

溶藻弧菌诱导对三疣梭子蟹血淋巴非特异性免疫水平的影响

谢建军^{1,2*}, 许文军^{1,2}, 施慧^{1,2}, 查智辉^{1,2}

(1. 浙江省海洋水产研究所, 浙江海洋学院海洋与渔业研究所, 浙江 舟山 316100;

2. 浙江省海水增养殖重点实验室, 浙江 舟山 316100)

摘要:以平均体质量为 (162 ± 26) g 雌性三疣梭子蟹为试验对象, 注射组从游泳足第一关节基膜注射 200 μL 浓度为 2.4×10^7 CFU/mL 的溶藻弧菌菌悬液, 对照组注射等量无菌生理盐水。各组在注射 0、24、48、72、96 h 后随机取 9 只三疣梭子蟹, 从游泳足基膜部位抽取血淋巴, 测定血淋巴的血细胞总数、大颗粒细胞比例、血清蛋白、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、一氧化氮和诱导型一氧化氮合成酶等非特异性免疫指标。结果表明, 遭受低剂量的溶藻弧菌侵袭后, 三疣梭子蟹血细胞总数迅速降低 ($P < 0.05$), 与对照组相比降低 36%, 而大颗粒细胞比例则先上升 ($P < 0.05$), 72 h 后恢复至正常水平; 血清蛋白含量则无明显变化; 血清中酸性磷酸酶、碱性磷酸酶活性也迅速增加, 并分别在 24、72 h 达到峰值 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 在 96 h 后两种酶的活性均恢复至对照组水平; 血清中一氧化氮含量及诱导型一氧化氮合成酶活性则稳步增加, 并在 96 h 达到峰值 ($P < 0.01$)。研究证实低剂量的溶藻弧菌能刺激三疣梭子蟹调动血细胞、酸、碱性磷酸酶、一氧化氮合成酶系统进行免疫防御, 但是各非特异性免疫指标大多具有明显的时间效应, 响应速度有较大差异。

关键词:三疣梭子蟹; 溶藻弧菌; 血淋巴; 酸性磷酸酶; 碱性磷酸酶; 一氧化氮; 一氧化氮合成酶

中图分类号: Q 579; S 917

文献标志码: A

三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 是我国重要的海产经济蟹类之一, 山东半岛至南海海域均有分布, 是我国重点海水捕捞品种和海水增养殖的品种^[1]。近年来, 由于养殖环境管理、配套养殖模式、饵料及病害控制等研究相对滞后, 养殖梭子蟹面临多种病害问题的挑战。已报道的对养殖梭子蟹危害较大的病原有血卵涡鞭虫 (*Hematodinium* sp.)^[2-3]、假丝酵母菌 (*Candida olephila*)^[4] 和弧菌^[5], 弧菌病主要由溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 引起, 在我国山东、浙江等地区的梭子蟹养殖过程中均有发生^[6]。

虾蟹类免疫系统研究是近年来的主要研究热点, 学者们通过外界环境因子的改变、病原胁迫、多糖、多肽激活等多种研究手段对对虾的免疫因子进行了较为系统的研究, 目前多种免疫增强剂

产品已成功应用于对虾养殖, 为疾病防控提供了新思路^[7]。有关三疣梭子蟹的免疫系统研究相对较少, 目前已有健康三疣梭子蟹血淋巴分型与计数^[8], 血淋巴免疫酶活性初步分析^[9] 以及患“乳化病”的三疣梭子蟹免疫酶变化等相关研究报告^[10]。上述研究初步证实: 三疣梭子蟹具有较为系统的抵御外界病原感染机制, 但是在其自身抵抗力较弱或超过自身免疫调节范围后, 也将导致疾病发生乃至死亡。

本试验采用在三疣梭子蟹免疫调节耐受范围内的低浓度溶藻弧菌感染三疣梭子蟹, 从 0 h 至 96 h 连续取样, 对以下非特异性免疫相关指标进行测定: 包括血细胞总数 (total hemocyte count, THC)、大颗粒细胞 (large granular cell, LGC) 比例、血清蛋白、酸性磷酸酶 (acid phosphatase,

收稿日期: 2010-03-17 修回日期: 2011-06-15

资助项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y3090402); 浙江省科技厅项目 (2010R50025, 2010F20006); 浙江海洋学院“重中之重”学科建设开放课题 (20100211)

通讯作者: 谢建军, E-mail: xiejianjun611@163.com

<http://www.sxuebao.cn>

ACP)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)等,探讨在耐受范围内,遭受溶藻弧菌侵袭后三疣梭子蟹非特异性免疫系统的防御反应变化特点,以期在三疣梭子蟹抗细菌感染免疫调节机制及疾病防控提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用三疣梭子蟹捕捞于浙江省海洋水产研究所西轩试验场同一个养殖塘,共 90 只雌蟹,体质量(162 ± 26) g,分别暂养于 200 L 塑料桶中,水温 $20 \sim 21$ °C,盐度 26, pH 8.1 ~ 8.3。暂养 1 周后正式试验,每天 17:30 左右投喂新鲜小黄鱼块,投喂 2 h 后换水 50%。

溶藻弧菌由本实验室于 2008 年分离自患病三疣梭子蟹,以胰蛋白胨大豆肉汤琼脂培养基(TSB)复苏培养,用 0.85% 生理盐水制成所需浓度菌悬液。采用 NIKON-80i 显微镜及 NIKON DSC-II 显微照相系统进行血细胞计数;血清蛋白浓度采用 TECAN SAFIRE 多通道酶标仪测定、ACP、AKP、NO、iNOS 用北京瑞利 VIS-722G 型分光光度计测定。

1.2 试验方法

感染浓度 经梯度浓度感染实验,确定实验注射浓度为 2.4×10^7 CFU/mL。

溶藻弧菌诱导试验 试验分组:试验分为处理组与生理盐水对照组,为避免三疣梭子蟹自相残杀,各组分养于同样养殖环境的 3 个塑料桶,每个试验桶内养殖 12 只。注射感染:从游泳足第一关节基膜处注射浓度为 2.4×10^7 CFU/mL 的溶藻弧菌悬液 200 μ L,生理盐水对照组则从相同位置注射 0.85% 生理盐水 200 μ L。试验取样:注射前取相同暂养条件下的三疣梭子蟹 9 只,作为注射 0 h 时的对照样本;注射组和空白组在 24、48、72、96 h 从每组 3 个试验桶分别取样 3 只,共 9 只蟹作为一组样品。样品处理:用已抽取 500 μ L 10% 福尔马林固定液的注射器从三疣梭子蟹游泳足第一关节基膜处准确抽取 500 μ L 血淋巴,迅速混匀后置 1.5 mL 离心管备用;其余血淋巴样品则置于 5 mL 灭菌离心管,37 °C 放置 2 h,4 °C 过夜,低速冷冻离心(5 000 r/min, 4 °C)分离血

清,每个样本的血清平均分装于 5 个 1.5 mL 离心管中,储存于 -70 °C 备用。

非特异性免疫指标检测 对三疣梭子蟹血清进行 THC、大颗粒细胞比例、血清蛋白、ACP、AKP、NO 和 iNOS 酶活力等非特异性免疫指标的测定。

血细胞总数、大颗粒细胞总数计数用普通血球计数板进行,为存档及提高计数效率,用显微照相系统将记数框内图像拍下,然后在电脑上计数,每个样品计数 3 次,取平均值。血清蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 方法进行测定,在 96 孔酶标板中进行。

以下各项指标采用南京建成生物工程研究所的试剂盒进行测定,使用方法参见说明书,测定各项指标的试剂盒均为同一批次试剂。ACP 活性测定采用磷酸苯二钠法,以 100 mL 血清在 37 °C 与底物作用 60 min,产生 1 mg 酚为 1 个酶活力单位;AKP 活性测定也是用磷酸苯二钠法,以 100 mL 血清在 37 °C 与底物作用 15 min,产生 1 mg 酚为 1 个酶活力单位;将原操作方法改进后在 96 孔酶标板上进行测定。NO 含量测定采用硝酸盐显色剂生成红色偶氮化合物来间接测定;iNOS 则利用 NOS 与精氨酸与分子氧反应生成 NO,而 NO 与亲核性物质生成有色化合物,从而通过测定吸光度进行定量。

实验数据处理 同一样品每个指标测定 3 个数值取平均值,最终结果以 mean $\pm$ SD 表示,采用 Excel 2003 以及 SPSS 11.5 (单因素方差, LSD)对数据进行分析,差异显著临界值 0.05,差异极显著临界值 0.01。

2 结果

注射溶藻弧菌 24 h 以后梭子蟹反应迟钝,摄食较差,投饵后主动摄食的梭子蟹占 30% 左右;48 h 后,处理组死亡梭子蟹一只;72 h 时梭子蟹开始摄食,活力有所增强。生理盐水对照组则活力正常,摄食积极,未出现死亡。

2.1 低浓度溶藻弧菌诱导对梭子蟹血细胞总数、大颗粒细胞比例和血清蛋白含量的影响

注射溶藻弧菌 24、48、72、96 h 后,取样点间梭子蟹 THC 与生理盐水对照组相比显著降低($P < 0.05$),24 h 时 THC [$(20\ 646 \pm 4\ 956)/\text{mm}^3$]与对照组 [$(32\ 222 \pm 6\ 284)/\text{mm}^3$]相比降

低 36%,但是各取样点间则无显著差异(图 1-a); 24 和 48 h 大颗粒细胞比例与生理盐水对照组差异显著($P < 0.05$);而 72 h、96 h 的大颗粒细胞比例与对照组无显著差异(图 1-b);不同取样点三疣梭子蟹血清蛋白含量注射后 24 h 数值稍有降

低,但是在 24 ~ 48 h 处于上升趋势,在 72 h 数值上稍超过对照组,但是各时间点差异不显著(图 1-c);对照组各指标在不同取样点数值略有变化,但无显著差异。

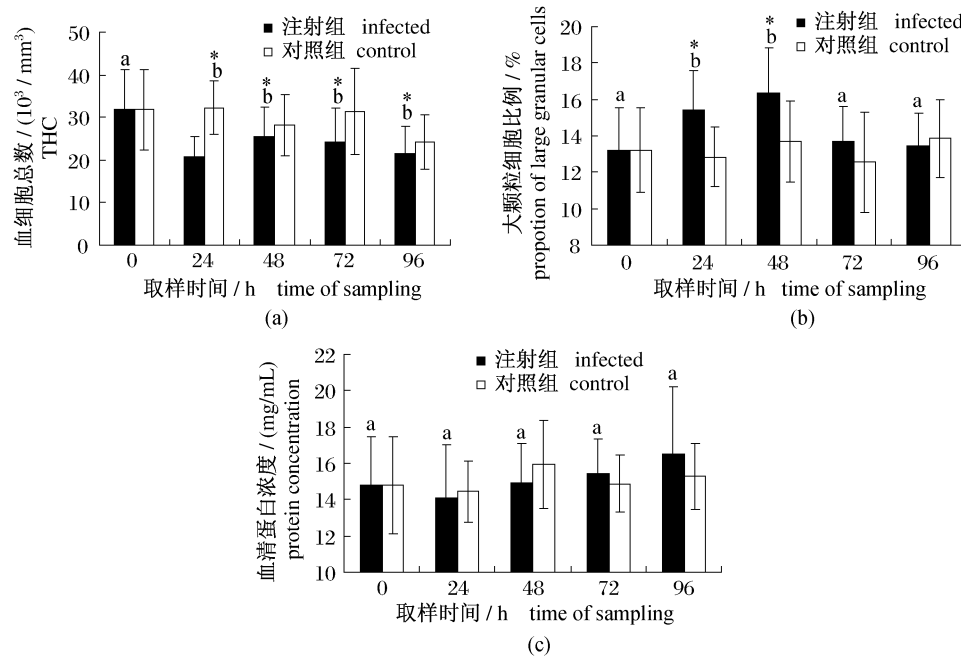


图 1 低浓度溶藻弧菌感染对三疣梭子蟹血细胞总数、大颗粒细胞比例和血清蛋白的影响

(a) 注射溶藻弧菌后不同时间点三疣梭子蟹血细胞总数的变化; (b) 大颗粒细胞比例的变化; (c) 血清蛋白的变化; 图中“*”和“**”分别表示同一时间点处理组与对照组之间有显著差异($P < 0.05$)或极显著差异($P < 0.01$); 图中处理组上方不同小写字母表示不同时间点处理组间差异显著($P < 0.05$)。

Fig.1 Variation in THC, LGC, and protein concentration in the serum of *P. trituberculatus* infected with low concentration *V. alginolyticus*

(a) variation in total hemocyte count (THC); (b) variation in proportion of large granular cell (LGC); (c) variation in haemolymph and protein concentration in the serum. The data represent means $\pm$ SD, * and ** indicate a significant difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$) between infected and control groups at the same time; Different letters in the infected columns indicate significant differences among different hours.

2.2 低浓度溶藻弧菌诱导对三疣梭子蟹血清 ACP、AKP 水平的影响

注射溶藻弧菌后梭子蟹血清 ACP 活性在注射后 24、48 h 极显著升高($P < 0.01$), 24 h 时 ACP [(3.99 ± 1.81) U/100 mL] 比对照组 [(0.96 ± 0.22) U/100 mL] 升高近 300%; 在 72 h 时数值有所降低 [(3.11 ± 1.01) U/100 mL], 但是与对照组 [(1.63 ± 0.14) U/100 mL] 仍有显著性差异($P < 0.05$), 但是 3 个时间点间无显著差异; 96 h 后, ACP 活性降低 [(1.94 ± 0.81) U/100 mL], 与对照组 [(1.78 ± 0.33) U/100 mL] 无显著差异(图 2-a); AKP 变化结果则与 ACP 类

似, 但是虽然其活性在注射后 24 h 有所增加但与对照组无显著差异, 48、72 h 活性继续升高并与空白组出现显著差异, 而在 96 h 活性有所下降并与空白组无显著差异。对照组 ACP、AKP 活性虽有所波动, 但是无显著变化(图 2-b)。

2.3 低浓度溶藻弧菌诱导对三疣梭子蟹血清 NO 含量和 iNOS 活性的影响

经低浓度溶藻弧菌诱导后, 三疣梭子蟹血清中 NO 含量在 24 h [(25.82 ± 5.54) $\mu\text{mol/L}$] 时变化并不明显, 在 48 h [(38.99 ± 12.54) $\mu\text{mol/L}$] 时与对照组出现显著性差异($P < 0.05$); 在 72 h [(135.31 ± 27.19) $\mu\text{mol/L}$] 出现极显著升高

($P < 0.01$),并在 96 h [$(147.86 \pm 38.82) \mu\text{mol/L}$]达到峰值(图 3-a)。iNOS 活性也在注射后逐渐升高,并在 72 h [$(9.41 \pm 1.93) \text{ U/mL}$]时出现显著性差异($P < 0.05$),96 h 时出现极显著差异($P < 0.01$)(图 3-b)。对照组 NO 含量与 iNOS 活性在试验期间无明显变化。

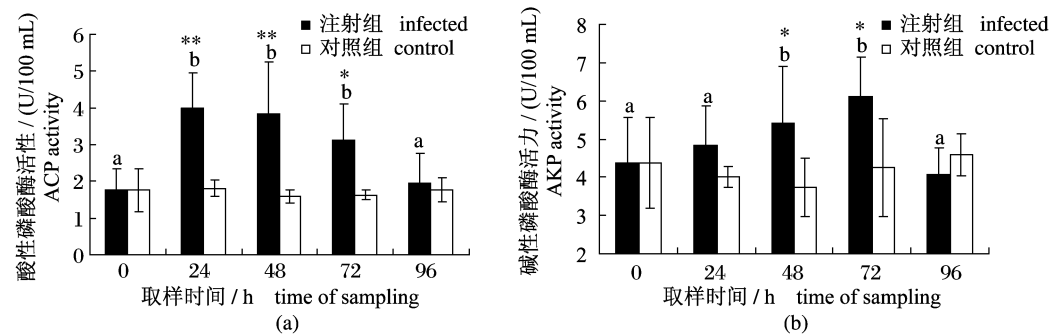


图 2 低浓度溶藻弧菌感染对三疣梭子蟹血清中酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP) 活性的影响
(a) 注射溶藻弧菌后不同时间点三疣梭子蟹血清中 ACP 活性变化; (b) AKP 的活性变化; 图中“*”和“**”分别表示同一时间点处理组与对照组之间有显著差异($P < 0.05$)或极显著差异($P < 0.01$); 图中处理组上方不同小写字母表示不同时间点处理组间差异显著($P < 0.05$)。
Fig. 2 Variation of ACP and AKP in the serum of *P. trituberculatus* infected with low concentration *V. alginolyticus*
(a) variation of acid phosphatase activity (ACP); (b) variation of alkaline phosphatase activity (AKP); The data represent means $\pm$ SD, * and ** indicate a significant difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$) between infected and control groups at the same time; Different letters in the infected columns indicate significant differences among different hours.

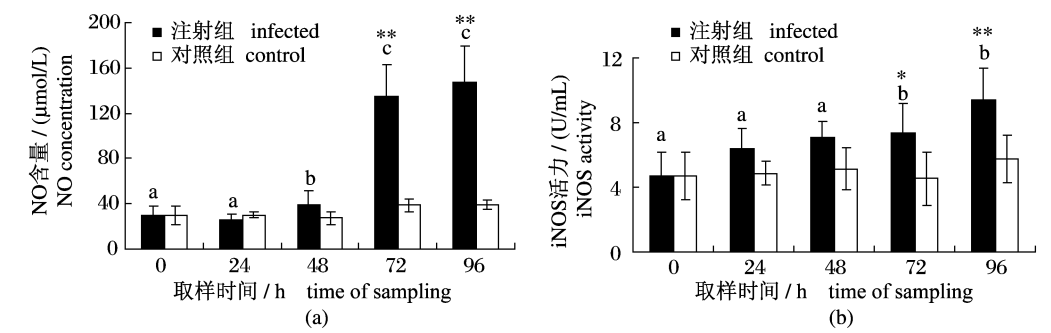


图 3 低浓度溶藻弧菌感染对三疣梭子蟹血清中一氧化氮 (NO) 含量、抑制型一氧化氮合成酶 (iNOS) 活性影响
(a) 注射溶藻弧菌后不同时间点三疣梭子蟹血清中 NO 含量; (b) iNOS 活性变化; 图中“*”和“**”分别表示同一时间点处理组与对照组之间有显著差异($P < 0.05$)或极显著差异($P < 0.01$); 图中处理组上方不同小写字母表示不同时间点处理组间差异显著($P < 0.05$)。
Fig. 3 Variation of NO concentration and inducible nitric oxide synthase in the serum of *P. trituberculatus* infected with low concentration *V. alginolyticus*
(a) variation of NO concentration; (b) variation of inducible nitric oxide synthase; The data represent means $\pm$ SD, * and ** indicate a significant difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$) between infected and control groups at the same time; Different letters in the infected columns indicate significant differences among different hours.

3 讨论

三疣梭子蟹病害严重影响该产业健康发展,寄生虫、细菌、病毒、真菌均能感染梭子蟹,其中以寄生虫、细菌病的危害最为严重^[2],溶藻弧菌是最典型的梭子蟹细菌性致病原之一,可引起梭子

蟹多种感染症状,如“牙膏病”、“乳化病”等^[4-5]。本实验采用的溶藻弧菌菌株对三疣梭子蟹有较强的致病力,感染较高浓度的该溶藻弧菌菌株会导致急性死亡。本研究采用较低浓度的菌悬液对三疣梭子蟹进行感染试验,探究三疣梭子蟹在细菌性病原侵袭后,其血淋巴内免疫防御反应特点,为

三疣梭子蟹细菌性疾病的免疫防治提供参考。

甲壳类动物的血细胞总数虽然易受环境因素及蜕壳等生理因素影响而出现明显波动,但是可以直接反应甲壳动物的健康状况。甲壳类动物在感染各种致病原后,血细胞作为细胞防御屏障会出现脱颗粒、吞噬、包裹等一系列免疫防御反应,从而导致血细胞总数下降^[7]。例如罗氏沼虾在注射低浓度的气单胞菌(*Aeromonas veronii*)后在4~24 h内THCs就出现显著性降低^[11],而日本对虾(*Penaeus japonicus*)在感染镰刀菌后血细胞数仅有对照组的54.3%^[12];另外兰蟹(*Callinectes sapidus*)感染血卵涡鞭虫(*Hematodinium perezii*)后血细胞总数降低50%~70%^[13],而三疣梭子蟹严重感染血卵涡鞭虫(*Hematodinium sp.*)后,其血淋巴中甚至观察不到血细胞^[3]。本实验中低剂量溶藻弧菌侵袭会造成梭子蟹THCs显著降低,而且96 h后,血细胞总数仍显著低于对照组,可能说明血细胞直接参与了溶藻弧菌的清除,不能在短时间内恢复。本实验中三疣梭子蟹大颗粒细胞比例在感染溶藻弧菌24 h后显著增加,但是在72 h后又恢复至对照组水平,证实大颗粒细胞也参与了三疣梭子蟹的体内溶藻弧菌的清除。

血清蛋白含量也可以反映甲壳动物的健康状况。黄旭雄等^[14]认为中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)感染白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)后会血清蛋白含量增加,但是也有报道证实中国明对虾和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)感染病毒后血清蛋白含量显著降低^[15-16],本试验中三疣梭子蟹血清蛋白含量虽有所升高但与对照组相比差异不显著,说明低浓度细菌感染对三疣梭子蟹血清蛋白含量影响较小。

酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)属于磷酸单酯水解酶类,由于两种酶的催化反应最适pH不同而有所区分。其中ACP是吞噬溶酶体的重要组成部分之一,会伴随着血细胞的防御性吞噬、包裹反应而释放,在生物体内参加磷酸基团的转移代谢,而AKP也是溶酶体的重要组成之一,但是还直接参与磷的代谢,对甲壳类钙质吸收、外骨骼形成等具有重要调节作用。有研究证明三疣梭子蟹在患“乳化病”后AKP酶活性会显著降低,另外急性感染较高剂量的溶藻弧菌以后,三疣梭子蟹的ACP、AKP活性随着感染时间延长持续

降低^[10]。但是本实验证实,ACP、AKP活性在诱导后持续上升,其中ACP活性在24 h后即达到显著性差异,AKP活性增加速度则稍微滞后,在48 h后达到显著性差异,更为值得注意的是在96 h后,ACP、AKP活性均降低至对照组水平。推测是低剂量溶藻弧菌触发了梭子蟹体液防御体系,刺激ACP、AKP参与溶藻弧菌的清除,说明两种磷酸酶活性的提高是梭子蟹应对细菌侵袭的一种防御机制。

生物体内一氧化氮(NO)由一氧化氮合成酶(NOS)催化产生,NOS分为结构型一氧化氮合成酶(cNOS)和诱导型一氧化氮合成酶(iNOS),其中iNOS与抗病有关,常存在于吞噬细胞中,iNOS能被细胞因子(如干扰素)和病原体以及免疫刺激物激活,iNOS激活后可以催化L-精氨酸产生一氧化氮,从而产生不同类型的活性氮中间体,参与免疫防御反应^[17-18]。水产动物体内也存在NO及iNOS活性,中国明对虾的NO和iNOS系统被证实与WSSV密切相关^[18],另外健康杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)血细胞也检测出iNOS活性^[19],因此NO与iNOS可作为水生生物进行健康状况评价指标。本试验首次证实,三疣梭子蟹血淋巴中存在iNOS,而且活性可由低剂量溶藻弧菌诱导,在注射溶藻弧菌24 h后,iNOS活性即有所增加,但是在72 h后才达到显著差异,96 h活性达到峰值。相应的NO含量也迅速上升,在48 h就开始出现极显著增加,其峰值出现时间与iNOS基本同步。这与乳酸菌可诱导大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)头肾巨噬细胞产生NO,增强抗病能力的研究结果一致^[20],说明NO含量和iNOS活性可作为三疣梭子蟹抗细菌感染的指示性指标。

三疣梭子蟹感染低浓度溶藻弧菌后,行动迟缓,基本不摄食,说明溶藻弧菌对其健康状况产生明显影响。但三疣梭子蟹可迅速调动其血淋巴内非特异性免疫因子进行抗感染防御,血细胞可能直接参与了细菌的清除,表现为血细胞总数显著降低和大颗粒细胞比例的变化,而血清蛋白含量变化不明显。值得注意的是,ACP、AKP及NO含量与iNOS活性虽然也出现显著增加,但ACP、AKP响应速度相对较快,且能迅速恢复至正常水平,NO含量与iNOS活性响应速度则较慢,在ACP、AKP活性恢复至接近正常水平后,其活性

才达到峰值,似乎形成了一种互补的防御机制。分析原因可能是三疣梭子蟹对体内入侵的细菌最先采取的清除机制与吞噬、溶酶体相关,而 ACP、AKP 正是与细胞吞噬、溶酶体密切相关的调节酶,因此其响应速度最为迅速。NO 能非特异性杀灭细菌并可增强非特异性免疫能力,其参与免疫调节机制较为复杂,在 96 h 后 NO 含量比对照组高出近 5 倍,这种极显著上升是否为正常防御反应,对机体是否会造成损伤,有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 俞存根,宋海棠,姚光展,等. 浙江近海蟹类资源合理利用研究[J]. 海洋渔业, 2003, 25(3): 136-141.
- [2] 许文军,徐汉祥,SHIELD J,等. 海产甲壳类血卵涡鞭虫病研究进展[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 695-702.
- [3] 许文军,施慧,徐汉祥,等. 养殖梭子蟹血卵涡鞭虫感染的初步研究[J]. 水生生物学报, 2007, 31(5): 27-32.
- [4] 许文军,施慧,徐汉祥,等. 梭子蟹假丝酵母菌病初步研究[J]. 水产学报, 2005, 29(6): 831-835.
- [5] 刘琪,李海燕,王群,等. 梭子蟹牙膏病病原菌—溶藻弧菌的鉴定及其系统发育分析[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(4): 9-13.
- [6] 陈国福,黄健,宋晓玲. 对虾免疫机能研究概况[J]. 水产学报, 2004, 28(2): 209-215.
- [7] 冯守明,杨先乐,李军,等. 凡纳滨对虾白斑综合征血液病理研究[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 108-112.
- [8] 周玉,穆占昆,杨振国. 三疣梭子蟹血淋巴细胞的形态、分类及计数[J]. 上海水产大学学报, 2001, 10(3): 279-281.
- [9] 赵青松,秦方锦,李长红,等. 3 种海产蟹血淋巴酶活性的初步研究[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2009, 22(1): 33-38.
- [10] 陈寅儿,王国良,金珊,等. 三疣梭子蟹患“乳化病”后几种保护酶活力的变化[J]. 水产科学, 2006, 25(9): 448-451.
- [11] SUNG H H, HWANG S F, TASI F M. Responses of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) to challenge by two strains of *Aeromonas* spp. [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2000, 76(4): 278-284.
- [12] YU J P. The classification, density and percentage of the shrimp, *Penaeus japonicus* [J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1993, 23(1): 107-114.
- [13] SHIELDS J D, SCANLON C, VOLETY A. Aspects of the pathophysiology of blue crabs *Callinectes sapidus* infected with the parasitic dinoflagellate *Hematodinium perezii* [J]. Bulletin of Marine Science, 2003, 72(2): 519-535.
- [14] 黄旭雄,周洪琪,宋理平. 急性感染对中国明对虾非特异性免疫水平的影响[J]. 水生生物学报, 2007, 31(3): 325-331.
- [15] 吴垠,邢殿楼,祝国芹,等. 中国对虾暴发性流行病的血液病理研究[J]. 中国水产科学, 1998, 5(3): 53-57.
- [16] SONGA Y L, YUA C I, LIENA T W, et al. Hemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2003, 14(4): 317-331.
- [17] 姜国建,于仁诚,周名江. 活性氮中间体和一氧化氮合成酶系统在生物病害防御中的作用[J]. 海洋科学, 2006, 30(3): 90-93.
- [18] 姜国建,于仁诚,王云峰,等. 对虾血细胞中一氧化氮合成酶鉴定与分析方法研究[J]. 中国水产科学, 2004, 11: 177-184.
- [19] 王广军,谢骏,余德光,等. 杂色鲍血细胞中一氧化氮合成酶活性的鉴别[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(6): 7-12.
- [20] VILLAMIL L, TAFALLA C, FIGUERAS A, et al. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2002, 9(6): 1318-1323.

Evaluation of hemato-immunological parameters in the swimming crab *Portunus trituberculatus* infected with low dose *Vibrio alginolyticus*

XIE Jian-jun^{1,2*}, XU Wen-jun^{1,2}, SHI Hui^{1,2}, ZHA Zhi-hui^{1,2}

(1. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Marine and Fishery Research Institute of

Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316100, China;

2. Key Laboratory of Marine Culture and Enhancement of Zhejiang Province, Zhoushan 316100, China)

Abstract: In this study, the alterations of some typical hematoimmunological parameters in the swimming crab *Portunus trituberculatus* infected with low dose *Vibrio alginolyticus* were investigated. Healthy crabs with an average weight of (162 ± 26) g were divided randomly into injected and control groups. Each crab was injected with 200 μL (2.4×10^7 CFU/mL) *V. alginolyticus* in injected group, and with 200 μL 0.85% sterile saline solution in control group. Then haemolymph samples were drawn from each crab at hours 0, 24, 48, 72 and 96 post injection for testing hematoimmunological parameters including total hemocyte count (THC), proportion of large granular cells, total serum protein concentration, acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), nitric oxide (NO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS). THC of injected crabs was significantly 36% lower than in control group and touched the bottom post injection 24 h ($P < 0.05$). Also, in injected groups, the proportion of large granular cells increased significantly at 24 h and 48 h ($P < 0.05$), and returned to the same level at 72 h and 96 h. Noticeably, there was no significant difference in the injected and control groups in PC, although the numerical value of injected group waved during the test (lower at 24 h, 48 h and higher at 72 h, 96 h than control group). The ACP activity, after injection, increased very significantly at 24 h, 48 h ($P < 0.01$) and 72 h ($P < 0.05$), then decreased to the control level at 96 h. The AKP activity increased gradually after injection, and noticeably, there was no significant difference with control group until at 48 h and 72 h ($P < 0.05$), then decreased to the control level at 96 h. The NO concentration and iNOS activity of injected group shared the same pronounced increasing, there was no significant difference with control group until 72 h ($P < 0.01$ for NO and $P < 0.05$ for iNOS) and 96 h ($P < 0.01$ for NO and iNOS), especially, the NO concentration in injected group was three times higher than that in control group at 96 h. All the results indicated hematoimmunological parameters of *P. trituberculatus* did play an important role in confronting the *V. alginolyticus*'s infection.

Key words: *Portunus trituberculatus*; *Vibrio alginolyticus*; haemolymph; acid phosphatase; alkaline phosphatase; nitric oxide; inducible nitric oxide synthase

Corresponding author: XIE Jian-jun. E-mail: xiejianjun611@163.com