\text{m}$ ; 2. Structure of hepatopancreas exposed to high pH(pH 10.2) at 2 h, showing the hepatocytes cellular structure was clear, vacuoles(Va) were observed in hepatopancreas tubule, bar=100  $\mu\text{m}$ ; 3. Structure of hepatopancreas exposed to high pH at 8 h, showing the size of hepatopancreas tubule was increased distinctly, the enlarged size and increased number of vacuoles, bar=100  $\mu\text{m}$ ; 4. Structure of hepatopancreas exposed to high pH at 24 h, showing the demarcation line of hepatopancreas tubule was blurred, hepatolysis, the number of cells was decreased distinctly, bar=100  $\mu\text{m}$ ; 5. Structure of hepatopancreas exposed to high pH at 96 h, showing basement membranes of hepatopancreas tubule were ruptured, the structure of hepatopancreas tubule was damaged severely, bar=100  $\mu\text{m}$