

“黄水病”对拟穴青蟹免疫指标的影响

周旻曦^{1,2}, 丁小丰^{1,2}, 王国良^{1,2*}

(1. 宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211;

2. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 以血细胞分析和酶学分析方法, 比较研究了患“黄水病”拟穴青蟹和正常拟穴青蟹的细胞免疫及血清免疫酶指标。结果表明: 患病拟穴青蟹与正常拟穴青蟹不同性别之间血细胞密度、3种血细胞比例和 LYM、ACP、AKP、SOD、PO 酶活性差异皆不显著($P>0.05$), 而同性别之间变化明显, 差异极显著($P<0.01$); 雄性患病拟穴青蟹与正常拟穴青蟹的血细胞吞噬百分比(PP)和血清 LYM 活力没有明显差别($P>0.05$), 而雌性患病拟穴青蟹 PP 和 LYM 均显著低于正常拟穴青蟹($P<0.05$); 同性别的患病青蟹 PI 极显著低于正常青蟹($P<0.01$); 患病拟穴青蟹与正常拟穴青蟹不同性别之间 POD 活性差异不显著($P>0.05$), 同性别之间 POD 活性显著高于正常拟穴青蟹($P<0.05$)。

关键词: 拟穴青蟹; 黄水病; 免疫指标

中图分类号: S945

文献标识码: A

文章编号: 1001-5132 (2011) 04-0014-05

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)隶属节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、梭子蟹科(Portunidae), 是我国东南沿海重要海洋经济蟹类之一。已在浙江、江苏及福建等省进行广泛的人工养殖。然而, 近些年常暴发一种以甲壳内出现黄色腔液, 即血淋巴呈黄色或浊白不凝液体为主要症状的流行性疾病, 俗称青蟹“黄水病”, 严重制约了青蟹养殖产业的发展。有关青蟹“黄水病”的病原病因较复杂, 有人认为是细菌性病原引起^[1-2], 也有报道是血卵涡鞭虫^[3], 但周素琴、丁朋晓等研究发现环境变化或恶化是引起青蟹“黄水病”发生的主要诱因^[4-5]。近几年, 已有学者从 pH、铵氮、重金属离子等胁迫对青蟹免疫因子影响方面开展研究^[6-8], 在实验条件下分析了环境因子变化与青蟹免疫水平之间的关系, 但对在养殖环境中自然发生“黄水病”的青蟹的免疫功能变化尚未见报道。笔者以血细胞密度(THC)、血细胞比例、血细胞吞噬能力以及血清溶菌酶(LYM)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、超

氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、酚氧化酶(PO)活性作为青蟹免疫水平的指标, 比较研究自然患病拟穴青蟹和正常拟穴青蟹在免疫指标上的差异及变化, 探索养殖拟穴青蟹疾病暴发与机体免疫能力之间的关系, 为养殖拟穴青蟹病害防控提供理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验用蟹

在“黄水病”发生高峰季节(9~10月), 于浙江三门县青蟹养殖塘采集试验用拟穴青蟹雌雄各 15 只, 其具有典型“黄水病”症状; 对照用正常青蟹取自同一养殖区但取材时间避开“黄水病”的发生时期, 雌雄青蟹各 15 只, 经血清检测, 无病, 每只重约 150g。

1.2 血样采集与处理

用一次性无菌注射器从青蟹第三步足基关节处取血, 将血淋巴液与抗凝剂 1:2 混匀, 静置于 4℃ 冰箱中 1~2 h, 经 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 冷冻离心 10 min, 取上清液, 用于相关酶活力的测定; 沉淀

收稿日期: 2011-07-07.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划(IRT0734); 浙江省科技厅重大攻关项目(2005C12038); 温州市科技重大项目(S20080018)。

第一作者: 周旻曦(1987-), 女, 湖南零陵人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产动物病害防治。E-mail: 370624674@qq.com

*通讯作者: 王国良(1955-), 男, 浙江定海人, 教授, 主要研究方向: 水产动物病害防治。E-mail: wangguoliang@nbu.edu.cn

的血细胞用于血细胞吞噬能力的测定。

1.3 检测方法

1.3.1 血细胞密度及血细胞比例

血细胞密度及比例的测定采用血球计数板在显微镜下直接计数、统计。

1.3.2 血细胞吞噬能力

参照 Itami 等^[9]方法,将大肠杆菌(*Escherichia coli*,由宁波大学微生物室提供)接种于普通营养琼脂培养基上,28℃恒温培养 18~24 h,用 0.90% 无菌生理盐水制成菌悬液,密度为 $10^6\sim 10^7$ cfu·cm⁻³。把菌悬液按一定比例加入血细胞中使血细胞密度为 $10^4\sim 10^5$ cfu·cm⁻³ 制成细胞菌悬液,28℃水浴,60 min 取样涂片,每个样品各涂 5 片。涂片干燥后,用 0.25% 的吖啶橙染色 8~10 min 后水洗,干燥后在荧光显微镜下进行观察计数。

按下式计算血细胞吞噬百分比和吞噬指数:

吞噬百分比(PP)=100 个血细胞中参与吞噬的细胞数/100×100%;

吞噬指数(PI)=细胞内总菌数/被计数具吞噬作用的细胞数。

1.3.3 血清免疫酶活性

LZM、SOD、AKP、ACP 等活力采用南京建成生物工程研究所的酶活力测试盒进行测定。

PO 测定参考 Smith 等^[10]的方法进行测定。

POD 参考管华诗^[11]的方法进行测定。

1.4 数据处理

用 SPSS 16.0 数据分析软件进行单因素方差分析,结果用平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 血细胞密度及各型血细胞比例变化

“黄水病”拟穴青蟹与正常拟穴青蟹 THC 及 3 种血细胞比例见表 1 和表 2。统计分析表明:不同性别患病青蟹和正常青蟹之间 THC 及 3 种血细胞比例差异皆不显著($P>0.05$),而同性别之间的差异极显著($P<0.01$)。患病青蟹比正常青蟹 THC 大幅度下降;正常青蟹中,3 类血细胞比例保持相对恒定,其中小颗粒细胞数量最多,其次是无颗粒细胞,大颗粒细胞较少;在患病后,3 类血细胞比例发生了明显变化,其中大颗粒细胞比例的变化幅度最大,雌、雄蟹大颗粒细胞的增幅分别达到 144.66% 和 162.20%,而小颗粒细胞与无颗粒细胞所占比例均明显下降。

2.2 血细胞吞噬活力变化

血细胞吞噬活力变化统计结果与变量分析见图 1 和图 2。表明正常青蟹和患病青蟹不同性别之间 PP、PI 差异皆不显著($P>0.05$);患病雄蟹 PP 低于正常雄蟹,差异不显著($P>0.05$),但患病雌蟹 PP 显著低于正常雌蟹($P<0.05$),PP 从 37.46% 下降至 21.81%;同性别的患病青蟹 PI 极显著低于正常青

表 1 “黄水病”拟穴青蟹与正常拟穴青蟹 THC 比较

	对照		黄水病		增降幅度/%
	$X\pm SD$	CV/%	$X\pm SD$	CV/%	
血细胞密度/ (10^7 cell·L ⁻¹)	3.54±1.82	51.40	0.42±0.44**	105.00	-88.12
	2.93±1.85	63.08	0.43±0.41**	95.92	-85.32

注: *差异显著($P<0.05$), **差异极显著($P<0.01$); $X\pm SD$ 为平均数±标准差; CV 为变异系数。表 2 同。

表 2 “黄水病”拟穴青蟹与正常青蟹血细胞比例比较

		对照		黄水病		增降幅度/%
		$X\pm SD$	CV/%	$X\pm SD$	CV/%	
大颗粒细胞/%	♂	22.32±4.75	21.28	58.52±2.76**	4.72	162.20
	♀	21.24±5.35	25.19	51.96±3.01**	5.78	144.66
小颗粒细胞/%	♂	43.21±3.05	7.05	22.62±2.22**	9.82	-47.64
	♀	44.26±4.40	9.93	27.52±1.72**	6.25	-37.82
无颗粒细胞/%	♂	34.01±5.57	16.37	18.86±3.29**	17.45	-44.56
	♀	34.50±6.27	18.18	20.52±1.69**	8.25	-40.53

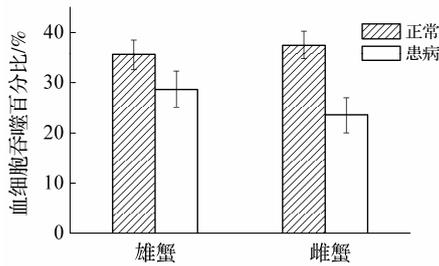


图1 “黄水病”拟穴青蟹与正常拟穴青蟹PP比较

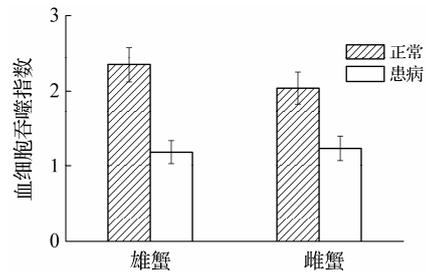


图2 “黄水病”拟穴青蟹与正常拟穴青蟹PI比较

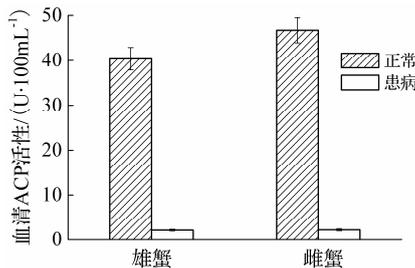


图3 “黄水病”拟穴青蟹与正常拟穴青蟹血清ACP比较

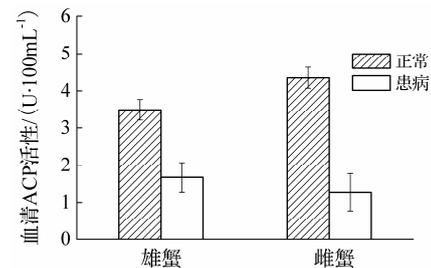


图4 “黄水病”拟穴青蟹与正常拟穴青蟹AKP比较

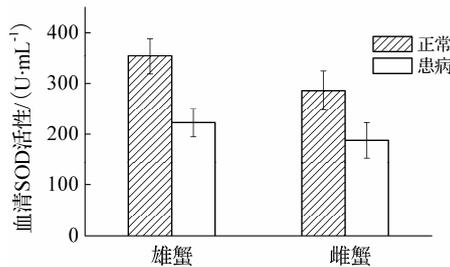


图5 “黄水病”拟穴青蟹与正常拟穴青蟹SOD比较

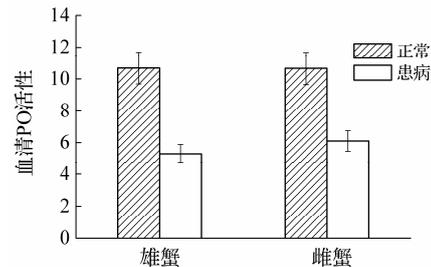


图6 “黄水病”拟穴青蟹与正常拟穴青蟹PO比较

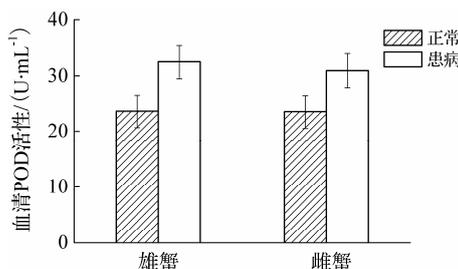


图7 “黄水病”拟穴青蟹与正常拟穴青蟹血清POD比较

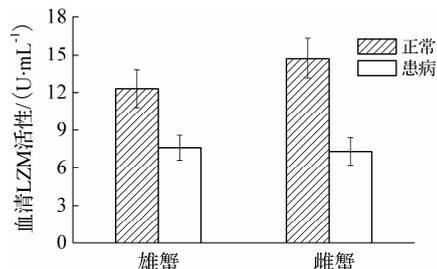


图8 “黄水病”拟穴青蟹与正常拟穴青蟹血清LZM比较

蟹($P<0.01$), 雄性患病组的PI值仅为1.19, 几乎是未患病雄蟹的一半。

2.3 几种血清免疫酶活性变化

免疫酶活性变化统计结果与变量分析见图3~图8。患病青蟹和正常青蟹不同性别之间血清ACP、AKP、SOD、PO、LZM、POD活性差异皆不显著($P>0.05$); 同性别的患病青蟹血清ACP、AKP、SOD、PO活性极显著低于正常蟹($P<0.01$), 其中血清ACP活性变化最为显著, 正常雌蟹ACP活性为 $46.71 \text{ U} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$, 而患病雌蟹血清ACP活

性仅为 $2.16 \text{ U} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$, 酶活力下降了20倍。患病前后雄性青蟹血清LZM活性差异并不显著($P>0.05$), 而雌性青蟹差异显著($P<0.05$)。同性别的患病雌雄青蟹血清POD活性变化不同于上述5种免疫酶, 皆呈现显著高于正常雌雄青蟹($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 “黄水病”对青蟹THC及各型血细胞比例的影响

在试验中, 患“黄水病”拟穴青蟹的THC极

显著地低于正常蟹,与其他学者在实验室条件下以 pH、铵氮、镉或铬胁迫拟穴青蟹引起 THC 下降的结果相同^[6-8]。在患病或感染的虾类中也发生同样的变化,具 WSSV 症状的中国明对虾 THC 明显降低^[12]。注射亚致死剂量维氏气单胞菌于罗氏沼虾后 4~24 h 其 THC 显著降低^[13]。现在大多研究认为甲壳类循环血细胞的补充是依靠造血组织而其自身不具有分裂增殖的能力^[14],青蟹“黄水病”主要由环境变化诱导引起^[4-5],患病青蟹血液 THC 下降的原因可能是环境胁迫对造血组织调节和释放分化成熟的血细胞进入循环系统产生了影响。

多数学者倾向将虾蟹类血细胞分为 3 类^[15-16],正常拟穴青蟹的 3 类血细胞比例保持相对恒定,从高到低依次为小颗粒细胞、无颗粒细胞、大颗粒细胞。但是患病后,青蟹的 3 类血细胞比例发生了明显变化,大颗粒细胞比例较高,其次是小颗粒细胞和无颗粒细胞。这可能与不同血细胞的免疫作用模式和持续周期的不同有关,3 类血细胞中,无颗粒细胞最活跃,小颗粒细胞最敏感,胞吐后细胞会裂解,皆容易在免疫早期发挥作用,而大颗粒细胞免疫作用持续周期较长,因此其存在数量相对最多。这种血细胞比例的变化不仅影响血细胞吞噬能力,也与血清免疫酶活性有关联。

3.2 “黄水病”对青蟹血细胞吞噬能力的影响

目前对甲壳类血细胞吞噬活性变化的研究多见于免疫增强剂和环境胁迫方面。血细胞吞噬活性可通过添加一些免疫增强剂得以提高^[17],而不同浓度的氨氮胁迫均可使血细胞 PP 和 PI 出现下降^[18]。本研究结果和环境胁迫试验相同,患“黄水病”青蟹可以抑制血细胞的吞噬活性。

患病后各类血细胞比例的变化可能影响 PP 的变化。小颗粒细胞是各类患病后吞噬细胞中吞噬活力最强的一类,当其比例下降时,PP 必然会相应下降。青蟹患病时,因机体对营养的摄入和吸收、对代谢废物的排泄的速率降低,正常生理活动受抑制,因此各类血细胞的代谢和活性也受到一定程度的影响。表现为 PI 的显著下降,吞噬能力明显减弱。

3.3 “黄水病”对青蟹血清免疫酶活性的影响

ACP 和 AKP 的前体主要存在于小颗粒细胞的颗粒中,当颗粒释放到细胞外才成为有活性的酶^[19]。

患病青蟹血清 ACP 和 AKP 活性皆极显著低于正常蟹,与小颗粒细胞比例的显著下降得不到及时补充导致合成与分泌的酶量减少有关。在 pH、氨氮胁迫下,拟穴青蟹 LZM 活性降低,下降幅度与胁迫浓度和胁迫时间成正比^[7,20]。“黄水病”青蟹的 LZM 活性降低,与 pH、氨氮胁迫的实验结果相一致,印证了自然条件下青蟹“黄水病”的发生与养殖环境胁迫的相关性。甲壳动物血清溶菌酶主要由吞噬细胞释放,病蟹 THC 显著下降致使血清溶菌酶表达量受到影响。SOD 和 POD 都是重要的抗氧化酶,能够清除细胞代谢过程产生的自由基。试验中,患病青蟹血清 SOD 活性极显著低于正常青蟹($P<0.01$),说明青蟹为了清除由于患病而产生的大量自由基,消耗了大量的 SOD,致使 SOD 的活性显著下降。POD 是细胞内保护酶系统中的一种,与抵御极端环境胁迫、病害等有着密切的关系,是生物响应逆境环境的重要标志。患病青蟹 POD 活性显著高于正常青蟹($P<0.05$),可能是受环境胁迫或病原侵染后的一种应激性反应。由于组织细胞受损,活性氧的产生和消除平衡被打破,使得活性氧产量增加。在日本对虾中,注射微生物悬液也可以提高 POD 活性,但随着异物被清除,POD 又逐渐回到原有水平^[21]。有研究表明,甲壳类的颗粒细胞中含有大量酚氧化酶原(ProPO),当受外界异物侵袭机体时,会刺激细胞产生胞吐作用进行脱颗粒,把酚氧化酶原系统释放到周围介质中,PO 随后被激活^[22]。而“黄水病”青蟹血清中 PO 活性极显著低于正常青蟹,是由于患病青蟹 THC 极显著低于正常青蟹,导致血清颗粒细胞随细胞密度的下降而降低,因而能够合成与释放的 PO 酶量减少,导致病蟹血清 PO 活性降低。

参考文献:

- [1] 纪荣兴,黄少涛.锯缘青蟹“黄体病”病原菌的研究[J].台湾海峡,1998,17(4):474-477.
- [2] 毛之娟,卓华龙,杨季芳,等.锯缘青蟹细菌性传染病的病原菌研究[J].台湾海峡,2001,20(2):187-193.
- [3] 施惠,许文军,李鹏飞,等.应用 PCR 方法检测患“黄水病”锯缘青蟹中的血卵涡鞭虫[J].海洋渔业,2008,30(1):74-79.
- [4] 周素琴.环境胁迫对养殖锯缘青蟹主要免疫因子的影响[D].青岛:中国海洋大学,2006.

- [5] 丁朋晓. 养殖锯缘青蟹暴发性流行病的初步研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2007.
- [6] 刘璐, 杨玉娇, 王国良. pH 突变对拟穴青蟹免疫因子的胁迫影响[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2009, 22(4): 484-489.
- [7] 金珊, 程岩雄, 杨玉姣, 等. 铵氮胁迫对拟穴青蟹免疫力的影响[J]. 浙江农业学报, 2008, 20(6):402-407.
- [8] 蒋云霞, 徐华, 艾春香. 镉或铬胁迫对拟穴青蟹血细胞总数和酚氧化酶活性的影响[J]. 海洋通报, 2010, 29(6): 649-653.
- [9] Itami T, Takahashi Y, Tsuchihira E, et al. The third Asian fisheries forum[M]. Manila: Asian Fisheries Society, 1994:375.
- [10] Smith V J, Söderhall K. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates[J]. Developmental and Comparative Immunology, 1991, 15(4):251-261.
- [11] 管华诗. 海水养殖动物的免疫、细胞培养和病害研究[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1999:1-45.
- [12] 黄旭雄, 周洪琪, 松理平. 急性感染对中国明对虾非特异免疫水平的影响[J]. 水生生物学报, 2007, 31(3):325-332.
- [13] Sung H H, Kuo P A, Kao W Y. Effect of lipopolysaccharides on in vitro phagocytosis by hemocytes from giant freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)[J]. Fish Pathol, 2000, 35(3):109-116.
- [14] Mats W Johansson, Pia Keyser. Crustacean haemocytes and haematopoiesis[J]. Aquaculture, 2000, 191:45-52.
- [15] 周晖. 常见虾蟹血细胞染色观察及分类研究[D]. 广州: 暨南大学, 2004.
- [16] 陈孝煊, 吴志新, 蔡灿东. 克氏原螯虾与红螯虾血相的比较研究[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(5):458-461.
- [17] 谢剑华, 管越强, 王静波. 虾青素对日本沼虾血细胞密度及吞噬活力的影响[J]. 河北渔业, 2008(1):8-10.
- [18] 黄鹤忠, 李义, 宋学宏, 等. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 免疫功能的影响[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(3):198-206.
- [19] 刘晓云, 张志峰, 马洪明. 中国对虾血细胞酶细胞化学的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(2):259-266.
- [20] 曾缓缓, 艾春香, 刘建国, 等. pH 胁迫对拟穴青蟹体内几种免疫因子的影响[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2008, 47(3):413-418.
- [21] 何南海. 对虾免疫功能指标的建立及其应用[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2004, 43(3):385-388.
- [22] Sung H H, Huang S F, Tasi F M. Responses of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) to challenge by two strains of *Aeromonas* spp[J]. Invertebr Pathol, 2000, 76:278-284.

Effects of “Yellow Water” Disease on Immune Factors in Mud Crab, *Scylla paramamosain*

ZHOU Min-xi^{1,2}, DING Xiao-feng^{1,2}, WANG Guo-liang^{1,2*}

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Using the method of hemocyte analysis and enzymologic analysis, the effects of immune parameters arising from “yellow water” disease and normal *Scylla paramamosain* are compared. The result show that, between sick and normal *Scylla paramamosain* of different gender, hemocyte density, hemocyte proportion, hemocyte, LZM, ACP, AKP, SOD, and PO enzyme activity differences are trivial ($P>0.05$), but the difference between them among the same gender is found to be noteworthy ($P<0.01$). In contrast with the normal *Scylla paramamosain*, the hemocyte phagocytosis percentage (PP) and LZM enzyme in the male sicken are not significant ($P>0.05$), while they are notably lower in female sicken ($P<0.05$). The level of same-sex sicken crab PI is significantly lower than the healthy ($P<0.01$). Between sicken and normal *Scylla*, the change of POD enzyme is minor among different genders ($P>0.05$), but it is striking than normal *Scylla* amid the same gender ($P<0.05$).

Key words: *Scylla paramamosain*; “yellow water” disease; immune factor

(责任编辑 史小丽)