

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2013.01.006

## WSSV<sup>+</sup> 斑节对虾的血清免疫相关酶对人工 感染 WSSV 粗提液的反应

张涛<sup>1,2</sup>, 黄建华<sup>1</sup>, 温为庚<sup>1</sup>, 杨其彬<sup>1</sup>, 郭志勋<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东省渔业生态环境重点实验室, 农业部南海渔业资源开发利用重点实验室, 广东广州 510300; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 用含  $3 \times 10^3$  拷贝·mL<sup>-1</sup>、 $6 \times 10^2$  拷贝·mL<sup>-1</sup> 和  $2 \times 10^2$  拷贝·mL<sup>-1</sup> 的对虾白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus, WSSV) 粗提液和 PBS 液 (对照) 注射感染病毒携带量约  $1 \times 10^5$  拷贝·g<sup>-1</sup> 的斑节对虾 (*Penaeus monodon*), 分别于第 15 分钟、第 30 分钟、第 1 小时、第 3 小时、第 6 小时、第 12 小时、第 24 小时、第 48 小时、第 72 小时取样, 研究了 WSSV 感染对斑节对虾血清内酸性磷酸酶 (acid phosphatase, ACP)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP)、酚氧化酶 (phenoloxidase, PO)、过氧化物酶 (peroxidase, POD) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性的影响。结果表明, 在 3 种感染浓度下 ACP、AKP、SOD 活性总体呈现先上升后下降随后上升的趋势, 其中 SOD 活性后期水平显著高于初期; PO、POD 活性总体呈现先下降后上升随后下降最后上升的趋势, 但 PO 后期活性水平与初期相当, 而 POD 后期活性水平显著高于初期。各免疫相关酶的反应强度与 WSSV 的感染浓度存在一定关系, 除 ACP 外其余 4 种酶的活性变化均以  $6 \times 10^2$  拷贝·mL<sup>-1</sup> 浓度组最为敏感。PBS 组 5 种免疫酶活性变化幅度均显著小于 3 种 WSSV 浓度感染组。

**关键词:** 斑节对虾; 白斑综合征病毒; 潜伏感染; 再感染; 免疫反应

中图分类号: S 945.4<sup>+</sup>7

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2013)01-0035-08

## Immune response of enzymes activities in *Penaeus monodon* serum with WSSV in latent period on reinfection

ZHANG Tao<sup>1,2</sup>, HUANG Jianhua<sup>1</sup>, WEN Weigeng<sup>1</sup>, YANG Qibin<sup>1</sup>, GUO Zhixun<sup>1</sup>

(1. Key Lab. of Fishery Ecology and Environment, Guangdong Province; Key Lab. of South China Sea Fishery Resources Utilization, Ministry of Agriculture; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** We studied the responses of 5 immuno-enzymes [acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), phenoloxidase (PO), peroxidase (POD), superoxide dismutase (SOD)] activities in serum of *Penaeus monodon* (with  $1 \times 10^5$  copies·g<sup>-1</sup> WSSV) to the injection with crude WSSV solution containing  $3 \times 10^3$  copies·mL<sup>-1</sup>,  $6 \times 10^2$  copies·mL<sup>-1</sup> and  $2 \times 10^2$  copies·mL<sup>-1</sup> virus and PBS at 15<sup>th</sup> minute, 30<sup>th</sup> minute, 1<sup>th</sup> hour, 3<sup>th</sup> hour, 6<sup>th</sup> hour, 12<sup>th</sup> hour, 24<sup>th</sup> hour, 48<sup>th</sup> hour, 72<sup>th</sup> hour. The activities of ACP, AKP and SOD first increased then decreased and then increased in the 3 groups of WSSV infection, while SOD activity was higher than the initial level significantly; the activities of PO and POD first decreased then increased then decreased and finally increased in the 3 groups of WSSV infection; the PO activity in later and earlier periods were equally the same, but POD activity was higher than the initial level significantly. The reactions of immuno-enzymes are related with the infection concentrations of WSSV, and the most sensitive changes of 4 enzymes activities except acid phosphatase are in the  $6 \times 10^2$  copies·mL<sup>-1</sup> WSSV group. The range of variation in the PBS group is smaller than that of 3 groups of WSSV infection.

收稿日期: 2012-05-21; 修回日期: 2012-09-19

资助项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-47); 广东省海洋渔业科技推广专项 (A201101B03); 农业部 948 项目 (2010-Z10)

作者简介: 张涛 (1986-), 男, 硕士研究生, 从事斑节对虾遗传育种及抗 WSSV 家系选育研究。E-mail: zhangtao5729@163.com

通信作者: 郭志勋, E-mail: guozhixun1@163.com

**Key words:** *Penaeus monodon*; WSSV; latent infection; reinfection; immune response

对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)因传染性强、致病性高,迄今为止仍是对全球对虾养殖业危害最严重的病原之一<sup>[1]</sup>。WSSV 宿主极其广泛,在养殖过程中对虾普遍存在 WSSV 潜伏感染,携带少量病毒的对虾仍可继续生长至商品规格<sup>[2-6]</sup>。然而,携带少量 WSSV 的斑节对虾(*Penaeus monodon*)在二次感染低剂量该病毒粗提液后,肌肉内病毒大量扩增并可导致对虾死亡<sup>[7]</sup>。

对虾只具有先天性免疫系统,体液中不存在免疫球蛋白,因此它无法像脊椎动物那样通过产生特异性抗体来达到自我保护的目的,但能依靠自身的免疫防御系统抵抗病原体的侵袭<sup>[8]</sup>。对虾机体的非特异性免疫主要包括细胞免疫和体液免疫,参与细胞免疫的血细胞是对虾体内防御外来病原微生物侵袭的主要屏障,而体液免疫主要依靠细胞释放到血浆中的多种因子的活性来完成<sup>[9-10]</sup>。在多种体液因子中,水解和氧化等免疫相关酶在对虾的免疫防御中发挥着极其重要的作用,对虾受到病原感染后这些酶的活性会发生不同的变化,如中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)感染 WSSV 后其碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)活性显著升高<sup>[11]</sup>,其酚氧化酶(phenoloxidase, PO)活性显著下降<sup>[2]</sup>,凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)感染 WSSV 后其超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(oxidase, POD)的活性显著降低<sup>[2]</sup>,但对携带 WSSV 的对虾二次感染该病毒后的免疫反应尚未见报道。笔者对 WSSV<sup>+</sup>斑节对虾人工感染 WSSV 后血清的酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)、AKP、PO、POD 和 SOD 等 5 种免疫相关酶活性的变化特征进行了分析,旨在探讨 WSSV<sup>+</sup>斑节对虾对再次感染 WSSV 的免疫反应规律。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验在中国水产科学研究院南海水产研究所三亚热带水产研究中心完成。试验用斑节对虾购自海南省三亚某养虾池塘,体长为(15.07 ± 1.31) cm,体质量为(20.08 ± 2.56) g,经荧光定量 PCR 检测了 120 尾对虾,发现对虾体内携带约(1.00 ± 0.32) × 10<sup>5</sup> 拷贝·g<sup>-1</sup> 的 WSSV。对虾购回后在 1 000 L 的桶中暂养 1 周,暂养期间对虾活力正常,没有

出现死亡。试验期间水温为 28.0 ~ 30.5 °C,盐度为 30.0 ~ 32.0, pH 为 7.8 ~ 8.2,溶解氧质量浓度为 6.6 ~ 7.0 mg·L<sup>-1</sup>。

### 1.2 试验方法

1.2.1 病毒注射液制备及定量 取白斑症状明显的斑节对虾作为病原(PCR 检测阳性,超低温保存),试验前取其肌肉组织 0.1 g,加入 1 mL PBS 注射液[136.9 mmol·L<sup>-1</sup>氯化钠(NaCl),2.7 mmol·L<sup>-1</sup>氯化钾(KCl),10.1 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>),1.8 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸氢二钾(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>),pH 为 7.4]冰浴研磨,10 000 r·min<sup>-1</sup>离心 20 min 后取上清液系列稀释至 10<sup>-9</sup>,0.45 μm 滤膜过滤。病毒稀释液部分用于注射,部分 -20 °C 冷冻保存。荧光定量 PCR 检测发现试验所用 3 个浓度的 WSSV 注射液,病毒浓度分别为 3 × 10<sup>3</sup> 拷贝·mL<sup>-1</sup>、6 × 10<sup>2</sup> 拷贝·mL<sup>-1</sup>、2 × 10<sup>2</sup> 拷贝·mL<sup>-1</sup>,感染浓度相当于 7.5 拷贝·g<sup>-1</sup>、1.5 拷贝·g<sup>-1</sup> 和 0.5 拷贝·g<sup>-1</sup> 对虾组织。

1.2.2 试验分组及取样 试验设 3 × 10<sup>3</sup> 拷贝·mL<sup>-1</sup>、6 × 10<sup>2</sup> 拷贝·mL<sup>-1</sup>、2 × 10<sup>2</sup> 拷贝·mL<sup>-1</sup> 及 PBS (对照)共 4 个处理组,每个处理组注射 120 尾虾,每尾虾的注射剂量为 50 μL,注射后于第 15 分钟、第 30 分钟、第 1 小时、第 3 小时、第 6 小时、第 12 小时、第 24 小时、第 48 小时、第 72 小时分别用 1 mL 注射器在对虾围心腔处抽取血淋巴,注入无菌的 1.5 mL 离心管中,每个处理组各个采样点各取 8 尾虾,每尾虾样品单独检测。血样过夜保存于 4 °C 冰箱,次日 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,吸出血清于 -20 °C 保存。试验期间保持正常日常管理。

1.2.3 免疫酶活性检测 1) ACP、AKP 活性检测。ACP、AKP 活性按南京建成生物工程研究所提供的 ACP、AKP 试剂盒测定,反应于 96 孔酶标板中,采用酶标仪 Molecular Devices SpectraMax M5 测量各反应体系中的吸光度(OD)。ACP、AKP 活性定义为以 100 mL 血清在 37 °C 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位。2) PO 活性检测。以 L-dopa 为底物,采用改进的 ASHIDA<sup>[13]</sup> 方法在 96 孔酶标板中进行。把 10 μL 血清加入 96 孔酶标板中,然后向各孔中加入 200 μL 0.1 mol·L<sup>-1</sup> pH 6.0 的磷酸钾盐缓冲液,最后向各样品孔中加入 10 μL 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 的 L-dopa,在酶标仪中振荡 4 次,每

隔 2 min 读取 490 nm 处的 OD 值。以试验条件下每分钟 OD 值增加 0.001 定义为 1 个酶活力单位。3) POD 活性检测。采用改进的雷质文等<sup>[21]</sup>方法在 96 孔酶标板中进行。把 20  $\mu\text{L}$  血清加入 96 孔酶标板中, 然后向各孔中加入 180  $\mu\text{L}$  显色缓冲液(7.3 g 一水柠檬酸, 11.86 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  定容至 1 L), 置于酶标仪中读取 490 nm 处的 OD 值( $A_1$ ); 再向样品各孔中加入 20  $\mu\text{L}$  显色液(4 mg 邻苯二胺; 4  $\mu\text{L}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; 10 mL 显色缓冲液), 置于酶标仪中摇匀后, 避光显色 15 min, 读取 490 nm 处的 OD 值( $A_2$ )。血淋巴上清液中 POD 相对活力以  $A_{\text{POD}} = (A_2 - A_1)$  表示。4) SOD 活性检测。SOD 活性按南京建成生物工程研究所提供的 SOD 试剂盒检测, 以每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 的量为 1 个亚硝酸盐单位 (NU)。

$$A_{\text{SOD}} = \frac{A_c - A_d}{A_c} \div 50\% \times d$$

式中  $A_{\text{SOD}}$  为 SOD 活力, 单位为  $\text{NU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;  $A_c$  为对照管吸光度;  $A_d$  为测定管吸光度;  $d$  为稀释倍数。

### 1.3 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件对试验数据进行统计分析, 计算 5 种免疫酶在 4 个处理组间的离散系数  $CV (CV = \sigma/\mu)$ , 采用 One-Way ANOVA 对试验结果进行方差分析, 采用 Duncan's 法进行多重比较, 取  $P < 0.05$  为差异显著性水平, 用 Excel 2007 绘制相关图表。

## 2 结果与分析

### 2.1 二次感染 WSSV 对血清 ACP 活性的影响

$3 \times 10^3$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  与  $6 \times 10^2$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  浓度组的 ACP 活性起初均显著上升,  $3 \times 10^3$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  浓度组在第 1 小时和第 12 小时分别达到较高值和最低值, 后逐渐上升至第 48 小时达到最大值; 而  $6 \times 10^2$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  浓度组在第 30 分钟即达到较高值, 随后经过起伏波动, 在第 12 小时处于极低值, 后期均维持在较高活性水平。 $2 \times 10^2$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  浓度组初期显著下降, 在第 30 分钟和第 1 小时分别达到最低值和较高值, 后呈现出小幅度内起伏波动趋势。PBS 组前期较为稳定, 后期略有起伏。比较 72 h 内 4 组 ACP 活性离散系数可看出, PBS 组离散程度 ( $CV$  为 0.18) 明显小于 3 种 WSSV 浓度组

( $CV$  为 0.51、0.25 和 0.27) (图 1)。

### 2.2 二次感染 WSSV 对血清 AKP 活性的影响

$3 \times 10^3$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  与  $6 \times 10^2$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  浓度组的 AKP 活性起初均显著上升, 区别在于  $3 \times 10^3$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  浓度组在第 1 小时达到最大值, 而  $6 \times 10^2$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  浓度组在第 30 分钟和第 3 小时分别达到了较大值和最大值, 2 个浓度组在第 6 小时后均呈现在同一水平下起伏波动的趋势;  $2 \times 10^2$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  浓度组在第 30 分钟和第 1 小时分别达到最小值和最大值, 随后在较高水平下波动, 在第 24 小时出现极低值后上升; PBS 组起初显著下降, 后期在小范围内起伏波动。比较 72 h 内 4 组 AKP 活性离散系数可看出, PBS 组离散程度 ( $CV$  为 0.16) 明显小于 3 种 WSSV 浓度组 ( $CV$  为 0.29、0.33 和 0.26) (图 2)。

### 2.3 二次感染 WSSV 对血清 PO 活性的影响

3 个 WSSV 浓度组 PO 活性初期均显著下降, 均在第 12 小时出现极低值, 但区别在于  $3 \times 10^3$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  浓度组在第 1 小时达到最大值, 后逐渐下降至第 12 小时;  $6 \times 10^2$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  浓度组在经过第 1 小时和第 6 小时 2 次波峰后逐渐下降至第 12 小时;  $2 \times 10^2$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  浓度组初期逐渐下降, 在第 6 小时出现最大值后下降至第 12 小时。3 个浓度组 PO 活性在后期均有上升, 但  $6 \times 10^2$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  浓度组起伏波动较大, 并在第 72 小时显著上升至初期水平; 其余 2 组上升幅度较小。PBS 组除第 3 小时外, PO 活性变化特征与  $2 \times 10^2$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  浓度组基本吻合。比较 72 h 内 4 组 PO 活性离散系数可看出, PBS 组离散程度 ( $CV$  为 0.27) 明显小于 3 种 WSSV 浓度组 ( $CV$  为 0.36、0.44 和 0.34) (图 3)。

### 2.4 二次感染 WSSV 对血清 POD 活性的影响

3 个 WSSV 感染组 POD 相对活性在后期均维持在较高水平, 但前期波动规律存在差异。 $3 \times 10^3$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  与  $6 \times 10^2$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  浓度组起初略有下降, 后逐渐上升至第 3 小时达到较高值, 前者维持在较高水平至第 24 小时出现最低值, 后者缓慢下降至第 12 小时出现较低值;  $2 \times 10^2$  拷贝  $\cdot \text{mL}^{-1}$  浓度组 3 h 内活性小幅波动, 在第 6 小时出现较高峰值后下降, 至第 12 小时出现最小值。PBS 组整个取样时间内活性变化幅度较小, 在第 48 小时略有上升, 随后下降至初期水平。比较 72 h 内 4 组 POD 相对活性离散系数可看出, PBS 组离散程度 ( $CV$  为 0.19) 明显小于 3 种 WSSV 浓度组 ( $CV$  为 0.41、

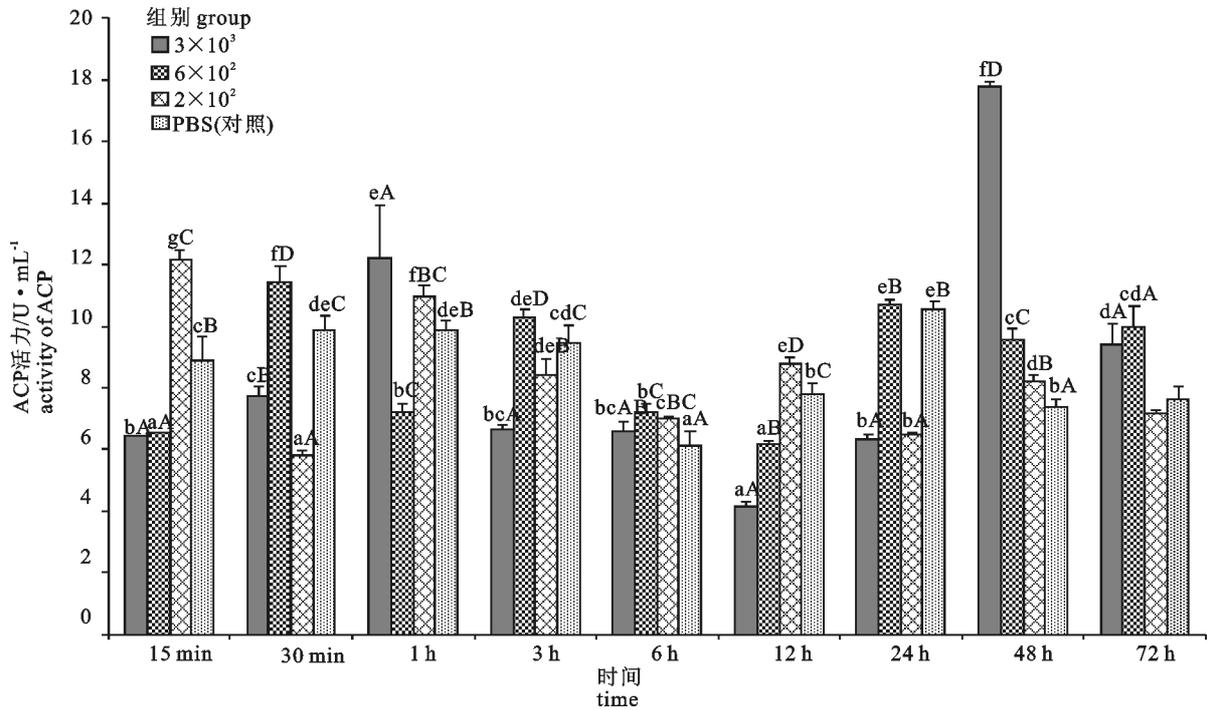


图1 感染不同浓度的 WSSV 后不同时间潜伏期斑节对虾血液中 ACP 活性变化  
不同小写字母表示同一 WSSV 浓度下不同时间点时活性差异显著,  $n=3, P<0.05$ ; 不同大写字母表示  
同一时间点不同 WSSV 浓度间活性差异显著,  $P<0.05$ ; 下图同此

Fig. 1 Change of ACP activity of *P. monodon* with different concentrations of WSSV solution in different latent periods  
Different small letters indicate significant difference among different periods with the same WSSV concentrations,  
 $n=3, P<0.05$ ; different capital letters indicate significant difference in the same period with  
different WSSV concentrations,  $P<0.05$ . The same case in the following figures.

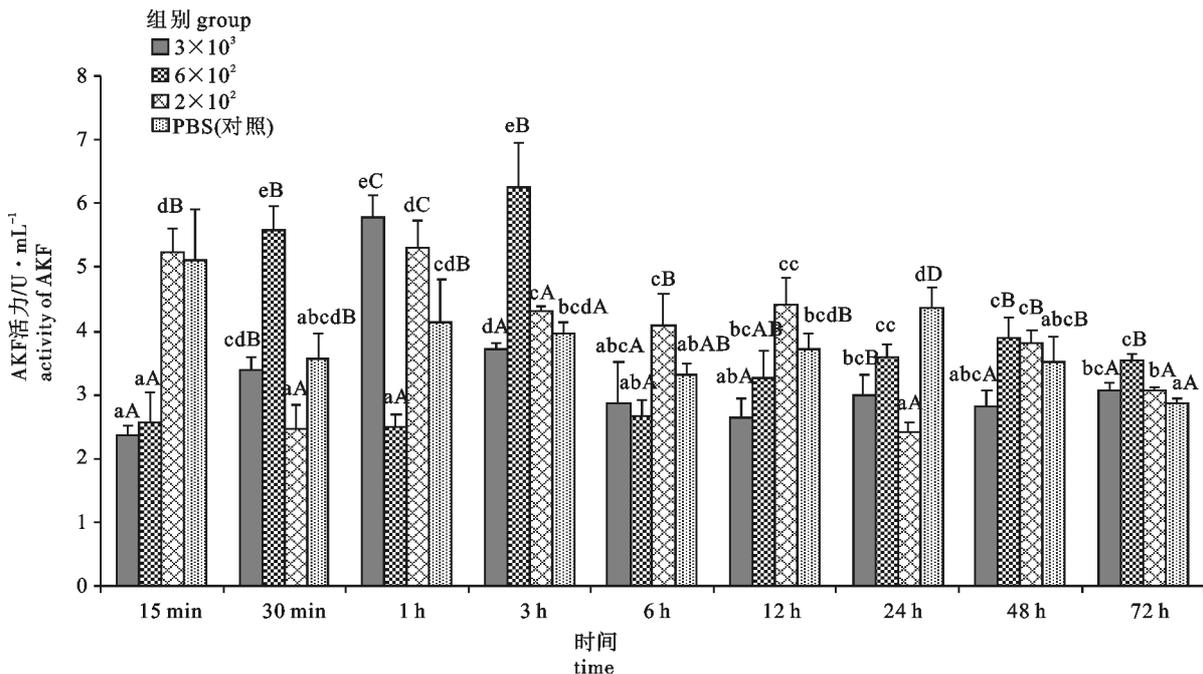


图2 感染不同浓度的 WSSV 后不同时间潜伏期斑节对虾血液中 AKP 活性变化

Fig. 2 Change of AKP activity of *P. monodon* with different concentrations of WSSV solution in different latent periods

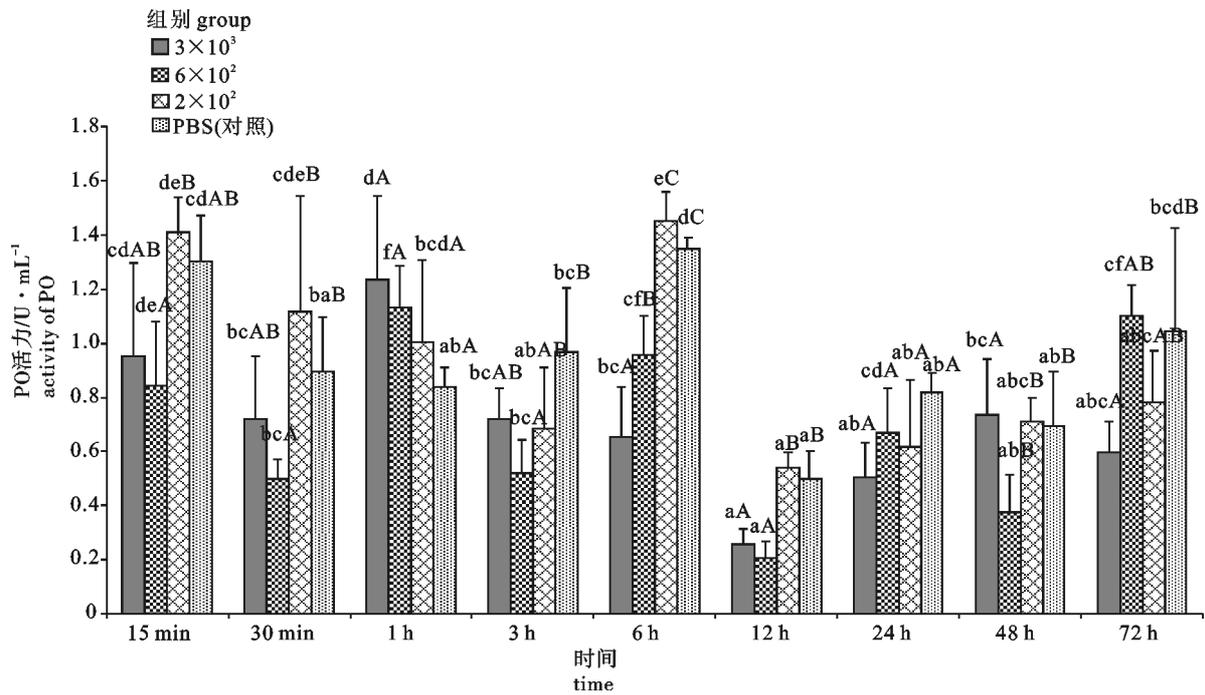


图 3 感染不同浓度的 WSSV 后不同时间潜伏期斑节对虾血液中 PO 活性变化

Fig. 3 Change of PO activity of *P. monodon* with different concentrations of WSSV solution in different latent periods

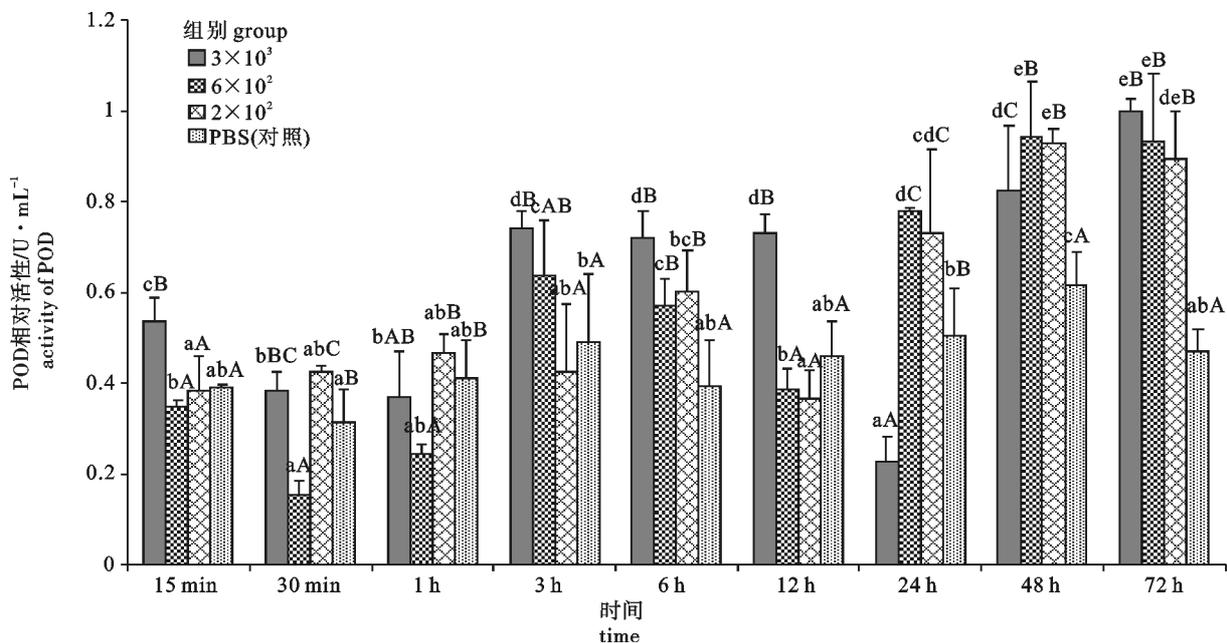


图 4 感染不同浓度的 WSSV 后不同时间潜伏期斑节对虾血液中 POD 相对活性变化

Fig. 4 Change of POD activity of *P. monodon* with different concentrations of WSSV solution in different latent periods

0.53 和 0.38)(图 4)。

### 2.5 二次感染 WSSV 对血清 SOD 活性的影响

3 × 10<sup>3</sup> 拷贝·mL<sup>-1</sup> 浓度组 SOD 活性在 3 h 内虽有波动但无显著差异, 后在第 6 小时和第 48 小时分别达到最大值和较低值, 后期与初期水平相当。

6 × 10<sup>2</sup> 拷贝·mL<sup>-1</sup> 浓度组起初逐渐上升至第 24 小时达到最大值, 后显著下降至第 48 小时达到较低值。2 × 10<sup>2</sup> 拷贝·mL<sup>-1</sup> 浓度组起初下降, 在第 30 分钟出现较低值, 第 30 分钟后的变化趋势与 6 × 10<sup>2</sup> 拷贝·mL<sup>-1</sup> 浓度组基本相同。PBS 组 SOD 活性在 3 h 内

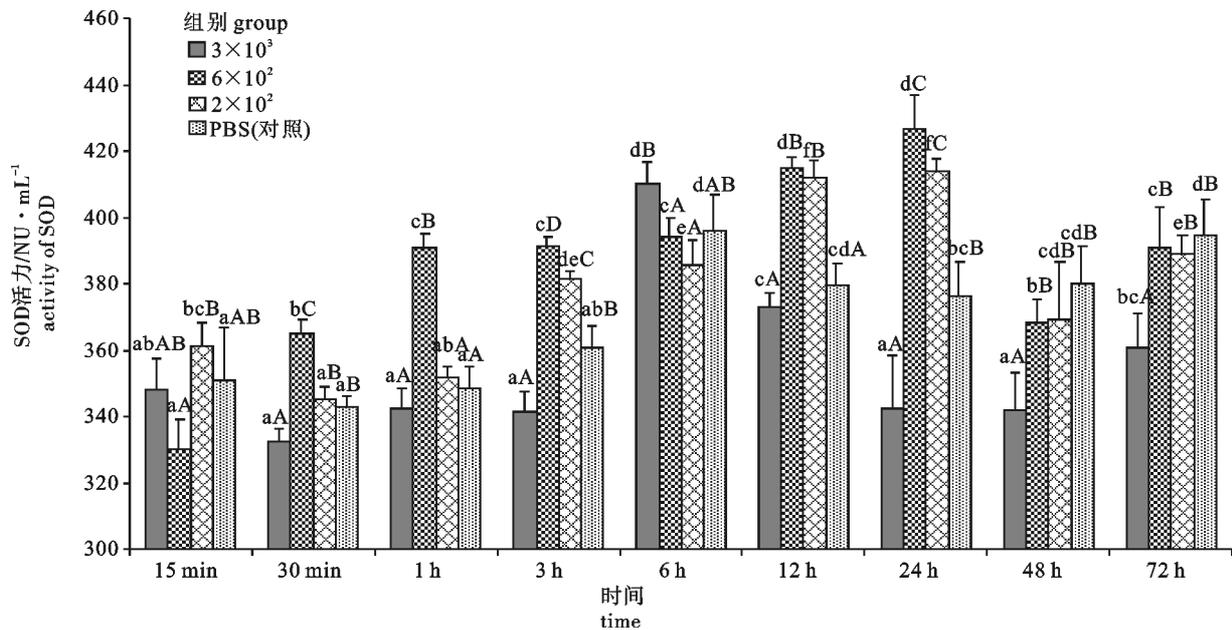


图5 感染不同浓度的 WSSV 后不同时间潜伏期斑节对虾血液中 SOD 活性变化

Fig. 5 Change of SOD activity of *P. monodon* with different concentrations of WSSV solution in different latent periods

虽有起伏但无显著差异，后逐渐上升至第6小时达到最大值，后虽有下降但均维持在较高水平。比较72 h内4组SOD活性离散系数可看出，PBS组离散程度(CV为0.51)明显小于3种WSSV浓度组(CV为0.64、0.67和0.61)(图5)。

### 3 讨论

潜伏感染是病毒感染的一种相对静止状态，当对虾因受到外源刺激而引发机体免疫反应时，可能会引起对虾体内病毒的扩增而发病，并且有助于病毒的传播<sup>[14]</sup>。利用该研究中3种WSSV粗提液注射感染WSSV<sup>+</sup>斑节对虾，可引起对虾肌肉内病毒大量扩增及对虾死亡<sup>[7]</sup>。此文通过二次感染3种低剂量WSSV，研究了WSSV<sup>+</sup>斑节对虾血清内ACP、AKP、PO、POD和SOD5种免疫酶活性的变化特征。

ACP和AKP是一种磷酸单脂酶<sup>[15]</sup>，它们可催化磷酸单脂的水解及磷酸基团的转移反应，与DNA、RNA、蛋白质、脂质等的代谢有关，对钙质吸收、骨骼形成、磷酸钙沉积、甲壳质分泌及形成都具有重要作用<sup>[16]</sup>。刘树青等<sup>[17]</sup>认为ACP是巨噬细胞溶酶体酶的标志酶，在甲壳类血液和血细胞中担负着机体防御的重要功能。此研究中2个较高WSSV浓度下初期ACP、AKP活性显著上升，而较低WSSV浓度下初期ACP、AKP活性显著下降；

感染后期ACP活性相对维持在较高水平，其中 $3 \times 10^3$ 拷贝·mL<sup>-1</sup>浓度组ACP活性在第48小时显著高于其他组。张涛等<sup>[7]</sup>发现小颗粒细胞比例在感染后第48小时显著下降，这与刘晓云等<sup>[18]</sup>认为在病理状态下血清中升高的ACP、AKP活性与小颗粒细胞的解体及其颗粒的排放有关的结论一致。DONG等<sup>[19]</sup>认为感染后期ACP活性的升高与小颗粒细胞的大量解体及其颗粒的排放有关，它们可通过修饰或改变病原体的表面分子结构，增强其异己性，加快对病原体的识别、吞噬和清除。感染后期AKP活性变化较为平缓，与张曼等<sup>[20]</sup>报道日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)感染WSSV后期AKP活性变化规律相似。

酚氧化物酶原激活系统(prophenoloxidase-activated system, proPO-AS)由PO、蛋白酶、模式识别蛋白和蛋白酶的抑制剂构成，是一个类似于高等动物补体的酶级联系统；其能被微生物或寄生虫细胞壁中的 $\beta$ -1,3葡聚糖(C)、脂多糖(LPS)和肽聚糖(PG)等成分激活，将酚氧化成醌，醌能自发形成最终产物黑色素(melanin)<sup>[21]</sup>，黑色素沉积到外来物上，通过包被和黑化将外来物限制和隔离，从而杀死微生物及寄生虫起到免疫和防御作用<sup>[2,22-24]</sup>。刘晓云等<sup>[18]</sup>在研究受病毒感染的中国对虾淋巴细胞中PO的作用时发现PO对病毒具有破坏作用。因此，作为对虾酚氧化物酶原激活系统中主要成员的

PO, 在对虾非特异性免疫系统中起着关键性作用<sup>[25]</sup>。笔者研究中3种WSSV浓度组下感染初期PO活性在较高水平下波动, 可能是WSSV表面异己成分激活了对虾酚氧化酶体系, 将酚氧化酶原转变为有活性的酚氧化酶; 后期随着对虾感染程度的加重, PO活性较前期显著下降, 这一结果与邱德全等<sup>[26]</sup>认为长时间的发病促使携带病毒对虾血清PO活性下降、雷质文等<sup>[2]</sup>认为暴发感染WSSV的中国对虾PO活性显著下降的观点相似; SHINN等<sup>[27]</sup>认为这与PO参与了进一步的非己识别和其他免疫反应如粘附到病毒表面有关, 并认为颗粒细胞和半颗粒细胞数量的下降也是导致PO活性下降的原因之一。

POD广泛存在于真核生物体内, 主要通过过氧化氢酶的作用, 将有害于细胞的代谢产物过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)分解成水(H<sub>2</sub>O)和氧(O), 防止H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>在细胞内堆积, 起到保护细胞的作用, 并通过氧化反应氧化多种有害底物<sup>[12]</sup>, 防止羟自由基的形成, 在防止生物分子损伤方面有着十分重要的作用<sup>[28]</sup>。雷质文等<sup>[2]</sup>将对虾受WSSV感染的程度分为潜伏感染、轻度感染、中度感染和严重感染。结果显示, POD活性由大到小依次为潜伏感染虾样>中度感染虾样>严重感染虾样。邱德全等<sup>[26]</sup>认为在氨氮胁迫下病毒病随着时间延长而加重, POD活性下降导致对虾代谢紊乱, 机体受到氧化损伤, 抗氧化防御系统不能发挥作用, 最后崩溃。笔者研究中3种WSSV浓度下前期POD活性起伏波动, 48h后均维持在较高水平, 这与王专伟等<sup>[29]</sup>报道的感染WSSV的斑节对虾血清POD活性在第60小时达到最大值的观点相似, 但与雷质文等<sup>[2]</sup>、邱德全等<sup>[26]</sup>认为感染后期POD活性降低的观点相反, 可能与对虾种类不同有关, 具体原因仍需进一步探究。

SOD是生物体内非常重要的一种抗氧化酶, 它能催化超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)发生歧化反应, 将其转化为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和氧气(O<sub>2</sub>), 可平衡体内的氧自由基<sup>[30]</sup>, 在保护功能大分子不被氧化破坏、清除活性氧物质、防御机体衰老等方面具有极为重要的作用<sup>[31-32]</sup>。对虾血清SOD活性与WSSV感染有着密切的关系<sup>[33]</sup>, 当SOD活性降低时体内自由基量会过多, 容易导致代谢紊乱, 潜伏携带的WSSV易被激活, 导致对虾发病<sup>[34]</sup>。笔者研究中3种WSSV浓度感染下, 前期SOD活性均显著上升, 但3×

10<sup>3</sup>拷贝·mL<sup>-1</sup>浓度组上升较为缓慢, 这与刘庆慧等<sup>[16]</sup>报道的中国对虾群体感染WSSV后SOD活性持续上升的结果相似, 可能是斑节对虾机体在WSSV感染后启动了一系列抵御机制, 免疫水平逐渐增强, SOD活性随之升高<sup>[35]</sup>; 在对虾发病期SOD活性均显著下降, 这与宋林生等<sup>[12]</sup>、黄永春<sup>[36]</sup>报道在感染后期SOD活性下降的观点相吻合, 可能与WSSV感染后自由基急剧增长有关, 自由基能够介导细胞膜氧化性损伤, 使得细胞活性改变, 从而导致抗氧化系统的机能异常, 处于极低的水平, 最终导致SOD活性降低<sup>[20]</sup>。

从笔者研究结果可知, WSSV<sup>+</sup>斑节对虾再次感染该病毒后, 5种免疫相关酶在感染中后期的活性变化与无毒对虾感染WSSV后的免疫反应基本一致; 3种感染浓度下5种免疫相关酶活性均呈现不同程度的起伏波动规律, 其中POD、SOD活性后期水平显著高于初期; 5种免疫相关酶的反应强度与WSSV的感染浓度存在一定关系, 除ACP外其余4种酶的活性变化均以6×10<sup>2</sup>拷贝·mL<sup>-1</sup>浓度组最为敏感。

#### 参考文献:

- [1] 张家明, 刘志昕. 对虾白斑综合症的研究进展[J]. 华南热带农业大学学报, 2002, 8(3): 22-27.
- [2] 雷质文, 黄健, 杨冰, 等. 感染白斑综合症病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究[J]. 中国水产科学, 2001, 8(4): 46-51.
- [3] LO C F, LEU J H, HO C H, et al. Detection of baculovirus associated with spot syndrome (WSBV) in *Penaeid* shrimps using polymerase chain reaction[J]. Dis Aquat Org, 1996, 25(1/2): 133-141.
- [4] WITHYACHUMNARNKUL B. Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV)[J]. Dis Aquat Org, 1999, 39(1): 21-27.
- [5] 邱德全, 谢数涛, 齐雪娟, 等. 斑节对虾虾苗白斑综合症杆状病毒的检测和养殖跟踪[J]. 湛江海洋大学学报, 1999, 19(4): 11-15.
- [6] 孙成波, 李婷, 王平, 等. 高位池养殖对虾携带白斑综合症病毒变化[J]. 海洋通报, 2009, 28(2): 116-120.
- [7] 张涛, 郭志勋, 黄建华, 等. 低剂量对虾白斑综合症病毒粗提液对斑节对虾体内潜伏期病毒及血细胞的影响[J]. 水产学报, 2012, 36(10): 1544-1553.
- [8] 赵红霞, 詹勇, 许梓荣. 水产动物免疫增强剂的研究[J]. 饲料研究, 2001(8): 1-4.
- [9] 李光友. 中国对虾疾病与免疫机制[J]. 海洋科学, 1995(4): 1-3.

- [10] 王建平, 吴雄飞. 虾类血细胞及体液免疫的研究现状[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2000, 19(4): 354-360.
- [11] 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.
- [12] 宋林生, 苏建国, 蔡中华, 等. 正常与感染白斑病的凡纳滨对虾几项免疫指标变化的初步研究[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 335-340.
- [13] ASHIDA M. Purification and characterization of pre-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*[J]. Arch Biochem Biophys, 1971, 144(2): 749-762.
- [14] 宋晓玲, 黄健, 王秀华, 等. 白斑综合征病毒感染与对虾的免疫防御反应[J]. 中国水产科学, 2006, 13(6): 1033-1039.
- [15] 陈清西, 陈素丽, 朱凌翔, 等. 长毛对虾碱性磷酸酶功能集团的研究[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1996, 35(4): 589-591.
- [16] 刘庆慧, 黄健, 杨冰, 等. 人工选育中国对虾两个群体 WSSV 感染相关免疫与生化因子的变化[J]. 海洋水产研究, 2005, 26(6): 22-27.
- [17] 刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对日本对虾血清酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 1999, 6(3): 111-113.
- [18] 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): 259-265.
- [19] DONG C H, ZHAO J M, SONG L S, et al. The immune responses in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* challenged with double-stranded RNA[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(3): 438-442.
- [20] 张曼, 宋维彦, 王军. 白斑综合征病毒对日本囊对虾仔虾免疫相关酶活性的影响[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2011, 50(1): 117-122.
- [21] 李国荣, 张士瑾, 李红岩, 等. 酚氧化酶研究概况 I——特性、功能、分布和胚胎发育中的变化[J]. 海洋科学, 2003, 27(4): 4-8.
- [22] 丁秀云, 李光友, 翟玉梅. 皱纹盘鲍经诱导后血淋巴中一些因子变化的研究[J]. 海洋与湖沼, 1996, 27(4): 362-367.
- [23] 王雷, 李光友. 甲壳动物的体液免疫研究进展[J]. 海洋科学, 1992(3): 18-19.
- [24] HUNG H S, HUNG J C, CHENG H H, et al. Phenoloxidase activity of hemocytes derived from *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii*[J]. J Invertebr Pathol, 1998, 71(1): 26-33.
- [25] 汪小锋, 雷廷俊, 从日山, 等. 几种免疫促进剂对中国对虾血细胞数量、形态结构以及酚氧化酶产量和活性的影响[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 66-73.
- [26] 邱德全, 杨士平, 邱明生. 氨氮促使携带白斑综合症病毒凡纳滨对虾发病及其血细胞、酚氧化酶和过氧化氢酶变化[J]. 渔业现代化, 2007(1): 36-39.
- [27] SHINN P Y, YING N C, SHU L H, et al. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(4): 582-588.
- [28] 王秀华, 宋晓玲, 黄健. 肽聚糖制剂对南美白对虾体液免疫因子的影响[J]. 中国水产科学, 2004, 11(1): 26-30.
- [29] 王专伟, 黄建华, 杨其彬, 等. 感染白斑综合症病毒的斑节对虾免疫酶变化特征[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(9): 1851-1854.
- [30] 林庆斌, 廖升荣, 熊亚红, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的研究和应用进展[J]. 化学世界, 2006(6): 378-381.
- [31] 张明, 王雷, 郭振宇, 等. 脂多糖和弧菌对中国对虾血清磷酸酶、超氧化物歧化酶和血蓝蛋白的影响[J]. 海洋科学, 2004, 28(7): 22-25.
- [32] 孙虎山, 李光友. 硒多糖和酵母聚糖对栉孔扇贝血淋巴中二种抗氧化酶活力的影响[J]. 中国海洋药物, 2000(5): 20-23.
- [33] 黄旭雄, 周洪琪. 不同规格中国明对虾的非特异性免疫水平[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(1): 7-11.
- [34] 丁美丽, 林林, 李光友, 等. 有机污染对中国对虾体内外环境影响的研究[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(1): 7-12.
- [35] 鄢庆批, 张俊杰, 邹文政, 等. 人工感染溶藻弧菌对大黄鱼免疫功能的影响[J]. 水产学报, 2007, 31(2): 96-102.
- [36] 黄永春. 凡纳滨对虾抗 WSSV 家系选育及抗病特性和遗传性状研究[D]. 广州: 中山大学, 2007.