

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 幼蟹上岸病的免疫学研究*

宋林生 苏建国 崔朝霞 方敏 蔡中华 茂昌^一 杨公社^二

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

^一(西北农林科技大学 陕西杨陵 712100)

^二(山东中华绒螯蟹繁育有限公司 东营 257000)

提要 对患上岸病幼蟹和正常幼蟹体内的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、溶菌酶活性及丙二醛含量等几项免疫学指标的测定和比较,探讨幼蟹上岸死亡疾病的病因。结果表明,患病幼蟹自由基的代谢出现紊乱,清除自由基的能力较正常幼蟹显著下降,其中超氧化物歧化酶及过氧化氢酶的活性极显著低于正常幼蟹($P < 0.01$)。而在反映自由基损伤程度的丙二醛含量上,患病幼蟹极显著高于正常幼蟹($P < 0.01$);患病幼蟹的溶菌酶活性显著低于对照组($P < 0.05$)。研究表明,大量自由基的积累对幼蟹的组织或器官造成了损伤,同时也降低了机体的免疫能力,从而导致了幼蟹上岸病的发生。

关键词 中华绒螯蟹,幼蟹上岸病,超氧化物歧化酶,过氧化氢酶,丙二醛,溶菌酶

中图分类号 Q958.8

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)又名河蟹,营养丰富,肉味鲜美,是我国重要的水产养殖品种之一,从20世纪80年代以来河蟹养殖业发展迅速,到2000年全国河蟹养殖产量超过100 000吨,年产值达120—150亿元,已成为水产养殖支柱产业之一。但伴随河蟹养殖规模的不断扩大,病害问题日趋严重。1995年出现的幼蟹上岸(南方称为上网)死亡和1997年出现的颤抖病,已成为当今河蟹养殖业的两大主要病害。据统计,仅1999年造成的经济损失就达20—30亿元。幼蟹上岸死亡疾病主要发生在蟹苗放养初期,当海水中的大眼幼体淡化后进入淡水养殖,变态为I期(C₁)或II期(C₂)幼蟹时,幼蟹表现为停食,活动力弱,变态期延长,在夜里和晴天下午集中爬到岸边,人为驱赶不下水,直至死亡。因这种疾病分布广(遍及全国养蟹省份)、死亡率高,不仅使河蟹苗种供应得不到保证,而且导致养殖生产无法进行,造成绝产绝收。

关于幼蟹上岸死亡的原因,目前尚未达成共识。尽管病原学研究的报道较多,但结果却不尽相同,其中包括有病毒、细菌、真菌、微孢子虫、纤毛虫等(姜静颖等,1996;孙丽敏等,1999)。由于涉及的病原生物种类较多,且大多数报道都没有感染实验的证据,所以

* 国家重点基础研究发展规划项目, G1999012007号。宋林生,男,出生于1966年1月,博士,研究员,博士生导师, E-mail: lshsong@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2001-11-06, 收修改稿日期: 2002-05-23

目前尚不能确定引起幼蟹上岸死亡的主要病原。本文通过对上岸幼蟹及对照幼蟹体内的溶菌酶(Lysozyme, LSZ)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)及丙二醛(Malondialdehyde, MDA)的测定和比较,探讨幼蟹上岸死亡疾病的病理变化及可能病因,从而为幼蟹上岸死亡疾病的预防及快速诊断提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

中华绒螯蟹幼体于2001年5月21日从山东中华绒螯蟹繁育有限公司(东营)采得,体重为0.1g左右,分为上岸组和正常组两组;分别切成小块置于50ml离心管中加入pH=6.4的1/15mol/L的PBS匀浆(匀浆过程中注意保持温度,以免影响测定结果),接着在4℃以20000r/min离心2h,弃沉淀,将上清液置于-80℃保存备用。以下每个指标都做一式三份的平行实验。

1.2 方法

1.2.1 总蛋白质含量的测定 采用考马氏亮兰(Coomassie Brilliant Blue G-250)法(Harris *et al.*, 1990; 吴冠芸等, 2000; 李娟等, 2000),以标准牛血清白蛋白的浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)为横坐标, OD_{595} 值为纵坐标绘制标准曲线,其线性回归方程为 $Y = 0.0036X + 0.2004$, $r^2 = 0.9273$ 。根据测得的样品的 OD_{595} 值及标准曲线的线性回归方程推算出样品的蛋白质含量。

1.2.2 超氧化物歧化酶活性的测定 按照硝基四唑氮蓝(nitrotetrazolium blue, NBT)还原法(王传文等, 2000),以标准牛红细胞SOD的活力单位(U)为横坐标, NBT的抑制率为纵坐标绘制标准曲线,其线性回归方程为 $Y = 9.1366X - 8.1535$, $r^2 = 0.987$, 经回归检验,具有实际意义。根据测得的样品的 OD_{560} 值及标准曲线的线性回归方程推算出样品SOD的活性,最后除以各自的蛋白含量,即得SOD的比活力,用U/mg protein表示。

1.2.3 过氧化氢酶活性的测定 按照硫代硫酸钠滴定法(李柏林等, 1989; 方允中等, 1989), H_2O_2 的标定浓度是9.94mmol/L。CAT的活性定义为:在5ml的反应体系中30℃10min每消耗0.01mmol/L的 H_2O_2 为一个CAT活力单位。

1.2.4 丙二醛含量的测定 按照硫代巴比妥酸(2-Thiobarbituric Acid, TBA)比色法(王传文等, 2000)进行。在1ml的反应体系中分别加入250 μl 2%硫代巴比妥酸和750 μl 27%的三氯乙酸,然后加入1,1,3,3-四乙氧基丙烷(1,1,3,3-Tetraethoxypropane, TEP)约1—2 μl 及样品50 μl ,使TEP的浓度分别为0.05、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0ml/ml,充分摇匀后在95℃水浴30min,冰浴10min,3000r/min离心10min,在532nm下比色,减去600nm下非特异吸收值,以TEP的浓度(nl/ml)为横坐标, OD_{532} 值为纵坐标绘制标准曲线,其线性回归方程为 $Y = 0.7169X + 0.0083$, $r^2 = 0.9976$, 经回归检验,该方程具有实际意义。根据样品的 OD_{532} 值及标准曲线的线性回归方程推算出样品的MDA的含量,最后除以各自的蛋白含量,即得MDA的比含量,用 μl TEP/mg protein表示。

1.2.5 溶菌酶活性的测定 按照琼脂糖平板法(姜秀云等, 1994; 覃倩萍等, 1998)。将在营养琼脂培养基上37℃培养24h的溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)用pH=6.4的1/15mol/L的PBS冲洗下来,并稀释成透光率($\lambda = 640\text{nm}$)为35%—40%的菌悬液,与2%的琼脂糖按1:1的比例混合,做成2mm厚的胶板,打孔,孔径和孔距分别为5mm和20mm。每孔加样15 μl ,培养18h,用标准样品浓度的对数与溶菌圈直径作标准曲线,其线

性回归方程为 $Y = 5.6469X + 2.325$, $r^2 = 0.9698$, 经回归检验, 该方程具有实际意义。根据样品的溶菌圈直径及标准曲线的线性回归方程推算出样品的 LSZ 活性, 最后除以各自的蛋白含量, 即得 LSZ 的比活力, 用 $\mu\text{g}/\text{mg protein}$ 表示。

2 结果

2.1 蛋白质的测定结果

由表 1 可见, 上岸组样品的 OD_{595} 值平均为 0.3267; 未上岸组样品的 OD_{595} 值为 0.3262, 推算出上岸组样品的蛋白含量为 3.5083mg/ml; 未上岸组样品的蛋白质含量为 3.4944mg/ml (表 1)。蛋白质含量的测定为以下几项指标的比较提供基准。

表 1 总蛋白质、溶菌酶、丙二醛、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶的测定结果

Tab. 1 The measuring results of gross protein, LSZ, MDA, CAT and SOD

项目		平均总蛋白 (mg/ml)	LSZ 活性 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白)	MDA 含量 (nl TEP/mg 蛋白)	CAT 比活性 (U/mg 蛋白)	SOD 比活性 (U/mg 蛋白)
上岸组	重复 1	3.5083	3.5351	0.7690	31.35	8.6206
	重复 2		4.3351	0.7666	32.49	7.0608
	重复 3		4.3351	0.8143	35.91	6.4524
未上岸组	重复 1	3.4944	6.5138	0.4567	100.16	35.0746
	重复 2		5.3314	0.4723	89.86	36.0926
	重复 3		6.5138	0.4334	95.58	35.4975

2.2 超氧化物歧化酶活性的测定

文中是用 NBT 还原法测定 SOD 的活性, 根据样品对 NBT 的抑制率推算出样品 SOD 的活性, 最后除以各自的蛋白含量, 即得 SOD 的比活力。测定的结果显示上岸组样品对 NBT 的抑制率依次为 13.68%、12.68% 和 12.29%; 未上岸组样品对 NBT 的抑制率依次为 30.55%、31.20% 和 30.82%。样品 SOD 的比活性见表 1。经 t 检验, 上岸组幼蟹与未上岸组幼蟹的 SOD 含量之间有极显著差异 ($P < 0.01$)。

2.3 过氧化氢酶活性的测定

上岸组消耗的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 依次为 4.42、4.40 和 4.34ml; 未上岸组消耗的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 依次为 3.22、3.40 和 3.30ml。样品的 CAT 比活性见表 1。经 t 检验, 上岸组幼蟹与未上岸组幼蟹 CAT 差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.4 丙二醛含量的测定

上岸组样品的 OD_{532} 值依次为 0.1050、0.1047 和 0.1107; 未上岸组样品的 OD_{532} 值依次为 0.0655、0.0677 和 0.0628。推算出样品 MDA 的含量见表 1。经 t 检验, 上岸组幼蟹与未上岸组幼蟹的 MDA 含量之间有极显著差异 ($P < 0.01$)。

2.5 溶菌酶活性的测定

上岸组样品的溶菌圈直径依次为 8.5、9.0 和 9.0mm; 未上岸组样品溶菌圈的直径依次为 10.0、9.5 和 10.0mm。推算出样品 LSZ 的含量见表 1。经 t 检验, 上岸组幼蟹与未上岸组幼蟹的 LSZ 活性之间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论与结论

河蟹原产于中国,国外对河蟹养殖与病害的研究甚少,目前还没发现国外相关的文献报道。国内专家学者对河蟹 C_1 期和 C_2 期上岸死亡疾病的相关研究报道大多从病原入手进行分析,相继在发病幼蟹中发现了病毒,细菌,真菌,微孢子虫,纤毛虫等病原生物(姜静颖等, 1996; 孙丽敏等, 1999)。由于病原的种类繁多而且无法进行感染和重复实验,因此目前尚无法确定真正的病原和发病原因。也有人认为上岸死亡疾病是由于水环境恶化所致,但该病流行时不分水域和水系,而且是在大眼幼体放养 5—7 天上岸死亡,此时养殖池水正处于优良状态,因此这种假设是否成立,尚没有直接的实验证据。由于幼蟹上岸这种疾病的特殊性,仅从病原和环境入手很难分析出致病机理,不仅无法对症下药,其后果会导致用药的误区,所以到目前为止还没发现一种能防治上岸死亡疾病的特效药。

大量的事实调查表明,上岸死亡病害与苗种的健康状况直接相关,存在发病高峰,且具有不传染性、不扩散性、难诊断性等特点,符合生理病害的特征,与病原性疾病区别较大,极有可能是一种生理性病害。综观河蟹 C_1 期和 C_2 期上岸死亡疾病的发生背景,存在这样一个事实:从 1995 年到现在,由于卤虫卵价格不断上涨,各育苗厂家为降低生产成本而减少或停止对其的使用,纷纷尝试使用卤虫卵的替代物,有关专家也根据测定胚胎发育阶段和早期幼体发育阶段的生化组分变化(Ward *et al.*, 1979)的方法来推测河蟹开口阶段的营养需求,尝试制造卤虫卵的替代物,但到目前为止还没有一种饵料能够完全替代卤虫卵的营养。这种做法很可能导致某种营养的缺乏或不足,最可能是某种脂类的不足。因为,根据甲壳类脂类代谢特点,河蟹卵巢积累的脂肪是成熟卵子胚胎发育的重要能源物质(Clarke *et al.*, 1990),其自身从头合成链不饱和脂肪酸的能力极为有限。而对于海水虾蟹类幼体来说,多不饱和脂肪酸(PUFA)是幼体发育的必需脂肪酸,对幼体发育和变态有重要作用(Levine *et al.*, 1984; Millamena *et al.*, 1988)。如果海水虾蟹类幼体期人工投喂饵料 PUFA 含量不足,就会造成幼体营养缺乏症,当这种不足在大眼幼体期成为不可逆转时,无论在淡水放养后如何强化,终将造成不可恢复。而且,在河蟹整个生活史的近 20 多个蜕皮期中,只有在 C_1 期到 C_2 期时,体重增加最大,达到 120%。充足的能量物质储存是幼体蜕皮发育到下一阶段的前提保证(Lovrich *et al.*, 1994),若在此快速发育阶段不能满足这种高能量需求,就会导致幼体大批死亡(Ouellet *et al.*, 1992; Mourente *et al.*, 1995)。在生产调查中发现,凡是发生上岸死亡的幼蟹在其大眼幼体期,肝胰脏及脂肪组织均发生病变。因此,很可能是 C_1 期之前营养不足,尤其是某种 PUFA 不足,造成生理代谢障碍,使病原生物继发感染,从而引起上岸死亡疾病的发生。如果是由 PUFA 缺乏而引起的疾病,以 PUFA 为作用底物之一的氧自由基必然会发生变化,即使氧自由基产生的量不变,由于 PUFA 的缺乏,过剩的氧自由基就会作用于富含脂质的生物膜、血管内皮细胞、神经细胞等,造成这些细胞、组织的结构损伤、功能改变,导致机体病变,甚至死亡(翟玉梅等, 1998; 孟凡伦等, 1999)。本研究从自由基角度出发,探讨幼蟹发病前后自由基的变化,分析发病的机制。

由于自由基不稳定,存在时间很短,较难测定,通常通过测定清除超氧阴离子自由基的 SOD、CAT 等抗氧化酶的活性及超氧阴离子自由基引起的脂质过氧化反应的降解产物 MDA 来反映机体细胞受自由基攻击的严重程度。正常情况下,自由基与防御系统之间成

一动态平衡状态,当平衡失调时就可引起和加速疾病的发生发展过程。

机体为了清除由各种原因引起的自由基,消耗了大量的SOD,故上岸幼蟹SOD的含量显著低于正常组。病变部位及其周围的正常细胞消耗过多的SOD,自由基的防卫系统受到破坏,促使超氧阴离子自由基、过氧化氢、单线态氧和羟自由基等浓度剧增,从而加速了病理性脂质过氧化反应。同时由于自由基对生物膜脂质的损伤最为广泛和严重,蟹含脂质较多,因此蟹易受到自由基的损害而发生脂质过氧化,产生大量的MDA。

SOD、CAT和MDA系机体氧自由基代谢的主要指标。SOD、CAT是清除机体内自由基的主要酶类,其活力的变化反映了机体抵制自由基损伤的能力(孙虎山等,2000),MDA是脂质过氧化反应的终产物之一。MDA的浓度可间接反映体内氧自由基的含量和组织损伤程度。通过检测这些指标能比较准确地反映机体内自由基的代谢情况及脂质过氧化的水平,对疾病的诊断和防治都具有一定的参考价值。

本实验中,SOD、CAT等抗氧化酶系活性显著降低,脂质过氧化的降解产物MDA含量大量增加,说明自由基的代谢紊乱可能是发病的一个重要环节。蟹体内过多自由基的产生以及自由基清除酶活性降低或使其合成障碍,堆积的自由基一方面可直接作用于细胞,造成细胞结构和功能的损害,另一方面可致微循环发生变化,使细胞缺血缺氧,产生代谢障碍,而进一步加剧损害。自由基的毒性作用与多种病理改变相关,导致多种疾病的发生和进一步加重病情。在目前缺乏一定标准判断上岸病病情程度的情况下,测定这些指标,可望有助于了解疾病的严重程度。

幼蟹上岸病可能是水体中溶解氧不足或免疫力降低而各种病原的并发感染,幼蟹上岸后大量运动,机体代谢明显加强,能量消耗大量增加,氧供应不足,导致组织缺氧,产生大量的氧自由基,接着体内氧供应增加,发生急剧再氧化,造成大批死亡。

氧自由基的失衡参与了幼蟹上岸病的发生发展过程。防治幼蟹上岸病可考虑用氧自由基清除剂,如在饵料中补充PUFA、VE、VC等。抗自由基治疗可提高抗氧化酶的含量和活性,清除体内过多的氧自由基,抑制病理性自由基反应,使体内自由基的生成与清除保持平衡,减少氧自由基过量对机体的损伤。

一般情况下,机体在受到外界病原生物的刺激下,LSZ的活性会有所提高,而本文的研究结果显示,上岸病幼蟹的LSZ活性显著的低于未上岸组($P < 0.05$),可能是由于自由基的作用影响了机体的免疫功能,造成溶菌酶活性的降低,但具体机制尚有待于进一步深入研究。

致谢 刘小林博士对数据统计分析做了大量工作,胥炜、李成华、丁君、邢容莲、李红蕾在样品处理、资料查询等方面做了大量的工作,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王传文,杨银香,赵相宝,2000. 消化性溃疡患者血浆MDA和红细胞SOD水平的测定. 实用医学杂志, 16(2): 133
- 方允中,李文杰,1989. 自由基与酶——基础理论及其在生物学和医学中的应用. 北京: 科学出版社, 129
- 孙丽敏,国际翔,1999. 中华绒螯蟹放养期仔蟹I型疱疹病毒的电镜观察. 水产科学, 18(6): 20-22
- 孙虎山,李光友,2000. 栉孔扇贝血淋巴中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性及其性质的研究. 海洋与湖沼, 31(3): 259-265
- 李娟,张耀庭,曾伟等,2000. 应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量. 中国生物制品学杂志, 13(2): 118-120

- 李柏林, 梅慧生, 1989. 燕麦叶片衰老与活性氧代谢的关系. 植物生理学报, 15(1): 6—12
- 吴冠芸, 潘华珍, 吴, 2000. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册. 北京: 科学出版社, 166—167
- 孟凡伦, 张玉臻, 孔 健等, 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
- 姜秀云, 吴惠毅, 1994. 平板法测定血清溶菌酶活性影响因素探讨. 上海免疫学杂志, 14(2): 108
- 姜静颖, 邢殿楼, 王 斌等, 1996. 池塘养殖中华绒螯蟹幼蟹的一种球状病毒粒子的电镜观察. 大连水产学院学报, 11(1): 51—53
- 覃倩萍, 彭崇基, 1998. 溶菌酶 3 种测定方法的比较. 广西预防医学, 4(3): 138—140
- 翟玉梅, 丁秀云, 李光友, 1998. 软体动物血细胞及体液免疫研究进展. 海洋与湖沼, 29(5): 558—562
- Harris E L V, Angal S, 1990. Protein Purification Methods. New York: IRL Press, 15—17
- Levine D M, Sulkin D S, 1984. Nutritional significance of long chain polyunsaturated fatty acids to the zoeal development of the brachyuran crab, *Eurypanopeus depressus*. J Exp Mar Biol Ecol, 81: 211—223
- Lovrich G A, Felder D L, 1994. Patterns of growth and triacylglycerol content in snow crab *Chionoectes opilio* zoeal stages reared in the laboratory. Mar Biol, 120: 585—591
- Millamera O M, Bombeo R F, Jumalon N A, 1988. Effects of various diets on the nutritional value of *Artemia* sp as food for the prawn *Penaeus monodon*. Mar Biol, 98: 217—221
- Mourente G, Medina A, Gonzalez S *et al*, 1995. Variation in lipid content and nutritional status during larval development of the marine shrimp *Penaeus kerathurus*. Aquaculture, 130: 187—199
- Ouellet P, Taggart C T, Frank K T, 1992. Lipid condition and survival in shrimp *Pandalus borealis* larvae. Can J Fish Aquat Sci, 49: 368—378
- Ward D G, Middleditch B S, Lawrence A L, 1979. Fatty acid changes during larval development of *Penaeus setiferus*. Proc World Maricult Soc, 10: 464—471

IMMUNOLOGICAL STUDIES ON THE DISEMBARKATION SYNDROME OF JUVENILE CHINESE MITTEN-HANDED CRAB *ERIOCHEIR SINENSIS*

SONG Lin-Sheng, SU Jian-Guo^{*}, CUI Zhao-Xia, FNAG Min, CAI Zhong-Hua,
DING Mao-Chang^{**}, YANG Gong-She[†]

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

^{*}(*Northwest Sci-Tech, University of Agriculture and Forestry, Yangling, 712100*)

^{**}(*Shandong Limited Company of Freshwater Crab Breeding, Dongying, 257000*)

Abstract Immunological approaches were used to measure the enzyme activity such as Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Lysozyme (LSZ), and the content of Malondialdehyde (MDA) in the disembarkation syndrome juvenile and the normal juvenile of Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*. Maladjustment of free radicals metabolism was obvious in the disembarkation syndrome juvenile, and the ability of eliminating free radicals in the disembarkation syndrome juvenile decreased greatly. SOD and CAT, reflecting the ability of eliminating free radicals in the body, were both greatly significantly lower than those of the control group ($P < 0.01$); the content of MDA, reflecting free radicals damage degree in the body, was greatly significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). The activity of LSZ in the disembarkation syndrome juvenile was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). The results indicated that the free radicals played an important role in the break out of the juvenile disembarkation syndrome and resulted in immunity declining and physiological damage.

Key words *Eriocheir sinensis*, Juvenile disembarkation syndrome, Superoxide dismutase, Catalase, Malondialdehyde, Lysozyme