

甲壳动物免疫机能的衡量指标及科学评价

The parameters reflecting immune state of crustacea and its scientific evaluation

黄旭雄, 周洪琪

(上海水产大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 200090)

中图分类号: R392

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2007) 07-0090-07

研究甲壳动物免疫系统和免疫机理的重要目的之一是为开展甲壳动物免疫防病提供理论基础。甲壳动物免疫防病的研究,是当前水产养殖中比较活跃的一个领域。而选择一个合适的指标进行科学正确的评价甲壳动物免疫状况,则是有效开展免疫防病治病的前提。作者就目前用于衡量甲壳动物免疫机能的各种指标及其检测和科学应用做一综述。

1 用于衡量甲壳动物免疫机能的指标

迄今为止,报道用于衡量甲壳动物免疫机能的指标主要可分四大类。

1.1 总血淋巴细胞密度和分血淋巴细胞密度

血淋巴细胞是甲壳动物的免疫系统的核心组分,血淋巴细胞既是细胞免疫的承担者,又是体液免疫因子的提供者^[1]。甲壳动物所具有的3种血淋巴细胞(透明细胞,小颗粒细胞,大颗粒细胞)在机体免疫防御中所起的作用不同,因此,血淋巴中总血淋巴细胞密度(Total haemocyte counts, THC_s)和分血淋巴细胞的密度(Differential haemocyte counts, DHC_s)在一定程度上反映了机体的免疫应激能力或健康状况。Moullac报道细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)的THC_s与其对病原的高敏感性有强相关性,低THC_s的动物更易感染疾病^[2]。垂死的西岩龙虾(*Panulirus cygnus* George)与健康者相比,其血淋巴中THC_s和颗粒细胞比率均达到最低^[3]。给罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)注射亚致死剂量的气单胞菌(*Aeromonas veronii*),在注射后的4~24 h内,虾体的THC_s显著下降,DHC_s的组成也发生了显著

变化,无颗粒细胞在病菌注射后的开始阶段显著增加,随后降到最低^[4]。给凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)注射Taura病毒,同样会引起THC_s、透明细胞和颗粒细胞数的显著下降^[5]。此外,体内注射LPS等异物也会造成甲壳动物血淋巴中THC_s的减少,减少到最低时所需的时间及程度与虾的种类有关^[6]。长臂虾(*Palaemon elegans*)在注射脂多糖8 h后,体内的THC_s下降,随后根据注射LPS的不同,THC_s恢复到最初水平^[7]。

THC_s和DHC_s是近几年国外使用较多的一个衡量甲壳动物的免疫状况的指标。但研究也发现,甲壳动物的THC_s和DHC_s水平容易受正常蜕皮周期、理化条件、营养水平等因素的影响而发生较大的变异。细角滨对虾的血淋巴细胞参数随蜕皮周期有显著变化。THC_s在蜕皮间期最小,而在蜕皮前期达到最大;小颗粒细胞的比例在蜕皮周期内无显著变化。而大颗粒细胞在蜕皮间期所占的比例最大,显著高于蜕皮后期^[8]。水温降低^[9]、氨氮增加^[9]以及低溶解氧刺激^[10]也都会使细角滨对虾的THC_s显著降低,低溶解氧刺激还使细角滨对虾的小颗粒细胞及透明细胞显著下降^[10]。日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)的THC_s

收稿日期: 2004-11-30; 修回日期: 2006-10-28

基金项目: 上海水产大学校长基金资助项目(科03-15); 上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介: 黄旭雄(1971-),男,浙江浦江人,副教授,博士,主要从事水产动物营养与饲料学研究,电话: 021-65710025, E-mail: xxhuang@shfu.edu.cn



在蜕皮间期较低,而蜕皮前期和蜕皮后期 THC_s 相对较高^[10]。但变温未对日本囊对虾的 THC_s 和 DHC_s 产生显著变化^[10]。而罗氏沼虾的 THC 在蜕皮前期 (D3) 最低,在蜕皮间期 (C) 最高^[11]。在水体氨氮大于 0.55 mg/L 时,罗氏沼虾的 THC_s 在不同氨浓度下无显著变化^[12]。温度、盐度和 pH 对罗氏沼虾的 THC_s 有显著影响。罗氏沼虾的 THC_s 随盐度的升高而增加,THC_s 在 pH 为 7.5~7.7 的水体中显著高于在 pH 为 9.0~9.5 及 4.6~5.0 的水体中,在 27~28 及 30~31 两温度下显著高于在 20~21 及 33~34^[13]。对断沟龙虾 (*Panulirus interruptus*) 而言,不管以 3 /h 还是 1.5 /h 的降温幅度,降温 (19 下降至 4) 都会引起其血淋巴 THC_s 的显著下降^[14]。而圣保罗对虾 (*Penaeus paulensis*) 的 THC_s 在盐度为 34 的水体中依次高于在盐度为 22 和 13 的水体中^[9]。饲料中的 Cu^[15,16]、V_C^[15] 和 V_E^[17] 水平都会影响斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的 THC_s 水平。

另外,THC_s 的相对高低与甲壳动物的健康状况及免疫机能的高低并不完全一致。自然感染了酵母的等足动物 *Saduria entomon* 的 THC_s 是正常健康动物 THC_s 的 3 倍^[18]。饲喂不同量羊栖菜多糖提取物的中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 其最大 THC_s 组并不是抗菌能力最强组^[19]。

THC_s 的检测一般采用从围心腔或腹部第二腹节的血窦抽取循环血,经抗凝处理后在显微镜下用血球计数板测定,而 DHC_s 则是将抗凝血涂片并用 Gimsa 染色后在相差显微镜下测得。

1.2 免疫相关酶活性及血淋巴细胞分泌物水平

1.2.1 酚氧化酶活力及酚氧化酶原

酚氧化酶原 (proPO oxidase, AproPO) 激活系统是甲壳动物体内重要的异物识别系统,入侵的异物将该系统激活后,其中的酚氧化酶 (Phenoloxidase) 可将酚催化形成黑色素,黑色素及其中间产物具有抗菌生物活性,可将一些病原体杀死。另外,酚氧化酶原系统的某些组分还有免疫调理作用,促进血淋巴细胞的吞噬作用。因此,酚氧化酶原激活系统的活性在一定程度上反映出甲壳动物健康状况及免疫灵敏性。合理使用免疫增强剂后能提高甲壳动物的酚氧化酶活性 (A_{PO})。甲壳动物的 A_{PO} 也因其所处的环境条件、生理状态和营养水平的不同而不同。Moullac 等^[8]报道细角滨对虾在不同蜕皮阶段的 A_{PO} 有显著差异,蜕皮间期的 A_{PO} 显著高于蜕皮前期。与此相对应,在弧

菌攻击后的死亡率方面,蜕皮间期 (21%) 也显著低于蜕皮前期 (48%)。罗氏沼虾在不同温度的水体中养殖 7 d,其 A_{PO} 在 27~28 及 30~31 两温度下显著高于在 20~21 及 33~34^[13]。断沟龙虾血淋巴 A_{PO} 会因降温而显著下降^[14]。相反,细角滨对虾的 A_{PO} 因降温而显著增强^[9]。罗氏沼虾的 A_{PO} 在盐度为 5 和 10 的水体中显著高于盐度为 0 和 15 的水体中^[13]。加州对虾 (*Penaeus californiensis*) 在盐度为 28~44 的水体中,其酚氧化酶原 (proPO) 随盐度提高而增加^[20]。中国明对虾和凡纳滨对虾的 A_{PO} 随盐度向下突变值的增加而增加^[21]。不同 pH 水体中的罗氏沼虾体内 A_{PO} 差异显著^[13]。中国明对虾和凡纳滨对虾的 A_{PO} 因 pH 发生突变而增加^[21]。氨氮浓度在 0~3 mg/L 范围内,细角滨对虾 A_{PO} 随水体中氨氮浓度的增加而增加^[9]。但罗氏沼虾在氨氮大于 0.55 mg/L 时,其 A_{PO} 下降^[22]。水体溶解氧的降低会引起罗氏沼虾 A_{PO} 下降^[2],而在低溶解氧水体中 (1 mg/L) 暂养 24 h 后细角滨对虾的 A_{PO} 却因调节 proPO 系统的抑制因子的减少而上升,同时病菌攻击后的死亡率显著提高^[23]。以残饵为主的有机污染源也会显著降低中国明对虾体内的 A_{PO}^[24]。在一些有机化合物 (如多氯联苯 PCB, 多核的芳香族碳氢化合物 PAH) 的污染的水体中,褐虾 (*Crangon crangon*) 的血细胞 A_{PO} 降低,同时其死亡率增加^[9]。病原攻击引起甲壳动物 A_{PO} 变化的情况较复杂,其变化与病原的种类、攻击的剂量和持续时间有关,A_{PO} 绝对值高低并不与机体的抗病力呈简单的线性相关。中国明对虾受到副粘病毒攻击后,体内的 A_{PO} 较对照组降低,并随攻击时间的延长而下降^[25]。中国明对虾 A_{PO} 降低并不与 WSSV 感染程度对应,说明并非 WSSV 爆发引起 A_{PO} 下降^[26]。而凡纳滨对虾在受 Tuara 病毒攻击后,血淋巴 A_{PO} 较对照组有显著增加^[5]。低剂量的弧菌攻击会显著提高中国明对虾的 A_{PO},并能维持一定时间的高水平;而较高浓度的弧菌注射感染,中国明对虾血清中 A_{PO} 迅速降低^[27];病菌感染后濒死的中国明对虾比正常中国明对虾的血清 A_{PO} 要高^[28]。给罗氏沼虾注射亚致死剂量的气单胞菌 (*Aeromonas* spp),其 A_{PO} 迅速增加并在 24 h 后恢复正常水平^[4]。事实上,在没有异物感染的情况下,对虾和罗氏沼虾的酚氧化酶主要是以无活性的酶原形式存储于颗粒细胞内,理论上未感染的对虾体内的 A_{PO} 应该是低水平的,一旦血淋巴细胞受到异物刺激,则会迅速上升。



A_{PO} 的测定方法,都以 L-dopa 为反应底物。具体测定的方法有 Ashida 方法^[29]、Horowitz 和 Shen 方法^[30]及微量法^[31]。

1.2.2 超氧化物歧化酶及过氧化物酶活力

超氧化物歧化酶 (SOD) 及过氧化物酶 (POD) 都是机体内的抗氧化酶,在清除超氧自由基,氧自由基,防止生物分子损伤方面发挥重要的生理作用。过多的氧自由基能导致机体免疫力下降,因此,机体 SOD 及 POD 活力能反映机体的免疫机能。黄灿华等^[32]报道病毒感染中国明对虾的 SOD 活力下降。雷质文等^[26]的研究表明不同白斑综合症病毒 (WSSV) 感染状态的中国明对虾之间的过氧化物酶活性有显著差异。其酶活性大小为:潜伏感染虾样>中度感染虾样>严重感染虾样。因此,SOD 和 POD 有可能用作对虾病毒检测与诊断的生理生化指标。部分能够提高甲壳动物抗病力的免疫刺激剂也能提高其体内的 SOD 或 POD 活性。中国明对虾注射复合疫苗后其 SOD 和 LSZ 活性均有显著提高^[33]而克氏螯虾 (*Procambarus clarkii*) 腹肌的 SOD 活性不因注射细菌糖蛋白而增加^[34]。注射聚甘露糖醛酸的中国明对虾血清、肝胰腺和肌肉中 POD 活性变化不明显^[35]。将凡纳滨对虾幼虾在含 - 葡聚糖和硫酸化多糖的溶液中浸泡 6 h,其血细胞和肌肉中的 SOD 活性和呼吸爆发较对照组都显著升高^[36]。

同样值得注意的是,甲壳动物的 SOD 或 POD 活性也受环境、营养等因素的影响而发生变化。对一种虾 *Palaeomonetes pugio* 的研究表明:当 70 min 内温度从 22 突变到 38,其线粒体 SOD 显著增加^[37]。以残饵为主的有机污染源会显著降低中国明对虾体内的 SOD^[24]。饲料中的 V_E 会影响斑节对虾的 SOD 活性^[17]。

超氧化物歧化酶活性的测定可采用连苯三酚自氧化法^[38]或 NBT 光还原法^[34],也可采用黄嘌呤氧化酶法。过氧化物酶活性的测定一般采用沃辛通 (Worthington) 法^[39],也可采用 96 孔酶标板法测定过氧化物酶的相对活性^[40]。

1.2.3 酸性磷酸酶及碱性磷酸酶活力

酸性磷酸酶 (ACP) 及碱性磷酸酶 (ALP) 是机体体内与重要的代谢调控酶。ACP 和 ALP 在体内直接参与磷酸机团的转移和代谢,ALP 还与膜的物质运输有关。对中国明对虾血细胞酶细胞化学的研究表明,患病对虾血清和小颗粒细胞内 ACP 及 ALP 阳性反应的产物增多^[41],即患病对虾的 ACP 和 ALP 活力

有所增强,这是机体免疫机能在病理条件下应急性激活反应的体现。注射或投喂免疫多糖后,日本囊对虾和中国明对虾体内的 ACP 和 ALP 活性在一定时间内也均较对照组高^[39, 42]。

ACP 和 ALP 活力的测定可采用磷酸苯二钠法^[43]。

1.2.4 血淋巴的血凝效价

凝集素 (agglutinin) 是甲壳动物体内又一重要的异物识别物质,借助其分子上的糖基与细胞表面的相应的糖基受体相结合,形成细胞间桥梁,导致细胞被凝集。因此,血淋巴血凝效价的大小可反映机体对非己细胞的免疫灵敏性。感染有黑斑病和红斑病的中国明对虾,其血淋巴凝集素的活力与虾病的严重程度呈反比相关^[44]。但人为注射 $4 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个弧菌可诱导中国明对虾血淋巴液的凝集素活力明显增强,并于注射后 48 h 达到峰值,随后开始衰减^[44]。病毒攻击后中国明对虾凝集活性的变化有不同的报道。受到副粘病毒攻击后,中国明对虾的血淋巴凝集素活性会降低,在攻击后 24 h,活性最低^[25]。而 WSSV 感染与否及感染程度不影响中国明对虾血淋巴凝集效价^[26]。此外,一些中药物质或细菌多糖在提高对虾的其他免疫指标的同时,也能提高对虾血淋巴的凝集效价^[34, 44, 45]。

血淋巴的血凝效价以人、鼠、鸡或兔的红细胞为凝集对象,采用倍比稀释法在血凝板上^[25, 44]或试管内^[45]测定。

1.2.5 抗菌活力和溶菌活力

甲壳动物体内存在多种抗菌肽及其他抗微生物成分^[46],这些物质的抗微生物作用可用抗菌活力来表示。不同组织中表现出不同的抗菌活力 (anti-bacteria activity),中国明对虾血浆中抗菌活力较血细胞溶解物中强^[47]。濒死对虾的抗菌力较正常对虾大大降低^[28]。投喂免疫型药物,在不影响中国明对虾生长速度的同时,可提高成活率和抗菌活力^[48]。抗菌活力的大小与所选择的试验细菌有关,同一样品对不同细菌体现出显著不同的抗菌活力^[47]。病菌攻击后抗菌活力的变化与病菌剂量有关,注射低剂量 (1.2×10^8) 大肠杆菌可大大提高中国明对虾血淋巴的抗菌活力;而注射高剂量 (3.6×10^8) 大肠杆菌会降低中国明对虾血淋巴的抗菌活力^[28]。

抗菌活力的测定一般参照 Hultmark 等^[28]的方法,也有通过平板计数孵育后细菌数量来衡量抗菌活力的大小^[47]。



溶菌活力(bacteriolysis activity)也是甲壳动物常用的免疫指标,可直观反映机体内溶菌酶活性。同抗菌活力相似,濒死的中国明对虾检测不到溶菌活力,注射低剂量(1.2×10^8)大肠杆菌可大大提高中国明对虾血淋巴的溶菌活力;而注射高剂量(3.6×10^8)大肠杆菌会降低中国明对虾血淋巴的溶菌活力^[28]。投喂免疫型药物,也能提高中国明对虾的溶菌活力^[48]。

溶菌活力的测定一般采用 Hultmark 等^[28]的改进方法,以溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)为底物进行测定。采用此法测得的仅仅是相对值,要得到溶菌比活力,则需有溶菌酶标准品作对照。

1.2.6 血清中类免疫球蛋白样物质的检测

有学者检测到对虾的血清中存在能够与人的某些抗体发生作用后产生沉淀反应的物质^[49-51],通常称之为类免疫球蛋白样物质。但从免疫进化的角度,对虾不存在免疫球蛋白。因此,准确讲虾血清中存在的是具有与人免疫球蛋白上特异性抗原决定簇结构极为相似的物质。王伟庆等^[50]的研究表明:中国明对虾的血清中除存在类免疫球蛋白样物质外,还存在类补体蛋白样物质和类 C 反应蛋白样物质。通过对健康虾和带病虾(病毒和弧菌感染)类免疫球蛋白、类 C3、类 C4 蛋白含量的比较,发现健康虾的类 IgG、类 IgM 样物质及类 C3、类 C4 蛋白含量都显著或极显著高于带病虾。因此类 IgG、类 IgM 样物质及类 C3、类 C4 蛋白含量可作为衡量机体不同免疫状况的定量指标。

血清中类免疫球蛋白样物质的检测可采用单扩散检测板法^[49]、消浊比浊法^[50]及免疫酶斑点法^[51]。

此外,血淋巴蛋白含量^[5],血蓝素含量^[5],可凝固蛋白(clottable proteins)含量^[5],血细胞转移酶(Tgase)活力^[5],血糖含量^[7],血清溶血素^[47]、血淋巴凝固时间^[52]等指标也被尝试用于描述对虾的免疫机能的状况。

1.3 体外血细胞吞噬功能检测

1.3.1 细胞毒活性氧

细胞毒活性氧是甲壳动物的血淋巴细胞在吞噬侵入体内的病原微生物时产生的一些超氧阴离子,吞噬活动越活跃,则产生的超氧阴离子的量也越多,也称呼吸爆发(respiratory burst)。细胞毒活性氧水平的测定被认为是监测对虾健康和免疫状况的有用工具^[55]。近期有关将细胞毒活性氧水平作为虾类免疫指标的报道较多^[2, 5, 15, 36, 54, 55]。Moullac 等^[2]报道,在缺氧(1 mg/L)水体中暂养 24 h 后的细角滨对虾,其呼

吸爆发的活性比对照组(养殖在正常溶氧水体)有所降低,同时病菌攻击后的存活率也比对照组显著降低。Song 等^[5]报道注射 Taura 综合征病毒(TSV)的凡纳滨对虾,其血淋巴的细胞毒活性氧的水平较对照组高,但在葡聚糖刺激后,细胞毒活性氧的增加量显著低于对照组。Pascual 等^[55]报道饲料蛋白水平会影响凡纳滨对虾的细胞毒活性氧等免疫指标的水平。过低的饲料蛋白降低对虾的生长的同时,也显著降低了细胞毒活性氧的水平。Campa-Cordova 等用 0.5 g/L β -葡聚糖和 1.0 mg/L 硫酸酯多糖分别浸浴凡纳滨对虾 1, 24 h 后硫酸酯多糖组虾的细胞毒活性氧水平都较浸浴前显著提高,48 h 后 β -葡聚糖组虾的细胞毒活性氧水平都较浸浴前显著提高。

细胞毒活性氧的检测一般采用 NBT 还原法^[53]。

1.3.2 离体血淋巴细胞的吞噬功能的检测

血淋巴中透明细胞是甲壳动物体内开展异物吞噬的主要细胞,通过测定血细胞对金黄色葡萄球菌的吞噬和杀伤情况可判定甲壳动物的免疫机能的高低。血细胞吞噬功能的强弱可用血淋巴细胞的吞噬率、吞噬指数、杀伤率和杀伤指数四指标衡量。血细胞吞噬功能的强弱与吞噬细胞的活力及菌的浓度有关。有报道表明,复合中草药免疫添加剂可提高对虾的血淋巴细胞的吞噬功能^[56]。真菌多糖也能提高中国明对虾淋巴细胞对白色念珠菌的吞噬率和吞噬指数^[57]。

血淋巴细胞的吞噬功能可采用丫啶橙检测法^[56];也有用 TTC 还原法^[57]和吞噬细胞花环^[57]试验来衡量。

1.4 活体攻毒试验

活体攻毒实验是最能直观反映机体综合免疫机能的实验手段。在一定剂量致病原的攻击下,免疫机能好的动物表现为低的累积死亡率或高的存活率或高的病原半致死浓度。氧胁迫状态下细角滨对虾免疫机能降低,抗鳃弧菌(*V. alginolyticus*)的能力降低,表现出高的死亡率^[2]。缺氧胁迫^[23]或高氨胁迫^[22]下的罗氏沼虾也表现出低的免疫机能,病原菌攻击后表现出高的死亡率。Huang 等^[19]报道摄食含 0.5%和 1%羊栖菜多糖提取物饲料 14 d 后的中国明对虾,其免疫机能得到改善,在哈维弧菌攻击后表现出高的存活率。Chotigeat 等^[58]报道,斑节对虾在摄食褐藻多糖(400 mg/(kg·d))15 d 后,免疫抗病机能提高,WSSV



人工感染后的成活率比对照组显著提高。

进行一次成功的攻毒实验,必须设置合理的致病原的剂量和采用有效的致病途径,相对较耗时。

2 甲壳动物免疫机能的科学评价

如上所述,尽管有多种指标已被用于衡量甲壳动物的免疫水平,但是,由于某些相关的基础研究还不完善,如何运用这些指标科学评价甲壳动物的免疫状态,笔者认为在实际评价中要特别注意如下几个因素:(1)评价时样本容量的大小对评价结果准确性的影响。由于甲壳动物是相对低等的水生变温动物,且生长过程中存在蜕皮周期,同种内个体间的免疫水平差异很大,因此在免疫指标的测定时,过小的样本容量可能影响评价的准确性。以试剂盒(黄嘌呤氧化酶法)测定同一养殖条件下处于蜕皮间期的中国明对虾腹肌 SOD 活性,假定测量允许误差为 $\pm 2.34\%$,则当样本容量大于 80 所测得的 SOD 活性的 95%置信区间在测量允许误差范围内,测定结果才具有代表性。若取 90%置信水平,则样本量大于 50 所测得结果就具有代表性^[59]。(2)血淋巴细胞的体外保存技术。多数甲壳动物的血淋巴量少,离体淋巴细胞的培养技术尚不成熟。常温下离体抗凝血淋巴液中的血细胞的生物学活性在短时间内就会减弱,因此采用检测离体细胞的吞噬功能或细胞毒活性氧来评价甲壳动物免疫机能,只有在完全一致的试验条件下,检测结果才有说服力。(3)正常机体的免疫酶水平的确定。单独运用某些酶指标评价机体的免疫水平,必须考虑两个重要的问题:一是正常机体的酶活力水平尚未确定,客观上给机体免疫水平的评价带来盲目性。在很多评价中,酶活力水平增高被认为是机体免疫水平提高。实际上,某些酶活力水平过高是机体非健康的病理表现。二是在所采用的免疫水平评价指标中,很多指标(如酶)会随机体正常生理活动(如:蜕皮)而发生变化,也给机体免疫水平的评价带来难度。(4)主要病害的发生过程与机体免疫参数的实时变化还不清楚,表征主要病害发生时机体的特征性免疫指标的筛选还不完善。在某些条件下,部分参数水平的显著变化,可能并不意味着机体的免疫状态或对某种病害的抵抗力有较大改变。

免疫防病的根本途径是提高机体的免疫力,提高机体免疫力的本质不是单纯提高某个免疫指标的水平,而是提高机体免疫的灵敏性和平衡性,即机体

对侵入体内的异物能够迅速产生充分的反应并在异物清除后能恢复正常状态。因此,在如何准确科学评价甲壳动物的免疫水平,还有许多基础性的工作有待开展,如不同环境下基础免疫水平的探查,有效的细胞分离和培养技术,遗传背景清晰纯正的实验动物模型等。在现阶段,活体攻毒试验虽然比较复杂,仍是评价甲壳动物免疫力的最有说服力的方法。

参考文献:

- [1] Johansson M W, Keyser P, Sritunyalucksana K, et al. Crustacean haemocytes and haematopoiesis [J]. *Aquaculture*, 2000, **191** (1-3): 45-52.
- [2] Moullac G L, Soyez C, Saulnier D, et al. Effect of hypoxia stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, **8** (8): 621-629.
- [3] Jussila J, Jago J, Tsvetnenko E, et al. Total and differential haemocyte counts in western rock lobsters (*Panulirus cygnus* George) under post-harvest stress [J]. *Marine and Freshwater Research*, 1997, **48** (8): 863-867.
- [4] Sung H H, Wang S F, Tasi F M. Responses of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) to challenge by two strains of *Aetomonas* spp. [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2000, **76** (4): 278-284.
- [5] Song Y L, Yu C I, Lien 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.
- [6] Lorenzon S., Guarrini S D, Smith V J, et al. Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans in vivo [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, **9** (1): 31-50.
- [7] Lorenzon S, Pasqual P, Ferrero E A. Different bacterial lipopolysaccharides as toxicants and stressors in the shrimp *Palaemon elegans* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, **13** (1): 27-45.
- [8] Moullac G L, Groumellec M L, Ansquer D, et al. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1997, **7** (4): 227-234.
- [9] Moullac G L, Haffner P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea [J]. *Aquaculture*, 2000, **191**



- (1-3): 121-131.
- [10] 于建平. 日本对虾血细胞分类、密度及组成[J]. 青岛海洋大学学报, 1993, 23(1): 107-114.
- [11] Cheng W, Chen J C. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2001, 11 (1): 53-63.
- [12] Cheng W, Chen J C. The virulence of *Enterococcus* to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2002, 12 (2): 97-109.
- [13] Cheng W, Chen J C. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2000, 10 (4): 387-391.
- [14] Gomez-Jimenez S, Uglow R F, Gollas-Galvan T. The effects of cooling and emersion on total haemocyte count and phenoloxidase activity of the spiny lobster *Panulirus interruptus* [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2000, 10 (7): 631-635.
- [15] Lee M H , Shiau S Y. Increase of dietary vitamin C improves haemocyte respiratory burst response and growth of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, fed with high dietary copper [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2003, 14 (4): 305-315.
- [16] Lee M H , Shiau S Y. Dietary copper requirement of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2002, 13 (4): 259-270.
- [17] Lee M H, Shiau S Y. Vitamin E requirements of juvenile grass shrimp, *Penaeus monodon*, and effects on non-specific immune responses [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2004, 16 (4): 473-485.
- [18] Hryniewiecka-Szyfter Z, Babula A. Total haemocyte counts and haematopoiesis in *Saduria entomon* (Linnaeus, 1758) (Isopoda, Valvifera) from the Baltic Sea infected with the yeast *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner [J]. **Crustaceana** (Leiden), 1996, 69 (4): 486-493.
- [19] Huang X X, ZHOU H Q, ZHANG H. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharides extracts on the ability on anti-disease and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2006, 20 (5): 750-757.
- [20] Vagas-Albores F, Baltazar P H, Clark G, *et al.* Influence of temperature and salinity on the yellowlegs shrimp, *Penaeus californiensis* Holmes, prophenoloxidase system [J]. **Aquaculture Res**, 1998, 29: 549-553.
- [21] 潘鲁青, 姜令绪. 盐度、pH 突变对 2 种养殖对虾免疫力的影响[J]. 青岛海洋大学学报, 2002, 32(6): 903-910.
- [22] Cheng W, Chen J C. The virulence of *Enterococcus* to freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its immune resistance under ammonia stress [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2002, 12(2): 97-109.
- [23] Cheng W, Liu C H, Hsu J P, *et al.* Effect of hypoxia on the immune response of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus* [J]. **Fish & Shellfish Immunology**, 2002, 13(5): 351-365.
- [24] 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): 7-11.
- [25] 彭其胜, 郭文场, 杨振国, 等. 中国对虾血淋巴凝集素的血凝活性与促噬活性[J]. 水产学报, 2001, 25 (3): 197-202.
- [26] 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.
- [27] 李天道, 于佳, 俞开康. 中国对虾血清中酚氧化酶活力研究[J]. 海洋湖沼通报, 1998, 1: 51-56.
- [28] 王雷, 李光友, 毛远兴. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26 (2): 180-185.
- [29] 王雷, 李光友, 毛远兴. 中国对虾血淋巴中的抗菌、溶菌活力与酚氧化酶活力的测定及其特性研究[J]. 海洋与湖沼, 1995, 26 (2): 179-185.
- [30] 昌鸣先, 陈孝煊. 两种多糖对日本沼虾酚氧化酶活力的影响[J]. 水生生物学报, 2003, 27(3): 269-272.
- [31] 尹丽红, 王琛柱, 钦俊德. 棉铃虫血淋巴酚氧化酶活性的微量测定[J]. 昆虫知识, 2001, 38 (2): 119-122.
- [32] 黄灿华, 陈棣华. 中国对虾病虾体内同工酶表型变化的初步研究[J]. 中国水产科学, 1999, 6 (1): 45-49.
- [33] 丁橘, 王雷, 李光友. 中国对虾复合疫苗的初步研究[J]. 海洋与湖沼, 1999, 30 (4): 355-361.
- [34] 莫照兰, 李会荣, 俞勇, 等. 细菌糖蛋白对螯虾免疫因子的影响[J]. 中国水产科学, 2000, 7 (3): 28-31.
- [35] 刘岩, 江晓路, 吕青, 等. 聚甘露糖醛酸对中国对虾免疫相关酶活性和溶菌溶血活性的研究[J]. 水产学报, 2000,



- 24 (6): 549-553.
- [36] Campa-Cordova A I, Hernandez-Saavedra N Y, Philippis R De, *et al.* Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, **12**(4): 353-366.
- [37] Downs C A, Fauth J E, Woodley C M. Assessing the health of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system [J]. *Marine Biotechnology*, 2001, **3**: 380-397.
- [38] 刘恒, 李光友. 免疫多糖对养殖南美白对虾作用的研究[J]. 海洋与湖沼, 1998, **29** (2): 113-118.
- [39] 刘树青, 江晓路, 牟海津, 等. 免疫多糖对中国对虾血清溶菌酶、磷酸酶和过氧化物酶的作用[J]. 海洋与湖沼, 1999, **30** (3): 278-283.
- [40] 王秀华, 雷质文, 黄健, 等. 96孔酶标板法测定对虾血淋巴的过氧化物酶相对活性的初步研究[J]. 海洋科学, 2001, **25** (11): 55-57.
- [41] 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.
- [42] 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): 107-108, 113.
- [43] 宋善俊. 临床医师手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 185-200.
- [44] 罗日祥. 中国对虾凝集素活力及弧菌的诱导动力学[J]. 海洋学报, 1997, **19** (4): 117-120.
- [45] 江晓路, 刘树青, 牟海津, 等. 真菌多糖对中国对虾血清及淋巴细胞免疫活性的影响[J]. 动物学研究, 1999, **20** (1): 41-45.
- [46] Bachère E, Destoumieux D, Bulet P. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity [J]. *Aquaculture*, 2000, **191** (1-3): 71-88.
- [47] 李春猛, 战文斌, 马牲, 等. 中国对虾血淋巴抗菌活性的测定[J]. 青岛海洋大学学报, 1999, **29**(4): 599-603.
- [48] 王雷, 李光友, 毛远兴, 等. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J]. 海洋与湖沼, 1994, **25** (5): 486-491.
- [49] 叶淑芳. 中国对虾免疫实验方法的探讨[J]. 海洋科学, 1991, **15** (6): 66.
- [50] 王伟庆, 李爱杰, 兰翠霞, 等. 用免疫消浊比浊法测定中国对虾血清中的免疫因子[J]. 水产学报, 1998, **22**(2): 170-174.
- [51] 章跃华, 彭宣宪, 王三英. 中国对虾血清三类免疫球蛋白样物质的研究[J]. 海洋科学, 2001, **25** (5): 37-41.
- [52] Jussila J, McBride S, Jago J, *et al.* Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panulirus cygnus* George) [J]. *Aquaculture*, 2001, **199** (1-2): 185-193.
- [53] Muñoz M, Cedeño R, Rodríguez J, *et al.* Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2000, **191**(1-3): 89-107.
- [54] 王宝杰, 王雷. 中国对虾血细胞吞噬活动中超氧阴离子 (O_2^-) 的产生[J]. 中国水产科学, 2003, **10** (1): 14-18.
- [55] Pascual C, Zenteno E, Cuzon G, *et al.* *Litopenaeus vannamei* juvenile energetic balance and immunological response to dietary protein [J]. *Aquaculture*, 2004, **236** (1-4): 431-450.
- [56] 杜爱芳, 蔡渭明, 于涟. 中国对虾血细胞吞噬功能的研究[J]. 中国水产科学, 1997, **4** (2): 1-6.
- [57] 江晓路, 刘树青, 张朝晖, 等. 多糖对中国对虾免疫功能的影响[J]. 中国水产科学, 1999, **6** (1): 66-68.
- [58] Chotigeat W, Tongsupa S, Supamataya K, *et al.* Effect of Fucoidan on Disease Resistance of Black Tiger Shrimp [J]. *Aquaculture*, 2004, **233** (1-4): 23-30.
- [59] 黄旭雄, 周洪琪, 王正侃, 等. 对虾免疫机能评估中样本容量的研究[J]. 水产学报, 2005, **29** (6): 819-823.

(本文编辑 : 刘珊珊)