

# 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)感染白斑症病毒(WSSV)后大颗粒血细胞的变化\*

张志栋 战文斌<sup>1)</sup> 薛艳红 邢 婧  
(中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室 青岛 266003)

**提要** 采用抗凡纳滨对虾大颗粒细胞的单克隆抗体,应用免疫细胞化学方法,分析了凡纳滨对虾人工感染白斑症病毒(WSSV)后血细胞中大颗粒细胞的变化。研究表明,凡纳滨对虾感染WSSV后,大颗粒细胞的细胞质较正常细胞的多;从WSSV感染凡纳滨对虾的第1天至第3天,大颗粒细胞的数量增加幅度较大。同时,大颗粒细胞占血细胞总数的比例也增加较大:第1天为15.2%,第2天为18%,第3天增大到45.9%,而后大颗粒细胞的比例稍有下降,到第8天下降到43.3%,但仍明显高于对照组(健康虾的大颗粒细胞比例为15.2%)。

**关键词** 凡纳滨对虾,白斑症病毒,单克隆抗体,大颗粒细胞  
**中图分类号** Q789

对虾白斑病是对虾养殖中危害严重的疾病之一,引起很高的对虾死亡率,给我国对虾养殖业造成了巨大的损失(何建国等,1999)。引起该病的病毒可广泛感染对虾的皮下组织、造血组织、结缔组织、血细胞、淋巴器官等组织器官,其中血细胞是白斑症病毒(White Spot Syndrome Virus, WSSV)侵染的主要靶细胞,它对于病毒在体内各组织器官中的感染起着重要的作用(Zhan *et al.*, 1999; Shih *et al.*, 2001)。

对虾的血细胞既是细胞免疫的承担者,又是体液免疫因子的提供者,现在一般把血细胞分为透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞三类,各自担负着不同的免疫功能(Sung *et al.*, 1999)。在健康对虾体内三类血细胞分别有相对稳定的比例和数量,当对虾患病后,三类血细胞的比例和数量会发生比较复杂的变化(Van de Braak *et al.*, 2002)。

近年来,单克隆抗体技术越来越多地应用在无脊椎动物免疫系统的研究上。Rodriguez等(1995)研制出了抗日本对虾血细胞的单克隆抗体,Sung等(1999)研制出了分别抗斑节对虾小颗粒细胞和大颗粒细胞的单克隆抗体,Van de Braak

等(2000)研制出了抗斑节对虾血细胞的单克隆抗体并研究了单克隆抗体在各种条件下与血细胞的反应特点。到目前为止,单克隆抗体主要用来研究无脊椎动物的血细胞分类、交叉反应以及血细胞发生等(Zhang *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2001; 战文斌等, 2002)。

本文利用实验室已有的抗凡纳滨对虾大颗粒细胞的单克隆抗体,应用免疫细胞化学方法,分析病毒感染前后大颗粒细胞的变化,为进一步探讨大颗粒细胞的防御作用与功能提供资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及试剂

健康的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)购自即墨对虾养殖场;WSSV自然感染的病虾取自乳山对虾养殖场,于-80℃保存。抗凡纳滨对虾大颗粒细胞和抗WSSV的单克隆抗体系本实验室研制。生物素标记的羊抗小鼠IgG抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的亲合素、HRP标记的羊抗小鼠IgG抗体购自Roche公司。显色底物DAB(3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐)购自Sigma公司。

\* 国家重点基础研究发展规划项目(973),G1999012002号;国家自然科学基金项目,30271016号;教育部海水养殖重点实验室开放课题,200423号。张志栋,博士研究生,E-mail:zhidong\_2001@hotmail.com

1) 通讯作者,战文斌,教授,博士生导师,E-mail:wbzhan@ouc.edu.cn

## 1.2 对虾感染实验

实验选取体长 8—10cm、外观健康的凡纳滨对虾,经 PCR 和抗体检测确认未被 WSSV 感染。病毒感染组直接投喂白斑症病毒感染的病虾组织,对照组投喂新鲜鱼肉,每天投喂三次,投喂约 30min 后将残饵清除。实验设三个平行组,实验过程连续充气,水温为 24—26℃。

## 1.3 血细胞分离及制片

自感染日开始,每天从各平行组随机抽取 3 尾凡纳滨对虾抽血制片。首先用 70% 酒精棉球擦拭对虾头胸甲后缘,再用吸取预冷抗凝剂(27mmol/L 柠檬酸钠, 336mmol/L 氯化钠, 115mmol/L 葡萄糖, 9mmol/L EDTA, pH 5.6)的一次性医用注射器插入对虾心脏吸取血液(1:1),然后于 4℃下 400g 离心 10min,弃上清。用与血淋巴等体积的 PBS 缓冲液(0.01mol/L, pH 7.4)重悬,滴 20 $\mu$ l 于干净载玻片上,湿盒中自然沉降 1h,弃去液体后室温干燥,丙酮固定 10min,风干后于 -20℃ 冻存备用。

## 1.4 免疫细胞化学及大颗粒细胞比例统计

先将血细胞制片置 0.5mol/L EDTA 溶液中 30min,抑制内源性过氧化物酶(Zhan *et al.*, 2003)。再用 PBS 洗三次,每次 5min。用 5% 的正常羊血清封闭细胞制片 30min, PBS 洗三次,每次 5min。第一步用抗对虾大颗粒细胞的单克隆抗体与细胞制片反应, 37℃ 湿盒中孵育 45min,取出载玻片, PBS 洗三次,每次 5min;第二步用生物素标记的羊抗小鼠 IgG 抗体反应,同样 37℃ 湿盒中孵育 45min, PBS 洗三次,每次 5min;第三步再用 HRP 标记的亲合素反应, 37℃ 湿盒中孵育 45min, PBS 洗

三次;最后用 DAB 发色液(5mg DAB 溶于 10ml 0.01mol/L 的 PBS 缓冲液, pH 5.0, 含有 0.15ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)发色 15—20min,经苏木精溶液衬染 10min,自来水冲洗,中性树脂封片。取 10 片在 10 $\times$ 40 倍显微镜下每片观察 10 个视野,计数每个视野中血细胞的总数和大颗粒细胞的数量,统计大颗粒细胞在血细胞总数中所占比例。

## 1.5 斑点免疫吸附实验检测 WSSV 对凡纳滨对虾的感染

分别抽出 WSSV 感染组和对照组的对虾血淋巴液,分别在冰浴的匀浆器中匀浆,然后将匀浆液于 4℃下 400g 离心 10min,取上清。将上清液加入等体积 0.5mol/L EDTA 混匀,室温下处理 30min,抑制内源性过氧化物酶(Zhan *et al.*, 2003)。将处理好的样品上清液点在硝酸纤维素膜上,晾干后放入 2% 牛血清白蛋白溶液中,置 37℃ 温箱封闭 1h。PBST(0.01mol/L PBS 含 0.05% Tween-20)缓冲液洗三次,每次 5min;再放入 WSSV 混合单抗中,置 37℃ 温箱孵育 1h, PBST 洗三次,每次 5min;然后,把硝酸纤维素膜放入 HRP 标记的第二抗体中,置 37℃ 温箱孵育 1h, PBST 洗三次,每次 5min;最后置 DAB 底物溶液中发色,取出晾干后观察硝酸纤维素膜上显色情况。

## 2 结果

### 2.1 凡纳滨对虾血细胞的免疫细胞化学

健康虾的血细胞与抗大颗粒细胞的单抗反应并经过苏木精溶液衬染后:大颗粒细胞的细胞质呈棕褐色,细胞核呈蓝色,核质比相对较小,与其他两类血细胞有显著的差别(图 1a);与健康虾

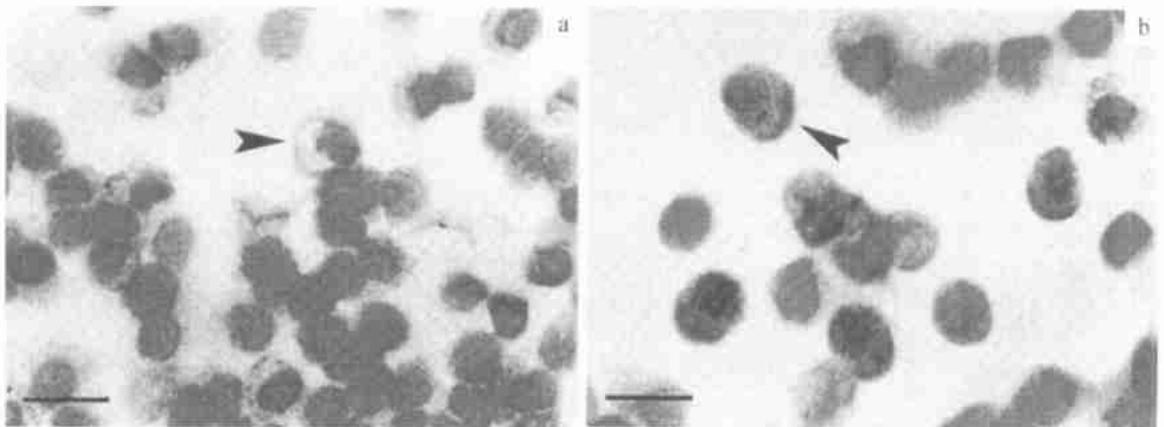


图 1 大颗粒细胞的单克隆抗体与血细胞的免疫细胞化学反应

Fig. 1 Immuno-staining of granular haemocytes in shrimp with Mab against granular haemocytes, counterstained with haematoxylin

a. 健康凡纳滨对虾的血细胞; b. WSSV 感染凡纳滨对虾的血细胞

箭头所指为大颗粒细胞,比例尺=10 $\mu$ m

的血细胞相比较, WSSV 感染组对虾大颗粒细胞的细胞质含量增多而且细胞质着色明显加深, 细胞核变得肥大 (图 1b)。

## 2.2 病毒感染对凡纳滨对虾大颗粒细胞数量变化的影响

通过显微镜观察统计每个视野的细胞数量: 在感染的第 1、2、3 天, WSSV 感染组凡纳滨对虾的血细胞总数呈逐渐上升的趋势, 从第 1 天每个视野的 150 个左右, 上升到第 2 天的 160 个, 第 3 天上升到 190 个左右; 大颗粒细胞每个视野的数量显著上升, 第 1 天为 22 个, 第 2 天为 27 个, 第 3 天

为 87 个 (图 2); 大颗粒细胞占血细胞总数的比例增加较大, 第 1 天为 15.20%, 第 2 天为 18.00%, 第 3 天增大到 45.90% (表 1)。在随后的几天, 血细胞总数显著下降; 大颗粒细胞的数量也呈下降的趋势 (图 2); 大颗粒细胞占血细胞总数的比例, 从第 3 天的 45.90% 下降到第 8 天的 43.30%, 但仍明显高于第 1 天的 15.20% (表 1)。对照组在实验期间, 血细胞总数始终在每个视野 158 个左右, 大颗粒细胞数在 24 个左右 (图 2), 大颗粒细胞占血细胞总数的比例维持在 15.20% 左右, 没有明显变化 (表 1)。

表 1 凡纳滨对虾血淋巴中大颗粒细胞在 WSSV 不同感染时期的比例 (%)

Tab 1 Proportion of granular haemocytes (%) in different stages of virus-infected *L. vannamei*

组别	感染时间(d)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
病毒感染组	15.20	18.00	45.90	44.70	44.11	43.98	43.70	43.30
对照组	15.20	15.19	15.20	15.19	15.22	15.19	15.19	15.20

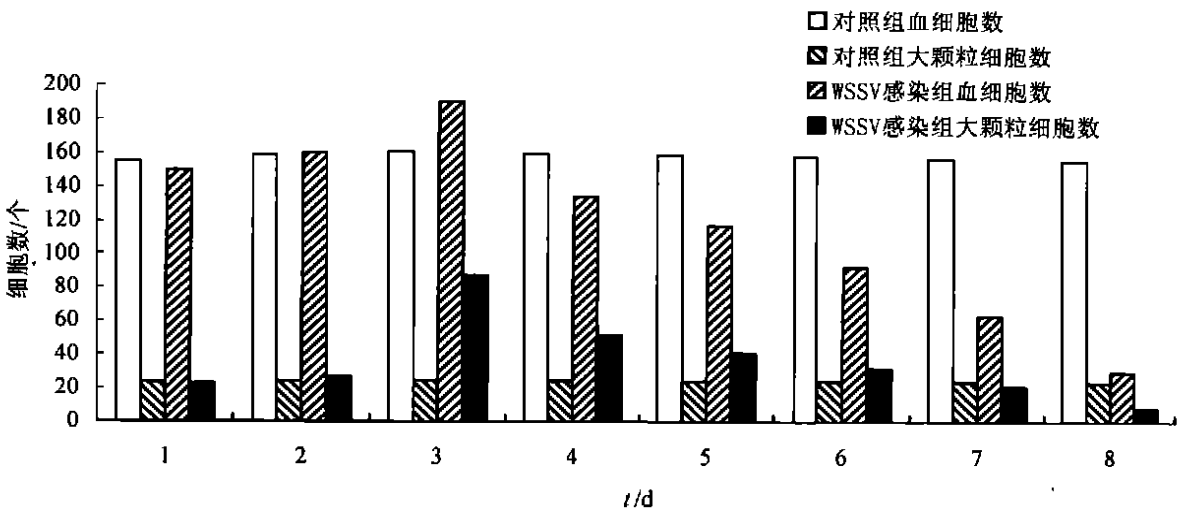


图 2 凡纳滨对虾被 WSSV 感染的不同时期每个显微镜视野下 (10×40) 观察到的血细胞数和大颗粒细胞数

Fig. 2 Number of total haemocytes and granular haemocytes in microscopic fields (10×40) at different stages of virus-infected *L. vannamei* in comparison with control group

## 2.3 WSSV 单克隆抗体检测病毒

从病毒感染组对虾抽取的血淋巴液经斑点免疫吸附实验检测后, 在硝酸纤维素膜上呈现明显的褐色, 说明对虾的血淋巴液与 WSSV 的单克隆抗体呈明显的阳性反应, 对虾已经感染了白斑症病毒。健康对虾的血淋巴液样品在膜上不显示颜

色反应。

## 3 讨论与结语

对虾的三类血细胞在免疫防御过程中各自担当不同的功能, 对抵抗病原微生物的侵袭起着重要的作用, 当受到外物刺激或离开虾体之后形态很容易发生改变, 因此依靠传统的光镜观察方法

很难准确统计三类血细胞的数量。本研究利用单克隆抗体能鉴别特异性细胞抗原决定簇的特点,用单抗选择观察大颗粒细胞,并统计其数量变化,这较传统形态学观察更准确,并且运用了生物素亲和素的信号放大作用,使结果更加敏感可靠。

对虾感染 WSSV 后,病毒不断破坏循环系统中的血细胞,同时造血组织产生血细胞补充到循环系统,在 WSSV 和造血组织的共同作用下,血细胞总数呈现先增加后减少的趋势,造成这一结果的原因可能是由于:在 WSSV 感染凡纳滨对虾的初期,WSSV 刺激造血组织加速产生血细胞,释放到循环系统,病毒破坏血细胞的速度没有造血组织产生血细胞的速度快,因此,本实验在前三天循环系统中血细胞的总数呈增加的趋势;在随后的几天,WSSV 在适宜的温度下不断增殖并且对虾的免疫力开始下降,病毒在血细胞内的大量增殖,严重破坏了血细胞,同时病毒感染了造血组织,使其产生的血细胞数量远没有被病毒破坏的血细胞数量多,导致循环系统中血细胞的总数大量减少。

凡纳滨对虾感染 WSSV 后,三类血细胞的比例发生了不同程度的变化,其中大颗粒细胞比例呈现先增大、后来稍有下降的趋势。原因可能是:大颗粒细胞内含有大量酚氧化酶原,对于病毒侵袭起着重要的作用,随着大颗粒细胞数量的增加,对虾的免疫防御能力也增强。在病毒感染的初期,对虾受到病毒的刺激,免疫防御能力增强,透明细胞和小颗粒细胞转化成免疫功能较强的大颗粒细胞,以致循环系统中大颗粒细胞数量占血细胞总数的比例在实验前三天显著增大。到病毒感染后期,随着病毒感染的加重,血细胞大量崩解,其中大颗粒细胞承担着重要的免疫防御任务,崩解的数量较多,循环系统中大颗粒细胞在血细胞中的比例稍有下降。

对虾的血细胞在免疫系统中起着重要作用,一直是研究的热点(Van de Braak *et al.*, 2002),而对虾三类血细胞的关系至今尚未有正式报道。作者利用单克隆抗体的高特异性和生物素亲和素的信号放大特点,准确观察了白斑症病毒感染凡纳滨对虾后大颗粒细胞的动态变化,并分析出了透明细胞和小颗粒细胞有可能向大颗粒细胞转化,从侧面说明了大颗粒细胞的免疫功能。虽然这一研究不能完全解释三类血细胞是如何转化的,但对进一步了解大颗粒细胞对病毒侵染对虾的敏感性和作用有着重要意义。

## 参 考 文 献

- 何建国,周化民,姚伯等,1999. 白斑综合症杆状病毒的感染途径和宿主种类. 中山大学学报, 8(2): 65—69 [He J G, Zhou H M, Yao B *et al.*, 1999. White spot syndrome baculovirus (WSBV) host range and transmission route. ACTA Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 8(2): 65—69]
- 战文斌,王 姝,张利峰等,2002. 中国对虾仔虾造血组织分布的研究. 水生生物学报, 26(5): 574—576 [Zhan W B, Wang S, Zhang L F *et al.*, 2002. Studies on distribution of hematopoietic tissue in the postlarva (*Penaeus chinensis*). ACTA Hydrobiologica Sinica, 26(5): 574—576]
- Rodriguez J, Boulo V, Mialhe E *et al.*, 1995. Characterisation of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. J Cell Sci, 108: 1043—1050
- Shih H H, Wang C S, Tan L F *et al.*, 2001. Characterization and application of monoclonal antibodies against white spot syndrome virus. J Fish Dis, 24: 143—150
- Sung H H, Wu P Y, Song Y L, 1999. Characterisation of monoclonal antibodies to haemocyte subpopulations of tiger shrimp (*Penaeus monodon*): immunochemical differentiation of three major haemocyte types. Fish Shellfish Immunol, 9: 167—179
- Van de Braak CBT, Taverne N, Botterblom M H A *et al.*, 2000. Characterisation of different morphological features of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) haemocytes using monoclonal antibodies. Fish Shellfish Immunol, 10: 515—530
- Van de Braak CBT, Taverne N, Botterblom M H A, *et al.*, 2002. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. Fish Shellfish Immunol, 13: 293—309
- Xue Q, Renault T, 2001. Monoclonal antibodies to European flat oyster *Ostrea edulis* hemocytes: characterization and tissue distribution of granulocytes in adult and developing animals. Developmental & Comparative Immunol, 25: 187—194
- Zhan W B, Chen J, Zhang Z D *et al.*, 2003. Elimination of shrimp endogenous peroxidase background in immunodot blot assays to detect white spot syndrome virus (WSSV). Dis Aquat Organ, 53: 263—265
- Zhan W B, Wang Y H, Fryer J L *et al.*, 1999. Production of monoclonal antibodies (Mabs) against white spot syndrome virus (WSSV). J Aquat Animal Health, 11: 17—22
- Zhang Z D, Zhan W B, Xue Y H *et al.*, 2004. Antigenic cross-reactivity of crustacean haemocytes using monoclonal antibodies produced against haemocytes of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Fish Shellfish Immunol, 16: 71—73

## VARIATIONS OF GRANULAR HAEMOCYTES WHEN SHRIMP *LITOPENAEUS VANNAMEI* INFECTED BY WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV)

ZHANG Zhi-Dong, ZHAN Wei-Bin, XUE Yan-Hong, XING Jing

(Laboratory of Pathology and Immunology of Aquatic Animals, Laboratory of Mariculture Ministry of Education of China, Ocean University of China, Qingdao, 266003)

**Abstract** White spot syndrome virus (WSSV) with its vast host range, has caused heavy economic losses in world shrimp culture since 1992, and it is currently the most principal disease agent in shrimp farming. The disease has been reported in cultured penaeid shrimp and other crustaceans, and can infect haematopoietic tissue, connective tissue, lymphoid organ and haemocytes etc. Shrimp haemocytes respond to pathogens through phagocytosis, nodule formation, and encapsulation. It is generally accepted that shrimp possess three haemocyte types by microscopical observation: hyaline haemocyte without granules but with a high nuclear to plasma ratio, semi-granular haemocyte with a few granules, granular haemocyte with a number of large granules and a low nuclear to plasma ratio. Three subpopulations consist of different functions in immune defensive process.

By immunocytochemical method combined with biotin-avidin, shrimp *Litopenaeus vannamei* periodically samples were investigated with a specific monoclonal antibody against granular haemocytes for variations of granular haemocytes in haemolymph, when the shrimp were subjected to WSSV infection. After haemocytes on slide were reacted with specific monoclonal antibody against granular haemocytes by immunocytochemical staining, the numbers of total haemocytes and granular haemocytes were counted in every visual field unit of microscope ( $10\times 40$ ). On the first three days of infection, the number of total haemocytes increased, from 150 cells per visual field on the first day, 160 cells on the second day, and to 190 cells per visual field on the third day; the number of granular haemocytes increased more quickly, 22 cells per visual field on the first day, 27 cells on the second day, and 87 cells per visual field on the third day. Granular haemocytes proportions of total haemocytes also increased, 15.20% on the first day, 18.00% on the second day, 45.90% on the third day. In the days followed, the number of both total haemocytes and granular haemocytes decreased sharply. Granular haemocytes proportion of total haemocytes decreased from the third day (by 45.90%) to the eighth day (by 43.30%), but these numbers were still higher than those of the control group where small changes from beginning to end by 15.20% dropping rate were shown.

In this study, the proportion of granular haemocytes in WSSV-infected shrimp elevated from the third day to the end of the test period. It is possible that granular haemocytes are more resistant to viral infection than hyaline and semi-granular haemocytes, so that the virus would take longer times to destroyed them. In Day 3th to 8th, the proportion of granular haemocytes decline quickly indicated that the WSSV had probably destroyed granular haemocytes by the infection time going.

It is often difficult to detect tiny amount of antigen with conventional immunohistochemical techniques. The modified immunohistochemistry method was combined with biotin-avidin by which the signals are amplified so that they are more sensitive in measurement for precise localization and specificity, although it is more complicated to practice. The new method wide application of the method in immunology research is predicted by the authors.

**Key words** Shrimp *Litopenaeus vannamei*, WSSV, Monoclonal antibody, Granular haemocytes