

## WSSV 感染对克氏原螯虾血细胞吞噬和 肝胰腺磷酸酶活性的影响

李海兵<sup>1,2</sup> 宋晓玲<sup>1\*</sup> 韦嵩<sup>1,2</sup> 刘君<sup>1,2</sup> 李赞<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(<sup>2</sup> 中国海洋大学生命科学与技术学院, 青岛 266003)

**摘要** 分析了克氏原螯虾 *Procambarus clarkia* 人工感染白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)后,其血细胞吞噬(Phagocytosis)活性,肝胰腺酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)活性的变化规律,其目的是为 WSSV 感染与螯虾的免疫防御反应等研究提供依据。分析结果显示,随着 WSSV 感染克氏原螯虾时间的延长,血细胞吞噬活性、肝胰腺酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)活性也随之改变,其中血细胞吞噬活性的变化规律性比较明显,可作为 WSSV 感染的敏感指标,也可以用作间接指示克氏原螯虾健康状况的指标。而在不同的感染时间,克氏原螯虾肝胰腺 ACP 与 AKP 的活性波动较大,无明显的规律可循,难以作为 WSSV 感染的敏感指标。

**关键词** WSSV 克氏原螯虾 吞噬活性 碱性磷酸酶 酸性磷酸酶

**中图分类号** S917;Q959.223.63 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)02-0078-05

## Impacts of WSSV on the activity of haemocyte phagocytosis and hepatopancreas phosphatase in *Procambarus clarkia*

LI Hai-bing<sup>1,2</sup> SONG Xiao-ling<sup>1\*</sup> WEI Song<sup>1,2</sup> LIU Jun<sup>1,2</sup> LI Yun<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(<sup>2</sup> College of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003)

**ABSTRACT** The impacts of White Spot Syndrome Virus (WSSV) on the haemocyte phagocytic activity, and the acid phosphate (ACP) and alkaline phosphate (AKP) activities in the hepatopancreas of *Procambarus clarkia* were examined. The results showed that the immune factors of *P. clarkia* changed along with the WSSV infection time, and phagocytes activity could reflect the health of shrimps indirectly. However, the variation of the ACP and AKP activity was not obvious and had no apparent tendency during different infection stages. This study provided basic data on immune level change after pathogenic affection.

**KEY WORDS** WSSV *Procambarus clarkia* Phagocytosis AKP ACP

国家重点基础研究发展规划(973)项目(2006CB101806)和公益性行业(农业)科研专项(200803012)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: songxl@ysfri.ac.cn

收稿日期:2009-03-06;接受日期:2010-10-29

作者简介:李海兵(1979-),硕士研究生,主要从事对虾病毒病免疫防治技术研究。E-mail: lihaibing8@yahoo.com.cn

自从20世纪90年代初对虾白斑综合征病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)引起的病毒性疾病在世界范围陆续暴发以来,至今它仍是困扰对虾养殖业的主要问题之一(杨丛海 2002)。对虾与其他无脊椎动物一样,缺乏特异性免疫系统,以天然的免疫反应为主,主要包括血细胞的吞噬、包囊,血淋巴凝集、沉淀以及释放酚氧化酶和黑色素等作用(孟凡伦等 1999),并通过血淋巴中的酚氧化酶(Phenoloxidase, PO)、过氧化物酶(Peroxidase)、凝集素(Lectin)、溶血素(Hemolysin)等的作用来达到抗病抑菌、消除异物的目的(Söderhäll *et al.* 1998; 牟海津等 1999),这些免疫因子在体内活性的大小直接反映出其免疫水平的高低(管华诗 1999)。克氏原螯虾 *Cambrus proclakii* 与对虾相比,价格便宜,易于饲养,来源广泛。魏静等(1998)率先用克氏原螯虾增殖 WSSV 获得成功,黄灿华等(1999)进一步证实了克氏原螯虾作为 WSSV 感染动物模型的可行性,朱建中等(2001)证实了 WSSV 在螯虾体内的增殖过程和增殖特性与其在对虾体内的相应行为具有相似性,国外也有相关研究证明了螯虾作为 WSSV 感染模型的可靠性(Maeda *et al.* 2000)。

本实验以 WSSV 粗提液为感染毒种,以克氏原螯虾为被感染动物,收集不同病毒感染时间螯虾的血细胞和肝胰腺,分别比较了血细胞吞噬活性、肝胰腺酸性磷酸酶和碱性磷酸酶活性的变化特征,为 WSSV 感染与螯虾的免疫防御反应等研究提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

健康克氏原螯虾 *Procambarus clarkia* 600 尾,平均体重 40 g,体长  $8.70 \pm 0.78$  cm,于 2007 年 4 月购自山东省济宁市微山湖水产养殖场,经核酸探针斑点杂交检测,确认未感染 WSSV,实验前暂养 7 d。

### 1.2 感染毒种制备

感染毒种为 WSSV 粗提液,其制备方法如下:称取 53.5 g 实验室  $-80$  °C 保存的感染 WSSV 死亡的对虾病料头尖组织。加入适量体积  $4$  °C 预冷的螯虾生理盐水,20 000 r/min 冰浴匀浆。获得的匀浆液  $4$  °C,3 000 g 离心 10 min;取上清液 4 000 g,  $4$  °C 离心 10 min;取上清液 6 000 g,  $4$  °C 离心 10 min;取上清液 8 000 g,  $4$  °C 离心 10 min。上清液经 400 目筛绢过滤除去杂质后,用  $0.45$   $\mu$ m 滤膜过滤除菌,分装,并于  $-80$  °C 冻存。该病毒粗提液每毫升含病料组织约 0.2 g,用于半数致死量试验和感染试验。

### 1.3 WSSV 对克氏原螯虾 LD<sub>50</sub> 的确定

设立 6 组,每组布置克氏原螯虾 10 尾。第 1 组直接注射 WSSV 粗提液原液,第 2 组至第 5 组注射依次 10 倍稀释的 WSSV 粗提液,第 6 组注射生理盐水,每尾于第二腹节注射 200  $\mu$ l。实验期间的容器为 1.5 L 塑料水族箱,每箱饲养 1 尾螯虾,以杜绝交叉感染。记录每日死亡螯虾数量,用镊子摘取鳃丝 0.5~1 g,放到预先已加入 SEMP 采样液的 1.5 ml 离心管中,  $4$  °C 保存用于病毒检测。

### 1.4 WSSV 感染实验和材料收集

实验螯虾暂养 7 d 后,在 WSSV 粗提液半数致死量确定的基础上,进行感染实验。200 尾注射 WSSV 粗提液(稀释到  $10^{-6}$ ),200 尾注射生理盐水(0.7% NaCl),每尾注射量为 200  $\mu$ l。攻毒后每隔 12 h 各组分别随机取数尾螯虾,分别取血细胞、肝胰腺和鳃丝。

感染实验水槽为 50 L 塑料水族箱,每日换水 1 次,每日投喂饲料 3 次,分别为 10:00、14:00、18:00,每天按螯虾体重的 2% 投喂,18:00 时的饲料投喂量占每日投喂量的一半,并根据残饵的多少调节投喂量。

### 1.5 螯虾免疫指标测定

#### 1.5.1 血细胞吞噬活性的测定

用 1 ml 一次性注射器从螯虾的血窦中抽取血淋巴,注入无菌的 1.5 ml 离心管中,加入肝素抗凝,并尽快

进行吞噬活性的测定( $n=3$ )。测定方法参照潘连德等(2000)略做修改:取肝素抗凝的全血与金黄色葡萄球菌悬液充分混匀,37℃孵育30 min,制成血涂片,晾干后滴加甲醇固定3 min,姬姆萨染色1~2 min,晾干,油镜下观察计数。计算吞噬细胞百分数。

$$\text{吞噬细胞百分数}(\%) = \text{吞噬了细菌的血细胞数} / \text{血细胞总数} \times 100\%$$

### 1.5.2 肝胰腺磷酸酶活性的测定

在冰浴条件下,取螯虾的肝胰腺,称重,于冰浴中匀浆,加入无菌生理盐水,使浓度达到0.1 g/ml。4 000 r/min,4℃离心10 min,除去沉淀后,即为肝胰腺提取液,用于ACP、AKP活性的测定( $n=3$ )。

ACP活性的测定按酸性磷酸酶测定试剂盒(南京建成生物研究所生产)要求进行测定。酸性磷酸酶活力(U/100 ml) =  $A_{\text{测定}} / A_{\text{标准}} \times \text{酚含量} \times \text{稀释倍数}$ 。

AKP活性的测定按碱性磷酸酶测定试剂盒(南京建成生物研究所生产)要求进行测定。碱性磷酸酶活力(U/100 ml) =  $A_{\text{测定}} / A_{\text{标准}} \times \text{酚含量} \times \text{稀释倍数}$ 。

## 1.6 WSSV的检测

摘取的虾鳃使用天根生化科技公司生产的“海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒”提取DNA,WSSV的PCR引物WSSV101、WSSV924由本实验室设计,上海生工生物工程技术有限公司合成,预期扩增产物长度为824 bp。

25  $\mu\text{l}$  PCR反应体系包括:灭菌双蒸水 17.75  $\mu\text{l}$ ,10 $\times$ PCR缓冲溶液 2.5  $\mu\text{l}$ ,25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  1.5  $\mu\text{l}$ ,10 mmol/L dNTP 0.5  $\mu\text{l}$ ,20 mmol/L 正向引物 0.75  $\mu\text{l}$ ,20 mmol/L 反向引物 0.75  $\mu\text{l}$ ,Taq DNA聚合酶(5 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.25  $\mu\text{l}$ ,DNA模板 1  $\mu\text{l}$ 。PCR反应条件:94℃ 2 min 预变性;30个循环:94℃ 30 s 变性,56℃ 30 s 复性,72℃ 1 min 延伸;最后72℃温育5 min。

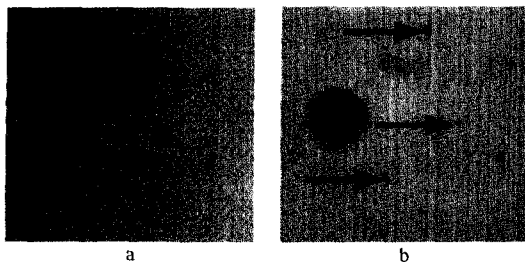
## 2 结果

### 2.1 WSSV对克氏原螯虾LD<sub>50</sub>的测定结果

在进行试验的9 d中,病毒粗提液原液、10<sup>-1</sup>稀释组、10<sup>-2</sup>稀释组螯虾均全部死亡;病毒液10<sup>-3</sup>稀释组死亡螯虾6尾;10<sup>-4</sup>稀释组死亡螯虾4尾;生理盐水对照组没有螯虾死亡。所有死亡螯虾鳃丝进行斑点杂交结果均呈阳性。阳性对照全部显色,阴性对照未显色。这表明死亡的螯虾全部因WSSV发病而致死。根据加减小离比法荆永志等(2001)计算得出病毒粗提液LD<sub>50</sub>的剂量为1.26 $\times$ 10<sup>-5</sup>,即用6.32 $\times$ 10<sup>-5</sup> g组织/ml的浓度接种200  $\mu\text{l}$ 的LD<sub>50</sub>为1。病毒粗提液的滴度为3.16 $\times$ 10<sup>3</sup> LD<sub>50</sub>/ml。

### 2.2 吞噬活性测定

WSSV感染过程中克氏原螯虾血细胞吞噬及吞噬活性的变化如图1、图2所示。从图2的结果可以看出,



注:a.被吞噬的细菌;b.未被吞噬的细菌

Note:a.phagocytosis on bacterium;b.no phagocytosis on bacterium

图1 染色后克氏原螯虾血细胞吞噬金黄色葡萄球菌(箭头所示)

Fig.1 Phagocytosis of *P. clarkia* haemocytes on *Staphylococcus aureus* bacteria indicated by histochemistry staining (indicated as arrows)

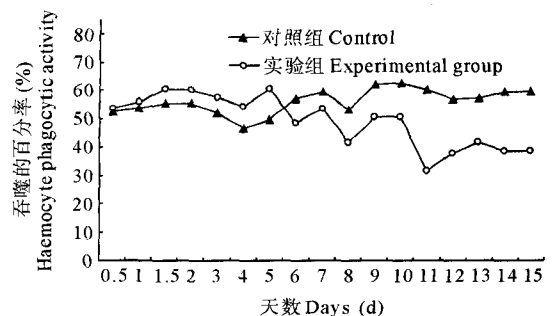


图2 WSSV感染对克氏原螯虾血细胞吞噬活性的影响

Fig.2 Impact of WSSV on the haemocyte phagocytic activity of *P. clarkia*

对照组螯虾血细胞吞噬率比较稳定,在 50%~60%之间;而实验组的螯虾血细胞吞噬率在 4 d 内变化不大,有微弱上升,第 5 天上升至最高点;前 5 d 实验组一直高于对照组,5 d 后开始下降,且明显低于对照组。

### 2.3 酸性磷酸酶活性的变化

WSSV 感染过程中,克氏原螯虾肝胰腺 ACP 活性变化如图 3 所示。实验组螯虾在病毒感染后,其肝胰腺 ACP 活性先升高,到第 3 天后开始下降,在第 7 天降至最低;而在病毒感染 7 d 后,ACP 活性又突然升高,其后呈现较为剧烈的上下波动状态。对照组螯虾肝胰腺 ACP 活性一直维持在一个较为稳定的范围之内。

### 2.4 碱性磷酸酶活力的变化情况

WSSV 感染过程中,克氏原螯虾肝胰腺 AKP 活性变化如图 4 所示。实验组螯虾在病毒感染后 3 d 内,其肝胰腺 AKP 活性较低,与对照组差异不大;在病毒感染后 3~8 d 内,AKP 活性有所升高,且呈现小幅度的上下波动,在第 6.5 天时达到该波动水平的最高值;而在病毒感染 8 d 后,AKP 活性突然升高,维持 2.5 d 后又陡降到原来的水平,其间在第 10 天时达到最高值。对照组螯虾肝胰腺 AKP 活性一直维持在一个较为稳定的范围之内。

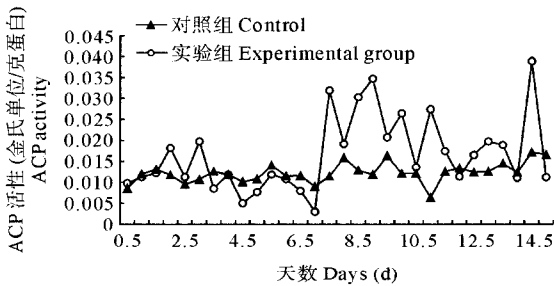


图 3 WSSV 对克氏原螯虾肝胰腺 ACP 活力的影响  
Fig. 3 Impact of WSSV on the activity of acid phosphatase (ACP) in *P. clarkia*

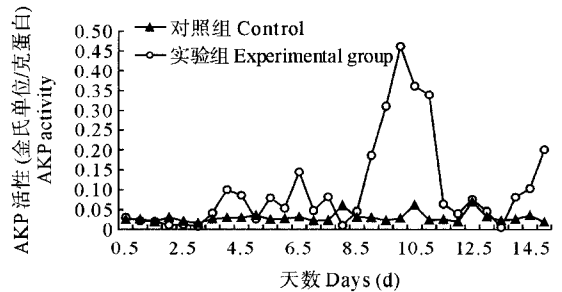


图 4 WSSV 对克氏原螯虾肝胰腺 AKP 活力的影响  
Fig. 4 Impact of WSSV on the activity of alkaline phosphatase (AKP) in *P. clarkia*

### 2.5 WSSV 检测结果

实验组在感染后第 2 天到实验结束所有样品均检测出 WSSV 感染;对照组在第 6 天时有 1 份样品检测出微弱的 WSSV 感染,而其余时间的所有样品均未检测到 WSSV 感染。

## 3 讨论

血细胞能吞噬侵入机体的病原微生物,在虾类的非特异性免疫防御反应中起着重要作用,并且血细胞的吞噬活性在一定程度上反映了对虾的健康状况(Shi *et al.* 2005)。本次实验显示,实验组螯虾在病毒感染后 6 d 之内,其血细胞吞噬活性显著高于对照组;而在病毒感染 6 天之后,其血细胞吞噬活性显著低于对照组,且随着感染进程的延长它们之间的差异愈加增大。该结果与 Johansson 等(2000)的研究结果相近,证实 WSSV 感染克氏原螯虾后会提高其血细胞吞噬活性,用于抵御外源异物的侵害,但随着感染时间的延长加剧了病毒对螯虾健康程度的破坏,其血细胞吞噬活性又会逐渐降低。血细胞吞噬活性变化规律明显,可作为 WSSV 感染的敏感指标,并可以用于间接指示克氏原螯虾的健康状况。

甲壳动物中的酸性磷酸酶(Acid phosphatase, ACP)来自于颗粒细胞的颗粒体,是巨噬细胞内溶酶体的标志酶,是溶酶体的重要组成部分,可以催化磷酸单酯的水解反应及磷酸基团的转移反应,能加速物质的摄取和转运。碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)是一种磷酸单脂酶,可催化所有的磷酸单酯的水解反应及磷酸基团的转移反应,它直接参与磷代谢,并与 DNA、RNA、蛋白质、脂质等代谢有关,加速物质的摄取和转运。已有的研究结果证明,在甲壳动物血细胞进行吞噬和包围化的免疫反应中,会伴随有 ACP 和 AKP 的释放

(Namikoshi *et al.* 2004; Witteveldt *et al.* 2004)。雷质文等(2001)报道,虽然中国对虾感染 WSSV 的程度不同,包括潜伏感染、轻度感染、中度感染和严重感染,其血淋巴酚氧化酶、碱性磷酸酶等免疫酶的活性差异并不显著。同多数甲壳动物一样,克氏原螯虾的循环系统是半开放式的,受取样时间、时机及方法,样品量,血清分离效果等多重影响,其血淋巴免疫酶活性的测定数据不够稳定。而肝胰腺磷酸酶含量丰富,组织量大,取样及测试简单、稳定,因而本实验我们选取肝胰腺分析磷酸酶活性与病毒感染的相关性。但实验结果显示肝胰腺 ACP 和 AKP 的活性波动较大,就目前的测定方法而言,无法作为 WSSV 感染的敏感指标。

为确认病毒感染的准确性,在整个实验过程中检测了每份样品的病毒感染状况。实验组所有样品病毒的 PCR 检测均呈阳性,但对照组也在第 6 天的 1 份样品中检测出微弱的 WSSV 感染。分析原因可能是摘取鳃丝的镊子处理不当,造成了样品间的交叉污染。

## 参 考 文 献

- 朱建中,陆承平. 2001. 对虾白斑综合征病毒在螯虾动物模型的感染特性. 水产学报, 25(1): 47~51
- 牟海津,江晓路,刘树青,王慧谥,管华诗. 1999. 中国对虾血细胞凝集素的性能研究. 中国水产科学, 6(3): 32~35
- 杨丛海. 2002. 中国对虾养殖现状及健康养殖管理的发展. 北京: 海洋出版社, 36~41
- 孟凡伦,张玉臻,孔 健,马桂荣. 1999. 甲壳动物中的酚氧化酶原激活系统研究评价. 海洋与湖沼, 30(1): 110~116
- 黄灿华,石正丽,张建红,张立人,陈棣华. 1999. 对虾白斑综合征杆状病毒体内增殖模型的建立. 中国病毒学, 14(4): 358~361
- 荆永志,李在连. 2001. 实验细菌学. 北京: 人民卫生出版社, 586~587
- 雷质文,黄 健,杨 冰,俞开康. 2001. 感染白斑综合征病毒(WSSV)对虾相关免疫因子的研究. 中国水产科学, 8(4): 46~51
- 管华诗. 1999. 海水养殖动物的免疫、细胞培养和病害研究. 济南: 山东科学技术出版社
- 潘连德,邹玉荣. 中华螯嗜中性粒细胞吞噬功能的影响. 中国水产科学, 7(2): 32~36
- 魏 静,陆承平,黄 健,杨丛海. 1998. 用对虾的致病病毒人工感染克氏原螯虾. 南京农业大学学报, 21(4): 78~82
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., and Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture, 191(1-3): 45~52
- Maeda, M., Itami, T., Mizuki, E. *et al.* 2000. Red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*), an alternative experimental host in the study of white spot syndrome virus. Acta Virol. 44(6): 371~374
- Namikoshi, A., Wu, J. L., Yamashita, T. *et al.* 2004. Vaccination trails with *Penaeus japonicus* to induce resistance to white spot syndrome virus. Aquaculture, 229(1-4): 279~285
- Shi, Z., Wang, H., Zhang, J., Xie, Y., Li, L., Chen, X., Edgerton, B. F., and Bonami, J. R. 2005. Response of crayfish, *Procambarus clarkii*, haemocytes infected by white spot syndrome virus. J. Fish Dis. 28(3): 151~156
- Söderhäll, K., and Cerenius, L. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. Curr. Opin. Immunol. 10(1): 23~28
- Witteveldt, J., Cifuentes, C. C., Vlak, J. M. *et al.* 2004. Protection of *Penaeus monodon* against White Spot Syndrome Virus by oral vaccination. J. Farol. 78(4): 2 057~2 061