



## “翻背症”对方斑东风螺主要消化酶及免疫相关酶的影响

赵旺<sup>1,2,3</sup>, 杨蕊<sup>1,2</sup>, 吴开畅<sup>1,2</sup>, 于刚<sup>1,2</sup>,  
陈明强<sup>1,2</sup>, 郑忠明<sup>3</sup>, 温为庚<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 热带水产研究开发中心, 海南 三亚 572018;

2. 农业农村部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东 广州 510300;

3. 宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315823)

**摘要:** 为探索方斑东风螺消化及免疫系统对“翻背症”的应答机制, 采集了健康(对照组)和“翻背症”早期、中期和晚期的方斑东风螺, 采用 TCBS 平板计数法检测螺体内弧菌含量, 试剂盒法检测螺体内组织超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、溶菌酶(LZM)等免疫相关酶和胃蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶等消化酶活性。结果显示, 方斑东风螺体内弧菌含量随病情的发展而显著增加, 晚期达到最大值。发病早期, CAT、SOD、POD、ACP 和胃蛋白酶等酶活性均显著上升。发病中期, POD、AKP、LZM 活性均上升, 且显著高于对照组和发病早期; 与发病早期相比, CAT、SOD、ACP、胃蛋白酶、脂肪酶活性有所下降; 与对照组相比, CAT、ACP 活性仍显著升高, 胃蛋白酶、脂肪酶活性显著降低, 而 SOD、淀粉酶活性无显著变化。发病晚期, 各消化酶与免疫相关酶活性均较发病中期有所下降, 但 POD、ACP 活性仍显著高于对照组, CAT、SOD、AKP、LZM 活性与对照组无显著差异, 而胃蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶活性显著低于对照组。研究表明, “翻背症”方斑东风螺体内弧菌的暴发过程中, 机体的免疫系统与消化系统均参与了机体病害免疫应答反应, 且可以采用 CAT、POD 和 ACP 活性作为方斑东风螺“翻背症”的检测评价指标。

**关键词:** 方斑东风螺; “翻背症”; 消化酶; 免疫酶

中图分类号: S 944.4<sup>9</sup>

文献标志码: A

方斑东风螺 (*Babylonia areolata*) 属腹足纲 (Gastropoda)、新腹足目 (Neogastropoda)、蛾螺科 (Buccinidae)、东风螺属 (*Babylonia*), 是中国福建、广东、广西和海南等地的重要经济养殖贝类之一<sup>[1]</sup>。然而养殖过程中多种病害频发, 如细菌性病害<sup>[2-5]</sup>、寄生性病害<sup>[6]</sup>等, 严重制约方斑东风螺养殖产业的发展。其中, “翻背症”(亦称“急性死亡症”)(RBS, reverse back syndrome)是近年来养殖中常见疾病, 该病具有流行范围广、发病快、感染性强、死亡率高、治愈困难等特点。

发病时, 方斑东风螺活力差, 无力钻沙, 无法保持正立, 仅能仰翻于沙面上; 不能摄食; 腹足表面聚集较多黑色杂质, 足肌边缘收缩内卷呈波纹状, 足部全伸或半伸出螺壳, 对外界刺激不敏感<sup>[5]</sup>。目前研究发现, 该病病原主要为弧菌, 包括哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*)<sup>[7]</sup>和塔氏弧菌 (*V. tubiashii*)<sup>[8]</sup>。

方斑东风螺是海洋无脊椎动物, 为开管式循环系统, 依靠非特异性免疫系统抵御病原菌入侵, 包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶

收稿日期: 2019-09-17 修回日期: 2020-02-02

资助项目: 海南省自然科学基金青年基金(318QN304); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-49); 三亚市院地科技合作项目(2018YD19, 2019YD21); 农业农村部财政专项(NHYYSWZZZYKZX2020)

通信作者: 温为庚, E-mail: wenweigeng@163.com

(POD)、过氧化氢酶(CAT)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)和溶菌酶(LZM)等。同时,对病原的免疫应答需要机体营养物质的供能。然而,目前对“翻背症”病原菌感染后,方斑东风螺机体免疫系统、消化系统怎样应答,均不甚明了。文章通过监测健康和不同阶段“翻背症”方斑东风螺体内弧菌含量、免疫相关酶、消化酶等的动态变化特征,探索“翻背症”发生时方斑东风螺体内主要免疫酶及消化酶对病原菌的应答机制,以期为明确该病的发生机理提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

方斑东风螺取自海南省万宁市某东风螺工厂化养殖场,为5月龄方斑东风螺,养成期3个月时发生“翻背症”;螺壳高(2.72±0.56)cm,体质量(3.85±0.79)g;养殖期间,水温27~31℃,pH 7.8~8.2,盐度28~32,溶解氧5~7 mg/L。从健康养殖池及“翻背症”发病期的养殖池中分别采集健康螺及“翻背症”螺样品,采样时,各实验组均已停止投饵3 d。

对照组正常螺(control group, CG):养殖池中无病螺,螺表现正常,昼伏夜出,白天很少出沙活动;螺体活力强,背腹颠倒后能通过足肌旋转运动迅速翻转过来;对饵料敏感,投饵后能迅速钻出沙面摄食<sup>[5]</sup>。

“翻背症”方斑东风螺按状态分为3类。

“翻背症早期”:方斑东风螺表现较为正常,可钻入养殖底沙中;但行动迟缓,活力不强,对饵料不敏感,投饵后基本不钻出沙面摄食。

“翻背症中期”:方斑东风螺活力较弱,螺体无力完全钻入沙中,半潜沙;对饵料不敏感,完全不能摄食;以物触碰足肌,足肌尚能缩回螺壳内。

“翻背症晚期”:方斑东风螺完全不能钻沙,亦不能保持正立壳口朝下状态,仰翻于沙面上,呈典型的“翻背”症状;对饵料完全不敏感,完全不能摄食;以物触碰足肌,足肌尚能微弱反应,但不能缩入螺壳内。

### 1.2 实验方法

分别随机采集健康与不同发病阶段方斑东风螺,使用无菌海水洗净螺壳表面附着物,无菌状态下用铁钳小心夹碎螺壳,用无菌镊子取出整个软体组织,再放入无菌研磨器中,加入

无菌生理盐水匀浆,匀浆液分为2份,分别进行弧菌含量测定及酶活性测定。使用无菌生理盐水将匀浆液做10、100、1 000倍梯度稀释,采用TCBS平板培养计数法进行螺体弧菌含量测定,计数方法参考GB 4789.2—2016<sup>[9]</sup>。另一份匀浆液在4℃、4 000 r/min离心10 min,取上清液置于-80℃冰箱保存备用;酶活性测定采用相关试剂盒(南京建成生物工程研究所)进行,分别测定SOD、POD、CAT、ACP、AKP、LZM等免疫相关酶和蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶等消化酶的活性。

### 1.3 数据分析

数据采用mean ± SD表达,并通过SPSS 19.0软件进行统计分析,先对数据作单因素方差分析(ANOVA),处理间若有显著差异,再用Duncan氏法进行多重比较, $P < 0.05$ 为差异显著。为更好呈现酶活性的变化情况,酶活性结果以相对酶活性表示,即相对酶活性=(实验组酶活性/对照组酶活性)×100%。

## 2 结果

### 2.1 “翻背症”对方斑东风螺体内弧菌含量的影响

正常状态下,方斑东风螺体内弧菌维持在较低水平,含量约为 $3.37 \times 10^5$  CFU/g(图1)。而“翻背症”病螺体内弧菌含量显著增加( $P < 0.05$ ),含量为 $2.62 \times 10^6 \sim 8.12 \times 10^6$  CFU/g;且发病的早、中、晚期也存在显著差异( $P < 0.05$ ),呈现随病情的发展弧菌含量持续增加的变化趋势。

### 2.2 “翻背症”对方斑东风螺抗氧化酶活性的影响

以对照组方斑东风螺抗氧化酶活性为100%，“翻背症”不同时期抗氧化酶相对酶活性见图2。“翻背症”对CAT的影响显著,发病期间,CAT的活性存在显著的差异( $P < 0.05$ );发病早期,CAT活性显著上升( $P < 0.05$ );发病中期,CAT活性有所降低,但仍显著高于对照组( $P < 0.05$ );发病晚期,CAT活性继续降低,显著低于发病早期和中期( $P < 0.05$ ),此时酶活性与对照组相当。总体来看,“翻背症”影响下,CAT活性表现为“诱导—抑制”的趋势。SOD的活性变化与CAT的变化趋势相似。SOD的活性在“翻背症”早期显著上升( $P < 0.05$ );但发病中期和晚期,SOD活性降低,与对照组差异不显著。这说明“翻背症”发生期间,SOD活性表现为“诱导—抑制”的变化趋势。POD活性也受“翻背症”的影响发生了

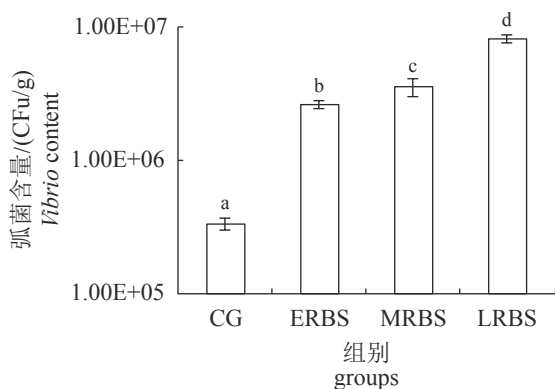


图1 方斑东风螺体内弧菌含量变化

图中不同字母表示组间存在显著性差异；CG.对照组；ERBS.“翻背症”早期；MRBS.“翻背症”中期；LRBS.“翻背症”晚期；下同

Fig. 1 Changes of *Vibrio* content in *B. areolata*

Different letters indicate significant differences; CG. control group; ERBS. early stage of reverse back syndrome; MRBS. middle stage of reverse back syndrome; LRBS. late stage of reverse back syndrome; the same below

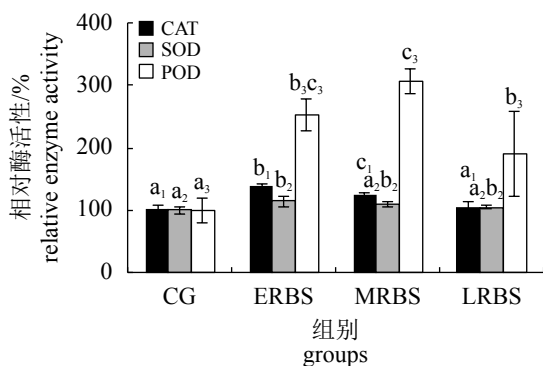


图2 “翻背症”对方斑东风螺抗氧化酶活性的影响

图中不同字母表示组间存在显著性差异，下同。数字下标1~3分别表示CAT、SOD、POD

Fig. 2 Effect of RBS on the anti-oxidase activity of *B. areolata*

Different letters indicate significant differences, the same below. The number subscripts 1-3 represent CAT, SOD and POD, respectively

显著的变化。“翻背症”早期，POD活性极显著升高 ( $P < 0.01$ )，活性达对照组的2.5倍以上；发病中期，POD活性仍在上升，但与早期的差异未达到显著水平；发病晚期，该酶活性下降，恢复到发病早期水平，但是仍显著高于健康的对照组 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 “翻背症”对方斑东风螺磷酸酶、溶菌酶活性的影响

以对照组酶活性为100%，“翻背症”不同时期ACP、AKP和LZM相对酶活性如图3。“翻背

症”影响下，方斑东风螺ACP、AKP和LZM也发生了变化。正常状态下，ACP活性较低，但方斑东风螺发生“翻背症”后，ACP活性发生显著变化 ( $P < 0.05$ )；“翻背症”早期，ACP活性增加300%以上，是整个发病期间活性最高的时期；随后ACP活性持续降低，但在发病晚期仍显著高于健康的对照组 ( $P < 0.05$ )。ACP的变化呈“诱导—抑制”的变化趋势。“翻背症”发生时，AKP活性也发生显著变化 ( $P < 0.05$ )；早期AKP活性呈上升趋势，到发病中期，酶活性达到峰值，显著高于其他各个时期；发病晚期酶活性降低，与对照组无显著差异。该酶的变化也呈“诱导—抑制”的变化趋势。与AKP的变化相似，LZM的活性变化也呈现先增加后降低的趋势，且活性最高值出现在发病中期。

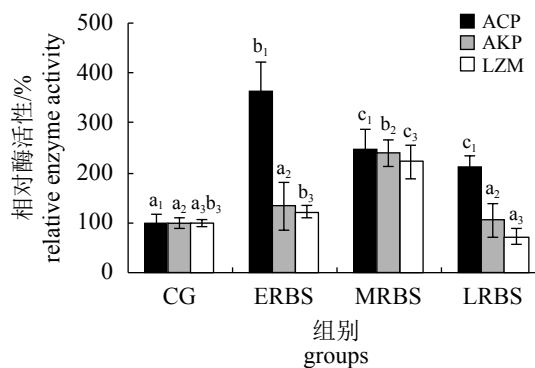


图3 “翻背症”对方斑东风螺磷酸酶、溶菌酶活性的影响

数字下标1~3分别表示ACP、AKP、LZM

Fig. 3 Effect of RBS on the phosphatase and LZM activity of *B. areolata*

The number subscripts 1-3 represent ACP, AKP and LZM, respectively

### 2.4 “翻背症”对方斑东风螺消化酶活性的影响

以对照组方斑东风螺消化酶活性为100%，“翻背症”病螺主要消化酶相对酶活性如图4。结果表明，胃蛋白酶的活性在“翻背症”发生期间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )；“翻背症”早期，胃蛋白酶活性与对照组相比呈显著增加的趋势；但随着病情的发展，胃蛋白酶的活性持续降低(中期)；“翻背症”晚期，胃蛋白酶活性最低，显著低于对照组和发病早期。总体来看，“翻背症”影响下，胃蛋白酶活性表现为“诱导—抑制”的变化趋势。脂肪酶的活性变化与胃蛋白酶的变化趋势相似。脂肪酶的活性在“翻背症”早期有所上升，但差异未达到显著水平；发病中期和晚期，脂肪酶活

性均显著低于对照组及发病早期。“翻背症”发生期间,脂肪酶活性变为“诱导—抑制”或“抑制”的趋势。从整体上看,“翻背症”病螺淀粉酶的活性均较低。随着病害的发展,淀粉酶活性持续降低,到发病晚期,淀粉酶活性显著低于对照组。可见,“翻背症”发生期间,淀粉酶活性变为“抑制”的趋势。

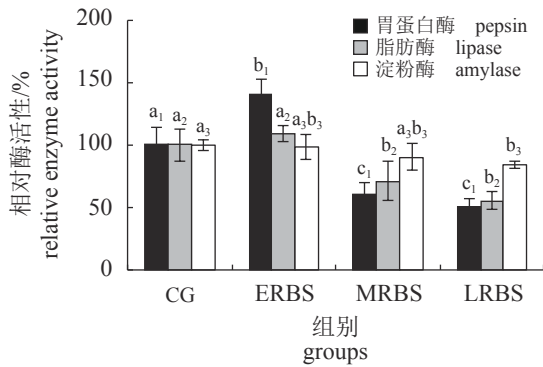


图4 “翻背症”对方斑东风螺消化酶活性的影响

数字下标 1~3 分别表示胃蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶

Fig. 4 Effect of RBS on the digestive enzyme activity of *B. areolata*

The number subscripts 1-3 represent pepsin, lipase and amylase, respectively

### 2.5 “翻背症”方斑东风螺消化酶及免疫相关酶活性对弧菌含量的回归分析

“翻背症”方斑东风螺的各项消化酶及免疫相关酶活性对弧菌含量采用 Cubic 方程 ( $Y=b_0+b_1X+b_2X^2+b_3X^3$ ) 类型<sup>[10]</sup>进行回归分析,结果如表 1。

表中  $R^2$  为决定系数,其值越大说明酶活性与弧菌含量间的相关性越大<sup>[10]</sup>。结果显示,在建立的各种消化酶及免疫相关酶对弧菌含量的回归分析中,CAT的  $R^2$  最大,为 0.835;其次为 POD(0.78)和 ACP(0.767);最小为 AKP,为 0.39。这 9 种酶的  $R^2$  值大小依次为 CAT>POD>ACP>脂肪酶>胃蛋白酶>SOD>淀粉酶>LZM>AKP。

## 3 讨论

### 3.1 弧菌含量与“翻背症”的联系

弧菌作为一类条件致病菌,广泛分布于水生环境中,可在水生动物体内无症状携带,弧菌的致病性与其含量激增密切相关,弧菌可引起多种贝类暴发恶性病害<sup>[11-13]</sup>。前期研究了方斑东风螺弧菌变动与环境因子的关系发现,健康养殖状态下,方斑东风螺弧菌含量为  $2.0 \times 10^2 \sim 7.5 \times 10^5$  CFU/g,与温度、pH、亚硝酸盐氮显著相关<sup>[14]</sup>;本研究结果中,健康螺体弧菌为  $3.37 \times 10^5$  CFU/g,在正常波动范围内,而“翻背症”病螺弧菌数量显著增加,超过  $10^6$  CFU/g,可见,弧菌的大量繁殖与“翻背症”的暴发存在密切联系。该结果与其他弧菌病害的暴发相似。流行病学调查发现,大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 溃疡病大面积流行的前几天,弧菌的感染率均大大升高,弧菌感染率的增长与溃疡病的发生存在密切的联系<sup>[15]</sup>;金乌贼 (*Sepia esculenta*) 幼体的弧菌性坏死病中,弧菌含量在患病前后相差 300 倍以上,且弧菌在异养菌中的比例上升了近 20%,是异养

表 1 “翻背症”方斑东风螺消化及免疫相关酶活性对弧菌含量的回归分析

Tab. 1 Regression analysis of digestion and immune-related enzyme activity on *Vibrio* content of RBS of *B. areolata*

酶 enzyme	$R^2$	$F$	$P$	回归方程系数 coefficient of regression equation			
				$b_0$	$b_1$	$b_2$	$b_3$
CAT	0.835	22.721	0	-1 713.081	444.289	0	-3.800
SOD	0.442	3.564	0.072	-412.673	124.610	0	-1.040
POD	0.780	15.956	0.001	-7 111.196	1 744.026	0	-14.377
ACP	0.767	14.836	0.001	-13 474.571	4 366.968	-345.580	0
AKP	0.390	2.875	0.108	-4 489.302	1 121.022	0	-9.520
LZM	0.438	3.502	0.075	-4 685.078	1 176.620	0	-10.184
胃蛋白酶 pepsin	0.489	4.312	0.049	-2 196.170	578.656	0	-5.330
脂肪酶 lipase	0.622	7.411	0.013	-1 148.332	318.686	0	-3.033
淀粉酶 amylase	0.440	3.531	0.074	-148.224	65.229	0	-0.663

菌中最主要的菌群<sup>[16]</sup>。

探索致病机理发现, 弧菌通过自身外膜蛋白对宿主进行吸附、内转和入侵<sup>[17]</sup>, 其生长代谢过程中产生的胞外产物如溶血素、胞外蛋白酶、铁载体等可对宿主产生毒害<sup>[18]</sup>。溶血素是弧菌的主要致病因子, 可作用于宿主血细胞膜, 致使血细胞破裂, 内容物释放, 形成溶血<sup>[19]</sup>; 胞外蛋白酶具有丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶活性, 可干扰宿主机体的稳态, 破坏宿主凝血系统酶活性, 引起细胞溶解, 导致宿主身体溃烂而死亡<sup>[20]</sup>; 铁载体可螯合宿主的含铁蛋白, 造成宿主细胞铁匮乏, 引起宿主发生病害, 是弧菌从宿主细胞中获取铁离子的载体<sup>[21]</sup>。因环境是决定弧菌是否感染方斑东风螺的主要因素之一, 对弧菌的含量及方斑东风螺的自身免疫有重要的影响<sup>[14]</sup>。健康方斑东风螺可通过自身的免疫系统将弧菌的含量控制在较低水平, 防止弧菌病害的发生; 当养殖系统水质恶化、pH波动、水温骤变、养殖密度过大、方斑东风螺体表损伤时, 引发弧菌的大量繁殖与方斑东风螺免疫力的下降, 一方面弧菌含量增加致使有害胞外产物分泌增多, 加重了对方斑东风螺的伤害; 另一方面方斑东风螺免疫力的下降无法完全应对病原的入侵。因此形成了弧菌病害的外因与内因, 最终导致方斑东风螺弧菌病的发生和流行。

### 3.2 抗氧化酶对“翻背症”的应答分析

生态因子的改变将诱发机体产生一系列的应激反应, 其中反应过程中产生的活性氧自由基可损伤机体<sup>[22]</sup>。CAT、SOD及POD是机体内重要的抗氧化酶, 其中CAT和SOD协同作用, 使自由基的产生、清除维持动态平衡, 可减少机体的氧化损伤, POD主要催化分解机体内的氧化物和过氧化物, POD与SOD活性变化在一定程度上能够反映机体的免疫机能<sup>[23]</sup>。大量研究表明, CAT、SOD和POD等抗氧化酶活性与发育阶段<sup>[24]</sup>、环境因子<sup>[25-26]</sup>、饵料<sup>[27]</sup>、药物<sup>[28]</sup>等有关, 也受细菌的影响显著。如仿刺参(*Apostichopus japonicus*)受灿烂弧菌(*V. splendidus*)刺激4h后, SOD活性显著升高, 随后开始下降<sup>[29]</sup>; 哈维氏弧菌刺激仿刺参后, SOD活性也显著升高<sup>[30]</sup>。本研究发现, CAT、SOD和POD等抗氧化酶的活性受弧菌的影响而变化; 同时, 这三者的变化趋势相似, 说明方斑东风螺机体抗氧化体系的协同性。方斑东风螺发生“翻背症”时, CAT、

SOD和POD等抗氧化酶活性均显著升高, 这说明弧菌诱发方斑东风螺体内产生大量高活性氧<sup>[10]</sup>, 方斑东风螺机体在感染早期尚能有效应答弧菌的入侵, 通过产生抗氧化酶及时清除超氧阴离子, 因此发病早期仍无显著病症。然而, “翻背症”中期和晚期, 方斑东风螺表现为活力弱, 不能钻沙、摄食, 而此时组织病理结果显示鳃叶、腹足、肝胰腺、消化道、肾脏等器官的细胞出现变性、坏死、血细胞浸润等现象<sup>[3]</sup>, 说明弧菌感染过程中产生的高活性氧物质引起的螺体细胞毒性<sup>[10]</sup>; 此时CAT、SOD和POD等酶活性均降低, 而弧菌含量并未下降, 说明方斑东风螺自身抗氧化酶已无法完全清除体内自由基。从回归分析结果看, CAT和POD的决定系数大, 表明这2种酶与弧菌含量的相关性大, 即CAT和POD活性变化与弧菌变化最为敏感, 所以可以采用CAT和POD这2个酶的变化作为方斑东风螺“翻背症”的检测评价指标。

### 3.3 磷酸酶对“翻背症”的应答分析

磷酸酶是一种正磷酸单酯酶, 因最适pH不同分为AKP和ACP, 是溶酶体酶的重要组成部分, 具有清除、水解、消化异物的作用, 是动物体内解毒体系的重要组成部分, 直接参与磷酸基团的代谢与转移, 并与DNA、RNA、蛋白质、脂质等代谢有关<sup>[31]</sup>。ACP和AKP以酶原的形式存在于透明细胞和小颗粒细胞中, 当病原菌入侵机体后, 即引发ACP和AKP产生相应应答, 其活性显著升高<sup>[10]</sup>。本研究中, ACP活性在“翻背症”的整个阶段均显著增加, 其中发病早期达到最大值, 而AKP在发病中期达到最大值, 这是机体免疫机能在病理条件下应激反应激活的体现。ACP活性的迅速上升, 可能与其具有修饰功能有关, 异物的清除首先需要被识别, 而ACP可改变或修饰外源物的表面结构以此提高异物的识别率<sup>[32]</sup>, 从而提升吞噬细胞吞噬及降解的速率, 因而在“翻背症”早期ACP活性大大增加。从回归分析结果看, ACP的决定系数也较大, 表明ACP与弧菌含量的相关性也较大, 即ACP活性变化与弧菌变化比较敏感, 所以也可以采用ACP酶的变化作为方斑东风螺“翻背症”的检测评价指标。AKP活性达到最大的时间稍晚于ACP, 但在短时间内仍能积极有效地参与到针对病原入侵的免疫应答中, 这与仿刺参<sup>[29]</sup>、青蛤(*Cyclina sinensis*)<sup>[33]</sup>及栉孔扇贝(*Chlamys far-*

eri)<sup>[34]</sup>等对弧菌的免疫应答情况相似。青蟹(*Scylla serrata*) AKP在碱性条件下可通过水解病原菌表面的磷酸基团而抑制或杀灭病原体<sup>[35]</sup>,而AKP在方斑东风螺体内的免疫机制仍有待进一步探索。

### 3.4 溶菌酶对“翻背症”的应答分析

LZM是一种碱性蛋白,广泛存在于动物的组织和体液中,能水解细菌细胞壁中的乙酰氨基多糖,使之裂解,从而破坏和消除侵入的革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌,在机体的防御中发挥重要作用<sup>[36]</sup>。研究表明,病原菌入侵后,机体LZM即被诱导表达。如鳗弧菌(*V. anguillarum*)感染大黄鱼6h后,LZM即被诱导而显著表达<sup>[37]</sup>;爱德华氏菌感染后,斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)体内LZM在肝脏、脾脏和头肾中表达量升高<sup>[38]</sup>;在贝类中存在相似的现象,弧菌刺激后文蛤(*Meretrix meretrix*)肝胰腺和鳃中LZM的mRNA表达量以及蛋白表达量都显著上升,并表现出抑菌活性<sup>[39]</sup>;本研究发现,方斑东风螺LZM活性在弧菌的感染下发生了变化,呈现先增加后降低的趋势,至“翻背症”中期达到最大值,这说明在应对弧菌入侵时,方斑东风螺LZM也参与了机体的免疫应答,并且在“翻背症”早期和中期,其活性随方斑东风螺体内弧菌含量的升高而显著增强;但是,其活性在“翻背症”晚期显著降低。这与张齐<sup>[40]</sup>的研究结果相似,致病菌灿烂弧菌刺激后,海参体腔细胞内容菌酶的含量持续增加,在48h时达到最高,之后海参溶菌酶含量逐渐降低。病害晚期LZM活性降低可能与弧菌含量有关,“翻背症”晚期螺体弧菌含量仍在显著增加,从机体抗氧化酶(CAT、SOD、POD等)和磷酸酶(AKP和ACP)活性情况来看,大量弧菌产生的胞外产物导致机体免疫系统产生不可自我修复的损伤,同时破坏了LZM的转录、表达与酶原激活,导致其活性降低。

### 3.5 消化酶对“翻背症”的应答分析

消化酶活性是反映水产动物生理消化机能的重要指标,决定了动物对营养物质的消化吸收能力<sup>[41]</sup>。研究表明,消化酶的活性受诸多因素的影响,可因种类、生理状态、水质因子、饵料、规格、养殖方式等而存在差异<sup>[42-43]</sup>。从目前方斑东风螺酶活性研究来看,方斑东风螺的消化酶活性与饥饿<sup>[44]</sup>、发育时期<sup>[45]</sup>、盐度<sup>[46]</sup>、饵料<sup>[47]</sup>

有关,而本研究证实,消化酶的活性与病害的联系密切。弧菌感染早期,方斑东风螺胃蛋白酶活性显著升高,脂肪酶的活性也有一定上升,而淀粉酶活性降低,说明弧菌感染提高了方斑东风螺对蛋白、脂肪的消化能力。梁箫等<sup>[48]</sup>也发现,灿烂弧菌感染厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)后,蛋白酶活性呈升高趋势,之后开始下降,而淀粉酶活性均呈下降趋势;凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)感染溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)后,蛋白酶活性也显著升高<sup>[49]</sup>;De Schrijver等<sup>[50]</sup>在大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)中发现了类似的现象,解蛋白弧菌(*V. proteolyticus*)刺激下,大菱鲆对蛋白的消化能力显著提高;这都与本实验结果相似。方斑东风螺为肉食性贝类,蛋白酶的活性最能反映机体对营养物质消化吸收的效率<sup>[51]</sup>,机体为应对弧菌入侵,提高蛋白酶的活性以分解更多的蛋白质为免疫相关酶(如抗氧化酶、磷酸酶和溶菌酶等)的高表达与翻译提供原料;而晚期随着弧菌含量的升高,机体自身已无力清除病原,抗氧化酶、磷酸酶和溶菌酶等活性均降低,免疫系统遭到破坏,同时消化系统也因组织结构发生变性坏死而导致蛋白酶活性降低。另外,方斑东风螺主要依靠消耗脂肪和糖原来提供能量<sup>[52]</sup>,机体应对病原的免疫清除需要消耗比正常代谢更多的能量,因此弧菌病早期脂肪酶活性的上升为免疫反应提供能量。

### 3.6 “翻背症”的药物防治探讨

研究表明,嗜酸乳酸菌(*Lactobacillus acidophilus*)<sup>[53]</sup>、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)<sup>[54]</sup>等益生菌可提高方斑东风螺非特异性免疫能力。另外,常杰<sup>[10]</sup>发现弧菌和免疫增强剂均能显著影响对虾总血细胞数(total haemocyte count, THC)、SOD、呼吸爆发(respiratory burst, RB)、酚氧化酶(phenoloxidase, PO)、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)、溶血活力、ACP、AKP和血清蛋白含量等主要免疫指标,但弧菌感染对对虾免疫指标的影响大于免疫增强剂。因方斑东风螺不具有特异性免疫,无法像水产脊椎动物一样通过注射灭活弧菌来激活机体产生特异性免疫而提高免疫水平。因此,正常养殖时期,通过益生菌、免疫增强剂提高方斑东风螺免疫力,是预防细菌性病害暴发的有效措施。“翻背症”的药物防治实验结果表明<sup>[5]</sup>,不同药物的治疗效果存在差异,且药物的使用时间越早治愈率越高,

这可能也与不同发病时期螺体内免疫相关酶的差异有关。“翻背症”对方斑东风螺机体主要抗氧化酶、消化酶、磷酸酶等均有不同程度的影响,如POD、ACP、LZM等酶活性显著增加,说明病原在机体内大量繁殖后将显著激活机体免疫反应,而机体的免疫功能将对病原有清除作用,二者相互影响,一旦机体免疫系统不足以应对病原菌的入侵,免疫系统崩溃机体将逐渐消亡。“翻背症”早期,螺体内病原菌含量相对较低,胞外因子对机体的损伤较小,此时使用药物协同机体的免疫相关酶共同杀灭体内病原菌的几率更大,因此更容易治愈;而随着发病期的推移,体内病原菌的含量增加,产生的胞外因子增多,对机体的损伤越来越严重,方斑东风螺表现为活力减弱、不能钻沙、无力保持正立的“翻背”症状,药物及免疫酶所产生的病原清除作用也越来越有限,且机体难以自我修复损伤,导致治愈率越来越低。因此,“翻背症”发生时,及时使用弧菌防治药物是有效的治疗手段。

#### 参考文献 (References):

- [1] 赵旺,于刚,王江勇,等. 7月龄方斑东风螺形态性状对体质量的通径分析[J]. *海洋科学*, 2017, 41(11): 82-88.  
Zhao W, Yu G, Wang J Y, *et al.* Path analysis of the effects of morphometric attributes on the body weight of 7-month-old *Babylonia areolata*[J]. *Marine Sciences*, 2017, 41(11): 82-88(in Chinese).
- [2] 张新中,文万饶,冯永勤,等. 方斑东风螺肿吻症病原菌的分离鉴定及药敏分析[J]. *海洋科学*, 2010, 34(5): 7-12.  
Zhang X Z, Wen W Y, Feng Y Q, *et al.* Isolation, identification and antibiotic sensitivity analysis of bacterial pathogen from proboscis intumescence disease in *Babylonia areolata*[J]. *Marine Sciences*, 2010, 34(5): 7-12(in Chinese).
- [3] 王江勇,王瑞旋,苏友禄,等. 方斑东风螺“急性死亡症”的病原病理研究[J]. *南方水产科学*, 2013, 9(5): 93-99.  
Wang J Y, Wang R X, Su Y L, *et al.* Pathogen and pathology of “acute death syndrome” of *Babylonia areolata*[J]. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(5): 93-99(in Chinese).
- [4] 梁健,高山,李永仁,等. 方斑东风螺肿吻致病菌分离及中草药对其的预防效果[J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(11): 267-269.  
Liang J, Gao S, Li Y R, *et al.* Isolation of pathogenic bacteria from proboscis intumescence disease in *Babylonia areolata* and the preventive effect of Chinese herbs[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2016, 44(11): 267-269(in Chinese).
- [5] 赵旺,吴开畅,王江勇,等. 方斑东风螺“翻背症”的病原及初步治疗研究[J]. *水产科学*, 2016, 35(5): 552-556.  
Zhao W, Wu K C, Wang J Y, *et al.* Pathogen and treatment of “reverse back syndrome” of whelk *Babylonia areolata*[J]. *Fisheries Science*, 2016, 35(5): 552-556(in Chinese).
- [6] 彭景书,戈贤平,李明,等. 方斑东风螺单孢子虫病的研究[J]. *水生生物学报*, 2011, 35(5): 803-807.  
Peng J S, Ge X P, Li M, *et al.* Study on haplosporidium disease of *Babylonia areolata*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(5): 803-807(in Chinese).
- [7] 刘巧红,王世锋,蔡岩,等. 海南养殖方斑东风螺暴发性疾病病原分离鉴定及药敏分析[J]. *渔业科学进展*, 2014, 35(1): 74-81.  
Liu Q H, Wang S F, Cai Y, *et al.* Isolation, identification and antibiotic sensitivity analysis of bacterial pathogen from cultured *Babylonia areolata* with fulminant infectious disease in Hainan[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2014, 35(1): 74-81(in Chinese).
- [8] 刘晓靖,王瑞旋,凌慧,等. 方斑东风螺“急性死亡症”病原及其毒力基因研究[J]. *海洋环境科学*, 2019, 38(1): 7-15.  
Liu X J, Wang R X, Ling H, *et al.* Studies on the pathogenic bacteria and their virulence factors of “acute death syndrome” in *Babylonia areolata*[J]. *Marine Environmental Science*, 2019, 38(1): 7-15(in Chinese).
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. GB 4789.2—2016. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. 北京:中国标准出版社,2016: 3-4.  
National Health and Family Planning Commission of PRC, China Food and Drug Administration. GB 4789.2—2016. National food safety standard, food microbiological examination: aerobic plate count[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 3-4 (in Chinese).
- [10] 常杰. 对虾和刺参敏感免疫学指标的筛选和评价[D]. 青岛:中国海洋大学,2010.  
Chang J. Studies on sensitive immunology parameters screening and evaluation in white shrimp *Litopenaeus vannamei* and sea cucumber *Apostichopus japonicus*  
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- Selenka[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010 (in Chinese).
- [11] Rojas R, Miranda C D, Opazo R, *et al.* Characterization and pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with massive mortalities of commercial hatchery-reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819)[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2015, 124: 61-69.
- [12] Sawabe T, Inoue S, Fukui Y, *et al.* Mass mortality of Japanese abalone *Haliotis discus hannai* caused by *Vibrio harveyi* infection[J]. *Microbes and Environments*, 2007, 22(3): 300-308.
- [13] Travers M A, Tourbiez D, Parizadeh L, *et al.* Several strains, one disease: experimental investigation of *Vibrio aestuarianus* infection parameters in the *Pacific oyster*, *Crassostrea gigas*[J]. *Veterinary Research*, 2017, 48(1): 32.
- [14] 凌慧, 赵旺, 王瑞旋, 等. 工厂化养殖方斑东风螺消化道及养殖环境中细菌数量变动与理化因子的关系[J]. *海洋环境科学*, 2018, 37(1): 62-69.
- Ling H, Zhao W, Wang R X, *et al.* Physical-chemical factors associated with the dynamic change of bacterial quantity of alimentary tract and environment in *Babylonina areolate* industrial aquaculture[J]. *Marine Environmental Science*, 2018, 37(1): 62-69(in Chinese).
- [15] 葛明峰, 郑晓叶, 王国良. 大黄鱼感染致病弧菌的检测及其病害的预测预警[J]. *水产学报*, 2014, 38(12): 2068-2074.
- Ge M F, Zheng X Y, Wang G L. Detection of pathogenic vibrios infection in *Larimichthys crocea* and its forecast and warning of disease[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(12): 2068-2074(in Chinese).
- [16] 安沛, 王印庚, 廖梅杰, 等. 金乌贼幼体弧菌性坏死病的病原、组织病理特征和药物敏感性[J]. *中国水产科学*, 2019, 26(1): 193-202.
- An P, Wang Y G, Liao M J, *et al.* Histopathological characteristics, pathogen, and drug sensitivity of vibriotic necrosis disease in the golden cuttlefish (*Sepia esculenta*)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(1): 193-202(in Chinese).
- [17] 张崇文. 哈维氏弧菌外膜蛋白 (OmpK 和 GAPDH) 免疫原性研究及主要海水病原弧菌外膜蛋白交叉保护性抗原筛选 [D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- Zhang C W. Study on the immunogenicity of *Vibrio harveyi* outer membrane protein (OmpK and GAPDH) and screening of cross protective immunogens of outer membrane protein from several main marine pathogenic vibrios[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2007 (in Chinese).
- [18] Mohamad N, Amal M N A, Yasin I S M, *et al.* Vibriosis in cultured marine fishes: a review[J]. *Aquaculture*, 2019, 512: 734289.
- [19] Rivas A J, Balado M, Lemos M L, *et al.* Synergistic and additive effects of chromosomal and plasmid-encoded hemolysins contribute to hemolysis and virulence in *Photobacterium damsela* subsp. *damselae*[J]. *Infection and Immunity*, 2013, 81(9): 3287-3299.
- [20] Han Y F, Mo Z L, Xiao P, *et al.* Characterization of EmpA protease in *Vibrio anguillarum* M3[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2011, 10(4): 379-384.
- [21] 李桂仙, 张春丹. 哈维氏弧菌致病因子检测与防治研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(6): 319-322, 329.
- Li G X, Zhang C D. Research progress of pathogenic factors and detection techniques of *Vibrio harveyi*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(6): 319-322, 329(in Chinese).
- [22] Choudhury F K, Rivero R M, Blumwald E, *et al.* Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination[J]. *The Plant Journal*, 2017, 90(5): 856-867.
- [23] Martínez-Ivarez R M, Morales A E, Sanz A. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2005, 15(1-2): 75-88.
- [24] 王海亮, 温海深, 黄杰斯, 等. 花鲈早期发育阶段机体抗氧化酶活力变化及生理功能分析[J]. *海洋湖沼通报*, 2018(5): 109-117.
- Wang H L, Wen H S, Huang J S, *et al.* Analyses of antioxidant enzyme activity and physiological function of *Lateolabrax maculatus* at early developmental stage[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2018(5): 109-117(in Chinese).
- [25] 严俊贤, 李有宁, 于刚, 等. 企鹅珍珠贝抗氧化系统对铜暴露的响应[J]. *水产科学*, 2018, 37(4): 494-498.
- Yan J X, Li Y N, Yu G, *et al.* Responses of antioxidant system in pearl oyster *Pteria pengium* to copper exposure[J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(4): 494-498(in Chinese).
- [26] 胡静, 吴开畅, 叶乐, 等. 急性盐度胁迫对克氏双锯鱼



- 幼鱼过氧化氢酶的影响[J]. *南方水产科学*, 2015, 11(6): 73-78.
- Hu J, Wu K C, Ye L, *et al.* Effect of acute salinity stress on catalase of juvenile *Amphiprion clarkii*[J]. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(6): 73-78(in Chinese).
- [27] 孟霄鹏, 孟阳, 王悦, 等. 益生菌对凡纳滨对虾免疫功能及肠道菌群的影响[J]. *水产科学*, 2017, 36(1): 60-65.
- Meng X P, Meng Y, Wang Y, *et al.* Effects of probiotics on immunologic functions and intestinal microflora in Pacific white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fisheries Science*, 2017, 36(1): 60-65(in Chinese).
- [28] Dong X Q, Zhang D M, Chen Y K, *et al.* Effects of antimicrobial peptides (AMPs) on blood biochemical parameters, antioxidase activity, and immune function in the common carp (*Cyprinus carpio*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(1): 429-434.
- [29] 陈仲, 蒋经伟, 高杉, 等. 不同病原菌刺激后仿刺参幼体腔细胞中免疫相关酶的应答变化[J]. *水产科学*, 2018, 37(3): 295-300.
- Chen Z, Jiang J W, Gao S, *et al.* Response of immune-related enzyme activities in the coelomocytes of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* challenged with different pathogenic bacteria[J]. *Fisheries Science*, 2018, 37(3): 295-300(in Chinese).
- [30] 蒋经伟, 丛聪, 董颖, 等. 不同细菌刺激后仿刺参体腔液中免疫相关酶的应答变化[J]. *动物学杂志*, 2015, 50(6): 947-956.
- Jiang J W, Cong C, Dong Y, *et al.* The variation of immune-related enzyme activities in the coelomic fluid of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) after challenge with different bacteria[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2015, 50(6): 947-956(in Chinese).
- [31] Yang C Y, Hao R J, Deng Y W, *et al.* Effects of protein sources on growth, immunity and antioxidant capacity of juvenile pearl oyster *Pinctada fucata martensii*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 411-418.
- [32] 王书平, 孔祥会, 江红霞, 等. 金鱼胚胎发育过程中磷酸酶活性的变化[J]. *水产科学*, 2011, 30(7): 405-408.
- Wang S P, Kong X H, Jiang H X, *et al.* Changes in activities of acid phosphatase and alkaline phosphatase during embryonic development of goldfish, *Carassius auratus*[J]. *Fisheries Science*, 2011, 30(7): 405-408(in Chinese).
- [33] 罗凯娅, 刘欣欣, 葛端阳, 等. 鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)侵染对青蛤(*Cyclina sinensis*)谷胱甘肽硫转移酶及其基因表达的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(4): 735-740.
- Luo K Y, Liu X X, Ge D Y, *et al.* Effect of *Vibrio anguillarum* on activity and gene expression of glutathione s-transferases in *Cyclina sinensis*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(4): 735-740(in Chinese).
- [34] 樊甄姣, 杨爱国, 吕振明, 等. 鳗弧菌注射对栉孔扇贝免疫活性的影响[J]. *南方水产*, 2007, 3(6): 52-55.
- Fan Z J, Yang A G, Lv Z M, *et al.* Effects of *Vibrio anguillarum* on immune activities of *Chlamys farreri*[J]. *South China Fisheries Science*, 2007, 3(6): 52-55(in Chinese).
- [35] Zhang Q R, Chen Q X, Zheng W Z, *et al.* Inhibition kinetics of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase activity by dithiothreitol or 2-mercaptoethanol[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2000, 32(8): 865-872.
- [36] Liburdi K, Benucci I, Esti M. Lysozyme in wine: an overview of current and future applications[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2014, 13(5): 1062-1073.
- [37] 邱本丹. 大黄鱼溶菌酶对鳗弧菌胁迫的响应研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2016.
- Qiu B D. The response of c-type and g-type lysozyme in Large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) to *Vibrio anguillarum*[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2016 (in Chinese).
- [38] Wang R J, Feng J B, Li C, *et al.* Four lysozymes (one c-type and three g-type) in catfish are drastically but differentially induced after bacterial infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(1): 136-145.
- [39] 岳欣. 文蛤弧菌病的病原分析、免疫应答及抗性选育研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2011.
- Yue X. *Vibrio* disease, anti-*vibrio* immunity and vibrioresistance selective breeding of clam *Meretrix meretrix*[D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2011 (in Chinese).
- [40] 张齐. 海参溶菌酶的功能、活性及其非酶抑菌活性位点的分析[D]. 大连: 大连工业大学, 2017.
- Zhang Q. The analysis of the immunologic function, isopeptidase activity and detection of the key sites of the antibacterial activity for the *Stichopus japoicus* lysozyme[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University, 2017

- (in Chinese).
- [41] Natalia Y, Hashim R, Ali A, *et al.* Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae)[J]. *Aquaculture*, 2004, 233(1-4): 305-320.
- [42] Zhou P P, Wang M Q, Xie F J, *et al.* Effects of dietary carbohydrate to lipid ratios on growth performance, digestive enzyme and hepatic carbohydrate metabolic enzyme activities of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Aquaculture*, 2016, 452: 45-51.
- [43] Hoseinifar S H, Dadar M, Ringø E. Modulation of nutrient digestibility and digestive enzyme activities in aquatic animals: the functional feed additives scenario[J]. *Aquaculture Research*, 2017, 48(8): 3987-4000.
- [44] 薛明, 柯才焕, 魏永杰. 饥饿对方斑东风螺幼螺生化组成和消化酶活力的影响[J]. *热带海洋学报*, 2010, 29(3): 120-125.
- Xue M, Ke C H, Wei Y J. Effects of starvation on biochemical compositions and digestive enzyme activities of spotted babylon, *Babylonia areolata* juveniles[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2010, 29(3): 120-125(in Chinese).
- [45] 魏永杰. 方斑东风螺幼体摄食的生理生态研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2007.
- Wei Y J. Studies on larval feeding ecophysiology of Ivory shell, *Babylonia areolata* Link[D]. Xiamen: Xiamen University, 2007 (in Chinese).
- [46] 赵旺, 谭春明, 张玥, 等. 盐度胁迫对方斑东风螺行为活动及消化酶活性的影响[J]. *渔业现代化*, 2019, 46(5): 41-45.
- Zhao W, Tan C M, Zhang Y, *et al.* Effect of salinity stress on the activities of actions and digestive enzymes of *Babylonia areolata*[J]. *Fishery Modernization*, 2019, 46(5): 41-45(in Chinese).
- [47] Zhou Q C, Zhou J B, Chi S Y, *et al.* Effect of dietary lipid level on growth performance, feed utilization and digestive enzyme of juvenile ivory shell, *Babylonia areolata*[J]. *Aquaculture*, 2007, 272(1-4): 535-540.
- [48] 梁箫, 张亚, 刘钰珠, 等. 灿烂弧菌对厚壳贻贝免疫指标和消化酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2018, 42(9): 1438-1445.
- Liang X, Zhang Y, Liu Y Z, *et al.* Influence of *Vibrio splendidus* on immune indexes and digestive enzyme activity of *Mytilus coruscus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(9): 1438-1445(in Chinese).
- [49] 许玉洁, 单洪伟, 马牲. 芽孢杆菌和溶藻弧菌对凡纳滨对虾消化酶、免疫酶活力及抗病力的影响[J]. *中国海洋大学学报*, 2015, 45(5): 46-53.
- Xu Y J, Shan H W, Ma S. Effects of *Bacillus* sp. and *Vibrio alginolyticus* on the activities of digestive and immune enzymes disease resistance of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2015, 45(5): 46-53(in Chinese).
- [50] De Schrijver R, Ollevier F. Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*[J]. *Aquaculture*, 2000, 186(1-2): 107-116.
- [51] 陈曦飞. 不同饵料添加剂对泥东风螺幼螺生长及消化酶活性的影响[J]. *福建水产*, 2015, 37(4): 301-307.
- Chen X F. Effects of different feed additives on the growth and digestive enzyme activity of *Babylonia lutosa*[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2015, 37(4): 301-307(in Chinese).
- [52] 薛明, 柯才焕, 王德祥, 等. 饥饿与再投喂对方斑东风螺生长、基本营养成分及RNA/DNA比值的影响[J]. *水产学报*, 2010, 34(3): 481-488.
- Xue M, Ke C H, Wang D X, *et al.* Effects of starvation and recovery on growth, proximate composition and RNA/DNA ratio in juvenile spotted ivory shell (*Babylonia areolata*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(3): 481-488(in Chinese).
- [53] 洗健安, 陈江, 张秀霞, 等. 饲料中添加乳酸菌对方斑东风螺稚螺生长、肌肉组成与免疫功能的影响[J]. *河北渔业*, 2016(1): 1-4, 34.
- Xian J A, Chen J, Zhang X X, *et al.* Effects of dietary *Lactobacillus* on growth performance, muscle composition and immunity of *Babylonia areolata*[J]. *Hebei Fisheries*, 2016(1): 1-4, 34(in Chinese).
- [54] 洗健安, 陈江, 张秀霞, 等. 饲料中添加枯草芽孢杆菌对方斑东风螺稚螺生长、肌肉组成与免疫功能的影响[J]. *饲料工业*, 2016, 37(4): 5-9.
- Xian J A, Chen J, Zhang X X, *et al.* Effects of dietary *Bacillus subtilis* on growth performance, muscle composition and immunity of *Babylonia areolata*[J]. *Feed Industry*, 2016, 37(4): 5-9(in Chinese).

## Effects of “reverse back syndrome” on main digestive enzymes and immune-related enzymes in *Babylonia areolata*

ZHAO Wang<sup>1,2,3</sup>, YANG Rui<sup>1,2</sup>, WU Kaichang<sup>1,2</sup>, YU Gang<sup>1,2</sup>,  
CHEN Mingqiang<sup>1,2</sup>, ZHENG Zhongming<sup>3</sup>, WEN Weigeng<sup>1,2\*</sup>

(1. Tropical Fishery Research and Development Center, South China Sea Fisheries Research Institute,  
Chinese Academy of Fishery Sciences, Sanya 572018, China;

2. Key Laboratory of South China Sea Fishery Resource Exploitation & Utilization,  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300, China;

3. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315823, China)

**Abstract:** To explore the response mechanism of digestion and immune system to “reverse back syndrome” (RBS) of *Babylonia areolata*, both healthy(control group, CG) and disease samples (early stage of RBS [ERBS], middle stage of RBS [MRBS], and late stage of RBS [ERBS]) were collected, the *Vibrio* content, the activity of SOD, POD, CAT, ACP, AKP, LZM, pepsin, lipase and amylase in these samples were detected by TCBS plate count methods and enzyme test kit methods. The results showed that the content of *Vibrio* increased significantly with the development of the disease, and it reached the maximum in LRBS of *Babylonia areolata*. In MRBS, the activity of POD, AKP and LZM increased, and significantly higher than CG and ERBS; compared with ERBS, the activity of CAT, SOD, ACP, pepsin and lipase decreased; but compared with CG, the CAT and ACP activity increased significantly, and the pepsin and lipase activity decreased significantly, while there was no significant difference in SOD and amylase activity. In LRBS, the activities of digestive enzymes and immune-related enzymes were lower than those in MRBS, and compared with CG, the POD and ACP activity significantly increased, the pepsin, lipase and amylase activity significantly decreased, while there was no significant difference in the CAT, SOD, AKP and LZM activity. In conclusion, the immune system and digestive system are involved in the immune response during the outbreak of *Vibrio* in the RBS, and the CAT, POD and ACP activity can be used as the detection and evaluation indicators.

**Key words:** *Babylonia areolata*; reverse back syndrome; digestive enzyme; immune enzyme

**Corresponding author:** WEN Weigeng. E-mail: wenweigeng@163.com

**Funding projects:** Hainan Provincial Natural Science Foundation (318QN304); Special Funds for the Construction of Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-49); Project of Academy Locality Science and Technology Cooperation of Sanya (2018YD19, 2019YD21); Financial Fund of Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China (NHYYSWZZZYKZX2020)