

中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 血细胞中 一氧化氮合成酶的鉴定及其在白斑综合症 病毒感染过程中的变化*

姜国建 于仁诚^{†1)} 王云峰[†] 颜天[†] 周名江[†]

(中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071;
中国科学院研究生院 北京 100039)

[†](中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室 青岛 266071)

提要 诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)在生物机体免疫,特别在无脊椎动物免疫中的作用近来得到了广泛的关注,由其催化产生的一氧化氮(NO)除具有已知的神经传导、松弛平滑肌等功能外,还具有抗菌、抗病毒、抗寄生虫等作用。作者通过硝基四氮唑蓝(NBT)法和血细胞形态观察等方法,对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)血细胞中存在的诱导型一氧化氮合成酶进行了初步鉴定。在此基础上,通过亚硝酸盐法和L-瓜氨酸法对比,研究了感染白斑综合症病毒(WSSV)后中国明对虾血细胞中一氧化氮合成酶的变化情况。结果显示,中国明对虾在感染WSSV后,iNOS活性在12h内有上升趋势,实验36h后酶活性显著下降,至60h后酶活性降至对照组的一半左右。同时,被脂多糖(LPS)诱导的一氧化氮合成酶活性与对照相比也有显著下降。与此对应的是,核酸探针斑点杂交法检测病毒的结果显示:实验36h后在对虾体内能够检测到白斑综合症病毒。对照组中国明对虾血细胞的iNOS在实验过程中基本保持稳定。这说明WSSV在感染中国明对虾初期可以诱导血细胞产生iNOS,但随着WSSV在中国明对虾体内的大量增殖及其对血细胞的破坏,使得iNOS活性显著降低,对虾也趋于死亡。因此,iNOS能够作为反映对虾在病毒感染过程中健康状况的有效指标。

关键词 中国明对虾,一氧化氮合成酶,白斑综合症病毒

中图分类号 Q789

中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)以其味美质优而著称,主要分布于黄、渤海,是我国重要的对虾养殖品种。但是近年来,由于白斑综合症(WSS)、桃拉病(Taura)和黄头病(YHV)等病毒病的流行,使得对虾养殖业在全球范围内遭受了巨大的损失,中国明对虾的产量也因此大幅度下降。与其它对虾相比,中国明对虾对白斑综合症病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)感染的敏感性高,更易于出现暴发性死亡(Yu *et al*)²⁾,中国明对

虾与其它对虾免疫状况的差异可能是其中的一个重要的原因,因此有必要深入探讨白斑综合症病毒感染中国明对虾后中国明对虾免疫因子的变化情况。由于对虾缺少获得性免疫,因此先天性免疫在对虾抵抗病原体方面具有重要的作用。目前在对虾先天性免疫和疾病抵抗能力方面已开展了大量的研究工作,如在酚氧化酶、抗菌肽、凝集素、活性氧等方面的研究已取得显著进展(Söderhäll *et al*, 1998; Roch, 1999; Bachère *et al*, 1995;

* 国家重点基础研究项目资助,G1999012011号。姜国建,博士,E-mail:jiangguojian@ms.qdio.ac.cn

1) 通讯作者,于仁诚,E-mail:rcyu@ms.qdio.ac.cn

2) Yu R C, Jiang G J, Zhou M J, 2004. Comparison of disease resistance ability to White Spot Syndrome Virus (WSSV) between *Fenneropenaeus chinensis* and *Marsupenaeus japonicus*: an immunological approach (submitted to Aquaculture)

收稿日期:2003-11-23,收修改稿日期:2004-02-18

Holmblad *et al*, 1999; Song *et al*, 1994; 李雷等, 2003; 叶星等, 2003, 这对于了解对虾的抗病机制、提出相应的防病措施都具有重要意义。

研究发现,生物体内的一氧化氮也有可能是在生物抵抗疾病的能力中发挥重要作用,一氧化氮除具有神经传导和松弛平滑肌等功能外,还具有抗菌、抗病毒、抗寄生虫等作用(Bredt *et al*, 1994),它可以通过作用于病原体的核酸、蛋白质和脂类等杀灭病原体(Enoch *et al*, 1995; de Murcia *et al*, 1994; Lindahl *et al*, 1995; Kröncke *et al*, 1997)。诱导型一氧化氮合成酶(Inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)因能被一些细胞因子或免疫刺激物诱导而得名,近几年 iNOS 作为抗病力指标在哺乳动物、鱼类、以及昆虫和贝类等无脊椎动物中已有比较深入的研究(Chakravorty *et al*, 2003; Davies, 2000; Tafalla *et al*, 2000; Franchini *et al*, 1995; Ottaviani *et al*, 1993),但有关一氧化氮(NO)和一氧化氮合成酶(NOS)在对虾免疫系统中的作用和地位还未见报道。因此,有必要了解一氧化氮在对虾抗病力中的作用和地位(Roch, 1999)。

目前针对机体内的 iNOS 已建立了多种鉴定与检测方法,其中硝基四氮唑蓝(NBT)还原法和血细胞形态观察法是两种重要的 iNOS 鉴定方法。NBT 法是基于 iNOS 的一种独特性质,即经福尔马林固定后仍然具有 NADPH 硫辛酰胺脱氢酶(NADPH-diaphorase)活性,在 NADPH 存在时能够催化 L-精氨酸产生活性氮化合物(RNI),将 NBT 还原生成蓝色的三苯基甲脂(Weisk *et al*, 1999; Dawson *et al*, 1991)。血细胞形态法的原理在于能够产生 iNOS 的血细胞经脂多糖处理后与细菌共同孵育,细胞会呈现较大的圆形并且附着大量的细菌(Ottaviani *et al*, 1993)。目前对于 iNOS 活力的测定主要是通过亚硝酸盐法和 L-瓜氨酸法进行分析,其原理在于 L-精氨酸经一氧化氮合成酶的催化能够生成 NO 和 L-瓜氨酸,这个反应定量生成的 L-瓜氨酸可以通过 L-瓜氨酸法测定(Weisk *et al*, 1999; Marzinzig *et al*, 1997),而生成的 NO 可以通过反应生成亚硝酸盐,并以 Griess 法测定(Wink *et al*, 1995; Weisk *et al*, 1999; Marzinzig *et al*, 1997)。作者针对中国明对虾的血细胞中是否存在 iNOS 以及白斑综合症病毒感染中国明对虾后血细胞 iNOS 活力的动态变化情况进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)购自青岛市黄岛区红岛镇大洋养殖场,对虾体长(11±1)cm,体重(18±2)g,在昼夜充气的海水中驯化 7 天,驯化用海水盐度为 32,水温为(20±1)℃。驯化过程中每天投喂人工饵料并吸底换水两次,取蜕皮间期的对虾进行实验。

1.2 血细胞中 iNOS 的鉴定

1.2.1 血样采集 取驯化后健康的中国明对虾,用 1ml 的无菌、无热原的注射器从对虾的腹血窦处取血,将对虾的血淋巴与 4℃的抗凝剂(450mmol/L NaCl(分析纯), 10mmol/L KCl(分析纯), 10mmol/L EDTA-Na₂(分析纯), 10mmol/L HEPES(Sigma), pH 7.3, 850mOsm/kg)以 1:4 的比例混合后,在 4℃以 1000g 离心 10min 后去除上清液。将血细胞再悬浮,并调节其密度为 10⁶ 个/ml 备用。

1.2.2 NBT 还原法鉴定血细胞中的 iNOS

NBT 还原法参照 Weisk 等(1999)提出的方法。将 1.2.1 中采集的血细胞悬浮在 500μl 含 5mmol/L 的 L-精氨酸(Sigma)和 5mmol/L 的 CaCl₂ 的 0.1mol/L Bis-Tris(Sigma)缓冲液(pH 6.4)中,调节血细胞密度为 10⁶ 个/ml,然后加入 500μl 脂多糖溶液[Sigma, 溶解于 0.1mol/L Bis-Tris 缓冲液(pH 6.4)中,浓度为 200μg/ml]共同孵育,以诱导 iNOS 的合成。在 4℃孵育 4h 后,于室温下 1000g 离心 5min,弃上清液。将得到的细胞在 4%的福尔马林溶液[分析纯,溶解在 0.1mol/L Tris(Sigma)缓冲液, pH 7.5—8.0]中固定 20min。室温下 1000g 离心 5min 去除福尔马林,然后将细胞在含有 0.1% Triton X-100(Serva)的 0.1mol/L 的 Tris 缓冲液(pH 7.8)中反复洗两次。将细胞在新制的 0.01% NBT [Sigma, 溶解于 0.1mol/L Tris 缓冲液中,其中含有 0.1% Triton X-100 和 0.01% NADPH(Sigma)]溶液中室温下孵育 10min 后,4℃下 1000g 离心 5min,弃上清液,然后将细胞混入 0.7ml 的 70% 甲醇溶液中,振摇,并在室温下 1000g 离心 10min 后,将细胞转入 0.6ml 的二甲亚砷(Sigma)溶液[54% (V/V) 二甲亚砷 + 46% (V/V) 2mol/L 氢氧化钾(分析纯)]中,以溶解蓝色的三苯基甲脂(formazan),每 10min 振摇一次溶液,并于 30min 后室温下 10000g 离心 5min。取上清液在 670nm 下测量吸光度。对照组的 NBT 溶液中以 NADH(Sigma)代替 NADPH,其余操作步骤相同。

1.2.3 血细胞形态法鉴定血细胞中的 iNOS

血细胞形态法采用 Ottaviani 等(1993)的方法。将 1.2.1 中采集的血细胞 100 μ l 滴加到洁净的载玻片上,在湿盒中放置 30min,使血细胞牢固地贴在载玻片上,然后以蒸馏水淋洗,去除血淋巴、抗凝剂和没有粘附在载玻片上的血细胞。加入 50 μ l 密度为 10⁸ 个/ml 的大肠杆菌 *Escherichia coli* 混悬液与载玻片上的血细胞孵育后,将样品分为四组,每组 3 个重复。第一组为对照组;第二组加入 LPS 溶液使其终浓度为 100 μ g/ml;第三组加入 LPS 溶液和阻断剂 L-NMMA (*N*^v-monomethyl-L-arginine, Sigma),使其终浓度分别为 100 μ g/ml 和 0.8mmol/L;第四组加入外源性 NO 的供体-亚硝基铁氰化钠(SNP, Sigma),使其溶液终浓度为 10⁻² mol/L。将各组样品在湿盒中孵育 4h 后,用蒸馏水淋洗 2min,用甲苯氨蓝溶液 [3mmol/L 硼酸钠(分析纯),0.5% 甲苯氨蓝(分析纯)]染色 10min,再用蒸馏水淋洗 2min。所得样本在 400 倍的显微镜下观察拍照。

1.3 白斑综合症病毒感染过程中一氧化氮合成酶的变化

1.3.1 感染实验 将驯化后的中国明对虾分为对照组和实验组,分别置于两个 200L 实验水槽中,每槽 20 尾。给实验组的中国明对虾肌肉内注射 100 μ l 稀释后的白斑综合症病毒粗提液(稀释 100 倍),使之感染白斑综合症病毒;对照组的中国明对虾注射 100 μ l 对虾生理盐水(Huang *et al.*, 1999)。每天在各槽中投喂人工饵料两次,并吸底一次。在注射感染白斑综合症病毒后 12、36、60、84h 分别取对照组和实验组的中国明对虾血样测试 iNOS 的活性状况。测试中每次每组取 3 只对虾,取血后将每组的血样混合,将血细胞的密度调节到 10⁵ 个/ml 后进行测试,每组测试做 4 个重复。

1.3.2 iNOS 活力测定 对实验过程中 iNOS 的变化情况采用 L-瓜氨酸分析和亚硝酸盐分析两种方法进行对照测定(Weisk *et al.*, 1999; Marzinzig *et al.*, 1997)。将采集的血细胞悬浮在含 2.5mmol/L L-精氨酸和 5mmol/L CaCl₂ 的 Bis-Tris 缓冲液中,并调节细胞密度为 10⁵ 个/ml。取 500 μ l 悬浮细胞加入 500 μ l Bis-Tris 缓冲液作为 ARG 液,另取 500 μ l 悬浮细胞与 500 μ l LPS 溶液(200 μ g/ml,溶于 Bis-Tris 缓冲液中)混合作为 ARG + LPS 液。在 4 $^{\circ}$ C 下,将 ARG 液和 ARG + LPS 液分别孵育 8h 后,加入 1% TritonX-100 溶液(溶于 Tris 缓冲液中, pH 7.8)裂解细胞,室温下 13000g 离心 15min,取上清液超滤,滤

液用于 L-瓜氨酸和亚硝酸盐的定量分析。

(1) L-瓜氨酸的分析:对 ARG 液和 ARG + LPS 液的分析完全相同。各取 150 μ l 滤液加入 50 μ l 尿素酶溶液(Sigma, 165U/ml),置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后,加入 50 μ l 2.45mol/L 的三氯乙酸溶液,充分混匀后,在室温下 13000g 离心 15min,取 150 μ l 上清液与 450 μ l ADMS 试剂 [18% (V/V) 47.7mmol/L 安替比林(Sigma)水溶液 + 40% (V/V) 79mmol/L 二乙酰一肟(Sigma, 溶解于 83mmol/L 的乙酸溶液中) + 42% (V/V) 15N H₂SO₄ (分析纯)]在沸水中孵育 25min 后,样品避光并冷至室温,然后在室温下 13000g 离心 5min,收集上清液并于 450nm 处测量吸光度,通过与 L-瓜氨酸(Sigma)浓度标准曲线(0—100 μ mol/L)对比计算出上清液中 L-瓜氨酸的浓度。

(2) 亚硝酸盐的分析:对 ARG 液和 ARG + LPS 液的分析完全相同。在 300 μ l 的滤液中加入 20 μ l 的 Bis-Tris 缓冲液 [含有 50 μ mol/L FAD(Sigma), 30 μ mol/L NADPH (Sigma), 以及 0.1U/ml 的亚硝化还原酶(Sigma)],在 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min。之后加入 20 μ l Bis-Tris 缓冲液 [含有 0.1kU/ml L-乳酸脱氢酶(Sigma), 0.3mmol/L 丙酮酸钠(Sigma)],在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后,4 $^{\circ}$ C 下 10000g 离心 15min。取 300 μ l 上清液与 150 μ l 4.7mmol/L 的氨苯砒(dapsone)溶液 [Sigma, 溶于 2mol/L HCl(分析纯)]充分混合,5min 后加入 150 μ l 1mmol/L 的 NEDA [N-(1-naphthyl)ethylenediamine, Sigma] 溶液后,4 $^{\circ}$ C 下 10000g 离心 5min。取上清液在 550nm 处测量吸光度,通过与亚硝酸盐浓度标准曲线(0—20 μ mol/L)对比计算出上清液中亚硝酸盐浓度。

1.3.3 染毒中国明对虾中 WSSV 的检测 用核酸探针斑点杂交试剂盒检测对虾体内的 WSSV,所用试剂盒购自中国水产科学院黄海水产研究所(史成银等, 1999)。每次实验后将已取血样的虾用于病毒检测。

1.4 数据分析

采用 Excel 软件所附的 Student *t*-test 对所得数据进行差异显著性分析, $P < 0.01$ 表示差异显著, $P < 0.001$ 表示差异极显著。

2 实验结果

2.1 中国明对虾血细胞中一氧化氮合成酶的鉴定

通过 NBT 还原法初步鉴定了中国明对虾血细胞中的 iNOS,实验结果显示,经过 4% 福尔马林固定后的中国明对虾血细胞具有 NADPH 硫辛酰胺脱氢

酶活性,能够在 NADPH 存在条件下还原 NBT,所得结果(在 670nm 处的吸收度为 0.1600 ± 0.0076)显著高于在 NADH 存在下对 NBT 的还原程度(在 670nm 处的吸收度为 0.0910 ± 0.0059 , Student *t*-test $P < 0.001$),说明中国明对虾血细胞内存在 iNOS。

血细胞形态学观察结果如图 1 所示,当中国明对虾的血细胞与大肠杆菌 *E. coli* 孵育 4h 后,血细胞的形状主要呈阿米巴形,少量呈圆形,并有少量的大肠杆菌吸附在血细胞的周围或被其吞噬(图 1a);而当血细胞与大肠杆菌及 LPS 孵育后,血细胞

的形状主要呈圆形(图 1b),这与添加外源性 NO 的供体-亚硝基铁氰化钠孵育后的结果相同(图 1d)。当血细胞与大肠杆菌及脂多糖和 iNOS 的阻断剂 L-NMMA 孵育后,血细胞的形状主要呈阿米巴形,少量呈圆形,并有少量的大肠杆菌吸附在血细胞的周围或被其吞噬(图 1c),说明中国明对虾血细胞在诱导剂 LPS 存在的情况下,能够产生诱导型一氧化氮合成酶。这为中国明对虾血细胞内一氧化氮合成酶的存在提供了进一步的证据。

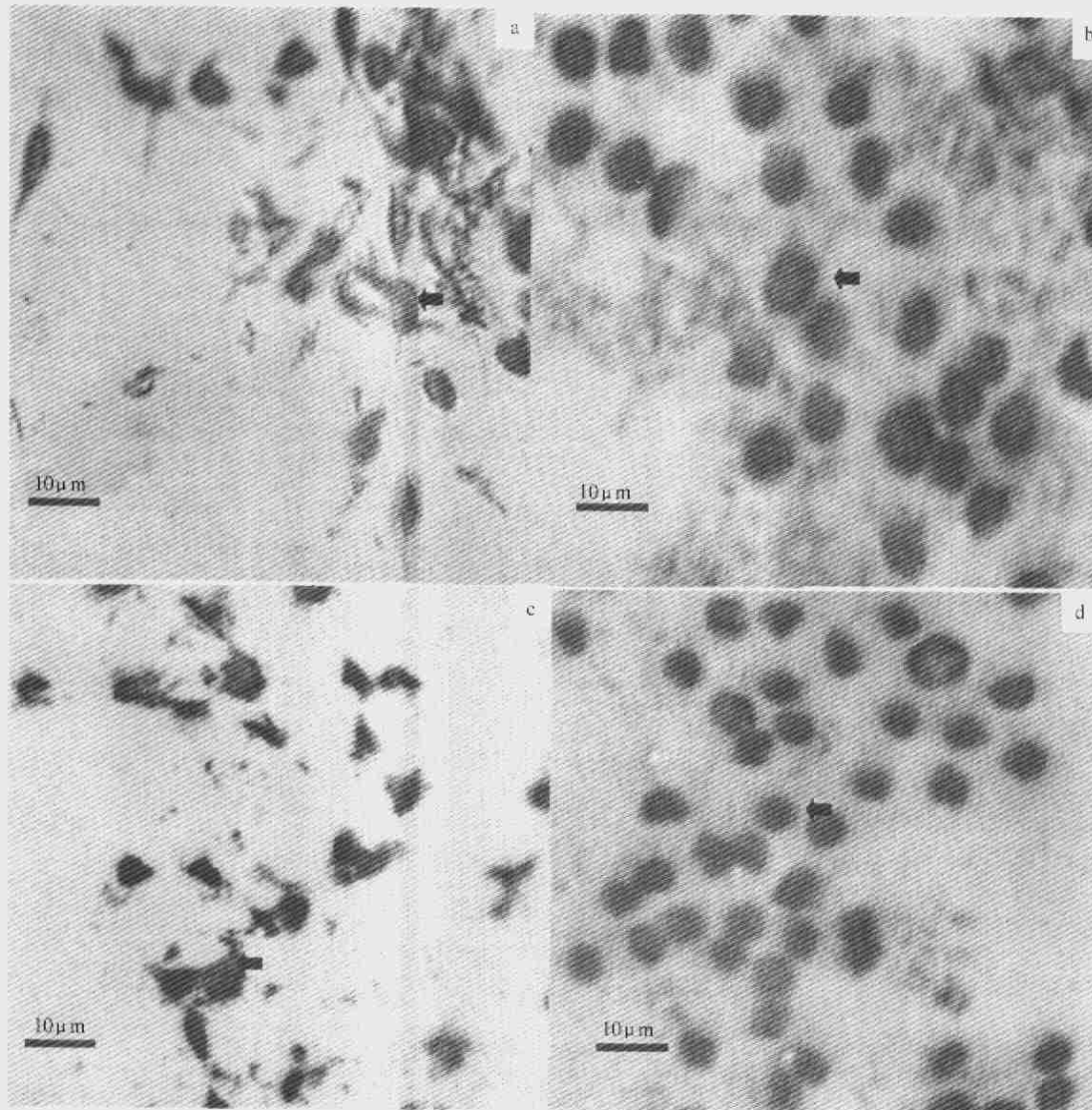


图 1 中国明对虾血细胞形状的变化

Fig.1 Variations in configuration of haemocytes of *F. chinensis*

- a. 与大肠杆菌孵育 4h 后血细胞的形状及其对大肠杆菌的粘附和吞噬状况;b. 与 LPS 和大肠杆菌孵育 4h 后的血细胞形状及其对大肠杆菌的粘附和吞噬状况;c. 与 LPS、大肠杆菌以及 NOS 的阻断剂 L-NMMA 孵育 4h 后的血细胞形状及其对大肠杆菌的粘附和吞噬状况;d. 与 NO 的供体亚硝基铁氰化钠及大肠杆菌孵育 4h 后的血细胞形状及其对大肠杆菌的粘附和吞噬状况

2.2 WSSV感染过程中中国明对虾血细胞中一氧化氮合成酶的活性变化

2.2.1 L-瓜氨酸法测定结果 图 2 显示了中国明对虾感染白斑综合症病毒后通过 L-瓜氨酸法测定的 iNOS 活力的动态变化情况。健康对虾血细胞中未经 LPS 刺激的 iNOS 本底所产生的 L-瓜氨酸浓度为 $(11.18 \pm 0.047) \mu\text{mol/L}$, 经 LPS 刺激后 iNOS 所产生 L-瓜氨酸的浓度为 $(12.77 \pm 0.26) \mu\text{mol/L}$ 。感染 12h 后对虾血细胞中酶活性本底值与实验开始时相比有所上升, 产生的 L-瓜氨酸的浓度为 $(12.08 \pm 0.64) \mu\text{mol/L}$, 比对照组有显著的升高 ($P < 0.001$)。在 36h 开始呈明显下降趋势 (与对照组比较 $P < 0.001$), 60h 后酶活性仅有对照组的一半, 到实验结束时, 所产生的 L-瓜氨酸浓度为 $(1.58 \pm 0.024) \mu\text{mol/L}$ 。同时, 经 LPS 刺激所产生的诱导型一氧化氮合成酶活性也有所降低, 如表 1 所示。在实验过程中, 对照组对虾的酶活性一直保持稳定, 能够被 LPS 所诱导的酶活性也保持在一定的水平上。

2.2.2 亚硝酸盐法测定结果 通过亚硝酸盐法对 iNOS 活力的测定得到了与 L-瓜氨酸法相似的结果如图 2 所示。健康对虾血细胞中的 iNOS 未经 LPS 刺激所产生亚硝酸盐的浓度为 $(10.64 \pm 0.26) \mu\text{mol/L}$, 经脂多糖刺激后产生亚硝酸盐的浓度为 $(11.82 \pm 0.13) \mu\text{mol/L}$ 。感染 12h 后, 对虾血细胞中酶活性的本底值与实验开始时相比有所升高, 所产生亚硝酸盐的浓度为 $(12.67 \pm 0.39) \mu\text{mol/L}$, 显著高于对照组 ($P < 0.001$)。同样, 实验进行到 36h 后, 酶活性呈明显下降趋势 (与对照组比较 $P < 0.001$), 60h 后酶活性仅有对照组的一半, 到实验结束时其值为 $(2.69 \pm 0.70) \mu\text{mol/L}$ 。在实验

过程中, 脂多糖能够诱导产生的 iNOS 活性与对照组相比也有明显降低, 即酶的可诱导潜力降低 (表 1), 对照组对虾的酶活性一直保持稳定, 能够被 LPS 所诱导的酶活性也保持在一定的水平上。

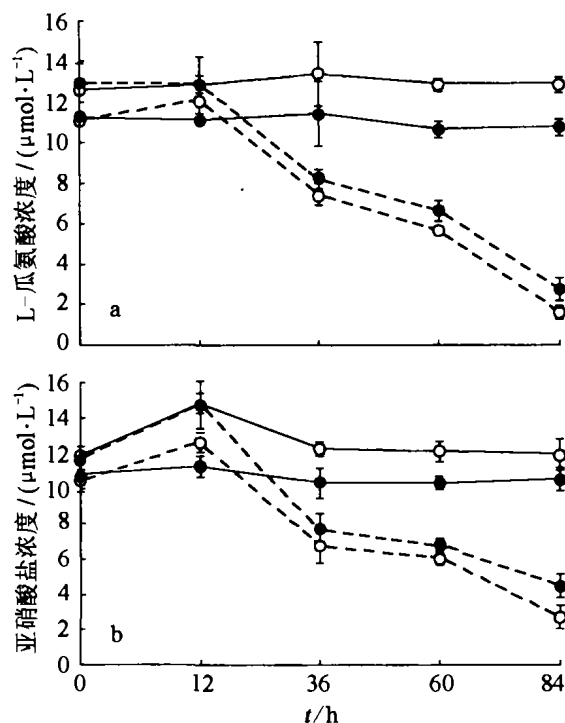


图 2 L-瓜氨酸法(a)和亚硝酸盐法(b)分析感染 WSSV 后中国明对虾血细胞 iNOS 的变化

Fig.2 iNOS variation in the haemocytes of *F. chinensis* post-inoculation of WSSV by L-citrulline analysis (a) and nitrite analysis (b)

- 健康的血细胞与 L-精氨酸孵育 8h 后;
- 健康的血细胞与 L-精氨酸和 LPS 孵育 8h 后;
- 感染 WSSV 的血细胞与 L-精氨酸孵育 8h 后;
- 感染 WSSV 的血细胞与 L-精氨酸和 LPS 孵育 8h 后

表 1 LPS 可诱导的 iNOS 的活性在实验过程中的变化情况

Tab.1 Variations of activities of iNOS induced by LPS during the period of the experiment

浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	组别	感染时间 (h)				
		0	12	36	60	84
L-瓜氨酸	对照组	1.37 ± 1.16	1.70 ± 1.29	1.96 ± 0.01	2.19 ± 0.26	2.14 ± 0.12
	感染组	1.81 ± 0.01	0.80 ± 0.20	0.75 ± 0.01	0.96 ± 0.41	1.16 ± 0.35
亚硝酸盐	对照组	1.09 ± 0.01	3.54 ± 0.80	1.88 ± 0.50	1.82 ± 0.19	1.40 ± 0.20
	感染组	1.27 ± 0.12	2.12 ± 0.13	0.93 ± 0.01	0.72 ± 0.04	1.78 ± 0.08

注: 以诱导产生的 L-瓜氨酸和亚硝酸盐浓度 ($\mu\text{mol/L}$) 增量指示

2.3 实验过程中染毒对虾的 WSSV 的检测

通过核酸探针斑点杂交方法检测了实验过程中对虾染毒情况。结果显示,在实验初期(0—12h)通过本方法未检测到病毒,而实验进行到 36h 后,对虾体内存在可以检测到的病毒,并且随时间延长病毒量逐渐增加。对虾体内病毒的增加与血细胞内一氧化氮合成酶活性的下降呈镜像关系。这说明白斑综合症病毒在中国明对虾体内的大量增殖及其对血细胞的破坏,使得 iNOS 活性显著降低,同时对虾也趋于死亡。

3 讨论与结语

对于诱导型一氧化氮合成酶的检测,现在已建立了多种方法(Ottaviani *et al.*, 1993; Weisk *et al.*, 1999; Marzinzig *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 1999; Pfarr *et al.*, 2001; Archer *et al.*, 1995; Miles *et al.*, 1995; Wilcox *et al.*, 1995; Beckman *et al.*, 1995; Leone *et al.*, 1995)。这些方法根据酶的自身特征或其催化的反应过程,对一氧化氮合成酶的存在及其活性进行鉴定和分析。本实验中运用的 NBT 法和血细胞形态法是比较常用的简便的 iNOS 鉴定方法。由于一氧化氮合成酶经福尔马林固定后仍然具有 NADPH-硫辛酰胺脱氢酶活性,甚至能被福尔马林诱导(Ott *et al.*, 1999),因此经福尔马林固定后,一氧化氮合成酶在 NADPH 存在时可以催化 L-精氨酸生成 NO 及其衍生物,将 NBT 还原为蓝色的三苯基甲脂。一氧化氮合成酶的这一独特特征,使得这一反应成为鉴定一氧化氮合成酶的有效生化反应之一(Dawson *et al.*, 1991; Hope *et al.*, 1991)。本实验的测定原理是:与血细胞孵育的 L-精氨酸作为底物可以通过自由扩散进入血细胞中,LPS 作为 iNOS 的诱导物与血细胞作用后诱导合成 iNOS,经福尔马林处理后一氧化氮合成酶仍然能够保持活性,催化 L-精氨酸生成 NO,NO 被氧化成为 RNI 的其它形式,NADPH 可将 RNI 的电子传递给 NBT 使其还原生色。本实验中对虾血细胞经福尔马林固定后在 L-精氨酸存在时,加 NADPH 的实验组在 670nm 处的吸收度值显著高于加 NADH 的实验组,说明中国明对虾的血细胞中存在 iNOS。另外,血细胞形态观察法也是鉴定 iNOS 存在与否的一种有效方法。根据 Franchini 等(1995)报道,鉴定紫贻贝 *Mytilus edulis* 和一种田螺 *Viviparus ater* 的血细胞中是否具有 iNOS,可以根据它与 NO 的供体—亚硝基铁氰化钠对细

菌和血细胞产生相似的效应判断,因为亚硝基铁氰化钠在水溶液中可以释放 NO(Feelish *et al.*, 1991),从而具有与一氧化氮合成酶相同的效应。Ottaviani 等(1993)报道,在 LPS 的刺激下紫贻贝和田螺的血细胞能够聚集大量的细菌在其周围,并且血细胞的形状呈圆形,亚硝基铁氰化钠对两者的血细胞有同样的作用,并以此作为 NO 产生的依据,其机制可能是:NO 与蛋白质和分子氧有很高的反应活性,在细胞质中的 NO 能激活鸟苷酸环化酶(GC)而提高 cGMP 的水平,cGMP 通过使 Ca^{2+} 外排和内储的方式使细胞内的 Ca^{2+} 减少,这样,低水平的 Ca^{2+} 使细胞的特异性粘附、聚集和趋化等现象受到抑制而使细胞呈圆形(Salzet *et al.*, 2000)。在本实验中对中国明对虾 *F. chinensis* 的血细胞的四种处理的结果显示:与大肠杆菌 *E. coli* 孵育的血细胞呈阿米巴形,少量呈圆形,并有少量的大肠杆菌吸附在血细胞的周围或被其吞噬,而与 LPS 孵育的血细胞形状主要为圆形并有大量的大肠杆菌吸附在细胞的周围,添加 SNP 处理的血细胞表现出同样的效应。但是这一效应可以被 NOS 的阻断剂 L-NMMA 所抑制,表现在添加 L-NMMA 和 LPS 的实验组中,对虾血细胞仍然呈现阿米巴形(图 1)。这一结果与 Ottaviani 等(1993)所报道的紫贻贝和田螺的血细胞的 iNOS 相类似。因此,上述两种方法都显示中国明对虾的血细胞中存在 iNOS。

在本实验中,作者采用的亚硝酸盐法和 L-瓜氨酸法,是在 Weisk 等(1999)和 Marzinzig 等(1997)的方法基础上经过优化而建立起来的,亚硝酸盐法将氨苯砷代替了传统的 Griess 法中的磺胺,使得亚硝酸盐的检测限达到 $0.2\mu\text{mol/L}$ (Marzinzig *et al.*, 1997),而 L-瓜氨酸法的检测限也能达到 $1.0\mu\text{mol/L}$ 。结果显示:这两种方法在检测中国明对虾感染 WSSV 后血细胞的 NOS 的变化趋势方面有较好的相关性(图 2)。

有关一氧化氮对病毒作用的报道很多,如一氧化氮作为先天免疫因子能杀死多种病毒,如 poliovirus(López-Guerrero *et al.*, 1998)、picornavirus(Sanders *et al.*, 1998)、flavivirus(Kreil *et al.*, 1996)、coronavirus(Lane *et al.*, 1997)、arenavirus(Campbell *et al.*, 1994)、rhabdovirus(Bi *et al.*, 1995)和 ACID virus(Raber *et al.*, 1996)等。同时,有些病毒可以诱导宿主产生一氧化氮,如 Coxsackie B3 病毒可以诱导鼠的 iNOS 产生大量的一氧化氮(Robinson *et*

al, 1999); 疱疹单一病毒-2 (HSV-2) 可以诱导鼠的 iNOS 产生大量具有抗病毒活性的一氧化氮, 并被 iNOS 的阻断剂 L-NMMA 阻断 (Benencia *et al.*, 1999), 被认为是病原体感染导致的非特异性炎症反应 (Akaike *et al.*, 2000)。乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒也可以诱导患者的 iNOS 产生一氧化氮 (Kandemir *et al.*, 2002)。在本实验中, 作者用亚硝酸盐法和 L-瓜氨酸法所测定的中国明对虾血细胞的 iNOS 在感染白斑综合症病毒后 12h 的活力高于对照组 (图 2) 可以推断: 此时白斑综合症病毒的侵入诱导了中国明对虾血细胞的 iNOS, 并产生一氧化氮, 病毒检测结果显示, 此时对虾体内的白斑综合症病毒尚未大量增殖。但当对虾体内的白斑综合症病毒大量增殖至可被斑点杂交方法所检测到时, 其血细胞的 iNOS 的活力显著下降 (图 2), 这可能是由于 WSSV 破坏了对虾的血细胞, 使得血细胞的免疫水平下降, 血细胞的 iNOS 的表达减弱。一般认为 iNOS 的活性取决于其蛋白质表达的转录水平, 但中国明对虾血细胞的 iNOS 是否以酶原的形式存在或其活性取决于其蛋白质表达的转录水平需要进一步的实验证明。同时由图 2 还可以看出, 在实验的全过程中, 与 LPS 孵育的血细胞的 iNOS 活性均高于未经 LPS 孵育的血细胞的 iNOS 活性, 而被白斑综合症病毒感染的中国明对虾血细胞中 iNOS 的可诱导性显著低于对照的健康对虾组 (表 1), 这些现象再次证明了中国明对虾血细胞中存在可被脂多糖诱导的 iNOS, 而这功能则由于白斑综合症病毒的侵害而下降。

参 考 文 献

- 史成银, 宋晓玲, 黄 捷等, 1999. 核酸斑点杂交分析方法检测对虾皮下及造血组织坏死杆状病毒 (HHN-BV). 海洋与湖沼, 30(5): 486—490
- 叶 星, 郑清梅, 白俊杰等, 2003. 短沟对虾和斑节对虾酚氧化酶原基因的克隆和序列分析. 海洋与湖沼, 34(5): 533—540
- 李 雷, 王金星, 康翠洁等, 2003. 对虾免疫防御中的阳离子和阴离子抗菌肽. 海洋与湖沼, 34(2): 217—223
- Akaike T, Maeda H, 2000. Nitric oxide and virus infection. Immunology, 101: 300—308.
- Archer S L, Shultz P J, Warren J B *et al.*, 1995. Preparation of standards and a measurement nitric oxide, nitroxyl, and related oxidation products. Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 7: 21—34
- Bachère E, Mialhe E, Noel D *et al.*, 1995. Knowledge and research prospects in marine mollusk and crustacean immunology. Aquaculture, 132: 17—32
- Beckman J S, Conger K A, 1995. Direct measurement of dilute nitric oxide in solution with an ozone chemiluminescent detector. Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 7: 35—39
- Benencia F, Courreges M C, 1999. Nitric oxide and macrophage antiviral extrinsic activity. Immunology, 98: 363—370
- Bi Z, Reiss C S, 1995. Inhibition of vesicular stomatitis virus infection by nitric oxide. J Virol, 69: 2208—2213
- Bredt D S, Snyder S H, 1994. Nitric oxide: a physiology messenger molecule. Annu Rev Biochem, 63: 175—195
- Campbell I L, Samimi A, Chiang C S, 1994. Expression of the inducible nitric oxide synthase: correlation with neuropathology and clinical features in mice with lymphocytic choriomeningitis. J Immunol, 153: 3622—3629
- Chakravorty D, Hensel M, 2003. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. Microbes and Infection, 5: 621—627
- Davies S A, 2000. Nitric oxide signalling in insects. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 30: 1123—1138
- Dawson T M, Bredt D S, Fotuhi M *et al.*, 1991. Nitric oxide and NADPH-diaphorase are identical in brain and peripheral tissue. Proc Natl Acad Sci USA, 88: 7797—7801
- de Murcia G, de Murcia J M, 1994. Poly (ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. Trends Biochem Sci, 19: 172—176
- Enoch T, Norbury C, 1995. Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the roles of p53 and ATM. Trends Biochem Sci, 20: 426—430
- Feelish M R, Noack E, 1991. The *in vivo* Metabolism of Nitrovasodilators and Their Conversion Into Vasoactive Species. In: Lewis B S, Kimchi A ed. Heart Failure-Mechanisms and Management. Springer Verlag, Berlin, 241—255
- Franchini A, Conte A, Ottaviani E, 1995. Nitric oxide: An ancestral immunocyte effector molecule. Adv Neuroimmunol, 5: 463—478
- Holmblad T, Soderhall K, 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. Aquaculture, 172: 111—123
- Hope B T, Michael G J, Knigge K M *et al.*, 1991. Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. Proc Natl Acad Sci USA, 88: 2881—2814
- Huang J, Song X L, Yu J *et al.*, 1999. The components of an inorganic physiological buffer for *Penaeus chinensis*. Methods in Cell Science, 21(4): 225—230
- Kandemir O, Polat A, Kaya A, 2002. Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis and its relation with histological severity of disease. J Viral Hepatitis, 9: 419—

- 423
- Kreil T R, Eibl M M, 1996. Nitric oxide and viral infection: no antiviral activity against a flavivirus *in vitro* and evidence for contribution to pathogenesis in experimental infection *in vivo*. *Virology*, 219: 304—306
- Kröncke K D, Fehsel K, Kolb-Bachofen V, 1997. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, and where? *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*, 1(2): 107—120
- Kumar V B, Bernardo A E, Alshaher M M *et al*, 1999. Rapid assay for nitric oxide synthase using thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry*, 69: 17—20
- Lane T E, Paoletti A D, Buchmeier M J, 1997. Disassociation between the *in vitro* and *in vivo* effects of nitric oxide on a neurotropic murine coronavirus. *J Virol*, 71: 2202—2210
- Leone A M, Moncada S, 1995. The determination of plasma nitrite and nitrate by capillary ion analysis. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 7: 98—102
- Lindahl T, Satoh M S, Poirier G G *et al*, 1995. Post-translational modification of poly (ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci*, 20: 405—411
- Lopez-Guerrero J A, Carrasco L, 1998. Effect of nitric oxide on poliovirus infection of two human cell lines. *J Virol*, 72: 2538—2540
- Marzinzig M, Nussler A K, Stadler J *et al*, 1997. Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*, 1(2): 177—189
- Miles A M, Chen Y, Owens M W *et al*, 1995. Fluorometric Determination of nitric oxide. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 7: 40—47
- Ott S R, Burrows M, 1999. NADPH diaphorase histochemistry in the thoracic ganglia of locusts, crickets, and cockroaches: species differences and the impact of fixation. *J Comparative Neurology*, 410: 387—397
- Ottaviani E, Paeman L R, Cadet P *et al*, 1993. Evidence for nitric oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes. *Eur J Pharmacol*, 248: 319—324
- Pfarr K M, Qazi S, Fuhrman J A, 2001. Nitric oxide synthase in Filariae: Demonstration of nitric oxide production by embryos in *Brugia malayi* and *Acanthocheilonema viteae*. *Experimental Parasitology*, 97: 205—214
- Raber J, Toggas S M, Lee S *et al*, 1996. Central nervous system expression of HIV-1 Gp120 activates the hypothalamic pituitary-adrenal axis: evidence for involvement of NMDA receptors and nitric oxide synthase. *Virology*, 226: 362—373
- Robinson N M K, Zhang H Y, Bevan A L *et al*, 1999. Induction of myocardial nitric oxide synthase by Coxsackie B3 virus in mice. *European J Clinical Investigation*, 29: 700—707
- Roch P, 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture*, 172: 125—145
- Salzet M, Breton C, Bisogno T *et al*, 2000. Comparative biology of the endocannabinoid system-possible role in the immune response. *Eur J Biochem*, 267: 4917—4927
- Sanders S P, Sierkierski E S, Porter J D *et al*, 1998. Nitric oxide inhibits rhinovirus-induced cytokine production and viral replication in a human respiratory epithelial cell line. *J Virol*, 72: 934—942
- Söderhäll K, Cerenius L, 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol*, 10: 23—28
- Song Y L, Hsieh Y T, 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances-analysis of reactive oxygen species. *Dev Comp Immunol*, 18: 201—209
- Tafalla C, Novoa B, 2000. Requirements for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages. *Developmental and Comparative Immunology*, 24: 623—631
- Weisk J, Wiesner A, 1999. Stimulation of NO synthase activity in the immune-competent lepidopteran *Estigmene acraea* Hemocyte line. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry*, 3(2): 123—131
- Wilcox D E, Smith R P, 1995. Detection and quantification of nitric oxide using electron magnetic resonance spectroscopy. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 7: 59—70
- Wink D A, Ford P C, 1995. Nitric oxide reactions important to biological systems: a survey of some kinetics investigations. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 7: 14—20

IDENTIFICATION OF INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE (iNOS) IN HAEMOCYTES OF SHRIMP *FENNEROPENAEUS CHINENSIS* AND ENZYME ACTIVITY DURING ITS INFECTED BY WHITE SPOT SYNDROME VIRUS

JIANG Guo-Jian, YU Ren-Cheng[†], WANG Yun-Feng[†], YAN Tian[†], ZHOU Ming-Jiang[†]

(Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100039)

[†](Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract In recent years, much attention has been given to nitric oxide synthase (NOS) that catalyzes L-arginine to nitric oxide (NO). NOSs play significant roles in neurotransmission and smooth-muscle relaxation (constitutive NOS or cNOS) and in immunity (induced NOS or iNOS) in anti microbia, antivirus and anti-parasite. NOS has been considered as an important part in innate immune system, especially in that of invertebrates.

In this study, iNOS, induced by lipopolysaccharide (LPS), was detected in haemocytes of *Fenneropenaeus chinensis*, by NBT reduction and haemocyte morphological studies. NBT reduction began with fixation by 4% formaldehyde, and then incubated in NADPH, induced by LPS. The induced haemocytes of *F. chinensis* have an ability to reduce NBT at higher levels than that treated with no NADPH but NADH (the differential significance $P < 0.001$). Results of haemocyte morphological studies showed that haemocytes of *F. chinensis* mainly are in amoeboid conformation with sporadic *Escherichia coli* congregated or clumped in their immediate vicinity. Treating haemocytes with LPS stimulates bacterial clumping around the big and round haemocytes. But by adding NOS inhibitor L-NMMA, the bacterial clumping resulting from LPS was stopped and the haemocytes returned to amoeboid conformation again. Adding nitric oxide donor-SNP stimulated both bacterial clumping around the haemocytes and promoting and maintaining haemocytes in big and round configuration. These results concluded that LPS has the same effect on haemocytes of *F. chinensis* to NO donor-SNP. This effect can be hindered by NOS inhibitor. Therefore, the haemocytes of *F. chinensis* have LPS-inducible NOS.

Variation of iNOS enzyme activity was compared between healthy and WSSV (White Spot Syndrome Virus) infected shrimps using L-citrulline analysis and nitrite analysis. Results of both methods show that iNOS activity in haemocytes of *F. chinensis* had a general decreasing trend compared to the relatively stable value in healthy shrimps. iNOS activity in WSSV infected shrimp increased slightly 12 hours post-inoculation, but decreased sharply after 36 hours. Thereafter, decreasing gradually until the end of experiment when the shrimp died. Enzyme activity was only half that of the control 60 hours post-inoculation. In addition, NOS differences of LPS-induced with non-induced haemocytes in healthy *F. chinensis* are generally higher than that of the WSSV-infected shrimp. Meanwhile, LPS-induced iNOS activity also decreased significantly with passing time in WSSV infected shrimps. Detection of WSSV with the Dig-DNA Probe dot blot hybridization test showed WSSV could not be detected in *F. chinensis* until 36 hours after inoculation. These results suggest that WSSV infection can stimulate iNOS synthesis slightly in *F. chinensis*. However, enzyme activity decreased sharply after proliferation of the virus, and the shrimp became both moribund and died simultaneously. iNOS activity of haemocytes of *F. chinensis* closely correlated with the infection and proliferation of WSSV. Therefore, iNOS can be considered as a valuable index for indicating health status and immunocompetence of *F. chinensis*.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*, Induced nitric oxide synthase (iNOS), White Spot Syndrome Virus (WSSV)